

양식 사료로서 *Kluyveromyces fragilis*와 *Candida utilis*의 영양가

이상민 · 김종균* · 김태진** · 민진기** · 박출기
강릉대학교 해양생명공학부, *부경대학교 식품생명공학부, **국립수산진흥원

Nutritive Value of *Kluyveromyces fragilis* and *Candida utilis* As Feed for Aquaculture

Sang-Min LEE, Joong Kyun KIM*, Tae Jin KIM**, Jin Gi MIN** and Heum Gi PARK

Faculty of Marine Bioscience & Technology, Kangnung National University, Kangnung 210-702, Korea

*Division of Food Science and Biotechnology, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

**National Fisheries Research & Development Institute, Pusan 619-900, Korea

This study was conducted in order to evaluate nutritive values of yeasts (*Kluyveromyces fragilis* and *Candida utilis*) according to growth stages (early log phase, log phase, stationary phase and death phase) and chemical treatment of their cell wall. Proximate, amino acids, fatty acids and nucleotides composition of the yeast samples was determined. Crude protein content was high in *K. fragilis* (48-59%) compared to *C. utilis* (26-43%). Crude lipid and fiber contents of the yeasts were below than 1.6% and 3.3%, respectively. Composition of aspartic acid, glycine, proline, leucine, lysine and valine of *K. fragilis* were higher than those of *C. utilis*, and glutamic acid and arginine of *C. utilis* were higher than those of *K. fragilis*. Proximate and amino acids composition was not significantly influenced by growth stage of the yeasts. Major fatty acids of the yeasts in all growth stages were C₁₀₋₁₈. C₁₆₋₁₈ contents were relatively high in the early log or log phase and C₁₀₋₁₂ contents were relatively high in the stationary or death phase. However, n-3 highly unsaturated fatty acids (C_{≥20}) in the all growth stages were not observed. This result indicated that these yeast strains could not be adequate as a dietary lipid source for marine fish. Composition of nucleotides and their related compounds (ATP, ADP, AMP, IMP and inosine) in the early log phase yeasts were lower than those in the log, stationary and death phase yeasts.

Key words: *Kluyveromyces fragilis*, *Candida utilis*, proximate analysis, amino acids, fatty acids, ATP, ADP, AMP, IMP, inosine

서 론

양식 경영에 있어 어종의 생리 생태적인 특성, 환경, 질병 및 사료영양은 기본적으로 고려되어야 하며, 이 중에서도 사료는 양어가 적절히 조절 할 수 있는 경제적인 요인으로 작용한다. 즉, 양식 생산 단가에 사료가 차지하는 비중이 매우 높기 때문에 대 상중에 적합한 사료의 개발과 공급은 필수적이다. 사료 공급은 대상어종, 어체의 크기에 따라 달라지며, 특히 성장속도가 빠르고, 환경 적응력이 낮은 자·치어의 먹이생물이나 미립자 사료의 선정은 중요생산의 성패를 좌우한다 하여도 과언이 아니다. 초기 먹이생물이나 미립자 사료는 사용되는 먹이나 원료의 영양가, 소화율, 대량 배양, 공급의 안정성 등을 고려하여 개발되어야 한다. 그래서 어린 자어의 먹이생물로 rotifer와 같은 동물성 plankton에 대한 많은 연구가 수행되어 왔는데, 주로 먹이생물로서 rotifer에 관한 연구는 대량 배양과 영양강화에 초점을 두었다 (Ben-Amotz et al., 1987; Dendrons and Thorpe, 1987; Furukawa and Hidaka., 1973; Hirayama and Funamoto, 1982; Hwang and Pyen, 1995; James and Abu-Rezeq, 1988; Lubzen et al., 1989; Rezep and James, 1987; Watanabe et al., 1979, 1983; Whyte and Nagata, 1990; Yu et al., 1989). Rotifer 배양에 있어 그들의 먹이로 사용되는 *Chlorella* 등과 같은 식물먹이생물은 배양 면적, 배양기간, 노동력, 계절에 따른 온도 조건 등을 맞추기 어려운 면이 있어, 배양장에서 중요생산하는 양어들은 값싸고 구입이 쉬운 빵효모나 가공된 농축제품 등을 rotifer의 먹이

로 많이 사용하여 왔다. 하지만 이러한 빵효모에는 *Chlorella* 등에 비해 자어가 필요로 하는 필수지방산과 같은 영양소가 낮기 때문에 빵효모로 배양된 rotifer를 자어에게 공급하기 전에 *Chlorella* 등과 같은 식물먹이생물이나 영양강화제로 영양강화시켜 사용되고 있다 (Kitajima et al., 1979; Watanabe et al., 1983; Fernandez-Reiriz et al., 1993). 따라서 식물먹이생물이나 빵효모를 대신할 수 있는 rotifer의 먹이 개발에 관한 연구가 필요하다. 또한, 자·치어의 먹이로 rotifer 다음 먹이 단계에 사용되는 미립자사료나 양성용 배합사료의 품질은 중요생산이나 어류 성장에 매우 중요하게 고려되어야 한다. 국내에서 배합 사료가 일부 시판되고 있지만, 아직까지는 많은 량이 수입되고 있는 실정이어서 미립자사료나 배합사료의 품질 개선에 관한 연구가 꾸준히 수행되어야 할 것이다.

초기 사료원으로 많이 사용되는 효모는 크기가 작고, 치어 및 패류 중요생산에 필수영양소를 골고루 갖추고 있으며 (Lawford et al., 1979), 대량생산하기가 용이하여 rotifer의 먹이로 미립자배합 사료의 원료로 개발 가치가 높을 것으로 생각된다. 효모의 종류는 수없이 많은데, 사료원으로 개발시 고려되어야 할 것은 대량생산과 영양소의 균형 및 소화율 등이다. 일반적으로 이러한 효모는 mannoprotein으로 이루어진 바깥층과 glucan이 이루는 안쪽층의 이중 세포벽을 형성하고 있어 (Farkas, 1985), 효모를 먹이로 하는 동물성플랑크톤이나 자·치어 및 패류가 소화하기 어려운 단점을 가지고 있다 (Coutteau et al., 1990). 효모의 소화율을 높이기 위한 효모 세포벽 처리 방법에는 high-press homogenization을 이용

하는 기계적 방법, protease나 glucanase를 이용하는 효소적 처리법, 그리고 화학적 방법 등이 있다 (Moon et al., 1996).

*Candida utilis*와 *Kluyveromyces fragilis* 균주는 Moon et al. (1996)이 병원성 균주가 아닌 먹이생물로서 개발 가능성이 높은 종으로 평가하면서 대량배양 가능성을 제시하였다. 그리고 식품첨가제로서 *C. utilis*는 단백질 내에 lysine과 같은 필수아미노산이 상대적으로 높게 함유하고 있음이 밝혀졌고 (Lawford et al., 1979), 패류 먹이로서 규조류 대체 가능성이 연구되었다 (Epifanio, 1979). 또한, *K. fragilis*를 포함한 몇 종의 효모 균주는 주류 및 유기농 산업폐기물 속에서 잘 자라므로 이들 균주를 양식에 있어 초기먹이 사료로 개발한다면, 이들 산업폐기물을 재활용할 수 있어 환경문제를 어느 정도 해결할 수 있으며, 또한 산업폐기물을 이용하므로 값싼 사료를 생산할 수 있을 것이다 (Moon et al., 1996). 이와 같이 효모의 개발 가능성은 제시되고 있지만, 사료원으로서 영양적인 가치는 종합적으로 평가되지 못했다. 따라서 본 연구에서는 이 두 균주를 사료 첨가제와 rotifer 배양용 먹이로서 가치를 평가하기 위해 성장 단계별 및 세포벽의 화학 처리에 따른 영양가를 분석하여 비교하였다.

재료 및 방법

효모균주의 배양

실험에 사용된 효모균주는 *Kluyveromyces fragilis* (ATCC 36534), *Candida utilis* (ATCC 9950)와 빵효모 (*Saccharomyces cerevisiae*)로서 YEPD agar slant에 보관·유지하였고, 이 agar 배지의 조성은 2% dextrose, 0.5% yeast extract, 2% peptone 및 2% agar이었다 (Moon and Kim, 1996). 효모는 먼저 agar plate의 colony로부터 접종하여 10 ml tube에서 배양한 후, 배양된 효모는 500 ml flask로 옮겨 37°C, 180 rpm에서 12시간동안 배양되었는데, *K. fragilis*는 2.5% fructose, 1% peptone, 0.5% yeast extract를, *C. utilis*는 2% dextrose, 2.8 mM K₂HPO₄, 12.8 mM KH₂PO₄, 75 mM NH₄Cl, 11.5 mM Na₂SO₄, 125 mM MgCl₂, 1.0 mM citric acid, 4 µm/l biotin을, *S. cerevisiae*는 2% dextrose, 0.5% yeast extract, 2% peptone의 배지조성을 사용하였다. 회분식 발효는 flask상에서 late-log phase까지 배양된 효모를 1 l-fermenter로 옮겨 600 ml working volume으로 5% inoculum (30 ml)을 사용하여 실시되었다. 이때 pH, foam, 그리고 DO는 Labo Controller에 의해 조절했는데, pH는 3 N-HCl 및 3 N-NaOH를 사용하여 적정 pH인 5를 유지하고, 발효반응에 의해 생성된 foam은 10% antifoam DB-110A로 조절하였다. 배양하는 동안 aeration과 agitation은 1.5 l/min과 650 rpm을 계속적으로 유지·조절하였다. Agitator는 6개의 flat-bladed 형태의 impeller였고, 용존산소량은 배양하는 동안 계속적으로 20% 이하로 떨어지지 않게 유지하였다. 발효가 진행되는 동안 광학현미경 (1,000×)을 통해 오염 정도를 확인하였다. 맥주효모와 유지효모 (이화유지공업)는 시판되고 있는 것으로 구입하였다.

화학적 처리

Log phase까지 배양한 각 효모 균주들을 5,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 회수하고, 효모 세포벽 제거에 효과적인 것으로 보고된 (Moon et al., 1996) ethylenediaminetetraacetic acid와 2-mercaptoethanol을 사용하여 세포벽을 화학처리하였다. 먼저, 30초씩 세 번의 sonication을 통해 효모균의 세포벽 제거를 위한 전처리를 실시하고, 5,000 rpm에서 원심하여 젖은 상태의 효모 무게를 재어 두고 0.2 M의 tris-buffer (pH 8)에 1 M의 Na₂-EDTA를 완전히 녹여 만든 용액에 미리 무게를 재어둔 효모균에 처리하였다. 이때 전체 용액중 젖은 상태의 효모균의 무게가 200 g wet yeasts/ml이 되도록 처리하였다. Vortex를 하여 화학처리제와 효모가 잘 섞이도록 한 후 바로 0.3 M의 2-mercaptoethanol을 섞고 다시 vortex한 다음, 화학처리된 효모를 30°C 배양기에 넣어 1시간 배양한 후, 5,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 형성된 protoplasted yeast만을 회수하였다. Protoplasted yeast의 형성여부를 알아보기 위해 화학처리된 균주들을 methylene blue로 염색한 후 광학현미경을 이용하여 1,000의 배율에서 관찰하였다.

성분분석

성장단계별 (early log phase, log phase, stationary phase 및 death phase)로 효모균주 (*K. fragilis*, *C. utilis*)를 배양하여 원심분리한 후 -80°C에 보관하다가 진공동결 건조시킨 후에 수분, 단백질, 지질, 섬유질, amino acid, fatty acid, 핵산관련물질 등을 분석하여 초기먹이의 영양가를 기존의 효모 (빵효모, 유지효모 및 맥주효모), 어분, 해산 *Chlorella ellipsoidea* (KMMCC-C-C-21) 및 rotifer (*Brachionus plicatilis*)와 비교하였다. 일반성분은 AOAC (1990)의 방법에 따라 분석하였는데, 조단백질 (N×6.25)은 Auto Kjeldahl System (Buchi B-324/435/412, Switzerland)을 사용하여 분석하였고, 조지방은 Soxhlet 추출법으로, 수분은 105°C의 dry oven에서 24시간 동안 건조 후 측정하였다. 조회분은 550°C의 회화로에서 4시간 동안 태운 후 정량하였다. 그리고 조섬유는 Automatic analyzer (Fibertec, Tecator, Sweden)로 각각 분석하였다.

총아미노산은 일정량의 시료를 취하여 약 50배의 6 N HCl로 110°C sand bath상에서 24시간 동안 가수분해한 후, 시료용액을 회전진공증발기로 감압건조한 다음 0.02 N sodium citrate buffer (pH 2.2)로 정용하였다. 이것을 0.45 µm membrane filter로 여과한 다음, -30°C 동결고에 저장하여 두고 실험에 사용하였다. 아미노산의 정량은 Biochrome 202 (Pharmacia, USA) 아미노산 자동분석기로 분석하였다.

지방산 조성은 Folch et al. (1957)의 방법에 따라 지질을 추출하여 14% BF₃-methanol (Sigma, USA)로 지방산을 methylation시킨 후, capillary column HP20M (0.25 µm×30 m)이 장착된 gas chromatography (HP-5890 II, USA)로 분석하였다. 표준지방산으로 12:0, 13:0, 14:0, 14:1, 16:0, 16:1, 17:0, 17:1, 18:0, 18:1, 18:2n-6, 18:3n-6, 18:3n-3, 18:4n-3, 18:4n-6, 20:0, 20:1, 20:2n-6, 20:3n-6, 20:4n-3, 20:5n-3, 22:0, 22:1, 22:4n-3, 22:5n-3, 22:6n-3 및 24:1 (Sigma, USA)을 사용하였다. Carrier gas는 helium (30 ml/min)을 사용하였으며, oven 온도는 150°C에서 230°C까지 2°C/min 증가시켰고, injector의 온도는 250°C, detector (FID) 온도는 270°C로 설정하였다.

ATP 및 관련 화합물의 정량은 Iwamoto et al. (1987)의 방법에 따라 ATP 관련 화합물의 시료를 조제하여 -30°C에 보관하였다. 측정시에 0.45 µm membrane filter로 여과 후 HPLC (SYKNM, Germany)에 주입하였다. Column의 이동상은 1% triethylamine (pH 6.5)를 사용하였으며, Nacalai Cosmosil 5C18-AR 역상칼럼 (Japan)으로 측정조건은 시료주입량 20 µl, 유속 1 ml/min, column 온도는 40°C로 하여 254 nm의 파장에서, 표준품은 Sigma사의 제품을 사용하여 분석되었다.

결과 및 고찰

K. fragilis, *C. utilis*, 맥주효모, 유지효모 및 빵효모의 일반성분을 분석한 결과를 Table 1에 표시하였다. 조단백질 함량은 *K. fragilis*가 48.2~58.5%로 *C. utilis*의 25.9~43.4%보다 높은 경향을 보였고, 성장 상태에 따라 차이는 있었지만, *C. utilis*의 단백질 함량은 기존의 맥주효모 또는 빵효모와 유사한 경향을 보였다. 조지방 함량은 유지효모의 15.4% 외에는 *K. fragilis*, *C. utilis*, 맥주효모 및 빵효모 모두 0.1~1.6%로 매우 낮은 수준이었다. 조섬유의 함량은 모든 효모에서 0.6~3.3%의 범위로 낮은 수준이었으며, 외벽을 화공처리한 protoplasted 효모의 조섬유 함량은 다소 낮아지는 경향을 보였다.

K. fragilis, *C. utilis*, 맥주효모, 유지효모 및 빵효모의 아미노산 조성을 분석한 결과를 Table 2에 표시하였다. 효모 종류에 따라 아미노산 조성이 다소 차이를 보였는데, Ala는 효모 종류에 따라

큰 차이를 보이지 않았고, Asp, Gly, Pro, Leu, Lys 및 Val은 *K. fragilis*가 *C. utilis*보다 그 함량이 높았으며, Glu 및 Arg은 *C. utilis*가 상대적으로 더 높은 경향을 보였다. 특히 필수아미노산인 Arg의 함량은 *C. utilis*에서 10.9~17.6%로 *K. fragilis*의 5.6~6.7%보다 매우 높을 뿐 아니라 기존의 맥주효모나 빵효모의 5.3~5.4%보다 훨씬 높았으며, 어분의 7.0%보다도 높았다. 또한, 양어 사료의 제한적인 필수아미노산인 Lys의 함량은 *K. fragilis*에서 8.7~9.9%로 *C. utilis*의 7.2~7.9%보다 높을 뿐 아니라 어분의 5.5%보다 높은 경향을 보였으나, Leu과 Met과 같은 필수아미노산은

Table 1. Proximate analysis (% of dry matter) of yeasts

Yeasts		Crude protein	Crude lipid	Crude fiber
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Early log phase	55.67	0.25	0.56
	Log phase	55.15	0.24	2.26
	Stationary phase	49.15	0.81	3.13
	Death phase	58.49	0.54	1.86
	Protoplasted	48.21	0.36	1.67
<i>Candida utilis</i>	Early log phase	43.40	1.62	1.81
	Log phase	35.13	0.06	0.93
	Stationary phase	25.89	0.13	3.30
	Death phase	26.29	0.23	1.36
	Protoplasted	36.47	0.18	0.86
Brewer's yeast ¹		38.04	0.42	0.68
ω-yeast ¹		33.95	15.42	1.23
Baker's yeast ¹		43.01	0.63	1.08

¹Provided by E-Hwa Oil & Fat Co., Pusan, Korea.

Table 2. Amino acids composition (% in protein) of yeasts and white fish meal

Amino acids	<i>Kluyveromyces fragilis</i>					<i>Candida utilis</i>					Brewer's yeast	ω-yeast ¹	Baker's yeast ¹	White fish meal ²
	Early log phase	Log phase	Stationary phase	Death phase	Proto-plasted	Early log phase	Log phase	Stationary phase	Death phase	Proto-plasted				
Ala	7.2	7.5	7.7	8.3	6.9	9.5	8.4	6.9	8.3	10.1	6.9	7.3	6.7	6.5
Asp	9.4	9.7	10.3	9.2	10.1	8.7	9.1	8.4	9.4	8.8	9.6	10.8	12.4	9.9
Glu	13.6	14.1	14.1	14.3	13.4	15.0	16.4	15.7	14.5	12.9	17.3	16.4	16.0	14.9
Gly	8.2	7.7	7.4	7.9	5.7	4.3	4.3	4.3	4.4	4.0	4.7	4.9	4.8	6.9
Pro	5.4	5.2	5.1	5.8	4.7	3.2	3.2	3.2	3.3	3.3	5.6	3.8	3.9	6.9
Ser	5.3	5.5	5.5	5.6	5.5	5.1	4.9	4.9	5.2	4.9	5.6	5.4	5.4	5.1
Arg	6.7	6.2	5.6	6.6	5.7	12.2	14.2	17.6	13.8	10.9	5.3	5.5	5.4	7.0
His	2.6	2.5	2.4	2.7	2.8	2.0	2.2	2.2	2.1	2.1	2.2	2.4	2.4	1.9
Ile	4.5	4.5	4.6	4.2	5.1	4.5	4.1	4.0	4.4	4.8	4.7	5.2	4.9	4.0
Leu	7.1	7.2	7.3	6.6	8.0	6.9	6.3	5.9	6.6	7.0	7.4	7.6	7.5	8.1
Lys	9.3	9.2	9.0	8.7	9.9	7.6	7.4	7.2	7.9	7.7	6.2	8.6	8.7	5.5
Met	1.3	1.3	1.0	1.5	1.0	1.3	1.1	1.2	0.8	1.8	1.0	1.1	0.7	2.3
Cys	1.3	1.2	1.2	1.6	1.4	1.5	1.5	1.2	1.1	2.2	1.6	1.4	1.6	1.2
Phe	4.4	4.4	4.7	4.0	4.8	4.3	4.0	3.9	4.4	4.5	4.9	5.1	5.0	4.3
Tyr	3.0	3.0	3.2	3.0	3.1	2.9	3.0	3.0	3.0	3.3	3.6	3.4	3.3	3.7
Thr	5.3	5.2	5.2	4.6	5.5	5.6	5.1	5.5	5.8	5.6	5.1	5.4	5.5	4.8
Val	5.4	5.6	5.7	5.2	6.3	5.3	5.0	4.7	5.0	6.2	5.6	5.8	5.8	4.9
Total EAA	50.9	50.3	49.9	48.7	53.6	54.1	53.9	56.4	54.9	56.1	47.6	51.5	50.8	47.7

¹Provided by E-Hwa Oil & Fat Co., Pusan, Korea.

²Produced by steam dry method (Han Chang Fish Meal Co., Pusan, Korea).

EAA: essential amino acid.

어분보다 낮은 경향이였다. 또한, *K. fragilis*와 *C. utilis*의 성장 단계별 아미노산 조성은 특별한 변화 경향이 없었으며, 세포 외벽을 처리한 protoplasted *K. fragilis*와 *C. utilis*의 Glu, Gly 및 Arg은 처리전보다 낮아지는 경향이였고, Leu, Phe 및 Val의 함량은 다소 높아진 것으로 나타났다. Protoplasted *K. fragilis* 및 *C. utilis*의 총 필수아미노산 함량은 맥주효모, 빵효모 및 어분보다 높은 경향을 보였고, 세포벽을 처리하지 않은 효모의 경우도 맥주효모나 어분보다 총 필수아미노산 함량이 높은 값을 나타내었다. 이와 같이 효모 종류에 따라서 아미노산 조성이 차이를 보였으며, 이러한 특성을 이용하여 사료원으로 사용할 때 상호 보완적인 효과 등을 고려하여 적절히 혼합 첨가할 수 있을 것으로 생각된다.

K. fragilis, *C. utilis*, 맥주효모, 빵효모, *C. ellipsoidea* 및 rotifer (*B. plicatilis*)의 지방산 조성을 Table 3에 표시하였는데, 유지효모를 제외한 *K. fragilis*, *C. utilis*, 맥주효모 및 빵효모의 지방산은 대부분 C₁₈ 이하의 포화 또는 불포화산으로 구성되어 있었다. *K. fragilis* 및 *C. utilis*의 지방산 조성은 성장 단계 또는 외막처리 여부에 따라 변화되었는데, 주로 C₁₆₋₁₈의 지방산들은 early log 또는 log phase에서 death phase로 갈수록, 또는 protoplasted에서 낮아지는 반면에 C₁₀₋₁₂와 같은 저급 지방산들은 증가하는 경향을 보였다. 이처럼 성장단계에 따른 지방산 조성의 변화는 이들 효모가 성장함에 따라 체내에 필요로 하는 지방산의 종류가 달라질 수 있음을 시사하고 있다. 특히 어린 시기일수록 지방산의 탄소수가 상대적으로 높은 것은 지방산의 생리적 기능과 연관시켜 고찰이 가능할 것으로 판단된다. 이러한 점들을 고려하여 이 효모들을 먹이로 사용할 때에는 초기 성장 단계의 것을 사용하는 것이 더

바람직 할 것으로 생각된다. 이와 같이 *K. fragilis*, *C. utilis*, 맥주효모 및 빵효모에는 rotifer나 해산어류 (Lee et al., 1993 a, b; Lee et al., 1994; Kalogeropoulos et al., 1992; Leger et al., 1979; Watanabe et al., 1989)에 필요한 EPA (eicosapentaenoic acid) 및 DHA (docosahexaenoic acid)와 같은 n-3HUFA (highly unsaturated fatty acids)가 검출되지 않았으며, 성장 단계별로 차이를 보였지만, 일부 담수어 (Kanazawa et al., 1980; Takeuchi et al., 1980, 1983; Takeuchi and Watanabe, 1977; Watanabe et al., 1989)의 필수지방산인 18:2n-6 (linoleic acid)은 검출되었다. 따라서 이러한 효모들을 rotifer나 해산어류의 사료원으로 사용시에는 필수지방산의 공급원이 될 수 없을 것으로 판단된다.

해산 자치어의 먹이로 사용되는 rotifer나 미립자사료에는 그들이 요구하는 필수지방산인 EPA나 DHA와 같은 n-3HUFA (Fernandez-Reiriz et al., 1993; Kitajima et al., 1979; Watanabe et al., 1983)가 충족되어 있어야 한다. 특히, rotifer의 먹이로 자주 사용되는 빵효모에는 n-3HUFA가 없어 그 영양적인 가치가 낮기 때문에 빵효모로 rotifer를 배양한 후에는 n-3HUFA가 풍부한 해산 *Chlorella*나 유화오일 등의 영양강화제로 해산 자어의 필수지방산을 보충하여주는 것이 일반적인 방법이다. 또한, 빵효모의 이러한 단점을 보완하기 위해 n-3HUFA가 풍부한 oil로 빵효모를 처리한 ω -yeast (유지효모)가 상품으로 시판되고 있다. 그리고 본 실험에서 분석된 효모의 지질 함량이 1% 이하이므로 이러한 n-3HUFA가 구성되어 있다 하더라도 n-3HUFA 공급원으로 사용하기에는 지질 함량이 너무 낮기 때문에 큰 장점은 없을 것으로 보인다. 따라서 *K. fragilis*와 *C. utilis*를 n-3HUFA 공급원으로 rotifer나

Table 3. Fatty acids composition (% area) of yeasts, *Chlorella* and rotifer

Fatty acids	<i>Kluyveromyces fragilis</i>					<i>Candida utilis</i>					Brewer's yeast ¹	ω -yeast ¹	Baker's yeast ¹	<i>Chlorella ellipsoidea</i>	<i>Brachionus plicatilis</i> ²
	Early log phase	Log phase	Stationary phase	Death phase	Protoplasted	Early log phase	Log phase	Stationary phase	Death phase	Protoplasted					
10:0	23.0	17.8	28.8	28.0	46.2	14.6	—	14.1	30.3	19.4	10.8	0.3	1.6	—	1.1
12:0	14.0	12.5	21.4	21.8	28.3	8.0	0.3	8.1	20.1	27.8	1.7	0.5	2.7	0.3	1.1
14:1	0.8	0.6	—	0.8	1.2	0.3	0.3	0.3	0.8	—	0.4	—	—	—	0.4
14:0	1.2	1.2	0.9	0.6	1.0	0.4	0.7	0.6	0.9	18.2	2.2	5.9	2.4	4.2	2.9
16:1	14.4	9.2	7.8	9.4	1.2	2.9	1.1	5.6	1.9	—	23.0	8.1	4.0	19.0	18.9
16:0	11.8	16.7	11.6	12.6	6.9	12.4	21.4	23.4	12.0	11.1	35.5	20.7	21.5	24.3	12.2
18:3n-3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4.0	3.0	16.0	—	—
18:2n-6	19.9	19.7	11.3	11.1	2.0	35.8	36.3	23.5	10.7	6.5	8.5	2.1	1.4	5.7	4.7
18:1	8.5	14.2	9.7	10.3	1.9	20.3	23.7	16.9	13.7	7.6	0.4	5.6	12.6	10.2	19.2
18:0	2.3	3.6	1.5	1.7	1.0	2.1	3.8	4.3	2.1	1.7	11.6	3.5	34.8	0.6	5.1
20:5n-3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	9.6	—	19.2	20.8
20:4n-6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.1	—	3.1	—
20:2n-6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	8.7	—	—	—
20:1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.0	—	—	3.4
20:0	1.8	2.4	2.5	2.2	3.6	0.8	4.6	0.7	1.1	2.6	—	0.5	0.7	—	0.3
22:6n-3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	9.5	—	—	7.6
22:4n-3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	8.8	—	—	—
22:1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.5	7.9	—	—	0.8
22:0	0.3	1.2	1.7	0.3	2.3	1.4	4.3	1.0	1.8	2.9	—	—	1.0	—	—

¹Provided by E-Hwa Oil & Fat Co., Pusan, Korea.

²Cultured at 26°C with *Chlorella ellipsoidea*.

— : not detected or trace amount (<0.2%).

해산어류 배합사료원으로 사용하기 위해서는 n-3HUFA가 풍부한 사료원과 혼합첨가하거나 효모균주 자체를 유지화하는 방안 등이 필요할 것으로 판단된다. 위와 같이 아미노산과 지방산 조성을 고려하여 보면, 효모를 사료원으로 사용할 때는 지질 공급원으로서 보다는 단백질 공급원으로서 고려되는 것이 더 바람직 할 것으로 보이며, 그 외에도 본 실험에서와 같이 외막 처리 등 소화율을 개선하거나 미지의 성장인자 공급원 첨가제로서 보다 상세한 연구가 요망된다.

효모에는 이미 언급한 것처럼 미지의 성장인자나 섭취유인물질이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다. 섭취유인물질로 알려진 핵산 관련물질을 분석하여 Table 4에 표시하였다. 핵산관련물질의 함량은 효모 균주별로, 성장 단계별로 차이를 보였는데, *K. fragilis* 및 *C. utilis*의 early log phase에서는 ATP 함량이 검출되지 않았지만, 그 후 단계 (log - death phase)에서 각각 증가하는 경향을 보였다. 그리고 protoplasted 상태에서는 두 균주 모두 ATP가 검출되지 않았는데, 이는 효모가 성장할 때 세포막에 ATP가 필요함을 암시한다.

ADP 함량은 *K. fragilis*에서 early log phase 이후 단계부터 증가하였고, 세포막을 처리한 protoplasted 상태에서는 높은 수준을 유지하였지만, *C. utilis*의 경우는 성장이 진행됨에 따라 감소하는 경향을 보였으며, protoplasted에서는 그 함량이 낮아지는 경향을 보였다. AMP 함량은 두 균주 모두 early log phase에서 낮은 수준이었지만, 그 후 단계에서는 높은 함량을 유지하였으며, protoplasted에는 검출되지 않았다. IMP 함량은 두 균주 모두 log phase에서 가장 높은 값을 보였으며, protoplasted에서는 낮은 값을 보였다.

Inosine 함량은 *K. fragilis*의 성장이 진행됨에 따라 32~210 mg/100g의 범위에서 증가되었고, *C. utilis*에서는 200~300 mg/100g의 범위로 *K. fragilis*보다 높은 경향이었고, log phase에서 최대값을 보였다. 또한, protoplasted 상태의 inosine 함량은 *K. fragilis*가 116 mg/100 g, *C. utilis*가 62 mg/100 g으로 나타났다. Hypoxan-

thine은 *K. fragilis*의 log phase에서 24 mg/100 g, *C. utilis*의 early log phase에서 3 mg/100 g으로 매우 낮은 값을 보였고, 그 외 단계에서는 검출되지 않았다. 성장 단계별로 이들의 핵산관련물질의 총량은 두 균주 모두 early log phase에서 가장 낮은 값을 보였고, 각 성장 단계별로 *K. fragilis*가 *C. utilis*보다 높은 값을 유지하였으며, protoplasted 상태에서는 *C. utilis*가 더 높은 값을 나타내었다.

이러한 핵산관련물질은 ATP->ADP->AMP->IMP->inosine->hypoxanthine으로 분해경로를 걸쳐 생성된다. 양식 사료에 있어 효모는 주로 rotifer의 먹이나 배합사료 첨가제로 사용되고 있으며, 배합사료 첨가제로 사용할 때는 효모 중에 함유된 미지의 성장인자나 섭취유인물질에 대한 효과를 보기 위해서이다. 어류의 섭취유인물질으로는 amino acids, betaine, IMP, inosine 등이 알려져 있으며 (NRC, 1993), 어종별로 명확히 밝혀진 예는 드물다. 본 실험에서 섭취유인물질로 알려진 IMP와 inosine의 함량은 효모 종류에 따라, 성장 상태에 따라 다른 것으로 나타났는데, *C. utilis*가 *K. fragilis*보다 그 함량이 대체로 높았다. 특히, *C. utilis*의 inosine 함량이 기존의 맥주효모, 빵효모보다 훨씬 높은 값을 보여 차후 배합사료의 첨가제로의 그 효능을 연구할 필요가 있다고 생각된다. 그리고 효모를 rotifer 먹이나 어류 사료원으로 사용할 때 효모 세포벽의 소화성 문제가 잠재되어 있는데, 본 연구에서 두 균주 모두 세포벽을 화학처리한 protoplasted 균주의 IMP 함량은 낮아졌고, inosine의 경우 *K. fragilis*보다는 *C. utilis*의 protoplasted에서 상대적으로 더 낮은 값을 보여 실제 사료원으로 이용할 때는 이러한 세포벽 화학처리가 소화에 얼마나 도움이 될지 상세한 검정이 필요할 것이다.

이상의 결과들로부터 *K. fragilis*와 *C. utilis*를 rotifer의 먹이로 사용할 때에는 필수지방산 보충 등의 방안이 필요할 것으로 판단되며, 섭취유인물질이나 미지의 성장인자 등의 효과를 얻기 위한 방안으로 미립자사료의 원료로 또는 양성용 배합사료의 첨가제로 사용하는 것에 대해서는 차후 상세한 연구가 추진되어야 할 것이다.

Table 4. Composition (mg/100 g) of nucleotides and their related compounds in the yeasts

Yeasts	ATP	ADP	AMP	IMP	Inosine	Hypoxanthine	Total	
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Early log phase	—	79.0	175.5	116.4	31.6	402.5	
	Log phase	438.8	311.1	432.8	540.5	75.1	1822.2	
	Stationary phase	248.1	230.9	289.8	224.1	82.9	1075.8	
	Death phase	423.7	334.9	488.5	94.5	209.5	1551.1	
	Protoplasted	—	379.8	—	49.3	116.4	545.5	
	Total	1110.6	1335.7	1386.6	1024.8	515.5	23.9	5397.1
<i>Candida utilis</i>	Early log phase	—	352.7	208.8	245.1	265.3	3.0	1074.9
	Log phase	534.5	257.7	428.1	600.0	399.9	—	2220.2
	Stationary phase	526.2	228.6	508.7	453.8	220.8	—	1938.1
	Death phase	560.9	193.4	419.5	426.7	199.5	—	1800.0
	Protoplasted	—	92.3	—	19.2	62.0	—	173.5
	Total	1621.6	1124.7	1565.1	1744.8	1147.5	3.0	7206.7
Brewer's yeast ¹	—	254.0	958.6	308.7	90.2	125.9	1737.4	
ω-yeast ¹	—	178.9	936.4	444.5	97.9	58.5	1716.2	
Baker's yeast ¹	121.9	475.2	1222.4	426.7	79.9	103.0	2429.1	

¹Provided by E-Hwa Oil & Fat Co., Pusan, Korea.

요 약

Kluyveromyces fragilis (ATCC 36534)와 *Candida utilis* (ATCC 9950) 균주를 사료 첨가제와 rotifer 먹이로서 가치를 평가하기 위해 성장 단계별 및 세포벽의 화학처리에 따른 영양가를 분석하여 비교하였다. 조단백질 함량은 *K. fragilis*가 48.2~58.5%로 *C. utilis*의 25.9~43.4%보다 높은 경향을 보였고, 조지방 함량은 *K. fragilis* 및 *C. utilis* 모두 0.1~1.6%로 매우 낮은 수준이었다. 조섬유의 함량은 두 효모에서 0.6~3.3%의 범위로 낮은 수준이었으며, protoplasted 효모의 경우는 다소 낮아지는 경향을 보였다. 효모 종류에 따라 아미노산 조성이 다소 차이를 보였는데, Asp, Gly, Pro, Leu, Lys 및 Val은 *K. fragilis*가 *C. utilis*보다 그 함량이 높았으며, Glu 및 Arg은 *C. utilis*가 상대적으로 더 높은 경향을 보였다. 성장 단계별 아미노산 조성은 특별한 변화 경향이 없었으며, 세포 외벽을 처리한 protoplasted *K. fragilis*와 *C. utilis*의 Glu, Gly 및 Arg은 처리전보다 낮아지는 경향이었고, Leu, Phe 및 Val의 함량은 다소 높아진 것으로 나타났다. *K. fragilis* 및 *C. utilis*의 지방산은 대부분 C₁₈ 이하의 포화 또는 불포화산으로 구성되어 있었는데, 주로 C₁₆₋₁₈의 지방산들은 early log 또는 log phase에서 death phase로 갈수록, 그리고 protoplast에서 낮아지는 반면에 C₁₀₋₁₂와 같은 저급 지방산들은 증가하는 경향을 보였다. *K. fragilis* 및 *C. utilis*의 early log phase에서는 ATP 함량이 검출되지 않았지만, 그 후 단계(log - death phase)에서 각각 증가하는 경향을 보였다. ADP 함량은 *K. fragilis*에서 early log phase 이후 단계부터 증가하였고, 세포막을 처리한 protoplast 상태에서는 높은 수준을 유지하였지만, *C. utilis*의 경우는 성장이 진행됨에 따라 감소하는 경향을 보였으며, protoplast 상태에서는 그 함량이 낮아지는 경향을 보였다. AMP 함량은 두 균주 모두 early log phase에서 낮은 수준이었지만, 그 후 단계에서는 높은 함량을 유지하였으며, protoplast 상태에는 검출되지 않았다. IMP 함량은 두 균주 모두 log phase에서 가장 높은 값을 보였으며, protoplast 상태에서는 낮은 값을 보였다. Inosine 함량은 *K. fragilis*의 성장이 진행됨에 따라 증가되었고, *C. utilis*에서는 *K. fragilis*보다 높은 경향이었고, log phase에서 최대값을 보였다. 성장 단계별로 이들의 핵산 관련물질의 총량은 두 균주 모두 early log phase에서 가장 낮은 값을 보였으며, 각 성장 단계별로 *K. fragilis*가 *C. utilis*보다 높은 값을 유지하였고, protoplast 상태에서는 *C. utilis*가 더 높은 값을 나타내었다.

감사의 글

이 논문은 해양수산부의 수산특정연구개발사업비 지원에 의해 수행된 결과의 일부이며, 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

AOAC. 1990. Official Methods of Analysis. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists. Arlington, Virginia. 1298 pp.

- Ben-Amotz, B., R. Fishler and A. Schneller. 1987. Chemical composition of dietary species of marine unicellular algae and rotifers with emphasis on fatty acids. *Mar. Biol.*, 95, 1~36.
- Coutteau, P., P. Lavens and P. Sorgeloos. 1990. Baker's yeast as a potential substitute for live algae in aquaculture diets: *Artemia* as a case study. *J. World Aquacult. Soc.*, 21, 1~9.
- Dendriens, P. and J.P. Thorpe. 1987. Experiments on the artificial regulation of the amino acid and fatty acid contents of food organisms to meet the assessed nutritional requirements of larval, post-larval and juvenile dover sole (*Solea solea* L.). *Aquaculture*, 61, 121~154.
- Epifanio, C.E. 1979. Comparison of yeast and algal diets for bivalve molluscs. *Aquaculture*, 16, 187~192.
- Farkas, V. 1985. The fungal cell wall. In: *Fungal protoplasts. Applications in biochemistry and genetics*, edited by J. F. Peberdy and L. Ferenczy. Marcel Dekker, Inc., New York, USA. pp. 3~29.
- Fernandez-Reiriz, M.J., U. Labarta and M.J. Ferreiro. 1993. Effects of commercial enrichment diets on the nutritional value of the rotifer (*Brachionus plicatilis*). *Aquaculture*, 112, 195~206.
- Folch, J., M. Lees and G.H.S. Stanley. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226, 497~509.
- Furukawa, I. and K. Hidaka. 1973. Technical problems encountered in the mass culture of the rotifer using marine yeast as food organisms. *Bull. Plankton Soc. Jap.*, 19, 61~71.
- Hirayama, K. and H. Funamoto. 1982. Supplementary effect of several nutrients of nutritive deficiency of baker's yeast for population growth of the rotifer, *Brachionus plicatilis*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 49, 505~510.
- Hwang, H.K. and C.K. Pyen. 1995. The effects of water temperature and salinity on the propagation of rotifer, *Brachionus plicatilis*. *J. Aquaculture*, 8, 59~67.
- Iwamoto, M., H. Yamanaka, S. Watabe and K. Hashimoto. 1987. Effects of storage temperature on rigor-mortis and ATP degradation in plaice *Paralichthys olivaceus* muscle. *J. Food Sci.*, 52, 1514~1517.
- James, C.M. and T.S. Abu-Rezeq. 1988. Effect of different cell densities of *Chlorella capsulata* and a marine *Chlorella* sp. for feeding the rotifer, *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture*, 69, 43~56.
- Kanazawa, A., S.I. Teshima, M. Sakamoto and M.A. Awal. 1980. Requirements of *Tilapia zillii* for essential fatty acids. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 46, 1353~1356.
- Kalogeropoulos, N., M.N. Alexis and R.J. Henderson. 1992. Effect of dietary soybean and cod-liver oil levels on growth and body composition of gilthead bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 104, 293~308.
- Kitajima, C., S. Fujita, F. Oowa, Y. Yone and T. Watanabe. 1979. Improvement of dietary value for red sea bream larvae of rotifers, *Brachionus plicatilis*, cultured with baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 45, 469~471.
- Lawford, G.R., A. Kligerman and T. Williams. 1979. Production of high-quality edible protein from *Candida* yeast grown in continuous culture. *Biotechnol. Bioeng.*, 21, 1163~1174.
- Leger, C., F.J. Gatesoupe, R. Metailler, P. Luquet and L. Fremont. 1979. Effect of dietary fatty acids differing by chain lengths and ω series on the growth and lipid composition of turbot *scophthalmus maximus* L. *Comp. Biochem. Physiol.*, 64B, 345~350.

- Lee, S.M., J.Y. Lee, Y.J. Kang and S.B. Hur. 1993a. Effects of n-3 highly unsaturated fatty acids on growth and biochemical changes in the Korean rockfish *Sebastes schlegeli* II. changes of blood chemistry and properties of liver cells. J. Aquaculture, 6, 107~123.
- Lee, S.M., J.Y. Lee, Y.J. Kang, H.D. Yoon and S.B. Hur. 1993b. n-3 highly unsaturated fatty acid requirement of the Korean rockfish *Sebastes schlegeli*. J. Korean Fish. Soc. 26, 477~492.
- Lee, S.M., J.Y. Lee and S.B. Hur. 1994. Essentiality of dietary eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid in Korean rockfish, *Sebastes schlegeli*. J. Korean Fish. Soc. 27, 721~726.
- Lubzen, E., A. Tandler, and G. Minkoff. 1989. Rotifers as food in aquaculture. Hydrobiologia, 186/187, 387~400.
- Moon, J.H., K.T. Tak and J.K. Kim. 1996. Development of yeast strain for aquaculture; possible yeast strains. Korean J. Life Science, 6, 135~141.
- Moon, J.H. and J.K. Kim. 1996. Production of yeast diet for aquaculture in batch fermenters. J. Korean Fish. Soc., 29, 882~887.
- NRC (National Research Council). 1993. Nutrient Requirements of Fish. National Acad. Press, Washington, D.C. 114pp.
- Rezep, T.A. and C.M. James. 1987. Production and nutritional quality of the rotifer *Brachionus plicatilis* fed *Chlorella* sp. at different cell densities. Hydrobiology, 147, 257~261.
- Takeuchi, T. and T. Watanabe. 1977. Requirement of carp for essential fatty acids. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 43, 541~551.
- Takeuchi, T., S. Arai, T. Watanabe and Y. Shimma, 1980. Requirement of eel *Anguilla japonica*, for essential fatty acids. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 46, 345~353.
- Takeuchi, T., S. Satoh and T. Watanabe. 1983. Requirement of *Tilapia nilotica* for essential fatty acids. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 49, 1127~1134.
- Watanabe, T., F. Oowa, C. Kitajima, S. Fujita and Y. Yone. 1979. Relationship between the dietary value of rotifers, *Brachionus plicatilis* and their content of ω highly unsaturated fatty acids. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 45, 883~889.
- Watanabe, T., C. Kitajima and S. Fikota. 1983. Nutritional values of live organisms used in Japan for mass propagation of fish: a review. Aquaculture, 34, 115~143.
- Watanabe, T., M.S. Izquierdo, T. Takeuchi., S. Satoh and C. Kitajima. 1989. Comparison between eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in terms of essential fatty acid efficacy in larval red seabream. Nippon Suisan Gakkaishi, 55, 1635~1640.
- Whyte, J.N.C. and W.K. Nagata. 1990. Carbohydrate and fatty acid composition of the rotifer, *Brachionus plicatilis* fed monospecific diets of yeast or phytoplankton. Aquaculture, 89, 263~272.
- Yu, J.P., A. Hino, M. Ushiro and M. Maeda. 1989. Function of bacteria as vitamin B₁₂ producers during mass culture of the rotifer *Brachionus plicatilis*. Nippon Suisan Gakkaishi, 55, 1799~1806.

1999년 8월 4일 접수

1999년 11월 20일 수리