

긴 사슬 지방산 생산을 위해 재조합된 *E. coli*로부터의 세포 내 지질 추출

함수미 · 유인상 · 박상준 · 김지현[†]

가천대학교 화공생명공학과
461-701 경기도 성남시 성남대로 1342
(2013년 6월 4일 접수, 2013년 7월 8일 채택)

Extraction of Intracellular Lipids from Recombinant *E. coli* for Improving Long-chain Fatty Acid Production

Su Mi Ham, In Sang Yoo, Sang Joon Park and Ji Hyeon Kim[†]

Department of Chemical and Biological Engineering, Gachon University, 1342 Seongnam-daero, Seongnam-si, Gyeonggi 461-701, Korea
(Received 4 June 2013; accepted 8 July 2013)

요 약

바이오알콜이 아닌 탄화수소계 바이오연료를 생산하기 위한 발효 공정에 대한 연구가 주목을 받고 있다. 본 연구에서는 야생 균주에 비해 긴 사슬 지방산을 과량 생산하는 재조합 *E. coli* MG1655를 배양한 후 세포 내 지질을 효과적으로 분리하기 위한 연구를 수행하였다. 고압 균질기를 이용하여 세포를 파쇄한 후 환경친화적인 용매들을 이용하여 지질을 추출하였다. 세포 파쇄는 고압 균질기의 압력이 5,000 psi 보다 큰 압력 하에서 효과적으로 이루어졌으며 20,000 psi 까지의 압력 범위에서는 1~3회 파쇄로 모두 90% 이상의 파쇄율을 얻었다. 추출 용매 시스템의 경우 hexane/isopropyl alcohol과 ethyl acetate/ethanol 시스템이 상대적으로 높은 지질 회수율을 나타내었고 상기 세포 파쇄 조건을 적용하여 초기 지질량의 약 60%를 추출하였다. 또한 추출된 지질은 C₁₂, C₁₄, C₁₆과 C₁₈과 같이 긴사슬 지방산으로 구성되었음을 확인하였다.

Abstract – Recently, biohydrocarbons are gathering an interest as a new bioenergy due to the versatile applicability. In the present work, a process is proposed for the recovery of lipids from Recombinant *E. coli* MG1655 which provides longer chain fatty acids. After the growth of the recombinant *E. coli*, the cells were disrupted by high pressure homogenizer for obtaining intracellular lipids and the resulting solutions were centrifuged and extracted. For the efficient cell disruption with high pressure homogenizer, the pressure higher than 5,000 psi was required. In addition, under the conditions of applied pressure 5,000 to 20,000 psi, 1~3 pass homogenizing was enough for the more than 90% cell disruption. As organic solvents for extraction of lipid, hexane/isopropyl alcohol and ethyl acetate/ethanol systems showed excellent extracting power. With these solvent systems, the 60% lipid could be recovered. Moreover it was found that the extracted lipids contained long-chain fatty acids such as C₁₂, C₁₄, C₁₆ and C₁₈.

Key words: Lipid, Long-chain Fatty Acid, Extraction, Disruption, Recombinant *E. Coli* MG1655

1. 서 론

최근 고유가 지속 및 기후변화 관련 환경규제가 강화되는 한편 전력 등 에너지 부족이 심화되고 있어 신재생에너지에 대한 중요성이 크게 강조되고 있다[1]. 그 중 바이오에탄올과 바이오디젤로 대표되는 바이오에너지는 재생 가능한 바이오매스로부터 얻어지며 액체라는 장점으로 수송용 연료로 활용된다는 장점이 있다. 바이오에탄올은 미세조류, 박테리아 등 다양한 균주에 의해 발효를 통해 생산되는 반면[2], 바이오디젤은 유지 식물로부터 지질을 추출하고 추가적인 반응을 통해 생산하고 있어 새로운 발효 공정 개발이 요구되어 왔다.

그 중 미생물이나 미세조류에서 생산되는 지질이 새로운 액체 연료로서 활용 가능성이 높아[3], 미생물을 이용하여 지방산 또는 isoprenoid 생합생 경로를 통한 고급 알코올이나 탄화수소 발효에 대한 연구가 진행되고 있다[4-6]. 한편 *E. coli* 등의 박테리아를 이용한 재조합 균주 개발 연구도 진행되어[7], Jeon 등[8]은 지방산 함량이 높은 재조합 *E. coli* MG1655를 개발하였다. 지방산 합성의 핵심 효소인 acetyl-CoA carboxylase (accA, accB, accC), malonyl-CoA-[acyl-carrier-protein] transacylase (fabD), acyl-acyl carrier protein thioesterase (EC 3.1.2.14 gene) 생산 유전자를 도입함으로써 세포 내 지방산 생산을 증가시켰으며 특히 C₁₆ 지방산이 야생 균주에 비해 1.2~2.4배 많이 생산됨을 보고하였다. 그러나 세포 내 지방산 함량이 증가하더라도 바이오연료로서 대량생산이 가능하고 경제성을 갖기 위해서는

[†]To whom correspondence should be addressed.
E-mail: jihyeon@gachon.ac.kr

세포 파쇄와 지방산 추출 등 분리공정의 개발이 매우 중요하다.

현재 세포 파쇄는 기계적인 방법과 비기계적 방법에 의해 수행되고 있다. 화학물질 또는 효소를 사용하는 비기계적 방법은 주로 실험실 규모에서 사용되고 큰 규모에서 사용될 경우 비용이 많이 요구되는 반면, 액체 또는 고체의 전단응력을 활용하는 기계적 방법은 스케일 업이 용이하고 비용 면에서 유리하여 대량생산 공정에서 선호되고 있다[9]. 일반적으로 바이오산업이나 제약산업에서는 고압 균질기를 이용한 세포 파쇄법이 널리 활용되고 있는데 고압 균질기는 스프레이 장착된 밸브와 밸브 시트 사이의 작은 틈에 세포 현탁액을 통과시켜 작은 틈 사이에서 발생하는, 매우 높은 전단응력과 밸브의 흐름에 수직인 링에 의한 추가적인 충격에 의해서 세포를 파쇄한다[10]. 지방산 추출의 경우에는 Bligh와 Dyer가 제안한 chloroform/methanol 혼합액이 가장 좋은 용매로 알려져 있다[11]. 그러나 chloroform은 환경이나 건강 측면에서 안전하지 않기 때문에 환경친화적인 새로운 용매 시스템의 개발이 필요하다. 용매의 독성, 추출 후 용매 제거를 고려한 휘발도, 용매 회수 비용, 추출 능력 등이 용매 선택에 있어서의 주요 고려 사항이 될 수 있다[12].

본 연구에서는 야생 균주에 비해 긴 사슬 지방산을 과량 생산하는 재조합 *E. coli* MG1655를 배양한 후 세포 내 지질을 효과적으로 분리하기 위한 연구를 수행하였다. 고압 균질기를 이용하여 세포를 파쇄한 후 hexane, isopropyl alcohol (IPA), methyl tert-butyl ether (MTBE), ethyl acetate, ethanol 등과 같은 다양한 환경친화적인 용매들을 이용하여 지질을 추출하였다. 이를 통해 최적의 분리공정을 제시하였고 파쇄 압력, 파쇄 횟수, 용매 추출 시스템 등과 같은 운전 변수들이 지질 추출에 미치는 영향을 고찰하였다.

2. 실험방법

2-1. 세포 배양 및 세포 내 지질 총량 결정

본 연구에 사용된 재조합 *Escherichia coli*-K12 MG1655 (F-lambda-*ilvG-rfb-50rph-1*; ATCC)는 서강대학교 화공생명공학과에서 제공받았다[8]. 재조합 *E. coli*는 2L 삼각플라스크에 LB 배지(20 g/L glucose, 10 g/L tryptone, 10 g/L NaCl, 5 g/L yeast extract, 0.1 g/L ampicillin)를 넣고 37 °C 진탕 배양기에서 150 rpm으로 24시간 동안 배양하였다.

세포 지질 총량을 결정하기 위해 세포 내 지질을 추출하였다[13]. 원심 분리 후 건조한 재조합 *E. coli*에 chloroform/methanol (2:1, v/v) 혼합액을 가하여 35 °C, 150 rpm으로 1차 추출하고 Filtration Assembly (100 ml, Millipore사)를 이용해 균체와 지질이 녹아있는 용매를 분리한 후, 균체를 다시 건조시켰다. 균체 내 지질을 완전히 추출하기 위해 2차로 Chloroform:Ethanol:6N HCl (4:3:1, v/v) 혼합액을 추가하여 1차 추출과 동일한 방법으로 추출하였다. 이후 1차 추출 용매와 2차 추출용매를 90 °C 건조기에서 overnight로 건조시킨 후 남아있는 지질의 양을 측정하였다.

2-2. 고압 균질기를 이용한 세포 파쇄

1 L 세포 배양액을 Y-type 균질조(Y-type, Microfluidics)를 장착한 고압 균질기(Model M110EH, Microfluidics)로 통과시켜 세포를 파쇄하였다. 적용 압력은 200~1,380 bar (3,000~20,000 psi) 범위에서 파쇄 실험을 수행하였으며 배양액 전체를 1회 통과시키는데 10분 정도가 소요되었다. 고압 균질기를 통과시키기 전과 통과 후에 각각

5 ml 샘플을 채취하여 파쇄된 세포의 크기측정을 위한 분석에 사용하였다.

2-3. 지질 추출

세포를 파쇄하고 원심분리를 통해 상등액을 제거한 후 다양한 추출 용매(10 ml/g)를 첨가하였다. 속도를 높여 빨리 평형에 도달하도록 티타늄 탐침(40T)를 장착한 초음파 균질기(Sonics, CV18)를 이용하여 30초 간격으로 20분간 추출을 실시하였다. 추출이 완료된 후 원심분리하고 지질이 함유된 유기 용매 층을 회수하여 90 °C에서 건조하고 용매를 완전히 휘발시킨 후 남아있는 지질의 무게를 측정하였다. 추출 시스템 별 추출 효율은 상등액 제거 이후 남은 파쇄된 세포에 추출 용매(10 ml/g)를 첨가하고 3일간 25 °C 진탕 배양기에서 150 rpm으로 접촉시킨 후 유기용매 층을 건조시켜 얻은 질량으로 상대 회수율을 계산하여 비교하였다.

2-4. 분석 방법

E. coli 파쇄 정도를 분석하기 위해 dynamic light scattering (DLS, Brookhaven instrument) 입자크기 분석기를 이용하여 세포 크기를 측정하였고 전자투과현미경(TEM, FEI, Tecnai, F30S-Twin)으로 파쇄 후의 균체 형태를 관찰하였다. 균체 농도는 600 nm에서 흡광도, OD (Optical Density) 값을 분광광도기(Agilent 8453 Diode Array Spectrophotometer)를 이용하여 측정하였다. 지질 추출 효율은 세포 내 지질 총량과 비교한, 지질 회수율을 통해 비교하였으며 지질의 상대 회수율에 대한 식은 다음과 같다.

$$\text{지질의 상대 회수율(\%)} = (\text{지질 추출 양/세포 내 지질 총량}) \times 100$$

GC-MS (Agilent Technologies 5973) 분석은 HP-FFAP (30.0 m \times 250 μ m \times 0.25 μ m, Agilent, USA) capillary column을 사용하였으며 온도는 100 °C에서 시작해서 30초간 유지한 다음 250 °C까지는 분당 20 °C 속도로 증가시키고 250 °C에서 9분간 유지하였다. 시료 주입구 및 검출기 온도는 각각 250 °C이었으며 carrier gas는 1 mL/min의 helium을 사용하였다. 시료는 1 μ L씩 주입하였고 split ratio는 25:1 이었다. 검출기는 FID (flame ionization detector detects)를 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

3-1. 고압 균질기 압력이 세포 파쇄에 미치는 영향

바이오디젤용 지질의 생산을 위해서는 실험실적 또는 분석을 위한 기존의 추출법과는 다른 경제성 있는 공정이 요구된다. 본 연구에서는 연속공정으로 지질을 생산하기 위해서, 고압 균질기를 이용해서 세포를 파쇄하고, 원심분리 후 이를 적절한 용매로 추출하며 이로부터 에스테르 교환반응으로 바이오디젤과 글리세롤을 얻는 공정을 제안하였다. Fig. 1에 *E. coli* 발효로 생산된 지질을 회수하고 바이오디젤을 얻기위한 생산공정의 모식도를 나타내었다. 이 공정의 경제성을 높이기 위해서는 세포파쇄와 추출 효율이 매우 중요하므로 먼저 세포 파쇄에 미치는 공정개발을 위한 첫 단계로 균질기 압력이 세포 파쇄에 미치는 영향을 고찰하였다.

발효로 얻은 재조합 *E. coli*의 건조 균체 농도는 1.84 g/L이었으며 총 지질은 0.56 g/L으로서 지질 함량은 약 30%이었다. 야생 *E. coli*의 지질 함량은 20%로 보고되고 있는데 재조합 균주의 경우 30%로서

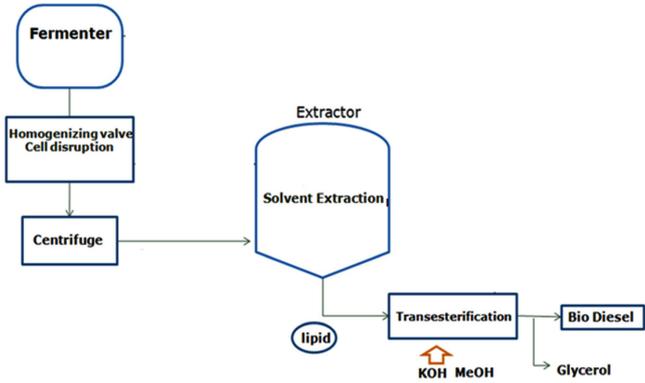


Fig. 1. Proposed process for Intracellular lipid recovery from Recombinant *E. coli*.

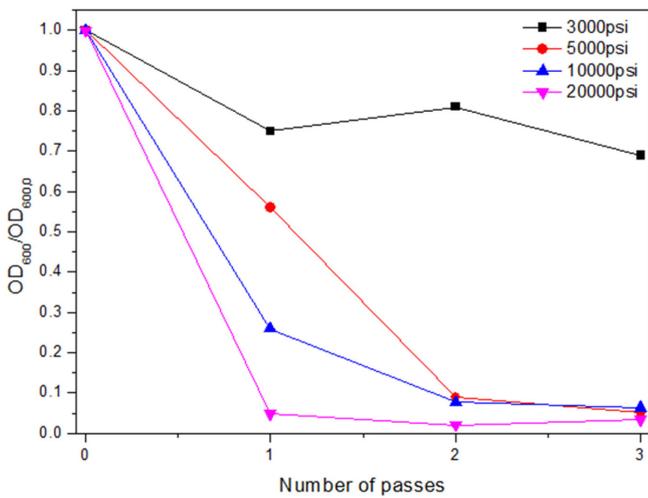


Fig. 2. Effect of operating pressure during high-pressure homogenization on $OD_{600}/OD_{600,0}$ values; $OD_{600,0}=2.1$ DCW g/L.

야생종에 비해 50% 가량 높음을 알 수 있었다. 또한 재조합 *E. coli* 균을 공급한 연구팀의 결과와 유사해서 실제 발효를 통해서도 동일한 지질 함량이 유지되고 있음을 확인하였다. 세포 파쇄 성능은 균체 농도를 나타내는 OD 값으로부터 얻은 파쇄 전과 파쇄 후의 상대적 세포농도($OD_{600}/OD_{600,0}$)와 dynamic light scattering으로 측정된 세포의 평균 직경(nm)의 감소 정도를 가지고 고찰하였다. Fig. 2는 고압 균질기의 압력과 파쇄 횟수에 따른 상대적 세포 파쇄율($OD_{600}/OD_{600,0}$)을 나타내었다. 예상한대로 균질기의 압력이 3,000 psi에서 20,000 psi로 높아질수록, 그리고 파쇄 횟수가 증가할수록 높은 파쇄율을 나타내었다. 그러나 3,000 psi로 파쇄한 경우 1회 처리시 약 20%의 세포가 파쇄되었으나 파쇄 횟수를 3회까지 증가시켜도 세포 파쇄율은 증가하지 않았으므로 고압 균질기 압력으로 적절하지 않음을 확인하였다. 반면에 5,000 psi 이상의 압력으로 파쇄한 경우는 모든 경우에 3회 처리한 경우 $OD_{600}/OD_{600,0}$ 값이 0.1 이하로 내려가 90% 이상의 파쇄율을 나타내었으며 20,000 psi의 경우에는 95% 이상의 파쇄율을 얻을 수 있었다. 그러나 처리 횟수가 증가하면 공정 비용도 증가하게 되므로 압력, 횟수와 파쇄율 등을 모두 고려하여 1회 파쇄에 95%의 파쇄율을 나타낸 20,000 psi를 최종 압력 값으로 선택하고 이후 실험을 진행하였다.

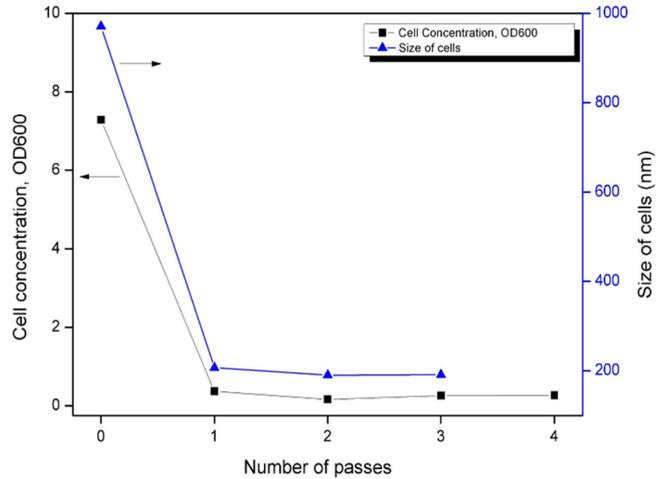


Fig. 3. Cell concentration (OD_{600}) and the average size of disrupted *E. coli* cells at different number of passes with high pressure homogenizer at 20,000 psi.

3-2. 파쇄 횟수가 세포에 미치는 영향

고압 균질기를 이용한 파쇄 횟수가 재조합 *E. coli*의 파쇄 정도 및 형태에 미치는 영향을 고찰하였다. Fig. 3에서 같이 1회 세포 파쇄가 끝난 후 OD 값은 7.5에서 0.37로 급격히 감소하였다. 2차 파쇄 후에는 파쇄 전 초기 OD 값의 5% 수준으로 감소하였으며 이후 추가적인 파쇄에도 일정하게 유지되어 95% 이상이 파쇄되었음을 확인하였다. 세포 직경도 OD 값의 변화와 동일한 변화를 나타내었다. 초기 평균 직경 값이 970 nm에서 1회 파쇄 후 약 200 nm로 감소한 이후 2회 이상 처리한 경우 횟수 증가에 따라 미세한 크기 감소가 있었으나 그 차이는 크지 않아 거의 일정한 값을 나타내고 있었다. 세포의 파쇄 전과 후의 형태와 모양을 관찰하고자 전자투과현미경(TEM) 이미지를 얻었으며 Fig. 4에 제시하였다. 본 연구에 사용한 재조합 *E. coli*를 24시간 배양한 후 측정된 모양은 일반적으로 잘 알려진 바와 같이 막대 형태였으며 평균 길이는 약 2 μ m, 직경은 약 0.6-0.8 μ m로 나타났다. 그러나 입자크기 분석기로 측정된 평균 입자크기는 약 1 μ m (1,000 nm)로 나타났는데 이는 입자를 완전한 구로 가정하고 계산했기 때문에 나타난 결과로 해석된다.

3-3. 추출 용매의 영향

추출에 사용할 용매는 독성, 추출 능력, 용매 회수율 등을 고려하여

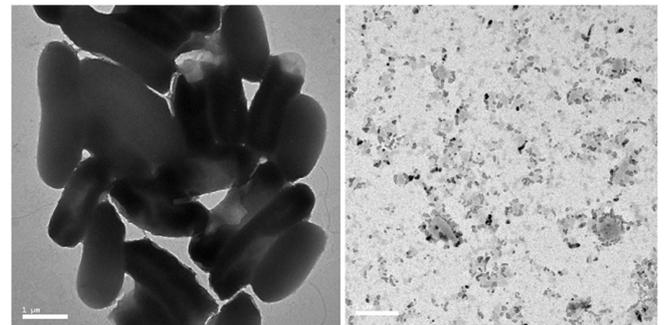


Fig. 4. TEM images of *E. coli* before (left, scale bar=1 μ m) and after (right, scale bar=200 nm) treating with high pressure homogenizer at 20,000 psi and 2 passes.

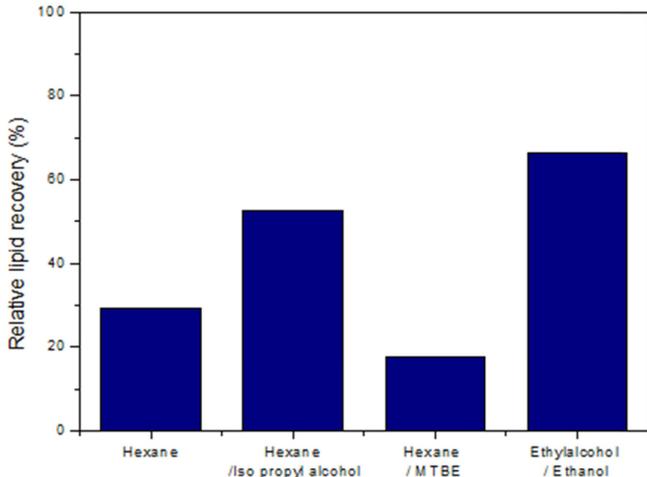


Fig. 5. Relative lipid recovery % for various solvent extraction systems.

선택하였다. Hexane은 비극성 용매로서 C₆, C₈ 과 같은 짧은 사슬 지방산보다는 긴사슬 지방산의 추출이 우수한 것으로 보고되고 있으며 [14], hexane/isopropyl alcohol (IPA), hexane/methyl tert-butyl ether (MTBE), ethyl acetate/ethanol 혼합액은 선택성, 추출 능력이 우수하고 상대적으로 안전하다고 알려진 용매이다[12,15,16]. 따라서 본 연구에서는 이상의 4가지 추출용매를 이용해서 파쇄한 세포로부터 지질을 추출하고 초기 값과 비교한 지질의 상대 회수율을 계산하였다. Fig. 5와 같이 hexane/isopropyl alcohol과 ethyl acetate/ethanol 혼합 용매의 경우 상대 회수율이 57, 63% 로 나타나 hexane/methyl tert-butyl ether (MTBE) 시스템보다 높은 결과를 보여주었다. 따라서 hexane/isopropyl alcohol과 ethyl acetate/ethanol 2가지 혼합 용매를 선택하였고 고압 균질기의 처리 횟수가 지질 추출에 미치는 영향을 고찰하였다. Fig. 6에서와 같이 ethyl acetate/ethanol 혼합 용매는 2회 파쇄, hexane/isopropyl alcohol 혼합 용매는 3회 파쇄 후 지질의 상대 회수율이 가장 높은 것으로 나타났으며, 최대값에 도달한 후 약

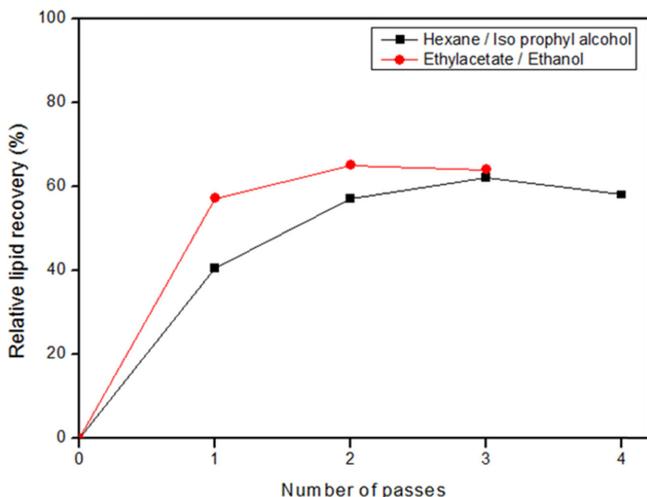


Fig. 6. Relative lipid recovery % as a function of number of homogenizing pass with 20,000 psi for two solvent extraction systems; hexane/isopropyl alcohol (black line) and ethyl acetate/etabnol (red line).

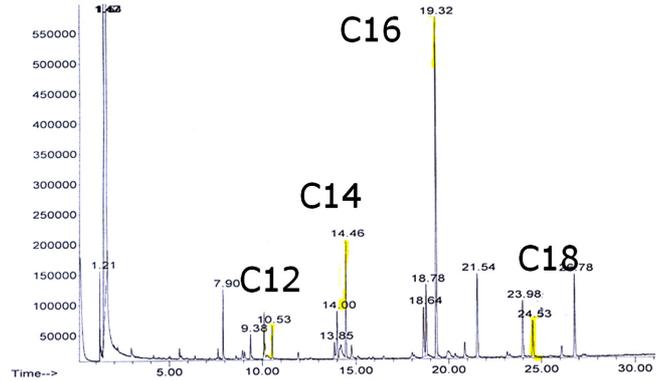


Fig. 7. GC/MS peaks of extracted fatty acid from recombinant *E. coli*.

간 감소하는 경향을 보였다. 또한 ethyl acetate/ethanol 시스템의 최대 회수율이 hexane/isopropyl alcohol에 비해 다소 높은 것으로 나타났다. 그러나 용매 추출 이후 용매를 회수하는 공정을 적용하는 경우에는 물과의 용해도가 훨씬 작은 hexane/isopropyl alcohol이 ethyl acetate/ethanol 시스템보다는 유리하므로 경제성 평가 등 추가적인 분석을 통해 최종 추출시스템을 선택하는 것이 바람직한 것으로 사료된다.

용매 추출이 완료된 후 지질성분을 GC/MS를 이용하여 분석하였다. Fig. 7에서와 같이 다양한 물질이 존재하였지만 C₁₂, C₁₄, C₁₆과 C₁₈ 지방산을 확인할 수 있었다. 본 연구에서 사용한 *E. coli*는 긴사슬 길이를 갖는 지방산을 함량을 높여 최종적으로 바이오디젤로 생산될 때 좋은 물성을 부여하고자 만들어진 재조합 균주이다. 특히 C₁₆ 지방산이 야생 균주에 비해 1.2~2.4배 많이 생산하는 균주로 보고된 바 있듯이 본 분석을 통해서도 C₁₆ 지방산이 다른 지방산보다는 많이 존재하고 있음을 확인하였다.

4. 결 론

긴사슬 지방산 함량이 높은 재조합 *E. coli* 발효를 통해 바이오디젤용 지질을 생산하기 위해 지질 분리공정에 대한 연구를 수행하였다. 바이오디젤용 지질의 생산을 위해서는 실험실적 또는 분석을 위한 기존의 추출법과는 다른 경제성 있는 공정이 요구되므로 본 연구에서는 고압 균질기를 이용해서 세포를 파쇄하고, 원심분리 후 이를 적절한 용매로 추출하는 시스템을 제안하였으며 고압 균질기의 파쇄 압력, 파쇄 횟수 및 용매 시스템이 지질의 추출에 미치는 영향을 고찰하였다. 재조합 *E. coli* 세포 내 지질함량은 야생 균주보다 50% 정도 높은 30%로 보고되었는데 실제 발효를 통해서도 동일한 지질 함량이 유지되고 있음을 확인하였다. 파쇄 전과 파쇄 후의 상대적 세포 농도(OD₆₀₀/OD_{600.0})와 dynamic light scattering으로 측정된 세포의 평균 직경(nm)의 감소 정도를 가지고 세포 파쇄 성능을 고찰한 결과 세포 파쇄는 5,000 psi 이상에서 효과적으로 이루어졌다. 압력이 증가할수록 파쇄 효율은 높아졌으며 5,000 psi 이상의 압력에서는 3회 파쇄하는 경우 모두 90% 이상의 파쇄율을 보였다. 20,000 psi의 압력에서는 1회의 처리로 95% 이상의 세포를 파쇄할 수 있었다.

4가지 환경친화적인 추출 용매 시스템에 대한 추출 효율을 관찰한 결과 hexane/isopropyl alcohol과 ethyl acetate/ethanol 시스템이 상대적으로 높은 지질 회수율을 나타내었다. 선택된 두 가지 용매 시스

템으로 20,000 psi에서 2회 파쇄한 경우 지질 회수율이 최대값에 도달함을 확인하였다. 또한 용매 추출이 완료된 후 지질성분을 분석한 결과 C₁₂, C₁₄, C₁₆과 C₁₈과 같은 긴사슬 지방산이 생산됨을 알 수 있었고 특히 C₁₆ 지방산이 다른 지방산보다는 많이 존재하고 있음을 확인하였다.

감 사

본 연구는 가천대학교의 연구비 지원으로 수행되었습니다.

References

1. Nguyen, T., Do, L. and Sabatini, D., "Biodiesel Production via Peanut Oil Extraction using Diesel-Based Reverse-Micellar Microemulsions," *Fuel*, **89**, 2285-2291(2010).
2. Huffer, S., Roche, C. M., Blanch, H. W. and Clark, D. S., "Escherichia coli for Biofuel Production: Bridging the Gap from Promise to Practice," *Trends Biotechnol.*, **30**, 538-545(2012).
3. Magnuson, K., Jackowski, S., Rock, C. O. and Cronan Jr., J. E., "Regulation of Fatty Acid Biosynthesis in Escherichia coli," *Microbiol. Mol Biol. Rev.*, **57**, 522-542(1993).
4. Atsumi, S., Hanai, T. and Liao, J. C., "Non-fermentative Pathways for Synthesis of Branched-Chain higher Alcohols as Bio-fuels," *Nature*, **451**, 86-89(2008).
5. Shiba, Y., Paradise, E. M., Kirby, J., Ro, D. and Keasling, J., "Engineering of the Pyruvate Dehydrogenase Bypass in Saccharomyces Cerevisiae for High-Level Production of Isoprenoids," *Metab. Eng.*, **9**, 160-168(2007).
6. Kalscheuer, R., Stöling, T. and Steinbuchel, A., "Microdiesel: Escherichia coli Engineered for Fuel Production," *Microbiology*, **152**, 2529-2536(2010).
7. Park, M. O., Tanabe, M., Hirata, K. and Miyamoto, K. Appl., "Isolation and Characterization of a Bacterium that Produces Hydrocarbons Extracellularly which are Equivalent to Light Oil," *Microbiol. Biotechnol.*, **56**, 448-52(2001).
8. Jeon, E., Lee, S., Won, J. I., Han, S. O., Kim, J. and Lee, J., "Development of Escherichia coli MG1655 Strains to Produce Long Chain Fatty Acids by Engineering Fatty Acid Synthesis (FAS) Metabolism," *Enzyme Microb. Technol.*, **49**, 44-51(2011).
9. Ho, C. W., Chew, T. K., Ling, T. C., Kamaruddin, S., Tan, W. S. and Tey, B., "Efficient Mechanical Cell Disruption of Escherichia coli by an Ultrasonicator and Recovery of Intracellular Hepatitis B Core Antigen," *Process Biochem.*, **41**, 1829-1834(2006).
10. Siddiqi, S. F., Titchener-Hooker, N. J. and Shamlou, P. A., "High Pressure Disruption of Yeast Cells: The Use of Scale Down Operations for the Prediction of Protein Release and Cell Debris Size Distribution," *Biotechnol. Bioeng.*, **55**, 642-649(1997).
11. Bligh, E. G. and Dyer, W. J., "A Rapid Method for Total Lipid Extraction and Purification," *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 911-917(1959).
12. Hara, A. and Radin, N. S., "Lipid Extraction of Tissues with a Low-Toxicity Solvent," *Anal. Biochem.*, **90**, 420-426(1978).
13. Bas, P., Archimède, H., Rouzeau, A. and Sauvart, D., "Fatty Acid Composition of Mixed-Rumen Bacteria: Effect of Concentration and Type of Forage," *J. Dairy Sci.*, **86**, 2940-2948(2003).
14. Lalman, J. A. and Bagley, D. M., "Extracting Long-chain Fatty acids from a Fermentation Medium," *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **81**, 105-110(2004).
15. Matyash, V., Liebisch, G., Kurzchalia, T., Shevchenko, A. and Schwudke, D., "Lipid Extraction by Methyl-tert-butyl Ether for High-throughput Lipidomics," *J. Lipid Res.*, **49**, 1137-1146(2008).
16. Lin, J., Liu, D., Yang, M. and Lee, M., "Ethyl Acetate/Ethyl Alcohol Mixtures as an Alternative to Folch Reagent for Extracting Animal Lipids," *J. Agri. Food Chem.*, **52**, 4984-4986(2004).