

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0075869 (43) 공개일자 2014년06월20일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12P 23/00 (2006.01) C12N 1/12 (2006.01) C12R 1/89 (2006.01) (21) 출원번호 10-2012-0142798 (22) 출원일자 2012년12월10일 심사청구일자 없음		(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가) (72) 발명자 심상준 서울특별시 강남구 선릉로 221 도곡렉슬아파트 301동 803호 최승필 경기도 안양시 동안구 귀인로 157 목련우성아파트 707동 905호 박준철 서울특별시 강동구 고덕로 131 강동롯데캐슬퍼스트아파트 101동 301호 (암사동) (74) 대리인 이처영, 장제환

전체 청구항 수 : 총 6 항

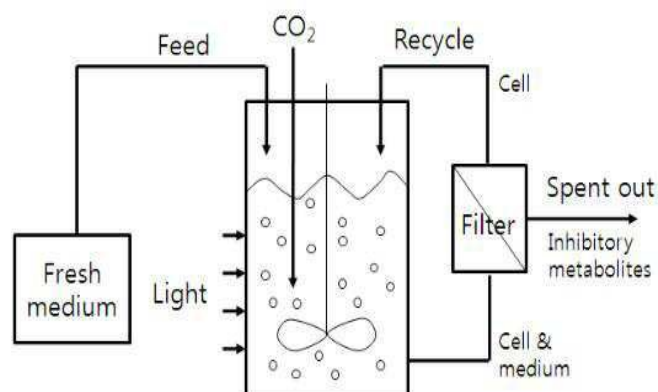
(54) 발명의 명칭 아스타잔틴 생산을 위한 헤마토코쿠스 플루비알리스의 퍼퓨전 배양법

(57) 요약

본 발명은 퍼퓨전 공정에 의하여 세포를 재순환시켜서 아스타잔틴 생산성이 향상된 미세조류의 혼합영양 배양방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 영양세포 단계의 미세조류 세포를 퍼퓨전 공정에 의하여 연속적으로 재순환시킴으로써 세포를 고농도로 광배양하고, 광도를 단계적으로 증가시켜 아스타잔틴의 유발을 최적화 시키는 배양방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*)의 퍼퓨전 배양법은 광도의 순차적인 증가에 따른 세포의 안정화와 아스타잔틴 유발효과의 극대화로 인해 아스타잔틴 생산성이 우수하여, 이 배양법을 혼합영양조건에서 연속식 혹은 대규모 광배양의 광유발에 활용한다면 보다 경제적인 아스타잔틴의 생산성을 기대할 수 있고, 아스타잔틴은 강력한 항산화물질로서 의학, 식품학 등의 산업분야에서 다양하게 활용할 수 있다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012T100201516

부처명 지식경제부

연구사업명 에너지자원융합원천 기술개발사업

연구과제명 미세조류를 이용한 이산화탄소의 고부가가치 상품 전환 공정의 실증

기 여 율 1/1

주관기관 한국지역난방공사

연구기간 2012.06.01 ~ 2017.05.31

특허청구의 범위

청구항 1

세포추출기를 이용하여 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*)를 퍼퓨전 배양하는 것을 특징으로 하는 아스타잔틴의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*)의 균체수가 증가할 수록 광세기를 순차적으로 증가시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 광세기는 $30 \mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ ~ $600 \mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ 의 범위에서 균체수의 증가에 따라 순차적으로 증가시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 사용되는 배지의 아세테이트 농도는 400mg/L~1.5g/L 인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 사용되는 배지의 나이트레이트 농도는 100mg/L~300mg/L 인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 사용되는 배지의 포스페이트 농도는 10~30mg/L 인 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 세포추출기를 이용하여 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*)를 퍼퓨전 배양하는 것을 특징으로 하는 아스타잔틴의 제조방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 영양세포 단계의 미세조류 세포를 퍼퓨전 공정에 의하여 연속적으로 재순환시킴으로써 세포를 고농도로 광배양하고, 광도를 단계적으로 증가시켜 아스타잔틴의 유발을 최적화 시키는 것을 특징으로 하는 아스타잔틴의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 아스타잔틴(Astaxanthin, 3,3'-dihydroxy- β, β' -carotene-4,4'-dione)은 적색을 띠는 케토카로티노이드(Ketocarotenoid) 계통의 비식물성 색소로, 베타-카로틴(β -carotene)과 같은 화학적 구조를 가진 카로티노이드계 색소의 일종으로, 유해 활성산소를 없애는 항산화 기능성 물질로 베타-카로틴에 비해 양쪽 말단기에 하이드록실기(-OH)와 케톤기(=O)를 하나씩 더 가지고 있다.

[0003] 아스타잔틴은 이러한 독특한 분자 구조적 특성 때문에 기존의 항산화 물질보다 월등히 높은 항산화 활성을 갖는

다 (비타민 E보다 500배, 베타-카로틴보다 20배). 이러한 높은 항산화 활성기능으로 인해 아스타잔틴은 의약품, 식품 첨가제, 착색제 및 동물과 치어의 사료 첨가제로 널리 사용되고 있고, 그 수요량 및 활용 범위가 급격히 확대될 것으로 예상되고 있다.

[0004] 이러한 아스타잔틴은 파피아 로드지마(*Phaffia rthodozyma*), 브레비박테리아(*Brevibacterium*), 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*) 등에 의해 자연적으로 생성된다(Sedmak, JJ. *et al.*, *Biotechnology Techniques*, 4:107, 1990; Nelis, HJ and De Leenheer, A. P., *Appl. Environ. Microbiol.*, 55:2505, 1989.; Kobayashi, M. *et al.*, *J. Ferment. Bioengin.*, 71:335, 1991).

[0005] 또한, 새우나 가재 등의 갑각류에서 추출되기도 하지만 그 함량이 적고, 추출 과정이 어려워 적용되지 않고 있으며, 파피아 로드지마는 세포성장률이 높으나 아스타잔틴의 생산성이 적고, 단단한 세포벽 때문에 추출에도 많은 어려움이 있다. 지구상 생물들 중에서 미세조류인 헤마토코쿠스 플루비알리스는 아스타잔틴의 축적함량과 수율이 가장 높으며, 특히 이 균주는 광합성을 하기 때문에 빛에 의한 이산화탄소의 고정화와 동시에 아스타잔틴의 생산성을 높이기 위한 다양한 연구가 수행되고 있다(Kobayashi, M. *et al.*, *J. Ferment. Bioengin.*, 71:335, 1991; Okaizola M., *J. Appl. Phycol.*, 12:499, 2000) 그러나, 이러한 아스타잔틴의 생물학적 생산은 화학적 생산에 비하여 생산비용이 아직까지는 높은 실정이다.

[0006] 일반적으로 일차적으로 광배양되는 헤마토코쿠스 플루비알리스로부터 아스타잔틴을 생산하기 위해서는 이차적으로 유발단계가 필요한데 유일한 유발원은 바로 강력한 빛이다. 하지만 탄소원을 공급해주는 자가영양조건에서는 빛에 의한 유발에 의하여 아스타잔틴의 축적함량은 높아질 수 있지만, 목표함량에 도달하기까지 상당히 많은 시간이 소요된다는 단점이 있다. 특히, 태양을 활용한 옥외배양시에는 태양이란 광원이 빛의 세기가 일정하지 않고, 연속적이지 않기 때문에 이러한 문제는 더욱 심각해진다. 그러나 혼합영양조건에서 고농도로 미세조류를 배양하는 방법을 통한다면 이러한 낮은 생산성의 문제는 해결 가능하다.

[0007] 따라서, 가장 우수한 아스타잔틴 축적 능력을 보유한 헤마토코쿠스 플루비알리스를 산업적으로 이용하기 위해서는 이산화탄소뿐만 아니라 유기물질을 활용한 혼합영양 조건에서 아스타잔틴의 느린 생산성 문제를 해결할 수 있는 고농도 세포 배양법을 개발하는 것이 시급히 필요한 실정이다.

[0008] 이에, 본 발명자들은 미세조류를 이용하여 아스타잔틴을 고효율로 생산하는 방법을 개발하고자 예의 노력한 결과, 아스타잔틴 생산능을 가지는 미세조류인 헤마토코쿠스 플루비알리스를 퍼퓨전 공정에 의하여 탄소원과 미세조류를 연속적으로 재순환시켜, 고농도로 배양한 후, 배양조의 광도를 단계적으로 증가시키는 경우, 아스타잔틴의 고농도로 생산할 수 있다는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 미세조류를 이용하여 아스타잔틴을 고효율로 생산하는 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 세포추출기를 이용하여 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*)를 퍼퓨전 배양하는 것을 특징으로 하는 아스타잔틴의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명에 따른 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*)의 퍼퓨전 배양법은 광도의 순차적인 증가에 따른 세포의 안정화와 아스타잔틴 유발효과의 극대화로 인해 아스타잔틴 생산성이 우수하여, 이 배양법을 혼합영양조건에서 연속식 혹은 대규모 광배양의 광유발에 활용한다면 보다 경제적인 아스타잔틴의 생산성을 기대할 수 있고, 아스타잔틴은 강력한 항산화물질로서 의학, 식품학 등의 산업분야에서 다양하게 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0012] 도 1은 광도를 조절할 수 있고 세포 배양액을 재순환시킬 수 있는 퍼퓨전 공정이 도입된 미세조류 광배양법으로서 미세조류 세포를 재순환시키고 유해물질을 제거할 수 있는 전체적인 리싸이클 시스템 과정을 도식화한 개략도이다.
- 도 2a 및 도 2b는 아세테이트, 나이트레이트, 포스페이트, 광세기 등의 다양한 초기 배양 조건들이 영양세포 단계에서 헤마토코쿠스 플루비알리스 세포의 비성장속도에 미치는 영향을 나타내는 그래프이다.
- 도 3은 영양세포단계의 헤마토코쿠스 플루비알리스 세포가 일정한 세포농도에서 배양되고 있을 때 다양한 광세기 조건들이 세포의 비성장속도에 미치는 영향을 나타내는 그래프이다.
- 도 4는 혼합영양조건의 회분식 배양공정에서, 영양세포단계의 헤마토코쿠스 플루비알리스의 세포 성장과 배지영양분 소모를 나타내는 그래프이다.
- 도 5는 혼합영양조건의 퍼퓨전 배양공정 혹은 유가식 배양공정에서 시간에 따라 배양액 재순환속도 혹은 배양액 주입속도가 달라졌을 때, 영양세포 단계의 헤마토코쿠스 플루비알리스의 세포 성장과 배지영양분 소모를 나타내는 그래프이다.
- 도 6은 서로 다른 광도를 일정하게 조사하는 회분식 공정에서, 유발 단계의 헤마토코쿠스 플루비알리스의 세포(cyst) 성장과 아스타잔틴 유발을 나타내는 그래프이다.
- 도 7은 광도를 단계적으로 증가시켜 조사하는 회분식 공정에서, 유발 단계의 헤마토코쿠스 플루비알리스의 세포(cyst) 성장과 아스타잔틴 유발을 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0013] 일 관점에서, 본 발명은 세포추출기를 이용하여 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*)를 퍼퓨전 배양하는 것을 특징으로 하는 아스타잔틴의 제조방법에 관한 것이다.
- [0014] 본 발명의 퍼퓨전 방식을 이용한 세포 재순환 시스템은 헤마토코쿠스 플루비알리스 세포를 고농도로 배양할 수 있고, 아스타잔틴을 배지 내에 고농도로 축적할 수 있는 새로운 배양 방법이다.
- [0015] 본 발명에서 퍼퓨전 배양이란, 배양액 내의 미세조류 세포를 세포추출기를 이용하여 추출한 후, 새로운 배지를 포함하는 배양조로 재순환시켜 배양하는 배양법을 말한다.
- [0016] 본 발명에 있어서, 상기 배양 방법은 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*)의 군체수가 증가할 수록 광세기를 순차적으로 증가시키는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0017] 본 발명에서 상기 광세기는 $30 \mu\text{mol photon/m}^2/\text{s} \sim 600 \mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ 의 범위에서 군체수의 증가에 따라 순차적으로 증가시키는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0018] 배양조에 투여되는 광세기가 $30 \mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ 이하이면, 미세조류가 이용가능한 빛의 양이 적어 세포의 비성장속도가 지나치게 낮아지며, $600 \mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ 이상이면 광스트레스에 의해 세포의 비성장속도가 낮아지게 된다.
- [0019] 본 발명은 우수한 아스타잔틴 축적능력을 보유한 헤마토코쿠스 플루비알리스가 아스타잔틴 합성시 발생하는 느린 생산성 문제를 거시적 공정적 관점에서 해결하기 위하여 이산화탄소 뿐만 아니라 유기물을 주입하는 혼합영양 조건의 배양법을 최적화하여 극복하였다.
- [0020] 본 발명에서 사용되는 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*)용 배양배지의 아세테이트 농도는 $400\text{mg/L} \sim 1.5\text{g/L}$ 인 것을 특징으로 할 수 있고, 나이트레이트 농도는 $100\text{mg/L} \sim 300\text{mg/L}$ 인 것을 특징으로 할 수 있으며, 포스페이트 농도는 $10 \sim 30\text{mg/L}$ 인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0021] 본 발명의 일실시예에서, 미세조류 배양배지의 아세테이트 농도는 도 2a에 나타난 바와 같이, $400\text{mg/L} \sim 1.5\text{g/L}$ 에서 세포가 높은 비성장속도를 나타내며, 배지 내의 최적 아세테이트 농도는 720mg/L 이었다.
- [0022] 본 발명의 일실시예에서, 미세조류 배양배지의 나이트레이트 농도는 도 2a에 나타난 바와 같이, $100\text{mg/L} \sim 300\text{mg/L}$ 에서 세포가 높은 비성장속도를 나타내며, 배지 내의 최적 나이트레이트 농도는 160

mg/l이었다.

[0023] 본 발명의 일실시예에서, 미세조류 배양배지의 포스페이트 농도는 도 2a에 나타난 바와 같이, 10~30mg/L에서 세포가 높은 비성장속도를 나타내며, 배지 내의 최적 포스페이트 농도는 14mg/l이었다.

[0024] 배양배지 내의 아세테이트, 나이트레이트 및 포스페이트의 경우, 상기 농도 조건의 범위를 벗어날 경우, 미세조류의 비성장속도가 현저히 낮아지게 된다.

[0025] 본 발명에서는 영양세포 농도를 최대화시키고 이후 고농도로 생육된 영양세포에 의한 광유발을 극대화시키기 위해 최적화된 배지주입 및 재순환 전략과 순차적인 광조사 방법을 특징으로 한다.

[0026] 결과적으로, 아스타잔틴의 생산은 부적절한 광세기에 의한 세포 성장 저해현상을 극복하고 동시에 잔여 질소원 및 저해물질에 의한 광유발 저해 현상을 극복하게 함으로서 혼합영양조건에서 헤마토코쿠스 플루비알리스의 세포 성장과 광유발에 의한 아스타잔틴 생산성이 크게 증대하였으며, 퍼퓨전 방식의 배지 재순환 조건에서 그 효과의 차이가 극명함을 알 수 있었다.

[0027] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명이 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0028] <실시예>

[0029] 본 실시예에서 사용한 헤마토코쿠스 플루비알리스는 *Haematococcus pluvialis* NIES-144로서 National Institute for Environmental Studies, Tsukuba, Japan으로부터 구입하여 사용하였다. 실시예에서 사용한 배지는 NIES-C, NIES 및 NIES-N 배지이고, NIES-C 및 NIES-N 배지의 성분은 표 1에 나타내었으며, NIES는 NIES-C 배지에서 1N Na acetate이 20mL/L로 추가된 배지이다.

[0030] NIES-C 배지: autotrophic medium (자가영양배지, 목적: 성장)

[0031] NIES 배지: heterotrophic medium (혼합영양배지, 목적: 성장)

[0032] NIES-N 배지: autotrophic medium (혼합영양배지, 목적: 광유발)

[0033] CO₂ 공급량: 5%(v/v)

[0034] 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	0.10 g	KCl	0.07 g
Na ₂ Glycerophosphate · 5H ₂ O	0.05 g	Na ₂ Glycerophosphate · 5H ₂ O	0.05 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.04 g	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.04 g
Tris-aminomethane	0.05 g	Tris-aminomethane	0.05 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	

[0035] *Haematococcus pluvialis* NIES-144 균주를 NIES-C 배지를 이용하여 5%(v/v) CO₂의 연속적인 공급과 50 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 세기의 빛을 12시간:12시간 광주기 조건으로 23℃에서 자가영양조건에서 배양하였다. 균주의 성장이 late-exponential 단계에 접어들면 세포배양액 (0.5x10⁶ cells/ml)을 취하여 세포의 비성장속도를 계산하여, 세포 성장에 최적의 아세테이트, 나이트레이트 및 포스페이트 농도를 구하였다. 또한 자가영양조건에서 생육시킬 때에 필요한 최적의 광세기를 구하였다.

[0036] 고농도 세포 배양을 위하여 투입되는 광에너지는 배양액의 세포 밀도가 높을 경우, 배양된 세포에 의하여 가려지게 된다. 따라서 세포를 광배양하면서 세포 농도가 높아짐에 따라 광세기를 비례적으로 높여주어야 한다. 그러나 이때에도 광반응기 표면에서 과도한 광세기를 받은 미세조류는 광저해를 받게 된다. 따라서, 고농도 세포 배양에서는 광세기를 시간에 따라 적절하게 높여주는 배양 전략을 수립하였다. 이러한 최적의 광세기를 파악하기 위하여 세포를 NIES-C 배지 (10 mM sodium acetate 포함유)에서 전배양시킨 세포를 3L 광반응기에 접종하여 NIES 배지를 사용하는 혼합영양조건에서 30, 60, 90, 120, 180 mmol photon/m²/s 의 광조건으로 생육시켰다.

[0037] 다음으로, 고농도 세포 배양을 위한 Fed-batch 배양공정 및 perfusion 배양공정을 실시하여 비교하였다. 도 1에서와 같이, 세포를 재순환시키는 perfusion 배양공정에서는 세포추출기(cell settler)를 이용하여 배양액을 제거하고, 세포만을 수득하였다.

[0038] 고농도의 배지를 공급하는 전략은 다음과 같은 미세조류 세포 성장에 관한 물질수지식을 이용하여 각각의 배지 성분에 대하여 공급 속도를 구하였다.

[0039]
$$\frac{d(S_A V)}{dt} = S_{FA} \cdot F_{in} - S_A \cdot F_{out} - \frac{\mu X V}{Y_A}$$

[0040] 여기에서 V , μ , Y_A 는 배양부피 (ml), specific growth rate (/day), 배지성분 A에 대한 cell growth yield (g/g) 이며 S_{FA} 와 S_A 는 feed와 광반응기의 A성분의 농도이다. F_{in} 와 F_{out} 는 feed와 spent medium의 volumetric flow rate (ml/day)이며 $F_{in} = F_{out}$ 이다. 정상상태에서 $dS_A/dt = \text{zero}$ 이며, $S_{FA} \gg S_A$ 이므로 $S_A/S_{FA} = \text{zero}$ 이라고 가정할 수 있다. 따라서, 다음과 같은 A성분의 공급속도식을 구하여 고농도 세포 배양에 적용하였다.

[0041]
$$F_{in} = \frac{\mu X V}{S_{FA} \cdot Y_A}$$

[0042] 이와 같이 하여 고농도의 영양세포로 배양시킨 후에는, *Haematococcus pluvialis* (NIES-144) 야생 세포를 NIES-N 배지에서 배양하여 아스타잔틴의 세포 내 생산을 효과적으로 유도하였다. 이때, 5% CO₂의 공급과 함께 150~450 mmol photon/m²/s 의 광세기 조건에서 아스타잔틴 축적농도가 최대로 될 때까지 세포를 배양하였다.

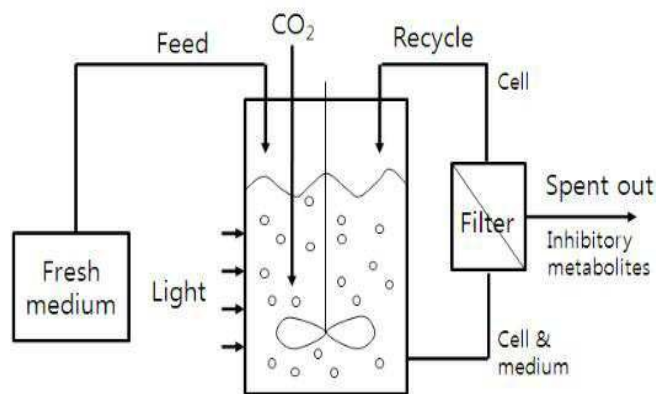
[0043] 실험예 1: *Haematococcus pluvialis* (NIES-144) 야생 세포의 혼합영양 조건에서의 최적의 영양 조건 도출

- [0044] 대수기에 이른 세포배양액($OD_{680} = \sim 0.5$)의 10%(v/v) 정도를 취하여 혼합영양 조건에서 비성장속도를 비교하였다.
- [0045] 그 결과, 도 2a에 나타난 바와 같이, 0.22/day의 비성장속도를 나타내는 최적의 아세테이트 농도는 720mg/L이었고 최적의 나이트레이트와 포스페이트 농도는 160mg/l 과 14mg/l 이었다. 각 배지 성분이 최적 농도 이상일 때에는 세포 성장이 크게 저해되었다.
- [0046] 또한, 도 2b에 나타난 바와 같이, 최적의 세포성장을 나타내기 위한 최소의 광량은 60 mmol photon/m²/s 이었으며 그 이상의 광량은 세포성장을 저해하였다. 이러한 과량의 광세기에서 *Haematococcus pluvialis* 세포는 생물학적 방어기작으로서 세포 내부에 이차대사물을 축적하는 것으로 나타났다.
- [0047] 실험예 2: 영양세포 단계 *Haematococcus pluvialis* 의 최적 세포 성장을 위한 광세기의 순차적 증가
- [0048] 광세기의 영향으로 인한 혼합영양 배양에서의 최적 세포 성장조건을 비교하였다. 고농도 세포에 의한 빛 가림을 완화하기 위하여 초기 세포 농도 1g/l와 2g/l의 고농도 세포배양액에서의 최적의 광세기를 조사하였다.
- [0049] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 1g/l 세포 농도의 세포배양액의 경우, 120 μ mol photon/m²/s의 광세기에서 0.18/day의 최대 비성장속도를 보였으며 2g/l 세포 농도의 세포배양액에서는 150 μ mol photon/m²/s에서 0.12/day의 성장속도를 보여 주었다. 본 실험을 바탕으로 고농도 배양을 위하여 세포 농도가 1g/l와 2g/l에 도달하였을 때 광세기를 60 μ mol photon/m²/s에서 120, 150 μ mol photon/m²/s로 증대시키는 전략을 수립하였다.
- [0050] 실험예 3: 영양세포 단계 *Haematococcus pluvialis* 의 회분식 배양
- [0051] 퍼퓨전(Perfusion) 배양과 유가식 배양에서 배지주입을 위한 물질수지 인자(parameter)를 구하고 성능 우위 비교를 위해 세포의 회분식 배양을 수행하였다.
- [0052] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 배양 10일째에 0.8g/l의 최대 영양세포농도를 얻을 수 있었다. 얻어진 물질수지 인자 값들은 다음과 같다. *Haematococcus pluvialis*의 acetate, nitrate 및 phosphate에 대한 growth yields (YA, YN, YP)는 각각 0.51g/g, 3.09g/g 및 31.05 g/g 이었고, 비성장속도 $\mu = 0.24$ /day, 초기세포농도 $X_0 = 0.18$ g/l, 초기 배양부피 $V_0 = 1500$ ml이었다.
- [0053] 실험예 4: 영양세포 단계 *Haematococcus pluvialis* 의 유가식 및 퍼퓨전 배양
- [0054] 양분 고갈로 인한 세포성장 저해를 막기 위해 유가식 및 퍼퓨전 배양을 위한 배지공급전략이 도입되었다. Acetate의 초기농도는 실험예 1에서 구한 720mg/l 이고, 배지주입속도는 이를 이용하여 계산하였다. 보충 배지 내 acetate, nitrate 및 phosphate의 비율은 1 : 0.165 : 0.016 이었다.
- [0055] 퍼퓨전 양에서는 720mg/l acetate, 118mg/l nitrate 및 11.5mg/l phosphate 농도의 배양액을 끊임없이 순환시켰고, 유가식 배양에서는 54g/l acetate, 12.4g/l nitrate, 1.2g/l phosphate 농도의 배양액을 퍼퓨전 양과 같은 영양을 공급하기 위해 주기적으로 소량 공급하였다. 실시예 1에서 유도된 식에 따라 퍼퓨전 배양에서 배지는
- [0056]
$$F_{per,in} = 176e^{0.24t}$$
- [0057] 의 속도로 지속적으로 순환되었고, 유가식 배양에서는
- [0058]
$$F_{fed,in} = 1.69e^{0.24t}$$
의 배지가 24시간 주기로 주입되었다 (F는 각각의 배지주입량 (ml)를 의미한다).
- [0059] 본 실험예에서 퍼퓨전 배양배지의 주입속도는 세포추출기에서 반응기로의 순환속도와 같게 하였다. Cell retention을 위하여 세포추출기(cell settler)를 사용하였으며, 1600 ml/day 이상의 순환속도에서 세포의 손실이 극대화되었기에 배지 순환속도의 한계점은 1600 ml/day로 설정하였고 유가식 배양에서도 이와 동일한 양의 양분을 주입하였다. 도 5a는 퍼퓨전 배양에서의 배지순환 속도를 나타내었다.

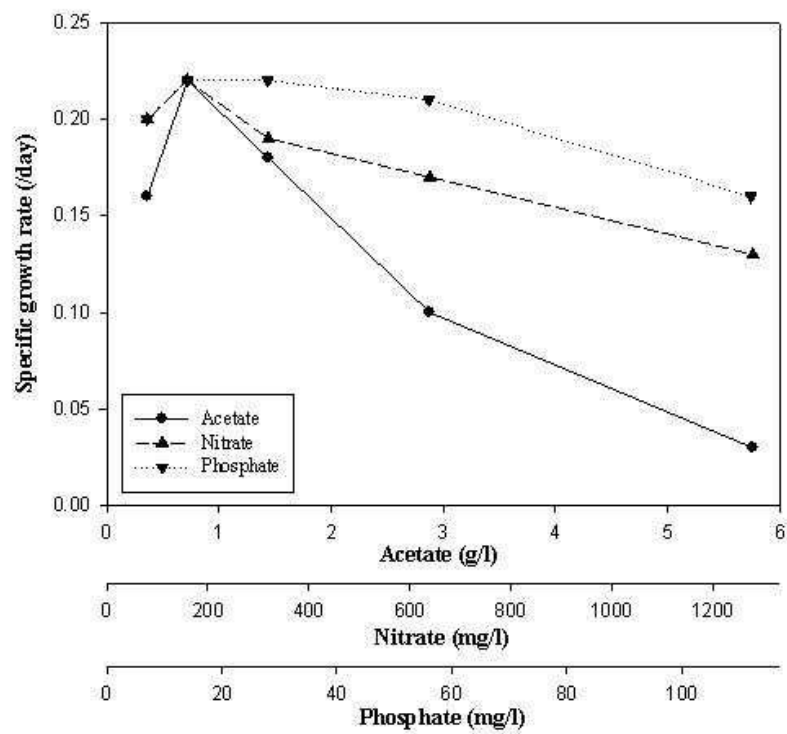
- [0060] 실험예 2의 결과를 바탕으로 광세기의 순차적 증가를 퍼퓨전배양과 유가식 배양에 도입하였다. 세포 농도가 1g/l, 2g/l를 넘는 시점을 기준으로 60에서 120과 150 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ 로 순차적으로 빛 세기를 강화하였다. 퍼퓨전 배양에서는 7일과 12일 째에 각각 120 및 150 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ 로 강화하였고, 유가식 배양에서는 세포 농도가 2g/l를 넘지 못함에 따라 배양 7일째에 120 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ 로 강화하였다.
- [0061] 그 결과, 도 5b 및 5c에 나타난 바와 같이 세포농도는 퍼퓨전 배양의 경우 배양 16일 째에 2.41g/l의 영양세포 농도를 얻을 수 있었으며, 유가식 배양에서는 배양 12일 째에 1.48g/l의 최대 영양세포 농도를 얻을 수 있었다.
- [0062] 실험예 5: 일정한 광세기에 의한 아스타잔틴 유발
- [0063] 퍼퓨전 배양을 통해서 얻어진 고농도 세포에서 아스타잔틴의 효율적인 세포축적을 위해 광세기의 순차적 증가 방법을 개발하였다. 일정한 광세기에 의한 아스타잔틴 유발량을 조사하고 광세기의 순차적 증가방법을 위한 기준을 마련하기 위해 실험을 진행하였다.
- [0064] 그 결과, 도 6에서 보는 바와 같이, 저광(150 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$)에서 세포수는 광스트레스에 의하여 21.0×10^6 개/ml에서 16.4×10^6 개/ml (22% 감소)로 감소하였고 300 mg/l의 아스타잔틴이 생성되었다. 중광(300 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$)과 고광의 경우, 세포수는 각각 13.4×10^6 개/ml와 11.0×10^6 개/ml (35%, 48% 감소)로 줄어들었으며 아스타잔틴의 양은 각각 473mg/l, 465mg/l 였다. 광세기의 순차적 증가 방법은 세포의 광 적응능력을 극대화 하기 위한 전략이므로 본 실험에서 세포수가 고정되는 시점, 즉 세포가 광세기에 적응하는 시점을 광세기의 순차적 증가 방법의 기준으로 삼았다. 중광과 고광의 경우 세포내 아스타잔틴의 농도가 2% 그리고 2.7% 축적하였을 때 세포수가 고정되었다.
- [0065] 실험예 6: 광세기의 순차적 증가에 의한 아스타잔틴 유발
- [0066] 실험예 6에서 얻어진 광세기의 순차적 증가 기준을 적용하여 수행한 배양에서 아스타잔틴 유발율을 확인하였다.
- [0067] 그 결과, 광세기는 저광에서 중광, 고광으로 증가되었으며, 세포내 아스타잔틴의 농도가 2%, 2.7%가 되는 시점(9일째와 12일째)에 변경하였다(도 7). 세포수는 20.4×10^6 개/ml에서 15.9×10^6 개/ml로 22% 감소하는 수준으로 저광을 일정하게 조사하였을 때와 비슷하였으나 아스타잔틴의 농도는 602mg/l로 26% 증가한 결과이다. 최종적으로 4.9%의 세포내 아스타잔틴 축적량을 보여주었다.
- [0068] 이상으로, 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

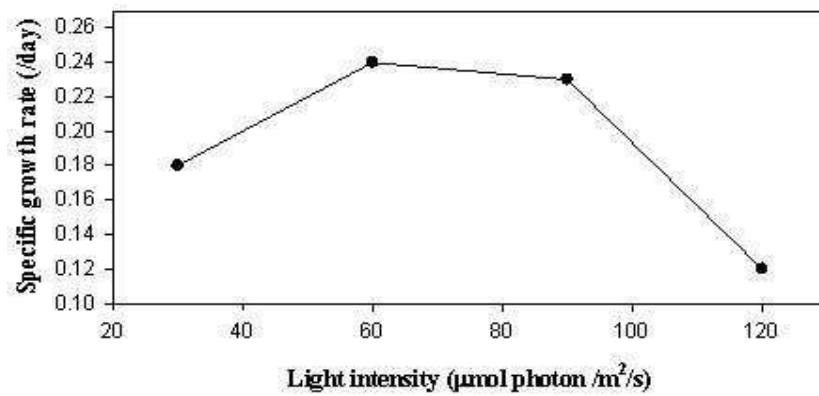
도면1



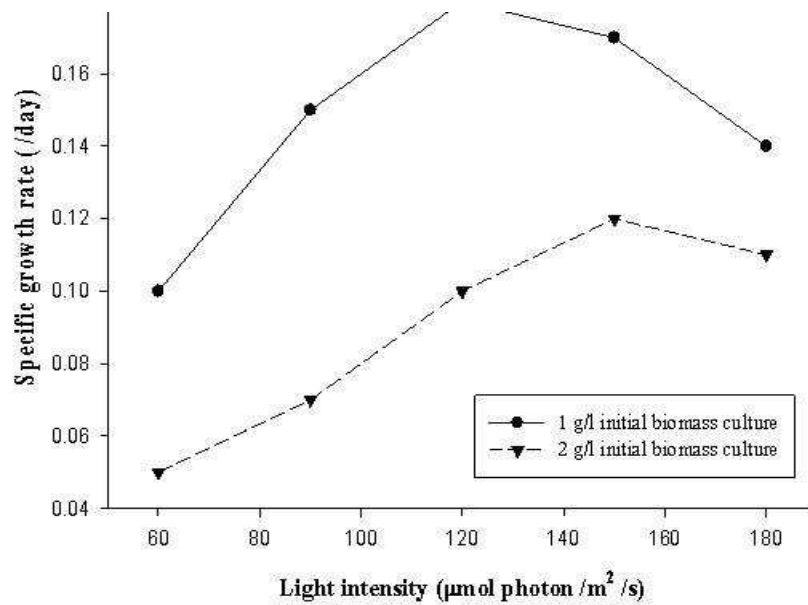
도면2a



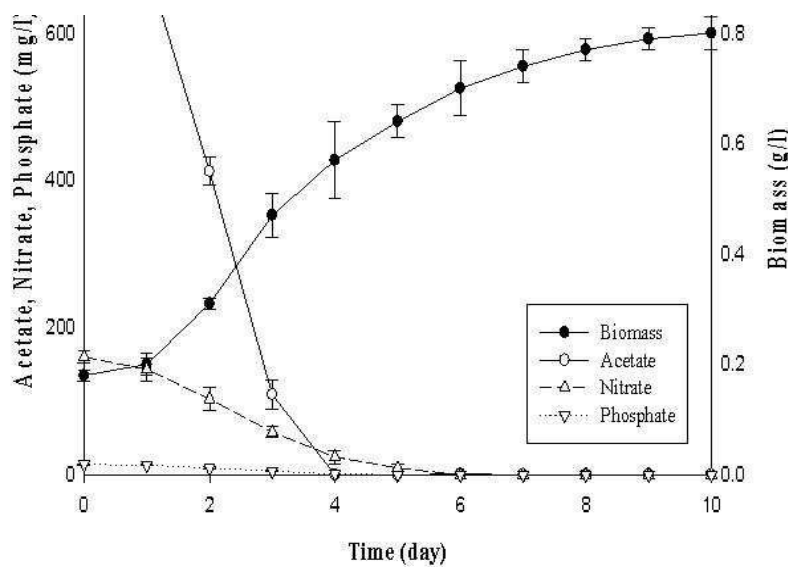
도면2b



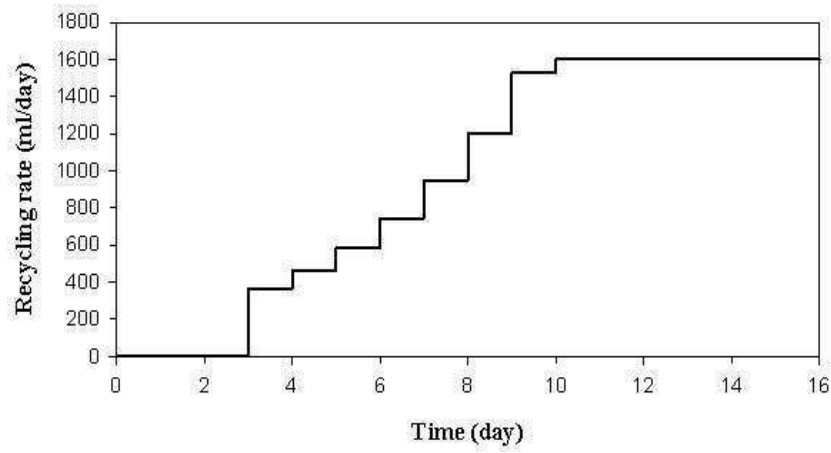
도면3



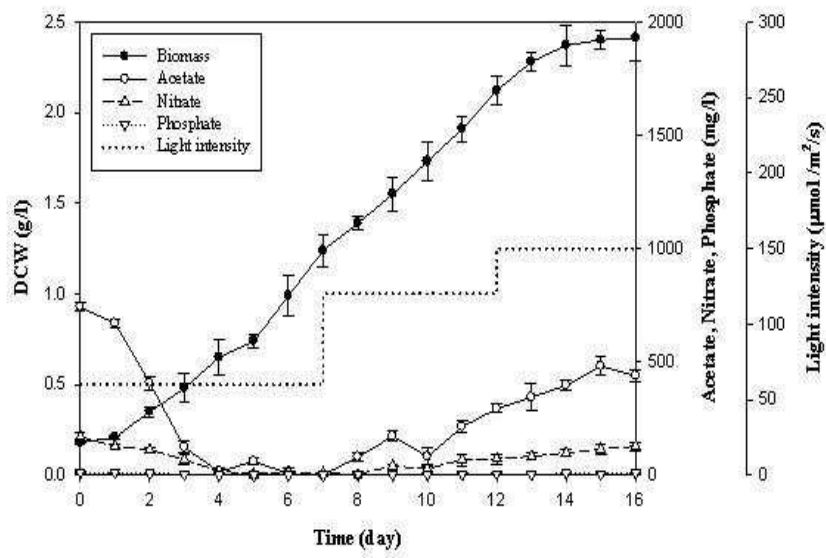
도면4



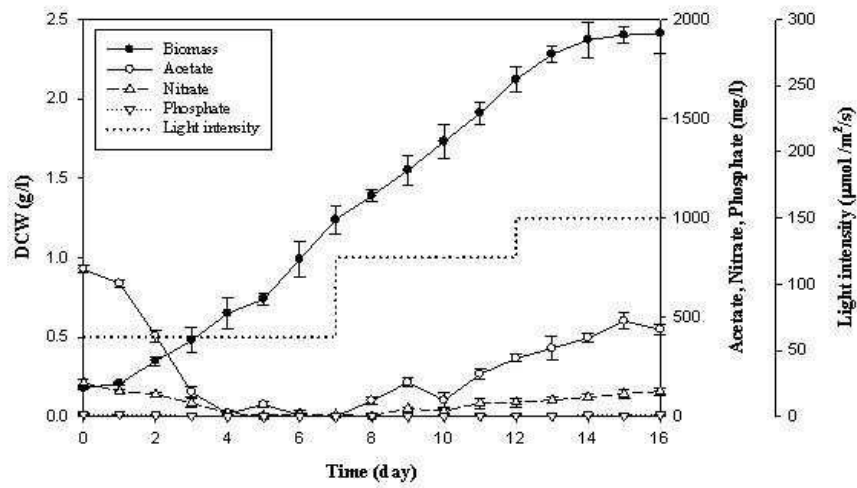
도면5a



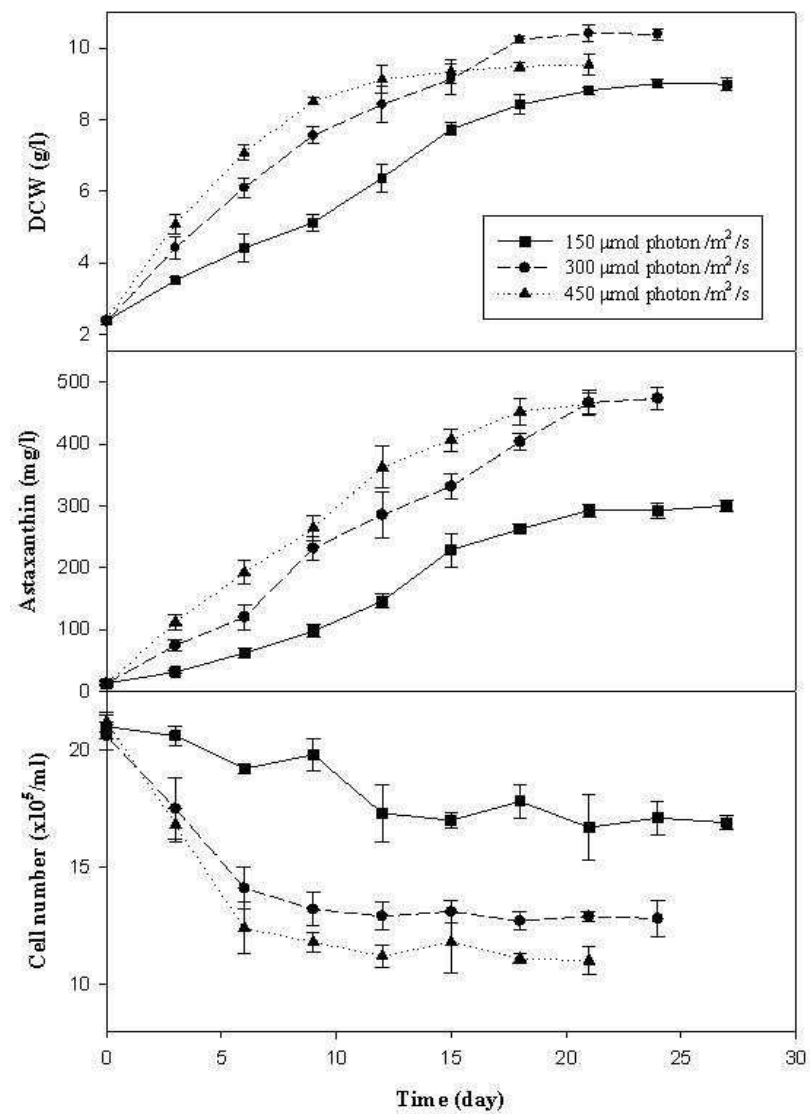
도면5b



도면5c



도면6



도면7

