

알콜발효에서 효모의 에탄올 내성 조건—발효온도와 기질종류에 대한 연구

김형진·유연우

아주대학교 공과대학 생물공학과

The Conditions Affecting Ethanol Tolerance of Yeast strains in Alcohol Fermentation - Study on the Fermentation Temperature and Substrate Type

Hyoung Jin Kim and Yeon Woo Ryu

Department of Biotechnology, Ajou University, Suwon, Korea

ABSTRACT

The alcohol fermentation using glucose and lactose was carried out to study the effect of fermentation temperature on the ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* STV89 and *Kluyveromyces fragilis* CBS397. The maximum specific growth rate and ethanol production rate were increased up to 35°C with the fermentation temperature, although maximum ethanol and cell concentration were decreased by increasing the fermentation temperature. The cell viability was also improved by lowering the fermentation temperature. Under the experimental conditions, the best ethanol tolerance of yeast strains was obtained at 25°C. The ethanol tolerance of *S. cerevisiae* is better than that of *K. fragilis* at the same fermentation condition. With respect to the carbon source, glucose is found to be more favorable for ethanol tolerance of *K. fragilis* than lactose.

서 론

알콜발효에서 효모는 자신이 생성한 에탄올에 의하여 세포성장과 에탄올생성이 억제되어 cell viability에 영향을 미친다(1,2). 따라서 효모의 에탄올에 대한 내성 정도는 발효조건과 사용한 균주의 특성에 따라 달라진다. 즉 효모의 에탄올 내성에 대하여 영향을 미치는 발효조건들에는 기질의 종류와 농도, inoculum의 농도, 발효 온도, 통기조건 및 배지의 조성 등이다.

일반적인 알콜발효에서 발효온도는 30°C에서 수행하는데, 발효온도를 증가시키면 전처리 과정에서의 cooling 비용 절감, 균주의 높은 metabolic activity에 의한 알콜 발효 속도의 증가, 오염 위험성 감소 및 에탄올 연속 증류공정에서의 경제성 등에 대한 장점이 있다. 그러나 효모에 의한 알콜발효에서는 약 40°C까지 세포성장 속도와 에탄올 생성 속도는 온도증가에 따라 증가하지만(3,4), 최대 cell 농도 및 에탄올 농도는 20-25°C 사이에서 최대값을 갖는다(4). 또한 cell viability도 온도가 낮을수록 증가하는데(4,5), 이는 발효온도가 높을수록 에탄올 생성속도의 증가가 세포내 에탄올이 배지로의 확산속도

보다 더 커지기 때문에 세포내 에탄올 농도가 증가하여(6,7) glucose의 대사 및 불포화 지방산의 합성을 억제하기 때문이다(8,9). 즉 세포내 에탄올은 adenosine triphosphatase 및 불포화 지방산 합성에 관여하는 enzymes 등의 membrane enzymes의 작용을 억제한다고 보고되었다(10-13).

따라서 본 연구에서는 *Saccharomyces cerevisiae* STV89와 *Kluyveromyces fragilis* CBS397을 이용한 알콜발효에서 발효온도에 대한 두 균주의 에탄올 내성 정도와 *K. fragilis*을 이용한 glucose와 lactose의 알콜발효에서 기질의 종류에 따른 균주의 에탄올 내성 정도를 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

균주 및 발효배지

본 연구에서는 고농도 에탄올을 생성할 수 있는 균주로서 본 실험실에 보관중인 *Saccharomyces cerevisiae* STV89(4)와 lactose의 알콜발효 능력이 우수한 균주로서 Centraalbureau voor Schimmel Cultres(Netherland)에 구입한 *Kluyveromyces fragilis* CBS397 (14)를 사용하였

다.

발효배지는 200 g의 glucose, 5 g의 yeast extract, 5 g의 peptone, 5 g의 KH_2PO_4 , 2g의 $(NH_4)_2SO_4$ 와 0.4 g의 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 을 수돗물에 녹여 1 L가 되게 하였고 pH는 멸균전에 5.0으로 조정하였다.

알콜발효 방법

2.0 L jar fermentor(NBS, USA)에 배지 1.5 L를 넣고 멸균후 inoculum을 5%(V/V) 첨가한 후 0.1 VVM으로 통기시키고, 300 rpm으로 교반하면서 발효온도 25, 30, 35, 40°C에서 알콜발효를 수행하였다.

분석방법

균체량은 cell을 원심분리하여 세척한 후 spectrophotometer로 540 nm에서 optical density를 측정하여 표준값에 의하여 건조균체량(g/l)으로 환산시켜 측정하였다. 에탄올 농도는 n-butanol을 internal standard로 하여 gas chromatography(G-3800 Yanaco, Japan)를 이용하여 정량하였으며, 당의 정량은 DNS법(15)을 이용하였다. Cell viability는 McDonald의 염색방법(16)에 의하여 시료와 염색 시약을 1:1로 혼합한 후 현미경 하에서 총 500개 이상의 cell을 count한 후 총 cell 수에 대한 생존 cell 수를 백분율로 나타내었다.

결과 및 고찰

Glucose 발효에서의 발효온도의 영향

S. cerevisiae STV89와 *K. fragilis* CBS397에 의한 20%(W/V) glucose의 알콜발효에서 세포성장, 에탄올 생성 및 에탄올 내성에 미치는 발효온도의 영향을 검토하였다. 균체의 농도는 25°C에서 최대값을 나타내었고, 온도가 증가할수록 최대 균체의 농도는 감소하였는데, 특히 *S. cerevisiae*보다 *K. fragilis*의 최대 균체량의 감소가 30°C 이후부터 더 급격히 감소하였다(Fig. 1). 반면 최대 비성장 속도는 온도증가에 따라 35°C까지 증가하여 최대값을 나타내었으나, 그 이상의 온도에서는 감소하였는데, 이때 *K. fragilis*가 *S. cerevisiae*보다 40°C에서 더 크게 감소하였다(Fig. 1). 이러한 결과는 Ryu 등(4)의 *S. cerevisiae*에 의한 고농도 알콜발효의 결과와 동일하였다. 따라서 효모의 최대 비성장 속도는 균체농도가 최대값을 갖는 조건과 무관하였는데, 이는 균주의 에탄올 내성과 관련이 있는 것으로 추정되며, 또한 *S. cerevisiae*가 *K. fragilis*보다 온도에 대한 내성이 큰 것으로 나타났다.

에탄올 생성과 발효온도와와의 관계에서 에탄올 농도가 최대인 발효시간에 대하여 계산한 overall ethanol pro-

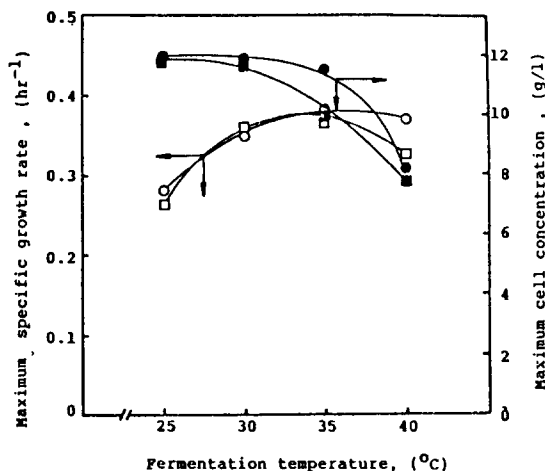


Fig. 1. Effect of fermentation temperature on the maximum specific growth rate (○, □) and maximum cell concentration (●, ■) of *S. cerevisiae* (○, ●) and *K. fragilis* (□, ■).

ductivity인 에탄올 생성 속도는 *S. cerevisiae*와 *K. fragilis* 모두 발효온도 증가에 따라 증가하여 25°C에서 당을 거의 소모하면서 최대값을 나타내었다(Fig. 2). 이는 온도증가에 따라 발효 초기에 cell의 대사활동이 증가하여 cell 내의 에탄올 축적이 증가하므로서 glucose의 대사와 세포 구성물질의 합성역제가 촉진되기 때문에(6

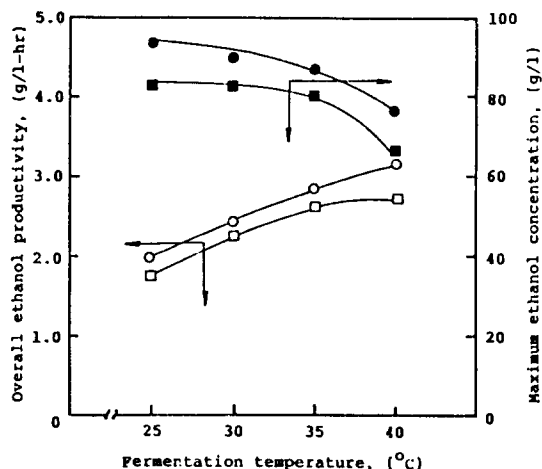


Fig. 2. Effect of fermentation temperature on the overall ethanol productivity (○, □) and maximum ethanol concentration (●, ■) of *S. cerevisiae* (○, ●) and *K. fragilis* (□, ■).

-9), 온도증가에 따라 에탄올 생성 속도는 증가하지만 최대 에탄올 농도는 감소하는 것으로 추정할 수 있다.

두 균주의 비교에서 균주가 최대로 생성할 수 있는 에탄올 농도는 25°C에서 48시간 발효시켰을 때 *S. cerevisiae*와 *K. fragilis*는 각각 94.7g/l와 82.8g/l이며 ethanol yield는 각각 0.476g EtOH/g glucose와 0.436g EtOH/g glucose로서 이론값의 약 95%와 85%였다. 이때 *K. fragilis*의 ethanol yield가 낮은 것은 당의 농도가 성장제한 조건이고 산소가 존재하면 *K. fragilis*는 에탄올을 탄소원으로 하여 성장을 계속하기 때문이다(17). 또한 *S. cerevisiae*와 *K. fragilis*의 overall ethanol productivity도 각각 1.97과 1.73 g EtOH/l-hr로 *S. cerevisiae*가 *K. fragilis*보다 에탄올 발효능력과 온도에 대한 내성이 더 좋았다.

온도에 대한 *S. cerevisiae*와 *K. fragilis*의 에탄올 내성에 대한 영향을 검토하기 위하여 배양배지의 에탄올 농도에 대한 cell viability를 각각 Figure 3과 Figure 4에 나타내었다. 두 균주의 viability를 비교해 볼 경우, 동일한 에탄올 농도에서의 cell viability는 두 균주 모두 온도가 증가할수록 크게 감소하였는데, 이는 온도의 증가에 따라 세포내에서의 에탄올 생성 속도가 세포내로부터 배지로 에탄올이 확산되는 속도보다 커서 결국 세포내에 에탄올이 축적되기 때문이다(6,7). 더우기 동일한 에탄올 농도에 도달하기 위한 발효시간은 온도가 낮을수록 길어지므로 발효온도가 낮을수록 효모의 에탄올에 대한 내성이 증가됨을 알 수 있었으며, 특히 *K.*

*fragilis*의 경우가 온도의 상승에 따라 cell viability가 크게 감소하는 것으로 보아서 *S. cerevisiae*에 비하여 온도에 대한 감수성이 더 크며, 또한 에탄올에 대한 내성이 *S. cerevisiae*가 *K. fragilis*보다 우수한 것을 알 수 있다.

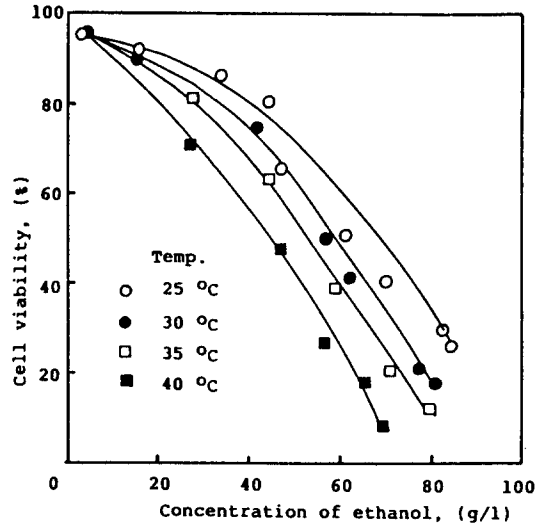


Fig. 4. The viability of *K. fragilis* CBS397 as function of ethanol concentration in broth at various fermentation temperatures.

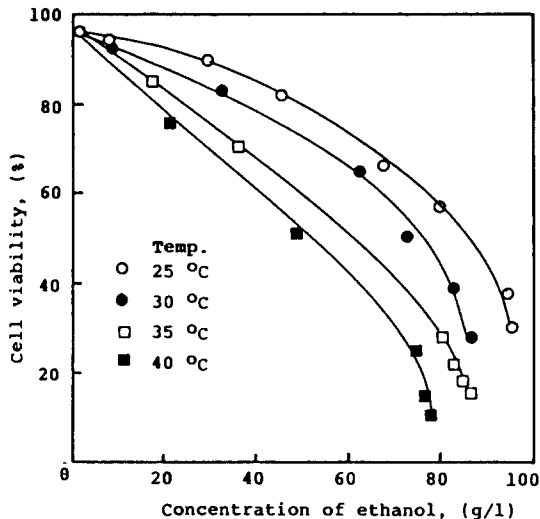


Fig. 3. The viability of *S. cerevisiae* STV89 as function of ethanol concentration in broth at various fermentation temperatures.

***K. fragilis*를 이용한 lactose 발효에서 온도의 영향**

K. fragilis CBS397을 이용한 20% (W/V) lactose의 알콜발효에서 cell growth, 에탄올 생성 및 에탄올 내성에 미치는 발효온도의 영향을 검토하여 glucose를 이용한 알콜발효의 결과와 비교하였다.

Cell growth에 대한 발효온도의 영향에서 lactose를 탄소원으로 이용한 경우도 glucose를 탄소원으로 이용할 때와 유사한 경향을 나타내었다(Fig. 5). 그러나 최대 균체농도가 25°C에서 lactose인 경우 8.6g/l로서 glucose일때의 11.8g/l보다 크게 감소하였다.

에탄올 생성 속도와 최대 에탄올 농도도 탄소원이 glucose와 lactose인 경우 온도에 대한 영향은 유사하였으나, 단지 40°C에서 에탄올 생성 속도 및 최대 에탄올 농도가 lactose인 경우 크게 감소하였다(Fig. 6).

동일 에탄올 농도에서의 cell viability도 탄소원이 glucose일때와 같이 25°C에서 가장 우수하였으며, 온도가 상승함에 따라 점차로 감소하였으나 주어진 온도에서의 cell viability는 glucose일 때보다 더 낮았다. 이는 40°C에서 42시간 발효시에 잔당이 52g/l가 존재하지만 cell은 거의 모두가 사멸된 것으로 보아 cell내의 에탄

음이 lactose 의 transport 나 β - galactosidase 에 의한 lactose 의 분해를 억제하거나, 40°C에서의 β - galactosidase 의 thermal deactivation 에 의한 것으로 추정할 수 있다.

결국 *K. fragilis* 에 의한 lactose 의 알콜발효에서도 glucose 을 이용한 경우와 같이 cell 의 최대 성장속도와

에탄올 생성 속도는 35°C에서 최대값을 나타내었으나 최대 cell 농도와 고농도의 에탄올을 얻을 수 있는 온도는 그보다 낮은 25°C였다. Cell viability 도 낮은 온도일수록 우수한 값을 나타내었으므로 발효온도가 낮을수록 에탄올에 대한 내성은 증가됨을 알 수 있었다. 또한 *K. fragilis* 는 lactose 일 때보다 glucose 를 탄소원으로 이용할 때가 발효능력과 에탄올에 대한 내성이 더 우수하였다.

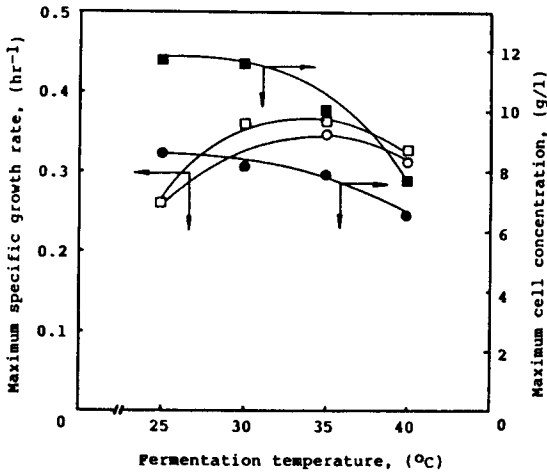


Fig. 5. Effect of fermentation temperature on the maximum specific growth rate (○, □) and maximum cell concentration (●, ■) of *K. fragilis* in glucose (□, ■) and lactose (○, ●) medium.

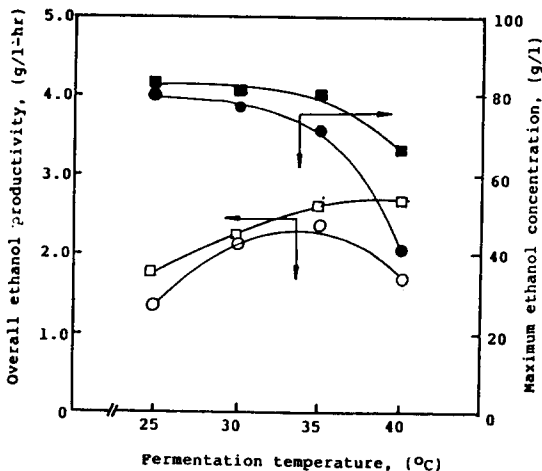


Fig. 6. Effect of fermentation temperature on the overall ethanol productivity (○, □) and maximum ethanol concentration (●, ■) of *K. fragilis* in glucose (□, ■) and lactose (○, ●) medium.

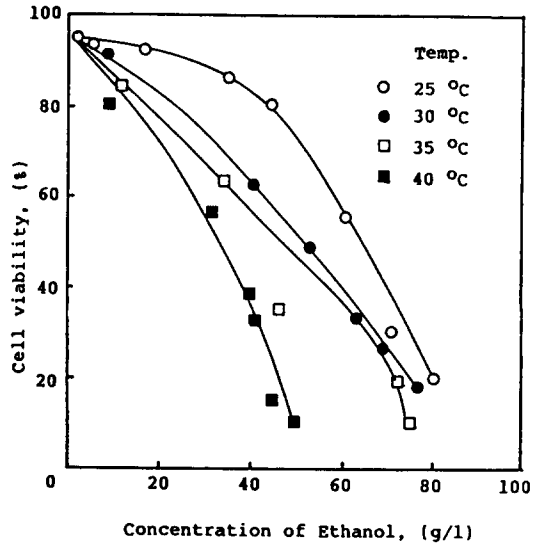


Fig. 7. The viability of *K. fragilis* CBS397 as function of ethanol concentration in broth of lactose fermentation at various fermentation temperatures.

요 약

Glucose 와 lactose 를 이용한 알콜발효에서 *Saccharomyces cerevisiae* STV89 와 *Kluyveromyces fragilis* CBS397 의 에탄올 내성에 대한 발효온도의 영향에 관한 연구를 수행하였다.

최대 비성장 속도와 에탄올 생성 속도는 발효온도에 따라 35°C까지 증가하였으나 최대 cell 농도와 에탄올 농도는 발효온도 증가에 따라 감소하였다. Cell viability 도 역시 발효온도가 낮을수록 향상되었다. 따라서 수행한 실험조건에서 효모의 에탄올 내성은 25°C에서 가장 우수하였다.

균주의 비교에서 에탄올에 대한 내성이 *S. cerevisiae* 가 *K. fragilis* 보다 동일한 실험조건에서는 더 우수하였으며, 탄소원의 종류에 대한 비교에서 *K. fragilis* 의 에탄올에

대한 내성은 glucose를 이용한 경우가 lactose를 이용할 때보다 더 우수하였다.

감 사

본 연구는 한국 과학재단의 목적기초 연구비로 수행하였으며, 이에 깊은 감사를 드립니다.

참고문헌

1. C.D. Bazua and C.R. Wilk(1977), *Biotechnol. Bioeng. Sym.*, **7**, 105
2. T.W. Nagodawithana and K.H. Steinkraus(1976), *Appl. Environ. Microbiol.*, **31**, 158
3. G.R. Cysewski(1976), *Thesis of ph.D*, University of Berkley
4. Y.W. Ryu and J.J. Kwon(1982), *Kor. J. Microbiol.*, **20**(2), 67
5. T.W. Nagodawithana, C. Castello and K.H. Steinkraus(1974), *Appl. Microbiol.*, **28**, 383
6. J.M. Navarro and G. Durand(1978), *Ann. Microbiol.*, **129B**, 215
7. F.J. Moss and P.A.D. Rickard(1971), *Biotechnol. Bioeng.*, **13**, 63
8. T.W. Nagodawithana, J.T. Whitt and A. J. Cutaita(1977), *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **35**, 179
9. F.H. White(1978), "Ethanol tolerance of brewing yeast" In Proc. 15th. Conversionb of the Institute of Brewing, Christchurch, 133
10. J. Caldwell and P.S. Sever(1974), *Clin. Pharmacol. Ther.*, **16**, 737
11. C.M. Grisham and R.E. Barnett(1972), *J. Biochim. Biophys. Acta.*, **266**, 613
12. C.M. Grisham and R.E. Barnett(1973), *J. Biochim. Biophys. Acta.*, **311**, 417
13. C.M. Grisham and R.E. Barnett(1973), *J. Biochim.*, **12**, 2635
14. J.H. Janssens, N. Burris, A. Woodward and R.B. Bailey(1983), *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 598
15. G.L. Miller(1959), *Anal. Chem.*, **31**, 426
16. V.R. McDonald(1963), *J. Food Sci.*, **28**, 135
17. J.P. Guiraud, J.M. Caillaud and P. Galzy(1982), *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **14**, 81

(Received July 7, 1989)