

乳糖酸酵에 의한 *Rhodotorula marina* IFO 0879 의
生長과 菌體油脂 生産에 關한 研究

김용석 · 유태종
고려대학교 식품공학과

Growth and Lipid Accumulation of *Rhodotorula marina*
IFO 0879 by Fermentation of Lactose

Yong-Suk Kim, and Tae-Jong Yu

Department of Food Technology, Korea University, Seoul

Abstract

The optimum conditions for growth and lipid production of *Rhodotorula marina* IFO 0879 were investigated. The optimum temperature and pH of cultivation was 30°C and pH 6.0-7.0, respectively. During shaking of the culture for 8 days at 30°C, the maximum cell biomass of *Rh. marina* was 9.82g per liter of the medium, and the lipid content obtained was 35.4(w/w) of the dry cell biomass. Lactose and glucose were the most effective carbon sources for the lipid production. Ammonium sulfate was found to be the most effective nitrogen in culture medium the growth of the yeast was retarded, whereas its growth was favored at high concentrations with decreased lipid yield. When lacose was added during fermentation, in the initial stage cell biomass and lipid production were lower than those of the control, but in the later stage the trend were reversed. The major fatty acids of yeast lipid were palmitic acid(20.3%), oleic acid(46.6%) and linoleic acid(16.2%)

서 론

전통적으로 식용 및 산업용 유지는 대부분 식물과 동물 자원으로부터 공급되었다. 그러나, 이들로부터의 유지생산은 단지 수개국에 한정되어 있으며, 다른 나라는 부족한 유지를 수입하거나 다른 공급원을 찾아야 하는 실정이다. 가능한 방법중의 하나가 미생물에 의한 유지생산이며, 실제로 미생물 유지를 생산하기 위한 연구가 오래전부터 수행되어 왔다.⁽¹⁾

미생물을 이용한 유지의 생산은 질소원의 종류⁽²⁾, 농도⁽³⁾, pH⁽⁴⁾ 및 온도⁽⁵⁾에 의해서 영향을 받는다. 그리고, 탄소원으로서 fructose⁽⁶⁾, alkane⁽⁷⁾ 벵짚당화액⁽⁸⁾, tapioca⁽⁹⁾, glycerin⁽¹⁰⁾, whey⁽¹¹⁾, cane molasses⁽¹²⁾ 등이 이용되었다.

한편, 국내에서 탄소원으로서 포도당을 이용하여 유지를 생산하고자 하는 연구는 많지만^(8,13-15) 乳糖를 이용한

연구는 보고되어 있지 않다.

따라서 본 연구에서는 탄소원으로서 乳糖를 이용할 수 있는 酵母로부터 유지를 생산하기 위한 배양조건과 생산된 지방산의 조성에 관하여 조사하였기에 보고한다.

재료 및 방법

공시균주

고려대학교 식품공학과에 보존되어 있는 *Rhodotorula marina* IFO 0879를 30°C, 3일간 potato dextrose agar 에 斜面培養한 후 4°C에서 보관하면서 사용하였으며, 1개월마다 繼代배양하였다.

사용배지

균체의 생장과 지방질 생산을 위한 기본배지로서 乳糖 3%, ammonium sulfate 0.145%, potassium phos-

phate monobasic 0.1%, magnesium sulfate 0.05%, yeast extract 0.05%를 사용하였다.

배양방법

지방질 생산배지 50ml를 500ml baffle flask에 분注하여 121°C, 15분간 가압살균후, 30°C에서 24시간 진탕배양(150rpm)한 種菌을 2% (v/v 3×10⁷/ml) 접종하여 동일한 조건에서 8일간 진탕배양하였다.

건조균체량

배양액 10ml를 원심분리 (5,000×g, 10min)하여 얻은 균체를 증류수로 1회 세척하고 105°C에서 건조하여 건조균체량으로 하였다.

乳糖 및 질소함량

배양액의 乳糖은 Miller 등⁽¹⁶⁾의 방법으로 하였으며, 배양액중의 질소는 micro-Kjeldahl 법⁽¹⁷⁾에 의하여 정량하였다.

지방지질함량

균체내 지방질은 박⁽¹⁶⁾의 방법에 準하여 정량하였다. 즉, 8일간 진탕배양한 배양액을 원심분리 (5,000×g, 10min)하여 균체를 분리한 후 105°C에서 건조하였다. 건조한 균체를 칭량하여 이것을 환류 냉각 flask 넣고 0.3% HCl 용액을 가한 다음, 100°C에서 2시간 가열하여 균체세포벽을 파괴하고 여과, 수세한 후 건조시키고, 이것을 soxhlet 장치에서 石油 ether (b. p. 60~80°C)로 16시간 추출후 감압농축하여 石油 ether를 제거하고, 90°C 건조기에서 2~3시간 건조후 칭량하여 粗脂肪으로 하였다.

지방질의 구성지방산 분석

추출한 지방질의 구성지방산은 Metcalf⁽¹⁸⁾의 방법에 準하여 분석하였다.

결과 및 고찰

지방질생산을 위한 배양조건

가. 배양기간중의 변화

500ml baffle flask에 넣은 기본배지 50ml에 균을 접종하여, 30°C에서 진탕배양 (150rpm)하면서 배양일수의 경과에 따른 변화를 조사하였다. Fig. 1에서, 균체중 식량은 처음 1일에 증식이 거의 없는 유도기를 보였으며

그 이후 급격히 증가하다가 질소원이 완전히 소모된 후인 6일에 9.82g/l로서 가장 많았고, 그 이후에는 약간 감소하는 경향을 보였다. 세포내 지방질축적량은 탄소원이 완전히 소모된 8일에 3.48g/l로써 가장 많았고, 그 이후부터는 3.48~3.40g/l로써 거의 변함이 없었다.

이 결과로 보아 질소원은 배양액중의 乳糖이 2/3정도 소모되었을 때 완전히 소모되었으며, 질소의 소모량이 급격히 증가하면서 세포내의 지방질생성량이 증가하는 것을 알 수 있다. 박⁽¹⁵⁾에 의하면 균체는 생육중에 당을 이용한 지방질의 축적보다는 질소를 이용한 단백질의 합성과 효모의 증식이 선행된다고 하였는데, 이는 본 실험의 결과를 뒷받침하는 것이라 할 수 있다.

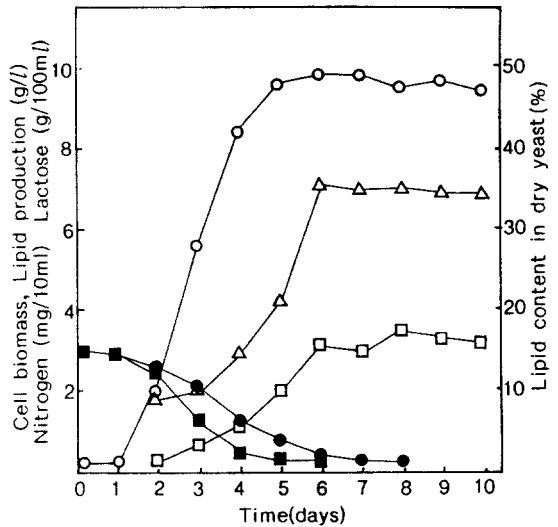


Fig. 1. Relationship between cell biomass, lipid content, lipid production, nitrogen and lactose content and fermentation time of *Rh. marina*

○—○ Cell biomass □—□ Lipid production
●—● Lactose content ■—■ Nitrogen content
△—△ Lipid content in dry yeast

나. 배양온도의 영향

공시균주를 20°C, 25°C, 30°C, 37°C의 각 온도별로 8일간 진탕배양한 결과는 Table 1과 같다. 균체량은 20°C에서 2.55g/l이었으나 온도가 상승함에 따라 증가되어 30°C에서 9.20g/l로써 최대로 나타났으며, 37°C에서는 다시 감소하였다. 지방질의 경우도 같은 경향을 보여 30°C에서 32.1%로써 최대로 나타났다. 이와같이 적은 온도 중심으로 균체량과 지방질 함량이 감소하는 경향은

Table 1. Effect of incubation temperature on cell biomass and lipid production of *Rh. marina*

Temp. (°C)	Cell bimoass (g/l)	Lipid content in dry yeast (%)	Final pH
20	2.55	8.5	5.80
25	7.93	27.4	5.80
30	9.20	32.1	5.90
37	3.76	30.8	6.15

Rhodotorula gracilis⁽⁶⁾의 경우와 일치함을 알 수 있다.

다. 초기 pH의 영향

각 배지의 초기 pH를 IN-HCl과 IN-NaOH로써 3.5~8.0 범위로 조절하여 배양한 결과는 Fig. 2와 같다. 효모의 증식은 pH가 낮을수록 억제되며, pH 6.0~7.5사이에서는 큰 차이를 나타내지 않았다. 그러나, 각 균체내의 지방질축적량은 pH가 낮을수록 증가하여 pH 4.5일 때 41.0%로서 최대를 나타내었다 이것은 *Rh. gracilis*⁽⁴⁾, *Mucor plumbeus*⁽¹⁹⁾의 경우와 유사함을 알 수 있다.

지방질생산을 위한 배지조성

가. 탄소원 종류의 영향

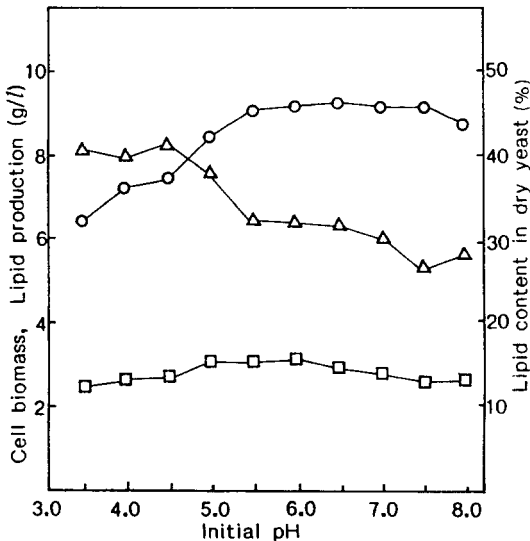


Fig. 2. Effect of initial pH of the medium on the growth and lipid production of *Rh. marina*

- Cell biomass
- Lipid production
- △—△ Lipid content in dry yeast

기본배지의 탄소원대신에 여러 종류의 단당류 및 다당류를 3% (w/v) 첨가하여 pH 6.0, 30°C에서 8일간 진탕배양(150rpm)한 결과는 Table 2와 같다. 탄소원으로서 乳糖(lactose)를 첨가했을 때, 균체량과 지방질 생산량에서 포도당(glucose)을 첨가했을 경우와 큰 차이가 없었으며, maltose, sucrose, galactose 순으로 지방질함량이 많았다. 탄소원으로서 dextrin을 첨가했을 경우는 균체량은 많았으나 지방질함량이 매우 낮았으며, soluble starch는 거의 이용하지 못하였다.

나. 탄소원 농도의 영향

기본배지의 질소원인 ammonium sulfate의 농도를 1.45g/l로서 고정시키고 乳糖의 농도를 10~70g/l의 범위로 첨가하여 배양한 결과는 Fig. 3과 같다. 乳糖 농도가 2%이하일 때는 균체내 지방질함량이 낮았으나, 그 이상의 농도에서는 많아져 7% 농도에서는 48.0%까지 증가하는 것을 알 수 있다. 그러나, 배양액중의 젓당 농도가 4%이상일 때는 당의 이용속도가 감소하며 균체의 증식이 상대적으로 느리게 나타났다. 이것은 배양액중의 질소원이 모두 소모되어 탄소원이 지방질합성에만 이용되기 때문인 것으로 생각된다.

다. 질소원 종류의 영향

기본배지의 탄소원인 乳糖의 농도를 30g/l로 고정시키고, 각종 질소원을 질소량으로 0.3g/l씩 각각 첨가하고, 1N-NaOH 용액을 사용하여 pH 6.0으로 조정한 후, 30°C에서 8일간 진탕배양한 결과는 Table 3과 같다. 질소원으로서 ammonium sulfate, yeast extract, urea, asparagine, casamino acid를 첨가했을 때 균체량과 지방질함량이 다른 질소원의 경우보다 많았다.

본 실험의 결과, 일반적으로 질소원으로서 유기질소원을 첨가했을 때 무기질소원의 경우보다 균체량과 지방질함량이 더 많은 것으로 나타났다. 이것은 *Aspergillus ochraceus*⁽²⁾, *M. Plumbeus*⁽²⁰⁾ 등의 결과와 일치하지

Table 2. Effect of various carbon sources on lipid production of *Rh. marina*

Source of* carbon	Cell biomass (g/l)	Lipid content in dry yeast (%)	Fat coefficient**
Lactose	9.82	34.6	11.3
Glucose	9.86	34.8	11.4
Galactose	3.06	21.4	2.18
Maltose	7.88	31.2	8.19
Sucrose	8.22	25.4	6.95
Soluble starch	1.56	-	-
Dextrin	5.87	12.0	2.35

* Carbon sources were added at level of 3%(w/v), 0.15%(w/v) ammonium sulfate was used as a nitrogen source

** g per 100g carbon source consumed

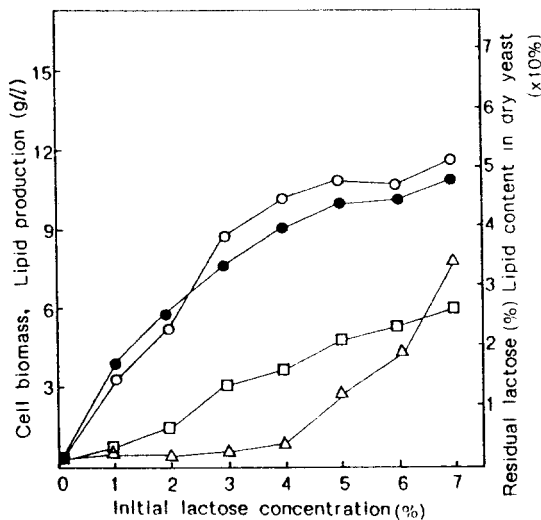


Fig. 3. Effect of initial lactose concentration on cell biomass and lipid production of *Rh. marina*

○—○ Cell biomass □—□ Lipid production
△—△ Residual lactose ●—● Lipid content in dry yeast

만, *Fusarium oxysporium*⁽²¹⁾은 KNO_3 를, *Penicillium lilacinum*⁽¹⁰⁾은 $NaNO_3$ 를 첨가했을 때 균체량과 지방질함량이 다른 질소원보다 높았다고 보고하였다. 즉, 균종에 따라 각종 질소원의 이용도가 다른 것으로 생각된다.

라. 질소원 농도의 영향

기본배지의 탄소원인 乳糖의 농도를 3%(w/v)로 고정시키고, 최적 질소원인 ammonium sulfate의 초기 농도를 0.5~3.0g/l(w/v) 범위로 변화시켰을 때 얻은 결과는 Fig. 4와 같다. ammonium sulfate의 농도가 2.0g/l 이하일 때는 농도가 증가할수록 균체량도 증가하였으나 그 이상의 농도에서는 큰 변화를 나타내지 않았다. 지방질 생산량은 질소원의 농도가 1.5g/l일 때 2.9g/l로서 최대에 이르렀으나, 그 이상에서는 균체량의 증가와는 반대로 급격히 감소하였다. 즉, 배양액의 질소 농도가 높을수록 지방질 함량은 감소하고, 농도가 낮을 때는 지방질 함량은 높으나 균체의 증식은 부진하였다. 질소원의 농도

Table 3. Effect of various nitrogen sources in lipid production of *Rh. marina*

Source of* nitrogen	Cell biomass (g/l)	Lipid content in dry yeast (%)	Fat coefficient**
$(NH_4)_2SO_4$	9.81	35.1	11.5
Yeast extract	10.28	30.6	10.5
$(NH_2)_2CO$	9.67	35.4	11.4
NH_4NO_3	6.92	27.1	6.3
$NaNO_3$	8.51	25.8	7.3
KNO_3	9.18	21.4	6.5
Casamino acid	9.31	30.7	9.5
Asparagine	8.94	31.1	9.3
NH_4Cl	5.74	18.9	3.6

* 3% lactose was used as carbon source and nitrogen concentration of each nitrogen source was 0.03%

** g lipid per 100g carbon source consumed

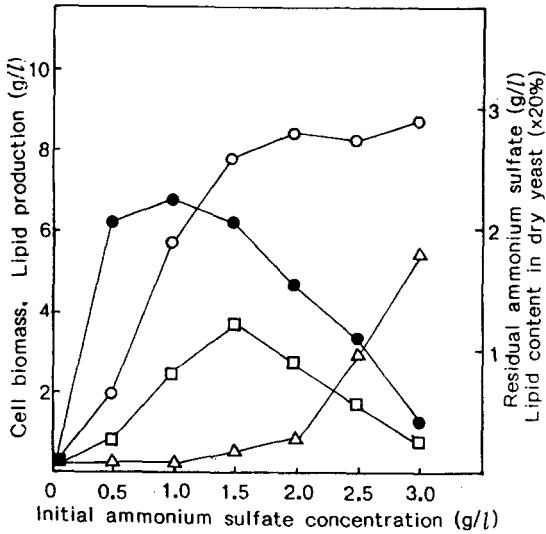


Fig. 4. Effect of initial ammonium sulfate concentration on cell biomass and lipid production of *Rh. marina*

- Cell biomass
- Lipid production
- △—△ Residual ammonium sulfate
- Lipid content in dry yeast

가 2.0g/l 이상일 때 균체량의 증가가 둔화된 것은 배양액 중의 질소원은 충분하여도 탄소원이 부족하기 때문인 것으로 생각된다.

지방질생산량이 최고일 때 ammonium sulfate의 농도는 1.5g/l 인데, 이것은 질소량으로 0.3g/l이며, 이때의 배양액중의 C/N 비는 41.5로서 김등⁽¹⁴⁾과 B-hatia 등⁽⁹⁾이 C/N 비가 40~50일 때 지방질생산량이 최

고에 이른다고 보고한 것과 비슷함을 알 수 있다.

마. 배양중 乳糖添加의 영향

균체배양중에 乳糖를 주기적으로 첨가시켜준 효과를 조사하기 위하여 다음과 같은 방법을 임의로 선정하여 실험하였다. 방법 I은 초기 당농도를 1%로 하고 매일 0.3% (w/v)씩을 첨가하였고, 방법 II는 초기 당농도를 4%로 하여 배양하였다. Fig. 5와 같이 배양중기까지는 방법 II가 방법 I의 경우보다 균체량과 지방질함량이 많았으나, 후기에서는 방법 I의 경우가 더 많았다. 이것은 주기적으로 당을 첨가한 경우 초기와 중기에는 탄소원이 부족하여 균체증식과 지방질생산에 이용할 수 없다가 배양후기에 탄소원이 계속 공급되어 균체 및 지방질생산량이 증가되기 때문으로 생각된다.

지방질의 구성지방산 분석

시험균의 기본배지에서 8일간 진탕배양하여 얻은 지방질의 지방산조성을 분석한 결과는 Table 4와 같다.

시험균의 세포내 지방질의 주지방산은 palmitic acid (20.3%), oleic acid(46.6%), linoleic acid(16.2%) 및 stearic acid(8.3%)이다. 이들 주지방산의 양을 합하면 91.4%로서 식용 유지와 비교하여 볼 때, 옥수수油, 면실油, 올리브油등과 같은 식물성 유지보다는 낮은 경향이며, 쇠기름이나 돼지기름과 비슷한 수치이다. 그러나 linoleic acid(16.2%)의 함량으로 볼 때, 시험효모가 생산하는 유지는 palm油와 비슷하였다.⁽²²⁾

한편, 다른 효모의 지방산 조성은 palmitic acid, oleic acid, stearic acid 및 linoleic acid의 함량이

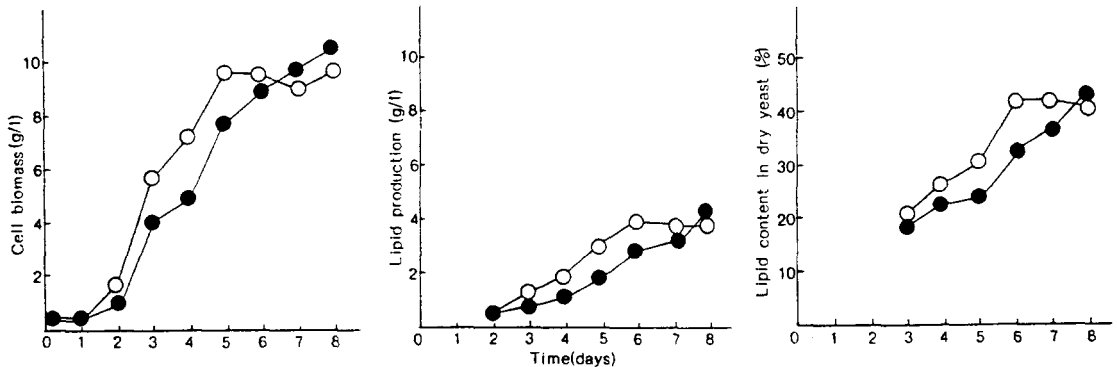


Fig. 5. Effect of lactose addition on cell biomass, lipid production and lipid content of *Rh. marina*

- Lactose added only at the beginning of fermentation
- Lactose added daily during fermentation

Table 4. Fatty acid composition of the lipid produced by *Rh. marina*

Fatty acid	Content (%)
C _{14:0} myristic acid	0.52
C _{16:0} palmitic acid	20.32
C _{16:1} palmitoleic acid	5.25
C _{18:0} stearic acid	8.31
C _{18:1} oleic acid	46.63
C _{18:2} linoleic acid	16.24
C _{22:0} benheic acid	0.29
unidentified	2.39

Candida utilis 99.4%, *Candida lipolytica* 79.7%, *Candida tropicalis* 75.8%, *Hansenula anomala* 97.1%, *Rhodotorula glutinis* 89.8% 등으로 보고되었으며⁽²³⁾, *Rh. gracilis*⁽⁴⁾는 84.0%를 구성하는 것으로 보고되었다. 즉, 균종마다 주지방산의 비율이 다른 다양성을 나타내고 있다. 곰팡이의 경우^(19,24)도 이들 지방산이 주성분을 이루고 있다.

시험균이 생산한 지방질의 불포화 지방산의 비율은 69.8%로서 옥수수油 88.0%, 면실油 74.0%, 올리브油 88.0%, 大豆油 82.0%보다 상당히 낮으며, 돼지기름 52.0%, 쇠기름 62.0%보다는 높은 경향을 보여주고 있다⁽²²⁾.

요 약

Rhodotorula marina IFO 0879의 균체생산과 균체내 유지생산을 위한 최적배양조건에 관하여 조사하였다. 균체량과 유지생산량은 30°C, pH 6.0~7.5에서 최고량을 나타내었다. 30°C에서 8일간 진탕배양하는 동안 질소성분이 어느정도 소모되어 균체가 증식한 후 지방질의 생성이 시작되었으며, 이때 최대균체량은 9.82g/l이고 세포내 지방질은 효모균체에 대하여 최고 35.4%까지 축적하였다. 탄소원으로서 乳糖과 포도당을, 질소원으로서 ammonium sulfate를 사용하였을 때 균체량과 지방질 함량이 가장 많았다. 배양액의 질소농도가 높을수록 균체 지방함량은 감소하고 균체량이 증가하였으며, 농도가 낮을수록 반대로 되었다. 배양액에 주기적으로 당을 첨가했을 때 초기에는 균체량과 지방질생성량이 대조구보다 적었으나 후기에는 더 많았다. 생산된 지방질의 주지방산은 palmitic acid(20.3%), oleic acid(46.6%) 및 linoleic acid(16.2%)이었다.

문 헌

- Woodbine, M.: *Prog. Ind. Microbiol.*, 1, 179(1959)
- Singh, J. and Sood, M.G.: *J. Sci. Fd. Agric.*, 29, 611(1978)
- Bhatia, I.S., Raheja, R.K. and Sukhija, S.: *J. Sci. Fd. Agric.*, 24, 779(1973)
- Kessel, R.H.J.: *J. Appl. Bact.*, 31, 220(1968)
- Steinberg, M.P. and Ordal, Z.J.: *J. Agric. Food Chem.*, 2 (17), 873(1954)
- Husain, S.S. and Hardin, M.M.: *Food Res.*, 17, 60(1952)
- Dostálek, M., Munk, V. and Volfivá, O.: *Biotechnol. Bioeng.*, 10, 33(1968)
- Yoon, S.H., Rhim, J.W., Choi, S.Y., Ryu, D.Y. and Rhee, J.S.: *J. Ferment. Technol.*, 60, 243(1982)
- 박완수, 구영조, 신동화, 민병용 : 한국산업미생물학회지, 11(2), 123(1983)
- Dunkan, B.: *Mycologia*, 65, 211(1973)
- Moon, N.J., Hammond, E.G. and Glatz, B.A.: *J. Dairy Sci.*, 61 1537(1978)
- Allen, L.A., Bernard, N.H., Fleming, M. and Hollis, B.: *J. Appl. Bacteriol.*, 27, 27(1964)
- Choi, S.Y., Ryu, D.Y. and Rhee, J.S.: *Biotechnol. Bioeng.*, 24, 1105(1982)
- 김진원, 강신권, 성낙계 : 한국산업미생물학회지, 12(4), 271(1984)
- 박성오 : 한국농화학학회지, 17(2), 93(1974)
- Miller, G.L., William, R.B., Glanon, Z. and Burton, A.L. : *Anal. Biochem.*, 2, 127(1960)
- A. O. A. C. : *Official Mehtods of Analysis of the AOAC*, 13th. ed, 858(1980)
- Metcalf, L.D. and Schmitz, A.A. : *Anal. Chem.*, 10, 363(1961)
- 유진영, 이형춘, 신동화, 서기봉 : 한국산업미생물학회지, 10, 87(1982)
- 신동화, 김창식 : 한국산업미생물학회지, 10, 15(1982)
- Bhatia, I.S. and Arneja, J.S. : *J. Sci. Food Agric.*, 29, 611(1978)
- 김동훈 : 식품화학, 탐구당, 서울, 351(1971)
- Thorpe, R.F. and Ratledge, C. : *J. Gen. Microbiol.*, 72, 151(1972)
- Etten, J.L. and Gottlieb, D. : *J. Bacteriol.*, 89(2), 409(1965)