

## 내당 내알콜성 *Saccharomyces cerevisiae*의 알콜 발효에 미치는 soybean meal의 영향

노민정 · 박경호 · 백운화 · 유주현

연세대학교 식품공학과

**초록 :** 내당 내알콜성 균주인 *S. cerevisiae* D1을 이용하여 알콜 발효를 할 때 ethanol 생산성을 증대시키기 위하여 발효시 soybean meal을 첨가하여 발효에 미치는 영향에 관해서 연구한 결과 다음의 결론을 얻었다. 알콜 발효시 soybean meal의 영향을 보면 초기 glucose 농도를 350 g/l로 하였을 때 soybean meal 첨가에 의해 ethanol 생산량이 증가하고 생균수도 증가하였으며 soybean meal 첨가 농도가 2%일 때보다 4%일 때 더 큰 증가를 보였다. Soybean meal을 water-soluble fraction과 lipidic fraction으로 분획하여 첨가하였을 때는 water-soluble fraction은 whole-soybean meal과 거의 같은 ethanol 생산량의 증가를 보였지만 lipidic fraction은 거의 영향을 미치지 않았다. 초기 glucose 농도를 달리하고 발효하였을 때는 soybean meal을 4% 첨가시 초기 glucose 농도와 상관없이 ethanol 생산 속도가 증가하였다. Ethanol 첨가에 의해 glucose 소비 속도가 감소하였고 soybean meal을 4% 첨가시 glucose 소비 속도가 증가하였지만 ethanol을 첨가한 경우의 소비 속도를 첨가하지 않은 경우의 소비 속도에 대한 비율로 나타내면 soybean meal 첨가와 상관없이 같은 값을 나타내었다. 따라서 soybean meal 첨가시 ethanol 생산량이 증가하는 이유는 내알콜성 증가보다는 결핍된 영양소를 보충해주기 때문이라고 추측된다(1991년 3월 11일 접수, 1991년 3월 25일 수리).

인류는 당을 알콜로 발효하기 위해 8,000년 이상 동안 효모를 이용해왔다. 전에는 주로 주류를 만드는 것이 목적이었지만 최근에 와서는 화학 연료의 대체 원으로서 알콜에 관심을 갖게 되었다. 제2차 세계대전 이전만 해도 ethanol은 주로 ethylene을 수화하는 화학 합성에 의해 생산되었지만 1973년의 석유파동 이후부터 경제적인 방법으로서 발효에 의한 ethanol 생산이 재검토되게 되었다<sup>1,2</sup>. 발효에 의해서 ethanol을 생산할 때 생산비의 대부분은 원료와 증류 공정에 드는 비용이다. 따라서 ethanol 생산 수율과 농도를 높이면 발효 비용을 상당히 절감할 수 있는데 이를 위해서는 사용 미생물을 잘 선택하고 적절한 발효 조건을 만들어 주어야 한다<sup>2,3</sup>.

알콜 발효시 불포화 지방산과 sterol, 단백질, 아미노산, 비타민 그리고 금속 이온등에 의해 생산성이 증가된다고 한다<sup>4</sup>. Jerusalem artichoke juice<sup>4,5</sup> 또는 soy flour<sup>6-8</sup>, peptone<sup>9</sup>을 첨가하면 발효시 알콜 생산이 증가된다고 하며 oryzenin, albumin<sup>10</sup>과 koji mold mycelia<sup>11-13</sup>등도 같은 영향을 나타내었다고 한다.

고농도의 알콜 발효에서는 효모의 생존, 발효 속도

와 ethanol 생산 농도가 저해를 받으며 가장 큰 원인은 ethanol의 toxicity<sup>14</sup>라고 하지만 영양소의 결핍이 문제가 된다는 보고도 있다<sup>5,16</sup>.

본 연구에서는 우리나라 토양에서 분리한 균주중 알콜 발효 수율이 높고 내당 내알콜성 균주인 *Saccharomyces cerevisiae* D1<sup>17</sup>을 이용하여 알콜발효를 할 때 soybean meal의 첨가가 ethanol 생산 농도에 미치는 영향을 알아보고 그 작용기작에 대하여 연구하였다.

### 재료 및 방법

#### 사용한 균주와 배지

본 연구에서 사용한 균주는 Yu등<sup>17</sup>이 우리나라 토양으로부터 분리한 내당 내알콜성 균주인 *Saccharomyces cerevisiae* D1을 사용하였다.

발효 배지로는 yeast extract 0.5%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1%, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5%에 glucose를 첨가하여 사용하였으며 생균수 측정에는 glucose 2%, peptone 0.1%, yeast extract 0.5%, agar 2%를 함유한 배지를 사용하였다.

### 접종균의 전배양 및 접종

모든 실험에서 접종균은 48시간 배양한 사면 배지로부터 1백균이를 3% glucose를 포함하는 발효 배지 50ml가 든 250ml 삼각 플라스크에 접종한 뒤 30°C에서 대수증식기 말기 시간인 15시간 배양한 후 원심분리하여 상등액을 제거하고 살균 증류수에 2번 washing하여 전배양액의 glucose를 제거한 후 3%(v/v)를 접종하였다.

### 알콜 발효

500ml 삼각 플라스크에서 working volume을 200ml로 하였으며 교반 속도는 120 rpm, 배양 온도는 30°C로 조절하고 glucose 농도를 변화시키면서 알콜 발효를 행하였다.

### Glucose 소비 속도

Glucose 소비 속도는 배양시 glucose 농도의 감소 곡선으로부터 구하였다<sup>10)</sup>.

10% glucose를 포함하고 0~8%(v/v)의 ethanol을 첨가한 발효 배지에서 30°C, 120 rpm으로 배양하면서 적당한 시간 간격으로 glucose 농도를 측정하였다.

### Soybean meal의 분획

Soybean meal을 증류수에 녹인 후 Hitachi model RPR 20-2-1771 rotor로 9,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상등액을 water-soluble fraction으로 사용하였다. Lipidic fraction은 ethyl ether로 추출한 후에 증류하여 ethyl ether를 제거하였다<sup>8)</sup>.

### 생균수 측정

생균수는 평판도주 배양법<sup>10)</sup>에 의하여 측정하였다. 배양액을 적당히 희석한 후에 평판배지에 도말하고 30°C에서 48시간 배양하여 생성된 colony 수를 세어서 생균수를 구하였다.

### Glucose와 ethanol 정량

Glucose와 ethanol의 농도는 Industrial analyzer(YSI model 27, Yellow Spring Instrument Co.)로 측정하였다. Glucose 농도 측정에서는 YSI 2365 glucose membrane kit를 사용하였고 ethanol 농도 측정에는 YSI 2386 alcohol membrane kit를 사용하였다.

### 결과 및 고찰

#### Soybean meal 첨가 농도

초기 glucose 농도를 350 g/l로 하고 알콜 발효를 하였을 때 시간에 따른 glucose 소비량과 ethanol 생산량 그리고 생균수를 측정하였다.

Soybean meal 첨가시 glucose 소비량이 현저히 증가하였고(Fig. 1) ethanol 생산량도 증가하였으며(Fig. 2) soybean meal을 4% 첨가시에 2% 첨가시보다 glucose 소비량과 ethanol 생산량이 더 증가하였다. Soybean meal을 2% 첨가하였을 경우에 9.5%(w/v)의 ethanol이 생산되고 4% 첨가하였을 경우에 12.3%(w/v)의 ethanol이 생산되어 첨가하지 않았을 경우의 6.7%(w/v)에 비해 ethanol 생산량이 각각 42%, 83% 높았다. 또한 생균수를 측정해 본 결과 soybean meal을 4% 첨가시 생육 속도와 정도가 증가하였다(Fig. 3).

#### Water-soluble fraction과 lipidic fraction의 영향

초기 glucose 농도를 400 g/l로 하고 알콜 발효를 하였을 때 시간에 따른 glucose 소비량과 ethanol 생산량

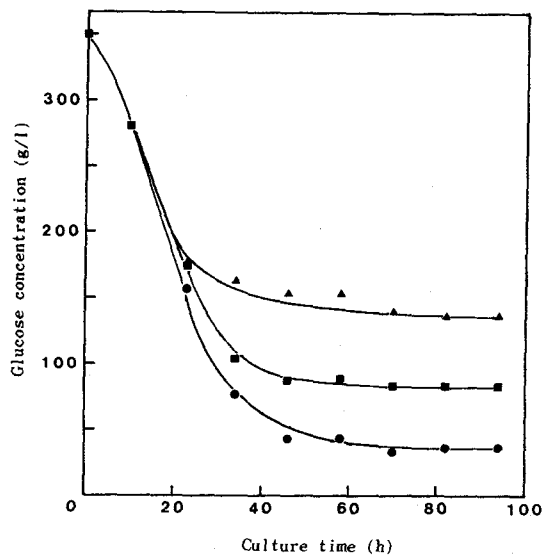


Fig. 1. Glucose utilization in the fermentation media supplemented with various concentrations of soybean meal.

Glucose(350 g/l) was added to the fermentation medium, cultivation was carried out as described in Materials and Methods.

- ▲ : Unsupplemented,
- : Supplemented with 2% soybean meal,
- : Supplemented with 4% soybean meal.

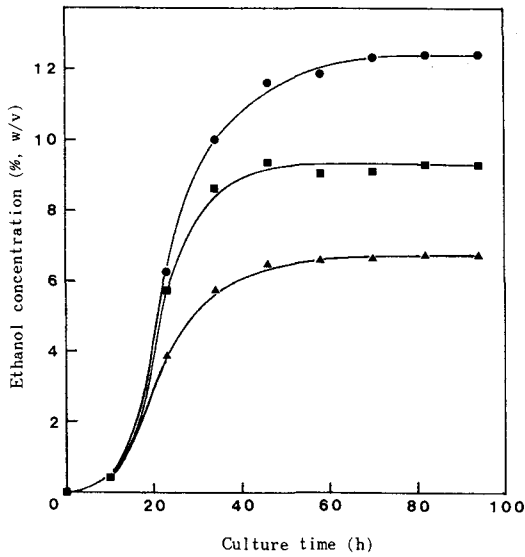


Fig. 2. Ethanol production in the fermentation media supplemented with various concentrations of soybean meal.

▲ : Unsupplemented,  
 ■ : Supplemented with 2 % soybean meal,  
 ● : Supplemented with 4 % soybean meal.

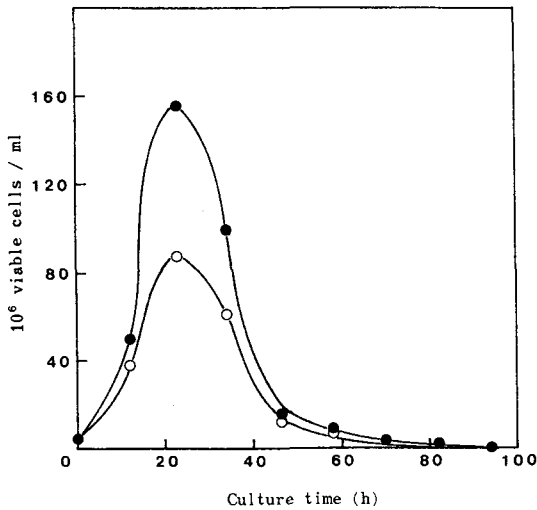


Fig. 3. Concentration of the viable cells in the fermentation media with or without soybean meal during cultivation.

● : 4 % soybean meal, ○ : None.

을 측정하였다.

Soybean meal을 6% 첨가시 glucose 소비량(Fig. 4)과 ethanol 생산량(Fig. 5)이 증가하였다. 그렇지만

ethanol은 soybean meal첨가시 11.4%(w/v)가 생산되어 초기 glucose 농도를 350 g/l로 하고 soybean meal을 4% 첨가하였을 경우보다 생산 농도가 낮았다. 이것은 glucose의 지해 때문이라고 추측된다<sup>3)</sup>.

Soybean meal의 water-soluble fraction을 첨가하였을 경우에는 whole-soybean meal을 첨가하였을 경우와 glucose 소비량과 ethanol 생산량이 유사하였으나 lipidic fraction을 첨가하였을 경우에는 거의 영향을 미치지 않았다(Fig. 4, Fig. 5). Viegas등<sup>5)</sup>은 알콜 발효시 whole-soy flour를 첨가하였을 경우와 water-soluble fraction만을 첨가하였을 경우에 ethanol 생산량이 유사하였으며 이것은 water-soluble fraction의 첨가에 의하여 부족한 영양소인 단백질 또는 이온들이 보강되기 때문이라고 추측하였다.

#### Glucose 농도에 따른 soybean meal의 영향

초기 glucose 농도를 달리(200 g/l, 300 g/l)하고 발효하였을 때 시간에 따른 glucose 소비량과 ethanol 생산량을 측정하였다. Fig. 6에서 보는 바와 같이 초기 glucose 농도가 200 g/l일 때 soybean meal을 첨가하지 않은 경우와 첨가한 경우 모두 glucose가 완전히 소

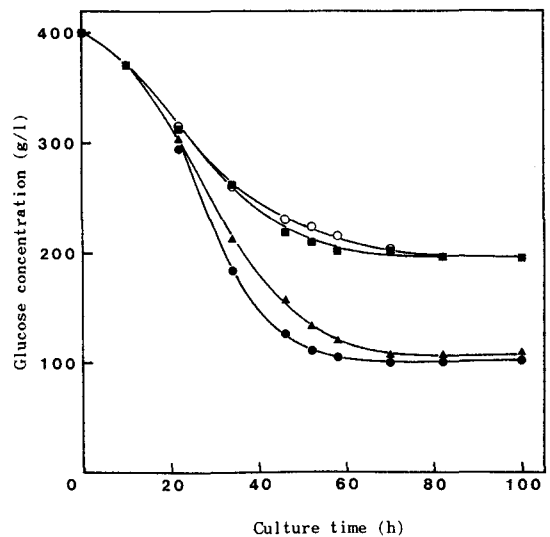


Fig. 4. Glucose utilization in the fermentation media supplemented with various soybean meal fractions.

Glucose(400 g/l) was added to the fermentation medium.

○ : Unsupplemented,  
 ● : 6 % soybean meal,  
 ▲ : Water soluble fraction equivalent to 6 % soybean meal,  
 ■ : Lipidic fraction equivalent to 6 % soybean meal.

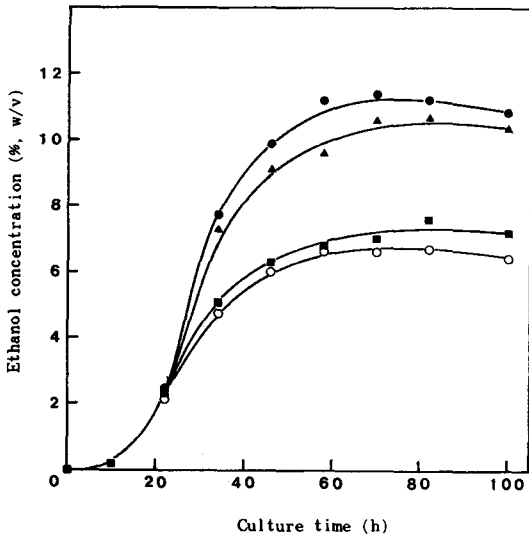


Fig. 5. Ethanol production in the fermentation media supplemented with various soybean meal fractions.

Glucose (400 g/l) was added to the fermentation medium.

- : Unsupplemented,
- : 6% soybean meal,
- ▲ : Water soluble fraction equivalent to 6% soybean meal,
- : Lipidic fraction equivalent to 6% soybean meal.

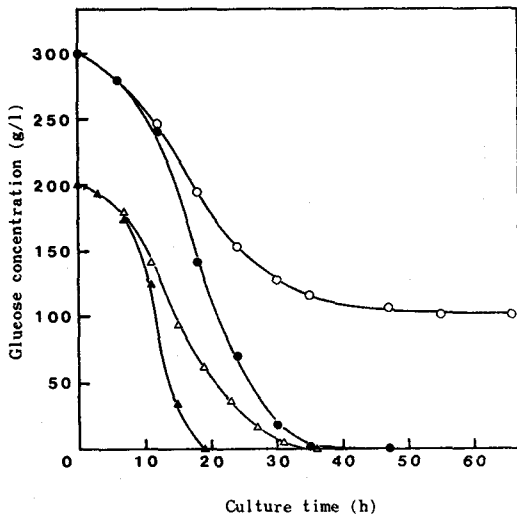


Fig. 6. Effect of initial glucose concentrations on the utilization of glucose in the absence and presence of soybean meal.

- : 300 g/l glucose, 4% soybean meal,
- : 300 g/l glucose,
- ▲ : 200 g/l glucose, 4% soybean meal,
- △ : 200 g/l glucose.

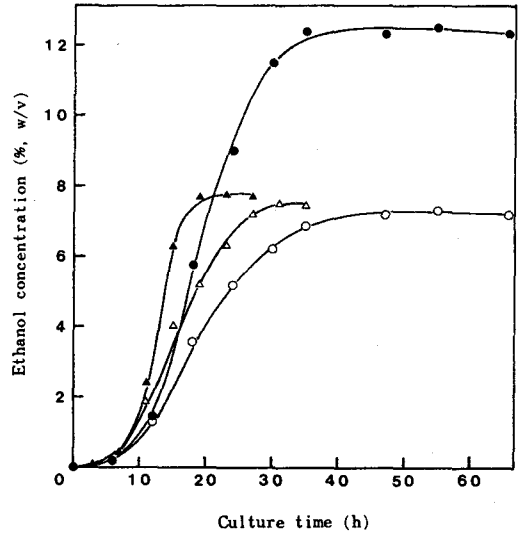


Fig. 7. Effect of initial glucose concentrations on ethanol production in the absence and presence of soybean meal.

- : 300 g/l glucose, 4% soybean meal,
- : 300 g/l glucose,
- ▲ : 200 g/l glucose, 4% soybean meal,
- △ : 200 g/l glucose.

비되었으나 soybean meal을 4% 첨가시 glucose 소비 속도가 현저히 증가하였다. 또한 초기 glucose 농도가 300 g/l일 때는 soybean meal을 4% 첨가시 glucose 소비량이 증가하였으며 소비 속도 역시 증가하였다. Ethanol의 경우도 초기 glucose 농도가 200 g/l일 때 soybean meal을 첨가하지 않은 경우와 첨가한 경우 모두 ethanol 생산량이 유사하였으나 soybean meal을 4% 첨가시 ethanol 생산 속도가 현저히 증가하였고 초기 glucose 농도가 300 g/l일 때는 soybean meal을 4% 첨가시 ethanol 생산량이 증가하였으며 생산 속도 역시 증가하였다(Fig. 7).

그러므로 soybean meal 첨가시 초기 glucose 농도에 상관없이 glucose 소비 속도와 ethanol 생산 속도가 증가하며 과량의 glucose 존재시에는 glucose 소비량과 ethanol 생산량도 증가한다는 것을 알 수 있었다.

#### Ethanol 첨가시의 glucose 소비 속도

Soybean meal을 첨가하지 않았을 경우와 4% 첨가하였을 경우의 glucose 소비 속도를 측정하였다. Fig. 8A에서 보는 바와 같이 ethanol 첨가에 의해서 glucose 소비 속도가 감소하였지만 soybean meal을 4% 첨가시 glucose 소비 속도가 증가하였다. 이것은

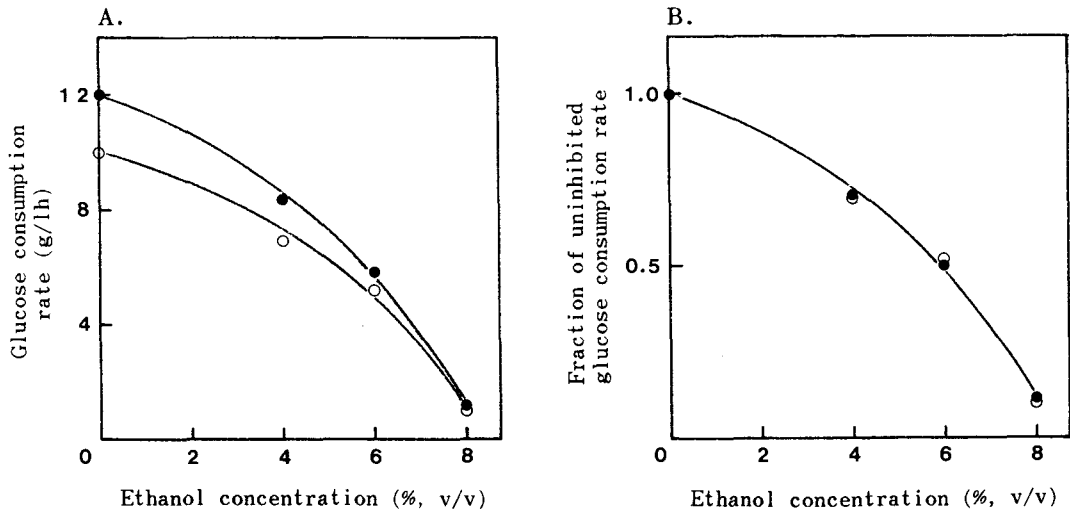


Fig. 8. Effect of increasing concentrations of ethanol on glucose consumption rates(A) and fraction of uninhibited glucose consumption rate(B) in soybean meal-supplemented(4%) and-unsupplemented media.

● : Supplemented, ○ : Unsupplemented.

soybean meal 첨가시 비증식 속도와 균체량이 증가하기 때문이다(Fig. 3). 그렇지만 0~8%(v/v)의 ethanol 첨가시 ethanol에 의한 glucose 소비 속도의 저해 비율을 보면 soybean meal을 첨가하지 않은 경우와 4% 첨가하였을 경우 모두 같은 값을 나타내었다(Fig. 8 B). Viegas등<sup>8)</sup>은 soy flour 첨가시 ethanol 생산량이 증가하는 이유를 효모의 내알콜성 증가보다는 영양

소의 결핍을 제거해주기 때문이라고 설명하였다.

### 감사의 말씀

본 연구는 동력자원부 대체에너지 개발과제의 지원연구비로 이루어졌으며 이에 대하여 감사드립니다.

### 참 고 문 헌

- Casey, G.P., and W.M. Ingledew : Crit. Rev. Microbiol., 13 : 219(1986)
- Oliver, S.G. : Chem. Ind., 18 : 425(1984)
- Jones, R.P., N. Pamment, and P.F. Greenfield : Process Biochem., 16 : 42(1981)
- Rosa, M.F., I. Sa-Correia, and J.M. Novais : Biotechnol. Bioeng., 31 : 705(1988)
- Rosa, M.F., I. Sa-Correia, and J.M. Novais : Biotechnol. Lett., 9 : 441(1987)
- Ju, N., D. Damiano, C. Shin, N. Kim, and S.S. Wang : Biotechnol. Lett., 5 : 837(1983)
- Damiano, D., and S.S. Wang : Biotechnol. Lett., 7 : 135(1985)
- Viegas, C.A., I. Sa-Correia, and J.M. Novais : Appl. Environ. Microbiol., 50 : 1333(1985)
- Dombek, K.M., and L.O. Ingram : Appl. Environ. Microbiol., 52 : 975(1986)
- Hayashida, S., D.D. Feng, and M. Hongo : Agr. Biol. Chem., 38 : 2001(1974)
- Hayashida, S., D.D. Feng, and M. Hongo : Agr. Biol. Chem., 39 : 1025(1975)
- Hayashida, S., D.D. Feng, K. Ohta, S. Chaitiumvong, and M. Hongo : Agr. Biol. Chem., 40 : 73(1976)
- Hayashida, S., and K. Ohta : Agr. Biol. Chem., 42 : 1139(1978)
- Day, A., E. Anderson, and P.A. Martin : Eur. Brew. Conv. Proc. Congr., 377(1975)
- Casey, G.P., C.A. Magnus, and W.M. Ingledew : Biotechnol. Lett., 5 : 429(1983)
- Viegas, C.A., I. Sa-Correia, and J.M. Novais : Biotechnol. Lett., 7 : 515(1985)
- 양지영, 박경호, 백운화, 유주현 : 산업미생물학회지, 18 : 511(1990)
- 유주현, 양 용, 정동호, 양한철 : 식품공학실험, 탐구당, p.363(1977)

Effect of soybean meal on the alcohol fermentation of sugar-alcohol-tolerant *Saccharomyces cerevisiae*

Min-Jeong Rho, Keung-Ho Park, Un-Hwa Paik and Ju-Hyun Yu(Department of Food Engineering, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea)

**Abstract :** In order to improve the productivity of ethanol by sugar-alcohol-tolerant *Saccharomyces cerevisiae* D1, the effect of addition of soybean meal on the alcohol fermentaton was investigated. The addition of soybean meal led to the increase of the ethanol productivity and viable cell concentration. Increasing the amount of soybean meal increased the number of viable cells and the consumption percentage of glucose. The water-soluble fraction of soybean meal was nearly as effective as whole-soybean meal, whereas the lipidic fraction had no positive effect. The addition of 4 % soybean meal increased the rate of ethanol production regardless of the initial concentrations of glucose. The rate of glucose consumption fermenting a soybean meal supplemented medium was higher than possible in a non-supplemented medium, either in the absence or in the presence of ethanol. But the percentage of ethanol inhibition of the glucose consumption rate was identical for supplemented and unsupplemented media. The increase of final ethanol concentration could not be attributed to an increase of ethanol tolerance of yeast cells but to the satisfaction of nutritional deficiencies.