

발간등록번호

11-1543000-000381-01

산업부산물로부터 바이오오일 및 고부가가치
생물소재 양산 기술 개발

(Production of Bio-oil and Value-added Material from
Waste Biomass)

한국생명공학연구원

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “산업부산물로부터 바이오오일 및 고부가가치 생물소재 양산 기술 개발에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2014 년 01 월 24 일

주관연구기관명 : 한국생명공학연구원

주관연구책임자 : 서 정 우

연 구 원 : 홍 원 경

연 구 원 : 유 안 나

연 구 원 : 박 장 민

협동연구기관명 : (주)젠닥스

협동연구책임자 : 정 화 지

연 구 원 : 박 은 준

연 구 원 : 김 정 근

연 구 원 : 백 가 연

연 구 원 : 신 경 수

요 약 문

I. 제 목

산업부산물로부터 바이오오일 및 고부가가치 생물소재 양산 기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

유채유, 팥유, 대두유와 같은 식물성 유지의 전이에스테르화 반응에 의한 현행 바이오디젤 생산 공정은 필연적으로 다량의 폐글리세롤을 부산물로 배출한다. 폐글리세롤의 대량 발생은 새로운 환경 문제를 야기할 수도 있지만, 효율적인 활용기술의 개발을 통한 고부가가치 산업의 연계는 오히려 바이오디젤 산업의 경쟁력을 강화하여, 바이오디젤의 보급과 원료 작물 재배를 확대함으로써 농가의 수익을 창출하는 효과를 가져 올 것으로 기대된다. 본 연구에서는 *Aurantiochytrium* sp. KRS101를 이용하여 폐글리세롤로부터 바이오오일 및 고부가가치 생물소재의 양산 기술을 개발하고자 함.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 전통 육종법 (UV, 감마선 조사 등)에 의한 *Aurantiochytrium* sp. KRS101의 특성 개량
2. 반응표면분석법을 적용한 *Aurantiochytrium* sp. KRS101의 폐글리세롤 함유 배지 조성의 최적화
3. *Aurantiochytrium* sp. KRS101의 배양 공정 확립, 스케일업 및 표준화
4. *Aurantiochytrium* sp. KRS101 유지성 바이오매스로부터 오일 추출, 정제 기술 개발

IV. 연구개발결과

1. 전통 육종법(UV, 감마선 조사)을 통해 우수한 오일 및 DHA 생산능을 보이는 변이체를 얻음.
2. 산업부산물(폐글리세롤, 당밀, Corn steep liquor, 대두박, 대두분)을 활용 *Aurantiochytrium* sp. KRS101 균주의 배지 및 배양조건 최적화, 또한 이를 통한 미세조류 오일의 경제적 생산 가능성 확인.
3. 폐글리세롤 이용 *Aurantiochytrium* sp. KRS101 균주 배양 공정 스케일업 확립(건조균체량 50.6g/L, 오일함량 38%, DHA함량 50%) .
4. 고유지성 미세조류 오일 추출 공정 확립 및 오일 분석.
5. 고유지성 미세조류 오일의 사업화 타당성 검토.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 특허 및 논문
 - 특허 출원1건, 국외논문 4편 게재, 국외 학회발표 3건
2. (주)젠다스의 유통 및 마케팅
3. 사료첨가제로서의 사업화
4. 고유지성 미세조류 오일을 이용 시제품 제작 및 상품화

SUMMARY

I. Title – Production of Bio-oil and Value-added Material from Waste Biomass

II. Research objectives

Recently, the demand for bio-diesel production from animal fat or plant oil (rapeseed oil, palm oil, soybean oil) is high, and growing. However, a great deal of crude glycerol is formed as the main by-product during bio-diesel production, and can be as much as 10% (w/w) of the bio-diesel generated. Large quantities of crude glycerol may cause new environmental problems but the efficient use of technology in the development, along with high value-added industry is rather to strengthen the competitiveness of the bio-diesel industry. Also, this link leads to bio-diesel supply and raw material crops expansion which is expected to generate profits to farmers. In the research, the purpose is to develop high value-added technology in bio-oil from crude glycerol using *Aurantiochytrium* sp. KRS101.

III. Research contents and spectrum

1. Improvement of *Aurantiochytrium* sp. KRS101 through traditional breeding methods (UV, gamma irradiation, etc.)
2. Statistical optimization of medium component for cultivating *Aurantiochytrium* sp. KRS101 using response surface methodology
3. Optimization, scale-up and standardization of process
4. Extraction and purification of oil from *Aurantiochytrium* sp. KRS101

IV. Results

1. Obtainment of superb mutants that shows high production ability of oil and DHA through traditional breeding methods (UV, gamma irradiation, etc.)
2. Optimization of medium component and culture condition using industrial by-products (crude glycerol, molasses, CSL, soy flour) and also the possible economic production of oil from *Aurantiochytrium* sp. KRS101
3. Scale-up process using crude glycerol is established
4. Oil analysis and extraction of oil from *Aurantiochytrium* sp. KRS101 are established
5. Study the validity of oil from *Aurantiochytrium* sp. KRS101 commercialization

V. Research application

1. Patent and paper – One patent application, four foreign paper publication
2. Distribution and marketing of Gendocs Co., Ltd.
3. Industrialization as a feed additive
4. Commercialization of production used microalga-oil (DHA)

CONTENTS

Chapter I	Project introduction	6
Chapter II	Current status of technology trends	12
Chapter III	Results	16
Chapter IV	Future perspectives	84
Chapter V	Achievement and application	116
Chapter VI	References	147

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	6
제 2 장	국내외 기술개발 현황	12
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	16
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	84
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획	116
제 6 장	참고문헌	147

제 1 장 연구개발과제의 개요

1. 연구배경

(1) 종속영양 미세조류 오일 생산 기술의 필요성

- 바이오디젤의 생산 증가에 따라 원료 물질인 바이오오일에 대한 수요가 급증하면서, 주요한 바이오오일 공급원인 식물성오일 (유채유, 대두유 등)의 가격이 급등하여 곡물 가격이 상승하면서 스태그플레이션이 위험성이 야기되고 있어 대체오일의 확보가 중요함.
- 계절이나 기후 등 환경요인들에 의해 영향을 많이 받고, 광활한 경작지를 필요로 하는 식물성오일과 비교해 미생물오일은 상대적으로 환경의 영향을 덜 받고, 좁은 공간에서도 오일의 생산이 가능한 장점이 있기 때문에 차세대 대체오일로 주목을 받고 있음.
- 특히 종속영양 미생물 오일은 기존의 미생물 배양 설비를 활용하여 폐기성의 유기물 등으로부터 생산이 가능하기 때문에, 국토면적이 협소하고 우수한 미생물 배양 기술을 확보하고 있는 우리나라에서 단기간 내에 산업화가 가능한 대체오일임.
- 효모, 곰팡이, 세균, 미세조류 등 다양한 유지성 미생물(오일의 함량이 균체량의 20%)들이 알려져 있지만, 유기성 미생물오일이 광합성오일과 화석오일에 대한 시장 경쟁력을 확보하기 위해서는 고기능 오일 성분을 활용하는 고부가가치 사업을 연계하는 전략이 반드시 필요함.
- Thraustochytrid 계열 종속영양 미세조류는 바이오매스의 30% 이상의 오일을 생산, 균체 내에 축적하며, 다중불포화지방산, 카로티노이드, 스쿠알렌 다양한 고기능 성분들이 함유되어 있어 차세대 바이오오일 공급원로서 매우 유망함.

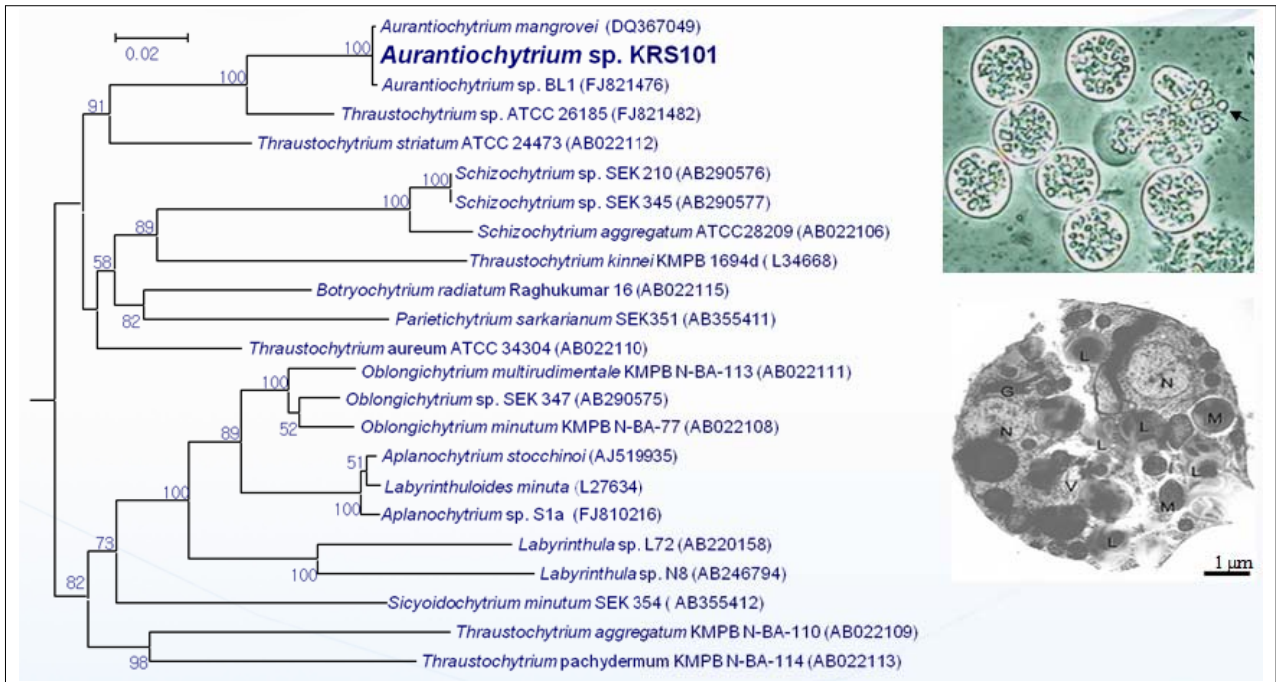


그림 1. 고유지성 Thraustochytrid 계열 종속영양 미세조류

(2) Aurantiochytrium sp. KRS101 DHA 오일의 상업적 중요성

- 대표적 Thraustochytrid계열 종속영양 미세조류 Aurantiochytrium sp. KRS101 균주의 오일은 다량의 다중불포화지방산을 함유하고 있으며, 특히 DHA (Docosahexaenoic acid, 22:6n3)의 함량은 전체 지방산의 50%이상임 (그림 2).

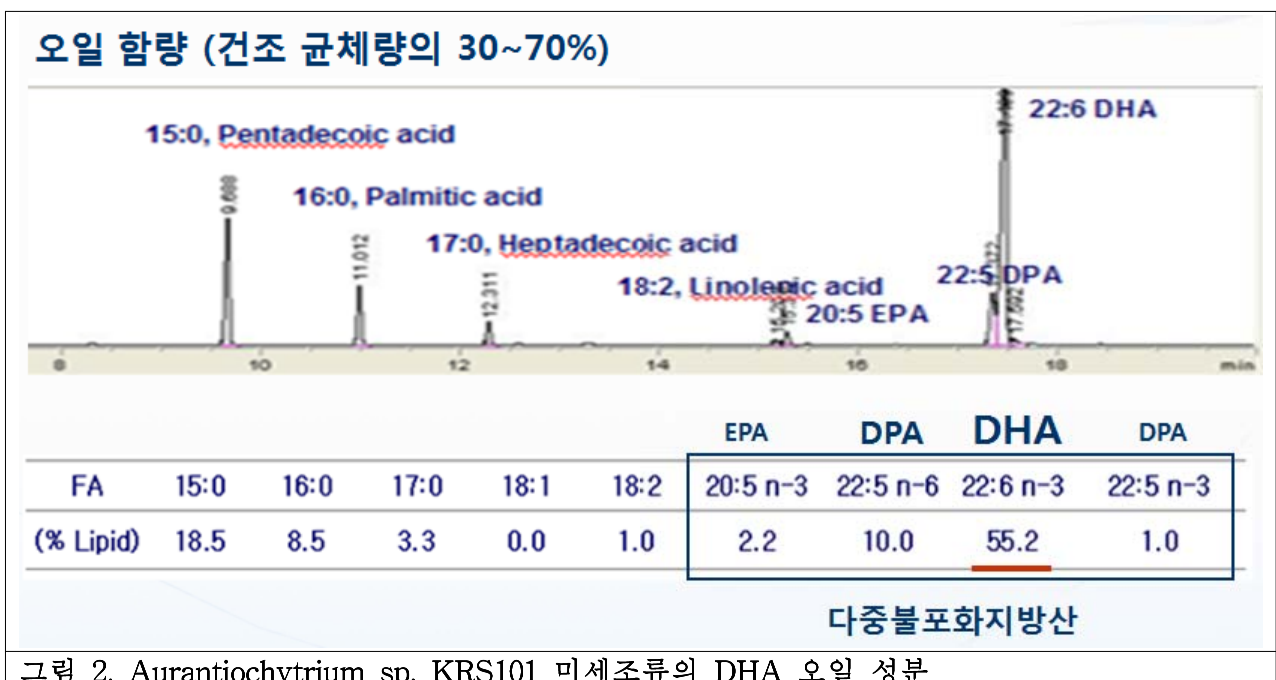


그림 2. Aurantiochytrium sp. KRS101 미세조류의 DHA 오일 성분

○ 인체 내에서 DHA는 콩 등 식물로 섭취한 알파-리놀레닉산 (18:3n-3)으로부터 일부 합성되기는 하지만, 그 양이 워낙 소량이기 때문에 반드시 음식물의 형태로 섭취하여야 하는 필수 영양소임 (Fig.3). 두뇌와 시력의 발달이 활발한 태아, 유아 및 아동기에 DHA의 공급이 원활하지 않을 경우, 뇌신경질환, 정서장애, 정인지체, 학습장애, 과잉행동 증후군 등 다양한 정신질환을 유발할 수 있는 것으로 알려져 있으며, 최근에는 노인성 치매와의 관련성이 밝혀지고 있어 세계보건기구를 비롯한 다양한 국제공인기관들은 매일 꾸준히 DHA 오일의 섭취를 권장하고 있음 (성인 1 g 이상).

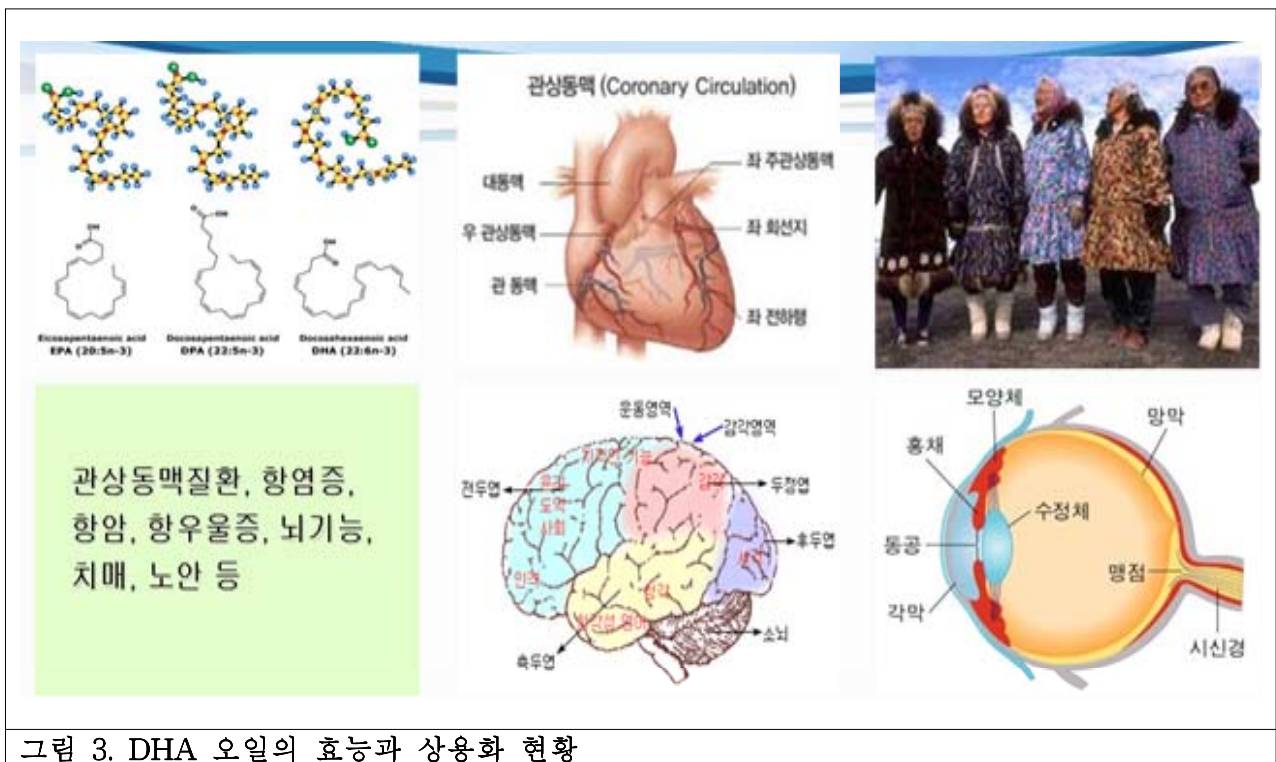
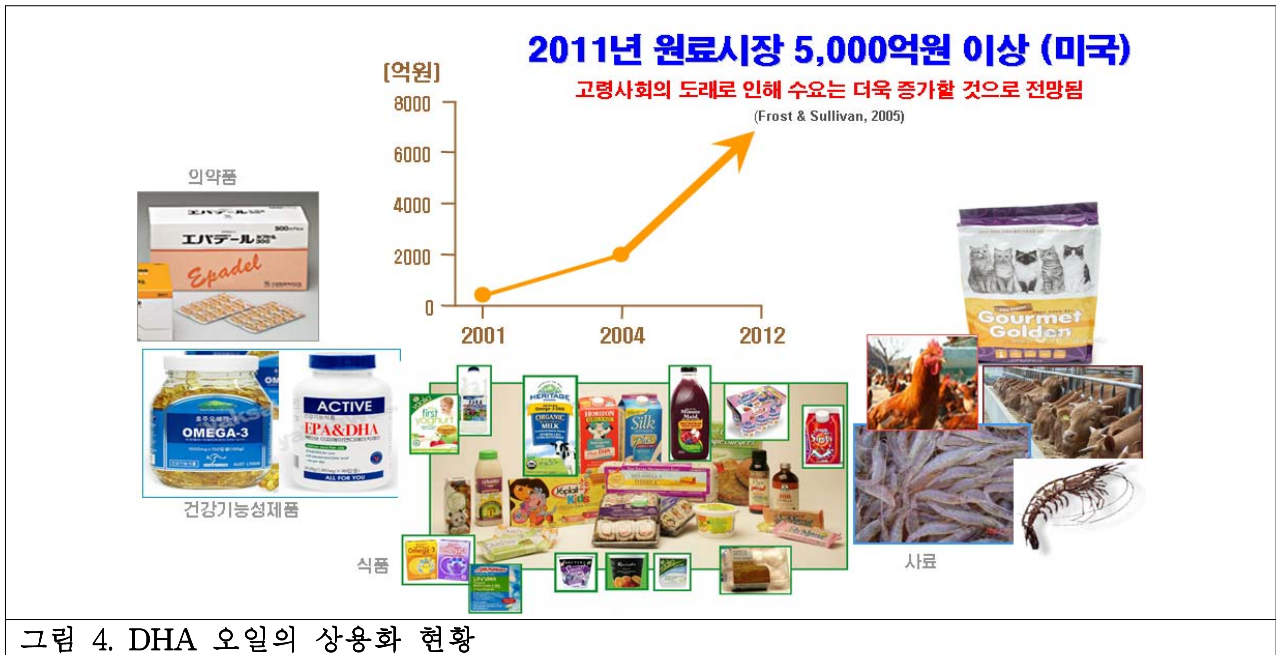


그림 3. DHA 오일의 효능과 상용화 현황

○ 우수한 인체 효능으로 인해 다양한 형태의 DHA 제품이 개발, 상용화되고 있으며, 시장규모는 미국내에서 2012년경 원료시장 규모만 약 5,000억 원에 이를 것으로 전망되며, 노인 인구 증가에 따라 시장이 급격히 확대될 것으로 예상되고 있음 (그림 4).



- 지금까지 DHA는 주로 참치와 같은 심해성 어류의 추출오일로부터 얻어지고 있지만, 해양 오염에 따른 어류 체내에 수은 등 중금속의 축적, 어획 규제 강화 등으로 인해 점차 해양 미세조류성 미생물을 이용한 생산 공정이 주목을 받고 있음. 순도가 좋은 해양 미세조류 DHA 오일은 어유 유래의 DHA 오일에 비해 상대적으로 고가이고 (어유 kg당 9-120달러; 미세조류 오일 kg당 175달러)이고, 2012년 경 전체 DHA 오일 시장의 약 40%를 해양 미세조류 DHA 오일이 점유할 것으로 예상됨. 따라서 기존의 어유 추출공정을 대체하기 위한 새로운 고순도의 DHA와 EPA 오일을 안정적으로 생산할 수 있는 기술개발에 대한 관심이 고조되고 있는데, 그 대표적인 방법이 DHA와 EPA 오일을 함유하는 유지성 미생물을 이용한 발효 공정이며, 향후 개발 기술은 막대한 상업적 가치를 지닐 것으로 판단됨.
- 미세조류 DHA 오일 세계 시장은 미국의 마르텍사에 의해 주도되고 있으며, 국내에서도 해양 미세조류를 이용한 DHA 오일 생산 기술 개발이 활발하게 진행되고 있지만, 아직 상용화가 이루어지지 않아 외국으로부터 전량을 수입하고 있는 실정임 (남양분유 등).



그림 5. 미국 마르텍사의 미세조류 DHA 오일 상용화 현황

2. 연구의 목적

- 본 연구는 전통육종기술을 이용하여 *Aurantiochytrium* sp. KRS101 균주의 개량, 대량배양 기술의 확립 및 산업부산물인 폐글리세롤을 활용하는 오일 생산기술 개발 등 상용화에 필요한 기술 개발을 목표로 하고 있음.
- 본 과제의 선행연구에서 확보한 *Aurantiochytrium* sp. KRS101 미세조류 균주는 5-리터 배양기를 이용한 실험에서 마르텍사의 미세조류 균주와 거의 유사한 수준의 DHA 생산성을 보이는 것으로 확인되어 상업적 가치가 매우 높은 것으로 전망됨. 마르텍사의 *Schizochytrium* (*Aurantiochytrium*) *limacinum* SR21의 DHA 생산성이 3.7 g/l day인데 반해 *Aurantiochytrium* sp. KRS101 균주는 3.3 g/l day을 DHA 생산성을 보임 (SR21 균주의 배양이 오일 생산 증진을 위해 2단계 산소공급 조건으로 이루어졌음을 감안할 때 KRS101의 성능은 거의 상용화 수준이라 판단됨).

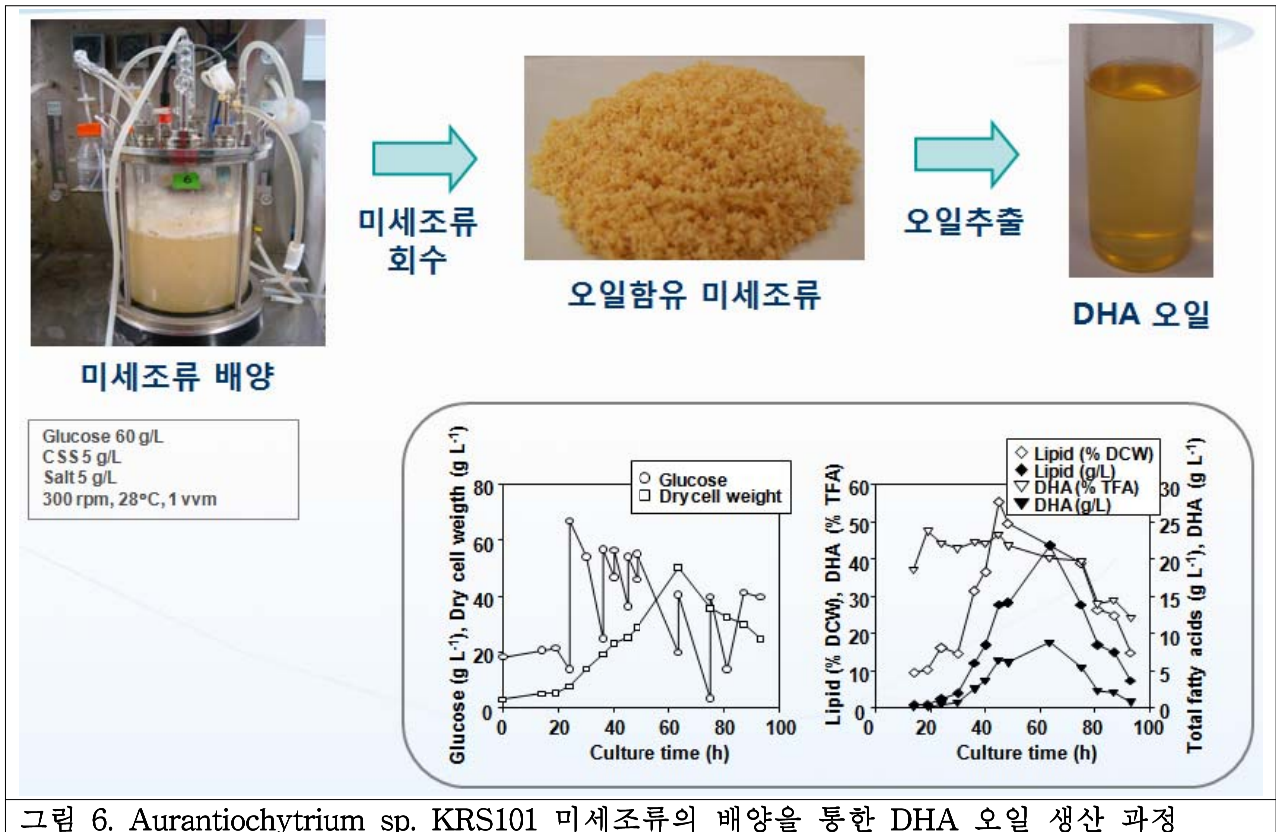


그림 6. Aurantiochytrium sp. KRS101 미세조류의 배양을 통한 DHA 오일 생산 과정

○ 현행 바이오디젤 제조 공정은 대두, 유채, 팜 등의 유지성 식물 유래의 오일로부터 산, 알칼리 혹은 효소 촉매를 사용하여 추출하는 방법인 데, 그 과정에서 바이오디젤 생산량의 약 10%에 해당하는 글리세롤이 부산물로 생산된다. 2006년 한해 미국에서 바이오디젤 부산물로 발생한 글리세롤의 양은 250만 파운드(72,735톤)로 화장품, 의약품, 식품 산업 등 전체 글리세롤 시장(660만 파운드)의 약 38% 수준임. 폐글리세롤의 과잉발생은 파운드당 20원 이하로 글리세롤 가격의 급락을 초래하였으며, 이로 인해 기존 글리세롤 생산 업체의 과산과 관련 시장의 붕괴시키는 결과를 낳고 있다. 이러한 글리세롤 가격의 하락은 폐글리세롤의 재활용을 차단하여 바이오디젤 제조업체에 부산물인 폐글리세롤을 처리하여야 하는 새로운 환경 처리 부담을 가중시켜 바이오디젤 산업의 경쟁력을 더욱 약화시키는 요인으로 작용할 것으로 예상된다.

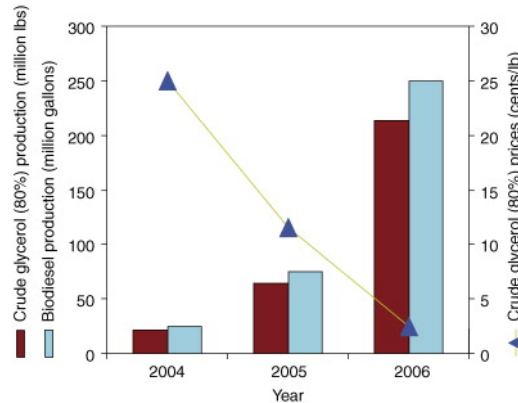


그림 7. 바이오디젤 생산 증대에 따른 부산물 글리세롤 발생량의 증가와 가격 하락

- 최근 미국 버지니아 대학의 Wen 교수 연구팀은 바이오디젤 부산물인 폐글리세롤을 영양원으로 활용하여 유지성 유기영양 미세조류인 *Schizochytrium limacinum*에 의한 바이오오일 및 고부가가치 생물소재 DHA의 생산 공정 연구 결과를 발표하였음. 폐글리세롤을 이용한 *Schizochytrium limacinum*의 발효 배양 후, 최대 미세조류 건조균체량과 지질 함량은 22.1 g/L과 45-50%이었고, 이때 팔미트산 (palmitic acid)와 DHA (docosahexaenoic acid)가 주요 구성 지방산으로 DHA의 최대수율은 4.91 g/L이었으며, 수은과 같은 중금속은 전혀 검출되지 않은 것으로 나타났음. 이러한 결과로부터 *Schizochytrium* 미세조류의 배양에 의한 폐글리세롤로부터 바이오오일 및 고부가가치 고기능 생물소재 DHA의 생산과 이를 활용한 고부가가치 사업은 바이오디젤의 경쟁력을 강화하여 바이오디젤의 보급을 촉진할 뿐 만 아니라, 원료 작물의 재배를 확대함으로써 농가의 수익을 증대하는 파급효과를 가져올 수 있을 것으로 기대됨. 하지만, 아직까지 국내에서는 폐글리세롤을 영양원으로 활용한 유지성 미세조류 *Schizochytrium*의 배양 및 오일 생산 공정 연구는 수행되지 않고 있는 상태임.

3. 기대효과

(1) 기술적 측면

미국 마르텍사가 포도당을 영양원으로 활용한 유지성 유기영양 미세조류의 배양 공정 기술을 확보하고 있지만, 아직까지 폐글리세롤을 영양원으로 활용한 배양 공정 기술은 개발되지 않은 상황임. 바이오디젤의 보급이 확대됨에 따라 급격히 발생량이 증가할 것으

로 예상되는 폐글리세롤을 고부가가치 산업원료로 전환하는 기술의 확보가 가능함.

(2) 환경적 측면

바이오디젤 산업부산물 폐글리세롤의 과잉 발생 (바이오디젤 생산량의 10%)은 글리세롤 가격의 급락과 기존 글리세롤 산업의 붕괴를 초래하여 폐글리세롤이 단순한 산업폐기물로 전락할 것으로 예상됨. 이는 바이오디젤 제조업체에 산업폐기물 처리를 위한 새로운 환경처리 비용을 가중시키는 결과를 낳고 있음. 따라서 폐글리세롤의 활용 기술은 환경적 측면에서 산업폐기물 처리 효과를 지님.

(3) 경제적 · 산업적 측면

바이오디젤 산업의 확대에 따라 제조 원료인 바이오오일의 수요가 급증하고 있음. 폐글리세롤로부터 생산된 미세조류 바이오오일은 식물성 오일과 함께 바이오디젤 원료로 활용이 가능하며, 동시에 고기능 생물소재인 DHA 오일은 다양한 고부가가치 산업 원료로 활용될 수 있는 데, 2012년 경 DHA 오일 시장은 원료시장만 약 5,000억 원 규모로 예측됨. 바이오디젤 부산물을 활용한 고부가가치 산업은 바이오디젤 산업의 가격 경쟁력을 강화하여 바이오디젤의 생산과 보급을 촉진할 것으로 기대됨.

(4) 농업경제 기여 측면

바이오디젤의 경쟁력 강화와 보급 확대에 의한 바이오오일 수요의 증가는 원료 작물의 재배를 촉진함으로써 관련 농가의 확대 및 수입 증대를 유발할 수 있을 것으로 기대됨.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 국외 기술 현황

○ 마르텍사 특허기술 :

공개번호 10-2011-0128944; 2011년11월30일

본 발명은 분리된 트라우스토키티리드 미생물뿐만 아니라 이의 균주 및 돌연변이체에 관한 것이다. 본 발명은 또한 생물량, 미생물 오일, 조성물, 배양물, 미생물 오일의 생산 방법, 및 분리된 트라우스토키티리드, 생물량 및 미생물 오일을 사용하는 방법에 관한 것임.

- ATCC 수탁 번호 제PTA-9695호로 기탁된 분리된 트라우스토키티리드 미생물.
- ATCC 수탁 번호 제PTA-9696호로 기탁된 분리된 트라우스토키티리드 미생물.
- ATCC 수탁 번호 제PTA-9697호로 기탁된 분리된 트라우스토키티리드 미생물.
- ATCC 수탁 번호 제PTA-9698호로 기탁된 분리된 트라우스토키티리드 미생물.

2. 국내 기술 현황

○ 대상 특허기술 :

등록번호 10-0700486 (2007년03월21일)

본 발명은 오메가-3 불포화 지방산을 생산하는 쉬조키티리움 sp. RT0100P1(Schizochytrium sp. RT0100P1)(KCTC-10937BP) 또는 쉬조키티리움 sp. SEK-228(Schizochytrium sp. SEK-228)(KCTC-10938BP)을 제공한다. 또한, 본 발명은 (a) 상기 균주를 배양하는 단계; 및 (b) 단계 (a)에서 얻어진 균체(biomass) 또는 배양액 으로부터 오메가-3 불포화 지방산을 추출하는 단계를 포함하는 오메가-3 불포화 지방산의 제조방법을 제공함.

등록번호 10-1068520 (2011년09월22일)

본 발명은 오메가-3 불포화 지방산 생산능을 갖는 미세조류(microalgae)에 커큐민(curcumin)을 처리하는 단계, 오메가-3 불포화 지방산 생산능 및 커큐민 내성을 갖는 균주를 분리하는 단계를 포함하는, 오메가-3 불포화 지방산 중 도코사헥사엔산 함량이 높은 균주의 제조방법; 및 상기 제조방법으로부터 얻어진 오메가-3 불포화 지방산 생산능 및 커큐민 내성을 갖는 쉬조키티리움 sp. CC44(Schizochytrium sp. CC44)(KCTC

11566BP)을 제공함.

○ 한국생명공학연구원 특허기술 :

등록번호 10-1147450 (2012년05월11일)

본 발명은 바이오오일 생성능을 가지는 Thraustochytrid계 미세조류 KRS101(KCTC11686BP) 및 상기 미세조류 KRS101을 배양하는 것을 특징으로 하는 바이오오일의 제조방법에 관한 것임. 본 발명에 따른 미세조류는 포도당 함유 배지에서 배양하였을 때 균체 내에 높은 비율로 바이오오일을 축적하여, 고수율로 바이오오일을 생산할 수 있음.

유기영양 미세조류에 의한 DHA 생산 관련 주요 특허 분석

특허번호	특허제목	출원인 (국가)	우선권	비고 (DHA 함량)
10-0338193	신규 원시균류 씨저카이트리움 에스피. 에프파이-2 및 그 배양방법	주식회사 제온 (한국)	1999.12.13	<i>Schizochytrium</i> sp. Sπ-2 (37.5% TFA)
10-2008-0086938	발효기내에서 진핵 미생물의 고밀도 배양에 의한 고도불포화지방산을 함유하는 지질의 증진된 생산 방법	마텍 바이오싸이언스 코퍼레이션 (미국)	2000.1.28	<i>Schizochytrium</i> sp. ATCC 20888 (41.4% TFA)
10-0680906	트라우스토키트리드 진균에서 다불포화 지방산의 수준을 증가시키는 방법	카우슬 오브 사이언티픽 앤드 인더스트리얼 리서치 (인도)	2000.3.29	<i>Ulkenia radiata</i> NIO-TH 21
10-2007-0042115	트라우스토키트리알레스 속의 미생물을 최적화된 저염배지를 이용하여 배양하는 방법	뉴트리노바 뉴트리션 스페셜티앤드 푸드 인그레디엔츠 게엠베하 (독일)	2004.11.10	<i>Ulkenia</i> sp. BP-5601 (47.4% TFA)
10-2007-0042114	트라우스토키트리알레스 속의 미생물을 배양하는 방법	뉴트리노바 뉴트리션 스페셜티앤드 푸드 인그레디엔츠 게엠베하 (독일)	2004.11.10	<i>Ulkenia</i> sp. BP-5601 (47.4% TFA)
10-2008-00	도코사헥사엔산 (DHA)을	아베스타젠리미	2005.12.1	<i>Thraustochytriu</i>

87820	생산하는 트라우스토키프리드 균주-SC1	티드 (인도)	9	<i>m</i> sp. SC1 (30.9% TFA)
10-0700486	오메가-3 불포화지방산을 생산하는 균주 및 이를 이용한 오메가-3 불포화지방산의 제조방법	대상주식회사 (한국)	2006.5.3	<i>Schizochytrium</i> sp. RT0100P1 & SEK-228 (19.7 % DCW)
10-2008-01 -11586	<i>Schizochytrium mangrovei</i> MM103을 이용한 Docosahexaenoic acid (DHA)의 생산 방법	이정열 (한국)	2007.6.19	<i>Schizochytrium</i> <i>mangrovei</i> MM103 (45.6% TFA)

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 전통육종기술을 이용한 *Aurantiochytrium* sp. KRS101 균주의 개량

- 최근 Lian 등이 Thraustochytrid 계열 미세조류 *Aurantiochytrium* sp. CCTCC M209059 균주에 자외선 조사 및 화학물연변이원 (N-methyl-N-nitro-N-nitrisiguanidine, NTG)을 처리하는 방법으로 오일과 DHA (Docosahexaenoic Acid) 함량이 각각 34.84%와 38.88% 개량된 변이균주 (HX-308) 개발에 성공하였음.

	CDW (g/l)	Fatty acid (g/l)	DHA content (% total fatty acid)	DHA (g g ⁻¹ dry weight)
HX-308M	45.24±0.40	17.83±0.30	58.25±0.20	0.23±0.15
	40.16±0.35	13.48±0.25	54.75±0.25	0.18±0.18
	42.88±0.28	15.44±0.17	55.66±0.34	0.20±0.21
CCTCC M209059	45.44±0.25	13.41±0.28	40.41±0.40	0.12±0.45
	44.38±0.42	12.95±0.35	42.10±0.25	0.12±0.21
	40.72±0.50	8.31±0.19	38.93±0.40	0.08±0.15

1. 자외선 조사를 통한 *Aurantiochytrium* sp. KRS101 균주 개량

가. 실험방법

- Lian 등의 연구 결과를 토대로 자외선 조사를 통한 *Aurantiochytrium* sp. KRS101 미세조류 균주의 전통육종을 수행하였음. 24시간 배양한 KRS101 균주 10 ml을 취한 후 4500 rpm, 10 min 동안 원심분리하여 상등액은 버리고 PBS buffer에 균체를 현탁한 후, 10, 20, 30, 40, 50, 60 분 동안 23 W, 15 cm 조건에서 자외선을 조사하여 사멸율이 약 99% 일때, 현탁한 균체를 적당히 희석하여 basal 배지 (glucose, 60 g/l; yeast extract, 10 g/l; Sea salt, 5 g/l; agar 15 g/l)에 도말하여 28°C에서 48 시간 동안 배양하였음. 약 200개 정도의 콜로니가 자라는 희석배수로 도말된 플레이트 상에서 상대적으로 빠른 균체 생육을 보이는 콜로니를 일차적으로 선별한 후, 플라스크 배양을 통하여 선별된 변이체들의 균체 생육, 오

일 생성 및 DHA 함량을 분석하였음.

○ 액체 배양을 위하여 선별한 변이체들을 14-ml 시험관에서 3 ml 배지에 접종하여 60 시간 동안 전배양하고, 배양 균체의 흡광도 (OD600nm)를 측정하여 동일량의 균체를 250-ml 플라스크 (50 ml 배지)에 이식하여 72 시간 동안 본배양 하면서, 일정한 시간 간격으로 포도당 영양원의 이용, 균체 생육 (OD600nm) 및 오일과 DHA의 생산량을 분석하였음.

○ 균체 내의 오일 함량 분석을 위해 Burja 등의 Bligh-Dyer 방법을 이용하여 오일을 추출하였음. 125 mg의 건조균체에 클로로포름 6.25 ml, 메탄올 12.5 ml과 50 mM K₂HPO₄ buffer 용액 (pH 7.4)를 5 ml 첨가하여 28°C에서 200 rpm으로 1시간 동안 교반한 후, 클로로포름과 phosphate 버퍼를 각각 6.25 ml 첨가하여 약 30번 정도 섞어 준 다음 정치하였음. 분리된 하부의 유기용매 층 (약 12.5 ml)을 회수하여 80°C dry oven에서 약 30분 정도 건조한 후 오일의 무게를 측정하였음. 오일의 함량은 아래 식에 따라 결정하였음.

○ Total lipid (g of oil per 100 g sample) = $[(W_L - W_D) / V_C] \times 100$ / $[V_P / W_S]$

W_D was the weight of an empty aluminum dish (g);

W_L the weight of an aluminum dish with dried lipid residue (g);

W_S the weight of sample (g);

V_C the total volume of chloroform in the graduated cylinder (ml); and

V_P the volume of chloroform transferred to the aluminum dish (ml).

○ 지방산 조성의 분석을 위해 건조균체에 5% (v/v) 황산-메탄올 용액 3 ml을 첨가한 후 90°C에서 1시간 동안 반응하였음. 지방산 에스테르 반응산물을 0.6 ml 헥산으로 추출한 후 가스크로마토그래피 [GC; Hewlett Packard 6890N equipped with a flame-ionization detector (FID) and an HP-5 (30 m × 0.32 mm, 0.25 mm; Agilent Technologies) capillary column] 법으로 분석하였음. 컬럼의 온도는 150°C (after 2 min of holding)에서 270°C (with a further 2 min of holding)로 분당 7°C 씩 증가하였음.

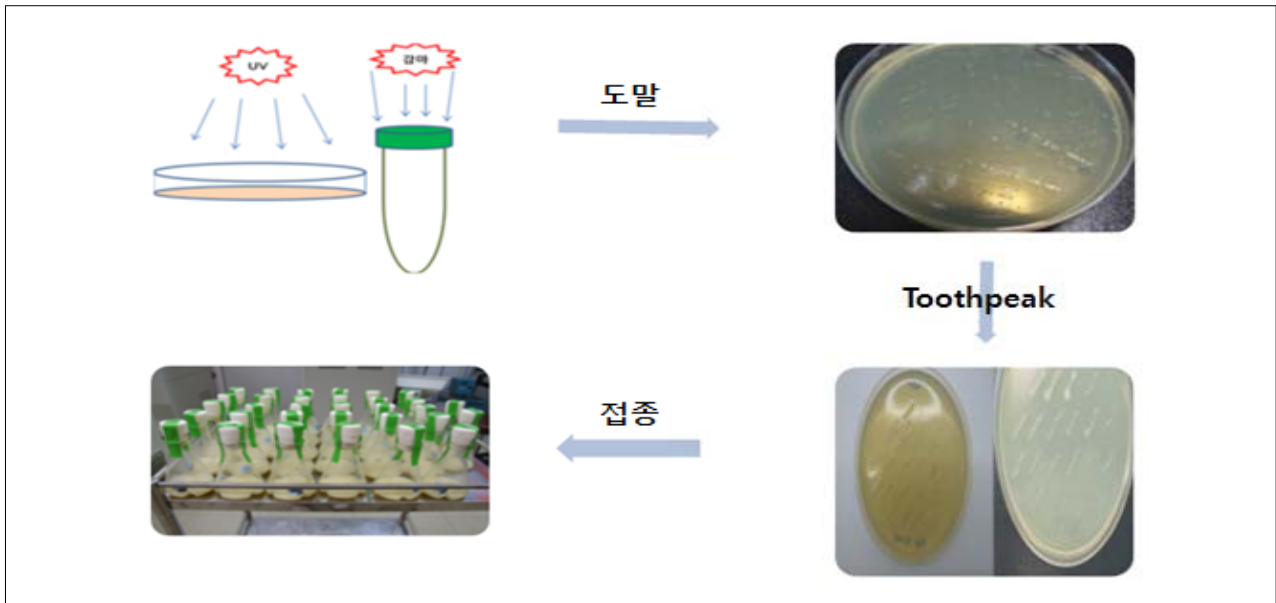


그림 8. 전통육종기술을 이용한 *Aurantiochytrium* sp. KRS101 미세조류 균주 개량 과정

나. 결과

○ 자외선 조사 돌연변이 실험에서 일차적으로 우수한 균체 생육을 보이는 변이체 55 종을 선별하였음. 우선 25 종 변이체들의 배양 특성을 분석한 결과, 전체적으로 야생균주 (대조구 positive control: PC)에 비교해 전체적으로 우수한 균체 생육과 오일 생산 특성을 보이는 것으로 나타났음. 특히 배양 초기 (24 시간)에는 UV2와 UV8 변이체가 다른 변이체들에 비해 빠른 균체 생육을 보였으며, 최종적으로는 UV3과 UV17 변이체가 가장 우수한 균체 생육을 보이는 것으로 조사되었음 (OD600nm 71.9와 72.5) (그림. 9). 오일 및 DHA 함량 분석 결과에서 UV2와 UV19 변이체가 우수한 오일, DHA 생산성을 보이는 것으로 나타났음 (오일: 34.6 g [g of oil 100 g⁻¹sample]와 34.39 g, DHA: 14.31 g와 14.19 g). 한편 나머지 30 종의 변이체들을 분석한 실험에서는 UV42, UV48, UV51 변이체가 야생균주 (PC)에 비해 2-3배 정도 빠른 생육을 보였으며, 최종적으로 UV55 변이체가 가장 뛰어난 균체 생육을 보이는 것으로 나타났음 (그림. 10). 반면 오일과 DHA의 함량은 균체 생육이 우수한 UV55 보다 UV48 변이체가 높았으며 (오일과 DHA 각각 31.15 g와 12.54 g), 야생균주와 비교해 오일과 DHA의 함량이 각각 1.5배와 4배 증가한 것으로 나타났음.

다. 결론

○ *Aurantiochytrium* sp. KRS101 미세조류 균주의 자외선 조사를 통하여 상대적으로 우수한 균체 생육을 보이는 변이체 55 종을 선별하였으며, 이들로부터 우수한 오일 및 DHA 생산능을 보이는 변이체 UV2를 최종선발 하였음.

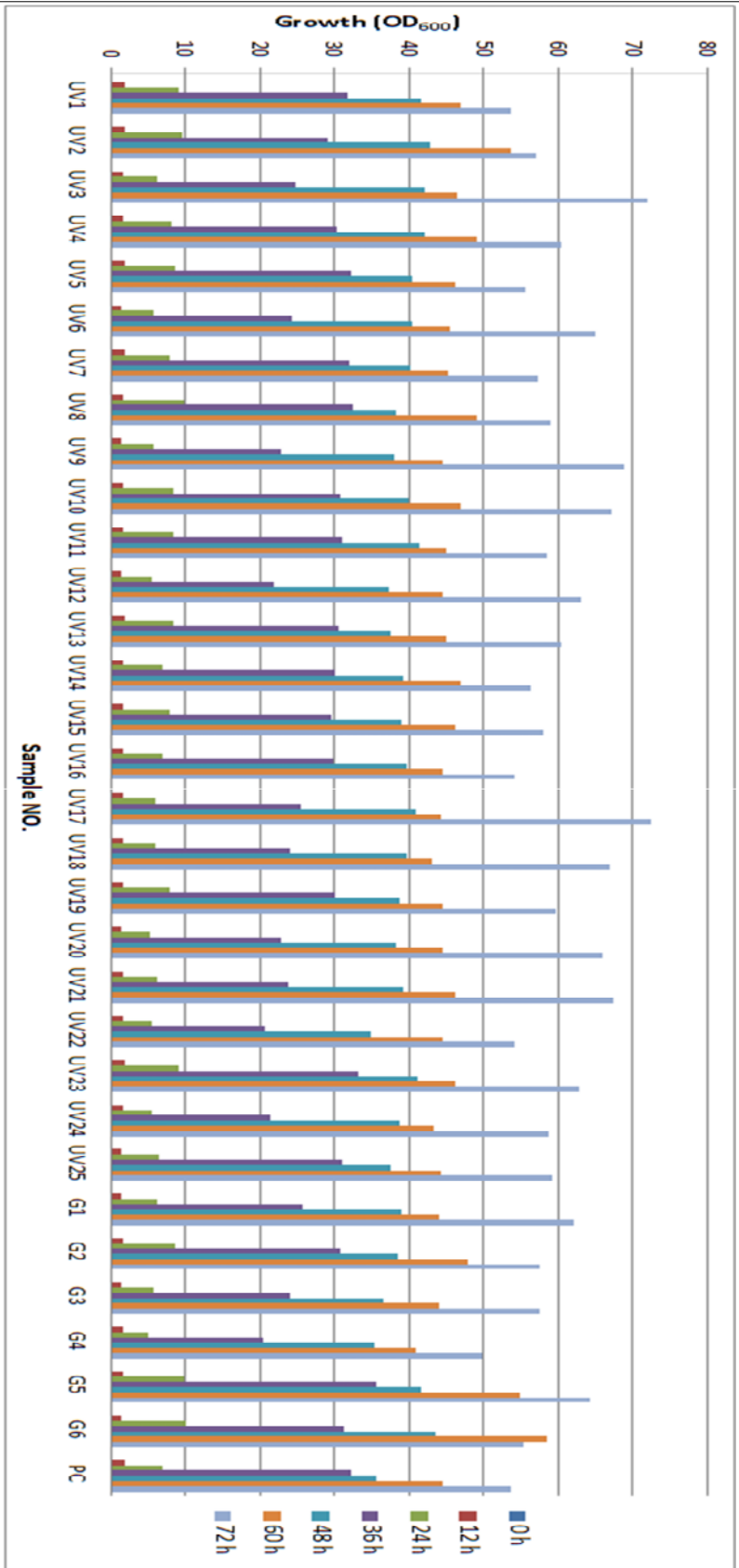


그림 9. 자외선 조사 Aurantiochytrium sp. KRS101 변이체의 균체생육 분석 (1)

표 1. 자외선 조사 *Aurantiochytrium* sp. KRS101 변이체의 오일, 지질 함량 분석 (1)

	Total lipid (g of oil 100 g ⁻¹ sample)	DHA (g of oil 100 g ⁻¹ sample)
UV1	29.08	12.72
UV2	34.60	14.31
UV3	25.62	10.38
UV4	17.47	7.23
UV5	33.31	13.79
UV6	29.70	12.31
UV7	18.70	7.11
UV8	29.61	12.12
UV9	25.27	9.68
UV10	30.08	12.35
UV11	32.40	12.93
UV12	24.94	9.69
UV13	16.51	6.33
UV14	23.66	10.16
UV15	21.50	8.79
UV16	25.41	11.17
UV17	27.11	11.42
UV18	29.92	12.40
UV19	34.39	14.19
UV20	22.34	8.67
UV21	20.76	8.97
UV22	19.82	8.48
UV23	14.24	6.01
UV24	29.39	11.82
UV25	20.18	8.07
G1	25.51	10.51
G2	27.67	11.33
G3	20.60	9.13
G4	15.77	13.24
G5	27.80	11.20
G6	32.26	6.26
PC ¹	24.06	9.54

¹PC: Positive control

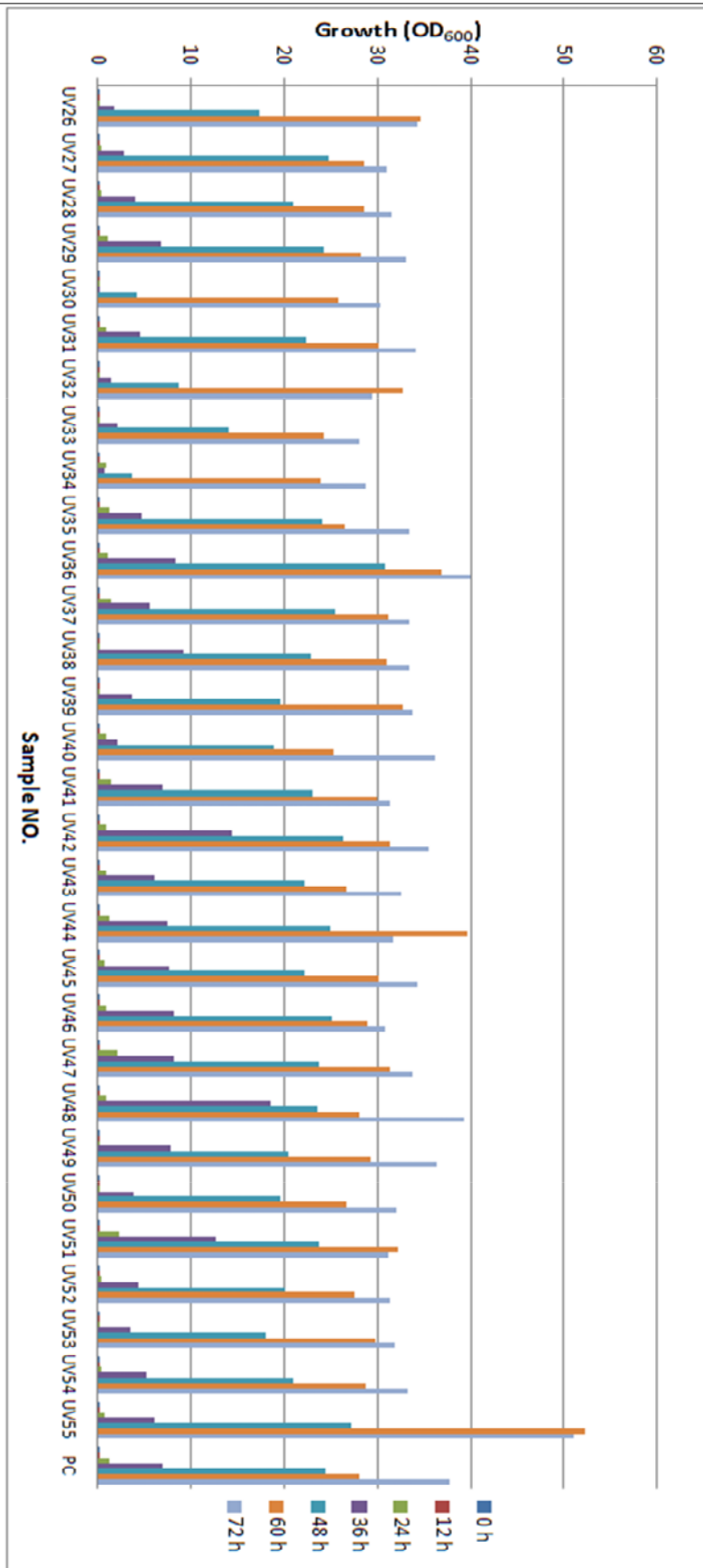


그림 10. 자외선 조사 *Aurantiochytrium* sp. KRS101 변이체의 균체생육 분석 (2)

표 2. 자외선 조사 Aurantiochytrium sp. KRS101 변이체의 오일, 지질 함량 분석 (2)

	Δ Glucose ¹	Total lipid (g of oil 100 g ⁻¹ sample)	DHA (g of oil 100 g ⁻¹ sample)
UV26	43.79	18.65	6.268
UV27	48.63	26.99	6.300
UV28	41.37	15.82	4.933
UV29	44.57	20.05	3.144
UV30	34.33	13.28	4.779
UV31	41.00	18.01	2.865
UV32	37.37	15.85	1.839
UV33	39.41	14.61	2.762
UV34	29.63	9.55	3.468
UV35	42.14	17.11	2.978
UV36	48.81	23.49	8.907
UV37	42.02	19.92	6.289
UV38	42.05	19.19	3.571
UV39	40.00	15.79	5.845
UV40	37.50	22.58	8.706
UV41	42.48	25.45	8.896
UV42	45.45	19.96	7.461
UV43	41.98	18.57	2.593
UV44	44.33	18.96	2.967
UV45	38.34	15.88	6.804
UV46	47.97	24.28	10.379
UV47	44.14	22.33	5.050
UV48	46.82	31.15	12.538
UV49	51.50	26.43	6.912
UV50	42.74	17.50	3.873
UV51	47.97	24.16	4.670
UV52	37.53	17.45	6.333
UV53	35.20	14.74	5.027
UV54	44.05	24.81	4.652
UV55	43.82	20.30	3.659
PC ²	41.11	18.58	3.893

¹ Δ Glucose: Glucose 소비량 (초기글루코스양-최종글루코스양)

²PC: Positive control

2. 감마선 조사를 통한 *Aurantiochytrium* sp. KRS101 균주 개량

가. 실험방법

- *Aurantiochytrium* sp. KRS101 미세조류 균주의 변이체를 얻기 위하여 감마선 (gamma ray) 조사 실험을 수행하였음 (한국원자력연구원, 정읍방사선과학연구소). *Aurantiochytrium* sp. KRS101 균주를 36시간 배양하여 45 ml을 취한 후 4500 rpm, 10 min 동안 원심분리하여, 상등액은 버리고 PBS buffer에 현탁한 후 감마선을 1시간 조사하여 (사멸률 약 99%) 균체를 적당히 희석하여 basal 배지 (glucose, 60 g/l; yeast extract, 10 g/l; Sea salt, 5 g/l; agar 15 g/l)에 도말하여 28°C에서 48 시간 동안 배양하였음. 약 200개 정도의 콜로니가 자라는 희석배수로 도말된 플레이트 상에서 상대적으로 빠른 균체 생육을 보이는 콜로니를 일차적으로 선별한 후, 플라스크 배양을 통하여 선별된 변이체들의 균체 생육, 오일 생성 및 DHA 함량을 분석하였음.
- 액체 배양을 위하여 선별한 변이체들을 14-ml 시험관에서 3 ml 배지에 접종하여 60 시간 동안 전배양하고, 배양 균체의 흡광도 (OD600nm)를 측정하여 동일량의 균체를 250-ml 플라스크 (50 ml 배지)에 이식하여 72 시간 동안 본배양 하면서, 일정한 시간 간격으로 포도당 영양원의 이용, 균체 생육 (OD600nm) 및 오일과 DHA의 생산량을 분석하였음.
- 균체 내의 오일 함량 분석을 위해 Burja 등의 Bligh-Dyer 방법을 이용하여 오일을 추출하였음. 125 mg의 건조균체에 클로로포름 6.25 ml, 메탄올 12.5 ml과 50 mM K₂HPO₄ buffer 용액 (pH 7.4)를 5 ml 첨가하여 28°C에서 200 rpm으로 1시간 동안 교반한 후, 클로로포름과 phosphate 버퍼를 각각 6.25 ml 첨가하여 약 30번 정도 섞어 준 다음 정치하였음. 분리된 하부의 유기용매 층 (약 12.5 ml)을 회수하여 80°C dry oven에서 약 30분 정도 건조한 후 오일의 무게를 측정하였음. 오일의 함량은 아래 식에 따라 결정하였음.
- Total lipid (g of oil per 100 g sample) = $[(W_L - W_D) / V_C] \times 100 / [V_P / W_S]$
 - W_D was the weight of an empty aluminum dish (g);
 - W_L the weight of an aluminum dish with dried lipid residue (g);
 - W_S the weight of sample (g);
 - V_C the total volume of chloroform in the graduated cylinder (ml); and
 - V_P the volume of chloroform transferred to the aluminum dish (ml).

- 지방산 조성의 분석을 위해 건조균체에 5% (v/v) 황산-메탄올 용액 3 ml을 첨가한 후 90°C에서 1시간 동안 반응하였음. 지방산 에스테르 반응산물을 0.6 ml 헥산으로 추출한 후 가스크로마토그래피 [GC; Hewlett Packard 6890N equipped with a flame-ionization detector (FID) and an HP-5 (30 m × 0.32 mm, 0.25 mm; Agilent Technologies) capillary column] 법으로 분석하였음. 컬럼의 온도는 150°C (after 2 min of holding)에서 270°C (with a further 2 min of holding)로 분당 7°C 씩 증가하였음.

나. 결과

- 감마선 조사 실험에서 총 29 종의 *Aurantiochytrium* sp. KRS101 변이체를 확보하였음. G5와 G6 변이체가 배양 초기에 빠른 균체 생육을 보이는 것으로 나타났으며 최종적으로는 G1과 G5 변이체가 가장 우수한 균체 생육을 보이는 것으로 조사되었음 (OD600nm 62.1와 55.4). 한편 오일과 DHA 생산에서는 G6 변이체가 높은 오일 생산량을 보인 반면 DHA 함량은 낮은 것으로 나타났고 (6.26 g), G2와 G5 변이체도 27.67 g과 27.80 g의 비교적 오일 생산량과 11.33 g과 11.20 g의 높은 DHA 함량을 보였음. 또한 G10과 G24 변이체가 우수한 균체 생육과 높은 오일, DHA 함량을 보였으며, G24 변이체의 오일과 DHA 생산량은 각각 39.02 g과 10.50 g으로 대조구인 야생균주 (PC)에 비해 각각 1.5 배와 1.3 배가 증가하였음 (그림. 11).

다. 결론

- 감마선 조사를 통하여 일차적으로 균체 생육이 우수한 변이체 29 종을 선별하였으며, 이들로부터 우수한 오일 및 DHA 생산능을 보이는 변이체 G24를 최종선발 하였음.

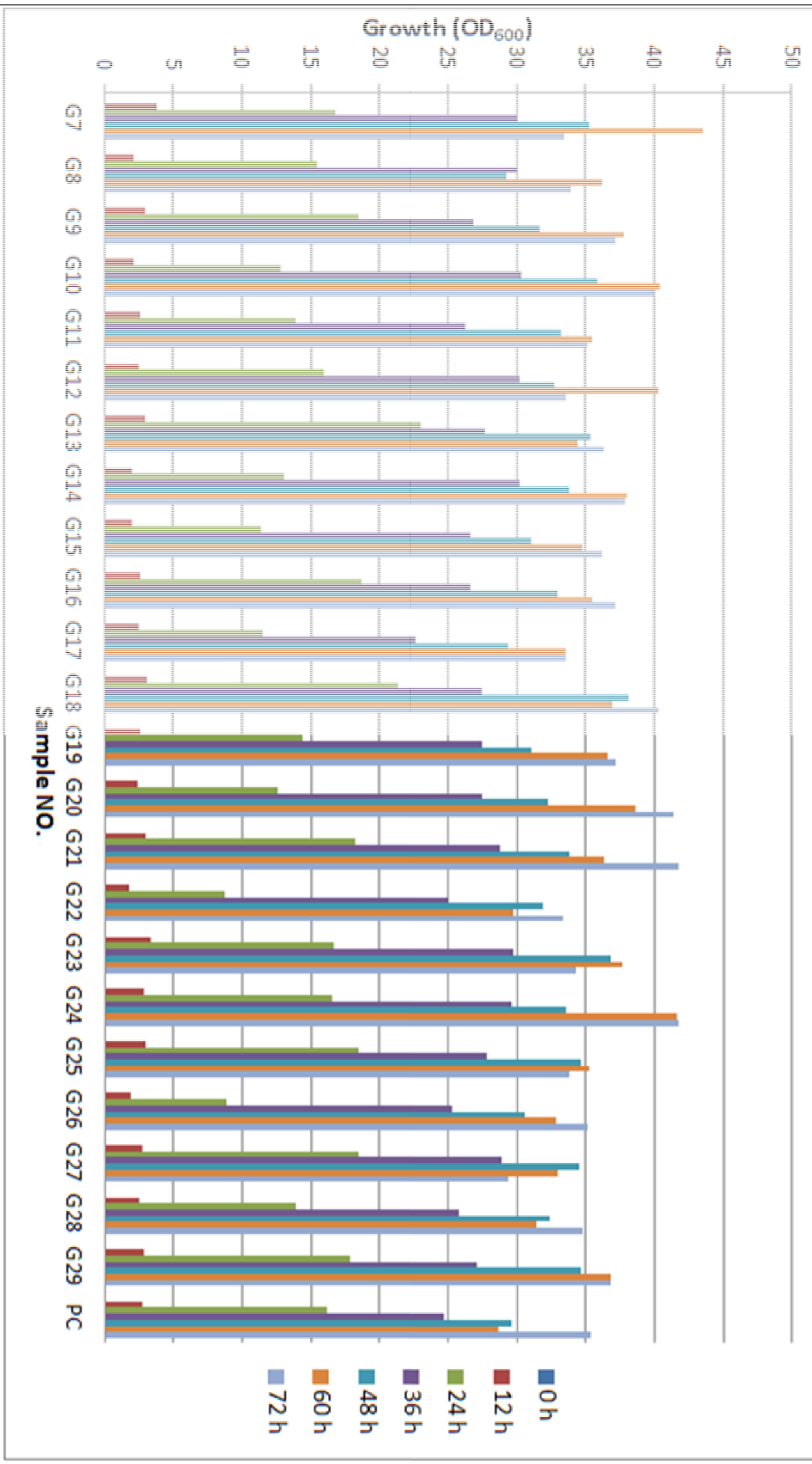


그림 11. 감마선 조사 *Aurantiochytrium* sp. KRS101 변이체의 균체생육 분석

표 3. 감마선 조사 *Aurantiochytrium* sp. KRS101 변이체의 오일, 지질 함량 분석

	Δ Glucose ¹	Totallipid (g of oil 100 g-1sample)	DHA (g of oil100 g-1sample)
G7	56.04	34.77	9.61
G8	56.56	31.29	8.31
G9	55.45	33.12	8.15
G10	55.90	34.54	8.65
G11	55.06	31.00	6.93
G12	56.19	34.51	8.20
G13	56.48	31.62	7.05
G14	51.81	27.81	6.83
G15	51.67	29.30	6.77
G16	54.51	32.11	8.43
G17	49.25	27.23	7.66
G18	56.70	33.51	9.43
G19	49.65	28.42	7.19
G20	54.18	31.74	9.32
G21	55.41	32.43	8.54
G22	52.00	29.83	6.47
G23	56.19	34.62	10.85
G24	56.27	39.02	10.50
G25	56.23	28.83	8.39
G26	49.00	26.73	6.99
G27	55.79	35.41	7.87
G28	54.82	34.25	7.46
G29	56.44	33.97	7.42
PC ²	54.03	29.87	7.73

¹ Δ Glucose: 초기글루코스양-최종글루코스양

²PC: Positive control

3. 결론

- *Aurantiochytrium* sp. KRS101 미세조류 균주의 자외선 조사를 통하여 상대적으로 우수한 균체 생육을 보이는 변이체 55 종을 선별하였으며, 이들로부터 우수한 오일 및 DHA 생산능을 보이는 변이체 UV2를 최종선발 하였음.
- 또한 감마선 조사를 통하여 일차적으로 균체 생육이 우수한 변이체 29 종을 선별하였으며, 이들로부터 우수한 오일 및 DHA 생산능을 보이는 변이체 G24를 최종선발 하였음.

제 2 절 *Aurantiochytrium* sp. KRS101 균주 배양 배지 조성 및 공정 최적화

1. 배지조성 최적화

- *Thraustochytrid* 계열 미세조류의 DHA 오일 대량생산 공정에서 생산비용의 절감을 위한 기존 배양원료의 대체원료의 활용이 필수적임. 고가의 글루코오스 탄소원의 대체 원료로 당밀(molasses)을, Yeast extract 질소원을 대체하기 위해 CSL(Corn steep liquor), 옥수수박, 타피오카, 소맥, 구연산박, 아몬드박, 팜박, 요소비료, 전지대두, 밀기울, 대두박, 대두분 등의 다양한 대체원료가 연구되고 있음.

(1). 당밀(탄소원)을 이용한 *Aurantiochytrium* sp. KRS101 미세조류 배양

가. 실험방법

- 탄소원인 글루코오스를 대신하여 당밀을 사용 (당밀농도는 12%, 24%, 36%, 48%).
- *Aurantiochytrium* sp. KRS101 미세조류 균체를 250ml 플라스크 [배지 (glucose, 60 g/l; yeast extract, 10 g/l; NaCl 5 g/l; KH₂PO₄ 9 g/l)]에서 60시간 동안 전배양한 후, 500ml 삼각플라스크에서 접종한 후 72시간 동안 회분식 배양을 실시하였음 [배지 (KH₂PO₄, 9g/L; NaCl, 5 g/l; yeast extract 10g/L), 배양 온도 28°C, 교반속도 250 rpm].
- 균체 내의 오일 함량 분석을 위해 Burja 등의 Bligh-Dyer 방법을 이용하여 오일을 추출하였음. 125 mg의 건조균체에 클로로포름 6.25 ml, 메탄올 12.5 ml과 50 mM K₂HPO₄ buffer 용액 (pH 7.4)를 5 ml 첨가하여 28°C에서 200 rpm으로 1시간 동안 교반한 후, 클로로포름과 phosphate 버퍼를 각각 6.25 ml 첨가하여 약 30번 정도 섞어 준 다음 정치하였음. 분리된 하부의 유기용매 층 (약 12.5 ml)을 회수하여 80°C dry oven에서 약 30분 정도 건조한 후 오일의 무게를 측정하였음. 오일의 함량은 아래 식에 따라 결정하였음.
- Total lipid (g of oil per 100 g sample) = $[(W_L - W_D) / V_C] \times 100 / [V_P / W_S]$

W_D was the weight of an empty aluminum dish (g);

W_L the weight of an aluminum dish with dried lipid residue (g);

W_S the weight of sample (g);

V_C the total volume of chloroform in the graduated cylinder (ml); and

V_P the volume of chloroform transferred to the aluminum dish (ml).

나. 결과

- 당밀을 이용한 *Aurantiochytrium* sp. KRS101 배양(working volume 100ml) 결과, 배양 72 시간 후 당밀의 농도가 높아질수록 높은 균체무게를 보이거나 지방산 양은 당밀 48% 경우 글루코오스 대비 97%에 이름 (표 4). 당밀을 *Aurantiochytrium* sp. KRS101 배양에 저가 탄소원으로써의 가능성을 보임.

표 4. 당밀을 이용한 *Aurantiochytrium* sp. KRS101 배양 결과

	DCW	TFA
대조구(글루코오스)	21.72 g/l	12.35 g/l
당밀 12%	11.03 g/l	2.44 g/l
당밀 24%	24.00 g/l	5.24 g/l
당밀 36%	40.83 g/l	9.17 g/l
당밀 48%	41.88 g/l	11.97 g/l

(2). 농업부산물을 이용한 *Aurantiochytrium* sp. KRS101 미세조류 배양

가. 실험방법

- 질소원으로 사용하는 Yeast extract 대신 CSL(Corn steep liquor), 옥수수박, 타피오카, 소맥, 구연산박, 아몬드박, 팜박, 요소비료, 전지대두, 밀기울, 대두박, 대두분을 사용함. 먼저 농업부산물을 전처리없이 질소원으로 사용한 후 배양결과가 양호한 농업부산물을 1차선별함. 1차 선별된 농업부산물 10g을 증류수 100ml에 잘 녹인 후 고온멸균. 멸균 후 원심분리를 하여 상층액 2ml을 media(100ml)의 질소원으로 사용함.
- *Aurantiochytrium* sp. KRS101 미세조류 균체를 250ml 플라스크 [배지 (glucose, 60 g/l; yeast extract, 10 g/l; NaCl 5 g/l; KH_2PO_4 9 g/l)]에서 60 시간 동안 전배양한 후, 500ml 삼각플라스크에서 접종한 후 72시간 동안 회분식 배양을 실시하였음 [배지 (glucose, 60g/L;

KH₂PO₄, 9g/L; 질소원 2ml; NaCl, 5 g/l), 배양 온도 28°C, 교반속도 250 rpm].

○ 균체 내의 오일 함량 분석을 위해 Burja 등의 Bligh-Dyer 방법을 이용하여 오일을 추출하였음. 125 mg의 건조균체에 클로로포름 6.25 ml, 메탄올 12.5 ml과 50 mM K₂HPO₄ buffer 용액 (pH 7.4)를 5 ml 첨가하여 28°C에서 200 rpm으로 1시간 동안 교반한 후, 클로로포름과 phosphate 버퍼를 각각 6.25 ml 첨가하여 약 30번 정도 섞어 준 다음 정치하였음. 분리된 하부의 유기용매 층 (약 12.5 ml)을 회수하여 80°C dry oven에서 약 30분 정도 건조한 후 오일의 무게를 측정하였음. 오일의 함량은 아래 식에 따라 결정하였음.

$$\text{○ Total lipid (g of oil per 100 g sample)} = [(W_L - W_D) / V_C] \times 100 / [V_P / W_S]$$

W_D was the weight of an empty aluminum dish (g);

W_L the weight of an aluminum dish with dried lipid residue (g);

W_S the weight of sample (g);

V_C the total volume of chloroform in the graduated cylinder (ml); and

V_P the volume of chloroform transferred to the aluminum dish (ml).

나. 결과

○ 다양한 질소원을 이용하여 *Aurantiochytrium* sp. KRS101 배양(working volume 100ml)한 결과, 배양 72시간 후 대조군과 가장 비슷한 양상으로 보이는 질소원은 밀기울, 전지대두, 대두박, 대두분임 (그림. 12). 대두박과 대두분을 고온에서 용출한 뒤 *Aurantiochytrium* sp. KRS101 배양을 실시한 결과 yeast extract보다 양호한 결과를 얻었음.

표 5. 대두박, 대두분을 이용한 *Aurantiochytrium* sp. KRS101 배양 결과

질소원	DCW (g/l)	Lipid (% DCW)	TFA (g/l)
Yeast extract	29.5	17.51	5.17
대두박	20.36	44.00	8.96
대두분	25.55	31.39	8.02

(3). 당밀과 CSS (Corn Steep solid, CSS) 조합을 통한 *Aurantiochytrium* sp. KRS101 미세조류 배양

가. 실험방법

- 질소원인 Yeast extract 대신 corn steep solid(C.S.S)를 탄소원인 글루코오스 및 당밀과 조합하여 사용함.
- *Aurantiochytrium* sp. KRS101 미세조류 균체를 250ml 플라스크 [배지 (glucose, 60 g/l; yeast extract, 10 g/l; NaCl 5 g/l; KH₂PO₄ 9 g/l)]에서 60 시간 동안 전배양한 후, 500ml 삼각플라스크에서 접종 한 후 72 시간 동안 회분식 배양을 실시하였음 [배지 (glucose, 60g/L(당밀 24%); KH₂PO₄, 9g/L; NaCl, 5 g/l; yeast extract, 10 g/l (C.C.S, 10g/L)), 배양 온도 28°C, 교반속도 250 rpm].
- 균체 내의 오일 함량 분석을 위해 Burja 등의 Bligh-Dyer 방법을 이용하여 오일을 추출하였음. 125 mg의 건조균체에 클로로포름 6.25 ml, 메탄올 12.5 ml과 50 mM K₂HPO₄ buffer 용액 (pH 7.4)를 5 ml 첨가하여 28°C에서 200 rpm으로 1시간 동안 교반한 후, 클로로포름과 phosphate 버퍼를 각각 6.25 ml 첨가하여 약 30번 정도 섞어 준 다음 정치하였음. 분리된 하부의 유기용매 층 (약 12.5 ml)을 회수하여 80°C dry oven에서 약 30분 정도 건조한 후 오일의 무게를 측정하였음. 오일의 함량은 아래 식에 따라 결정하였음.
- Total lipid (g of oil per 100 g sample) = $[(W_L - W_D) / V_C] \times 100 / [V_P / W_S]$
 - W_D was the weight of an empty aluminum dish (g);
 - W_L the weight of an aluminum dish with dried lipid residue (g);
 - W_S the weight of sample (g);
 - V_C the total volume of chloroform in the graduated cylinder (ml); and
 - V_P the volume of chloroform transferred to the aluminum dish (ml).

나. 결과

표 6. C.C.S를 질소원으로 이용한 *Aurantiochytrium* sp. KRS101 배양 결과

sample	DCW(g/L)	Total lipid(g/L)	lipid content(%)
control	24.61	17.11	69.63
glucose+C.S.S	25.66	16.39	63.88
당밀(24%)+C.S.S	29.59	12.64	42.74

- 질소원을 C.S.S로 대체했을 경우 DCW는 대조군에 비교했을 때 줄어들지 않고 유지하는 경향을 보임. 또 탄소원 대체제로 당밀을 사용하고, 질소원으로 C.S.S를 사용했을 경우 DCW가 대조군에 비해 1.2배 가량 더 높은 것을 확인함 (표 6). 그러나 총 지방산 함량을 분석해 보았을 때, 탄소원으로 glucose를 사용한 경우는 균체량의 60% 이상이 지방 함량으로 나타났지만, 당밀을 사용한 경우에는 42%로 줄어드는 경향을 보임. 질소원을 C.S.S로 대체했을 경우 탄소원을 당밀로 했을 경우보다 글루코오스를 사용하는 것이 효과적이었음. C.S.S는 효과적인 질소원 대체제로 활용이 기대되어짐.

(4). 폐글리세롤(탄소원)을 이용한 *Aurantiochytrium* sp. KRS101 미세조류 배양

1) 반응표면분석법을 적용한 *Aurantiochytrium* sp. KRS101의 폐글리세롤 함유 배지 조성의 최적화

가. 실험방법

- Glycerol은 biodiesel을 생산하는 과정에서 생산되는 주요 부산물로 약 10% (w/w)의 비율로 생산이 된다. 화석연료 과다사용과 탄소배출량 제한으로 인한 biodiesel의 생산이 증가하면서 glycerol의 생산량 또한 급격히 증가하고 있다. 이에 따라 glycerol의 가격은 국제적으로 크게 감소하였으며, 생산된 glycerol의 효율적인 이용이 필요하다. 따라서 우리는 glycerol을 탄소원으로 이용하여 미세조류를 배양하여 지방산(fatty acid)을 생산하고자 함.
- 반응표면분석법 (Response Surface Methodology, RSM)은 발효공정과 생산 공정의 최적화를 수행하는데 가장 효과적인 방법으로, 탄소원으로 Crude glycerol (glycerol 81.5%, water 1%, metanol 0.5%, others 17%)을 사용하여 *Aurantiochytrium* sp. KRS101 미세조류의 Dry cell weight (DCW)생산에 가장 영향을 미칠 수 있는 변수 즉, 독립변수 (X_n) 즉, Crude glycerol(X_1), Corn steep liquor (X_2), Inoculation volume (X_3), Initial pH (X_4), 로 선정하였으며, 각 조건들은 -2, -1, 0, 1, 2로서 다섯 단계로 부호화하였고, 실험값은 표 7에 표시된 바와 같음. 다양한 조건의 배지 50 ml 를 포함하는 250-ml 플라스크에 *Aurantiochytrium* sp. KRS101 미세조류를 접종하여 28°C, 125rpm에서 72 시간 동안 배양하였음.

표 7. Experimental range and levels of the independent variables

Independent variables	Sympol code	Range and levels				
		-2	-1	0	1	2
Crude glycerol (g/l)	X_1	10	20	30	40	50
Corn steep liquor (ml/l)	X_2	10	20	30	40	50
Inoculation volume (%V/V)	X_3	1	6	11	16	21
Initial pH	X_4	5	5.5	6	6.5	7

- 표 7에 나타낸 독립변수는 중심합성실험계획 (central composite design, CCD)에 따라 표 8과 같이 30구로 설정하였으며, 또한 독립변수의 영향을 받는 종속변수 (Y) 즉, 생산된 DCW

를 측정하여 그 값을 회귀분석에 사용하였고, 이때 네 가지 독립변수와 종속변수에 대한 2차 회귀모형은 다음과 같음.

$$Y = B_0 + B_1X_1 + B_2X_2 + B_3X_3 + B_4X_4 + B_{11}X_1^2 + B_{22}X_2^2 + B_{33}X_3^2 + B_{44}X_4^2 + B_{12}X_1X_2 + B_{13}X_1X_3 + B_{14}X_1X_4 + B_{23}X_2X_3 + B_{24}X_2X_4 + B_{34}X_3X_4$$

- 여기서 Y는 종속변수 X₁, X₂, X₃, X₄는 독립변수, B₀는 절편, B_n은 회귀계수이고, 중심합성법에 의거해 얻은 실험결과를 바탕으로 "Design Expert" software (version 7.1.4, Stat-Ease, Inc., Minneapolis, USA)을 이용하여 통계적으로 분석하여 회귀방정식을 구하였으며, 회귀분석 결과 임계점이 최대점과 최소점이 아니고 안정점일 경우에는 능선분석을 하여 최적점을 구하였으며, contour map과 3차원 반응표면분석으로 Dry cell weight (DCW) 생산의 최적 조건을 찾았음.
- 균체 내의 오일 함량 분석을 위해 Burja 등의 Bligh-Dyer 방법을 이용하여 오일을 추출하였음. 125 mg의 건조균체에 클로로포름 6.25 ml, 메탄올 12.5 ml과 50 mM K₂HPO₄ buffer 용액 (pH 7.4)를 5 ml 첨가하여 28°C에서 200 rpm으로 1시간 동안 교반한 후, 클로로포름과 phosphate 버퍼를 각각 6.25 ml 첨가하여 약 30번 정도 섞어 준 다음 정치하였음. 분리된 하부의 유기용매 층 (약 12.5 ml)을 회수하여 80°C dry oven에서 약 30분 정도 건조한 후 오일의 무게를 측정하였음. 오일의 함량은 아래 식에 따라 결정하였음.
- Total lipid (g of oil per 100 g sample) = [(W_L-W_D)/V_C]*100 / [V_P/W_S]
 W_D was the weight of an empty aluminum dish (g);
 W_L the weight of an aluminum dish with dried lipid residue (g);
 W_S the weight of sample (g);
 V_C the total volume of chloroform in the graduated cylinder (ml); and
 V_P the volume of chloroform transferred to the aluminum dish (ml).
- 지방산 조성의 분석을 위해 건조균체에 5% (v/v) 황산-메탄올 용액 3 ml을 첨가한 후 90°C에서 1시간 동안 반응하였음. 지방산 에스테르 반응산물을 0.6 ml 헥산으로 추출한 후 가스크로마토그래피 [GC; Hewlett Packard 6890N equipped with a flame-ionization detector (FID) and an HP-5 (30 m × 0.32 mm, 0.25 mm; Agilent Technologies) capillary column] 법으로 분석하였음. 컬럼의 온도는 150°C (after 2 min of holding)에서 270°C (with a further 2 min of holding)로 분당 7°C 씩 증가하였음.

표 8. Experimental design of RSM studies using five independent variables with eight center points

Run	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	DCW (g/l)
1	-1.00	-1.00	-1.00	-1.00	2.9
2	1.00	-1.00	-1.00	-1.00	9.3
3	-1.00	1.00	-1.00	-1.00	8.1
4	1.00	1.00	-1.00	-1.00	12.9
5	-1.00	-1.00	1.00	-1.00	3.6
6	1.00	-1.00	1.00	-1.00	9.9
7	-1.00	1.00	1.00	-1.00	8.7
8	1.00	1.00	1.00	-1.00	18.8
9	-1.00	-1.00	-1.00	1.00	2.2
10	1.00	-1.00	-1.00	1.00	7.7
11	-1.00	1.00	-1.00	1.00	9.2
12	1.00	1.00	-1.00	1.00	14.6
13	-1.00	-1.00	1.00	1.00	3.3
14	1.00	-1.00	1.00	1.00	11.5
15	-1.00	1.00	1.00	1.00	9.3
16	1.00	1.00	1.00	1.00	18.1
17	-2.00	0.00	0.00	0.00	1.5
18	2.00	0.00	0.00	0.00	17.8
19	0.00	-2.00	0.00	0.00	3.6
20	0.00	2.00	0.00	0.00	15.1
21	0.00	0.00	-2.00	0.00	6.6
22	0.00	0.00	2.00	0.00	8.5
23	0.00	0.00	0.00	-2.00	8.3
24	0.00	0.00	0.00	2.00	10.2
25	0.00	0.00	0.00	0.00	9.8
26	0.00	0.00	0.00	0.00	7.3
27	0.00	0.00	0.00	0.00	8.0
28	0.00	0.00	0.00	0.00	9.8
29	0.00	0.00	0.00	0.00	11.1
30	0.00	0.00	0.00	0.00	10.9

나. 결과

○ 본실험에서는 유지성 미세조류인 *Aurantiochytrium* sp. KRS101균주의 폐글리세롤 함유 배지에서 반응표면분석법을 적용하여 DCW생산 최적화를 하고자 하였다. 실험 결과는 위의 Table 7에 결과를 나타내었다. 실험결과, crude glycerol = 40 g/l, Corn steep liquor = 40 ml/l, Inoculation volume = 16% (V/V), Initial pH = 5.5의 조건에서 가장높은 18.8 g/l의 DCW를 보였다(Run 8). 또한, crude glycerol = 10 g/l, Corn steep liquor = 30 ml/l, Inoculation volume = 11% (V/V), Initial pH = 6.0의 조건(Run 17)에서 1.5 g/l의 가장 낮은 DCW를 보였음.

○ *Aurantiochytrium* sp. KRS101 미세조류 이용하여 Dry cell weight (DCW) 생산에 영향을 주는 4개의 변수 중에서 유의확률 (Probability value, P value) 값이 가지는 의미는 일반적으로 0.05 보다 작으면 처리간 효과 차이가 “통계적으로 유의하다 (significant)”라고 하며, 이 값이 0.01 보다 작으면 “통계적으로 매우 유의하다 (highly significant)” 라고 말함. 여기서 유의하다란 용어는 가정한 모형이 데이터 해석에 의미가 있다는 뜻임. 표 9의 분산분석표 (ANOVA) 결과에 의하면 모델식은 P-value가 <0.0001으로 통계적으로 매우 유의한 범위에 있음을 알 수 있으며, 변수 변화량 (CV)의 값은 13.39 이므로 실험의 정확성과 신뢰도가 높고, 이차회귀식에 의하여 형성된 반응표면결과 R²는 0.9353으로 높게 나타났음. 분산분석법에 의해 결정된 quadratic 방정식을 다음과 같이 나타내었으며,

$$Y = -15.35 + 0.18X_1 + 0.3X_2 + 0.17X_3 + 0.46X_4 + -0.54X_1^2 + 0.03X_2^2 - 0.91X_3^2 - 0.36X_4^2 + 0.18X_1X_2 + 0.19X_1X_3 - 0.23X_1X_4 + 0.30X_2X_3 - 0.25X_2X_4 + 0.05X_3X_4$$

○ 산출된 Dry cell weight (DCW) 생산 최적 조건은 crude glycerol = 48.08 g/l, Corn steep liquor = 48.19 ml/l, Inoculation volume = 12.02 (% V/V), 초기 pH = 6.2이었으며, 이 조건 하에서 DCW의 예상 생산치는 13.00 g/l였으며, 실제 생산치는 13.56 g/l로 거의 일치하는 값을 보였으며, 14.5 g/l의 Total lipid를 얻었음 (표 10).

표 9. Analysis of variance for quadratic model (ANOVA)

Source	SS	DF	MS	F-value	Prove > F
Model	559.3	4	139.82	90.30	<0.0001
Residual	38.71	25	1.55		
Lack of fit	28.16	20	1.41	0.67	0.7655
Pure error	10.55	5	2.11		
Total	598.01	29			

R² = 0.9353; R²(Adj) = 0.9249; CV = 13.39; SS, sum of squares; DF, degrees of freedom; MS, mean squares

표 10. 반응표면 분석에 의한 최적조건에서의 *Aurantiochytrium* sp. KRS101 배양 결과

sample	DCW(g/L)	Total lipid(g/L)	lipid content(%)
최적조건	13.56	5.7	42.1%

2) 폐글리세롤 농도의 영향

가. 실험방법

- Glycerol은 biodiesel을 생산하는 과정에서 생산되는 주요 부산물로 약 10% (w/w)의 비율로 생산이 된다. 화석연료 과다사용과 탄소배출량 제한으로 인한 biodiesel의 생산이 증가하면서 glycerol의 생산량 또한 급격히 증가하고 있다. 이에 따라 glycerol의 가격은 국제적으로 크게 감소하였으며, 생산된 glycerol의 효율적인 이용이 필요하다. 따라서 우리는 glycerol을 탄소원으로 이용하여 미세조류를 배양하여 지방산(fatty acid), 특히 DHA를 생산하고자 함.
- 미세조류인 KRS의 배양에는 약 80%의 crude glycerol을 이용하였다. 배지 내의 glycerol의 함량은 HPLC를 이용하여 분석하였다. 컬럼은 phenomenex의 Rezex ROA-Organic acid H+ 300 × 7.80 mm를 이용하였으며, 이동상은 2.5 mM H₂SO₄, 검출기는 RI를 이용하였다. 미세조류 배양을 위한 기본 배지조성은 yeast extract 10 g, KH₂PO₄ 9 g, sea salt 5 g에 glycerol과 CSL을 각각 25 ~ 70 g/L, 2.5 ~ 12.5 g/L 농도로 맞추고 D.W를 첨가하여 total volume을 1 L로 하여 glycerol과 CSL 농도에 따른 세포성장 실험을 진행하였음. 초기 glycerol와 CSL의 적절한 농도를 확인하기 위해 500 mL flask를 이용하여 배양부피를 100 mL로 해서 실험을 진행하였다. 배양은 각각의 배지에 tetracycline을 10 mg/L 농도로 첨가하여 shaking incubator에서 125 rpm, 28 °C로 배양하였음.

나. 결과

- 실험결과 그림 13에 나타낸 바와 같이 배양 9 시간 이전의 초기 cell growth는 glycerol 35 g/L에서 세포성장이 좀 더 빠른 것으로 나타났다. 그러나 그 이후 세포성장은 고농도의 glycerol 배지에서 높게 나타났다. KRS를 glycerol 농도별로 실험한 결과 약 60 g/L의 농도에서 세포성장이 가장 높은 것을 나타났다. 전체 배양과정에서 glycerol 소모는 50 ~ 60 g/L에서 가장 많은 것으로 나타났다. 배양 96 시간에 50 g/L에서는 glycerol을 거의 다 소모한 것으로 보아 배지 내의 glycerol의 농도가 낮아져 더 이상 KRS의 growth가 증가하지 못한 것으로 보임.

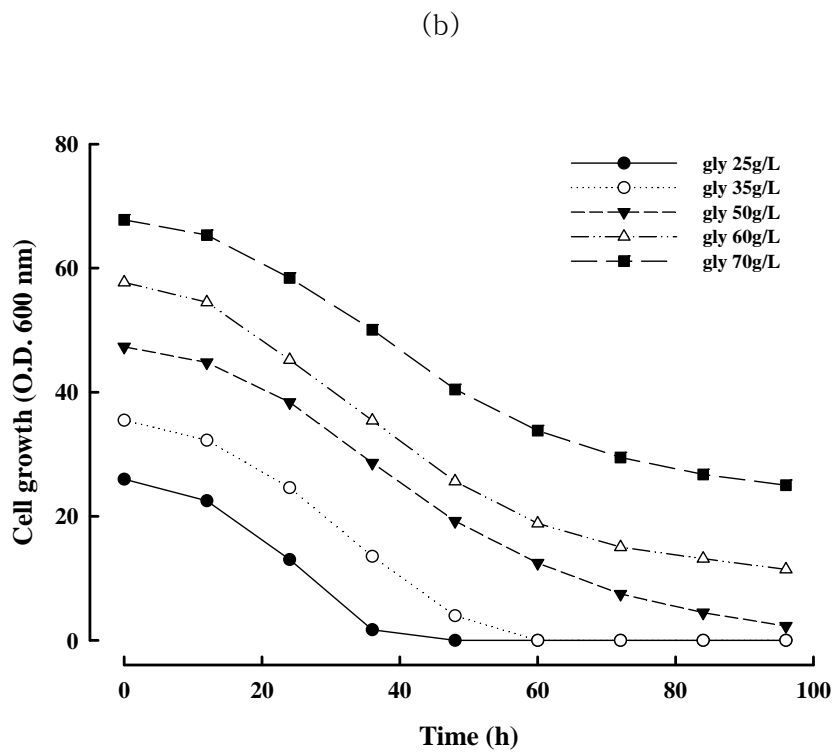
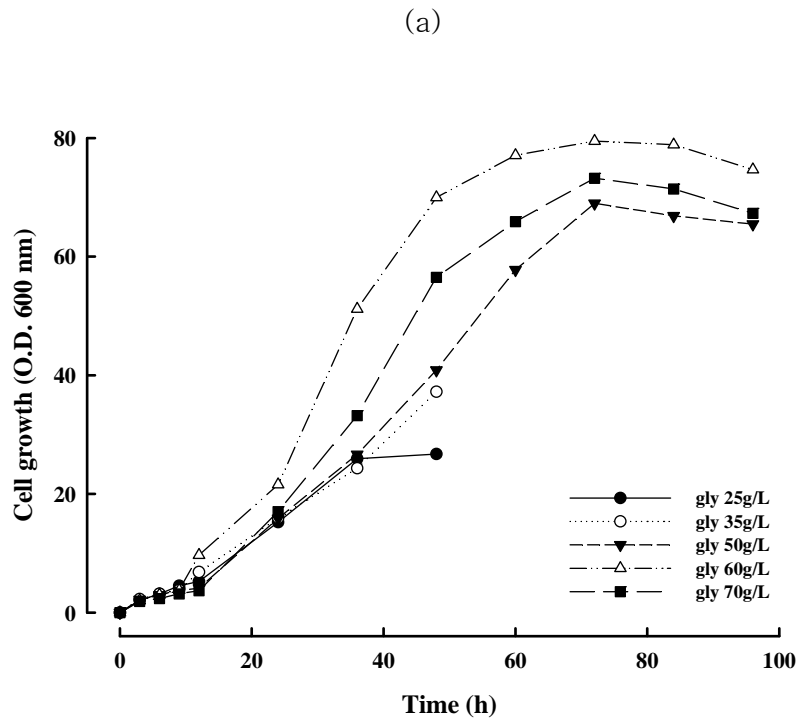


그림 13. 초기 glycerol 농도에 따른 KRS 세포성장 변화. (a) cell growth, (b) glycerol 농도

표 11. 초기 glycerol 농도에 따른 growth 및 glycerol 소모량 변화

	Glycerol 25 g/L		Glycerol 35 g/L		Glycerol 50 g/L		Glycerol 60 g/L		Glycerol 70 g/L	
	growth	glycerol	growth	glycerol	growth	glycerol	growth	glycerol	growth	glycerol
0	0	25.99	0	35.47	0	47.31	0	57.71	0	67.80
12	5.24	22.50	6.83	32.27	4.11	44.79	9.67	54.49	3.70	65.34
24	15.23	13.01	15.92	24.59	15.86	38.38	21.57	45.21	17.01	58.43
36	25.93	1.71	24.32	13.54	26.66	28.59	51.17	35.44	33.21	50.07
48	26.73	-	37.22	3.96	40.86	19.24	69.97	25.63	56.51	40.44
60	-	-	-	-	57.76	12.46	77.07	18.84	65.91	33.81
72	-	-	-	-	68.96	7.46	79.47	15.04	73.21	29.48
84	-	-	-	-	66.86	4.46	78.87	13.15	71.41	26.75
96	-	-	-	-	65.46	2.29	74.67	11.44	67.31	25.02

3) CSL(Corn steep liquor) 농도의 영향

가. 실험방법

- 질소원으로 사용한 yeast extract를 대신해서 저가배지인 corn steep liquor에서의 KRS의 세포성장을 확인하였다, 초기 glycerol의 농도를 50 g/L로 하고 CSL 농도를 2.5 ~ 12.5 g/L로 하여 실험을 진행하였음.

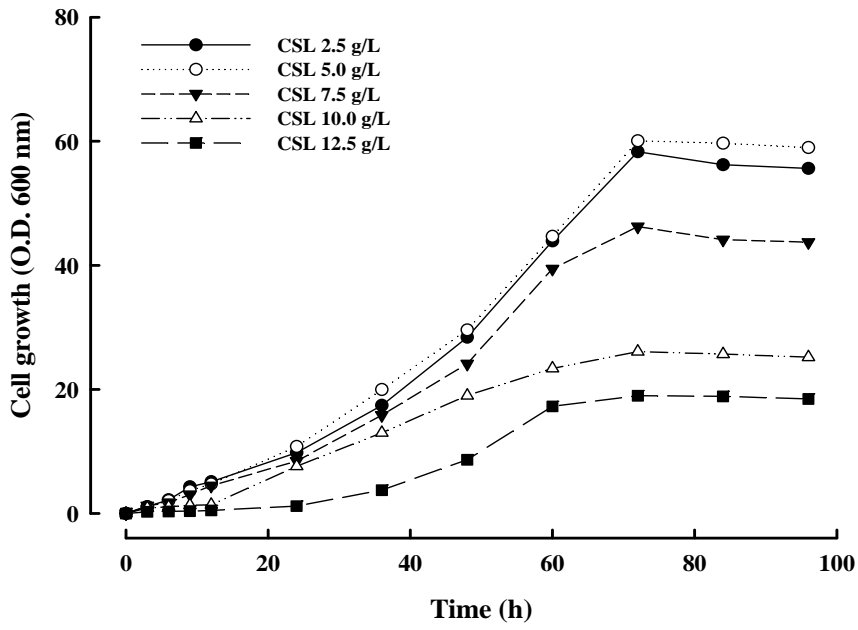
나. 결과

- CSL 농도별 실험 결과 표 12와 그림 14에 나타낸바와 같이 CSL 5 g/L를 첨가한 배지에서 세포성장이 가장 높은 것으로 나타났다. 그리고 그 이상의 농도에서는 오히려 KRS의 세포성장이 급격히 감소하는 것을 나타났다. 2.5 g/L와 5.0 g/L에서의 세포성장은 거의 차이가 없는 것으로 나타났다. 5.0 g/L 이상의 CSL에서는 glycerol의 소모속도도 급격히 감소하였으며, 배양 96 시간이 지나도 배지 내에 최대 31 g/L의 glycerol이 남아있는 것을 나타났다. Flask 배양 실험결과 초기 glycerol 농도 50 g/L와 CSL 5.0 g/L가 KRS의 성장 배지로 사용하기에 가장 적절한 것으로 보임.

표 12. 초기 CSL 농도에 따른 growth 및 glycerol 소모량 변화

	CSL 2.5 g/L		CSL 5.0 g/L		CSL 7.5 g/L		CSL 10.0 g/L		CSL 12.5 g/L	
	growth	glycerol	growth	glycerol	growth	glycerol	growth	glycerol	growth	glycerol
0	0	47.02	0	47.89	0	47.80	0	48.77	0	46.97
12	1.1	44.71	1.03	45.89	1.23	46.26	0.87	47.73	0.26	46.67
24	2.2	39.64	2.06	42.56	1.74	43.06	1.06	45.94	0.32	46.40
36	4.29	33.21	3.68	37.24	3.03	38.85	1.32	42.51	0.37	45.55
48	5.12	24.09	4.76	30.42	4.47	34.47	1.38	37.26	0.49	44.95
60	9.82	14.40	10.78	21.24	8.43	28.33	7.59	31.93	1.18	41.97
72	17.42	5.36	19.98	10.71	15.83	20.05	12.99	25.34	3.76	38.74
84	28.42	1.64	29.58	4.25	24.13	17.55	18.99	22.16	8.67	34.23
96	43.92	0.00	44.68	0.00	39.43	14.79	23.39	19.98	17.27	31.23

(a)



(b)

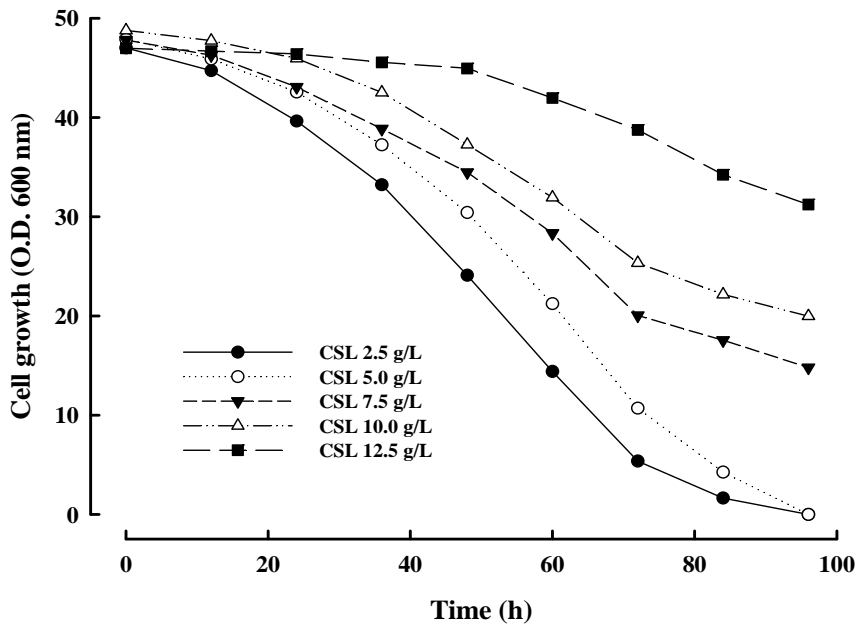


그림 14. 초기 CSL 농도에 따른 KRS 세포성장 변화. (a) cell growth, (b) glycerol 농도

2. 배양 공정 변수 최적화

(1) pH의 영향

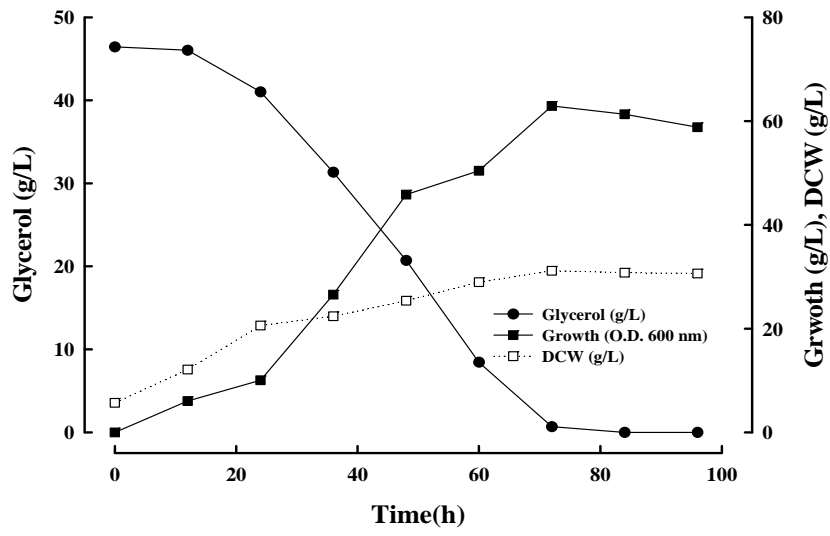
가. 실험방법

- Glycerol 50 g/L, CSL 5.0 g/L 그리고 그 외의 배지 성분은 동일하게 유지하고 5 L bioreactor를 이용하여 교반 속도를 200 rpm으로 고정하고 pH와 vvm의 변화에 따른 cell growth 및 lipid 생산량의 변화를 비교하였음.

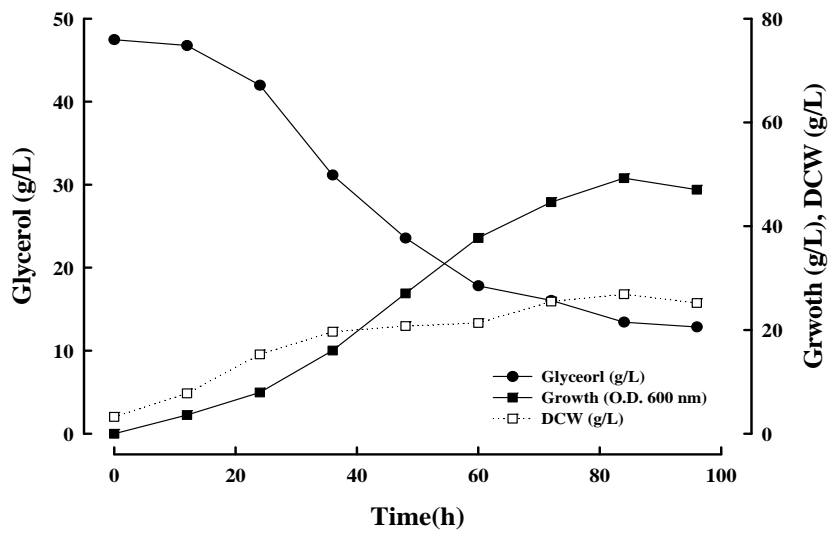
나. 결과

- pH 5.5 ~ 7.0으로 조절하여 KRS를 각각 배양한 결과 그림 15에 나타난 바와 같이 cell growth는 pH 5.5에서 배양 72 시간에 optical density 62.94로 가장 높은 것으로 나타났다. 또한 이 때 세포건조 중량도 31.14 g/L로 가장 높은 것으로 나타났다. Glycerol의 소모가 pH 5.5에서 72 시간에 전부 소모된 것으로 나타난다. 따라서 glycerol의 부족으로 인해 더 이상 자라지 못하고 세포성장이 이후 감소한 것으로 보인다. pH 5.5 이상의 조건에서는 세포성장 전체적으로 감소하는 것으로 나타났으며 glycerol의 소모 또한 줄어들어 배양 96 시간 이후에도 glycerol이 배지 내에 남아있는 것으로 나타났다. 미세조류의 total lipid에서 DHA의 함량은 모든 pH 조건에서 거의 유사하게 약 40~50% 인 것으로 나타났다 (Fig. 17). 세포내의 lipid 함량은 배양과정 중에서 지속적으로 증가하는 것으로 나타났으며, 최대 함량은 pH의 변화에 따라 차이가 크게 나타났다. 건조중량에서 lipid가 차지하는 비율은 pH 5.5에서 35.28%로 가장 높았고 pH 7.0에서 18.58%로 가장 낮은 것으로 나타났다. 배양 L 당 lipid의 생산량 또한 pH 5.5에서 10.99 g/L로 가장 높게 나타났다. Crude glycerol의 이용한 배양에서 pH의 변화는 DHA의 함량 변화에 미치는 영향은 아주 적은 것으로 보이며 total lipid의 함량에 영향을 미치는 것으로 나타남.

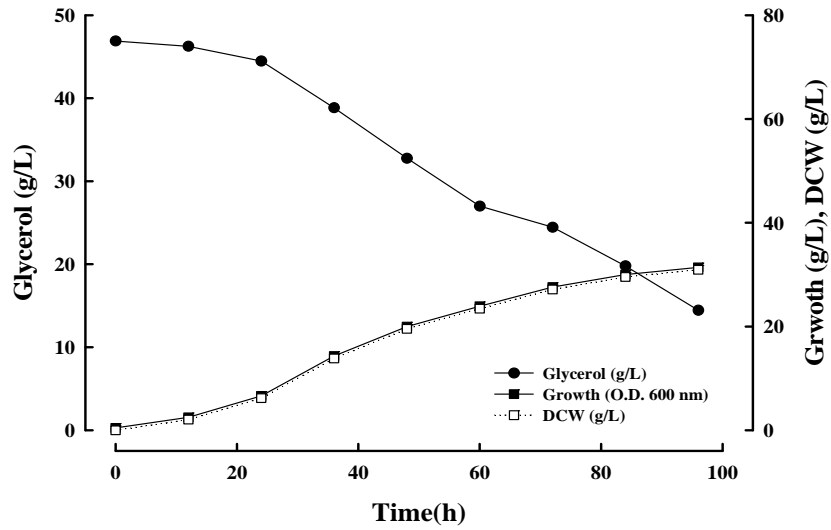
(a) pH 5.5



(b) pH 6.0



(c) pH 6.5



(d) pH 7.0

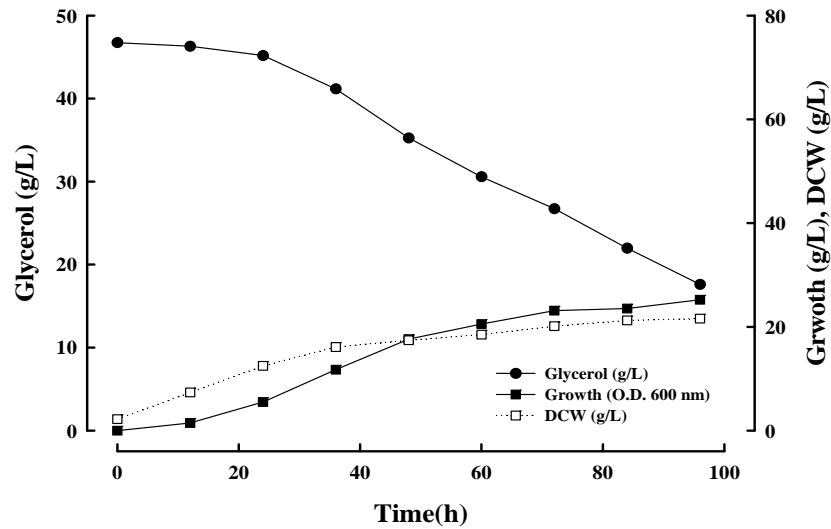


그림 15. 5L STR 배양기에서 pH 조절에 따른 KRS의 cell growth 및 glycerol 소모. (a) pH 5.5, (b) pH 6.0, (c) pH 6.5, (d) pH 7.0. Total sugar, closed circles; growth, closed squares; dry cell weight, open squares.

(2) Aeration의 영향

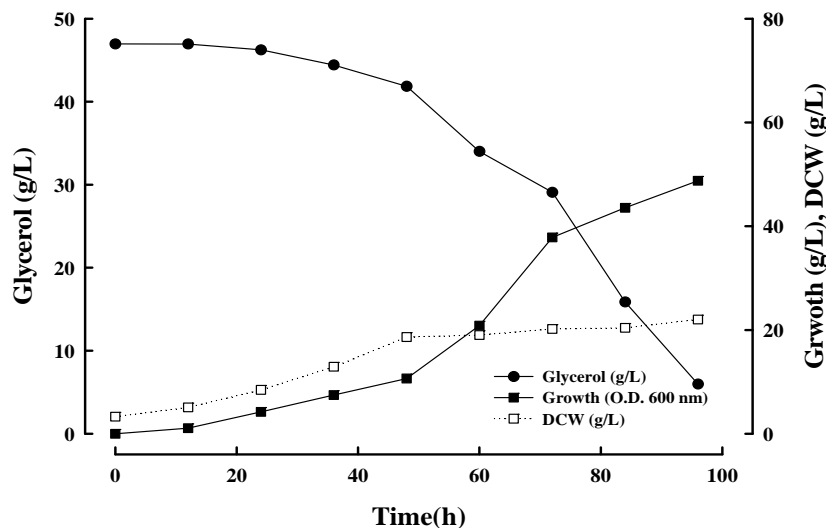
가. 실험방법

- KRS 배양에서 aeration의 영향을 확인하기 위해 5 L STR 배양기를 이용하여 vvm에 따른 변화를 확인하였다. 배지 성분 및 전배양은 pH 실험과 동일하게 유지하였다. 산소공급량 (vvm) 외에 배양조건은 28 °C, 200 rpm으로 pH 6.0을 유지하며 배양하였음.

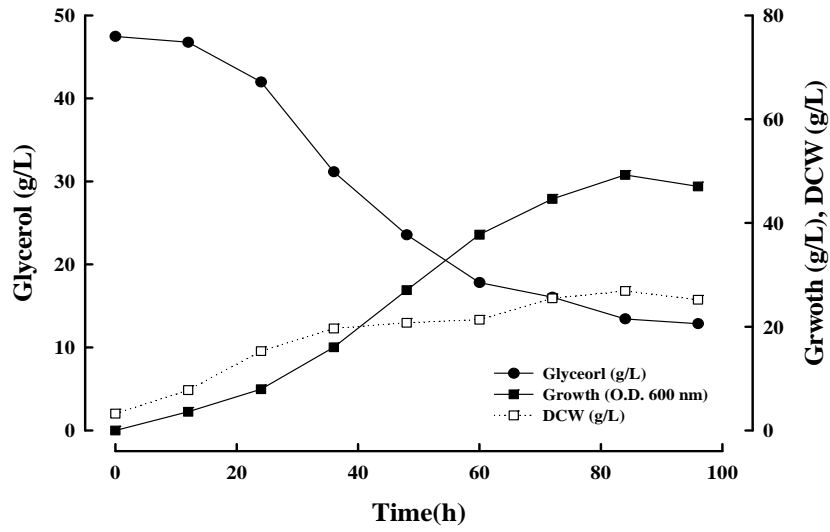
나. 결과

- 배양 결과 그림 16, 17에 나타낸 바와 같이 3.5 vvm에서 배양 96 시간에 optical density 65.38로 가장 높은 것으로 나타났으며, 그 외의 조건에서는 대략 50 정도인 것으로 나타났다. 세포건조 중량은 2.0 vvm과 3.0 vvm에서 최대값이 각각 26.88, 25.96 g/L로 큰 차이가 없었으며, 3.5 vvm에서는 29.45 g/L로 높게 나타났다. 산소공급량에 따른 배양결과 total lipid의 함량은 대략 20~30% 정도인 것으로 나타났다. Total lipid 중에서 DHA의 함량은 차이가 크게 나는 것도 있었지만 대부분 약 40~50% 정도인 것으로 나타났다. 3.5 vvm에서 total lipid는 8.78 g/L로 나타났으며 이 때 DHA의 생산량은 3.54 g/L로 확인되었음.

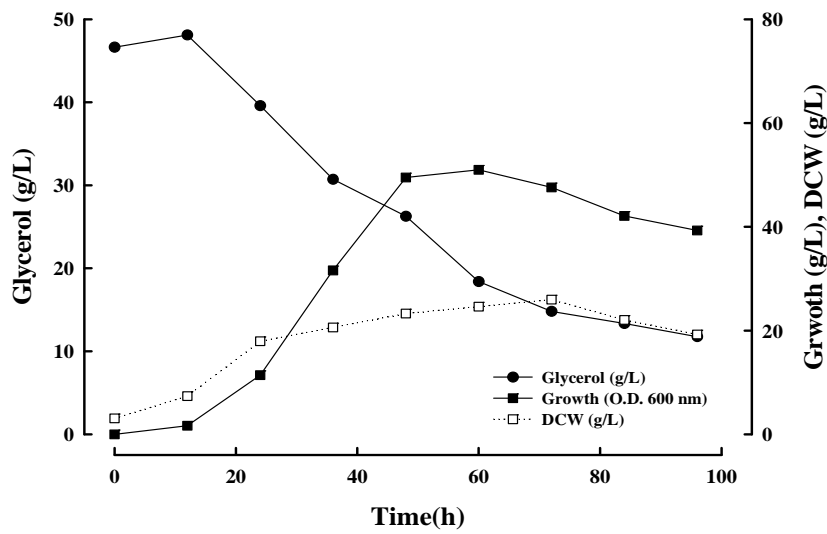
(a) 1.0 vvm



(b) 2.0 vvm



(c) 3.0 vvm



(d) 3.5 vvm

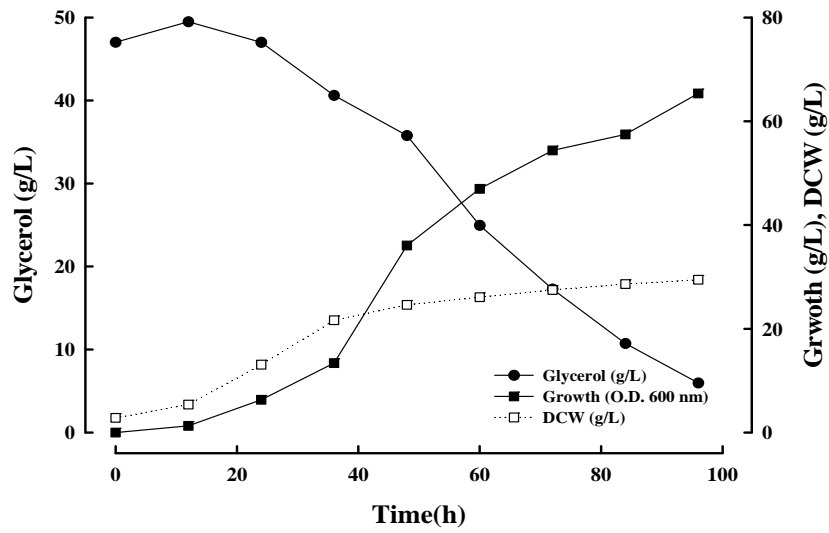
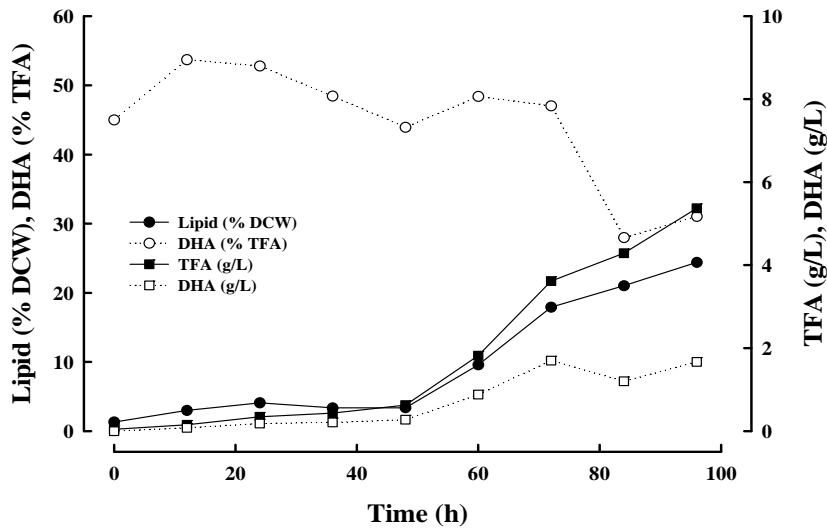
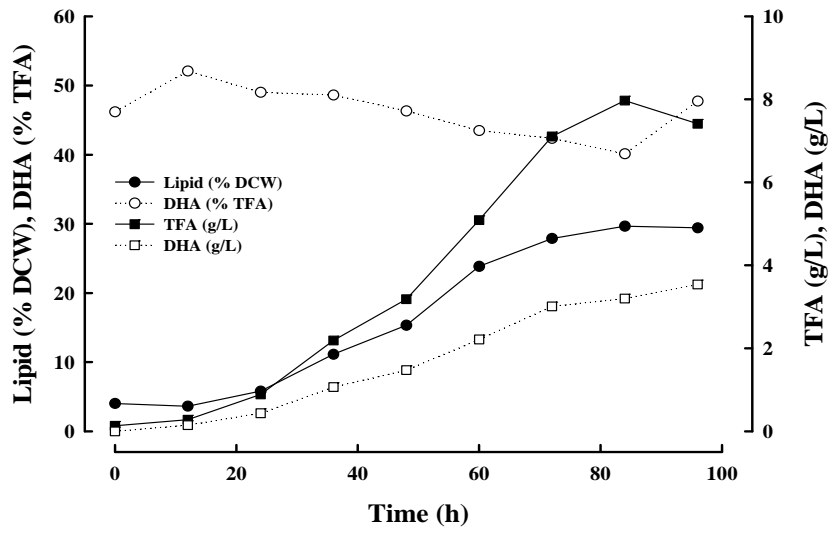


그림 16. 5L STR 배양기에서 air aeration에 따른 KRS의 cell growth 및 glycerol 소모. (a) 1.0 vvm, (b) 2.0 vvm, (c) 3.0 vvm, (d) 3.5 vvm. Total sugar, closed circles; growth, closed squares; dry cell weight, open squares.

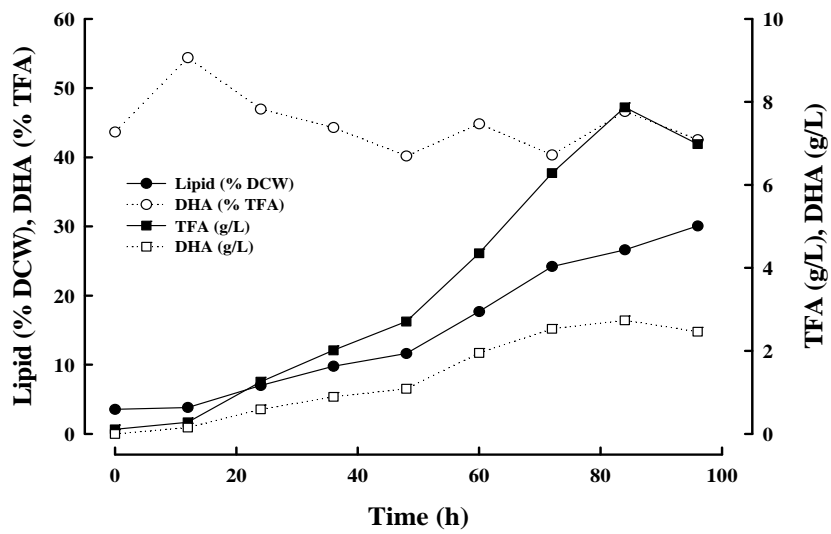
(a) 1.0 vvm



(b) 2.0 vvm



(c) 3.0 vvm



(d) 3.5 vvm

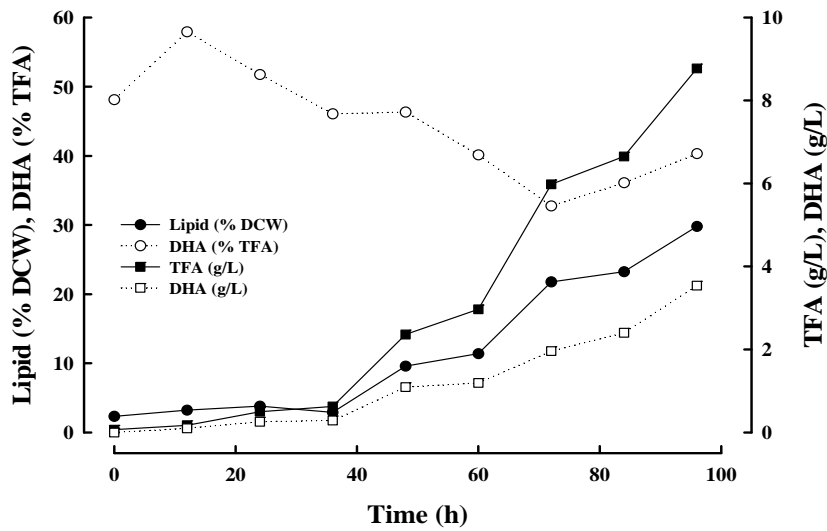


그림 17. 5L STR 배양기에서 pH 조절에 따른 KRS의 lipid 및 DHA 생산량 변화. (a) 1.0 vvm, (b) 2.0 vvm, (c) 3.0 vvm, (d) 3.5 vvm. Lipid(% DCW), closed circles; DHA(% TFA), open circles; TFA(g/L), closed squares; DHA(g/L), open squares.

(3) 균체 접종량의 영향

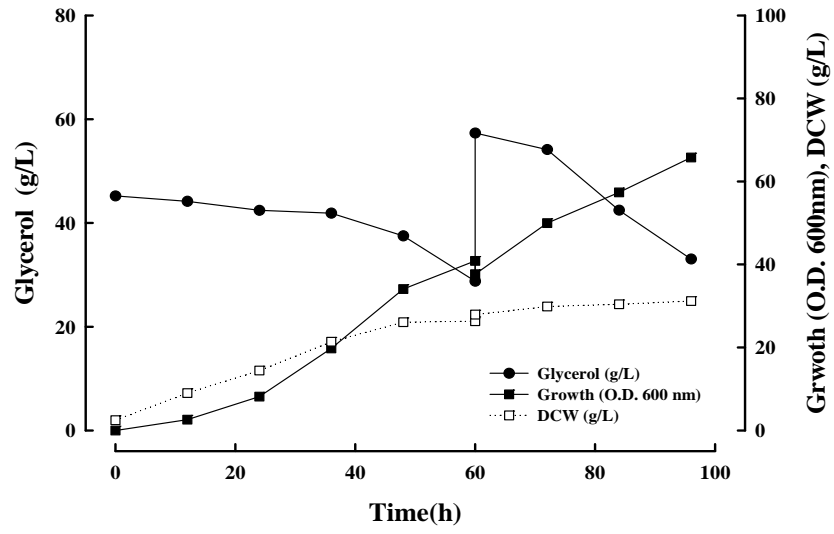
가. 실험방법

- KRS 배양에서 균체 접종량의 영향을 확인하기 위해 5 L STR 배양기를 이용하여 접종량에 따른 변화를 확인하였다. 배지 성분 및 전배양은 pH 실험과 동일하게 유지하였다. 산소 공급량(vvm) 외에 배양조건은 28 °C, 200 rpm으로 pH 6.0을 유지하며 배양하였음.

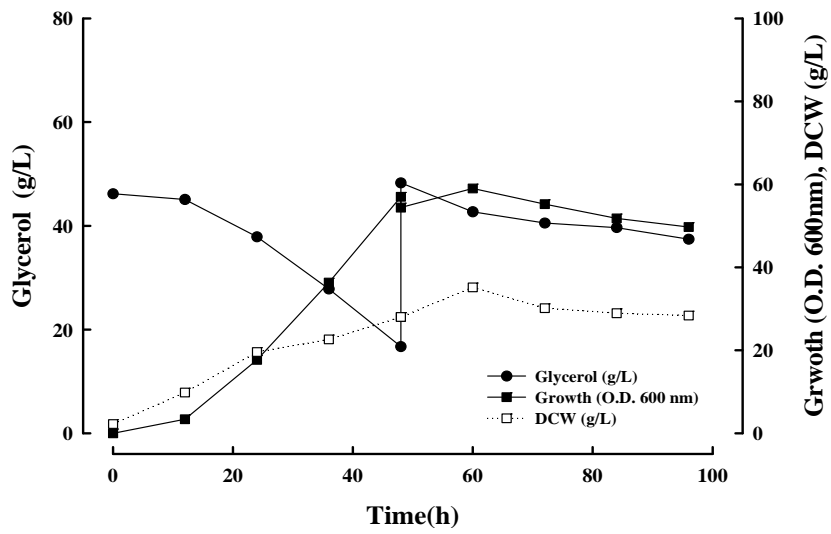
나. 결과

- 초기 접종량에 따른 cell growth의 차이를 비교한 결과 그림 18에 나타낸 바와 같이 14.0 g/L에서는 약 O.D. 90 정도에 도달하였으나 그 이외의 접종량에서는 60~70 정도로 낮은 것으로 나타났다. 세포건조 중량은 O.D. 값의 약 60%로 EFB로 배양했을 때와 비교해서 매우 높게 나타났다. 접종량 14.0 g/L에서 배양 96 시간에 세포건조 중량은 51.54 g/L를 얻을 수 있었다. 세포건조중량에서 lipid의 함량은 대략 30% 정도인 것으로 나타났으며, 이 중 DHA의 함량은 약 40~50% 사이인 것으로 나타났다. Total lipid와 DHA의 총량은 접종량 14 g/L에서 가장 높은 것으로 나타났으며 각각 13.26, 7.125 g/L로 확인되었음.

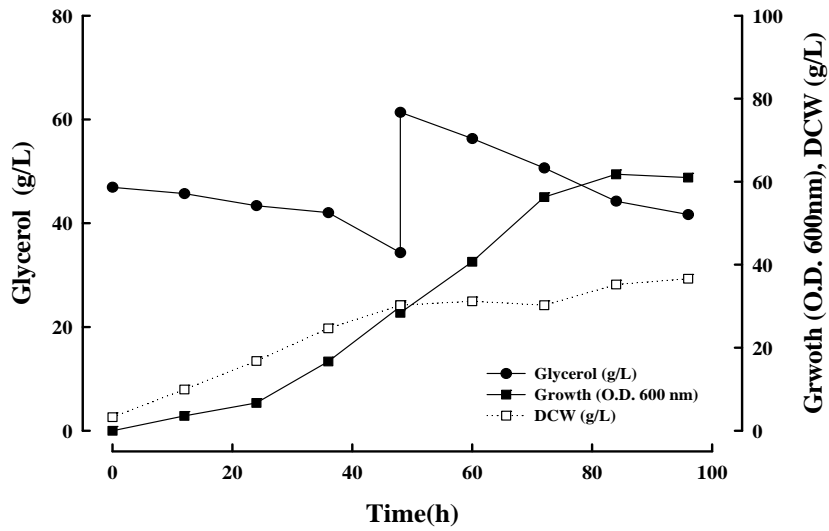
(a) 10% (3.5 g/L)



(b) 20% (7.0 g/L)



(c) 30% (10.5 g/L)



(d) 40% (14.0 g/L)

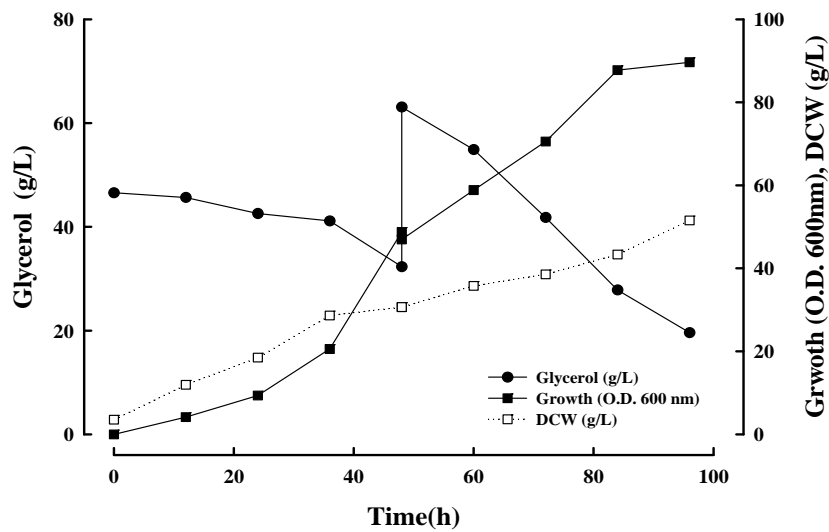


그림 18. 5L STR 배양기에서 초기 접종량에 따른 KRS의 cell growth 및 glycerol 소모. (a) 10%, (b) 20%, (c) 30%, (d) 40%. Total sugar, closed circles; growth, closed squares; dry cell weight, open squares

3. 배양공정 운전방식

(1) 반연속식(Repeated fed-batch) 배양

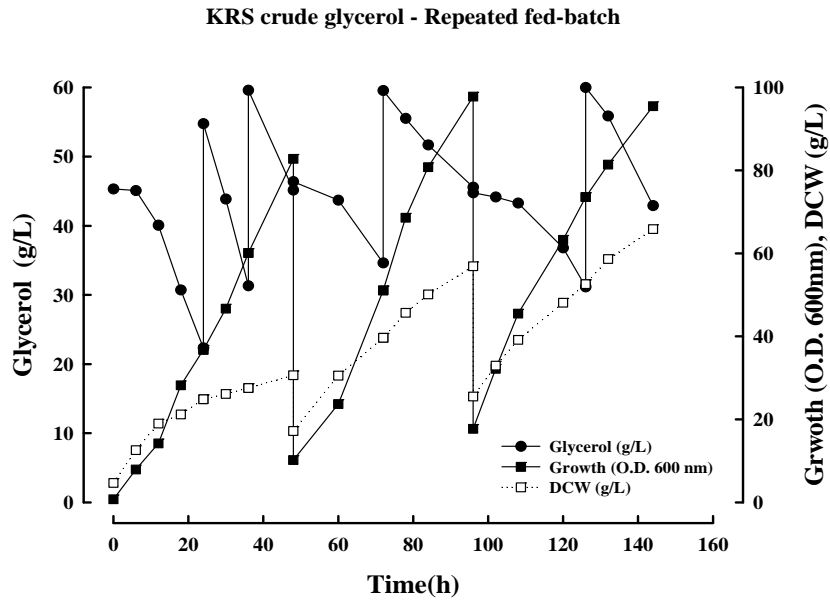
가. 실험방법

- 배양은 온도 28 °C, 교반속도 200 rpm, 산소공급량을 3.5 vvm으로 고정하고 auto controller를 사용하여 HCl과 NH₄OH를 배지 내로 주입하여 pH를 5.5로 유지하면서 배양하였다. 사용한 배지는 crude glycerol 50 g, CSL 5.0 g, KH₂PO₄ 9 g, sea salt 5 g에 D.W를 첨가하여 total volume을 1 L로 하여 배지를 만들었다. 전배양 또한 동일한 배지를 이용하여 1 L baffle flask에 200 mL을 28 °C, 125 rpm에서 약 3일간 배양하였다. 5 L STR 배양기를 이용한 KRS 배양은 working volume 2L, 접종량은 KRS 건조중량으로 14 g/L를 접종하였다. Repeated fed-batch는 배양 48 시간마다 배양배지의 40%를 남기고 새로운 배지를 첨가하여 실험하였다.

나. 결과

- 배양결과 48, 96 시간에 배지 교환을 할 때 초기 세포 농도가 급격히 증가하는 것으로 나타났으며 세포 건조 중량도 그에 따라 크게 증가하는 것으로 나타났다. 초기 세포 접종량을 계산하여 세포 건조 중량의 증가를 비교하여도 48, 96, 144 시간에서 증가량이 각각 25.94, 39.72, 40.34 g/L로 두 번째 배양에서 증가량이 약 50% 이상 높아졌으며 그 이후 증가량을 유지하는 것으로 나타났다 (그림 19 a). 세포 건조 중량에서 total lipid의 함량은 초기 배양의 마지막인 48 시간에 38.24% 높게 나타났으나 이후 96, 144 시간에서는 약 20 %로 lipid의 함량이 급격히 감소하는 것으로 나타났다. 그러나 DHA의 함량은 약 40~50%로 유지되는 것으로 나타났다. 전체적으로 배양단계를 거치면서 세포 건조 중량이 증가하였으나 lipid의 함량이 크게 감소하여 total lipid는 48, 96, 144 시간에 각각 11.72, 11.88, 13.67 g/L로 그 차이가 크지 않았다 (그림 19 b)).

(a)



(b)

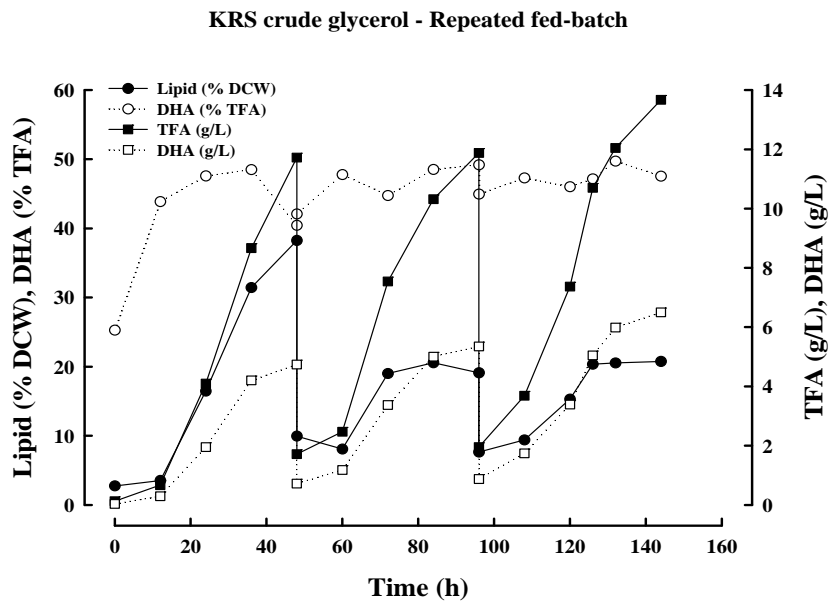


그림 19. 5L STR 배양기에서 KRS의 repeated fed-batch. (a) cell growth 및 glycerol 소모, (b) lipid 및 DHA 생산량 변화.

제 3 절 *Aurantiochytrium* sp. KRS101 균주 배양 스케일업 공정 개발

1. 50, 500L 배양기를 이용한 유가식 배양

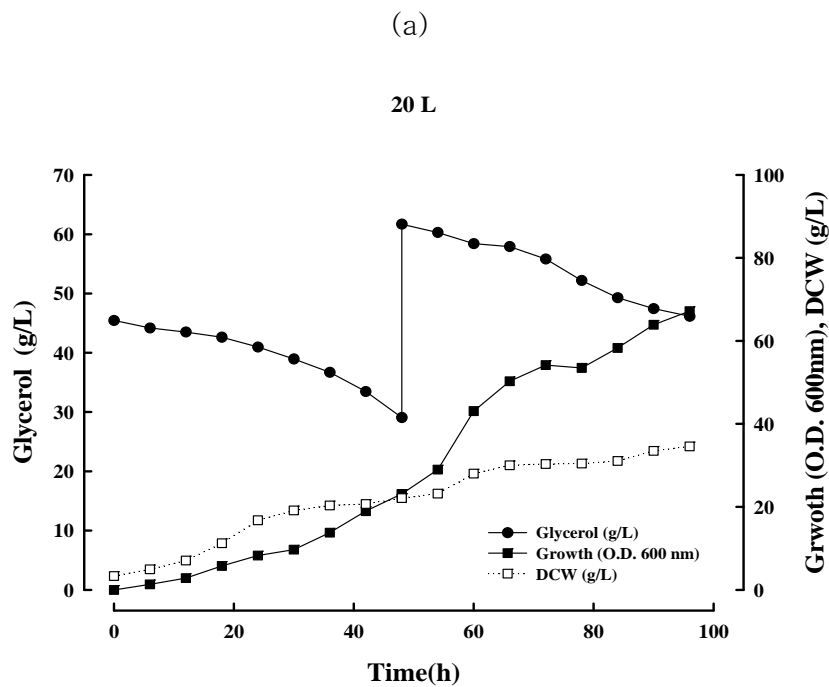
가. 실험방법

- 대량배양에서 KRS의 성장 및 lipid의 생산량을 확인하기 위해 50 L와 500 L의 배양기를 이용하여 scale-up 실험을 진행하였다. 배양온도는 28 °C를 유지하였으며, pH는 auto controller를 사용하여 HCl과 NH₄OH를 배지 내로 주입하여 pH를 6.5로 유지하면서 배양하였다. 사용한 배지는 crude glycerol 50 g, CSL 5.0 g, KH₂PO₄ 9 g, sea salt 5 g에 D.W를 첨가하여 total volume을 1 L로 하여 배지를 만들었다. 전배양 또한 동일한 배지를 이용하여 3일간 배양하여 working volume의 10%를 접종하였다. 배양기의 working volume은 50과 500 L에서 각각 20, 300 L로 하여 배양하였다. 50 L 배양기에서의 운전 조건은 100 rpm, 2.0 vvm으로 fed-batch 배양하였음.
- 균체 내의 오일 함량 분석을 위해 Burja 등의 Bligh-Dyer 방법을 이용하여 오일을 추출하였음. 125 mg의 건조균체에 클로로포름 6.25 ml, 메탄올 12.5 ml과 50 mM K₂HPO₄ buffer 용액 (pH 7.4)를 5 ml 첨가하여 28°C에서 200 rpm으로 1시간 동안 교반한 후, 클로로포름과 phosphate 버퍼를 각각 6.25 ml 첨가하여 약 30번 정도 섞어 준 다음 정치하였음. 분리된 하부의 유기용매 층 (약 12.5 ml)을 회수하여 80°C dry oven에서 약 30분 정도 건조한 후 오일의 무게를 측정하였음. 오일의 함량은 아래 식에 따라 결정하였음.
- Total lipid (g of oil per 100 g sample) = $[(W_L - W_D) / V_C] \times 100 / [V_P / W_S]$
W_D was the weight of an empty aluminum dish (g);
W_L the weight of an aluminum dish with dried lipid residue (g);
W_S the weight of sample (g);
V_C the total volume of chloroform in the graduated cylinder (ml); and
V_P the volume of chloroform transferred to the aluminum dish (ml).

나. 결과

- 50 L 배양기에서의 운전 조건은 100 rpm, 2.0 vvm으로 fed-batch 배양하였다. 배양결과

cell growth는 O.D. 67.19까지 증가하는 것으로 나타났으며 세포 건조 중량은 34.59 g/L까지 도달하는 것으로 나타났다 (그림 20 a). Total lipid의 함량은 배양 72 시간 이후 약 22~23% 정도로 안정되는 것으로 나타났으며 DHA의 함량은 약 50% 전후로 변화하는 것으로 나타났다 (그림 20 b). Total lipid와 DHA의 최대 생산량은 각각 7.74, 3.57 g/L로 5 L 배양기에서의 결과에 비해 감소한 것으로 나타났다. 500 L 배양기에서의 운전 조건은 100 rpm, 0.67 vvm으로 fed-batch 배양하였다. 배양 결과 세포 성장은 O.D. 124.67까지 도달하는 것으로 나타났으며, 건조 중량으로는 최대 50.58 g/L까지 도달하는 것으로 나타났다. 이는 5 L와 50 L 배양 결과에 비해 크게 증가한 것으로 나타났다. 세포 건조 중량에서의 lipid의 함량은 60 시간 이후 약 35~38%로 나타났으며, DHA의 함량은 이전 실험과 유사하게 약 50% 정도로 나타났다. Total lipid와 DHA의 최대 생산량은 각각 19.15, 10.52 g/L로 5 L 배양기에서의 결과에 비해 2.5배 이상 크게 증가한 것으로 나타났다.



(b)

20 L

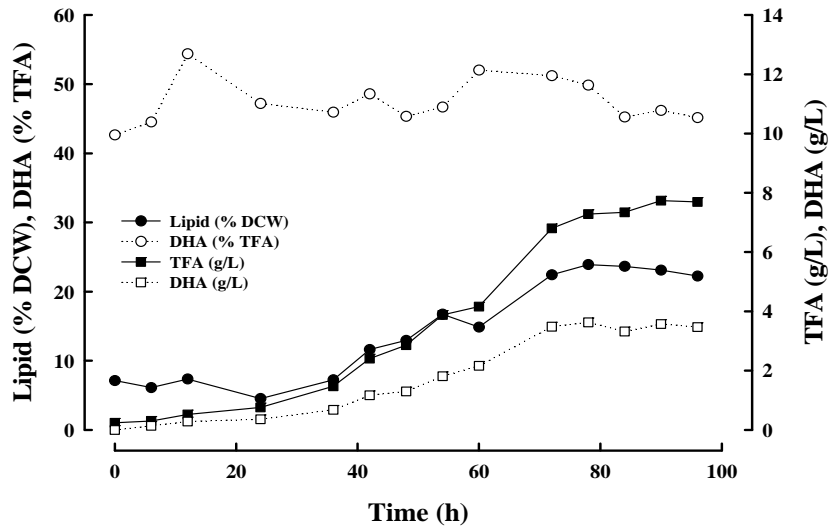
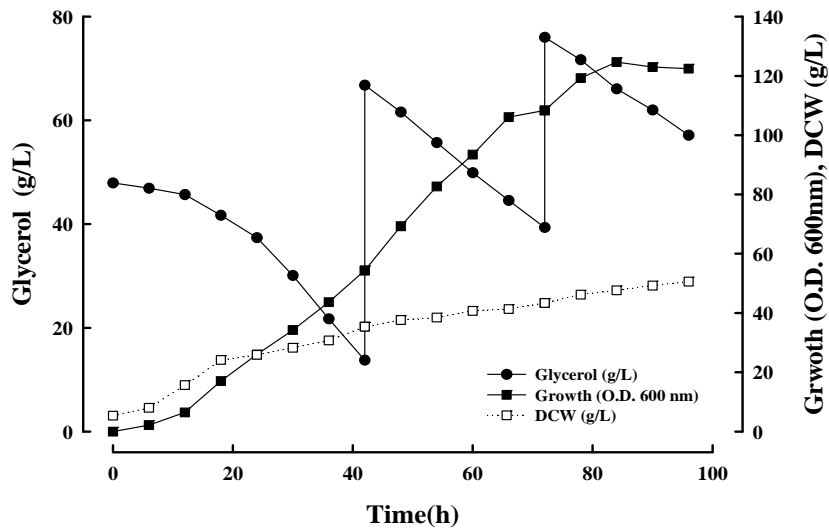


그림 20. 50 L STR 배양기에서 KRS의 repeated fed-batch. (a) cell growth 및 glycerol 소모, (b) lipid 및 DHA 생산량 변화.

(a)

300 L



(b)

300 L

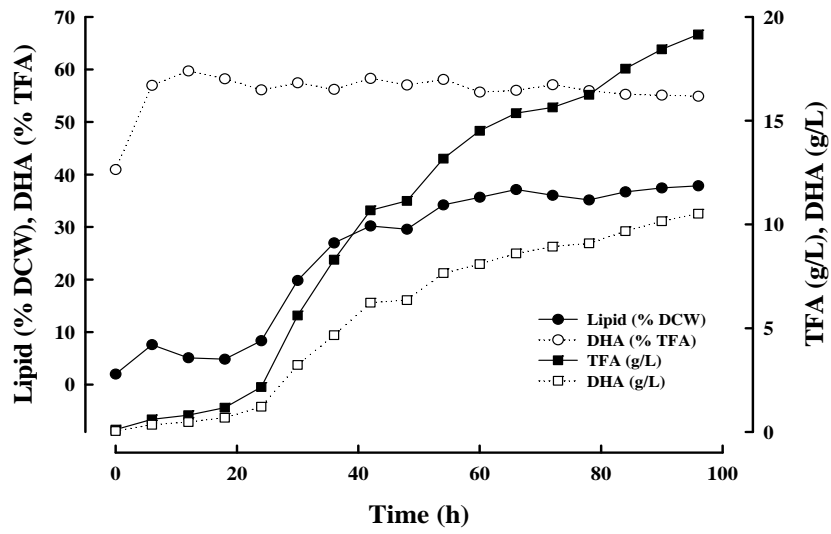


그림 21. 500 L STR 배양기에서 KRS의 repeated fed-batch. (a) cell growth 및 glycerol 소모, (b) lipid 및 DHA 생산량 변화.

2. 산업스케일 규모 (5톤 이상) 고유지성 미세조류 배양

(1) 교반형(STR) 배양기

가. 실험방법

- Aurantiochytrium sp. KRS101 미세조류 균체를 5-1 플라스크 [2 l 배지 (glucose, 60 g/l; yeast extract, 10 g/l; Sea salt, 5 g/l; agar 15 g/l)]에서 60 시간 동안 전배양한 후, 500리터 배양기에 72 시간 동안 배양한 배양액을 5톤 배양기로 이식하여 12시간 간격으로 포도당 영양원의 이용, 균체 생육 (OD600nm) 및 오일과 DHA의 생산량을 분석하였음. 배양 온도 28°C, 교반속도 80 rpm으로 회분식 배양을 실시하였음.
- 균체 내의 오일 함량 분석을 위해 Burja 등의 Bligh-Dyer 방법을 이용하여 오일을 추출하였음. 125 mg의 건조균체에 클로로포름 6.25 ml, 메탄올 12.5 ml과 50 mM K₂HPO₄ buffer 용액 (pH 7.4)를 5 ml 첨가하여 28°C에서 200 rpm으로 1시간 동안 교반한 후, 클로로포름과 phosphate 버퍼를 각각 6.25 ml 첨가하여 약 30번 정도 섞어 준 다음 정치하였음. 분리된 하부의 유기용매 층 (약 12.5 ml)을 회수하여 80°C dry oven에서 약 30분 정도 건조한 후 오일의 무게를 측정하였음. 오일의 함량은 아래 식에 따라 결정하였음.
- Total lipid (g of oil per 100 g sample) = $[(W_L - W_D) / V_C] \times 100 / [V_P / W_S]$
W_D was the weight of an empty aluminum dish (g);
W_L the weight of an aluminum dish with dried lipid residue (g);
W_S the weight of sample (g);
V_C the total volume of chloroform in the graduated cylinder (ml); and
V_P the volume of chloroform transferred to the aluminum dish (ml).
- 지방산 조성의 분석을 위해 건조균체에 5% (v/v) 황산-메탄올 용액 3 ml을 첨가한 후 90°C에서 1시간 동안 반응하였음. 지방산 에스테르 반응산물을 0.6 ml 헥산으로 추출한 후 가스크로마토그래피 [GC; Hewlett Packard 6890N equipped with a flame-ionization detector (FID) and an HP-5 (30 m × 0.32 mm, 0.25 mm; Agilent Technologies) capillary column] 법으로 분석하였음. 컬럼의 온도는 150°C (after 2 min of holding)에서 270°C (with a further 2 min of holding)로 분당 7°C 씩 증가하였음.

나. 결과

○ 5000 리터 배양기를 이용한 *Aurantiochytrium* sp. KRS101 배양에서 (working volume 2500 l media), 배양 48 시간째 30.5 g/l의 건조균체량이 얻어졌음 (그림. 22). 오일 생산량은 건조 균체량의 26.9%인 8.2 g/l이었으며, 포도당으로부터 오일 전환수율은 19.6% (오일 g/ g 포도당)이었으며, DHA 함량은 전체 지방산의 39.5% 이상이었으며, DHA 생산성은 1.6 g/l 인 것으로 나타났음.

표 13. *Aurantiochytrium* sp. KRS101의 2500 리터 배양 (5000-리터 교반형 배양기)

	Stage I (0-24 h)	Stage II (24-48 h)	Stage III (48-60 h)	Overall
Specific growth rate (μ , h^{-1})	0.076	0.046	0.002	0.057
Specific glucose consumption rate (q_s , h^{-1})	0.013	0.090	-	0.064
Specific lipid accumulation rate (q_p , h^{-1})	0.031	0.066	0.001	0.039

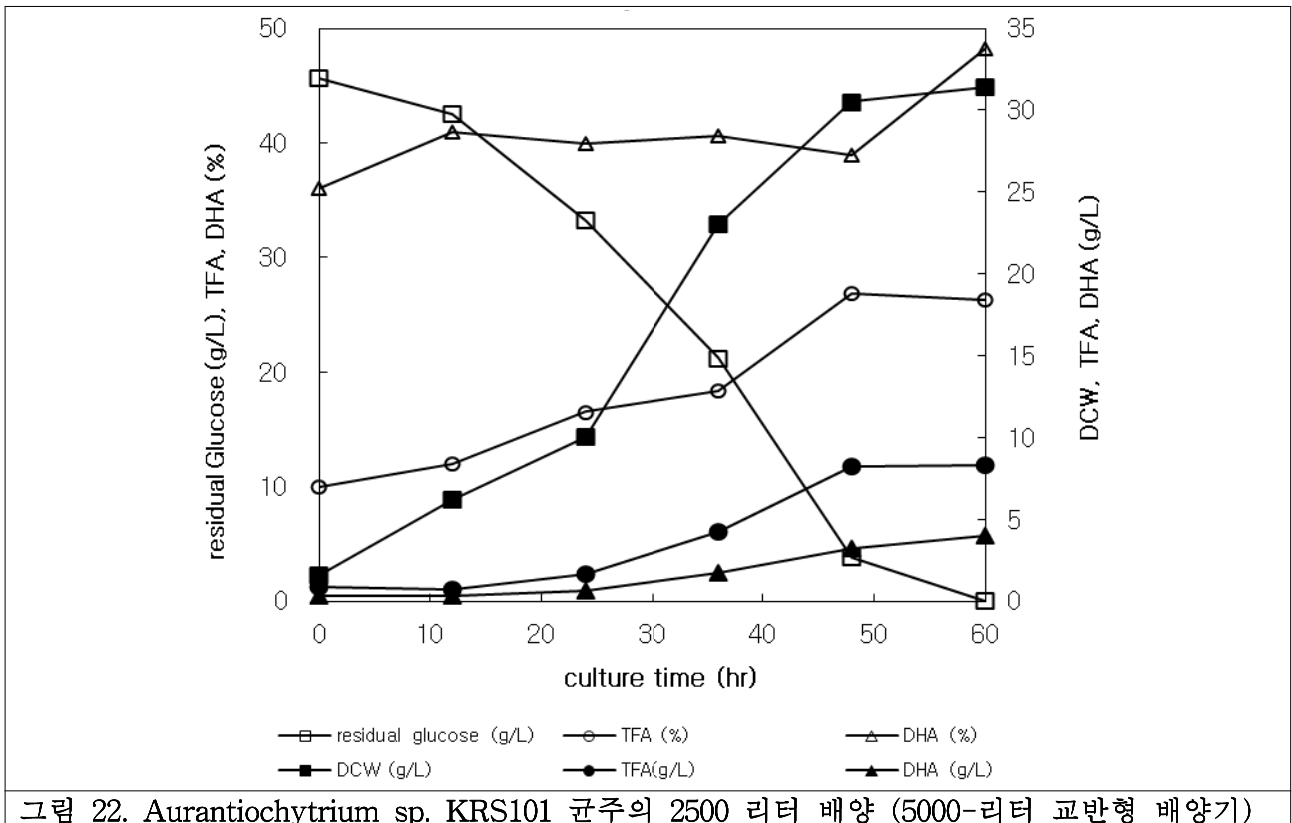


그림 22. *Aurantiochytrium* sp. KRS101 균주의 2500 리터 배양 (5000-리터 교반형 배양기)

(2) 기포탑형(Air-lift) 배양기

가. 실험방법

- 교반형 배양기와 동일한 방법으로 기포탑형의 6톤 배양기를 이용한 파일럿 스케일 배양 실험을 수행하였음.

나. 결과

- 앞서 기술한 바와 같이 5-리터 배양기 실험에서 DHA의 생산성은 3.3 g/1 day로 거의 세계 최고 수준인 데 반하여 300-, 5000-리터 배양기를 이용한 *Aurantiochytrium* sp. KRS101의 배양 실험에서 1.08 g/1 day와 1.6 g/1 day로 다소 낮은 DHA 생산성을 보였음. 교반형 배양기와 달리, 6000-리터 규모 기포탑형 배양기를 이용한 배양에서 (3000 리터) *Aurantiochytrium* sp. KRS101 균주의 증식 속도와 포도당 소모 속도는 크게 증가하였으며 (각각 μ , 0.090 /h와 q_s ,0.115/h), 가 크게 증가하였으며, 오일 생산 속도와 함량 또한 교반형에 비해 2배 정도 증가하는 것으로 나타났으며 (q_p ,0.060/h과 16.3g/l), 최고 수준인 DHA 생산성인 5.6 g/1 day을 보였음. 기포탑형 배양에서 ***Aurantiochytrium* sp. KRS101 균주는 최고 수준인 DHA 생산성인 5.6 g/1 day을 보였음.** 마르텍사 SR21 균주의 최고 DHA 생산성인 13/1 g/1 day (14000 갤런)이 유가식 2단계 공기주입 배양 조건에서 얻어졌음을 감안할 때, 공정 개선을 통하여 KRS101 균주의 상업적 DHA 생산성 달성이 가능할 것으로 예측됨.

표 14. *Aurantiochytrium* sp. KRS101의 3000 리터 배양 (6000-리터 기포탑형 배양기)

	Stage I (0-12 h)	Stage II (12-24 h)	Stage III (24-36 h)	Overall
Specific growth rate (μ ,h ⁻¹)	0.195	0.069	0.007	0.090
Specific glucose consumption rate (q_s ,h ⁻¹)	0.062	0.092	-	0.115
Specific lipid accumulation rate (q_p ,h ⁻¹)	0.095	0.129	0.053	0.060



그림 23. 기포탑형 배양기를 이용한 *Aurantiochytrium* sp. KRS101 미세조류 배양

표 15. Comparison of parameters at different type of bioreactors on DHA fermentation by *Aurantiochytrium* sp. KRS101

	Stirrer type (5-ton scale)	Air-lift type (6-ton scale)
Lipid conversion rate ($\text{g g}^{-1}\text{glucose}$)	0.196	0.262
Lipid productivity ($\text{g l}^{-1}\text{day}^{-1}$)	4.08	10.8
DHA content (% total fatty acids)	39.5	52.3

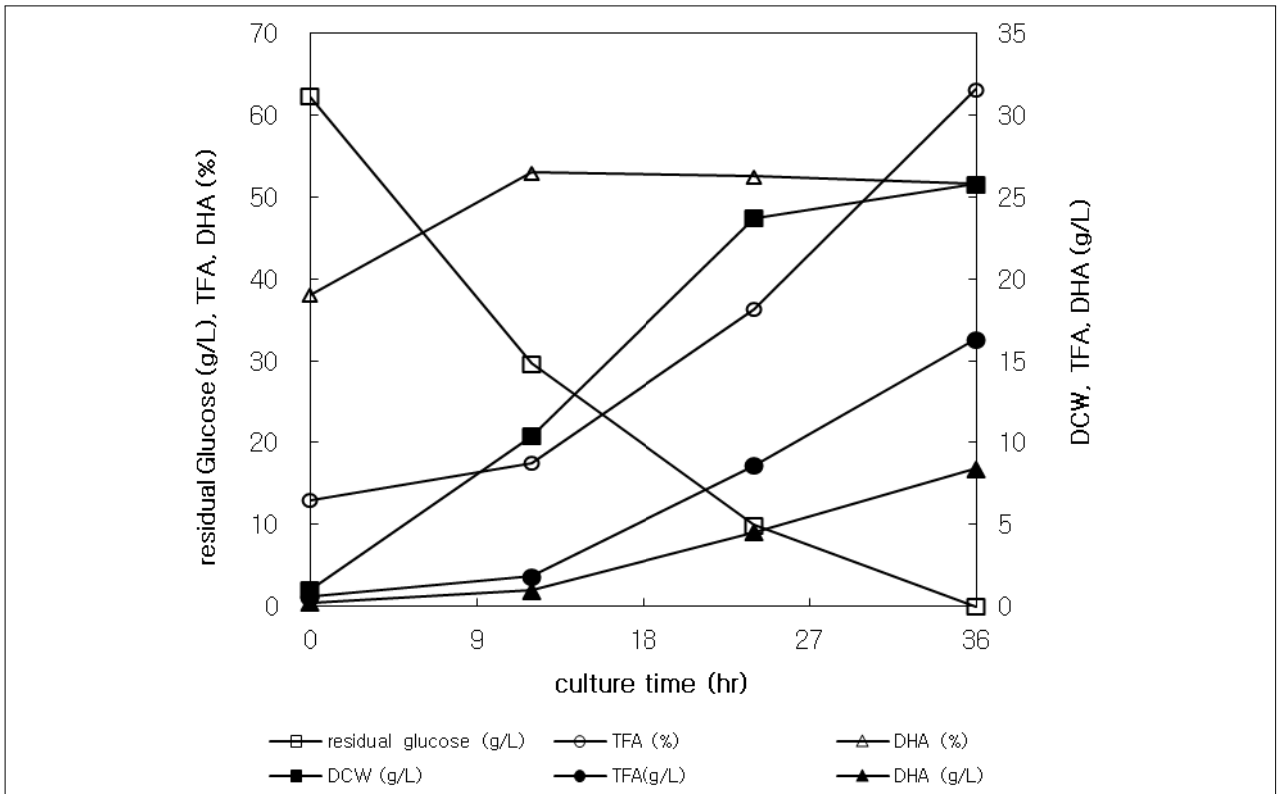


그림 24. Aurantiochytrium sp. KRS101 균주의 3000 리터 배양 (6000-리터 기포탑형 배양기)

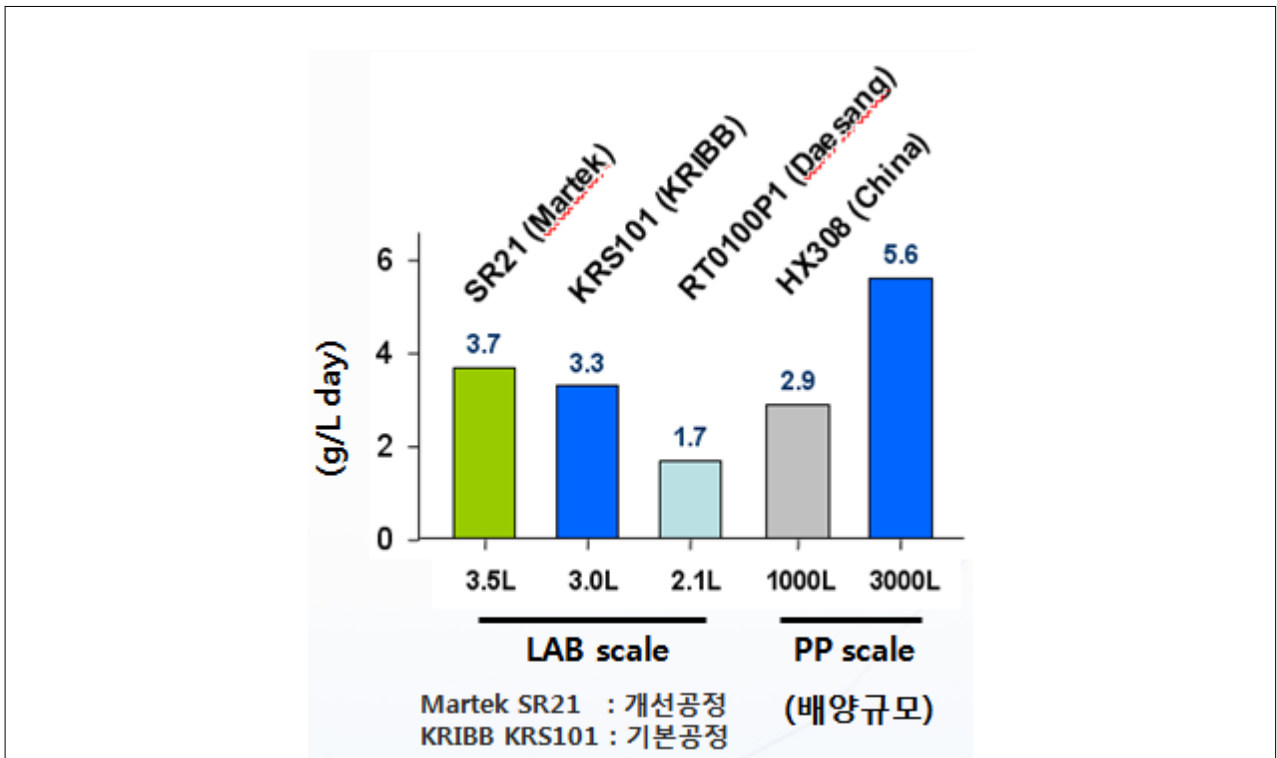


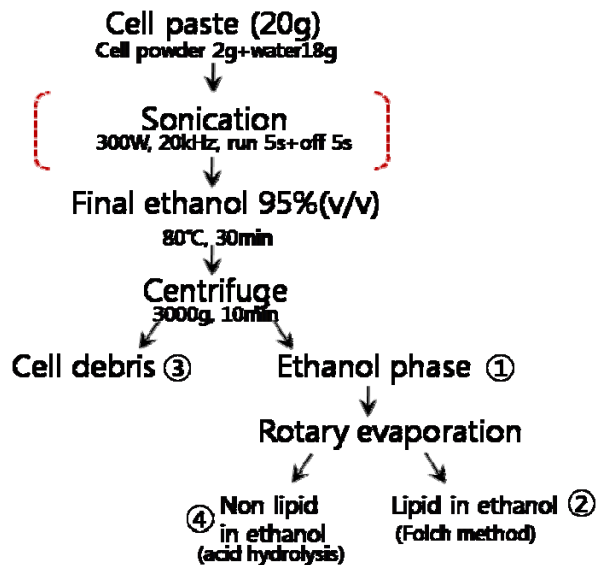
그림 25. Thraustochytrid 계열 미세조류의 DHA 생산성 비교

제 4 절 Aurantiochytrium sp. KRS101 DHA 오일 추출 공정 개발

1. 에탄올 추출방법

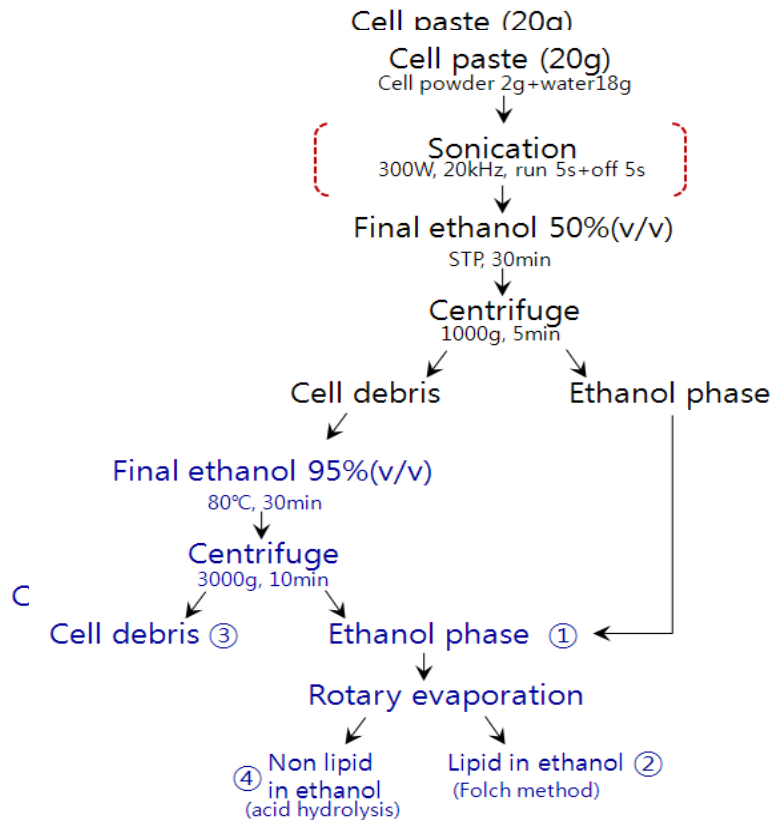
가. 실험방법

▶ 1 step ethanol processing



- Dry cell weight 10%(w/w)의 cell paste 20g을 50ml 튜브에 넣고 에탄올 380ml을 첨가하여 최종 에탄올 농도가 95%가 되도록 한 후 80°C에서 30분간 반응시킴. 반응액을 냉각한 후 3000g에서 10분간 원심분리한 후 상등액과 고형물을 분리함. 상등액은 감압 증류하여 95% 에탄올에 녹아있는 crude한 lipid를 회수함. 회수한 crude lipid는 Folch 법에 의해 lipid fraction을 분리하고 non lipid fraction에 잔류해 있는 lipid를 분석함.

▶ 2 step ethanol processing



- Dry cell weight 10%(w/w)의 cell paste 20g을 50ml 튜브에 넣고 에탄올 20ml을 첨가하여 최종 에탄올 농도가 50%가 되도록 한 후 상온에서 30분간 교반함. 반응액을 1000g에서 10분간 원심분리한 후 상등액과 고형물을 분리함. 상등액은 50% 에탄올에 녹아있는 crude한 lipid를 회수함. 고형물은 에탄올을 첨가하여 최종에탄올 농도 95%(v/v)가 되도록 한 후 80°C에서 30분간 반응시킴. 반응액을 냉각한 후 3000g에서 10분간 원심분리한 후 상등액과 고형물을 분리함. 상등액은 감압 증류하여 95% 에탄올에 녹아있는 crude한 lipid를 회수함. 회수한 crude lipid는 Folch 법에 의해 lipid fraction과 non lipid fraction을 분리하고 Acid hydrolysis법으로 non lipid fraction에 잔류해 있는 lipid를 분석함.

초음파 처리(Sonication)

- 에탄올 추출 전 단계에 초음파를 이용하여 세포파쇄 처리했을 때 에탄올 추출 효율에 영향을 미치는지 알아보기 위해 초음파 처리를 함. 50ml 튜브에 Dry cell weight 10%(w/w)의 cell paste 20g을 분주하고 샘플이 과열이 되는 것을 방지하기 위해 튜브를 ice-water bath에 넣음. SONOSMASHER를 이용하여 300W, 20kHz의 출력으로 약 15분 간(run-time 5sec, off-time 5sec) 처리함.

Folch 방법

- Folch 방법은 추출한 crude lipid 1g에 클로로포름과 메탄올을 부피비 2:1로 혼합한 용액을 20ml을 넣고 상온에서 15~20분간 흔들면서 반응시킴. 혼합액을 3000g에서 10분간 원심분리한 후 liquid phase만 회수한 후 층 분리를 위해 증류수 4ml을 넣고 섞음. 2000rpm으로 10분간 원심분리하여 윗층은 따로 분리하고, 아래층은 다시 50% 메탄올(v/v)을 4ml 넣고 섞어 윗층은 분리함(washing, 2회 반복). 아래층은 회수하여 감압 증류하여 클로로포름을 날리고 오일을 회수하여 에탄올에 녹아있는 lipid를 정량함(lipid in ethanol). 따로 분리한 윗층 역시 메탄올과 물을 날려 에탄올에 녹아있는 non lipid를 정량함(non lipid in ethanol).

Acid hydrolysis법

- 에탄올에 녹는 비오일층(non lipid in ethanol)에 남아 있는 잔류 오일을 측정하기 위해 Folch 방법에 의해 분리한 non lipid in ethanol 샘플에 ethanol 1ml에 녹여 50ml 유리병에 회수하고 염화수소와 물의 비율이 25:11(v/v)인 용액을 5ml 첨가한 후 밀봉하여 75.5℃ 항온수조에 넣어 40분간 반응시킨 후 실온에서 냉각함. 에탄올 5ml을 첨가하고 12ml ethyl ether를 넣고 1분간 교반함. 12ml petroleum ether를 첨가하고 1분간 교반한 후 층이 분리되면 윗층만 filter paper에 여과하여 회수함. 다시 8ml ethyl ether를 넣고 1분간 교반함. 8ml petroleum ether를 첨가하고 1분간 교반한 후 층이 분리되면 윗층만 filter paper에 여과하여 회수함 (2회반복). 회수한 상층액을 135℃ 오븐에 10분간 건조하여 남아있는 잔류 오일 무게를 정량함.

나. 결과

- *Aurantiochytrium* sp. KRS101의 자체 오일 함량은 58.7%, Cell debris는 41.3%이다. 본 실험을 통해 초음파 파쇄 처리를 하지 않고 1단계 에탄올 추출한 결과 회수한 오일의 양이 Dry cell weight(g)당 0.369g이며 이는 미세조류 내 오일함량 대비 회수율이 67.5%임. 또한 초음파파쇄 처리 후 1단계 에탄올 추출을 했을 때에는 Dry cell weight(g)당 0.532g의 오일을 얻었으며 미세조류 오일 함량 대비 회수율은 90.6%로 초음파 처리에 의해 회수율이 23.1% 향상함을 확인하였음.
- 초음파 파쇄 처리를 하지 않고 2단계 에탄올 추출을 했을 때 Dry cell weight(g)당 0.407g의 오일을 얻어 회수율이 69.3%이었으며, 초음파 파쇄 처리 후 2단계 에탄올 추출을 했을 때 Dry cell weight(g)당 0.542g의 오일을 얻어 92.3%의 회수율을 보였음. 이로써 초음파

처리로 인한 회수율 증가가 23.0% 임을 확인할 수 있었다. 다만 1단계 에탄올 추출과 2단계 에탄올 추출했을 때 증가율은 1~2% 내외로 유의성이 없는 것으로 사료됨. 차후 에탄올을 이용하여 오일을 추출할 경우 초음파 처리 후 1단계 에탄올 추출이 효율적이라 판단됨.

표 16. 오일추출 분석방법별 비교

		Weight percent of dry cell weight			
		① Ethanol phase	② Lipid in ethanol	③ Cell debris	④ Residual lipid of non lipid in ethanol fraction
1 step	Non sonication	55.2	39.6	40.0	11.2
	Sonication	73.4	53.2	24.1	18.0
2 step	Non sonication	64.6	40.7	35.3	21.1
	Sonication	76.2	54.2	22.5	20.0

2. 열수(고온가압) 추출

가. 실험방법

- 배양액을 4℃에서 9000rpm으로 40분간 원심분리하여 균체를 분리한다. 배양액 1L에서 회수된 균체량에 50ml의 물을 첨가하고 수산화칼륨 1%를 촉매로 하여, 125℃에서 30분간 고온가압(Autoclave)에서 반응하였음. 반응액을 25℃에서 14000rpm으로 원심분리하면 Fig. 16에서와 같이 층분리가 일어나고 90℃에서 약 30분간 오일층을 녹여내어 오일을 회수하였으며, 상기와 같은 방법으로 함량과 지방산 조성을 분석하였음.

나. 결과

- 고온가압법에 의한 오일 추출 시 배양액 1L당 오일 생산량은 약 5.5g(건조균체량의 약 45%) 이었으며 DHA함량은 약 50 %였음. 유기용매인 클로로포름이나 헥산을 이용한 오일 추출과 비교했을 때 거의 유사하거나 약간 상승함을 확인하였음.

다. 결론

- *Aurantiochytrium* sp. KRS101 오일을 추출하고자 하는 경우 헥산이나 메탄올 또는 클로로포름 등의 유기용매를 사용하여 추출하는 방법이 일반적이며, 본 연구에서도 클로로포름을 이용한 유기용매 추출법을 이용하여 오일의 함량과 조성을 분석하였음.
- 헥산이나 클로로포름 등의 유기용매를 사용하여 추출한 오일의 경우 마우스를 대상으로 한 동물실험에서 안전성 문제를 야기할 우려가 있기 때문에, 보다 안전한 방법인 고온가압 (125℃에서 30분 동안 Autoclave)에 의한 *Aurantiochytrium* sp. KRS101 오일 추출 방법을 확립하였음.

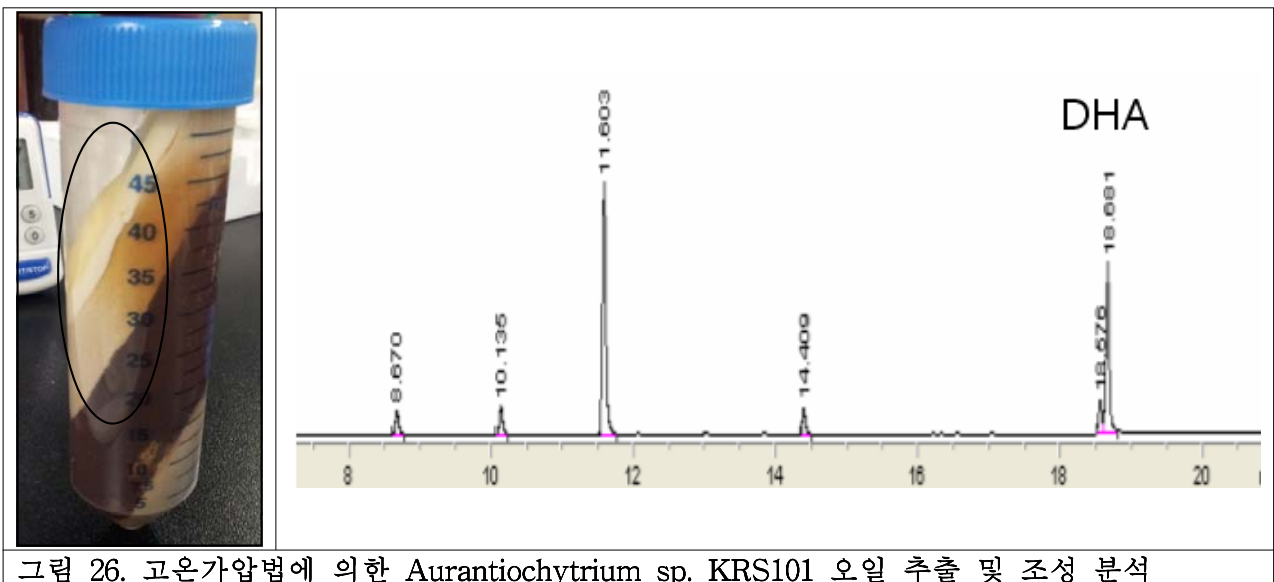


그림 26. 고온가압법에 의한 *Aurantiochytrium* sp. KRS101 오일 추출 및 조성 분석

3. 초임계유체추출법

가. 실험방법

- 전남 장성 소재의 전남 나노바이오연구센터의 초임계유체추출법 장치를 이용하여 미세조류를 추출하였음. 건조균체 90g을 시료로 2시간 동안 오일을 추출하였으며, 추출한 오일은 상기와 같은 방법으로 분석하였음.

나. 결과

- 초임계추출은 맥주용 홉 엑기스 추출, 커피의 탈 카페인 식품의 비가열살균 시스템에 응용이 가능한 방법으로, *Aurantiochytrium* sp. KRS101 오일의 추출에 응용하였음. 초임계유체

추출 방법에 의해 *Aurantiochytrium* sp. KRS101 미세조류 균체 90g으로부터 37g의 오일이 추출되었으며 (균체량의 41%), 가스크로마토그래피를 이용한 지방산 조성 분석 결과, DHA 함량은 45% 인 것으로 나타났음.

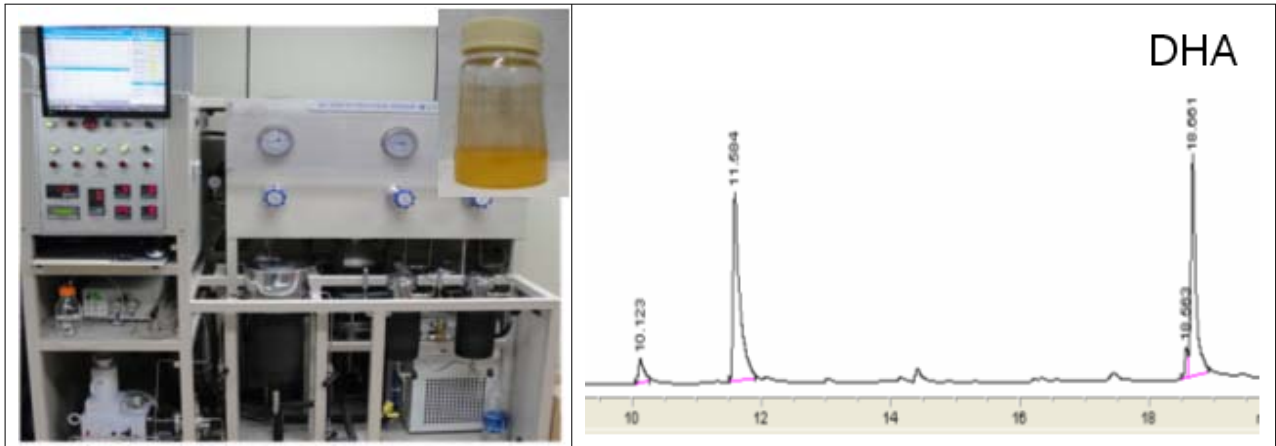


그림 27. 초입계 추출법에 의한 *Aurantiochytrium* sp. KRS101 오일 추출 및 조성 분석

제 5 절 산업부산물 활용 *Aurantiochytrium* sp. KRS101 DHA 오일의 유해 성분 분석

- 폐글리세롤을 활용하여 *Aurantiochytrium* sp. KRS101 미세조류 오일의 안전성을 검증하기 위해 배양액 중의 함유된 유해 중금속의 함유 여부를 한국식품연구원에 의뢰하여 분석하였음.
- 분석결과, 하기와 같이 유해 중금속 성분이 전혀 함유되어 있지 않아, 산업부산물인 폐글리세롤을 탄소원으로 배양한 미세조류 및 추출오일은 식품이나 사료(단미사료)로 사용하는데 전혀 문제가 없는 것으로 판단됨.

표 17. 폐글리세롤 이용 *Aurantiochytrium* sp. KRS101 미세조류 배양액의 유해물질 분석

유해 물질	Hg	Pb	Sn	Cd	As
농도	mg/kKg				
분석결과	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
분석방법	수은분석 측정법	ICP-AES 측정법	ICP-AES 측정법	ICP-AES 측정법	ICP-AES 측정법

불검출기준: Hg 0.0005 mg/kg, Pb 0.0197 mg/kg, Sn 0.0348 mg/kg, Cd 0.0013 mg/kg, As 0.0641 mg/kg 이하

※ 한국식품연구원 분석의뢰 결과 (분석 제 AO2013-07-25-249호)

제 6 절 *Aurantiochytrium* sp. KRS101 DHA 오일의 효능 테스트

1. 미세조류 액상사료 및 분말사료 생산

- *Aurantiochytrium* sp. KRS101 미세조류 단미사료 생산을 위한 500리터 배양을 실시하였음.

○ 상기와 같이 지방산 조성 분석 및 사료의 유해성 분석은 사단법인 한국단미사료협회의 사료분석센터에 의뢰해 분석을 함.

(2) 미세조류 대량배양 결과

○ 상기와 같이 500 L 배양기 (working volume 300 L media)를 이용하여 *Aurantiochytrium* sp. KRS101 균주를 배양하였으며, 배양결과, 44.12 g/L의 건조균체량, 지방산은 30.65%, 그리고 DHA 함량은 전체 지방산의 48.95% 였음.

○ 사단법인 한국단미사료협회 사료분석센터에 의뢰하여 사료의 유해성 성분을 재차 분석한 결과, 사료관리법 시행규칙에 따르는 유해물질 기준에 적합한 것으로 결과를 얻음 (표 18).

표 18. 사료 유해물질 분석

유해물질	납/중금속	카드뮴	비소	수은	크롬	불소	아플라톡신B1	오크라톡신 A	아플라톡신B2	아플라톡신G1	아플라톡신G2	멜라민
농도	ppm						ppb					
법령기준	20	0.5	40	0.5	100	100	50	200	50	50	50	불검출
분석결과	불검출	불검출	0.25	불검출	불검출	2.05	불검출	8.80	불검출	불검출	불검출	불검출

※(사)한국단미사료협회 사료분석센터 분석의뢰 결과 (분석 제 2012-4693-1호)

○ 미세조류 액상사료 생산을 위해 300 L배양액을 원심분리하여 70 L의 농축액으로 만든 후 항산화제와 유화제를 혼합하여 1 L의 플라스틱 용기에 포장 생산하였음 (그림 28).



그림 28 *Aurantiochytrium* sp. KRS101 액상 단미사료생산 과정 및 1 L 액상 제품

- 미세조류 분말사료를 제조하기 위하여 원심분리 농축액 70 L를 동결건조 하여 10~12 kg의 미세조류 동결건조 원말을 생산하였음. 미세조류 동결 건조 원말의 지방산 함량은 60~80%, DHA의 함량은 25~40%임. 미세조류 동결건조 원말에 부형제 (포도당, 대두박)를 일정량 혼합하여 1 kg 알루미늄 포장지에 포장 생산하였음.

2. 양식새우 성하 및 종묘 치하 급이 테스트

(1) *Aurantiochytrium* sp. KRS101 액상단미사료 새우양식장 급이 결과

가. 양식새우 (성하) 급이 실험방법



- *Aurantiochytrium* sp. KRS101 액상단미사료를 새우양식장에 공급하여 급이실험을 진행. 액상단미사료 급이량은 배합사료 급이량의 0.3%임 (배합사료 1톤당 *Aurantiochytrium* sp. KRS101 단미사료 3 L와 기존 양식장에 사용 중인 락토바실러스를 함께 사용).



그림 29. 미세조류 양식새우 급이실험

○ 표 19는 *Aurantiochytrium* sp. KRS101 액상단미사료 급이 테스트 개요를 보여주고 있음.

표 19. 미세조류 급이 테스트 개요 및 사료계수 결과

	일반양식장	A양식장	B양식장
소재지	충남 서산시 일대	충남 서산시 대산읍 기은리 773-2 베드로수산	충남 서산시 대산읍 대로리 913-7 참살이 수산
양식면적	1만평	9천5백평	2만5천평
입식일자	2012년 6월	2012년 6월 9일	2012년 5월 26일
입식 마리수	100만 마리	100만 마리	200만 마리
새우출하량 (2012년 10월 12일 기준)	15톤	13.5톤	32톤
사료 급이량 (2012년 10월 12일 기준)	22.5톤	13.7톤	36톤
사료계수 (사료급이량/새우출 하량)	1 : 1.5	1 : 1.01 (매우양호)	1 : 1.13 (양호)
KRS101 단미사료 급이량	-	41리터	108리터
양식장 전경			

나. 양식 새우 (성하) 급이실험 결과

○ *Aurantiochytrium* sp. KRS101 액상단미사료를 급이한 새우와 일반양식장 새우의 증체를 비교한 결과 단미사료를 급이한 새우의 증체율이 일반 새우양식장 보다 높았음 (표 20). 입식 90일령의 경우 32% 이상의 증체율 증가가 있었음.

○ 새우는 통상 20 g 이상에서 급이사료의 양을 감소시키면서 출하준비가 이루어지는데 양식이 매우 양호한 시점인 90일에서 120일 사이에 20 g에 도달함. 급이 실험을 진행한 양식장에서는 83일과 88일에 새우의 무게가 20 g에 도달하였는데 이 결과로 미루어보아 미세조류 급이를 통해 양식기간 및 급이사료량을 줄일 수 있을 가능성이 매우 높다고 판단됨. 뿐만아니라 양식기간을 단축시킴으로써 생산 비용절감이 가능함.

표 20. *Aurantiochytrium* sp. KRS101 단미사료 급이실험 결과

	입식 1일령	입식 30일령	입식 60일령	입식 90 (93)일령	20g 도달 기간
일반양식장	0.01 g	0.8 g	4.0 g	12~15 g	115일
A양식장	0.01 g	1.70 g	6.0 g	22.0 g	83일
B양식장	0.02 g	1.78 g	6.24 g	(22.0 g)	88일

○ 그림 30은 15일령 새우와 90일령새우를 비교하여 보여주고 있음.

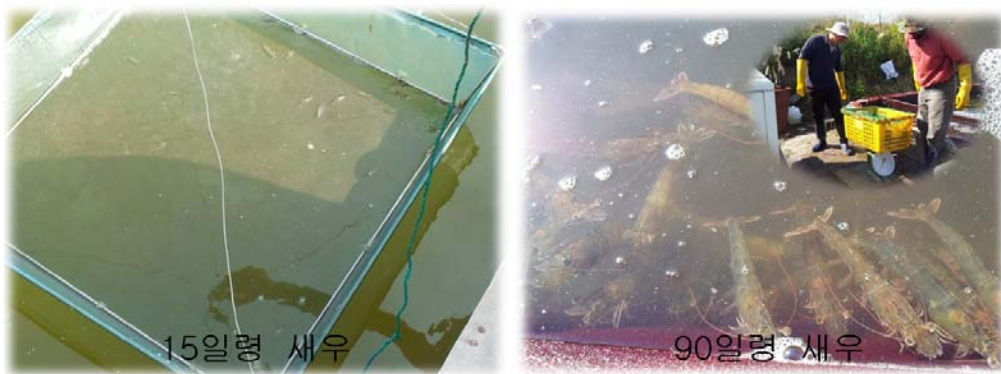


그림 30. 양식 시작 직후와 출하중인 새우의 비교

(2) *Aurantiochytrium* sp. KRS101 단미사료 새우양식장 치하 (종묘) 급이 결과

가. 종묘 급이 실험방법

○ *Aurantiochytrium* sp. KRS101 균체가 생산하는 지방산에는 풍부한 DHA를 포함하고 있어 DHA 기능성 지방산을 함유하는 단미사료로 개발하기 위해 양식 흰다리새우의 급이실험을 진행함. 미세조류 동결건조 분말을 사료와 배합하여 흰다리 새우 치하에 급이하였음 (치하 사료 공급량의 1%).

○ 미세조류 액상 사료는 새우 치하의 먹이생물인 알테미아 (*Artemia*) 영양강화제로 사용하였음 또한 알테미아의 먹이생물인 로티퍼의 영양강화제로 사용하였음 (20만 개체의 알타미어 부하 시 1~2 ml 사용).

나. 종묘 급이실험 결과

- 미세조류 KRS101 단미사료를 종묘배양장에 급이한 결과 부화율 및 생존률이 무처리구에 비해 5% 이상 증가하였음 (표 21). 이와같은 결과로 미루어보아 미세조류 급이로 인해 질병에 대한 면역이 증가된 것으로 예상됨. 치하의 치사율이 감소함에 따라 치하 구입비 절감, 질병확산 감소 등의 효과가 예상됨.
- 미세조류 급이 시 출하 기간이 무처리구에 비해 7일 앞당겨짐에 따라 출하 기간을 약 12% 앞당길 수 있음. 치하 출하기간을 앞당김으로서 양식장 관리 비용 절감효과 있음.

표 21. 종묘 배양장 적용 실험 조건 및 결과

	일반 종묘배양장 (무처리구)	실험진행 종묘 배양장 (무처리구)	실험진행 종묘 배양장 (처리구)
소재지	충남 태안군	충남 태안군 창리 대상양식산업	충남 태안군 창리 대상양식산업
새우 종묘 종류	흰다리새우	흰다리새우	흰다리새우
모하 입식 기간	2013년 3월	2013년 3월	2013년 3월
치하 출하일	2013년 5월	2013년 5월	2013년 5월
육상 수조 방식	6 m 또는 8 m 라운드형	8 m 라운드형	8 m 라운드형
KRS101 단미사료 급이량	-	-	* 분말사료 : 치하사료 급이량의 1% * 액상사료 : 알테미어 20만개체 기준 1~2 ml
먹이생물영양강화 효과 (부화율 및 생존율)	80 ~ 90%	85%	90% 이상
로티퍼 배양 시 먹이생물 적용효과	로티퍼 생육시간 48시간 이상	로티퍼 생육시간 48시간 정도	로티퍼 생육시간 24~40시간
치하사료 혼합 투여효과 (출하일수)	치하 출하 60~70일	치하 출하 63일	치하 출하 56일
치하사료 혼합 투여효과 (사료효율, FCR)	1.0~1.2	1.0	0.9

제 7 절 사업성 분석

1. 기술성 분석

1) 기술개발 수준

표 22. 최적 조건하에서 미세조류 배양 후 성분조사 (한국생명공학연구원)

건조균체량 (Dry Weight)	50.6 g/L		
오일 함량	38 (% DW)	19.3 g/L	
DHA함량	50.0 (% Oil)	9.6 g/L	3.5 g/L/day

* 28℃, 300 rpm, 3 vvm, pH7유지, 60시간 (2.5day) 유가식 배양

2) 경쟁업체 기술수준

표 23. 국내 업체의 미세조류 배양 특허 기술 (대상)

건조균체량 (Dry Weight)	58.5 g/L		
오일 함량	41.5 (% DW)	24.3 g/L	
DHA함량	51 (% Oil)	12.4 g/L	1.9 g/L/day

* 28℃, 200 rpm, 1 vvm, 160시간 (6.7day)

3) 경쟁업체 기술수준

표 24. 해외 업체의 미세조류 배양 특허 기술 (Martek)

건조균체량 (Dry Weight)	140 g/L		
DHA 함량	40 (% Oil)	56.3 g/L	8.3 g/l/day

* 100~300 rpm, 20% O₂, 7day

○ 본 연구를 통한 기술사업화 시 기술 수준은 외국 경쟁 업체 (Martek)에 비해 약 1/3정도의 수준이며 국내업체 (대상)와는 동등한 기술수준임.

4) 관련기술의 효율성 비교 (특허분석)

표 25. 특허 분석

비교항목	특허기술		
	본 과제 기술	대상	Martek
균체건조량 (Dry Weight)	50 g/L	58 g/L	140 g/L
Oil 함량	38.0(% DW)	41.5(% DW)	-
DHA 함량	50(% Oil)	51(% Oil)	40(% DW)
일(day)당 생산량	3.5 g/L/day	1.9 g/L/day	8.3 g/L/day

○ 기술수준은 해외업체에 비해 1/3 수준이지만, 생산단가가 저렴하고 일(day)당 생산량과 고농화를 통한 가격경쟁력 확보가 가능할 것으로 예상됨. 현 수준에서 추가 기술개발을 진행하여 바이오오일의 성분 (고농화) 및 생산단가를 낮춤으로써, 국내 원료물질의 공급 및 해외 원료물질의 대체가 예상됨에 따라 미세조류를 활용한 바이오오일의 생산 경제성 우위 확보가 가능함.

2. 사업성 분석

- DHA (docosahexaenoic acid, 22 carbons and 6 double bonds)는 두뇌, 안구조직 및 신경계에 필수적인 지방산으로 특히 유아의 시력 및 운동신경능력 개발에 중요한 기능을 하는 것으로 알려져 있음. 또한 치매 환자 뇌에서는 그 양이 현저하게 줄어드는 것으로 보고되었으며, 노안의 황반변성 억제 등 다양한 항노화 기능들이 새롭게 밝혀지고 있음(그림. 29).
- 인체 내에서 DHA는 콩 등 식물로 섭취한 알파-리놀레닉산 (18:3n-3)으로부터 일부 합성되기는 하지만, 그 양이 워낙 소량이기 때문에 반드시 음식물의 형태로 섭취하여야 하는 필수 영양소로 인식되어 세계보건기구를 비롯한 각국의 공인 기관들이 DHA를 하루 1그램 이상 꾸준히 섭취하도록 권장하고 있음.

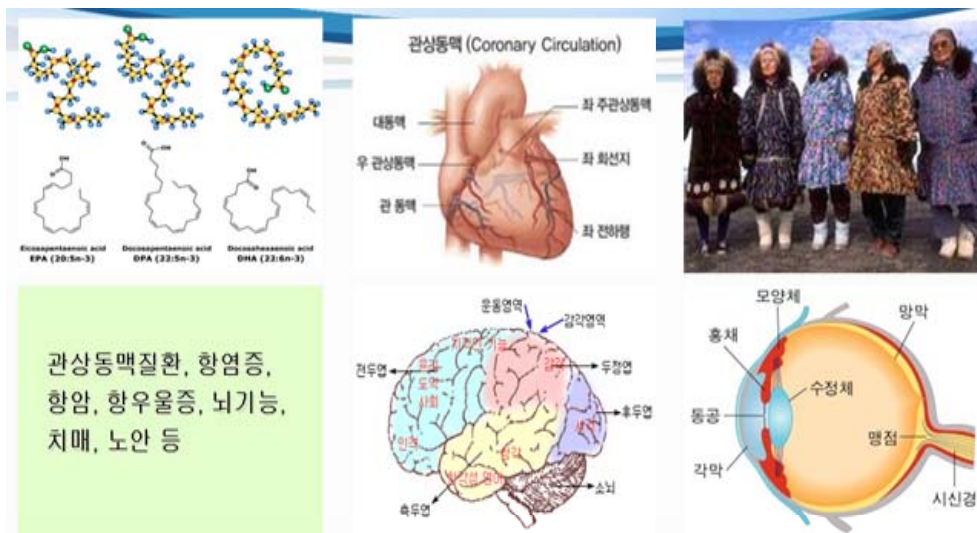


그림 31. DHA 오일의 효능

- DHA와 함께 최근 그 중요성이 대두되고 있는 EPA (eicosapentaenoic acid, 20 carbons and 5 double bonds)의 가장 대표적인 효능은 심혈관 질환 예방 및 치료 효과이며, 이는 북유럽 에스키모의 낮은 심혈관 질환 발병율과도 상관성이 있는 것으로 밝혀졌음.
- 현재 상용 DHA와 EPA 오일의 대부분은 심해성 어류의 기름, 어유 (魚油)로부터 얻고 있지만, 무분별한 포획으로 인한 해양생물자원의 고갈에 따라 어획량이 갈수록 감소하고 있고 전 세계적인 어획 규제가 점차 강화되고 있는 상황임.

○ 최근에는 해양 환경오염이 심각해짐에 따라 어류에 PCBs (Polychlorinated Biphenyls)나 Dioxin과 같은 독성 화학물질의 축적이 증가하고 있어, 어류 유지 사용에 대한 우려와 규제가 점차로 증가하고 있는 상황임. PCB는 절연유로 활용되다가 강한 독성과 잔류성으로 인해 1970년대에 사용이 금지된 화학물질이며, Dioxin은 여러 개의 염소가 붙어있는 방향족 화합물로 환경 잔류성이 매우 강한 생식계, 면역계, 호르몬 조절 기능 장애를 유발하는 발암물질임 (일일 허용 섭취량 미국기준 1 pg/kg body 이하). 또한 2011년 일본의 후쿠시마 원자력발전소 폭발 사고로 인해 실제적으로 수산물 소비가 위축되고 관련 산업이 축소되고 있어 종속영양 유지성 미세조류에 의해 안전하게 생산되는 오메가-3 제품의 필요성이 더욱 강조될 것으로 예상됨. 따라서 기존의 어유 추출공정을 대체하기 위한 새로운 고순도의 DHA와 EPA 오일을 안정적으로 생산할 수 있는 기술개발에 대한 관심이 고조되고 있는데, 그 대표적인 방법이 DHA와 EPA 오일을 함유하는 유지성 미생물을 이용한 발효 공정이며, 향후 개발 기술은 막대한 상업적 가치를 지닐 것으로 판단됨.

○ 유지성 미생물 중 Thraustochytrid 계열 미세조류는 바이오매스의 30% 이상의 오일을 생산하여 균체 내에 축적하며, 다중불포화지방산, 카로티노이드, 스쿠알렌 등 다양한 고기능 성분들이 함유되어 있어 어류 대체의 차세대 바이오오일 공급원로서 매우 유망함.

○ 바이오오일 시장

- 2012년 국내 바이오디젤 생산 목표(디젤 소비량의 3% 수준인 5.4억 리터)를 감안할 때 원료인 바이오오일의 수요는 지속적으로 증가할 것으로 전망됨. 유채 재배를 비롯한 다양한 국내 바이오오일 공급 체계의 구축이 필요함.

표 28. 바이오디젤 시장 전망

	2011	2012	2013	2014	2015	2016
Volume (million gallon)	7,830	10,926	14,979	20,430	27,634	37,280
Revenue (\$ million)	8,299	11,363	15,279	20,635	27,081	35,789

(US and EU Biodiesel Fuel Market Current and Future Outlooks Oct 2007 by Fuji-Keizai USA Inc.)

○ 뇌건강 소재 (Docosahexaenoic Acid)

- 뇌건강 개선 생물소재인 DHA를 첨가한 식품 제품의 수요는 고령화 사회가 도래함에 따라 더욱 증가할 것으로 전망됨. 특히 두뇌 발달이 활발한 유아식의 대부분에 DHA가 적용될 것으로 예상되는 데, 기존 심해성 어류의 어유 유래의 DHA 오일은 유아들에 사용이 제한되고 있는 EPA를 함유하고 있어 유아식에 사용하기에 적절하지 않기 때문에 미세조류 유래의 DHA의 오일 시장은 더욱 확대될 것으로 전망됨.
- 미국 마르텍사가 세계 시장을 주도하고 있으며, 남양분유를 비롯한 다수의 국내업체들도 마르텍사로부터 수입한 미세조류를 이용한 제품을 출시하였음.

표 29. DHA 오일 시장 전망

구 분		현재	예상 (단위: 억원)					
		(2012년)	(2013년)	(2014년)	(2015년)	(2016년)	(2017년)	(2018년)
해외시장	규모	5,000	5,250	5,512	5,788	6,078	6,381	6,700
	성장률	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%
국내시장	규모	500	525	551	579	608	638	670
	성장률	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%
합계	규모	5,500	5,775	6,063	6,367	6,685	7,019	7,370
	성장률	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%

※ 산출근거 :

해외시장 2011년 기준 약 5000억원, 국내시장 약 500억원 규모. 연간 성장률을 5%로 추정

3. 사업화 계획

- 바이오디젤 제조업체 (원료 공급 및 바이오오일 활용), 식품업체 (바이오오일 및 고부가가치 생물소재 활용)과 연계한 사업화 계획
- 사료첨가제로서의 효능 검증 후 사업화 계획
- 국외 바이오디젤 및 유지 산업과 연계한 플랜트 건설 계획 (예: 말레이시아, 인도네시아 팜유 산업 부산물 활용 산업)

구 분		사 업 화 년 도				
		(2014 년) 과제종료후 1년	(2015 년) 과제종료후 2년	(2016 년) 과제종료후 3년	(2017 년) 과제종료후 4년	(2018 년) 과제종료후 5년
사 업 화 품 목		미세조류 오일	미세조류 오일	미세조류 오일	미세조류 오일	미세조류 오일
투 자 계 획	인 건 비(억원)	-	-	1	2	5
	재료비 및 설비투자비 (억원)	-	-	2	5	20
	경상운영비(억원)	-	-	1	1	4
	계(억원)	-	-	4	8	29
생 산 계 획		1톤	1톤	100톤	500톤	2000톤
판매계획 (단위:억원)	내 수			2.6	4	10
	수 출			-	7	42
	계			2.6	11	52

제 4 장 목표달성도 및 관련분야의 기여도

제 1 절 연차별 연구 목표 달성도

구분	연도	당초 연구개발의 목표	연구개발의 결과	달성도
1차 년도	2011	전통 육종법을 이용한 Aurantiochyrium sp. KRS101 균주 개량 및 대량 배양 공정 구축	<ul style="list-style-type: none"> ○ UV, 감마선 조사법에 의한 Aurantiochyrium sp. KRS101 미세조류의 증식 속도 및 오일 생산능 향상된 변이 균주 개발(2종) <ul style="list-style-type: none"> - 균체 증식 속도 개선 - 오일 생산 수율 개선 ○ Aurantiochyrium sp. KRS101 대량 배양 <ul style="list-style-type: none"> - 교반형 (5톤) 및 기포탑형 (6톤) 발효 배양 - 균체량 및 오일, DHA 생산성 분석 완료 	100%
2차 년도	2012	Aurantiochyrium sp. KRS101 균주의 발효배양 및 오일 추출 공정 기술 개발 및 폐글리세롤 활용 대량 배양 공정 구축	<ul style="list-style-type: none"> ○ 폐글리세롤 기반 Aurantiochyrium sp. KRS101 미세조류의 최적 배지 조성 확립 ○ 5리터 발효조를 이용한 Aurantiochyrium sp. KRS101 최적 배양공정 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 5리터 발효조를 이용한 배양공정 연구 - 배양온도, pH, 용존산소농도, shaking speed 등 영향 검토 및 최적 조건 확립 - 유가식, 반연속식 공정 연구 ○ Aurantiochyrium sp. KRS101 균체 오일 최적 추출 기술 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 물리적 방법에 의한 미세조류 오일 추출 (열수, 초임계) - 화학적 방법에 의한 미세조류 오일 추출 (에탄올) ○ 미세조류 액상 사료첨가제 효능 테스트 완료 	100%
3차 년도	2013	Aurantiochyrium sp. KRS101 오일 대량 생산 공정 최적화 및 사업화 예비 타당성 검토	<ul style="list-style-type: none"> ○ Aurantiochyrium sp. KRS101 오일 대량 생산 공정 최적화 <ul style="list-style-type: none"> - 50, 500, 5000L 스케일업을 통한 균체 대량생산 - 오일 대량 추출 - 최종목표 달성 <ul style="list-style-type: none"> • 건조균체량: 50 g/L 이상 • 오일함량: 35% 이상 • DHA 함량: 45% 이상 ○ 사업화 예비 타당성 검토 (사료) <ul style="list-style-type: none"> - 균체 및 오일의 유해성분 함유 여부 분석(중금속) - 균체 및 오일 생산 경제성 분석 	100%

제 2 절 관련분야의 기여도

1) 사회경제적 측면

- 바이오 디젤을 대체연료로 사용하기 위해서는 석유에 대한 상대적 경제성확보가 필수적이거나 현재의 석유가격에서는 경제성을 확보하기가 쉽지 않은 단점이 있다. 이러한 단점은 저비용 생산 시스템을 확립을 확립하고 바이오 디젤과 함께 고부가가치 바이오 오일을 생산함으로써 경제성확보가 가능할 것으로 판단됨.
- 국내 및 국외시장 분석결과 심해성 어류의 어유를 적용한 유제품 등의 생산 및 판매가 이루어지고 있으나, 중금속 오염, 불쾌한 어취 등으로 인한 문제점이 있으므로, 본 연구과제에서는 미세조류 유래의 오일 생산 기술을 개발함으로써, 원료 오일 및 관련 제품 등을 생산하여 국내 및 국외에 판매할 계획임.
- 무역수지개선효과

구 분	사 업 화 년 도				
	(2014 년) 과제종료후 1년	(2015 년) 과제종료후 2년	(2016 년) 과제종료후 3년	(2017년) 과제종료후 4년	(2018년) 과제종료후 5년
수 입 대 체(억원)	-	-	2.6	4	10
수 출(억원)	-	-	-	7	42

○ 고용창출효과

구 분	사 업 화 년 도				
	(2014 년) 과제종료후 1년	(2015년) 과제종료후 2년	(2016 년) 과제종료후 3년	(2017년) 과제종료후 4년	(201 8년) 과제종료후 5년
연구개발 인력	-	-	1	1	1
생산 인력	-	-	1	4	10
기타	-	-	-	2	4
계	-	-	2	7	15

2) 과학기술적 측면

- 기존 특허는 포도당 등 고가의 영양원을 활용한 미세조류의 발효배양을 통한 바이오오일 생산 기술 분야에 치중되어 있다. 본 연구과제에서는 산업부산물 특히 저가의 폐글리세롤을 영양원으로 활용한 신규분리 유지성 미세조류의 발효배양을 통하여 바이오오일 및 고부가가치 생물 소재 생산 기술 개발 연구를 추진하였으며, 국내 특허를 출원함.
- 기존 논문은 표준균주를 이용한 폐글리세롤로부터 바이오오일 생산 연구 분야에 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 야생으로부터 새롭게 분리한 신규 미세조류 균주의 개량 및 바이오오일 생산 연구를 추진하여 SCI급 학술지 등에 4편 게재함.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 연구개발 성과

1. 연구개발결과의 목표 및 실적

<정량적 목표항목>

	목표	달성	달성도(%)
건조균체량	50g/L 이상	50.6g/L	101
오일함량	35% 이상	38%	109
DHA 함량	45% 이상	50%	111
논문	3편	4편	133
특허	1건	1건	100
학회발표	3회	3회	100

2. 특허(지식재산권)

번호	종 류	명 칭	출원일	국 명	출원번호	발생차수
1	국내 특허	트라우스토키트리드 미세조류의 형질전환체 및 이를 이용한 이눌린으로부터 바이오오일의 제조방법	2012.05	대한민국	10-2013- 0153114	3 차년도

출원번호통지서

출원일자 2013.12.10
특기사항 심사청구(무) 공개신청(무) 참조번호(317)
출원번호 10-2013-0153114 (접수번호 1-1-2013-1129413-54)
출원인명칭 한국생명공학연구원(3-1999-034166-5)
대리인성명 이처영(9-2003-000118-9)
발명자성명 서정우 김철호 홍원경 허선연
발명의명칭 트라우스토키트ريد 미세조류의 형질전환체 및 이를 이용한 이눌린으로부터 바이오오일의 제조방법

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마당-PCT/마드리드
※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내
※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

3. 논문 게재/발표 실적

게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol. (No.)	국내외 구분	SCI 구분
		주저자	교신 저자	공동 저자				
2012	Growth of the oleaginous microalga <i>Aurantiochytrium</i> sp. KRS101 on cellulosic biomass and the production of lipids containing high levels of docosahexaenoic acid	홍원경	서정우	김철호 Dina Rairakhwada, 김성훈, 허병기, Akihiko Kondo	Bioprocess Biosyst Eng	35:129 - 133	국외	SCI
2012	Fermentation strategies for 1,3-propanediol production from glycerol using a genetically engineered <i>Klebsiella pneumoniae</i> strain to eliminate by-product formation	오백록	김철호	서정우, 허선연, 홍원경, 라련화, 손준호, 박돈희	Bioprocess Biosyst Eng	35:159 - 165	국외	SCI
2012	Optimization of culture conditions for 1,3-Propanediol Production from Glycerol Using a Mutant Strain of <i>Klebsiella pneumoniae</i>	오백록	김철호	서정우, 허선연, 홍원경, 라련화, 김성훈, 박돈희	Appl Biochem Biotechnol	166:127 - 137	국외	SCI
2013	Production of lipids containing high levels of docosahexaenoic acid from empty palm fruit bunches by <i>Aurantiochytrium</i> sp. KRS101	홍원경	서정우	유안나, 허선연, 오백록, 김철호, Akihiko Kondo	Bioprocess Biosyst Eng	36:959 - 963	국외	SCI

Growth of the oleaginous microalga *Aurantiochytrium* sp. KRS101 on cellulosic biomass and the production of lipids containing high levels of docosahexaenoic acid

Won-Kyung Hong · Chul Ho Kim ·
Dina Rairakhwada · Seonghun Kim ·
Byung-Ki Hur · Akihiko Kondo · Jeong-Woo Seo

Received: 30 May 2011 / Accepted: 16 July 2011 / Published online: 30 September 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract We examined the growth of a novel oleaginous microalga, *Aurantiochytrium* sp. KRS101, using cellulosic materials as nutrients, and the resultant production of lipids containing high levels of docosahexaenoic acid (DHA). The microalgal strain could grow using either carboxymethylcellulose or cellobiose as a carbon source, and produced lipids containing high levels of DHA (49–58% of total fatty acids). In line with this growth behavior, carboxymethylcellulase and cellobiohydrolase activities were evident in both cell-free lysates and culture broths. Additionally, an industrial cellulosic biomass, palm oil empty fruit bunches (POEFB), a by-product of the palm oil industry, were utilized by the microalgal strain for cell growth and lipid production.

Keywords *Aurantiochytrium* · Microalga · Cellulose · Empty fruit bunch · Lipid

Introduction

Single cell oils, which are accumulated by many microorganisms (e.g., algae, yeast, bacteria, and fungi) under certain culture conditions [1–3], have attracted intense research interest. Compared with plant oils, microbial oils offer many advantages; in particular, microorganisms have a short life cycle; are more easily handled than plants; are less affected by location, season, and climate; and are a source of oil that is amenable to scale-up [4]. Although microbial oils may be especially valuable, considering the rapid expansion of the biodiesel industry, commercialization is hindered by the fact that microbial oils are usually more expensive to produce than vegetable oils, because heterotrophic growth nutrients are costly.

Among the heterotrophic microorganisms studied, yeast has the particular advantage of a fast growth rate and high oil content. Some yeast strains, such as *Rhodospiridium* sp., *Rhodotorula* sp., and *Lipomyces* sp. can accumulate intracellular lipids to levels as high as 70% of biomass dry weight. Most such lipids are triacylglycerol (TAG)-containing long-chain fatty acids; the lipids are thus similar in structure to vegetable oils [5–7]. The microalga *Chlorella protothecoides* grows to a high cell density (15.5 g L⁻¹) under heterotrophic culture conditions, and the oil content is also high (>50% of dry weight) [8–10]. Apart from algae and yeasts, fungi also synthesize oils under particular culture conditions. The mold *Mortierella isabellina* accumulates lipids to 50% of biomass dry weight [11]. As with fungi, some bacteria also biosynthesize oils under certain growth conditions. Mona et al. found that *Gordonia* sp. and *Rhodococcus opacus* could accumulate oils under particular culture conditions to achieve a maximum oil content of 80% dry weight, but biomass was only 1.88 g L⁻¹ [8].

W.-K. Hong · C. H. Kim · D. Rairakhwada · S. Kim ·
J.-W. Seo (✉)
Microbe-based Fusion Technology Research Center,
Jeonbuk Branch Institute, Korea Research Institute of Bioscience
and Biotechnology (KRIBB), Jeongeup, Jeonbuk 580-185,
South Korea
e-mail: jwseo@kribb.re.kr

B.-K. Hur
Department of Biological Engineering, Inha University,
Incheon 402-751, South Korea

A. Kondo (✉)
Department of Chemical Science and Engineering,
Graduate School of Engineering, Kobe University,
Kobe 657-8501, Japan

An oleaginous microalga of the Thraustochytrid family may be especially valuable for oil production because at least 50% of the dry biomass is lipid, with a high content of omega-3polyunsaturated fatty acids (PuFA) [7], especially docosahexaenoic acid (DHA, C22:6n-3) which plays a key role in development of the brain and eye [12–14]. A high content of valuable fatty acids would afford economic advantage for the use of microbial oil as a bio-oil feedstock. To date, many types of nutrient sources have been tested for supporting the growth of oleaginous microalgal strains. For example, Chi et al. [15] cultivated the Thraustochytrid microalga *Schizochytrium limacinum* SR21 using a hydrolyzed potato broth as a nutrient. Liang et al. [16] employed stalk juice from sweet sorghum for cultivation of a microalgal strain. Apart from agricultural products, crude glycerol, a byproduct of the biodiesel industry, has also been used for cultivation of a microalgal strain. Recently, we showed that molasses permitted the growth of a novel Thraustochytrid microalgal strain, termed *Aurantiocytrium* sp. KRS101 [17]. However, despite the fact that microalgal strains are usually found on the leaves of mangrove trees [18, 19], the use of cellulosic biomass supporting the growth was not tested. We here evaluate whether *Aurantiocytrium* sp. KRS101 can grow using cellulosic biomasses as nutrients.

Materials and methods

Microalgal strain and media

Details of the Thraustochytrid microalgal strain *Aurantiocytrium* sp. KRS101 will be reported elsewhere [17]. KRS101 was cultivated in 250 mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of basal medium [glucose, 60 g L⁻¹; yeast extract, 1 g L⁻¹; artificial sea salt (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 6 g L⁻¹], at 28 °C with shaking at 120 rpm, for 3 days. Carboxymethylcellulose and cellobiose were purchased from Sigma. Palm oil empty fruit bunches (POEFBs) were obtained from a local Malaysian company (Ultimate BioTechnology).

Cultivation of *Aurantiocytrium* sp. KRS101

Cells were pre-cultured in 300 mL amounts of basal medium, with shaking at 120 rpm, for 3 days at 28 °C. These pre-cultures were transferred into fresh medium containing carboxymethylcellulose, cellobiose, or pre-treated POEFB, at a concentration of 0.5% (w/v), and cultivated under the same conditions. POEFB was prepared by the method of Ariffin et al. [20]. Briefly, the material was ground in a hammer mill to an average diameter of

1–2 mm and next soaked in 0.5 M NaOH for 4 h followed by heating in an autoclave at 121 °C for 15 min. Next, treated fibers were soaked in tap water and washed until all residual alkali was removed, and dried. Aliquots of culture were collected every 12 h for analysis of growth by measurement of absorbance at 600 nm.

Enzyme activity analysis

Cells were grown to logarithmic phase using carboxymethylcellulose, cellobiose, or POEFB as a carbon source, disrupted by sonication, and cell debris was removed by brief centrifugation. Cell-free lysates and culture supernatants were analyzed for the determination of cellulosic hydrolysis activity. To measure carboxymethylcellulase activity, fractions were incubated with 0.5% (w/v) carboxymethylcellulose in 0.01 mol L⁻¹ Tris-HCl buffer (pH 6.5) at 60 °C for 1 h. The amount of reducing sugar produced was measured using the 3,5-dinitrosalicylic (DNS) reagent [21]. Cellobiohydrolase activity was determined by incubating each fraction in the presence of 15 mM cellobiose in 50 mM citrate buffer (pH 4.8). The concentration of protein in cell-free lysates and supernatants was determined by the method of Bradford [22].

Lipid analysis

Total lipid content was calculated using a modified miniaturized Bligh-Dyer method [23]. Dried cells (125 mg) were placed in screw-capped tubes, and 6.25 mL chloroform, 12.5 mL methanol, and 5 mL 50 mM K₂HPO₄ buffer solution (pH 7.4) were added to each tube. Samples were agitated for 1 h, shaking at 200 rpm, at 28 °C. Each sample was next transferred to a 50-mL graduated tube, and 6.25 mL chloroform and 6.25 mL phosphate buffer were added. Each tube was inverted 30 times; next, the liquid was allowed to settle for 1 h before the recovery of the bottom layer (approximately 12.5 mL). This organic layer was transferred to a pre-weighed aluminum dish and the solvent was evaporated over 30 min in a dry oven set to 80 °C. After cooling, the dish and contents were weighed, and total lipid levels were determined gravimetrically (to yield the weight of lipid extracted) using the following equation:

$$\text{Total lipid (g of oil 100 g}^{-1}\text{ sample)} \\ = [(W_L - W_D) \times V_C \times 100] / [V_P \times W_S]$$

where W_D was the weight of an empty aluminum dish (g); W_L the weight of an aluminum dish with dried lipid residue (g); W_S the weight of sample (g); V_C the total volume of chloroform in the graduated cylinder (mL); and V_P the volume of chloroform transferred to the aluminum dish (mL).

Analysis of fatty acid composition

Dried cells were resuspended in 3 mL 5% (v/v) methanolic sulfuric acid and heated at 90 °C for 1 h in sealed vials. Fatty acid methyl esters (FAMES) were extracted into 0.6 mL aliquots of hexane and analyzed by gas chromatography (Hewlett Packard 6890N) using an instrument equipped with a flame-ionization detector (FID) and an HP-5 (30 m × 0.32 mm; 0.25 mm ID; Agilent Technologies) capillary column. The column temperature was raised from 150 °C (after 2 min of holding) to 270 °C (with a further 2 min of holding), at a rate of 7 °C per min.

Determination of glucose concentration

Residual glucose concentration in culture broth was determined using the 3,5-dinitrosalicylic acid method [21].

Results and discussion

Growth of *Aurantiocytrium* sp. KRS101 using carboxymethylcellulose or cellobiose as a nutrient source

To evaluate whether *Aurantiocytrium* sp. KRS101 could utilize cellulosic materials to support cell growth, the microalgal strain was first cultivated using carboxymethylcellulose as sole carbon source. As shown in Fig. 1a, cells grew to stationary phase with a maximum specific growth rate of 0.080 h⁻¹, and growth next progressed more slowly, but with continuous consumption of carboxymethylcellulose. However, the maximum growth level attained was approximately tenfold lower than that seen using glucose as carbon source, probably because cellulose hydrolysis was not particularly effective.

Next, we examined the growth of *Aurantiocytrium* sp. KRS101 using cellobiose (an intermediate of cellulose hydrolysis) as a carbon source. The growth pattern was similar to that seen when carboxymethylcellulose was employed as carbon source (the maximum specific growth rate, 0.077 h⁻¹, was similar to that recorded using carboxymethylcellulose as carbon source; Fig. 1b). These results indicated that *Aurantiocytrium* sp. KRS101 could utilize cellulosic biomass as a carbon source for cell growth.

Production of lipids containing DHA by *Aurantiocytrium* sp. KRS101 using carboxymethylcellulose or cellobiose as a carbon source

The levels of lipid produced by *Aurantiocytrium* sp. KRS101, grown using cellulosic nutrients as carbon

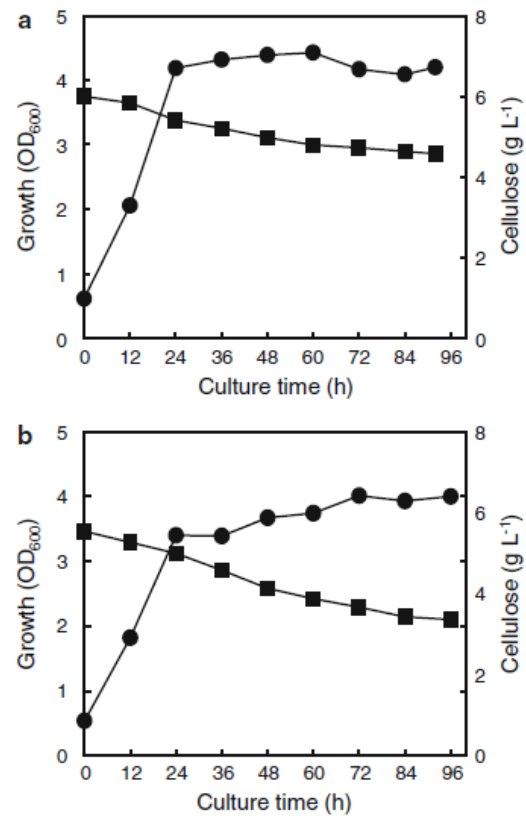


Fig. 1 Cultivation of *Aurantiocytrium* sp. KRS101 using carboxymethylcellulose (a) or cellobiose (b) as carbon sources. Growth levels; closed circles. Reducing sugar levels; closed squares

sources were determined. Table 1 shows that the lipid levels attained were 0.70 and 1.17 g L⁻¹ (17.5 and 29.2% to dry cell weight) when carboxymethylcellulose and cellobiose, respectively, were employed; these levels were significantly lower than 21.8 or 20.2 g L⁻¹ (37.6 and 36.1% to dry cell weight) achieved upon fed-batch fermentation using glucose or molasses [17] as carbon sources, because of low-level growth in the presence of cellulosic nutrients. However, comparable levels of DHA

Table 1 The levels of lipids and DNA in *Aurantiocytrium* sp. KRS101 grown on cellulosic biomasses

Cellulose	TFA (g L ⁻¹)	DHA	
		(TFA %)	(g L ⁻¹)
CMC	0.70	49.1	0.34
CB	1.17	58.4	0.68
EFB	0.90	58.1	0.52

CB cellobiose, CMC carboxymethylcellulose, DHA docosahexaenoic acid, EFB empty fruit bunches from the palm oil industry, TFA total fatty acids

were detected in microalgal lipids produced upon growth in cellulosic nutrients, constituting 49.1 and 58.4% of total fatty acids, when carboxymethylcellulose and cellobiose, respectively, were employed as growth sources. The DHA content after fed-batch fermentation using glucose or molasses as carbon sources was approximately 40–45% of total fatty acids [17].

Cellulose hydrolysis activities of *Aurantiochytrium* sp. KRS101

To obtain biochemical information on growth and lipid production by the *Aurantiochytrium* sp. KRS101 strain, using cellulosic nutrients, we assayed cellulose hydrolysis activities (those of carboxymethylcellulase and cellobiohydrolase) in cell-free lysates and culture broths. Carboxymethylcellulase activities were detected in *Aurantiochytrium* sp. KRS101 cells and broths of cultures grown in the presence of carboxymethylcellulose or cellobiose (Fig. 2a). Although specific hydrolysis activities were measurable in culture broths, the activities were much greater in cell-associated fractions. It has been reported that a higher activity of carboxymethylcellulase was apparent in cell-associated fractions, compared to extracellular fractions, of the cellulolytic soil bacterium *Cytophaga hutchinsonii* and the ruminal bacterium *Fibrobacter succinogenes* [24, 25].

Further, cellobiohydrolase activities were observed in both cell-free lysates and culture broths. Hydrolysis activities were markedly higher in cell-associated fractions compared to extracellular fractions (Fig. 2b), in agreement with the suggestion that the enzymatic degradation of cellobiose occurs within membranes.

Growth of and lipid production by *Aurantiochytrium* sp. KRS101 using empty fruit bunches derived from the palm oil industry as a carbon source

Based on the results obtained above, we next examined whether *Aurantiochytrium* sp. KRS101 could utilize an industrial cellulosic biomass as a carbon source. To this end, we employed pre-treated EFBs derived from the palm oil industry. As shown in Fig. 3, cells grew to stationary phase in such a medium; the maximum growth rate was 0.091 h^{-1} ; and growth cessation was then apparent. The lipid level in *Aurantiochytrium* sp. KRS101 cells grown with POEFB was 0.90 g L^{-1} and DHA constituted 58.1% of total fatty acids (Table 1). In agreement with data in the presence of cellulosic nutrients, both carboxymethylcellulase and cellobiohydrolase activities were evident in both cell-free lysates and culture broths of microbes grown using EFB as a sole carbon source (Fig. 2a, b).

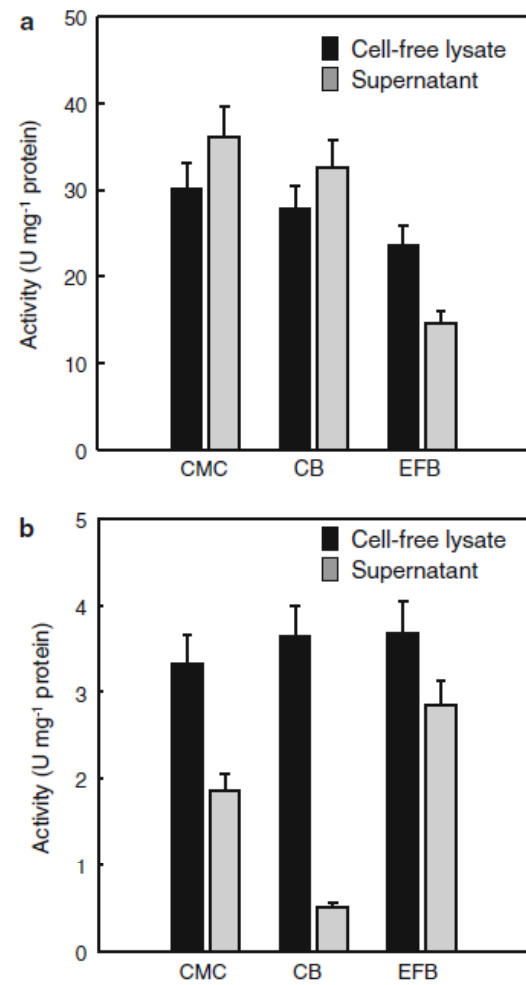


Fig. 2 Activities of carboxymethylcellulase (a) and cellobiohydrolase (b). Enzyme levels were assessed in the logarithmic growth phase using carboxymethylcellulose, cellobiose, or POEFB, as nutrients

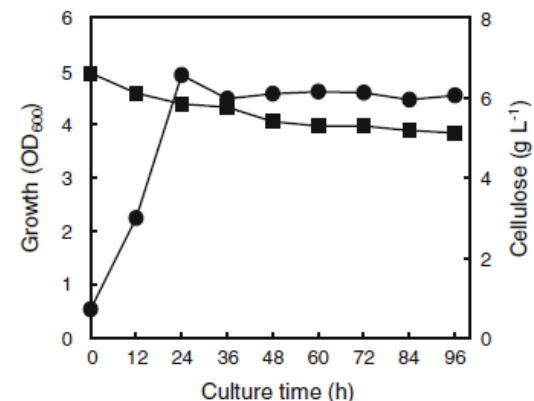


Fig. 3 Cultivation of *Aurantiochytrium* sp. KRS101 in a medium incorporating pretreated empty fruit bunch material derived from the palm oil industry. Growth; closed circles. Reducing sugar levels; closed squares

Conclusions

Aurantiochytrium sp. KRS101 can use cellulosic materials such as carboxymethylcellulose and cellobiose as nutrients, and can produce lipids containing high levels of DHA. In agreement with these conclusions, cellulose hydrolysis activities, as reflected by carboxymethylcellulase and cellobiohydrolase levels, were evident in both cell-free lysates and culture broths. Additionally, the microalgal strain was capable of utilizing an industrial cellulosic material derived from the palm oil industry, the empty fruit bunch. To the best of our knowledge, this is the first report describing utilization of cellulosic materials by a microalgal strain.

Acknowledgments This study was supported by the Ministry of Food, Agriculture, Forestry, and Fisheries and by the Advanced Biomass R&D Center (2010-0029737) of Korea Grant funded by the Ministry of Education, Science and Technology, of the Republic Korea.

References

- Beopoulos A, Cescut J, Haddouche R, Uribealarea JL, Molinajouve C, Nicaud JM (2009) *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. *Prog Lipid Res* 48:375–387
- Economou CN, Makri A, Aggelis G, Pavlou S, Vayenas DV (2010) Semi-solid state fermentation of sweet sorghum for the biotechnological production of single cell oil. *Bioresour Tech* 101:1385–1388
- Zhu LY, Zong MH, Wu H (2008) Efficient lipid production with *Trichosporon fermentans* and its use for biodiesel preparation. *Bioresour Tech* 99:7881–7885
- Li Q, Du W, Liu D (2008) Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Appl Microbiol Biotechnol* 80:749–756
- Easterling ER, French WT, Hernandez R, Licha M (2009) The effect of glycerol as a sole and secondary substrate on the growth and fatty acid composition of *Rhodotorula glutinis*. *Bioresour Tech* 100:356–361
- Hu C, Zhao X, Zhao J, Wu S, Zhao ZK (2009) Effects of biomass hydrolysis by-products on oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Bioresour Tech* 100:4843–4847
- Li Y, Zhao Z, Bai F (2007) High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture. *Enz Microbiol Tech* 41:312–317
- Gouda MK, Omar SH, Aouad LM (2008) Single cell oil production by *Gordonia* sp. DG using agro-industrial wastes. *World J Microbiol Biotechnol* 24:1703–1711
- Xu H, Miao X, Wu Q (2006) High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *J Biotechnol* 126:499–507
- Yokochi T, Honda D, Higashihara T, Nakahara T (1998) Optimization of docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium limacinum* SR21. *Appl Microbiol Biotechnol* 49:72–76
- Seraphim P, Michael K, George A (2004) Single cell oil (SCO) production by *Mortierella isabellina* grown on high-sugar content media. *Bioresour Tech* 95:287–291
- Brooks SL, Mitchell A, Steffenson N (2000) Mothers, infants, and DHA. Implications for nursing practice. *Am J Matern Child Nurs* 25:71–75
- Carlson SE (2009) Early determinants of development: a lipid perspective. *Am J Clin Nutr* 89:678S–684S
- Auestad N, Halter R, Hall RT, Blatter M, Bogle ML, Burks W, Erickson JR, Fitzgerald KM, Dobson V, Innis SM, Singer LT, Montalto MB, Jacobs JR, Qiu W, Bornstein MH (2001) Growth and development in term infants fed long-chain polyunsaturated fatty acids: a double-masked, randomized, parallel, prospective, multivariate study. *Pediatrics* 108:372–381
- Chi Z, Hu B, Liu Y, Frear C, Wen Z, Chen S (2007) Production of omega-3 polyunsaturated fatty acids from cull potato using an algae culture process. *Appl Biochem Biotechnol* 137–140: 805–815
- Liang Y, Sarkany N, Cui Y, Yesuf J, Trushenski J, Blackburn J (2010) Use of sweet sorghum juice for lipid production by *Schizochytrium limacinum* SR21. *Bioresour Tech* 101:3623–3627
- Hong WK, Rairakhwada D, Seo PS, Park SY, Hur BK, Ki CH, Seo JW (2011) Production of lipids containing high levels of docosahexaenoic acid by a newly isolated microalga, *Aurantiochytrium* sp. KRS101. *Appl Biochem Biotechnol* 164:1468–1480
- Hargraves PE (2008) Allelopathy at the land/sea interface: microalgae and Brazilian pepper. *Mar Environ Res* 66:553–555
- Gocke K, Cortés J, Murillo MM (2001) Planktonic primary production in a tidally influenced mangrove forest on the pacific coast of Costa Rica. *Rev Biol Trop* 49:279–288
- Ariffin H, Hassan MA, Shah UKM, Abdullah N, Ghazali FM, Shirai Y (2008) Production of bacterial endoglucanase from pretreated oil palm empty fruit bunch by *Bacillus pumilus* EB3. *J Biosci Bioeng* 106:231–236
- Millier GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31:426–428
- Kongruang S, Han MJ, Breton CI, Penner MH (2004) Quantitative analysis of cellulose-reducing ends. *Appl Biochem Biotechnol* 113–116:213–231
- Chi Z, Pyle D, Wen Z, Frear C, Chen S (2007) A laboratory study of producing docosahexaenoic acid from biodiesel-waste glycerol by microalgal fermentation. *Process Biochem* 42:1537–1545
- Zhu Y, Li H, Zhou H, Chen G, Liu W (2010) Cellulose and cellodextrin utilization by the cellulolytic bacterium *Cytophaga hutchinsonii*. *Bioresour Technol* 101:6432–6437
- Jun HS, Qi M, Gong J, Egbosimba EE, Forsberg CW (2007) Outer membrane proteins of *Fibrobacter succinogenes* with potential roles in adhesion to cellulose and in cellulose digestion. *J Bacteriol* 189:6806–6815

Fermentation strategies for 1,3-propanediol production from glycerol using a genetically engineered *Klebsiella pneumoniae* strain to eliminate by-product formation

Baek-Rock Oh · Jeong-Woo Seo · Sun-Yeon Heo ·
Won-Kyung Hong · Lian Hua Luo ·
Jun Ho Son · Don-Hee Park · Chul-Ho Kim

Received: 30 May 2011 / Accepted: 17 July 2011 / Published online: 30 September 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract We generated a genetically engineered *Klebsiella pneumoniae* strain (AK-VOT) to eliminate by-product formation during production of 1,3-propanediol (1,3-PD) from glycerol. In the present study, the glycerol-metabolizing properties of the recombinant strain were examined during fermentation in a 5 L bioreactor. As expected, by-product formation was completely absent (except for acetate) when the AK-VOT strain fermented glycerol. However, 1,3-PD productivity was severely reduced owing to a delay in cell growth attributable to a low rate of glycerol consumption. This problem was solved by establishing a two-stage process separating cell growth from 1,3-PD production. In addition, nutrient co-supplementation, especially with starch, significantly increased 1,3-PD

production from glycerol during fed-batch fermentation by AK-VOT in the absence of by-product formation.

Keywords Glycerol · *Klebsiella pneumoniae* · 1,3-Propanediol · By-product formation · Two-stage fermentation · Nutrient co-supplementation

Introduction

The demand for biodiesel production from animal fat or plant oil is high, and growing. However, a great deal of raw glycerol is formed as the main by-product during biodiesel production, and can be as much as 10% (w/w) of the biodiesel generated [1]. This surplus of raw glycerol has greatly disturbed the market for traditional glycerol, both in terms of how glycerol is packaged and price. In addition, a significant environmental problem arises because glycerol cannot be discharged directly into the environment [2]. Thus, much research has been devoted to development of methods to refine glycerol (a low-cost feedstock) into industrially valuable materials, such as fuels, chemical-building blocks, and bioactive substances.

1,3-Propanediol (1,3-PD) is a valuable chemical used mainly in the synthesis of polymethylene terephthalates, aiding polymerization of the terephthalate units [3]. The use of such polymers in the manufacture of materials, such as textile fibers, films, and plastics, is expanding rapidly. The 1,3-PD building block is currently produced by chemical processes including hydroformylation of ethylene oxide and hydration of acrolein [4, 5]. Recently, a microbial fermentation process using a recombinant *Escherichia coli* strain expressing genes from *Klebsiella pneumoniae* and *Saccharomyces cerevisiae* was developed, and glucose was converted to 1,3-PD [6]. However, it is desirable to

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00449-011-0603-2) contains supplementary material, which is available to authorized users.

B.-R. Oh · J.-W. Seo · S.-Y. Heo · W.-K. Hong ·
L. H. Luo · C.-H. Kim (✉)
Microbe-based Fusion Technology Research Center,
Jeonbuk Branch Institute, KRIBB, Jeongeup,
Jeonbuk 580-185, Korea
e-mail: kim3641@kribb.re.kr

B.-R. Oh · D.-H. Park
Interdisciplinary Program of Graduate School for Bioenergy
and Biomaterials, Chonnam National University,
Gwangju 500-757, Korea

L. H. Luo
Institute for Molecular Biology and Genetics, Research Center
of Bioactive Materials, Chonbuk National University, Jeonju,
Chonbuk 561-756, South Korea

J. H. Son
Daegu Gyeongbuk Institute for Oriental Medicine Industry,
Gyeongsan, Gyeongbuk 712-260, Korea

produce 1,3-PD by microbial fermentation using glycerol as substrate because, again, glycerol is an abundant by-product of biodiesel manufacture.

K. pneumoniae is typical of microorganisms capable of producing 1,3-PD, and the relevant anabolic pathway has been well studied (Fig. 1) [7]. Glycerol is first converted to 3-hydroxypropionaldehyde (3-HPA) by a coenzyme B₁₂-dependent glycerol dehydratase (DhaB), and the product is next reduced to 1,3-PD in a reaction catalyzed by reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH)-dependent 1,3-PD oxidoreductase (DhaT). In addition to the reductive pathway, glycerol is also metabolized by an oxidative pathway, wherein the material is first dehydrogenated to dihydroxyacetone (DHA) by an NAD⁺-dependent glycerol dehydrogenase (DhaD), and DHA is next phosphorylated to dihydroxyacetone phosphate (DHAP) in a reaction facilitated by an ATP-dependent DHA kinase (DhaK). If the oxidative branch is operative, glycerol is assimilated and yields an increase in biomass, which results in generation of many different metabolites such as acetate, ethanol, lactate, succinate, and 2,3-butanediol (2,3-BD).

The genes encoding the functionally linked proteins DhaB and DhaT of the reductive branch and DhaD and DhaK of the oxidative branch are clustered in a chromosomal DNA region of *K. pneumoniae* termed the *dha* regulon [8]. Many research groups have sought to enhance 1,3-PD production using metabolic engineering [9–12], either by greatly increasing enzyme activities [13–15] or by improving NADH availability [16]. However, although increased production of 1,3-PD is paramount, minimization

of by-product biosynthesis (by-products are formed at a level approximately 70% [w/w] that of 1,3-PD) must be considered when metabolic engineering is planned [17]. 2,3-BD is a major by-product of the synthesis of 1,3-PD, and creates problems in downstream processing when efforts are made to obtain high purity 1,3-PD because the two compounds have similar boiling points [18].

Recently, we engineered a mutant strain of *K. pneumoniae* (termed AK-VOT) to eliminate by-product formation during 1,3-PD production from glycerol, by inactivating the oxidative branch of the glycerol metabolic pathway (Fig. 1) [19]. In the recombinant strain, by-product formation, with the exception of acetate, was eliminated, resulting in a higher production yield relative to that of the wild-type strain. In the present study, we investigated the glycerol metabolizing properties of the recombinant strain on the 5 L bioreactor scale and developed fermentation strategies to enhance 1,3-PD production.

Materials and methods

Microbial strain and media

The *Klebsiella pneumoniae* strains described in our previous study [19] were grown either in LB (yeast extract [Difco], 0.5% [w/v]; Bacto-trypton [Difco], 1.0% [w/v]; and NaCl, 1.0% [w/v]) or in a defined glycerol-containing medium with 20 g L⁻¹ of glycerol, 2 g L⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 3.4 g L⁻¹ K₂HPO₄, 1.3 g L⁻¹ KH₂PO₄, 0.2 g L⁻¹ MgSO₄, 0.002 g L⁻¹ CaCl₂ 2H₂O, 1 g L⁻¹ yeast extract, 1 mL Fe solution [5 g L⁻¹ FeSO₄ 7H₂O and 4 mL L⁻¹ HCl (37%, w/v)], and 1 mL trace element solution [70 mg L⁻¹ ZnCl₂, 100 mg L⁻¹ MnCl₂ 4H₂O, 60 mg L⁻¹ H₃BO₃, 200 mg L⁻¹ CoCl₂ 4H₂O, 20 mg L⁻¹ CuCl₂ 2H₂O, 25 mg L⁻¹ NiCl₂ 6H₂O, 35 mg L⁻¹ Na₂MoO₄ 2H₂O, with 4 mL HCl (37%, w/v)]. Tetracycline was added to a final concentration of 10 µg mL⁻¹.

Batch fermentation

Seed cells for fermentation were prepared in a 250-mL flask containing 50 mL LB medium supplemented with tetracycline and 0.5 mM isopropyl-β-thiogalactoside (IPTG). Flasks were incubated at 37 °C for 12 h and were subsequently used to inoculate fermentation medium at 2.5% (v/v). Fermentation was conducted at 37 °C, with stirring at 200 rpm, and at pH 7.0, with 0.5 volume per min of air in a 5 L vessel (Kobiotech. Co. Ltd, Korea) containing 2 L of fermentation medium with tetracycline (10 µg mL⁻¹) and IPTG (0.5 mM). To examine the effect of aeration volume, fermentation was conducted with input of various amounts of air (0.1, 0.5, 1.0, or 3.0 volumes per min). Glucose,

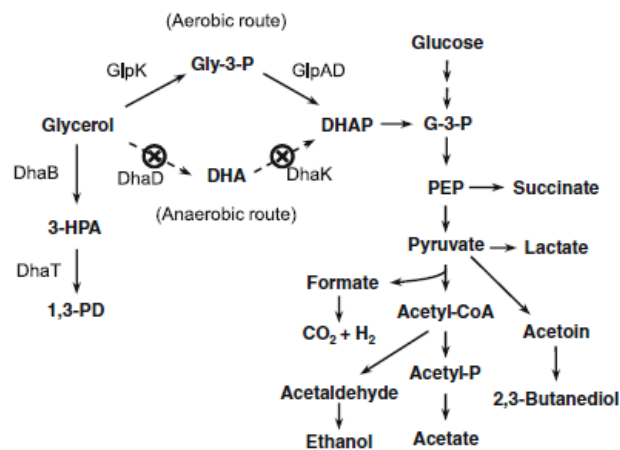


Fig. 1 Glycerol metabolism in *Klebsiella pneumoniae*. The metabolic pathway involving DhaD, which is inactivated in the AK-VOT strain, is indicated by the dashed line. DHA dihydroxyacetone, DhaB glycerol dehydratase, DhaD glycerol dehydrogenase, DhaK dihydroxyacetone kinase, DHAP dihydroxyacetone phosphate, DhaT 1,3-propanediol oxidoreductase, G-3-P glyceraldehyde-3 phosphate, GlpAD Gly-3-P dehydrogenase, GlpK glycerol kinase, Gly-3-P glycerol-3 phosphate, 3-HPA 3-hydroxypropionaldehyde, PEP phosphoenolpyruvate, 1,3-PD 1,3-propanediol

lactose, maltose, starch, sucrose, or xylose was added at a concentration of 10 g L⁻¹ to supplement the glycerol substrate.

In the two-stage process, cells were grown to an absorbance of 1.5–2.0 at OD₆₀₀ in LB medium containing tetracycline (10 µg mL⁻¹) and IPTG (0.5 mM), and glycerol (20 g L⁻¹) was next added for conversion into 1,3-PD.

Fed-batch fermentation

Seed cells prepared by the above method were inoculated into the bioreactor at 2.5% (v/v) concentration and fermentation was conducted at 37 °C and pH 7.0, stirring at 200 rpm, and aeration with 0.5 volume per min of air in a 5 L vessel containing 2 L of fermentation medium with tetracycline (10 µg mL⁻¹) and IPTG (0.5 mM). Glycerol or a glycerol-and-starch mixture was batch-fed at various timepoints after residual glycerol concentration was measured, as described below.

Metabolite analysis

The concentrations of residual glycerol, 1,3-PD, ethanol, acetate, lactate, succinate, and 2,3-BD were measured using a high-performance liquid chromatography system (Agilent 1200) equipped with a refractive index detector and an organic acid analysis column (300 mm × 78 mm; Aminex HPX-87H; Bio-Rad). The mobile phase was 0.005 mol L⁻¹ H₂SO₄ and the flow rate was 0.8 mL per min. The column temperature was maintained at 65 °C. Biomass concentration was determined by measurement of optical density at 600 nm (OD₆₀₀).

Response surface methodology (RSM)

RSM is a group of empirical techniques aimed at evaluating the relationship between a cluster of controlled

experimental factors and an array of measured responses, using one or more selected criteria [20, 21]. The series of experiments we designed and conducted are shown in Supplementary Table 1. RSM was adopted to optimize production of 1,3-PD by statistically modeling the individual and interactive effects of all of pH, aeration rate, glycerol concentration, fermentation time, and temperature. A central composite design (CCD) was employed to maximize 1,3-PD production; this consisted of 50 experiments exploring five variables at the -2, -1, 0, +1, and +2 levels [22]. 1,3-PD production was the response (dependent) variable. A second-order polynomial model was fitted for 1,3-PD production, using Eq. 1 as shown in Supplementary Table 1. Statistical analysis of data was performed using the “Design Expert” software (version 7.1.6; Stat-Ease, Inc., USA) statistical package.

Supplementary Table 1 summarizes the central composite experimental plan along with the values of variables in each individual experiment. The 1,3-PD concentration was the response parameter evaluated in various run cycles. The mathematical model, which represents a second-order polynomial, is given by Eq. 2 below [23], in which variables are encoded (Supplementary Table 2):

$$\begin{aligned}
 Y = & 8.20 - 0.42X_1 + 0.42X_2 + 0.54X_3 + 0.67X_4 \\
 & - 0.44X_5 - 0.37X_1^2 - 0.07X_2^2 - 0.50X_3^2 \\
 & - 0.21X_4^2 - 1.00X_5^2 - 0.25X_1X_2 - 0.15X_1X_3 \\
 & - 0.26X_1X_4 - 0.29X_1X_5 + -0.08X_2X_3 \\
 & - 0.21X_2X_4 - 0.01X_2X_5 + 0.35X_3X_4 + 2.187E \\
 & - 0.03X_3X_5 - 0.67X_4X_5 \quad (2)
 \end{aligned}$$

The statistical significance of Eq. 2 was verified using the *F* test and the analysis of variance (ANOVA) for the response surface model is summarized in Supplementary Table 3.

The three-dimensional response surface curves were next contour plotted in two dimensions to explain

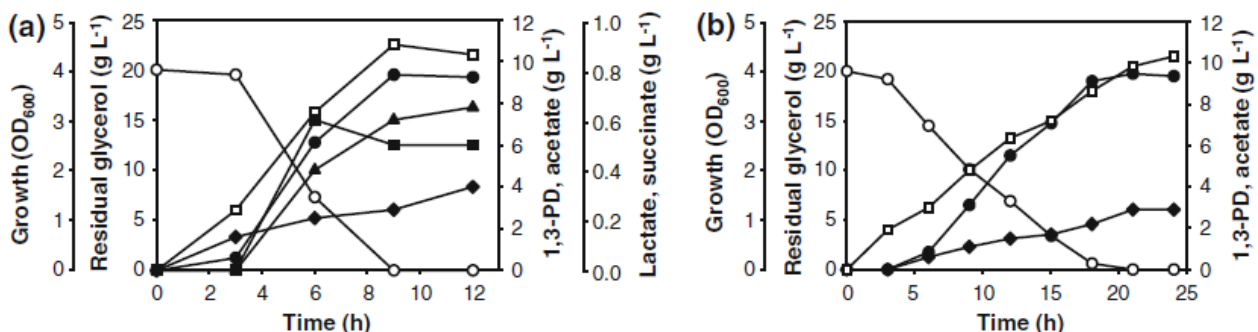


Fig. 2 Batch fermentation for 1,3-PD production from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* Cu-VOT (a) and AK-VOT (b). Residual glycerol, open circle; 1,3-PD, closed circle; acetate, open square; cell growth, closed square; 2,3-BD, closed triangle

interactions among fermentation parameters and to determine the optimum level of each variable required for maximal 1,3-PD production (Supplementary Fig. 1a–j).

The numerical method of Myers and Montgomery was used to solve the regression equation (Eq. 2). The model predicted the optimal values of test variables in coded units, and the results were as follows: $A_1 = -1.00$, $A_2 = 1.00$, $A_3 = 1.00$, $X_4 = 1.00$, and $A_5 = -0.42$, with the corresponding Y being 10.16 g L^{-1} . The natural values obtained by placing the encoded values of Supplementary Table 1 into the equation were $\text{pH} = 6.5$, aeration volume = $0.7 \text{ volume per min}$, glycerol concentration = 25.0 g L^{-1} , fermentation time = 15.0 h , and temperature = $35.7 \text{ }^\circ\text{C}$.

Results and discussion

Analysis of glycerol metabolism by *K. pneumoniae* AK-VOT

When *K. pneumoniae* AK-VOT was fermented under the conditions used for 1,3-PD production by the Cu-VOT strain (control) [19], similar amounts of 1,3-PD were produced (Fig. 2), but by-product formation was completely eliminated (except for acetate) upon fermentation by AK-VOT, compared with the control. However, the glycerol consumption rate of AK-VOT was low, resulting in slow growth to a low final cell density. This was reflected in lower 1,3-PD productivity ($0.44 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) compared with that of the control strain ($0.87 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). The delay in glycerol consumption by AK-VOT was attributable to manipulation of the genetic background, during which *dhaD* encoding glycerol dehydrogenase had been removed (Fig. 1), abolishing the anaerobic route of glycerol fermentative metabolism to eliminate the formation of large amounts of by-products such as 2,3-BD. Thus, only the aerobic route was available for glycerol utilization as a carbon source for cell growth by AK-VOT, whereas both aerobic and anaerobic routes were operative in Cu-VOT [24].

Effect of aeration volume on glycerol metabolism by *K. pneumoniae* AK-VOT

To test the assumption above, the effect of aeration rate on glycerol metabolism by AK-VOT was examined. As expected, both glycerol consumption rate and growth increased with increasing aeration rate (Fig. 3). However, the final level of 1,3-PD production was not affected by change in aeration volume, although production speed was slightly increased as air volume increased. Thus, glycerol was utilized via respiratory metabolism during cultivation with high-level aeration, but not via fermentative metabolism, by the recombinant strain.

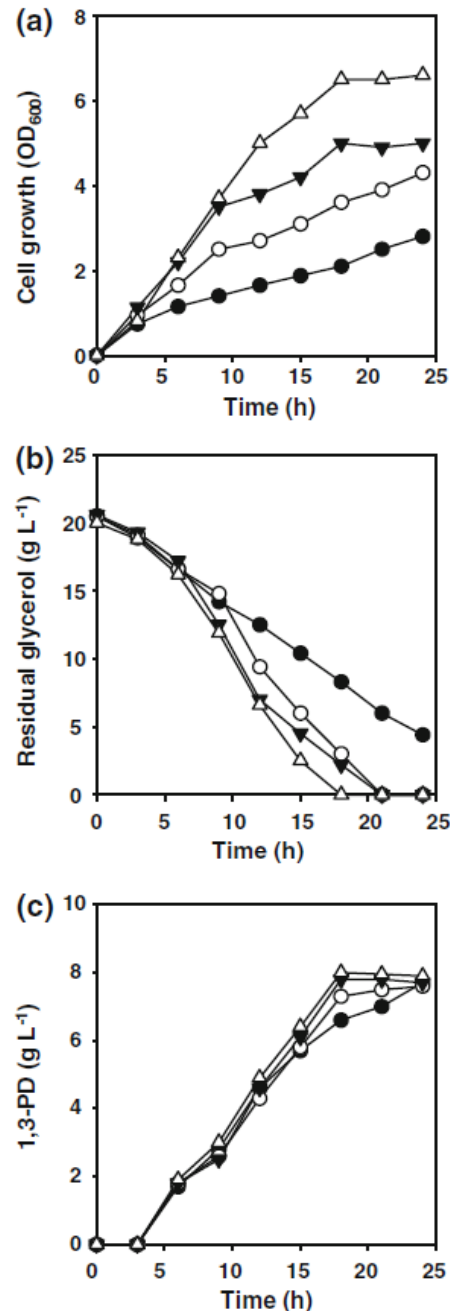


Fig. 3 Growth (a), glycerol utilization (b), and 1,3-PD production (c) of recombinant *K. pneumoniae* AK-VOT fermented at various aeration rates (0.1 volume per minute [vvm], closed circle; 0.5 vvm, open circle; 1.0 vvm, closed triangle; 3.0 vvm, open triangle)

Fermentation by *K. pneumoniae* AK-VOT using a two-stage process

Based on the above results, we developed two fermentation strategies to increase 1,3-PD productivity by *K. pneumoniae* AK-VOT. First, we investigated a two-

stage fermentation protocol in which cell growth and 1,3-PD production were distinct. To compensate for the delay in AK-VOT growth owing to the low glycerol consumption rate when glycerol was supplied as the sole carbon source, cells were first grown in LB medium and glycerol was added to induce 1,3-PD production. This two-stage process was optimized using RSM, as described in the “Materials and methods”. Using the optimized process, maximal 1,3-PD production increased to 11.29 g L⁻¹, and the conversion rate and productivity were 0.66 mol mol⁻¹ and 0.63 g L⁻¹ h⁻¹, respectively (Fig. 4).

Effect of nutrient co-supplementation on glycerol metabolism in *K. pneumoniae* AT-VOT

As another strategy, we investigated the effects of co-supplementation with various nutrients on glycerol metabolism in *K. pneumoniae* AK-VOT. As shown in Fig. 5, supplementation with starch or xylose yielded similar patterns of cell growth and glycerol utilization by the recombinant strain, but 1,3-PD production was markedly increased from 8.0 to 10.6 g L⁻¹ (starch) or 10.2 g L⁻¹ (xylose), again with no by-product formation. Glucose, maltose, and sucrose could not substitute for starch or xylose. Growth of AK-VOT was stimulated by glucose, maltose, or sucrose, but glycerol consumption and 1,3-PD production decreased somewhat (to 5.4, 5.8, and 6.3 g L⁻¹ when glucose, maltose, or sucrose, respectively, was present). This negative effect may be attributable to catabolite repression of glycerol metabolism [25]. Interestingly, the negative effect was greater when glycerol was supplemented with lactose.

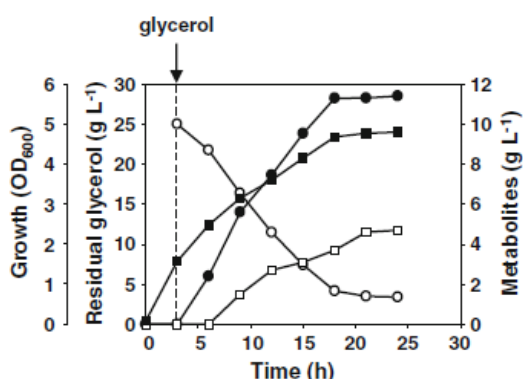


Fig. 4 Two-stage fermentation for 1,3-PD production from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* AK-VOT. Residual glycerol, open circle; 1,3-PD, closed circle; acetate, open square; cell growth, closed square; 2,3-BD, closed triangle

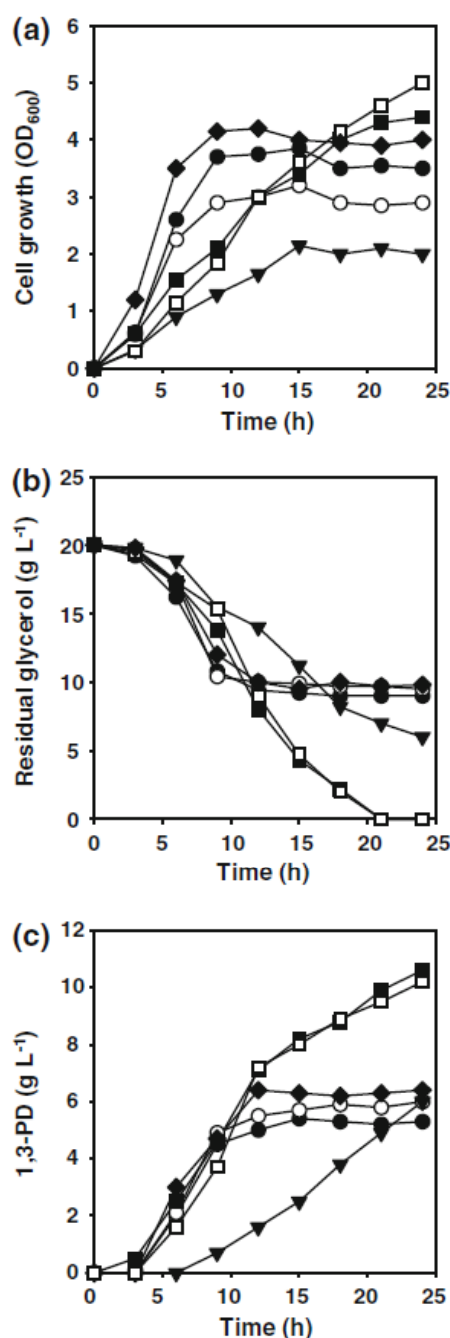
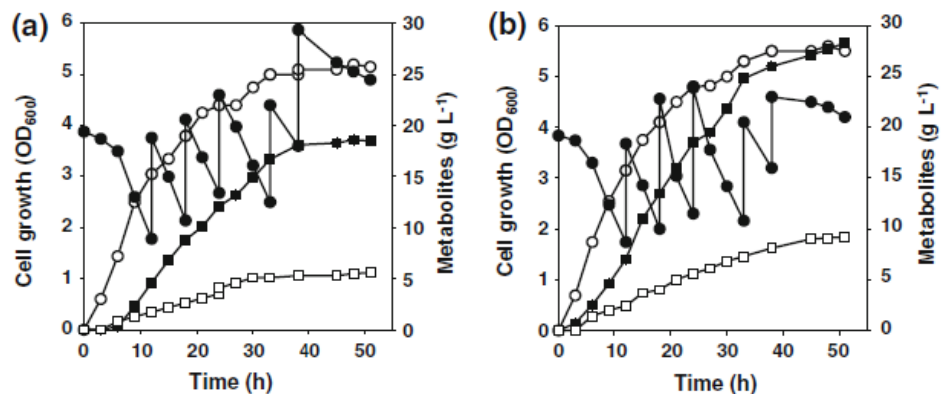


Fig. 5 Growth of (a), glycerol utilization by (b), and 1,3-PD production of (c) recombinant *K. pneumoniae* AK-VOT under different conditions of fermentation during which glycerol was supplemented with various nutrient sources (10 g L⁻¹). Glucose, closed circle; lactose, closed triangle; maltose, closed diamond; starch, closed square; sucrose, open circle; xylose, open square

Fed-batch fermentation of *K. pneumoniae* AK-VOT using supplementation of glycerol with starch

We conducted fed-batch fermentation to yield 1,3-PD, using the *K. pneumoniae* AK-VOT strain and the substrate

Fig. 6 Fed-batch fermentation during 1,3-PD production by *K. pneumoniae* AK-VOT. The nutrients were glycerol alone (a), or glycerol and starch (10 g L^{-1}) (b). Acetate, open square; growth, open circle; 1,3-PD, closed square; residual glycerol, closed circle



co-supplementation strategy. To this end, starch, which is readily available as an industrial medium, was selected as the co-supplementing substrate. Growth in the presence of both glycerol and starch remarkably enhanced production of 1,3-PD, and the maximal production level, production rate, and productivity were 26.1 g L^{-1} , $0.64 \text{ mol mol}^{-1}$, and $0.51 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$, respectively, compared with the values (18.5 g L^{-1} , $0.50 \text{ mol mol}^{-1}$, and $0.36 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$, respectively) obtained when glycerol alone was used as carbon source (Fig. 6). No by-product formation was evident during enhanced production of 1,3-PD, although the amount of acetate increased. In line with the efficient utilization of starch by *K. pneumoniae* AK-VOT, chromosomal analysis identified two genes (YP_001336072 and YP_001337588) encoding alpha-amylases involved in catabolism of starch.

Conclusion

In the present study, the glycerol-metabolizing properties of the genetically engineered *K. pneumoniae* AK-VOT strain were examined upon fermentation in a 5 L bioreactor. As expected, by-product formation was completely absent (except for acetate) when AK-VOT fermented glycerol. However, 1,3-PD productivity was severely compromised owing to a delay in cell growth attributable to a low glycerol consumption rate. Increase in aeration volume during fermentation improved glycerol utilization and cell growth of the AK-VOT strain, but did not increase 1,3-PD production. To optimize 1,3-PD synthesis, two fermentation strategies were developed. One was a two-stage process, in which cells were first grown in a rich medium (LB), and 1,3-PD production was then induced by adding glycerol. Another strategy was co-supplementation of glycerol with another nutrient, especially starch, during fermentation. Both processes successfully increased production of 1,3-PD during fermentation by AK-VOT, with no by-product production.

Acknowledgments This research was supported by the Ministry of Environment (Grant No. 202-091-004) and by the Ministry of Food, Agriculture, Forestry, and Fisheries of the Republic Korea.

References

- Johnson DT, Taconi KA (2007) The glycerin glut: options for the value-added conversion of crude glycerol resulting from biodiesel production. *Environ Prog* 26:338–348
- da Silva GP, Mack M, Contiero J (2009) Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnol Adv* 27:30–39
- Pagliaro M, Ciriminna R, Kimura H, Rossi M, Pina CD (2007) From glycerol to value-added products. *Angewandte Chemie-International Edition* 46:4434–4440
- Haas T, Wiegand N, Arntz D (1994) Process for the production of 1,3-propanediol. US patent, NO 5334778
- Slaugh LH, Powell JB, Forschner TC, Semple TC, Weinder PR (1995) Process for preparing 1,3-propanediol. US patent No 5463146
- Bhatia SK, Kurian JV (2008) Biological characterization of Sorona polymer from corn-derived 1,3-propanediol. *Biotechnol Lett* 30:619–623
- Hao J, Wang W, Tian J, Li J, Liu DH (2008) Decrease of 3-hydroxypropionaldehyde accumulation in 1,3-propanediol production by over-expressing *dha T* gene in *Klebsiella pneumoniae* TUAC01. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35:735–741
- Nakamura CE, Whited GM (2003) Metabolic engineering for the microbial production of 1,3-propanediol. *Curr Opin Biotechnol* 14:454–459
- Tong IT, Liao HH, Cameron DC (1991) 1,3-Propanediol production by *Escherichia coli* expressing genes from the *Klebsiella pneumoniae dha* regulon. *Appl Environ Microbiol* 57:3541–3546
- Skraly FA, Lytle BL, Cameron DC (1998) Construction and characterization of a 1,3-propanediol operon. *Appl Environ Microbiol* 64:98–105
- Sun J, van den Heuvel J, Soucaille P, Qu Y, Zeng AP (2003) Comparative genomic analysis of *dha* regulon and related genes for anaerobic glycerol metabolism in bacteria. *Biotechnol Prog* 19:263–272
- Zheng P, Wereath K, Sun J, van den Heuvel J, Zeng AP (2006) Overexpression of genes of the *dha* regulon and its effects on cell growth, glycerol fermentation to 1,3-propanediol and plasmid stability in *Klebsiella pneumoniae*. *Process Biochem* 41:2160–2169

13. Yang G, Tian J, Li J (2007) Fermentation of 1,3-propanediol by a lactate deficient mutant of *Klebsiella oxytoca* under microaerobic conditions. *Appl Microbiol Biotechnol* 73:1017–1024
14. Zhang Y, Li Y, Du C, Liu M, Cao Z (2006) Inactivation of aldehyde dehydrogenase: a key factor for engineering 1,3-propanediol production by *Klebsiella pneumoniae*. *Metab Eng* 8:578–586
15. Zhao L, Zheng Y, Ma X, Wei D (2009) Effects of over-expression of glycerol dehydrogenase and 1,3-propanediol oxidoreductase on bioconversion of glycerol into 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* under micro-aerobic conditions. *Bioprocess Biosyst Eng* 32:313–320
16. Zhang YP, Huang ZH, Du CY, Li Y, Cao ZA (2009) Introduction of an NADH regeneration system into *Klebsiella oxytoca* leads to an enhanced oxidative and reductive metabolism of glycerol. *Metab Eng* 11:101–106
17. Oh BR, Seo JW, Choi MH, Kim CH (2008) Optimization of culture conditions for 1,3-propanediol production from crude glycerol by *Klebsiella pneumoniae* using response surface methodology. *Biotechnol Bioprocess Eng* 13:524–532
18. Xiu ZL, Zeng AP (2008) Present state and perspective of downstream processing of biologically produced 1,3-propanediol and 2, 3-butanediol. *Appl Microbiol Biotechnol* 78:917–926
19. Seo MY, Seo JW, Heo SY, Baek JO, Rairakhwada D, Oh BR, Seo PS, Choi MH, Kim CH (2009) Elimination of by-product formation during production of 1,3-propanediol in *Klebsiella pneumoniae* by inactivation of glycerol oxidative pathway. *Appl Microbiol Biotechnol* 84:527–534
20. Bandaru VVR, Somalanka SR, Mendu DR, Madicherla NR, Chityala A (2006) *Enzyme Microb Technol* 38:209–214
21. Lee H, Song M, Hwang S (2003) Optimizing bioconversion of deproteinated cheese whey to mycelia of *Ganoderma lucidum*. *Process Biochem* 38:1685–1693
22. Kim JK, Oh BR, Shin HJ, Eom CY, Kim SW (2008) Statistical optimization of enzymatic saccharification and ethanol fermentation using food waste. *Process Biochem* 43:1308–1312
23. Myers RH, Montgomery DC (2002) *Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments*. Wiley, New York
24. Forage RG, Lin ECC (1982) dha System mediating aerobic and anaerobic dissimilation of glycerol in *Klebsiella pneumoniae* NCIB418. *J Bacteriol* 151:591–599
25. Meyer M, Dimroth P, Bott M (2001) Catabolite repression of the citrate fermentation genes in *Klebsiella pneumoniae*: evidence for involvement of the cyclic AMP receptor protein. *J Bacteriol* 183:5248–5256

Fermentation strategies for 1,3-propanediol production from glycerol using a genetically engineered *Klebsiella pneumoniae* strain to eliminate by-product formation

Baek-Rock Oh · Jeong-Woo Seo · Sun-Yeon Heo ·
Won-Kyung Hong · Lian Hua Luo ·
Jun Ho Son · Don-Hee Park · Chul-Ho Kim

Received: 30 May 2011 / Accepted: 17 July 2011 / Published online: 30 September 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract We generated a genetically engineered *Klebsiella pneumoniae* strain (AK-VOT) to eliminate by-product formation during production of 1,3-propanediol (1,3-PD) from glycerol. In the present study, the glycerol-metabolizing properties of the recombinant strain were examined during fermentation in a 5 L bioreactor. As expected, by-product formation was completely absent (except for acetate) when the AK-VOT strain fermented glycerol. However, 1,3-PD productivity was severely reduced owing to a delay in cell growth attributable to a low rate of glycerol consumption. This problem was solved by establishing a two-stage process separating cell growth from 1,3-PD production. In addition, nutrient co-supplementation, especially with starch, significantly increased 1,3-PD

production from glycerol during fed-batch fermentation by AK-VOT in the absence of by-product formation.

Keywords Glycerol · *Klebsiella pneumoniae* · 1,3-Propanediol · By-product formation · Two-stage fermentation · Nutrient co-supplementation

Introduction

The demand for biodiesel production from animal fat or plant oil is high, and growing. However, a great deal of raw glycerol is formed as the main by-product during biodiesel production, and can be as much as 10% (w/w) of the biodiesel generated [1]. This surplus of raw glycerol has greatly disturbed the market for traditional glycerol, both in terms of how glycerol is packaged and price. In addition, a significant environmental problem arises because glycerol cannot be discharged directly into the environment [2]. Thus, much research has been devoted to development of methods to refine glycerol (a low-cost feedstock) into industrially valuable materials, such as fuels, chemical-building blocks, and bioactive substances.

1,3-Propanediol (1,3-PD) is a valuable chemical used mainly in the synthesis of polymethylene terephthalates, aiding polymerization of the terephthalate units [3]. The use of such polymers in the manufacture of materials, such as textile fibers, films, and plastics, is expanding rapidly. The 1,3-PD building block is currently produced by chemical processes including hydroformylation of ethylene oxide and hydration of acrolein [4, 5]. Recently, a microbial fermentation process using a recombinant *Escherichia coli* strain expressing genes from *Klebsiella pneumoniae* and *Saccharomyces cerevisiae* was developed, and glucose was converted to 1,3-PD [6]. However, it is desirable to

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00449-011-0603-2) contains supplementary material, which is available to authorized users.

B.-R. Oh · J.-W. Seo · S.-Y. Heo · W.-K. Hong ·
L. H. Luo · C.-H. Kim (✉)
Microbe-based Fusion Technology Research Center,
Jeonbuk Branch Institute, KRIBB, Jeongeup,
Jeonbuk 580-185, Korea
e-mail: kim3641@kribb.re.kr

B.-R. Oh · D.-H. Park
Interdisciplinary Program of Graduate School for Bioenergy
and Biomaterials, Chonnam National University,
Gwangju 500-757, Korea

L. H. Luo
Institute for Molecular Biology and Genetics, Research Center
of Bioactive Materials, Chonbuk National University, Jeonju,
Chonbuk 561-756, South Korea

J. H. Son
Daegu Gyeongbuk Institute for Oriental Medicine Industry,
Gyeongsan, Gyeongbuk 712-260, Korea

produce 1,3-PD by microbial fermentation using glycerol as substrate because, again, glycerol is an abundant by-product of biodiesel manufacture.

K. pneumoniae is typical of microorganisms capable of producing 1,3-PD, and the relevant anabolic pathway has been well studied (Fig. 1) [7]. Glycerol is first converted to 3-hydroxypropionaldehyde (3-HPA) by a coenzyme B₁₂-dependent glycerol dehydratase (DhaB), and the product is next reduced to 1,3-PD in a reaction catalyzed by reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH)-dependent 1,3-PD oxidoreductase (DhaT). In addition to the reductive pathway, glycerol is also metabolized by an oxidative pathway, wherein the material is first dehydrogenated to dihydroxyacetone (DHA) by an NAD⁺-dependent glycerol dehydrogenase (DhaD), and DHA is next phosphorylated to dihydroxyacetone phosphate (DHAP) in a reaction facilitated by an ATP-dependent DHA kinase (DhaK). If the oxidative branch is operative, glycerol is assimilated and yields an increase in biomass, which results in generation of many different metabolites such as acetate, ethanol, lactate, succinate, and 2,3-butanediol (2,3-BD).

The genes encoding the functionally linked proteins DhaB and DhaT of the reductive branch and DhaD and DhaK of the oxidative branch are clustered in a chromosomal DNA region of *K. pneumoniae* termed the *dha* regulon [8]. Many research groups have sought to enhance 1,3-PD production using metabolic engineering [9–12], either by greatly increasing enzyme activities [13–15] or by improving NADH availability [16]. However, although increased production of 1,3-PD is paramount, minimization

of by-product biosynthesis (by-products are formed at a level approximately 70% [w/w] that of 1,3-PD) must be considered when metabolic engineering is planned [17]. 2,3-BD is a major by-product of the synthesis of 1,3-PD, and creates problems in downstream processing when efforts are made to obtain high purity 1,3-PD because the two compounds have similar boiling points [18].

Recently, we engineered a mutant strain of *K. pneumoniae* (termed AK-VOT) to eliminate by-product formation during 1,3-PD production from glycerol, by inactivating the oxidative branch of the glycerol metabolic pathway (Fig. 1) [19]. In the recombinant strain, by-product formation, with the exception of acetate, was eliminated, resulting in a higher production yield relative to that of the wild-type strain. In the present study, we investigated the glycerol metabolizing properties of the recombinant strain on the 5 L bioreactor scale and developed fermentation strategies to enhance 1,3-PD production.

Materials and methods

Microbial strain and media

The *Klebsiella pneumoniae* strains described in our previous study [19] were grown either in LB (yeast extract [Difco], 0.5% [w/v]; Bacto-trypton [Difco], 1.0% [w/v]; and NaCl, 1.0% [w/v]) or in a defined glycerol-containing medium with 20 g L⁻¹ of glycerol, 2 g L⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 3.4 g L⁻¹ K₂HPO₄, 1.3 g L⁻¹ KH₂PO₄, 0.2 g L⁻¹ MgSO₄, 0.002 g L⁻¹ CaCl₂ 2H₂O, 1 g L⁻¹ yeast extract, 1 mL Fe solution [5 g L⁻¹ FeSO₄ 7H₂O and 4 mL L⁻¹ HCl (37%, w/v)], and 1 mL trace element solution [70 mg L⁻¹ ZnCl₂, 100 mg L⁻¹ MnCl₂ 4H₂O, 60 mg L⁻¹ H₃BO₃, 200 mg L⁻¹ CoCl₂ 4H₂O, 20 mg L⁻¹ CuCl₂ 2H₂O, 25 mg L⁻¹ NiCl₂ 6H₂O, 35 mg L⁻¹ Na₂MoO₄ 2H₂O, with 4 mL HCl (37%, w/v)]. Tetracycline was added to a final concentration of 10 µg mL⁻¹.

Batch fermentation

Seed cells for fermentation were prepared in a 250-mL flask containing 50 mL LB medium supplemented with tetracycline and 0.5 mM isopropyl-β-thiogalactoside (IPTG). Flasks were incubated at 37 °C for 12 h and were subsequently used to inoculate fermentation medium at 2.5% (v/v). Fermentation was conducted at 37 °C, with stirring at 200 rpm, and at pH 7.0, with 0.5 volume per min of air in a 5 L vessel (Kobitech. Co. Ltd, Korea) containing 2 L of fermentation medium with tetracycline (10 µg mL⁻¹) and IPTG (0.5 mM). To examine the effect of aeration volume, fermentation was conducted with input of various amounts of air (0.1, 0.5, 1.0, or 3.0 volumes per min). Glucose,

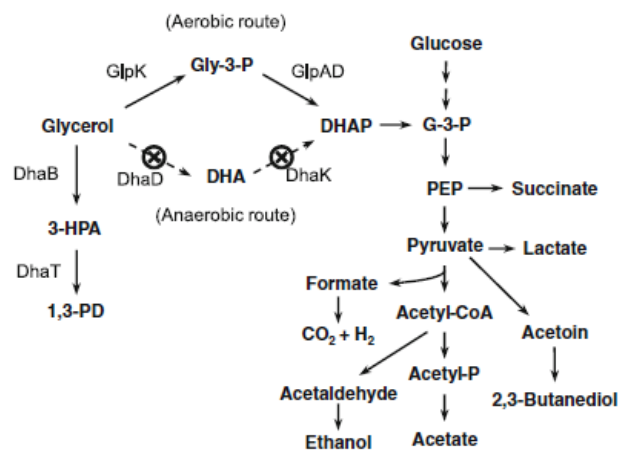


Fig. 1 Glycerol metabolism in *Klebsiella pneumoniae*. The metabolic pathway involving DhaD, which is inactivated in the AK-VOT strain, is indicated by the dashed line. DHA dihydroxyacetone, DhaB glycerol dehydratase, DhaD glycerol dehydrogenase, DhaK dihydroxyacetone kinase, DHAP dihydroxyacetone phosphate, DhaT 1,3-propanediol oxidoreductase, G-3-P glyceraldehyde-3 phosphate, GlpAD Gly-3-P dehydrogenase, GlpK glycerol kinase, Gly-3-P glycerol-3 phosphate, 3-HPA 3-hydroxypropionaldehyde, PEP phosphoenolpyruvate, 1,3-PD 1,3-propanediol

lactose, maltose, starch, sucrose, or xylose was added at a concentration of 10 g L⁻¹ to supplement the glycerol substrate.

In the two-stage process, cells were grown to an absorbance of 1.5–2.0 at OD₆₀₀ in LB medium containing tetracycline (10 µg mL⁻¹) and IPTG (0.5 mM), and glycerol (20 g L⁻¹) was next added for conversion into 1,3-PD.

Fed-batch fermentation

Seed cells prepared by the above method were inoculated into the bioreactor at 2.5% (v/v) concentration and fermentation was conducted at 37 °C and pH 7.0, stirring at 200 rpm, and aeration with 0.5 volume per min of air in a 5 L vessel containing 2 L of fermentation medium with tetracycline (10 µg mL⁻¹) and IPTG (0.5 mM). Glycerol or a glycerol-and-starch mixture was batch-fed at various timepoints after residual glycerol concentration was measured, as described below.

Metabolite analysis

The concentrations of residual glycerol, 1,3-PD, ethanol, acetate, lactate, succinate, and 2,3-BD were measured using a high-performance liquid chromatography system (Agilent 1200) equipped with a refractive index detector and an organic acid analysis column (300 mm × 78 mm; Aminex HPX-87H; Bio-Rad). The mobile phase was 0.005 mol L⁻¹ H₂SO₄ and the flow rate was 0.8 mL per min. The column temperature was maintained at 65 °C. Biomass concentration was determined by measurement of optical density at 600 nm (OD₆₀₀).

Response surface methodology (RSM)

RSM is a group of empirical techniques aimed at evaluating the relationship between a cluster of controlled

experimental factors and an array of measured responses, using one or more selected criteria [20, 21]. The series of experiments we designed and conducted are shown in Supplementary Table 1. RSM was adopted to optimize production of 1,3-PD by statistically modeling the individual and interactive effects of all of pH, aeration rate, glycerol concentration, fermentation time, and temperature. A central composite design (CCD) was employed to maximize 1,3-PD production; this consisted of 50 experiments exploring five variables at the -2, -1, 0, +1, and +2 levels [22]. 1,3-PD production was the response (dependent) variable. A second-order polynomial model was fitted for 1,3-PD production, using Eq. 1 as shown in Supplementary Table 1. Statistical analysis of data was performed using the “Design Expert” software (version 7.1.6; Stat-Ease, Inc., USA) statistical package.

Supplementary Table 1 summarizes the central composite experimental plan along with the values of variables in each individual experiment. The 1,3-PD concentration was the response parameter evaluated in various run cycles. The mathematical model, which represents a second-order polynomial, is given by Eq. 2 below [23], in which variables are encoded (Supplementary Table 2):

$$\begin{aligned}
 Y = & 8.20 - 0.42X_1 + 0.42X_2 + 0.54X_3 + 0.67X_4 \\
 & - 0.44X_5 - 0.37X_1^2 - 0.07X_2^2 - 0.50X_3^2 \\
 & - 0.21X_4^2 - 1.00X_5^2 - 0.25X_1X_2 - 0.15X_1X_3 \\
 & - 0.26X_1X_4 - 0.29X_1X_5 + -0.08X_2X_3 \\
 & - 0.21X_2X_4 - 0.01X_2X_5 + 0.35X_3X_4 + 2.187E \\
 & - 0.03X_3X_5 - 0.67X_4X_5 \quad (2)
 \end{aligned}$$

The statistical significance of Eq. 2 was verified using the *F* test and the analysis of variance (ANOVA) for the response surface model is summarized in Supplementary Table 3.

The three-dimensional response surface curves were next contour plotted in two dimensions to explain

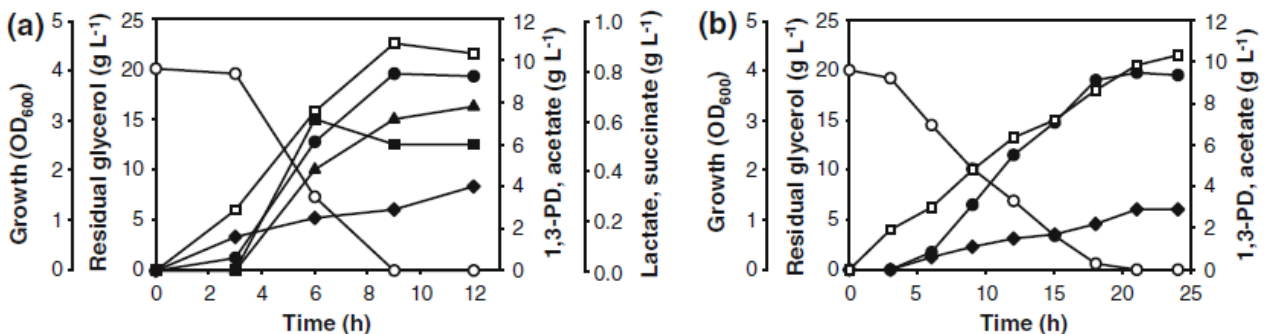


Fig. 2 Batch fermentation for 1,3-PD production from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* Cu-VOT (a) and AK-VOT (b). Residual glycerol, open circle; 1,3-PD, closed circle; acetate, open square; cell growth, closed square; 2,3-BD, closed triangle

interactions among fermentation parameters and to determine the optimum level of each variable required for maximal 1,3-PD production (Supplementary Fig. 1a–j).

The numerical method of Myers and Montgomery was used to solve the regression equation (Eq. 2). The model predicted the optimal values of test variables in coded units, and the results were as follows: $A_1 = -1.00$, $A_2 = 1.00$, $A_3 = 1.00$, $X_4 = 1.00$, and $A_5 = -0.42$, with the corresponding Y being 10.16 g L^{-1} . The natural values obtained by placing the encoded values of Supplementary Table 1 into the equation were pH = 6.5, aeration volume = 0.7 volume per min, glycerol concentration = 25.0 g L^{-1} , fermentation time = 15.0 h, and temperature = $35.7 \text{ }^\circ\text{C}$.

Results and discussion

Analysis of glycerol metabolism by *K. pneumoniae* AK-VOT

When *K. pneumoniae* AK-VOT was fermented under the conditions used for 1,3-PD production by the Cu-VOT strain (control) [19], similar amounts of 1,3-PD were produced (Fig. 2), but by-product formation was completely eliminated (except for acetate) upon fermentation by AK-VOT, compared with the control. However, the glycerol consumption rate of AK-VOT was low, resulting in slow growth to a low final cell density. This was reflected in lower 1,3-PD productivity ($0.44 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) compared with that of the control strain ($0.87 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). The delay in glycerol consumption by AK-VOT was attributable to manipulation of the genetic background, during which *dhaD* encoding glycerol dehydrogenase had been removed (Fig. 1), abolishing the anaerobic route of glycerol fermentative metabolism to eliminate the formation of large amounts of by-products such as 2,3-BD. Thus, only the aerobic route was available for glycerol utilization as a carbon source for cell growth by AK-VOT, whereas both aerobic and anaerobic routes were operative in Cu-VOT [24].

Effect of aeration volume on glycerol metabolism by *K. pneumoniae* AK-VOT

To test the assumption above, the effect of aeration rate on glycerol metabolism by AK-VOT was examined. As expected, both glycerol consumption rate and growth increased with increasing aeration rate (Fig. 3). However, the final level of 1,3-PD production was not affected by change in aeration volume, although production speed was slightly increased as air volume increased. Thus, glycerol was utilized via respiratory metabolism during cultivation with high-level aeration, but not via fermentative metabolism, by the recombinant strain.

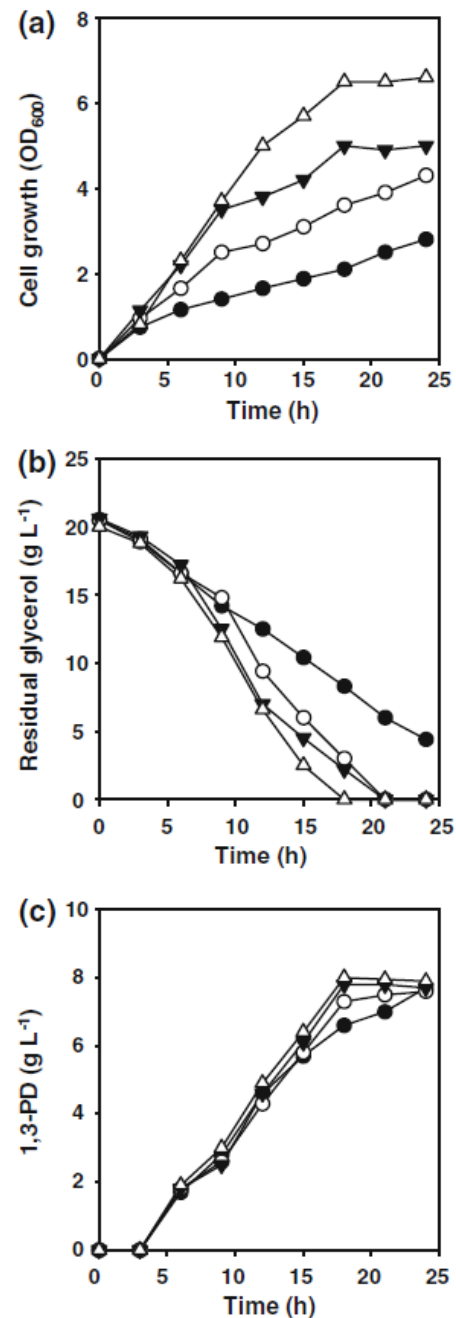


Fig. 3 Growth (a), glycerol utilization (b), and 1,3-PD production (c) of recombinant *K. pneumoniae* AK-VOT fermented at various aeration rates (0.1 volume per minute [vvm], closed circle; 0.5 vvm, open circle; 1.0 vvm, closed triangle; 3.0 vvm, open triangle)

Fermentation by *K. pneumoniae* AK-VOT using a two-stage process

Based on the above results, we developed two fermentation strategies to increase 1,3-PD productivity by *K. pneumoniae* AK-VOT. First, we investigated a two-

stage fermentation protocol in which cell growth and 1,3-PD production were distinct. To compensate for the delay in AK-VOT growth owing to the low glycerol consumption rate when glycerol was supplied as the sole carbon source, cells were first grown in LB medium and glycerol was added to induce 1,3-PD production. This two-stage process was optimized using RSM, as described in the “Materials and methods”. Using the optimized process, maximal 1,3-PD production increased to 11.29 g L⁻¹, and the conversion rate and productivity were 0.66 mol mol⁻¹ and 0.63 g L⁻¹ h⁻¹, respectively (Fig. 4).

Effect of nutrient co-supplementation on glycerol metabolism in *K. pneumoniae* AT-VOT

As another strategy, we investigated the effects of co-supplementation with various nutrients on glycerol metabolism in *K. pneumoniae* AK-VOT. As shown in Fig. 5, supplementation with starch or xylose yielded similar patterns of cell growth and glycerol utilization by the recombinant strain, but 1,3-PD production was markedly increased from 8.0 to 10.6 g L⁻¹ (starch) or 10.2 g L⁻¹ (xylose), again with no by-product formation. Glucose, maltose, and sucrose could not substitute for starch or xylose. Growth of AK-VOT was stimulated by glucose, maltose, or sucrose, but glycerol consumption and 1,3-PD production decreased somewhat (to 5.4, 5.8, and 6.3 g L⁻¹ when glucose, maltose, or sucrose, respectively, was present). This negative effect may be attributable to catabolite repression of glycerol metabolism [25]. Interestingly, the negative effect was greater when glycerol was supplemented with lactose.

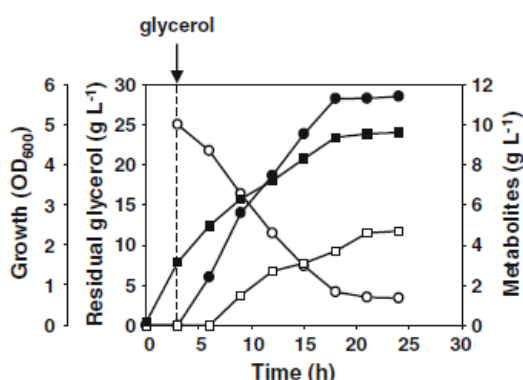


Fig. 4 Two-stage fermentation for 1,3-PD production from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* AK-VOT. Residual glycerol, open circle; 1,3-PD, closed circle; acetate, open square; cell growth, closed square; 2,3-BD, closed triangle

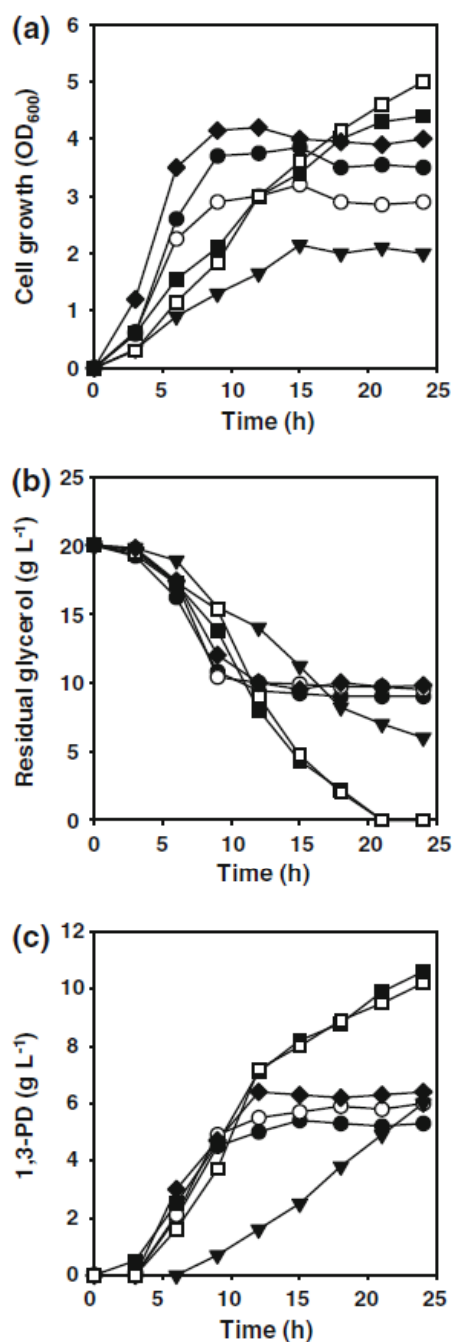
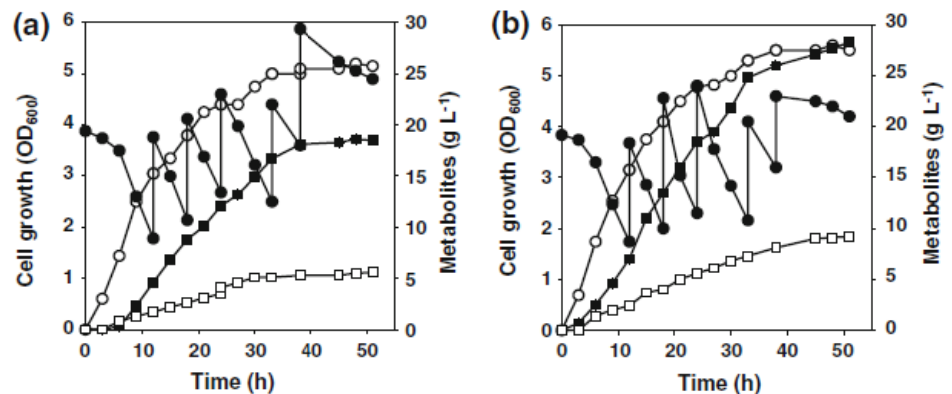


Fig. 5 Growth of (a), glycerol utilization by (b), and 1,3-PD production of (c) recombinant *K. pneumoniae* AK-VOT under different conditions of fermentation during which glycerol was supplemented with various nutrient sources (10 g L⁻¹). Glucose, closed circle; lactose, closed triangle; maltose, closed diamond; starch, closed square; sucrose, open circle; xylose, open square

Fed-batch fermentation of *K. pneumoniae* AK-VOT using supplementation of glycerol with starch

We conducted fed-batch fermentation to yield 1,3-PD, using the *K. pneumoniae* AK-VOT strain and the substrate

Fig. 6 Fed-batch fermentation during 1,3-PD production by *K. pneumoniae* AK-VOT. The nutrients were glycerol alone (a), or glycerol and starch (10 g L⁻¹) (b). Acetate, open square; growth, open circle; 1,3-PD, closed square; residual glycerol, closed circle



co-supplementation strategy. To this end, starch, which is readily available as an industrial medium, was selected as the co-supplementing substrate. Growth in the presence of both glycerol and starch remarkably enhanced production of 1,3-PD, and the maximal production level, production rate, and productivity were 26.1 g L⁻¹, 0.64 mol mol⁻¹, and 0.51 g L⁻¹h⁻¹, respectively, compared with the values (18.5 g L⁻¹, 0.50 mol mol⁻¹, and 0.36 g L⁻¹h⁻¹, respectively) obtained when glycerol alone was used as carbon source (Fig. 6). No by-product formation was evident during enhanced production of 1,3-PD, although the amount of acetate increased. In line with the efficient utilization of starch by *K. pneumoniae* AK-VOT, chromosomal analysis identified two genes (YP_001336072 and YP_001337588) encoding alpha-amylases involved in catabolism of starch.

Conclusion

In the present study, the glycerol-metabolizing properties of the genetically engineered *K. pneumoniae* AK-VOT strain were examined upon fermentation in a 5 L bioreactor. As expected, by-product formation was completely absent (except for acetate) when AK-VOT fermented glycerol. However, 1,3-PD productivity was severely compromised owing to a delay in cell growth attributable to a low glycerol consumption rate. Increase in aeration volume during fermentation improved glycerol utilization and cell growth of the AK-VOT strain, but did not increase 1,3-PD production. To optimize 1,3-PD synthesis, two fermentation strategies were developed. One was a two-stage process, in which cells were first grown in a rich medium (LB), and 1,3-PD production was then induced by adding glycerol. Another strategy was co-supplementation of glycerol with another nutrient, especially starch, during fermentation. Both processes successfully increased production of 1,3-PD during fermentation by AK-VOT, with no by-product production.

Acknowledgments This research was supported by the Ministry of Environment (Grant No. 202-091-004) and by the Ministry of Food, Agriculture, Forestry, and Fisheries of the Republic Korea.

References

- Johnson DT, Taconi KA (2007) The glycerin glut: options for the value-added conversion of crude glycerol resulting from biodiesel production. *Environ Prog* 26:338–348
- da Silva GP, Mack M, Contiero J (2009) Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnol Adv* 27:30–39
- Pagliaro M, Ciriminna R, Kimura H, Rossi M, Pina CD (2007) From glycerol to value-added products. *Angewandte Chemie-International Edition* 46:4434–4440
- Haas T, Wiegand N, Arntz D (1994) Process for the production of 1,3-propanediol. US patent, NO 5334778
- Slaugh LH, Powell JB, Forschner TC, Semple TC, Weinder PR (1995) Process for preparing 1,3-propanediol. US patent No 5463146
- Bhatia SK, Kurian JV (2008) Biological characterization of Sorona polymer from corn-derived 1,3-propanediol. *Biotechnol Lett* 30:619–623
- Hao J, Wang W, Tian J, Li J, Liu DH (2008) Decrease of 3-hydroxypropionaldehyde accumulation in 1,3-propanediol production by over-expressing *dha T* gene in *Klebsiella pneumoniae* TUAC01. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35:735–741
- Nakamura CE, Whited GM (2003) Metabolic engineering for the microbial production of 1,3-propanediol. *Curr Opin Biotechnol* 14:454–459
- Tong IT, Liao HH, Cameron DC (1991) 1,3-Propanediol production by *Escherichia coli* expressing genes from the *Klebsiella pneumoniae dha* regulon. *Appl Environ Microbiol* 57:3541–3546
- Skraly FA, Lytle BL, Cameron DC (1998) Construction and characterization of a 1,3-propanediol operon. *Appl Environ Microbiol* 64:98–105
- Sun J, van den Heuvel J, Soucaille P, Qu Y, Zeng AP (2003) Comparative genomic analysis of *dha* regulon and related genes for anaerobic glycerol metabolism in bacteria. *Biotechnol Prog* 19:263–272
- Zheng P, Wereath K, Sun J, van den Heuvel J, Zeng AP (2006) Overexpression of genes of the *dha* regulon and its effects on cell growth, glycerol fermentation to 1,3-propanediol and plasmid stability in *Klebsiella pneumoniae*. *Process Biochem* 41:2160–2169

13. Yang G, Tian J, Li J (2007) Fermentation of 1,3-propanediol by a lactate deficient mutant of *Klebsiella oxytoca* under microaerobic conditions. *Appl Microbiol Biotechnol* 73:1017–1024
14. Zhang Y, Li Y, Du C, Liu M, Cao Z (2006) Inactivation of aldehyde dehydrogenase: a key factor for engineering 1,3-propanediol production by *Klebsiella pneumoniae*. *Metab Eng* 8:578–586
15. Zhao L, Zheng Y, Ma X, Wei D (2009) Effects of over-expression of glycerol dehydrogenase and 1,3-propanediol oxidoreductase on bioconversion of glycerol into 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* under micro-aerobic conditions. *Bioprocess Biosyst Eng* 32:313–320
16. Zhang YP, Huang ZH, Du CY, Li Y, Cao ZA (2009) Introduction of an NADH regeneration system into *Klebsiella oxytoca* leads to an enhanced oxidative and reductive metabolism of glycerol. *Metab Eng* 11:101–106
17. Oh BR, Seo JW, Choi MH, Kim CH (2008) Optimization of culture conditions for 1,3-propanediol production from crude glycerol by *Klebsiella pneumoniae* using response surface methodology. *Biotechnol Bioprocess Eng* 13:524–532
18. Xiu ZL, Zeng AP (2008) Present state and perspective of downstream processing of biologically produced 1,3-propanediol and 2, 3-butanediol. *Appl Microbiol Biotechnol* 78:917–926
19. Seo MY, Seo JW, Heo SY, Baek JO, Rairakhwada D, Oh BR, Seo PS, Choi MH, Kim CH (2009) Elimination of by-product formation during production of 1,3-propanediol in *Klebsiella pneumoniae* by inactivation of glycerol oxidative pathway. *Appl Microbiol Biotechnol* 84:527–534
20. Bandaru VVR, Somalanka SR, Mendu DR, Madicherla NR, Chityala A (2006) *Enzyme Microb Technol* 38:209–214
21. Lee H, Song M, Hwang S (2003) Optimizing bioconversion of deproteinated cheese whey to mycelia of *Ganoderma lucidum*. *Process Biochem* 38:1685–1693
22. Kim JK, Oh BR, Shin HJ, Eom CY, Kim SW (2008) Statistical optimization of enzymatic saccharification and ethanol fermentation using food waste. *Process Biochem* 43:1308–1312
23. Myers RH, Montgomery DC (2002) *Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments*. Wiley, New York
24. Forage RG, Lin ECC (1982) dha System mediating aerobic and anaerobic dissimilation of glycerol in *Klebsiella pneumoniae* NCIB418. *J Bacteriol* 151:591–599
25. Meyer M, Dimroth P, Bott M (2001) Catabolite repression of the citrate fermentation genes in *Klebsiella pneumoniae*: evidence for involvement of the cyclic AMP receptor protein. *J Bacteriol* 183:5248–5256

Production of lipids containing high levels of docosahexaenoic acid from empty palm fruit bunches by *Aurantiochytrium* sp. KRS101

Won-Kyung Hong · Anna Yu · Sun-Yeon Heo ·
Baek-Rock Oh · Chul Ho Kim · Jung-Hoon Sohn ·
Ji-Won Yang · Akihiko Kondo · Jeong-Woo Seo

Received: 16 July 2012 / Accepted: 17 September 2012 / Published online: 4 October 2012
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2012

Abstract The oleaginous microalga *Aurantiochytrium* sp. KRS101 was cultivated in enzymatic hydrolysates of alkali-pretreated empty palm fruit bunches (EFBs), without prior detoxification process. The maximal levels of lipid and docosahexaenoic acid synthesized were 12.5 and 5.4 g L⁻¹ after cultivation for 36 h. Similar lipid levels were also obtained via simultaneous saccharification and cultivation. The results suggested that EFB is a promising source for production of useful lipids by the microalgal strain.

Keywords Heterotrophic oleaginous microalga ·
Aurantiochytrium sp. · Docosahexaenoic acid ·
Lipid · Empty palm fruit bunch

W.-K. Hong and A. Yu contributed equally to this article.

W.-K. Hong · A. Yu · S.-Y. Heo · B.-R. Oh ·
C. H. Kim · J.-W. Seo (✉)
Applied Microbiology Research Center, Biomaterials Research
Institute, Korea Research Institute of Bioscience
and Biotechnology (KRIBB), Jeongeup,
Jeonbuk 580-185, Korea
e-mail: jwseo@kribb.re.kr

J.-H. Sohn
Systems and Synthetic Biology Research Center, Korea
Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB),
Daejeon 305-333, South Korea

J.-W. Yang
Department of Chemical and Biomolecular Engineering
and Advanced Biomass R&D Center, KAIST, 291 Daehakno,
Yuseong-gu, Daejeon 305-701, South Korea

A. Kondo
Department of Chemical Science and Engineering,
Graduate School of Engineering, Kobe University,
Kobe 657-8501, Japan

Introduction

Oleaginous microalgae of the Thraustochytrid family may be valuable sources of oil because at least 30 % of dry biomass is lipid, and they contain high levels of omega-3 polyunsaturated fatty acids (PuFAs) [1–3]. In particular, they are rich in docosahexaenoic acid (DHA, C22:6n-3), which plays key roles in brain and eye development [4–6]. Additionally, the high levels of desirable fatty acids render microbial oil valuable as a feedstock for production of biofuel [7].

Recently, we isolated and identified a novel Thraustochytrid microalga (termed *Aurantiochytrium* sp. KRS101) that produced high levels of lipid and DHA (over 45 % by weight of total fatty acids) [8]. Upon fed-batch fermentation in a 5-L bioreactor, good biomass levels and lipid production values (50 and 22 g L⁻¹, respectively) were obtained; DHA productivity (3.3 g L⁻¹ d⁻¹) was comparable to that of *Schizochytrium limacinum* SR21 [9]. The commercial potential of the microalgal strain was high, as revealed by successful cultivation in a pilot-scale bioreactor [10].

Many types of nutrients have been tested for the ability to support the growth of oleaginous microalgal strains. For example, Chi et al. [11] cultivated the Thraustochytrid microalga *S. limacinum* SR21 in a hydrolyzed potato broth. Liang et al. [9] employed sweet sorghum stalk juice for cultivation of a microalgal strain. Other feedstock for microbial lipids production was used such as corncob hydrolysate [12], rice straw hydrolysate [13], and wastewaters [14]. In addition to agricultural products, crude glycerol, a byproduct of the biodiesel industry, has been used for cultivation of a microalgal strain. We earlier showed that molasses supported the growth of the microalga *Aurantiochytrium* sp. KRS101. In the present study,

we explored whether a cellulosic biomass would support growth of this microalgal strain and the production of lipids including DHA by the strain.

Materials and methods

Microalgal strain and media

Details of the Thraustochytrid microalgal strain *Aurantiochytrium* sp. KRS101 have previously been reported [8]. The microalga was cultivated in 500-mL baffled flasks containing 50 mL of basal medium [glucose 60 g L⁻¹, yeast extract 10 g L⁻¹, dried natural sea salt (CJ Co., Seoul, Korea) 10 g L⁻¹] at 28 °C, with shaking at 125 rpm, for 3 days.

Pretreatment and enzymatic saccharification of empty palm fruit bunches

Empty palm fruit bunches (EFBs) were supplied by Gen-docs (Daejeon, Korea). EFB fibers were milled to a particle size of 1–2 mm, soaked in 1 M NaOH solution with shaking at ambient temperature for 30 min, autoclaved at 121 °C at 15 psi for 1 h, and finally washed with tap water to remove NaOH. EFB thus pretreated was mixed with a cellulase solution (Novozyme, Bagsvaerd, Denmark) to yield a mixture containing 10 % (w v⁻¹) solids at a concentration of 40 Filter Paper Assay Unit (FPU) per g of EFB; the mixture was incubated at 45 °C for 3 days with shaking at 150 rpm. The amount of PFEB added constituted 5–10 % of culture volume. Inoculum constituted 2, 5 and 10 % of culture volume. Treated enzyme was 40 FPU g⁻¹ of EFB. Glucose concentration of PFEB was 58 g L⁻¹. Cultured working volume was 600 mL in 2-L baffled flasks. Enzymatic hydrolysates of EFB were analyzed via HPLC (Young-Lin Instrument Co., Anyang, Korea); the instrument was equipped with a Waters 2410 refractive index detector (Waters, Milford, MA, USA), an autosampler, an analytical Rezex ROA-Organic Acid H+ column (7.8 × 300 mm; Phenomenex, Torrance, CA, USA), and a SecurityGard (KJ0-4282; Phenomenex). All samples were clarified by filtration through filters of 0.20-μm pore size (DISMIC-13HP; Toyo Roshi Kaisha, Tokyo, Japan) prior to injection into the analytical column. The column temperature was at 65 °C. The mobile phase was 2.5 mM sulfuric acid at a flow rate 0.6 mL min⁻¹ under isocratic conditions. 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) and furfural (Sigma-Aldrich, MO, USA) standard were analyzed via HPLC (Young-Lin Instrument Co.) by same detection method. Furfural standard solution (Sigma-Aldrich) was detected in concentration of 0.01, 0.02, 0.04, 0.08, 0.1 g L⁻¹ by HPLC. HMF (Sigma-Aldrich) was

dissolved in 2.5 mM sulfuric acid and then analyzed at concentration of about 0.01, 0.02, 0.04, 0.08, 0.1 g L⁻¹. The column temperature was at 65 °C. The mobile phase was 2.5 mM sulfuric acid at a flow rate 0.6 mL min⁻¹ under isocratic conditions.

Fermentation by *Aurantiochytrium* sp. KRS101

The enzymatic hydrolysate of pretreated EFB, without further detoxification, was used as a growth substrate for *Aurantiochytrium* sp. KRS101. Cells were precultured in basal medium, with shaking at 125 rpm, for 3 days at 28 °C, and then transferred at 2.5 % (v v⁻¹) to a 5-L fermenter containing fresh medium in which the hydrolysate was substituted for glucose. The fermentation conditions were 28 °C, stirring at 50 rpm, 0.5 v v⁻¹ min⁻¹ of air, and pH 7.0. Culture aliquots were collected every 12 h for analysis via the measurement of absorbance at 600 nm.

When simultaneous saccharification and fermentation (SSF) was to be performed, precultured cells were transferred into a 5-L fermenter in which the medium included pretreated EFB as carbon source and cellulose solution at 40 FPU g⁻¹ EFB.

Dry cell weight analysis

Dry cell weight (DCW) was estimated by harvesting cells at 4,500g at 4 °C for 20 min. Each supernatant was discarded and each pellet washed three times with phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2). Resuspended cells were again harvested by centrifugation at 4,500g at 4 °C for 20 min. Each pellet was resuspended in 600 μL of distilled water and transferred to a preweighed vial. Cell pellets were dried at 60 °C for 12 h using a speed vacuum concentrator (Biotron 4080C; Bucheon, Korea). Each vial was weighed and DCW values were obtained.

Lipid analysis

Total lipid content was calculated using a modified (miniaturized) Bligh-Dyer method as described by Burja et al. [15]. Dried cells (125 mg) were placed in screw-cap test tubes, and 6.25 mL of chloroform, 12.5 mL of methanol, and 5 mL of 50 mM K₂HPO₄ buffer (pH 7.4) were added to each tube. Samples were agitated for 1 h at 200 rpm at 28 °C. Each sample was then transferred to a 50-mL graduated tube to which 6.25 mL of chloroform and 6.25 mL of phosphate buffer were added. Each tube was inverted 30 times and the phases allowed to separate for 1 h before the recovery of the bottom layer (approximately 12.5 mL). This liquid was transferred to a preweighed aluminum dish and the solvent evaporated over 30 min in a

dry oven at 80 °C. After cooling, the dish and contents were weighed, and total lipid levels were determined gravimetrically (to yield the weight of lipid extracted) using the following equation:

$$\text{Total lipid (g of oil per 100 g sample)} = [(W_L - W_D) \times V_C \times 100] / [V_P \times W_S]$$

where W_D was the weight of an empty aluminum dish (g); W_L the weight of an aluminum dish with dried lipid residue (g); W_S the weight of sample (g); V_C the total volume of chloroform in the graduated cylinder (mL); and V_P the volume of chloroform transferred to the aluminum dish (mL).

Analysis of fatty acid composition

Dried cells were resuspended in 3 mL of 4 % ($v v^{-1}$) methanolic sulfuric acid and heated at 90 °C for 1 h in sealed vials. Fatty acid methyl esters (FAMES) were extracted into 0.3 mL of hexane and analyzed via gas chromatography (GC; Hewlett Packard 6890N; Ramsey, MN, USA); the instrument was equipped with a flame-ionization detector (FID) and an HP-5 (30 m \times 0.32 mm; 0.25 mm; Agilent Technologies; Santa Clara, CA, USA). The column temperature was raised from 150 °C (after 2 min of holding) to 270 °C (with a further 2 min of holding) at a rate of 7 °C per min.

Results and discussion

Cultivation of *Aurantiocytrium* sp. KRS101 in a medium containing enzymatic saccharification products of EFBs

Growth of *Aurantiocytrium* sp. KRS101 was first observed in a medium containing enzymatic saccharification products of EFBs; the composition of EFB enzymatic hydrolysate was 51.2 % of cellulose, 23.3 % of hemicellulose, 15.3 % of lignin and ash etc. The medium contained 58 g L⁻¹ of glucose and 18 g L⁻¹ of xylose (Fig. 1). As shown in Fig. 1, active growth of KRS101 was observed, and lipid production was noted; glucose was rapidly consumed. This indicated that no toxic materials such as HMF and furfural were present in the saccharification solution (data not shown). As expected, glucose was the first to be consumed; after this hexose was exhausted, the pentose xylose was next utilized. The maximal levels of lipid and DHA attained were 12.5 and 5.4 g L⁻¹, respectively. The composition of fatty acid of the oil produced was similar contents that; 5.1 % of myristic acid, 1.4 % of penta-decanoic acid, 36.6 % of palmitic acid, 1.9 % of EPA,

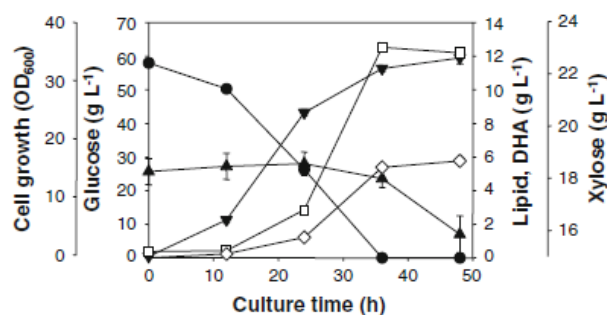


Fig. 1 Cultivation of *Aurantiocytrium* sp. KRS101 in a saccharified solution derived from empty palm fruit bunches (EFBs). Filled circles glucose levels, filled normal triangles xylose levels, filled inverted triangles cell growth, open squares lipid content, open diamonds DHA content. The error bar shows mean of the three independent analysis results. Standard deviation calculated from Student's *t* test. It represented the mean \pm SD

7.7 % of DPA ($n = 3$), 47.3 % of DHA ($n = 6$), respectively.

Although most of lignin, hemicelluloses and ash were washed off after pretreatment with NaOH, the remaining soluble lignin was at least 0.069 % of total PEFB, therefore it did not inhibit fruit bunch hydrolysis or downstream growth of algae. The carbon efficiency for DHA production based on total sugars was 10.2 % of the hydrolysate. The efficiency of hexoses versus pentose conversion into DHA was 95.8 versus 4.2 %. Also, artificial media containing the same sugar content as the hydrolysate produced similar 11.8 and 4.2 g L⁻¹ of lipid and DHA, respectively.

Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) by *Aurantiocytrium* sp. KRS101 using pretreated EFB

Next, *Aurantiocytrium* sp. KRS101 was cultivated employing SSF using pretreated EFB. There are many advantages in utilizing SSF instead of separate hydrolysis and fermentation (SHF). For example, end-product inhibition of the enzymes in the enzymatic hydrolysis can be avoided, the risk of contamination is reduced (since the somewhat toxic hydrolysate after pretreatment tends to suppress bacterial growth), and capital investments are lower as the total reactor volume is decreased due to higher productivity.

When the medium contained 5 % ($w v^{-1}$) of pretreated EFB (final concentrations of 34 g L⁻¹ of glucose and 11 g L⁻¹ of xylose), most glucose was consumed in 3 days of cultivation, yielding 1.7 g L⁻¹ of lipid, and xylose was next utilized for further growth (Fig. 2a). The late stages of growth also featured the reuse of nutrient stored as lipid, thus decreasing lipid levels. To increase lipid production, the concentration of pretreated EFB was raised to 10 %

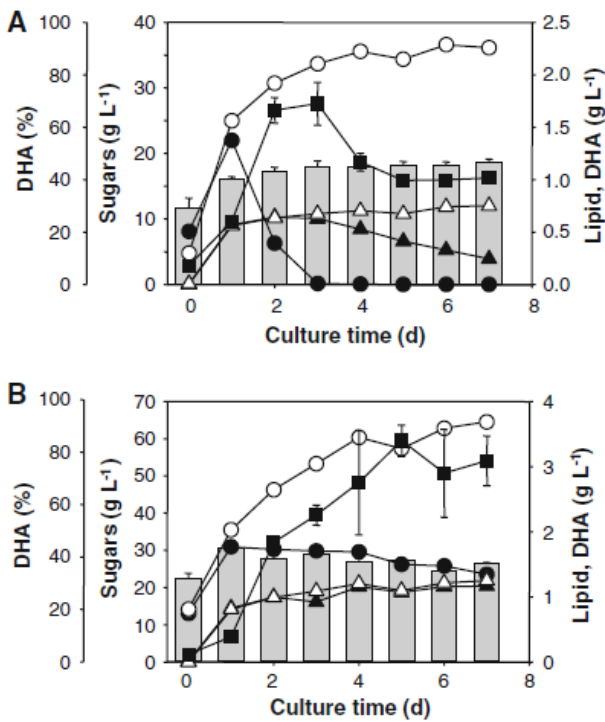


Fig. 2 Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) by *Aurantiochytrium* sp. KRS101 using pretreated EFB. **a** EFB at 5 % (w v⁻¹); **b** EFB at 10 % (w v⁻¹). Filled circles glucose levels, filled triangles xylose levels, filled squares lipid content, gray bars DHA content, open circles and triangles glucose and xylose levels (in the absence of cell inoculation). The error bar shows mean of the three independent analysis results. Standard deviation calculated from Student's *t* test. It represented the mean ± SD

(w v⁻¹). Interestingly, the amount of glucose consumed (31.1 g L⁻¹) was similar to that metabolized in the above experiment; a large amount of glucose (26.2 g L⁻¹) remained in the culture solution upon cessation of glucose catabolism (Fig. 2b). Xylose was not consumed due to the effect of catabolite repression driven by residual glucose. However, the maximal level of lipid production increased

twofold (3.4 g L⁻¹). This enhanced production may be explained by the higher level of glucose in culture solution, which may have stimulated the synthesis of lipid as a stored nutrient. Although there is further scope for using corncorb, rice straw, corn stalk and sugarcane bagasses by H₂SO₄ hydrolysates or HCl hydrolysates (Table 1), this is the first article of lipid production by SSF.

Enhanced production of lipid on SSF by *Aurantiochytrium* sp. KRS101

In the SSF experiments described above, employing pre-treated EFB at 10 % (w v⁻¹), it was likely that enzymatic saccharification was adequate; it was not necessary to add more cellulase. Therefore, the effect of another parameter, the inoculum level, on SSF was evaluated. As shown in Fig. 3a, utilization of sugars derived from EFB by enzymatic saccharification increased as the inoculum level rose from 2 to 10 % (v v⁻¹). The effect of inoculum level on lipid production was more notable. The maximal level of lipid production attained upon cultivation in SSF after inoculation at 10 % (v v⁻¹) was fourfold greater (12.6 g L⁻¹) than those noted when the inoculum levels were 2 and 5 % (v v⁻¹) (Fig. 3b). The productivity of lipid synthesis also increased by approximately threefold (from 0.68 to 1.8 g L⁻¹ d⁻¹) when the inoculum level was raised to 10 % (v v⁻¹). However, DHA contents were not notably affected by the inoculum level.

Conclusion

The heterotrophic microalga *Aurantiochytrium* sp. KRS101 produced lipids containing high levels of DHA upon simultaneous saccharification and cultivation and also upon growth in enzymatic hydrolysates of alkali-pretreated EFBs, even when the hydrolysates were not subjected to further detoxification. Further optimization of this

Table 1 Lipid accumulation efficiency from cellulosic materials by oleaginous microorganism

Carbon source	Treatment	Strain	Biomass (g L ⁻¹)	Lipid content (%)	Lipid yield (g L ⁻¹)	Reference
Comcorb	Enzymatic hydrolysates	<i>Trichosporon dermatis</i>	24.4	40.1	9.8	[12]
Com stalk	H ₂ SO ₄ hydrolysates	<i>Rhodotorula glutinis</i>	17.0	11.8	2.0	[16]
Rice straw	Enzymatic hydrolysates	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	2.8	56.3	1.1	[17]
Rice straw	H ₂ SO ₄ hydrolysates	<i>Rhodotorula glutinis</i>	3.6	5.7	0.2	[16]
Rice straw	H ₂ SO ₄ hydrolysates	<i>Trichosporon fermentans</i>	28.6	40.1	11.5	[13]
Sugarcane bagasses	HCl hydrolysates	<i>Yarrowia lipolytica</i>	11.4	58.5	6.7	[18]
Palm empty fruit bunches	Simultaneous enzymatic hydrolysis and fermentation	<i>Aurantiochytrium</i> sp. KRS101	34.4	36.3	12.5	This work

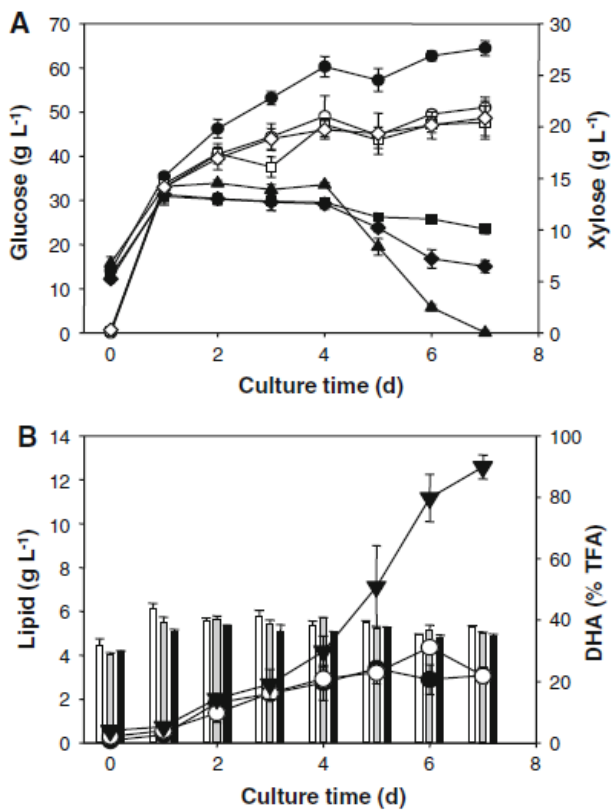


Fig. 3 Effect of inoculation size on SSF by *Aurantiochytrium* sp. KRS101. **a** Residual glucose (filled symbols) and xylose levels (open symbols). Inoculum size: circles 0 % ($v v^{-1}$), square 2 %, diamonds 5 %, open triangles 10 %. **b** Lipid content (open circles 2 %, filled circles 5 %, filled triangles 10 %) and DHA content (open bars 2 %, gray bars 5 %, filled bars 10 %). The error bar shows mean of the three independent analysis results. Standard deviation calculated from Student's *t* test. It represented the mean \pm SD

biological process may yield an economically viable method for industrial production of a valuable lipid from a byproduct of palm oil industry.

Acknowledgments This work was supported the Advanced Biomass R&D Center of Korea (Grant No. 2010-0029737) funded by the Ministry of Education, Science and Technology and by the Ministry of Food, Agriculture, Forestry, and Fisheries, of the Republic Korea.

References

- Gouda MK, Omar SH, Aouad LM (2008) Single cell oil production by *Gordonia* sp. DG using agro-industrial wastes. *World J Microbiol Biotechnol* 24:1703–1711
- Xu H, Miao X, Wu Q (2006) High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *J Biotechnol* 126:499–507
- Yokochi T, Honda D, Higashihara T, Nakahara T (1998) Optimization of docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium limacinum* SR21. *Appl Microbiol Biotechnol* 49:72–76
- Brooks SL, Mitchell A, Steffenson N (2000) Mothers, infants, and DHA. Implications for nursing practice. *Am J Matern Child Nurs* 25:71–75
- Carlson SE (2009) Early determinants of development: a lipid perspective. *Am J Clin Nutr* 89:678S–684S
- Auestad N, Halter R, Hall RT, Blatter M, Bogle ML, Burks W, Erickson JR, Fitzgerald KM, Dobson V, Innis SM, Singer LT, Montalto MB, Jacobs JR, Qiu W, Bornstein MH (2001) Growth and development in term infants fed long-chain polyunsaturated fatty acids: a double-masked, randomized, parallel, prospective, multivariate study. *Pediatrics* 108:372–381
- Zhao ZB, Hua YY, Liu B (2005) Strategies to secure feedstock supply for Chinese biodiesel industry. *China Biotechnol* 25:1–6
- Hong WK, Rairakhwada D, Seo PS, Park SY, Hur BK, Kim CH, Seo JW (2011) Production of lipids containing high levels of docosahexaenoic acid by a newly isolated microalga, *Aurantiochytrium* sp. KRS101. *Appl Biochem Biotechnol* 164:1468–1480
- Liang Y, Sarkany N, Cui Y, Yesuf J, Trushenski J, Blackburn J (2010) Use of sweet sorghum juice for lipid production by *Schizochytrium limacinum* SR21. *Bioresour Technol* 101:3623–3627
- Hong WK, Kim CH, Yu AN, Sohn JH, Yang JW, Kondo A, Seo JW (2012) Production of lipid with high level of docosahexaenoic acid by large-scale cultivation of *Aurantiochytrium* sp. KRS101 (Submitted)
- Chi Z, Hu B, Liu Y, Frear C, Wen Z, Chen S (2007) Production of omega-3 polyunsaturated fatty acids from cull potato using an algae culture process. *Appl Biochem Biotechnol* 137–140:805–815
- Huang C, Chen XF, Xiong L, Chen XD, Ma LL (2012) Oil production by the yeast *Trichosporon dermatis* cultured in enzymatic hydrolysates of corncobs. *Bioresour Technol* 110:711–714
- Huang C, Zong MH, Wu H, Liu QP (2009) Microbial oil production from rice straw hydrolysate by *Trichosporon fermentans*. *Bioresour Technol* 100:4535–4538
- Anastasi A, Spina F, Romagnolo A, Tigini V, Prigione V, Varese GC (2012) Integrated fungal biomass and activated sludge treatment for textile wastewaters bioremediation. *Bioresour Technol* 123:106–111
- Burja AM, Radianingtyas H, Windust A, Barrow CJ (2006) Isolation and characterization of polyunsaturated fatty acid producing *Thraustochytrium* species: screening of strains and optimization of omega-3 production. *App Microbiol Biotechnol* 72:1161–1169
- Die C, Tao J, Xie F, Dai Y, Zhao M (2007) Biodiesel generation from oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* with xylose assimilating capacity. *Afr J Biotechnol* 6:2130–2134
- Li P, Miao X, Li R, Zhong J (2011) In Situ biodiesel production from fast-growing and high oil content *Chlorella pyrenoidosa* in rice straw hydrolysate. *J Biomed Biotechnol* 2011:1–8. doi: 10.1155/2011/141207
- Tsigie YA, Wang CY, Truong CT, Ju YH (2011) Lipid production from *Yarrowia lipolytica* Po1g grown in sugarcane bagasse hydrolysate. *Bioresour Technol* 102:9216–9222

4. 학회 발표 실적

The screenshot shows the website for the IUMS 2011 Sapporo congress. The header includes the logo 'The Unlimited World of Microbes' and the text 'IUMS 2011 Sapporo The Unlimited World of Microbes International Union of Microbiological Societies 2011 Congress'. Below the header is a navigation bar with 'ABSTRACTS SEARCH SYSTEM', a 'BACK' button, and a printer icon with the text 'The browser start-up for print'. A menu bar contains 'PROGRAM', 'TIME TABLE', 'BAM & Mycology', 'Virology', and 'HELP'. The main content area is titled 'BAM & Mycology' and shows the date 'Wednesday, 7 September 16:00~16:30' and location 'Poster Room A'. A specific abstract is highlighted with a green box: 'P-AM05-2 PRODUCTION OF LIPIDS CONTAINING HIGH LEVELS OF DOCOSAHEXAENOIC ACID BY A NEWLY ISOLATED MICROALGA, AURATIOCHYTRIUM SP. KRS101'. The authors listed are 'Won-Kyung Hong¹, Dina Rairakhwada¹, Byung-Ki Hur², Sang-Ki Rhee³, Chul Ho Kim¹, Jeong-Woo Seo¹'. The affiliations are: ¹ Microbe-Based Fusion Technology Research Center, JBI, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Korea, South; ² Department of Biological Engineering, Inha University; ³ Department of Medical Biotechnology, Soan Chunhyang University. The abstract text describes the isolation of a novel oleaginous Thraustochytrid containing a high content of docosahexaenoic acid (DHA) from a mangrove ecosystem in Malaysia. The strain, identified as Auratiochytrium sp. by 18S rRNA sequencing and named KRS101, was used with various carbon and nitrogen sources, indicating metabolic versatility. Optimal culture conditions for maximizing cell growth and high levels of lipid and DHA production were achieved using glucose (60 g/l) as carbon source, corn steep solid (10 g/l) as nitrogen source, and sea salt (15 g/l). The highest biomass, lipid, and DHA production of KRS101 upon fed-batch fermentation were 50.2 g/l (16.7 g/l/day), 21.8 g/l (44% DCW), and 8.8 g/l (40% TFA), respectively. Similar values were obtained when a cheap substrate like molasses, rather than glucose, was used as the carbon source (DCW of 52.44 g/l, lipid and DHA levels of 20.2 g/l and 8.83 g/l, respectively), indicating that production of microbial oils containing high levels of DHA can be produced economically when the novel strain is used.

세계 미생물 연합학회 (2011 IUMS) 참가 및 연구결과 발표
(일시: 2011. 9. 6-10, 장소: 일본 삿포로 컨벤션 센터, 참가자: 서정우, 홍원경)

2012

SIMB Annual Meeting & Exhibition

Society for Industrial Microbiology and Biotechnology

August 12 - 16, 2012

Washington Hilton

Washington, DC

www.simhq.org/annual

Show dates: August 12 - 15

Poster Abstract P108

A transgene expression system for the marine microalga *Aurantiochytrium* sp. KRS101 using a mutant allele of the gene encoding ribosomal protein L44 as a selectable transformation marker for cycloheximide resistance

Won-Kyung Hong¹, Sun-Yeon Heo, Chul Ho Kim, Jung-Hoon Sohn, Akihiko Kondo and Jeong-Woo Seo, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Jeongseup-si, South Korea

In the present study, the gene encoding ribosomal protein L44 (RPL44) of the oleaginous heterotrophic microalga *Aurantiochytrium* sp. KRS101 was first identified and characterized. RPL44 has proline as residue 56 imparting sensitivity to the antibiotic cycloheximide. A new genetic system for *Aurantiochytrium* sp. KRS101 was developed by replacing proline 56 of RPL44 with glutamine (the P56Q mutation), which was resistant to cycloheximide served as a selection marker. The gene encoding the $\Delta 12$ -fatty acid desaturase of *Mortierella alpina*, used as a reporter, was successfully introduced into chromosomal DNA of *Aurantiochytrium* sp. KRS101 via 18S rDNA-targeted homologous recombination. Enzymatic activity converting oleic acid (C18:1) to linoleic acid (C18:2) was detected in the transformant but not in wild-type strain.

Society for Industrial Microbiology and Biotechnology Annual Meeting 연구결과 발표
(일시: 2012. 8. 12 - 16, 장소: 미국 워싱턴 힐튼호텔, 참가자: 홍원경)

FEMS 2013

5TH CONGRESS OF EUROPEAN MICROBIOLOGISTS

LEIPZIG, GERMANY

JULY 21-25, 2013



www.kenes.com/fems-microbiology

Call for Abstracts

Important dates:

Deadline for Abstract Submission: February 11, 2013

Early Registration Deadline: April 15, 2013



Federation of European Microbiological Societies 2013 연구결과 발표
(일시: 2013. 7. 21 - 25, 장소: 독일 라이프치히, 참가자: 후원경)

제 2 절 성과활용 계획

1. 기술이전

기술명 : 폐글리세롤 기반 *Aurantiochytrium* sp. KRS101 미세조류 대량 생산 기술

- 본 연구과제의 참여기업인 (주)젠닥스에 기술이전 (2013.12.02.)



2. 사업화 계획

- 사료첨가제로서의 사업화



- 고유지성 미세조류 오일을 이용 시제품 제작 및 상품화(건강기능식품 소재로 판매)
- 바이오디젤 제조업체 (원료 공급 및 바이오오일 활용), 식품업체 (바이오오일 및 고부가가치 생물 소재 활용)과 연계한 사업화
- 향후 국외 바이오디젤 및 유지 산업과 연계한 플랜트 건설 계획

구 분		사 업 화 년 도				
		(2014 년) 과제종료후 1 년	(2015 년) 과제종료후 2 년	(2016 년) 과제종료후 3 년	(2017 년) 과제종료후 4 년	(2018 년) 과제종료후 5 년
사 업 화 품 목		미세조류 오일	미세조류 오일	미세조류 오일	미세조류 오일	미세조류 오일
투 자 계 획	인 건 비(억원)	-	-	1	2	5
	재료비 및 설비투자비(억 원)	-	-	2	5	20
	경상운영비(억원)	-	-	1	1	4
	계(억원)	-	-	4	8	29
생 산 계 획		1톤	1톤	100톤	500톤	2000톤
판매계획 (단위:억원)		내 수		2.6	4	10
		수 출		-	7	42
		계		2.6	11	52

구 분		현재	예상 (단위: 억원)					
		(2012년)	(2013년)	(2014년)	(2015년)	(2016년)	(2017년)	(2018년)
해외시장	규모	5,000	5,250	5,512	5,788	6,078	6,381	6,700
	성장율	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%
국내시장	규모	500	525	551	579	608	638	670
	성장율	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%
합계	규모	5,500	5,775	6,063	6,367	6,685	7,019	7,370
	성장율	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%

※ 산출근거 :
해외시장 2011년 기준 약 5000억원, 국내시장 약 500억원 규모.
연간 성장률을 5%로 추정

무역수지개선효과

구 분	사 업 화 년 도				
	(2014 년) 과제종료후 1년	(2015 년) 과제종료후 2년	(2016 년) 과제종료후 3년	(2017년) 과제종료후 4년	(2018년) 과제종료후 5년
수 입 대 체(억원)	-	-	2.6	4	10
수 출(억원)	-	-	-	7	42

고용창출효과

구 분	사 업 화 년 도				
	(2014 년) 과제종료후 1년	(2015년) 과제종료후 2년	(2016 년) 과제종료후 3년	(2017년) 과제종료후 4년	(201 8년) 과제종료후 5년
연구개발 인력	-	-	1	1	1
생산 인력	-	-	1	4	10
기타	-	-	-	2	4
계	-	-	2	7	15

제 6 장 참고문헌

1. Beopoulos A, Cescut J, Haddouche R, Uribelarrea JL, Molina-Jouve C, Nicaud JM (2009) *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. *Prog Lipid Res* 48:375 - 387
2. Economou CN, Makri A, Aggelis G, Pavlou S, Vayenas DV(2010) Semi-solid state fermentation of sweet sorghum for the biotechnological production of single cell oil. *Bioresource Tech* 101:1385 - 1388
3. Zhu LY, Zong MH, Wu H (2008) Efficient lipid production with *Trichosporon fermentans* and its use for biodiesel preparation. *Bioresource Tech* 99:7881 - 7885
4. Li Q, Du W, Liu D (2008) Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Appl Microbiol Biotechnol* 80:749 - 756
5. Easterling ER, French WT, Hernandez R, Licha M (2009) The effect of glycerol as a sole and secondary substrate on the growth and fatty acid composition of *Rhodotorula glutinis*. *Bioresource Tech* 100:356 - 361
6. Hu C, Zhao X, Zhao J, Wu S, Zhao ZK (2009) Effects of biomass hydrolysis by-products on oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Bioresource Tech* 100:4843 - 4847
7. Li Y, Zhao Z, Bai F (2007) High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture. *Enz Microbiol Tech* 41:312 - 317
8. Gouda MK, Omar SH, Aouad LM (2008) Single cell oil production by *Gordonia* sp. DG using agro-industrial wastes. *World J Microbiol Biotechnol* 24:1703 - 1711
9. Xu H, Miao X, Wu Q (2006) High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *J Biotechnol* 126:499 - 507
10. Yokochi T, Honda D, Higashihara T, Nakahara T (1998) Optimization of docosaehaenoic acid production by *Schizochytrium limacinum* SR21. *Appl Microbiol Biotechnol* 49:72 - 76
11. Seraphim P, Michael K, George A (2004) Single cell oil (SCO) production by *Mortierella isabellina* grown on high-sugar content media. *Bioresour Tech* 95:287 - 291
12. Brooks SL, Mitchell A, Steffenson N (2000) Mothers, infants, and DHA. Implications for nursing practice. *Am J Matern Child Nurs* 25:71 - 75
13. Carlson SE (2009) Early determinants of development: a lipid perspective. *Am J Clin Nutr* 89:678S - 684S
14. Auestad N, Halter R, Hall RT, Blatter M, Bogle ML, Burks W, Erickson JR, Fitzgerald KM, Dobson V, Innis SM, Singer LT, Montalto MB, Jacobs JR, Qiu W, Bornstein MH

- (2001) Growth and development in term infants fed long-chain polyunsaturated fatty acids: a double-masked, randomized, parallel, prospective, multivariate study. *Pediatrics* 108:372 - 381
15. Chi Z, Hu B, Liu Y, Frear C, Wen Z, Chen S (2007) Production of omega-3 polyunsaturated fatty acids from cull potato using an algae culture process. *Appl Biochem Biotechnol* 137 - 140: 805 - 815
16. Liang Y, Sarkany N, Cui Y, Yesuf J, Trushenski J, Blackburn J (2010) Use of sweet sorghum juice for lipid production by *Schizochytrium limacinum* SR21. *Bioresource Tech* 101:3623 - 3627
17. Hong WK, Rairakhwada D, Seo PS, Park SY, Hur BK, Ki CH, Seo JW (2011) Production of lipids containing high levels of docosahexaenoic acid by a newly isolated microalga, *Aurantiochytrium* sp. KRS101. *Appl Biochem Biotechnol* 164:1468 - 1480
18. Hargraves PE (2008) Allelopathy at the land/sea interface: microalgae and Brazilian pepper. *Mar Environ Res* 66:553 - 555
19. Gocke K, Corte's J, Murillo MM (2001) Planktonic primary production in a tidally influenced mangrove forest on the pacific coast of Costa Rica. *Rev Biol Trop* 49:279 - 288
20. Ariffin H, Hassan MA, Shah UKM, Abdullah N, Ghazali FM, Shirai Y (2008) Production of bacterial endoglucanase from pretreated oil palm empty fruit bunch by *Bacillus pumilus* EB3. *J Biosci Bioeng* 106:231 - 236
21. Millier GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31:426 - 428
22. Kongruang S, Han MJ, Breton CI, Penner MH (2004) Quantitative analysis of cellulose-reducing ends. *Appl Biochem Biotechnol* 113 - 116:213 - 231
23. Chi Z, Pyle D, Wen Z, Frear C, Chen S (2007) A laboratory study of producing docosahexaenoic acid from biodiesel-waste glycerol by microalgal fermentation. *Process Biochem* 42:1537 - 1545
24. Zhu Y, Li H, Zhou H, Chen G, Liu W (2010) Cellulose and cellodextrin utilization by the cellulolytic bacterium *Cytophaga hutchisonii*. *Bioresour Technol* 101:6432 - 6437
25. Jun HS, Qi M, Gong J, Egbosimba EE, Forsberg CW (2007) Outer membrane proteins of *Fibrobacter succinogenes* with potential roles in adhesion to cellulose and in cellulose digestion. *J Bacteriol* 189:6806 - 6815
26. Johnson DT, Taconi KA (2007) The glycerin glut: options for the value-added conversion of crude glycerol resulting from biodiesel production. *Environ Prog* 26:338 - 348
27. da Silva GP, Mack M, Contiero J (2009) Glycerol: a promising and abundant carbon

source for industrial microbiology. *Biotechnol Adv* 27:30 - 39

28. Pagliaro M, Ciriminna R, Kimura H, Rossi M, Pina CD (2007) From glycerol to value-added products. *Angewandte Chemie-International Edition* 46:4434 - 4440

29. Haas T, Wiegand N, Arntz D (1994) Process for the production of 1,3-propanediol. US patent, NO 5334778

30. Slauch LH, Powell JB, Forschner TC, Semple TC, Weinder PR (1995) Process for preparing 1,3-propanediol. US patent No 5463146

31. Bhatia SK, Kurian JV (2008) Biological characterization of Sorona polymer from corn-derived 1,3-propanediol. *Biotechnol Lett* 30:619 - 623

32. Hao J, Wang W, Tian J, Li J, Liu DH (2008) Decrease of 3-hydroxypropionaldehyde accumulation in 1,3-propanediol production by over-expressing dha T gene in *Klebsiella pneumoniae* TUAC01. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35:735 - 741

33. Nakamura CE, Whited GM (2003) Metabolic engineering for the microbial production of 1,3-propanediol. *Curr Opin Biotechnol* 14:454 - 459

34. Tong IT, Liao HH, Cameron DC (1991) 1,3-Propanediol production by *Escherichia coli* expressing genes from the *Klebsiella pneumoniae* dha regulon. *Appl Environ Microbiol* 57:3541 - 3546

35. Skraly FA, Lytle BL, Cameron DC (1998) Construction and characterization of a 1,3-propanediol operon. *Appl Environ Microbiol* 64:98 - 105

36. Sun J, van den Heuvel J, Soucaille P, Qu Y, Zeng AP (2003) Comparative genomic analysis of dha regulon and related genes for anaerobic glycerol metabolism in bacteria. *Biotechnol Prog* 19:263 - 272

37. Zheng P, Wereath K, Sun J, van den Heuvel J, Zeng AP (2006) Overexpression of genes of the dha regulon and its effects on cell growth, glycerol fermentation to 1,3-propanediol and plasmid stability in *Klebsiella pneumoniae*. *Process Biochem* 41:2160 - 2169

38. Yang G, Tian J, Li J (2007) Fermentation of 1,3-propanediol by a lactate deficient mutant of *Klebsiella oxytoca* under microaerobic conditions. *Appl Microbiol Biotechnol* 73:1017 - 1024

39. Zhang Y, Li Y, Du C, Liu M, Cao Z (2006) Inactivation of aldehyde dehydrogenase: a key factor for engineering 1,3-propanediol production by *Klebsiella pneumoniae*. *Metab Eng* 8:578 - 586

40. Zhao L, Zheng Y, Ma X, Wei D (2009) Effects of over-expression of glycerol dehydrogenase and 1,3-propanediol oxidoreductase on bioconversion of glycerol into

1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* under micro-aerobic conditions. *Bioprocess Biosyst Eng* 32:313 - 320

41. Zhang YP, Huang ZH, Du CY, Li Y, Cao ZA (2009) Introduction of an NADH regeneration system into *Klebsiella oxytoca* leads to an enhanced oxidative and reductive metabolism of glycerol. *Metab Eng* 11:101 - 106

42. Oh BR, Seo JW, Choi MH, Kim CH (2008) Optimization of culture conditions for 1,3-propanediol production from crude glycerol by *Klebsiella pneumoniae* using response surface methodology. *Biotechnol Bioprocess Eng* 13:524 - 532

43. Xiu ZL, Zeng AP (2008) Present state and perspective of downstream processing of biologically produced 1,3-propanediol and 2, 3-butanediol. *Appl Microbiol Biotechnol* 78:917 - 926

44. Seo MY, Seo JW, Heo SY, Baek JO, Rairakhwada D, Oh BR, Seo PS, Choi MH, Kim CH (2009) Elimination of by-product formation during production of 1,3-propanediol in *Klebsiella pneumoniae* by inactivation of glycerol oxidative pathway. *Appl Microbiol Biotechnol* 84:527 - 534

45. Bandaru VVR, Somalanka SR, Mendu DR, Madicherla NR, Chityala A (2006) Enzyme *Microb Technol* 38:209 - 214

46. Lee H, Song M, Hwang S (2003) Optimizing bioconversion of deproteinated cheese whey to mycelia of *Ganoderma lucidum*. *Process Biochem* 38:1685 - 1693

47. Kim JK, Oh BR, Shin HJ, Eom CY, Kim SW (2008) Statistical optimization of enzymatic saccharification and ethanol fermentation using food waste. *Process Biochem* 43:1308 - 1312

48. Myers RH, Montgomery DC (2002) *Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments*. Wiley, New York

49. Forage RG, Lin ECC (1982) dha System mediating aerobic and anaerobic dissimilation of glycerol in *Klebsiella pneumoniae* NCIB418. *J Bacteriol* 151:591 - 599

50. Meyer M, Dimroth P, Bott M (2001) Catabolite repression of the citrate fermentation genes in *Klebsiella pneumoniae*: evidence for involvement of the cyclic AMP receptor protein. *J Bacteriol* 183:5248 - 5256

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 산업부산물로부터 바이오오일 및 고부가가치 생물소재 양산 기술 개발에 관한 사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 산업 부산물로부터 바이오오일 및 고부가가치 생물소재 양산 기술 개발에 관한 사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.