



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0111681
(43) 공개일자 2019년10월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/12 (2006.01) C12N 13/00 (2017.01)
C12P 23/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/12 (2019.02)
C12N 13/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0034112
(22) 출원일자 2018년03월23일
심사청구일자 2018년03월23일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
주식회사 아스타바이오
전라북도 전주시 덕진구 백제대로 567, 210호(금암동, 전북대학교반도체물성연구소)
(72) 발명자
유명기
서울특별시 강북구 한천로123길 31(번동)
최윤이
서울특별시 성북구 안암로 145, 생명과학관 서관 414 (안암동5가, 고려대학교안암캠퍼스)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 남앤남

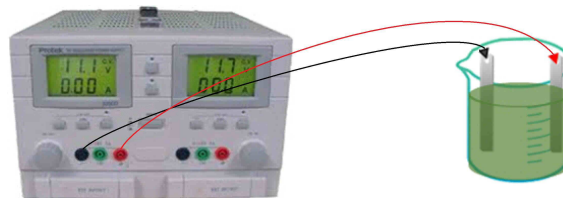
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 전기 자극을 이용한 미세조류의 성장 방법 및 아스타잔틴 생산 방법

(57) 요약

아스타잔틴은 높은 항산화 효과를 지니고 있어서 의약품, 건강식품 등 다양한 분야에 사용되고 있다. 헤마토코쿠스는 다른 생물에 비해 아스타잔틴 함량이 높아 활발한 연구가 진행되고 있으나, 성장 속도가 매우 느려 아스타잔틴 생산에 어려움을 겪고 있다. 본 발명은 전기 자극을 이용하여 헤마토코쿠스 성장을 촉진하고, 그에 따라 아스타잔틴 생산을 증대시킬 수 있다. 따라서 본 발명은 헤마토코쿠스를 이용하여 아스타잔틴을 생산하는데 매우 유용하며, 추후 다른 미세조류 생산에도 활용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12P 23/00 (2013.01)

(72) 발명자

김지영

서울특별시 서대문구 홍지문길 10, 102호(홍은동,
북악그린맨션)

이창수

광주광역시 남구 서문대로654번길 33, 202동 1708
호(진월동, 진월2차 현대아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711062872

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 연구개발특구진흥재단

연구사업명 2017년 기술이전사업화 사업

연구과제명 아스타잔틴 기반 고기능성 오메가-3 제품 개발 (Development of high-performance Omega-3 product based on astaxanthin)

기 여 율 1/1

주관기관 주식회사 아스타바이오

연구기간 2017.03.01 ~ 2018.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

미세조류에 전기 자극을 가하는 단계를 포함하는 미세조류의 생장 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 전기 자극을 가하는 단계는,

상기 미세조류의 배지 내에 전극을 설치하고, 상기 전극을 전원장치에 연결하여 전압을 가하는 미세조류의 생장 방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 전극은 탄소강 및 알루미늄 중 적어도 어느 하나를 포함하는 것을 특징으로 하는 미세조류의 생장 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 전기 자극을 가하는 단계에서는 1 V 내지 30 V의 전압을 가하는 것을 특징으로 하는 미세조류의 생장 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 전기 자극을 가하는 단계에서는 1일 내지 5일의 간격으로 전압을 가하는 것을 특징으로 하는 미세조류의 생장 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 미세조류는 헤마토코쿠스인 것을 특징으로 하는 미세조류의 생장 방법.

청구항 7

제1항의 방법으로 생장된 미세조류로부터 아스타잔틴을 추출 및 분리하는 단계를 포함하는 아스타잔틴 생산 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 전기 자극을 이용하여 미세조류의 성장을 촉진하는 방법에 관한 것이다. 더 자세하게는, 전기 자극을 이용하여 아스타잔틴을 생산할 수 있는 미세조류인 헤마토코쿠스의 성장을 촉진시키고, 아스타잔틴 생산량을 증대시키는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 적색의 케토카로티노이드(Ketocarotenoid)의 일종인 아스타잔틴(Astaxanthin, 3,3'-dihydroxy- β , β '-carotene-4,4'-dione)은 항산화 능력이 매우 뛰어난 물질로써, 의약품, 식품첨가제 등 다양한 분야에 활용되고 있다. 아스타잔틴은 화학적으로 합성하거나 아스타잔틴을 자연적으로 생산하는 생물로부터 얻을 수 있다. 그러나 화학적으로 합성하는 방법은 사료로써만 사용되며, 사람에게 사용하기 위해서는 생물로부터 생산한 아스타잔틴만 이용하고 있다. 일부 곰팡이와 박테리아가 아스타잔틴을 생산할 수 있는 것으로 알려져 있으나, 미세조류인 헤마토코쿠스(*Haematococcus*) 종을 이용한 생산이 가장 많이 이루어지고 있다.

[0003] 헤마토코쿠스는 배양 초기에 초록색의 물방울 모양을 하고 있으며 두 개의 편모로 이동성을 갖는다. 그러다 높은 광량, 영양원 부족, 세포 노화 등의 스트레스를 받으면 편모를 잃고, 세포벽이 두꺼워지며 세포 내에 아스타잔틴을 체내에 축적한다. 헤마토코쿠스는 다른 생물들에 비해 아스타잔틴 함량이 높지만, 매우 느린 성장속도를 가지고 있어 대량 생산을 할 때 생산이 오래 걸리고 다른 미생물에 의해 오염이 되는 등의 문제가 발생하고 있다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 현재 밀폐형 광생물배양기(Closed-type photobioreactor)에서 배양을 하거나 초기 배양량을 높이는 방법이 활용되고 있으나, 경제적으로 부담이 되며, 헤마토코쿠스의 느린 성장속도를 근본적으로 해결할 수 없다는 명확한 한계를 가진다. 따라서 헤마토코쿠스의 성장을 촉진하여 많은 양의 바이오매스(Biomass)를 얻는 기술과 동시에 아스타잔틴 생산을 증대시키는 기술 역시 요구된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명은 전기 자극을 통하여 미세조류 세포의 성장을 촉진할 수 있는 방법을 제공하고자 한다. 또한, 생장이 촉진된 미세조류를 활용하여 바이오매스 및 유용물질 생산 공정에 널리 활용하고자 한다. 특히, 다양한 분야에 활용 가능한 고부가가치 물질인 아스타잔틴 생산을 증대시킬 수 있는 방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0005] 본 발명의 일 실시예에 따른 미세조류의 성장 방법은 미세조류에 전기 자극을 가하는 단계를 포함할 수 있다.

[0006] 본 발명의 일 실시예는, 상기 전기 자극을 가하는 단계에서, 상기 미세조류의 배지 내에 전극을 설치하고, 상기 전극을 전원장치에 연결하여 전압을 가하는 것을 특징으로 한다.

[0007] 본 발명의 일 실시예는, 상기 전극은 탄소강 및 알루미늄 중 적어도 어느 하나를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0008] 본 발명의 일 실시예는, 상기 전기 자극을 가하는 단계에서 1 V 내지 30 V의 전압을 가하는 것을 특징으로 한다.

[0009] 본 발명의 일 실시예는, 상기 전기 자극을 가하는 단계에서 1일 내지 5일의 간격으로 전압을 가하는 것을 특징으로 하는 미세조류의 성장 방법.

[0010] 본 발명의 일 실시예는, 상기 미세조류는 헤마토코쿠스인 것을 특징으로 한다.

[0011] 본 발명의 일 실시예에 따른 아스타잔틴 생산 방법은 상기 미세조류의 성장 방법으로 성장된 미세조류로부터 아스타잔틴을 추출 및 분리하는 단계를 포함한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명의 일 실시예에 따른 미세조류 성장 방법은 전기 자극을 이용하여 효과적으로 미세조류의 세포 수를 증가시킬 수 있다. 또한, 생장이 촉진된 미세조류를 활용하여 바이오매스 및 유용물질 생산 공정에 널리 활용할 수 있다.

[0013] 특히, 본 발명의 일 실시예를 헤마토코쿠스에 적용할 경우, 헤마토코쿠스의 성장을 촉진할 수 있고, 아스타잔틴

생산도 증대시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 미세조류의 성장 방법을 설명하는 모식도이다.

도 2는 전기 자극의 강도에 따른 헤마토크스 세포 수 변화를 나타낸 그래프이다.

도 3은 전기 자극의 주기에 따른 헤마토크스 세포 수 변화를 나타낸 그래프이다.

도 4a는 전극의 종류에 따른 헤마토크스 세포 수 변화를 나타낸 그래프이고, 도 4b는 건중량 및 아스타잔틴 생산량 변화를 나타낸 그래프이고, 도 4c는 배지 내 질소원 농도 변화를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 이하, 본 문서의 다양한 실시예들이 첨부된 도면을 참조하여 기재된다. 실시예 및 이에 사용된 용어들은 본 문서에 기재된 기술을 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 해당 실시예의 다양한 변경, 균등물, 및/또는 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

[0016] 이하, 첨부한 도면을 참조하여 본 발명의 실시예를 상세하게 설명하면 다음과 같다.

[0018] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 미세조류의 성장 방법을 설명하는 모식도이다.

[0019] 도 1에 도시한 바와 같이, 본 발명은 미세조류에 전기 자극을 가하여 미세조류의 성장을 촉진하는 미세조류 성장 방법에 관한 것이다. 본 발명을 통해 미세조류에 전기 자극을 주어 세포 분열을 촉진하여 세포 수를 늘릴 수 있다.

[0020] 구체적으로, 전기 자극을 가하는 단계에서는, 미세조류의 배지를 준비하고, 배지 내에 전극(양극 및 음극)을 설치할 수 있다. 이러한 전극을 직류전원장치(DC power supply)에 연결하여 전압을 가할 수 있다.

[0021] 이때, 전극은 탄소강 및 알루미늄 중 적어도 어느 하나를 포함할 수 있다. 즉, 전극은 탄소강 재질, 알루미늄 재질 또는 이들의 혼합 재질일 수 있다. 그러나 실시예가 이에 한정되는 것은 아니고, 전극은 철, 구리, 금, 은, 백금과 같은 금속 전극과 탄소, 세라믹, 제올라이트와 같은 비금속 전극이 사용될 수도 있다.

[0022] 한편, 바람직하게는 전극은 알루미늄일 수 있다. 추후 설명할 실시예 4를 통해, 전극이 알루미늄 재질일 경우 탄소강 재질에 비해 세포 수가 더 많이 증가함을 확인하였다. 또한, 알루미늄 재질의 전극을 사용하였을 때 아스타잔틴 함량과 건중량도 증가함을 확인하였다.

[0023] 전기 자극을 가하는 단계에서는 1 V 내지 30 V의 전압을 가할 수 있다. 1 V 보다 낮은 전압을 가할 경우 미세조류의 성장 촉진 효과가 미미할 수 있고, 30 V 보다 높은 전압을 가할 경우 미세조류가 사멸되거나 오히려 미세조류의 생장이 저해될 수 있다.

[0024] 전기 자극을 가하는 단계에서는 1일 내지 5일의 간격으로 전압을 가할 수 있다. 즉, 전기 자극을 일정 주기로 지속적으로 가할 수 있다. 1일 내지 5일 간격으로 전압을 가할 경우, 한번만 전압을 가하는 경우에 비해 세포의 성장을 보다 더 촉진할 수 있다.

[0025] 한편, 본 발명의 다양한 실시예에 따른 미세조류 성장 방법은, 특정 파장의 LED 광원을 가하는 단계, 온도 조절 단계, pH 조절 단계, 또는 마이크로필름 등을 이용한 물리적 압력 조절 단계 등을 추가로 포함할 수도 있다. 이러한 추가 단계들은 전기 자극을 가하는 단계와 동시에 또는 교대로 진행될 수 있다.

[0026] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 미세조류는 헤마토크스일 수 있다. 예를 들면, 미세조류는 헤마토크스 플루비아리스(*Haematococcus pluvialis*) 종 일 수 있다. 즉, 본 발명의 성장 방법을 헤마토크스에 적용하여 헤마토크스의 세포 수를 늘려 성장을 촉진시킬 수 있다.

[0027] 한편, 본 발명의 일 실시예에 따른 아스타잔틴 생산 방법은 상기 미세조류의 성장 방법으로 성장된 미세조류로부터 아스타잔틴을 추출 및 분리하는 단계를 포함할 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 성장 방법으로 생장이 촉진된 헤마토크스로부터 아스타잔틴을 대량 생산할 수 있다. 즉, 헤마토크스의 세포 수가 증가함으로써, 질소원의 농도가 낮아져 헤마토크스로 하여금 더 빨리 아스타잔틴을 합성하도록 할 수 있다. 그러나 실시예가 이에 한정되는 것은 아니고, 헤마토크스 외에 다양한 미세조류의 성장을 촉진시켜 이로부터 바이오매스 및 유용

물질을 대량으로 생산할 수 있다.

- [0029] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0031] 실시예 1. 전기 자극을 이용한 헤마토코쿠스의 배양 및 성장
- [0032] 본 실시예에서는 헤마토코쿠스 플루비아리스(*Haematococcus pluvialis*) 종을 이용하였다. 배양 배지는 OHM을 이용하였으며, 1L 3차 증류수에 0.41?g KNO₃, 0.03?g Na₂HPO₄, 0.246?g MgSO₄ · 7H₂O, 0.11?g CaCl₂ · 2H₂O, 2.62?mg Fe(III)-citrate · H₂O, 0.011?mg CoCl₂ · 6H₂O, 0.12?mg CuSO₄ · 5H₂O, 0.075?mg Cr₂O₃, 0.98?mg MnCl₂ · 4H₂O, 0.12?mg Na₂MoO₄ · 2H₂O, 0.005?mg SeO₂, 50 ug biotin, 35 ug thiamine, 그리고 30 ug B12를 첨가하였다. 배지는 121 °C에서 20분간 멸균을 한 후 사용하였다. 250 mL 둥근바닥플라스크(DURAN 제조)에 150 mL의 배지를 넣었으며 접종 세포 수는 10 X 10⁵ cells/mL가 되도록 하였다. 빛 광량은 50 μ molm⁻²s⁻¹, 온도 25 °C에서 배양하였고, 1 vvm의 공기를 주입하였다.
- [0033] 전기 자극을 주기 위하여 직류전원장치(DC power supply)를 이용하였다. 150 mL의 세포를 250 mL의 비커에 담아 조심스럽게 흔든 후 전극을 비커 안에 넣어 25 V의 강도로 전기 자극을 1분간 주었다. 전극은 탄소강 재질 또는 알루미늄 재질의 전극을 이용하였다. (크기: 8.5 cm X 1.0 cm) 모든 전극은 한 번 사용 후 새 것으로 교체하였다.
- [0035] 한편, 하기 실시예 2 내지 4와 같이 조건을 달리하여 성장된 헤마토코쿠스 세포 수, 아스타잔틴 함량, 건중량 및 질소원 농도 변화를 측정하였다. 헤마토코쿠스 세포 수는 Hemacytometer(Hausser Scientific 제조)를 이용하여 측정하였다. 건중량은 1.45 μ m 공극 크기를 가진 필터를 이용하여 측정하였다. 아스타잔틴 함량 측정은 bead-beater(BioSpec 제조)를 이용하여 헤마토코쿠스 세포를 90% 아세톤(SAMCHUN 제조)과 마이크로비드(micro-bead)가 담긴 튜브에 담아 파쇄하고 13000rpm에서 원심분리하여 상층액을 분리한 다음 분광광도계(GENESYS 제조)를 이용하여 측정하였다. 상층액을 474 nm에서 측정하였으며, 아스타잔틴 계산식인 (OD₄₇₄-0.0831)/0.1426을 이용하여 계산하였다. (단위: mg/L)
- [0037] 실시예 2. 전기 자극 강도에 따른 헤마토코쿠스 세포 수 변화
- [0038] 본 발명의 방법에 따라 헤마토코쿠스 세포에 0 V, 15 V, 25 V, 30 V의 강도로 전기 자극을 주었다. 도 2에 따르면, 전기 자극을 주었을 때 헤마토코쿠스의 세포 수가 대체로 증가함을 확인할 수 있다. 한편, 전압이 30 V일 경우, 15 V 또는 25 V의 전압을 가했을 때 보다 세포 수 증가 효과는 적었다. 이러한 결과를 통해 30 V 미만의 전압을 가하는 것이 미세조류의 세포 수 증가 효과가 뛰어남을 확인할 수 있었다. 즉, 헤마토코쿠스 세포에 특정한 수치의 전압으로 전기 자극을 주는 것이 헤마토코쿠스의 성장을 촉진시키는 효과가 있음을 시사한다.
- [0040] 실시예 3. 전기 자극 주기에 따른 헤마토코쿠스 세포 수 변화
- [0041] 본 발명의 방법에 따라 헤마토코쿠스 세포에 전기 자극을 주지 않은 대조군과 25 V 강도로 초기에 한 번만 전기 자극, 4일 간격 전기 자극, 5일 간격 전기 자극을 준 실험군의 세포 수를 비교하였다. 도 3에 따르면 전기 자극을 한 번이라도 준 헤마토코쿠스 샘플의 세포 수가 대조군에 비해 증가함을 확인할 수 있다. 또한, 전기 자극을 초기에 한 번 주는 것보다 여러 번 주는 것이 세포의 성장을 촉진하는데 도움이 되는 것을 볼 수 있다. 한편, 4일 간격으로 전기 자극을 받은 세포보다 5일 간격으로 전기 자극을 받은 세포의 수가 더 많이 증가하는 것으로 보아 한 번 전기 자극을 주고 일정 기간 회복할 시간이 있을 때 효과가 더욱 높음을 확인할 수 있다.
- [0043] 실시예 4. 전극 종류에 따른 전기 자극 효과 변화
- [0044] 도 4a는 전기 자극에 사용한 전극 종류(탄소강 또는 알루미늄 재질)에 따른 헤마토코쿠스 세포 수 변화를 나타낸 것이다. 도 4a에 따르면 탄소강 재질의 전극을 사용하였을 때보다 알루미늄 재질의 전극을 사용하였을 때 세

포 수가 더 많이 증가함을 확인할 수 있다.

[0045] 도 4b는 건중량과 아스타잔틴 함량을 나타낸 것인데, 도 4a 결과와 마찬가지로 알루미늄 재질의 전극을 사용하였을 때 아스타잔틴 함량과 건중량이 증가함을 확인할 수 있다.

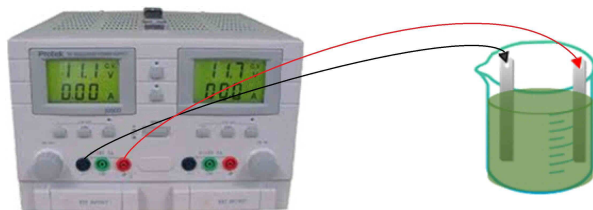
[0046] 도 4c는 배지 내 질소원 농도 변화를 나타낸 것이다. (단위 1 mg/L) 탄소강 재질의 전극을 사용한 방법과 알루미늄 재질의 전극을 사용한 방법 모두 대조군에 비해 질소원 농도가 낮는데, 이는 세포 수가 증가하여 질소원 소모가 빨라졌음을 시사한다. 또한 질소원의 농도가 낮아져 헤마토코쿠스로 하여금 더 빨리 아스타잔틴을 합성하도록 만들었음을 의미한다.

[0048] 상술한 실시예에 설명된 특징, 구조, 효과 등은 본 발명의 적어도 하나의 실시예에 포함되며, 반드시 하나의 실시예에만 한정되는 것은 아니다. 나아가, 각 실시예에서 예시된 특징, 구조, 효과 등은 실시예들이 속하는 분야의 통상의 지식을 가지는 자에 의하여 다른 실시예들에 대해서도 조합 또는 변형되어 실시 가능하다. 따라서 이러한 조합과 변형에 관계된 내용들은 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 할 것이다.

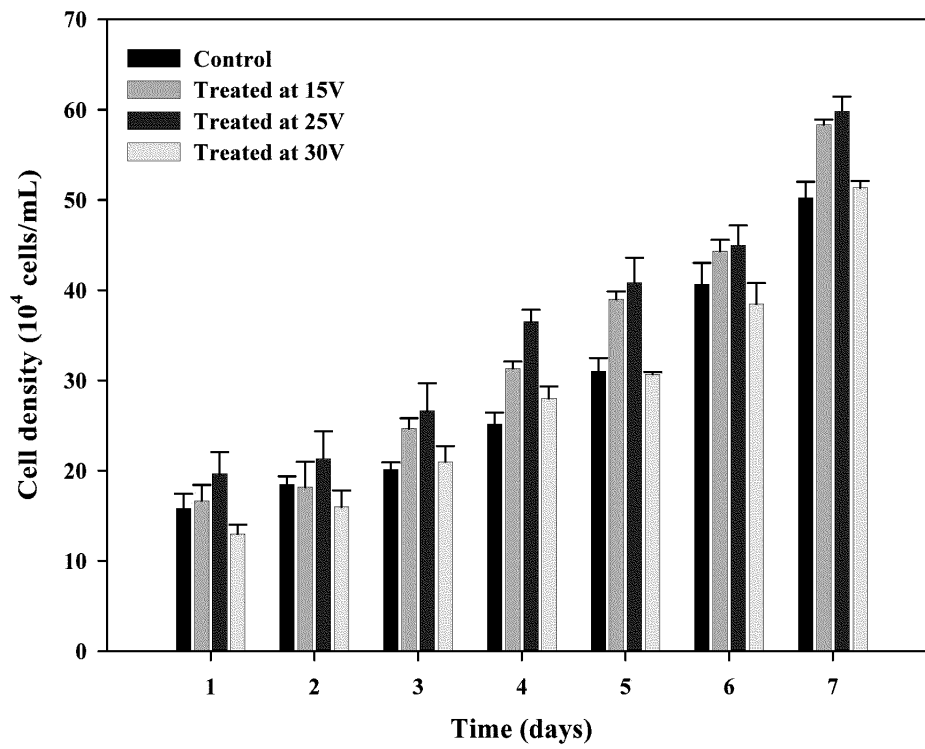
[0049] 또한, 이상에서 실시예들을 중심으로 설명하였으나 이는 단지 예시일 뿐 본 발명을 한정하는 것이 아니며, 본 발명이 속하는 분야의 통상의 지식을 가진 자라면 본 실시예의 본질적인 특성을 벗어나지 않는 범위에서 이상에 예시되지 않은 여러 가지의 변형과 응용이 가능함을 알 수 있을 것이다. 예를 들어, 실시예들에 구체적으로 나타난 각 구성 요소는 변형하여 실시할 수 있는 것이다. 그리고 이러한 변형과 응용에 관계된 차이점들은 첨부한 청구 범위에서 규정하는 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

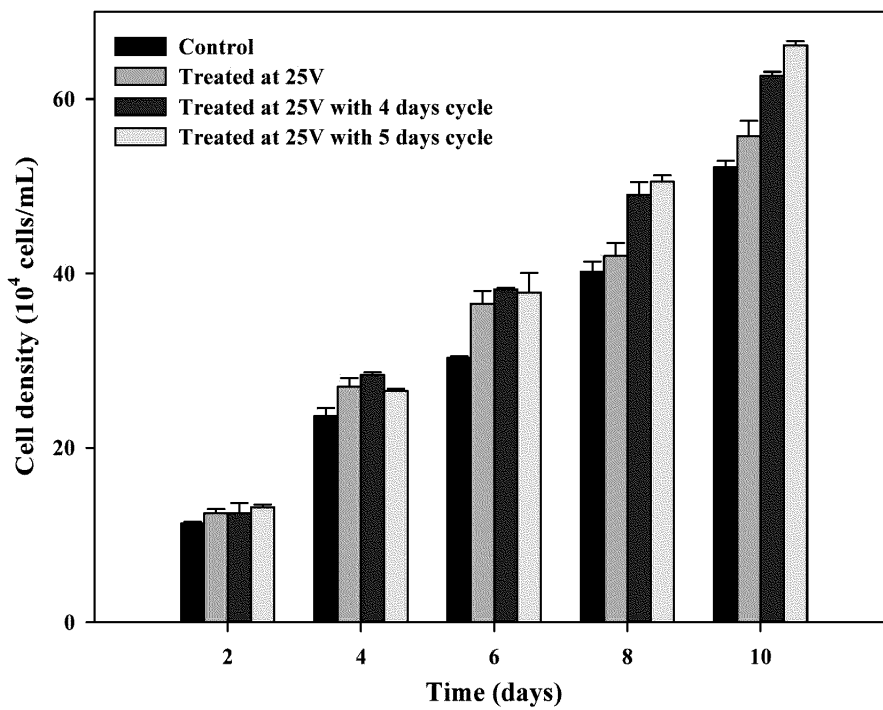
도면1



도면2

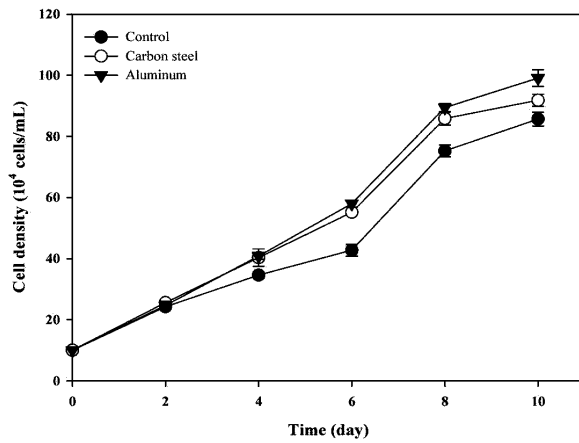


도면3

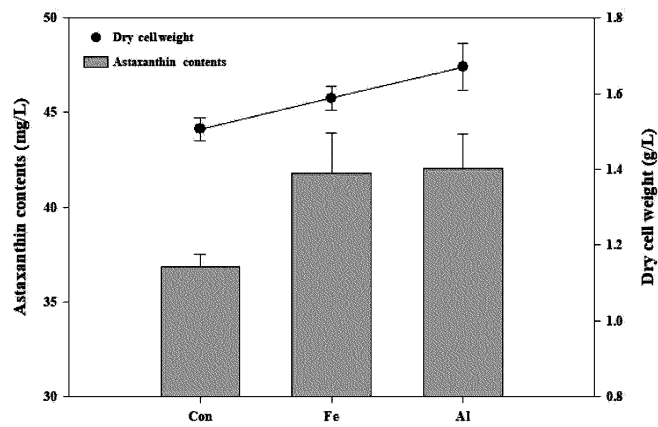


도면4

(a)



(b)



(c)

Treatment	Cultivation time				
	48h	96h	144h	192h	240h
Control	155.0±1.6	103.4±1.8	18.1±1.3	7.2±0.7	9.6±0.6
Carbon steel	145.1±3.4	89.0±4.7	14.2±1.9	8.6±0.7	9.7±0.4
Aluminum	147.1±2.6	88.9±3.0	14.1±1.2	7.5±0.3	9.8±0.3