

## 배양기의 작동인자가 *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304의 성장 및 Docosahexaenoic acid(DHA)의 생합성에 미치는 영향규명

조대원 · 송상규 · 김원호 · 허병기\*  
인하대학교 공과대학교 생물공학과

**Effect of Operating Factors on the Growth and DHA Biosynthesis of *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304.** Cho, Dae-Won, Sang-Kue Song, Won-Ho Kim, and Byung-Ki Hur\*. Department of Biological Engineering, Inha University, Inchoen 402-751, Korea – The effect of rotation speed and culture temperature on the growth of *T. aureum* and also the biosynthesis of lipid and DHA was investigated. The optimal temperature for the growth was 32°C, but the best temperature for the maximum production of lipid and DHA was 18°C in the range of 4°C to 39°C. In the case that the temperature was higher than 39°C and lower than 11°C, the growth was very slow and the production of DHA was also very low. However, the lipid content in the biomass became higher with decrease in the culture temperature. The rotation speed for the maximum growth was 100 rpm. But the growth and the production of DHA were not affected by the change of rotation speed in the range of 100 to 250 rpm. When the rotation speed was 50 rpm, the growth as well as the production of DHA and lipid was greatly reduced.

**Key words:** *Thraustochytrium aureum*, docosahexaenoic acid(DHA), lipid, culture temperature, rotation speed

$\omega$ -3 계열의 불포화지방산은 알킬사슬의 메틸기로부터 세 번째 원자에 최초의 이중 결합이 시작하는 지방산으로, eicosapentaenoic acid(EPA)와 docosahexaenoic acid(DHA)가 대표적인  $\omega$ -3 다중불포화지방산이다. EPA는 20개의 탄소와 5개의 이중결합(22:5)을 내포하고 있는  $\omega$ -3 다중불포화지방산이며, DHA는 22개의 탄소와 6개의 이중결합(22:6)으로 이루어져 있다[13]. Dyerberg와 동료연구자들은 인체에 대한  $\omega$ -3 다중불포화지방산들의 생리적 기능과 유익한 효과에 관한 연구결과를 발표하였다[6]. 그 후  $\omega$ -3 다중불포화지방산이 심장질환, 고혈압, 염증 및 일부의 암 등의 예방과 치료에 효과가 있다는 연구결과가 발표되었다[18, 20].

DHA는 인간을 포함한 포유류에서 대뇌피질, 눈의 망막, 정소와 정액 등에 주요한 구성성분으로 알려져 있다[5, 7-8]. 특히 DHA는 뇌의 구조적 지질의 가장 풍부한 구성요소 중의 하나이며, 인간의 모유에는 우유보다 30배 이상의 DHA가 함유되어 있어, 유아의 뇌조직 발달에 주요한 역할을 하는 것으로 보고 되고 있다[17]. 또한 성인에 있어서는 뇌조직의 구조적 유지를 위하여 DHA가 필요하다[9]. DHA의 부족은 여러 세포조직의 경화현상과 약화현상을 유발할 수 있어 태아의 신경조직 형성을 위한 산모의 DHA 소모가 세포

조직의 약화에 한 요인이다[17]. 이외에 DHA의 함량이 낮을 경우, 알츠하이머 질병과 정신분열증 유발에도 영향을 미칠 수 있다고 보고 되어 있다[9].

EPA와 DHA가 인류의 건강에 중요한 영향을 미친다는 연구결과가 발표되면서 이 두 지방산을 상업적으로 생산하려는 연구가 주목을 받기 시작하였다.  $\omega$ -3 다중불포화지방산의 주 공급원은 물고기기름이다. 물고기기름에는 7-17%의 DHA가 포함되어 있다. 그러나 식품첨가제로 사용되는 물고기기름은 특유의 비린내와 맛 그리고 산화에 의한 안전성문제로 인하여 사용에 대한 제한성을 내포하고 있다[3]. 다중불포화지방산은 바다에서 서식하는 해조류나 곰팡이 또는 박테리아가 생합성하여 체내에 에너지원으로 저장하거나 몸체의 구성요소로 사용한다. 물고기는  $\omega$ -3 다중불포화지방산을 자체적으로 생합성하는 반응 기구를 지니고 있지 않기 때문에, 체내에서 필요로 하는 다중불포화지방산을 이들 미생물의 섭취를 통하여 충족시키고 있다. 따라서 물고기기름을 구성하고 있는 지방산의 양과 조성은 해양미생물 즉 먹이사슬의 일차  $\omega$ -3 다중불포화지방산 생합성 형태에 따라서 결정된다[2, 22].

DHA를 생산하는 미생물에는 해양식물성 플랑크톤과 *Entomoph thorrals*속, *Mucoreles*속, *Ascomycetes*속 등의 곰팡이가 있다. 특히 *Thraustochytrid*의 곰팡이는 DHA의 함량이 높은 반면 DHA와 구조가 유사한 다른 종류의  $\omega$ -3 다중불포화지방산의 함량이 낮은 지질을 생산하기 때문에 DHA

\*Corresponding author  
Tel: 82-32-860-7512, Fax: 82-32-874-4046  
E-mail: biosys@inha.ac.kr

회수에 상대적으로 유리하다[22].

미생물의 성장과  $\omega$ -3 다중불포화지방산 생합성에 영향을 미치는 인자로 배지의 조성, 탄소원, 질소원, 영양원의 고갈, 지방산전구체의 첨가, pH, 배양온도, 빛의 세기, 산소농도 및 배양기간이 보고 되어 있다[1, 4, 12, 14-16, 18, 19, 21, 22]. 미생물이 합성하는  $\omega$ -3 다중불포화지방산 조성 분포는 미생물의 종류에 따라 고유한 분포특성을 나타내나, 환경인자가 지방산 조성 분포와 지방산 생산성에 영향을 미친다는 연구결과가 보고되어 있다. 그러나 여러 환경인자 중 어떤 인자가 생산성에 가장 큰 영향을 미치는가에 대한 명확한 연구결과는 아직 보고되어 있지 아니하다. 따라서 본 연구에서는 배양환경인자 중 배양온도와 교반속도가 해양곰팡이의 일종인 *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304 의 균체성장과 지질 및 DHA 생산특성에 미치는 영향을 정량적으로 규명하였다.

## 재료 및 방법

### 균 주

본 연구에서 사용된 균주는 해양곰팡이의 일종인 *T. aureum* ATCC 34304이다. 균주의 활성을 유지하기 위하여 두주일 단위로 사면배지와 평판배지에 계대배양한 후 4°C에서 냉장보관하면서 접종용 균주배양에 사용하였다.

### 배지조성

접종용 균주배양을 위한 배지는 Solomon Goldstein의 배지조성을 부분적으로 보완하여 사용하였다. 배지조성은 1 L를 기준으로 NaCl 24 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 12 g, KCl 0.75 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mg, CaCO<sub>3</sub>·2H<sub>2</sub>O 1 g, NaNO<sub>3</sub> 40 mg, Tris 1 g, Na<sub>2</sub>EDTA 12 mg, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2 mg, NaMoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 1 mg, Thiamine-HCl 0.01 mg, NaHCO<sub>3</sub> 0.1 g, vitamin B<sub>12</sub> 0.001 mg과 탄소원으로는 포도당 5 g/L, 질소원으로 효모추출물과 펩톤의 각 1 g이었다.

### 배양조건

접종용 균주의 배양은 250 mL Erlenmeyer flask 내에서 작동부피를 60 mL로 하여 진탕배양기에서 수행하였다. 배양온도는 24°C, 교반속도는 100 rpm 및 배양시간은 48 hr로 하였다. 배양온도와 교반속도가 미생물의 성장특성 및 DHA 생합성특성에 미치는 영향을 규명하기 위한 배양실험은 2 L 배양기에서 작동부피를 1 L로부터 수행하였다. 배양온도는 4, 11, 18, 24, 32 및 39°C로 변화시켰으며 교반속도는 50, 100, 150, 200 및 250 rpm으로 변화시켰다. 7일 동안 배양하면서 24시간단위로 300 mL의 시료를 채취하여 성장특성과 지질 및 DHA의 생합성특성을 규명하였다.

### 시료의 분석

24시간단위로 시료를 채취하였다. 원심분리후 상등액은 잔

당 분석에 사용하였으며, 분리된 균체는 건조 균체량, 균체내의 지질함량 및 지질내의 지방산함량분석에 사용하였다. 균주가 생합성한 지방산조성은 Lepage방법[11]을 사용하였다. 건조시킨 균체에 3 mL의 메탄올을 첨가한 후 100°C에서 1시간 동안 고압상태로 반응시켜 균주가 생산한 fatty acid를 fatty acid methyl ester로 전환시키고, 기준물질을 heptadecanoic acid methyl ester(C17:0)로 하여 gas chromatography(HP 6890) 사용하여 지방산조성을 분석하였다. Detector로는 FID를 사용하였다. Column은 HP-5 (Crosslinked 5% PH ME Siloxane, 30 m×0.32 mm×0.26 mm)의 capillary column을 사용하였다. 이때 오븐의 온도는 150°C(2 min) + 7 °C/min + 265°C(2 min)이었으며 detector의 온도는 300°C이었다.

## 결과 및 고찰

### 배양온도가 *T. aureum*의 성장 및 DHA 생합성에 미치는 영향

배양온도를 4, 11, 18, 24, 32 및 39°C로 고정시키고 배양시간에 따른 *T. aureum*의 성장특성을 Fig. 1에 나타내었다. 이 결과에 의하면, 배양온도에 따른 균체의 성장특성은 두가지의 집단으로 구분할 수 있다. 배양온도가 낮은 4°C와 11°C인 경우와 배양온도가 높은 39°C인 경우에는 균체가 거의 성장하지 못하였으나, 배양온도 18, 24 및 32°C에서는 배양시간에 따라 2 g/L까지 균체가 성장하였다. 배양온도 4 내지 32°C 범위에서는 배양온도 증가에 따라 균체의 성장량이 증가하는 경향을 나타내었으나 32°C 이상에는 균체 성장량이 급격히 감소하였다.

Bajpai와 그의 동료들[1]도 배양온도 증가에 따라 균체의 농도가 증가하였으며, 최적배양온도는 28°C이었다는 연구결과를 발표하였다. Yokochi 등[22]도 배양온도가 균체의 성

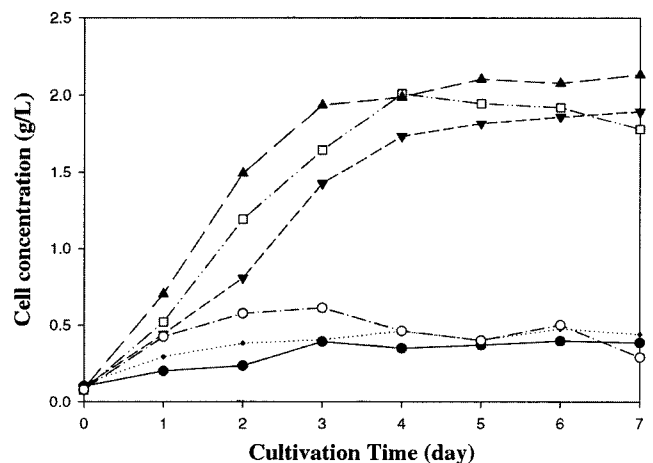


Fig. 1. The effect of cultivation temperatures on the cell growth of *T. aureum*. ● : 4°C, ● : 11°C, ▼ : 18°C, □ : 24°C, ▲ : 32°C, ○ : 39°C.

장에 영향을 미친다는 연구결과를 발표하였으며 최적배양온도는 25°C이었다. 이외의 여러 해양미생물의 경우에도 배양온도가 균체의 성장에 영향을 미치나 최적온도는 균주에 따라 서로 다르다는 연구결과가 발표되어 있다[21].

배양온도가 균체의 성장에 미치는 영향을 규명하기 위하여, Fig. 1과 당의 소비량을 사용하여 동일한 배지조성에서 균체성장이 멈추는 배양 5일후의 균체수율을 배양온도에 따라 비교하였다. 배양온도 18°C에서는 당 1 g 소모에 대하여 균체가 0.3736 g 증가하였으며 24°C에서는 0.3899 g, 32°C에서는 0.4411 g이 성장하여, 본 연구의 *T. aureum*의 성장을 위한 최적온도는 32°C이었다.

배양온도가 균체내의 지질 및 DHA생합성에 미치는 영향을 분석하기 위하여, 각 온도에서 균체의 성장변화량에 따른 지질 및 DHA의 생성변화량을 구하였다. Fig. 2는 배양온도 18°C에서 균체성장량 ΔX, 지질생성량 ΔL 및 DHA 생성량 ΔDHA 사이의 함수관계를 나타내고 있다. 기울기로부터 ΔX에 대한 ΔL과 ΔDHA의 비를 구하면,  $Y_{L/X} = \Delta L / \Delta X = 0.1860$ ,  $Y_{DHA/X} = \Delta DHA / \Delta X = 0.0806$ 이다. 동일한 방법에 의하여 다른 온도에 따라  $Y_{L/X}$ 와  $Y_{DHA/X}$ 를 구하여 Fig. 3에 나타내었다. 이결과에 의하면 배양온도가 낮을수록 균체성장의 많은 부분이 지질로 축적되고 있으며, 단위 균체당 DHA의 함량도 높았다. 배양온도가 4°C인 경우 균체 1 g 증가에 대하여 지질의 증가량이 차지하는 비율이 32%이었으나, 32°C인 경우 지질증가량의 비율은 13%로 감소하였다. DHA의 함량도 4°C에서는 균체증가량의 15%를 차지하였으나, 32°C에서는 5%까지 감소하였다. Bajpai[1]도 배양온도가 낮아질수록 지질의 함량이 높아진다는 동일한 경향의 연구결과를 보고하였다.

*T. aureum*의 온도에 따라 균체, 지질 및 DHA의 생산성을 분석하기 위하여, 배양시작 5일후의 균체, 지질 및 DHA의 농도를 Fig. 4에 나타내었다. 이 결과에 의하면 균체의 농도

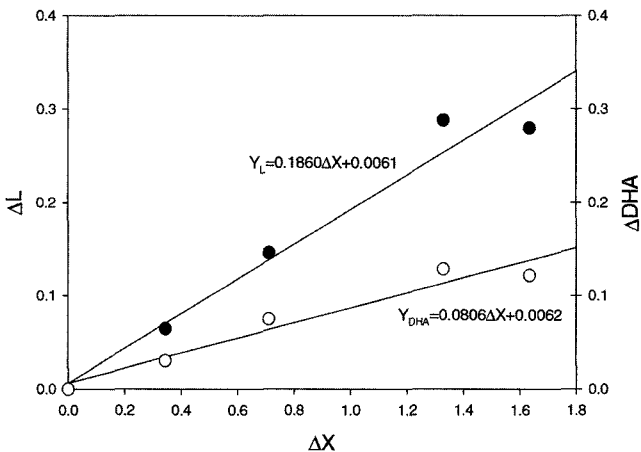


Fig. 2. Lipid change(ΔL) vs. biomass change(ΔX) and DHA change(ΔDHA) vs. biomass change(ΔX) at 18°C of cultivation temperature.

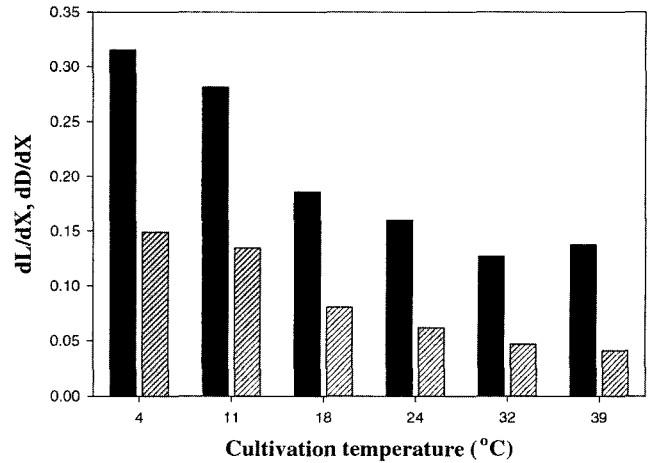


Fig. 3. The effect of cultivation temperatures on the yield of total lipid and DHA contents. ■,  $Y_{L/X}$ ; ▨,  $Y_{DHA/X}$ .

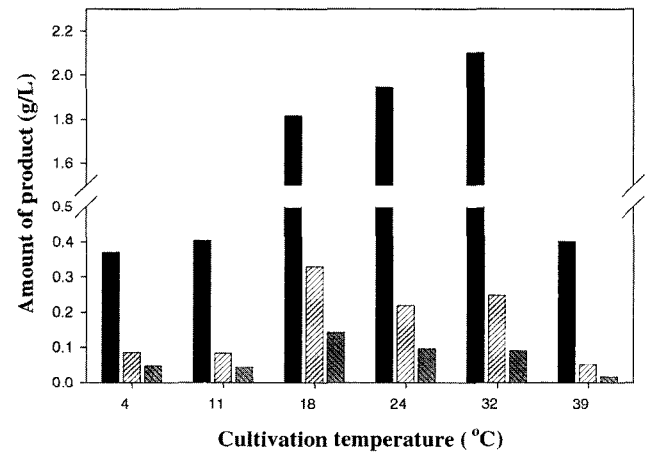


Fig. 4. The effect of cultivation temperatures on the concentration of cell, lipid, DHA after 5 days culture. ■, Cell concentration; ▨, Lipid concentration; ▩, DHA concentration.

가 가장 높은 온도는 32°C이었으나, DHA농도가 가장 높은 온도는 18°C이었다. 배양온도 4, 11, 18, 24, 32 및 39°C 중 배양 5일후의 균체농도가 가장 낮은 온도는 4°C이었으며, 지질의 농도와 DHA의 농도가 가장 낮은 온도는 39°C이었다. *T. aureum*인 경우, 배양온도가 높으면 균체성장은 물론 균체내의 지질 및 DHA의 축적량도 급격히 감소하는 경향을 나타내었다.

**교반속도가 *T. aureum*의 성장 및 DHA 생합성에 미치는 영향**

배양온도를 24°C로 고정하고 교반속도를 50에서 250 rpm 까지 50 rpm씩 변화시키면서, 교반속도가 *T. aureum*의 성장 및 지질과 DHA의 생합성에 미치는 영향을 분석하였다. Fig. 5는 각 교반속도에서 배양시간에 따른 균체농도를 나타내고 있다.

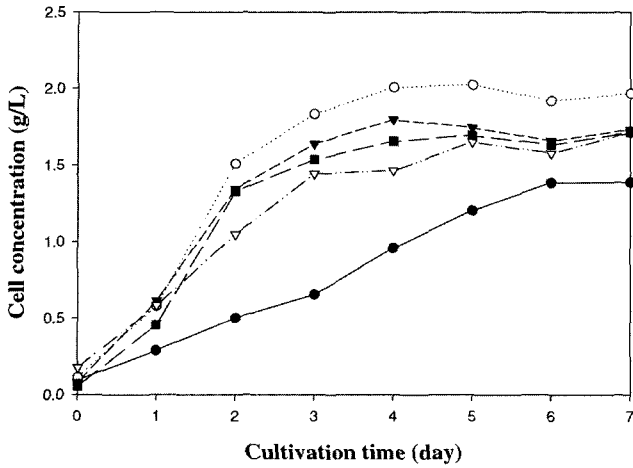


Fig. 5. The effect of rotation speeds on the cell growth of *T. aureum*. ●, 50 rpm; ○, 100 rpm; ▼, 150 rpm; ▽, 200 rpm; ■, 250 rpm.

교반속도가 50 rpm인 경우, 다른 교반속도에 비하여 균체 성장이 현격하게 저하하였다. 배양기간 7일 동안 균체성장이 가장 높은 교반속도는 100 rpm이었으며, 150, 200 및 250 rpm의 교반속도에서는 교반속도가 균체성장에 영향을 크게 미치지 아니하였다. 교반속도가 균체성장에 대한 지질 및 DHA 변화량 비율에 미치는 영향을 정량적으로 분석하기 위하여 균체성장 변화량  $\Delta X$ 와 지질 및 DHA 변화량  $\Delta L$ 과  $\Delta DHA$  사이의 함수관계를 규명하여보았다. Fig. 6은 교반속도 200 rpm에 대한  $\Delta X$ 와  $\Delta L$  및  $\Delta DHA$  사이의 함수관계이다. 이 그림의 직선의 기울기로부터  $\Delta X$ 에 대한  $\Delta L$ 과  $\Delta DHA$ 의 비율  $Y_{L/X}$  및  $Y_{DHA/X}$ 를 구하면 0.15와 0.06이다. 다른 교반속도에 대하여도 동일한 방법을 적용하여  $Y_{L/X}$ 와  $Y_{DHA/X}$ 를 구하여 Fig. 7에 도시하였다. 이 결과로부터 단위 균체량당 지질의 함유량이 가장 높은 교반속도는 50 rpm이

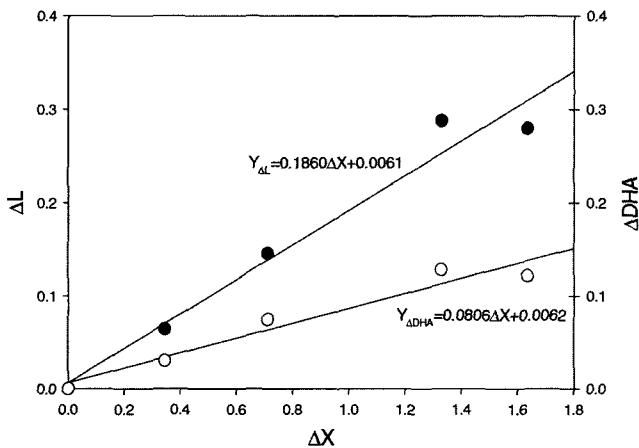


Fig. 6. Lipid change(DL) vs. biomass change(DX) and DHA change(DDHA) vs. biomass change(DX) at 200 rpm of agitation speed.

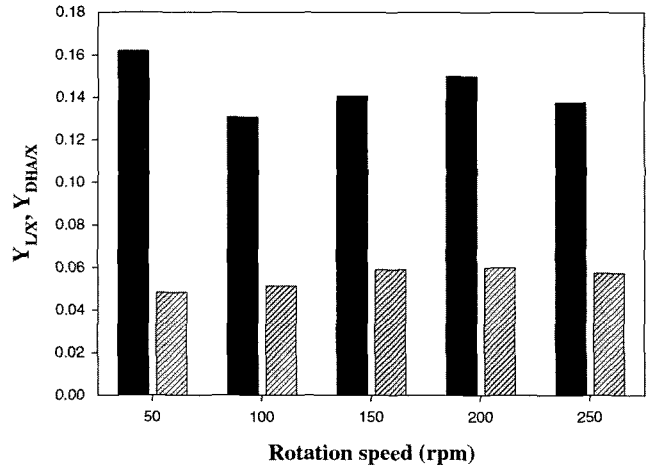


Fig. 7. The effect of rotation speeds on the yield of lipid and DHA. ■,  $Y_{L/X}$ ; ▨,  $Y_{DHA/X}$ .

였으며 DHA의 함량이 가장 높은 교반속도는 150 rpm이었다. 그러나 그 차이가 크지 아니하여 교반속도가  $Y_{L/X}$ 와  $Y_{DHA/X}$ 에 영향을 미친다고 해석하기는 어렵다. Bajpai[1] 등도 교반속도가 균체성장과 지질 및 DHA 생합성에 미치는 영향에 대한 연구결과를 발표하였다. 이들 연구결과에 의하면, 교반속도가 250 rpm 이상이 되면 균체의 형태가 변형되어 DHA 함량이 크게 감소하였다. 배양시작 5일후의 배양액 내의 균체, 지질 및 DHA의 농도를 비교하여 Fig. 8에 도시하였다. 이 결과에서 알 수 있듯이, 본 연구의 *T. aureum* 균주는 교반속도 100 내지 250 rpm에서는 교반속도가 균체의 생성, DHA와 지질의 생합성에 크게 영향을 미치고 있지 아니함을 알 수 있다. 그러나 교반속도 50 rpm에서는 균주의 성장량과 지질 및 DHA의 생합성량이 교반속도 100 rpm 이상에 비하여 현격히 저하되었다.

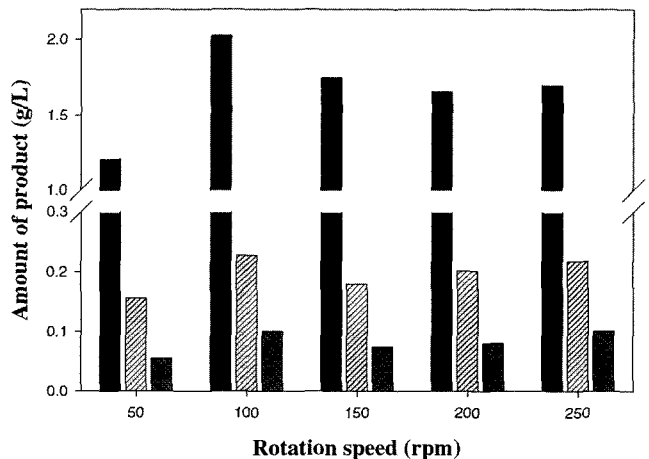


Fig. 8. The effect of rotation speeds on the concentration of cell, lipid, and DHA after 5 days culture. ■, Cell concentration; ▨, Lipid concentration; ▩, DHA concentration.

## 요 약

교반속도와 배양온도가 *T. aureum* ATCC 34304의 성장과 지질 및 DHA 생합성에 미치는 영향을 규명하였다. 배양온도 4°C 내지 39°C 범위에서 균체 성장에 최적인 온도는 32°C이었으며, DHA와 지질의 생성량이 가장 높은 온도는 18°C이었다. 배양온도 39°C 이상과 11°C이하에서는 균체의 성장량과 DHA 및 지질의 생성량이 대단히 적었으나, 온도가 낮을수록 단위균체당 축적되는 지질과 DHA의 함량은 증가하여 배양온도 4°C에서는  $Y_{L/X}$ 의 값이 32%까지,  $Y_{DHA/X}$ 의 값은 15%까지 증가하였다.

교반속도 50 내지 250 rpm 사이에서 균체 성장이가 가장 높은 교반속도는 100 rpm이었다. 교반속도 100과 250 rpm 사이에서는 교반속도가 균체의 성장량과 지질 및 DHA 생합성량에는 영향을 미치지 아니하였으나, 교반속도가 50 rpm으로 감소하면 균체 성장량과 지질 및 DHA 생성량이 모두 크게 감소하였다.

## 감사의 글

본 연구는 해양수산부의 수산특정연구개발사업(과제번호: 20020075)에 의해 수행되었으며 연구비 지원에 감사드립니다.

## REFERENCES

- Bajpai, P. K., P. Bajpai, and O. P. Ward. 1991. Optimization of production of docosahexaenoic acid (DHA) by *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304. *JAOCS* **68**: 509-514.
- Braden, L. M., and Carroll K. K. 1986. Dietary polyunsaturated fat in relation to mammary carcinogenesis in rats. *Lipids* **21**: 285-288.
- Carlson, S. E. 1996. Arachidonic acid status of human infants: influence of gestational age at birth and diets with very long chain n-3 and n-6 fatty acids. *J. Nutr.* **126**: 1092S-1098S.
- Cohen, Z. C., A. Vonshak, and A. Richmond. 1987. Fatty acid composition of *Spirulina* strains grown under various environmental conditions. *Phytochemistry* **26**: 2255-2258.
- Dratz, E. A., and A. J. Deese. in A. P. Simopoulos, R. R. Kifer, and R. E. Martin. 1986. Health effects of polyunsaturated fatty acid in seafoods. pp 319-330, Academic Press Inc., Florida.
- Dyerberg, J. 1986. Linolenate-derived polyunsaturated fatty acids and prevention of Atherosclerosis. *Nutrition Reviews* **44**: 125-134.
- Gascon, A., J. Helene, M. Sital, D. Yves, L. D. Brun, and P. Julien. 1996. Plasma lipoprotein profile and lipolytic activities in response to the substitution of lean white fish for other animal protein sources in premenopausal women. *Am. J. Clin. Nutr.* **63**: 315-321.
- Ghisolfi, J. 1995. Acid gras polyinsatures et development cerebral et sensoriel du nourrisson *Archives de Pediatrie* **2**: 825-830.
- Horrocks, L. A. and Yeo, Y. K. 1999. Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA). *Pharmacol Res.* **40**: 211-225.
- Jiang, Y. and F. Chen. 2000. Effects of medium glucose concentration and pH on docosahexaenoic acid content of heterotrophic *Cryptocodinium cohnii*. *Process Biochem.* **35**: 1205-1209.
- Lepage, C. and C. C. Roy. 1984. Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction and purification. *J. Lipid Res.* **25**: 1391-1396.
- Neidelman, S. L. 1987. Effect of temperature on lipid unsaturation. *Biotechnology and Genetic Eng. Rev.* **5**: 245-268.
- Park, B. S., B. J. Hwang, S. J. Lee, and Y. C. Lee. 1994. Omega-fatty acid. pp. 58-59, Ukil Cultural Publisher Inc., Korea.
- Peberdy, J. F. and D. K. Toomer. 1975. Effect of nutrient starvation on the utilization of storage lipids in *Mortierella ramaruiana*. *Microbios.* **13**: 123-131.
- Radwan, S. S. and A. H. Soliman. 1988. Arachidonic acid from fungi utilizing fatty acids with short chains as sole sources of carbon and energy. *J. Gen. Microbiol.* **134**: 387-393.
- Sajbidor, J., S. Dobronova, and M. Certik. 1990. Arachidonic acid production by *Mortierella* sp. S-17: influence of C/N ratio. *Biotechnol. Lett.* **12**: 455-456.
- Salem, N., H. Y. Kim, and J. A. Yargey. in A. P. Simopoulos, P. R. Kifer, and R. E. 1986. Health effects of polyunsaturated fatty acids in seafoods. pp 49-60, Academic Press Inc., Florida.
- Singh, A. and O. P. Ward. 1996. Production of high yields of docosahexaenoic acid by *Thraustochytrium roseum* ATCC 28210. *J. Ind. Microbiol.* **12**: 370-373.
- Stinson, I. E., R. Kwoczak, and M. J. Kuruntz. 1991. Effect of cultural conditions on production of eicosapentaenoic acid by *Pythium irregulare*. *J. Ind. Microbiol.* **8**: 171-178.
- Ward, O. P. 1995. microbial production of long-chain PUFAs. *INFORM* **6**: 683-688.
- Yongmanitchai, W. and P. W. Owen. (1989) Omega-3 fatty acids : Alternative sources of production. *Process Biochem.* **24**: 117-125.
- Yokochi, T., D. Honda, T. Higashihara, and T. Nakahara. 1998. Optimization of docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium limacium* SR21. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **49**: 72-76.

(Received Jan. 18, 2005/Accepted Feb. 2, 2005)