

廢纖維資源의 醱酵工學的 利用에 關한 研究

(第 8 報) 纖維素資化細菌의 混合培養

尹 漢大 · 成 洛葵

慶尙大學 食品加工學科
(1978년 4월 2일 수리)

Studies on the Fermentative Utilization of Cellulosic Wastes

(Part 8) Mixed Culture of Cellulose Assimilating Bacteria

Han Dae Yun · Nack Kie Sung

Gyeong Sang National University, Jinju, Korea
(Received April 2, 1978)

Abstract

The study was made of the cultural condition and physiological characteristics of the symbiotic pair of microorganisms, *Cellulomonas flavigena* and the second organism.

It also contains the results of a taxonomical study of the second organism.

The results obtained were summarized as follows:

- 1) Cell yield of the mixed culture, *Cellulomonas* and the second organism, was higher than that of each pure culture in CM-Cellulose medium.
- 2) The taxonomical characteristics of the second organism revealed that it probably belonged to the genus *Sporocytophaga* because it had a gliding motility and microcyst.
- 3) Optimum pH of the mixed culture was found to be in the vicinity of 7.2, and optimum temperature of the cell growth in the mixed culture was observed to be in the vicinity of 30°C.
- 4) It was found that the majority of the population during growth in the mixed culture consisted of *Cellulomonas flavigena*.
- 5) *Cellulomonas flavigena* required thiamine and biotin as growth factors but *Sporocytophaga* sp. had no requirement of vitamins.
- 6) Glucose was not found in detectable amounts in the medium of *Cellulomonas flavigena* but it was traced in the mixture by thin layer chromatography.
- 7) Sixteen amino acids were analyzed from the cell protein of *Cellulomonas flavigena* by amino acid autoanalyzer. The amount of the leucine, valine and arginine was very high.

서 론

옛날부터 酒類, 乳製品, 醬類 등의 醱酵食品은 自然的인 混合培養에 依해서 製造되었으며, 最近에는 순수 분리한 菌을 目的에 따라 人爲的으로 混合培養하므로써 單獨培養에서 보다 더욱 좋은 結果를 얻었다고 보고되었으며^(1,2), 특히 Han 등⁽³⁾은 *Cellulomonas* 屬과 *Alkaligenes* 屬을 混合培養하여 좋은 結果를 얻은 바가 있다. 이러한 混合培養에 대한 研究⁽⁴⁾는 約 70年前에 시작되었으며 오늘날에도 混合培養의 有用性은 認定되었지만, 混合培養의 機作은 微生物사이의 相互作用이 매우 복잡하기 때문에 基本的인 特性을 正確하게는 究明하지 못하고 있다.

混合培養에 있어서 각 菌들 간의 相互作用은 mutualism, commensalism, mutualism, competition, amensalism, parasitism, predation 등으로 分類⁽⁴⁾되는데 이중에서도 commensalism은 工業的으로 매우 중요한 것으로 알려져 있다.

한편 單獨培養에서 하나의 菌株는 菌 特有的인 代謝過程을 가지므로, 生理的인 能力(capacity)도 制限되어 있다. 이러한 制限은 培養過程에서 각기 보완될 수 있는 機能을 지닌 두 種類 以上の 菌을 混合培養하므로써 어느 정도 解決할 수 있으리라 믿는다. 특히 纖維素分解菌은 實驗室에서 纖維素分解率이 自然에서 보다 훨씬 떨어지는데, 미생물사이의 symbiosis를 잘 確立시키므로써 單獨培養에서 보다 좋은 結果를 얻을 수 있다고 생각되어 저자들은 SCP 生産을 위한 纖維素資化細菌의 分離 및 利用過程에서 얻은 主菌株인 *Cellulomonas flavigena*와 補助菌을 混合培養하므로써 보다 나은 菌體增殖의 可能性을 조사하고 이에 따른 기초적인 몇 가지 實驗結果를 보고하는 바이다.

材料 및 方法

1. 使用菌株

前報⁽⁵⁾에서 分離同定한 纖維素資化細菌 *Cellulomonas flavigena*를 主菌株로 使用하였으며 補助菌은 主菌株의 分離 및 利用過程^(5,6)에서 얻은 菌이다.

2. 培地組成 및 培養法

前報에^(5,6) 依한 方法으로 하였다. 단 纖維素는 C. M. C. (Katayama Chemical製)를 基質로 使用하

였다.

3. 細菌의 同定法

補助菌은 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology⁽⁷⁾에 의하여 同定하였다.

4. 菌의 生育度 測定法

菌體培養液을 3배로 희석하여 MPS-5000 Spectrophotometer (Shimadzu)로 660 nm에서 O. D.를 測定하여 生育程度를 비교하였으며, 菌數測定은 pour plating technique에 의하여 各各의 colony 狀態를 구별하여 測定하였다.

5. Vitamin 要求性測定法

Vitamin 源으로 yeast extract 대신 각종 수용성 vitamin을 0.002%되게 添加하였으며, 生育에 따른 濁度를 肉眼으로 觀察하여 生育程度를 判定하였다.

6. 培養液中의 纖維素 分解 糖의 同定

Pastuska 法⁽⁸⁾에 依해 培養液을 前處理하였으며, butanol : acetic acid : water를 5 : 4 : 3의 比率로 섞은 展開溶媒를 使用하여 T. L. C. 하였으며 發色劑는 一次的으로 I₂에 依하여 spot를 확인한 다음 다시 50% H₂SO₄溶液으로 發色시켰다. 그리고 本實驗에 使用한 標準物質로서는 特級試藥을 使用하였다.

7. 菌體 蛋白質의 아미노酸 分析法

乾燥菌體를 精粹하여 ample에 取하고 6N HCl를 加하여 封入한 後 110±1°C oven에서 24時間 加水分解하여 rotary evaporator로서 농축시켜 수회 물을 加하여 HCl를 除去하고 citrate buffer (pH 2.2)를 加한 후 Spackman等⁽⁹⁾의 方法에 따라 Amberite CG-120 樹脂 column을 利用하는 아미노酸 自動分析機(JLC-6AH, No 410)로서 分析하였다.

實驗結果 및 考察

1. 混合培養에 따른 菌體 增殖

Fig. 1은 *Cellulomonas flavigena*와 補助菌을 C. M. C. 培地에서 單獨 및 混合培養하여 經時的으로 生育程度를 O. D.로 表示한 것이다. 混合培養하였을 때가 單獨培養時보다는 월등한 菌體의 增加를 보이고 있는데 이러한 現象은 두 菌의 상호작용으로 생각되며, 그 價値性이 認定되어 補助菌을 同定하고, 混合培養에 따른 여러가지 影響에 대한 調査를 계속하였다.

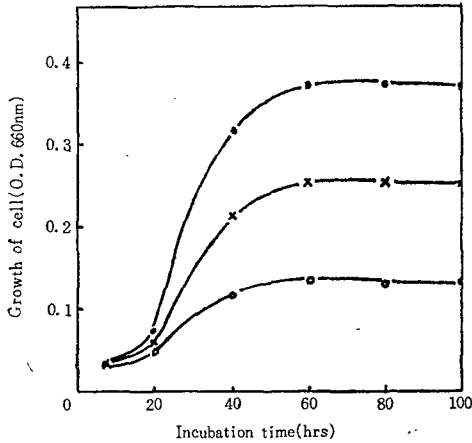


Fig. 1. The Kinetics of Growth of Organisms in CM-Cellulose inoculated with *Cellulomonas* sp. and *Sporocytophaga* sp.
 —•— : *Cellulomonas* sp. and *Sporocytophaga* sp.
 ×—× : *Cellulomonas* sp.
 ○—○ : *Sporocytophaga* sp.

2. 補助菌의 同定

補助菌의 形態의, 培養의, 生理的 特性을 조사한 결과는 Table 1, 2와 같다.

以上の 結果에서 補助菌은 gliding motility를 보였으며, 원형의 microcyst가 확인되었는데 이것은 *Sporocytophaga* 屬과 一致하였다. 한편 Bergey's Manual 8판에 의하여 strain을 결정하는데 어려움이 있어 屬을 결정하는 것으로 그쳤다.

Table 1. Morphological and Cultural Characteristics of the Isolated Microorganism.

A. Morphological Characteristics	
1. Form	: Round
2. Size	: (0.5~0.7) × (5.0~8.0) μ
3. Motility	: Gliding
4. Gram stain	: Negative
5. Microcyst	: Spherical
B. Cultural characteristics	
1. Agar slant	: White
2. Broth	: Pellicle
3. Filter paper	: No degradation
4. Optimum temp.	: 30°C
5. Colony	
a) Form	: Circular
b) Elevation	: Concave
c) Margin	: Lobate

Table 2. Physiological Characteristics of the Isolated Microorganism.

1. Starch hydrolysis	+	
2. Nitrate reduction	-	
3. Indole	-	
4. Gelatin liquefaction	+	
5. NH ₃	+	
6. M. R. test	+	
7. Voges-Proskauer test	+	
8. H ₂ S	+	
9. Litmus milk	acid	
10. Catalase	+	
11. Urease	+	
14. Acid from carbohydrate		
Glucose	+	Fructose +
Maltose	+	Lactose +
Sucrose	+	
15. Carbohydrate assimilation		
Glucose	+	Galactose +
Arabinose	+	Maltose +
Cellobiose	+	Dextrin +
Fructose	+	Mannose +
Lactose	+	Sucrose +
Raffinose	+	Starch +

3. 菌體增殖에서의 pH 影響

混合培養에 따른 pH의 影響을 檢討하기 위해 pH를 다르게 조절한 培地에서 單獨 및 混合接種하여 60時間 培養하여 生育程度를 O.D.로 表示한 結果는 Fig. 2와 같다. Fig. 2에서 처럼 *Cellulomonas flavigena* 單獨으로 培養하였을 때 pH 7 부근에서 좋았으며 *Sporocytophaga* sp.는 전자보다 약간 높은 pH에서 生育이 좋았다. 그리고 混合培養에서는 7.2근방이 좋았으며, 混合培養하므로써 넓은 pH영역에서 菌體 增殖이 좋았다.

4. 菌體增殖에서의 溫度影響

混合培養에 있어서 溫度의 影響을 檢討하기 위하여 25°C, 30°C, 35°C, 45°C로 溫度를 調節하여 經時的으로 培養한 結果는 Fig. 3과 같다.

Fig. 3에서 처럼 混合培養에서 菌體의 增殖은 30°C 부근에서 가장 양호하였으며 45°C 以上에서는 菌體의 增殖은 거의 없었다.

5. 混合培養에 있어서의 두 菌의 分布狀態

Cellulomonas flavigena 와 *Sporocytophaga* sp.를 C. M. C. 培地에서 培養시켜 混合培養液中에 存在하는 菌의 分布狀態를 調査한 結果는 Fig. 4와 같

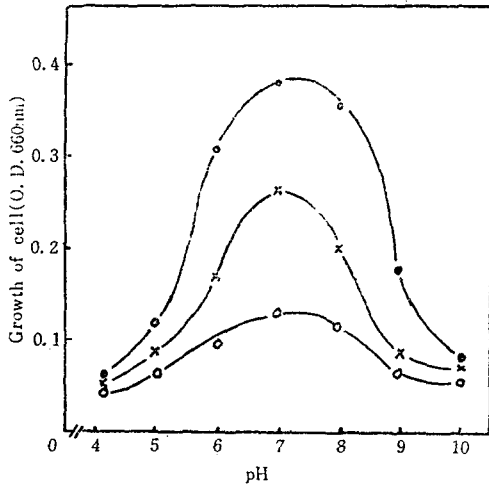


Fig. 2. Effect of pH on the Growth of *Cellulomonas* sp. and *Sporocytophaga* sp. in CM-Cellulose Medium.

—○— : *Cellulomonas* sp. and *Sporocytophaga* sp.
 - - - x - - - : *Cellulomonas* sp.
 —□— : *Sporocytophaga* sp.

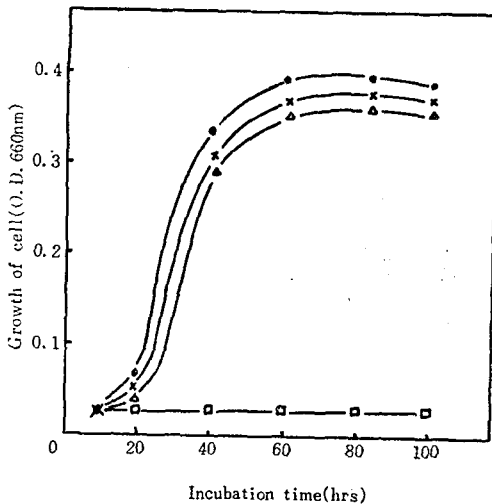


Fig. 3. Effect of Temperature on the Mixed Culture.

x-x : 25°C
 — : 30°C
 △-△ : 35°C
 □-□ : 45°C

다. 혼합배양액에서 주로 분포되어있는 것은 *Cellulomonas flavigena*였으며 *Sporocytophaga* sp. 의

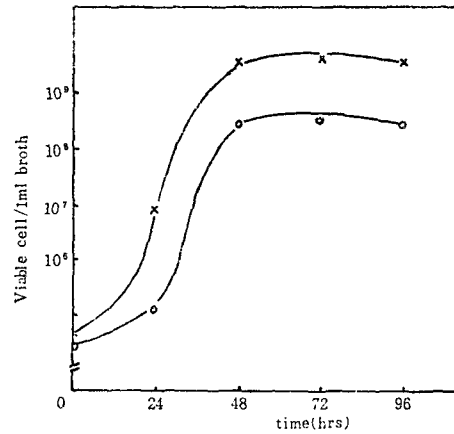


Fig. 4. Differential Count of *Cellulomonas* sp. and *Sporocytophaga* sp. during Mixed Culture in CM-Cellulose Medium.

x-x : *Cellulomonas* sp.
 o-o : *Sporocytophaga* sp.

分布比率은 10 : 1 정도로 나타났다. 그리고 배양 24시간 후에는 生育分布比率의 차가 컸으며 시간이 경과함에 따라 그比率은 점점 낮아지는 경향이였다. 이러한 사실로 미루어 보아 基質로서 사용된 C.M.C.가 chain이 긴 狀態에서는 *Cellulomonas flavigena*에 의해 주로 分解된 후, 짧아진 cellulose chain을 *Sporocytophaga* sp.와 함께 資化하므로써 全體의인 代謝速度를 促進시켜 混合培養에 의한 菌體生育이 增加되는 것이 아닌가 생각된다.

6. 菌의 濾紙崩壞에 미치는 影響

振盪用 液體培地 10 ml 가 함유된 小型 시험관에 *Cellulomonas flavigena*와 *Sporocytophaga* sp.를 接種하고 진탕배양하여 時間이 經過함에 따라 filter paper가 崩壞되는 面積을 肉眼으로 觀察하여 檢定한 結果는 Fig. 5.와 같다. Fig. 5에서 처럼 *Cellulomonas flavigena* 單獨培養과 混合培養과의 濾紙崩壞能에 대한 差이는 별로 없었으며, *Sporocytophaga* sp. 단독으로는 붕괴시키지 못하였다.

7. Vitamin 要求性 檢討

各種 水溶性 vitamin을 0.002% 수준으로 첨가하여 *Cellulomonas flavigena*의 vitamin 要求性を 調査한 結果는 Table 3과 같다.

Table 3에서 처럼 thiamine과 biotin이 菌의 growth factor로서 필요하였으며 일정한 濃度에서는 thiamine이 biotin 보다 生育에 대한 影響이 컸으며, yeast extract와 mixed vitamin 區는 thiamine

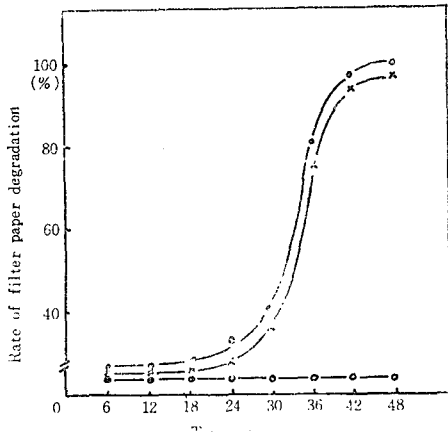


Fig. 5. Effect of Filter Paper Degradation by *Cellulomonas* sp. and *Sporocytophaga* sp.

—·— : *Cellulomonas* sp. and *Sporocytophaga* sp.
 ×—× : *Cellulomonas* sp.
 ○—○ : *Sporocytophaga* sp.

區에 비해 生育程度가 현저히 빠르게 나타났다.

그리고 *Sporocytophaga* sp.의 vitamin 要求性은 없었다. 以上の 두 結果로 보아 두 菌株의 vitamin 이 相異한 것으로 나타났는데, 이것은 한 菌株가 다른 菌株에 growth factor를 제공하는데 어떤 역할을 하지 않는가 생각되며, 이러한 結論을 얻는에는 더욱 檢討의 여지가 있다고 생각된다.

8. T. L. C. 에 依한 培養液中的 纖維素 分解 糖의 同定

분말여지를 基質로 하여 *Cellulomonas flavigena* 및 混合培養한 液을 Pastuska (8) 法에 依하여 處理한 다음 T. L. C. 로 分析한 結果는 Fig. 7과 같다. 標準物質로 glucose, cellobiose, cellotriose는 잘 나타났다으나 cellotetrose 이상의 化合物은 잘 동정되지 않았다.

Fig. 7에서 보는 바와 같이 *Cellulomonas flavigena* 單獨培養에 있어서는 cellobiose와 다른 中間代謝產物이 추적되었으며 glucose는 추적할만한 量은 없었으나 混合培養에서는 glucose의 存在가 確認되었다. 따라서 *Cellulomonas*의 體外酵素가 cellulose를 加水分解하여 cellobiose까지 分解하여, 이것은 다시 細胞內에서 代謝되는 것으로 생각된다. 韓氏도 *Cellulomonas* 속의 단독 배양시 측정되는 中間代謝產物 때문에 cellulase의 生合成이 저

Table 3. Effect of Vitamins on the Growth^{b)} of *Cellulomonas flavigena*

Vitamins ^{a)}	Growth			
	1 day	2 days	3 days	4 days
Control	---	---	---	---
Yeast extract	--	++	++	++
Thiamine-HCl	--	-+	++	o++
Biotin	--	--	-+	++
Riboflavin	--	--	--	--
Pantothenic acid	--	--	--	--
Vitamin B ₆ -HCl	--	--	--	--
Vitamin B ₁₂	--	--	--	--
Thiamine-HCl+Biotin	--	++	++	++
Pantothenic acid + B ₆ -HCl	--	--	--	--
Riboflavin+B ₆ -HCl	--	--	--	--
Thiamine+B ₆ -HCl	--	++	++	++
Biotin+B ₆ -HCl	--	--	--	--
Mixed Vitamin ^{c)}	--	++	++	++

a: 0.002% of vitamin or vitamins were added into basal medium.

b: Growth was determined by visual observation of cloudiness from duplicated tube of each treatment.

c: Water soluble vitamins

해되어 混合培養하므로써 菌體生産을 증가시킨 것을 보고하였다⁽¹⁰⁾.

이러한 사실로 보아 混合培養하므로써 菌의 cellulolytic activity의 장애를 어느 정도 제거하는 역할을 하므로써 增殖이 더욱 활발해지는 것이 아닌가도 생각된다.

以上の 菌이 증식하는데 있어서 여러가지 外的인 條件과 內的인 條件을 檢討하여 얻어진 結果로서 混合培養效果에 대한 相互機作的 結論을 얻는다는 것은 어려운 것이라 생각되며, 酵素學的인 面을 더욱 調査하여 본다면 確실한 結論을 얻을 수 있으리라 생각된다.

앞으로 SCP生産에 있어서 原料의 공급면에서 볼 때, 基質로서 纖維素가 좋은 것으로 생각되며,

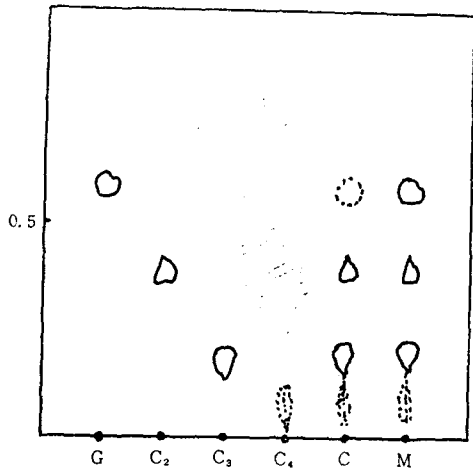


Fig. 6. Diagram Showing T. L. C. of Culture Broth.

G: Glucose, C₂: Cellobiose
 C₃: Cellotriose, C₄: Cellotetrose
 C: *Cellulomonas* sp. culture
 M: Mixed culture
 Solvent system: butanol/acetate/water (5:4:3)
 Detection: I₂ and 50% H₂SO₄

이러한 점을 감안할 때 혼합배양에 의해 菌體收率을 더욱 向上시키는 것도 바람직한 것이라고 생각된다.

9. 菌體蛋白質의 아미노酸 定量

*Cellulomonas flavigena*를 alkali 處理한 變질에서 培養하여 乾燥한 後 아미노酸을 分析한 結果는 Fig. 7과 같다. Peak 1에서 18까지는 標準物質과 溶出位置가 잘 一致하였으며 모두 16種類의 아미노酸이 檢出同定되었다. 아미노酸의 含量이 많은 것은 arginine, aspartic acid, threonine, glutamic acid., alanine, valine 등의 순서였다.

한편 菌體中에 含有된 必須 아미노酸의 含量은 Table 4와 같다. Table 4에서 처럼 必須 아미노酸으로는 valine, leucine, arginine이 비교적 많이 함유되어 있었다.

보통 菌體內의 蛋白質 含量은 乾物로 換算하여 45~50% 정도 含有되어 있어 전통적인 蛋白質食品에 比較하면 蛋白質含量이 매우 높은 것으로 나타나고 있으며 生産價格面에서 볼 때 비교적 낮은 편이다⁽¹¹⁾. 그리고 現在 SCP의 生産은 石油蛋白質이 生産의 中心이 되어 있는 實情인데, 石油資源의 有限성과 그 毒性物質의 問題性을 고려한다면 앞으로 纖維素資源으로부터 SCP 生産이 바람직한 것

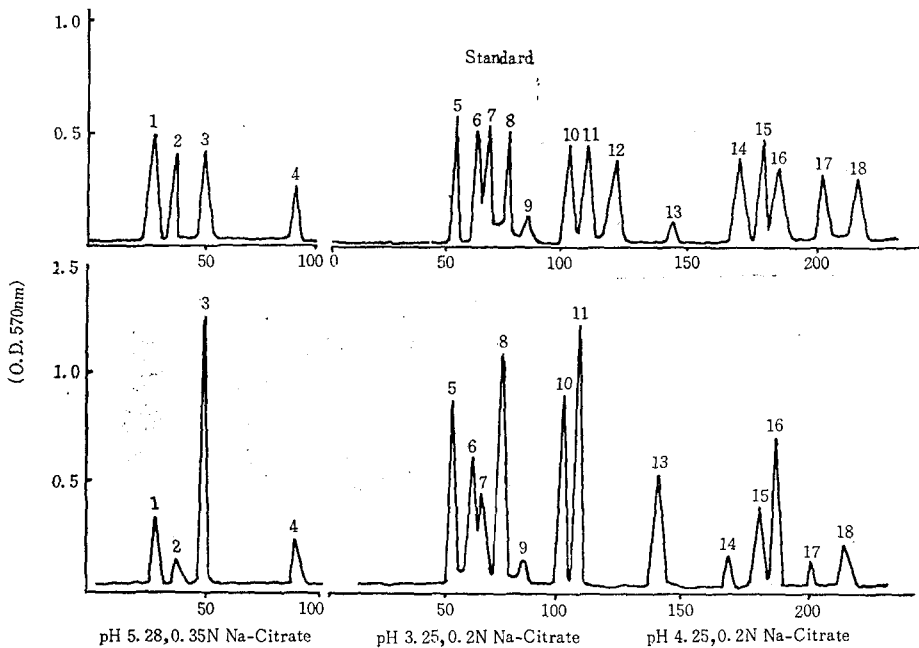


Fig. 7 Chromatograph of Amino Acid of the Cell Protein.

1. Lys 2. His 3. NH₃ 4. Arg 5. Asp 6. The 7. Ser 8. Glu 9. Pro 10. Gly 11. Ala 12. Cys 13. Val 14. Met 15. Ileu 16. Leu 17. Tyr 18. Phe

Table 4. Essential Amino acid Content of the Cell Protein (grams of amino acid per 100 grams of protein).

Amino acid	<i>Cellulomonas</i> cell protein
Arginine	8.1
Histidine	2.3
Isoleucine	3.6
Lysine	5.0
Methionine	1.7
Phenylalanine	4.5
Tyrosine	2.7
Threonine	6.3
Valine	8.7
Leucine	8.5

※*Cellulomonas* sp. are grown on alkali-treated rice straw.

으로 생각된다. 이러한 觀點에서 볼 때 섬유소 자원 원이 비교적 많은 우리 나라에서 이들의 보다 효과적인 利用을 위해서 混合培養에 依한 利用 可能性을 더욱 研究하여 차후에 보고코자 한다.

要 約

纖維素 資化細菌의 分離 및 利用過程에서 混合培養하므로써 菌體增殖이 向上 되었는데, 이러한 混合培養에 따른 여러 가지 影響과 補助菌을 同定한 結果를 要約하면 다음과 같다.

1) *Cellulomonas flavigena*의 單獨培養에서는 O. D. 가 0.26이었으나, 補助菌과 混合培養하므로써 O. D. 가 0.37로 증가하였다.

2) 補助菌은 gliding motility가 있었으며, microcyst가 確認되었는데 이것은 *Sporocytophaga* 屬과 一致하였다.

3) 混合培養에서 生育最適 pH는 7.2 부근이 좋았으며, 最適溫度는 30°C 부근이었다.

4) 混合培養에 있어서 두 菌의 分布도는 10 : 1 정도로 *Cellulomonas flavigena* 가 주로 分布되어

있었다.

5) *Cellulomonas flavigena*의 growth factor로서 thiamine과 biotin을 要求하였으며, *Sporocytophaga* sp.는 vitamin 要求성이 없었다.

6) *Cellulomonas flavigena*의 單獨培養液에서는 추적할 만한 glucose 量이 없었으나, 混合培養에서는 glucose가 確認되었다.

7) *Cellulomonas flavigena*의 菌體中 必須아미노酸으로 valine, leucine, arginine이 비교적 많은 편이었다.

文 獻

- 1) Peitersen N. : *Biotechnology and Bioengineering*, **17**, 361 (1975).
- 2) Peitersen N. : *Biotechnology and Bioengineering*, **17**, 1291 (1975).
- 3) Han, Y.W. and V.R. Srivassan: *Appl. Microbiol.*, **16**, 1140 (1968).
- 4) *Advances in Applied Microbiology* (10), Academic Press, New York and London p. 269~290 (1960).
- 5) Sung, N. K. and K.H. Shim: *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **5** (10), 1 (1977).
- 6) Sung, N.K., K.H. Shim and H.D. Yun: *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **5** (10), 127 (1977).
- 7) Buchanan R.E. and N.E. Gibbone: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed, Williams & Wilkins Co., Baltimore Md. (1974)
- 8) 鈴木有隆: 薄層クロマトグラフィの實際, 廣日書店, (1954).
- 9) Spackman D.H., Stein W.H. and S. Moore: *Anal. Chem.*, **30**, 1190 (1958).
- 10) Han, Y.W. : Studies on the Bacteria and Bacterial enzyme involved in the Degradation of Cellulase, Degree Thesis of Louisiana State Univ.
- 11) Callihan C.D., C.E. Dunlap and Y.W. Han: *Food Tech.*, **25** (2), 32 (1971).