

메주에서 분리한 고온성 효모 *Saccharomyces cerevisiae* OE-16의 생리적 특성과 알코올 발효

김재호 · 김나미* · 이종수

배재대학교 유전공학과, *한국인삼연초연구원

Physiological Characteristics and Ethanol Fermentation of Thermotolerant Yeast *Saccharomyces cerevisiae* OE-16 from Traditional Meju

Jae-Ho Kim, Na-Mi Kim* and Jong-Soo Lee

Dept. of Genetic Engineering, Paichai University, Taejeon 302-735, Korea, *Korea Ginseng and Tobacco Research
Institute, Taejeon 305-345, Korea

Abstract

A thermotolerant yeast, *Saccharomyces cerevisiae* OE-16 was isolated from traditional Meju, was investigated on their physiological characteristics and ethanol fermentation ability. *Saccharomyces cerevisiae* OE-16 were able to grow up to 45°C and 40% of glucose. *Saccharomyces cerevisiae* OE-16 was also resistant to 15% of KCl, 1,200ppm of Pb²⁺, Hg²⁺ and 500ppm of potassium sorbate. From 20% glucose media, *Saccharomyces cerevisiae* OE-16 produced 83.4g per liter of ethanol at 30°C and 9.5g per liter of ethanol at 40°C for 72 hours.

Key words: physiological characteristics, ethanol fermentation, thermotolerant yeast *Saccharomyces cerevisiae* OE-16.

서 론

에탄올 발효에서 고온성 효모를 이용하면 발효 중에 잡균의 오염을 방지할 수 있고 술덧 냉각에 소요되는 경비와 노력을 절감할 수 있으며 하절기에 술덧의 품질이 상승하여도 냉각처리없이 안전하게 발효할 수 있는 이점이 있다. 또한 다당류를 이용한 알콜 발효시 고온에서 당화와 발효를 동시에 실시할 수 있는 잇점 등이 있으므로 발효공업에서 매우 유용하게 이용될 수 있다¹⁻⁵⁾.

지금까지 고온성 효모로는 *Saccharomyces cerevisiae* D-71¹⁾, *Saccharomyces cerevisiae* F38-1^{5,6)}, *Saccharomyces cerevisiae* D-1⁷⁾, *Saccharomyces peka*, *Saccharomyces anamensis*, *Saccharomyces thermantito*, *Hansenula polymorpha*, *Saccharomyces fermentati*, *Kluyveromyces maxianus*와 *Kluyveromyces fragilis*, *Pichia* 속균과 *Saccharomyces* D-6, K-34 등

많은 균주들이 알려져 있고⁸⁻¹⁰⁾ 생육 최고온도와 알콜 발효력 등이 다양하여 일부 균주들이 알콜발효공업에 유용하게 이용되고 있고 기존의 알콜 발효 효모와의 세포 융합 등을 통한 균주 육종에도 응용되고 있다^{1,4,5,6)}

최근 전통 장류의 각종 생리 기능성이 소개되면서 이들의 수요가 점점 증가하고 있다. 이들 전통 장류의 품질을 좌우하는 것은 메주 발효에 관여하는 미생물 들로서 이들은 제조 지역과 제조 방법에 따라 다르게 분포하고 있다. 일반적으로 메주에는 *Mucor mucedo*, *Rhizopus japonicus*, *Penicillium glaucum* 등과 *Aspergillus* 속균, *Rhizopus nigricans*, *Rhizopus chinensis*, *Rhizopus oryzae* 등의 곰팡이 들이 주로 표면 분포하고 있고 *Bacillus pumilus*와 *Bacillus subtilis* 등의 세균 등이 표면과 내부에 골고루 서식하고 있으며 그 밖에도 *Mucor hiemalis*와 *Mucor circinelloides*, *f. griseo-cyanus*, *Rhizopus oryzae*와 *Rhizopus stolonifer*,

* Corresponding author : Jong-Soo Lee

*Absidia corymbifera*와 *Avidia gluaca*, *Absidia spinosa*, *Scopulariopsis brevicaulis* 등이 전국에서 제조되고 있는 재래식 메주에서 발견되고 있다^{11,12}). 또한 일부 재래식 메주에서 진균류와 bacteriocin을 생성하는 젖산균 및 각종 생리 특성을 가진 효모 등이 분포하고 있는 것으로 알려지고 있으며¹¹) 간장 발효¹³)와 유통과정 중의 변질 장류로부터 가스발생 효모가 분리되어 이들의 특성이 밝혀졌다¹⁴).

지금까지 메주 발효에 관여하는 효모로 조¹⁵)가 강원도와 경상북도의 재래식 메주에서 *Rhodotorula flava*와 *Torulopsis dattila* 등을 분리하였고 박 등¹⁶)도 재래식 고추장 메주에서 약 10^6 CFU/g의 효모가 분포함을 보고하였으나 정 등¹⁷)은 고추장 메주에서는 효모를 분리할 수 없었지만 이것을 원료로하여 담금하였을 때 발효 12개월에는 8.3×10^5 CFU/g의 효모가 분포함을 보고하였다.

필자 등은 재래식 메주로부터 기능성을 가진 산업용 효모들을 분리하여 장류산업과 알콜발효공업 등에 이용하고자 전국 각지의 재래식 메주에서 47주의 효모를 분리하여 동정하고¹¹) 이들의 각종 효소 활성과 생리 기능성 등을 조사하여¹⁸) 보고하였다. 본 연구에서는 이들 메주 효모 가운데 40°C에서 비교적 생육이 양호한 고온성 효모, *Saccharomyces cerevisiae* OE-16을 선정하여 각종 생리특성과 알콜발효력을 조사하였다.

재료 및 실험방법

1. 균주, 배지 및 시약

이 등¹¹)이 재래식 메주에서 분리한 47주의 효모 중에서 40°C에서 비교적 생육이 양호한 *Saccharomyces cerevisiae* OE-16을 시험균주로 사용하였다.

에탄올과 염류 등의 각종 내성 실험에는 주로 Difco사(미국)의 YM배지를 사용하였고 알코올 발효실험에는 20% glucose를 함유한 YEPD배지를 사용하였다.

또한 cycloheximide는 Wako화학사(일본) 제품을 사용하였고 각종 중금속과 일반 시약은 분석용 특급을 사용하였다.

2. 각종 내성 실험

YM배지에 glucose는 10~80%, NaCl과 KCl은 1~20%, 에탄올은 살균된 배지에 1~25%까지 일정 농도로 첨가하고 30°C에서 2~4일간 시험균주를 배양한 후 생육 정도를 분광분석기로 660nm에서 흡광도를 측정하여 이들의 내성을 조사하였다¹⁴).

또한 중금속 및 화학제에 대한 내성은 효모의 생육

을 억제하는 것으로 알려진 Pb, Hg, Co, Cu, Ag 등과 sorbic acid, cycloheximide, propionic acid 등을 YM배지에 중금속은 100~1,200 ppm, 화학제는 10~1,000 ppm까지 일정농도로 첨가한 후 위와 같은 방법으로 시험균주의 내성을 조사하였다.

3. 알코올 발효 실험

1) 효모배양

Saccharomyces cerevisiae OE-16을 7%의 glucose를 함유한 맥아즙 배지에 접종하여 30°C에서 2일간 배양하여 사용하였다.

2) 발효 및 에탄올 정량

20%의 glucose를 함유한 YEPD 배지 (pH 5.0)에 *Saccharomyces cerevisiae* OE-16의 전배양액을 5% 첨가하여 30°C와 40°C에서 각각 3일간 발효시켰다. 발효액의 에탄올 함량은 상법에 따라 일반 수증기 증류법으로 측정하였다^{1,5}).

결과 및 고찰

1. *Saccharomyces cerevisiae* OE-16의 생리적 특성

1) 생육온도 및 pH

일반적으로 에탄올 발효에서 초기 에탄올 생성량은 효모의 생육 온도가 높아질수록 증가하지만 최고 생육 온도에서는 생육저해와 함께 급격히 발효력이 떨어지는 것으로 알려져 있다^{8,19}). 생육 최적온도와 최고 온도를 검토하기 위하여 *S. cerevisiae* OE-16의 생

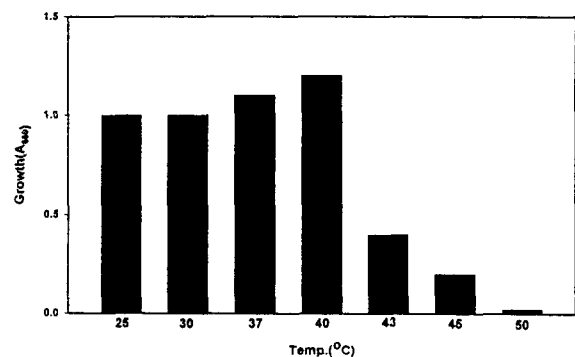


Fig. 1. Effects of temperature on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* OE-16. Growth was described as absorbance at 660 nm after incubation for 2 days in YM medium at each temperature.

육에 미치는 온도의 영향을 조사한 결과 Fig. 1과 같이 30°C보다 오히려 40°C에서 생육이 더 좋았고 45°C까지 생육하였다.

이러한 시험균주의 생육 최고온도는 고온 환경에서 분리한 *S. cerevisiae* F38-1의 생육 최고온도인 43°C^{5,6)}와 고온성 효모인 *S. cerevisiae* D-71¹⁾의 45°C와 유사하였으나 공장폐기물에서 분리된 고온성 효모 *S. cerevisiae* RA-74-2와 *K. maxianus* RA-912의 생육 최고 온도인 48°C³⁾보다 낮은 온도이었다.

한편, YM 배지의 초기 pH를 4.0에서 9.0까지 각각 조정하여 시험 균주의 생육에 미치는 영향을 조사한 결과 pH 5.0에서 생육이 제일 좋았고 중성보다는 산성영역에서 생육이 양호하였다¹¹⁾. (data not shown).

2) Glucose와 에탄올에 대한 내성

내당성 및 알코올 내성효모의 선별은 이들이 초기 발효속도를 빠르게 하고 최종 알콜농도를 증가시켜 주므로 산업적으로 중요하다^{1,5)}.

따라서 *S. cerevisiae* OE-16의 생육에 미치는 glucose의 영향을 조사한 결과 Fig. 2와 같이 40%의 glucose를 함유한 YM배지에서도 생육하여 변질 장류에서 분리된 가스생성효모들¹⁴⁾보다 비교적 내당성이 강하였으며 정 등¹⁷⁾이 고추장 발효 중 분리한 *S. cerevisiae*가 25% glucose를 함유한 YM 배지에서 생육이 좋았다는 결과와 유사하였다. 이러한 내당성은 알코올 발효공업에서 고농도 담금에 유리한 특성으로 생각된다.

또한 시험균주는 6% 이상의 에탄올 농도에서 생육이 저해되었다(Fig. 3). 이는 알코올 발효용 효모로서는 비교적 약한 알코올 내성이었지만 공장 폐기물에

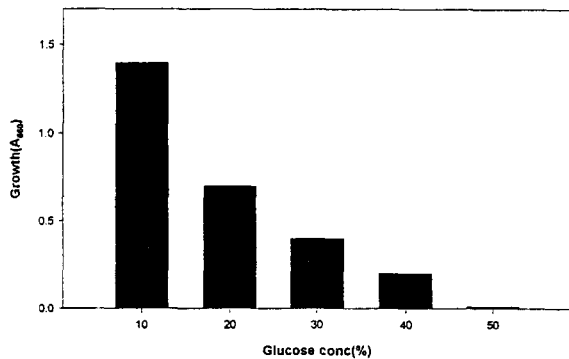


Fig. 2. Effect of glucose concentration on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* OE-16. Growth was described as absorbance at 660 nm after incubation for 2 days in YM broth containing various glucose concentration.

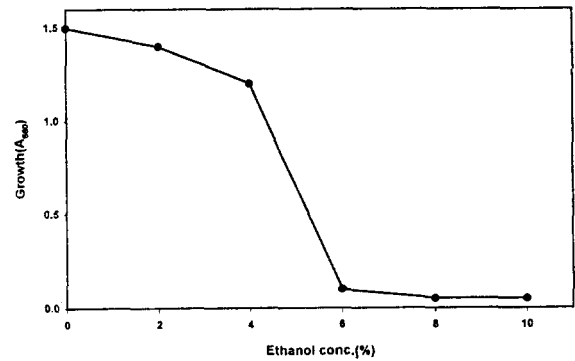


Fig. 3. Effect of ethanol concentration on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* OE-16. Cell was cultured at 30°C for 2 days in YM broth containing various ethanol concentration.

서 분리된 고온성 효모 *S. cerevisiae* RA-74-2와 *K. maxianus* RA-912³⁾ 및 고온 발효성 효모 *S. cerevisiae* F38-1^{5,6)}들의 에탄올 내성과는 유사한 결과이었다.

한편, 알코올 발효효모에 일시적인 열처리(충격)를 가하면 세포내에서 열 충격 단백질의 생성이 유도되어 에탄올 내성이 증가하는 것으로 알려져 있다³⁾. 따라서 시험균주 *S. cerevisiae* OE-16을 YEPD 배지에 접종하여 30°C에서 대수기 말기까지 24시간 배양한 후 37°C에서 1시간 열처리한 다음 15% 에탄올을 첨가하여 30°C에서 계속 배양하였을 때 배양 2일까지 계속적으로 생육하는 것으로 보아 시험균주의 에탄올 내

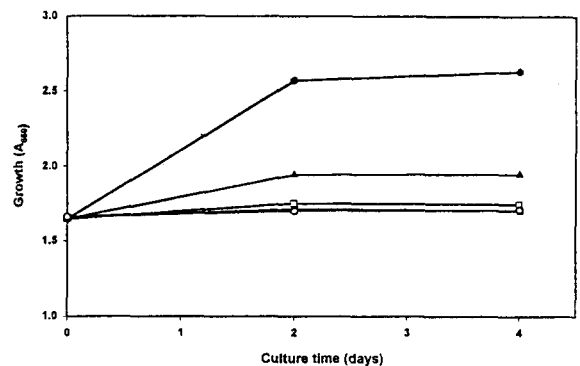


Fig. 4. Ethanol resistance of *Saccharomyces cerevisiae* OE-16 according to the temporary heat-treatment. The cultivation was carried out in YM media at 30°C. —●—: 30°C, ethanol free media, —○—: 30°C, 15% (v/v) ethanol media, —▲—: 30°C 1 hr(Heat stress)--30°C, 15% (v/v) ethanol media, —□—: 55°C 5min(Heat shock), --30°C, 15% (v/v) ethanol media, —■—: 55°C, 5min(Heat shock)--37°C, 1hr(Heat stress), --30°C, 15% (v/v) ethanol media.

성이 이와 같은 열처리로 증가되었음을 알 수 있었다 (Fig. 4). 그러나 위와 같이 대수기 말기까지 배양한 균을 55°C에서 5분간 열처리하거나 55°C에서 5분간 열처리 후 다시 37°C에서 1시간 처리했을 때는 생육이 정지되어 높은 온도에서의 열처리는 에탄올 내성에 아무런 영향을 주지 못하였다. 따라서 열처리에 따른 고온성 효모의 에탄올 내성 증가에 관한 생리생화학 적 기작을 설명할 수 있는 추가의 실험이 현재 진행중 이다.

한편, 손 등³⁾은 고온성 효모인 *S. cerevisiae* RA-74-2를 55°C에서 5분간 처리한 후 37°C에서 1시간 처리하였을 때와 단지 37°C에서 1시간만 처리하였을 때 모두 에탄올 내성이 증가하였다고 보고한 바 있다.

3) 염류에 대한 내성

일반적으로 당밀을 기질로 하여 알코올 발효시킬 때 20%의 당밀에는 약 3.5%의 KCl을, 25% 당밀의 경우는 약 4.4%의 KCl을 함유하고 있으므로 KCl에 대한 내성이 강한 알코올 발효 효모가 유리한 것으로 보고되어 있다²⁰⁾.

따라서 *S. cerevisiae* OE-16의 염류에 대한 내성을 조사한 결과 NaCl에 대하여 6%, KCl에 대하여 15% 까지 내성을 보였다(Fig. 5). 이 결과로 보아 본 시험 균주는 당밀을 기질로 하여 알코올을 생산할 경우 유리 할 것으로 생각되고, 또한 Morimura 등²⁰⁾의 KCl 내 성변이주인 *S. cerevisiae* K211 보다 KCl 내성이 강하

였다. 그러나 변질장류에서 분리된 가스 생성효모들¹⁴⁾이나 장류 숙성효모인 *Zygosaccharomyces rouxii* SR-S¹⁾ 및 고추장 발효 중 분리된 *Zygosaccharomyces rouxii*와 *S. cerevisiae*¹⁷⁾ 보다 다소 내성이 떨어 지는 결과로서 일반적으로 장류는 비교적 고농도의 식염을 함유하고 있으므로 내염성 효모들이 분포하는 데¹⁷⁾ 비하여 메주에는 염을 함유하고 있지 않기 때문 에 내염성이 약한 시험균주가 분리된 것으로 추정된 다.

4) 중금속 및 화학제에 대한 내성

S. cerevisiae OE-16은 Pb²⁺와 Hg²⁺ 등의 중금속에 대하여 1,200ppm까지 내성이 있었으나 Cu²⁺에 대하여는 400ppm에서도 내성이 없었다(Table 1). 이러한 중금속에 대한 내성은 알코올 생산 공정에 응용되 거나 세포융합 등에 의한 균주 육종시 선발 표지 인자 로서 활용될 수 있을 것으로 생각된다³⁾.

또한 시험균주는 500ppm 까지 potassium sorbate 에 대하여 내성을 보여 장류에서 분리된 가스생성효 모(100 ppm)¹⁴⁾와 *S. cerevisiae* (50~100 µg/ml)³⁾ 보 다 이에 대한 내성이 강했다. 또한, cycloheximide에 대하여는 10ppm 이하의 내성을 보였고 propionic acid 에 대하여는 0.5%까지 내성이 있어 변질 장류의 가스 생성효모¹⁴⁾와 유사한 내성을 보였지만 고온성 효모 *S. cerevisiae* D-71과 내염성 효모 *Zygosaccharomyces rouxii* SR-S¹⁾ 보다는 propionic acid에 대한 내성이 약

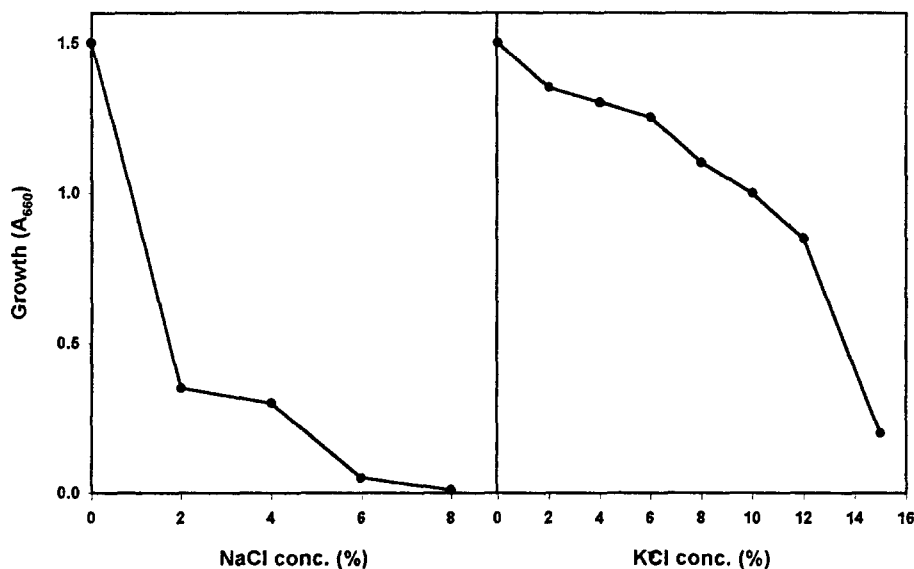


Fig. 5. Effect of NaCl and KCl on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* OE-16. Cell was cultured at 30°C for 2 days in YM broth containing various concentration of NaCl and KCl.

Table 1. Resistance of various heavy metals and chemicals against to *Saccharomyces cerevisiae* OE-16.

Pb(NO ₃) ₂		HgCl ₂		CoCl ₂		CuSO ₄		AgNO ₃		K-Sorbate			Cyclo-heximide			Propionic acid(%)		Arginic acid(%)		
800	1200	400	800	1200	800	1200	400	800	100	400	100	500	1000	10	50	100	0.1	0.5	0.1	1
+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+

*Concentration of chemicals was described as ppm.

Table 2. Alcohol productivity of *Saccharomyces cerevisiae* OE-16 from 20% glucose broth at 30°C and 40°C

Temperature	Final pH	Alcohol productivity (g/l)
30°C	3.9	83.4
40°C	4.1	9.5

* Ethanol concentration were described as production after fermentation for 72h at 30°C and 40°C in 20% glucose containing YEPD medium (pH 5.0).

하였다.

2. 알코올 발효특성

Glucose를 20% 함유한 YEPD 배지에 *S. cerevisiae* OE-16의 전배양액을 첨가하여 30°C와 40°C에서 72시간 발효시킨 후 발효액 중의 에탄올 함량을 측정된 결과 30°C 발효의 경우 이론 수득량의 81%인 리터당 약 83g의 에탄올을 생성하였다(Table 2). 또한 40°C에서 발효시켰을 때 20% glucose로부터 9.5 g/l의 에탄올을 생성하였으며 이미 보고된 고온성 효모 *S. cerevisiae* F38-1과 *S. cerevisiae* RA-74-2³⁾ 등 보다 낮은 에탄올 생성량을 보였다.

일반적으로 알코올 발효 생성물은 발효 온도의 변화와 이에 따른 대사 변화로 생성량과 질이 달라지는 것으로 알려져 있다^{3,19)}. 따라서 본 실험에 사용한 고온성 효모 *S. cerevisiae* OE-16을 실제 알코올 발효공업에 이용하기 위해서는 우선 당밀과 다양한 종류의 전분질 원료를 사용하여 발효시킨 후 에탄올 정량과 각종 부산물에 대한 분석이 추가로 이루어져야 할 것으로 생각된다.

요 약

재래식 매주에서 분리된 고온성 효모, *Saccharomyces cerevisiae* OE-16의 각종 생리적 특성과 알코올 발효력을 조사하였다. *Saccharomyces cerevisiae* OE-16은 30°C보다 40°C에서 더 잘 생육하였고 40%

의 glucose에 내성을 보였다. 또한 시험균주는 4% NaCl과 15% KCl에 내성을 보였고 Pb²⁺와 Hg²⁺에 대하여 1,200ppm까지, potassium sorbate에 대해서는 500ppm까지 내성이 있었다. Glucose를 20% 함유한 배지로 30°C에서 72시간 발효시켰을 때 약 83.4g/liter의 에탄올을 생성하였고 40°C에서는 20% glucose로부터 9.5g/l의 에탄올을 생성하였다.

참고문헌

1. 이종수, 김찬조 : *Sacch. cerevisiae* D-71과 *Zygosacch. rouxii* SR-S와 원형질체 형성과 융합, *한국산업미생물학회지*, 16, 142~149 (1988).
2. Ryu, B. H., Nam, K. D., Kim, H. S., Kim, D. S., Ji, Y. A. and S. J. Jung : Screening of thermotolerant yeast strain for ethanol fermentation, *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, 16, 265~269 (1988).
3. Sohn, H. Y. and Seu, J. H. : Screening and characterization of thermotolerant alcohol-producing yeast, *J. Microbiol. Biotech.*, 4, 215~221 (1994).
4. Kim, Y. H., Lee, J. R. and Seu, J. H. : Genetically engineered yeasts by heterologous transformation and intergeneric two-step protoplast fusion for ethanol fermentation, *J. Microbiol. Biotechnol.*, 3, 232~237 (1993).
5. 김재완, 진익렬, 서정훈 : 연료용 알코올의 고온 생산을 위한 고온성 효모 *Sacch. cerevisiae* F38-1의 분리, *한국산업미생물학회지*, 23, 617~623 (1995).
6. 김재완, 김상현, 진익렬 : 연료용 알코올의 고온 발효를 위해 분리한 고온성 효모균주 *Sacch. cerevisiae* F38-1의 발효 특성, *한국산업미생물학회지*, 23, 624~631 (1995).
7. Yang, J. Y., Park, K. H. Park, U. H. and Yu, J. H. : Screening and characterization of high-alcohol producing *Sacch. cerevisiae* D1, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 18, 511~516 (1990).
8. Hacking, A. J., Taylor, I. W. F. and Hanas, C. M. : Stylection of yeast able to produce ethanol from glucose at 40°C, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 19, 361~363 (1984).
9. 성낙계, 박윤중, 정지훈, 이종갑 : 발효공학, 형설출판사, p.194~196 (1981).

10. 정동효, 이상규, 민병찬, 배정설, 허유행 : 발효공학, 선진분화사, p.198~199 (1980).
11. 이종수, 이성훈, 권수진, 안 철, 유진영 : 재래식 메주로부터 효모의 분리, 동정 및 배양조건, 한국산업미생물학회지, 25, 435~441 (1997).
12. 이상선, 성장근 : 전통장류용 메주의 산업화를 위한 기반기술연구(전통메주에서 균의 분리 및 동정), 한국식품개발연구원 보고서, p. 397~451 (1995).
13. 이택수, 이석건 : 간장발효에 관여하는 효모에 관한 연구(1), 한국농화학회지, 13, 97~103 (1970).
14. Lee, J. S., Choi, Y. J., Kwon, S. J., Yoo, J. Y. and Chung, D. H. : Screening and characteristics of yeasts from traditional *Doenjang* and *Kochujang*, *Food and Biotech.*, 5, 54~58 (1996).
15. 조재선 : 한국의 전통발효식품연구 동향에 관한 분석고찰, *Kor. J. Diet. Culture*, 4, 375~382 (1989).
16. 박종면, 오훈일 : 재래식 고추장 숙성 중 미생물과 효소력의 변화, 한국식품과학회지, 27, 56~62 (1995).
17. 정윤창, 최원진, 오남순, 한민수 : 재래식 및 개량식 고추장 효모의 분포 및 생리 특성, 한국식품과학회지, 28, 253~260 (1996).
18. 이종수, 이성훈, 권수진, 안 철, 유진영 : 재래식 메주에서 분리한 효모들의 각종 효소활성과 기능성, 한국산업미생물학회지, 25, 448~453 (1997).
19. Kilian, S. G., Prior, B. A., Lategan, P. M. and Kruger, W. C. J. : Temperature effects on ethanol and isopropanol utilization by *Candida krusei*, *Biotech. Bioeng.*, 23, 267~275 (1981).
20. Morimura, S., Ling, Z. Y. and Kida, K.: Ethanol production by repeated-batch fermentation at high temperature in a molasses medium containing a high concentration of total sugar by a thermotolerant flocculating yeast with improved salt-tolerance, *J. Ferment. Bioeng.*, 83, 271~279 (1997).

(1999년 10월 13일)