



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0032671
(43) 공개일자 2021년03월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 23/00 (2006.01) C12M 1/00 (2006.01)
C12M 1/34 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12P 23/00 (2013.01)
C12M 21/02 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0113982
(22) 출원일자 2019년09월17일
심사청구일자 2019년09월17일

(71) 출원인
한국지역난방공사
경기도 성남시 분당구 분당로 368(분당동)
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
장원석
경기도 고양시 일산동구 강석로 110, 503동 703호(마두동, 강촌마을5단지아파트)
성기준
경기도 용인시 기흥구 강남동로 54, 701동 701호(구갈동, 강남마을7단지계룡리슈빌아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인다나

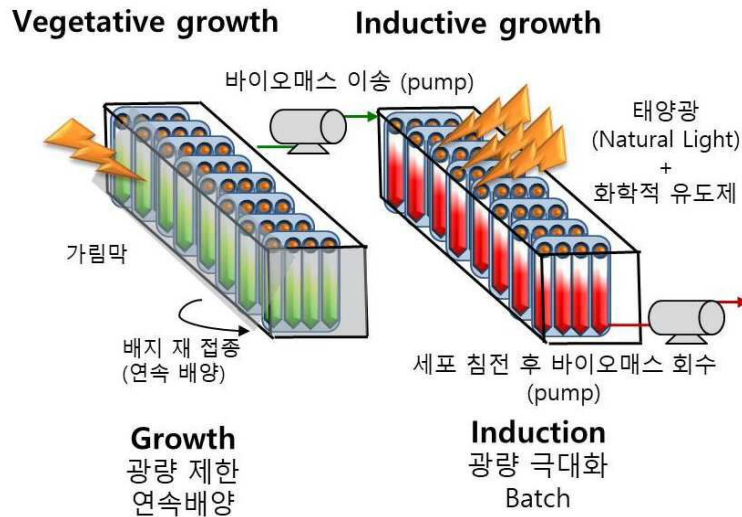
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 미세조류 배양 시스템을 이용한 아스타잔틴 생산방법

(57) 요약

본 발명은 옥외 배양 조건에서 미세조류를 배양하는 시스템을 이용한 아스타잔틴 생산방법에 관한 것으로, 2단 배양 공정을 이용하여 광 조건을 최적화하고, 생장기 동안 질소원을 첨가하며, 유도기 동안 화학적 유도제를 사용하여 태양광 조건에서도 효과적으로 아스타잔틴을 생산할 수 있는 장점이 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12M 41/06 (2013.01)

C12M 41/34 (2013.01)

(72) 발명자

오문세

서울특별시 서초구 동작대로 138-13, 202호(방배동)

이종준

경기도 화성시 동탄순환대로21길 54, 1322동 1101호(청계동, 동탄2신도시 센트럴 푸르지오)

김경민

경기도 성남시 분당구 분당로 190, 107동 901호(분당동, 샛별마을라이프아파트)

심상준

서울특별시 강남구 선릉로 221, 301동 803호(도곡동, 도곡렉슬아파트)

최윤영

서울특별시 강남구 개포로 516, 708동 1501호(개포동, 주공아파트)

홍민익

경기도 성남시 수정구 위례동이로 24, 5905동 102호(창곡동, 이편한세상 테라스 위례)

명세서

청구범위

청구항 1

제1 반응기 내부에 생장기 배지, 미세조류, 이산화탄소 및 질소원을 공급하여 바이오매스를 생장시키는 생장 공정; 및

제1 반응기로부터 공급된 바이오매스를 포함하는 배양액에 유도기 배지 및 탄소원을 공급하여 태양광 존재 하에서 아스타잔틴을 생산하는 생산 공정을 포함하는 아스타잔틴 생산방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

생장 공정은 질소원을 1 mM 내지 10 mM의 농도로 공급하는 것을 특징으로 하는 아스타잔틴 생산방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

생장 공정은 10 내지 80 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 의 광 조건에서 수행하는 것을 특징으로 하는 아스타잔틴 생산방법.

청구항 4

제 1항에 있어서,

제1 반응기의 배양액은 질소 농도가 고갈되어 기 설정 농도 이하가 되면 배양액의 일부를 제2 반응기로 이송하는 것을 특징으로 하는 아스타잔틴 생산방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

제1 반응기에서 제2 반응기로 배양액의 이송이 완료되면, 제1 반응기에 생장기 배지를 배양액 배출량만큼 재공급하여 미세조류를 연속해서 생장시키는 것을 특징으로 하는 아스타잔틴 생산방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

생산 공정에서 탄소원은 에탄올 및 아세트이트로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는 아스타잔틴 생산방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

생산 공정은 탄소원을 0.5 mM 내지 20 mM의 농도로 공급하는 것을 특징으로 하는 아스타잔틴 생산방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

생장 공정은 100 내지 200 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 의 광조건에서 수행하는 것을 특징으로 하는 아스타잔틴 생산방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

제1 반응기 및 제2 반응기는 독립적으로 교반형 반응기, 판형 반응기, 관형 반응기, 컬럼형 반응기 및 고분자 필름형 반응기 중 어느 하나인 것을 특징으로 하는 아스타잔틴 생산방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 옥외 배양 조건에서 미세조류를 배양하는 시스템을 이용하여 아스타잔틴을 생산하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 에너지 생산을 위한 석탄, 석유 그리고 천연 가스와 같은 화석 연료의 연소는 대기 중 CO₂의 농도를 높이는 주요 원인이고, 이는 지구 온난화의 원인이 되고 있다. 이러한 CO₂ 배출 문제를 해결하기 위해 미세 조류를 이용한 CO₂의 생물학적 전환 연구가 많이 이루어지고 있는 상황이다. 여러 종의 미세조류 중 *Haematococcus pluvialis* (헤마토코쿠스 플루비알리스)는 담수종으로서, *Chlorophyceae* 중, *Volvocales* 속, *Haematococcaceae* 과에 속한다. 이전 연구에서 헤마토코쿠스는 생존에 적합하지 않은 환경에서, 예를 들면 영양 고갈 (질소, 인), 높은 광도, 염도 스트레스와 같은 환경에서 아스타잔틴을 대량으로 축적한다는 사실이 밝혀졌다. 최대 아스타잔틴 축적율은 5-6 %에 달하며 지구상에서 가장 풍부한 아스타잔틴의 원료이다.

[0003] 헤마토코쿠스는 형태적으로 확실히 구분되는 생활사를 가진다: 초록색의 flagellate cell 상태 (생장기)와 빨간색의 운동성이 없는 cyst(포낭) 상태의 아스타잔틴 유도기의 세포. 질소 결핍과 더불어 높은 광 조건은 아스타잔틴 유도에 가장 효과적인 방안이다. 그러므로, 아스타잔틴 생산성 증대를 위해 2단 배양법이 창안되었다: 생장기는 생장에 유리한 조건에서 진행되어 고농도 세포 배양을 가능하게 하고, 유도기에는 다양한 스트레스 조건을 주어 세포 내 아스타잔틴을 대량으로 축적하게 한다. 최근, 2단 배양 시스템은 헤마토코쿠스 산업 및 연구진에서 아스타잔틴 생산에 효율적인 시스템으로 널리 활용되고 있다. 일반적으로 생장기 때 세포를 고농도로 배양하기는 어렵다. 그러므로, 생장기 세포를 대량으로 배양하고, 아스타잔틴을 최대량으로 생산하는 공정 개발이 필요할 것으로 예상된다.

[0004] 그러나, 헤마토코쿠스는 당 수송체(sugar transporter)가 없기 때문에, 당 첨가 조건에서 종속 영양 조건으로 잘 성장할 수 없다. 그러므로 당 섭취를 가능하게 하는 수송체가 없는 광 독립 영양 미세 조류는 유전자 도입을 통해 종속 영양 조건에서 자라게 하는 연구가 진행되었다. 구체적으로 미세 조류 *Parachlorella kessleri* (즉, *Chlorella kessleri*)로부터 Monosaccharide/H⁺ symporter 유전자를 도입한 미세 조류 *Volvox carteri*와 규조류 *Phaeodactylum tricornutum*은 헥소오스 섭취 단백질인 (hexose uptake protein) HUP1 생산 유전자를 가지고 있어서 암 조건에서 포도당을 소모하여 성장할 수 있다. 종속 영양 조건은 멸균된 환경에서 고농도 세포 배양을 가능하게 할 수 있다는 장점이 있다. 만약 헤마토코쿠스에 이러한 유전자를 도입한다면, HUP1 유전자를 가진 헤마토코쿠스 플루비알리스는 독성이 있는 글루코오스인 2-deoxy glucose를 종속 영양 조건 (heterotrophic)에서 소모하여 아스타잔틴을 생산할 수 있다. 최대 바이오매스 생산량은 dry cell weight 기준 0.2 mg/L로 밝혀졌다. 그러나 이렇게 대사공학적으로 조작된 균주는 생산성이 낮아 대량 배양 현장에 적용하기는 어려운 문제점이 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 한국특허공개공보 제10-2013-0038605호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 옥외 배양조건에서 적용 가능한 야생형(wild-type) 미세조류를 이용하여 아스타잔틴을 생산하는 방법에 관한 것으로, 미세조류 생활사에 최적화된 2단 배양 공정을 적용하여 제1 반응기(green stage)에서

바이오매스의 생산량을 증대시키고, 제2 반응기(red stage)에서 화학적 유도제를 활용하여 바이오매스 내 아스타잔틴 축적 속도를 증가시켜 아스타잔틴을 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0007] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여,
- [0008] 본 발명은 제1 반응기 내부에 생장기 배지, 미세조류, 이산화탄소 및 질소원을 공급하여 바이오매스를 생장시키는 생장 공정; 및
- [0009] 제1 반응기로부터 공급된 바이오매스를 포함하는 배양액에 유도기 배지 및 탄소원을 공급하여 태양광 존재 하에서 아스타잔틴을 생산하는 생산 공정을 포함하는 아스타잔틴 생산방법을 제공한다.
- [0010] 도 1은 본 발명에 따른 미세조류 배양 시스템을 이용하여 아스타잔틴을 생산하는 방법을 나타낸 모식도이다. 도 1을 살펴보면, 제1 반응기는 생장기 배지, 미세조류, 이산화탄소 및 질소원을 공급하면서 가림막을 통해 낮은 광도의 광을 조사하여 바이오매스를 생장시키는 생장 공정이 진행되고, 제2 반응기는 제1 반응기로부터 이송된 바이오매스 배양액에 유도기 배지 및 화학적 유도제인 탄소원을 일정 농도로 공급하면서 태양광 존재 하에서 아스타잔틴을 생산할 수 있다. 또한, 제1 반응기의 배양액의 질소 농도가 고갈되어 기 설정 농도 이하가 되면 배양액의 일부를 제2 반응기로 이송하고, 제1 반응기에서 제2 반응기로 배양액이 완료되면, 제1 반응기에 생장기 배지를 배양액 배출량만큼 재공급하여 미세조류를 연속해서 생장시킬 수 있다. 이때, 제1 반응기 및 제2 반응기는 컬럼형 반응기를 사용할 수 있다.
- [0011] 상기 미세조류는 아스타잔틴 또는 베타카로틴 등 카로테노이드를 2차 대사 산물로서 생산하는 미세조류 균주라면 특별히 제한되지 않는다. 구체적으로, 미세조류는 헤마토코쿠스, 클로렐라 또는 두니리엘라일 수 있다.
- [0012] 하나의 예로서, 본 발명에 따른 아스타잔틴 생산방법은 제1 반응기에 질소원은 무기 질산염 또는 무기 암모늄염이면 특별히 제한되지 않는다. 구체적으로 제1 반응기에 질소원은 질산칼륨(KNO_3), 질산칼슘($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$), 질산나트륨(NaNO_3), 염화암모늄(NH_4Cl) 또는 황산암모늄($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)을 사용하여 생장 공정을 수행할 수 있고, 미세조류의 세포 생장이 대수기에 다다랐을 때 질소원을 공급할 수 있다. 구체적으로, 생장 공정은 질소원을 1 mM 내지 10 mM의 농도로 공급할 수 있고, 보다 구체적으로, 질소원을 1 mM 내지 8 mM, 2 mM 내지 8 mM, 3 mM 내지 8 mM, 3 mM 내지 6 mM 또는 2 mM 내지 4 mM의 농도로 공급할 수 있다. 예를 들어, 질소원을 2번 이상으로 나누어 추가 공급할 수 있다. 상기와 같이 질소원을 공급함으로써, 낮은 광 조건에서도 바이오매스의 생장을 증가시킬 수 있다.
- [0013] 또한, 생장 공정은 10 내지 80 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 의 광조건에서 수행할 수 있다. 구체적으로, 생장 공정은 20 내지 80 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, 20 내지 70 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, 20 내지 50 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, 30 내지 80 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, 30 내지 60 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 또는 30 내지 50 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 의 광 조건에서 수행할 수 있다.
- [0014] 본 발명에 따른 아스타잔틴 생산방법은 제1 반응기의 배양액은 질소 농도가 고갈되어 기 설정 농도 이하가 되면 배양액의 일부를 제2 반응기로 이송할 수 있다. 구체적으로, 제1 반응기의 배양액의 질소 농도를 실시간으로 측정하여 바이오매스 생장이 종료되는 질소 농도 “0”에 도달하기 전에 배양액 이송 펌프를 제어하여 배양액 이송 라인을 통해 배양액의 일부를 제2 반응기로 이송할 수 있다.
- [0015] 추가적으로, 제1 반응기에서 제2 반응기로 배양액의 이송이 완료되면, 제1 반응기에 생장기 배지를 배양액 배출량만큼 재공급하여 미세조류를 연속해서 생장시킬 수 있다.
- [0016] 또 하나의 예로서, 본 발명에 따른 아스타잔틴 생산방법은 에탄올 및 아세테이트로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 탄소원을 제2 반응기에 공급하여 생산 공정을 수행할 수 있다. 구체적으로, 제2 반응기 내의 탄소원은 에탄올 또는 아세테이트일 수 있고, 높은 광 조건(200 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 이상)에서는 아세테이트를 탄소원으로 사용하고, 낮은 광 조건(200 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 이하)에서는 에탄올을 탄소원으로 사용할 수 있다. 의 광조건의 광조건상기와 같은 탄소원은 아스타잔틴 생산에 탄소원으로 사용되면서, 화학적 유도제로 바이오매스 세포 내 산화 스트레스를 증가시켜 아스타잔틴 생산을 촉진시키는 역할을 할 수 있다. 특히 탄소원으로 에탄올을 사용하는 경우는 낮은 광도 조건에서도 우수한 바이오매스(아스타잔틴) 생산효율을 나타낼 수 있다.
- [0017] 상기 생산 공정은 탄소원을 0.5 mM 내지 20 mM의 농도로 제2 반응기에 공급하여 수행할 수 있다. 구체적으로,

생산 공정은 탄소원을 0.5 mM 내지 10 mM, 0.5 mM 내지 5 mM, 1 mM 내지 20 mM, 1 mM 내지 10 mM, 0.8 mM 내지 7 mM 또는 1 mM 내지 5 mM의 농도로 공급할 수 있다. 상기와 같은 탄소원을 공급함으로써, 낮은 광 조건에서도 아스타잔틴의 생산을 향상시킬 수 있다.

[0018] 또한, 생산 공정은 100 내지 200 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 의 광조건에서 수행할 수 있다. 구체적으로, 성장 공정은 100 내지 180 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, 100 내지 150 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, 130 내지 200 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, 130 내지 180 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, 130 내지 160 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 또는 130 내지 150 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 의 광 조건에서 수행할 수 있다.

[0019] 상기 제1 반응기 및 제2 반응기는 독립적으로 교반형 반응기, 관형 반응기, 관형 반응기, 컬럼형 반응기 및 고분자 필름형 반응기 중 어느 하나일 수 있다. 구체적으로, 제1 반응기 및 제2 반응기는 동일한 용량을 가지는 교반형 반응기, 관형 반응기, 관형 반응기, 컬럼형 반응기 또는 고분자 필름형 반응기일 수 있으며, 보다 구체적으로, 컬럼형 반응기일 수 있다.

발명의 효과

[0020] 본 발명에 따르면, 2단 배양 공정을 이용하여 광 조건을 최적화하고, 성장기 동안 질소원을 첨가하며, 유도기 동안 탄소원(화학적 유도제)을 공급함으로써, 태양광 조건에서도 배양기간이 단축되고 야생형 균주를 이용하여 효과적으로 아스타잔틴을 생산할 수 있는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 본 발명에 따른 미세조류 배양 시스템을 이용하여 아스타잔틴을 생산하는 방법을 나타낸 모식도이다.

도 2는 본 발명에 따른 미세조류 배양 시스템에서 질소 농도에 따른 바이오매스의 농도(A), 잔류 질소 농도(B), 잔류 인 농도(C), 세포 내 단백질 농도(D) 및 카로테노이드/클로로필의 비(E)를 나타낸 그래프이다.

도 3은 본 발명에 따른 미세조류 배양 시스템에서 탄소원 종류 및 농도와 광도 조건에 따른 바이오매스 농도와 아스타잔틴 농도를 나타낸 그래프이다: (A)는 130~150 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 의 중간 광도 조건이고, (B)는 30~50 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 의 낮은 광도 조건이다.

도 4는 본 발명에 따른 미세조류 배양 시스템에서 탄소원 종류별 세포 성장 곡선(바이오매스 농도(a-1, b-1), 아스타잔틴 농도(a-2, b-2), 잔류 탄소 농도(a-3, b-3)를 나타낸 그래프이다: (A)는 130~150 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 의 중간 광도 조건이고, (B)는 30~50의 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 의 낮은 광도 조건이다.

도 5는 본 발명에 따른 미세조류 배양 시스템에서 광도 세기 별, 탄소원 종류에 따른 총 지방산메틸에스테르(Total FAME) 양(A), 중간 광도(130~150 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$)에서의 FAME 구성요소의 양(B) 및 낮은 광도(30~50 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$)에서의 FAME 구성요소의 양(C)을 나타낸 그래프이다.

도 6은 본 발명에 따른 미세조류 배양 시스템에서 에탄올 농도별 시간에 따른 바이오매스의 농도(A)와 디클로로플루오레신(dichlorofluoresin)의 농도(B)를 나타낸 그래프이다. 이때, 광도 조건은 130~150 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 이다.

도 7은 본 발명에 따른 미세조류 배양 시스템에서 광도 세기별 각각 자가 영양 조건과 에탄올 1mM 조건에서 각각 디클로로플루오레신의 농도(A)와 말론디알데하이드(malondialdehyde)의 농도(B)를 나타낸 그래프이다.

도 8은 본 발명에 따른 미세조류 배양 시스템에서 탄소원(아세테이트, 에탄올, 글루코오스) 1mM과 함께, 세사몰(sesamol) 또는 DCMU(3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea)를 주입한 경우의 시간에 따른 바이오매스의 농도(a-1, b-1), 디클로로플루오레신의 농도(a-2, b-2)와 말론디알데하이드의 농도(a-3, b-3)를 나타낸 그래프이다: (A)는 130~150 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 의 중간 광도 조건이고, (B)는 30~50의 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 의 낮은 광도 조건이다.

도 9는 본 발명에 따른 미세조류 배양 시스템에서 에탄올 첨가 유무별 시간에 따른 아스타잔틴 생합성과 관련된 유전자들의 전사량에 대한 그래프이고, (A)는 ipi-1, (B)는 ipi-2, (C)는 psy, (D)는 pds, (E)는 crt0, (F)는 crtR-b의 유전자에 관한 그래프이다. 이때, 광도 조건은 130~150 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 이하, 실시예를 통하여 본 발명의 구성 및 효과를 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0023] 실시예

[0024] 본 발명에서 사용된 균주는 *Haematococcus pluvialis* NIES-144로서 National Institute for Environmental Studies, Tsukuba, Japan으로부터 구입하였다. 사용된 배지는 변형된 NIES-C 및 NIES-N 배지이며, 이의 구성 성분은 하기 표 1에 나타내었다. 또한, 자가 영양 조건에서 *H. pluvialis* 대량 배양 공정의 옥외 배양 조건은 아래에 나타내었다.

[0025] 저밀도 폴리에틸렌 필름(LDPE) 및 폴리에틸렌 테레프탈레이트와 무연신 폴리프로필렌 혼합 필름(PET+CPP, Filmax, CPP Film)으로 광합성 생물 반응기(높이:40cm, 가로:45cm, 측면:5cm, 용량:6L, “V” 자 홈의 최대 내부 간격:15cm*3개)는 100L 부피의 기포탑(bubble column) 형식의 공기 방울을 이용하여 교반하는 것으로 제1 반응기와 제2차 반응기를 제작하였다.

[0026] 제작된 제1 반응기는 NIES-C 배지(자가영양배지, 목적: 성장)를 포함하고, 제2차 반응기는 NIES-N 배지(자가영양배지, 목적: 영양 결핍 스트레스를 통한 아스타잔틴 축적 유도)를 포함하였다.

[0027] - 가스 공급 : 옥외 배양 공정을 위해 한국 지역난방공사 판교지사에서 배출되는 배가스를 사용하였으며, 이 때 CO₂ 농도는 약 3~6%로 관찰됨.

[0028] - 주입 유량 : 0.1 vvm (vessel volume per minute)

[0029] - 배양 온도 : 23±3 °C

[0030] - 광주기 : (대략적으로) 명암주기 12 : 12

[0031] -버퍼 조건은 10mM의 KOH 용액을 이용하여 배가스를 하루 정도 폭기시켜 버퍼 용액을 제조함

표 1

NIES-C		NIES-N	
성분	함량(/L)	성분	함량(/L)
Ca(NO ₃) ₂	0.15 g	CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.13 g
KNO ₃	2mM 2mM + 2mM 4 mM 4mM + 4mM 8mM	KCl	0.07 g
버퍼 조건	KOH 10 mM 12 시간 이상 배가스 aeration +phosphate buffer	버퍼 조건	KOH 10 mM 12 시간 이상 배가스 aeration +phosphate buffer
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.04 g	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.04 g
Thiamine	0.01 mg	Thiamine	0.01 mg
Biotin	0.10 µg	Biotin	0.10 µg
Vitamin B12	0.01 µg	Vitamin B12	0.01 µg
PIV metal solution (per liter)	3 ml	PIV metal solution (per liter)	3 ml
Na ₂ EDTA 1 g		Na ₂ EDTA 1 g	
FeCl ₃ · 6H ₂ O 0.196 g		FeCl ₃ · 6H ₂ O 0.196 g	
MnCl ₂ · 4H ₂ O 0.036 g		MnCl ₂ · 4H ₂ O 0.036 g	
ZnSO ₄ · 7H ₂ O 0.022 g		ZnSO ₄ · 7H ₂ O 0.022 g	
CoCl ₂ · 6H ₂ O 4 mg		CoCl ₂ · 6H ₂ O 4 mg	
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O 2.5 mg		Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O 2.5 mg	

- [0033] **실험예 1-옥외 배양에서 고농도 세포 바이오매스 성장을 위한 fed-batch 개발**
- [0034] 본 발명에 따른 미세조류 배양 시스템에서 질소원 농도와 탄소원 종류에 대한 영향을 평가하기 위해서, 하기와 같이 질소원 조건을 조성하였다. 배지는 변형된 NIES-C 배지를 사용하였으며, 질소원을 제외한 나머지 영양 조건은 NIES-C 배지와 같았으며, 상기 조건에서 배양한 결과는 도 2에 나타내었다.
- [0035] - 초기 질소원 농도 : 1 mM (Control, 초기 공급), 2 mM (초기 공급), 2 mM (초기 공급) + 2 mM (추가 공급), 4 mM (초기 공급), 4 mM (초기 공급) + 4 mM (추가 공급), 8 mM (초기 공급)
- [0036] - Green stage에서 질소원 기질 추가 공급 시점 : 세포 접종 후 9일
- [0037] - 질소원 기질 농도 : 각각 2 mM, 4 mM
- [0038] 또한, 유도기에 접어들기 전 여러 탄소원을 이용하여 green resting cell로부터 아스타잔틴 축적 효율 및 축적 속도에 대한 실험을 진행하였으며, 그 결과는 도 3에 나타내었다.
- [0039] 초기 배양 조건은 1.0 g/L이고 300 ml 플라스크를 활용하였고, 배양 부피는 100 ml 이었다. 광 조건은 높은 광 조건 ($130\sim150 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$)과 낮은 광 조건 ($30\sim50 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$)을 각각 활용하였고 탄소원 종류는 포도당, 아세트이트, 에탄올, 그리고 대조군으로 NIES-N 배지 (자가영양조건)을 사용하였다. 탄소원 농도는 각각 1 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM씩 주입하였다.
- [0040] 도 2는 발전소 연소 가스 및 태양광을 이용하여 미세조류 배양 시스템으로 미세조류를 배양하는 과정에서 생장기 동안의 세포 생장 곡선이다. 도 2를 살펴보면, 세포 생장이 대수기 (exponential phase)에 다다랐을 때, 세포 생장에 필수적인 제한 기질인 질소원을 각각 1 mM (control), 2 mM+2 mM, 4 mM, 4 mM+4mM, 8 mM을 공급하면서 각각의 질소 농도에 따른 바이오매스의 농도(A), 잔류 질소 농도(B), 잔류 인 농도(C), 세포 내 단백질 농도(D) 및 카로테노이드/클로로필의 비(E)를 측정하였다. 구체적으로, 1 mM 질소원 조건에서 배양이 진행됨에 따라 카로테노이드/클로로필 비는 최대 8.6 까지 올라가며 이는 세포가 flagellate 상태에서 cyst 형태로 변화하였음을 의미한다. 이 때 세포 내 질소원 농도는 거의 0에 가깝게 떨어지며, 이 때의 배양 기간을 기준으로 잡아 세포를 유도기 라인으로 이송한다. 도 2A에서 볼 수 있듯이 세포 바이오매스의 농도는 2mM+ 2mM, 4 mM 조건이 가장 높다. 그러나 초기에 배지 내 질소원 농도가 과도하면 세포 생장이 저해되고, 만약 배지 내 질소원이 전부 소모되지 못하면 유도기 때 아스타잔틴 축적 함량 및 그 축적 속도가 저해되므로 오히려 세포가 전부 소모할 수 없는 질소원 농도는 아스타잔틴 축적에 불리한 것을 알 수 있다.
- [0041] 도 3은 각 광도 조건별 탄소원 종류 및 농도에 따른 바이오매스 생산성 및 아스타잔틴 생산성에 대한 그래프이다. 도 3을 살펴보면, 중간 광도 조건($130\sim150 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, 도 3A)에서 아세트이트는 우수한 탄소원이며, 10 mM, 및 20 mM 조건에서 각각 0.132 g/L/day, 0.126 g/L/day로 바이오매스 생산량 또한 높았다. 그러나 낮은 광 조건($30\sim50 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, 도 3B)에서 아세트이트 조건에서 바이오매스 생산량은 급격히 낮아졌다. 이를 통해 아세트이트를 탄소원으로 소모하기 위해서는 광량 확보가 필수적인 것을 확인할 수 있었다. 에탄올은 중간 광도 및 낮은 광도 조건에서 모두 효과적으로 탄소원으로 활용되었다. 특히 낮은 농도 (1 mM)에서 효과적으로 아스타잔틴 축적을 유도하였으며 오히려 높은 농도에서 과도한 활성 산소종 생산으로 인해 그 생산성이 저해되었다.
- [0042] **실험예 2-옥외 배양에서 탄소원의 효과**
- [0043] 본 발명에 따른 미세조류 배양 시스템에서 탄소원 효과에 대한 영향을 평가하기 위해서, 하기와 같은 조건에서 탄소원 조건 최적화를 위한 실험을 진행하였다.
- [0044] - 탄소원 조건 최적화를 위한 flask 실험
- [0045] 1) 배양 부피: 300 ml 플라스크 이용, 100 ml 씩
- [0046] 2) 배지 조건: NIES-N 배지
- [0047] 3) 탄소원 공급 조건 : 포도당 (glucose), 아세트이트 (sodium acetate), 에탄올 (ethanol)을 조성된 bicarbonate buffer에 각각 1 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM 씩 주입
- [0048] 4) 광조건: $130\sim150 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ (중간 광, 옥외 배양 광 부족 조건), $30\sim50 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ (낮은 광)

- [0049] 옥외 배양에서는 배지 내 탄소원이 외부 미생물 유입으로 인한 오염의 원인이 되므로 각각의 탄소원을 1 mM씩 적용하여 배양을 진행하였다. 먼저, 반응기 내 배지 조성을 위해 10 mM의 KOH 용액을 이용하여 배가스를 하루 정도 폭기시켜 버퍼 용액을 제조한다. 그 후 탄소원 및 NIES-N 배지 성분을 접종한 후 세포를 하기 도 1과 같이 이송하여 유도 공정을 진행하였다.
- [0050] 하기 도 4에 의하면 옥외 배양에서 탄소원 농도를 각각 중간 광도 및 낮은 광도로 조정된 실험군에 대해 바이오매스 생장, 아스타잔틴 생산, 잔류 탄소원 농도가 나타났다. 도 4를 살펴보면, 포도당은 아스타잔틴 생산 및 바이오매스 생장에 유리한 탄소원이 아니며, 이는 포도당이 미세 조류 헤마토크쿠스 플루비알리스 내에서 탄소원으로 이용되지 못하기 때문이다. 아세테이트와 에탄올은 탄소원으로 사용되며, 아세테이트의 사용은 광도에 의존적이나 에탄올은 낮은 광도에서도 효과적인 탄소원으로 소모되는 것으로 나타났다. 보통 세포 내 C/N 비가 높아지면 광합성 전자 전달계가 저해될 뿐 아니라 세포 소기관이 손상되며 활성 산소종이 발생하며, 세포 내 $NADP^+$ 가 NADPH로 환원되며 세포 내 산화 스트레스를 감소시키려 한다. 세포 내에서 과량 환원된 NADPH는 아스타잔틴 및 FAME 합성에 소모된다. 에탄올의 세포 내 활성 산소종 발생 효과는 세포 내에서 아스타잔틴 생합성 매커니즘을 발동시킬 뿐 아니라 NADPH를 과량 생산하고 이러한 효과는 광 조건에 관계 없이 일어나기 때문에 낮은 광도에서 에탄올은 우수한 바이오매스 생산성, 아스타잔틴 합성 효과를 나타낼 뿐 아니라 배양 기간 중 탄소원으로 도 활용된다.
- [0051] 이러한 결과는 하기 도 5의 지방산 생산량과도 연관된다. FAME(지방산, fatty ethly methyl ester)은 아스타잔틴 축적량과 연관된다. 아세테이트와 에탄올 조건에서 FAME 축적량이 가장 높게 나타났다. 특히 에탄올을 공급하였을 때는 낮은 광 조건에서도 FAME 축적량이 우수했다. 헤마토크쿠스 내 지방산은 주로 C16과 C18이며, 비록 광량이 증가할수록 지질 축적에 유리하였으나(최대 22 %), 에탄올을 이용한 활성 산소종 발생 조건에서도 세포가 NADPH를 소모하며 지방산을 합성하므로 낮은 광 조건에서도 지질 생산이 아세테이트 조건보다 높게 나타났다.
- [0052] **실험예 3-아스타잔틴 생합성 매커니즘 조사를 통한 에탄올 조건 최적화**
- [0053] 본 발명에 따른 미세조류 배양 시스템에서 아스타잔틴 생합성 매커니즘에 대해 알기 위해서, 하기와 같은 조건에서 실험을 진행하였다.
- [0054] - 최적화된 탄소원 조건을 이용한 red stage 배양
- [0055] 1) Red stage에서 bicarbonate buffer 조성 조건: 10 mM KOH 용액에 배가스 0.1 vvm으로 12시간 이상 aeration
- [0056] 2) 탄소원 조건: 포도당 (glucose), 아세테이트 (sodium acetate), 에탄올 (ethanol)을 조성된 bicarbonate buffer에 각각 1 mM 씩 주입
- [0057] 3) 광조건: $130\sim150 \mu E/m^2/s$ (중간 광), $30\sim50 \mu E/m^2/s$ (낮은 광)
- [0058] - rtPCR (real-time PCR) 유전자 프라이머 조건 [표 2]에 나타나 있음

표 2

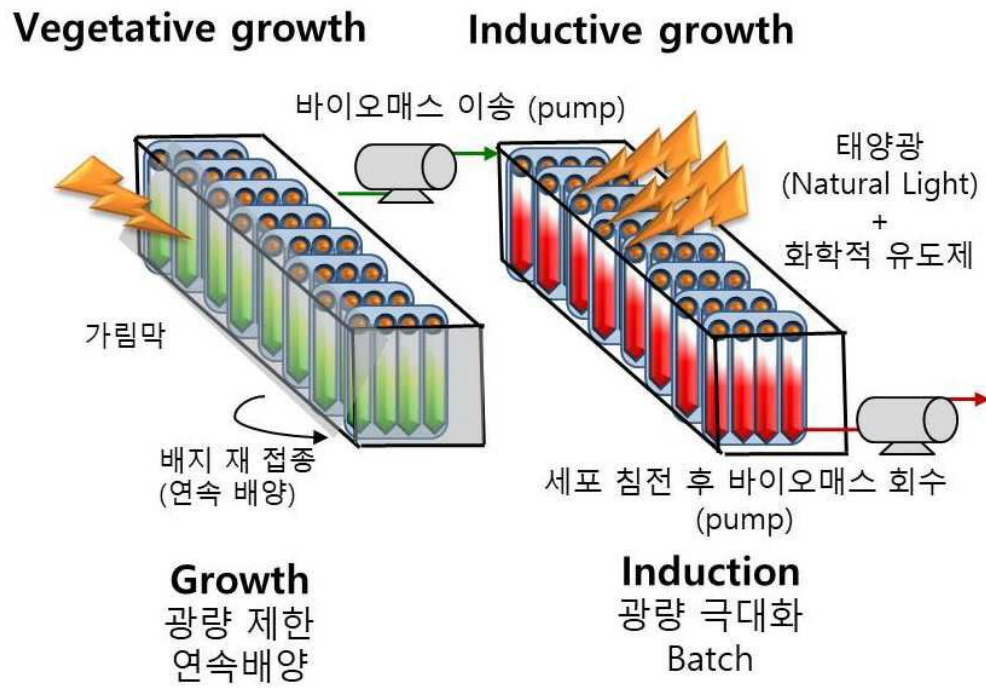
[0059]

Gene		Primer sequence (5'-3')
18S	Forward	TGCCTAGTAAGCGCGAGTCA
	Reverse	CCCACCGCTAAAGTCAATCC
ipi-1	Forward	GTGGACGAAGTCAGGTAC
	Reverse	CGTGTTCAGTCAGTGTTCAGG
ipi-2	Forward	CACTGACAAACACGAGGAT
	Reverse	AATATGATGCACCATTTGACTC
psy	Forward	ATGCCATTGAGAAGAATGACTA
	Reverse	TGACCACTTGCTGTTCTG
pds	Forward	GCCACCTCACAACTCAT
	Reverse	ACCTCCTACCTGTCTTGG
crtO	Forward	GGAGAAGGAGAAGGAGGT
	Reverse	GAAGGTGGTGGCTTGTAG
crtR-b	Forward	TGAAGCCAACGACTTGTT
	Reverse	ATGCCGTATAGCGTGATG

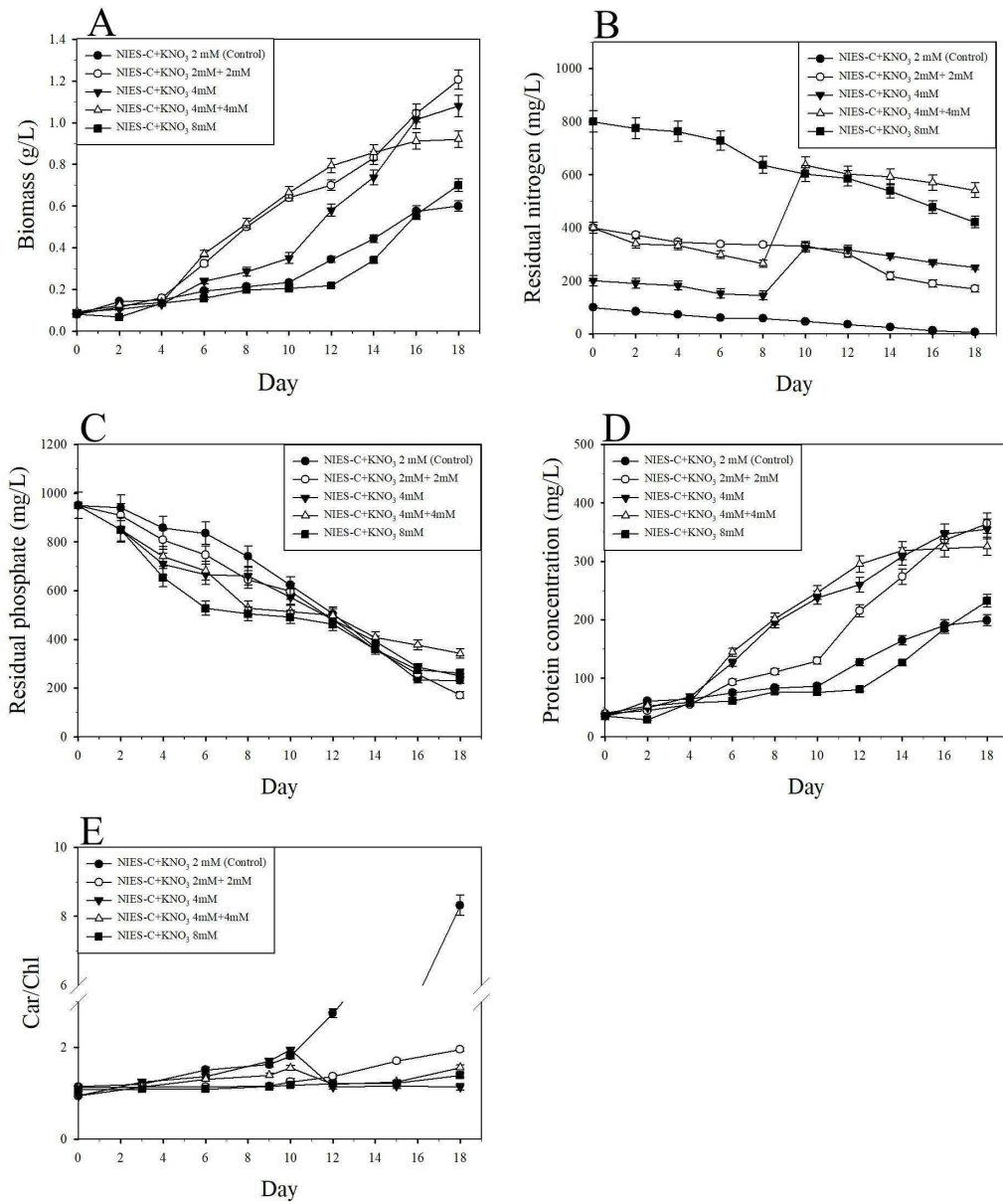
- [0060] 도 6에서 볼 수 있듯이 에탄올로 인한 활성 산소종 발생은 일정 농도일 때는 아스타잔틴 생합성을 유도하나, 과도한 양의 활성 산소종은 오히려 세포에 손상을 줄 수 있다. DCF 측정을 통해 세포 내부의 활성 산소종 양을 정량할 수 있는데, 에탄올 1 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM 조건에서 각각 바이오매스 생산량과 활성 산소종 농도를 측정했을 때, 에탄올 농도가 증가할수록 바이오매스 농도가 감소하는 것을 확인할 수 있다. 활성 산소종 농도는 인덱션 초기 0~2일 동안 높게 나타나며 그 이후 점차 세포 내에서 그 농도가 줄어드는 것을 확인할 수 있다.
- [0061] 이에 따라 세포 손상을 최소화하며 아스타잔틴 축적을 효율적으로 유도할 수 있는 에탄올 농도 최적화 조건이 도출되었으며, 자가 영양 조건과 에탄올 1 mM 첨가 조건을 비교하였다. 도 7에 나타난 바와 같이 활성 산소종 농도와 지질 과산화물 농도를 각각 측정하였으며, 자가 영양 조건과 비교하였을 때 에탄올 첨가 조건에서 활성 산소종과 활성 산소종으로 인한 polyunsaturated fatty acid 산화물인 MDA (malondialdehyde) 농도가 증가한 것을 확인할 수 있었고, 그 농도는 중간 광 조건에서 더 높았다. 이를 통해 활성 산소종은 광 조건에 따라 생성되는 정도가 다르며, 광 또한 세포의 산화 스트레스에 관여한다는 사실을 도출할 수 있었다. 낮은 광 조건은 비교적 세포에 적용되는 산화 스트레스가 낮기 때문에 아스타잔틴 축적에 불리하나, 에탄올과 같은 화학적 유도제를 사용하면 산화 스트레스의 정도를 증가시킬 수 있다.
- [0062] 도 8을 살펴보면, 산화 스트레스를 억제하는 sesamol과 광계 II를 억제하는 DCMU를 사용하였을 때, 세포 내 산화 스트레스는 급격히 감소한다. Sesamol은 항산화제로서 세포의 산화 스트레스를 억제하는 항산화 물질이며, 세포의 malic cycle을 저해하여 NADPH 공급량을 감소시킨다. 결과적으로 아스타잔틴 및 지질 합성에 소모될 수 있는 NADPH 양이 감소하게 된다. DCMU는 광계 II의 활성을 억제하는데, 결과적으로 광 조건과 관계없이 세포는 성장할 수 없게 된다. 이를 통해 헤마토크쿠스 세포의 유도기 동안 광계 II의 관여는 필수적이며, 일정 정도 이상의 광량 조사는 아스타잔틴 생산을 위해 필요하다는 사실을 도출할 수 있다.
- [0063] 도 9는 에탄올 첨가 조건에서 헤마토크쿠스의 아스타잔틴의 생합성에 관여하는 유전자의 활성을 관찰하였다. 자가 영양 조건과 비교하였을 때, rt-PCR 데이터를 통해 아스타잔틴 생합성에 관여하는 유전자의 전사 정도가 유도기 진입 후 초기 12시간 내 급격히 증가하는 것을 확인하였다. 아스타잔틴 생합성의 탄소원 기질을 제공하는 효소 (IPP isomerase)를 생산하는데 관여하는 유전자인 ipi 및 카로테노이드를 아스타잔틴으로 변형시키는데 관여하는 효소 (CRT-R-B (β -carotene hydroxylase): β -carotene을 아스타잔틴으로 전환시키는 β -carotene ketolases/oxygenases)를 생산하는데 관여하는 유전자인 crtB-0의 활성이 각각 9 배, 17.5 배 증가하였다. 이를 통해 에탄올은 활성 산소종을 발생시키며 아스타잔틴 생합성에 관여하는 유전자의 활성을 증대시킴으로서 아스타잔틴 축적량 증대에 도움을 주며 에탄올을 화학적 유도제로 적절히 활용하였을 때, 옥외 광 부족 조건에서 아스타잔틴 생산을 증가시킬 수 있다.

도면

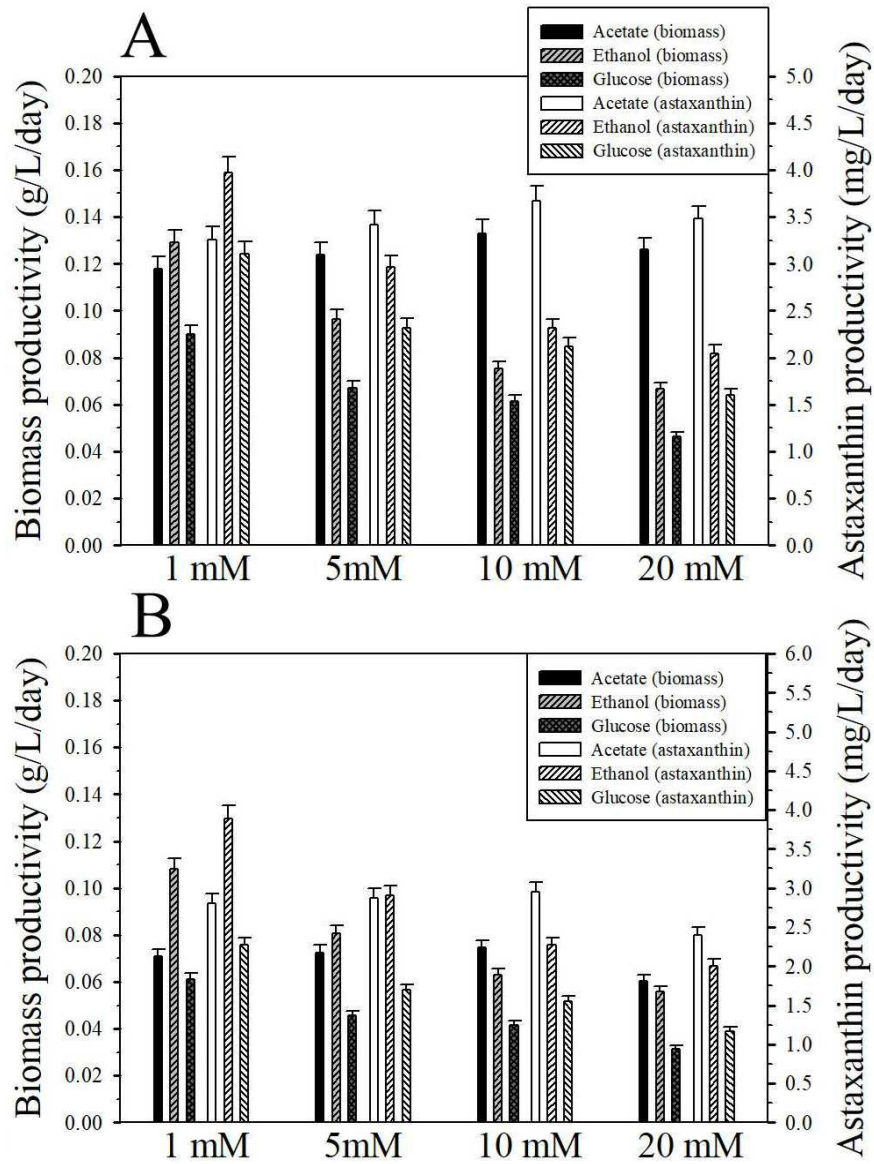
도면1



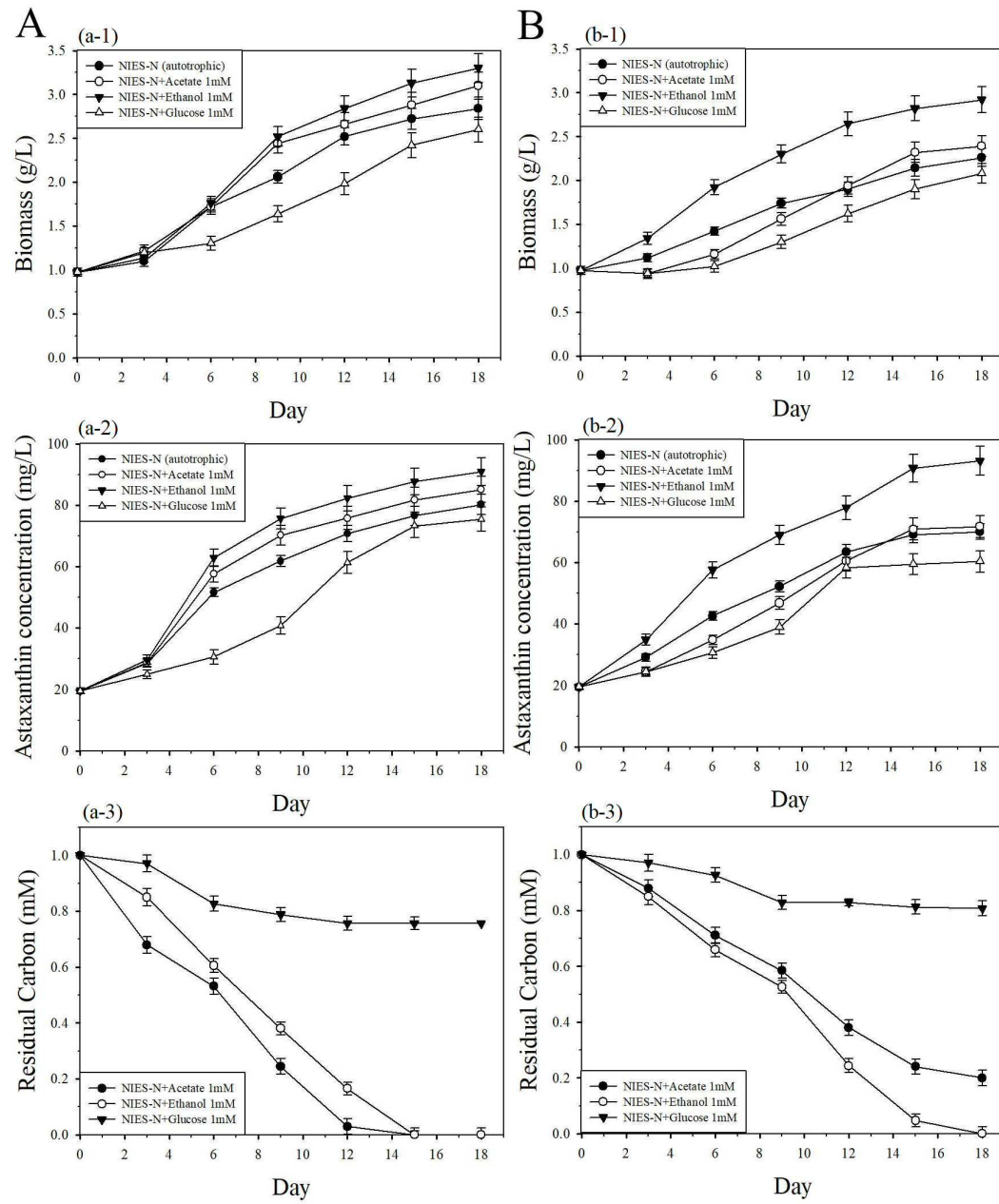
도면2



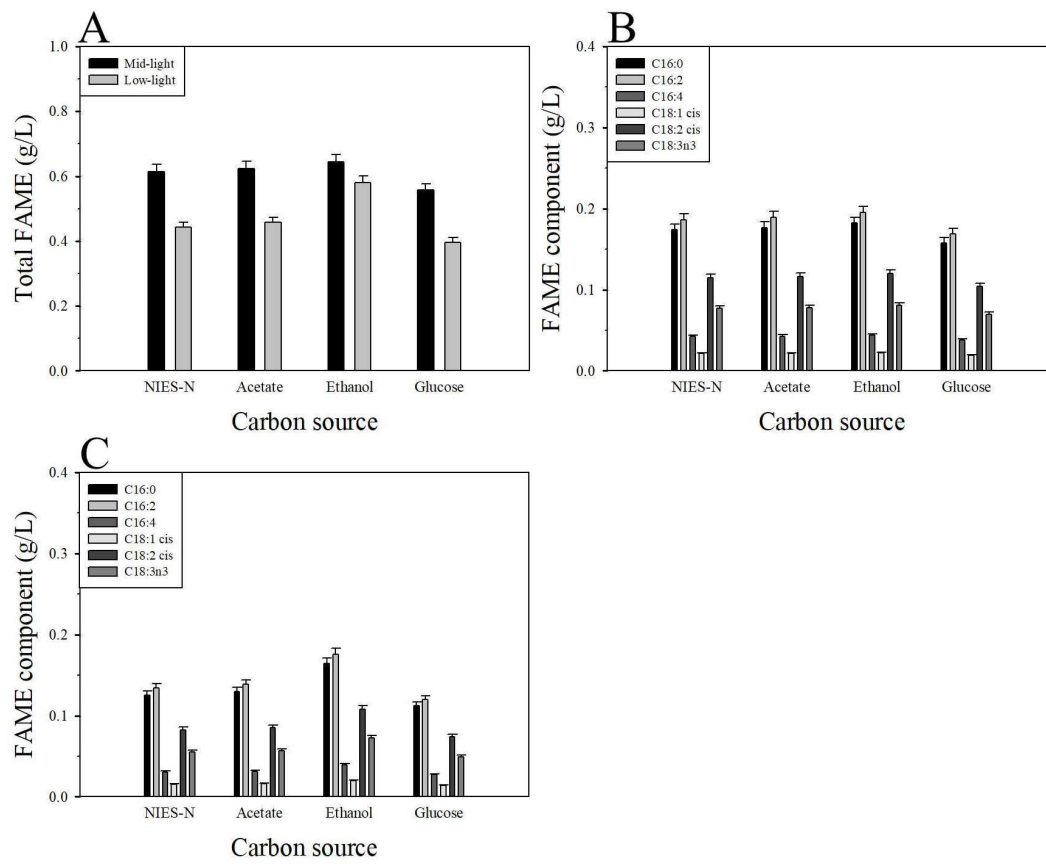
도면3



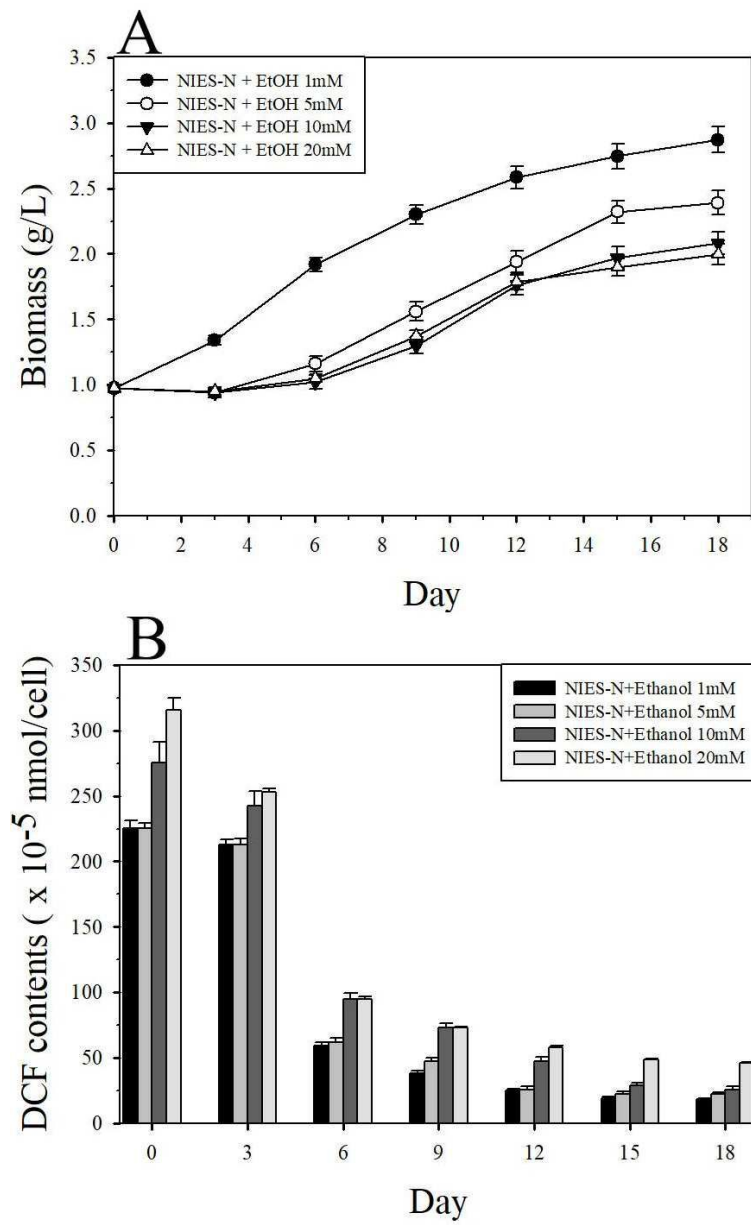
도면4



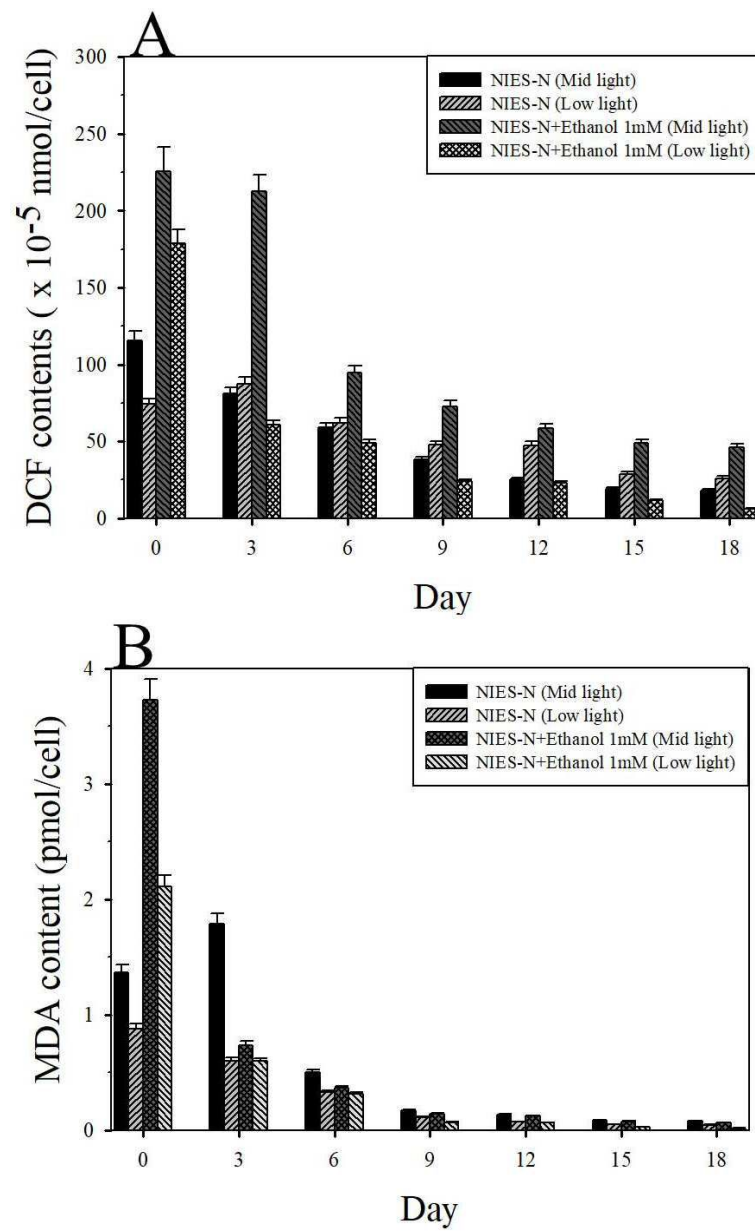
도면5



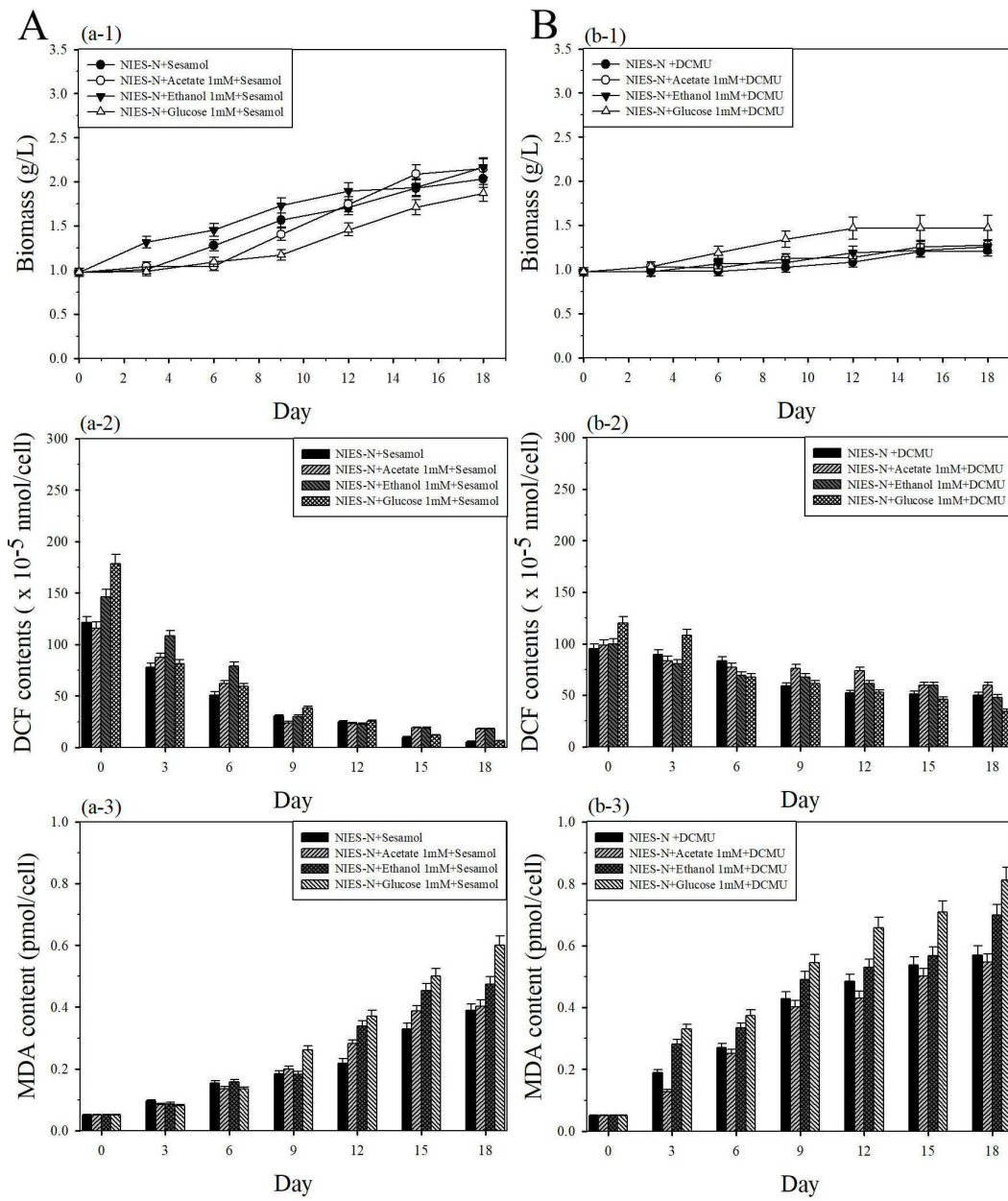
도면6



도면7



도면8



도면9

