

해양 환경에 따른 *Thraustochytrium aureum*(ATCC34304)의 DHA(docosaehxaenoic acid)생산과 성장특성

박천익, 조대원, 김호중, 허병기*

(인하대학교 공과대학 생물공학과 생물시스템공학연구소*)

전화 (032) 860-7512, FAX (032) 875-0827

Abstract

Shaking cultivation was carried out in 250 mL Erlenmeyer flasks containing 60 mL of culture solution for 7 days. Artificial seawater was used as a basal culture medium. The cultivation was performed under the conditions that the temperature ranged from 4 °C to 32 °C, the agitation speed 50 rpm to 200 rpm, and the sugar concentration 5 g/L to 35 g/L. The medium condition was cultured that sugar and nitrogen ratio 1.25 to 10. The biomass, the lipid content in biomass, and the DHA content of lipid were investigated according to the cultivation conditions. The lipid in biomass was distributed between 10 and 34 %, the DHA in lipid 34% to 43% of the lipid, and the biomass concentration 0.425 g/L to 4.50 g/L.

서론

Omega-3 fatty acid 인 eicosapentaenoic acid(EPA)와 docosaehxaenoic acid(DHA)는 보통 해양 어류의 식물성 플랑크톤에서 발견되어지는 다중불포화지방산(Polyunsaturated fatty acids)이다 EPA는 5개의 이중결합을 갖고 20개의 탄소로 이루어져 있고(20:5 ω3), DHA는 6개의 이중결합을 갖는 22개의 탄소로 구성되어 있다. (22:6 ω3) 이들 다중불포화지방산은 화학적인 합성이 곤란하여 천연물 특히 해산물로부터 획득해야 하는데, 현재 공업적으로는 이들 지방산을 어유에서 추출하여 사용하고 있으며, 어유 중의 이들 지방산은 어류의 먹이인 플랑크톤과 같은 해양미생물로부터 기원한다고 알려져 있다. 또한 지방산의 양과 조성은 해양 미생물 즉 먹이 사슬의 일차 생산자의 형태와 이용에 따라서 결정된다. 그러나 어류에서 얻어지는 이들 지방산의 생산량은 전세계 수요의 60%정도만을 충족시키고 있을 뿐이다. 따라서 발효공학기술을 이용하여 박테리아나 조류 및 해양 곰팡이에서 이들 지방산을 대량으로 생산하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다.

미세조류로부터 효과적으로 EPA와 DHA를 생산하기 위해서는 첫째 높은 균체농도를 얻어야 하고, 동시에 생체 내에서 원하는 지방산의 함량을 높여야 한다. Grima 등은 *Isochrysis galbana*의 경우 최적 성장조건과 최적 지방산 생산조건이 동일하지 않다는 것을 발견하였고, 여러 연구자들 또한 DHA나 EPA의 생성량은 영양원의 제한, 질소원/인원 비의 변화, 질소원의 종류, 환경조건(pH, 온도, 빛 세기, aeration), 성장시기 등에 영향을 받는다는 것을 발견하였다. 미생물이 합성하는 다중불포화지방산의 조성 분포는 현재까지 수행된 연구 결과에 대한 분석을 통하여 많은 연구 결과들이 미생물의 종류에 따라 상반된 결과를 나타내고 있고 또한 여러 환경 인자

중 어느 인자가 생산성에 큰 영향을 미치는 인자인가는 아직 명확히 밝혀져 있지 않다. 다중 불포화 지방산이 인간에게 미치는 여러 유용한 생리학적·영양학적 효과들에 대한 외국의 연구들이 활발하며 특히 질병 치료·예방 효과에 관련된 의학적 보고는 매년 수백 편에 달하고 있는 실정이다. 그러나 현재 국내에서 다중불포화지방산의 생산 연구는 미비한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 인공해수배지를 이용한 회분식 발효를 통하여 실험 균주의 발효특성을 규명하고자 한다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지 조성

본 실험에서 사용한 균주는 *Thraustochytrium aureum* ATCC 34034이었으며, 미국으로부터 직접 분양을 받았다. 균주의 활성을 유지하기 위하여 계대배양한 후 4℃에서 냉장 보관하면서 접종용 균주 배양에 사용하였다. 배양에 사용된 기본배지는 인공해수배지이며, 배지 조성은 Solomon Goldstein이 사용한 배지 조성을 부분 보완한 조성으로 배지 1ℓ 내의 각 성분의 함량은 NaCl 25 g, MgSO₄ 7H₂O 5 g, KCl 1 g, KH₂PO₄ 0.1 g, CaCO₃ 0.2 g, (NH₄)₂SO₄ 0.2 g, Sodium glutamate 2 g, Thiamine-HCl 10μg, NaHCO₃ 0.1 g, Vitamine B12 1 μg 으로 고정한 후, glucose 농도를 5 에서 35 g/ℓ, 질소원 과 탄소원의 비율(C/N)을 1.25 에서 10 으로 변화시키며 실험을 실시하였다.

발효조건

250mL Erlenmeyer flask에 working volume 60mL로 회전식 진탕 배양기에서 빛을 가하면서 배양하였다. 작동 온도는 24℃, 회전수는 100rpm 이었다. 접종용 균주 배양 시간은 24시간이었으며, 발효 특성 규명을 위한 배양 시간은 7일이었다. 시료는 24시간마다 같은 배지 조성으로 60mL flask를 3개씩 취해 지방산 분석과 lipid 분석에 사용하였다.

균체 건조 중량 및 당 분석

시료 채취 후, 시료가 담긴 시험관을 3000rpm 에서 15분간 원심분리 하였다. 상등액은 잔당 분석에 사용하였고 침전물은 증류수로 2-3회 세척하고 70℃ dry oven에서 건조한 후 균체 농도 및 fatty acid 분석과 lipid 분석에 사용하였다.

추출과 지방산 분석

Guy Lepage의 direct transesterification 방법을 변형하여 사용하였다. 건조된 균체에 아세틸클로라이드-메탄올 용액 3mL을 첨가한 후 질소 하에서 100℃로 1시간 동안 중탕 가열하여 에스테르화반응을 시켰다. 반응이 끝난 후 핵산 2mL을 첨가하여 vortexing하고, 다시 증류수 3mL을 첨가하고 vortexing하여 원심분리시키면 용액은 두상으로 분리된다.

GC분석

분리된 두 상으로부터 lipid가 포함된 윗상을 1000μL취하여 기준물질인 Heptadecanoic acid

를 20 μ L를 첨가한 후 GC분석을 했다. HP사의 6890 series GC system을 사용하여 균체의 지방산 조성을 분석하였다. 사용한 column은 HP 19091J-413이었으며, detector로는 FID를 사용하였다. 오븐의 온도는 150 $^{\circ}$ C(2min) + 7 $^{\circ}$ C/min + 265 $^{\circ}$ C(2min)이었으며 detector의 온도는 300 $^{\circ}$ C이었다.

결과 및 고찰

배양온도 4 $^{\circ}$ C내지 32 $^{\circ}$ C에서 균체의 성장특성에 미치는 연구결과에 의하면 Fig. 1에서 보는 바와 같이 24 $^{\circ}$ C에서 최대균체량을 얻을 수 있었다. 그러나 낮은 온도에서는 생성되는 균체량이 너무 적어 배양액 단위부피 당 DHA생산량은 24 $^{\circ}$ C에서 최대치를 나타내었다. Fig. 2는 교반속도가 성장특성에 미치는가를 보여준다. 연구결과에 의하면 100rpm에서 최대 균체량을 얻을 수 있었다. 50 rpm을 제외한 나머지 변수에서는 비교적 비슷한 균체량과 lipid와 DHA의 수율을 얻어냈다. Fig. 3은 초기 당농도 변화에 따른 균체량의 변화를 나타낸다. 균체량은 거의 일정했으며, 당전환률은 초기 당농도가 증가함에 따라 감소하는 경향을 보였다. Fig. 4는 질소원과 탄소원의 비율에 따른 균체량의 변화를 보여주며, N/C 비율이 0.8이고 7일 반응 후에 최대값 2.65g/L을 가지며, 4일 반응 이후는 거의 일정하게 유지된다.

요 약

배양 조건으로 온도는 4, 11, 18, 24, 32 $^{\circ}$ C로 배양하여, 24 $^{\circ}$ C에서 Lipid 내에 약 42.3%의 DHA 최대 수율을 보였으며, 교반속도는 50, 100, 150, 200rpm으로 실험하여 100rpm에서 최대수율로 42.1%를 얻었다. 초기 당농도는 5, 8, 11, 14, 17, 23, 29, 35g/L로 주어 8g/L에서 Lipid내 DHA 농도가 43.1%로 나타났으며, N/C 비율은 glucose 5 g/L로 고정하여 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8에서 38-40 %로 거의 일정하게 나타났다.

참고문헌

1. Yongmanitchai, W. and O. P. Ward (1989), "Omega-3 fatty acid: alternative sources of production" *Process Biochem.*, **24**, 117-125
2. Braden, L. M. and Carroll K. K. (1986), "Dietary polyunsaturated fat in relation to mammary carcinogenesis in rats" *Lipids*, **21**, 285-288
3. Tanaka, Y., J. Hirano, and T. Funada (1992), "Concentration of docosahexaenoic acid in Glyceride by Hydrolysis of Fish Oil with *Candida cylindracea* Lipase", *J. Am. Oil Chem. Soc.* **69**, 1210-1214.
4. 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.

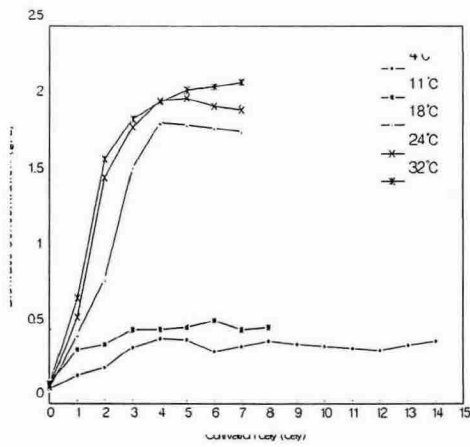


Fig. 1 Pattern of biomass production at various cultivation temperatures.

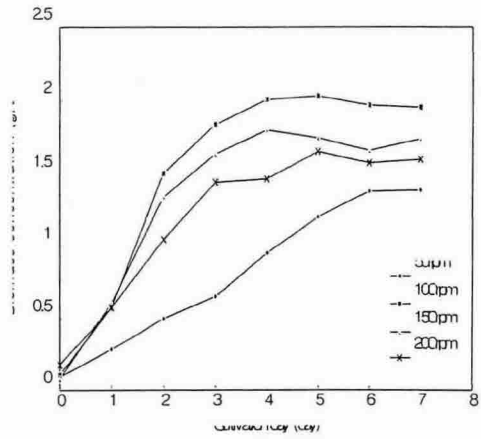


Fig. 2 Pattern of biomass production at various cultivation rotation speeds.

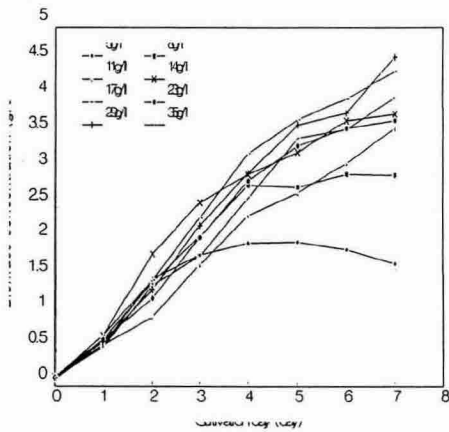


Fig. 3 Pattern of biomass production at various initial sugar concentration.

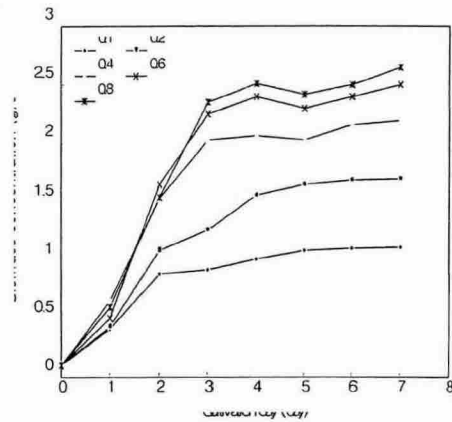


Fig. 4 Biomass production of various N/C ratio at glucose conc. 5g/L.