

*Mortierella alpina*를 이용한 아라키돈산의 생산에서 유기질소원의 선정과 배양 조건의 최적화

하 석 진 · ¹박 장 서 · † 유 연 우
아주대학교 분자과학기술학과, ¹두산바이오텍
(접수 : 2003. 12. 9., 게재승인 : 2004. 2. 26.)

Selection of Organic Nitrogen Source and Optimization of Culture Conditions for the Production of Arachidonic Acid from *Mortierella alpina*

Suk Jin Ha, Chang Seo Park¹, and Yeon Woo Ryu†
Department of Molecular Science and Technology, Ajou University, Suwon 442-749,
¹Doosan Biotech. BU, Yongin 449-795, Korea
(Received : 2003. 12. 9., Accepted : 2004. 2. 26.)

Experiments were carried out to select an organic nitrogen source and optimize the culture conditions for the production of arachidonic acid by *Mortierella alpina* DSA-12. Corn steep powder(CSP) was selected as an organic nitrogen source based on arachidonic acid production and raw material price. The optimum C/N ratio was in the range of 15 to 17 with the medium containing glucose as carbon source and CSP as nitrogen source. The optimum culture conditions for arachidonic acid production showed 500 rpm agitation and 25°C culture temperature at 0.5 vvm aeration. Under the optimum conditions, the concentration of cell, total lipid and arachidonic acid were 21.8 g/L, 10.2 g/L and 3.70 g/L, respectively, from 50 g/L glucose and 18 g/L CSP. In the 500 L fermenter with 0.5 vvm aeration and 200 rpm agitation, the concentration of cell, total lipid and arachidonic acid were 19.8 g/L, 9.1 g/L and 3.67 g/L, respectively, from 50 g/L glucose and 18 g/L CSP. This result showed that an arachidonic acid production could be possible with a bench-scale fermenter using corn steep powder as a nitrogen source.

Key Words : Arachidonic acid, polyunsaturated fatty acid, lipid, *Mortierella alpina*, corn steep powder

서 론

Arachidonic acid (5,8,11,14-cis-eicosatetraenoic acid, ω-6, 20: 4)는 고도 불포화 지방산으로 포유동물에서는 직접 합성되지 않고, 단지 식품을 통하여 섭취되는 필수 지방산인 linoleic acid를 전구체로 체내에서 elongation과 desaturation 반응에 의하여 합성된다(1). 이러한 arachidonic acid는 생체 내에서 세포막의 주요 구성성분이며, 또한 대사조절에 관여하는 postaglandin과 leukotrienes 합성의 전구체로 요구되는 필수 지방산이다(2). 그러나 노약자 및 병약자와 유아들은 체

내에서 arachidonic acid의 합성이 낮아 arachidonic acid의 식이 공급이 필요하다(3).

현재 arachidonic acid의 생산은 돼지의 간, 정어리 및 난황 등에서 추출하고 있으나, 그 함량이 5% 이하로서 매우 낮아 가격이 비싸다. 따라서 최근에는 미생물로부터 arachidonic acid를 저렴한 가격으로 대량 생산하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있는데, 미생물들 중에서 곰팡이인 *Mortierella alpina*가 가장 유용하다고 보고 되어 있다(4-7). 그러나 *M. alpina*에 의한 arachidonic acid의 생산에서 arachidonic acid가 세포 내에 함유되어 있기 때문에 생산성 증가를 위해서는 고농도의 균사체 배양이 필요한데, 곰팡이의 배양에서는 균체의 증가에 따라 점도(viscosity)가 증가하므로 고농도의 균사체 배양이 어렵다. 따라서 고농도의 균사체 배양을 위해서는 pellet form으로 배양하는 것이 filamentous form으로 배양하는 것보다 더 유리하지만, mycelial morphology는 배지조

† Corresponding Author : Department of Molecular Science and Technology, Ajou University, Suwon 442-749, Korea
Tel : +82-31-219-2449, Fax : +82-31-216-8777
E-mail : ywryu@ajou.ac.kr

성과 배양조건에 따라 달라진다. 즉 *M. alpina*를 이용한 arachidonic acid의 생산에서 탄소원으로는 glucose가 가장 많이 이용되고 있지만(5), 200 g/L 이상의 glucose 농도에서는 세포성장이 억제될 뿐만 아니라 균사체의 성장이 filamentous form으로 유도됨이 보고되었다(8).

일반적으로 균사체의 성장 및 arachidonic acid의 생산에 yeast extract가 가장 적합한 질소원으로 보고되었다(9, 10). 또한 유기 질소원이 *M. alpina*의 mycelial morphology에 미치는 영향에서 yeast extract, gluten meal 및 corn steep liquor 등의 경우에는 pellet form으로 성장하며, pharmedia, fish meal 및 soybean meal의 경우에는 filamentous form으로 성장한다고 보고되었다(11). 반면에 Chen등(12)은 *M. alpina* Wuji-H4를 이용하여 무기질소원에 대한 영향을 검토한 결과 urea 및 ammonium chloride 등을 사용하였을 때에 지질의 축적과 균사체의 성장에 효과가 있음을 확인하였다. 또한 Zhu 등(13)은 가격이 저렴한 soybean meal과 sodium nitrate를 질소원으로 이용하여 100 g/L의 glucose로부터 1.87 g/L의 arachidonic acid를 생산하였다고 보고하였다. 특히 arachidonic acid의 생산을 위한 최적의 C/N ratio가 20인 경우에 arachidonic acid의 생산에 최적임이 보고되었다(14).

배양조건에서는 용존산소량, 교반속도, 배양온도 등이 mycelial morphology와 지질함량에 커다란 영향을 미친다. 즉 Lindberg와 Molin(15)은 *M. alpina* CBS 343.66을 이용한 불포화지방산의 생산에서 18°C에서 배양하면 곰팡이가 pellet form으로 성장하면서 glucose가 고갈되었을 때에 arachidonic acid의 함량이 총 지질함량의 57%까지 증가하였는데, 이때 arachidonic acid의 증가량은 palmitic acid, stearic acid 및 oleic acid의 감소량과 일치함을 밝혔다. 산소는 포화 지방산을 불포화 지방산으로 전환하기 위한 oxygenation 반응의 기질로 요구되므로 산소는 불포화 지방산의 생성에 매우 중요한 요소로 알려져 있다(16). 즉 Higashiyama 등(17)은 *M. alpina* IS-4를 이용한 arachidonic acid의 생산에서 용존산소량(dissolved oxygen: DO)이 mycelial morphology와 arachidonic acid의 생산에 미치는 영향을 검토한 결과 arachidonic acid의 생산을 위해서는 DO를 10~15 ppm으로 유지시켜주는 것이 최적이고, mycelial morphology는 DO의 농도를 20~50 ppm으로 유지시켜 주었을 때 초기의 filamentous form에서 pellet form으로 전환되었다고 보고하였다.

따라서 본 연구에서는 *M. alpina* DSA-12를 이용한 arachidonic acid의 산업적인 생산을 위한 저렴한 가격의 유기 질소원의 선정과 배양조건의 최적화 및 500 L 발효조에서 arachidonic acid의 생산 가능성에 대한 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

균주

본 연구에서는 arachidonic acid를 생산하기 위하여 개발된 돌연변이 균주인 *Mortierella alpina* DSA-12를 두산 바이오텍으로부터 분양받아 사용하였다.

배지 및 배양

접종용 배지는 20 g/L glucose와 10 g/L yeast extract가 포

함된 GY배지를 이용하였으며, 균주의 계대배양은 GY배지에 1.5% agar를 첨가하여 사용하였다. Arachidonic acid의 생산을 위한 발효배지는 탄소원으로 50 g/L의 glucose와 질소원으로 18 g/L corn-steep powder (CSP)를 사용하였다. 접종용 균주는 agar plate로부터 균사체를 wire loop로 수집하여 5 mL의 멸균 증류수에 넣고 강하게 vortexing한 후에 4,000 rpm에서 5 분간 원심 분리하여 상등액을 100 mL의 GY배지가 포함된 500 mL의 baffled flask에 접종하여 25°C의 shaking incubator에서 180 rpm으로 교반하면서 3일간 배양하여 이용하였다.

Arachidonic acid의 생산을 위한 배양은 모두 발효조를 이용하였다. 즉 발효배지 2.0 L을 3.3 L 발효조 (NBS, USA)에 넣고 멸균한 후에 25°C에서 500 rpm의 교반과 0.5 vvm의 통기 조건에서 실험을 수행하였다. 500 L 발효조 (Marubishi W. Japan)에서의 배양은 발효배지 300 L을 넣고 25°C에서 200 rpm의 교반과 0.5 vvm의 통기 조건에서 배양하였다. 모든 배양에서의 접종량은 5% (v/v)로 하였다. 배지의 초기 pH는 4 N NaOH를 이용하여 5.5로 조절하였으며, foam의 조절은 neorin을 3배 희석하여 사용하였다.

실험방법

유기질소원의 선정에서는 glucose 50 g/L에 yeast extract 10 g/L과 CSP 15 g/L을 각각 첨가하여 발효조에서 실험하였으며, 최적 C/N ratio 선정은 50 g/L의 glucose에 CSP을 10~25 g/L까지 변화시켜 주면서 발효조에서 실험을 수행하였다. 교반속도에 대한 영향은 0.5 vvm의 통기조건과 25°C에서 교반속도를 300~500 rpm까지 변화시켜 주면서 발효조에서 실험을 수행하였다. 배양온도에 대한 영향은 0.5 vvm의 통기와 500 rpm의 교반조건에서 온도를 20°C~30°C까지 변화시켜 주면서 발효조에서 실험을 수행하였다.

분석방법

균사체량의 측정에는 배양액을 Whatman filter (No. 2)로 여과하고 증류수로 2회 세척한 후에 55°C의 진공건조기 (50 mmHg)에서 무게의 변화가 없을 때까지 건조시켜 건조 균체량 (Dry Cell Weight, DCW, g/L)으로 하였다. 배양액의 glucose의 농도는 Glucose analyzer (YSI1500, USA), 또는 RI detector를 이용한 HPLC (Waters, USA)로 분석하였다.

총 지질의 함량은 건조 균사체를 mortar를 이용하여 분말로 제조하고 40 mesh sieve에서 걸러진 분말 1 g에 chloroform : methanol (2 : 1)용액 30 mL를 넣고 40 분간 ultrasonication 시켜 fume hood에서 24시간 방치하였다. 다시 한번 40 분간 ultrasonication 시키고, 여기에 0.02% CaCl₂ 용액을 첨가하여 분별 깔때기로 chloroform 층을 분리하였다. 이러한 CaCl₂의 추출과정을 수회 반복하여 맑은 chloroform 층을 얻은 후에 rotary evaporator를 이용하여 건조시켜 얻은 지질의 중량을 총 지질의 함량으로 결정하였다. 지방산 분석은 100 mg의 지질에 4 mL의 sodium hydroxide 용액을 첨가하여 10 분간 가열한 다음 5 mL의 methanolic boron trifluoride 용액을 첨가하여 2 분간 methylation 반응을 시켰다. 여기에 3 mL hexane을 첨가하여 천천히 흔들어준 다음 hexane 층을 분리하여 anhydrous sulfate를 처리한 시료를 gas chromatography (HP 5890 series III, USA)로 분석하였다. Column은 capillary

column (30 m × 0.32 mm)인 omegawax 320을 이용하였으며, FID는 260°C이고 injector는 250°C이었다. 시료의 양은 1 µl로 하고 split ratio는 100 : 1로 하였다. Column의 온도는 180°C에서 240°C까지 3°C/min으로 승온하여 주었으며, holding time은 15분이었다. 사용된 carrier gas는 질소이고, flow rate는 1.0 mL/min이었다. 실험결과는 3개의 동일한 시료를 분석하여 평균한 값이다.

결과 및 고찰

유기 질소원의 선정과 C/N ratio의 결정

배양 배지의 기본 요소인 탄소원과 질소원에서 glucose를 탄소원으로 하여 유기질소원인 yeast extract와 corn steep powder (CSP)에 대한 비교실험을 수행하였다. 즉 glucose는 가장 널리 이용되는 비교적 저렴한 가격의 탄소원이며, 또한 Ward등(7)이 *Mortierella* sp.를 이용한 실험에서 glucose가 arachidonic acid의 생산을 위한 최적의 탄소원으로 보고하였다. 그러나 유기질소원으로 yeast extract가 arachidonic acid의 생산을 위하여 가장 적합하다는 보고(11)가 있으나, 산업적으로 이용하기 위해서는 가격이 비싸기 때문에 이를 대체할 수 있는 저렴한 가격의 CSP와 비교하였다. 특히 CSP는 옥수수로부터 전분을 생산하는 과정의 부산물로서 미생물의 성장과 발효에 충분한 질소원, 비타민 및 무기물들이 함유되어 있어 발효공업에서 질소원으로 많이 사용하고 있다. 따라서 glucose의 농도를 50 g/L로 고정하고 yeast extract와 CSP를 각각 10 g/L과 15 g/L이 포함된 배지를 사용하여 발효조에서 실험을 수행하였다. 이는 Park 등(14)이 *M. alpina*를 이용한 arachidonic acid의 생산에서 최적의 C/N ratio가 15~20으로 보고하였기 때문에 이를 기준으로 하였다. 즉 사용한 yeast extract의 질소함량은 약 10% (w/w)이므로 C/N ratio 20에 맞추어 환산하면 glucose 50 g/L에 존재하는 탄소량 20 g/L에 대하여 요구되는 질소량은 1 g/L, 즉 yeast extract는 10 g/L이 필요하며, CSP는 질소함량이 약 6.7% (w/w)이므로 같은 방법으로 환산하면 약 15 g/L이 된다.

Table 1에서 보는 바와 같이 균사체량은 yeast extract에서 약간 더 높았으나, 지질 및 arachidonic acid의 함량은 CSP가 yeast extract에서 보다 더 높았다. 따라서 총 지질의 함량과 arachidonic acid의 수율 및 생산성이 질소원으로 CSP를 사용한 경우가 yeast extract를 사용하는 경우보다 더 우수할 뿐만 아니라 가격도 CSP가 yeast extract 보다 저렴하기 때문에 *M. alpina* DSA-12를 이용한 arachidonic acid의 생산을 위한 유기질소원으로 CSP를 선정하였다.

Table 1. Effect of yeast extract and CSP as a nitrogen source on the production of cell mass, total lipid and arachidonic acid

Nitrogen source	DCW (g/L)	Lipid (%)	Lipid (g/L)	Ara (%)	Ara (g/L)	P _A (mg/L · hr)
Yeast extract	22.8	41.1	9.2	35.4	3.26	19.4
CSP	21.5	47.2	10.1	36.7	3.71	22.1

Lipid (%) : g-total lipid/g-dry cell weight × 100

Ara (%) : g-arachidonic acid/g-total lipid × 100

P_A : arachidonic acid productivity

유기질소원인 CSP를 이용한 arachidonic acid의 생산을 위한 최적의 C/N ratio 결정을 위한 실험은 glucose 50 g/L에 CSP를 10~25 g/L (C/N ratio를 10~30 사이)로 변화시켜 가며 배양을 하였다. 실험결과에서 mycelial morphology에는 큰 차이 없이 쌀알 반만 한 크기의 pellet 형태를 보였으며, 단지 CSP의 농도가 높아질수록 약간 크고 매끈한 pellet 형태가 되었다(data not shown). 균사체량은 CSP의 농도증가에 따라 증가하여 20 g/L의 CSP에서 최대 22.5 g/L의 균사체량을 얻었으며, 그 이상의 농도에서는 균사체량이 감소하였다(Table 2). 이는 50 g/L의 glucose에 대하여 20 g/L의 CSP 농도까지가 균사체 성장을 위한 최적의 질소원 농도이기 때문으로 판단되었다. 총 지질의 함량은 CSP의 농도 증가에 따라 감소하였으며, 이는 C/N ratio가 높을수록 총 지질 함량이 증가한다는 Li 등(18)의 보고와 일치하였다. Arachidonic acid의 함량은 CSP의 농도에 관계없이 약 36% 정도이었으나, 전체적인 균사체량이나 총 지질 함량을 통한 최종 arachidonic acid의 생산량은 CSP 농도가 17.5 g/L인 경우에 3.76 g/L로 가장 높았다. Arachidonic acid의 생산성은 CSP의 농도증가에 따라 20 g/L까지는 균사체량의 증가와 함께 증가하였다. 따라서 arachidonic acid의 생산을 위하여 50 g/L의 glucose 농도에 대한 최적의 CSP 농도는 17.5 g/L에서 20.0 g/L 사이로서 이때의 C/N ratio는 약 15에서 17 사이이며, 이는 Park 등(14)이 yeast extract를 이용하는 경우에 최적 C/N ratio인 15~20과 거의 유사한 결과를 얻었다. 이러한 결과를 토대로 앞으로의 실험에서는 50 g/L의 glucose에 대하여 18 g/L의 CSP를 이용하였다.

Table 2. Effect of CSP concentration on the production of cell mass, total lipid and arachidonic acid

CSP conc. (g/L)	C/N ratio	DCW (g/L)	Lipid (%)	Lipid (g/L)	Ara. (%)	Ara. (g/L)	P _A (mg/L · hr)
10.0	30.0	19.5	49.9	9.7	34.9	3.39	16.3
12.5	23.9	20.8	48.7	10.1	36.9	3.73	22.2
15.0	19.9	21.5	47.2	10.1	36.7	3.71	23.1
17.5	17.1	21.9	46.6	10.2	36.8	3.76	24.1
20.0	14.9	22.5	43.1	9.7	36.7	3.56	24.8
25.0	11.9	16.5	22.8	3.8	35.2	1.34	8.0

교반 속도의 영향

액체배양에서 곰팡이는 작은 pellet form으로부터 filamentous form까지의 형태로 성장한다. 그런데 이러한 곰팡이의 mycelial morphology는 배지조성이나 배양조건 등에 따라 달라지는데, 특히 *M. alpina*의 mycelial morphology는 교반속도에 의하여 큰 영향을 받는다. 더구나 고도 불포화 지방산인 arachidonic acid의 생산을 위해서는 높은 용존산소량이 요구되는데(1), pellet form보다 filamentous form이 세포 내부로의 산소 전달 속도는 더 빠르지만, filamentous form인 경우에는 배양액의 점도가 크게 증가하여 산소의 mass transfer와 교반에 문제가 발생하므로 고농도 배양이 불가능해진다. 즉 *M. alpina* 1S-4를 이용한 실험에서 filamentous form이 산소의 전달 속도에 있어서는 유리하지만, 실제로 작은 pellet form이 고농도의 균사체 배양과 arachidonic acid의 생

산에 보다 더 유리하다는 보고가 있다(19). 따라서 교반속도가 mycelial morphology와 arachidonic acid의 생산에 미치는 영향을 검토하기 위한 실험을 수행하였다. 실험결과(Table 3)에서 300 rpm으로 교반하는 경우에는 mycelial morphology가 실타래가 엉킨듯한 filamentous form으로 성장하였으며, 교반속도가 증가할수록 pellet form에 가까워져서 400 rpm 이상에서는 거의 매끈하고 찢알 반 정도의 작은 pellet form이 되었다(data not shown). 이 때 300 rpm의 교반에서는 균사체가 발효조 면을 따라 wall growth를 하는 등 균사체가 배양기를 가득 채워 걸로 보기에 균사체량이 매우 높을 것으로 예상되었으나, 실제로는 가장 낮은 16.6 g/L이었으며, pellet form을 보인 500 rpm의 경우에서 가장 높은 약 21.8 g/L이었다. Glucose를 모두 소모하는 시간도 교반속도의 증가에 따라 감소하여 500 rpm의 경우에 가장 빠른 6일이었으며, 교반속도가 느려질수록 glucose의 소모 속도도 함께 느려졌다. 지질의 함량은 교반속도가 증가함에 따라 증가하여 300 rpm의 경우 40.4%이었으나 350 rpm 이상에서는 45% 이상이었다. 이는 교반속도의 증가에 따른 용존 산소량의 증가에 의하여 지질의 함량이 증가한 것으로 사료된다. Arachidonic acid의 함량은 교반속도와 관계없이 총 지질함량의 약 36% 정도를 유지하였다. 그러나 전체적인 균사체의 성장, 배양시간, 지질 및 arachidonic acid의 함량을 고려하여 500 rpm의 교반속도를 최적조건으로 결정하였다.

Table 3. Effect of agitation speed on mycelial morphology, cell growth, lipid and arachidonic acid production

Agitation (rpm)	Morphology (form)	DCW (g/L)	Lipid (%)	Lipid (g/L)	Ara. (%)	Ara. (g/L)	Culture time (days)
300	Filamentous	16.6	40.4	6.7	36.2	2.43	10
350	Louse pellet	18.9	45.7	8.6	35.5	3.05	8
400	Compact pellet	21.5	46.4	10.0	35.6	3.56	7
500	Compact pellet	21.8	46.8	10.2	36.3	3.70	6

배양온도의 영향

미생물의 성장에서 배양온도는 가장 중요한 조건 중의 하나이며, 특히 배양온도가 낮을수록 불포화 지방산의 함량이 높아진다고 알려져 있다(18). 따라서 glucose 50 g/L와 CSP 18 g/L이 포함된 배지를 이용하여 20℃, 25℃, 28℃, 30℃의 온도에서 실험을 수행하였다. 실험결과(Table 4)에서 mycelial morphology는 큰 변화 없이 모두 pellet form을 나타내었으나, 20℃에서 배양한 경우에는 pellet에 실타래 같은 균사들이 많이 있었으며, 25℃와 28℃에서는 비교적 매끈한 pellet의 형태를 나타내었다. 균사체와 총 지질의 농도는 25℃에서 가장 높았으나, arachidonic acid의 함량은 20℃에서 더 우수하였다. 이는 낮은 온도에서 세포막의 유동성을 높이기 위하여 세포막 내의 불포화 지방산의 조성이 증가한다는 보고(20)와 낮은 온도에서는 산소의 용해도가 증가하므로 많은 산소를 필요로 하는 긴 사슬의 불포화 지방산의 생합성이 보다 용이하다는 보고(21)와 일치하는 결과를 얻었다. 그러나 30℃에서는 6일이 지나도 균사체의 성장이 거의 없었으며, 28℃의 경우에도 9일 배양에서 glucose가 24 g/L이 남아 있었다.

이러한 결과로부터 본 연구에 사용한 *M. alpina*의 배양을 위한 최적 온도는 25℃ 이하가 적합함을 알 수 있었다. 즉 arachidonic acid의 함량이 20℃에서 배양한 경우가 더 높지만, 배양시간이 너무 길기 때문에 생산성을 고려하여 25℃를 최적 배양 온도로 결정하였다.

Table 4. Effect of culture temperature on cell growth, lipid and arachidonic acid production

Culture temperature	DCW (g/L)	Lipid (%)	Lipid (g/L)	Ara. (%)	Ara. (g/L)	Culture time (days)
20℃	20.3	47.4	9.6	40.6	3.90	8
25℃	21.8	46.8	10.2	36.3	3.70	6
28℃	11.6	29.5	3.4	20.5	0.70	9

500 L 발효조에서의 배양

M. alpina DSA-12를 이용한 arachidonic acid의 산업적 생산 가능성을 검토하기 위하여 500 L 발효조 (Marubishi co., Japan)에 50 g/L glucose와 18 g/L CSP가 포함된 300 L의 배지를 넣고 25℃에서 0.5 vvm의 통기와 200 rpm의 교반 조건에서 실험을 수행하였다(Fig. 1). 균사체의 형태는 pellet form을 보였으며, 크기는 약간 증가하였다. Glucose 소모 속도 또한 비슷하여 배양 시간은 똑같은 6일이 소요되었다. 더구나 실험실 scale의 3.3 L의 경우에 균사체, 지질 및 arachidonic acid의 농도가 각각 21.8 g/L, 10.2 g/L, 3.70 g/L이었는데, 500 L에서도 19.8 g/L, 9.1 g/L, 3.67 g/L로서 유사하였다. 따라서 bench-scale에서도 실험실 수준의 결과를 얻을 수 있었기 때문에 *M. alpina* DSA-12를 이용한 arachidonic acid의 산업적 생산도 가능할 것으로 사료되었다.

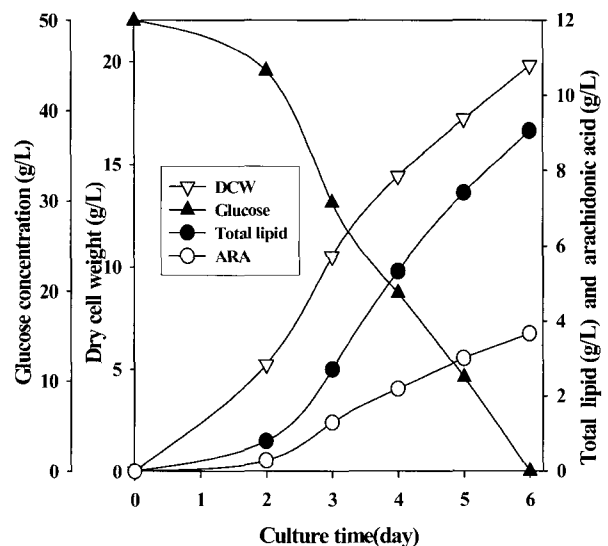


Figure 1. Profiles of cell growth, total lipid and arachidonic acid production during the batch culture of *M. alpina* DSA-12 in 500 L fermenter under 0.5 vvm and 200 rpm at 25℃.

요 약

곰팡이인 *Mortierella alpina* DSA-12를 이용한 arachidonic acid의 생산을 위한 유기질소원의 선정과 배양 조건의 결정에 연구를 수행하였다. Corn steep powder (CSP)를 원료의 가격과 arachidonic acid의 생산을 기준으로 유기질소원으로 선정하였다. 탄소원으로 glucose와 질소원으로 CSP를 사용한 경우에 최적의 C/N ratio는 15~17 범위이다. Arachidonic acid의 생산을 위한 최적의 배양조건은 25℃에서 500 rpm의 교반과 0.5 vvm의 통기이며, 이 때 50 g/L의 glucose와 18 g/L의 CSP로부터 21.8 g/L의 균사체량에 10.2 g/L의 총 지질을 얻을 수 있었으며, arachidonic acid의 농도는 3.70 g/L이었다. 500 L의 발효조에서 0.5 vvm과 200 rpm의 교반으로 실험을 수행한 결과 19.8 g/L의 균사체량과 9.1 g/L의 총 지질 및 3.67 g/L의 arachidonic acid를 얻었다. 이러한 결과는 bench-scale의 발효조에서도 질소원으로 CSP를 이용하여 arachidonic acid의 생산이 가능함을 보여주었다.

감 사

본 연구는 과학기술부 특정연구개발사업의 연구비 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Higashiyama K., S. Fujikawa, E. Y. Park, and S. Shimizu (2002), Production of arachidonic acid by *Mortierella* fungi, *Biotechnol. Bioproc. Eng.* **7**(5), 252-262.
- Gill, I. and R. Valivety (1997), Polyunsaturated fatty acid, part 1: occurrence, biological activities and applications, *Trends in Biotechnol.* **15**, 401-409.
- Carlson, S. E., S. H. Werkman, J. M. Peeples, R. J. Cooke, and E. A. Tolley (1993), Arachidonic acid status correlates with the first year growth in preterm infants, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 1073-1077.
- Amano, N., Y. Shinmen, K. Akimoto, H. Kawashima, T. Amachi, S. Shimizu, and H. Yamada (1992), Chemo-taxonomic significance of fatty acid composition in the genus *Mortierella* (Zygomycetes, Mortierellaceae), *Mycotaxon* **94**, 257-265.
- Shinmen, Y., S. Shimizu, K. Akimoto, H. Kawashima, and H. Yamada (1989), Production of arachidonic acid by *Mortierella* fungi: selection of a potent producer and optimization of culture conditions for large-scale production, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**, 11-16.
- Sajbidor J., S. Dobronova, and M. Certik (1990), Arachidonic acid production by *Mortierella alpina* sp. S-17. Influence of C/N ratio, *Biotechnol. Lett.* **10**, 455-456.
- Ward, O. P., P. K. Bajpai, and P. Bajpai (1991), Arachidonic acid production by fungi, *Appl. Environ. Microbiol.* **57**(4), 1255-1258.
- Totani, N., K. Someya, and K. Oba (1992), Industrial production of arachidonic acid by *Mortierella*, In *Industrial applications of single cell oils*, D. J. Kyle and C. Ratledge, Eds., p52, AOCS Press, IL, USA.
- Hansson, L. and M. ostalek (1988), Effect of culture conditions on mycelial growth and production of γ -linolenic acid by the fungus *Mortierella ramanniana*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 240-246.
- Aki, T., Y. Nagahata, K. Ishihara, Y. Tanaka, T. Morinaga, K. Higashiyama, K. Akimoto, S. Fujikawa, S. Kawamoto, S. Shigeta, K. Ono, and O. Suzuki (2001), Production of arachidonic acid by filamentous fungus, *Mortierella alliacea* strain YN-15, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **78**, 599-604.
- Park, E. Y., Y. Koike, K. Higashiyama, S. Fujikawa, and M. Okabe (1999), Effect of nitrogen sources on mycelial morphology and arachidonic acid production in cultures of *Mortierella alpina*, *J. Biosci. Bioeng.* **88**, 61-67.
- Chen, H. C., C. C. Chang, and C. X. Chen (1997), Optimization of arachidonic acid production by *Mortierella alpina* Wuji-H4 isolate, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **74**(5), 569-578.
- Zhu, M., L. J. Yu, and Y. X. Wu (2003), An inexpensive medium for production of arachidonic acid by *Mortierella alpina*, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 75-79.
- Park, E. Y., Y. Koike, K. Higashiyama, and S. Fujikawa (2001), Effect of consumed carbon to nitrogen ratio on mycelial morphology and arachidonic production in cultures of *Mortierella alpina*, *J. Biosci. Bioeng.* **91**(4), 382-389.
- Lindberg, A. M. and G. Molin (1993), Effect of temperature and glucose supply on the production of polyunsaturated fatty acids by fungus *Mortierella alpina* CBS343.66 in fermentor cultures, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **39**, 450-455.
- Kendrick, A. and C. Ratledge (1992), Lipid formation in oleaginous mold *Entomophthora exitalis* growth in continuous culture: effects of growth rate, temperature and dissolved oxygen tension on polyunsaturated fatty acids, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37**, 18-22.
- Higashiyama, K., K. Muarakami, H. Tsujimura, N. Matsumoto, and S. Fujikawa (1999), Effects of dissolved oxygen on the production by *Mortierella alpina* 1S-4, *Biotechnol. Bioeng.* **63**, 442-448.
- Li, Z. Y., Y. Lu, V. B. Yadwad, and O. P. Ward (1995), Process for production of arachidonic acid concentrate by a strain of *Mortierella alpina*, *Can. J. Chem. Eng.* **73**, 135-139.
- 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**(4), 489-494.
- Hiruta, O., T. Futamura, H. Takeha, A. Satoh, Y. Kanisaka, T. Yokochi, T. Nakahara, and O. Suzuki (1996), Optimization and scale up of γ -linolenic acid production by *Mortierella ramanniana* MN 15-1, a high γ -linolenic acid producing mutant, *J. Fermt. Bioeng.* **82**(4), 366-370.
- Yongmanitchai, W. and O. P. Ward (1989), Omega-3 fatty acids: alternative sources of production, *Proc. Biochem.* **24**, 117-125.