

## *Schwanniomyces castellii* 에 의한 전분의 직접 알콜발효

성 정 헌 · 고 성 환 · 유 연 우  
아주대학교 공과대학 생물공학과

### Direct Alcohol Fermentation of Starch by *Schwanniomyces castellii*

Jeong Heon Seong, Sung Hwan Ko and Yeon Woo Ryu

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

#### ABSTRACT

Alcohol fermentations were carried out to confirm the capacity of ethanol production from glucose, starch and soluble starch (dextrin) by *Schwanniomyces castellii* NRRL Y-2477.

*Schw. castellii* NRRL Y-2477 was able to produce the 63.9 g/l ethanol using 94% substrate from 150 g/l glucose medium. The direct alcohol fermentation of starch having the maximum solubility of 20g/l at 30°C yielded 9.1g/l ethanol upon complete depletion of starch, whereas 34.5g/l ethanol was produced by utilizing 82% of 100g/l soluble starch medium. The fermentation of 150g/l soluble starch produced 52.1g/l ethanol using about 79% of substrate.

Thus, it was found that the limiting step of direct alcohol fermentation of starch by *Schwanniomyces castellii* NRRL Y-2477 was a hydrolysis of starch.

#### 서 론

현재 알콜발효에 의한 주정의 생산공정은 원료인 기질의 준비, 알콜발효, 증류의 3단계로 나눌 수 있다. 따라서 전분을 이용한 알콜발효에서 전분의 액화-당화공정 없이 전분을 직접 발효시킬 수 있는 공정개발은 ethanol 생성을 위한 원가를 크게 절감시킬 수 있을 것이다.

효모들(yeasts) 중에서 전분을 직접 알콜발효시킬 수 있는 균주로서는 *Saccharomyces diastaticus*, *Schwanniomyces* spp. 및 *Endomycopsis* (*Saccharomycopsis*) spp. 등이 있다(1). 이들 중에서 *Schwanniomyces* spp. 는  $\alpha$ -amylase, glucoamylase 및 deb-branching enzyme 인 pullulanase 을 생성하므로 전분의 직접 알콜발효에 매우 적합한 균주라 하겠다(2).

따라서 *Schwanniomyces* spp. 를 이용한 전분의 직

접 알콜발효에서는 3종류의 amylolytic enzymes 이 모두 존재하므로 pullulan 과 isomaltose 를 분해시켜 glucose 를 생성할 수 있으며, cell mass yield 는 glucose 일때 보다도 전분일 때가 더 높았고 성장속도는 glucose 와 전분에서 거의 동일하였으므로 전분의 직접 알콜발효에 매우 유용한 균주가 될 수 있다(3, 4). 그러나 *Schwanniomyces* spp. 을 이용한 전분의 직접 알콜발효에서의 문제점은 이 균주들의 알콜에 대한 내성 및 알콜발효 능력이 *Sacch. cerevisiae* 보다 좋지 못하며 이들이 분비하는  $\alpha$ -amylase 의 생성이 glucose 에 의하여 catabolite repression 을 받는다. 즉 starch나 maltose 존재하에서 induction 되는 inducible enzymes (4-8)인 반면 glucose 농도가 0.1g/l 이상이면  $\alpha$ -amylase 와 glucoamylase 는 catabolite repression 에 의하여 생성이 억제되며, 이때  $\alpha$ -amylase 의 생성이 glucoamy-

lase 보다 더 크게 억제된다(4, 5, 7). 또한 *Schwanniomyces* spp. 의 amylolytic enzymes 은 산소결핍 상태에서는 enzymes 의 합성이 억제되고 통기에 의하여 생성이 증가된다(7, 9).

주정공업에서 실제 요구되는 ethanol 의 농도는 최소한 80g/l 이상이 되어야 증류에 의한 회수공정에서 효율성이 있다. 그런데 *Schwanniomyces* spp. 에 의한 전분의 직접 알콜발효에서는 전분의 분해제한조건과 균주의 알콜에 대한 내성이 좋지 못하여 현재까지는 80g/l의 ethanol 농도를 얻었다는 보고는 없는데, 이는 *Schwanniomyces* spp. 가 47g/l ethanol 농도에서 ethanol 생성 및 세포성장이 억제를 받으며 (4), 생성된 ethanol 에 의하여 non-competitive type 으로 amylolytic enzymes 의 활성이 억제될 뿐만 아니라  $\alpha$ -amylase 와 glucoamylase 는 각각 16g/l 와 40g/l 의 ethanol 농도에서 enzymes 합성이 크게 감소된다는 보고가 있다(10).

따라서 본 연구에서는 *Schwanniomyces* spp. 중에서 amylolytic enzymes 의 생성과 전분의 직접 알콜발효 및 ethanol 에 대한 내성능력이 우수한 *Schw. castellii* NRRL Y-2477 를 이용하여 이 균주에 대한 전분의 직접 알콜발효 능력 및 발효조건에 대한 연구를 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 배지조성

본 연구에서는 amylolytic enzymes 의 생성능력 및 알콜발효 능력이 우수한 *Schwanniomyces castellii* NRRL Y-2477 를 이용하였다.

균주 보관용 사면배지는 2% glucose, 1% yeast extract, 1% peptone 및 1.5% agar 가 포함된 slant 를 제조하여 사용하였다. Slant 에 균을 접종시켜 incubator 에서 30°C로 24시간 배양한 후 4°C에 보관하면서 사용하였으며 3주마다 동일한 배지조성의 slant 에 옮겨주었다.

접종용 균주의 배양은 300ml 삼각 flask 에 2% glucose, 1% yeast extract 및 1% peptone 이 포함된 배지 50ml 을 첨가하여 멸균한 후 균을 접종하여 30°C에서 16시간 동안 150rpm 으로 진탕배양하여 사용하였다. 모든 배양 및 발효를 위한 접종용 균주의 양은 5% (v/v) 로 하였다. 발효배지는 0.5% yeast extract, 0.5% peptone, 0.5%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.2%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  및 0.04%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  에 발효조건에 따라 15% glucose, 2% starch 및 10%와 15%의

soluble starch (dextrin) 을 첨가하여 사용하였다.

### 알콜발효

알콜발효는 2.5L Jar Fermentor (한국발효기)에 배지 1.5L 을 넣고 30°C에서 300rpm 으로 교반하면서 수행하였다. 또한 발효조건중에서 0.05VVM 으로 통기시킨 경우와 통기를 하지 않은 경우에 대한 연구 및 pH 조절을 위한  $\text{CaCO}_3$  첨가에 대한 영향을 검토하였다.

### 분석방법

환원당의 정량은 DNS 방법(11)에 의하여 측정하였고, 총당의 정량은 Anthrone 법(12) 및 환원당 정량과 마찬가지로 방법으로 상등액을 준비하여 상등액 2ml 에 1N HCl 1ml 을 가하여 잘 섞은 다음 100°C 항온수조에서 60min 간 끓이면서 산가수분해시킨 후 1N NaOH 1ml 을 가하여 중화시켰다. 이렇게 준비된 시료용액 1ml 에 DNS 시약 1ml 을 가하여 환원당 정량과 마찬가지로 총당을 정량하였다. 배양액중의 ethanol 농도는 n-butanol 을 internal standard 로 하여 gas chromatography (Hitachi Model 263-30, Japan) 로 측정하였다. 균수는 현미경하에서 hemacytometer 를 이용하여 counting 하였다.

## 결과 및 고찰

### Glucose 의 알콜발효

*Schwanniomyces castellii* NRRL Y-2477 의 알콜발효 능력을 검정하기 위하여 150g/l의 glucose 가 포함된 발효배지를 이용하여 pH 조절없이 알콜발효를 수행한 결과를 Fig. 1 에 나타내었다. 실험 결과 48시간 발효 후 94%의 glucose 를 소모하면서 63.9g/l 의 ethanol 를 생성하였으며, 이때의 ethanol yield 는 0.45g-ethanol/g-glucose 로서 이론값의 88%였다. 이러한 결과는 일반적인 알콜발효 효모인 *Saccharomyces cerevisiae* 보다는 약간 낮은 값을 나타내었다.

### 전분의 직접 알콜발효

물에 용해될 수 있는 전분의 최대 농도인 20g/l를 이용하여 알콜발효를 수행한 결과 Fig. 2 와 같다. 통기의 경우에는 20g/l의 전분이 거의 모두 소모되었으나 단지  $1.0 \times 10^9$  cell/ml 정도의 세포성장만이 이루어지고 ethanol 생성은 거의 없었다. 이는 탄소

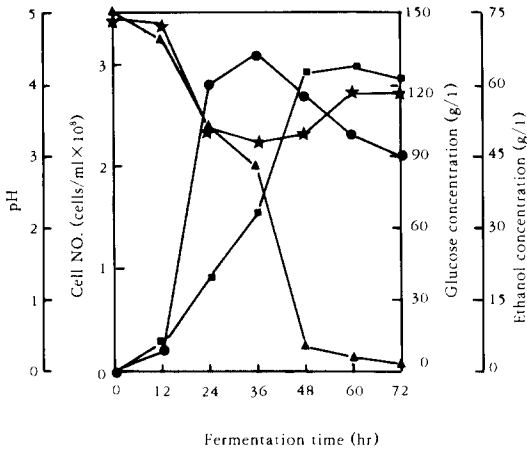


Fig. 1. Profiles of cell growth (●), ethanol production (■), pH change (★) and sugar consumption (▲) during the batch fermentation of 150g/l glucose by *Schw. castellii* NRRL Y-2477.

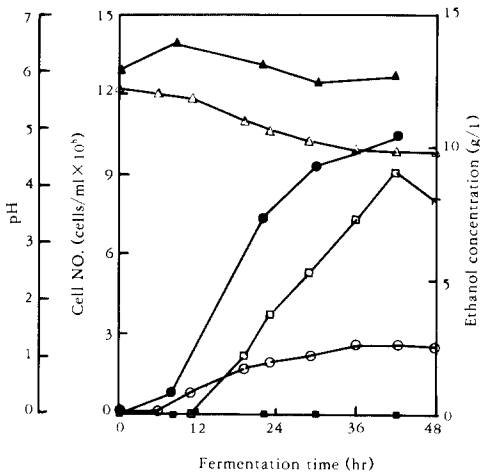


Fig. 2. Profiles of cell growth (○, ●), ethanol production (□, ■), and pH change (△, ▲) during the batch fermentation of 20g/l starch by *Schw. castellii* NRRL Y-2477 under anaerobic (○, □, △) and aerobic (●, ■, ▲) conditions.

원의 제한조건에서 산소가 존재하므로 효모의 호기성 대사에 의하여 ethanol 생성없이 세포성장만 이루어진 것으로 생각된다. 반면 통기를 하지 않은 경

우는 12시간 배양 이후부터 ethanol 이 생성되기 시작하여 42시간 배양했을 때 전분을 모두 소모하면서 9.1g/l 의 ethanol 을 생성하였으며, ethanol yield 는 0.45g-ethanol/g-starch 로서 이론값의 88% 였다. 이때 발효초기 12시간까지 ethanol 생성이 없었던 것은 이미 배지 용액내에 산소가 존재하기 때문인 것으로 추정된다. 따라서 *Schw. castellii* NRRL Y-2247 를 이용한 20g/l 이하의 용해된 전분 기질에서는 통기를 하는 경우 ethanol 의 생성없이 균주의 성장만 이루어져 전분을 함유한 식품공업의 폐수로부터 single cell protein 의 생성에 이용이 가능하다(13).

Soluble Starch (Dextrin) 의 직접 알콜발효

주정용 및 연료용 ethanol 생산을 위해서는 80g/l 이상의 ethanol 농도를 얻어야 하므로 기질의 농도를 높여 주어야 한다. 따라서 dextrin 을 이용하여 전분의 직접 알콜발효를 수행하면서 통기의 영향을 검토한 결과 Fig. 3 과 같다. 즉 100g/l 의 dextrin 이 포함된 발효배지를 발효조에 넣고 통기를 하지 않은 경우와 0.05VVM 으로 통기를 하면서 알콜발효를 수행하였으며 pH 조절을 위하여 0.1% (w/v) CaCO<sub>3</sub> 를 첨가하고 초기 pH 를 5.5로 조정하였다. 실험결과 20g/l 전분의 직접 알콜발효 일때와는 반

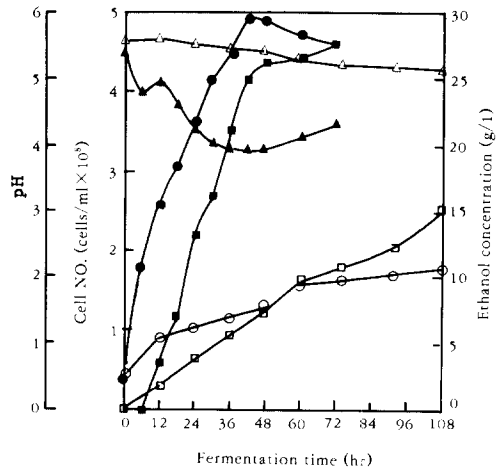


Fig. 3. Profiles of cell growth (○, ●), ethanol production (□, ■) and pH change (△, ▲) during the batch fermentation of 100g/l dextrin by *Schw. castellii* NRRL Y-2477 under anaerobic (○, □, △) and aerobic (●, ■, ▲) conditions.

대로 100g/l dextrin 인 경우에는 통기에 의하여 세포성장과 ethanol 생성이 크게 향상되었다. 즉 통기를 하지 않은 경우 108시간 배양했을때 세포수가  $1.76 \times 10^8$  cell/ml 이고 ethanol 농도는 15.2g/l 인 반면 통기인 경우 최대 세포수가  $4.91 \times 10^8$  cell/ml 로서 2.8배 증가하였으며, ethanol 농도는 72시간 배양했을때 27.7g/l 로서 1.8배 증가하였다. 이러한 결과는 충분한 양의 탄소원 존재하에서 미량의 산소는 효모의 성장요소로 작용할 뿐만 아니라 효모들의 ethanol 에 대한 내성증가 요소로서 작용하기 때문이며(14), 또한 통기에 의한 amylolytic enzymes 의 생성증가에 의한 것으로도 추정된다(7, 9). 따라서 높은 ethanol 생산성으로 높은 ethanol 농도를 얻기 위해서는 전분의 직접 알콜발효에서도 통기가 필수적인 것임을 알았다. 반면 pH 의 감소는 통기를 하지 않은 경우가 통기일때 보다 적었다.

*Schw. castellii* NRRL Y-2477 에 의한 전분의 직접 알콜발효에서 발효중에 pH 가 크게 감소하여 pH 에 대한 영향을 검토하였다. 즉 100g/l 의 dextrin 이 포함된 배지를 발효조에 넣고 초기 pH 를 5.8로 맞춘 후 pH 조절없이 0.05VVM 으로 통기하면서 알콜발효를 수행한 결과 Fig. 4 와 같다. 실험결과 최대 세포수 및 ethanol 농도는  $1.4 \times 10^8$  cell/ml 과 16.5g/l 로서 기질의 약 36% 만이 이용되었으며,

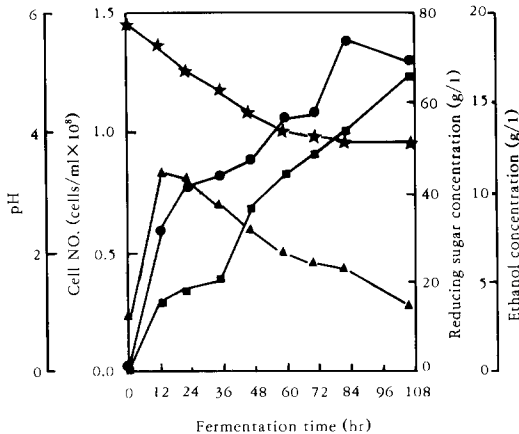


Fig. 4. Profiles of cell growth (●), ethanol production (■), pH change (★) and reducing sugar concentration (▲) during the batch fermentation of 100g/l dextrin by *Schw. castellii* NRRL Y-2247 under non-controlled pH.

더구나 배지내에는 15g/l 의 환원당이 존재하였다. 이때 배지의 pH 는 발효가 진행됨에 따라 점차 감소하여 60시간 발효이후 부터는 4.0 이하로 낮아져 최종 pH 는 3.83이 되었다. 따라서 이러한 pH 감소가 *Schw. castellii* 에 의한 알콜발효를 저해시킬 뿐만 아니라 생성된 amylolytic enzymes 의 불활성화(6, 15)에 의하여 ethanol 생성이 매우 저조한 것으로 추정된다. 또한 서 등(16)의 *Sacch. diastaticus* 에 의한 액화 potato starch 의 발효에서 pH 를 조절하지 않을 경우 최종 pH 가 2.0까지 낮아지면서 ethanol 생성 및 세포성장이 중단되어 ethanol 농도는 최대 28.4g/l 정도이지만, pH 를 4.2로 조절하는 경우 최종 ethanol 농도를 52.1g/l 까지 증가시킬 수 있었다. 이때 *Schwanniomycetes* spp. 및 *Sacch. diastaticus* 에 의한 전분의 직접 알콜발효에서 pH 가 감소하는 이유에 대해서는 잘 알려져 있지 않지만 아마도 유기산들의 생성에 의한 것으로 추정하고 있다. 따라서 전분의 직접 알콜발효 동안에 pH 의 감소에 의한 영향을 최소화 하기 위하여 배지내에 0.1% (w/v) 의  $\text{CaCO}_3$  를 첨가하고 초기 pH 를 6.4로 조정하여 동일한 조건에서 알콜발효를 수행한 결과 Fig. 5 와 같다. 실험결과  $\text{CaCO}_3$  첨가에 의한 pH 조절은 잘되어 발효동안에 4.5에서 5.0사이를 유지시켜 주었다.

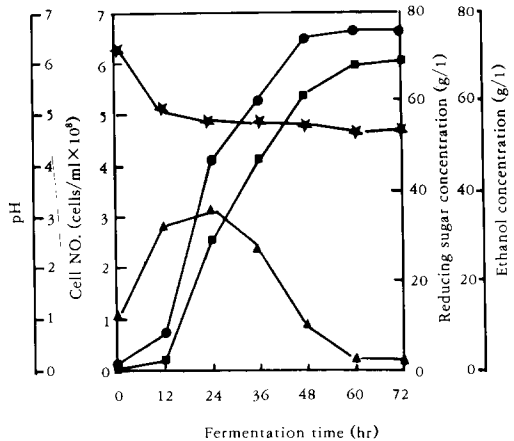


Fig. 5. Profiles of cell growth (●), ethanol production (■), pH change (★) and reducing sugar concentration (▲) during the batch fermentation of 100g/l dextrin by *Schw. castellii* NRRL Y-2247 under pH control by adding 0.1% (w/v)  $\text{CaCO}_3$ .

또한 세포수 및 ethanol 농도는 72시간 발효후에  $6 \times 10^8$  cell/ml 과 34.5g/l 로서 pH 를 조절하지 않은 경우 보다 각각 4.7배와 2.1배 증가하였다. 발효 능력은 기질의 약 82%를 이용하였으며 ethanol yield 는 0.43 g-ethanol/g-dextrin 으로서 이론값의 84%였다. 이와 같은 결과는 *Schw. castelli* R-69 (15)에 의한 92.5g/l 에서 얻은 ethanol 농도 33.9g/l와 동일한 값을 나타내었다. 그러나 사용 기질을 모두 이용하지 못한 이유는 생성된 ethanol 에 의하여 amylolytic enzymes 의 합성과 활성 억제에 의한 것으로 추정되는데(10), 이는 pH 가 4.5이상으로 유지되지만 환원당의 농도는 발효 60시간 이후부터 3g/l 이하로 매우 낮게 존재하는 것으로도 알 수 있었다. 또한 150g/l dextrin 이 포함된 배지에 0.1% (w/v) 의  $\text{CaCO}_3$  를 첨가하여 초기 pH 를 6.0으로 조절한 후 0.05VVM 으로 통기하면서 알콜발효를 수행한 결과 Fig. 6 과 같다. 실험결과 최대 세포수는 48시간 발효시  $4.77 \times 10^8$  cell/ml 였으며, 최대 ethanol 농도는 72시간 발효시 52.1g/l 였다. 이때의 ethanol yield 는 0.44 g-ethanol/g-dextrin 으로서 이론값의 86%였으며, 기질의 79%를 이용하였다.

이러한 결과들로부터 전분의 직접 알콜발효에서의 율속단계는 전분의 가수분해 과정으로 추정되므로 전분의 직접 알콜발효를 위해서는 균주의 mutation 에 의한 amylolytic enzymes 의 합성 및 활성억제가 되지 않는 mutant 를 얻어야 할 것이다.

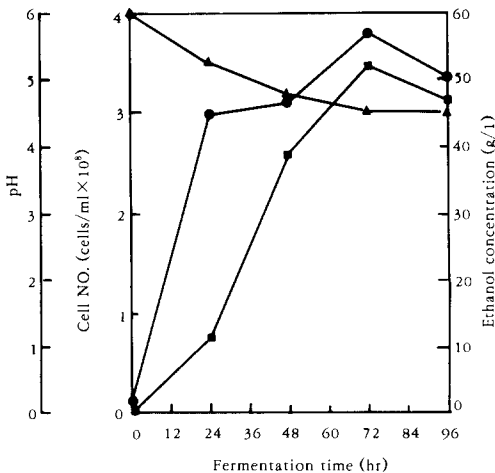


Fig. 6. Profiles of cell growth (●), ethanol production (■), and pH change (▲) during the batch fermentation of 150g/l dextrin by *Schw. castelli* NRRL Y-2477.

## 요 약

*Schwanniomyces castelli* NRRL Y-2477 에 의한 전분의 직접 알콜발효에 대한 연구를 수행하였다. 이 균주의 150g/l glucose 에 대한 알콜발효능력은 사용 기질의 94%를 이용하여 ethanol 를 63.9g/l 를 생성하였으며, 이때의 ethanol yield 를 0.45 g-ethanol/g-glucose 로서 일반적인 알콜발효 효모인 *Sacch. cerevisiae* 보다는 약간 낮았다. 전분이 상온에서 최대 용해될 수 있는 20g/l 전분의 직접 알콜 발효에서는 통기인 경우 ethanol 의 생성없이 세포성장만이 이루어졌으며, 통기를 하지 않은 경우는 9.1g/l 의 ethanol 를 생성하여 ethanol yield 는 이론값의 88%를 나타내었다. 반면 100g/l의 dextrin 을 이용한 알콜발효에서는 통기에 의하여 ethanol 의 생성이 1.8배 증가하였으며, 또한  $\text{CaCO}_3$  첨가에 의한 pH를 조절한 경우 조절하지 않은 경우 보다 ethanol 생성이 2.1배 증가한 34.5g/l 의 농도로서 이때의 기질에 대한 발효능력은 82%이고 ethanol yield 는 이론값의 약 84%였다. 또한 150g/l dextrin 의 알콜발효에서는 약 79%의 기질을 소모하면서 52.1g/l 의 ethanol 을 생성하였다.

따라서 *Schwanniomyces castelli* NRRL Y-2477 에 의한 전분의 직접 알콜발효에서의 율속단계는 전분의 가수분해 과정을 확인하였다.

## 감 사

본 연구는 동력자원부 대체에너지 기술개발 사업의 지원에 의하여 이루어졌으며 이에 감사의 말씀을 드립니다.

## 참고문헌

1. A. M. Sills, C. J. Panchal, I. Russell and G. G. Stewart (1987), *CRC Crit. Rev. Biotechnol.*, **5** (2), 105.
2. W. M. Ingledew (1987), *CRC Crit. Rev. Biotechnol.*, **5**(2), 159.
3. A. M. Sills, M. E. Sauder and G. G. Stewart (1983), *Dev. Ind. Microbiol.*, **24**, 295.
4. J. J. Wilson, G. G. Kachatourians and W. M. Ingledew (1982), *Biotechnol. Lett.*, **4**, 333.
5. A. M. Sills and G. G. Stewart (1982), *J. Inst. Brew.*, **88**, 313.

6. A. M. Sillescu, M. E. Sauder and G. G. Stewart (1984), *J. Inst. Brew.*, **90**, 311.
7. C. V. Lusena, C. C. Champagne and G. B. Calleja (1985), *J. Biochem. Cell. Biol.*, **63**, 366.
8. G. B. Calleja, S. Levy-Rick, C. V. Lusena, A. Nasim and F. Moranelli (1982), *Biotechnol. Lett.*, **4** (8), 534.
9. B. Simoes-Mendes (1984), *Can. J. Microbiol.*, **30**, 1163.
10. M. H. Malfait, G. Moulin and P. Galzy (1986), *J. Ferment. Technol.*, **64**, 279.
11. G. L. Miller (1959), *Anal. Chem.*, **31**, 426.
12. J. Weiner (1978), *J. Inst. Brew.*, **84**, 222.
13. E. Y. Park, D. L. Grawford, R. A. Roger and R. C. Heimsch (1991), *J. Microbiol. Biotechnol.*, **1**(3), 212.
14. Y. W. Ryu and H. W. Jang (1991), *J. Microbiol. Biotechnol.*, **1**(1), 6.
15. M. R. Dhawale and W. M. Ingledew (1983), *Biotechnol. Lett.*, **5**(3), 185.
16. 서정훈, 김영호, 전도연, 이창후 (1986), 한국산업미생물학회지, **14**(4), 311.