

## 배양 조건에 따른 *Pseudomonas* sp. CH-414의 Phospholipid 생산능의 변화

박 신 형 · \*신 원 철 · †홍 역 기  
강원대학교 공과대학 발효공학과, \*생물산업소재연구센터

### Phospholipid Production by *Pseudomonas* sp. CH-414 under Various Culture Conditions

Shin-Hyoung Park, Won-Cheol Shin\* and Eock-Kee Hong†

Department of Fermentation Engineering, Kangwon National University

\*Bioproducts Research Center, Chunchon 200-701, Korea

#### ABSTRACT

Using *Pseudomonas* sp. CH-414, the optimum culture conditions were investigated for the cell growth and the phospholipid production in batch culture by varying pH and aeration rate. With starting the cultivation under the conditions of pH 7.0 and 1vvm, pH was controlled to 6 or 8 at 30 hours of culture time. In the case of changing into pH 6.0, the phospholipid production was increased by ca. 20% with comparison to the case of pH 7.0. However, the biomass and the phospholipid concentration were rapidly decreased after 30 hours of culture time when pH was controlled to 8.0. As the aeration rate was increased, the biomass was increased while the phospholipid concentration was considerably varied and unstable. Especially, the concentration of phospholipid was rapidly decreased with 3vvm of aeration rate. Finally, under the culture conditions of pH 7.0 and 3vvm until 30 hours for the cell growth, which were controlled to pH 6.0 and 1vvm for the stable production of phospholipid beyond that time, the dry cell weight was 18.5g/ℓ and the phospholipid concentration was 0.83g/ℓ (45mg/g cell).

#### 서 론

미생물로부터의 lipid 생산은 최근들어 고도 불포화지방산, 특히 EPA(eicosapentaenoic acid)나 DHA(docosahexaenoic acid) 등이 가지고 있는 생리학적 특성(1, 2) 및 약리효과(3-5)로 인하여 매우 관심있는 분야로 대두되고 있다. 이러한 특성을 가지고 있는 고도 불포화지방산은 식물이나 동물의 지방 및 어유로부터 추출하여 왔다. 그러나 동식물

지방 및 어유로부터 고도 불포화지방산을 추출하는 것은 원료 공급의 문제점과 다른 지방산의 혼합물이 많아 분리 정제에 어려움이 있을 뿐만 아니라 생체 내 함유량도 낮아(6) 공업화가 제대로 이루어지지 못하고 있는 실정이다. 따라서 이러한 문제점을 해결하기 위하여 미생물로부터 특정 고도 불포화지방산을 생산하려는 연구가 활발히 이루어지고 있다. 고도 불포화지방산의 생합성 과정에 관한 연구는 yeast를 대상으로 많이 행하여졌으며(7) moss(8), fungi(9), algae(10) 등 여러 종류의 미생물로부터 고도 불포화지방산 추출과 아울러 지방산 합성에 관

† Corresponding Author

여하는 효소에 대한 유전공학적인 측면에서의 많은 연구가 진행되고 있다(11, 12).

본 연구는 고도 불포화지방산을 생산하는 균주 *Pseudomonas* sp. CH-414를 대상으로 하여 대부분의 고도 불포화지방산이 인지질의 형태로 존재한다는 점을 감안하여 통기속도와 pH의 변화에 따른 균체량 및 인지질 생산의 변화를 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 배지조성

본 연구에서는 *Pseudomonas* sp. CH-414를 인지질 생산을 위한 균주로 사용하였으며(13) nutrient agar plate상에서 배양하여 충분히 생육시킨 후 4℃의 냉장고에 보관하였다. 배지는 탄소원으로 glucose(1.5%)를, 유기 질소원으로 yeast extract(3.0%)를 사용하였으며, 해수(20%, v/v)는 Whatman filter paper(No. 1)로 여과한 후 사용하였다. 종균 배양은 nutrient agar plate에 보관된 *Pseudomonas* sp. CH-414 1 백금이를 상기의 배지에 접종하여 진탕배양기(KMC-8480SF, Vision Scientific, Korea)에서 20℃, 250rpm으로 48시간 진탕배양시킨 것을 종균으로 사용하였다.

### 배양조건

5 l jar fermentor(MD-300, B. E. Marubishi, Japan)에서 2.5 l의 working volume으로 배양을 수행하였다. 종균 배양액을 2.5ml 접종하여 20℃, 400rpm, 초기 pH 7.0인 조건에서 통기속도와 pH를 변화시키면서 실험하였다. 배지의 pH는 2 N-HCl과 1 N-NaOH 용액을 사용하여 조절하였다.

### 분석방법

건조 균체량은 분광광도계(552S, Perkin-Elmer, U. S. A.)를 이용하여 550nm에서 흡광도를 측정하여, 표준곡선으로부터 구하였다. 건조 균체량은 105℃에서 항량이 될 때까지 건조시킨 후 측정하였다. 인지질의 정량은 배양액을 5000×g에서 20분간 원심분리한 후 Folch 방법(14)에 따라 침전된 균체를 2ml의 증류수로 현탁하고 chloroform과 methanol 혼합 용액(1:2, v/v) 7ml를 첨가한 후, 다시 5000×g에서 20분간 원심분리한 후 chloroform층을 시료로 하여 Fiske-Subbarow 방법(15)에 따라 행하였다.

## 결과 및 고찰

### 균주생육 특성

*Pseudomonas* sp. CH-414를 이용하여 20℃, 400rpm의 배양조건하에서 pH 및 통기속도에 대한 균체량 및 인지질 생산능의 변화에 대하여 검토하였다. 이에 앞서 *Pseudomonas* sp. CH-414의 생육 특성을 알아보기 위하여 20℃, 400rpm, 1vvm에서 초기 pH를 7.0으로 하여 pH의 조절없이 실험을 행하였다(Fig. 1). 배양시간이 지남에 따라 계속적인 pH의 증가를 보였으며 배양 36시간에는 pH가 8.7까지 증가하였다. 또한 배양 30시간 이후부터는 균체량 및 인지질 농도의 급격한 감소를 나타내었다.

### pH의 영향

배양 온도 20℃, 400rpm, 1vvm인 조건에서 초기 pH를 7.0으로 조절하여 배양한 후 배양 30시간 이후부터 pH를 각각 6, 7, 8로 조절하여 균체량 및 인지질 생산능의 변화에 대한 실험을 수행하였다. pH를 7.0으로 조절하면서 배양하였을 경우(Fig. 2) 균체량은 약 15.5g/l를 나타내었으며 인지질의 농도

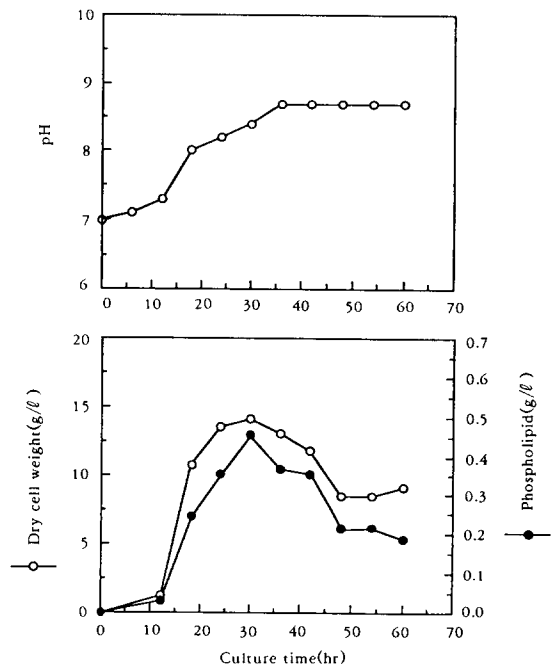


Fig. 1. Profiles of cell growth and phospholipid concentration(1vvm, initial pH 7.0. pH was not controlled).

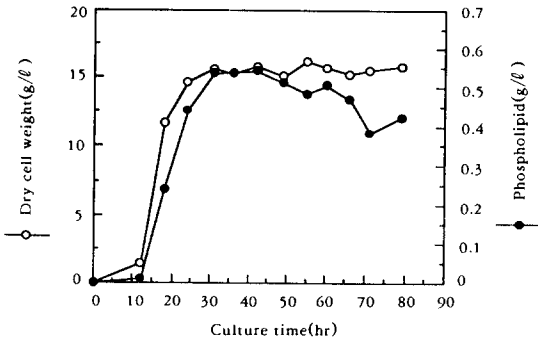


Fig. 2. Profiles of cell growth and phospholipid concentration(1vvm, pH 7.0 controlled).

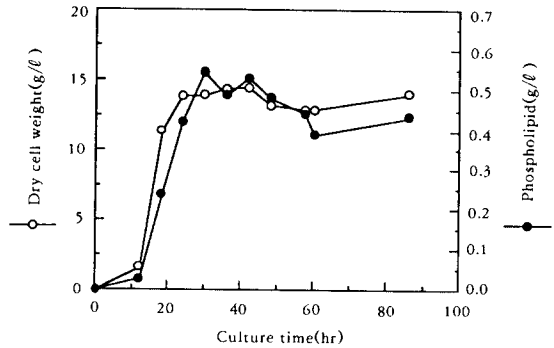


Fig. 5. Profiles of cell growth and phospholipid concentration(0.5vvm, initial pH 7.0. At 30 hours pH was controlled to 6.0).

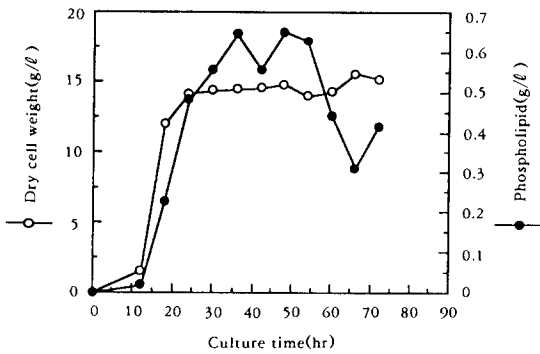


Fig. 3. Profiles of cell growth and phospholipid concentration(1vvm, initial pH 7.0. At 30 hours pH was controlled to 6.0).

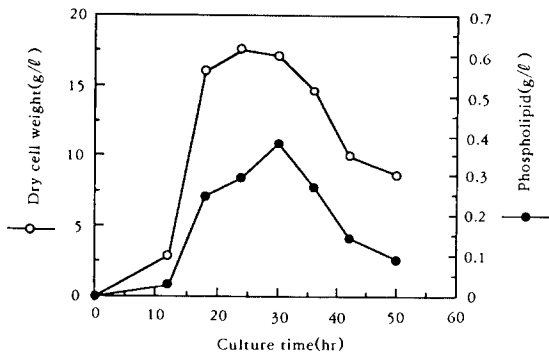


Fig. 4. Profiles of cell growth and phospholipid concentration(1vvm, initial pH 7.0. At 30 hours pH was controlled to 8.0).

는 약 0.54g/l로 pH를 조절하지 않은 경우보다 비교적 안정되게 유지되었다. 배양 30시간 이후부터 pH를 7.0에서 6.0으로 조절하여 배양하였을 경우

(Fig. 3) pH를 계속적으로 7.0으로 유지하면서 배양한 경우보다 인지질의 농도는 약 20% 정도 증가하였으나(0.65g/l) 균체량은 약간 감소하였다(14.8g/l). pH를 7.0에서 8.0으로 높여 주었을 경우(Fig. 4) 균체량은 17.5g/l까지 증가하였으나 인지질의 양은 0.38g/l로 매우 낮았다. 또한 pH를 8.0으로 변화시킨 이후에는 균체량뿐만 아니라 인지질의 양도 급격히 감소하였다(Fig. 4). 이러한 결과를 미루어 보아 인지질의 생산은 pH 8.0에서 매우 불안정함을 알 수 있었다. Yongmanitchai와 Ward (16)는 *Phaeodactylum triconutum*을 이용하여 pH 7.6에서 가장 많은 지방산을 생산하였고 Aki-moto 등(17)은 *Alteromonas* sp. SCRC-2738을 이용하여 pH 8.0에서 지방산 생산성이 가장 좋았다고 보고하였으나, *Pseudomonas* sp. CH-414는 이와는 달리 pH 6.0에서 가장 높은 인지질 생산능을 보였다.

통기속도의 영향

통기속도의 영향은 Fig. 3에서의 조건하에서 공기 공급속도를 각각 0.5, 1, 2, 3vvm으로 변화를 주어 이에 따른 균체량 및 인지질 생산의 변화를 검토하였다. 배양 30시간까지 pH 7.0, 1vvm으로 배양한 후 pH를 6.0으로 변화를 준 다음 통기속도의 영향에 대한 실험을 수행하였다. 통기속도를 0.5vvm으로 낮추어 배양하였을 경우(Fig. 5) 배양 42시간부터는 균체량 및 인지질의 감소를 보였으나, 통기속도가 증가할수록 균체량이 증가함을 알 수 있었으며(Fig. 3, 6과 7), 3vvm에서는 약 20g dry cell weight/l를 나타내었다. 그러나 인지질의 생산성에

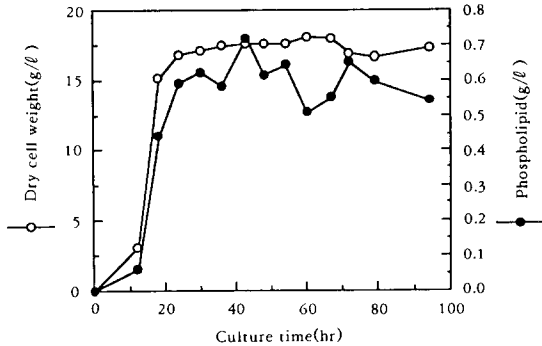


Fig. 6. Profiles of cell growth and phospholipid concentration(2vvm, initial pH 7.0. At 30 hours pH was controlled to 6.0).

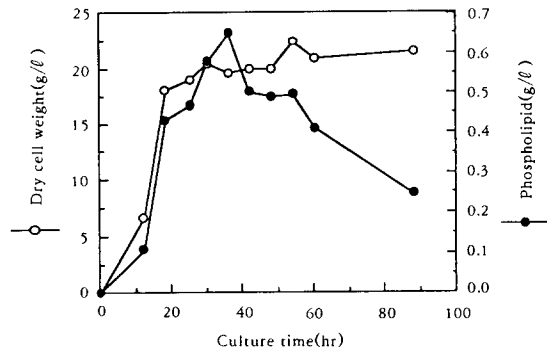


Fig. 7. Profiles of cell growth and phospholipid concentration(3vvm, initial pH 7.0. At 30 hours pH was controlled to 6.0).

서는 통기속도가 증가할수록 인지질 생산능의 변화가 심하였으며(Fig. 6), 3vvm의 통기속도에서는 균체량은 증가한 반면 인지질의 양은 급격한 감소를 보였다(Fig. 7). 통기속도에 의한 균체의 성장과 인지질의 생산에 미치는 영향에 대한 결과로는 균체의 성장에는 충분한 공기의 공급이 필수적임을 알 수 있었으며 이와는 대조적으로 인지질의 생산에 있어서는 Freisleben 등(18)이 *Thermoplasma acidophilum*을 사용하여 공기 공급에 따른 인지질 생산성에 대하여 보고한 것과 동일한 경향으로 공기의 공급량이 적을 경우 인지질 생산에 유리한 것으로 나타났다.

이상의 실험 결과를 토대로 하여 pH 7.0, 3vvm의 조건하에서 균체량을 높이기 위하여 30시간까지 배양한 후 인지질의 생산을 안정화시키고자 pH를 6.0,

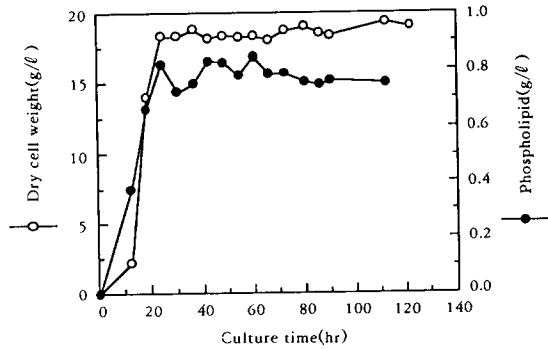


Fig. 8. Profiles of cell growth and phospholipid concentration(3vvm, initial pH 7.0. At 30 hours aeration rate was changed into 1vvm and pH was controlled to 6.0).

1vvm으로 변화시켜 실험을 수행하였다(Fig. 8). 이때의 균체량은 약 18.5g/ℓ 이었으며 인지질의 생산량도 약 0.83g/ℓ 까지 증가하였다. 또한 45mg/g cell의 인지질 생산능을 보였을 뿐만 아니라 배양시간이 경과함에 따라 인지질의 생산이 약간 감소하였지만 매우 안정되게 생산되었다.

### 요 약

*Pseudomonas sp.* CH-414를 이용하여 통기속도 및 pH 변화에 대한 균체량 및 인지질 생산 변화에 대한 실험을 수행하였다. pH를 7.0에서 8.0으로 변화시켰을 때는 인지질의 생산량뿐만 아니라 균체량이 동시에 급격하게 감소하였으나, pH를 7.0에서 6.0으로 낮추어 주었을 경우 pH 7.0과 비교하여 인지질이 약 20% 정도 증가하였으며 균체량의 변화는 없었다. 통기속도가 증가할수록 균체량은 증가하였으나 인지질의 생산은 변화가 심하였으며 3vvm에서는 인지질 농도의 급격한 감소를 보였다. 이상의 결과를 토대로 배양 30시간까지는 pH 7.0, 3vvm으로 배양한 후 그 이후부터는 pH 6.0, 1vvm으로 변화를 주어 배양하였을 때 균체량은 약 18.5g dry cell weight/ℓ 이었고 인지질의 양은 약 0.83g/ℓ (45mg/g cell)이었다.

### 감 사

이 논문은 1993년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의해 연구되었습니다.

## 참고문헌

1. M. Neuringer, W. E. Conner, C. V. Petten and L. Barstand(1984), *J. Clin. Invest.*, **73**, 272.
2. A. P. Simopoulos(1988), *Nutr. Today*, **23**, 10.
3. W. R. Henderson, S. J. Astley, M. M. Mccready, P. Kushmerick, S. Casey, J. W. Becker and B. W. Ramsey(1994), *J. Pediatr.*, **124**, 400.
4. L. M. A. Sassen, J. M. J. Lamers and P. D. Verdouw(1994), *Cardio. Drugs Therapy*, **8**, 179.
5. B. E. Phillipson, D. W. Rothrock, W. E. Connor, W. S. Harris and D. R. Illingworth (1985), *New Eng. J. Med.*, **312**, 1210.
6. N. Haagsman, C. M. van Gent, J. B. Luten, R. W. de Jong and E. van Doorn(1982), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **59**, 117.
7. S. J. Wakil, J. K. Stoops and V. C. Joshi (1983), *Ann. Rev. Biochem.*, **52**, 537.
8. R. Siron, G. Giusti and B. Berland(1989), *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **55**, 95.
9. S. Shimizu, H. Kawashima, Y. Shinmen, K. Akimoto and H. Yamada(1988), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **65**, 1455.
10. R. H. Al-Hasan, F. M. Hantash and S. S. Rannadwan(1991), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **35**, 530.
11. S. Jareonkitmongkol, E. S. Sakuradani and S. Shimizu(1994), *Arch. Microbiol.*, **161**, 316.
12. M. Usui, H. Sembongi, H. Matsuzaki, K. Matsumoto and I. Shibuya(1994), *J. Bacteriol.*, **176**, 3389.
13. W. C. Shin, C. H. Kim and E. K. Hong(1994), *J. Microbiol. Biotechnol.*, **4**, 338.
14. J. Folch, M. Lees and G. H. Sloane-Stanley (1957), *J. Biol. Chem.*, **226**, 497.
15. R. F. Boyer(1986), *Modern Experimental Biochemistry*, p. 393, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., Reading, MA.
16. W. Yongmanitchai and O. P. Ward(1991), *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 419.
17. M. Akimoto, T. Ishii, K. Yamagaki, K. Ohtaguchi, K. Koide and K. Yazawa(1990), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **67**, 911.
18. H. J. Freisleben, L. Henkel, R. Gutermann, P. Rudolph, G. John, B. Sterberg, S. Winter and K. Ring(1994), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **40**, 745.