

미생물을 이용한 아라키돈산의 생산기술 개발

박창열*, 황병희, 유연우, 박장서*

아주대학교 분자과학기술학과, (주)두산바이오텍 BU*

전화 (031) 260-1402, FAX (031) 260-1381

Abstract

Arachidonic acid is a polyunsaturated fatty acid(PUFA) containing twenty carbon atoms with four double bonds. The family of ω -6 PUFA, including arachidonic acid as well as γ -linoleic acid, was served as intermediates in the formation of several key prostaglandin and leukotrienes. Several fungal strains of the genus *Mortierella* accumulate high amounts of arachidonic acid. In this study experiments were carried out to optimize the culture conditions for the mass production of fungus *Mortierella alpina* DSA-12 and lipid production with high proportion of polyunsaturated fatty acids, especially arachidonic acid. The batch culture was carried out in 500 L fermenter containing 50 g/L glucose, 18 g/L corn-steep powder and 100 mg/L MnSO₄ under 25°C, aeration rate of 0.5 vvm and agitation speed of 200 rpm without pH control. As a result, we could be obtained 22 g/L of cell mass with high contents of lipid (12.1 g/L) and arachidonic acid (5.1 g/L)

The intermittent fed-batch culture was performed in the medium containing 20 g/L glucose and 10 g/L corn-steep powder. The final glucose concentration was 170 g/L and pH was maintained at 5.5 ~ 6.0 by adding 14% ammonia solution. It was shown relatively high cell concentration (70.5 g/L) with high contents of lipid (45.8 g/L) and arachidonic acid (18.3 g/L). Therefore, when compared to batch cultures, the high concentration of arachidonic acid could be obtained by fed-batch culture using *M. alpina* DSA-12. These results imply that the fed-batch culture of *M. alpina* DSA-12 was feasible in industrial purpose and could be employed in the commercial production of arachidonic acid.

서론

Arachidonic acid는 polyunsaturated fatty acid 로서 포유동물에서는 직접 합성되지 않고, 단지 식물성 식품을 통하여 섭취된 필수 지방산인 linoleic acid를 전구체로 하여 합성되는 중요한 생체내의 지방산이다. Arachidonic acid는 생체 내에서 세포막의 주요 성분이며, 또한 대사조절에 관여하는 postaglandin, thromboxane 등의 다

양한 eicosanoids 합성을 위한 전구체로 이용된다. Arachidonic acid 결핍증으로는 혈장 또는 혈구중의 w3 계열 지방산 함유량이 저하되고 낙류성 피부염(scaly dermatitis)이 관찰되었으며 지각이상, 근력저하, 보행곤란, 하지통, 시각이상 등의 증상이 나타나는 것으로 보고되었다. 또한 arachidonic acid는 모유에 약 0.3% 정도 포함되어 있어 그 중요성이 인정되고 있다. 이에 본 연구에서는 *Motierella alpina* DSA-12를 이용하여 아라키돈산을 대량생산하기 위한 공정을 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

본 연구에서 사용된 균주는 *Motierella alpina* DSA-12이었으며, GY 배지 (2% glucose, 1% Yeast extract)에 1.5% agar를 첨가하여 사용하였다. Spore는 Czapek-Dox agar 배지에서 얻은 포자를 이용하였으며, 액체 배양은 glucose 2%와 yeast extract 1%가 포함된 GY배지를 이용하였다.

탄소원의 분석 : Glucose는 glucose analyzer (YSI model sidekick, USA)을 이용하였으며, glycerol은 NH2 column (shidheido, Japan)을 이용하여 HPLC (Waters, U.S.A.)에서 RI detector로 측정하였다. 이때 용매는 물과 acetonitrile를 혼합한 용액을 사용하였으며 유속은 1.4 mL/min이고 column의 온도는 40℃로 하였다.

총지질 함량 분석 : Folch's 방법을 이용하여 지질을 추출하여 건조시킨 후 지질의 건조중량을 총 지질 함량으로 결정하였다.

지방산 분석 : AOAC 965.33의 방법에 의하여 sample 준비 후 GC를 이용하여 분석하였다. GC분석은 HP 5890 series III (USA)를 이용하였으며, 사용한 capillary column은 30m X 0.32mm ID 에 film 두께가 0.25 μ m인 omegawax 320을 이용하였다. FID는 260℃, injector는 250℃이었으며 sample injection의 양은 1 μ l로 하고 split ratio는 100:1로 하였다. Column의 온도는 180℃에서 240℃까지 3℃/min으로 승온하여 주었으며 holding time은 15분이었다. 사용된 carrier gas는 질소이었으며 flow rate는 1.0 mL/min로 하였다.

결과 및 고찰

균체내 총지질함량을 증가시키기 위하여 배양배지내에 glycerol을 첨가하여 실험을 수행한 결과 균체량 및 균체내 총 지질함량은 증가하였으나 지질내 아라키돈산의 함량은 큰 변화가 없었다. 균체의 형태와 균체 내 총지질의 함량과 지질내 아라키돈산의 함량의 관계를 알아보기 위하여 Mn과 KH₂PO₄를 배양 초반에 첨가하여 실험을 수행한 결과, Mn을 첨가한 경우에는 경우에는 작은 pellet 형태로 성장하였으며, KH₂PO₄의 경우에는 풀어진 실타래의 형태로 성장을 하는 것을 확인하였다. Flask 배양의 경우에 Mn의 최적 농도는 100 mg/L로 총 지질내의 아라키돈산의 함량은 48.2%로서 첨가하지 않은 것에 비하여 약 13.4% 증가하여 최종적으로 4.6 g/L를 생산하였다. 발효조의 경우에 있어서는 최적 Mn의 첨가 농도는 50 mg/L로

서 첨가하지 않은 것에 비하여 약 5%의 증가한 3.3 g/L의 아라키돈산을 생산할 수가 있었지만 결론적으로 큰 영향이 없는 것으로 나타났다. 그러나 균체의 배양 중의 형태는 Mn을 첨가하여 준 때에 작은 pellet으로 되어 고농도 균체를 생산하기 위한 유가식 배양공정으로의 적용 가능성을 확인하였다. KH_2PO_4 의 경우에는 1 g/L를 배양 초반에 첨가하였을 때 균체량과 총 지질의 함량이 증가하였으나, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 또는 MnCl_2 를 KH_2PO_4 와 혼합하여 사용한 경우에는 아라키돈산의 함량이 크게 감소하여 $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 만을 사용하는 것이 더욱 효과적이라는 것을 알 수 있었다. 또한 500 L의 발효조에서 이를 확인한 결과 50 mg/L보다는 100 mg/L의 Mn 농도에서 아라키돈산의 함량 및 균체량이 증가하였으며 특히 총지질 함량이 증가하였고, 결과적으로 $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 가 100 mg/L가 첨가되었을 때 아라키돈산은 총지질 중에 42.0%의 함량으로 5.1 g/L을 생산할 수 있었다.

유가식 배양에 있어서는 7~14% 암모니아액을 사용하였는데 14%의 암모니아액을 사용하였을 때 균체량은 크게 증가하여 최대 70.5 g/L을 얻을 수 있었으며, 회분식 배양에서 얻을 수 있는 22.0 g/L에 비하여 3.2배 증가하였다. 또한 유가식 배양에서 총지질 함량은 65.0%이었고, 아라키돈산의 함량은 총지질의 40%로서 크게 증가하여 회분식 배양보다 아라키돈산 수율은 약 2.5배, 생산성은 약 1.7배가 증가하였다. 최종적으로 유가식 배양에 의하여 18.3 g/L의 아라키돈산을 생산할 수 있었는데, 이는 현재까지 *M. alpina* 속의 곰팡이를 이용하여 아라키돈산을 생산한 것 중에서 가장 높은 농도로 생산할 수 있었다.

참고문헌

1. Singh, A. and Ward, O.P., Production of high yields of arachidonic acid in a fed-batch system by *Motierella alpina* ATCC 32222(1997). *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 48,1-5.
2. Enoch Y. Park., Yasushia, Koike., Kenichi, Higashiyama., and Shigeaki, Fujikawa, Effect of consumed carbon to nitrogen ratio on mycelial morphology and arachidonic production in cultures of *Motierella alipina*(2001). *J. Biosci. and Bioeng.*, 91(4),382-389.
3. Chen. H. C., C. C. Chang., and C. X. Chen., Optimization of Arachidonic acid production by *Motierella alpina* Wuji-H4 isolate(1997),*JAOCS*. 74(5),569-578.
4. Kenchi, Higashiyama., Katsushi, Muarakami., Hideo, Tsujimura., Nobuya, Matsumoto, and Shigeaki, Fujikawa., Effects of dissolved oxygen on the prodcution by *Motierella alpina* 1S-4(1999), *Biotechnol. Boeng*. 63,442-448.

5. Kenchi, Higashiyama., Shigeaki, Fujikawa., Toshiaki, Taguchi., Kengo, Akimoto. and Sakayu, Shimizu. Effects of mineral addition on the growth morphology of and arachidonic acid production by *Motierella alpina* 1S-4(1998), *JAOCS*. 75, 1815-1819.

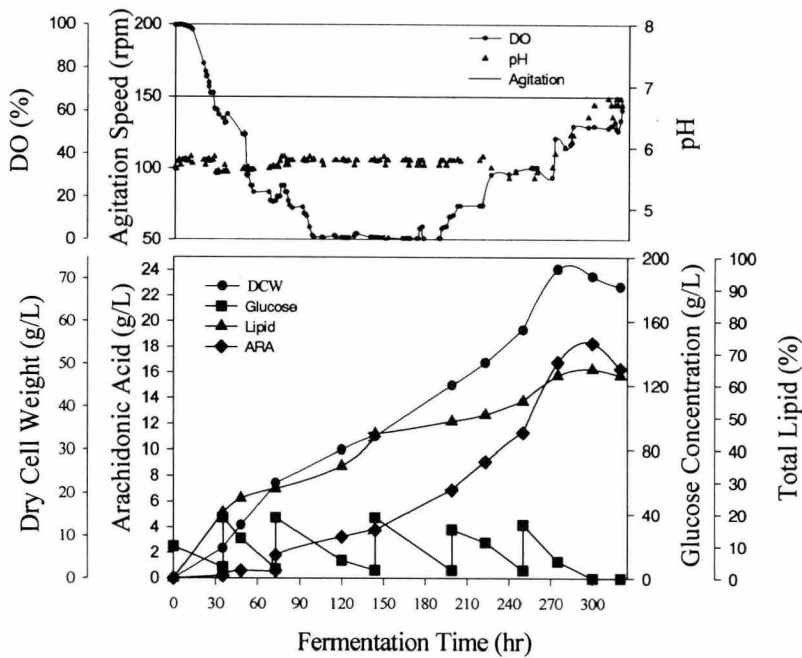


Fig. Profiles of cell and glucose concentrations, and lipid and arachidonic acid production during the intermittent fed-batch culture of *M. alpina* DSA-12 for the final glucose concentration of 170 g/L. The pH was maintained at 5.5 ~ 6.0 by adding of 14% ammonia solution. The composition of initial medium was 20 g/L glucose and 10 g/L CSP.