

## 배양방법에 따른 *Euglena gracilis*의 성장 및 지방산 조성

정우철 · 최종국 · 강창민<sup>1</sup> · 최병대 · 강석중\*

경상대학교 해양식품생명의학과, <sup>1</sup>안전성평가연구소 경남환경독성분부

### Effects of Culture Methods on the Growth Rates and Fatty Acid Profiles of *Euglena gracilis*

U-Cheol Jeong, Jong-Kuk Choi, Chang-Min Kang<sup>1</sup>, Byeong-Dae Choi and Seok-Joong Kang\*

Department of Seafood and Aquaculture Science, Gyeongsang National University, Tongyeong 53064, Korea

<sup>1</sup>Institute of Toxicology, Jinju 52834, Korea

The quality and quantity of live food sources strongly influence the success of fish production in farming operations. Thus, critical studies of live forage species are a crucial element for progress in fish aquaculture. The fat content of food is an especially important determinant of growth in marine fish. Omega-3 highly unsaturated fatty acids (HUFA) are essential components of diet that determine the nutritional value of larval fish. *Euglena* is a protist that has potential as a forage species. These single-celled organisms have plant and animal characteristics they are motile, elliptical in shape and 15–500 µm in diameter. Their nutritional content is excellent, but most studies have focused on cells raised in autotrophic culture. We therefore examined differences in the lipid and fatty acid contents, and the growth of *Euglena* cells grown under autotrophic, heterotrophic, and mixotrophic conditions. Biomass production reached 15.03 g/L, 12.28 g/L, and 3.66 g/L under mixotrophy, heterotrophy, and autotrophy, respectively. The proportional n-3 HUFA content differed among culture methods: 10.04%, 5.80% and 10.01% in mixotrophic, heterotrophic and autotrophic cultures, respectively. Mixotrophy was to be the best form of cultivation for improving the growth and nutritional content of *Euglena*.

Key words: *Euglena gracilis*, Fatty acid, Heterotrophic, Autotrophic, Mixotrophic

### 서론

유글레나(euglenoids)는 직경 15-500 µm 크기의 나선형 모양으로 꼬인 길쭉한 방추형인데 매우 자유롭게 변형하며, 체내에 엽록체를 가지고 광합성을 하는 점으로 보아 식물에 속한다고 하지만, 세포벽이 없고 편모로 유영생활을 하므로 원생동물의 편모충류로 취급하기도 한다(Rodríguez-Zavala et al., 2010). 즉, 식물과 동물의 중간에 위치한다고 볼 수 있는데 엽록소를 가지고 광합성을 하는 것은 식물적 특성이며, 입이나 수축포를 가지고 자유롭게 움직이는 것은 동물적 특성에 속한다(Ruiz et al., 2004). 대부분 담수에서 살며 작은 연못이나 도랑에서 흔히 볼 수 있고 내만의 염수역에서도 볼 수 있다. 현재, 유글레나를 함유하는 조류에 의한 유용물질 생산의 가능성에 관해서 각종 산

업계가 주목하고 있으며(Hayashi et al., 1994; Chisti and Yan, 2011), 유글레나 분말은 식품으로서의 실용화가 이미 수행되고 있으며(Choi et al., 2004), 고등식물에 비하여 석유화학 대체원료, 혹은 연료의 원료 등 유용물질을 고수율로서 생산할 수 있는 능력을 가지고 있다(Ishikawa et al., 2008; Lira-Silva et al., 2011). 또한 수많은 미세조류 중에서도 여러 분야에서 유용성이 기대되고 있는 유글레나는 광합성을 통해 대기 중 이산화탄소를 섭취해 고정하고 산소를 배출하므로 이를 이용한 하폐수의 영양염류 제거 및 회수된 바이오매스를 Bio-fuel로 생산하는 시스템 개발을 위한 연구가 진행되고 있다(Navarro et al., 1997; Ramalho et al., 1998; Tucci et al., 2006; Jasso-Chavez et al., 2010). 현재 유글레나의 배양방법으로는 자가영양 배양방법과 타가영양 배양방법으로 이루어지고 있으나, 대부

<http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2016.0038>



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Korean J Fish Aquat Sci 49(1) 038-044, February 2016

Received 16 January 2016; Revised 16 February 2016; Accepted 17 February 2016

\*Corresponding author: Tel: +82. 55. 772. 9154 Fax: +82. 55. 644. 4202

E-mail address: sjkang@gnu.ac.kr

분의 배양방법은 자가영양(autotrophic) 배양방법이 주를 이루고 있다(Chae et al., 2006). 타가영양 배양방법은 제한적이기는 하지만, 유글레나는 자가영양배양과 타가영양배양이 모두 가능한 것으로 알려져 있다(Dos et al., 2007). 타가영양배양방법은 자가영양배양방법과 달리 광조사가 필요하지 않으며, 성장률이 높다는 장점이 있다(Regnault et al., 1995). 유글레나는 여러 가지 기능성물질을 생산하는 것으로 알려져 있으며,  $\beta$ -1,3 glucan으로 구성된 파라밀론(paramylon)은 천연플라스틱을 만드는 원료로도 사용되어지고 있다 (Barsanti et al., 2000ab; Choi et al., 2013). Vitamin E 를 포함한 영양소가 높기 때문에 식품첨가물로도 사용되고 있으며, 지질함량이 15-24% (dry weight)로 높기 때문에 바이오연료 생산에 관한 연구도 이루어지고 있다(Navarro et al., 1997). 유글레나 자체의 바이오매스(Biomass)는 일반적으로 식품(Food), 섬유(Fiber), 사료(Feed), 비료(Fertilizer), 연료(Fuel)의 순서로 부가가치가 높다(Rocchetta et al., 2006; Courchesne et al., 2009). *E. gracilis*는 세포 건조량의 20% 이상이 면역증강제인  $\beta$ -1,3 glucan, 고함유지질(15-24%), 다른 미세조류에는 볼 수 없는 EPA, DHA, 등을 함유하고 있기 때문에 어류 자치어의 먹이생물도 관심을 받고 있다(Harwood, 1988; Hayashi et al., 1994; James and Browse, 1999; Choi et al., 2013). 또한 어류 자치어의 먹이생물인 로티퍼와 알테미아의 영양강화제로도 사용되어지고 있다(Hayashi et al., 1992). 이처럼 수산용 먹이생물로서 각광을 받고 있는 유글레나(*E. gracilis*)가 산업적으로 유용성을 갖기 위해서는 어류 자치어가 요구하는 기능성 물질은 높게 유지하면서 경제성 있는 배양방법의 개발이 절실하다. 따라서 이번 연구에서는 그 기초실험의 일환으로 배양방법에 따른 유글레나의 성장과 지질영양학적인 변화를 조사하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험 주 및 배지

본 실험에 사용된 유글레나는 한국 해양미세조류은행으로부터 *Euglena gracilis* KMMCC-1351를 분양 받아 사용하였으며, 배양에 사용한 기본배지는 Table 1에 나타낸 바와 같이 Cramer-Myers medium (Cramer and Myers, 1952)을 사용하였다. 타가영양배양과 혼합영양배양은 Cramer-Myers medium 를 기본 배지로 사용하여 Glucose 15 g/L, Sodium glutamate 5 g/L 추가하여 제조하였으며, 각각의 배지별로 제조한 후 121 °C에서 15분간 고압멸균하였다.

### 배양방법

배양방법은 자가영양배양(Autotrophic culture), 타가영양배양(Heterotrophic culture) 그리고 혼합영양배양(Mixotrophic culture)으로 하였다. 자가영양배양방법은 1 L 둥근플라스크에 500 mL 용량으로 배양하였으며, 광주기는 18L:6D, 주간의 조

Table 1. Composition of Cramer-Myers (C&M)<sup>1</sup> medium

Components	Concentration
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.0 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.0 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2 g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.2 g
EDTA-3Na·2H <sub>2</sub> O	0.8 g
Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	3.0 mg
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1.8 mg
CoSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.5 mg
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.4 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.2 mg
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.02 mg
Vitamin B <sub>1</sub>	0.1 mg
Vitamin B <sub>12</sub>	0.5 µg
Distilled water final volume	1 L
Final pH	pH 3.5

<sup>1</sup>Cramer-Myers (C&M) medium (Cramer and Myers, 1952).

도는 3,000 lx로 유지하였고, Air는 0.20 µm sterilized air filter (Advantec mfs, Inc., Japan)를 통해 공급하였다. 타가영양배양 방법은 500 mL 삼각플라스크를 이용하여 200 mL 용량으로 배양하였으며, 광주기는 0L:24D로 하였으며, 교반은 진탕배양기 (KSI-200L, Kocon Co., Ltd)를 이용하여 120 rpm으로 하였다. 혼합영양배양방법은 500 mL 삼각플라스크를 이용하여 200 mL 용량으로 배양하였으며, 광주기는 18L:6D, 주간의 조도는 3,000 lx로 유지하였다. 이 때 모든 실험구의 배양온도는 25 ± 0.5 °C로 유지하였다. 초기 접종밀도는 10 × 10<sup>4</sup> cells/mL로 7일간 3반복으로 배양하였고, 2회/일 동일한 시간에 Haemocytometer로 3회 반복 계수하여 평균 세포수를 측정계수하였으며, 배양이 완료된 배양액은 4 °C의 고속원심분리기(UNION 32R, Hanil Science Industrial Co., Ltd. Korea)에서 3,000 rpm으로 25분간 원심분리한 후, 배양액은 버리고 세포만 회수하여 동결 건조하여 분석에 사용하였다.

### 총지질

총 지질 추출은 Bligh and Dyer방법(1959)에 준하였다. 비커에 균체 5 g을 취하여 세포분쇄기(homogenizer AM-12, Nihonseiki Kaisha Co. Ltd., Tokyo, Japan)에서 15,000 rpm로 5분간 분쇄한 후, Chloroform과 Methanol을 2:1로 혼합한 추출 용매를 시료의 2 배량 넣어 하루 동안 방치한 다음 chloroform 층만을 분리하기 위하여 둥근 플라스크 위에 깔때기를 놓고, 그 위에 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 넣어 서서히 chloroform층만 흘러내리게 하였다. 분리된 chloroform 층은 진공회전농축기(Rotavapor R-114, BUCHI)를 사용하여 40 °C이하에서 용매를 완전히 증

발시킨 후, 추출된 총 지질의 무게를 측정하였다. 모든 작업은 질소 기류 하에서 행하였다.

## 지질

지질의 classes 는 TLC/FID와 Iatrorecorder TC-21 intergrator가 장착된 Iatroscan New MK-5 (Iatron Laboratory Inc., Tokyo, Japan)를 이용하여 분석하였다. 분석조건에서 공기의 유속은 2 L/min이며 detector 수소량은 160 mL/min으로, scanning speed는 0.30 cm/s로 하였다. 분석 과정은 먼저 Rod S-III (0.9×150 mm, 석영봉 규산 코팅)를 5분간 수세한 후, 다시 증류수 10 mL로 행군 다음 수분을 증발시키기 위하여 아세톤 10 mL로 씻고 50℃로 조정된 Rod-Dryer (TK-5 Iatron Lab. Inc., Tokyo, Japan)에서 5분간 건조시킨 후 Iatroscan내에서 수소염 이온화불꽃상에서 3회 이상 반복하여 유기물을 완전히 제거시켰다. Rod에 시료 1 µL를 Microdispenser (Drummond Scientific Co., Bromall, PA, USA)로써 점적하여 전개조 (NaCl로 포화시킴)에서 10분간 포화시켰다. 전개용매는 n-hexane : diethyl ether : acetic acid = 97:3:1 (v/v)를 이용하여 약 10 cm까지 전개시킨 후, Rod를 전개조에서 꺼내고 Rod-Dryer에서 5분간 건조시켜서 Iatroscan으로 분석하여 지질획분의 조성비를 구하고 그 함량을 산출하였다. 동정은 표준인 cholesterol ester, free fatty acid, triglyceride, cholesterol 및 phospholipid에 의하여 동정하였다.

## 지방산

지방산 methyl ester 유도체화는 시료 일정량과 내부표준물질(C<sub>23:0</sub> methyl ester) 1 mL (1 mg)를 cap tube에 취하고, 0.5 N NaOH-methanol 용액 1.5 mL를 가하여 질소를 충전한 다음, 100℃에서 8분간 가열하여 검화하였다. 방냉 후 12% BF<sub>3</sub>-methanol 2 mL를 가한 후 tube의 뚜껑을 닫고, 100℃에서 11분간 가열하여 methyl화 하였다. 약 30℃로 냉각한 후 Iso-octane 1 mL를 첨가하고 30초간 vortex mixer로 혼합하였다. 즉시 3 mL의 포화식염수를 가한 다음 흔들어 방치하여 iso-octane층이 분리되도록 하였다. Iso-octane층을 시료 병(4 mL)에 옮긴 후, 다시 Iso-octane 1 mL를 첨가한 다음 흔들어 재추출하여 시료 병에 모으고 이를 지방산 methyl ester 시료로 하였다. 지방산 분석에 사용하는 GLC는 Omegawax™-320 fused-silica capillary column (30 m×0.32 mm×0.25 µm, i.d., Supelco Co., Bellefonte, PA, USA)를 장착한 Clarus 600 (Perkin Elmer Co. Ltd., USA)를 이용하였다. 분석조건으로 Column은 185℃에서 8분간 유지하고 3℃/min씩 230℃까지 상승시킨 후, 10분간 유지하였다. 이 때 주입기는 250℃, 검출기는 270℃ 그리고 carrier gas는 He (1.0 kg/cm<sup>2</sup>)를 사용하였다. 지방산의 분석은 동일조건에서 분석한 표준품의 ECL과 비교하여 동정하였고, 지방산 표준품은 14:0, 16:0, 18:1, 18:2, 18:3, 20:0, 22:1, 24:0 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)과 GC-MS로 동정된 menhaden oil을 사용하였다.

## 통계처리

모든 자료는 SPSS (16.0) 프로그램을 이용하여 분산분석(one-way ANOVA)과 회귀분석(Regression Analysis)을 실시하여 Duncan's multiple range test (Duncan, 1955)로 평균간의 유의성(P<0.05)을 검정하였다.

## 결과 및 고찰

### 배양방법에 따른 성장

*E. gracilis* 를 이용하여 자가영양배양, 타가영양배양 그리고 혼합영양배양방법에 따른 결과는 Fig. 1에 나타난 바와 같다. 배양방법에 따른 세포의 성장 실험은 실험구마다 동일하게 10×10<sup>4</sup> cells/mL로 접종하였다. 자가영양배양방법을 통한 배양 결과는 초기 배양 밀도 10.2×10<sup>4</sup> cell/mL로 접종한 후 12시

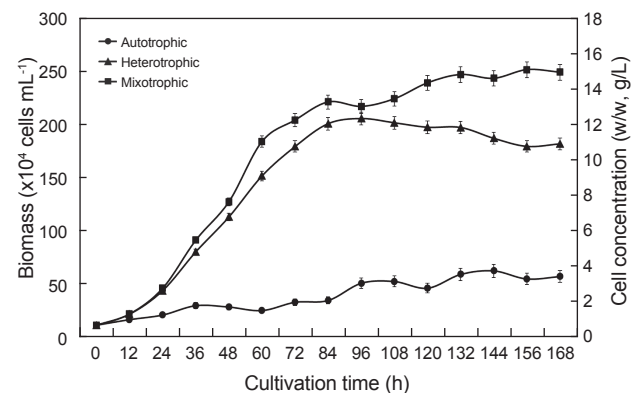


Fig. 1. The effect of cultivation methods on the cell growth of *Euglena gracilis*. Data were means±S.D. of triplicate.

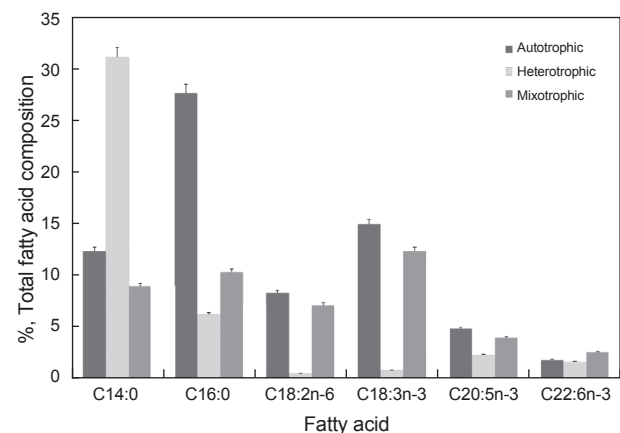


Fig. 2. Fatty acid profile of *Euglena gracilis* grown in different culture conditions. Data were means±S.D. of triplicate.

간 간격으로 성장을 측정하였다. 그 결과 접종 이후 24시간 경과 19.8×10<sup>4</sup> cell/mL, 48시간 경과 27.3×10<sup>4</sup> cell/mL, 72시간 경과 31.8×10<sup>4</sup> cell/mL, 96시간 경과 49.7×10<sup>4</sup> cell/mL, 120시간 경과 45.0×10<sup>4</sup> cell/mL, 144시간 경과 61.3×10<sup>4</sup> cell/mL로 증가하였으며 그 이후 감소하는 경향을 나타냈다. 이로써 자가영양배양에 의한 성장은 접종 후 144시간째 61.3×10<sup>4</sup> cell/mL로 최대 성장을 나타냈으며, 이 때 바이오매스는 4.0 g/L였다. 타가영양배양방법을 통한 배양 결과는 초기 배양 밀도 10.2×10<sup>4</sup> cell/mL로 접종한 후 12시간 간격으로 성장을 측정하였다. 최초 접종 후 24시간 경과 42.7×10<sup>4</sup> cell/mL, 48시간 경과 112.0×10<sup>4</sup> cell/mL, 72시간 경과 178.3×10<sup>4</sup> cell/mL, 96시간 경과 204.6×10<sup>4</sup> cell/mL, 120시간 경과 196.4×10<sup>4</sup> cell/mL, 144시간 경과 186.0×10<sup>4</sup> cell/mL였으며 그리고 168시간 경과 시 180.8×10<sup>4</sup> cell/mL였다. 타가영양배양에 의한 성장은 접종 후 96시간 경과 204.6×10<sup>4</sup> cell/mL일 때 가장 높은 성장을 보였으며, 이 때 바이오매스는 12.0 g/L였으며, 이후 점차 감소하기 시작하였다(*P*<0.05). 이러한 경향은 초기 투여된 배지가 모두 소진되어 더 이상 성장을 할 수 없는 배양조건이 된 것으로 보여짐에 따라 타가영양배양의 경우 배양 시작 후 84시간 전후로 추가 배지 공급이 이루어져야 지속적인 성장이 이루어질 것으로 사료된다. 혼합영양배양방법으로 배양한 결과는 초기 배양 밀도 10.2×10<sup>4</sup> cell/mL로 접종한 후, 12시간 간격으로 성장 측정을 하였다. 그 결과 접종 후 24시간 경과 45.0×10<sup>4</sup> cell/mL, 48시간 경과 126.3×10<sup>4</sup> cell/mL, 72시간 경과 203.2×10<sup>4</sup> cell/mL, 96시간 경과 216.0×10<sup>4</sup> cell/mL, 120시간 경과 238.2×10<sup>4</sup> cell/mL, 144시간 경과 242.4×10<sup>4</sup> cell/mL였으며 그리고 168시간 경과 후 248.2×10<sup>4</sup> cell/mL였다. 혼합영양배양에 의한 성장은 접종 후 156시간 후에 250.6×10<sup>4</sup> cell/mL로 이 때 가장 높은 성장을 보였으며(*P*<0.05), 이 때 바이오매스는 15.0 g/L였다. 배양방법에 따른 세포의 성장 실험은 실험구마다 동일하게 10×10<sup>4</sup>cells/mL로 접종하였다. 자가영양배양구에서는 접종 후 서서히 증가하는 경향을 보이며, 접종 후 144시간 경과시점에서 61.3×10<sup>4</sup>cells/mL로 가장 높게 나타났지만(*P*<0.05). 타가영양배양과 혼합영양배양에서는 접종 후 급격히 증가하는 경향을 보이며, 타가영양배양의 경우는 접종 후 84시간째 199.8×10<sup>4</sup>cells/mL로 급격한 증가를 보였으며 이후 증가 속도가 낮아지며 96시간째 204.6×10<sup>4</sup>cells/mL로 가장 높게 나타났지만(*P*<0.05). 혼합영양배양의 경우는 접종 후 84시간째 220.2×10<sup>4</sup>cells/mL까지 급격한 증가를 보였으나, 이후 증가 속도가 낮아지며 168시간 배양 후에 250.2×10<sup>4</sup> cells/mL로 가장 높은 성장을 나타내었다(*P*<0.05). 이로써 배양방법에 따른 *E. gracilis*의 배양 결과는 혼합영양배양방법을 통한 배양이 가장 높은 성장을 나타냈으며, 다음으로 타가영양배양법 그리고 자가영양배양법 순으로 나타났다. 이로써 성장측면에서 *E. gracilis*의 생산을 위한 가장 적합한 방법은 혼합영양배양법인 것으로 나타났다.

총 지질 및 지질 종류의 변화

배양방법에 따른 총 지질의 변화는 Table 2에 나타난 바와 같이 자가영양배양방법 18.36%, 타가영양배양방법 21.02%, 혼합영양배양 19.16%으로 타가영양배양방법이 자가영양배양방법에 비하여 총 지질의 함량이 높은 것으로 나타났다(*P*<0.05). 배양방법에 따른 *E. gracilis*의 지질 class조성은 Table 2에 나타난 바와 같다. 극성지질과 비극성지질의 조성을 보면 극성지질이 모든 실험구에서 68.15-91.48%로 지질 조성의 대부분을 차지하였다. 특히 자가영양배양방법을 통하여 배양하였을 때 91.48%로 가장 높게 나타났으며, 그 다음이 혼합영양배양방법을 통한 배양에서 83.72%였으며, 타가영양배양방법을 통한 배양의 경우에 68.15%로 가장 낮게 나타났다(*P*<0.05). 자가영양배양방법이 타가영양배양방법에 비하여 극성지질이 뚜렷하게 증가하는 이유는 광합성의 유무에 의한 차이로 생각된다. 이러한 경향은 El-Sheekh and Fathy (2009)의 연구결과에서 *Chlorella vulgaris*를 자가영양배양과 타가영양배양의 조건에서 배양하였을 때 자가영양배양방법의 chlorophyll 함량이 타가영양배양방법에 비하여 2 배 증가한다는 결과와 거의 일치하고 있다. 따라서 본 실험에서의 극성지질의 현저한 차이는 chlorophyll 색소, 인지질, 당지질의 증가에 기인할 가능성이 높으므로 향후 이에 대한 자세한 연구가 요망된다.

비극성지질의 조성에서는 모든 실험구에서 triglycerols (TG)가 가장 높게 나타났으며 그 정도는 타가영양배양방법 24.93%, 혼합영양배양방법 12.40%, 자가영양배양방법 5.74%의 순으로 나타났다(*P*<0.05). 이는 극성지질과 역관계를 나타냈다. TG는 에너지원인 저장지질로서 타가영양방법의 배지의 주성분인 포도당이 저장지질로서의 전환 가능성을 나타낸다. Cholesteryl ester (CHOL)의 함량은 자가영양배양방법을 통하여 배양하였을 때 1.91%로 가장 낮게 나타났으며(*P*<0.05), 혼합영양배양방법을 통한 배양에서 2.79%였으며, 타가영양배양방법을 통

Table 2. Lipid classes in cells cultivated under different culture conditions

Lipid class	Culture conditions		
	AC <sup>1</sup>	HC <sup>2</sup>	MC <sup>3</sup>
Total lipids (%)	18.36±0.08	21.02±0.12	19.16±0.05
FFA <sup>4</sup>	0.87±0.06	1.99±0.08	1.09±0.12
TG <sup>5</sup>	5.74±0.07	24.93±0.06	12.40±0.35
CHOL <sup>6</sup>	1.91±0.04	4.93±0.06	2.79±0.02
PL <sup>7</sup>	91.48±0.09	68.15±0.19	83.72±0.23

<sup>1</sup>AC: Autotrophic culture, <sup>2</sup>HC: Heterotrophic culture, <sup>3</sup>MC: Mixitrophic culture, <sup>4</sup>FFA: free fatty acids, <sup>5</sup>TG: triacylglycerols, <sup>6</sup>CHOL: cholesteryl ester, <sup>7</sup>PL: polar lipids and chlorophylls. The values are mean±S.D. (n=3). Different superscript letters within rows represent significant differences between treatments (*P*<0.05).

한 배양의 경우에 4.93%로 가장 높게 나타났다( $P<0.05$ ). 배양 방법에 따라서는 TG와 같은 경향을 나타냈다. Free fatty acids (FFA) 함량은 자가영양배양법을 통하여 배양하였을 때 0.87%로 가장 낮게 나타났으며( $P<0.05$ ), 혼합영양배양법을 통한 배양에서 1.09%였으며, 타가영양배양법을 통한 배양의 경우에 1.99%로 가장 높게 나타났다( $P<0.05$ ). 유글레나의 바이오매스의 획득이 목적이 아니라, 색소와 극성지질과 같은 기능성물질을 중점적으로 얻기 위한 배양방법은 광 조건에서 배양하는 자가영양배양방법이 유효한 것으로 나타났다.

### 지방산 변화

배양방법에 따른 *E. gracilis*의 지방산 조성은 Table 3에 나타난 바와 같다. 자가영양배양, 타가영양배양 그리고 혼합영양배양방법을 통해서 배양된 결과는 포화지방산(Saturated fatty acid)의 경우 자가영양배양, 타가영양배양 그리고 혼합영양배양에서 각각 51.54%, 70.09% 그리고 34.78%로 타가영양배양을 할 경우 포화지방산이 가장 높았으며, 자가영양배양 그리고 혼합영양배양 순으로 나타났다( $P<0.05$ ). 포화지방산의 종류에 있어서도 자가영양배양, 타가영양배양 그리고 혼합영양배양방법에서 공통적으로 16:0, 18:0가 주요 지방산을 차지하였다. 그러나 그 함량에는 배양 방법에 따라 조성비 차이가 큰 것으로 나타났다. 불포화지방산(unsaturated fatty acid)의 경우는 각각 48.46%, 29.91% 그리고 65.22%로 혼합영양배양을 할 경우 불포화지방산이 가장 높았으며, 자가영양배양 그리고 타가영양배양 순으로 나타났다( $P<0.05$ ). 18:3n-3의 경우 자가영양배양 그리고 혼합영양배양에서 각각 14.92% 그리고 12.30%로 나타났으나, 타가영양배양에서는 0.73%로 자가영양배양과 혼합영양배양 한 결과와 비교해서 낮게 나타났으며( $P<0.05$ ). 18:2n-6의 경우 자가영양배양 그리고 혼합영양배양에서 각각 8.23% 그리고 7.06%로 나타났으나, 타가영양배양에서는 0.42%로 자가영양배양과 혼합영양배양 한 결과와 비교해서 낮게 나타났다( $P<0.05$ ). 20:5n-3(EPA)의 경우 자가영양배양, 타가영양배양 그리고 혼합영양배양에서 각각 4.79%, 2.22% 그리고 3.88%로 자가영양배양에서 가장 높았으며, 혼합영양배양 그리고 타가영양배양 순으로 나타났으며( $P<0.05$ ), 22:6n-3(DHA)의 경우는 각각 1.74%, 1.56% 그리고 2.47%로 혼합영양배양을 할 경우 가장 높았으며( $P<0.05$ ), 자가영양배양 그리고 타가영양배양 순으로 나타났다( $P<0.05$ ). 그리고  $\sum$ n-3 HUFA (highly unsaturated fatty acid)의 경우 자가영양배양, 타가영양배양 그리고 혼합영양배양에서 각각 10.01%, 5.80% 그리고 10.04%로 자가영양배양과 혼합영양배양을 할 경우가 높았으며( $P<0.05$ ), 타가영양배양에서는 다른 두 실험구에 비해서 낮게 나타났으며( $P<0.05$ ),  $\sum$ n-6 HUFA의 경우는 각각 8.88%, 8.10% 그리고 10.13%로 혼합영양배양에서 가장 높았으며( $P<0.05$ ), 자가영양배양 그리고 타가영양배양 순으로 나타났다( $P<0.05$ ).

이상의 결과를 종합해 보면 유글레나의 지방산조성은 배양방

Table 3. Fatty acid compositions of *Euglena gracilis* grown in different culture conditions (% of total fatty acids)

Fatty acid	Culture Conditions		
	AC <sup>1</sup>	HC <sup>2</sup>	MC <sup>3</sup>
14:0	12.30±0.20	31.15±0.18	8.90±0.06
15:0	2.28±0.08	17.78±0.14	8.68±0.03
Iso16:0	5.81±0.06	8.93±0.08	0.90±0.01
16:0	27.65±0.18	6.15±0.06	10.25±0.12
16:1n-5	3.08±0.02	3.54±0.03	4.26±0.06
16:2n-4	0.47±0.01	2.00±0.04	1.36±0.04
17:0	0.90±0.01	4.09±0.02	4.37±0.02
16:3n-4	1.26±0.03	3.05±0.01	9.00±0.08
16:3n-1	0.00±0.00	0.12±0.01	0.45±0.01
16:4n-1	0.00±0.00	0.35±0.00	1.54±0.01
18:0	2.45±0.02	1.44±0.03	1.45±0.00
18:1n-9	1.35±0.01	0.79±0.02	3.33±0.03
18:1n-7	0.00±0.00	0.14±0.00	0.71±0.02
18:2n-6	8.23±0.06	0.42±0.01	7.06±0.10
18:2n-4	0.25±0.00	0.15±0.00	1.23±0.08
18:3n-3	14.92±0.10	0.73±0.00	12.30±0.16
18:4n-1	0.00±0.00	1.65±0.03	1.41±0.02
20:0	0.16±0.01	0.54±0.00	0.23±0.01
20:1n-7	0.00±0.00	2.10±0.06	1.43±0.00
20:2n-6	2.55±0.03	1.19±0.02	1.71±0.01
20:3n-6	0.61±0.00	0.69±0.00	0.61±0.00
20:4n-6	3.39±0.03	3.39±0.10	3.64±0.03
20:3n-3	1.38±0.02	0.50±0.00	0.77±0.01
20:4n-3	1.77±0.06	0.74±0.00	1.54±0.02
20:5n-3	4.79±0.08	2.22±0.08	3.88±0.05
22:1n-7	0.00±0.00	0.95±0.02	0.98±0.00
22:4n-6	0.23±0.01	0.99±0.01	1.31±0.03
22:5n-6	2.11±0.06	1.84±0.06	2.87±0.08
22:4n-3	0.05±0.00	0.18±0.00	0.17±0.00
22:5n-3	0.28±0.01	0.61±0.01	1.21±0.03
22:6n-3	1.74±0.02	1.56±0.06	2.47±0.04
SFA <sup>4</sup>	51.54	70.09	34.78
USFA <sup>5</sup>	48.46	29.91	65.22
n-3 HUFA <sup>6</sup>	10.01	5.80	10.04
n-6 HUFA	8.88	8.10	10.13
n-6/n-3	0.89	1.40	1.01

<sup>1</sup>AC: Autotrophic culture, <sup>2</sup>HC: Heterotrophic culture, <sup>3</sup>MC: Mixotrophic culture, <sup>4</sup>SFA: Saturated fatty acid, <sup>5</sup>USFA: Unsaturated fatty acid, <sup>6</sup>HUFA: Highly unsaturated fatty acid. The values are mean±S.D. (n=3). <sup>a</sup> Different superscript letters within rows represent significant differences between treatments ( $P<0.05$ ).

법에 따라서 현저히 달라지는 특징을 나타낸다. 현재 미세조류의 분류 biomarker로서 지방산이 주요한 도구로 사용되고 있으며(Volkman et al., 1998), 유글레나조류는 엽록체의 유무를 기준으로 독립영양군과 종속영양군으로 구분된다. 녹색 유글레나류는 엽록체와 안점(stigma)이 있고, 광합성을 하며, 무색 유글레나는 오랜 진화적 역사를 통해 엽록체를 잃은 것으로 추정된다고 하였으나(Walne 1980), 이번 실험을 통해서 종에 따른 차이보다 광 조사의 유무에 따라 극성지질이 현저히 변동하므로 극성지질의 많은 부분을 차지하고 있는 엽록체의 생성의 차이로 종 분류하는 것은 문제점이 있는 것으로 사료된다. 이처럼 배양방법과 환경조건에 따라 지질 생합성 형태가 달라지므로(Coleman et al., 1988; Girotti 2001), 유글레나를 냉암소에서 starvation 시키면서 지속적으로 관찰한 결과 분류학적으로 중요한 엽록체나 파라미론의 형태적인 변이가 일어나는 점에서(Kim and Boo, 1998; Watanabe and Suzuki, 2002) 향후 여기에 대한 세밀한 연구가 요구된다. 배양방법에 따른 지방산의 변동은 포화지방산의 경우 자가영양배양방법보다 타가영양배양방법에서 높은 함량을 나타내는 반면에  $\Sigma n-3$  HUFA의 경우에는 타가영양배양보다 자가영양배양과 혼합영양배양에서 높게 나타났다( $P < 0.05$ ). 또한 식물류에서 특이적으로 높은 18:2n-6은 자가영양배양과 혼합영양배양에서 높게 나타났다. 이러한 원인은 광의 의한 영향이 큰 것으로 사료된다. 유글레나는 엽록소를 가지고 있어 광합성을 하는 식물성 특성과 입이나 수축포를 가지고 자유롭게 움직이는 동물성 특성 모두를 가지고 있어 광의 유무와 유기탄소원의 공급에 따른 성장 특성이 다르게 나타났다. 자가영양배양에서는 광합성을 통한 식물성 특성의 성장을 보였지만, 타가영양배양에서는 공급된 유기탄소원을 흡수하여 성장을 하는 동물성 특성을 보였다. 혼합영양배양 방법에서는 식물성과 동물성 특성을 모두 보이며 성장한 것으로 사료된다. 또한 배양온도는 미세조류에 의해 생산된 지방산의 종류에 중요한 영향을 미치는 것으로 보고되고 있으며(Thompson et al., 1992), 일반적으로 많은 미세조류 종들은 배양온도가 감소하였을 때 불포화지방산의 비율이 증가하는 것으로 알려져 있다(Jiang and Chen, 2000). 또한 유기탄소원의 농도가 낮으면 지질의 축적이 촉진하였는데 이것은 성장률이 낮았기 때문이라고 보고되고 있으며(Jiang and chen, 1992), 배지의 영양소 중에서 질소 성분이 부족할 경우에 지질 축적이 된다고 알려져 있다(Honda et al., 1998). 이번 실험을 통해서 배양방법에 따른 유글레나의 성장과 오메가-3 고도불포화지방산과 같은 기능성 물질과 지방산의 함량은 달라지는 것으로 나타났다. 유글레나의 성장 측면에서는 유기탄소원을 사용하여 배양하는 것이 안정적인 바이오매스를 확보할 수 있는 것으로 나타났으며, 어류 자치어의 먹이생물로서 지질영양학적인 측면에서는 광을 이용한 배양방법이 우수한 것으로 나타나 양측을 고려해 보면 혼합영양배양을 하는 것이 가장 좋은 것으로 나타났다.

## 사 사

이 논문은 안전성평가연구소에서 2015년도 (바이오화학 소재용 바이오매스의 개발을 위한 유글레나 대량배양 기술개발)으로 수행하는 연구사업의 위탁연구임.

## References

- Barsanti LR, Bastianini A, Passarelli V, Tredici MR and Gualtieri P. 2000a. Fatty acid content in wild type and WZSL mutant of *Euglena gracilis*. *J Appl Phycol* 12, 515-520.
- Barsanti LR, Vismara R, Passarelli V and Gualtieri P. 2000b. Paramylon(b-1,3- glucan) content in wild type and WZSL mutant of *Euglena gracilis*. Effects of growth conditions. *J Appl Phycol* 13, 59-65.
- Bligh EG and Dyer WJ. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37, 911-917.
- Chae SR, Hwang EJ and Shin HS. 2006. Single cell protein production of *Euglena Gracilis* and carbon dioxide fixation in an innovative photo-bioreactor. *Bioresour Technol* 97, 322-329.
- Choi JA, Oh TH, Choi JS, Chang DJ and Joo CK. 2013. Impact of beta-1,3-glucan isolated from *Euglena gracilis* on corneal epithelial cell migration and on wound healing in a rat alkali burn model. *Curr Eye Res* 38, 1207-1213.
- Chisti Y and Yan J. 2011. Energy from algae: current status and future trends algal biofuels a status report. *Appl Energy* 88, 3277-3279.
- Choi SW, Park IK and Park BS. 2004. Effect of dietary supplementation of fresh water algae *euglena* on the performance and egg quality and fatty acid composition of egg yolk in laying hens. *Korean J Poult Sci* 31, 283-291.
- Coleman LW, Rosen BH and Schwartzbach SD. 1988. Environmental-control of carbohydrate and lipid-synthesis in *Euglena*. *Plant Cell Physiol* 29, 423-432.
- Courchesne NMD, Parisien A, Wang B and Lan CQ. 2009. Enhancement of lipid production using biochemical, genetic and transcription factor engineering approaches. *J Biotechnol* 141, 31-41.
- Cramer M and Myers J. 1952. Growth and photosynthetic characteristics of *Euglenagracilis*. *Arch Microbiol* 17, 384-402.
- Dos SFV, Rocchetta I, Conforti V, Bench S, Feldman R and Levin M. 2007. Gene expression patterns in *Euglena gracilis*: insights into the cellular response to environmental stress. *Gene* 389, 136-145.
- Duncan DB. 1955. Multiple range and multiple F test. *Biometric* 11, 1-42.
- El-Sheekh MM and Fathy A. 2009. Variation of some nutritional constituents and fatty acid profiles of *Chlorella vulgaris* Beijerinck grown under auto and heterotrophic conditions. *Intern J Botany* 5, 153-159.
- Girotti AW. 2001. Photosensitized oxidation of membrane lip-

- ids: reaction pathways, cytotoxic effects, and cytoprotective mechanisms. *J Photochem Photobiol* 63, 103-113.
- Harwood JL. 1988. Fatty acid metabolism. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 39, 101-138.
- Hayashi M, Toda K, Yoneji T, Sato O and Kitaoka S. 1992. Dietary value of rotifer and artemia enriched with *Euglena gracilis* for red sea bream. *Nippon Suisan Gakkaishi* 59, 1051-1058.
- Hayashi M, Kyoji T, Hiroto I, Reiko K and Shozaburo K. 1994. Effects of shifting pH in the stationary phase of growth on the chemical composition of *Euglena gracilis*. *Biosci Biotech Biochem* 58, 1964-1967.
- Honda D, Yokochi T, Nakahara T, Erata M and Higashihara T. 1998. *Schizochytrium limacinum* sp. nov., a new thraustochytrid from a mangrove area in West Pacific Ocean. *Mycol Res* 102, 439-448.
- Ishikawa T, Nishikawa H, Gao Y, Sawa Y, Shibata H, Yabuta Y, Maruta T and Shigeoka S. 2008. The pathway via D-galacturonate/L-galactonate is significant for ascorbate-biosynthesis in *Euglena gracilis*. *J Biol Chem* 283, 31133-31141.
- James GW and Browse J. 1999. The  $\Delta 8$ -Desaturase of *Euglena gracilis*: An alternate pathway for synthesis of 20-carbon polyunsaturated fatty acids. *Archiv Biochem Biophys* 365, 307-316.
- Jasso-Chávez R, Pacheco-Rosales A, Lira-Silva E, Gallardo-Pérez JC, García N and Moreno-Sánchez R. 2010. Toxic effects of Cr(VI) and Cr(III) on energy metabolism of heterotrophic *Euglena gracilis*. *Aquat Toxicol* 100, 329-338.
- Jiang Y and Chen F. 2000. Effect of temperature and temperature shift on docosahexaenoic acid production by the marine microalgae *Cryptocodinium cohnii*. *JAOCS*, 77, 613-617.
- Kim JT and Boo SM. 1998. Morphology, population size and environmental factors of two morphotypes in *Euglena geniculata* (Euglenophyceae) in Korea. *Algological Studies* 91, 27-36.
- Lira-Silva E, Ramírez-Lima IS, Olín-Sandoval V, García-García JD, García-Contreras R, Moreno-Sánchez R and Jasso-Chávez R. 2011. Removal, accumulation and resistance to chromium in heterotrophic *Euglena gracilis*. *J Hazard Mater* 193, 216-224.
- Navarro L, Torres-Marquez ME, González-Moreno S, Devars S, Hernández R and Moreno-Sánchez R. 1997. Comparison of physiological changes in *Euglena gracilis* during exposure to heavy metals of heterotrophic and autotrophic cells. *Comp Biochem Physiol* 116C, 265-272.
- Ramalho JC, Campos PC, Teixeira M and Nunes MA. 1998. Nitrogen dependent changes in antioxidant system and in fatty acid composition of chloroplast membranes from *Coffea arabica* L. plants submitted to high irradiance. *Plant Sci* 135, 115-124.
- Regnault A, Chervin D, Chammal A, Piton F, Calvayrac R and Mazliak P. 1995. Lipid composition of *Euglena gracilis* in relation to carbon-nitrogen balance. *Phytochemistry* 40, 725-733.
- Rocchetta I, Conforti V, Mazzuca M, Balzaretto V and Ríos deMolina MC. 2006. Effect of chromium on the fatty acid composition of two strains of *Euglena gracilis*. *Environ Pollut* 141, 353-358.
- Rodríguez-Zavala JS, Ortiz-Cruz MA, Mendoza-Hernández G and Moreno-Sánchez R. 2010. Increased synthesis of  $\alpha$ -tocopherol, paramylon and tyrosine by *Euglena gracilis* under conditions of high biomass production. *J Appl Microbiol* 109, 2160-2172.
- Ruiz LB, Rocchetta I, dos Santos Ferreira V and Conforti VTD. 2004. Isolation, culture and characterization of a new strain of *Euglena gracilis*. *New strain of Euglena gracilis*. *Phycol Res* 52, 168-174.
- Thompson PA, Guo M, Harrison PJ and Whyte JNC. 1992. Effects of variation in temperature:  $\omega$  II. On the fatty acid composition of eight species of marine phytoplankton. *J Phycol* 28, 488-497.
- Tucci S, Proksch P and Martin W. 2006. Fatty acid biosynthesis in mitochondria of *Euglena gracilis*. In: Benning, C., Ohlrogge, J. (Eds.), *Advances in Plant Lipid Research: Proceedings of the 17th International Symposium on Plant Lipids*, East Lansing, Michigan, July 2006. Michigan State University Press, pp 133-136.
- Volkman JK, Barrett SM, Blackburn SI, Mansouf MP, Siwes EL and Gelin F. 1998. Microalgal biomarkers: A review of recent research developments. *Org Geochem* 29, 1163-1179.
- Walne PL. 1980. In *phytoflagellates*. Elsevier, north Holland. Euglenoid flagellates pp. 165-212
- Watanabe M and Suzuki T. 2002. Involvement of reactive oxygen stress in damium-induced cellular damage in *Euglena gracilis*. *Comp Biochem Physiol Part C* 131, 491-500.