

石油炭化水素醱酵에 있어서의窒素源의影響

朴 泰 源 · 金 泰 永 · 尹 熙 榮

서울대학교 공과대학 화학공학과

(1973. 3. 23 접수)

Effects of Nitrogen Sources in the Fermentation of Petroleum Hydrocarbon

Tai Won Park, Taeyoung Kim and Hee Young Youn

Department of Chemical Engineering, College of Engineering,
National Seoul University, Seoul, Korea.

(Received March 23, 1973)

요 약. *Rhodotorula* sp. 로 $C_{12}\sim C_{14}$ 의 *n*-alkane 混合物에서 無機系 窒素源인 窒酸鹽과 암모늄鹽 그리고 有機系 窒素源인 urea 들의 그 化學形의 差異에 따라 醱酵時間과 收率面에서 어떻게 影響을 미치는가와 窒酸나트륨으로서 炭素源의 炭素에 對한 窒素의 添加比率의 差異에 따라 미치는 影響 등을 調査해 보았다.

그 結果 最高生長에 達하는데 要하는 時間은 窒酸나트륨과 黃酸암모늄이 各各 40 hrs. 와 45 hrs. 인데 比해 urea 는 이들보다 훨씬 긴 66 hrs. 가 걸렸고 收率面에 있어서는 0.1 N-NaOH 의 消費量으로서 兩無機鹽이 各各 0.36 과 0.38 ml 인데 比해 urea 는 0.78 ml 나 되었다. Medium 中の 窒素對 炭素 比率의 影響은 medium 에 加하는 *n*-alkane 混合物를 1% (vol.) 에서 窒酸나트륨으로서 N/C 가 0.2 일 때가 가장 優秀한 結果를 나타내었고 대개 炭素에 對한 窒素의 比率이 낮을 때보다는 높은 때가 더 좋은 生長效果를 보였다.

Abstract. In the fermentation for preparation of petroprotein by *Rhodotorula* sp. in $C_{12}\sim C_{14}$ *n*-alkane mixture it was investigated how the effects due to the difference of chemical form of the nitrogen sources are, that is, how the inorganic nitrogen sources such as nitrates and ammonium salts and organic nitrogen source such as urea effect on the view of fermentation time and yield and how the ratios of nitrogen to carbon with $NaNO_3$ effect.

Then following results were obtained: the time required to maximum growth, when $NaNO_3$ or $(NH_4)_2SO_4$ was used as nitrogen source, was 40 hrs. and 45 hrs., respectively, but when urea was used, it was 66 hrs. much longer than above nitrogen sources. On the view of yield, however, in use of the both inorganic sources, when the yield is represented as consumption of 0.1 N-NaOH, it was 0.36 and 0.38 ml, respectively, but, in the case of urea, it amounted to 0.78 ml.

In the effect of the ratios of nitrogen to carbon in medium, when *n*-alkane mixture was added in 1% (vol.) and N/C with $NaNO_3$ was 0.2 the best results were obtained and generally the higher the value of the ratio the better growth effects were shown.

1. 結 論

石油蛋白質이 人類의 劃期的인 蛋白質資源으로서 크게 脚光을 받게되면서, 世界各國에서 이에 關한 研究論文이 수 없이 發表되고 있는데, 이들의 상당한 部分은 어떻게 하여 短期間內에 좋은 收率로 蛋白質을 얻을 수 있을까 하는데 主眼을 두고 있다.

實際적으로 여기에 關聯되는 因子들이라 하면 使用菌株, 基質로서의 炭素源, 補助基質로서의 窒素源을 비롯한 여러가지 無機質 그리고 aeration, agitation 등과 같은 工學的 操作方法 등 수없이 들 수 있을 것이다.

本研究은 이 因子들中 特히 供給 窒素源의 化學形—即 窒酸鹽形, 암모늄鹽形과 같은 無機系窒素源과 尿素와 같은 有機系窒素源—과 炭素에 대한 窒素의 比率이 酸酵의 時間的 面에서와 收率的 面에서 어떻게 影響을 미치는가 하는 點과 數種의 菌種에 있어 各窒素源에 對한 嗜好性 等を 糾明해보고져 하였다.

이들에 關해 이미 報告된 報文들을 보면, K. Arima et al.¹은 酵母 *Pichia* sp.에 對해 窒素源으로 尿素와 窒酸암모늄을 比較한 結果를 發表했는데 이에 依하면 lag phase time은 尿素쪽이 倍程度로 기나 generation time은 거의 비슷하고 stationary phase에 達할 때의 optical density (650 m μ 에서)에 依한 收率은 尿素쪽이 2倍 程度로 크다. J. E. Zajic²은 methane을 炭素源으로 하고 *Pseudomonas methanica*를 生長시킬 時 窒素源으로는 암모늄形보다는 KNO₃와 같은 窒酸鹽이 더 좋았다고 報告했다. F. Wagner et al.³은 酵母 *Nocardia* NBZ 23에 對해 C₁₄~C₁₇의 n-alkane 混合物을 炭素源으로 하고 窒素源으로는 窒酸암모늄, 黃酸암모늄 그리고 尿素를 比較했는데, 여기서는 最終 cell 濃도와 cell 收率은 거의 같으나, generation time만은 크게 差異지는 값인 0.8, 2.1, 4.0 hrs.라 하였고 또 窒素源으로 黃酸암모늄과 尿素에 있어 各各 yeast extract와 corn steep liquor를 더 加하였을 時 前者는 generation time이 2.1 hrs.에서 0.5 hrs.로 크게 短縮되었으나 後者는 아무런 變化가 없

었고 또 다른 菌種인 *Nocardia opaca*와 *Mycobacterium phlei*에 對해 窒素源으로 尿素가 든 medium에서 자라게 했을 時와 여기에 yeast extract와 corn steep liquor를 더 加한 medium에서 자라게 해 보았을 時 菌體收率面에서 큰 差異를 보인다. J. Takahashi et al.⁴은 菌 *Pseudomonas aeruginosa*를 가지고 5種의 窒素源을 kerosene에 加한 medium들에서 cell 收率을 調査했는데 그 實驗結果들은 Table 1과 같다. 여기서는 尿素가 菌體收率을 가장 좋게 함을 볼 수 있고 암모늄鹽系는 窒酸鹽系보다 떨어짐을 알 수 있다.

以上の 報告들은 綜合要約해보면, 尿素는 K. Arima 등과 J. Takahasahi들이 다 같이 菌體收率을 增加시킨다는데 意見을 모우고 있으나, F. Wagner 등의 結果로는 꼭 그렇다고 볼 수 없고,

Table 1. Effect of various nitrogen sources on cell yield

Nitrogen Sources	Relative cell yields
NH ₄ Cl	0.6
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.4
NaNO ₃	0.8
KNO ₃	0.8
Urea	1.1

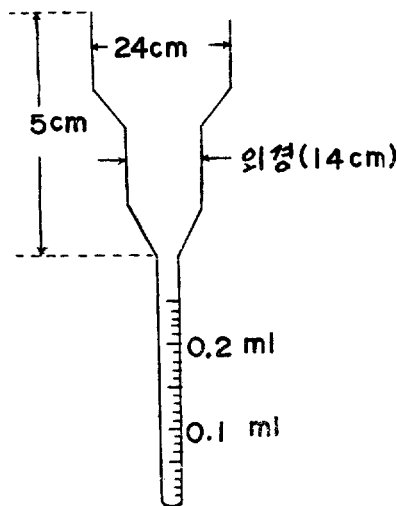


Fig. 1. Centrifugal tube

Table 2. Effect of nitrogen sources on *n*-alkane mixture assimilation by three kind of microorganism on view of yield.

	Cell yield (ml of packed volume per 10 ml of broth)		
	Rhodotorula sp. *	Candida sp.	Hansenula sp.
NaNO ₂	<u>0.09</u> <u>0.05</u>)0.05 0.02	0.06, 0.10)0.08 0.08'	0.04, 0.03)0.04 0.05'
KNO ₃	0.03, 0.02)0.04 0.06	0.02, 0.04)0.04 0.06'	0.06, —)0.06 0.50'
(NH ₄) ₂ SO ₄	<u>0.02</u> <u>0.01</u>)0.02 0.03	0.08, 0.01)0.03 0.02'	0.05, 0.02)0.06 0.10'
NH ₄ Cl	<u>0.04</u> <u>0.02</u>)0.03 0.03	0.03, 0.02)0.03 0.04'	0.08, 0.10)0.07 0.03'
Urea	<u>0.16</u> <u>0.08</u>)0.12 0.11	0.07, 0.12)0.09 0.09'	0.09, 0.14)0.12 0.12'

The data underlined in Rhodotorula sp. column are obtained by neutralizing the broth with 0.1N-NaOH and the other are obtained only by shaking culture without adding any alkali.

窒酸鹽系의 醱酵時間 卽 lag phase time 과 generation time 에 미치는 影響은 K. Arima 들 과 F. Wagner 들의 實驗에서 確實히 짧은 듯하 나 이렇게 斷定짓기에는 더 한 實驗的 data 가 必要할 것 같다.

2. 實 驗

2.1. 菌株.

前報⁵의 實驗에서 가장 優秀한 菌種으로 選定 된 것들로서 stock culture 되어 있는 Rhodotorula sp., Candida sp., Hansenula sp. 를 使用하였다.

2.2. 炭化水素.

炭素數 12, 13, 14 의 *n*-alkane 의 混合物로서 그 組成이 各各 19.3%, 63.9%, 16.8% 되는 것을 使用하였다.

2.3. 培養方法

2.3.1. 種培養. 前報⁶에 報告된 培로의 組成의 medium 과 方法으로 48 hrs. 씩 5 회로 馴養培養한 것을 使用하였다.

2.3.2. 主培養. Medium 을 그 成分의 組成이 種培養때와 同一하게 하되 窒素源만은 窒素의 量이 1.4 mg/ml 이 되게 (N/C 의 比가 미치는 影響에 關한 實驗에서만은 除外) 調製하고

이를 200 ml 取하여 500 ml-Erlenmeyer flask 에 넣고 여기에 1% (vol.) 의 炭化水素를 添加한 後 殺菌한다. 다음 2ml 의 種菌을 接種하여 28~30°C 로 維持되는 往復式 shaking incubator 에서 40~80 hrs. 동안 pH 를 一定한 時間間隔으로 제어서 0.1 N-NaOH 로서 4.5 로 維持하게 하면서 振盪培養하였다.

이렇게 하여 얻어진 最終菌體量은 Fig. 1 에 그려진 遠心分離管에 담아 15 분 동안 遠心分離 (4000 rpm) 하여 다져지게 한 것을 매겨진 눈금으로 測定하였다.

3. 結果 및 考察

3.1. 各種窒素源의 影響. Rhodotorula sp. 菌에 있어 各窒素源이 미치는 影響은 Fig. 2 에 그려진데로 無機鹽系의 窒素源인 窒酸鹽과 암모늄鹽이 有機系인 尿素보다 lag phase time 이 짧고 또 다 자라는데 걸리는 時間 역시 짧아 各各 40 hrs. 와 45 hrs. 가 됨을 볼 수 있는 반면 有機系는 無機系보다 生長이 遲延되어 다 자라는데 걸리는 時間은 훨씬 긴 66 hrs. 나 된다.

그러나 0.1 N-NaOH 消費量은 有機系가 단연 많아 2倍以上됨을 볼 수 있다.

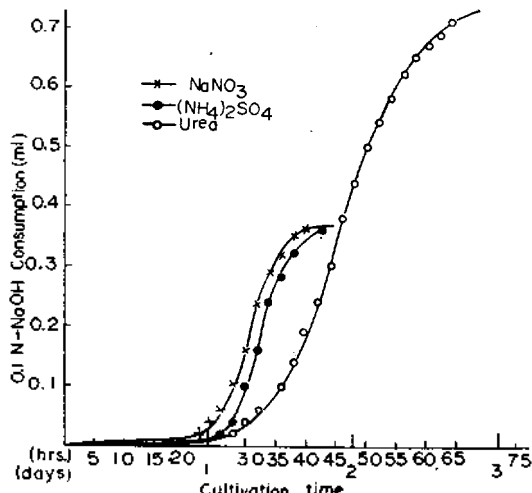


Fig. 2. Growth curve of *Rhodotorula* sp. in each nitrogen Source.

두 無機鹽에 있어서는 서로 거의 비슷하다고 볼 수 있겠으나 窒酸鹽이 약간 더 좋은 결과를 보이고 있다.

Fig. 2에 그려진 無機系鹽種은 NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 이나 다른 種類인 KNO_3 , NH_4Cl 를 사용했을 경우에도 위와 거의 같은 결과를 얻을 수 있었다.

收率面에서 본 影響은 Table 2와 같다.

이로부터 無機鹽系에 있어서는 거의 서로 類似한 값이라 볼 수 있으나 urea는 이들보다 越等함을 볼 수 있다. 이것은 0.1 N-NaOH 消費量에 의한 data와 거의 比例되는 값이 있다.

또 *Rhodotorula* sp.外에 *Candida* sp.와 *Hansenula* sp.로서 各窒素源에 對한 이들 菌種의 嗜好性을 調査해본 結果 亦是 Table 2로부터 特異性은 전혀 發見할 수 없었고 一律的 傾向만을 보이고 있다.

3.2. 窒素對炭素의比率이 미치는影響. *Rhodotorula* sp. 菌에 있어 加하는 窒素源의 最適量을 求할 目的으로, medium에 對해 *n*-alkane 混合物의 量을 5, 2, 1% (vol.)로 넣은 것에 各窒素源으로서 NaNO_3 로 N/C가 1, 0.2, 0.05가 되게 하여 振盪培養하면서 要求되는 0.1 N-NaOH 量을 經時的으로 求해 본 結果 아래의 Fig. 3과 같았다.

Fig. 3의 I, II, III으로부터 N/C의 比가 生長率에 매우 큰 影響이 있음을 볼 수 있다. 이들中 N/C가 0.2일 때가 가장 좋은 結果를 나타냈었다. 炭化水素의 medium에 對한 量에 따른 影響도 상당한 差異를 주고 있으므로 반드시 함께 考慮되어야 할 것으로 思料된다. 여기서는 1%의 炭化水素가 가장 좋은 結果의 값을 준다. 그리고 窒素의 比率이 낮을 때보다는 多少 높을 때가 더 좋은 生長效果를 보이고 있다.

4. 結 論

Rhodotorula sp.等에 依한 石油蛋白醱酵에 있어 窒酸鹽, 암모늄鹽의 無機系窒素源과 urea의 有機系의 窒素源의 影響을 調査해 본 結果

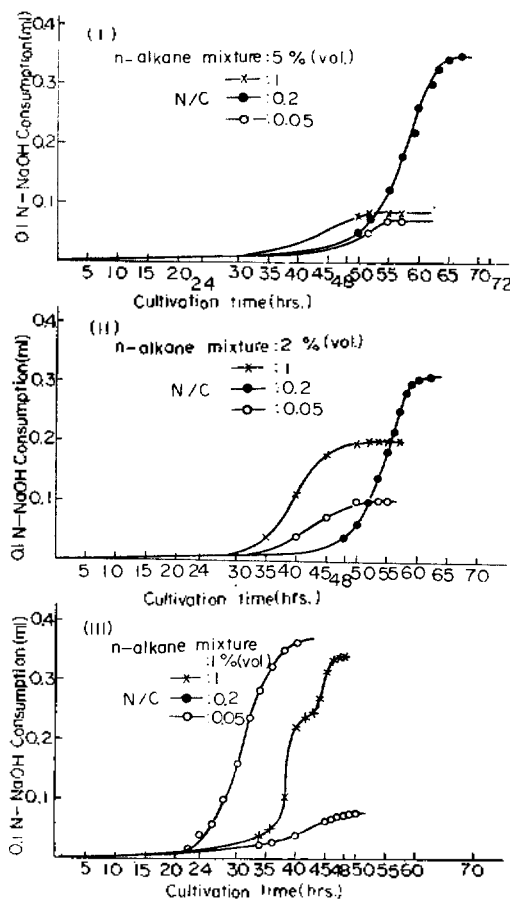


Fig. 3. Effects of N/C ratios on the growth of *Rhodotorula* sp.

1) 最高生長에 達하는데 要하는 時間은 窒酸鹽과 암모늄鹽에 있어서는 各各 40 hrs. 와 45 hrs 이나 urea 는 이들 보다 훨씬 긴 66 hrs. 이었다.

2) 그러나 0.1 N-NaOH 의 消費量으로 본 收率에 미치는 影響은 兩無機鹽이 各各 0.36 과 0.38 ml 인데 비해 urea 는 0.78 ml 에 達하였고, 이는 遠心分離에 依해 菌體를 集積시켜 乾 容積을 收率로 본 data 와 거의 比例하였다.

3) 窒酸鹽과 암모늄鹽에 있어서는 서로 거의 비슷하다고 할 수 있으나 窒酸鹽쪽이 약간 더 나은 結果를 주었다.

4) 3種의 菌種으로 菌들의 各 窒素源에 對한 嗜好性을 調査해 본 結果 特異性은 전혀 發見할 수 없고 一律적인 傾向을 보였다.

5) Medium 에 加하는 窒素 對 炭素의 比率이 미치는 影響은 medium 에 對해 *n*-alkane mixture 1% (vol.) 에서 NaNO_3 로 N/C 가 0.2 일때가 가장 優秀한 結果를 나타내었고, 대개 炭素에 對

한 窒素의 比率이 낮을 때보다는 높을 때가 더 좋은 生長效果를 보였다.

本 研究는 1972 年度 文敎部 學術研究 助成費의 도움을 받아 이루어진 것으로 이에 對하여 感謝의 뜻을 表한다.

References

1. K. Arima, S. Ogino, K. Yano and G. Tamura, *Agr. Biol. Chem.*, **29**, 1004 (1965).
2. James E. Jajic, Symposium: Detergent and Hydrocarbon oxidations, chapter 2, p.16~27.
3. F. Wagner, Th. Kleemann and W. Zahn, *Biotech and Bioeng.*, **11**, 393~408 (1969).
4. J. Takahashi, K. Kobayashi, Y. Kawabata and K. Yamata: *Agr. Biol. Chem.*, **27**, 836 (1963)
5. 朴泰源 沈利澤 金允煥, 大韓石油公社報告(I), (1969).
6. 朴泰源 沈利澤 金允煥 尹熙榮, 大韓石油公社報告(II), (1970).