

추출방법이 모르티에렐라(*Mortierella*)속 유래 단세포유지 지방질과 아라키돈산 추출 수율에 미치는 영향

김선기 · 정국훈 · 한정준 · 조상우¹ · 윤석후^{2,*}
(주)두산, ¹풀무원, ²우석대학교 식품생명공학과

Effect of Extraction Methods on the Extraction Yield of Total Lipid and Arachidonic Acid from Single Cell Oil, *Mortierella* sp.

Sun-Ki Kim, Guk-Hoon Chung, Jeong-Jun Han, Sang Woo Cho¹, and Suk Hoo Yoon^{2,*}

Doosan Co.

¹Pulmuone Co.

²Department of Food Science and Biotechnology, Woosuk University

Abstract An oleaginous fungus was isolated from soil and identified as *Mortierella* sp. (M-12) for producing arachidonic acid (AA). Cell disruption methods, extraction methods, and particle sizes of freeze-dried biomass were tested to achieve maximum extraction of total lipids and AA. M-12 grown in glucose yeast media at 25°C for 7 days contained 35.5% total lipid, and 47% of the total lipid was AA. Lipid extraction yield from wet biomass was shown to be similar to that in a dry state. Maximum lipid extraction was achieved using a mixture of chloroform and methanol (2:1) as an extraction solvent. Different mechanical cell disruption methods did not affect lipid extraction yields. The smaller the particle size of the biomass, the better the lipid extraction yield was observed. Particle size of biomass was shown to more strongly affect lipid extraction than extraction time. The highest AA content was observed in the class of neutral lipids.

Keywords: *Mortierella* sp., single cell oil, lipid extraction, fatty acid composition, arachidonic acid

서 론

아라키돈산(arachidonic acid, AA)은 포유류의 지방에 들어 있는 n-6계 필수 지방산의 일종으로 구조의 특성으로 인하여 영하의 낮은 온도에서도 세포막에 유동성을 부여한다(1). 또한 AA는 인체의 조직이나 기관에 존재하는 인지질로부터 phospholipase A2의 작용에 의하여 유리된 후, 산화효소에 의하여 prostaglandin, thromboxane, leukotriene으로 합성되는데, 이 물질들은 혈압 저하, 혈소판 응집·저해, 혈관 확장, 항 종양, 수면 유도 등의 생리활성을 갖는다(2). AA는 식품을 통하여 외부로부터 공급되거나 체내에서 linoleic acid를 기질로 하여 생합성 되는데, 모유에 존재하는 AA는 유아의 두뇌 성장을 촉진시킨다고 알려져 있다(3,4). 식품 중에 자연적으로 존재하는 AA의 양은 식품에 따라 차이가 많으나 대체적으로 다른 지방산에 비하여 그 양은 매우 적은 편이며, 가금류와 쇠고기 등의 AA 함량은 가식부의 0.03-0.9% 수준이다(5). 우리나라의 영양섭취 기준에서는 다중불포화지방산의 섭취를 전체 에너지 섭취의 10% 이내로 규정하고 있으며, 이중

n-6계의 섭취가 40-80% 적정하다고 보고 있다(6). 그러나 AA의 권장 섭취량은 규정되어 있지 않은데 그럼에도 불구하고 근래 들어 유아식의 이용 빈도가 증가함에 따라 이에 첨가되는 AA의 수요가 증가하고 있다(7).

AA를 생산하는 전통적인 방법은 동물의 지방조직인 돼지 간, 정어리, 난황 등으로부터 용출, 용매 추출 등의 방법으로 지방질을 추출하고, 추출된 지방질에서 용매를 사용하여 AA를 추출하는 방법인데 천연적으로 존재하는 양이 전체 지방산의 5% 이내로 미량이라 경제적인 대량 생산의 필요성이 대두되어 왔다(8). AA를 생산할 수 있는 다른 방법으로는 미생물을 이용하거나(9), AA를 생산하는 미생물의 유전자를 재조합한 식물체를 이용하는 방법이 있다(10). 미생물을 이용한 AA의 생산은 실용화가 되어 있는데 AA를 생산하는 균들 중 모르티에렐라(*Mortierella* sp.)속 균은 경제적인 AA 생산 균주의 하나로 알려져 있다(11). 미생물 AA는 균체 지방구세포 내에 존재하는데, AA를 경제적으로 생산하기 위해서는 경제적인 추출과 정제 공정이 필수적이다. AA를 포함한 미생물유지(혹은 단세포유지, single cell oil)는 일반적으로 균체를 회수하여 건조한 후 분쇄하여 용매로 추출하는 방식으로 얻어 진다(12). 그러나 미생물 균체의 건조에는 에너지가 많이 소요되므로 에너지를 절약할 수 있는 대체 공정이 연구되어 왔는데 그 중의 하나가 습식 추출 방식이다(13). 습식 추출 방식은 미생물 균체를 건조시키는 과정 없이 균체 회수 후 곧 바로 유지를 추출함으로써 건조 공정을 생략하여 에너지 소비를 절약할 수 있다. 본 연구에서는 모르티에렐라 속 균이 생산하는 지방질과 AA를 효과적으로 추출하기 위하여 전처리 방법과 추출 용매 선정 등의 추출 조건을 최적화하였다.

*Corresponding author: Suk Hoo Yoon, Department of Food Science and Biotechnology, Woosuk University, Wanju, Jeonbuk 565-701, Korea
Tel: 82-63-290-1514
Fax: 82-63-291-9312
E-mail: shooyoon@woosuk.ac.kr/sukhooyoon@gmail.com
Received December 21, 2014; revised March 16, 2015;
accepted March 23, 2015

재료 및 방법

균주 배양 및 용매

본 실험에서는 토양으로부터 분리하여 모르티에렐라 속으로 동결된 균주 중 유지 생산효율이 가장 높은 균주 M-12를 선발하여 AA 생산 균주로 사용하였다. 추출 실험을 위하여 M-12를 GY (glucose-yeast)배지로 25°C에서 7일 동안 배양하여 동결건조한 균체를 추출 실험의 기준 시료로 사용하였다. 사용된 용매는 특별한 설명이 없으면 모두 분석용 시약급이었다.

지방질 함량 측정

균체의 지방질(Total lipids) 함량은 Soxhlet법(14)과 Folch's solvent (chloroform : methanol=2:1, CM)를 이용한 침지법(15)에 따라 측정하였고 필요에 따라 추출용매를 달리하여 실험하였다. 동결건조된 균체 약 1g를 원통여지에 담고 유기용매의 종류에 따라 추출온도를 달리한 Soxhlet법에 의하여 16시간 연속 환류 추출한 후, 감압농축시켜 용매를 제거하고 CM를 사용하여 정제하였다(15). 추출용액을 0.088% KCl 용액으로 2번 세척한 후 감압증발장치를 이용하여 유기용매를 날려 보내고, 질소가스를 불어 넣어 잔존 용매를 제거한 후, 감압건조하여 무게를 재어 균체의 지방질 함량(Total lipids, % w/w)을 측정하였다. 추출 조건을 달리하여 추출한 경우 추출 효율은 지방질 추출량(Total lipids extracted, TLE, % w/w)으로 표시하였다.

지방질 추출을 위한 균체 전처리

지방질 및 AA 추출 공정을 최적화하는데 사용된 시료로써 배양 후 회수한 젖은 상태의 균체, 동결만 시킨 균체, 동결건조한 균체 등 세 종류를 사용하였다. 균체의 세포벽을 파괴하기 위하여 ultrasonic disintegrators를 이용한 sonication 방법으로 0.1 W/mL로 10분간 처리하거나(16), Waring blender (LB10S, Waring Co., Winsted, MN, USA)에서 glass beads를 이용하여 15분간 처리하는 방법(17), Ultra-Turrax (T-25, IKA, Staufen, Germany)를 이용하여 13,500 rpm에서 1분간 처리하는 homogenization 방법(18) 등을 사용하였다. 건조균체 입자크기가 지방질 추출에 미치는 영향을 보기 위하여 막자사발로 분쇄한 균체를 20메시(mesh)와 40메시의 체를 사용하여 거른 후, 입자 크기에 따라 rough (20메시 미통과분, ≥ 0.841 mm), medium (20메시는 통과하나 40메시를 통과하지 않은 획분, $0.42 \text{ mm} \leq m < 0.841$ mm), fine (40메시를 통과한 획분, < 0.42 mm) 등 세 부분으로 나누어 헥세인(hexane)을 용매로 사용하여 Soxhlet법으로 6-12시간 연속 환류 추출하였다. 분쇄와 건조공정의 순서가 지방질의 추출에 미치는 영향을 조사하기 위하여 균체를 blender를 사용하여 먼저 분쇄한 후 건조하는 '선분쇄, 후건조' 공정과, 균체를 건조한 후에 분쇄를 하는 '선건조 후분쇄' 공정을 사용하여 지방질 추출 효율을 측정하였다(17).

균체 지방질의 대량 추출

균체 지방질을 대량으로 추출하기 위하여 균체를 세 가지 방법으로 준비하였다. 균체를 회수하여 증류수로 한 번 씻은 후 젖은 균체(Wet)를 CM 용액에 24시간 침지하여 추출하거나, 세척한 균체를 -40°C의 냉동고에서 동결시킨 후(Frozen) 용매에 침지하여 추출하거나, 동결건조한 균체를 용매에 침지하여 추출하여 지방질 함량과 AA의 함량을 비교하였다. 동결건조 균체 시료를 만들기 위하여 균체를 동결 전에 균질화하고 동결건조한 후 이를 다시 균질화하였다. 대량의 균체에서 지방질을 효과적으로 추출하기 위한 방법을 찾기 위하여 침지법(15)과 Soxhlet법을 사용하

여 추출 효율을 비교하였다. 침지법을 사용하는 경우에는 건조균체 100 g이나 이에 해당되는 젖은 균체나 동결균체를 추출용매 2L에 넣고 24시간 동안 서서히 교반하면서 지방질을 추출한 후 4시간 동안 정치시켜 용해되지 않은 고체물질을 침전시키고, 용액을 거름종이(Whatman No. 42, ashless, GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA)로 여과한 후 여액을 회전증발기에서 감압증발시켜 조지방질을 얻었다. Soxhlet 방법은 동결건조된 균체 1g을 원통여지에 담고 여러 종류의 용매를 사용하여 10시간 연속추출한 후 감압농축시켜 용매를 제거하고 조지방질을 얻었다. 조지방질은 필요에 따라 Folch's washing으로 정제하였으며, Soxhlet법을 이용하여 추출할 경우 용매의 비등점에 따라 추출 온도를 달리하여 추출하였다. 정제한 지방질은 갈색병에 넣어 질소로 충전하여 -40°C 냉동고에 보관하였다.

추출용매가 따른 지방질의 추출에 미치는 영향

침지법이나 Soxhlet법으로 지방질을 추출할 때 추출용매에 따른 지방질의 추출 효율을 측정하였다. 추출 용매는 극성에 따라 다양한 용매를 사용하였는데 butanol, cyclo-hexane, iso-hexane, iso-octane, hexane, hexane/iso-propanol (1:1), diethylether, hexane/iso-propanol (2:1), chloroform/methanol (1:1), chloroform/methanol (2:1) 등이 사용되었다. 침지법에서는 용매의 종류만 달리하여 나머지 조건은 모두 동일하게 하여 실험하였다.

균체 지방질의 분획

M-12 지방질의 종류를 분석하기 위하여 silicic acid column chromatography를 사용하였다(19). Activation된 규산을 유리관에 충전하고 클로로폼, 아세톤, 메탄올을 차례로 흘려 지방질을 중성지방질(neutral lipid), 당지방질(glycolipid), 인지지방질(phospholipid)로 분획하였고, 분획된 지방질 종류는 TLC로 확인하였다(20).

지방산 조성 분석

균체의 지방산 조성은 AOCS Ce2-66법에 따라 분석하였다(21). 추출하여 정제한 지방질을 14% BF₃/MeOH로 메틸에스터 시킨 후 Hewlett Packard 5890 Series II (Hewlett-Packard, Wilmington, DE, USA)로 분석하였다. 칼럼은 Supelcowax-10 모세관 컬럼(30 cm×0.2 mm i.d.×0.2 μm)을 사용하였으며 칼럼온도는 175°C에서 3°C/분으로 240°C까지 승온시킨 후 240°C로 유지하였다. 주입구와 FID 검출기의 온도는 모두 250°C로 하였다. 운반기체는 헬륨을 25 mL/분로 사용하였으며 split ratio를 1:50으로 조정하였다. 각 지방산의 피크들은 머무름 시간을 비교하여 확인하였으며, 지방산의 함량은 동정된 각 피크의 면적을 구한 뒤 각각의 면적비를 백분율로 나타내었다.

통계처리

본 연구에서 모든 실험은 세 번 반복으로 행하였으며, 수치는 세 실험값의 평균값으로 나타내었다. 모든 결과는 일원배치 분산분석을 사용하여 5% 유의 수준에서 분석하였으며, 사용한 프로그램은 SAS software (Version 8.2; SAS, Cary, NC, USA)이었다. 실험값들의 표준편차가 3% 이내로 나온 경우에는 표준편차나 오차막대를 표시하지 아니 하였다.

결과 및 고찰

선발 균주의 지방질 및 아라키돈산 함량

모르티에렐라 종 균주로 확인된 M-12를 GY배지에 배양하여

Table 1. Total lipid contents and fatty acid composition of *Mortierella* strains M-12 grown in GY (glucose-yeast) media*

16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	20:3	20:4	TLE** (% w/w)
18.2	4.3	11.4	11.3	5.9	2.2	46.7	35.5

*Values are averages of triplicate determinations. SD was not shown when SD was less than 3% unless otherwise specified.

**Total lipids extracted. See the text.

Table 2. Effect of pretreatment before extraction on total lipid contents and fatty acid composition of *Mortierella* strains M-12 grown in GY media*

State	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	20:3	20:4	TLE (% w/w)**
Wet	18.5	4.0	10.9	11.4	6.1	1.9	47.1	32.6 ^a
Frozen	18.3	4.1	11.0	11.5	5.9	2.4	46.8	34.8 ^{ab}
Freeze-Dried	18.2	4.3	11.4	11.3	5.9	2.2	46.7	35.5 ^b

*Values are averages of triplicate determinations. SD was not shown when SD was less than 3% unless otherwise specified.

**The values with same superscripts in same column are not significantly different at $p < 0.05$.

Table 3. Effect of extraction solvents on total lipid extraction by Soxhlet method*

Extraction solvent	TLE (% w/w)**	Extraction conditions
Butanol	4.1 ^a	90°C, 10 h
Cyclo-hexane	16.5 ^b	65°C, 16 h
Iso-hexane	20.4 ^c	65°C, 16 h
Iso-octane	21.2 ^{cd}	90°C, 10 h
Hexane	21.5 ^{cd}	65°C, 16 h
Hexane/iso-propanol (1:1)	22.2 ^d	65°C, 10 h
Diethylether	22.4 ^d	55°C, 16 h
Hexane/iso-propanol (2:1)	22.9 ^{de}	65°C, 10 h
Chloroform/methanol (1:1)	23.2 ^{de}	90°C, 10 h
Chloroform/methanol (2:1)	23.7 ^d	90°C, 10 h

*Values are averages of triplicate determinations. SD was not shown when SD was less than 3% unless otherwise specified.

**The values with same superscripts in same column are not significantly different at $p < 0.05$.

Table 4. Effect of extraction solvents on total lipid extraction by immersion method*

Extraction solvent	TLE (% w/w)**
Butanol	3.2 ^a
Cyclo-hexane	18.4 ^b
Diethylether	22.4 ^c
Iso-octane	22.5 ^c
Iso-hexane	24.4 ^{cd}
Hexane/iso-propanol (1:1)	24.5 ^{cd}
Hexane/iso-propanol (2:1)	24.7 ^{cd}
Hexane	24.7 ^{cd}
Chloroform/methanol (1:1)	27.2 ^e
Chloroform/methanol (2:1)	29.4 ^f

*Values are averages of triplicate determinations. SD was not shown when SD was less than 3% unless otherwise specified.

**The values with same superscripts in same column are not significantly different at $p < 0.05$.

회수한 후 균체의 지방질 함량 및 지방산 조성을 분석하였다(Table 1). M-12를 25에서 7일간 배양하여 균체를 동결건조 시킨 후 추출하였을 때 조지방질 함량은 건조 균체의 35.5±1.1% (w/w)이었다. 주요 지방산은 AA, palmitic acid, oleic acid, linoleic acid의 순으로 나타났으며, AA의 함량은 46.7%로 측정되었다. 일반적인 모르티에렐라 종 균체의 경우 지방질 함량은 18-21% 수준이며 AA의 함량은 17-19% 수준으로써, M-12의 유지 생산 효율이 높았으며, M-12 균체에서 유지를 제외한 나머지 균체가 시간당 유지를 생산하는 양을 비율로 나타내는 비유지생산계수(specific lipid production rate (g lipid/g lipid-free biomass/h))도 높았다(22).

균체 지방질 대량 추출을 위한 용매의 선택

M-12 균체에서 AA를 효과적으로 추출하기 위하여 균체를 전처리하거나 추출 용매를 달리 하여 유지 추출 수율을 비교하였다(Table 2). 젖은균체, 동결균체, 동결건조(Freeze-Dried) 균체를 CM 용액에 24시간 침지하여 추출하여 지방질 함량과 AA의 함량을 비교한 결과, 동결 건조한 균체를 시료로 사용할 경우 지방질 추출 효율이 35.5±1.1% (w/w)로 가장 효과적이었으나, 지방산 조성에서는 큰 차이를 보이지 않았다.

M-12로부터 AA를 효과적으로 추출하기 위한 추출 용매를 선택하기 위하여 10 종류의 추출용매를 사용하여 Soxhlet법으로 추출된 지방질의 양을 측정하였다(Table 3). 동결건조한 균체를 CM

용액으로 90에서 10시간 환류시켜 지방질을 추출할 경우 지방질 함량은 23.7±0.5% (w/w)로 가장 높게 나타났다. Diethylether, hexane, hexane/iso-propanol, iso-octane도 비교적 좋은 지방질 추출 효과를 나타내었다. 침지법에 적합한 추출 용매를 선발하기 위하여 10종류의 추출 용매를 사용하였다(Table 4). 동결건조된 균체를 CM 용액에 침지시켰을 때 지방질 함량이 29.4±0.7% (w/w)로 가장 높게 나타났다. 즉 Soxhlet법이나 침지법 모두에서 CM 용액을 사용할 경우 추출 효율이 가장 높았으나, 침지법을 사용할 경우 Soxhlet법을 사용할 경우보다 높은 추출율을 보였다. 전체적으로 생체 시료로부터 지방질을 효과적으로 추출하는 추출용매로서 극성을 가진 메탄올이나 아이소프로판올(iso-propanol), 비극성의 클로로폼이나 헥세인을 혼합하여 사용할 때 추출 효율이 높았다. 이는 수분이 함유된 상태의 시료로부터 지방질을 분리하는 경우 이러한 용매들이 3 용매계, 즉 두 종류의 추출 용매와 물로 이루어진 환경을 만들어 결합지질을 유리시키는 동시에 인지질 등의 극성지질과 친화성이 증대되어 효과적으로 지방질을 추출하기 때문인 것으로 사료된다(23). 반면 건조 상태의 균체에서 지방질을 추출하는 경우에는 비극성의 헥세인이나 다이에틸에테르(diethylether)가 추출용매로 사용될 수 있다. 추출용매를 CM 용액으로 동일하게 사용할 경우 침지법에서의 추출 수율이 Soxhlet법에 의한 추출 효율보다 높게 나타났다. 추출 시간은 침지법의 경우 24시간이 소요되지만 Soxhlet법은 10-16시간이 소요되어 상

Table 5. Lipid classes of total lipids of M-12 fractionated by silicic acid column chromatography*

	Lipid class (%)*		
	NL	GL	PL
Lipid class content (% w/w)	65.3-68.9	27.5-29.7	3.6-5.1
Arachidonic acid**	30.8	39.9	23.5

*NL, neutral lipids; GL, glycolipids; PL, phospholipids.

**Values are averages of triplicate determinations. SD was not shown when SD was less than 3% unless otherwise specified.

Table 6. Effect of mechanical cell disruption methods on lipid extraction*

Cell disruption methods	Total lipid extracted (%)**
Without disruption	29.4 ^a
Waring blender with grinding mill	34.4 ^b
Ultrasonication	35.5 ^{bc}
Ultrasonication with grinding mill	35.8 ^{bc}
Homogenization with ultra-turrex	36.2 ^c
Homogenization with grinding mill	36.2 ^c

*Values are averages of triplicate determinations. SD was not shown when SD was less than 3% unless otherwise specified.

**The values with same superscripts in same column are not significantly different at $p < 0.05$.

Table 7. Effect of particle size on lipid extraction from M-12*

Particle size	Total lipid extracted (% w/w)		Arachidonic acid content (%)**
	6 h	12 h	
Rough	8.4	9.1	33.9 ^a
Medium	11.6	12.5	36.7 ^b
Fine	14.2	14.8	38.3 ^c

*Values are averages of triplicate determinations. SD was not shown when SD was less than 3% unless otherwise specified.

**The values with same superscripts in same column are not significantly different at $p < 0.05$.

대적으로 신속한 추출이 이루어졌지만 침지법을 사용할 경우 환류 추출 시 소요되는 에너지를 절약할 수 있을 것으로 사료된다.

균체 지방질의 분획

CM 용액을 사용하여 침지법으로 추출한 M-12 지방질을 silicic acid column chromatography를 사용하여 neutral lipids (NL), glycolipids (GL), phospholipids (PL)로 분획하여 함량을 측정된 결과 NL이 65.3-68.9%, GL이 27.5-29.7%, PL이 3.6-5.1%로 나타났다(Table 5). NL의 AA 함량은 30.8%로 나타났으며, glycolipids에서는 39.9%로 가장 높게 나타났다. 세 가지 지방질 분획 중의

AA 함량이 23.5-39.9%인 점으로 보아 실험에 사용된 균체가 충분한 유지축적 단계를 거칠 경우 AA의 함량은 증가될 수 있을 것으로 사료된다.

균체 세포벽 분쇄가 지방질 추출에 미치는 영향

동결건조된 균체를 기계적인 방법을 사용하여 세포벽을 파괴한 후 CM=2:1 용액으로 지방질을 추출하였다(Table 6). 건조만 하고 추출 전 기계적 분쇄로 세포벽을 파괴하지 않고 지방질을 추출한 경우(29.4%)보다 기계적인 분쇄방법을 사용하여 세포벽을 파괴하였을 경우 총지방질은 34.4-36.2%로 많이 추출되었으나, 초음파 분쇄나 균질화 처리 등의 기계적 분쇄 방법 사이에는 큰 차이를 보이지 않았다.

균체 입자크기가 지방질 및 아라키돈산 추출에 미치는 영향

M-12 건조균체를 분쇄한 후 입자 크기에 따라 rough, medium, fine 세 가지 시료로 분획하고 헥세인으로 6시간 추출한 결과 지방질 추출량은 8.4, 11.6, 14.2%로 나타나 입자가 고울수록 추출율은 높아졌다(Table 7). 헥세인으로 12시간 추출하였을 때에는 각각 9.1, 12.5% 그리고 14.8%의 유지 수율을 보였는데 이들 결과 미루어보아 지방질의 추출 효율은 추출 시간보다는 추출 시 입자의 크기에 더 많은 영향을 받는 것으로 사료된다. 추출된 지방질의 AA함량은 33.9-38.3%로써 입자의 크기나 추출시간에 큰 영향을 받지 않는 것으로 나타났으며 입자 크기가 작을수록 추출효율이 높았다. 따라서 균체 지방질 추출의 경우에도 다른 유량자원의 유지 추출에서와 마찬가지로 입자를 작게 하여 표면적을 최대로 하는 것이 추출 효율을 제고시킨 것으로 사료된다(24).

분쇄와 건조공정의 순서와 지방질 추출 효율

균체를 먼저 분쇄하여 건조시킨 "선분쇄 후건조 시료"가 먼저 건조한 후에 분쇄한 "선건조 후분쇄" 시료보다 지방질 추출이 잘 되는 것으로 나타났다(Table 8). 또한 추출 용매는 CM 용액이 Hexane:Ethanol (9:1, H:E=9:1) 용액보다 높은 추출 효율을 보였다. 이는 CM 용액을 사용할 경우 극성지방질이 많이 추출되기 때문으로 사료된다. 또한 예상대로 균체를 건조(dried)만 해서 추출한 경우보다 건조 후 분쇄를 하고 추출하였을 때 추출 효율이 더 높았다. 전처리 공정의 순서와 추출 용매가 지방질의 종류 구성에 미치는 영향을 Table 9에 나타내었다. 순수한 헥세인만을 사용하여 분쇄 후 건조한 시료에서 지방질을 추출하였을 때 neutral lipid의 함량이 87.7%로 가장 높았다. 그러나 CM 용액을 사용하였을 경우 총지방질 함량은 24.1%로 높았지만 neutral lipids의 함량은 낮고 glycolipids의 함량이 높게 나타났다. 공정 조건을 변화시켜 neutral lipids만이 특이적으로 주성분으로 추출되면 polar lipid를 제거하는 공정이 생략될 수 있으므로 추출 용매의 선정은 중요한 의미를 갖게 된다.

자연계에 미량으로 존재하는 AA를 얻기 위하여 미생물을 이

Table 8. Effects of cell disruption, sequence of drying and blending process, and extraction solvent on total lipid extracted from M-12* (unit: %, w/w)

	1 h Immersion (H:E=9:1)		1 h Immersion (CM)		5 h Soxhlet (H:E=9:1)		5 h Soxhlet (CM)	
	dried**	ground**	dried**	ground**	ground**	ground**	ground**	ground**
Grinding→drying***	-	19.7 ^a	-	24.1 ^b	23.4 ^b	28.3 ^c		
Drying→grinding***	7.4 ^a	9.7 ^a	17.5 ^b	23.9 ^c	15.4 ^b	26.4 ^c		

*Values are averages of triplicate determinations. SD was not shown when SD was less than 3% unless otherwise specified.

**Total lipid extracted from dried only sample (dried), and from dried and ground (ground) sample.

***The values with same superscripts in same row are not significantly different at $p < 0.05$.

Table 9. Effect of extraction solvents and extraction method on lipid class of M-12*

	1 h Immersion (Hexane100%)			1 h Immersion (H:E=9:1)			1 h Immersion (CM)		
	NL**	GL**	PL**	NL	GL	PL	NL	GL	PL
Grinding→drying	87.7	8.4	3.9	63.3	30.9	5.8	29.5	64.0	15.5
Drying→grinding	70.9	21.2	7.9	38.5	56.1	5.4	17.4	65.1	17.5

*Values are averages of triplicate determinations. SD was not shown when SD was less than 3% unless otherwise specified.

**NL, neutral lipids; GL, glycolipids; PL, phospholipids.

용하는 방법이 상업적으로 사용되고 있다. 미생물에서 지방질을 경제적으로 추출하기 위해서는 에너지를 적게 사용하는 방법이 필요하다. 따라서 대량의 균체 시료에서 지방질을 경제적으로 추출하기 위해서는 에너지가 많이 소용되는 건조 공정을 생략하는 추출 공정의 개발이 필요할 것으로 사료되는데, 젖은 상태에서 지방을 추출하기 위해서는 균체 파쇄 기기에서 균사체가 용이하게 흐르게 하는 것이 중요할 것으로 사료된다. 이 경우 친수성 용매나 물 분자가 지방질의 친수층을 감싸 지방질의 추출을 방해할 수 있는데 이를 해결하면 습식 추출 공정의 상업적인 이용이 가능하리라 사료된다.

요 약

아라키돈산(AA)은 포유동물에 식품을 통해 섭취되는 필수지방산으로써 동물조직에서 추출되어 이용되어 왔다. 경제적으로 AA를 생산하기 위하여 토양으로부터 AA를 다량으로 생산하는 모르티에렐라 종으로 확인된 M-12균주를 선발하였다. 균체로부터 지방질과 AA를 효율적으로 추출하기 위하여 전처리 공정, 공정 순서, 추출 용매, 추출 방식, 입자 크기 등을 달리하여 추출 효율을 분석하였다. M-12를 GY배지로 25°C에서 7일 배양하여 동결 건조한 시료를 사용하였을 때 지질방 중 47% 이상의 AA를 함유하고 있었다. 지방질 추출 효율은 균체의 젖은 상태와 건조 상태로 나눈 전처리 공정에 따라 큰 차이를 보이지 않았다. 클로로폼과 메탄올(2:1) 용액을 추출 용매로 사용하였을 때 가장 높은 추출율을 보였으며 헥세인이나 아이소헥세인도 우수한 추출 효율을 나타내었다. 균체를 분쇄하기 위하여 blending, ultrasonication, Ultra-turrex homogenization 등 기계적 분쇄방법을 사용하였으나 추출 효율은 큰 차이를 보이지 않았다. 균체 입자가 고울수록 유지의 추출 효율은 높게 나타났고 추출 시간보다는 추출 시 입자 크기가 추출 효율에 더 큰 영향을 주는 것으로 나타났다. 그러나 추출된 유지를 분획하여 지방산 조성을 분석한 결과 neutral lipids 내에 AA의 함량이 65.3-68.9%로 가장 높게 나타났다.

References

- Fukaya T, Gondaira T, Kashiyae Y, Kotani S, Ishikura Y, Fujikawa S, Kiso Y, Sakakibara M. Arachidonic acid preserves hippocampal neuron membrane fluidity in senescent rats. *Neurobiol. Aging* 28: 1179-1186 (2007)
- Granström E. The arachidonic acid cascade. The prostaglandins, thromboxanes and leukotrienes. *Inflammation* 8: S15-25 (1984)
- Goodnight Jr SH, Harris WS, Connor WE, Illingworth DR. Polyunsaturated Fatty acids, hyperlipidemia, and thrombosis. *Arterioscl. Throm. Vas.* 2: 87-113 (1982)
- Haag M. Essential fatty acids and the brain. *Can. J. Psychiat.* 48: 195-203 (2003)
- Mann NJ, Johnson LG, Warrick GE, Sinclair AJ. The arachidonic acid content of the Australian diet is lower than previously estimated. *J. Nutr.* 125: 2528-2535 (1995)
- Park YS, Park HJ, Won SI. Association of Fatty Acid Intake and Dyslipidemia in Korean Adults: Korea National Health and Nutrition Survey, 1998-2007. *J. East Asian Soc. Dietary Life* 21: 789-807 (2011)
- Makrides M, Neumann MA, Byard RW, Simmer K, Gibson RA. Fatty acid composition of brain, retina, and erythrocytes in breast- and formula-fed infants. *Am. J. Clin. Nutr.* 60: 189-194 (1994)
- Mann NJ, Johnson LG, Warrick GE, Sinclair AJ. The arachidonic acid content of the Australian diet is lower than previously estimated. *J. Nutr.* 125: 2528-2535 (1995)
- Shinmen Y, Shimizu S, Akimoto K, Kawashima H, Yamada H. Production of arachidonic acid by *Mortierella* fungi. *Appl. Microbiol. Biot.* 31: 11-16 (1989)
- Qi B, Fraser T, Mugford S, Dobson G, Sayanova O, Butler J, Napier JA, Stobart AK, Lazarus CM. Production of very long chain polyunsaturated omega-3 and omega-6 fatty acids in plants. *Nature Biotechnol.* 22: 739-745 (2004)
- Eroshin VK, Dedyukhina EG, Chistyakova TI, Zhelifonova VP, Kurtzman CP, Bothast RJ. Arachidonic-acid production by species of *Mortierella*. *World J. Microb. Biot.* 12: 91-96 (1996)
- Ratledge C. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. *Biochimie* 86: 807-815 (2004)
- Zhu M, Zhou PP, Yu LJ. Extraction of lipids from *Mortierella alpina* and enrichment of arachidonic acid from the fungal lipids. *Bioresource Technol.* 84: 93-95 (2002)
- Manirakiza P, Covaci A, Schepens P. Comparative study on total lipid determination using Soxhlet, Roesse-Gottlieb, Bligh & Dyer, and modified Bligh & Dyer extraction methods. *J. Food Compos. Anal.* 14: 93-100 (2001)
- Duthie AH, Patton S. Purification of phospholipids recovered from thin-layer chromatograms for infrared spectral analysis. *J. Lipid Res.* 6: 320-322 (1965)
- Clarke PR, Hill CR. Physical and chemical aspects of ultrasonic disruption of cells. *J. Acoust. Soc. Am.* 47: 649-653 (1970)
- Dunn B, Wobbe CR. Preparation of protein extracts from yeast. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 13: 1-9 (2001)
- Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, Cisneros-Zevallos L, DH Byrne. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J. Food Compos. Anal.* 19: 669-675 (2006)
- Rouser G, Kritchevsky G, Simon G, Nelson GJ. Quantitative analysis of brain and spinach leaf lipids employing silicic acid column chromatography and acetone for elution of glycolipids. *Lipids* 2: 37-40 (1967)
- Freeman CP, West D. Complete separation of lipid classes on a single thin-layer plate. *J. Lipid Res.* 7: 324-327 (1966)
- Lee SY, Jung MY, Yoon SH. Optimization of the refining process of camellia seed oil for edible purposes. *Food Sci. Biotechnol.* 23: 65-73 (2014)
- Eroshin VK, Satroudinov AD, Dedyukhina EG, Chistyakova TI. Arachidonic acid production by *Mortierella alpina* with growth-coupled lipid synthesis. *Process Biochem.* 35: 1171-1175 (2000)
- Chen CS, Wu SH, Girdaukas G, Sih CJ. Quantitative analyses of biochemical kinetic resolution of enantiomers. 2. Enzyme-catalyzed esterifications in water-organic solvent biphasic systems. *J. Am. Chem. Soc.* 109: 2812-2817 (1987)
- Snyder JM, Friedrich JP, Christianson DD. Effect of moisture and particle size on the extractability of oils from seeds with supercritical CO₂. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 61: 1851-1856 (1984)