

메탄올자화 효모에 관한 연구

金賢姬·閔丙禮*

(漢陽大學校 理科學科 生物學科 · *檀國大學校)

A Study on Methanol-Assimilating Yeast

KIM, Hyun Hee and Byung-Re MIN*

(Dept. of Biology, College of Sciences, Hanyang University. *Dankook University)

ABSTRACT

Thirty species of wild yeasts were isolated and identified from two hundred strains collected from flowers by enrichment techniques using streptomycin. Among them, twenty three species could assimilate methanol and three species, *Candida incommunis*, *Cryptococcus aerius* and *Hansenula ciferrii* which showed good biomass yield were selected.

These three species assimilated methanol as carbon and energy source without mixture of vitamin and yeast extract. The species grown on methanol media were confirmed to have all essential amino acids in their cellular constituents.

The content of total amino acids are as followings; *Candida incommunis*: 42.5%, *Hansenula ciferrii*: 39.9% were higher than *Kloeckera* sp. No. 2201: 39.9%. And *Cryptococcus aerius*: 36.5% was also higher than *Candida utilis*: 31.9%.

Of the essential amino acids lysine and threonine which are usually lacking in grain protein were as much as flour's. The experiments on the growth conditions for the higher biomass yield showed the result that the optimum concentration of methanol and temperature were defined as 1.3% and 30°C in each species.

緒 論

메탄올을 자화하는 효모는 Ogata(1969) 등에 의하여 처음으로 발견되었다. 점차 메탄올을 자화하는 효모의 새로운 종이 Hazeu(1972), Levine 및 Cooney(1973), Yokote(1974) 등에 의하여 계속 발견되었으며, 메탄올의 농도와 온도, pH, 배지의 조성 특히 비타민의 유무에 따른 효모의 최적 생장조건 등이 연구되어지고 있다.

효모는 토양, 해수, 공기중에 많이 분포한다고 알려져있다. Lodder(1970)는 메탄올을 자화하는 효모를 나무의 껍질과 수목에 기생하는 곤충에서 처음으로 발견하였으며 수목의 성분에서 lignin과 관계가 있지않나 생각되어지고 있다.

따라서 본 연구는 메탄올을 자화하는 효모의 채집원을 곤충과 관계가 깊은 꽃으로 선택하였다. 200여 분리 균주에서 30종을 동정하였으며 그 중 23종이 메탄올을 탄소원으로 하여 생육하였고, 특히 3종의 증식이 가장 뚜렷하므로 그의

Table 1. The composition of media.

media component	A	B	C	D	E	F	G
(NH ₄) ₂ SO ₄	3g			5g	3g	1g	
NH ₄ Cl		4g	4g				4g
KH ₂ PO ₄ ·7H ₂ O	2g	1g	1g	3g	1g	1g	1g
K ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O		1g	1g		1g		
MgSO ₄ ·7H ₂ O				3.5g			
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.4g	0.5g	0.5g	0.5g	0.4g	0.5g	0.4g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.01g		0.01g		0.01g		0.01g
MnSO ₄ ·6H ₂ O	0.01g				0.002g		0.01g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O					0.002g		
Yeast extract	1g			0.1g	0.1g	0.5g	
Thiamin-HCl	500μg				200μg		200μg
Biotin	50μg				4μg		5μg
Vitamin mixture		10ml	1ml				
Acromycin				100μg			
Streptomycin	0.3g						0.3g

A ; H. Tezuka, 1975. B ; K. Ogata, 1970. C ; Y. Yasuharu, 1974. D ; H. Asthana, 1971.
 E ; H. Dellweg, 1975. F ; K. Ogata, 1975. G ; Modified medium by author.

생장곡선, 균체량, 필수 아미노산의 조성과 함량, 총질소량을 구하였다. 그리고 배양시의 온도와 메탄올의 농도에 따른 균체량을 관찰하였으며, 병원성 여부도 검정하였다.

材料 및 方法

산야에 서식하는 야생초의 꽃에서 채집한 200여 균주중 메탄올의 자화능이 강한 3종의 효모를 대상으로 하여 실험하였다.

1. 분리 및 동정

순수배양에 의해 분리하였으며, Lodder(1970), Barnett(1974)의 방법에 따라 형태적, 생리적 실험을 하여 동정하였다.

2. 사용배지

본 실험에서는 table 1에서 보는 바와 같이 순수한 무기배지와 최소한의 성장요인으로 yeast extract, peptone 및 복합비타민이 첨가되지 않은 무기염류와 메탄올을 이용한 실험자의 개량적인 배지를 사용하였다. 즉 NH₄Cl : 4g, KH₂PO₄·7H₂O ; 1g, K₂HPO₄·7H₂O ; 1g, MgSO₄·4~6H₂O ; 0.01g, thiamin ; 200μg, biotin ; 5μg, D. H₂O ; 1l의 배지를 사용하였으며 메탄올의 농도

는 1.3%로 하였다.

3. 배양조건

배지 100ml를 넣은 500ml 삼각플라스크에 백금으로 균주를 접종한 후 30°C에서 130cycle/min으로 진탕배양하였다. pH는 6.0으로 조정하였다.

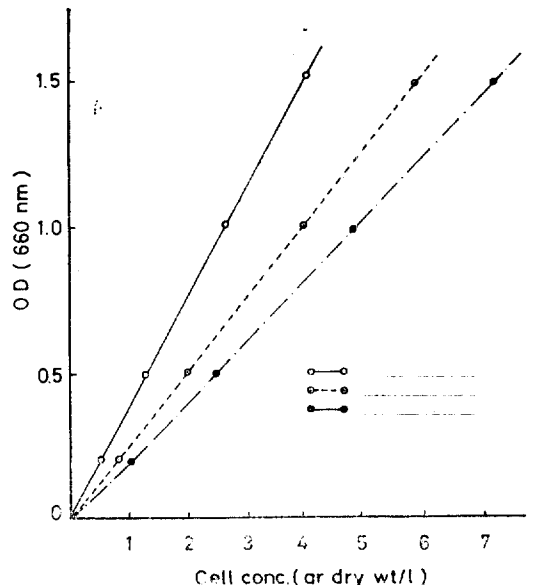


Fig. 1. Relations between cell concentration and OD at 660 nm.

Table 2. Operating condition (Amino acid auto analyzer*)

Operating conditions required	Analysis	Analysis of Acidities & Neutrals
Column size	23x1.9cm (short Col.)	6.9x0.9cm (long Col.)
Packing resin type**	PA-35	AA-15
Height of resin Col.	5.5cm	56cm
Resin pouring buffer***	pH 5.28 (3.35N)	pH 3.28 (0.20N)
Buffer flowing rate	68ml/hr	68ml/hr
Analysis		
Duration of run	50min	175min
Flow rate buffer	68ml/hr	68ml/hr
ninhydrin	34ml/hr	34ml/hr
First buffer	pH 5.28±0.02 (0.35)	pH 3.28±0.02 (0.20)
Second buffer	not applicable	pH 4.25±0.02 (0.20)
Buffer change (min. after start)	not applicable	85min
Operation temp. bath tank	55.5 C	55.5 C
Operation temp. reaction tank	100 C	100 C
Approximate col. pressure	40psi	130psi
Regeneration/equilibration		
Regeneration (NaOH)	approx. 3ml	approx. 15ml
Equilibration	approx. 40ml	approx. 70ml
Equilibration buffer	pH 5.28±0.02	pH 3.28±0.02

*Amino acid auto analyzer; Beckman amino acid analyzer M-116

**Resin; strong sulphonic acid cation exchanger

***Buffer; sodium citrate buffer

4. 세포농도와 건조중량

세포의 농도는 Spectrophotometer spectronic 20(BAUSH & LOMB)를 사용하여 파장 660nm에서 흡광도로써 세포농도를 구하였다.

건조중량은 3000rpm에서 30분간 원심분리하여 얻은 균체를 증류수로 4회 세척한 후 105°C에서 18시간 건조시킨 다음 측정하였다.

5. 아미노산의 조성, 함량 및 총 질소량의 분석

원심분리하여 얻은 균체의 농축액을 산가수분해한 후 Beckman amino acid analyser M-116에 의하여 아미노산의 조성과 함량을 분석하였다. Beckman amino acid analyser M-116을 사용시의 조건은 table 2와 같다. proline은 440nm에서 그 밖의 다른 아미노산은 570nm에서 분석하였다. 그리고 총 질소량은 microkjeldhal method에 의하여 실험하였고, Shimadzu UV200을 사용하여 410nm에서 측정하였다.

6. 온도조건과 메탄올의 농도

배양 온도는 25°C, 30°C, 35°C에서, 메탄올의 농도는 1%, 1.3%, 2%, 4%, 10%에서 배양하여 균체량을 비교하였다.

結果 및 考察

1. 분리 및 동정

꽃에서 채집한 200여 균주중 3종이 메탄올을 탄소원으로 하여 가장 잘 성장하였으며, Lodder (1970)의 문헌에 의한 형태적, 생리적 실험을 한 바 *Candida incommunis*, *Cryptococcus aerius*, *Hansenula ciferrii*로 동정되었고, 그들의 특성은 table 3에서 보는 바와 같다. 특히 Lodder (1970)의 "The Yeasts"에 의하면 *Hansenula ciferrii*는 희귀한 종으로서 그의 서식처가 분명하지 않은 것으로 알려졌다. Goichi 등 (1975)은 메탄올을 자화하는 효모가 7속 30종으로 보

Table 3. Characteristics of three species.

Species Character	<i>Candida incommunis</i>	<i>Cryptococcus aerius</i>	<i>Hansenula ciferrii</i>
Habitat	Flower	Flower	Flower
Shape of the cell	Ovoid	Elongate	Large elongate
Size of the cell	3.5×2.5 μm	2-3×4-5 μm	2-3×5-6 μm
Slide culture	Non pseudomycelium	Non pseudomycelium	Mycelium
Ascospore	Non	Non	Spore formation
Pigment of colony	Creamed color	Creamed color	Creamed color
Fermentation			
Glucose	+	-	--
Galactose	-	-	+
Sucrose	-	-	+
Maltose	-	-	-(w)
Lactose	-	-	-
Raffinose	-	-	+(1/3)
Assimilation			
Glucose	+	+	+
Galactose	+	+	+
Sucrose	+	+	+
Maltose	+	+	+
Lactose	-	+	+
Melibiose			-
Raffinose	+	+	+
Cellobiose			+(w)
Trehalose			+
L-Rhamnose			+(w)
Ethanol	-	-	+
Glycerol			+
D-Mannitol			+
Salicin			+
Soluble starch			+
D-Xylose			+(w)
L-Arabinose			+(w)
Citric acid			+
Inositol			-
KNO ₃	+	+	+
Growth of 37°C	+	+	+

Legend: +; positive fermentation or assimilation.

-; negative fermentation or assimilation.

w; weak fermentation or assimilation.

고하였으며, 그 외에 Cato 등 (1974)이 *Pichia methanolica* 와 *Hansenula ofunaensis* 를,

(1976)는 *Torulopsis nagoyaensis* 의 새로운 종을 발견하였다. 따라서 지금까지 메탄올을 자화

하는 효모는 *Saccharomyces*, *Hansenula*, *Pichia*, *Candida*, *Torulopsis*, *Kloeckera* 와 *Rhodotorula* 의 7속에 한정되어 있는 것으로 나타났다. 또한 본 실험에서 사용된 *Candida incommunis*, *Cryptococcus aerius*, *Hansenula ciferrii* 도 위의 7속에 속하며 전에 발견되지 않은 새로운 균주이다.

2. 건조중량과 성장곡선

단세포 단백질의 생산에서 높은 균체수율은 바람직하다(Cooney 등 1972). *Candida incommunis* 는 1.3%의 메탄올이 포함된 배지 1l에서 흡광도가 1.45로서 건조중량은 3.7g을 나타냈으며, 균체수율(g cell/g substrate)은 0.29, *Cryptococcus aerius*는 흡광도가 1.5로서 건조중량이 7g이며, 균체수율은 0.42이다. 효모의 최대 균체수율은 0.66(Kato K., 1974)으로 보고되어 있는데, *Cryptococcus aerius*의 균체수율은 0.54로 비교적 높은 편이다.

이들 균주의 성장곡선은 figure 2와 같다.

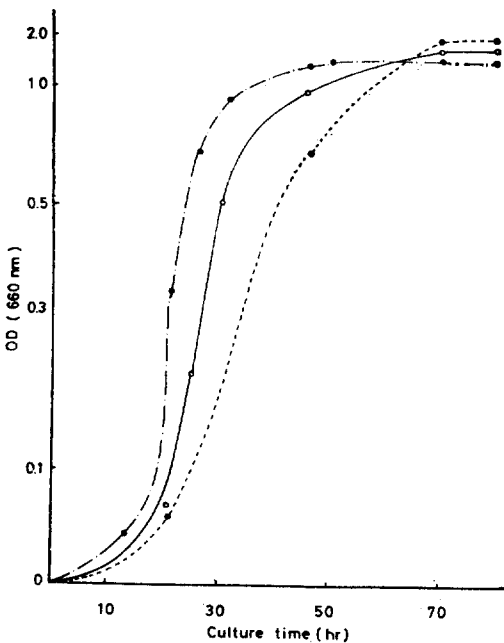


Fig. 2. Growth curve in batch culture. (for symbol to lines see the legend to Fig.1).

3. 아미노산의 조성, 함량 및 총 질소량의 분석

Beckman amino acid analyser M-116에 의하여 아미노산을 분석하였다. proline은 440nm

에서 측정하였으며, 그 밖의 다른 아미노산은 570nm에서 측정하였다. 분석결과는 *Candida incommunis*는 figure 3, *Hansenula ciferrii*는 figure 4, *Cryptococcus aerius*는 figure 5에서와 같이 함량의 차이는 다소 있으나 필수 아미노산이 전부 포함되어 있다. 그리고 총 아미노산은 table 4에서 보는 바와 같이 *Candida incommunis*가 42.5%, *Hansenula ciferrii*는 39.9%로서 Ogata 등 (1970. a)이 보고한 *Kloeckera sp.* No. 22의 39.9%에 비해 함량이 높고 *Crypto-*

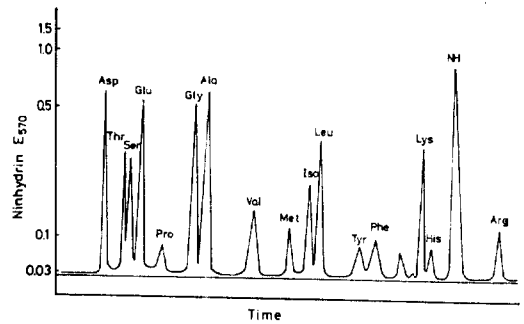


Fig. 3. Chromatogram of amino acids in *Candida incommunis*.

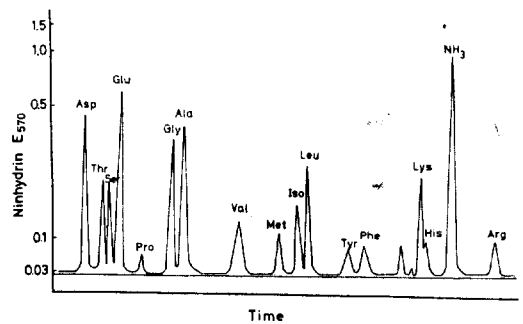


Fig. 4. Chromatogram of amino acids in *Cryptococcus aerius*.

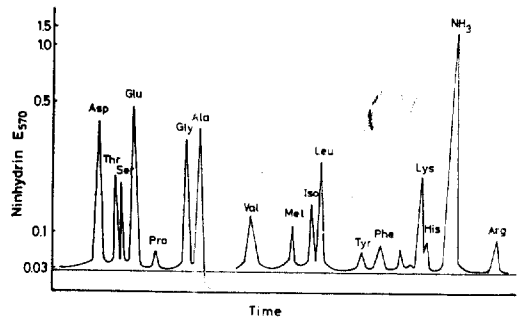


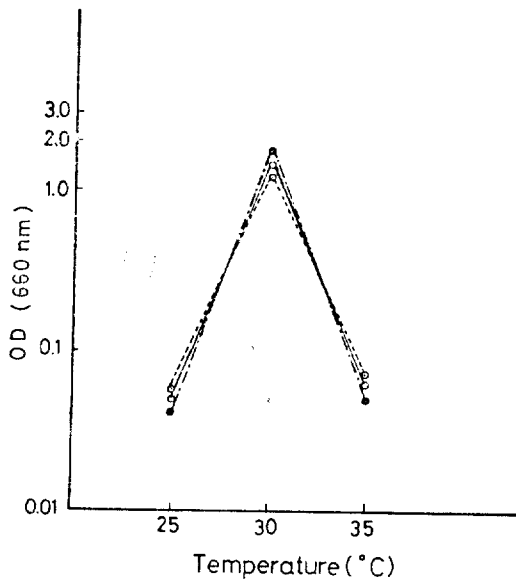
Fig. 5. Chromatogram of amino acids in *Hansenula ciferrii*.

Table 4. Amino acid composition of yeasts.

Amino acid(%)	FAO	<i>Candida incommunis</i>	<i>Cryptococcus aerius</i>	<i>Hansenula ciferrii</i>	<i>Kloeckera*</i> sp. No. 2201	<i>Candida** utilis</i>
Lysine	4.2	2.6	2.2	2.3	3.4	2.1
Histidine		0.8	0.8	0.9	1.8	1.0
Arginine		1.9	1.5	1.8	2.4	2.3
Aspartic acid		4.3	3.5	3.9	4.7	2.9
Threonine	2.8	2.5	1.8	2.2	2.3	2.0
Serine		1.9	1.5	1.6	2.3	1.8
Glutamic acid		6.3	7.7	7.6	3.5	4.8
Proline		1.7	1.3	1.5	1.4	1.1
Glycine		2.3	1.8	2.0	2.4	1.6
Alanine		4.8	3.4	4.2	3.1	2.5
Valine	4.2	2.7	2.3	2.8	2.4	2.1
Methionine	2.2	1.0	0.9	1.0	0.4	0.1
Isoleucine	4.2	1.9	1.2	1.8	2.3	2.0
Leucine	4.8	3.7	3.1	3.5	3.2	2.2
Tyrosine		1.8	1.4	1.3	1.5	1.3
Phenylalanine	2.8	2.2	1.8	1.5	1.8	0.1
Total		42.5	36.5	39.9	39.9	31.9

* *Kloeckera* sp. No. 2201; Ogata *et al.*, 1970a.

** *Candida utilis*; Ogata *et al.*, 1970b.



○—○ : *Candida incommunis*.

⊙--⊙ : *Cryptococcus aerius*.

●—● : *Hansenula ciferrii*.

Fig. 6. Effect of culture temperature on biomass yield. (for symbol to lines see legend to Fig. 1).

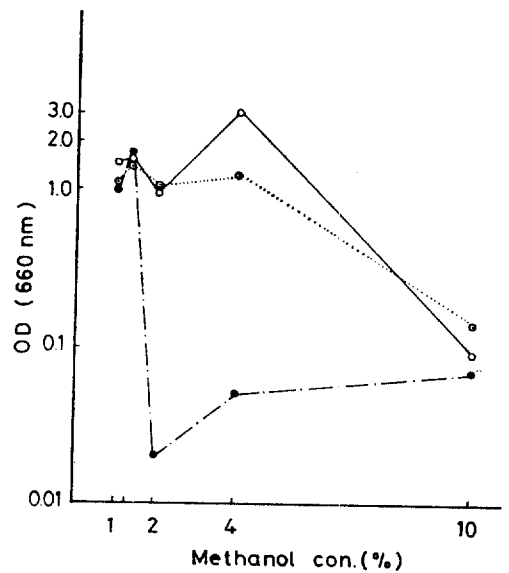


Fig. 7. Effect of methanol concentration on biomass yield. (for symbol to lines see the legend to Fig. 1).

*coccus aerius*는 36.5%로서 *Candida utilis*(Ogata 등, b)의 31.9%보다 높다. 그리고 곡류단백

질에 흔히 결핍되어 있는 lysine과 threonine의 필수 아미노산이 소맥분의 수준으로 들어있다.

총 질소량은 micro-kjeldhal method에 의해 측정하였으며, 그 결과 *Candida incommunis*는 31.4%, *Hansenula ciferrii*는 28.8%, *Cryptococcus aerius*는 27.1%로 나타났다.

4. 온도조건과 메탄올의 농도

대부분의 메탄올 자화효도는 20~30°C에서 자란다. 본 실험에서 사용한 균주 *Candida incommunis*, *Cryptococcus aerius*, *Hansenula ciferrii*의 최적 생장온도는 figure 6에서 보는 바와 같이 30°C임을 밝혔다. 메탄올은 본래 미생물의 생장에 유해물질이었으므로 낮은 농도에서 생장 속도, 균체수율이 높다. 그러나 Karalaht

(1973)등이 *Candida N-17*의 특수 생장율에 대한 메탄올의 효과에 관한 실험에서 메탄올농도 0.03%이하로 되었을 때 생장속도가 하락함을 보여주었다. 오히려 균체수율을 위해서는 메탄올의 농도가 낮은 것이 바람직하나 너무 낮아도 생장속도가 하락하므로 생장조건 중의 하나인 온도조건이 상보적으로 작용하여 30°C에서 1.3% 메탄올농도가 최적조건으로 형성된 것이 아닌가 하고 생각된다(Zobell, 1958; Van Niel, 1955). figure 7에서는 본 실험에서 사용된 3균주가 모두 1.3%의 메탄올이 최적농도임을 보여준다.

Blood agar에서 배양시킨 3종의 효모들은 모두 용혈현상이 나타나지 않음을 보아 일차적으로 병원성이 없는 것으로 검정하였다.

摘 要

1. 꽃에서 분리한 20여 균주에서 30종을 동정하였으며, 그 중 메탄올을 자화할 수 있는 균주는 23종이었으며, 가장 생장이 좋은 3종을 선별하였다.

그 3종은 *Candida incommunis*, *Cryptococcus aerius*, *Hansenula ciferrii*였다.

2. 위의 3종은 복합비타민과 yeast extract의 공급이 없이 탄소원으로 메탄올을 자화하여 증식하였으며, 메탄올을 이용하여 증식한 효모의 아미노산 조성을 검사한 결과 필수 아미노산이 모두 포함되어 있었다.

3. 총 아미노산의 함량이 *Candida incommunis*는 42.5%, *Hansenula ciferrii*는 39.9%로서 *Kloeckera sp.* No. 22 (Ogata 등 1910a)의 39.9%보다 높고, *Cryptococcus aerius*는 36.5%로서 *Candida utilis*(Ogata 등 1970b)의 31.9%보다 높다.

4. 곡류단백질에 흔히 결핍되어 있는 lysine과 threonine의 필수 아미노산이 이들 yeast에서는 소맥분의 수준으로 포함되어 있다.

5. 총 질소량 *Candida incommunis*가 31.4%, *Hansenula ciferrii*가 28.8%, *Cryptococcus aerius*가 27.1%로 나타났다.

6. 높은 균체수율을 위한 실험결과 메탄올의 농도 1.3%, 온도 30°C가 최적 생장조건으로 나타났다.

V. 引用文獻

- Asai, Y., N. Makiguchi, M. Shimada and Y. Kurimura, 1976. New species of methanol-assimilating yeasts. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **22**(4) : 197-214.
- Asthana, H., A.E. Humphrey and V. Moritz, 1971. Growth of yeast on methanol as the sole carbon substrate. *Biotechnol. Bioeng.*, **13** : 923-929.
- Barnett, J.A. and R.J. Pankhurst, 1974. A new key to the yeasts. North-Holland publishing Co., Amsterdam.
- Blagodatskaya, V.M., Z.S. Erofeeva and V.K. Eroshin, 1975. Requirments of growth factors of yeasts growing on methanol. *Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya.*, **12**(3) : 316-318.
- Chen, S.L. and H.J. Pepler, 1977. Single-cell proteins in food applications. *Develop. Indust. Microbiol.*, **19** : 79-94.
- Cooney, C. L. and D.W. Levine, 1972. Microbial utilization of methanol. *Advan. Appl. Microbiol.*, **15** : 337.
- Davis, M.G. and A.J. Thomas, 1973. An investigation of hydrolytic techniques for the amino

- acid analysis of foodstuffs. *J. Sci. Fd. Agric.*, **24**: 1525—1540.
- Fujii, T. and K. Tonomura, 1972. Oxidation of methanol, formaldehyde and formate by a *Candida* species. *Agr. Biol. Chem.*, **36**: 2997.
- Fujii, T., Y. Asada and K. Tonomura, 1975. Assimilation of methanol by *Candida* species N-16. Microbial Growth on C₁-compounds, Tokyo, Japan.
- Gerritsen, T., M.L. Rehberg and H.A. Weisman, 1965. On the determination of free amino acids in serum. *Anal. Biochem.*, **11**: 460—466.
- Gibbs, B.M. and D.A. Shapton, 1968. Identification methods for microbiologists. Part B. Academic press, London.
- Goichi, O., Y. Tani and N. Kato, 1975. Oxidation of methanol by yeasts. Microbial Growth on C₁-compounds, Tokyo, Japan.
- Goot, S., R. Okamoto, T. Kuwajima and A. Takamatsu, 1976. Growth characteristics of methanol assimilating yeasts on various substrates. *J. Ferment. Technol.*, **54**: 213.
- Hazeu, W., J.C. de Bruyn and P. Bos, 1972. Studies on methanol oxidizing. *Arch. Microbiol.*, **87**: 187.
- J.A. Barnett, 1977. The nutritional tests in yeast systematics. *J. Gen. Microbiol.*, **99**(1): 183.
- Kato, N., T. Tamaoki, Y. Tani and K. Ogata, 1972. Purification and characterization of formaldehyde dehydrogenase in methanol utilizing yeast, *Kloeckera* sp. No. 2201. *Agr. Biol. Chem.*, **36**: 2411.
- Kato, K., Y. Kurimura, N. Makiguchi and Y. Asai, 1974. Determination of methanol strongly assimilating yeasts. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **20**: 124—127.
- Levine, D.W. and C.L. Cooney, 1973. Isolation and characterization of a thermotolerant methanol utilizing yeasts. *Appl. Microbiol.*, **20**: 123—127.
- Lodder, J., 1970. The yeasts. North-Holland Publishing Co., Amsterdam.
- Muntis, M.Y., E. Cbrera and A.R. Navarro, 1976. An obligate osmophilic yeast from honey. *Appl. Environ. Microbiol.*, **32**(3): 320—323.
- Nesterov, A.I., Y.N. Mschenskii, V.F. Gal'chenko, B.B. Namsaraev and V.Y. Il'chenko, 1977. Comparative study of the growth parameters of methanotrophic bacteria. *Microbiol.*, **46**(1): 4—8.
- Ogata, K., H. Nishikawa and M. Ohsugi, 1969. A yeast capable of utilizing methanol. *Agr. Biol. Chem.*, **33**: 1519.
- Ogata, K., H. Nishikawa, M. Ohsugi and T. Tochikura, 1970a. Studies on the production of yeast. I. A yeast utilizing methanol as sole carbon source., *J. Ferment. Technol.*, **48**: 389.
- Ogata, K., H. Nishikawa, M. Ohsugi and T. Tochikura, 1970b. Studies on the production of yeast. II. The cultural conditions of methanol assimilating yeast, *Kloeckera* sp. No. 2201. *J. Ferment. Technol.*, **48**: 470.
- Oki, T., K. Kouno, A. Kitai and A. Ozaki, 1972. New yeasts capable of assimilating methanol. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **18**: 295.
- Patel, R.N. and A. Felix, 1976. Microbial oxidation of methane and methanol. *J. Bacteriol.* **128**(1): 413—424.
- Peel, D. and J.R. Quayle, 1961. Microbial growth on C₁-compounds. *Biochem. J.*, **81**: 465.
- Podgorskil, V.S. and V.N. Ivanov, 1975. Double substrate-oxygen limitation of the growth of methanol-oxidizing yeasts. *Appl. Biochem. Microbiol.*, **11**(3): 298.
- Pyun yoo-ryang and Tai-wan Kwon, 1971. Production of single-cell protein on petroleum hydrocarbon. III. On the growth of *Candida tropicalis* KIST 351. *Kor. J. Microbiol.*, **9**(3): 95—102.
- Rock J.S., A. Goldverg, A. Ben-Bassat and R.I. Mateles, 1976. Isolation and characterization of two methanol utilizing bacteria. *Agr. Biol. Chem.*, **40**(11): 2129—2135.
- Shkidehenko, A.N., 1976. Effect of carbon dioxide on growth of *Candida utilis* during continous chemostat cultivation. *Microbiol.*, **45**(1): 57—61.
- Tezuka, H., T. Nakahara, Y. Minoda and K. Yamada, 1975. Production of yeast cells from methanol. *Agri. Biol. Chem.*, **39**(1): 285—286.
- Van Niel, C.B., 1955. Natural selection in the microbial world. *J. Gen. Microbiol.*, **13**: 201—217.

- V.F. Gal'chenko, 1975. Use of silica gel in the isolation of pure cultures of obligate methane-oxidizing microorganisms. *Appl. Biochem. Microbiol.*, **2**(3) : 400.
- Womack, M., C.E. Bodwell and D.A. Vaughan, 1974. Estimation of changes in the availability of each individual essential amino acid in food proteins. *J. Fd. Sci.*, **39** : 490—493.
- Yokote, Y., M. Sugimoto and S. Abe, 1974. yeasts utilizing methanol as s sole carbon source. *J. Ferment Technol.*, **52** : 201.
- Zobell, C.E., 1958. Ecology of sulfate reducing bacteria. *Producers Monthly.*, **22**(7) : 12—29.