



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0051306
(43) 공개일자 2010년05월17일

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01) C12N 1/00 (2006.01)

C12P 19/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0110414

(22) 출원일자 2008년11월07일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

부경대학교 산학협력단

부산 남구 용당동 산 100번지 부경대학교내

(72) 발명자

김영태

부산광역시 남구 대연3동 부경대학교 대연캠퍼스

자연과학대 미생물학과 생화학실험실 7404호

(74) 대리인

최규환

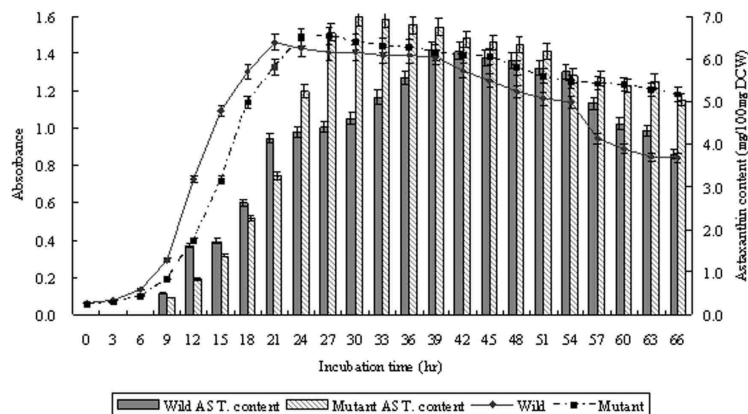
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 파라코커스 해운덴시스(Paracoccus haeundaensis)의 돌연변이와 스트레스 처리에 의한아스타잔틴 생성량 증가 방법

(57) 요약

본 발명은 파라코커스 해운덴시스(*Paracoccus haeundaensis*) 균주에 자외선을 처리하여 아스타잔틴을 대량 생산하는 파라코커스 해운덴시스 변이 균주의 제조 방법, 상기 방법에 의해 제조된 아스타잔틴을 대량 생산하는 파라코커스 해운덴시스 변이 균주, 및 파라코커스 해운덴시스(*Paracoccus haeundaensis*) 균주에 자외선을 처리하는 단계를 포함하는 아스타잔틴을 대량 생산하는 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도3



특허청구의 범위

청구항 1

파라코커스 해운덴시스(*Paracoccus haendaensis*) 균주에 5J~20J의 자외선을 5분~20분간 처리하는 단계; 및
상기 자외선 처리된 균주를 배양하는 단계를 포함하는 아스타잔틴을 대량 생산하는 파라코커스 해운덴시스 변이 균주의 제조 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 균주의 배양은 25~30℃, pH 8, 배양시간 24~50 시간의 조건에서 수행하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항의 방법에 의해 제조된 아스타잔틴을 대량 생산하는 파라코커스 해운덴시스 변이 균주.

청구항 4

파라코커스 해운덴시스(*Paracoccus haendaensis*) 균주에 5J~20J의 자외선을 5분~20분간 처리하는 단계;

상기 자외선 처리된 균주를 배양하는 단계; 및

상기 배양 균주로부터 아스타잔틴을 회수하는 단계를 포함하는 아스타잔틴을 대량 생산하는 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 균주의 배양은 25~30℃, pH 8, 배양시간 24~50 시간의 조건에서 수행하는 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 파라코커스 해운덴시스의 돌연변이와 스트레스 처리에 의한 아스타잔틴 생성량 증가 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 파라코커스 해운덴시스의 물리, 화학적 처리 및 스트레스를 처리하여 아스타잔틴을 대량으로 생성하는 변이 균주의 제조 방법, 상기 방법에 의해 제조된 파라코커스 해운덴시스 변이 균주 및 파라코커스 해운덴시스의 물리, 화학적 처리 및 스트레스 처리를 통해 아스타잔틴을 대량 생산하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 카로티노이드(carotenoids)는 C₄₀ 이소프레노이드 화합물(isoprenoid compounds)로서, 카로티노이드를 함유한 식품은 호박, 당근, 고구마, 감귤 및 열대성과일 등 실로 다양하고 다채롭게 분포하고 있다. 카로티노이드는 지용성 화합물로서 많은 식물에 들어 있고 태양에서 발사하는 유해한 광산화 등의 영향으로부터 식물체를 보호하면서 한편으로는 식물의 수정을 돕는 새나 곤충을 유인하는데 도움을 준다. 카로티노이드는 화학예방물질 즉, 항암물질이다. 카로티노이드는 정상세포의 성장이나 세포의 재생을 돕고 종양의 성장을 억제한다는 의미를 갖고 있다.

[0003] 카로티노이드는 세포간의 연락을 조절하고 세포분화를 촉진한다. 또 세균이나 바이러스, 종양 등의 이물을 식별해서 파괴하는 면역의 감시기능을 향상시킨다. 그래서, 감기나 인플루엔자, 각종의 감염증, 나아가 어느 종류의 암까지 예방하는 역할도 한다. 카로틴의 항암작용으로서는 DNA를 수복하는 유전자의 유도, 종양성장의 원인이 되고 있는 유전자(암 유전자)의 억제, 암의 전이를 억제하는 유전자의 활성화 등을 들 수 있다.

[0004] 더욱이 카로틴은 혈관의 손상을 막고 LDL 콜레스테롤의 산화를 억제함으로써 심혈관질환 리스크를 줄여준다. 이

러한 카로티노이드에는 베타-카로틴 (β -carotene; 당근에 존재; 도 1)과 아스타잔틴(astaxanthin; 연어 및 바다가재에 존재; 도 1), 라이코펜 (lycopene; 토마토의 적색 색소) 등이 있으며, 아스타잔틴의 항산화력이 다른 카로티노이드의 10배 이상이고, α -토코페롤 (tocopherol)의 100배 이상인 것으로 알려져 있다.

[0005] 아스타잔틴이 들어있는 서플리먼트의 효과에 대해서 스웨덴의 마르무스텐박사의 연구결과를 보면 젊고 건강한 운동선수에게 아스타잔틴의 서플리먼트 (4mg/day)를 섭취 시킨바 놀랍게도 체력과 지구력이 3배로 향상되었다. 운동하면 대사기능이 좋아져 필연적으로 부산물로서 활성산소가 다량으로 발생하여 이것이 축적되어 근육이 피로현상을 나타내고 이어 운동능력이 저하된다. 아스타잔틴은 이때 항산화력을 발휘하여 활성산소를 신속히 제거하면서 운동능력을 향상시키게 된다. 이와 같은 작용에는 노화방지라는 측면도 없지 않다.

[0006] 미토콘드리아는 모든 세포에 존재하는 아주 미세한 기관으로 에너지 생산을 위해서 산소를 많이 필요로 하는데 이 과정에서 활성산소가 발생한다. 아스타잔틴은 다른 카로티노이드나 Vitamin E와 함께 미토콘드리아에 있는 지질의 산화를 억제한다. 한 덴마크 과학자는 수종의 카로티노이드의 활성산소 소거력을 비교 검토한바 안정성이 높은 카로티노이드일수록 지질의 과산화를 억제하는 활성이 강하다는 것을 밝혔다. 이 연구에서 아스타잔틴이 가장 안정성이 높고 따라서 지방의 과산화를 억제하는 효과도 가장 컸다는 결과도 나와 있다.

[0007] 아스타잔틴은 비교적 작은 분자로 다른 카로티노이드처럼 지용성이다. 그러나 친수성이라는 점에서 다른 카로티노이드와 다르다. 친수성이 있기 때문에 포착한 활성산소를 쉽게 Vitamin C 속에 방출해서 체내에서 제거할 수 있게 되는 것이다. 또한, 현재까지 아스타잔틴의 독성 (toxicity)에 대해서는 보고된 바 없어, 아스타잔틴은 신경질환 (neurodegenerative diseases), 암 (cancer), 면역질환 (immune disorders), 심장혈관질환 (cardiovascular diseases) 등을 포함하는 다양한 질환의 치료 및 예방에 이용되고 있다. 이러한 이유로 아스타잔틴의 수요는 매년 증가하고 있으며, 이에 따라 아스타잔틴의 중요성이 강조되고 있다.

[0008] 아스타잔틴은 화학 합성법을 이용하여 합성할 수 있으나 화학합성으로 제조된 아스타잔틴은 천연 아스타잔틴에 비해 생체 흡수율이 낮고, 식품 첨가제로서의 안전성에 문제가 되고 있어 일부 국가에서만 사용이 허가된 상태이다. 따라서, 천연 아스타잔틴의 생산법에 관심이 집중되고 있으며, 이 중 미생물을 이용한 아스타잔틴의 제조에 상업적 관심이 일고 있다.

[0009] 현재 아스타잔틴을 생산하는 것으로 알려진 미생물로는 효모인 파피아 로도지마 (*Phaffia rhodozyma*; Miller et al., 1976, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 48: 529-536), 녹색조류인 해마토코커스 플루비알리스 (*Haematococcus pluvialis*; Bubrick, 1991, *Bioresour Technol.*, 38: 237-239), 그람-양성균 브레비박테리움 103 (*Brevibacterium* 103; Lizuka & Nishimura, 1969, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 15: 127-134), 그람-음성균 아그로박테리움 아우란티아쿰 (*Agrobacterium aurantiacum*; Yokoyama et al., 1994, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 58: 1842-1844), 파라코커스 마르쿠시아이 (*Paracoccus marcusii*; Harker et al., 1998, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 48: 543-548) 및 파라코커스 카로티니파시엔스 (*Paracoccus carotinifaciens*; Tsubokura et al., 1999, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 49: 277-282) 등과 본 실험실에 의해 동정된 파라코커스 해운덴시스 (*Paracoccus haeundaensis*; Kim et al., 2004, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 54: 1699-1702) 등이 알려져 있다.

[0010] 한국특허등록 제10-0788479호에는 카로티노이드 생합성 유전자를 이용한 대장균으로부터 아스타잔틴의 생산이 개시되어 있으나, 파라코커스 해운덴시스의 돌연변이 및 스트레스 처리에 의해 아스타잔틴의 생산을 증가시키는 보고는 없다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0011] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 안출된 것으로서, 본 발명에서는 본 발명자들의 앞선 연구에 의해서 보고된 파라코커스 해운덴시스로부터 아스타잔틴 생산량을 증대시키고자 하는 것으로, 일반적으로 파라코커스 해운덴시스 야생 균주가 생산하는 아스타잔틴의 함량은 매우 적으므로 파라코커스 해운덴시스 야생 균주에 물리, 화학적 처리 및 스트레스를 가하여 아스타잔틴의 생산량을 증대시키는 방법을 확립하고자 한다.

과제 해결수단

[0012] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 파라코커스 해운덴시스 (*Paracoccus haeundaensis*) 균주에 자외선을 처리하여 아스타잔틴을 대량 생산하는 파라코커스 해운덴시스 변이 균주의 제조 방법을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 아스타잔틴을 대량 생산하는 파라코커스 해운덴시스 변이 균주를 제

공한다.

- [0014] 또한, 본 발명은 파라코커스 해운덴시스(*Paracoccus haeundaensis*) 균주에 자외선을 처리하는 단계를 포함하는 아스타잔틴을 대량 생산하는 방법을 제공한다.

효 과

- [0015] 본 발명에 따르면, 파라코커스 해운덴시스 야생 균주가 생산하는 아스타잔틴의 함량을 증대시킬 수 있으며, 본 발명의 생산량 증대 방법은 식품학적, 약학적 및 미용학적 용도로 사용되는 카로티노이드의 생산에 매우 유용하게 사용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- [0016] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 물리, 화학적 처리를 통하여 파라코커스 해운덴시스 야생 균주의 아스타잔틴 생성량을 증대시키는 방법을 고안한 것이다.
- [0017] 따라서, 본 발명은 파라코커스 해운덴시스(*Paracoccus haeundaensis*) 균주에 5J~20J의 자외선을 5분~20분간 처리하는 단계; 및
- [0018] 상기 자외선 처리된 균주를 배양하는 단계를 포함하는 아스타잔틴을 대량 생산하는 파라코커스 해운덴시스 변이 균주의 제조 방법을 제공한다.
- [0019] 본 발명의 아스타잔틴을 대량 생산하는 파라코커스 해운덴시스 변이 균주의 제조 방법은 먼저 파라코커스 해운덴시스(*Paracoccus haeundaensis*) 균주에 5J~20J의 자외선을 5분~20분간 처리하는 단계를 포함한다. 자외선은 예를 들면, 254nm의 파장을 이용할 수 있으나, 자외선 파장 범위 내이면 이에 제한되지 않는다. 또한, 자외선 처리는 5J~20J의 자외선을 5분~20분간 처리할 수 있으며, 바람직하게는 20J의 자외선을 20분간 처리할 수 있다. 본 발명의 방법에서, 물리적 돌연변이를 야기할 수 있는 방법이라면 자외선 처리에 한정되지 않는다.
- [0020] 또한, 본 발명의 방법은 물리적 돌연변이에 한정되지 않고, 화학적 돌연변이 방법을 이용할 수 있으며, 화학적 처리는 예를 들면, ethyl methanesulfonate (EMS)를 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0021] 본 발명의 아스타잔틴을 대량 생산하는 파라코커스 해운덴시스 변이 균주의 제조 방법은 상기 자외선 처리된 균주를 배양하는 단계를 포함한다. 배양 단계에서 스트레스 처리를 하는데, 스트레스 처리는 탄소원과 배양조건을 달리하여 처리할 수 있다. 탄소원은 락토오스, 만니톨, 프럭토스, 말토스, 수크로스, 글루코스, 아라비노스, 및 갈락토스일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0022] 배양 조건에서, 배양 온도는 25~30℃가 바람직하며, 더욱 바람직하게는 25℃이다. pH는 pH 8이 가장 바람직하다. 배양시간은 24~50 시간이 바람직하며, 27~36 시간이 더욱 바람직하다. 염 농도는 3% 정도가 바람직하다.
- [0023] 본 발명은 또한, 본 발명의 방법에 의해 제조된 아스타잔틴을 대량 생산하는 파라코커스 해운덴시스 변이 균주를 제공한다. 본 발명의 방법에 의해 제조된 파라코커스 해운덴시스 변이 균주는 파라코커스 해운덴시스 야생 균주와 비교하여, 약 5배 이상 아스타잔틴을 생산하였다.
- [0024] 본 발명은 또한,
- [0025] 파라코커스 해운덴시스(*Paracoccus haeundaensis*) 균주에 5J~20J의 자외선을 5분~20분간 처리하는 단계;
- [0026] 상기 자외선 처리된 균주를 배양하는 단계; 및
- [0027] 상기 배양 균주로부터 아스타잔틴을 회수하는 단계를 포함하는 아스타잔틴을 대량 생산하는 방법을 제공한다.
- [0028] 본 발명의 아스타잔틴을 대량 생산하는 방법에서, 자외선 처리 및 배양 방법은 전술한 바와 같다. 따라서, 자외선 처리는 5J~20J의 자외선을 5분~20분간 처리할 수 있으며, 바람직하게는 20J의 자외선을 20분간 처리할 수 있다.
- [0029] 상기 균주의 배양은 25~30℃, pH 8의 조건에서 수행하는 것이 바람직하며, 가장 바람직하게는 25℃, pH 8의 조건에서 수행한다. 배양시간은 24~50 시간이 바람직하며, 27~36 시간이 더욱 바람직하다.
- [0030] 본 발명의 아스타잔틴을 대량 생산하는 방법에서, 배양 균주로부터 아스타잔틴을 회수하는 방법은 예를 들면, HPLC(high performance liquid chromatography) 또는 TLC(thin-layer chromatography) 등 당업계에 공지된 방

법에 따라 수행할 수 있다.

[0031] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0032] 실시예

[0033] 실시예 1. 파라코커스 해운덴시스 야생 균주의 물리적 처리

[0034] 파라코커스 해운덴시스 야생 균주가 생산하는 아스타잔틴의 양을 증대시키기 위한 돌연변이 처리로 254nm의 UV를 조사하였다. 물리적 처리는 UV를 조사하지 않은 파라코커스 해운덴시스 야생 균주를 대조군으로 하였다. UV 조사는 시간별로 5분, 10분, 20분, 그리고 40분의 조건으로 처리하였으며, 또한 UV 조사 세기별로 5J, 20J, 40J, 그리고 60J의 조건으로 처리하였다. 각각의 조건으로 교차 처리하였을 때 균의 성장률을 흡광도를 통해 확인하였으며 아스타잔틴 생성량은 균체의 건조 중량을 측정한 후 건조중량에 비례하여 아스타잔틴 생성량을 계산하였다. 위 방법으로 아스타잔틴 생성량에 대한 물리적 처리의 최적 조건을 확인하였다.

[0035] 하기 표 1은 자외선 조사 시간 및 세기별 야생 균주와 변이 균주의 아스타잔틴 생성량을 나타낸 것이다. 변이 균주에서, 괄호 속의 숫자는 자외선 조사 세기 및 조사 시간을 나타낸다. 예를 들면, 20J20M은 20J의 자외선을 20분간 조사한 것이다.

표 1

[0036]

	세포 건조 중량 (DCW: g/L)	아스타잔틴 함량 (mg/100mg DCW)
야생 균주	5.2	3.48
변이 균주(20J20M)	4.0	20.34
변이 균주(20J5M)	5.3	12.22
변이 균주(5J5M)	4.7	15.27
변이 균주(5J40M)	2.8	6.00

[0037] 상기 표 1에서 알 수 있는 바와 같이, 자외선을 조사하지 않은 야생 균주에 비해 자외선을 조사한 변이 균주에서 아스타잔틴의 생성이 현저하다는 것을 알 수 있으며, 특히 20J의 자외선을 20분간 조사한 변이 균주의 경우에 야생 균주에 비해 약 5배 이상의 아스타잔틴을 생성한다는 것을 알 수 있다.

[0038] 실시예 2. 파라코커스 해운덴시스 야생 균주의 화학적 처리

[0039] 파라코커스 해운덴시스 야생 균주가 생산하는 아스타잔틴의 양을 증대시키기 위한 화학적 처리로 EMS(아크로사)를 사용하였다. 화학적 처리는 EMS를 가하지 않은 파라코커스 해운덴시스 야생 균주를 대조군으로 하였다. EMS를 최종농도 0.3mM, 0.6mM, 1.2mM, 2.5mM, 5mM 및 10mM이 되도록 배지 내에 첨가하여 배양한 후 균의 성장률을 흡광도를 통해 확인하였으며, 아스타잔틴 생성량은 균체의 건조 중량을 측정한 후 건조중량에 비례하여 아스타잔틴 생성량을 계산하였다. 각각의 조건으로 처리하여 화학적 처리를 실시했을 때의 아스타잔틴 생성량에 대한 최적 조건을 확인하였다 (데이터 미제시).

[0040] 실시예 3. 파라코커스 해운덴시스 변이 균주의 스트레스 처리

[0041] 일반적으로 아스타잔틴 색소의 생성은 자기 방어기작에 의한 것이라고 알려져 있다. 따라서, 파라코커스 해운덴시스가 생성하는 아스타잔틴 양을 증대시키기 위한 방법으로 물리, 화학적 처리 외에 균주에 직접 여러 가지 스트레스 처리를 하였다.

[0042] 물리, 화학적 최적 처리조건에 맞춰서 배양된 파라코커스 해운덴시스 변이주를 배양조건을 달리하여 각각 배양한 후, 아스타잔틴 생성량을 측정하여 아스타잔틴 생성량에 대한 최적 배양조건을 확인하였다. 배양조건의 차이는 배지의 pH, 염농도, 그리고 배양 온도를 달리한 것으로 각각의 조건을 교차처리 하였을 때 최적의 아스타잔틴 생성량을 알아 보았다. pH는 단계별로 4~10, 염(NaCl) 농도는 단계별로 0~7%로 하였으며, 배양온도는 15℃,

20℃, 25℃, 30℃, 37℃, 및 42℃로 하였다.

[0043] 또한, 탄소원 첨가 여부에 따른 아스타잔틴 생성량의 차이를 확인하기 위하여 물리, 화학적 최적 처리조건에 맞춰서 배양된 파라코커스 해운덴시스 변이주에 탄소원, 즉 락토오스, 만니톨, 프럭토스, 말토스, 수크로스, 글루코스, 아라비노스, 및 갈락토스를 각각 첨가한 후 최적 배양조건하에서 배양하였으며, 아스타잔틴 생성량을 측정하여 아스타잔틴 생성량 증대에 대한 탄소원 필요 유무를 확인하였다.

[0044] 도 2는 각종 스트레스 (pH, 염농도, 탄소원, 배양온도)에 따른 아스타잔틴 생성량을 나타낸 그래프이다. 탄소원의 경우, 모든 당이 야생 균주보다 UV 조사 돌연변이 균주에서 더 많은 아스타잔틴 생산량 (평균 80mg/100mg DCW(dry cell weight))을 보였다. 배양온도에 따른 아스타잔틴 생성량의 경우, 25℃에서 최대 아스타잔틴 생산량 (약 140mg/100mg DCW)을 보였다. pH의 경우, pH 8이 최적 조건이었으며 아스타잔틴 생성량은 약 100mg/mg DCW 이었다. 염농도에 따른 아스타잔틴 생성량은 약 50 mg/mg DCW 이었다.

[0045] 상기에서 알 수 있는 바와 같이, 위 조건은 돌연변이체에서 야생 균주보다 더 우수하게 아스타잔틴이 생성된다는 것을 보여주는 것이다.

[0046] 실시예 4. 야생 균주와 변이 균주의 생장곡선

[0047] 상기에 제시한 방법을 통하여 제조된 파라코커스 해운덴시스 변이 균주와 파라코커스 해운덴시스 야생 균주의 생장률과 아스타잔틴 생성량을 비교 분석하기 위하여 시간별로 생장률과 아스타잔틴 생성량을 조사하였다. 이를 통해 최적 배양 시간을 함께 확인하였다 (도 3). 도 3은 UV 조사를 통하여 아스타잔틴을 최대 생산하는 돌연변이 균주를 이용하여 스트레스 조건 즉, 아스타잔틴을 최대 생산하는 스트레스 조건을 적용하여 야생 균주와 돌연변이 균주의 성장에 따른 아스타잔틴의 생산량을 비교한 결과이다. 따라서, UV 조사 시간은 20분이며, 세기는 20J 이다.

[0048] 도 3에서 알 수 있는 바와 같이, 파라코커스 해운덴시스 변이 균주의 배양 시간은 24~50 시간이 적합한 것으로 나타났으며, 야생 균주에 비해 돌연변이 균주가 현저하게 많은 아스타잔틴을 생산한다는 것을 알 수 있었다.

[0049] 실시예 5. 야생 균주와 변이 균주의 아스타잔틴 생성량

[0050] 상기에 제시한 방법을 통하여 파라코커스 해운덴시스 변이 균주가 생성하는 아스타잔틴 함량을 야생 균주와 비교하였다. 결과는 상기 표 1과 같으며, 변이 균주가 야생 균주보다 약 5배 이상 아스타잔틴을 많이 생산하는 것을 알 수 있었다.

도면의 간단한 설명

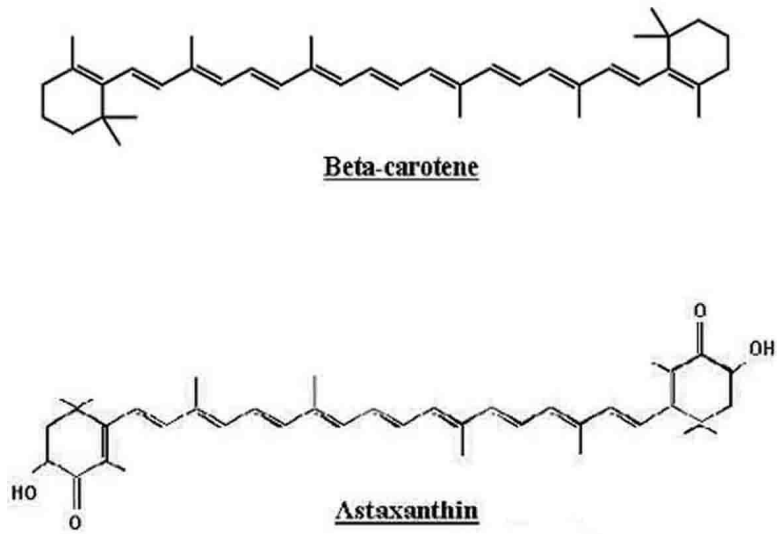
[0051] 도 1은 아스타잔틴 및 베타-카로틴의 구조이다.

[0052] 도 2는 각종 스트레스, 즉, 탄소원(A), 배양온도(B), pH(C), 염농도(D)에 따른 아스타잔틴 생성량을 나타낸 그래프이다.

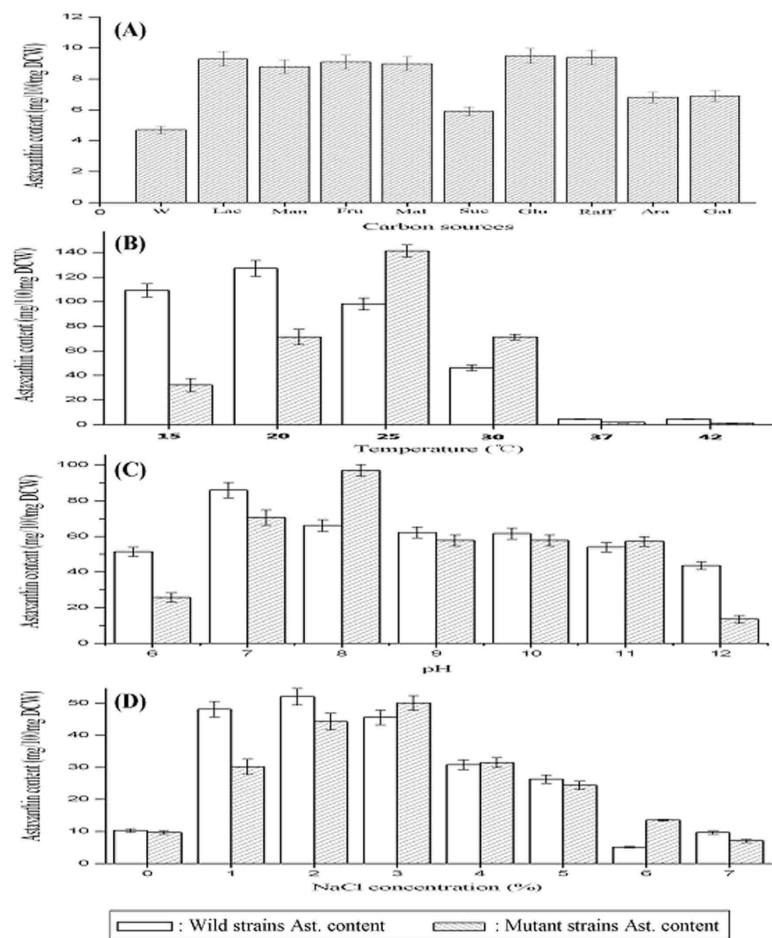
[0053] 도 3은 야생 균주와 변이 균주의 생장곡선에 따른 아스타잔틴 함량을 나타내는 그래프이다.

도면

도면1



도면2



도면3

