

## 고온성 알콜발효 효모의 Alcohol Dehydrogenase의 특성

예상수 · 임시규 · 손호용 · 진익렬 · 이인구<sup>1</sup> · 김영호 · 서정훈 · 박 완\*  
경북대학교 자연과학대학 미생물학과, <sup>1</sup>농과대학 농화학과

**Alcohol Dehydrogenase of Thermotolerant Alcohol-producing Yeasts. Sang-Soo Yea, Si-Kyu Lim, Ho-Yong Sohn, Ing-Nyul Jin, In-Koo Rhee<sup>1</sup>, Young-Ho Kim, Jung-Hwn Seu and Wan, Park\*.** Department of Microbiology, College of Natural Sciences, <sup>1</sup>Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea - The characteristics of alcohol dehydrogenase (ADH, EC 1.1.1.1, alcohol:NAD oxidoreductase) of thermotolerant alcohol-producing yeasts, *Saccharomyces cerevisiae* RA-74-2 and *Kluyveromyces marxianus* RA-912, were compared with that of mesophilic *S. cerevisiae* D, an industrial strain. Under anaerobic culture condition, both *S. cerevisiae* RA-74-2 and D had similar level of ADH activity at 30°C, and the activity of *S. cerevisiae* RA-74-2 at 37°C was the same level at 30°C. However, the level of ADH activity of *S. cerevisiae* D at 37°C decreased about 70% of that at 30°C. The level of enzyme activity of *K. marxianus* RA-912, which showed lower alcohol productivity than *S. cerevisiae* RA-74-2 and D, was about 43% of those strains at 30°C, and decreased somewhat at 37°C. The results showed a good correlation between the alcohol productivities and the level of ADH activities of these strains grown at 30°C and 37°C. And the higher heat stability of ADH of *S. cerevisiae* RA-74-2 than that of *S. cerevisiae* D seemed to reflect the ability of high temperature fermentation. Despite of its fermentation ability even at 45°C, however, the ADH of *K. marxianus* RA-912 showed lower heat stability than that of *S. cerevisiae* D. Both *S. cerevisiae* RA-74-2 and D showed similar patterns of two bands of ADH isozyme, and the low band of *S. cerevisiae* RA-74-2 moved slightly faster than that of *S. cerevisiae* D. The staining intensity of the bands of *S. cerevisiae* D at 37°C was weaker than those at 30°C. However, *S. cerevisiae* RA-74-2 showed no differences in total intensity of the bands of 30°C and 37°C. As the patterns of cellular proteins and ADH isozyme of *K. marxianus* RA-912 were different from *S. cerevisiae* RA-74-2 and D, *K. marxianus* might have its own characteristic ADH system.

화석에너지 자원고갈의 문제와 환경오염 문제의 해결을 위한 대체방안의 하나로써 재생 가능한 biomass로부터 알콜의 생산은 최근에 다시 주목의 대상이 되고 있다. 이에 따라 알콜 발효의 경제성을 높이기 위하여 발효공정의 개선, 균주의 개발, 값싼 원료의 발굴에 대한 연구가 이루어지고 있다. 이 중에서 고온성 알콜발효는 냉각, 발효 종류 등 여러 공정의 관리 운용상 높은 경제성이 기대되어 고온성 발효균주의 분리 및 개발이 요구되고 있다(1-8). 그렇지만 효모는 일반적으로 고온에서 생육이 어려우며 온도가 증가함에 따라 알콜 내성이 감소하여 고온성 알콜 발효가 어려운 것으로 알려져 있어(8-9), 내열성의 증진, 고온성 균주의 분리, 개발을 위해서는 고온에서 효모의 생리적 특성에 대한 이해가 필요할 것이다. 지금까지 고온성과 생체막 지질의 조성(10), heat shock 단백질(11-13), glycerol, trehalose(13-14) 등과의 관계

가 보고되었었으며, 알콜 내성과 온도, 삼투압, 배지조성 등과의 연관성도 보고되고 있다(9).

alcohol dehydrogenase(ADH)는 알콜발효에서 중심적 역할을 수행하는데, 효모의 ADH는 여러 개의 isozyme이 존재하며, 이들은 배양조건, 온도 안정성 기질 특이성 등이 상이한 것으로 알려져 있으며, 알콜 생산성과 밀접한 관련이 있을 것으로 생각된다(15-17). 본 연구에서는 손 등에 의해 분리되어 40°C에서 높은 발효력을 나타내 산업화 가능성을 보여주는 고온성 알콜 발효효모 *S. cerevisiae*(3-5)를 사용하여 우선 ADH활성특성을 중심으로 고온성 균주의 생리적 특성을 규명하여 고온 알콜 발효력과 ADH와의 연관성의 일단을 알고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### 사용 균주

본 실험에서 사용한 균주는 손(3-5)에 의하여 분리된 고온성 발효 효모 *Saccharomyces cerevisiae* RA-74-2, *Kluyveromyces marxianus* RA-912이며, 대조균주로는 산업적으로 이용되고 있는 균주 중 하나인 *Saccharomyces*

\*Corresponding author

Tel. 82-53-950-5376, Fax. 82-53-955-5522

E-mail: celllife@kyungpook.ac.kr

Key words: High temperature fermentation, ADH, Isozyme, *S. cerevisiae*, *K. marxianus*

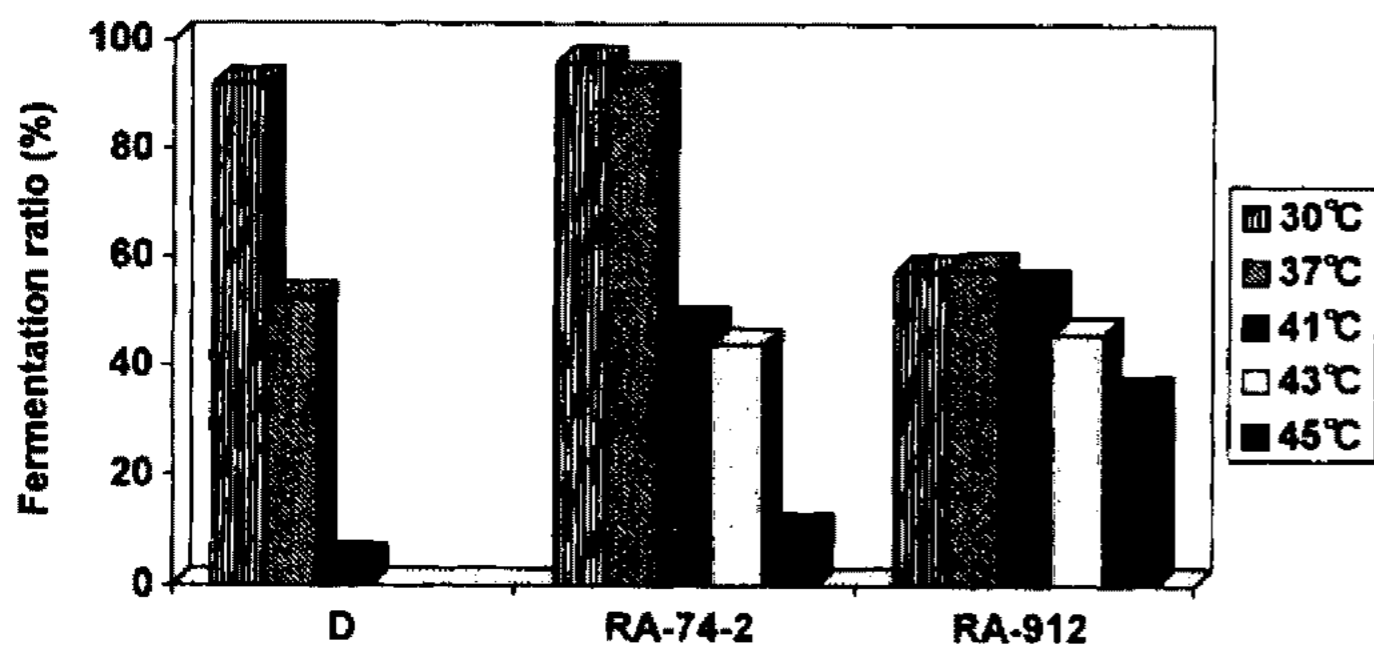


Fig. 1. The fermentation ability of thermotolerant isolates of *S. cerevisiae* RA-74-2 and *K. marxianus* RA-912 and industrial strain *S. cerevisiae* D at high temperatures (data from Ref. 4).

*cerevisiae* D 균주를 에너지 자원 기술개발 지원센터 (RaCER)로부터 분양 받아 사용하였다. 이들 균주의 증식 및 발효 특성은 Fig. 1과 같다(4).

#### 사용 배지 및 배양 조건

효모의 배양에는 Glucose 10%를 함유한 Hayduck 변형 배지(Yeast extract 0.5%,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.3%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2%) 또는 YPD(Yeast extract 2%, Polypeptone 1%, Glucose 2%)배지를 사용하였다. 균을 배양할 때에는 30°C, YPD배지에서 하룻밤 진탕 배양한 균을 종균으로 사용하였다. 혐기적 배양은 진한 황산이 들어있는 발효관으로 밀봉하여 균체가 가라앉지 않을 정도로 75 rpm으로 교반하며 배양하였으며 호기적 배양은 면전하여 110 rpm으로 진탕 배양하였다.

#### 조효소액의 조제 및 세포 분획

배양한 균체를 원심 집균하고, 냉각된 멸균수로 두번 수세를 한 다음 중량에 대하여 2배 부피의 용균완충액(0.6 M Sorbitol, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 7.4)을 넣어 현탁하였다. 이 현탁액에 Zirconium beads를 넣어 진탕하며 균체를 파쇄시켰다. 파쇄액을 7,000 rpm, 10분간 원심 분리로 상층액을 분리하여 효소액으로 사용하였다. 또한, 세포질 및 미토콘드리아 분획 제조는 12,000 rpm, 4°C에서 10분간 원심분리 하여 상층액을 세포질성 분획으로 사용하였고 잔사를 0.05 M Tris-HCl(pH 7.4) 완충액으로 두번 씻어낸 다음 동일한 완충액으로 잘 현탁하여 미토콘드리아성 분획으로 사용하였다(18-19). 모든 과정은 4°C이하에서 수행했으며, 조제한 시료는 -70°C에서 보관하면서 사용하였다. 단백질의 양은 Lowry 방법(20)에 따라 bovine serum albumin을 표준단백으로 사용하여 정량하였다.

#### Alcohol Dehydrogenase(ADH)의 활성 측정

ADH의 활성은 acetaldehyde의 환원력 또는 알콜의

산화력으로 측정하였다(15, 21). acetaldehyde의 환원력에 의한 활성 측정 시는 0.2 M acetaldehyde 0.1 ml와 1.1 mM  $\beta$ -NADH 0.3 ml를, 알콜 산화력에 의한 활성측정은 0.4 M 에탄올 0.1 ml와 13 mM  $\beta$ -NAD<sup>+</sup> 0.3 ml를 0.05 M Tris-HCl(pH 7.4) 완충액 2.0 ml에 섞은 다음 효소액 0.05 ml을 넣고 25°C 항온 수조에서 반응시킨 후 340 nm에서 NADH의 흡광도의 감소와 증가율로 활성을 측정하였다. 조제한 효소액의 ADH 활성측정을 위한 최적 조건을 찾아 효소 활성이 직선으로 성립하는 반응시간과 효소 농도에서 측정하였다. 이때 활성은 3회 반복의 흡광도 평균 수치로 나타내었다.

#### ADH의 활성염색 및 polyacrylamide gel 전기영동

ADH의 활성염색은 Gokhale의 방법(17)에 따라 하였다. 비변성 7.5% polyacrylamide gel 전기영동한 gel을 0.5 M ethanol, 7 mg/ml NAD<sup>+</sup>, 25  $\mu$ g/ml phenazine methosulfate(PMS), 1 mg/ml nitro blue tetrazolium chloride(NBTC), 60 mM Tris-HCl(pH 8.6)용액에 담가 25°C의 암실에서 1시간 동안 염색을 하였다.

SDS-polyacrylamide gel 전기영동은 Laemmli의 방법(22)에 준하여 12.5% acrylamide gel을 사용하였으며, Coomassie brilliant blue R-250으로 단백질을 염색하였다. 이때 분자량 marker는 Pharmacia사의 제품을 사용했다.

#### 사용 시약

$\beta$ -NAD<sup>+</sup>,  $\beta$ -NADH는 Sigma사의 제품을, acetaldehyde는 Fluka사의 제품을, ethanol은 Haymann사의 제품을 사용하였다. 그리고 나머지 시약은 시판되고 있는 1급 이상의 Difco, Sigma, Junsei사의 제품을 사용하였다.

#### 결과 및 고찰

##### 배양온도에 따른 고온성 효모의 ADH의 활성

고온성 알콜 발효효모인 *S. cerevisiae* RA-74-2와 *K. marxianus* RA-912의 ADH 특성을 밝혀보고자, 현재 주정업계에서 사용하고 있는 *S. cerevisiae*인 D 균을 비교균으로 사용하여 30°C, 37°C에서 10% Glucose를 함유한 Hayduck 변형 배지에서 호기적 조건과 혐기적 조건에서 각각 16간 동안 배양하여 ADH의 활성을 검토하였다.

30°C, 혐기적인 발효 조건에서 배양된 *S. cerevisiae* D와 RA-74-2의 ADH의 활성은 비슷하였으며 알콜 발효력이 떨어지는 *K. marxianus* RA-912는 *S. cerevisiae* D와 RA-74-2에 비해 약 43%의 활성을 나타내었다. 37°C에서 배양한 경우에는 고온 발효력이 우수한 *S. cerevisiae* RA-74-2의 ADH 활성은 30°C와 비슷하였으나, *S. cerevisiae* D균은 30°C에서의 활성에 비해 약 70% 감소

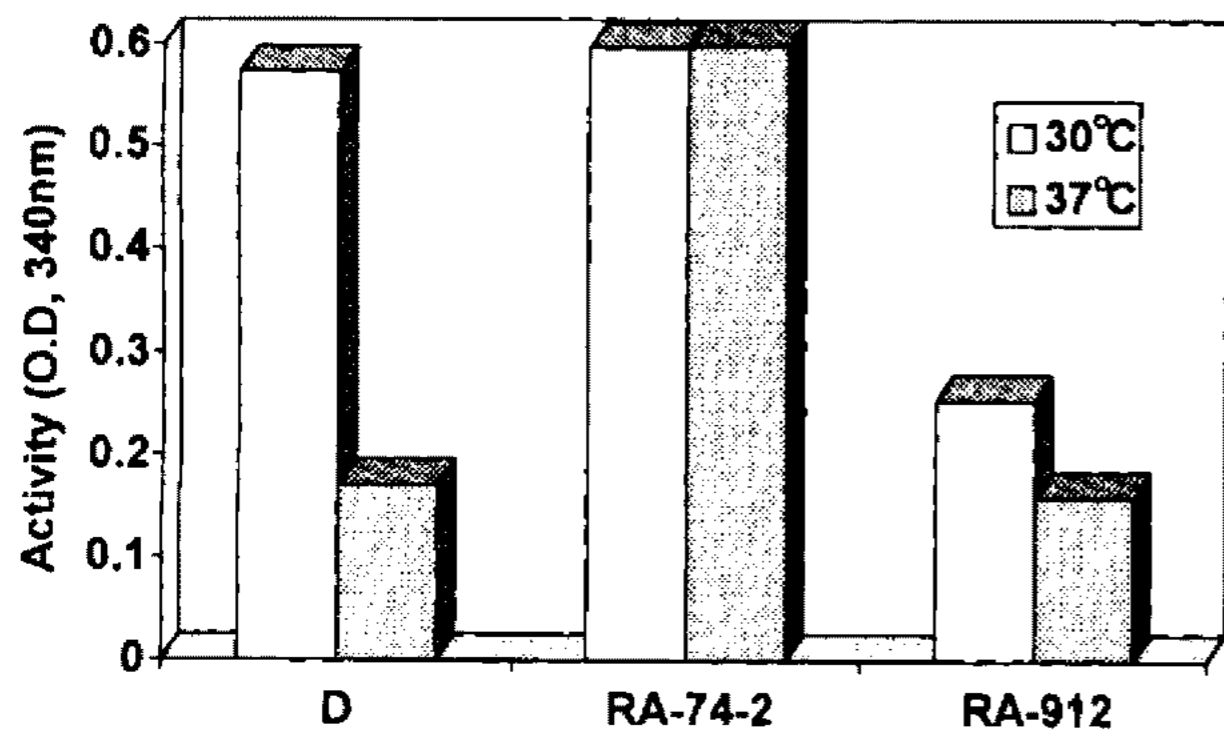


Fig. 2. The level of ADH activities of yeast strains anaerobically cultured at high temperature.

Cell-free extracts were prepared from the yeast cells grown under anaerobic condition at each temperature for 16 hours. 150  $\mu$ g as protein of cell-free extract was used as an enzyme source. ADH activities were assayed in the presence of NADH as electron donor for 1min at 25°C.

하였다. *K. marxianus* RA-912도 30°C에 비해 약간의 활성감소를 나타내었다(Fig. 2). 이러한 결과는 이들 균주의 알콜발효력(Fig. 1)과 잘 일치되는 것으로, 온도에 따른 발효력과 ADH 활성은 밀접한 연관성이 있음을 보여주고 있다.

호기적인 조건에서 30°C와 37°C에서 각각 배양한 균의 ADH의 활성 측정의 결과는 Fig. 3과 같이 혐기적으로 배양한 세포의 활성에 비해 Gokhale 등(17)의 보고와 같이 전반적으로 다소 감소하는 결과를 나타내었지만 혐기적 조건으로 배양한 경우와 유사한 경향을 나타내었다.

그리고 NAD를 수소 수용체로 하여 ethanol 산화력으로 ADH의 활성을 측정한 결과도 acetaldehyde의 환원력으로 측정한 결과와 비슷한 양상을 나타내었다(자료미제시).

#### 고온성 알콜 발효효모의 ADH의 열 안정성

고온성 알콜 발효효모의 고온에서의 우수한 알콜 발효력은 여러 인자에 의해 지배를 받을 것으로 생각되며,

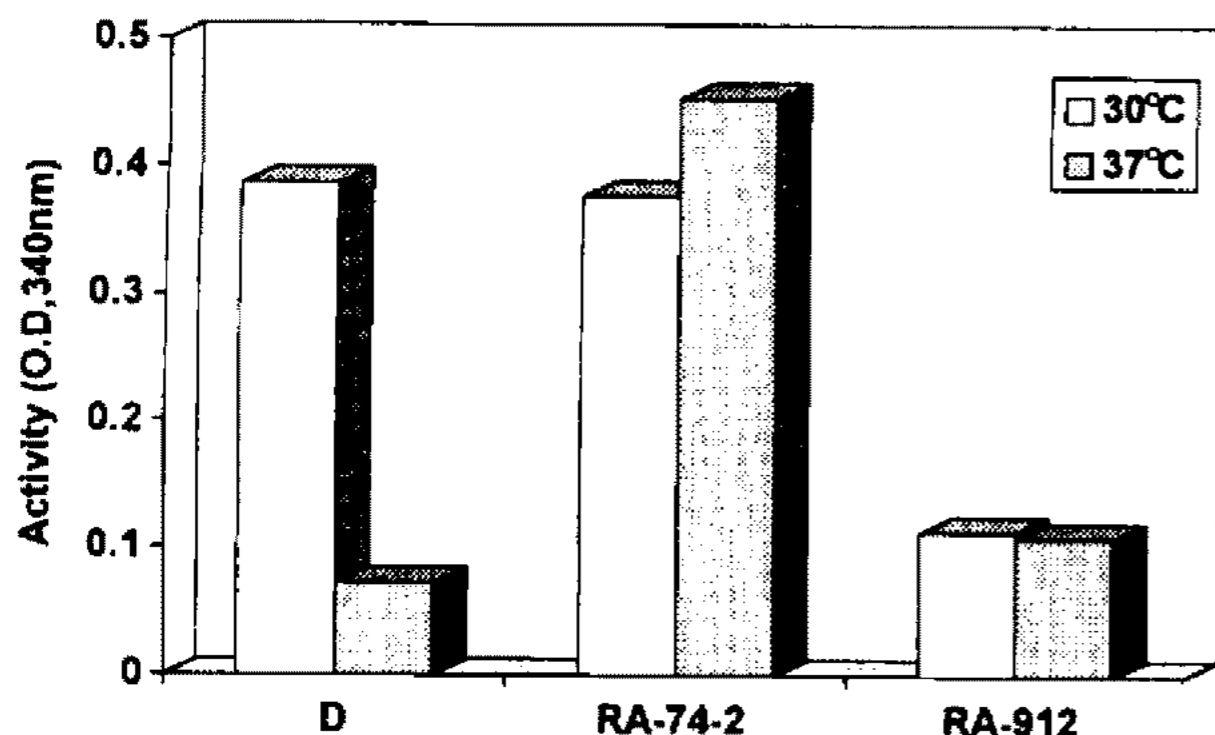


Fig. 3. The level of ADH activities of yeast strains aerobically cultured at high temperature.

For reaction conditions, see Fig. 2.

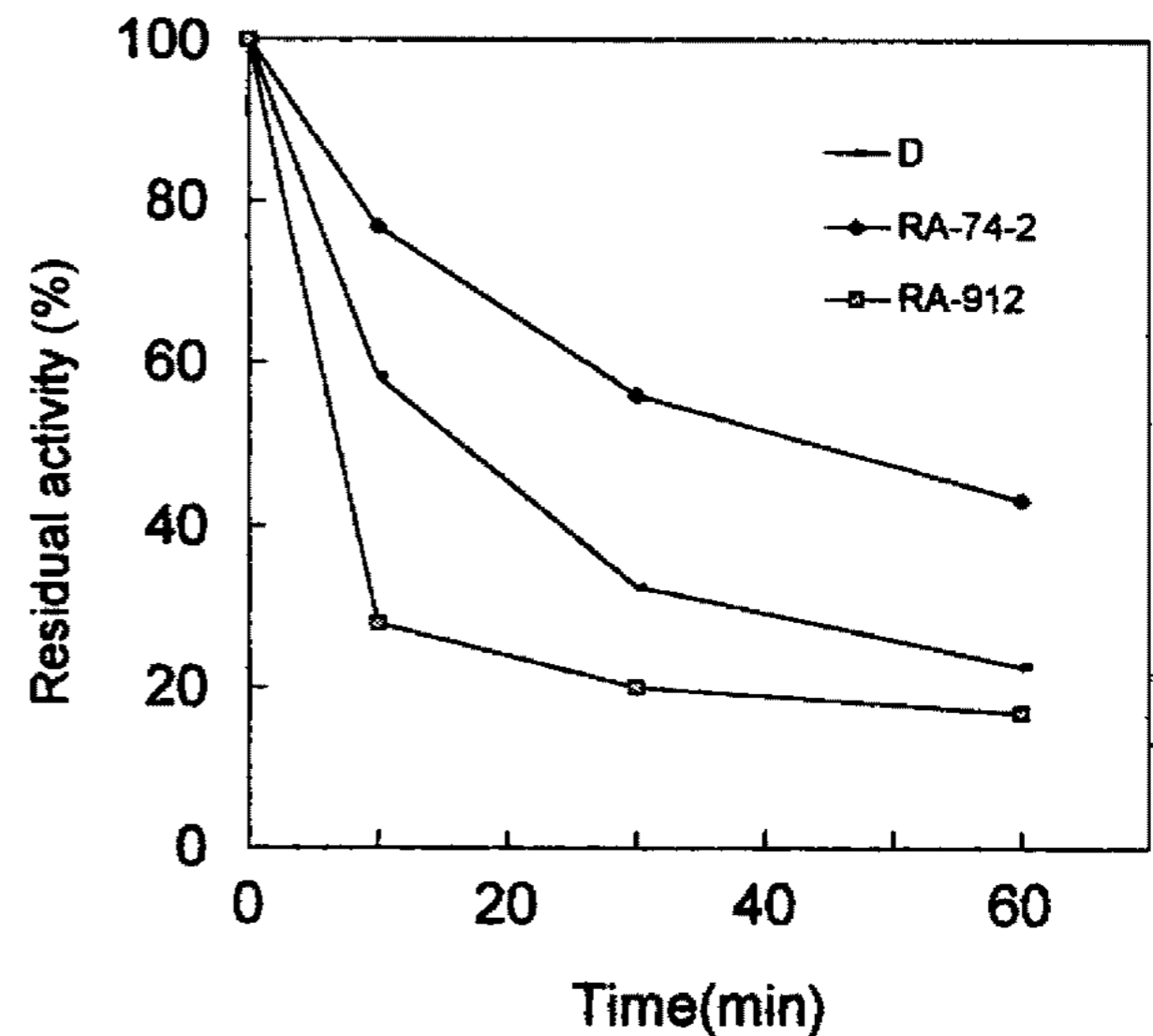


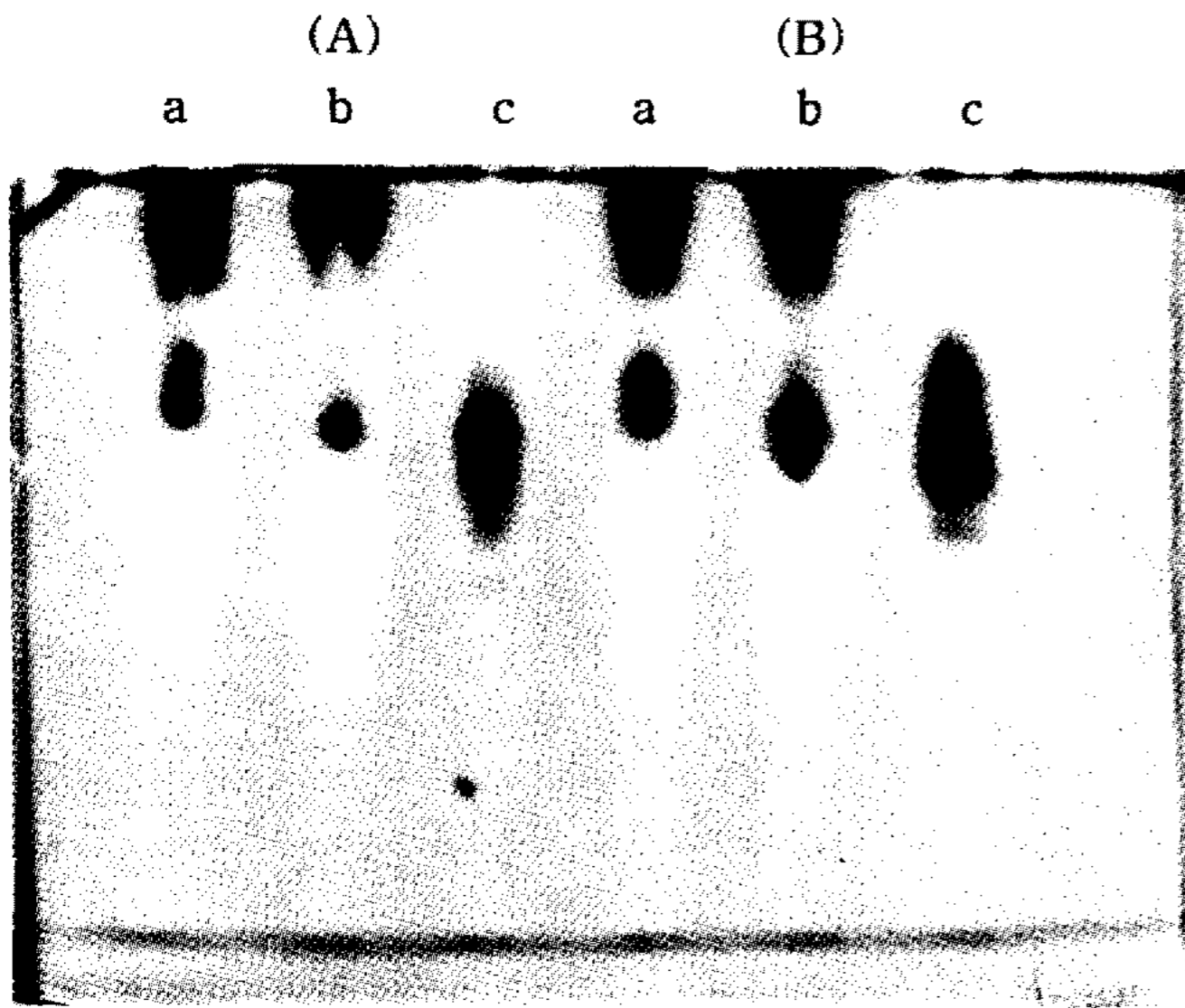
Fig. 4. Thermal stability of ADH of yeast strains.

The enzyme solutions in 0.05 M Tris-Cl buffer, pH 7.4 were incubated at 60°C. After incubation for various periods of time as indicated, the residual enzyme activities were measured as Fig. 2.

ADH의 열 안정성도 그중 하나로 생각할 수 있다. 그래서 30°C에서 배양한 세포 추출액을 60°C에서 처리하면서 시간별로 ADH의 잔존 활성을 측정하여 열 안정성을 조사한 결과는 Fig. 4와 같다. 세 균주 모두 열처리에 따라 ADH의 활성이 감소하였으나 고온 발효력이 우수한 *S. cerevisiae* RA-74-2의 경우 *S. cerevisiae* D 균주에 비해 열 안정성이 비교적 높게 나타나 *S. cerevisiae* RA-74-2의 고온 알콜발효능을 반영하는 것으로 보였다. 알콜 발효력은 낮으나 고온성 발효효모인 *K. marxianus* RA-912의 열 안정성은 예상과는 달리 *S. cerevisiae* D에 비해 낮은 것으로 나타났다. 이는 고온성 알콜발효능이 ADH의 특성만에 의해 결정되지 않음을 반증하는 예로 생각된다.

#### 고온성 알콜 발효효모의 ADH의 isozyme

알콜 발효력의 차이, ADH의 활성의 차이는 ADH의 질적 양적 차이거나 isozyme의 차이 등을 반영한 결과일 수 있다. 이 가능성을 검토하기 위하여 30°C, 37°C에서 각각 배양한 효모의 ADH의 활성염색을 시도한 결과는 Fig. 5와 같다. 같은 *S. cerevisiae*인 D와 RA-74-2의 경우 강한 활성염색을 나타내는 두개의 주요 밴드로 나타났으나, 고온성인 RA-74-2의 아래 band는 *S. cerevisiae* D보다 빠른 이동도를 나타내고 있다. 이러한 이동도의 차이는 서로 다른 isozyme이 존재할 경우와, 동일한 기원의 ADH이지만 구조적인 변화의 차이를 반영한 결과일 수도 있다. 그리고 *S. cerevisiae* D는 30°C에 비해 37°C에서 전체적인 활성염색 정도가 약간 감소하나 *S. cerevisiae* RA-74-2는 30°C와 37°C에서 거의 유사한 활성염색 강도를 보여 Fig. 2의 결과와도 부합되는 것으로 생각된다. *K. marxianus*인 RA-912의 단백질 및 활성염색 양상은

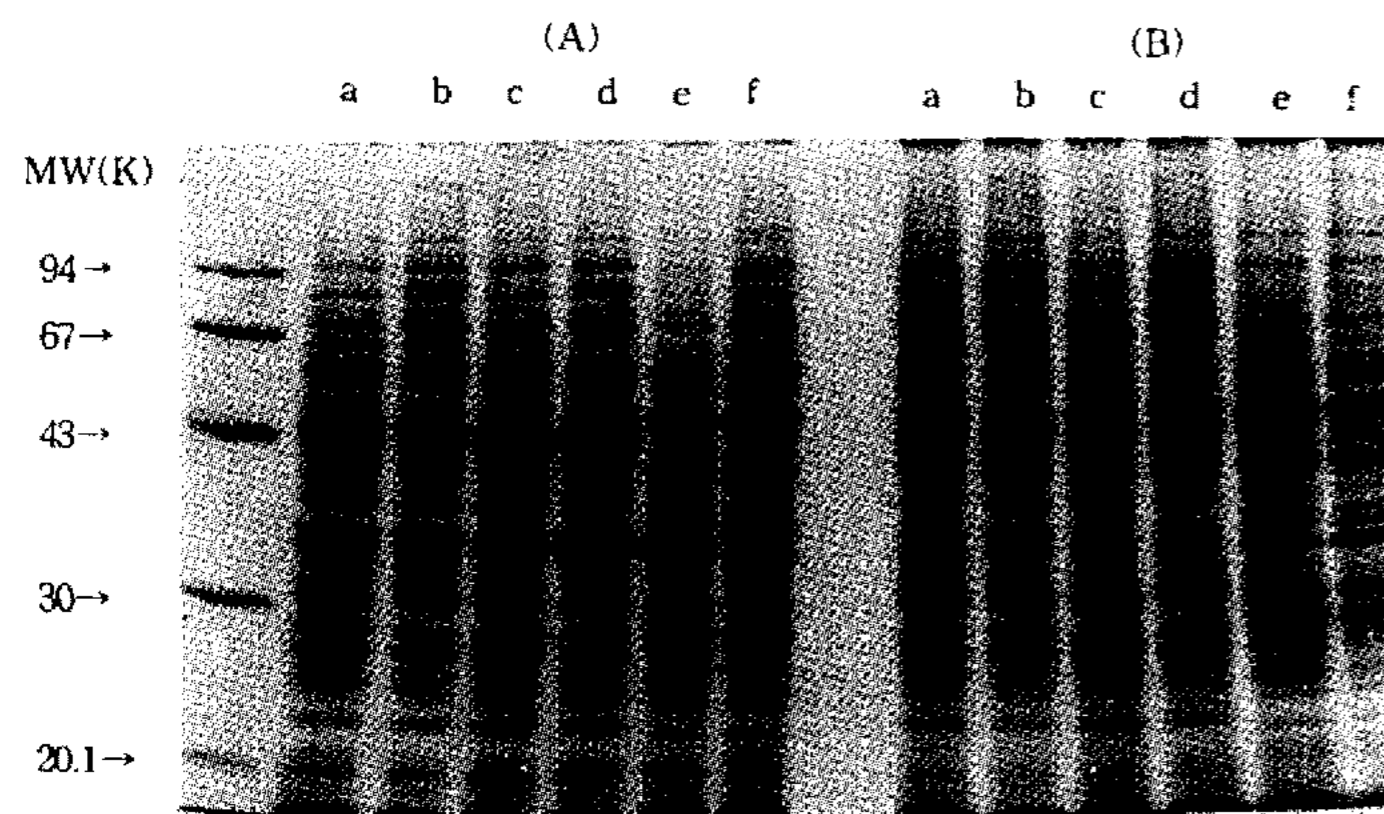


**Fig. 5.** The pattern of ADH isozymes of yeast strains grown at 30°C (A) and 37°C (B).

About 180 µg of cytosolic protein in each lane were separated on 7.5% polyacrylamide gel and stained for ADH activity as described in Materials and Methods. Lanes : a, *S. cerevisiae* D; b, *S. cerevisiae* RA-74-2; c, *K. marxianus* RA-912.

*S. cerevisiae*와 다른 양상을 보여 *K. marxianus* 특유의 ADH 효소계를 갖고 있는 것으로 생각된다.

고온성 알콜 발효력은 ADH 활성에만 의존하는 것은 아니며 세포내 여러 인자(10-14)들에 의해 복합적으로 지배되는 것으로 생각할 수 있어 고온성 효모 특유의 단백질 양상이 있을 가능성을 보았다(Fig. 6). *S. cerevisiae* RA-74-2의 세포질 및 미토콘드리아 단백질 양상은 *S. cerevisiae* D와 부분적으로는 약간 다른 양상을 볼 수 있었고, 배양온도에 따라서도 약간의 차이를 볼 수 있었으나 전체적으로는 유사하였다. 이러한 결과만으로는 효모의 내열성 또는 고온발효성 인자를 규명할 수 없었으



**Fig. 6.** Cytosolic (A) and mitochondrial (B) protein profiles of yeast strains on 12.5% of SDS-PAGE.

The molecular weight of marker proteins are indicated on the left. Lanes: a, *S. cerevisiae* D, 30°C; b, *S. cerevisiae* D, 37°C; c, *S. cerevisiae* RA-74-2, 30°C; d, *S. cerevisiae* RA-74-2, 37°C; e, *K. marxianus* RA-912, 30°C; f, *K. marxianus* RA-912, 37°C.

나, 앞으로 변이주의 분리, 분석 등을 통하여 이들 인자의 일부를 규명할 수 있으리라 생각된다.

## 요 약

고온성 알콜발효효모인 *S. cerevisiae* RA-74-2와 *K. marxianus* RA-912의 alcohol dehydrogenase 특성을 산업적으로 사용하고 있는 중온성 *S. cerevisiae* D균과 비교 검토하였다. 30°C, 혐기적인 발효 조건에서 배양된 *S. cerevisiae* RA-74-2와 D의 ADH의 활성은 비슷하였고 알콜 발효력이 떨어지는 *K. marxianus* RA-912는 *S. cerevisiae* RA-74-2와 D에 비해 약 43%의 활성을 나타내었다. 37°C에서 배양한 경우, 고온 발효력이 우수한 *S. cerevisiae* RA-74-2의 ADH 활성은 30°C와 비슷하였으나, *S. cerevisiae* D균은 30°C에서의 활성에 비해 약 70% 감소하였다. *K. marxianus* RA-912도 30°C에 비해 약간의 활성감소를 나타내었다. 이는 이들 균주의 알콜발효력과 잘 일치되는 것으로, 온도에 따른 발효력과 ADH 활성의 연관성을 보여주고 있다. 또한 *S. cerevisiae* RA-74-2의 ADH의 열 안정성도 *S. cerevisiae* D에 비해 높게 나타나 *S. cerevisiae* RA-74-2의 고온 알콜발효능을 반영하는 것으로 보였다. 그러나 45°C에서도 발효가 가능한 *K. marxianus* RA-912의 열 안정성은 예상과는 달리 *S. cerevisiae* D에 비해 낮게 나타났다.

ADH의 isozyme 양상에서는 *S. cerevisiae*인 D와 RA-74-2의 경우 강한 활성염색을 보이는 두개의 주요 밴드로 나타났으나 아래 밴드의 이동도가 약간의 차이를 보였으며, *S. cerevisiae* RA-74-2는 D와 달리 30°C와 37°C에서 거의 유사한 활성염색 강도를 보였다. *K. marxianus*인 RA-912의 단백질 및 활성염색 양상은 *S. cerevisiae*와 다른 양상을 보여 *K. marxianus* 특유의 ADH 효소계를 갖고 있는 것으로 생각된다.

## 감사의 말

이 연구는 통상산업부 에너지자원기술개발지원센터의 지원에 의해 이루어졌습니다.

## 참고문헌

- Slapack, G. E., I. Russell and G. G. Stewart. 1988. Thermophilic bacteria and thermotolerant yeasts for ethanol production. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- 방원기. 1987. 에탄올 발효의 선진기술: 대체연료로서의 에탄올 생산. 주류공업, 37-44.
- Shon, H. Y. and J. H. Seu. 1994. Screening and characterization of thermotolerant alcohol-producing yeast. *J. Microbiol. Biotechnol.* 4: 215-221.

4. Shon, H. Y., W. Park, I. Jin and J. H. Seu. 1994. The fermentation characteristics of newly selected thermotolerant yeasts at high temperature. *J. Microbiol. Biotechnol.* **4**: 222-229.
5. Sohn, H. Y., Y. H. Kim, I. K. Rhee and J. H. Seu. 1994. Application of thermotolerant yeast at high temperature in jar-fermentor scale. *J. Microbiol. Biotechnol.* **4**: 316-321.
6. Ryu, Beung-Ho, Ki-Du Nam, Hae-Sung Kim, Dong-Seuk Kim, Young-Ae Ji and Soo-Ja Jung. 1988. Screening of thermotolerant yeast strain for ethanol fermentation. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **16**: 265-269.
7. Laluce, C., M. C. Paimieri and R. C. Lopes da Cruz. 1991. Growth and fermentation characteristics of new selected strains of *Saccaromyces* at high temperature and high cell densities. *Biotechnol. Bioeng.* **37**: 528-536.
8. Hughes, D. B., N. J. Tudroszen and C. J. Moye. 1984. The effect of temperature on the kinetics of ethanol production by a thermotolerant strain of *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnol. Lett.* **6**: 1-6.
9. Tony, D'Amore and G. G. Stewart. 1987. Ethanol tolerance of yeast. *Enzyme Microb. Technol.* **9**: 322-330.
10. vanUden, N. 1984. *CRC Crit. Rev. Biotechnol.* **1**: 263-272.
11. Michel, G.P.F. and J. Starka. 1986. Effect of ethanol and heat stress on the protein pattern of *Zymomonas mobilis*. *J. Bacteriol.* **165**: 1040-1042.
12. McAlister, L. and D. B. Finkelstein. 1980. Heat shock proteins and thermal resistance in yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **93**: 819-824.
13. Lewis, J. G., R. P. Learmonth and K. Watson. 1995. Induction of heat, freezing and salt tolerance by heat and salt shock in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **141**: 687-694.
14. Hottiger, T., C. De Virgilio, W. Bell, T. Boller and A. Wiemken. 1992. The 70-kilodalton heat-shock proteins of the SSA subfamily negatively modulate heat-shock-induced accumulation of trehalose and promote recovery from heat stress in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **210**: 125-132.
15. Lutstorf, U. and R. Megnet. 1968. Multiple forms of alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.* **126**: 933-944.
16. Wales, M. R. and C. A. Fewson. 1994. NADP-dependent alcohol dehydrogenases in bacteria and yeast: purification and partial characterization of the enzymes from *Acinetobacter calcoaceticus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Micobiology* **140**: 173-183.
17. Gokale, D. V., B. S. Rao and S. Sivaramakrishnan. 1986. Alcohol dehydrogenase and invertase activities in ethanol tolerant yeasts. *Enzyme Microb. Technol.* **8**: 623-626.
18. Cambell, I. and J. H. Duffus. 1988. Yeast. a practical approach, Pp 219. IRL press.
19. Nedergaard, J. and B. Cannon. 1979. Overview-Preparation and properties of mitochondria from different sources. *Methods in Enzymology*, LV: 3-32.
20. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
21. Kim, B. H. and J. G. Zeikus. 1992. Specificity of alcohol dehydrogenase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259. *J. Microbiol. Biotechnol.* **4**: 268-272.
22. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685.

(Received 22 March 1997)