

발효온도에 의한 효모의 에탄올 내성 요인 연구

장 형 옥 · *유 언 우
아주대학교 공과대학 생물공학과

Study on the Factors Affecting the Ethanol Tolerance of Yeast Strains by Fermentation Temperature

Heang Wook Jang and Yeon Woo Ryu

Department of Biotechnology, College of Engineering, Ajou University,
Suwon 441-749, Korea

ABSTRACT

This study is to investigate the ethanol tolerance of yeast strains related to fatty acid composition and intracellular ethanol concentration for various fermentation temperatures. The maximum accumulation of ethanol in the cells was decreased by lowering the fermentation temperature, while unsaturated fatty acid content was increased by decreasing the fermentation temperature. Thus, we found that the increase of ethanol accumulation in cells resulted in the decrease of unsaturated fatty acid content.

Therefore, it was suggested that the composition of unsaturated fatty acids in the cell membrane was strongly related to the diffusion of ethanol from cell to medium.

서 론

일반적인 알콜발효 공정에서 발효온도를 증가시키면 여러가지 장점들이 있다. 즉 원료의 전처리 과정에서 cooling 비용의 절감, 균주의 높은 metabolic activity에 의한 발효속도의 증가, 오염위험성 감소 및 에탄올 연속증류 공정에서의 경제성등이다.

그러나 효모에 의한 알콜발효에서 온도증가에 따라 약 40°C-45°C까지는 세포성장과 에탄올 생성속도는 증가하지만(1-3), 세포 및 에탄올 농도는 20°C-25°C 사이에서 최대값을 나타낸다(2-5). 또한 효모의 생존율도 온도가 낮을 수록 증가한다(2-4). 이와같이 발효온도가 낮을 수록 효모의 에탄올에 대한 내성이 증가하는 것은 발효온도가 세포내 에탄올 농도에 커다란 영향을 미치기 때문이다(6, 7). 즉 발효온도가 높을 수록 에탄올 생성속도가 세포내 에탄올이 배지로의 확산속도보다 더 커지기 때문에 세포내 에탄올의 축적이 증가하여(6-8) glucose의 대사과정 및 세포내 구성물질의 합성을 억제한다(9-13). 특히 효모의 에탄올에 대한 내성을 향상시켜 주는 불포화지방산 및 sterols의 합성을 억제시킨다

(11, 12). 따라서 효모의 에탄올에 대한 내성은 근본적으로 에탄올의 확산능력과 관련이 있는 것으로 알려져있다(1, 14). 즉 surface active agents, lipids, sterols 및 peptones 등을 배지에 첨가해 주면 세포내 에탄올 농도가 크게 감소되며, hexokinase의 활성도 증가한다는 보고가 있다(10, 14-16). 더구나 불포화지방산은 세포내 에탄올의 확산 및 영양분들의 흡수를 용이하게 해주어 세포에 대한 에탄올의 독성을 완화시켜 주는 것으로 추정하고 있다(15, 16).

발효온도에 따른 효모의 지방산 함량변화는 일반적으로 발효온도가 낮을 수록 불포화지방산 및 sterols의 함량이 증가한다(13, 17, 18). 특히 불포화지방산들 중에서 효모의 에탄올에 대한 독성을 완화시켜주는 linoleic acid의 함량이 크게 증가한다는 보고가 있다(15, 16, 19).

따라서 본 연구에서는 *Saccharomyces cerevisiae* STV89와 *Kluyveromyces fragilis* CBS397을 이용한 glucose의 회분식 알콜발효에서 발효온도에 따른 지방산 구성 및 세포내 에탄올 농도를 측정하여 세포내 에탄올의 축적정도와 지방산 함량 변화와의 관계

를 검토하여 효모의 에탄올 내성에 영향을 주는 요인을 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지조성

본 연구에서는 고농도 에탄올을 생성할 수 있는 *Saccharomyces cerevisiae* STV89(2)와 Centraalbureau voor Schimmel Culture(Netherland)에서 구입한 *Kluyveromyces fragilis* CBS 397을 사용하였다.

접종용 배지는 5% glucose, 1% yeast extract 및 1% peptone이 포함된 배지를 사용하였으며, 발효배지는 20% glucose, 0.5% yeast extract, 0.5% peptone, 0.5% KH_2PO_4 , 0.2% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 및 0.04% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 가 포함된 배지를 이용하였다. 배지의 pH는 5.0으로 조정하였다.

알콜발효

20 liter jar fermentor(Bioengineering, Swiss)에 16 liter의 발효배지를 넣고 멸균 후 inoculum을 5% (v/v) 첨가하였다. 알콜발효는 0.1VVM으로 통기시키고, 300rpm으로 교반하면서 발효온도를 20°C, 30°C, 40°C로 하여 수행하였다.

분석방법

균체량은 cell을 0.45 μm 의 milipore filter로 여과하여 2회 세척한 다음 50°C의 vaccum dry oven에서 24시간 건조시켜 측정하였다. 에탄올 농도는 n-butanol을 internal standard로 하여 gas chromatography(Hitachi, Japan)를 이용하였다. 세포내 에탄올 농도의 측정 및 지방산 분석은 전보에 사용한 방법(21)을 이용하였다.

결과 및 고찰

세포내 에탄올 농도의 변화

*S. cerevisiae*와 *K. fragilis*에 의한 20%(w/v) glucose의 알콜발효에서 온도에 따른 세포내 에탄올 농도를 측정한 결과 Fig.1과 Fig.2에 각각 나타내었다. 실험결과에서 두 균주 모두 발효시간에 따른 세포내 에탄올 농도의 변화양상은 유사하였으나 각각의 발효온도에서 세포내 최대 에탄올 농도는 *K. fragilis*가 *S. cerevisiae*보다 높았다. 즉 발효온도가 30°C와 40°C에서는 발효초기 6시간까지 에탄올 생

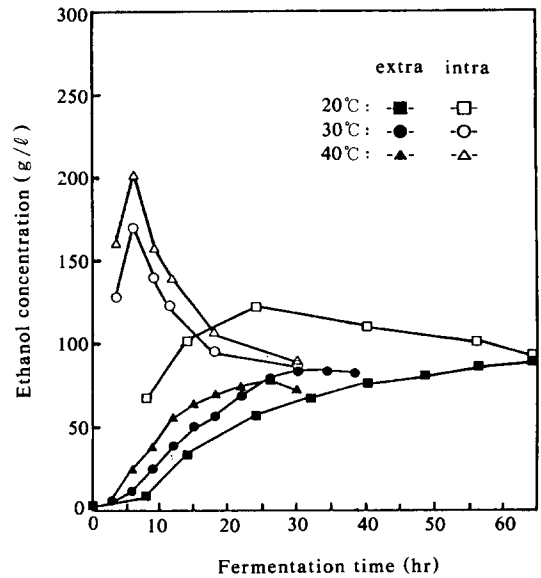


Fig. 1. The extracellular and intracellular ethanol concentrations of *S. cerevisiae* STV 89 during the fermentation time for various fermentation temperatures.

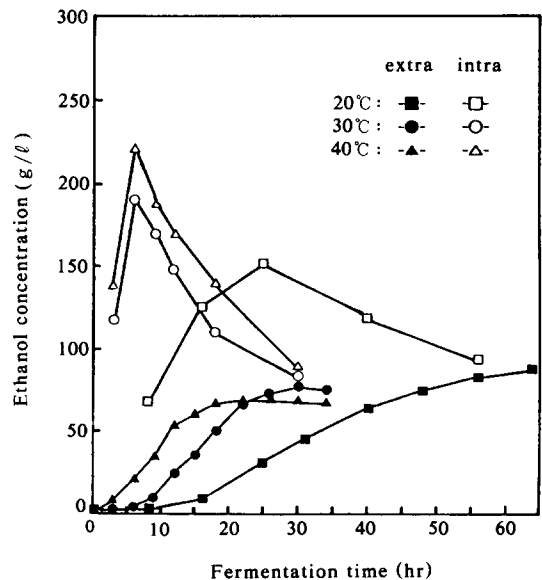


Fig. 2. The extracellular and intracellular ethanol concentrations of *K. fragilis* CBS 397 during the fermentation time for various fermentation temperatures.

성속도가 배지로의 에탄올 확산속도보다 더 커서 세포내에 에탄올의 축적이 급격히 이루어지다가 에탄올의 생성속도가 에탄올의 확산속도 보다 낮아지는 시간 이후에는 발효시간이 지나면서 세포내 에탄올 농도가 급격히 감소하였다. 반면 온도가 낮은 20°C에서는 알콜발효 속도가 느리게 진행되면서 약 24시간 발효시까지 세포내 에탄올이 축적되기 시작하여 배지의 에탄올 농도보다 *S. cerevisiae* 약 2배, *K. fragilis* 약 5배 정도 높게 축적된 후 서서히 감소하기 시작하였다. 이는 세포내 에탄올이 simple diffusion에 의하여 배지로 분비되기 때문에(6) 20°C에서는 세포내 에탄올이 배지로 확산되는 속도가 30°C와 40°C 보다 낮기때문에 최대 세포내 에탄올 농도는 40°C일때가 가장 높았으며, 이러한 결과는 Navarro 등(7)의 보고와 동일하였다. 따라서 발효 온도의 증가는 세포내 에탄올 축적을 증가시켜 효모의 에탄올에 대한 내성이 발효온도 증가에 따라 감소하게 된다(2-4).

지방산 함량분석

각각의 발효온도에서 *S. cerevisiae*와 *K. fragilis*의 지방산 함량을 분석한 결과 Table 1과 Table 2에 나타내었다. 실험결과에서 두 균주 모두 발효온도가 낮아질수록 불포화지방산 함량의 비율이 증가하였다. 즉 *S. cerevisiae*의 경우 불포화지방산의 함량이

20°C, 30°C, 40°C에서 각각 약 75%, 70%, 58%였으며, 특히 발효온도 감소에 따라 Palmitoleic acid(C_{16:1})의 함량은 감소하였으나 Oleic acid(C_{18:1}) 및 linoleic acid(C_{18:2})의 함량은 증가하였다. 또한 *K. fragilis*의 경우도 *S. cerevisiae*와 같이 불포화지방산의 함량이 발효온도 증가에 따라 감소하였다. 특히 발효온도 증가에 따라 linoleic acid의 함량이 크게 감소한 반면 stearic acid(C_{18:0})의 함량은 크게 증가하였다. 이러한 결과는 호기성 조건하에서 불포화지방산 및 sterols의 함량이 혐기성 조건하에서 보다 크게 증가한다는 결과(22)와 유사하였으며, 또한 낮은 발효온도에서 sterols의 함량이 증가한다는 결과(18)와 비교할때 불포화지방산 및 sterols 함량의 증가가 효모의 에탄올에 대한 내성 증가와 관련이 있음을 알 수 있다.

따라서 대부분의 알콜발효에서 발효온도를 증가시키면 효모의 성장속도 및 에탄올 생성속도는 증가하지만, 에탄올에 대한 내성은 감소되어 최대 에탄올 농도 및 세포농도는 감소한다(1-5). 이는 발효온도가 높을 수록 에탄올 생성속도가 세포내 에탄올이 배지로의 확산속도 보다 더 커서 세포내의 에탄올 축적속도가 증가하여 glucose의 대사과정과 세포구성 물질의 합성억제도 증가하기 때문이다(6-13). 특히 세포내 에탄올의 축적 증가는 불포화지방산 합성을 억제한다(9, 13). 결국 낮은 발효온도에서 효

Table 1. The fatty acid composition of *S. cerevisiae* STV 89 at for various fermentation temperatures.

Culture temperature	Culture time(hr)	Fatty acid composition(%)									Sum(%)	
		C _{12:0}	C _{14:0}	C _{14:1}	C _{16:0}	C _{16:1}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{20:0}	Saturated	Unsaturated
20°C	9	0.4	0.5	5.9	15.4	11.0	6.9	37.3	21.2	1.4	26.4	75.4
	25	0.6	0.3	6.3	14.7	12.1	7.3	35.1	22.7	0.9	23.8	76.2
	56	0.5	0.2	6.7	15.2	11.5	7.1	32.7	25.2	0.9	23.9	73.1
	average	0.5	0.3	6.3	15.1	11.5	7.1	35.0	23.1	1.1	24.1	74.9
30°C	6	0.5	0.8	3.2	19.5	15.0	4.2	31.3	22.5	3.0	28.0	72.0
	15	0.5	0.9	6.2	19.8	16.0	4.2	30.0	17.6	4.8	30.2	69.3
	30	0.4	1.2	6.1	18.8	15.6	5.7	29.6	18.0	4.6	30.7	69.3
	average	0.5	1.0	5.2	19.4	15.5	4.6	30.3	19.4	4.1	29.6	70.4
40°C	6	4.2	7.2	4.3	19.5	20.1	6.5	21.2	11.9	5.1	42.5	57.5
	15	3.5	5.9	5.1	17.6	19.6	9.4	20.6	13.4	4.9	41.3	58.7
	30	3.9	6.2	3.7	17.5	18.7	7.9	23.6	12.2	6.3	41.8	58.2
	average	3.9	6.5	4.4	18.2	19.4	7.9	21.8	12.5	5.4	41.9	58.1

Table 2. The fatty acid composition of *K. fragilis* CBS 397 for various fermentation temperatures.

Culture temperature	Culture time(hr)	Fatty acid composition(%)									Sum(%)	
		C _{12:0}	C _{14:0}	C _{14:1}	C _{16:0}	C _{16:1}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}	Saturated	Unsaturated
20°C	16	0.4	1.7	0.1	21.0	10.9	2.2	30.0	24.5	9.2	25.3	74.7
	25	4.0	2.0	1.0	18.0	10.4	2.7	21.5	32.8	7.6	26.7	73.3
	56	—	0.3	0.1	17.4	7.9	3.5	28.4	35.6	6.8	21.2	78.8
	average	1.5	1.3	0.4	18.8	9.7	2.8	26.6	31.0	7.9	24.4	75.6
30°C	6	3.1	3.2	—	12.7	8.2	15.2	22.8	28.9	5.9	34.2	65.8
	18	3.1	2.0	—	12.3	14.9	14.1	23.8	26.5	3.3	31.5	68.5
	30	3.5	0.4	—	10.5	12.8	15.4	30.4	26.4	0.6	29.8	70.2
	average	3.2	1.9	—	11.8	12.0	14.9	25.6	27.3	3.3	31.8	68.2
40°C	6	—	0.8	0.5	17.5	13.7	35.2	20.9	11.4	—	53.5	46.5
	18	0.4	0.2	0.8	19.4	17.6	32.7	18.7	10.2	—	52.7	47.3
	30	1.1	4.5	0.4	13.6	13.3	31.3	21.9	13.9	—	50.5	49.5
	average	0.5	1.8	0.6	16.8	14.9	33.1	20.5	11.8	—	52.2	47.8

모의 에탄올에 대한 내성증가는 발효온도가 낮을 수록 세포내 에탄올 농도가 낮아져서 세포막에 불포화 지방산 함량이 증가되기 때문이다(17). 더욱이 세포막에 존재하는 불포화지방산중 linoleic acid는 세포로 부터의 에탄올 확산을 촉진시켜 에탄올이 세포에 미치는 독성을 감소시켜주기 때문이다(15, 16).

요 약

Saccharomyces cerevisiae STV89와 *Kluyveromyces fragilis* CBS 397을 이용한 알콜발효에서 발효온도에 따른 세포내 에탄올 농도와 지방산 함량비율을 분석하여 효모의 에탄올 내성에 영향을 미치는 요인을 밝히고자 하였다.

실험결과 사용한 두 균주 모두 발효온도가 낮을 수록 최대 세포내 에탄올 농도는 감소한 반면, 불포화지방산 중에서 oleic acid와 linoleic acid의 함량은 증가하였다. 따라서 세포내 에탄올 축적이 감소하면 세포막의 불포화지방산 함량이 증가하여 세포로 부터의 에탄올 확산이 촉진되기 때문에 효모의 에탄올에 대한 내성이 증가되는 것으로 추정된다.

감 사

본 연구는 한국과학재단의 목적기초연구비(1989

~1990) 지원에 의하여 수행되었다.

참 고 문 헌

1. D. William and D. M. Munnecke(1981), *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 1813.
2. Y. W. Ryu and J. J. Kwon(1982), *Korean J. Microbiol.*, **20**, 67.
3. H. J. Kim and Y. W. Ryu(1989), *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **4**, 167.
4. T. W. Nagodawithana, C. Castellano and K. H. Steinkraus(1974), *Appl. Microbiol.*, **28**, 383.
5. I. Sá-Correia and N. van Uden(1983), *Biotechnol. Bioeng.*, **25**, 1665.
6. T. W. Nagodawithana and K. H. Steinkraus (1976), *Appl. Environ. Microbiol.*, **31**, 158.
7. J. M. Navarro and G. Durand(1978). *Ann. Microbiol.(Inst. Pasteur)*, **129B**, 215.
8. I. Laudrin and G. Goma(1982), *Biotechnol. Lett.*, **4**, 537.
9. T. W. Nagodawithana, J. T. Whitt and A. J. Cutaia(1977), *J. Amer. Soc. Brew. Chem.*, **35**, 179.
10. J. M. Navarro and J. D. Finck(1982), *Cell.*

- Mol. Biol.*, **28**, 85.
11. F. Meyer and K. Block(1963), *Biochim. Biophys. Acta.*, **77**, 671.
 12. C. M. Grisham and R. E. Barnett(1973). *J. Biochim. Biophys. Acta.*, **311**, 417.
 13. F. H. White(1978), In *Proc. 15th. Conv. Inst. Brew.*, Christchurch(Australia), p.133.
 14. J. M. Navarro(1980),*Cell. Mol. Biol.*, **26**, 241.
 15. D. S. Thomas and A. H. Rose(1979), *Arch. Microbiol.*, **122**, 49.
 16. A. H. Rose and M. J. Beavan(1981), *Basic Life Sci.*, **18**, 513.
 17. E. Pfister, I. Hancock and I. Garrison(1977), *J. Amer. Soc. Brew. Chem.*, **35**, 49.
 18. N. Rozes, F. Larue and P. Ribereau-Gayon (1988), *Biotechnol. Lett.*, **10**, 821.
 19. M. Kates and R. M. Baxter(1962), *Can. J. Biochem. Physiol.*, **40**, 1213.
 20. G. L. Miller(1959), *Anal. Chem.*, **31**, 426.
 21. Y. W. Ryu and H. W. Jang(1991), *J. Microbiol. Biotechnol.*, **1**, 6.
 22. J. H. Janssens, N. Burris, A. Woodward and R. B. Bailey(1983), *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 598.