

## 효모의 혼합 배양에 관한 연구

### 제 1 보 혼합배양의 상호작용

변유량 · 권태완\* · 유주현

연세대학교 식품공학과, \*한국과학기술연구소

(1977년 10월 4일 수리)

## Studies on a Mixed Yeast Culture

### Part 1. Interactions in a Mixed Yeast Culture

by

Yu-Ryang Pyun, \*Tai-Wan Kwon and Ju-Hyun Yu

Department of Food Engineering, Yonsei University, \*Korea Institute of Science and Technology

(Received December 4, 1977)

#### Abstract

A mixed culture of *Candida tropicalis* and *Trichosporon cutaneum* was carried out using a n-paraffin medium. The growth of *C. tropicalis* was markedly enhanced by the mixed culture with *T. cutaneum* which did not grow on n-paraffin. *C. tropicalis* extracellularly excreted free fatty acids as metabolic products of n-paraffin in the culture medium. *T. cutaneum* appeared to assimilate these free fatty acids which were growth inhibitors for *C. tropicalis*, thereby enhancing the growth of *C. tropicalis*.

#### 서 론

과거 40년간 급속히 발전한 발효산업은 주로 목적하는 단일 미생물의 순수 배양에 의한 것이다. 그러나 옛날부터 인류는 유제품, 양조 등에 자연적인 혼합배양을 이용하여 왔다. 최근에는 순수 분리한 균을 목적에 따라 인위적으로 혼합배양하는 방법이 연구되고 있다. (1-4) 이와 같은 인위적인 혼합배양은 종래의 단독배양에서 기대할 수 없었던 물질을 생산하거나 발효방법을 개량할 수 있는 가능성을 갖고 있다.

혼합배양에 있어서 각 균들간의 상호 작용은 여러가지로 분류된다. 그 중에서 competition과 predation에 관하여는 상당한 연구가 진행되었으나, (5) commensalism의 관하여는 연구된 것이 적다. Commensalism은 자연계의 미생물의 생태학적 면에서 뿐만 아니라 공업적으로

도 매우 중요하다. 그러나 현재까지 밝혀진 commensalistic system은 Shindala등<sup>(6)</sup>이 *Proteus vulgaris*의 생육이 *Sacharomyces cerevisiae*가 생산하는 niacin에 의존한다는 연속배양 결과를 보고한 것 이외에, Relly등<sup>(7)</sup>, Megee등<sup>(8)</sup> 및 Lec등<sup>(9)</sup>이 보고한 몇가지에 한정되어 있다.

저자들은 탄화수소효모균체단백질의 생산성을 향상시킬 수 있는 혼합배양균주를 선발하여 두 균주는 각각 탄화수소 資化性인 *Candida tropicalis*와 非資化性인 *Trichosporon cutaneum*임을 보고한 바 있다. (10-11)

이 혼합배양계는 현재까지 밝혀진 共生系와 다른 새로운 共生系로서, 탄화수소 자화성효모와 지방산에 대하여 친화력이 큰 탄화수소 비자화성 효모와의 혼합배양계인 것으로 밝혀졌다. 이는 탄화수소발효에서 문제가 되고 있는 지방산의 생육저해작용을 해소할 수 있는 유용한 방법으로 전망된다.

재료 및 방법

1. 재 료

본 실험에 사용한 균주는 탄화수소 자화성인 *Candida tropicalis*와 비자화성인 *Trichosporon cutaneum*이다<sup>(10)</sup> *C. tropicalis*를 단독배양할 때는 Table 1의 medium A를, *T. cutaneum*과 혼합배양할 때는 medium B를, 혼합배양의 상호작용을 밝히기 위한 합성배지로는 medium C를 각각 사용하였다.

실험에 사용한 n-paraffin은 日本蠟業의 super heavy fraction이다<sup>(11)</sup>

Table 1. Composition of culture medium

Medium	A	B	C
n-Paraffin	3.0%	3.0%	3.0%
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4.0g	4.0g	4.0g
(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO	2.0g	3.0g	2.0g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.5g	1.5g	1.5g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	1.0g	1.0g	1.0g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	400mg	400mg	400mg
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	100mg	100mg	100mg
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	100mg	100mg	100mg
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	100mg	100mg	100mg
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	10mg	10mg	10mg
CSL Powder	400mg	600mg	
Biotin			25μg
Thiamine			400μg
Distilled water	1l	1l	1l

2. 실험장치 및 배양방법

본 실험에 사용한 발효조는 5l-jar fermentor (Marubishi, MJF-5)와 28l MicroFerm (New Brunswick Scientific, CMF-128S)이다. 각 발효조의 내부에는 4개의 baffle, 2~3의 6-blade flat turbine 및 ring sparger가 설치되어 있고, 또한 각 발효조에는 pH지시조절계 (Leeds and Northrup, Speedomax H), 온도기록조절계 (Fenwall 536) 및 자동소포장치와 定量펌프(Zero-Max Model E-1)가 부착되어 있다.

플라스크 및 발효조에서의 배양조건은 Table 2에 표시하였다. 종균배양은 본배양과 동일조성의 배지로 30시간 플라스크 배양한 것을 사용하였으며, 본 배양액의 5~10%를 접종하였다. 이때 *C. tropicalis*와 *T. cutaneum*의 接種比는 4:1로 하였다.

Table 2. Culture conditions

Condition	Fermentor	Flask	5l Jar	28l Micro Ferm
Fermentor volume(l)		0.5	5	28
Working volume(l)		0.1	3	15
Inoculum(%)		5.0	10	10
Agitation(rpm)	180 strokes/min		800	900
Aeration(vvm)		—	2	2
Temperature (°C)		30	33	33
pH		4.0~6.0	4.5	4.5

3. 분석방법

(1) 균체량 측정법

일정한 시간 간격으로 적당량의 시료를 채취하여 제면환성제(Igepal Co 50)를 1~2방울 가하고 격렬히 교반한 다음 원심분리하여 균체를 회수하고 2회 세척한 후 증류수에 다시 현탁시켜 spectrophotometer (Spectronic 20)로 660mμ에서 흡광도를 측정하거나, 수세한 균체를 감압건조하여 균체량을 측정하였다.

*C. tropicalis*와 *T. cutaneum*은 둘다 효모이므로 현미경으로 형태를 구별하기 어렵다. 그러나 YM 한천평판에서 *C. tropicalis*는 백색의 광택이 있는 작은 菌落을 형성하고, *T. cutaneum*은 연한 다갈색의 큰 菌落을 형성하므로 용이하게 구별할 수 있다. 따라서 이 菌落의 형태차를 이용하여 각 균의 生菌數를 측정하므로써 혼합배양에서 두 균의 菌數比를 구하였다.

(2) 자화물질 및 저해물질의 검출

n-Paraffin배지에 *C. tropicalis*를 배양한 對數増殖期の 배양액 10l를 Fig. 1과 같은 과정으로 分割하였다. 이와같이 하여 얻은 각 分割液의 일정량을 합성배지에 첨가하고 *C. tropicalis*와 *T. cutaneum*을 각각 단독 또는 혼합배양하여 균의 생육을 측정하므로써 자화물질 및 저해물질을 검출하였다.

(3) 정량방법

Thin-layer chromatography plate는 silica gel G (Merk)를 유리판에 0.25mm의 두께로 조제하고, 110°C에서 1시간 활성화시킨 것이다. 당의 전개용매로는 butanol-pyridine-water (6:4:3)를 사용하였고, spot는 anthrone 발색시약으로 검출하였다. 지방의 전개용매로는 chroloform-acetone-methanol-acetic acid-water (8:1.5:0.25:0.25:0.2)을 사용하였으며, spot는 di-chrome-sulfuric acid를 분무하고 130°C에서 탄화하여 검출하였다.

배양액에 함유된 총 탄수화물은 Makimenko등<sup>(12)</sup>의

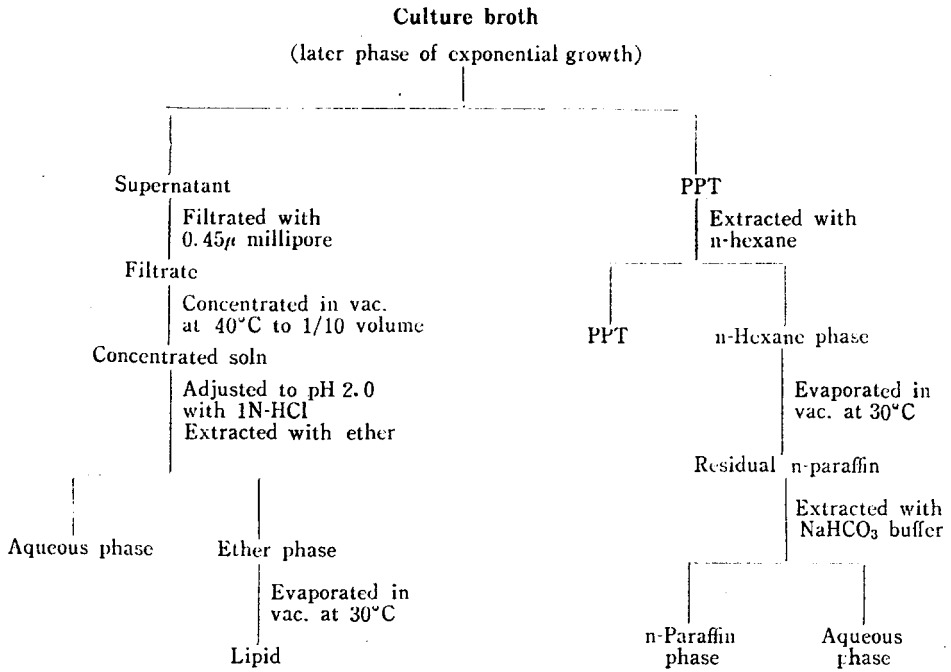


Fig. 1. Fractionation Procedure

anthrone법으로, 유리지방산은 Novok<sup>(13)</sup>의 비색법으로 각각 정량하였다.

### 결과 및 고찰

#### 1. 혼합배양의 특성

균체증식속도 (dX/dt) 및 암모니아 소비속도(dN/dt)를 각각 균체농도(X) 및 암모니아 소비량(N)에 대하여 작도한 Fig. 2 및 Fig. 3를 보면 단독 및 혼합배양의

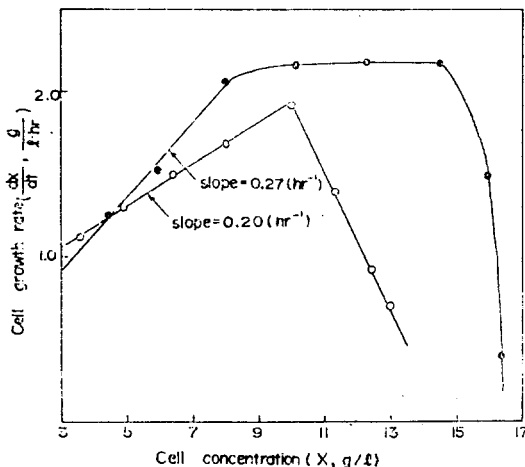


Fig. 2. Plot of cell growth rate vs cell concentration —○— : single culture, —●— : mixed culture

생육특성의 차를 명백히 알 수 있다. *C. tropicalis*의 단독배양에 있어서 對數増殖期の 비증식속도는 Fig. 2에서 알 수 있는 것처럼 0.2hr<sup>-1</sup>이었고, 균체농도 10 g/l부터 증식속도는 현저히 감소하였다. 그러나 혼합배양의 내수증식기의 비증식속도는 0.27hr<sup>-1</sup>로서 단독배양에서보다 현저히 높았고, 약 2시간의 直線生育期 다음에는 기질이 완전히 소비되어 증식속도가 감소하였다. Fig. 3의 암모니아 소비속도는 Fig. 2의 효모의 증식과 반대현상을 나타내어, 단독배양에서의 암모니아 소비속도 및 총암모니아 소비량은 혼합배양의 경우보다 많았다.

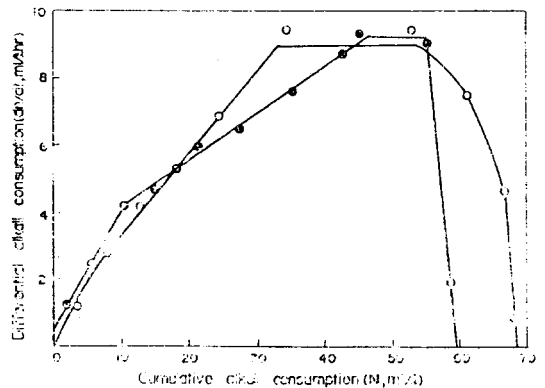


Fig. 3. Plot of differential vs cumulative alkali consumption —○— : single culture, —●— : mixed culture

두 효모를 각각 단독 또는 혼합배양했을 때의 菌數分布를 일정한 시간간격으로 측정하여 Fig. 4에 나타내었다. *C. tropicalis*의 균수는 *T. cutaneum*과 혼합배양하므로써 단독 배양에 비하여 현저히 증가 하였음을 알 수 있다. 한편 *T. cutaneum*은 단독으로는 n-paraffin 배지에서 전혀 생육하지 못하였으나, *C. tropicalis*와의 혼합배양에서는 총균수의 1/30정도 증식하였다.

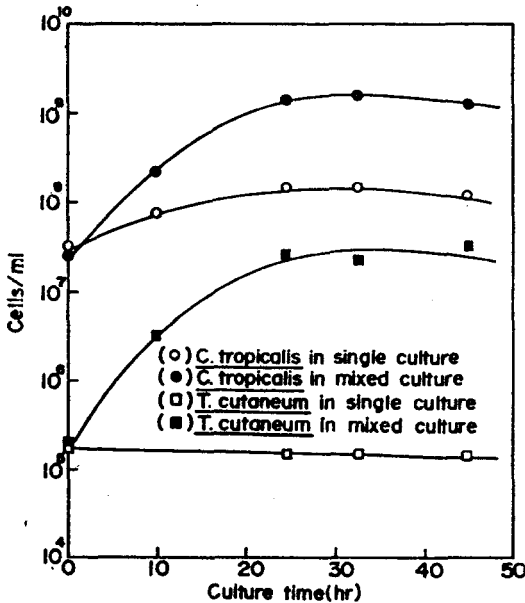


Fig. 4. Growth of *C. tropicalis* and *T. cutaneum* in single and mixed cultures

이상의 결과로 미루어 보아 다음과 같이 추정할 수 있다.

(1) *C. tropicalis*를 단독배양할 때, 배양시간이 경과함에 따라 점차적으로 증식속도가 감소하는 것은 자신의 생육을 저해하는 어떤 대사산물이 배양액에 축적되기 때문이다.

(2) *T. cutaneum*은 단독으로는 n-paraffin배지에서 생육하지 못하지만 혼합배양할 경우에 증식하는 것은 *C. tropicalis*가 *T. cutaneum*이 자화할 수 있는 탄소원을 생산하기 때문이다.

(3) 혼합배양에서 *C. tropicalis*의 증식속도 및 균체수율이 현저히 향상되는 것은 *T. cutaneum*이 *C. tropicalis*의 생육저해물질을 제거하여 주기 때문이다.

(4) *C. tropicalis*의 단독배양에서 배양중반기부터 암모니아 소비량이 증가하는 것은 산성물질이 대사산물로 생산되므로 이를 중화하기 위해 암모니아가 추가적으로 소비되기 때문이다.

## 2. *T. cutaneum*의 자화물질의 檢出

앞에서 추정한 바와같이 *T. cutaneum*의 탄소원을 *C. tropicalis*의 배양액 중에서 검출하기 위해, n-paraffin 배지에 *C. tropicalis*를 단독배양한 대수증식기의 배양액 10l를 Fig. 1과 같이 分割하였다. 이와같이하여 얻은 농축수용액 분획을 완전합성배지에 4~6% 첨가하고 *T. cutaneum*을 배양한 결과는 Fig. 5와 같다. 농축수용액 분획을 첨가하지 않았을 경우에 *T. cutaneum*은 전혀 생육하지 못하였으나 수용액 분획의 첨가량이 증가할수록 증식량도 증가하였다. 이는 농축수용액 분획 속에 *T. cutaneum*이 자화할 수 있는 어떤 물질이 함유되어 있다는 것을 의미한다. 이물질을 검출한 결과 anthrone 전환황산용액에서 암록색으로 되었으며, TLC에서 anthrone 발색시약에 의해 청색반점이 확인 되었으므로 탄수화물로 추정되었다. 또한 농축수용액 분획을 배지에 6% 첨가한 경우에 탄수화물의 초기 농도는 0.18 μg/ml이었으나, *T. cutaneum*을 배양한 후에는 0.05 μg/ml로 감소하였다. 이와같은 결과는 *C. tropicalis*에 의하여 생산된 미량의 탄수화물의 약 72%가 *T. cutaneum*에 의하여 자화되었다는 것을 의미한다.

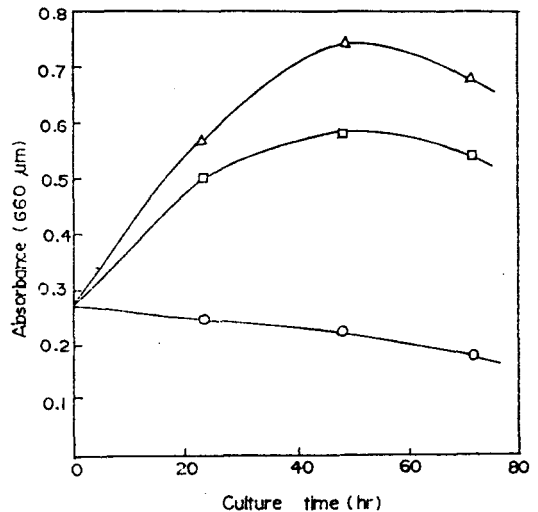


Fig. 5. Growth of *T. cutaneum* on the aqueous fraction of culture filtrate of *C. Tropicalis*  
 —○—: no addition, —□—: 4%, —△—: 6%

균체 emulsion에서 추출한 잔여 n-paraffin 分割을 합성배지에 2~6%첨가하고 *T. cutaneum*을 배양 한 결과는 Fig. 6과 같다. *T. cutaneum*은 n-paraffin을 자화하지 못함에도 불구하고 잔여 n-paraffin의 첨가농도에 거의 비례해서 균체증식량이 증가하는 것은 n-paraffin에

함유되어 있는 *C. tropicalis*의 어떤 친유성 대사산물을 *T. cutaneum*이 자화하기 때문일 것이다. Makula등<sup>(14)</sup> 여러 연구자들은 탄화수소발효에서는 재래의 당질발효에서 보다 다량의 菌體外 지방산이 배양액에 축적된다고 하였다. 그리고 전술한 Fig. 3의 결과와 같이 단독 및 혼합배양에 있어서 암모니아 소비량의 차이로 미루어 보아 n-paraffin에 함유된 물질은 지방산으로 추정되었다.

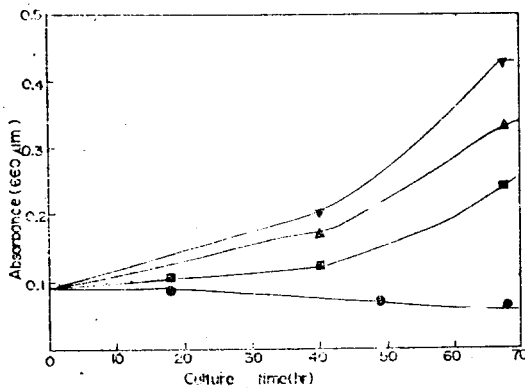


Fig. 6. Growth of *T. cutaneum* on the residual n-paraffin fraction  
 ●—: no addition, ■—: 2%, ▲—: 4%, ▼—: 6%

이를 확인하기 위해 *C. tropicalis*의 대수증식기의 배양액에서 추출한 잔여 n-paraffin을 TLC로 분석한 결과 지방산의 표준물질로 사용한 palmitic acid와 동일한 Rf의 위치에 spot가 나타났으므로 잔여 n-paraffin에 지방산이 함유되어 있음을 확인하였다. 그러나 이 잔여 n-paraffin에 *T. cutaneum*을 배양한 후에는 palmitic acid와의 동일 위치에 spot가 나타나지 않았으므로 잔여 n-paraffin에 함유되어 있던 지방산이 완전히 *T. cutaneum*에 의하여 소비된 것으로 판단되었다.

이상의 각 分劃에서 밝히진 결과를 종합적으로 확인하기 위해 28l 발효조에서 *C. tropicalis*를 단독 또는 *T. cutaneum*과 혼합배양하면서 유리지방산과 탄수화물의 농도를 일정한 시간간격으로 측정한 결과는 Fig. 7과 같다. 여기서 단독배양의 경우를 살펴보면 배양시간이 경과함에 따라 수용액상의 지방산 함량은 약 600 $\mu$ eq/l, n-paraffin상의 지방산 함량은 60meq/l까지 각각 증가하였으며 *C. tropicalis*의 대사산물로 생산된 지방산은 대부분 n-paraffin상에 존재함을 알 수 있다. 수용액 상의 탄수화물함량은 배양시간에 따라 서서히 약 50 $\mu$ g/l까지 증가하였다.

한편 혼합배양의 경우에 배양액 및 n-paraffin에 함유

된 유리지방산은 각각 50 $\mu$ eq/l 및 200 $\mu$ eq/l로 현저히 감소하였으며, 수용액상의 탄수화물도 15 $\mu$ g/l로 감소하였다. 이와같은 결과는 *T. cutaneum*이 *C. tropicalis*의 대사산물인 지방산과 탄수화물을 자화하여 소비하였기 때문이다. 그러나 탄수화물의 양은 지방산에 비해 미량이기 때문에 *T. cutaneum*의 主炭素源은 유리지방산인 것으로 판단되었다.

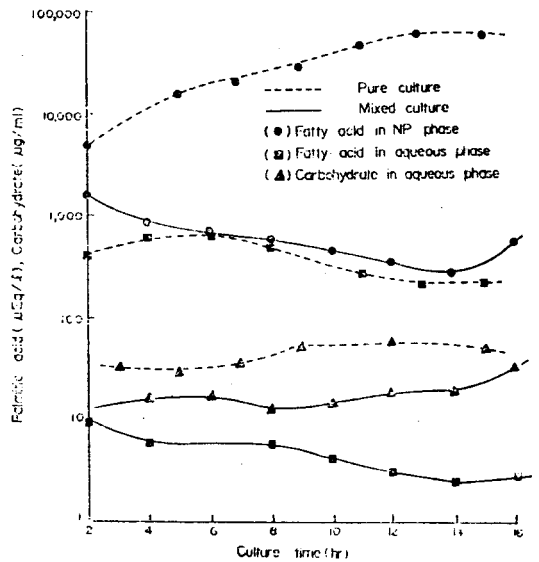


Fig. 7. Formation of extracellular fatty acid and carbohydrate during the growth of *C. tropicalis*, and assimilation of extracellular fatty acid and carbohydrate by *T. cutaneum* during mixed culture

*T. cutaneum*은 광범위한 유기화합물을 자화하는 특이적인 균주이다. 알콜발효폐액 속에 함유된 각종의 異質의인 탄소원을 거의 완전히 자화하며, 有機酸의 혼합물을 함유하고 있는 caprolactam폐액에서도 잘 생육하는 것으로 보고되고 있다.<sup>(16)</sup> *T. cutaneum*의 이와같은 특징은 혼합 배양균주의 검색과정에서도 밝혀졌다.

### 3. *C. tropicalis*에 대한 지방산의 생육저해작용

*C. tropicalis*의 배양액의 잔여 n-paraffin에서 추출한 지방산을 탄화수소배지에 0.2%첨가하고 단독 또는 혼합배양한 결과는 Fig. 8과 같다. Fig. 8에서보는 바와 같이 *C. tropicalis*의 단독배양에서는 지방산의 첨가에 의해 생육은 현저히 억제되었다. 그러나 혼합배양에서는 지방산을 첨가한 경우와 첨가하지 않았을 경우에도 두 생육저해를 받지 않았다. 이는 *T. cutaneum*이 지방산을 자화하여 *C. tropicalis*에 대한 저해작용을 소멸시켰기 때문이다.

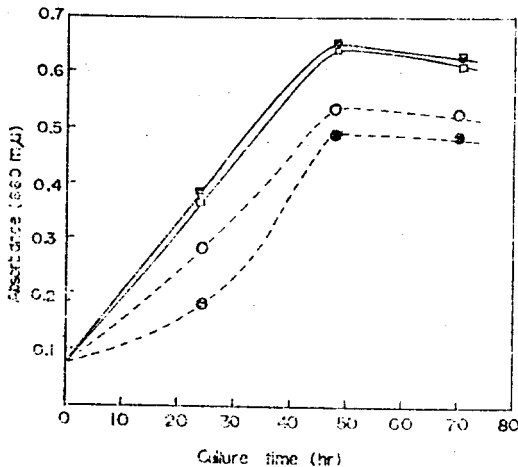


Fig. 8. Inhibition of the growth of *C. tropicalis* by fatty acids extracted from residual n-paraffin fraction

- : single culture without fatty acid
- : single culture with fatty acid at the concentration of 0.2% (v/v)
- : mixed culture without fatty acid
- : mixed culture with fatty acid at the concentration of 0.2% (v/v)

直鎖狀탄화수소의 미생물에 의한 산화는 우선 알당이 산화되어 알콜, 알데하이드를 거쳐 지방산이 되고, 다음에는 β-산화에 의해 통상의 지방산代謝系서 분해, 대사되는 것으로 알려져 있다. 따라서 Makula 등<sup>(14)</sup> 여러 연구자들에 의하면 탄화수소발효에서는 당질발효에 비하여 다량의 균체의 지방산이 배양액에 축적되며 생성되는 지방산은 기질의 탄소수에 크게 좌우된다고 하였다. 또한 Aida 등<sup>(17)</sup>과 Prokop 등<sup>(18)</sup>은 탄화수소 자화성균의 대사산물로 생산된 지방산이 本菌에 대하여 저해작용을 한다고 보고한 바 있으며, 탄화수소酸化系에 대한 catabolic repression 또는 inhibition에 의한 것으로 推論하였다. Pilat 등<sup>(19)</sup>은 *C. lipolytica*에 의한 輕油의 탈납을 위한 연구에서 발효중반기에 다량으로 생산되는 산성대사산물의 本菌에 대한 저해작용으로 탈납공정이 지연 또는 경지되며 균체수율이 현저히 감소된다고 하였다.

이상의 모든 실험결과로부터 혼합배양에 있어서 두 효모의 상호작용을 종합하면 다음과 같다. 즉 *C. tropicalis*는 n-paraffin을 자화하여 증식하면서 대사산물로서 유리지방산을 배양액에 분비하고, 이들 지방산에 의하여 생육이 저해된다. 그러나 *T. cutaneum*은 이 지방산을 주탄소원으로 소비하면서 생육하기 때문에 지방산의 생육저해작용이 혼합배양에서는 해소되어 *C. tropicalis*

의 증식속도 및 균체수율이 향상된다는 것을 알았다.

이와같은 혼합배양계는 共生菌(commensal)인 *T. cutaneum*은 本菌(host)인 *C. tropicalis*의 대사산물을 필요로 하지만 本菌은 共生菌에 의하여 영향을 받지 않으며, 本菌은 자신의 대사산물에 의하여 생육저해를 받는다. 따라서 저해작용을 가진 commensalism에 속한다고 할 수 있다.

### 요 약

탄화수소 자화성균인 *C. tropicalis*와 非자화성인 *T. cutaneum*의 혼합배양에 있어서 두 효모간의 상호작용을 구명하였다. 즉 本菌인 *C. tropicalis*는 n-paraffin을 자화하여 증식하면서 유리지방산을 대사산물로 배양액에 축적하는 동시에 자신이 이 지방산에 의해 생육저해를 받는다. 共生菌인 *T. cutaneum*은 本菌의 대사산물인 유리지방산을 탄소원으로 생육하므로써 생육저해작용을 해소하여 本菌의 증식 속도와 균체수율을 향상시키는 commensalistic system을 형성하는 것으로 판단되었다.

### 참 고 문 헌

- (1) Bungay III, H.R. and Krieg, N.R.: Chemical Engineering Symposium Series No. 69, p.62 (1966)
- (2) Ryu, D.Y., Lee, R.W., Thowa, R.W. and Brown, W.R.: *Biotechnol. Bioeng.* 11, 1255 (1969)
- (3) Srinivasan, V.R. and Han, Y.W.: *Advan. Chem. Ser.*, 95, 447(1969)
- (4) Peterson, N.: *Biotechnol. Bioeng.*, 17, 1291 (1975)
- (5) Bungay, H.R.: *Advances in Applied Microbiology*, Academic Press, New York, 10, p.269 (1968)
- (6) Shindala, A., Bungay, H.R., Kriegand, N.R. and Cubert, K.: *J. Bacteriol.*, 89, 693(1965)
- (7) Chao, C.C. and Reilly, P.J.: *Biotechnol. Bioeng.*, 14, 75(1972)
- (8) Megee, R.D., Drake, J.F., Fredrickson, A.G. and Tsuchiya, H.M.: *Can. J. Microbiol.*, 18, 1733(1972)
- (9) Lee, I.H., Fredrickson, A.G. and Tsuchiya, H.M.: *Biotechnol. Bioeng.*, 18, 513(1976)
- (10) Mheen, T.I., Pyun, Y.R. and Kwon, T.W.: *Korean J. Food Sci. Technol.*, 6, 219(1974)
- (11) Pyun, Y.R., Mheen, T.I. and Kwon, T.W.: *Korean J. Food Sci. Technol.*, 6, 231(1974)
- (12) Maksimenke, O.A.: *Applied. Biochem. Microbiol.*, 114(1973)

- (13) Novak, M.: *J. Lipid Res.*, 6, 131(1965)
- (14) Makula, R.A. and Finnetry, W.R.: *J. Bacteriol.*, 112, 398(1972)
- (15) Kato, N. and Shibaoaki, I.: *J. Ferment. Technol.*, 53, 793(1975)
- (16) Ilina, L.D.: *Prikladnaya Biokhimya i Microbiologiya*, 16, 1135(1974)
- (17) Aida, T. and Yamaguchi, K.: *Agr. Biol. Chem.* 33, 1244(1969)
- (18) Sobotka, M., Prokop, A. and Panos, J.: *Biotecnol. Bioeng.*, 16, 1135(1974)
- (19) Pilat, P., Prokop, A., Fencel, Z. and Panos, J.: *J. Ferment. Technol.*, 51, 236, 249 (1973)