

醱酵飼料의 生産에 關한 研究(1)

— 有用酵母菌의 分離同定 및 培養條件 —

裴貞高 *李澤守 **朴允仲 **李錫健

(大田農業高等專門學校, *생포醬油釀造場, **忠南大學校農科大學)

Studies on the Production of Fermented Feed (1)

—Isolation, Identification and Cultural Conditions of Useful Yeasts—

BAE, Jung Surl, *Taik Soo LEE, **Yoon Joong PARK, **Suk Kun LEE

(Taejon Agricultural Junior College. *Saimpyo Soysauce Brewery.)

**College of Agriculture, Chung Nam University.

ABSTRACT

This experiment was carried out to research for the use of the mycelium and enzyme on the production of fermented feed. Among 354 strains isolated from natural sources, 3 strains of useful yeasts were selected and identified, and the cultural conditions of these strains were examined. The results obtained were as follows.

- (1) The strain No. 55, No. 112 and No. 340 selected were identified *Endomycopsis fibuliger*, *Endomycopsis javanensis* and *Candida tropicalis*, respectively.
- (2) The optimum pH and sugar concentration of the medium for the strain No. 55, No. 112 and 340 selected was around pH 6.5 and Bllg. 10°. The optimum temperature for the growth of the strain No. 55 and No. 112 selected was 30°C and was 25°C of the strain No. 340.
- (3) The strain No. 55 and No. 112 were grown exceedingly well on the media containing 0.1 percent of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

緒 論

우리나라의 農業은 耕農爲主로서 우리들의 食生活은 主로 穀類에 依存되어왔다. 그러나 근래에는 政府施策으로서 有畜農業을 권장하고 있으며 뉴질랜드등 牧畜業이 發達한 국가와 제휴하여 畜産진흥에 적극적인 지원을 할 방침으로 알려져 있다.그런데

畜産진흥책의 先決問題로는 飼料의 生産技術이 개발되어야 할것이다. 國土의 여건으로 볼때 飼料作物의 재배, 加工副産物의 直接的인 利用단으로는 畜産業의 효율적인 發展을 기할수없다. 따라서 영양가치가 豊富한 人工飼料를 저렴하게 大量生産 할 수 있는 研究가 시급한 것이다.

從來醱酵飼料에 關한 研究로서는 硫安을

침가한 澱粉粕에 麴菌을 培養하여 純蛋白質을 合成하는 金(1962), 住江(1949), 坂口(1950) 등의 報告와 cellulase 生産菌으로 醱酵飼料를 製造하여 成鷄에 飼養試驗한 金(1969) 등의 報告가 있으며 또한 微生物의 菌體를 利用하는 飼料酵母에 對한 多數의 研究報告(三輪 1958)가 있다. 著者 등은 菌體와 酵素를 利用할수 있는 微生物을 利用한 醱酵飼料의 生産에 對한 研究의 一端으로 自然界로부터 酵素生成有用酵母를 分離選定하여 同定하고 액체배양에 의한 菌體生産最適條件에 對하여 實驗하였으므로 그 結果를 報告 하는 바이다.

材料 및 方法

1. 菌株의 分離와 同定

乾熱殺菌한 shalc에 맥아즙(Bllg 10°)한천 배지를 평판 固化하여 소경장소의 공기중으로부터 집식배양한다음 colony 상으로 生育狀態가 왕성한 酵母菌들을 354 株 分離하고 이들을 밀기울 고체배지와 맥즙액체배지에 培養하여 가장 왕성하게 生育하는 3 株를 選定 하였다. 選定菌株를 Lindner 小滴培養法에 따라 純分離하고 生理的 및 形態的 性質을 조사하여 Lodder (1967)의 分類同定法에 따라 同定하였다.

2. 培養

맥아즙배지의 당도와 pH를 달리한 實驗 외에는 당도 Bllg. 10° pH 6.5의 배지를 균 일한 6 부 시험관에 6ml 씩 넣어 가압살균

후 選定菌株를 接種하고 培養溫度 및 培養期間에 對한 실험을 제외 하고는 30°C, 3 일 간 培養하였다.

3. 균체증식도 측정

培養液 3ml 를 取하여 원심분리한 침전물을 증류수로서 10ml가 되게 현탁하고 현탁액의 optical density를 spectrophotometer (Beckman model 101)로 파장 560m μ 에서 측정하여 O.D.값으로 菌體量을 比較 하였다.

4. 酵母菌體의 一般成分 分析

침전물을 제거한 맥아즙 培地를 500ml 용 삼각 flask에 100ml 씩 분주하고 選定菌株를 接種하여 30°C, 3일간 培養한다음 원심분리하고 다시 증류수로 세척한 菌體를 定량한 정량용 여지로 여과한후 70°C 에서 24 시간 건조한것을 試料로하여 水分은 105°C의 乾熱器中에서 恒量이 될때까지 건조한후의 乾量, 粗蛋白質은 micro kjeldahl 法, 粗脂肪은 soxhlet抽出法, 灰分은 600°C의 furnace 에서 회화하여 分析하였고 炭水化物은 菌體總量에서 水分, 蛋白質, 脂肪, 灰分을 감함량으로 表示하였다.

結果 및 考察

1. 菌株의 分離와 同定

空氣中으로 부터 分離한 酵母菌 354 株 中 밀기울 培地와 맥아즙액체배지에 가장 왕성하게 生育하는 3株를 選定하고 이들의 菌學的 性質에 對하여 實驗한 結果는 Table 1 과 같다.

Table I. The microbiological characteristics of the selected 3 strains.

Strain No.		55	112	340
Item				
Cells		Oval (1.5×3.0)~(2.3×3.8) μ elongate (2.3×6.0)~(3.0×12) μ	Oval (3.0×3.8)~(4.5×7.5) μ sausage (2.3×4.5)~(3.0×18) μ	Cylindrical (3.0×6.0)~(6.0×23) μ
Spore		Round (1)	Round(1)	—
Cultures	SL	True mycelium	True mycelium	True mycelium
	ME	Tellicle, ring, sediment	Thin pellicle, sediment	Ring, sediment
	MA	White hairy, flat, dull, wrinkled	Yellowish brown, wrinkled, raised, dull	White hairy, flat, wrinkled, dull

Fermentation	Gu	+	-	+
	Ga	-	-	+
	Su	±	-	+
	Ma	±	-	+
	La	-	-	-
	Ra	±	-	±
Assimilation	Gu	+	+	+
	Ga	+	+	+
	Su	+	-	+
	Ma	+	-	+
	La	+	-	-
KNO ₃	-	-	-	
EtOH	±	+	+	
SP	-	-	-	

※ SL:slide culture, ME:malt extract culture, MA:malt agar streak culture, Gu:glucose, Ga:galactose, Su:sucrose Ma:maltose, La:lactose, Ra:raffinose, KNO₃:KNO₃ assimilation, EtOH:ethanol utilization, SP:splitting of arbutin. () : numbers of spore.

分離選定菌株의 菌學的性質을 살펴 Lodder의 分類 key에 따라 同定한 結果 strain No. 55는 *Endomycopsis fibuliger*, strain No. 112는 *Endomycopsis javanensis*, strain No.340은 *Candida tropicalis*로 各各 同定 되었다.

2. 液體培養에 依한 菌體의 生産

① 培養最適條件

麥芽汁 培地의 pH와 糖度를 各各 달리 한 경우와 培養溫度 및 培養期間을 各各 달리 한 경우 培養液의 菌體增殖度를 測定한 結果는 Table 2~5와 같다.

Table 2. Influence of media pH on the growth of the isolated 3 strains.

Strains	pH				
	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5
No. 55	0.51	0.58	0.70	0.67	0.65
No. 112	0.47	0.55	0.65	0.62	0.60
No. 340	1.30	1.74	1.85	1.78	1.64

(Unit: the value of O.D. at 560m μ)

맥아즙(Bllg. 10°)의 pH를 NaOH 또는 HCl로 5.5~7.5로 各各달리 調整한 培地에 接種하여 30°C로 3일간 培養한 結果 分離

菌株모두가 pH 6.5에서 菌체증식이 가장 良好하였으며 培地의 糖濃도를 Bllg.5~20°로하여 30°C 3일간 培養한 경우에는 모두 Bllg. 10°에서 良好하였다. 또한 培養溫度를 25~40°C로 各各 달리하여 3일간 培養한 結果 strain No. 55와 strain No. 340은 30°C

Table 3. Effects of media concentration on the growth.

Strains	Media conc.(Bllg)			
	5	10	15	20
No. 55	0.57	0.67	0.60	0.48
No. 112	0.61	0.63	0.52	0.41
No. 340	1.69	1.87	1.80	1.65

(Unit: the value of O.D. at 560m μ)

Table 4. Influence of incubating temperature on growth

Strains	Temp.(°C)			
	25	30	35	40
No. 55	0.60	0.68	0.58	0.32
No. 112	0.77	0.65	0.49	0.28
No. 340	1.73	1.87	1.25	0.72

(Unit:the value of O.D. at 560m μ)

Table 5. Influence of incubating time on the growth.

Strains	Time (days)			
	1	2	3	4
No. 55	0.29	0.54	0.70	0.72
No. 112	0.20	0.50	0.64	0.70
No. 340	0.80	1.77	1.85	1.89

(Unit: the value of O.D. at 560m μ)

에서 菌體 증식이 良好 하였으며 strain No. 112는 25°C 에서 良好하였다. 30°C 로 培養 할때 培養期間이 經過할수록 4일째 까지 어 느균이나 菌체증식은 다소 계속 되었다.

② 無機窒素源의 영향

맥아즙(Bllg. 10°) 培地에 硫酸 ammonium 을 0.1~5.0%의 濃度로 첨가하고 첨가 硫酸 ammonium 量의 70% 量의 CaCO₃를 첨가한 培地에 分離選定菌을 接種하여 30°C로 3日間 培養한다음 菌體增殖度를 測定하였다. CaCO₃ 첨가량에 따라 培地의 탁도가 各各 다르므로 菌을 接種하지 않은 各各의 培地를 3ml 식 取하여 培養液 測定時와 同一한 처리를하여 얻은 O.D. 값을 培養區의 O.D. 값에서 減하였다. 그 結果는 Table 6 과 같다.

Table 6. Effect of ammonium sulfate on the growth in the malt extract media (Bllg 10°)

Strains	Conc. (%)				
	0	0.1	0.5	1.0	5.0
No. 55	0.58	0.64	0.47	0.44	0.40
No. 112	0.55	1.32	1.28	0.91	0.43
No. 340	1.77	1.80	1.94	1.74	1.20

(Unit: the value of O.D. at 560m μ)

strain No. 55 와 strain No. 112 는 硫酸 ammonium 을 0.1% 첨가했을때 가장 良好하였고 strain No. 340은 0.5% 첨가했을때 菌체증식이 가장 良好하였다. 特히 strain No. 112 는 硫酸 ammonium 0.1~0.5% 첨가배지

에 있어서 無添加區보다 2 倍이상의 菌체가 증가 되었으며 그이상의 濃度에서는 多少 減 소되었다. 李(1970)등은 석유이용미생물로 서 分離한 *Candida curvata* Hy-69-19의 배 양에 있어서 無機窒素源으로서는 (NH₂)₂CO 가 가장 良好하였으며 (NH₂)₂SO₄등은 培養 期間동안 PH 를 산성으로 變動시키므로 培 養液의 PH를 調整하면서 培養할 必要가있다 고 하였다 또한 Yamada (1968)는 *Candida tropicalis*의 培養에 있어서 (NH₂)₂CO 는 NH₄ NO₃ 나 (NH₄)₂SO₄ 보다 自化속도가 높다고 報告한바있다. 著者등은 (NH₄)₂SO₄의 資化 에 있어서 酸性殘基를 CaCO₃로서 中和되도 록 하였으나 分離菌株 모두가 0.5%이상의 (NH₄)₂SO₄ 첨가에 있어서는 菌체증식이 減 소되었다.

③ 菌體의 一般成分

分離菌株를 液體培養하여 얻은 菌體를 一 般法에 따라 分析한 結果는 Table 7과 같다.

Table 7. The chemical composition of mycelium of isolated strains.

Strains	Moisture	Protein	Fat	Ash	Carbohy- drate
No. 55	10.20	55.0	1.43	6.62	26.75
No. 112	11.51	46.4	2.02	8.05	32.02
No. 340	9.85	50.3	0.82	6.17	32.86

(Unit: %)

strain No. 55는 protein 含量이 비교적 많 으나 carbohydrate의 含量이 적었으며 strain No. 112는 fat와 ash 의 含量이 많았고 菌體 증식이 가장 왕성한 strain No. 340은 맥아 즙 (Bllg. 10°) 培地에 3일간 培養에 있어서 ml當 14.3mg 의 菌體를 生産하였으며 fat 含 量이 다소 적은편이었다.

李(1970)등이 報告한 *Candida curvata* Hy -69-19보다는 어느것이나 Protein 含量은 많았으며 fat 含量은 적은 結果였다.

摘 要

醱酵飼料의 生産에 있어서 微生物의 菌體와 酵素를 利用할 目的으로 自然界로부터 生育狀態가 旺盛한 酵母 354 의 菌株中 優秀菌株 3 株를 選定하여 同定하고 液體培養條件에 對하여 實驗한 結果는 다음과 같다.

(1) Strain No. 55는 *Endomycopsis fibuliger*, strain No. 112 는 *Endomycopsis javanensis*, Strain No. 340 은 *Candida tropicalis* 로 同定 되었다.

(2) 選定菌株 strain No. 55, strain No. 112, strain No. 340 의 生育最適 pH 는 6.5, 最適糖濃度는 Bllg. 10° 였으며 strain No. 55 와 strain No. 112 의 生育最適溫度는 30°C, strain No. 340 의 最適溫度는 25°C 였다.

(3) Strain No. 55 와 strain No. 112 는 培地에 硫酸 ammonium 을 0.1% 첨가했을때, strain No. 340 은 0.5% 첨가했을때 균체중식이 가장 良好하였다.

引 用 文 獻

- (1) Kinshi Suminoe, Yoshinori Matsuya, 1949. Production of proteinous foods and fodders by microorganisms. *J. Agri. Chem. Soc. Japan.*, 23, 507.
- (2) Kinichiro Sakaguchi, Hiroshi Okazaki, Takashi Iwasaki, 1950. Studies on the protein synthesis by molds. *J. Agri. Chem. Soc. Japan.*, 24, 197.
- (3) Kim. Chan Jo, Woo Young Choi, 1969. Studies on the cellulase producing microorganisms (part II). identification of the selected molds and their utilization, *J. Kor. Agri. Chem. Soc.*, 11, 89.
- (4) Lee. Ke Ho, Hyun Kyung Shir, Studies on the petroleum hydrocarbon utilizing microorganisms (part I), *J. Kor. Agri. Chem. Soc.*, 13, 43.
- (5) Lodder, J., 1967. The yeasts. North-Holland publishing company, Amsterdam.
- (6) Mani Miwa, 1958. Feed yeast. *J. Agri. Chem. Soc. Japan*, 32, A144.
- (7) Yamada, K., J. Takashi, Y. Kawabata, T & T. Onihara, 1968. In single cell protein, MIT press.
- (8) 金浩植, 曹惠鉉, 姜禧信, 1962. 麴菌醱酵飼料의 製造法에 關한 研究, 서울大論文集 (D) 生農系 11. 69.