

석유탄화수소를 이용한 단세포단백질의 생산에 관한 연구

제 7 보 시험공장에서 혼합배양균주의 생육조건

변유량 · 민태익 · 권태완

한국과학기술연구소 식량자원연구실

(1974년 12월 1일 수리)

Production of Single-Cell Protein on Petroleum Hydrocarbon

Part 7. Growth Conditions of Mixed Cultures in Pilot Plant.

by

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

Food Resources Lab., Korea Institute of Science and Technology.

(Received December, 1974)

Abstract

The growth of a mixed yeast culture consisting of *Canda tropicalis* var. KIST 76 and *Tricosporon cutaneum* KIST 76-H was compared with that of pure cultures under pilot plant conditions. The mixed culture was judged stable based on the nearly constant ratio of the two organisms at the completion of fermentation. We obtained higher cell yields, protein content and productivity in the mixed culture on n-paraffin than the pure culture of *C. tropicalis* var. KIST 76. *T. cutaneum* KIST 76-H did not grow on n-paraffin medium. With the batch cultivation of mixed organisms on n-paraffin, the specific growth rates during the exponential growth phase were 0.24–0.33 hr⁻¹; cell yields were 96–106% and productivities were 2.9–3.6g/1. hr. The cells obtained contained 55–58% crude protein and 5.5–6.3% lipid. The critical value of dissolved oxygen concentration Ccrit. and saturation constant, km, are approximately 1.5 ppm and 0.228 ppm respectively. Also we established the optimal conditions for the mixed culture in batch fermentation.

서 론

벌지 않은 장래에 人類가 직면하게 될 단백질위기를 解消하기 위해서는 현실적인 對應策을 마련하지 않으면 안되며 새로운 단백질자원 개발의 필요성이 증대되고 있다.

炭化水素를 基質로 한 효모단백질은 魚粕과 大豆粕 등을 대체할 수 있는 새로운 단백질자원으로 각광을 받아 많은 연구가 진행되었다. 본연구자들은 탄화수소를

모생산을 위한 실현실적 연구결과를 이미 報告한바 있으며⁽¹⁻⁵⁾, 이어서 시험공장연구, 동물사육실험 등을 수행하였는바⁽⁶⁻⁷⁾ 本報에서는 그 결과의 일부인 시험공장에서 의 혼합배양균주의 생육특성과 배양조건 등을 보고한다.

과거 30여년간 醱酵産業의 급속한 발전은 주로 단독 배양에 의한 것으로 오늘날 수많은 유용한 제품이 생산되고 있다. 그러나 古來로 인류는 乳製品, 알콜발효 등 여러가지 식품, 음료제조에 혼합배양을 이용하여 왔으며 최근에와서는 高度로 발전된 단독배양기술을 이

용한 혼합배양법의 잠재적인 가능성과 그 중요성이 강조되고 있다. 일찌기 Johnson⁽⁸⁾은 長鎖의 탄화수소를 기질로 했을때 *C. intermedia*를 단독배양하는 것보다 *C. intermedia*와 *C. lipolitica*를 혼합배양하므로서 資化能이 우수하였다고 보고하므로서, 탄화수소효모생산에 혼합배양의 가능성을 示唆하였다. 그러나 탄화수소발효에 혼합배양을 이용한 구체적인 보고는 거의 없으며 단지 British Petroleum의 輕油공정에 의한 Lavera공장에서 효모와 세균의 혼합배양법을 채택하고 있으며⁽⁹⁾ 日本의 旭化成은 2종의 균주에 의한 혼합배양법의 독자적인 기술을 완성한 것으로 알려져 있을뿐⁽¹⁰⁾ 상세한 것은 발표되지 않았다.

본 연구자들은 장기간에 걸친 탄화수소자화성 우수 균주의 선발과 개량실험결과, 탄화수소자화성 균주인 *C. tropicalis* var. KIST 76과 非자화성인 *Tricosporon cutaneum* KIST 76-H를 혼합배양하므로서 菌體收率이 현저히 향상됨을 알았다⁽¹¹⁾. 따라서 이들 혼합균주를 이용한 탄화수소효모 생산기술을 발전시키기 위하여 연간 10톤 규모의 시험공장연구를 수행하였다.

실험 방법

1. 균 주

C. tropicalis var. KIST 76과 *Tricosporon cutaneum* KIST 76-H를 단독 또는 혼합배양하였다. 前者는 탄화수소자화성균주로서 biotin요구성이며 後者는 ethanol자화성균주로서 thiamine요구성이다.

2. 배 지

사용한 배지의 조성은 Table 1과 같으며 본배지는 실험실에서 플라스크배양으로 배지의 조성을 검토하여 선정 한 것이다. 탄소원으로는 日本鑛業의 *n*-paraffin (super-heavy fraction)을 사용하였으며 그 특성은 Table 2

Table 1. Composition of medium

Component	Amount
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.2%
(NH ₂) ₂ CO	0.2"
KH ₂ PO ₄	0.15"
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	0.10"
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.04"
CaCl ₂ · 2H ₂ O	100 mg/l
FeSO ₄ · 7H ₂ O	100 "
MnSO ₄ · 4H ₂ O	100 "
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	10 "
CSL	200 "

Table 2. Properties of *n*-paraffin

Tests	
Specific gravity(15°C)	0.776
N-P purity (wt.%)	97.1
N-P homolog distribution(wt%)	
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. %)	0.103
Bromine number	0.042
Sulfur content (ppm)	3.9
Distillation range(°C)	262~297

와 같다.

3. 배양장치

본 실험에 사용한 발효조는 28 l MicroFerm(NBS Model CMF-128S) 및 시험공장에 설치된 100 l, 500 l 및 1000 l용량의 발효조들이다. 100 l 발효조는 種菌槽이며 500l발효조는 표준형의 구조를 가지고 있다. 본 실험에 주로 사용한 1000 l발효조는 시험공장연구를 통하여 탄화수소발효에 적합하도록 개발한 순환형발효조로서 개략적인 구조도는 Fig.1과 같다. 발효조 內面에 draft tube와 3枚의 baffle이 설치되어 있으며 탱크下部에 propeller형 교반기가 설치되어 있다. 교반기 下部에 ring spargers를 설치하였으며 pH 및 溶存酸素電極은 外部流通型으로 설치하여 발효조의 조업에 관계없이 수리, 교체 및 살균이 가능하게 하였다.

4. 배양방법

500 ml 플라스크(working vol. 100 ml)에서 *C. tropicalis* var. KIST 76과 *T. cutaneum* KIST 76-H를 각각 33°C에서 30시간 진탕배양한 후, 100l종균조(working volume 50 l)에 1~2 l점종하였다. 혼합배양일때 *n*-paraffin자화균주와 비자화균주의 비율은 4 : 1로 하였다. 종균조에서 5~10시간 배양한 후에 500 l 또는 1000 l시험공장발효조에 각각 10% 점종하였다. 온도는 자동조절장치에 의하여 30~36°C±1로 조절하였다. pH도 자동조절장치에 의하여 4.0~6.0으로 유지하였으며 pH조절에는 28% 암모니아수를 사용하였다.

5. 분석방법

배양액중의 溶存산소는 DO Analyzer(NBS Model DO-50)로 측정하였으며 teflon膜電極은 Fig.1에서 보는바와 같이 pH전극과 함께 설치하였다. 발효조의 입구 또는

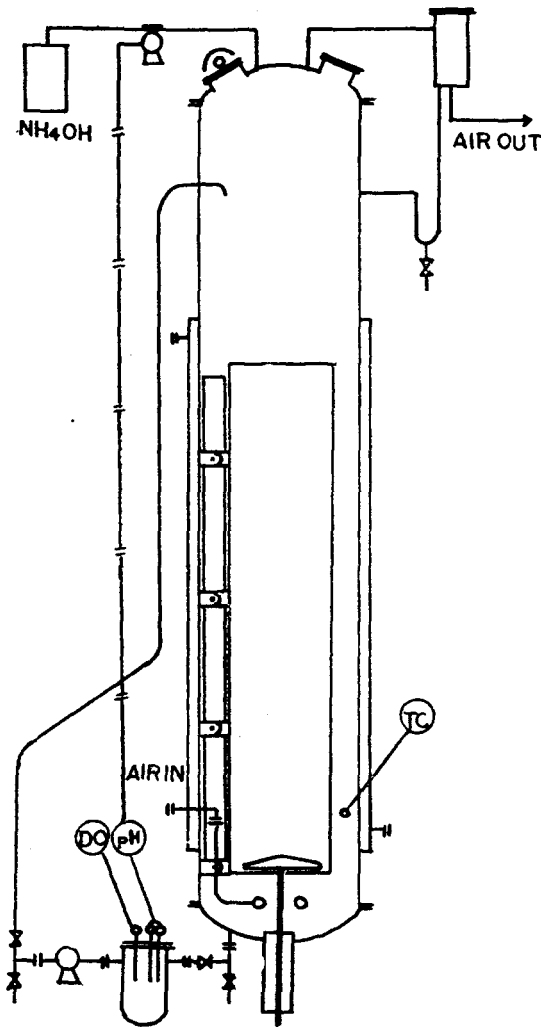


Fig.1. Schematic diagram of 1000 l draft tube fermentor.

출구개스의 酸素分壓은 Fieldlab Oxygen Analyzes로 측정하였으며 출구개스속에 함유된 수분 및 CO₂는 分壓을 측정하기 전에 각각 trap에서 제거하였다. 산소전달량 및 산소전달용량계수 K_La는 Wang 등⁽¹²⁾의 방법으로 다음 식을 사용하여 계산하였다. 이때 氣相의 산소분압 p_i는 입구 및 출구개스의 산소분압의 對數平均을 사용하였다.

$$N_a = 6 \times 10^4 Q (P_i - P_o) / (A \cdot MV \cdot P_T)$$

$$K_{L_a} = N_a / (p^* - p)$$

N_a: 산소전달속도, mMO₂/l.hr

Q: 통기량, STP l/min.

P_i: 발효조 입구개스의 산소분압, atm

P_o: 발효조 출구개스의 산소분압, atm

A: 물기체용적, 표준상태에서 22.4 l

MV: 배지용적, l

P_T: 공기압력, atm

K_La: 산소전달계수, mMO₂/l. hr

P*: 기상의 산소분압, atm

P_L: 액상의 산소분압, atm.

균체농도는 배양액시료 약 200 ml를 2시간 간격으로 채취하여 Igepal CO 50을 적당량 첨가하고 잘 교반한 다음 Sorval (Model RC-2B) 원심분리기에서 5000 rpm으로 10분간 원심분리하여 균체를 회수하고 水洗하여 건조중량을 구하였다. 조단백질함량은 micro-Kjeldahl법으로 조지방은 Soxhlet추출기에서 diethyl ether로 24시간 연속추출하여 구하였다.

결과 및 고찰

1. 단독 및 혼합배양의 생육특성

C. tropicalis KIST 76과 T. cutaneum KIST 76-H를 혼합 배양했을 때 균체수율이 향상된다는 것은 이미 前報에서 보고하였다. 상기 균주를 시험공장발효조에서 단독 및 혼합배양 했을 때 대표적인 생육곡선은 Fig. 2 및 Fig. 3과 같다. Fig. 2의 단독배양일 때에 생육곡선을 살펴보면 암모니아 소비량과 균체농도는 배양중반을 제외하고는 거의 비례하며, 여러 연구자들이 보고⁽¹³⁾한 바와 같이 암모니아소비량으로 균체생육도를 간접적으로 간편하게 판단할 수 있다. 그러나 Fig. 3의 혼합배양에서는 암모니아소비량은 균

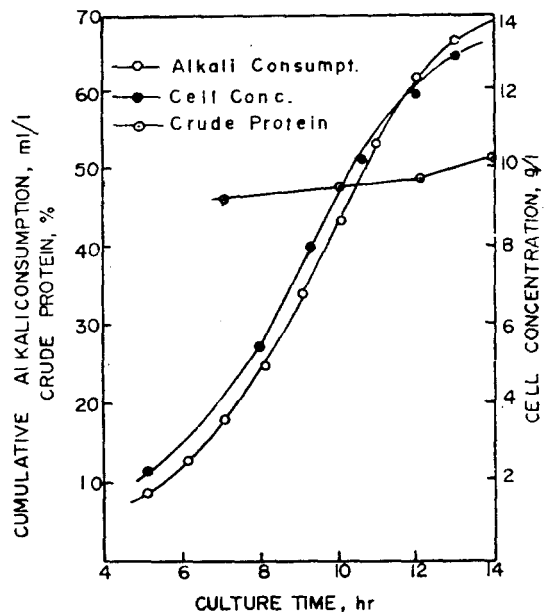


Fig. 2. Typical growth of *Candida tropicalis* var. KIST 76 in single culture.

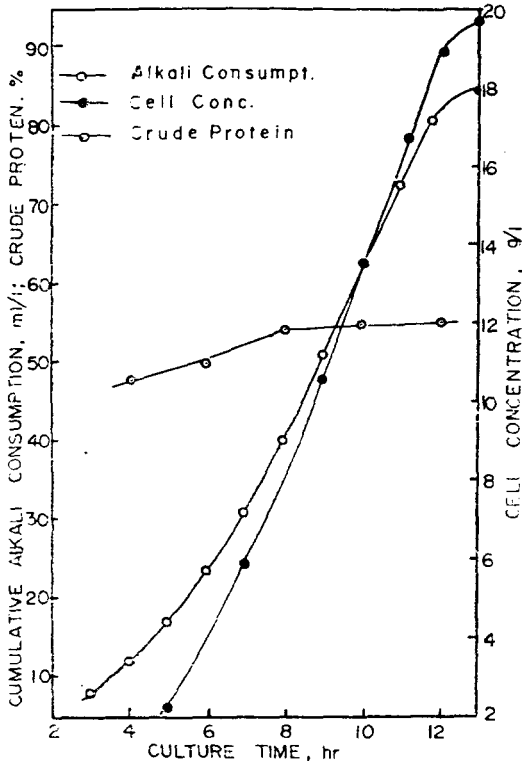


Fig. 3. Typical growth of *C. tropicalis* var. KIST 76 and *Tricosporon cutaneum* KIST 76-H in mixed culture.

체중도와 비례하지 않으며 발효가 진행됨에 따라 점차 감소되는 경향을 보이고 있다. 한편 배양시간에 따른 균체단백질함량의 변화를 보면 단독, 혼합배양에서 공히 배양중반기에 단백질함량이 현저히 증가하였다. 이 균체단백질을 생산하는데 있어서 생육중반에 熟成工程을 두어 균체내 단백질함량을 높일 필요가 있음을 암시하고 있다.

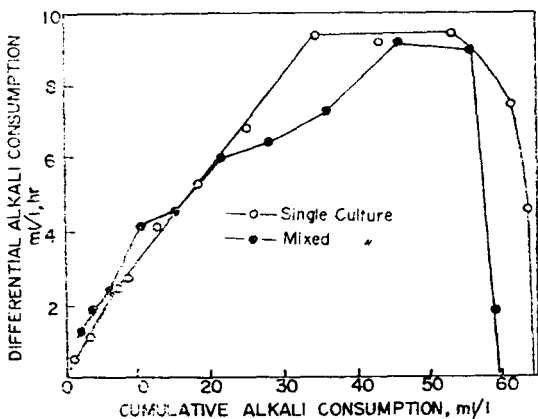


Fig. 4. Plot of differential vs cumulative alkali consumption.

상술한 단독, 혼합배양에서의 암모니아소비량의 차이는 Fig. 4를 살펴보면 더욱 명백히 알 수 있다. 단독 배양일 때는 안전한 對數增殖期와 直線의 生育期를 보이고 있다. 그러나 혼합배양의 경우에는 대수증식기의 암모니아 소비량의 증가가 불안정하여 diphasic growth에 유사한 현상을 보이고 있다. 이와같은 현상은 *T. cutaneum* KIST 76-H가 *C. tropicalis* var. KIST 76이 생산하는 有機酸 또는 알콜류의 대사산물을 차화하기 때문이 아닌가 짐작된다. *T. cutaneum* KIST 76-H는 n-paraffin배지에서 단독으로 전연 생육하지 않으나 *C. tropicalis* var. KIST 76과 共存하면 總菌數중 1/10~1/30 정도 생육한다. 또한 *C. tropicalis* var. KIST 76를 단독배양한 폐배지에서 *T. cutaneum* KIST 76-H가 약간 생육하는 것이 인정되었으나 양균주가 안정한 혼합배양계를 형성하는 원인의 규명은 앞으로의 연구과제이다.

한편 Fig 4에서 보는 바와 같이 단독 및 혼합배양에서 모두 1~2시간의 직선적 생육기가 관찰된다. 이와 같은 직선적 생육은 수용성인 糖質기질을 사용 했을때는 관찰되지 않는 현상으로서 물에 불용성인 炭化水素 醱酵의 특성이다. 탄화수소산화균의 n-paraffin섭취機構에 대해서는 여러가지 動力學的인 이론이 제안되어 있다. Humphrey 및 Erickson⁽¹⁴⁾과 Ochoa등⁽¹⁵⁾은 탄화수소산화성균은 주로 油滴과의 직접적인 접촉으로 기질을 소비하므로 탄화수소油滴의 界面面積의 제한으로 배양후반에 직선적 생육을 한다고 보고하였다.

단독, 혼합배양균주의 대표적인 생육 data는 Table 3과 같다. 대수증식기의 比增殖速度는 단독 또는 혼합배양에 관계없이 0.24~0.25hr⁻¹였다. 그러나 기질에 대한 균체수율은 혼합배양했을때 102%로서 단독배양

Table 3. Comparison of growth results obtained with *C. tropicalis* var. KIST 76 and *T. cutaneum* KIST 76-H in pure and mixed culture

Parameter	KIST 76 in pure culture	KIST 76+KIST 76H in mixed culture	Liquiche-mica (16)
Initial substrate concentration, g/l	2	2	—
Specific growth rate, hr ⁻¹	0.25	0.24	—
Cell yield on substrate, %	71	102	104—114
Max. productivity, g/l.hr	2.4	3.2	2.97—3.24
Crude protein, %	52.0	57.6	60—63
Crude fat, %	6.4	6.2	2—4

의 71%에 비해 31%나 현저히 향상되었다. 또한 조단백질함량을 살펴보면 혼합배양일 때는 57.6%로서 단독배양의 52%에 비해 약 5%정도 향상되었다.

기질에 대한 균체수율은 제품의 경제성에 가장 큰 영향을 미치는 중요한 인자이다. *n*-paraffin을 기질로 사용했을 때 균체수율의 이론적 최급은 어려우나 燃燒熱, available electron 및 ATP등을 기준으로 계산한 최대수율의 理論値는 110~153%인 것으로 보고되고 있다⁽¹⁷⁾. 현재까지 실험실적으로 얻어진 최대균체수율은 100~120%이며 통상 산업규모에서는 原單位를 1.0내외로 보고 있다. 예컨대 鍾淵化學의 기술로 연산 10만 톤규모의 공장을 건설하고 있는 Liquichimica의 발표에 의하면⁽¹⁸⁾ 균체수율은 104~114%, 균체생산성은 2.97~3.24 g/l.hr이다. 이들과 비교해 볼 때 본혼합배양균주의 최분배양에서의 최대균체생산 속도는 약 3.2 g/l.hr 인바, 수율면에서나 균체생산성에서 매우 우수한 産業菌株임을 알 수 있다.

2. 산소소비량

탄화수소산화성균의 對酸素擧動의 해석은 합리적인 배양관리를 위하여 매우 중요하다. 균체의 산소소비속도와 용存산소와의 관계는 Fig. 5에 나타내었다. 단독배양일 때는 2 ppm전후에서 臨界容存산소농도 C_{crit} 이 인정되었으며, 혼합배양에서는 이보다 낮은 1.5 ppm에서 C_{crit} 이 나타났다. Fig. 6의 Lineweaver-Burk plot에 의하여 산소소비속도에 대한 K_m 值를 구하여 보면 단독배양에서는 0.63 ppm, 혼합배양에서는 0.288 ppm이

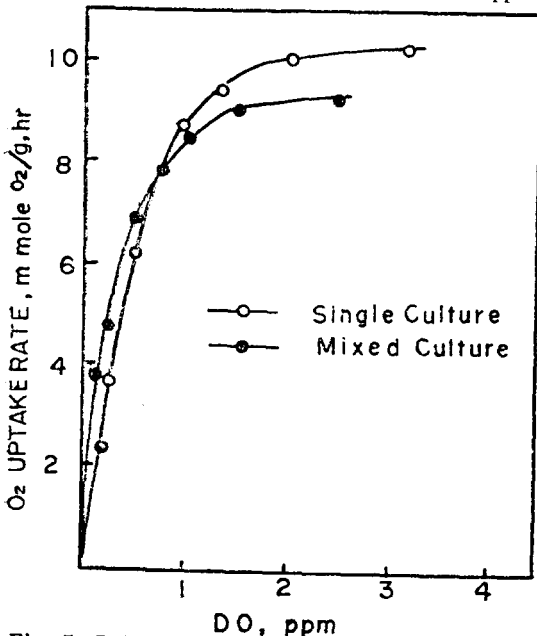


Fig. 5. Relationship between the oxygen uptake rate and the concentration of dissolved oxygen

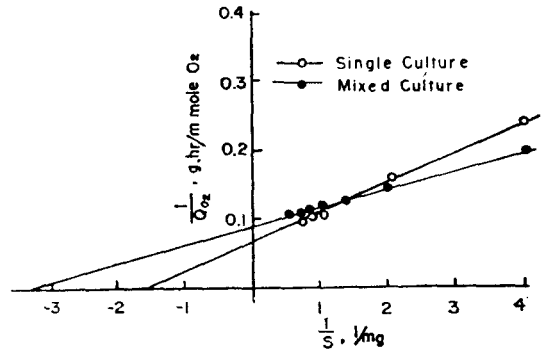


Fig. 6. Lineweaver-Burk plot of data in Fig. 5.

었다. 즉 단독배양일 때는 혼합배양에서 보다 산소에 대한 親和力이 낮음을 의미한다. 炭水化合物기질에 대해서는 많은 연구자들에 의하여 C_{crit} 및 K_m 值가 발표되었다. 그러나 탄화수소산화성효모에 대해서는 발표된 바 적다. Mimura⁽¹⁸⁾는 hexadecane을 기질로 했을때 *C. tropicalis*의 C_{crit} 및 K_m 은 각각 1~2 ppm, 0.74 ppm이며 발효기간동안 거의 변화없이 일정하다고 보고하였으며, Moo-Young⁽¹⁹⁾ 등은 *C. lipolitica*를 *n*-dodecane을 기질로 배양했을때 C_{crit} 및 K_m 은 각각 1.2 ppm, 0.8ppm이라 보고하였다. 또한 Sonoda⁽²⁰⁾ 등은 *Candida*屬 효모를 *n*-paraffin에 배양했을때 C_{crit} 은 2 ppm, K_m 은 0.22 ppm인 것으로 보고하였다.

혼합배양의 경우 C_{crit} 이상의 조건에서 산소소비속도

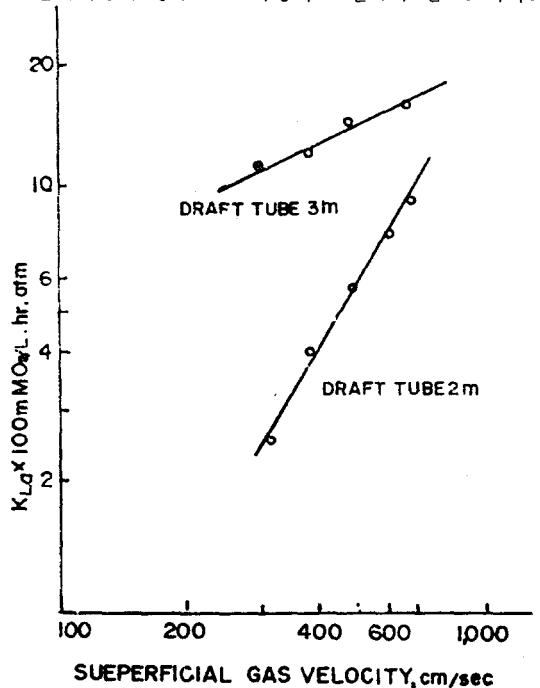


Fig. 7. Effect of superficial gas velocity on oxygen transfer coefficient in mixed cultures.

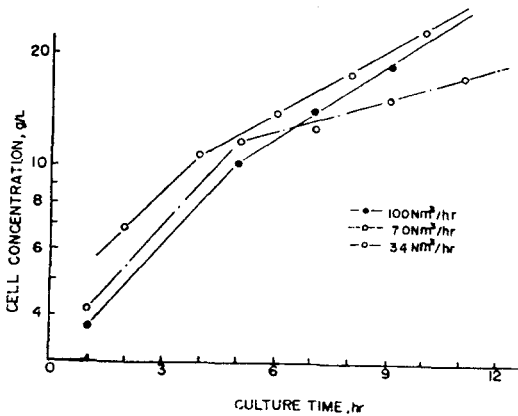


Fig. 8. Effect of aeration on the growth of mixed cultures in draft tube fermentor.

는 9.2 m mole O₂/g cell. hr이므로 15~20 g/L의 균체농도로 배양할 경우에 산소요구량은 138~184 m mole O₂/L. hr이다. 통상의 표준형발효조의 산소전달량은 50~100 m mole O₂/L. hr이므로 상술한 탄화수소배양계에 필요한 산소요구량을 만족시킬 수 없다. 따라서 본연구자들은 탄화수소발효에 적합한 특수한 형태의 draft tube 발효조를 연구, 개발하였으며(Fig. 1 참조), 상술한 혼합균주를 본발효조에서 배양하면서 定常狀態法으로 측정한 산소전달계수, K_La값은 Fig. 7과 같다. Fig. 7에서 보는바와 같이 K_La는 830~1400 m mole O₂/L. atm·hr이며, 산소전달량은 140~230 m mole O₂/L. hr로서 매우 우수하였으며 탄화수소배양계에 필요한 산소요구량을 만족시킬 수 있다. 또한 draft tube 발효조에서 통기량이 균체생육에 미치는 영향을 검토한 결과는 Fig. 8과 같다. 균체농도가 10 g/L이하에서는 통기량에 관계없이 비증식속도는 일정하였으며, 10 g/L이상에서는 모두 증식속도가 감소하였다. 이는 본발효조의 산소전달의 제한에 의한 것이 아니라 탄화수소油滴의 界面面積의 제한에 기인되는 것으로 판단할 수 있다.

한편 배양액중의 용존산소의 농도와 pH변화를 관찰해 본 결과, *C. tropicalis* var. KIST 76을 단독배양했을 때는 용존산소가 C_{crit}이하로 내려가도 pH가 상승하는 현상은 보이지 않았으며, pH저하속도는 용존산소와 相關이 있는 중요한 因子였다⁽¹⁹⁾. 그러나 혼합배양에서는 용존산소가 거의 0에 가까워 질수록 pH가 6~7로 급속히 상승하였으며 충분한 산소를 공급하면 pH는 다시 저하하는 현상을 나타내었다. *T. cutaneum* KIST 76-H를 포도당을 기질로 단독배양했을 때 산소공급이 제한되면 역시 pH가 급속히 상승하였는바 혼합배양에서 pH상승은 *T. cutaneum* KIST 76-H에 기인되는 것으로 생각된다.

3. 배양조건

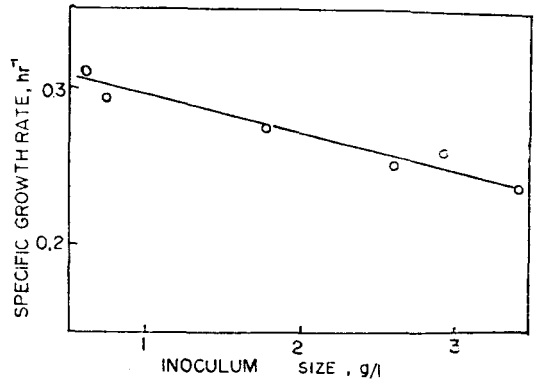


Fig. 9. Effect of inoculum size on specific growth rate of mixed cultures.

1) 접종량의 영향

접종량을 0.5~3.5 g/L범위로 변화시키면서 균체생육에 미치는 영향을 살펴본 결과는 Fig. 9와 같다. 접종량이 증가함에 따라 비증식속도는 감소하였으며 이는 Prokop⁽¹³⁾등과 Pilat⁽²²⁾등의 연구와 일치한다. 또한 Table 4에서 보는바와 같이 접종량이 증가하면 직선적 생육속도와 균체생산성이 약간 증가되었으며 총발효시간은 단축되었다. 이로 미루어 본 배양 조건은 여러가지 生育變數에 영향을 미친다는 것을 알 수 있으며, 다음의 실험에서는 가능한 한 접종량을 일정한 범위로 유지하도록 노력하였다. 접종량이 0.5 g/L이하일 때는 Fig. 9에 나타내지는 않았으나 誘導期가 매우 길고 비증식속도, 균체수율등이 不良하였다.

2) 최적배양온도

시험공장발효조에서 생육최적온도를 구명하기 위하여 다른 배양조건은 고정하고 배양온도를 26~36°C까지 변화시켰다. 각온도에서의 배양조건 및 생육 data는 Table 4(Run 14~16)와 같으며 주요 data는 Fig. 10에 圖示하였다. 비증식속도는 33°C에서 최고값 0.288hr⁻¹이였.

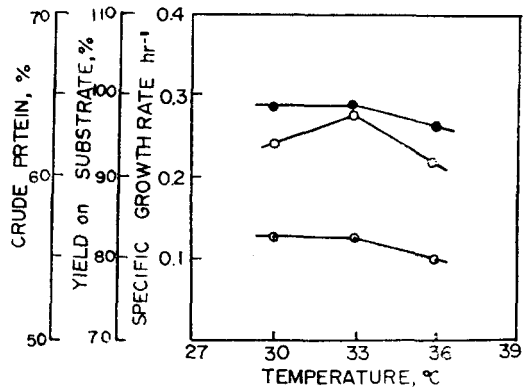


Fig. 10. Effect of temperature on the growth of mixed cultures.—○—specific growth rate; —●—yield on substrate; —□—crude protein.

Table 4. Growth parameters of mixed culture at different fermentation conditions

Parameter	Experimental number									
	Run 14	Run 15	Run 16	Run 17	Run 18	Run 19	Run 20	Run 21	Run 22	
<i>n</i> -Paraffin concentration (g/l)	14.2	13.8	13.8	13.8	13.8	13.8	13.8	13.8	13.8	7.07
Aeration (l/min)	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
Agitation (rpm)	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
Operating pH	4.0	4.0	4.0	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	4.0	
Operating temperature (°C)	30	33	36	33	33	33	33	33	33	
Inoculum size (g/l)	1.4	1.3	1.3	1.3	1.16	0.52	0.82	1.44	0.5	
Specific growth rate (hr ⁻¹)	0.243	0.288	0.216	0.290	0.295	0.320	0.267	0.231	0.300	
Linear growth rate (ml 28% NH ₄ OH/l. hr)	1.09	0.64	0.58	0.64	0.157	0.82	0.96	1.02	0.49	
Linear growth time (hr)	1.6	1.0	1.8	1.0	1.2	0.8	1.8	3	0.7	
Total fermentation time (hr)	10	10	9	10	9.5	7.5	11	10	12	
Alkali consumption per unit of biomass (ml 28%NH ₄ OH/g cell)	0.294	0.213	0.185	0.213	0.214	0.346	0.178	0.397	0.298	
Max. cell concentration (g/l)	15.4	14.9	14.6	14.9	14.4	15.0	13.7	15.00	8.02	
Yield of cells to substrate (%)	98.8	98.6	96.4	98.6	96.5	97.3	93.5	80.6	106.3	
Max. productivity (g/l. hr)	3.2	3.4	3.1	2.7	2.7	2.9	2.4	2.2	1.32	
Crude protein (%)	56.4	56.6	55.1	57.6	58.1	57.8	58.0	55.1	56.5	
Crude lipid(%)	—	5.7	6.2	5.7	6.3	5.5	5.2	5.9	—	

Parameter	Experimental number								
	Run 23	Run 24	Run 25	Run 26	Run 27	Run 28	Run 29	Run 30	
<i>n</i> -Paraffin concentration(g/l)	13.8	20.5	27.1	13.8	13.8	13.8	13.8	13.8	
Aeration (l/min)	30	30	30	20	20	20	20	20	
Agitation (rpm)	300	300	300	180	230	300	325	350	
Operating pH	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	
Operating temperature (°C)	33	33	33	33	33	33	33	33	
Inoculum size (g/l)	1.3	1.4	1.2	1.0	2.31	2.2	1.2	1.8	
Specific growth rate (hr ⁻¹)	0.288	0.271	0.266	0.149	0.190	0.285	0.301	0.330	
Linear growth rate (ml 28% NH ₄ OH/l. hr)	0.64	0.30	0.8	0.04	0.76	1.22	1.7	0.8	
Linear growth time (hr)	1.0	2.0	2.8	6.0	2.5	1.5	1.3	1.2	
Total fermentation time (hr)	10	14	16	17	14	10	8	9	
Alkali consumption per unit of biomass (ml 28% NH ₄ OH/g cell)	0.213	0.103	0.196	0.238	0.335	0.328	0.512	0.301	
Max. cell concentration (g/l)	14.9	20.6	23.2	12.3	16.11	16.3	15.0	16.3	
Yield of cells to substrate (%)	98.6	93.7	86.5	81.8	100	102	100	105.1	
Max. Productivity (g/l. hr)	4.0	2.7	2.5	1.55	1.7	3.3	3.3	3.55	
Crude protein (%)	56.6	57.6	56.9	55.6	55.2	55.3	55.7	57.6	
Crude lipid (%)	5.7	6.2	5.8	—	—	—	—	—	

으며, 30°C 및 36°C에서는 이보다 낮은 값을 보였다. 균체수율 및 단백질함량은 배양온도에 별 영향을 받지 않고 각각 98.8~96.4% 및 56.4~55.1% 범위였다. Table 4를 보면 단위균체량당 평균알카리소비량은 온도가 상승할수록 점차 감소하는 경향을 보였으며, 균체생산속도는 3.1~3.4 g/l. hr로서 전체적으로 매우 우수하였다. 이상으로 미루어 볼때 최적배양온도는 33°C 이나 보다 고온인 36°C에서 비증식속도가 약간 저하되는 것 이외에는 양호한 결과를 얻을 수 있으므로 냉각

비 절감을 기할 수 있을 것이다.

3) pH의 영향

생육 pH를 4.0~6.0사이에서 변화시켰을 때 생육 data는 Table 4(Run 17~21) 및 Fig. 11에 나타내었다. Fig. 11을 보면 비증식속도는 pH 5.0에서 가장 높은 0.32hr⁻¹였으나 pH 4.0에서는 0.29hr⁻¹로서 큰 차이가 없었다. 그러나 pH가 높아지면 비증식속도는 현저히 감소하여 pH 6.0에서는 0.23hr⁻¹였다. 균체단백질은 pH 5.5까지는 거의 변화없이 57%내외였으나 pH 6.0에

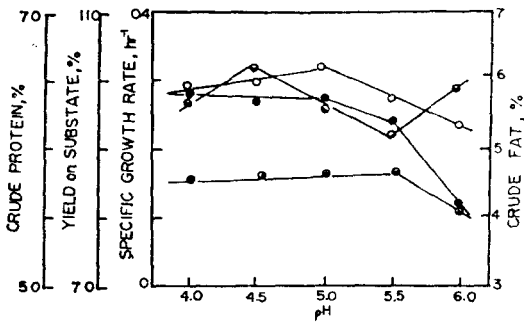


Fig. 11. Effect of pH on the growth of mixed culture. —○—specific growth rate; —●—yield on substrate; —○—crude protein; —●—crude fat.

서는 다소 낮은 55%이며, 균체지방은 일정한 경향을 나타내지 않았다. 또한 균체수율은 pH 5.0까지는 거의 일정한 97%정도였으나, pH 5.0이상에서는 급속히 감소하여 pH 6.0에서는 80.6%에 지나지 않았다. 이상의 결과를 종합해 볼 때 최적 pH는 5.0이나 4.0에서 배양하여도 비중식속도, 수율 및 균체성분에 현저한 영향을 미치지 않음을 알 수 있다. 따라서 배양관리상 낮은 pH에서 배양하는 것이 바람직하며, 살균하지 않은 배지로 장기간 pH 4.0에서 배양하여도 오염은 크게 문제되지 않았다.

4) *n*-Paraffin농도의 영향

n-Paraffin기질 농도를 1~4%로 변화시켰을 때 균체 생육에 미치는 영향은 Table 4(Run 22~25) 및 Fig. 12에 나타내었다. Fig. 12를 살펴보면 기질에 대한 균체 수율은 *n*-paraffin농도 1vol%에서 106%였으나 기질농

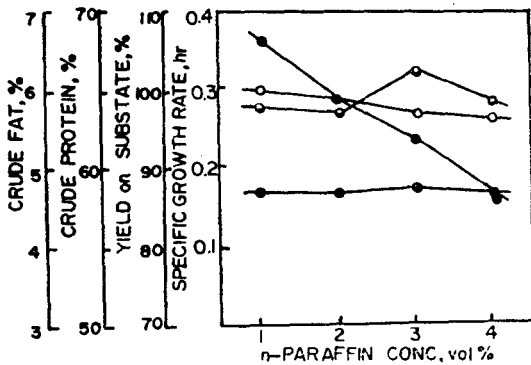


Fig. 12. Effect of *n*-paraffin concentration on the growth of mixed cultures. —○—specific growth rate; —●—yield on substrate; —○—crude protein; —●—crude fat.

도가 증가함에 따라 점차 감소하며 4 vol%에서는 86.5%로서 약 20%나 감소되었다. 한편 비중식속도는 기질농도가 증가함에 따라 현저한 변화는 보이지 않고 서서히 감소하여 0.30~0.266 hr⁻¹의 범위였으며, 단백질 및 지방함량도 거의 변화없이 각각 57%, 6%내외였다. Table 4의 균체생산성을 보면 2 vol%에서 가장 우수하였으며, 직선적 생육속도와 그 기간 및 총배양시간은 기질농도가 증가할 수록 점점 길어졌다.

醱酵費를 줄이기 위해서는 가능한 高濃度배양을 하는 것이 경제적이나 기질농도가 높아지면 균체수율이 상대적으로 감소하므로 어느농도에서 배양하는 것이 가장 경제적인가 하는 것은 매우 중요하다. 현재까지 국내외에서 발표된 상업규모의 경제성분석자료에 의하면 경제적인 균체농도는 20g/l내외, 균체생산성은 3.0g/l, hr정도이며 기질당 균체수율은 90~100%로 전망되고 있다.

5) 교반속도의 영향

표준형 6 blade turbine impeller 3개를 impeller 직경과 동일간격으로 shaft에 설치한 500 l발효조에서 교반속도가 균체증식에 미치는 영향은 Table 4(Run 26~30) 및 Fig. 13, 14와 같다. Fig. 13을 보면 비중식속도는 교반속도가 증가함에 따라 직선적으로 증가하였으며 균체수율은 230 rpm이상에서는 거의 변화없이 100%수준이었다. 이는 전술한바와 같이 비중식속도는 油滴의 크기에 의존되므로 교반속도가 증가하면 탄화수소粒子가 小滴으로 배양액에 乳化分散되기 때문이다. 한편 180 rpm의 低速에서는 탄화수소가 거의 분산되지 못하여 不均一液相을 형성하므로 대부분의 균체가 기질제한상태에서 생육하여 비중식속도, 단백질함량이 현저히 감소한다. 이와같은 현상은 Fig. 14에서 명백히 알 수 있다. 즉 180 rpm에서는 대수증식기가 나타나지 않고 전 발효기간을 통하여 기질제한에 의한 직선생육기만 나타

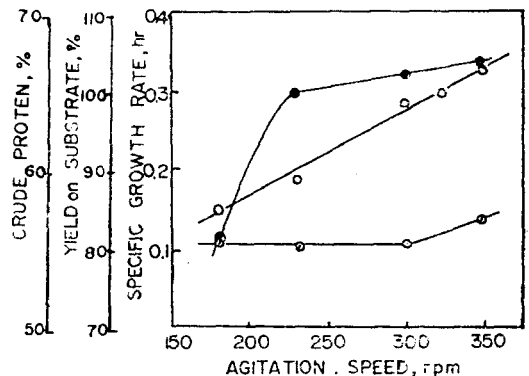


Fig. 13. Effect of impeller speed on the growth of mixed cultures. —○—specific growth rate; —●—yield on substrate; —○—crude protein; —●—crude fat.

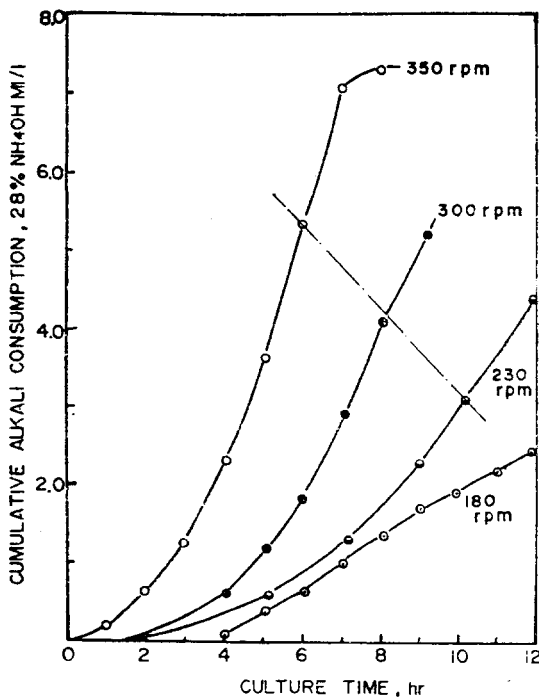


Fig. 14. Response of mixed cultures to different impeller speed.

났다. 한편 230 rpm 이상에서는 교반속도가 증가할수록 대수증식기는 길어지는 반면에 직선생육기는 단축되었다. 직선생육기가 나타나는 점들을 연결하면 點線으로 표시된 직선이 된다. Ochoa 등⁽¹⁷⁾의 연구에 의하면 이 직선은 일정한 界面面積을 나타내는 線으로 교반속도에 무관하게 界面面積이 일정한 값 이하에 도달하면 기질제한을 받게 됨을 의미한다.

요 약

탄화수소산화성균주인 *C. tropicalis* var. KIST 76과 非好化성균주인 *T. cutaneum* KIST 76-H의 혼합배양을 이용한 炭化水素酵母의 생산기술을 개발하기 위하여 시험공강규모의 回分배양연구를 수행하였는바 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. *C. tropicalis* var. KIST 76과 *T. cutaneum* KIST 76-H는 안정한 혼합培養界를 형성하며 균체수율, 단백질함량 및 균체생산속도는 각각 102%, 57.6% 및 3.2 g/l,hr로서 단독배양의 71%, 52% 및 2.4 g/l,hr에 비하여 현저히 향상된 우수한 産業菌株임을 알았다.
2. 혼합배양균주의 臨界溶存산소농도 및 親和性, km 값은 각각 1.5 ppm, 0.228 ppm이었으며 최적조건에서

산소요구량은 9.2 mmole O₂/g cell,hr였다. 한편 시험공장 발효조의 산소전달량은 140~230 m mole O₂/l,hr로서 필요한 산소량을 공급할 수 있었다.

3. 혼합균주의 생육適溫은 33~36°C였으며 최적 pH는 5.0이다. 그러나 pH 4.0에서 비증식속도, 균체생산성, 균체성분에 큰 영향을 주지 않고 無殺菌조업이 가능하였다.
4. 최적 *n*-paraffin 농도는 1.5~2 g/l이며 기질농도가 증가할수록 균체수율은 감소하였으나 비증식속도, 균체성분에는 큰 영향이 없었다.

참 고 문 헌

- 1) 권태완, 민태익, 박용, 변유량: 한국식품과학회지, 2, 56(1970).
- 2) 박용, 민태익, 변유량, 권태완: 한국식품과학회지, 2, 61 (1970).
- 3) 변유량, 권태완: 한국미생물학회지, 9, 95 (1971).
- 4) 이용현, 변유량, 권태완: 한국식품과학회지, 4, 200 (1972).
- 5) 변유량, 권태완, 지규만, 김춘수: 한국식품과학회지, 4, 252 (1972).
- 6) 권태완등: 단세포단백질의 국내생산에 관한 연구 (3), 한국과학기술연구소, 서울 (1971).
- 7) 권태완등: 단세포단백질의 국내생산에 관한 연구 (4), 한국과학기술연구소, 서울 (1972).
- 8) Miller, T. L. and Johnson, M. J.: *Biotechn, Bioeng.*, 8, 549 (1966).
- 9) Private communication
- 10) 青木: 日本開發銀行調査日報, 3 (1970. 6).
- 11) 권태완등: 단세포단백질의 국내생산에 관한 연구 (5), 한국과학기술연구소, 서울 (1974).
- 12) Wang, D. I-C. and Hatch, R.T.: *Proceedings I.S.F.M.*, 201 (1971).
- 13) Prokop, A., Erickson, L.E. and Paredes-Lopez, O.: *Biotechn Bioeng.*, 13, 241 (1971).
- 14) Humphrey, H.E. and Erickson, L.E.: *J. Appl. Chem Biotechnol.*, 4, 126 (1972).
- 15) Ochoa, A.: *M. Sc. Thesis, Dept Nutrition Food Sci.*, Cambridge, Mass, (1971).
- 16) Peri, P: *UNIDO Expert Group Meeting on the Manufacturing Proteins from Hydrocarbons* (Oct. 1973, Vienna).
- 17) 高橋穰三: 石油と微生物, No. 10, 41 (1973).
- 18) Mimura, A.: *J. Ferment Technol.*, 4S, 449 (1970).

- 19) Moo-Young, M., Simzu, T. and Whitworth, D.A.: *Biotechn. Bioeng.*, **13**, 741 (1971).
- 20) Sonoda, Y., Someya, J. and Futai, N.: *J. Ferment. Technol.*, **7**, 479 (1973).
- 21) Chepigo, S.V.: *17th World Petroleum Congress Mexico, April* (1967).
- 22) Pilat, P., Prokop, A. Fencl, Z. and Panos, J.: *J. Ferment. Technol.*, **51**, 236 (1973).