

# Methanol을 이용한 단세포단백질 생산에 관한 연구 (제 2 보), *Methylomonas methanolica* YUFE 101의 회분발효와 연속발효

유주현 · 정건섭 · 변유량  
연세대학교 식품공학과  
(1978년 5월 30일 수리)

## Production of Single-Cell Protein from Methanol (Part 2). Batch Fermentation and Continuous Fermentation by *Methylomonas methanolica*

Ju Hyun Yu, Kun Sub Chung, and Yoo Ryang Pyun  
Department of Food Engineering, Yonsei University, Seoul, Korea.  
(Received May 30, 1978)

### Abstract

The growth characteristics of *Methylomonas methanolica* YUFE 101, isolated from sewage samples, have been studied. conclusions of the study were;

- (1) Optimum cultivation pH and temperature are 6.3 and 32.5°C respectively
- (2) The specific oxygen uptake rate was 332  $\mu\text{l}/\text{mg-dry weight}/\text{hr}$ .
- (3) The maximum specific growth rate was 0.19  $\text{hr}^{-1}$  and cellular yield was 0.43 g-dry cell/g-methanol in batch culture,
- (4) The maximum biomass productivity achieved was 0.21 g-dry cell/l/hr at a dilution rate of 0.1  $\text{hr}^{-1}$  during continuous cultivation.
- (5) The contents of crude protein and total nucleic acid in the dry cell were 73 % and 12 % respectively.

### 서 론

전보<sup>(1)</sup>에서는 methanol을 자화하는 균주를 분리하여 *Methylomonas methanolica*로 동정하고, 이의 영양조건을 검토한 결과를 보고하였다. 여기서는 이 균주의 물리적 조건에 대하여 검토한 다음, 회분발효와 연속발효를 실시하여 균체의 생산성을 비교하였다. 또한 생산된 건조균체의 단백질과 핵산함량을 조사한 결과를 보고한다.

### 실험재료 및 방법

#### 실험균주 및 배양방법

하수로부터 분리한 *Methylomonas methanolica* YUFE 101<sup>(1)</sup>을 사용하였으며 사용한 배지조성은 배지 1l당  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  6g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  4g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

6g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1g, methanol 8ml를 함유하도록 하였다. 그리고 pH는 6.3으로 조절하였다. 이때 사용한 methanol은 공업용 methanol을 사용하였다.

#### 균체량의 측정법

균체생육은 620nm에서의 흡광도를 측정하여 정하였으며<sup>(2)</sup>, 균체의 건조중량은 배양액을 8,000rpm에서 10분간 원심분리한 후 증류수로 세척하여 100~110°C에서 24시간 건조시켜 측정하였다<sup>(3)</sup>. 620nm에서의 흡광도와 균체건조중량 사이에는  $D_w (\text{g-dry cell}/\text{l}) = 0.21 + (0.9 \times \text{absorbancy})$ 가 성립하였다.

#### 산소 소비량 측정법

산소 소비량은 Warburg manometer을 사용하여 32°C에서 측정하였다. 이때 주실에는 시료 (3mg-

dry weight/ml) 0.5 ml 와 methanol 을 제외한 배지 10 ml 을, 부실에는 CO<sub>2</sub> 흡수제인 2 N-KOH 0.5 ml 을 넣고, 촉질에는 기질 (methanol 100 μmole/ml) 1.0 ml 을 넣었다(4,5). 비산소 소비속도 Q<sub>O<sub>2</sub></sub> 값은 μl/mg-dry weight/hr 로 표시하였다.

#### Methanol, 단백질, 핵산의 분석법

배양액속의 methanol 농도는 Boos 등(6)의 방법에 따라 KMnO<sub>4</sub> 를 사용하여 formaldehyde 로 산화시킨후 chromotropic acid 로 발색시켜 580 nm 에서 흡광도로 측정하였다. 단백질 함량은 건조균체를 water bath 에서 1 N-NaOH 로 15분간 처리한후 Biuret 법(7)으로 측정하였다. 총 핵산함량은 Ohta 등(8)의 방법에 따라 1 N-perchloric acid 로 70°C 에서 20분간 추출하여 260 nm 에서 흡광도를 측정하여 정하였다.

#### 연속배양법

연속배양 실험은 1 l 용 New Brunswick BioFlo model-C 30 chemostat 로 행하였다. 이때의 배양온도는 32°C, 통기량은 0.2~0.3 vvm, 교반속도는 700 rpm 이었으며 배지는 peristaltic pump 로 일정량씩 급입하였고, 발효조의 운전용적은 overflow assembly(9)를 이용하여 550 ml 로 일정하게 유지시켰다. 배양중 거품을 방지하기 위하여 소포제인 polypropylene glycol-2,000 을 사용하였다.

정상상태에서의 균체수율은  $Y_x = x / (S_0 - S)$  식으로부터 구하였으며, Y<sub>x</sub> 는 균체수율, X 는 균체농도, S<sub>0</sub> 는 초기 methanol 농도, S 는 정상상태의

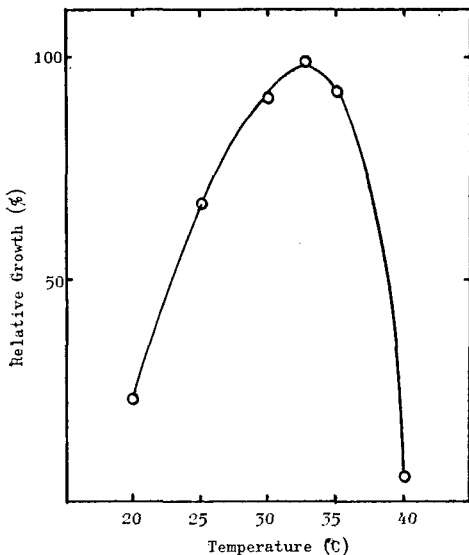


Fig. 1. Effect of Temperature on the Growth.

발효조 내의 methanol 농도이다.

### 실험결과 및 고찰

#### 1. 배양온도의 영향

배양온도가 균체생육에 미치는 영향을 Fig. 1 에 표시하였다. 25~35°C 사이에서 생육이 가능하였고, 생육 최적온도는 32~33°C 로 보여주었으나, 40°C 이상에서는 생육이 되지않았다.

#### 2. pH 의 영향

본 실험균주의 생육에 미치는 초기 pH 의 영향은 Fig. 2 와 같았다. pH 5.5—pH 7.0 사이에서 생육이 가능하였으며, 생육 최적 pH 는 p 6.3 부근이었다.

#### 3. 비산소 소비속도

비산소 소비속도를 측정할 결과 332 μl/mg-dry wt. /hr 로 구해졌는데, 이 값은 Kim 등(10)이 *Methylomonas* sp. 에 대하여 구한 Q<sub>O<sub>2</sub></sub> 값인 403 μl/mg-dry wt. /hr, Amano 등(11)이 *Methylomonas methanolica* nov. sp. 에 대하여 구한 343.8 μl/mg-dry wt. /hr 보다 약간 작은 값이긴하지만 거의 유사한 값을 나타내었다.

#### 4. 회분배양

배양 최적조건에서 실험실 규모의 1 l 발효조를 이용하여 Fig. 3 과 같은 생육곡선을 얻었는데 이 곡선

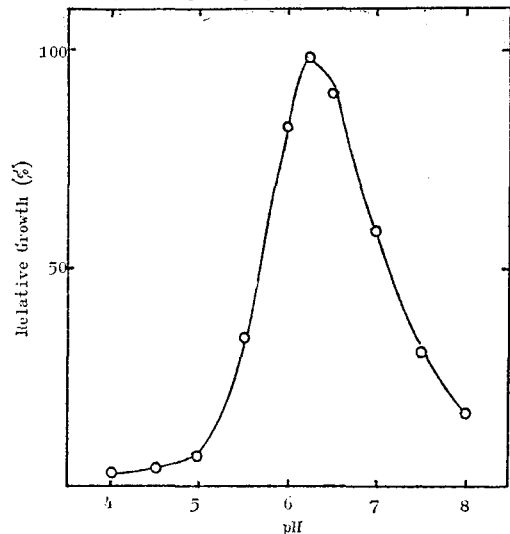


Fig. 2. Effect of Initial pH of Medium on the Growth.

의 대수증식기에서 산출할 최대 비증식속도는  $0.19 \text{ hr}^{-1}$ 이었으며, 접종후 45 시간 뒤에 균체 최대생육을 보였으며, 이때의 균체수율은  $0.47 \text{ g-dry cell/g-methanol}$ 이었다.

### 5. 연속배양

연속배양은 회석율  $0.05 \text{ hr}^{-1}$ 에서부터  $0.2 \text{ hr}^{-1}$  범위내에서 실험하였는데, 각 회석율의 변화에 따른 균체농도와 methanol 소비량의 관계를 Fig. 4에 나타냈다. 회석율이 증가함에 따라 발효조 내의 균체농도는 점차적으로 감소되어  $D=0.1 \text{ hr}^{-1}$  이상에서는 현저히 감소하였으며,  $D=0.175 \text{ hr}^{-1}$ 에서는 거의 wash out 되었다.  $D=0.1 \text{ hr}^{-1}$  이내에서의 균체농도는 최분배양시 최종농도의 70~80 % 수준을

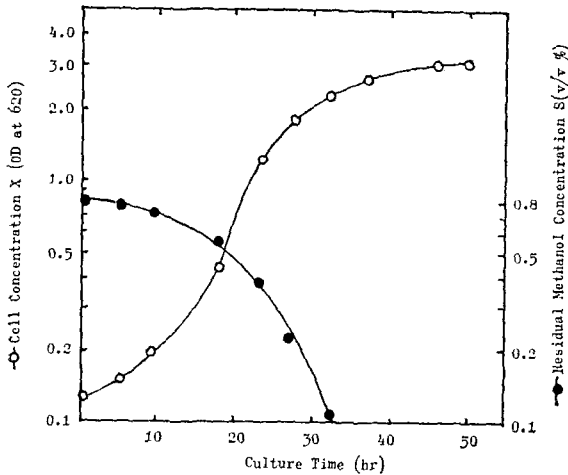


Fig. 3. The Typical Growth Curve in Batch Culture.

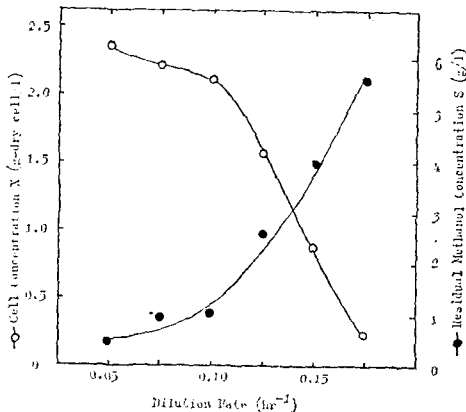


Fig. 4. Cell Concentration and Residual Substrate at Different Dilution Rates during Continuous Cultivation.

유지하고있었다. 연속배양중 기질로 공급한 methanol 중 상당량이 소비되지않고 남아있었는데  $D=0.1 \text{ hr}^{-1}$ 에서는 초기 methanol 농도의 약 20 % 정도가 이용되지않고 있었다. 이 현상은 연속배양의 특성으로 생각되는데, Dostálek 등<sup>(12)</sup>은 이런 소비되지않은 기질의 손실을 줄이기 위하여 two-stage process 를 개발하였는데, 첫째 단계에서는 methanol 을 균체생산이 최대로 얻어지는 농도로 해서 배양하였으며, 둘째 단계에서는 이 배양액의 methanol 농도가  $300 \mu\text{g/l}$ 로 될때까지 통기시키며 배양하여 생산성을 높일 수 있었다고 보고하고 있다.

한편 회석율에 따른 균체생산속도와 기질에 대한 균체수율의 변화는 Fig. 5와 같다. 균체수율은  $D=0.075 \text{ hr}^{-1}$ 에서 최대값인  $0.42 \text{ g-dry cell/g-methanol}$ 에 도달하였다. 이렇게 회석율의 변화에 따라 균체수율이 달라지는 것은 Levine 등<sup>(13)</sup>은 일종의 metabolic pattern 이 변하는 것으로, 최대 균체수율은 나타낸 회석율보다 적은 회석율에서는 균체의 유지에 필요한 energy 가 증가하기 때문이며, 이보다 큰 회석율에서는 균체의 metabolite 들의 생산 및 분비에 energy 를 소비하므로 균체수율이 감소한다고 보고하고 있다. 최대 균체생산속도는  $D=0.1 \text{ hr}^{-1}$ 에서 얻어졌는데 이때의 값은  $0.21 \text{ g-dry cell/l/hr}$ 이었다. 최대 균체생산속도를 기초로 하여 최적회석율을 구한다면  $0.1 \text{ hr}^{-1}$ 이다.

연속배양시의 균체생산속도는 최분배양시의 평균 균체생산속도인  $0.07 \text{ g-dry cell/l/hr}$  시의 약 3 배에 상당하였다.

각 회석율에서의 정상상태는 연속배양을 시작한

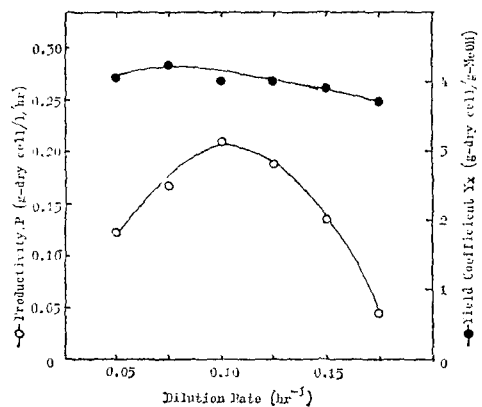


Fig. 5. Productivity and Yield Coefficient at Different Dilution Rates during Continuous Cultivation.

후 mean residence time (1/D)의 5~6 배 시간후에 얻어졌으며, 이 사이에서 별다른 fluctuation 은 관찰되지않았다.

## 6. 균체의 단백질 및 핵산함량

균체의 조단백질 함량은 건조중량 백분율로 73 % 이었고, 총 핵산함량은 12 %이었다. 이 값은 Table 1 의 비교에서 보는 바와 같이 다른 methanol 이용세 균들과는 비슷하였으나, methanol 이용효모에 비해서는 단백질함량이 훨씬 많았다. 건조균체중의 핵산함량이 단세포단백질에서는 문제가 되므로 핵산함량을 줄이기위하여 Ohta 등<sup>(8)</sup>은 heat-shock process 를 개발하였는데, 이 처리를 통하여 *Candida utilis* 의 핵산함량을 초기 핵산함량의 70~75 %를 감소시킬수 있었다고 보고하고 있다.

**Table 1.** Comparison of Protein and Nucleic Acid Contents of Cells Grown on Methanol.

Microorganisms	Crude protein (dry wt. %)	Nucleic acid (dry wt. %)	Reference
<i>Methylomonas</i> sp.	73	12	this work
<i>Methylomonas methanolica</i> nov. sp.	73.1	11.4	(14)
<i>Methylomonas clara</i>	85	15	(32)
<i>Pseudomonas</i> C	62.3	12.2	(19)
<i>Klebschera</i> sp. N 2201	45	5.5	(33)
<i>Hansenular Polymorpha</i> DL-1	45	5-7	(34)

## 요 약

토양과 하수로부터 분리한 *Methylomonas methanolica* YUFE 101 의 물리적 배양조건과 회분배양 및 연속배양의 생산성을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

(1) 본 실험균주의 최적 배양온도는 32.5°C 최적 pH 는 6.3부근이다.

(2) 비산소 소비속도는 332  $\mu$ l/mg-dry wt./hr 이

었다.

(3) 회분배양에서의 균체수율은 0.47 g-dry cell/g-methanol 이었으며, 최대 비증식속도는 0.19 hr<sup>-1</sup> 이었다.

(4) 연속배양에서의 최적회석율은 0.1 hr<sup>-1</sup> 이었으며, 이때의 최대 균체생산속도는 0.21 g-dry cell/l/hr 이었다. 균체수율은 D=0.075 hr<sup>-1</sup>에서 0.42 g-dry cell/g-methanol 로 최대값을 나타냈다.

(5) 건조균체 중의 조단백질 함량은 73%이고 총 핵산함량은 12 %이었다.

## References

- 1) 유주현 · 정진섭 · 변유량 : 한국산업미생물학회지, 제 1 보의 Vcl 과 page 기입 (1979)
- 2) Häggström, L. : *Biotechnol. Bioengin.*, **11**, 1043 (1969).
- 3) Snedecor, B., Cccney, C.L. : *Appl. Microbiol.*, **27**, 1112 (1974).
- 4) Anththcny, C., Zatman, L.J. : *Biochem. J.*, **92**, 609 (1964).
- 6) Bccs, R.N., Rahway, N.J. : *Anal. Chem.*, **20**, 30 (1948).
- 7) Stickland, L.H. : *J.Gen. Microbiol.*, **5**, 698 (1951).
- 8) Ohta, S., Maul, S., Sinskey, A.J., Tannenbaum, S.R. : *Appl. Microbiol.*, **22**, 415 (1971).
- 9) Nccris, J.R., Ribbon, D.W. : Academic Press, Lcnden and N. Y., p.291 (1970).
- 10) Kim, J.H., Ryu, D.Y. : *J. Ferment. Technol.*, **54**, 427 (1976).
- 11) Amanc' Y., Sawada, H., Takada, N., Terui, G. : *J. Ferment. Technol.*, **53**, 315 (1975).
- 12) Dcsalek, M., Häggström, L., Mclin, N. : *Prcc. IV IFS; Ferment. Technol. Today*, 497 (1972).
- 13) Leine, D.W., Cccney, C.L. : *Appl. Microbiol.*, **26**, 982 (1973).