

## *Rhodotorula graminis* SW 214의 세포외 지방질 생산에 관한 연구

김성연·고 경·박성오  
서울여자대학교 식품과학과

### Production of Extracellular Lipid by *Rhodotorula graminis* SW 214

Sung-Yeun Kim, Kyoung Kough and Sung-Oh Park

Department of Food Science, Seoul Woman's University, Seoul, Korea

#### Abstract

A lipid producing yeast was screened from leaves of *Albabiscus* and was identified as a *Rhodotorula graminis* SW 214. During the shaking incubation of 8 days at 25°C, the yeast produced extracellular lipids of 7.3 g/l of the media. The relative concentration of carbon and nitrogen sources in the media influenced the extracellular lipid production greatly. When with nitrogen sources in the media were almost exhausted for growth of the yeast the sufficient carbon sources, the lipid production proceeded vigorously. Eight days of batch cultivation with 8% glucose, 2.5 g/l of yeast extract,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1 g/l),  $\text{MgSO}_4$  (0.2 g/l) and pH 6 gave maximum biomass and extracellular lipid production of 8.05 g/l and 8.89 g/l, respectively. The acid value, saponification value, the iodine value, and the unsaponifiable matter of the extracellular lipids of *Rhodotorula graminis* SW 214 were 2.6, 534, 5.1 and 2.4, respectively. Lipid was constituted 75.2% triglyceride, 5.9% free fatty acid, 10.8% phospholipid, 4.9% esterified sterol and 3.3% free sterol. Major fatty acids found were 3-hydroxypentadecanoate, 3-hydroxyhexadecanoate, trans-9-octadecanoate, cis-9-hexadecanoate (hydroxy palmitic), 15-methylhexadecanoate (oleic), 18-methylno-nadecanoate, octadecanoate (stearic) and 3-hydroxytridecanoate.

Key words: Extracellular lipid, oleaginous yeast, screening, *Rhodotorula graminis* SW 214, fermentation condition, batch cultivation

#### 서 론

지질을 생산하는 미생물로는 조류, 세균, 곰팡이 및 효모가 있는데 영양학적, 공업적 목적에 적합한 지질 생산균에 대한 선택의 기준에서 세균은 *Mycobacteria*와 *Corynebacteria* 같은 지질 함량이 높은 균주도 있지만 독성이 문제되었고<sup>(1)</sup>, 해조류는 성장의 속도가 느리고 특별한 환경조건에 지질 생산량이 10%가 넘지 않는 비실용성으로<sup>(2)</sup> 배제되며, 효모와 곰팡이에 의한 지질 생산 연구가 주로 진행되고 있다. 미생물의 지질 생산능력 평가에서는 미생물지질의 양 뿐만 아니라 지질의 특성, 지질생산에의 기질의 이용률도 고려되어 일반적으로 기질의 이용률에 있어서는 효모가 더 우수하다. 다가 불포화 지방산은 곰팡이가 더 많은 함량을 나타낸다고 보고되었다<sup>(3)</sup>. 유지자원의 생산방법의 하나로서 발효법에 의한 유지의 생산을 시도할 목적으로 박<sup>(4)</sup>은 세포내 지질을 다량 생산하는 효모인 *Rhodotorula glutinis* var-*glutinis* SW 17과 세포외 지질을 다량 생산하는 *Rhodo-*

*rula gracilis* SW 54에 의한 지질 생산에 관한 연구를 보고하였으며 신<sup>(5)</sup>은 *Mucor plumbeus*의 배양조건 개선 시험과 대량 배양을 실시할 경우 탄소원으로 이용할 고구마 전분의 분리 및 액화 시험을 실시하여 보고하였다. 또한 Yoon<sup>(6)</sup>은 *Rhodotorula gracilis* NRRL Y-1091을 이용하여 회분식 및 연속식 배양, 지질의 합성과 대사 경로에 대해 연구하였으며 반<sup>(7)</sup>은 미생물의 고농도 배양에 대한 연구를 하였다. 고<sup>(8)</sup>는 돼지 감자 중의 inulin을 이용하여 값싼 탄소원으로부터 지질을 다량 생산하는 *Rhodotorula glutinis* SW 204를 분리 동정하고 이들의 특성을 연구하였으며 최<sup>(9)</sup>는 *Rhodotorula gracilis* NRRL Y-1091로 철, 마그네슘, 구리, 판토텐산 등 배지성분에서 무기질 성분 및 비타민 성분을 변화시켜 이 성분들이 지질과 지방산 조성에 미치는 영향에 관하여 연구하였다.

미생물 지질 생산을 위한 가장 중요한 인자 중 하나는 C : N 비율이다. Naquib와 Hanna<sup>(10)</sup>은 *Penicillium notatum*의 경우 공급되는 질소량이 적으면 성장이 저해되어 지질 생산도 낮고 질소량의 공급이 너무 많으면 단백질 함성이 증가함과 동시에 균체 성장이 활발하여 지질함성은 낮다고 보고하였다. Botham<sup>(11)</sup>은 C : N 비율이 높거나 질소원이 부족한 상태에서 지질 함량이 가장 많

Corresponding author: Kyoung Kough, Department of Food Science, Seoul Woman's University, Nowon-ku, Seoul 139-774, Korea

았음을 보고하였다. 미생물에 의한 세포내 지질 생산에 관한 연구에 비해 세포외 지질 생산에 관한 연구는 1956년에 시작되었는데 Spencer와 Sallans<sup>(12)</sup>는 *Torulopsis*속 균주로부터 생산된 세포외 지질을 관찰하였으나 이 지질을 효모 세포의 자기 소화에 의하여 생긴 세포외 지질이라고 하였다. Deinema<sup>(13)</sup>는 Newzealand산 식물염에서 2개 균주의 효모를 분리하고 이들 효모가 세포외 지질을 축적한다고 처음으로 보고하였다. 이것을 기초로 하여 분리된 *Rhodotorula graminis*와 그 밖에 여러 균주의 효모에 대하여 세포 내외 지질 생산에 대한 연구와 지질분석에 대하여 연구 발표하였으나 합성경로와 원인, 조건 등에 대한 연구는 미흡한 상태이다.

본 연구에서는 세포내 지질을 추출하기 위한 효모 세포벽 분해과정이 필요 없고 단지 배지내에 용출된 세포외 지질을 용매로 추출 가능한 세포외 지질 생산 효모를 자연 중의 식물 노엽에서 분리 동정하여 합성 배지에서 최적 생육 조건과 지질 특성 및 온도에 따른 지방산의 조성변화, 생성된 지질의 화학적 특성을 살펴 보았다.

## 재료 및 방법

### 지질 생산균의 분리 선정

전국 각 지역에서 채집한 98종의 각 식물노엽 약 1g을 각각 잘게 썰어서 멸균시킨 균 선발 용액 (0.3%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.3% sodium propionate) 10 ml에 넣고 25°C에서 2~3일간 정치배양하여 세균 및 곰팡이를 도태시키고 효모 균만을 선균한 배양액을 얻었다. 이 배양액을 적절히 희석하고 상등액 1 ml를 박<sup>(4)</sup>의 배양기(glucose 20 g/l,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g/l,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2 g/l, sodium propionate 3 g/l, agar 20 g/l, pH 5.8)에 접종하고 25°C에서 3일간 평판배양하여 나타난 적색 또는 적황색 독립 colony를 취하여 malt agar(malt extract 20g, beef extract 3g, water 1,000 ml) tube에 배양보관 하였다. 각 분리 균주에 대하여 세포외 지질 생산량을 측정하기 위하여 지질생 산배지(glucose 40 g/l, yeast extract 2.5 g/l,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g/l,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2 g/l, pH 6.0) 100 ml를 500 ml용 진탕 flask에 분주 살균하고 분리보관된 각 균을 접종하여 24°C에서 8일간 진탕배양(oscillation 165/min, stroke 5 cm) 하였다. 그 중 지질생산량이 2 g/l 이상이 되는 균주만을 선정하여 본 연구에 사용하기로 하였다.

### 효모의 동정

세포외 지질 생성능이 우수하여 선정한 효모의 동정은 Kreger-van Rij<sup>(14)</sup>의 동정법에 준하여 세포의 형태와 크기, colony의 형태와 구조, pellicle, ring 및 sediment의 형성, pseudomycelium 및 arthrospore의 형성, 당류발효성, 탄소원의 자화성, nitrate 자화성, vitamin 요구성, starch 생산성, urase 형성 등을 조사하였다.

### 지질생산의 배양 조건

최고량의 지질을 생산하는 배양일수를 결정하기 위하여 지질생성 배지에 분리균주를 접종하고 25°C에서 9~10일간 진탕배양(oscillation 165/min, stroke 5 cm)하면서 매일 효모의 성장(효모의 건물량, biomass)과 지질 생산량을 측정하였다. 배양액 중의 질소원 및 탄소원의 측정은 지질 생성 배지에서 효모를 배양하면서 1일 1회 배양액을 원심분리하고 다음에 균체를 제거한 여액에 대하여 환원당은 DNS법<sup>(15)</sup>에 따라 측정하고 질소함량은 micro Kjeldahl 법<sup>(16)</sup>에 따라 배양액 중의 이들 성분의 잔량을 측정하였다. 배지중의 질소원과 glucose 농도의 영향을 검토하기 위하여 지질생산배지중에 질소농도를 0.15~0.525 l, glucose농도는 20~100 g/l 범위의 배양액에서 효모를 8일간 진탕배양한 후 효모 건조균체량과 지질생산량을 측정 검토하였다. 또한, 효모의 세포외 지질생성 배양액 중의 질소원으로서 유기태와 무기태 질소원의 효과를 비교하였다. 유기태 질소원의 배양액은 yeast extract 2.5 g/l와 pepton 3.34 g/l(질소로는 0.375 g/l)를 질소원으로 사용하였으며 한편 무기태의 것은( $\text{NH}_4$ )<sub>2</sub> $\text{SO}_4$  2.12 g/l,  $\text{KNO}_3$  1.62 g/l(질소로는 0.225 g/l)를 사용하였다. 이 4종의 배양액에 각각 효모를 접종한 후 pH 6.0에서 8일간 진탕배양하고 각 균주에 대한 건조균체량과 세포외 지질생산량을 측정하여 상호비교하였다. 배양액의 pH 영향을 보기 위하여, 0.1N HCl과 0.1N KOH 용액으로 pH가 3.5로부터 7까지 조절된 각종 pH의 지질 생산배지에 효모를 8일간 진탕배양하면서 1일 1회씩 건조균체량과 세포외 지질 생산량을 측정하였다.

### 지질의 분리 및 분석

8일간 진탕배양한 배양액을 냉각원심분리(4~8°C, 6,000 rpm, 20 min)하여 상등액을 분리한 다음 석유 ether(b.p. 60~80°C)와 diethylether 혼합용매(1:1) 약 50 ml를 넣어 다시 위와같은 방법으로 2회 냉동원심분리하여 지질층을 추출하여 보관하고 균체는 60°C의 진공 건조기에서 건조하였다. 또한 원심분리하여 얻은 상등액을 분별 깔대기에 넣고 석유 ether와 diethylether의 혼합용매를 사용하여 지질을 추출하고 이것을 위의 액과 합하여 회전진공증발기(rotary vacuum evaporator)를 이용하여 용매를 증발제거시키고 지질을 정량하였다. 산값, 비누화값, 요오드값, 비비누화물 등은 AOCs 방법<sup>(17)</sup>에 따라 측정하였다. 박<sup>(4)</sup>의 방법으로 세포외 지방질을 추출하였으며, column chromatography에 의하여 분리한 각각의 지질을 TLC plates(silica gel 60, Merck)에 시료 지질을 spotting 하여 n-hexane : diethylether : glacial acetic acid(80 : 20 : 1)의 전개용매하고 iodine vapor에 의해 발색시켜, 지질 종류를 확인하였다. 표준 지질은 tripalmitin, palmitic acid, lecithin, cholesterol, cholesterol palmitate를 사용하였다. TLC에 의하여 분리한 각 지질은 Amenta<sup>(18)</sup> 방법에 의하여 정량하였고,

이때 Spectrophotometer(Bausch & Lomb)를 사용하여 최대흡수 부위인 350 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

생산된 지질은 Metcalfe 등<sup>(19)</sup> 및 Luddy 등<sup>(20)</sup>의 변법으로 다음과 같이 처리하였고, 지방산 정량은 gas liquid chromatography(GLC) 방법<sup>(21)</sup>으로 Hewlett-Packard 5890A를 사용하여 column은 silica capillary column(25×0.2 mm id, packed with ultra 25% phenylmethyl silicon) 사용하였고 detector는 flame ionization detector, 온도는 injection port, 250°C ; detector port, 300°C 로 하였다. Gas flow rate는 carrier gas H<sub>2</sub> 30 ml/min, air 400 ml/min, N<sub>2</sub> 30 ml/min로 분리 정량하였다.

## 결과 및 고찰

### 지질 생산균의 분리 동정

98종의 식물노염에서 분리된 균주들 중 10종의 *Rhodotorula*속 효모 균주에 대하여 세포외 지질 생산량을 조사하였다. 이 중 제주도 여미지 식물원에서 채취한 알바비스커스 앞에서 분리된 *Rhodotorula*속 효모균주가 세포외 지질 생산량이 가장 많았으므로 이 균주(strain No.214)를 선발하였다. 이 효모 균주의 배양액내의 지질 생산량은 약 6~7 g/l으로 *Deinema*<sup>(13)</sup>가 *Rhodotorula graminis*와 *Rhodotorula glutinis*에서 최고 2 g/l의 세포외 지질생산을 보고한 것보다 3배 가량 많은 우수한 균주이었다. Strain No.214 균주에 대하여 배양학적, 형태학적, 생리학적 특성을 조사한 결과는 malt extract에서 3일간 25°C 에서 배양한 결과 cell은 둥글었으며(2.5~4.0×4~8)µm 약간의 침전을 형성하였다. 한달 후에는 진한 오렌지색이 되었고 침전 형성이 많았다. Malt agar에서 균을 한달간 배양한 결과 색은 coral red였고, 표면은 매끄러웠으며 texture는 끈적였다. Potato-glucose agar에 slide 배양한 결과 pseudomycelium이 형성되지 않았다. Fermentation은 일어나지 않았으며 erythritol, melezitose, melibiose를 이용하지 않았다. 비타민으로는 thiamine을 필요로 했으며 starch는 형성되지 않았다. 또한 42°C 이상에서는 성장하지 않았으며 urease를 형성하였다. 이상의 결과로 보아 선발 균주 strain No.214는 *Rhodotorula graminis* SW 214로 동정 되었으며, 이 균주는 biofactor로서 thiamine을 필요로 하였다. 또한 pantothenic acid와 biotin, pyridoxine 도 성장에 도움을 주었으므로 이들을 함유한 yeast extract를 첨가했을 때 균 성장이 좋았다.

### 지질 생산의 최적조건

*Rhodotorula graminis* SW 214를 지질 생성 배지에 접종하고 25°C 에서 진탕배양하면서 배양 일수가 경과함에 따른 지질 생산량의 변화와 배양액 중의 glucose 및 질소원 소모량의 변화를 조사한 결과는 Fig. 1와 같다. 세포외 지질 생산균인 *Rhodotorula graminis* SW 214의 배양 일수에 따른 효모 건조균체량과 세포외 지질 축

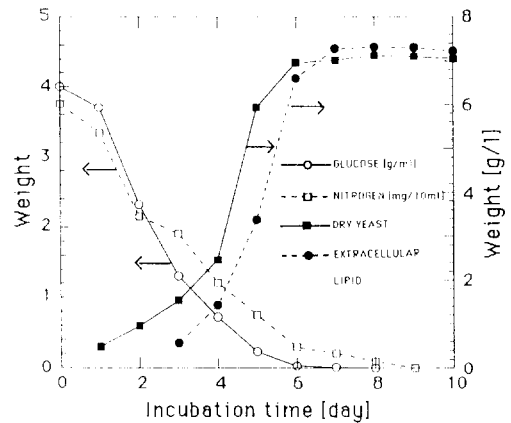


Fig. 1. The production of extracellular lipid and the consumption of glucose and nitrogen sources by *Rhodotorula graminis* SW 214 in the medium

적량을 Fig. 1에서 보면 처음 1일은 균체 증식이 거의 없는 유도기를 보였으며 glucose와 질소량의 소모량도 비교적 적었다. 2일째부터 급속한 균체의 증식에 비례하여 glucose와 질소원의 소비량도 급속히 증가함을 볼 수 있었으며 3일째부터 세포외 지질이 생성되기 시작하였으며 4일째부터는 이미 지방구를 육안으로 확인할 수 있었고 6~7일경에 직경이 2~3 mm인 지방구들이 배양액 저면에 침전되는 것을 볼 수 있었다. 배양액 중의 glucose 함량은 균 배양후 5일 이후부터 거의 고갈되었으며 8일째 완전히 고갈되었다. 건조균체량은 glucose가 완전히 소모된 8일에 7.12 g/l로 가장 많았고 그 이후에는 약간 감소되는 경향을 보였다. 배지내 지질 축적량은 7.31 g/l로 건조 균체량과 거의 비례하여 증가하였고 7일부터 10일까지는 7.21~7.31 g/l로 거의 변화가 없었다. 이 결과로 보아 효모 증식이 1일째부터 증가되는데 비하여 세포외 지질의 축적은 3일째부터 이루어지므로 단백질 합성이 저장물질 즉 지질의 축적보다 선행함을 알 수 있었다. 또한 glucose 및 nitrogen이 효모에 섭취되어 균체물질 및 지질의 생합성에 이용되고 배양액내의 glucose 및 nitrogen이 고갈되었을 때 효모의 증식이 정지되고 지질의 증가도 정지됨을 알 수 있었다. 한편 8일까지 최고량으로 축적되었던 지질은 그후 배양액의 nitrogen이 고갈된 후 계속해서 배양했을 때 8~10일 사이의 단기간에는 다시 소모되지 않음을 보여주고 있다. 그러나 박<sup>(22)</sup>은 *Rhodotorula graminis* SW-54로 그 이후 신탄배양을 계속하면 세포내외 지질은 다같이 효모에 의하여 재소모되어 90일 전후에 완전히 소모되었고 접종 후 8일경에 yeast extract 0.5g/100 ml 또는 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.2 g/100 ml를 가하여 계속 신탄배양하면 질소원 첨가 후 25일 이내에 세포내외 지질이 완전히 고갈되었는데 이는 탄소원이 고갈되었을 때 생산된 지질이 다시 효모의 에너지원 및 체단백질 합성에 재 이용되었기

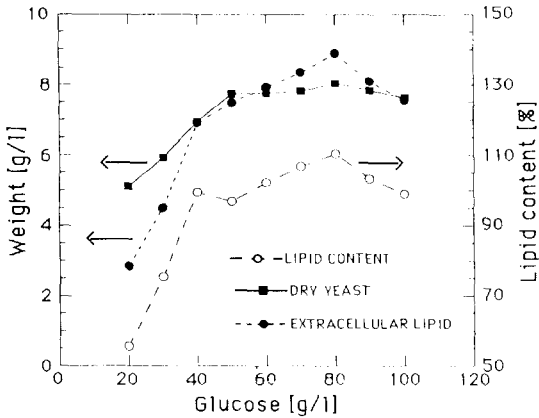


Fig. 2. Effect of glucose concentration on cell biomass and lipid content of *Rhodotorula graminis* SW 214 grown in glucose medium

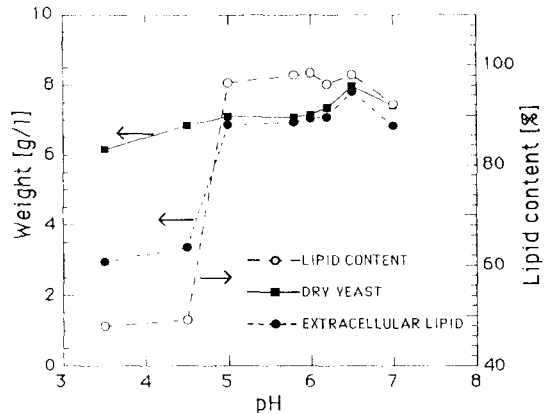


Fig. 4. Effect of pH on the cell biomass and lipid content of *Rhodotorula graminis* SW 214 grown in glucose medium

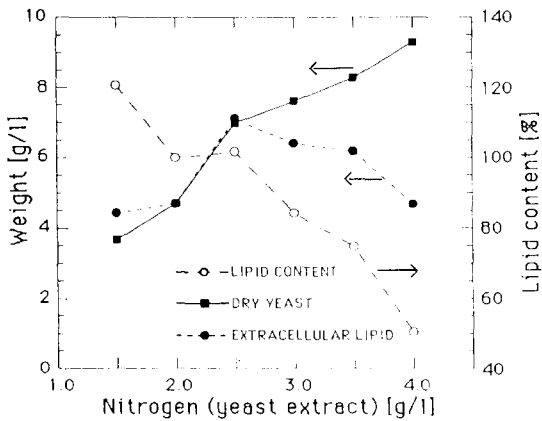


Fig. 3. Effect of nitrogen concentration on cell biomass and lipid content of *Rhodotorula graminis* SW 214 grown in glucose medium

때문이라고 보고하였다.

*Rhodotorula graminis* SW 214를 탄소원인 glucose 농도와 질소원인 yeast extract 농도를 다르게 한 각종 배지에 각각 접종하고 8일간 배양 하였을때 효모 건조 균체량과 세포의 지질 생산량의 변화를 조사한 결과는 Fig. 2, 3과 같다. Yeast extract 농도를 2.5 g/l로 고정시키고, glucose 농도를 변화시켰을 때 효모 건조 균체량과 세포의 지질 생산량은 Fig. 2와 같다. Glucose 농도를 20 g/l 첨가하였을 때 세포의 지질 생산량은 2.84 g/l이었으나 80 g/l로 증가시켰을 때 8.89 g/l로 약 3배 가량 증가하였으며 효모 건조 균체량도 glucose 농도가 증가함에 따라 증가하였다. 그러나 glucose 농도는 90~100 g/l 범위로 증가하였을 때 세포의 지질 생산량과 효모 균체량은 오히려 감소하는 경향을 보였다. 이는 Boulton과 Ratledge<sup>(22)</sup>에 의한 일반 효모배양 최적 당농도인 4%

보다는 매우 높았으나, *Rhodotorula gracilis*<sup>(23)</sup>의 지질 생산을 위한 최적 당농도가 8% 였다는 결과와 일치하였다. 또한 glucose 농도가 90~100 g/l 범위에서 효모 건조 균체량의 감소는 당농도가 높아지면 삼투압의 영향으로 균체 증식이 억제된다고 보고한 Shimi<sup>(24)</sup>의 실험 결과와 일치하였다. Glucose 농도를 4%로 고정시키고 질소원인 yeast extract를 1.5~4.0 g/l 범위로 증가시켰을 때 효모 건조 균체량은 3.67 g/l에서 9.30 g/l로 현저하게 증가하였고 세포의 지질 생산량은 yeast extract 농도가 1.5~2.5 g/l 범위에서는 증가하였으나, 그 이상의 농도에서는 오히려 감소하였다(Fig. 3). 이 결과에 의하면 질소원을 이용한 단백질 합성이 glucose를 원료로 한 세포의 지질의 합성보다 우선적으로 이루어지는 것을 알 수 있는데 이것은 박<sup>(4)</sup>의 결과와 일치하였다. 한편 yeast extract의 농도를 고정시키고 glucose 농도를 증가시켰을 때 효모의 증식과 지질의 생성이 다같이 활발하게 증대되었는데 이 경우는 질소원이 효모의 증식에 이용된 후에도 지질 합성에 사용될 수 있는 탄소원이 남아 있기 때문이라고 생각된다. 그리고 지질 생합성은 질소와 glucose 비율이 1:200(w/w)일 때 최적조건이 되며 이보다 질소량이 많으면 단백질 증식 즉 효모의 증식이 더욱 활발해진다고 하였는데 이는 본 실험의 결과를 뒷받침 하여 주는 것이라고 할 수 있다.

pH에 대한 효모 건조 균체량과 세포의 지질 생산량은 Fig. 4와 같다. pH 6.0~6.5에서 효모의 건조 균체량과 세포의 지질의 생산량이 가장 많았고 pH 6.0~6.5보다 산성 또는 염기성 배지에서는 균체 생산량이 감소하였으며 지질 생산량도 현저히 감소하였다. 특히 pH 3.5, 4.5에서 효모 건조 균체량은 pH 6.0에서와 별 큰 차이가 없는 반면 지질 생산량은 pH 3.5, 4.5에서와 pH 6.0에서는 큰 차이가 있었다. 또한 pH 7에서 지질 생산량 및 건조 균체량이 감소하였는데 이 결과는 박<sup>(4)</sup>이 보고한 *Rhodo-*

**Table 1. Effect of nitrogen source on cell biomass and lipid content of *Rhodotorula graminis* SW 214 grown in glucose medium**

Source of nitrogen (g/l)	Biomass (g/l)	Wt. of extracellular lipid (g/l)	Content (%)
Yeast extract(2.5)	7.16	7.03	112.2
Pepton (3.34)	6.10	3.65	59.8
KNO <sub>3</sub> (1.62)	6.10	0.08	1.0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (2.12)	6.14	0.59	9.6

*torula graminis* SW-54가 pH 5~6에서 효모 균체량과 세포외 지질 생산량이 많고 이보다 산성 또는 염기성 배지에서 효모 건조 균체량과 지질 함량이 감소했다는 결과와 비슷한 경향을 보였다.

지질 생산 배지 중에 질소원으로서 yeast extract 2.5 g/l, pepton 3.34 g/l, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.12 g/l 및 KNO<sub>3</sub> 1.62 g/l를 각각 첨가하여 pH 6에서 8일간 진탕 배양하였을 때 효모 균체량과 지질 생산량은 Table 3과 같으며 질소원으로서 yeast extract를 사용할 때 건조 균체량은 7.16 g/l이고 세포외 지질 생산량은 7.03 g/l로 가장 많았고 pepton과 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, KNO<sub>3</sub>에 의한 균체 생성량은 서로 비슷하였으나 지질 생산량은 현저히 감소함을 알 수 있었다. 특히, KNO<sub>3</sub>를 사용하였을 때 지질 생산량은 0.08 g/l로 지질 함량이 가장 낮았다. 이는 박<sup>4)</sup>이 질소원으로 KNO<sub>3</sub>를 사용한 결과 *Rhodotorula graminis* SW-54의 세포외 지질 함량이 현저히 감소한다는 보고와 일치하였다. 박<sup>4)</sup>은 이러한 현상의 원인을 nitrate가 효모의 단백질 합성이나 지질 합성에 이용되자면 NO<sub>3</sub> → NH<sub>4</sub>의 단계를 거쳐야 하므로 KNO<sub>3</sub>는 질소원으로 부적당하여 유기태 질소원인 amino기나 무기태 질소원인 NH<sub>4</sub> 보다는 그 효율이 떨어지는 것이 이라고 추정하였다.

배양온도가 *Rhodotorula graminis* SW 214의 균체증식과 지질 생산에 미치는 영향을 검토한 결과는 Fig. 5와 같다. Figure에서 보는 바와 같이 온도별 변화에 따른 균체량은 15°C 에서 7.24 g/l로 가장 높았고 지질 함량은 25°C 에서 7.36 g/l로서 가장 높았다. 최적 균 성장온도와 최고 지질 생산온도는 일치하지 않았으나 이 균주의 균체량과 지질 함량을 동시에 고려할 때 최적 배양온도는 25°C 였다. 위의 결과는 *Rhodotorula glutinis* SW-204의 최적 배양온도가 25°C 라는 고<sup>6)</sup>의 보고와 같았다.

### 지질의 특성

*Rhodotorula graminis* SW 214로부터 생산한 지질의 산값, 비누화값, 요오드값 그리고 비비누화물량은 각각 2.6, 534, 5.12, 2.4이었다. 이를 미정제 팜기름(crude palm oil), 미정제 콩기름(crude soy oil)의 등과 비교한 결과가 미생물 지질의 산가는 2.6로서 0.6~1.4인 미정제 콩기름보다는 높았으나 미정제 팜기름보다 낮았으며 10.6

**Table 2. The lipid components of the extracellular lipid of *Rhodotorula graminis* SW 214**

Lipid components	<i>Rhodotorula graminis</i> SW-214 extracellular lipid (%)
Triglyceride	75.2
Free fatty acid	5.9
Phospholipid	10.8
Esterified sterol	4.9
Free sterol	3.3

**Table 3. Component fatty acid of extracellular lipid of *Rhodotorula graminis* SW 214**

Fatty acid	Content (%)
C13i 3-OH (3-hydroxytridecanoate)	1.8
C16:1 <sup>9</sup> (cis-9-hexadecenoate)	10.9
C15 3-OH (3-hydroxypentadecanoate)	37.9
C16:0 3-HO (3-hydroxyhexadecanoate)	20.8
C18:1 <sup>9</sup> (trans-9-octadecanoate)	11.5
C18:0 (octadecanoate)	2.6
C17:0i (15-methylhexadecanoate)	9.8
C20i (18-methylnonadecate)	4.6

인 *Penicillium javanicum*<sup>25)</sup>의 지질, 12.3인 *Fusarium solani* SW 3~2<sup>34)</sup>, 11.2~12.8인 해바라기씨 기름<sup>26)</sup> 보다는 낮았다. 또한 고<sup>6)</sup>가 연구한 *Rhodotorula glutinis* SW 204가 생산한 세포내 지질의 산가 14.6인 경우 보다는 낮았는데 이는 세포내 지질인 경우 효모 세포막을 파괴하기 위해 HCl 등으로 산처리 과정에서 지질이 분해되어 유리 지방산 양이 많음에 비해 세포외 지질 생산 균인 본 균주의 유리 지방산은 비교적 적을 뿐 아니라 추출과정이 비교적 간단하여 지질의 산화가 덜 진행되었다고 생각할 수 있다. 비누화 값은 524로서 189~195인 미정제 콩기름과 196~202인 미정제 팜기름보다 매우 높은 값이었으나 554인 *Rhodotorula glutinis* 35<sup>27)</sup>의 세포외 지질의 비누화 값과 유사한 값이었다. 요오드값은 5.12로서 120~141인 미정제 콩기름과 64인 미정제 팜기름에 비해 훨씬 떨어졌으며 *Rhodotorula glutinis* 35<sup>27)</sup>의 세포내 지질의 요오드값 74.1보다는 훨씬 떨어졌지만 *Rhodotorula glutinis* 35의 세포외 지질의 2.17보다는 약간 높았다. 위의 결과로 보아 세포외 지질이 세포내 지질보다 포화도가 큰 지방산으로 구성되어 있음을 알 수 있다. *Rhodotorula graminis* SW 214의 비비누화물량은 2.4%로서 0.15~0.99인 미정제 팜기름, 1.6인 미정제 콩기름보다 높았고 8.18%인 *Aspergillus sydowi*<sup>28)</sup> 보다는 낮음을 알 수 있었다. *Rhodotorula graminis* SW 214가 생산한 세포외 지질을 TLC에서 분리하고 분리된 각종 지질을 분별 정량한 결과는 Table 2와 같다. Triglyceride 함량이 75.16%로 가장 많았고 phospholipid 10.77%, free fatty acid 5.88%, esterified sterol 4.94%, free sterol이 3.25 순으로 함유되어 있었다.

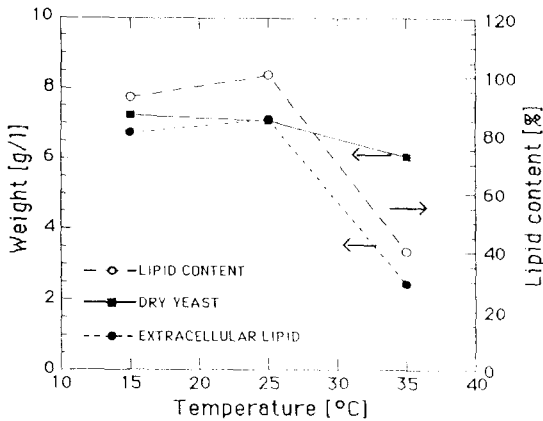


Fig. 5. Effect of temperature on cell biomass and lipid content of *Rhodotorula graminis* SW 214 grown in glucose medium

본 실험의 결과는 박<sup>(41)</sup>이 *Rhodotorula graminis* SW-54에서 보고한 것과 비슷한 경향을 보였으며 *Deinema*<sup>(13)</sup>가 *Lipomyces starkeyi*에서 보고한 것보다 phospholipid가 10% 이상, sterol 함량이 2~3% 많이 함유되어 있었고 대두<sup>(26)</sup>, 목화씨<sup>(29)</sup>, 호박씨<sup>(29)</sup>에 대한 연구 결과와 비교하면 free fatty acid, phospholipid, free sterol 및 esterified sterol 함량이 많이 함유되어 있어서 효모에 의한 지질 생성의 특이성을 보여 주었다. *Rhodotorula graminis* SW 214를 25°C에서 배양하여 얻은 세포의 지방산 조성을 GLC로 분석한 결과는 Table 3과 같다. 상업적으로 retention time(RT)이 계산된 26 bacterial FAMES(catalog No.4-7080 ; Suploco)를 포함한 standard<sup>(21)</sup>와 비교하면 이 균주가 생산한 세포의 지방산 중 C15-3OH(3-hydroxypentadecanoate)가 37.90%로 가장 많음을 알 수 있었다. 또한 이균주가 생산한 세포의 지방산 조성을 standard와 RT를 비교하면 C13i-3OH(3-hydroxytridecanoate) 1.75%, C16:19(cis-9-hexadecanoate) 10.93%, C15-3OH(3-hydroxypentadecanoate) 37.90%, C16:0-3OH(3-hydroxyhexadecanoate, hydroxypalmitic acid) 20.80%, C18:19 (trans-9-octadecanoate, oleic acid) 11.53%, C18:0 octadecanoate, stearic acid) 2.64%, C17:i 9.82%, C20i 4.63%였다. 이러한 조성은 *Rhodotorula glutinis*<sup>(69)</sup> 세포내 지질의 조성과의 비교하면 세포내 지질은 대부분이 oleic acid, linoleic acid, palmitic acid 등 식물 지질과 비슷하였으나 *Rhodotorula graminis* SW 214 세포의 지질은 oleic acid, stearic acid 비율이 불과 14.17% 밖에 되지 않았고 hydroxy-fatty acid가 60.45%를 차지하여 세포내의 지방산 조성이 매우 다름을 알 수 있었다. 또한 본 실험의 결과 중 20.80% hydroxy palmitic acid 함량은 Tulloch<sup>(30)</sup>가 *Rhodotorula glutinis* CBS 4686 세포의 지방산의 3-D-hydroxypalmitic acid 비율이 높음을 보고한 결과와 박<sup>(41)</sup>이 *Rhodotorula graminis* SW 54 세포의 지

질이 oleic acid 11.52%, hydroxy palmitic acid 21.83% 등으로 구성되었다는 보고와 유사하였다. 그러나 3-hydroxy pentadecanoate이 가장 많은 비율을 차지하고 있다는 본 실험의 결과와는 일치하지 않았는데 이는 본 균주의 세포의 지방산 조성의 특성이라고 생각되며 좀 더 연구하여야 할 과제라고 생각한다.

## 요 약

알바비스쿠스 잎으로부터 세포외 지질을 대량 생산하는 효모를 분리하고 동정한 결과 *Rhodotorula graminis* SW 214로 확인하였으며, 25°C에서 8일간 진탕배양시 *Rhodotorula graminis* SW 214 세포의 지질 생산량은 7.31 g/l였다. 배지내의 질소원과 탄소원의 농도는 세포외 지질 생산에 큰 영향을 주었는데 배지내의 질소원이 효모 성장에 거의 이용되고 탄소원이 아직 남아 있을때 지질 생산이 활발히 이루어졌다. 배지내에 질소원 농도가 높은 동안에는 지질 생산이 더디게 이루어졌다. *Rhodotorula graminis* SW 214 세포의 지질 생산량의 최적조건으로는 glucose 8%, yeast extract 2.5 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g/l, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2 g/l, pH 6에서 8일간 배양할 때임을 알 수 있었고 효모건조 균체량은 8.05 g/l, 지방 생산량은 8.89 g/l였다. *Rhodotorula graminis* SW 214 세포의 지질의 TLC에 의한 분별 정량 결과는 triglyceride 75.16%, phospholipid 10.77%, free fatty acid 5.88, esterified sterol 4.94%, free sterol 3.25%였다. *Rhodotorula graminis* SW 214 세포의 지방의 주된 지방산 조성은 3-hydroxypentadecanoate 37.90%, 3-hydroxyhexadecanoate 20.80%, trans-9-octadecanoate 11.53%, cis-9-hexadecanoate 10.93%, 15-methylhexadecanoate 9.82%, 18-methylnonadecanoate 4.63%, octadecanoate 2.64%, 3-hydroxytridecanoate 1.75%였다.

## 문 헌

1. Ratledge, C.: The industrial potential of microbial lipids. *J. Gen. Microbiol.* **68**, 13(1971)
2. Priestley, G.: Algal protein. *Food from Waste*, p.114 (1976)
3. Chavant, L.P., Mazliak, K. and Sancholle, M.: Variation of the lipid content of yeast cells. *Ann. Pham. Francaises*, **37**, 55(1979)
4. 박성오: *Rhodotorula*속의 의한 세포 내외의 지방 생산. 한국농학회지, **17**, 93(1976)
5. 신동화: *Mucor plumbeus*에 의한 전분으로부터 지방질 생산에 관한 연구. 박사학위논문, 동국대학교 대학원 (1980)
6. Yoon, S.H.: Lipid from yeast fermentation: Effects of cultural conditions on lipid production and its characteristics of *Rhodotorula glutinis*. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **60**, 1281(1983)
7. 박재구: 미생물 고농도 배양, *Escherichia coli*, *Rhodotorula glutinis*. 한국과학기술원 박사학위논문, 한국과학

- 기술원(1985)
8. 고 경 : *Rhodotorula glutinis* SW 204의 지방질 생산의 연구. 박사학위논문, 서울여자대학교 대학원(1988)
  9. 최연배 : 연속배양에서 미량원소가 *Rhodotorula glutinis*의 지방산 조성에 미치는 영향에 대한 연구. 석사학위논문, 한국과학기술원(1989)
  10. Naquib, K. and Hanna, H.A.: Lipid production of *Penicillium notatum*. *Mycopathol. Mycol. Appl.* **54**(3), 303 (1974)
  11. Botham: A biochemical explanation for lipid accumulation in *Candida* 107 and other oleaginous microorganisms. *Journal of General Microbiology.* **114**, 361 (1979)
  12. Spencer, J.F.T. and Sallans, H.R.: Extracellular lipid of *Torulopsis*. *Can. J. Microbiol.*, **2**, 72(1956)
  13. Deinema, M.H.: Intra- and extra- cellular lipid production by yeasts. *Mededeingen Van de Landbouwhogeschool Wageningen*, **61**, 1(1961)
  14. Kreger-van Rij: *The Yeast. a taxonomic study*. Elsevier, pp.894-900, Amsterdam (1987)
  15. Miller, G.L.: Use of dinitrosalicylic acid reagent for detremination of reducing sugar. *Anal. Chem.* p.426 (1958)
  16. Assoc. Off. Anal. Chem.: *Official Methods of the AOAC*, 13th ed., p.858(1980)
  17. A.O.C.S.: Official Method Te la-64. *Industrial Oils and Derivatives*, (1973)
  18. Amenta, J.S.: Separation of lipids. *J. Lipid Res.*, **5**, 270 (1964)
  19. Metcalfe, L.D., Schmitz, A.A. and Pelka, J.R.: The Rapid Preparation of Fatty Acid Esters for Gas Chromatographic Analysis. *Anal. Chem.*, **38**, 514(1966)
  20. Luddy, F.E., Barford, R.A., Herb, S.F. and Magidman, P.: A Rapid and quantitative procedure for the preparation of methylesters of butter oil and other fats. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **45**, 549(1968)
  21. Cacciapuoti, B.L., Ciceroni, D. and Barbini, A.: Fatty acid profiles, a chemotaxonomic key for the classification of strains of the family *Leptospiraceae*. *Inter. J. System. Bacteriol.*, **41**(2), 295(1991)
  22. Boulton, P.A. and Ratledge, C.: A biochemical explanation for lipid accumulation in *Candida* 107 and other oleaginous microorganisms. *J. Gen. Microbiol.*, **114**, 361(1979)
  23. Lundin, H.: Optimum conditions for microbiological production of fat *Rhodotorula gracilis*. *J. Inst. Brewing*, **56**, 17(1950)
  24. Shimi, I.R.: The lipids of *Penicillium* sp. *J. Sci. Food Agr.*, **100**, 244(1959)
  25. Steiner, M.: A modified peroxide test for detection of lipid oxidation in dairy products. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **51**, 202(1974)
  26. Kirschenbauer, H.G.: *Fats and Oils*. Reinhold Pub. Co., London, p.192(1960)
  27. Znlashko, M.V., Pidoplichko, G.A., Petrochenko, L.V. and Shamingin, T.V.: Extracellular lipids of *Rhodotorula glutinis*. *Institute of Microbiology*, **46**(5), 931(1977)
  28. Strong, F.M. and Petersen, W.H.: Chemistry of mold tissue. The lipids of *Aspergillus sydowi*. *J. Am. Chem. Soc.*, **56**, 952(1934)
  29. Brown, B.E., Meade, E.M. and Butterfield, J.R.: The effect of germination upon the fat of the soybean. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **39**, 327(1962)
  30. Tolloch, A.P.: Gas liquid chromatography of the hydroxy-acetoxy- and oxo- stearic acid methyl esters. *J. Am. Oil chem. Soc.*, **41**, 833(1964)
- 
- (1993년 11월 25일 접수)