한국농화학회지 Vol. 13, No. 1 March 1970
Jour. of the Korean Agricultural Chemical Society

석유(탄화수소) 이용미생물에 관한 연구(제 1 보)

——효모세포에 의한 석유로부터 단백질 생성에 관하여——

이 계 호 · 신 현 경

서울대학교 농과대학 식품공학과

(1969, 12, 31. 수리)

Studies on the Petroleum hydrocarbon-utilizing Microorganisms(Part 1)

On the Production of Protein from the Yeast-cell

Ke Ho Lee and Hyun Kyung Shin

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

(Received Dec. 31. 1969)

Summary

To study the productivity of single cell protein from the petroleum hydrocarbon utilizing yeasts, 242 soil samples, such as oil soaked soil of gas stations and garage, coal, farm soil, and sewage, from 135 places in Korea were collected. From these samples 468 yeast strains which utilize petroleum hydrocarbon as a sole organic carbon source were isolated and identified by observing the growth rates.

For the identified strains optimum culture conditions were determined and analysis of cell components were performed.

1. 90.8% of petroleum hydrocarbon utilizing yeast strains were found from oil soaked soil and about 10% from coal, farm soil and sewage etc.

2. The yeast strain of the highest cell productivity was isolated from oil soaked soil and was identified as *Candida curvata* HY-69-19.

3. The optimum culture conditions for the selected yeast strain were found to be pH 5.0, 28°C and affluent aerated state.

4. *Candida curvata* HY-69-19 was found to utilize favorably the heavy gas oil fractionated at above 268.9°C as carbon source and urea as inorganic nitrogen source.

5. The growth curve of this strain on heavy gas oil medium showed that the yeast has a lag phase up to 18 hours and logarithmic growth phase between 24 to 42 hours. Generation time was found to be between 3.8 and 4.5 hours during the logarithmic growth phase.

6. About 300 mg dried cells per heavy gas oil was harvested under the culture conditions of adjusted pH to 5.0 at time intervals of 6 hours for 54 hours and heavy gas oil urea for shaking culture medium.

7. Chemical composition of the yeast cell was found to be 40.25%, 14.81%, 24.32% and 10.63% for crude protein, crude lipid, carbohydrate and ashes, respectively.

* 본 연구는 FY-69 문교부 학술연구조성비에 의하여 이루어진 것임.

서 언

근래 석유탄화수소를 탄소원으로 무기질소화합물인 요소나 황산암모니아 등을 질소원으로 하여 미생물을 증식시켜 이 미생물 세포를 식용으로 하려는 과제가 많이 논의되고 있다.

석유탄화수소를 이용하는 미생물에 대한 연구는 Miyoshi[1]가 paraffine을 분해시키는 *Botrytis cinera*를 포도에서 발견한 이래 Tauson[2]은 *Debaryomyces, Endomyces, Hansenula, Torulopsis, Monilia* 등의 탄화수소 이용성을 발표하였고 탄화수소 이용 미생물에 관한 연구로 Zobell[3], Davis[5], Stewart[8], Fuhs[9], Foster[10] 등에 의한 발표가 있었고 Just[4]의 *Torulopsis colliculosa, Candida lipolytica, Candida tropicalis*와 Harris[6]의 *Saccharomyces, Tricosporon*에 대하여 보고했고 Hoerburger[7]는 *Candida tropicalis*를 230~290°C 유분(溜分)의 탄화수소배지에 22시간 배양후 소모 탄화수소에 대하여 92%의 균체수율을 얻고 공기공급이 중요인자임을 보고했으며 Raymond[11·12]는 *Nocardia sp.*를 *n*-Octadecane에 배양하여 균체수율 83%를 얻었고 Champagnat[13 14]는 generation time이 2~5시간인 *Candida lipolytica*를 2일간 배양하여 원료 gas유를 탈납하고 균체 단백질을 생산하였으며 이 단백질은 lysine, threonine, vitamin B complex가 많아 동물성 단백질 pattern에 가까워 단백질 부족을 해결하는 데 가장 효과적인 것임을 보고하였으며 Miller[15 16] 등은 *Candida intermedia*를 *n*-tetradecane~*n*-Octadecane에 배양하여 균체수율 82%를 얻었고, Iizuka[17, 18, 19] 등은 탄화수소를 이용하는 Gram positive 균으로 *Corynebacterium hydrocarboclastus*와 *Brevibacterium lipoliticum*을, Gram negative 균으로 *Pseudomonas, Flavobacterium, Alkaligenes* 등이 glutamic acid 생산성과 이들 세균이 지하 수백 m에서 분리되며 이들 균주가 발견된 곳에 유징(油徵)이 있는 것이라 보고하였고, Yamada[22] 등은 탄화수소배양에서 여러가지 amino acid 생성 세균으로 *Achromobacter, Micrococcus, Corynebacterium, Bacillus* 등이 있음을 보고하였으며 Komagata[20] 등은 탄화수소 이용효모로 *Candida cloacae, C.maltosa, C.parapsilosis, C.lipolytica, C.guilliermondii, C.intermedia, Rhodotorula rubra* 등을 보고하였고 Takeda[21] 등은 *Torulopsis sp.*에 대한 탄화수소 배양의 최적조건구명과 70% 균체수율을 보고하였고 또한 *Pseudomonas* 배양으로 80%의 균체수율을 보고하였다. Otsuka[23] 등은 *Candida sp.*를 light oil에 배양하여 11g/*l*의 건조효모 균체를 생산하였고 Yamada[24] 등은 *Candida tropicalis*를 hexadecane에 배양하여 78%를 자화(資化)한 최고 15.6g/*l*의 균체수율을 얻었다. 그밖에도 Wang[25], Shimizu[26], Aiba[27], Iida[28], Itoh[29] Park[30] 등에 의하여 탄화수소자화효모에 관한 많은 연구가 발표되었다.

본연구는 석유탄화수소 이용미생물연구의 일환으로서 미생물에 의한 단백질생산의 목적으로 석유탄화수소 이용미생물중 효모를 분리, 선정, 증식율, 잡균오염율, 교반속도, 공기공급의 영향, 생육최적조건으로 pH, 온도, 탄화수소종류등 제조건을 검토하였고 효모가 세균보다는 생장속도가 느린 단점은 있으나 효모는 잡균 오염의 염려가 적은 낮은 pH에 잘 생육하고 균체가 커서 회수가 용이하고 lysine 및 vitamin B complex가 많은 장점이 있으므로 효모균체단백질 생산을 위한 기초적인 실험을 하여 흥미있는 결과를 얻었으므로 이에 보고하는 바이다.

실 험

Ⅰ. 실험재료

(1) 시료 :

전국 135개 지역에서 주유소 및 세차장의 유침(油浸)토양, 석탄, 논, 밭, 산, 하천 등 표층 4cm의 토양 242종을 수집 균분리시료로 하였다.

(2) 석유탄화수소 : 사용한 탄화수소는 대한석유공사 울산정유공장의 원유증류의 정류탑에서 각종 류분(溜分)을 분양받아 탄소원의 기질로 하였다.

Ⅱ. 실험 방법

(1) 1차 Screening

500ml용 shaking flask에 1차 screening medium 30ml(Table 2)를 분주하고 autoclave에서 10lbs, 10분간 가압살균한후 수집한 시료 5g을 직접 media에 가하여 28°C에서 48시간 reciprocal shaker에서 진탕배양(Strokes 5cm. Oscillation 120/min.)함으로서 탄화수소를 탄소원으로 자화하여 잘번식하는 미생물만을 집식시켜 dilution pour plate method로서 분리하고 1차 screening agar media에서 stock culture 하여 5°C 냉장고에 보관하고 2차 screening에 사용하였다.

(2) 2차 Screening

1차 screening에서 얻은 균주중 증식율이 높고 균체율이 양호한 우수균주를 선발하기 위하여 배

Table 1. Petroleum fraction

Fraction	Specific gravity 60/60°F	Boiling point °F	°C
Light straight run gasoline(L.S.R.G.)	0.6800	94	34.4
Naphtha	0.7405	114	45.6
Kerosene	0.7963	352	177.8
Light gas oil (L.G.O)	0.8368	408	208.9
Heavy gas oil(H.G.O.)	0.8654	516	268.9
Vacuum light gas oil (V.L.G.O)	0.8866	—	—

Table 2. Composition of media for screening

	1st screening medium	2nd screening medium
Hydrocarbon	35ml*	35ml*
NH_4NO_3	5.0g	3.0g
$(NH_4)_2SO_4$		1.0
$(NH_2)_2CO$		1.0
KH_2PO_4	2.5g	2.5
K_2HPO_4	2.5g	
Na_2HPO_4		2.5
$MgSO_47H_2O$	1.0g	0.7
$CaCl_22H_2O$		0.1
Yeast extract		0.1
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$		0.002
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$		10^{-5}
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$		10^{-4}
H_3BO_3		10^{-5}
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$		10^{-5}
$Co(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$		5×10^{-6}
Tween 20	0.5ml	0.5ml
Top water	1,000ml	
Deionized water		1,000ml
pH adjusted to 5.0 with 0.1N-HCl or 1N-NH_4OH		

* : Admixture of locally available Kerosene and heavy gas oil in equal volume ratio.

** : Hydrocarbons used were L.S.R.G., Naphtha, Kerosene, L.G.O., H.G.O., V.L.G.O., L.S.R.G. & Naphtha were separately sterilized.

지조성을 더 보강한 2차 screening media 30 ml (Table 2)를 500ml용 shaking flask에 분주, 멸균한 후 5°C 보존균주에서 1 loop를 접종 28°C에서 24시간 진탕배양으로 preculture하여 균주를 활성화시킨 다음 활성화된 균의현탁액 1 ml를 따로 미리 준비된 500ml용 shaking flask의 2차 screening media 30ml 중에 접종 28°C에서 48시간 진탕배양하여 그 배양액 2ml를 취하여 원심분리(3,000 RPM)하여 침전된 균체를 증류수 10ml로 현탁하여 optical density를 Coleman spectrophotometer Model 14로 wavelength 560mμ에서 측정하여 O.D. 값으로 균체량을 비교하였다.

(3) 선발된 우수균주의 배양최적조건 구명

분리, 선발된 우수균주에 대하여 탄소원으로서 탄화수소 류분(溜分)별, 질소원으로서 무기질소화합물의 종류별, growth factor 등 제조건이 우수균주의 증식율에 미치는 영향을 검토하기 위하여 다음과 같은 항목을 2차 screening에서와 같은 방법으로 증식도를 비교하였다.

가) pH의 영향 : 2차 screening medium을 initial pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0으로 조정하여 5일간 정치배양하였다.

나) 온도의 영향 : 2차 screening medium으로 24, 28, 30, 32, 36, 40°C에서 5일간 정치 배양하였다.

다) 석유 탄화수소유분별 : 탄소원으로서 원유정제의 각유분별로(Table 1) 증식도에 미치는 영향을 비교하였다.

라) 무기질소화합물의 종류별 : 질소원으로서 NH_4NO_3, NH_4Cl, $(NH_4)_2SO_4$, $(NH_2)_2CO$, $NH_4NO_3+(NH_4)_2SO_4$(1:1), $(NH_2)_2CO+(NH_4)_2SO_4$(1:1)를 0.5W/V%로 가하여 증식도에 미치는 영향을 비교하였다.

마) 배양중 pH 조정이 증식도에 미치는 영향 : 배양시간에 따라서 축적되는 지방산[23]과 질소원에서 유효질소를 미생물이 이용하고 남은 잔유기(殘有基)에 의한 pH 변화를 예상하여 1N-NH_4OH로서 최적 pH로 조정하면서 균체증식을 비교하였다.

바) Growth factor의 영향 : vitamin free casamino acid (Difco), casamino acid (Difco), yeast extract (Difco), peptone (Difco), corn steep liquor를 각각 단독으로 0.1g/l 씩 첨가한 배지와 첨가하지 않은 control 배지로 비교하였다.

(4) 선발된 우수균주의 동정

2차 screening에서 선발된 우수균주의 분류학적 연구로 배양적, 형태적 생리적 제특성의 검토와 동정은 Lodder[31]의 The yeasts a taxonomic study (1952)에 따라서 동정하였다.

(5) 효모균체의 회수 및 일반성분분석

배양액을 trichloroatetic acid로서 2%가 되게 산

성으로 처리하여 원심분리(3,000 R.P.M)를 30분간 하고 200 volume의 acetone[21]으로 세척 재차원심분리한후 70°C에서 24시간건조 다시 105°C에서 항량이되게 처리, 건조균체로 하였으며 이것을 상법에 따라서 조단백질은 Micro Kjeldahl법, 조지방은 ethyl ether을 이용한 Soxhlet 추출법, 회분은 600°C에서의 회화법으로 2회반복분석하였고 탄수화물은 총량에서 단백질, 지방, 수분, 회분을 감한 량으로 표시하였다.

결과 및 고찰

(1) 1차 Screening

비교적 간단한 배지조성의 1차 screening에서 pH 5.0, 28°C에서 48시간 enrichment culture로서 석유탄화수소를 이용하는 증식속도가 빠른 효모만을 포착하였다. 국내 135개지역에서 수집한 시료 242종에서 탄화수소이용효모 468주를 Table 3과 같이 분리하였는바 주유소및 세차장의 유침(油浸)토양에서 전분리 균주의 90.8%를 분리하였고 하천 그밖에 일반 토양에서도 약 10% 분리되었는데 이것은 탄화수소 이용미생물의 광범위한 분포상을 보여주는 것인데 주로 유침토양에 많은 것은 흥미있는 사실이며 이것은 Takeda[21]의 보고와 비슷한 결과를 나타냈다.

(2) 2차 Scereening

1차 screening에서 얻어진 468주에 대하여 2차 screening 하여 optical density가 560mμ에서 0.7 이상인 균주 5주를 선발하였다. 본대학 소장 type culture인 효모 76균주에 대하여도 이상과 같은 조건으로 배양, 비교한 결과 탄화수소 이용효모가한 균주도 없었으므로 본실험에서 분리, 선발된 효모균주는 균체증식율 및 수율을 높이는데 양호한 것들이라 생각된다.

(3) 선발된 우수균의 배양최적조건 구명

가) pH의 영향 : 분리선발된 우수균주 중에서 HY-160-5, HY-427-2는 pH 6.0에서 HY-201-10 HY-258-3, HY-69-19는 pH5.0에서 optimum condition으로 가장 양호한 증식상태를 보였다.

나) 온도의 영향 : HY-160-5, HY-201-10, HY-427-2는 30°C 그리고 HY-69-19, HY-285-3은 28°C에서 optimun temperature로 증식상태가 양호하였다.

다) 탄소원으로 Petroleum fraction별 영향

탄소원으로 원유증류의 각유분별 자화성과 증식율을 Table 5에서 표시하였다. 2차 screening에서

Table 3. Distribution of petroleum hydrocarbon utilizing yeasts by 1st screeing

Sources for isolation	Number of sample	Kinds of hydrocarbon	Number of isolated strains
Garage soil	79	Kerosene+Heavy gas oil	197
Oil-soaked soil	131	〃	262
Coal	4	〃	2
Farm soil	12	〃	2
Sewage	16	〃	5

Table 4. List of the selected yeasts

Strain No.	Sources isolated	O.D. at 560mμ
HY-160-5	Oil soaked soil	0.72
HY-201-10	Oil soaked soil	0.74
HY-427-2	Garage soil	0.72
HY-258-3	Garage soil	0.70
HY-69-19	Oil soaked soil	0.78

선발된 5균주가 모두 heavy gas oil에서 우수한 증식상태를 보였으며 이것은 이들균주가 heavy gas oil을 잘 이용하는 특성이며 heavy gas oil은 n-alkane 중 고온증류획분(B.P 268.9°C 이상)인 C_{15}~C_{19} 화합물을 비교적 많이 함유하고 있는 것과 이들을 잘 이용하는 균의 자화성을 암시하는 것으로 생각되고 이것은 Takeda[21]가 *Torulopsis* sp.의 배양에서 B.P 250°C 이상의 fraction에서 균체수율이 높았다고 보고한바와 상관성이 있는 것임을 알 수 있다. 특히 본 실험에서 주유소의 유침토양에서 분리선정된 *Candida curvata* HY-69-19 strain은 heavy gas oil을 가장 우수하게 자화(資化)하여 균체수율을 높일수 있음을 나타냈으므로 본균을 최우수균주로 선정하였다.

라) 질소원으로 무기질소화합물의 영향

질소원으로 NH_4NO_3, NH_4Cl, $(NH_4)_2SO_4$, $(NH_2)_2CO$ 중에서 증식율을 Table 6에서와 같이 비교하였는데 분리선정된 *Candida curvata* HY-69-19에 대하여 탄소원을 heavy gas oil로 하고 NH_4NO_3, NH_4Cl, $(NH_4)_2SO_4$ 등을 각각 단독 질소원으로한 배지의 처음 pH를 5.0으로 조정하고 48시간 진탕배양하여 final pH가 2.5~2.6으로 감소되고 증식율은 격감되었으며 pH 2.5에서도 생존가능성을 보였다.

그런데 Fig. 1에서와 같이 $(NH_2)_2CO$만의 단독 질소원은 final pH가 3.9이였고 더 이상의 pH감

Table 5. Effect of different fraction of petroleum on growth of the selected yeast strains

Strains / fractions	HY-160-5	HY-201-10	HY-427-2	HY-258-3	HY-69-19
L.S.R.G.*	0.03	0.055	0.07	0.06	0.07
Naphtha*	0.11	0.08	0.01	0.09	0.09
Kerosene	0.45	0.48	0.35	0.33	0.57
L.G.O.	0.66	0.50	0.55	0.645	0.70
H.G.O.	0.72	0.75	0.72	0.70	0.85
V.L.G.O.	0.71	0.70	0.63	0.60	0.74
Kerosene+L.G.O**	—	—	—	—	0.62
Kerosene+H.G.O**	0.72	0.74	0.72	0.70	0.78
L.G.O+H.GO.**	—	—	—	—	0.81

Hydrocarbons { LSRG* Naphtha*: were separately sterilized.
** : Admixture of equal volume ratio

Table 6. Effect of different nitrogen sources and growth factors on growth of the isolated *Candida curvata* HY-69-19 strain

Nitrogen-sources*	O.D.	pH+	Growth factors**	O.D.
NH_4NO_3	0.85	2.5	Vitamin free casamino acid	0.63
$(NH_2)_2CO$	1.80	3.9	Casamino acid	0.53
$(NH_4)_2SO_4$	0.96	2.5	Yeast extract	0.85
NH_4Cl	0.82	2.5	Corn steep liquor	0.77
$NH_4NO_3+(NH_4)_2SO_4$	0.90	2.6	Peptone	0.58
$(NH_2)CO_2+(NH_4)_2SO_4$	1.28	3.3	None	0.62

* : Each nitrogen source was added at the concentration of 0.5W/V%, H.G.O. was used as a carbon source
+ : Final pH in shaking cultured for 48 hrs. at 28°C
** : Each growth factor was added at the concentration of 0.01%, W/V%, H.G.O. was used as a carbon source and ammonium sulfate as a nitrogen source.
O.D.: Optical density at 560mμ

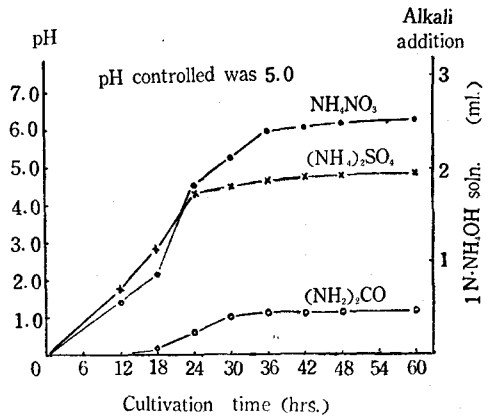

Fig 1. Decreasing rate of pH and alkali addition during cultivation of *Candida curvata* HY-69-19

소는 인정되지 않았고 또한 증식율의 감소가 가장 적었으므로 $(NH_2)_2CO$가 양호한 무기질소원이되는 것 같다.

마) 배양중 pH 조정이 증식도에 미치는 영향

배양중 축적되는 지방산[23]과 무기질소원에서 효모가 유효질소를 자화한 잔유기(殘有基)에 의하여 pH가 떨어지는 것이 아닌가 생각되어 배양중 6시간 마다 pH 5.0으로 조정한 다음 check 시간까지 pH 감소를 시간에 대하여 plot한 결과를 Fig. 1에서 나타낸 배양중 pH 감소율이다. pH 5.0으로 조정하는데 필요한 alkali인 NH_4OH 첨가 소요량은 pH 감소가 심한 NH_4NO_3 $(NH_4)_2SO_4$의 순서이고 $(NH_2)_2CO$는 감소가 적어서 alkali 소요량도 가장 적었다. 질소원중 NH_4NO_3는 ammonia와 nitrate를 자화하는 효모에 대하여 좋은 질소원이 되겠지만 nitrate의 자화성이 없는 *Candida curvata*

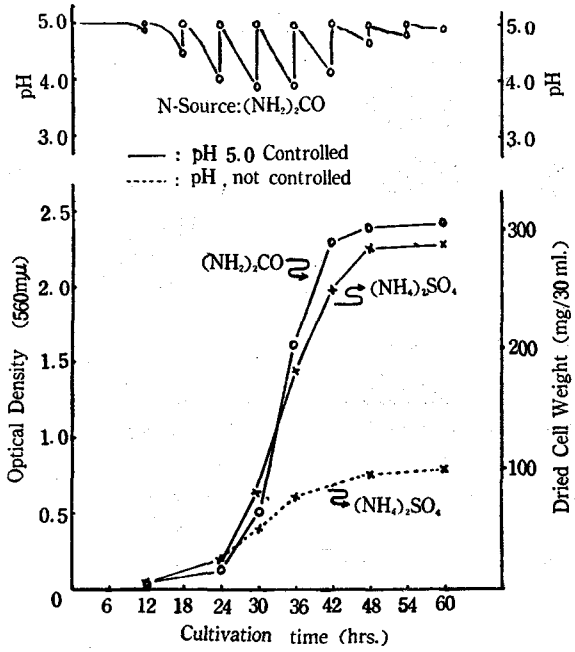

Fig. 2. Time course of cell production of *Candida curvata* HY-69-19 in shaking culture.

HY-69-19는 $(HH_4)_2SO_4$, NH_4Cl와 같이 ammonia를 자화한후의 잔유기가 강산성화하기 때문에 배양액의 pH가 격감되는 것이라 생각되므로 잔유기에 의한 산성화도가 적은 $(NH_2)_2CO$가 가장 우수한 무기질소원임을 알았다. 그런데 $(NH_2)_2CO$가 배양초기에 있어서 다른 질소원인 NH_4NO_3, $(NH_4)_2SO_4$ 보다 자화속도가 늦은 것을 볼 수 있는데 이것은 Yamada[24]의 *Candida tropicalis*를 배양하는 경우와 비슷한 결과임을 알수 있다. 그러므로 질소원으로 $(NH_2)_2CO$의 단독보다는 그외의 질소원과 공용하면 lag phase를 단축시킬 수 있어서 증식율에 있어서 양호한 효과를 기대할 수 있을 것이므로 앞으로 광범한 최적질소원 및 그의 농도를 더욱 검토하여야 할것이다. pH 감소율의 경향은 12~36 시간 사이에서 감소율이 현저하였는데 이것은 효모의 growth curve와 비슷한 상관성을 보였고 이 경향을 이용하여 Ertola[32] 등은 alkali로 titration하여 growth rate를 측정하기도 하였다.

배양중 6시간마다 pH 5.0으로 조정하고 균세포증식을 시간에 따라 plot 한 결과는 Fig. 2의 growth curve와 같으며 pH 감소율과 비슷한 흥미있는 결과를 보였으며 *Candida curvata* HY-69-19는 lag phase 18시간이고 24~42시간 사이에서 logarithmic growth phase를 보였고 48시간에서 maximum growth phase가 되고 logarithmic growth phase의 generation time은 3.8~4.5시간인 결과를 얻었다. 그리고 탄소원으로 heavy gas oil, 질소원으로$(NH_2)_2CO$인 배지를 28°C에서 대개 6시간마다 pH5.0으로 조정하면서 54시간 shaking culture로 배양액 30ml 당 건조균체량 300mg의 수율을 얻었다.

바) Growth factor의 영양

배지중에 몇가지 growth factor를 종류 별로 첨가하여 증식율을 비교한 결과는 Table 6과 같다. growth factor 첨가없이도 대체로 증식상태가 좋았으므로 이는 앞으로 *Candida curvata* HY-69-19에 의한 공장규모 생산의 cost down에 좋은 자료가 될 것이다. 그런데 yeast extract, corn steep liquor 첨가구에서 약간의 양호한 증식을 나타냈다.

(4) 선반된 우수균주의 동정

Identification.

The results of the indentification and the sources of isolation of hydrocarbon-utilizing yeast strain (HY-69-19) is shown in following description.

Candida curvata (Diddens et Lodder)

Strain:HY-69-19

This strain was isolated from oil-soaked soil and garage soil by the technique of kerosene and heavy gas oil enrichment culture.

Taxonomical characters of this yeast agreed with the standard description of *Candida curvata* given by Lodder and Kreger Van Rij[31].

Growth in malt extract: After 3 days at 28°C cells are oval occasionally long-oval, $(3-4.5)\times(4.5-8.5)\mu$

Single (Fig. 3)

A thin, dull, slightly wrinkled, creeping pellicle is formed and a sediment.

After one month at 17°C a sediment and a thin, white, slightly wrinkled pellicle are present.

Growth on malt agar:

After one month at 17°C the streak culture is yellowish, dull, much folded, the border is surrounded by psedomycelium.

Sporulation: not observed.

Slide culture: Pseudomycelium is well developed. The cells are long. The pseudomycelium is much branched. Cells are very long, but septa are not formed. (Fig. 4)

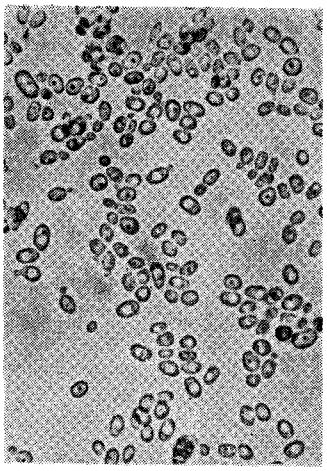

Fig. 3. Cells of *Candida curvata* HY-69-19. Grown in malt extract, for 3days at 28°C (×600)

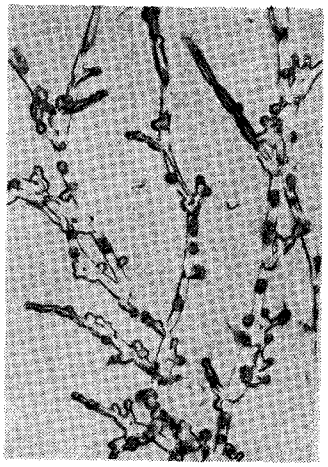

Fig. 4. Pseudomycelia of *Candida curvata* HY-69-19. Slide culture on potato dextrose agar, for 15 day at 28°C (×600)

Fermentation: Glucose, galactose, maltose, saccharose and lactose are not fermented.

Sugar assimilation: Glucose, galactose, maltose, saccharose and lactose are assimilated.

Assimilation of potassium nitrate: Negative.

Ethanol as sole source of carbon: Growth occurs. A pellicle is formed.

Growth in litmus milk: Growth occurs, but color not changed.

Growth in vitamin free medium: Growth occurs.

Starch-like substance production: Negative.

Splitting of arbutin: Slightly psitive.

(5) 효모균체의 회수 및 일반성분석

Candida curvata HY-69-19를 탄소원 heavy gas oil 3% 질소원 $(NH_2)_2CO$ 0.5%인 배지를 pH5.0으로 수시조정하면서 flask의 진탕배양 54시간에서 건조균체량 300mg/Heavy gas oil ml의 수율을 얻었다. 이와같은 결과는 agitation과 aeration이 충분한 air lift-type인 Jar fermentor로서 pH 조정을 원할하게 연속배양을 한다면 더욱더 높은 균체수율을 바랄 수 있고 나아가서 Waldhof-type fermentor에 의한 공장규모생산 연구를 뒷받침하는 큰 수확이라 하겠다.

그리고 배양액에서의 효모균체 회수에서 원심분리에 의한 완전회수는 곤란한 점이 약간있었다. 건조균체의 성분을 보면 조단백질 40.25%, 조지방 14.81% 회분 10.63% 탄수화물 24.32%이었다. 단백질함량이 Champagnat[13] 등(British Petroleum)의 43.6%와 비슷한 결과를 보였으며 한편 균체회수중 이용치 못한 oil이 함께 섞여 있을 우려에서 단백질함량이 낮은 느낌도 있다.

균체단백질의 평가는 량적인 것도 있겠지만 질소화합물의 분석 및 필수아미노산 분석은 물론 나아가서 vitamin 분석도 아울러서 이루어져야 할것이다. 그러므로 분리선정된 *Candida curvata* HY-69-19는 공업적으로 석유탄화수소에서 단백질생산에 쓰일 수 있는 새로운 균주라 생각되는 바이다.

요 약

석유탄화수소 이용미생물연구의 일환으로서 미생물에 의한 세포단백질생산의 목적으로 전국각지 135개지역에서 주유소 세차장의 유침(油浸)토양을 비롯 석탄, 논밭, 하천토양등 242종을 수집하고 이시료로부터 석유탄화수소를 유일한 유기탄소원으로 이용하는 효모 468균주를 분리하였고 분리된 효모균주의 증식율(增殖率)을 screening 하여 우수균주를 선정하였다.

선정된 효모에 대하여 동정(同定) 및 배양 최적조건의 검토 그리고 효모균체의 성분분석을 한 결과 다음과 같다.

1) 석유탄화수소 이용효모중 90.8%가 주유소및 세차장등 유침토양에서 나머지 10%가 석탄, 작토(作土) 하천토양에서 분리되였다.

2) 분리선정된 가장 우수한 효모균주는 주유소의 유침토양에서 분리됐고 *Candida curvata* HY-

69-19로 동정되었다.

3) 분리선정된 *Candida curvata* HY-69-19는 optimum pH 5.0, optimum temperature 28°C, aerobic condition에서 균증식율이 컸다.

4) *Candida curvata* HY-66-19는 유기탄소원으로 petroleum fraction 중 비중이 0.8654이고 비점이 268.9°C 이상의 fraction인 heavy gas oil을 잘 이용하며 무기질소원으로$(NH_2)_2CO$가 증식율과균체세포생산에 최적임을 알았다.

5) 분리선정된 이효모는 heavy gas oil 배지에서 lag phase 18시간, logarithmic growth phase 24시간~42시간 사이며 이 때의 generation time은 3.8~4.5시간이었다.

6) 분리선정된 이 효모는 heavy gas oil 및$(NH_2)_2CO$ 배지로 54시간 pH를 6시간마다 조정하면서 진탕배양하여 300mg/ml. H.G.O.의 건조균체를 생산하였다.

7) *Candida curvata* HY-69-19의 균체성분은 조단백질 40.25%, 조지방 14.81%, 탄수화물 24.32% 회분 10.63%이었다.

끝으로 이연구사업은 FY 69 문교부 학술연구조성비의 지원에 의하여 수행된 것이며 지원해주신 관계관 여러분께 심심한 감사를 드리며 석유의 각 류분(溜分)을 분양해주신 대한석유공사에 사의를 표하며 실험을 도와준 본대학 대학원생 신현경, 김종국 양군에게 사의를 표하는 바이다.

참 고 문 헌

1. Miyoshi, M.: Jahrb. Wiss. Botan., 28 269(1895)
2. Tausson, T.A.: Chem. Abst. **35**, 3673 (1941)
3. Zobell,C.E.: Advances in Enzymology **10**, 443 (1950)
4. Just,F.:Die Brauerei Wiss, Beilage **4**, 57 (1951)
5. Davis, J.B.: Bacteriol. Rev., **18**, 215 (1954)
6. Harris, R.G. & R.J. Strawinsky: U.S. Patent 2,697,061 (1954)
7. Hoerburger, W.; Forschungs Ber. Wirtsch. Verkehrsministeriums Nordrhein Westfalen **131**, 2211 (1955)
8. Stewart J. E., R.E.Kallio & D.P. Stevenson: J.Bact. **78**, 441 (1959)
9. Fuhs, G.W.:Arch. Mikrobiol., **39**, 375 (1961)
10. Foster, J.W.: Antonie van Leeuwenhock., **28**, 241 (1962)
11. Raymond,R.L. & J.B.Davis: Appl. Microbiol., **8**, 329 (1960)
12. Raymond, R.L: Develop. Ind. Microbiol., **2**, 23 (1961)
13. Champagnat A., C.Vernet, B.Laine & J.Filosa: Nature **197**, 13 (1963)
14. Miller, T.L., & J. Filosa: U.S. Patent 3,193, 390 (1965)
15. Miller, T.L., S.Lie & M.J. Johnson: Biotech. & Bioeng., **6**, 299 (1964)
16. Miller, T.L., & M.J.Johnson: Biotech & Bioeng., **8**, 549 567 (1966)
17. Iizuka,H. & S. Otsuka: J.Gen. appl. Microbiol. **9**, 23 (1963)
18. Iizuka, H. & K. Komagata: ibid **9**.73 83(1963)
19. Iizuka, H. & K. Komagata: ibid **10**, 207 223 (1964)
20. Komagata, K., N. Taktsuya: ibid **10**, 313 323 (1964)
21. Takeda, I., T. Iguchi, T. Kawamura, & S. Senoh: Agr. Biol. Chem. **29**, 796 (1965)
22. Yamada, K., J.Takahashi, K.Kobayashi & Y. Imada: ibid **27**, 390 773 836 (1963)
23. Ostsuka, S.I., R.Ishii and N.Katsuya: J. Gen. Appl. Microbiol. **12**, 1 (1966)
24. Yamada, K., J. Takashi, Y. Kawabata, T. & T. Onihara: in Single Cell Protein MIT press (1968)
25. Wang, DIC: Chem. Engineering **75**, 99 (Aug. 26) (1968)
26. Shimizu, S.: J, Ferment. Technol. **47**, 542 551 (1969)
27. Aiba, S.,V. Moritz, J.I.Sumeya & K.L.Haung: J. Ferment. Technol. **47**, 203 211 (1969)
28. Iida, M. & H.Iizuka: J. Ferment.Technol. **47**, 442 (1969)
29. Itoh, M & S.Doi: J. Ferment. Technol. **47**, 161(1969)
30. Park, T. W.: Dae Han Hwahak Hwoejee **13**, 187 (1969)
31. Lodder, J. and N.J.W. Kreger-van Rij: The Yeasts a taxonomic study, North Holland Pub. Co., Amsterdam (1952)
32. Ertola.R.J.:J. Ferment. Tech. **47**, 536 (1969)