

고수을 DHA생산을 위한 *Thraustochytrium aureum*의 배지조성과 발효조건에 관한 연구

박 경 원, 김 준 식, 허 병 기
인하대학교 화공·고분자·생물공학부
전화 (032) 860-7512, FAX (032) 875-0827

Abstract

Marine fungus, *Thraustochytrium aureum* ATCC 34034, was incubated in artificial sea water media in order to produce docosahexaenoic acid(DHA). Cultures were performed at 24°C in light for 3 days with orbital shaker at 200rpm. Maximum cell productivity of 1.34g/L and DHA yield of 41.4 mg/L were obtained by using this method, which is almost the twice level of DHA yield obtained for the strains reported previously. This strain did not produce DHA in YM media and YPG media. The results indicate that salinity influenced cell growth and production of DHA.

서 론

인류의 삶의 질 향상과 더불어 건강에 대한 관심이 날로 증대되고 있다. 따라서 보다 많은 인류에게 질병치료의 기회를 제공하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있는 것이 사실이다. 다중 불포화 지방산류인 ω -3 fatty acids 중 EPA와 DHA가 인류의 건강에 중요한 영향을 미친다는 연구 결과가 발표되면서 이들 두 불포화 지방산을 상업적으로 생산하려는 연구가 주목받고 있다. 다중 불포화 지방산은 바다에서 서식하는 미생물인 algae, fungi 또는 bacteria가 생산하여 체내에서 에너지원으로 저장하거나 몸체의 구성요소로 사용한다.

ω -3 fatty acid는 물고기가 자체적으로 생산할 수 없는 필수 지방산이므로 이들 미생물을 섭취함으로써 체내에 필요한 다중불포화 지방산을 충족시키고 있다. 지방산의 양과 조성은 일차적으로 해양 미생물, 즉 먹이 사슬의 일차 생산자의 형태와 이용성에 따라 결정된다(1,2). 현재 DHA의 상업적 원료는 물고기와 물고기 기름이다. 물고기 기름은 많은 불포화 지방산과 EPA에 더하여 DHA 7-14%를 포함한다(3). 물고기 기름안의 상대적으로 낮은 DHA비율과 이들 기름의 대부분이 수화공정을 거쳐 마가린 및 쇼트닝으로 생산되는 동안 DHA와 EPA는 산화 또는 수화되어 본래의 기능을 상실하게 되므로 해양 미생물을 인공적으로 배양함으로써 인류가 필요로 하는 높은 순도의 DHA를 생산하려는 것이 본 연구의 목적이다.

재료 및 방법

사용균주

본 실험에서 사용한 균주는 *Thraustochytrium aureum* ATCC 34034이었으며, 미국으로부터 직접 분양을 받았다. 배양에 사용된 기본배지는 인공해수배지이며, 생산량 비교 실험을 위하여 Bajpai배지(NaCl 25, MgSO₄·7H₂O 5, KCl 1, KH₂PO₄ 0.1, CaCO₃ 0.2, (NH₄)₂SO₄ 0.2, Sodium glutamate 2, Thiamine-HCl 10 μ g, NaHCO₃ 0.1, Yeast Extract 2, Cyanocobalamin 1 μ g, glucose 5) (g/L), YM 배지(Yeast Extract 3, Peptone 5, malt extract 3, glucose 5) (g/L)와 YPG배지((Yeast Extract 3, Peptone 10, glucose 5) (g/L)를 사용하였다.

발효조건

250mL Erlenmeyer flask에 working volume 100mL로 회전식 진탕 배양기에서 형광등 2개를 설치하여 빛을 가하면서 배양하였다. 온도는 24℃, 회전수는 200rpm 이었다. 초기 pH는 6으로 조절하고 접종용 균주는 24시간, 생산용 균주는 3일간 배양하였다.

균체 건조 중량

30mL씩 취한 균주를 원심분리하여 증류수로 2-3회 세척하고 85℃ 건조기에서 항량이 될 때까지 건조한 후 측정하였다.

추출과 지방산 분석

Guy Lepage의 direct transesterification 방법(4)을 변형하여 사용하였다. 건조된 균체에 아세틸클로라이드-메탄올 용액 3mL을 첨가한 후 질소하에서 100℃로 1시간 동안 중탕가열하여 에스테르화반응을 시켰다. 반응이 끝난 후 핵산 2mL을 첨가하여 vortexing하고, 다시 증류수 3mL을 첨가하고 vortexing하여 원심분리시키면 용액은 두상으로 분리된다.

GC분석

분리된 두 상으로부터 윗 상을 1000 μ L 취하여 기준물질인 Heptadecanoic acid를 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℃(2min) + 7℃/min + 265℃(2min)이었으며 detector의 온도는 300℃이었다.

결과 및 고찰

Thraustochytrium aureum ATCC 34034를 미국 ATCC사로부터 분양을 받은 후 초기 배양하여 분석한 결과가 Fig.1에 나타내어지고 있다. 전체 지방산 생산량의 약 43%를 DHA가 차지하고 약 5%의 EPA가 생산됨을 알 수 있다. 물고기 기름의 경우가 7-14%의 DHA를 포함하는 것에 비하면 3-6배에 이르는 DHA의 생산량을 보여 준다. Fig.2에 물고기 기름의 지방산 조성을 분석한 결과를 나타내었다. 인공 해수 배지, Solomon Goldstein이 사용한 배지 조성을 부분 보완한 배지(Bajpai배지), YM배지와 YPG배지의 4종류의 배지를 사용하여 회분식 배양에서의 균체성장과 DHA생산 수율에 배지가 미치는 영향을 알아보았고 Fig.2에 나타내었다. 탄소원으로 5g/L의 glucose로 동일하게 배양한 결과 YM배지와 YPG배지에서는 균체의 성장도 좋지 못하였으며, 특히 DHA도 생산하지 못하였다. 이것은 *Thraustochytrium aureum*이 해양 곰팡이이므로 성장에 염분이 중요한 영향을 미친다는 것을 지시한다. 최대 건조 균체량과 최대 DHA 생산 수율은 인공 해수배지에서 얻었으며, 각각 1.34g/L의 균체와 41.4mg/L의 DHA이었다. 이것은 균체 1g당 30.82mg의 DHA를 생산한다는 것을 의미한다.

요 약

Thraustochytrium aureum ATCC 34034를 인공 해수 배지에서 24℃, 200rpm, 초기 pH 6으로 고정하여 빛을 가하면서 3일간 배양을 한 결과, 최대 건조 균체량은 1.34g/L이었으며, 최대 DHA생산량은 41.4 mg/L이었다. 모든 실험에서 탄소원으로는 glucose를 5g/L로 고정하였다. YM배지와 YPG배지에서는 *Thraustochytrium aureum*이 DHA를 생산하지 못하였으며, 이 균주가 해양 미생물이라는 점을 고려해보면, 성장과 DHA생산에 있어서 염분이 중요

한 영향을 미친다고 생각된다.

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.

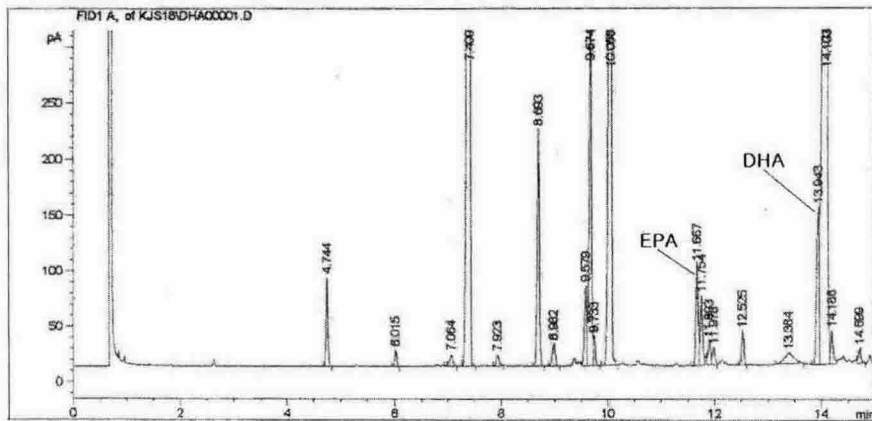


Fig.1 GC profile of fatty acids composition producing by *Thraustochytrium aureum* ATCC 34034.

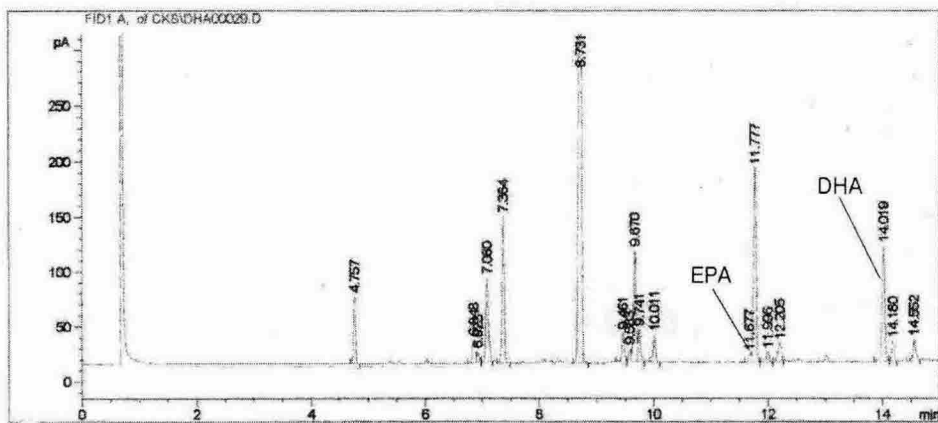


Fig.2 GC profile of fish oil

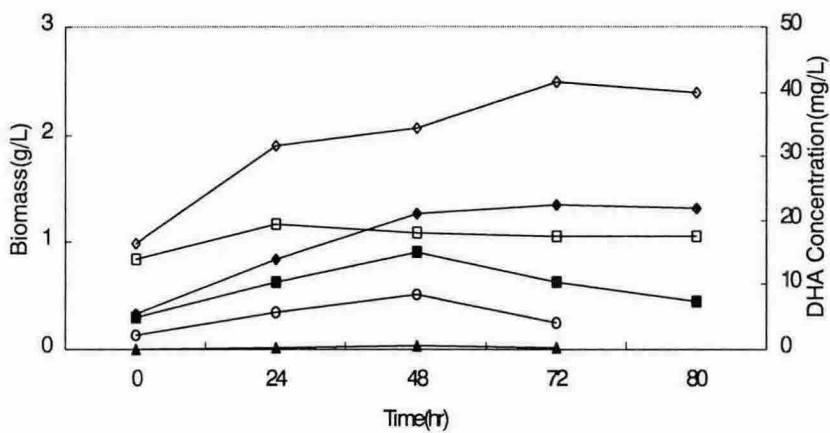


Fig.3 Effect of media on growth and DHA production by *Thraustochytrium aureum* ATCC 34034.

■: Biomass in Bajpai media(g/L), ◆: Biomass in artificial sea water media(g/L), ○: Biomass in YM media(g/L), ▲: Biomass in YPG media(g/L), □: DHA Yield in bajpai media(mg/L), ◇: DHA yield in artificial sea water media(mg/L)