

질소원의 종류 및 초기 당농도가 곰팡이 *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304의 성장 및 발효 특성에 미치는 영향

김원호, 허병기

인하대학교 생물공학과 생물시스템공학실험실

(032) 860-7512, FAX (032) 875-0827

Abstract

The effects of initial sugar concentration and the various nitrogen sources on the fermentation characteristics of *Thraustochytrium aureum* were investigated. The sugar conversion ratios decrease with increase in the initial sugar concentration regardless of the kinds of nitrogen sources. The specific growth rate, the biomass yield, and the DHA yield also decreased but approached constant values higher than the concentration of 30 g/L. The sugar conversion ratios and the specific growth rate showed the highest values in case of using the yeast extract as nitrogen source. It was difficult to conclude that the variation of nitrogen source had some effects on the biomass yield. However, the initial sugar concentration had a rather effects on the biomass yield for the sugar concentration of 40 g/L showed 0.27. The nitrogen source that showed the greatest yield of DHA was sodium glutamate.

1. 서론

Omega-3 지방산 중 eicosapentaenoic acid(EPA)와 docosahexaenoic acid(DHA)는 보통 해양어류와 식물성 플랑크톤에 내포되어 있는 다중불포화지방산(polyunsaturated fatty acids : PUFAs)이다. DHA는 심장 및 순환계, 염증예방, 암치료 등에서 효과가 있는 것으로 알려져 있다. DHA를 생산하는 미생물은 해양식물서 플랑크톤과 *Entromophthorales*속, *Mucorales*속, *Ascomycetes*속 등의 곰팡이가 있다. 배지의 질소량이 녹조류, 세균, 곰팡이에서 포화/불포화 지방산의 비에 영향을 준다고 알려져 있다. 곰팡이와 같은 Heteritrophic microorganism에서는 질소원 뿐만 아니라 탄소원의 농도도 지질생성을 조절하는 것으로 보고되어 있다. *Motierella ramanniana* 균체인 경우 C/N비가 높으면 균체의 총 지질량이 증가 할 뿐만 아니라 다중불포화지방산의 수율도 증대되는 것으로 보고되어 있다. 농도이외에 질소원의 종류도 곰팡이의 지질생산에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. *M. ramanniana*는 potassium nitrate가 포함된 배지를 사용할 경우 ammonium salts가 포함된 배지를 사용하는 경우보다 생성되는 지질의 농도가 높다고 보고되어 있다. 본 연구에서 사용하려는 균주 *Thraustochytrium aureum*은 탄소원의 농도가 2%인 합성배지에서 최대농도 0.334g/L까지 DHA를 생산할 수 있다고 보고되고 있으며, 탄소원의 종류, 질소원의 종류 및 염의 농도 등이 다중불포화 지방산 생성에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 탄소원으로 포도당을 사용하고 질소원으로는 yeast extract, sodium glutamate, tryptone, peptone 등을 사용하여 탄소원 농도와 질소원의 종류가 *Thraustochytrium aureum*의 발효 특성에

미치는 영향을 정량적으로 규명하여 보았다.

2. 재료 및 방법

2.1 균주

본 연구에서 사용한 균주는 *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304 로 미국 ATCC로부터 직접 분양 받았다. 균주의 활성을 유지하기 위하여 두 주일 단위로 사면배지와 평판배지에 계대 배양 한 후 4°C에서 냉장 보관하면서 접종용 균주배양에 사용하였다.

2.2 배지조정

접종용 균주 배양을 위한 배지조성은 Solomon Goldstein이 사용한 배지조성을 부분 보완한 조성으로 용액 1L를 기준으로 NaCl 25g, MgSO₄ · 7H₂O 5g, KCl 1g, KH₂PO₄ 0.1g, CaCO₃ 0.2g, (NH₄)₂SO₄ 0.2g, sodium glutamate 2g, thiamine-HCl 10 µg, NaHCO₃ 0.1g, vitamin B₁₂ 1µg, glucose 20g, yeast extract 2g이었다. *T. aureum* ATCC 34304 의 발효특성을 규명하기 위한 배지조성은 위의 배지조성을 기본으로 하여 포도당 농도는 10 g/L, 20 g/L, 30 g/L, 40 g/L로 변화시켰으며 질소원은 yeast extract, sodium glutamate, peptone, tryptone 등으로 변화시켰다. 이 경우, 각 질소원의 농도는 2g/L이었다. 각 회분식 발효의 초기 pH는 1N NaOH 용액을 사용하여 6.0으로 맞추었다. 발효배지의 멸균은 당과 나머지 성분을 분리하여 수행함으로써 갈변현상을 방지하였다.

2.3 시료의 분석

시료 채취 후, 즉시 시료가 담긴 시험관을 100°C 끓는 물에 담근 후 3분간 증탕가열을 하였다. 시험관을 상온으로 냉각시킨 후 4000 rpm에서 20분간 원심분리 하였다. 상등액은 잔당 분석용으로 사용하였고, 침전물은 균체농도 분석에 사용하였다. 세포 농도는 85°C의 건조기에서 24시간 건조시킨 후 함량에 도달하였을 때의 무게를 측정하여 구하였으며, 포도당의 농도는 Glucose Analyzer(TOA, Glu-11, Japan)을 사용하여 구하였다. DHA 농도는 Heptaedcanoic acid (C17:0)을 기준물질로 하여 Gas chromatography(Hewlett Packard, HP 5890 Series II)을 사용하여 분석하였으며, Detector로는 Flame Ionized Detector를 사용하였고, HP-1(Methyl silicone Gum, 5m × 2.65µm) widebore column을 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

본 연구에서는 다음 식들로 표현되는 당의 전환율, 균체수율, 균체의 비성장속도, DHA 수율 등과 당농도 및 질소원의 종류사이의 함수관계를 규명하였다.

$$\text{당의 전환율} : \frac{\Delta S}{S_0} \quad (\text{g/g}) \quad (1)$$

$$\text{균체수율} : Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta S} \quad (\text{g/g}) \quad (2)$$

$$\text{균체 비성장속도} : \mu = \frac{1}{X_{av}} \frac{\Delta X}{\Delta t} \quad (\text{hr}^{-1}) \quad (3)$$

$$\text{DHA 수율} : Y_{DHA/S} = \frac{\Delta(DHA)}{\Delta S} \quad \left(\frac{\text{mg}}{\text{g}} \times \frac{1}{100} \right) \quad (4)$$

3.1 초기 당 농도가 발효 특성치에 미치는 영향

Fig. 1은 질소원으로 sodium glutamate를 사용하였을 때 초기 당농도 변화가 위의 식의 발효 특성치에 미치는 영향을 나타내고 있다. Fig. 1의 결과에 의하면 초기 당 농도 40 g/L가 되면 당전환율은 0.4이하로 감소하여 미발효 잔당이 20 g/L이상이었다. 균체수율도 초기 당농도 30 g/L이상에서는 0.24로 일정한 값을 나타내었다. 초기 당농도 10 g/L에서 최대 DHA 전환수율은 34mg/g을 나타내었으며 당농도 30 g/L이상에서는 16mg/g으로 일정한 값을 나타내었다. 균체의 비성장속도는 초기 당농도는 거의 일정한 값 0.05 hr^{-1} 를 나타내었다.

3.2 질소원 및 초기 당 농도와 발효특성치 사이의 함수 관계

Fig. 2는 질소원의 종류에 따라서 식 (1)로 표현되는 당의 전환율과 초기 당농도 사이의 함수관계를 나타내고 있다. 초기 당농도 20 g/L까지는 질소원의 종류에 상관없이 높은 전환율을 나타내었으나 30 g/L이상으로 증가하면 당의 전환율이 급격히 감소하여 미반응 잔당 농도가 높아짐을 알 수 있다. Fig. 3는 전환한 당의 그램당 생성된 DHA의 밀리그램의 100분의 1을 나타내고 있다. Sodium glutamate인 경우가 다른 질소원의 경우보다 다소 높은 DHA 수율을 나타내었으며 가장 낮은 DHA 수율은 peptone을 사용한 경우이었다. Fig. 4의 실험결과에 의하면 DHA 생성농도는 tryptone과 peptone을 제외하고는 별 차이를 나타내지 않았다. 당농도 10 내지 40 g/L사이에서 질소원에 관계없이 DHA 생성농도가 최대가 되는 당농도는 20 g/L이었다. 균체의 비성장속도는 초기 당농도에 관계없이 가장 큰 균체 비성장속도를 나타내는 질소원은 yeast extract와 sodium glutamate의 혼합물이었다. 질소원의 종류에 상관없이 초기 당농도가 증가하면 균체의 비성장속도는 감소경향을 나타내어 초기 당농도 10g/L 이상에서는 당의 저해영향이 있음을 알 수 있다.

3.3 다중반응표면의 최적화

다섯 종류의 질소원과 네 종류의 초기 당 농도가 *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304의 당 전환율, 비성장속도, DHA 수율, 균체수율 및 DHA의 생성농도의 다섯 가지 특성치에 미치는 영향을 다중반응표면법을 사용하여 종합적으로 분석하였다. 반응변수를 고려한 Derringer-Suish의 목적 함수값이 최대가 되는 당 농도는 10g/L이었으며 질소원은 yeast extract와 sodium glutamate의 혼합물이었다. 당은 전부 소모하며, DHA의 수율은 0.3mg/g/100, 균체 수율은 0.5g/g임을 알 수 있다.

4. 결론

초기 당농도 10내지 40 g/L 범위에서 당농도 변화와 다섯 종류의 질소원 즉 yeast extract, sodium glutamate, yeast extract와 sodium glutamate의 혼합물, tryptone 및 peptone이 *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304의 DHA 발효특성치에 미치는 영향을 규명하여 보았다. 질소원의 종류에 관계없이 당 전환율은 초기 당농도의 증가에 따라 계속 감소하는 경향을 나타내었다. 균체의 비성장속도, 균체수율 및 DHA 수율은 초기 당농도 증가에 따라 감소하였으나 초기 당농도 30 g/L이상에서는 일정한 값에 도달하는 경향을 나타내었다. 당 전환율 및 균체의 비성장속도는 질소원 중 yeast extract와 tryptone을 사용하는 경우가 다

큰 질소원을 사용하는 경우보다 높은 수치를 나타내었다. DHA 수율 향상에 가장 큰 영향을 미치는 질소원은 sodium glutamate이었으나 이 경우 균체수율이 다른 질소원에 비하여 적은 값은 나타내어 생성된 DHA 농도는 다른 질소원에 비하여 높다고 해석하기는 어려웠다. 다섯 종류의 질소원 중 생성농도는 초기 당농도가 20g/L인 경우에 질소원의 종류에 관계 없이 가장 높은 수치를 나타내었다. 다섯 가지의 질소원과 4종류의 당농도가 당전환율, 균체의 비성장속도, DHA 수율, 균체수율 및 DHA 생성농도에 미치는 영향을 종합적으로 분석하기 위하여 Derringer-Suish 방법과 SAS 프로그램을 이용하였다. 분석결과 균주의 DHA 생산에 최적인 질소원은 yeast extract와 sodium glutamate의 혼합물이며 당 농도는 10g/L이었다. 이 경우 당 전환율 1.0, 비성장속도는 0.0448g/L · hr, DHA 수율은 0.2952mg/g/100, 균체수율은 0.5485g/g 및 DHA 농도는 0.3232g/L이었다.

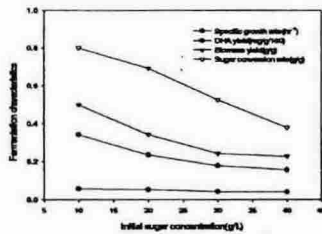


Fig. 1. Effect of initial sugar concentration on the fermentation characteristic, the basal medium supplemented with 0.2% sodium glutamate.

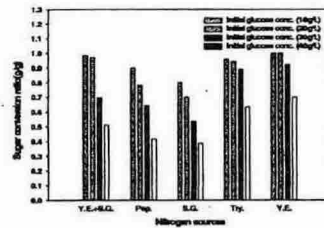


Fig. 2. Relationship between sugar conversion ratios and Initial sugar concentrations.

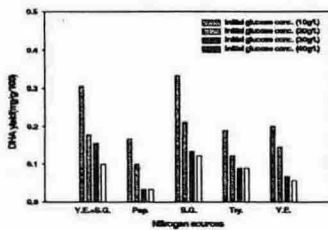


Fig. 3. Relationship between DHA yield and initial sugar concentrations.

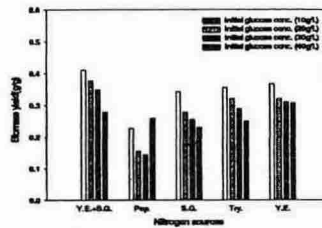


Fig. 4. Relationship between various nitrogen sources and the biomass yield.

참고 문헌

1. Cohem, Z. (1987), *J. Am. Oil Chemists' Soc*, **64**(9), 1621
2. Yamada, H. et al., (1987), *J. Am. Okl Chemists' Soc*, **4**(9), 1254
3. Ben. Amotz, A. Tornabene & Woh. Thomas (1985), *J. Phycol.*, **21**, 72
4. Weete, J. D. (1980), *Lipid Biochemistry of Fungi and Other Organism*, P. 9, Plenum. Press, New york
5. Hanssion, L. & M. Postalek (1988), *Appl. Microbial. Biotrchnol.*, **25**, 240
6. Lepage, G. and C. C. Roy(1984), Improved Recovery of Fatty Acid Through Direct Transesterification without Prior Extraction or Purification, *J. Lipid Res.*, **25**, 1391 - 1396