

회분식과 유가식 배양에 의한 *Motierella alpina*로부터의 Arachidonic acid의 생산

황병희, ¹박창열, 유연우

아주대학교 분자과학기술학과, ¹두산 기술원
전화 (031) 219-2455, 팩스 (031) 216-8777

Abstract

In the batch culture experiments, the addition of $MnSO_4$ was examined in flask culture, and then the optimal amounts of $MnSO_4$ was investigated in 2.5-L jar-fermenter. As a results, 0.005% $MnSO_4$ was found to enhance the ARA yield of 1.14-fold. Also the addition of KH_2PO_4 was investigated in 2.5-L jar-fermenter and the ARA yield was enhanced 1.20-fold. Fed batch culture study shown a relatively high productivity of cell mass (62.1 g/L) and ARA content (12.0 g/L) when 14 % ammonia solution were alternatively used to control the pH and nitrogen source in the cultivation period.

서론

아라키돈산 (arachidonic acid, ARA)은 polyunsaturated fatty acid (ω -6, 20:4)로서 표유동물에서는 직접 합성되지 않고, 단지 식물성 식품을 통하여 섭취된 필수 지방산인 linoleic acid를 전구체로 하여 합성되는 중요한 생체내의 지방산이다. 본 연구에서 사용된 *Motierella alpina*속의 균주는 곰팡이라는 특성상 배양시간이 증가할수록 점도가 증가하여 고농도의 균체를 생산하기가 어렵다는 단점을 가지고 있으며, ARA가 균체 내의 intracellular molecules이라는 점에서 고농도의 균체를 배양하는 것이 ARA의 생산성과 수율의 향상에 필연적이라고 하겠다. 따라서 본 연구에서는 배양 중 morphology type에 영향을 주는 것으로 알려져 있는 $MnSO_4$ 와 KH_2PO_4 의 영향을 알아보고자 회분식 배양을 통하여 살펴보았다. 또한 유가식 배양에서는 고농도의 균체 생성을 위하여 intermittent feeding method을 사용하여 당을 공급하였으며, 추가적인 질소원의 공급과 배양 중 균체의 생육에 효과가 있는 pH인 5.5-6.0 사이로 유지하기 위하여 5 N NaOH 또는 14-28 % 암모니아용액을 사용하였다.

재료 및 방법

본 연구에 사용한 균주는 두산 기술원으로부터 분양 받은 *Motierella alpina* DSA-12를 사용하였다. Flask 배양의 경우에 100 mL 배지를 500 mL baffled flask에 넣고 180 rpm으로 rotary incubator에서 배양을 하였으며, 2.5-L jar-fermenter의 경우 working volume 1.5 L로 하여 500 rpm으로 6 일간 배양을 하였다. 멸균 전 pH는 6.0으로 조정하여, 배양온도는 25°C로 하고 glucose 50 g/L와 CSP 18 g/L를 본 배양 배지로 사용하였다. 유가식 배양의 경우에는 12-L bioengineering fermenter(swiss)를 사용하여 초기 glucose 20 g/L와 CSP 10-20 g/L로 0.5 vvm, 150 rpm으로 25°C에서 배양을 하다가, 적절한 DO의 유지를 위하여

배양 중 rpm을 변화시키었다. 또한 당 농도가 5-10 g/L이상이 유지되게 간헐적으로 공급하였다. 유가식 배양의 경우 pH를 균체의 성장에 효과적인 5.5-6.0사이를 유지하게끔 하였다. Glucose 농도는 Glucose analyzer(YSI1500, USA)를 사용하여 분석하였고, Folch 방법을 이용하여 총 지질함량을 측정하였다. 균체에서 추출한 지방산의 methylation은 AOAC 965.33의 방법을 이용하였고, GC는 HP 5890 series III (USA)를 이용하여 총 지질중 ARA의 함량을 측정하였다.

결과 및 고찰

MnSO₄의 영향에 관한 실험은 MnSO₄ · 7H₂O를 2 mg/L-1,000 mg/L로 첨가하여 ARA의 함량과 morphology type에 미치는 영향을 살펴본 결과에서, 100-200 mg/L의 첨가농도까지 총지질 함량과 ARA는 증가하였고 500 mg/L이상의 첨가농도에서는 총지질의 함량과 균체량이 감소하였다(Fig. 1). 또한 배지 내에 첨가되는 Mn의 농도가 증가할수록 풀어진 균사체에서 pellet으로 형태가 바뀌었으며, 100-200 mg/L의 농도에서 작은 size(1-2 mm)의 pellet이 형성되는 것을 관찰할 수가 있었다. 그 이상의 농도에서는 pellet의 크기가 커져 2-3 mm 이상의 큰 pellet이 형성되어 균체량 및 총지질 함량이 감소하였다. 2.5 L jar-fermenter에서 Mn의 농도를 50-100 mg/L로 하여 확인을 하였는데, 균체량에는 차이가 없었고 총지질의 함량과 ARA의 함량이 약간 증가하였다(Table 1). 그러나 pellet의 형성이 매우 작고 단단하고 점도가 낮아 교반에 어려움이 없었으므로 고농도의 균체 생성을 위한 유가식 배양공정으로 적용가능성을 확인하였다. KH₂PO₄의 영향의 대한 실험은 첨가되는 KH₂PO₄의 농도가 1 g/L일 때 균체량과 총지질 함량이 증가하였고, 2 g/L일 때에는 총지질 함량이 감소하였다(Table 2). 또한 총 지질내의 ARA의 함량은 KH₂PO₄가 첨가량이 증가할수록 감소하였는데, 이는 KH₂PO₄에 첨가에 의하여 균체의 성장은 좋아졌으나, 배양후반기로 갈수록 점도의 증가로 산소의 전달이 용이치 않은 것에 의한 것으로 사료된다. KH₂PO₄의 첨가량이 증가할수록 균체의 형태가 풀어진 균사체로 자라 배양 후반기로 갈수록 교반이 어려웠으므로, 균체 증식에는 효과가 있으나, 점도의 증가로 인하여 ARA의 생성에는 효과적이지는 못했다. 유가식 배양에서 14 % 암모니아를 사용한 FBC-I에서는 배양 6일째에 총지질 중에 ARA의 함량이 39.3%으로 5.9 g/L을 얻을 수 있었으며, 이때의 균체량은 최대 30.5 g/L을 얻었다(Fig. 2). 그러나 FBC-1의 총지질의 함량과 ARA의 함량에 비하여 균체량이 낮았고, 이는 질소원의 양이 부족하여 생긴 것으로 사료되어 FBC-II에서는 28 % 암모니아를 사용하였다. 실험결과(Fig. 3)에서 균체의 성장은 빨리 이루어져 배양 149시간째에 39.4 g/L를 얻었으나, 총지질의 함량과 ARA의 함량은 각각 33.6%(12.6 g/L)과 38.1%(5.3 g/L)로 회분식 배양에 비하여 차이가 없거나 크게 떨어졌다. 이는 과량의 질소원의 공급으로 인하여 지질의 함성과 불포화지방산의 합성이 저해된 것으로 사료된다. FBC-III에서는 회분식 배양에서의 C/N ratio를 맞추어 초반에는 20 g/L의 glucose와 10 g/L의 CSP를 사용하고 배양을 하다가 당이 5-10 g/L가 되었을 때 당과 함께 나머지 CSP를 첨가하였으며, 이후로는 당만을 공급하여 주었다. 또한 FBC-I과 FBC-II와 달리 5 N NaOH만을 사용하여 균체 성장에 유리한 pH인 5.5-6.0사이를 유지하여 주었으나, 전체적으로 배양기간이 길어져 당이 모두 소모되는 시간이 240시간으로 배양시간이 길어졌으며, 균체량과 총지질의 양은 각각 33.3 g/L

와 11.3 g/L로서 낮은 편이었고, ARA의 양도 34%로 총 3.8 g/L를 얻을 수 있었다(Fig. 4). FBC-IV에서는 초반에 공급되는 20 g/L의 glucose와 10 g/L의 CSP 이외에 부가적인 CSP의 공급의 공급이 없이 배양을 하였는데, 부가적인 질소원의 양은 14 % 암모니아만을 사용하여 pH가 5.5이하로 떨어지면 암모니아가 공급이 되도록 하였다(Fig. 5). 균체량은 배양 168시간까지 지속적으로 상승하여 균체량 41.4 g/L를 얻을 수 있었고, 총지질의 함량도 크게 증가하여 20.6 g/L을 얻을 수 있었지만, 총 지질내의 ARA의 양은 회분식 배양에 비하여 35 %로 약간 감소하여 7.0 g/L을 얻을 수 있었다. 균체 증식에서 볼 때 암모니아가 질소원으로서 이용이 충분하게 이루어졌음을 알 수가 있었다. FBC-V의 경우에 FBC-IV와 동일하게 배양을 하다가 당이 고갈되는 pH라 여겨지는 pH 6.0-6.5사이에 당을 공급하였다. 균체 성장과 총지질의 함량은 배양 244시간까지 증가하여 최대 균체량 62.1 g/L과 총지질 40.0 g/L를 얻을 수 있었다(Fig. 6). 총지질내의 ARA함량은 FBC-IV와 마찬가지로 30.0-35 %로 회분식 배양에 비하여 낮은 편이지만, 최종적으로 12.0 g/L의 아라키돈산을 얻을 수 있었으며 유가식 배양 연구에서 가장 좋은 결과를 나타내었다.

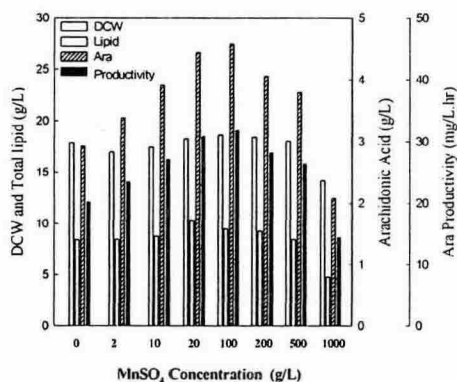


Figure 1. Effect of $MnSO_4$ concentration on the lipid and arachidonic acid production by *M. alpina* DSA-12

Table 1. Effect of manganese sulfate on cell growth, lipid and arachidonic acid content of *M. alpina* DSA-12.

$MnSO_4$ 7H ₂ O (mg/L)	DCW (g/L)	Lipid (%)	Lipid (g/L)	Ara (%)	Ara (g/L)
0	19.8	41.8	8.3	35.3	2.9
50	17.5	47.2	8.2	40.0	3.3
100	19.7	44.2	8.7	39.3	3.4

Table 2. Effect of potassium phosphate on cell growth, lipid and arachidonic acid content of *M. alpina* DSA-12.

KH_2PO_4 (g/L)	DCW (g/L)	Lipid (%)	Lipid (g/L)	Ara (%)	Ara (g/L)
0	19.8	41.8	8.3	35.3	2.9
1	24.1	47.7	11.4	30.7	3.5
2	23.3	38.6	9.8	26.8	2.4

요약

Motierella alpina DSA-12의 회분식 발효에서 $MnSO_4$ 첨가로 작은 pellet을 형성하게 하여 유가식 배양으로의 적용 가능성을 보았으나, KH_2PO_4 의 경우에는 균체증식에는 효과가 있었지만, 균체가 풀어져 자라 점도가 증가하여 ARA의 합성이 억제되었다. 유가식 배양에 14 % 암모니아 용액을 사용할 때 균체증식과 총지질의 함량에 영향이 있음을 확인했으며, 62.1 g/L의 균체량에 60%이상의 지질 함량으로 12.0 g/L의 아라키돈산을 생산할 수 있었다.

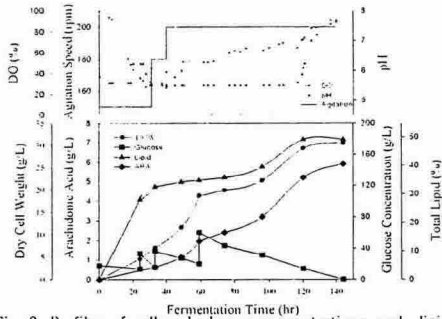


Fig. 2. Profiles of cell and glucose concentrations, and lipid and arachidonic acid production during an intermittent fed-batch culture of *M. alpina* DSA-12 for the final glucose concentration of 100 g/L

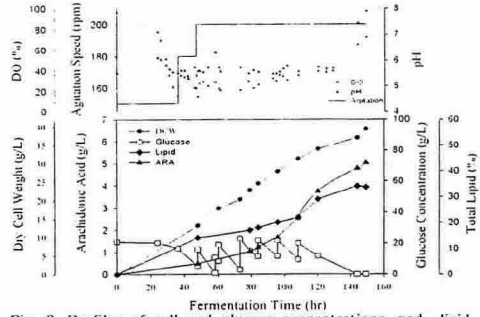


Fig. 3. Profiles of cell and glucose concentrations, and lipid and arachidonic acid production during an intermittent fed-batch culture of *M. alpina* DSA-12 for the final glucose concentration of 100 g/L. The composition of initial medium was 20 g/L glucose and 20 g/L CSP

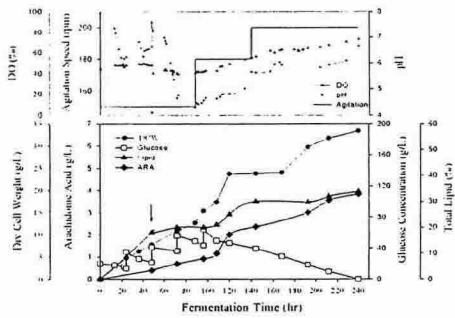


Fig. 4. Profiles of cell and glucose concentrations, and lipid and arachidonic acid production during an intermittent fed-batch culture of *M. alpina* DSA-12 for the final glucose concentration of 100 g/L. pH was maintained at 5.5 by adding of 5 N NaOH. The composition of initial medium was 20 g/L glucose and 10 g/L CSP. The arrow indicate the feeding of make up 26 g/L CSP.

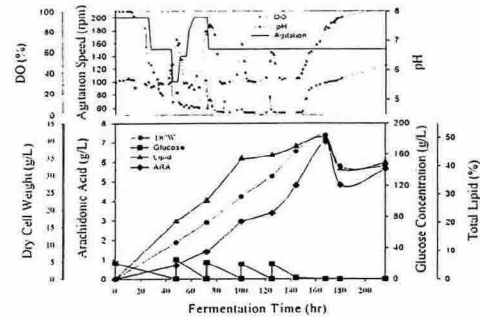


Fig. 5. Profiles of cell and glucose concentrations, and lipid and arachidonic acid production during an intermittent fed-batch culture of *M. alpina* DSA-12 for the final glucose concentration of 100 g/L

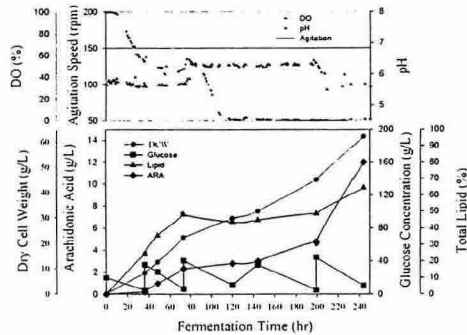


Fig. 6. Profiles of cell and glucose concentrations, and lipid and arachidonic acid production during an intermittent fed-batch culture of *M. alpina* DSA-12 for the final glucose concentration of 140 g/L

참고 문헌

1. Bajpai, P. K., P. Baipai, and O. P. Ward. Arachidonic acid production by fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1255-1258(1991)
2. Sajbidor, J., S. Dobronova, and M. Certik. Arachidonic acid production by *Mortierella sp.* S-17: Influence of C/N ratio. *Biotech. Lett.* 12(6): 455-456(1990)