

Rhizopus nigricans Ehrenberg의 Methanol 내성 유도

김명희 · 성혜윤 · 김말남*

상명여자대학교 자연과학대학 생물학과

소수성 기질인 progesterone을 수용성 반응액 속에 용해하기 위하여 사용되는 methanol이 *Rhizopus nigricans*의 성장과 progesterone의 11 α -hydroxylation 반응에 미치는 영향을 조사하고, 세포막 인지질의 불포화 지방산 함량을 증가시켜 유기용매에 대한 내성을 유도하였다. *R. nigricans*의 균사체는 methanol 존재하에서 형태적인 변화를 일으켰으며, 세포막 인지질의 지방산 조성에 변화를 가져와 불포화 지방산, 특히 oleic acid의 함량이 증가되었다. 세포의 고정화는 유기용매로부터 세포를 보호하여 progesterone의 11 α -hydroxylation 율을 증가시켰다. 성장 배지에 500 $\mu\text{g/l}$ 의 biotin을 첨가하였을 때 세포막 인지질의 oleic acid 함량이 증가되었으며 methanol에 대한 내성이 증진되어 높은 progesterone의 11 α -hydroxylation 율을 얻을 수 있었다.

KEY WORDS □ *Rhizopus nigricans* Ehrenberg, progesterone, 11 α -hydroxylation, oleic acid, biotin, immobilization

Progesterone의 11 α -hydroxylation(11), Reichstein's substance S의 11 β -hydroxylation(12) 및 hydrocortisone의 Δ^1 -dehydrogenation(8)과 같은 steroid의 전환 반응에서 기질인 소수성 steroid는 유기용매에 용해시켜 수용액 반응기에 도입되어 사용되고 있다. Steroid 전환 반응에 사용되는 유기 용매는 그 종류와 농도에 따라 세포의 생리 활성에 변화를 초래함으로써 균체의 효소활성에 저해를 일으키며 세포의 형태와 생존 여부에도 영향을 미친다(20, 22).

수용성 유기용매가 효소원에 직접 접촉하여 저해 작용을 하므로 소수성 유기용매를 사용하여 유기용매/수계의 two-liquid phase system을 반응계로 사용하는 경우가 있는데 이때 기질인 소수성 steroid는 유기용매계에 포함되며 유기용매의 농도를 높일 때 기질의 농도를 높일 수 있고, 유기용매는 효소원이 존재하는 수계와 혼합되지 않아 효소원과 유기용매가 직접 접촉하지 않으므로 효소원의 안정성을 유지할 수 있다(4, 18).

한편 유기용매를 사용하지 않고 소수성 기질인 steroid를 반응액 내에 도입하는 방법도 연구되었다. Ohlson 등(17)은 계면 활성제인 Tween 80만을 사용하여 steroid를 반응액 내에 확산되도록 하였으며, Kloosterman IV와 Lilly(13)는 기질인 hydrocortisone을 수용성 물질인 polyvinyl pyrrolidone에 결합시켜 반응액 내에 도입하는 방법을 연구하였고, Park과 Hoffman(19)도 polydimethyl siloxane (PDMS)의 소수성 특성과 polyethylene oxide(PEO)의 친수성 특성에 의하여 수계에서 micelle 구조를 갖는 계면 활성제인 PDMS-PEO에 기질인 hydrocortisone을 용해시켜 반응액에 도입하였을 때 전환

율이 증진됨을 보고하였다. 그러나 그들은 낮은 기질 농도에서만 반응을 수행하였고, 0.3 g/l 이상의 농도에서는 기질에 의한 저해 작용이 일어나 좋은 결과를 얻지 못하였다.

Ingram(9)은 *Escherichia coli* K-19를 이용하여 액체 배지에 methanol을 첨가하였을 때 세포의 알코올에 대한 적응성을 조사하였다. 세포막의 지방산 조성이 변화되어 포화 지방산의 비율이 감소하고 불포화 지방산의 비율이 증가되었다. 이로부터 세포막의 유연성이 달라지며, 불포화 지방산은 알코올이 세포 내로 유입되는 것을 막아줌으로써 알코올에 대한 내성을 유도함이 발견되었다.

Mishira와 Kaur(15)는 효모의 ethanol 발효에서 효모 세포막의 인지질이 알코올에 대한 내성에 중요한 작용을 하며, 세포막에 불포화 지방산이 증가하면 유기용매에 대한 내성이 증진되므로 외부에서 oleic acid, linoleic acid와 같은 불포화 지방산을 첨가하여 주면 유기용매에 대한 내성이 증진된다고 보고하였다.

Steroid 전환 반응에서 유기용매 내성에 관한 연구는 거의 보고된 바가 없다. 미생물 세포에 유기용매에 대한 내성을 유도하여 steroid 전환 반응에 대한 효소원으로 사용하면 유기용매로부터 효소 활성의 저해 및 균체의 상해를 방지할 수 있고, 고농도의 소수성 기질을 사용하는 반응에도 이용될 수 있다.

본 연구에서는 *R. nigricans*에 의한 progesterone의 11 α -hydroxylation 반응에 가장 적은 저해 효과를 나타내는 유기용매인 methanol(10)이 균사체의 성장과 형태 및 progesterone의 전환 반응에 미치는 영향을 조사하고, 세포막 인지질의 불포화 지방산 함량을 증가시킴으로써 유기용매에 대한 내성을 유도

하였을 때 progesterone 전환반응의 효소 활성에 변화가 있는지를 조사하였다. 또한 유기용매에 대한 내성과 세포막 인지질의 불포화 지방산과의 상관 관계도 조사하였다.

재료 및 방법

균주의 배양과 고정화

R. nigricans Ehrenberg의 배지, 배양 조건 및 polyacrylamide gel을 이용한 고정화는 Kim 등(11)의 방법과 같이 하였다.

Methanol에 의한 progesterone의 전환 반응에 대한 영향 및 *R. nigricans*의 형태적 변화

고정화하지 않은 free mycelia 또는 polyacrylamide gel에 고정화된 균사체를 효소원으로 하고, 기질인 progesterone을 용해시키는 methanol의 농도를 1, 2, 4, 8, 10%로 달리하여 반응액(20 mM 인산완충용액, pH 6.0)에 첨가시켜 progesterone의 전환 반응을 실시함으로써 progesterone의 전환 반응에 미치는 methanol의 영향을 조사하였다.

4% 이상의 methanol은 *R. nigricans*의 포자 발아를 완전히 억제하는 것이 확인되었으므로, methanol에 의한 *R. nigricans*의 성장 및 형태적인 변화를 조사하기 위하여 액체 성장 배지에서 14시간 배양시킨 free mycelia의 배양액에 1, 2, 4, 6, 8, 10% 농도로 methanol을 첨가하여 다시 10시간 배양시켜 균사체의 양(건중량)을 측정하였으며 이때의 균사체의 형태 변화를 광학 현미경(Nikon, Biopot 108) 하에서 관찰하였다.

Methanol에 대한 내성의 유도

액체배지에서 14시간 배양된 free mycelia 또는 polyacrylamide gel에 고정화된 균사체의 배양액에 oleic acid(50 mM), linoleic acid(50 mM), palmitoleic acid(50 mM), biotin(500 $\mu\text{g/l}$), CoCl_2 (0.1 mM), CaCl_2 (1.0 mM) 및 Tween 80(0.05%)을 각각 첨가하여 다시 10시간 배양시켜 methanol에 대한 내성을 유도하였다.

Progesterone의 전환 반응 및 분석

Progesterone의 농도는 0.5 g/l, 반응시간은 5시간, 온도와 pH는 각각 28°C, pH 6.0에서 실험하였다. Steroids의 정량분석은 Kim 등(11)의 방법을 따랐다.

지방산의 정량 분석

Methanol에 처리된 균사체 또는 유기용매 내성이 유도된 균사체로부터 Bevan 등(3)의 방법에 의하여 인지질을 추출하였고, 인지질 내의 지방산은 Allen과 Good(1)의 방법으로 메틸화 하였다. 메틸화된 지방산의 종류 및 함량은 gas chromatography(Perkin Elmer Sigma 3B Chromatography)를 이용하여 분석하였으며 조건은 다음과 같이 하였다.

Column은 10% diethyleneglycol succinate coated Gas Chrom Q(glass column, 3 mm \times 6 ft, 100~120 mesh), 질소의 기류는 30 ml/min, column

의 온도는 170°C, injection port 온도는 230°C, detect oven 온도는 250°C로 조정하였으며, H_2 flame ionization detector로 분석하였다.

결과 및 고찰

Methanol에 의한 progesterone의 전환 반응에 대한 영향 및 *R. nigricans*의 형태적인 변화

Methanol이 progesterone의 11 α -hydroxylation과 *R. nigricans*의 성장에 미치는 영향을 Fig. 1에 제시하였다. Methanol 농도가 증가할수록 progesterone의 11 α -hydroxylation율이 급격히 감소되었으며 균체의 생성장도 급격히 감소되었다. Polyacrylamide gel에 고정화된 균사체보다 고정화하지 않은 균사체에서 효소 활성에 더 큰 저해 작용을 받은 것은 고정화하지 않은 균사체는 직접 유기용매에 노출되거나 고정화된 균사체는 고정용 담체 표면에 있는 균사체만 직접 유기용매에 노출되어, 고정화에 의하여 세포가 유기용매로부터 받는 저해 작용을 억제할 수 있기 때문인 것으로 생각된다.

Fig. 2는 methanol에 의한 *R. nigricans* 세포의 형태 변화를 조사한 것이다. Methanol 농도가 증가할수록 균사체는 짧고 굵어지며 많은 branch를 형성하는 경향을 나타내었다. 1, 2%의 methanol 농도에서는 균사체의 말단이 황변하고 뭉치며, 세포 내용물이 균사체로부터 유출되었다. 10% methanol에서는 모든 균사체 내부가 황변하고 원형질의 분리가 일어났으며 세포는 사멸하였다. Choi 등(5)은 *R. nigricans*

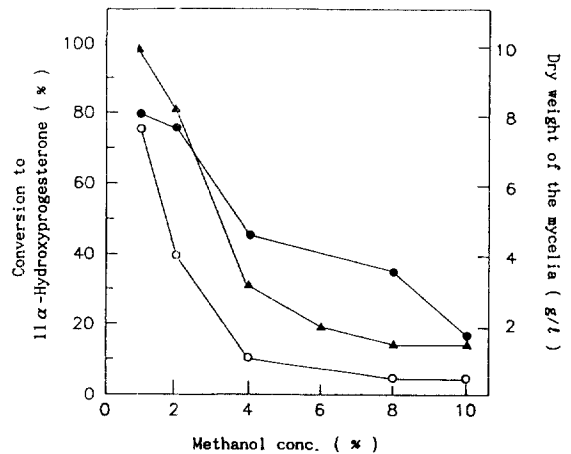


Fig. 1. Effect of methanol on the mycelial growth of *R. nigricans* and the 11 α -hydroxylation of progesterone.

▲, dry weight of mycelia; ○, 11 α -hydroxyprogesterone of free mycelia; ●, 11 α -hydroxyprogesterone of immobilized mycelia in polyacrylamide gel.

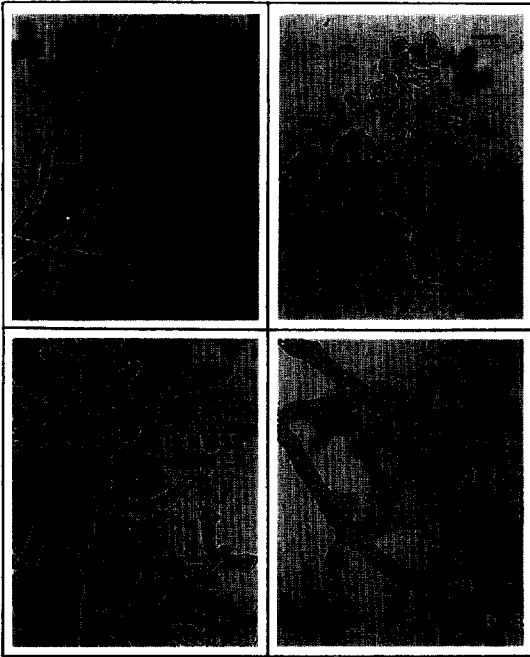


Fig. 2. Morphological variation of *R. nigricans* to the function of methanol concentration.

A to D represent 0, 1, 2, 10% of methanol concentration, respectively. Arrows indicate the leakage of cellular component (B, C) and the plasmolysis (D). Bar scales are 25 μ m.

Table 1. Content of fatty acids in the phospholipid of cell membrane in *R. nigricans* treated with methanol during cultivation.

Fatty acid	Treated conc.(%) of methanol				
	0	1	2	4	10
Oleic acid	32	37	41	38	36
Linoleic acid	19	20	20	19	15
Palmitoleic acid	3	3.2	3.0	2.84	2.6
Other fatty acids	46	39.8	36	40.16	46.4

ATCC 6227b에 의한 progesterone의 전환 반응에서 기질인 progesterone에 의하여 균사체의 길이가 짧아지고 굵어지며 많은 branch가 형성된다고 보고한 바 있으며, *Mucor rouxii*는 5%의 glucose와 phenethyl alcohol이 성장 배지에 존재할 때 사상의 균사체가 형성되지 않고 효모와 같은 단세포성으로 성장됨이 보고되었다(22). Alcohol은 극단적인 온도나 pH와 같은 효과를 나타내며 (9), Turien등(24)은 *Neurospora crassa*의 포자 발아시 0.16~0.32%의 phenethyl alcohol이 첨가되면 세포내 발아 물질이 축적되어 사상의 균사체 형성을 억제한다고 하였으며, 이와 같은 세포의 형태적 변화는 *Candida albicans*

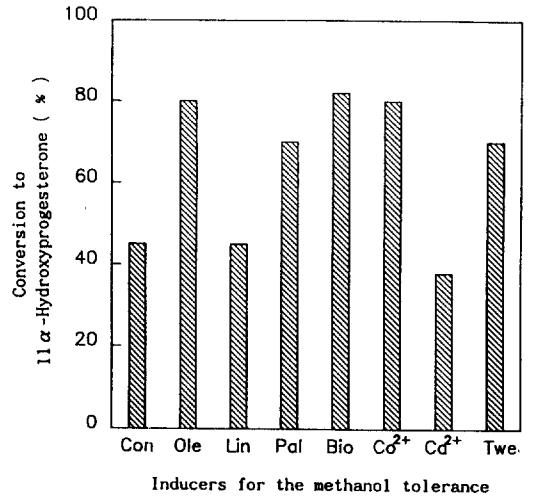


Fig. 3. Induction of methanol tolerance by treatment of mycelia with various chemicals during the cultivation.

Methanol concentration was 4%. Con, control; Ole, oleic acid; Lin, linoleic acid; Pal, palmitoleic acid; Bio, biotin; Co^{2+} , $CoCl_2$; Ca^{2+} , $CaCl_2$; Twe, Tween 80.

(14), *R. arrhizus*와 *Zygorhynchus moelleri*(22)에서도 관찰되었다.

유기용매는 미생물 세포의 세포막 지질층 또는 막성 단백질에 구조적인 변화를 초래하여 세포의 형태와 생리활성에 저해작용을 일으킨다(21). Methanol에 의한 *R. nigricans*의 세포막 인지질의 지방산 조성변화를 Table 1에 제시하였다. Methanol에 전혀 접촉하지 않은 세포에 비하여 methanol에 처리된 세포는 인지질의 지방산 중 oleic acid($C_{18:1}$)의 함량이 증가되었는데 이는 세포막이 알코올에 대한 내성을 증진시키기 위한 적응성을 나타내는 것으로 사료된다. Ethanol 존재하에서 혐기적으로 성장된 sake's yeast는 ethanol에 처리되지 않은 효모보다 ethanol에 대한 내성이 높아졌으며(25), 알코올 발효 과정에서 ethanol에 대한 내성이 큰 효모군은 ethanol에 대한 내성이 약한 효모에 비하여 불포화 지방산의 함량이 높다고 보고된 바 있다(23). 미생물의 유기용매에 대한 내성은 세포막 불포화 지방산의 함량과 관련이 있으며, 세포막 불포화 지방산의 종류와 함량을 인위적으로 조절함으로써 *R. nigricans*의 유기용매에 대한 내성을 유도할 수 있을 것으로 사료된다.

***R. nigricans*의 methanol에 대한 내성의 유도**

불포화 지방산인 oleic acid, linoleic acid, palmitoleic acid와 세포 성장시 막성 인지질의 생성을 촉진하는 것으로 알려진 biotin(6)과 Co^{2+} (7), 세포막표면에 결합되어 유기용매가 원형질막에 직접 접촉하는 것을 막아줌으로써 유기용매 내성이 유도될 수 있다고 보고된 Ca^{2+} (16) 및 oleic acid가 풍부하여

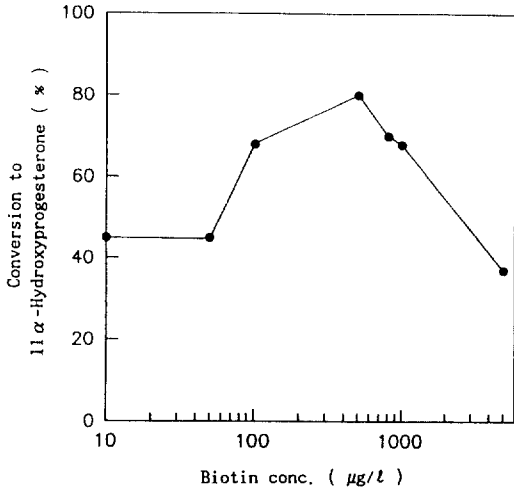


Fig. 4. Effect of biotin concentration on the induction of the methanol tolerance.

Methanol concentration was 4%.

세포막 인지질의 불포화 지방산 생성을 촉진할 수 있는 Tween 80(2)에 의한 유기용매 내성 유도 결과를 Fig. 3에 나타내었다. Oleic acid, palmitoleic acid, biotin, Co^{2+} 및 Tween 80으로 유기용매 내성을 유도한 경우 불포화 지방산으로 처리하지 않은 균사체의 경우보다 더 많은 양의 11α-hydroxyprogesterone이 생성되었으므로 이들 물질에 의해 유기용매에 대한 내성이 유도되었음을 알 수 있다. 이들 중 biotin이 가장 우수한 유기용매 내성 유도 효과를 나타내었으며, 최적의 biotin 농도는 Fig. 4에 나타낸 바와 같이 500 μg/l로 조사되었다.

Fig. 5는 500 μg/l의 biotin으로 유기용매에 대한 내성을 유도한 균사체를 progesterone 전환반응에 사용하였을 때 반응액 내의 methanol 농도에 따른 효소활성의 변화 정도를 조사한 결과이다. 4%와 8% 농도의 methanol에서 유기용매 내성 유도에 의해 11α-hydroxyprogesterone의 생성물이 약 35% 정도 더 높게 나타났다.

세포막 인지질의 지방산 조성과 유기용매에 대한 내성

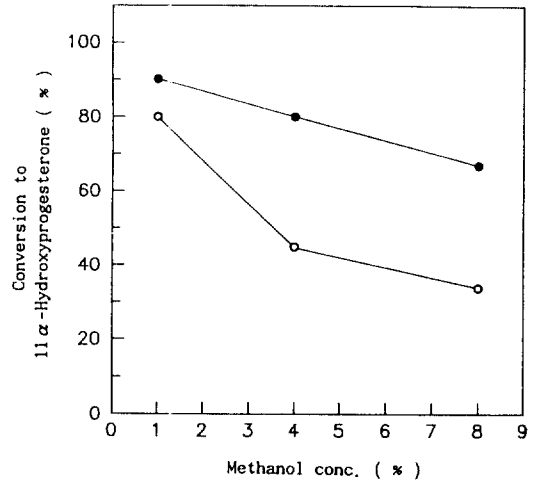


Fig. 5. Efficiency of biotin treatment to immobilized *R. nigricans* in the polyacrylamide gel on the inhibitory effect of methanol. Biotin concentration was 500 μg/l.

○, without biotin treatment; ●, treatment with biotin.

*R. nigricans*의 성장배지에 여러 유기용매 내성 유도용 물질을 첨가하였을 때 biotin, oleic acid, palmitoleic acid, Tween 80, Co^{2+} 에서 유기용매에 대한 내성이 유도되었으나(Fig. 3), linoleic acid와 Ca^{2+} 에서는 그 효과가 매우 작거나 오히려 11α-hydroxyprogesterone의 생성물이 감소되었다. 유기용매 내성의 증진이 진균인 *R. nigricans*에서도 효모나 세균에서와 같이 막성 인지질의 지방산 조성과의 관련이 있는지를 조사한 결과(Table 2), 미생물 성장 배지속에 주입된 지방산은 모두 세포막 인지질의 합성에 사용된 것으로 보인다. 지방산 합성에 필수 보조 효소로 알려져 있는 biotin과 Co^{2+} 을 성장 배지에 첨가하였을 때 두 경우 모두 세포막 내 oleic acid의 비율이 증가되었다. 따라서 진균인 *R. nigricans*에서도 효모와 세균에서와 같이 세포막 지방산 조성의 변화에 의하여 유기용매에 대한 내성이 유도될 수 있다고 판단된다. Fig. 3의 유기용매 내성에 대한 효과가 세

Table 2. Content of fatty acids in the phospholipid of cell membrane in *R. nigricans* treated with various inducers for methanol tolerance.

Fatty acid	Inducers for methanol tolerance							
	Control	Oleic acid	Linoleic acid	Palmitoleic acid	Tween 80	Biotin	Co^{2+}	Ca^{2+}
Oleic acid	32	49	30	36	43	49	65	32
Linoleic acid	19	7	24	13	14	13	9	18
Palmitoleic acid	3	3	3	15	3	5	2	3
Other fatty acids	46	41	43	36	40	33	24	47

포막 불포화 지방산 중 oleic acid의 함량(Table 2)과 큰 상관 관계를 나타내는 것으로부터 불포화 지방산인 oleic acid의 함량 증가가 유기 용매에 대한 내성에 중요한 요인인 것으로 사료된다.

한편 Ca^{2+} 은 세포막 인지질의 지방산 조성에 변화를 주지 않았던 점으로 미루어 Ca^{2+} 에 의한 progesterone의 11α -hydroxylation을 억제(Fig. 3)는 세포막 인지질의 지방산 조성과는 상관 관계가 없는 것으로 생각되며, Nabais 등(16)이 Ca^{2+} 은 효모의 세포 표면에 결합되어 세포막을 유기용매로부터 보호한다고 보고한 바 있어, *R. nigricans*의 성장중에 주입된 Ca^{2+} 도 세포 표면에 침착되어 유기용매 뿐만 아니라 유기용매 속에 용해되어 있는 소수성 기질인 progesterone의 세포내 투과를 방해하여 11α -hydroxylation을 억제한 것이 낮은 전환율의 원인이 된 것으로 사료된다.

사 사

본 논문은 1993년도 상명여자대학교 자연과학연구소 연구비에 의하여 연구되었음.

참 고 문 헌

- Allen, C.F. and P. Good, 1971. Acyl lipid in photosynthetic system, p. 523-547. In *Methods in Enzymology*, Vol. 23, Academic Press, New York.
- Asther, M., G. Corrieu, R. Drapron, and E. Odier, 1987. Effect of Tween 80 and oleic acid on ligninase production by *Phanerochaete chrysosporium* INA-12. *Enzyme Microb. Technol.* 9, 245-249.
- Beavan, M.J., C. Charpentier, and A.H. Rose, 1982. Production and tolerance of ethanol in relation to phospholipid fatty acyl composition in *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 431. *J. Gen. Microbiol.* 128, 1447-1455.
- Ceen, E.G., P. Dunnill, and J.P.R. Herrman, 1988. Two-liquid phase reactor studies of 11α -hydroxylation of progesterone by *Aspergillus ochraceus*. *Biotechnol. Bioeng.* 31, 743-746.
- Choi, Y.B., H.S. Kim, and Y.H. Park, 1990. Enhancement of biotransformation yield in 11α -hydroxylation of progesterone by continuous addition of the substrate. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 18, 280-285.
- D'Amore, T., C.J. Panchal, I. Russell, and G.G. Stewart, 1990. A study of ethanol tolerance in yeast. *CRC Crit. Rev. Biotechnol.* 9, 287-304.
- Forouhi, E. and D.J. Gunn, 1983. Some effects of metal ions on the estimation of reducing sugars in biological media. *Biotechnol. Bioeng.* 25, 1905-1911.
- Hocknull, M.D. and M.D. Lilly, 1990. The use of free and immobilized *Arthrobacter simplex* in organic solvent/aqueous two-liquid phase reactors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33, 148-153.
- Ingram, L.O., 1990. Ethanol tolerance in bacteria. *CRC Crit. Rev. Biotechnol.* 9, 305-319.
- Kim, M.H., 1987. Studies on 11α -hydroxylation of progesterone with *Rhizopus nigricans* Ehrenberg. Master's thesis. Sangmyung Women's University, Seoul.
- Kim, M.H., J.J. Lee, M.N. Kim, and B.R. Min, 1990. Optimal material and conditions for the immobilization of *Rhizopus nigricans* in the 11α -hydroxylation reaction of progesterone. *Kor. J. Mycol.* 18, 84-88.
- Kim, M.N. and Y.S. Kim, 1989. Induction of steroid 11β -hydroxylase in *Pellicularia filamentosa*. *Kor. J. Microbiol.* 27, 336-372.
- Kloosterman IV, J. and M.D. Lilly, 1984. Effect of supersaturated aqueous hydrocortisone concentrations on the Δ^1 -dehydrogenase activity of free and immobilized *Arthrobacter simplex*. *Enzyme Microb. Technol.* 6, 113-116.
- Lingappa, B.T., M. Prasad, Y. Lingappa, D.F. Hunt, and K. Biermann, 1969. Phenethyl alcohol and tryptophol: Autoantibiotics produced by the fungus *Candida albicans*. *Science* 163, 192-194.
- Mishira, P. and S. Kaur, 1991. Lipids as modulators of ethanol tolerance in yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34, 697-702.
- Nabais, R.C., I.S. Correia, C.A. Viegas, and J.M. Novais, 1988. Influence of calcium ion on ethanol tolerance of *Saccharomyces bayanus* and alcoholic fermentation by yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 2439-2446.
- Ohlson, S., P.O. Larsson, and K. Mosbach, 1978. Steroid transformation by activated living immobilized *Arthrobacter simplex* cells. *Biotechnol. Bioeng.* 20, 1267-1248.
- Osborne, S.J., J. Leaver, M.K. Turner, and P. Dunnill, 1990. Correlation of biocatalytic activity in an organic-aqueous two-liquid phase system with solvent concentration in the cell membrane. *Enzyme Microb. Technol.* 12, 281-291.
- Park, T.G. and A.S. Hoffman, 1990. Immobilization of *Arthrobacter simplex* in thermally reversible hydrogels: Effect of temperature cycling on steroid conversion. *Biotechnol. Bioeng.* 35, 152-159.
- Pinheiro, H.M. and J.M.S. Cabral, 1991. Effects of solvent molecular toxicity and microenvironment composition on the Δ^1 -dehydrogenation activity of *Arthrobacter simplex* cells. *Biotechnol. Bioeng.* 37, 97-102.
- Schneider, H., 1968. Conversion of pentoses to ethanol by yeasts and fungi. *Crit. Rev. Biotechnol.* 9, 1-40.
- Terenzi, H.F. and R. Stock, 1969. Stimulation of fermentation and yeast-like morphogenesis in *Mucor rouxii* by phenethyl alcohol. *J. Bacteriol.* 97, 1248-1261.

23. Thomas, D.S., J.A. Hossack, and A.H. Rose, 1978. Plasma-membrane composition and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* **117**, 239-245.
24. Turien, G., R. Peduzzi, and B.T. Lingappa, 1972. Morphogenesis in *Neurospora crassa* by phenethyl alcohol. *Archiv. Für Mikrobiologie* **85**, 333-345.
25. Yamashiro, K., M. Shimoide, Y. Tani, and S. Fukui, 1967. Resistance to the ethanol in sake's yeast. *J. Ferment. Technol.* **45**, 942-956.

(Received July 27, 1993)

(Accepted August 14, 1993)

ABSTRACT: Induction of Methanol Tolerance in *Rhizopus nigricans* Ehrenberg

Kim, Myung-Hee, Hye-Yoon Sung, and Mal-Nam Kim* (Department of Biology, College of Natural Sciences, Sangmyung Women's University, Seoul 110-743, Korea)

The effects of methanol, used as a solvent for the hydrophobic substrate progesterone, on the morphology of *Rhizopus nigricans* and 11 α -hydroxylation of progesterone was investigated. The methanol tolerance of the 11 α -hydroxylase system in polyacrylamide immobilized *R. nigricans* mycelia as well as in free mycelia has been induced by adding various unsaturated fatty acids, biotin and ions into the cultivation medium. Immobilization of the cell seemed to protect the cells from denaturation by methanol. It gave higher reaction rate of progesterone than the free mycelia in the presence of methanol. 500 $\mu\text{g/l}$ of biotin was found to be the most effective induction agent for the methanol tolerance among tested chemicals. *R. nigricans* cells sustained its enzymatic activity at higher methanol concentrations as a result of accumulation of unsaturated fatty acids, especially oleic acid, in the membrane phospholipid.