

Rhodotorula 屬 菌株에 依한 細胞 內外
脂質生産에 關한 研究

朴 性 五
서울女子大學 食品加工學科

(1974년 4월 2일 수리)

**Studies on the Production of Intra- and
Extra-cellular Lipids by the Strains in
the Genus *RHODOTORULA***

Sung-Oh Park

Department of Food Technology, Seoul Woman's College

(Received April 2, 1974)

Summary

A potent intracellular-lipid-producing yeast, *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis* SW-17, was screened out from a variety of arable soils, compost heaps, and fodders, and two strains of excellent extracellular-lipid-producing yeasts, *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis* SW-5 and *Rhodotorula graminis* SW-54, were screened out from the surface of many species of leaves. And then the intra- and extra-cellular lipid productions by those *Rhodotorula* yeasts were studied. The results were as follows:

1. During the shaking culture of 8 days at 24°C, both the intra- and extra-cellular lipid accumulation started almost at the stationary phase of growth, when the nitrogen source in the medium was a little more than half used up. The intracellular lipid production by *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis* SW-17 reached 58.42% (w/w) of dried yeast, and the extracellular lipid production by *Rhodotorula graminis* SW-54 amounted to 2.62g per liter of the medium.

2. After the carbon and nitrogen sources in the medium were almost consumed, if the yeasts were shake-cultured further in a state of starvation, the yeast cells re-utilized the already produced intra- and extra-cellular lipids and the lipids completely disappeared in the medium in about 90 days.

3. The relative concentration of carbon and nitrogen sources in the media greatly

influenced both the intra- and extra-cellular lipid production. When the nitrogen source in the medium was almost used up for the growth of yeast, and excess carbon sources were still available, the lipid production vigorously proceeded. As long as the nitrogen source concentration in the medium was high, the lipid production was greatly suppressed.

4. The optimum pH for both the intra- and extra-cellular lipid production by those yeasts was pH 5.0—6.0.

5. The fatty acid components of the intracellular lipid of *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis* SW-17 were myristic, palmitic, palmitoleic, stearic, oleic, linoleic, and linolenic acids. The largest components of the fatty acids were palmitic acid equivalent to 30—45% of the whole fatty acids and oleic acid equivalent to 35—50%.

6. The fatty acid components of the extracellular lipid of *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis* SW-5 and *Rhodotorula graminis* SW-54 were myristic, palmitic, stearic, oleic, linoleic, linolenic, 3-D-hydroxypalmitic, and 3-D-hydroxystearic acids. The largest components of the fatty acids were 3-D-hydroxypalmitic acid equivalent to 22—25% of the acids and 3-D-hydroxystearic acid equivalent to 13—17%.

7. The polyol component of the intracellular lipids was only glycerol, whereas the polyols of extracellular lipids were glycerol, mannitol, xylitol and arabitol.

緒 言

現在까지의 食糧生産은 주로 農業에만 依存하여 왔으며 食糧増産을 위하여 作物의 品種改良, 栽培管理, 栽培技術의 向上 및 耕地面積의 擴大 開墾等 最善의 増産策을 講究하여 왔으나 이와같은 努力과 方法에는 限界가 있어 農業에 의한 食糧増産案으로는 世界的으로 늘어나는 人口增加를 따르지 못하게 되어 앞으로 極甚한 食糧危機를 면하지 못할 것 같다. 이러한 食糧不足을 克服하기 위한 手段의 하나로서 醱酵工業에 의한 食糧生産方法이 오래 전부터 研究되어 왔다. 即 世界 第1次 大戰當時 獨逸에서는 甚한 食糧難에 逢着하였고 이것을 打開하기 위하여 食飼料 酵母를 開發하여 蛋白質을 生産하려는 研究^{1,2)}가 進行된 바 있고 그 후 研究가 거듭되어 酵母를 營養強化 添加劑로서 食用 또는 飼料用으로 實用化하였다. 한편 農工産廢棄物로부터 微生物 菌體를 生産하려는 研究로서 木材糖化液을 資化하는 菌株인 *Candida utilis*,^{3,4,5)} *Hansenula anomala*,³⁾ *Mycotorula lipolytica*,^{3,5)} *Hansenula suaveolens*⁵⁾ 등이 分離發見되었고 In-skeep⁶⁾ 등은 亞黃酸 pulp 廢液을 利用하여 *Candida utilis*를 工場規模로 培養하는 方法을 研究開發하여 河川汚染問題도 同時に 解決하였다. 또 果汁 사탕수수 및 사탕무우 당밀^{7,8)} 등이 微生物 培養을 위한 基質로 利用되었으며 最近에 와서는 非食用海

藻類를 利用하여 酵母를 生産하려는 Tomiyasu,⁹⁾ Otsuta¹⁰⁾ 등의 研究와 石油 資化 微生物로 부터 單細胞蛋白質을 開發하려는 Zobell¹¹⁾, Beerestecher¹²⁾ Johnson¹³⁾의 研究가 世界的으로 活潑히 進行되어 왔다. 石油蛋白質의 경우 순수한 n-paraffin을 基質로 使用하였을때 基質量에 대하여 *Torulopsis* sp.¹⁴⁾ 72%, *Candida intermedia*¹⁵⁾ 82%, *Candida lipolytica*¹⁶⁾ 102%의 菌體收率을 各各 얻었고 많은 研究의 進展에 따라 現在 工場規模로 石油蛋白質이 生産되고 있다. 이와같이 微生物에 의한 蛋白質 生産의 研究와 더불어 微生物에 의한 脂質 生産 研究도 併行되었다. Nägeli와 Loew¹⁷⁾는 1878년에 처음으로 麥酒酵母菌體로부터 脂肪生産 可能性을 示唆하였다. 그後 1912년에 Lindner¹⁸⁾가 *Endomyces vernalis*로부터 脂肪生産에 관한 研究를 처음으로 發表하였으며 1919년에 Lindner와 Unger¹⁹⁾는 底面醱酵麥酒酵母, 壓搾酵母 및 *Torula utilis* 등으로 부터 alcohol을 炭素源으로 하여 脂肪을 生産할 수 있음을 報告하였는데 이때 培養液에 炭水化合物을 多量 供給하여 주면 脂肪生合成이 더욱 잘 이루어 진다고 보고 하였다. 그러나 微生物에 의한 油脂生産에 관한 研究는 그 당시 油脂의 化學分析法과 脂肪酸의 純粹分離法이 確立되어 있지 않았으므로 蛋白質開發을 위한 食飼料 酵母에 대한 研究에 比하여 별로 進전이 없었다. 그後 1949년에 Hilditch²⁰⁾가 油脂 構成脂肪酸의 分析方

법을 확립한 후 微生物로부터 脂質을 生産하려는 研究가 本格的으로 시작되어 細胞內脂質을 多量 生産하는 各種 微生物이 分離發見되었다. 即 絲狀 菌中에서 菌體內 油脂含量이 40~50%인 *Mucor mucedo*,²¹⁾ *Aspergillus nidulans*,²²⁾ *Penicillium lanosum*,²³⁾ *Aspergillus flaviceps*²⁴⁾ 등이 報告되었고 酵母中에서 含量이 40~70%인 *Candida reukaufii*,²⁵⁾ *Cryptococcus terricolus*²⁶⁾, *Rhodotorula gracilis*^{27),28)} 등이 報告되었으며 또한 藻類中에서 含量이 80%以上인 *Chlorella pyrenoidosa*²⁹⁾와 *Chlorella ellipsoidea*³⁰⁾가 報告되었다. 한편 Raymond³¹⁾은 n-paraffin을 基質로 使用하여 菌體內 油脂含量이 78%인 *Nocardia* sp.와 47%인 *Candida* sp.를 分離發見하였다. 그리고 Heide,³²⁾ Raaf³³⁾, Schulze³⁴⁾ 등은 微生物에 의한 脂肪合成에 關한 여러가지 培養條件을 究明하여 報告하였다.

微生物에 의한 細胞外 脂質生産에 關한 研究는 最近에 시작되어 1956년에 Spencer³⁵⁾는 *Torulopsis* 屬 菌株로부터 生産된 細胞外 脂質을 觀察하였으나 이 脂質을 酵母 細胞의 自家消化에 의하여 생긴 生胞內 脂質이라고 誤認하고 그 以上 實驗을 進行시키지 않았다. 그 후 Dr. Menna³⁶⁾는 New-zealand 産 植物葉에서 2 菌株의 酵母를 分離하고 이들 酵母가 細胞外 脂質을 培地中에 蓄積한다고 처음으로 報告하였다. Deinema³⁷⁾와 Ruinen³⁸⁾은 이것을 基質로하여 分離한 *Rhodotorula graminis*와 그밖에 數菌株의 酵母에 대하여 細胞內外 脂質 生産에 대한 研究를 하였으며 계속하여 Ruinen

^{39),40)}, Tulloch,⁴¹⁾ Stodola⁴²⁾ 등이 細胞外 脂質의 生産과 脂質分析에 대하여 研究發表하였다.

油脂資源이 不足한 國內油脂實情을 보면 食用 油脂로서는 先進國이 1人 1日 脂肪攝取量이 150g 以上인데 比하여 우리나라는 20g 內外에 不遇하다. 그리고 油脂工業에 所要되는 油脂原料는 大部分의 量을 外國에서 輸入하고 있다. 1974年度 부터는 이와같은 不足한 油脂原料의 國內調達을 위하여 農業에 依한 各種 油脂原料의 生産을 勸奨하고 있으나 外國에서 活發히 研究되고 있는 醱酵法에 依한 油脂生産의 試圖가 아직 國內에는 없다. 따라서 筆者는 油脂資源의 生産方式의 하나로서 醱酵法에 依한 油脂의 生産을 試圖할 目的으로 細胞內外 脂質을 多量 生産하는 優秀菌株를 分離選定한 다음 選定菌에 對한 培養學的, 形態學的, 生理學的 諸特性을 調査 檢討하여 同定하였고 이들 菌株의 脂質生産 最適條件을 究明하는 同時에 이들이 生産하는 脂質의 構成成分에 關하여 研究檢討 하였다.

實驗 方法

1. 脂質生産菌 分離 選定

(1) 細胞內 脂質生産菌 分離

(i) 材料: 다음 表 1과 같이 各地域에서 蒐集한 土壤, 堆肥, 飼料를 細胞內 脂質生産菌 分離의 材料로 하였다.

Table 1. Samples used for the isolation of yeasts producing intracellular lipid.

試 料	採 取 場 所	採 取 時 期
土 壤	全南 羅州郡 文平面 雲峰里 七峰部落 竹林土 全南 潭陽郡 金城面 原栗里 竹林土 濟州道 濟州市 신천단 竹林土 서울特別市 孔陵洞 서울女子大學 農場	1972年 4月
	京畿道 安城郡 薇陽面 眞村里	1972年 9月
堆 肥	서울特別市 孔陵洞 서울女子大學 農場	1972年 4月
	京畿道 安城郡 薇陽面 眞村里	1972年 9月
飼 料	서울市內 市販 配合飼料	1972年 4月

(ii) 培養基: 菌分離用 培養基는 表 2와 같은 組成의 培地를 使用하였다.

(iii) 培養方法: 全國 各 地域에서 蒐集한 土壤, 堆肥, 飼料等試料를 各各 1g씩 取하여 이것을 滅菌 水로 適當히 稀釋한 다음 그 上澄液 1ml를 表 2의

菌分離用 培地에 接種하고 25°C에서 3日間 平板 培養하였다. 그 후 獨立된 赤色 또는 赤黃色 colony를 取하여 malt agar tube에 培養 保管하고 各 分離菌株에 對하여 細胞內 脂質生産量을 測定하였다.

(iv) 細胞內 脂質生産酵母의 分離와 選定: 各

Table 2. Composition of the medium used for the isolation of yeasts producing intracellular lipid.

Glucose	20 g
Yeast extract	2.5g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2g
Sodium propionate	3 g
Agar	20 g
Tap water	1000 ml
pH	5.8

試料에서 分離한 個個의 菌株에 對하여 다음과 같은 實驗方法에 依하여 그 細胞內 脂質生産량을 調査한 後 그 脂質生産량이 乾燥菌體에 對하여 50% 以上이 되는 菌株만을 本 研究에 使用하는 酵母菌 株로 選定하였다.

(2) 細胞外 脂質生産菌 分離와 選定

(i) 材料: 細胞外 脂質를 多量生産하는 *Rhodotorula* 菌을 分離選定할 材料로는 表 3과 같은 各種 植物葉을 使用하였다.

Table 3. Plant leaves used for the isolation of yeasts producing extracellular lipid.

番 號	植 物 名		採 集 場 所 및 採 集 時 日	分 離 菌 數
	韓 國 名	學 名		
1	인 도 고 무	<i>Ficus elastica</i>	서울女大內 溫室 1974. 4. 21	—
2	디펜바키아	<i>Dieffenbachia picta</i> SCHOTT		1
3	기 누 라	<i>Gynura aurantiaca</i> DC.		2
4	몬 스 테 라	<i>Monstera dericiosa</i> LIEBM		1
5	실 화 화	<i>Bergenia crassifolia</i> FRITSCH		3
6	남 천	<i>Nandina domestica</i> THUMB		1
7	피 란 더 스	<i>Phyllanthus nivosus</i> BULL		2
8	마 란 타	<i>Maranta bicolor</i> KER.		1
9	네 후로렐시스	<i>Nephrolepis cordifolia</i> PRESL.		1
10	세 네 시 오	<i>Senecio cineraria</i> DC.		1
11	가 랑 고 에	<i>Kalanchoe blossfeldiana</i> VON POELLIRITY		2
12	화와이무궁화	<i>Hibiscus rosa-shinensis</i> L.		1
13	큰자주달개비	<i>Setocveasea purpurea</i>		2
14	얼루기접란	<i>Chlorophytum comosum</i> BAK		2
15	베고니아렉스	<i>Begonia Rex</i> PUTZ		1
16	광 굴 나 무	<i>Citrus aurantium</i> L.		1
17	아 크 메 아	<i>Aechmea fasciata</i> BAKER		—
18	만 량 나 무	<i>Ardisia crispa</i> A. DC.		1
19	수 국	<i>Hydrangea paniculata</i> SIEB		1
20	페 페 로 미 아	<i>Peperomia hederifolia</i> HORT		1
21	마 리 카	<i>Marica northiana</i>	서울女大內 溫室 1972. 5. 1	1
22	가 라 테 아	<i>Calathea oppenheimiana</i> var. <i>tricolor</i> HORT		1
23	흰줄무늬달개비	<i>Tradescantia fluminensis</i>		1
24	피 리 아	<i>Pilea cadierei</i> GAGNEP		1
25	뮤렌베키아	<i>Muehlenbeckia platyclados</i> MEISN		1
26	크 로 톤(적)	<i>Codiaeum variagatum</i> BLUME		1
27	포인세치아	<i>Euphorbia pulcherrima</i> WILLD		1
28	크 라 술 라	<i>Crassula lactea</i>		—
29	비로도마란타	<i>Calathea argyraea</i>		2
30	자코비니아	<i>Jacobinia pohliama</i> BENTH		1
31	휘로덴드롱	<i>Philodendron hastatum</i> K.		1
32	카 네 이 손	<i>Dianthus caryophyllus</i> L.		1

33	제 라 늪	<i>Pelargonium zonale</i> WILLD		1
34	개 량 동 백	<i>Camellia japonica</i> L. var. <i>rosea</i> CURTIS		1
35	광 광 나 무	<i>Ilex crenata</i> THUNBERG	南海岸一帶	1
36	호랑이가시나무	<i>Ilex cornuta</i> LINDLEY	1972.4.20	1
37	후 박	<i>Machilus thunbergii</i> SIEB & ZUCC		1
38	합 박 꽃 나 무	<i>Magnolia sieboldii</i> KOCH		2
39	청 칠 나 목	<i>Aucuba japonica</i> THUNB		1
40	사 철 나 무	<i>Masakia japonica</i> NAKAI		1
41	동 칠 나 백	<i>Camellia reticulata</i> LINDL.		1
42	귤 나 무	<i>Citrus nobilis</i> MAKINO		1
43	팔 손 이	<i>Fatsia japonica</i> DECAISNE		1
44	가 시 나 무	<i>Cyclobalanopsis myrsinaefolia</i> OERST		1
45	스 툽 크	<i>Matthiola incana</i> R. BR.		1
46	꽃 배 고 니 아	<i>Begonia semperflorens</i> LINK et OTTO	建國大學校內	1
47	구근배고니아	<i>Begonia tuberhybrida</i> VOSS	溫室	1
48	콜 디 리 네	<i>Cordylone terminalis</i> KUNTH	1972.6.11	1
49	헤 데 라(열록)	<i>Hedera herix</i> L. var. <i>tricolor</i> HIBBERD		2
50	아스파라가스	<i>Asparagus asparagoides</i> WIGHT		1
51	산세비에리아	<i>Sansevieria lawrentii</i> WILDEM		—
52	육 카	<i>Yucca aloifolia</i> L.		—
53	휘 닉 스	<i>Phoenix canariensis</i> CHAUB		1
54	영 산 홍	<i>Rhododendron mucronatum</i> G. DON.		2
55	자 금 우	<i>Ardisia japonica</i> BLUME		1
56	드 라 세 나	<i>Dracaena fragrans</i> KEK-GAWL var. MASSANGEANA HORT		1
57	후 크 샤	<i>Fuchsia hybrida</i> VOSS		1
58	班入제라늪	<i>Pelargonium zonale</i> AIT		1
59	紅霧鳥	<i>Rhododendron obtusum</i> PLANCH		1
60	판 다 나 스	<i>Pandanus veitchii</i> DALL		—
61	후 리 지 아	<i>Vriesia carinata</i> WAWRA		1
62	크 로 톤(광엽)	<i>Codiaeum variegatum</i> var. <i>picrum</i> MUELL		1
63	코 레 우 스	<i>Coleus blumei</i> BENTH		1
64	소 나 무	<i>Pinus densiflora</i> SIEB & ZUCC		—
65	산 다 화	<i>Camellia sasanqua</i> THUMB		1
66	로 에 오	<i>Rhoeo discolor</i> HANCE		1
67	사 철 나 무	<i>Masakia japonica</i> NAKAI	三和農場(서울, 佛岩洞)	—
68	바 위 취	<i>Saxifraga stolonifera</i> MEERB		1
69	동 굴 레	<i>Polygonatum japonicum</i> MORREN	1972.6.17	1
70	리 봉 그 래 스	<i>Arrhenatherum elatius</i> MERT		1
71	노 간 주	<i>Juniperus utilis</i> KOIDZUMI		—
72	대 나 무	<i>Phyllostachys nigra</i> MUNOR var. <i>henonis</i> STAFF		—
73	막 총 나 무	<i>Sambucus williamsii</i> HANCE		1
74	전 나 무	<i>Abies holophylla</i> MAXIMOWICZ		1
75	능 소 화	<i>Campsis grandiflora</i> K. SCHUM		1
76	헤 데 라	<i>Hedera herix</i>		2
77	포 인 세 치 아	<i>Euphorbia pulcherrima</i> WILLD		1
78	시 셔 스	<i>Cissus discolor</i> BLUME		—
79	시 제 초	<i>Passiflora racemosa</i> BROT		—

80	극락조화	<i>Strelitzia augusta</i> THUMB	三和農場(서울, 1972. 6. 17)	1
81	영초	<i>Primula malacoides</i> FRANCH	佛岩洞)	1
82	익소라	<i>Ixora chinensis</i> LAM	1972. 6. 17	1
83	오리나무	<i>Alnus japonica</i> STEUDEL		1
84	상수리나무	<i>Quercus acutissima</i> CARRUTHERS		—
85	회양목	<i>Buxus koreana</i> NAKAI		—
86	흑배나무	<i>Bioto orientalis</i> ENDLICHER var. <i>nepalensis</i> ENDLICHER		—

(ii) 培養基: 菌分離用 培養基는 表 4와 같은 組成의 培地를 使用하였다.

Table 4. Composition of the medium used for the isolation of yeasts producing extra-cellular lipid.

Glucose	20 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2g
Sodium propionate	3 g
Agar	20 g
Tap water	1000 ml
pH	5.8

(iii) 分離 및 培養方法: 全國 各 地域에서 採集한 90餘種의 各 植物老葉 約 1g 를 各 各 別로 減菌시킨 選菌劑 溶液(0.3% KH₂PO₄, 0.3% sodium propionate) 10ml 에 넣고 25°C 에서 2~3 日間 靜置培養하여 細菌 및 곰팡이를 淘汰시키고 酵母菌만을 選菌한 培養液을 얻었다. 이 培養液을 適當히 稀釋하고 上澄液 1ml 를 表 4와 같은 菌分離用 培地에 接種하고 25°C 에서 3日間 平板培養하여 나타난 赤色 또는 赤黃色 獨立 colony 를 取하여 malt agar tube 에 培養 保管하고 各 分離菌株에 對하여 細胞外 脂質 生産量을 測定하였다.

(iv) 細胞外 脂質生産 酵母의 選定: 90餘種의 植物老葉에서 分離된 酵母에 對하여 細胞外 脂質定量方法에 의하여 그 脂質生産量을 調査하여 그 中 脂質生産量이 2g/l 以上이 되는 菌株만을 選拔하여 本 研究에 使用하는 酵母菌株로 하였다.

2. 脂質生産을 爲한 酵母의 培養

(1) 培養液

酵母에 脂質을 生成시키기 爲하여 使用한 培養液의 組成은 表 5와 같다.

(2) 培養方法

脂質 生産 培地 100ml 를 500ml 容振盪 flask 에 分注 殺菌하고 分離培養된 各菌을 接種하여 24°C

Table 5. Composition of the medium used both for the intra- and extra-cellular lipid production.

Glucose	40 g
Yeast extract	2.5g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2g
Tap water	1000 ml
pH	5.8

에서 8日間 振盪培養(oscillation 165/min., stroke: 5cm)하였다.

3. 脂質의 分離 및 定量

(1) 細胞內 脂質

8日間 振盪培養한 培養液을 遠心分離(2500rpm) 하여 菌體를 分離한 다음 石油 ether(b.p. 60-80°C) 로 2回 洗滌하고 洗滌液은 다음 細胞外 脂質定量 用試料로 使用하였고 菌體는 100°C 의 乾燥器에서 乾燥하였다. 乾燥한 菌體를 秤量하여 이것을 還流 冷却 flask 에 넣고 0.3% HCl 溶液을 加한 다음 100°C 에서 3時間 加熱하여 菌體細胞膜을 破壞하고 濾過하여 水洗한 後 乾燥시키고 이것을 Soxhlet 裝置를 使用하여 菌體中의 脂質을 定量하였다.

(2) 細胞外 脂質

8日間 振盪培養한 培養液을 遠心分離하여 얻은 上澄液을 分液濾斗에 넣고 石油 ether 과 diethyl ether 의 混合溶媒(1:1)를 使用하여 脂質을 抽出하고 여기에 細胞內 脂質定量時 菌體를 洗滌한 洗滌液을 合하여 溶媒를 蒸發除去시키고 脂質을 定量하였다.

4. 酵母의 同定法

分離된 酵母 中 細胞內外 脂質生産能이 優秀하여 選定한 酵母의 同定은 J. Lodder⁴³⁾ 및 飯塚⁴⁴⁾의 同定法에 準하여 다음과 같은 方法으로 同定하였다.

(1) 細胞의 形態와 크기

Malt extract 및 YM 培地(yeast extract 3g, malt extract 3g, peptone 5g, glucose 10g, dist. water 1,000ml)를 사용하여 25°C 에서 3日間 培養하여 鏡檢하였다.

(2) Colony 의 形態와 構造

Malt agar 및 Malt gelatin plate 에 17°C 로 1個月間 培養하여 觀察하였다.

(3) Pellicle, Ring 및 Sediment 의 形成

上記한 Malt extract 및 YM 培地에 25°C 로 3~30日間 培養하면서 觀察하였다.

(4) Pseudomycelium 및 Arthrospore 의 形成

Potato glucose agar 를 사용하여 25°C 에서 slide culture 하여 5時間後부터 經時的으로 鏡檢하였다.

(5) 糖類 醱酵性

Durham 醱酵管(外管 190×19mm, 內管 40×6mm)에 糖醱酵能測定用 培地(yeast extract 4.5g, peptone 7.5g, dist. water 1,000ml) 7ml 와 16%의 各種 糖溶液 1ml 를 넣고 殺菌한 後 殺菌水로 3회 洗滌한 酵母懸濁液 0.1ml 를 接種하였다. 이것을 25°C 에서 1~2週間 培養하면서 內管中의 gas 發生 與否로 糖類 醱酵能을 觀察하였다.

(6) 炭素源의 資化性

殺菌水로 3회 洗滌한 供試菌의 殺菌水懸濁液 4ml 와 50°C 內外의 YNB agar(yeast nitrogen base 6.7g, bacto agar 20g, dist. water 1,000ml) 16ml 를 petri dish 에서 無菌的으로 混和한 다음 25°C 의 incubator 中에서 凝結水를 蒸發시키고 少量의 供試 炭素源粉末을 無菌的으로 附着시키는 Auxanograph 法⁴³⁾으로 確認하고 한편 無糖基礎培地⁴⁵⁾ 또는 YNB 液體培地를 115°C 에서 15時間 殺菌한 後 別途로 殺菌해 놓은 3%의 炭素源液을 無菌的으로 添加하고 供試菌을 接種하는 方法을 使用하여 25°C 에서 1週間 培養하면서 炭素源의 資化性을 比色法으로 檢討하였으며 control 로서는 糖類를 添加하지 않은 同一培地를 使用하였다.

(7) Nitrate 資化性

YCB agar (yeast carbon base 11.7g, bacto agar 20g, dist. water 1,000ml) 16ml 와 供試菌의 殺菌水懸濁液 4ml 를 無菌的으로 混和한 다음 炭素源의 資化性實驗과 同一한 Auxanograph 法을 適用하여 KNO₃ 및 NaNO₂ 粉末을 附着하여 培養하였으며 control 로서는 (NH₄)₂SO₄ 를 使用하였다.

(8) Vitamin 要求性

Vitamin 要求性培地 (Vitamin free base 1.7g, dist. water 100ml)를 試驗管에 10ml 씩 分注하여

115°C 로 15時間 殺菌한 後 供試菌을 接種하여 25°C 에서 3-7日間 培養하면서 觀察하였다.

(9) Starch 生産性

YNB agar 를 使用하여 Auxanograph 法으로 glucose 의 資化性을 檢討한 後 形成된 colony 上에 iodine 溶液을 滴下하여 澱粉反應을 觀察하였다.

5. 脂質生産의 培養最適條件의 究明

(1) 培養日數

最高量의 脂質을 生産하는 培養日數를 決定하기 爲하여 表 5와 같은 脂質生産培地에 分雜菌株를 接種하고 25°C 에서 9-10日間 振盪培養 (oscillation 165/min., stroke : 5cm)하면서 每日 酵母의 生長 (酵母의 乾物量)과 脂質 生産量을 測定하였다.

(2) 培養液內의 窒素源 및 炭素源의 測定

上記한 (1)의 方法으로 酵母를 培養하면서 1日 1回 培養液을 遠心分離하고 다음에 菌體를 除去한 濾液에 對하여 glucose 는 Somogyi 變法⁴⁶⁾에 따라 測定하였고 한편 窒素含量은 Kjeldahl 法에 따라 培養液中의 이들 成分의 殘量을 測定하였다.

(3) 培養液의 窒素源 및 Glucose 濃度의 영향

培地中의 窒素源과 glucose 濃度가 酵母의 增殖과 脂質生産에 미치는 影響을 檢討하기 爲하여 脂質生産培地中에 窒素濃度는 0.15~0.525g/l, glucose 濃度는 20~70g/l 範圍의 各種 培養液에 酵母를 8日間 振盪培養한 後 酵母菌體乾燥量과 脂質生産量을 測定 檢討하였다. 한편 酵母 培養中 培養液의 pH는 每日 1回 殺菌된 0.1N KOH 溶液으로 pH 를 6.0으로 調節하였다.

(4) 培養液의 pH

0.1N HCl 과 0.1N KOH 溶液으로 pH 가 4로부터 8까지 調節된 各種 pH 의 脂質生産培地에 酵母를 8日間 振盪培養하면서 1日 1回씩 乾燥菌體量과 細胞內外 脂質生産量을 測定하였다. 한편 各培養液의 pH는 每日 1回 殺菌된 0.1N HCl 과 0.1N KOH 溶液으로 選定된 pH 가 되게 調節하였다.

(5) 窒素源의 種類

酵母의 細胞內外 脂質生産 培養液中의 窒素源으로서 有機態와 無機態의 2種 窒素源의 效果를 比較하였다. 有機態窒素源의 培養液은 yeast extract 2.5g/l 또는 peptone 3.34g/l(窒素로는 0.375g/l)를 窒素源으로 使用하였으며 한편 無機態의 것은 (NH₄)₂SO₄ 2.12g/l 또는 KNO₃ 1.62g/l(窒素로는 0.225g/l)를 使用하였다. 이 4種의 培養液에 各各 酵母를 接種한 後 pH 6.0 에서 8日間 振盪培養하

고 各 菌株에 對한 乾燥菌體量과 細胞內外 脂質生 產量을 測定하여 相互比較하였다.

6. Thin Layer Chromatography(TLC) 法에 依한 脂質의 分別定量

酵母로부터 生産된 細胞內外 脂質의 分別定量은 Amenta⁴⁷⁾의 方法에 準하여 다음과 같이 實施하였다. 酵母에서 얻은 脂質試料 1g을 約 10ml의 chloroform에 溶解시키고 少量의 活性炭을 加하여 carotenoids를 除去하고 다음 Folch^{48,49)}의 方法에 따라 蒸溜水로 洗滌하여 水溶性 不純物을 除去한 다음 TLC法으로 分別定性 및 定量 할 脂質試料로 하였다.

脂質의 TLC分別은 glass plate (10×20cm)에 silica gel G (E. Merck社製品)로 薄層을 만들고 110°C에서 1時間 活性化시킨 다음 chloroform에 溶解시킨 精製脂質의 量을 100-300μg範圍로 spotting하여 n-hexane:diethyl ether: glacial acetic acid=80:20:1(容率比)의 展開溶媒⁵⁰⁾로 上昇法에 따라 1次 展開(約 40分間)시켰다. 이 plate는 室溫에서 約 10分間 乾燥시킨 後 黃酸溶液(1:9)으로 噴霧하여 炭化시키다가 iodine vapor에 의하여 發色시켜 脂質을 確認하였다.

이때 標準脂質로서는 cholesterol, tripalmitin, palmitic acid, cholesterol palmitate, Lecithin (Applied Science Lab.社製品)을 使用하였다.

脂質의 定量은 TLC로 分離한 各 脂質을 Amenta⁴⁷⁾法에 의하여 다음과 같이 實施하였다. 即 plate 한쪽에 標準脂質과 試料를 約 1.5cm간격으로 spotting하고 다른 한쪽에 一定量의 試料를 spotting하여 展開시킨 後 試料部位를 aluminium foil로 가리고 黃酸溶液(1:9)을 噴霧하여 100°C에서 30分間 加熱하여 發色시키면서 溶媒를 蒸發除去시켰다. 展開上昇된 標準脂質과 試料의 發色部位로 보아 發色시키지 않은 試料의 脂質部位를 確認한 다음 約 2×2cm 넓이의 分離된 各 脂質의 silica gel G를 各各 끊어내어 試驗管에 옮겨놓고 여기에 脂質 50-200μg에 對하여 acid dichromate reagent (36N H₂SO₄ 100ml에 K₂Cr₂O₇ 0.25g을 溶解시킨) 2ml씩을 加하고 100°C의 水浴槽에서 45分間 끓인후 遠心分離하고 그 上澄液 0.5ml를 蒸溜水 20ml로 稀釋하여 Spectronic 20 Colorimeter (Baush & Lomb)를 使用하여 最大吸收部位인 350mμ의 波長에서 吸光度를 測定하였다. 이때 같은 양의 silica gel G를 同一條件으로 處理하여

silica gel G blank로 하고 吸光度를 測定하였다. 완전히 還元된 dichromate溶液의 吸光度는 water blank에 대하여 0.01-0.02 정도라는 것을 알고 있으므로 次後 완전히 還元된 dichromate溶液을 blank로 使用하는 代身에 water blank를 使用하였다.

以上과 같은 方法으로 測定한 各 吸光度值에서 脂質試料의 量을 表示하는 試料의 吸光度는 다음과 같이 計算하였다.

試料의 吸光度(Δ Absorbance)

= silica gel blank의 吸光度 測定值 - 試料의 吸光度 測定值

지금 脂質標準物質인 tripalmitin, palmitic acid, lecithin, cholesterol, cholesterol palmitate에 對하여 各各 上記한 바와 같이 acid dichromate溶液으로 酸化시킨 後 350mμ에서 그 吸光度를 測定하고 그 값을 silica gel blank의 吸光度 測定值에서 뺀 Δ Absorbance와 脂質量을 比較하면 그림 1에서 表示된 바와 같이 Δ Absorbance는 脂質量과 正比例하여 Lambert-Beer의 法則이 잘 適用될 수 있음을 알 수 있으며 이 方法으로 다음 그림 1의 3個 標準曲線들을 利用하여 測定된 Δ Absorbance에서 各各 다음 方程式을 써서 triglyceride와 free fatty acid의 量(F), free sterol과 esterified sterol (S) 및 phospholipid(P)의 量을 各各 計算하였다.

定量用 直線의 方程式:

Triglyceride와 free fatty acid (F)

$$F = \frac{100}{0.44} A + \frac{4}{0.44} \quad \text{혹은} \quad A = \frac{0.44}{100} F - 0.04$$

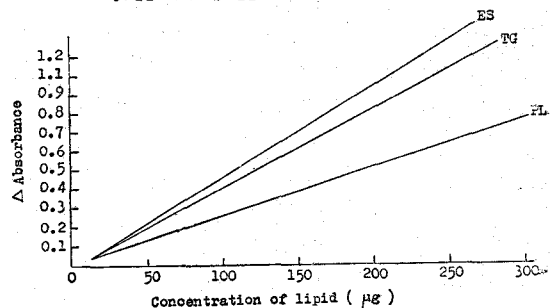


Fig.1. Standard curves of lipids used for analysis by thin layer chromatography.

Standard lipid components developed on silica gel plates with n-hexane: diethyl ether: glacial acetic acid=80:20:1, followed by dichromate color reagent.

ES: Cholesterol or Cholesterol palmitate

TG: Tripalmitin or Palmitic acid

PL: Lecithin

Free sterol과 esterified sterol (S)

$$S = \frac{100}{0.49} A + \frac{4}{0.49} \text{ 혹은 } A = \frac{0.49}{100} S - 0.04$$

Phospholipid (P)

$$P = \frac{100}{0.27} A + \frac{2}{0.27} \text{ 혹은 } A = \frac{0.27}{100} P - 0.02$$

A: A Absorbance

7. Gas Liquid Chromatography에 의한 細胞內外 脂質의 構成脂肪酸의 分析

細胞內外脂質의 構成脂肪酸는 Metcalf⁵¹⁾의 方法에 準하여 다음과 같이 實施하였다. 脂質 1g을 10ml의 10% alcoholic sodium hydroxide 溶液으로 45分間 還流冷却하면서 鹼化한 後 冷却하고 diethyl ether로 非鹼化物을 抽出除去한 다음 HCl로 溶液을 酸性으로 하고 diethyl ether로 遊離脂肪酸를 抽出하였다. 다음에 抽出한 脂肪酸 約 100-200mg에 12.5% BF₃-methanol 3ml를 加하고 2分間 boiling water bath上에서 methylation시킨 다음 分液瀝斗를 使用하여 石油 ether (b.p. 40-60°C) 30ml와 蒸溜水 20ml의 混合液으로 抽出하였다. 石油 ether層 만을 分離한 후 石油 ether를 蒸發시켜 肪脂酸의 methyl ester를 얻어 다음과 같은 條件下에서 gas liquid chromatography (GLC)法으로 分離 定量하였다. relative retention volume과 retention time은 既知濃度の 標準脂肪酸ester(日本 東京化學工業社 製品)의 標準 gas chromatogram과 比較檢討하여 各 脂肪酸를 確認하였고 各 chromatogram의 面積은 半值幅法에 따라 計算하였다.

Instrument and operating conditions for gas liquid chromatography.

Instrument	Varian Aerograph Model 204
Detector	Flame Ionization Detector
Column	Polar type: 20ft × 1/8in., 5% FFAP on chromosorb W (80/100 mesh) Non polar type: 5ft × 1/8in., 3% SE-30 on chromosorb W (80/100 mesh)
Column temp.(°C)	Polar type: 55-225 Non polar type: 75-240
Programmed rate (°C/min.)	Polar type: 10 Non polar type: 6
Injector temp.(°C)	210

Detector temp.(°C)	250
Carrier gas & flow rate	N ₂ , 30ml/min.
Fuel gas & flow rate	H ₂ , 30ml/min. Air, 350ml/min.
Sensitivity range	10 ⁻¹¹

8. 細胞外 脂質 構成 Polyol의 同定

細胞外 脂質의 構成成分인 polyol의 同定은 Tulloch⁴³⁾와 Deinema³⁷⁾의 方法에 準하여 다음과 같이 實施하였다.

細胞外 脂質 約 1g을 3% HCl-methanol 溶液 約 15ml中에서 加水分解시킨 다음 methanol을 蒸發시켜 除去한 後 다시 少量의 蒸溜水를 加하여 diethyl ether로 脂溶性 部分을 抽出除去하였다. 다음에 Ag₂CO₃로 Cl⁻을 沈澱 除去시키거나 또는 ion exchange resin을 使用하여 除去하였다. 이 polyol水溶液은 約 2ml가 되기까지 beaker에서 蒸發濃縮시켜 paper chromatography (PC) 및 thin layer chromatography (TLC)에 의한 展開 用 試料로 하였다. PC는 Whatmann No.1 filter paper를 使用하고 n-butanol : ethanol : water = 7 : 2 : 2의 溶媒를 使用하여 下降法에 의하여 展開시켰고 TLC는 0.02M sodium acetate 溶液 95ml에 silica gel G 40g을 넣어서 10×20cm glass plate에 silica gel 薄層을 만들고 室溫에서 乾燥시킨 다음 chloroform : glacial acetic acid : water = 30 : 35 : 5의 展開溶媒를 使用하여 一次 上昇法으로 展開시켰다. chromatogram의 發色은 PC, TLC 다같이 다음 2種의 發色試藥을 使用하였다.

① 0.1N AgNO₃와 5N NH₄OH의 混合溶液⁵²⁾ (1 : 1)을 噴霧한 다음 70°-100°C로 加熱하여 暗褐色 spot로 確認하였다.

② diphenylamine 1g과 aniline 1ml를 acetone 100ml에 溶解하고 85% H₃PO₄ 10ml를 加하여 噴霧한 다음 130°C에서 10分間 加熱하여 發色시켰다.

結果 및 考察

1. 優秀脂質生産 酵母의 選定

土壤, 堆肥, 飼料 등에서 分離된 37個의 *Rhodotorula* 酵母菌株에 對하여 그 細胞內脂質 生産量을

調査한 바 表 6에서 보는 바와 같이 土壤에서 分離된 한 菌株(strain No. 17)에 있어서 그 脂質生産量이 菌體乾燥量에 對하여 50%(最適條件에서는 70%)以上인 것을 發見하여 優秀한 細胞內 脂質生産菌株로 選定하였다. 本 研究에서 分離한 이 酵母는 *Deinema*⁸⁷⁾가 優秀菌株로서 選定한 *Rhodotorula graminis*의 40% 細胞內 脂質生産菌株 보다 더욱 多量의 脂質을 生産하는 것이며 Enebo²⁷⁾ 등이 報告한 *Rhodotorula gracilis*의 60-74%의 細胞內 脂質生産能力과 最適條件에서는 對等한 能力을 갖는 酵母菌株라고 하겠다.

90餘種의 植物老葉에서 分離된 82個의 *Rhodotorula* 屬 酵母菌株에 對하여 細胞外 脂質生産량을

調査한 바 그 培養液中の 脂質生産量이 2g/l 以上인 優秀한 細胞外 脂質生産 菌株 3種(strain No. 5, 54 및 26)을 表 6에서 보는 바와 같이 3種의 다른 植物에서 各各 分離 選定하였다.

이들은 表 6에서 보는 바와 같이 細胞內 脂質生産量도 乾體酵母重量의 約 35%를 同時에 生産할 수 있는 菌株들이었다. *Deinema*⁸⁷⁾는 *Rhodotorula graminis*와 *Rhodotorula glutinis*에서 最高 2g/l의 細胞外 脂質生産能을 報告한 것으로 보아 本 研究에서 分離한 上記 *Rhodotorula* 屬 3菌株는 細胞外 脂質生産能力에 있어서 이들과 比較할 때 더 優秀한 菌株임을 알 수 있다.

Table 6. The intra- and extra-cellular lipid production.

Strain No.	Intra-cellular lipid (%)	Extra-cellular lipid (g/l)	Source
12	47.6	Trace	Arable soil
17	58.3	Trace	Arable soil
...
3	...	1.19	<i>Gynura aurantiaca</i> DC.
5	35.6	2.26	<i>Bergenia crassifolia</i> FRITSCH
8	...	1.95	<i>Maranta bicolor</i> KER.
11	...	1.17	<i>Kalanchoe blossfeldiana</i> VON POELLIRITY
26	34.7	2.13	<i>Codiaeum variegatum</i> BLUME
37	...	1.94	<i>Machilus thunbergii</i> SIEB & ZUCC.
49	...	1.24	<i>Hedera helix</i> L. var. <i>tricolor</i> HIBBERD
54	36.8	2.62	<i>Rhododendron mucronatum</i> G. DON.
62	...	1.83	<i>Codiaeum variegatum</i> var. <i>picrum</i> MUELL
76	...	1.44	<i>Hedera helix</i> L.
82	...	1.27	<i>Ixora chinensis</i> LAM.

2. 分離選定菌株의 同定

(1) 分離選定한 Strain No. 17의 同定

細胞內 脂質生産能이 優秀하여 分離選定된 strain No. 17의 菌株에 對하여 培養學的, 形態學的 및 生理學的 特性을 調査한 結果 表 7과 같다.

Table 7. Morphological, cultural and physiological characteristics of the isolated strain No.17 and No. 5.

(1) Growth in malt extract:

After 3 days at 23°C cells are ovoidal to globose, (2.3-5.0) × (4.0-10)μ. There is usually a thin ring and a little sediment. After one month a medium to heavy pink to orange or salmon-colored ring, and a heavy sediment are present.

(2) Growth on malt agar:

After one month the streak culture of strain No. 17 is coral red and the one of strain No. 5 is yellowish red.

The appearances of both strains are glossy and the textures are mucous.

(3) Slide culture on potato-glucose agar:

Pseudomycelium formation not observed.

(4) Fermentation:

Glucose.—

(5) Assimilation of carbon compounds:

Glucose+, Galactose+, Fructose+, Mannose+, Sucrose+, Maltose+, Cellobiose-, Trehalose+ (weak), Lactose-, Melibiose-, Raffinose+, Melezitose+, Inulin-, Soluble starch-, Xylose+, L-Arabinose-, Ribose+, L-Rhamnose+, Ethanol+, Glycerol+, Dulcitol-, Mannitol+, Sorbitol-, Salicin+, Inositol-.

(6) Assimilation of nitrogen compounds:

Potassium nitrate+, Sodium nitrite+, Ammonium sulfate+, Urea+, Peptone+, Asparagine+.

(7) Growth in vitamin-free medium: Positive.

(8) Starch formation: Negative.

以上の結果로 보아 選定菌株 strain No. 17 은 *Rhodotorula glutinis var. glutinis* SW-17로 同定 하였다.

(2) 分離選定한 Strain No.5의 同定

細胞外 脂質生産能이 優秀하여 分離選定된 strain No.5의 菌株에 對하여 培養學的, 形態學的 및 生理學的 特性을 調査한 結果는 表 7과 같고 streak culture 의 色이 strain No. 17은 赤色인데

比하여 strain No. 5는 淡赤色이고 黃色을 약간 띠었다는 點만이 서로 다르다. 따라서 strain No. 5는 *Rhodotorula glutinis var. glutinis* SW-5로 同定하였다.

(3) 分離選定한 Strain No. 54 및 26의 同定

植物老葉에서 分離選定된 strain No. 54와 26에 對하여 그 培養學的, 形態學的 및 生理學的 特性을 調査한 結果는 表 8과 같다.

Table 8. Morphological, cultural and physiological characteristics of the isolated strain No. 54 and No. 26.

(1) Growth in malt extract:

After 3 days at 23°C the cells are globose to ovoidal, 2.5–4.0 μ wide and 4–8 long, single, in pairs and sometimes in short chains or clusters. A thin ring and a little sediment are present. After one month there is a moderate pink ring and a heavy sediment are present.

(2) Growth on malt agar:

After one month at room temperature the streak culture is coral red, the surface is smooth and glossy; texture somewhat mucous.

(3) Slide culture on potato-glucose agar:

Pseudomycelium formation not observed.

(4) Fermentation: Glucose—.

(5) Assimilation of carbon compounds:

Glucose+, Galactose+, Fructose+, Mannose+, Sucrose+, Maltose-, Cellobiose-, Trehalose+ (weak), Lactose-, Melibiose-, Raffinose+, Melezitose-, Inulin-, Soluble starch-, Xylose+ (weak), L-Arabinose-, Ribose+, L-Rhamnose+, Ethanol-, Glycerol-, Dulcitol-, Mannitol+, Sorbitol-, Salicin-, Inositol-.

(6) Assimilation of nitrogen compounds:

Potassium nitrate+, Sodium nitrite+, Ammonium sulfate+, Urea+, Peptone+, Asparagine+.

(7) Growth in vitamin free medium: Positive.

(8) Starch formation: Negative.

表 8의 結果로 보아 選定菌株 strain No. 54는 *Rhodotorula graminis* SW-54로 strain No. 26은 *Rhodotorula graminis* SW-26으로 各各 同定하였다.

3. 脂質生産의 最適培養

(1) 培養日數와 脂質生産量과의 關係

Rhodotorula glutinis var. *glutinis* SW-17, *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis* SW-5 및 *Rhodotorula graminis* SW-54를 脂質生産培地에 接種하고 25°C에서 振盪培養하면서 培養日數가 經過함에 따른 脂質生産量의 變化와 培養液中の glucose 및 窒素源 消耗量의 變化를 調査한 結果는 表 9, 10, 11 및 그림 2, 3, 4와 같다.

Table 9. The production of intracellular lipid and consumption of glucose and N source in the medium by *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis* SW-17.

Date	Wt. of dry yeast (g/l)	Wt. of intra-cellular lipid (g/l)	Lipids in dry yeast (%)	Wt. of glucose (g/100ml)	Wt. of nitrogen (mg/10ml)
0	—	—	—	4.00	3.75
1	0.48	—	—	3.70	2.97
2	7.53	3.81	50.62	2.32	1.84
3	8.91	4.84	54.32	1.30	1.04
4	9.99	5.66	56.66	0.48	0.33
5	10.84	6.14	56.61	0.14	0
6	10.59	6.13	57.89	0	
7	10.56	6.12	57.91		
8	10.45	6.11	58.42		
9	10.42	6.01	57.62		

細胞內 脂質 生産菌인 *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis* SW-17의 培養日數에 따른 細胞內 脂質蓄積量의 變化를 그림 2에서 보면 처음 1일은 菌體 增殖이 전혀 없는 誘導期를 보였으며 glucose와 窒素源 消耗量도 比較的 적었다. 1日 以後부터는 急激한 菌體의 增殖에 比例하여 glucose와 窒素源 消耗量도 急激히 增加함을 볼 수 있었다. 培養液中的 glucose 含量은 菌培養後 5日內에 完全히 消耗되었고 nitrogen은 4日內에 完全히 消耗되었다. 乾燥菌體의 量은 glucose가 完全히 消耗된 5日에 10.84g/l로 가장 많았고 그 後에는 약간 감소되는 傾向을 보였다. 細胞內 脂質蓄積量은 6.14g/l로 乾燥菌體量과 거의 比例하여 增加하였고 5日後부

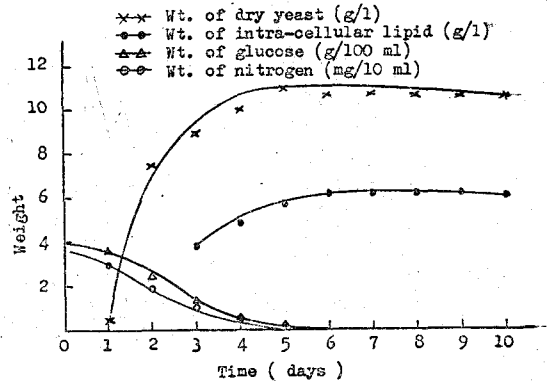


Fig. 2. The production of intracellular lipid and the consumption of glucose and N source in the medium by *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis* SW-17.

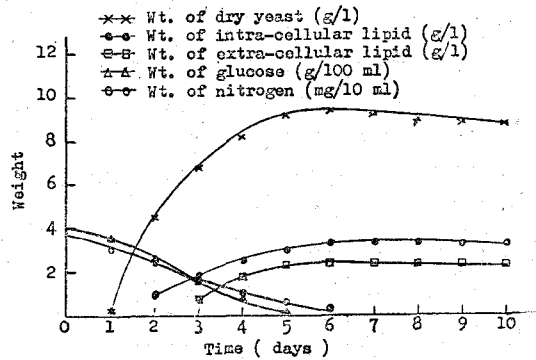


Fig. 3. The production of intra- and extra-cellular lipids and the consumption of glucose and N source in the medium by *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis* SW-5.

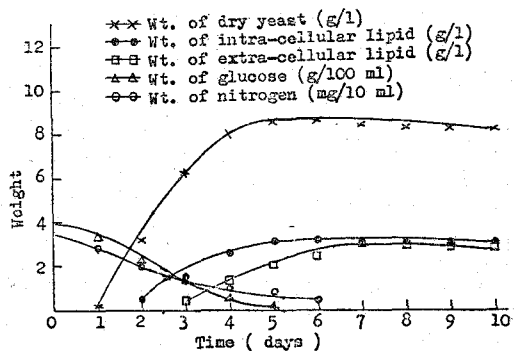


Fig. 4. The production of intra- and extra-cellular lipids and the consumption of glucose and N source in the medium by *Rhodotorula graminis* SW-54.

터 9日까지는 6.14~6.01g/l로 거의 恒量이 되었다. 이 結果로 보아 菌體의 增殖과 더불어 glucose

Table 10. The production of intra- and extra-cellular lipids and the consumption of glucose and N source in the medium by *Rhodotorula glutinis var. glutinis* SW-5.

Date	Wt. of dry yeast (g/l)	Wt. of intracellular lipid (g/l)	Lipids in dry yeast (%)	Wt. of extra-cellular lipid (g/l)	Wt. of glucose (g/100ml)	Wt. of nitrogen (mg/10ml)
0	—	—	—	—	4.00	3.75
1	0.26	—	—	—	3.49	3.04
2	4.48	0.82	18.32	—	2.56	2.31
3	6.85	1.83	26.71	0.77	1.53	1.65
4	8.10	2.48	30.39	1.83	0.69	0.90
5	9.14	2.99	32.77	2.22	0.07	0.48
6	9.49	3.28	34.53	2.26	0	0.19
7	9.21	3.28	35.62	2.26		
8	8.94	3.16	33.28	2.15		
9	8.89	3.10	34.91	2.13		
10	8.87	3.09	34.90	2.10		

Table 11. The production of intra- and extra-cellular lipids and the consumption of glucose and N source in the medium by *Rhodotorula graminis* SW-54.

Date	Wt. of dry yeast (g/l)	Wt. of intracellular lipid (g/l)	Lipids in dry yeast (%)	Wt. of extracellular lipid (g/l)	Wt. of glucose (g/100ml)	Wt. of nitrogen (ml/10ml)
0	—	—	—	—	4.00	3.75
1	0.20	—	—	—	3.43	2.86
2	3.20	0.41	12.88	—	2.15	1.91
3	6.21	1.53	24.86	0.56	1.38	1.21
4	8.05	2.46	30.51	1.42	0.45	1.03
5	8.53	3.07	35.96	2.00	0.11	0.75
6	8.57	3.09	36.02	2.43	0	0.30
7	8.30	2.99	36.08	2.82		0
8	8.20	2.97	36.21	2.79		
9	8.19	2.96	36.17	2.76		
10	8.18	2.95	36.09	2.75		

및 nitrogen 이 酵母에 攝取되어 菌體物質 및 脂質의 生合成에 利用되고 菌體의 增殖과 더불어 그 細胞內 脂質總量도 增加함을 알 수 있고 酵母의 增殖이 培養液內 glucose 및 nitrogen 의 枯渴 때문에 停止되면 脂質의 增加도 停止함을 알 수 있다. 한편 一但 5일까지 最高量으로 蓄積되었던 脂質은 그後 培養基의 nitrogen 이 枯渴되는 5—9日 사이의 短期間에는 다시 消耗되지 않음을 보여 주고 있다.

그림 3,4에서 細胞外 脂質 生産菌인 *Rhodotorula glutinis var. glutinis* SW-5와 *Rhodotorula graminis* SW-54에 對하여 그 細胞內 脂質 生産량을 보면 菌體의 增殖 및 細胞內 脂質의 生産에 따른 glucose

와 窒素源 消耗는 *Rhodotorula glutinis var. glutinis* SW-17의 경우와 비슷한 結果를 보여주었으나 대체적으로 菌體增殖度가 낮았고 細胞內 脂質 生産量도 훨씬 적었다. 또 *Rhodotorula graminis* SW-54는 nitrogen 이 完全 消耗되는 日數인 7日로 glucose 6日보다 1日 程度 길었으나 이경우에도 nitrogen 이 完全히 消耗된 後에 乾燥菌體量과 細胞內 脂質 生産량이 最高値를 보여 주었다. 한 便 *Rhodotorula glutinis var. glutinis* SW-5와 *Rhodotorula graminis* SW-54의 細胞外 脂質의 生産을 보면 細胞內 脂質보다 그 生産開始가 約 1日 지연되나 最高生産량을 보여 주는 時期는 細胞內 脂質 最高生産時期와 같았고 그 細胞外 脂質의 最高生

產量은 *Rhodotorula graminis* SW-54에 있어서는 2.8g/l 나 되어 *Deinema*³⁷⁾가 *Rhodotorula graminis* CBS 3043으로 實驗하여 얻은 2g/l 보다 0.8g/l 나 더 많이 生産하는 優秀菌株임을 알 수 있다. 細胞外 脂質은 菌接種後 5日째부터 培地內에서 이미 脂肪球를 肉眼으로 確認할 수 있었으며 7~8日頃에는 直徑이 대략 2~3mm 인 脂肪球들이 培養液底面에 沈澱되는 것을 볼 수 있었다. 後 振盪培養을 계속하면 細胞內外 脂質은 다같이 酵母에 依하여 再消耗되어 90日前後에 完全히 消耗됨을 觀察할 수 있었다. 그러나 菌接種後 8日頃에 yeast extract 0.5g/100ml 또는 (NH₄)₂SO₄ 0.2g/100ml 를 加하고 계속 振盪培養하면 窒素源添加後 25日 以內에 細胞內外 脂質이 完全히 消耗됨을 볼 수 있었다.

酵母의 細胞外 脂質이 어떠한 生理的 役割을 하고 있는지는 아직 報告된 바 없으나 前記 實驗結果에서와 같이 炭素源이 枯竭되었을 때는 이것이 다시 酵母의 energy 源 및 體蛋白合成에 再利用된다는 것으로 보아 細胞外 脂質도 貯藏物質로서의 役割을 하고 있다는 것을 알 수 있다. 本 實驗에 使用한 3菌株의 酵母가 生産하는 細胞內外 脂質 어느 것에 있어서나 glucose가 消耗되는 期間과 窒素가 消耗되는 期間이 거의 같았으며 細胞內外 脂質合成은 培養液中的 窒素가 1/2程度 消耗되었을 때 부터 시작하여 glucose와 窒素源이 거의 다 消耗되었을 때 細胞內外 脂質의 蓄積量이 最高에 이르렀다. 이는 *Deinema*³⁷⁾가 窒素源이 培養液中的 glucose 4g 中 1g이 消耗되기 전에 完全히

消耗되고 窒素가 完全히 消耗된 때 부터 細胞內外 脂質合成이 시작된다고 報告한 것으로 보아 *Deinema*³⁷⁾가 分離한 菌株는 本 實驗에서 分離한 3菌株에 比하여 窒素의 同化速度가 빠른 fast growth type임을 알 수 있다. 이 結果에서 미루어 보면 酵母 細胞가 培養液中的 窒素源을 모두 使用하여 蛋白質을 合成増殖할 수 있는 最高限度까지 生長한 다음 아직도 炭素源이 남아 있으면 이를 脂質로 變化시키는 것이 아닌가 생각된다.

本 實驗結果에서는 窒素源이 거의 다 消耗되었을 때 炭素源도 다 消耗되고 炭素는 거의 다 酵母蛋白質合成에만 消耗되었으며 *Deinema*³⁷⁾의 實驗 경우는 窒素가 다 消耗되었을 때 아직도 炭素源은 原量의 3/4의 炭素源이 남아 있어서 이때부터 이 炭素源에서 脂肪이 合成되기 始作한 것이라고 解釋된다. 이로 미루어 보아 窒素源과 炭素源이 共存時 窒素源의 可用限度까지 酵母의 増殖과 蛋白質의 合成이 貯藏物質 即 脂肪의 蓄積보다 先行하는 것이라고 생각된다.

(2) 培養液中的 窒素源과 炭素源濃도가 酵母의 生長과 脂質生産에 미치는 영향

脂質 生産性이 優秀한 것으로 選定된 3種 酵母를 窒素源인 yeast extract 또는 炭素源인 glucose의 濃도를 다르게 한 各種 培地에 各各 接種하고 殺菌한 0.1N KOH 溶液으로 培養期間中 每日 pH를 調節하면서 8日間 培養하였을 때 酵母 乾燥菌體量과 細胞內外 脂質生産量의 變化를 調査한 結果는 表 12, 13, 14와 같다.

Table 12. Effect of concentrations of nitrogen source and glucose in the medium on yeast growth and intracellular lipid production of *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis* SW-17.

Glucose (g/l)	Nitrogen (g/l)	Yeast ext. (g/l)	Dry yeast (g/l)	Wt. of intracellular lipid (g/l)	Lipids in dry yeast (%)
40	0.150	1.0	7.12	5.08	71.42
40	0.225	1.5	9.27	5.84	63.03
40	0.375	2.5	10.45	6.11	58.42
40	0.525	3.5	10.15	1.32	12.63
20	0.375	2.5	4.41	1.38	31.32
30	0.375	2.5	6.79	3.28	48.28
40	0.375	2.5	10.45	6.11	58.42
50	0.375	2.5	14.44	9.17	63.53
60	0.375	2.5	17.51	11.87	67.80
70	0.375	2.5	20.21	14.30	70.76

表 12, 13, 14에서 보는 바와 같이 특히 glucose 의 濃도를 4%로 固定시키고 窒素源인 yeast

Table 13. Effect of concentrations of nitrogen source and glucose in the medium on yeast growth and intra- and extra-cellular lipid production of *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis* SW-5.

Glucose (g/l)	Nitrogen (g/l)	Yeast ext. (g/l)	Dry yeast (g/l)	Wt. of intracellular lipid (g/l)	Lipids in dry yeast (%)	Wt. of extracellular lipid (g/l)
40	0.150	1.0	5.63	2.65	47.14	4.38
40	0.225	1.5	8.28	3.39	40.92	3.63
40	0.375	2.5	8.94	3.16	35.35	2.15
40	0.525	3.5	8.95	0.85	9.50	0.14
20	0.375	2.5	3.21	0.52	16.23	0.57
30	0.375	2.5	7.28	1.87	25.72	0.99
40	0.375	2.5	8.94	3.16	35.28	2.15
50	0.375	2.5	10.57	4.06	38.38	3.31
60	0.375	2.5	11.87	5.11	43.02	4.39
70	0.375	2.5	12.43	5.81	46.75	5.21

Table 14. Effect of concentrations of nitrogen source and glucose in the medium on yeast growth and intra- and extra-cellular lipid production of *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis* SW-5.

Glucose (g/l)	Nitrogen (g/l)	Yeast ext. (g/l)	Dry yeast (g/l)	Wt. of intracellular lipid (g/l)	Lipids in dry yeast (%)	Wt. of extracellular lipid (g/l)
40	0.150	1.0	4.86	2.37	48.74	4.06
40	0.225	1.5	7.87	3.23	41.10	3.24
40	0.375	2.5	8.20	2.97	36.22	2.79
40	0.525	3.5	8.21	0.78	9.50	0.33
20	0.375	2.5	4.17	0.57	13.78	0.84
30	0.375	2.5	6.73	1.59	23.65	1.23
40	0.375	2.5	8.20	2.97	36.21	2.79
50	0.375	2.5	10.15	3.97	39.10	3.52
60	0.375	2.5	11.94	5.42	45.36	4.15
70	0.375	2.5	13.10	6.40	48.84	4.59

extract의 농도를 1.0~3.5g/l範圍로 增加시켰을 때 細胞內外 脂質 生産量이 3種다같이 현저하게 감소되었으며 yeast extract의 濃도가 0.525g/l일 때는 細胞內 脂質의 含量이 10%以下로 감소되었고 한편 細胞外 脂質도 0.14~0.33g/l로 감소되었으나 酵母乾燥菌體量은 窒素濃度變化에 별 영향을 받지 않았음을 알 수 있다.

이와 反對로 窒素濃도를 2.5g/l로 固定시키고 glucose의 濃도를 20~70g/l의 範圍로 增加시켰을 때 細胞內외의 脂質生産量이 현저하게 增加하여 表 12에서 보던 *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis* SW-17에 있어서는 細胞內 脂質含量이 70.76%까지 增加하였고 表 13과 14에 의하면 *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis* SW-5와 *Rhodotorula glutinis*

var. *glutinis* SW-54의 細胞外 脂質生産量이 各各 5.21g/l와 4.59g/l까지 增加하였으며 이 경우에 酵母乾燥菌體量은 glucose 濃도가 20g/l일때에 비하여 約 3~5倍 增加 하였다. 이와같은 結果는 *Deinema*³⁷⁾와 *Spotholz*⁵⁹⁾의 結果와 비슷한 傾向임을 알 수 있다.

위의 結果로 보아 酵母에 있어서는 窒素源을 利用한 蛋白質의 合成이 glucose를 原料로한 細胞內外 脂質의 合成보다 優先적으로 이루어진다는 것을 알 수 있다. 즉 窒素의 量이 充分한 限炭化合物이 우선 蛋白質合成에 全적으로 利用된다는 것은 glucose를 40g/l로 固定시키고 窒素源을 增加시킬때 酵母는 계속 增殖하나 脂質의 生成量은 오히려 減少하였다는 結果를 보면 알 수 있다. 이경

우 효母的 增殖이 별로크지 않은 것은 glucose 의 量이 모든 窒素源을 蛋白質合成에 使用되기에 不充分하기 때문이라고 생각된다. yeast extract 의 濃度를 固定시키고 glucose 의 濃度를 增加시켰을 때는 酵母의 增殖과 脂質의 生成이 多같이 活發하게 增大되었다. 이 경우는 모든 窒素源으로부터 蛋白質을 合成하는데 必要한 炭水化合物이 모두 使用된 後에도 脂質合成에 使用될 수 있는 glucose 가 남아있기 때문이 아닌가 生覺된다.

Foster⁵⁴⁾와 Steiner⁵⁵⁾는 脂肪이 細胞內의 貯藏物 質이지만 이들의 生合成은 蛋白質合成이 어떤 理由로 合成이 不可能하거나 阻止당하였을 때 이루어진다고 하였다. 그리고 脂肪生合成은 窒素와 glucose 의 比率이 1:200(w/w)일때 最適條件이 되며 이보다 窒素量이 많으면 蛋白質 合成이 더욱 活發해 진다고 하였는데 이것은 本實驗의 結果를 뒷받침하여 주는 것이라고 할 수 있다.

(3) 培養液의 pH가 酵母 生長과 脂質 生産에 미치는 영향

分離選定된 3 菌株을 pH를 다르게한 各 脂質 生産培地(4% glucose, 0.25% yeast extract)에 接種하고 殺菌한 0.1N HCl과 0.1N KOH로 pH를 調節하면서 8日間 振盪培養하였을때 各 pH에 대한 酵母乾燥菌體와 細胞內外 脂質生産量은 그림 5와 같다.

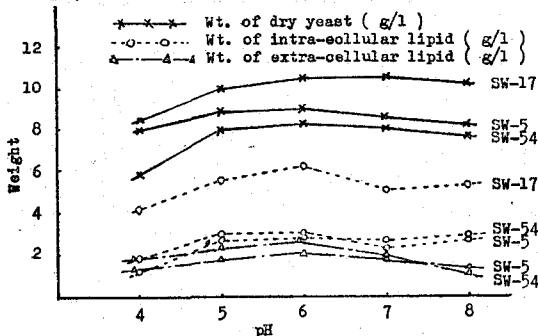


Fig. 5. Effect of pH of the nutrient medium on growth and lipid synthesis in *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis* SW-17, *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis* SW-5 and *Rhodotorula graminis* SW-54.

그림 5에서 보는 바와 같이 pH 5~6에서 酵母乾燥菌體와 細胞內外 脂質의 生産量이 가장 많았고 pH 5~6보다 酸性 또는 鹽基性 培地에서는 菌體生産量이 감소하였으며 細胞內 脂質含量은 細胞外 脂質 生産量보다 變化가 적었고 특히 pH 7에서 細胞內 脂質 生産量이 약간 減少하였다가 pH 8에서 다시 增加하는 경향이 있었다.

이 結果는 Deinema³⁷⁾가 pH 7부근에서 細胞內 脂質 生産量이 急速히 減少한다고 보고한 結果와 量的으로 差異는 있으나 Deinema³⁷⁾와 Spotholz⁵³⁾의 研究結果와 거의 같은 傾向을 보여 주고 있다.

(4) 窒素源의 種類가 酵母 生長과 細胞內外 脂質 生産에 미치는 영향

脂質 生産 培地중의 窒素源으로서 yeast extract 2.5g/l(窒素로서 0.375g/l), peptone 3.34g/l(窒素로서 0.375g/l), (NH₄)₂SO₄ 2.12g/l(窒素로서 0.225g/l) 및 KNO₃ 1.62g/l(窒素로서 0.225g/l)를 各各 使用하고 pH 6에서 8日間 振盪培養하였을때 酵母乾燥菌體量과 細胞內外 脂質生産量은 그림 6과 같다.

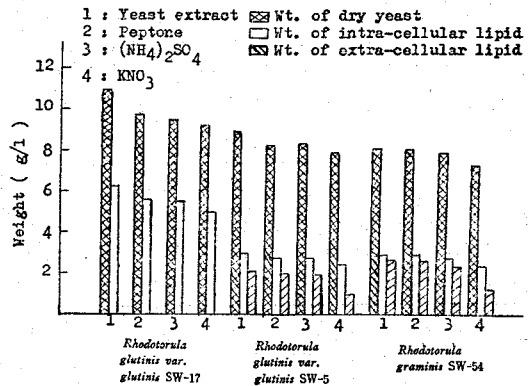


Fig. 6. Influence of types of nitrogen compounds on yeast growth and lipid synthesis.

그림 6에서 보는 바와 같이 窒素源으로서 yeast extract를 使用할때 乾燥菌體量과 細胞內外 脂質 生産量은 가장 많았고 한편 peptone과 (NH₄)₂SO₄는 生産量이 서로 비슷하였으며 KNO₃를 使用하였을때 특히 細胞外 脂質生産量이 현저하게 감소하였다. 그 이유는 nitrate가 酵母의 蛋白質合成이나 脂質合成에 利用되자면 NO₃⁻→NH₄⁺의 段階를 거쳐야 하므로 KNO₃는 窒素源으로 不適當하여 有機態窒素源인 amino基나 無機態 窒素源인 NH₄⁺보다는 그 效率이 떨어지는 것이 아닌가 생각된다.

4. TLC에 의한 細胞內外 脂質의 分別 定量

分離選定된 菌株가 生産한 細胞內外 脂質을

TLC 法으로 分離한 結果는 그림 7과 같고 TLC 에서 分離된 各種脂質을 Amenta 法⁴⁷⁾으로 分別定量한 結果는 表 15와 같다.

表 15에서 보던 分離選定된 菌株의 細胞內 脂質中 triglyceride 含量은 細胞外 脂質中の 含量보다 10~12%가 많이 含有되어 있었으며 細胞內 脂質中の phospholipid의 含量은 細胞外 脂質中の 含量보다 8~9%가 적게 含有되어 있었다. 大體의으로 細胞外 脂質中에는 細胞內脂質中에서 보다 中性脂肪 以外の 脂質이 많이 含有되어 있었다.

한편 이와같은 結果는 動物物中の free fatty acid 含量이 4~8%인데 比하여 이것은 8~12%나 되었는데 이것은 細胞內 脂質을 抽出할때 使用한 0.3% HCl 溶液에 의하여 脂肪酸 ester가 少量 加水 分解되어 free fatty acid가 많아진 것이 아닌가 생각된다.

本 實驗結果는 Deinema³⁷⁾가 *Lipomyces starkeyi*에서 報告한 것 보다 細胞外脂質에 있어서 phospholipid가 10%以上, sterol 含量이 2~3% 많이 含有되어 있었다. 또한 植物種子中の 脂質에 對한 여러 研究結果, 大豆에 대한 Brown⁵⁶⁾ 및 Neumann⁵⁷⁾의 研究, 목화씨에 대한 Olcott⁵⁸⁾의 研究, 호박씨에 대한 Heumann⁵⁹⁾의 研究 및 亞麻씨에 대한 Zimmerman⁶⁰⁾의 研究 等の 結果와 比較하면 free fatty acid, phospholipid, free sterol 및 esterified sterol의 含量이 훨씬 많이 含有되어 있어서 酵母에 依한 脂質生成의 特異性을 보여 주고 있어 興味있는 事實임을 알았다.

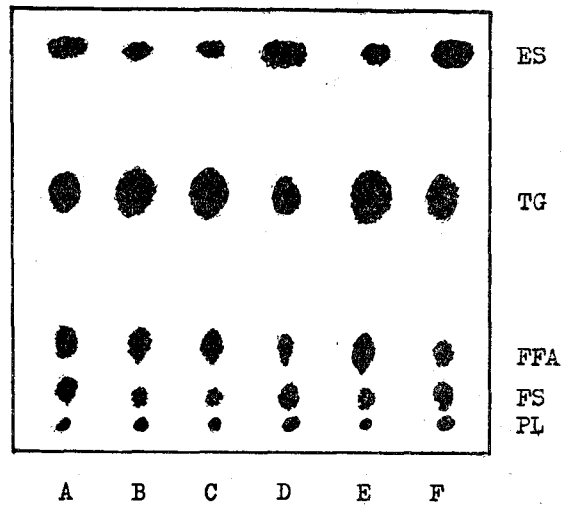


Fig. 7. Thin layer chromatogram of the intra- and extra-cellular lipids.

- A : Standard mixture(tripalmitin, palmitic acid, lecithin, cholesterol palmitate and cholesterol).
- B : Intracellular lipid of *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis* SW-17.
- C : Intracellular lipid of *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis* SW-5.
- D : Extracellular lipid of *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis* SW-5
- E : Intracellular lipid of *Rhodotorula graminis* SW-54.
- F : Extracellular lipid of *Rhodotorula graminis* SW-54.

Solvent system : n-hexane : diethylether : glacial acetic acid=80 : 20 : 1 (v/v/v)

Table 15. The lipid components of the intra- and extra-cellular lipids of *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis* SW-17, *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis* SW-5 and *Rhodotorula graminis* SW-54.

Lipid components	SW-17		SW-5		SW-54	
	Intracellular lipid	Extracellular lipid	Intracellular lipid	Extracellular lipid	Intracellular lipid	Extracellular lipid
Triglyceride	84.44	72.11	82.91	72.11	82.53	73.61
Free fatty acid	10.03	7.98	11.46	7.98	11.85	7.88
Phospholipid	2.21	11.77	2.62	11.77	2.43	10.83
Esterified sterol	2.95	5.82	2.83	5.82	2.98	5.16
Free sterol	0.37	2.32	0.18	2.32	0.21	2.52

5. 細胞內外 脂質中 構成脂肪酸의 分析

實驗에 使用한 3種의 分離選定 菌株을 各各 脂質生産培地에 接種하여 24°C와 30°C에서 8日間 培養한 다음 細胞內脂質을 抽出鹼化시키고 BF₃-methanol 溶液⁵¹⁾으로 esterification 시킨 다음 5%

FFAP column을 使用하여 GLC 法으로 分析한 結果는 表 16과 같으며 그중에서 *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis* SW-17의 細胞內脂質에 대한 GLC의 結果는 그림 8과 같고 標準脂肪酸 methyl ester의 GLC 結果는 그림 9와 같다. 이것을 보면 이들 3 酵母의 細胞內脂質의 主脂肪酸은 palmitic acid

Table 16. Effect of temperature on the composition of fatty acids in the intracellular lipids of yeasts.

Fatty acid	<i>Rhodotorula glutinis</i> var. <i>glutinis</i> SW-17		<i>Rhodotorula glutinis</i> var. <i>glutinis</i> SW-5		<i>Rhodotorula graminis</i> SW-54	
	24°C.	30°C.	24°C.	30°C.	24°C.	30°C.
Myristic acid	1.57	0.97	2.39	1.02	2.62	1.07
Palmitic acid	31.30	24.80	43.90	23.02	44.90	24.10
Palmitoleic acid	1.92	3.09	4.19	1.66	4.16	1.38
Stearic acid	4.87	4.72	1.72	6.02	0.87	6.33
Oleic acid	47.80	56.20	35.70	26.50	35.70	56.00
Linoleic acid	11.40	10.20	11.30	27.25	11.00	9.89
Linolenic acid	1.60	—	0.79	14.52	0.73	0.76

와 oleic acid 로서全體 脂肪酸의 約 35 및 45%를 含有되어 있다. 各各 차지하고 있으며 linoleic acid 는 約 10%가

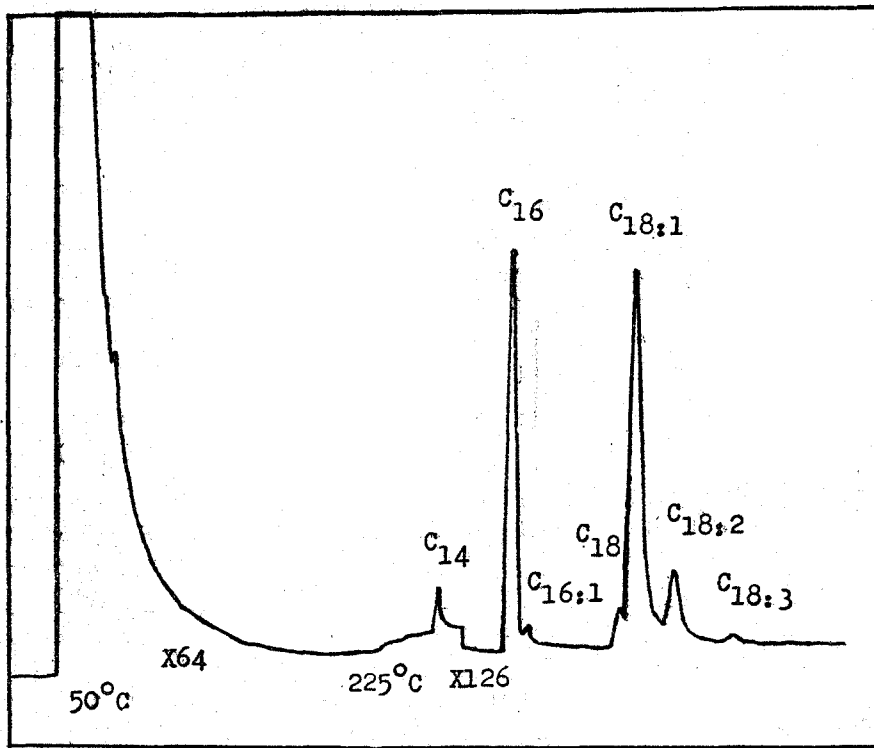


Fig. 8. Gas liquid chromatogram of methyl esters of the fatty acids in the intracellular lipid of *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis* SW-17. (5% FFAP on Chromosorb W).

培養溫度別 細胞內 脂肪의 脂肪酸組成을 나타낸 表 16을 보면 24°C에서 菌을 培養하였을 때 보다 30°C에서 培養하였을 때는 palmitic acid 量이 감소 되었고 反面 oleic acid 와 같은 不飽和 脂肪酸의 量은 增加되었다. 이와같은 結果는 Deinema⁸⁷⁾가 *Rhodotorula graminis* C.B.S. 3043을 使用하여 實

施한 研究結果와 一致하고 Bass⁶¹⁾가 報告한바 있는 *Rhodotorula gracilis*를 高溫에서 培養하였을 때 生産된 脂質中の 飽和脂肪酸 含量이 增加하여 iodine value 가 감소되었다고 한 結果와는 相反된다.

Holloway 等⁶²⁾은 liver microsome 에 있어서

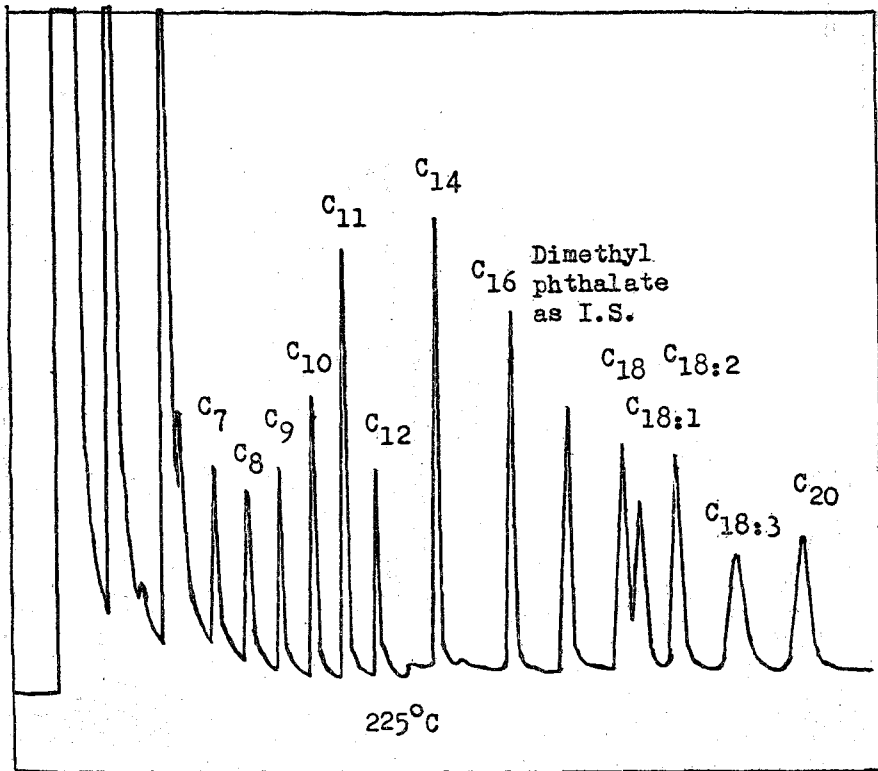


Fig. 9. Gas liquid chromatogram of methyl esters of standard fatty acids. (5% FFAP on Chromosorb W).

飽和脂肪酸인 stearyl-CoA 가 不飽和脂肪酸인 oleyl-CoA 로 轉換時 다음 그림 11과 같은 過程으로 이루어진다고 하였다.

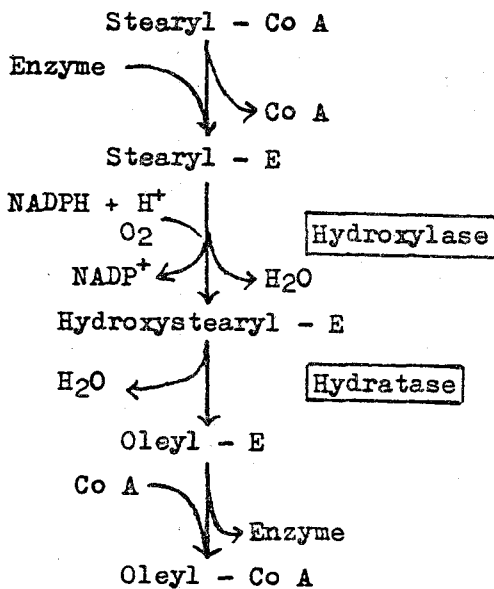


Fig. 10. The conversion of stearyl-CoA to oleyl-CoA.

本 實驗結果를 그림 10에 依據하여 考察하여 보면 stearyl-CoA 에서 oleyl-CoA 로 變化하는 過程中 特히 hydroxylase 또는 hydratase 가 關與하는 段階에 있어서 activation energy(Ea)의 값이 相當히 높아서 溫度가 높을 수록 stearyl-CoA→oleyl-CoA 로의 反應速度가 빨라지기 때문이 아닌가 생각된다.

Rhodotorula graminis SW-54를 24°C 에서 培養하여 얻은 細胞外 脂質의 methyl ester 를 5% FFAP column 을 使用하여 分析한 GLC 의 結果는 그림 11과 같다.

이 chromatogram 에 依하면 3個의 脂肪酸과 a,b,c,d 및 e 의 5個의 未知物質 peak 가 檢出되었는데 確認된 脂肪酸全體量과 未知物質 a,b,c,d 및 e 를 全部 합한 量과의 比率은 40 : 60程度로서 未知物質이 더 많이 含有되어 있었다. 이들 未知物質 中에서 peak c 는 relative retention time 에 依한 carbon number 로 볼때 stearic acid 와 未知物質이 overlap 되어 있음을 알 수 있다. 이들 未知物質을 確認하기 위하여 同一試料를 3% SE-30 column 을 使用하여 分析한 結果는 그림 12의 GLC 結果와 같았고 같은 column 을 使用한 標準脂肪酸

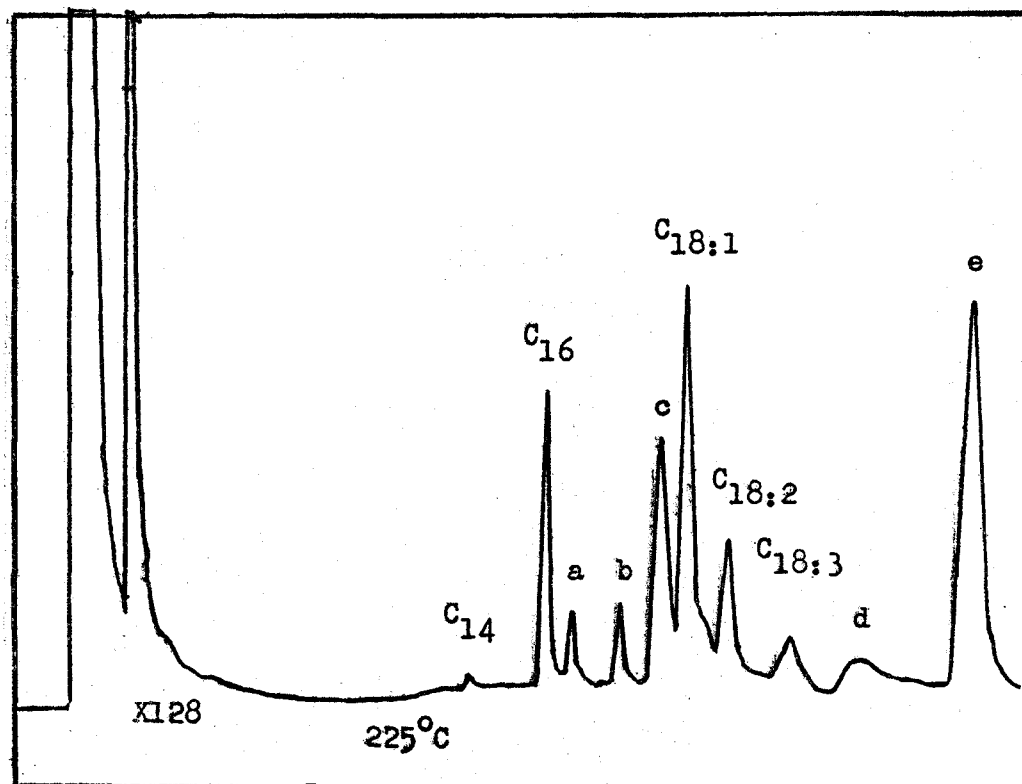


Fig. 11. Gas liquid chromatogram of methyl esters of the fatty acids in the extracellular lipid of *Rhodotorula graminis* SW-54. (5% FFAP on Chromosorb W).

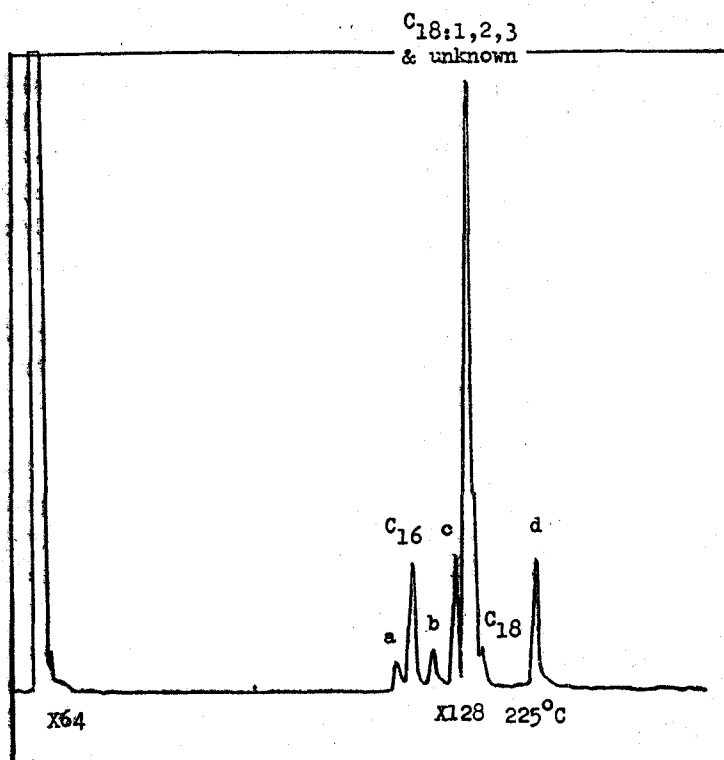


Fig. 12. Gas liquid chromatogram of methyl esters of the fatty acids in the extracellular lipid of *Rhodotorula graminis* SW-54. (3% SE-30 on Chromosorb W).

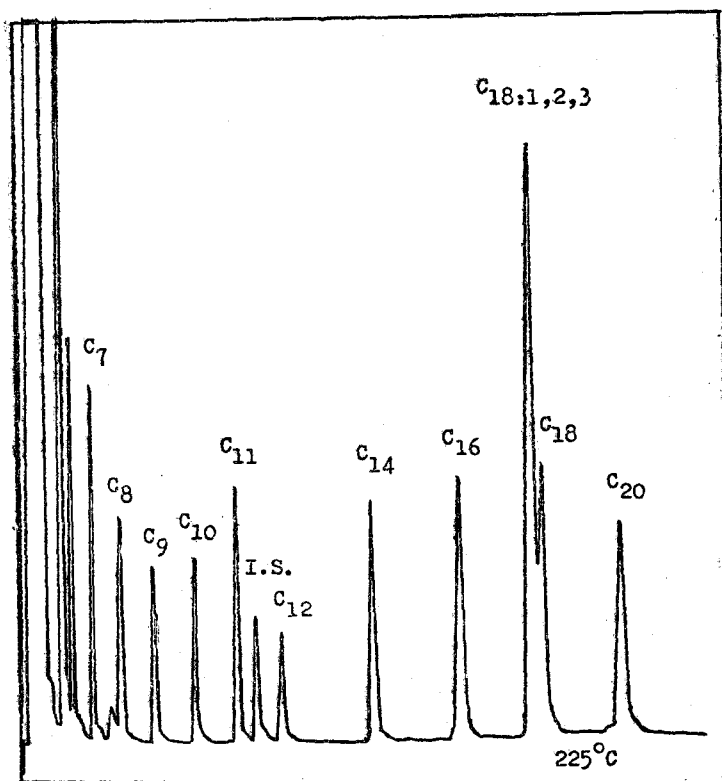


Fig. 13. Gas liquid chromatogram of methyl esters of standard fatty acids. (3% SE-30 on Chromosorb W).

methyl ester의 GLC 결과는 그림 13과 같다.

그림 12의 試料 chromatogram과 standard chromatogram에서 carbon number를 比較하여 보면 peak C_{18:1,2,3} & unknown의 carbon number가 17.6이므로 이 peak에 oleic acid, linoleic acid, linolenic acid가 overlap되어 있는 것임을 알 수 있다.

또한 Tulloch⁶³⁾와 Van Ammers⁶⁴⁾는 *Rhodotorula glutinis* CBS 4648에서 生産된 細胞外 脂肪酸 methyl ester를 silicon oil column(SE-30 column)을 사용하여 GLC로 分析한 결과 3-D-hydroxypalmitic acid (85%)와 3-D-hydroxystearic acid (15%)를 確認하였는데 이들의 relative retention time에 依한 carbon number는 各各 17.7 및 19.5였다. 따라서 이것과 本實驗의 結果를 比較하면 carbon number 17.6位置에는 이 脂肪酸도 역시 overlap되어 都合 4개의 脂肪酸이 overlap되어 있는 것을 알 수 있다. 그러므로 全體脂質에 對한 이 peak의 量에서 5% FFAP column에 의한 chromatogram(그림 11)에서 定量된 oleic acid, linoleic acid, linolenic acid의 全량을 減하여

Table 17. Component fatty acids (wt. percent) of the extracellular lipids of two yeast species, grown at 24°C.

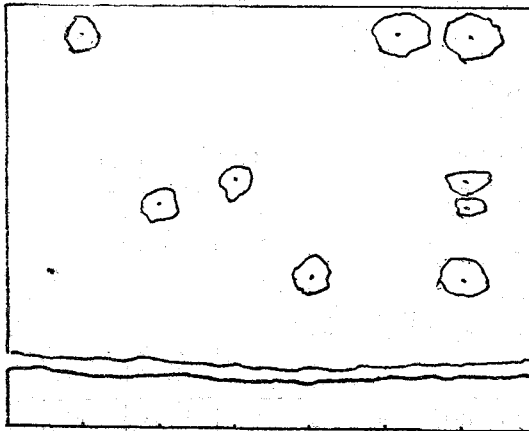
Fatty acid	<i>Rhodotorula glutinis</i> var. <i>glutinis</i> SW-5	<i>Rhodotorula glutinis</i> SW-54
Myristic acid	0.83	0.31
Palmitic acid	9.42	9.37
Stearic acid	3.78	3.50
Oleic acid	11.52	19.27
Linoleic acid	3.38	7.90
Linolenic acid	3.65	2.81
3-D-Hydroxypalmitic acid	24.88	21.83
3-D-Hydroxystearic acid	17.30	12.80
Unknown	25.24	22.21

3-D-hydroxypalmitic acid 量을 算出하였다. 그림 12에서 보는 바와 같이 peak d는 그 carbon number를 relative retention time으로 부터 計算한 結果 19.5이므로 3-D-hydroxystearic acid라고 確認하였다. 이와같이 5% FFAP column과 3% SE-30

column을 사용한 GLC에 의하여 細胞外脂質의 構成 脂肪酸含量을 計算한 結果는 表 17과 같다. 卽 細胞外 脂質 構成 脂肪酸는 palmitic acid와 oleic acid가 各各 9%와 11—19%程度 含有되어 있었고 hydroxy fatty acid가 35~40%程度 含有되어 있었으며 未知 物質이 22~25%程度 含有되어 있었다. 이와같은 事實은 Deinema³⁷⁾와 Tulloch⁶³⁾의 研究結果와 거의 一致하지만 3-D-hydroxypalmitic acid와 3-D-hydroxystearic acid量의 比率이 85:15라고 한 Tulloch⁶³⁾의 研究結果에 比하여 本實驗 結果는 1.5~2:1程度로서 3-D-hydroxypalmitic acid量이 少量 含有되어 있음이 特異하다고 하겠다.

6. 細胞內外 脂質을 構成하고 있는 Polyol의 確認

分離選定된 菌株인 *Rhodotorula glutinis var. glutinis* SW-5가 生産한 細胞內外 脂質을 構成하고 있는 polyol을 下降法에 依하여 展開한 PC의 結果는 그림 14와 같다.



G X A M Sin Sex
Fig. 14. Paper chromatogram of polyols in the intra- and extra-cellular lipid of *Rhodotorula glutinis var. glutinis* SW-5.

G: Glycerol, X: Xylitol, A: Arabitol,
M: Mannitol, Sin: Polyols in the intra-cellular lipids, Sex: Polyols in the extra-cellular lipids. Solvent system: n-Butanol: Ethanol: Water=7:2:2

즉 細胞內 脂質構成 polyol로서 glycerol만이 確認되었고 細胞外 脂質構成 polyol로서는 glycerol, arabitol, xylitol, mannitol이 確認되었다. 以上の 結果로 本實驗에서 分離選定한 菌株로부터 生産된 細胞內 脂質中の 脂肪酸 ester는 simple triglyceride

이었음을 確認하였고 細胞外 脂質中の 脂肪酸 ester는 simple triglyceride와 hydroxy fatty acid의 pentitol과 hexitol ester로 構成되어 있음을 確認하였다.

Tulloch⁶³⁾는 *Rhodotorula graminis*로부터 生産된 細胞外 脂質의 polyol를 acetylation시킨後 GLC로 分析하여 mannitol (76.9%), arabitol(15.6%), xylitol (7.5%)이 含有되어 있음을 確認하였고 이들 polyol 1分子에 hydroxy fatty acid 1分子씩이 結合되었고 그 外에 hydroxy基에는 acetyl基가 結合되었으며 glycerol은 含有되어 있지 않았다고 報告하였는데 이 結果는 本實驗의 結果와 一致함을 알았다.

要 約

土壤, 堆肥, 飼料로 부터 細胞內脂質을 多量生産하는 酵母로서 *Rhodotorula glutinis var. glutinis* SW-17을 選拔하였고 또 植物葉에서 細胞外 脂質을 多量生産하는 2菌株의 酵母 *Rhodotorula glutinis var. glutinis* SW-5 및 *Rhodotorula graminis* SW-54를 分離同定하여 그들의 細胞內外 脂質生産에 關한 基礎的인 研究를 한바 다음과 같은 結果를 얻었다.

1) 24°C에서 8日間 振盪 培養할때 菌體增殖後 窒素成分이 어느程度 消耗되었을 때부터 脂肪의 生成이 시작되었으며 이때 *Rhodotorula glutinis var. glutinis* SW-17은 細胞內脂質을 酵母乾體에 대하여 最高 58.42%까지 그리고 *Rhodotorula graminis* SW-54는 細胞外 脂質을 2.62g/l까지 生産하였다.

2) 培養液中の 炭素源과 窒素源이 4~5일에 全部 消耗된후 飢餓狀態에서 24°C로 계속 振盪培養하면 酵母細胞는 細胞內外 脂質을 다시 利用하여 培養 90日頃에는 脂質이 完全 消耗되었다.

3) 細胞內外 脂質의 生合成은 炭素源과 窒素源의 相對的인 濃度와 密接한 關係가 있어서 窒素가 酵母增殖에 전부 利用되어 窒素 飢餓狀態에서 過剩의 炭素源이 있을때 脂質이 현저하게 生成되었다. 反對로 培養液內的 窒素濃度를 增加시키면 脂質生産量은 현저하게 低下되었다.

4) 本分離選定된 酵母菌株의 培養 및 脂質生成, 最適 pH는 5.0~6.0이었다.

5) 本分離選定된 酵母菌株의 細胞內 脂質은

myristic, palmitic, palmitoleic, stearic, oleic, linoleic 및 linolenic acid 로 構成되었으며 이中 palmitic acid 30~45%, oleic acid 가 35~50%로 가장 많았다.

6) 本分離 選定된 酵母菌株의 細胞外 脂質의 構成脂肪酸은 myristic, palmitic, stearic, oleic, linoleic, linolenic, 3-D-hydroxypalmitic 및 3-D-hydroxystearic acid 로 構成되었으며 이中 3-D-hydroxypalmitic acid 가 22~25%, 3-D-hydroxystearic acid 가 13~17%로 가장 많았다.

7) 本分離選定된 酵母菌株의 細胞內 脂質 構成 polyol 은 glycerol 뿐이 었으며 細胞外 脂質의 構成 polyol 은 glycerol, mannitol, xylitol 및 arabitol 이었다.

끝으로 本 研究를 遂行함에 있어서 校閱과 始終 指導 鞭撻을 아끼지 않으신 서울大學校 農科大學 李春寧博士, 曹應鉉博士, 金載弼博士, 李啓瑞博士 님과 本研究를 직접 도와주신 金永培碩士, 鄭求英碩士外 여러분께 衷心으로 感謝를 드립니다.

參 考 文 獻

1. Fink, H., und F. Just: Biochem. Zeit., 300, 84 (1938).
2. Fink, H., und F. Just: Biochem. Zeit., 303, 234 (1939).
3. Peterson, W.H., J.F. Snell, and W.C. Frazier: Ind. Eng. Chem., 37, 30 (1945).
4. Harris. E.E., J.F. Saeman, R.R. Marquardt, M.L. Hannan, and S.C. Rogers: Ind. Eng. Chem., 40(7), 1220 (1948).
5. Kurth, E.F. and V.H. Cheldelin: Ind. Eng. Chem., 38, 617 (1946).
6. Inskeep, G.C., A.J. Wiley, J.M. Holderby, and L.P. Hughes: Ind. Eng. Chem., 43, 1702 (1951).
7. Agarwal. P.N., K. Singh, P.S. King, and W.H. Peterson: Arch. Biochem., 14 (1 and 2), 105-115 (1947).
8. Lewis, J.C., J.J. Stubbs, and W.M. Noble: Arch. Biochem., 4(3), 389(1944).
9. Tomiyasu, Y. and B. Zenitani: J. Agr. Chem. Soc., 25, 406(1950).
10. Otsuta, S., R. Ishii and N. Katsuya: Agr. Biol. Chem., 29, 292 (1967).
11. Zobell, C.E.: Advances in Enzymology, 10,

- 443(1950).
12. Beerestecher, E.: Petroleum Microbiology, Elsevier Press, New York, (1954).
13. Johnson, M.J.: Science, 115, 1515 (1967).
14. Takeda, I., T. Iguchi, T. Gawamura, S. Horiguchi and S. Senon: Agr. Biol. Chem., 29(9), 796(1965).
15. Miller, T.L. and M.J. Johnson: Biotech. and Bioeng., 8, 549 (1966).
16. Chepigo, S.V., others: 7th. World Petroleum Congress Proceeding, 8, 205(1967), Mexico City.
17. Nägeli, C., Loew, O.: Ann., 193, 322 (1878).
18. Lindner, P., Csifer, S.: Wochenschrift f. Brauerei 29, 1(1912).
19. Lindner, P., Unger, T.: Wochenschr. f. Brauerei, 36, 188 (1919).
20. Hilditch, T.P.: Cheepman and Hall, London (1949).
21. Blinc, M.: Slovenska Akad. Znanosti Umetnosti, 2, 43; 3, 41 (1951).
22. Garrido, J.M., et. al: An. Soc. Esp. Fis. Quim., 49, 81, 829 (1953).
23. Garcia, R.P., et al: Rev. Cienc. Apl., 10, 13 (1956).
24. Woodbine, M., et al: J. Expl. Bot., 2, 204 (1951).
25. Koch, R., et al: Branntweinwirt., 3, 65 (1949).
26. Pederson, T.A.: Acta Chem. Scand., 15, 651 (1961).
27. Enebo, L., et al: Arch. Biochem., 11, 383 (1946).
28. Blink, M. and B. Hocevar: Mh. Chem., 84, 1127 (1953).
29. Spoehr, H.A. and H.W. Milner: Plant Physiol., 24, 120 (1949).
30. Iwamoto, H., et al: Bull. Agr. Chem. Soc. Japan, 19, 240 (1955).
31. Raymond, R.L. and J.B. Davis: Appl. Microbiol., 8, 329 (1960).
32. Heide, S.: Arch. f. Mikrobiol. 10, 135 (1939).
33. Raaf, H.: Arch. f. Mikrobiol.: 12, 131 (1941).

34. Schulze, K.L.: Arch. f. Mikrobiol.: **15**, 315 (1950).
35. Spencer, J.F.T., and H.R. Sallans: Can. J. Microbiol., **2**, 72 (1956).
36. Menna, M. Dr: J. Gen. Microbiol., **18**, 269 (1958).
37. Deinema, M.H.: Thesis, Mededel. Landbouwhogeschool Wageningen: **61**(2), 1(1961).
38. Ruinen, J.: Nature, **177**, 220 (1956).
39. Ruinen, J.: Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol. **29**, 425 (1963).
40. Ruinen, J., and M.H. Deinema: Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.: **30**, 377 (1964).
41. Tulloch, A.P.: J. Am. Oil Chem. Soc.: **41**, 833 (1964).
42. Stodola, F.H., and L.J. Wickerham: J. Biol. Chem., **235**, 2584 (1960).
43. Lodder, J.C.: "The yeasts", a taxonomic study: North Holland Publ. Comp. Amsterdam 1187 (1971).
44. 飯塚廣, 後藤昭二: 酵母の分離 同定法(1969)
45. 東京大學: 實驗農藝化學(上) 267 (1960).
46. Somogyi: J. Biol. Chem., **160**, 92 (1945).
47. Amenta, J.S.: J. Lipid Res., **5**, 270 (1964).
48. Folch, J., Lees, M., and Sloane Stanley, G.H.: Federation Proc., **13**, 209 (1954).
49. Sperry, W.M. and Brand, F.C.: J. Biol. Chem., **223**, 69 (1955).
50. Smith, I. and Feinberg, J.G.: Paper, Thin Layer Chromatography and Electrophoresis, Shandon Sci. Co., London, 187 (1965).
51. Metcalfe, L.D. and Schmitz, A.A.: Anal. Chem. **33**, 363 (1961)
52. Hough, L.: Nature **165**, 400 (1950).
53. Spotholz, C.H., Litchfield, J.H., Ordal, Z.J.: J. of Appl. Microbiol., **4**, 285 (1956).
54. Foster, J.W.: Chemical Activities of Fungi, Acad. Press. (1949).
55. Steiner, M.: Handbuch der Pflanzenphysiologie **7**, 209 (1957).
56. Brown, B.E., Meade, E.M. and Butterfield, J.R.: J. Am. Oil Chemists Soc., **39**, 327 (1962).
57. Neumann, P.: Biochem. Z., **308**, 141 (1941).
58. Olcott, H.D. and Fontaine, T.D.: J. Am. Chem. Soc., **62**, 825 (1941)
59. Heumann, W.: Planta, (Fr.), **34**, 1 (1944).
60. Zimmerman, E.C. and Kolsterman, H.J.: J. Am. Oil Chemist's Soc., **42**, 58 (1965).
61. Bass, A.: Chem. Abstr. **47**, 168 (1953).
62. Holloway, P.W., Peluffo, R., Wakil, S.J.: Biochem. Biophys. Res. Commun., **6**, 270 (1962).
63. Tulloch, A.P., Spencer, J.F.T.: C.J. Chem., **42**, 830 (1964).
64. Van Ammers, M., M.H. Deinema, C.A. Landheer and M.H.M. van Rooyen: Rec. Trav. Chim., **83**, 708 (1964).