

# Methanol 을 이용한 단세포단백질의 생산에 관한 연구

(제 1 보) Methanol 이용미생물의 분리 및 배지조성

유 주 현 · 정 건 섭 · 변 유 량

연세대학교 식품공학과  
(1978년 5월 30일 수리)

## Production of Single-Cell Protein from Methanol

(Part 1) Isolation of Methanol-Utilizing Microorganism and  
Composition of Medium

Ju Hyun Yu, Kun Sub Chung and Yoo Ryang Pyun

Department of Food Engineering, Yonsei University, Seoul, Korea.

(Received May 30, 1978).

### Abstract

By the successive enrichment culture, methanol-utilizing bacteria of 213 strains were isolated from soil samples collected from various places. Among them one strain showing excellent growth was selected.

The organism isolated was obligate methylotroph and identified as *Methylomonas methanolica* on the basis of its morphological and physiological characteristics of the cell.

The medium have been to be collected for the maximum biomass productivity. The microorganism was capable of growing satisfactorily on a medium containing only methanol 0.8% (v/v), ammonium sulfate 0.6%, magnesium sulfate 0.1%, phosphate salts, but did not require growth factor.

### 서 론

세계적으로 부족되는 단백질의 개발을 위한 한 가지 방법으로 미생물단세포 단백질 (Single-Cell Protein, 이하 SCP 로 생략)을 사료 혹은 식용으로 이용하려는 생각이 오래전부터 진행되어 왔다.

SCP는 값싼 원료로부터 많은 량을 생산할 수 있어야 하고, 또한 단백질함량이 높아야 한다. 이런 관점에서 볼 때 methanol은 값이 싼 탄소원이 고, 수용성이며, 또한 한정된 미생물만이 이를 이용할 수 있으므로 발효중의 오염을 최소로 줄일 수 있는 잇점을 지닌 SCP 생산의 원료가 되므로<sup>(1,2)</sup> 이를 이용하여 단백질함량이 높은 세균을 생산하는 것은 매우 흥미있는 일이다<sup>(3)</sup>.

Von Söhngen은 1906년 C<sub>1</sub>-화합물 이용미생물에 관하여 보고한 바 있으나, 이는 단지 실험실적 호기성에 지나지 않았었고, 그 후 1966년까지는 단지 3종류의 methanol 이용미생물만이 보고되었다. Cooney와 Levine<sup>(4)</sup>은 1972년 많은 C<sub>1</sub>-화합물 이용 미생물에 대한 종합보고를 하였다.

그러나 우리 나라에서는 탄화수소를 원료로 한 SCP 생산에 대한 연구<sup>(4,5)</sup>는 많이 있었지만, methanol을 원료로 하여 SCP를 얻으려는 시도는 1976년 Hong 등<sup>(6)</sup>의 methanol 이용효모 및 세균의 분리와 Kim 등<sup>(7)</sup>의 연구가 있다. 본 연구에서는 methanol 이용세균을 토양으로부터 분리한 다음, 생리학적, 형태학적 성질을 조사하여 동정하고 이 미생물의 균체생산량을 증가시키기 위하여 영양조건을 조사하였기에 보고한다.

## 실험재료 및 방법

### Methanol 이용미생물의 분리

토양과 하수로부터 methanol 을 이용하는 세균을 분리하기 위하여 Häggström<sup>(8)</sup>의 mineral-salts media(이하 MSM 으로 생략)를 사용하였다. 이 배지의 조성은 NH<sub>4</sub>Cl 8 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2 g, FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 83.5 mg, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 3.3 mg, ZnCl<sub>2</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.9 mg, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.8 mg, MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.8 mg, methanol 15 ml, 증류수 1,000 ml, pH 6.0 이며, 고체배지는 MSM 에 1.7%의 한천을 넣어 사용하였다.

일정량의 토양과 하수를 10 ml MSM 에 넣어 30°C 진탕배양기에서 5일간 배양한 후 새로운 배지에 일정량씩 옮겨 같은 방법으로 2회 반복 진탕 배양한 후 평판배양법<sup>(9)</sup>에 의하여 methanol 이용세균을 분리하여 사면배지에 보관하였다.

### 균주의 선별

삼각 flask 250ml 짜리에 : 250ml MSM 을 넣고 분리한 methanol 이용세균을 1백금이씩 접종하여 30°C 진탕배양기에서 2일간 배양한 후 620nm 에서 흡광도를 측정하여 가장 높은 흡광도를 나타내는 균주를 선별하여 본 실험에 사용하였다.

### 균주의 동정

선별한 균주의 동정은 "Bergey's Manual of Det

rminative Bacteriology (8th ed.)"<sup>(10)</sup>과 다른 연구 논문등<sup>(11-17, 21-24)</sup>을 참조하여 동정하였다.

여러종류 탄소원의 이용에 대한 실험은 MSM에서 methanol 대신 다른 탄소원을 0.5% 함유한 배지를 사용하였으며, formate 나 formaldehyde 와 같은 독성물질은 0.01% 농도로 하여 실험하였다.

## 실험결과 및 고찰

### 1. Methanol 이용성이 높은 균주의 선별

토양과 하수로부터 분리한 213 주의 methanol 이용미생물들은 분홍색을 나타내는 균주 67 주, 노란색 48 주, 흰색 98 주, 이었다. 이 중에서 생육이 비교적 좋은 미생물 5주를 선별하였는데, 이들은 모두 흰색을 나타내는 균이었으며, 성질은 Gram 음성, 간균형이고 운동성을 갖고 있었다. 2차 선별과정을 통하여 이 중에서 생육이 가장 좋은 균주 하나를 선별하여 실험에 사용하였다.

### 2. 균주의 동정

선별한 균주의 형태적 특성은 고체배지상에서 colony 는 circular, convex, creamy white, mucoid appearance 이었고, 전자현미경관찰에서 간균형으로 크기는 0.5~1.2 μm, 單毛균이었으며, 내생포자는 관찰되지 않았다. 생리적 특성은 절대호기성이고, methanol 이외의 탄소원에서는 생육하지 않았으며(methane 이용성에 대한 실험은 하지 못함) 생육인자를 요구하지 않고, catalase test 와 oxidase

Table 1. Comparison of the Isolate with Other Methanol-Utilizing Bacteria.

Microorganisms	Yield	Form	Flagella	Color	Size (μm)	Growth temp. (°C)	Methane	Methanol	Formaldehyde	Formate	Ethanol	Acetate	Glucose	Starch	Peptone	Alkylamine	Reference
Isolate	0.48	r	po	cw	0.5×1.2	30-35	*	++	-	-	-	-	-	-	-	-	this work
<i>My. methanolica</i> nov. sp.	*	r	po	cw	0.5×1.5	20-37	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	(14)
<i>My. methanolica</i>	*	r	po	cw	0.6×1.6	30	*	++	*	*	*	*	*	*	*	*	(17)
<i>P. methanica</i>	*	r	po	p	0.6×1.8	30-37	+	++	-	-	-	-	-	-	-	*	(22)
<i>Mn. methylovora</i>	*	s	po	cl	*	20-30	-	++	*	-	-	-	-	-	-	-	(23)
Bacteria C2A1	*	s	po	cl	*	*	-	++	*	-	-	-	-	*	*	+	(24)
<i>P. AM1</i>	0.2	r	po	p	0.5×2.0	25-30	-	++	-	+	+	-	+	*	*	+	(11)
<i>P. C.</i>	0.31	s	po	p	*	28-40	-	++	-	-	+	*	+	+	-	-	(16)
<i>P. M27</i>	*	r	po	p	0.8×2.6	30	-	++	-	+	-	+	-	*	+	+	(21)

Symbols; *My.*; *Methylomonas*, *P.*; *Pseudomonas*,  
*Mn.*; *Methanomonas*, r; rod, po; polar flagella, cw; creamy white, cl; colorless, p; pink,  
 \*; not test,

**Table 2.** Comparison of the Isolate with *Methylomonas methanolica* nov. sp.

Microorganisms	<i>My. methanolica</i> nov sp.	Isolate
Physiological Characteristics		
Obligateaerobic	+	+
Optimum pH	6.8-7.5	6.3
Optimum temp.	30°C	33°C
Assimilation of nitrate	+	+
Reduction of nitrate to nitrite	+	+
Indole production from methanol bouillon	-	-
Hydrolysis of starch	-	-
Hydrolysis of gelatin	*	-
H <sub>2</sub> S production	-	-
Litmus milk containing methanol	-	-
Voges-Prokauer test	*	-
Catalase test	*	+
Oxidase test	*	+
Utilization of Carbon Sources		
Glucose	-	-
Fructose	-	-
Ribose	-	-
Lactose	-	-
Ethanol	-	-
n-Propanol	-	-
i-Propanol	-	-
n-Butanol	-	-
i-Butanol	-	-
Na-Formate	-	-
Na-Acetate	-	-
Na-Oxalate	-	-
Na-Tartarate	-	-
Na-Citrate	-	-
Glycine	*	-
Alanine	*	-
Serine	*	-
Glutamic acid	*	-
Requirement of growth factors	-	-

\*; no report

test 는 양성을 나타냈다 (Table 1, 2)

이런 선별균주의 특성은 "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (8th ed.)"<sup>(10)</sup>의 *Methylomonas* 屬 특성과 잘 일치하므로 이 屬의 미생물로 생각된다. 특히 Table 2에서 Amano 등<sup>(14)</sup>이 보고한 *Methylomonas methanolica* 와 비교한 바와 같이 생육최적 pH 와 온도에서만 약간의 차이를 보일뿐 모든 형태적 생리적 특성이 서로 같으므로 선별한 균주는 *Methylomonas methanolica* 로 동정

되며, *Methylomonas methanolica* YUFE 101 로 명명하였다.

Whittenbury 등<sup>(18)</sup>의 1970 년 연구가 있기전까지만 해도 methane 과 methanol 이용세균에 대한 분류는 명확하지 못하였었다. Forster 등<sup>(12)</sup>은 1966년 에 obligate methylotrophs 에 "*Methylo-*"라는 접두어를 사용하였는데, Whittenbury 등의 연구에서는 Methyl group 을 이용할 수 있는 methylotrophs 에 공통으로 "*Methylo-*"를 사용하였다.

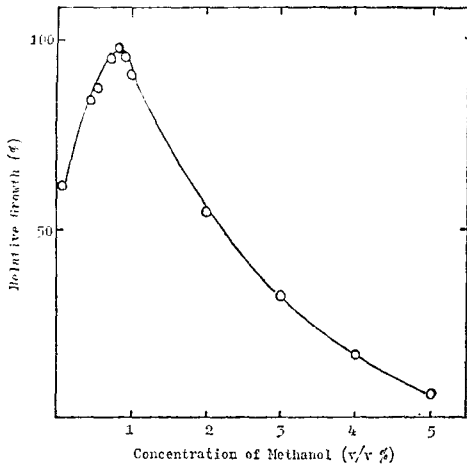


Fig. 1. Effect of Methanol Concentration on the Growth.

C<sub>1</sub>-화합물이용미생물은 methane 이나 methanol 에서만 생육하는 obligate methylotrophs 와 methane 에서는 생육하지않지만, methanol 이나, methyl amine, formate 혹은 그밖의 유기화합물을 탄소원으로 이용할 수 있는 facultative methylotrophs 로 나누어진다<sup>(13)</sup>. 이런 관점에서 볼 때 선별한 균주는 obligate methylotrophs 라 할 수 있다.

### 3. *Methylomonas methanolica* YUFE 101 의 배양조건

#### 탄소원의 영향

분리 동정한 균주의 생육에 대한 탄소원 종류별 영향을 본 결과 Table 1, 2에서 보는 바와 같이 methanol 이외의 다른 C<sub>1</sub>-화합물이나, 유기화합물 등은 탄소원으로 이용되지 않았으며, 단지 methanol 만이 탄소원 및 에너지원으로 이용되었다. 초기 methanol 농도에 따른 육생에 대한 영향은 Fig. 1에 나타내었는데, 초기 methanol 농도 0.8% (v/v) 까지는 생육이 증가되었고, 그 이상의 농도에서는 생육이 억제되기 시작하여 5% (v/v)에서는 완전히 억제되었는데, 이는 다른 methanol 이용미생물과 유사함을 보여주었다. 즉, Kaneda 등<sup>(19)</sup>은 초기 methanol 농도 1.0%에서 생육이 억제되기 시작한다고 보고하였으며, Chen 등<sup>(20)</sup>은 0.1% (w/v)까지는 급속히 생육이 증가되다가 0.1~0.3% (w/v) 사이에서는 거의 일정하며 4.6% (w/v)에서 생육이 완전히 억제된다고 보고하였다.

#### 질소원의 영향

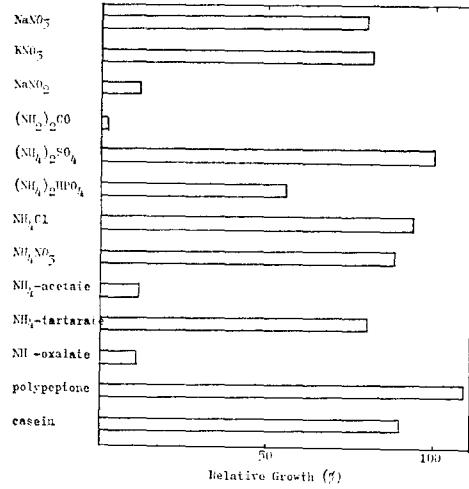


Fig. 2. Effect of Various Nitrogenous Compounds on the Growth.

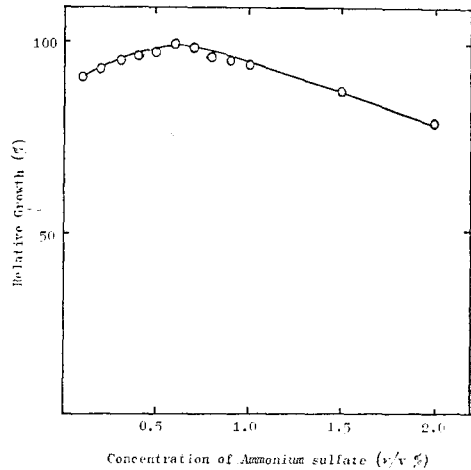


Fig. 3. Effect of Ammonium Sulfate Concentration on the Growth.

질소원을 제외한 MSM 에 Fig. 2에 표시한 여러 종류의 질소원을 1.0%씩 첨가하여 배양한결과 무기질소원으로는 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 첨가하였을 때 가장 생육이 좋았으며 유기질소원인 polypeptone을 첨가하였을때는 이보다 조금 더좋은 생육을 보여주었으나, 근소한 차이가 있었다. (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>의 농도 별 변화에 따른 생육의 변화는 0.6%일때 가장 좋은 생육을 나타냈으며, 그 이상의 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>농도에서는 서서히 생육이 저해되었다(Fig. 3).

#### 금속이온의 영향

MSM 에서 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 와 미량금속원소들을 제외한 배지에 각 금속이온을 0.01%씩 첨가하여 배

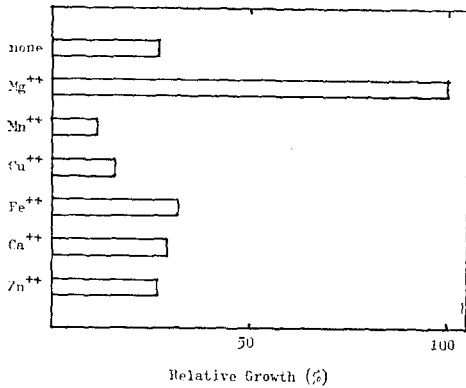


Fig. 4. Effect of Various Metal Ions on the Growth.

양하였다.  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 를 넣었을 때는 넣지 않았을 때보다 3배정도 생육의 증가를 보였으나,  $Mn^{++}$ 과  $Cu^{++}$ 에서는 약간의 저해효과를 나타냈을 뿐 별다른 영향을 보여주지 않았다(Fig. 4).

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$  농도별 생육에 대한 영향을 Fig. 5에 표시했는데 0.005%까지는 급속한 생육의 증가를 보였으나, 0.1%이상에서는 거의 같은 정도의 영향을 나타냈으므로 이하에서는  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 의 농도를 0.1%로 했으며, 다른 금속이온들을 넣지 않았다.

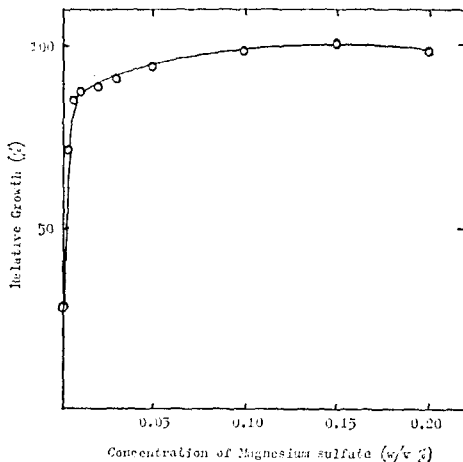


Fig. 5 Effect of Magnesium Sulfate Concentration on the Growth.

#### 생육인자의 영향

여러가지 생육인자들을 MSM에 각 농도별로 첨가하였을 때와 첨가하지 않았을 때의 생육을 비교해본 결과는 Table 3에 나타낸 것과 같이 polypeptone을 첨가하였을 때만 약간의 증가를 보였을 뿐 다른 복합유기화합물이나 vitamine을 첨가하였을

Table 3. Effect of Growth Factors on the Growth.

Nutrient	Concentration	Relative growth (%)
NONE		100
Polydeptone	0.005, 0.01%	102
Meat extract	0.005, 0.01%	98
Yeast extract	0.005%	86
	0.01%	93
Casein	0.005%	86
	0.01%	71
Vitamin		
thiamin·HCl	0.025, 0.05mM	99
Biotin	0.025, 0.05mM	97
Tocopherol	0.025, 0.05mM	100
Folic acid	0.025mM	97
	0.05mM	99
Ca-pantothenate	0.025mM	93
	0.05mM	95

때는 오히려 생육저해현상을 나타냈는데 이는 Amano 등<sup>(14)</sup>의 보고와 같았다.

"Bergy's Manual of Determinative Bacteriology (8th ed.)"<sup>(10)</sup>에 의하면 *Methylomonas*속 미생물은 유기화합물의 생육인자를 요구하지 않는다는 사실로 보아서 이 미생물은 생육인자들이 생육증가에 영향을 미치지 못하거나 또는 오히려 생육을 저해하는 현상의 결과는 이속 미생물의 특성으로 생각된다.

#### 요 약

SCP 생산을 위하여 토양과 하수로부터 methanol을 탄소원 및 에너지원으로 이용하는 세균을 분리하여 이중 생육이 우수한 균주를 선별하였고, 이의 형태적 생리적 특성을 조사하여 동정하였다. 그리고 탄소원, 질소원, 금속이온, 생육인자 등이 생육에 미치는 영향을 조사하여 영양조건을 최적화한 결과를 다음과 같이 얻었다.

1) 우량균주로 선별한 균주는 탄소원으로서 methanol 이외의 다른 유기화합물에서는 생육이 되지 않는 obligate methylotrophs로서 형태적 생리적 특성을 근거로 *Methylomonas methanolica*로 동정되었다.

2) 최적영양조건은 초기 methanol 농도 0.8% (v/v), 질소원은  $(NH_4)_2SO_4$  0.6%, 금속이온은  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.1%이었다.

## Reference

- 1) Cooney, L., Levine, D.W., Snedecor, B. : *Food Technol.*, **29**, 33 (1975).
- 2) Snedecor, B., Cooney, C.L. : *Appl. Microbiol.*, **27**, 1112 (1974).
- 3) MacLennan, D.G., Gow, J.S., Stringer, D. A. : *Process, Biochem.*, **8**, 22 (1973).
- 4) 권태완, 민태익, 박용, 변유량 : 한국식품과학회지, **2**, 56 (1970).
- 5) 강효원 : 산업미생물학회지, **2**, 155 (1974).
- 6) 홍순우, 태숙영, 강은희 : 미생물학회지, **14**, 189 (1976).
- 7) Kim, J.H., Ruy, D.Y. : *J. Ferment. Technol.*, **54**, 427 (1976).
- 8) Häggström, L. : *Biotechnol. Bioeng.*, **11**, 1043 (1969).
- 9) 유주현, 양용, 양한철, 정동효 : 식품공학실험, 탐구당, p.54 (1975).
- 10) Buchanan, R.E., Biggson, N.E. : *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., Williams & Wilkins Co., Baltimore (1974).
- 11) Peel, D., Quayie, J.R. : *Biochem. J.*, **81**, 465 (1961).
- 12) Foster, J.W., Davis, R.H., *J. Bacteriol.*, **91**, 1924 (1966).
- 13) Dahl, J.S., Mehta, R.J. : *J. Bacteriol.*, **109**, 916 (1972).
- 14) Amano, Y., Sawada, H., Takada, N., Terui, G. : *J. Ferment. Technol.*, **53**, 315 (1975).
- 15) Kouno, K., Ozaki, A. : *Microbial Growth on C<sub>1</sub>-Compounds* (Tokyo) p.11 (1975).
- 16) Chalfan, Y., Mateles, R.I. : *Appl. Microbiol.*, **23**, 135 (1972).
- 17) Dostalek, M., Häggström, L., Molin, N. : Proc. IV IFS; *Ferment. Technol. Today*, 497 (1972).
- 18) Whittenbury, R., Phillips, K.C., Wilkinson, J.F. : *J. Gen. Microbiol.*, **61**, 205 (1978).
- 19) Kaneda, J., Roxburg, J.M. : *Can. J. Microbiol.*, **5**, 87 (1959).
- 20) Chen, B.J., Lim, H.G., Tsao, G.T. : *Biotechnol. Bioengin.*, **18**, 1629 (1976).
- 21) Anthony, C., Zatman, L.J. : *Biochem. J.*, **92**, 609 (1964).
- 22) Harrington, A.A., Kallio, R.E. : *Can. J. Microbiol.*, **6**, 1 (1960).
- 23) Kouno, K., Oki, T., Nomura, H., Ozaki, A. : *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **19**, 11 (1973).
- 24) Colby, J., Zatman, L.J. : *Biochem. J.*, **128**, 1373 (1972).