

Rhodotorula glutinis K-501로부터 세포외지질 생산을 위한 배양 조건의 최적화

† 김 의 용 · 박 평 규 · 채 희 정

서울시립대학교 공과대학 화학공학과

¹대상(주) 중앙연구소

(접수 : 1997. 9. 23., 게재승인 : 1997. 12. 1.)

Optimization of Culture Conditions for Extracellular Lipid Production from *Rhodotorula glutinis* K-501

Eui Yong Kim[†], Pyoung Kyu Park and Hee Jeong Chae¹

Dept. of Chemical Engineering, The University of Seoul, Seoul 130-743, Korea

¹R&D Center, Daesang Corp., Icheon, Kyongki-Do 467-810, Korea

(Received : 1997. 9. 23., Accepted : 1997. 12. 1.)

An extracellular lipid-producing strain, *Rhodotorula glutinis* K-501, was isolated from soil. The extracellular lipid produced by the cell was found to have good and stable emulsifying activity. Factors affecting the extracellular lipid production were studied to optimize culture conditions for maximum production. Sucrose and ammonium sulfate were selected as best carbon and nitrogen sources, respectively because they gave the highest concentration of product. The optimum C/N ratio was 50. Optimum concentrations of KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , MgSO_4 , and CaCl_2 were 3.5, 1.0, 0.75, and 0.1g/L, respectively. The optimum temperature and initial pH were determined as 22°C and 7.0, respectively. When the batch culture was conducted with a sucrose concentration of 60g/L under the optimized conditions, extracellular lipid was produced to a concentration of 8.1g/L with a high production yield of 51.9% based on dry cell weight.

Key Words : extracellular lipid, emulsifying activity, culture conditions, *Rhodotorula glutinis*

서 론

지질(lipid)이란 자연계에 존재하는 에스테르 고분자 물질로 클로로포름, 에테르, 벤젠과 같은 비극성 용매에 의해서 세포로부터 추출되는 물에 녹지 않는 물질을 말한다. 지질은 인간의 영양원으로서 뿐 아니라 화학 및 화장품 원료, 식료산업 등에 폭 넓게 응용되고 있으며 지방, 오일, 왁스, 스테로이드 등을 포함한다(1). 제 1차 세계대전으로 심각한 식량문제에 봉착한 독일에서 지질의 생산을 위해 미생물을 이용한 연구를 시작하였는데 이는 동·식물 세포를 이용하는 것보다 대량생산을 위한 공정이 간편하다는 장점이 있기 때문이었다. 1917년 최초로 Lindner(2)는 효모 *Endomyces vernalis*를 배양하여 지질을 생합성하였으며, 그 이후 많은 연구를 통해 500여종의 효모 중에서 약 25종에 해당하는 *Rhodotorula glutinis*, *Candida curvata*, *Candida lipolytica*, *Cryptococcus terricolus*, *Endomycopsis vernalis*, *Trichosporon cutaneum*,

Trigonopsis variabilis 등이 세포내지질(intracellular lipid)을 30% 이상 축적하는 것으로 밝혀졌다(3-5). 또한 60,000여종의 곰팡이 중에서 약 40여종에 해당하는 *Mucor mucedo*, *Mucor plumbeus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus sydowi*, *Penicillium soppi*, *Penicillium lilacinum*, *Entomophthora obscura*, *Fusarium oxysporum* 등이 세포내지질을 약 20% 이상 함유하는 것으로 밝혀져 있다(6). 이와 같이 고농도로 지질을 세포 내에 축적하는 미생물을 유질 종(oleaginous species)이라 한다. 일부 박테리아나 조류 등도 세포 내에 지질을 축적하는 것으로 알려져 있으나(7) 일반적으로 박테리아는 지질의 함량이 낮고 독성이 문제가 되며, 조류 역시 지질의 함량이 낮을 뿐 아니라 증식속도가 느리다는 문제가 있다. 아직까지 미생물을 이용하여 지질을 생산하는 것은 식물경작에 의해 지질을 추출하는 공정에 비해 경제성이 없는 것으로 평가되었다. 그러나 최근 경제성 측면에 중점을 두어 효모에 의한 지질(triacylglycerol)의 생산 공정이 문헌상으로 검토되었다(8). 효모 같은 미생물에 의해서 생합성되는 지질은 동식물 세포에 의해서 생합성되는 지질에 비하여 생합성 경로가 다양하여 단순한 triacylglycerol로부터 polyisopropenoid ether 지질에 이르기까지 그 종류가 매우 다양하다는 특징이 있다. 따라서 생체계면활성제(biosurfactant)와 같은 특정 지질을 생합성하

† Corresponding Author : Dept. of Chemical Engineering,
The University of Seoul, Seoul 130-743, Korea
Tel : 02-210-2530, Fax : 02-216-0570
E-mail : eykim@scucc.scu.ac.kr

고자 할 때에는 효모 등의 미생물을 이용하는 공정이 동식물을 이용하는 공정보다 더욱 유리하다고 할 수 있다.

계면활성제란 양친매성 즉 친수성 부분과 친유성 부분을 동시에 갖는 분자 구조의 물질로서 계면에 선택적으로 배향흡착하여 계면의 성질을 변화시키는 특징을 갖고 있다. 계면활성제는 과거에 주로 세제에 국한되어 사용되어 오던 것이 최근 유화제, 분산제, 침투제, 습윤제 등 각 분야에서 다양한 용도로 사용되고 있으며, 동식물 지질 또는 식화학공업의 원료를 이용하여 화학합성에 의해 생산되어 왔다(9). 그러나 화학합성 계면활성제의 독성과 난분해성으로 인하여 심각한 환경문제가 야기되면서 이를 해결할 수 있는 대체 계면활성제로 미생물에 의해 생합성되는 생체계면활성제의 개발이 활발히 이루어지고 있다(10). 미생물에 의해 생합성되는 생체계면활성제의 종류는 이들의 생화학적 성질과 사용된 기질의 종류에 따라 지질, 지방산, 당지질(glycolipids), 지단백(lipoprotein), 지다당(lipopolysaccharides), 인지질(phospholipids), 당 에스테르(sugar esters) 등이 있다. 본 연구에서는 지질을 효율적으로 생합성하는 효모 *Rhodotorula glutinis*를 토양으로부터 분리하였으며, 생체계면활성제로서 우수한 유화능을 나타내면서 동시에 고농도로 세포외지질(extracellular lipid)을 생합성할 수 있는 최적의 미생물 배양 조건을 검토하였다.

재료 및 방법

균주의 분리

세포외지질을 생합성하기 위해 본 실험에서 사용한 균주는 서울시립대학교 교정 내 낙엽수 토양으로부터 분리하였다. 채취된 토양을 멸균 증류수에 넣고 완전 혼합시킨 후 상등액을 MS배지(K_2HPO_4 0.173%, KH_2PO_4 0.068%, NH_3NO_3 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01%, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.01%, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.003%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.003%)에 접종하여 30°C에서 진탕배양하였다. 배양액을 한천배지에 도말하여 배양 온도 30°C에서 2일간 배양한 결과 평판배지 상에 자색을 띠는 몇 개의 콜로니가 나타났으며 콜로니 주변에는 윤기가 있는 고점성의 물질이 나타났다. 이들을 백균이로 취하여 MS배지 상에서 다시 배양하였으며 이상의 과정을 수차례 반복하여 균주를 분리하였다. 한편 분리된 균들에 대해 urease test와 nitrate reduction test를 하였으며 탄소원 동화실험을 하여 균주를 동정하였다.

배지 및 배양 조건

종균을 위한 배지로는 YM배지(glucose 1%, peptone 0.5%, yeast extract 0.3%, malt extract 0.3%)를 사용하였다. 지질 생산을 위한 기본배지의 조성은 sucrose 6%, $(NH_4)_2SO_4$ 0.12%, $MgSO_4$ 0.075%, KH_2PO_4 0.035%, Na_2HPO_4 0.1%, $CaCl_2$ 0.01%, yeast extract 0.05% 를 사용하였으며 실험에 따라 탄소원과 질소원, 무기염의 종류 및 농도를 각각 변화시켰다. 특별한 언급이 없는 한 배양 온도는 22°C, pH는 7로 하였다. 삼각플라스크 배양은 500mL플라스크에서 200mL의 작업용량으로 수행하였으며 150rpm으로 교반하였다. 발효조 배양은 2L Jar fermentor (New Brunswick Scientific Co.)에서 교반속도를 300rpm으로, 통기속도를 1 vvm으로 하였다.

세포외지질의 회수

채취한 배양액 100mL에 petroleum ether와 diethylether의

1:1(v/v) 혼합용매 50mL를 첨가한 후 완전 혼합하여 세포외지질을 세포로부터 완전 분리시켰다. 그 후 4°C, 12500rpm에서 10분 동안 원심분리하여 얻은 균체를 80°C에서 24시간 동안 건조시켜 세포의 건조중량을 측정하였다. 세포가 제거된 용액은 정지시켜 용매상과 수용액상으로 분리시킨 후 분액깔대기를 이용하여 용매상을 회수하였으며 남은 수용액상에 대해 동일한 용매 추출과정을 수 차례 반복하였다. 그 후 실온에서 회전 진공증발기를 이용하여 용매를 증발 제거시켜 세포외지질을 회수하였으며 그 중량을 측정하므로써 세포외지질의 농도를 측정하였다. 이상의 과정을 통해 회수된 세포외지질을 Folch 등(11)의 방법에 따라 다음과 같이 정제하였다. 회수된 세포외지질에 chloroform : methanol : H_2O (8:4:3, v/v/v)의 혼합용매를 가하여 완전 혼합한 후 분액깔대기를 이용하여 상을 두 층으로 분리하였고, chloroform층을 취하여 실온에서 회전 진공증발기로 용매를 제거하여 이물질이 제거된 세포외지질을 얻었으며 갈색 시약용기에 질소가스를 충전하여 냉동보관하면서 분석을 위한 시료로 사용하였다.

유화도의 측정

유화도(emulsifying activity)는 Cirigliano등(12)의 방법을 이용하여 측정하였다. 시료 0.3mg을 10mL의 0.1M sodium acetate buffer(pH 4.0)에 용해시킨 후 유화기질인 hexadecane 0.1mL을 첨가하여 2분간 완전교반하여 유화시켰다. 그 후 10분간 정지시킨 뒤 540nm에서 흡광도를 측정함으로써 유화도를 측정하였다.

결과 및 고찰

균주의 동정

토양으로부터 분리된 균주를 광학현미경을 통하여 관찰한 결과 분리균은 약 2-4 μ m의 크기를 가진 타원형 균으로 운동성이 없었으며 평판배지 상에서 자색 콜로니를 나타내었다(Table 1). 콜로니의 주변에는 윤기가 있는 점성의 물질이 다량 존재하였는데 이를 회수하여 TLC상에서 용매를 사용하여 전개시킨 후 지질 검출시약인 rhodoamine B로 발색실험을 한 결과 지질인 컷으로 확인되었다. 또한 세포를 배양한 후 acetone과 petroleum ether를 이용하여 세포내의 색소를 추출한 후 HPLC분석(칼럼: μ -Bondapak C_{18} , 검출기: UV detector, 검출 파장: 435 nm, 용매: acetonitrile-tetrahydrofuran- H_2O 5:3:1)을 한 결과 torularhodin, torulene과 β -carotene이 각각 79.5%, 6.4%와 15.1% 인 카로테노이드를 생합성하는 균주임이 확인되었다. 탄소동화 실험결과 총 31종의 탄소원 중 sorbitol, glucose를 포함하여 19종의 탄소원을 이용하여 균체가 증식되었으며 rhamnose와 erythritol을 포함하여 14종의 탄소원은 이용하지 못하였다. 이상의 탄소원 동화실험의 결과는 효모인 *Rhodotorula glutinis*의 결과(13,14)와 동일한 것으로 나타났다. 산물인 지질과 카로테노이드의 생합성 능력을 기존의 문헌(15-17)과 비교하여 볼 때 본 실험을 위해 분리된 균주는 *Rhodotorula glutinis*로 밝혀졌으며 아균주명을 이용하여 *Rhodotorula glutinis* K-501이라 명하였다.

배양 시간에 따른 유화도의 변화

Rhodotorula glutinis K-501에 의해서 생합성된 세포외지질의 유화도를 조사하였다. 배양 시간의 경과에 따른 세포외지질

Table 1. Biochemical characteristics of the isolated strain *Rhodotorula glutinis* K-501.

Contents	Biochemical characteristics
Morphological characteristics	
Cell shape	elliptical
Cell size	2-4 μ m
Motility	negative
Pseudomycelium	negative
Colony form	circular
Colony surface	smooth and shining
Colony color	red
Biochemical characteristics	
Urease test	positive
Nitrate reduction test	positive
Assimilation test	
Sorbitol	positive
D-Xylose	positive
Ribose	positive
Glycerol	positive
Rhamnose	negative
Palatinose	positive
Erythritol	negative
Melibiose	negative
Glucuronate	negative
Melezitose	positive
Gluconate	negative
Levulinat	negative
Glucose	positive
Sorbose	positive
Glucosamine	negative
Galactose	positive
Esculine	positive
Sucrose	positive
N-acetyl-Glucosamine	negative
DL-Lactate	negative
L-Arabinose	negative
Cellobiose	negative
Raffinose	positive
Maltose	positive
Trehalose	positive
2-keto-Gluconate	positive
2-methyl-D-Glucoside	negative
Mannitol	positive
Lactose	negative
Inositol	negative
Mannose	positive
Fructose	positive
Phenol	positive

의 유화도 변화를 알아보기 위하여 탄소원으로 60g/L의 glucose를 사용하여 삼각플라스크 실험을 하였는데 그 결과를 Figure 1에 나타내었다. 배양 초기 균체가 성장함과 동시에 세포외지질의 유화도가 증가하였으나 대수증식기 중간지점인 96시간 이후로는 유화도의 변화가 없었다. 이것으로부터 일정시간이 지난 후부터는 일정한 조성을 가진 지질이 생합성되는 것으로 판단되었다. 따라서 이후의 모든 실험에서는 특별한 언급이 없

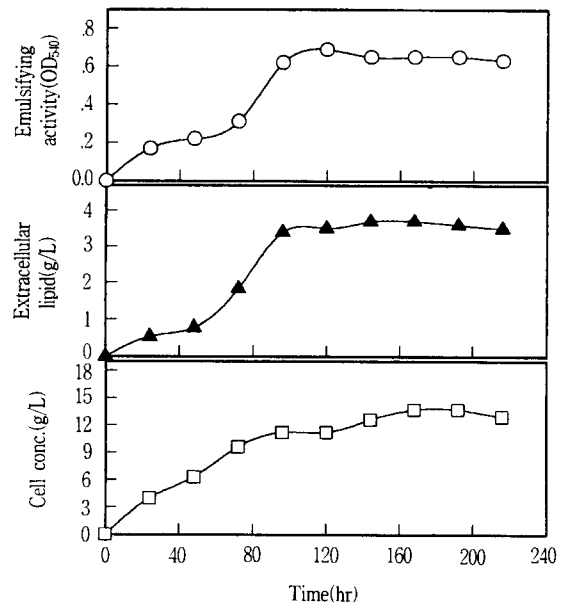


Figure 1. Time courses of extracellular lipid and emulsifying activity.
 □ : cell concentration, ▲: extracellular lipid, ○: emulsifying activity

는 한 유화도의 값이 변하지 않는 세포의 정상기에서 시료를 채취하여 분석하였다. 최근 *Rhodotorula glutinis*에 의해서 유화활성이 우수한 유화제가 생합성됨이 일부 문헌을 통해 보고된 바 있다(18,19).

탄소원의 영향

탄소원의 종류와 농도는 효모의 지방질 생합성능에 커다란 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(20). pH 7의 기본배지에 탄소원의 농도를 60g/L로 하여 9종의 탄소원에 따른 영향을 고찰하였는데 그 결과는 Table 2와 같다. 시료는 세포증식이 정상기에 있는 144시간에 채취하여 세포 농도, 세포외지질의 농도와 유화도를 측정하였다. 그 결과 세포의 농도는 전체적으로 7.6-12.8g/L의 범위에 있었으나 세포외지질의 농도는 탄소원의 종류에 따라 상이한 결과를 나타내었다. 생합성된 세포외지질의 농도는 sucrose를 사용했을 경우 5.62g/L로 가장 높았으며 fructose, glucose, mannose 등의 순으로 높게 나타났다. 또한 유화도가 0.62-0.76범위의 값을 가진 것으로 나타나 상용 유화제인 Tween 80의 유화도가 동일한 분석 조건 하에서 0.3인 점을 고려할 때 유화활성이 매우 우수함을 알 수 있었다. 그러나 sorbitol, mannitol, galactose, D-xylose와 maltose의 경우 세포는 증식되었으나 세포외지질의 생합성 농도는 1g/L 이하로 매우 낮았으며 유화활성은 감지되지 않았다. 이는 탄소원의 종류에 따라 세포외지질의 생합성 경로가 다를 뿐 아니라 생합성 지질의 조성이 다르기 때문에 나타나는 결과라 판단되었다. 탄소원에 대한 실험결과 지질의 농도뿐 아니라 유화활성도 우수한 것으로 나타난 sucrose를 최적의 탄소원으로 선정하였다.

질소원의 영향

탄소원을 sucrose로 고정하고(60g/L) 질소원을 달리하여 조사한 결과를 Table 3에 나타내었다. 일반적으로 무기질소원을 사

Table 2. Effects of carbon sources on the production of extracellular lipid.*

Carbon source**	Dry cell weight (g/L)	Extracellular lipid concentration (g/L)	Lipid production yield, $Y_{p/x}$ (%)	Emulsifying activity (OD_{510})
Glucose	12.7	3.55	28.0	0.62
Sucrose	12.8	5.62	43.9	0.76
Fructose	11.8	3.75	31.8	0.67
Mannose	12.6	2.48	19.7	0.76
Sorbitol	9.6	0.73	7.6	-
Mannitol	9.1	0.86	9.5	-
Galactose	12.0	0.32	2.7	-
D-Xylose	8.0	0.22	2.8	-
Maltose	7.6	0.30	3.9	-

* data at 144hr

** initial concentration, 60g/L

용했을 경우 유기 질소원보다 비교적 세포의 농도와 세포외지질의 생합성 농도가 높은 것으로 조사되었다. 한편 trypton의 경우 세포당 지질의 생합성 수율($Y_{p/x}$)이 79.3%로 높았으며 생합성 농도도 4.38g/L로 높았으나 유효활성이 비교적 낮았다. $(NH_4)_2SO_4$ 의 경우 모든 면에서 우수한 결과를 나타내었으므로 최적의 질소원으로 선정하였다. 윤 등(21)의 연구에 따르면 세포내지질의 생합성에서도 질소원으로 $(NH_4)_2SO_4$ 가 우수한 것으로 보고된 바 있다.

Table 3. Effects of nitrogen sources on the production of extracellular lipid.*

Nitrogen source**	Dry cell weight (g/L)	Extracellular lipid concentration (g/L)	Lipid production yield, $Y_{p/x}$ (%)	Emulsifying activity (OD_{510})
$NaNO_3$	9.6	4.41	45.9	0.60
NH_4Cl	12.5	4.61	36.9	0.59
$(NH_4)_2SO_4$	11.8	5.87	49.7	0.67
NH_4NO_3	13.2	4.00	30.3	0.62
Yeast extract	6.9	3.51	50.9	0.57
Malt extract	2.6	1.32	50.8	-
Peptone	5.3	3.58	67.5	0.36
Trypton	5.5	4.38	79.3	0.42

* data at 144hr

** initial concentration, 1.5g/L

C/N 비의 영향

미생물에 의해 지질을 생합성하는데 가장 중요한 인자 중 하나는 C/N 비이다. 세포외지질의 생합성에 미치는 C/N비(w/w)의 영향을 검토하기 위하여 sucrose (60g/L)를 탄소원으로 고정하고 질소원으로 $(NH_4)_2SO_4$ 의 농도를 변화시키면서 실험한 결과는 Figure 2와 같다. 실험결과 C/N의 비가 낮을수록 즉, 초기 질소원의 농도가 높을수록 균체의 성장이 활발해져 세포 농도가 커짐을 알 수 있었다. 그러나 생합성된 세포외지질의 농도는 세포 농도에 비례하지 않았고 최적의 C/N비가 존재하였는데 그 값은 50이였으며 이때 세포당 생합성된 세포외지질의 수율도 가장 높았다. 이는 C/N비가 높을 때 즉, 질소원이 소량일 때는 배

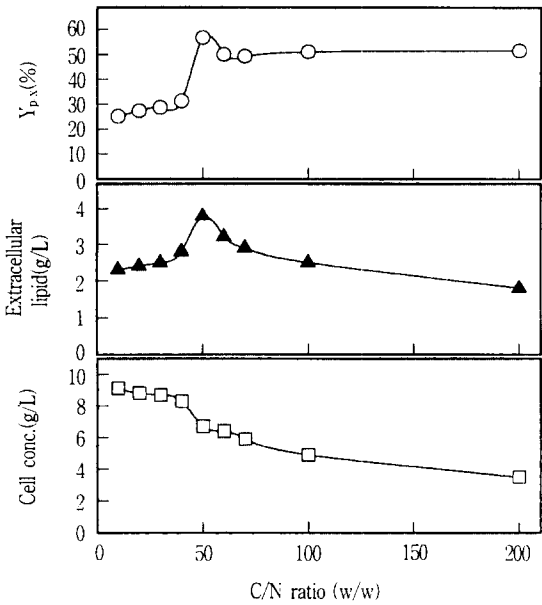


Figure 2. Effect of C/N ratio on the production of extracellular lipid.

□ : cell concentration, ▲: extracellular lipid, ○: $Y_{p/x}$

지 중에서 질소원이 일찍 고갈되고 이에 따라 필요한 단백질의 합성이 불가능하여 세포의 증식이 억제되며 더불어 세포외지질의 생합성 농도가 낮아지는 것으로 판단되었다. 지질이 효율적으로 생합성되기 위해서는 탄소원이 세포증식이 아닌 지질의 생합성에 주로 소모되어야 한다. C/N비가 낮을 때 즉, 배양시 질소원이 과량으로 공급되면 세포외지질의 생합성보다는 세포의 증식이 활발해지기 때문에 세포외지질의 생합성 농도가 낮아지므로 결과적으로 최적의 C/N비가 존재하는 것으로 판단되었다. 한편 Botham등(22)은 C/N의 비가 높을수록 지질의 농도가 높다는 결과를 보고한 바 있다.

무기염의 영향

세포외지질의 생합성 농도를 향상시키기 위해 4종류의 무기염에 대해 농도를 변화시켜가면서 세포 농도, 세포외지질의 농도, 세포당 생합성된 세포외지질의 수율을 조사하였는데 그 결과를 Table 4에 나타내었다. KH_2PO_4 의 경우 농도를 0~4g/L로 변화시켜 실험한 결과 세포 농도는 2g/L일 때 가장 높았으나 세포외지질의 농도는 KH_2PO_4 의 농도 증가에 따라 점차 높아져 KH_2PO_4 3.5g/L에서 최대가 되었다. Na_2HPO_4 는 배지에 첨가되지 않은 경우 세포 농도가 가장 높았으나 세포외지질의 생합성 농도가 낮았다. 반면 Na_2HPO_4 가 투여된 경우 세포외지질의 농도에는 큰 차이는 없었으나 농도 1.0g/L일 때가 최적임을 알 수 있었다. $MgSO_4$ 의 경우 농도의 증가에 따라 세포 농도와 세포외지질의 농도가 계속 증가하여 $MgSO_4$ 의 농도가 0.75g/L일 때 최대의 활성을 보였다. $CaCl_2$ 의 경우도 Na_2HPO_4 와 유사한 결과를 보이고 있는데 $CaCl_2$ 의 농도가 0.1g/L일 때가 세포 농도 뿐 아니라 생합성된 세포외지질의 농도도 최대가 되었다.

배양 온도의 영향

배양 온도를 20, 22, 24, 30, 37°C로 변화시키면서 플라스크

Table 4. Effect of concentration of inorganic salts on the production of extracellular lipid.*

Inorganic salts	Salt concentration (g/L)	Cell concentration (g/L)	Extracellular lipid concentration (g/L)	Lipid production yield, $Y_{p/x}$ (%)
KH ₂ PO ₄	0	5.9	1.58	26.8
	1.0	7.6	2.66	35.0
	2.0	8.0	2.87	35.9
	2.5	7.3	3.12	42.7
	3.0	6.7	3.44	49.1
	3.5	6.7	3.81	56.9
	4.0	5.5	2.07	54.5
Na ₂ HPO ₄	0	7.7	1.80	23.4
	1.0	6.7	3.61	53.7
	3.0	6.4	3.10	48.4
	5.0	6.4	3.32	51.9
	7.0	6.4	3.21	50.1
	9.0	6.4	3.10	48.4
MgSO ₄	0	3.8	1.25	32.9
	0.2	5.7	2.20	38.6
	0.4	6.7	2.91	43.4
	0.5	7.2	3.67	51.0
	0.6	7.3	3.91	53.6
	0.7	7.3	4.00	54.8
	0.75	7.3	4.22	57.8
	0.8	6.8	2.90	42.7
CaCl ₂	0	2.1	0.94	44.7
	0.05	6.2	3.22	51.9
	0.1	6.9	3.95	57.2
	0.15	6.7	3.71	55.4
	0.2	6.5	3.67	56.5
	0.3	6.7	3.66	54.6
	0.4	6.7	3.53	52.7

* data at 144hr

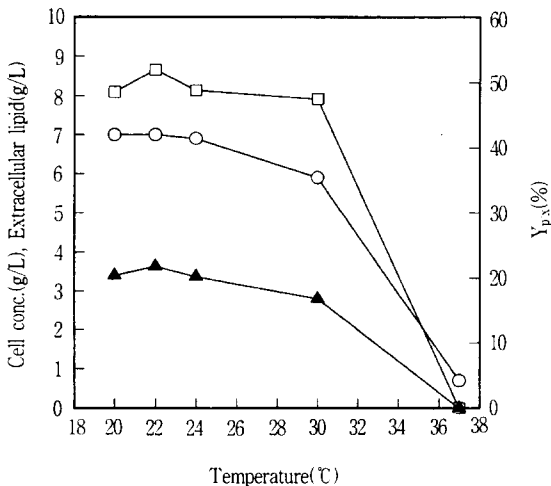


Figure 3. Effect of temperature on the production of extracellular lipid.

□ : cell concentration, ▲ : extracellular lipid, ○ : $Y_{p/x}$

배양한 결과를 Figure 3에 나타내었다. 20°C에서 30°C까지는 온도에 무관하게 세포 성장이 일어나지만 37°C에서는 세포 성장이 불가능하였으며 세포외지질의 생합성도 불가능하였다. 이는 지질의 생합성에 종종 이용되는 *Cryptococcus albidus*를 이용한 결과와 유사하여 20°C에서는 균체 증식뿐 아니라 지질의 생합성 농도가 높았으나 30°C에서는 세포 성장이 불가능하였다(23). *Candida lipolytica*나 *Saccharomyces cerevisiae*는 균체의 최적 성장 온도보다 낮은 온도에서, *Rhodotorula gracilis*는 최적 성장 온도보다 높은 온도에서 생합성 지질의 농도가 증가한 것으로 보고된 바 있다(24). 본 실험주인 *R. glutinis* K-501는 20°C에서 30°C까지의 온도 범위에서 세포 농도와 세포외지질의 생합성 농도가 비슷한 결과를 보이고는 있으나 양자 모두 최적의 온도는 22°C로 일치하였다.

pH의 영향

배양 초기의 pH를 2에서 10까지 변화시켜가면서 세포 농도와 세포외지질의 생합성 농도를 살펴보았는데 그 결과를 Figure 4에 나타내었다. 균체의 증식은 pH 3으로부터 9까지 넓은 범위에서 가능하였으며 pH 5에서 세포 농도가 가장 높았다. 또한 세포외지질의 생합성 역시 pH 3으로부터 9까지 넓은 영역의 pH에서 가능하였으며 pH 7에서 최대 농도 3.71g/L이었으며 이때 세포당 생합성 수율도 가장 높게 나타났다. 따라서 최적의 pH는 7로 결정하였다.

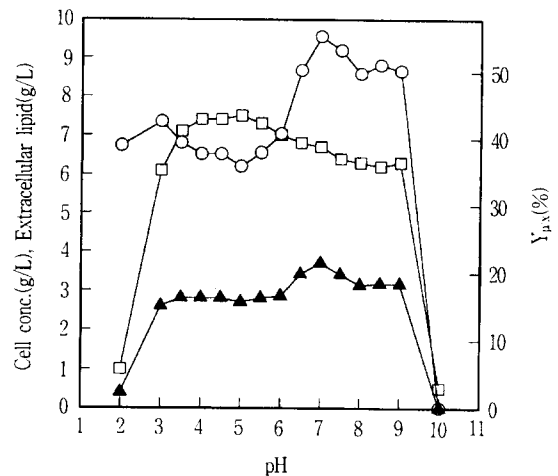


Figure 4. Effect of pH on the production of extracellular lipid.

□ : cell concentration, ▲ : extracellular lipid, ○ : $Y_{p/x}$

배양 시간에 따른 세포외지질의 생합성

이상의 실험을 통해 얻은 최적의 배지 조성 및 배양 조건에 맞추어 탄소원을 sucrose (60g/L)로 하여 Jar fermentor에서 *Rhodotorula glutinis* K-501을 배양하였는데 그 결과를 Figure 5에 나타내었다. 최적의 C/N비에 따라 질소원으로 (NH₄)₂SO₄의 초기 농도를 1.2g/L로, 초기 pH를 7.0으로, 배양 온도는 22°C로 하였다. 배양 초기 20시간 이내에 질소원의 고갈과 더불어 세포외지질의 생합성이 시작되었다. 탄소원이 점차 소모되면서 균체가 증식되었으며 탄소원 60g/L를 이용하여 세포 농도는 15.6g/L, 세포외지질의 농도는 8.1g/L로 최대의 값을 가졌다. 결

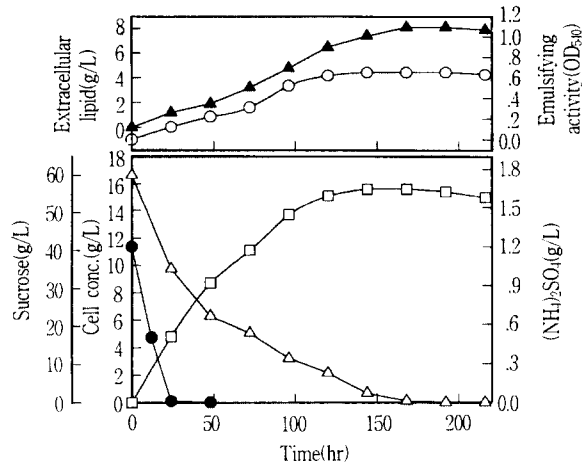


Figure 5. The time course of batch culture of *Rhodotorula glutinis* K-501 in fermentor.

△ : sucrose, □ : cell concentration, ▲ : extracellular lipid
● : $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ○ : emulsifying activity

과적으로 세포외지질 8.1g/L가 생합성되었는데 탄소원 기준으로 13.5%, 단위세포 질량 기준으로 51.9%의 세포외지질 생합성 수율을 얻을 수 있었다.

요 약

세포외지질을 생합성하는 균주 *Rhodotorula glutinis* K-501을 토양으로부터 분리하였는데 이들에 의해 생산된 지질은 우수하고 안정적인 유화특성을 나타내었다. 세포외지질의 생합성을 극대화하기 위하여 지질의 생산에 영향을 주는 인자들을 검토하여 배양 조건을 최적화하였다. Sucrose와 ammonium sulfate를 각각 탄소원과 질소원으로 사용하였을 때 세포외지질의 생합성 농도가 높았으므로 최적의 성분으로 결정되었으며, 최적의 C/N비는 50이었다. KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , MgSO_4 , CaCl_2 는 각각 3.5, 1.0, 0.75, 0.1g/L일 때가 최적의 농도였으며 최적의 온도와 pH는 22°C, 7.0이었다. 최적의 조건하에서 sucrose 60g/L을 사용하여 교반식 발효조에서 회분배양을 한 결과 세포외지질이 8.1g/L의 농도로 생합성되어 단위세포 질량당 51.9%의 높은 수율을 얻을 수 있었다.

감 사

본 연구는 1996년도 교육부 학술연구조성비(생물화학공학 B(1)-7)에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Kamel, B. S. and Y. Kakuda (1994), Technological Advances in Improved and Alternative Sources of Lipids, 1st ed., pp.235-291, Chapman & Hall, London.
- Linder, P. (1922), Das Problem der Biologischen Fettbildung und Fettgewinnung, *Z. Angew. Chem.*, **35**, 110-114.

- Ratledge, C. (1989), Biotechnology of Oils and Fats, Microbial Lipids(C. Ratledge and S. G. Wilkinson, eds.), Vol. 2, pp.567-668, Academic Press, London.
- Ratledge, C. (1992), Microbial Lipids: Commercial Realities or Academic curiosities, Industrial Applications of Single Cell Oils(D. J. Kyle and C. Ratledge, eds.), pp.1-15, American Oil Chemists' Society, Champaign, IL.
- Moreton, R. S. (1988), The Physiology of Lipid Accumulating Yeasts, Single Cell Oil(R. S. Moreton, ed.), pp.1-32, Longman, Harlow.
- Losel, D. M. (1988), Fungal Lipids, Microbial Lipids(C. Ratledge and S. G. Wilkinson, eds.), Vol. 2, pp.699-806, Academic Press, London.
- Kyle, D. (1992), Production and Use of Lipids from Microalgae, *Lipid Technol.*, **4**, 59-64.
- Davies, R. J. and J. E. Holdsworth (1992), Synthesis of Lipids in Yeast: Biochemistry, Physiology, Production, *Adv. Appl. Lipid Res.*, **1**, 119-159.
- Kosaric, N., N. C. C. Gray, and W. L. Cairns (1987), Biotechnology and the Surfactant Industry, Biosurfactants and Biotechnology(N. Kosaric, W.L. Cairns, and N. C. C. Grayeds.), pp.1-45, Marcel Dekker, Inc., New York.
- Deasi, J. D. and A. J. Deasi (1993), Production of Biosurfactants, Biosurfactants: Production, Properties, Application(N. Kosaric ed.), pp.65-97, Marcel Dekker, New York.
- Folch, J., M. Lees and G. H. S. Stanley (1956), A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipids from Animal Tissues, *J. Biol. Chem.*, **226**, 497-508.
- Cirigliano, M. C. and G. M. Carman (1985), Purification and Characterization of Liposan, a Bioemulsifier from *Candida lipolytica*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**, 846-850.
- Kough, K. (1988), Studies on the Production of Lipid by *Rhodotorula glutinis* SW 204, Ph.D. Thesis, Dept. of Food Science, Seoul Woman's Univ., Seoul.
- Barnett, J. A., R. W. Payne, and D. Yarrow (1983), Yeast Characteristics and Identification, Cambridge Univ. Press, London.
- Nam, H. S., S. Y. Cho, and J. S. Rhee (1988), High-performance Liquid Chromatographic Analysis of Major Carotenoids from *Rhodotorula glutinis*, *J. Chromatography*, **448**, 445-447.
- Polulyakh, O. V., O. I. Podoprighora, S. A. Eliseev, Y. V. Ershov, V. Y. Bykhovskii, and A. A. Dmitrovskii (1991), Biosynthesis of Torulene and Torularhodin by the Yeast *Paffia rhodozyma*, *Prikladnaya Biokhimiya Mikrobiologiya*, **27**, 541-545.
- Kenneth, L., T. O. M. Nakayama, and C. O. Chichester (1964), Biosynthesis of Yeast Carotenoids, *J. Bacteriol.*, **88**, 1688-1694.
- Shepherd, R., J. Rockey, I. W. Sutherland, and S. Roller (1995), Novel Bioemulsifiers from Microorganisms for Use in Foods, *J. Biotechnol.*, **40**, 207-217.

19. Johnson, V., M. Singh, and V. Saini (1992), Bioemulsifier Production by an Oleaginous Yeast *Rhodotorula glutinis* IIP-30, *Biotechnol. Letts.*, **14**, 487-490.
20. Kough, K., H. B. Na, and S. O. Park (1993), Production of Lipid By *Aspergillus sydowi* SW 4-1, *Kor. J. Food Sci. Technol.*, **25(6)**, 787-793.
21. Yoon, S. H., J. W. Rhim, S.Y. Choi, D. Y. Ryu, and J. S. Rhee (1982), Effect of Carbon and Nitrogen Sources on Lipid Production of *Rhodotourla gracilis*. *J. Ferment. Technol.*, **60**, 243-246.
22. Botham, P. A. and C. Ratledge (1979), A Biochemical Explanation for Lipid Accumulation in *Candida* 107 and Other Oleaginous Micro-organisms, *J. Gen. Microbiol.*, **114**, 351-375.
23. Hansson, L. and M. Dostalek (1986), Influence of Cultivation Conditions on Lipid Production by *Cryptococcus albidus*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **24**, 12-18.
24. Boulton, C. A. and C. Ratledge (1985), Biosynthesis of Fatty Acids and Lipids, *Comprehensive Biotechnology*, Vol. 4 (M. Moo-Young, ed.), pp.459-482, Pergamon Press, Oxford.