

Rhodotorula sp. 의 菌体油脂 生産에 미치는 炭素源과 窒素源 濃度の 影響

김진원 · 강신권 · 성낙계

경상대학교 농과대학 식품가공학과
(1984년 9 월 4 일 수리)

Effect of Carbon and Nitrogen concentration on Lipid production by *Rhodotorula* sp.

Zin Won Kim, Shin Kwon Kang and Nack Kie Sung

Department of Food Science and Technology, College of Agriculture,
Gyeongsang National University
(Received September 4, 1984)

Effect of C/N ratios on the cell growth, cell lipid, cell protein and fatty acids of *Rhodotorula* sp. was examined. At low concentration of nitrogen in cultural medium the growth of the yeast was retarded, whereas its growth was favorable at high concentration but lipid yield was decreased due to a high content of cell protein. In order to increase lipid yield, the optimum C/N ratio obtained was 45-50 (5% glucose, 0.0414% nitrogen). During the cultivation cell protein synthesis occurred mainly in initial stage and the lipid was accumulated rapidly at the late phase. The highest content of total fatty acid was observed at the optimum C/N ratio. The higher C/N ratio was the more unsaturation degree of fatty acid decreased. It was attributed principally to a decreased oleic acid with palmitic acid increased. No significant changes occurred in content of other fatty acids.

미생물에 의해 생성된 유지의 화학조성이나 배양 조건 등은 많은 연구자들에 의해 밝혀졌으며,⁽¹⁻⁴⁾ 1949년에는 유지의 구성지방산 분석방법이 확립되었다.⁽⁵⁾

유지미생물은 일반미생물에 비해 생화학적으로 특이한 효소활성을 지니고 있다는 점도 보고되었고,⁽⁶⁾ 근년에는 폐당밀 및 아황산펄프폐액,⁽⁷⁾ 벚꽃당화액⁽⁸⁾ 등 폐자원을 이용한 유지의 생산이 검토된 바 있다.

미생물의 유지생성에 영향을 미치는 요인에는 질소원농도와 C/N비^(7,9) 온도,^(10,11) pH⁽¹²⁾ 등이 있는데, 균체가 유지를 다량 축적하는데는 탄소원과 질소원의 농도 즉 배지중에 질소원의 공급을 적당한 농도에서 제한할 필요성과 그에 따른 C/N비가 대단히 중요한 요인이 된다. 일반적으로 질소가 과다하

면 균체량은 많으나, 유지함량이 낮고 질소가 과소하면 유지함량은 높지만 균체증식이 불량하게 되며 또한 탄소원의 농도가 너무 높으면 삼투압 관계로 인해 균체량이 감소하게 된다. C/N비는 생성된 유지의 지방산조성에도 영향을 미치게 되는데 Bhattia⁽¹³⁾ 등은 *Fusarium oxysporium* 으로부터, Marr⁽¹⁴⁾ 등은 *E. Coli* 로 부터 탄소원과 질소원의 농도변화에 따른 포화지방산 및 불포화지방산의 변화를 보고하였다.

본 실험에서는 *Rhodotorula* sp. 효모에 대하여 C/N비가 지질생성에 미치는 영향과 생성된 지질의 지방산 조성을 분석하여 그 결과를 보고하고자 한다.

材料 및 方法

본 실험에 사용한 균주는 토양에서 분리한 *Rhodotorula* sp. R-007⁽¹⁵⁾을 사용하였으며, 표 1 과 같은 조성의 배지 100ml을 필요에 따라 탄소원과 질소원의 농도를 조정하여 500ml flask에 분주하여 27℃에서 5일간 진탕배양(stroke 6cm, oscillation 170/min)하였다.

C/N比의 산출은 탄소원으로서 glucose를 질소원으로서 glycine을 사용하여 각각 순수한 C와 N로서의 양을 계산하여 C/N比로 표시하였다.

건조균체량 및 균체질소량은 AOAC법,⁽¹⁶⁾ glucose는 Somogyi법⁽¹⁷⁾ 지질은 Soxhlet법으로 정량 분석하였고, 지방산은 상법⁽¹⁸⁾으로 분리, methylation시킨 후 gas liquid chromatography법으로 표 2의 조건에서 (Model: Shimazu GC-6AM) 정량하였다.

Table 1. The composition of medium for lipid production.

Carbon source (Glucose)	1.0 -9.5% (w/v)
Nitrogen source (Glycine)	0.06 -0.5% (w/v)
KH ₂ PO ₄	0.1%
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.05%
NaCl	0.05%
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.02%
FeCl ₃ · 6H ₂ O	1 × 10 ⁻⁵ M
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	3 × 10 ⁻⁵ M
Thiamine HCl	0.00004%

結果 및 考察

질소농도가 균체생육과 지질생성에 미치는 영향

Glucose의 농도를 4%로 고정하고 glycine을 농도별로 첨가하여 배지 중에 질소의 공급량이 효모의 건조균체량과 지질 생성 및 균체의 단백질 함량

Table 2. Gas liquid chromatography operation conditions for fatty acid analysis.

Column	15%DEGS, glass 2m×3mm
Detector	Flame ionization detector
Column temperature	165℃
Detector temperature	180℃
Carrier gas (N ₂)	60ml/min.
Chart speed	5 mm/min.

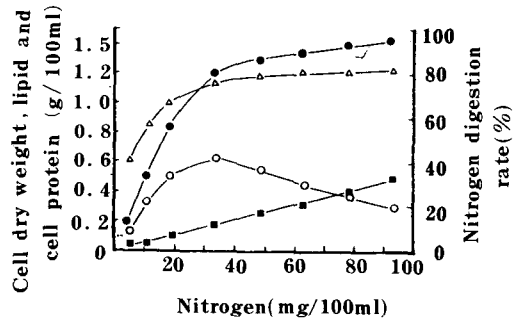


Fig. 1. Effect of nitrogen concentration on cell growth and lipid production of *Rhodotorula* sp.

* Glucose concentration : 4 g/100ml

* Incubation time : 5 days

$$\text{Nitrogen digestion rate} = \frac{\text{Nitrogen in the cell}}{\text{Nitrogen in the medium}} \times 100$$

○—○ : Total lipid production

●—● : Cell dry weight

△—△ : Nitrogen digestion rate

■—■ : Cell protein

에 미치는 영향을 조사한 결과는 그림 1과 같다.

그림에서 보는 바와같이 질소의 공급량이 증가함에 따라 지질함량은 감소되는 반면에 단백질함량은 증가되었다.

지질의 생산량은 질소농도가 33.3mg/100ml 일때 최대였으며 더 이상의 질소가 공급되면 균체량은 다소 증가하지만 지질 생산량은 오히려 감소하였다.

균체의 단백질량은 질소의 공급에 따라 비례하여 증가하였으며 질소동화율(Nitrogen digestion rate: 질소의 단백질 전환율)은 처음에는 40%에 불과했으나 지질생산량이 최대인 점에서 79%에 이르고 그 다음은 거의 변화가 없었다.

표 3은 질소의 공급량에 따른 균체생육과 지질생성의 경시적인 변화를 조사하기 위하여 질소농도를 저농도(A), 최적농도(B), 고농도(C)의 세가지 시험구로 나누어 나타낸 결과이다.

표에서 보는 바와같이 질소량이 과소할 경우(A)에는 5일 배양기간을 통하여 균체의 증식이 극히 부진하였으며, (B)에서는 5일, (C)에서는 4~5일에 각각 건조균체량이 최대치를 나타냈다. 또한 (B)와 (C)의 경우에 균체단백질량은 각각 3~5일과 4일에 일전치에 도달하지만 (B)에서는 5일까지 계속해서 증가하고 있다. 이것은 (B)의 경우는 제한된 질소량으로 인해 체단백질의 합성은 배양초기에 일찍 완료되고 남은 영양원으로 지질을 계속 합

Table 3. Changes of cell weight, total lipid and cell protein of *Rhodotorula* sp. during cultivation at various nitrogen concentration.

Nitrogen concentration (mg/100ml)		Incubation (days)						
		3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.0	5.5
11.1	a)	0.36	0.41	0.45	0.48	0.50	0.53	0.57
	b)	0.23	0.26	0.28	0.30	0.31	0.33	0.36
	c)	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
33.3	a)	0.51	0.87	1.04	1.20	1.25	1.23	-
	b)	0.17	0.40	0.50	0.60	0.63	0.63	-
	c)	0.17	0.19	0.19	0.19	0.19	0.18	-
77.7	a)	0.64	0.95	1.30	1.38	1.37	-	-
	b)	0.19	0.28	0.36	0.37	0.37	-	-
	c)	0.20	0.33	0.39	0.39	0.38	-	-

*Glucose concentration : 4g/100ml

- a) Cell dry weight (g/100ml)
- b) Total lipid (g/100ml)
- c) Cell protein (g/100ml)

성 축적하지만 (C)에서는 과잉의 질소로 인하여 영양원의 대부분이 거의 단백질 합성에 이용되었기 때문인 것으로 생각된다. 朴⁽¹⁸⁾과 Deinema⁽²⁰⁾에 의하면 균체는 생육 중에 당을 이용한 지질의 축적보다는 질소를 이용한 단백질의 합성이 우선된다고 하였는데 이는 본 실험의 결과를 뒷받침하는 것이라 할 수 있다.

이상의 결과로 보아 지질생산을 위해서는 어느 정도의 질소량을 배지에 공급해야 하고 그 적정선은 질소동화율이 일정한 값에 도달하는 정도이며

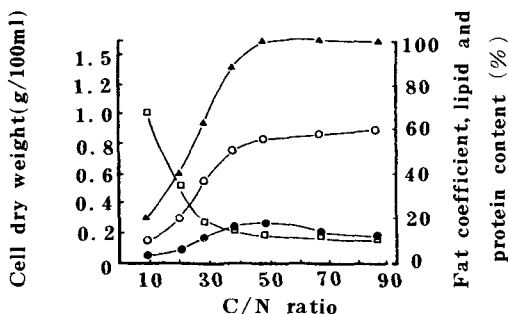


Fig. 2. Effect of C/N ratio on cell dry lipid and protein content and fat coefficient.
 *Nitrogen concentration : 41.4mg/100ml
 *Incubation time : 5 days
 ▲—▲ : Cell dry weight □—□ : Protein content
 ○—○ : Lipid content ●—● : Fat coefficient

이 정도에서 질소를 제한해야 할 것으로 생각된다. 그리고 표 3에서 단백질함량이 32% 정도까지 상승하는 것으로 보아 이 균주는 유지효모로서 뿐만 아니라 단백질효모로서의 가능성도 시사하는 것으로 생각되며 中川⁽⁷⁾도 이와 같은 결과를 보고한 바 있다.

C/N比가 균체생육 및 지질생성에 미치는 영향

질소원의 농도를 glycine 0.224% (순질소로서 41.4 mg/100ml)로 고정하고 glucose의 농도를 달리하여 C/N比가 균체생육 및 지질생성에 미치는 영향을 조사한 결과는 그림 2와 같다.

C/N比가 증가함에 따라 건조균체량과 지질함량은 급상승하는 반면에 균체의 단백질함량은 격감하는 경향이 대조를 이루고 있으며 이들이 모두 C/N比 40~50 이상에는 변화가 완만하다는 점에서 일치하는 경향을 보이고 있다. 中川⁽⁷⁾도 *Rhodotorula* sp. 균주로서 행한 실험에서 지질생성의 C/N比는 40~50이라 하였는데, 이것은 본 실험의 결과와 일치하는 것이다. 또한 유지계수 (fat coefficient : 공급된 당에 대한 지질을 중량백분율로 표시)도 같은 C/N比에서 최대치를 나타내고 있다. 지질 함량은 C/N比 50 이상에서도 약간 증가하지만 유지계수는 오히려 감소되므로 생산면에서 본다면 불리하다고 할 수 있다. 따라서 유지를 생산하는 데는 C/N比를 적당히 조절하여 균체를 충분히 생육시킴과 동시에 균체의 유지함량을 높여야 할 것으로 생각된다.

배양시간의 경과에 따른 균체생육 및 지질생성

그림 3은 최적 C/N比로 선정된 48 (glucose 5%, glycine 0.224%)에서 배양 시간의 경과에 따른 건

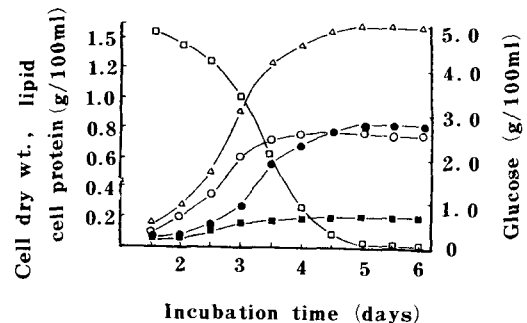


Fig. 3. Time course of lipid production by *Rhodotorula* sp. .

- *Glucose concentration : 5g/100ml
- *Nitrogen concentration : 41.4mg/100ml
- △—△ : Cell dry weight ●—● : Lipid
- : Cell protein □—□ : Glucose
- : Lipid free cell (cell dry weight-lipid)

Table 4. Total fatty acid contents and ratios of their saturated and unsaturated fatty acids by nitrogen concentration

Nitrogen concentration (mg/100ml)	Total lipid (g/100ml)	Total fatty acid (%)	Saturated fatty acid (%)	Unsaturated fatty acid (%)
(A) 11.1	0.38	57.3	30.8	69.3
(A) 33.3	0.64	65.7	23.6	76.3
(C) 77.7	0.38	49.5	16.8	81.5

* Glucose concentration : 4 g/100ml)
 * Incubation time : 5 days
 * Total fatty acid : % to total lipid acid

조균체량, 지질생성량 및 균체단백질량의 변화를 조사한 것이다. 배양 시작 후 3.5일 까지는 지질량에 비해 건조균체량이 급증하고 있으나 3.5일 이후부터는 곡선의 경사가 거의 비슷해지는 경향을 보이고 있다. 균체의 단백질량도 역시 3.5일까지는 점점 증가하다가 3.5일 이후에는 일정한 값을 나타내고 있는 것을 보아 이 시간 이후의 glucose의 소비는 대부분이 지질의 합성에 이용되는 것으로 생각된다. 이러한 결과로 보아 질소원을 모체로한 단백질의 합성은 주로 배양초기에 이루어지며 지질은 중반 이후에 집중적으로 합성 축적되는 것을 알 수 있다. Kessell⁽²¹⁾은 *Rhodotorula gracilis*로 행한 실험

Table 5. The composition of total fatty acid by nitrogen concentration (%)

Fatty acid	Relative retention time	Nitrogen concentration (mg/100ml)		
		(A) 11.1	(B) 33.3	(C) 77.7
C _{14:0}	0.49	1.4	1.0	0.8
2	0.71	0.1	0.1	0.1
C _{16:1}	0.84	0.2	0.1	trace
C _{16:0}	1.00	21.2	15.6	10.6
Unidentified	1.07	trace	0.1	1.7
C _{18:0}	1.16	0.5	1.9	0.7
C _{17:0}	1.59	6.9	6.1	5.1
C _{18:0}	2.03	1.3	0.9	0.3
1	2.21	44.6	51.3	60.1
2	2.65	10.1	10.2	10.7
3	3.54	8.0	8.0	7.1
C _{20:2}	4.63	2.6	1.4	1.0
4	5.51	3.1	3.3	1.8

* Glucose concentration : 4 g/100ml
 * Incubation time : 5 days

Table 6. Total fatty acid contents and the ratios of their saturated and unsaturated fatty acids by C/N ratio

Glucose (%)	C/N ratio	Total lipid	Total fatty acid (%)	Saturated fatty acid (%)	Unsaturated fatty acid (%)
2.0	19	0.19	51.3	16.9	81.8
3.5	34	0.54	60.5	20.4	79.1
5.0	48	0.83	66.0	23.6	75.6
6.5	63	0.79	65.1	25.8	74.1
8.0	77	0.76	62.8	28.8	71.7
9.5	92	0.74	62.1	29.8	70.1

* Nitrogen concentration : 41.4mg/100ml
 * Incubation time : 5 days
 * Total fatty acid : % to total lipid

험에서 배양액 중의 질소가 소모되고 난 후, 즉 중반 이후부터 지질이 급속도로 축적된다고 하였으며 *Dienema*⁽²⁰⁾도 비슷한 결과를 보고하였는데 이는 본 실험의 결과와 일치하는 경향이라 볼 수 있다.

배양액 중의 질소농도가 지방산조성에 미치는 영향

Glucose의 농도를 4 g/100ml로 고정하고 질소농도를 변화시키면서(C/N比의 조절) 지질생성량과 총 지방산 함량을 비교하고 그때의 포화 및 불포화 지방산의 함량을 조사한 결과는 표 4와 같다.

총지방산 함량은 지질생성량이 가장 많은(B)에서 제일 높았으며 불포화지방산은 질소가 많이 공급될 수록 증가 하였다. Marr⁽¹⁴⁾ 등은 *E. Coli*로 행한 실험에서 탄소원을 제한하고 질소를 증가시키면 불포화지방산이 증가한다고 하였다.

생체내의 유지를 생세포의 구성요소와 저장물질로 구분하여 생각하면 (C)의 경우 균체단백질 함량이 (A)의 28%(표 4 참조)에 비해 대단히 높으므로 (C)의 지질은 체구성요소로서의 유지가 대부분일 것이다. 이렇게 볼 때에 질소의 공급량이 많을 수록 불포화지방산의 함량이 증가하는 것은 체구성분으로서의 유지 또는 체내 단백질함량이 증가하는 것과 밀접한 관계가 있는 것으로 생각된다.

한편 (A), (B), (C) 각 경우에 있어서 총지방산 조성을 살펴보면 표 5와 같다.

질소농도가 증가함에 따라 oleic acid(C_{18:1})의 함량이 높아져서 (C)에서는 (A)에서 보다 15% 정도 증가하였고 palmitic acid(C_{16:0})는 10%정도 감소하였으며 그의 기타 지방산의 변화는 미미하였고,

Table 7. The composition of total fatty acid by C/N ratios(%)

Fatty acid	Relative retention time	C/N ratios					
		19	34	48	63	77	92
unit: % (w/w)							
C _{14:0}	0.49	0.8	0.9	0.8	1.2	1.3	1.5
2	0.71	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
C _{16:1}	0.84	tr.	0.1	0.2	0.2	0.1	0.1
C _{16:0}	1.00	11.3	14.6	17.0	19.2	21.2	22.6
Unidentified	1.07	1.5	0.5	0.8	0.2	0.3	0.2
C _{16:1}	1.16	1.1	1.3	1.2	1.5	1.6	1.9
C _{17:0}	1.59	4.6	4.6	5.0	4.9	4.8	4.5
C _{18:0}	2.03	0.2	0.3	0.8	0.5	0.8	1.2
1	2.21	57.3	54.8	52.0	49.0	48.0	47.0
2	2.65	13.3	12.3	11.0	11.7	10.8	10.4
3	3.54	6.6	6.5	6.0	6.4	5.8	5.4
C _{20:2}	4.63	1.8	2.1	2.0	2.0	1.8	1.5
4	5.51	1.6	1.9	2.1	3.2	3.5	3.7

*Incubations time: 5days

주로 palmitic, oleic acid가 주류를 이루고 있었다.

C/N비가 지방산조성에 미치는 영향

질소농도를 41.4ml/100mg로 제한하고 glucose의 농도를 달리하여 C/N비에 따른 총지방산, 포화 및 불포화지방산의 함량을 조사한 결과는 표6과 같다.

총지방산함량은 지질생산에 최적C/N비인 48에서 가장 높으며 포화지방산량은 C/N비가 커질수록 증가하며 불포화지방산량은 C/N비 48까지는 증가하다가 그 이후에는 감소하는 경향을 보이고 있다. 표 7은 C/N비에 따른 총지방산 조성의 변화를 조사한 것이다.

Glucose의 농도가 증가함에 따라 oleic acid는 약 10%정도 감소하였으나 palmitic acid는 약 11%정도 증가하였다. linoleic acid와 linolenic acid도 C/N비가 커질수록 약간 감소하였고 heptadecanoic acid (17:0)와 eicosatetraenoic acid (C_{20:4})는 C/N 비가 커질수록 증가하였으나 그 변화량은 1~2%로서 소량이었다.

그리고 본 실험에 사용한 공시균주가 최적 C/N비 48에서 생산한 지방산의 조성에서 일반적인 양상을 살펴보면 oleic acid가 50% 이상으로 가장 많고 그 다음은 palmitic, linoleic, linolenic acid 순으로서 이들이 전체의 85%를 차지하고 있다. 일반적으로 곰팡이 및 효모류가 생산하는 주요 지방산은 위의 네가지로 알려져 있는데 본 실험에서도 이와 같은 결과를 얻었다. 또한 탄소수 奇數의 지방산에서

C_{15:1}는 미량이었으나 C_{17:0}은 5%정도의 함량을 나타냈는데 이것은 같은 *Rhodotorula* sp.로서 실험한 Kessell,²¹⁾ 中川⁽⁷⁾ 朴⁽¹⁹⁾의 결과와는 상이하였으며, *Rhodosporidium* sp.로부터 渡辺등⁽¹²⁾과는 비슷한 경향이었고 고급불포화지방산으로서 C_{20:2}와 C_{20:4}가 2%정도의 함량을 보인 점은 Kessell,²¹⁾의 결과에서는 보고되지 않은 것이다. 이것은 균주와 배양조건의 차이에서 기인되는 것 같다.

要 約

배양액 중에 탄소원과 질소원의 농도를 조절하여 C/N비가 *Rhodotorula* sp.의 균체생육과 지질생산에 미치는 영향을 조사하고 생성된 지질의 지방산 조성을 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

배양액의 질소농도가 높을수록 균체지방 함량은 감소하고 대신 단백질 함량이 증가하며 질소가 과소할 경우에는 지질 함량은 높으나 균체 생육이 부진하였다.

지질생산의 최적 C/N비는 45~50(48)이었으며 질소의 기준량은 질소동화율(Nitrogen digestion rate)과 밀접한 관계가 있었다.

생육 과정에서 체단백질의 합성과 지질의 집중적인 축적간에는 시간적인 구분 현상이 뚜렷하여 단백질은 배양초기에 주로 합성되고 지질은 중반 이후에 집중적으로 합성 축적되었다. 그리고 총지방

산의 함량은 지질생성량이 가장 많은 조건, 즉 최적 C/N比에서 가장 높았다.

C/N比가 증가할수록 포화지방산의 함량이 증가하고 불포화지방산의 함량은 감소하였으며 이것은 주로 palmitic acid와 oleic acid사이의 상호 증감에 기인되는 것이었다.

References

1. Nageli, C. and Loew, O.: *Ann.*, **193**, 322 (1978)
2. Linder, P. and Csifer, S.: *Wochenschrift F. Brauerei.*, **29**, 1 (1912)
3. Linder, P. and Unger, T.: *Wochenschrift F. Brauerei.*, **36**, 188 (1919)
4. 신동화, 김창식: 한국산업미생물학회지, **10**(1), 15(1982)
5. Hildth, T.T.: *Cheepman and Hall*, London (1949)
6. 中川昌平: *Bull. Univ. Osaka Pref. Ser.*, **B21**, 197 (1969)
7. 中川昌平: *Bull. Univ. Osaka Pref. Ser.*, **B21**, 175 (1969)
8. Yoon, S.H.: *J. Ferment. Technol.*: **60**, 243(1982)
9. 朝井: 微生物工業, 朝倉書店, (1956)
10. Enebo, L. and Iwamoto, H.: *Acta. Chem. Scan.*, **20**, 439 (1966)
11. McMurrugh and A.H. Ross: *J. Bacteriol.*, **107**(3) 753(1977)
12. Singh, J. and Walker, T.K.: *J. Sci. Ind. Res.*, **15C**, 222(1956)
13. Bhatia, I.S. and Arenja, J.S.: *J. Sci. Fd. Agric.*, **29**, 611 (1978)
14. Marr, A.G. and Ingarham, J.I.: *J. Bacteriol.*, **89**, 1260(1962)
15. Sung, N.K., Kim, Z.W. and Park, W.H.: *Univ. Gyeongsang J. Inst. Agric.*, **16**(1982)
16. Association of official Analytical Chemist: (1980)
17. Somogyi, M.: *J. Biol. Chem.*, **177**, 771(1937)
18. 日本生化学会: 東京化学同人, **83**(1974)
19. Park, S.O.: *J. Korean Agric. Chem.*, **17**, 93(1974)
20. Deinema, M.H.: *Landbouwhogeschool Wageningen*, **61**, 2(1961)
21. Kessell, R.H.: *J. Appl. Bacteriol.*, **31**, 220(1968)
22. 渡辺大蔵, 平井美智子, 柏崎秀明: 醸酵協会誌, **33**(4,5), 25(1975)