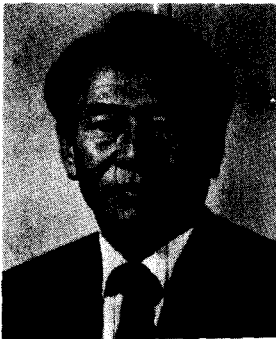


유전공학을 이용한 Alcohol 제조기술

-Amylase
분비성 Alcohol
발효효모의 개발-



서 정 훈
(경북대학교 자연과학대학 미생물학과)

I. 서 론

미생물공업 분야에 있어서 Alcohol 발효공업은 가장 오랜 역사를 지닌 분야인 동시에 종전의 방법에 있어서는 그 기술적 수준이 한계에 도달해 있다고 말할 수 있다. 따라서 생산비용의 절감이 요구되는 현재, 종전의 방법에 입각한 원료이용율의 향상, Energy의 효율적 관리 등의 방법으로는 더이상 생산 cost를 절감하기 어려운 실정이므로, 기존의 발효방법의 개선은 필연적이라고 할 수 있다. 실제로 Alcohol공업의 경우, 원료로서 직접 환원당을 사용할 경우에는 그 발효공정이 단순함과 동시에 원료사용량도 비교적 적어 별다른 문제가 없으나 직접환원당 대신 전분질 원료를 Alcohol 발효공업의 기질로 사용할 경우에는 여러가지 문제점으로 인하여 기존의 발효방법 대신 새로운 발효방법이 요구된다. 오늘날 이러한 제반 문제를 해결하기 위한 여러 방면의 연구가 활발히 시도되고 있으며 그중 현재까지 가장 많은 주목을 끌고 있는 분야는 바로 무증자 발효방법으로 이는 전분의 호화, 액화 및 살균공정을 필요치 않는 발효방법으로 일부 국가에서는 이 방법의 전면적 적용이 검토되고 있다고 한다. 그러나 이 방법은 생전분을 당화하는 Enzyme의 자가생산이라는 문제가 있어 국내에서는 아직 채택되지 않고 있는 실정이다. 그래서 본인 등은, 현재 전분액화용으로 Bacterial α -amylase가 비교적 싼 가격으로 시판되고 있다는 점을 감안하여 Alcohol 발효성 효모인 *Saccharomyces cerevisiae*계 Yeast에 당화효소인 Glucoamylase의 형질을 도입한 새로운 Alcohol 발효 효모를 개발하고자 하였으며 현재까지의 연구의 진행중 비교적 좋은 결과를 얻었기에 이에 대한 방법과 성적을 본보에 요약하고자 한다.

■ 목 차 ■

- I. 서 론
- II. 연구의 진행개요
- III. Jar-Fermentor를 이용한 발효실험
- IV. Pilot Plant Scale Fermentation
- V. 고 찰
- VI. 결 론

II. 연구의 진행 개요

본 연구의 일차적 목적이 Alcohol 발효력이 강한 *S. cerevisiae*에 Glucoamylase gene을 도입한 후 이 Gene을 효율적으로 발현시키는 것이다. 이러한 연구목적에 응용이 가능한 기존의 방법으로는 크게 두가지 방법이 있다. 그 첫째의 방법으로는 *E. coli-S. cerevisiae*의 Shuttle vector에 목적하는 유전자를 Cloning하여 *E. coli*에서 증폭시킨 후 이 Hybrid DNA를 Yeast에 Transformation시켜 발현시키는 방법이며, 두번째의 방법으로는 발효성 효모와 당화성 효소를 분비하는 미생물을 Protoplast fusion (세포융합)시키는 방법이라고 할 수 있다. 그러나 실제에 있어 첫번째 방법으로 YR_p 7과 YE_p 13 vector에 *Bacillus amyloliquefaciens*의 Amylase gene을 Cloning하여 Yeast에 Transformation시켜보았으나 예상된 여러가지 이유로 인하여 목적하는 유전자의 Yeast내에서의 발현이 매우 약하여 그 실용화에는 많은 어려움이 있다고 판정되었기에 새로운 방법을 모색하였다. 그 방법은 본 연구를 수행하는 과정에서 개발된 것으로, Alcohol 발효력이 약하고 악취의 생성이 심하여 실용화할 수는 없으나 Glucoamylase를 강하게 분비하는 *Saccharomyces diastaticus*의 Chromosomal DNA를 Rodriguez, Miura 등의 방법으로 추출하여 제한효소 Bam HI으로 부분분해한 후 여기서 얻은 DNA 단편들을 *S. cerevisiae*에 직접 Transformation하여 Amylase를 분비하는 Colony를 선별하고 이들 균주중 1) Alcohol 발효력이 강하고 2) 유전안정성이 우수하며 3) Amylase 생성력이 강한 균주를 최종적으로 선별하여 그 균주를 TSD-14로 명명하였다. 이 TSD-14균주는 액화전분으로부터 약 70%정도의 발효율을 나타

내었으나 이는 실용화 수준에는 미흡하였으므로 그 원인을 조사한 결과 Glucoamylase gene donor인 *S. diastaticus*의 Glucoamylase는 전분분자내의 α -1,4 linkage를 분해하는 활성은 비교적 강하나 전분의 Amylopectin chain의 시발점인 α -1,6 linkage의 분해활성이 매우 약하다는 것을 알게되어 이점을 보완하기 위하여 α -1,6 glucosidase activity가 강한 *Candida tropicalis*와 Cell fusion시켜 얻어진 융합체를 목적에 따라 선별하여 최종적으로 FSC-14-75균주를 얻었다. 이 균주는 1) Alcohol 발효력 2) 유전안정성 3) 최종발효율 4) 생육도 등이 우수하여 실용화의 가능성이 있다고 판정되기에 이 균주를 사용하여 1) Flask에 의한 발효실험 2) Mini-jar fermentor scale (2.5 liter) 발효실험 3) Pilot plant scale 발효실험을 마쳤으며 그 결과를 본보에 기술하고자 한다.

III. Jar-Fermentor를 이용한 발효실험

이 실험에서는 alcohol 발효기질용 전분의 종류로써 potato starch, sweet potato starch, Tapioca, 쌀보리 그리고 절간고구마 등을 대상으로 하였으며 균주의 실용화를 위하여 발효조건은 가능한한 공장에서의 조건과 같이 하였다.

단 기질로써 정제된 potato starch나 sweet potato starch를 사용하였을 경우 이들 원료에는 유기 N원 전혀 없으므로 amylase 생성력이 매우 낮았으므로 부득히 고가의 yeast extract를 소량 첨가하였다. 그러나 Tapioca 절간고구마, 쌀보리 등의 천연 원료를 사용할 경우에는 yeast extract의 첨가는 불필요하였다.

(1) 재료 및 방법

1. 사용균주

본 실험에 사용한 균주는 앞에서 기술한 바와 같이 *S. cerevisiae*에 *S. diastaticus*의 amylase gene을 직접 transformation시켜 얻은 *S. cerevisiae* amylase 분비균인 TSD-14와 α 1, 6-amylglucosidase 분비균인 *C. tropicalis*를 protoplast fusion시킨 FSC-14-75 균주를 사용하였다.

2. Alcohol의 분석

발효과정이나 최종발효액 250ml를 취하여 방법에 따라 alcohol을 증류하였다. 증류는 210ml~220ml로 하여 물을 가하여 250ml로 하여 alcohol비중계로 alcohol을 측정 한 후 온도를 환산하여 v/v%로 표시하였다.

3. 원료전분

Jar-fermentor test에 사용한 원료전분은

- 1) 일본 Junsei 회사의 potato starch, sweet potato starch
- 2) Tapioca의 경우 P회사에서 입수한 것을 40mesh로 분쇄하여 사용하였으며
- 3) 절간고구마 역시 40mesh로 분쇄한 P회사의 것을
- 4) 쌀보리는 P회사에서 alcohol 발효원료로 사용하는 것을 입수하여 사용하였다.

4. Mini-jar Fermentor

본 실험에 사용한 Mini-jar fermentor는 Tokyo Rikakikai 회사의 3liter 용량으로 발효액 용량은 2.5liter였다.

5. pH 조절

발효중 pH의 조절이 필요할 경우에는 8시간 간격으로, 10N NaOH를 이용하여 무균적

으로 행하였다.

6. 발효방법

수분환산한 전분을 일정량의 α -amylase로 액화한 후 필요한 영양분을 첨가하고 jar fermentor에 2,500 ml씩 분주하여 121°C에서 60분간 살균한 후 30°C로 냉각하여 종균을 접종하여 교반속도 300~500rpm, aeration 0.6v/v/min으로 6시간, 발효온도 30°C로 발효하였다.

7. 종균접종량

Jar fermentor에 의한 alcohol 발효 실험에서의 종균접종량은 1%로 하였다.

8. α -Amylase

본 실험에 사용한 α -amylase는 Novo Co. Thermamyl로 starch를 액화한 후 측정 한 직접 환원당은 glucose로 환산하여 0.6%의 수준이었다.

9. 잔당분석

발효액중의 잔당분석은 먼저 발효액을 HCl로 산가수분해하고 Somogyi-Nelson 법으로 환원당을 정량하는 방법을 사용하였다.

10. 시 약

특별히 명시치 않은 시약은 1급품으로 사용하였다.

(2) 결 과

1. Potato starch를 이용한 alcohol 발효

1.1 Alcohol 발효에 미치는 pH의 영향

본 연구에서 개발한 FSC-14-75균주의 α 1, 4-glucosidase gene은 *S. diastaticus* 유래의

것으로 이 α 1,4-glucosidase의 최적 pH는 5.0-5.5이므로 발효시의 pH를 enzyme의 최적 pH인 5.5로 조절하였다. 또 일반적으로 yeast에 의한 alcohol발효 pH는 4내외이므로 control로써 pH4.2를 택하여 양 pH간의 발효성을 조사하였다. 이 실험에서는 기질로써 20%

potato 전분을 액화하고 필요한 영양물질을 첨가하여 살균하고 30°C에서 발효시켰다. 그 결과 Table 1에서 보는 바와 같이 pH5.5에 비해서 pH4.2가 보다 나은 성적을 나타내었는데 이는 amylase생성에 있어서의 pH의 차이로 해석된다.

Table 1. The effect of pH on alcohol productivity of fusant FSC-14-75

Ferment. pH	Net % of starch*	Nitrogen source	Alcohol productivity (v/v%)			
			4day	6day	8day	10day
4.2	Potato 20%	(NH ₄) ₂ SO ₄ 0.3% yeast extract	9.6	10.6	11.3	11.3
5.5	Potato 20%	(NH ₄) ₂ SO ₄ 0.3% yeast extract	9.4	10.0	10.8	10.9

* Starch was preliquefied with 0.05% of α -amylase

1.2 발효에 미치는 yeast extract의 영향

*S. cerevisiae*는 vitamine 첨가에 의해 alcohol 생성활성이 증가한다는 사실이 이미 오래 전부터 알려져 있으므로 본 실험에서도 이 점을 감안하여 yeast extract의 첨가효과를 조사하였다. Yeast extract의 사용량은 0.2%로

하였으며 원료 starch의 전처리, seeding 등은 전술한 방법에 준하였고 pH는 4.2 온도는 30°C로 하였다. Table 2에서 보는 바와 같이 FSC-14-75는 yeast extract의 영향을 많이 받는 것으로 나타났는데 이는 yeast extract가 enzyme 생성에 관여하는 것으로 추측된다.

Table 2. Effect of yeast extract on alcohol production

	Nitrogen Source	Net % of Starch*	Alcohol productivity (v/v%)			
			4day	6day	8day	10day
FSC-14-75	(NH ₄) ₂ SO ₄ 0.3%	Potato 20%	4.8	7.1	9.8	10.3
FSC-14-75	Yeast ext. 0.2% (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.3%	Potato 20%	7.3	9.6	9.9	10.1

* Starch was preliquefied with 0.8% of α -amylase.
The pH was adjusted to 4.2

1.3 15% Potato starch를 기질로 한 alcohol 발효

본 연구의 최종목적이 공업적으로 이용이 가능한 alcohol발효균주의 개발에 있으므로 본 실험에서는 실제 공장에서 적용하고 있는 조

건인 15%의 potato starch를 기질로 하여 alcohol발효 실험을 하였다. 실험방법은 전술한 방법에 따라 적량의 amylase로 액화한 기질에 필요한 nutrients를 첨가, 살균하고 seeding volume 1%의 종균 FSC-14-75를 접종하고,

30°C, pH 4.2로 발효시켰다.

Table 3. Alcohol productivity on 15% of potato starch

Strain	Net % of Starch*	Nitrogen Source	Alcohol productivity (v/v%)			
			4day	6day	8day	10day
FSC-14-75	Potato 15%	(NH ₄) ₂ SO ₄ 0.3%	5.8	7.5	8.1	8.3
FSC-14-75	"	Yeast ext. 0.2% (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.3%	8.2	8.2	8.2	-

*The starch was preliquefied with 0.8% of α -amylase.
The pH was adjusted to 4.2.

1.4 20% Potato starch를 기질로 한 alcohol 발효

일반적으로 alcohol 공업에서 전분질을 기질로 할 경우에는 15%내외가 기준으로 되어 있으나 본 실험에서는 amylase 분비 yeast의 개발이라는 목적하에 기질농도를 다양하게 실험해 보았다. 그리고 yeast의 N원으로 (NH₄)₂

SO₄를 단일 N원으로 한 경우와 yeast extract를 첨가한 효과, 발효 pH를 4.2와 5.5로 바꾸어 실험해 보았다.

원료 전분은 potato starch의 경우 0.8%의 α -amylase로 액화 후 1% seeding, 30°C의 조건으로 발효시켰다 (Table 4).

Table 4. Alcohol productivity on 20%* of potato starch

Strain	α -amylase %	Nitrogen Source	Alcohol productivity (v/v%)			
			4day	6day	8day	10day
FSC-14-75	0.05	Yeast ext. 0.2% (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.3%	9.6	10.6	11.3	11.3
FSC-14-75**	0.05	"	9.4	10.0	10.8	10.9
FSC-14-75	0.8	(NH ₄) ₂ SO ₄ 0.3%	4.8	7.1	9.8	10.3

* The percentage (%) was net concentration of starch.

**In this case, the fermentation pH was adjusted to 5.5.
The other case, the fermentation pH was adjusted to 4.2.

1.5 25% potato starch를 기질로 한 alcohol 발효

기존의 alcohol 발효공업에 있어서는 가능한 고농도의 기질을 사용하는 것이 경제적으로 유리하다. 그 이유는 살균, 배양, 증류에 필요한 energy의 소비를 절감할 수 있음과 동시에 인력의 소모 또한 줄일 수 있기 때문이다. 현

재 우리나라에서는 여러가지 요인으로 15% 정도의 기질을 사용하고 있으나 앞으로는 차차 고농도의 기질을 사용하는 방법을 개발해야 할 것으로 생각된다. 따라서 본 연구에서도 25% 정도의 고농도 기질을 사용하여 개발된 효모의 발효실험을 행하였다.

Table 5. Alcohol productivity on 25% of potato starch

Strain	Net % of Starch*	Nitrogen Source	Alcohol productivity (v/v%)			
			4day	6day	8day	10day
FSC-14-75	Potato 25%	Yeast ext. 0.2% (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.3%	-	12.0	13.3	13.7

*The starch was preliquefied with 0.8% of α -amylase.
The fermentation pH was adjusted to 4.2.

1.6 Seed volume의 영향

Alcohol공업에 있어서는 밀폐식 tank에 의한 발효라 할지라도 발효일수의 단축 및 잡균의 오염배제 등의 이유로 종균의 접종량을 10% 정도로 하고 있다. 본 실험에서는 amylase 분비효모를 사용하는 관계상 amylase productivity와 분비가 yeast age에 크게 좌우되리

라고 추측됨으로 seed volume을 1%와 10%로 비교하여 보았다. 기질은 potato starch 25%를 사용하였으며 pH 4.2, 발효온도 30°C, amylase사용량 0.8%였다. Table 5에서 보는 바와 같이 seed volume이 높으면 alcohol의 생성량이 높고 동시에 발효기간이 단축됨을 알았다.

Table 6. Effect of seed volume on alcohol productivity of FSC-14-75

Seed volume	Net % of starch*	Nitrogen source	Alcohol productivity (v/v%)				
			2day	4day	6day	8day	10day
10%	20% potato	Yeast ext. 0.2% (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.3%	6.6	11.6	11.0	11.3	10.9
1%	20% potato	Yeast ext. 0.2% (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.3%	-	-	10.5	10.3	10.6

*The starch was preliquefied with 0.8% of α -amylase.
The pH was adjusted to 4.2.

2. Cassava starch를 이용한 alcohol 발효

본 연구에서 개발한 FSC-14-75균주의 개발 목적은 alcohol공업에의 직접 이용에 그 목적을 두고 있으나 연구의 진행에는 potato starch를 기질로 하여 기초실험을 행하였다. 그래서 여기에서는 현재 각 공장에서 주로 사용하고 있는 cassava starch(Tapioca)를 기질로 하여 alcohol발효실험을 행하였다.

사용한 cassava는 실제 공장에서 사용하고 있는 상태인, 40mesh로 파쇄된 원료를 사용하였다. 이 원료로 mini-jar fermentor 실험을

할 때 잔당분석은 거의 불가능 하였다. 그 이유는 발효초기부터 말기까지 불용성성분이 많아 working volume이 2 liter인 mini-jar fermentor에서는 균일한 상태의 시료를 필요량 채취할 수 없었기 때문이다. 발효방법은 원료 전분에 필요량의 amylase를 첨가하여 80°C에서 약 1시간 액화하고 121°C에서 60분간 살균하고 30°C에서 1%의 종균을 접종하여 발효시켰다. 이때 전분의 농도는 25g의 Tapioca를 100ml의 용수에 첨가하였으며 이때 Tapioca의 net concentration은 약 20%가 되며 이 농

도는 실제 공장에서의 사용농도이며 생성된 alcohol을 증류하여 그 농도로써 alcohol 발효

Table 7. Alcohol productivity on cassava starch*

Strain	α -amylase %	Nitrogen source	Alcohol productivity (v/v%)			
			4day	6day	8day	10day
FSC-14-75	0.8	(NH ₄) ₂ SO ₄ 0.3%	8.5	-	-	-
FSC-14-75	0.03	(NH ₄) ₂ SO ₄ 0.3% Yeast ext. 0.2%	-	-	6.2	-

*Cassava starch concentration was 25g/100ml.

The fermentation pH was 3.8 and not adjusted during fermentation.

3. 쌀보리와 절간고구마 혼용원료에서의 alcohol 발효

실제 공업적으로 이용하고 있는 alcohol 발효원료는 Tapioca, 쌀보리, 절간고구마의 3종이 대종을 이루고 있다. 공장에서 발효시, 쌀보리만을 단일 원료로 사용할 때에는 발효액의 점도와 당화성이 나빠 alcohol의 수율에 부정적인 영향을 미치므로 보통 쌀보리와 Ta-

pioca 혹은 쌀보리와 절간고구마를 1:1로 섞어서 사용하고 있다. 본 연구에서도 이 점을 감안하여 발효기질로 약 40mesh로 분쇄한 쌀보리와 절간고구마를 등량혼합하여 사용하였으며 α -amylase는 원료비로 0.8%, 원료농도는 25g/100ml의 비율로, 기타 조건은 전술한 방법에 준하였다.

Table 8. Alcohol productivity of fusant FSC-14-75

Strain	Conc. of starch*	N source	Ferment. pH	Alc. after 4day
FSC-14-75	25g/100ml	(NH ₄) ₂ SO ₄ 0.3%	3.8**	7.6 (v/v%)

* Starch composition; Barley: Sliced sweet potato starch(w/w)

**The pH was not adjusted

Starch was preliquefied with 0.8% of α -amylase

IV. Pilot Plant Scale Fermentation

alcohol의 산업적 발효공정을 대략적으로 살펴보면 1) 원료전분의 호화 2) 액화 3) 당화 4) 발효 등의 4 단계로 이루어져 있다. 이때

첫 3 단계는 원료전분을 molds 혹은 bacteria의 amylase로 당화하는 공정이며 4번째의 단계는 효모인 *Saccharomyces cerevisiae*를 이용한 발효공정인데, 이때 많은 에너지, 시간, 인력이 소요되는 원료전분의 당화공정이 필수적인 이유는 발효에 이용되는 *S. cerevisiae*가 비록 alcohol에 대한 내성과 발효효율

면에서는 훌륭하지만 glucose나 maltose 및 sucrose와 같은 당당류 혹은 이당류만을 이용하여 alcohol을 생성할 수 있기 때문이다.

실제 국내 여러 alcohol발효기업체들에 비

해 비교적 합리적이고 이상적인 공정으로 alcohol을 생산하는 우수한 기업체로 알려진 P 회사의 원료전분으로부터 alcohol의 발효생산 공정을 살펴보더라도 (Fig. 1)에서 나타난 바

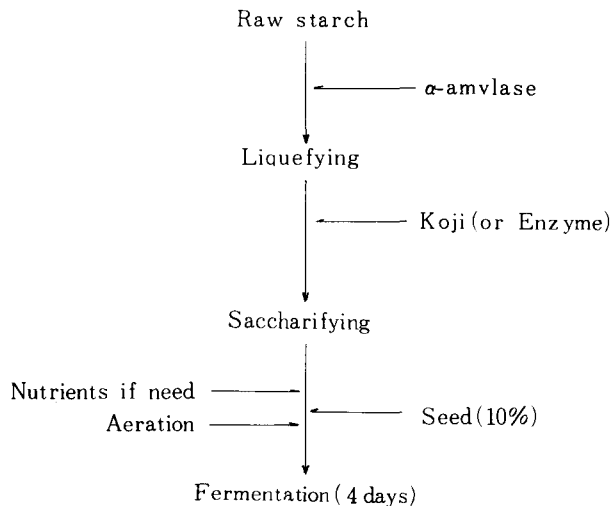


Fig. 1. Industrial process of P. Co

와 같이 α -amylase (Thermamyl Novo Co.)에 의한 원료전분의 액화, Novo사에서 구입하거나 혹은 자체 개발한 Koji로부터 얻은 당화효소에 의한 당화공정, 그리고 뒤이어 당화시킨 fermentation broth에 10%의 seed culture를 접종하여 4일동안 발효시키는 공정으로 이루어져 있으며 이때 생성되는 alcohol은 (Fig. 2) 실제 예에서 보는 바와 15.5%의 총당을 가진 fermentation broth로부터 8.9%v/v 정도이며 잔당은 1% 내외임을 알 수 있다. 따라서 본인 등은 alcohol 발효공업에 있어 발효공정의 단순화 및 그 생산원가의 절감을 목적으로, 현재 alcohol발효공업에 실제로 이용되고 있는 *S. cerevisiae* 그리고 starch 분해능을 가진 *S. diastaticus* 및 *C. tropicalis*를 이용하여

heterologous transformation과 intergeneric protoplast fusion 방법으로 액화전분을 기질로 하여 당화와 발효를 동시에 할 수 있는 새로운 효모 균주 FSC-14-75를 개발한바 있으며, 이미 실험실 규모에서 mini-jar fermentor를 이용한 기초실험으로 발효조건 및 발효율을 검토한 바 있다.

그 결과 α -amylase (Thermamyl Novo Co.)로 처리한 preliquefied potato starch (DE = 2.0)에서의 발효율을 추정해 볼 때 그 산업적 이용 가능성이 충분한 것으로 생각되었으므로 본 실험에서는 그 공업적 이용가능성을 타진하기 위하여 pilot plant scale (working volume = 350 liter) fermentation을 행하였으며 그 발효율과 alcohol생성율을 조사하였다.

Starch Tapioca
 Koji 25 μ/g starch
 Seed 10%
 Aeration 6hrs (0.5v/v/min)

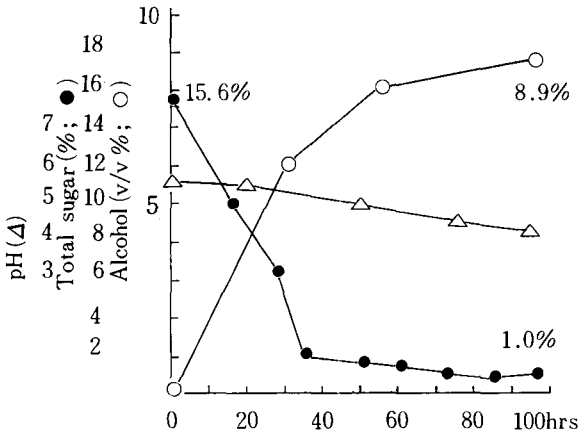


Fig. 2. Industrial data of P. Co.

(1) 재료 및 방법

본 연구에서 개발된 새로운 효모균주 FSC-14-75의 공업적 이용 가능성을 pilot plant scale에서 최종적으로 검토하기 위하여 액화 전분을 기질로 하여 alcohol 발효를 행하였으며, 그 방법은 alcohol 발효 효율이 높을뿐 아니라 비교적 합리적인 공정으로 alcohol을 발효 생산하는 우수 기업체로 알려진 대구의 P 회사의 alcohol 발효공정에 준하였는데 이는 Fig. 3 과 같다. 단 이 때의 평균 seeding volume 은 실제 공장에서의 10%가 아닌 0.6%~1.0 %정도로 사용하였으며, 이들 각 단계를 구체 적으로 서술하면 다음과 같다. (Fig. 3)

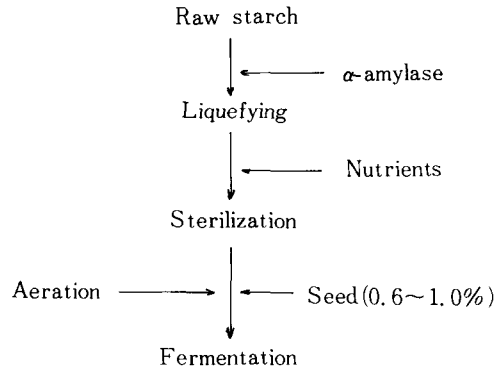


Fig. 3. Experimental flow sheet

1. 사용균주

본 연구에 사용한 균주는 전보에서 보고한 바와 같이 *S. cerevisiae*에 *S. diastaticus*의 amylase gene을 직접 transformation시켜 얻은 *S. cerevisiae*의 transformant로서 amylase 분비성 균주인 TSD-14균주와 α, 1, 6-amylase를 분비하는 *C. tropicalis* 균주를 protoplast fusion시킨 FSC-14-75 균주 및 FSC-14-75균주 유래의 flocculating-cell form인 TSD-14-75(F) 균주와 single-cell form인 FSC-14-75(S) 균주였다.

2. 원료전분

원료전분은 식용으로 사용하는 시판 sweet potato starch를 사용하였으며 수분 함량은 20.5%였다.

3. Seed culture

Seed culture는 glucose 2%, preliquefied potato starch (liquefied with 0.3% of α-amylase to potato starch) 3%, yeast extract 0.2%, (NH₄)₂SO₄ 0.3%, KH₂PO₄ 0.1%, Mg SO₄ · 7H₂O 0.2%, pH 5.5조성의 medium을 사용하였으며 0.6v/v/min으로 aeration, 300-500rpm으로 agitation하면서 2일 동안 mini

Table 1. Strains used in the experiment

Strain	Origin
FSC-14-75	Intergeneric fusant between TSD-14* and <i>C. tropicalis</i>
FSC-14-75(S)	Single-cell form of FSC-14-75 strain
FSC-14-75(F)	Flocculating-cell form of FSC-14-75 strain

* Transformant of *S. cerevisiae* X2180-1A by chromosomal DNA of *S. diastaticus*.

-jar fermentor에서 배양한 후 seeding에 사용하였다.

4. Fermentation broth 및 발효조건

Fermentation broth의 조성은, preliquefied sweet potato starch (liquefied with 0.3% of α -amylase to potato starch) 20%, Yeast extract 0.01%, denaturated malt powder 0.2%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.3%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2%, pH 4.2조성이었다.

Fermentation broth의 조제는 약 250liter의 물과 필요량의 sweet potato starch를 혼합하고 agitation하면서 온도를 높여 60°C 정도에 도달하면 수분을 제외한 starch량에 대하여 0.3%의 α -amylase (Thermamyl novo Co.)와 소포제인 silicon oil 200ml를 첨가하여 80°C에서 약 1시간 동안 액화시킨후 나머지 영양분을 넣어 최종 volume이 350liter가 되게 한후 steam으로 120°C 20분간 살균하였으며 이때 살균이 끝나면 fermentation broth를 30°C까지 식혀 10N NaOH로 pH를 4.2로 조절하였다. 이어 fermentation broth의 0.6% - 1.0%에 해당하는 seed culture를 접종하고 120-150rpm으로 agitation하면서 30°C에서 발효를 진행하였다. 이때 seeding후 6시간까지는 균의 생육 및 amylase생성을 유도하기 위하여 0.6v/v/min으로 aeration하였고, 발효시 pH는 8시간 간격으로 pH 4.2로 조절하였다.

5. Alcohol의 분석

Alcohol의 정량적 분석은, 먼저 발효액 250ml를 취하여 증류액이 210-220ml되게 증류하고 증류수를 가하여 250ml로 make-up하고 alcohol hydrometer로 alcohol농도를 측정하고 온도를 보정한 후 v/v%로 환산하였다.

6. 잔당의 분석

발효가 진행중이거나 발효가 끝난 발효액의 잔당분석은 발효액을 HCl로 산가수 분해하여 Betrand법으로 환원당을 정량하였다.

7. Pilot plant scale fermentor

본 실험에서 사용한 pilot plant scale fermentor는 대구 P주정회사의 400liter용량의 것으로 실제 본 실험에서는 operating volume을 350liter로 하여 사용하였다.

(2) 결 과

1. FSC-14-75균주의 13.3% sweet potato starch에서의 alcohol발효

본 연구에서 개발한 새로운 alcohol발효효모 FSC-14-75 균주의 산업적 이용성을 최종적으로 검토하기 위하여, α -amylase로 미리 액화한 preliquefied sweet potato starch(총당 = 14.8%)를 alcohol발효기질로 함유한 fermentation broth 350liter를 jar fermentor에 넣고 0.6% seed culture를 접종하여 30°C, pH 4.2에서 8일간 pilot plant scale fermentor에서 발효시키면서 일정간격으로 생성되는 alco-

hol을 잔당과 함께 측정하였다. 이때 aeration은 0.6v/v/min으로, 접종후 6시간까지 행하였으며 agitaton은 발효종료까지 120-150rpm으로 계속하였다.

Fig. 4에서 나타난 바와 같이 배양최종일인 8일후의 FSC-14-75균주의 alcohol생성량은 6.6%, 잔당은 3.15%로서 발효율은 총

당에 대해서는 약 70%, 소비당에 대해서는 약 87.5%였다. 그러나 이 실험 결과는 전단계인 실험실 규모에서의 mini-jar fermentor (working volume=2 liter)를 이용하여 얻은 alcohol에 비하면 발효율이 다소 낮게 나타났는데 이는 fermentation broth뿐만 아니라 발효조건등이 서로 다르기 때문으로 추측되었다.

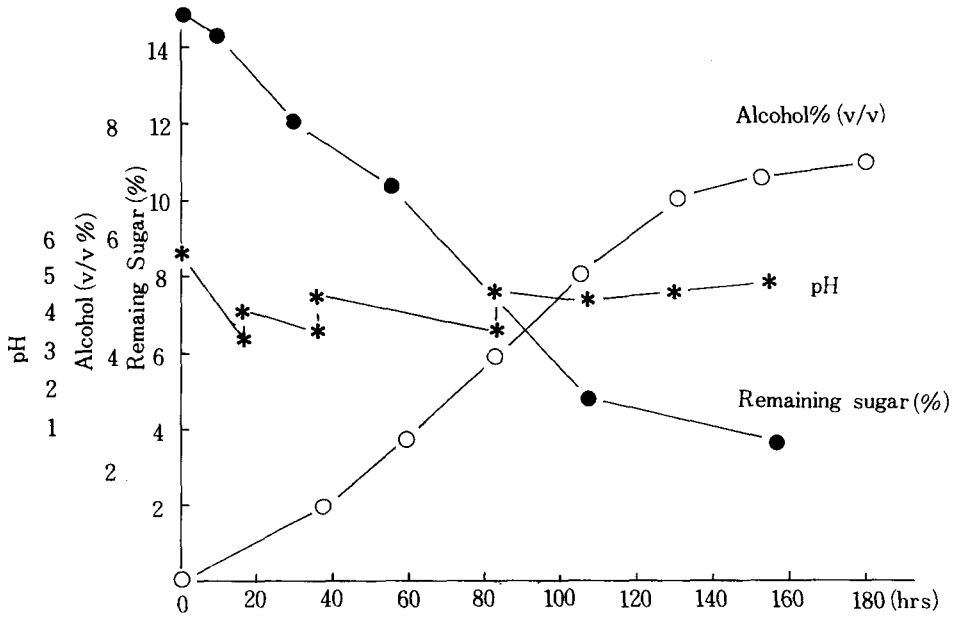


Fig. 4. Alcohol fermentation of FSC-14-75 on 13.3% of sweet potato starch
Total sugar : 14.8%, Max. alcohol : 6.6% (v/v) R. sugar : 3.15%

2. Flocculating-cell form 균주의 분리

FSC-14-75균주의 pilot plant scale fermentation결과, 그 발효율이 실험실 규모에서 보다 다소 낮게 나타났을뿐 아니라 fermentation broth를 현미경으로 관찰하여 본바 역시 실험실 규모에서의 발효에서와는 달리 전형적인 FSC-14-75균주형태인 flocculating-cell form에 비해 single-cell form이 매우 높은 비율로 존재하고 있었으므로, single cell isolation method로 single-cell form과 flocculating-cell form을 각각 분리하여 FSC-14-

75(F)와 FSC-14-75(S)로 명명하였다.

그리고 FSC-14-75(F)와 FSC-14-75(S)균주의 preliquefied potato starch에서의 alcohol발효율을 조사하기 위하여 mini-jar fermentor를 이용하여 각 균주의 alcohol생성능을 조사하였다.

그 결과 Fig. 5에서 보는 바와 같이 flocculating-cell form strain이 single-cell form strain에 비하여 growth나 alcohol생성능이 우수하였으며 결과적으로 15%의 preliquefied potato starch에서의 FSC-14-75(F) 균주의

alcohol생성은 8.13%, 이때 잔당은 Somogyi-Nelson법으로 측정된 결과 0.49%였다.

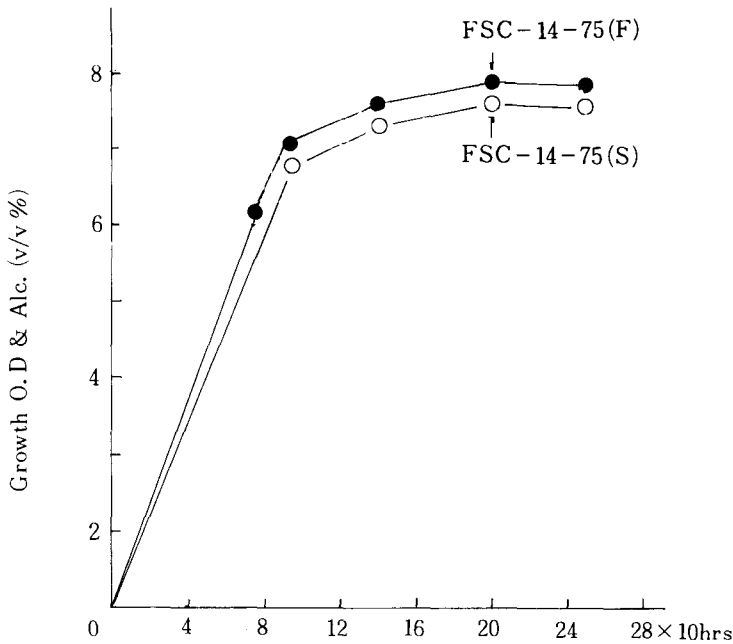


Fig. 5. Alcohol fermentation of FSC-14-75(F) and FSC-14-75(S)

3. FSC-14-75(F)균주의 15% sweet potato starch에서의 alcohol 발효

FSC-14-75균주 유래의 flocculating form인 FSC-14-75(F)와 FSC-14-75(S) 두 균주중 alcohol발효력을 조사하기 위하여, 15% preliquefied sweet potato starch(총당 = 15.3%)를 함유한 fermentation broth 350 liter를 400liter의 pilot plant scale fermentor에서 발효시키면서 alcohol생성량 및 잔당을 조사하였다. 이때 seed volume은 1%, 온도는 30°C, pH 4.2(2N NaOH로 8시간 간격으로 조절), aeration은 0.6v/v/min로 12시간 행하였다.

그 결과 Fig. 6에서 나타난 바와 같이 alcohol생성량은 배양 8일후 최대인 7.7%에 도

달하였으며 이때 잔당은 1.9%였다. (Fig. 6)

한편 fermentation broth의 살균후 50ml의 α -amylase(Thermamyl Novo Co.)를 재차 첨가하여 FSC-14-75(F)균주의 발효기간중 α -amylase가 계속적으로 작용할 수 있도록 한 후 그 결과를 조사한 결과는 Fig. 7과 같았다. Fig. 7에서 나타난 바와 같이 alcohol 생성량은 배양 8일후 최대치인 7.7%에 도달하여 잔당은 1.46%로 다소 낮았으나 α -amylase를 살균후 첨가하지 않은 경우와 별 차이점이 없었다. 본 실험의 결과로는 preliquefied potato starch를 FSC-14-75(F)균주로 발효시킬때, 발효에 이용되지 못하고 존재하는 잔당은 α -1,6 linkage의 저분자성 oligosaccharide인 것으로 추측되었다. 특히 발효율 및 잔당에 있

어서 실험실에서서의 mini-jar fermentor를 이용한 결과와 다소 차이가 있는 것은, 발효기질의 차이 즉 전자의 경우는 potato starch이고

후자는 sweet potato starch이기 때문인 것으로 추측된다(Fig. 7).

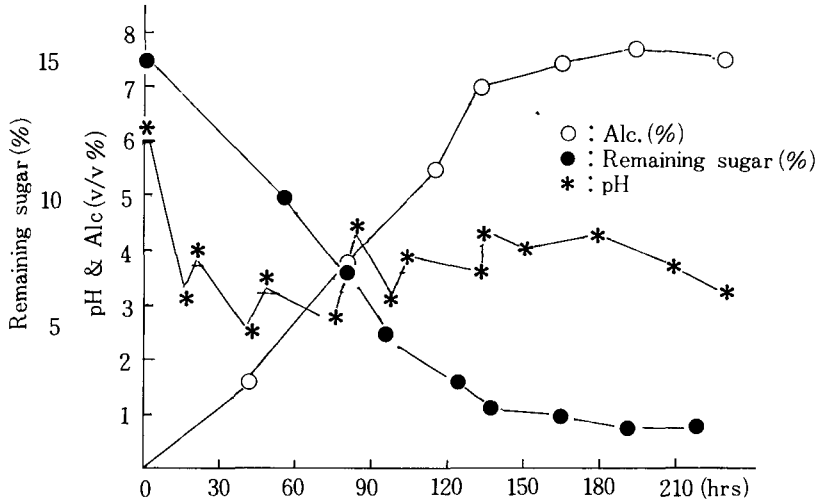


Fig 6. Alcohol fermentation of fusant FSC-14-75(F)
 Substrate : 15% potato starch
 Total sugar : 15.33% (=13.8% as starch)

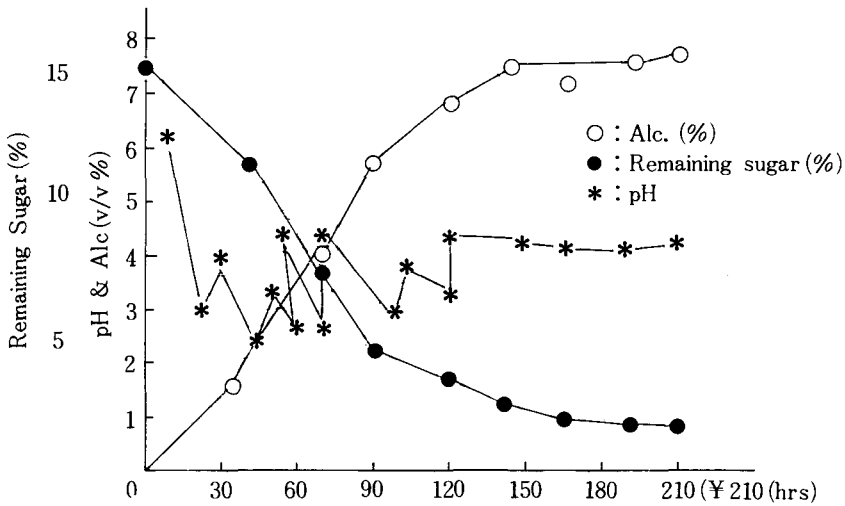


Fig 7. Alcohol fermentation of fusant FSC-14-75(F)
 Substrate : 15% potato starch
 Total sugar : 14.57% (=13.11% as starch)
 After sterilization, 50ml of Novo Thermamyl α -amylase added.

V. 고찰

산업적 alcohol발효공정의 단순화 및 그 생산원가의 절감을 목적으로 현재 alcohol발효공업에 실제로 이용되고 있는 *S. cerevisiae*와, 그리고 starch분해능을 가진 *S. diastaticus* 및 *C. tropicalis*를 사용하여 heterologous transformation과 intergeneric protoplast fusion방법으로 새로운 효모균주를 개발한 결과, 원료전분의 호화, 액화, 당화, 발효등의 4 단계로 나누어져 있는 alcohol발효과정중 당화공정을 거치지 않는 즉, 액화전분을 기질로 바로 alcohol을 생성할 수 있는 새로운 효모균주 FSC-14-75를 개발하였다. 이 균주의 발효 조건 및 발효를 2liter 규모의 mini-jar fermentor로써 조사한 바 그 산업적 이용성이 충분한 것으로 사료되어, 그 산업적 이용성을 조사하기 위하여 operating volume이 350liter인 pilot plant scale fermentor에서 발효율을 조사하였다.

먼저 13.3%의 preliquefied sweet potato starch(총당=14.8%)를 alcohol 발효기질로 전술한 350liter 규모의 jar-fermentor에 전배양한 seed culture를 0.6%로 접종한 후 생성되는 alcohol과 잔당을 분석한 결과는 Fig. 4와 같았다. 즉, 발효최종일인 8일째 FSC-14-75균주의 alcohol 생성량은 6.65%, 잔당은 3.15%로(총당에 대해 70%, 소비당에 대해 87.5%) 일반적인 공업적 발효율 85-90% 정도에 비교해 매우 우수한 균주로 생각되었다.

그러나 이 결과는 전보에서 보고한 mini-jar fermentor에서의 15% preliquefied potato starch를 기질로한 실험 결과보다 다소 낮은 성적이었다. 이는 fermentation broth에 이용된 발효기질이, 본 pilot plant scale fermentation

에서는 식용 sweet potato starch를 사용하였으나 mini-jar fermentor를 이용한 실험실 규모의 실험에서는 정제 potato starch(Junsei Co. Japan)를 사용한 차이점, 또한 발효조건의 차이, seed volume의 차이(mini-jar fermentor의 경우 seed volume 1.0%, pilot plant scale 경우 0.6%) 등에 기인하는 것으로 추측되었다. 실제 alcohol발효공장에서는 seed volume을 10%정도로 사용하므로 본 균주의 경우에도 seed volume을 10%정도로 증가시키면 발효율 및 발효 시간등에 있어서 보다 나은 결과를 얻을 수 있으리라 생각된다.

한편 발효액을 현미경 관찰한 결과, FSC-14-75균주의 전형적인 형태인 flocculating-cell form과는 다른 single-form cell이 높은 비율로 존재하였는데 이는 실험실 규모에서 발효한 발효액의 경우와는 상이한 결과였다. 그래서 FSC-14-75균주로부터 single cell isolation방법으로 flocculating-cell form과 single-cell form을 분리하여 FSC-14-75(F)와 FSC-14-75(S)로 각각 명명하고 이들 두 균주의 alcohol생성능을 상호 비교해본 바 Fig. 5에서 보는 바와 같이 FSC-14-75(F)균주가 FSC-14-75(S)균주에 비해 다소 alcohol 생성능이 우수하였으며, FSC-45-75(F)균주는 15%의 preliquefied potato starch를 함유한 fermentation broth로부터 발효10일만에 8.13%의 alcohol을 생성하였으며, 이때 잔당은 0.49%, 발효율은 총당에 대하여 74%, 소비당에 대하여 77.4%였다.

이상에서 얻은 FSC-14-75(F)균주의 pilot scale에서의 발효능을 조사하기 위하여 총당으로 15.3%인 preliquefied potato starch를 발효원으로 함유한 fermentation broth 350 liter를 1%의 seed culture로서 접종한 후 발효시킨 결과는 Fig. 6과 같았다. 즉 alcohol 생성량은 발효 8일후 최대인 7.7%에 도달하

였고 이때 잔당은 1.46%, 발효율은 총당에 대해 77.6%, 소비당에 대해 85.7%였다. 그리고 350liter fermentation broth를 살균한 후 1%의 seed culture로 접종함과 동시에 50ml의 α -amylase를 (Thermany Novco Co.) 재차 발효기질에 첨가하고 FSC-14-75(F) 균주의 preliquefied potato starch 발효과정중 α -amylase가 계속적으로 작용할 수 있도록하여 그 효과를 검토한 결과는 Fig. 7에서 보는 바와 같이 무첨가구와 별다른 차이가 없었다. 따라서 본 결과로 미루어 보아 FSC-14-75(F) 균주에 의해 발효에 이용되지 못하고 남아 있는 잔당에 있어서 주요결합 방식과 또한 액화전분에 있어서 발효속도에 영향을 주는 전분의 주요 결합방식은 주로 α -1,6 linkage인 것으로 생각되므로 본 균주의 α -1,6 linkage를 분해할 수 있는 α -1,6 glucosidase의 능력을 습득 보완한다면 그 산업적 이용 가능성은 충분할 것으로 사료되었다.

VI. 결 론

효모균주의 개발을 위하여 alcohol 발효효모인 *S. cerevisiae*에 *S. diastaticus* amylase gene을 vector를 사용하지 않고 직접 naked DNA상태로 heterologous transformation하여 amylase분비성 transformant를 얻었으며 (TSD-14), 이를 재차 α -1,6 glucosidase 분비균주인 *C. tropicalis*간의 intergeneric protoplast fusion을 시도하여 액화전분을 발효기질로 하여 당화와 발효를 동시에 행할 수 있는 새로운 효모균주 FSC-14-75를 얻었다. 이미 본인등은 이 FSC-14-75균주의 alcohol 발효능을 operating volume이 2liter 정도인 mini-jar fermentor를 사용하여 조사한 바 있

고 그 결과 산업적 이용 가능성이 충분하다고 인정되었으며, 이를 최종적으로 검토하기 위하여 operating volume이 350liter인 pilot plant scale에서 발효력을 조사하였다. 실제 원료전분의 호화, 액화, 당화, 발효등의 4단계로 나뉘어져 있는 산업적 alcohol 발효과정중, 당화과정을 단일화 할 수 있으면 koji제조에 사용되는 경비와 인력을 줄일 수 있을 뿐만 아니라 60°C에서 10시간 정도 행해야 하는 당화과정 자체의 소요시간 및 인력과 energy를 절감할 수 있어 경제적인 잇점이 있다.

먼저 13.3% preliquefied potato starch (총당=14.8%)를 alcohol 발효원으로 함유한 fermentation broth 350liter를 0.6% seed로 발효시킨 결과 발효최종일인 8일만에 6.6% alcohol 잔당 3.15%, 발효율은 총당에 대해 70%, 소비당에 대해 87.5%의 결과를 나타내었다.

한편 FSC-14-75균주를 single cell isolation으로 분리해본 결과 현미경하에서 flocculating-cell form과 single-cell form의 두가지 형태로 나타났다. 따라서 이를 각각 분리하여 FSC-14-75(F)와 FSC-14-75(S)균주로 정하고 이들 두 균주의 alcohol 발효능을 비교해본 결과 FSC-14-75(F)균주가 growth 및 alcohol생성력이 우수하였는데, 15%의 preliquefied potato starch로부터 발효 10일만에 8.13% (v/v)의 alcohol을 생성하였고 잔당은 0.49%, alcohol 발효율은 총당에 대하여 74%, 소비당에 대하여 77.4%였다.

이상에서 얻은 FSC-14-75(F)균주의 alcohol생성능은 pilot plant scale에서 검토하기 위하여 총당 15.3%의 preliquefied potato starch를 함유한 fermentation broth 350liter를 1% seed로써 발효시킨 결과 alcohol생성량은 배양 8일후 최대인 7.7% (v/v)에 도달하였고 이때 잔당은 Betrand법에 의하면 1.46%로, 발

효율은 총당에 대하여 77.6%, 소비당에 대하여 85.7%였다.

한편 FSC-14-75균주의 preliquefied potato starch 발효과정중 α -amylase의 계속적인 작용효과를 검토하기 위하여 350 liter fermentation broth를 살균후 1% seed와 동시에 50ml의 α -amylase (Thermamyl Novo Co.)를 첨가하여 alcohol의 생성을 조사한 결과 발효율 및 잔당에 별 차이가 없었으며 따라서 preliquefied potato starch 발효진행중에 작용하는 α -amylase의 효과는 인정되지 않았다.

후 기

본보에 기술한 것은 일련의 연구중에서 Alcohol발효에 대한 성적만을 발췌한 것으로 T-

SD-14 및 FSC-14-75균주의 육종에 있어서 많은 성적 즉, Enzyme productivity, 유전 안정성, Fusion frequency, Amylase성질, Biochemical mutant의 획득, 기타 균주의 생리적 성질 및 문헌등을 기술하지 않았음으로 독자들에게는 다소 이해하기 힘든 부분도 있으리라 생각합니다. 이점에 대해서는 현재 본 연구에 관한 상세한 결과를 관련 학회지에 투고 준비중에 있으므로 논문이 발표된 후에 참고해주시기 바랍니다. 아울러 본 연구의 수행에 있어 많은 도움을 주신 대구소재의 풍국주정공업 주식회사의 사장님, 연구실장님과 공장장님 그리고 관계하신 임직원 여러분께 본 지면을 빌어 감사를 드리는 바입니다. 또 본보에 기술한 외에 *S. diastaticus*와 *C. tropicalis*를 세포융합하여 얻은 융합체의 연구결과 역시 대단히 우수한 것으로 나타났습니다만 여기에 대해서는 차후 다시 기회를 보아 발표하고자 합니다.