

# 微生物蛋白質을 生産하기 爲한 메탄을 資化酵母에 關한 研究

鄭 熙 鍾

全南大學校 農科大學 食品工學科  
(1986년 12월 10일 접수)

## Studies on a methanol-assimilating yeast for the production of Single Cell Protein

Hee-Jong Chung

Department of Food Science and Technology, College of Agriculture,  
Chonnam National University  
(Received December 10, 1986)

### Abstract

A methanol-assimilating yeast for the production of Single Cell Protein was isolated from the soil and identified. Methanol as a sole carbon source was used in this study. The strain was identified as *Candida boidinii* which grew best at the initial concentration of methanol at 2%, with the addition of 0.5% methanol at every 12 hours. The Single Cell Protein production was maximal after 72 hours of incubation at pH 5.0, 30°C. Thiamin and biotin were stimulated the growth of this yeast at the levels of 1000µg/ℓ and 10µg/ℓ, respectively.

### 序 論

근래 世界的으로 食糧供給이 人口增加를 凌駟하지 못하여 食糧危機가 머지않아 닥아올 것으로 내다보고 있으며 특히 蛋白質부족이 크게 문제되고 있다. 이러한 世界的인 食糧危機를 克服하기 위해서 다각적인 研究가 進行되어 왔으며 특히 飼料는 물론 食品으로서의 利用價値를 갖는 새로운 Protein Source의 開發에 큰 關心을 기울이게 되었다. 그 중 酵母나 細菌과 같은 微生物이 生産하는 protein 즉 Single Cell Protein(SCP)이 蛋白質 부족 해결책으로 劃期的인 可能性을 보였다. 그러나 SCP生産價의 40~50%를 차지하는 carbon source의 低廉貨가 先行되어야 했다.<sup>1)</sup> 이에 methanol이나 gas oil등이 값이 싸고 運搬과 貯藏이

便利하여 새로운 研究의 對象이 되고 있다. 特別 methanol은 물에 대한 溶解度가 높아서 細胞內로의 移動이 容易하여 微生物에 의한 利用이 손쉬운 長點이 있다.

이러한 SCP의 微生物學的 生産에 關한 研究는 Söhngen<sup>2)</sup>이 methan-oxidizing bacteria를 最初로 分離한 이후 그에 關한 研究가 계속되다가<sup>3~5)</sup> 最近에 이르러서는 Ogata<sup>6~8)</sup>등에 의한 研究를 最初로 methanol 資化酵母에 關한 研究가 활발하다.<sup>9~13)</sup> 그 이유는 酵母가 細菌보다 細胞의 크기가 커서 쉽게 回收할 수 있고 核酸에 대한 protein 含量比率이 큰 長點때문이다.

本 研究에서는 methanol을 炭素原으로 하여 SCP를 生産하기 위하여 自然界로부터 分離·同定한 methanol 資化酵母의 特性에 對하여 보고하

고자 한다.

## 材料 및 方法

### 1. 材 料

#### 1) 酵母의 分離

全南大學 주변과 전남 광산군 하남면 장수리 일대의 soil과 sewage 등으로 부터 53 Samples을採取하여 test tube(직경 16.5mm)에 각각 分離用培地 5ml를 분注한 다음 여기에 採集한 試料 1g 정도씩을 添加한 Slurry를 만들어 29℃에서 7일간 진탕배양(왕복 진탕기 120 strokes/min)하였다.

일주일 후 다시 새로운 分離用培地에 현탁액 1白金耳量을 接種하고 그후는 3일 간격으로 5회 반복 培養한 다음 YM agar培地에 平板培養하였다. 여기서 얻어진 短粹한 colony를 斜面培地에 옮겨 4℃에 保管하였다. 分離된 酵母는 다시 methanol 액체배지에서 資化性を 확인하여 資化能이 우수한 菌株를 本實驗에 사용하였다.

#### 2) 基本培地

本實驗에 사용한 基本培地의 組成은 表1과 같다. 단 分離時에 細菌의 增殖을 抑制하기 위해 pH 4.4로 調節하고 chloramphenicol(80mg/l)을 添加하였다.

### 2. 方 法

#### 1) 培 養

培養은 250ml 삼각flask(培地50ml)에서 행하였으며 특별히 언급된 이외에는 表1의 基本培地를 사용하였고 29℃에서 진탕배양하였다.(表1)

Table 1. Composition of the basal medium\*

Component	Amount(%)
Methanol	2.0
NH <sub>4</sub> Cl	0.4
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.05
Yeast extract	0.05

\*Dissolved in 1000ml distilled water and adjusted to the final pH at 5.0.

#### 2) 生育度의 測定

生育度는 Spectronic 20 Spectrophotometer를 사용하여 absorbance(550nm)를 測定했고 本實驗에서는 同상 培養液을 10倍 稀釋해서 測定하였다.

#### 3) 菌株의 同定

分離한 酵母의 分類學的 同定은 Lodder<sup>14)</sup>와 Barnett & Pankhurst<sup>15)</sup>에 依據하여 行하였다. 酵母의 醱酵性和 nitrate 資化性은 자기 Durham 法과 Liquid medium 法을 採擇하여 調査하였다.

#### 4) 메탄을 濃度에 따른 生育度 調査

Methanol濃度가 酵母의 生育에 미치는 影響을 調査하기 위하여 接種時 1~5%의 methanol을 添加하였을 때의 生育도와 接種時 1~2%, 培養中 0.5~1.0%의 methanol을 週期的으로 添加하였을 때의 生育度を 자기 調査하였다.

#### 5) Vitamin 要求性

本菌株의 vitamin要求性を 調査하기 爲하여 基本培地에서 yeast extract를 除外한 vitamin-free培地에 thiamine, nicotinic acid, pyridoxine Ca-Pantothenate는 각각 1000μg/l, p-aminobenzoic acid는 200μg/l, folic acid와 biotin은 각각 10μg/l를 添加하여 培養한 後 그 生育度を 測定하였다.

## 結果 및 考察

### 1. 菌株의 分類學的 性質

本實驗에서 分離한 70여 strain의 酵母中 methanol 資化能이 가장 優秀한 Strain에 대하여 그 分類學的 性質을 檢討한 結果는 다음과 같다.

#### A. 形態學的 性質

2% glucose-yeast extract-peptone water와 2% glucose-yeast extract-peptone agar培地에 28℃에서 72時間 培養했을 때 細胞의 形態는 대개 long-ovoid, cylindrical型이었다. 크기는 1.2~4.8×6.0~10.8μ 程度이며 2.4~3.6×7.2~8.4μ가 大部分이었다. 液體培地에서는 2日 培養後부터 얇은 pellicle을 形成하였고 灰白色의 sediment를 形成하였다. 固體培地에서의 colony形態는 circular, convex이며 entire한 edge를 갖는다.

表面은 가장자리가 smooth하고 약간 glistening했으나 中心部分은 약간 rough했다.

18℃에서 4週間 保管後의 colony形態는 entire 했던 edge가 약간 undulate한 形態로 變化되었고 表面도 약간 더 rough해졌다. 다극 출아에 의해 增殖되며 菌絲와 위菌絲의 形成有無는 corn meal agar培地를 利用하여 Slide Culture法과 Dalmau plate 培養法으로 調査하였는데 마치 나무가지 모양의 수많은 blastospore chain을 갖는 pseudo-mycelium을 形成하였다.

子囊孢子의 形成은 Carrot Wedge法과 modified Gorodkova agar培地를 利用하여 4~6週間 培養 하면서 1週日마다 5% malachite green液과 0.5% Safranin 染色法에 의해 調査하였으나 孢子의 形成은 보이지 않았다.

培地의 種類에 따른 增殖法과 形態의 變化를 調査한 結果 methanol 培地에서 다극출아증식이 현저하였고 cell 形態도 2% glucose-yeast extract-peptone water나 YM broth에 比하여 훨씬 round한 形態임을 알 수 있었다.

以上の 形態學的 性質을 要約하면 表2와 같다.

#### B. 生理學的 性質

Lodder<sup>14)</sup>의 方法에 準하여 本 菌株에 대한 生理學的 諸性質을 檢討한 結果는 表3과 같다.

#### C. 最適 pH와 最適溫度

本 菌株의 生育에 미치는 pH를 調査하기 爲하여 表1의 基本培地를 묽은 NaOH와 HCl로 각각 pH를 調整하고 29℃에서 72시간 진탕 배양한 結

Table 2. Morphological properties of the isolated strain

Characteristics of vegetative reproduction		
a) Multipolar budding		
b) Pseudomycelium formation		positive
Shape and Size of cell		
long-ovoid, cylindrical		
2.4~3.6×7.2~8.4μ		
Ascospore formation		negative
Ballistospore formation		negative
Macromorphological characteristics		
Shape	circular, convex, entire	
Color	greyish white	
Surface	smooth(rough in center)	

Table 3. Physiological properties of the isolated strain

Pellicle formation		positive
Sediment formation		positive
Fermentation		positive
glucose		
Assimilation		positive
glucose	xylose	
ethanol	glycerol	
erythritol	ribitol	
mannitol	sorbitol	
lactic acid(W)	succinic acid(W)	
sorbose(SW)	glucono-lactone(SW)	
Growth in vitamin-free medium		weak

W=weak, SW=slow and weak

果 pH2와 9에서는 전혀 生育하지 않았고 最適pH는 5.0이었다.(그림1)

또 溫度는 基本 培地를 그대로 利用하여 각 溫度에서 72시간 진탕 배양한 結果 生育溫度는 4~36℃였고 最適溫度는 28~30℃였다.(그림2)

D. 菌株의 同定

本 菌의 分類學的 性質을 Lodder<sup>14)</sup>에 準하여 檢索한 結果 孢子形成을 하지 않았기 때문에 無孢子 酵母인 *Cryptococceae* family로 單정되었고 그들중 菌絲는 形成하지 않고 菌絲만을 形成하기 때문에 *Candidoidae* Subfamily로 單정되었다.

또 Genus 檢索法에 따라 檢討한 結果 다극성 출아증식을 행하는 점, colony의 差色이 없는 것으로 보아 carotinoid性 色素를 形成하지 않는 점

등으로 미루어 *Candida*속으로 單정하였고 Lodder<sup>14)</sup>와, Barnett & Pankhurst<sup>15)</sup>에 依據하여 檢索한 結果 maltose와 cellobiose를 資化하지 않고 erythritol과 nitrate를 資化하는 점, glucose만을 醱酵하는 점 등으로 미루어 本 菌을 *Candida boidinii*라 同定하였다.

本 實驗의 結果와 Lodder<sup>14)</sup>의 分類의 諸 性質을 比較하면 表4,5와 같다.

形態의인 特徵을 比較한 結果 本 實驗에서는 pellicle을 弱하게 形成한 點과 크기에 있어서 약간의 差異를 보였다.

本 實驗에서 調査하지 못한 D-arabinose, D-ribose, Ca-2-Ketogluconate, K-5-Ketogluconate이외의 生理的인 特徵을 比較한 結果 L-sorbose

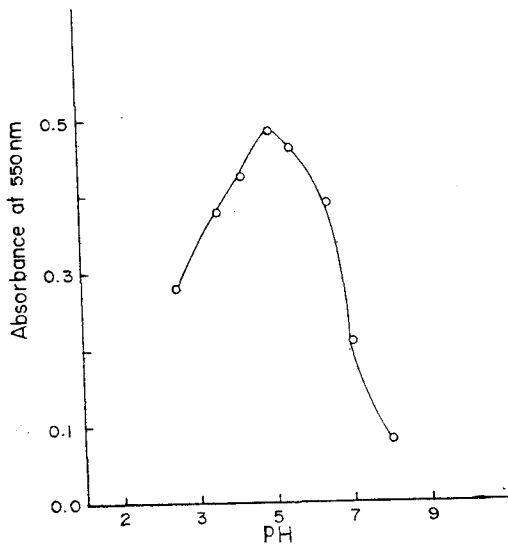


Fig. 1. Effect of pH on the growth of the the isolated strain.

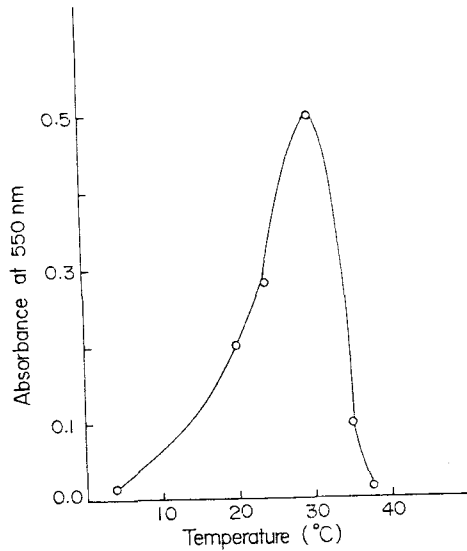


Fig. 2. Effect of temperature on the growth of the isolated stain.

Table 4. Comparison of the isolate with *C. boidinii*(standard description) in morphological characteristics

Species	Shape	Size	Ring	Pellicle	Pseudomycelium	Sediment
Isolate	long-ovoid cylindrical	1.2~4.8× 6.0~10.8μ	-	+(w)	+	+
<i>C. boidinii</i>	long-ovoid cylindrical	1.5~3.5× 7.0~12.0μ	-	+	+	+

W=weak

Table 5. Comparison of the Isolate with *C. boidinii*(standard description) in physiological characteristics

Carbon compounds	Species			
	Isolate		<i>C. boidinii</i>	
	F	A	F	A
Glucose	+	+	+	+
Galactose	-	-	-	-
Maltose	-	-	-	-
Sucrose	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-
Raffinose	-	-	-	-
L-sorbose		+(SW)		-
Cellobiose		-		-
Trehalose		-		-
Melibiose		-		-
Inulin		-		-
Soluble-starch		-		-
D-xylose		+		+
L-arabinose		-		-or +
D-arabinose		*		-
D-ribose		*		+
L-rhamnose		-		-
Ethanol		+		+
Glycerol		+		+
Erythritol		+		+
Ribitol		+		+
Galactitol		-		-
D-mannitol		+		+
D-glucitol		+		+
$\alpha$ -methyl-D-glucoside		-		-
Salicin		-		-
Glucono- $\beta$ -lactone		+(SW)		*
Ca-2-ketogluconate		*		*
K-5-ketogluconate		*		*
DL-lactic acid		+(W)		+(W)
Succinic acid		+(W)		-
Citric acid		-		-
Inositol		-		-
Nitrate		+		+

F=fermentation, A=assimilation, +=positive, -=negative,

\* =not tested, W=weak, SW=slow and weak.

(SW)와 Succinic acid(W)를 資化하는 點이 달랐는데 *Candida beidinii*의 Succinic acid 資化性에 대해서는 Lee와 Komagata<sup>19)</sup>에 의해 弱하게 資化함이 이미 밝혀진 바있다. 다만 L-Sobose를 아주 느리고 弱하게 資化하는 特性만이 달랐다.

以上の 實驗 結果로 미루어 *Candida*屬과 一致하였고, L-Sorbose(SW)를 資化하는 點만의 差異를 보였으나 *Candida*屬中 nitrate positive인 다른 여러 種들과 比較한 結果 生理的인 特性이 아주 달랐기 때문에 本 菌株을 *C. boidinii*라 同定하였다.

2. 메탄올 濃도에 따른 菌의 生育度

本 菌株에 대한 1~5%의 各 methanol 濃度에서의 生育度を 調査한 結果 2%일때 가장 生育이 좋았고 1%일때 보다 3%일때 오히려 더 좋은 生育을 보였으며 5%에서는 生育이 상당히 抑制됨을 알 수 있었다.(그림3)

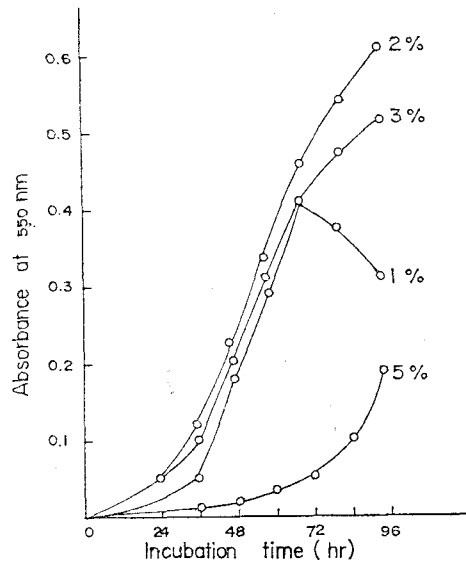


Fig. 3. Effect of methanol concentration on the growth of the isolated strain.

Table 6. Effect of the additional feeding of methanol on the growth of the isolated strain

Initial concentration	Levels of additional methanol (%)							
	Incubation time(hr)							
	0	24	36	48	60	72	84	96
1%	—	—	—	—	—	—	—	—
1%	—	—	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	—
1%	—	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	—
1%	—	0.5	0.5	1.0	1.0	1.0	1.0	—
1%	—	0.5	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	—
2%	—	—	—	—	—	—	—	—
2%	—	—	—	0.5	0.5	0.5	0.5	—
2%	—	—	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	—
2%	—	0.2	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	—
Initial concentration	Growth(Absorbance at 550nm)							
	Incubation time(hr)							
	0	24	36	48	60	72	84	96
1%	0.001	0.010	0.060	0.210	0.360	0.440	0.410	0.385
1%	0.001	0.013	0.052	0.181	0.310	0.422	0.481	0.532
1%	0.001	0.011	0.091	0.233	0.341	0.432	0.483	0.551
1%	0.001	0.010	0.066	0.194	0.297	0.403	0.440	0.550
1%	0.001	0.021	0.133	0.265	0.310	0.354	0.412	0.434
2%	0.001	0.020	0.153	0.282	0.394	0.490	0.558	0.641
2%	0.001	0.013	0.065	0.192	0.333	0.441	0.503	0.594
2%	0.001	0.021	0.121	0.273	0.422	0.563	0.633	0.685
2%	0.001	0.013	0.056	0.184	0.263	0.365	0.424	0.503

이때 Pouring method에 의해 24時間마다 生菌數를 調査한 結果 72時間 培養했을때  $3.86 \times 10^8$ 의 菌體數로 最大의 生育을 보였으며 96時間 後에는  $3.64 \times 10^8$ 개로 減少하기 시작하였으나 吸光度는 계속 增加함을 알 수 있었다.

또 接種時 1~2%의 濃度에서 培養中 24時間 後부터 0.5~1%의 methanol을 각기 다르게 添加했을 때 菌의 生育은 全般的으로 添加하지 않는 경우에 비해 훨씬 좋았으며 특히 最初 2%濃度에서 36時間 後부터 0.5%씩 methanol을 添加했을 때 가장 生育이 좋았다.(表6)

### 3. Vitamin 要求性

Vitamin-free 培地에서 弱하게 生育하는 生理的인 特性을 가진 本 菌株에 대한 각 vitamin要求性を 調査하여 表7과 같은 結果를 얻었다. 즉 本 菌은 thiamine과 biotin을 각각  $1000 \mu\text{g}/\ell$ ,  $10 \mu/\ell$  添加하였을 때 生育이 促進되었다.(表7)

### 4. 最適 生育條件에서의 菌體增殖

以上の 實驗 結果, 調査된 最適 條件 즉 pH 5.0, 溫度 29℃, methanol 2%濃度 등의 基本 培地에서 72時間 진탕 培養했을 때의 菌體量은 0.268 g/100ml였다. 이는 Ogata<sup>9)</sup> 등이 *Kloeckera* sp. No.2201을 96時間 培養하여 얻은 1% methanol 濃度에서 0.225g/100ml, 3%에서 0.460g/100ml의 菌體量과 比較할 때 生産량이 낮으나 培養時間이

짧아 單位時間에 보다 많은 量의 SCP生産이 가능하고 低濃度の methanol에서 生育이 잘 되기 때문에 生産原價가 低廉한 經濟性을 지닌 것이 本 酵母의 長點이라 하겠다. 다만 生産收率을 增加시키기 爲한 研究과 菌體成分 分析에 의한 protein, 核酸 등의 含量에 關한 檢討가 계속되어야 한다.

## 要 約

Methanol을 利用하여 Single Cell Protein(SCP)을 生産하기 위한 基礎研究로서 自然界에서 methanol資化酵母를 分離·同定하고 培養條件을 調査한 結果는 다음과 같다.

1. 本 methanol 資化酵母는 *Candida boidinii*로 同定되었고
2. 本 資化酵母의 最適 pH는 5.0이고 最適溫度는 28~30℃이었다.
3. 本 資化酵母는 最初 methanol濃度 2%의 培地에서 培養하면서 培養 36時間 後부터 每 12時間마다 0.5%의 methanol을 添加한 배지에서 가장 왕성한 生育을 보였다.
4. Thiamine( $1000 \mu\text{g}/\ell$ )과 biotin( $10 \mu\text{g}/\ell$ )을 添加했을 때 生育이 促進되었다.
5. 最適 生育條件에서 0.268g/100ml의 菌體量을 얻을 수 있었다.

## 參 考 文 獻

1. Wang, D.I.C.: *Chem. Eng.*, **26**(17), 99 (1968).
2. Söhngen, N.L., Zentralbl. Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten: *Hyg. Abt.*, **215**, 513 (1906).
3. Bassalik, K.: *Jahrb. Wiss. Bot.*, **53**, 287 (1914).
4. Dworkin, M and Foster, J.W.: *J. Bacteriol.*, **72**, 646 (1956).
5. Cooney, C.L and D.W. Irvine.: *Adv. Appl. Microbiol.*, **15**, 337 (1972).
6. Ogata, K., Nishikawa, H and Ohsugi, M.: *Agri. Biol. Chem.*, **23**, 1519 (1969).
7. Ogata, K., Nishikawa, H., Ohsugi, M. and

Table 7. Vitamin requirement for growth

Vitamin( $\mu\text{g}$ )		Growth*
Thiamine-HCl	(1.000)	0.185
Nicotinic acid	(1.000)	0.018
Pryidoxine-HCl	(1.000)	0.015
Ca-pantothenate	(1.000)	0.018
P-aminobenzoic acid	(200)	0.013
Folic acid	(10)	0.016
Biotin	(10)	0.225
Thiamine+Biotin		0.292
Vitamin free		0.021
Basal medium		0.485

\*Absorbance at 550nm

- Tochikura, T.: *J. Ferment. Technol.*, **48**, 389 (1970).
8. Ogata, K., Nishikawa, H., Ohsugi, M. and Tochikura, T.: *J. Ferment. Technol.*, **48**, 470 (1970).
9. Asthana, H., Humphrey, A.E and Moritz, V.: *Biotechnol. Bioeng.*, **13**, 923 (1971).
10. Oki, T., Kouno, K., Kitai, A and Ozaki, A.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **18**, 295 (1972).
11. Levine, D.W and C.L. Coony.: *Appl. Microbiol.*, **26**, 982 (1973).
12. Minami, K., Yamamura, M., Shimizu, S., Ogawa, K and Sekine, N.: *J. Ferment. Technol.*, **56**, 1 (1978).
13. Lee, J.D and Komagata, K.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **26**, 133 (1980).
14. Lodder, J.(ed).: *The yeast. a. Taxonomic study*, North Holland Publishing Co., Amsterdam (1970).
15. Barnett, J.A and R.J. Pankhurst.: *A new key to the yeast*. North Holland publishing Co., Amsterdam (1974).
16. Lee, J.D and K. Komagata, J.J.: *J. Sytematic. Bacteriol.*, **30**, 154 (1979).