

알콜발효에서 효모의 에탄올 내성 조건—통기와 lipid첨가에 대한 연구

김형진·장형욱·유연우
아주대학교 공과대학 생물공학과

The Conditions Affecting Ethanol Tolerance of Yeast strains in Alcohol Fermentation - Study on the Aeration and Lipid Addition

Hyoung Jin Kim, Heang Wook Jang and Yeon Woo Ryu
Department of Biotechnology, Ajou University, Suwon, Korea

ABSTRACT

The alcohol fermentation was carried out to study the effect of aeration and unsaturated fatty acids added on the ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* STV89 and *Kluyveromyces fragilis* CBS397. The cell growth rate and ethanol production rate were stimulated by aeration and the cell mass production and ethanol production were also substantially improved. With respect to strains, the maximum specific growth rate and overall ethanol productivity of *K. fragilis* under aerated condition were 6.4 fold and 4.4 fold higher than those of strictly anaerobic condition, although those of *S. cerevisiae* were increased 1.7 times and 2.3 times by aeration. The addition of ergosterol, linoleic acid and oleic acid also improved the cell growth and ethanol production of *S. cerevisiae* and *K. fragilis*. Thus it was found that oxygen and unsaturated fatty acids added played a decisive role on the increase of ethanol tolerance of yeast strains.

서론

일반적인 알콜발효에서 균주의 에탄올에 대한 내성은 발효조건과 사용균주의 특성에 따라 크게 달라진다. 이 중에서 산소는 효모의 에탄올 내성에 미치는 영향이 매우 크다. 즉 산소는 효모의 성장을 위하여 두 가지 역할을 한다. 하나는 호흡대사 과정의 최종 전자수용체로 작용하고, 다른 하나는 혐기적 알콜발효에서 미량의 산소는 세포의 성장과 발효속도를 촉진시키는 factor로 작용한다. 따라서 호기성 조건에서 glucose의 농도가 성장제한 조건일때 glucose의 거의 대부분은 산소가 최종 전자수용체로 이용되는 호흡대사 과정을 통하여 cell growth에 필요한 에너지와 세포 구성물질의 합성에 이용되므로 glucose의 specific consumption rate가 감소하는 Pasteur effect가 나타난다(1). 따라서 호기성 조건에서는 일반적으로 cell mass yield가 0.40-0.47 g dry cell weight / g glucose로서 혐기성일때의 0.05-0.12 g dry cell weight / g glucose보다 훨씬 증가한다(2). 반면

glucose의 농도가 2.0 g / l 이상부터는 catabolite repression에 의하여 호흡대사에 관련된 효소들의 합성 및 활성 억제 시작되어 glucose의 농도가 약 50 g / l가 되면 호흡대사에 관여하는 효소들의 합성이 완전히 억제되어 호흡대사에서 알콜발효 대사로 전환된다(3,4). 따라서 산소가 존재할지라도 glucose의 농도가 높으면 거의 대부분의 glucose가 알콜발효에 의해서 이루어지는 Counter Pasteur effect가 일어난다(5).

혐기적 알콜발효에서 미량의 산소는 cell growth와 발효속도를 촉진시키는 factor로 작용하는데(2), 이는 산소가 cell membrane 및 mitochondria membrane 합성에 필요한 불포화 지방산 및 sterol과 이들의 전구체 합성에 필요한 것으로 알려져 있기 때문이다(6,7). 실제 혐기적 조건에서 ergosterol을 배지에 첨가한 경우 통기조건과 동일한 결과를 얻었으며(2), 또한 완전혐기조건에서 총 lipid 당 불포화 지방산의 함량은 18%인데 2.8 μM의 산소 존재하에서는 82%까지 증가하였다(6). 또한 Janssens 등의(8) *Kluyveromyces fragilis*의 결과에서도 혐기성일 때보다 호기성 조건인 경우 불포화 지방산의

함량이 크게 증가함을 보여주고 있다. 결국 미량의 산소는 효모에 불포화 지방산의 함량을 증가시키며, 이는 cell viability의 증가와 깊은 관련이 있다(9). 따라서 산소의 영향에 대한 cell viability는 호기성 조건일때가 혐기성 조건일 때보다 크게 증가한다는 것으로 보고되고 있다(9,10). 즉 Cysewski 등은(11) vacuum과 cell recycle의 연속 알콜발효 system에서 cell viability가 혐기성 조건에서는 계속적으로 감소하였으나 호기성 조건에서는 95% 이상이 유지됨을 보여주었다. 이 때 산소는 세포내의 불포화 지방산 및 이들의 전구체 합성에 요구되며(3), 호기성 조건일때가 혐기성 조건일때보다 불포화 지방산의 함량이 크게 증가하는 것으로도 알 수 있다(12).

그러나 과량의 산소는 효모의 성장에 해를 일으키기도 하는데, 이는 O_2 tension이 높으면 아미노산의 운반, 단백질의 합성, metabolism에 관여하는 효소의 작용등이 free radical에 의한 H_2O_2 의 형성등에 의하여 간접적으로 알콜발효에 방해작용이 존재하게 된다(9).

따라서 본 연구에서는 *Saccharomyces cerevisiae* STV89와 *Kluyveromyces fragilis* CBS397의 두 균주를 이용하여 glucose를 이용한 알콜발효에서 통기에 의한 균주의 에탄올 내성에 대하여 검토하고, 혐기조건하에서 lipid(ergosterol과 linoleic, oleic acids) 첨가에 의한 균주의 에탄올 내성에 미치는 영향을 검토하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지조성

본 실험에 사용한 균주는 본 실험실에서 보관중인 *Saccharomyces cerevisiae* STV89와 Centraalbureau voor Schimmel Cultures(Netherlands)로부터 구입한 *Kluyveromyces fragilis* CBS397이다. 이들 균주는 malt extract agar 사면 배지에 접종하여 30°C에서 24시간 배양한 후 4°C에서 보관하였고, 4주마다 새로운 배지에 옮겨주었다.

Inoculum용 배지는 glucose 50g, yeast extract 10g, peptone 10g에 수돗물을 첨가하여 1 liter가 되게하여 이용하였다. 알콜발효 배지는 glucose 200g, yeast extract 5g, peptone 5g, KH_2PO_4 5g, $(NH_4)_2SO_4$ 2g 및 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.4g에 수돗물을 첨가하여 1 liter가 되게 제조하였다.

분석방법

균주는 Thoma cell을 이용하여 측정하였고, 균체량은 배양액을 원심분리한 후 침전물을 증류수로 2회 세척한 다음 80°C 건조기에서 무게가 일정하게 될 때까지 건조시켜 측정하였다.

에탄올 농도는 2%(V/V)의 n-butanol를 internal standard로 하여 gas chromatography(FID, G-3800 Yanaco, Japan)를 이용하여 측정하였으며, 당의 정량은 DNS법(13)에 의하여 정량하였다.

Cell viability는 McDonald 방법(14)에 의하여 총 500개 이상의 cell에 대한 cell 수를 백분율로 나타내었다.

알콜발효 방법

20 liter fermentor(Bioengineering, Swiss)에 배지 16 liter를 넣고 121°C에서 멸균시켜 냉각한 후 접종량을 5%(V/V)로 하여 30°C에서 300 rpm으로 교반하면서 발효를 수행하였다. pH는 전 발효과정에서 5.0으로 조절하였다. 통기조건은 0.125 VVM으로 통기하였으며, 완전혐기 조건은 질소를 통과시켜 산소를 완전히 제거시키고 발효동안에도 질소를 0.01 VVM으로 통과시키면서 발효를 수행하였다. Lipid의 첨가에 대한 영향은 16 liter 배지에 oleic acid 및 linoleic acid를 각각 1.44g과 ergosterol를 96mg이 되도록 absolute ethanol에 녹여 첨가시킨 후 완전혐기 조건에서 발효를 수행하였다.

결과 및 고찰

알콜발효는 완전혐기적 상태의 대사과정으로 이루어질지라도 대부분의 효모는 산소를 growth factor로 요구하여 소량의 산소가 존재하면 알콜발효가 촉진된다는 보고가 있어(2,3), *S. cerevisiae* STV89와 *K. fragilis* CBS397을 이용한 20% glucose의 알콜발효에서 통기 및 lipid 첨가의 영향을 검토하였다.

균체 성장의 비교에서 통기 조건일때 *S. cerevisiae*(Fig. 1)와 *K. fragilis*(Fig. 2)의 최대 비성장 속도는 각각 0.384 hr^{-1} 과 0.347 hr^{-1} 이고, 최대 균체농도는 *S. cerevisiae*가 26시간 배양했을때 11.80 g/l 이고, *K. fragilis*를 38시간 배양했을때 9.97 g/l 였다(Table 1). 따라서 호기성 조건에서 *S. cerevisiae*의 성장이 *K. fragilis*보다 약간 우수하였다. 완전혐기 조건에서 *S. cerevisiae*와 *K. fragilis*의 최대 비성장 속도는 각각 0.226 hr^{-1} 과 0.054 hr^{-1} 이며 최대 균체농도는 6.79 g/l 와 1.23 g/l 였다(Table 1). 또한 완전혐기 조건에서 ergosterol과 oleic acid 및 linoleic acid를 첨가한 경우 *S. cerevisiae*와 *K. fragilis*의 최대 비성장 속도는 각각 0.300 hr^{-1} 과 0.309 hr^{-1} 이고 최대 균체농도는 8.26 g/l 와 4.65 g/l 였다(Table 1).

에탄올 생성에 대한 통기조건에서 *S. cerevisiae*(Fig. 3)와 *K. fragilis*(Fig. 4)의 overall ethanol productivity는 각각 3.53 과 3.35 g EtOH/l-hr 이고, 최대 에탄올 농도는 *S. cerevisiae*가 97.1 g/l 로 ethanol yield가 0.486 g/l 으로 이론값의 95%인 반면, *K. fragilis*는 87.0 g/l 로 ethanol yield가 0.435 g/l 으로 이론값의 85%였

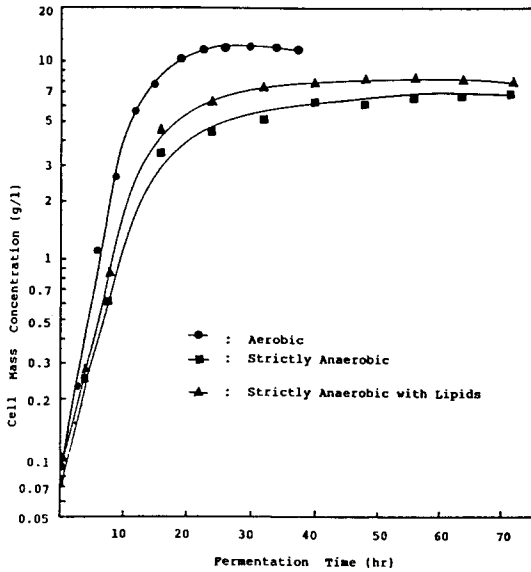


Fig. 1. Production of cell mass during the batch fermentation of *S. cerevisiae*

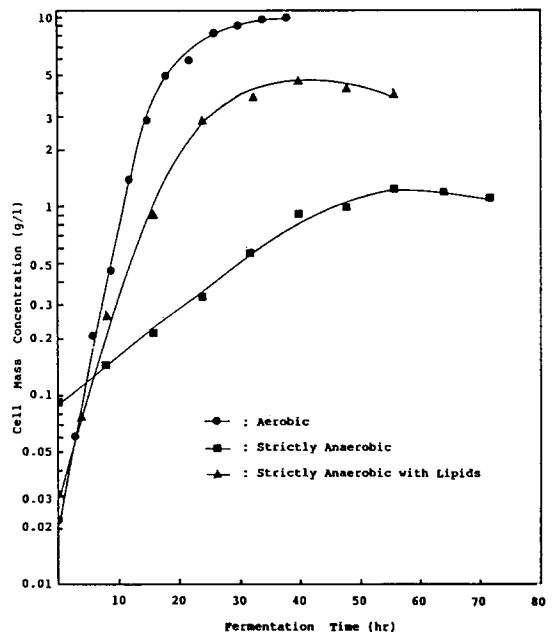


Fig. 2. Production of cell mass during the batch fermentation of *K. fragilis*

다 (Table 1). 따라서 에탄올 생성속도는 두 균주가 거의 비슷하였으나 최대 에탄올 농도와 ethanol yield는 *S. cerevisiae*가 우수하였는데 (Table 1), 이는 Guiraud 등(16)과 유등(17)의 보고와 같이 당의 농도가 성장 제한 조건이고 산소가 존재할 경우 *K. fragilis*는 생성한 에탄올을 탄소원으로 이용하여 성장을 계속하기 때문이다. 완전혐기 조건에서 *S. cerevisiae*와 *K. fragilis*의 overall ethanol productivity는 각각 1.55와 0.77 g EtOH/l-hr이고, 최대 에탄올 농도는 74.5 g/l와 55.2 g/l였다. 또한 완전혐기 조건에서 ergosterol과 linoleic 및 oleic acids를 첨가한 경우 *S. cerevisiae*와 *K. fragilis*의 overall ethanol productivity는 1.45와 1.09 g EtOH/l-hr였고, 최대 에탄올 농도는 81.2 g/l와 72.6 g/l였다

(Table 1).

따라서 두 균주 모두 통기에 의하여 균체의 증식 및 에탄올 생성이 촉진되었는데, 이는 효모에 있어서의 일반적인 통기의 영향과 동일하였으나(15), *K. fragilis*가 *S. cerevisiae*보다 산소에 대한 영향이 더 크게 나타났다. 즉 최대 비성장 속도와 최대 균체농도가 통기에 의하여 *S. cerevisiae*인 경우 모두 1.7배 증가한 반면 *K. fragilis*는 6.4배와 8.1배가 증가하였다. 또한 최대 에탄올 농도와 overall ethanol productivity도 통기에 의하여 *S. cerevisiae*는 각각 1.3배와 2.4배 증가하였으나 *K. fragilis*는

Table 1. The various kinetic parameters in each fermentation conditions

Fermentation conditions	<i>S. cerevisiae</i>				<i>K. fragilis</i>			
	μ_{max} (hr ⁻¹)	X_m (g/L)	P (g/L-hr)	P_m (g/L)	μ_{max} (hr ⁻¹)	X_m (g/L)	P (g/L-hr)	P_m (g/L)
Aerobic	0.384	11.80	3.53	97.1	0.347	9.97	3.35	87.0
Strictly Anaerobic	0.226	6.79	1.55	74.5	0.054	1.23	0.77	55.2
Strictly Anaerobic with Lipids	0.300	8.26	1.45	81.2	0.309	4.65	1.09	72.6

μ_{max} : Maximum specific growth rate,
P : Overall ethanol productivity

X_m : Maximum cell concentration
 P_m : Maximum ethanol concentration

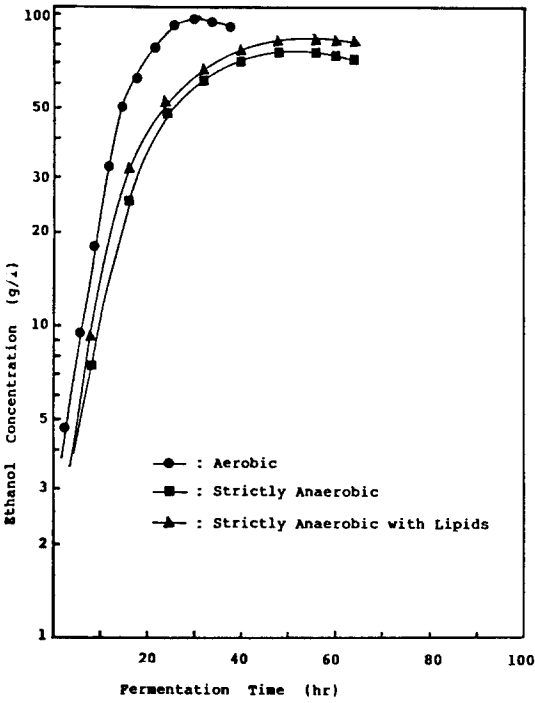


Fig. 3. Production of ethanol during the batch fermentation of *S. cerevisiae*.

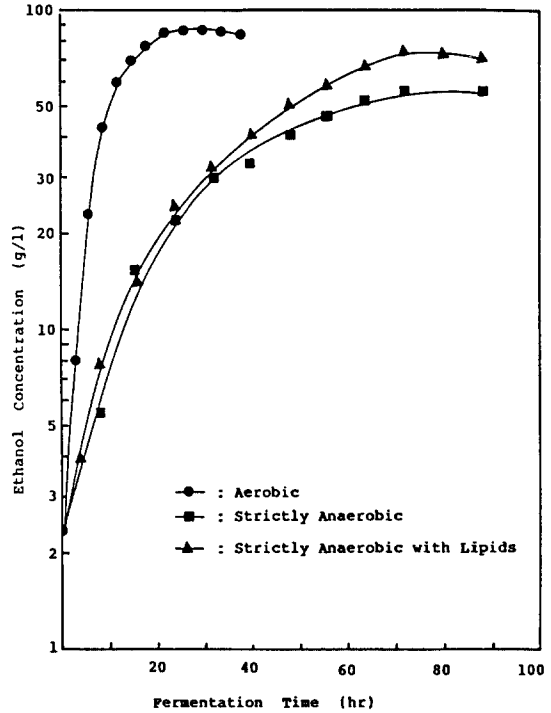


Fig. 4. Production of ethanol during the batch fermentation of *K. fragilis*.

4.4배와 1.6배 증가하였다. 따라서 *K. fragilis*가 cell growth 및 에탄올 생성을 위하여 *S. cerevisiae* 보다 산소가 더 필수적인 factor로 작용함을 알 수 있었으며, 이는 Ryu 등(18)의 결과와도 동일하였다. 또한 ergosterol 과 linoleic 및 oleic acids의 첨가에서도 두 균주 모두 완전 혐기 조건일 때보다 cell growth와 에탄올 생성이 촉진 되었으며, 특히 *K. fragilis*에서 그 영향이 크게 나타났다. 결국 산소는 sterol이나 불포화 지방산 합성에 중요한 factor로 작용하고 있음을 알 수 있으며, 이는 Roger 등(6)과 Jollow 등(12)의 결과와도 동일하였다.

동일 에탄올 농도에서의 cell viability를 비교해 보면 *S. cerevisiae*(Fig. 5)와 *K. fragilis*(Fig. 6) 모두 통기 조건에서가 완전혐기 조건에서보다 우수하였으며, 특히 *K. fragilis*의 cell viability가 통기에 의하여 크게 향상되었다. 또한 ergosterol 과 linoleic 및 oleic acids의 첨가에 의해서도 두 균주 모두 cell viability가 향상되었다.

따라서 미량의 산소는 효모에 불포화 지방산의 함량을 증가시켜 cell viability를 향상시킨다는 보고들과 일치하였다(2,3,6,7,8,9). 즉 세포막에 불포화 지방산의 함량이 증가하면 cell viability가 증가하는데(19), 이는 membrane의 불포화 지방산이 세포내 에탄올의 배지로 확산을 용이하게 해주고(20), 또한 cell membrane에

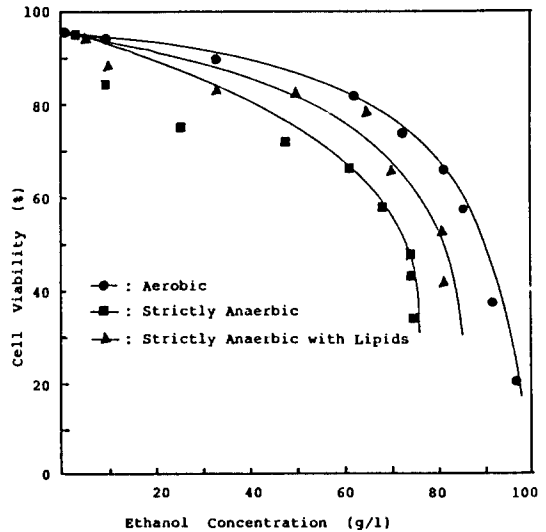


Fig. 5. The cell viability of *S. cerevisiae* as function of ethanol concentration in broth.

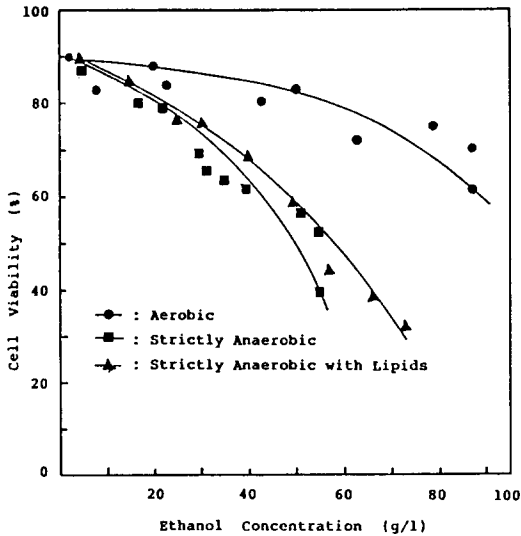


Fig. 6. The cell viability of *K. fragilis* as function of ethanol concentration in broth.

linoleic acid의 함량이 높을 경우 oleic acid의 함량이 높을 때보다 cell viability가 증가하는데 (19,20), 이는 배지내의 에탄올 존재하에서 amino acids 및 glucose의 uptake가 linoleic acid의 함량증가에 따라 증가하기 때문이다 (20). 결국 산소에 의한 효모의 에탄올 내성 증가는 cell membrane의 불포화 지방산의 함량증가에 의한 것으로 추정할 수 있다.

요 약

Saccharomyces cerevisiae STV89와 *Kluyveromyces fragilis* CBS397의 에탄올 내성에 대한 산소와 불포화 지방산의 첨가 영향을 연구하기 위한 알콜발효를 수행하였다. 실험결과 통기에 의하여 세포성장과 에탄올 생성 속도가 촉진되었으며, 세포와 에탄올 생성량도 크게 증가되었다. 특히 균주의 비교에서 cell의 최대 비성장 속도와 에탄올 생성 속도가 *S. cerevisiae*의 경우 1.7배와 2.3배 증가하였지만, *K. fragilis*인 경우 6.4배와 4.4배가 증가하여 *K. fragilis*가 에탄올 생성 및 cell growth를 위하여 *S. cerevisiae*보다 산소가 더 필수적인 요인으로 작용한다. 또한 *S. cerevisiae*와 *K. fragilis* 모두 ergosterol, linoleic acid 및 oleic acid의 첨가에 의하여 cell growth와 에탄올 생성이 향상되었다. 따라서 산소와 불포화 지방산은 효모의 에탄올 내성 증가에 중요한 요인으로 작용함을 알 수 있었다.

감 사

본 연구는 한국과학재단의 목적기초 연구비의 지원에 의하여 수행되었다.

참고문헌

1. E.S. Polakins, W.Bartley and G.A.Meed(1965), *Biochem. J.*, **97**, 298
2. G.R. Cysewski(1976), *Thesis of ph. D.*, University of Berkley
3. T.W. Cowland and D.R. Maule(1966), *J. Inst. Brew.*, **72**, 480
4. M.D. Akbar, P.D. Rikard and F.J. Moss(1974), *Biotechnol. Bioeng.*, **16**, 455
5. R.H. Deden(1966), *J. Gen. Microbiol.*, **44**, 149
6. P.J. Rogers and P.R. Stewart(1973), *J. Gen. Microbiol.*, **79**, 205
7. B.H. Kirsop(1974), *J. Inst. Brew.*, **80**, 252
8. J.H. Janssens, N. Burris, A. Woodward and R.D. Bailet(1983), *Appl. Environ. microbiol.*, **45**, 598
9. R.D. Tyagi(1984), *Process Biochem.*, **Aug.**, 136
10. T.W. Nagodawithana, C.Castello and K.H. Steinkraus(1974), *Appl. Microbio.*, **28**, 383
11. G.R. Cysweski and Cr. Wilke(1977), *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 1125
12. D. Jollow G.M. Dellerman and A.W.Linnane(1968), *J. Cell. Biol.*, **37**, 221
13. G.L. Miller(1959), *Anal. Chem.*, **31**, 426
14. V.R. McDonald(1963), *J. Food Sci.*, **28**, 135
15. E. Oura(1974), *Biotechnol. Bioeng.*, **16**, 1197
16. J.P. Guiraud, J.M. Caillaud and P. Galzy(1982), *European J. Apl. Microbiol. Biotechnol.*, **14**, 81
17. 유연우 · 김철호 · 김수일(1984), *한국산업생물학회지*, **12**, 51
18. Y.W. Ryu, C.Kim and S.I.Kim(1988), *Korean J. Chem. Eng.*, **5**(1), 1
19. D. Sthamsas, J.A. Hossack and A.H. Rose(1978), *J. Arch. Microbil.*, **117**, 239
20. D.S. Thomas and A.H.Rose(1979), *J. Arch. Microbiol.*, **122**, 49

(Received July 7, 1989)