KOR. J. FOOD SCI. TECH.
Vol. 2, No. 2 (1970)

석유탄화수소를 이용한 단세포단백질의 생산에 관한 연구
I. 석유자화균주의 분리 및 우수균주의 선정

한국과학기술연구소 식량자원연구실
권태완 · 민태익 · 박 융 · 변유량

(1970년 9월 10일 수리)

Production of Single-Cell Protein on Petroleum Hydrocarbon
I. Isolation and Selection of Hydrocarbon Utilizing Microorganisms

by
Tai-wan Kwon, Tae-Ick Mheen, Yoong Park and Yoo-Ryang Pyun
Food Resources Lab., Korea Institute of Science and Technology

(Received Sept. 10, 1970)

Abstract

Although there are no oil wells in Korea, yet more than 900 strains of petroleum hydrocarbon utilizing microorganisms have been isolated from 357 soil and sewage samples collected from oil depots and other sources there. From these samples 7 strains of yeast were selected on the basis of their superior cell yields. Five of them were identified as *Candida tropicalis*, the other being *Candida lipolitica* and *Torulopis* sp. Of the selected strains the mass doubling time is 2.9~4.5 hrs., the yield is 6.5~16.3 g/*l*; the conversion rate of crude petroleum substrate into the microbial mass is 7.8~19.3%; and protein content of dried cells is 48.8~59.8%.

서 언

급격히 증가하고 있는 인구로 말미암아, 세계적으로 단백질결핍 현상이 악화일로에 있는 오늘날, 인류를 단백질기아로부터 구출해내기 위하여 보다 능률적인 단백질의 생산, 또는 새로운 단백질자원의 개척이 시급히 요청되고 있는 것이다. 물론 여기에는 여러가지 방책이 있을 수 있으나, 그중에서도 석유를 이용하여 단백질을 생산하고자 하는 연구가 최근 여러나라에서 활발히 진행되고 있다[1]. 이에 관한 연구결과는 특허로서[2] 또는 보문으로서[3] 이미 수많이 발표된 바 있다.

다시 말해서 이는 석유를 자화할 수 있는 미생물을 배양함으로써 공업적으로 단세포단백질을 생산하고자 하는 것인 바, 재래적인 농축산방식에 수반되는 시간적, 공간적 제약조건을 극복할 수 있으므로 최적조건하에서 연중 계속해서 단백질을 양산할 수 있는 장점이 있다.

국토가 협소한데 인구밀도는 높아서 벌써 식량부족에 허덕이고 있는 우리나라에서도 장차를 대비하기 위하여 이와같은 방법을 하루바삐 활용할 필요가 있는것이다[4]. 그러나, 이와같은 목적으로 쓸 수 있을만큼 우수한 균주, 즉, 간단한 조건하에서도 배양이 용이하고 그 번식속도가 빠르며, 단백질함량이 높고 그 아미노산조성이 양호하며 동시에 독성이 없는 균주들은 특허로 보호되었거나, 각국의 산업비밀로서 입수할 수 없는 실정이므로, 단세포단백질의 국내생산을 위해서는 부득이 우리 스스로의 힘으로써 우수한 균주를 찾아낼 수 밖에는 별 도리가 없는 것이다. 본 연구에서는 장차 우리나라에서 단세포단백질을 공업적으로 생산하는 데 쓰일 만한 우수한 균주의 탐색을 시도한 것으로서, 그 일부의 결과가 얻어졌기에 여기에 보고하는 바이다.

실 험

시 료

서울근교를 주로하여 제주도를 포함한 전국 각지의 일반토양(논 · 밭 · 산 · 역부지) · 주유소 및 군용유류보급

기지의 유류침적토양·퇴비·하천·해수·온천수·메주·곡자 등 시료 357종을 수집하였다.(표 1)

Table 1. Numbers and kinds of collected samples

Kinds	Numbers
Soil	200
Compost	40
Garage soil	30
Household waste river and pond water	30
Rotten vegetable and fish	15
Soil from military oil depot	12
Cannery waste	10
Meju and Kokja	10
Hot spring water	5
Sea water	5
Total	357

석유자화균주의 분리

석유자화능력이 있는 균주를 분리하기 위하여 석유획분을 유기탄소원으로 하는 배지를 사용하였으며, 그 분리조작은 다음과 같다.

제 1 차선별—100ml Erlenmeyer flask에 표 2-I의 배지 30ml를 분주하고 15 lb에서 15분간 가압살균한 후 액체시료는 직접 1ml를 그리고 고체시료일 경우에는 1g을 50ml의 물에 균일하게 섞은 후 그 상등액 1ml를 주입하고, 30°C에서 4~6일간 진탕배양(108 strokes/min.)하였다. 이 배양액으로부터 1.8%의 agar를 첨가한 표 2-I 고체 배지를 사용하여 30°C에서 3~4일간 평판배양법에 의하여 순수분리하였다. 단일 colony를 각각 nutrient agar slant, malt extract agar slant 그리고 표 2-I 배지에 agar를 가하여 만든 slant에 옮겨서 보존하였다.

Table 2. Media for isolation and cultivation of hydrocarbon utilizing microorganisms

	I	II
Hydrocarbon*	10.0~50.0g	50.0g
NH_4NO_3	5.0	1.5
NH_4Cl		1.5
$(NH_4)_2SO_4$		1.5
$(NH_2)_2CO$		1.5
KH_2PO_4	2.5	2.5
K_2HPO_4	2.5	
Na_2HPO_4		2.5
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1.0	0.5
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$		0.1
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$		5.0mg
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$		20mg
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$		0.1mg
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$		0.02mg
$Na_2MoO_4 \cdot H_2O$		0.05mg
Yeast extract		100mg
Malt extract		100mg
Tween 20	0.5ml	0.5ml
Distilled water	1*l*	1*l*
pH	5.0, 6.5	6.2

* Admixture of locally available kerosine and diesel oil in equal volume ratio

제 2 차선별—위에서 분리한 균주중 가장 잘 번식한 slant의 균주를 골라서 위의 방법에 따라서 멸균한 30ml의 표 2-II 배지에 1백금이 씩 접종하여 30°C에서 3일간 진탕배양(108 strokes/min.)한 후 서너방울의 계면활성제를 가하여 균일하게 섞은 다음 그중, 10ml를 취하여 눈금달린 conical test tube에 넣어서 3000rpm으로 10분간 원심분리하였으며, 이때 침전된 균체의 packed volume이 0.1ml 이상인 것만을 추려냈다. 한편 육군기술연구소·동양맥주주식회사·조선맥주주식회사 및 국립공업연구소에서 분양받은 이미 동정된 효모 67주와 미국 Battelle기념연구소와 일본동경대학교 응용미생물 연구소에서 입수한 석유자화미생물 균주도 참고로 이 2차선별실험에 포함시켰다.

우수균주의 동정

비교적 균체수율이 좋은 7주만을 제 2차선별한 것 중에서 골라서, 형태적특성, 배양상태 및 생리적성질에 관한 실험을 함으로써 그 결과를 바탕으로 선정된 균주에 대한 분류학적 판정을 내렸다[5].

단세포단백질의 실험실규모생산 및 단백질함량분석

단백질함량분석에 쓰일 단세포단백질을 실험실규모로 생산하기 위하여 500ml의 Erlenmyer flask에 표 2-II 배양액 150ml를 주입하고 상법에 의하여 살균한 후 별도로 100ml의 flask에서 2일간 30°C에서 전배양한 배양액 5ml를 접종하여 같은 온도에서 5일간 진탕배양(80 strokes/min.)하였다. 배양이 끝난 후 배양액은 separatory funnel을 써서 대부분의 미생물균체가 탄화수소에 현탁되어 있는 상층과 일부의 균체가 부유하고 있는 하층의 배양액으로 분리하였다. 상층부는 다시 소량의 계면활성제를 첨가한 후 원심분리하였고, 하층배양액은 그대로 원심분리하여 균체를 회수하였다. 이렇게 얻은 균체를 서로 합친 후 증류수로 수회 세척하여 원심분리한 후 건조시켰다. 조단백질함량은 이 건조균체를 사용하여 Kjeldahl법에 의해서 3회 반복 분석하였다.

결과 및 고찰

균주의 분리

국내각지에서 수집한 총 357종의 시료를 처리하여 탄화수소를 자화하는 미생물을 분리하였는데, 그 수는 세균 585주, 효모 279주, 그리고 곰팡이 94주로서 총 958주였다. 우리나라에는 유전이 없는데도 불구하고, 석유자화미생물이 유류침적토양은 물론 일반토양·퇴비·쓰레기·곡자·공장폐수, 심지어는 해수·하천수·온천수에 이르기까지 수많은 시료로부터 분리되었음은 이들 미생물이 널리 자연계에 분포되어 있음을 지적하는 것이다.

일반적으로 곰팡이는 단백질함량이 적고 균체를 회수하기 곤란하여 단세포단백질의 공업적생산에 활용되지 않으므로, 제2차선별에서는 제외하였다. 따라서 제1차선별에서 얻어진 세균과 효모만을 대상으로 제2차선별을 실시한 결과 packed volume이 0.1ml/10ml 이상인 균주를 48주 얻었다. 한편 육군기술연구소·국립공업연구소·동양맥주주식회사 및 조선맥주주식회사에서 입수한 효모에서는 이러한 균주를 얻지 못하였으며, 또 Battelle 기념연구소에서 입수한 석유자화균주 *Micrococcus cerificans*(H.O.I)와 동경대학교에서 입수한 석유자화균주 ***Candida japonica, Candida intermedia, Candida tropicalis, Candida albicans*** 등도 같은 조건으로 배양한 후 균체수율을 비교하여 보았으나 모두 이 수준에 이르지 못하였다.

상기 48주를 재차 비교배양하여 그 중에서도 균체수율이 우수한 7주의 효모만을 최종적으로 선발하였다(표 3). 표 1의 종류별 시료의 수와 표 3의 선정된 미생물의 분리원을 살펴보면, 주유소 토양이나 군용유류보급기지토양에 더 많이 우수한 균주를 분리해 낼 가망성이 있음을 알 수가 있다. 즉, 주유소나 군부대 주둔지 같이 오래동안 유류가 침적되었던 토양에 석유탄화수소를 자화할 수 있도록 적응된 미생물이 더 많음을 암시하고 있는 것이며, 이는 이등[6]의 결과와 일치한다. 유감스럽게도, 온천수에서는 고온에서도 생육할 수 있는 균주를 분리할 수 있기를 기대하였으나, 그런 균주들은 모두 균체수율이 낮았다.

Table 3. List of the selected microorganisms

Strain No.	Microorganisms	Sources isolated
84—1	Yeast	Compost heap(Seoul)
222	〃	Soil(Chunan)
231	〃	Soil(Kwangju)
245	〃	Garage soil(Kyungju)
351	〃	Soil from military oil depot (Dukjung ri)
352	〃	〃
359	〃	Soil from military oil depot (Junkok)

우수균주의 동정

최종적으로 선발된 석유탄화수소 자화효모 7주에 대한 분류학적 동정을 위하여 형태적 배양적 생리적 성질을 관찰한 결과는 표 4와 같으며, 이들을 종합검토하여 추정해본 결과, 5주(222, 245, 351, 352, 359)는 *Candida tropicalis*, 1주(84—1)는 *Candida lipolytica* 그리고 231은 *Torulopsis* 속으로 동정되었다.

Table 4. Properties of the selected yeasts

Strain number		84—1	222	231	245	351	352	359
Shape		oval and cylindrical	round to oval	round	round to oval	oval and cylindrical	oval and cylindrical	oval and cylindrical
Size(μ)		(2—4.8)×(6.4—9.6)	(2.4—6.4)×(8—12.0)	1.6—4.8	(2.4—6.4)×(4.8—9.6)	(3.2—4.8)×(6.4—18.0)	(3.2—6.4)×(8.2—14.6)	(3.2—6.4)×(8.2—19.2)
Pellicle		pellicle, sediment	ring and pellicle	thin pellicle	ring and pellicle	ring and pellicle	ring and pellicle	ring and pellicle
Slide culture on potato dextrose agar (25°C, 4 days)		mycellium	pseudo-mycellium		pseudo-mycellium	pseudo-mycellium	pseudo-mycellium	pseudo-mycellium
Fermentation of carbohydrates	glucose	−	+	−	+	+	+	+
	galactose	−	+	−	+	+	+	+
	sucorse	−	+	−	+	+	+	+
	maltose	−	+	−	+	+	+	+
	lactose	−	−	−	−	−	−	−
	raffinose	−	−	−	−	−	−	−

Assimilation of carbohydrates	glucose	+	+	+	+	+	+	+
	galactose	+(weak)	+	+(weak)	+	+	+	+
	sucrose	−	+	+	+	+	+	+
	maltose	−	+(weak)	−	−	+(weak)	+	+(weak)
	lactose	−	+(weak)	−	+(weak)	+(weak)	+(weak)	−(weak)
KNO_3 assimilation		−	+	−	−	−	−	−
Ethanol as carbon sources		+(weak)	+	±	+	+(weak)	+(weak)	−(weak)
Vitamin requirements		+(thiamin)	−	−	−	−	−	+
Arbutin splitting		−	−	−	−	−	−	−
Fat splitting		+	+	−	+	+	+	+
Litmus milk		peptonized	not coagulated	not coagulated	not coagulated	not coagulated	not coagulated	not coagulated
Gelatin liquefaction		+	−	−	−	−	−	−
Source		Compost heap	soi l	soil	garage soil	soil from military oil depot		

선정된 효모의 수율 및 단백질함량

선정된 효모에 대한 수율 및 단백질의 함량은 표 5에서 보는 바와 같다. 이들 균주의 mass doubling time은 2.9~4.5hr 이고, 그 수율은 최저 6.5g/*l* 에서 16.3

Table 5. Cell yield and protein content of the selected yeasts

Strain No.	Mass doubling time(hr.)	Specific growth rate (hr^{-1})	cell yield (g/*l*)	conversion rate (%)	crude protein (%)
84—1	3.7	0.187	6.8	8.1	53.5
222	4.3	0.161	8.6	10.3	57.1
231	4.5	0.154	6.5	7.8	48.8
245	4.1	0.169	7.0	8.4	52.2
351	2.9	0.239	16.3	19.3	58.5
352	3.4	0.204	14.8	17.8	56.1
359	3.8	0.182	13.2	15.9	59.8

g/*l* 에 걸쳐 있다. 이는 Otsuka 등[7]이 *Candida tropicalis* YO-148을 최적조건하에서 배양했을 때의 11 g/*l* 보다는 좋은 수율이나, 이등[6]이 *Candida curvata* HY-69-19로 얻은 30 g/*l* 보다는 낮은 결과를 보이고 있다. 그러나 단백질의 함량은 최저 48.8%에서 최고 59.8%로서 이는 Vadalkar 등[8]의 *Candida lipolytica* 나 *Candida tropicalis* 와 거의 일치하는 결과를 보이고 있으며, 이등[6]의 40.25%나 Chamaghat등[9] 의 *Candida lipolytica* 43.6%보다는 훨씬 높은 것이다.

또, 본실험에서는 정제탄화수소가 아닌 경유 및 등유의 혼합액을 유기탄소 기질로 사용한 것인바, 효모균체로의 전환율은 균주에 따라서 7.8~19.3% 범위로 변동하였다. 시판 경유 및 등유혼합액 중 n-paraffin 함량을 약 20%로 본다면 19.3%의 전환율은 거의 100%에 상당하는 paraffin의 자화를 암시하는 것으로 해석된다.

앞으로 이들 단백질의 질을 평가하기 위해서는 총 질소화합물의 분석, 나아가서는 필수아미노산의 분석이 이루어짐으로써 최종적으로 공장규모의 단세포단백질생산에 이용될 균주가 결정될 것이며, 이들에 대한 실험실규모의 배양조건에 대해서는 제 2 보에서 계속해서 보고하려 한다.

요 약

단세포단백질의 국내생산을 목적으로 전국 각지의 토양을 비롯한 기타 시료 357종에서 900여주의 탄화수소 자화균주를 분리하였고, 그중에서 비교적 수율이 좋은 효모 7주에 대한 균학적 성질을 조사한 결과 *Candida tropicalis*(5주), *Candida lypolitica* (1주), *Torulopsis* sp (1주)로 동정되었다. 선정된 효모균주의 mass doubling time은 2.9~4.5 hr., 수율은 6.5~16.3g/*l*, 경유 및 등유의 균체로의 전환율은 7.8~19.3%이고, 건조효모의 조단백질함량은 48.8~59.8%이었다.

참 고 문 헌

1. 권태완 : 국제단세포단백질회의에 다녀와서, "화학과 공업의 진보", 8, 66(1968)
2. Noyes, R.: Hydrocarbon fermentation in Protein Food Supplements, Noyes Development Corporation, Park Ridge, New Jersey, p, 1, (1969)
3. 권태완 · 민태익 · 박용 · 변유량 · 조재선 : 단세포단백질(SCP)의 국내생산에 관한 연구, 과학기술처 연구개발사업보고서, pp. 69~59(1969)
4. 권태완 : 새로운 단백질자원의 개발, SCP(단세포

단백질)의 국내생산에 대해서, "새기술", 1(1), 27 (1969)

5. 飯塚廣, 後藤昭二 : 酵母の分類同定法, 東京大學出版會, 東京(1969)
6. 이계호 · 신현경 : 석유(탄화수소) 이용미생물에 관한 연구(제1보) 한국농화학회지, 13, 43(1970)
7. Otsuka, S.I., R. Ishii and N. Katsuya: Utilization of Hydrocarbons as Carbon Sources in Production of Yeast Cells, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 12, 1(1966)
8. Vadalkar, K., H.D. Singh, J.N. Baruah and M.S. Iyengar: Utilization of Gas Oil in the Production of Single Cell Protein, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 15, 375(1969)
9. Champagnat, A., C. Vernet, B. Laine and J. Filosa: Biosynthesis of Protein-Vitamin Concentrates from Petroleum, *Nature*, 197, 13(1963)