

Mucor sp. KCTC 8405P에 의한 γ -Linolenic Acid 함유 곰팡이 유지의 생산

박종현 · 신현경*
한국식품개발연구원

Production of the Fungal Lipid Containing γ -Linolenic Acid from *Mucor* sp. KCTC 8405P

Jong-Hyun Park and Hyun-Kyung Shin*
Korea Food Research Institute

Abstract

Mucor sp. KCTC 8405P was cultivated in a jar fermentor for the production of fungal lipid containing γ -linolenic acid with feeding the glucose solution periodically. The transition of the fungal growth into the mycelial phase from yeast-like growth was achieved by pH shift after the first two day of cultivation in the low pH medium and then lipid accumulation was accelerated until the seven day of cultivation, when the glucose in the culture broth was almost consumed. With the culture conditions applied in this experiment, biomass of 99.3 g/l by the dry cell weight and the total extractable lipid of 38.0 g containing 3.5 g/l γ -linolenic acid were obtained.

Key words: *Mucor* sp. KCTC 8405P, fungal lipid, γ -linolenic acid, fed-batch culture

서 론

γ -Linolenic acid (GLA : 6,9,12-octadecatrienoic acid) 는 linoleic acid로부터 탈수소 효소($\Delta 6$ -desaturase) 등에 의하여 생체내에서 전환되어 n-6계의 고도 불포화지방산이 되고 다시 prostaglandin의 전구물질이 된다^{1,2)}. 이 GLA는 고혈압 등 각종 순환계 질환 등의 치료 및 예방에 효과가 있어, 영양학적 효과와 제약학적 이용 잠재력이 큰 것으로 보고되었다³⁻⁵⁾.

이러한 GLA는 달맞이꽃 종자 등의 식물유에 낮은 함량으로 존재하므로 높은 생산성과 안정적인 공급을 위하여 미생물로부터 GLA를 생산하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다⁶⁻⁹⁾.

최근 일본에서는 *Mortierella* sp.¹⁰⁾의 고농도 균체배양으로 GLA를 함유하는 유지의 산업적 생산이 이루어지고 있다. 그러한 생산은 유가배양법에 의한 고농도 균체배양으로 이루어졌는데 이때 곰팡이 균사의 성장과 영킹 등으로 인하여 발효과정의 제어에 어려움이 따르게 된다. Hasson 등¹⁸⁾은 *Mucor rouxii*를 효모 모양으로 연속배양하여 GLA의 생산성을 높여야 시도했다. 그러나

이러한 연속배양은 공정이 복잡하고 기질에 대한 수용이 낮아 산업적 적용의 한계가 있다.

따라서 본 연구에서는 많은 지방질의 축적과 그 지방질 중 GLA 함량이 높은 *Mucor* sp. KCTC 8405P의 배양 형태학적 특성을 이용한 유가배양법으로 GLA를 생산하고자 했고 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

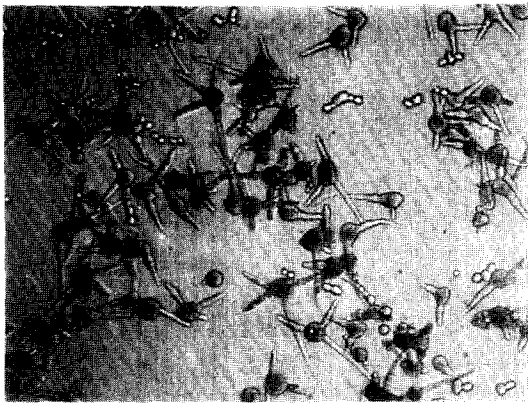
사용균주 및 배양

Mucor sp. KCTC 8405P⁽¹¹⁾를 Potato dextrose agar 사면배지에 계대, 보관하였고 종배양 배지는 강 등⁽¹²⁾의 방법을 따랐다.

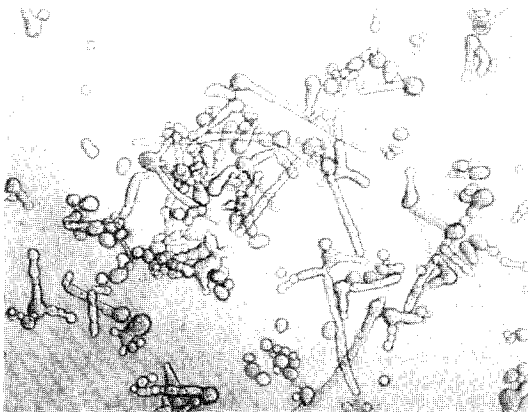
고농도 균체배양을 위한 초기 3l 배양액 중의 조성은 다음과 같다. 포도당, 525g; (NH₄)₂SO₄, 70g; KH₂PO₄, 105g; MgSO₄·7H₂O, 10.5g; NaCl, 3.7g; malt extract, 6.8g; yeast extract, 6.8g; Peptone, 3.7g; FeSO₄·7H₂O, 350 mg; CaCl₂·2H₂O, 350 mg; CuSO₄·5H₂O, 7 mg; ZnSO₄·7H₂O, 35 mg; MnSO₄·4H₂O, 35 mg. 포도당 525 g을 60% 당액으로 조제하여 배양액 중에 1일 간격으로 첨가하였고 7일간 배양한 후 총 배양액은 약 3.5l가 되었다. 5l의 배양조(New Brunswick Scientific Bio Flo II, USA)를 사용하여 25°C, 500 rpm, 1.0 vvm의 발효조건에서 배양하였으며 antiform A(Sigma Chemical Co. USA)를 초기에 첨가하였다. 배양액의 pH와 용존 산소

Corresponding author: J.H. Park, Biotechnology Lab., Korea Food Research Institute, Baekhyun-Dong, Bundang-Ku, Sungnam 462-420, Korea

*Present address: Dept. Food Sci. and Nut., Hallym University, Okchondong, Chunchon 200-702, Korea



(A)



(B)

Fig. 1. Photomicrographs of *Mucor* sp. KCTC 8405P grown for three days by the different time of pH control ($\times 150$)

The pH of the culture medium (pH 1.9) was increased to 3.0 after two day cultivation (A) and one day cultivation (B) from inoculation

(D.O.)는 10 N NaOH를 사용한 자동 pH controller와 D.O. probe를 사용하여 연속 측정하였다.

분석방법

건조 균체량과 총지질량 및 GLA 함량은 강 등⁽¹²⁾의 방법으로, 배양액 중의 포도당량과 $(NH_4)_2SO_4$ 량은 DNS⁽¹³⁾ 법과 Chaney 등⁽¹⁴⁾의 방법으로 측정하였다.

결과 및 고찰

강 등의 보고⁽¹²⁾로 곰팡이 *Mucor* sp. KCTC 8405P는 낮은 배양 pH에서는 효모 모양으로 생육하고 높은 배양 pH에서는 균사체로 생육함과, GLA를 함유하는 지방질의 축적은 이 균사체에서 잘 이루어짐을 알았다. 그런데 본 균주로 GLA의 산업적 생산을 위해서는 고농도 균체배

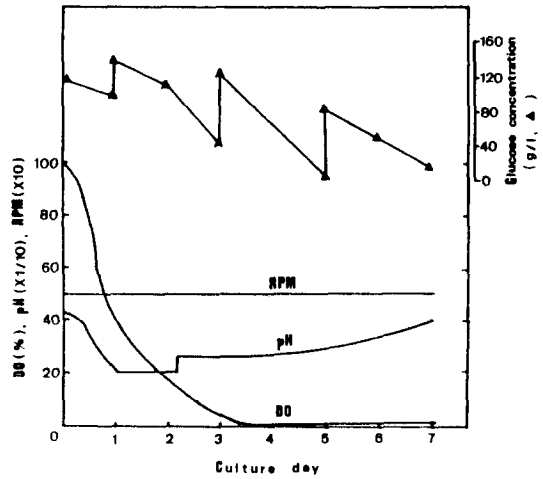


Fig. 2. Conditions of fed-batch culture for γ -linolenic acid production by *Mucor* sp. KCTC 8405P

To the initial 3.0 l, 1050g of glucose was fed and final culture volume was 3.5 l. Dissolved oxygen (D.O.) of 100 % was obtained by saturation of air. Glucose concentration indicates the amount of glucose remained in the culture broth

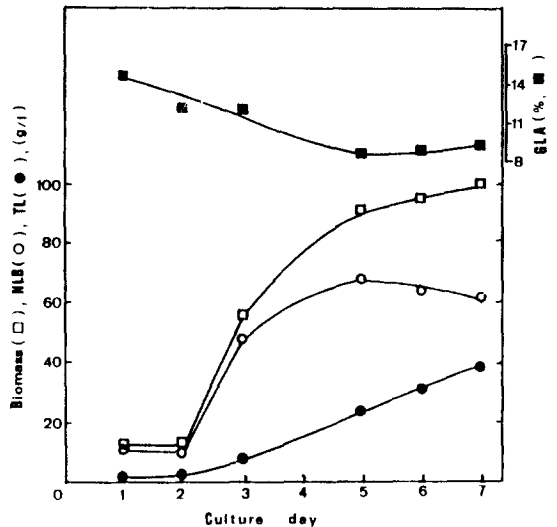


Fig. 3. Time-course of the cell growth, lipid accumulation and GLA content during fed-batch culture by a jar fermenter under the conditions of Fig. 2

Abbreviations: Biomass; dry cell weight, NLB; non-lipid biomass, TL; total lipid, GLA; γ -linolenic acid

양을 해야하는데 이를 위하여 곰팡이 균사체 길이를 똑같이 할 배양학적 필요가 있다. 이러한 synchronous growth는 본 균주의 dimorphism⁽¹⁵⁾을 이용하여 배양액의 pH를 조절하므로써 이루어졌다⁽¹⁶⁾. 즉, 종균을 pH 4.3의 배양액에 접종하여 하루 배양 후에는 pH가 약 1.9로

Table 1. Efficiency of γ -linolenic acid production from *Mucor* sp. KCTC 8405P in batch and fed-batch culture¹⁾

Culture type	$Y_{x/s}$	$Y_{l/s}$	$Y_{g/s}$	$P_{g/s,t}$	GLA (g/l)	Culture day
Batch(Erlenmeyer flask) ¹⁾	0.36	0.14	0.018	3.6	0.15	5
Fed-batch(jar fermentor)	0.37	0.14	0.013	1.9	3.5	7

¹⁾From the reference 12.

$Y_{x/s}$: dry cell weight/glucose consumed, $Y_{l/s}$: total lipid/glucose consumed

$Y_{g/s}$: γ -linolenic acid (GLA)/glucose consumed, $P_{g/s,t}$: GLA/glucose consumed/culture day

떨어지면서 효모 모양으로 생육하게 되고 이러한 상태에서 하루 더 배양한 후 pH를 NaOH 용액으로 3.0 이하로 떨어지지 않도록 제어하면 synchronous growth로 유도된다(Fig. 1A). 그러나 배양 일수를 줄이기 위해 접종 후 하루 배양한 다음, pH를 제어하면 효모 모양에서 균사체로의 전이가 일정하게 이루어지지 않으므로(Fig. 1B) 접종 후 pH의 제어없이 2일간 배양하는 것이 필요했다. Fig. 1B의 경우 균사체의 모양은 배양 7일까지 변함이 없었으며 총지방질의 양은 synchronous growth 배양의 약 2/3에 지나지 않았다. 그리고 효모 모양에서 균사체로의 전이 유도는 pH 뿐만 아니라 발효조내의 압력, 배양액 중의 CO₂ 농도 등도 관여⁽¹⁵⁾하는 것으로 생각된다.

배양액 중의 질소원이 고갈되고 균사체의 확장이 멈춘 배양 3일 후 균체의 지방질 축적이 시작됨을 알 수 있었고(Fig. 3) 배양 7일 후에는 배양액 중의 포도당이 고갈되었다. 이때 GLA의 함량이 약 9%로 떨어짐을 알 수 있는데 이는 세포막 지방질의 GLA 함량은 높지만 많은 양을 차지하고 있는 세포내 축적 지질중의 GLA 함량은 낮기 때문인 것⁽¹¹⁾으로 생각되나 삼각플라스크 배양 때의 총 14% GLA 함량으로 높이기 위한 배양학적 연구가 더 이루어져야겠다. 배양 7일 후에는 교반기에 의해 파괴된 균사체가 현미경으로 관찰되었는데 질소원의 농도를 조절하여 균사체의 길이를 적절히 조정할 필요가 있겠다. Fig. 2와 같은 조건으로 유가배양하여 플라스크배양 때와의 수율과 생산성을 비교하였다(Table 1). 발효조에 의한 배양의 생산성(Pg/s, t)은 플라스크 배양보다 떨어지고 있었으나 기타의 수율은 비슷한 것으로 나타났다. 그러나 보다 높은 GLA 생산성을 위해서는 효모 모양에서 균사체 성장으로 전이한 후 배양액 중의 포도당을 빨리 지질로 전환시키는 배양조건을 최적화하여 배양 일수를 단축하는 연구가 요망된다.

본 연구에 의하여 최종 배양액의 30% 포도당을 첨가한 유가배양법에 의하여 *Mucor* sp. KCTC 8405P로 건조 균체량 99.3 g/l, 38.0 g/l의 지질과 3.5 g/l의 GLA를 생산할 수 있었다.

요 약

γ -linolenic acid를 함유한 유지를 생산하기 위해 포도당을 주기적으로 첨가하면서 *Mucor* sp. KCTC 8405P를

유가배양하였다. 배양 시작 후 2일까지 효모 모양으로 배양한 후 배지의 pH를 높여 균사체 모양으로 유도하여 배양하면, 지방질은 포도당이 고갈되는 배양 7일째까지 축적되었다. 본 배양조건에 의하여 건조 균체량 99.3 g/l, 총지방질 38.0 g/l와 3.5 g/l의 γ -linolenic acid를 얻을 수 있었다.

문 헌

1. Larsson-Backstrom, C., Arrhenius, E., Sagge, K., Lindmark, L. and Sevansson, L.: Influence of α -linolenic and γ -linolenic acid enriched and fat free diets on fatty acid profile and prostaglandin biosynthesis and on the outcome of rat intraperitoneal sepsis. *Pro. Lipid Res.* 25, 197(1989)
2. Manku, M.S., Soma, M. and Jenkins, D.E.: Effects of feeding γ -linolenic acid on mesenteric and urinary prostaglandin out flow in Guinea-pigs. *Pro. Lipid Res.* 25, 309(1986)
3. Mills, D.E. and Ward, R.P.: Effects of essential fatty acids administration on cardiovascular responses to stress in the rats. *Lipids*, 21, 139(1986)
4. Robinsom, K.M. and Botha, J.H.: Effects of gamma-linolenic acid, dihommo-linolenic acid and ethanol on cultured human mammary carcinoma cells. *Prostaglandins Leukotrienes and Medicine*, 20, 209(1985)
5. Sugano, M., Ishida, T., Yoshida, K., Tanaka, K., Niwa, M., Arima, M. and Morit, A.: Effects of mold oil containing γ -linolenic acid on the blood cholesterol and eicosanoid levels in rats. *Agri. Bio. Chem.*, 50, 2483(1986)
6. Gosselin, Y., Lognay, G. and Thonart, T.: Improvement of fed batch mass culture for γ -linolenic biosynthesis by *Tetrahymena rostrata* (protozoa). *Biotechnol. Lett.*, 11, 423(1989)
7. Hansson, L. and Dostarek, M.: Effect of culture conditions on mycelial growth and production of γ -linolenic acid by the fungus *Mortierella ramanniana*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 28, 240(1988)
8. Hansson, L., Dostarek, M. and Sorenby, B.: Production of γ -linolenic acid by the fungus *Mucor rouxii* in fed-batch and continuous culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 31, 223(1989)
9. Sajbodor, J., Certik, M. and Dobronova, S.: Influence of different carbon sources on growth, lipid content and fatty acid composition in four strains belonging to Mucorales. *Biotechnol. Lett.* 10, 347(1988)
10. Suzuki, O., Yokochi, T., Amano, K., Sano, T., Seto,

- S., Ohtu, Y., Ishida, S., Iwamoto, S., Moriota, K., Satoh, A. and Uotani, K.: Development in production of fat containing γ -linolenic acid by fungi and its industrialization. *J. Jpn. Oil Chem. Soc. (Yugagaku)* **37**, 1081 (1988)
11. Shin, Y.C. and Shin, H.K.: Screening of γ -linolenic acid-producing fungi. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **20**, 724(1988)
 12. Kang, H.S. and Shin, H.K.: Influence of medium composition on the production of γ -linolenic acid by *Mucor* sp KCTC 8405P. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **17**, 568(1989)
 13. Miller, G.L.: Use of dinirosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, **31**, 426 (1959)
 14. Chaney, A.L. and Marbach, E.P.: Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clin. Chem.*, **8**, 130(1962)
 15. Romano, A.H.: Dimorphism, In *The Fungi*, Ainsworth, G.C. and Sussman, A.S.(ed), Academic Press, New York, Vol.II, p.181(1966)
 16. Park, J.H. and Shin, H.K.: High density cell culture of *Mucor* sp. KCTC 8405P for production of γ -linolenic acid in fed-batch culture. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **1**, 126(1991)
-
- (1992년 1월 21일 접수)