



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0112877
(43) 공개일자 2016년09월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 23/00 (2006.01) C12N 5/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12P 23/00 (2013.01)
C12N 5/0018 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0039268
(22) 출원일자 2015년03월20일
심사청구일자 2015년03월20일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
심상준
서울특별시 강남구 선릉로 221, 301동 803호 (도곡동, 도곡렉슬아파트)
최윤영
서울특별시 강남구 개포로 516, 708동 1501호 (개포동, 주공아파트)
(74) 대리인
이처영, 장제환

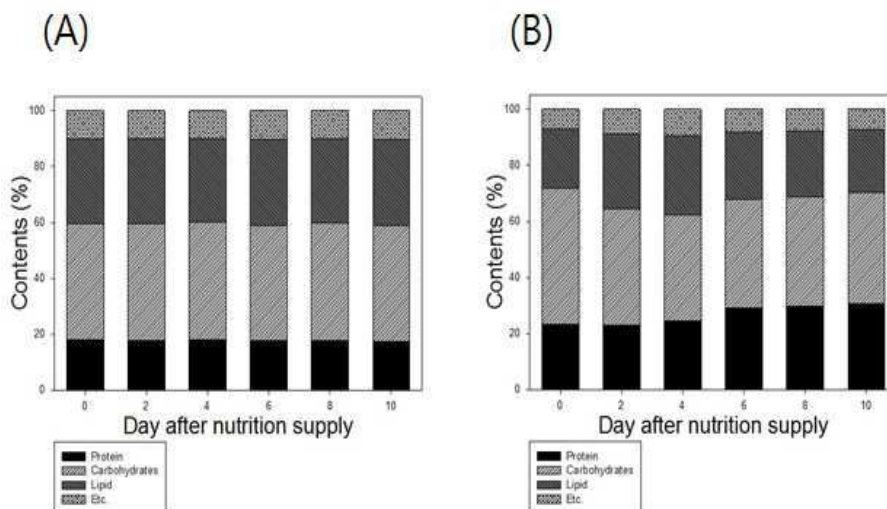
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 헤마토코쿠스 플루비알리스의 세포발아 유도를 통한 아스타잔틴의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 헤마토코쿠스 플루비알리스(Haematococcus pluvialis)의 세포발아를 유도하는 것을 특징으로 하는 아스타잔틴의 제조방법에 관한 것으로, 구체적으로 성숙한 포자형태의 헤마토코쿠스 플루비알리스(Haematococcus pluvialis)에 높은 광도와 질소원을 제공하여 발아를 유도하고 세포 내 C/N(탄소/질소)비 조절을 통해 세포벽을 약화시켜 아스타잔틴 수득을 높이는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

C12N 2500/05 (2013.01)

C12N 2529/10 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014049278

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 Korea CCS 2020

연구과제명 [2-1차년도] 생물학적 이산화탄소 고속전환 유기 자원화 기술

기 여 율 1/2

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2014.06.01 ~ 2015.05.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 G031423013

부처명 산업통상자원부

연구관리전문기관 한국에너지기술평가원

연구사업명 에너지기술개발사업

연구과제명 [RCMS](3차년도)미세조류를 이용한 이산화탄소의 고부가가치 상품 전환 공정의 실증

기 여 율 1/2

주관기관 한국지역난방공사

연구기간 2014.06.01 ~ 2015.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

다음 단계를 포함하는 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*)의 세포발아 유도를 통한 아스타잔틴의 제조방법:

- (a) 자가영양조건에서 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*)를 배양하는 단계;
- (b) 아스타잔틴 생성을 유발한 다음, 성숙한 포자형태의 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*)의 발아를 유도하는 단계; 및
- (c) 상기 발아가 유도된 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*)로부터 아스타잔틴을 수득하는 단계.

청구항 2

제1항에 있어서, 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*)의 발아 유도는 질소원을 첨가하여 세포 내 C/N비를 0.1~2로 낮추는 것르 특징으로 하는 방법

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 질소원은 KNO_3 인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*)의 발아 유도는 $200\sim 500 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 이상의 광조건에서 이루어지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 배양은 LNG 연소 배기가스를 공급하되, 옥외 광생물반응기에서 수행하는 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*)의 배양 후, 세포발아를 유도하는 것을 특징으로 하는 아스타잔틴의 제조방법에 관한 것으로, 구체적으로 성숙한 포자형태의 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*)에 높은 광도와 질소원을 제공하여 발아를 유도하고 세포 내 C/N(탄소/질소)비 조절을 통해 세포벽을 약화시켜 아스타잔틴 수득을 높이는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*)는 담수에서 서식하는 미세조류이고 카로테노이드인 아스타잔틴을 건 중량의 3~4%로 축적하는 능력이 있다. 헤마토코쿠스 플루비알리스는 영양 고갈, 강한 광에 노출,

염도 증가, 너무 낮거나 높은 온도와 같은 다양한 스트레스에 대항하기 위해 포자 구조를 생성한다. 이 과정에서 스트레스에 저항하기 위해 지질, 카로테노이드 등 2차 대사 산물을 축적하는데, 그 중 적색을 띠는 케토카로티노이드(Ketocarotenoid)인 아스타잔틴(Astaxanthin, 3,3'-dihydroxy- β , β '-carotene-4,4'-dione)은 항산화 효과를 지닌 기능성 물질로 주목받고 있다(Bing Wang et al., Astaxanthin Accumulation in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) as an Active Photoprotective Process Under High Light Irradiance, J. Phycol. 39, 1116-1124 (2005)).

[0003] 아스타잔틴은 대표적인 항산화제인 비타민 E보다 500배, 베타-카로틴보다 20배 정도 높은 항산화 활성을 지닌다. 아스타잔틴의 항산화 능력은 UV 광산화, 염증반응, 암, *Helicobacter pylori* 감염, 노화로 인한 황반변성(망막 신경조직 변성), 면역 반응에 있어서 핵심적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 또한, 특유의 붉은 색으로 인해 양식어류, 가금류에 색소로 쓰이고 우수한 항산화 능력으로 인해 식품첨가제, 영양보충제, 의약품 산업에서 이용될 가치가 높다.

[0004] 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*)는 아스타잔틴의 생산에 있어서 가능성 있는 생물이고 생장과 아스타잔틴을 축적하는 포자기, 두 개의 서로 다른 단계가 있다.(Kobayashi et al, Morphological Changes in the Life Cycle of the Green Alga *Haematococcus pluvialis*, Journal of Fermentation and Bioengineering, Vol 84, No.1 94-97, 1997) 헤마토코쿠스를 감싸고 있는 세포벽은 70%가 탄수화물(66% 헥소스), 3% 셀룰로오스, 그리고 6% 단백질과 3%의 아세토기 분해 저항 물질로 이루어져 있다. 아스타잔틴은 헤마토코쿠스의 두꺼운 시스트(cyst) 세포벽 안에 축적된다. 두꺼운 세포벽은 스포로폴레닌(꽃가루 등을 둘러싸고 있는 화학적 저항성이 있는 표벽 구성 물질) 같은 물질, 알가닌으로 이루어져 있는데 이는 아스타잔틴의 용매 추출을 막는다(Hagen et al., Ultrastructural and chemical changes in the cell wall of *Haematococcus pluvialis*(Volvocales, Chlorophyta) during aplanospore formation, Eur. J. Phycol. (2002), 37 : 217-226).

[0005] Volvocales 속의 다른 종과 같이 단세포 담수종 미세조류인 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*)는 극한의 환경에서 시스트를 생성한다. 이러한 시스트는 많은 양의 아스타잔틴을 함성하고 축적한다. 그러나 화학적, 효소적, 물리적 충격에 강한 저항성을 지니기 때문에 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*)의 세포벽은 아스타잔틴 추출 과정에 어려움을 준다. 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*)의 시스트 세포벽은 가수분해가 불가능한(nonhydrolyzable) 고분자로 이루어져 있다. 이동성이 있는 flagellate 단계는 젤라틴성의 세포외기질을 가지고 있으나 이동성을 잃으며 세포외기질 내 primary cell wall이라는 새로운 층을 형성한다. trilaminar sheath는 primary cell wall 안에 형성되고 가장 안쪽에 있는 층은 비결정성의 secondary wall이다. 그리고 시스트는 발아(germination)를 거쳐 zoospore를 방출한다. 이 발아과정 중 모양이 바뀐다. 발아와 zooid 방출 중 헤마토코쿠스 플루비알리스의 시스트 세포벽의 요소의 특정한 거동은 녹조류에서는 특이한 것이다. Trilaminar sheath와 secondary wall은 단일 구조처럼 행동한다. 시스트 크기가 커지며 zooid 형성 동안 부서진다. 대조적으로 더 신축성이 있는 tertiary wall이 밖으로 뻗어나오고 발아 과정 내내 시스트 팽창이 같이 일어난다. zooid 방출 순간에 tertiary wall은 시스트의 훨씬 얇은 정단 조직에서만 파괴된다. 비록 secondary와 tertiary wall이 성숙한 시스트에서 비슷하게 나타난다 할지라도 시스트 형성 과정 중 이들 요소들의 배열은 다르다. 이것은 아마도 발아 과정 중 이러한 세포벽들의 거동을 설명해 줄 것이다. 방출된 zoospores는 잠깐 동안 아스타잔틴이 존재하므로 붉은색을 유지하나 이는 곧 분해된다(Damiani et al., Cell wall and germination in *H. pluvialis*, Phycologia (2006) Volume 45 (6) 616-623).

[0006] 세포 내 있는 아스타잔틴은 헤마토코쿠스 세포를 그대로 섭취하는 것보다 세포 밖으로 추출하여 섭취했을 때 생물학적 활성을 가진다. 그러므로, 생물학적 활성을 갖는 아스타잔틴 수득을 위해서는 헤마토코쿠스 세포의 세포벽을 파쇄하여 세포 내에 있는 아스타잔틴을 추출해야 한다. 이에 따라 시스트 세포로부터의 아스타잔틴 추출에 관한 다양한 연구가 이루어지고 있다(Sarada et al., An Efficient Method for Extraction of Astaxanthin from Green Alga *Haematococcus pluvialis*, J. Agric. Food Chem., 2006, 54, 7585-7588).

[0007] 그 동안 용매 및 산 처리 추출, 효소 처리 후 용매 추출, DMSO, 그리고 세포 분해 공정을 이용한 여러 아스타잔틴 추출법이 보고된 바 있다. 추출 공정에서 처리시간, 온도, 산 농도는 추출율을 높이는 주요한 요인이다. 또한 UAE(ultrasound-assisted extraction), MAE(microwave-assisted extraction)와 같이 세포벽을 약화시키는 전처리를 가해 추출을 돕는 방법도 연구되고 있다. 그러나 이 모든 방법은 아스타잔틴이 손실될 뿐만 아니라 대규모 공정에 적용하기 어려운 점이 있다(Duankamol Ruen-ngam et al., Comparison of Extraction Methods for Recovery of Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*, Separation Science and Technology, 46: 64-79,

2011).

[0008] 이에, 본 발명자들은 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*)부터 아스타잔틴을 효율적으로 추출하는 방법을 개발하고자 예의 노력한 결과, 성숙한 포자형태의 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*)에 높은 광도와 질소원을 제공하여 발아를 유도하면 세포 내 C/N(탄소/질소)비가 낮아지고 세포벽이 약화되어 아스타잔틴 수득율이 높아진다는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*)의 세포벽을 약화시켜 아스타잔틴 수득 효율을 향상시키는 방법을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (a) 자가영양조건에서 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*)를 배양하는 단계 (b) 아스타잔틴 생성을 유발한 다음, 성숙한 포자형태의 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*)의 발아를 유도하는 단계 및 (c) 상기 발아가 유도된 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*)로부터 아스타잔틴을 수득하는 단계를 포함하는 자가영양조건에서 헤마토코쿠스 플루비알리스 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*)의 세포발아 유도를 통한 아스타잔틴의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명에 따른 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*) 세포 발아를 통한 세포벽 약화를 위한 전처리 기술을 이용하면 적절한 광도와 C/N 비(탄소/질소 비) 조성을 통해 아스타잔틴 분해를 최소화할 수 있으며, 세포 구성 성분 내 단백질 함량을 최대화하여 세포 파쇄를 쉽게 할 수 있어 그 안에 존재하는 아스타잔틴을 높은 수율로 추출할 수 있다. 또한 이 기술은 배양 공정에 적용 가능하여 이후 추출 과정을 용이하게 한다는 장점이 있고, 비교적 그 적용 방법이 간단하여 배양 공정에 적용 가능하고 이후 추출 과정을 용이하게 한다는 장점이 있으며, 다른 전처리 방법과 달리 생물학적인 메커니즘을 이용하므로 에너지 소비가 적으며 친환경적이다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 자가영양조건을 이용한 광 배양 공정을 이해하기 쉽게 나타낸 개략도이다.

도 2는 자가영양조건에서 약 2달 동안의 유발(아스타잔틴 합성) 기간을 거친 헤마토코쿠스 플루비알리스에 영양원인 NIES-C 배지를 공급하였을 때 세포 발아 중 형태 변화를 나타낸 광학 현미경 사진이다.

도 3은 자가영양조건에서 약 2달 동안의 유발(아스타잔틴 합성) 기간을 거친 헤마토코쿠스 플루비알리스에 각각 다른 광 조건($50 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, $300 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$)에서 질소원을 농도별로 공급한 후 바이오매스와 아스타잔틴 농도 변화 추이를 나타낸 그래프이다.

도 4는 자가영양조건에서 약 2달 동안의 유발(아스타잔틴 합성) 기간을 거친 헤마토코쿠스 플루비알리스에 각각 다른 광 조건($50 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, $300 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$)에서 농도 별로 질소원을 공급하여 발아기를 유도한 후 아스타잔틴 추출 효율을 나타낸 그래프이다.

도 5는 농도 2.0mM의 질소원을 첨가한 조건에서 세포 내 성분 함량 변화를 나타낸 막대그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0013] 본 발명에서는 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*)로부터 아스타잔틴의 생산효율을 높이기 위하여 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*)의 세포벽을 약화시키는 방법을 제공하였다.
- [0014] 구체적으로, 본 발명자들은 자가 영양 조건에서 유도기를 거쳐 아스타잔틴을 함유한 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*)에 일시적으로 질소원을 공급하여 세포내 C/N 비를 낮추고 세포 발아를 유도하여 배양 공정 중 세포 주기를 세포벽이 단단한 aplanospore에서 flagellate기로 접어들도록 하여 상대적으로 세포벽을 약화시켰으며, 이러한 조건에서 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*)로부터의 아스타잔틴 추출 효율이 향상된 것을 확인하였다.
- [0015] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, (a) 자가영양조건에서 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*)를 배양하는 단계 (b) 아스타잔틴 생성을 유발한 다음, 성숙한 포자형태의 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*)의 발아를 유도하는 단계 및 (c) 상기 발아가 유도된 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*)로부터 아스타잔틴을 수득하는 단계를 포함하는 자가영양조건에서 헤마토코쿠스 플루비알리스 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*)의 세포발아 유도를 통한 아스타잔틴의 제조방법에 관한 것이다.
- [0016] 본 발명에서는 세포 발아를 위한 광조건과 C/N 비(탄소/질소 비)의 최적화를 달성하기 위하여, 이산화탄소 고정 및 유용 물질 생산을 위해 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*)를 자가영양조건에서 대량 배양하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0017] 본 발명에 있어서, 배양 조건은 회분배양(Batch-culture) 조건으로서, 반응기 내 별다른 유입과 유출 없이 연속적으로 이산화탄소만이 공급되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0018] 본 발명에서 생장기 단계의 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*)는 NIES-C 배지에서 배양하며, 광조건은 $50\sim70\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0019] 본 발명에서 생장기가 끝난 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*)는 NIES-N 배지에서 배양하며 증식을 억제하고 $200\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s} \sim 500\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 범위의 광조건으로 스트레스 환경을 제공하여 시스트 생성 및 아스타잔틴 생산을 유발하는 것을 특징으로 할 수 있으나 이에 국한된 것은 아니다.
- [0020] 바람직하게는 상기의 광조건이 $300\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0021] 본 발명에서 자가영양조건에서 성숙한 시스트에 $200\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s} \sim 500\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 범위의 광조건을 제공하고 질소원을 첨가하여 세포내 C/N 비(탄소/질소 비)를 조절하는 것을 특징으로 할 수 있으나 이에 국한된 것은 아니다.
- [0022] 바람직하게는 상기의 광조건이 $300\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0023] 본 발명에서 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*) 발아기에는 NIES-C 배지를 공급하고 $200\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s} \sim 500\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 범위의 광조건을 제공하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0024] 바람직하게는 상기의 광조건이 $300\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0025] 본 발명의 일실시예에서 $300\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 광조건 및 2.0mM KNO_3 일 때, 대조군의 C/N비가 2.3인 것과 비교하여 실험군은 1.3이었다.
- [0026] 결과적으로, 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*)의 발아 과정 중 아스타잔틴 분해를 최소화하고 추출 효율을 최대화하기 위해 발아에 영향을 주는 두 요인인 광도와 C/N 비(탄소/질소 비) 조건을 고려하여 배양 공정 중 아스타잔틴 손실을 최소화할 수 있었다.
- [0027] 이하 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

- [0028] <실시예>
- [0029] 본 발명에 사용된 균주는 *Haematococcus pluvialis* NIES-144로서 National Institute for Environmental Studies, Tsukuba, Japan으로부터 구입되었다. 본 실험에 사용된 배지의 NIES-C와 NIES-N이며, 이들의 구성 성분을 하기 [표1]에 나타내었다. 또한 자가영양조건에서 헤마토크스 플루비알리스에 공급한 지역 난방공사 판교지사의 배가스 성분을 하기 [표 2]에 나타내었다. 또한 광 배양공정의 옥외 배양 조건은 아래에 나타내었다.
- [0030] - NIES-C 배지: autotrophic medium (자가영양배지, 목적: 생장)
- [0031] - NIES-N 배지: autotrophic medium (자가영양배지, 목적: 생육억제, 광유발, 아스타잔틴 생산)
- [0032] - 가스 공급 : 한국 지역난방공사 판교 지사 배기가스 (LNG 연소 배가스)
- [0033] - 주입속도 : 0.1~0.2 L/min
- [0034] - 배양 온도 : 26 ± 3 °C
- [0035] °C - 광주기 : (대략적으로) 16:8
- [0036] - 반응기 종류 : 5L 부피의 기포탑(bubble column)을 이용하여 교반하는 관형(tubular)의 투명한 광 생물 반응기
- [0037] - 생장 및 시스트 유도기 시 광조건 : $50 \sim 70 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ (for vegetative growth); $300 \sim 500 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ (for inductive growth)
- [0038] - 서로 다른 C/N 비 조성에 사용된 영양원 : 0.5mM KNO₃, 1.0mM KNO₃, 2.0mM KNO₃, 대조군 (아무것도 첨가하지 않음)

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	

표 2

	기준치 (평균값)	최대값/최소값
SO _x (ppm)	-	-
NO _x (ppm)	24.74	169.73 / 2.23
CO (ppm)	46.31	52.90 / 24.24

CO ₂ (%)	4-6%	
O ₂ (%)	11.50%	13.28% / 8.88%

- [0041] 실시예 1. 헤마토코쿠스 플루비알리스의 성숙한 시스트 배양액의 C/N 비(탄소/질소 비) 변화 후 발아 과정의 관찰
- [0042] C/N 비(탄소/질소 비)가 헤마토코쿠스 플루비알리스의 시스트 발아에 미치는 영향을 탐구하기 위하여, 먼저 헤마토코쿠스 플루비알리스를 생장 조건에서 배양하였다. 도 1A에서 배양 공정에 관해 대략적으로 나타내었다. 유기 탄소원이 결핍된 NIES-C 배지에서 낮은 광도의 빛($50 \sim 70 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$)과 오직 배가스 내 이산화탄소만을 유일한 탄소원으로 생육하여 대수기에 이른 세포 배양액 ($\text{OD}_{680} = \sim 0.6$) 내 세포를 NIES-N 배지를 첨가하여 증식을 억제하고, 강한 빛($300 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$)에 노출하여 시스트 형성을 유도하였고 이후 약 2달 동안의 유도기를 거쳤다.
- [0043] 유도기는 다음과 같이 진행하였다. 플라젤레이트 세포를 스트레스 상황에 1달 이상 노출하여 원형질체가 둥글게 변하고 크기가 커지고 운동성을 잃은 시스트를 형성하였다. 시스트가 성숙되면 vegetative wall(생장기 때의 세포벽)은 사라진다. 시스트의 직경은 $22 \sim 76 \mu\text{m}$ 이다. 기존 연구에서 전자현미경으로 시스트 세포벽으로 관찰한 결과 외부의 primary wall, trilaminar sheath, secondary wall로 이루어져 있음을 밝혀냈다. 그리고 최근에 추가적인 tertiary wall이 관찰되었다. 4-6주 정도 된 시스트에서 2개의 층을 가진 섬유질성의 tertiary wall을 관찰할 수 있다. 시스트가 점차 성숙해지며 primary cell wall은 분해된다.
- [0044] 도 2에 나타난 바와 같이, C/N 비(탄소/질소 비) 변화 후 세포 발아를 관찰할 수 있었다. 시스트 발아 과정은 다음과 같다. 먼저 유도기를 거친 헤마토코쿠스 플루비알리스에 생장기에 사용했던 NIES-C 배지를 영양원으로 공급하였다. 새로운 배지로 옮겨졌을 때 시스트는 발아하고 zoospore를 방출한다. 시스트 발아와 zoospore 방출 과정에서 세포벽은 다음과 같이 변화한다. trilaminar sheath가 파괴되는 반면에 신장성이 있는 tertiary wall이 인접한 secondary wall과 함께 이동하며 시스트의 크기 확장과 모형 변화에 관여한다. Zooid는 이 tertiary wall을 파괴하며 방출되며, 정단 조직에서 매우 얇아진다. 이 단계에서 zooid는 아스타잔틴 때문에 시스트와 마찬가지로 붉은 색으로 관찰되었다.
- [0045] 실시예 2. 자가영양조건에서 헤마토코쿠스 플루비알리스의 성숙한 시스트 발아가 바이오매스 및 아스타잔틴 농도 변화에 미치는 영향
- [0046] C/N 비(탄소/질소 비) 변화가 발아에 주는 영향을 관찰하기 위하여 헤마토코쿠스 플루비알리스의 성숙한 시스트에 도 1B에서 나타난 바와 같이 각각 다른 농도의 질소원(0.5mM KNO_3 , 1.0mM KNO_3 , 2.0mM KNO_3)을 공급해 발아를 유도하였고, 광도가 발아에 주는 영향을 관찰하기 위하여 세포 발아 동안 각각 높은 광 조건과 낮은 광 조건을 주었다.
- [0047] 도 3A는 높은 광도에서의 바이오매스, 도 3B는 낮은 광도에서의 바이오매스, 도 3C는 높은 광도에서의 아스타잔틴 농도, 도 3D는 낮은 광도에서의 아스타잔틴 농도를 나타낸다. C/N 비(탄소/질소 비) 변화 후 헤마토코쿠스 플루비알리스는 바이오매스 생장 및 아스타잔틴 농도 감소를 보였다(도3).
- [0048] 도 3A 및 3B에 나타난 바와 같이 초기 바이오매스는 $2.0 \sim 2.3\text{g/L}$ 인 반면 질소원 공급 후 바이오매스가 영양원 공급 10일 후 C/N 비에 따라 높은 광도에서는 최대 3.4g/L 이고 낮은 광도에서는 최대 3.7g/L 로 증가한 것을 확인할 수 있었다. 또한 도 3C와 3D에 나타난 바와 같이 초기 아스타잔틴 농도는 $100 \sim 110\text{mg/L}$ 인 반면 질소원 공급 후 아스타잔틴 농도는 영양원 공급 10일 후 높은 광도에서 C/N 비에 따라 최대 94mg/L , 최소 71mg/L 이었고, 낮은 광도에서 최대 70mg/L , 최소 46mg/L 으로 나타났다.
- [0049] 결과적으로 낮은 광도의 빛(3B)이 높은 광도의 빛(3A)보다 바이오매스 생장에 유리함을 알 수 있었다. 낮은 광도의 빛은 세포 생장기 조건의 광도 조건이다. 이는 강한 광 조건은 세포에서 일종의 스트레스로 작용하므로 이에 대응하기 위해 탄소 고정이 광 보호 물질인 아스타잔틴의 형태로 이루어지나, 낮은 광 조건은 탄소 고정이 바이오매스 증가로 이어질 것이라는 관점과 상충한다.
- [0050] 또한 낮은 광도는 높은 광도에 비해 더 많은 아스타잔틴 분해를 야기하였다. 이는 아스타잔틴의 광보호적 역할, 다시 말해 차광막으로서 그리고 직접적인 산화 손상에 대응하기 위해 또는, 방어 매커니즘의 부산물로서 세포

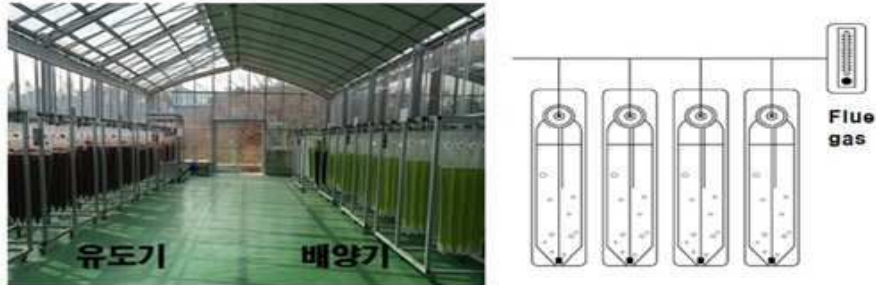
를 보호하기 위해 생성된다는 기존 연구 결과와 상응한다.

- [0051] 실시예 3. 자가영양조건에서 헤마토코쿠스 플루비알리스의 성숙한 시스트 발아가 아스타잔틴 추출을 향상에 주는 영향
- [0052] 10일 동안의 시스트 발아 과정 동안 헤마토코쿠스 샘플을 채취하여 아스타잔틴 추출 실험을 진행하였다. 추출은 다음과 같이 진행하였다. 먼저 2ml microtube에 세포 배양액 1ml를 넣고 상등액을 버리고 세포 pellet만을 남긴다. 그 후 methanol 1ml을 넣고 glass bead를 첨가한다. 이후 호모게나이저(Qiagen사, Germany)를 이용하여 물리적 충격을 가해 bead-beating법으로 세포벽을 파쇄하여 세포 내 물질을 추출하였다. 그리고 HPLC(Shimazu 사, Japan)를 이용하여 아스타잔틴 농도를 분석하였다.
- [0053] 도 4A는 높은 광도 조건에서 아스타잔틴 추출 효율 변화를 나타낸 것이다. 발아 유도 후 1일~4일 동안 추출 효율이 증가하였으며, 특히 2.0mM의 KNO_3 첨가 조건에서 추출 효율이 급격히 증가함을 알 수 있었다. 그 후 추출 효율은 거의 일정하게 유지되는 양상을 보였다. 아스타잔틴 추출 효율의 증가는 세포가 발아하면서 시스트가 커지며 zooid 형성동안 세포벽이 부서지는 것과 관련된다.
- [0054] 도 4B는 낮은 광도 조건에서 아스타잔틴 추출 효율 변화를 나타낸 것이다. 발아 유도 후 추출 효율은 계속적으로 증가하였으며, 대조군에서도 추출 효율이 약간 증가하는 하였다(10일 후 70%). 이와 같은 결과는 낮은 광도 조건은 세포 생장에 유리하므로 세포가 점차 시스트에서 플라젤레이트로 분화하면서 세포벽의 단단한 구조가 약화됨에 따른 것으로 보인다.
- [0055] 아스타잔틴 추출 효율은 다음과 같이 계산하였다.
- [0056] [아스타잔틴 추출 효율(%) = 30분의 호모게나이저 처리 후 추출된 아스타잔틴 농도/ 총 아스타잔틴 농도 100]
- [0057] 실시예 4. 2.0mM KNO_3 조건(낮은 C/N비)에서 헤마토코쿠스 플루비알리스의 세포 구성 성분의 함량비
- [0058] 도 5A, B는 아스타잔틴 추출 효율 및 수득률이 가장 우수했던 높은 광도에서 2.0mM KNO_3 첨가 조건에서 세포 구성 성분인 단백질, 탄수화물, 지질 등의 함량을 백분율로 나타내었다. 대조군인 A와 비교해 보았을 때 실험군인 B에서 단백질 함량은 건중량 대비 17%에서 30%로 늘어났으며 이는 시스트가 발아하며 새로 세포 분열을 위해 위한 단백질 합성이 왕성하게 일어남에 따른 것으로 보인다. 세포 분열이 활발히 일어나고 단백질 함량이 높은 세포는 상대적으로 단단한 섬유질성의 탄수화물 중합체로 이루어진 시스트에 비해 물리적 충격에 약하므로 더 쉽게 아스타잔틴을 추출할 수 있었다. 높은 단백질 함량은 세포 발아가 왕성함을 의미하며, 단백질 성분이 높을수록 세포 파쇄에 적은 노력이 필요하나, 세포 발아가 일어나며 보호 물질인 아스타잔틴이 분해되고 세포 내 대사산물이 새로운 세포 분열 쪽으로 사용되므로 적절한 중간 지점을 찾는 것이 중요할 것이다.
- [0059] 본 발명의 실시예에 의하면, 완전히 성숙한 시스트에 질소원을 첨가하여 C/N 비를 낮추면 광도에 따라 정도의 차이가 관찰되나 바이오매스가 증가하며 아스타잔틴 농도가 감소하였다. 낮은 광도에서 바이오매스 증가율이 더 우수하였으나, 아스타잔틴이 높은 광도에 비하여 더 많이 분해된다. 반면, 높은 광도에서는 바이오매스 증가율은 낮으나 아스타잔틴이 보존되는 효과가 있었다. 이는 아스타잔틴이 항산화물질로서 광 보호 효과가 있기 때문이라고 사료된다.
- [0060] 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.

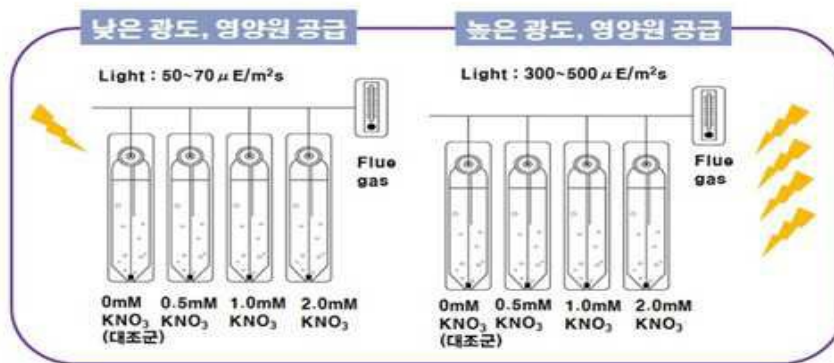
도면

도면1

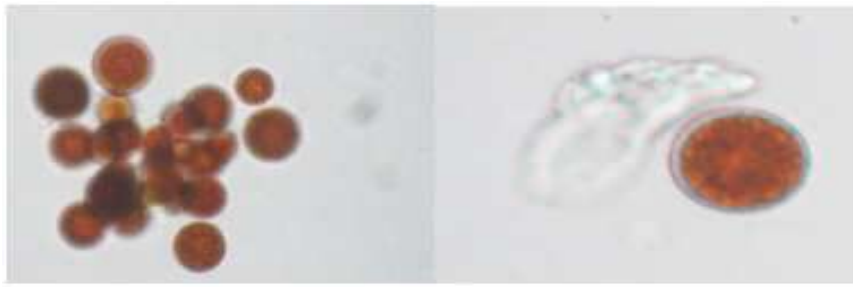
(A)



(B)

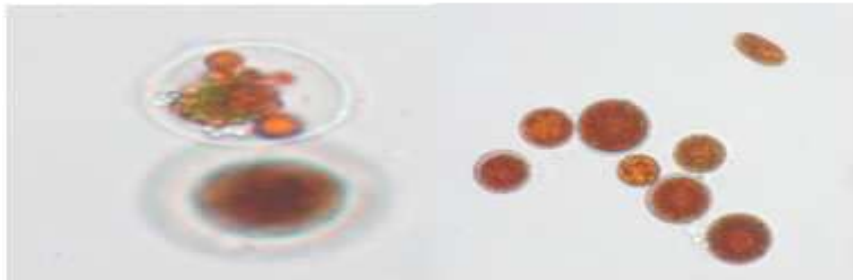


도면2



Day 0

Day 2



Day 4

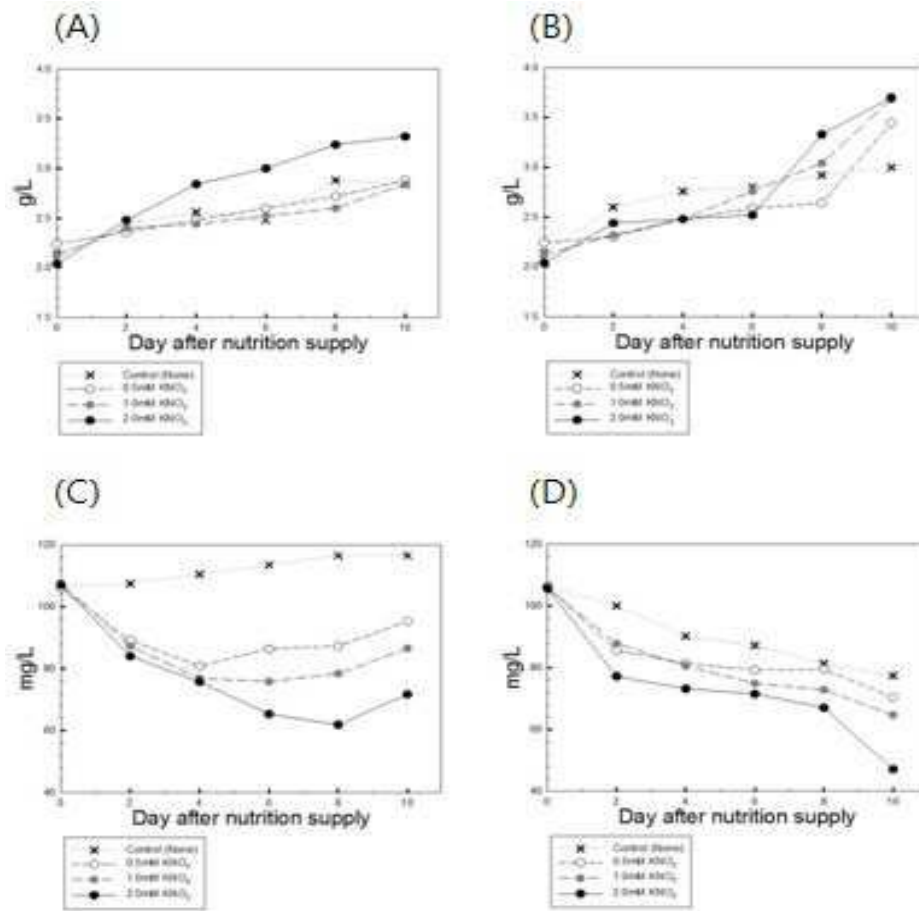
Day 6



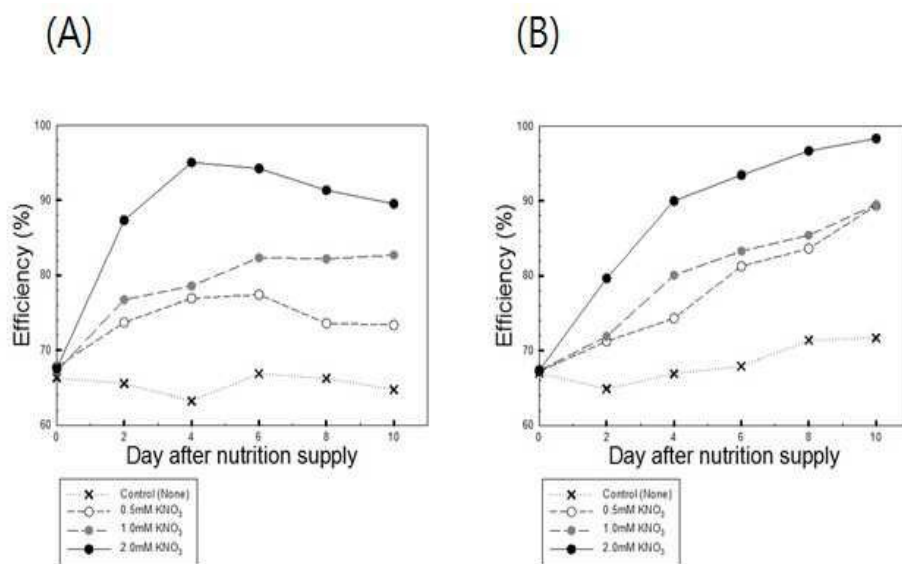
Day 8

10일 후 방출된 Zooid

도면3



도면4



도면5

