

총 설

## 미생물에 의한 단세포유지의 생산과 이용

김용노 · 윤석후<sup>1,\*</sup>

서울대학교 농업생명과학대학 바이오시스템소재학부, <sup>1</sup>우석대학교 식품과학대학 식품생명공학과

### Single Cell Oil-Recent Trends in Microbial Production and Utilization

Yong-Ro Kim and Suk Hoo Yoon<sup>1,\*</sup>

Department of Biosystems Engineering, Seoul National University

<sup>1</sup>Department of Food Science and Biotechnology, Woosuk University

**Abstract** With the shortage of edible fats and oils and depletion of fossil fuels in many countries, microbial lipids is emerging as one of the most promising sources of fats and oils in the global market. Oleaginous microorganisms, also called single cell oils (SCOs), can accumulate lipids more than 25% in the cell volume. Triacylglycerols are the major storage lipids. SCOs offer several advantages for lipid production as follows: SCOs have short life span which would shorten production time, cultivation conditions are not affected by climate and place; the production process is easy to control. There are a number of oleaginous yeasts, molds, and microalgae. Furthermore, the lipid productivity of SCOs can be enhanced through strain improvement and the optimization of cultivation conditions. The new strains developed using recent advanced biotechnical methods showed greatly improved oleaginicacy. Further, hydrolysates of lignocellulosic materials can be used as carbon sources for economic production of SCO.

**Keywords:** single cell oil, microbial lipid, functional lipid, fermentation, genetic and metabolic engineering

## 서 론

인류의 식생활과 식품산업에서 유지류가 차지하는 비중은 실로 막중하다. 유지는 인간에게 필요한 3대 영양소의 하나로서 각종 생리기능을 가지며, 인류의 식탁을 풍요롭게 하는데 없어서는 안 될 영양소이기 때문이다. 그러나 식용유지 원료의 생산이 미국, 중국, 지중해 연안국, 남미, 동남아 등 몇몇 나라에 국한되어 있어 세계적인 유통이 원활치 않을 경우 수급과 가격의 변동이 심하게 된다. 이러한 이유로 인하여 동식물성 유지 이외 원료에서 유지를 얻으려는 노력이 시도되었다. 미생물을 이용한 유지, 즉 단세포유지(single cell oil, SCO)를 생산하여 동식물성 유지를 대체하려는 시도는 1910년대 독일에서 연구가 처음 시작되었다(1). 그러나 그 동안 미생물을 이용한 유지생산은 저가의 동식물성 유지 생산과 비교하여 경제성이 없어 실용화에 어려움을 겪어 왔다. 그러나 근래 들어 분자생물학과 발효공학의 발달로 미생물 유지 생산 수율이 급격히 높아지고, 고도불포화지방산과 같은 고가의 지방질 제품을 생산하는 상업적 기술이 개발되고, 바이오디젤과 같은 새로운 수요가 창출되면서 미생물을 이용한 유지 생산에 관한 관심은 새로운 전기를 맞이하게 되었다(2). 단세포유지는 단세포단백질과는 달리 식용, 사료용 이외에도 공업용 원료로도 사용될 수 있으므로, 소비자들이 선호도, 법적 규제 등

의 문제는 상대적으로 작은 것으로 사료되기 때문이다. 본 소고에서는 단세포유지를 생산하는 미생물과 그들이 생산하는 유지의 종류, 유지의 생합성 및 축적 메커니즘, 유지 축적 제거 기술, 단세포유지의 이용과 경제성 등에 관한 최근의 동향과 전망에 관하여 논하고자 한다.

## 단세포유지 생산 미생물

지방질(lipids)은 생명체의 필수 구성성분이므로 모든 미생물은 유지를 생합성하는 능력을 가지고 있으며 구조지방질을 포함하여 균체의 약 10%를 지방질로 보유한다. 그러나 몇몇 미세조류, 효모, 곰팡이는 세포의 20-70% (건물 기준)를 유지로 보유하기도 하는데 이들을 이용하면 단세포유지를 생산할 수 있다(3). 미생물을 이용하여 유지를 생산하는 경우 여러 가지 장점을 갖는데, 이는 미생물의 생애 주기가 짧으며, 생산 노동력이 절감되며, 생산에 있어서 장소, 시간, 계절, 기후 등의 영향을 받지 않는 점과 대형화가 용이한 점 등을 가지고 있어 단세포유지는 미래의 유지자원으로서 가능성이 매우 크다고 할 수 있다.

단세포유지 생산에 적합한 미생물의 선별 기준으로는 균체 생산량(cell mass production, g 균체/L 배지), 균체 생산수율(cell mass yield, g 균체/g 당 소모량), 지방질 함량(lipid content, g 지방질/g 균체), 지방질계수(lipid coefficient, g 지방질/g 당 소모량), 지방질 출력(lipid output, g 지방질/L 배지), 지방질 생산율(lipid productivity, g lipid/L 배지/시간), 지방질 형성 비속도(specific rate of lipid formation, g 지방질/시간/g 균체) 등이 사용된다.

## 효모

단세포유지 생산에 가장 널리 사용된 미생물은 효모이다.

\*Corresponding author: Suk Hoo Yoon, Department of Food Science and Biotechnology, Woosuk University, Samnye 55338, Korea  
Tel: 82-63-290-1514  
Fax: 82-63-291-9312  
E-mail: shooyoon@woosuk.ac.kr/sukhooyoon@gmail.com  
Received November 12, 2015; revised November 27, 2015;  
accepted November 30, 2015

*Cryptococcus curvatus*, *Lipomyces starkeyi*, *Rhodosporidium toruloides*, *Rhodotorula glutinis*, *Trichosporon fermentans*, *Yarrowia lipolytica* 등을 글리세롤, 포도당, 공장 폐수 등에서 배양하면 약 25-70%(건조균체 기준)의 트라이아실글리세롤(triacylglycerols, TAG)이 주성분인 유지를 함유한 바이오매스를 얻을 수 있으며, 이들의 주요 구성 지방산은 미리스트산(C14:0, myristic acid), 팔미트산(C16:0, palmitic acid), 스테아르산(C18:0, stearic acid), 올레산(C18:1, oleic acid), 리놀레산(C18:2, linoleic acid), 알파리놀렌산(C18:3,  $\alpha$ -linolenic acid, ALA) 등으로서, 식물성 유지의 지방산 구성과 유사하다(4,5).

효모의 배양 조건은 단세포유지 생산에 많은 영향을 미치는데, C/N 비율(탄소원/질소원 비율, C/N ratio), 질소원, 온도, pH, 산소, 미량원소와 무기질의 농도 등이 영향을 미친다. C/N 비율이 25에서 70으로 증가하면 유지 함량은 18%에서 46%로 증가하며, 무기질소원은 효모의 증식에는 적당하나 유지의 축적에는 유기질소원이 유리하다(6,7). 미량 원소도 균의 생육과 유지 축적에 영향을 미치는데,  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  등이 주요 원소가 된다(8). 효모의 연속 배양 시 균의 비생장율(specific growth rate)이 일정 수준 이상으로 높아지면 균의 생육 및 유지 형성에 부정적인 영향을 미친다(9). 일반적으로 용존 산소 농도는 유지 축적에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 밝혀졌다(10,11).

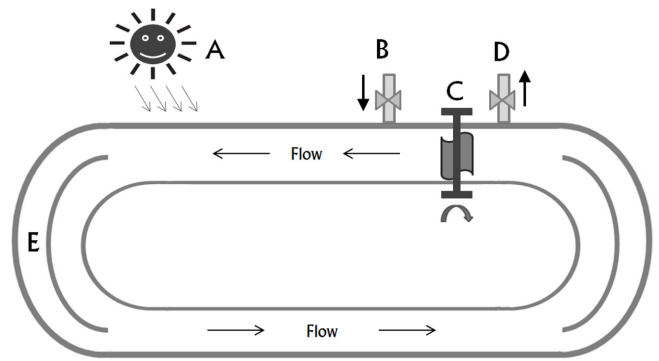
단세포유지의 경제성을 결정짓는 가장 중요한 요소 중의 하나는 저렴한 탄소원을 얼마나 이용할 수 있는가에 달려 있다. 효모는 기본적으로 포도당을 이용하나, 자일로스, 아라비노스, 마노스, 글리세롤, 농산 폐기물 등이 사용될 수 있다(12). 향후 바이오디젤 생산이 활발해지면 부산물로 생산되는 글리세롤을 이용하는 균주는 많은 관심을 받게 될 것이다(13). 최근에는 셀룰로스의 가수분해물을 활용하는 연구가 행해지고 있는데 이 가수분해물은 아세트산, 폼산, 피루발 같은 독성물질을 함유하고 있는 경우가 있어 이들을 활용하기 위해서는 독성물질을 미리 제거해야 하는 것이 필수적이다(14).

## 곰팡이

유지 생산 곰팡이가 생산하는 유지는 TAG보다는 DHA, EPA, ARA, GLA 등과 같은 고도불포화지방산이 주종을 이룬다. 이들은 체내에서 독특한 생리적 기능을 가지고 있어 고부가가치 물질로 각광받고 있다(5). 고도불포화지방산(polyunsaturated acid, PUFA)을 생산하는 주요 곰팡이는 *Cunninghamella* 속, *Mortierella* 속, *Mucor* 속, *Rhizopus* 속, *Thamnidium* 속, *Conidiobolus* 속, *Saprolegnia* 속, *Blastocladiella* 속, *Pythium* 속, *Thraustochytrium* 속, *Schyzochytrium* 속 균 등으로서 이들을 감자 녹말 폐수, 자일로스, 포도당, 해바라기 기름, 옥수수 대 등에서 배양하면 약 19-65% (건조균체 기준)의 유지를 함유한 바이오매스를 얻을 수 있다.

곰팡이가 생산하는 단세포유지는 일반적인 동식물성 유지의 구성성분인 TAG보다 고가이며, 여러 가지 발효 기법이나 생물공학적인 방법을 통해 생산성을 높일 수 있으며, 값싼 원료로부터 생산이 가능하며, 생산이 계절이나 기후의 영향을 받지 않으며, 자연계에서 얻어지는 PUFA보다 고농도 고품질의 제품을 얻을 수 있으며, 동식물보다 상대적으로 단순한 대사로 인하여 유전자나 대사의 조절이 용이하며, 유지 추출 후에 탈지 균체는 단백질, 미량 원소, 비타민, 산화방지제 등으로 이용될 수 있다(15).

단세포유지 곰팡이는 액침발효(submerged fermentation)나 고체 발효(solid state fermentation)를 통하여 생산한다. 액침발효의 경우, 발효, 균체 분리, 유지 추출 및 정제 공정을 거치는데 이 경



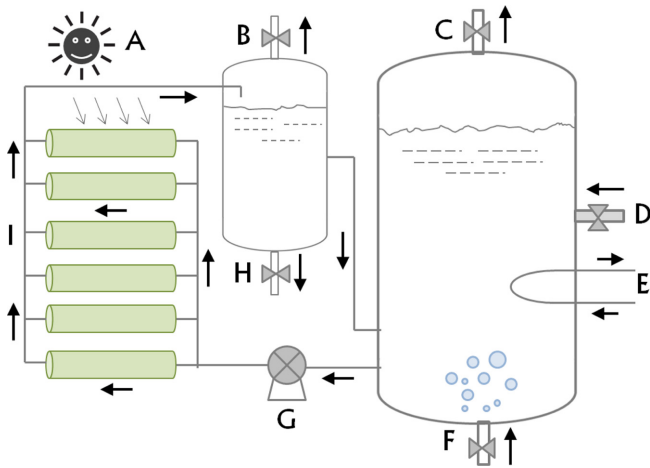
**Fig. 1. Schematic diagram of typical raceway pond.** A, sunlight; B water, nutrient; C, paddle wheel; D, harvest; E, baffle

우도 탄소원의 가격이 중요한 인자가 된다. 일반적으로 5 kg의 탄소원에서 약 1 kg의 TAG 유지를 생산하게 되는데, 적절한 발효 공정 조절을 통하여 PUFA 함량이 높은 유지를 생산할 수 있다(16).

## 미세조류

광합성을 하는 독립영양(autotrophic) 미세조류를 이용하여 단세포유지를 생산할 경우 가장 큰 장점은 탄소원으로서 무한대의 이산화탄소와 에너지원으로서 태양광을 무상으로 쓸 수 있다는 점이다. 단세포유지의 경제성을 결정짓는 제일 큰 요인이 탄소원과 에너지원의 가격인데 이를 무상으로 사용할 수 있다는 것이 매우 큰 이점이다. 독립영양균인 녹조식물문(Chlorophyta)의 *Chlorella ellipsoidea*, *Dunaliella* sp., *Neochloris oleabundans*, *Haematococcus pluvialis*, *Tetraselmis chui* 등은 약 12-56%의 유지를 함유하며, 돌말강(Bacillariophyceae)의 *Chaetoceros gracilis*, *Phaeodactylum tricornerutum*, *Skeletonema* sp., *Thalassiosira pseudonana*, *Ch. calcitrans*, *Ch. muelleri*, *Nitzschia cf. pusilla* 등은 약 11-60% (건조균체 기준)의 유지를 생산하며, *Isochrysis* sp., *Nannochloropsis oculata*, *Nannochloropsis* sp., *Pavlova salina*, *Rhodomonas* sp., *T. weissflogii* 등도 약 6-41%의 유지를 생산한다 한다. 또한 종속 영양 미세조류인 *C. protothecoides*, *Cryptochodium cohnii*나 복합영양균(phototrophic, mixotrophic, heterotrophic)인 *C. vulgaris* 등은 약 19-49%의 균체 유지를 생산한다(5,17,18).

미세조류는 균종의 차이 이외에도 배양 온도, 빛의 강도, pH, 염도, 무기질, 질소원 등의 영향을 받으며, TAG나 PUFA가 주성분인 유지를 생산한다. 독립영양 미세조류를 대량 배양하여 단세포유지를 생산하는 것은 대단히 복잡하다. 왜냐하면 배양 중 내 빛을 공급해 주어야 하기 때문이다. 또한 빛의 강도는 일시에 따라 변화가 많으므로 이를 보정해 주어야만 하기 때문이다. 현재 독립영양 미세조류의 대량 배양에는 raceway ponds 방식과 tubular photobioreactor 방식이 사용되고 있다. Raceway ponds 방식은 넓고 개방된 수조에서 미세조류를 배양하는 방식으로 폐수 처리 방식과 유사하나 운영비가 적게 든다(Fig. 1)(19). Tubular photobioreactor 방식은 폐쇄형 배양기에 태양광 집광판이 설치된 장치로써 물, 에너지, 영양분을 절약할 수 있으며 배양 조건 조절이 가능하며 일정한 수율의 유지를 얻을 수 있다(Fig. 2)(19). 독립영양 미세조류인 *C. potothecoides*는 배양조건을 바꾸거나 유전자조작을 통하여 종속영양(heterotrophic) 미세조류로 바꿀 수가 있는데 이 경우 저렴한 탄소원의 확보가 성공의 관건이 된다.



**Fig. 2. Schematic diagram of typical tubular photobioreactor.** A, sunlight; B, exhaust; C, exhaust; D, water, nutrient; E, coolant; F, air, CO<sub>2</sub>; G, pump; H, harvest; I, solar tube array

**세균**

세균이 생산하는 지방질의 다른 단세포유지와는 다른 성질을 갖는 복합 리포이드(complex lipoid)가 주요 성분이다. 대부분의 세균은 TAG 보다는 PUFA나 가지지방산이 포함된 지방질을 생산한다. *Gordonia* 속균과 *R. opacus* 균은 특수한 조건에서 80%의 유지 함량은 갖기도 하나 균체량은 1.88 g/L 밖에 안돼 단세포유지로서의 이용성은 낮은 편이다(20).

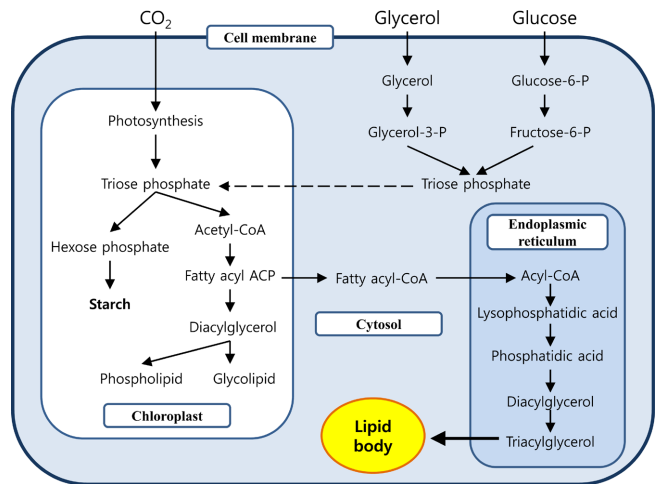
세균의 지방산 생합성 유전자는 다른 균에 비하여 잘 알려져 있어서 유지 축적을 위한 유전자 변형, 대사공학 기술 등의 적용이 상대적으로 용이하다. 재조합 대장균의 일종은 유기배양에서 지방산에스터를 1.28 g/L 정도를 생산하는데 비록 유지 생산수율은 낮더라도 단세포유지 생산에 새로운 시도를 한 것으로 사료된다(21).

**단세포유지의 지방질 생합성 및 축적 메커니즘**

미생물 유지를 생산하는 경로는 드 노보 합성(*de novo synthesis*)와 엑스 노보 합성(*ex novo synthesis*) 두 가지가 있다. 친수성 물질로부터 유지 축적이 이루어지는 드 노보 합성과 소수성 물질로부터 유지 축적이 이루어지는 둘 사이에는 생화학적인 수준에서 차이가 있다.

드 노보 유지 생산은 배지 내에 질소원이 고갈된 후에 일어나는 2차적 합성대사(anabolism)의 일종이다. 세포내 대사로 만들어진 아세틸보조효소에이(acetyl-CoA)가 베타산화의 역순으로 된 대사를 거쳐 지방산을 합성하는 것이다. 지방산은 글리세롤과 에스터반응을 거쳐 저장 지방질(주로 TAG)과 구조 지방질(인지방질, 당지방질)로 합성된다. 드 노보 유지 생산에서는 포도당이 가장 널리 쓰이는 탄소원이나, 녹말, 펙틴, 젓당, 자일로스, 과당, 리그노셀룰로스 가수분해물 등 다양한 탄소원이 사용되기도 한다. 탄소원의 종류는 농도에 따라 균의 생육에 영향을 미치며, 축적되는 지방질의 양적, 질적인 특성에도 영향을 미친다(22).

엑스 노보 유지 생산은 균의 성장과 연관되어 이루어지는데 배지 내 질소원 고갈과는 무관하게 이루어진다. 이는 배지 내의 유지류를 미생물이 생물학적으로 변환시키는 것이기 때문인데 동물이나 식물에서는 거의 발견되지 않는다. 이 작용을 통하여 고부가가치를 갖는 PUFA를 생산하기도 한다. 균체 내로 들어 온



**Fig. 3. Carbon capture and lipid biosynthesis pathway in autotrophic and heterotrophic oleaginous microorganism.**

지방산은 크랩스 회로를 거쳐 균의 성장에 사용되거나 생물학적 변환을 통하여 균체 내에는 없었던 세포를 구성하는 새로운 지방산이 만들어 진다(22). 저장 지방질 혹은 중성지방질을 생산하는 경로는 지방산 합성을 거쳐 TAG 합성으로 이어진다.

**지방산 합성**

유지 생산 효모, 곰팡이, 미세조류는 공통적으로 포도당을 탄소원으로 이용할 수 있다. 그러나 미세조류는 무기 탄소(이산화탄소)와 유기 탄소(포도당, 아세트산 등)를 모두 이용할 수 있다. 미세조류는 광합성을 수행하며 식물처럼 캘빈회로(Calvin cycle)을 통하여 이산화탄소를 고정한다. 이산화탄소는 엽록소에서 글리세르알데하이드 3-인산(glyceraldehyde 3-phosphate, GAP)로 만들어지며, GAP는 캘빈회로에서 나와 세포질로 옮겨진 후 해당 경로(glycolytic pathway)를 통하여 피루브산으로 만들어진 후, 피루브산 수소제거효소(pyruvate dehydrogenase, PDH)에 의하여 아세틸보조효소에이(acetyl-CoA)로 바뀌게 된다(Fig. 3)(23). 포도당이 탄소원으로 사용되면 포도당은 세포질에서 해당작용을 거쳐 피루브산으로 변환된다. 그 후 미토콘드리아로 이동되어 피루브산은 아세틸보조효소에이로 변환되고 옥살로아세트산과 같이 농축되어 시트레이트를 형성한다. 미토콘드리아의 시트레이트 함량이 충분히 높아지면 시트레이트는 세포질로 옮겨져 시트레이트-피루브산 셔틀 경로를 거쳐 아세틸보조효소에이와 옥살로아세트산으로 분해된다. 지방산의 탄소사슬 신장(elongation)은 주로 두 가지 효소, 즉 아세틸보조효소에이카복실효소(acetyl-CoA carboxylic enzyme, ACC)와 지방산합성효소(fatty acid synthase, FAS)에 의하여 일어난다. ACC는 아세틸보조효소에이를 이용하여 말로닐보조효소에이를 생산한다. 말로닐보조효소에이가 일단 만들어지면 FAS 다중효소계의 하나인 말로닐보조효소에이:아세틸전달단백질 아세틸전달효소(malonyl-CoA:ACP transacylase, MAT)에 의하여 말로닐아실운반단백질(malonyl-acyl-carrier protein, malonyl-ACP)가 만들어 진다. FAS는 말로닐기를 아실운반단백질(acyl-carrier protein, ACP)로 옮겨 팔미트산, 스테아르산, 팔미톨레산, 올레산, 리놀레산 등과 같은 긴사슬 지방산을 만드는데 필요한 탄소원으로 사용한다. 두 개씩의 탄소가 추가되는 각 사이클은 β-ketoacyl-ACP synthase (KAS)에 의한 반응과 malonyl-ACP를 아실 수용체로 하는 축합반응으로 이루어진다. 마지막으로

acyl-ACP thioesterase (FAT)가 아실 사슬을 잘라내고 지방산을 유리시킨다.

### 트라이아실글리세롤 합성

진핵 미생물에서의 TAG 합성은 미토콘드리아나 세포질 그물에 있는 색소체에서 일어나는 반면에, 원핵 미생물에서는 세포질에서 일어난다. TAG 생합성은 글리세롤-3-인산(glycerol-3-phosphate, G3P) 경로로도 불리는 케네디경로(Kennedy pathway)를 통하여 일어나는데, 간 TAG의 90% 이상은 이 경로를 통하여 만들어진다(Fig. 3)(12,24,25).

TAG 합성의 첫 단계는 G3P와 아실보조효소에이(acyl-CoA)가 acyl-CoA:glycerol-sn-3-phosphate acyl-transferase (GPAT)에 의한 아실화로 리소포스파티데이트(lysophosphatidate, LPA)를 만드는 것으로 시작된다. GPAT는 TAG 합성에서 제일 낮은 비활성(specific activity)을 가지며 전체 반응속도를 조절하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. LPA는 다른 아실보조효소에이와 함께 리소포스파티데이트 아실기 전달효소(lysophosphatidate acyl-transferase, LPAT) 작용에 의하여 농축되며 포스파티데이트(phosphatidate, PA)를 생성한다. PA는 포스파티드산 인산가수분해효소(phosphatidic acid phosphatase, PAP)에 의하여 탈인산화되며 다이아실글리세롤(diacylglycerol, DAG)을 생성한다. 마지막으로 세 번째 아실보조효소에이가 acyl-CoA:diacylglycerol acyl-transferase (DGAT)의 작용으로 DAG에 들어가면서 TAG가 생성된다. DGAT는 이 경로의 중요한 조절인자로 알려져 있다. 글리세라이드나 글리세로포스파티드(glycerophosphatide)를 합성하는 케네디 경로에서 DAG는 매우 중요한 역할을 한다. DGAT를 overexpression 시키면 인지지방질을 형성하는 것 보다는 DAG를 TAG로 더 많이 생성하는 것으로 밝혀졌다.

효모 내에서 PA의 드 노보 생성은 G3P 경로나 다이하이드록시아세톤인산(dihydroxyacetone phosphate, DHAP) 경로를 거쳐 일어난다. G3P 경로는 박테리아나 진핵 균주에서 일어나며, DHAP 경로는 효모나 포유류 세포에서만 발견된다. DHAP는 *sn-1* 위치에서 DHAP acyltransferase (DHAPAT)에 의해서 아실화되고, 생성물인 1-acyl-DHAP는 1-acyl-DHAP 환원효소에 의해서 환원되어 LPA를 생성하고, LPA는 LPAT에 의해서 PA로 변환된다.

미생물의 PUFA는 포도당으로부터 드 노보 합성에 의하여 생성된 지방산이나 외부로부터 들어 온 지방산을 효소적으로 신장시키거나 불포화시킴으로써 생성된다. 또한 지방산의 생물학적 수소첨가(포화) 부분적 혹은 전체 분해대사가 영향을 미치기도 한다.

## 단세포유지 미생물이 생산하는 유지

### 트라이아실글리세롤

효모와 미세조류는 저장 지방질로서 TAG와 다이아실글리세롤(diacylglycerols, DAG)을 축적하는 경우가 많다. 이 저장 지방질은 식물성 유지와 지방산 조성이 유사하여 식용이나 사료용 유지로도 사용될 수 있다. 그러나 최근에는 환경 친화적이고 지속 가능한 연료를 찾는 세계적인 추세에 힘 입어 바이오디젤(biodiesel) 원료로서 관심을 끌고 있다(26).

일부 효모는 균체 생산량이 높고 지방질 함량이 높아 단세포유지로 이용되는데, *C. curvatus* (예전의 *Apiotrichum curvatum* 또는 *Candida curvata*)는 균체의 60%를 지방질로 함유한다(27). 또한 이 효모를 충분한 양의 질소원과 글리세롤을 탄소원으로 배양하면 118 g/L의 균체와 25%의 지방질 함량을 얻을 수 있다. *R.*

*toruloides*를 질소 제한조건에서 배양하면 100 g/L의 균체와 75%의 균체 지방질 함량을 얻을 수 있다(28).

일반적으로 효모 내의 축적은 배지 내에 질소원이 고갈되고 탄소원이 충분히 많을 때 일어난다. 그러나 *C. terricola*는 예외적으로 질소원이 고갈되기 이전 대수성장기에 TAG를 축적하는데, 이는 빠른 성장과 질소원이 풍부한 배지를 사용하여 SCO를 생산할 수 있다는 점에서 관심을 끈다(29).

효모 세포 내 지방질의 지방산 조성은 효모의 종류, 성장 시기, 환경 요건, 기질과 배지의 조성 등에 많은 영향을 받는다. 효모 중성지방질의 80-90%는 TAG로 이루어져 있으며 탄소수 14-20개 사이의 지방산이 글리세롤에 결합되어 있다. 가장 보편적인 지방산은 탄소수 16개 혹은 18개의 포화 또는 불포화지방산으로서, 올레산, 팔미트산, 스테아르산이 주요 지방산이다(27-31).

대부분의 단세포유지 효모는 질소원이 존재하는 시기에는 단백질을 합성이 일어나며, 유지 축적은 탄소원이 많이 있을 때 일어난다. 로그성장기에는 리놀레산이 다량 존재하던 정지상에 들어가면 감소하면서 스테아르산이나 올레산이 많아지게 된다. 또한 Δ9 불포화효소의 작용으로 스테아르산이 올레산으로 바뀌기도 한다(32,33). 단세포유지 효모의 주요 지방산은 팔미트산, 스테아르산, 올레산, 리놀레산이며, 리그노세르산(C24:0, lignoceric acid), 팔미트올레산(C16:1 ω7, palmitoleic acid), 베헨산(C22:0, behenic acid), 미리스트산, 알파리놀렌산, 아라키드산(C20:0, arachidic acid) 등이 소량 함유되어 있다. 다른 지방산들은 미량으로 존재한다. 지방산 조성은 균종보다는 균속, 배양 조건에 따라 다양하게 변화한다.

### 감마리놀렌산(γ-linolenic acid, GLA)

단세포유지 곰팡이를 이용한 고부가가치 지방질의 생산은 접합균강(*Zygomycetes*)에서 활발히 연구되고 있는데, 이들이 생산하는 PUFA는 지방질 TAG 부분에 포함되어 있다(15,34). 미세조류도 ω-3계 PUFA를 생산하는데 이용되고 있으며, 몇몇 회사들이 곰팡이와 미세조류를 이용해서 PUFA의 상업적인 생산을 하고 있다. 단세포유지 PUFA 연구는 GLA에 대하여 처음 이루어졌다. 미생물에 의해서 사상균 곰팡이의 일종인 *Zygomycetes*는 많은 양의 지방질을 축적하기는 하지만 GLA(all-*cis*-6,9,12-octadecatrienoic acid, ω6 C18:3)의 농도는 낮다. GLA 생산에 가장 적합한 균은 *Mucorales* 속으로 알려져 있는데, 균체의 약 4%를 GLA로 생산한다. 유지 함량은 건조균체의 20% 가량이며 GLA 함량은 지방질의 20-25% 정도이다. 다른 GLA 생산 균주는 미세조류인 *Spirulina platensis*인데 *Zygomycetes* 만큼 GLA 함량이 높지는 않으나 몇몇 나라에서 건강식품으로 판매되고 있다(35).

최초의 상업적 대규모 생산은 1985년 영국에서 *M. circinelloides* (*M. javanicus*)를 사용하여 시작되었다. 200 kL 배양기에서 배양하여 균체의 약 20%를 유지로 생산하였고, 유지의 18%가 GLA였다(36). 추출과 정제를 거치면 순도 98%의 TAG를 얻었는데, 함유된 GLA의 양은 기존의 달맞이꽃 유지의 함량보다 두 배가 높았다. 일본에서는 *Mortierella*와 *Mucor*를 이용하여 이단계 연속배양(two-stage continuous fermentor system)을 하였다. *Mo. isabellina*를 배양하여 83 g lipid/L의 유지를 얻었는데 이중 4.5%가 GLA로서 부피당 수율은 3.4 g GLA/L이었다(37). 이외에도 *Mo. ramaniana* (5.5 g GLA/L), *M. mucedo*, *Cunninghamella echinulata* 등도 이용되고 있다.

생산 원가를 줄이기 위한 노력도 계속되고 있는데, 석유화학 부산물인 모노카복실산(monocarboxylic acids)을 이용하거나(38), *M. ambiguus*를 다공성 물질에 고정화하여 키우거나(39), 다른 유

용한 물질을 동시에 생산하는 방법 등이 연구되고 있다. *M. circinnelloides*는 GLA와 코코아 버터 대용물(cocoa butter equivalents)을 생산하며(40), *Rhizopus arrhizus*는 탄수화물을 세포 외 L(+)-젖산으로 변환하면서 균체에는 GLA를 축적하기도 한다(41). 고체표면발효 방법도 GLA 생산에 이용되는데, *Mo. isabellina*와 *Cunninghamella japonica*는 높은 GLA 생산성으로 주목을 받고 있다(42).

#### 아라키돈산(arachidonic acid, ARA)

ARA (all-*cis*-5,8,11,14-eicosatetraenoic acid,  $\omega$ 3 C20:4)를 산업적으로 생산할 수 있는 균주는 주로 *Mortierella* 속 균이다(43,44). 이 균의 배양 조건을 변경함으로써 ARA의 양을 증가시킬 수 있어 30-70% ARA를 생산하는데 이 중 90%는 TAG에 결합하고 있다. 균체를 수확하여 저온에서 저장하거나 6일 정도 상온에서 저장하면 ARA 함량을 거의 2배로 올릴 수 있다. 이는 온도를 낮출 경우 균주가 낮은 온도에 적응하기 위하여 세포막의 유동성을 유지하고자 인지지방질의 ARA 함량을 높이기 때문이다.

*Mo. alpina*를 배양할 때 땅간 이온은 ARA의 합성을 촉진하나 철 이온농도가 40 mg/L 이상이면 ARA의 합성을 방해하게 된다(45). *Mo. alpina*를 최적 조건에서 배양하면 단위 배양액 부피당 13 g/L (220 mg/g 건조균체)의 ARA를 생산할 수 있는데 이는 미세조류 *Porphyridium cruentum*의 생산 수율보다 높은 것이다(46). 또한 이 균주를 기장 배지에서 고체 발효 시키면 건조 균체 1g 당 57.4 mg의 ARA를 얻을 수 있으며, 감자와 포도당 페이스트를 사용하면 11.8 mg/g을 얻을 수 있다(47,48). *Mortierella* 건조 균체에서 ARA를 추출하여 정제하는 공정은 일반 유지류의 공정과 크게 다르지 않았다(49,50).

#### 다이호모감마리놀렌산(dihomo- $\gamma$ -linolenic acid, DGLA)

ARA를 생합성하는 대부분의 곰팡이들은 적은 양의 DGLA(all-*cis*-8,11,14-eicosatrienoic acid,  $\omega$ 3 C20:3)도 동시에 생산하는데, ARA 함량이 높을수록 더 많은 양의 DGLA를 생산한다(44). 그 이유는 ARA가 DGLA에  $\Delta$ 5 불포화효소가 작용하여 만들어지기 때문이다. 그러므로 이 효소의 작용을 억제하면 많은 양의 DGLA를 생산할 수 있다. *Mortierella alpina* 배지에 참기름(3% 정도)과 같은 효소 억제제를 첨가하면 DGLA를 1.7-2.6 g/L 정도 얻을 수 있다. 반면 이러한 경우, ARA의 생산은 0.7 g/L에 그치는데, 참기름의 세사민이 효소 저해작용을 하기 때문이다(51,52). 땅콩기름을 사용하면 DGLA를 1.9 g/L 정도로 얻을 수 있다. 다른 방법은  $\Delta$ 5 불포화효소가 없는 균주를 만들어 이용하는 방법인데, 재조합 *Mo. alpina*는 4.1 g/L의 DGLA (지방질의 42%)를 생산하기도 한다(53).

#### 에이코사펜타엔산(eicosapentaenoic acid, EPA)

ARA를 생산하는 대부분의 곰팡이들, 특별히 *Mortierella*속 균들은 저온에서 배양 시 상당한 양의 EPA (all-*cis*-5,8,11,14,17-icosapentaenoic acid,  $\omega$ 3 C20:5)를 생성한다. 이는 ARA를 EPA로 전환시키는 효소인  $\Delta$ 17 불포화효소가 저온에서 활성화되기 때문이다. 저온에서 세포막의 유동성을 유지하기 위해서는 구성 지방산의 불포화도를 높여야 하기 때문이다(54-57).

*Mo. elongata*를 배양하면 0.6 g/L (지방질의 15.1%)의 EPA를 얻을 수 있는데(56), *Mo. alpina* 배지에 ALA를 첨가하여 배양하면 1.35 g/L의 EPA를 얻을 수 있다(55). ALA가 EPA로 변환되는 것은 온도에 영향을 받지 않는데, 이 점은 냉각에 필요한 에너지를 절약할 수 있다는 점에서 생산에 유리하다. 그러나 배양온도도

낮추고 ALA도 동시에 첨가하면 EPA 수율을 1.9 g/L까지 올릴 수 있다(55). 배지에 첨가된 지방질을 변환시키는 방법으로 ARA를 생산하는 방법은 고체상발효에서 수행할 수 있는데, *Mo. alpina*를 아마인기름(ALA 함량 57%)이 첨가된 보리에서 배양하면 23.4 mg/g 발효체(유지 내 EPA 함량 17.8%)의 EPA와 36.3 mg/g 발효체(유지 내 ARA 함량 27.6%)의 ARA를 얻을 수 있다. 발효균체를 10°C에서 7일간 저장하면  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 지방산의 비율을 0.9에서 1.1로 증가시킬 수 있으며, PUFA/포화지방산의 비율도 6.0에서 7.8로 증가시킬 수 있다. 대부분의 균사체 지방질의 경우 ARA 함량이 EPA 함량보다 높는데, ARA는 다양한 생리적 기능을 가지므로 실제로는 EPA 함량이 높고 ARA 함량이 낮은 지방질이 용도가 높게 된다. 그러므로  $\Delta$ 12 불포화효소가 결여되어  $\omega$ 3,  $\omega$ 6 지방산을 합성할 수 없는 돌연변이 균주가 사용되고 있다(58). 왜냐하면 다른 불포화효소와 신장효소(elongase)는 외부에서 첨가된 ALA를 효과적으로 EPA로 변환시켜 EPA/ARA 비율을 2.5까지 높일 수 있다. *Saprolegnia* 속 곰팡이 균은 낮은 배양온도에서 올리브기름을 EPA로 변환시켜 EPA/AA 비율을 10.9로 만드는데, 균체의 2.3%를 EPA로 생산한다(59).

*Mortierella*나 *Pythium*(60,61)의 몇몇 균주가 지방산의 25%를 EPA로 생산하나, 한 미세조류는 지방산의 50%를 EPA로 생산하여 산업적으로 이용되는데, 이 균은 다른 PUFA를 생산하지 않아 정제에 유리한 점이 있다(62). 해양 세균인 *Shewanella putrefaciens*는 균체의 15%를 지방질로 함유하며 지방질의 25-40%를 EPA로 함유하나, 모든 EPA가 세포막의 인지지방질에 결합되어 있어 분리에 어려움이 있다(63).

#### 도코사헥사엔산과 도코사펜타엔산(docosahexaenoic and docosapentaenoic acid, DHA와 DPA)

*Thraustochytrium aureum* 같은 해양 곰팡이는 균체의 50%를 DHA (all-*cis*-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid,  $\omega$ 3 C22:6, cervonic acid)로 생산한다(64,65). 그러나 이 균의 지방질 함량은 10-15%이며 생장이 느리고 수율이 낮은 단점이 있다. *Schizochytrium* SR21 균은 배양 시 강력한 교반에도 잘 견디며 5일 배양 후에는 15.5 g DHA/L를 얻을 수 있다(66). 이 균은 또한  $\omega$ 6 DPA (all-*cis*-4,7,10,13,16-docosapentaenoic acid,  $\omega$ 6 C22:5, osbond acid)도 생산하는데, DHA와 DPA의 함량이 높고 다른 PUFA를 생산하지 않거나 적은 양만 생산하여 정제에도 유리하다.

다른 곰팡이나 미세조류, 저온 박테리아도 DHA를 생산하는 것으로 알려져 있으나 생산 수율은 전술한 곰팡이의 경우보다 낮다(65). 중속영양균인 해양 미세조류 *Cr. cohnii*는 균체의 25%와 지방질의 39%를 DHA로 합성하여 8 g/L의 수율을 보여 이 조류를 직접 수산양식하는 어류의 먹이로 사용하기도 하다.

#### 에이코사테트라엔산(eicosatetraenoic acid, ETA)

ETA (all-*cis*-5,8,11,14-eicosatetraenoic acid,  $\omega$ 6 C20:4)는 프로스타글란딘의 전구체로서 관심을 받고 있다(66). ETA는 불포화효소가 결여된 *Mo. alpina*를 이용하여 생산할 수 있다.  $\Delta$ 5 불포화효소가 없는 돌연변이 균은 ALA가 들어 IT는 배지에서 지방질의 26%를 ETA (1.6 g/L)로 생산하는데, 이 균은 통상적으로 DGLA도 같이 생산하므로 배양조건을 조절하여 DGLA의 생산을 억제하여야 한다(67).  $\Delta$ 5와  $\Delta$ 12 불포화효소가 결여된 균을 ALA 배지에서 배양하면 2.3 g/L (지방질의 37%)의 ETA를 생산하면서 DGLA의 생산은 억제할 수 있다.

이외에도 적은 양이지만 LT3 류코트리엔의 전구체가 되는 매드산(mead acid), C13-C19 PUFA (이중결합 3-5개,  $\omega$ 3,5,6),

C18, C20의 다양한 PUFA도 만들어진다. 이와 같이 단세포유지 곰팡이의 지방질 축적과 고도불포화지방산의 축적 메커니즘은 잘 알려져 있다(34).

## 단세포유지의 생산성 향상

단세포유지의 생산성을 향상시키는 방법은 두 가지로 나눌 수 있다. 미생물의 배양 공정을 최적화하는 방법과, 최근 들어 많은 발전을 이룬 유전공학, 대사공학 기술 등을 사용하여 균주 자체를 개량하는 방법이 그 것이다.

### 배양공정의 최적화

단세포유지를 생산하는 미생물의 배양 조건은 생산되는 지방질의 양과 질에 큰 영향을 미치는 것으로 오래 전부터 잘 알려져 있다(1,68). 미생물의 생육 단계, 탄소원의 종류와 농도, 질소원의 종류와 농도, 미량 영양소의 농도, 온도, pH, 용존 산소 농도 등은 물론, C/N 비율, 질소원의 첨가 시기, 탄소원과 미량원소의 비율 등도 영향을 미친다. 탄소원을 당화시킴과 동시에 발효를 진행시키는 방법도 사용되고 있다(69). 단세포유지를 생산하는 미생물은 효모, 곰팡이, 미세조류, 세균 등이 있지만 유지 생합성과 축적 메커니즘은 공통적인 면을 가지고 있으므로, 여기서는 효모를 예로 들어 설명하고자 한다.

### 탄소원의 종류와 농도

모든 종속영양 단세포유지 생산 균주는 공통적으로 포도당을 이용하여 지방질을 생산할 수 있다. 단세포유지 생산의 경제성은 값이 싼 탄소원을 얼마나 잘 이용하느냐에 달려 있기 때문에 많은 연구가 이 부분에 집중되어 있다. 특별히 지구 상에 다량 존재하는 리그노셀룰로스(lignocellulose)를 얼마나 효율적으로 이용하느냐가 관심을 끌고 있다. 그러한 관점에서 단세포유지 생산 효모는 리그노셀룰로스의 가수분해물의 삼투압에 잘 견디며 원하는 지방질을 생산해 내는 균주가 각광을 받고 있다(70). SCO 생산에 이용되는 기질로는 타피오카 녹말, 옥수수 대, 옥수수 속대, *Populus euramevicana* CV 잎, 벚꽃, 사탕수수 찌꺼기 펄프, 고구마 덩굴, 밀짚 등의 가수분해물, 식품공장 폐수, 도시 폐수 등이 사용되며, 이들을 이용하는 균주로는 *C. curvatus*, *C. humicola*, *Geotrichum fermentans*, *Rs. toruloides*, *R. glutinis*, *R. graminis*, *R. mucilaginosa*, *T. coremiiforme*, *T. cutaneum*, *T. derma*, *Y. lipolytica* 등이 있다(70).

높은 당 농도가 지방질의 생산에 미치는 영향은 효모의 종류에 따라 다르다. 한 *R. toruloides* 균은 배지 내 포도당 농도 70 g/L까지는 유지 생산 수율이 증가하나, 그 이상에서는 균체와 지방질 생산이 감소하는 것으로 나타났다. 그러나 한 *R. glacialis* 균에서는 120 g/L까지는 균체와 지방질 생산이 증가하기도 한다. 일반적으로 Crabtree 양성 효모(호흡 결여)인 *S. cerevisiae* 나 *Y. lipolytica*는 분해대사물 억압이 일어나나, Crabtree 음성 효모(호흡 충분)인 *R. glutinis*, *C. utilis*, *Pichia stipitis*에서는 일어나지 않는다. Crabtree 양성 효모는 고농도의 포도당 배지에서 지방질을 적게 생산하나, Crabtree 음성 효모는 지방질을 많이 생산한다. 많은 단세포유지 생산 효모는 Crabtree 음성균이다. 몇몇 *Candida* 속 균과 *C. magnus* 균은 자일로스보다 포도당을 균체 생성에는 더 잘 이용하나, 유지 생산은 자일로스에서 균체의 60%를 지방질로 축적하여 유지 생산 수율이 더 높게 나타나기도 한다(71-74).

단세포유지 생산 미생물은 자일로스, 글리세롤과 벚꽃 등의 농산부산물물의 가수분해물을 탄소원으로 이용할 수 있는 것으로 알

려져 있다. 이 경우 균주는 가수분해물의 높은 농도에 견딜 수 있는 능력, 즉 삼투압 내성(osmolarity tolerance)을 가져야 한다. 한 *R. toruloides* 속 균은 포도당 농도가 70 g/L인 배지에서도 유지를 축적할 수 있다(75). 리그노셀룰로스 분해물을 지방질로 전환시키는 연구는 효모를 중심으로 많이 연구되어 왔다. 효모는 셀룰로스 분해 능력이 없기 때문에 효모가 이용하기 위해서는 전처리를 거쳐 분해되어 유리당으로 만들어져야 효모가 이용할 수 있다(76). 그러나 이러한 분해물들은 효모의 생육에 나쁜 영향을 미치는 유기산이나 퓨란 등을 함유하는 경우가 있다. 그러므로 이러한 탄소원을 이용하기 위해서는 배지에서 이들을 제거하거나 이들 억제제(inhibitor)에 견디는 효모를 사용하여야 한다. 전처리가 끝난 리그노셀룰로스 물질들은 가수분해를 거쳐 단당류나 올리고당으로 변환되는데, 산업적으로는 셀룰로스가수분해효소, 헤미셀룰로스가수분해효소, 펙틴사구분해효소, 리그닌가수분해효소 등으로 이루어진 효소 복합물을 사용하여 가수분해하여 변환시킨다(76,77).

### 질소원의 종류와 농도

단세포유지 생산 효모의 종류에 따라 질소원이 총 지방질의 양과 지방산 조성에 미치는 영향은 폭 넓게 연구되어 왔다(6,78-80). 대부분의 효모는 염화암모늄(ammonium chloride), 아스파라진, 글루탐산을 질소원으로 잘 이용하나, *Rs. toruloides*(예전의 *R. gracilis*)는 유기 질소원에서 배양하면 무기 질소원에서 배양할 때보다 더 많은 지방질을 축적한다고 보고되었다. 그러나 한 *Rs. toruloides* 균주는 황산암모늄(ammonium sulfate), 아스파라진(asparagines), 효모추출물(yeast extract)을 질소원으로 사용하였을 때 균체의 성장과 유지 축적이 잘 일어나기도 하였다. 또 다른 균주는 urea에서 균체 성장과 유지 축적이 잘 일어났으며, 유지 생산은 ammonium sulfate 보다 염화암모늄에서 더 높게 나타났다. 이는 같은 종의 균주라도 균주에 따라 각기 다른 영양 요구성을 갖기 때문이다. 예외적으로 *C. terricola*는 대수 성장기 이후에 과량의 질소원이 존재함에도 불구하고 유지를 축적하기도하나(29), 일반적으로 단세포유지 효모는 질소원이 고갈된 이후 과잉으로 존재하는 탄소원을 유지로 전환시키는 것이 알려져 있다.

### C/N 비율

단세포유지 효모의 경우 배지의 C/N 비율은 유지 생산에 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 대부분의 효모는 C/N 비율이 증가하면 할수록 많은 유지를 축적하나, 어느 한계를 지나면 오히려 축적을 방해하는 것으로 알려져 있다. 한 *R. glutinis* 균주는 C/N 비율을 150에서 350으로 증가시키면 유지변환 수율이 0.25에서 0.4로 증가하나 그 이상에서는 균의 사멸이 일어났다(24,81). 두 가지 이상의 탄소원이 있으면 유지 축적에 큰 영향을 미친다. *Y. lipolytica*의 경우 포도당을 유일한 탄소원으로 사용할 경우 최적 C/N 비율은 35이나, 포도당과 글리세롤을 동시에 사용하면 최적 비율은 180으로 증가하였다. 또 다른 *R. toruloides* 균주는 C/N 비율을 증가시키면 균체 생성은 줄어드나 유지 함량은 증가하여 전체적인 유지 생산 수율은 증가하는 것으로 나타났는데 C/N 비율 140에서 최대 62.3%의 유지 함량을 보였다(75).

### 통기와 용존산소 농도

단세포유지를 생산하는 효모는 강력한 통기 하에서 유지 축적이 증가된다(82). 단세포유지 생산량은 미생물의 균체량과 유지 함량에 의해서 결정된다. *Rs. toruloides*의 경우 통기량을 증가시키면 생육속도는 증가하나 세포 내 유지 농도는 감소하는 것

로 보고되었다. 따라서 통기량의 증가에 따른 치중 유지 생산수율은 약 0.012 g lipid/g 건조균체/h로 보고되었다(4). 또한 *R. toruloides*의 일회식 배양에서는 배지에서 질소원이 고갈된 직후에는 산소 요구량이 증가하나 이후에는 감소하는 것으로 나타났다(80). 산소 요구량과 유지 생산수율은 효모균의 종류에 따라 달라지므로 각 균주에 대하여 실험적으로 구하여야 한다.

## pH

단세포유지의 상업적인 생산에서는 pH (산도) 조절도 중요한 조절 인자 중의 하나이다. 그러므로 pH 변화나 배지의 산성화에 영향을 받지 않는 균주의 선택이 유리하다. 효모와 박테리아 혼합된 미생물군에서 효모를 선택적으로 배양하기 위해서는 산성 YM 배지(pH 3.9)가 오래 전부터 사용되어 왔다(83). 산업적으로 산성 배지는 박테리아의 생육을 저해하지만 유지 생산 효모에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다(80). 실제로 *R. toruloides*의 총 유지 생산성은 pH 3-6 사이에서 배양 시 차이를 보이지 않았다(84).

## 배양온도

단세포유지 효모의 배양온도를 25°C에서 10°C로 낮출 경우 *Y. lipolytica*와 저온균인 *Cd. scottii*의 총 유지 생산 수율과 인지지방질의 생산은 증가하는 동시에 유지의 불포화도도 증가하였다. 이와 같은 현상은 일반 효모인 *Cd. utilis*와 *S. cerevisiae*에서도 관찰되었다. 그러나 낮은 온도에서 배양하는 방법은 높은 냉각 비용으로 인하여 산업적인 생산에 응용하기에는 어려움이 있다(85,86).

## 배양방법

단세포유지 효모를 효율적으로 고농도 배양하기 위하여 유가 배양(fed-batch culture)과 연속배양(continuous culture) 방법 등이 사용된다. *R. glutinis*를 질소제한 조건에서 연속배양하면 비생장율(specific growth rate)이 증가하면 할수록 비지방질의 생산 수율(specific lipid production rate)은 감소하였지만, 탄소제한 조건에서는 증가하였다. 그러나 모든 조건에서 비생장율이 증감하면 총지방질의 불포화도는 증가하였다(9). 또한 비생장율이 증가하면 탄소원, 질소원, 산소의 비흡수율(specific uptake rate)은 모두 증가하였다(10).

*Cd. curvata* D를 포도당과 자일로스르 사용하여 연속배양하면 0.16과 0.27 g/L/h의 지방질을 각각 얻었으며, 14 g/L의 균체를 얻을 수 있다. *Apiotrichum curvatum*을 포도당을 사용하여 배양할 경우 0.42 g/L/h의 지방질을 얻는데 균체의 지방질 함량은 31.9% (w/w)였다. *R. glutinis*를 산소가 강화된 공기를 사용하여 84시간 유가배양할 경우 185 g/L의 균체를 얻을 수 있으며(87), *L. starkeyi* 경우에는 140시간 유가배양할 경우 지방질 함량 54% (w/w)의 균체 153 g/L을 얻을 수 있다(88).

배양방법을 달리하여 얻은 단세포유지 효모의 주요 지방산은 올레산, 팔미트산, 리놀레산, 스테아르산 등으로서 식물성 유지의 지방산 조성과 유사하였다(89).

## 기타 요인

탄소원과 질소원 이외의 배지 구성성분도 단세포유지 효모의 생장에 영향을 미치는데, *S. cerevisiae* 배양 시 인 성분을 제한하면 트리아실글리세롤의 함량이 증가함을 볼 수 있다(82). *Cd. albicans* 배양 시 염화소듐의 함량을 10%로 증가시키면 지방질의 함량이 현저히 증가하였다(82).

## 유전자변형과 대사공학을 이용한 균주의 개선

최근 유전공학과 대사공학 기술의 발전과 더불어 단세포유지 생산 미생물의 유전자 기능을 변형시켜 미생물의 지방질 축적을 향상시키려는 시도가 활발히 진행되고 있다. 이러한 시도는 다섯 가지로 나눌 수 있는데, 지방산 생합성 관여 효소의 overexpression, TAG 생합성 관여 효소의 overexpression, TAG 생합성 by-pass 경로 관여 효소의 조절, 지방질 합성과 경쟁하는 대사에 관련된 효소의 down-regulation, multi-gene 형질전환에의 접근 등이 방법이다. 지방산과 TAG 합성에 관련하여 overexpression되거나 knockout된 유전자는 매우 다양하다(5,90).

## 지방산 합성 강화

지방산 생합성에 관여하는 효소는 acetyl-CoA carboxylase (ACC), glycerol-sn-3-phosphate acyl-transferase (GPAT), diacylglycerol acyltransferase (DGAT), glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH), acetyl-CoA synthetase (ACS), ATP:citrate lyase (ACL), malic enzyme (ME), glycerol-3-phosphate deshydrogenase (G3PDH) 등이다(5,22-25). 단세포유지 곰팡이인 *M. rouxii*나 일반 효모인 *Hansenula polymorphac*의 ACC1 효소를 heterologous expression 시키면 총지방산 함량을 40% 증가시킬 수 있다(91). 대장균 ACC와 thioesterase를 동시 발현시키면(coexpression) 지방산 합성 속도를 6배 증가시킬 수 있다. 이러한 사실로 보아 ACC가 관여하는 단계가 지방질 생합성의 속도조절 단계라는 것을 확인할 수 있다(92).

## TAG 합성 강화

GPAT는 Kennedy 경로를 거쳐 라이소포스파테이트를 합성하므로 TAG를 합성하는 첫 반응에 관여한다. 또한 DGAT1을 조작한 *S. cerevisiae* 균주의 TAG 생합성은 50% 증가한 반면, DGAT2를 조작한 균주에서는 TAG 생합성이 50% 감소하였다(93). DGAT는 TAG 합성의 마지막 단계를 조절한다. 아라비딤시스의 DGAT를 효모에 형질전환(transformation) 시키면 DGAT의 활성이 200-600배 증가하여 결과적으로 3-9배의 TAG 합성을 가져온다(94).

## By-pass 경로 조절

ACS, ACL, ME와 같은 효소는 지방질 대사에 직접 관여하지는 않지만 지방질 합성에 필요한 대사물의 양을 증가시킴으로써 지방질 축적에 영향을 미친다(95). 대장균에서 ACS를 over-expression 시키면 포도당대사 중 아세트산의 양을 현저히 감소시킨다. 그러나 아세트산이 유일한 탄소원일 경우에는 아세트산의 합성 대사를 강화한다. ACS의 활성이 증가하면 아세트산을 아세틸보조효소에이로 활성화시키고 이것이 지방산의 합성을 증가시키게 된다. 예로서 대장균에서 ACS 유전자를 over-expression 시키면 ACS의 활성이 9배 정도 증가한다. 지방질 대사에 있어서 ME는 지방산합성효소(fatty acid synthase, FAS)와 불포화효소(desaturases)의 작용을 NADPH를 공급하는 역할을 한다(96). 대장균에서 ME를 over-expression 시켜 NADPH의 양이 증가하거나 배지에 말산(malic acid)을 첨가하면 세포 내 지방질의 함량이 4배 증가하였다(97). ACL은 시트르산(citric acid)을 아세틸보조효소에이와 옥살로아세트산으로 변환시키는데, 단세포유지 효모와 곰팡이, 포유동물의 지방산 축적에서 주요효소로써 작용한다. ACL이 강화된 *Aspergillus oryzae*의 지방산과 TAG 생산성은 각각 1.7배, 1.9배 증가하였다(98).

지방산과 TAG의 생합성 및 by-pass 경로에 관여하는 효소의 유전자는 ACC, ACC1, ACL, Antisense PEPC, DGAT, FAT

*fabD* (MAT), FAT, GPAT, *GPD1* (GPDH), KAS III, ME, SLC1-1 (LPAT),  $\Delta$ AGPase,  $\Delta$ DAGPase,  $\Delta$ GPD1 (GPDH),  $\Delta$ GPDI, ACS,  $\Delta$ GPAT2 (GPDH),  $\Delta$ LRO1 (PDAT),  $\Delta$ ME,  $\Delta$ TGL3,  $\Delta$ TGL4 (TAG lipases) 등이 있다(5).

유전자 공여종(source species)은 *Acinetobacter calcoaceticus* (식물), *M. rouxii* (곰팡이), *Agrobacterium tumefaciens* (세균), *Anabaena* sp. (미세조류), *Arabidopsis* (plant), *A. nidulans* (곰팡이), *A. oryzae* (곰팡이), *Chlamydomonas* (미세조류), *Chlamydomonas reinhardtii* (미세조류), *Diploknema Butyracea* (식물), *Escherichia coli* (세균), *Jatropha curcas* (식물), *Mo. alpine* (곰팡이), *M. circinelloides* (곰팡이), *Ricinus communis* (식물), safflower (식물), *Spinacia oleracea* (식물), *Streptomyces avermitilis* (세균), *Streptomyces coelicolor* (세균), *Umbellularia californica* (식물), *Y. lipolytica* (효모) 등이며, 수혜종(receiver species)은 *Arabidopsis* (식물), *A. nidulans* (곰팡이), *A. oryzae* (곰팡이), *Brassica napus* (식물), *Chlamydomonas* (미세조류), *Chlamydomonas reinhardtii* (미세조류), *E. coli* (세균), *Hansenula polymorpha* (효모), *M. circinelloides* (곰팡이), *Nicotiana tabacum* (식물), rapeseed, *Arabidopsis* (식물), *Y. lipolytica* (효모) 등인데, 성능이 개선된 새로운 균주는 기존의 균주에 비하여 약 40%내지 10배의 유지 생산 능력을 보이는 것으로 나타났다(5).

#### 지방산 및 TAG 분해 억제

지방질 축적을 증가시키는 다른 방법에는 지방질 합성과 경쟁하는 다른 대사에 관여하는 효소를 down-regulation 하는 방법이 있다. 지방산을 분해하는 베타 산화( $\beta$ -oxidation)에 관련된 효소를 저해하거나(99,100), 포스파티드산들 DAG로 변환하는 대신 CDP-diacylglycerol로 변환시켜 인지지방질 합성하는 경로에 관여된 효소를 억제하거나(101,102), 녹말의 생합성을 저해하거나(103), TAG 분해효소인 트리아아실글리세롤라이페이스(triacylglycerol lipase, TGL)의 유전자를 억제하는 방법(104) 등이 있다.

#### Multi-gene 동시 조절

TAG 합성에 관여하는 두 개 이상의 효소에 관련된 유전자를 동시에 overexpression 시키는 multi-gene approach 방법도 단세포 유지 미생물의 지방질 생성에 기여한다(105,106). 대상 유전자는 ACC, thioesterase,  $\Delta$ fadD (acyl-CoA synthetase); ACP, KAS, FAT; ACC1, DGAT1; *POX1-6* (AOXs), MFE1, GPD1,  $\Delta$ GPAT2 등이 다(5). 유전자 공여종은 *E. coli* (세균), *H. phuvialis* (미세조류), *Y. lipolytica* (효모) 등이며, 수혜종은 *E. coli* (세균), *H. phuvialis* (미세조류), *Y. lipolytica* (효모) 등이고, 유지 생산 능력이 약 5-20배로 증가하였다(5).

미세조류인 *H. phuvialis*의 지방산 합성에 관여하는 주요 효소에는 ACP, KAS, FAT 등이 포함되는데, 이들의 발현과 지방산 합성 사이에는 직선적인 관계가 나타났다. 단세포유지 효모인 *Y. lipolytica*에서 ACC1과 DGA1을 동시에 발현시켰더니 지방질 함량이 41.4% 증가하는 상승효과를 보였다(107). 또한  $\Delta$ gut 돌연변이 *Y. lipolytica* 균주의 *POX1-6* (6개의 acyl-coenzyme A oxidase, AOX)를 삭제하였더니 지방질 함량이 4배 증가하였다(81). *Y. lipolytica* 균주의  $\Delta$ 6,  $\Delta$ 12 불포화효소의 유전자를 동시발현시켰더니 감마리놀렌산의 생성이 현저히 증가되었다(108).

## 요 약

단세포유지 생산에 이용되는 미생물은 효모, 곰팡이, 미세조류

등이다. 단세포유지의 생산 효율은 배지의 조성을 조절하여 영양 공급을 최적화하거나, 배양 조건을 조절하거나, 최신의 생명공학 기술을 활용하여 균주를 개량함으로써 증가시킬 수 있다. 단세포 유지를 상업적으로 대량 생산하기 위해서는 값이 싼 탄소원을 확보하는 것이 무엇보다 중요하므로 지구 상에 풍부한 섬유질 자원을 활용하는 방법이 주목을 끌고 있다. 미세조류는 대기 중의 탄산가스를 탄소원으로 이용하므로 탄소원의 비용이 들지 않는다는 장점이 있다. 단세포유지 생산 미생물의 유전자를 조작하거나 대사공학기술을 이용하는 방법은 균주의 생산성을 획기적으로 높이기도 한다. 단세포유지는 그 동안 식품, 사료, 의약품 등으로 사용되어 왔으나 최근에는 바이오디젤(biodiesel)의 원료로도 사용될 수 있어 또 다른 관심을 끌고 있다.

## References

- Woodbine M. Microbial fat: Microorganisms as potential fat producers. *Prog. Ind. M.* 1: 181-245 (1959)
- Ratledge C, Cohen Z. Microbial and algal oils: Do they have a future for biodiesel or as commodity oils? *Lipid Technol.* 20: 155-160 (2008)
- Ratledge C. Single cell oils for the 21st century. 2nd ed. pp. 3-26. In: Single cell oils-microbial and algal oils. Cohen Z, Ratledge C (eds). AOCS Publishing, Champaign, IL, USA (2010)
- Choi SY, Ryu DDY, Rhee JS. Production of microbial lipid: Effects of growth rate and oxygen on lipid synthesis and fatty acid composition of *Rhodotorula gracilis*. *Biotechnol. Bioeng.* 24: 1165-1172 (1982)
- Liang MH, Jiang JG. Advancing oleaginous microorganisms to produce lipid via metabolic engineering technology. *Prog. Lipid Res.* 52: 395-408 (2013)
- Yoon SH, Rhim JW, Choi SY, Ryu DDY, Rhee JS. Effect of carbon and nitrogen sources on lipid production of *Rhodotorula gracilis*. *J. Ferment. Technol.* 60: 243-246 (1982)
- Hassan M, Blanc PJ, Granger LM, Pareilleux A, Goma G. Influence of nitrogen and iron limitations on lipid production by *Cryptococcus curvatus* grown in batch and fed-batch culture. *Process Biochem.* 31: 355-361 (1996)
- Li YH, Liu B, Zhao ZB, Bai FW. Optimization of culture conditions for lipid production by *Rhodospiridium toruloides*. *Chinese J. Biotechnol.* 22: 650-656 (2006)
- Yoon SH, Rhee JS. Lipid from yeast fermentation: Effects of cultural conditions on lipid production and its characteristics of *Rhodotorula gracilis*. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 60: 1281-1286 (1983)
- Yoon SH, Rhee JA. Quantitative physiology of *Rhodotorula glutinis* for microbial lipid production. *Process Biochem.* 18: 2-4 (1983)
- Liang XA, Dong WB, Miao XJ, Dai CJ. Production technology and influencing factors of microorganism grease. *Food Res. Dev.* 27: 46-47 (2006)
- Donot F, Fontana A, Baccou JC, Strub C, Schorr-Galindo S. Single cell oils (SCOs) from oleaginous yeasts and moulds: Production and genetics. *Biomass Bioenerg.* 68: 135-150 (2014)
- Kurokawa H. Oleaginous yeast convert glycerol to triacylglycerol. *INFORM* 26: 618-619 (2015)
- Shen JJ, Li FC, Yang QL, Feng DW, Qin S, Zhao ZB. Fermentation of *Spartina anglica* acid hydrolysate by *Trichosporon cutaneum* for microbial lipid production. *Mar. Sci.* 3: 38-41 (2007)
- Certik M, Shimizu S. Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. *J. Biosci. Bioeng.* 87: 1-14 (1999)
- Cheirsilp B, Kitcha S. Solid state fermentation by cellulolytic oleaginous fungi for direct conversion of lignocellulosic biomass into lipids: Fed-batch and repeated-batch fermentations. *Ind. Crop. Prod.* 66: 73-80 (2015)
- Illman AM, Scragg AH, Shales SW. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme Microb. Tech.* 27: 631-635 (2000)



18. Chen GQ, Jiang Y, Chen F. Variation of lipid class composition in *Nitzschia laevis* as a response to growth temperature change. *Food Chem.* 109: 88-94 (2008)
19. Jorquera O, Kiperstok A, Sales EA, Embiruçu M, Ghirardi ML. Comparative energy life-cycle analyses of microalgal biomass production in open ponds and photobioreactors. *Biores. Technol.* 101: 1406-1413 (2010)
20. Gouda MK, Omer SH, Aouad LM. Single cell oil production by *Gordonia* sp. DG using agro-industrial wastes. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24: 1703-1711 (2008)
21. Kalscheuer R, Stolting T, Steinbuchel A. Microdiesel: *Escherichia coli* engineered for fuel production. *Microbiology* 152: 2529-2536 (2006)
22. Papanikolaou S, Aggelis G. Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.* 113: 1031-1051 (2011)
23. Scott SA, Davey MP, Dennis JS, Horst I, Howe CJ, Lea-Smith DJ, Smith AG. Biodiesel from algae: Challenges and prospects. *Curr. Opin. Biotech.* 21: 277-286 (2010)
24. Beopoulos A, Cescut J, Haddouche R, Uribealrrea JL, Molina-Jouve C, Nicaud JM. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. *Prog. Lipid Res.* 48: 375-387 (2009)
25. Rajakumari S, Grillitsch K, Daum G. Synthesis and turnover of non-polar lipids in yeast. *Prog. Lipid Res.* 47: 157-171 (2008)
26. Sitepu IR, Sestric R, Ignatia L, Levin D, Bruce German J, Gillies LA, Almada LAG, Boundy-Mills KL. Manipulation of culture conditions alters lipid content and fatty acid profiles of a wide variety of known and new oleaginous yeast species. *Bioresource Technol.* 144: 360-369 (2013)
27. Meesters PAEP, Huijberts GNM, Eggink G. High-cell-density cultivation of the lipid accumulating yeast *Cryptococcus curvatus* using glycerol as a carbon source. *Appl. Microbiol. Biot.* 45: 575-579 (1996)
28. Liu H, Zhao X, Wang F, Li Y, Jiang X, Ye M, Zhao ZK, Zou H. Comparative proteomic analysis of *Rhodospiridium toruloides* during lipid accumulation. *Yeast* 26: 553-566 (2009)
29. Pedersen TA. Lipid formation in *Cryptococcus terricolus*. I. Nitrogen nutrition and lipid formation. *Acta Chem. Scand.* 16: 359-373 (1962)
30. Connor MR, Atsumi S. Synthetic biology guides biofuel production. *BioMed. Res. Int.* 2010: 1-9 (2010)
31. Radulovic M, Knittelfelder O, Cristobal-Sarramian A, Kolb D, Wolinski H, Kohlwein SD. The emergence of lipid droplets in yeast: Current status and experimental approaches. *Curr. Genet.* 59: 231-242 (2013)
32. Hassan M, Blanc PJ, Granger LM, Pareilleux A, Goma G. Lipid production by an unsaturated fatty acid auxotroph of the oleaginous yeast *Apiotrichum curvatum* grown in single-stage continuous culture. *Appl. Microbiol. Biot.* 40: 483-488 (1993)
33. Ykema A, Verbree EC, Kater MM, Smit H. Optimization of lipid production in the oleaginous yeast *Apiotrichum curvatum* in wheypermeate. *Appl. Microbiol. Biot.* 29: 211-218 (1988)
34. Laoteng K, Certik M, Cheevadhanark S. Mechanisms controlling lipid accumulation and polyunsaturated fatty acid synthesis in oleaginous fungi. *Chem. Pap.* 65: 97-103 (2011)
35. Cohen Z, Heimer YM. Production of polyunsaturated fatty acids (EPA, ARA and GLA) by the microalgae *Porphyridium* and *Spirulina*. pp. 243-273. In: *Industrial applications of single cell oils*. Kyle DJ, Ratledge C (eds). AOCS Press, Champaign, IL, USA (1992)
35. Pritchett WC, Taylor WG, Carroll DM. Chlorophyll removal during earth bleaching of soybean oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 24: 225-227 (1947)
36. Ratledge, C. Microbial lipids: Commercial realities or academic curiosities. pp. 1-14. In: *Industrial applications of single cell oils*. Kyle DJ, Ratledge C (eds). AOCS Press, Champaign, IL, USA (1992)
37. Nakabara T, Yokochi T, Kamisaka Y, Suzuki O. Gamma-linolenic acid from genus *Mortierella*. pp. 61-97. In: *Industrial applications of single cell oils*. Kyle DJ, Ratledge C (eds). AOCS Press, Champaign, IL, USA (1992)
38. Botba A, Strauss T, Kock JLF, Pohl CH, Coetzee DJ. Carbon source utilization and  $\gamma$ -linolenic acid production by *Mucoralean* fungi. *Syst. Appl. Microbiol.* 20: 165-170 (1997)
39. Fukuda H, Morikawa H. Enhancement of  $\gamma$ -linolenic acid production by *Mucor ambiguus* with nonionic surfactants. *Appl. Microbiol. Biot.* 27: 15-20 (1987)
40. Roux MP, Kock JLF, Botha A, du Preez JC, Wells GV, Botes PJ. *Mucor*: A source of cocoa butter and gamma-linolenic acid. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 10: 417-422 (1994)
41. Kristofikova L, Rosenberg M, Vlnova A, Sajbidor J, Certik M. Selection of *Rhizopus* strains for L(+)-lactic acid and  $\gamma$ -linolenic acid production. *Folia Microbiol.* 36: 451-455 (1991)
42. Emelyanova EV. Gamma-linolenic acid production by *Cunninghamella japonica* in solid state fermentation. *Process Biochem.* 31: 431-434 (1996)
43. Amano N, Shinmen Y, Akimoto K, Kawashima H, Amachi T. Chemotaxonomic significance of fatty acid composition in the genus *Mortierella* (*Zygomycetes*, *Mortierellaceae*). *Mycotaxon* 45: 257-265 (1992)
44. Eroshin VK, Dedyukhina EG, Chistyakova TI, Zhelifonova VP, Botast RJ. Studies on arachidonic acid production by *Mortierella* fungi: A microbiological method for selecting arachidonic acid producers. *Microbiology* 65: 26-31 (1996)
45. Sajbidor J, Kozelouhova D, Certik M. Influence of some metal ions on the lipid content and arachidonic acid production by *Mortierella* sp.. *Folia Microbiol.* 37: 404-406 (1992)
46. Chen HC, Chang CC, Chen CX. Optimization of arachidonic acid production by *Mortierella alpina* Wuji-H4 isolate. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74: 569-578 (1997)
47. Totani N, Watanabe A, Oba K. An improved method of arachidonic acid production by *Mortierella alpina*. *Yukagaku* 36: 328-331 (1987)
48. Stredanska S, Slugen D, Stredansky M, Grego J. Arachidonic acid production by *Mortierella alpina* grown on solid substrates. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 9: 511-513 (1993)
49. Kim SK, Chung GH, Han JJ, Cho SW, Yoon SH. Effect of extraction methods on the extraction yield of total lipid and arachidonic acid from single cell oil, *Mortierella* sp. *Korean J. Food Sci. Technol.* 47: 281-285 (2015)
50. Kim SK, Chung GH, Han JJ, Cho SW, Yoon SH. Bleaching of lipids extracted from single cell oil produced by *Mortierella* sp.. *Korean J. Food Sci. Technol.* 47: 405-408 (2015)
51. Shimizu S, Akimoto K, Kawashima H, Shinmen Y, Yamada H. Production of dihomo- $\gamma$ -linolenic acid by *Mortierella alpina* IS-4. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 66: 237-241 (1989)
52. Shimizu S, Akimoto K, Sugano M, Yamada H. Studies on desaturase inhibitors of polyunsaturated fatty acid biosynthesis. pp. 37-41. In: *Essential fatty acids and eicosanoids*. Sinclair A, Gibson R (eds). AOCS Press, Champaign, IL, USA (1993).
53. Jareonkitmongkol S, Sakuradani E, Shimizu S. A novel  $\Delta 5$ -desaturase defective mutant of *Mortierella alpina* IS-4 and its dihomo- $\gamma$ -linolenic acid productivity. *Appl. Environ. Microb.* 59: 4300-4304 (1993)
54. Shimizu S, Kawashima H, Shinmen Y, Akimoto K, Yamada H. Production of eicosapentaenoic acid by *Mortierella* fungi. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 65: 1455-1459 (1988)
55. Shimizu S, Kawashima H, Akimoto K, Shinmen Y, Yamada H. Conversion of linseed oil to an eicosapentaenoic acid-containing oil by *Mortierella alpina* IS-4 at low temperature. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32: 1-4 (1989)
56. Bajpai PK, Bajpai P, Ward OP. Optimisation of culture conditions for production of eicosapentaenoic acid by *Mortierella elongata* NRRL 5513. *J. Ind. Microbiol.* 9: 11-18 (1992)
57. Kotula KL, Yi M. Optimization of conditions for the production of eicosapentaenoic acid by *Mortierella*. *J. Food Quality* 17: 101-114 (1994)
58. Jareonkitmongkol S, Shimizu S, Yamada H. Production of an eicosapentaenoic acid-containing oil by a  $\Delta 12$  desaturase-defective mutant of *Mortierella alpina* IS-4. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 70: 119-123 (1993)
59. Shirasaka N, Shimizu S. Production of eicosapentaenoic acid by *Saprolegnia* sp. 28YTF-1. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 72: 1545-1549 (1995)

60. Weete JD, Gandhi SR. Enhancement of Czo polyunsaturated fatty acid production in *Pythium ultimum*. pp. 98-117. In: Industrial applications of single cell oils. Kyle DJ, Ratledge C (eds). AOCS Press, Champaign, IL, USA (1992)
61. O'Brien DJ, Kurantz MJ, Kwoczak R. Production of eicosapentaenoic acid by the filamentous fungus *Pythium irregulare*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 40: 211-214 (1993)
62. Boswell KDB, Glaude R, Prima B, Kyle DJ. SCO production by fermentative microalgae. pp. 274-286. In: Industrial applications of single cell oils. Kyle DJ, Ratledge C (eds). AOCS Press, Champaign, IL, USA (1992)
63. Yazawa K, Watanabe K., Ishikawa C, Kondo K, Kimura S. Production of eicosapentaenoic acid from marine bacteria. pp. 29-51. In: Industrial applications of single cell oils. Kyle DJ, Ratledge C (eds). AOCS Press, Champaign, IL, USA (1992)
64. Kendrick A, Ratledge C. Lipids of selected molds grown for production of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. Lipids 27: 15-20 (1992)
65. Singh A, Ward OP. Microbial production of docosahexaenoic acid (DHA, C22:6). Vol 45. pp. 271-312. In: Advances in Applied Microbiology. Neidleman SL, Laskin AI (eds). Academic press, Waltham, MA, USA(1997)
66. Yaguchi T, Tanaka S, Yokochi T, Nakahara T, Higashihara T. Production of high yields of docosahexaenoic acid by *Schizochytrium* sp. strain SR21. J. Am. Oil Chem. Soc. 74: 1431-1434 (1997)
67. Kawashima H, Kamada N, Sakuradani E, Jareonkitmongkol S, Akimoto K, Shimizu S. Production of 8,11,14,17-*cis*-eicosatetraenoic acid by  $\Delta 5$  desaturase-defective mutants of an arachidonic acid-producing fungus, *Mortierella alpina*. J. Am. Oil Chem. Soc. 74: 455-459 (1997)
68. Rattray J. Yeast. pp. 555-697. In: Microbial lipids. Ratledge C, Wilkinson S (eds). Academic press, Waltham, MA, USA (1988)
69. Tanimura A, Takashima M, Sugita T, Endoh R, Kikukawa M, Yamaguchi S, Sakuradani E, Ogawa J, Shima J. Selection of oleaginous yeasts with high lipid productivity for practical biodiesel production. Bioresource Technol. 153: 230-235 (2014)
70. Sitepu IR, Garay LA, Sestric R, Levin D, Block DE, German JB, Boundy-Mills KL. Oleaginous yeasts for biodiesel: Current and future trends in biology and production. Biotechnol. Adv. 32: 1336-1360 (2014)
71. Ageitos JM, Vallejo JA, Veiga-Crespo P, Villa TG. Oily yeasts as oleaginous cell factories. Appl. Microbiol. Biotechnol. 90: 1219-1227 (2011)
72. Chi Z, Zheng Y, Jiang A, Chen S. Lipid production by culturing oleaginous yeast and algae with food waste and municipal wastewater in an integrated process. Appl. Biochem. Biotechnol. 165: 442-453 (2011)
73. Galafassi S, Cucchetti D, Pizza F, Franzosi G, Bianchi D, Compagno C. Lipid production for second generation biodiesel by the oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis*. Bioresource Technol. 111: 398-403 (2012)
74. Leiva-Candia DE, Pinzi S, Redel-Macias MD, Koutinas A, Webb C, Dorado MP. The potential for agro-industrial waste utilization using oleaginous yeast for the production of biodiesel. Fuel 123: 33-42 (2014)
75. Kraisintu P, Yongmanitchai W, Limtong S. Selection and optimization for lipid production of a newly isolated oleaginous yeast, *Rhodospiridium toruloides* DMKU3-TK16. Kasetsart. J. Nat. Sci. 44: 436-445 (2010)
76. van Dyk JS, Pletschke BI. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes-factors affecting enzymes, conversion and synergy. Biotechnol. Adv. 30: 1458-1480 (2012)
77. Girio F, Fonseca C, Carvalheiro F, Duarte LC, Marques S, Bogel-Lukasik R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. Bioresource Technol. 101: 4775-4800 (2010)
78. Husain SS, Hardin MM. Influence of carbohydrate and nitrogen sources upon lipid production by certain yeasts. J. Food Sci. 17: 60-66 (1952)
79. Evans CT, Ratledge C. Effect of nitrogen source on lipid accumulation in oleaginous yeasts. J. Gen. Microbiol. 130: 1693-1704 (1984)
80. Turcotte G, Kosaric N. Lipid biosynthesis in oleaginous yeasts. Bioprocess Eng. 40: 73-92 (2005)
81. Beopoulos A, Mrozova Z, Thevenieau F, Le Dall MT, Hapala I, Papanikolaou S, Chardot T, Nicaud JM. Control of lipid accumulation in the yeast *Yarrowia lipolytica*. Appl. Environ. Microb. 74: 7779-7789 (2008)
82. Rattray JB, Scheibeci A, Kidby D. Lipids of yeasts. Bacteriol. Rev. 39: 197-231 (1975)
83. Miller JJ, Webb NS. Isolation of yeasts from soil with the aid of acid, rose bengal, and oxgall. Soil Sci. 77: 197-204 (1954)
84. Kessell RHJ. Fatty acids of *Rhodotorula gracilis*: Fat production in submerged culture and the particular effect of pH value. J. Appl. Bacteriol. 31: 220-231 (1968)
85. Hunter K, Rose AH. Lipid composition of *Saccharomyces cerevisiae* as influenced by growth temperature. BBA-Lipid. Lipid Met. 260: 639-653 (1972)
86. Kates M, Paradis M. Phospholipid desaturation in *Candida lipolytica* as a function of temperature and growth. Can. J. Biochem. Cell B. 51: 184-197 (1973)
87. Pan JG, Rhee JS. Biomass yields and energetic yields of oleaginous yeasts in batch culture. Biotechnol. Bioeng. 28: 112-114 (1986)
88. Hiroaki Y, Hironori M, Takeshi K, Shoichi S. Mass production of lipids by *Lipomyces starkeyi* in microcomputer-aided fed-batch culture. J. Ferment. Technol. 61: 275-280 (1983)
89. Ratledge C, Streekstra H, Cohen Z, Fichtali J. Downstream processing, extraction, and purification of single cell oils. 2nd ed. pp. 179-195. In: Single cell oils - microbial and algal oils. Cohen Z, Ratledge C (eds). AOCS Publishing, Champaign, IL, USA (2010)
90. Wang JJ, Zhang BR, Chen SL. Oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* mutants with a disrupted fatty acyl-CoA synthetase gene accumulate saturated fatty acid. Process Biochem. 46: 1436-1441 (2011)
91. Ruenwai R, Cheevadhanarak S, Laoteng K. Overexpression of acetyl-CoA carboxylase gene of *Mucor rouxii* enhanced fatty acid content in *Hansenula polymorpha*. Mol. Biotechnol. 42: 327-332 (2009)
92. Liang Y, Cui Y, Trushenski J, Blackburn JW. Converting crude glycerol derived from yellow grease to lipids through yeast fermentation. Bioresource Technol. 101: 7581-7586 (2010)
93. Zaremborg V, McMaster CR. Differential partitioning of lipids metabolized by separate yeast glycerol-3-phosphate acyltransferases reveals that phospholipase D generation of phosphatidic acid mediates sensitivity to choline-containing lysolipids and drugs. J. Biol. Chem. 277: 39035-39044 (2002)
94. Bouvier-Nave P, Benveniste P, Oelkers P, Sturley SL, Schaller H. Expression in yeast and tobacco of plant cDNAs encoding acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase. Eur. J. Biochem. 267: 85-96 (2000)
95. Lin H, Castro NM, Bennett GN, San KY. Acetyl-CoA synthetase overexpression in *Escherichia coli* demonstrates more efficient acetate assimilation and lower acetate accumulation: A potential tool in metabolic engineering. Appl. Microbiol. Biotechnol. 71: 870-874 (2006)
96. Yoon SH, Park JS, Rhee JS. Production of NADPH for lipogenesis in oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis*. Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng. 12: 247-251 (1984)
97. Meng X, Yang J, Cao Y, Li L, Jiang X, Xu X, Liu W, Mo X, Zhang Y. Increasing fatty acid production in *E. coli* by simulating the lipid accumulation of oleaginous microorganisms. J. Ind. Microbiol. Biot. 38: 919-925 (2011)
98. Papanikolaou S, Galiotou-Panayotou M, Fakas S, Komaitis M, Aggelis G. Citric acid production by *Yarrowia lipolytica* cultivated on olive-mill wastewater-based media. Bioresource Technol. 99: 2419-2428 (2008)
99. Michinaka Y, Shimauchi T, Aki T, Nakajima T, Kawamoto S, Shigeta S, Suzuki O, Ono K. Extracellular secretion of free fatty acids by disruption of a fatty acyl-CoA synthetase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biosci. Bioeng. 95: 435-440 (2003)
100. Scharnewski M, Pongdontri P, Mora G, Hoppert M, Fulda M. Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* deficient in acyl-CoA syn-

- thetases secrete fatty acids due to interrupted fatty acid recycling. FEBS J. 275: 2765-2778 (2008)
101. Cao Z, Gao H, Liu M, Jiao P. Engineering the acetyl-CoA transportation system of *Candida tropicalis* enhances the production of dicarboxylic acid. Biotechnol. J. 1: 68-74 (2006)
  102. Coleman RA, Lee DP. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. Prog. Lipid Res. 43: 134-176 (2004)
  103. Li Y, Han D, Hu G, Sommerfeld M, Hu Q. Inhibition of starch synthesis results in overproduction of lipids in *Chlamydomonas reinhardtii*. Biotechnol. Bioeng. 107: 258-268 (2010)
  104. Dulermo T, Nicaud JM. Involvement of the G3P shuttle and beta-oxidation pathway in the control of TAG synthesis and lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica*. Metab. Eng. 13: 482-491 (2011)
  105. Verwoert IGS, van der Linden KH, Walsh MC, Nijkamp HJJ, Stuitje AR. Modification of *Brassica napus* seed oil by expression of the *Escherichia coli fabH* gene, encoding 3-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III. Plant Mol. Biol. 27: 875-886 (1995)
  106. Roesler K, Shintani D, Savage L, Boddupalli S, Ohlrogge J. Targeting of the *Arabidopsis* homomeric acetyl-coenzyme A carboxylase to plastids of rapeseeds. Plant Physiol. 113: 75-81 (1997)
  107. Tai M, Stephanopoulos G. Engineering the push and pull of lipid biosynthesis in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for biofuel production. Metab. Eng. 15: 1-9 (2013)
  108. Chuang LT, Chen DC, Nicaud JM, Madzak C, Chen YH, Huang YS. Co-expression of heterologous desaturase genes in *Yarrowia lipolytica*. New Biotechnol. 27: 277-282 (2010)