

가축분뇨를 이용한 SCP 생산 균주의 분리 및 균체 단백질 생산

한석균 · 고유석 · 안태영 · 배동훈^{1*}

단국대학교 미생물학과 및 서울대학교 분자미생물학연구소

¹단국대학교 식품공학과 및 연세대학교 생물산업소재연구소

Production of Single Cell Protein from Poultry Feces. Suk-Kyun Han, You-Suk Go, Tae-Young Ahn and Dong-Hoon Bai^{1*}. *Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Dankook University, Cheonan 330-714 and Research Center for Molecular Microbiology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea.*
¹*Department of Food Engineering, College of Engineering, Dankook University, Cheonan 330-714 and Bioproducts Research Center of Yonsei University, Seoul 120-749, Korea* - From the soil collected from provincial area of South Korea, a microorganisms which have been shown good growth in the minimal poultry feces extract medium was isolated. Supplement of glucose to the poultry feces extract medium helped the complete uptake of soluble protein by microorganism. Uric acid in the poultry feces extract medium could be completely degraded during the microbial growth. Maximum cell growth (3.8×10^9 CFU/ml) obtained at 36 hours of incubation after inoculation. Uric acid was degraded faster in minimal medium than in the glucose complement medium. VFA (volatile fatty acid), which are known as major compounds of poultry feces odor, were almost removed from the minimal poultry feces extract medium. Glucose supplement to the minimal medium enhanced the growth of microbial cells. Addition of 4% of glucose and 4% of neopeptone to the minimal poultry feces extract medium helped the maximal growth of cells.

최근 우리 나라에서는 식생활의 변화 및 외식산업의 빠른 성장과 함께 닭고기의 수요량이 증가하고 있고 양계산업도 매년 크게 성장하고 있다. 이에 따라 계분의 배출량도 점점 증가하고 있으며 일부는 비료로 사용되기도 하나 대부분의 계분은 그대로 방출되어 지표수 및 하수로 흘러들어 환경보호 의식이 크게 고양되고 있는 요즘에 큰 사회문제로 대두되고 있다.

사료자원이 빈곤한 우리 나라는 사료 원료의 대부분을 수입에 의존하고 있으며 매년 사료 수요량도 증가하고 있으므로 수입 옥수수, 밀기울, 대두박의 대체 원료로서 가축분의 사료로의 재활용에 관한 연구가 절실히 요구되는 형편이다. 가축분의 사료 이용성에 대한 검토는 우리 나라와 같이 사료자원이 부족한 나라에서는 매우 유용한 연구중의 하나이다. 그러나 계분의 사료화에 대한 연구는 주로 사료자원이 풍부한 미국이나 유럽에서 활발히 수행되었다(1-3). 잠재적인 영양원을 다시 사료화 하기 위한 연구도 국내에서 일부 연구자들에 의하여 수행되었으나 탈취문제, 영양가를 보존하기 위한 계분 건조 조건의 미확립, 주 질소원인 uric acid 이용성 재고 문제 등이 그대로 남아 있기 때문에 아직은 계분의 효율적인 사료로서의 활용이 이루어지지 못하고 있다(4-9). Flegal등(10)과 McNab등(11)의 연구에 따르면 건조계분은 대상 가축에 따라 일반사료의 10%까지 대체 가능한 것으로 나타났고 발효법을 이용한 계분사료는 40%까지 배합급여가 가능하며 경제성 및 실효성

이 높은 것으로 기대된다(12). 계분을 발효시키면 악취가 제거되고 저장성이 크게 향상될 뿐 아니라 비타민이 증가되고 동시에 uric acid나 creatin 형태의 질소원은 균체의 단백질 합성에 이용되어 사료로서의 효용성이 크게 증대되는 것으로 보고되어지고 있다(13).

최근 계분의 사료화를 위한 노력의 일환으로 액체 표면 배양법등에 의한 SCP(single cell protein) 효모 생산에 대한 연구가 있으나(6,14), 우량균주 선정 및 경제성 등이 해결되어 있지 않고 생산공정의 최적화에 관한 연구도 아직은 본격적으로 착수되고 있지 않은 실정이다. 지금까지 국내에서는 복합 silage나 건조계분에 관한 연구가 되어져 왔으나, 복합 silage는 수분 함량이 높아서 유통에 문제점이 있고 건조계분은 연료비 등의 문제가 있어 비경제적인 것으로 판단되었다. 그러므로 본 연구에서는 계분의 사료로서의 효용성을 증대시키기 위해서 문제가 되고 있는 탈취문제, 영양가 재고를 위하여 직접발효법에 의한 계분발효조건을 확립하고 계분성분을 효과적으로 활용할 수 있는 미생물을 자연계로부터 분리하는 등 발효공법의 개발을 목표로 하였다. 나아가서 분해과정을 거쳐 SCP 기질로서의 특성을 향상시킨 후 효모를 중심으로한 고체배양과 액체배양의 공정을 최적화하여 경제성을 향상시킴에 주력하고자 하였다.

재료 및 방법

계분의 채취

계분은 충남 천안군 성거면에 위치한 연암 축산 원에

*Corresponding author.

Key words: Uric acid, volatile fatty acid, single cell protein

전문대학내에 위치한 산란계농장으로부터 주 2회 정기적으로 수집하였다. 본 실험에서 사용된 계분을 생산한 종자는 '브라운 300'이었으며, 사육에 이용된 사료는 (주)무지개 사료에서 생산된 산란계용 '산란 300'이었다. 계분은 분변한지 2시간 이내의 것을 채취하였고 수집된 계분은 냉장된 상태로 실험실로 운반하였으며, 냉장 및 냉동의 상태로 보관하여 실험에 사용하였다.

계분의 성분분석

계분의 성분분석을 위하여 수분함량, pH, 가용성단백질, 조단백질, 요산, 휘발성 지방산, 암모니아, 환원당 분석의 실험을 수행하였다. 수분함량을 결정하기 위하여 시료 1g을 분취하여 항온 건조기에서 105°C, 24시간 동안 건조하여 함수중량과 건조중량의 차이로 수분 함수율을 계산하였다(15). 수집한 계분의 수소이온농도(pH)는 실험실로 운반한 시료가 실온과 같아졌을 때 soil pH tester(Demetra, Japan)로 측정하였다.

계분내의 가용성 단백질(soluble protein) 정량은 Bradford method를 사용하였다(16). 가용성 단백질의 적정곡선을 작성하기 위해 표준단백질로서 BSA(bovine serum albumin, Sigma #A6003)를 사용하였고 595 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 간접적으로 가용성 단백질을 정량하였다. 조단백질은 Micro-kjeldahl 방법(17)과 시료를 고온으로 가열하여 이때 생성되는 재의 탄소, 수소, 질소의 대비함량을 측정하는 CHN analyzer(Corder MT-3, Tanaco, Japan)로 분석하였다(15). 측정된 질소의 양을 단백질 양으로 환산하기 위하여 환산계수는 6.25를 사용하였다. 요산 정량을 위하여 urease peroxidase method를 이용하였다. 요산(uric acid)이 uricase에 의해 산화되어 발생한 과산화수소가 peroxidase의 기질로 작용한 후 4-aminoantipyrine과 N-ethyl-N-sulfopropyl-m-toluidine(ESPT)가 산화적으로 축합반응하여 생성된 색소를 550nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다. 이때 표준품으로는 0.1 mg/ml uric acid 표준용액을 조제하여 사용하였고, 모든 분석치는 이 값과 비교하여 정량하였다.

휘발성 지방산(volatile fatty acid, VFA)의 분석은 상등액 1.8 ml에 0.2 ml의 2 M 황산을 첨가하여 산성화시킨 후 2 ml의 diethyl ether를 첨가하여 휘발성 지방산을 추출하고 gas chromatography(HP 5890 series II, HP FFAP 0.32 mm, 50 m column)를 이용하여 ethyl ether내에 존재하는 휘발성 지방산의 정량과 정성분석을 행하였으며, 각 10mM 농도의 표준품인 휘발성 지방산 시료(Lot. No.-19740, Matreya, U.S.A.)를 분석 때마다 internal control로 사용하였다. 표준시료의 분석을 통하여 얻은 각 위치에서의 chromatogram 면적값과 분석시료의 면적값을 비교하여 시료의 휘발성 지방산을 정량하였다. 분석시 detector는 FID를 사용하였으며 injector, oven, detector의 온도는 190, 220,

180°C이었다.

암모니아의 분석은 표준방법의 Phenate법에 의하여 정량하였다(15). 배양액내의 환원당은 dinitrosalicylic acid(DNS)법으로 측정하였다(18). 분석된 모든 결과는 건조중량 단위로 환산하여 표시하였다.

균체농도의 측정

중속영양세균의 측정은 시료를 1% peptone 수의 희석용액으로 1/10씩 희석하여 희석액 0.1 ml을 beef-extract 3 g/l, Bacto-peptone 5 g/l, Bacto-agar 15 g/l의 영양한천배지(Difco, U.S.A.)에 도말한 후 30°C에서 1~2일간 배양하여 이중 30~300개의 colony를 나타내는 평판배지를 택하여 계수에 사용하였다. 균류를 측정하기 위하여 시료를 1% peptone수의 희석용액으로 1/10씩 희석하여 희석액 0.1 ml을 Sabouraud dextrose agar medium(Difco, U.S.A.)에 도말한 후 30°C에서 1~2일간 배양하여 이중 30~300개의 colony를 나타내는 평판배지를 택하여 계수에 사용하였다(15). 이때 일반세균의 번식을 억제하기 위하여 100 mg/l의 kanamycin을 첨가하였다. 대장균류의 측정을 위해 시료를 1% peptone수의 희석용액으로 1/10씩 희석하여 희석액 0.1 ml을 EMB agar medium(Difco, U.S.A.)에 도말한 후 30°C에서 1~2일간 배양하여 이중 30~300개의 colony를 나타내는 평판배지를 택하여 계수에 사용하였다(15). 분석된 모든 결과는 건조중량 단위로 환산하여 표시하였다.

활성균주의 분리

계분내의 질소원을 이용하는 세균은 경기도, 충청남북도, 경상남북도, 강원도등 각지로부터 토양과 가금류의 분변시료로부터 분리하였다. 질소원으로 계분을 첨가한 배지상에서 1차적으로 성장률이 우수한 균주를 분리하기 위하여 10 mg/l의 kanamycin이 첨가된 poultry feces-extract medium(poultry feces 1000 g/l, 2N Na₂CO₃(pH 8.5), Bacto-agar 15 g/l)(14)을 균주분리용 배지로 사용하였으며 30°C에서 배양하였다. 1차적으로 선별된 균주들을 2차적으로 흡광도 측정과 평판배지도말법에 의하여 성장률이 우수한 균주를 분리하였다.

D116 균주의 형태·생리학적 특성

분리한 균주를 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(19)에 제시된 방법에 따라 형태·생리학적 특성을 조사하였다. 분리한 균주의 주사현미경 관찰을 위하여 Sabouraud dextrose broth에서 30°C, 18시간 동안 진탕하여 증균시킨 배양액 0.1 ml을 2% glutaraldehyde로 slide glass에 고정한 다음 sodium phosphate buffer(pH 7.0)로 3회 세척한 후 냉동 건조하고 gold coating한 후 scanning electron microscope(JEOL 5200, Japan)로 촬영하였다.

SCP(single cell protein)생산을 위한 계분발효의 조건 탄소원에 대한 친화력을 알아보기 위해서 Sabouraud broth(Difco, U.S.A.)를 기본배지로 사용하였으며 30°C에서 30시간동안 배양 후 흡광도(600 nm)를 측정하여 각 기질에 대한 균체생산력으로 환산하였다. 탄소원의 농도에 따른 성장률의 변화를 알아보기 위하여 Sabouraud broth(Difco, U.S.A.)를 기본배지로 이용하였으며 glucose의 농도를 0%에서 20%까지 단계적으로 조절하여 30°C에서 30시간동안 배양 후 흡광도(600 nm)를 측정하여 각 기질에 대한 균체생산력을 비교하였다. 질소원의 농도에 따른 성장률의 변화를 알아보기 위하여 질소원으로는 Neopeptone(Difco, U.S.A.)을 사용하였다. 이 실험 역시 Sabouraud broth(Difco, U.S.A.)를 기본배지로 이용하였으며 Neopeptone(Difco, U.S.A.)의 농도를 0%에서 6%까지 단계적으로 조절하여 30°C에서 30시간동안 배양한 후 흡광도(600 nm)를 측정하여 각 기질에 대한 균체생산능을 비교하였다.

SCP 생산을 위한 액체발효의 조건

SCP의 생산을 위한 최적의 액체발효조건을 확립하기 위하여 5l 용량의 jar fermenter(SY-500, 한국발효기)로 실험을 수행하였다. 또한 계분의 액체발효에 따른 성분의 변화를 보기 위하여 84시간 동안 가용성 단백질과 uric acid의 변화량 및 환원당의 변화를 조사하였다. 액체발효배지의 조성은 feces extract 2000 ml, K_2HPO_4 17.41 g, KH_2PO_4 13.6 g, glucose 160 g, antifoam 5 ml, tap water 1600 ml을 혼합하여 121°C 15 psi 15분간 습윤멸균하였고 선별 분리한 D116 균주를 배양하여 100 ml(2.0×10^8 CFU/ml)을 접종하였다. 계분내의 불용성 물질을 제거하기 위하여 계분 200 g과 수돗물 1800 ml을 혼합하여 여과지(Whatman No.1 filter paper, U.S.A.)로 감압여과하여 배양액으로 사용하였으며 종균 배양 발효조로서 5l 용량의 jar fermenter(SY-500, 한국발효기)를 사용하였다. D116 균주를 Sabouraud dextrose medium(Difco, U.S.A.) 100 ml에 접종하여 균주성장의 log phase가 끝나는 시점인 30시간동안 30°C에서 진탕배양한 배양액을 접종액(seed solution)으로 사용하였다. 이것을 액체발효배지에 접종한 후 30°C에서 150~200 rpm의 교반속도, 통기량 0.6 vvm으로 배양하였다. 6시간 단위로 발효배양액을 채취하여 원심 분리(3000×g, 5 mins)한 후 상등액을 분리하여 가용성 단백질, 요산, 환원당, pH, 세균수의 변화를 측정하였다.

결과 및 고찰

계분의 분석과 미생물의 분포

계분내의 수분함량, pH, 가용성 단백질, 조단백질, 암모니아, 요산, 휘발성 지방산 등의 일반 성분 분석과 종속영양세균, 균류 및 대장균류의 균수를 측정하였다.

Table 1. Composition and bacterial distribution of poultry feces.

Poultry feces composition	Content
Water content	73%
pH	4.0
Reducing sugar	0.005%
Soluble protein	4 mg/g-dw
Total protein	0.35 g/g-dw
Ammonia	56.3 µg/g-dw
Uric acid	62 mg/g-dw
VFA	
Acetic acid	257.2 mM
Propionic acid	48.6 mM
Isobutyric acid	0.8 mM
Butyric acid	9.8 mM
Isovaleric acid	2.2 mM
Valeric acid	1.0 mM
Isocaproic acid	0.6 mM
Caproic acid	0.12 mM
Heptanoic acid	0 mM
Heterotrophic bacteria	1.7×10^7 /g-dw
Yeast	2.4×10^6 /g-dw
Coli form bacteria	5.1×10^6 /g-dw

그 결과는 Table 1과 같으며, 계분의 조성에서 균체 생육에 필요한 가용성 당의 함량이 매우 낮게 나타나 있으므로 균체생육속도를 촉진시키기 위하여 본 실험에서는 필요에 따라 적당량의 가용성 당을 보강하여 주기로 결정하였다.

균주의 분리

계분을 단일 질소원으로 하여 조제한 배지에서 성장하는 미생물을 분리한 결과 75종류의 토양에서 150종, 12종류의 계분으로부터 80종, 18종의 양계장 토양으로부터 80종 및 6종의 여타 가금류의 분변으로부터 110종 등의 생육가능한 균주를 분리하였으며, 다시 이들 400여종을 중심으로 2차 선별을 하고 계분을 질소원으로 잘 이용할 수 있는 균주를 선별하여 계분배지에서 균체의 생육속도가 다른 균주에 비해 우수한 균주를 분리하여 D116으로 명명하였다. 분리한 균주는 poultry feces extract medium상에서 타균주에 비해 높은 균체 생산능과 계분의 이취미를 효율적으로 제거함을 보였다.

D116 균주의 형태·생리학적 특성

분리한 균주의 형태적 특성을 검사하기 위해 전자현미경으로 관찰한 결과, 외형상 특징 중 균주의 크기는 2~4 µm의 구형이었으며 표면은 smooth한 형태로 출아를 관찰할 수 있었다(Fig. 1). 고체배지에서 형태·생

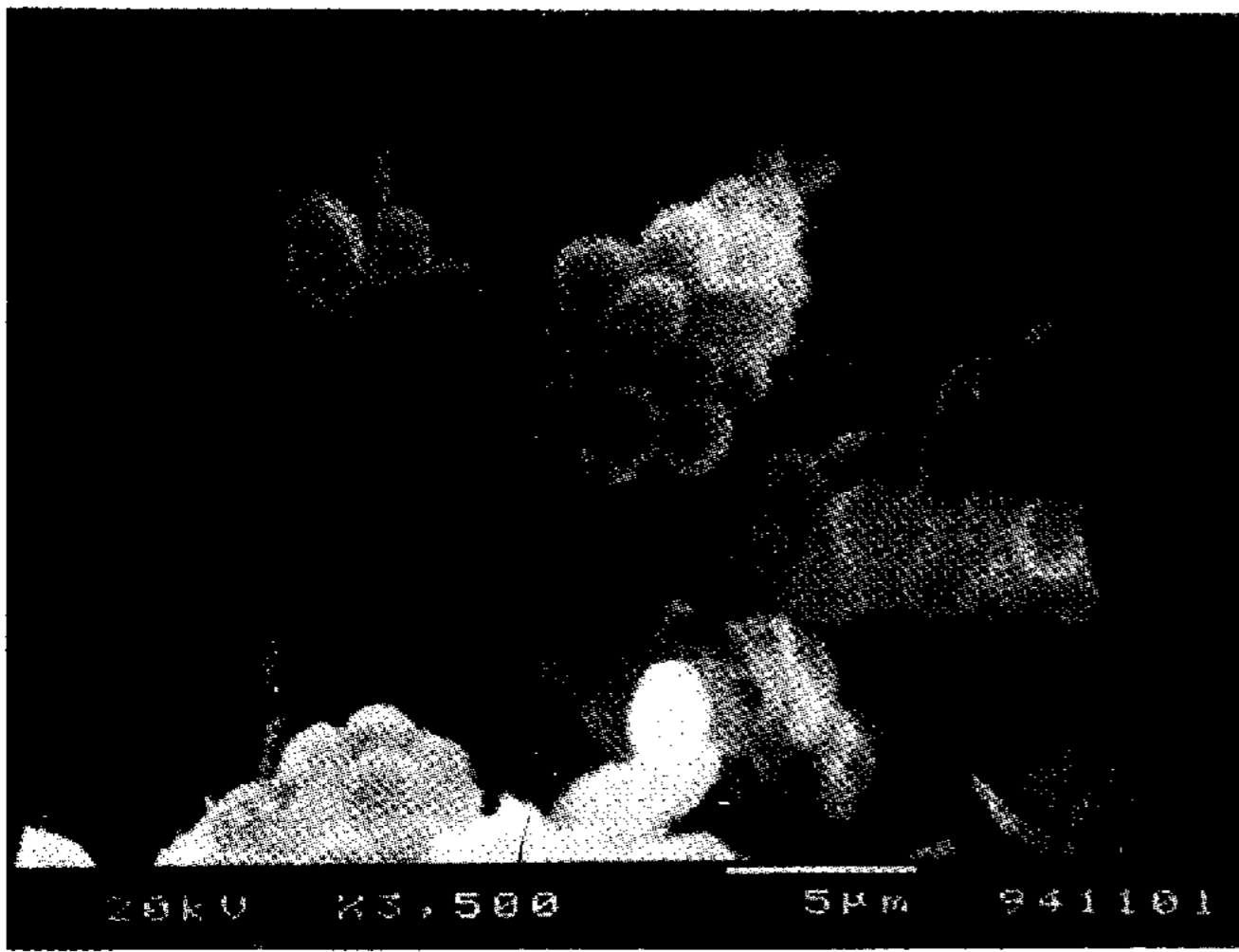


Fig. 1. Scanning electron microscopic photograph of strain D116.

Table 2. The morphological and physiological characteristics of the *Candida* sp. D116 strain

Fermentation	galactose	+	lactose	-
	sucrose	-	maltose	-
	cellobiose	-	glucose	+
	xylose	-	arabinose	-
	threose	-	melezitose	-
	rafinose	-	melibiose	-
	Utilization	xylitol	-	dulcitol
adonitol		+	glyceraldehyde	+
sorbitol		+	erythritol	-
cyclo-heximide		-	inocitol	-
nitrate reduction		-	2-keto-D-gluconate	-
urea		-		
Morphology		ccocci, 2.0~4.0 µm, non-motile		

리학적 특성을 검토한 결과 white creamy color의 colony였으며 10종의 탄소원을 대상으로 당이용능을 조사한 결과 glucose, galactose maltose는 잘 이용하였으나 그외의 탄소원은 이용하지 못하였다(Table 2). 이상의 분류학적 특성을 기초로 하여 yeast의 분류기준과 비교·검토한 결과 본 균주를 *Candida* sp.로 동정하였으며, 따라서 본 균주를 *Candida* sp. D116으로 명명하였다.

발효에 따른 계분성분의 변화 분석

본 실험에서 선정된 D116 균주를 사용하여 poultry feces extract medium내에서의 가용성 단백질의 변화를 관찰하였다(Fig. 2). 이 균주는 glucose가 없는 배지 내에서의 가용성 단백질 섭취를 거의 못하고 있다. 그러나 glucose를 첨가하면 배지 내에 있는 가용성 단백질의 거의 전부를 사용한다. 배지 내에서 감소한 가용성 단백질은 대부분이 균체단백질로 전환되었을 것으로 추

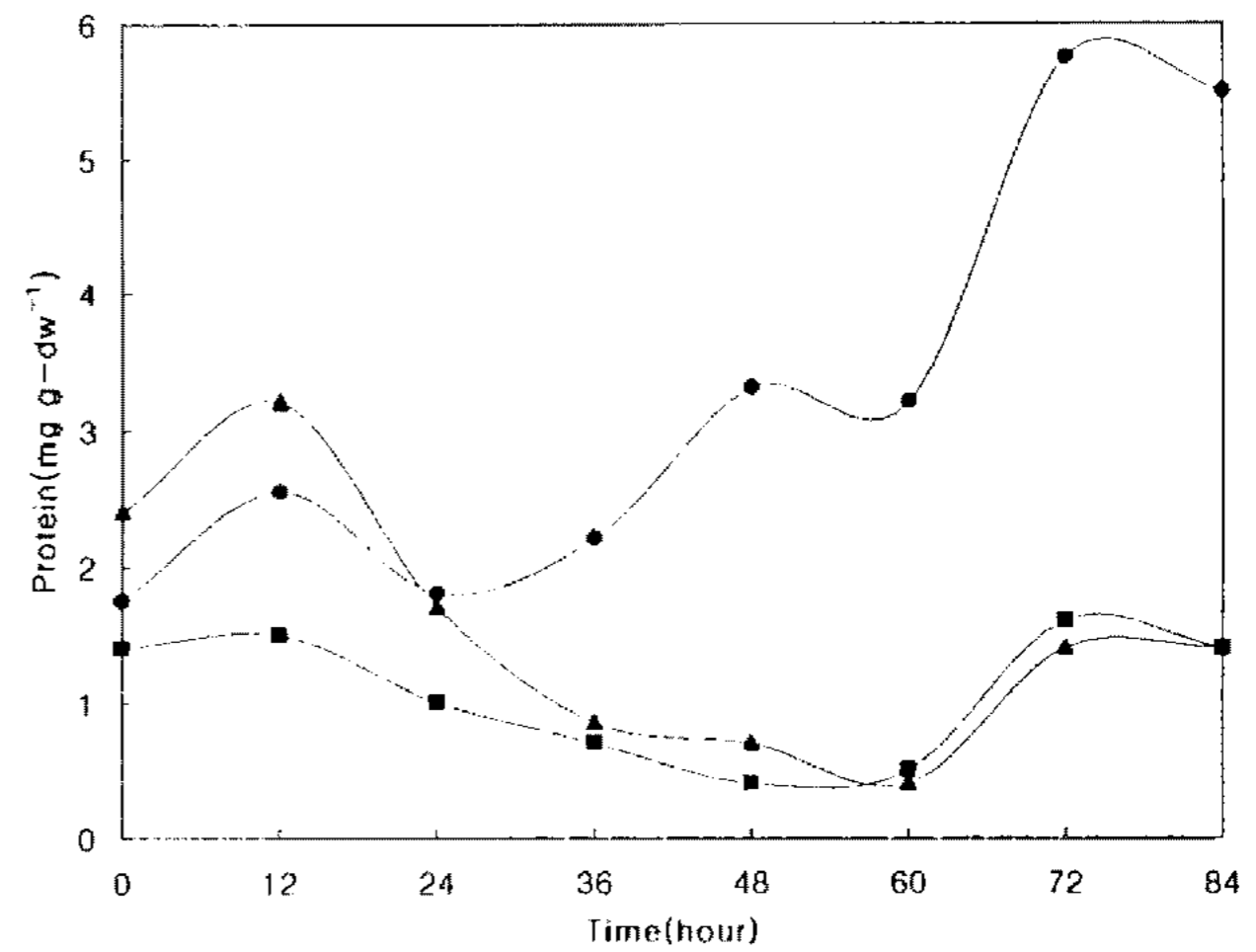


Fig. 3. Changes in uric acid content during treatment of strain D116.

(Control: ●; Glucose 2%: ▲; Glucose 5%: ■)

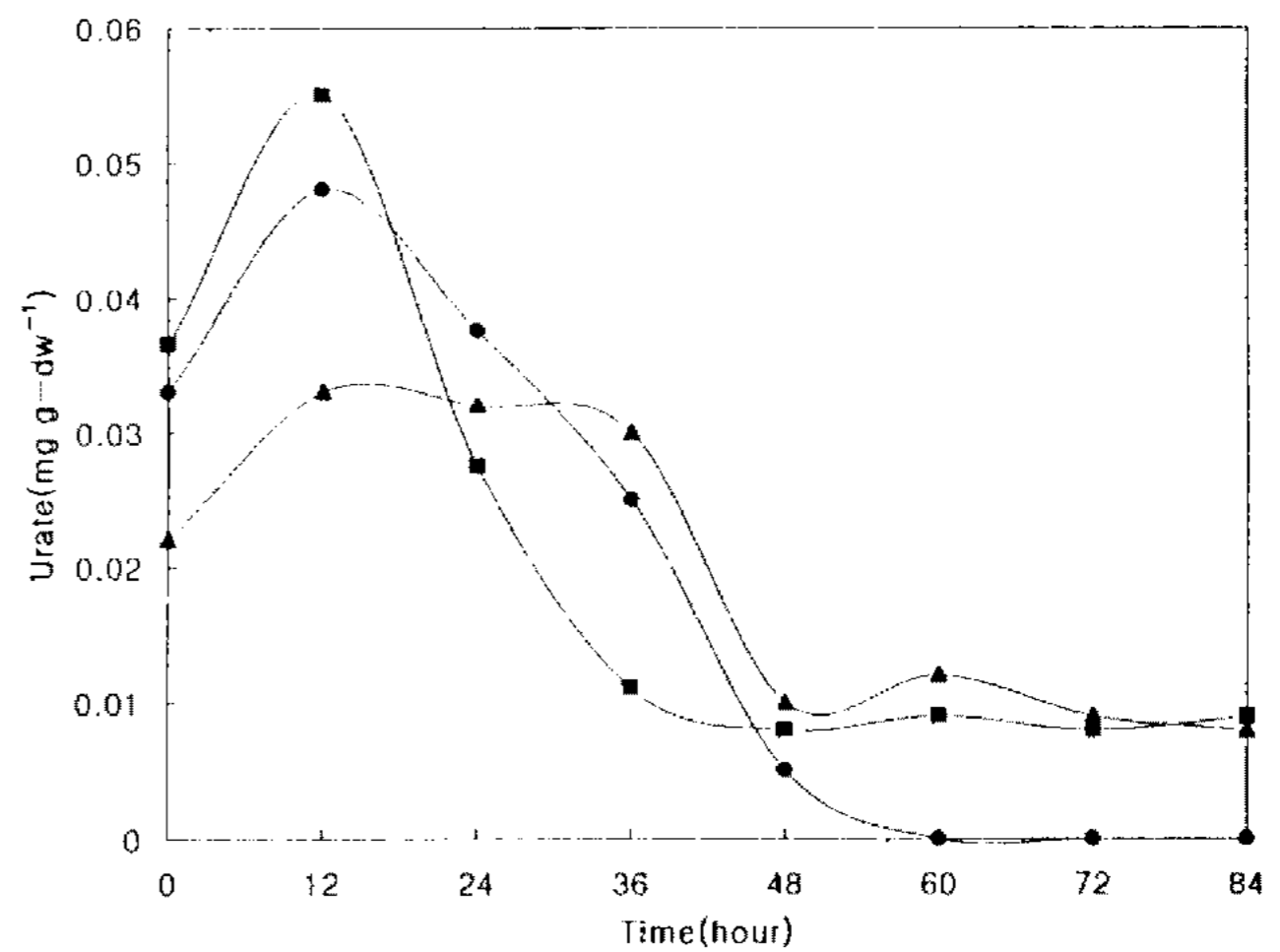


Fig. 2. Changes in soluble protein content during treatment of strain D116.

(Control: ●; Glucose 2%: ▲; Glucose 5%: ■)

정된다. 약 60시간 이후에 가용성 단백질의 양이 다시 증가하는 것은 각 균주들의 성장곡선과 관계가 있음을 보여주고 있다. 예비실험의 결과 약 60시간이 경과하면 배지내의 균체들은 stationary phase의 말기에 도달하고 사멸기에 이르는 것으로 보아 이는 사멸기에 이르는 균주들의 자기소화에 의하여 균체내 단백질이 배지로 분비된 현상이라 추정된다.

D116 균주의 uric acid 이용율에 대한 결과는 Fig. 3에 나타내었다. 가금류의 분변에 존재하는 조단백질의 일부는 uric acid의 형태로 배출된다. 따라서 계분을 잘 이용할 수 있는 균주를 선별하는 중요한 요인 중의 하나가 균주의 uric acid 이용능력이다. 또한 uric acid가 제거되지 않은 사료는 가축에게 성장 저해 효과가 있기 때문에 uric acid의 이용능이 증가하면 사료로서의 효용성도 증가한다(5). Uric acid는 여러 단계를 거쳐 glycollate와 urea로 분해된다(20). 이중 urea는 질소원으로

Table 3. Changes in volatile fatty acids content during treatment with glucose of strain *Candida* sp. D116.

Volatile fatty acids	0% Glucose			2% Glucose			5% Glucose		
	0 hr	48 hr	96 hr	0 hr	48 hr	96 hr	0 hr	48 hr	96 hr
Acetic acid (mM)	61.91	0.39	0	61.91	47.25	76.57	61.91	64.91	53.64
Propionic acid (mM)	14.66	0	0	14.66	8.12	8.62	14.66	11.90	9.81
Isobutyric acid (mM)	0.29	0	0	0.29	0.92	1.28	0.29	1.46	2.07
Butyric acid (mM)	5.00	0	0	5.00	1.90	1.70	5.00	3.12	2.06
Isovaleric acid (mM)	0.25	0	0	0.25	0.30	0.45	0.25	0.44	0.48
Valeric acid (mM)	0.15	0	0	0.15	0.05	0	0.15	0.07	0.05
Isocaproic acid (mM)	0.11	0	0	0.11	0.05	0.05	0.11	0.08	0.06
Caproic acid (mM)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Heptanoic acid (mM)	0	0	0	0	0.03	0.03	0	0.07	0.11

로서 균체의 단백질 합성에 이용된다. 또한 glycollate는 dicarboxylic acid cycle-glycerate 경로 또는 hydroxyaspartate 경로를 통해 에너지원 및 탄소원으로 이용된다. D116 균주의 경우 접종후 약 60시간이 경과하면 배지 내에 있는 uric acid가 상당량 감소되었다. 가용성 단백질의 경우와는 다르게 60시간 이후에도 다시 증가하지 않는 현상은 uric acid가 균체내로 흡수된 후 체세포 성분 및 균체 단백질 합성에 사용되었기 때문이라고 추정되어진다. Uric acid의 분해는 glucose를 첨가하지 않은 배지에서 더 빨리 일어난다. 이런 현상은 모든 균주의 경우에서 동일하게 관찰되었는데 glucose가 없으면 부족한 탄소원을 보충하기 위하여 더 빨리 uric acid를 분해하는 현상에 기인한 결과라 추정되어진다. 첨가한 glucose의 양에 따른 uric acid 이용능의 차이는 크지 않았다.

Table 3은 D116 균주가 탄소원인 glucose의 농도에 따라 VFA(volatil fatty acids)를 제거하는 상태를 나타낸 것이다. 배양기간동안 48시간 간격으로 시료를 채취하여 측정하였다. 이 결과들을 비교하여 보면 전체적인 양상은 uric acid 이용의 경우와 비슷하게 첨가한 glucose의 양과 VFA 이용능과는 반비례하는 결과를 나타내고 있었다. 이것은 균주가 짧은 chain으로 이루어진 fatty acid를 분해·섭취함에 있어서 부족한 탄소원을 보충하고자 glucose를 첨가하지 않은 배지에서 배양할 때 더 빨리 분해하여 나타난 경우라고 생각되었다. 특히 균체 성장에 충분하도록 5%의 glucose를 첨가하였을 경우 VFA의 감소가 거의 일어나지 않았으며, 오히려 어떤 VFA들은 더 축적되는 결과를 보이기도 하였다. 하지만 국내외에서 발표된 다른 연구결과(14,21)들과 비교해 보았을 때 본 연구에서 분리한 균주들이 가지고 있는 VFA 분해의 potential activity는 상당히 높은 수준임을 알 수 있었다.

SCP 생산을 위한 계분발효의 조건

발효효율과 SCP의 생산증대를 위하여 균체생육에 미치는 여러 가지 탄소원의 영향과 각 탄소원에 따른

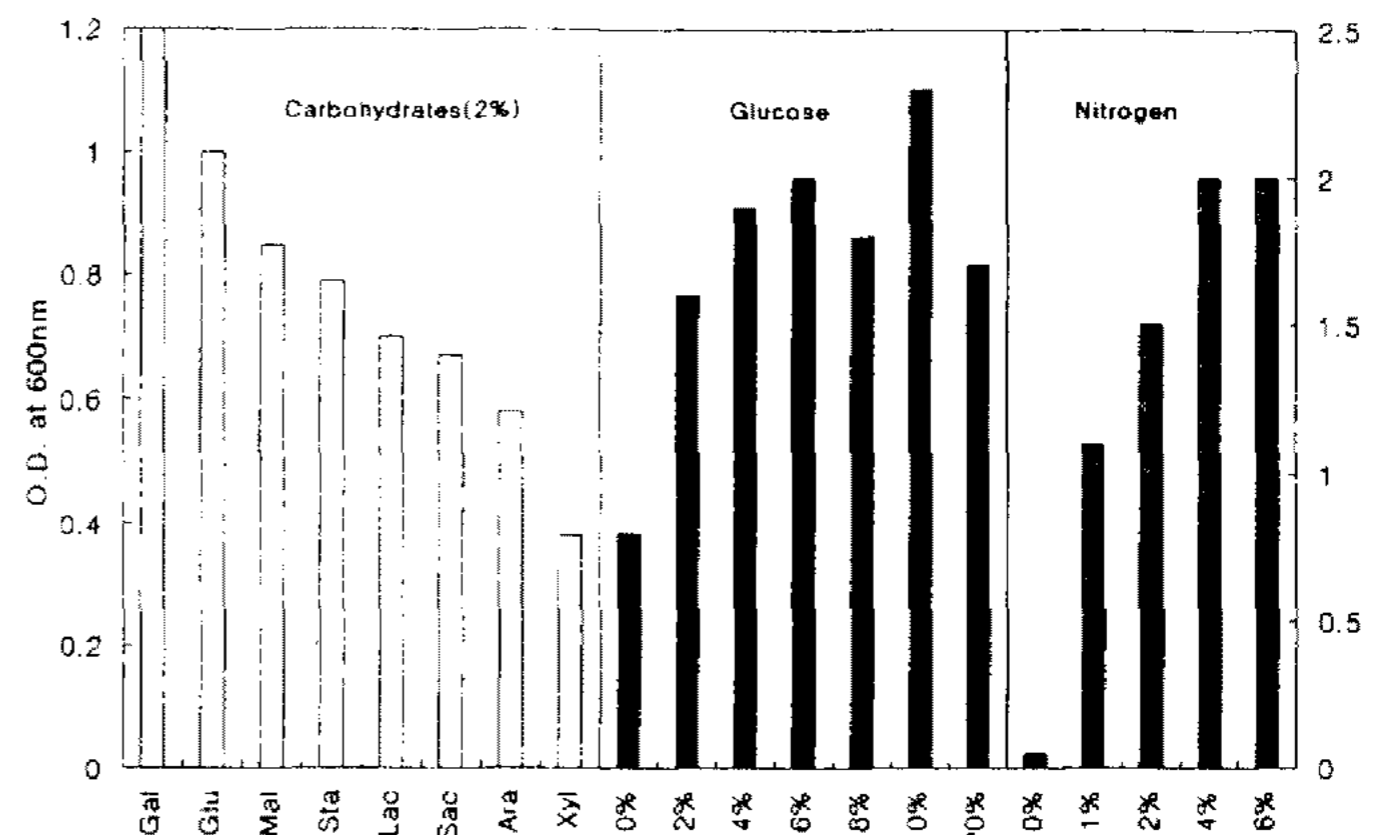


Fig. 4. Effect of various carbohydrates as a carbon source, glucose and nitrogen content (%) on the growth of strain D116.

성장률의 변화, 질소원의 농도 조절에 따른 성장률의 변화 등을 조사하였다. 탄소원의 종류와 탄소원 및 질소원의 농도가 균체생육에 미치는 영향을 측정된 결과는 Fig. 4와 같다. D116 균주는 glucose보다는 galactose와 더 높은 기질 친화력을 보였다. 그러나 galactose의 경우 glucose보다 단가가 월등히 높은 점을 감안하여 최적 탄소원을 glucose로 선택하였다. 배지내의 glucose 농도를 다르게 하여 배양한 경우 4% glucose 농도까지는 균체생육이 증가하였으나 4% 이상의 농도에서는 거의 비슷한 균체생산능을 보였으며, 질소원 농도를 다르게 하여 균체를 생육시킨 경우도 4% 농도까지는 균체의 생육이 증가하였으나 4% 이상에서는 더 이상의 균체생산의 증가가 없었다.

SCP 생산을 위한 액체발효의 조건

계분을 이용하여 액체발효배지를 조제하고 액체배양액에서 균체의 성장에 따른 배지내 성분의 변화를 보기 위하여 84시간 동안 배양기간중 배양액의 가용성 단백질과 uric acid 및 환원당의 변화를 조사하였다. D116 균주는 glucose의 존재하에 약 60시간이 경과하면 poultry feces-extract(PFE) 배지내에 있는 거의 모든 가

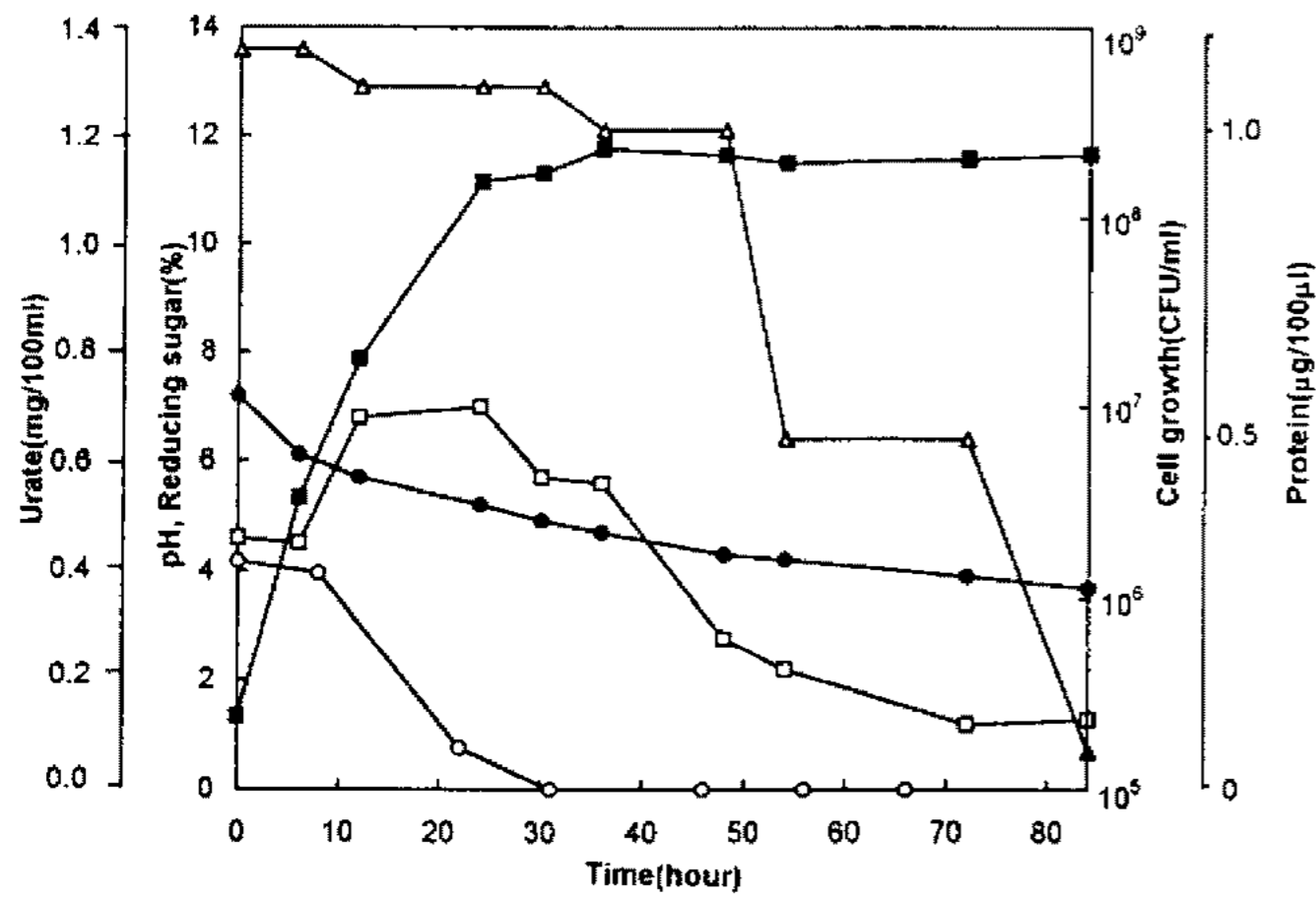


Fig. 5. Profiles of cell growth, pH, protein, urate and reducing sugar content during batch fermentation with 4% poultry feces extract medium in 5l jar fermenter.

□: Soluble protein (µg/100 ml), ■: Cell growth (CFU/ml), ○: Reducing sugar (%), ●: pH, △: Urate (mg/100 ml)

용성 단백질 및 요산을 분해하게 된다(Fig. 5). Viable count를 통하여 균체생산능을 조사하였는데 약 36시간 정도에서 균체 생산능이 최고조에 도달하였으며, 그 이후에는 점차 감소하는 결과를 보였다(Fig. 5). 배양액의 pH는 균체의 성장에 따라 점차 감소하는 경향을 보였으며 이는 균체가 증가함에 따라 산성 물질대사산물의 생산으로 인하여 pH가 감소하는 것으로 추측되어진다.

Uric acid는 균체의 성장이 정지기(stationary phase)에 도달하였을 때 급격한 감소를 보이며, 이는 D116 균주가 uric acid를 분해할 수 있으며 질소원으로서는 계분내의 uric acid를 이용하였을 가능성을 보여주고 있다(Fig. 5). 일단 균체내로 흡수된 uric acid는 여러 단계의 대사경로를 거쳐 glycollate와 요산으로 분해되기 때문에 uric acid가 재검출되지 않는다. 환원당의 경우 큰 변화는 없었으나 균체성장이 최고에 달한 36시간에 많은 감소를 보이고 있으며 그 이후에도 일정한 농도를 유지하였다(Fig. 5).

Single Cell Protein(SCP)의 생산

SCP의 대량생산은 300l fermenter(한국발효기)를 이용하여 우수균주로 선발된 D116 균주를 50%의 계분혼합 배지와 30°C의 배양 온도에서 36시간 배양하여 균주의 생육수준이 3.8×10^9 CFU/ml 농도의 균체를 생산하였다. 매회의 조작에서 200l의 배양액중 약 870 g-dw의 균체를 얻었으며 생산된 균체의 조단백질 함량은 67%이었다. 본 연구자들은 현재 본 실험에서 생산된 균체를 사용하여 가금용 조사료를 조제하고 이에 대한 사양실험을 진행하고 있으며 이 결과는 다음에 보고하고자 한다.

요 약

질소원으로서는 계분을 이용하는 균주를 선별하고 계분배지에서 균체의 생육속도가 다른 균주에 비하여 우수한 균주를 분리하였다. 형태·생리학적 특성을 기초로 하여 yeast의 분류 기준과 비교하여 본 균주를 *Candida* sp.로 동정하였으며 본 균주를 *Candida* sp. D116으로 명명하였다. Poultry feces extract medium에서 4% 농도의 glucose 첨가가 *Candida* sp. D116의 성장을 증진시켰으며 uric acid의 분해를 촉진하였다. 질소원으로는 neopeptone 4% 첨가가 균체 생육에 효과적이었다. D116 균주를 액체 발효하여 균체생산능, 요산 그리고 가용성 단백질의 변화를 조사하였다. 그 결과 약 60시간이 경과하면 액체 발효 배지내의 거의 모든 가용성 단백질 및 요산의 감소를 보였으며 균체생육은 약 36시간 배양하였을 때 최고조에 도달하였고 그 이후에는 점차 감소하는 경향을 보였다. SCP의 대량생산의 결과 50%의 계분혼합 배지와 30°C의 배양 온도에서 36시간 배양하여 균주의 생육수준이 3.8×10^9 CFU/ml 농도의 균체를 생산하였고 200 L의 배양액중 약 870 g-dw의 균체를 얻었으며 생산된 균체의 조단백질 함량은 67%이었다.

사 사

본 연구는 1994년도 농업진흥청의 연구과제로 수행되었으며, 농업진흥청의 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. Cromwell, G.L. 1989. Requirements and biological availability of phosphorus for swine. Proc. Pitman Moore Nutr. Conf. Des Moines, IA. Pp. 75-95.
2. Golueke, C.G. 1977. Biological Reclamation of Solid Wastes. Rodale Press, Emmaus. pp. 50-53.
3. Sauer, W. and L. Ozmek. 1986. Digestibility of amino acids in swine: Results and their practical applications. *A Reviews. Livestock. Prod. Sci.* 15: 387-388.
4. 민정훈. 1990. 계분의 호기성 발효중 성분변화와 관여 미생물의 특성에 관한 연구. 중앙대학교 석사학위 논문.
5. 배동호, 정근기, 최창본. 1988. 볏짚 암모니아 처리시 암모니아원으로서는 요소의 이용에 관한 연구. 축산지. 30(8): 477-481.
6. 배영호. 1985. 계분 발효사료가 broiler의 성장에 미치는 영향. 부산대학교 석사학위 논문.
7. 송영민. 1990. 계분과 당밀을 첨가한 볏짚 silage의 품질과 사료적 가치. 경상대학교 석사학위 논문.
8. 조남일. 1988. *Lactobacillus plantarum* 접종 및 당밀 첨가가 볏짚 계분 발효사료의 발효양상에 미치는 영향. 고려대학교 석사학위 논문.
9. 채주권. 1986. 계분의 혐기성 소화에 관한 연구. 인하대학교 석사학위 논문.
10. Flegal, C. J. and H. C. Zindel. 1971. The utilization of dehydrated poultry waste by laxing hens. *Poultry Sci.* 48: 1807(abstract).

11. McNab, J.M., D.J.W. Lee and D.W.F. Shamnon. 1972. The growth of broiler chickens fed low protein diets containing triammonium citrate, diammonium hydrogen citrate and autoclaved dried poultry manure. *Brit. Poultry Sci.* **13**: 357-365.
12. Harmon, B.W., J.P. Fontenot and K.E. Webb. 1975. Ensilaged broiler litter and corn forage. *J. Anim. Sci.* **40**: 144-155.
13. Ohta, Y. and M. Ikeda. 1978. Deodorization of pig feces by *actinomyces*. *Appl. Environ. Microbiol.* **36**: 487-491.
14. Choi, M.Y. and E. Lee. 1992. Utilization of deodorized poultry feces with *Tolura* sp. CH-30. *J. Microbiol. Biotech.* **2**: 273-277.
15. APHA-AWWA-WPCE. 1992. *Standard Method for the Examination of Water and Wastewater*. 18th ed. AWWA, Dencer, Co., Washington.
16. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
17. Bradstreet, R. B. 1984. *The Kjeldahl Method for Organic Nitrogen*. Academic Press, New York.
18. Berfeld, P. 1955. In Colowick, S. P. and N. O. Kaplan (ed.), *Methods in Enzymology*, Academic Press, N.Y., Vol. 1. Pp. 149-183.
19. Krieg, N. R. and J. G. Holt. 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Pp 1104-1207, Vol. 2. Williams and Wilkins Co., Baltimore.
20. Gottschalk, G. 1985. *Growth with Organic Acids, Bacterial Metabolism*. 2nd ed. Springer-Verlag, New York, Pp. 277-279.
21. Martin, A. M. 1991. *Bioconversion of Waste Materials to Industrial Products*. Elsevier Applied Science, Berlin.

(Received 11 August 1996)