

연구노트

모르티에렐라(*Mortierella*)속 유래 단세포유지로부터 추출한 지방질의 탈색

김선기 · 정국훈 · 한정준 · 조상우¹ · 윤석후^{2,*}

(주)두산, ¹풀무원, ²우석대학교 식품생명공학과

**Bleaching of Lipids Extracted from Single Cell Oil
Produced by *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 The deacidified oil obtained from the oleaginous fungus, *Mortierella* sp. (M-12) was bleached, after degumming, using activated clay under a 50-100 mmHg vacuum. The bleaching conditions were partially optimized as follows: activated clay, 1%, bleaching temperature 90°C, and treatment time 20 min. After bleaching, the color of bleached oil as determined by the Lovibond Tintometer, satisfied the specification for edible fats and oils. The bleaching process also decreased the contents of free fatty acids and phosphorus in the deacidified oil. The acid value of the bleached oil also satisfied the specification for edible fats and oils. It was early shown that the normal bleaching process can be used for the bleaching of heavily-colored microbial lipids for human consumption.

Keywords: *Mortierella* sp., single cell oil, arachidonic acid, bleaching, deacidification

서 론

포유동물의 지방질에 들어 있는 아라키돈산(arachidonic acid, AA)은 면역물질의 합성, 세포막의 유동성 부여에 관여하는 ω-6 계 필수 고도불포화지방산의 일종이다(1). AA는 전통적으로 동물의 지방질조직으로부터 추출하였으나 그 양이 매우 제한적이라 늘어나는 AA의 수요를 충족시킬 수 있는 새로운 수단이 필요하게 되었는데 그 중의 하나가 미생물에 의한 AA의 생산이다(2). 미생물이 생산하는 균체 지방질(단세포유지)은 균체의 특성을 이용하여 중성지방질과 고도불포화지방산을 포함한 다양한 종류의 유지를 생산할 수 있다(3). 미생물이 생산하는 유지는 일반 유량자원인 동식물 유지보다 극성지방질을 많이 함유하고 있으며, 유리지방산과 색소의 함량도 높은 편이다(4). 동식물 유량자원으로 얻어진 대부분의 유지는 트리아실글리세롤 이외에도 인지지방질, 유리지방산, 색소, 이취물질 등을 함유하고 있어 정제공정을 거쳐 이러한 미량성분들을 제거하여야 소비자가 선호하는 식용급 유지로 만들 수 있다(5,6). 미생물이 생산한 AA를 포함한 유지도 식용으로 이용하기 위해서는 일반적인 식용유지와 동일한 수준의 규격을 갖는 유지로 정제하여야 한다. 특별히 미생물이 생산하는 대부분의 지방질은 색소의 함량이 높기 때문에 식

용유지로 이용하기 위해서는 적절한 탈색공정이 필요하다. 상업적인 유지 정제과정에서의 탈색은 주로 흡착제를 처리하여 색소 물질을 흡착, 제거하는데, 색소의 제거 정도는 사용하는 흡착제의 종류(7), 탈색 공정의 조건(8) 등에 따라서 달라진다. 본 연구에서는 모르티에렐라속 균이 생산한 지방질을 식용유지급으로 정제하기 위하여 정제공정의 하나인 탈색공정을 최적화하였다.

재료 및 방법

균주 선발과 배양

균주의 선발, 동정, 배양, 지방질의 추출은 Kim 등(9)의 방법으로 수행하였다. 토양으로부터 분리하여 *Mortierella* 속으로 동정된 M-12 균주를 AA를 함유한 지방질의 생산 균주로 사용하였다. GY (glucose yeast, Bacto Yeast Extract, Difco, Detroit, MI, USA) 배지에서 25에서 7일간 배양하여 회수한 균체를 증류수 3차 세척한 후 동결건조시킨 균주를 막자사발로 40메시(mesh) 이하 크기로 분쇄하였다. 분쇄한 균주를 20배(w/v)의 클로로폼(chloroform)과 메탄올(methanol) (2:1) 용액에 침지하여 서서히 교반하면서 24시간 동안 지방질을 추출하였다. 교반 후 4시간 동안 정지시켜 찌꺼기(debris)를 침전시킨 후, 상등액을 거름종이(여과지) (Whatman No. 42, ashless, GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA)로 여과시킨 후, 여액을 회전증발기(rotary evaporator)에서 감압증발시켜 지방질을 얻었다. 추출한 지방질(조유)은 갈색병에 넣어 질소로 충전하여 -40°C 냉동고에 보관하였다.

지방산 조성과 이화학적 분석

균체의 지방산 조성은 AOCS Ce2-66법에 따라 분석하였다(10,11). 추출하여 정제한 지방질을 14% BF₃/메탄올로 메틸에스

*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 March 18, 2015; revised April 14, 2015;

accepted April 20, 2015

테르화 시킨 후 Hewlett Packard 5890 Series II (Hewlett-Packard, Wilmington, DE, USA) 가스크로마토그래피(gas chromatograph)로 분석하였다. 칼럼은 Supelcowax-10 capillary column (30 cm×0.2 mm i.d.×0.20 µm)을 사용하였으며 칼럼온도는 175°C에서 3°C/분으로 240°C까지 승온시킨 후 240°C로 유지하였다. 주입구 및 불꽃 이온화 검출기(flame ionization detector, FID)의 온도는 모두 250°C로 하였다. 운반기체는 He를 25 mL/min로 사용하였으며 split ratio를 1:50으로 조정하였다. 각 지방산의 피크들은 표준 지방산의 메틸에스터(methylester)의 머무를 시간과 비교하여 확인하였으며, 지방산의 함량은 동정된 각 피크의 면적을 구한 뒤 각각의 면적비를 백분율로 나타내었다.

탈산유와 탈색유의 산값(Cd 3d-63), 과산화물값(Cd 8-53), 인 함량(Ca 12-55) 등은 AOCS 방법에 따라 분석하였다(11).

추출 지방질의 탈검과 탈산

M-12에서 추출한 지방질을 탈색처리하기 위한 전단계로 탈검과 탈산 공정을 행하였다. 탈검과 탈산 공정은 Lee 등(12)의 방법을 사용하였다. 원유에 85% 인산(phosphoric acid)을 0.2% 첨가하여 70°C에서 20분간 반응시킨 후 원심분리기(CL 10; Thermo Scientific, Asheville, NC, USA)를 사용하여 10,000×g에서 10분간 원심분리하여 검물질을 제거하고 탈검유를 얻었다. 탈검유에 20 degree Baume NaOH 용액을 0.5% 과량으로 첨가하여 75°C에서 20분간 반응시킨 후 원심분리기(CL 10, Thermo Scientific, Asheville)를 사용하여 10,000×g에서 10분간 원심분리하여 비누물질을 제거하였다.

추출 지방질의 탈색

조유를 식용유지 수준의 탈색 후 규격을 갖게 하기 위하여 탈검과 탈산을 거친 지방질을 탈색 처리하였다. 50 g의 탈산유를 온도계와 교반기가 장착된 3입구 둥근바닥플라스크(round bottom flask)에 넣고, 0.5-2.0%의 활성백토(activated clay)를 첨가한 후 서서히 교반하면서 90°C까지 가열하고, 50-100 mmHg의 진공 하에서 10-30분 간 교반하면서 탈색을 시행하였다(12). 탈색 후에는 탈색유와 활성백토를 분리하기 위하여 4,330×g에서 10분간 원심분리하여 기름을 분리하고, 분리된 기름을 Whatman No. 42 filter 여과지로 여과하여 탈색유를 얻었다. 탈색유의 색상은 AOCS Tintometer Color 방법(AOCS Cc 13e)에 따라 Lovibond Tintometer (Model E, 5 1/4 inch cell, Lovibond Tintometer, Sarasota, FL, USA)를 사용하여 측정하였다(11).

통계분석

모든 실험은 3번 반복하여 행하였으며, 수치는 세 실험값의 평균값으로 나타내었다. 통계분석은 일원배치 분산분석(one-way analysis of variance) (ANOVA)를 사용하여 5% 유의 수준에서 행하였으며, 사용한 프로그램은 SPSS Statistics (IBM, Poukeepsie, NY, USA)이었다(13). 실험값들의 표준편차가 3% 이내로 나온 경우에는 표준편차나 error bar를 표시하지 아니 하였다.

결론 및 고찰

추출 지방질의 이화학적 성질

M-12 균체의 지방질 함량은 건조 균체의 35.5±1.1%(중량 기준)이었으며, 주요 지방산은 아라키돈산(46.7%), 팔미트산(18.2%), 올레산(11.4%), 리놀레산(11.3%)이었으며, 스테아르산, 리놀렌산 등이 검출되었다(Table 1). 아라키돈산의 함량이 46.7±0.8%으로써

Table 1. Characteristics of M-12 lipids before and after bleaching^{1),2)}

		Before bleaching (Deacidified oil)	After bleaching (Bleached oil)
Fatty acid composition (% area)	16:0 ³⁾	18.2	18.3
	18:0	4.3	4.2
	18:1	11.4	11.3
	18:2	11.3	11.4
	18:3	5.9	5.9
	20:3	2.2	2.3
	20:4	46.7	46.6
Acid value (mg KOH/g)		0.71 ^a	0.5 ^b
Peroxide value (meq/kg)		10.37 ^a	17.58 ^b
Phosphorus content (ppm)		1.64 ^a	1.12 ^b
Color	Blue	2.1 ^a	0 ^b
	Red	10.6 ^a	0.7 ^b
	Yellow	68 ^a	10 ^b

¹⁾Values are averages of triplicate determinations. SD was not shown when SD was less than 3% unless otherwise specified.

²⁾The values with same superscripts in same column are not significantly different at $p < 0.05$.

³⁾Numbers before and after colon stand for number of carbon of fatty acid and number of double bond, respectively.

본 실험에 사용된 모르티에렐라 균은 기존에 보고된 아라키돈산 생산 균주와 유사한 생산 양상을 보였다(2,3). M-12로부터 추출한 조유에 85% 인산 용액을 0.2% 수준으로 첨가하여 20분간 처리하여 탈검하였으며, 탈검유에 12% NaOH 용액을 0.5% 과량으로 첨가하여 탈산을 시행하였다. 탈검과 탈산 과정을 거친 탈산유의 이화학적 특성은 Table 1과 같다. 탈산유의 산값과 과산화물값은 0.71 mg KOH/g과 10.37 meq/kg로써 탈산을 거친 일반적인 식물성 유지의 값들과 유사하게 나타났다(5,12). 미생물유지는 배양과 추출 공정 시 다량의 수분이 존재하면서 가수분해가 일어나고 가수분해 결과 유리된 지방산의 불포화도가 높아 과산화물도 많이 생성되나 탈검과 탈산을 거치면서 일반적인 산값과 과산화물값을 가지게 되는 것으로 사료된다(14). 조유의 인 함량은 일반적인 식물성 원유보다 낮게 나타났는데 탈산 후에는 1.64 ppm의 낮은 값을 보였다.

탈색

탈산유의 색상을 Lovibond colorimeter로 측정한 결과 Blue (B) 2.1, Red (R) 10.6, Yellow (Y) 68로 나타났다(Table 1). Lovibond colorimeter는 유지의 색상을 B (0-40), R (0-70), Y (0-70)의 각 숫자와 “bright, dull”의 조합으로 나타낸다(11). 탈산유는 매우 진한 황토색의 진한 색상을 띄었는데 이는 다른 식물성 유지인 동백기름과 콩기름 탈산유의 색상(진한 노랑색 또는 옅은 오렌지색, B 0.1-0.2, R 1.2-3.0, Y 22.3-33.0)보다 높게 나타났다(12,15). 식용유지의 탈색효과는 사용되는 흡착제의 종류와 양, 처리 온도와 처리 시간에 영향을 받는다(8,15). 활성백토를 탈검유의 0.5-2% 수준으로 첨가하여, 90°C에서 20분간 처리하여 탈색 효과를 살펴 본 결과 1% 활성 백토를 첨가하였을 때 가장 좋은 탈색 효과를 보였고, 그 이상의 농도에서는 차이를 보이지 않았다(Table 2). 또한 1%의 활성백토를 첨가하여 90°C에서 10-30분간 처리하였는데 20분간 처리하였을 때 탈색효과가 가장 높게 나타났으며 그 이상의 시간에서는 차이를 보이지 않았다(Table 3). 따라서 M-12 지방질 탈산유의 최적 탈색 조건은 1%의 활성

Table 2. Effects of amount of activated clay added on color and acid value of bleached M-12 lipids^{1),2),3)}

Amount of clay (%)	Color			Acid value (mg KOH/g)
	Blue	Red	Yellow	
0	2.1 ^a	10.6 ^a	68 ^a	0.71 ^b
0.5	0.7 ^b	4.3 ^b	32 ^b	0.54 ^{ab}
1	0 ^c	0.7 ^c	10 ^c	0.50 ^a
1.5	0 ^c	0.7 ^c	10 ^c	0.50 ^a
2	0 ^c	0.7 ^c	10 ^c	0.50 ^a

¹⁾The bleaching process was conducted at 90°C for 20 min.
²⁾Values are averages of triplicate determinations. SD was not shown when SD was less than 3% unless otherwise specified.
³⁾The values with same superscripts in a same column are not significantly different at $p < 0.05$.

Table 3. Effects of bleaching time on color and acid value of bleached M-12 lipids^{1),2),3)}

Bleaching time (min)	Color			Acid value (mg KOH/g)
	Blue	Red	Yellow	
0	2.1 ^a	10.6 ^a	68 ^a	0.71 ^b
10	1.2 ^b	3.5 ^b	27 ^b	0.54 ^{ab}
20	0 ^c	0.7 ^c	10 ^c	0.50 ^a
30	0 ^c	0.7 ^c	10 ^c	0.50 ^a

¹⁾The bleaching process was conducted with 1% activated clay at 90°C.
²⁾Values are averages of triplicate determinations. SD was not shown when SD was less than 3% unless otherwise specified.
³⁾The values with same superscripts in a same column are not significantly different at $p < 0.05$.

백토를 첨가하여 90°C에서 20분간 처리하는 것으로 나타났다. 최적 조건에서 탈색을 마친 탈색유는 B 0, R 0.7, Y 10의 값을 보였는데 이는 다른 식물성 유지의 탈색유의 색상과 유사한 값이며, 식용유지의 규격을 만족시키는 결과를 보였다(12,16,17). 탈색 후에는 일반 식물성유지의 탈색유와 비슷한 색상을 나타내었다. 따라서 M-12 유지의 탈색은 일반적인 유지 탈색 공정으로 처리될 수 있음을 알 수 있었다.

탈색공정의 주 목적은 색소를 제거하는 것이지만 탈색공정에서는 탈검공정에서 완전히 제거되지 않았던 검물질이나, 탈산공정에서 제거되지 않은 잔존 유리지방산이 제거되는 부수적인 효과도 있음이 잘 알려져 있다(18,19). 활성백토를 1% 수준으로 첨가하여 90°C에서 20분간 처리하였을 때 탈산유의 인 함량은 1.64 ppm에서 1.12 ppm으로 유의적으로 감소하였다(Table 1). 활성백토를 0.5-2% 수준으로 첨가하여 90°C에서 20분간 처리하였을 때 탈색유의 산가 변화를 Table 2에 나타내었다. 1% 첨가 수준에서 산값은 0.5로 감소하였으며 그 이상의 농도에서는 추가 효과를 보이지 않았다. 또한 1%의 활성백토를 첨가하여 90°C에서 처리 시간을 달리 하여 10-30분간 처리한 결과 20분간 처리하였을 때 산가가 0.5로 가장 낮게 나타났으며 그 이상의 처리 시간에서 탈산 효과가 증가하지 않았다(Table 3). 탈산과 탈색이 끝난 유지의 산값은 0.5로써 일반적인 식용유지의 규격에 해당하였다. 또한 탈색 후 이어지는 탈취공정에서도 탈산이 일어나므로 최종적인 탈취공정이 끝나면 M-12 지방질의 산값은 0.5 미만으로 떨어질 것으로 예상된다(16).

탈색공정이 M-12 탈산유의 지방산 조성에는 영향을 끼치지 않는 것으로 나타났다(Table 1). 탈산유와 탈색유의 지방산 조성은

유의적인 차이를 보이지 않았으며, 아라키돈산의 함량에도 유의적인 차이가 없었다.

탈색공정은 기름의 종류, 백토의 품질, 탈산유의 품질 등에 따라 달라지는데, 탈색용 흡착제로는 보편적으로 산성백토, 활성백토, 활성탄 등이 상업적으로 사용되고 있다(12,18). 일반적으로 유지탈색용 백토라고 하면 활성백토를 말하며 원유에 대하여 보통 1-2% 정도의 양을 사용하는데 M-12 지방질의 경우에도 1%를 첨가할 때 효과가 제일 좋았다. 진공은 고온에서 공기에 의한 유지의 열화를 방지하기 위한 탈기효과와 탈색반응 중에 발생하는 수증기, 가스등을 제거하는데 필요하며 탈색온도의 범위도 넓혀주는 역할을 하므로 본 실험에서도 진공 하에서 탈색을 실시하였다. 일반적으로 탈색공정은 진공가열 중에 탈색제와 잘 혼합된 상태로 진행되며 탈색제가 착색물질을 흡착할 수 있는 충분한 시간을 필요로 하는데 대개 20-40분이 소요된다(12). 탈색공정이 진공에서 진행되나 고온에서 진행되는 이유로 인하여 대부분의 경우 탈색유의 과산화물가는 증가하게 되는데 본 실험에서도 탈산유의 10.37에서 17.58로 증가하였다(Table 1). 그러나 탈색공정에서 생성된 과산화물은 다음 공정인 탈위공정에서 완전히 파괴되거나 제거됨이 잘 알려져 있다(5,20).

요 약

아라키돈산을 고농도로 함유한 유지를 생산하는 *Mortierella* sp. M-12로부터 얻은 균체 지방질을 식용에 적합하도록 정제하기 위하여 탈색 공정을 최적화하였다. 동결건조한 균체로부터 Folch's solvent를 사용하여 균체 지방질 조유를 얻은 후 탈검과 탈산을 거쳐 얻은 탈산유를 50-100 mmHg 진공 하에서 탈색을 진행하였다. 활성백토를 1% 수준으로 첨가하여 90°C에서 20분간 수행하였을 때 식용유지 규격에 적합한 색상을 갖는 탈색유를 얻을 수 있었다. 탈색 공정 중에 부수적으로 일어난 탈검과 탈산 작용으로 인하여 탈색유의 인 함량은 31.7% 감소하였으며, 산값은 0.5로 감소하여 식용유지의 규격에 적합한 수준이 되었다. 모르티에렐라 단세포유지는 일반적인 유지의 탈색공정을 통하여 식용급 동식물 유지와 같은 수준의 탈색유를 얻을 수 있었다.

References

1. Brash AR. Arachidonic acid as a bioactive molecule. *J. Clin. Invest.* 107: 1339-1345 (2001)
2. Shinmen Y, Shimizu S, Akimoto K, Kawashima H, Yamada H. Production of arachidonic acid by *Mortierella* fungi. *App. Microbiol. Biot.* 31: 11-16 (1989)
3. Kyle D. Arachidonic acid and methods for the production and use thereof. U.S. Patent 5,658,767 (1997)
4. Jareonkitmongkol S, Sakuradani E, Shimizu S. A novel 5-desaturase-defective mutant of *Mortierella alpina* 1S-4 and its dihomo-linolenic acid productivity. *Appl. Environ. Microb.* 59: 4300-4304 (1993)
5. Jung MY, Yoon SH, Min DB. Effects of processing steps on the contents of minor compounds and oxidation of soybean oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 66: 118-120 (1989)
6. Dueppen DG, Zeller SG, Diltz SI, Driver RH. Extraction and winterization of lipids from oilseed and microbial sources. U.S. Patent 7,695,626 (2010)
7. Gil B, Kim MJ, Kim JH, Yoon SH. Comparative Study of Soybean Oil refining using rice hull silicate and commercial adsorbents. *Food Sci. Biotechnol.* 23: 1025-1028 (2014)
8. Ortega-Garcia J, Medina-Juárez LA, Gámez-Meza N, Noriega-Rodríguez JA. Optimisation of bleaching conditions for soybean oil using response surface methodology. *Food Sci. Technol. Int.*

- 11: 443-449 (2005)
9. Kim SK, Chung GH, Han JJ, Cho SW, Yoon SH. Effect of extraction methods on the extraction yield of total lipid and arachidonic acid from single cell oil, *Mortierella* sp. Korean J. Food Sci. Technol. 47: 281-285 (2015)
 10. Liu KS. Preparation of fatty acid methyl esters for gas-chromatographic analysis of lipids in biological materials. J. Am. Oil Chem. Soc. 71: 1179-1187 (1994)
 11. AOCS. Official Methods and Recommended Practices of the AOCS. 6th ed. Method Ce2-66, Cd 3d-63, Cd 8-53, Ca 12-55, Cc 13e. American Oil Chemists' Society, Champaign, IL, USA (2009)
 12. 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)
 13. Ott L. Introduction to the analysis of variance. pp. 325-360. In: An Introduction to Statistical Methods and Data Analysis. Bogartz RS (ed). PWS Publishers, Boston, MA, USA (1984)
 14. Yuan C, Wang J, Yao J, Yu Z, Shang Y, Gong G. Production of arachidonic acid by *Mortierella alpina* I₄₉-N₁₈. Food Technol. Biotech. 40: 311-315 (2002)
 15. Škevin D, Domijan T, Kraljic K, Kljusuric JG, Nederal S, Obratnovic M. Optimization of bleaching parameters for soybean oil. Food Technol. Biotech. 50: 199-207 (2012)
 16. List GR, King JW, Johnson JH, Warner K, Mounts TL. Supercritical CO₂ degumming and physical refining of soybean oil. J. Am. Oil Chem. Soc. 70: 473-476 (1993)
 17. Wan PJ, Hurley TW, Guy JD, Berner DL. Comparison of visual and automated colorimeters-An international collaborative study. J. Am. Oil Chem. Soc. 74: 731-738 (1997)
 18. Wiedermann LH. Degumming, refining and bleaching soybean oil. J. Am. Oil Chem. Soc. 58: 159-166 (1981)
 19. Taylor DR, Jenkins DB, Ungermaun CB. Bleaching with alternative layered minerals: A comparison with acid-activated montmorillonite for bleaching soybean oil. J. Am. Oil Chem. Soc. 66: 334-341 (1989)
 20. Maza A, Ormsbee RA, Strecker LR. Effects of deodorization and steam-refining parameters on finished oil quality. J. Am. Oil Chem. Soc. 69: 1003-1008 (1992)