

## 石油炭化水素 醱酵에 의한 脂質의 生成

박 태 원 · 서 형 준

서울대학교 공과대학 공업화학과

(1975. 12. 31 접수)

## Cellular Lipid Formation by Petroleum Hydrocarbon Fermentation

Tai Won Park and Hyung Joon Suh

Department of Chemical Technology, College of Engineering,  
Seoul National University, Seoul, Korea

(Received Dec. 31, 1975)

**요 약.** 脂質 生産의 새로운 供給源으로 고려될 수 있는 石油炭化水素 醱酵에 의한 菌體脂質의 生成에 있어서 炭化水素의 炭素數의 影響과 그 脂肪酸의 組成을 檢討하였다.

菌株로서 *Rhodotorula* sp., 基質로서 炭素數가 짝수인 *n*-tetradecane 과 *n*-hexadecane 을 使用하여 容量 2l 의 醱酵槽에서 溫度 28°C, pH 4.0~4.6, 酸素供給速度 0.4 vvm, 攪拌速度 1000 rpm 의 條件에서 醱酵시켜 生成된 菌體를 回收, 乾燥後 菌體脂質을 抽出하고 gas-liquid chromatography 로 脂肪酸 組成을 檢索한 바, *n*-tetradecane 과 *n*-hexadecane 을 基質로 한 경우, 生成菌體의 脂質含量은 各各 12.0 및 25.8 % 이었으며 菌體 脂肪酸은 大部分 炭素數가 짝수인 脂肪酸으로 構成되어 있었다.

**ABSTRACT.** The effect of carbon number of hydrocarbon used as a carbon source in the production of cellular lipid of *Rhodotorula* sp. and its fatty acid composition were investigated.

Using *Rhodotorula* sp. on *n*-tetradecane and *n*-hexadecane whose carbon numbers are even, fermentation was carried out in a jar fermentor of 2 liter-capacity at 28°C, with pH range of 4.0~4.6 and at oxygen flowing rate of 0.4 vvm and agitation velocity of 1000 rpm.

Drying the produced cell after completion of fermentation, cellular lipid was extracted from the cell using soxhlet extractor and examined its fatty acid composition by gas-liquid chromatography.

Cellular lipid content in the cell produced on *n*-tetradecane and *n*-hexadecane were 12.0 % and 25.8 % on the basis of dry cell weight, respectively and their fatty acids were mostly even-numbered in carbon number.

### 1. 緒 論

世界の人口増加에 따른 食糧不足의 解決方案의 하나로 石油蛋白에 대한 研究가 急速히 進行되어 石油質化가 可能한 菌株의 調査와 培養液, 醱酵條件등이 많이 研究되고 있다.

近年에는 菌體脂質의 脂肪酸 組成에 대해서도

發表되고 있는데 *n*-alkanes 로부터 微生物酸化로 産出되는 脂肪酸은 大量生産의 觀點에서 볼 때 큰 關心事가 되고 있다.

이들에 關係 Raymond 와 Davis<sup>1</sup> 는 *n*-hexadecane 과 *n*-octadecane 을 基質로 하고 *Nocardia* sp. 를 生長시켰을 때 菌體脂質의 量이 70 % 라고 했으며 Davis<sup>2</sup> 는 C<sub>13</sub>~C<sub>20</sub> 의 *n*-alkanes 를 基質

로 하였을 때, 基質의 炭素數가 홀수이면 炭素數가 홀수인 脂肪酸이, 基質의 炭素數가 짝수이면 炭素數가 짝수인 脂肪酸이 생기며 또한 基質의 炭素數와 같은 數의 炭素를 가진 脂肪酸이 支配的이라고 하였다. Romero와 Brenner<sup>3</sup>는 *Pseudomonas aeruginosa*를 菌株로 하고 hexadecane을 基質로 했을 경우, 주로 C<sub>14</sub>부터 C<sub>22</sub>의 飽和脂肪酸이 나타났으며 不飽和脂肪酸과 히드록시酸도 함께 나타났다고 報告하였다. Mizuno *et al.*<sup>4</sup>은 *n*-alkanes와 glucose를 基質로 하고 *Candida* sp.를 菌株로 하였을 때 生成되는 菌體脂質은 어떠한 基質을 使用했을 경우라도 palmitic, palmitoleic, stearic, oleic과 linoleic acid를 포함하고 있다고 했으며, Miller와 Johnson<sup>5</sup>은 C<sub>15</sub>~C<sub>25</sub>의 *n*-alkanes에 *Candida* sp.를 作用시켜 얻은 菌體에는 1.9~13.4%의 脂質을 포함하고 있다고 하였다. 또한 Colin Ratledge<sup>6</sup>는 菌株로 *Candida* sp., 基質로는 C<sub>12</sub>~C<sub>14</sub> 混合 *n*-alkanes를 使用하였을 때 基質의 24.8%에 해당하는 量이 脂肪酸으로 되었다고 하였으며, Makula와 Finnerty<sup>7</sup>는 炭素數가 짝수 혹은 홀수인 *n*-alkanes에서 자란 *Micrococcus cerificans*로부터의 脂肪酸의 組成은 基質의 炭素數가 짝수인 경우, 炭素數가 짝수인 脂肪酸이, 그리고 基質의 炭素數가 홀수인 경우 炭素數가 홀수와 짝수의 脂肪酸으로 된다고 밝혔다.

以上에서 보면 使用된 菌株에 따라, 그리고 첨가된 基質에 따라 菌體脂質의 生成에 많은 差異가 있으며 또 基質의 炭素數가 生成되는 脂肪酸 組成에 影響이 있음을 알 수 있다.

本 研究에서는 石油炭化水素를 原料로 脂質을 工業적으로 生産하기 위한 基礎實驗으로서, 菌株로서 *Rhodotorula* sp., 基質로는 *n*-tetradecane과 *n*-hexadecane을 使用하여 菌體收率, 菌體脂質含量, 菌體脂肪酸의 組成을 檢討하였다.

## 2. 實 驗

### 2.1. 菌 株

本 實驗의 菌株로는 前報<sup>8</sup>에서 가장 優秀한 菌種으로 選定되어 stock culture되어 있는 것

중의 하나인 *Rhodotrula* sp.를 使用하였다.

### 2.2. 炭化水素

純度 99% 以上の *n*-tetradecane(S. G. = 0.764)과 *n*-hexadecane(S. G. = 0.774)을 基質로 使用하였다.

### 2.3. 培養液

種培養과 主培養에 使用된 培養液은 증류수 1l 당 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4.7g, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 4.0g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 0.3g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.0g, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01g, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.01g, MnSO<sub>4</sub>·4-5H<sub>2</sub>O 0.01g, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 0.01g, 그리고 少量의 yeast-extract로 되어있다.

### 2.4. 裝 置

醱酵槽는 안지름 120mm, 높이 220mm로서 容量은 約 2l이며 攪拌은 4개의 blade가 달려 있는 impeller로서 行하였다.

### 2.5. 培 養

2.5.1. 種培養. 500ml Erlenmeyer flask에 培養液 50ml를 取하고 15 psig, 120°C의 高압실에서 15分間 殺菌하고 培養液을 28°C로 냉각시킨 후 0.5ml의 *n*-alkanes를 넣고 stock culture되어 있는 *Rhodotrula* sp.를 接種하여 28°C의 振盪培養器에서 2日間 培養하였다.

위와 똑 같은 過程을 5回 反復하여 馴養培養시킨 後 主培養에서의 種菌으로 使用하였다.

2.5.2. 主培養. 醱酵槽와 培養液 1l를 各各 高압실에서 15 psig, 120°C의 中기압으로 15分間 殺菌한 후 醱酵槽를 恒溫槽에 固定하고 agitator를 motor에 連結한 다음 滅菌한 培養液에 1%(v/v)에 해당하는 *n*-alkanes 10ml와 種培養에서의 種菌 10ml를 接種한 후, pH 4.6으로 하고 溫度 28°C, 酸素 bombe로부터 air filter를 거친 酸素의 供給速度 0.4 vvm, 攪拌速度 1000 rpm, pH 4.0~4.6의 條件에서 主培養하였다. 또 pH는 每30分마다 測定하여 1N-NH<sub>4</sub>OH로서 調整하였다.

### 2.6. 菌體回收

培養이 끝난 後 生成된 菌體는 3500 rpm의 원심분리기로 20分間 원심분리하여 40°C의 증류수로 2回 세척한 後 30°C에서 眞空乾燥시켜 乾燥菌體를 얻었다. 收得率은 첨가된 *n*-alkanes

量에 대한 乾燥菌體最과의 百分比로서 나타내었다.

### 2.7. 脂質의 抽出

乾燥菌體를 잘 粉碎하여 Pederson<sup>9</sup>의 보고에서와 같이 chloroform-methanol(1:1) solvent로서 soxhlet extractor에서 60°C로 1日間 抽出하였다. 脂質의 含量은 乾燥菌體量에 대한 脂質量과의 百分比로서 나타내었다.

### 2.8. 脂質의 脂肪酸 組成

2.8.1. 脂肪酸의 에스테르化. Stoffel<sup>10</sup>의 보고에 따라, 5%의 dry HCl을 가한 dry methanol 5 ml에 100 mg의 脂質을 溶解하여 15 ml의 round flask에서 때때로 shaking하면서 80~100°C로 3時間동안 reflux시킨 후, 室溫으로 冷却하고 3.5 ml의 petroleum ether로서 3回 反復하여 methyl ester를 抽出하였다. Extract는 70°C까지 서서히 溫度를 높여 solvent를 蒸發시켰다.

2.8.2. Gas-Liquid Chromatography. 裝置로는 HITACHI Gas Chromatograph 063을 사용하였으며 column은 50~60 mesh Anakrom ABS에 10% SE-30으로 充填된 2m×3mm stainless steel column을 사용하였다.

Column 溫度 250~280°C (R: 10°C/min), injection 溫度 320°C, detector 溫度 320°C, attenuation 2×10<sup>4</sup>, chart speed 40 mm/min.로 維持하고 carrier gas로 nitrogen gas를 40 ml/min로 flow시키면서 methyl ester를 1 microliter 注入하여 gas chromatogram을 얻었다.

Gas chromatogram에서 각 peak의 面積을 planimeter로 測定하여 각 peak의 百分比를 구하였다.

## 3. 結果 및 檢討

### 3.1. 醱酵速度

Fig. 1은 醱酵速度를 나타낸 것으로 醱酵時間에 따라 첨가된 總 NH<sub>4</sub>OH 量을 plot한 것이다. Fig. 1에서 보면 C<sub>14</sub>에 대한 菌株의 lag phase는 15 hrs, log phase는 32 hrs이며 C<sub>16</sub>에 대한 菌株의 lag phase는 13 hrs, log phase는 28 hrs이며, 첨가된 總 NH<sub>4</sub>OH 量은 C<sub>14</sub>의 경우, 24.9 ml, C<sub>16</sub>의 경우, 28 ml이었다.

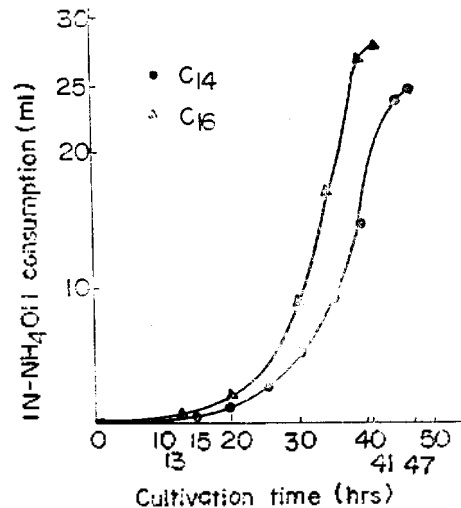


Fig. 1. Growth curve of *Rhodotorula* sp. in each carbon source.

### 3.2. 醱酵收得率과 脂質含量

生成된 乾燥菌體의 量은 C<sub>14</sub>의 경우, 5.642g, C<sub>16</sub>의 경우, 5.960g이었으며 여기서 抽出한 脂質의 量은 各各 0.677g 및 1.542g이었다. 첨가된 C<sub>14</sub> 및 C<sub>16</sub>의 量은 다 같이 10 ml이고 그의 比重이 各各 0.764 및 0.774이므로 C<sub>14</sub>의 경우, 醱酵收率은 73.8%, 脂質含量은 12.0%이며 C<sub>16</sub>의 경우, 醱酵收率은 77.0%, 脂質含量은 25.8%이었다.

### 3.3. 菌體脂質의 脂肪酸 組成

Fig. 2는 C<sub>14</sub>를 基質로 하였을 경우의 菌體脂質의 脂肪酸 組成을 나타내는 gas chromatogram으로서 stearic acid가 가장 높은 比率를 차지하고 있으며 myristic acid와 palmitic acid가 거의 비슷한 比率를 차지하고 있다. 그리고 myristoleic acid, palmitoleic acid로 추측되는 不飽和脂肪酸이 약간 나타나 있다. Fig. 3은 C<sub>16</sub>을 基質로 하였을 경우로서, palmitic acid가 특히 많은 比率를 차지하고 있으며 stearic acid, myristic acid가 그 다음의 比率를 차지하고 있다. 여기서도 不飽和脂肪酸으로 예상되는 것들이 다소 나타나 있다.

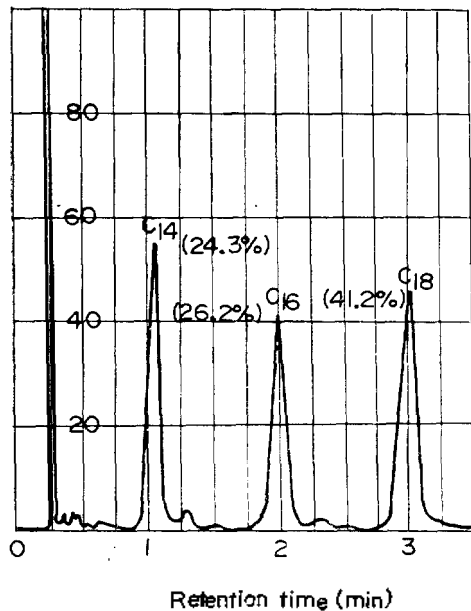


Fig. 2. Gas chromatogram of fatty acid from *n*-tetradecane

column : 2m×3mm. size  
Anakrom ABS-10%SE-30  
column temperature : 250~280°C (R : 10°C/min.)  
sample size : 1 microliter

#### 4. 結 論

1) *n*-Tetradecane 과 *n*-hexadecane 을 基質로 하였을 경우, 生成菌體의 脂質含量은 各各 12.0% 와 25.8% 이었다.

2) 菌體脂質은 *n*-tetradecane 과 *n*-hexadecane 의 두가지 基質에 대해 모두 myristic acid, palmitic acid 및 stearic acid 등의 炭素數가 작수인 飽和脂肪酸을 포함하고 있으나 그 比率에 많은 差異가 있으며 不飽和脂肪酸으로 추측되는 것들도 약간씩 포함하고 있다.

#### 引 用 文 獻

1. R. L. Raymond and J. B. Davis, *Appl. Microbiol.*, 8 (6), 329 (1960).

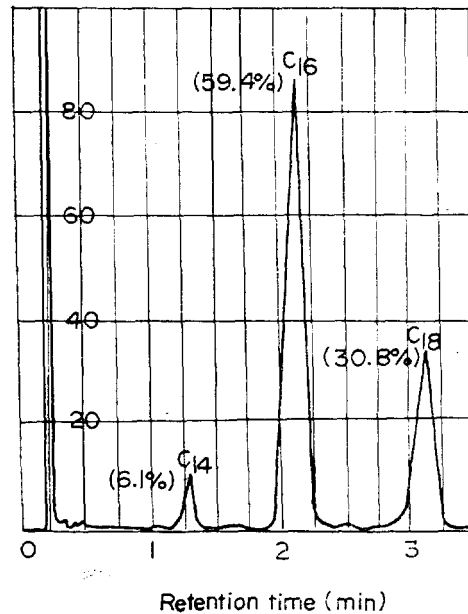


Fig. 3. Gas chromatogram of fatty acids from *n*-hexadecane same as in Fig. 2.

- J. B. Davis, *Appl. Microbiol.*, 12(3), 210 (1964).
- Ethel M. Romero and Rodolfo R. Brenner, *J. Bacteriol.*, 91, 183 (1966).
- Masayuki Mizuno, et al., *Agr. Biol. Chem.*, 30, 506 (1966).
- Thomas L. Miller and Marvin J. Johnson, *Biotechnol. Bioeng.*, 8, 549 (1966).
- Colin Ratledge, *Biotechnol. Bioeng.*, 10, 511 (1968).
- R. Makula and W. R. Finnerty, *J. Bacteriol.*, 95, 2102 (1968).
- Tai Won Park, Reported to Korea Oil Corporation on Petroleum-protein production I, II (1969, 1970).
- T. A. Pedersen, *Acta. Chem. Scand.*, 16, 374 (1962).
- Wilhelm Stoffel, Florence Chu and Edward H. Ahrens, *Anal. Chem.*, 31(2), 307 (1959).