

# Microbial Oil의 개발 현황



한국식품개발연구원 윤 석 후

## 1. 서 론

미생물을 이용한 유지의 생산은 동식물 유지의 대체자원으로써의 가능성 때문에 1910년대 독일에서 연구가 시작되어 현재에 이르기까지 계속되어 왔으나 현재까지의 미생물 생산공정으로는 값싼 식물성유지에 비하여 경제성이 떨어지기 때문에 공업적인 생산은 이루어지지 않고 있다. 그럼에도 불구하고 최근 들어 미생물유지, 즉 단세포유지(Single Cell Oil) 생산에 관한 연구가 늘어나고 있는 것은 몇가지 관점에서 생각해 볼 수 있다. 첫째로는 전세계의 유지생산이 미주, 지중해 연안국 및 동남아 몇개국에 국한되어 세계적인 유통이 때로는 원활치가 않아 수급과 가격의 변동이 심하고, 둘째로는 생물 공학기술의 발달로 인하여 좀더 경제적인 방법으로 단세포유지를 생산할 수 있는 가능성이 증대되었기 때문이다. 또한 단세포유지는 단세포단백질과는 달리 식용, 사료용 이외에 공업용 원료로도 사용될 수 있으므로 소비자들의 선호도, 법적 규제 등의 문제가 상대적으로 작은 것도 한 이유가 될 것이다. 본 소고에서는 유지를 생산하는 미생물과 그들이 생산하는 유지의 종류, 유지생합성 및 축적 메카니즘, 단세포유지 발효공학 및 유지추출, 단세포유지의 경제성, 단세포유지에 관한 최근의 연구동향에 관하여 살펴보기로 한다.

## 2. 유지축적 미생물과 유지의 종류

미생물내의 유지는 보통의 조건하에서는 세포막 등에 필요한 구조지질을 포함하여 약 10% 내외로 존재하는데, 세포의 노화정도나 환경요인에 따라 그 함량은 변화하게 된다. 유지생산미생물이란 대체로 건조균체를 기준으로 유지함량이 25% 이상

되는 경우를 말하는데, 유지의 범위를 어디까지 하느냐에 따라 변할 수도 있지만 보통은 용매로써 추출이 가능한 물질중 특별한 약리작용을 갖지 않는 것을 말한다. 이 범위에는 fatty acids, glycerides, wax ester, polyester, sterols, carotenoids 등이 포함된다. 유지의 축적은 균체의 내외에서 모두 일어날 수 있는데, 세균, 녹조류, 효모, 곰팡이 등이 유지를 축적할 수 있으며 이들 중 효모나 곰팡이가 주류를 이루고 있다. 그러나 같은 종(species)이라도 균주(strain)에 따라 유지를 축적하는 것과 그렇지 않은 것이 있으며, 시간에 따라 유지축적능력이 없어지는 경우도 있다. 세균중에는 *Nocardia*나 *Mycobacterium*속이 높은 유지함량을 보이며 *Athrobacter* AK 19는 중성지질이 대부분인 80%의 유지를 함유하고 있다. *Alcaligenes*속이나 *Protomonas*속은 저장물질로서 중성지질 대신에 poly- $\beta$ -hydroxybutyrate를 축적하기도 하는데 이 물질은 생물학적으로 분해가 가능한 열가소성 물질로써 그 응용성이 강조되고 있다. *Acinetobacter*속의 한 균주는 wax 성분을 15%까지 생산하기도 하며, *Bacillus*속의 한 균주는 생물유화제나 생물계면활성제로 쓰이는 proteolipid의 일종인 surfactin을 생산하기도 한다. 세균류가 생산하는 유지의 지방산은 palmitic, stearic, oleic acids가 주종(약 85%)을 이루고 있다. 녹조류의 유지함량은 40-70% 정도이고 세균이나 효모보다 다중 불포화지방산의 함량이 특히 높다. 녹조류를 이용한 SCO 공정의 장점은 공정의 가장 큰 경제적 제한요소인 탄소원이 탄산가스로서 무한정 공급될 수 있다는 점인데 이 경우의 제한점은 적당한 대지, 물, 태양, 그리고 따뜻한 기후 등이 된다. *Chlorella vulgaris*의 한 균주는 40%의 유지함량을 갖고 있는 것으로 알려졌고, *Chlorella*나 *Scenedesmus* 등에서는 chondrillas-

terol과 poriferasterol을, *Spirulina*는  $\beta$ -carotene이나 xanthophyll 등의 물질을 얻을 수 있다. *Botryococcus braunii*는 약 30-50%의 유지함량을 나타냈고 그중 20%는 탄화수소이어서 연료용 유지로써 적합할 것이다. *Chlorella vulgaris*의 지방산 조성은 palmitic(26%), palmitoleic(8%), linoleic(34%), linolenic(20%) acids 등이 주요 구성분을 이루고 있다. 세균이나 녹조류에 비하여 효모나 곰팡이의 유지에 관한 연구가 가장 오랫동안 계속되어 왔는데 그 이유는 효모는 SCO 미생물로서 좋은 성질을 많이 갖고 있기 때문이다. 즉 유지함량이 40-70%로 높을 뿐만 아니라 균체의 농도를 쉽게 증가시킬 수 있기 때문이다. 이에 비해 곰팡이의 경우는 유지함량이 상대적으로 낮고, 높은 농도로 배양하기가 어려우며, 복잡한 구조를 갖는 2차 대사산물을 축적하는 단점이 있으나 전분이나 섬유질 등의 다당류를 직접 이용할 수 있다는 점은 유리한 점이다. 효모 중에서 유지 형성능력을 갖는 것은 *Candida*, *Lipomyces*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Trochosporon*속 등이며 모든 유지생산 효모는 ATP: citrate lyase라는 효소를 예외없이 갖고 있다. 주요 유지는 중성지방이 약 90%이며 주요 지방산은 oleic, palmitic, linoleic, stearic acids 등이다. 곰팡이의 경우도 효모의 비슷한 양상을 보이나 지방산조성에 있어서는 효모보다 더욱 다양한 변화를 보인다. 특이한 지방산으로는 *Claviceps* 균주에서 hydroxy fatty acid를 건조균체의 약 62%까지 얻을 수 있고, *Aspergillus fumigatus*는 건조균체의 약 5%의 sterol을 생산한다.  $\beta$ -carotene은 *Blakeslea*나 *Phycomyces*속에서, 코코아버터와 유사한 균체의 지방은 *Mortierella nana*에서 얻을 수 있으며, *Cunninghamella elegans*나 *Thamnidium elegans*는  $\gamma$ -linolenic acid 함량이 높은 유지를 생산하기도 한다. 곰팡이의 유지에 관한 연구는 주로 곰팡이의 다양한 유지조성을 이용하는 쪽으로 진행되고 있다.

### 3. 유지생합성 및 유지축적 메카니즘

유지축적미생물의 유지과생산 메카니즘은 효모

를 중심으로 연구되어 왔는데, 유지생합성 경로는 일반유지의 생합성대사와 크게 다르지 않다. 세포내 유지축적단계를 전형적인 유지생산효모의 하나인 *Rhodotorula glutinis*에서 살펴보면, 배양 시작후 약 18시간 경과후 배지중의 질소원이 고갈되고 세포수의 증가가 정지되면 아직도 많이 남아있는 탄소원을 이용하여 세포내 저장물질인 유지를 생합성, 축적하게 된다. 질소원이 탄소원보다 먼저 고갈되도록 하려면 C/N 비율이 높아야 하는데 일반적인 미생물의 최적 C/N 비율이 7-10인 것이 유지축적을 위해서는 약 50정도가 필요하다. 질소원 이외에도 비타민, 무기염 등이 고갈되어 단백질, 핵산 등이 생산되지 않아 세포수의 증가가 정지되면 유지축적이 일어난다. 즉 비유지생산속도가(specific lipid production rate, g lipid/g lipid-free biomass/hr) 다른 세포성분의 합성속도보다 상대적으로 빠르면 유지축적이 일어나게 된다. 이렇게 생산된 유지는 막구조를 갖는 지방구에 축적되게 된다. 유지축적이 일어나는 단계를 생화학적인 면에서 보면 우선 질소원이 모두 고갈되면 남아있는 탄소원의 대사로 인하여 세포내의 AMP 농도는 떨어지고 AMP 농도에 의존하는 mitochondria내 효소인 isocitrate dehydrogenase의 활성이 줄어든다. isocitrate가 TCA 회로를 통하여 분해되지 못하기 때문에 mitochondria내에 isocitrate와 citrate가 축적된다. 축적된 citrate는 citrate:malate translocase에 의해서 세포질로 이동되어 유지축적효모의 특징적인 효모인 ATP: citrate lyase에 의해서 acetyl CoA와 oxaloacetate로 분해된다. citrate의 이동은 malate의 이동과 반대방향으로 일어나는데 malate는 oxaloacetate로 부터 형성된다. 위 과정에서 생긴 acetyl CoA는 지방산 생합성경로인 acetyl CoA carboxylase의 작용을 시작으로 지방산으로 합성된다. 유지생합성에 필요한 환원력은 주로 pentose phosphate pathway에 의해서 공급된다. 포도당을 기질로 사용하였을 때의 유지수율은(lipid yield, g lipid/g substrate) 이론적으로는 0.329이나 보통의 수율은 0.2정도이다. 일반적인 미생물의 최대균체수율은 이론적으로는 약 0.85정도이나 실제로는 0.5정도이다. 그러므로 성장단계에서 유지축적단계로 넘

어가게 되면 유지를 포함한 전체 균체수율은 유지 축적이 계속될수록 점점 낮아지게 된다. 세포내의 최대유지함량은 세포 전체에 지방구가 뻘뻘히 들어 있을 때인데 그 조건이나 이유는 아직 모르고 있다.

#### 4. 단세포유지 발효공학 및 유지추출

단세포유지 발효는 최종목적물질이 균체내에 존재한다는 점에서 단세포단백의 발효와 유사한 점이 많다. 다만 다른 점은 적당한 배양 후 질소원을 고갈시켜 유지함량을 높이는 일과 발효 후에 세포벽을 파괴하여 유지를 추출해 내는 일이다. *Rhodotorula glutinis*는 배분식 배양중에 질소원 고갈로 인하여 유지축적단계에 접어들면 유지를 제외한 균체량은 증가하지 않고 유지함량만이 계속 증가하며 50-60%에 이르게 된다. 균체수율은 유지축적이 진행됨에 따라 감소하게 되지만 산소에 대한 균체수율은 증가하게 된다. 유지축적패턴으로 보면 연속배양에 의한 유지생산이 어려운 것으로 보이나 최대비성장속도의 25-30% 정도의 속도로 유지시키면 35-40%의 유지함량을 얻을 수 있다. 일반적인 유지축적 미생물은 탄소제한조건에서는 유지를 축적하지 않으나 *Cryptococcus terricolus*는 탄소제한조건의 연속배양에서도 유지를 축적한다. 그러나 비유지생산속도는 질소제한 조건에서 더 높았다. 또한 질소제한 연속배양의 비산소흡수속도는 유지축적이 일어나지 않는 탄소제한조건보다 훨씬 낮아서 일반 미생물의 경우와는 다른 양상을 보이고 있다. 일반적으로 회분식 배양보다 연속배양이 유지의 용적생산성은 높으나, SCO의 경우 SCP보다 최대비성장속도가 낮고 최대성장속도의 25-30% 정도로 조업해야 한다는 점에서 생산성은 훨씬 낮아지게 된다. 이렇게 낮은 생산성을 높이기 위하여 반복분식 고농도 배양을 할 경우 유지함량 56%의 균체 약 150g/l를 얻을 수 있다. 산소제한조건에서 질소원이 고갈되면 유지축적과 함께 산소의 요구량이 줄어들게 되어 산소제한조건에서 벗어나게 된다. Bioreactor의 경우 생산성이 산소 전달능력으로 결정된다는 사실을 감안하면 SCO의 유지축적단계시 낮은 산소요구량은 생산성의 증가로 직접 연결될 수 있

다. 일반적으로 종합하여 보면, 대개의 유지축적 미생물의 균체수율은 0.5, 유지수율로는 0.2(유지함량 50%) 정도가 되며 유지수율은 최적조건에서는 배양방법에 관계없이 같은 수준으로 유지된다. 유지의 생산성은 고농도 연속배양이나 반복분식 고농도 배양이 유리할 것으로 사료된다.

SCO 공정의 최종목적은 좋은 지방산조성을 갖는 유지를 경제적으로 생산하는 것이다. 최종유지의 성질에 영향을 주는 발효조건에는 비성장속도, 기질의 종류, 기질의 농도, 온도, 용존산소 등이 있다. 비성장속도에 의한 지방산조성의 변화는 기본적으로 유지함량의 변화에 따른 구조유지와 저장유지의 상대함량이 변화하기 때문인 것으로 생각된다. 질소제한 속배양에서 비성장속도의 감소와 함께 유지의 불포화도가 감소하는데, 비성장속도 자체의 영향이라기 보다는 유지함량의 변화에 영향을 주어서, 즉 유지함량이 증가할수록 저장유지의 비율이 높아지므로 생긴 영향이라고 생각된다. 일반적으로 말하면 유지함량이 증가하면 유지의 불포화도는 감소한다. 기질의 종류는 유지의 함량 및 지방산조성에 큰 영향을 끼친다. n-alkane을 기질로 하면 지방산의 길이가 n-alkane의 길이와 같아진다. 이와같이 원하는 지방산 함량이 높아지도록 직접 기질이나 지방산을 직접 넣어주어 발효시키는 방법이 주목을 받고 있다. 기질의 농도는 C/N 비율의 변화와 함께 유지함량에 변화를 주겠지만, 일단 잔존 탄소에너지원이 충분하다고 하면 그 농도에 의한 변화는 구조유지의 저장유지의 비율을 변화시키지 않는 한 거의 없을 것으로 생각된다. 배양온도의 상승은 인지질의 환원도를 증가시키지만 중성지질에는 큰 영향이 없을 것으로 생각된다. 연속배양에서 용존산소의 증가가 유지함량을 증가시키고 지방산조성도 약간 변화시키지만 유지의 불포화도는 거의 변하지 않는다.

유지추출과정이 SCP에는 없는 SCO 공정의 후방공정인데, 곰팡이나 녹조류는 세포벽이 효모만큼 강하지 않아 용매추출법이 가능하나 효모는 여러가지 추출법의 연구가 필요하다. 효모의 유지추출은 일단 세포벽을 파괴한 후 유지를 추출하게 되는데 세포벽 파괴는 산과 알칼리를 이용하는 화학적 방법, 기계적 방법, 세포벽 용해효소를 이용하

는 방법 등이 있다. 보통 chloroform/methanol로 유지를 추출후 세척과정을 거치면 약 10%의 불순물이 제거된다. 추출된 유지의 조성은 균주, 사용기질, 배양조건에 따라 달라지지만 *Candida*와 *Rhodotorula*는 팜유 및 땅콩기름과 유사한 지방산조성을 갖는다.

## 5. 단세포유지의 경제성

SCO 공정의 유지수율은 약 0.2이므로, 즉 1 Kg의 포도당으로 0.2 Kg의 유지를 생산하므로 SCO 유지의 경제성은 거의 전적으로 탄소기질의 가격에 의존하게 된다. 따라서 사용기질은 농수산물 폐기물처럼 거의 값이 안나가는 것이어야 한다. 이외에는 셀룰로즈, 전분, 유당 등이 가능성 있는 기질이 될 수 있다. SCO 공정의 경제성을 결정하는 주요 변수는 SCP와 마찬가지로 기질의 에너지 함량 대 가격에 의해 생산단가에 영향을 미칠 것이다. SCO나 SCP가 경쟁해야될 상대가 값이 비교적 싼 대두유와 대두박이라고 가정할 때, 대두유의 가격이 대두박의 가격보다 약 3.5배가 되므로, SCP 공정에서는 1톤의 포도당에서 0.3톤의 단백질만을 생산하는 반면, SCO 공정에서는 0.1톤의 단백질을 포함하여 약 3.5배의 부가 가치를 갖는 유지를 0.2톤을 더 생산하므로 SCO 공정이 SCP 공정보다 항상 경제성이 높음을 알 수 있다. 현재까지 알려진 균주의 유지수율, 발효단가를 토대로 SCO의 생산가격을 계산하여 보면 methanol이나 molasses가 경제성이 있는 기질로 생각되어 진다.

## 6. 단세포유지에 관한 최근의 연구동향

지금까지의 내용을 토대로 살펴보면 미생물유지의 생산은 값비싼 동식물성 유지의 대체품, 다른 데서 얻기 어려운 특수한 성질 및 조성을 갖는 특수유지, 폐기물 처리시 얻어지는 부산물로서의 유지 등에 응용될 것으로 생각된다. *Rhodotorula*나 *Mortierella*를 이용하면 값비싼 코코아버터의 대체품을 얻을 수 있고, 우리의 목적에 맞는 유지를 생산하도록 유도하는 발효공정 등을 생각할 수 있다. 특수유지로서 관심을 끄는 것은 r-linolenic acid, EPA와 DHA 등의 고도불포화 지방산, 스테롤, wax ester, glycolipid ester, PHB 등이 있다. 농수산물 폐기물이나 식품산업 폐기물 등의 생물학적 폐수처리를 겸하여 SCO를 키우는 것이 공업용유지로서의 이용 가능성이 높으며, 식용 SCO의 생산을 위하여는 치즈 whey 등의 부산물 사용이 적당할 것이다. 또한 저가의 탄화수소에서 공업용유지 생산이 가능할 것이다.

## 참고문헌

1. Ratledge, C., Lipids, in "Biotechnology", ed. H. Pape and H.J. Rhem, Vol.4, pp.185-214, Verlag-Chimie, 1986.
2. Rattray, J.B.M., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **61**, 1701, 1984.
3. 윤석후, 미생물을 이용한 유지의 생산, 식용유지공업의 신기술, 제9장, 한국식품과학회, 1987.