

전분이용성효모, *Sporobolomyces holsaticus* FRI Y-5의 배양조건에 관한 연구

박완수 · 구영조 · 신동화 · 민병용

농어촌개발공사 식품연구소

(1982年 11月 1日 수리)

Study on the Cultural Conditions of Starch Utilizing Yeast *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 November 1, 1982)

Abstract

It was investigated under several cultural conditions to produce biomass directly from starch by an strictly aerobic and amylolytic yeast, *Sporobolomyces holsaticus* FRI Y-5. Its optimal temperature and initial pH of medium for growth were 23°C and 6.9, respectively. Activation energy, E_a , for growth was calculated to be 17.33 Kcal/mole from the Arrhenius relationship. When each of 13 nitrogen sources was added to the basal medium, $(NH_2)_2CO$ had the best effect, on which concentration of cell after 3 day incubation was 10.6 g/l and cell yield was 0.451. The yeast growth was affected by $MgSO_4$, K_2SO_4 and $ZnSO_4$ as a mineral source and was best on the medium containing all of them. The addition of yeast extract (5g/l) could enhance the production of biomass and cell yield to 77% and 32%, respectively.

서 론

전보⁽¹⁾에서 저자들은 전분질로부터 효모균체를 직접 생산하기 위하여 전분이용성 효모를 분리 동정하였고, 전분질을 직접 이용하여 균체를 생산할 수 있는 가능성을 보였기로 각 탄소원별 균체생육 및 균체분석을 실시하였고, 아울러 이 효모의 일반적인 배양조건을 확인하였기에 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

사용균주 및 기본배지 조성

사용균주는 전보⁽¹⁾에서 보고한 *Sporobolomyces holsaticus* FRI Y-5를 사용하였다.

기본배지로는 전보⁽¹⁾에서 보고한 것과 같은 조성의 배지를 사용하였으며, 혐기적 조건에서의 효모증식을 검토한 경우 환원제로서 cysteine·HCl을 1g/l로 첨가하였다. 배지살균은 121°C에서 15분간 행하였고 배지의 pH는 살균후 HCl 용액이나 NaOH 용액을 사용하여 조절하였다.

배양방법

배양온도는 온도별 실험을 제외한 모든 실험에서 25°C로 하였다.

pH 및 온도별 실험은 500ml 삼각플라스크에 배지 250ml을 넣어 회전식 진탕기에서 250 rpm으로 배양하

여 비교하였으며, 그밖의 모든 실험은 배지 150ml을 넣어 왕복식수조진탕기로 Stroke 120, 진폭 3.5cm에서 수행하였다.

배지조성별 배양시험의 경우, 질소원은 유기질과 무기질 각각 질소량으로 1g/l 되게 첨가하였고, SO₄⁻² 염은 0.02 M 되게 첨가하여 처리 구별로 비교하였다.

접종은 보존균주를 액체배지에 30시간 증식시켜 접종원으로 사용하였으며 접종량은 5%로 하였다.

분석방법

- 가. 건조균체량—전보⁽¹⁾에 준하였다.
- 나. 균체성장속도—전보⁽¹⁾에 준하였다.
- 다. 전분함량—건조균체량 측정시 원심분리후 모은 상등액을 열탕수조에서 90분 동안 0.6N HCl로 가수분해 후 중화시킨 다음 dinitrosalicylic acid method⁽²⁾에 의하여 환원당을 정량한 다음 0.9를 곱하여 전분량으로 환산하였다. 이때 표준물질로 포도당을 사용하였다.
- 라. 균체수율⁽³⁾—생산된 건조균체량을 소비된 전분량에 대한 비로서 나타낸다.

결과 및 고찰

산소요구성

혐기적 조건하에서 균의 생육가능성을 검토하기 위하여 환원제로서 cysteine·HCl을 사용하여 배지중의 용존산소를 미리 제거한 후 배양하였을 때, 배양 72시간 후에도 전혀 균이 증식하지 않았다. 그러므로 균체생산시 산소가 절대 필요하다고 사료된다.

균의 생육에 미치는 초기 pH의 영향

배지의 pH를 2.0에서 9.5 범위내의 각각 다르게 조절하여 *Sp. holsaticus* FRI Y-5의 생육에 미치는 초기 pH의 영향을 검토한 결과 Fig. 1 과 같다.

pH 3 이하에서는 거의 성장을 하지 않았으며 pH 3 ~ 5에서는 pH가 증가할수록 비성장속도는 증가하나 최대 균체량과 균체수율은 거의 일정하였다. pH 6.9에서 최대균체량 7.2g/l, 균체수율 0.27, 비성장속도 0.14hr⁻¹로 가장 좋은 효과를 보여주었다. pH 9.5에서도 좋은 비증식속도를 보여주었으나 균체수율이나 최대균체량의 감소함을 볼 수 있었다.

한편, 일반적 효모의 최적 pH는 3~6으로 알려져 있는데, 정등⁽⁴⁾은 두부폐수를 이용 *Candida guilliermondii*를 배양할 때 pH가 6.0~7.5이었고, Thanh등⁽⁵⁾은 topioca 전분폐액을 이용 *Candida utilis*를 배양할 때 pH가 4~6이었으며, 유등⁽⁶⁾은 밤송이 산 가수분해액을 이용, *C. tropicalis*를 배양할 때 pH 6.0이었다. 또한 성등⁽⁷⁾은 톱밥 및 폐신문지당화액을 이용, GFY-2 효모

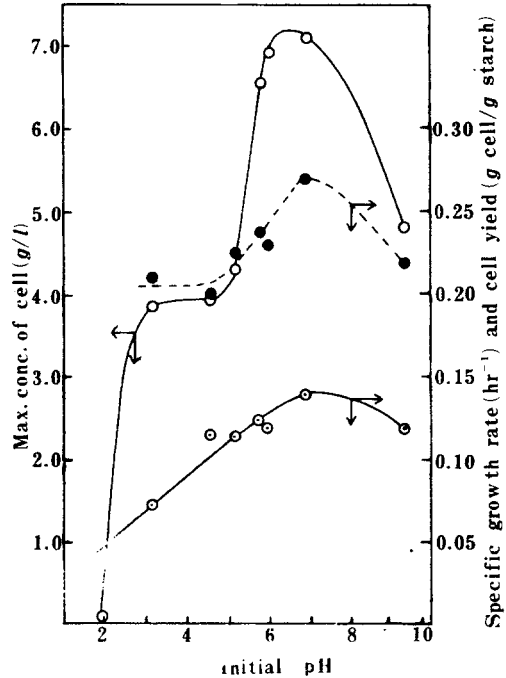


Fig. 1. Effect of the initial pH of medium on specific growth rate (○—○), cell yield (●—●) and max. conc. of cell (○—□)

균주를 배양했을 때 pH 5~7에서 최적을 나타내었다.

본 실험에서의 최적 pH 6.9는 약간 알칼리성으로 기울어진 값임을 알 수 있다. 따라서 앞으로의 모든 실험에서 배지의 초기 pH는 6.7내지 7.1로 조절하였다.

균의 생육에 미치는 온도의 영향

가용성전분 70g/l을 첨가한 기본배지를 사용하여 *Sp. holsaticus* FRI Y-5의 생육에 대한 배양온도의 영향을 검토하기 위하여 5내지 35°C 범위내의 각 온도에서 실험한 결과는 Fig. 2 와 같다.

검토된 온도 범위에서, 23°C 일 경우 비성장속도 0.19 hr⁻¹, 최대균체량 23.5g/l, 균체수율 0.63으로 균체생육이 가장 좋은 것으로 관찰되었다.

절대온도에 대한 비성장속도관계를 Arrhenius plot으로 표시했을 경우, Fig. 2 에서 알 수 있듯이, 활성화에너지, E_a는 17.33 kcal/mole로 미생물생육에 있어 전형적인 E_a 값이 15~20 kcal/mole⁽⁸⁾이라는 점과 잘 일치하고 있다. 또한 균체생산시 균체수율에 대한 온도의 영향은 중요한 요인으로, 온도가 증가함에 따라 균체수율은 증가하나 적온이상으로 온도가 증가했을 경우 균체수율이 감소하였다.

질소원별 배양실험

균의 생육에 미치는 각종 질소원의 영향을 검토하기 위하여 질소원 13종을 질소량당으로 1.0g/l 씩 각각 첨

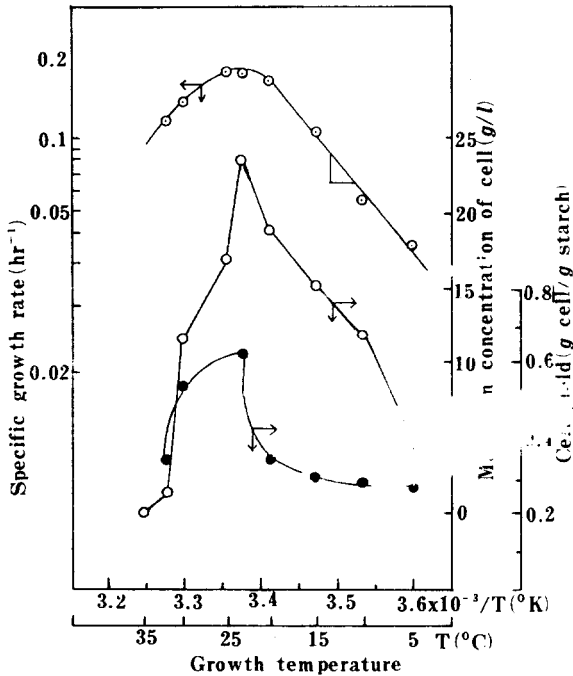


Fig. 2. Arrhenius plot of growth versus absolute temperature; the activation energy, E_a is 17.33 kcal/mole
 ○—○ : specific growth rate
 ○—○ : max. cont. of cell
 ●—● : cell yield

가한 기본배지와 $(NH_2)_2CO$ 와 $NaNO_3$ 을 총질소 함량으로 1.0g/l되게 동시에 첨가한 분리배지를 사용하여 비교실험한 결과는 Table.1 과 같다. 또한 검토된 질소원

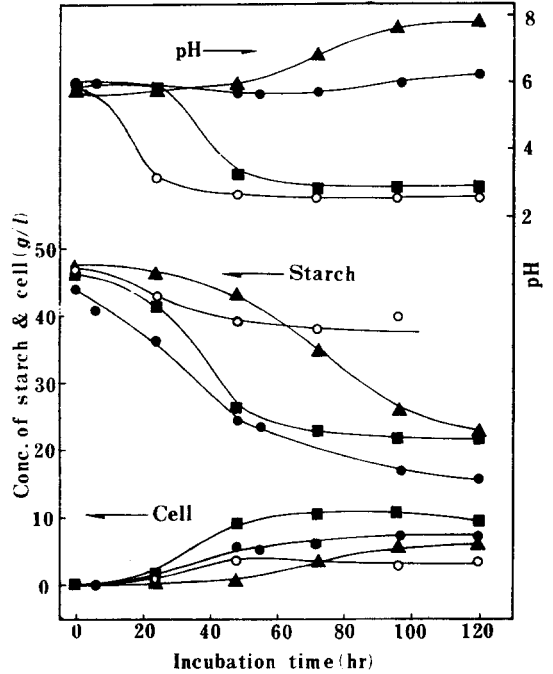


Fig. 3. The growth on various types of nitrogen source
 ●—● $NaNO_3 + (NH_2)_2CO$
 ▲—▲ $NaNO_3$
 ■—■ UREA
 ○—○ $(NH_4)_2SO_4$

중 중요한 몇가지 질소원에 대하여 배양시간에 따른 배양중 여러 변화를 본 결과는 Fig.3 과 같다.

Table. 1 에서 알 수 있듯이 질소원중 $(NH_2)_2CO$ 가 3일 배양후 균체량이 10.6g/l로 가장 많았으며 $(NH_4)_2HPO_4$

Table 1. The effect of N-sources on the growth of *S. holsaticus* FRY-5

N-source (g N/l)	Con. of biomass (g/l)				Cell yield coefficient	Final pH -initial pH
	1 day	3 days	5 days	7 days		
$(NH_2)_2CO$ + $NaNO_3$	1.79	6.52	7.69	6.65	0.274	
$(NH_2)_2CO$	1.80	10.60	10.67	8.78	0.451	-2.74
$(NH_4)_2SO_4$	1.26	3.68	3.90	3.22	0.463	-3.15
NH_4Cl	1.12	3.42	3.33	2.66	0.495	-3.08
$(NH_4)_2HPO_4$	1.74	5.94	6.34	5.23	0.341	-3.39
NH_4NO_3	0.84	3.51	3.30	2.39	0.495	-2.81
KNO_3	0.06	7.18	7.70	7.23	0.279	+2.37
$NaNO_3$	0.04	3.75	6.19	5.92	0.274	+2.10
$Ca(NO_3)_2$	0.05	1.20	3.59	4.23	0.176	+0.75
$Zn(NO_3)_2$	0.10	1.55	3.51	2.48	0.194	+0.36
Bacto- peptone	1.07	4.97	5.74	7.67	0.611	+0.08

*no growth: $Mg(NO_3)_2$, NaN_3 and $NaNO_2$

을 제외한 (NH₄)⁺ 형태의 질소원은 균체량이 4g/l 이하로 비교적 낮은편이었다.

NO₃⁻ 질산염의 질소원중, KNO₃가 (NH₂)₂CO에 이어 두번째로 균체량이 많았으나 그밖의 질소원은 낮은 편이었다. 또한 이러한 NO₃⁻ 형태의 질소원들은 다른 질소원에 비하여 24시간 내지 48시간후에 효모증식이 시작되었으므로 Fig. 3 에서 명확히 알 수 있었다.

검토된 질소원중, 전혀 효모증식이 일어나지 않은 것은 Mg(NO₃)₂, NaN₃, 및 NaNO₂ 이었으며, Bacto-peptone인 경우 생육속도가 느리나 7 일배양후 7.67g/l 의 비교적 많은 균체량을 생산하였다.

분리배지를 사용한 경우를 비교했을 경우 5일 배양후 7.68g/l로 (NH₂)₂CO를 단독 첨가했을 경우보다 적으나 NaNO₃보다는 많았다.

한편, 균체수율은 유기질소원인 Bacto-peptone이 0.611로 가장 좋았으며, 무기질소원으로 (NH₂)₂CO 을 포함한 NH₄⁺ 형태의 질소원은 0.341~0.495 범위로 높은 편이나, NO₃⁻ 형태의 질소원은 0.279 이하로 낮았다. (NH₂)₂CO와 NaNO₃을 동시에 사용한 분리배지의 경우 NaNO₃와 같은 0.274로, 균체수율이 낮은 질소원에 영향을 받는 것으로 사료된다.

그밖에 배양중 pH 변화는 질소원의 형태와 밀접한 관계가 있는 것으로 나타났다. 즉 (NH₂)₂CO를 포함한 NH₄⁺ 형태의 질소원들은 균의 증식에 따라 pH가 감소하나 NO₃⁻ 형태의 질소원은 pH가 증가하였으며, 이러한 사실은 일반적으로 미생물에 의한 NH₄⁺과 NO₃⁻의 대사작용시 예상되는 배지내 수소이온농도의 변화와 일치하였다⁽⁶⁾ 또한 유기질소원인 Bacto-peptone은 pH 변화가 거의 없었으며, (NH₂)₂CO와 NaNO₃을 동시에 첨가한 경우에는 배양중기에 약간 감소하다 증가하는 경향을 나타내었다.

이러한 질소원의 pH변화중 특이한 점은 Fig. 2에서 알 수 있듯이, (NH₂)₂CO인 경우 배양 24시간후에 pH가 급격히 떨어지나 NH₄⁺ 형태의 질소원은 배양초기부터 pH가 급격히 떨어져 배양 24시간에는 pH 2.6으로 일정하였다.

이상의 결과 (NH₂)₂CO를 사용하였을 경우 균체량이 다른 질소원보다 월등히 많고 균체수율도 0.451로 높은 편이므로 가장 적합한 질소원이라 사료된다. 배양중 pH 변화를 고려해볼 때 *Sp. holsaticus* FRI Y-5는 pH 변화를 일으킬 수 있는 산이나 알칼리성 생성물을 생산하지 않는다고 사료된다.

균체생육에 미치는 SO₄⁻²염의 영향

일반적으로 미생물균체는 주로 탄소 50%, 질소 7~12%인 1~3%로 구성되어 있으며 다음으로 많은 원자

성분은 황 0.5~1.0%와 마그네슘 0.5% 등이다⁽⁶⁾. 이러한 미량성분이 *Sp. holsaticus* 증식에 미치는 영향을 검토하기 위하여, 대조구로 가용성 전분; 50g/l, (NH₂)₂CO; 2.4g/l, 및 NaH₂PO₄·2H₂O; 7.3g/l을 포함한 배지를 사용하고, 여기에 SO₄⁻²을 0.02M 첨가하여 얻어진 결과는 Table 2와 같다.

Table 2. The effect of minerals on the growth of *S. holsaticus* FRI Y-5

SO ₄ ⁻² sources (0.02m)	Conc. of biomass (g/l)				Cell yield coefficient	Final pH -initial pH
	1 day	3 days	5 days	7 days		
No addition	0.21	0.15	0.38	0.15	-	+1.89
Mg ⁺⁺	1.67	6.39	7.76	4.70	0.321	+0.21
K ⁺	1.73	4.88	4.75	3.77	0.236	+1.05
Zn ⁺⁺	1.38	4.21	7.98	6.79	0.304	-1.96
Mg ⁺⁺ +K ⁺	1.88	8.20	8.47	7.45	0.336	+3.59
Mg ⁺⁺ +Zn ⁺⁺	1.43	5.54	8.47	6.74	0.35	+1.00
K ⁺ +Zn ⁺⁺	1.09	5.72	4.48	2.97	0.527	-1.02
Mg ⁺⁺ +K ⁺ +Zn ⁺⁺	2.38	10.2	10.15	8.03	0.48	-3.01

SO₄⁻²염을 첨가하지 않은 대조구는 거의 증식을 하지 않았으며, SO₄⁻²염을 단독으로 첨가했을 경우 MgSO₄가 가장 빠른 증식과 높은 균체수율을 보여주었다. 2종의 SO₄⁻²염을 동시에 첨가한 경우에는 (MgSO₄+K₂SO₄) 처리구가 가장 좋은 생육상태를 보여 주었으며, 3종의 SO₄⁻²염을 모두 첨가한 경우에 3일 배양후 균체량이 10.2g/l로 가장 높았고 균체수율도 0.48로 높은 편이었다.

그러므로 SO₄⁻² 뿐만 아니라 Mg⁺⁺, K⁺, 및 Zn⁺⁺가 균체증식에 필요한 미량원소라 사료되었다.

균의 생육에 미치는 유기영양원의 영향

기본배지에 yeast extract와 malt extract를 각각 5g/l로 첨가하여 *Sp. holsaticus*의 생육에 미치는 영향을 검토한 결과는 Table 3 과 같다.

Table 3. Effect of yeast extract and malt extract on growth of *Sp. holsaticus* FRI Y-5

Addition of growth factor (5g/l)	Conc. of biomass (g/l)				Cell yield coefficient
	1day	3days	5 days	7 days	
Control*	1.67	6.39	7.76	4.70	0.321
Yeast extract	3.73	11.35	10.73	8.47	0.425
Malt extract	2.14	8.43	9.45	7.63	0.367

*Basal medium: soluble starch(50g/l), urea(2.14g/l), NaH₂PO₄·2H₂O(7.3g/l), MgSO₄·7H₂O(5.0g/l)

Yeast extract나 malt extract가 전혀 첨가 안될 때, 즉 가용성전분을 제외하고는 무기영양원만 있는 배지에서도 어느정도 생육할 수 있는 점으로 보아, 이 균주는 엄밀히 비타민이나 아미노산등의 영양요구성균주는 아니지만 이러한 유기영양원을 첨가함으로써 생육이 증가함을 알 수 있다. Table 3 에서 알 수 있듯이 yeast extract는 malt extract보다 균체증식 및 균체 수율에 있어 더 좋은 효과를 나타내어 대조구에 비해 균체량은 77% 균체수율은 32% 증가되었다.

요 약

전분질로부터 효모균체를 직접 생산하기 위하여 분리 동정된 전분이용성 효모, *Sp. holsaticus* FRI Y-5의 기본적인 배양조건에 대하여 검토하였다.

이 균주는 산소를 절대적으로 요구하며, 배지의 초기 pH가 6.9일 때 최대균체량 7.2g/l, 균체수율 0.27, 비성장속도 0.14hr⁻¹로 가장 좋은 생육현상을 보여 주었고 배양온도는 23°C가 적온이었다. 균체생육의 활성화 에너지 Ea는 17.33 kcal/mole로 산출되었다. 검토된 13종의 질소원 가운데 (NH₂)₂CO가 3일 배양후 균체량이 10.69g/l로 가장 많았으며 이때 균체수율은 0.451

이었다. SO₄⁻²염으로서 Mg⁺², K⁺, 및 Zn⁺²와 유기영양원으로서 yeast extract도 균체증식에 좋은 영향을 주는 것으로 판명되었다.

문 헌

1. 박완수, 구영조, 신동화, 서기봉 : 한국식품과학회지 **15**, 46 (1983)
2. Miller, G. L. : *Anal. Chem.*, **31**, 426 (1959)
3. Pirt, S. J. : *Principles of Microbe and Cell Cultivation*, Blackwell Scientific Pub., London (1975)
4. 정기택, 송형익 : 한국식품과학회지, **13**, 91 (1981)
5. Thanh, N. C. and Wu, J. S. : *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, **8**, 202 (1975)
6. 유주현, 양용, 홍윤명, 박정길 : 한국산업 미생물학회지, **3**, 135 (1975)
7. 성낙계, 김명찬, 심기환 : 한국산업미생물학회지, **4**, 51 (1976)
8. Wang, D. I. C., Cooney, C. L., Demain, A. L., Durnill, P., Humphrey, A. E., and Lilly, M. D. : *Fermentation and Enzyme Technology*, John Wiley & Sons, Inc., p. 90 (1979)