

## 돼지감자 (*Helianthus tuberosus* L.)로부터의 알콜 생산을 위한 균주 선발

柳 然 禹 · 金 哲 鎬 · 金 秀 一

아주대학교 공과대학 환경공학과  
(1983년 3월 2일 수리)

### Selection of Yeast Strains for Alcohol Production from Jerusalem Artichoke Tubers (*Helianthus tuberosus* L.)

Yeon-Woo Ryu, Chul-Ho Kim and Su-Il Kim

Dept. of Environmental Engineering, Ajou University, Suwon, Korea

#### Abstract

To investigate the possibility of ethanol production from jerusalem artichoke tubers (*Helianthus tuberosus* L.), various yeast strains were evaluated for their potential in metabolizing carbohydrate from jerusalem artichoke tubers to ethanol. Among them, *Kluyveromyces fragilis* CBS 1555 showed the highest inulase activity and ethanol fermentability. On the batch kinetic analysis, *K. fragilis* also showed the highest in parameters for ethanol production and substrate utilization, although lower than *Saccharomyces cerevisiae* Y-10 in cell mass yield and ethanol production yield.

#### 서 론

근래 세계적인 석유과동 이후에 biomass에 의한 대체 에너지 개발에 대한 연구가 많이 진행되고 있다. 그중 재생성 자원의 발효에 의한 알콜생산에 대한 위치가 매우 높아지게 되었으며 실제로 브라질에서는 사탕수수 및 기타 원료를 사용, 연간  $3.8 \times 10^6 m^3$ 의 ethanol을 생산하여 이중 74%는 gasoline에 10~20%를 첨가하여 자동차의 연료로 이용하고 있다.<sup>1)</sup>

Biomass로부터 알콜을 생산하기 위한 대상 작물로는 돼지감자(*Helianthus tuberosus* L.)의 이용에 대한 연구가 진행되고 있는데, 이는 타 작물에 비하여 거칠은 토양에서도 잘자라며 내병성, 내충성이 강하여 농약을 사용하지 않고도 재배가 가능하고 또한 기후에 대한 적응력과 번식력이 강하며, 피경의 수확량도 ha당 30~50톤으로 타 작

물에 비하여 높기 때문이다.<sup>2)</sup> 이러한 돼지감자의 조성은 풀종 등의 차이에 따라 다르기는 하나 대략 70~80%의 수분과 15~20%의 탄수화물 및 기타 섬유질, 지방, 단백질, 무기물 등으로 되어있다.<sup>2)</sup> 이중 주요 저장 탄수화물인 이눌린(Inulin)은 25~35개의 fructose가  $\beta(2 \rightarrow 1)$  결합으로 이어진 D-fructofuranose의 연쇄상 중합체로 비환원성 말단에 sucrose residue를 가지고 있으며<sup>3)</sup> 이것은 흡습성이 크고, 뜨거운 물에 쉽게 용해되며 산이나 효소 처리에 의하여 쉽게 가수분해되는 비 발효성 당이다.

이눌린을 원료로한 알콜 발효 방법은 Rüdiger<sup>4)</sup>, Lampe<sup>5)</sup> 등과 같이 이눌린을 산처리하거나 Windish<sup>6)</sup>, 숲<sup>7)</sup> 등과 같이 inulase를 이용하여 당화시킨후 알콜 발효를 행하는 것과 Guiraud<sup>8,9)</sup>, Margaritis<sup>10,11)</sup>, Duvnjak<sup>12)</sup> 등에 의하여 보고된 바와 같이 이눌린 분해력 및 알콜 발효능을 함께 가지고 있는 효모를 이용하여 돼지감자 피경 추출액을

당화공정없이 직접 알콜 발효를 행하는것 두 가지로 대별할 수 있다. 직접 알콜 발효방법은 당화공정을 거치는 간접 방법보다 많은 이점이 있으나 적합한 균주의 선별이 매우 중요시된다.

본 연구에서는 직접 발효를 위한 균주 선발을 위하여 먼저 균주의 inulase 생성 여부에 의한 이눌린 분해 능력과 분해된 이눌린의 생성물인 fructose를 이용하여 알콜을 생산할 수 있는 알콜발효능을 검토하고, 다음으로는 inulase 생성 및 알콜 발효능을 함께 가지고 있는 균주들에 대해서는 좀더 세밀한 실험 결과에 의한 kinetic parameter들을 비교, 이눌린 원료로부터 알콜을 효율적으로 생산할 수 있는 가장 적합한 균주를 선별하는 실험을 행하였다.

### 재료 및 방법

균주: 본 실험에 사용한 균주들은 외국에서 제공받은 것과 본 실험실에 보관중이던 아래와 같은 11종의 효모들을 사용하였다.

*Kluyveromyces fragilis* CBS 1555, *K. marxianus* LG, *Saccharomyces castellii* CBS 2863, *S. fermentati* CBS 818, *S. rosei* LG, *S. cerevisiae* Y-10, *Candida kefir* CBS 834, *C. salmanticensis* CBS 5121, *Lipornyces starkeyi* LG, *Torulopsis colliculosa* CBS 133, *Pichia polymorpha* CBS 4516.

배지: YNB-inulin 배지는 membrane filter (Toyo Rochi,  $\phi$  0.45 $\mu$ m)를 사용하여 무균액으로 만든 2.5% inulin(Merck) 20ml와 6.7% Yeast Nitrogen Base (Difco) 10ml를 고압 멸균기를 사용하여 멸균한 0.1M phosphate buffer(pH5.5) 20ml 및 증류수 50ml를 혼합하여 준비하였다. 알콜 발효 배지는 폐지갑자 피경을 121°C에서 30분간 증자한 후 착즙기(Fred S. Carver INC.)로 7metric ton까지 압착하여 얻은 착즙액을 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>를 사용, pH를 5.5로 조절하고 121°C에서 15분간 멸균하여 사용하였다.

접종용 균주는 glucose 50g, yeast extract 5g, peptone 5g을 1l에 녹인 접종용 배지를 사용하여 30°C에서 24시간 진탕 배양하였다.

분석방법: 균수는 Thoma cell을 사용하여 측정하였으며 균체량은 배양액을 원심분리한 후 침전물을 증류수로 2회 씻은 다음, 50°C 진공 건조기에서 함량에 도달할 때까지 건조시켜 구하였다.

에탄올 농도는 gas chromatography(FID, Type Girdel 3000)에 의하여 정량하였다. 총당은 Anthrone법<sup>13)</sup>에 의하여 정량하였으며 환원당은 Somogyi법<sup>14)</sup>이나 DNS법<sup>15)</sup>에 의하여 정량하였다.

효소의 활성도 측정: Inulase 활성도는 inulin으로부터 유리되는 fructose의 양으로 측정하였으며 효소의 단위는 30°C에서 1분간에 1 $\mu$ mole의 환원당을 생성하는 것을 1 unit로 하였고, 활성도는 효소액 1ml당의 효소단위로 정의하였다. Invertase의 활성도는 30°C에서 1분간에 1 $\mu$ mole의 sucrose를 분해하는 것을 1 unit로하여 효소액 1ml당의 효소단위로 정의하였다.

실험과정: 이눌린 분해력 비교 실험은 500ml 배양 플라스크에 100ml의 YNB-inulin 배지를 넣고 각각 배양된 접종용 균주를 1%(v/v)씩 접종하여 30°C 진탕 배양기에서 24시간 배양하였다.

알콜 발효 실험은 500ml 배양 플라스크에 피경 착즙액(당농도 158g/l, pH 5.5) 200ml를 넣고 5%(v/v)균을 접종한 다음 진탕 배양기로 30°C에서 36시간 110rpm으로 진탕 배양하였다.

Batch kinetic paramaters의 비교 실험은 4l jar fermentor에 피경 착즙액(당농도 145g/l, pH5.5) 2.5l를 넣고, 30°C에서 40시간동안 배양하였다. 이때 통기량은 0.25VVM으로 하였고, 교반 속도는 300rpm이없으며 거품 발생을 방지하기 위하여 antifoam(sigma)을 첨가하였다. 이때도 접종량은 5%(v/v)였다.

Kinetic parameters의 계산: maximum specific growth rate( $\mu_m$ ; hr<sup>-1</sup>), specific sugar uptake rate ( $q_s$ ; g sugar/g cell-hr)와 specific ethanol production rate( $q_p$ ; g EtOH/g cell-hr)는 성장 곡선의 대수기에서 계산하였으며, cell mass yield( $Y_{x/s}$ ; g cell mass/g sugar)는 균체량의 농도가 최대인 점에서 측정하였고, ethanol yield( $Y_{p/s}$ ; g EtOH/g sugar), percent theoretical ethanol yield( $Y$ ; %), overall ethanol productivity( $Q$ ; g EtOH/l-hr) 및 ethanol fermentability( $F$ ; %)는 ethanol 농도가 최대인 점을 기준으로 계산하였다. 이 중 F값은 배지의 총당에 대한 알콜로 전환된 당의 %비율로 정의하였다.

### 결과 및 고찰

이눌린 분해력 비교: 수집한 자 균주간의 inulin 분해력을 비교하기 위하여 YNB-inulin 배지에서

**Table 1.** Inulase and invertase activities of various yeast strains.

Strains	N/N <sub>0</sub> *	Inulase activity	Invertase activity
<i>K. fragilis</i>	130	0.124	0.59
<i>K. marxianus</i>	106	0.116	0.63
<i>S. castellii</i>	25	0.015	0.67
<i>S. fermentati</i>	34	0.018	0.57
<i>S. rosei</i>	3	0.004	0.15
<i>S. cerevisiae</i>	4	0.004	0.14
<i>C. kefyri</i>	70	0.013	0.22
<i>C. salmenticensis</i>	39	0.061	0.35
<i>T. colliculosa</i>	38	0.018	1.00
<i>P. polymorpha</i>	53	0.024	0.64
<i>L. starkeyi</i>	3	0.023	0.00

\*N/N<sub>0</sub> : Ratio of cell numbers of inoculum and after 24hr culture.

24시간 배양한 후 균수 증가율과 inulase 및 invertase 활성도를 측정 한 결과는 표 1과 같다. 균수 증가율과 inulase 생성이 가장 좋은 균주는 *K. fragilis*와 *K. marxianus*로 나타났으며 그외에 inulase 생성이 보고된 *P. polymorpha*<sup>16)</sup>, *C. kefyri*<sup>17)</sup>, *C. salmenticensis*<sup>18)</sup>는 탄소원이 inulin뿐인 배지에서 성장에 양호하였으며, *T. colliculosa*는 invertase 활성이 가장 좋았다. 반면, *Saccharomyces sp.* 중의 *S. rosei*와 *S. cerevisiae*는 invertase 활성은 어느정도 존재하나 inulase 활성이 너무 미약하여 성장이 제한되고 반대로 *L. starkeyi*는 inulase 활성은 어느정도 양호하나 invertase 활

성이 전혀 없는 경우도 성장이 제한됨을 나타내고 있다.

**알콜 발효능 비교 :** 표 2는 각 균주들에 대한 폐지감자 피경 착즙액에서의 알콜 발효에 대한 결과이다. 발효능(F)이 가장 좋은 균주는 *K. fragilis*로써 82.8%였고, 잔류당의 농도도 20g/l로 가장 적었다. 또한, *K. marxianus*와 *T. colliculosa*도 알콜 발효능이 70% 이상으로 비교적 양호하였다. 이중 *T. colliculosa*는 inulase 활성도가 낮았음에도 알콜 발효능이 양호한 것은 착즙액에 중합도가 낮은 oligofructosan들이 존재하므로<sup>19)</sup> 이 균주가 대량으로 생성하는 invertase에 의하여(표 3) 발효성당으로 쉽게 분해될 수 있기 때문인 것으로 추측되며, 동일한 이유로 inulase 생성이 매우 미약한 *S. cerevisiae*, *S. castellii*, *S. rosei*에서도 총당의 50% 정도를 발효시킬 수 있는 유사한 결과를 나타내고 있다. 반면, *P. polymorpha*, *L. starkeyi* 및 *C. salmenticensis*는 inulase 생성이 양호하지 만<sup>16, 18)</sup>(표 1) 주어진 조건의 당 농도에서는 cell growth와 당 소모가 거의 없었다. 이는 150g/l의 glucose 배지에서 이들 균주의 cell growth 및 당 소모가 거의 없었다는 Guiraud 등<sup>8)</sup>의 연구 보고와 동일하였으며 이것은 배지의 높은 삼투압 영향인 것으로 생각된다.

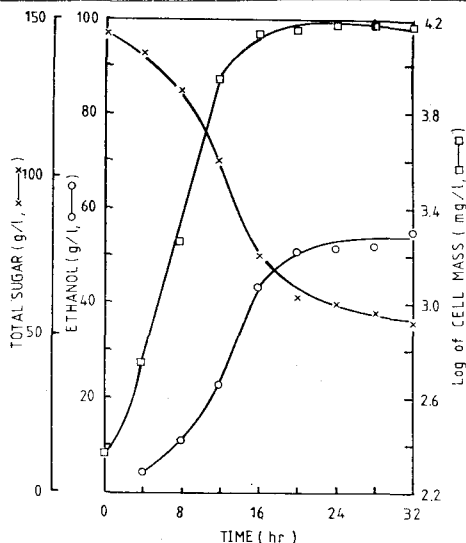
**Batch kinetic parameters 비교 :** 표 2에 알콜 발효능이 70% 이상인 *K. marxianus* 및 *T. colliculosa*와 inulase 활성이 매우 미약한 *S. cerevisiae*를 비교 균주로 하여 발효조에서 batch kinetic parameters의 비교 검토를 위한 실험을 행한 결과는 그림 1~4와 같고, 이 그림을 토대로 계산

**Table 2.** Ethanol fermentability and ethanol yield of yeast strains on jerusalem artichoke tuber juice.

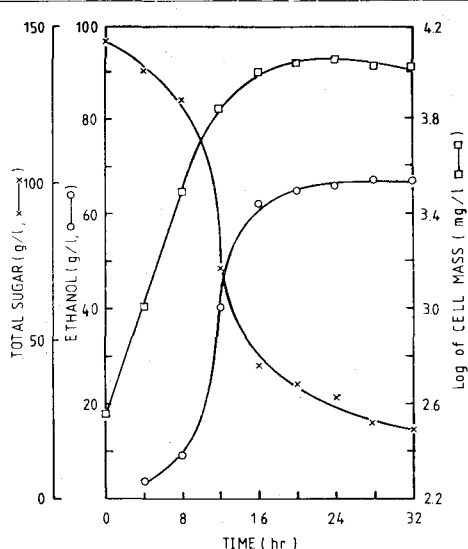
Strains	Degree of ethanol (% , %)	Remaining sugar (g/l)	Ethanol yield (%)	Ethanol fermentability(F) (%)
<i>K. fragilis</i>	8.5	20	94.9	82.8
<i>K. marxianus</i>	7.5	32	91.7	73.1
<i>S. castellii</i>	5.4	66	90.4	52.6
<i>S. fermentati</i>	5.7	54	84.4	55.6
<i>S. rcszi</i>	5.8	52	84.3	56.5
<i>S. cerevisiae</i>	4.7	80	92.8	49.3
<i>T. colliculosa</i>	7.3	41	96.1	71.2
<i>P. polymorpha</i>	—	158	—	—
<i>L. starkeyi</i>	—	158	—	—
<i>C. salmenticensis</i>	—	158	—	—

**Table 3.** The variation of invertase activity during fermentation in jerusalem artichoke tuber juice.

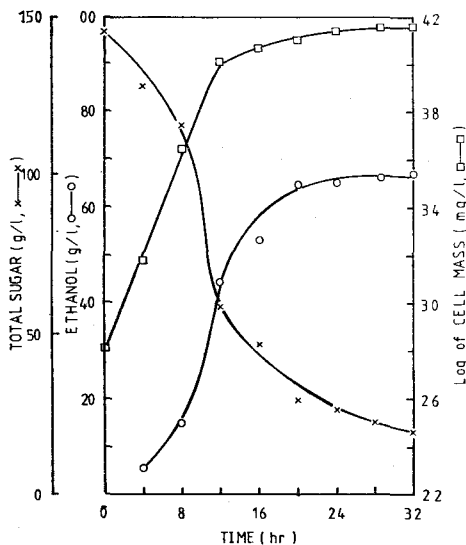
Time(hr)	Invertase activity(units/ml)			
	8	16	24	32
<i>S. cerevisiae</i>	2.279	31.610	45.425	54.772
<i>T. colliculosa</i>	7.944	14.726	16.602	17.687
<i>K. marxianus</i>	3.914	1.999	1.361	0.707
<i>K. fragilis</i>	4.560	2.667	1.278	0.277



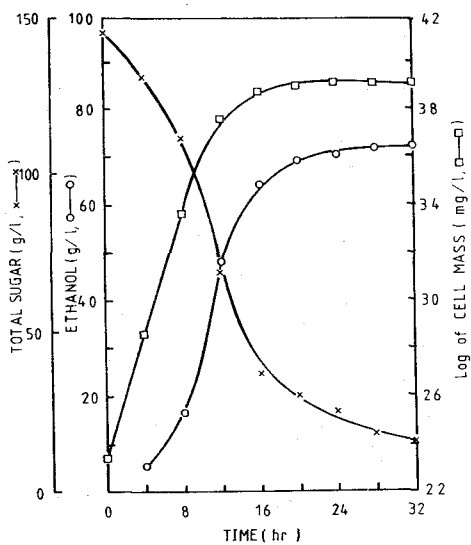
**Fig. 1.** Batch growth of *Saccharomyces cerevisiae* Y-10 in jerusalem artichoke tuber juice.



**Fig. 3.** Batch growth of *Kluveromyces marxianus* LG in jerusalem artichoke tuber juice.



**Fig. 2.** Batch growth of *Torulopsis colliculosa* CBS 133 in jerusalem artichoke tuber juice.



**Fig. 4.** Batch growth of *Kulyveromyces fragilis* CBS 1555 in jerusalem artichoke tuber juice.

Table 4. Summary of batch kinetic parameters.

Parameters	<i>S. cerevisiae</i> Y-10	<i>T. colliculosa</i> CBS 133	<i>K. marxianus</i> LG	<i>K. fragilis</i> CBS 1555
$\mu_m$ (hr <sup>-1</sup> )	0.348	0.262	0.244	0.273
$q_p$ (g/g-hr)	0.976	0.743	0.994	1.529
$q_s$ (g/g-hr)	1.381	1.513	0.087	3.124
$Y_{x/s}$ (g/g)	1.181	0.122	0.079	0.070
$Y_{p/s}$ (g/g)	0.468	0.433	0.443	0.449
Y(%)	91.6	83.7	86.9	87.9
Q(g/1-hr)	1.52	2.19	2.21	2.35
F(%)	62.5	72.2	71.2	77.0

$\mu_m$  : maximum specific growth rate

$q_p$  : specific ethanol production rate

$q_s$  : specific sugar uptake rate

$Y_{x/s}$  : cell mass yeile

$Y_{p/s}$  : ethanol yield

Y : percent of theoretical ethanol yield

Q : overall ethanol productivity

F : ethanol fermentability

한 kinetic parameters는 표 4에 나타내었다. 이 결과 최대 균체 성장 속도를 나타내는  $\mu_{max}$ 는 *S. cerevisiae*가 0.348hr<sup>-1</sup>로 가장 큰 값이었고, 균체 수득율인  $Y_{x/s}$ 도 0.181g/g으로 *Kluyveromyces* 속 균주들보다 약 2~2.5배 정도 큰 값이었으며, 최대 균체 농도는 15.4g/l였다(그림 1). 이것은 균주간의 특성도 있겠지만 *S. cerevisiae*는 invertase의 생성이 매우 큰 반면(표 3) inulase의 생성이 아주 적기 때문에(표 1) 발효시킬 수 있는 유리당의 농도가 항상 20g/l 이하로 growth limiting 조건의 낮은 농도이며, 통기 조건이기 때문에 알콜 발효보다는 호흡에 의한 균체 생성을 위한 대사활동이 우세하기 때문이다. 그러나 *S. cerevisiae*의 알콜 발효능이 62.4%로 다른 균주에 비하여 가장 작은 것은 중합도가 높은 inulin의 가수분해가 이루어지지 않기 때문인 것이며 이는 약 40%로 추정된다. 반면, *K. fragilis*는 다른 균주에 비하여 알콜 생성 속도( $q_p$ ), 기질 이용 속도( $q_s$ ), 알콜 발효 속도(Q) 및 알콜 발효능(F)이 각각 1.53g/g-hr, 3.12g/g-hr, 2.35g/l-hr 및 77%로 가장 높았다. 이는 이 균주가 다른 균주에 비하여 inulase의 생성이 가장 좋고(표 1), 또한 통기에 의하여 inulase의 생성이 증가되기 때문에<sup>20)</sup> 다른 균주보다 중합도가 높은 inulin을 쉽게 이용할 수 있으므로 알콜 발효 속도와 알콜 발효능이 크다. 따라서 가장 짧은 시간내에 총당의 90% 정도를 발효시킬

수 있었던 것으로 추측된다. 또한 *K. fragilis*의  $q_p$ 가 1.53g/g-hr로 Ryu<sup>21)</sup>의 *S. cerevisiae*에 의한 알콜 발효에서의 maximum specific ethanol production rate값 1.5g/g-hr와 비슷하였다. 따라서, 통기 조건에서 *K. fragilis*에 의한 폐지갑자 착즙액을 배지로한 알콜 발효에서는 효소 가수분해 반응이 발효 전공정에 미치는 영향이 *S. cerevisiae*에서 보다 적으며 산소를 이용한 균체 생성보다는 알콜 발효 대사가 우세한 것으로 생각된다. 이는 *K. fragilis*의  $Y_{x/s}$ 가 0.07g/g으로 통기 조건이 아닌 Duvnjak<sup>12)</sup> 등의 0.032g/g보다 큰 값이었지만 glucose 배지에서의 일반적인 알콜 발효 일배의 0.1g/g<sup>21,22)</sup>보다는 작은 것으로도 추정할 수 있다. 그러나 *K. fragilis*의 ethanol yield는 87.9%로 *S. cerevisiae*의 91.6%보다 낮은 값을 나타내고 있다. 이는 *K. fragilis*가 통기의 조건에서 배지중의 이용 가능한 유리당의 농도가 growth limiting 조건으로 되면 생성한 알콜을 산화시켜 그 에너지를 cell growth에 이용하기 때문에<sup>23)</sup> 발효 말기에는 잔당의 농도가 계속 감소할지라도 알콜 농도는 증가하지 않고 오히려 감소하는 결과는 Guiraud<sup>19)</sup>의 보고와 동일하였다.

결론적으로 *K. fragilis*는 32시간 발효시켰을때 최대 균체 농도는 8.2g/l이고 최대 알콜 농도는 7.3%(v/v)였으며, 잔당의 농도는 15g/l로 총당의 약 90%가 발효되었다. 이것은 다른 균주에 비하여

균체 생산은 가장 적은 반면, 알콜 생산에서는 가장 짧은 시간내에 가장 높은 알콜 농도를 나타내었고 또한 잔당의 농도도 가장 적었다. 즉, 이 균주는 다른 균주에 비하여 균체 수득율( $Y_{x/s}$ )은 가장 적은 반면, 알콜 생성 속도( $q_p$ ), 알콜 발효 속도( $Q$ ) 및 알콜 발효능( $F$ )은 다른 균주에 비하여 가장 높았고 알콜 수득율( $Y_{p/s}$ )은 *S. cerevisiae*보다 약간 낮았다. 따라서 이 균주에 의한 폐지갑자 폐경을 이용한 알콜 발효 최적 조건을 연구하므로써 알콜 수득율, 알콜 발효능 및 알콜 발효 속도를 더 증가시킬 수 있을 것이다.

### 초 록

폐지갑자 폐경에서의 알콜 생산을 위한 균주 선발에서, 먼저 11종의 효모를 YNB-inulin 배지에서 inulase 생성에 대한 실험 결과 *K. fragilis*와 *K. marxianus*가 각각 0.124unit/ml와 0.116unit/ml로 가장 양호하였으며, 다음으로 폐지갑자 폐경착즙액에서 36시간 알콜 발효 실험을 행한 결과 알콜 발효능이 70% 이상인 균주는 *K. fragilis*, *K. marxianus* 및 *T. colliculosa*였으며, 이중 *K. fragilis*가 82.8%로 가장 좋은 결과를 나타내었다. 또한 위 세 균주 및 *S. cerevisiae*의 알콜 발효 kinetic parameter들을 비교 분석한 결과 *K. fragilis*가 가장 좋은 균주로 판명되었다. 즉, 균체 수득율( $Y_{x/s}$ )은 0.07g/g으로 다른 균주에 비하여 가장 적었으며, 알콜 수득율은 0.45(이론치의 88%)로 *S. cerevisiae*의 0.47(이론치의 92%)보다 낮았으나, 알콜 생성 속도( $q_p$ ), 알콜 발효 속도( $Q$ ) 및 알콜 발효능( $F$ ) 값은 각각 1.53g/g-hr, 2.35g/l-hr 및 77%로 다른 균에 비하여 가장 높았다.

### 사 의

본 연구는 한국과학재단의 연구지원으로 행하여졌다.

### 참고문헌

1. Yand V. and Trindade S.C.: Chem. Eng.

Prog., 79 : 11(1973)  
 2. Fleming S.Z. and Gootwassink J.W.D.: CRC Crit. Rev. Food Sci. Nut., 11 : 1(1979)  
 3. Hirst E.L., McGilvary D.I. and Percival E.G.V.: J. Chem. Soc., 1297(1950)  
 4. Rüdiger M.: Z. Spiritusind, 43 : 203(1920)  
 5. Lampe B.: Z. Spiritusind, 55 : 121(1932)  
 6. Windish K.: Z. Spiritusind, 43 : 203(1920)  
 7. 김기철, 충북대학교 논문집, 10 : 306(1976)  
 8. Guiraud J.P., Deville-Duc T. and Galzy P.: Folia Microbiol., 26 : 147(1981)  
 9. Guiraud J.P., Daurelles J. and Galzy P.: Biotech. Bioeng., 23 : 1461(1981)  
 10. Margaritis A. and Bajpai P.: Biotech. Bioeng., 24 : 1473(1982)  
 11. Magaritis A. and Bajpai P.: Biotech. Bioeng., 24 : 1483(1982)  
 12. Duvnjak Z., Kosaric N. and Kliza S.: Biotech. Bioeng., 24 : 2297(1982)  
 13. Weiner J.: Ind. Brew., 84 : 222(1978)  
 14. Somogyi M.: J. Biol. Chem., 195 : 19(1952)  
 15. Miller G.L.: Anal. Chem., 31 : 426(1959)  
 16. Chautard P., Guiraud J.P. and Galzy P.: Acta. Microbiol. Acad. Sci.(Hung)., 28 : 245(1981)  
 17. Negoro H. and Kito E.: J. Ferment. Technol., 51 : 96(1973)  
 18. Guiraud J. P., Viard-Gaudin C. and Galzy P.: Agric. Biol. Chem., 44 : 1245(1980)  
 19. Guiraud J.P.: Thèse Doct. d'Etat. USTL (1981)  
 20. 옥영일의, 한국과학연구재단연구보고서 (1981)  
 21. Ryu Y.W.: Thèse Doct. Eng. INSA de Toulouse(1980)  
 22. Cyseweski G.R.: Thesis of Ph.D. Univ. Berkley(1976)  
 23. White J. and Muns D.J.: J. Inst. Brew., 56 : 261(1950)