

Ethanol 이용 미생물에 의한 단세포 단백질 생산에 관한 연구

李 啓 瑚 · 河 珍 弘

서울대학교 農科大學 食品工學科

(1973. 1. 15 수리)

A Study on the Production of Yeast Utilizing Ethanol as a Sole Carbon Source

Ke-Ho Lee and Ha Jin-Hong

Dept. of Food Technology, College of Agriculture, Seoul National University

(Received Jan. 15, 1973)

Summary

In order to obtain the basic informations on the production of single cell protein from ethanol, 145 yeast strains utilizing ethanol as a sole carbon source were isolated from 32 soil samples in Korea.

A yeast strain showing the highest cell yield among the isolated strains was selected and identified.

The optimum culture condition, utilization of other carbon sources and the cultural characteristics for the selected yeast, and the chemical analysis of the yeast cell composition, and utilization of ethanol by the selected yeast were investigated. All the culture was carried out in the shaking flasks.

The results obtained were as follows:

1. The selected yeast strain was identified as *Debaryomyces nicotianae*-SNU 72.
2. The optimum composition of the medium for the selected yeast is: Ethanol 40 ml, Urea 0.5 g, Potassium phosphate (dibasic) 0.5 g, Ammonium phosphate (monobasic) 0.15 g, Magnesium sulfate 0.05 g, Calcium chloride 0.01 g, Yeast extract 0.005 g, Tap water 1000 ml.
3. The optimum pH was 5.0-5.5, the optimum temperature 30-33°C and the aerobic state was unimportant.
4. Utilization of methanol, n-propanol, iso-propanol, n-butanol, iso-butanol, tert-amyl alcohol and acetic acid by the selected yeast was very weak. So substitution of the substrate was thought to be impossible.
5. Studies on the propagation of the yeast cells showed that the lag phase of the yeast cells lasted 16 hours, and the logarithmic growth phase extended 16 to 28 hours. The specific growth rate was about 0.19 hr^{-1} and the doubling time was 3.6 hours during the logarithmic growth phase.

6. As the result of the chemical analysis of the dry yeast cells, the content rate of the crude protein was 55.19%, the content of others was similar to the average content of the yeast component.

7. After 34 hours cultivation, under the optimum culture condition investigated, the dry cell yield against the amount of the added ethanol was 53.4% (W/V%), the dry cell yield against the amount of the utilized ethanol was 73.6% (W/V%), the evaporation rate of ethanol was about 19.1%.

서 론

인구의 급증과 함께 심각하게 대두되고 있는 식량문제로서 특히 단백질의 부족현상을 해결하기 위하여 근래에 석유단백질의 생산에 관한 연구가 세계 각국에서 활발하게 진행되고 있다.

그런데 석유단백질은 식품이나 사료로 전제할때 발암성 물질로 확정된 1.2-benzpyrene의 함유여부로 주목되고 있는 유독성의 문제점을 들 수 있고 또 종래의 발효성 당질의 탄소원을 대체하기 위해서 최근에는 석유화학공업 및 유기합성공업의 급속한 발달에서 오는 부산물인 저급의 유기산 및 alcohol 등을 발효자원으로 개발 이용할려는 연구가 시도되고 있다.

예를들면 amino acid 발효공업에 있어서 원료인 페당밀을 acetic acid나 ethanol등의 C₂-화합물로 대체시키고 있으며 citric acid 발효에 methanol을 첨가하여서 수량의 증가를 보았고²⁻⁴⁾, Bikhovski et al⁵⁾은 alcohol 및 acetone-butanol 발효폐액에 methanol을 첨가하고 methane 발효균을 배양시켜서 vitamine B₁₂을 생산하는데 관해서 보고한바도 있다.

또한 Harada et al⁶⁾은 ethanolamine에서 glycine의 생산, Oki et al⁷⁾은 ethanol에서 L-glutamic acid의 생산등을 발표하였고 Murooka et al⁸⁾은 토양에서 분리한 세균으로 ethanol, n-propanol, n-butanol 기질에서 o-ethyl-, o-propyl-, o-butyl-homoserine과 같은 새로운 amino acid의 생산에 관해 연구하였다.

이렇게 대사산물을 생산 이용하려는 목적의 연구외에 단백질 함량이 높은 균체생산을 목적으로 하는 연구도 활발하게 진행되고 있는데 methanol 자화성 세균에 관한 연구는 Harrington et al¹⁰⁾, Kaneda et al¹¹⁾, Dworin et al¹²⁾ 이외에도 여러 학자들의 발표가 있으며 Hamer¹³⁾은 methanol 자화 세균의 호기성 발효기작을 위주로 연구하였다.

Methanol 자화성 효모에 대해서는 Omata et al¹⁴⁾,

Ogata et al¹⁵⁾의 보고가 있으며 Akiba et al¹⁶⁾은 토양에서 분리한 세균으로 methanol, ethanol, n-propanol, n-butanol 등의 기질에 대한 자화성을 검토하였고 Ueyama et al¹⁷⁾은 iso-propyl alcohol을 이용하는 세균 *Arthrobacter*를 분리동정하였다.

Ethanol을 탄소원으로 이용하는 효모에 관한 연구는 효모의 분류동정상 필요하기 때문에 종래부터 많이 연구되어 왔지만 ethanol을 유일한 탄소원으로 하는 효모의 생산과 그 조건에 대한 전반적인 검토는 Omata et al,¹⁴⁾ Mor et al,¹⁸⁾ Taketomi et al¹⁹⁾²¹⁾이 발표한 정도이다.

1949年 Agarward et al²⁰⁾과 Taketomi et al¹⁹⁾은 회석당액에 효모를 통기배양시켜서 당이 소비된후 副生하는 alcohol이 자화이용되어서 효모의 수량이 증가됨을 확인한 것이 ethanol을 이용한 효모생산에 관한 연구의 발단이 된 것이다. 그후 Taketomi et al²¹⁾은 Bread yeast인 *Saccharomyces cerevisiae*, *Torula utilis*, *Mycoderma japonica*의 3 균주로서 ethanol을 유일한 탄소원으로 하여 그 자화성을 검토한 결과 회석 ethanol 농도(0.5%~1.5%)에서 ethanol을 직접同化 이용한다는 것을 보고하였다.

Omata et al¹⁴⁾은 43株의 보존효모균주로서 ethanol을 단일 탄소원으로하여 그 자화성을 검토한 결과 *Pichia mogi* No. 2, No. 3, *Mycoderma mandshurica*, *Torula utilis* No. 1, No. 2, bakery yeast인 *Saccharomyces cerevisiae*와 *Candida krusei*, *Debaryomyces globosus*, *Saccharomyces cerevisiae* hefe Toyo, *Saccharomyces cerevisiae* Brenneri hefe Rasse XII 등이 우수 균주이며 대개가 40~46%의 수율을 얻었다고 보고하고 특히 bakery yeast인 *Saccharomyces cerevisiae*와 *Pichia mogi* No. 3을 jar fermentor에서 각각 26시간, 36시간 배양한 결과 사용한 ethanol에 대해 33%와 63%의 수율을 얻었다고 발표하였다.

분류학상 ethanol을 유일한 탄소원으로 이용하는 균주를 보면 유포자 효모로는 *Endomycopsis*屬, *Pichia*屬, *Hansenula*屬, *Debaryomyces*屬, *Dekkera*:

屬, *Kluyveromyces*屬, *Fabospora*屬 등이 있고 무포자 효모로는 *Brettanomyces*屬, *Cryptococcus*屬, *Trichosporon*屬, *Candida*屬 등을 들수 있는데 이들의 실제적인 ethanol 이용율은 각종 각종에 따라 상당한 차이를 나타내는 것으로 보고하고 있다.

탄소원으로서의 ethanol은 옛부터 희석농도로 하여 주류등 식품으로 상용되어 왔으므로 석유단백질 식품의 불안성을 배제할수 있으며 ethanol을 이용한 효모의 생산에 관한 연구는 국내에서는 전혀 없는 형편이므로 저자는 ethanol을 이용하여 단백질 식품을 생산할 목적으로 본 실험을 행한 것이다.

전국 각지역의 토양시료에서 ethanol자화성 효모를 분리하고 growth rate가 양호한 균주를 screening하여 그중 우수균주를 선정, 동정하고 선정된 우수균주에 대하여 기질농도, 온도, pH, 각종 영양원의 효과, 통기효과등의 제반 최적 배양조건과 증식률, 균체의 화학적 조성등 대량생산을 전제로 한 전반적인 기초적 조건을 검토하였기에 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

1. 우수균주의 분리 및 동정

1) 균분리 및 1차선별 : 250 ml-shaking flask에 Table 1의 배지 40 ml을 넣어 10 lb에서 30분간 살균한후 전국 각지에서 수집한 토양시료 2g을 넣어서 30°C의 항온실에서 rotary type의 shaker(stroke 5cm, oscillation 160r.p.m)로 2일간 진탕배양 하였다. 그 현탁액 1ml를 dilution pour plate method에 의하여 Table 1의 agar medium에 2일간 평판배양시킨후 조기 발생의 독립 colony만을 Table 1의 agar slant medium에 채취하여 일차선별을 행하였다.

2) 2차선별 : 1차선별에서 분리한 균주중 growth rate가 우수한 균주를 택하여 2차선별을 행하였는데 선택한 우수균주를 Table 1의 liquid medium에서 24시간 활성화 시킨후 그 1ml씩을 inoculum으로 하여 Table 1의 배지 40 ml씩을 분주한 250 ml-shaking flask에 접종하고 26시간 진탕배양 시킨후 탁도(optical density)로서 균체 증식률이 가장 높은 우수균주를 선정하였으며 이를 malt agar slant medium에 계속 이식 보존하면서 신선효모 상태로 다음 실험을 계속하였다.

3) 우수균주의 동정 : 2차선별에서 탁도에 의해 선정된 가장 우수한 균주를 형태적, 배양적, 생리

Table 1. Composition of Culture Medium

Constituent	Amount
Ethanol*	25 ml
(NH ₂) ₂ CO	2.5 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.5
KH ₂ PO ₄	2
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.1
Yeast extract	0.05
Tap water	1000 ml
pH	6.0

Autoclaved at 10 lb. 30min.

*Ethanol was added after sterilization of medium. pH was adjusted with 30 : 1 HCl soln. and 30 : 1 NH₄OH soln. diluted with water.

적 특성에 따라 Lodder et al의 The Yeasts, A Taxonomic Study²²⁾ 그리고 飯塚등의 酵母의 分類同定法²³⁾에 준하여 동정을 행하였다.

2. Alcohol

유일 탄소원으로서의 ethanol은 일본 甘槽化學工業(株)에서 제조한 용량 % 99.5, 비중 0.797이하인 Shimakyu's extra pure chemicals를 사용하였다

3. 배양방법 및 조건

Malt agar slant medium에서 배양 보존한 신선효모 1백금니를 Table 1의 배지 40 ml을 넣은 250 ml-shaking flask에 접종하여 24 시간 30°C에서 진탕배양하여 활성화시키고 이렇게 전배양하여 활성화된 균주의 현탁액 1ml을 inoculum으로하여 Table 1의 배지 40 ml을 넣은 250 ml-shaking flask에 접종하고 30°C에서 2일간 진탕배양 시킨다. 진탕배양은 rotary type의 shaker(stroke 5cm, oscillation 160 r.p.m)에서 실험하였다.

배양조건에 대해서는 기질의 농도, 온도, pH, 질소원의 종류와 농도, 인산염의 종류와 농도, 유기영양원의 효과, 통기의 영향, 무기물의 효과등 균체생육에 필요한 제 조건을 검토하여 실험도중에서 얻어진 최적 조건의 결과는 그 다음 실험에 계속적으로 적용하였다.

4. 생육도 측정

진탕배양 시킨후 균체의 생육도는 Coleman Spectrophotometer Model-14로 파장 610m μ 에서 탁도(optical density, O.D.)로 측정 비교하였다. 생육도의 측정에는 배양액을 30배량으로 희석하여 행하였다.

5. 건조 균체량의 측정

배양액을 3,000 r.p.m.에서 15분간 원심분리한 후 acetone으로 세척하고 다시 15분간 원심분리 하였으며 다시 증류수로 세척 그리고 원심분리를 2회 반복하여 집균하였다. 원심집균한 균체를 회수하여 60°C의 vacuum dry oven에서 10시간 동안 건조시킨 다음 항량을 구하여 이를 건조균체량으로 하였다.

6. 균체의 일반성분 분석

上記方法으로 하여 얻어진 건조균체에 대한 성분분석으로 수분정량은 105~110°C에서 1시간 가열하는 상법으로, 조단백질은 Kjeldahl법으로, 조지방은 ethyl ether를 이용한 Soxhlet추출법을 사용했으며, 회분은 상법에 의하여 600°C에서 가열 회화한 후 항량을 구하였고, 가용성 무질소물운총량에서 수분, 조단백질, 조지방질, 회분의 양을 뺀 값으로 표시하였다.

7. Alcohol의 정량^{24) 25)}

균체 증식후 탄소원인 ethanol의 이용 및 잔류량은 $KMnO_4$ 산화법을 이용하여 정량하였다.

실험결과 및 고찰

1. 우수균주의 분리 및 선정

국내 각지에서 수집한 32점의 토양시료를 채취하여 ethanol을 자화하는 효모균주를 분리하고 ethanol 이용성이 가장 우수한 균주를 선정하여 동정하였다. 1차선별에서 145개 효모균주를 분리하였는데 영양원이 한정된 Table 1의 배지에서 2일간 배양으로 32점의 시료로부터 145개 균주를 분리한 것은 토양중에 ethanol자화효모가 비교적 널리 분포하고 있음을 입증하고 있는 것이다. 1차선별한 145개 균주를 Table 1의 agar slant medium에 이식하여 여기서 growth rate가 우수한 균주 32개를 선택하였으며 이들을 Table 1의 liquid medium에서 26시간 배양하여 배양액에 대한 탁도의 비교 측정으로 균체 생육도가 가장 우수한 효모균주를 선정하였다.

선정된 균주의 형태적 특성, 배양상태 및 생리적 성질에 관해서는 Table 2와 같으며 Lodder et al²²⁾과 飯塚등²³⁾의 방법과 대조한 결과 *Debaryomyces nicotianae*와 비슷한 균주이므로 *Debaryomyces nicotianae*-SNU 72로 동정하였다.

Ethanol을 유일 탄소원으로 잘 이용하는 효모균주는 대부분이 유포자효모이며 그중에서도 분류학상²²⁾ *Pichia*속 *Hansenula*속이 강력하게 ethanol을

자화하는 것으로 알려져 있으나 본 실험에서는 ethanol의 이용성이 가장 큰 균주가 *Debaryomyces nicotianae*로 동정된바 매우 흥미있는 결과라 할수 있겠다.

Table 2. Description of *Debaryomyces nicotianae*-SNU 72

Growth in malt extract:

After 3 days at 25°C, cells were usually round, seldom oval and mainly single or some in pairs.

The size of cells with round to oval shape was $(4.5-2.5) \times (3.7-2.5)$.

After one week at 25°C, a turbidic and creeping ring, a sediment and a few islets were formed.

Growth on malt agar:

The streak culture after one month at 17°C to 20°C was greyish-white, dull, turbidic, umbilicate, wrinkled all over the surface.

Slide culture on potato agar:

No pseudomycelium.

Sporulation:

Spores were round with an oil drop in the middle. Mainly one spore or two spores were developed in the ascus.

An isogamous or usually a heterogamous conjugation preceded ascus formation.

Fermentation: absent.

Sugar assimilation: glucose(+). galactose(+). maltose(+). sucrose(+). lactose(-).

Assimilation of potassium nitrate: absent.

Ethanol as sole source of carbon: good growth, a thin pellicle was formed.

Splitting of arbutin: positive.

Production of carotenoid pigment: negative.

Production of starch-like compound: negative.

Ester formation: very weakly.

Production of acids: negative.

Reaction to litmus milk medium: peptonized, changed from blue to greyish-yellow.

Gelatin liquefaction: negative.

Source: isolated from soil.

2. 선정균주 *Debaryomyces nicotianae*-SNU 72의 배양 최적조건에 대한 검토

1) Ethanol 농도의 영향

기질로서의 ethanol 에 대한 농도별 자화능을 검토하기 위하여 4일동안 배양하면서 경시적으로 균체 증식도를 측정한 결과 다음 Fig. 1과 같다.

기질농도 6% 이상에서는 48시간 까지는 고농도로 인한 균체 생육상의 저해를 받아서 균체증식이 좋지 못하다는 것을 알 수 있다. 그러므로 본 실험정균주의 적정농도 범위는 4~5%라고 판정할 수 있겠다.

Omata et al¹⁴⁾에 의하면 jar fermentor 를 이용하여 4~5일간 배양한 결과 *Torula yeast*와 *bakery yeast*의 최적농도 범위는 2.4~4.0%이며 *Pichia mogi*는 4.0~6.4%라고 보고하였는 바 이는 본균주의 적정농도 범위와 비슷한 것이다.

본균주에 있어서도 6%농도에서 비교적 우수한 활성을 보여 4일간 배양후에는 오히려 최고 생육도를 보이고 있으므로 jar fermentor의 사용등과 같은 배양상의 제조건 개선으로 ethanol 耐性을 증가시킬 수 있는 가능성은 충분하다고 하겠다. 다음에 계속되는 배양조건의 검토에는 ethanol 농도

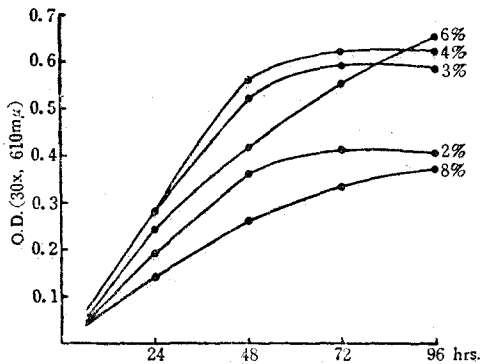


Fig. 1. Effect of ethanol concentration on the growth of the selected yeast.

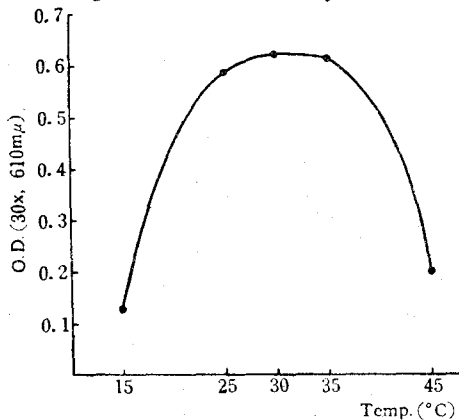


Fig. 2. Effect of Temperature on the growth of the selected yeast.

4%를 사용하여 실험을 행하였다.

2) 온도의 영향

효모는 특수한 고온균이나 저온균을 제외하고는 일반적으로 25~35°C가 적정온도범위로 알려져 있다.

Fig. 2에서와 같이 본균주는 3일간 배양한 결과 30°C 부근에서 증식이 양호하며 저온 보다는 고온에서 생육이 약간 우수함을 알 수 있다.

석유탄화수소 배지에서 배양할때와 같이 반응열은 많지 않지만 ethanol의 반응열은 362Kcal/100g로서 glucose의 191.5Kcal/100g 경우보다는 높으므로²⁰⁾²¹⁾ 저온보다는 고온에서의 생육도가 약간 우수함은 ethanol 이용균주로서는 좋은 조건을 구비하는 현상이라 할 수 있다.

3) pH의 영향

일반적으로 균체생육에 pH의 영향이 현저하다는 것은 잘 알려진 사실로서 효모의 적정 pH 범위는

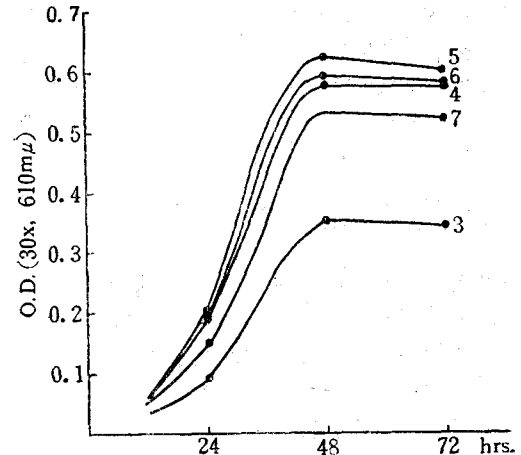


Fig. 3. Effect of pH on the growth of the selected yeast.

Table 3. Effect of inorganic nitrogen sources on the growth of the selected yeast.

N-source	O.D. (30×610mμ)
(NH ₂) ₂ CO	0.62
NH ₄ Cl	0.56
NH ₄ NO ₃	0.50
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.53
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.58
(NH ₂) ₂ CO + (NH ₄) ₂ HPO ₄ (1:1)	0.61
(NH ₂) ₂ CO + (NH ₄) ₂ SO ₄ (1:1)	0.60
(NH ₂) ₂ CO + NH ₄ NO ₃ (1:1)	0.55

Each N-source was added in the concentration of 0.5%.

5.0~7.0로 되어있다. 본실험에서 선정균주의 pH에 대한 영향은 Fig. 3과 같이 나타났으며 pH 3.0과 7.0에서는 증식도가 낮았으나 pH 4.0~6.0의 비교적 넓은 범위에서 별차이 없이 잘 증식함을 알 수 있다. 본균주의 최적 pH 범위는 5.0~5.5로 판정할 수 있으며 이 범위는 비교적 낮은 pH로서 배양상 잠균번식의 우려가 없는 유리한 조건을 구비하는 현상이라 하겠다.

효모가 생육함에 따라 첨가한 무기 영양소 중에서 이용하고 남은 殘基 즉 $SO_4^{=}$, $CO_3^{=}$, $PO_4^{=}$, Cl^- 등의 산기 때문에 배양액의 pH는 현저하게 저해된다. 그러므로 본실험에서는 12시간마다 28% NH_4OH 를 30배로 희석한 수용액으로 pH를 조절하면서 배양을 행하였다. 그런데 flask 진탕 배양에서는 일정한 시간 간격으로 pH를 조절하기는 잠균번식의 우려 때문에 곤란하므로 Lee et al²⁸⁾은 석유탄화수소배지에서 효모를 배양할때 배지 조제시 $CaCO_3$ 0.3%를 가하여 배양하면 균체 생육중 pH가 5.5~6.5 범위를 유지할 수 있었으므로 따로 pH를 조절할 필요가 없었다고 보고한 바도 있다. 본 실험에서는 최적 pH를 5.0으로 조정하여 다음 실험을 행하였다.

4) 무기 질소원의 종류별 영향

선정된 효모균주에 대한 최적 질소원을 찾기 위하여 본 실험을 행한 결과 단일 질소원으로서 urea가 가장 우수하며 혼합구에서는 $(NH_2)_2CO + (NH_4)_2HPO_4$ 가 우수한 질소원으로 나타났다. 이외에 혼합구 $(NH_2)_2CO + (NH_4)_2SO_4$ 도 비교적 좋은 질소원임을 확인하였다.

Omata et al¹⁴⁾은 $(NH_4)_2SO_4$, NH_4Cl 등은 부적당하며 전반적으로 보아 효모배양에서는 urea가 양호하다고 보고하고 0.2~0.5%를 적정농도 범위로 잡았다.

본 실험에서는 $(NH_2)_2CO + (NH_4)_2HPO_4$ 의 혼합구 역시 우수한 질소원이지만 urea 단일구를 사용하는 것이 공업적 생산의 cost down 면에서 유리하며 균체 생육속도도 약간 우수하므로 앞으로 계속되는 실험에 urea만을 사용하였다.

5) 질소원(Urea)의 농도

최적 질소원으로 선정된 urea의 농도에 따른 효모의 증식도를 조사해 본 결과 Fig. 4에서와 같이 urea의 농도 0.7% 이상에서는 생육 저해현상을 나타내고 있으며 0.3~0.5%가 적정농도 범위임을 알 수 있다.

Omata et al¹⁴⁾도 urea의 적정농도 범위를 0.2~

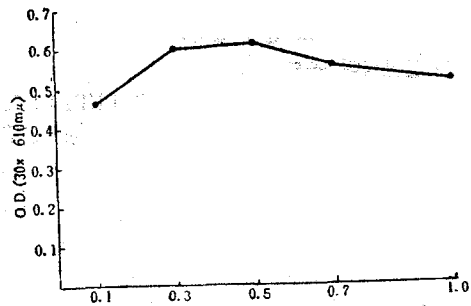


Fig. 4. Effect of urea concentration on the growth of the selected yeast

Table 4. Effect of phosphate sources on the growth of the selected yeast.

P-source	O.D.(30×610μm)
K_2HPO_4	0.60
KH_2PO_4	0.60
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	0.43
$NH_4H_2PO_4$	0.59
$KH_2PO_4 + Na_2HPO_4(1:1)$	0.59
$K_2HPO_4 + NH_4H_2PO_4(1:1)$	0.61
$Na_2HPO_4 + NH_4H_2PO_4(1:1)$	0.57

Each phosphate was added in the concentration of 0.4%.

0.5%로 보고 했지만 본균주의 urea에 대한 최적 농도가 0.5%인것은 약간 다량의 질소원을 요구하는 셈으로 질소이용효율을 높이는 우수 균주임을 알 수 있다.

6) 인산염의 종류별 영향

인산염의 종류에 따른 균체의 증식도를 검토하여 Table 4와 같은 결과를 얻었다. 단일구에서는 Na_2HPO_4 를 제외하고는 별다른 큰 차이를 발견할 수 없을 정도로 모두 우수한 영양원이며 혼합구에서는 $NH_4H_2PO_4 + K_2HPO_4$ 가 가장 우수하며 이 혼합구는 질소원과 인산염을 동시에 공급할 수가 있어서 질소원에서 초기 분해가 약간 완만한 urea의 결점을 보완할 수가 있었으므로 유리한 영양원으로 간주된다.

Ogata et al²⁷⁾은 methanol을 기질로 하여 효모를 배양할때 $KH_2PO_4 + K_2HPO_4$ 의 인산염 혼합구에 uridine, uridine mono phosphate, adenosine, adenosine mono phosphate와 같은 핵산관련물질을 첨가하여 인산염과 핵산의 공동효과를 조사하였으나 핵산 관련 물질 첨가구에서 균체 증식상의 차이를 발견하지 못했다고 보고하면서 인산염의 효

과를 상승시키기 위해 이런 물질을 첨가하는 것은 불필요하다고 보고 한바 있다.

7) 인산염의 농도

최적 인산염으로 선정된 $K_2HPO_4 + NH_4H_2PO_4$ 의 농도별 균체 증식에 미치는 영향을 검토한 결과는 Fig. 5와 같다. 인산염의 적정농도 범위는 0.1~0.5%로서 비교적 넓은 범위이며 균체 증식도는 인산염 농도 0.5%부터 감소하기 시작하여 0.7%에서는 급강하 함을 알았다. 본 실험에서는 0.3% 첨가구를 최적농도로 확인하고 다음 실험을 계속 하였다.

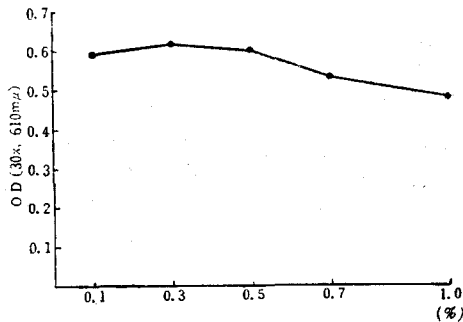


Fig. 5. Effect of phosphate concentration on the growth of the selected yeast.

8) 성장요소의 영향

각종 유기 영양원에 대해 농도별로 균체 증식도를 조사해본 결과는 Table 5와 같다. yeast extract 첨가구는 다른 성장요소 첨가구보다 우수한 균체 증식을 보이고 있는데 이는 본균주가 yeast extract의 어떤 성분을 그 증식에 대한 촉진물질로 하고있

Table 5. Effect of natural nutrients on the growth of the selected yeast.

Natural nutrient	Concentration(%)	O. D. (30×610mμ)
Yeast extract	0.001	0.45
	0.005	0.61
	0.01	0.62
	0.02	0.62
	0.05	0.61
Casamino acid	0.005	0.37
	0.01	0.46
Vit.-free casamino acid	0.005	0.21
	0.01	0.34
Peptone	0.005	0.45
	0.01	0.56
Control		0.24

음을 나타내고 있는 것으로 생각된다. 본균주의 yeast extract 적정농도 범위는 약간 높은 편인 0.01~0.02%로서 석유탄화수소를 이용하는 균주들²⁸⁾과 마찬가지로 ethanol 자화 효모인 본균주에서도 성장요소의 첨가효과를 인정할 수 있겠다. 그런데 본 실험에서는 0.01%의 yeast extract 첨가구에서 최고의 균체 증식도를 보이지만 yeast 균체의 대량 생산을 위한 cost down면에서 볼때는 균체 증식율이 0.01% 첨가구와 별차없는 0.005% 첨가구를 배양 최적농도로 하여도 growth rate에 큰 영향을 끼치지 않음을 알수있다. 그러나 vitamin-free casamino acid 첨가구는 무기 질소원만 첨가한 control 구와 별차이가 없는 점으로 미루어 보아 우수한 영양원은 될수 없는 것으로 생각되며 본균주는 vitamin 등의 영양요구성임을 암시해 준다. 그러므로 본실험에서는 growth factor로서 yeast extract 0.005%를 최적농도로 판단하고 이를 다음 실험에 적용하였다.

9) 무기물의 영향

수도물 中에는 상당량의 각종 미량원소가 존재할 것을 고려하여 본 실험에서는 Table 1의 기본 배지에 증류수를 가하여 배양액을 조제하였다.

균체배양 결과 $MgSO_4 \cdot 0.05\% + CaCl_2 \cdot 0.01\%$ 를 첨가한 기본배지 그대로의 배양구에서 역시 가장 우수한 균체생육도를 보였으며 다른 무기물첨가구에서는 control 구 보다는 상당히 높은 편이나 $Mg^{++} \cdot 0.05\% + Ca^{++} \cdot 0.01\%$ (기본배지)구 보다는 약간 미달하는 생육도를 나타내고 있어 Mg^{++} 와 Ca^{++} 이외의 다른 무기물의 첨가는 불필요한 것으로 생각된다.

10) 통기의 영향

본 선정균주의 균체증식에 따른 통기의 영양을 조사하기 위하여 250 ml-shaking flask의 일정한 용량의 용기내에 배양액을 10, 20, 40, 60, 100 ml씩 각각 다르게 넣어서 그 효과를 검토한 결과 Fig. 6와 같이 나타났다. 40 ml까지는 약간씩 상승하여 40 ml에서 최고의 균체증식을 보였다가 그 이상의 배지량에서는 균체 증식도가 감소됨을 알수 있다.

탄화수소를 기질로 하는 경우는 탄화수소의 경우 보다 다량의 산소를 요구함은 잘 알려진 사실이며 Kester et al²⁹⁾는 미생물에 의한 탄화수소의 분해기구는 대부분이 산화반응이라고 보고한 바도 있다. 각종의 기질별로 필요한 이론상의 산소량을 살펴보면 acetic acid 1 mole을 완전 연소하는데 필요한 산소량은 2 mole이며 ethanol의 경우는 3 mole, sugar의 경우는 6 mole, C_{14} 의 n-paraffin의 경우는 20 mole로서 이에 따르면 ethanol을 탄소원으로 하는 경우의 통기량은 sugar를 기질로 할때와 대등

하게 하면 충분할 것으로 생각된다.

Table 6. Effect of minerals on the growth of the selected yeast.

Minerals	Concentration(%)	O.D. (306×10mμ)
Na ₂ SO ₄	0.0002	0.39
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.0002	0.42
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.0002	0.49
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0.0002	0.48
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.0002	0.38
Na ⁺ +Fe ⁺ +Cu ⁺ +Mn ⁺ +Zn ⁺ +Mg ⁺ +Ca ⁺	each 0.0001	0.58
MgSO ₄ +CaCl ₂	0.05+0.01	0.61
	(basal med.) 0.025+0.01	0.55
	0+0.01	0.38
CaCl ₂ +MgSO ₄	0.005+0.05	0.46
	0+0.05	0.56
Control		0.36

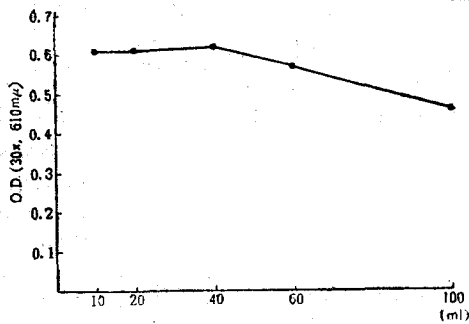


Fig. 6. Effect of aeration on the growth of the selected yeast.

3. 각종 탄소원의 이용

Table 1의 기본배지에서 탄소원만을 달리하여 2일간 진탕배양으로 본 균주의 각종 탄소원 특히 alcohol류에 대한 자화능을 검토한 결과 Table 7과 같다. 본 ethanol 자화효모는 ethanol 이외의 다른 alcohol에 대한 균체 증식도는 보잘것 없는 것으로 나타나고 있어 다른 종류의 alcohol로 탄소원을 전환하기는 곤란함을 알았다.

Omata et al.¹⁴⁾은 43 개의 ethanol 자화성효모 균주로서 각종 alcohol에 대한 자화능을 검토한 결과 methanol에 대해서는 균체생육이 다소용이하여 43 개균주중에서 26개가 확실한 자화능을 가지나 그 균주들의 균체 생산량은 매우 낮았다고 보고하였다. 또 iso-propanol에 대해서는 9개균주가, 그리고 n-butanol에 대해서는 3개균주가 확실한 자화능

Table 7. Effect of carbon sources on the growth of the selected yeast.

Carbon source	O.D. (610mμ)
Methanol	0.32
Ethanol	1.85
n-Propanol	0.29
iso-Propanol	0.30
n-Butanol	0.20
iso-Butanol	0.10
tert.-Amyl alcohol	0.09
Acetic acid	0.28

Carbon source was added in the concentration of 3%.

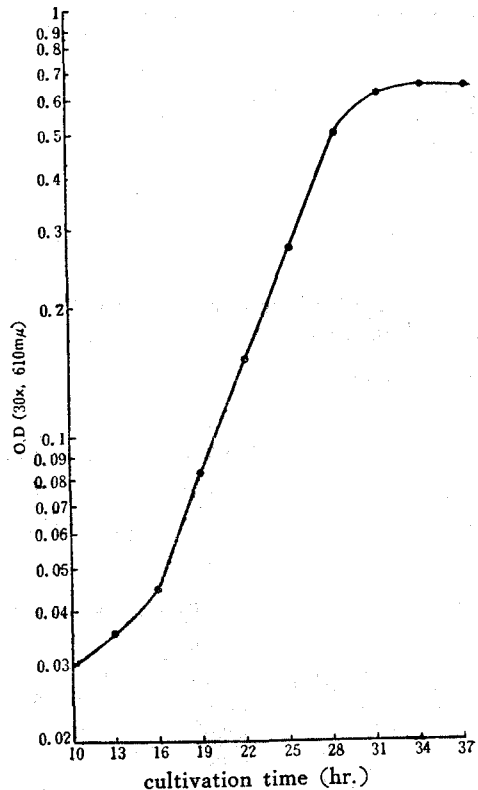


Fig. 7. Timecourse of cell propagation of the selected yeast.

을 가질뿐 전반적으로 생육상황이 나빴으며 sec-butanol과 tert-butanol에 대해서는 거의 모두가 생육하지 않았다고 보고한 바도 있는데 이는 본 실험 결과와 대차없음을 알 수 있다.

4. 세포증식 경과

배양조건의 검토에서 얻어진 모든 최적조건을 적용하여 본 선정균주 *Debaryomyces nicotianae*-SNU-72에 대한 세포증식 경과를 살펴 본 결과 Fig. 7과

같다. 본 균주의 lag phase는 대체로 16시간 까지로 나타나고 있으며 16시간부터 28시간까지가 대수기(logarithmic growth phase)임을 알 수 있다. 대수기에 있어서 비증식속도(specific growth rate)는 약 1.9hr^{-1} 정도이며 이때 이 세포의 doubling time은 3.6시간 정도였음을 확인하였다.

5. 건조 균체량과 일반성분 분석

본 선정균주를 34시간 동안 진탕배양하여 반복적으로 세척, 원심분리한 다음 건조 균체량을 구하였다. 균체수량은 16.88 g/l 이며 사용 alcohol 량에 대한 수율은 53.4%로 나타났다.

Omata et al¹⁴⁾은 jar fermentor를 이용하여, bakery yeast는 26시간 배양으로 33%의 수율을, *Pichia mogi*는 36시간 배양으로 63%의 수율을 얻었다고

보고하였다. 본 선정균주의 수율이 *Pichia mogi*의 것보다 다소 낮은 것은 flask진탕배양으로 인한 특히 pH 조절을 위하여 면전을 개폐할때 ethanol이 심하게 휘발했기 때문으로 생각된다. 그러므로 배양설비 개선으로 수율을 향상시킬 수 있는 가능성은 충분하다고 할수있다.

건조균체를 상법에 의하여 일반 성분분석을 행하였는데 기질별로 효모균체의 조성을 비교한바는 Table 8에서와 같으며 본균주의 단백질 함량은 55.19%로서 우수한 편에 속한다고 할수있지만 필수 아미노산과 비타민의 분포 및 그 함량등의분석이 따라야만 본 선정균주의 균체에 대한 정확한 영양가를 평가할 수 있을 것이다.

Table 8. Composition of yeasts grown on various substrates

Strain	Substrate	Protein	Fat	N-free extract	Ash
<i>Kloeckera</i> sp. ²⁷⁾	Methanol	45.3	5.24	33.97	6.90
<i>Candida utilis</i> ²⁷⁾	Acetic acid	40.76	12.88	32.59	6.06
Baker's yeast ³⁰⁾	Carbohydrate	40~50	1~2	32~40	6~10
<i>Candida</i> sp. ³¹⁾	Gas oil	54.5~57.7	1.9~7.2	—	—
<i>Debaryomyces nicotianae</i> -SNU 72	Ethanol	55.19	4.81	26.06	7.84

6. Alcohol의 이용률

효모의 생산에 있어서 ethanol이 양호한 탄소원이라는 것은 이상의 실험에서 명백하게 되었다. 그런데 본 실험에서는 실험실적인 것이므로 alcohol류를 탄소원으로 이용하는데 문제가 되는 것은 휘발성에 의한 손실인 것이다. 특히 flask배양에서는 pH 조절상 배양중 면전의 개폐가 불가피하므로 더 많은 휘발이 예상된다. ethanol의 이용률, 휘발량, 잔류량에 대해서는 Table 9에서와 같다.

Ethanol농도 4v/v%의 배양액에서 총 ethanol량은 1,264mg이며 blank test에 의하면 휘발한 ethanol량은 241.1 mg로 약 19.1%로 나타나고 있다. 사용한 총 ethanol량 1,264mg 중에서 잔류 ethanol 105.7 mg과 휘발한 ethanol 241.1 mg을 빼고나면 실제로 균체생산에 소비된 ethanol은 916.9 mg밖에 되지 않는다. 이때 균체수량은 675 mg이므로 소비된 ethanol량에 대한 균체수율은 73.6%로 나타났다. 사용 ethanol량에 대한 수율은 53.4%로 약간 낮은 편이나 이는 19.1%라는 상당량의 ethanol이 배양중 휘발했는데 이를 빼지 않고 계산한 것이기 때문이다.

Table 9. Utilization of ethanol by the selected yeast.

	Blank test (not inoculate) (34hrs)	Cultured (34hrs)
Added ethanol	1264mg (4v/v%)	1264mg(4v/v%)
Residual ethanol	992.6	105.7(8.36%)
Evaporated ethanol	241.4	
Utilized ethanol		$1264 - (241.4 + 105.7) = 916.9$
Evaporation rate of ethanol		19.1%
Dry cell weight		675mg
Dry cell wt. per utilized ethanol		73.6%

본균주의 ethanol이용률이 73.6%라는 것은 Omata et al¹⁴⁾이 jar fermentor를 이용하여 *Pichia mogi*로서 36시간 배양에서 약 79%의 수율을 얻었다는 보고와 비교해 볼때 flask배양이라는 점을 고려해보면 별차이 없는 우수한 수율이지만 *Guenthre*²⁶⁾²⁷⁾이 반응열에 관련시켜 산출한 균체수율을 예를들면 아래와 같은데 본 실험 결과는 ④식에 의하면 이론치 $94.5\% = \left(\frac{189}{200} \times 100\right)$ 에 비하여 상당히미

달하는 수치인 것이다.

- ① glucose 200g → 전조효모균체 100g + 반응열
 $373 \times 2 = 746 \text{Kcal}$ 363Kcal 383Kcal
 (연소열) (연소열)
- ② methanol 200g → 전조효모균체 144g + 반응열
 $538 \times 2 = 1076$ $363 \times 1.44 = 524$ $383 \times 1.44 = 552$
- ③ n-paraffin 100g → 전조효모균체 1.53g + 반응열
 1143 $363 \times 1.53 = 557$ $383 \times 1.53 = 587$
- ④ ethanol 200g → 전조효모균체 189g + 반응열
 $705 \times 2 = 1410$ $363 \times 1.89 = 686$ $383 \times 1.89 = 724$

이론치에 육박하는 높은 균체수율을 얻기 위해서는 제반 배양설비의 개선 특히 ethanol의 휘발방지를 위한 설비와 아울러 균주의 ethanol에 대한 耐性의 증가가 선결문제라고 하겠다.

요 약

Ethanol을 이용하여 효모균체를 생산할 목적으로 전국 각지의 32점의 토양시료에서 145개 균주를 분리하고 그중 ethanol자화능이 가장 우수한 균주를 선정하여 동정하였다.

그 선정균주에 대해서 배양상의 최적조건, 각종 탄소원의 이용성, 균체증식 경과, 균체의 화학적 조성, ethanol의 이용율등을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Ethanol 이용효모로 가장 우수한 균주는 *Debaryomyces nicotianae*-SNU 72로 동정되었다.
2. 선정균주의 최적 배지조성은 다음과 같다. ethanol농도 8% 이상에서는 분명한 생육저해를 일으켰으며 또한 성장요소로서 yeast extract 0.005%를 첨가한 효과는 현저하였고 Mg[#]와 Ca[#] 첨가구는 균체생산에 양호한 결과를 보였으나 그이외의 무기물 첨가는 불필요하였다.

Ethanol 40ml, (NH₂)₂CO 0.5g, K₂HPO₄ 0.15g
 NH₄H₂PO₄ 0.15g, MgSO₄·7H₂O 0.05g,
 CaCl₂·2H₂O 0.01g, Yeast extract 0.005g,

Tap water 1000ml.

3. 선정균주의 배양 최적조건은 pH 5.0~5.5, 온도 30~33°C이고 통기의 효과는 정지 배양의 경우 보다는 양호하였다.

4. Ethanol 이용성 효모인 본균주의 각종 다른 alcohol 및 acetic acid에 대한 균체생육은 저조하여 기질의 대체는 곤란하였다.

5. 선정효모균주의 lag phase는 16시간 까지이고 다음 28시간 까지 대수기였으며 이때에 비증식율은 1.9hr⁻¹이고 doubling time은 3.6시간이었다.

6. 균체성분은 조단백질이 55.19%였으며 기타 조성은 효모의 평균조성에 준하였다.

7. 본 선정효모균주의 검토된 최적조건으로 34시간 배양한 결과 사용한 ethanol에 대한 균체수율은 53.4%, 소비된 ethanol 량에 대한 균체수율은 73.6%, 배양중 ethanol휘발량은 약 19.1%였다.

References

- 1) Galder, A.: New Scientist, Nov. p.468(1967)
- 2) Usami, S. & Taketomi, N.: Ind. Chem., 64: 2072 (1961)
- 3) Noguchi, Y. & Bando, Y.: J. Ferment. Technol., 38:485 (1960)
- 4) Moyer, A.J.: Appl. Microbiol., 1:1 (1953)
- 5) Pantchava, E.C. & Bikhvoski, V. Ya.: Prikl. Biokhim. Microbiol., 1:37 (1965)
- 6) Harada, T. & Murooka, Y.: J. Ferment. Technol., 44:192 (1966)
- 7) Oki, T., Sayama, Y., Nishimura, Y. & Ozaki, A.: Agr. Biol. Chem., 32:119 (1968)
- 8) Murooka, Y. & Harada, T.: Agr. Biol. Chem., 31:1035 (1967)
- 9) Harrington, A.A. & Kallio, R.E.: Can. J. Microbiol., 6:1 (1967)
- 10) Johnson, P.A. & Quayle, J.R.: Biochem. J., 95:859(1965)
- 11) Kaneda, T. & Roxburgh, J.M.: Can. J. Microbiol., 5:87 (1959)
- 12) Dworkin, M. & Foster, J.W.: J. Bacteriol., 72:46 (1956)
- 13) Hamer, G.: J. Ferment. Technol., 46:177 (1968)
- 14) Omata, S., Murao, S. & Terajima, H.: J. Ferment. Assoc., 26:313, 317 (1969)
- 15) Ogata, K., Nishikawa, H., Ohsugi, M. & Tochikura, T.: J. Ferment. Technol., 48:389 (1970)
- 16) Akiba, T., Ueyama, H., Yamauchi, Y., Seki, M. & Fukimbara, T.: J. Ferment. Assoc., 27:91 (1969)
- 17) Ueyama, H., Yamauchi, Y., Tsugi, N. & Fukimbara, T.: J. Ferment Technol., 49:581 (1971)
- 18) Mor, J.R. & Fiechter, A.: Biotech. and Bioeng., 10:159 (1968)

- 19) Taketomi, N. & Suzuki, H.: *Ind. Chem.*, **52**: 328 (1949)
- 20) Agarward & Peterson.: *Arch. Biochem.*, **20**: 59 (1949)
- 21) Taketomi, N., Suzuki, H. & Tanaka, S.: *Ind. Chem.*, **54**:642 (1951)
- 22) Lodder, J. & N.J.W. Kreger-van Rij: *The Yeasts, A Taxonomic Study*, North Holland Pub. Co., Amsterdam. (1952)
- 23) 飯塚, 後藤: 酵母の分類同定法, 東京大學出版會(1969)
- 24) 東京大學: 實驗農藝化學, 上卷, p.257, 朝倉書店
- 25) 京都大學: 農藝化學實驗書, 三卷, p.1319, 產業圖書
- 26) 高橋: 食品工業, No.2, p.19. (1968)
- 27) Ogata, K., Nishikawa, H., Ohsugi, M. & Tochikura, T.: *J. Ferment. Technol.*, **48**:470, 478 (1970)
- 28) Lee, K.H., Shin, H.K.: *J. Korean Agr. Chem. Soc.*, **14**:9. (1970)
- 29) Kester, A.S. & Foster, J.W., *J. Bacteriol.* **85**: 859, (1963)
- 30) Stoke, J.L.: *Microbial Protein*, A.M. Altschul, Ed. Academic Press (1958)
- 31) Jonhson, M.J.: *Science*, **115**:1515 (1967)