

배양액내 나트륨 및 칼륨 이온 농도가 *Saccharomyces cerevisiae*의 발효에 미치는 영향

송우용 · 성현아¹ · 신수정[†]

접수일(2014년 12월 5일), 수정일(2015년 2월 3일), 채택일(2015년 2월 5일)

Impact of sodium or potassium cations in culture medium to ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*

Woo-Yong Song, Hyun-A Seung¹ and Soo-Jeong Shin[†]

Received December 5, 2014; Received in revised form February 3, 2015; Accepted February 5, 2015

ABSTRACT

In bioethanol from acid hydrolysis process, neutralization of acid hydrolyzate is essential step, which resulted in dissolved cations in glucose solution. Impact of cations to *Saccharomyces cerevisiae* in glucose solution was investigated focused on ethanol fermentation. Both potassium and sodium cations decreased the ethanol fermentation and glucose to ethanol conversion as potassium or sodium cations.

In sodium cation, more than 1.13 N sodium cation in glucose solution led to ethanol production less than theoretical yield with severe inhibition. In 1.13 N sodium cation concentration, ethanol fermentation was slowed down to reach the maximum ethanol concentration with 48 h fermentation compared with 24 h fermentation in control (no sodium cation in glucose solution).

In case of potassium cation, three different levels of potassium led to similar ethanol concentration even though slight slow down of ethanol fermentation with increasing potassium cation concentration at 12 h fermentation. Sodium cation showed more inhibition than potassium cation as ethanol concentration and glucose consumption by *Saccharomyces cerevisiae*.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, ethanol fermentation, sodium cation, potassium cation

• 충북대학교 목재종이과학과 (Department of Wood and Paper Science, Chungbuk National University, Chungbuk 361-763, Korea)

¹ 충북대학교 생화학과 (Department of Biochemistry, Chungbuk National University, Chungbuk 361-763, Korea)

[†] 교신 저자(corresponding author): E-mail: haseung@chungbuk.ac.kr, soojshin@cbnu.ac.kr

1. 서론

바이오알코올을 원료는 전분계, 당질계, 목질계 바이오매스이다.¹⁾ 설탕은 포도당과 과당이 연결되어 있는 이당으로 이루어져 있고, 전분은 포도당이 α -1,4결합을 하고 있는 다당으로 이루어져 있다. 설탕과 전분계 원료는 미생물에 의해 분해가 쉽고, 발효균주도 쉽게 사용할 수 있는 장점이 있다. 목질계 바이오매스는 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 리그닌을 주성분으로 복잡한 구조로 이루어져 있어 다당에서 단당으로 효소나 미생물에 의한 분해과정이 어렵다.

목질계 바이오매스를 포도당으로 전환시키기 위해서는 효소가수분해와 산 가수분해 방법을 사용한다.²⁾ 효소가수분해는 셀룰로오스를 효소를 이용하여 가수분해 하여 포도당을 얻는 방법으로, 효소가수분해 방법은 가수분해 과정에서 발효 저해물질이 생성되지 않는 장점이 있다. 하지만 산 가수분해 방법에 비해 시간이 오래 걸리고, 효소가수분해를 하기 위해서는 효소가 셀룰로오스에 쉽게 접근 할 수 있도록 전처리 과정이 필요로 하게 된다.³⁾ 또한 목질계 바이오매스의 종류에 따라 각 바이오매스에 적합한 전처리 방법을 사용해야 한다.⁴⁾

산 가수분해법은 염산이나 황산을 사용하여 다당을 가수분해하여 단당으로 전환시키는 방법이다. 산의 농도에 따라 묽은 산 가수분해와 진한 산 가수분해가 있다. 묽은 산 가수분해 방법은 목질계 바이오매스에 묽은 산을 처리하여 단당을 얻는 방법으로, 높은 반응온도를 필요로 한다. 진한 산 가수분해 방법은 진한 산을 목질계 바이오매스에 처리하여 단당으로 전환시키는 방법이다. 진한 산 가수분해 방법은 묽은 산 가수분해 방법에 비해 높은 농도의 산을 사용하지만 낮은 온도에서 가수분해 반응이 일어난다. 묽은 산이나 진한 산 가수분해 방법은 효소 가수분해 방법과 달리 가수분해 시간이 짧고, furfural, 5-HMF(5-hydroxymethylfurfural), 유기산 등 발효 저해 물질이 생성되어 이후 바이오알코올 발효과정에 저해로 작용한다.⁵⁾

목질계 바이오매스 당화액내 존재하는 유기산이나 알데히드는 세포 맴브레인을 파괴시켜 세포의 기능을 저하시킨다.⁶⁾ 백합나무의 산당화액을 원료로 에탄올 발효를 할 때, 당화액내에 존재하는 헤미셀룰로오스

유래 아세트산의 *Pichia stipitis*에 대한 발효 저해 문제를 묽은 염기 처리하여 해결할 수 있다.⁷⁾ 하지만 2년생 호랑버들의 수피와 목부의 산 당화액으로 부탄올 발효를 실시한 결과 발효 저해 문제는 부탄올의 생성을 느리게 진행 시키는 수준에서 발생하였다.⁸⁾ *Saccharomyces cerevisiae*의 경우 아세트산이 존재하는 조건에서도 포도당의 에탄올 발효에 저해를 받지 않았다.⁹⁾ 하지만 유전자 조작된 *S. cerevisiae*의 경우 포도당 발효에서는 저해가 없었지만 자일로스 발효과정이 느리게 진행되었다.¹⁰⁾ 산 가수분해 방법으로 얻어진 당 수용액을 발효에 사용하기 위해서는 중화과정이 필요하다. 중화에 사용되는 약품은 수산화칼슘으로 중화과정에서 불용성 염(황산칼슘, 일반명 석고)가 만들어지고, 불용성 염은 여과로 제거 하여 당 수용액이 만들어진다. 중화과정에서 만들어진 불용성 염에 당이 흡착되어 당 수율이 감소하는 단점이 나타나지만, 당 수용액 내 칼슘 양이온이 대부분 제거되었기 때문에 발효과정에서 칼슘 양이온의 영향은 매우 적다.

수산화칼슘이외에 산업적으로 수산화나트륨이나 수산화칼륨이 중화제로 사용될 수 있다. 이때 만들어진 염은 수용액에서 용해도가 높아 일부 양이온이 존재한다. 본 연구에서는 수산화나트륨이나 수산화칼륨을 산 당 수용액 중화에 사용할 경우 존재하는 양이온의 에탄올 발효 균주에 미치는 영향을 확인하고자 가장 널리 사용되는 발효 효모인 *S. cerevisiae*를 통해 수용성 염이 에탄올 발효에 미치는 영향을 탐색하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 공시재료

실험에 사용한 시약은 포도당(동양제철화학), peptone (Gellix), malt extract(Bacto), yeast extract(Bacto), KH_2PO_4 (덕산약품), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Shinyo Pure Chemical), Na_2SO_4 (대정화금), K_2SO_4 (대정화금)은 순도 99% 이상의 제품을 사용하였으며, 사용 균주는 *Saccharomyces cerevisiae* KCCM 12236(이후 *S. cerevisiae*로 약칭)을 한국미생물보존협회에서 분양 받아 사용하였다.

2.2 실험방법

2.2.1 배양액 제조

발효에 사용한 실험 당 수용액의 조성은 포도당 60.0 g/L, peptone 5.0 g/L, yeast extract 5.0 g/L, KH₂PO₄ 1.0 g/L, MgSO₄•7H₂O 2.0 g/L을 넣어 제조 하였다. 표준 당 수용액에 첨가한 염의 수준은 20.0℃ 용해도를 기준으로 3개의 농도로 나누어 첨가하였다.

2.2.2 *S. cerevisiae* 배양

YM배지(glucose 10.0 g/L, yeast extract 3.0 g/L, malt extract 3.0 g/L, peptone 5.0 g/L) 20.0 mL에 *S. cerevisiae* 한 개의 colony를 넣고 18시간 이상 30.0℃, 200 rpm 조건으로 진탕 배양기에서 배양하였다. 18시간 이상 배양한 *S. cerevisiae* 배양액을 YM배지에 1%(v/v)비율로 넣은 후 30.0℃, 200 rpm 조건으로 진탕 배양기에서 배양하였다. 3시간 이후 1시간 간격으로 샘플을 채취하여 자외선-가시광선 분광기(UV-1601, Shimadzu, Japan)로 660 nm에서 흡광도를 측정하여 이후 에탄올 발효과정에서 효모 첨가 수준에 반영하였다.

2.2.3 에탄올 발효

측정한 흡광도 값이 0.3 - 0.7의 값이 확인 되었을 때 표준 당 수용액에 접종을 실시하였다. 표준 당 수용액에 *S. cerevisiae* 배양액 5.0%(v/v)로 접종 하였다. 발효 조건은 30.0℃, 150 rpm 진탕 배양기에서 48시간 발효 하였으며, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48시간 샘플을 채취하여 포도당과 에탄올 농도 분석에 사용하였다.

2.2.4 분석

발효 후 채취한 샘플의 포도당, 에탄올 농도 측정을 위해 High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) (Shimadzu, Japan)를 사용하였다. Aminex HPX-87H (300 mm x 7.8 mm, Bio-Rad)컬럼과 RID-10A (Shimadzu, Japan) 굴절률 검출기를 사용하였다. 이동상은 0.005M 황산으로 60℃에서, 이동상의 유속 0.6 mL/min 조건으로 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

Table 1. Water solubility of sulfate salt with different cations (at 20℃, g/L)⁽¹¹⁾

Salt	Solubility
CaSO ₄ •(1/2)H ₂ O	2.55
CaSO ₄ •2H ₂ O	3.20
CaSO ₄ •4H ₂ O	0.34
K ₂ SO ₄	111.0
Na ₂ SO ₄	195.0

3.1 황산 당화액의 중화와 염의 생성

산 당 수용액을 발효에 적합하게 중화하기 위하여 염기를 사용할 수 있다. 염기의 비용을 고려하면 수산화나트륨, 수산화칼슘, 수산화칼륨이 적합하다. 이때 중화 반응에 의하여 황산칼슘, 황산칼륨, 황산나트륨 염이 생성된다. 이들 3가지 염은 수용액에서 다른 용해도 값을 갖는다 (Table 1).

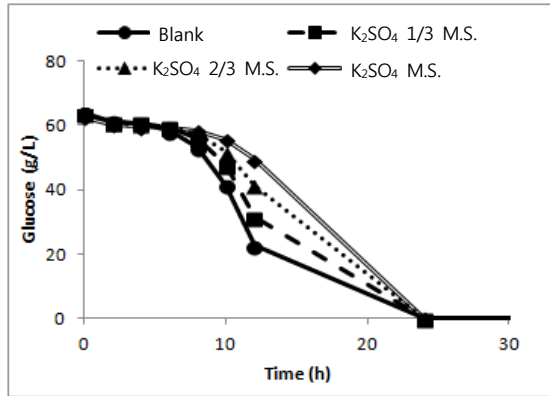
수산화칼슘을 염기로 사용하여 황산을 중화하면 황산칼슘(일명 gypsum)염이 생성되며 용해도가 매우 낮아 불용성 염의 생성량이 많다. 황산칼슘 염은 흡수성이 크며 염과 당 수용액의 분리 과정에서 단당이 흡착되었다.¹²⁾

따라서 본 연구에서는 염의 생성량이 상대적으로 적은 칼륨과 나트륨 기반 염기의 중화에서 발생하는 염이 발효 효모에 미치는 영향을 확인하고자 염의 농도를 달리 하여 발효에 미치는 영향을 평가하였다.

3.2 칼륨 양이온이 *S. cerevisiae* 발효 효모의 에탄올 발효에 미치는 영향

지질로 구성된 생물체의 막은 대부분의 물질에 대해 선택적 투과성을 가지며 특히나 전하를 띠는 이온의 경우는 막의 채널이나 특수한 운송체를 이용하여 세포의 안과 밖으로 이동이 가능하다. 이 실험에서 사용된 *S. cerevisiae* 또한 막에 다양한 종류의 양이온 운송체를 가지고 있으며, 이들의 역할은 세포에 충분한 양의 칼륨을 제공하여 칼륨 항상성을 유지할 뿐만 아니라 독성의 나트륨 양이온을 제거하여 일정한 막전위를 유지하여 세포내 pH를 조절함으로써 세포의 성장과 분열에 필수적인 세포 내부의 팽압을 지켜 외부 환경에 의해 세포에게 가해지는 삼투압스트레스에 대응하고자 함이다.¹³⁾

따라서 발효 후 중화에 사용되어지는 여러 양이온들



(a)

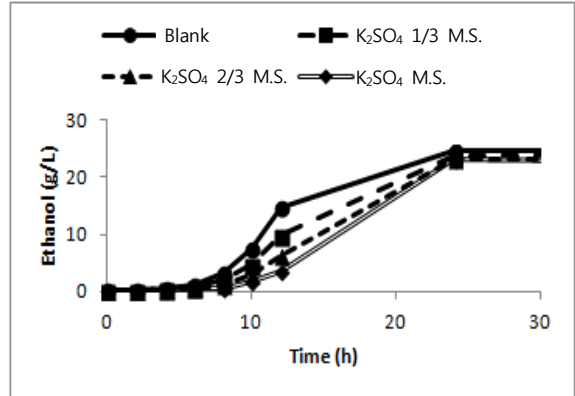
Fig. 1. Time course profile for the glucose consumption by *S. cerevisiae* in the present of different concentration of potassium sulfate.

의 첨가에 따라 효모의 발효능력에 변화를 가져온다. 칼륨 양이온의 최대 용해도값을 기준으로, 40 g/L (최대 용해도의 1/3값), 80 g/L(최대 용해도의 2/3 값), 120 g/L(최대 용해도값)으로 3가지 다른 농도로 첨가 한 후 48시간 에탄올 발효과정에서 포도당의 소비량과 에탄올의 생성량을 분석하였다.

염을 첨가하지 않은 당 수용액을 48시간의 발효 후 당 수용액의 에탄올 농도는 24.6 g/L로 칼륨염 40g/L 첨가한 당 수용액의 에탄올 농도 24.2 g/L나, 80g/L 첨가한 당 수용액의 에탄올 농도 23.2 g/L, 120g/L 첨가한 당 수용액의 에탄올 농도 22.6 g/L로 염의 첨가에 의한 에탄올 발효 저하는 크지 않았다 (Fig. 2). 발효 후 에탄올 농도뿐만 아니라 발효에 걸리는 시간도 발효 저해의 중요한 요소이다. 칼륨염이 첨가된 당 수용액은 초기 발효 단계에서 포도당의 소비 속도와 에탄올의 생성속도를 기준으로 발효가 저해되었지만, 염의 첨가와 관계없이 24시간 이내에 발효가 종료되었고 (포도당의 완전 소비), 최대 에탄올 농도에 도달하였다.

3.3 나트륨 양이온이 *S. cerevisiae* 발효 효모의 에탄올 발효에 미치는 영향

효모에 나트륨 양이온을 첨가한 경우, 효모의 성장과 산소소비량을 감소시켰으며, 이로 인해 높은 농도뿐만 아니라 적은 농도의 나트륨 양이온을 첨가 하여도 효모의 에탄올 발효 농도와 시간에 영향을 미쳐 결과적



(b)

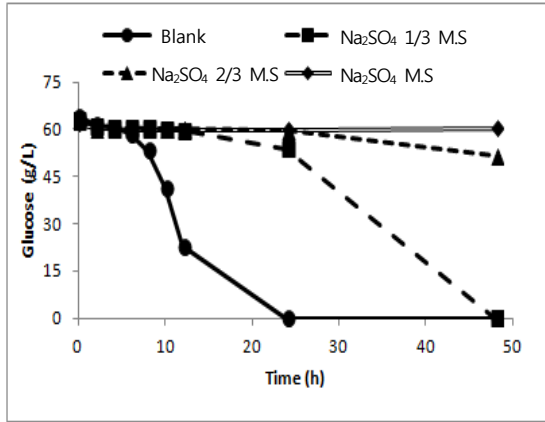
Fig. 2. Time course profile for the ethanol production by *S. cerevisiae* in the present of different concentration of potassium sulfate.

으로 에탄올 발효를 저해하는 것으로 여겨진다.¹³⁻¹⁶⁾ 나트륨 양이온이 *S. cerevisiae*의 에탄올 발효에 미치는 영향을 확인하기 위해 표준 당 수용액에 황산나트륨의 최대 용해도를 기준으로 68 g/L(최대 용해도의 1/3 값), 135 g/L(최대 용해도의 2/3 값), 202 g/L(최대 용해도값)으로 3가지 다른 농도로 첨가 한 후 48시간 에탄올 발효과정에서 포도당의 소비량과 에탄올의 생성량을 분석하였다.

염을 첨가하지 않은 당 수용액을 48시간의 발효 후 에탄올 농도는 24.6 g/L로 나트륨염 68g/L 첨가한 당 수용액의 에탄올 농도 22.3 g/L나, 135 g/L 첨가한 당 수용액의 에탄올 농도 2.7 g/L, 202 g/L 첨가한 당 수용액의 에탄올 농도 0.2 g/L로 염에 의한 발효 저해는 칼륨염 보다 더 큰 것으로 보였다.(Fig. 4) 에탄올 발효 속도는 나트륨 염이 첨가된 당 수용액은 염이 첨가되지 않은 당 수용액에 비해 낮은 포도당 소비 속도와 에탄올 생산 속도를 보였고, 칼륨염이 첨가된 당 수용액에 비해서도 낮은 에탄올 발효 속도를 보였다.

3.4 칼륨과 나트륨 양이온이 *S. cerevisiae* 발효 효모의 에탄올 발효에 미치는 영향 비교

염 첨가 수준이 가장 낮은 당 수용액은 모두 48시간 이내에 발효가 완료 되었다. 하지만 속도에서는 매우 큰 차이를 보였다. 칼륨 양이온이 첨가된 당 수용액은 24 시간 이전에 포도당이 모두 소비되었지만, 나트륨



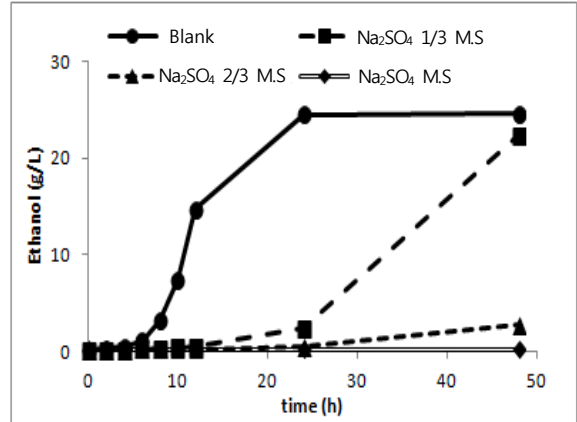
(a)

Fig. 3. Time course profile for the glucose consumption by *S. cerevisiae* in the present of different concentration of sodium sulfate.

양이온이 첨가된 당 수용액은 48 시간이 지나 포도당이 모두 소비되었다 (Fig. 1 and Fig. 3). 당 수용액에 첨가된 염의 수준이 높아질수록 칼륨 양이온이 첨가된 당 수용액은 에탄올 농도가 조금 낮아지지만, 모두 24시간 이내에 발효가 종료되었다. 하지만 나트륨 양이온이 첨가된 당 수용액은 48 시간에서도 낮은 포도당 소비량을 보이고, 생산된 에탄올 농도도 낮거나 거의 없었다. 두 양이온의 경우 효모의 발효에 다른 양이온과 비교해 큰 영향을 주는 것은 세포막의 전위와 삼투압 유지에 중요한 인자이기 때문이다.

염이 첨가된 환경에서의 에탄올 발효는 당 수용액내 양이온의 종류와 농도에 따라 다른 특성을 보인다. 이것은 나트륨 양이온의 경우 세포 내부에 독성을 즉 세포에게 삼투압스트레스를 유발하여¹⁷⁾ 약간의 나트륨도 세포 내부에 유입되는 것을 방지하기 위해 여러 운송체를 이용하여 나트륨을 외부로 내보내게 되는데 이때 세포의 성장과 여러 생리작용에 사용되어야 할 많은 양의 ATP(에너지)가 나트륨의 해독작용에 이용됨으로써 전체적인 세포의 성장과 발효능력을 저하하는 것으로 생각되어진다.¹³⁻¹⁶⁾

이와 반대로 칼륨 양이온 첨가의 경우는 이전의 연구들 중 *in vitro* 실험에서 에탄올 발효에 필수적인 요소임이 알려졌으며,¹⁸⁾ 또한 칼륨 양이온을 첨가하여도 효모의 산소소비량 및 성장 속도에는 영향을 미치지 않는



(b)

Fig. 4. Time course profile for the ethanol production by *S. cerevisiae* in the present of different concentration of sodium sulfate.

것으로 알려져 있다.¹⁴⁾ 따라서 칼륨의 경우는 세포에 독성을 나타내는 나트륨과 달리 세포의 여러 생리학적 반응에 중요한 인자로 작용하며 특히 발효와 관련되어 여러 효소의 활성화에 있어서도 필수적인 역할을 함으로써 효모의 발효와 성장에 악영향을 미치지 않는 것으로 여겨진다.^{17,19-20)} 이처럼 양이온이라는 같은 전하적 성질에도 나트륨과 칼륨은 세포막의 선택적 투과성과 삼투압스트레스 유지라는 작용에 의해 세포에게 다른 영향을 미치며 이로 말미암아 첨가 시 효모의 발효의 시간과 에탄올 생성능력에도 서로 다른 효과를 나타낸다.

4. 결론

당 수용액에 황산칼륨(K₂SO₄)과 황산나트륨(Na₂SO₄)을 첨가하여 수용성 염의 양이온이 *S. cerevisiae*의 에탄올 발효에 미치는 영향을 확인한 결과 염을 첨가한 경우 염이 없는 당 용액 보다 에탄올 발효 속도와 단당에서 에탄올로 전환 농도가 감소하였다. 첨가된 수용성 염이 에탄올 발효를 저해하였고, 염의 농도가 높을수록 에탄올 발효 저해가 뚜렷하였다. 양이온에 따른 발효저해 정도는 Na₂SO₄가 K₂SO₄보다 더 심하게 저해 받는 것을 확인하였다. 특히 이번 실험을 통해 효모의 발효 후 중화반응에서 수용성 염을 생성하는 나트륨

과 칼륨 양이온중 나트륨의 경우 효모의 막전위유지와 세포 내부에서 삼투압을 유발하는 독성을 나타내어 에탄올 발효와 성장 저해 능력이 칼륨 양이온에 비해 확연하고 크게 나타남을 확인 할 수 있었다.

사 사

이 논문은 2014년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

Literature Cited

- Shah, Y.R., and Sen, D.J., Bioalcohol as green energy - A review, International Journal of Recent Scientific Research, 1(2):57-62 (2011).
- Balat, M., Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review, Energy Conversion and Management, 52: 858-875 (2011).
- Shin, S.-J., Han, S.-H., Cho, N.-S. and Park, J.-M., Relationship between biomass components dissolution(xylan and lignin) and enzymatic saccharification of several ammonium hydroxide soaked biomass, Journal of Korea TAPPI 42(1):35-40 (2010).
- Alvira, P., Tomas-Pejo, E., Ballesteros, M. and Negro, M.J., Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review, Bioresource Technology 101: 4851-5861 (2010).
- Shin, S.-J., Park, J.-M., Cho, DH, Kim YH, and Cho, N.-S., Acid hydrolysis characteristics of yellow poplar for high concentration of monosaccharides production, Journal of Korean Wood Science and Technology 37:578-584 (2009).
- Huang, C., Zhu, D.H, Wu, H., Lou, W.-Y. and Zong, M.-H., Evaluating the influence of inhibitors present in lignocellulosic hydrolysates on the cell membrane integrity of oleaginous yeast *Trichosporon fermentans* by flow cystometry, Process Biochemistry 49:395-401 (2014).
- Cho, DH, Shin, S.-J., Bae, Y., Park, C., and Kim, YH., Enhanced ethanol production from deacetylated yellow poplar acid hydrolysate by *Pichia stipitis*, Bioresource Technology 101:4947-4951 (2010).
- Han, S.-H., Cho, DH., Kim, YH, and Shin, S.-J., Biobutanol production with 2-year old willow biomass by acid hydrolysis and ABE(acetone-butanol-ethanol) fermentation, Energy 61:13-17 (2013).
- Lee, H., Cho, DH, Kim YH, Shin, S.-J., Kim, SB, Han SO, Lee, J., Kim SW, and Park C., Tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* K35 to lignocellulose-derived inhibitory compounds, Biotechnology and Bioprocess Engineering 16:755-760 (2011).
- Casey, E., Sedlak, M., Ho, N., and Mosier, N., Effect of acetic acid and pH on the co-fermentation of glucose and xylose by a genetically engineered strain of *Saccharomyces cerevisiae*, FEMS Yeast Research 10:385-393 (2010).
- Dean, J.A., Handbook of Chemistry 14th edition, McGraw Hill, New York, pp.5.9-5.21 (1992).
- Wei, J.R., Dien, B., Bothast, R., Hendrickson, R., Mosier, N.S., and Ladisch, M.R., Removal of fermentation inhibitors formed during pretreatment of biomass by polymeric adsorbents, Industrial & Engineering Chemistry Research 41:6132-6138 (2002).
- Olz, R., Larsson, K., Adler, L., and Gustafsson, L., Energy flux and osmoregulation of *Saccharomyces cerevisiae* grown in chemostats under NaCl stress, Journal of Bacteriology 175:2205-2213 (1993).
- Conway, E.J., and Moore, P.T., A sodium-yeast and some of its properties, Biochemistry Journal 57:523-528 (1954).
- Blumwald, E., Aharon, G.S., and Apse, M.P., Sodium transport in plant cells, Biochimica et Biophysica Acta 1465:140-151 (2000).
- Hosono, K., Effect of salts stress on lipid composition and membrane fluidity of the salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii*, Journal of General Microbiology 138:91-96 (1992).
- Mavis, R.D., and Stellwagen, E., The role of cations in yeast phosphofructokinase catalyst, The Journal of Biological Chemistry 245:674-680 (1970).
- Muntz, J.A., The role of potassium and ammonium ions in alcoholic fermentation, The Journal of Biological Chemistry 171:653-665 (1947).
- Casey, E., Mosier, N., Adamec, J., Stockdale, Z., Ho, N., and Sedlak, M., Effect of salts on the co-fermenta-

tion of glucose and xylose by a genetically engineered strain of *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnology for Biofuels* 6:83-92 (2013).

20. Luisa Neves, M., Oliveira, R.P., and Luca, C.M.,

Metabolic flux response to salt-induced stress in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*, *Microbiology* 143:1133-1139 (1997).