

발효에 의해 생성되는 물질은 무엇인가?

1. 서론

생물은 살아가는데 필요한 에너지를 호흡을 통해 얻어야한다. 대부분의 세포활동을 위한 에너지원은 화학에너지인 ATP이다. 이 ATP를 가수분해하는 과정에서 발생하는 에너지는 생명활동에 필요한 다양한 대사활동을 일으키는데 이용된다.

ATP는 어디에서 얻어지는가? ATP는 음식물에서 직접 얻을 수 없으므로, 세포 내부에서의 생화학반응을 통해서 음식물의 결합에너지로부터 변환시켜야한다. 이와 같은 세포 내의 생화학 반응은 포도당을 기본 물질로 해당과정과 세포호흡 과정을 통해 ATP로 전환하는 과정이다. 해당과정은 산소를 이용하지 않는 무산소 과정이지만, 세포호흡은 산소를 이용하는 반응이다. 본 실험에서는 효모를 이용한 알코올 발효현상을 관찰하기로 한다.

2. 학습목표

- (1) 미생물에 의한 다양한 발효의 유형을 이해할 수 있다.
- (2) 미생물의 생리적 특성에 따른 발효현상을 이용하여 미생물을 동정할 수 있다.

3. 준비물

Autoclave, clean bench, shaker, 교반기, 배양기, 미생물 균주, 균주에 적합한 배지

4. 탐구활동

실험 I. 기체 발생 및 알코올생성

(1) 실험 준비

- ① 기 구 : 온도계 1개, 온도조절이 가능한 수조(water bath) 또는 항온기 1대, 피펫 6개, 피펫용 고무마개, 유성펜(또는 wax pencil), stop watch 또는 초침이 있는 시계, 눈금이 있는 실린더, 250ml 삼각플라스크, 20ml 시험관 6개, 250ml 삼각플라스크 6개, 집게 6개, 현미경, 슬라이드 글라스, 커버 슬립, 큰 시험관, Durham관
- ② 재 료 : 활발하게 성장하고 있는 효모를 넣은 탄수화물(포도당, 젓당, 설탕, 녹말) 5% 용액, 포도 주스, 활발히 성장 중인 효모배양액, 1N 가성소다용액, Phenol red 지시약, 솜마개

(2) 실험 과정

[탐구1] 알코올발효에서 효모의 필요성 관찰

- ① 먼저 수조내의 물의 온도가 37℃ 정도 되게 맞춘 후, 250ml 삼각플라스크 6개에 37℃ 정도의 물을 수조에 채우고 수조에 담근다.
- ② 6개의 시험관(20ml)에 유성펜으로 “포도당”, “젓당”, “설탕”, “전분”, 그리고 “대조구”(2개)라 표시한다.
- ③ 먼저 4개의 시험관에 성장하고 있는 효모가 들어있는 탄수화물 용액들을 각 10ml씩 채우고, 5번째 시험관에는 포도당용액 10ml, 6번째 시험관에는 열처리하여 죽은 효모가 들어있는 포도당용액 10ml를 채운다. 모든 시험관은 더운물이 들어있는 삼각플라스크에 꽂아 둔다.
- ④ 1ml 피펫에 연결된 10cm 정도의 튜브 끝에 고무 밸브를 끼우고 피펫을 효모가 들어있는 탄수화물용액에 담근 다음, 정확히 1ml 용액을 빨아올린 후 용액이 흘러내리지 않게 집게로 고무 튜브를 처리한다.(그림 1)
- ⑤ 각 피펫의 처음 위치 부분을 표시한 후 20분 동안 2분 간격으로 피펫 내부에서 용액의 위치를 표시하여 시간의 변화에 따른 각 피펫내부에서 용액의 이동량(감소량)을 기록한다.
- ⑥ 시험관 별 용액의 이동량과 시간과의 관계를 그래프로 그린다.
- ⑦ 차이가 나는 원인을 분석한다.

[탐구2] 알코올발효 과정에서 탄산가스 발생 관찰

- ① 이전의 실험에 사용한 시험관들을 세척하지 말고 37℃에서 40분 정도 더 방치한 다음 각 시험관에 phenal red 용액을 몇 방울씩 떨어뜨려 색깔의 변화를 관찰한다.(phenol red는 pH 지시약으로 중성이나 염기성용액에서는 분홍색 또는 붉은색을 나타낸다).
- ② 실험시간 24시간 전에 0.5% 포도당 용액에 효모를 접종한 시험관과 포도당용액만 들어있는 시험관(대조구)에 듀람(Durham)시험관을 넣은 후 솜마개를 하여 37℃에 보관하며 기체의 발생 유무를 조사한다.(그림 2)

[탐구3] 효모에 의한 알코올 생산

- ① 250ml 삼각플라스크에 약 100ml의 포도주스를 넣은 후, 이전의 실험에서 사용하였던 효모용액을 약 5ml 첨가한다.
- ② 플라스크의 입구를 솜으로 막은 후 37℃ 항온기에서 1주일 동안 보관한다. 보관하는 도중 하루에 한번 정도 거품발생유무와 냄새의 변화를 관찰한다(포도주 냄새가 나더라도 마시지 않는다).

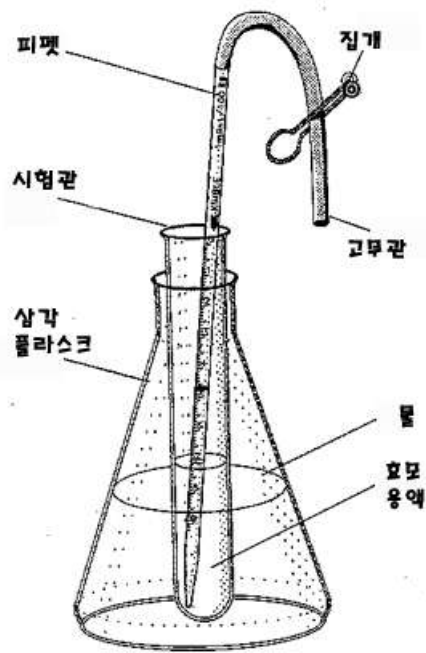


그림 1. 발효 측정 장치

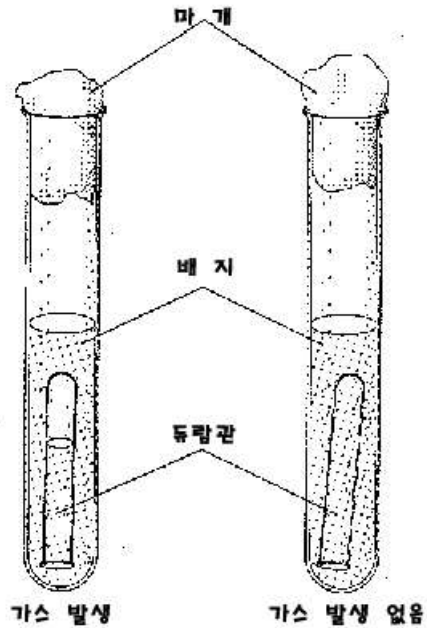


그림 2. 가스발생 확인 장치

(3) 결과 및 분석

① 알코올발효에서 효모의 필요성 관찰

각 시험관에서 생성된 가스의 양(ml)을 2분마다 측정하고 대조구와 비교한 변화비율을 분석한다.

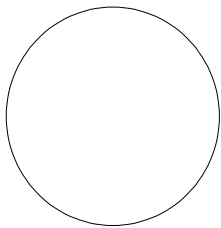
경과 시간 (분)	기준 변화량		포도당		젖당		설탕		녹말	
	대조구 1	대조구 2	변화량	차이량	변화량	차이량	변화량	차이량	변화량	차이량
2										
4										
6										
8										
10										
12										
14										
16										
18										
20										

② 가스 발생 정도

시 료	용액의 색깔	수소이온농도 (산, 알카리)	Durham관 가스 포집
대조구 1			
포도당			
젖당			
설탕			
녹말			
대조구 2			

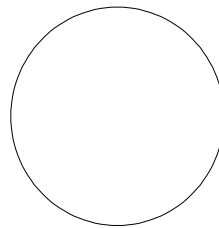
③ 효모에 의한 알코올 생산

일주일간 발효과정에서 관찰한 포도 주스에서의 변화를 기록하고 첫날과 7일째에 현미경으로 관찰한 상을 그리시오.



배율 :

1일차



배율 :

7일차

(4) 토 의

① 어떤 탄수화물 용액에서 발효가 가장 잘 일어나는가?

② 탄수화물마다 발효 정도가 다른 이유는?

③ 가성소다용액을 넣은 후에 어떤 변화가 나타나는지 관찰하고, 발효에 의해 산 성도가 변한 이유를 설명해보자.

④ 성장 중에 있는 효모의 특징에 대해 설명하시오.

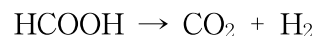
실험 II. 산을 생성하는 발효(Methyl red test)

(1) 실험 목적

Durham관 시험은 발효산물의 산성도와 가스의 발생 유무를 알 수는 있으나, 성분을 확인할 수는 없다. 이 실험의 목적은, 주로 포도당이 대부분인 MRVP broth 배지를 이용함으로써 포도당을 발효하는 세균들이 유기산을 많이 생성하는가 혹은 2,3-butanediol을 많이 형성하는가를 측정하는데 있다.

(2) 실험의 원리

일반적으로 그람 음성 장내세균은 MRVP 배지에서 포도당을 분해했을 때 세균의 종류에 따라 최종산물이 다르게 나타난다. *Escherichia*, *Salmonella*, *Proteus*, *Aeromonas*와 같은 속들은 포도당을 발효할 경우 많은 양의 Lactic, Acetic, Succinic, Formic acid 와 더불어 이산화탄소, 수소, 에탄올을 형성한다. 이들이 축적되면 산성도가 pH 5이하로 낮아진다. 이 상태의 배지에 Methyl red를 첨가하면 붉은색으로 변하므로 산을 생성하는 발효임을 확인할 수 있다. 또한 이들 미생물들은 Formic acid를 이산화탄소와 수소로 분해하는 Formic hydrogenase를 분비하므로 많은 양의 가스를 생산하는 특징을 보인다.



Methyl red test에서 양성반응은 밝은 빨강색, 음성반응은 노랑이나 오렌지색으로 나타난다. 약한 양성 반응으로 붉은 오렌지색이 검출되기도 한다. *bacillus*속 세균의 검정 시에는 MRVP 배지 조성 가운데 K_2HPO_4 대신 NaCl을 넣은 배지를 사용한다.

(3) 실험 준비

① 기구 및 시약 : 항온 배양기, 시험관, Methyl red

② 재료 ㉠ 균주 : *E. coli* (양성균), *Enterobacter aerogenes*(음성균)

㉡ 배지 : MRVP broth(Methyl red-Voges-Proskauer) 배지(Polypeptone 또는 Buffered, peptone 7g, K_2HPO_4 5g, Glucose 5g, 증류수를 넣어 최종 부피를 1ℓ로 만듦. 최종 pH6.9)

(4) 실험 과정

- ① MRVP broth 배지에 두 종류의 세균을 접종하고 30℃에서 5일간 또는 37℃에서 2일간 배양한다.
- ② 각 배양액 10ml씩을 두 개의 시험관에 담은 후 Methyl red 용액을 5~6방울 가한다. (배양액 한 방울과 Methyl red 한 방울을 섞는다.)
- ③ 두 시험관의 pH, 색변화, 가스의 생산 유무를 관찰하여 기록한다.

(5) 결과 및 분석

시 료	용액의 색깔	수소이온농도 (산, 알카리)	Durham관 가스 포집
<i>E. coli</i>			
<i>Enterobacter aerogenes</i>			

(6) 토 의

- ① 두 시험관의 색변화를 분석해보자. 어느 균의 시험관이 적색으로 분명하게 변하는가?
- ② Methyl red를 첨가할 때 붉게 변하는 것을 통해 어떤 사실을 알 수 있는가?
- ③ 본 실험의 결과와 오래된 술이 신맛을 갖는 것과 어떤 관계가 있는가?

실험 III. Catalase 생성 발효

(1) 실험 목적

산소를 사용하는 대부분의 호기성 또는 통성 혐기성 균들은 자신의 효소계에 저해한 과산화수소(H₂O₂)를 생산한다. 그러나 이러한 환경에서도 그들 자신의 생존이 가능한 것은 이들이 Hydrogen peroxide를 물과 산소로 전환하는 Catalase를 생산하기 때문이다. Catalase 생산력이 없거나 있다는 사실은 세균의 그룹에 있어서 매우 중요한 차별점이 된다. 이 실험에서는 이러한 Catalase 생성능을 갖고 있는지의 여부를 검사하는 데 그 목적이 있다.

(2) 실험의 원리

H_2O_2 는 산소호흡에 의해 당이 분해될 때 생성되는 산화물로, 환원형의 Flavoprotein이 산소와 반응하여 생성되는 유독성 산물이다. 이와 같은 맹독성 H_2O_2 를 물과 산소로 분해할 수 있는 Catalase는 Heme을 Prosthetic group으로 가지고 있는 효소로서 Cytochrome을 갖는 호기성 또는 대부분의 조건적 혐기성 세균에 존재한다. 때문에 Catalase에 의해 H_2O_2 가 물과 산소로 전환되므로 이때 산소 방출 즉 기포발생을 관찰할 수 있게 된다.

(3) 실험 준비

[기구·시약] : 시험관, 백금이, 3% 과산화수소액.

[재료] (1) 균주 : *Staphylococcus epidermis*(양성균), *Streptococcus*(음성균)

(2) 배지 : NA 배지 또는 Soybean-casein digest agar(Tryptic soy agar라고도 함) 배지 (Pancreatic digest of casein 15g, Pancreatic digest of soybean meal 5g, NaCl 5g, 증류수를 넣어 총 부피를 1L로 만든다. 최종 pH 7.3).

(4) 실험 과정

[방법 1]

- ① 두 종의 세균을 준비된 배지(사면, 평판, 액체)에 각각 접종한다.
- ② 37°C의 인큐베이터에서 12-16시간 동안 배양한다.
- ③ 사면배양체의 표면에 3% 과산화수소 1ml를 가한다. 평판배지나 반고체배지에 배양한 경우에는 과산화수소 몇 방울을 균체 위에 가하여 관찰하고, 액체 배양체는 배양액 0.5ml와 과산화수소 0.5ml를 가한 후 관찰한다.
- ④ 과산화수소를 가한 즉시·5분 후·10분 후에 기포가 발생되는지 조사한다.

[방법 2]

배양한 균체의 일부만을 이용하고 남은 부분을 보존하고자할 때는 다음과 같은 방법을 쓴다.

- ① 두 개의 슬라이드를 준비하여 윗면에 과산화수소를 한 방울씩 떨어뜨린다.
- ② 검정할 세균의 콜로니를 비금속성 기구로 채취하여 슬라이드 위의 과산화수소에 혼합한다. 잘 안보이면, 현미경을 이용하여 저배율로 기포발생을 조사한다.
- ③ 혼합 즉시·5분 후·10분 후에 기포발생을 조사한다.

[방법 3]

Heme이 든 배지에서 자랄 때만 Catalase를 형성하는 세균을 검정하기 위한 방법

- ① Pseudocatalase의 형성을 막기 위해 1% 포도당을 가하여 멸균한 Blood agar base (Soy bean-casein digest)에 Defibrinated blood와 멸균 증류수를 동량 섞은 혼합액을 5%로 만든다.
- ② 이 배지를 100°C에서 15분 끓여 Blood 자체의 Catalase를 불활성화시킨 다음 45~50°C로 식혀 멸균된 페트리 접시에 붓는다.
- ③ 배지를 응고 건조시킨 후 접종하고 배양하여 3% 과산화수소를 직접 콜로니에 처리하거나, [방법2]와 같이 확인한다.

(5) 결과 및 분석

세균에 따른 기체 발생 측정 결과 (+ :발생, - : 미발생)

경 과 시 간 세 균	즉 시	5분	10분
<i>Staphylococcus epidermis</i>			
<i>Streptococcus</i>			

실험 결과를 판정함에 있어 과산화수소를 가한 즉시 기포가 발생하면 강한 양성반응, 5분 후에 발생하면 약한 양성반응, 10분 후에 발생하거나 발생하지 않으면 음성반응으로 판정한다.

[주 의 사 항]

- ① 혈액을 포함하는 배지는 혈액 자체의 Catalase 활성을 나타내어 결과를 분명하게 확인하기 어려울 수도 있으므로 사용 전에 처리과정을 준수해야 한다.
- ② Lactic acid를 생성하는 세균들은 포도당이 없거나 함량이 1% 미만인 배지에서는 Nonheme pseudocatalase를 만드는 것에 유의해야 한다. 배지에 1%의 포도당을 가하면 pseudocatalase 형성이 억제된다. 혐기성세균을 확인할 때는 배양체를 약 30분 정도 공기에 접촉시킨 후, 과산화수소를 가한다.

5. 참고자료

(1) 유기물을 에너지원으로 이용하여 성장하는 생물들은 유산소 호흡·무산소 호흡·발효의 3가지 서로 다른 대사방법을 통하여 생명활동에 필요한 에너지를 만들고 있다. 유산소 호흡은 유기물로부터 에너지를 만드는 과정에서 전자전달계를 거친 최종 전자의 수용체로서 산소를 이용한다. 무산소 호흡은 산소가 없는 환경에서 세포의 외부로부터 공급된 탄산가스, 황산염이온, 유황, 질산염이온, 푸마르산 등의 산화된 무기물 또는 유기물을 전자전달계에서 방출되는 전자의 수용체로 이용한다. 이들 두 과정을 통해 ATP가 만들어지는 것을 인산화라 한다.

(2) 발효는 전자전달계에서 방출된 전자의 수용체로서 산소 또는 기타의 성분을 요구하지 않는다. 발효과정은 에너지원으로 이용하는 유기물질 자체가 효소에 의해 산화, 환원되면서 에너지를 방출하는 대사방법이다. 이와 같은 과정을 통해 ATP가 만들어지는 것을 기질수준의 인산화라고 한다. 진핵세포생물의 경우에는 무산소 호흡 현상은 찾아볼 수 없고, 유산소 호흡은 미토콘드리아에서 이루어지고, 발효는 세포질에서 일어난다. 비록 유산소 호흡을 하는 동물일지라도 격렬한 운동을 할 때에는, 근육세포에서 유산소 호흡뿐만 아니라 젖산을 생산·분비하는 젖산발효를 병행하기도 한다. 세포 소기관이 없는 원핵세포 생물의 경우에는 유산소 호흡, 무산소 호흡, 발효가 모두 세포질에서 진행된다.

생물에 의한 발효현상을 관찰하는 데에는 알코올발효과정을 통하여 탄수화물로부터 에탄올과 탄산가스를 생산하여 세포 밖으로 내버리는 효모를 이용하는 방법을 보편적으로 이용하고 있다. 특히 포도주스는 탄수화물과 아미노산을 많이 함유하고 있으며 삼투압도 낮기 때문에 효모의 성장을 위한 좋은 배지 및 알코올성 음료의 생산에 대한 간단한 실험 재료로 사용할 수 있다.

6. 참고문헌 및 관련인터넷주소

- (1) 발효공학. 하덕모. 신광출판사. 1998.
- (2) 발효공학. 김공식. 한빛지적소유센터. 1998.
- (3) 진단 미생물학 실습. 김신무 외. 고려의학. 1998.
- (4) 미생물학 실험서. 한국미생물학회. 을유문화사. 1998.
- (5) 생물학실험. 한국생물과학협회. 아카데미서적. 1995.