

ALKANE 의微生物酸化의 反應條件과

炭素 및 窒素平衡

서울대학교 工科大学

朴 泰 源

(1969. 5. 17. 接受)

Reaction Conditions and Carbon, Nitrogen Balance in the Course of Microbiological Oxidation of Alkane

by

Tai Won Park

College of Engineering

Seoul National University

(Received May 17, 1969)

ABSTRACT

As part of an extensive program on the microbiological oxidation of hydrocarbons, reaction conditions and nutrients consumption of candida lipolytica grown on alkane as carbon source were studied. For optimum growth of yeast, the conditions of pH 5, temperature 30°C, carbon number C₁₆ & C₁₈, aeration 25.6 l/1/hr, agitation 3000 r. p. m., hydrocarbon concentration 10% were obtained. Carbon and nitrogen balance related to these conditions were also investigated. In the course of this investigation, some significant effects of pH and carbon number of hydrocarbon variation were observed.

序 論

近來 石油을 利用하여 微生物의 作用으로 有用한 製品을 얻는 問題가 많이 論議되고 있다. 여러 사람들에 依해 炭化水素로부터 脂肪酸, 알코올, 알데히드 등을 얻었다는 報告가 있으며¹⁾²⁾ 또한 炭化水素를 炭素源으로 하여 얻은 微生物細胞를 食用으로 하는 課題가 몇몇 會社에서 生産段階에 있다³⁾.

1946年 TAGGART⁴⁾는 天然가스에 微生物을 作用시켜 脂肪酸, 에스테르, 알코올 등을 製造하는 特許를 얻었다. JUST와 SHNABEL⁵⁾은 1948년에 4~5%의 炭化水素培養基에서 1kg의 細菌細胞를 얻었으며 1951년에는 Candida lipolytica와 Candida tropicalis를 파라핀系 炭化水素에서 培養하여 좋은 收率로 酵母細胞를 얻었는데 이들은 炭素數가 12個 以上の 直鎖파라핀과 올레핀 炭化水素를 資化하고 側鎖炭化水素는 資化하지 않

음을 發表하였다.

1955年 HOERBURGER⁶⁾는 Candida tropicalis를 使用하여 細胞生成에는 空氣供給量이 重要함을 指摘하였다. 1963年 CHAMPAGNAT⁷⁾는 파라핀系 炭化水素를 選擇적으로 代謝하는 菌을 使用하여 原料가스를 完全히 脫蠟하여 10kg의 原料가스로부터 石油蛋白(蛋白質, 미타민濃縮物) 1kg 및 流動點이 低下된 重油 9kg을 얻었으며 이 石油蛋白에는 Lysine, Threonine이 많이 動物蛋白의 pattern에 가까우며 비타민 B群이 많이 包含되어 蛋白質 不足을 解決하는 가장 效果의인 方法 中の 하나로 期待되고 있다.

1961年 Raymond⁸⁾는 Candida로 n-octadecane을 1963年 Miller와 Johnson⁹⁾은 Candida intermedia로 n-octadecane을 Candida guilliermondi와 Candida parasitosis로 n-hexadecane을 또한 Candida intermedia로 eicosane, docosane, pristane을 資化시켰다.

1967年 Chapiro⁸⁾는 酵母細胞의 收率이 좋은 것으로 *Candida arborea*, *Candida pelliculosa*, *Candida lipolytica*를 들고 있다.

Johnson⁹⁾은 *Pseudomonas*屬의 細菌을 使用하여 methane, naphthalene, octadecane의 細胞蛋白 收量의 比가 $C_4:C_{10}:C_{18}=0.87:0.60:1.20$ 이라는 結果를 發表하고 炭素源을 methane:methanol:glucose로 하였을 때의 收量의 比는 0.87:0.92:0.93이라 하였다.

1963年 高橋¹⁰⁾와 山田은 *Pseudomonas aeruginosa*를 kerosene에 作用시켜 20%收率의 菌體를 얻었고 그 細胞中에는 60%의 蛋白質과 5%의 RNA가 含有되어 있었다.

Esso-Nestle¹¹⁾에서는 石油蛋白細胞製造用으로 1,000餘種의 細菌과 酵母를 試驗中이며 酵母는 Lysine 含量이 많고 다른 雜菌의 汚染이 制限될만큼 낮은 pH에서도 成長이 可能하고 細菌보다 커서 培養 回收가 容易하며 反面에 細菌은 酵母보다 蛋白質含量이 많고 成長率이 크고 比較的 簡單한 培地에서도 培養이 可能하다고 하였다.

Shell¹²⁾에서는 4ton의 methane으로부터 1ton의 蛋白質을 얻었으며 Walnak¹³⁾도 methane으로부터 Protein-Vitamin Concentrate를 얻었다. 現在 이와 같은 石油鑿採의 分野에서는 石油蛋白製造研究가 가장 關心을 끌고 있으나 이들 외에도 Strawinsky, Harris, Raymond, Davis 등에 의해 intracellular products²⁾로서 脂質蓄積이 發表되었고 Stewart, Hayaishi, Kallio, Raymond, Davis, Lindsay 등에 의해 Waxester, glyceride, Poly-β-hydroxybutyrate 形成이 認定되었다. 또한 Haas와 Bushnell에 의해 Carotenoid 生成研究가 있었으며 興味로운 事實을 發表하였다.

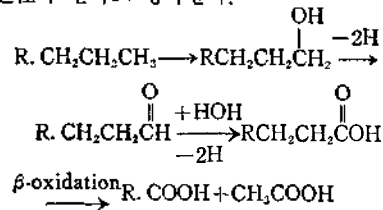
Guseinov²⁾은 土壤中의 酸性石油殘渣가 methane과 空氣를 利用한 *Pseudomonas methanitrificans*의 作用으로 窒素分을 增加시켜 肥料로서의 效果를 나타냄을 發表하였다.

Microbial extracellular products²⁾ 또는 Cyclic compounds, Alkyl 基를 가진 Cyclic hydrocarbons, Aliphatic acids, Diols, Dicarboxylic acids, Methyl ketone, 아미노酸, 糖脂質, 多糖質 등의 生成反應이 많이 研究되고 있어 이와 같은 것을 製造하는 데 있어 앞으로 많은 化學反應이 이와 같은 微生物에 의한 反應과 競爭해야 할 立場에 있다.

한편 炭化水素의 微生物에 의한 分解機構도 興味있는 課題로 되어 있고 炭化合物에 비해 그 歷史도 짧고 數도 적어서 未知, 未決의 點도 많으나 Beerstrecher¹⁾ Foster¹⁴⁾ 등에 의한 見解에 依하면 分解機構의 大部分

은 分子狀 酸素가 參與하는 酸化分解이다.

微生物의 種類에 따라 分解機構가 相異할 것은 當然하며 一般的으로 論할 수는 없으나 現在 보편적으로 생각되는 n-paraffin의 分解過程은 于先 n-파라핀부터 Kallio¹⁵⁾의 Hydroperoxide說 또는 MASON¹⁶⁾의 Mixed function oxidase說에 의한 primary alcohol이 생기고 Monoterminal oxidation에 의해 다음과 같이 進行되며 β-oxidation以後는 現在 알려져 있는 脂肪酸의 分解過程과 같다고 생각된다.



또한 Diterminal oxidation에 의해 Di-acid를 經由하는 것도 minor pathway로 報告되었으며¹⁷⁾ Ester의 生成¹⁵⁾가스炭化水素의 境遇 methyl ketone의 生成¹⁸⁾도 報告되어 있다.

Alkane의 微生物酸化研究에 있어서는 炭化水素酸化性菌의 分離, 培養, 炭化水素種類的 影響, 培地組成, 培養條件等이나 代謝 등의 基礎問題가 많이 取扱되고 있으며¹⁹⁾前記한 바와 같은 炭化水素分解 機構 및 醱酵工學의 問題點으로 酸素要求量, 炭化水素의 分散方法, 基質添加量의 影響, 反應裝置²⁰⁾ 등에 대해서 部分的으로 檢討되고 있다.

著者は ALKANE의 微生物酸化의 一連의 研究의 始初로서 石油蛋白製造를 目的으로 ALKANE의 微生物酸化의 Kinetics의 基礎資料를 얻기 爲해 우선 生育速度와 榮養分消費의 量의 關係를 pH, 溫度, ALKANE의 種類, 空氣供給量, 攪拌速度, ALKANE의 量 등의 反應條件으로 檢討하고 特히 炭素 및 窒素平衡의 資料를 얻었으므로 이에 報告하는 바이다.

實 驗

菌 株: 土壤에서 分離한 후 炭化水素培地에서 馴養한 *Candida lipolytica*를 使用하였다.

培 養 法: 分離된 酵母를 1當 Na_2HPO_4 , 0.21g, $Na_2H_2PO_4$, 0.09g, $FeSO_4$, 0.001g, NH_4NO_3 , 2.0g, $MgSO_4$, 0.2g, KCl , 0.04g, $CaCl_2$, 0.015g, H_2BO_3 , 0.01mg, $CuSO_4$, 0.005mg, $MnSO_4$, 0.01mg, $ZnSO_4$, 0.01mg, M_2O_3 , 0.01mg $CoCl_2$, 0.01mg, 酵母 extract 0.1g의 培養液에서 30°C에서 5日間 振盪培養後 水洗하고 冷凍乾燥後 實驗用으로 使用하였다.

炭化水素: 使用한 炭化水素는 Phillip Petroleum Co.

의 것으로 98%의 純度로 別다른 處理는 하지 않았다.

實驗方法 : 密閉된 醱酵槽(4l)에서 營養劑의 出入을 control 할 수 있고, 溫度는 water jacket 로 調節하며 Impeller 型의 攪拌機도 一定하게 測定할 수 있는 速度로 攪拌하게 되어 있다. 約 200mg의 菌株를 接種하여 12時間의 Exponential Growth 로서 約 12g/l의 細胞를 얻을 수 있다.

醱酵液의 營養成分은 1當 KH_2PO_4 , 와 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.25g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.7g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4g, CaCl_2 0.1g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.002g, 또 微量元素로서 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 50mg/l, H_3BO_3 100mg/l, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 100mg/l, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 100mg/l, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{27} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1g/l, $\text{C}_6(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 100mg/l, 6個混合溶液 0.1ml, 酵母 extract 를 100mg 이 包含되며 炭化水素(hexadecane) 를 1%(V/V)添加後 菌株를 添加하여 約 4l의 醱酵液을 使用하였다. 一般의인 實驗條件은 29°C , pH4 이다.

pH는 約 4로 自動調節되도록 調節液으로 NH_4OH 溶液을 注入하였고 pH meter 에 連結하여 自動記錄하였으며 排出되는 가스 중 O_2 는 Beckman Polarograph 로 CO_2 는 Infrared Spectrograph 로 測定하게 裝置를 構成하였다.

定量用 細胞 試料는 一定時間마다 가스의 排出을 中斷하고 고무管을 通해 siphon 作用으로 一定量을 取해 filter membrane 으로 濾過後 Isopropyl alcohol 로 洗滌하여 100°C 에서 乾燥後 細胞重量을 測定하고 窒素含量을 測定하였다. 細胞의 炭素含量은 Coleman Carbon-Analyser 의 實驗的으로 얻어진 것이다. 이 實驗에서 使用한 計算式은 다음과 같다.

$$\text{Specific growth rate } \mu = 3.3 \frac{\log X_2 - \log X_1}{t_2 - t_1}$$

X: total dry wt t: time (hr)

$$\text{Yield} = \frac{\text{細胞의 重量}}{\text{Alkane의 使用量}} \times 100$$

$$\text{Carbon\%} = \frac{C_{\text{cells}} + C_{\text{CO}_2} + C_{\text{others}}}{C_{\text{total}}}$$

$$\text{Nitrogen\%} = \frac{N_{\text{cells}}}{N_{\text{NH}_4}}$$

實驗結果 및 考察

1. pH의 影響

Fig. 1 은 hexadecane 을 使用한 實驗에서 pH의 變化에 依한 yield 및 培養液에 남아 있는 炭素 및 窒素의 殘餘比率를 plot 한 것이며 Fig. 2는 yield, cell의 C 및 N 含量, $C_{\text{CO}_2}/C_{\text{cell}}$, $C_{\text{CO}_2}/N_{\text{cell}}$ 및 N/C, C cell/C RECOVERY 등을 plot 한 것이다.

pH 5에서 $\mu=0.74$ 이며 generation time 90 min 을

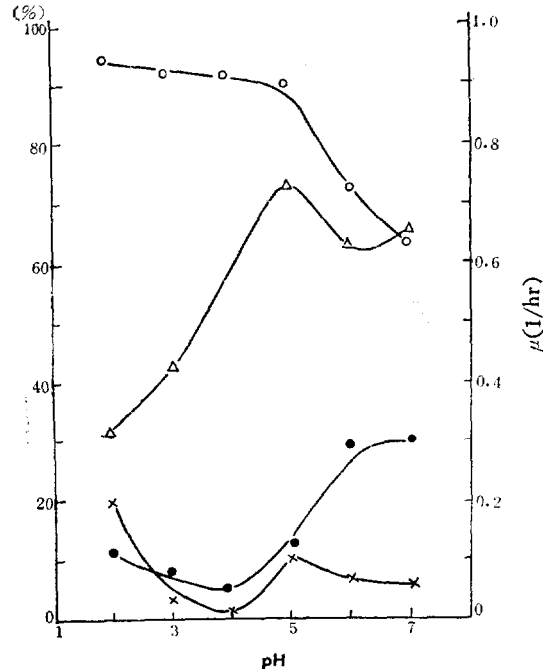


Fig. 1 Effect of pH Variation on Growth Rate of Yeast
 O: yield (%) Δ: μ (1/hr)
 x: N residue (%) ●: C residue (%)

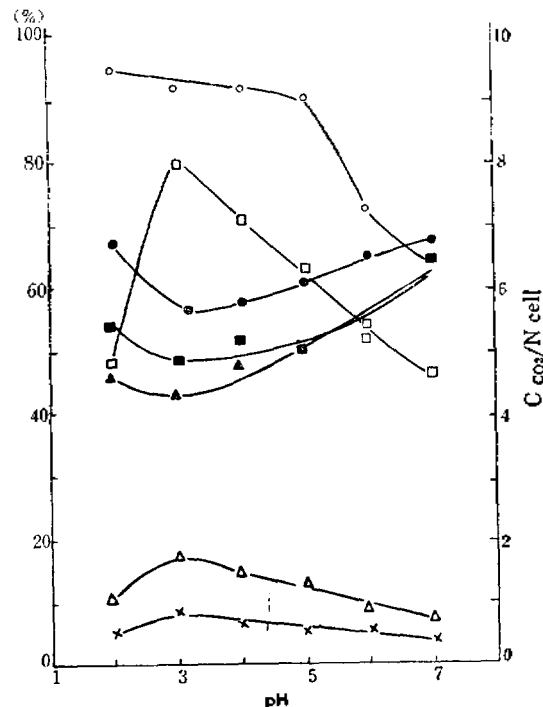


Fig. 2 Effect of pH Variation on Carbon & Nitrogen Balance
 O: yield (%) ●: $C_{\text{cell}}/C_{\text{rec}}$ (%) x: N_{cell} (%)
 Δ: $N_{\text{cell}}/C_{\text{cell}}$ (%) ▲: $C_{\text{CO}_2}/N_{\text{cell}}$ (%) □: $C_{\text{CO}_2}/\text{cell}$ (%)
 ■: C cell (%) rec: recovery

나타내어 比較的 좋은 結果로 생각된다.

炭素 및 窒素의 資化率은 pH4에서 最高值를 갖고 以後 pH의 增加에 따라 窒素는 多少 減少하나 炭素의 資化率은 急減하며 炭素의 蓄積率은 pH3에서 最少로 이때 N/C 값은 約 18(%)로 가장 N 含量이 높다.

蓄積된 炭素 및 窒素에 對한 CO₂의 發生量은 N 및 C의 細胞中의 含量(蓄積率)과는 逆의 關係를 갖고 있으며 이는 蛋白質의 生合成이 減少하고 合成量의 減少에 따라 CO₂의 發生과 함께 發熱하는 것으로 생각된다.

Cell 中의 炭素의 蓄積率이 pH3以後 增加함에 도 pH5以後 C RESIDUE가 急增함으로써 Cell yield도 急減하는 것으로 생각된다.

2. 溫度의 影響

yeast의 適溫範圍는 28~30°C가 알려져 있다¹⁹⁾.

Fig. 3은 溫度變化에 '한 μ, yield, N residue, C residue를 Plot한 것이며, Fig. 4는 yield, N cell, C cell, N cell/Ccell, C CO₂/C cell, C CO₂/Ncell, Ccell/Crec 등을 Plot한 것이다.

本實驗에서 μ가 30°C일때 最高值를 보이며 N cell에 대한 CO₂發生量比는 N cell이 그다지 큰 變動을 받지 않는데 비해 相當한 變化를 보이는 便으로 이로써 蛋白質 合成에 따른 energy所要量이 큰을 確認할 수 있다.

其他 適用溫度範圍內에 있어 別로 큰 影響을 받지 않음을 알 수 있다.

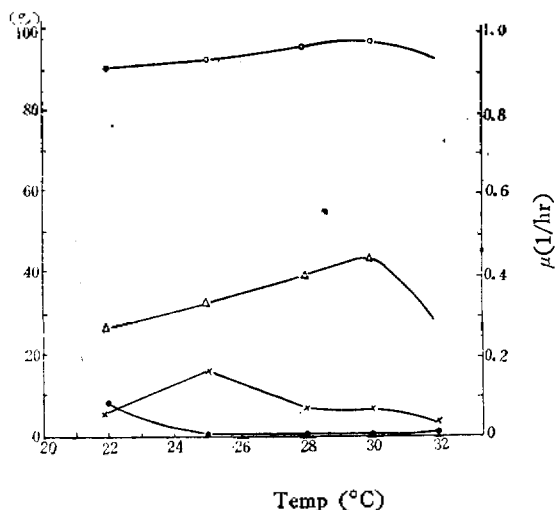


Fig. 3 Effect of Temperature Variation on Growth Rate of Yeast

○ : yield(%) △ : μ(1/hr)
● : C residue(%) × : N residue(%)

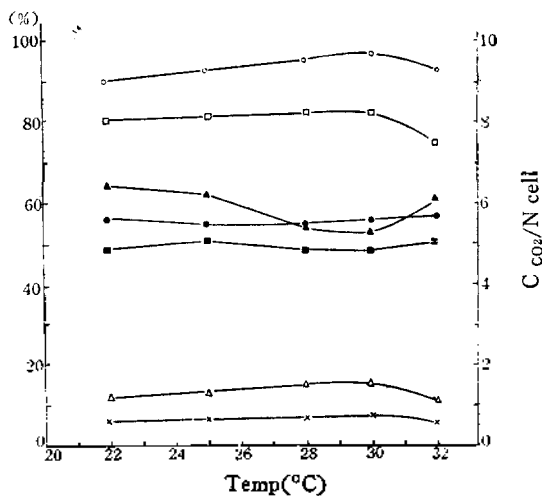


Fig. 4. Effect of Temperature Variation on Carbon & Nitrogen Balance

○ : yield(%) ● : C cell/C rec(%) × : Ncell(%)
△ : N cell/Ccell(%) ▲ : C CO₂/N cell □ : CCO₂/Ccell(%)
■ : C cell(%)

3. 炭化水素의 炭素數의 影響

炭化水素資化性菌이 가장 資化하기 쉬운 것은 炭素數 10부터 20까지의 直鎖의 것이라는 것이 알려져 있으며 Chepigo²⁰⁾는 C₁₀~C₂₄의 Alkane를 炭素源으로 利用할 것을 推薦하였고 第一 活潑한 酵母細胞의 蓄積은 C₁₅~C₁₉의 n-Paraffin을 利用 하였을 때 이를 發表하였다.

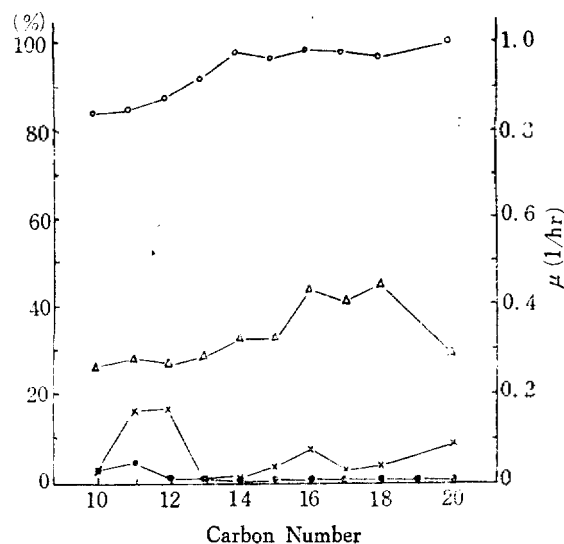


Fig. 5. Effect of Carbon Number Variation of Hydrocarbon on Growth Rate of Yeast

○ : yield(%) △ : μ(1/hr)
● : C residue(%) × : N residue(%)

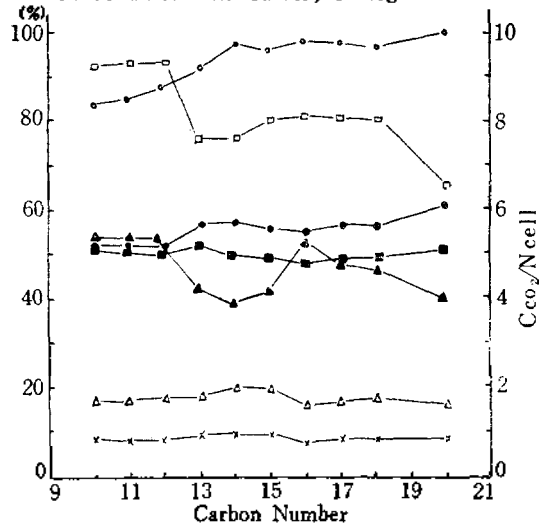


Fig. 6. Effect of Carbon Number Variation of Hydrocarbon on Carbon & Nitrogen Balance
 ○ : yield (%) ● : C cell/C rec (%) × : N cell (%)
 △ : N cell/C cell (%) ▲ : C co₂/N cell □ : C co₂/C cell (%)
 ■ : C cell (%)

Fig. 5 및 Fig. 6 은 탄소數의 差에 依한 μ , yield, N rec, C rec, C co₂/N cell, C co₂/C cell, N cell, C cell, N/C, C cell/C rec 등을 表示한 것으로 使用한 酵母가 hexadecane 培地에서 馴養한 것이므로 C₁₆ 과 C₁₈ 에서 maximum growth rate 를 表示하는 것은 當然한 結果이며 다른 것들은 炭素數와 一定한 關係를 갖지 않는다고 생각된다.

4. 空氣供給量

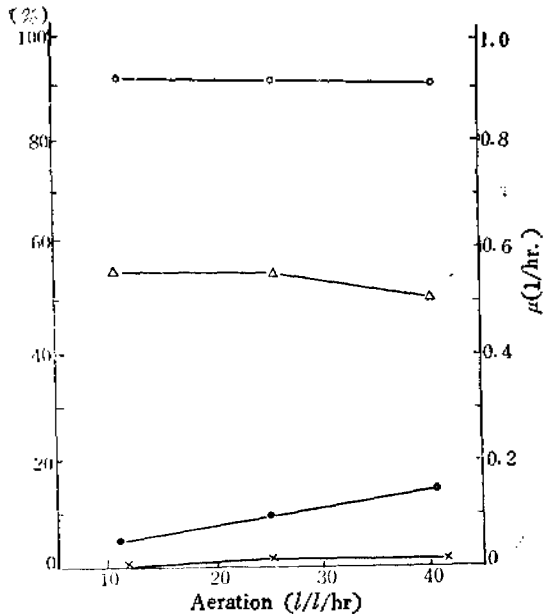


Fig. 7. Effect of Aeration on Growth Rate of Yeast
 ○ : yield (%) ● : C residue (%)
 △ : μ (1/hr.) × : N residue (%)

Aeration의 重要性에 對해서는 Hoerburger²⁾도 發表한 바 있으며 Darlington²⁰⁾도 炭水化合物보다 3 倍의 酸素가 必要하다고 하였다. Fig. 7, Fig. 8 에서와 같이 10 ~ 40 l/l/hr. 의 範圍內에서 거의 別다른 差를 보이지 않고 있다. 다만 C co₂/C cell의 감소와 C cell/C rec의 增加로 yield의 增加가 期待되나 C rec. 및 N rec의 Aeration에 따른 減少로 yield는 거의 一定한 값을 維持하고 있다.

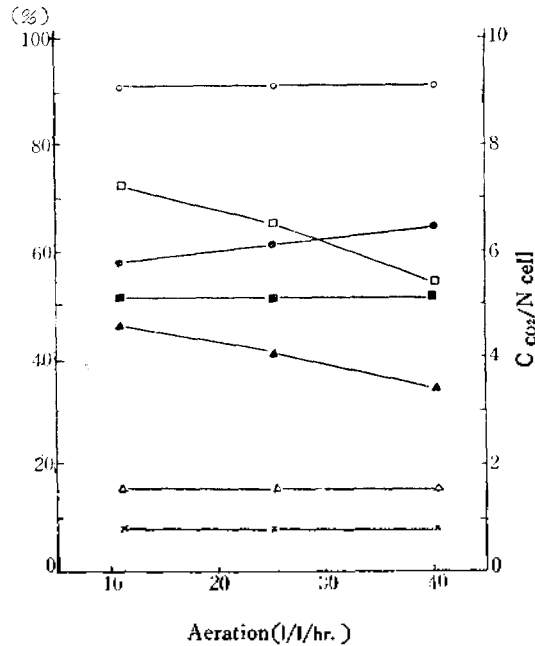


Fig. 8. Effect of Aeration on Carbon & Nitrogen Balance
 ○ : yield (%) ● : C cell/C rec. (%) × : N Cell (%)
 △ : N cell/C cell (%) ▲ : C co₂/N cell
 ■ : C co₂/C cell (%) □ : C cell (%)

5. 攪拌

Fig. 9, Fig. 10 에서 보는바와 같이 Agitation r. p. m.의 增加에 따라 μ 도 增加하여 3,000 r. p. m에서 maximum μ 를 나타내고 C rec 및 N rec가 Agitation r. p. m.에 따라 增加하므로 yield는 增加를 繼續하고 있다. 한편 다른 項目은 實驗範圍內에서 別變化를 보이지 않는다.

6. 炭化水素添加量

炭化水素의 培養液에 對한 添加量은 0.01~10%로 區區하나 添加量이 적을 수록 菌의 生育阻害를 일으킬 憂慮가 적다고 생각되며 Raymond²¹⁾도 接種量과 炭化水素 添加量과의 比率이 重要하다고 하였는데, Fig. 11, Fig. 12 에서 보는 바와 같이 hexadecane 添加量이 많을 수록 μ 가 增加한다.

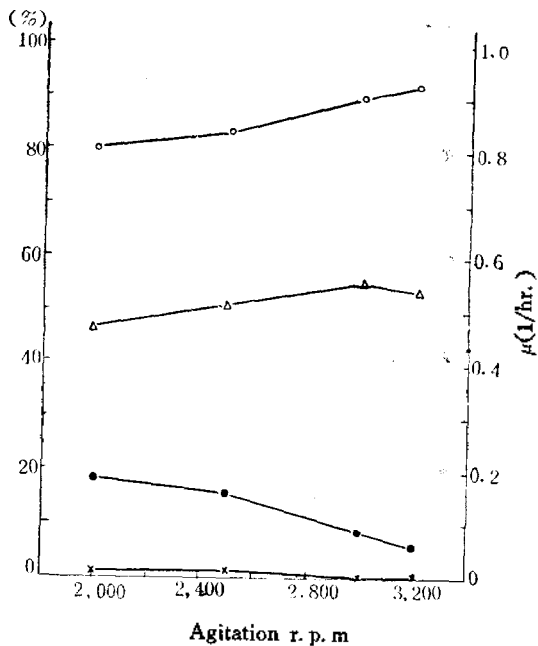


Fig. 9. Effect of Agitation on Growth Rate of Yeast
 ○ : yield(%) △ : μ(1/hr.)
 ● : C residue(%) × : N residue(%)

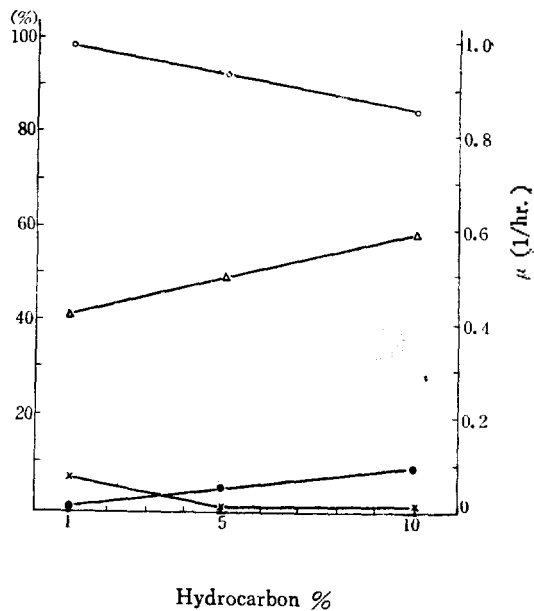


Fig. 11. Effect of Concentration of Hydrocarbon on Growth Rate of Yeast

○ : yield(%) △ : μ(1/hr.)
 ● : C residue(%) × : N residue(%)

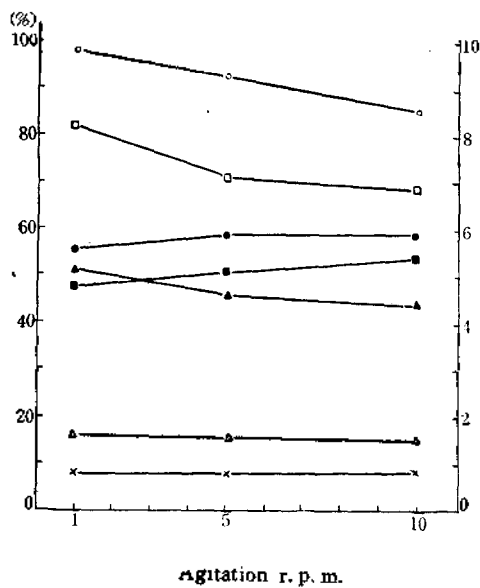


Fig. 10. Effect of Agitation on Carbon & Nitrogen Balance
 ○ : yield(%) ● : C cell/C rec(%)
 × : N cell(%) △ : N cell/C cell(%)
 ▲ : C CO₂/N cell □ : C CO₂/C cell(%)
 ■ : C cell(%)

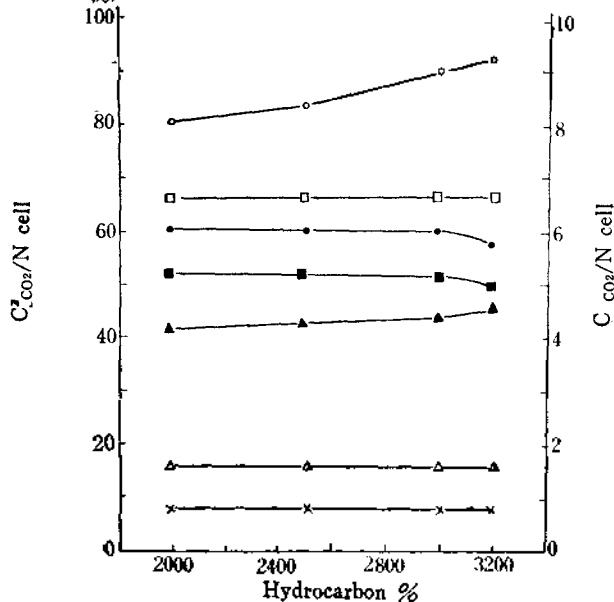


Fig. 12. Effect of Concentration of Hydrocarbon on Carbon & Nitrogen Balance

○ : yield(%) ● : C cell/C rec(%)
 × : N cell(%) △ : N cell/C cell(%)
 ▲ : C CO₂/N cell □ : C CO₂/C cell(%)
 ■ : C cell(%)

한편 細胞中の 炭素 및 窒素量에 對한 CO₂의 減少와 함께 炭化水素 添加量의 增加에 따라 炭素 및 窒素의 蓄積率은 多少 增加하는 傾向을 보이나 炭素의 資化率 急減으로 yield도 炭化水素 添加量 增加에 對해 急激히 減少하는 것을 볼 수 있다.

結 論

ALKANE의 微生物酸化의 Kinetics 研究의 一環으로 hexadecane을 炭素源으로 하여 *Candida lipolytica*를 使用하여 細胞를 生育시킬 때의 反應條件과 營養分 消費의 量的 關係를 檢討하여 生育速度의 最高條件으로 pH 5, 溫度 30°C, 炭化水素의 炭素數 C₁₅과 C₁₆, 空氣供給量 25.6 l/l/hr, 攪拌速度 3,000 r. p. m., 炭化水素의 濃度 10%를 얻었으며 이 過程 中에서의 炭素와 窒素의 平衡을 追跡한 結果 前記 6個條件 pH變動과 炭化水素의 炭素數의 差異에서 細胞中の 窒素와 炭素의 比에 顯著한 差異를 볼 수 있으며 이는 生體內에서 合成되는 蛋白質의 아미노酸 組成에 聯關이 있는 것으로 推測되며 特定한 아미노酸 組成의 細胞形成에 考慮되어야 할 因子로 생각된다.

參 考 文 獻

- 1) E. Beerestecher, *Petroleum Microbiology* (Elsevier Press, 1954) p. 166
- 2) J. B. Davis, *Petroleum Microbiology* (Elsevier Publishing Co. 1967) p. 283
- 3) T. Takata, *Hydrocarbon Processing* 48, 99(1969)
- 4) M. S. Taggart, *U. S. P.* 2, 396, 900 (1946)
- 5) F. Just, W. Schnabel, S. Ullmann, *Die Brauerei*

- 4, 57 (1951)
- 6) A. Champagnat *et al*, *6th World Petroleum Congress* (Section IV-Paper 4-D 10) 1963, June, Frankfurt.
- 7) R. L. Raymond, *Development Ind Microbiol.*, 2, 23 (1961)
- 8) S. V. Chepigo *et al*, *7th World Petroleum Congress* Proceeding Vol 8, 205-214, 1967 April, Mexico City
- 9) M. J. Johnson, *Science* 115, 1515 (1967)
- 10) J. Takahashi *et al*, *Agr. Biol. Chem.* 27, 836 (1963)
- 11) *Information Economique Esso*, Jan. 1967
- 12) *Chem. & Eng. News*, 44 (25), 20 (1966)
- 13) B. Walnak *et al*, *Biotechnology & Bioengineering* vol IX 57 (1967)
- 14) J. W. Foster, *Antonie van Leeuwenhoek* 28, 241 (1962)
- 15) R. E. Kallio, J. E. Stewart, *J. Bact.* 78, 441, 726 (1954)
- 16) H. S. Mason, *Adv. in Enzymology* 19, 79(1957)
- 17) A. S. Kester, J. W. Foster, *J. Bact.* 85 859(1963)
- 18) B. H. Lukins, J. W. Foster, *J. Bact.* 85, 1074 (1963)
- 19) K. Yamada, J. Takahashi, *Kogyokagakuasshi*, 67, 693 (1964)
- 20) W. A. Darlington, *Biotechnology & Bioengineering* 6, 241 (1964)
- 21) R. L. Raymond, J. B. Davis, *Appl. Microbiol.* 8, 329 (1960)