

고농도 알콜발효효모 *Saccharomyces cerevisiae* D1의 분리 및 특성

양지영* · 박경호 · 백운화 · 유주현¹

동양맥주 두산연구소, ¹연세대학교 식품공학과

Screening and Characterization of the High-Alcohol Producing *Saccharomyces cerevisiae* D1

Yang, Ji-Young*, Kyung-Ho Park, Un-Hwa Pek and Ju-Hyun Yu¹

Doosan Research Laboratories, Oriental Brewery Co., Yoido 80, Seoul, Korea

¹Department of Food Engineering, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

A high-alcohol producing yeast strain had sugar and alcohol tolerance was isolated from soil and identified as *Saccharomyces cerevisiae* D1 according to the Lodder's yeast taxonomic studies. On investigation of the characteristics of the strain, it could grow in 60% glucose, within 15% ethanol and in the YPD medium containing 2.0 mM copper. It had 39.1% the inhibition rate of fermentation efficiency and 8% viability after 2 days in the YPD medium containing 15% ethanol. Its optimum initial pH, growth temperature, initial glucose concentration for the production of alcohol showed pH 4.5, 30°C and 30%, respectively. *Saccharomyces cerevisiae* D1 produced 14.0% (w/v) alcohol when incubated at 30°C with orbital shaking 150 rpm for 72 h in a medium (pH 4.5) containing 30% (w/v) glucose.

여러 가지 Biomass로부터 알콜생산에 대한 연구는 세계 여러 나라에서 오래 전부터 연구진행되어 왔다(1, 2). 알콜생산에 공업적으로 이용되는 균주의 개발특성에 대해서는 여러 가지가 있으나(3) 아직까지도 큰 발전을 보지 못하고 있다. 균주개발의 방법으로는 자연선택법(4), 자연적응법(5, 6), 돌연변이법(8), 세포융합법(7-9), 연속배양법(10)을 이용하고 있으며 균주의 알콜내성기작(11), 유전적 해석(12, 13) 및 삼투압 기작(14)의 기초적 연구 및 알콜발효에 미치는 여러 factor에 관한 기초 연구(15, 16) 등이 수반되어 왔으나 현재까지 보고된 바로는 Tahia Benitez(6), R. Legmann(9), Juan Jimenez(10), Seiei Watanabe(8) 등이 보고한 결과들은 모두 15%(v/v) 이하의 알콜을 생산하고 있다.

본 연구에서는 고농도 알콜생산균을 토양으로부터 자연선택법으로 분리, 동정한 후 균주의 특성과 고농도 알

콜생산조건을 검토하였다.

재료 및 방법

균주의 분리 및 동정

우리나라 각지로부터 수집된 토양시료로부터 45% sucrose 함유 고농도당 배지와 15% 알콜함유배지로부터 순수분리된 균주로부터 35% 당함유 배지를 이용하여 3차에 걸쳐 최종 고농도 알콜을 생산하는 최종균주를 선별하였다. 선별된 균주는 Lodder의 "The Yeast"의 방법(17)에 따라 동정하였다.

내당성 측정

Glucose가 0%에서 60%를 함유한 배지 100ml을 담은 300ml 삼각 flask에 30°C 2일간 배양된 seed 0.5%를 접종하여 30°C 2일간 정지배양한 후 10배 희석된 배양액을 580nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 현재 주정생산에 사용되고 있는 *Saccharomyces cerevisiae* 발원 1호를 이용하였다.

Key words: High-alcohol fermentation, alcohol tolerance, sugar tolerance, copper tolerance

*Corresponding author

내알콜성 측정(18)

Alcohol이 0%에서 20% 범위에서 함유된 배지 100 ml을 담은 300 ml 삼각 flask에 30°C 2일간 배양된 seed 0.5%를 접종하여 30°C 2일간 정치배양 후 10배 희석된 배양액을 580 nm에서 흡광도를 측정하여 생육에 따른 내알콜성을 검토하였다. Glucose 35% 배지 100 ml을 담은 300 ml 삼각 flask에 15% alcohol 배지에서 30°C 2일간 정치배양된 seed 0.5%를 접종하여 30°C 3일간 진탕배양한 후 10배 희석된 배양액을 580 nm에서 흡광도와 잔당을 측정하여 발효능에 따른 내알콜성을 검토하였다. 15% alcohol 배지 100 ml을 담은 300 ml 삼각 flask에 30°C 2일간 배양된 seed 0.5%를 접종하여 30°C 2일간 정치배양 후 methylene blue 염색법으로 염색하여 효모의 생존률을 측정하였다.

대조구로 사용한 효모는 현재 주정생산에 사용되고 있는 *Saccharomyces cerevisiae* 발연 1호를 이용하였다.

$$\text{생존률 (\%)} = \frac{\text{염색되지 않은 세포수}}{\text{전체 세포수}} \times 100$$

구리에 대한 내성 측정(19)

YPD 배지 100 ml을 담은 300 ml 삼각 flask에 30°C 2일간 배양된 seed 0.5%를 접종하여 30°C 2일간 정치배양하였다. 배양액을 100배 희석하여 CuSO₄가 함유된 고체배지에 도말하여 30°C 4일간 배양 후 균락생성 여부를 관찰하였다. 대조구로는 현재 산업적으로 사용되고 있는 *Saccharomyces* 속 효모 8균주를 이용하였다.

알콜발효용 배지 및 배양조건

알콜발효를 위한 기본배지로는 glucose 35%, yeast extract 1%, peptone 2% pH 4.5를 사용하였다. 균주의 배양은 300 ml 삼각 flask에 100 ml의 배지를 넣고 균을 5% (v/v) 접종한 후 배양하였으며 진탕배양의 경우 orbital shaker에서 150 rpm으로 진탕하여 배양하였다.

Alcohol 분석 및 균체량과 잔당의 측정

Gas chromatography (Varian Inst., California, USA) 방법에 의해 alcohol 함량을 측정하였다. Column은 Porapak Q를 사용하였으며 분석조건은 injector temperature 150°C, column temperature 250°C이었으며 carrier gas로 질소와 수소를 사용하였다. 그리고 균체량은 10배 희석된 배양액을 spectrophotometer (Perkin-Elmer model 555)를 사용하여 580 nm에서 측정하였으며 잔당은 DNS method(20)에 의해서 측정하였다.

결과 및 고찰

사용균주의 분리 및 동정

우리나라 전국에서 수집된 1600여점의 토양시료로부터 2차 선별 후 783 균주를 순수분리하였으며 다시 3차에 걸친 알콜발효능 screening 결과 No.73-1을 실험균주로 최종선발하였다. 분리균 No.73-1은 구형이고 침강성이 있으며 자낭포자가 있으며 출아법에 의해 증식하였다. 위의 결과로 *Saccharomyces* 속에 속하는 효모인 것으로 추정된다. 또한 질산염과 lactose를 자화하지 못하고 melibiose를 발효하지 못하는 특성으로 보아 *Saccharomyces cerevisiae*로 동정되었다(Table 1, 2). 이 분리균주는 *Saccharomyces cerevisiae* D1호로 명명하였다.

분리균주의 특성

분리균주의 내당성: 분리균주의 당에 대한 내성을 조사하기 위하여 배지 당농도를 변화시켜 미생물 성장을 측정된 결과 Fig.1과 같았다. 생육에 있어서 최적 당농도는 15%이었다. 이러한 결과는 Jimenez 등(21)이 발표한 결과와 같았다. 대조구로 사용한 *Saccharomyces cerevisiae* 발연 1호도 같은 결과를 나타내었으나 분리한 효모는 대조구에 비하여 흡광도가 높게 나타났다. 특히 배지의 당농도가 60%인 경우 대조구는 거의 생육하지 못하였으나 *Saccharomyces cerevisiae* D1은 생육하였다. 따라서 *Saccharomyces cerevisiae* D1은 60%의 농도에서도 생육할 수 있는 내당성 균주임을 알 수 있었다.

분리균주의 내알콜성: 미생물의 알콜내성에 대한 기작은 정확히 밝혀져 있지 않았으며 또한 측정방법(18, 22)도 확립되어 있지 않다. 따라서 이제까지 발표된 방법 중 대표적인 3가지 방법(18)으로 분리균주의 에탄올에 대한 내성을 조사하였다. 배지의 에탄올농도를 변화시켜

Table 1. Morphological characteristics of the isolated strain.

Shape	Oval
Size	2.5 - 6.5 μm
Flocculation	+
Formation of ascospores	+
Formation of pseudomycelium	-
Mode of vegetative reproduction	Budding

Table 2. Physiological characteristics of the isolated strain.

A kind of sugar	Assimilation	Fermentation
Glucose	+	+
Galactose	+	+
Maltose	+	+
Sucrose	+	+
Fructose	ND	+
Mannose	ND	+
Melizeitose	ND	+
Inulin	ND	-
Melibiose	ND	-
Lactose	-	-
Xylose	ND	-
Rhamnose	ND	-
Arabinose	ND	-
Soluble starch	ND	-
Ethanol	+	ND
KNO ₃	-	ND

(+): growth or fermentation

(-): none

ND: not detected

미생물 성장을 측정된 결과 Fig. 2와 같았으며 배지 중 에탄올농도가 5% 이후부터 급격히 생육이 저해되는 현상을 나타내었으며 에탄올농도 15% 이상에서는 생육하지 못하였다. 이러한 결과는 Brown 등(23)과 Martin 등(18)의 결과와 비슷하였다. 대조군으로 사용한 *Saccharomyces cerevisiae* 발원 1호도 비슷한 결과를 나타내었으며 10% 이상의 에탄올농도에서 생육하지 못하였다. 에탄올에 대한 생육이 급격히 저하되는 에탄올농도의 범위는 5%에서 10%로 나타났으며 7.5% 에탄올농도에서 분리균과 대조군의 생육저해율은 각각 22%, 45%이었다. 또한 미생물의 생육이 저해되는 15% 알콜이 함유된 배지에서 2일간 침적시킨 후 알콜발효능에 따른 알콜내성을 조사한 결과는 Table 3과 같았다. 침적시키지 않은 경우 분리균과 대조군의 생육은 각각 1.09, 0.96이었으며 잔당은 각각 3.0%, 6.2%이었다. 에탄올 15%에 침적한 경우 분리균과 대조군의 생육은 각각 1.07, 0.85이었으며 잔당은 각각 15.5%, 32.0%이었다. 분리균과 대조군의 알콜에 의한 알콜발효능의 저해율은 각각 39.1%, 89.6%로 분리균은 대조군에 비해 2.3배나 덜 저하받았다. 또한 15% 에탄올배지에 2일간 침

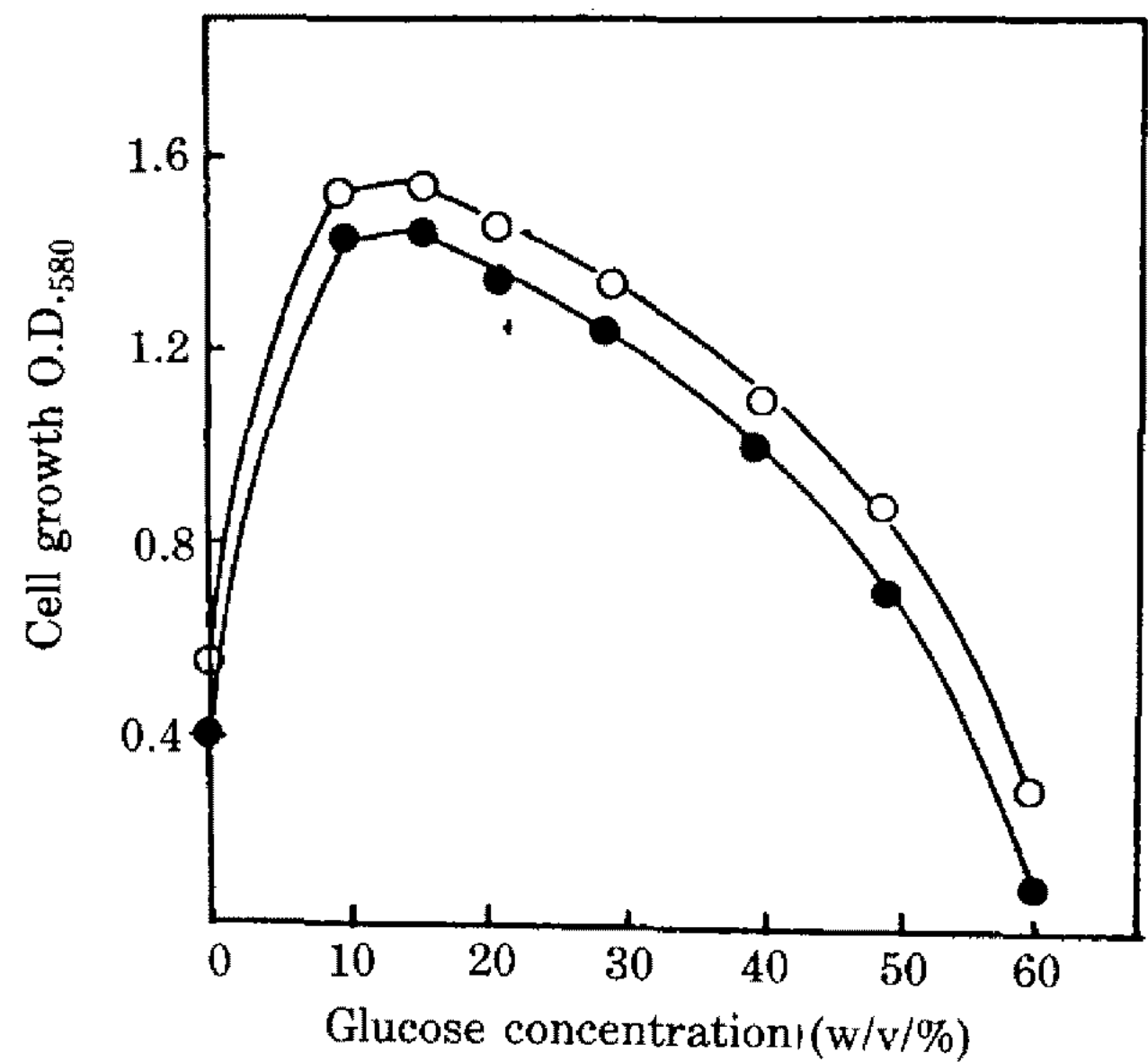


Fig. 1. Effect of glucose concentration on the cell growth of *Saccharomyces cerevisiae* D1 and *Saccharomyces cerevisiae* Balyon 1.

S. cerevisiae D1: ○, *S. cerevisiae* Balyon 1: ●

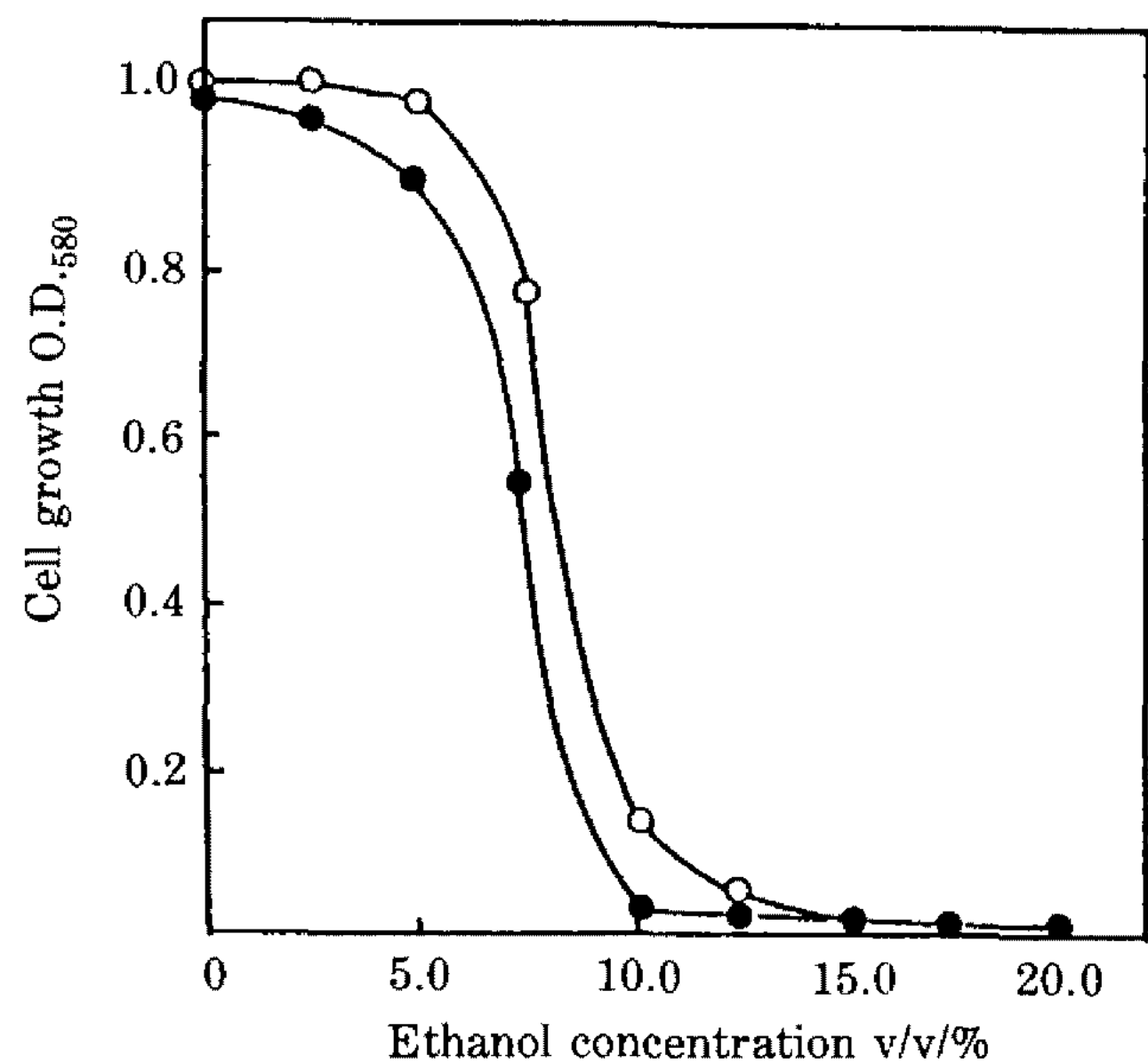


Fig. 2. Effect of ethanol concentration on the cell growth of *Saccharomyces cerevisiae* D1 and *Saccharomyces cerevisiae* Balyon 1.

S. cerevisiae D1: ○, *S. cerevisiae* Balyon 1: ●

적 후 대조군과 분리균의 생존률은 각각 2.3%, 8.0%로 분리균은 대조군에 비해 생존률이 높았다.

이상 2가지 방법에 의한 알콜내성을 검토한 결과 분리균이 대조군에 비해 에탄올내성이 강한 균주임을 알 수 있었다.

분리균주의 구리에 대한 내성: 분리균주가 일반효모와

Table 3. Comparison of the cell growth and the sugar utilization of *Saccharomyces cerevisiae* D1 and *Saccharomyces cerevisiae* Balyon 1 according to alcohol treatment.

Strain	Concentration of Alcohol (%)		Concentration of Alcohol (%)	
	0	15	0	15
	Residual Sugar (%)	Cell Growth (OD)	Residual Sugar (%)	Cell Growth (OD)
<i>S. cerevisiae</i> D1	6.2	0.96	32.0	0.85
<i>S. cerevisiae</i> Balyon 1	3.0	1.09	15.5	1.07

Table 4. Comparison of the copper ion sensitivity about the various *Saccharomyces* strains.

Strain	Concentration of CuSO ₄ (mM)			
	0	0.2	1.0	2.0
<i>S. cerevisiae</i> Balyon 1	+	-	-	-
<i>S. cerevisiae</i> D1	+	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i> PH	+	+	-	-
<i>S. cerevisiae</i> PG	+	+	-	-
<i>S. sake</i> GJ	+	-	-	-
<i>S. carsbergensis</i>	+	-	-	-
<i>S. sp</i> E	+	-	-	-
<i>S. sp</i> HB	+	+	-	-
<i>S. sp</i> AB	+	-	-	-

는 다른 특성을 갖는 미생물인지를 알아보기 위하여 구리에 대한 내성을 조사하였다. 배지 중 구리농도를 변화시켜 미생물 성장을 측정된 결과는 Table 4와 같았다. 일반적으로 효모의 구리에 대한 내성을 갖는 구리농도는 0.5mM 이하로 알려져 있으며 (19) 분리균을 제외한 모든 효모들이 0.2mM의 농도에서 생육이 저해되었다. 그러나 분리균의 경우 2.0mM의 농도에서도 생육을 나타내는 것으로 관찰되었으며 다른 효모에 비교하여 구리에 대한 내성이 높은 효모임을 알 수 있었다.

분리균주의 알콜발효 특성

초기 pH의 영향: 분리균주의 알콜발효에 미치는 배지 초기 pH의 영향을 조사하기 위하여 배지의 초기 pH를 변화시켜 35% glucose가 함유한 배지에서 30°C, 3일

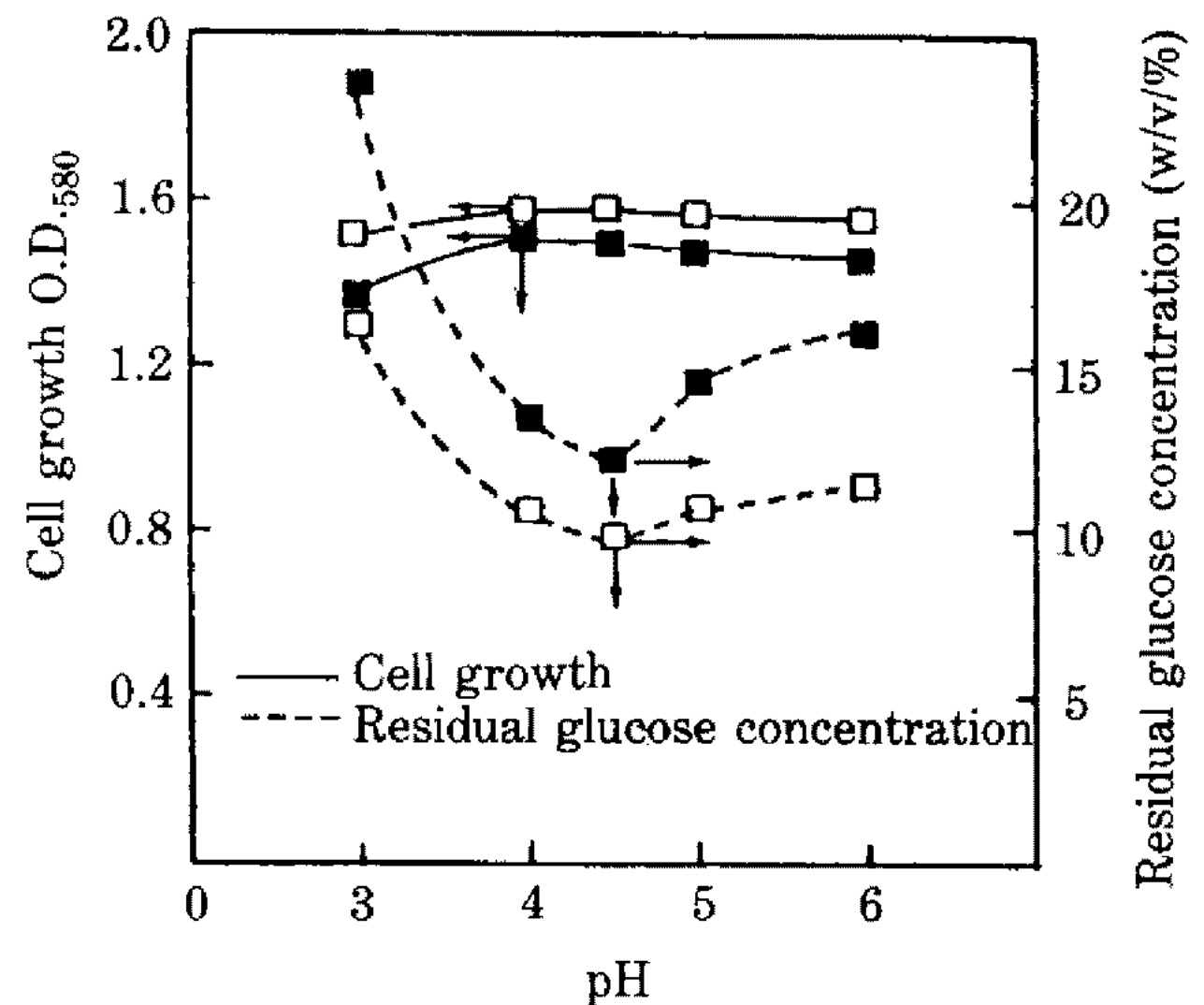


Fig. 3. Effect of initial pH the growth and glucose utilization of *Saccharomyces cerevisiae* D1 and *Saccharomyces cerevisiae* Balyon 1.

Cells were cultured at 30°C for 72 h in 35% glucose medium.

S. cerevisiae D1: □, *S. cerevisiae* Balyon 1: ■

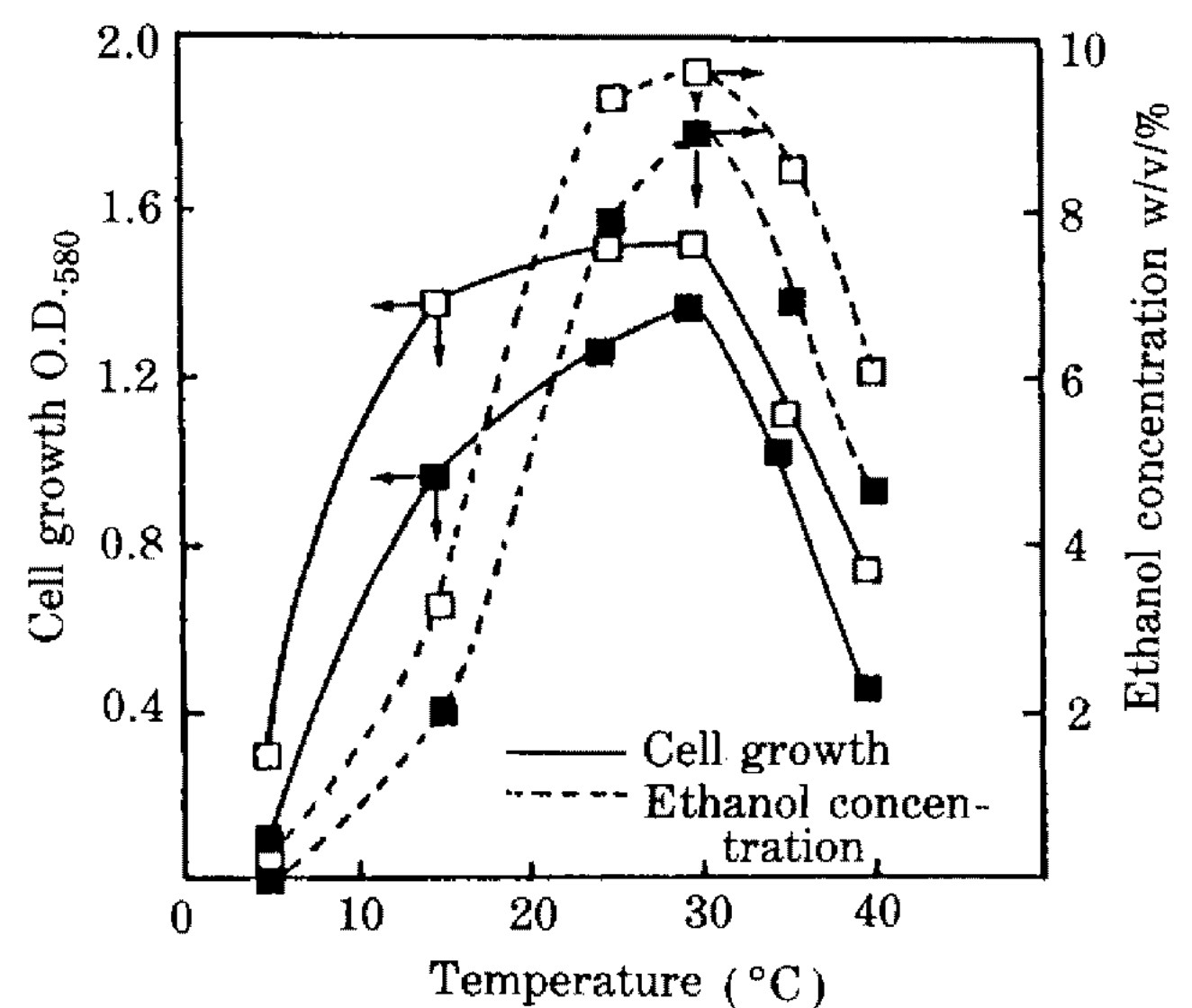


Fig. 4. Effect of temperature on the ethanol fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* D1 and *Saccharomyces cerevisiae* Balyon 1.

Cells were cultured at 30°C for 72 h in 35% glucose medium.

S. cerevisiae D1: □, *S. cerevisiae* Balyon 1: ■

배양 후 균생육과 잔당을 측정된 결과는 Fig. 3과 같았으며 알콜발효의 최적 pH는 4.5이었다 (16). 대조균 역시 비슷한 유형이었으나 잔당은 분리균보다 많이 남아있음을 관찰하였다.

배양온도의 영향: 분리균주의 알콜발효에 미치는 배지 온도의 영향을 조사하기 위하여 배지온도를 변화시켜

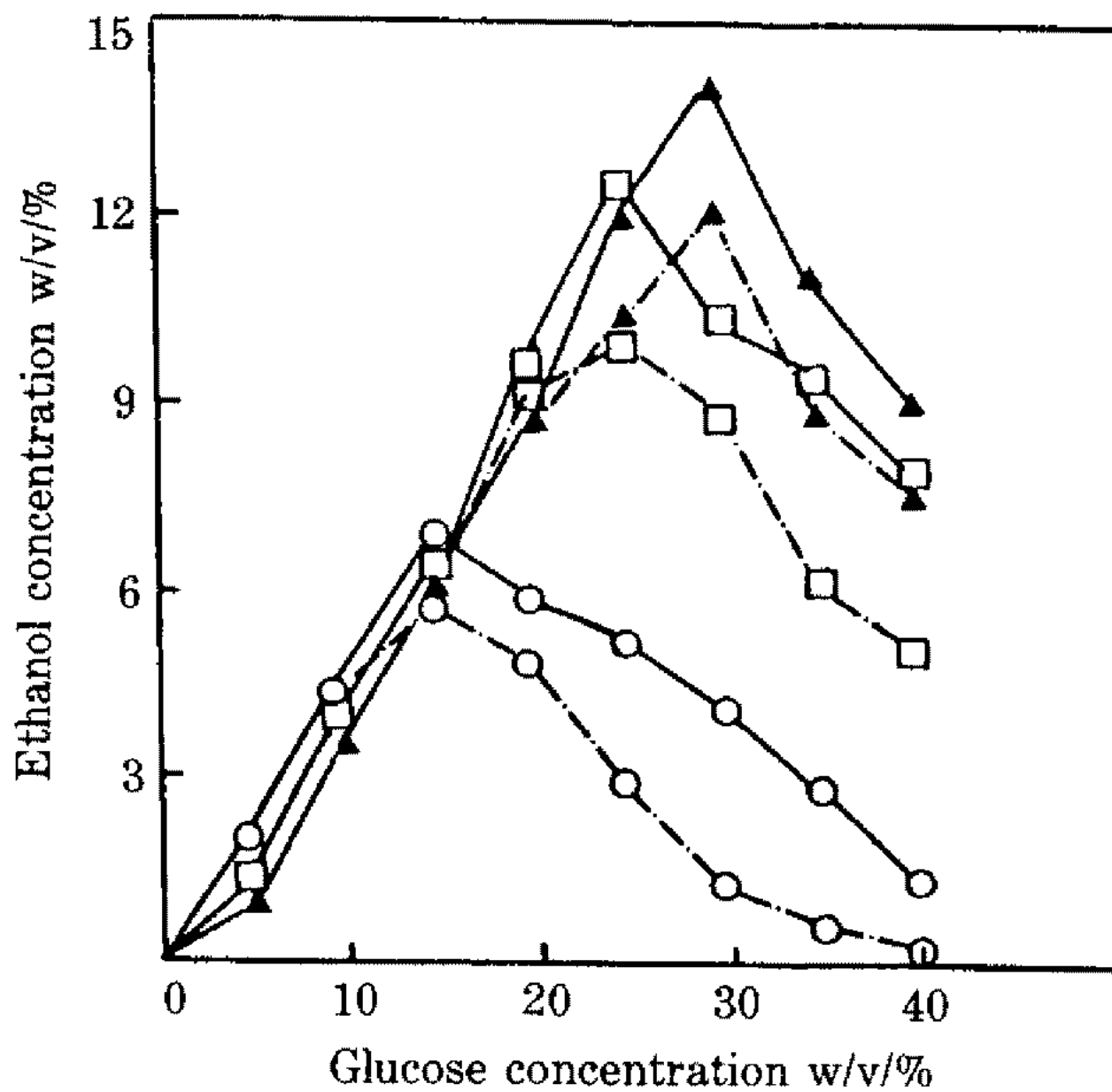


Fig. 5. Effect of initial glucose concentration on the ethanol fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* D1 and *Saccharomyces cerevisiae* Balyon 1.
Cells were cultured at 30°C for 24 h (○), 48 h (□) and 72 h (▲) in various glucose medium.
S. cerevisiae D1: —, *S. cerevisiae* Balyon 1: - - -

35% glucose가 함유한 배지에 30°C, 3일 배양 후 균생육과 알콜농도를 측정된 결과는 Fig. 4와 같았으며 알콜발효의 최적온도는 30°C이었다(24). 대조균 역시 비슷한 유형을 나타냈으며 최적온도인 30°C에서 3일 배양시 분리균과 대조균은 각각 9.6%(w/v), 8.9%(w/v)의 알콜을 생산하였다.

초기 기질농도의 영향: 분리균주의 알콜발효에 미치는 배지 기질농도의 영향을 조사하기 위하여 배지의 당농도를 변화시켜 여러 농도 glucose가 함유한 배지에 30°C 배양 후 매일 알콜농도를 측정된 결과는 Fig. 5와 같았으며 당농도가 15% 이하의 경우 1일만에 최고 알콜농도에 도달하였으며 당농도가 15% 이상인 경우 배양시간이 길어질수록 생성알콜농도가 증가하였다. 당농도 30%의 경우 3일 배양시 분리균과 대조균은 각각 14.1%(w/v), 12.0%(w/v)의 알콜을 생산하였다. 이 때 발효수율은 각각 94%, 80%이었다. 이러한 결과로부터 분리한 효모의 알콜생산량은 대조균에 비교하여 116% 높다고 생각할 수 있다.

진탕효과: 분리균주의 알콜발효에 미치는 진탕효과의 영향을 조사하기 위하여 15%와 30% glucose가 함유한 YPD 배지를 사용하여 30°C, 3일 정지 및 진탕배양 후 알콜농도를 측정된 결과는 Fig. 6과 같았다. 당농도

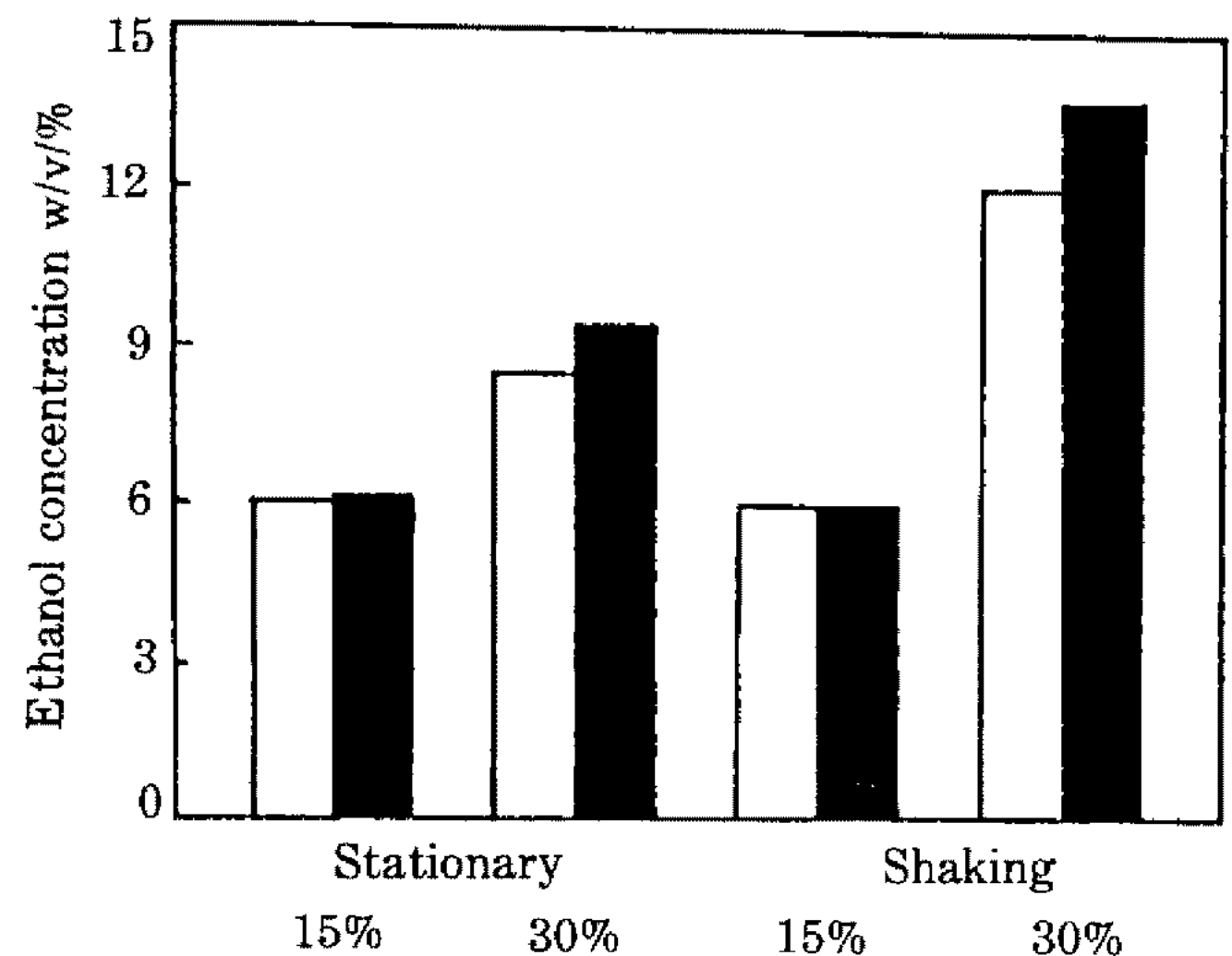


Fig. 6. Effect of agitation on the ethanol fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* D1 and *Saccharomyces cerevisiae* Balyon 1.
Cells were cultured at 30°C for 72 in 15% and 30% glucose medium.
S. cerevisiae D1: ■, *S. cerevisiae* Balyon 1: □

가 15%의 경우는 진탕효과가 없었으나 당농도가 30%의 경우는 진탕효과가 크게 나타났다. 분리균의 경우 정지, 진탕배양시 각각 9.3%(w/v), 14.0%(w/v)의 알콜을 생산하였으며 대조균의 경우 8.4%(w/v), 12.0%(w/v)의 알콜을 생산하였다. 분리한 균과 대조균 모두가 고농도의 당을 함유한 배지에서 알콜발효할 경우, 진탕배양하므로 알콜수율이 증가하는 결과를 관찰할 수 있었다. 이 결과로부터 고농도의 당에서 알콜발효시는 통기하는 것이 효과적이라 생각할 수 있었다.

요 약

토양으로부터 분리한 효모는 내당성, 내알콜성이 있으며 알콜발효능이 우수한 균주를 분리하여 *Saccharomyces cerevisiae*로 동정하였다. 이 균의 특성을 살펴본 결과 당농도가 60% 배지에서도 생육이 가능한 내당성의 특징과 15%(v/v) 이상의 에탄올이 함유된 배지에서는 생육할 수 없고 15%(v/v) 에탄올에 2일 침적 후 알콜에 의한 알콜발효능의 저해율은 39.1% 저해받았으며 8.0%의 생존률을 나타내는 내알콜성특징과 2.0mM의 구리가 함유된 배지에서도 생육할 수 있는 내구리성의 특성을 갖고 있었다. 또한 분리균주의 알콜발효특성을 조사한 결과 배지 초기 pH는 4.5, 배양온도는 30°C, 초기 당농도는 30%일 때가 좋았으며 30% 당농도의 배

지를 사용하여 30°C, 3일 진탕배양에 의해 50.5%의 발효수율이 증가한 14.0%(w/v)의 알콜을 생산하였다.

감사의 말씀

본 연구의 일부는 동력자원부 대체에너지 개발과제의 지원연구비로 이루어졌으며 이에 대하여 감사드립니다.

참고문헌

1. 이상필 : 산업정보시리즈, **18**, 4-8(1987).
2. Casey, G.P. and W.M. Ingledew: *CRC Critical Reviews in Microbiology* **13**, 219 (1986).
3. Struley, S.L. and T.W. Young: *Biotech. Genet. Eng. Revs.* **4**, 1-35 (1986).
4. Saito, K., K. Moriya, H. Shimoi, S. Sato, M. Tadenuma and K. Yoshizawa: *J. Brew. Soc. Japan* **82**, 6, 439-443 (1987).
5. Perfecto, Q.F. and S. Hayashida: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol* **18**, 148-152 (1983).
6. Benitez, T., L. Castillo, A. Aguilera, J. Conde and E. Cerdaolmedo: *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 5, 1429-1435 (1983).
7. Vegmann, R. and P. Maragalith: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 198-202 (1986).
8. Watanabe, S., K. Kiamoto, K. Takahasi and K. Yoshizawa: *J. Brew. Soc. Japan* **83**, 11, 757-763 (1988).
9. Legmann, R. and P. Maragalith: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 198-202 (1986).
10. Jimenez, J. and T. Benitez: *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 4, 917-922 (1988).
11. Pascual, C., A. Alonso, I. Garcla, C. Romay and A. Kolyk: *Biotech. Bioeng.* **32**, 374-378 (1988).
12. Jimenez, J. and T. Benitez: *Curr. Genet.* **12**, 421-428 (1987).
13. Agudo, L.C.: *Curr. Microbiol.* **12**, 41-44 (1985).
14. D'Amore, T., C.J. Panchal, I. Russell and G.G. Stewart: *J. Indust. Microbiol.* **2**, 365-372 (1988).
15. Stewart, G.G., T. D'Amore, C.J. Panchal and I. Russell: *MBAA Technical Quarterly.* **25**, 47-53 (1988).
16. Jones, R.P., N. Pamment and P.F. Greenfield: *Process Biochemistry* **16**, 42-49 (1981).
17. Lodder, J. and K. Riji: "The Yeasts, A taxonomic study" North Holland Publishing, Co., Amsterdam (1967).
18. Kalmokoff, M.L. and W.M. Ingledew: *ASBC Journal* **43**, 4, 189-196 (1985).
19. Weltch, J.W., S. Fogel, G. Cathala and M. Karin: *Mol. Cell. Biol.* **3**, 1353-1361 (1983).
20. Bergmeyer, H.U.: *Methods of Enzymatic Anlysis Vol. 2*, Academic Press, 885 (1974).
21. Jimenez, J. and T. Benitez: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 150 (1986).
22. Jimenez, J. and N. Uden: *Biotech. Bioeng.* **27**, 1596-1598 (1985).
23. Brown, S.W., S.G. Oliver, D.E.F. Harrison and R.C. Righelato: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **11**, 151 (1981).
24. Stokes, J.L.: *The Yeast Vol. 2*, Academic Press, 199
25. 森室和仁, 斉藤和夫, 下飯仁, 佐藤俊一, 蔘沼誠: *J. Brew. Soc. Japan* **21**, 577(1987).

(Received August 13, 1990)