

## 해양 곰팡이 *Thraustochytrium aureum*의 형태학적 변화와 DHA 생산과의 특성 규명

박경원, 박천익, 조대원, 허병기  
인하대학교 응용화학부 생물공학전공  
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 13 days with orbital shaker at 100rpm. 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 produce much more DHA after sporangium disruption .

### 서론

바다에서 서식하는 미생물인 algae, fungi 또는 bacteria가 생산하여 체내에서 에너지원으로 저장하거나 몸체의 구성요소로 사용되는  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids(PUFAs)는 물고기가 자체적으로 생산할 수 없는 지방산이므로 이들 미생물을 섭취함으로써 체내에 필요한 다중불포화지방산을 충족시키고 있다. 지방의 에너지원으로서의 역할 외에 여러 영양학적 기능에 대해 연구한 결과가 1929년 Burr<sup>(1)</sup> 등에 의하여 발표되면서 필수지방산(essential fatty acid, EFA)의 중요성을 인식하게 되었다. 필수지방산인 eicosapentaenoic acid(EPA)와 docosahexaenoic acid(DHA)는 해양성 동물 및 식물성 플랑크톤에서 주로 발견되는 다중불포화지방산(Polyunsaturated fatty acids, PUFAs)으로서 체인의 지방산의 terminal 메틸기로부터 세 번째 탄소에서 이중결합이 시작되어  $\omega$ -3 또는 n-3 지방산으로 불린다.  $\omega$ -3계 지방산은 생체막의 주요 구성 성분으로 특히 망막(retina)<sup>(2,3)</sup>과 대뇌피질(cerebral cortex)<sup>(4)</sup>에 다량 존재할 뿐 아니라 부족시 막에 관련된 효소활성(enzyme activity), 전달(transport), 수용체(receptor) 등의 기능에 변화가 온다고 알려져 있다<sup>(5)</sup>. Singer 등<sup>(6)</sup>은 어유를 섭취함으로써 혈압을 낮출 수 있는 것으로 보고하였다.  $\omega$ -3계 지방산은 편두통, 피부결핵, 류마티스 관절염과 같은 염증성 질병에 효과가 있다고 알려져 있으며, 이러한 기작은 염증과 항체 반응의 강력한 매개체(mediator)인 prostaglandin과 leukotriene의 균형을 변화시키는 이들 지방산의 기능과 관련이 있는 것으로 보고되어 있다<sup>(7)</sup>. Kumar<sup>(8)</sup>는 *Thraustochytrium aureum*의 미성숙 포자낭은 매우 큰 기름방울을 포함하고 있으며 포자낭의 모양은 다양하지 않으나 거의 구형이며, 유주자 형성이전에 포자낭의 중심부분은 뾰족한 알갱이 상태로 되어 있다고 보고하였다. 이에 본 연구는 포자낭을 둘러싸고 있는 막의 파열과 함께 불포화지방산을 포함한 lipid가 생성될 수 있다는 점에 착안하여 형태학적인 변화와 DHA생산과의 관계를 규명하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 사용균주 및 발효조건

본 실험에서 사용한 균주는 *Thraustochytrium aureum* ATCC 34034이었으며, 미국으로부터 직접 분양을 받았다. 배양에 사용된 기본배지는 인공해수배지를 사용하였으며, 250mL Erlenmeyer flask에 working volume 60mL로 회전식 진탕 배양기에서 형광등 2개를 설치하여 빛을 가하면서 배양하였다. 온도는 24°C, 회전수는 100rpm 이었다. 초기 pH는 6으로 조절하고 접종용 균주는 24시간, 생산용 균주는 13일간 배양하였다.

### 균체 건조 중량

30mL씩 취한 균주를 원심분리하여 증류수로 2-3회 세척하고 85°C 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°C로 1시간 동안 증탕가열하여 에스테르화반응을 시켰다. 반응이 끝난 후 헥산 2mL을 첨가하여 vortexing하고, 다시 증류수 3mL을 첨가하고 vortexing하여 원심분리시키면 용액은 두상으로 분리된다.

### GC분석

분리된 두 상으로부터 윗 상을 1000  $\mu$ L 취하여 기준물질인 Heptadecanoic acid를 20  $\mu$ 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°C(2min) + 7°C/min + 265°C(2min)이었으며 detector의 온도는 300°C이었다.

## 결과 및 고찰

*Thraustochytrium aureum* ATCC 34034를 미국 ATCC사로부터 분양을 받은 후 배양하여 건조균체량 과 glucose 소비량을 분석한 결과가 Fig.1과 2에 나타내어지고 있다. 배양 5~6일 정도에서 최대균체량과 최대 소모량을 관찰할 수 있다. Fig.3에서 전체 지방산 생산량의 약 43%를 DHA가 차지하고 약 5%의 EPA가 생산됨을 알 수 있다. Fig.4는 포자낭의 파열 이전의 균체의 모습을 보이고 있으며 GC 분석 결과 Fig.5의 포자낭 파열 이후의 지방산 조성에 비하여 낮은 DHA함량을 나타냄을 확인할 수 있었다.

참고문헌

1. Burr, G. O. and M. M. Burr, (1930), *J. Biol. Chem.*, **86**, 587
2. Anderson, R. E., (1970), *Exp. Eye Res.*, **10**, Pp. 339
3. Ghisolfi J., (1995), *Archives de pediatrie*, **2(9)**, 825-830
4. O'Brain, J. E., Sampson, E. L., (1965), *J. lipid Res.*, **6**. Pp. 545
5. Svennerholm, L., (1968), *J. of Lipid Res.*, **9**, 570
6. Singer, P., W. Jaeger, and M. Wirth, S. Voigt, E. Maumann, S. Zimontkowski, K. Haidu, and W. Goedicke, (1983), *Dtsch Gesundheitswes.*, **38(3)**, 101
7. Higgs, G. A., (1986), *Prog. Lipid Res.*, **25**, 555
8. Kumar, S. R. (1980), *The British Mycological Society*, **74(3)**, 607-614

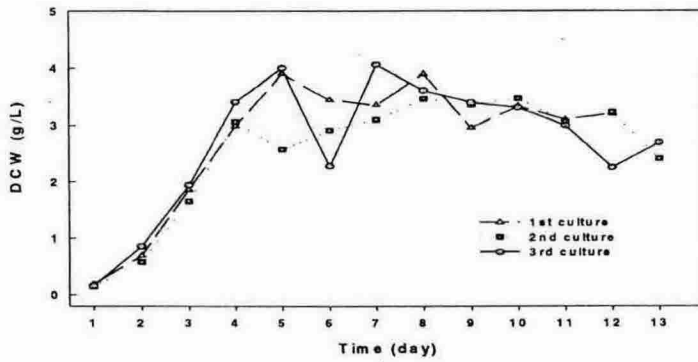


Fig.1 Time course changes of *Thraustochytrium aureum* cell growth in three different culture

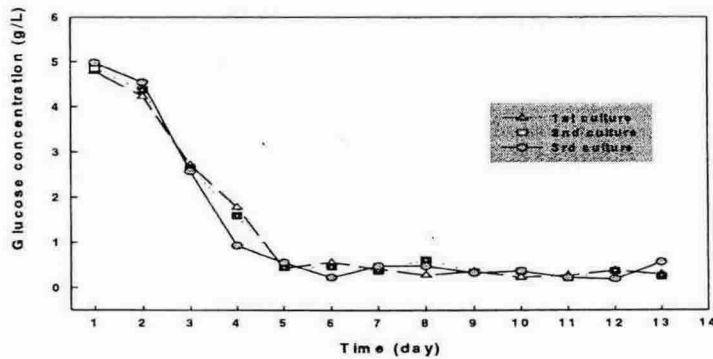


Fig.2 Time course changes of glucose consumption in *Thraustochytrium aureum* cell culture

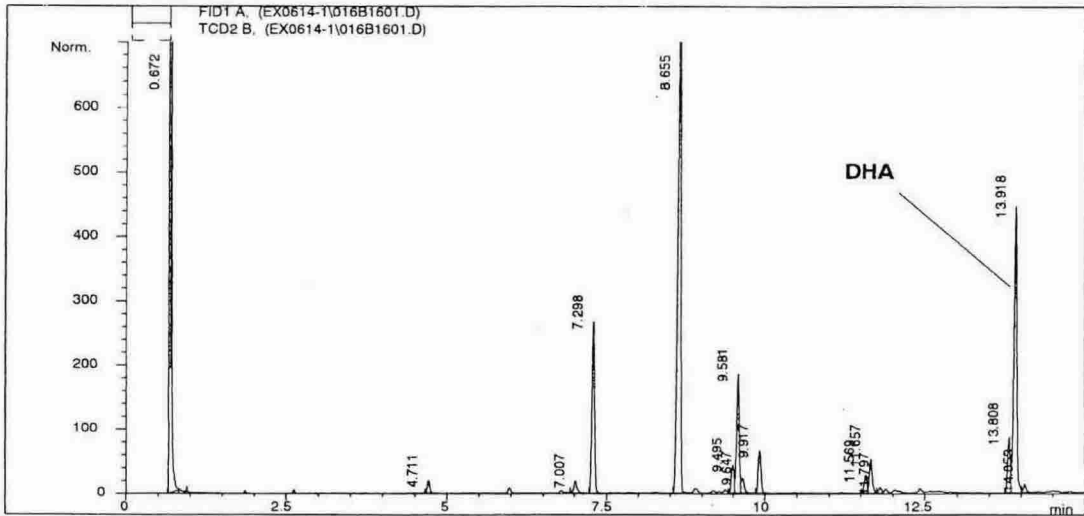


Fig.3 GC profile of fatty acids composition producing by *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304

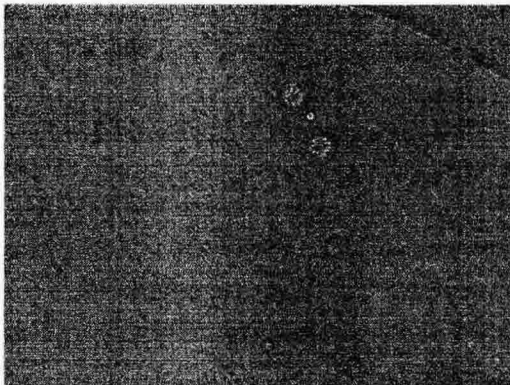


Fig.4 Picture of *Thraustochytrium aureum* before sporangium disruption

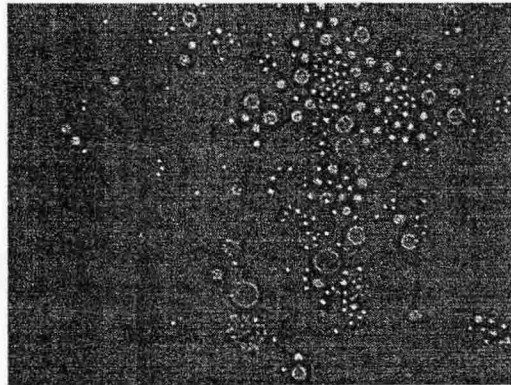


Fig.5 Picture of *Thraustochytrium aureum* after sporangium disruption