Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 23, No. 5, 617-623 (1995)

연료용 알콜의 고온생산을 위한 고온성 효모 *Saccharomyces cerevisiae* F38-1의 분리

김재완 · 진익렬* · 서정훈
경북대학교 자연과학대학 미생물학과

Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* F38-1, a Thermotolerant Yeast for Fuel Alcohol Production at Higher Temperature

Jae-Wan Kim, Ingnyol Jin* and Jung-Whun Seu
Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

Abstract — A new thermotolerant yeast strain was siolated, and its characteristics have been studied. The strain was identified and named *Saccharomyces cerevisiae* F38-1. This strain could grow not only at high temperature, but also in high concentrations of sugar and ethanol. *S. cerevisiae* F38-1 could grow in a medium containing 50% glucose. The isolate produced ethanol at 43℃, but didn't grow at 40℃ in the presence of 8% ethanol. Fermentation studies showed that the isolate ferments 20% glucose to 9.8% (V/V) ethanol at 40℃ in the presence of 0.2% yeast extract.

부존 화석연료의 유한성과 이들의 사용으로 인한 대기오염의 심각성 등으로 인해 최근 리우에서 열린 국제환경회의에서 CO_2의 발생량을 규제하자고 결의했다. 이러한 Green Round와 같은 국제적인 움직임으로 인해 청정연료의 사용이 필수적이 되고 그 수요가 급증할 것으로 예상되어 이들에 대한 개발이 불요불급하게 되었다. 그중 각종 유기성 자원 biomass 및 폐기물로부터 생산이 가능한 에탄올이 대체에너지로서 가장 큰 주목을 받고 있다. biomass는 양적으로 가장 많으며 재활용 가능한 차원이기 때문이다(1).

현재 우리나라의 알콜생산기술은 상당한 수준에 있으나 연료용으로 값싸게 생산공급하기 위해서는 각각의 생산공정상의 문제점을 해결하기 위한 기술의 개발이 필수적이다. 알콜발효공업에 있어서 기술개발이란 반응공정의 개발과 균주의 개량을 말한다. 지금까지 균주 개량의 측면에서 기질의 다양화를 가능하게 하는 당화용 glucoamylase를 분비하는 효모의 개발(3), 고농도 알콜의 발효가 가능한 효모의 개발(13), 내알콜성 효모의 개발(5), 응집성 효모의 개발(6), 증류에 소비되는 비용을 줄이고 균체를 재회수할 수 있는 막 방법(9), 균체의 고정화(15, 16) 등의 연구가 보고되고 있다. 그러나 이러한 보고에서 볼 수 있듯이, 알콜생산의 증대를 위한 획기적인 방법의 개발은 현재로선 생각할 수가 없고 각각의 공정에 산재해 있는 문제점을 개선하고, 에너지소비를 절감하는 등 개선책을 마련하여 생산성을 향상시켜야 한다.

효모에 의한 알콜생산에 소비되는 에너지는 증류시 소비되는 에너지와, 알콜발효시 원하는 배양온도(30~32℃)로 유지하기 위해 냉각에 소비되는 에너지 등이 주를 이룬다. 이런 공정의 개선이 이루어진다면 알콜생산비를 절약할 수 있다(7). 따라서 고온성 효모를 개발할 수 있다면 외부온도가 높은 하절기에 발효온도를 유지하기 위하여 사용되는 냉각경비를 대폭 절감할 수 있을 것이다. 또한 고온성 알콜발효효모의 개발은 다당류를 이용한 알콜발효시 선행되어야 하는 당화 및 발효를 고온에서 행할 수 있게 되고(4), 발효공정의 개선안으로 발효조에서 감압조작으로 배양액으로부터 에탄올을 증발시키는 법(17) 등에 적용할 수 있게 된다. 그러나 고온성 발효효모의 개발에 관해서 국내외적으로 성공한 보고는 많지 않다. 최근 40℃에서 10% sucrose 발효배지로부터 알콜을 생산하는 효모를 분리한 보고가 있다(8, 10).

가장 최근 우리 연구진중 한 팀에서 40℃에서 발효를 잘 하는 고온성 알콜발효 효모의 분리에 성공

Key words: *Saccharomyces cerevisiae* F38-1, thermotolerant yeast, 9.8% (V/V) ethanol at 40℃
*Corresponding author

했다(2). 그런데 이미 보고한 균주와 성질이 다소 다르고, 발효능은 거의 같거나 부분적으로는 오히려 우수한 효모 균주를 별도로 분리하여 균주의 생리적 성질을 밝혔기에 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

균주의 분리 및 동정

대구근교의 고온환경에서 채취한 시료 그대로를 40℃에서 2일간 정치배양한 후, 이 배양액 약간을 취하여 선택배지(YPD agar media+30 μg/ml ampicillin+0.1% sodium propionate)에 도말한 다음, 40℃에서 배양하여 생육이 우수한 균주를 1차선별하였다. 1차선별균들을 Durham tube가 붙어있는 18×180 mm test tube에 YPD broth 10 ml를 넣어 40℃에서 2일간 발효시켜 발효속도와 균 생육도가 좋은 균을 선별하고, 2차선별균중 발효배지 50 ml를 넣은 250 ml flask에서 발효능이 가장 우수한 효모균주을 최종적으로 선발하였다. 최종선발한 균주의 동정을 위하여 Lodder and Barnett법(11, 12)에 따라 발효능 조사와 탄소원 및 질소원 동화, 등 생화학적인 특성을 시험 조사하였다. 알콜생성 및 알콜내성과 깊이 연관이 있는 세포막의 지방산의 함량은 Thomas 등의 방법(21)에 따라 조사하였다. 그리고 이 균주를 2% glutaraldehyde로 고정한 다음 sodium phosphate buffer (pH 7.0)로 3회 세척한 후 냉동건조하고 gold coating 한 다음 전자현미경으로 형태를 관찰하였다.

대조구로서는 에너지자원기술개발 지원센터로부터 분양받은, 현재 국내주정회사에서 알콜발효균주로 사용중인, *Saccharomyces cerevisiae* 균주 중 고온에서 알콜생성능이 가장 우수한 B회사 균주(이하 *S. cerevisiae* B 또는 B 균주라 약칭함) 및 이미 우리 연구진이 분리동정하여 고온 알콜생성능을 조사한 *S. cerevisiae* R74-2(2)를 사용하였다.

사용배지

균 분리시 및 알콜발효를 위한 전배양시의 배지는 YPD(yeast extract 1%, polypeptone 1%, glucose 2%)를 사용하였고, 발효배지는 glucose 20%, yeast extract 0.2%, polypeptone 0.2%, $(NH_4)_2SO_4$ 0.3%, KH_2PO_4 0.1%, $MgSO_4$ 0.2%로 구성된 배지를 사용하였다. 균보관용 배지는 PDA(potato dextrose agar)를 사용하였다. 배지의 갈변방지를 위해 당과 질소원을 따로 살균하여 발효 직전 혼합하여 사용했다.

고온성 측정

분리균의 고온증식능을 조사하기 위해 YPD broth에 1일간 30℃ 항온수조에서 전배양한 후 Temperature gradient incubator(Toyo Kagaku Sanyo Co., LTD. model TN-3)에서 15~50℃ 사이 각 온도에서 2일간 진탕배양시킨 다음 균의 생육도를 Spectrophotometer(Beckman DU-40, 580 nm)로 측정하였다(10).

내당성 측정

Glucose가 0~70%(W/V) 함유된 YPD broth에 접종하여 30℃와 40℃의 항온수조에서 2일간 진탕 배양 후 배양액을 580 nm에서 흡광도로서 내당성을 측정하였다(10).

내알콜성 측정

알콜내성의 측정은 다음의 두 가지 방법으로써 조사했다.

먼저 YPD broth를 autoclaving한 후 0~20%(V/V)의 ethanol을 첨가하여 30℃와 40℃의 항온수조에서 2일간 정치배양 후, 배양액의 580 nm에서의 흡광도로서 내알콜성을 측정하였다(10).

다른 한 측정방법으로는 15%의 ethanol을 함유한 YPD broth 100 ml을 넣은 250 ml flask에서 30℃와 40℃의 항온수조에서 2일간 정치배양 후, 발효배지에서 5일간 발효하여 발효율의 저하여부를 조사하여 내알콜성을 측정하였다(10).

Alcohol 발효율

알콜 발효율을 측정하기 위하여 250 ml flask에 발효배지 50 ml를 첨가 살균한 후, conc-H_2SO_4를 Durham tube에 채워 수분의 증발을 막고 30~43℃의 각 항온수조에서 진탕(100 rpm) 또는 정치배양하였다. 이때 발효율은 CO_2 생성에 따른 중량감소로써 계산하였다(14).

Alcohol 농도 측정

Alcohol 양은 배양액 50 ml의 1차 증류액을 alcohol hydrometer로 측정한 값을 Gay Lussac table로 환산하여 계산하였다(18). 그리고, 경시적인 방법으로는 CO_2 생성에 따른 무게 감소로 발효율을 측정하였다(14).

결과 및 고찰

균주의 분리 및 동정

대구근교의 고온환경에서 채취한 시료로부터 최종 선별한 균주 F38-1을 YPD 한천 배지에서 18시간

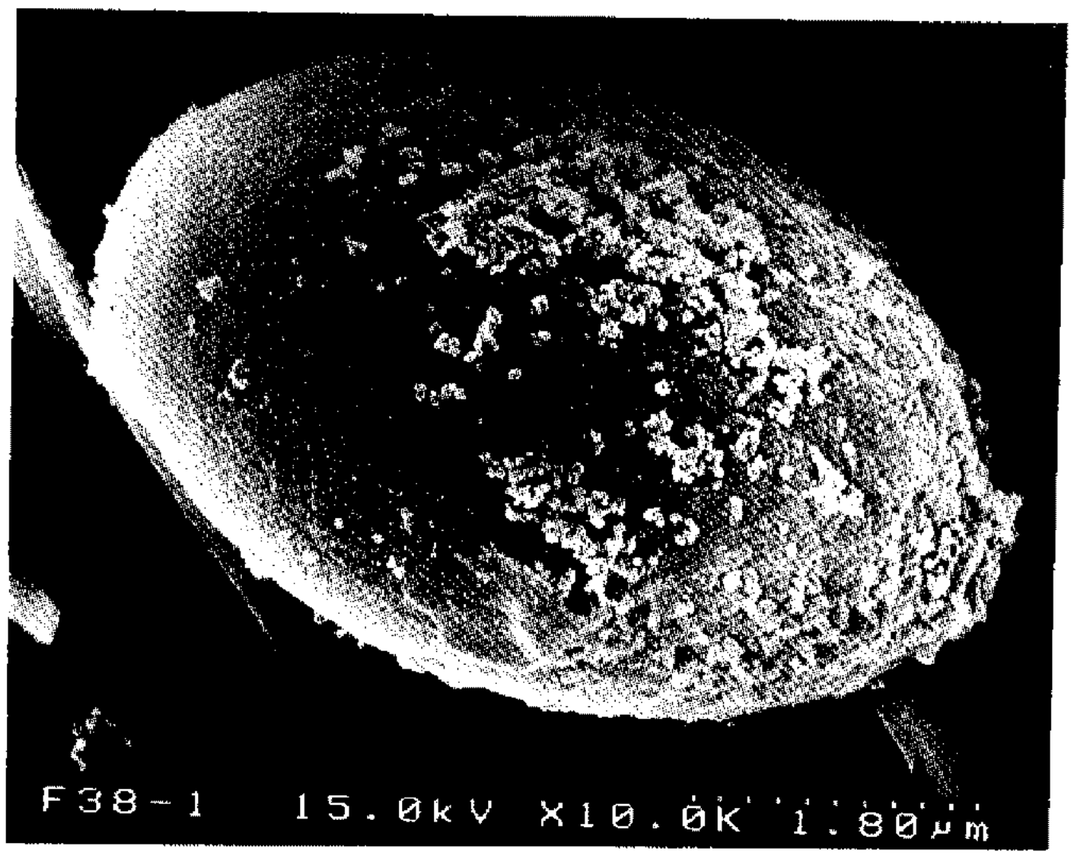

Fig. 1. Scanning electron micrograph of *S. cerevisiae* F38-1.

Table 1. Morphological characteristics of the isolate F38-1

	S. cerevisiae F38-1	S. cerevisiae B
Shape	oval	oval
Size	6×4 νm	7×5 νm
Flocculation	+	+
Formation of ascospores	+	+
Formation of pseudomycelium	−	−
Mode of vegatative reproduction	budding	budding
colony	cream	cream

배양시 생기는 유백색 균총을 전자현미경으로 관찰한 결과(Fig. 1 및 Table 1), 이 균주는 타원형으로 크기는 6×4 μm(장축×단축)로 비교적 큰 효모이며, 출아혼을 발견할 수 있어 출아법으로 증식함을 알 수 있었다. 이 균은 외형이 매끈한데 비해 대조구인 *S. cerevisiae* RA74-2(이하 RA74-2라 약칭함)는 다소 rough 했으며, 이 균의 크기는 RA74-2보다 조금 작은 편이었다(2).

한편 분리균의 생화학적인 특징을 조사한 결과(Table 2), 분리균은 2탄당인 melibiose에 대해 빠른 발효능과 자화능을 가지고 있으며, trehalose에 대해 빠른 자화능을 가지는 특징을 가지고 있다. 이 특징은 대조구 RA74-2와 다른 점이었다(2).

세포막의 불포화지방산 함량은 고농도 알콜생성(19) 및 알콜내성(14, 20)과 크게 관계가 있다고 알려져 있어 F38-1의 fatty acid의 함량을 조사하였다. F38-1은 특히 알콜내성과 고농도알콜생성에 중요한 불포화지방산인 C_{16} 이상의 함량이 높았는데, 그중 palmitoleic acid(C_{16})의 함량은 대조구 RA74-2보다 다소

Table 2. Physilolgical and biochemical characteristics of the isolate F38-1

	S. cerevisiae F38-1	S. cerevisiae B	S. cerevisiae ATCC 24858
Fermentation			
D-glucose	+	+	+
Galactose	+	+	−
Sucrose	+	+	+
Maltose	+	+	−
Lactose	−	−	−
Melibiose	+	−	−
Soluble starch	−	−	−
Assimilation			
D-glucose	+	+	+
D-ribose	−	−	−
Lactose	−	−	−
Galactose	+	+	−
Maltose	+	+	−
Melibiose	+	−	−
Trehalose	+	−	+−
Ribitol	−	−	−
Xylose	−	−	−
Mannitol	−	−	−
Sucrose	+	+	+
Inulin	−	−	−
Inositol	−	−	−
Salicin	−	−	−
Raffinose	+	+	+
Glycerol	−	−	−
Soluble starch	−	−	−
Ethanol	+	+	−
Methanol	−	−	−
Nitrogen			
Nitrate	−	−	−
Nitrite	−	−	−
Ammonium	+	+	+
Urea Test	−	−	−
Ethylamine	−	−	−
Cadaverine	−	−	−
D.B.B Test	−	−	−
Starch Test	−	−	−
Cycloheximide			
100 ppm	−	−	−
1000 ppm	−	−	−

높았다(data not shown).

이러한 형태적 생화학적 특성을 조사하고 Lodder and Barnett(11, 12) 법에 의해 동정한 결과 *Saccharomyces cerevisiae*의 한 균주임을 알 수 있었다.

F38-1의 고온성

발효온도의 증가와 함께 효모의 성장속도 및 에탄올 생성속도는 증가되나 최종 에탄올 농도는 저하되고 최대온도 근처에서의 배양은 원형질막의 불안정을 초래하고 또한 세포활성의 급격한 감소를 초래한다(13).

F38-1의 최적발효온도와 온도에 대한 영향을 조사하기 위해 YPD broth를 이용하여 15~50℃까지 각 온도에서 2일간 진탕배양한 후 균의 생육도를 측정한 결과 Fig. 2를 얻었다. F38-1은 37℃에서 최대 생육을 보이고 43℃ 이상에서 현저한 생육저해를 보이고 있다. 대조구 B균의 경우에는 40℃에서 현저한 생육저해가 일어났다. *S. cerevisiae* F38-1은 RA74-2와 거의 같은 고온성을 나타냈으며(2), 대조구 B균에 비해 고온에서도 알콜발효능을 가지면서 생육이 가능한 thermotolerant yeast이었다.

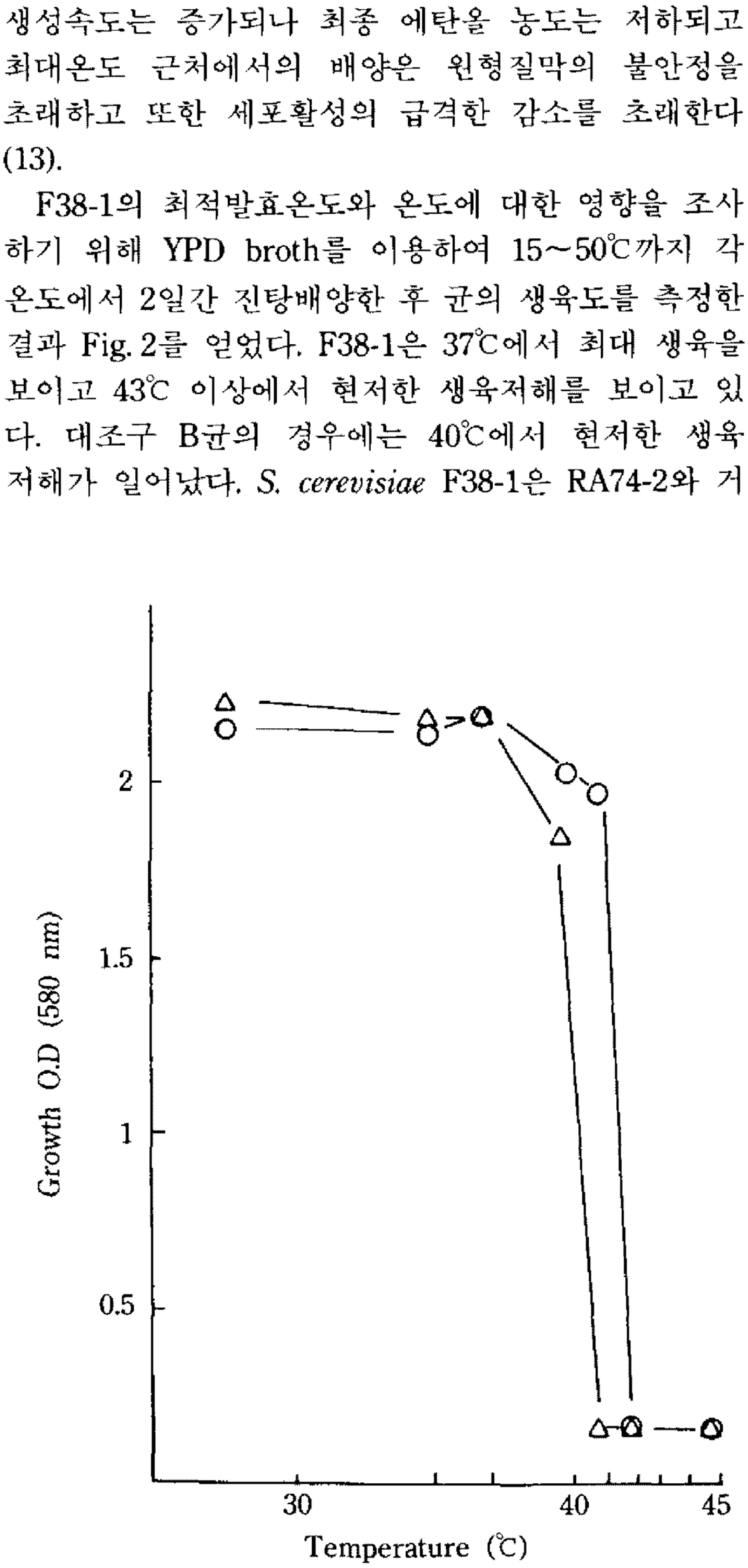

Fig. 2. Effects of temperature on the growth.
Cells were cultured at given temperature for 2 days in the YPD medium comprising 1% yeast extract, 1% polypeptone, and 2% glucose.
Symbols: ○−○, *S. cerevisiae* F38-1; △−△, *S. cerevisiae* B

F38-1의 내당성

발효초기 기질의 농도가 높을수록 초기발효속도의 증가와 최종 알콜농도의 증가 및 공정의 단순화 등의 잇점이 있으나, 발효가 진행될수록 알콜의 농도가 높아짐에 따라 발효속도가 떨어져 발효일수가 길어지며 발효 종료후 잔당이 많이 남게 된다(13, 14). 이 보고에 근거하여 분리균 F38-1의 최적 당농도를 측정하여 가장 효율적인 알콜발효를 수행하고자 0~70% glucose를 함유한 YPD broth를 이용 30℃와 40℃에서 2일간 배양 후 생육도를 측정한 결과 Fig. 3를 얻었다. 30℃에서 F38-1과 대조구 모두 당 30% (W/V) 이상에서 현저한 생육의 저해를 받았으며 당농도 50%(W/V) 이상에서는 거의 생육이 정지되어, 당내성이 50% 임을 알 수 있었다. 40℃에서도 이와 비슷한 양상을 나타내지만 온도증가에 따른 상승효과로 생육도는 현저히 낮아짐을 알 수 있었다.

F38-1의 내알콜성

F38-1의 내알콜성을 측정하기 위해 발효배지에 0~15% alcohol을 첨가하여 30℃와 40℃에서 2일간 정치배양한 후 생육도를 측정한 결과는 Fig. 4와 같았다. 30℃에서는 F38-1은 에탄올 농도가 6%(V/V) 이상부터 생육이 점차 저해되다가 10%(V/V) 이상에서 급격히 저해되었으며, 13%(V/V) 이상에서는 생육하지 못했다. 40℃에서는 에탄올내성이 온도가 높아짐에 따라 상승효과로 인해 현저하게 생육이 저해되어 기존의 보고와 일치했다(5). F38-1은 알콜농도가 3% (V/V) 이상에서 생육이 급격히 저하되고 8%(V/V) 이상에서는 생육하지 못했다. 그러나 대조구 B균은 2%에서 급격한 생육의 저해를 받기 시작했으며 4% 이상에서는 생육하지 못했다. 위의 결과로써, F38-1은 온도의 증가에 따른 알콜내성이 대조구에 비해 높다는 사실을 알 수 있었다.

내알콜성 측정의 다른 방법으로 YPD broth에 15% alcohol을 첨가하여 30℃에서 2일간 정치배양한 후 균을 회수하여 발효배지에서 30℃와 40℃, 5일간 발효하여 발효율을 측정하였다(Table 3). F38-1과 대조구 B균 모두 30℃에서는 발효율의 저해를 보이지 않았으나, 40℃에서는 F38-1의 경우 발효율에 심각한 저해를 보이지 않으나 B균은 55%에서 35%로 심각한 저해를 나타내고 있다. 이 결과에서도 F38-1은 우수한 알콜내성을 나타냈다.

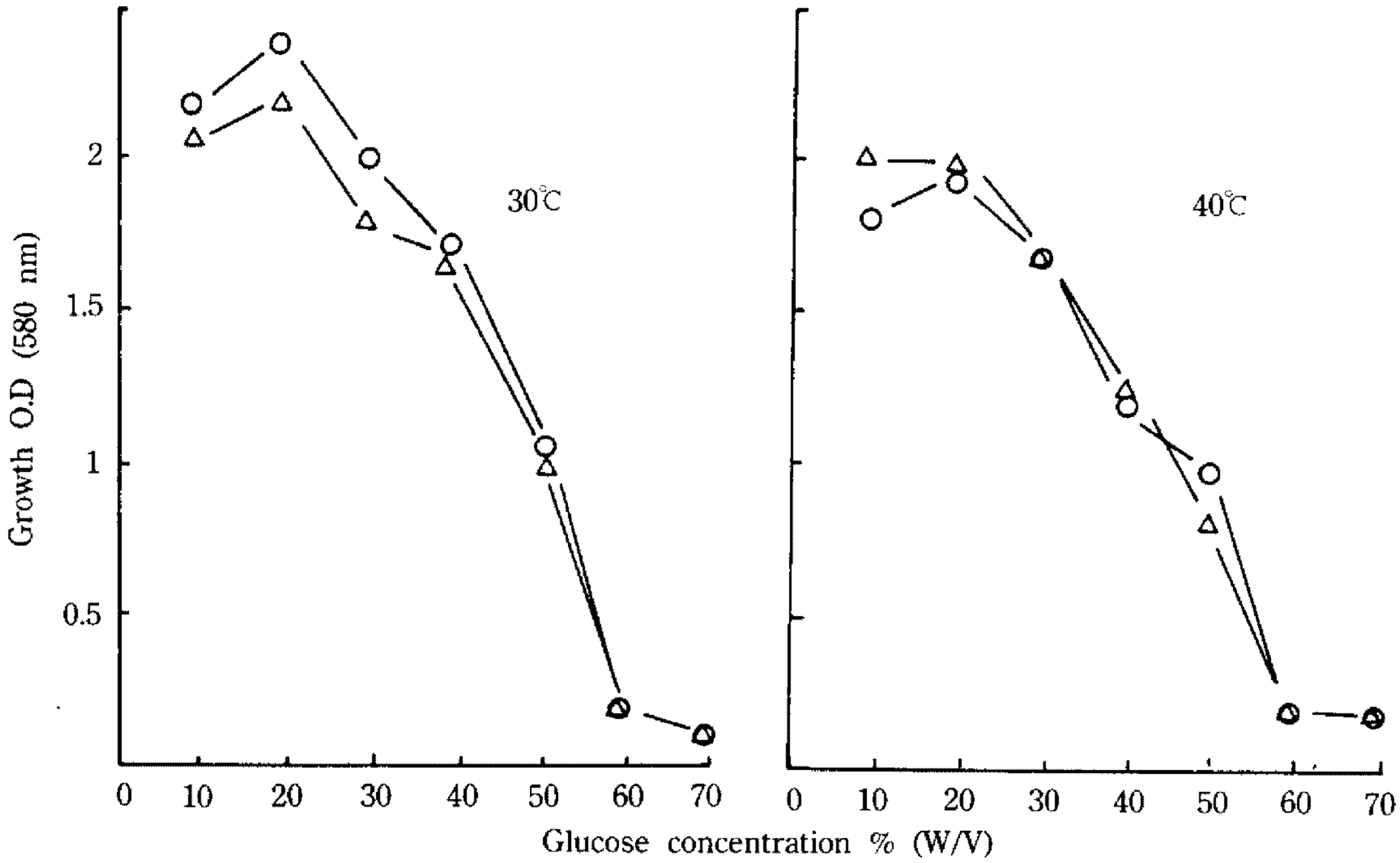

Fig. 3. Effects of glucose concentration on cell growth at 30℃ and 40℃.
Cultures were made for 2 days using YPD medium containing various glucose concentrations. Symbols: ○−○, *S. cerevisiae* F38-1; △−△, *S. cerevisiae* B

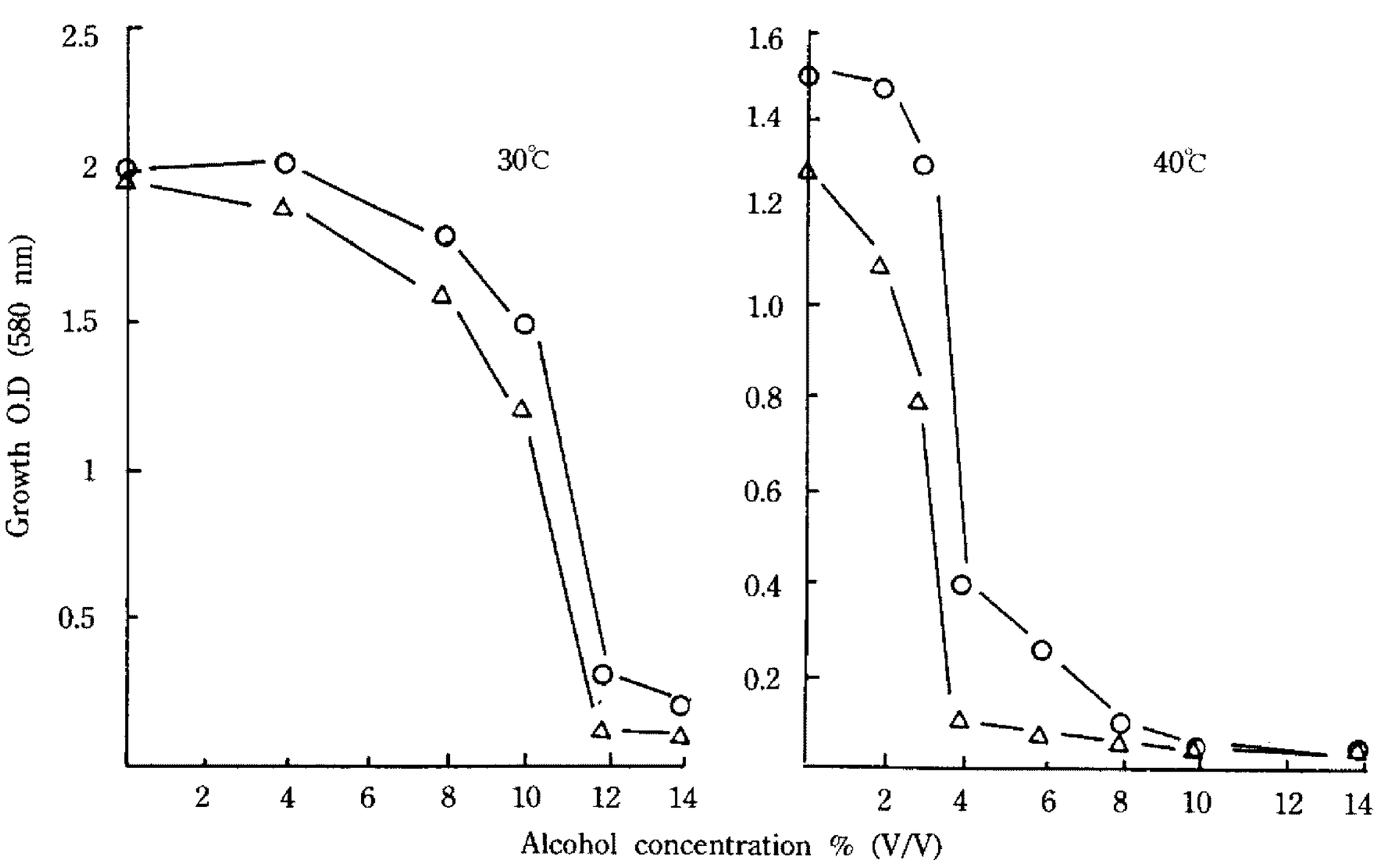

Fig. 4. Effects of ethanol concentration on the growth.
Cells were grown in the YPD medium containing various alcohol concentrations at 30℃ and 40℃ for 2 days. Symbols: ○−○, *S. cerevisiae* F38-1; △−△, *S. cerevisiae* B

F38-1의 발효력

F38-1의 발효력을 조사하기 위해 발효배지를 사용하여 30, 37, 40, 43℃를 유지하는 항온수조에서 5일간 정치배양했다(Fig. 5). 30℃에서 F38-1은 94%의 발효율로 11.8%(v/v)의 알콜을 생성했고, B균은 92%의 발효율로 11.2%의 알콜을 생성했다. 37℃에서 F38-1은 자신의 30℃의 결과와 거의 같았으나 대조구 B균은 74%의 발효율로 7.2%의 알콜을 생성했다. 40℃

Table 3. Comparision of alcohol fermentabilities of *Saccharomyces cerevisiae* F38-1 and *S. cerevisiae* B in the presence of added ethanol

Temperature	30℃		40℃	
Concentration of alcohol (%, V/V)	0	15	0	15
S. cerevisiae F38-1	90	89	76	70
S. cerevisiae B	92	92	55	35

The fermentability of each strain was determined after 5 days incubation at given temperature. The inocula were prepared by treating with 15% ethanol for 2 days at the temperature of respective fermentation before cells were collected for the inoculation.

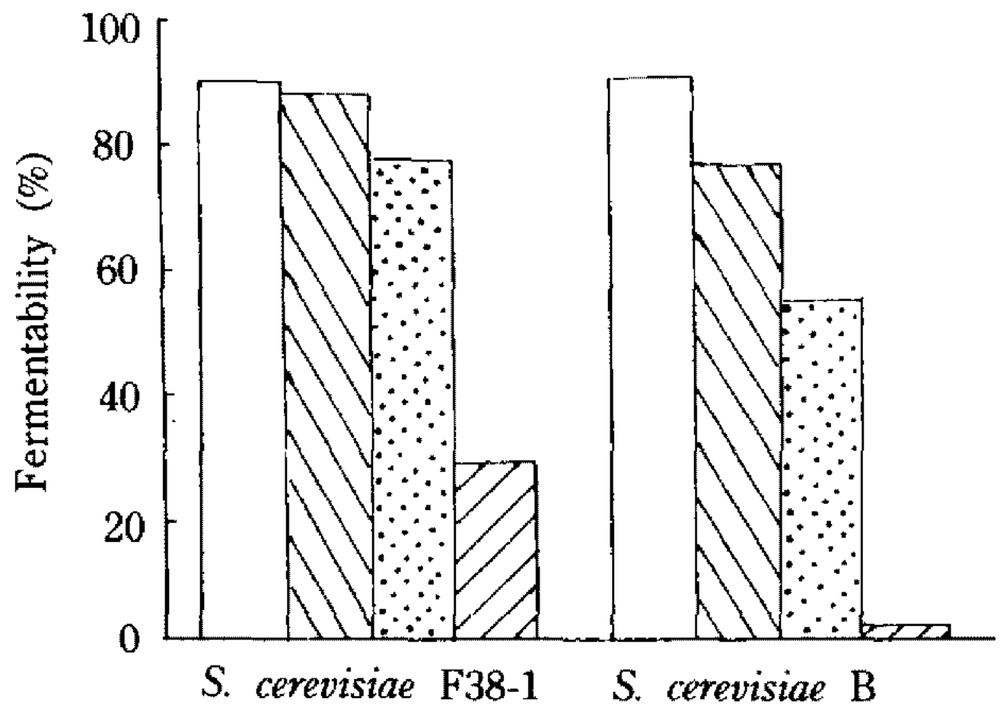

Fig. 5. Effects of temperature on the fermentability. Cells were cultured at given temperature for 5 days in a fermentation medium of 20% glucose, 1% yeast extract, 0.1% KH_2PO_4 and 0.2% $MgSO_4$.
Symbols: □, 30℃; ▧, 37℃; ▦, 40℃; ▨, 43℃

에선 온도와 생성된 알콜의 저해작용, 및 고농도의 기질 등의 상승적인 저해작용으로 알콜생성이 저해받아 생성율이 떨어졌지만, F38-1은 77%의 발효율로 9.8%(v/v) 알콜을 생성하여 대조구인 B균이 6.6%(v/v)의 알콜을 생성한 것에 비해 훨씬 발효율이 우수하였다. 그리고 43℃에서도 F38-1은 30%의 발효율로써 3.7%의 알콜을 생산해냈지만, 대조구 B균은 생육이 크게 위협을 받는 듯 했다. 이상의 실험결과로써 이 균주 F38-1은 고농도의 당이나 알콜에도 잘 견디며 더우기 고온에서도 알콜발효능이 우수한 균주임을 알 수 있었다.

요 약

대구근교의 고온환경에서 고온성, 내당성, 내알콜성, 응집성이 있고 고온에서의 알콜발효능이 우수한 효모균주를 분리, 동정한 결과 *Saccharomyces cerevisiae*로 판명되어 F38-1로 명명했다. 이 균주는 50% (W/V)의 포도당농도에서도 생육이 가능하고, 40℃에서 알콜농도 6~10%(V/V)에 이틀간 노출될 때 균의 성장이 저해를 받았으나, 43℃의 고온에서도 생육하며 알콜생성하는 thermotolerant 효모이다. 그리고 20% 포도당과 0.2% yeast extract를 포함하는 발효배지를 사용하여 40℃의 고온에서 발효했을 때 9.8%(V/V)의 알콜을 생산하는 우수한 발효율을 나타냈다.

감사의 말씀

이 연구는 통상산업부 에너지자원기술개발 지원센터의 연구비 지원으로 수행되었습니다.

참고문헌

1. 박순철. 1995. 바이오매스로부터 연료용 에탄올 생산기술 개발. 생물화공 **9**(2): 20-29.
2. Sohn, H.Y. and J.H. Seu. 1994. Screening and characterization of thermotolerant alcohol-producing yeast. *J. Microbiol. Biotechnol.* **4**: 215-221.
3. Kim, Y.H. and J.H Seu. 1988. Culture condition for glucoamylase production and ethanol productivity of heterologous transformant of *Saccharomyces cerevisiae* by glucoamylase gene of *Saccharomyces diastaticus*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **16**: 494-498.
4. Kim, Y.H., J.R. Lee and J.H. Seu. 1993. Genetically engineered yeast by heterologous transformation and intergeneric two-step protoplast fusion for ethanol fermentation. *J. Microbiol. Biotechnol.* **3**: 232-237.
5. Park, Y.M., C.H. Kim and S.K. Rhee. 1992. Selection of an ethanol tolerant *Clostridium thermohydrosulfuricum* strain. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2**: 226-229.
6. Son, S.M., I.G. Kim and Y.R. Pyun. 1992. High productivity of ethanol fermentation using flocculant yeast. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 607-613.
7. Ryu, B.H., K.D. Nam, H.S. Kim, D.S. Kim, Y.A. Ji and S.J. Jung. 1988. Screening of thermotolerant yeast strain for ethanol fermemtation. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **16**: 265-269.
8. Hacking, A.J., I.W.F. Taylor and C.M. Hanas. 1984. Selection of yeast able to produce ethanol from glucose at 40℃. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 361-363.
9. Kim, T.S., S.H. Lee, S.M. Son, Y.J. Kwon and Y.R. Pyun. 1991. Continuous ethanol fermenta-

tion using membrane cell recycle fermentor. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 419-427.
10. Yang, J.Y., K.H. Park, U.H. Paek and J.H. Yu. 1990. Screening and characterization of high-alcohol producing *Saccharomyces cerevisiae* D1. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **18**: 511-516.
11. Lodder, J. 1970. The yeast. North-Holland Publishing Co. Netherlands. 1st ed.
12. Barnett, J.A., R.W. Payne and D. Yarrow. 1983. Yeast: characteristics and identification. Cambridge University Press. Cambridge.
13. Jones, M.A. and W.M. Ingledew. 1994. Fuel alcohol production: optimization of temperature for efficient very-high-gravity fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 1048-1051.
14. Ohta, K., K. Supanwong, and S. Hayashida. 1981. Environmental effects on ethanol tolerance of *Zymomonas mobilis*. *Annual Reports ICME.* **3**: 109-116.
15. Luong, J.H.T. and M.C. Tseng. 1984. Process and technoeconomics of ethanol production by immobilized cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 207-216.
16. Nagashima, M., M. Azuma, S. Noguchi, K. Inuzuka, and H. Samejima. 1984. Continuous ethanol fermentation using immobilized yeast cells. *Biotech. Bioeng.* **26**: 992-997.
17. Ramalingham, A. and R.K. Finn. 1977. The vacufer process: a new approach to fermentation alcohol. *Biotech. Bioeng.* **19**: 583-589.
18. Seu, J.H. and Y.H. Kim. 1989. Ethanol fermentation of fusion between heterologous transformant of *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida tropicalis* in mini-jar. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **17**: 8-13.
19. Watson, K. and R. Cavicchioli. 1983. Aquisition of ethanol tolerance in yeast cells by heat shock. *Biotechnol. Letters* **5**: 683-688.
20. Ryu, Y.W. and H.W. Jang. 1991. Effect of Oxygen and unsaturated fatty acids on the ethanol tolerance of yeast strains. *J. Microbiol. Biotechnol.* **1**: 6-11.
21. Thomas, D.S., J.A. Hossack, and A.H. Rose. 1978. Plasma-membrane lipid composition and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* **117**: 239-245.

(Received 20 July 1995)