

## Production of Docosahexaenoic Acid in a Culture by *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304

Sang-Kue Song<sup>1</sup>, Heui-Yun Kang<sup>2</sup>, Won-Ho Kim<sup>1</sup>, and Byung-Ki Hur<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biological Engineering, Inha University, Inchoen 402-751, Korea.

<sup>2</sup>Institute of Biotechnological Industry, Inha University, Incheon, 402-751, Korea

TEL: +82-32-860-7512, FAX: +82-32-872-4046

*Thraustochytrium aureum* ATCC 34304 was investigated for industrial production of DHA. The optimal temperature for the cell growth was 32°C, but consumption rate of substrate was fastest at 24°C. There is no difference of cell mass and lipid concentration in the range of 18°C to 32°C. When the cultural temperature was decreased, yield of lipid production was increased. DHA concentration was obtained 40% of lipid after 3days culture because increasing cell mass brought out increasing lipid concentration. Therefore, optimal temperature for the production of DHA was decided 24°C considering consumption rate of substrate and lipid concentration. The cell growth was not influenced by initial substrate concentration in the range of 5 to 25 g/L. Initial substrate concentration was decided 15 g/L of glucose because of excellent contents of lipid and DHA. In order to produce industrial scale of DHA, the basic parameters for fermentation was decided 15 g/L of glucose, 100 rpm, 24°C, pH 6.0 in the 5L fermenter (working volume 3L). The results of  $Y_{X/S}$  and  $Y_{DHA/Lipid}$  were obtained 1.11-fold and 1.22-fold, respectively than flask culture.

### 서 론

$\omega$ -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<sup>1)</sup>. DHA는 인간을 포함한 포유류에서 대뇌피질, 눈의 망막, 정소와 정액 등에 주요한 구성성분으로 알려져 있다<sup>2-4)</sup>. 특히 DHA는 뇌의 구조적 지질의 가장 풍부한 구성요소 중의 하나이며, 인간의 모유에는 우유보다 30배 이상

의 DHA가 함유되어 있어, 유아의 뇌조직 발달에 주요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다<sup>5)</sup>.

DHA를 생산하는 미생물에는 해양식물성 플랑크톤과 *Entromoph thorrales*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 회수에 상대적으로 유리하다<sup>6)</sup>. 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 초기 당 농도가 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 2주일 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 초기 당 농도가 미생물의 성장특성 및 DHA 생합성특성에 미치는 영향을 규명하기 위한 배양실험은 2 L 배양기에서 작동부피를 600 mL로부터 수행하였다. 배양온도는 4, 11, 18, 24 및 32°C로 변화시켰으며 초기 당 농도는 5, 10, 15, 20 및 25 g/L로 변화시켰다. 7일 동안 배양하면서 24시간단위로 30 mL의 시료를 채취하여 성장특성과 지질 및 DHA의 생합성특성을 규명하였다.

### 시료의 분석

24시간단위로 시료를 채취하였다. 원심분리후 상등액은 잔당 분석에 사용하였으며, 분리된 균체는 건조 균체량, 균체내의 지질함량 및 지질내의 지방산함량분석에 사용하였다. 균주가 생합성한 지방산조성은 Lepage방법<sup>7)</sup>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.

### 결론

ω-3 불포화 지방산의 대표적인 DHA 생산을 위하여 해양 미생물인 *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304를 배양하였다. 배양온도에 따른 균체의 성장과 지질 생성의 특성을 알아보기 위하여 초기 당 농도 5 g/L에서 배양온도를 각각 4, 11, 18, 24 및 32°C로 설정하여 배양하였다. 4°C와 11°C의 경우 배양 3일까지 건조균체량 0.5 g/L 정도 증가하여 배양 말기까지 유지되었고, 지질의 양도 0.15 g/L를 넘지 못했다. 배양 온도가 18°C 이상에서는 배양 초기 3일동안 빠르게 세포가 성장하여 당을 모두 소비한 6일 이후에 균체량도 감소하였다. Bajpai와 그의 동료들<sup>8)</sup>도 배양온도 증가에 따라 균체의 농도가 증가하였으며, 최적배양온도는 28°C이었다는 연구결과를 발표하였다. Yokochi 등<sup>6)</sup>도 배양온도가 균체의 성장에 영향을 미친다는 연구결과를 발표하였으며 최적배양온도는 25°C이었다. 이외의 여러 해양미생물의 경우에도 배양온도가 균체의 성장에 영향을 미치나 최적온도는 균주에 따라 서로 다르다는 연구결과가 발표되어 있다<sup>9)</sup>. 지질의 양은 균체의 성장과 함께 증가 하였고,

DHA의 양은 온도에 따라 초기 함량에는 차이를 보였으나, 3일 이후에는 지질 양의 40%인 안정된 함량을 나타냈다. 배양온도 32°C에서는 지질생산 수율이 낮았으나 온도가 낮아질수록 지질의 생산수율이 증가하여 11°C에서는 당 소비량의 20% 이상이 균체 내 지질로 전환되었다. 따라서, 기질의 소비속도와 균체 성장 및 DHA의 생산수율을 고려하여 24°C로 배양 온도를 최적화하였다.

초기 당 농도를 5, 10, 15, 20 및 25 g/L로 하여 배양하여 균체성장과 DHA 생산수율을 알아보려고 하였다. 균체 성장은 초기 당 농도에 의한 저해를 받지 않았으며, 당 소모량에 대한 균체 생성량의 수율 ( $Y_{X/S}$ )은 평균  $0.34 \pm 0.05$  g-cell/g-glucose 이었고, 당 소모량에 대한 지질의 생성 수율 ( $Y_{lipid/S}$ )은  $0.05 \pm 0.01$  g-lipid/g-glucose 이었다. *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304 내에 축적되는 지질 중 DHA의 생산수율 ( $Y_{DHA/lipid}$ )은  $0.38 \pm 0.06$  g-DHA/g-lipid 으로 지질 내 지방산 조성 중 DHA의 조성은 초기 당 농도에 관계없이 일정한 것을 알 수 있었다. 또한 생산 균체량에 대한 지질 ( $Y_{lipid/X}$ )과 DHA의 양( $Y_{DHA/X}$ )은 각각  $0.15 \pm 0.02$  g-lipid/g-cell,  $0.06 \pm 0.01$  g-DHA/g-cell 으로 정상적인 생명현상을 유지하기 위하여 균체 무게 당 일정비율의 지질과 DHA를 필요로 하고 있음을 알 수 있었다. 따라서, 균체성장에 저해를 받지 않으면서 지질과 DHA의 함량이 우수했던 포도당 15 g/L를 배양 초기 당 농도로 정하였다.

*Thraustochytrium aureum*을 이용한  $\omega$ -3 불포화 지방산 생산 기술 개발을 위하여 균주의 성장 및 DHA 생산특성을 최적화하였고, 산업적 생산을 위한 배양특성을 규명하고자 작동부피만을 변화시켜 5 L 발효기(작동부피 3L)에서 초기 당 농도 15 g/L, 100 rpm, 24°C, pH 6.0의 조건으로 배양하였다. 발효기 배양에서는 flask보다 기질당 균체수율이 약 1.11배, 총 지질에서 DHA의 함량이 약 1.22배 증가한 결과를 얻었다. 이는 scale-up에 의한 수율 증가가 호기성 균주의 산소전달 증가와 교반형태의 차이에 의한 것으로 사료된다.

## REFERENCES

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. Ghisolfi, J. 1995. Acid gras polyinsatures et developement cerebral et sensoriel du nourrisson *Archives de Pediatrie* **2**: 825-830.
  5. 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.
  6. 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.
  7. Lepage, C., and C. C. Roy. 1984. Improved recovers of fatty acid through direct transesterification without prior extraction and purification. *J. Lipid Res.* **25**: 1391-1396.
  8. 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.
  9. Yongmanitchai, W., and P. W. Owen, (1989) Omega-3 fatty acids : Alternative sources of production. *Process Biochem.* **24**: 117-125.