

석유탄화수소를 이용한 단세포단백질의 생산에 관한연구

II. *Candida tropicalis* KIST 359 에 대하여

한국과학기술연구소 식량자원연구실

박, 응 · 민태익 · 변유량 · 권태완

(1970년 9월 10일 受理)

Production of Single-Cell Protein on Petroleum Hydrocarbon

II. On the Growth of *Candida tropicalis* KIST 359

by

Yoong Park, Tae-Ick Mheen, Yoo-Ryang Pyun and Tai-Wan Kwon

Food Resources Lab., Korea Institute of Science and Technology

Seoul, Korea

(Received Sept. 10, 1970)

Abstract

The growth characteristics of *Candida tropicalis* KIST 359, isolated from soil samples collected at an oil depot in Korea, have been studied by cultivating batches under varying conditions. The conclusions of the study were:

1. The yeast easily assimilates hydrocarbons in a range of C₁₄-C₁₇, and the optimum cultivation temperature and pH are 30°C and 5.5, respectively.

2. Using this strain of micro-organism, gas oil gives a higher cell yield than kerosine and with gas oil except urea all other nitrogen sources (NH₄NO₃, NH₄Cl, (NH₄)₂SO₄ and (NH₄)₂HPO₄) similarly support a satisfactory growth of the yeast.

3. The highest yield is obtained with a gas oil level of 10%(v/v), and concentrations of nitrogen source and MgSO₄·7H₂O of 0.5 and 0.05%(w/v), respectively.

4. The protein content of dried yeast cells is 59.8%. Its amino acid composition can be compared well with that of FAO provisional patterns, but with a low methionine and a high lysine content.

서 언

석유탄화수소를 자화하는 미생물을 대량 배양함으로써 새로운 단백질 자원으로 삼고자 하는 노력이 여러

나라에서 활발히 진행되고 있는 이때⁽¹⁻⁴⁾ 본 연구소에 서도 이와 같은 새 단백질원의 국내개발을 위하여 이미 그 연구에 착수한 바 있다. 여기서는 절보⁽⁵⁾에서 밝힌 바 있는 우수균주 중의 하나인 *Candida tropicalis* KIST

359 에 대하여 생육조건 및 화학성분 등을 좀더 상세히 살폈으므로, 그 결과를 보고한다.

실 험

사용균주

군부대의 유훈침적 토양으로부터 분리한 *Candida tropicalis* KIST 359⁽⁵⁾를 사용하였다.

배 지

사용 배지는 별도 언급이 없는 한 1l 당(NH₄)₂SO₄, 1.5g; NH₄NO₃, 1.5g; NH₄Cl, 1.5g; (NH₂)₂CO, 1.5g; KH₂PO₄, 2.5g; Na₂HPO₄, 2.5g; MgSO₄·7H₂O, 0.2g; CaCl₂·2H₂O, 0.01g; CuSO₄·5H₂O, 0.01mg; FeSO₄·7H₂O, 5mg; MnSO₄·4H₂O, 2mg; ZnSO₄·7H₂O, 0.1mg; yeast extract 100mg 을 함유하고 있으며 pH는 6.0 이다. 이때 사용한 탄화수소는 주로 시판경유와 등유이며, 일부 실험에는 정제 n-alkane(K & K Laboratory Inc.)을 사용하였다. 사용량은 각각 다르며 그때 그때 적절히 명시하였다.

접 종

Nutrient agar 배지를 이용하여 30°C에서 48~72 시간 동안 사면 배양한 효모균주를 500 ml 삼각플라스크의 탄화수소배지 100 ml에 접종하여 30°C에서 진탕배양 하였다. 2 일간 이와 같이 전배양한 배양액을 사용하여 플라스크 배양에는 시험배지 1ml 당 균수가 약 1×10⁵ ~5×10⁶ 정도되도록 접종하였으며, 발효조배양에는 1ml 당 약 2×10⁷ 되도록 접종하였다.

배양방법

진탕배양은 500ml 삼각플라스크에 석유탄화수소배지 100ml 를 주입 살균한 후 상술한 바와 같이 접종하여 30°C에서 3~4 일간 배양하였다(108 strokes/min.). 배지에 첨가한 경유는 5%(v/v), n-paraffin 은 1%(v/v) 이다. 한편 본 실험에서 사용한 실험실발효조의 용량은 2.5l 이며, 여기에 배지 1l 를 주입, 살균한 후 살균하지 않은 경유 또는 등유를 5~20%(v/v)농도로 가하였다. 통기속도는 3l/min, 교반속도는 1,000rpm, 온도는 30°C 로 유지하면서 약 40시간 배양하였다. 별도의 언급이 없는 한 pH는 1N-NaOH 를 첨가함으로써 6.0±0.2 로 조절하였다.

균체증식도 측정

균체의 농도는 비탁법으로 측정하였다⁽⁶⁾. 즉 배양액 10ml 를 15ml 원심분리관에 일정시간 간격으로 2 개씩 채취하여 3,000rpm 에서 15 분간 원심분리한 다음, 상층의 cream 층과 하층의 수용액을 모세관으로 주의하여 흡입함으로써 분리하였다. 효모 cream 층에는 약 40°C

의 acetone-peroleum ether(3:1) 혼합용매를 5 배량 가 하고 수분간 잘 교반한 후 원심분리하여 균체를 침전시켰다. 연후에 상층의 용매는 제거하고, 침전된 균체는 재차 혼합용매·50% ethanol 및 증류수의 순으로 세척 하였다. 세척한 균체는 10 배량의 증류수에 현탁시킨후 570mμ 에서 흡광도를 측정하고 또 일부 실험에서는 hemacytometer 를 사용하여 총균수를 직접측정하였다.

균체의 회수

배양이 끝난 후 발효조의 배양액을 separatory funnel 에 옮겨 수용액층을 cream 층으로부터 분리하였다. 이 효모 cream 층은 다시 원심분리함으로써 소비되지 않은 경유와 수용액배지를 상층과 하층으로 분획하고 이어서 조심스럽게 양층을 흡입 제거하였다. 이렇게 해서 얻어진 효모 cake 는 약 40°C 의 상기 혼합용매 및 석유 ether 로 처리하고 60°C 에서 감압 건조시켰다.

균체의 일반성분 및 아미노산조성

조단백질·조지방·수분 및 회분은 상법⁽⁷⁾에 의해서 측정하였으며, 아미노산 함량은 gas-liquid chromatography 법⁽⁸⁻¹⁰⁾으로 분석하였다.

결과 및 고찰

플라스크배양에 의한 실험

1. 배양온도의 영향

그림 1 에 배양온도가 균체증식에 미치는 영향을 표시하였다. 30°C에서 가장 증식이 양호하였으나, 40°C에서도 비교적 잘 번식하므로 고온배양의 가능성을 시사하고 있다.

2. pH의 영향

본 균주의 증식에 미치는 pH의 영향은 그림 2 와 같다. pH 3 및 7에서는 증식도가 낮았으나, pH 4~6의 비교적 넓은 범위에서 별차 없이 잘 증식함을 알 수 있다. pH 4~6의 범위에서 pH 변화에 따른 영향이 뚜렷하지 못한 것은 pH 를 1 일 2 회 밖에 조절하지 못하였으므로 전 배양기간을 통하여 pH 를 일정하게 유지하지 못하였기 때문이라고 생각된다. 이 점은 다음의 발효조에 의한 실험에서 밝혀진다.

3. 탄소원과 질소원의 영향

탄소원으로는 등유와 경유를, 질소원으로는 4 개의 다른 무기질소염과 요소를 사용하였다. 표 1 에서 보는 바와같이 경유가 등유보다도 적합한 탄소원임을 알 수 있다. 질소원으로 등유에서는 NH₄Cl 이, 경유에서는 (NH₄)₂SO₄ 가 다소 우수하나 대체적으로 질소원의 종류에는 별영향을 받지 않는다. Otsuka 등⁽¹¹⁾과 Yamada

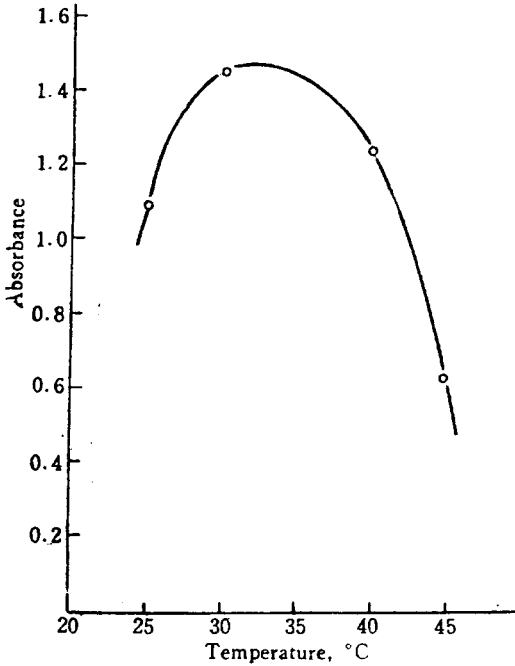


Fig. 1. Effect of temperature on the growth of *Candida tropicalis* KIST 359

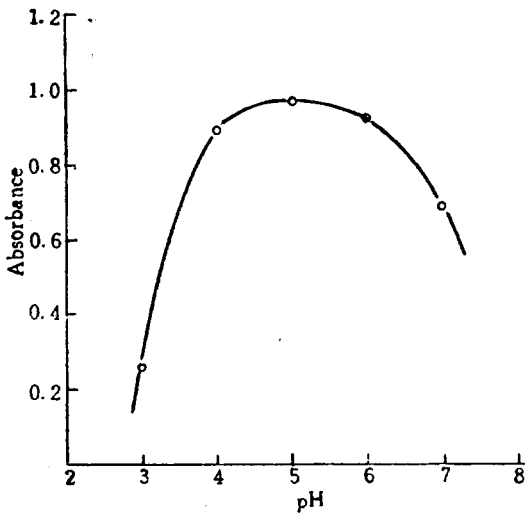


Fig. 2. Effect of pH on the growth of *Candida tropicalis* KIST 359

등⁽¹²⁾은 각각 *Candida tropicalis* 의 최적 질소원은 경유 및 n-hexadecane 을 기질로 했을 때 NH_4Cl , NH_4NO_3 임을 보고한 바 있다. 그러나 본 균주와 같이 질소원의 종류에 별 영향을 받지 않는 것은 공업적인 면에서 볼 때 유리한 점으로서, 가장 값싼 질소원의 선택이 가능함을 암시한다.

Table 1. Effect of carbon and nitrogen sources on the growth of *Candida tropicalis* KIST 359

Nitrogen sources (0.5%, w/v)	Carbon sources(5%, v/v)	
	Kerosene	Gas-oil
NH_4NO_3	0.50*	1.30*
NH_4Cl	0.60	1.40
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.55	1.45
$(\text{NH}_2)_2\text{CO}$	0.26	0.50
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0.55	1.10

* Absorbance at 570m μ

4. n-paraffin 의 탄소수의 영향

탄소수 12 부터 18 까지의 정제 n-alkane 을 각각 탄소원으로 하여 그 자화능을 비교해본 결과 C_{13} 에서 가장 증식도가 낮았으며, $\text{C}_{14}\sim\text{C}_{17}$ 에서는 별차없이 잘 자화되었다(그림 3). Chepigo⁽¹³⁾의 보고에 의하면 $\text{C}_{10}\sim\text{C}_{24}$ 의 n-alkane 이 주로 자화되며, 그중에서도 $\text{C}_{15}\sim\text{C}_{19}$ 의 것이 가장 잘 자화된다고 하였다. 또한 Miller 등⁽¹⁴⁾의 보고에 의하면 기수의 n-alkane 은 우수의 것에 비해서 잘 자화되지 않는다고 한다. 그러나 본 실험에 있어서 기수·우수의 차이 없이 그리고 탄소수에 거의 무관하게 $\text{C}_{14}\sim\text{C}_{17}$ 사이에서 비슷한 증식을 나타낸것은 플라스크

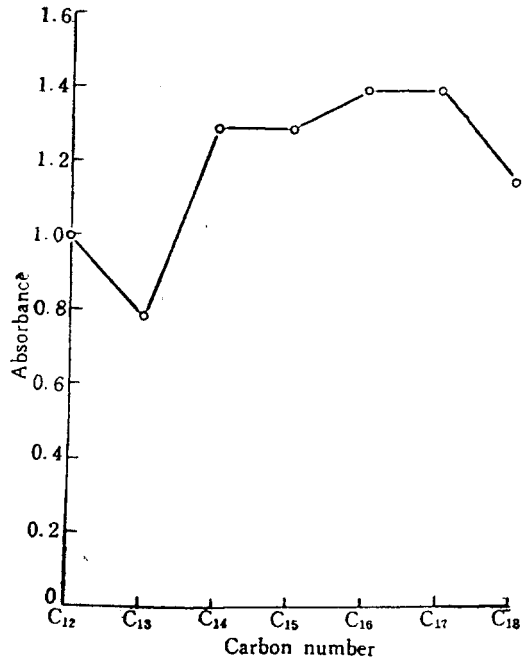


Fig. 3. Effect of carbon number of n-paraffin on the growth of *Candida tropicalis* KIST 359

배양에서의 여러인자들의 제한에 의한 것으로 생각되며, C₁₈에서의 낮은 증식은 이 배양 온도에 있어서 그 탄화수소의 용존이 곤란한 것에 기인한다고 생각된다.

5. Mg 이온농도의 영향

Mg 이온농도의 영향을 검토하기 위하여 MgSO₄·7H₂O의 농도를 0~1.5g/l 사이에서 변화시켜본 결과, 0.5 g/l 농도로 첨가했을 때 가장 증식도가 우수하였으며, 그 이상 과량 존재하여도 증식에는 영향을 주지 않음을 알 수 있다(그림 4). 그런데 Mg 이온은 산소를 함유하지 않은 유기탄소 기질의 산화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(15).

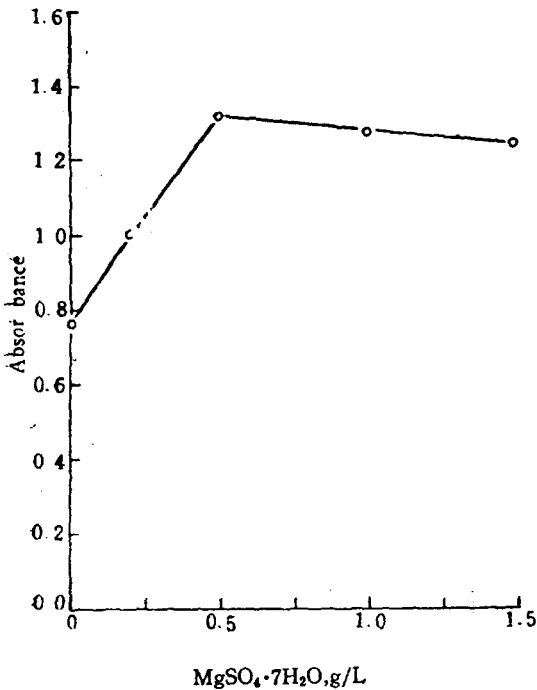


Fig. 4. Effect of MgSO₄·7H₂O concentration on the growth of *Candida tropicalis* KIST 359

6. 계면활성제의 영향

계면활성제로 tween 20 을 0.1%농도로 배지에 첨가했을 때 균체증식은 훨씬 감소되었다(그림 5). 탄화수소는 일반탄수화물기질과 달리 물에 극히 불용성이므로 균일하게 분산시키는 것이 매우 중요하다. 석유기질의 분산방법의 하나로 계면활성제의 사용이 고려되었으며(16) 일부 보고에 의하면 계면활성제의 첨가로 수율이 증가한다고 한다(11). 그러나 Aiba 등(17)의 보고에 의하면, 계면활성제는 균체와 탄화수소입자와의 접촉을 방해하기 때문에 균체의 생육을 저해한다고 하였는 바, 본 실험결과도 이 사실을 지지하는 것으로 해석된다.

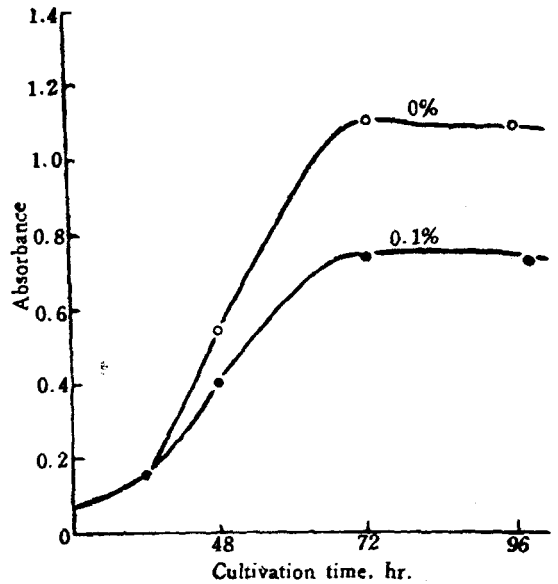


Fig. 5. Effect of surface active agent on the growth of *Candida tropicalis* KIST 359

실험실규모의 발효조에 의한 실험

1. pH의 영향

알의 플라스크 배양실험에서 본 균주의 최적 pH는 4~6의 범위내에 존재할 것이 짐작되므로 여기서는 실험실규모 발효조를 이용하여 pH가 비증식속도에 미치는 영향을 좀더 상세히 검토하였는 바, pH 5.5에서 비증식속도가 0.182 hr⁻¹로서 가장 크므로, 본 균주의 최적 pH는 5.5임을 알 수 있다. Otsuka 등(11)과 Yamada(12)등은 각각 *Candida tropicalis*의 최적 pH가 7.0 및 6.0이라 보고한 바 있다.

Table 2. Effect of pH on the growth of *Candida tropicalis* KIST 359 during cultivation of the strain in a laboratory fermenter

pH	Mass doubling time(hr)	Specific growth rate(hr ⁻¹)
4.5	6.3	0.110
5.5	3.8	0.182
6.5	6.1	0.114

2. 경유농도의 영향

표 3 과 그림 6에서 경유농도가 균체증식에 미치는

영향을 살필 수 있다. 경유의 초농도에 관계없이 lag phase는 대체로 약 18 시간이었으며, 비증식속도는 0.182hr⁻¹로서 일정하였다. 균체수율은 경유농도의 증가에 따라 점진적으로 증가되며, 이는 탄수화물에서와 같이 삼투압에 의한 저해현상을 일으키지 않고 고농도의 탄화수소배지를 사용할 수 있음을 나타내고 있다⁽¹⁸⁾. 여기서 경유의 밀도를 0.83g/cm³ 이라고 하면, 경유기질에 대한 균체수율은 경유농도가 10%일 때 15.9%로서 최고치를 보인다. 균체수율의 증가는 경유농도 10% 이상에서 큰 차이를 나타내고 있지 않고, 오히려 기질에 대한 수율은 감소하므로 10%가 경제적인 경유농도일 것으로 생각된다. 한편 등유를 탄소원으로 사용했을 때 비증식속도는 경유와 차이가 없으나, lag phase가 48시간으로 매우 길어졌으며, 기질에 대한 수율도 경유의 절반가량밖에 되지 않았다.

Table 3. Effect of petroleum concentration on the growth of *Candida tropicalis* KIST 359

Initial petroleum concentration (% v/v)	Cell yield (g. dry wt. / l. medium)	Cell yield on substrate (g. dry wt. / 100g. petroleum)
gas-oil		
5	5.9	14.2
10	13.2	15.9
15	15.4	12.4
20	16.9	10.2
kerosene		
10	6.2	7.8

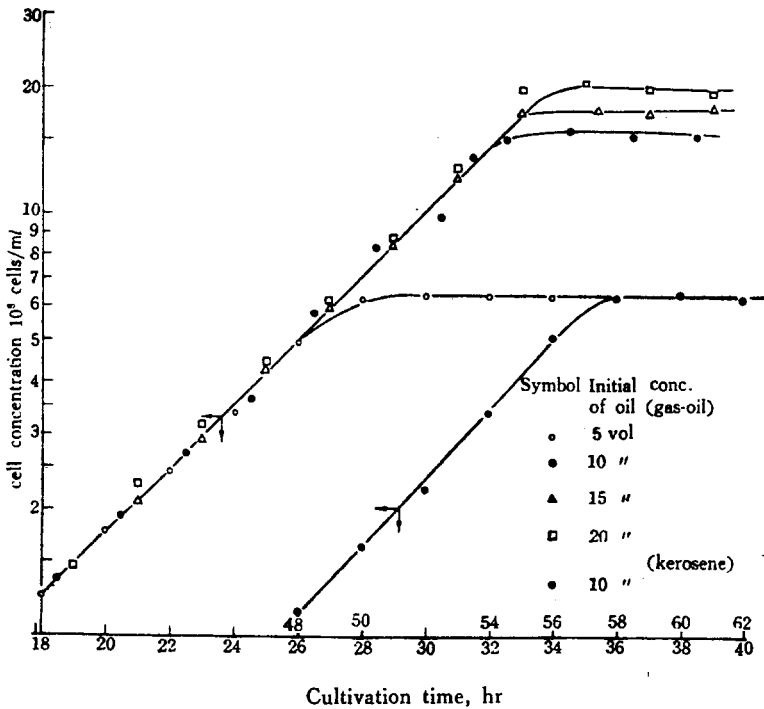


Fig. 6. Growth curves of *Candida tropicalis* KIST 359 in various petroleum concentration

균체의 일반성분 및 아미노산조성 :

본 효모균체의 조단백질함량은 59.8%로서 다른 효모에 비하여 우수하다 (표 4). 국내에서 별도로 개발된 효모균주에 비하여 그 단백질함량이 훨씬 높으며, 인도의 RRL 및 일본의 Kanegafuchi Chemical의 효모보다도 높으나 영국의 BP 효모보다는 다소 낮다.

표 5에 본 균체의 아미노산조성을 다른 단세포단백질 및 FAO 표준구성과 비교하였다. FAO 표준구성과 비교하여 보면, methionine이 다소 부족한 것 외에는 다른 필수아미노산함량은 보다 높다. 특히 lysine 함량은 10%로서 이미 보고된 단세포단백질보다 훨씬 많으며, IFP 효모⁽²⁴⁾와 비슷하나, IFP 효모는 methionine 함량이 낮다.

Table 4. Composition of yeasts grown on petroleum hydrocarbons

Source	Substrate	Protein(N×16)	Lipid	Ash	Phosphorus
KIST	gas-oil	59.8%	3.7%	4.8%	1.3%
SNU ⁽¹⁸⁾	kerosene	40.2~47.6	—	—	1.02—1.94
SNU ⁽¹⁹⁾	gas-oil	40.3	14.8	10.6	—
RRL ⁽²⁰⁾	gas-oil	51.7~60.0	1.8~3.8	6.3~7.8	1.48
Kanegafuchi ⁽²¹⁾	n-paraffin	54.1	2.8	7.1	—
BP ⁽²²⁾	gas-oil	66	0.5	7.5	1.9
BP ⁽²³⁾	n-paraffin	62	8	5.7	1.4

Table 5. Essential amino acid composition of yeasts grown on petroleum hydrocarbons(% in protein)

Amino acids	KIST-359 (yeast)	RRL-SCP ⁽¹⁹⁾	Japanese petro-yeast ⁽²¹⁾	BP protein concentrate ⁽²²⁾	IFP yeast ⁽²⁴⁾	FAO reference protein ⁽²⁵⁾
Threonine	3.87	4.26	5.08	5.4	3.2	2.8
Tryptophan	*	0.99	1.22	1.3	1.7	1.4
Phenylalanine	6.0	3.89	4.36	4.8	4.3	2.8
Isoleucine	6.33	5.96	5.45	5.3	4.8	4.2
Leucine	9.12	7.39	6.93	7.8	8.2	4.8
Lysine	10	6.19	7.52	7.8	10.7	4.2
Methionine	1.2	1.93	1.22	1.6	0.7	2.2
Valine	5.95	7.10	5.43	5.8	6.3	4.2
Cystine	1.95	—	1.76	0.9	—	2.0

* not analyzed

요 약

참 고 문 헌

유류침적토양에서 분리한 *Candida tropicalis* KIST 359 를 진탕배양 또는 발효조배양으로 여러가지 조건하에서 배양함으로써, 이 균주의 배양조건을 살피고, 그 균체의 화학성분 및 아미노산 조성을 밝혔다.

1. 본 균주는 C₁₄~C₁₇ 사이의 n-alkane 을 잘 자화할 수있으며, 그 최적 배양온도는 30°C, 최적 pH는 5.5 부근이다.
2. 균체수율을 기준으로 할 때, 경유가 등유보다 좋은 기질이고, 경유를 썼을 때 요소를 제외한 다른 네가지 질소원(NH₄NO₃, NH₄Cl, (NH₄)₂SO₄ 및 (NH₄)₂HPO₄)은 서로 큰 차이 없이 좋은 수율을 보였다.
3. 경유의 농도 10%(v/v), 질소원의 농도 0.5%(w/v), 그리고 MgSO₄·7H₂O의 농도 0.05%(w/v)에서 그 수율이 가장 높았다.
4. 균체의 단백질함량은 59.8%이며, 그 아미노산조성은 FAO 표준주성에 비교할 만하나, methionine 은 부족하고, lysine 의 함량은 높다.

- (1) Mateles, R.I. and S.R. Tannenbaum: in "Single-Cell Protein," The MIT Press, Cambridge(1968)
- (2) Anon.: C & EN, 21 (Feb. 2, 1970)
- (3) Anon.: Chem. Week, 41(Aug. 2, 1969)
- (4) Wang, D.I.C.: Chem. Engr., 75, 99(Aug. 26, 1969)
- (5) 권태완 · 민태익 · 박용 · 변유량 : 한국식품과학회지, 2(2), 56~60 (1970)
- (6) 醫科學研究所 學友會 編 : 細菌學實習提要, 第2版, 丸善株式會社, 東京(1967)
- (7) Jolly, S.C.: Official Standardised and Recommended Methods of Analysis, Society for Analytical Chemistry, W. Heffer and Sons Ltd., Cambridge (1963)
- (8) Lankin, W.M. and C.W. Gerke: Anal. Chem., 37, 382(1965)
- (9) Gerke, C.W. and F. Shahrokhi: Anal. Biochem., 15, 97(1966)

- (10) Gerke, C.W., D. Roach, R.W. Zumwalt, D.L. Stalling and L.L. Wall: Quantitative G.L.C. of amino acids in proteins and biological substance, Anal. Biochem. Lab., Inc. (1968)
- (11) Otsuka, S.I., R. Ishii and N. Katsuya: J. Gen. Appl. Microbiol., 12, 1(1966)
- (12) Yamada, K., J. Takashi, Y. Kawabata, T. Okada and T. Onihara: in "Single-Cell Protein", The MIT Press, Cambridge, 192(1968)
- (13) Chepigo, S.V.: 7th World Petroleum Congress, Mexico(April, 1967)
- (14) Miller, T.L., S. Lie and M.J. Johnson: Biotech. and Bioengr., 6, 299(1964)
- (15) 武田勲: 醸酵協會誌, 24(10), 443(1966)
- (16) Fukui, S. and A. Tanaka: 石油と石油化學, 12(8), 58(1968)
- (17) Aiba, S., V. Moritz, J.I. Someya and K.L. Haung: J. Ferment. Technol., 47, 203(1969)
- (18) 이계호, 신현경: 한국농화학회지, 13, 43(1970)
- (19) 대한석유공사: 오일뉴스, 세 70-3호, 4(1970)
- (20) Singh, H.D., P.L. Barua, M. Chakravarty, J. N. Baruah and M.S. Iyengar: J. Gen. Appl. Microbiol., 16, 91(1970)
- (21) Takata, T.: Hydrocarbon Processing, 48(3), 99(1969)
- (22) Evans, G.H.: in "Single-Cell Protein", The MIT Press, Cambridge, 243(1968)
- (23) Bennett, I.C., J.C. Hondermark and J.R. Todd: Hydrocarbon Processing, 48(3), 104(1969)
- (24) Decerle, C., S. Franckowiak and C. Gatellier: Hydrocarbon Processing, 48(3), 109(1969)
- (25) FAO/WHO: Protein Requirements(1957), FAO Nutritional Studies, No. 16