

에탄올 생성능과 생존능이 우수한 효모균주의 분리와 동정

강태영 · 오귀환 · 김 근*
수원대학교 유전공학과

Isolation and Identification of Yeast Strains Producing High Concentration of Ethanol with High Viability. Kang, Tae-Young, Gui-Hwan Oh, and Keun Kim*. *Department of Genetic Engineering, The University of Suwon, Kyonggi-Do, 445-743, Korea* - To isolate yeast strains producing high concentration of ethanol, 125 strains were subjected to screening. Initially 14 strains able to grow in a medium containing 15%(v/v) ethanol, 7 strains capable of growing in a medium containing 50%(w/v) glucose, 23 strains having relatively fast fermentation rates, 13 strains able to grow at 42°C were selected. After secondary screening, 11 strains having relatively high initial fermentation rate and producing high concentration of ethanol were selected. After tertiary screening 5 strains producing high concentration of ethanol were selected. These 5 strains were tested again for their ethanol production, residual sugar, and viability using fermentation medium containing 25% glucose. The strain producing the highest concentration of ethanol was 20-1 strain which produced 10.56%(w/v) (13.4%, v/v) ethanol in 4 days, and the highest viable strain was 11-1 which produced 10.35%(w/v) ethanol (13.1%, v/v) with the viability of 30.44% after 5 days of fermentation. Both of the 20-1 and 11-1 strains were identified as *Saccharomyces cerevisiae*.

Key words: high concentration of ethanol, viability, isolation, identification, *Saccharomyces cerevisiae*

에탄올은 기능적인 면에서나 경제적인 면에서 타 대체 에너지로 대체하기 곤란한 수송용 액체에너지로서 석유를 대신하는 에너지 중 가장 적합한 연료 형태라 할 수 있다[3, 6]. 에탄올이 가솔린과 가액면에서 경쟁력을 갖추려면, 여러 가지 신 기술 개발로 그 생산비를 대폭 낮추어야 한다.

현재 국내 에탄올 생산업체에서의 에탄올 생산은 회분식 발효로서 33°C에서 3일간 발효시 에탄올 7.89%(w/v)(10%, v/v)을 생산하고 있으며, 4일간 발효시 8.68%(w/v)(11%, v/v)까지 가능하나 더 오랫동안 발효시켜도 더 이상 에탄올 농도가 증가하지 않고, 잔당이 많이 남게 된다. 따라서 본 연구의 목표는 짧은 발효 시간에 잔당이 적고 고농도의 에탄올을 생산하는 균주를 개발함에 있다. 또한 균체를 여러 번 재순환하여 사용할 수 있도록 고생존능의 효모 균주를 개발하고자 하였다.

이러한 균주는 당내성, 에탄올내성, 발효효율, 발효속도 등의 여러 발효 특성이 우수함으로써 이루어지는데[10], 이 에탄올 고생산성 효모 균주의 개발로 발효조의 용량을 최소화하고 에탄올의 분리정제의 효율을 높이고 증류에너지의 사용을 최소화할 수 있다[5]. 또한 발효시간이 단축됨으로써 발효에 필요한 에너지 절감효과는 물론 에탄올생산성을 높일 수 있다. 특히 초기 발효속도가 증진됨으로써 초기에 에탄올이 많이 생성되어 잡균 오염을 줄일 수 있다.

재료 및 방법

균주

본 실험에서 사용한 균주는 본 연구소에 보관중인 균주(K33-K150 등 K series)와 국내외 균주 분양기관 KCTC, KFCC, NRRL, IFO에서 분양받은 균주(KCTC1701-IFO 1386), 국내외 대학에서 분양받은 균주(Y898-Y3058 등 Y series) 총 89균주와 국내 주정 공장 토양 및 주변에서 수집한 균주(JD, JF, 1-20 series) 36균주 등 125균주를 수집하여 우수 균주를 선별하는데 사용하였다.

토양 등 자연 sample에서 균주를 분리할 때는 1g의 sample을 10 ml의 멸균수에 넣고 vortex로 혼합 한 다음 10^{-2} - 10^{-3} 의 비율로 희석하고 0.1 ml 희석액을 0.003% Rose Bengal을 함유한 YPD agar plate에 도말하여 30°C 2일간 배양 후 나타난 효모 colony를 수집하였다.

배지

효모의 성장배지로는 YPD로서 1%(w/v), yeast extract, 2%(w/v) pepton, 2%(w/v) glucose로 구성하였고, 고체배지에는 2%(w/v) agar를 첨가하여 30°C에서 48시간 동안 배양하여 사용하였다.

에탄올 첨가배지에서의 균 성장 측정

YPD agar를 멸균한 후 에탄올(95 혹은 100%, v/v)을 최종 농도 12%(v/v), 15%(v/v)가 되도록 첨가하여 고체배지를 만들고 균주를 접종하여 30°C에서 48시간 배양시킨 다음 성

*Corresponding author

Tel. 82-31-220-2344, Fax. 82-31-220-2344

E-mail: kkim@mail.suwon.ac.kr

장 여부를 측정하였다.

당내성 측정

당내성 측정은 YPD40[40%(w/v) glucose 함유]과 YPD 50[50%(w/v) glucose함유]에 각 균주를 Pepper multiple inoculator로 replica plating 하여 30°C에서 48시간 배양 후 성장 여부를 control plate인 2% glucose를 포함하는 YPD 고체배지에서의 균주 성장과 비교하여 그 성장도를 결정하였다.

발효속도 비교

균주의 발효 속도를 비교하기 위하여 10 ml의 YPD를 채운 15 ml cap tube에 Durham fermentation tube를 넣고 각 균주별 1 백금니분을 두개씩 접종하여 33°C에서 정치배양 시키면서 CO₂ 가스 수집량을 24, 48시간 단위로 관찰하여 육안으로 비교하였다. 초기 발효속도는 YPD20[20%(w/v) glucose 함유]를 사용하여 아래의 식에 의하여 계산하였다.

초기 발효속도 (ml/hr)=

Durham fermentation tube 부피 (0.932 ml)

Durham fermentation tube 를 CO₂ 로 채우는데 걸리는 시간 (hr)

고온내성 측정

YPD 고체배지에 접종하여 42°C에서 48시간 배양 후 성장 여부를 결정하였다.

에탄올 첨가 배지에서의 발효능 측정

YPD broth에 에탄올 15%(v/v)를 첨가한 배지 10 ml를 15 ml cap tube에 넣고 Durham fermentation tube를 넣어 33°C에서 CO₂기포가 형성되는지 관찰하였다.

생존능 측정

생존능은 Lee[8] 등의 방법을 이용한 methylene blue

염색법을 이용하여 haemocytometer로 측정하였다.

에탄올 정량

에탄올 정량은 Bernet & Gutman[2]방법에 근거하여 alcohol dehydrogenase를 이용한 효소정량을 하였다.

잔당 정량

발효액 내의 잔당(residual glucose)은 glucose를 standard로 하여 3,5-dinitrosalicylic acid를 이용하여 환원당량을 측정하는 방법[9]을 사용하였다.

플라스크 발효시험

YPD25 broth 20 ml를 제조하여 100 ml 삼각 flask에 넣고 1.5 × 10⁸ cell/ml되게끔 효모균을 접종하여 33°C에서 5일간 무산소상태를 유지하면서 에탄올정량, 생존능, 잔당을 측정하였다.

효모균주의 동정

효모균주의 동정을 위해 Kreger-van Rij[7]의 방법을 사용하였다.

결 과

1차 선별

수집한 에탄올 발효균주 125주의 에탄올내성, 당내성, 고온내성, 발효속도 등을 측정하였고 각 발효특성 별로 우수한 균주를 선별하여 그 결과를 Table 1에 나타내었다.

15% 에탄올배지에서 성장을 보인 균주는 JD1을 위시한 13균주였는데 대부분이 국내 주정공장에서 채취한 샘플에서 분리된 균주들이었다. 당내성에 있어 50% glucose에서 좋은 성장을 보인 균주는 K43을 비롯하여 7균주로 나타났다. 발효속도에서 Y86을 비롯한 22균주가 비교적 빠른 CO₂ 생성율을 보였는데 이들은 모두 2% glucose가 포함된 YPD에서 24시간 내에 Durham fermentation tube에 CO₂가 가득 채워진 발효속도가 비교적 빠른 균주들이었다. 42

Table 1. Selected yeast strains after first screening

Property	Strain No.
Ethanol tolerant ^a	JD1, JD2, JD3, JD4, JD5, JF1, JF2, JF3, JF5, PKS-1, 11-1, 11-2, 20-1
Sugar tolerant ^b	K43, K46, K60, K142, K143, Y35, 1185
Fast fermentation rate ^c	K86, K87, K98, K109, K126, Y567, Y898, Y2034, Y2416, 1057, JF1, JF2, JF4, 20-1, 20-2, A, B, C, D, E, F, ATCC26602
Thermotolerant ^d	K58, JD1, JD2, JD3, JD4, JD5, JF3, JF5, F043, PKS-1, 5-2, 5-3, 5-4, 6-1, 7-1

^aYeast strains able to grow at 30°C on YPD agar plate containing 15%(v/v) of ethanol.

^bYeast strains able to grow very well at 30°C on YPD agar plate containing 50%(w/v) of glucose.

^cYeast strains having relatively high fermentation rate. The fermentation was conducted in 15 ml cap tubes containing 10 ml YPD and Durham fermentation tube for 2 days at 30°C.

^dYeast strains able to grow at 42°C on YPD agar plate.

Table 2. Various fermentation characteristics of different yeast strains^a

Type	Strain	Initial fermentation rate (/hr)	Ethanol (% w/v)	Viability (%)	Fermentation in 15% ethanol ^b
Ethanol-tolerant	JD1	0.078	4.10	73.4	-
	JD2	0.078	2.83	71.4	-
	JD3	0.078	6.96	82.2	-
	JD4	0.078	3.80	63.2	-
	JD5	0.078	5.33	81.9	-
	JF1	0.078	3.79	62.3	-
	JF2	0.078	2.78	74.5	-
	JF3	0.078	3.92	73.5	-
	JF5	0.078	4.77	72.7	-
	PKS-1	0.016	0.40	80.0	-
	11-1	0.078	6.36	58.0	-
	11-2	0.062	5.75	73.6	-
	20-1	0.062	6.44	70.7	++
Sugar-tolerant	K43	0.078	4.48	81.8	-
	K46	0.078	4.79	66.7	-
	K60	0.026	0.98	91.2	+
	K142	0.016	1.82	86.2	-
	K143	0.078	6.38	70.0	-
	Y35	0.078	5.32	77.6	-
	1185	0.078	6.22	73.3	-
	Fast fermentation rate	K86	0.078	2.10	85.7
K87		0.078	3.69	83.8	-
K109		0.078	2.04	70.0	-
K126		0.078	3.74	80.6	-
Y567		0.078	5.38	68.6	-
Y898		0.078	6.61	69.0	-
Y2034		0.078	4.46	74.4	-
Y2416		0.078	3.23	74.6	-
1057		0.078	5.46	64.7	-
JF4		0.078	4.14	63.2	-
20-2		0.078	5.30	67.1	-
A		0.052	7.26	39.1	+++
B		0.078	4.86	50.9	-
C		0.078	ND ^c	ND	+++
D		0.078	6.03	59.6	+++
E		0.052	5.59	55.8	-
F		0.052	3.81	76.2	-
ATCC26602	0.078	4.29	62.5	-	
Thermo-tolerant	K58	0.026	0.78	90.7	-
	F043	0.016	1.64	89.6	-
	5-2	0.016	0.62	94.7	-
	5-3	0.016	1.42	80.0	-
	5-4	0.016	0.94	84.9	-
	6-1	0.016	1.02	90.9	+
	7-1	<0.016	0.62	94.5	+

^aOne loopful of each activated yeast culture was inoculated into 15 ml cap tube containing 10 ml YPD20 broth and Durham fermentation tube and the fermentation was conducted at 30°C for 3 days.

^bThe fermentability in 15% ethanol was examined using the YPD20 broth containing 15%(v/v) ethanol and Durham fermentation tube at 30°C for 3 days.

^cND, not determined.

°C에서 성장을 보인 균주는 K58을 비롯한 12균주들이었는데 역시 대부분 국내 주정공장 혹은 고량주 생산공장의 토양 등에서 채취한 샘플에서 분리된 효모균주들이었다. 1차 선별의 전체적인 결과를 살펴보면 에탄올내성, 당내성, 발효속도, 고온내성이 모두 우수한 균주는 하나도 없었고, 에탄올내성이면서 고온내성인 균주는 JD1등 고량주생산공장에서 분리한 8균주이었으며, 그 외 두 가지 특성이 모두 우수한 균주는 에탄올내성과 발효속도가 우수한 20-1균주 한 균주를 제외하고는 없었다.

2차 선별

1차 screening 결과 에탄올내성, 당내성, 고온내성, 발효속도 우수균주 등의 총 46균주에 대한 초기 발효속도, 에탄올 생성량, 에탄올(15%, v/v)존재하에서의 발효능 여부를 조사하였고 그 결과를 Table 2에 나타내었다.

초기 발효속도의 경우 대부분의 균주가 20%(w/v) glucose를 함유한 YPD20에서 초기 발효속도는 빠르게 나타났다. 그러나 이들 초기 발효속도가 빠른 균주들의 3일 후의 에탄올 생성량은 많은 차이를 보였다. 따라서 초기 발효속도가 빠르다고 하여서 에탄올 생성량이 꼭 많다고 볼 수가 없었다. 그러나 초기 발효속도가 아주 느린 즉 0.026 ml/hr 이하의 균주의 경우 에탄올생성량은 2%(w/v)미만으로서 아주 낮은 생성량을 보였다. 6%(w/v)이상의 에탄올을 생산한 균주는 JD3, 11-1, 20-1, K143, 1185, Y898, A, D 등의 8균주였다. 특히 15%(v/v)의 고농도 에탄올 존재하에서 성장을 보인 13균주 중에서 6% 이상의 에탄올을 생성한 균주는 JD3, 11-1, 20-1 3균주 뿐이었고, 나머지는 최저 0.4%를 비롯하여 대부분 5%(w/v) 이하의 낮은 에탄올량을 생산하는 것으로 보아 고농도의 에탄올에서의 성장능이 에탄올 생성능과 연관이 있다고 보기는 힘들었다. 이는 발효능과 에탄올 존재하의 성장능은 서로 관련이 없다고 보고한 Benitez 등[1]의 결과와도 비슷한 결과이며, 특히 D'Amore and Stewart[4]는 위의 두 표현형이 유전적으로 서로 독립된 현상이라는 가설을 발표하였다.

발효배지에 15%(v/v)의 에탄올을 첨가시킨 경우 발효능의 존재여부를 조사하였는데 대부분의 균주가 고농도 에탄올 존재하에서 발효능이 미미하였고, 7균주가 발효능을 보였다. 특히 주정공장 현장의 산업균주 A, C, D균주는 고농도 에탄올 존재하에서 그 발효능이 상대적으로 우수하였다.

3차 선별

2차 선별에서 에탄올생성량이 많은 JD3를 비롯한 8균주와 고농도 에탄올 존재하에서 발효능이 우수한 D균주, 그리고 control로서 ATCC26602주를 사용하여 25%(w/v)의 glucose가 함유된 발효배지에 최종세포수가 1×10^8 cells/ml 되게끔 접종하여 이들 중 에탄올생성량이 많은 11-1, 20-1, A, 1185, Y898등의 5균주를 선별하였다(Table 3).

Table 3. Ethanol production by various yeast strains^a

Strain	Ethanol (% w/v)
JD3	7.75
11-1	8.84
20-1	8.72
K143	7.99
1185	8.44
Y898	8.21
A	8.80
C	7.15
D	8.13
ATCC26602	6.01

^aThe activated cells of each strain were inoculated into 100 ml Erlenmeyer flask containing 20 ml YPD25 and the fermentation was conducted in 33°C-water bath for 3 days. The initial cell number in the fermentation medium was 1×10^8 cells/ml.

4차 선별

3차 선별에서 선별한 A, 1185, 11-1, 20-1, Y898균주를 $1.5 \sim 2 \times 10^8$ cells/ml 되게끔 접종하고, 최대 무산소 상태를 유지시키면서 25%(w/v)의 glucose로부터 5일 동안의 발효에서 시간별 에탄올생성량, 잔당, 생존능 등을 측정하였고 그 결과를 Table 4에 나타내었다. 이 중에서 가장 에탄올생성량이 많은 균주는 20-1로서 4일 발효후 10.56%(w/v) 혹은 13.4%(v/v)의 에탄올을 생성하였고 그 다음은 11-1균주로서 5일 발효후 10.35%(w/v) 혹은 13.11%(v/v)의 에탄올을 생성하였다. 이들 두 균주는 4일 혹은 5일 후에 잔당이 0.10%(w/v)로서 거의 잔당이 남지 않았다. 생존능이 가장 우수한 균주는 11-1균주로서 4일, 5일 발효 후 각각 41.00, 30.44%의 생존능을 나타내었다. 에탄올 생성량이 제일 많은 20-1은 4일, 5일 발효 후에 생존능이 각각 1.36, 0.31%이어서 에탄올 생성량은 우수하나 생존능이 낮아, 에탄올 생성능과 발효 후 생존능이 동시에 우수한 균주는 11-1이라 할 수 있다.

현재 국내 주정업체 현장에서 사용되고 있는 A, B, C, D, E, F 균주 중에서 발효력이 가장 우수하다고 생각되는 A균주의 경우 에탄올생성력은 5일 발효후 8.84%(w/v), 잔당이 4.95%(w/v), 생존능이 3.53%임에 비추어 볼때 본 실험에 분리 선별한 11-1, 20-1 균주들이 에탄올생성량, 잔당, 생존능에 있어 훨씬 우수함을 나타내었다.

효모균주의 동정

효모균주의 동정을 위해 포자형성 여부, 포자형태 관찰, budding 방식, carbon, nitrate assimilation test, cycloheximide에서의 성장여부를 관찰하였고 그 결과를 Table 5와 Table 6에 나타내었다. 이 결과를 Kreger-Van Rij[7]에 기술된 분류key에 따라 동정한 결과 모두 *Saccharomyces* 속에 속하는 것으로 판명되었으며(Table 7), 에탄올 생성이 우수한 20-1과 생존능이 우수한 11-1은 모두 *S. cerevisiae*로 동정되었다.

Table 4. Ethanol fermentation and viability of various yeast strains^a

Strain	Ethanol (% w/v) after				
	1 day	2	3	4	5
A	5.28	7.24	7.55	7.26	8.84
1185	5.44	8.05	8.46	8.35	9.30
11-1	5.16	8.44	8.73	9.65	10.35
20-1	6.57	7.42	9.54	10.56	10.26
Y898	5.12	7.92	8.21	8.73	8.89

Strain	Residual glucose (% w/v) after				
	1 day	2	3	4	5
A	8.65	7.52	5.53	5.43	4.95
1185	9.26	5.53	2.43	2.24	1.64
11-1	9.16	6.37	3.14	2.15	0.10
20-1	7.50	1.77	0.17	0.10	0.10
Y898	8.93	4.73	3.71	4.11	3.85

Strain	Viability (% w/v) after				
	1 day	2	3	4	5
A	79.50	30.47	15.77	10.15	3.53
1185	93.00	50.03	27.27	15.00	12.65
11-1	96.60	57.64	48.14	41.00	30.44
20-1	95.70	35.26	25.47	1.36	0.31
Y898	87.20	60.74	10.81	0.43	0.00

^aThe activated cells of each strain were inoculated into 100 ml Erlenmeyer flask containing 20 ml YPD25 and the fermentation was conducted anaerobically at 33°C for 5 days. The initial cell number in the fermentation medium was 1.5×10^8 cells/ml.

Table 5. Growth and morphological characteristics of isolated yeast strains

Strains	Growth in malt agar	Pseudohyphae		Ascospore formation	Appearance of ascospore	Vegetative growth	Cell size (µm)
		Corn meal	Morphology				
A	+	-	-	+	Spherical or oval	Multilateral budding	(3.85~7.71) × (5.65~10.28)
1185	+	-	-	- ^a	-	"	(4.11~7.19) × (4.11~7.71)
11-1	+	-	-	+	Spherical or oval	"	(4.62~7.71) × (5.14~8.99)
20-1	+	-	-	+	"	"	(3.59~6.42) × (3.85~7.71)
Y898	+	-	-	+	"	"	(4.36~7.71) × (4.36~8.22)

^aThe strain 1185 is a haploid and cannot form ascospore.

Table 6. Some physiological characteristics of isolated yeast strains

Strains	Assimilation								Growth in presence of cyclohexamide (100 ppm)	Growth at 37°C
	Nitrate source			Carbon source						
	KNO ₃ ^a	Ety	Cad	Ga	Su	Ma	Ra	Ce		
A	-	-	++	+++	+++	+++	-	-	-	+
1185	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+
11-1	-	w	-	+++	+++	+++	+	-	-	+
20-1	-	-	w	+++	+++	++	-	-	-	+
Y898	-	w	-	+++	++	+++	+	-	-	+

^aKNO₃: potassium nitrate, Ety: ethylamine, Cad: cadaverine, Ga: galactose, Su: sucrose, Ma: maltose, Ra: raffinose, Ce: cellobiose w: weak positive.

Table 7. Identified scientific names of the isolated yeast strains

Strain	Scientific name	
	Genus	Species
A	<i>Saccharomyces</i>	<i>kluveri</i>
1185	<i>Saccharomyces</i>	<i>kluveri</i>
11-1	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>
20-1	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>
Y898	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>

고 찰

에탄올 생산에서 우수한 발효특성은 고농도의 당기질로부터 고농도의 에탄올을 빠른속도로 생산하며 발효후 잔당이 남지않고, 발효후 생존능이 좋은 점들을 들 수 있다. 이러한 우수균주는 선택, 돌연변이, 교배, 원형질체융합 등의 여러 가지 유전적 방법으로 개발할 수 있다[10]. 이를 위해서는 일차로 여러 발효특성별로 우수한 균주를 분리하여 확보해둘 필요가 있다[1]. 본 연구에서도 균주 육종을 위해 각 발효특성별로 우수균주를 분리 확보함과 동시에 에탄올 생성능이 기존 균주들 보다 더 우수한 균주를 발굴하려는 데 목적이 있다. 총 125균주의 에탄올 생성능과 발효 후 생존능 등을 모두 정밀하게 분석하기가 힘들기 때문에 4차에 걸친 탐색과정을 거쳐 그 수지를 줄인 후에 소수의 후보 균주들을 가지고 에탄올 발효능을 분석하고자 하였다. 1차 탐색에서는 2%(w/v) 당이 함유된 YPD를 사용하여 각 발효특성별로 46균주를 선별하였고, 2차 탐색에서는 20%(w/v) 당이 함유된 배지에서 에탄올 생성능을 비교하여 9균주를 선별하였으며, 3차탐색에서 25%(w/v) 당 배지에서 5균주를 선별하여, 4차 탐색에서 다시 25%(w/v) 당배지와 무산소적 조건에서 에탄올 발효를 다시 정밀 분석한 결과 에탄올 생성능이 가장 우수한 20-1, 그리고 발효 후 생존능이 가장 우수한 11-1을 각각 선별하였는데 이들 두 균주는 모두 국내 주정공장 내의 토양에서 분리된 균주들이었으며, 동정 결과 역시 에탄올 생산 균주로 잘 알려진 *S. cerevisiae*로 나타났다.

많은 수의 균주들 중에서 에탄올 생성능이 우수한 균주를 선별하기 위한 탐색과정에서, 모든 균주들의 에탄올 생성능을 정밀 분석하는 것이 제일 정확한 방법이겠으나, 수많은 시료를 많은 양의 발효배지에서 일일이 시험하는 것은 실제적으로 매우 힘든 일이라 하겠다. 따라서 많은 시료의 수자를 줄일 수 있는 1차선별 등에서는 간단하고 편리하며 빠른 방법을 사용하는 것이 바람직하다. 이러한 방법들에는 cab tube내에서 Durham fermentation tube에 의한 CO₂ 생성속도의 비교, 에탄올 함유배지에서의 성장여부, 고농도 에탄올함유 발효배지에서의 CO₂ 생성능 여부등이 육안으로 빨리 비교할 수 있기 때문에 사용될 수 있다. 그러나 이들 방법은 발효능이 아주 저조한 균주들을 제외시키

는데는 사용될 수 있겠으나 이들 방법에 전적으로 의존하여 근소한 차이를 나타내는 우수한 균주 들로부터 제일 우수한 균주를 선별하는 데는 부적합하다고 사료된다(Table 2). 따라서 이들 육안비교 방법의 결과 매우 우수하다고 하여 에탄올 생성능과 발효효율이 매우 좋다고 단정할 수는 없고, cab tube를 사용하지 않고 보다 더 많은 양의 발효 배지를 사용하여 무산소적으로 발효하여 정밀분석을 하는 것이 바람직하다하겠다.

요 약

에탄올 고생산능 및 고생존능을 가진 효모 균주를 분리하기 위하여, 효모 125주를 수집하고 1차선별에서 에탄올 내성, 당내성, 발효속도, 고온내성 등의 각 발효 특성별로 우수 균주들을 분리한 결과 15%(v/v) 에탄올에서 성장을 보인 14균주, 50%(w/v) 포도당에서 매우 좋은 성장을 보인 7균주, 발효속도가 빠른 23균주, 42°C에서 성장을 보인 12균주를 분리하였다. 이들 균주들은 모두 대조구로 사용된 국내주정업체 현장에서 사용되고 있는 균주들보다 각각의 특성에서 훨씬 우수하였다. 2차선별에서 초기발효속도, 에탄올 생성량을 기준으로 8균주를 선별하였고, 3차선별에서 에탄올생성량이 상대적으로 우수한 5균주를 선별하였으며, 4차선별에서 다시 에탄올 생성량 및 생존능이 우수한 균주를 조사한 결과 에탄올생성량이 가장 많은 균주는 20-1로서 3일 발효후 10.56%(w/v) (13.4%, v/v)의 에탄올을 생성하였고, 생존능이 가장 우수한 균주는 11-1로서 5일 발효후 48.1%의 생존능을 나타내었으며, 이 때 11-1은 10.35%(w/v)(13.1%, v/v)의 에탄올을 생성하였다. 이들 두 균주는 동정한 결과 모두 *Saccharomyces cerevisiae*로 판명되었다.

REFERENCES

- Benitez, T., L. del Castillo, A. Aguilera, J. Conde, and E. Cerda-Olmedo. 1983. Selection of wine yeast for growth and fermentation in the presence of ethanol and sucrose. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**: 1429-1436.
- Bernet, E. and I. Gutmann. 1974. Ethanol determination with alcohol dehydrogenase and -NAD. pp. 1499-1502. In H. U. Bergmeyer (ed.), *Methods of enzymatic analysis*, vol. 3, Academic Press, Inc. New York.
- Brandt, D. 1981. Ethanol production by fermentation, pp. 357-373. In S. S. Sofer and O. R. Zaborski (ed.), *Biomass conversion process for energy and fuel.*, Plenum Press, New York.
- D'amore, T., and G. G. Stewart. 1987. Ethanol tolerance of yeast. *Enzyme Microbiol. Technol.* **9**: 322-330.
- Jones, R. P., N. Pamment, P. F. Greenfield. 1981. Alcohol fermentation by yeast-the effect of environmental and other variables. *Process Biochem.* **16**(3): 42-49.
- Kosaric, N., Ng, D. C. M., and G. S. Stewar. 1980. Ethanol

- production by fermentation: An alternative liquid fuel. *Adv. Appl. Microbiol.* **26**: 147–227.
7. Kreger-van Rij, N. J. W. 1984. *The yeasts, a taxonomic study*. 3rd ed. Elsevier Science Publishers, B.V., Amsterdam.
 8. Lee, S. S., F. M. Robinson, and H. Y. Wang. 1981. Rapid determination of yeast viability. *Biotechnol. & Bioeng. Symp.* **11**: 641–649.
 9. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426–428.
 10. Tubb, R. S. 1984. Genetics of ethanol-producing microorganisms. *CRC. Crit. Rev. Biotechnol.* **1**(3): 241–261.

(Received October 14, 2000)