

## 절간 고구마를 이용한 RNA 생산에 관한 연구

이종임\* · 송재철 · 양한철\*

식품영양학과

(1985. 4. 30 접수)

### 〈요 약〉

RNA 생산을 위한 최적 당화조건을 이용하여 생산된 절간 고구마당화액을 탄소원으로 효모 RNA 생산능력이 가장 양호한 *Cryptococcus laurentii* 균주를 분리하였다.

최적 배양조건을 검토한 결과 질소원으로 ammonium sulfate 0.6%, MnSO<sub>4</sub> 0.1% 그리고 ca-pantothenate 400µg/l 를 무기염류, 비타민류로 각각 첨가하였을 때 최대 RNA 생산능력을 나타내었다. 기본배지의 배양조건을 검토하여 얻은 최종배지에서의 효모 균체당 RNA 생산은 30.2% 증가하였다.

## RNA production from the Hydrolyzate of Sliced and Dried Sweet Potatoes

Lee, Jong-Im · Song, Jae-Chul · Yang Han-Chul

Dept. of Food and Nutrition

(Received April 30, 1985)

### 〈Abstract〉

During an extensive screening tests of yeast on their RNA formation it was found that *Cryptococcus laurentii* had especially high RNA content and high dry cell weight (D.C.W) in the case of using hydrolyzate of sliced and dried sweet potatoes as a carbon source.

Under the above conditions, the RNA content and yield of dry cells were investigated changing the media composition. Ammonium sulfate 0.6% was appeared to be favorable as a nitrogen sources. The optional concentration of Mn<sup>2+</sup> was showed to be 0.1%.

Ca-pantothenate, 400µg/ml, showed relatively favorable effects as a growth factor. The maximum RNA content of dry cell weight was 16.8% when grown on the medium containing above supplements under the optimal conditions.

### I. 서 론

DNA 는 유전자의 본체이며 RNA 는 IMP, GMP 의 정미물질 자원으로 식품공업의 핵산계 화합조미료로서 중요하다. Glutamic acid 는 Ikeda<sup>1)</sup>가 다시마(昆布)에서 처음 구수한 맛의 주성분으로 분리하여 amino acid 가 식품의 맛과 관계됨을 보고 하

였고 정미 구성분으로서의 핵산계 화합물에 대한 본격적인 연구는 Kodama<sup>2)</sup>가 Katsuo bushi(dried bonito)의 정미 구성분이 inosinic acid 의 histidine 염입을 보고한 이래 약 40년이 지나서 이루어졌다. 1956년 일본에서 오징어 근육이나 어육 폐액 등에서 5'-IMP 를 추출하였으며 1961년 이후 일본에서 효모를 원료로 RNA 분해법에 의한 핵산계 조미료를 생산한 이후 효모균체 생산 및 RNA 함량증가

\* 고려대학교 식품공학과

에 관한 많은 연구가 진행되어 왔다. 특히 효모는 아황산칼륨 폐액이나 당밀과 같은 값싼 탄소원으로 배양할 수 있어 공업적 이용에 관한 보고가 있었는데 Dawson 등<sup>3)</sup>은 효모생산 탄소원으로써 일산 농산 폐자원인 고구마전분 폐액을, Weaver와 Heister<sup>4)</sup>는 감자전분 폐액을, Klatt 등<sup>5)</sup>은 당롱가공 폐액을, Porges 등<sup>6)</sup>은 낙농 폐액을 이용하였으며 국내에서는 톱밥<sup>7)</sup> 및 폐신문지 당화액<sup>7)</sup> 또는 주정 폐액<sup>8)</sup>, 벚짇 당화액 등을 폐자원으로 이용하여 효모를 생산한 바 있다.<sup>9)</sup>

본 연구에서는 고함량 RNA 효모 생산원료로써 국내에서 생산되는 절간 고구마의 산 당화액을 이용하여 균주선정, 사용균주의 배양조건 및 영양요구성을 검토하였다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 실험재료

시료인 절간고구마는 진로주조(주)에서 주정원료로 사용한 절간 고구마를 이용하였으며 일반성분은 Table 1과 같다.

Table 1. General Composition of Sliced and Dried Sweet Potatoes.

Moisture	9.12%
Crude Protein	3.76%
Crude Fat	0.70%
Crude Fiber	2.26%
Nitrogen Free Ext.	81.64%
Ash	2.52%

### 2. 사용균주 및 배지

Table 2. Composition of Basal Medium.

Casamino acid	0.5%
Inorganic salts	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.05%
MnSO <sub>4</sub> 4--6 H <sub>2</sub> O	2%
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.01%
Buffer	
Potassium citrate	0.5%
Citric acid	0.1%
*Hydrolyzate	1,000ml
pH	6.0

\*Concentration of Reducing Sugar: 4.41%

고려대 식품공학과에서 보존한 효모를 시험균주로 사용하였으며 배지조성은 Table 2와 같다.

### 3. 실험방법

절간 고구마의 일반성분 중 조단백질은 킬달법으로, 기타성분은 상법<sup>10)</sup>에 따라 정량하였다. 산 당화는 가수분해제로 염산을 농도별로 시료에 대하여 5배(V/W) 가하고 autoclave에서 압력 및 시간별로 가수분해시켜 최적당화조건(염산농도 0.8%, 압력 2.0kg/cm<sup>2</sup>, 30분간 가수분해)을 이용한 당화액을 고 RNA 함량을 생산하기 위한 탄소원으로 사용하였다. 종균으로 보존균은 malt extract 한천 사면배지에 30°C에서 24시간 배양한 것을 사용하였으며 미타린, 금속이온 요구성 검토시는 균체를 살균수로 헹탁, 회식하여 10<sup>6</sup>/ml의 균농도로 접종하였다. 배양조건은 기본배지 50ml를 500ml 질탕 배양 플라스크에 분주하여 120°C에서 15분간 가압 살균후 접종하고 30°C에서 48시간 질탕배양(120 stokes, 진폭 7cm) 하였다. 건조균체양측정은 일정량의 배양액을 미리 평량한 원심분리관에 넣고 3,000rpm에서 10분간 원심분리한 후 무균수로 2번 세척한 후 105°C에서 함량이 될 때까지 건조시킨 후 평량한 다음 배양액 ml당 중량<sup>11)</sup>으로 표시하였다. RNA 함량은 Saline 정량법에 의해 순품 RNA 표준물질로서 작성한 표준곡선에서 RNA를 계산 정량하였다.

## III. 결과 및 고찰

### 1. 균주선정

각종 효모를 기본배지에 30°C, 24시간 배양한 결과(Table 3) 효모 RNA 함량 범위는 1.8~10.1%였으며 그 중 *Cryptococcus laurentii*는 10.1%로 가장 높았다. 또 *Cryptococcus laurentii*의 RNA 함량은 대수기에서 급증하였으며 48시간 이후에는 감소하는 경향을 나타내었다. 이것은 RNA 함량이 평균세대 기간의 역수 즉 증식속도와 정비례하여 대수기 초기에 RNA 함량이 최대 증가를 나타낸 것 같다. 효모의 RNA 함량은 원형질의 합성이 활발한 대수증식기에 높은 효과를 나타내는 것과 일치하였다. 건조균체량도 시간경과에 따라 증가하였으며 48시간 전후해서 최대치를 나타내었다. 효모의 발육과 RNA 함량의 생육곡선은 Figure 1과 같다.

Table 3. Screening Test of Various Yeasts.

Species	Yield of Dry Cell (mg/ml)	RNA (%)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8.32	4.6
<i>Brenneriyeffe rasse 2</i>	6.33	3.8
<i>Candida guilliermondii</i>	13.32	3.2
<i>Candida lipolytica</i>	7.42	5.6
<i>Candida macedoniensis</i>	8.66	4.9
<i>Candida tenuis</i>	3.0	7.9
<i>Candida utilis</i>	13.6	4.2
<i>Debariomyces hansenii</i>	9.1	6.0
<i>Debariomyces japonicus</i>	8.0	38.2
<i>Endomyces lindneri</i>	8.6	7.2
<i>Cryptococcus laurentii</i>	8.9	10.1
<i>Hansenula anomala</i>	7.0	6.9
<i>Saccharomycodes ludwigii</i>	3.67	4.6
<i>Saccharomycodes occidentalis</i>	8.3	4.0
<i>Sporobolomyces odoros</i>	4.4	7.4
<i>Pichia orientalis</i>	4.3	1.8
<i>Pichia polymorpha</i>	13.3	3.4
<i>Sporobolomyces salmonicolor var. polymyxa</i>	3.0	5.4
<i>Sporobolomyces salmonicolor</i>	2.3	5.2
<i>Tolulopsis aeria</i>	5.0	3.6
<i>Tolulopsis candida</i>	2.3	3.4
<i>Tolulopsis famata</i>	10.3	8.4
<i>Tolulopsis globosa</i>	3.3	6.2
<i>Tolulopsis ruba var. alpha</i>	8.3	4.1
<i>Trichosporon behrendii</i>	5.0	3.2
<i>Rhodotorula ruba</i>	7.0	3.8

Each yeast was inoculated in 50ml of basal medium in 500ml flask and cultivated at 30°C with a reciprocal shaking for 24 hrs.

2. 질소원의 영향

배양조건으로 초기배지 pH를 6.0으로, 배양시간을 48시간으로 고정하여 질소원을 제외한 기본배지에 각종 질소원을 일정 농도별로 첨가하여 RNA 함량을 검토한 결과(Table 4) 무기태 질소원으로는 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 0.6%(Table 5), 유기태 질소원으로는 yeast extract를 0.4%(Table 6), 첨가하였을 때 최대 RNA를 생산하였다. 건조균체량은 RNA 생산량과 반드시 비례하지 않았으나 일반적으로 균체량의 증가로 효모 RNA 함량은 증가하였다. Ammonium phosphate의 RNA 생산 효과가 좋은 것은 질소원으로서 뿐만 아니라 유리 가능한 인산무기

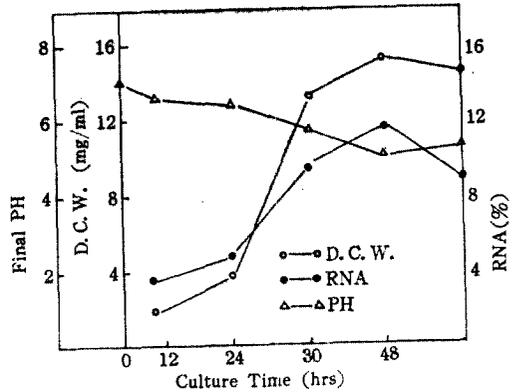


Fig. 1. Time Course of Production of RNA during the Growth of *Cryptococcus laurentii*

RNA content was determined by salin method and dry cell weight was measured drying at 105°C for 10-12 hours. The temperature was maintained at 30°C and initial pH was 6.0 on a reciprocal shaker during the cultivation.

Table 4. Effect of Nitrogen Sources in the Culture Media

Nitrogen Sources	D.C.W (mg/ml)	Final pH	RNA %	RNA per Culture Medium (mg/ml)
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	11.0	5.11	8.75	0.96
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	5.6	5.34	5.84	0.33
KNO <sub>3</sub>	3.2	5.50	3.68	0.12
NaNO <sub>3</sub>	7.6	5.70	5.45	0.41
NH <sub>4</sub> Cl	7.3	5.77	3.51	0.26
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	11.0	5.02	8.36	0.92
Casamino Acid	9.6	5.20	7.48	0.72
Peptone	12.3	5.48	8.33	1.02
Malt Ext.	14.6	5.69	6.20	0.29
Yeast Ext.	15.0	5.52	8.68	1.30
C. S. L	7.2	5.97	6.46	0.47
Asparagine	6.8	5.36	3.49	0.24

1.5% of nitrogen source was added to the basal medium for *Cr. laurentii*. Cultivation: 30°C, 48 hours, initial pH 6.0, reciprocal shaker.

염의 작용에 의한 상승효과로 사료된다. 또 peptone의 효과는 각종 아미노산종류의 RNA 합성대사에 관계되는 것으로 yeast extract와 함께 RNA 생산에 좋은 효과를 나타내었다.

**Table 5. Optimum Concentration of Ammonium sulfate**

Concentration of Ammonium sulfate (%)	D. C. W (mg/ml)	Final pH	RNA %	RNA per Culture Medium (mg/ml)
0	4.7	5.81	4.2	0.19
0.2	5.8	5.62	8.6	0.50
0.4	7.9	5.62	10.1	0.80
0.6	9.6	5.56	9.3	0.89
0.8	7.7	5.42	8.7	0.67
1.0	8.4	5.46	8.4	0.71
2.0	3.7	5.48	5.2	0.20

**Table 6. Optimum Concentration of Yeast Ext.**

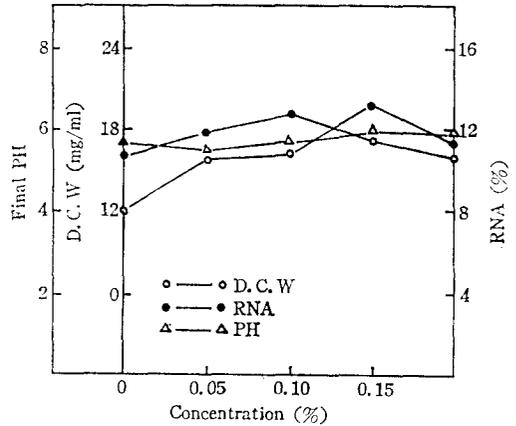
Yeast Ext. (%)	D. C. W (mg/ml)	Final pH	RNA %	RNA per Culture Medium (mg/ml)
Basal Medium	12.0	6.30	10.2	1.22
0	11.0	5.59	7.3	0.80
0.2	13.3	5.63	5.4	0.72
0.4	14.1	5.44	15.7	2.21
0.6	15.0	5.52	5.3	0.80
0.8	14.0	5.46	5.9	0.83
1.0	14.2	5.52	8.7	1.24

### 3. 금속이온의 영향

금속이온을 제거한 기본배지에 각종 금속염을 첨가하여 RNA 함량의 증가를 검토한 결과(Table 7)  $Mn^{+2}$ ,  $K^{+}$ 가 일반적으로 양호한 효과를,  $Cu^{+2}$ 와

**Table 7. Effect of Metal Ion in the Culture Media.**

Metal Ion	Yield of D. C. W (mg/ml)	Final pH	RNA (%)	RNA per culture medium (mg/ml)
None	11.0	5.36	10.5	1.16
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	18.2	5.19	9.37	1.70
$ZnSO_4$	17.0	5.24	10.2	1.73
$MnSO_4$	11.7	5.23	15.5	1.81
KCl	14.7	5.34	12.3	1.78
NaCl	12.1	5.30	10.5	1.27
$CaCl_2$	14.0	5.24	9.5	1.33
$CaCO_3$	10.2	6.79	10.3	1.05
$CuSO_4$	2.1	4.94	6.7	0.14
$FeSO_4$	15.2	5.06	11.0	1.70
$CoCl_2$	7.0	5.03	13.6	0.95



**Fig. 2. Effect of Concentration of  $Mn^{+2}$**

$Co^{+1}$ 는 저해 효과를 나타내었으며 그 저해는  $Cu^{+2}$  첨가시 가장 심하였다.  $Mn^{+2}$ 의 효과는 세포막 투과성인자로서 핵산관련물질의 발효에 크게 기여하는 것으로 과잉으로 존재시 균체량만 증가하고 RNA 축적은 다소 감소하였다.  $Mn^{+2}$ 의 최적농도범위는 매우 좁은 최적농도는 0.1%였다(Figure 2). 이것은  $Mn^{+2}$  농도가 균의 생리에 영향을 주는 것으로 효모세포의 비정상적인 신장 등 이상형태로 변하면서 효모 균체량이 감소한 것으로 사료될 수 있다.

### 4. 비타민류의 영향

당화액에 질소원을 고정하고 각종 미량비타민을 단독첨가(Table 8) 또는 일종씩 제거한 미량비타민 혼합액을 대조군으로 하여 30°C, 48시간 배양하여 RNA 생산효과를 검토한 결과(Table 9) ca-pantothenate를 400 $\mu$ g/ml 첨가하였을 때 절저한 상승효과를 나타내었다(Figure 3). 효모생산에 있어서 ca-pantothenate 요구성은 질소원으로서는 casein hydrolyzate를 사용한 경우 ca-pantothenate의 현저한 발육촉진효과는 L-histidine과 같은 특정 아미노산에 의해 효모 생육저해에 비하여 ca-pantothenate가 회복효과를 크게 나타내기 때문이라고 생각된다. ca-pantothenate는 효모 생육에 필요한 bios로서 RNA 합성대사에 필요한 조효소인 coenzyme A의 구성성분으로 중요하므로 ca-pantothenate에 의한 대사촉진에 의해 RNA 합성에 의한 축적이 ca-pantothenate만의 결핍으로 크게 저하된 것으로 사료된다.

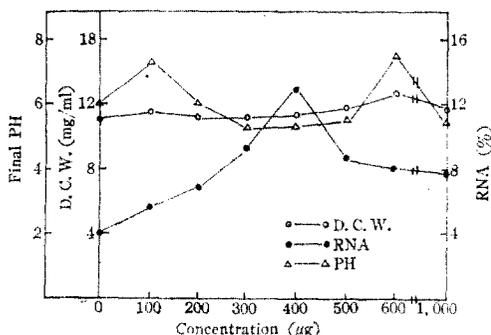
**Table 8. Effect of Various Vitamins Added to the Basal Medium Supplemented with Casamino Acid as Nitrogen Source.**

Vitamines	Yield of D. C. W. (mg/ml)	Final pH	RNA(%)	RNA per Culture Medium (mg/ml)
Thiamine	5.2	5.76	6.26	0.32
Riboflavin	5.8	5.86	5.86	0.34
Pyridoxine	6.3	5.82	6.23	0.39
Biotin	11.2	5.79	7.47	0.84
Ca-pantothenate	13.0	6.41	10.65	1.38
Nicotinic acid	13.2	5.77	6.42	0.85
p-Amino benzoic acid	7.1	5.86	5.28	0.37
Folic acid	4.7	5.84	6.76	0.32
Inositol	5.7	5.85	6.25	0.36
All	12.9	5.72	14.47	1.87

RNA content of *Cr. laurentii* in respons to various vitamins in the basal medium sdplemented with casamino acid as nitrogen source.

**Table 9. Effect of Various Vitamins Removed from Complete Medium Supplemented with Casamino acid as Nitrogen Sources.**

Vitamins	Added Volume (μg/l)	Yield of D. C. W. (gm/ml)	Final pH	RNA(%)	RNA per Culture Medium(mg/ml)
Thiamine	500	10.9	6.31	11.65	1.27
Riboflavin	500	9.8	5.55	14.12	1.38
Pyridoxine	500	9.6	6.04	11.37	1.09
Biotin	5	7.2	6.72	14.30	1.02
Ca-pantothenate	500	8.7	5.41	6.80	0.59
Nicotinic acid	500	8.9	5.45	12.20	1.08
p-Amino benzoic acid	50	14.2	5.26	12.90	1.83
Folic acid	5	11.4	5.65	12.90	1.47
Inositol	25,000	7.8	6.25	11.20	0.87
All		4.8	7.22	6.60	0.32



**Fig. 3. Effect of Concentration of Ca-pantothenate on the Content of RNA.**

5. 기본배지와 최종배지의 RNA 생산효과

기본배지와 최적배양조건을 검토한 최종배지를 이용하여 효모 RNA 생산능력을 비교한 결과 현저한 RNA 축적능력을 나타내었으며 건조균체량은 약 10% 증가하였으나 효모균체당 RNA 생산은 30.3%

**Table 10. Comparison of Final Medium with Basal.**

Medium	Yield of D. C. W (mg/ml)	Initial pH	RNA(%)	RNA per Culture Medium (mg/ml)
Basal	16.3	6.0	12.9	2.10
Final	17.9	6.0	16.8	3.00

증가하였다(Table 10).

#### Ⅶ. 결 론

결간 고구마당화액을 탄소원으로하여 선정된 효모의 RNA 생산능력을 증가시키기 위해 필수영양분인 질소원, 무기염류, 비타민의 첨가효과를 검토하였다. 질소원으로는 ammonium sulfate 와 yeast extract 가, 무기염류로는  $MnSO_4$ , 비타민류로는 ca-patohenate 가 균체내 최대 RNA 축적을 나타내었다. 본 연구는 값비싼 탄소원을 값싼 농산물인 결간 고구마로 대체 이용하므로 공업적인 방법으로 대규모 RNA 생산 가능성을 나타내었다.

#### References

1. K. Ikeda, J. Tokyo Chem. Soc., 30, 820 (1909)
2. S. Kodama, J. Tokyo Chem Soc., 34, 751 (1913)
3. P. R. Dawson and his coworkers, Year Book of Agriculture, 199, Washington, D.C. U.S. Government Printing Office(1950~1961)
4. E. A. Weaver, E.G. Heisler and their co-workers, U.S. Dept. Agr. Bur., Agr. Ind Chem., Eastern Regional Research Lab. AIC-350(1953)
5. T.J. Klatt, E.D. parker, A.F. pomes and N. Porges, Oil and Soap, 22, 319(1945)
6. N.K. Sung, M.C. Kim and K.H. Shim, Korean J. Appl. Micro. Bioeng., 4, 51(1976)
7. P.H. Oh, R. Yang and J.H. Yu, Korean J. Appl. Micro. Bioeng., 4, 51(1976)
8. M. Bae, A.S. Yoon and B.H. Kim, Korean J. Appl. Micro. Bioeng., 1, 13(1973)
9. K.Y. Park, J.C. Lee, H.Y. Cho and H.C. Yang, Korean J. Appl. Micro. Bioeng., 5, 79(1977)
10. 박재주, 선고석품분석, 66, 신광출판사, 서울 (1982)
11. M.H. Yim, H.S. Son, N.H. Chung and H.C. Yong, Korean J. Appl. Bioeng., 12(3), 219(1984)