

석유 탄화수소 이용 미생물에 관한 연구 (제 2 보)

—효모를 이용한 석유탄화수소로부터 단백질 생산에 관하여—

李 啓 瑚 · 申 鉉 炯
서울대학교 농과대학 식품공학과
(1970. 12. 31. 수리)

Studies on the Petroleum hydrocarbon-utilizing Micro-organisms(Part 2)

On the Production of Single Cell Protein from Petroleum
hydrocarbon with a yeast strain

Ke Ho Lee and Hyun Kyung Shin

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

(Received Dec. 31, 1970)

Summary

In order to obtain basic information on the production of single cell protein from petroleum, more than 400 yeast strains were isolated from various soil samples in Korea utilizing petroleum hydrocarbon as the sole carbon source.

A yeast strain showing the highest cell yield among the isolated strains was selected and identified. The optimal culture condition was searched in the flasks shaken throughout the procedure. And the growing characteristics for the selected yeast strain and chemical analysis of the yeast cell component were carried out.

The results obtained were as follows:

1. The selected yeast strain was identified as *Candida curvata* and we named it *Candia curvata-SNU 70*.
2. The composition of the medium proposed for the present yeast strain is: Light Gas Oil 30 ml, Urea 400mg, Ammonium sulfate 100mg, Potasium phosphate (monobasic) 670mg, Sodium phosphate (dibasic) 330mg, Magnesium sulfate 500mg, Calcium carbonate 3g, Yeast extract 50mg, Tween 20 0.05ml, Tap water 1,000ml.
3. Other culture conditions employed for the yeast were pH 5.5—7.0, temp. 30°C under an affluent aerobic state.
4. Addition of light gas oil in portions to the culture media as the growth proceeded was more effective, especially in the cultivation on the higher oil concentration media.
5. Studies on the propagation of the yeast cells in the light gas oil medium revealed that the yeast has the lag phase lasted 16 hours and the logarithmic growth phase covered 16 to 28 hours. The specific growth rate was about 0.22 hr⁻¹ and doubling time was 3.2 hrs. during the logarithmic growth phase.
6. Under the cultural condition employed, the cell yield against the amount of light gas oil (wt%) was 16.1% and the protein content of the dried yeast cells was 48.4%.

머릿말

미생물이 석유탄화수소를 탄소원으로 이용할 수 있다는 사실이 단편적으로 알려진¹⁾ 이래 최근 미생물을 석유에 이용시켜 여러가지 유용한 제품 즉 세포단백²⁾, 유지³⁾, 유기산⁴⁾, 비타민⁵⁾, 에스터⁶⁾, 알콜등을 생산해 내려는 연구가 활기를 띄고있다. 그 중 세포 단백질의 생합성은 인구증가와 함께 대두되고 있는 식량난 해결에 크게 기여할 수 있을 것으로 기대되어 특히 주목을 받고 있다.

석유를 유일한 탄소원으로 이용할 수 있는 미생물⁷⁾은 주로 *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Thiobacillus*, *Mycobacterium* 등의 세균과 *Candida*, *Torulopsis* 등의 효모 및 *Aspergillus*, *Penicillium* 등의 곰팡이 등 그 종류가 다양하나 단백질 생산 목적에는 대량생산이 쉽고 단백질 함량이 높은 세균과 효모가 적합하다고 생각되고 있다

세균은 성장속도가 빠르고 단백질함량이 높으며 여러 종류의 탄화수소를 이용할 수 있기 때문에 methane 이나 n-paraffin 을 원료로 하여 60~103%의 균체수율을 얻을 수 있었다는 보고⁸⁾ 등 많은 연구가 있으나 균체가 작아 회수등의 조작이 불편한 점이 있어 현재 균체가 비교적 크고 대량생산이 쉬운 효모가 단백질제조용으로 가장 적합한 미생물로 지목받고 있는 것이다.

효모세포는 단백질 함량이 높고 필수아미노산의 분포가 적당하며 비타민 B군을 많이 포함하고 있어 그 자체가 양질의 식량자원이 될 수 있어 1차대전 이래 당밀, 목재당화액(wood hydrolyzate) 및 아류산폐액(sulfite liquor) 등에 배양시켜 사료용 등으로 소량씩 이용되어 왔으나, 석유탄화수소가 이들 탄수화물 원료들 보다 공급과 가격에 있어서 훨씬 안정되고 유리하기 때문에 공업적인 효모세포의 대량생산을 위한 많은 연구가 새롭게 진행되고 있는 것이다.

순수한 n-paraffin 을 기질로 하였을 경우 *Torulopsis sp.*를 사용하여 72%⁹⁾, *Candida intermedia* 를 사용하여 82%⁹⁾, *Candida lipolytica* 를 사용한 102%¹⁰⁾의 균체수율이 보고되고 있으며 Gas oil 을 직접 기질로 했을 경우 10t 의 Gas oil 에서 1t 의 석유단백질과 9t 의 탈납(脫蠟) oil 을 얻어 유동점 저하로 인한 기름의 개량도 아울러 꾀할 수 있었다는 흥미있는 결과¹¹⁻¹²⁾ 등이 보고된 바 있다.

본 연구는 석유이용 효모세포의 식량화 내지 사료화를 목적으로 우리나라 각 토양시료로부터 석유탄화수소 이용효모를 분리하고 그중 증식율이

좋은 균주를 선정, 동정하고 선정된 균주의 석유배지에서의 배양최적조건을 조사하여 대량생산을 위한 기초자료를 얻고자 시도한바 몇가지 흥미있는 결과를 얻었으므로 여기 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

1. 우수균주의 선정 및 동정방법

1) 균분리 및 1차선별 : 전국 각 지역의 주유소, 세차장 및 유침토양을 수집하여 Table 1의 조성인 media A 50ml 에 2g 의 토양시료를 넣은후 500ml shaking flask 로 2일간 진탕 배양시켜 현탁액 1 ml 를 pour plate method 에 의하여 media A 의 agar 배지에서 평판배양 시킨후 독립 colony 를 동배지 slant 에 채취 보존시켜 일차 선별을 하였다.

2) 2차선별 : 영양요구성이 적은 균주를 얻기 위하여 1차선별된 균주를 비교적 배지조성이 간단한 media B 5ml 가 든 test-tube 에 접종하고 진탕 배양시켜 활성화된 균현탁액을 얻었다. 이들 10개의 현탁액을 한 조로하여 각 1ml 씩을 취하여 media B 가 30ml 씩 분주된 500ml-shaking flask 에 접종하고 30시간 진탕배양 시킨후 dilution pour plate method 에 의하여 상대적으로 증식율이 좋은 것을 택하여 2차선별을 하였다.

3) 우수균주의 선정 및 동정 : 2차선별된 균주들

Table 1. Composition of media for screening and cultivation

Constituents	Media A	Media B
Hydrocarbon*	30ml	30ml
NH ₄ NO ₃	2.5g	—
(NH ₂) ₂ CO	2.5	5g
KH ₂ PO ₄	2	2
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	1	1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.7	0.5
CaCO ₃	0.1	0.1
FeSO ₄ ·7H ₂ O	10 ⁻³	—
MnSO ₄ ·4H ₂ O	10 ⁻³	—
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	10 ⁻³	—
H ₃ BO ₃	10 ⁻³	—
Yeast Extract	0.1	0.05
Tween 20	0.1ml	0.1ml
Tap water	1000ml	1000ml
pH **	5.0	5.0

Autoclaved at 115°C×10min.

* Kerosene, Light Gas Oil and Heavy Gas Oil (in equal weight) was used,

** Adjusted with 0.1N-HCl and 0.1N-NH₄OH

을 각각 media B에서 3일간 500ml-shaking flask로 진탕배양 하여 원심분리 한 후 탁도(Optical Density)로써 균체증식율이 가장 높은 우수균주를 선정하였다.

선정된 균주는 배양학적, 형태학적, 생리학적 제 특성에 따라 Lodder의 The Yeasts, A Taxonomic Study¹³⁾에 준하여 동정하였다.

2. 석유탄화수소

대한석유공사 울산정유공장의 원유정류탑에서 얻어진 온도별 각 유분(fraction)을 직접 탄소기질로 사용하였다. 각유분(溜分)의 성질은 Table II와 같다.

Table 2. Properties of petroleum fractions

Fraction	Specific gravity (60/60°F)	B.P.(°C)
Light Straight Run Gasoline	0.6800	34.4
Naphtha	0.7405	45.6
Kerosene	0.7963	67.78
Light Gas Oil (LGO)	0.8368	208.9
Heavy Gas Oil (HGO)	0.8654	268.9
Vacuum Light Gas Oil (V. LGO)	0.8866	—

3. 배양방법

1) 접종 : 선정균주, *Candida curvata*-SNU70를 4°C에서 media B-agar slant에서 보존시켰다가 균체 1 loop를 20ml 배지에 접종하여 30시간동안 진탕배양시켜 활성화된懸탁액 1ml을 Inoculum으로 사용했다.

2) 배양조건 : media B 조성배지를 500ml-shaking flask에 30ml 넣고 27~30°C에서 2~3일간 진탕배양(stroke 5cm, Oscillation 120/min)시켰다.

실험도중 얻어진 결과를 그 다음 계속된 실험에서는 적용하였다.

4. 세포량 측정

배양액(30ml)에 동량의 증류수를 가하고 기포과 균체의 분리를 유리하게 하기 위하여 Tween 20을 몇방울 넣고 배지중 이용안된 탄산칼슘을 녹이기 위하여 염산(1:1) 1ml을 가한 후 약간가열시켰다. 가열시킨 액 10ml을 취하여 원심분리(3000 rpm×30min)시킨후 다시 증류수를 가해 재차 원심분리(3000rpm×10min)를 시켜분리된 균체를 20배로 희석한 다음 Coleman Spectrophotometer Model-14으로 파장 560m μ 에서 탁도(Optical Density, O.D.)를 보아 세포량을 비교 측정하였다.

한편 건조세포량을 측정하기 위하여 재차원심분

리한 분리잔사(殘渣)를 아세톤으로 세척하고 3차 원심분리한 잔사를 70°C에서 8시간 건조한 다음 항량을 구하여 건조 균체량으로 하였다.

5. 균체의 일반성분 분석방법

위에서 얻어진 건조균체에 대한 성분분석으로 수분함량은 105°C에서 1시간 가열하는 상법으로, 조단백질은 Micro-kjeldahl법, 조지방은 ethyl ether을 이용한 soxhlet 추출법을 사용했으며 회분은 상법에 의하여 600°C로 가열한 후 항량을 구하였고 가용성무질소물은 총량에서 단백질, 지방, 수분, 회분을 감한 량으로 표시하였다.

실험결과 및 고찰

1. 우수균주의 선정 및 동정

전국 각지역의 100여점의 토양시료에서 석유이용효모 400여주를 일차 선별하였고 2차선별에서는 40개를 얻었다. 이중 균체 증식이 가장 우수한 효모균주 하나를 우수균주로 선정하였다.

선정된 균주의 형태학적, 배양학적, 생리학적 특성을 조사검토한바 Table 3과 같았으므로 Lodder의 The Yeasts, A Taxonomic Study¹³⁾에 대조한 결과 *Candida Curvata*와 거의 비슷한 균주임을 알 수 있어 *Candida curvata*-SNU 70로 동정하였다.

석유이용 효모는 *Candida*속이 대부분¹⁴⁾이며 그 외 *Torulopsis*, *Rhodotorula*, *Hansenula*속 등이 보고된 바 있으며 *Candida*속 중에서도 특히 *Candida lipolytica*,¹⁰⁾ *Candida intermedia*⁹⁾ *Candida tropicalis*¹⁵⁾등이 우수균주로 지목받고 있으나 본 *Candida curvata*에 관한 연구는 기보한바 있는 Lee²⁶⁾등의 보고 외에 거의 없는 형편임을 밝힌다.

Table 3. Description of *Candida curvata*-SNU70

Growth in malt extract;

After 3 days at 25°C cells were round to oval (3~5×3~8 μ). Single (Fig. 8) A pellicle and a sediment were formed.

Streak culture on malt agar;

Cream colored, raised, wrinkled. wet with dull parts

Slide culture on potato agar;

Prominent true- and pseudomycelium developed. (Fig. 9)

Sporulation; not observed

Fermentation; absent

Sugar assimilation; Glucose (+), Galactose (+), Maltose (+), Sucrose (+)

Lactose (±)

Assimilation of KNO₃; negative

Utilization of Ethanol as sole carbon source;
positive

Production of Carotenoid pigments; negative

Production of starch like products; negative

Acid formation from milk; negative

Growth in Vit.-free medium; occurred

Splitting of Arbutin; very weakly positive

Source; Isolated from oil soaked soil

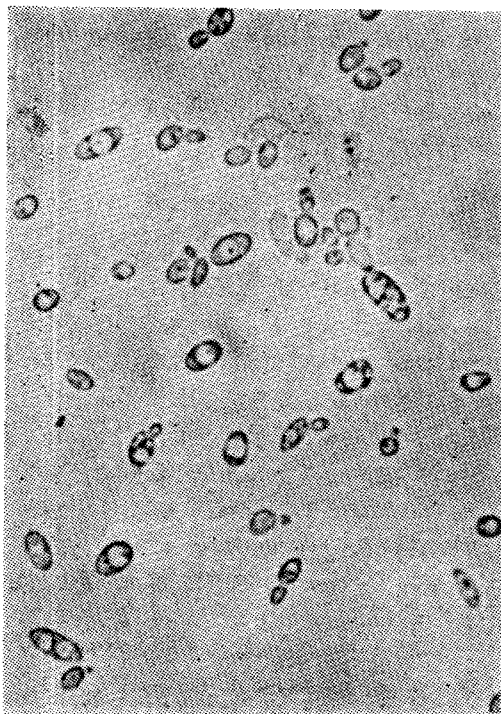


Fig. 8. Cells of *Candida curvata*-SNU 70. Grown in Malt extract, for 3 days at 28°C (×600)

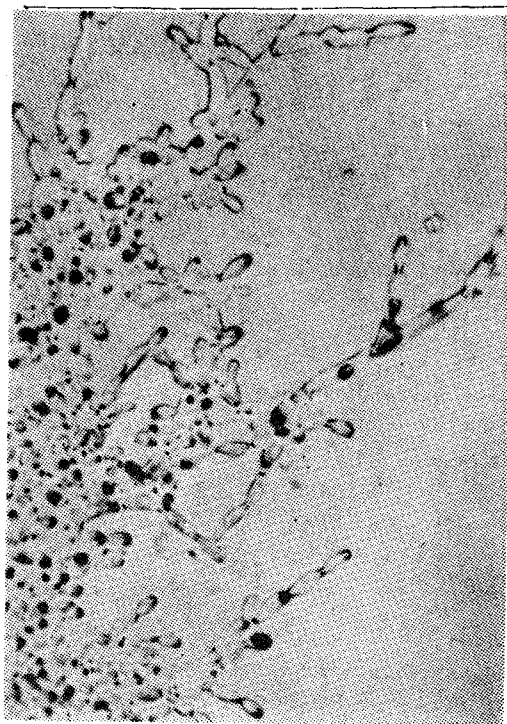


Fig. 9. Pseudomycelia of *Candida curvata*-SNU 70. Slide culture on Potato dextrose agar, for 15 days at 28°C (×600)

2. 선정균주, *Candida Curvata*-SNU 70.의 배양 최적조건의 검토

1) 석유의 유분(fraction)별 영향

Table 4에서 알 수 있는 바와 같이 B.P.가 208.9°C인 Light Gas Oil과 268.9°C인 Heavy Gas Oil에서 좋은 균증식을 보이고 있다. 이와같은 사실은 B.P. 180~275°C의 유분에 C₁₁~C₁₆의 n-paraffin이, ~330°C의 유분에서 ~C₂₀의 n-paraffin이 다량 함유된다는 보고¹²⁾와 그리고 C¹⁰~C₂₀ 사이의 n-paraffin 특히 n-Hexadecane과 n-Octadecane의 이용율이 가장 좋았다는 Raymond⁹⁾ 등의 보고와 흥미있는 관련성을 보이고 있음을 알 수 있다.

또한 Takeda⁹⁾ 등의 B.P. 250°C 부근의 유분에서 균체수율이 높았다는 보고 및 Kerosene보다 Gas Oil에서 증식율이 우수했다는 Someya¹⁰⁾ 등의 보고와도 일치된 결과를 보여주고 있다고 생각된다.

앞으로의 실험에서는 Light Gas Oil을 탄소원으로

로 사용하였다.

Table 4. Effect of petroleum fractions on the growth of the selected yeast

Fraction	B.P.(°C)	O.D.
LSRG	34.4	0.02
Naphtha	45.6	0.09
Kerosene	67.78	0.31
LGO	208.9	0.41
HGO	268.9	0.38
V. LGO	—	0.32
Kerosene+LGO	—	0.35
LGO+HGO	—	0.40
HGO+V.LGO	—	0.36
HGO+Kerosene	—	0.31

Separately sterilized.

Each fraction was added in the concentration of 3%

2) Light Gas Oil 의 농도가 증식에 미치는 영향

Table 5. Effect of the concentration of Light Gas Oil on the growth of the selected yeast

LGO conc. (Vol. %)	O.D.	Cell yield (g/l media)	Cell yield (g/100g LGO)
0.5	0.07	0.6	14.3
1	0.15	1.2	14.3
3	0.41	3.2	12.7
5	0.65	5.2	12.4
7	0.69	5.6	9.5
10	0.75	6.0	7.1
20	1.26	10.2	6.1

경유농도가 증가할 수록 균체량에서도 증가경향을 보이고 있으나 가해진 경유에 대한 균체 수율은 1%이상에서 점점 감소하는 경향을 볼 수 있다 이와 같은 감소경향은 고농도에 의한 생육저해 및 경유중에 함유된 방향족화합물에 의한 생육저해도 생각할 수 있었으며 후라스크 배양지의 여러 불리한 여건 때문일 수도 있다고 보겠다.

탄화수소 배지 1l 당 건조균체수율이 10~35g 을 생산할 수 있는 정도가 바람직 하다는 Wang¹⁷⁾ 등의 보고 보다는 낮은 값이지만 통기 및 연속배양 등의 제조조건 개선으로 균체수율을 높일 수 있을 것을 기대하고, 본 실험에서는 탄화수소농도 3% 를 사용하였다.

기질에 대한 균체수율이 14%정도 이하로 낮지만 이것은 효모가 이용할 수 있는 성분인 경유중의 n-paraffin 의 함량이 6.5~18.1%²⁾ 정도라는 비교에 의하면 본 선정균주는 상당히 우수한 탄화수소 이용효도임을 알 수 있다.

3) 온도의 영향

효모의 적온 범위는 일반적으로 28~30°C로 알려져 있다. Fig. 1에서와 같이 본 균주는 30°C 부근에서 증식이 양호하고 40°C 정도에서는 증식이 상당히 떨어짐을 알 수 있다.

석유탄화수소 배지에서의 효모증식은 특히 다량의 열이 발생하여 배지의 온도를 높이기 때문에 적절한 냉각수단이 필요로 된다고 하며 따라서 고온에 견딜 수 있는 균주가 유리하게 생각되며 요청되고 있다. Mateles¹⁸⁾ 등은 내열성 세균의 증식에 대하여 보고한 바도 있다.

4) 무기질소원 별 영향

질소원의 종류에 따라서 Table 6에서 보는바와

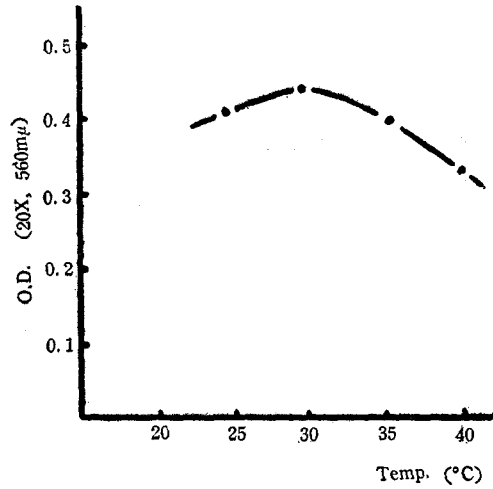


Fig. 1. Effect of Temperature on the Growth of the Selected Yeast.

같이 배양과정중 배지의 pH에 큰 영향을 미침을 알 수 있다. 배양개시후 일정시간의 배양이 진행되면 유산, 초산암모늄, 염화암모늄 등은 암모늄기의 이용후 남는 SO₄²⁻, NO₃⁻, Cl⁻ 등에 의하여 pH 감소가 현저함을 알 수 있다. 요소 및 요소와 유산의 혼합구가 pH 감소가 비교적 완만하며 균증식율이 좋으나 요소단일구는 Initial pH를 너무높여 Optimum pH를 벗어날 우려가 있기 때문에 요소와 유산을 4대 1로 혼합한 것을 앞으로의 실험에서 질소원으로 사용하였다.

Table 6. Effect of inorganic nitrogen sources on the growth of the selected yeast

N-sources	Initial pH	24 hrs pH	O.D.
(NH ₄) ₂ SO ₄	6.0	3.0	0.38
NH ₄ NO ₃	5.8	3.0	0.36
(NH ₂) ₂ CO	7.4	6.0	0.42
NH ₄ Cl	5.8	3.2	0.33
(NH ₄) ₂ SO ₄ +NH ₄ NO ₃	5.8	3.4	0.36
NH ₄ NO ₃ +(NH ₂) ₂ CO	6.6	5.5	0.41
(NH ₄) ₂ SO ₄ +(NH ₂) ₂ CO	—	—	—
(1:4)	6.4	6.0	0.42
(1:1)	6.2	6.0	0.42

After 24hrs, pH was kept above 5.0 with CaCO₃. Each N-source was added in the concentration of 0.5%

그러나 pH만 적절히 조성시킬 수 있다면 유산이나 초산암모늄에 관해서도 더욱 검토해볼 만한

여지가 있을 것으로 생각된다.

5) 질소원의 농도에 의한 영향

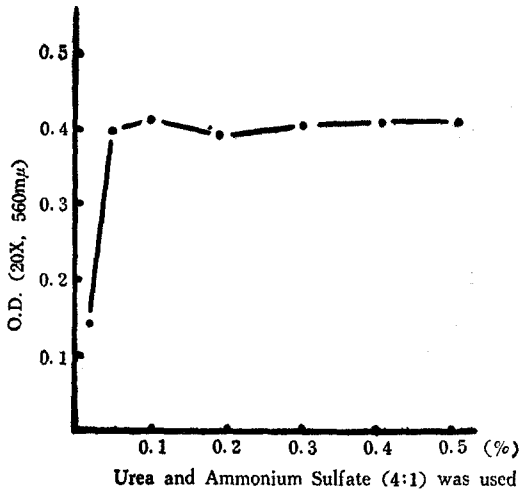


Fig. 2. Effect of the Nitrogen concentration on the Growth of the Selected Yeast

질소의 농도에 따른 효모의 증식율을 조사해 본 결과 Fig. 2와 같았다. 경유증에서 효모가 탄소원으로 이용가능한 n-paraffin의 함량이 6.5~18.1% 라면 효모가 이용할 수 있는 질소의 량이 n-paraffin을 탄소기질로 사용할때 보통 쓰이는 배지의 질소 농도인 0.1~0.5% 보다는 낮아도될 수 있을 것이라 예상했던 바 0.05%의 질소원농도 하에서도 증분함을 알 수 있다.

6) pH의 영향

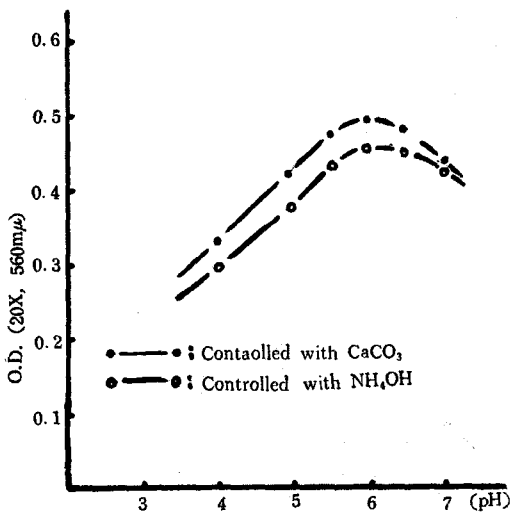


Fig. 3. Effect of pH on the Growth of the Selected Yeast.

효모가 생육함에 따라서 질소원으로 암모늄기를 이용하기 때문에 그 잔유기 CO₃²⁻, SO₄²⁻ 등의 성질에 따라 pH는 감소한다.

암모니아수, 탄산칼슘을 수시로 첨가하여 pH감소를 방지하면서 각 pH 별로 배양시켜 효모의 생육에 미치는 영향을 조사하여 Fig. 3과 같은 결과를 얻었다. pH, 5.5~7.0사이의 비교적 넓은 범위에서 좋은 증식을 보이고 있음은 배양에 유리한 조건이 될 수 있겠으나 후라스크 진탕배양에서 비교적 정확한 pH조정이 힘들었기 때문에 optimum pH가 뚜렷이 나타나지 못했을 수도 있겠다고 본다. 일반적으로 탄산칼슘으로 조절한 구가 암모니아수 조절구 보다 증식율이 우수하였다. 이는 Ca⁺⁺의 상승작용도 있겠으나 pH조절시 pH감소를 비교적 완만하게 하여 일정한 pH유지가 가능했기 때문으로 생각한다.

배지 조제시 탄산칼슘을 0.3% 가하여 배양하면 생육중 pH가 6.6~5.5 범위를 유지할 수 있었으므로 따로 pH조절할 노력이 필요없게 됨을 알수 있었다.

일반적으로 효모의 적정 pH는 5~7사이인데 낮은 pH를 optimum condition으로 가지는것이 세균등의 오염을 방지 시킬 수 있어 유리할 것으로 생각되고 있으며 박¹⁰⁾은 *Candida lipolytica*가 적정 pH 4를 갖는것을 보고한 바 있다.

7) 인산염의 농도에 의한 영향

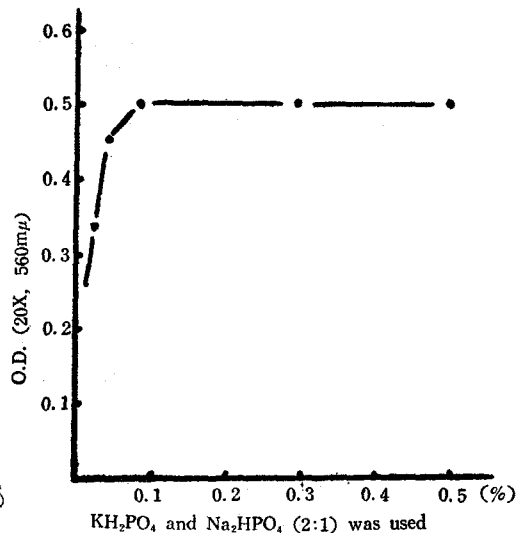


Fig. 4. Effect of Phosphate on the Growth of the Selected Yeast

인산염의 농도가 증식에 미치는 영향을 검토한 바 Fig. 4와 같다. 배지내의 완충작용 및 K^+ , Na^+ 의 공급도 아울러 고려하기 위하여 KH_2PO_4 와 Na_2HPO_4 를 2:1로 섞어서 사용하였다. Fig. 4에서 0.1% 이상의 농도에서는 균증식에 별차를 발견할 수 없어 이 농도를 적정농도로 하고 다음 실험부터는 이 결과를 적용시켰다. 이 인산염의 0.1%농도도 n-paraffin을 원료로 한 다른 연구의 인산염 농도 보다는 낮은 값이 되는 것이다.

8) 유기영양원의 영향

무기질소원인 control 구와 유기질소원인 vitamin free casamino acid 구를 보면 양구가 비슷한, 상당한 증식을 보이고 있음은 흥미있는 일이다.

Table 7에서 yeast extract 0.05%의 농도하에서도 다른 배양구보다 우수한 균 증식을 보이고 있는데 이는 이 효모가 yeast extract 중의 어떤 생육인자를 그 증식에 대한 촉진물질로 하고 있음을 암시해 준다고 생각한다.

Table 7. Effect of natural nutrients on the growth of the selected yeast.

Natural nutrients	Concentration (%)	O.D.
Yeast Extract	0.001	0.37
	0.005	0.50
	0.01	0.50
	0.02	0.48
	0.05	0.48
Corn Steep Liquor	0.01	0.36
Casamino Acid	0.01	0.41
Vit-free Casamino Acid	0.01	0.36
Peptone	0.01	0.40
Control		0.36

9) 계면활성제의 영향

석유발효에 있어서는 석유분자가 물과의 친화력이 약하여 물에 불용성이기 때문에 석유의 배지내에서 적당한 분산이 이루어져 미생물세포와의 접촉 빈도가 많아져야 함이 중요한 일인 것이다. 석유의 분산은 대부분 기계적 방법이나 발효조내의 공기공급과 함께 이루어지는데 본 실험에서는 진탕배양(Stroke 5cm, Oscillation 120/min)과 함께 계면활성제를 첨가함으로써 그 증식효과를 살펴본 결과 Fig. 5와 같다.

Tween 20이 Tween 80보다 우수하고 무첨가구 보다는 상당한 효과를 보여줌을 알 수 있다.

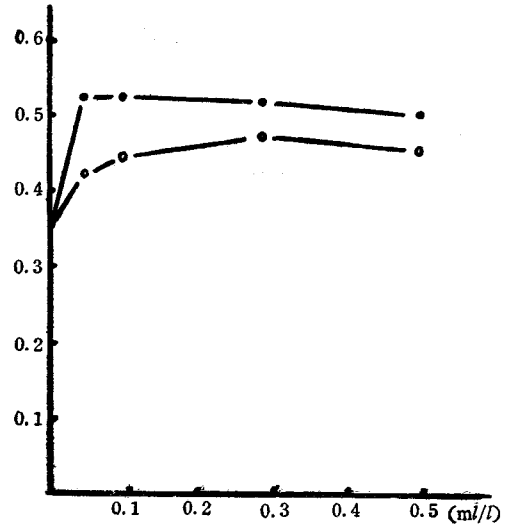


Fig. 5. Effect of Surfactants on the Growth of the Selected Yeast.

Aiba²⁰⁾ 등은 계면활성제가 오히려 효모세포와 n-paraffin과의 접촉을 방해하여 증식율을 떨어뜨린다고 보고한바 있으나 Otsuka²¹⁾ 등은 계면활성제가 균체수율증가에 효과가 있음을 보고한바 있는데 본 실험결과와 일치함을 알 수 있다. 그러나 본 실험결과와는 후라스크 진탕배양의 효과인바 강력한 통기, 교반력을 갖춘 발효조에서의 효과에 대하여는 더욱 검토할 여지가 있을것 같다.

9) 통기의 영향

기름의 분산분해와 함께 탄화수소 $[(CH_2)_n]$ 발효가 종래의 탄수화물 $[(CH_2O)_n]$ 발효와 가장 크게 다른 점은 다량의 산소요구성에 있다.

미생물에 의한 탄화수소 분해기구의 대부분은 산화반응²²⁾으로 알려져 있으며 Darlington²³⁾은 탄수화물 발효보다 3배의 공기가 필요함을 밝힌바 있다.

본 실험에서는 통기, 교반의 영향을 살펴보기 위하여 동일용량(500ml flask)의 용기내에 배지량을 30, 50, 100, 200ml씩 다르게 가하여 진탕배양함으로써 그효과를 검토하여 Fig. 6과 같은 결과를 얻었다.

50ml까지는 비슷한 결과를 보여주고 있으나 그 이상의 배지량에서는 균증식율이 감소함을 알 수 있다. 대량 연속배양을 할 경우 탄화수소의 분산 및 통기를 효과적으로 할 수 있는 발효조의 개발을 위한 공학적 노력이 절실히 요구됨을 알 수 있다.

과를 비교한결과 Table 8과 같다.

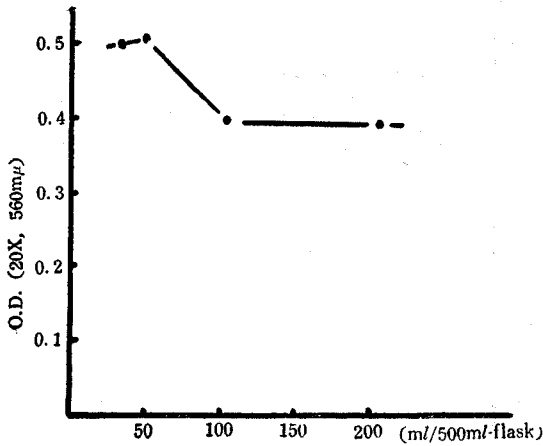


Fig. 6. Effect of Aeration on the Growth of the Selected Yeast.

11) 유가법(流加法, Addition Process)의 영향 미생물은 고농도배지에서 균세포의 생육저해를 일으킨다고 알려져 영양소를 배양초기에 한꺼번에 가하지 않고 균의 생육속도에 맞추어 여러회로 나누어 가해주는 유가법(Addition Process)이 효모 세포제조시 유리한 방법으로 알려져 있다.

본 실험에서는 다른 영양소는 처음에 넣고 경유의 서로 다른 농도에 따라, 전량의 경유를 처음에 가하는 보통방법과 배양시작할때 전 경유량의 20%, 15시간 배양후 10%, 18시간후 10%, 21시간후 20%, 24시간후 20%, 27시간후 15%, 30시간후 5%로 나누어 가해준 유가법과의 균중식 효

Table 8. Effect of Addition Process

Conc. of LGO (vol. %)	Addition Process		Control	
	O.D.	Cell Yield (g/100g LGO)	O.D.	Cell Yield (g/100g LGO)
3	0.51	4.9	0.50	16.0
7	1.15	11.0	1.12	15.2
10	1.63	15.6	1.10	10.5
15	2.05	19.7	1.28	8.2
20	2.10	20.2	1.71	8.1
30	2.57	24.9	1.72	5.3

Oil divided into 20%(first), 10% (15hrs), 10% (18hrs), 20% (21hrs), 20% (24hrs), 15% (27hrs), 5% (30hrs).

Table 8에서 볼수 있는 바와 같이 유가법이 보통방법보다 균중식에 좋은 경향을 보여 주었으며 특히 10%이상의 고농도배양에서 그 효과가 뚜렷함을 알 수 있었다.

이 결과 발효조를 사용한 연속배양에서는 후라스 크배양에서 보다 고농도배양이 가능함을 알 수 있으며 균점종량과 탄화수소의 비가 중요하다고 지적한 Raymond²⁰의 보고와 관련이 있음을 알 수 있다.

3. 선정균주의 세포증식 경과

선정균주, *Candida curvata*-SNU 70에 대한 배양실험결과 얻어진 이상의 제 최적조건을 적용하여 그 세포증식 경과를 살펴본 것은 Fig. 7과 같다.

Candida curvata-SNU 70은 lag phase가 대체로 16시간 까지로 보이고 16~28시간 까지가 대수

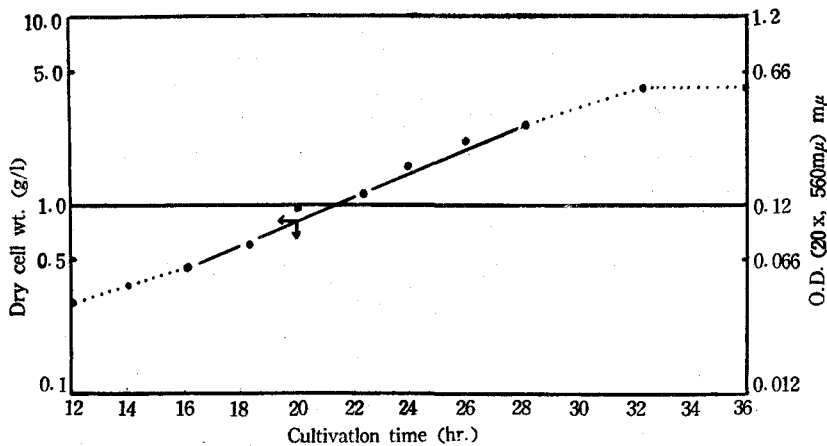


Fig 7. Time Course of Cell Propagation of the Selected Yeast.

기(logarithmic growth phase)임을 알 수 있다. 대수기에 있어서의 비증식속도(specific growth rate), μ_x 는 약 0.22hr^{-1} 정도이며 이때 이 세포의 doubling time은 3.2시간 정도였음을 확인하였다. Aiba²¹⁾ 등은 탄화수소의 농도에 관계없이 *Candida guilliermondii*를 사용하여 μ_x , 0.14hr^{-1} 를 보고 했고 기타 μ_x , $0.33\sim 0.16\text{hr}^{-1}$ 와 doubling time이 2.1~4.3 시간인 여러 보고들을 볼 수 있는데

한 균주도 비슷한 결과를 보여주고 있어 공업적으로 사용가능한 균주임을 알 수 있다.

4. 균체의 일반성분 분석

본 실험의 Light Gas Oil 배지상에서 생산된 *Candida curvata*-SNU 70의 균체와 타기질의 탄소원배지상의 효모균체의 조성을 비교한 결과는 Table 9과 같다.

Table 9에서 보는 바와 같이 본 균주는 일반효

Table 9. Composition of yeasts grown on various substrates.

Strain	Substrate	Protein	Lipid	Nitrogen free extract	Ash
<i>Candida curvata</i> -SNU 70	Light Gas Oil	48.4	3.8	28	10.2
Baker's yeast ²⁴⁾	Carbohydrate	40~50	1~2	32~40	6~10
<i>Candida utilis</i> ²⁵⁾	Sulfite Liquor	47.43	1.01	—	—
Mixture of <i>Candida sp.</i> ²⁾	n-Paraffin	41.5~48.3	4.6~13.4	—	—
<i>Candida sp.</i> ²⁾	Gas Oil	54.5~57.7	1.9~7.2	—	—

모와 그 조성에 있어서 큰 차이는 없어 보인다. 다만, Gas Oil을 원료로 한 본 실험결과는 n-paraffin을 원료로 하여 *Candida intermedia*와 *Candida lipolytica*를 혼합 배양한 균체에 비해 조지방의 함유량이 상당히 낮은 값을 보임을 알 수 있다.

균체세포에 대한 영양가 평가를 위해서는 단백질의 다소와 그 단백질의 필수아미노산의 분포 및 비타민군의 분석도 아울러 따라야 할 것으로 생각된다.

요 약

석유에 효모를 길러 식량 내지 사료로 이용할 것을 목적으로 전국 각지의 100여점의 토양시료로부터 400여주의 탄화수소이용 효모균주를 분리하고 그 중 가장 균체수율이 좋은 균주를 선정하여 동정하였다.

그 균주의 석유탄화수소 배지에서의 배양최적조건, 생육경과 및 균체조성을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 우수균주로 선정된 효모는 *Candida curvata*-SNU 70으로 동정되었다.

2. 선정효모의 적정 증식배지조성은 다음과 같다
Light Gas Oil 30ml, $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ 400mg, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 100mg, KH_2PO_4 670mg, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 330mg, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 500mg, CaCO_3 3g, Yeast Extract 50mg, Tween 20 0.05ml, Tap Water 1000ml.

3. 선정효모의 배양조건은 pH 5.5~7.0, 30°C

및 충분한 통기조건이 적당함을 알았다.

4. 유가법은 특히 10% 이상의 고농도배양에서 효과를 보였다.

5. 선정효모, *Candida curvata*-SNU 70는 lag phase가 16시간 까지이고 다음 28시간까지가 대수기임을 알 수 있었으며, 대수기에서 비증식율, μ_x 는 0.22hr^{-1} 이고 doubling time은 3.2시간이었다

6. 얻어진 최적조건에서 2일간 배양시켜 Light Gas Oil에 대한 균체수율 16.1%를 얻었으며 건조세포의 단백질함량은 48.4%였다.

참 고 문 헌

- Zobell, C.E.: *Advances in Enzymology*, **10**, 443 (1950).
- Johnson, M.J.: *Science*, **115**, 1515 (1967).
- Raymond, R.L. & J.B. Davis: *Appl. Microbiol.*, **8**, 392 (1960).
- Yamada, K., J. Takahashi, K. Kobayashi: *Agr. Biol. Chem.*, **27**, 380 (1963).
- Tanaka, A., T. Nagasaki, M. Inagawa and S. Fukui: *J. Ferment. Technol.*, **46** (6), 468 (1968).
- Stewart, J.A., W.R. Finnerty & R.E. Kallio: *Science*, **132**, 1504 (1960).
- Beerestecher, E.: *Petroleum Microbiology*, Elsevier Press, New York (1954).
- Takeda, I., T. Iguchi, T. Gawamura, S. Horiguchi & S. Senon: *Agr. Biol. Chem.*, **29**

- (9), 796 (1965).
9. Miller, T.L. & M.J. Johnson: *Biotech. & Bioeng.*, **8**, 549 (1966).
 10. Chepigo, S.V., others: 7th. World Petroleum Congress Proceeding, **8**, 205, 1967 April, Mexico City.
 11. Champagnat, A., C. Vernet, B. Laine & J. Filosa: *Nature*, **197**, 13 (1963).
 12. Gatellier, C.: *Hydrocarbon Processing*, **143**, 143 (1964).
 13. Lodder, J. & N.J.W. Kreger-van Rij: *The Yeasts, A. Taxonomic Study*, North Holland Pub. Co., Amsterdam (1952).
 14. Markovetz, A.J. & R.E. Kallio: *J. Bacteriol.* **87** (4), 968 (1964).
 15. Yamada, K., J. Takabata, T. Okada & T. Onihara: *Single Cell Protein*, The MIT Press, Cambridge, 192 (1968).
 16. Someya, J., T. Murakami, N. Tagaya, N. Futai & Y. Sonada: *J. Ferment. Technol.*, **48** (5), 291 (1970).
 17. Wang, D.I.C.: *Chem. Engineering*, **75**, 99 (1968).
 18. Mateles, R.I., others., *Science*, **155**, 1322 (1967).
 19. Park, T.W.: *J. Korean Chemical Society*, **13** (2), 187 (1969).
 20. Otsuka, S.I., R. Ishii and N. Katsuya: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **12**, 1 (1966).
 21. Aiba, S., V. Moritz, J.I. Someya & K.L. Haung: *J. Ferment. Technol.*, **47**, 203 (1969)
 22. Kester, A.S. & J.W. Foster: *J. Bacteriol.*, **85**, 859 (1963).
 23. Darlington, W.A: *Biotech. & Bioeng.*, **6**, 241 (1964).
 24. Stoke, J. L.: *Microbial Proteins*, A.M. Altshul, Ed., Academic Press (1958).
 25. Wiley, A. J., others: *Ind. Eng. Chem.*, **43**, 1702 (1951).
 26. K.H. Lee and H.K. Shin: *J. Korean Agr. Chem. Soc.*, **13**, 43 (1970)