

## 酵母의 糖類醱酵性檢索을 爲한 Gas chromatography 의 利用

曹士鴻・\*韓龍鳳

(東洋麥酒株式會社・\*梨花女大藥大)

### Gaschromatographische Überprüfung der Zuckerverwertungsfähigkeit der Hefe

CHO Sa Hong and Yong Bong HAN\*

(Oriental Brewery, \*College of Pharmacy, Ewha Woman's University)

#### ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die gaschromatographische Methode auf die Überprüfung der Gärungsprodukte und der Zuckerverwertungsfähigkeit der Hefe angewandt.

Trotz vereinzelt gravierender Unterschiede in der Bildung von Gärungsprodukten ist eine Identifizierung der einzelnen Hefearten im allgemeinen nicht möglich.

Die gaschromatographische Methode, die für die Überprüfung der Zuckerverwertungsfähigkeit der Hefe verwendet wurde, kann folgende Vorteile bringen:

- 1) geringen Zuckerverbrauch und keine Störungen durch Verunreinigungen der Zucker,
- 2) genau und sofort erkennbare, graphische Darstellungen,
- 3) quantitative Erfassung der Vergärungsreihenfolgen und Abbauintensitäten mehrerer Zucker.

#### 緒論

酵母를 分類함에 있어서 各種糖類에 對한 醱酵性 또는 同化性을 檢索한다는 것은 重要的 實驗中의 하나이다. 從來의 Einhorn Kolben 이나 Durham 管 또는 Smith 管 등을 使用하는 方法은 때때로 不確實한 境遇가 發生하였다. 그러므로 새로운 方法으로 微生物의 特性을 나타내려는 努力은 繼續되어 왔으며 近年에 와서는 bacteria 의 代謝生成物質(Henis et al., 1966) 또는 細胞의 組織成分에 對해서(Abel et al., 1963; Moss

and Lewiss, 1967; Oyama, 1963; Reiner, 1965; Yamakawa and Ueta, 1964) gas chromatography 를 利用하여 微生物의 特徵을 表示하려 하였다.

이 研究에서는 gas chromatography 를 利用하여 酵母의 醱酵生成物質에 依한 特性을 檢討하고 糖類의 醱酵性을 檢索하려 하였다

#### 材料 및 方法

使用된 酵母는 이미 學名이 밝혀진 菌株이었으나 麥汁寒天培地の petrischale 에서 다시 二次에 걸쳐 分離 培養하였다. 醱酵生

成物質에 對한 比較實驗에서 培地는 10.2%의 麥汁을 使用하였고 inoculum은 3%의 麥汁에 培養하였다.

揮發性인 醱酵生成物質의 分析은 gas chromatography를 使用하였는데 試料의 操作은 "Head Space technique"(Bassette et al., 1962; Kepner et al., 1963)을 적용하였다. 糖類의 醱酵性 檢索을 위한 培養液은 증류수 50 ml에 各種糖分 1g씩을 溶解시키고 이 용액 1 ml/씩을 시험관에 넣어 殺菌한 다음 酵母水 1 ml/씩을 加하였다. 여기에 酵母菌株를 接種하여 28°C에서 醱酵시켜 그 殘留糖分을 gas chromatography로 分析하였다. 試料의 操作은 Brobst & Lott(1966)의 方式에 依해서 培養液 0.5 ml/씩을 취해서 원심분리시키고 그 중 0.3 ml/를 lyophilizing tube에 넣고 凍結乾燥한 다음 pyridin 0.3 ml로 溶解시켰다. 여기에 hexamethyldisilazan 0.3 ml와 측매로서 trifluor acetic acid 0.03 ml를 加하여 잘 振盪하고 15分이 經過한 다음에 gas chromatograph에 注入하였다.

Gaschromatograph; Fraktometer, Perkin-Elmer F7,

Säule: 2 m rostfreies Stahlrohr,

(Innendurchmesser; 3 mm),

Stationäre Phase: Silikongumme SE 52

(1% auf Chromosorb G 80/100 Mesh),

Trärgas: He (66 ml/min),

Temperaturprogramm: 180—300°C

(10°C/Min),

Temperatur im Injektionsblock: 400°C,

Temperatur der Zuleitung zum Detektor: 395°C,

Detektor: Flammenionisationsdetektor.

### 結果 및 考察

酵母의 醱酵生成物質中에서 代表的인 揮發成分을 分析한 結果는 table 1에 表示하였다. 分析한 揮發成分은 ethanol, acetaldehyde, ethyl acetate, n-propanol, isobutanol, isoamyl acetate, n-butanol, active

amyl alcohol, iscamyl alcohol 등 이었다. table 1에서 Qa는 active amyl alcohol에 對한 isomyl alcohol의 비이며 各性分 밑에 表示한 숫자는 table 2에서 綜合하기 위한 것이다. (11)은 gas chromatography에 依한 total higher alcohol이고 (12)는 Komarowsky reaction에 依한 比色法으로 測定한 total higher alcohol이다. Table 1은 aerobic condition으로 28°C에서 麥汁을 醱酵시킨 後에 分析한 結果인데 ethanol을 보면 28°C에서 醱酵시켰을 경우에 *S. cerevisiae*의 final fermentation degree가 높은 것을 알수 있다.

Ethyl acetate는 一括性이 없고 n-propanol, isobutanol, active amyl alcohol & isoamyl alcohol에서도 *S. cerevisiae*의 경우에 더 많이 生成되었다. 그러나 NCYC 240과 같이 例外도 發見되었다. acetaldehyde는 空氣와 醱酵性糖分의 殘留量에 따라서 極히 不安定하였으며 stem 34에서 acetaldehyde, n-propanol, active amyl alcohol 등과 같이 그 含量이 거의 비슷한 경우가 許多하였다. 野生酵母의 麥汁最終醱酵度는 上面 또는 下面醱酵用酵母보다 낮으며 ethanol 0.7%以下를 生成한 酵母는 maltose의 醱酵性이 없는 菌株이었다. 表로 나타내지는 않았으나 aerobic condition으로 18°C에서 醱酵시킨 후 分析한 結果 ethanol의 含量이 28°C에서 醱酵시켰을 때와는 달라 *S. carlsbergensis*나 *cerevisiae*의 경우에 거의 동등 하였다. 이것은 *S. cerevisiae*의 optimal fermentation temperature range가 *S. carlsbergensis*에 比하여 높은 편이기 때문이라고 추측된다. aerobic condition으로 8°C에서 醱酵시켜 分析한 結果를 보면 *S. carlsbergensis*와 *S. cerevisiae*의 경우 ethanol의 含量은 거의 비슷하나 n-propanol, isobutanol, active & isoamyl alcohol의 含量에 있어서는 위 두種의 差異가 28°C와 18°C에서 醱酵시켜 分析한 結果에 比하여 현저히 減少되었다. 특히 ethyl acetate의 生成이 급격히 鈍化된 것

은 낮은 온도에서 세포조직에 필요한 acetyl-CoA의供給이 충분치 못하기 때문이 아닌가 생覺된다.

28°C, 18°C, 8°C에서 醱酵시켜 分析한 結果를 綜合해서 各揮發成分들을 그 含量이 높은 順으로 羅列하여 table 2에 表示하였다. table 2에서 보면 서로 다른 種別間的 差異는 어느程度 나타나진 하나 一括性이 없고 同種의 stem 間에도 큰 差異를 나타낼 뿐만아니라 그 培養條件에 따라서 크게 影響을 받았다. 또한 여러 成分들의 含量이 비슷한 경우가 많아서 醱酵生成物質에 依하여 種 또는 stem의 特性을 表示한다는 것은 어려운 문제라고 생각된다.

糖類의 醱酵性檢索에 있어서 元培養液中의 糖分에 對한 chromatogram은 Fig 1과 같다. 使用된 糖은 arabinose, xylose, mannose, galactose, glucose, saccharose, lactose, maltose, melibiose, raffinose, melezitose, maltotriose 등이며 internal standard로서 salicin을 선택하였다.

Fig 2는 *S. cerevisiae*를 接種한 後 6日 만에 分析한 graph인데  $\alpha$ ,  $\beta$ -mannose,  $\alpha$ ,  $\beta$ -galactose,  $\alpha$ ,  $\beta$ -glucose, saccharose,  $\alpha$ ,  $\beta$ -maltose, raffinose & maltotriose가 없어진 것을 알 수 있다. raffinose의 peak 15가 安全히 없어진 대신 melibiose의 peak 14가 增加한 것은 raffinose의 fructose部分만이 加水分解되어 醱酵한 것으로 그 殘留部分 即 melibiose만이 남기 때문이다. Fig 3은 melibiose도 醱酵시킬 수 있는 *S. carlsbergensis*의 糖分解 過程에서 分析한 結果이다. Fig 3에서 보면 glucose, saccharose, raffinose가 거의 同時에 變 먼저 分解되었다.

그러나 raffinose의 melibiose部分은 아직 分解되지 않았으므로 *S. cerevisiae*의 경우와 마찬가지로 일단 melibiose의 含量이 增加되었다. maltose는 아직 分解가 進行되지 않은 것으로 보아 glucose의 1-4結合보다 saccharose의 glucose와 fructose의

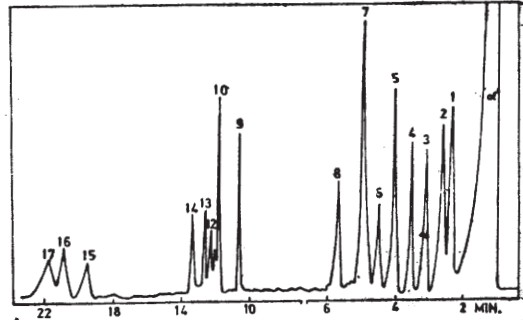


Abb. 1: Gaschromatogramm von Zuckerderivaten im Nährmedium. Peak 1;  $\alpha$ -Arabinose, 2;  $\beta$ -Arabinose, 3;  $\alpha$ -Xylose, 4;  $\beta$ -Xylose, 5;  $\alpha$ -Mannose, 6;  $\alpha$ -Galactose, 7;  $\alpha$ -Glucose +  $\beta$ -Mannose +  $\beta$ -Galactose, 8;  $\beta$ -Glucose, 9; Salicin, 10; Saccharose, +  $\alpha$ -Lactose, 11;  $\alpha$ -Maltose, 12;  $\beta$ -Maltose, 13;  $\beta$ -Lactose, 14; Melibiose, 15; Raffinose, 16; Melezitose, 17; Maltotriose.

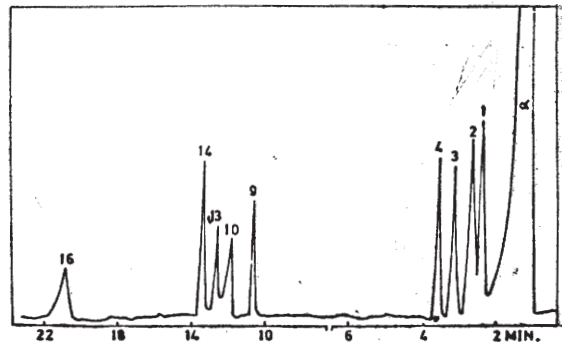


Abb. 2: Gaschromatogramm von Zuckerderivaten, 6 Tage nach dem Ansatz mit *S. cerevisiae* bei Zimmertemperatur. Peakidentität wie oben.

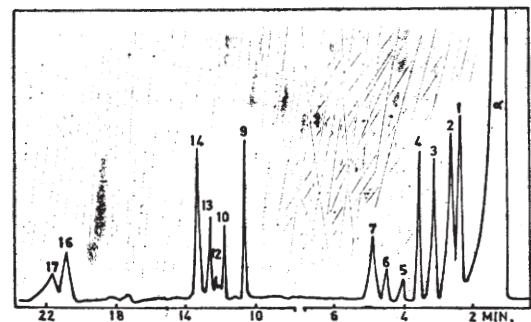


Abb. 3: Gaschromatogramm von Zuckerderivaten, 3 Tage nach dem Ansatz mit *S. carlsbergensis* (Untergärige Bierhefe, Stamm C). Peakidentität wie bei Abb. 1.

Tabelle 1. Flüchtige Bestandteile am Ende der

Hefe	Äthanol % G/V (1)	Acetald. mg/l (2)	Äthylacetat mg/l (3)	n-Propanol mg/l (4)	Isobutanol mg/l (5)
Untergärige Brau.-Hefe					
Bruchhefe 34	3.64	12.0	17.0	13.3	10.5
304	3.54	5.0	11.0	8.5	6.8
C	3.69	24.2	20.5	13.0	7.2
H	3.59	7.8	14.5	11.0	7.6
Staubhefe 66	3.53	10.2	10.3	12.8	9.5
K	3.63	7.5	11.0	8.0	6.5
Obergärige Brau./Hefe					
E	3.70	95.4	19.5	18.7	73.6
NCYC 240	3.70	20.6	16.3	10.3	14.3
NCYC 1,200	3.72	11.4	12.7	19.4	38.7
“Wilde” Hefen					
<i>S. cerevisiae</i> (Backhefe) By	2.97	11.0	13.0	14.0	24.2
<i>S. ellipsoideus</i>	3.07	23.0	14.2	15.2	21.6
<i>S. intermedius</i>	3.60	330.0	16.8	17.8	47.5
<i>S. pastorianus</i>	3.54	30.5	4.3	7.3	16.2
<i>S. turbidans</i>	3.52	88.2	19.1	33.0	31.0
<i>S. validus</i>	3.10	16.2	4.2	12.8	12.5
<i>S. lactis</i>	0.62	7.5	5.3	2.6	15.0
<i>S. exiguus</i>	0.61	5.5	0.7	4.0	2.9
<i>S. fragilis</i>	0.69	7.0	2.5	5.3	16.9
<i>Kl. apiculata</i>	0.49	12.6	25.2	1.7	4.0
<i>Rh. glutinis</i>	0.04	Spuren	Spuren	Spuren	0.7
<i>Cand. tropicalis</i>	2.57	25.0	4.8	11.4	52.3
<i>Cand. mycoderma</i>	0.37	2.2	138.0	1.2	8.5
<i>Pichia membranaefaciens</i>	0.18	Spuren	Spuren	Spuren	0.5
<i>Hansenula anomala</i>	0.51	5.3	172.3	4.2	7.0

## Würzeverwertung bei 28°C unter aeroben Bedingungen

Isoamylacet. mg/l (6)	n-Butanol mg/l (7)	akt. Amylalk. mg/l (8)	Isoamylalk. mg/l (9)	Qa (10)	Sum. der höh. Alk. mg/l (11)	höh. Alk. n. Farb-Reak. mg/l (12)
1.6	1.1	13.8	51.2	3.71	89.9	79.2
0.6	0.9	12.8	31.2	2.43	60.2	50.3
0.5	1.5	10.5	41.8	3.98	74.0	55.0
1.5	0.3	11.7	46.3	3.96	76.9	63.2
0.8	0.9	13.8	47.4	3.44	84.4	69.2
1.0	1.0	11.3	40.0	3.53	66.8	57.9
0.7	1.3	25.7	57.7	2.24	177.0	173.3
2.3	1.1	10.9	39.3	3.60	75.9	68.8
1.2	1.3	21.8	63.9	2.94	145.1	135.1
1.4	0.9	21.1	46.9	2.22	107.1	85.4
0.4	0.6	13.7	44.6	3.26	95.7	88.3
0.3	0.6	29.8	39.4	1.32	135.1	132.1
0.1	0.4	14.4	36.6	2.53	74.9	69.8
0.2	0.6	16.4	50.8	3.10	131.8	110.4
0.3	0.2	11.0	33.2	3.02	69.7	58.6
Spuren	0.2	13.4	36.6	2.72	67.8	68.3
"	0.1	1.5	7.7	5.20	16.2	11.2
0.1	0.1	5.2	17.3	3.32	44.8	45.6
Spuren	Spuren	4.4	3.8	0.86	13.9	13.0
"	"	0.7	1.3	1.85	2.7	3.0
"	"	20.8	35.4	1.70	119.9	110.9
0.1	"	7.3	17.9	2.45	34.9	35.5
Spuren	"	0.3	0.7	2.33	1.5	1.7
0.4	0.1	5.0	11.2	2.24	27.5	29.3

Tabelle 3 Fähigkeit der

Stamm		Arabinose	Xylose	Mannose	Galactose	Glucose
Saccharomyces	F.	—	—	+	+	+
carlsbergensis	A.	—	—	+	+	+
Saccharomyces	F.	—	—	+	+	+
cerevisiae	A.	—	—	+	+	+
Saccharomyces	F.	—	—	+	+	+
ellipsoideus	A.	—	—	+	+	+
Saccharomyces	F.	—	—	+	+	+
intermedius	A.	—	—	+	+	+
Saccharomyces	F.	—	—	+	+	+
pastorianus II	A.	—	—	+	+	+
Saccharomyces	F.	—	—	+	+	+
turbidans	A.	—	—	+	+	+
Saccharomyces	F.	—	—	+	+	+
validus	A.	—	—	+	+	+
Saccharomyces	F.	—	+	+	+	+
lactis	A.	—	+	+	+	+
Saccharomyces	F.	—	—	+	+	+
exiguus	A.	—	—	+	+	+
Saccharomyces	F.	—	—	+	+	+
fragilis	A.	—	—	+	+	+
Kloeckera	F.	—	—	—	—	+
apiculata	A.	—	—	—	—	+
Rhodotorula	F.	—	—	—	—	—
glutinis	A.	—	—	+	—	+
Candida	F.	—	—	+	+	+
tropicalis	A.	—	+	+	+	+
Candida	F.	—	—	—	—	+
mycoderma	A.	—	—	+	—	—
Pichia membrana-	F.	—	—	—	—	—
naefaciens	A.	—	+	+	—	+
Hansenula	F.	—	—	+	+	+
anomala	A.	—	+	+	+	+

## Zuckerverwertung von Hefen

Salicin	Saccharose	Lactose	Maltose	Melibiose	Raffinose	Melezitose	Maltotriose
-	+	-	+	+	+	-	+
-	+	-	+	+	+	-	+
-	+	-	+	-	1/3	-	+
-	+	-	+	-	-	-(E)	+
-	+	-	+	-	1/3	-	-
-	+	-	+	-	-	-	-
-	+	-	+	-	1/3	-	+
-	+	-	+	-	-	-	+
-	+	-	+	-	1/3	-	+
-	+	-	+	-	-	-	+
-	+	-	+	-	1/3	-	+
-	+	-	+	-	-	-	+
-	+	-	+	-	1/3	-	-
-	+	-	+	-	-	-	-
-	+	+	+	-	1/3	-	-
-	+	+	+	-	-	-	-
-	+	-	-	-	1/3	-	-
-	+	-	-	-	-	-	-
-	+	-	-	-	1/3	-	-
-	+	+	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-
-	+	-	-	-	-	-	-
-	+	-	+	-	-	-	-
-	+	-	+	-	-	-	+
-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-
-	+	-	+	-	1/3	-	-
+	+	-	+	-	-	-	+

F.: Fermentation, A.: Assimilation



**Tabelle 2.** Die mengenmäßige Größenreihenfolge der flüchtigen Gärungsprodukte der Hefe

Hefe		Gärtemperatur		
		8°C	18°C	28°C
Untergär. Brau.-Hefe				
Bruchhefe	34	198543267	192385467	193842567
	304	195842376	198453267	198345276
	C	129853476	192345867	192348576
	H	198543267	192853467	193842567
Staubhefe	66	198452367	192845367	198432576
	K	198245376	198235467	198342567
Obergär. Brau.-Hefe				
	E	125984376	125983467	125983476
NCYC	240	198452367	193854367	192358467
NCYC	1200	195824367	195843267	195843276
"Wilde" Hefen				
S. cerevisiae (Backhefe) By		198245376	192584367	198245376
S. ellipsoideus		192458376	192548376	192543876
S. intermedius		129584376	129583467	125984376
S. pastorianus II		129584376	195824376	192584376
S. turbidans		192583476	194235867	129453876
S. validus		192485367	129485367	192458367
S. lactis		192854367	192853476	195823476
S. exiguus		192485367	129458376	192458376
S. fragilis		159824376	159248376	195248367
Kl. apiculata		129385467	13298546	13298546
Rh. glutinis		195823	195823	195823
Cand. tropicalis		129584367	159284367	159284367
Cand. mycoderma		13958246	139852467	139582467
Pichia membranaefaciens		129583	195283	195823
Hansenula anomala		13295846	13925846	139528467

— : Nur in Spuren auftretend



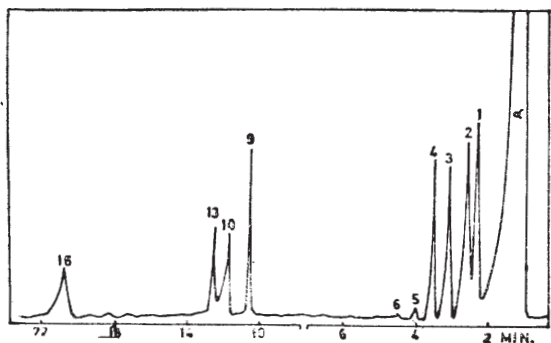


Abb. 4: Gaschromatogramm von Zuckerderivaten, 6 Tage nach dem Ansatz mit *S. carlsbergensis* (Untergärige Bierhefe, Stamm C). Peakidentität wie bei Abb. 1.

結合이 쉽게加水分解되는 것으로 믿어진 다 그 다음에 mannose가 분해되며 이어서 galactose가 醱酵되는것 같다. 이와같이 糖類의 醱酵性檢索에 gas chromatography를 利用하므로서 多糖類의 分解過程을 觀察할 수 있을 뿐만 아니라 諸糖分의 分解되는 順位와 速度를 알아 볼 수있으므로 酵母의 糖代謝에 關한 研究에 도움이 될 가능성이 있다 Fig 4는 역시 *S. carlsbergensis*의 培養液을 6日 後에 分析한 것이다. Fig 4에서는 maltose, melibiose, maltotriose 등도 모두 分解되었다.

이와같이 酵母에 依해서 分解되어 없어진 糖分에 對해서는 “+”로 表示하였고 分解되지 않은 糖을 “-”로 表示하였다. ethanol이 生成될 경우에 醱酵性을 가진 것으로 보

며 Kluyver(Lodder & Kreger-Van Rij 1967)의 理論에 依해서 醱酵性을 가진 糖分에 對해서는 同化性을 認定하고 不確實한 境遇에 한하여 個別的으로 糖의 醱酵實驗을 行하였다.

16 種의 釀造用 또는 野生酵母에 對해서 위와 같이 分析한 結果를 綜合하여 table 3에 表示하였다. Kluyver의 理論에 例外는 發見하지 못하였으나 酵母가 어떤 糖分에 對해서 醱酵性은 없고 同化性만을 가질 수 있다는 點은 疑問이 간다. table 3에 있어 서도 ethanol의 生成이 극히 微弱한 경우에는 醱酵性을 “-”로 表示하였으나 嚴密한 意味에서 ethanol이 全然 生成되지 않는 경우는 이 實驗中에서 發見하지 못하였다. 비록 氣泡를 形成할 만큼 醱酵性이 強하지 못할지라도 同化性만을 가졌다고 믿어왔던 *Pichia*의 경우에도 약간의 ethanol은 生成되었다. 醱酵性檢索에 使用된 酵母中에서 *S. cerevisiae*에 속하는 stem E 만이 melezitose의 同化性을 나타냈으며 salicin을 同化시킬 수 있는 것은 *Hansenula anomala* 뿐이었다.

gas chromatography를 利用하여 糖類의 醱酵性을 檢索하므로서 糖類에 들어있는 不純物의 障礙를 받지 않으며 明瞭한 graph로 表示할 수 있으므로 結果는 더욱 確實하였다.

## 摘 要

酵母의 醱酵生成物質과 糖類의 醱酵性檢索을 위하여 gas chromatography를 利用하였다. 醱酵產物의 生成은 境遇에 따라서 상당한 差異를 나타냈으나 醱酵生成物質에 依해서 一般的으로 各種의 酵母를 同定한다는 것은 不可能하였다.

糖類醱酵性檢索을 위하여 gas chromatography를 使用하므로서 다음과 같은 利點을 發見하였다.

- 1) 少量의 糖類가 所要되며 不純物의 障礙를 받지 않고
- 2) 明確하고 쉽게 알아 볼 수 있는 圖表로 表示할 수 있을 뿐만 아니라
- 3) 同時에 諸糖分의 分解되는 順位와 速度를 把握할 수 있다.

## REFERENCES

1. Abel, K., H. Deschmertz, and J.I. Peterson, 1963. Classification of microorganisms by analysis of chemical composition. I. Feasibility of utilizing gas chromatography. *J. Bacteriol.*, **85**, 1039—1044.
2. Bassette, R., S. Özeris, and C.H. Whitnah, 1962. Gas chromatographic analysis of head space gas of dilute aqueous solutions. *Anal. Chem.*, **34**, 1540—1543.
3. Brobst, K.M., and C.E. Lott, 1966. Analysis of carbohydrate mixtures by gas-liquid chromatography. *Amer. Soc. Brew. Chem. Proc* **1966**, 71—75.
4. Henis, Y., J.R. Gould, and M. Alexander, 1966. Detection and identification of bacteria by gas chromatography. *Appl. Microbiol.*, **14**, 513—524.
5. Kepner, R.E., J. Strating, and C. Weurman, 1963. Quantitative determination of esters in beer by gas chromatographic analysis of head space vapours. *J. Inst Brew.*, **69**, 399—405.
6. Lodder, J., and N.J.W. Kreger-Van Rij, 1967. The Yeasts, a taxonomic study. North-Holland Publishing Comp., Amsterdam, 1967.
7. Moss, C.W., and V.J. Lewis, 1967. Characterization of Clostridia by gas chromatography. I. Differentiation of species by cellular fatty acids. *Appl. Microbiol.* **15**, 390—397.
8. Oyama, V.I., 1963. Use of gas chromatography for the detection of life on mars. *Nature*, **200**, 1058—1059.
9. Reiner, E., 1965. Identification of bacterial strains by Pyrolysis-gas-liquid chromatography. *Nature*, **206**, 1272—1274.
10. Yamakawa, T., and N. Ueta, 1964. Gas chromatographic studies of microbial components. I. Carbohydrate and fatty acid constitution of Neisseria. *Japan. J. Exptl. Med.*, **34**, 361—374.