



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0023232
(43) 공개일자 2018년03월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/12 (2006.01) C12N 1/38 (2006.01)
C12P 23/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/12 (2013.01)
C12N 1/38 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0108225
(22) 출원일자 2016년08월25일
심사청구일자 2016년08월25일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
주식회사 아스타바이오
전라북도 전주시 덕진구 백제대로 567, 210호(금암동, 전북대학교반도체물성연구소)
(72) 발명자
최윤이
서울특별시 성북구 안암로 145 고려대학교 생명과학과 서관 414호
이창수
서울특별시 성북구 안암로 145 고려대학교 생명과학과 서관 L401호
(74) 대리인
특허법인 동원

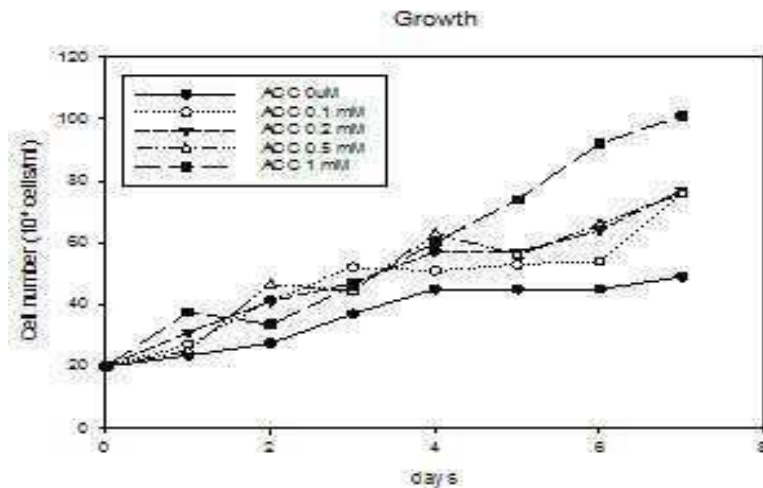
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 미세조류 해마토코쿠스의 아스타잔틴 축적 향상 방법

(57) 요약

본 발명을 통하여 에틸렌의 전구체인 ACC가 아스타잔틴을 생합성하는 미세조류 해마토코쿠스에서 세포의 성장 촉진과 그로 인하여 아스타잔틴의 생산을 촉진한다는 것을 확인할 수 있었다. 이는 기존의 비생물학적 요인들에 의하여 조절되어졌던 방식에서 크게 벗어나 생물학적 요인에 의하여 아스타잔틴의 생합성을 촉진한다는 점에서 크게 의의가 있다. 또한, 이러한 방법은 기존의 연구들과 결합하여 진행하였을 경우 향후 산업적 응용 가능성에 비추어 볼 때 그 의미가 매우 크다고 할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12P 23/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

에틸렌전구체(ACC) 전처리를 통해 미세조류 해마토코쿠스의 성장을 촉진하고 그에 따라 아스타잔틴의 축적을 향상시키는 방법

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 에틸렌전구체의 농도가 증가함에 따라 아스타잔틴의 농도가 증가후 감소하는 것을 특징으로 하는 아스타잔틴의 축적을 향상시키는 방법

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 아스타잔틴의 농도가 최대로 되는 에틸렌전구체의 농도가 1mM인 것을 특징으로 하는 아스타잔틴의 축적을 향상시키는 방법

청구항 4

에틸렌을 분비하는 물질에 의한 전처리로 미세조류 해마토코쿠스의 성장을 촉진하고 그에 따라 아스타잔틴의 축적을 향상시키는 방법

청구항 5

제4항에 있어서,

에틸렌 전구체의 예와 같이 일정한 에틸렌 농도에서 아스타잔틴의 농도가 최대로 증가하는 것을 특징으로 하는 아스타잔틴의 축적을 향상시키는 방법

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 ACC (1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid)라고 하는 식물호르몬인 에틸렌의 전구체 처리를 통해 해마토코쿠스 조류의 성장 촉진과 아스타잔틴의 생산기간 단축에 관한 것이다. 해마토코쿠스 미세조류에 ACC를 처리하면 세포 분열이 촉진되고, 높아진 세포밀도에 의하여 스트레스의 척도가 되는 ROS 발현이 증가되며, 이로 인하여 카로티노이드 생합성 유전자의 발현이 증가되어 최종적 산물인 아스타잔틴이 기존 배양 기술에 비해 빠르게 생성되는 배양기간 단축에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

아스타잔틴(Astaxanthin, 3,3'-dihydroxy- β , β '-carotene-4,4'-dione)은 적색을 띄는 케토카로티노이드(Ketocarotenoid) 물질로 베타카로틴(β -carotene)과 같은 화학적 구조를 가지는 카로티노이드계 색소의 일종으로, 유해 활성산소를 없애는 항산화 기능성 물질로 베타카로틴에 비해 양쪽 말단에 하이드록실기(-OH)와 케톤기(=O)를 하나씩 더 가지는 구조를 가진다. 이러한 구조적 특성으로 기존의 항산화 물질보다 월등히 높은 항산화 활성을 갖는 것으로 보고되어 진다. 또한 아스타잔틴은 대표적인 항산화제로 보고된 비타민 E보다 500배, 베타카로틴보다 20배 높은 항산화 활성을 지니고 있으며, 건강식품, 의약품, 화장품, 식품 첨가제 및 동물과 치어의 사료 첨가제로 사용되고 있어, 전 세계적으로 그 수요량 및 활용 범위가 급격히 확대될 것으로 예상되고 있다.

[0003]

아스타잔틴은 연어, 새우, 가재, 도미, 생선 알, 송어, 홍색의 미세조류, 효모에서 확인이 이루어지며, 자연적으로 가장 높은 함량을 만들어내는 균주로는 해마토코쿠스로 보고되어 진다. 해마토코쿠스는 낮은 성장 속도와 두꺼운 세포벽 및 낮은 세포 밀도와 같은 문제점으로 인해 산업성이 미약하나, 높은 아스타잔틴 축적량과 해마

토코쿠스만이 갖는 3S, 3S'의 아스타잔틴 이성질체가 지질환경에서의 안정성을 높이는 것으로 추정되어 가장 장래성 있는 생산 방법으로 판단된다. 따라서 해마토코쿠스 종에 의한 상업화를 이루기 위하여 고농도 배양과 아스타잔틴의 고농도 생산 및 배양 기간의 단축은 필수적이라고 할 수 있다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0004] (비특허문헌 0001) 1. Abeles, F.B., Morgan, P.W., Saltveit Jr, M.E. 2012. Ethylene in Plant Biology. Academic Press
- (비특허문헌 0002) 2. GAO, Z.-q., MENG, C.-x. 2007. Impact of extraneous ethylene concentrations to astaxanthin accumulation of *Haematococcus pluvialis* [J]. Food Science. 10: 093.
- (비특허문헌 0003) 3. Johnson, P.R., Ecker, J.R. 1998. The ethylene gas signal transduction pathway: a molecular perspective. Annu Rev Genet 32: 227-254.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0005] 현재 해마토코쿠스를 이용한 아스타잔틴의 생산은 대부분이 무생물적 요건을 조절하여 바이오매스를 증가시키거나 아스타잔틴의 농도를 높이는 것에만 집중되어 발명되어 지고 있다. 하지만, 전 세계적으로 해마토코쿠스를 산업화에 성공한 사례는 극히 일부의 나라에서만 이루어지고 있다. 국내에서는 아직까지 발명단계에 그치고 있으며 무생물학적 요건들만을 조절하는 국제적인 흐름에 따라가고 있는 실정이다. 본 발명에서는 기존의 무생물학적 요건의 조절이 아닌 식물호르몬의 전구체를 사용하여 미세조류의 성장을 촉진시키고, 그로 인하여 아스타잔틴의 생합성 속도를 증진시키는 것에 있다. 또한, 생물학적 요인의 조절을 통하여 조금 더 안정적인 조절을 통하여 아스타잔틴의 생산을 증가시킨다는 점에 의의가 있다.

과제의 해결 수단

- [0006] 본 발명은 아스타잔틴의 축적을 향상시키는 방법으로서, 에틸렌전구체(ACC) 전처리를 통해 미세조류 해마토코쿠스의 성장을 촉진시킨다.
- [0007] 또한 본 발명은 상기 에틸렌전구체의 농도가 증가함에 따라 아스타잔틴의 농도가 증가후 감소하는 것을 특징으로 한다.
- [0008] 또한 본 발명은 상기 아스타잔틴의 농도가 최대가 되는 에틸렌전구체의 농도가 1mM인 것을 특징으로 한다.
- [0009] 또한 본 발명은 아스타잔틴의 축적을 향상시키는 방법으로서, 에틸렌 (에틸렌 분비물질 사용 : 바나나 껍질) 전처리로 미세조류 해마토코쿠스의 성장을 촉진시킨다.
- [0010] 또한 본 발명은 에틸렌 전구체의 예에서와 같이 일정 양의 에틸렌 농도에서 아스타잔틴의 농도가 최대로 증가하는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

- [0011] 본 발명을 통하여 에틸렌의 전구체인 ACC가 아스타잔틴을 생합성하는 미세조류 해마토코쿠스에서 세포의 성장 촉진과 그로 인하여 아스타잔틴의 생산을 촉진한다는 것을 확인할 수 있었다. 이는 기존의 비생물학적 요인들에 의하여 조절되어졌던 방식에서 크게 벗어나 생물학적 요인에 의하여 아스타잔틴의 생합성을 촉진한다는 점에서 크게 의의가 있다. 또한, 이러한 방법은 기존의 발명들과 결합하여 진행하였을 경우 향후 산업적 응용 가능성에 비추어 볼 때 그 의미가 매우 크다고 할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0012] 도 1 내지 2. 미세조류 해마토코쿠스(*Haematococcus pluvialis*)에서의 ACC 처리를 통한 세포 성장의 증가(도 1) 및 ROS 발현 변화(도 2). (Growth curve에서 induction 시기는 exponential stage로 하였고, ACC 처리 시

세포의 농도는 10×10^4 cells를 사용함. ACC 처리 농도는 표1의 1-5 순서로 처리함)

도 3 내지 5. 미세조류 해마토코쿠스(*H. pluvialis*)에서의 ACC 처리를 통한 아스타잔틴의 생합성 증가. (도 3. ACC 처리에 따른 해마토코쿠스의 발현 변화, 도 4. ACC 처리에 따른 세포들의 형태학적 발현 변화, 도 5. ACC 처리에 따른 아스타잔틴의 발현 변화)

도 6 내지 7. 미세조류 해마토코쿠스(*Haematococcus pluvialis*)에서의 ACC 처리에 따른 카로티노이드 유전자 발현량 변화. (도 6. BKT, 도 7. CHY.)

도 8 내지 12. 미세조류 해마토코쿠스(*Haematococcus pluvialis*)에서의 바나나껍질 처리에 따른 발현 변화. (도 8. 바나나 껍질을 이용한 실험의 전체적인 구성, 도 9. 바나나 껍질을 처리했을 때 해마토코쿠스 세포의 형태학적인 변화, 도 10. 바나나 껍질 처리에 따른 해마토코쿠스 세포의 성장률,

도 11. 아스타잔틴의 축적량, 도 12. ROS 발현 변화.)

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 본 발명은 식물호르몬의 전구체 처리를 통한 해마토코쿠스 미세조류의 성장촉진과 그로 인하여 발생하는 ROS 증가로 생성되는 산업적 활용이 가능한 아스타잔틴 생산 촉진에 관련된 것이다. 해마토코쿠스에서 아스타잔틴을 유도하기 위하여 기존에 pH, 광량, 온도, 질소, 무기물질 등 배양 조건의 조절을 통한 방법 등이 많이 사용되어져 왔다. 하지만, 본 발명방법은 생물학적 요소인 식물의 호르몬, 즉, 에틸렌의 특성에 착안한 방법으로 식물의 노화, 열매숙성과 관련된 에틸렌이 해마토코쿠스 미세조류에 직접적 처리를 하였다.

[0014] 본 발명에서는 에틸렌의 전구체인 ACC를 해마토코쿠스에 처리하여 결과를 보고자 하였다. 이는 에틸렌이 자연에서 가스 상태로 존재하기 때문에 정확한 농도에 따른 영향을 보기 위한 방안이다. 본 발명에서는 에틸렌의 전구체인 ACC가 해마토코쿠스의 성장과 아스타잔틴의 생합성에 specific하게 어떠한 변화를 주는지에 대하여 규명하였다. 또한, 산업적으로 적용할 수 있도록 에틸렌을 많이 발생하는 바나나 껍질을 활용하여 ACC와 비슷한 결과를 나타내는지도 수행하였다. 이하, 본 발명에 대하여 상세하게 설명하였다.

[0015] 본 발명에서 모든 세포는 25℃, 빛 세기 $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 에서 1vvm의 공기를 주입하여 배양되었다. ACC의 처리 농도는 하단의 표 1과 같이 0 mM, 0.1 mM, 0.2 mM, 0.5 mM, 1 mM로 정하였으며, 각각의 농도를 1, 2, 3, 4, 5의 다섯 가지 처리로 편의상 지칭하였다.

표 1

[0016] 본 발명에서 사용한 ACC 처리 농도

Treatments	1	2	3	4	5
ACC	0 mM	0.1 mM	0.2 mM	0.5 mM	1 mM

[0017] 해마토코쿠스의 성장은 세포수 계산법 (cell counting)을 통하여 이루어 졌으며, 아스타잔틴 농도 측정은 세포 파쇄 후 spectrophotometer를 이용한 정량적 측정법, ACC가 해마토코쿠스에 스트레스를 주는 정도는 NBT(nitroblue tetrazolium)염색을 하여 세포파쇄 후 spectrophotometer를 통하여 측정되었다.

[0018] 실시 1. 해마토코쿠스의 성장 비교. 해마토코쿠스에서 ACC의 처리는 표1과 같이 1-5의 농도별 처리를 통하여 이루어졌다. 세포의 성장은 매일 세포를 수확하여 세포수 계산법(cell counting)을 통하여 이루어 졌으며, ACC의 농도에 따라 해마토코쿠스의 성장이 증가되는 것을 확인할 수 있다 (도면 1). ACC 처리에 따른 해마토코쿠스 세포가 받는 스트레스 정도는 NBT(nitroblue tetrazolium)염색을 하여 세포파쇄 후 560 nm의 흡광도에서 측정되었다. NBT 염색법은 세포내 SOD(superoxidase dismutase)를 측정하는 방법으로 ROS의 대표적인 SOD, CAT(catalase), peroxidase중 하나이다. 본 연구에서 ROS의 발현량 변화는 도 2와 같이 낮은 농도의 ACC에서는 ROS가 증가하는 것으로 확인되며, 높은 농도에서는 오히려 ROS가 감소하는 것으로 보인다. 이는 해마토코쿠스가 생합성한 아스타잔틴에 의하여 ROS값이 떨어진 것으로 보인다 (도 2).

[0019] 실시 2. ACC 처리에 따른 해마토코쿠스 세포의 형태학적 변화 및 아스타잔틴 발현 변화. ACC는 해마토코쿠스에서 빠른 성장 때문에 높은 스트레스를 갖게 된다. 이는 세포간 간섭 현상, 빛의 저해, 영양분의 고갈등 다양한 원인이 있을 것으로 사료되며, ACC 처리시 낮은 농도에서는 아직 녹색 상태의 해마토코쿠스 세포가 농도가 높아질수록 점점 더 갈색으로 변화되는 모습을 볼 수 있다 (도 3, 4). 이렇게 변화된 모습은 세포내 아스타잔틴의

농도를 증가시키게 되고, ACC농도에 따라서 아스타잔틴이 증가되었음을 확인할 수 있다 (도 5). 하지만, ACC 처리 직 후 빠르게 증가되는 것이 아니라 세포의 성장이 이어진 다음 아스타잔틴의 농도가 증가했다는 점에서 ACC는 아스타잔틴의 생합성을 위한 직접적인 요인이 아닌 간접적으로 관여했다는 것을 확인할 수 있었다.

[0020]

실시 3. ACC 처리에 따른 해마토코쿠스의 카로티노이드 생합성 유전자의 발현. 카로티노이드 생합성 유전자 중 아스타잔틴의 생합성에 직접적으로 영향을 미치는 대표적인 유전자는 *BKT*와 *CHY* 유전자를 들 수 있다. *BKT*는 베타카로틴에서 크산토잔틴으로, *CHY*는 크산토잔틴에서 아스타잔틴으로 생합성하는데 관여하는 유전자이다. 도 6과 7과 같이 *BKT*와 *CHY* 유전자는 ACC 처리 농도에 따라 급격하게 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있다. 이렇게 카로티노이드 유전자 발현의 증가로 인하여 아스타잔틴의 농도를 도 5와 같이 얻을 수 있었다.

[0021]

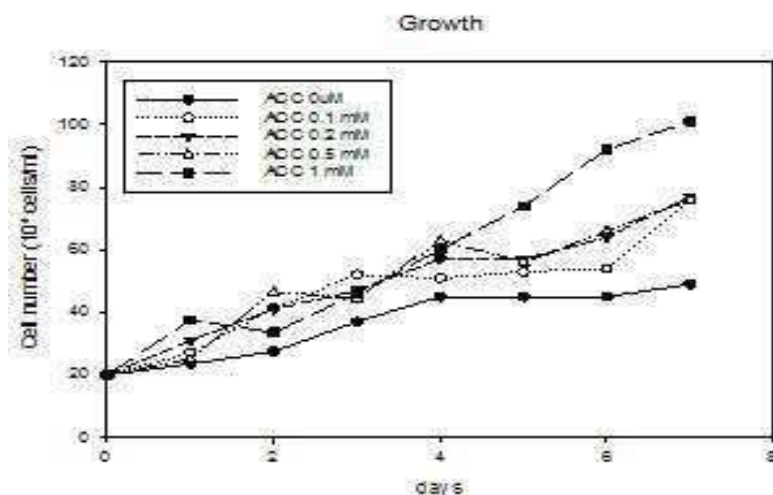
실시 4. 바나나 껍질을 이용한 해마토코쿠스의 발현 변화. 에틸렌의 전구체가 아닌 실제 에틸렌이 들어갔을 때에도 비슷한 결과를 얻을 수 있는지 확인하고자 하였다. 본 연구에서는 산업적 경제성을 고려하여 에틸렌 가스가 많이 생산되는 바나나 껍질을 에틸렌 가스 대신 사용하였고, 전체적인 구성은 도 8과 같다. 에틸렌 가스의 농도에 따른 변화를 보기 위하여 서로 다른 양의 바나나 껍질을 준비하였고, 각 농도에 따른 세포의 발현 변화는 도 9처럼 바나나 껍질이 없는 경우와 비교하였을 때 많은 세포들이 갈색으로 변화되는 것을 확인할 수 있다. 이는 바나나 껍질에서 생산되는 에틸렌 가스에 의한 영향으로 전구체인 ACC를 처리하였을 때와 비슷한 경향으로 나타났다. 에틸렌 가스에 의한 성장률은 낮은 농도와 높은 농도에서 비슷하게 나타났으며, 대조군인 바나나 껍질이 없는 곳보다 비교적 높은 수치로 확인되었다. 429g의 바나나 껍질을 이용한 경우와 1048g의 바나나 껍질을 사용했을 때 성장률이 비슷한 이유는 어느 정도의 농도 이상에서는 차이가 줄어드는 것으로 보인다 (도 10). 아스타잔틴은 429g에서 가장 높은 축적량을 보였고, 1048g에서 그 다음 높은 수치를 보였다 (도 11). ROS 역시 아스타잔틴이 가장 높았던 바나나 껍질 429g에서 가장 낮았고, 1048g, 그리고 바나나 껍질을 처리하지 않은 해마토코쿠스의 순으로 확인되었다 (도 12). 이러한 결과는 ACC와 비슷한 경향을 나타내며, ACC를 5mM의 농도를 투여하였을 때는 오히려 1mM 보다 낮은 아스타잔틴을 합성하는 것을 확인하였다 (data not shown). 즉, 에틸렌은 해마토코쿠스의 성장을 촉진하여 아스타잔틴을 생합성하지만, 일정 농도 이상에서는 오히려 아스타잔틴의 생합성을 저해하기도 한다. 이러한 결과로 우리는 효과적인 아스타잔틴의 생합성을 위하여 적절한 농도의 에틸렌이 필요하다는 것을 규명하였다.

[0022]

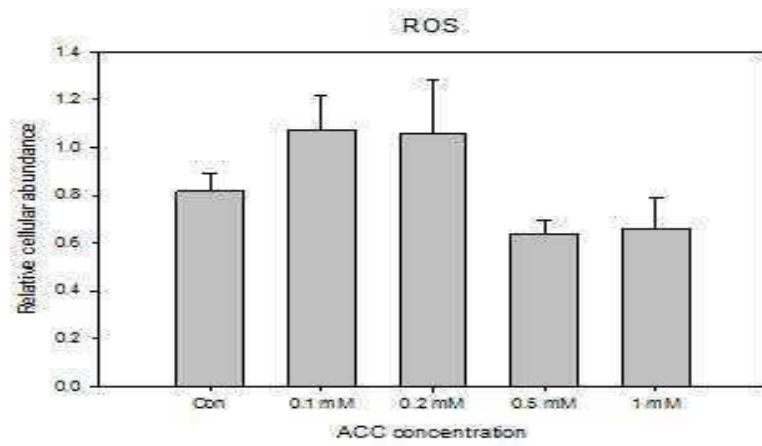
본 발명을 통해 에틸렌을 이용한 해마토코쿠스의 아스타잔틴 생합성에 대한 이해를 높이고, 적절한 농도의 적용을 통하여 산업적으로 이용가능하다는 것을 확인할 수 있었다.

도면

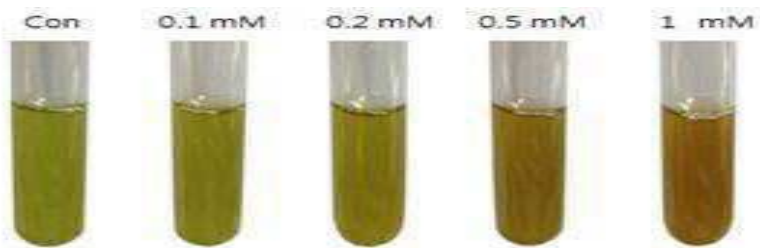
도면1



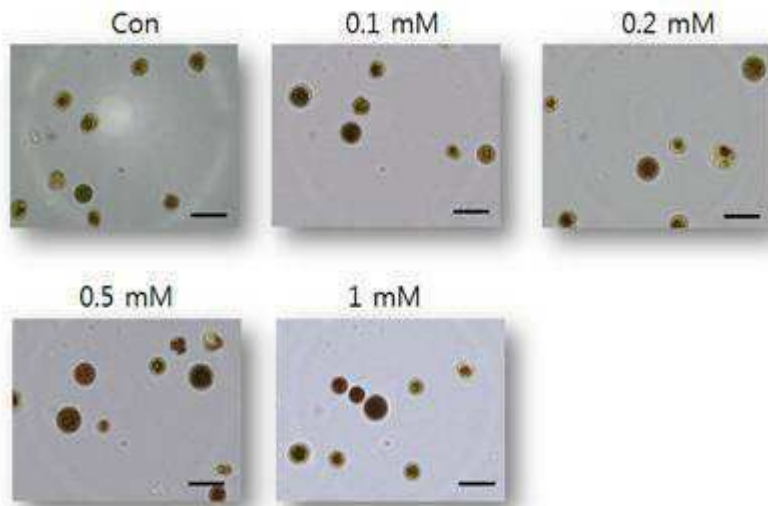
도면2



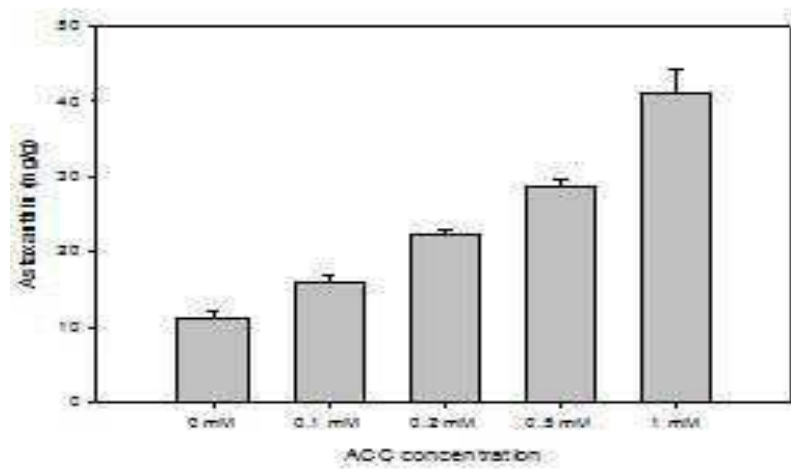
도면3



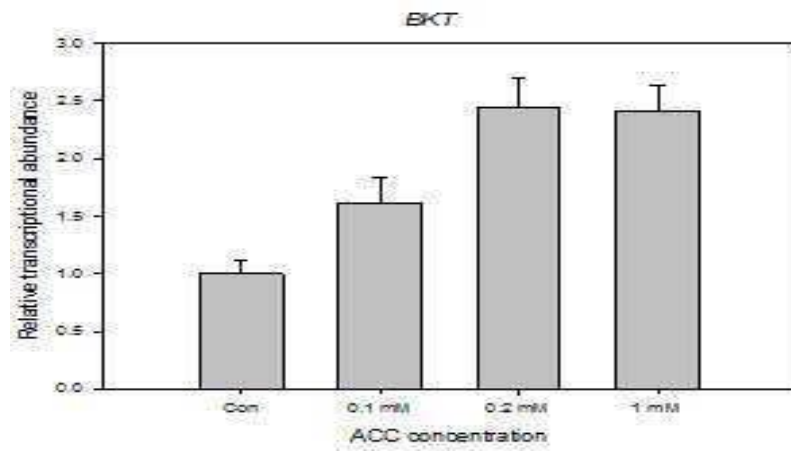
도면4



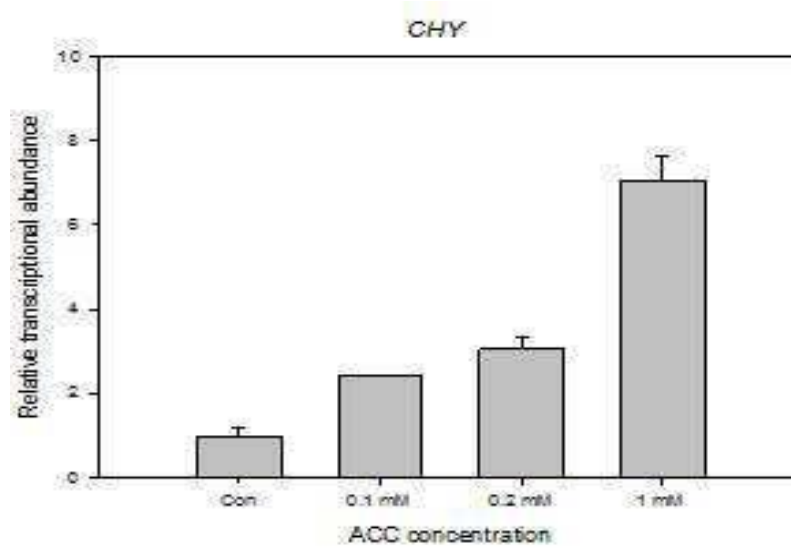
도면5



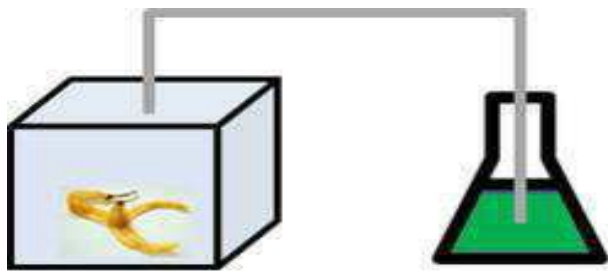
도면6



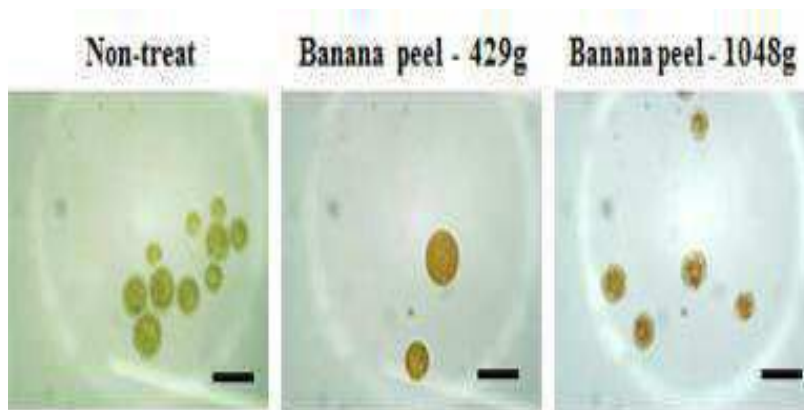
도면7



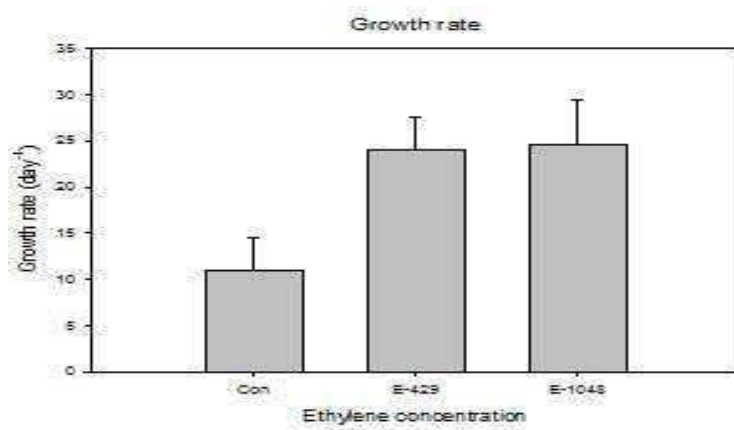
도면8



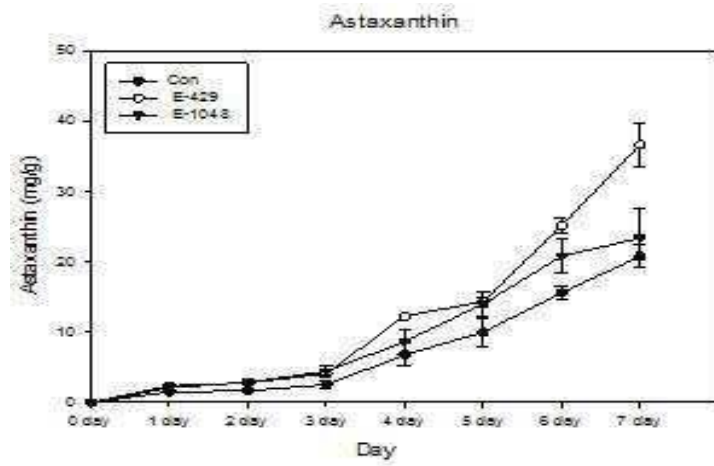
도면9



도면10



도면11



도면12

