

## Mixotrophic 배양조건에 따른 *Euglena gracilis*의 성장과 지질에 미치는 영향

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

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

### Effect of Growth Conditions on the Biomass and Lipid Production of *Euglena gracilis* Cells Raised in Mixotrophic Culture

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

Microalgae are functional foods because they contain special anti-aging inhibitors and other functional components, such as eicosapentaenoic acid (EPA), docosahexaenoic acid (DHA), and omega-3 polyunsaturated fatty acids. Many of these functional dietary components are absent in animals and terrestrial plants. Thus, microalgae are widely utilized in human functional foods and in the feed provided to farmed fish and terrestrial livestock. Many marine organisms consume microalgae, often because they are in an appropriate portion of the cell size spectrum, but also because of their nutritional content. The nutritional requirements of marine organisms differ from those of terrestrial animals. After hatching, marine animals need small live forage species that have high omega-3 polyunsaturated fatty acid contents, including EPA and DHA. *Euglena* cells have both plant and animal characteristics; they are motile, elliptical in shape, 15-500  $\mu\text{m}$  in diameter, and have a valuable nutritional content. Mixotrophic cell cultivation provided the best growth rates and nutritional content. Diverse carbon (fructose, lactose, glucose, maltose and sucrose) and nitrogen (tryptone, peptone, yeast extract, urea and sodium glutamate) supported the growth of microalgae with high lipid contents. We found that the best carbon and nitrogen sources for the production of high quality *Euglena* cells were glucose ( $10 \text{ g L}^{-1}$ ) and sodium glutamate ( $1.0 \text{ g L}^{-1}$ ), respectively.

Key words: *Euglena gracilis*, Fatty acid, Carbon sources, Nitrogen sources, Mixotrophic

### 서론

유글레나는 엽록체를 가지고 광합성을 하는 점에서 식물로 취급하지만, 세포벽이 없고 편모로 유영생활을 하는 점에서 동물의 편모충류로 분류하기도 한다(Ruiz et al., 2004; Rodríguez-Zavala et al., 2010). 유글레나는 Vitamin E, Pramylon과 같은 기능성 물질 뿐만 아니라 EPA와 DHA 같은 오메가-3 고도불포화지방산을 함유하고 있기 때문에 어류 자치어의 먹이생물도 관심을 받고 있다(Harwood, 1988; Hayashi et al., 1993; James and Browse, 1999; Barsanti et al., 2000; Choi et al., 2013). 이들 기능성물질과 지방산의 함량은 자가영양배

양(autotrophic), 타가영양배양(heterotrophic) 및 혼합영양배양(Mixotrophic) 배양조건에 따라서 달라진다(Wen and Chen, 2003; Wang et al., 2012). 즉 목적하는 기능성물질을 얻기 위해서는 배양방법의 결정이 중요하다. 전보(Jeong et al., 2015)의 연구에 의하면 유글레나의 바이오매스와 오메가-3 고도불포화지방산의 함량 측면에서는 혼합배양방법이 최적배양방법인 것으로 나타났다. 따라서 본 실험에서는 혼합영양배양 조건하에서 배양온도와 pH와 같은 물리적 환경조건과 탄소원, 질소원 및 C/N비율과 같은 영양조건을 달리했을 때 다른 유글레나의 성장과 지질에 미치는 최적 배양조건을 구하고자 하였다.

<http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2016.0030>



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) 030-037, February 2016

Received 19 January 2016; Revised 15 February 2016; Accepted 16 February 2016

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

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

## 재료 및 방법

### 실험균주 및 배양방법

본 실험에 사용된 균주 *Euglena gracilis* KMMCC-1351는 한국해양미세조류은행(KMMCC) 으로부터 분양 받아 사용하였으며, 배양에 사용한 배지는 Table 1에 나타낸 바와 같이 Hutner medium (Leticia et al., 1997)을 사용하였다. 제조한 배지는 121 °C에서 15분간 고압 멸균하여, 초기 접종은 0.62 g/L로 7일간 3반복으로 배양하였으며, 바이오매스의 측정은 고속원심분리기(UNION 32R, Hanil Science Industrial Co., Ltd. Korea)에서 3,000 rpm으로 25분간 원심 분리한 후, 배양액은 버리고 세포만 측정하였다.

### 배양온도와 pH

배양온도에 따른 실험은 진탕배양기(KSI-200L, Koencan Co., Ltd)를 이용하여 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C 그리고 35 °C로 실시하였으며, pH에 따른 실험은 0.1 N HCl과 0.1 N NaOH를 이용하여 pH 3.5, pH 4.5, pH 5.5, pH 6.5, pH 7.5 그리고 pH 8.5로 실험을 실시하였다. 배양이 완료된 배양액은 4 °C의 고속원심분리기(UNION 32R, Hanil Science Industrial Co., Ltd. Korea)에서 3,000 rpm으로 25분간 원심 분리한 후, 배양액은 버리고 세포만 회수하여 동결 건조하여 분석에 사용하였다.

Table 1. Composition of Hutner medium

Component	Concentration
Glucose	15.0 g,
Sodium glutamate	5.0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.4 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.2 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5 g
CaCO <sub>3</sub>	0.2 g
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	0.0144 g
Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	10 mg
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1.16 mg
CoSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.38 mg
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	4.4 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.3 mg
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.32 mg
Vitamin B <sub>1</sub>	2.5 mg
Vitamin B <sub>12</sub>	20 µg
Distilled water final volume	1 L
Final pH	pH 3.5

<sup>1</sup>Hutner medium (Leticia et al., 1997).

### 탄소원과 질소원

영양조건에 따른 실험은 탄소원의 종류, 질소원의 종류 그리고 C/N 비율에 따른 실험을 실시하였다. 탄소원에 따른 성장은 Hutner medium 을 기본배지에 탄소원인 Glucose 를 제외하여 Fructose, Lactose, Glucose, Maltose 그리고 Sucrose를 각각 1.5% (w/v)로 공급하여 배양하였다. 질소원에 따른 성장은 Hutner medium 을 기본배지에 질소원인 sodium glutamate 을 제외하여 Tryptone, Peptone, Yeast extract, Urea 그리고 sodium glutamate 사용하여 각각 0.5% (w/v) 공급하여 배양하였다. C/N 비율에 따른 성장은 탄소원으로 glucose와 질소원으로 sodium glutamate 를 이용하여 질소원인 sodium glutamate 1.0 g/L으로 고정시키고, 탄소원인 glucose 농도를 각각 1.0 g/L, 5.0 g/L, 10 g/L, 20 g/L 그리고 30 g/L 공급하여 C/N 비율이 각각 1, 5, 10, 20 그리고 30 비율로 조정하여 배양하였다. 이때의 배양온도는 25 ± 0.5 °C, 광주기는 18L:6D, 주간의 조도는 3,000 lx로 유지하였다.

### 분석방법

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 2배량 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 증발시킨 후, 추출된 총 지질의 무게를 측정하였다. 모든 작업은 질소 기류 하에서 행하였다. 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 °C에서 8분간 가열하여 검화하였다. 방냉 후 12% BF<sub>3</sub>-methanol 2 mL를 가한 후 tube의 뚜껑을 닫고, 100 °C에서 11분간 가열하여 methyl화 하였다. 약 30 °C로 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 °C에서 8분간 유지하고 3 °C/min씩 230 °C까지 상승시킨 후, 10분간 유지하였다. 이 때 주입기는 250 °C, 검출기는 270 °C 그리고 carrier gas는 He (1.0 kg/cm<sup>2</sup>)을 사용하였

다. 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

### 배양온도와 pH에 따른 영향

배양온도와 pH에 따른 *E. gracilis*의 성장은 Fig. 1에 나타낸 바와 같다. 배양온도 15°C, 20°C, 25°C, 30°C 그리고 35°C에서 실험구마다 0.62 g/L로 접종하여 1일 경과 후 각각 0.68 g/L, 0.78 g/L, 1.06 g/L, 1.03 g/L 그리고 0.98 g/L였으며, 2일 경과 후에는 1.88 g/L, 2.36 g/L, 3.10 g/L, 2.83 g/L 그리고 2.68 g/L였다. 3일 경과 후 15°C, 20°C, 25°C, 30°C 그리고 35°C 구에서

각각 3.28 g/L, 4.83 g/L, 5.67 g/L, 5.22 g/L 그리고 5.01 g/L였으며, 4일 경과 후에는 각각 4.86 g/L, 6.78 g/L, 8.22 g/L, 7.83 g/L 그리고 7.12 g/L로 성장하였다. 5일 경과 후 15°C, 20°C, 25°C, 30°C 그리고 35°C 구에서 각각 5.82 g/L, 9.16 g/L, 10.05 g/L, 9.82 g/L 그리고 9.35 g/L였으며, 6일 경과 후에는 각각 7.08 g/L, 10.82 g/L, 12.06 g/L, 11.56 g/L 그리고 10.60 g/L로 성장하였다. 7일 경과 후 15°C, 20°C, 25°C, 30°C 그리고 35°C 구에서 각각 7.83 g/L, 12.25 g/L, 13.12 g/L, 12.80 g/L 그리고 11.88 g/L로 성장하여 배양온도에 따른 성장은 25°C에서 가장 높은 성장은 나타내었지만 30°C구와 유의적인 차이는 보이지 않았다( $P < 0.05$ ). 다음으로 20°C와 35°C 순으로 나타났으며( $P < 0.05$ ), 15°C구에서 가장 낮은 성장을 보였다( $P < 0.05$ ). 이로서 *E. gracilis*의 성장에 가장 적합한 배양온도는 25-30°C로 나타났다. pH에 따른 pH 3.5, pH 4.5, pH 5.5, pH 6.5, pH 7.5 그리고 pH 8.5에서 실험구마다 동일하게 0.62 g/L로 접종하여 1일 경과 후 각각 1.08 g/L, 1.00 g/L, 0.88 g/L, 0.68 g/L, 0.78 g/L 그리고 0.80 g/L였으며, 2일 경과 후에는 3.08 g/L, 2.66 g/L, 1.90 g/L, 1.18 g/L, 1.88 g/L 그리고 2.50 g/L로 성장하였다. 3일 경과 후 pH 3.5, pH 4.5, pH 5.5, pH 6.5, pH 7.5 그리고 pH 8.5에서 각각 5.46 g/L, 5.03 g/L, 2.98 g/L, 2.08 g/L, 3.08 g/L 그리고 4.86 g/L였으며, 4일 경과 후에는 각각 8.10 g/L, 7.22 g/L, 4.60 g/L, 3.16 g/L, 4.36 g/L 그리고 7.02 g/L로 성장하였다. 5일 경과 후 pH 3.5, pH 4.5, pH 5.5, pH 6.5, pH 7.5 그리고 pH 8.5에서 각각 10.6 g/L, 8.96 g/L, 5.81 g/L, 4.50 g/L, 5.62 g/L 그리고 9.11 g/L였으며, 6일 경과 후에는 각각 12.38 g/L, 9.96 g/L, 7.02 g/L, 5.52 g/L, 6.88 g/L 그리고 10.50 g/L로 성장하였다. 7일 경과 후 pH 3.5, pH 4.5, pH 5.5, pH 6.5, pH 7.5 그리고 pH 8.5에서 각각 13.60 g/L, 10.80 g/L, 7.82 g/L, 6.38 g/L, 7.22 g/L 그리고 11.30 g/L로 성장하여 pH에 따른 성장은 pH 3.5에서 가장 높은 성장은 나타내었으며( $P < 0.05$ ), 다음으로 pH 8.5와 pH 4.5로 나타났다( $P < 0.05$ ). 대부분의 미생물들은 pH 6.5-7.5의 중성적인 환경에서 잘 생육하는 것과는 다르게 pH 3.5와 pH 8.5같은 극한의 환경에서 성장이 우수한 것으로 나타났다.

배양온도와 pH에 따른 *E. gracilis*의 지질함량은 Fig. 2에 나타낸 바와 같다. 배양온도 15°C, 20°C, 25°C, 30°C 그리고 35°C에서 각각 18.8%, 18.7%, 19.6%, 20.2% 그리고 20.6%로 배양온도에 따른 지질함량의 실험구들 간의 차이는 보이지 않았으며( $P < 0.05$ ), pH에 따른 pH 3.5, pH 4.5, pH 5.5, pH 6.5, pH 7.5 그리고 pH 8.5에서 지질함량은 각각 18.6%, 17.7%, 18.8%, 17.2%, 17.6% 그리고 18.6%로 pH에 따른 지질함량의 실험구들 간의 차이는 없는 것으로 나타났다( $P < 0.05$ ).

배양온도에 따른 *E. gracilis*의 지방산 조성은 Table 2에 나타낸 바와 같다. 포화지방산의 경우 15°C, 20°C, 25°C, 30°C 그리고 35°C에서 각각 30.90%, 33.79%, 37.93%, 42.45% 그리고 48.23%로 배양 온도가 상승할수록 증가하는 것으로 나타났으며( $P < 0.05$ ), 불포화지방산의 경우는 각각 69.10%, 66.21%,

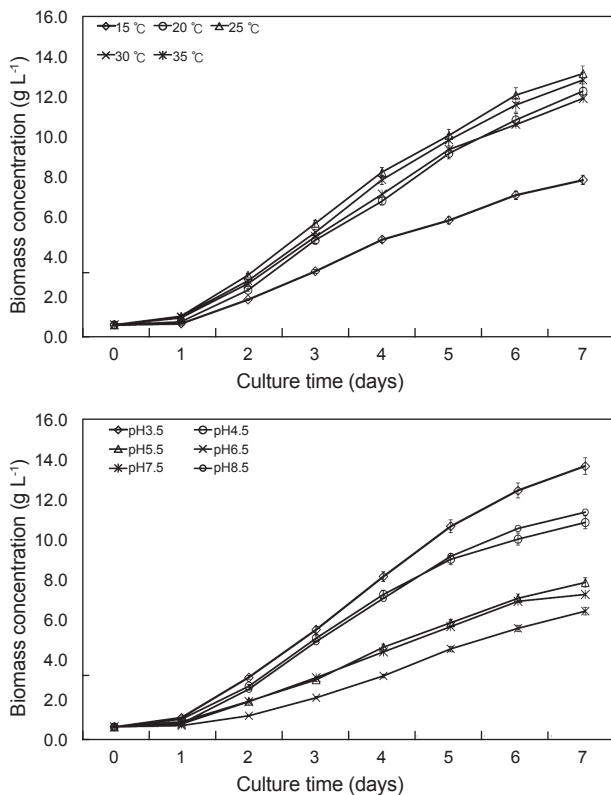


Fig. 1. Biomass concentration of *Euglena gracilis* with various temperature and initial pH. (A) Effect of temperature (B) Effect of initial pH.

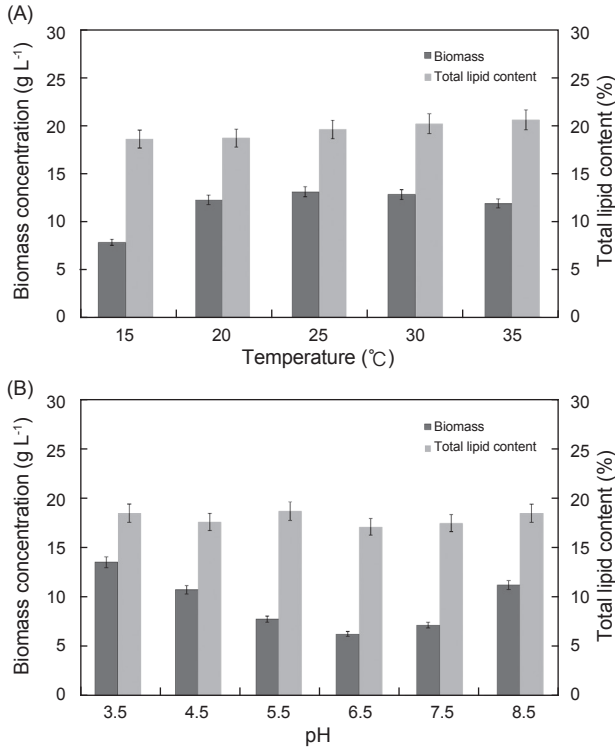


Fig. 2. Biomass concentration and total lipid content of *Euglena gracilis* with various temperature and initial pH. (A) Effect of temperature (B) Effect of initial pH.

62.07%, 57.55% 그리고 51.77%로 배양온도가 상승할수록 감소하는 것으로 나타났다( $P < 0.05$ ). 또한 18:3n-3의 경우 15°C, 20°C, 25°C, 30°C 그리고 35°C에서 각각 11.47%, 10.61%, 9.13%, 5.28% 그리고 2.98%로 나타났으며, 20:5n-3(EPA)의 경우 각각 6.00%, 5.58%, 4.58%, 3.22% 그리고 2.88%였으며, 22:6n-3(DHA)의 경우는 각각 4.56%, 3.93%, 2.66%, 1.66% 그리고 1.28%로 나타났다. 이러한 18:3n-3, 20:5n-3 22:6n-3 모두 배양온도가 높아짐에 따라 낮아지는 경향을 보였다.  $\sum n-3$  HUFA (Highly unsaturated fatty acid)의 경우 15°C, 20°C, 25°C, 30°C 그리고 35°C에서 각각 21.74%, 19.21%, 15.70%, 11.35% 그리고 8.18%로 나타났으며,  $\sum n-6$  HUFA의 경우 각각 20.00%, 21.77%, 15.55%, 17.41% 그리고 17.84%으로 나타났다. 배양온도는 미세조류에 의해 생산된 지방산의 종류에 중요한 영향을 미치며(Ackman et al., 1968; Satu and Murata, 1980; Thompson et al., 1992), 일반적으로 많은 미세조류 종들은 성장온도가 감소하였을 때 불포화지방산의 비율이 증가하는 것으로 알려져 있다(Mortensen et al., 1988; James et al., 1989; Renaud et al., 1999; Oliveira et al., 1999; Jiang and Chen, 2000). 이번 실험을 통해서 배양온도에 따라 유글레나의 지방산조성에도 현저한 차이를 보이는 것으로 나타났다. 특히, 배양온도가 높을수록 포화지방산의 비율은 높아진다는 여

리 문헌의 결과들과 일치하는 결과를 나타내었다. 또한, 특징적인 것은 배양온도가 높아질수록 전형적인  $\sum n-3$  계열이 낮아지는 것으로 나타나 지질영양학적 측면에서 낮은 온도에 배양하는 것이 우수한 것으로 나타나 이는 배양조건에 따른 생산 바이오매스량(biomass)과 영양학적인 측면에서 적정배양온도를 찾는 것이 좋을 곳으로 사료된다. 배양온도에 따른 지방산은 인지질과 sterol 지방산의 함량과 조성은 영향을 받는데 식물 조직세포에서 고도불포화지방산은 12°C에서 80%가 형성되나 20°C와 30°C에서는 각각 51%와 30%의 불포화지방산이 합성되며(Browse and Slack, 1993). 온도가 낮으면 불포화 지방산의 양이 많아지는 반면 배양 온도가 높으면 포화지방산의 양이 많아진다고 보고되고 있다(Neidelman, 1987). 이번 연구에서도 온도가 높아짐에 따라 포화지방산의 비율이 높아지는 것과 일치하는 것으로 나타났다.

### 탄소원과 질소원의 영향

탄소원과 질소원 종류에 따른 실험 결과는 Fig. 3에 나타난 바와 같다. 탄소원으로 Fructose, Lactose, Glucose, Maltose 그리고 Sucrose를 사용하여 배양한 결과는 각각 8.52 g/L, 6.81 g/L, 13.23 g/L, 5.62 g/L 그리고 3.32 g/L로 glucose를 탄소원으로 사용하는 구에서 가장 높은 성장을 보였으며( $P < 0.05$ ), 다음으로 fructose, lactose순으로 높게 나타났다. 총지질 함량은 fructose, lactose, glucose, maltose 그리고 sucrose를 사용하여 배양한 결과는 각각 15.6%, 17.7%, 20.2%, 14.2% 그리고 17.0%로 glucose에서 가장 함량이 높았으며( $P < 0.05$ ), 다음으로 lactose, sucrose 순으로 나타났다( $P < 0.05$ ). 질소원으로 Tryptone, Peptone, Yeast extract, Urea 그리고 sodium glutamate 를 사용하여 배양한 결과는 각각 11.2 g/L, 11.8 g/L, 12.2 g/L, 10.60 g/L 그리고 13.32 g/L로 sodium glutamate 구에서 가장 높은 성장을 보였으며( $P < 0.05$ ), 다음으로 yeast extract, peptone 순으로 나타났다. 총 지질 함량은 tryptone, peptone, yeast extract, urea 그리고 sodium glutamate 를 사용하여 배양한 결과는 각각 15.8%, 17.7%, 16.3%, 14.2% 그리고 19.6%로 sodium glutamate 에서 가장 함량이 높았으며( $P < 0.05$ ), 다음으로 peptone, yeast extract 순으로 나타났다( $P < 0.05$ ). 탄소원과 질소원의 농도에 따른 성장 결과는 Fig. 4에 나타난 바와 같다. 탄소원으로 glucose와 질소원으로 sodium glutamate 를 이용하여 C/N 비율이 각각 1, 5, 10, 20 그리고 30 비율로 조정하여 배양한 결과는 Fig. 4에 나타낸바와 같이 바이오매스는 각각 1.83 g/L, 6.65 g/L, 13.6 g/L, 16.6 g/L 그리고 17.3 g/L로 C/N 비율이 높아짐에 따라 바이오매스량 또한 높아지는 것으로 나타났으나 C/N 비율이 10이상에서 바이오매스량은 성장이 둔화되는 것으로 나타났다. 총 지질 함량은 C/N 비율이 각각 1, 5, 10, 20 그리고 30 비율일 때 각각 18.6%, 17.8%, 20.2%, 22.3% 그리고 21.6%로 C/N 비율이 10, 20, 30 구에서 유의적 차이가 없이 높은 것으로 나타났다( $P < 0.05$ ). 또한 C/N 비율에 따라 탄소원의

Table 2. Fatty acid compositions of *Euglena gracilis* grown in different temperature (% of total fatty acids)

Fatty acid	Temperature				
	15°C	20°C	25°C	30°C	35°C
14:0	9.09±0.18	11.57±0.12	14.21±0.23	17.48±0.08	21.56±0.12
15:0	5.20±0.01	4.96±0.10	7.07±0.16	8.33±0.06	9.74±0.10
16:0	15.13±0.12	15.68±0.20	14.46±0.28	14.40±0.36	14.11±0.32
16:1n-5	1.68±0.01	2.95±0.02	3.95±0.08	3.43±0.02	2.16±0.02
16:2n-4	0.56±0.00	0.83±0.01	1.05±0.02	0.96±0.01	0.86±0.02
17:0	2.42±0.01	1.96±0.02	5.58±0.08	5.82±0.06	5.53±0.08
16:3n-4	4.40±0.02	3.19±0.03	6.90±0.05	5.48±0.13	4.65±0.12
16:3n-1	0.81±0.04	1.00±0.01	0.54±0.00	0.48±0.00	0.50±0.02
16:4n-1	1.34±0.01	0.63±0.00	1.15±0.01	0.30±0.00	0.43±0.02
18:0	1.33±0.02	1.40±0.02	2.04±0.03	2.03±0.02	2.52±0.02
18:1n-9	2.51±0.02	2.13±0.04	2.79±0.02	6.00±0.02	5.04±0.08
18:1n-7	2.18±0.01	2.07±0.02	0.46±0.00	0.52±0.00	0.69±0.02
18:2n-6	3.97±0.02	4.72±0.08	5.91±0.08	5.75±0.02	4.71±0.08
18:2n-4	0.34±0.02	0.35±0.00	0.79±0.00	0.82±0.01	0.72±0.01
18:3n-3	11.47±0.10	10.61±0.16	9.13±0.22	5.28±0.16	2.98±0.12
18:4n-1	1.87±0.02	1.64±0.02	1.04±0.01	0.49±0.00	0.72±0.02
20:0	0.15±0.00	0.18±0.00	0.14±0.00	0.21±0.02	0.30±0.00
20:1n-7	2.71±0.03	2.31±0.01	1.19±0.03	0.37±0.04	0.69±0.01
20:2n-6	3.65±0.04	3.65±0.05	1.32±0.02	1.93±0.02	2.06±0.06
20:3n-6	1.30±0.03	1.92±0.02	1.03±0.03	1.32±0.03	1.27±0.02
20:4n-6	6.35±0.06	7.08±0.06	3.87±0.06	3.99±0.06	6.13±0.08
20:3n-3	1.69±0.02	1.11±0.02	0.55±0.01	1.00±0.01	0.89±0.03
20:4n-3	1.71±0.01	1.50±0.02	1.07±0.01	1.41±0.03	1.44±0.06
20:5n-3	6.00±0.026	5.58±0.03	4.58±0.08	3.22±0.06	2.88±0.05
22:1n-7	0.56±0.00	0.59±0.00	0.79±0.00	0.89±0.02	0.86±0.02
22:4n-6	0.81±0.01	1.20±0.01	1.73±0.03	2.20±0.08	1.66±0.03
22:4n-3	0.22±0.00	0.12±0.00	0.26±0.00	0.21±0.00	0.14±0.00
22:5n-6	3.93±0.02	3.19±0.06	1.70±0.01	2.22±0.06	2.02±0.02
22:4n-3	0.59±0.01	0.76±0.02	0.71±0.00	0.96±0.02	0.58±0.01
22:5n-3	1.45±0.02	1.18±0.01	1.32±0.01	0.82±0.01	0.86±0.01
22:6n-3	4.56±0.06	3.93±0.02	2.66±0.02	1.66±0.07	1.28±0.05
SFA <sup>1</sup>	30.90 <sup>e</sup>	33.79 <sup>d</sup>	37.93 <sup>c</sup>	42.45 <sup>b</sup>	48.23 <sup>a</sup>
USFA <sup>2</sup>	69.10 <sup>a</sup>	66.21 <sup>b</sup>	62.07 <sup>c</sup>	57.55 <sup>d</sup>	51.77 <sup>e</sup>
∑n-3 PUFA <sup>3</sup>	21.74 <sup>a</sup>	19.21 <sup>b</sup>	15.70 <sup>c</sup>	11.35 <sup>d</sup>	8.18 <sup>e</sup>
∑n-6 PUFA	20.00 <sup>b</sup>	21.77 <sup>a</sup>	15.55 <sup>d</sup>	17.41 <sup>c</sup>	17.84 <sup>c</sup>
n-6/n-3	0.92 <sup>d</sup>	1.13 <sup>c</sup>	0.99 <sup>c</sup>	1.53 <sup>b</sup>	2.18 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>SFA: Saturated fatty acid, <sup>2</sup>USFA: Unsaturated fatty acid, <sup>3</sup>PUFA: Poly unsaturated fatty acid. The values are mean±S.D. (n=3). <sup>a-c</sup>Different superscript letters within rows represent significant differences between treatments ( $P<0.05$ ).

소모량을 측정된 결과 C/N 비율이 10 일 때 배양 1, 2, 3, 4, 5, 6 그리고 7일 경과 후 각각 7.82 g L<sup>-1</sup>, 4.86 g L<sup>-1</sup>, 2.08 g L<sup>-1</sup>, 1.23 g L<sup>-1</sup>, 0.36 g L<sup>-1</sup>, 0.12 g L<sup>-1</sup> 그리고 0.08 g L<sup>-1</sup>였으며, C/N 비율

이 20 일 때 각각 17.81 g L<sup>-1</sup>, 13.22 g L<sup>-1</sup>, 9.26 g L<sup>-1</sup>, 7.84 g L<sup>-1</sup>, 6.25g L<sup>-1</sup>, 5.88 g L<sup>-1</sup> 그리고 4.63g L<sup>-1</sup>로 나타났다. C/N 비율이 30 일 때 배양 1, 2, 3, 4, 5, 6 그리고 7일 경과 후 각각 27.83 g

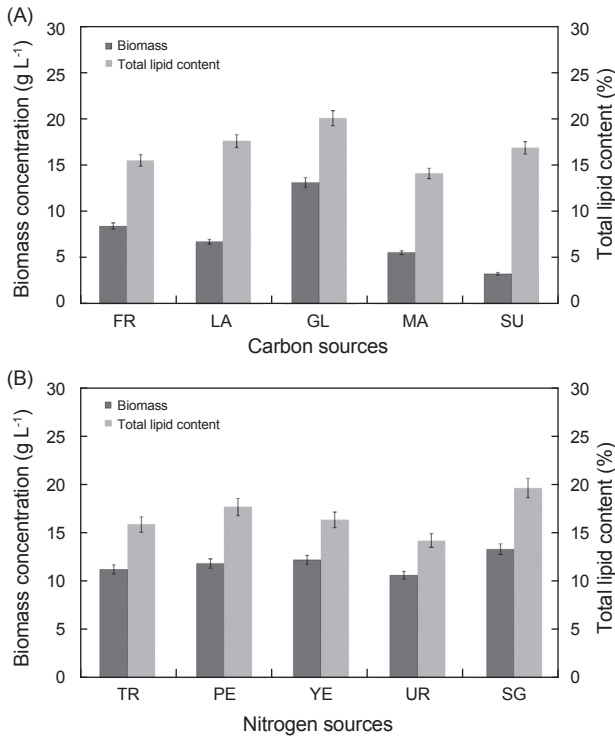


Fig. 3. Biomass concentration and total lipid content of *Euglena gracilis* with various carbon and nitrogen sources. (A) FR: Fructose, LA: Lactose, GL: Glucose, MA: Maltose, SU: Sucrose. (B) TR: Tryptone, PE: Peptone, YE: Yeast extract, UR: Urea, SG: sodium glutamate.

L<sup>-1</sup>, 23.81 g L<sup>-1</sup>, 18.62 g L<sup>-1</sup>, 15.42 g L<sup>-1</sup>, 13.65 g L<sup>-1</sup>, 12.84 g L<sup>-1</sup> 그리고 11.92 g L<sup>-1</sup>로 나타났다. C/N 비율이 10일 때 배양시작 후 5일 경과 시점에서 0.36 g L<sup>-1</sup>로 탄소원의 소모가 거의 완료되는 것으로 나타났지만, C/N 비율이 20과 30 구에서는 7일간 배양하여도 탄소원의 잔류량이 각각 4.63g L<sup>-1</sup>와 11.92 g L<sup>-1</sup>로 탄소원 모두 소모되지 못하고 잔류되는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 C/N 비율이 10일 때 배양 후 5일 경과 시점에서 모두 소모되는 것으로 보아 추가로 배지를 공급할 경우 5일이 경과되지 않는 시점에 추가 공급을 해주는 것이 적당하고 하겠다. 이상의 결과로 C/N 비율이 높아짐에 따라 생산되는 바이오매스는 증가하는 것으로 나타났지만, C/N 비율이 10 이상에서 성장이 현저히 둔화되는 것으로 나타났으며, 배양시간에 따른 탄소원의 소모량을 측정된 결과 C/N 비율은 10일 때 가장 적합한 것으로 사료된다.

미세조류의 생육과 지방산 생성은 배지 조성 및 환경조건에 의해서 영향을 받는다. 유지미생물의 지질축적은 배지의 영양소, 대개는 질소가 고갈되었을 때 시작되며(Honda et al., 1998), glucose 농도가 낮으면 지질의 축적이 촉진하였는데 이것은 성장률이 낮았기 때문이라고 보고되고 있다(Jiang and chen,

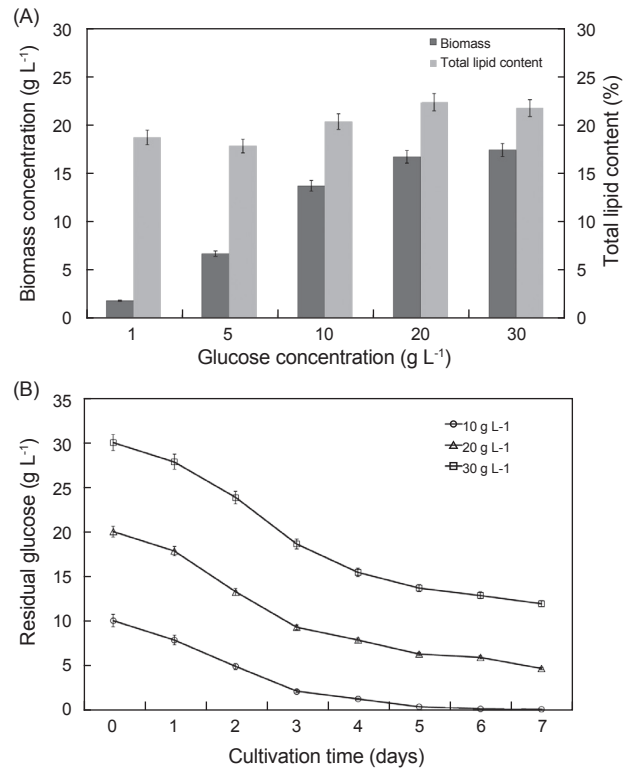


Fig. 4. Effect of glucose concentrations. (A) Effect of glucose concentration on biomass and total lipid content (B) time-course profiles of glucose consumption under various initial glucose concentrations.

1992). 또한 지질 농도는 대수증식기에는 감소되었지만, 미지의 배지성분이 제한되어 생육이 지연되면 증가되었다고 한다(Honda et al., 1998). 질소원의 종류에 따라 지질생성에 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며(Regnault et al., 1995), *M. ramanniana*는 potassium nitrate가 포함된 배지를 사용할 경우 ammonium salts가 포함된 배지를 사용하는 경우보다 생성되는 지질의 농도가 높다고 보고되어 있다(Sajbidor et al., 1990). 또한 유지미생물의 지질축적은 배지의 영양소 중에서 질소 성분이 부족할 경우에 축적이 된다고 알려져 있다(Honda et al., 1998). 또한 배지의 질소량은 녹조류, 세균, 곰팡이의 포화지방산과 불포화지방산의 비율에 영향을 준다고 알려져 있으며(Yokochi et al., 1998), 해양미세조류인 *Dunaliella bardawii*와 *D. salina* 등은 질소원이 고갈된 상태에서 지질함량이 높아진다고 보고되어 있지만(Renaud et al., 1995), 담수미세조류인 *Scenedesmus*와 *Chlorella*에서는 질소원의 농도가 높을 때 지질함량이 증가하는 것으로 보고되고 있다(Piorreck et al., 1984). 또한 곰팡이와 같은 타영양(heterotrophic) 미생물은 질소원뿐만 아니라 탄소원의 농도도 지질생성을 조절하는 것으로 보고되어 있으며(Watanabe et al., 1997; Kim et al., 2005a,

2005b), *Motierella ramanniana* 균체인 경우 C/N비율이 높으면 총 지질함량이 증가할 뿐만 아니라 고도불포화지방산의 수율도 증가되는 것으로 보고되어 있다(Sajbidor et al., 1990). 지질의 농도는 대수증식기에는 감소되었지만, 미지의 배지성분이 제한되어 생육이 지연되면 지질의 생산은 계속 증가되었다고 한다(Honda et al., 1998). 따라서 지질 생산도 생육과 같이 생육제한 조건 즉, 세포의 성장이 이루어지고 정체가 시기에 영양성분이 제한되어 스트레스를 받게 되면 지질함량이 증가되었으며(Navarro et al., 1997), 탄소원을 기질로 이용하여 지질을 생산한다는 사실은 오래 전부터 알려져 왔다(Perez-Garcia et al., 2011). 균중에 따른 지질 생산량과 그 지방질의 조성 등이 많은 연구자에 의하여 밝혀지고 있으며(Fan et al., 2002; Wu et al., 2005; Zhu et al., 2007), 이상의 결과에서 배양방법과 영양성분에 따른 유글레나의 성장은 생리적인 부분에서 많은 차이를 보이는 것으로 보아 배양환경과 영양조건에 따른 변화가 나타나고 있다. 이러한 점을 고려할 때 본 연구는 배양조건에 따른 지방산의 변동에 관한 연구가 거의 미미한 상태에서 그 기여도가 클 것으로 생각한다.

## 사 사

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

## References

- Ackman RG, Tocher CS and McLachlan J. 1968. Marine phytoplankton fatty acids. J Fish Res Board Can 25, 1603-1620.
- Barsanti LR, Bastianini A, Passarelli V, Tredici MR and Gualtieri P. 2000. Fatty acid content in wild type and WZSL mutant of *Euglena gracilis*. J Appl Phycol 12, 515-520.
- Bligh EG and Dyer WJ. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can J Biochem Physiol 37, 911-917.
- 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.
- Duncan DB. 1955. Multiple range and multiple F test. Biometric 11, 1-42.
- Fan KW, Vrijmoed LLP and Jones EBG. 2002. Physiological studies of subtropical mangrove Thraustochytrids. Botanica Marina 45, 50-57.
- 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. 1993. Dietary value of rotifers and artemia enriched with *Euglena gracilis* for red sea bream. Nippon uisan 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.
- James GW and Browse J. 1999. The  $\Delta 8$ -Desaturase of *Euglenagracilis*: An alternate pathway for synthesis of 20-carbon polyunsaturated fatty acids. Archiv Biochem Biophys 365, 307-316.
- James CM, Al-Hinty S and Salman AE. 1989. Growth and  $\omega$ -3 fatty acid and amino acid composition of microalgae under different temperature regimes. Aquaculture 77, 337-351.
- 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 WH, Jeong YS, Park CI and Hur BK. 2005a. The effect of concentration of glucose and salts on both the growth and the production of lipid and DHA of *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304. Kor J Biotech Bioeng 20, 271-277.
- Kim WH, Park SH, Song SK, Bae KD and Hur BK. 2005b. The effect of weight ratio of carbon source to nitrogen source on the growth and the composition of fatty acid of *Thraustochytrium aureum* ATCC34304. Kor J Biotech Bioeng 20, 266-270.
- Mortensen SH, Borsheim KY, Rainuzzo JR and Knutsen G. 1988. Fatty acid and elemental composition of the marine diatom *Chaetoceros gracilis* Schutt. Effect of silicate deprivation, temperature and light intensity. J Exp Mar Bio Ecol 122, 173-185.
- Navarro L, Torres-Marquez ME, Gonza'lez-Moreno S, Devars S, Hernandez R and Moreno-Sa'nchez R. 1997. Comparison of physiological changes in *Euglena gracilis* during exposure to heavy metals of heterotrophic and autotrophic cells. Comp Biochem Physiol 116, 265-272.
- Neidelman SL. 1987. Effect of temperature on lipid unsaturation. Biotech Genetic 5, 245-268.
- Oliveira MAS, Monteiro MP, Robbs PG and Leite SG. 1999. Growth and chemical composition of *Spirulina maxima* and *Spirulina platensis* biomass at different temperatures. Aquacult 7, 261-275.
- Perez-Garcia O, Escalante FME, de-Bashan LE and Bashan Y. 2011. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. Water Res 45, 11-36.
- Piorreck M, Baasch KH and Pohl P. 1984. Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes. Phytoch 23, 207-216.
- Regnault A, Chervin D, Chammal A, Piton F, Calvayrac R, Mazliak P, 1995. Lipid composition of *Euglena gracilis*

- in relation to carbon-nitrogen balance. *Phytochemistry* 40, 725-733.
- Renaud SM, Luong-Van T and Parry DL. 1999. The gross chemical composition and fatty acid composition of 18 species of tropical Australian microalgae for possible use in mariculture. *Aquaculture* 170, 147-159.
- Rodríguez-Zavala JS, Ortiz-Cruz MA, Mendoza-Hernández G and Moreno-Sánchez R. 2010. Increased synthesis of *a*-tocopherol, paramylon and tyrosine by *Euglena gracilis* under conditions of high biomass production. *J Appl Microbiol* 1096, 2160-2172.
- Ruiz LB, Rocchetta I, dos-Santos FV 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.
- Sajbidor J, Dobronova S and Certik M. 1990. Arachidonic acid production by *Mortierella* sp. S-17: influence of C/N ratio. *Biote Lett* 12, 455-456.
- Satu N and Murata N. 1980. Temperature shift-induced responses in lipids in the blue-green alga, *Anabaena variabilis*: The central role of diacylmonoalactosyl glycerol in thermo-adaption. *Biochim Biophys Acta* 619, 353-365.
- 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.
- Wang H, Xiong H, Hui Z and Zeng X. 2012. Mixotrophic cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* with diluted primary pig-gery wastewater to produce lipids. *Biores Tech* 104, 215-220.
- Watanabe K, Ishikawa C, Ohtsuka I, Kamata M, Tomita M, Yazawa K and Muramatsu H. 1997. Lipid and fatty acid composition of a novel docosahexaenoic acid producing marine bacterium. *Lipids* 32, 975-978.
- Wen ZY and Chen F. 2003. Heterotrophic production of eicosa-pentaenoic acid by microalgae. *Biotech Advances* 21, 273-294.
- Wu ST, Yu ST and Lin LP. 2005. Effect of culture conditions on docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium* sp. S31. *Process Biochem* 40, 3103-3108.
- Yokochi T, Honda D, Higashihara T and Nakahara T. 1998. Optimization of docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium limacium* SR21. *Appl Microbiol Biotechnol* 49, 72-76.
- Zhu L, Zhang X, Ji L, Song X and Kuang C. 2007. Changes of lipid content and fatty acid composition of *Schizochytrium limacinum* in response to different temperatures and salinities. *Process Biochem* 42, 210-214.