

전분이용성 효모의 분리 및 동정

박완수 · 구영조 · 신동화 · 서기봉

농어촌개발공사 식품연구소

(1982년 11월 1일 수리)

Isolation and Identification of Starch Utilizing Yeast

Wan Soo Park, Young Jo Koo, Dong Hwa Shin and Kee Bong Suh

Food Research Institute, AFDC, Hwasung-kun, Kyunggi-do, 170-31, Korea

(Received November 1, 1982)

Abstract

Direct starch-utilizing microorganisms were isolated from 50 samples. Among them, Y-5 strain was selected as one of the potential microorganisms which could utilize starch directly to produce protein or lipid as food resources. The Y-5 strain was identified as a strain of *Sporobolomyces holsaticus*. It grew on starch or inulin better than on glucose or fructose and its composition was 45% of crude protein, 16% of crude lipid and 9.2% of ash.

서 론

농업에 의한 전통적 식량생산체계와는 달리 비전통 식량⁽¹⁾ (synthetic food)으로서의 단세포단백질은 세균, 효모, 곰팡이 및 조류 등 여러가지 미생물을 이용하여 노르말 파라핀, 메탄가스, 메탄올, 에탄올, 초산, 이산화탄소, 식물성기름⁽²⁾, 전분질 및 섬유소 가공폐액과 갑각류의 키틴질 가공폐기물^(3,4) 등을 원료로 생산되고 있다.

그중 제빵용 효모를 포함한 세계적인 효모 생산량은 대략 연간 50만톤으로 추정되고 있다⁽⁵⁾.

이러한 효모 생산을 위한 여러가지 탄소원 가운데 전분질은 일반적으로 먼저 발효성 당으로 분해한 다음 이용되어 왔으나 전분이용성 효모에 의한 균체의 직접생산이 시도되어 1956년 Wickerham 등의 미국특허⁽⁶⁾로 전분함유배지에서 전분을 당당류로 분해하는 효모인 *Saccharomycopsis fibuliger*를 이용한 혼합배양이 개발되었고 1960년 비슷한 것으로 *Endomycopsis fibuliger*를 이용한 *Symba Yeast* 생산에 대한 연구⁽⁷⁾가 있

으며 국내에서는 균체 생산보다는 효모아밀라아제에 관한 보고⁽⁸⁻¹⁰⁾가 있을 뿐이다.

본 연구에서는 국내에서 증산이 가능하고 값싼 전분 원료의 효율적 이용을 위하여 당화공정을 거치지 않고 직접 균체생산을 할 수 있는 것점이 있는 전분이용성 효모를 분리 동정하고 단세포 단백질원으로서의 가능성을 검토하였으므로 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

전분이용성 효모의 분리

균 분리원으로 경기도 화성군 반월면 근교의 사료, 토양, 나뭇잎, 감자, 고구마, 옥수수 등을 분리원으로 하였다. 이들을 잘게 썰고 고루 혼합한 후 살균된 생리 식염수로 적당히 희석한 액 약 1ml를 Table 1과^(11,12) 같은 한천배지에 pour plate method로 접종하여 25°C에서 2~3일간 배양하였으며 형성된 독립콜로니에서 조균하여 같은 평판배지에서 순수분리를 3회 반복한 후 형태학적으로 효모를 선별하였다. 선별된 전분이용성 효모는 같은 사면 배지에 접종하여 보관하고 다음 실

험에 사용하였다.

Table 1. Medium composition for the isolation of starch utilizing yeasts

Components	Concentration (g/l)
Soluble starch	50.00
Urea	1.07
NaNO ₃	2.39
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	7.3
MgSO ₄ · 7H ₂ O	5.0
K ₂ SO ₄	0.44
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.05
Agar	23.00
pH	5.8

균주의 선발

Table 1.과 같은 액체배지 50ml를 250 ml 삼각플라스크에 넣고, 수증기압 15psi에서 15분간 살균한 후 보관중인 균주를 1백금이씩 접종하고 25℃에서 72시간 수조에서 진탕배양(120 stroke, 진폭 3.5cm) 한 다음 건조균체량을 측정하여 그 양이 가장 많은 균주를 선발하였다.

균주의 동정

선발된 전분이용성 효모의 배양적 및 형태학적 특성과 생리학적 특성을 상법에 의하여 추구하며 Barnett와 Pankhurst(1974)⁽¹³⁾의 key로서 동정하였으며 Rose와 Harrison(1969)⁽¹⁴⁾ 및 Lodder⁽¹⁵⁾의 방법으로 확인하고 다시 한국중균협회에서 분양받은 표준균주와 대조하였다.

탄소원별 배양실험

Table 1.의 배지조성중 가용성 전분 및 한천을 제외한 것을 기초배지로 하여 탄소원은 이눌린, 가용성 전분, 맥아당, 과당, 설탕, 및 포도당을 탄소량으로 계산하여 22.2g/l되게 각각 첨가한 후 배양액 50ml를 250ml 삼각플라스크에 넣고 수증기압 15psi에서 15분간 살균한 후 미리 준비하여 활성화시킨 선발균주를 1ml씩 접종, 25℃에서 120 스트로오크(진폭 3.5 cm)로 진탕배양하면서 균체 성장속도를 측정하였다.

분석 방법

가. 건조균체량 : 배양액 10ml를 취하여 원심분리한 침전균체를 증류수로 2회 반복 세척 원심분리하여 침전물을 105℃ 건조법으로 건조하여 건조균체량으로 하였다.

나. 균체 성장 속도 : 균체량 측정방법과 같이 세척 원심분리한 균체를 같은 부피가 되도록 증류수로 현탁시

킨 후 UV-VIS Spectrophotometer (Varian Techtron, model 635)를 사용하여 525nm에서 흡광도를 측정하여 배양시간에 따라 흡광도의 대수함수 값을 그래프로 나타내어 Pilone 등의 방법⁽¹⁶⁾에 의하여 비성장속도를 계산하였다.

다. 조단백질 : Kjeldahl 법⁽¹⁷⁾으로 총질소를 측정하여 환산계수 6.25를 곱하여 조단백질량으로 하였다.

라. 조지방 : 동결 건조된 균체를 40 mesh 이상으로 분쇄한 후 이 시료 약 2g을 속슬레장치에서 클로로포름 : 메탄올 혼합용액(2 : 1, V/V)으로 16시간 추출한 후 감압농축하여 동결건조기에서 18시간 건조후 칭량하여 조지방량으로 하였다.

마. 조회분 : 동결 건조된 균체를 600℃에서 회분화시켜 조회분량으로 하였다.

결과 및 고찰

전분이용성 효모의 분리 및 선발

Fig 1.과 같이 사료, 토양 등의 분리원에서 순수분리한 202 균주중에서 효모는 8균주가 1차로 선발되었으며 이것을 진탕배양한 결과 건조균체량이 10g/l 이상인 균주는 Y-5 및 Y-7 이었으며 균체량이 12.20g/l인 균주를 균체생산을 위한 전분이용성 최우수 효모를 선발하였다.

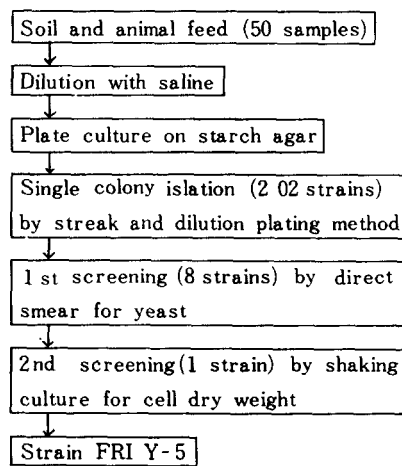


Fig.1. Isolation of starch utilizing yeast

선발균주의 동정

가. 형태적 특성 : 분리 선발된 FRI Y-5 균주의 형태학적 특성은 Table 2 와 같았다. 즉 세포의 모양은 조금 둥근 편이었으나 번식모양이 다극성 출아법이었고 aerial sterigmate에 달려 있는 사출모자의 모양이 비

대칭 kidney shape 이었고 심하게 discharge 되었다. 진균사의 clamp connection 을 볼 수 없었으므로 2차균사는 형성하지 않는 것으로 판단되었다.

Table 2. The morphological characteristics of the isolate FRI Y-5

Classification	Characteristics
Shape of cell	Oval and elongate
Cell size	(1.7~2.3) × (4~8) μ
Vegetative reproduction	By budding (multilateral)
Ballistospore	Present (asymetric kidney shape discharge)
Chlamyospore	Absent
Pseudo hyphae	Present
True hyphae	Present (without clamp connection)

나. 배양적 특성 : 맥아즙 및 맥아즙 한천 평판배지에서 배양하면서 배양적 특성을 관찰한 결과는 Table 3 과 같다. 즉 콜로니의 끝이 undulate 하고 콜로니의 크기가 조금 작은 편이었으나 맥아즙 시험관 배양시 pellicle 및 ring 과 침전하는 성질이 전형적이었으며 색깔이 연분홍색이며 아세톤에 용해되는 카로티노이드 색소를 함유하였다.

Table 3. The cultural characteristics of the isolate FRI Y-5

Classification	Characteristics
Malt extract culture	
Pellicle	Present
Ring	Present(broad)
Sediment	Heavy or moderate
Growth on malt agar	
Colony form	Irregular
Colony edge	Undulate
Elevation	Umbo-nate
Surface	Slightly rough and semi dull
Color	Pink
Colony size	2.5~5mm

다. 생리학적 특성 : 선발균주 FRI Y-5의 생리학적 특성은 Table 4 와 같았다.

유당, D-포도당, 설탕 배지에서 발효하지 않았고 설탕과 맥아당을 탄소원으로 자화하여 성장하였다. 니트레이트와 셀로비오제는 자화하였으나 에리스리톨은 자화하지 못하였다. 이상의 선발균주 FRI Y-5의 균학적 특성 검토 결과 사출도자를 형성하고 비대칭 kidney

Table 4. Physiological characteristics of the isolate FRI Y-5

Classification	Characteristics
Fermentation of sugar	
Lactose	Negative
D-glucose	Negative
Sucrose	Negative
Assimilation of carbon compound	
Sucrose	+
Maltose	+
Erythritol	-
Cellobiose	+
Pottassium nitrate assimilation	Positive

shape 이었고 출아번식을 하며 연분홍색의 카로티노이드 색소를 형성하고 진균사를 가지며 clamp connection 을 하지 않는 점으로 보아 *Sporobolomyces* 속에 속한다는 것을 알 수 있었다. 진균사를 형성하며 nitrate, sucrose 및 maltose 를 자화하는 것으로 보아 *Sporobolomyces holsaticus* 로 잠정적으로 동정하였다. 이를 한국종균협회에서 분양받은 동일균주인 *Sporobolomyces holsaticus* KFCC 34712와 균학적인 성질을 비교한 결과는 Table 5와 같다. 세포의 모양이 조금 둥근 편이고 맥아즙 평판배양시 콜로니 끝이 undulate 하고 분홍색이 조금 진한 편이었으나 그의 균학적성질이 동일하였다. 이런 점으로 미루어 분리 선발 균주 FRI Y-5는 *Sporobolomyces holsaticus* 이거나 근연균으로 판단된다.

탄소원에 따른 성장률 비교

탄소원에 따른 균체성장률을 알아보기 위하여 탄소원 별로 초기에 탄소량이 같도록 제산하여 첨가한 후 배양하면서 균체량 및 성장속도를 측정한 결과는 Table 6 과 같다.

거의 배양 7 일에서 균체농도가 대부분 최대가 되었으며 이눌린이 가장 많아서 14.55g/l 이었고 가용성전분, 맥아당, 과당, 설탕, 포도당의 순이었다. 비성장

Table 6. The growth of a strain FRI Y-5 on the various carbon sources

Carbon sources	Initial conc. carbon sources (g/l)	Max. conc. of cell (g/l)	Specific growth rate (hr ⁻¹)
Glucose	55.6	5.41	0.051
Fructose	55.6	7.45	0.111
Maltose	52.8	9.36	0.171
Sucrose	52.8	5.81	0.078
Soluble starch	50.0	12.20	0.183
Inulin	50.0	14.55	0.25

Table 5. Comparison of microbiological characteristics of strain FRI Y-5 with those of *Sporobolomyces holsaticus* KFCC 34712

Classification	<i>Sporobolomyces holsaticus</i> KFCC 34712	Selected strain FRI Y-5
Morphological characteristics		
Vegetative reproduction	By budding (multilateral)	By budding (multilateral)
Ballistospore	Present (asymetric, kidney shape)	Present (asymetric, kidney shape)
True hyphae	Present (without clamp connection)	Present (without clamp connection)
Cultural characteristics		
Color	Pale pink	Pink
Pellicle and ring	Present	Present
Physiological characteristics		
Fermentation of sugar (glucose, lactose, sucrose, galactose, maltose,)	Negative	Negative
Assimilation of carbon compound		
Sucrose, trehalose	+	+
Inulin, soluble starch	+	+
Lactose, melibiose	-	-
Arabinose, glycerol	+	+
Succinate, inositol	+	+
Mannitol	+	+

속도도 마찬가지로 이눌린이 가장 커서 0.25hr^{-1} 이었으며 가용성전분, 맥아당, 과당, 설탕 및 포도당의 순으로 다당류에서 2 당류나 단당류보다 균체량 및 비성장속도가 큰 것을 알 수 있었다. 따라서 전분, 이눌린 같은 다당류의 직접 이용에 적합한 균주로 사료되었다.

효모 균체의 일반성분

분리선발된 전분이용성 효모 FRI Y-5의 미생물 식량원으로서의 가능성을 알아보기 위하여 분석한 균체의 일반성분은 Table 7 과 같다.

일반적으로 미생물 식량원으로서의 효모 균체의 성

Table 7. The composition of the cell of a strain FRI Y-5

Components	Percent of cell dry weight
Crude protein*	45.2
Crude lipid**	15.9
Ash	9.2

* N x 6.25

** chloroform/methanol = 2 : 1 (v/v)

분⁽¹⁸⁾은 조단백이 47~56%, 조지방이 2~6%, 회분은 5~9.5%인데 비하여 FRI Y-5는 조단백이 45.2%로 약간 낮은 편이었고 조지방이 15.9%로 상당히 높았으며 회분은 9.2%로 거의 비슷하였다.

요 약

값싼 전분질 원료로부터 직접 균체생산을 목적으로 화성균 반월면 근교의 퇴비 및 토양 등 전분질 시료에서 전분을 직접 자화하여 균체를 상당량 생산하는 전분 이용성 효모 1주를 분리하고 동정하였다.

이 효모의 형태적 배양적 및 생리적 특성을 구명한 결과 *Sporobolomyces holsaticus*로 동정되었다. 이 효모는 가용성 전분이나 이눌린 같은 다당류에서 이당류나 단당류에서보다 최대 균체량 및 비성장속도가 컸으며 균체성분은 조단백 45.2%, 조지방 15.9%, 회분 9.2%이었다.

1. Ouellette, R. P., Lord, N. W. and Cheremisinoff, P. N. : *Food Industry Energy Alternatives*, Food and Nutrition Press, Inc., p. 20 (1980)
2. Nakahara, T., Sasaki, K. and Tabughi, T. : *J. Ferment. Technol.* **60**, 89 (1982)
3. Cosio, I. G., Fisher, R. A. and Carroad, P. A. : *J. Food Sci.* **42**, 901 (1982)
4. Revah-Moiseev, S. and Carroad, P. A. : *Biotech. and Bioeng.*, **23**, 1067 (1981)
5. Flynn, G. and Adams, M. R. : *An Industrial Profile of Yeast Production*, Tropical Products Institute/O. D. A, U. K (1981)
6. Lemmel, S. A., Heimsch, R. C. and Edwards L. L. : *Appl. Environ. Microbiol.* **37**, 227 (1979)
7. Skoman, H. : *Food from Waste* (Birch, G. G. Parker, K. J. and Worgan, J. T., eds.), Applied Sci. Publ., London (1976)
8. 배정설, 박윤중, 이석건, 이택수 : 한국미생물 학회 지 **9**(1), 27 (1971)
9. 배정설, 박윤중, 이석건, 이택수 : 한국 미생물학회 지, **9**(2), 32 (1971)
10. 박윤중, 윤한교, 손천배 : 한국식품과학회지, **7**, 243 (1975)
11. Singh, J. and Sood, M. G. : *J. Am. Oil Chemists Soc.*, **50**, 485 (1973)
12. Singh, J. and Sood, M. G. : *J. Sci. Food Agr.*, **23**, 1113 (1972)
13. Barnett, J. A. and Pankhurst R. J. : *A New Key to the Yeasts*, North-Holland Publ. Co., p. 88, 222 (1974)
14. Rij, N. J. W. K. : *The Yeast* (Rose, A. H. and Harrison J. S., eds.) Academic Press, Vol. 1, p. 5 (1969)
15. Lodder, J. : *The Yeast Taxonomy Study*, North-Holland Publ. Co., p. 831 (1971)
16. Pilone, G. J., and R. E. Kunkee : *Appl. Environ. Microbiol.* **32**, 405 (1976)
17. Lillevic, H. A. : *Methods in Food Analysis*, (Joslyn, M. A., ed.) Academic Press, New York and Loddon (1970)
18. Reed, G. : *Food Technology*, **35**, 89 (1981)