

## 석유탄화수소를 이용한 단세포단백질의 생산에 관한 연구

### IV. *Candida tropicalis* KIST 351 의 연속배양 및 몇가지 조건에 관하여

이 용 현 · 변 유 량 · 권 태 완

한국과학기술연구소 식량자원연구소

(1972년 7월 10일 수리)

## Production of Single Cell Protein on Petroleum Hydrocarbon

### IV. On the Continuous Fermentation and Some Cultivation Conditions for *Candida tropicalis* KIST 351

by

Yong-Hyun Lee Yoo-Ryang Pyun and Tai-Wan Kwon

Food Resources Laboratory, Korea Institute of Science and Technology

(Received July 10, 1972)

#### Abstract

Effects of several different petroleum fractions (LGO, HGO, VGO, Diesel oil, SP(E), HGO-wax, L/M-wax), stepwise addition of calculated amounts of HGO at defined intervals, recycling of spent media on cell growth of *Candida tropicalis* KIST 351 were studied using 2.5 l fermenter by batch process. In addition, continuous cultivation of the yeast was also performed in the light of biomass production using 28 l fermenter with LGO.

1) Cell concentration, yield on the basis of gas oil and n-paraffin with the petroleum fractions were in the range of 11~15 g/l, 10~12% and 77~82%, respectively.

2) By stepwise addition of the gas oil, cell concentration and yield on the oil were increased up to 18.9 g/l and 13%, respectively.

3) Spent medium showed emulsifying ability of hydrocarbon and stimulating effect on the cell growth. Without additional supplementation of  $Mg^{++}$  up to 20% of spent medium could be reused, while by adding of the  $Mg^{++}$ , 50% of medium could be recycled.

4) Optimum condition of continuous cultivation for biomass production was attained at the dilution rate of  $D=0.1\sim0.125\text{ hr}^{-1}$ . Maximum yield coefficient on consumed n-paraffin was 0.94 at  $D=0.1\text{ hr}^{-1}$ , however, 24% of supplied n-paraffin in the media was not utilized at this dilution rate.

#### 서 론

저자들은 본연구실에서 분리한 석유탄화수소 자화균  
주인 *Candida tropicalis* KIST 351에 대하여 전보<sup>(1,2)</sup>에

그 배양조건과 예비동물사육시험 결과를 발표한 바 있  
다. 여기서는 등근주에 대하여 석유유분별자화능, 유  
가(流加)배양, 폐배지의 재사용 및 연속배양<sup>(3,4,5)</sup>등 일  
련의 배양 기술적인 문제를 검토한 바 있으므로 그 건

과를 보고한다.

으며, 석유 유분 중의 n-paraffin 함량은 urea adduction 법<sup>(7)</sup>으로 정량하였다.

재료 및 방법

석유 유분별 자화능 비교

*Candida tropicalis* KIST 351을 사용 하였고, 배양조 건, 배지조성, 증식도측정 및 회수방법은 전보<sup>(2)</sup>와 같

대한석유공사및 극동형석유에서 분양받은 석유 유분의 자화능을 비교하였으며, 그 물성은 Table 1과 같다.<sup>(6)</sup>

Table 1. Physical properties of gas oil fractions

	KOCO				Kuk-dong				
	Kerosene	LGO	HGO	VGO	Diesel oil	HGO	SP(E)	HGO wax	L/M wax
Gravity (°API)	47.9	39.3	32.8	36.5	41.1	23.4	33.3	37.1	30.4
Specific gravity	0.7936	0.8275	0.8660	0.8423	0.8198	0.9135	0.8586	0.8393	0.8740
Viscosity (SUS at 98.9°C)	27	37	44	215	33	40.5	45.2*	37.7	45.3
Pour point (°C)	-51	-81	4.5	32	-6.7 -17.8°C	25	-6.7	41	49
Boiling range (°C)	160~238	196~330	262~379	—	178~311	—	—	—	—

\* at 86° F

탄소원의 유기배양

배지에 HGO(KOCO) 2.5%(v/v)를 주입한 후 배양 하여 균체농도가 약 2 g/l 일때 부터 HGO를 계산량 만큼씩 첨가하기 시작하였고, 그 첨가량은 oil에 대한 균체수율을 10%, generation time을 3.2 hr로 기준하여 산출하였으며, HGO의 농도가 16%가 될때까지 매 시간마다 첨가하면서 30시간 배양하였다.

폐배지(spent medium)의 역할

2.5 l 발효조에서 *Candida tropicalis* KIST 351, 359 및 *Torulopsis* 속인 231을 30시간 배양한 후에 배양액을 원심분리하여 폐배지를 회수하고 이를 다시 millipore filter로 여과하였다. 폐배지의 탄화수소 유화성을 실험하기 위해서는 폐배지 및 배지 폐배지 등량 혼합액에 hexadecane과 HGO를 각각 2%, 15% 첨가하고 진탕기에서 15분간 강력히 교반 한 후 5분간 정지하였다가 400 mμ에서 흡광도를 측정하였다.

폐배지가 효도의 증식에 미치는 영향을 검토하기 위해서 상기 폐배지를 배지에 10~80%까지 혼합하였다. 동 혼합배지를 500 ml 플라스크에 50 ml 분주하고 pH 6으로 조절한 후 *Candida tropicalis* KIST 351을 접종하고 40시간 진탕배양 하였다. 배양종료 후 흡광도를 측정하여 균체증식을 비교하였다.

연속배양

28 l-Micro Ferm(New Brunswick Scientific Co. LTD.; CMF-128S)중의 살균배지 11 l에 전배양액 500 ml를 접종하여 회분배양(batch cultivation)을 시작하였다. 이때의 배양조건은 pH 5.5, 온도 33°C였고, 통기량은 3 VVM, 교반속도는 800 rpm이었다. 연속배양은 발효조

중의 균체량이약 7g에 상당되는 대수증식기 후반 즉 1N NH<sub>4</sub>OH가 약 400~500 ml 소비되었을 때 시작하였다. 배지는 peristaltic pump로 일정량씩 급입하였으며, 경유는 별도로 소형 peristaltic pump로 공급하였다. 연속 배양 중의 발효조의 운전용량(working volume)은 13 l이며, level controller로 자동조절하였다. 각 회석울에서의 정상상태는 1N NH<sub>4</sub>OH의 시간당 소비량이 일정량으로 유지될 때를 기준으로 하였으며, 보통 연속배양을 시작한 후 48~60시간 전후에서 이루어졌다. 연속 배양 결과의 해석에는 Aiba등<sup>(8)</sup>이 사용한 기호와 정의 를 사용하였으며 효모생산량과 기질탄화수소이용율이 최대로 되는 회석울을 구하였고, 각 회석울에서의 기질이용, 균체수율, 균체생산속도 등을 검토하였다.<sup>(3,5)</sup>

결과 및 고찰

석유 유분별 자화능 비교

경유 유분에 따라 균체농도는 다소 차이가 있어 11~15 g/l 였으며 경유에 대한 수율(경유 100 g 당 균체생산량)은 10~12%였다. Champagnet등<sup>(10)</sup>은 n-paraffin 함량이 8~14%인 산지가 자기 다른 5종의 경유에 효모를 배양하여 균체농도 10~15 g/l, 경유에 대한 수율 8~15%를 얻었다. 또한 Miller등<sup>(11)</sup>은 n-paraffin 함량이 12~18%인 5종의 경유에 *Candida intermedia*와 *Candida lipolitica*를 배양하여 generation time 4~6 hr 균체농도 6~10 g/l 및 경유에 대한 수율 9.1~12.3%를 얻은 바 있다.

한편 본 실험에서 351균주의 generation time은 3.3~3.8 시간이었는데, 단백질 함량은 60% 내외로 경유

Table 2. Growth of *Candida tropicalis* KIST 351 on the gas oil samples

	LGO (KOCO)	HGO (KOCO)	VGO (KOCO)	Diesel oil (KOCO)	HGO (Kukdong)	SP(E) (Kukdong)
Generation time (hr)	3.53	3.33	3.45	3.4	3.41	3.85
Sp. growth rate (hr <sup>-1</sup> )	0.196	0.208	0.201	0.204	0.203	0.180
Cell yield on medium (g/l)	14.2	15.1	11.2	14.8	15.3	13.3
On total oil (%)	11.4	11.6		11.9	11.1	10.7
Cell N (%)	9.71	9.62	9.63	9.57	9.60	9.42
Crude protein, N×6.25(%)	60.7	60.1	60.2	59.8	60.0	58.8
N. added as NH <sub>4</sub> OH per 100 g cell (g)	14.2	14.4	12.2	16.5	—	—
n-Paraffin (%)						
Before fermentation	15.1	15.2	13.9	—	14.8	—
After fermentation	0.3	0.4	2.1	—	1.1	—

의 종류에 따라 큰 변화를 보이지 않았다. Urea adduct 법으로 측정된 n-paraffin 함량은 14~15%이고 소비된 n-paraffin에 대한 수율은 77~82%였으며 석유평사의 LGO 및 HGO의 n-paraffin의 자화율은 97%로서 우수하였다. 균체 100 g당 NH<sub>4</sub>OH로 배지에 공급된 질소는

균체의 질소함량보다 3~7g 많으며 이는 산성대사산물의 중화에 소비된 것으로 생각된다.

극동석유의 HGO wax와 L/M wax는 pour point가 각각 41° 및 49°C로서 배양 온도인 33°C에서 고상임에도 불구하고 Table 3에서 보는 바와 같이 다른 액상

Table 3. Growth of *Candida tropicalis* KIST 351 on the Kuk-dong gas oil samples

	HGO	SP(E)	HGO wax	L/M wax	HGO(KOCO)
Cell yield on medium (g/100 ml)	0.75	0.69	0.80	0.80	0.70

경유 보다 균체농도가 높았다. 이는 KIST 351균주가 비교적 강체의 n-paraffin도 잘 자화하는 것을 나타내며, 이와같은 고체상 wax를 용매에 녹여 배양한다든지 배양액 속에 미세한 입자로 분산 시킬 수 있는 방법을 개발한다면 우수한 기질로 사용할 수 있을 것이다.

유가배양

Mimura 등<sup>(12)</sup>과 Eltora 등<sup>(13)</sup>이 지적한 바와 같이 침출량에 비하여 oil 농도가 높으면 균체가 oil에 의하여 물러 싸이므로 배양액과의 접촉이 방해되어 생육저해를 받는다. 이 생육저해 현상을 방지하고 탄화수소 자화율을 높이기 위해 oil을 계산량씩 축차적으로 첨가하면서 배양 하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 oil의 축차적 첨가에 의해 18.9 g/l의 고 농도의 균체를 얻을 수 있었으며 경유에 대한 수율도 13%로 향상되었다. 이와 같이 기질을 축차적으로 첨가하는 방법은 이미 재래 탄수화물 발효에서 널리 활용되어 왔으며 석유탄화수소 발효에의 응용에는 B P의 Filosa<sup>(14)</sup>가 1966년 그의 특허에 발표하였으며 또한 강(姜)<sup>(15)</sup> 등이 보고한 바 있다. 기질의 축차적 첨가 탄화수소 회분발효에 유용한 방법이며 연속발효에서는 초기 배양에 응용할 수 있을 것이다.

폐배지(spent medium)의 역할

탄화수소 발효에 있어서 액상탄화수소를 탄소원으로 미생물이 자화하기 위해서는 탄화수소를 배양액에 유화

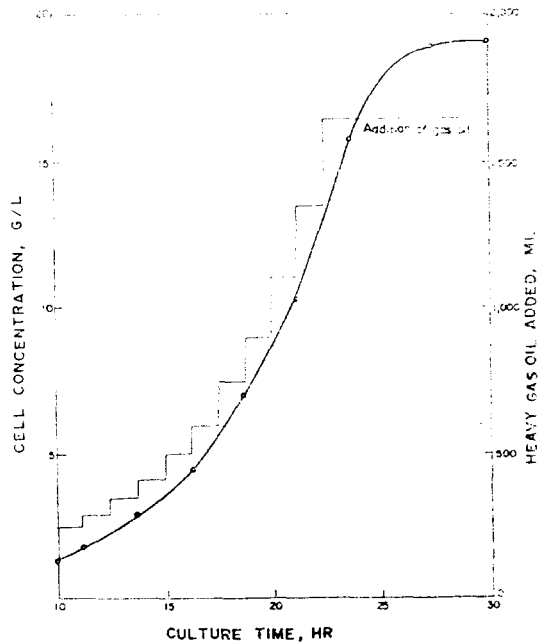


Fig. 1. Growth curve of *Candida tropicalis* KIST 351 by stepwise input of HGO

분산시켜 주어야 하며 분산 방법의 하나로 계면활성제의 사용이 제안되고 있다. 그러나 대부분의 탄화수소

자화성균은 생육하면서 자신이 탄화수소를 유화 분산시키는 성질을 가지고 있으며 배양액에 이더한 물질이 용출되는 것으로 알려져 있다. Takahashi<sup>(10)</sup> 등은 최근 *Candida petrophilum*의 배양액에 탄화수소를 강력히 유화시키는 물질이 존재한다는 것을 관찰하였으며 이를 분리 정제하여 peptide와 지방산으로 구성되어 있음을 확인하였다. 또한 Coty등<sup>(11)</sup>은 *Achromobacter*의 폐배지가 탄화수소를 잘 분산시키고 균체증식을 촉진시킨다고 발표하였다.

전보에 밝힌 KIST 351, 359 및 231 균주를 HGO를 기질로 배양하여 그 폐배지가 가지는 탄화수소 분산성을 살펴본 결과 Table 4와 같다. 포도당 배지에서 배

양했을 때는 탄화수소를 유화시키지 않았으나 탄화수소를 기질로 했을 때는 상기 연구자들이 관찰한 바와 같이 폐배양액에 의하여 탄화수소가 현저히 분산되었으나 유효력은 KIST 231 균주의 폐배지가 우수하였다.

폐배지 속에는 소비되지 않은 금속이온 등 영양원이 다소 함유되어 있으므로 균체의 증식을 촉진한다고 보고되었는 바, 폐배지를 배지에 10~80% 혼합하고 균체증식에 미치는 영향을 검토하였다. Fig. 2를 살펴보면 폐배지의 첨가에 의해 균체 증식이 촉진되었음을 알 수 있으며 이는 폐배지에 의하여 탄화수소가 잘 유화되었기 때문일 것이다. Mg 이온을 보충하지 않았을 때는 20%, 보충하였을 때는 50%까지 혼합하여도 증식이 저해되지 않았다. 이와 같은 결과로 더하여 볼 때 부족한 금속이온 등을 첨가하여 주면 적어도 50%는 배양액을 회수하여 재 사용할 수 있을 것이며 연속배양에 있어서 폐배지를 회수 재 사용함으로써 증식속도와 생산성을 증대시킬 수 있는 가능성을 시사하고 있다.

Table 4. Emulsification of hydrocarbon by spent media

Media	Carbon sources			
	HGO(KOCO)			Glucose
	231	351	359	
Fresh medium(F.M.)	0.03*	0.03*	0.03*	0.54*
Spent medium(S.M.)	0.035	0.04	0.04	0.61
F.M.(1 part)+S.M.(1 part)	0.035	0.06	0.05	0.68
F.M.+ {Hexadecane(2%) {Gas oil(15%)	0.22	0.22	0.22	0.59
	0.25	0.25	0.25	0.32
S.M.+ {Hexadecane(2%) {Gas oil(15%)	0.70	0.41	0.55	0.62
	0.64	0.38	0.42	0.64
F.M.(1 part)+S.M.(1 part) + {Hexadecane(2%) {Gas oil(15%)	0.44	0.41	0.39	0.63
	0.28	0.28	0.31	0.66

\* Absorbance at 400 m $\mu$

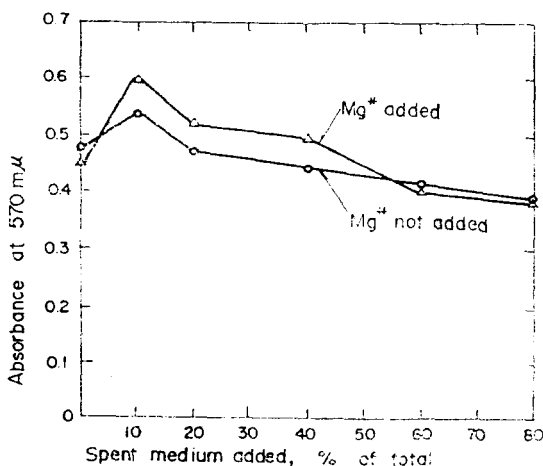


Fig. 2. Influence of spent medium on the growth of *Candida tropicalis* KIST 351

연속배양

연속배양은 희석율(dilution rate) 0.05 hr<sup>-1</sup>에서 시작하여 0.25 hr<sup>-1</sup> 범위 내에서 실험하였고<sup>(12)</sup>, 각 희석율에 따른 균체농도와 잔유 n-paraffin의 농도의 관계를 도시하면 다음 Fig. 3과 같다.

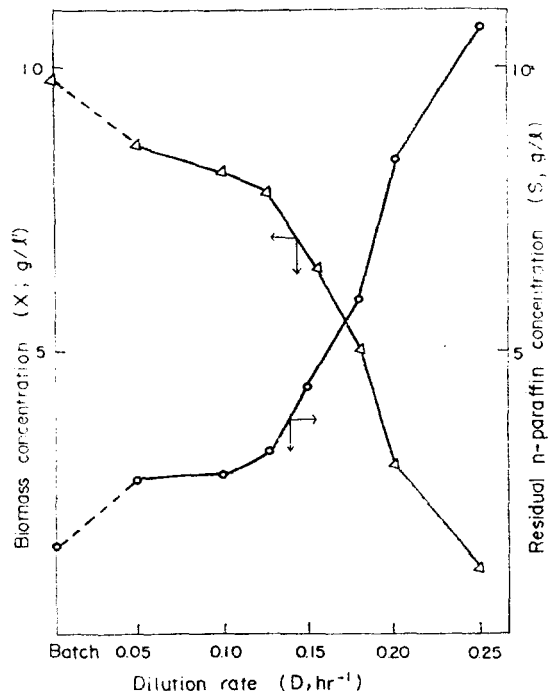


Fig. 3. Concentrations of biomass and residual substrate at different dilution rates during continuous cultivation of *Candida tropicalis* KIST 351

회석율이 증가함에 따라 발효조 중의 균체농도는 점차적으로 감소되었다. 그러나  $D=0.125 \text{ hr}^{-1}$  범위안에서는 균체농도의 급속한 감소현상은 없었고, 이때의 균체 농도는 회분배양시의 최종 농도인  $9.7 \text{ g/l}$ 에는 미치지 못하였으나 70~80% 수준의 균체농도를 유지할수 있었다. 균체농도의 급속한 감소현상은 회석율  $0.125 \sim 0.15 \text{ hr}^{-1}$ 에서 발생하였다.

연속배양의 중요한 특징으로써, 기질로써 공급한 경우 중에 소모되지 않은 n-paraffin 함량이 상당량에 이르며 최적회석율인  $D=0.1 \sim 0.125 \text{ hr}^{-1}$ 에서는 배지 중에 공급된 n-paraffin 의 25% 정도가 이용되지 않고 있다. 이 소모되지 않은 n-paraffin 은, 단세포 단백질 생산의 경제성에 큰 부담이 될 것이 예상되며 단조연속배양(one-stage continuous cultivation)을 다조연속배양(multi-stage continuous cultivation)으로 바꿈으로써 이 소비되지 않은 n-paraffin 을 완전히 이용토록 함이 필요한 것이다. Chepigo<sup>(19)</sup>는 상업규모의 효모제조의 연속 process는 2단으로 조업함이 유리하다고 하였다. 제1단은 배양물을 강력하게 유화할 수 있는 시설을 구비한 발효장치에서 이루어지는 효모세포생성의 주과정이며, 제2단은 축적효모 세포를 숙성시키는 과정으로써 효모 균은 제장치로부터 배양물과 동시에 급입되어 소비되지 않은 paraffin 과 효모세포에 흡착된 잔유 paraffin 을

완전히 소비하며 균체도 아울러 숙성되게하는 과정이 필요하다고 하였다.

한편 회석율에 따른 균체생산속도(productivity)와 소비된 기질에 대한 균체수율의 변화는 다음 Fig.4와 같다. 균체수율은 회석율  $0.1 \text{ hr}^{-1}$ 에서 최대치  $0.94$ 에 도달하였고  $D=0.15 \text{ hr}^{-1}$  범위내에서는 소비된 paraffin 에 대한 수율은  $0.86 \sim 0.94$ 로써 매우 높았다. 최대 균체생산속도는 회석율  $0.125 \text{ hr}^{-1}$ 에서 얻어졌으며, 이때의 수치는  $1.0 \text{ g/l/hr}$ 였다. 회분배양시 대수증식기에 있어서 최대 균체생산속도는  $0.7 \text{ g/l/hr}$ 였으며, 전 발효기간 중에는 약  $0.32 \text{ g/l/hr}$ 로써 연속배양의 균체생산속도는 회분배양의 약 3배에 상당되었다.

이상과 같이 균체생산을 위한 최적회석율은  $0.10 \sim 0.125 \text{ hr}^{-1}$ 의 범위내에 있으며, 이때의 발효조 중의 균체농도는 약  $8 \text{ g/l}$ 였고, 균체수율  $0.92 \sim 0.94$ , 균체생산속도는  $1.0 \text{ g/l/hr}$ 였다.

요 약

*Candida tropicalis* KIST 351 은 2.5 l 및 28 l 발효조에서 배양하여 석유 유분별자화능, 석유탄화수소기질의 즉각적 유가배양(流加培養), 폐배지(spent medium)의 재사용 및 연속배양 등 배양기술적인 기초문제를 검토한 바 그 개요는 다음과 같다.

- (1) 각종 경유유분(LGO, HGO, VGO, Diesel oil, SP(E), HGO-wax, L/M-wax)에 있어서 균체농도는 11~15 g/l, 경유에 대한 수율은 10~12%, 소비된 n-paraffin에 대한 수율은 77~82%였다.
- (2) 동 균주를 유가배양 함으로써 균체를 배지에 대하여 18.9 g/l, 경유에 대한 수율을 13%로 향상시킬 수 있었다.
- (3) 폐배지는 탄화수소를 유화시키고 증식을 촉진하는 효과를 가지고 있었으며 Mg#를 보충하지 않았을 때는 20%, 보충하였을 때는 50% 까지 회수 재 사용 할 수 있었다.
- (4) 균체생산을 위한 연속배양의 최적회석율은  $D=0.1 \sim 0.125 \text{ hr}^{-1}$ 의 범위내에 있으며, 이때의 균체농도는 약  $8 \text{ g/l}$ 였고,  $D=0.125 \text{ hr}^{-1}$ 에서의 균체생산속도는  $1.0 \text{ g/l/hr}$ 로써 최대치에 달하였다. 소비된 경유 중의 n-paraffin에 대한 균체수율은  $D=0.1 \text{ hr}^{-1}$ 에서  $0.94$ 로써 최대치를 보였다. 그러나 회석율  $0.1 \text{ hr}^{-1}$ 에서 공급된 n-paraffin 의 약 24%가 기질로써 소비 되지 않았으므로 이에 대한 적절한 대책이 요구된다.

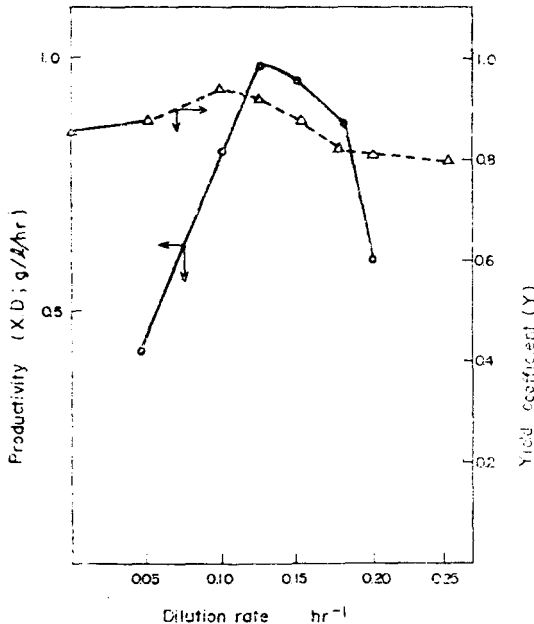


Fig. 4. Productivity and yield coefficient at different dilution rate during continuous cultivation of *Candida tropicalis* KIST 351

## 인 용 문 헌

- 1) 권태완, 민태익, 박용, 변유량 : 한국식품과학회지 2 (2), 56 (1970).
- 2) 변유량, 권태완 : 한국미생물학회지, 9 (3), 95 (1971).
- 3) Dostalek, M., Munk, V., Volfova, O. and Fencel, Z.: *Biotech. Bioeng.*, 10, 865 (1968).
- 4) Pechurkin, N. S., Pozmogova, I. N., Sodovskaya, G. M., Terkov, I. A. and Gitelzon, I. I.: *Microbiologiya*, 5 (4), 409 (1969).
- 5) Moo-Young, M., Shimizu, T. and Whitworth D. A.: *Biotech. Bioeng.*, 8, 741 (1971).
- 6) 대한석유공사 : 제품규격
- 7) Hoppe, A.: *Advances in petroleum chemistry and refining*, 8, 192 (1964).
- 8) Aiba, S., Humprey, A. E. and Miller, N. F.: *Biochem. Eng.*, Academic Press, New York (1965).
- 9) Decerle, C., Franskowiak, S. and Gatller, C.: *Hydrocarbon Processing*, 48, 109 (1969).
- 10) Champagnet, A., Vernet, C., Laine, B. and Filosa, J.: *Nature*, 197, 13 (1963).
- 11) Miller, T. L. and Tohnson, M. J.: *Biotech. Bioeng.*, 8, 567 (1966).
- 12) Mimura, A., Watanabe, S. and Takeda, I.: *J. Ferment. Technol.*, 49, 255 (1971).
- 13) Eltora, R. J., Lilly, M. D. and Webb, F. C.: *Biotech. Bioeng.*, 7, 309 (1965).
- 14) Filosa, J. A.: U. S. Patent 3,246,196 (1966).
- 15) 강효원, 정동효 : 과학기술처 70년도연구개발보고서(MOST-R-70-53-CH), 석유(탄화수소)로부터 사료효모제조에 관한 연구
- 16) Takahashi, I., Takeda, I. and Ohsawa, H.: *Agri. Biol. Chem.*, 33, 1957 (1969).
- 17) Coty, V. F. and Leavitt, R. I.: *Development in Industrial Microbiology*, 12, American Institute of Biological Science, Washington D.C., 61 (1971).
- 18) Deindoerfer, F. H. and Humprey, A. E.: *Ind. Eng. Chem.*, 51(7), 809 (1959).
- 19) Chepigo, S. V.: *7th World Petroleum Congress*, Mexico (April, 1967).