

## 돼지감자를 이용한 고농도 알코올발효 균주의 탐색

홍 연 · 최언호\*

서울여자대학교 식품과학과

### Screening and Identification of Wild Strains for the Production of High Concentration of Alcohol from Jerusalem artichoke Tubers

Hong, Yeun and Eon-Ho Choi\*

Department of Food Science, Seoul Woman's University, Seoul 139-744, Korea

**Abstract** — Yeast screening for effective production of alcohol from Jerusalem artichoke tubers as an alternative energy source was performed. Inulin assimilative strains with high alcohol tolerance were isolated from wild sources and cultured in the liquid media of Jerusalem artichoke powder varying its concentration from 15 to 30%. As a result, four strains of 2,445 isolates showing the inulin assimilation were selected as alcohol fermentative and alcohol tolerant yeasts. These strains were assigned to be *Kluyveromyces marxianus* F043 and *Kluyveromyces* sp. F173, E040, and F334, respectively, by their cultural and physiological characteristics. The F043 strain produced ethanol of 98.1 g/l in the 25% Jerusalem artichoke medium for 3 days.

바이오매스의 발효로부터 생산되는 알코올은 그 물리적, 연소적 특성이 석유와 비슷하여 대체에너지로 각광을 받고 있다(1). 돼지감자(*Jerusalem artichoke*: *Helianthus tuberosus* L)는 기후와 토양에 대한 적응력과 번식력 및 내병성, 내충성이 강하여 단위 면적 당 생산량이 높고(2) 탄수화물의 알코올 전환성이 80~90%에 이르므로 이에 대한 연구가 활발히 진행되어 왔다(3).

돼지감자의 구성당은 주로 이눌린인데 이것은 2~35개의 fructose가  $\beta(2\rightarrow1)$ 결합으로 연결된 fructan으로 돼지감자 고형성분의 약 80%를 차지한다(4). 이눌린을 원료로 한 알코올 발효방법은 돼지감자를 산이나 inulase 등의 가수분해 효소로 당화시킨 후 효모에 의하여 알코올 발효를 행하는 방법과 이눌린 분해력 및 알코올 발효능을 동시에 가지고 있는 효모를 이용하여 돼지감자를 직접 발효시키는 방법으로 대별할 수 있다(1). 당화공정이 필요없는 직접 발효법에서는 endo type inulase 활성이 높고 균체증식 속도 및 발효속도가 크며 알코올에 대한 내성이 비

교적 큰 균주가 요구된다. 돼지감자의 알코올발효 미생물로는 *Kluyveromyces fragilis*, *K. marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida kefyr* 등이 있는데 이중 *K. marxianus*가 발효속도 및 알코올수율 면에서 우수한 것으로 보고되고 있다(5).

효모에 의한 알코올 발효시 기질인 당의 농도를 높여 고농도로 알코올을 생산하게 되면 발효 및 증류공정에 소모되는 동력 에너지가 절감되고 발효과 정중 잡균의 증식이 억제된다. 그러나 고농도 배지에서는 가열증자로 점도가 높아져서 교반이 잘 안되며 고농도의 알코올로 효모의 생육이 저해받게 된다. 이를 해결하기 위해서는 다당류를 산(6)이나 효소(7)로 분해시켜야 되고 또 산처리 하였을 때는 산과 당이 반응하여 생성된 furfural 유도체가 균의 생육을 억제한다고 보고되고 있다(8).

본 연구의 목적은 국내에서 생산된 돼지감자에서 직접 고농도의 알코올을 생산하는 알코올 내성 균주를 야생으로부터 분리하는데 있다. 지금까지 돼지감자의 알코올 발효 연구는 생감자나 줄기의 마쇄액 또는 이들의 착즙액으로 수행되었다. 그런데 수확된 돼지감자는 저장성이 없고 생돼지감자의 고농도 발효는 한계가 있으므로 본 연구에서는 건조분말을 이용하였다.

**Key words:** Alcohol fermentation, yeast screening, Jerusalem artichoke, alternative energy, high concentration culture

\*Corresponding author

## 재료 및 방법

### 원료와 전처리

경기도 양주군에서 수확한 야생 돼지감자를 얇게(약 1 mm) 절간한 후 24시간 풍건하고 50°C 에서 열풍건 조하여 분말화하였다. 이를 냉동고(-20°C)에 보관하고 균주 선발 및 알코올 발효의 원료로 사용하였다.

### 배지

균주배양용으로 YPD 액체배지(1l 수용액 중 yeast extract 10 g, peptone 20 g, dextrose 20 g, pH 5.5), 균주 선발용으로 이눌린배지(1l 수용액 중 inulin 20 g, yeast extract 5 g, pH 5.8)를 사용하였다. 돼지감자 배지는 증류수에 돼지감자 가루를 15~30% 되게 첨가하여 조제하였다.

### 야생균주의 선발

**균주의 분리**: 서울여자대학 교내의 습기가 많은 지역의 토양과 두엄, 돼지감자에 묻은 토양, 썩은 돼지감자 등을 분리원으로 사용하였다. 시료 0.5 g을 tetracycline(100 ppm)과 sodium propionate(0.3%)가 첨가된 이눌린 액체배지에 넣고 30°C 에서 24시간 진탕 배양한 후 tetracycline과 sodium propionate가 첨가된 이눌린 평판배지에서 2일간 배양하여 나타난 집락을 tetracycline과 sodium propionate가 첨가된 YPD 평판배지에 옮겨 30°C 에서 2일간 배양하였다. 순수분리된 집락을 4°C 에 보관하였다.

**이눌린 자화, 발효능 조사**: 순수분리된 야생균주들을 YPD 액체배지에 접종하여 30°C 에서 24시간 진탕배양(100 rpm)하였다. 이 배양액을 세척, 원심분리(3,000×g)하여 Durham 관이 들어 있는 이눌린 액체배지에 접종한 후 30°C 에서 4일간 정치배양하면서 24시간 간격으로 Durham 관 내의 기포 생성을 관찰하였고, 배양 4일째에는 배양액의 흡광도를 spectrophotometer로 660 nm에서 측정하였다.

**알코올 내성균주의 선발**: 위에서 이눌린을 자화하고 가스를 발생하는 야생균주들을 YPD 액체배지에 접종하여 30°C 에서 24시간 진탕배양한 후, 0.1 ml를 10%(v/v)의 농도로 ethanol이 첨가된 YPD 액체배지 5 ml에 접종하고 30°C 에서 2일간 진탕배양하였다. 배양액의 흡광도가 0.100 이상인 균주들을 2, 3차 선발하고 다시 0.170 이상인 균주를 선발하여 10%의 ethanol에 대한 내성균주로 선정하였다. 이들 균주를 다시 12, 14, 16%로 ethanol 농도를 높인 YPD 액체배지에서 위와 동일한 방법으로 배양하고 흡광도를 측정하였다.

**알코올 발효균주의 선발**: 이눌린 발효능이 우수하고 ethanol을 첨가한 배지에서 내성이 좋은 야생균주들을 YPD 액체배지에 접종하여 30°C 에서 24시간 배양하였다. 500 ml 삼각 플라스크에 돼지감자배지(돼지감자 분말 15, 20, 25, 30%(w/v)) 100 ml를 넣고 이에 위의 전배양액(preculture)을 10%(v/v) 접종하고 30°C 에서 처음 24시간은 진탕배양하고 그후 48시간은 정치배양하여 알코올 발효능을 조사하였다.

### 균주의 동정

위에서 선발된 알코올 내성 및 알코올 발효능이 우수한 균주들을 Barnette 등(9)의 검색표에 의하여 동정하였다.

### 원료와 발효액의 성분분석

원료의 수분은 분말시료 5 g을 평취하여 105°C 에서 상압건조법으로 정량하였고, 환원당은 시료 1 g을 취하여, 총당질은 시료 10 g을 25% HCl 15 ml로 가수분해시킨 후 Somogyi 방법으로 정량하였다. 알코올은 발효액 100 ml를 단순 증류시켜 Gay-Lussac meter에 의하여 정량하였다.

## 결과 및 고찰

### 야생균주의 선발

**균주의 분리**: 이눌린을 이용하는 효모를 분리하기 위하여 파리(A), 두엄(B), 썩은 돼지감자(D, F), 돼지감자에 묻은 흙(E) 등 여러 시료로부터 총 2,445개의 이눌린 자화성 집락을 분리하였다.

**알코올 내성균주의 선발**: 이눌린 배지에서 야생균주들의 기포생성능과 생육도가 높으면 알코올 발효능도 우수할 것으로 보고 분리된 집락 2,445개 중 기포를 잘 생성하고 배양액의 흡광도가 0.4 이상인 122개의 균주들을 1차적으로 선발하고 이들을 10%(v/v)의 ethanol이 첨가된 YPD 액체배지에서 배양하여 생육도를 측정하였다. 균주의 생육도 측정결과 0.100 이상의 흡광도를 나타낸 집락들로서 2차, 3차 선발을 거쳐 10개의 집락을 10%의 ethanol에 대한 상대적인 내성균주로 선발하였다. 이들이 10% 이상의 ethanol에서도 높은 생육도를 나타내는지를 알아보기 위하여 Table 1에서처럼 에탄올 농도를 16%까지 높였을 때의 흡광도를 측정하였다. 이때 3개의 분리균주가 16% 에탄올 농도에서 0.3 이상의 흡광도를 보였으며 F173이 그 중 가장 높은 흡광도를 보여 알코올 내성이 강한 균주로 선정하였다.

**알코올 발효균주의 선발**: 에탄올에 내성이 있는

**Table 1. Growth of alcohol tolerant strains selected from wild strains in YPD broth with high ethanol concentration**

Code No. of strains	Cell growth (O.D. at 660)				
	Initial ethanol concentrations (% v/v)				
	0	10	12	14	16
C177*	1.338	0.597	0.489	0.392	0.342
D044	1.412	0.229	0.215	0.213	0.201
E034	1.554	0.405	0.352	0.287	0.223
E040	1.558	0.415	0.337	0.291	0.232
F043	1.624	0.406	0.256	0.230	0.198
F049	1.790	0.500	0.460	0.371	0.312
F173	1.424	0.660	0.559	0.505	0.421
F334	1.440	0.351	0.319	0.291	0.193
F335	1.604	0.484	0.432	0.361	0.292
F346	1.370	0.310	0.268	0.223	0.215
F348	1.672	0.350	0.368	0.248	0.209

\**Saccharomyces cerevisiae* U.C.Davis C177

균주들의 돼지감자 배지에서의 알코올 생성능을 조사하고자 15~30%로 농도를 조절하여 알코올 발효를 시킨 결과는 Table 2와 같다. 이때 균주는 10%의 에탄올을 첨가한 배지에서 잘 생육하는 균주 10개를 사용, 비교하였다. 본 실험에 사용한 돼지감자 분말은 수분이 10%, 당질이 80% 함유되어 있으므로 알코올로의 전환 이론치는 25% 배지의 경우 102.2 g/l가 된다. 10개의 균주 중 E040, F043, F334가 발효능이 좋은 것으로 나타났다. 이때 배지의 농도에 따른 균주들의 알코올 생성량은 배지 농도가 높아짐에 따라 증가하며 25% 배지에서는 발효액 1l 당 최고 98.1 g/l (이론치의 96%)의 알코올 농도를 보였으나 30% 배지에서는 오히려 감소하여 최고 생성량이 104.7 g/l (이론치의 85.5%)의 상대적으로 낮은 에탄올 생산능을 나타내었다. 이는 효모가 배지중의 알코올 농도가 높아짐에 따라 대사작용이 억제되거나 고농도 기질의 삼투압을 견디지 못함으로써 알코올 생성에 저해를 받는다고 생각할 수 있다.

배지 중의 알코올 농도가 높아지면 세포막은 아미노산, 단백질 등 260 nm에서 흡수대를 보이는 물질들이 손상을 받아 세포막 투과성이 현저히 감소하게 되며 삼투압 차이로 인한 탈수, alcohol dehydrogenase 같은 효소의 억제와 세포내 조성물의 파괴로 인한 사멸이 증가되는 결과를 보인다(10). 또한 세포내 알코올은 adenosine triphosphatase 및 불포화지방산 합성에 관여하는 효소 등 membrane enzyme의 작용을 억제한다고 보고된 바 있다(11). 그러므로 고농도 기질에서 알코올 발효를 수행하려면 사용하는 효모의

**Table 2. Ethanol production of selected wild strains in Jerusalem artichoke medium for 72 hrs at 30°C**

Code No. of strains	Ethanol production (g/l)			
	Concentration of J. artichoke powder in medium (% w/v)			
	15	20	25	30
C177*	42.5	53.6	61.6	86.9
D044	51.5	70.2	83.5	91.9
E034	56.5	73.7	92.4	93.5
E040	56.5	77.3	97.5	91.4
F043	56.4	75.2	98.1	103.4
F049	51.5	70.2	87.6	104.7
F173	51.7	71.6	79.5	97.9
F334	52.9	74.7	93.9	97.9
F335	53.1	74.8	87.8	95.1
F346	57.0	75.6	90.1	92.4
F348	46.5	72.5	85.0	93.5
Theoretical value	61.2	81.6	102.2	122.4

\**Saccharomyces cerevisiae* U.C.Davis C177

알코올 내성이 개선되어야 할 것이다. Kim 등(12)은 효모의 알코올 내성을 증가시키기 위한 발효조건을 검토한 바 불포화지방산을 첨가했을 때 효모의 알코올에 대한 내성이 증가되었다고 보고하였다. 또한 알코올 발효배지중 당의 농도를 높임에 따라 균의 생육은 저해받게 되므로 삼투압이 높은 고농도의 배지에서 생육, 발효할 수 있는 효모를 찾는 것이 중요하다. 기질 농도가 높아짐에 따라 효모 생육이 억제되는 이유는 일반적으로 cell maintenance를 위해 요구되는 에너지와 삼투압 증가에 따른 세포막 투과성, 균주활성의 변화 때문으로 보고 있다(13, 14).

Table 2의 결과로 볼 때 각 균주별로 알코올 생성량이 높게 나타나는 적합한 농도가 있으나 F043이 4가지 농도의 돼지감자 배지에서 비교적 많은 양의 알코올을 생성한다고 판단되었다. F043은 25% 배지에서는 발효액 1l 당 98.1 g/l(이론치의 96.0%), 30% 배지에서는 103.4 g/l(이론치의 84.5%)의 알코올을 생성하였으며 가장 강한 알코올 내성을 보인 F173은 이론적인 에탄올생성량에 대해 평균 82.5%의 낮은 알코올수율을 나타냄으로써 알코올에 대한 내성과 돼지감자 배지중에서의 알코올 생성능은 서로 일치하지 않음을 알 수 있었다. 일반적으로 돼지감자를 이용한 알코올 발효균주로는 *Kluyveromyces* 속을 들 수 있는데 유 등(2)은 돼지감자를 이용한 알코올 생산균주 선발 실험에서 *S. cerevisiae*보다는 *K. fragilis*가

Table 3. Characteristics of wild isolates

	Isolated strains			
	E040	F043	F173	F334
Carbon sources assimilation				
Glucose	++	++	+	++
Glycerol	++	++	+	++
2-keto-D-gluconate	-	-	-	-
L-arabinose	-	-	-	+
Xylitol	++	++	++	++
Galactose	++	++	++	++
$\alpha$ -methyl-D-glucoside	-	-	-	-
N-acetyl-D-Glucosamine	-	-	-	-
Mannitol	++	++	++	++
Rhamnose	-	-	-	-
Cellobiose	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	+
Maltose	-	-	-	+
Sucrose	++	++	+	++
Trehalose	-	-	++	++
Melezitose	-	-	-	+
Raffinose	+	-	-	++
Arabinose	++	++	++	++
Inositol	-	-	-	-
Sorbitol	++	++	++	++
Rhamnose	-	-	-	-
Arabinose	-	-	-	-
Nitrogen sources assimilation				
Nitrate	-	-	-	-
Nitrite	-	-	-	-
Ethylamine	+	+	+	+
L-lysine	+	+	+	+
Cadaverine	+	+	+	+
Creatinine	-	-	-	-
Sugar fermentation				
D-glucose	++++	++++	++++	++++
D-galactose	++, D	++, D	++, D	++, D
Maltose	-	-	-	-
Me- $\alpha$ -D-Glucoside	-	-	++	-
Sucrose	++++	++++	++++	++++
$\alpha$ , $\alpha$ -trehalose	+	+	+	+
Melibiose	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-
Cellobiose	-	-	-	-
Melezitose	-	+	-	-
Raffinose	++	++	+	+
Inulin	++++	++++	++++	++++

++++: strongly fermented, +: weakly fermented, -: not fermented, D: delayed

**Table 4. Some physiological characteristics of wild isolates**

	Isolated strains			
	E040	F043	F173	F334
Growth in media:				
with 0.01% cycloheximide	+	+	+	+
with 0.1% cycloheximide	+	+	+	+
with 50% glucose	+	+	+	+
with 60% glucose	-	-	+	-
with vitamin free w/o myo-inositol	-	-	-	-
w/o pantothenate	+	+	+	+
w/o biotin	+	+	+	+
w/o thiamin	+	+	+	+
w/o biotin and thiamin	+	+	+	+
w/o pyridoxine	+	+	+	+
w/o niacin	-	-	+	-
w/o folic acid	+	+	+	+
w/o PABA	+	+	+	+
Urease activity	-	-	-	-
Acid production	±	±	±	±

+: positive, -: negative, ±: slightly positive

균체 수득률은 적으나 단시간내에 높은 농도의 알코올을 생성하였다고 보고하였다.

### 분리균주의 동정

알코올 발효균주로 선발된 F043과 알코올 내성이 가장 좋았던 F173, 그리고 비교적 알코올 발효능이 우수했던 E040, F334를 함께 동정한 결과 세포의 모양은 계란형이었고 모두 다극성 출아법에 의하여 번식하고 potato-dextrose agar에서 의균사(pseudomycelium)를 형성하였으며 sporulation 배지에서 자낭포자를 형성하는 형태학적 특성을 나타냈다. 배양학적 특성을 보면 모든 균주들이 흰색에 가까운 크림색의 colony를 형성하였고 표면은 광택이 없는 특징이 동일하게 나타났다.

탄소원과 질소원에 대한 자화능과 당발효성(Table 3), 생리적 특성(Table 4)을 조사한 결과 네 균주가 모두 inulin을 발효시켰고 F043의 경우는 다른 균주들과는 달리 melezitose를 발효하였으며 F334는 다른 균주들과 비교했을 때 L-arabinose와 lactose, maltose, raffinose, trehalose 등을 자화하였고 E040은

raffinose를 자화하였으며 알코올에 강한 내성을 보였던 F173은 trehalose를 자화하였고 Me- $\alpha$ -D-glucoside를 발효하였다. 50% glucose를 함유한 YPD 배지에서는 네 균주 모두 생육하였으며 60% glucose 배지에서는 F173 균주만이 생육하였다. 그리고 0.01%와 0.1% cycloheximide 첨가에 의해 생육이 저하되지 않았으며 urease 생성능이 없었다. 4개 균주의 특성은 서로 미미한 차이를 보였으며 F043 이외의 균주들은 *Kluyveromyces marxianus*의 특성과는 약간씩 다른 결과를 보였으므로 F043은 *Kluyveromyces marxianus*로, F173, E040, F334 균주들은 *Kluyveromyces* sp.로 동정되어 이들을 각각 *Kluyveromyces marxianus* F043, *Kluyveromyces* sp. F173, E040, F334로 명명하였다.

### 요 약

돼지감자로부터 대체에너지용 알코올을 효율적으로 생산하기 위한 고농도 알코올 발효균주의 탐색연구가 수행되었다. 야생으로부터 2,445개의 이눌린 자화균주를 분리하고 이들의 알코올 내성 및 15~30%의 돼지감자 배지에서 알코올발효를 수행한 결과 F043, F173, E040, F334의 네 균주가 고농도 에탄올 첨가에 내성이 있으면서 고농도 돼지감자 배지에서 알코올 발효능이 좋은 균주들로 선발되었으며 그 중 F043 균주는 25% 배지에서 98.1 g/l의 알코올을 생성하였다. 이들의 배양 및 생리특성을 조사한 결과 F043은 *Kluyveromyces marxianus*로, F173, E040, F334는 *Kluyveromyces* sp.로 동정되었다.

### 감사의 글

본 연구는 동력자원부 대체에너지 기술개발사업 연구비의 지원으로 수행된 결과의 일부임을 밝히며 이에 감사를 드립니다.

### 참고문헌

- Hur, B.K., J.S. Yu, and J.W. Yang. 1989. Ethanol fermentation by *K. fragilis* from Jerusalem artichoke. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* 4: 50-58.
- Ryu, Y.W., C.H. Kim, and S.I. Kim. 1983. Selection of yeast strains for alcohol production from Jerusalem artichoke tubers(*Helianthus tuberosus* L.). *J. Kor. Agric. Chem. Soc.* 26: 119-124.
- Duvnjak, Z., N. Kosaric, and R.D. Hayes. 1981. Kinetics of ethanol production from Jerusalem artichoke juice with some *Kluyveromyces* species.

- Biotechnol. Lett.* **3**: 589-594.
4. Ryu, Y.W., C.H. Kim, and S.I. Kim. 1984. Ethanol production from *Jerusalem artichoke* tubers (*Helianthus tuberosus* L) by *Kluyveromyces fragilis*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **12**: 51-55.
  5. Kim, J.H., B.K. Hur, C.S. Bae, and H.S. Kim. 1990. Ethanol fermentation characteristics of *K. marxianus* on *Jerusalem artichoke* tuber extract. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **5**: 75-80.
  6. Kim, K. and M.K. Hamdy. 1986. Acid hydrolyses of *Jerusalem artichoke* for ethanol fermentation. *Biotechnol. and Bioeng.* **28**: 138-141.
  7. Chua, J.W., N. Fukui, Y. Wakabayashi, T. Yoshida, and H. Taguchi. 1984. Enzymatic hydrolysis of sweet potato for energy saving production of ethanol. *J. Ferment. Technol.* **62**: 123-130.
  8. Toran-diaz, J., V.K. Jain, J.J. Allais, and J. Baratti. 1985. Effect of acid or enzymatic hydrolysis on ethanol production by *Zymomonas mobilis* growing on *Jerusalem Artichoke* juice. *Biotechnol. Lett.* **7**: 527-530.
  9. Barnette, J.A., R.W. Payne, and D. Yarrow. 1983. *Yeast*. Cambridge Univ. Press, London.
  10. Salgueiro, S.P., I. Sa-Correia, and J.M. Novais. 1988. Ethanol induced leakage in *S. cerevisiae* - Kinetics and relationship to yeast ethanol tolerance and alcohol fermentation productivity. *Appl. and Environ. Microbiol.* **54**: 903-909.
  11. Kim, H.J. and Y.W. Ryu. 1989. The conditions affecting ethanol tolerance of yeast strains in alcohol fermentation - Study on the fermentation temperature and substrate type. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **4**: 167-171.
  12. Kim, H.J., H.W. Jang, and Y.W. Ryu. 1989. The conditions affecting ethanol tolerance of yeast strains in alcohol fermentation - Study on the aeration and lipid Addition. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **4**: 172-176.
  13. Stouthamer, A.H. and C. Betlenhausen. 1973. Utilization of energy for growth and maintenance of continuous and batch cultures of microorganisms. *Biochim. Biophys. Acta.* **301**: 53-70.
  14. Edwards, H.V. 1970. The influence of high substrate concentration on microbial kinetics. *Biotechnol. Bioeng.* **12**: 679-712.

(Received December 11, 1993)