KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL.
Vol. 6, *No.* 4 (1974)

석유탄화수소를 이용한 단세포단백질의 생산에 관한 연구

제 6 보 혼합배양균주의 선정 및 배지조성의 검토

민태익 · 변유량 · 권태완

한국과학기술연구소 식량자원연구실
(1974년 12월 1일 수리)

Production of Single-Cell Protein on Petroleum Hydrocarbon

Part 6. Selection of the Strains for Mixed Cultivation and Evaluation of the Medium Composition

by

Mheen Tae-Ick, Yoo-Ryang Pyun, and Tai-Wan Kwon

Food Resources Lab., Korea Institute of Sci. and Technol.
(Received December, 1974)

Abstract

For the production of single cell protein from *n*-paraffin, yeasts utilizing *n*-paraffin and ethanol were isolated from oil deposit and oil field soils. The mixed cultivation between yeasts assimilating *n*-paraffin and ethanol was carried out to increase cell yield. Finally, selected strains were identified and suitable medium composition for mixed culture was compared with that of single cultures using flask and 5 *l*-jar fermentor.

Yeasts grow on *n*-paraffin and ethanol were identified as *Candida tropicalis* var. KIST 76 and *Trichosporon cutaneum* KIST 76H respectively.

By mixed cultivation under the suitable medium composition using 5 *l*-jar fermentor, maximum dry cell weight reached 20 g/*l* after 12 hrs. cultivation and it's protein content was 58%. Yield has been increased about 25% and protein content has been increased 6.7% compared to that of single culture, *Candida tropicalis* var. KIST 76, after 16 hrs. cultivation.

서 언

경유(gas oil)를 기질로 하는 단세포단백질의 생산에 관해서는 이미 전보[1~5]를 통하여 보고한 바 있다. 그러나 균체단백질의 생산만을 목적으로할 때, gas oil은 원가면에서는 *n*-paraffin보다 유리하지만 배양상의 문제점, 균체의 회수 및 제품의 안전성등 여러면에서 난

점을 남기고 있다. 따라서 국내의 단세포단백질 생산에서도 gas oil에서 *n*-paraffin으로의 기질전환이 불가피하게 되었다.

저자들은 기존의 gas oil자화균주와 다시 새로운 시료로부터 *n*-paraffin과 ethanol자화균주를 분리하고 이들 균주간의 혼합배양을 시도한 결과, *n*-paraffin자화성 효모와 *n*-paraffin비자화성이면서 ethanol자화성 효모를 동시에 혼합배양함으로써 균체의 수율은 물론 단백질의 함량도 증가시킬 수 있었다.

본고에서는 선정된 혼합배양균주의 동정과 아울러서 혼합배양시 몇가지 최적배지조성을 단독배양시와 비교검토한 결과를 보고한다.

실 험 방 법

1. 시료 및 균주

n-Paraffin 및 ethanol자화미생물은 국내외를 통하여 광범위하게 수집한 유침 및 유전지대의 토양에서 전보[1]와 같은 방법으로 분리하였으며, 이미 전보[1~4]에서 분리 보존중인 70균주의 효모도 동시에 비교하였다.

2. 배 지

n-Paraffin 및 ethanol자화미생물의 분리, 선발용 배지로는 표 1의 A, B, C, D배지를 사용하였으며 단독배양과 혼합배양시의 최적배지조성을 검토하기위한 기본배지로는 표 1의 C배지를 사용하였다.

사용한 *n*-paraffin은 일본광업제품인 super heavy fraction으로 그 특성은 표 2와 같고, corn steep liquor는 천일곡산 제품으로 본 연구소에서 spray dry한 것이다.

Table 1. Media for the isolation and cultivation of *n*-paraffin and ethanol utilizing yeasts

Ingredients \ Medium	A	B	C	D
	(%)	(%)	(%)	(%)
n-Paraffin(ethanol)	2.0(1.0)	2.0(1.0)	3.0	3.0
$(NH_4)_2SO_4$	0.2	0.2	0.2	0.4
NH_4NO_3	0.2			
Urea		0.2	0.2	0.3
KH_2PO_4	0.15	0.15	0.15	0.15
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	0.10	0.10	0.10	0.10
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.04	0.04	0.04	0.05
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	500 mg/*l*	500 mg/*l*	100 mg/*l*	200 mg/*l*
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	100	100	100	50
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	100	100	100	20
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	10	10	10	10
Corn steep liquour	200	200	200	400

Table 2. Properties of *n*-paraffin used in fermentation

Tests \ *n*-Paraffin	Super heavy fraction
Special gravity (15°C)	0.7760
N-P purity(%)	97.1
N-P homologue distribution (wt. %)	
C_{10}	Trace
C_{11}	〃
C_{12}	〃
C_{13}	〃
C_{14}	10.4
C_{15}	45.4
C_{16}	27.0
C_{17}	10.1
C_{18}	2.9
C_{19}	0.9
Mean molecular weight	219.8(C-15.5)
Isoparaffin content(wt. %)	2.9
Aromatic content(wt. %)	0.103
Bromine number	0.042
Sulfur content (ppm)	3.9
Flash point (°C)	12.8
Colour (APHA)	<8
Distillation range (°C)	262~297

3. 배양조건

n-Paraffin 및 ethanol자화미생물의 배양은 500 m*l* 삼각 flask와 5 *l*-jar fermentor(Marubish Lab. Equipment Co., Ltd)를 사용하였으며 그 배양조건은 표 3과 같다.

종배양은 동일조성의 배지로 30시간 배양하되 혼합

Table 3. Fermentation condition used in different fermentors

Fermentation conditions \ Fermentor	Erlenmyer flask	Jar fermentor
Vessel volume(*l*)	0.5	5.6
Medium volume(*l*)	0.05	2.0
Seed inoculum(%)	5.0	10.0
Agitation	Rotary shaker	2 stand flat blade turbine impellers
Agitation rate(rpm)	180 strokes/m	700
Aeration(V/V/m)	—	1.0
Temperature(°C)	32±1	33±1
pH	5.0—4.0	4.5
Indicator(0.1%BCG)	1 drop	2 m*l*

배양인 경우, *n*-paraffin 비자화성효모만은 ethanol배지에서 72시간 배양하였다. 종균의 접종량은 혼합배양의 경우 처음에는 각 균주간의 혼합비를 1 : 1로 하였으나 배지조성의 검토에서는 4 : 1의 비로 총 5~10%가 되도록 하였다. 배양중 pH는 N NH_4OH 용액으로 지시약 BCG의 색이 연녹색에서 무색으로 변할 때 마다 경시적으로 주입하여 보정하였다.

4. 분석방법

세포의 증식 및 단백질의 분석은 전보[2]와 같은 방법으로 행하되, 흡광도는 배양액을 경시적으로 sampling하여 20~30배 희석액을 Spectronic 20을 사용, 570 mμ에서 측정하였다.

균체의 건조중량은 최종배양액 20 ml을 원심분리하여 acetone으로 2회 세척한 균체를 모아 105°C에서 한시간 건조후 평량하였다.

한편 균체의 packed volume은 배양액 10 ml를 눈금이 새겨진 원추형시험관에 넣고 3,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 그 최저 눈금을 기준으로 측정하였다.

5. 효모의 분류동정

효모의 동정은 Lodder[6]의 분류방법에 준하여 실시하였다.

실험결과 및 고찰

1. *n*-Paraffin자화균주의 분리

실험실에서 분리 보존중인 gas oil 및 *n*-paraffin자화균주 70균주와 새로 수집한 시료에서 분리한 100여균주의 효모균주를 표 1의 배지를 사용, 수회에 걸쳐서 그 수율을 검토하고 최종적으로 표 4에서 보는 바와 같이 5균주를 선정하였다.

Table 4. Final selected strains utilizing n-paraffin

Strains	Absorbance (20×dilution,) 28 hrs	References or sources
Candida intermedia		
KIST 120-7	0.80	(4)
Strain No. 10	0.75	(4)Jinhae, oil dep.
Strain No. 3-6	0.88	Taiwan, oil dep.
Strain No. 6-3	0.90	Taiwan, oil dep.
Strain No. 76	0.85	Dongrae,oil dep.

2. Ethanol자화균주의 분리

기존의 gas oil 또는 *n*-paraffin 자화균주가 ethanol이나 methanol을 자화할 수 있는지의 여부를 비교검토하였으며 아울러서 새로운 ethanol자화균주의 분리를 시도하였다.

표 5에서 보는 바와 같이 대부분의 *n*-paraffin자화균주는 ethanol을 자화하지 못하였으나 Strain No. 8, 10, 13은 ethanol에서 생육이 비교적 양호하였다. 한편 토양에서 새로 분리한 Strain No. 76H는 ethanol에서 생육은 가장 양호하였으나 *n*-paraffin에서는 전혀 증식되지 않았다. 또한 이들 모든 균주는 methanol에서는 생육을 인정할 수 없었다.

Table 5. Growth on ethanol and *n*-paraffin as carbon sources

Carbon sources / Strains	Ethanol*	*n*-Paraffin**	Sources
Candida tropicalis KIST 359	0.15	0.65	(2)
C. intermedia KIST 120-5-7	0.08	0.80	(4)
C. intermedia var. KIST C-728	trace	0.78	〃
Strain No. 3-6	trace	0.88	
Strain No. 6-3	0.08	0.90	
Strain No. 8	0.33	0.73	
Strain No. 8-5-2	trace	0.80	
Strain No. 10	0.35	0.75	
Strain No. 13	0.32	0.75	
Strain No. 76	trace	0.85	
Strain No. E-1	0.06	0.70	
Strain No. 76H	0.40	0.06	Dongrae, soil

* Packed volume/10ml

** Absorbance at 570 mμ, 20 × dilution

3. 혼합배양

가. *n*-Paraffin자화균주간의 혼합배양

n-Paraffin자화성균주는 각각 기질에 대한 선택성을 가지고 있어서 탄소수가 다른 탄화수소의 혼합물을 기질로 사용할 때 둘 또는 그 이상의 균주를 혼합배양함으로써 첨가한 원료에 대한 균체 수율을 증가시킬 수 있다.

Takeda등[7]은 각종 *n*-paraffin자화능을 가진 *Torulopsis petrophilum*과 *Bretanomyces petrophilum*을 gas oil을 탄소원으로 하는 배지에 1 : 9의 비율로 접종, 혼합배양함으로써 최종 균체수율을 향상시킨 바 있으며 Miller와 Johnson[8]도 *Candida intermedia*와 *Candida lipolytica*를 혼합배양하여 같은 목적을 달성한바 있다. 또한 저자등[9]도 *Candida tropicalis*와 *Torulopsis sp.*를 혼합배양하여 같은 결과를 확인한 바 있다.

따라서 최종적으로 선발된 *n*-paraffin 자화균주중 Strain No. 6-3, 10, 76의 3균주를 사용, 단독 및 혼합배양시의 균체수율을 비교하였다. 즉, 표 6에서 보는

바와 같이 Strain No. 6-3과 76의 혼합배양에서는 단독배양과 비교하여 별차이가 없었으나 Strain No. 10과 76의 혼합배양에서는 단독배양시보다 양호한 결과를 보였다.

Table 6. Effect of the single and mixed culture between *n*-paraffin utilizing yeasts

Strains \ Growth	Absorbance(30×dilution)			Packed volume
	20 hrs.	24 hrs.	30 hrs.	
Single culture				
Strain No. 6-3	0.75	0.78	0.88	0.60
Strain No. 10	0.50	0.57	0.72	0.35
C. tropicalis var. KIST 76	0.57	0.68	0.80	0.40
Mixed culture				
Strain No. 6-3 and 10	0.73	0.76	0.80	0.35
Strain No. 6-3 and *C. tropicalis* var. KIST 76	0.75	0.78	0.87	0.60
Strain No. 10 and *C. tropicalis* var. KIST 76	0.68	0.70	0.80	0.40

나. *n*-Paraffin자화균주와 ethanol자화균주간의 혼합배양

예비실험결과 새로 토양에서 분리한 ethanol자화성균주 Strain No. 76H는 *n*-paraffin자화균주와 혼합배양함으로써 균체수율이 증가됨을 알았다. 따라서 이 ethanol자화성균주와 선정된 *n*-paraffin자화성균주와의 혼합배양을 시도한 결과, 표 7에서 보는 바와 같이 모든 *n*-paraffin자화균주는 단독배양시보다 ethanol자화균주와 혼합배양함으로써 균체수율은 현저히 증가하고 있음을 재확인하였다.

Table 7. Comparilon of single and mixed culture between *n*-paraffin utilizing yeast and *Trichosporon cutaneum* KIST 76H

Yeast \ Growth	Absorbance (30×dilution)			Packed volume	Dry weight(g/l)
	20 hrs.	24 hrs.	30 hrs.		
Single culture					
C. tropicalis KIST 359	0.20	0.34	0.48	0.20	7.30
C. intermedia KIST 120-5-7	0.28	0.45	0.63	0.30	9.10
C. intermedia KIST 728	0.33	0.48	0.67	0.30	9.30
Strain No. 6-3	0.56	0.65	0.76	0.60	11.70
Strain No. 10	0.34	0.40	0.66	0.40	10.20
Strain No. 13	0.39	0.50	0.64	0.30	9.00
Strain No. 45	0.32	0.44	0.65	0.30	9.10
C. tropicalis var. KIST 76	0.37	0.52	0.71	0.30	9.80
Mixed culture					
C. tropicalis KIST 359	0.62	0.70	0.80	0.50	12.04
C. intermedia KIST 120-5-7	0.52	0.66	0.80	0.50	12.15
C. intermedia KIST 728	0.52	0.65	0.80	0.45	11.90
Strain No. 6-3	0.62	0.71	0.83	0.60	13.00
Strain No. 10	0.50	0.62	0.74	0.55	12.45
Strain No. 13	0.53	0.70	0.80	0.35	12.00
Strain No. 45	0.57	0.68	0.81	0.40	12.32
C. tropicalis var. KIST 76	0.60	0.70	0.83	0.63	13.70

다. Fermentor 실험

5 *l* jar fermentor를 사용하여 *n*-paraffin 자화성균주 Strain No. 76과 6-3의 두효모를 *n*-paraffin 비자화성, ethanol자화성균주 Strain No. 76H와 혼합배양하여 단독배양시와 비교한 결과는 그림 1과 같으며 이 때의 단백질함량은 표 8에서 보는 바와 같다.

즉 Strain No.76과 76H를 혼합배양하였을 때의 건조균체량 및 단백질함량은 각각 18.4 g/*l*, 58.0%로서 Strain No. 76H 단독배양시의 15.8 g/*l*, 53.2%에 비하여 16.5% 및 9.0%가 증가하였으며, Strain No. 6-3의 경우도 단독배양시보다 혼합배양하였을 때 건조균체량이나 단백질함량은 다소 증가하였다.

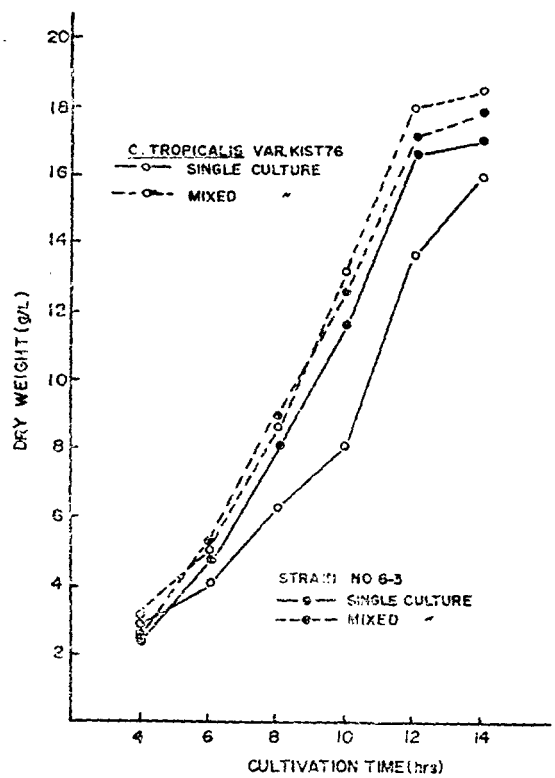


Fig. 1. Growth of single and mixed culture in 5 *l* jar fermentor.

4. 균주의 분류동정

균주의 동정은 *n*-paraffin자화성균주 Strain No. 76과 *n*-paraffin비자화성이면서 ethanol자화성균주인 Strain No. 76H 두효모에 대해서만 실시하였는 바 그 형태는 그림 2,3과 같으며 생리적특성은 다음과 같다.

Table 8. Protein content of single and mixed cultures

Strains	Protein(%)
Single culture	
Strain No. 6-3	53.2
C. tropicalis var. KIST 76	54.0
Mixed culture	
Strain No. 6-3	56.5
C. tropicalis var. KIST 76	57.0

가. Strain No. 76

Growth in glucose-yeast extract-pepton water: Cells are round to oval, size is (4~6)×(4~8.5)μ. (fig.2, a). A sediment and a thin pellicle are formed.

Growth on glucose-yeast extract-peptone agar: After one month at 25°C the streak culture is cream colored, dull, wrinkled, tough and hairy.

Dalmau plate culture on corn meal agar: Pseudomycellium is abundantly formed and blastospores are present (fig. 2, b).

Fermentation: Glucose, galactose, sucrose, maltose, trehalose and melezeitose are fermented. Cellobiose, lactose, melibiose, raffinose and inulin are not fermented.

Assimilation of carbon compounds: Glucose, galactose, sucrose, maltose, melezeitose, trehalose, L-sorbose, D-xylose, glycerol, D-mannitol, D-glucitol, α-methyl-D-glucoside and salicin are assimilated. Other carbon compounds are not assimilated(6).

Assimilation of potassium nitrate: Absent.

Growth in vitamin free medium: Grow very weakly.

Vitamins stimulating growth: Biotin.

Sodium chloride tolerance: 10~13%(W/V).

Maximum temperature of growth: 40°C.

Splitting of arbutin: Absent.

Production of carotenoid pigment: Not produced.

Production of ester: Not produced.

Production of starchlike compound : Not produced.

Reaction on litmus mik: Changed blue.

Splitting of fat: Positive.

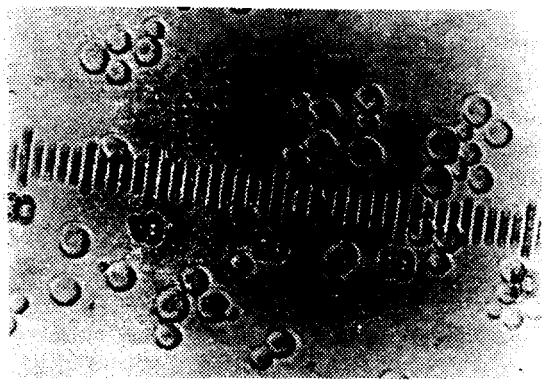
Production of acid: Positive.

Gelatin liquefaction: Absent.

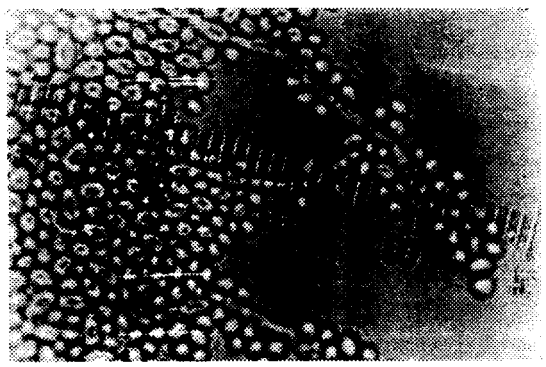
Urease: Absent.

나. Strain No. 76H

Growth in glucose-yeast extract-peptone water: True



(1)



(2)

Fig. 2. Vegetative cells and pseudomycellium of strain No. 76.

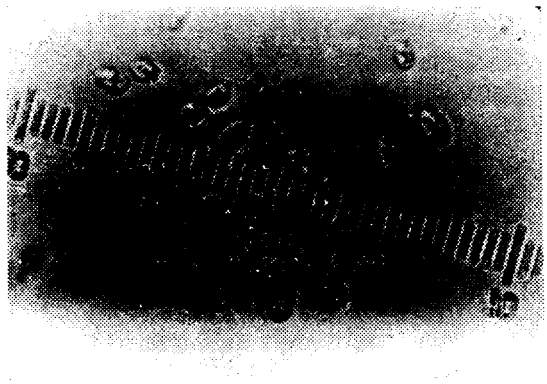
mycellium and arthrospore are always present. Budding cells abundantly formed. Cells are oval to racket shaped, size is usually. $4.5\times(6.0\sim15.0)\mu$. (fig. 3). After three days at 25°C a ring and thin pellicle formed and sank in the broth. Sediment is loose.

Growth on glucose-yeast extract-peptone agar: After one month at 25°C the streak culture is yellowish to cream colored, the surface is wrinkled and fringed with mycellium.

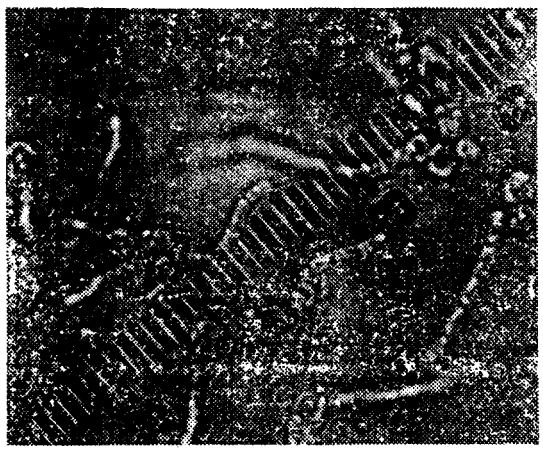
Dalmau plate cultures on corn meal agar: True mycellium is always abundant; arthrospores are variable size. Blastospores are arranged in chains.

Fermentation: Negative.

Assimilation of carbon compounds: Glucose; galactose, maltose, cellobiose, trehalose, melibiose, raffinose, soluble starch, L-sorbose, D-xylose, L-arabinose, D-ribose, ethanol, glycerol, erythritol, mannitol, α-methyl-D-glucoside, lactic acid, succinic acid and citric acid are assimilated. Other carbon compounds are not assimilated (6).



(1)



(2)

Fig. 3. Vegetative cells and arthrospores of strain No. 76H.

Assimilation of potassium nitrate: Absent.

Growth in vitamin free medium: Weak.

Vitamins stimulating growth: Thiamine.

Growth on 50% (w/w) glucose-yeast extract agar: Negative.

Maximum growth temperature; 40°C.

Starch formation: Slightly positive.

Urease: Positive.

Splitting of arbutin: Very slightly positive.

Production of carotenoid pigment: Not produced.

Production of ester: Not produced.

Reaction on litmus milk: Acid coagulated and changed cream color.

Splitting of fat: Slightly positive.

Production of acid: Positive.

Gelatin liquefaction: Positive.

이상의 형태적 생리적 성질을 종합하여 검토하면 Strain No. 76은 의균사가 있으며 세포는 출아에 의해서 증식하고 분열자가 없는 점으로 *Canadida* 속으로, Strain No. 76H는 균사가 있으며 출아로 증식하고 분열자가 있는 점에서 *Trichosporon* 속으로 분류된다.

Candida 속의 Strain No. 76은 nitrate를 자화하지 못하는 점, glucose, sucrose, maltose, galactose, cellobiose를 자화하고 lactose, raffinose, L-rhamnose, erythritol을 자화하지 못하며 39°C에서 생육하고 sucrose를 발효하는 점등이 도두 *Candida tropicalis*와 일치하며 Nakase등[10]이 보고한 *Candida tropicalis* form II와 모든 생리적 성질이 일치하지만 ethanol과 succinic acid의 자화능에 차이가 있으므로 본 균주는 *Candida tropicalis* var. KIST 76으로 명명하였다. 한편 *Trichosporon*속에 속하는 Strain No. 76H는 당류의 발효능이 전혀 없는 점, nitrate를 이용하지 못하는 점, glucose, galactose, sucrose, maltose, lactose를 자화하는 점등이 모두 표준 *Trichosporon cutaneum*과 일치하였다.

5. 최적배지조성의 검토

가. 혼합비

Candida tropicalis var. KIST 76과 *Trichosporon cutaneum* KIST 76H의 단독 및 혼합배양시의 최적배지조성을 비교검토하기 전에 우선 두균주의 혼합비를 검토하였다.

즉 표 9에서 보는 바와 같이 *Candida tropicalis* var. KIST 76과 *Trichosporon cutaneum* KIST 76H의 혼합비는 4 : 1에서 가장 좋은 결과를 보였다.

Table 9. Effect of mixture ratio of *C. tropicalis* var. KIST 76 and *T. cutaneum* KIST 76H

Mixture Ratio		Growth (Absorbance) 18 hrs.	24 hrs.	40 hrs.	Dry Weight g/l
C. tropicalis:	*T. cutaneum**				
5	0	0.44*		0.80*	9.60
4	1	0.72		0.97	16.25
3	2	0.58		0.92	14.20
2	3	0.48		0.83	13.10
1	4	0.25		0.73	8.82
0	5	0.10		0.10	1.60
5	0**		0.535**		7.75
4	1		0.745		15.20
3	2		0.700		13.60
2	3		0.625		12.70
1	4		0.135		2.70
0	5		0.060		1.20

* Medium: Table 1 C. 20×dilution

** Medium: Table 1 D. 30×dilution

나. 질소원의 종류 및 농도

질소원중 황산암모늄과 요소의 농도를0.2~0.8% 첨가하여 *Candida tropicalis* var. KIST 76의 단독 및 *Trichosporon cultaneum* KIST 76H와의 혼합배양 결과는 그림 4에서 보는 바와 같다. 즉 황산암모늄의 최적첨가농도는 단독 및 혼합배양의 경우 공히 0.4~0.6%서 양호하였으며 요소의 경우 첨가농도가 높을 수록 생육은 오히려 감소하였다.

다. 황산암모늄과 요소의 혼합비

전보[11]에서 황산암모늄과 요소를 동량 혼합사용함으로써 flask배양중 pH의 저하를 감소시킬 수 있었다. *n*-Paraffin 첨가농도를 3%로 하였을 때 황산암모늄과 요소를 각각 0.2~0.8%, 0.2~0.3%의 범위로 혼합첨가하여 단독배양과 혼합배양시균체의 증식에 미치는 영향을 검토하였다. 즉, 그림 5에서 보는 바와 같이 황산암모늄과 요소의 혼합비는 혼합배양의 경우 4 : 2에서 가장 양호하였으며 단독배양시에는 4 : 3에서 양호하였다.

라. 유기영양원의 종류 및 농도

유기영양원으로 yeast extract와 corn steep liquor (spray dried)를 100~600 mg/*l*의 농도로 첨가하여 단독배양과 혼합배양시 균체증식에 미치는 영향을 검토한

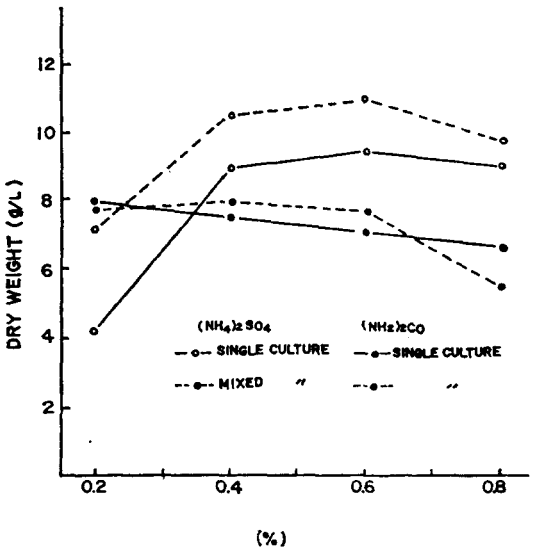


Fig. 4. Effect of nitrogen sources and their concentration on growth of cultures.

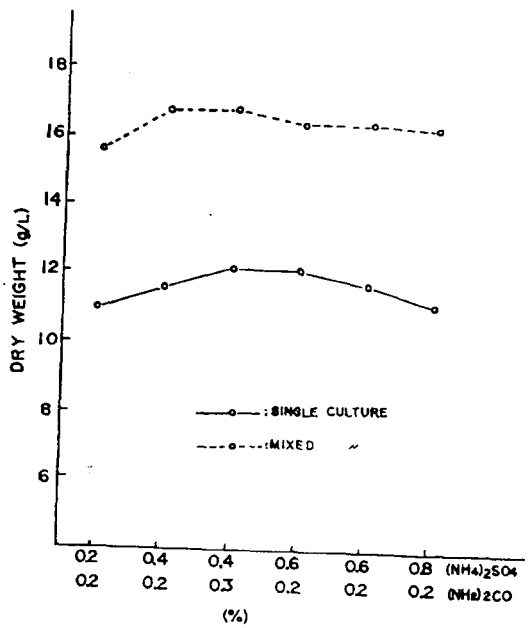


Fig. 5. Effect of mixture ratio of ammonium sulfate and urea on growth of cultures.

결과는 그림 6과 같다. 즉, 유기영양원으로는 yeast extract 보다 corn steep liquor가 양호하였으며 그 첨가 농도는 단독배양의 경우, 600 mg/*l*까지는 첨가량에 비례하여 균체량도 증가하였으나 혼합배양의 경우에는 400 mg/*l* 첨가에서 최고치에 달하였으며 그 이상에서는 오히려 감소하였다.

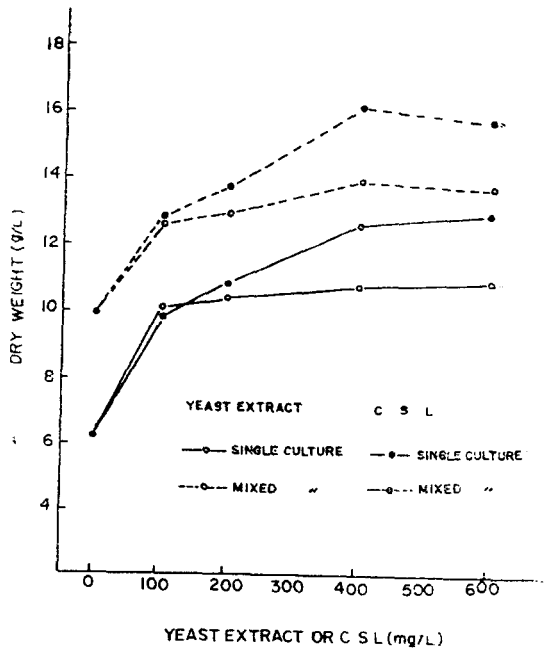


Fig. 6. Effect of yeast extract and corn steep liquor on growth of cultures.

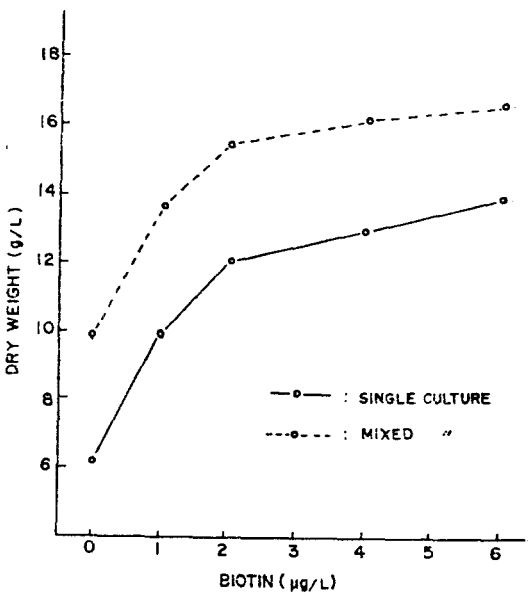


Fig. 7. Effect of biotin on growth of cultures.

다. Biotin 및 thiamine의 첨가효과

Candida tropicalis var. KIST 76과 *Trichosporon cutaneum* KIST 76H는 각각 biotin과 thiamine의 요구

주로 확인되었는 바, 이들 비타민을 단일 또는 혼합첨가하여 균체증식에 미치는 영향을 검토하였다. 즉 그림 7에서 보는 바와 같이 biotin의 첨가는 단독 및 혼합배양의 경우, 6 $\mu g/l$ 농도 까지는 첨가량에 비례하여 균체량도 증가하였다. 한편 혼합배양에서 biotin과 thiamine의 혼합첨가는 표 10에서 보는 바와 같이 biotin 2 $\mu g/l$ 첨가에서만 thiamine의 첨가가 다소 효과가 있을 뿐 biotin 4 $\mu g/l$ 이상의 첨가에서는 thiamine의 첨가도 별로 영향을 미치지 못하였다.

Table 10. Effect of mixture ratio of biotin and thiamine. HCl concentration on growth of cultures

Mixture ratio	Growth: Absorbance (30×dilution) 20 hrs	Absorbance (30×dilution) 40 hrs	Dry weight (g/l)
Mixed culture			
Biotin ($\mu g/l$) Thiamine. HCl ($\mu g/l$)			
2 0	0.360	0.790	15.40
2 200	0.380	0.800	16.13
2 400	0.380	0.790	16.36
2 600	0.395	0.795	16.78
4 0	0.385	0.800	16.30
4 200	0.350	0.700	15.41
4 400	0.365	0.785	16.35
4 600	0.360	0.790	16.25
8 0	0.375	0.800	16.60
8 200	0.400	0.810	16.80
8 400	0.390	0.800	16.50
8 600	0.400	0.805	16.70

바. 인산의 첨가

전보[11]에서 배지중에 첨가하는 인산가리와 인산소다를 인산으로 대치할 수 있음을 보고한 바 있다. 따라서 단독 및 혼합배양의 경우 인산의 최적첨가량을 알기 위하여 무첨가에서 1.5 ml/l까지 농도를 변화시켜서 비교한 결과는 그림 8에서 보는 바와 같다. 즉, 단독배양의 경우, 인산의 최적첨가량은 0.6 ml/l이었으며, 혼합배양시에는 0.9 ml/l 일 때 가장 양호하였다. 이 때 K^+이온의 공급원으로는 KCl 0.1%를 첨가하였다.

사. 금속이온의 첨가

몇가지 금속이온의 첨가가 단독 및 혼합배양시의 균체증식에 미치는 영향을 검토한 결과는 그림 9, 10 및 표 11에서 보는 바와 같다.

즉 그림 9에서 보는 바와 같이 Mg^{++} 이온의 경우, 단독배양에서는 800 mg/l의 농도까지는 그 농도가 증가

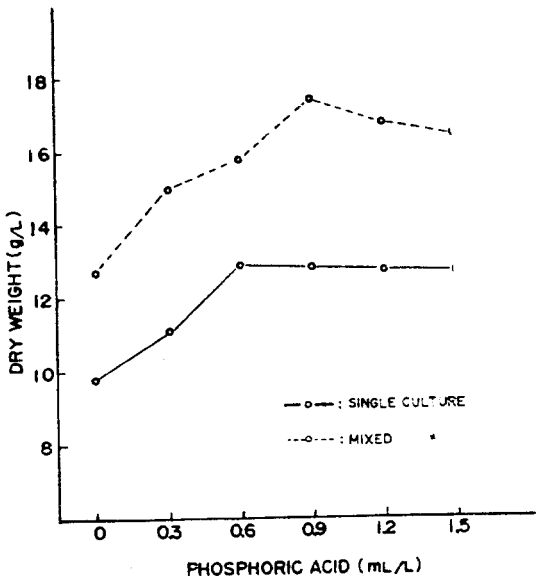


Fig. 8. Effect of phosphoric acid concentration on growth of cultures.

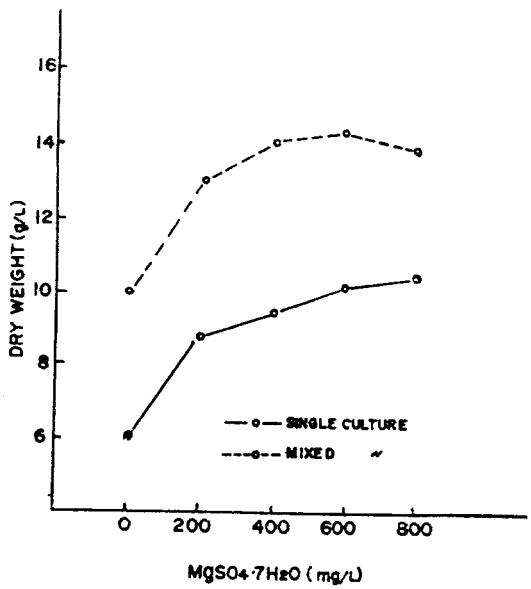


Fig. 9. Effect of magnesium ion concentration on growth of cultures.

할 수록 균체량도 증가하였으나 혼합배양시에는 600 mg/l의 첨가에서 가장 좋은 결과를 보였고 그 이상에서는 오히려 다소 감소하였다. 한편 Ca^{++}이온의 경우도 그림 10에서 보는 바와 같이 단독배양에서는 600 mg/l까지는 첨가량의 증가에 따라 균체량도 증가하였으나 혼합배양에서는 200 mg/l의 첨가에서 양호하였다. 또한 표 11에서 보는 바와 같이 Zn^{++}이온을 첨가하지 않았을

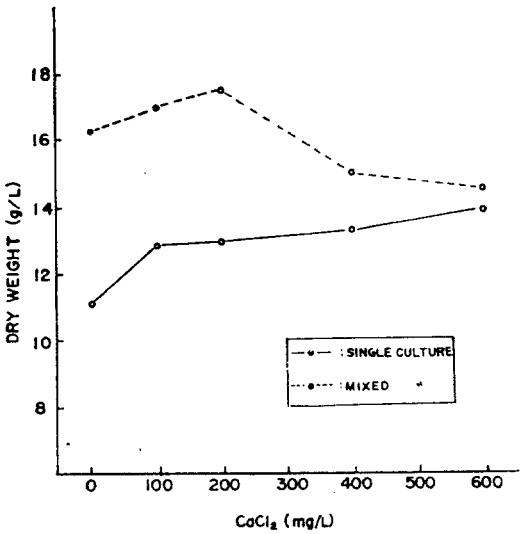


Fig. 10. Effect of calcium ion concentration on growth of cultures.

때의 Fe^{++}, Mn^{++}이온의 최적첨가농도는 각각 50, 20 mg/*l*이었으며, Fe^{++}, Mn^{++}이온을 100 mg/*l*의 고농도로 첨가하면 미량의 Zn^{++}이온을 첨가함으로써 균체량이 증가되었다.

전보[11]에서 gas oil을 기질로 사용할 경우 Fe^{++}, Mn^{++}이온의 첨가는 100 mg/*l*가 최적임을 보고한 바 있으며 Takeda등[12]과 Iguchi등[13]도 탄화수소의 발효에서는 고농도의 Fe^{++}, Mn^{++}이온이 요구된다고 보고하고 있다.

아. 계면활성제의 첨가

Otsuka등[14] 및 Tanaka등[15]은 탄화수소 발효에서 계면활성제의 첨가로 수율이 증가됨을 보고한 바 있으며 Aiba[16]등은 계면활성제의 첨가는 오히려 균체와 탄화수소와의 접촉을 방해하여 균체증식의 저해현상을 보고한 바 있다. 저자등[2]도 Tween 20을 첨가하였을 때 Aiba[16]등과 같은 결과를 확인하였다. 그러나 계면

Table 11. Effect of Fe^{++}, Mn^{++}, Zn^{++} ion concentration on growth of cultures

Metal ions (mg/*l*)			Absorbance (30×dilution)		Dry weight (g/*l*)
			20 hrs.	44 hrs.	
Single culture					
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$			
0	100	0	0.30	0.710	9.75
10	100	0	0.35	0.725	12.50
20	100	0	0.40	0.740	12.65
50	100	0	0.45	0.760	13.95
100	100	0	0.35	0.780	12.65
100	0	0	0.21	0.700	12.50
100	10	0	0.32	0.720	12.55
100	20	0	0.40	0.750	12.80
100	50	0	0.36	0.770	12.50
100	100	10	0.46	0.800	14.05
100	100	20	0.42	0.770	12.40
100	100	30	0.32	0.740	12.10
Mixed culture					
0	100	0	0.40	0.750	12.85
10	100	0	0.45	0.780	15.60
20	100	0	0.58	0.790	16.30
50	100	0	0.60	0.785	16.40
100	100	0	0.55	0.760	14.45
100	0	0	0.42	0.760	13.95
100	10	0	0.44	0.775	15.15
100	20	0	0.55	0.780	16.00
100	50	0	0.46	0.770	15.40
100	100	10	0.60	0.880	16.40
100	100	20	0.55	0.780	16.05
100	100	30	0.44	0.770	15.45

활성제의 종류에 따라 균체증식에 미치는 영향은 다를 것이 기대되어 계면활성제로서 Tween, Span, Igepal을 각각 0.05%의 농도로 첨가하여 단독 및 혼합배양의 경우를 비교하였다.

표 12에서 보는 바와 같이 단독배양의 경우 Tween계와 Span계중 Span 60은 저해현상을 보였으나 Span 80은 별영향을 미치지 않았으며 Igepal은 무첨가시 보다 효과가 있었다. 한편 혼합배양의 경우도 Igepal은 무첨가시보다 양호한 결과를 보였고 Tween 80은 생육저해현상을, Tween 20, Span 60은 오히려 촉진현상을 초래하였다.

자. 소포제의 첨가

Gas oil을 기질로 사용하였을 때와는 달리 *n*-paraffin을 기질로 사용하면 발효중기에 상당량의 거품이 발생되어 발효관리상 난점이 있으며 생육 또한 감소된다.

Table 12. Effect of surfactants on growth of cultures

Surfactants \ Growth		Absorbance (30×dilution) 18 hrs.	Absorbance (30×dilution) 30 hrs.	Dry weight (g/*l*)
Single culture				
Tween	20	0.20	0.20	2.10
Tween	60	0.20	0.30	3.40
Tween	80	0.29	0.43	4.43
Span	60	0.27	0.32	2.80
Span	80	0.49	0.70	12.30
Igepal	Co-5	0.53	0.85	13.10
Control		0.25	0.60	12.20
Mixed culture				
Tween	20	0.51	0.82	17.85
Tween	60	0.37	0.73	15.23
Tween	80	0.54	0.60	9.30
Span	60	0.69	0.80	16.38
Span	80	0.58	0.71	14.63
Igepal	Co-50	0.87	0.76	16.50
Control		0.50	0.78	15.80

따라서 소포제로서 poly glycer olyate와 antifoam FD-62를 각각 0.05% 첨가하여 이들의 효과를 단독 및 혼합배양시에 비교하였다. 즉 표 13에서 보는 바와 같이 소포제는 antifoam FD-62보다 poly glycer olyate가 양호하였으며 단독 및 혼합배양의 경우 모두 poly glycer olyate의 첨가는 무첨가시보다 현저한 효과를 보였다. 한편 antifoam FD-62는 단독배양에서는 오히려 역효과를 나타냈으며 혼합배양에서는 첨가효과가 다소 인정되었다.

차. Fermentor 실험

Flask배양을 통해서 얻은 최적배지 조성으로 5 *l* jar

Table 13. Effect of antifoams on growth of cultures

Antifoams \ Growth	Absorbance (30×dilution) 18 hrs	Absorbance (30×dilution) 30 hrs	Dry weight (g/*l*)
Single culture			
Poly glycer olyate	0.60	0.81	14.95
Antifoam FD-62	0.29	0.29	2.20
Control	0.25	0.60	12.20
Mixed culture			
Poly glycer olyate	0.76	0.80	19.20
Antifoam FD-62	0.52	0.81	18.13
Control	0.50	0.78	15.80

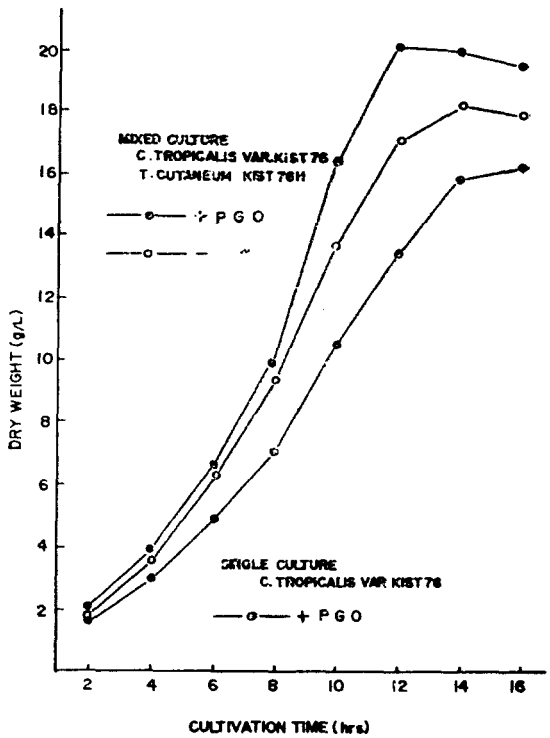


Fig. 11. 5 *l*-jar fermentor experiment under the best medium condition.

Medium for single culture: *n*-paraffin 3(%), urea 0.3, $(NH_4)_2SO_4$ 0.4, H_3PO_4 0.06, KCl 0.1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.08, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.06, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.02, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01, PGO 0.05, corn steep liquor 0.04

Medium for mixed culture: Same as above except urea 0.2(%), H_3PO_4 0.09, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05 and $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.02.

fermentor를 사용하여 단독 및 혼합배양시의 균체량을 경시적으로 비교한 결과는 그림 11에서 보는 바와 같다. 즉, 최적배지조성에서 단독배양하였을 때의 균체수율은 배양 16시간후에 16 g/*l*에 달하였으며 혼합배양시에는 배양 12시간만에 20 g/*l*에 달하였다. 한편 혼합배양의 경우 poly glycer olyate를 첨가하지 않으면 14시간 배양후에 18 g/*l*에 달하였다.

요 약

국내외에서 수집한 유침 및 유전지대의 토양시료에서 *n*-paraffin자화성균주와 ethanol자화성균주를 분리하여 혼합배양을 시도하였고 선정된 균주에 대해서는 동정과 아울러 최적배지조성을 검토하였다.

최종적으로 선정된 균주중 *n*-paraffin자화성균주(Strain No. 76)는 *Candida tropicalis* var. KIST 76으로, ethanol자화성균주 (Strain No. 76H)는 *Trichosporon cutaneum* KIST 76H로 동정되었다.

최적배지조성에서 *Candida tropicalis* var. KIST 76을 단독배양하였을때 건조균체량은 배양 16시간 후에 16 g/*l*(대기질당 수율 71.1%), 이때의 단백질함량은 53.4%였으나 *Candida tropicalis* var. KIST 76과 *Trichosporon cutaneum* KIST 76H와 혼합배양하면 배양 12시간 후에 건조균체량은 20 g/*l*(대기질당 수율 88.8%), 단백질함량은 58.0%로 증가하였다.

참 고 문 헌

1) 권대완, 민태익, 박웅, 변유량 : 한국식품과학회지, **2**, 56 (1970).

2) 박웅, 민태익, 변유량, 권대완 : 학국식품과학회지, **2**, 61 (1970).

3) 변유량, 권태완 : 한국미생물학회지, **9**, 95 (1971).

4) 이용현, 변유량, 권태완 : 한국식품과학회지, **4**, 200 (1971).

5) 변유량, 권태완, 지규만, 김춘수 : 한국식품과학회지, **4**, 752 (1972).

6) Lodder, J.: *The Yeasts-A Taxnonomic Study*, North-Holland Pub. Co., Amsterdam (1971).

7) 武田 勲等 : 日本特許出願公告, 昭 40～20667 (1965).

8) Miller, T.L. and M.J. Johnson: *Biotech., Bioeng.*, **8**, 549, 567 (1966).

9) 권태완 등 : 단세포단백질의 국내생산에 관한연구 (2) 한국과학기술연구소, 서울(1970).

10) Nakase, K., et al.: *J. Appl. Microbiol.*, **18**, 349 (1969).

11) 권대완 등 : 단세포단백질의 국내생산에 관한연구 (4), 한국과학기술연구소, 서울(1972).

12) 武田 勲等 : 日本特許出願公告, 昭 40～24511 (1965).

13) 井口 酒等 : 日本特許出願公告, 昭 40～20666 (1965).

14) Otsuka, S.L., et al.: *J. Gen. Microbiol.*, **12**, (1966).

15) Tanaka, A., et al.: *J. Ferm. Technol.*, **45**, 1156 (1967).

16) Aiba, S.V., et al.: *J. Ferm. Technol.*, **47**, 203 (1969).