

## *Sporobolomyces holsaticus*의 배양중 전분자화 특성조사

박완수 · 구영조 · 신동화 · 민병용

농어촌개발공사 식품연구소  
(1983년 3월 7일 수리)

### Study on the Pattern of Starch Assimilation by *Sporobolomyces holsaticus*

Wan Soo Park, Young Jo Koo, Dong, Hwa Shin and Byong Yong Min

Food Research Institute/AFDC, Hwasung-Kun Kyunggi-Do, 170-31, Korea

(Received March 7, 1983)

#### Abstract

Direct conversion of starchy materials to single cell protein of *Sporobolomyces holsaticus* FRI Y-5 was investigated. Effect of yeast extract concentration on its cell growth showed that it could utilize more of starch in the medium containing 2.5 g/l of yeast extract. In case of jar fermentor culture, the specific growth rate and cell yield of *Sp. holsaticus* on soluble starch were calculated to be  $0.14 \text{ hr}^{-1}$  and 0.425, respectively and its maximum cell concentration was 13.4 g/l. After 80 hr of incubation time, 45.96% of starch was consumed and 45.1% of relative blue value was decreased. Reducing sugars in the starch medium seemed to increase from 4.06 g/l to 6.08 g/l and then to decrease. During fermentor culture, pH of medium was almost not changed in the range of  $\text{pH } 7.0 \pm 0.5$ . The optimal temperature and pH of *Sp. holsaticus* amylase activity were  $40^\circ\text{C}$  and  $\text{pH } 7.5$ , respectively. It was shown from the effect of *Tapioca* starch concentration on the cell growth that the optimal concentration of *Tapioca* starch for *Sp. holsaticus* was lower than that of soluble starch. FRI Y-5 cells settled much slower than *Sp. holsaticus* IFO 1032 cells and the viscosity vs cell concentration relationship was related to be linear.

#### 서 론

전분으로부터 효모균체를 직접 생산하기 위하여 전분 이용성 효모를 분리 동정하였고<sup>(1)</sup>, 그것에 대한 기본적인 배양조건<sup>(2)</sup>과 배양시 탄소원과 다른 영양원간의 영양균형이 균체생육도에 미치는 영향<sup>(3)</sup>을 검토하였다.

본 연구에서는 전분을 기질로 배양할 때 *Sporobolomyces holsaticus* FRI Y-5의 전분자화 특성에 대하여 검토하였기에 보고하는 바이다.

#### 재료 및 방법

#### 사용균주 및 기본배지조성

사용균주는 전보들<sup>(4)</sup>에서 보고한 *Sporobolomyces holsaticus* FRI Y-5을 사용하였다. 배지조성은 전보<sup>(5)</sup>에서 보고한 것을 기초로 하여 Table 1 과 같은 기본 배지를 설정하였으며 배지살균과 배지의 pH 조절은 전보<sup>(6)</sup>에 준하였다.

#### 배양방법

모든 배양실험에서 배양온도는  $23^\circ\text{C}$ 였고 접종은 보존 균주를 30시간 증식시켜 접종원으로 사용하였으며 접종량은 5% (V/V)으로 하였다.

진탕배양실험은 500 ml 삼각플라스크에 배지 200ml 를 넣어 왕복식 수조진탕기로 stroke 120, 진폭 3.5cm에서

Table 1. The basal medium for growth of *Sp. holsaticus* FRI Y-5

Components	Concentration (g/l)
Soluble starch	67.5
Urea	1.29 (C/N=50)
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	3.022 (C/P=50)
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	2.31 (C/S=77.57)
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.017
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.029

수행하였고, 발효조배양실험은 jar-fermentor(최대용량 2.6l, L. E. Marubishi, MD26)에 배지 2l를 넣고 교반 속도 500RPM, 통기량 1.5V/V/M으로 수행하였으며 이때 소포제로서 H<sub>2</sub>O/Tween 80/silicone antifoamer (98 : 1 : 1. V/V/V)을 50ml/l로 사용하였다.

**부분정제된 효소액의 최적 pH 및 온도 측정실험**

가. Amylase의 부분정제효소액의 조제

발효배양실험시 얻은 배양액을 amylase의 전분흡착과 유안분획방법<sup>(6)</sup>에 의하여 부분정제하였다.

나. Amylase의 작용 최적온도

pH 5.8의 citrate/phosphate 완충용액으로 조제한 기질용액을 사용하여 15~60℃의 각 온도에서 효소력을 측정하였다.

다. Amylase의 작용 최적 pH

pH 3.1~10.2 사이의 각 pH의 universal buffer solution(Britton and Robinson type)으로 조제한 기질용액을 사용하여 각 pH에서의 효소력을 측정하였다.

**Tapioca 분말의 조제**

전조된 Tapioca를 구멍의 직경이 1mm인 체가 부착된 laboratory cutting mill(Arthur H. Thomas Co. Model 4)에 의하여 마쇄한 후, Tapioca 분석실험 및 배양실험의 시료로 사용하였다.

**Viscosity 측정**

가. 전분농도별 viscosity 측정

0~90g/l의 가용성 전분 또는 Tapioca 전분을 각 농도별로 첨가한 배지용액을 121℃에서 15분간 처리한 후, 냉각하여 23℃에서 Brookfield Syncro-Lectric Viscosimeter(Model LVT)에 의하여 viscosity를 측정하였다.

나. 효모 균체량별 viscosity 측정

각 배양시간마다 200ml의 배양액을 채취하여 가.와 같은 방법으로 viscosity를 측정한 후, 이것을 원심분리하여 얻은 상등액의 viscosity를 다시 측정하여 균체량별로 비교하였다.

**효모균체의 침강속도 측정**

UV-VIS spectrophotometer (Varian Techtron, Mo-

del 635)를 사용하여 파장 525nm에서 흡광도가 1.0이 되게 세포현탁액을 준비한 다음 시간에 따라 파장 525nm에서의 흡광도를 측정하여 초기 흡광도에 대한 백분율로 표시하였다<sup>(6)</sup>.

**분석방법**

가. 수분함량

상법에 의하여 105℃에서 항량이 될 때까지 건조하여 측정하였다.

나. 균 체 량

상법에 의하여 건조균체량을 측정<sup>(1)</sup>하거나 UV-VIS spectrophotometer (Varian Techtron Model 635)를 사용하여 525nm에서 흡광도를 측정하여 건조균체량으로 환산하였다.

다. 환원당함량

환원당은 dinitrosalicylic acid method<sup>(6)</sup>에 의하여 측정하였으며 glucose의 양으로 표시하였다.

라. 전분함량, 균체수율-전분<sup>(2)</sup>에 준하였다.

마. 총질소량, 회분, 비성장속도-전분<sup>(1)</sup>에 준하였다.

바. Amylase activity의 측정<sup>(7,8)</sup>

Amylase의 역가측정은 1% 가용성 전분용액을 기질로 하여 효소액을 첨가해 15분간 반응시킨뒤 0.1N HCl 용액으로 반응을 정지시키고 이를 0.05% I<sub>2</sub>-0.5%KI용액으로 발색시켜 blank과 차이로서 결정하였으며, 1% 전분용액의 blue value를 파장 660nm에서 1분에 1% 저하시키는 효소의 역가를 dextrogenic unit of Naga-se(D. U. N.) 1로 하였다.

$$D. U. N. = \frac{Ab - Ab'}{Ab} \times \frac{100}{15} \times n$$

- Ab : blank의 흡광도
- Ab' : 반응액의 흡광도
- n : 효소의 희석배수

사. Blue value의 측정

배양액을 원심분리하여 얻은 상등액을 적당히 희석한 후, 이 희석액 1ml에 0.1N HCl 용액 100ml와 0.005% I<sub>2</sub>-0.5% KI 용액 100ml를 첨가하여 파장 660nm에서 흡광도를 측정하였다.

**결과 및 고찰**

**균체생육에 대한 yeast extract의 첨가 효과**

전분<sup>(3)</sup>에서 유기영양원을 제외한 영양원간의 영향균형이 균체생육도에 미치는 영향을 검토하였으며, 그것을 기초로 본 연구의 기본배지조성을 설정하였다. 이러한 기본배지에 유기영양원으로서의 yeast extract를 각 농도별로 첨가하여 균체생육에 미치는 효과를 관찰한

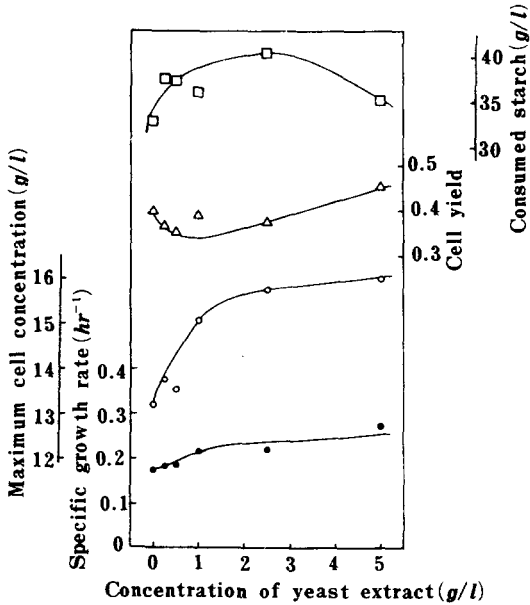


Fig. 1. Effect of yeast extract on the growth of *Sp. holsaticus* FRI Y-5

(-□-) consumed starch; (-△-) cell yield; (-○-) maximum cell conc.; (-●-) specific growth rate.

결과는 Fig. 1과 같다.

Yeast extract의 농도가 증가함에 따라 비성장속도는 서서히 증가하는 경향을 보였으며, 3일 배양후의 최대 균체량은 급속히 증가하다 완만하게 증가하였다. 그러나 균체수율은 약간 감소하다 증가하는 경향을 보였으며 소비된 전분량은 점차 증가하여 yeast extract 2.5 g/l 첨가시 최대였고 오히려 그 이상으로 첨가할 경우 전분소비량이 감소하였다. 즉 yeast extract의 농도가 증가함에 따라 최대균체량이 증가하면서 전분이용성이 증가하나 2.5g/l 이상일 경우 최대균체량은 계속 증가하나 오히려 전분이용성은 감소하였다.

이러한 결과는 yeast extract가 영양원 뿐만 아니라 기질원으로도 좋다는 것을 알 수 있었다. 그러므로 최대균체량이 비교적 많으면서 많은 전분을 이용할 수 있는 yeast extract 2.5g/l의 첨가가 최적이라고 사료되었으며, 앞으로의 모든 실험에서는 기본배지에 yeast extract 2.5g/l을 첨가하여 사용하였다.

*Sp. holsaticus* FRI Y-5의 전분이용특성

앞에서 결정된 배지를 사용하여 전분을 기질로 *Sp. holsaticus* FRI Y-5를 발효조에서 배양했을 때, 전분분해에 따른 균체성장과 환원당, pH 및 전분의 부분적 가수분해에 따른 요오드 착색물질의 농도인 relative blue value의 변화를 관찰한 결과는 Fig. 2와 같다.

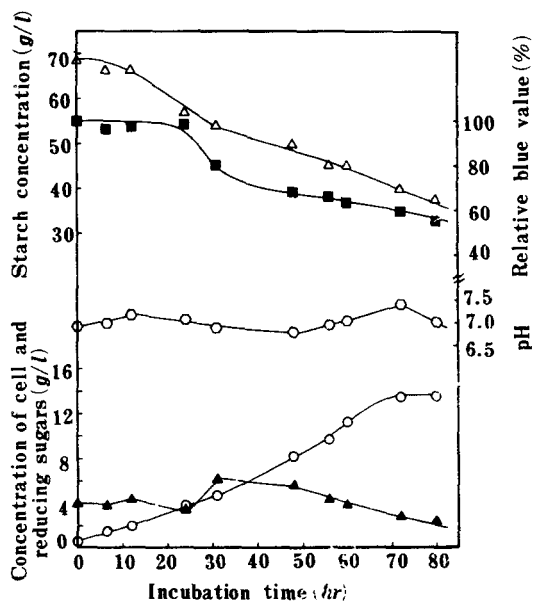


Fig. 2. Cell growth of *Sp. holsaticus* FRI Y-5 on starch when pH was not controlled

(-△-) starch; (-■-) relative blue value; (-○-) pH; (-▲-) reducing sugars; (-○-) cell concentration

*Sp. holsaticus*의 초기 비성장속도는 0.14hr<sup>-1</sup>로 계산되었으며 72시간후에 정지기에 도달하여 최대균체량은 13.4g/l이었다.

전분은 배양초기부터 서서히 감소하여 80시간후에 전분농도는 36.98g/l로 45.96%가 소비되었으며 이 때 균체수율은 0.425로 계산되었다. Relative blue value는 초기에 거의 변화되지 않았으나 배양 24시간후에 급격히 감소하여 배양 80시간후에는 54.9%로 45.1%가 감소하여 전분소모율 45.96%와 거의 일치하였다.

또한 환원당은 전분이 분해됨에 따라 전체적으로 증가하다 감소하는 경향을 보였으며, 배양 31시간후 6.08 g/l로 최대였다.

배양중 pH는 pH 7.0을 중심으로 변화가 거의 없었으며 이러한 배지조건하에서 pH 조절은 불필요하다고 사료되었다.

*Sp. holsaticus* FRI Y-5 amylase activity에 대한 온도 및 pH의 영향

전보<sup>(2)</sup>에서 *Sp. holsaticus* FRI Y-5의 최적배양온도와 배지의 초기 최적 pH는 각각 23℃와 pH 6.9로 보고하였다. *Sp. holsaticus* FRI Y-5 Amylase의 최적온도와 최적 pH를 이것들과 비교하기 위하여, 전분배양액을 부분정제한 후 측정된 결과는 각각 Fig. 3, Fig. 4와 같다.

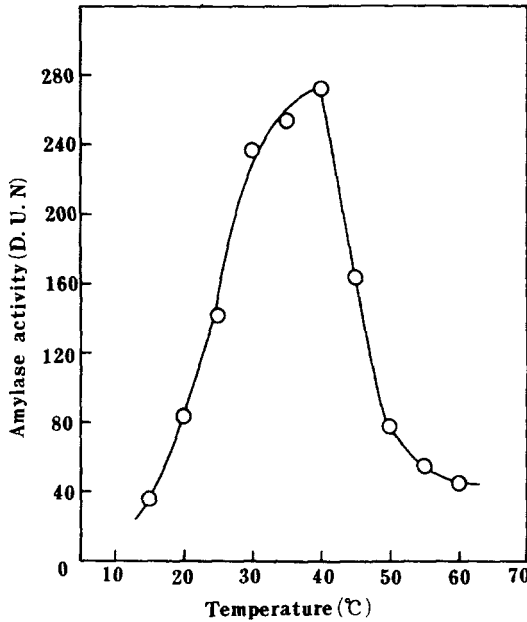


Fig. 3. Effect of temperature on *Sp. holsaticus* FRI Y-5 amylase activity

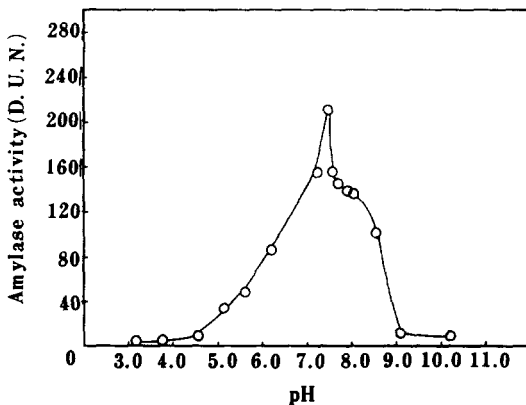


Fig. 4. Effect of pH on *Sp. holsaticus* FRI Y-5 amylase activity

이 효모 amylase의 최적온도는 Fig. 3에서 보는 바와 같이 40°C였으며 최적성장온도 23°C에서는 최대효소역가의 약 44%를 보여주었다. 이러한 최적성장온도 23°C에서 측정된 효모 Amylase의 최적반응 pH는 Fig. 4에서 보는 바와 같이 pH 7.5였으며, 산이나 알칼리쪽으로 갈수록 효소역가는 급격히 감소하였고, pH 4.5 이하나 pH 9.0 이상에서는 효소역가가 매우 낮았다. 이 효모의 배지 최적초기 pH인 pH 6.9에서는 최대 효소역가의 55.5%를 보여주었다.

이러한 a amylase 역가를 지닌 효모들에 대한 보고<sup>(9-16)</sup>

는 문헌상에서 찾아볼 수 있는데, *Sp. holsaticus* FRI Y-5 amylase의 최적온도 30~40°C에 비하여 *Saccharomycopsis capsularis*<sup>(11)</sup>의 40~50°C, *Lipomyces kononenkoae*<sup>(12)</sup>의 60~65°C, *Schwanniomyces castellii*<sup>(14)</sup>의 60°C, *Sch. alluvius*<sup>(13)</sup>의 40°C, *Candida muscorum*<sup>(16)</sup>의 60~65°C는 높은 편이었고, 이 효모 amylase의 최적 pH 7.5에 비하여 *Sch. castellii*<sup>(14)</sup>의 pH 6.0, *Sch. alluvius*<sup>(13)</sup>의 pH 6.3, *C. muscorum*의 pH 4.2는 낮은 편이었다.

*Sp. holsaticus*의 Tapioca 전분이용성

*Sp. holsaticus* FRI Y-5의 Tapioca 전분이용성을 검토하기 위하여, 먼저 Tapioca의 화학적 조성을 분석 검토하였으며 그 결과는 Table 2.와 같다.

Table 2. Chemical composition of Tapioca powder

Components	Content (% w/w)
Moisture	12.47
Starchy materials	69.1
Reducing sugars	4.90
Insoluble materials *	6.69
Total nitrogen	0.19
Ash	3.12

\*Insoluble materials was not hydrolyzed by 0.06 N HCl at 100°C for 3hr

Tapioca 분말의 조성은 전분질 69.10%, 환원당 4.9%, 회분 3.12%였고, 반면에 총 질소량은 0.19%에 불과하였으며, 전분함량 측정시 산에 의하여 분해되지 않는 불용성물질을 6.69%나 함유하고 있었다.

이러한 조성을 지닌 Tapioca 분말을 기질로 하여 yeast extract 2.5g/l을 첨가한 기본배지에서 Tapioca 분말의 농도별로 *Sp. holsaticus*을 5일 배양한 결과는 Table 3과 같다.

Table 3. The effect of Tapioca starch on cell growth of *Sp. holsaticus*

Tapioca powder (g/l)	Consumed Tapioca starch (g/l)	Cell concentration (g/l)	Cell yield
40(27.64) *	14.13	9.30	0.658
60(41.46)	25.53	18.17	0.712
80(55.28)	16.79	14.44	0.860

\*The parentheses indicate Tapioca starch content in Tapioca powder

*Tapioca* 전분의 초기농도가 41.46g/l일 때 *Tapioca* 전분의 소모량은 25.53 g/l로 최대였으며 균체량도 18.17 g/l로 최대였다. 반면에 균체수율은 *Tapioca* 전분의 초기농도가 증가할수록 증가하였으며 55.28g/l일 때 0.86으로 최대였다.

전보<sup>(1)</sup>에서 보고한 바에 의하면 질소원의 첨가량이 일정할 때 가용성전분의 농도가 증가함에 따라 C/N비가 증가하며 이때 균체량은 계속 증가하였는데, Table 3에서 보는 바와 같이 *Tapioca* 전분에서는 초기농도가 55.28g/l으로 높을 때 균체량은 오히려 감소하였다.

이러한 이유는 121°C에서 15분간 살균 후에 가용성 전분과는 달리 *Tapioca* mash의 높은 viscosity 때문으로 사료되었으며, *Tapioca* 전분과 가용성전분의 농도별 viscosity의 측정 결과는 Fig. 5와 같다.

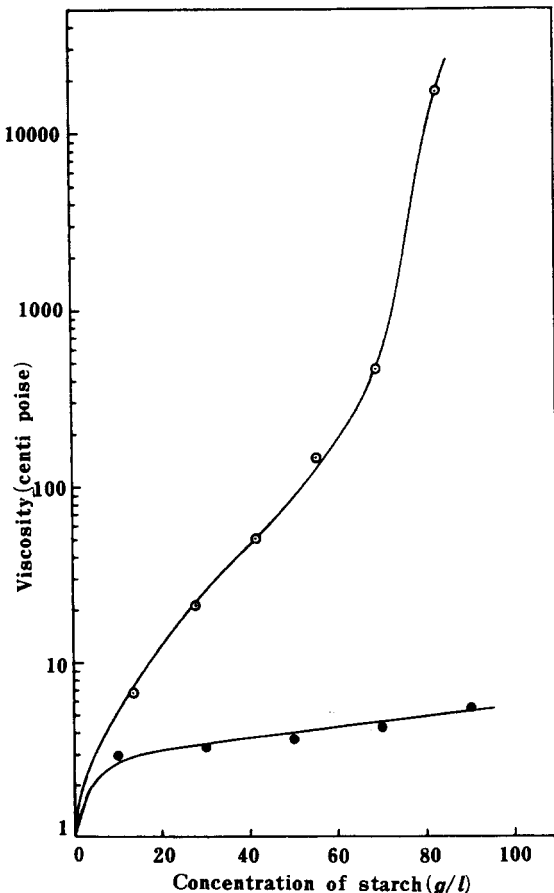


Fig. 5. Relationship between viscosity and concentration of starch

(-○-) *Tapioca* starch mashes;  
 (-●-) Soluble starch.

가용성전분은 농도가 증가함에 따라 viscosity가 완만하게 증가하였으나, *Tapioca* 전분은 급격히 viscosity가 증가하였으며, 실제로 *Tapioca* 전분을 70g/l 이상 첨가하여 살균하면 냉각후 gel 상태로 존재하였다.

***Sp. holsaticus* FRI Y-5의 물리적 특성**

미생물균체를 새로운 단백질원으로 고려할 때 저렴한 생산을 위한 기술적 문제가 대두된다. 특히 효모의 형태학적 특성중 일반적으로 filamentous cell은 단세포단백질의 제조시 직접 texturization 또는 fabrication이 용이하나 취급과 균체이송문제 때문에 생산효율이 떨어진다. 이러한 문제를 해결하기 위해서, 첫 단계에서 경제적으로 최적조건하에서 증식시킨 후 바람직한 phenotypic properties을 발현할 수 있는 두번째 단계로 전환하는 two-stage fermentation process가 개발되고 있다.

전보<sup>(1)</sup>에서 보고한 바에 의하면 *Sp. holsaticus* FRI Y-5는 배지조성에 따라 mycelial-like form과 yeast-like form을 형성하는 특성을 가지고 있었다. 가용성전분을 기질로 사용하여 yeast extract 2.5g/l을 첨가한 기본배지에서 배양한 *Sp. holsaticus* FRI Y-5의 침강속도를 측정된 결과는 Fig. 6과 같다. 즉 FRI Y-5 균주는 *Sp. holsaticus* IFO 1032 균주에 비하여 침강속도가 매우 느렸다.

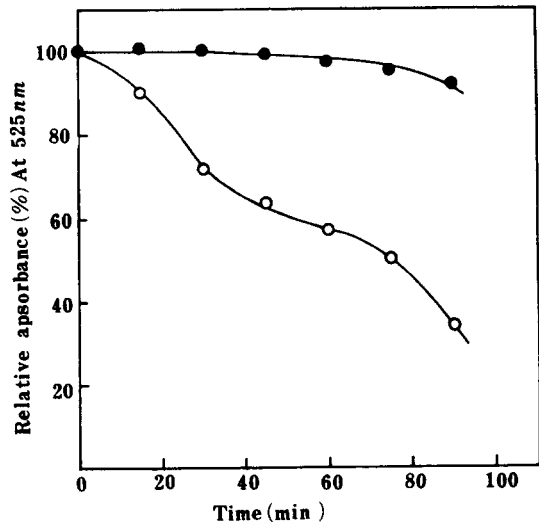


Fig. 6. Settling rates of *Sp. holsaticus* FRI Y-5 (-●-) IFO 1032 (-○-) grown on starch

Miyasaka 등<sup>(17)</sup>의 보고에 의하면 *S. cerevisiae* A364 A 균주는 *Sp. holsaticus* FRI Y-5 균주와 마찬가지로 침강속도가 매우 느린 반면 새로운 형태학적 변이주 JO7 균주는 침강속도가 매우 빨랐다.

또한 *Sp. holsaticus* FRI Y-5 균체의 viscosity를 원

심분리후 전분배양액의 점도에 대한 원심분리전 전분배양액의 점도의 비로서 측정된 결과는 Fig. 7에서와 같다. 즉 균체농도가 증가할수록 균체의 점도는 거의 직선적으로 증가하며 균체농도가 10g/l 이상일 때는 더욱 점도가 크게 증가하였다.

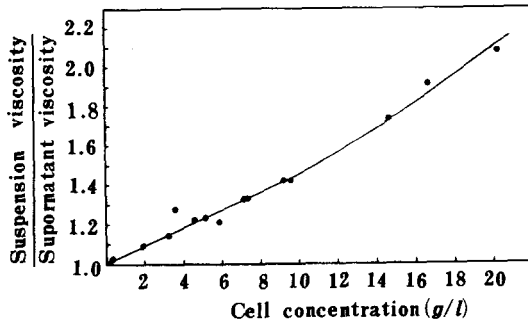


Fig. 7. Change in viscosity as a function of yeast concentration when *Sp. holsaticus* FRI Y-5 was grown on starch

*Hansenula polymorpha*의 경우<sup>(18)</sup> 균체농도가 20g/l 일 때 세포상등액에 대한 배양액의 viscosity 비는 1.26 인데 비하여 *Sp. holsaticus* FRI Y-5는 같은 농도일 때 약 2.1로 균체의 점도가 더 크게 나타났다.

### 요 약

전분으로부터 효모균체를 직접 생산하기 위하여 분리, 동정된 전분이용성 효모, *Sporobolomyces holsaticus* FRI Y-5의 배양중 전분자화특성에 대하여 검토하였다.

유기영양원인 yeast extract 첨가실험에서 균체량이 최고에 이르며 전분이용율도 높은 최적첨가량은 2.5g/l 였다. 발효조배양실험에서 *Sp. holsaticus*의 비성장 속도는 0.14hr<sup>-1</sup>였으며 최대균체량은 13.4g/l였다. 배양 80시간후 relative blue value는 45.1%가 감소되었고 전분은 45.96%가 소모되었으며 이때 균체수율은 0.425였다. 환원당은 전체적으로 증가하다 감소하는 경향을 보였으며 배양중 pH는 pH7.0을 중심으로 거의 변화가 없었다.

*Sp. holsaticus amylase*의 최적온도 및 작용 pH는 각각 40°C, pH 7.5였다.

*Tapioca* 전분농도별 배양실험에서 *Tapioca* 전분의 초기농도가 41.46g/l 일 때 균체량이 18.17g/l로 최대였으며 이때 소모된 *Tapioca* 전분량도 25.53g/l로 최대였다. 그러나 균체수율은 *Tapioca* 농도가 증가함에 따라 증가하였다. 이때 *Tapioca* 전분의 최적초기농도는 가용성전분에 비하여 낮았다.

*Sp. holsaticus* FRI Y-5의 침강속도는 IFO 1032 균주에 비하여 매우 느렸으며 균체점도는 높은 편이었다.

### 문 헌

1. 박완수, 구영조, 신동화, 서기봉 : 한국식품 과학회 학회지, 15, 46(1983)
2. 박완수, 구영조, 신동화, 민병용 : 한국식품과학회지, 15, 51(1983)
3. 박완수, 구영조, 신동화, 민병용 : 한국식품과학회지, 15, 56(1983)
4. 鄭萬在, 谷口肇, 九山芳治 : 한국산업미생물학회지, 9, 185(1981)
5. Calleja, G. B. and Johnson, B. F. : *Can. J. Microbiol.*, 23, 68(1977)
6. Miller, G. L. : *Anal. Chem.*, 31, 426(1959)
7. 오두환, 이강표, 변유량, 유주현 : 한국산업미생물 학회지, 9, 91(1981)
8. Street, H. V. : *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol. 2, 2nd ed., Academic Press Inc., New York, p. 898 (1974)
9. Fukumoto, J., Tsujisaka, Y. and Araki, M. : *Chem. Abstr.*, 55;24, 917(1961)
10. Stepanov, A. I., Afanaséva, V. P., Zaitseva, G. V., Mednokova, A. P. and Lupandina, I. B. : *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.*, 11, 682(1975)
11. Ebertova, H. : *Folia Microbiol.* (Prague), 11, 422 (1966)
12. Spencer-Martins, I. and van Uden, N. : *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 6, 241(1979)
13. Moulin, G. and Galzy, P. : *Agric. Boil. Chem.*, 43, 1165(1977)
14. Oteng-Gyang-Gyang, K. : Ph. D. Thesis, Universite des Sciences at Technique du Languedoc, Montpellier, France (1979)
15. Wilson, J. J. and Ingledew, W. M. : *Appl. Environ.*, 44, 301(1982)
16. 朴允中, 尹漢教, 孫天培 : 한국식품과학회지, 7, 243 (1975)
17. Miyasaka, Y., Sinskey, A. T., Deangelo, J. and Rho, C. : *J. Food Sci.*, 45, 558(1980)
18. Wang, D. I. C., Cooney, C. L., Demain, A. L., Demain, A. L., Dunnill, P., Humphrey, A. E. and Lilly, M. D. : *Fermentation and Enzyme Technology*, John Willey and Sons, Inc., p. 71(1979)