

*S. cerevisiae*에 의한 알콜배지에서 질소원 조성의 최적화 연구

허 병 기 · 유 현 주 · \*정 재 기  
인하대학교 공과대학 생물공학과  
\*인하대학교 공과대학 환경공학과

The Optimization of the Composition of Nitrogen Source in the Medium of Alcohol Fermentation of *S. cerevisiae*

Byung Ki Hur, Hyun Ju Yoo and Jae Kee Jung\*  
Department of Biological Engineering, Inha University  
\*Department of Environmental Engineering, Inha University

ABSTRACT

The effect of concentration of yeast extract and  $\text{NH}_4\text{Cl}$  in the medium of alcohol fermentation of *S. cerevisiae* ATCC 24858 on the fermentation characteristics, specific growth rate, sugar conversion, alcohol productivity was experimentally investigated.

Regardless of initial sugar concentrations, the values of the above three characteristics increased with augument of concentration of yeast extract. However, the increasing tendency ceased above a certain concentration. The concentration of  $\text{NH}_4\text{Cl}$  had little effect on the change of the three characteristics. The functional relationships between the concentration of yeast extract and the characteristics were different according to the initial sugar concentrations, but those between the ratio of yeast extract concentration to initial sugar concentration and the characteristics could be expressed as same forms respectively regardless of initial sugar concentrations.

Also the values of the three characteristics approached to the maximum values around 0.085 of the ratio, but did not increase any more above 0.1 of the ratio.

We have come to conclusion that the optimum ratio of the yeast extract concentration to the initial sugar concentration was about 0.085 and the ratio should not be decided as greater than 0.1 in the medium of alcohol fermentation of *S. cerevisiae* ATCC 24858.

서 : 론

발효알콜이 대체에너지원으로서의 경제성을 띄기 위해서는 생산성 향상 문제가 해결되어야 한다. 균주의 탐색, 균주의 개량, 바이오리액터의 개발, 경제적 분리공정의 개발등 여러 측면에서 알콜생산성 향상을 위한 연구가 수행되고 있다. 이중 하나가 발효배지의 최적화 연구이다. 알콜발효에 사용되는 배지에는 균체의 에너지원으로

로 필요한 당분은 물론 균체의 구조 합성에 필요한 탄소, 질소, 인, 황, 칼륨, 마그네슘등의 성분이 구조성분합량에 비례적으로 포함되어 있어야 한다. 또한 극미량의 망간, 코발트, 구리, 아연등의 미네랄과 유기성장인자인 아미노산, 핵산, 비타민등도 소량 필요하게된다(1). 따라서 알콜발효 배지에는 위의 성분들이 균체의 대사활동에 최적인 조성으로 구성되어야 한다.

실험실 규모의 실험에서는 균체의 성장속도 및 알콜생

성속도를 급속히 증대시키고 효율을 향상시키기 위하여 포도당 기질이외에 NH<sub>4</sub>Cl, MgSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub> 및 효모추출물이 보강되어야 한다(2). 암모니아 이온은 단백질이나 핵산의 합성에 필요한 질소원으로 사용되며 효모추출물은 균체의 구조합성에 필요한 아미노산, 퓨린·피리미딘, 비타민 및 각종 미네랄을 제공한다. 따라서 알콜발효 배지중 암모니아이온 및 효모추출물의 조성은 균체의 성장 및 알콜 생산성에 큰 영향을 미치게 된다.

Fig. 1은 알콜 발효에서 사용되는 여러 균주의 발효배지에 대한 포도당 농도와 효모 추출물 및 암모니아 이온 농도 사이의 함수관계를 나타내고 있다. Fig. 1의 기호는 Table 1에 표시된 미생물을 의미하며 원으로 둘러싸인 점은 효모 추출물의 농도를, 그렇지 않는 점은 암모니아 이온 농도를 나타낸다.

이 분석 결과에 의하면 발효배지에 암모니아이온과 효모추출물의 조성은 균주의 종류, 당농도, 및 발효 방식에 따라서 변화된다는 것을 알 수 있다. 포도당 농도 10 g / l를 기준으로 했을 때 균주에 따라서 암모니아 이온 농도는 0.268 내지 5.07 g / l 사이에, 효모추출물의 농도는 0.56에서부터 20 g / l 사이에 분포되어 있었다(3-16). 암모니아 이온 및 효모추출물의 농도와 당농도 사이의 관계를 살펴보면 당농도 변화에 따라서 비례적으로 두 조성의 농도가 변화하는 경우가 있는(6, 16) 반면 당농도 변화에 관계없이 이 두 조성이 고정되는 경우도 있었다(3, 8, 9, 14, 15). 또한 동일한 균주 *S. cerevisiae* ATCC 24858에 대하여서도 발효방식 및 당농도 변화에 따라서 단위 당농도에 대한 효모추출물 및 암모니아 이온의 농도값이 차이를 나타내었다(3, 6, 8).

이 결과에 의하면 효모추출물 및 암모니아 이온 농도가 어떤 값일때 균체의 성장속도 및 알콜생산성이 최적상태에 도달할 수 있는지가 분명하지 않다. 따라서 본

연구에서는 효모 *S. cerevisiae* ATCC 24858을 사용하여 당농도와 효모추출물 및 암모니아 이온 농도사이의 함수관계를 구명함으로써 균체의 성장속도 및 알콜생산성이 최적인 이 두 성분의 조성을 규명하려고 하였다.

재료 및 방법

균주

본 실험에 사용한 균주는 *S. cerevisiae* ATCC 24858이다. 4℃ 사면배지상에 냉장보관된 균주를 YM액체배지에 접종하고 30℃에서 16시간동안 진탕배양시킨 후 알콜 발효실험의 집중균주로 사용하였다.

발효기질

본 실험에서 사용한 발효기질의 기본조성은 Table 2와 같다. 암모니아이온과 효모 추출물의 농도가 발효특성에 미치는 영향을 규명하기 위하여 Table 2 기본조성의 NH<sub>4</sub>Cl 농도와 효모추출물의 농도를 1/4배 내지 3배 사이의 범위에서 변화시켜 가면서 발효실험을 수행하였다. 당농도 변화에 대한 영향을 알아보기 위하여 발효배지내의 초기 당농도가 30, 75, 150 g / l인 경우 각각에 대하여 실험하였다. 당농도가 100 g / l와 다른 경우에 대한 다른 성분의 기본 조성은 당의 변화량과 비례적으로 변화시켰다. 이 경우 역시 NH<sub>4</sub>Cl 및 효모추출물의 농도는 기본조성의 1/4배 내지 3배 사이에서 변화시켰다.

갈변현상을 방지하기 위하여 당은 나머지 성분들과 분리 별관하였으며 pH는 0.2N NaOH용액과 0.2N HCl 용액을 사용하여 4.5가 되도록 조절하였다.

Table 2. Basic Composition of Fermentation Medium

Component	Composition ( g / l )
Glucose	100.0
NH <sub>4</sub> Cl	1.3
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.12
CaCl <sub>2</sub>	0.06
Yeast Extract(DIFCO)	8.5

발효실험

회전식 진탕배양기에서 온도 30℃, 회전수 130rpm으로 배양하였다. 시간에 따른 발효특성치의 변화를 규명하기 위하여 발효시작 15시간까지는 매 3시간 간격으로 시료를 채취하였으며 그 이후에는 발효가 거의 종결된 후에 최종 시료를 채취하였다.

Table 1. Microorganisms

Symbols	Microorganisms	References
A	<i>S. cerevisiae</i> ATCC 24858	(3),(6),(8)
B	<i>K. fragilis</i> NRRL 655	(4)
C	<i>S. cerevisiae</i> , Compressed bader's Yeast Mauri DYC Foods, Auckland	(5)
D	<i>S. cerevisiae</i> ATCC 4126	(7),(16)
E	<i>S. bayanus</i>	(9)
F	<i>S. cerevisiae</i> NRRL-Y 132	(11),(13)
I	<i>S. cerevisiae</i> NRRL-Y 265	(15)
M	<i>Zymomonas mobilis</i>	(14)
O	<i>S. cerevisiae</i>	(12)

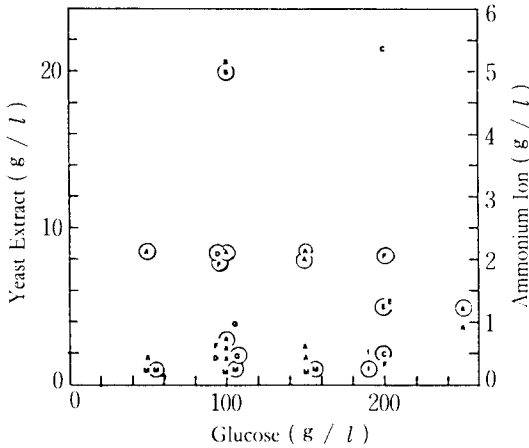


Fig. 1. Concentrations of glucose vs. those of yeast extract and ammonium ion in the media used for the ethanol fermentation of various microorganism.

증가시킴으로써 거의 100%에 접근함을 알 수 있다. 또한 당 전환율이 최대점에 도달하는 효모추출물의 농도는 초기 당농도와 함수관계에 있다는 결론에 도달할 수 있다.

u UV-120)를 사용하여 DNS법(17)으로 분석하였으며, 알콜농도는 n-propanol을 기준물질로 하여 Gas-Chromatography (HP 5890A)를 이용하여 분석하였다(18). 균체 농도는 분광광도계를 사용하여 660nm에서 얻은 균체 회색액의 흡광도를 균체 건조량과 흡광도 사이의 표준곡선(19)으로 부터 구하였다.

**결과 및 고찰**

**NH<sub>4</sub>Cl 및 효모추출물의 농도와 균체의 비성장속도**

Fig. 2a는 초기 당농도를 75 g/l로 하고 효모추출물의 농도를 매개변수로 했을때 NH<sub>4</sub>Cl농도와 대수기에서의 비성장속도 사이의 함수관계를 나타내고 있다. 이 결과에 의하면 효모추출물의 농도를 2.5 내지 9.0 g/l 사이의 값으로 고정시키면 NH<sub>4</sub>Cl의 농도 변화는 균체의 비성장속도에 거의 영향을 미치지 않음을 알 수 있다.

Fig. 2b는 동일 초기 당농도에 대하여 NH<sub>4</sub>Cl의 농도를 매개변수로 했을 때 효모추출물의 농도와 균체의 비성장속도 사이의 함수관계를 나타내고 있다. NH<sub>4</sub>Cl농도에 관계없이 효모추출물의 농도가 증가하면 비성장속도도 증가하나 6.5 g/l 이상에서는 증가 현상이 둔화됨을 알 수 있다. 초기 당농도가 30 g/l, 150 g/l인 경우

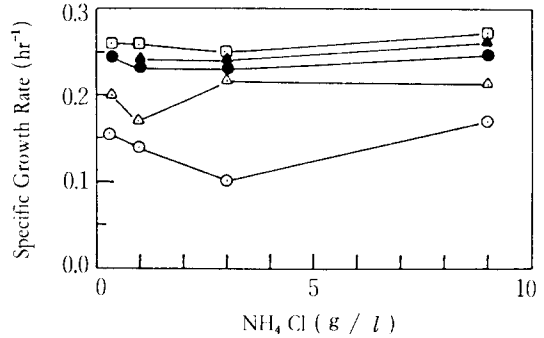


Fig. 2a. Specific growth rate vs. concentration of NH<sub>4</sub>Cl. Yeast extract concentration (g/l), □=9.0, ▲=7.5, ●=6.38, △=4.5, ○=2.5. Initial sugar conc., 75 g/l

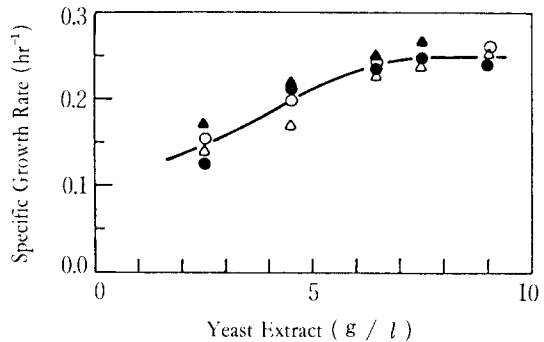


Fig. 2b. Specific growth rate vs. concentration of yeast extract. NH<sub>4</sub>Cl concentration (g/l), ○=0.33, △=0.975, ●=3.0, ▲=9.0. Initial sugar conc., 75 g/l.

에도 NH<sub>4</sub>Cl 및 효모 추출물의 농도가 비성장속도에 미치는 영향은 Fig. 2와 같은 경향을 나타내었다.

Fig. 3은 초기 당농도와 대수기에서 비성장속도의 최대치를 나타내는 효모추출물 농도사이의 함수관계를 나타내고 있다. 이 결과에 의하면 초기 당농도와 효모추출물 농도 사이에는 선형적인 함수관계가 성립됨을 알 수 있다. 따라서 이 직선의 기울기로 부터 균체의 비성장속도가 최대치가 되는 단위 농도당의 효모추출물 농도비를 구하면 0.085가 됨을 알 수 있다.

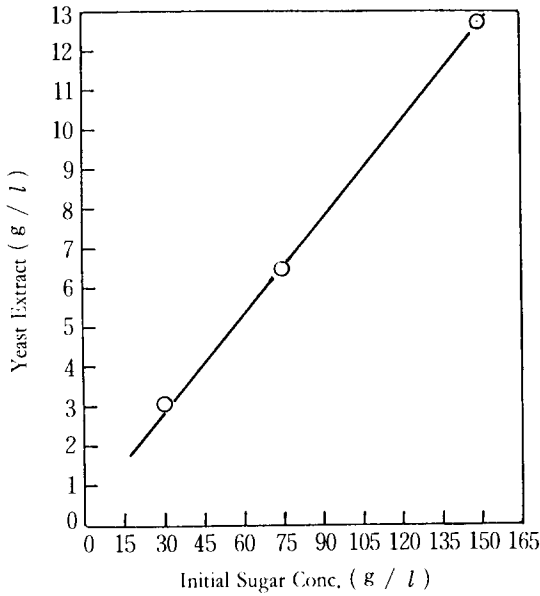


Fig. 3. Concentrations of yeast extract vs. those of initial sugar at the maximum specific growth rate.

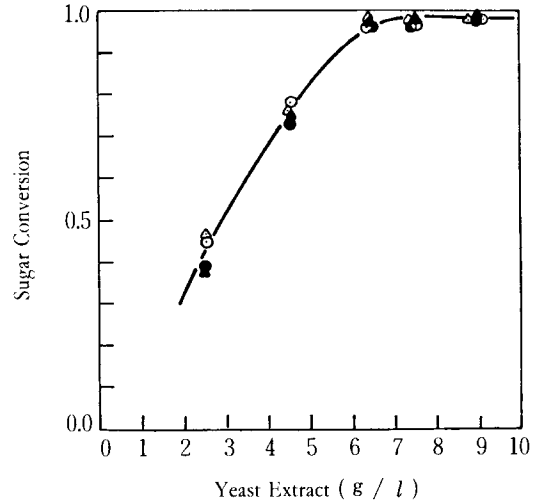


Fig. 4b. Sugar conversions vs. concentrations of yeast extract.  $\text{NH}_4\text{Cl}$  concentrations (g/l),  $\blacktriangle=9.0$ ,  $\bullet=3.0$ ,  $\triangle=0.975$ ,  $\circ=0.33$ . Initial sugar conc. (75 g/l).

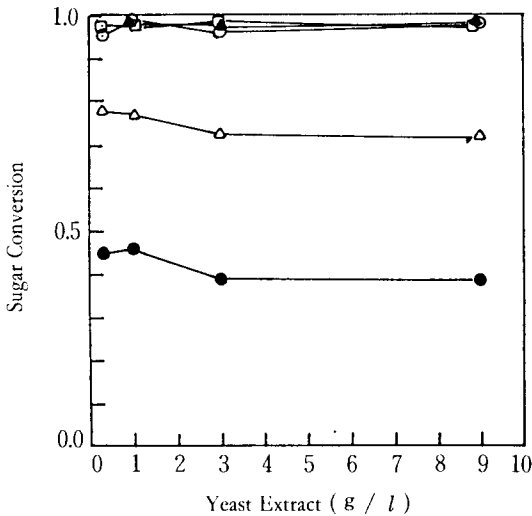


Fig. 4a. Sugar conversions vs. concentrations of  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . yeast extract concentrations (g/l),  $\square=9.0$ ,  $\circ=7.5$ ,  $\blacktriangle=6.38$ ,  $\triangle=4.5$ ,  $\bullet=2.5$ . Initial sugar conc. (75 g/l).

이 결과에 의하면  $\text{NH}_4\text{Cl}$  농도가 증가함에 따라 3 g/l까지는 알콜생산성이 다소 감소하는 것 같으나 이 경향 역시 뚜렷하지 않다. 알절의 당전환율, 비성장속도에 대한 분석결과와 같이 효모추출물의 농도가 일정한 것이다. 매개변수 효모추출물의 농도가 일정한 경우 0.33 g/l 내지 9.0 g/l 범위에서의  $\text{NH}_4\text{Cl}$  농도변화는 당 전환율에 영향을 거의 미치고 있지 않음을 알 수 있다.

Fig. 4b에 나타나 있듯이 효모추출물의 농도는 매개변수  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 의 농도에 관계없이 당 전환율에 영향을 크게 미친다는 것을 알 수 있다. 효모추출물의 농도가 낮을 경우에는 농도의 증가에 따라 당 전환율이 급격히 상승하나 6.4 g/l 이상에서는 당 전환율이 더 이상 증가하지 않았다. 위와 동일한 경향을 초기 당농도 30 g/l, 150 g/l에 대하여서도 얻을 수 있었다.

Fig. 5는 초기 당농도 30, 75, 150 g/l에 대하여 효모추출물 농도와 당 전환율 사이의 함수관계를 나타내고 있다. 이 그림의 당 전환율 각 점은 Fig. 4a와 같은 그림의 동일한 효모추출 농도에서 매개변수 농도변화에 따라 얻은 당 전환율의 평균값을 의미한다. 이 결과에 의하면 효모 *S. cerevisiae* ATCC 24858의 당 전환율은 초기 당농도 30내지 150 g/l 사이에서는 효모추출물의 농도를

**시료분석**

시료가 담긴 시험관을 4,000rpm으로 30분간 원심분리한 후 상등액은 잔당과 알콜농도 분석에 침전물은 관체농도 분석에 사용하였다. 잔당농도는 분광광도계(Shimadzu

Fig. 6은 초기 당농도 30, 75, 150 g / l에 대하여 단위당농도에 대한 효모추출물 농도의 비와 당 전환율 사이

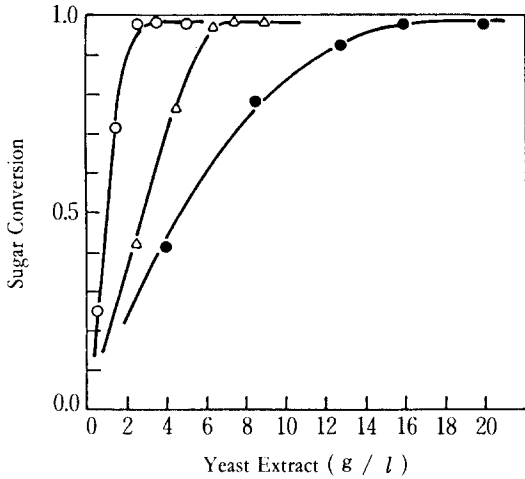


Fig. 5. Sugar conversions vs. concentrations of yeast extract at initial sugar concentrations, 30(○), 75(△), and 150(●) g / l.

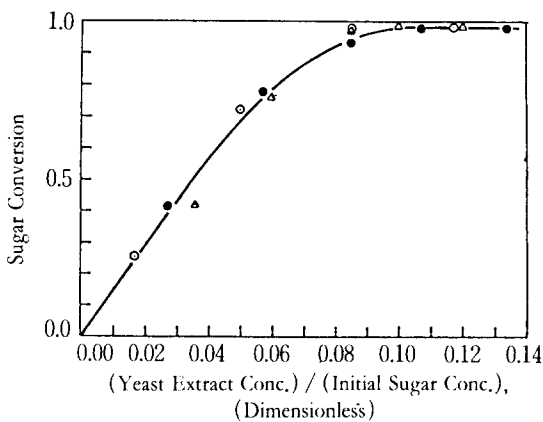


Fig. 6. The ratio of yeast extract conc. to initial sugar conc. vs. sugar conversion at various initial sugar conc.,  
○=30 g / l, △=75 g / l, ●=150 g / l.

의 함수관계를 표시한 것이다. 이 함수관계는 초기 당농도에 관계없이 하나의 함수로 표시할 수 있음을 알 수 있다. 또한 당농도에 대한 효모추출물 농도 비가 증가할수록 전환율이 증가하여 비값이 0.085에 이르면 최대 당 전환율에 도달하며 비값이 1.0이상에서는 당 전환율이 전혀 증가되지 않음을 알 수 있다.

**알콜생산성과 NH<sub>4</sub>Cl 및 효모추출물 농도사이의 관계**

Fig. 7a는 초기 당농도 75 g / l인 발효실험에서 발효가 종료되었을 때 효모추출물 농도를 배개변수로 한 알콜생산성과 NH<sub>4</sub>Cl농도 사이의 함수관계이다. 본 연구에서 이용한 알콜생산성은 발효가 끝났을 때의 알콜농도에서 발효 초기의 알콜농도를 뺀 값을 발효시간으로 나눈 값으로 다음식으로 정의된다.

$$\text{알콜생산성} = \frac{\Delta P}{\Delta t}$$

윗식에서, ΔP=발효 종결시의 알콜농도-발효초기 알콜농도  
Δt=발효시간

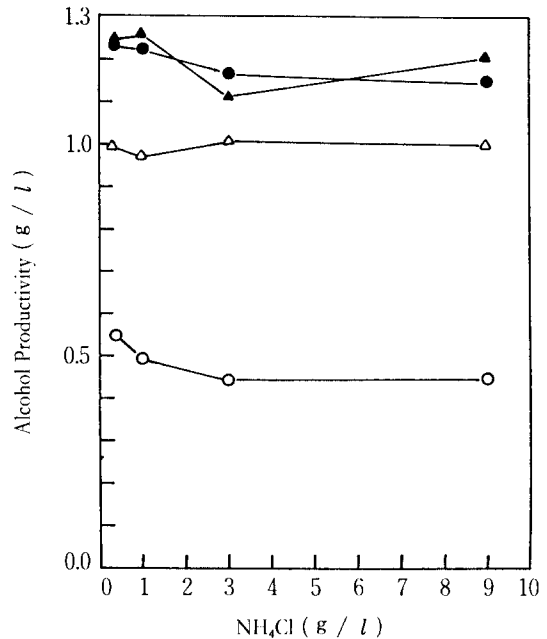


Fig. 7a. Alcohol productivity vs. NH<sub>4</sub>Cl concentration. Yeast extract concentration (g / l),  
▲=7.5, ○=6.38, △=4.5, □2.5.  
Initial sugar concentration, 75 g / l.

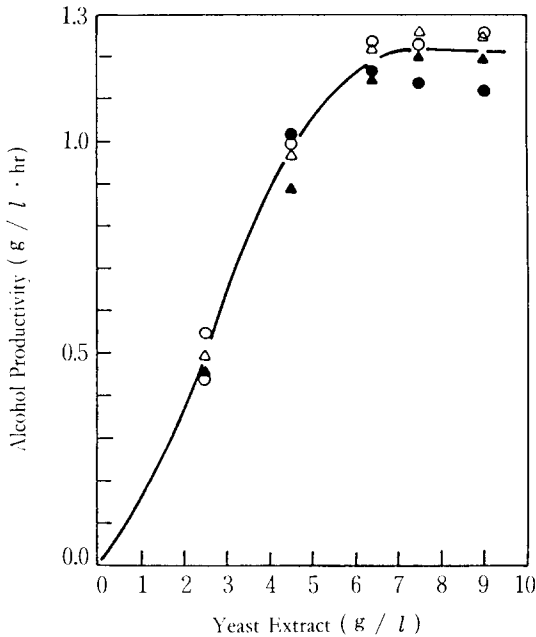


Fig. 7b. Alcohol productivity vs. concentration of yeast extract. NH<sub>4</sub>Cl Conc. (g/l), ▲=9.0, ○=3.0, △=0.915, ○=0.33. Initial sugar concentration, 75 g/l.

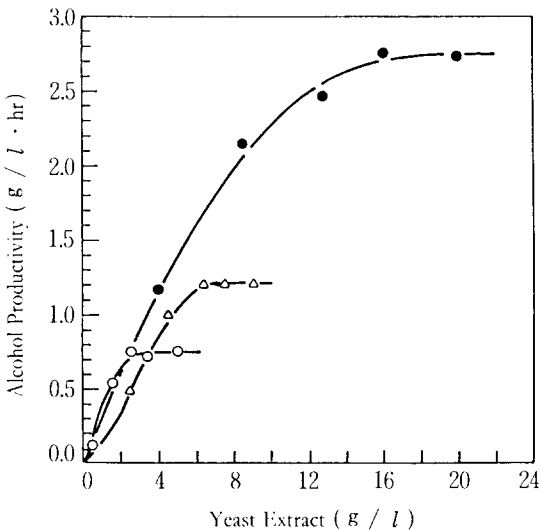


Fig. 8. Alcohol productivity vs. yeast extract conc. at various initial sugar conc., ○=30 g/l, △=75 g/l, □=150 g/l.

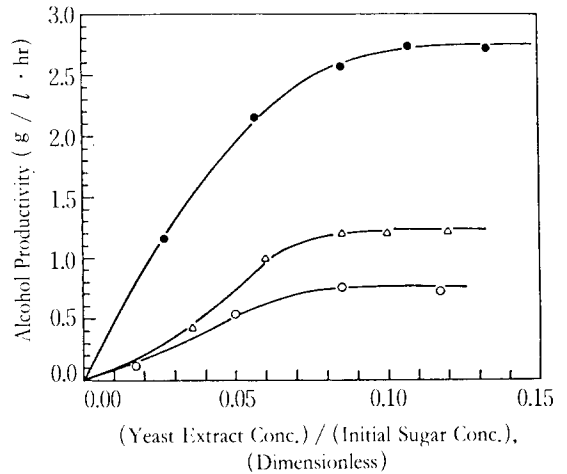


Fig. 9. Alcohol productivity vs. (Y.E. Conc.) / (initial sugar conc.) at initial sugar concentrations, ○=30 g/l, △=75 g/l, □=150 g/l.

당 전환율과 NH<sub>4</sub>Cl 및 효모추출물 농도 관계

Fig. 4a는 초기 당농도가 75 g/l인 경우 발효가 종결되었을 때의 당 전환율을 NH<sub>4</sub>Cl농도의 함수로 표시한 경우 NH<sub>4</sub>Cl의 농도변화는 알콜생산성에 영향을 거의 주지 않는다.

Fig. 7b는 NH<sub>4</sub>Cl농도를 매개변수로 했을 때 효모추출물의 농도와 알콜생산성과의 함수관계를 나타내고 있다. 효모추출물 농도 6.5 g/l까지는 농도 증가에 따라 알콜생산성이 급격히 증가하나 그 이상에서는 거의 증가되지 않음을 알 수 있다. 위와 같은 경향은 초기 당농도 30 g/l, 150 g/l인 경우에도 동일하였다.

Fig. 8은 각 효모추출물 농도에서 NH<sub>4</sub>Cl농도 변화에 따라 얻은 알콜생산성값의 평균치와 효모추출물 농도 사이의 함수관계를 초기 당농도 30, 75, 150 g/l에 대하여 나타낸 것이다. 알콜생산성은 효모추출물의 농도와 초기 당농도의 함수이며 각 초기 당농도에서 최대 알콜생산성을 나타내는 효모추출물의 농도는 서로 다른 값을 나타내며 당농도에 따라서 증가함을 알 수 있다.

Fig. 9는 단위 당농도에 대한 효모추출물 농도비와 알콜생산성 사이의 함수관계를 여러가지 초기 당농도에 대하여 표시한 결과이다. 초기 당농도에 관계없이 이 비값과 알콜생산성은 동일한 함수관계를 나타냄을 알 수 있다. 비 값이 증가하면 초기 당농도에 관계없이 알콜생산성은 증가하나 0.085 이상에서는 알콜생산성이 더이상 증가하지 않는다. 알콜생산성 측면에서 고찰하면

초기 당농도에 관계없이 효모추출물의 농도가 초기 당농도에 대하여 0.085값 이상이 되게 할 필요가 없음을 알 수 있다. 더욱이 이 값이 0.1 이상에서는 알콜생산성 증대에 전혀 영향을 미치지 않는다는 것을 예측할 수 있다.

## 요 약

알콜발효 배지 중 질소원으로 사용되는 효모추출물과  $\text{NH}_4\text{Cl}$  농도 변화가 효모 *S. cerevisiae* ATCC 24858의 발효 특성, 균체 비성장속도, 당전환율 및 알콜 생산성에 미치는 영향을 규명하여 보았다.

초기 당농도에 관계없이 효모추출물의 농도가 증가하면 위의 세 특성치값도 동시에 증가하나 어느 농도 이상에서는 그 증가 경향이 멈추었다. 그러나  $\text{NH}_4\text{Cl}$  농도 변화는 이들 세 특성치 변화에 영향을 거의 미치지 않았다. 초기 당농도 변화에 따라서 비성장속도, 당전환율, 및 알콜 생산성과 효모추출물 농도 사이의 함수관계는 서로 다르게 나타났으나 단위 당농도에 대한 효모추출물의 농도비와 위의 세 특성치 사이의 함수관계는 초기 당농도에 관계없이 각각 동일한 함수로 표현할 수 있었다. 또한 이 비값 0.085 근방에서 이 특성치들이 동시에 최대값에 접근하였으며 0.1 이상에서는 그 증가가 완전히 멈추었다.

효모 *S. cerevisiae* ATCC 24858의 알콜발효 배지 중 효모추출물의 농도는 초기 당 농도에 대하여 0.085근방의 값이 되도록 결정하는 것이 최적이며 0.1 이상이 되지 않도록 하는 것이 바람직하다.

## 참 고 문 헌

1. N. Kosaric et al. (1983), *Biotechnology* (H. Dellweg eds), **3**, 261.
2. B. L. Maiorella(1985), *Comprehensive Biotechnology* (M. Moo-Young eds), **3**, 877, Dergamon Press.
3. I. J. Chung and Y. S. Park(1983), *PACHEC* 83, **3**, P. 174-179.
4. H. Udriot et al. (1989), *Biotechnol. Lett.*, **11**(7), 509
5. P. G. Crabbe et al. (1986), *Biotechnol. Bioeng.*, **11**, 939.
6. C. W. Lee and H. N. Chang(1987), *Biotechnol. Bioeng.*, **29**, 1005
7. R. Grasz and G. Stephanopoulos(1990), *Biotechnol. Bioeng.*, **36**, 1006
8. T. Cho and M. L. Shuler(1986), *Biotechnology Progress*, **2**(1), P. 53-60.
9. M. R. Aires Barros et al. (1987), *Biotechnol. Bioeng.*, **29**, 1097
10. M. Minier and G. Goma(1982), *Biotechnol. Bioeng.*, **24**, 1565
11. H. Y. Wang et al. (1981), *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, No. 11, 555.
12. D. Williams and D. M. Munnecke(1981), *Biotechnol. Bioeng.*, **20**, 1813
13. M. A. Gencer and R. Mutharasan(1983), *Biotechnol. Bioeng.*, **25**, 2243.
14. M. R. Melick et al.(1987), *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 370.
15. C. B. Netto and G. Goma(1987), *Biotechnol. Bioeng.*, **30**, 320.
16. G. R. Cysewski and C. R. Wilke(1977), *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 1125
17. G. L. Miller(1959), *Anal. Chem.*, **31**, 426.
18. 김진환, 허병기, 북영일(1991), *한국생물공학회지*, **6**(2), 123
19. 허병기, 김현성, 북영일(1989), *한국생물공학회지*, **4**(2), 191.

(Received; August 20, Accepted; September 20)