

메탄올 자화성 *Candida boidinii* YF-3의 분리와  
단세포 단백질(SCP)의 생산

李啓瑚 · 裴星美

서울대학교 農科大學 食品工學科

Isolation of Methanol-assimilating *Candida boidinii* YF-3  
and Production of Single Cell Protein

Ke-Ho Lee and Sung-Mee Bae

Department of Food Science and Technology, Seoul National University, Suwon

Abstract

A large number of methanol-assimilating yeasts and bacteria were isolated from samples of soil, sewage, decomposed milk and spoiled sweet-radish pickles. Among the yeasts, one strain was selected and identified as a strain of *Candida boidinii*. In 1% (v/v) methanol *Candida boidinii* YF-3 grew well and could grow in as much as 5%. This yeast required biotin for growth. Maximum growth was observed at 30°C and pH 6 in a semisynthetic medium. The productivity was 2.72g of dry cells per liter in batch culture with 1%(v/v) methanol and the cell yield for methanol was 0.39 gg<sup>-1</sup>. The specific growth rate was 0.11 h<sup>-1</sup> and the generation time was 6.4 hours. The protein content of the cell was 45.5% and total nucleic acid content was 5.9%. The amino acid profile was as good as FAO standard for food protein.

서 론

메탄올을 에너지 및 탄소원의 발효기질로 하여 단세포 단백질(SCP)과 항생물질, 조효소, 아미노산등을 발효생산<sup>(5,20)</sup>하고자 메탄올 자화성효모의 연구는 Ogata<sup>(15-17)</sup>등에 의하여 많은 균주가 분리되었고 SCP 생산연구로<sup>(7,19,21-24)</sup> 이루어졌다. SCP생산에는 효모가 세균에 비하여 핵산함량이 낮고 균체회수가 쉬우며 식품화기질로서<sup>(5)</sup>보다 우수한 점이 있다.

본연구는 단무지로부터 메탄올 자화성이 우수한 효모를 분리, 동정하고 균체단백질 생산을 위한 배양공학 적 최적조건을 확인하고 단세포단백질로서의 영양학적 가치를 검토하였다.

재료 및 방법

균주의 분리

토양, 호수, 개천, 연못, 부패우유, 시판 단무지에서 채집한 80점의 시료로부터 enrichment technique에 의해 메탄올 자화성균주를 분리하였다. 분리, 배양의 배지조성은 Table1과 같다.

5ml의 분리용배지에 시료 1g을 접종하여 30°C에서 5일간 시험관으로 진탕배양(120 stock/min)하였다. 단

Table 1. Composition of media for screening and cultivation

Screening Medium		Growth Medium	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3.0 g	NH <sub>4</sub> Cl	4.0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4.0 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.0 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.4 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.0 g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	20.0 mg	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.04 g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	20.0 mg	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.3 mg
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	5.0 mg	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.12 mg
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	2.0 mg	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.07 mg
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.5 mg	MnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.08 mg
Yeast extract	0.1 g	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.4 mg
Vitamin solution*	1.0 ml	Yeast extract	0.5 g
Methanol**	10.0 ml	Methanol**	10.0 ml
Distilled water	1.0 L	Distilled water	1.0 L
pH	4.5-6.0	pH	6.0

\*Contained thiamine-HCl 10mg, riboflavin 500mg, kpyridoxin HCl 100mg, Ca-pantothenate 100mg, folic acid 10 mg and biotin 10 mg in 1L.

\*\*Methanol was added without sterilization after autoclaving other components.

무지의 경우에는 공기중에서 4~7일간, 방치한 후에 시료로 사용하였다. 배양액을 신선한 배지로 옮겨 진

탕배양하는 조작을 5번 반복하고 pour plate법으로 메탄올 한천배지(분리용배지에 2%의 한천 첨가)에서 정지배양 하면서 생성된 집락중 증식속도가 빠르고 집락의 크기가 큰 균주를 1차 screening으로 선발하고 평판도말법으로 순수분리하였고 메탄올 한천배지에서 보존하였다.

분리된 균주 중에서 효모를 30°C에서 4일간 500ml용 진탕플라스크 배양하여 증식속도가 빠르고 균체생산량이 많은 것을 우수한 균주로 선정하는 2차 screening을 하였다.

#### 분리 효모의 동정

분리된 효모는 Lodder<sup>(9,10)</sup>등과 Barnett<sup>(2,3)</sup>의 방법으로 동정하였다.

#### 배양공학적 조건 확인

균체의 생육실험으로 500ml용 삼각 플라스크를 사용하여 왕복진탕기로(120 strokes/min) 30°C에서 진탕배양하면서 확인하였다.

5l 발효조(New Brunswick, Jar, Fermentor)에서의 배양은 초기 pH6.0, 30°C, 교반속도는 200rpm, 통기속도는 2.5v. v. m으로 하였다. 플라스크 및 발효조 배양시 배지로는 증식용배지(Table 1)를 사용하였다. 메탄올 농도는 배지의 1% (v/v)로 첨가하고 종균 접종량은 5~10%로 하였다. 균체수율은 소비된 메탄올량에 대한 생산된 건조균체량으로 표시하였다. (g/g)

#### 분석방법

균체의 생육도는 510 nm에서 배양액의 흡광도를 측정하였고, 건조균체량은 원심분리후 세척한 균체를 105°C에서 20시간 건조후 칭량비교하였다.

배지중의 잔존 메탄올량은 Fleck<sup>(13)</sup>법으로 분석하고 균체의 일반성분은 상법<sup>(6)</sup>에 의하여 분석하였다.

DNA는 Burton법<sup>(4)</sup>으로 정량하고 아미노산은 아미노산 자동분석기에 의하여 분석<sup>(16)</sup>하였다.

### 결과 및 고찰

#### 메탄올 자화성효모의 분리

수집시료 80점으로 부터 메탄올 자화성 효모74주와 세균52주를 분리하였다. 분리된 효모중 2차 screening한 결과 가장 우수한 균주는 단무지에서 분리선정한 YF-3 strain으로 본실험에 사용하였다.

#### 분리균주 YF-3의 동정

분리선정한 YF-3균주에 대한 형태학적 배양학적 특성을 조사한 결과는 Table 2에서, 생리학적 특성은 Table 3에서, 탄소원별 발효능은 Table 4에서, 탄소원별 자화능은 Table 5와 같다. YF-3균주는 다극출아성이었고 자낭포자, 동포자, 사출포자, 유절포자를 생성하지 않아 무포자 효모로 분류하였다. 영양세포의 형태는 긴 타원형 또는 원통형이며 기균사를 잘 형성하였는데 슬라이드 배양과 메탄올 배양에서 더욱 현저하였다. 당 발효능은 포도당에 한정되었고 카로티노이드

**Table 2. Morphological and cultural characteristics**

#### Morphology of cell

Long-ovoid of cylindrical, 2.5-5.5×6.3-13μm, reproduction by multipolar budding, pseudomycelium formation, no spore formation

#### Growth on YM agar

Abundant growth, unbonate colonies, filiform(streak culture), soft, delicately wrinkled, cretaceous, creamy white

#### Growth in YM broth

Abundant growth, ring and thin pellicle\*, strongly turbid, compact sediment

\* Pellicle was not formed or formed very thin pellicle in malt extract medium.

**Table 3. Physiological characteristics**

Formation of carotenoid pigments	-
Liquefaction of gelatin	-
Splitting of arbutin	-
Production of starch-like compounds	-
Production of acetic acid	-
Assimilation of potassium nitrate	+
Assimilation of ethanol	+
Hydrolysis of urea	-
Growth in 5% glucose and 10% NaCl	-
NaCl tolerance	7%
Growth on 50% glucose	-
Growth on 60% glucose	-
Growth in vitamin-free medium	week
Vitamin stimulating growth	biotin
Growth at 37°C	-
Optimum temperature for growth	30°C
Optimum PH for growth	6
Fermentation of carbon compounds	glucose
Assimilation of carbon compounds	(Table 5.)

**Table 4. Fermentation of carbon compounds**

Glucose	+	Melibiose	-
D-Galactose	-	Cellobiose	-
L-Sorbose	-	Lactose	-
$\alpha$ -Methyl-D-Glucoside	-	Raffinose	-
Sucrose	-	Inulin	-
Maltose	-	Soluble starch	-

**Table 5. Assimilation of carbon compounds**

Glucose	+	Ethanol	+
D-Galactose	-	Methanol	+
L-Sorbose	-	n-Propanol	-
$\alpha$ -Methyl-D-glucoside	-	iso-Propanol	-
Salicin	-	n-Butanol	W*
Arbutin	-	iso-Butanol	-
Sucrose	-	Glycerol	+
Maltose	-	Erythritol	+
Melibiose	-	Ribitol	+
Cellobiose	-	D-Glucitol	+
Lactose	-	D-Mannitol	+
Raffinose	-	Succinate	+
Inulin	-	DL-Lactate	+
Soluble starch	-	Citrate	-
D-Xylose	+	K-Acetate	+
L-Arabinose	+	Formate	-
D-Ribose	+	Formalin	-
L-Rhamnose	-	Dichloromethane	-

\*W: Weak growth in 0.5% n-Butanol

색소는 생산하지 않았으며 액체배양시 얇은 피막을 형성하였다. 생육인자로서 biotin을 요구하며 C1화합물외에 포도당을 이용할 수 있는 facultative methylotroph 이었다.

Lodder<sup>(10,11)</sup> 등의 분류기준에 따르면 YF-3은 *Candida boidinii*와 거의 일치하였으나 호박산 자화능이 있고 염분저항력이 7%로 분류기준에서의 균주보다 낮았다는 점이 달랐다. 그러나 Barnett<sup>(9)</sup>의 분류기준으로는 호박산자화능도 있어 *Candida boidinii*와 같은 특성이었다. 따라서 위와같은 분류학적 특성을 고찰하여 YF-3균주를 *Candida boidinii*로 동정할 수 있었다.

*Candida boidinii* YF-3의 생육 특성

1. 초기 pH의 영향

증식용 배지의 pH를 각각 달라하여 30°C에서 40시간

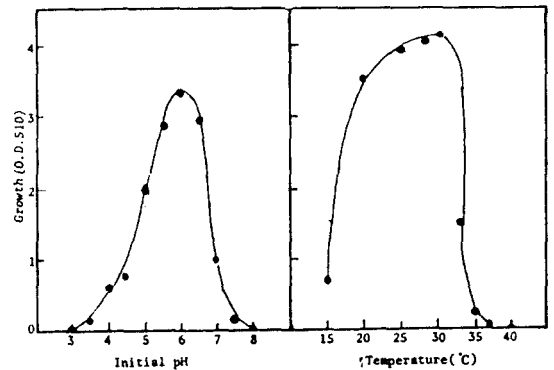
동안 진탕배양한 결과는 Fig1과 같이 YF-3의 생육 pH범위는 4~7이었고, 최적 pH는 6.0이었다.

2. 배양온도의 영향.

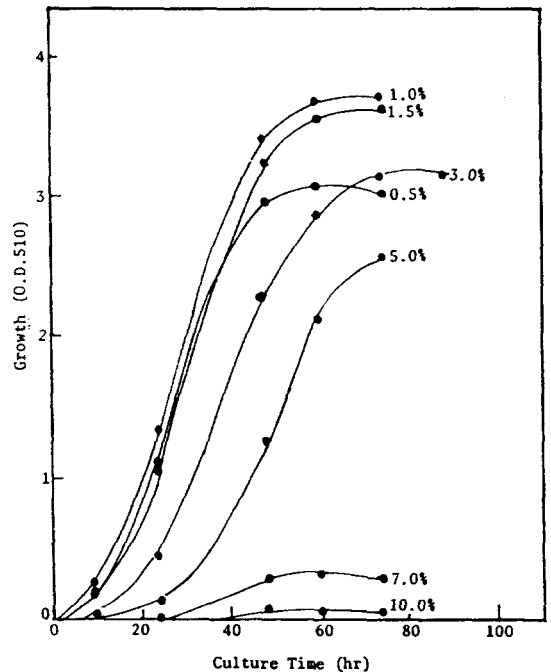
여러 온도에서 48시간 동안 진탕배양한 결과 YF-3의 생육온도는 15~34°C 이었고, 최적 온도는 30°C였다.

3. 메탄올 농도의 영향.

배양 초기의 메탄올 농도가 1% (v/v)일때 생육도가 가장 높았으며 5%에서도 잘 자랐다. (Fig 2) 0.5~1%



**Fig. 1. Effect of pH and Temperature on the growth of *Candida boidinii* YF-3**



**Fig. 2. Effect of methanol concentration on the growth of *Candida boidinii* YF-3. Shaking culture was carried out the pH 6, 30°C**

이상에서 생육이 저해된다는 다수의 보고(1,8,14,23)가 있었으나 생육이 가능하였음은 흥미있는 결과이었고, Mimura등(1,15)의 결과와 비슷한 경향이었다.

4. 탄소원 종류에 따른 영향.

여러 알코올을 탄소원으로 하여 시험한 결과는 Fig3에서와 같이 에탄올에서 가장 좋은 생육상태를 보였는데, Sahn등(16)등의 결과와 일치하였다.

5. 비타민 요구성

YF-3은 생육인자로서 biotin을 요구하였다(Table 6) 메탄올배지에서 biotin과 유기영양원을 비교한 결과는 Fig. 4와 같이 효모추출물을 첨가했을때 생육이 빨랐다. 그런데 비타민을 전혀 첨가하지 않은 경우에 Table 6의 배지에서는 미약하나마 생육했으나 메탄올배지에서는 전혀 생육하지 않았다. thiamin은 생육에 영향을 주지 않았지만 biotin과 함께 첨가되었을때 biotin만 첨가한 경우보다도 생육도가 높았다.

6. 질소원의 영향

YF-3은 암모늄염, 질산염, 아질산염, 유기질소원, 요소, 아미노산을 이용할 수 있었다. 특히 글루탐산의 영향이 컸었다. 암모늄염으로는 NH<sub>4</sub>Cl에서 생육이 좋았으며(Fig. -5) 아질산염에서는 생육도가 낮았다.

금속이온의 영향

Mg이온의 영향이 가장 컸으며 증식용 배지의 조성

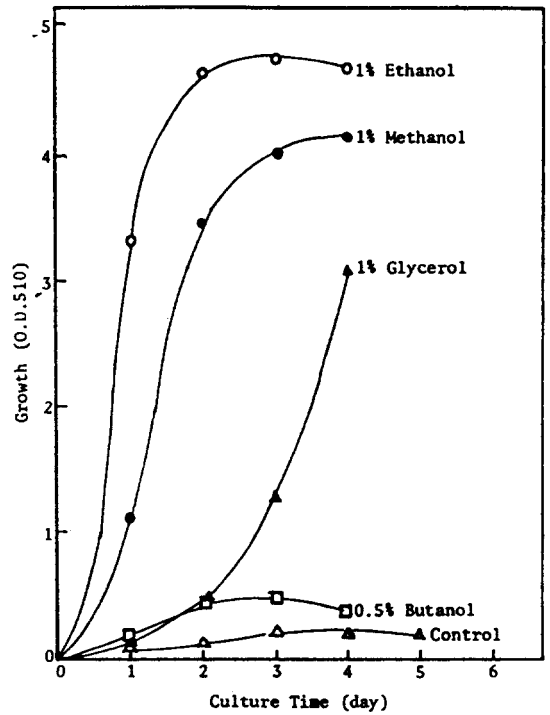
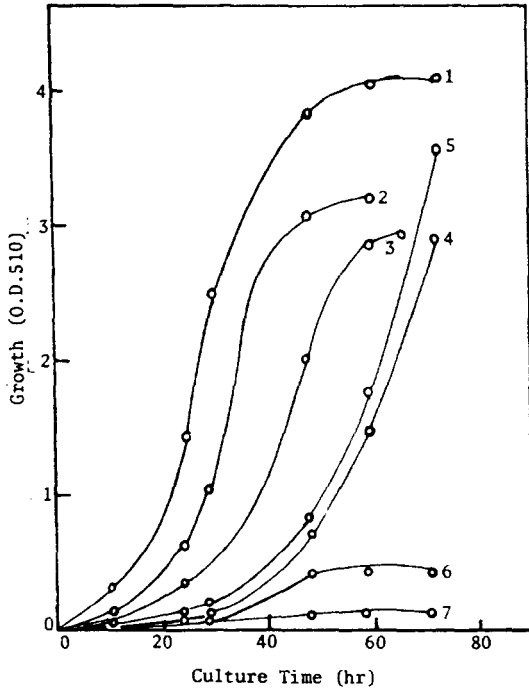


Fig. 3. Effect of various alcohols as carbon source on the growth of *Candida boidinii* YF-3. Each alcohol was added to the basal medium at 0 hr

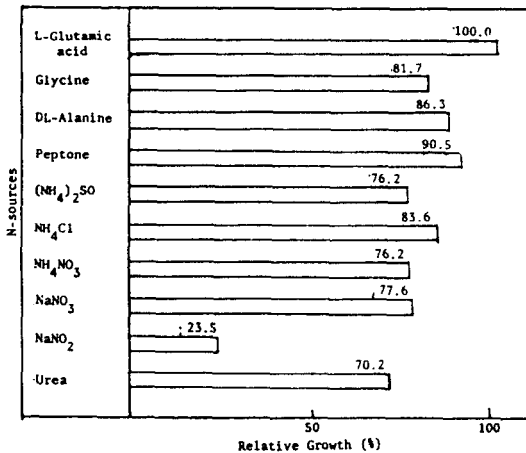
Table 6. Vitmain requirement for growth of isolate YF-3

Vitamins	Concentration (μg/l)	Growth (O.D.) after 48 hr	
		Added to vitamin-free medium	Removed from complete medium
None	-	0.26	0.00
Thiamin-HCl	1000	0.36	-
	400	-	2.26
Riboflavin	1000	0.32	-
	200	-	2.11
Pyridoxine-HCl	1000	0.48	-
	400	-	2.20
Nicotinic acid	1000	0.52	-
	400	-	2.24
Ca-Pantothenate	1000	0.49	-
	2000	-	2.21
Biotin	10	1.98	-
	20	-	0.58
Folic acid	10	0.45	-
	2	-	2.30
p-Aminobenzoic acid	200	0.40	2.26

\* Difco Bacto-vitamin-free yeast base



**Fig. 4. Effect of biotin and organic nutrients on the growth of *Candida boidinii* YF-3.**  
 Shaking culture was conducted at 30°C.  
 1% (v/v) methanol was added to the growth medium without yeast extract  
 1: 0.05% yeast extract, 2: 0.05% peptone, 3: 0.05% casamino acid, 4: 10µg/l biotin, 5: 10µg/l biotin and 1000 µg/l thiamine-HCl, 6: 1000 µg/l thiamine HCl, 7: control



**Fig. 5. Effect of nitrogen sources on the growth of *Candida boidinii* YF-3.**  
 Shaking culture was conducted for 40 hours at 30°C.  
 0.3% (w/v) N-sources were added to the Yeast Carbon Bas

대로 금속이온을 모두 첨가한 경우와 비슷한 생육도를 보였다. (Table, 7)

1. 발효조 배양의 생육 특성.

5l 발효조로 batch배양하면서 YF-3의 전형적인 생육곡선은 Fig6에서와 같이 균체 생산량은 건조균체로서 2.72g/l이었고, 균체 수율은 0.39 gg<sup>-1</sup>로 다른 보고에서<sup>(6,12,18)</sup>보다 높은 결과 이었다. 비성장속도는 0.11h<sup>-1</sup>, 세대시간은 6.4시간임을 확인하였다.

2. 균체의 조성.

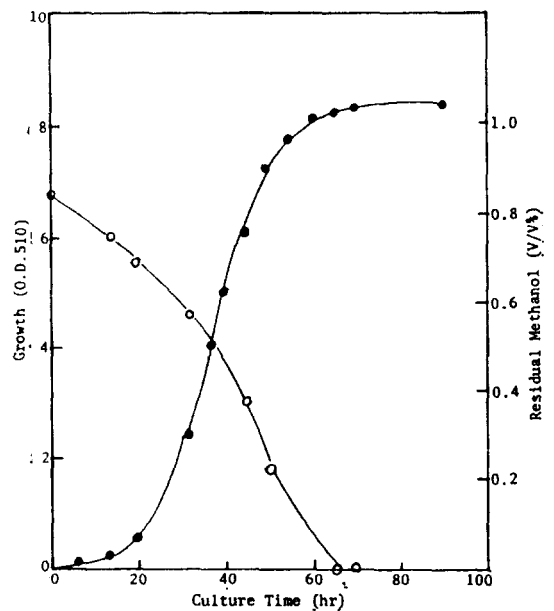
선정균주 YF-3의 건조균체의 일반성분과 amino산의 분석 결과는 Table8,9에서와 같이 조단백질 함량은 45.5%, 총 amino산의 함량은 35.22%였다. 단백질의 영양적 가치는 amino산의 조성에 좌우되는<sup>(11)</sup> 바, 필

**Table 7. Effect of metal ions on the growth of *Candida boidinii* YF-3**

Ions*	Mg	Ca	Fe	Zn	Cu	Mn	All**
Growth (O.D.)	1.42	0.58	0.81	0.09	0.07	0.25	1.45

\*Metal ions concentration were added as the composition of growth medium.

\*\*All metal ions were added as the composition of Growth medium (Table 1).



**Fig. 6. Growth of *Candida boidinii* YF-3 on methanol in a 5L-jar fermenter.**  
 Cultivation was carried out at 30°C with working volume of 2.5L  
 —●— Growth, —○— Residual methanol

**Table 8. Chemical composition of *Candida boidinii* YF-3 (dry bases)**

Crude protein	45.50%
Crude fat	2.03
Crude fiber	0.79
Mitrogen-Fre extract	42.52
Ash	6.71
Moisture	2.46

수 amino산 함량을 FAO reference와 비교할 때 좋은 편이었으며 특히 lysine 함량이 높았다. 메탄올 자화성 효모의 일반 성질로 보고되었듯이 methionine 함량이 약간 낮았는데 이것은 회수된 균체에 합성 methionine을 첨가함으로써 극복할 수 있겠다.<sup>(11)</sup>

총핵산 함량은 5.9%로 DNA 함량이 1.2%, RNA 함량이 4.7%였으며 이 수치는 다른 효모와 비슷하였다.<sup>(8,19)</sup>

SCP 생산에 고려되어야 할 조건으로 경제성 외에 고 단백질, 저핵산, 저 탄수화물, 저지질을 함유하는 것이 바람직하다.<sup>5)</sup> 이러한 영양학적인 가치를 검토해 볼

때 *Candida boidinii* YF-3은 단 세포단백질로 양호한 편이었다.

### 요 약

토양, 호수, 개천, 연못, 부패우유, 난무지로부터 메탄올을 자화하는 효모와 새균을 분리하였다. 효모 중 가장 생육이 빠른 균주를 선발하여 동정하고 메탄올 배양에서의 생육특성을 조사하였다. 그 결과 분리된 효모 YF-3은 *Candida boidinii*로 동정되었다.

이 균주의 특성은 biotin을 요구하며 C<sub>1</sub>화합물 외에 다른 화합물도 이용할 수 있는 facultative methylotroph로서 최적 pH는 6.0, 최적 온도는 30°C, 최적 메탄올 농도는 배지의 1%(v/v)였다.

균체 생산량은 건조균체로 2.72g/l 균체 수율은 0.39 g g<sup>-1</sup>로 측정되었다. 균체의 총핵산 함량은 5.9%, 조단백질 함량은 45.5%, 총아미노산 함량은 35.22%도 분석되었다.

**Table 9. Amino acid composition of *Candida boidinii* YF-3**

Amino acids	g amino acid/ 100g dry cells	g amino acid 100g protein	FAO reference
			g amino acid/ 100g protein
Lysine	2.84%	6.24	4.2
Threonine	2.27	4.99	2.8
Valine	1.95	4.29	4.2
Methionine	0.52	1.14	2.2
Isoleucine	1.20	2.64	4.2
Leucine	2.83	6.22	4.8
Phenylalanine	1.60	3.52	2.8
Tryptophan	—*	—*	1.4
Arginine	2.41	5.30	
Histidine	1.43	3.14	
Alanine	2.08	4.57	
Aspartic acid	5.41	11.89	
Glutamic acid	4.84	10.64	
Glycine	1.80	3.96	
Proline	0.81	1.78	
Serine	2.17	4.77	
Tyrosine	1.06	2.33	
Total	35.22%		

\* Not estimated

## 문 헌

1. Allais, J.J., Baratti, J.: *J. Ferment. Technol.*, **61**, 339(1983)
2. Barnett, J.A., Pankhurst, R.J.: A New Key to the Yeasts, a key for identifying yeasts based on physiological tests only, North-Holland Publ. Co., Amsterdam-London(1974)
3. Barnett, J.A., Payne, R.W., Yarrow, D.: *Yeasts, characteristics and identification*, Cambridge Univ. Press, Cambridge (1984)
4. Burton, K.: *Biochem. J.*, **62**, 315(1956)
5. Cooney, C.L., Levine, D.W.: *Adv. Appl. Microbiol.*, **15**, 337 (1972)
6. Herbert, D., Phipps, P.J., Strange, R.E.: *Methods in Microbiology* Academic Press, London-New York, Vol. 5B, pp. 209 (1971)
7. Lee, J.D., Komagata, K.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **26**, 133 (1980)
8. Levine, D.W., Cooney, C.L.: *Appl. Microbiol.* **26**, 982 (1973)
9. Lodder, J.: *The Yeasts, a Taxonomic Study*, North-Holland Publ. Co., Amsterdam-London (1971)
10. Lodder, J., Kreger-van Rij, N.J.W.: *The Yeasts, a Taxonomic Study*, North-Holland Publ. Co., Amsterdam (1952)
11. Mateles, R.I.: *Microbiol Technology*, current state, future prospects, Cambirdge Univ. Press, London pp. 29 (1979)
12. Mimura, A., Wada, M., Nakano, T., Hayakawa, S., Iguchi, T.: *J. Ferment. Technol.*, **56**, 443 (1978)
13. Munro, H.N., Fleck, A.: *Meth. Biochem. Anal.*, **14**, 133 (1966)
14. Nawawy, A.S., Gnan, S.O.: *Biotechnol. Bioeng.*, **25**, 863 (1983)
15. Ogata, K., Nishikawa, H., Ohsugi, M.: *Agri. Biol. Chem.*, **33**, 1519 (1969)
16. Ogata, K., Nishikawa, H., Ohsugi, M., Tochikura, T.: *J. Ferment. Technol.*, **48**, 389 (1970)
17. Ogata, K., Nishikawa, H., Ohsugi, M., Tochikura, T.: *J. Ferment. Technol.*, **48**, 470 (1970)
18. Sahm, H., Wagner, F.: *Arch. Mikrobiol.*, **84**, 29 (1972)
19. Sahm, H.: *Adv. Biochem. Eng.*, **6**, 77 (1977)
20. Tani, Y.: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **12**, 63 (1984)
21. Tani, Y., Kato, N., Yamada, H.: *Adv. Appl. Microbiol.*, **24**, 165 (1978)
22. Urakami, T., Terao, I., Nagai, I.: *J. Ferment. Technol.*, **61**, 221 (1983)
23. van Dijken, J.P., Harder, W.: *J. Gen. Microbiol.*, **84**, 409 (1974)
24. Yang, H.C., Shin, K.C.: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **5**, 29 (1977)
25. Yokote, Y., Sugimoto, M., Abe, S.: *J. Ferment. Technol.*, **52**, 201 (1974)

---

(1987년 3월 26일 접수)