

## Arachidonic Acid 생산을 위한 *Mortierella alpina* 곰팡이의 심부 및 고체 발효 특성 연구

<sup>1</sup>신형태 · <sup>1</sup>이수원 · <sup>1</sup>박기문 · <sup>1</sup>송재환 · <sup>2</sup>서동상 · †이재흥  
성균관대학교 생명공학연구소, <sup>1</sup>성균관대학교 식품생명공학과, <sup>2</sup>성균관대학교 유전공학과  
(접수 : 2005. 1. 27., 게재승인 : 2005. 2. 16.)

### Characteristics of Submerged and Solid-State Fermentations for Production of Arachidonic Acid by *Mortierella alpina*

Hyung Tai Shin<sup>1</sup>, Soo Won Lee<sup>1</sup>, Ki Moon Park<sup>1</sup>, Jae Whan Song<sup>1</sup>, Dong Sang Suh<sup>2</sup>, and Jae Heung Lee<sup>†</sup>  
Institute of Life Science and Technology, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea  
<sup>1</sup>Department of Food Biotechnology, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea  
<sup>2</sup>Department of Genetic Engineering, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea  
(Received : 2005. 1. 27., Accepted : 2005. 2. 16.)

The objective of this work was to evaluate a solid-state fermentation process for the practical production of arachidonic acid (AA) by *Mortierella alpina* ATCC 32222. In the present investigation, batch culture kinetics for both submerged- and solid-state fermentations was carried out at 25°C to identify the relationship between growth and arachidonic acid (AA) production. Glucose and yeast extract were used in submerged fermentations by using flasks, while rice bran was used as a sole raw material in the other type of fermentations by using a series of Petri dishes. It was evident that a mixed-growth associated pattern existed between the two variables, irrespective of modes of fermentations. The effect of carbon to nitrogen (C/N) ratio on AA production in solid-state fermentation was studied in the range of 6.5 - 20. As a result, an optimum condition was found to be 6.5. Supplementary carbon source was not necessary to meet the optimum C/N ratio. Unlike the previous results obtained by other researchers, a supplement of sodium glutamate up to 4% (w/w) to the rice bran medium did not have a positive effect on the AA productivity. However, an increase in AA productivity was obtained with the rice bran medium supplemented with sesame oil.

**Key Words :** Arachidonic acid, carbon to nitrogen ratio, mixed-growth associated pattern, *Mortierella alpina*, sesame oil, submerged and solid-state fermentation

### 서론

지방산은 우리 몸과 식품 내에 들어있는 지방의 대부분을 이루고 있는 물질로 필수지방산과 비필수지방산으로 나눌 수 있다. 필수지방산이란 리놀레산 (linoleic acid)과 리놀렌산 (linolenic acid) 등을 가리키는데 식사를 통하여 꼭 섭취하여야 한다. 한편 비필수지방산이란 체내에서 충분히 합성되는 지방산이다. 실제로 자연계에는 지방산이 유리된 상태로 존재하는 경우가 매우 드물며 대부분 에스

테르결합을 한다. 지방산의 포화도는 탄소원자 간의 이중결합의 존재여부에 달려 있는데, 불포화지방산이란 이중결합을 가지고 있는 지방산이다. 포화지방산은 주로 동물성 지방에 많은데 포화지방산을 과다 섭취하면 동맥경화와 관상 심장병을 유발하는 것으로 알려져 있다. 다가 불포화 지방산으로서  $\omega$ 3 지방산은 구조식상 첫번째 이중결합이 존재하는 위치가 methyl기로부터 3번째 있는 불포화지방산을 말하는데 DHA (C22:6 $\omega$ 3), EPA (C20:5 $\omega$ 3), linolenic acid (C18:3 $\omega$ 3)가 여기에 해당된다. 한편  $\omega$ 6 지방산은 첫번째 이중결합이 methyl기로부터 6번째 있는 불포화지방산으로서 arachidonic acid (AA, C20:4 $\omega$ 6)가 여기에 해당된다(1, 2).

AA는 인체영양에 있어서 필수적인 불포화지방산으로서 다양한 생리적 기능을 가지는 것으로 알려져 있다. 즉 AA는 prostaglandins, thromboxanes, leukotrienes와 같은

† Corresponding Author : Institute of Life Science and Technology, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea  
Tel : +82-31-290-7893, Fax : +82-31-290-7884  
E-mail : jaeheung@skku.ac.kr

eicosanoids의 전구물질로 작용 된다(1, 3). 또한 DHA와 더불어 AA는 뇌세포의 구성성분으로서 두뇌발달을 촉진하고 학습기능을 향상시키는 것으로 알려져 있다. 특히 DHA와 AA는 두뇌발달과 시각기능 유지에 핵심적인 building blocks에 관여하는 것으로 보고되고 있는데, 특히 출산 3개월 전부터 출생 후 수개월 사이가 이러한 지방산이 가장 필요한 시기인 것으로 알려졌다. 따라서 모유 속에는 DHA와 AA성분이 함유되어 있기 마련이다. 그러나 분유에는 통상 DHA와 AA가 함유되어 있지 않기 때문에 영양학자들은 분유에 이러한 지방산을 첨가하도록 권유하고 있다. 따라서 국내에서도 일부기업들은 외국으로부터 AA를 수입하여 분유에 소량 첨가한 제품을 판매하고 있다. 그러나 AA의 경우 순품 기준으로 \$1,000/kg 이상의 고가이기 때문에 앞으로 국내에서도 AA의 대량생산이 필요한 실정이다. 지금까지 알려진 제조방법으로는 돼지의 간, fish oil 등으로부터 추출(4)하거나 또는 미생물공정으로 생산되고 있는데 주요 제조회사로는 DSM-Gist (Netherlands)와 Zeneca-Roche (UK) 등이다(2).

AA는 일부 protozoa, algae, fungi 세포 중에 존재한다고 알려져 있는데, 그중 AA를 생산하는 최적의 미생물은 Phycomyces 군에 속한 fungi인 *Mortierella alpina*로 알려져 있다. 실제 *M. alpina*는 GRAS (Generally Recognized As Safe) 미생물로서 있고 향후 food biotechnology 분야에서 가장 각광받을 수 있는 미생물종의 하나로 평가되고 있다(5). 현재까지의 AA관련연구는 대부분 포도당배지를 사용한 심부발효 (submerged fermentation)를 통하여 이루어졌고 고체발효 (solid-state fermentation)의 사례는 찾아보기 힘들다(6, 7). 일반적으로 solid-state fermentation을 채택할 경우 발효특성상 submerged fermentation과는 달리 저렴한 곡물 또는 농산폐기물을 주원료로서 사용할 수가 있고, 산소공급을 위한 통기교반 관련 에너지 비용의 절감이 가능하며, 폐수가 발생되지 않는 특성이 있을 뿐만 아니라 시설비가 적게 들고 소규모의 생산에 유리한 장점들이 있어서 효소생산, 유기산 생산, 그리고 생물농약 생산 등에 부분적으로 실용화되고 있다(4).

본 연구에서는 AA 생산균주인 *M. alpina* ATCC 32222를 사용하여 회분식 submerged fermentation과 solid-state fermentation 연구를 통하여 미생물 균체성장과 목적물인 AA의 생성패턴, AA 생성에 미치는 발효온도의 영향, 나아가서 값싼 원료인 쌀겨 (rice bran)를 이용한 고체발효 배지의 최적화연구를 통하여 실질적으로 저렴하게 AA를 생산할 수 있는 제반 조건을 확립하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 균주

본 실험에 사용된 균주는 *M. alpina* ATCC 32222로서 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, USA)으로부터 구입하여 사용하였다(8). 균주 보존은 2% (w/v) glucose, 1% (w/v) yeast extract 및 3% (w/v)의 agar를 넣은 고체배지에 접종하여 25°C에서 3일간 배양한 후에 4°C에서 보관하여 사용하였다.

### 배양조건 및 방법

최상의 균주 활성도를 유지시키고 식균량 (inoculum size)을 균일하게 하기 위하여 본 배양배지 (5% glucose, 0.1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05% MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 1.5% peptone, 0.25% yeast extract)에 *M. alpina* ATCC 32222를 식균하여 25°C에서 3일간 진탕배양한 후, 이 균주를 보존용 고체 배지에 재 식균하여 25°C에서 3일간 추가로 배양하고 나서 agar-plug method(9)로 직경 6 mm의 크기로 편칭한 후 이를 inoculum으로 사용하였으며, 심부발효실험은 통상 300 mL baffled-flasks에 50 mL의 본 배양배지를 넣고 121°C에서 15분간 살균한 후 25°C에서 rotary shaker (100 rpm)를 이용하여 10일간 배양하였다.

균체배양 및 AA 생성에 대한 온도의 영향을 조사하기 위한 실험은 균주와 함께 편칭된 고체배지를 본 배양배지에 식균하여 전기 5일간은 25°C에서 진탕 배양 (100 rpm) 하고, 후기 5일 동안은 여러 온도 즉 15°C, 20°C, 25°C 및 30°C에서 배양하여 균체와 AA의 생성에 미치는 온도의 영향을 조사하였다. 한편 고체발효실험은 시중에서 구입한 쌀겨를 본 배양배지로서 5 g씩 Petri dishes에 담아 증류수 10 mL로 균일하게 반죽한 후 121°C에서 15분간 살균하고 25°C에서 7~8일간 정치배양 하였다. 고체발효 배지 최적화를 위하여 쌀겨에 포도당을 첨가시켜서 Carbon to Nitrogen (C/N) ratio를 6.5, 10, 15, 20으로 조절하여 실험하였고, sodium glutamate를 각 Petri dish에 0 ~ 0.2 g 범위로 첨가 (0-4%, w/w)하여 그 영향을 조사하였다. 한편 여러 가지 시중에서 구입한 vegetable oil (soybean, sesame, sunflower, olive)을 각각 0.25 g/5 g rice bran씩 첨가하여 대조군과의 발효결과를 비교하였으며 특히 sesame oil의 효과를 심층 조사하였다.

배양종료 후에는 발효완료액 (fermentation broth)을 filter paper (Whatman No. 2)를 사용 진공 여과하여 균체를 분리하고, 50 mL의 증류수로 3회 세척한 후 105°C에서 20시간 건조시켜 최종 건조 균체량 (Dry Cell Weight, DCW)을 얻었다. 고체발효물의 경우는 흐르는 물로 균체와 쌀겨를 깨끗이 씻어서 용이하게 분리시킨 후 건조하였다.

### 지방산 추출 및 분석

지방산 분석은 우선 발효로부터 회수한 균체를 60°C에서 20시간 건조시킨 후 mortar를 이용 분쇄하여 20 mg을 취하고, 여기에 0.7 N HCl-CH<sub>3</sub>OH 5 mL을 가한 후 100°C에서 환류 (reflux)하면서 3 hr 동안 methylation시켰다(10). 그 후 이 용액에 hexane 3 mL을 가하여 fatty acid methyl esters를 추출한 후, 이 용액 2 µL 취하여 Gas Liquid Chromatograph (Shimadzu GC-14B, Japan)로 분석하였다. 표준시료 (fatty acid methyl esters)는 Sigma (St. Louis, USA) 시약 (palmitic 16:0, stearic 18:0, oleic 18:1, linoleic 18:2, α-linolenic 18:3, γ-linolenic 18:3 및 arachidonic 20:4)을 사용하였고, column은 HP-1 (Crosslinked Methyl Silicone Gum, USA)이었으며 분석조건은 injector와 detector는 260°C, 그리고 oven은 190°C에서 시작하여 5°C/min으로 승온시키면서 최종온도는 220°C로 유지시켰다.

### Glucose, Nitrogen 및 Phosphate 분석

배지 내 탄소원으로 사용된 포도당 농도 및 쌀겨 중의 total sugar는 DNS 방법(11)을 사용하여 분석하였다. 총 당의 분석은 시료 0.1 g에 증류수 10 mL과 20% HCl 1 mL을 가한 후 100°C에서 2.5 hr 환류시킨 후 냉각하고, 여기에 1 N NaOH를 가하여 pH를 알카리로 조정하고 다시 100 mL까지 희석한 후에 DNS방법으로 분석하였다. Nitrogen 농도는 Kjeldahl nitrogen procedure (Kjeltec 2100 Distillation Unit, FOSS Tecator AB, Sweden)로 분석하였다. 한편 phosphorous 즉 인산염 (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 분석은 Taussky와 Shorr(12) 방법을 사용하여 포도당 분석과 마찬가지로 spectrophotometer (Spectronic 20, Bausch & Lomb)를 사용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였다.

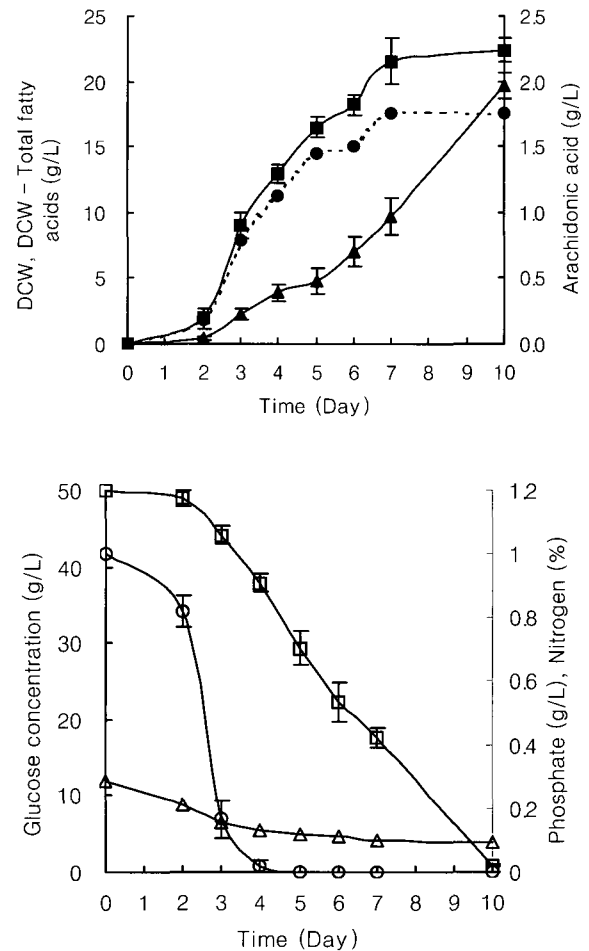
### 결과 및 고찰

#### *M. alpina* ATCC 32222의 심부발효 특성

AA는 균체 내에 축적되기 때문에 발효배양을 통하여 고농도의 균체를 얻는 것이 매우 중요하다. *M. alpina*의 균체 성장과 AA의 생성패턴을 정확히 규명하기 위해 25°C에서 10일간 회분식 진탕 배양하여 균체량, 탄소원과 질소원의 농도, AA의 축적 등을 측정하여 그 결과를 Fig. 1에 나타내었다. Fig. 1에서 알 수 있듯이 균체 내 AA축적은 발효 2일째부터 이루어지고 있었고 발효 7일째 이후에 균체성장은 거의 정지 (Dry Cell Weight - Total fatty acids)되었지만 AA 생성은 활발히 이루어지고 있었다. 배양말기에는 건조 균체량 대비 total fatty acids의 비율이 약 20%에 달하기 때문에 여기서 실제 건조 균체량은 total fatty acids를 제외한 값으로 표시 하였다(13). 이러한 결과는 AA 생성에 대하여 Eroshin 등(14, 15)이 보고한 growth-coupled pattern과 Anderson과 Wynn(2)이 보고한 non-growth associated pattern의 중간형태인 소위 mixed-growth associated pattern에 해당된다. 본 실험 결과로부터 *M. alpina* ATCC 32222에 의한 AA의 생성은 nitrogen이나 phosphate가 limitation 되어야만 이루어지는 것은 아님을 알 수 있었다.

Table 1은 submerged fermentation 발효완료 후에 균체 내에 축적된 AA와 기타 지방산들의 조성을 나타내고 있다. AA의 조성은 약 40%로서 이는 Anderson 과 Wynn(2)의 결과 (35%)와 매우 비슷하였지만 Simizu 등(16)의 결과보다는 높았고, Yuan 등(3)의 결과인 70% (scale-up의 경우는 53%)보다는 훨씬 적게 나타났다. 이러한 결과는 균주의 특성과 배지 종류의 차이에 따라서 이 값이 크게 달라질 수 있다는 것을 보여준다. 한편 Table 1에서 알 수 있듯이 본 연

구에서는  $\gamma$ -linolenic acid (C18:3 $\omega$ 6)가 약간 축적되는 결과를 보여주고 있다. 실제로 AA 생합성은  $\gamma$ -linolenic acid로부터 dihomo- $\gamma$ -linolenic acid (C20:3 $\omega$ 6)를 거쳐 arachidonic acid(C20:4 $\omega$ 6)로 이루어지는데, 산소가 제한될 경우  $\gamma$ -linolenic acid에서 dihomo- $\gamma$ -linolenic acid로의 경로가 율속 단계(17)인 것으로 알려져 있다. 따라서 통기교반을 좀더 향상 시켜주면 AA의 생성이 증가될 수 있을 것으로 사료된다. 한편 Higashiyama 등(18)은 용존산소가 *M. alpina*의 morphology에 영향을 주고, 이러한 형태학적 특성이 다시 AA의 생성에도 영향을 미치는 것으로 보고하였다.



**Figure 1.** A typical batch submerged fermentation kinetics for arachidonic acid production by *M. alpina* ATCC 32222. Fermentations were performed in triplicate and the values are the means  $\pm$  the standard deviations. (■) Dry Cell Weight, (●) Dry Cell Weight - Total fatty acids, (▲) Arachidonic Acid, (□) Glucose, (○) Phosphate, and (△) Nitrogen.

**Table 1.** The fatty acid profiles obtained from a number of *M. alpina* strains in submerged fermentation

Strain	Relative fatty acid composition (% w/w)								Reference
	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3 $\omega$ 6	18:3 $\omega$ 3	20:4 $\omega$ 6	others	
<i>M. alpina</i> ATCC 32222	14.6	12.3	19.1	6.2	5.2	-	39.9	2.7	This work
<i>M. alpina</i> 149-N18	6.3	2.2	3.7	4.0	1.6	-	70.2	11.6	(3)
<i>M. alpina</i> 20-17	15.9	8.1	21.0	14.3	-	5.5	28.4	6.8	(16)
<i>M. alpina</i> <sup>a</sup>	16.0	14.0	14.0	10.0	-	4.0	35.0	7.0	(2)

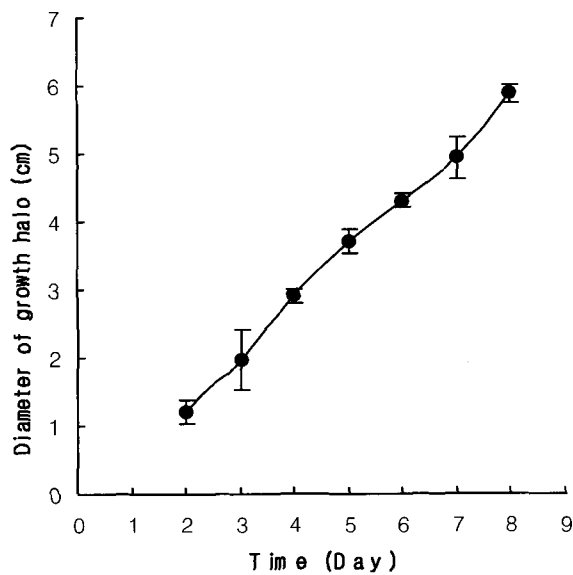
<sup>a</sup> Organism used for commercial production of single cell oil.

**Table 2.** The effect of temperature shift<sup>a</sup> on growth and arachidonic acid production in submerged fermentation<sup>b</sup>

Treatment (°C)	Dry Cell Weight (g/L)	Total fatty acids (g/L)	Arachidonic acid (g/L)
25 → 15	25.76	6.24	2.62
25 → 20	22.20	7.14	3.04
25 → 25	22.50	4.89	2.28
25 → 30	22.47	6.80	1.96

<sup>a</sup>Temperature was shifted on the 6th day of submerged fermentation from 25°C to 15°C, 20°C, 25°C, or 30°C.

<sup>b</sup>Fermentations were carried out at various temperatures for 10 days.



**Figure 2.** The effect of incubation time on the diameter of halo in cm on the surface of the rice bran solid medium from the progressive growth of *M. alpina* ATCC 32222 during solid-state fermentation at 25°C.

**배양 과정 중 온도 변화에 따른 영향**

비록 Singh과 Ward(4)가 유가식 배양공정에서 배양 과정 중간에 배양 온도를 바꾸어서 AA의 수율을 좀 더 향상시킨 보고는 있었지만 지금까지 발효배양 온도가 AA 생성에 미치는 영향에 대한 구체적인 보고는 없었다. 따라서 본 연구에서는 체계적으로 온도변환의 효과가 어느 정도인지를 조사하기 위해 우선 균체성장의 최적조건인 25°C에서 5일간 배양 (전기배양)한 이후에 온도를 변환 (25→15°C, 25→20°C, 25→25°C, 25→30°C)시켜 5일간 추가 배양 (후기 배양)하였다(Table 2). Table 2에서 알 수 있듯이 배양온도를 변환했을 때 최종 균체농도에는 큰 영향이 없었다. 그러나 최종 AA의 생성은 배양온도를 25→20°C로 변환시켰을 때가 25°C로 유지했을 경우보다 약 1.3배의 생산성이

향상되는 결과가 얻어졌다. 따라서 최적 배양온도 변화조건은 25→20°C일 때임을 알 수 있었다. 이러한 결과는 최근 Ha 등(19)이 보고한 내용과 매우 유사하다. 한편 배양 온도의 변환 사례는 아니지만 potato 및 glucose 고체배지를 사용하여 15-30°C 범위에서 온도의 영향을 조사한 연구에서도 비슷하게 20°C에서 최대의 AA수율이 얻어졌다(6). 일반적으로 지방산 조성에 있어서의 불포화 정도는 배양 온도에 영향을 크게 받는 것으로 알려져 있는데, 배양온도가 낮아지면 차가운 환경에서의 적응에 따른 membrane fluidity의 증가로 인하여 불포화지방산의 조성비율이 상대적으로 증가하게 되는 것으로 알려져 있다(20).

***M. alpina* ATCC 32222의 고체발효 특성**

*M. alpina* ATCC 32222의 고체발효 특성을 조사하기 위하여 우선 6mm로 펀칭된 종균을 저렴한 농산 부산물인 쌀겨 고체배지가 함유된 Petri dish 중앙에 놓아 식균한 후 배양시간에 따른 균사체의 직경을 측정하였다. Fig. 2에서 알 수 있듯이 균체 성장에 따른 원형의 제1차 균사체(subsurface mycelium) 직경과 배양시간과는 거의 선형적인 관계가 있음을 알 수 있었다. 배양 3~4일 이후부터는 제1차 균사체 표면으로부터 수직방향으로 부드러운 솜털모양의 제2차 균사체(aerial mycelium)가 왕성하게 성장했다. Table 3는 배양시간에 따른 균체량, AA 생성량, 그리고 여러 지방산의 조성을 보여주고 있다. 주요 지방산으로는 C20:4 이외에 C16:0, C18:1, C18:2 등이었으며, 균체성장과 AA생성과의 관계는 submerged fermentation에서와 매우 유사하게 mixed-growth associated pattern을 보여주었다. 8일간 고체 배양 하면 약 55 mg AA/5g rice bran을 얻을 수 있었다. 한편 Table 3에서 보듯이 AA의 비율은 25% 정도로서 submerged fermentation때의 40%보다 훨씬 적은 것으로 나타났다는데, 이는 같은 균주라도 배지조성과 산소농도 등 환경조건이 크게 달랐기 때문인 것으로 사료된다.

**탄소원대 질소원 비율의 영향**

배지의 탄소원대 질소원 비율은 AA 발효에 있어서 매우 중요한 특성 요소인 것으로 알려져 있다. 예를 들면, Koike 등(21)은 포도당과 질소원 농도의 함이 일정한 값으로 조절된 심부발효배양을 통하여 C/N ratio가 *M. alpina*의 morphology와 AA 생성에 미치는 영향을 연구하였고 AA생성의 최적 C/N ratio는 15-20인 것으로 보고했다. Ha 등(19)도 포도당과 corn steep powder를 사용한 *M. alpina* DSA-12 액체배양에서 최적 C/N ratio에 대하여 비슷한 결과가 얻어졌다. 본 연구에서 사용한 쌀겨 (수분 16.0 ± 0.2%) 중의 총 당은 분석결과 포도당 기준으로 48.0 ± 2.9% (w/w) 그

**Table 3.** The effect of incubation time on arachidonic acid production and fatty acid profiles in solid-state fermentation with rice bran at 25°C

Time (day)	Dry Cell Weight (g/5 g rice bran)	Arachidonic acid (mg/5 g rice bran)	Relative fatty acid composition (% w/w)						
			16:0	18:0	18:1	18:2	18:3ω3	20:4ω6	others
3	0.21	2.7	30.4	5.5	30.1	20.1	2.4	6.0	5.6
5	0.65	20	21.1	4.3	25.1	21.1	1.0	21.5	5.1
8	0.86	55	22.1	3.0	24.7	17.0	1.8	25.1	6.3

리고 조단백질은  $17.6 \pm 0.2\%$  (w/w)이었고, 따라서 쌀겨 자체의 C/N ratio는 6.5이었다. 본 연구에서는 C/N ratio의 영향을 조사하기 위하여 쌀겨 고체배지에 포도당을 추가로 첨가시켜 6.5 - 20 범위로 조정하였다. Table 4에서 알 수 있듯이 C/N ratio를 점차 증가시켜주면 균체성장이 심각하게 저해되어 solid-state fermentation의 효율이 크게 저하됨을 알 수 있었고, C/N ratio가 15 이상에서는 균체성장이 거의 이루어지지 않았다. 따라서 쌀겨를 원료로 한 고체발효에서는 C/N ratio를 증가시켜 줄 필요가 없음을 알 수 있었다. 통상 쌀겨 중에는 전분 등 탄수화물이 30-50% (w/w), 단백질이 10-20% (w/w) 정도로 구성(22)되어 있지만 *M. alpina* 발효가 진행되면서 이러한 고분자 물질들은 부분적으로 가수분해 되고 또한 동시에 이용된다고 볼 수 있다. 따라서 발효과정 중 실질적으로 이용될 수 있는 탄소원 및 질소원 (available carbon and nitrogen sources)에 대한 경시적 C/N ratio는 6.5와 크게 다를 수 있다고 사료된다. 따라서 본 연구의 solid-state fermentation 결과는 Koike 등(21)의 submerged fermentation 조건과 다르기 때문에 결과도 상당히 다르게 나타났다고 생각된다.

**Table 4.** The effect of carbon to nitrogen (C/N) ratio on growth and arachidonic acid production in solid-state fermentation at 25°C for 8 days

Carbon to Nitrogen ratio	Dry Cell Weight (g/5g rice bran)	Total fatty acids (g/5g rice bran)	Arachidonic acid (mg/5g rice bran)
6.5	0.86	0.25	55
10	0.48	0.49	45
15	trace	trace	trace

**Table 5.** The effect of sodium glutamate supplement on growth and arachidonic acid production in solid-state fermentation at 25°C for 8 days

Sodium glutamate (g/5g rice bran)	Dry Cell Weight (g/5g rice bran)	Total fatty acids (g/5g rice bran)	Arachidonic acid (mg/5g rice bran)
0	0.86	0.25	55
0.05	0.79	0.26	55
0.1	0.73	0.25	56
0.2	0.74	0.38	58

### Sodium glutamate 첨가효과

Singh 등(23)은 *Thraustochytrium* sp.에 의한 DHA 발효에서 glutamate가 적절한 질소원이라고 발표했고, 최근 Lan 등(24)도 *M. alpina*에 의한 AA 발효에서 glutamate가 pentose phosphate pathway를 활성화시켜서 AA의 생성에 긍정적 효과 (glutamate를 0.8 g/L 첨가하였을 경우 control 대비 1.7배 향상)를 제공한다고 보고했다. 따라서 본 연구에서도 쌀겨에 glutamate를 첨가하여 그 효과를 조사하여 보았다. 그러나 예상과는 달리 Table 5에서 알 수 있듯이 *M. alpina* ATCC 32222는 glutamate에 의해 오히려 growth inhibition이 일어났으며 따라서 최종 균체량도 감소되는 경향을 보였다. 그러나 glutamate 농도를 증가시키에 따라 균체 당 total fatty acids (% (w/w))은 약간 증가되는 경향을 보였고, 점차 C20:4 조성은 감소되지만 C18:1은 증가되는 결과가 얻어졌다. 이러한 결과는 glutamate가 *M. alpina*의 growth를 저해할 뿐만 아니라 아마도 AA 생합성경로(2) 상

의 desaturase에 특이적 저해제로 작용할 가능성을 시사하므로 앞으로 이에 대한 추가연구가 필요하다. 전체적으로 종합해보면 Table 5에서 알 수 있듯이 sodium glutamate 첨가가 실질적 AA 생성에 긍정적인 영향을 주지 않는다고 판단된다.

**Table 6.** The effect of sesame oil supplement on growth and arachidonic acid production in solid-state fermentation at 25°C for 7 days

Sesame oil (g/5g rice bran)	Dry Cell Weight (g/5g rice bran)	Total fatty acids (g/5g rice bran)	Arachidonic acid (mg/5g rice bran)
0.0	0.75	0.27	55
0.20	0.78	0.27	58
0.375	0.82	0.25	65

### Sesame oil 첨가가 AA 생성에 미치는 효과

문헌(4, 16, 25)에 의하면 각종 식용유를 배지에 첨가할 경우 AA 생성에 대하여 어느 정도 긍정적인 효과가 얻어진다는 사실이 알려져 있다. 본 연구에서도 여러 종류의 식용유 (sunflower, soybean, sesame, olive)에 대한 영향을 예비적으로 조사하여 본 결과 sesame oil이 가장 효과가 좋았다(data not shown). 따라서 sesame oil의 첨가정도에 따른 균체 성장 및 AA 생성에 대한 영향을 실험하여 그 결과를 Table 6에 나타내었다. Table 6에서 알 수 있듯이 sesame oil을 배지에 0.3-0.4 g/5 g rice bran 첨가해주면 AA 생산성이 대조구 대비 약 1.2배 증가되었다. 실제로 sesame seeds의 구성성분은 대부분 C18:1과 C18:2이고 실제 C20:4는 거의 존재하지 않으며(26), 항산화물질인 sesamin과 sesamol 등이 소량 함유되어 있다(27). 그러나 sesame seeds를 약 250°C에서 열처리하여 볶은 후 기름을 추출하면 sesamin 성분은 큰 변화가 없지만 sesamol은 대부분 파괴되고 별도로 sesamol이 생성된다(28). 비록 sesamin과 sesamol은 dihomog- $\gamma$ -linolenic acid에서 AA 생합성경로의 저해제(27)로 알려져 있지만, 열처리로부터 생성되는 기타 물질들과 sesame oil에 함유된 각종 아미노산 및 미네랄 등이 아마도 AA합성을 촉진함으로써 sesame oil 첨가에 의해 AA 생산성이 향상되는 결과가 얻어지는 것으로 사료된다.

최근 들어 기능성 소재를 이용한 인체용 건강식품 개발이 활발히 진행되고 있다. 비슷한 개념으로 농산 부산물을 이용하여 AA를 저렴하게 생산한 후 animals diets에 보강시켜줌으로써 궁극적으로 AA가 함유된 축산물 생산이 가능하게 될 것으로 사료된다(2). 실제로 쌀겨 등은 단미사료로 이미 널리 사용되고 있기 때문에 본 연구에서처럼 고체발효를 이용하면 별도의 AA 분리 정제 공정 없이 기능성 신소재가 함유된 사료첨가제가 개발될 수 있을 것이다. 본 고체발효 연구에서는 배양시간을 7-8일로 제한했지만 배양시간을 15-20일 정도 늘려주면 이에 따라 AA의 생산도 대폭 향상될 수 있을 것으로 생각된다.

### 요약

본 연구의 목적은 최근 DHA와 더불어 분유첨가제 등 기능성 신소재로서 수요가 증가되고 있는 arachidonic acid

(AA)를 곰팡이 *Mortierella alpina* ATCC 32222를 이용하여 실질적으로 값싸게 생산할 수 있는 고체발효공정을 개발하기 위한 것이다. 본 연구에서는 회분식 심부 및 고체발효연구를 통하여 균체성장과 AA 생성에 대한 패턴을 조사하였는데, 심부발효에서는 포도당과 효모추출물을 그리고 고체발효에서는 농산 부산물인 저렴한 쌀겨를 원료로 하여 실험하였다. 심부발효 및 고체발효의 속도론적 관점에서 두 공정 모두 균체성장과 AA 생성 간에 전형적인 mixed-growth associated pattern이 일어났다. 고체발효 배지의 최적화를 위하여 carbon to nitrogen (C/N) ratio를 6.5-20 범위로 조절하여 실험해 본 결과 쌀겨에 탄소원인 포도당을 첨가해 주지 않은 경우 즉, 6.5에서 가장 좋은 결과가 얻어졌다. 또한 sodium glutamate를 쌀겨에 소량 (0-4%, w/w) 첨가했을 때 보고된 문헌과는 달리 균체성장은 오히려 감소되는 경향을 보였으며, 고온에서 볶은 참깨로부터 얻어진 sesame oil (7.5%, w/w)을 첨가했을 경우 AA 생산성은 약 1.2배가 향상되었다.

## 감 사

이 논문은 2003년도 학술진흥재단의 연구비에 의하여 연구되었으며 (KRF-2003-005-F00007), 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

- Higashiyama, K., S. Fujikawa, E. Park, and S. Shimizu (2002), Production of arachidonic acid by *Mortierella* fungi, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **7**, 252-262.
- Anderson, A. J. and J. P. Wynn (2001), Microbial polyhydroxyalkanoates, polysaccharides and lipids, In *Basic biotechnology*, C. Ratledge and B. Kristiansen, Eds, pp. 339-348, Cambridge University Press.
- Yuan, C., J. Wang, Y. Shang, G. Gong, J. Yao and Z. Yu (2002), Production of arachidonic acid by *Mortierella alpina* I<sub>49</sub>-N<sub>18</sub>, *Food Technol. Biotechnol.* **40**, 311-315.
- Singh, A. and O. P. Ward (1997), Production of high yields of arachidonic acid in a fed-batch system by *Mortierella alpina* ATCC 32222, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**, 1-5.
- Adrio, J. L. and A. L. Demain (2003), Fungal biotechnology, *Ind. Microbiol.* **6**, 191-199.
- Totani, N. and K. Oba (1988), A simple method for production of arachidonic acid by *Mortierella alpina*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 135-137.
- Stredanaka, S., D. Slugen, M. Stredansky, and J. Grego (1993), Arachidonic acid production by *Mortierella alpina* grown on solid substrates, *World J. Microbiol. Biotechnol.* **9**, 511-513.
- Pandey, A., C. R. Soccol, and D. Mitchell (2000), New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products, *Process Biochem.* **35**, 1153-1169.
- Crueger, W. and A. Crueger (1982), *Biotechnology. A text book of industrial microbiology*, pp 25-26, Science Tech, Inc.
- Hirano, M., H. Mori., Y. Miura, N. Matsunaga, N. Nakamura, and T. Matsunaga (1990),  $\gamma$ -Linolenic acid production by microalgae, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **24/25**, 183-191.
- Miller, G. L. (1959), Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Anal. Chem.* **31**, 426-428.
- Taussky, H. H. and E. Shorr (1953), A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus, *J. Biol. Chem.* **202**, 675-685.
- Higashiyama, K., S. Fujikawa, E. Y. Park and M. Okabe (1999), Image analysis of morphological change during arachidonic acid production by *Mortierella alpina* 1S-4, *J. Biosci. Bioeng.* **87**, 489-494.
- Eroshin, V. K., A. D. Satroudinov, E. G. Dedyukhina, and T. I. Chistyakova (2000), Arachidonic acid production by *Mortierella alpina* with growth-coupled lipid synthesis, *Process Biochem.* **35**, 1171-1175.
- Eroshin, V. K., E. G. Dedyukhina, A. D. Satroudinov, and T. I. Chistyakova (2002), Growth-coupled lipid synthesis in *Mortierella alpina* LPM 301, a producer of arachidonic acid, *Microbiol.* **71**: 169-172.
- Shimizu, S., H. Kawashima, K. Akimato, Y. Shinmen, and H. Yamada (1989), Microbial conversion of an oil containing a  $\gamma$ -linolenic acid to an oil containing eicosapentaenoic acid, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **66**, 342-347.
- Wynn, J. P. and C. Ratledge (2000), Evidence that the rate-limiting step for the biosynthesis of arachidonic acid in *Mortierella alpina* is at the level of the 18:3 to 20:3 elongase, *Microbiology*, **146**, 2325-2331.
- Higashiyama, K., K. Murakami, H. Tsujimura, N. Matsumoto and S. Fujikawa (1999), Effects of dissolved oxygen on the morphology of an arachidonic acid production by *Mortierella alpina* 1S-4, *Biotechnol. Bioeng.* **63**, 442-448.
- Ha, S. J., C. S. Park, and Y. W. Ryu (2004), Selection of organic nitrogen source and optimization of culture conditions for the production of arachidonic acid from *Mortierella alpina*, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **19**, 78-82.
- Suutari, M. and S. Laasko (1994), Microbial fatty acids and thermal adaptation, *Crit. Rev. Microbiol.* **20**, 285-328.
- Koike, Y., H. J. Cai, K. Higashiyama, S. Fujikawa and E. Park (2001), Effect of consumed carbon to nitrogen on mycelial morphology and arachidonic acid production in cultures of *Mortierella alpina*, *J. Biosci. Bioeng.* **91**, 382-389.
- Orthofer, F. T. (1996), Rice bran oil, In *Fifth Edition Bailey's industrial oil & fat products Vol. 2*, Y. H. Hui, Ed., p.395, John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Singh, A., S. Wilson, and O. P. Ward (1996), Docosahexaenoic acid (DHA) production by *Thraustochytrium* sp. ATCC 20892, *World J. Microbiol. Biotechnol.* **12**, 76-81.
- Lan, W. Z., W. M. Qin, and L. J. Ju (2002), Effect of glutamate on arachidonic acid production from *Mortierella alpina*, *Lett. Appl. Microbiol.* **35**, 357-360.
- Shinmen, Y., S. Shimizu, K. Akimato, H. Kawashima, and H. Yamada (1989), Production of arachidonic acid by *Mortierella* fungi, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**, 11-16.
- Deshpande, S. S., U. S. Deshpande, and D. K. Salunkhe (1996), Sesame oil, In *Fifth Edition Bailey's industrial oil & fat products Vol. 2*, Y. H. Hui, Ed., p.468, John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Shimizu, S., K. Akimato, Y. Shinmen, H. Kawashima, M. Sugano, and H. Yamada (1991), Sesamin is a potent and specific inhibitor of  $\Delta 5$  desaturase in polyunsaturated fatty acid biosynthesis, *Lipids*, **26**, 512-516.
- Yoshida, H. and S. Takagi (1997), Effects of seed roasting temperature and time on the quality characteristics of sesame (*Sesame indicum*) oil, *J. Sci. Food Agric.* **75**, 19-26.