韓國環境衛生學會誌
Kor. J. Env. Hlth. Soc.
Vol. 18, No. 1, 84~94, 1992

Immobilized *Saccharomyces cerevisia*의 反應特性에 관한 연구

金 成 器

韓國放送通信大學 保健衛生學科

Studies on the Reactive Characteristics of Immobilized *Saccharomyces cerevisia* in Ethanol Production

Kim Sung Kih

Korea Air and Correspondence University, Seoul, Korea

ABSTRACT

In an attempt to develop the immobilized biocatalysts based on immobilized *Saccharomyces cerevisiae*, immobilized yeast was investigated with respect to the conditions affected to ethanol productivities.

Saccharomyces cerevisiae was immobilized in the form of the beads by magnetic-calcium alginate, non magnetic-calcium alginate and acrylamide polymerization. Magnetic immobilized yeast, non-magnetic immobilized yeast and polyacrylamide immobilized yeast were compared in respect of their pH stability, thermostability, heat tolerance, the relation between the concetration of native yeast and retained activity of immobilized yeast, the activity depending on bead size of immobilized yeast, and the effects of magnesium and cobalt on the activities.

The more small bead had retained the higher activity for the three kinds of immobilized yeast. In case of 1.0mm diameter of beads, the retained activity was 40~50% for the all groups. The pH stability profile for the immobilized yeast showed a broad range of optimun activity while the native yeast gave a sharp pick for its optimun pH value. The thermostability was at the range of 25~55℃ for the immobilized yeast groups.

It was investigated that the influent magnesium and cobalt concentration, and the relative activity have an influent on heat tolerance at steady state. Both protein content released from immobilized yeast and activity of immobilized yeast were changed after activation of immobilized yeast cell.

Ⅰ. 緖 論

産業이 發達되어 經濟的 成長과 더불어 우리가 찬란한 文明을 創造하고자 함은 어느 누구도 부인할 수 없다. 이러한 우리들의 소박한 생각은 결국 하나밖에 없는 地球環境 및 自然環境을 유린하고 파괴하게 된다.

산업장에서 나오는 각종 汚染物質이나 廢水 등은 그 理化學的 性狀이 다르고 또 인간을 비롯하여 자연에 미치는 영향이 각기 다르기 때문에 우리가 이들을 잘 관리하여 우리 자신과 자연을 보호한다는 것은 쉬운 일이 아니다. 따라서 우리가 環境을 汚染시키고 있는 물질을 잘 관리하기 위하여 새로운 方法을 開發한다는 것은 먼저 産業場에서의 經濟性과 實用性이 우선 고려되어야 한다. 아무리 좋은 방법을 개발하였더라도 산업장에서 나오는 副産物이나 廢棄物이 그 經濟性이 적기 때문에 이들을 처리하는데 高價의 費用이 요구된다던가 또 이용하는 방법이 까다로우면 이를 쉽게 이용할 수 없게 된다.

이러한 관점에서 볼때 immobilized biocatalysts를 개발하여 이용하게 되면 immobilized biocatalysts가 가지고 있는 많은 장점에 의하여 環境性 廢棄物을 除去하고 또 이들을 再活用할 수 있다. 1970년초부터 immobilized biocatalysts의 개발과 더불어 Borchardt[1]과 Cysewski 및 Wilke[2]는 immobilized biocatalysts를 이용하여 工場廢水를 廉價로 처리할 수 있다고 보고한 바 있다. 微生物이나 酵素를 이용하여 공장폐수를 처리하는 것은 다른 이화학적 방법보다 이점이 있다. 化學物質의 처리로 인하여 反應 副産物의 새로운 공해도 나타나지 않기 때문에 근래에 와서 微生物을 이용한 廢棄物 처리나 副産物 제거에 있어서 유용한 방법으로 이용되고 있다.

우리가 微生物을 이용한다는 것은 결국 미생물이 갖고 있는 어떤 酵素의 작용을 얻기 위함인데 실제 工業用으로 사용될 경우 미생물로부터 효소를 추출하여 정제할 필요가 없다. 細胞를 파괴하여 酵素를 精製하는 과정에서 일어나는 酵素의 不活用化를 막을 수 있기 때문에 장점이 있다.

金[3]은 알코올 生産工程 중에서 전처리공정을 連續的으로 행할 목적으로 immobilized biocatalysts를 이용하려고 시도하였다. 또 Witt 등[4]은 ethanol 생산시의 원료인 澱粉을 麥芽에 의하여 加水分解시키는 대신 미생물의 amylase를 고정화시켜서 澱粉을 糖化시켰다. 또 Morisi 등[5]은 乳糖製造工場에서 나오는 廢棄物의 악취를 제거하기 위하여 효모의 lactase를 이용하고자 효모를 고정화시켰다. 이를 80일간 연속적을 반응시켜도 활성의 저하도 없이 우유의 乳糖을 除去하는 목적에 공업적 가치가 있다고 보고하였다.

食品工場의 폐수를 비롯하여 醱酵工場, 糖分工場, 製粉工場, 製紙工場 등의 유기산업체의 폐수를 처리하는 과정에서 單細胞蛋白質[6]을 생산한다던가 또 알코올[7]을 생산한다면 폐수의 生物學的 酵素要求量도 감소시킬 수 있게 된다. 우리나라의 감자 가공공장의 폐수중에 총 炭水化物의 함량은 약 6.7g/l이고 澱粉의 함량은 약 6.2g/l이며 還元糖量은 0.4g/l 정도 포함하고 있다[8]고 한다.

Hulshoff 등[9]은 微生物을 固定시켜 immobilized biocatalysts를 제조하여 産業廢水를 처리할 수 있는 새로운 反應槽를 開發하였다. 따라서 본 연구는 여러 산업장에서 나오는 폐수중의 여러가지의 탄수화물이 다시 細菌의 繁殖을 가져오는 등 2차 오염을 일으키고 또 생물학적 산소요구량을 증가시키고 있는 것을 방지하기 위하여 일련의 연구를 시도하였다. 탄수화물의 가수분해물이나 포도당으로 부터 ethanol을 생산할 경우 공업적으로 편리하게 이용할 수 있는 immobilized biocatalysts를 개발하고저, 먼저 ethanol를 생산하는 효모를 고정화시키고 그 反應 活性에 요구되는 條件들을 실험하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

Ⅱ. 材料 및 方法

1. 酵母의 培養

본 실험에 사용한 효모는 *Saccharomyces cerevisiae* NFRI 408이며 효모는 yeast extract 0.5g, malt extract 0.5g, 포도당 1.5g, KH_2PO_2 0.25g/100ml의 배양기에서 30℃에서 24시간 진탕배양하여 재료로 사용하였다. 이 때 배양액중의 菌體數는 4×10^8cell/ml 정도이었다. 액체진탕배양한 효모를 5,000×G에서 10분간 원심분리하여 습한 균체를 얻어 immobilized biocatalysts 제조에 사용하였다.

2. Magnetic immobilized yeast와 polyacrylamide immobilized yeast의 제조

Magnetic immobilized의 제조는 Munro[10]의 방법에 의하였는데 magnetic powder는 직경이 50μm 정도였으며 이 대조구에 사용되는 철분은

교질성 아철산염을 이용하였다. 효모균체 10g을 증류수에 헌탁시키고 4%(w/v)의 calcium alginate 용액 20ml과 magnetic powder 0.4g을 혼합시켜 증류수로 50ml를 만든다. 이 혼합액을 30℃에 보존하면서 가는 주사바늘을 이용하여 0.2M의 calcium chloride 용액속에 천천히 떨어뜨리면 bead가 생성된다. 이것을 0.05M-calcium chloride 용액에서 4℃에서 보존하였다.

또 polyacrylamide immobilized yeast 제조는 Yamamoto 등[11]과 필자[12]들이 보고한 방법에 의하여 acrylamide를 DMAPN으로 重合시켜서 만들었다. 효모 10g을 증류수에 헌탁시키고 여기에 특급 acrylamide 7.5g과 N,N'-methylenbis-acrylamide(BIS) 400mg을 첨가하여 용해시켰다. 이 혼합액에 다시 5%의 β-dimethylamino propionitrile 5ml와 1%의 $K_2S_2O_8$ 5ml를 가하여 50 ml로 만들었다. 이 혼합액을 35℃에서 30분간 polymerization시켰다. 이것을 다시 냉각된 생리식염수에서 bead를 만들었다. 이렇게 제조된 immobilized yeats는 대단히 物理的 性狀이 安定하여 취급하기가 용이해진다.

3. Native yeast와 Immobilized yeast의 알코올 生産性 측정

본 실험에 사용된 *Saccharomyces cerevisiae*의 native상태의 ethanol의 생산성과 또 여러가지 방법으로 固定化시킨 상태의 ethanol의 생성성을 측정하기 위하여 순수 glucose를 基質로 사용하였다.

0.01M의 calcium chloride용액속에 0.25M의 glucose용액을 만들어 이 기질용액에 대하여 yeast extract 0.1%, malt extract 0.1%를 첨가하였다. 살균된 배양기에 native yeast 1g이 되도록 bead를 첨가하여 pH 6.5로 조절하여 30℃에서 24시간 발효시킨다.

Ethanol은 gas chromatograph에 의하여 측정하였다. 발효된 시료에 2.5%의 m-HPO_3용액을 등량 가한 후 10분간 전처리하여 원심분리하였다. 그 상등액 5μl를 Varian 3,700 Gas Chromatograph에 주입하고 이 때 carrier gas로 일분당 질소가스 40ml를 주입하였다. 이 시료는 110℃의 column을 통하여 flame ionization eletector로 들어갔다.

4. *Saccharomyces cerevisiae*의 pH 및 熱安定性

*Saccharomyces*의 反應液에서 基質을 빼고 citrate phosphate 완충액으로 pH를 3~6으로, Tris 완충액으로 pH를 7~9로 조절하고 여기에 native yeast와 immobilized yeast를 각각 넣어서 10시간 방치하였다. 이것을 다시 pH 7.0으로 조절하여 기질을 넣어서 native yeast와 immobilized yeast의 각 pH에 대한 安定性을 ethanol의 생산량으로 조사하였다.

또 *Saccharomyces*의 熱에 대한 安定性을 보기 위하여 반응액에 역시 基質을 빼고 온도를 25℃, 35℃, 45℃, 55℃, 65℃, 75℃ 그리고 85℃로 조절하고 pH 7.0에서 native yeast와 immobilized yeast를 각각 넣고 10분간씩 予熱을 시킨 후에 이들을 다시 30℃로 조절하여 이들에 기질액을 넣어서 native yeast와 immobilized yeast의 열에 대한 안정성을 측정하였다.

5. Native yeast와 Immobilized yeast의 耐熱性에 대한 금속 이온 영향

Native yeast와 immobilized yeast의 ethanol 생산성에 있어 금속 이온의 영향을 조사하기 위하여, $MgCl_2$을 이용하여 마그네슘의 이온을 10^{-4}, 10^{-3}, 10^{-2}, 10^{-1} 그리고 1M이 되도록하여 여기에 0.25M의 glucose 용액을 만들었다. 그리고 이들 각 기질에 native yeast와 immobilized yeast를 첨가하여 ethanol의 생산성을 조사하였다. 그리고 다음 10^{-3}M의 마그네슘 이온과 코발트의 용액을 만들어 30℃, 40℃, 50℃, 60℃, 70℃ 그리고 80℃로 조절하여 magnetic immobilized yeast와 polyacrylamide immobilized yeast를 각각 넣고 10분간 予熱시킨 후 native yeast와 2종의 immobilized yeast의 ethanol 생산량을 측정하였다.

6. 蛋白質의 測定

Folin-Ciocalteu용액에 의한 Lowry 등[13]의 방법에 따라 단백질을 정량하였다. 시료 1ml당 단백질이 5~100γ정도 함유하도록 immobilized yeast

의 진탕액을 조제하고, 시료 0.2m*l*에 alkaline copper용액 1m*l*를 첨가한 후 실온에서 15분간 방치하였다. 여기에 Folin-Ciocalteu용액 0.1m*l*를 첨가하여 다시 30분간 방치한 후 500mμ에서 吸光度量을 측정하였다. 이 때 표준곡선은 bovine serum albumin을 이용하였다.

Ⅲ. 結果 및 考察

1. 酵母의 量과 固定化 酵母의 活性관계

Immobilized biocatalysts을 제조함에 있어서 가장 중요한 조건 중의 하나가 그 immobilized biocatalysts가 갖고 있는 殘餘活性이 된다. 固定化에 이용되는 固定化전의 효모의 양이 고정화된 상태에서 어느 정도의 殘餘活性으로 나타나는지를 조사하기 위하여 native yeast 양을 달리하여 측정해 본 결과 Fig. 1과 같다.

固定化에 사용되는 monomer의 g당 native yeast의 양이 증가함에 따라 그 잔여활성이 비례하지 않고 일반적으로 감소하였다. Magnetic immobilized yeast의 경우 0.05g에서 0.2g까지 급격히 감소하여 40%의 殘餘活性밖에 보이지 않았고 0.4g부터는 완만하지만 계속하여 감소하였다. 그러나 polyacrylamide immobilized yeast의 경우는 사용된 양의 증가에 반비례하여 거의 일직선으로 감소하였다. 이러한 현상은 비록 native yeast를 많이 사용하였다 하더라도 그 양만큼 immobilized biocatalysts가 갖고 있는 활성은 증가하지 않았음을 말해 주고 있다. immobilized biocatalysts를 장기간 보존하면서 반복하여 사용할 경우 일정한 양의 효모의 脫離를 방지하기 위하여 native yeast의 양을 가능한 많게 할 필요가 있기 때문이다.

2. Bead 크기에 따른 Immobilized Yeast의 殘餘活性

Immobilized biocatalysts를 이용하여 생물공학적 조작을 할 경우 immobilized yeast의 크기에 따라 조작의 용이함이 다르다. 그러기 때문에 immobilized yeast의 크기와 그 보유활성을 조사해 보았다. 일정한 양의 native yeast로써 제조된 immobilized biocatalysts라 하더라도 bead의 크기에 따라 yeast의 활성은 다르게 나타났다. Magnetic immobilized yeast, non-magnetic immobilized yeast와 polyacrylamide immobilized yeast의 bead의 크기가 Fig. 2에서 볼 수 있듯이 여러가지로 생길 수 있는데, 이들의 직경이 0.1 mm 정도인 것은 殘餘保有活性이 거의 완전한데 비하여 그 크기가 클수록 활성은 급격히 감소하여 직경이 3.0mm 정도가 되면 그 활성은 20~30% 밖에 없었다.

Bead의 크기가 크면 그만큼 酵母의 含有量도 많을 것인데 그 활성이 도리어 줄어든다는 것은 immobilized biocatalysts의 제조에 중요한 특성을 의미한다. 이렇게 bead가 크면 효모의 殘餘活性이 현저하게 감소하는 것은 2가지로 설명할 수 있다. 첫째 bead 속 깊은 곳에 있는 酵母의 酵素의 活性部位의 表面積이 어떤 물리적 자극에 의해 감소되기 때문으로 볼 수 있다. 또 다른 하나는 酵素의 양만큼 氣質과 複合體가 충분히 이루어질 수 있을 만큼 基質의 diffusion이 잘 되지 않고 또

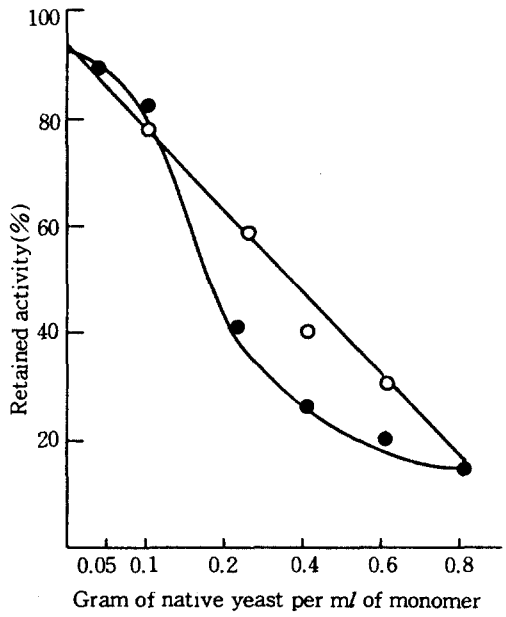

Fig. 1. Relation between the concentration of native yeast and retained activities of the immobilized yeast.

●- Magnetic immobilized yeast;
O- Polyacrylamide immobilized yeast

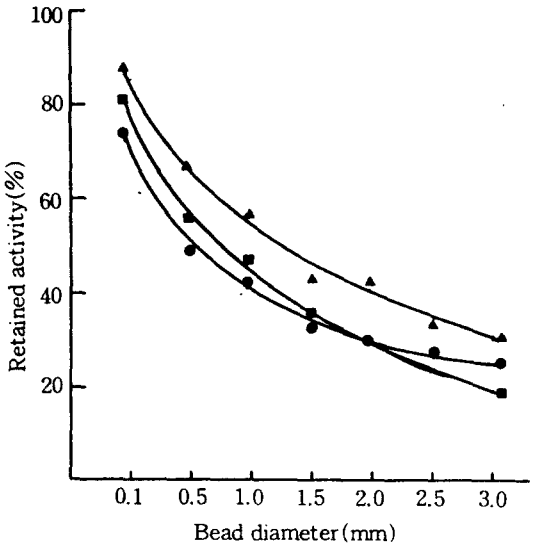

Fig. 2. Changes in the retained activity of immobilized yeast cell depending on bead sizes.

- ● Magnetic immobilized yeast
- ■ Non-magnetic immobilized yeast
- ▲ Polyacrylamide immobilized yeast

product 역시 효소의 활성에 feed back inhibition이 일어난다고 생각되어 진다.

3. Immobilized Yeast의 pH에 대한 安定性

처음에 최적의 pH 조건하에서 immobilized biocatalysts를 사용한다고 하더라도 immobilized biocataylsts를 장기간 반복하여 사용할 경우 生産物質 등으로 反應液의 pH의 安定性이 문제된다. Native yeast와 immobilized yeast를 각각 pH 3에서 9까지 조절하여 pH의 安定性을 조사해 본 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 pH 3에서는 크게 낮았으나 중성으로 갈수록 잔여활성이 계속적으로 증가하여 55~80% 정도였다. Native yeast의 경우 전반적으로 immobilized yeast보다 약 40~50% 정도 활성이 감소하였다. Polyacrylamide immobilized yeast 경우는 pH 5에서 8까지 그리고 magnetic immobilized yeast 경우는 pH 6에서 8까지 광범위하게 殘餘活性이 높았다. 이러한 사실은 무엇보다 immobilized biocatalysts를 이용한 反復性 사용에 중요한 장점으로 생각된다.

일반적으로 酵素나 微生物을 고정화시킬 경우 이들은 固定化 擔體間의 疎水結合, 水素結合 및 吸着과 같은 상호작용을 받게 된다. 따라서 Barker 등[14]은 擔體의 立體構造의 변성을 받아서 pH의 安定性은 크게 향상한다고 보고하고 있다.

4. Immobilized Yeast의 熱 安定性

Immobilized biocatalysts를 한번 사용 후 세척하면서 다시 반복하여 사용할 경우 反復回數의 증가에 따라 자연히 효모 효소의 활성은 저하된다고 볼 수 있다. 이의 중요한 원인중의 하나가 酵素反應時의 열의 누적에서 오는 酵素蛋白質의 變性을 생각하지 않을 수 없다.

Native yeast와 immobilized yeast를 그 반응액의 pH 7에서 10분간씩 予熱처리한 후 이를 다시 30℃로 조절하여 그 활성을 측정한 결과는 Fig. 4와 같다. Native yeast 경우 35℃까지는 별 변화가 없었으나 그 이상의 온도에서는 급격히 감소되어 55℃에서 35% 정도밖에 잔여활성이 없었

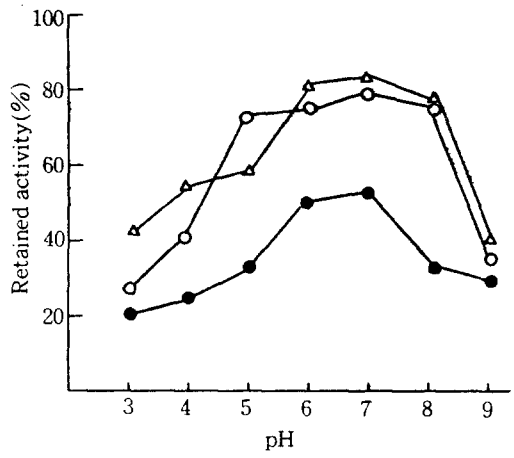

Fig. 3. pH-Activity profile of *Saccharomyces cerevisiae*. The native and immobilized yeast were preincubated at various pH of phosphate buffer solution for 10hr without the substrate and then the enzyme activities were assayed as described in the text.

- ● Native yeast
- ○ Magnetic immobilized yeast
- △ Polyacrylamide immobilized yeast

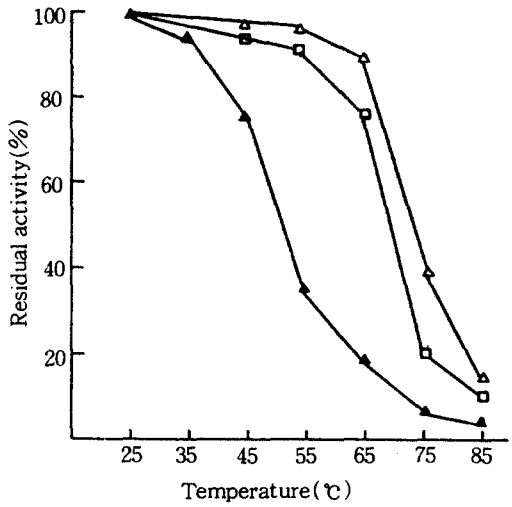

Fig. 4. Profile of thermal stability of *Saccharomyces cerevisiae*.
The native and immobilized yeast were preincubated at the various teaper without the substrate for 10hr and the residual activities were assayed as described in the text.
▲ Native yeast
△ Magnetic immobilized yeast;
□ Polyacrylamide immobilized yeast.

다. 그러나 immobilized yeast의 경우 열에 대하여 대단히 안정하여 65℃까지 거의 변화가 없었고 그 이상의 온도에서는 급격히 감소함을 보여주었다. Magnetic immobilized yeast와 polyacrylamide immobilized yeast는 모두 유사한 경향을 보여 주었으며, 이들은 85℃에서 거의 활성이 상실되었다. 이러한 현상은 Goldstein 등[15]이 보고한 것처럼 固定化로 인하여 酵母間의 凝集力이 증가하여 이들이 細胞膜간에 화학적 결합이 이루어져서 monomer나 carrier의 包埋處理의 효과를 나타내기 때문에 熱 安定性이 향상된 것을 볼 수 있다.

5. Immobilized Yeast의 活性에 있어 금속이온의 效果

금속이온이 酵素의 活性 發現에 어떠한 영향을 미치고 있는 지는 immobilized yeast의 反復使用에 있어 중요한 의미를 갖는다. 특히 효모로써 알코올을 발효시킬 때 마그네슘 이온과 코발트 이온이 알코올의 醱酵酵素의 활성을 상승[16]시켜 주는 것으로 알려져 있기 때문에 이들에 대한 실험을 한 결과 Fig. 5와 같다. Native yeast의 경우는 10^{-4}M의 마그네슘 용액에서부터 그 활성은 차츰 증가하여 10^{-2}M에서 최고의 활성을 보여 주었고 또 10^{-1}M에서부터는 급격히 감소하였다. 이러한 결과는 마그네슘의 농도에 따라 효모의 알코올 생산성을 향상시킬 수 있음을 알 수 있다. 그러나 2종류의 immobilized yeast의 경우 마그네슘의 첨가효과가 거의 분명하지 않았다. 더욱이 마그네슘의 첨가 농도가 증가할수록 점점 감소하는 경향으로 나타났다.

이러한 사실은 immobilized yeast가 특별히 저농도의 마그네슘 용액에서 활성화된다기 보다 고정화 시키는 과정에서 이미 마그네슘 이온이 carrier나 monomer를 통하여 충분히 공급되었기 때문에 추가로 첨가된 것은 마그네슘의 효과로 나타나지 않은 것으로 보여진다.

6. Native Yeast의 耐熱性

앞서 언급한 바와 같이 효모의 알코올 발효 효

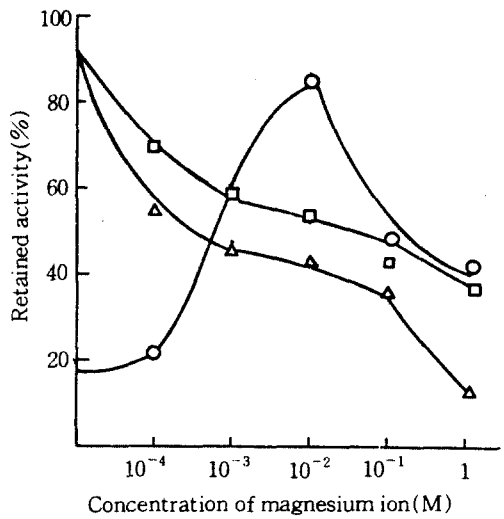

Fig. 5. The effects of magnesium ion the activities of native and immobilized *Saccharomyces cerevisiae*.
○ Native yeast
△ Magnetic immobilized yeast
□ Polyacrylamide immobilized yeast

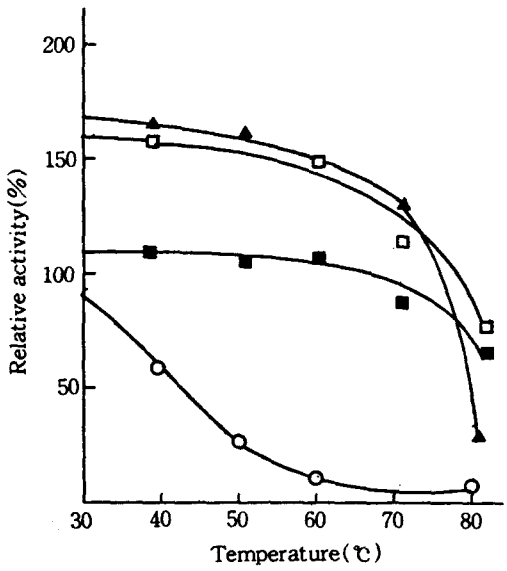

Fig. 6. Heat tolerance of native *Saccharomyes cerevisiae*.
The native yeast was preincubated at the above mentioned temperature for 10hr and the relative activities were estimated.
○ Control ▲ 10^{-3}M of magnesium ion
■ 10^{-3}M of cobolt ion
□ Magnesium and cobalt ion

소가 마그네슘에 의하여 영향을 받았다면 이 효소의 耐熱性도 향상될 것으로 보기 때문에 이 실험을 하게 된다. Native yeast에 마그네슘과 코발트 이온을 각각 혹은 혼합하여 첨가한 후 일정한 온도에서 10분간 가온한 후에 native yeast의 殘餘活性을 조사해 본 결과 Fig. 6과 같다. 앞의 결과와 같이 10^{-3}M의 마그네슘 용액에 40℃에서 予熱處理할 경우 170%의 相對活性을 보였고 대조구는 약 60%의 활성을 보여 마그네슘구가 약 3배에 가까운 높은 활성을 보였다. 이러한 현상은 60℃에서 予熱시킬 때까지 같은 경향을 보였다. 70℃에 予熱시킬 경우는 마그네슘구에도 현저하게 활성이 감소되어 대조구와의 차이는 근소하게 되었다. 이 때 마그네슘과 코발트를 같이 혼합하여 실험해 본 결과 40℃에서 60℃까지의 予熱에서는 마그네슘 단독처리구와 별차이가 없었다. 그러나 70℃의 고온처리시에도 마그네슘 단독 처리구보다 현저하게 殘餘活性이 높아서 고온에 있어서 마그네슘과 코발트의 혼용처리가 탁월한 효과가 있음을 알 수 있었다. 그러나 코발트 단독처리는 마그네슘 단독처리구보다 훨씬 相對活性이 낮았다. 코발트 처리구는 予熱溫度의 변화에 별 영향이 나타나지 않고 40℃부터 70℃까지 거의 일정하였다.

이로서 마그네슘과 코발트는 분명히 native yeast의 알코올 발효효소의 耐熱性을 향상시킴을 확인할 수 있다.

7. Immobilized Yeast의 耐熱性

Immobilized biocatalysts를 사용한다는 것은 immobilized yeast가 갖고 있는 생물학적 재제인 효모의 효소를 이용함인데, 이 때 열에 대한 이 효소의 불활성을 방지하는데 있어 금속이온의 효과를 조사하기 위하여 다음에 실험하였다.

Magnetic immobilized와 polyacrylamide immobilized yeast에 각각 마그네슘과 코발트를 혼합처리하여 40℃에서 80℃까지 10분간 予熱處理하여 그들에 대한 알코올 생산력을 측정해 본 결과 Fig. 7과 같다. 2종의 immobilized yeast 구간에 있어서는 효소의 耐熱性 活性에 현저한 차이가 나타나지 않았다. 그러나 각각의 대조구에 마그네슘과 코발트를 혼합처리한 구에 있어서는 다소 차이가 있었으며 이러한 현상은 40℃에서 70℃까지 유사한 경향이었다.

다만 70℃ 이상이 되면 급격히 떨어져 내열성에 대한 相對活性은 극히 낮았다. Fig. 6에서 본 바와 같이 마그네슘 첨가구가 native yeast의 대조구보다 3배 정도 相對活性이 증가하였는데 immobilized yeast를 제조할 경우에는 뚜렷한 차이가 없는 것은 Fig. 5에서 볼 수 있었던 것과 같이 immobilized biocatalysts를 제조할 경우에 이미 충분한 양의 마그네슘 이온 등이 이용된 것으로 볼 수 있다.

Lilly와 Dunnill[16]은 基質의 용액에 Mg^{+2}와 Ca^{2+} 등 2가 금속이온을 첨가하여 4개월 이상 30℃의 column immobilized yeast를 사용할 수 있었다고 보고하였다. 이러한 사실은 곧 immobilized yeast를 장기간 사용할 시 사용기간에 따라 immobilized yeast의 凝集力의 변화가 언제 오느냐 문제가 된다. Jayatissa[17]는 효모의 細胞壁중의 carboxyl기가 마그네슘 등의 multi-valent 陽이온에 의하여 연결되어 凝集力의 증가와 그 耐熱

Table 1. Changes in protein content of liquid released from immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cell

Storage (Day)	Magnetic immobilized yeast(mg of protein/10g of bead)		Non-magnetc immobilized yeast(mg of protein/10g of bead)		Polyacrylamide immobilized yeast(mg of protein/10g of bead)	
	Before activation	After activation	Before activation	After activation	Before activation	After activation
1	0.29±0.02	0.29±0.01	0.26±0.02	0.25±0.02	0.35±0.04	0.23±0.03
5	0.32±0.04	0.25±0.02	0.33±0.03	0.23±0.04	0.45±0.01	0.20±0.01
10	0.35±0.05	0.21±0.01	0.35±0.03	0.18±0.05	0.50±0.06	0.18±0.01
20	0.45±0.06	0.30±0.03	0.42±0.03	0.34±0.01	0.51±0.02	0.25±0.03
30	0.50±0.04	0.35±0.06	0.53±0.02	0.36±0.02	0.52±0.06	0.32±0.05

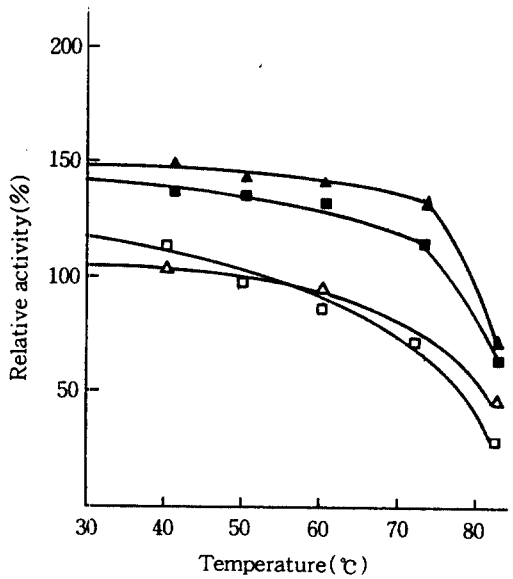

Fig. 7. Heat tolerance of immobilized *Sccharomyces cerevisiae*.

- □ Magnetic immobilized yeast without magnesium and cobalt ion:
- ■ Magnetic immobilized yeast with 10^{-3}M of magnesium and cobalt ion
- △ Polyacrylamide immobilized yeast without magmesium and cobalt ion;
- ▲ Polyacrylamide immobilized yeast with 10^{-3}M of magnesium and cobalt ion.

性의 향상이 나타난다고 보고한 것과, 본 실험의 결과는 일치한다고 볼 수 있다. 이렇게 ethanol 생산시 반응온도를 높일 수 있다면 부폐균의 번식을 억제할 수 있고 또 증류과정에서 에너지의 수요를 줄이는 등 이점이 많다.

8. Immobilized Yeast의 活性化와 蛋白質의 流出

Immobilized biocatalysts를 제조하여 반복하여 사용하게 되면 처음 이용한 native yeast가 자연히 自家消化되거나 또는 고정화 효모의 凝集力에 어떤 변화가 오거나 하여 단백질이 유출되는 경우를 생각할 수 있다. 그로 인하여 수일만에 그 활성이 20~30%씩 감소함을 전보[7]에서 확인할 수 있다. 이러한 원인을 규명하기 위하여 일정한 시일을 두고 immobilized yeast를 活性化시키기 전과 시킨 후로 나누어서 immobilized yeast를 완충용액에 넣고 10분간씩 진탕한 후 이들로부터 단백질이 유출되는 양을 비교해 보았다.

Table 1에서 보는 바와 같이 magnetic immobilized yeast를 활성화시키기 전에는 저장 1일에서는 0.27mg의 적은 양의 단백질이 유출되었으나 사용기간이 경과할 수록 점점 증가하여 30일후에는 처음의 약 85% 정도 증가하였다. 이와같은 조건으로 하여 magnetic immobilized를 活性化시켜 보았더니 처음에는 같았으나 사용기간이 경과할수록 역시 점점 증가하였다. 그러나 활성화시키기 전보다는 현저하게 감소되었다. 활성화전 30일의 사용시에는 0.5mg이었으나 활성화시킨 후에는 0.35mg으로 30% 정도 적게 용출되었다. 이러한 현상은 non-magnetic immobilized와 polyacrylamide immobilized yeast의 경우는 유사한 경향을 보여주고 있었다. 그러나 polyacrylamide immobilized yeast 에 있어서는 활성화전에 사용 1일에 다른 실험구보다 30% 정도 많은 양의 단백질이 유출되었고 5일에는 0.45mg으로 40% 정도

증가하였다. 그 후에는 다른 실험구보다 증가는 둔화되어 30일 사용시에는 다른 실험구와 같은 수준이었다. 이러한 사실은 native yeast가 acrylamide의 重合에 의하여 entrapping되어 polyacrylamide immobilized yeast가 될 때 어떤 장애를 받았으나 이를 다시 polyacrylamide immobilized yeast상태에서 다시 활성화시킨 이후에는 어떤 장해를 받지 않고 細胞의 分裂이 잘 되었음을 보여줌을 알 수 있었다. 또 효모를 일단 고정화 시킨 후에 다시 활성화시키면 효모의 凝集力이 증대되어 immobilized yeast의 반응활성은 높아지는 것으로 인정되었다.

Day Poon[18]은 immobilized yeast를 사용할 경우 그 효모의 凝集機作을 조사하여 그 응집체가 파괴되지 않도록 하는 것이 immobilized biocatalysts를 사용하는 공정의 성패가 된다고 하였으며 또 Rose[19]은 ethanol의 생산공정에 있어 immobilized yeast의 응집력이 강한 효모는 連續工程에서도 反應生成液만을 제거할 수 있고 고농도의 균체를 유지시킬 수 있어서 생산성을 높일 수 있다고 보고하는 것과 본 실험의 결과는 큰 의미가 있다고 본다.

Ⅳ. 結　論

食品工場과 製紙工場 등의 산업장에서 나오는 廢棄物이나 副産物이 可容性 糖分 특히 單糖類를 함유하고 있어, 이것들이 細菌의 繁殖 등을 조장하여 環境性 2차 오염을 일으키고 있다. 이러한 單糖類를 除去함과 동시에 이를 再利用하여 ethanol을 생산하기 위하여 *Saccharomyces cerevisiae*을 고정화시켰다. Immobilized biocatalysts를 제조하기 위한 immobilized yeast의 反應活性에 미치는 條件들을 실험하여 다음과 같은 몇가지 유용한 결론을 얻을 수 있었다.

1. Immobilized yeast를 제조할 때 사용하는 native yeast의 양이 magnetic immobilized yeast와 polyacrylamide immobilized yeast가 된 후에 어느 정도의 활성을 보유하는지에 대하여 실험하였더니 magnetic immobilized yeast 및 polyacrylamide immobilized yeast 모두 固定化溶液당 native yeast양이 0.05g일 때 80% 이상의 활성을 나타냈다. 그러나 native yeast의 양이 더 증가할수록 반비례하여 그 활성은 감소하였다.

2. Magnetic immobilized yeast, non-magnetic immobilized yeast 그리고 polyacrylamide immobilized yeast로 제조된 bead의 크기가 효모의 ethanol 생산성과의 관계를 보았더니 3종류의 immobilized yeast 모두 bead의 直徑이 클수록 反比例하여 그 殘餘活性은 감소하였다. Bead의 직경이 1mm 정도에서 이들의 殘餘活性은 40~50% 정도였다.

3. Immobilized biocatalysts를 이용할 때 그 酵素의 活性에 영향을 주는 pH에 대한 안정성을 보기 위하여 여러 pH의 완충용액에 10시간씩 방치한 후 그 殘餘活性을 측정해 보았더니 magnetic immobilized yeast와 polyacrylamide immobilized yeast가 native yeast 보다 효소의 활성이 크게 안정되었다. Native yeast는 pH 7에서 높은 활성을 보인 반면 magnetic immobilized yeast는 pH 6~8에서 그리고 polyacrylamide immobilized yeast는 pH 5~8 사이에서 광범위하게 안정된 높은 잔여활성을 보여주었다.

4. Immobilized biocatalysts를 製造하여 長期間 反復하여 사용할 경우 효모의 열에 대한 安定性을 측정해 보았더니, magnetic immobilized yeast와 polyacrylamide immobilized yeast는 대조구보다 熱에 대한 安定性이 월등히 높았다. magnetic immobilized yeast와 polyacrylamide immobilized yeast는 모두 55℃에서 90% 이상의 높은 안정성을 보여주었고 대조구에서는 55℃에서 35% 정도밖에 殘餘活性이 없었다. 또 2종의 immobilized yeast간에 있어서는 뚜렷한 차이가 발견되지 않았다.

5. 금속이온이 효모의 알코올의 생산성에 미치는 영향을 보기 위하여 마그네슘을 native yeast와 immobilized yeast의 반응액을 첨가해 보았다. native yeast에서는 10^{-4}M의 마그네슘 용액에서부터 증가하여 10^{-2}M에서 최고치를 나타내었고 그 이상의 농도에서는 급격히 감소하였다. 그러나 2종류의 immobilized yeast 경우는 모두 뚜렷한 마그네슘의 효과를 인정할 수 없었으며 그 농도가 증가할수록 활성은 감소하는 경향이였다.

6. 금속이온이 효모의 알코올 발효시의 耐熱性

에 미치는 영향을 조사하기 위하여 native yeast의 반응액에 마그네슘과 코발트를 첨가하였다. 40℃에서 予熱處理할 경우 대조구보다 10^{-3}M의 마그네슘과 혹은 마그네슘 및 코발트의 혼용구에 있어서의 相對活性이 3배 가까이 높았고 이는 60℃에서의 처리까지 계속되었다. 코발트 단독 첨가구는 마그네슘 단독 첨가구보다 현저하게 활성이 낮았고 또 予熱溫度의 변화에는 별 영향이 없었다.

7. Immobilized yeast의 알코올 생산성에 있어 耐熱性에 미치는 금속이온의 영향을 조사하였다. Immobilized yeast와 polyacrylamide immobilized yeast에 10^{-3}M의 마그네슘과 코발트를 첨가하였더니 40℃에서 70℃까지의 予熱處理에 있어 耐熱性에 대한 相對活性은 거의 일정하였고 이들의 대조구와는 다소의 차이가 있었다. 또 대조구에 있어서는 60℃에 처리했을 때부터 그 활성은 급격히 감소하였다.

8. Immobilized biocatalysts를 장기간 반복해서 사용할 경우 immobilized yeast의 변화로 인한 활성의 저하의 원인을 찾기 위하여 실험을 하였다. 3종류의 immobilized yeast를 일정한 기간을 두고 活性化 시키기 전과 활성화 시킨 후에 있어서 이들로부터 단백질이 유출되는 양을 조사하였다. 모든 실험구에 있어서 활성화 시키기 전이 시킨 후보다 단백질의 유출이 많았다. 또 이들에 있어서 저장기간이 길어짐에 따라 단백질의 유출도 많은 것을 볼 수 있어서 효모의 활성저해와 일치되는 경향이었다. 특히 polyacrylamide immobilized yeast에서는 활성화 시키기 전에 다른 실험구보다 많은 유실이 계속되었고 또 활성화 시킨 후에는 도리어 그 유실이 적었다. 이는 고정화 방법에 중요한 차이로 볼 수 있다.

참 고 문 헌

1. Borchardt, J. A.: The utilization of immobilized microorganism in a waste water disposal plant, *Biotechn. Bioeng, Symp.*, **2**, 131~138, 1971.
2. Cysewski, G. R. and Wilke, C. R.: Studies on the process of continuous fermentation with immobilized biocatalysts, *Biotechn. Bioeng.*, **19**, 1125~1131, 1977.
3. 金成器 : 固定化 菌體를 利用한 連續 알코올 生産, 酒精工業, **10**, 33~38, 1980.
4. Witt, P. R., Sair, R. A., Richardson, T. and Olson, N. F.: Ethanol fermentation by means of immobilized biocatalysts, *Brewers Dig*, **10**, 70~76, 1970.
5. Morisi, F., Pastore, M. and Viglia, A.: Control of waste water of lactose plant by immobilized yeast, *J. Dairy Sci*, **56**, 1123~1130, 1973.
6. Touzi, A., Provis, J. P., Moulin, G., Deschamps, F. and Galzy, P.: Production of food yeast from starch waste, *Europ. J. Appl. Microbiol. Biotech.* **15**, 232~241, 1982.
7. 金成器 : Immobilized biocztzlysts를 利用한 環境性 廢棄物質 抑制에 관한 연구, 韓國環境衛生學會誌, **17**, 120~128, 1991.
8. 박웅렬 : 식품공장 폐수처리와 단백질 생산, 생물산업, **4**, 87~59, 1991.
9. Hulshoff, Pol. L. and Lettinga, G.: New technologies for anaerobic waste water treatment, *Water Sei. and Techn.*, **18**, 41~53, 1986.
10. Munro, P. A., Dumnill, P. and Lilly, M. O.: Studies in the magnetic immobilized biologically active entities, *Biotechn. Bioeng.*, **19**, 101~124, 1977.
11. Yamamoto, T., Sato, T., Tosa, T. and Chibata, I.: Preparation of immobilized biocatalysts by polyacrylamide, *Biotechn. Bioeng.*, **16**, 1589~1595, 1974.
12. Kim, S.: Studies on the immobilization of enzymes and microorganism, *Korea J. of Appl. Microbiol. and Bioeng.*, **7**, 1~8, 1979.
13. Lowry, O. H., Resebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the folin reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265~275, 1951.
14. Barker, S. A., Doss, S. H., Groy, Y. J. and Yeo, T. H.: The characteristics of immobilized enzyme in the process of ethanol fer-

mentation, *Carbohydrate Research,* **20**, 1~14, 1971.

15. Goldstein, L., Pecht, M., Blumberg, S. and Levin, Y.: The relation between mechanism and ethanol productivity of immobilized yeast *Biochemistry,* **9**, 2322~2331, 1970.
16. Lilly, M. D. and Dunnill, P.: The effects of metal ion on the thermal stability of immobilized yeast, *Process Biochem.*, **6**, 29~34, 1971.
17. Jayatissa, P. M. and Rose, A. M.: The effects of metal ion on the ethanol fermentation, *J. Gen. Microbiol,* **96**, 165~174, 1976.
18. Day, A. W. and Poon, N. H.: The mechanism of immobilization utilized yeast, *Can. J. Microbiol.* **21**, 558~564, 1975.
19. Rose, D.: The productivities of ethanol by continued fermentation of immobilized biocatalysts, *Process Biochem,* **11**, 10~18, 1976.