(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0026763
(43) 공개일자 2024년02월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 13/00 (2017.01) *C12N 1/12* (2006.01)
C12P 23/00 (2006.01) *C12R 1/89* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 13/00 (2013.01)
C12N 1/12 (2019.02)
(21) 출원번호 10-2022-0105020
(22) 출원일자 2022년08월22일
심사청구일자 2022년08월22일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
한상일
전라북도 정읍시 광교4길 12-4 (시기동)
최윤이
서울특별시 성북구 안암로 145 (안암동5가)
전민서
서울특별시 성북구 고려대로17가길 64 (안암동1가, 래미안 안암)
(74) 대리인
특허법인 남앤남

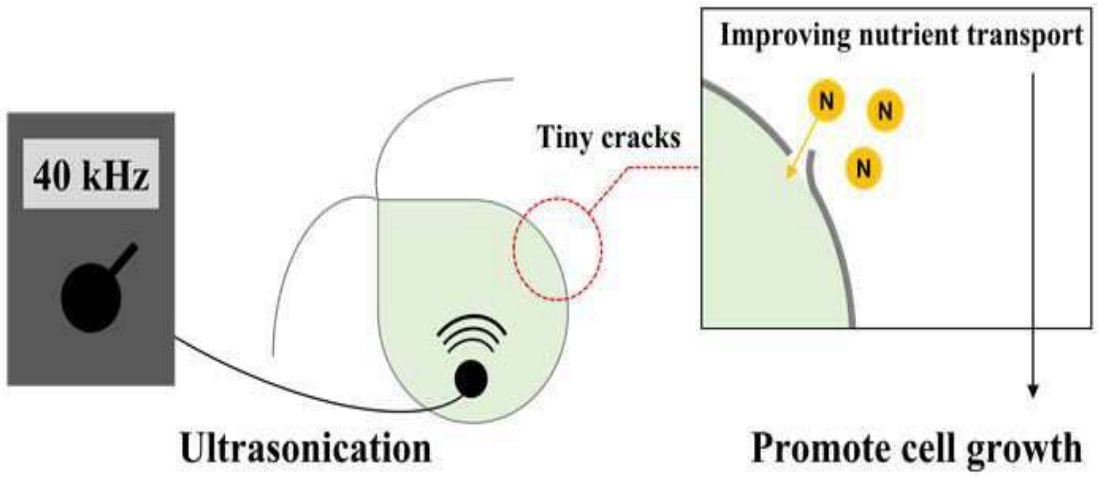
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **초음파 자극을 이용한 헤마토코쿠스 라쿠스트리스의 성장 촉진방법**

(57) 요 약

본 발명은 초음파 자극을 이용한 헤마토코쿠스 라쿠스트리스의 성장 촉진방법에 관한 것으로, 구체적으로 본 발명은 미세조류에 저주파수 및 저출력의 초음파를 처리하는 단계를 포함하는 미세조류의 세포 성장 촉진방법 및 미세조류에 저주파수 및 저출력의 초음파를 처리하고 배양하는 단계를 포함하는 세포 성장이 촉진된 미세조류로부터 바이오매스 또는 아스타잔틴을 대량생산하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 초음파 자극을 이용한 헤마토코쿠스 라쿠스트리스의 성장 촉진방법은, 단시간의 초음파 처리를 통해 미세조류인 헤마토코쿠스 라쿠스트리스의 세포벽에 미세기공을 형성하도록 함으로써 영양분 수송의 개선을 유도하여 세포 밀도, 엽록소 함량 및 아스타잔틴의 수율을 향상시킬 수 있다. 따라서 본 발명에서 확립한 최적의 초음파 자극 조건을 이용할 경우, 고부가가치의 산업 소재인 바이오매스 및 아스타잔틴 등을 미세조류로부터 효율적으로 대량생산 할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12P 23/00 (2013.01)
C12R 2001/89 (2021.05)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711141613
과제번호	2021B300
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	(재단)과학기술일자리진흥원
연구사업명	공공연구성과활용촉진(R&D)
연구과제명	광 조건하 미세조류 기반 아스타잔틴 고생산 및 제품화 기술 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2022.01.01 ~ 2022.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

미세조류에 저주파수 및 저출력의 초음파를 처리하는 단계를 포함하는, 미세조류의 세포 성장 촉진방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 초음파를 처리하는 단계는 20~40kHz의 저주파수, 20~80W 저출력, 3~15일의 초음파 처리 주기 및 5분의 초음파 처리 시간으로 수행하는 것을 특징으로 하는, 미세조류의 세포 성장 촉진방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 초음파를 처리하는 단계는 40kHz의 저주파수, 20W 저출력, 15일의 초음파 처리 주기 및 5분의 초음파 처리 시간으로 수행하는 것을 특징으로 하는, 미세조류의 세포 성장 촉진방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 초음파 처리는 미세조류의 세포벽에 미세기공을 형성하도록 하여 영양분의 수송을 개선시키는 것을 특징으로 하는, 미세조류의 세포 성장 촉진방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 저주파수 및 저출력의 초음파 처리는,

미세조류의 세포밀도 증가;

엽록소 함량증가; 및

아스타잔틴 수율증가; 효과를 갖는 것을 특징으로 하는, 미세조류의 세포 성장 촉진방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 미세조류는 헤마토코쿠스 라쿠스트리스(*Haematococcus lacustris*)인 것을 특징으로 하는, 미세조류의 세포 성장 촉진방법.

청구항 7

미세조류에 저주파수 및 저출력의 초음파를 처리하고 배양하는 단계를 포함하는, 세포 성장이 촉진된 미세조류로부터 바이오매스 또는 아스타잔틴을 대량생산하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 초음파를 처리하는 단계는 20~40kHz의 저주파수, 20~80W 저출력, 3~15일의 초음파 처리 주기 및 5분의 초음파 처리 시간으로 수행하는 것을 특징으로 하는, 세포 성장이 촉진된 미세조류로부터 바이오매스 또는 아스타잔틴을 대량생산하는 방법.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 미세조류는 헤마토코쿠스 라쿠스트리스(*Haematococcus lacustris*)인 것을 특징으로 하는, 세포 성장이 촉진된 미세조류로부터 바이오매스 또는 아스타잔틴을 대량생산하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 초음파 자극을 이용한 헤마토코쿠스 라쿠스트리스의 성장 촉진방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 미세조류는 광합성과 세포 대사를 통해 빛과 무기물을 에너지와 탄소 화합물로 전환할 수 있다. 이들은 고등식물보다 광합성 효율과 면적 대비 생산성이 월등히 높고, 인공 배양이 용이하여 계절에 따른 제한 없이 재배 가능하므로 차세대 바이오매스 생산 원료로써 유망하다. 더욱이, 일부 미세조류는 산업적으로 귀중한 천연 고부가가치 물질을 생합성 할 수 있다.

[0003] 미세조류 유래 고부가가치 물질 중 하나인 아스타잔틴은 항산화, 항염, 항당뇨, 항암 등 다양한 생리활성을 보인다. 특히, 아스타잔틴은 천연 화합물 중 가장 높은 항산화 활성을 나타내고, 경구 복용 시 완전한 무독성을 나타내므로 자외선에 의한 눈과 피부 보호, 뇌신경 퇴화 질병 예방, 면역기능 강화, 심혈관질환 예방 등의 효과를 나타내어 식품, 의약품, 화장품, 사료 등의 다양한 산업 분야에서 아스타잔틴의 수요가 꾸준히 증가하고 있다.

[0004] 이러한 아스타잔틴은 크게 화학적 합성에 의해 수득되거나 또는 크릴새우, 효모, 미세조류로부터 추출하여 수득된다. 그러나 합성 아스타잔틴은 유리 아스타잔틴으로 빛과 온도에 매우 불안정하고 낮은 생리활성을 보인다. 또한, 크릴새우 유래 아스타잔틴은 높은 회분 및 키틴 함량으로 인해 품질이 낮은 문제가 있고, 높은 정제 비용이 드는 문제가 있다. 또한, 효모 유래 아스타잔틴은 3R,3’ R 형태의 아스타잔틴으로 생체 이용률이 매우 낮다. 반면, 미세조류 유래 아스타잔틴은 에스터 아스타잔틴 형태로 수득할 수 있어 빛과 열 안정성이 높고, 3S,3’ S 형태의 아스타잔틴이므로 생체 이용률이 가장 높다. 따라서 미세조류 유래 아스타잔틴이 산업적으로 가장 적합하다.

[0005] 한편, 담수 단세포 녹조류인 헤마토코쿠스(Haematococcus sp.)는 다량의 아스타잔틴을 생산할 수 있는 산업적으로 가장 유망한 미세조류 중 하나이다. 헤마토코쿠스는 세포 건조중량의 최대 5%까지 카로티노이드를 축적할 수 있으며, 이 중 아스타잔틴 함량은 약 90%에 달한다. 헤마토코쿠스의 생활사는 광합성과 세포분열이 활발히 이루어지는 영양 단계와 아스타잔틴이 축적되는 성숙기로 엄격하게 구분되며, 스트레스 조건에서 체내의 활성산소를 제거하기 위해 아스타잔틴 생합성을 시작하는 것으로 알려져 있다. 따라서 아스타잔틴 생산성을 최대화하기 위해서는 효과적인 세포 성장 촉진과 스트레스 자극이 모두 고려되어야 한다.

[0006] 지금까지 연구된 헤마토코쿠스의 생산성을 높이기 위한 기술은 대부분 아스타잔틴 생합성 유도를 위한 스트레스 자극에만 초점이 맞추어져 있었을 뿐, 헤마토코쿠스의 세포 성장을 촉진시키는 방법에 대한 연구는 미흡하다. 세포 성장 촉진은 바이오매스 생산성을 향상시킬 수 있고 세포 밀도를 증진시키며, 최대 세포 밀도에 도달하기까지의 배양 시간을 단축할 수 있으므로 헤마토코쿠스의 재배에 소모되는 비용과 시간을 절약하여 경제성을 향상시킬 수 있기 때문에, 아스타잔틴 생합성 유도만을 위한 기술이 아닌 헤마토코쿠스의 성장을 증진시킬 수 있는 기술의 개발이 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국등록특허 10-2167513

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 이에 본 발명자들은 헤마토코쿠스 라쿠스트리스의 성장을 효과적으로 촉진시킬 수 있고, 동시에 일차대사물질 및 이차대사물질의 생산성을 향상시킬 수 있는 최적의 저출력 초음파 처리 조건을 확립함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0009] 따라서 본 발명의 목적은 미세조류에 저주파수 및 저출력의 초음파를 처리하는 단계를 포함하는, 미세조류의 세포 성장 촉진방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 미세조류에 저주파수 및 저출력의 초음파를 처리하고 배양하는 단계를 포함하는, 세포 성장이 촉진된 미세조류로부터 바이오매스 또는 아스타잔틴을 대량생산하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해 본 발명은, 미세조류에 저주파수 및 저출력의 초음파를 처리하는 단계를 포함하는, 미세조류의 세포 성장 촉진방법을 제공한다.

[0012] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 초음파를 처리하는 단계는 20~40kHz의 저주파수, 20~80W 저출력, 3~15일의 초음파 처리 주기 및 5분의 초음파 처리 시간으로 수행하는 것일 수 있다.

[0013] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 초음파를 처리하는 단계는 40kHz의 저주파수, 20W 저출력, 15일의 초음파 처리 주기 및 5분의 초음파 처리 시간으로 수행하는 것일 수 있다.

[0014] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 초음파 처리는 미세조류의 세포벽에 미세기공을 형성하도록 하여 영양분의 수송을 개선시키는 것일 수 있다.

[0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 저주파수 및 저출력의 초음파 처리는, 미세조류의 세포밀도 증가; 엽록소 함량증가; 및 아스타잔틴 수율증가; 효과를 갖는 것일 수 있다.

[0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 미세조류는 헤마토코쿠스 라쿠스트리스(*Haematococcus lacustris*)일 수 있다.

[0017] 또한 본 발명은 미세조류에 저주파수 및 저출력의 초음파를 처리하고 배양하는 단계를 포함하는, 세포 성장이 촉진된 미세조류로부터 바이오매스 또는 아스타잔틴을 대량생산하는 방법을 제공한다.

[0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 초음파를 처리하는 단계는 20~40kHz의 저주파수, 20~80W 저출력, 3~15일의 초음파 처리 주기 및 5분의 초음파 처리 시간으로 수행하는 것일 수 있다.

[0019] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 미세조류는 헤마토코쿠스 라쿠스트리스(*Haematococcus lacustris*)일 수 있다.

발명의 효과

[0020] 본 발명에 따른 초음파 자극을 이용한 헤마토코쿠스 라쿠스트리스의 성장 촉진방법은, 단시간의 초음파 처리를 통해 미세조류인 헤마토코쿠스 라쿠스트리스의 세포벽에 미세기공을 형성하도록 함으로써 영양분 수송의 개선을 유도하여 세포 밀도, 엽록소 함량 및 아스타잔틴의 수율을 향상시킬 수 있다. 따라서 본 발명에서 확립한 최적의 초음파 자극 조건을 이용할 경우, 고부가가치의 산업 소재인 바이오매스 및 아스타잔틴 등을 미세조류로부터 효율적으로 대량생산 할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 본 발명에 따른 초음파 자극을 이용한 헤마토코쿠스 라쿠스트리스의 성장 촉진을 유도과정에 대한 배양 모식도이다.

도 2는 다양한 출력의 초음파 자극에 대한 헤마토코쿠스 라쿠스트리스의 (a) 세포 밀도 변화, (b) 엽록소 함량 변화 및 (c) 아스타잔틴 수율 변화를 나타낸 그래프이다.

도 3은 다양한 초음파 처리 주기에 대한 헤마토코쿠스 라쿠스트리스의 (a) 세세포 밀도 변화, (b) 엽록소 함량 변화 및 (c) 아스타잔틴 수율 변화를 나타낸 그래프이다.

도 4는 (a) 다양한 출력의 초음파 자극 및 (b) 다양한 초음파 처리 주기에 대한 헤마토코쿠스 라쿠스트리스의

세포 형태를 관찰한 사진을 나타낸 것이다.

도 5는 초음파 자극 여부에 따른 헤마토코쿠스 라쿠스트리스의 세포 표면 구조 변화 투과전자현미경으로 관찰한 사진을 나타낸 것이다.

도 6은 초음파 자극에 의한 헤마토코쿠스 라쿠스트리스에서 세포 성장 및 항산화와 관련된 유전자들의 상대적 mRNA 발현 수준을 분석한 결과를 나타낸 것으로, *minD* 및 *transporter*는 각각 영양분 수송과 관련된 septum site-determining protein 및 nitrate/nitrite transporter에 해당되며, *SOD*와 *CAT*는 각각 세포 스트레스와 관련된 superoxide dismutase 및 catalase에 해당된다.

도 7은 초음파 자극 여부에 따른 헤마토코쿠스 라쿠스트리스 배양액 내의 (a) 총 질소 변화 및 (b) 총 인 함량 변화를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 본 발명은 미세조류의 성장을 효과적으로 촉진시킬 수 있는 방법을 개발한 기술로서, 단시간의 초음파 자극을 통해 헤마토코쿠스 라쿠스트리스 내로의 영양분 수송을 개선할 수 있고 세포 밀도를 향상시킬 수 있으며, 바이오매스 및 아스타잔틴과 같은 유용한 산업소재의 생산을 증진시킬 수 있는 미세조류의 성장 촉진을 위한 최적의 초음파 처리 조건을 규명한 점에 특징이 있다.

[0023] 생물 산업분야에서 초음파의 처리는 대부분 세포 내의 유용성분을 추출하기 위한 세포 파쇄, 입자의 분쇄 및 균질화를 목적으로 널리 이용되고 있는 방법이다.

[0024] 한편, 본 발명에서는 이러한 초음파 처리를 이용하여 유용물질을 생산할 수 있는 미세조류의 세포 성장을 촉진하기 위한 방법으로 적용하였고, 최적의 초음파 처리 조건을 확립하였다.

[0025] 본 발명의 일실시예에 따르면, 담수 단세포 녹조류에 속하는 헤마토코쿠스 라쿠스트리스를 대상으로, 상기 미세조류의 세포 성장을 극대화시킬 수 있는 초음파 처리 조건을 확인하기 위해, 다양한 초음파 출력 조건, 주파수, 처리 주기, 처리 시간에서 미세조류의 세포밀도, 엽록소 함량 및 아스타잔틴의 수율 변화를 분석하였다.

[0026] 그 결과, 20~40kHz의 저주파수, 20~80W 저출력, 3~15일의 초음파 처리 주기 및 5분의 초음파 처리 시간으로 수행할 경우, 초음파를 처리하지 않은 군에 비해 헤마토코쿠스 라쿠스트리스의 세포밀도, 엽록소 함량 및 아스타잔틴의 수율이 모두 증가하는 것으로 나타났고, 특히 40kHz의 저주파수, 20W 저출력, 15일의 초음파 처리 주기 및 5분의 초음파 처리 조건에가 그 효과가 가장 높은 것으로 나타났다.

[0027] 따라서 본 발명은 미세조류에 저주파수 및 저출력의 초음파를 처리하는 단계를 포함하는, 미세조류의 세포 성장 촉진방법을 제공할 수 있다.

[0028] 상기 초음파를 처리하는 단계는 20~40kHz의 저주파수, 20~80W 저출력, 3~15일의 초음파 처리 주기 및 5분의 초음파 처리 시간으로 수행할 수 있으며, 바람직하게는 40kHz의 저주파수, 20W 저출력, 15일의 초음파 처리 주기 및 단시간인 5분의 초음파 처리 시간으로 수행할 수 있다.

[0029] 또한 상기 초음파 처리는 당업계에 사용되는 초음파 장비라면 모두 이용할 수 있으며, 초음파 장치의 형태는 수조형 또는 팁형 모두 사용 가능하다. 바람직하게는 전체면적에 전력을 고르게 가할 수 있으므로 수조형이 바람직하다.

[0030] 본 발명에 따른 초음파 처리에서 주파수는 20~40kHz의 주파수 범위에서 처리하는 것이 바람직한데, 만일 20kHz 미만의 주파수로 처리하게 되면, 미세조류의 세포 성장 효과를 나타낼 수 없으며, 반면, 40kHz를 초과하는 주파수에서 처리하게 되면 세포에 과도한 스트레스가 유발되어 세포분열이 억제되거나 물리적으로 세포가 파쇄될 수 있는 문제점이 있다. 따라서 상기 주파수 범위로 처리하는 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 40kHz의 주파수로 처리하는 것이 좋다.

[0031] 또한 초음파의 출력은 20~80W의 범위에서 처리할 수 있다.

[0032] 상기 초음파 출력이 20W 미만일 경우, 미세조류의 세포성장, 엽록소의 함량증진 및 아스타잔틴의 함량증진 효과를 나타낼 수 없으며, 반면, 80W 초과할 경우에는 세포에 너무 큰 자극이 주어져 세포가 사멸하거나 파쇄될 수 있다.

[0033] 따라서 초음파의 출력은 20~80W 범위에서 수행할 수 있으며, 바람직하게는 20W로 수행할 수 있다.

[0034] 또한 초음파 처리 시간은 주기 당, 단 한 번 5분의 처리 시간으로 수행할 수 있는데, 만일 5분 미만으로 초음파 처리를 수행하게 되면 세포벽에 적절한 미세기공이 형성되지 않으며, 반면 5분을 초과하여 수행하게 되면 세포가 파쇄될 수 있다.

[0035] 초음파 처리 주기는 3일~15일로 수행할 수 있는데, 만일 3일 미만의 주기로 초음파를 처리하게 되면 미세조류의 성장 촉진 효과가 미비할 우려가 있고, 반면 15일을 초과하게 되면 세포가 사멸할 수 있다. 따라서 초음파 처리 주기는 3~15일로 수행하는 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 15일을 주기로 처리하는 것이 좋다.

[0036] 15일을 초음파 주기로 처리하게 되면, 초음파 처리로 인한 세포손상을 충분히 회복할 수 있고, 미세조류의 세포 성장, 엽록소의 함량증진 및 아스타잔틴의 함량증진을 가장 효과적으로 증진시킬 수 있다.

[0037] 이러한 본 발명에 따른 초음파 처리 조건은 배양기간 내내 지속적으로 초음파를 처리하는 것이 아닌, 초음파 처리 주기별 단 한번의 초음파 처리를 통해 미세조류의 성장을 촉진시킬 수 있고 동시에 미세조류 내의 바이오매스 및 아스타잔틴의 함량을 매우 효과적으로 증진시킬 수 있다.

[0038] 나아가 본 발명자들은 이러한 본 발명의 조건으로 초음파 자극을 주었을 때, 미세조류에 어떠한 영향을 주는지 확인하기 위한 실험을 수행하였다.

[0039] 투과전자현미경 관찰 결과, 본 발명의 조건으로 초음파를 처리한 헤마토코쿠스 라쿠스트리스는 초음파를 처리하지 않은 대조군과 달리, 세포벽에 미세기공이 형성된 것을 확인할 수 있었다. 그러나 세포벽의 내부 층에는 아무런 손상이 유발되지 않았다.

[0040] 이러한 결과를 통해 본 발명의 초음파 처리 조건은 미세조류의 세포벽에 미세기공을 형성하도록 하여 배양액 내의 영양분이 미세조류 내부로 쉽게 수송되어 보다 효과적으로 미세조류의 성장을 유도할 수 있음을 알 수 있었다.

[0041] 본 발명의 다른 일실시예에서는, 본 발명의 초음파 처리 조건으로 자극시킨 헤마토코쿠스 라쿠스트리스와 초음파를 처리하지 않은 헤마토코쿠스 라쿠스트리스로부터 총 RNA를 추출한 후, 세포성장, 영양분 수송 및 산화스트레스 관련 유전자들의 발현변화를 분석하였다.

[0042] 그 결과, 세포성장, 영양분 수송 및 산화스트레스 관련 유전자의 발현이 초음파 자극으로 인해 증가된 것으로 나타났고, 특히 유전자의 발현증가 정도는 산화스트레스 관련 유전자에 비해 세포성장 및 영양분 수송관련 유전자에서 더 높은 것으로 나타났다. 이러한 결과는 본 발명에 따른 초음파 처리 조건이 스트레스 유도 효과보다 세포성장 및 영양분 수송 증진 효과에 더 큰 영향을 준다는 것을 의미한다.

[0043] 본 발명에서 초음파 처리를 통해 세포 성장을 유도하기 위한 미세조류는 헤마토코쿠스 속(*Haematococcus sp.*) 미세조류 일 수 있고, 바람직하게는 헤마토코쿠스 라쿠스트리스(*Haematococcus lacustris*)일 수 있다.

[0044] 또한 본 발명은 미세조류에 저주파수 및 저출력의 초음파를 처리하고 배양하는 단계를 포함하는, 세포 성장이 촉진된 미세조류로부터 바이오매스 또는 아스타잔틴을 대량생산하는 방법을 제공할 수 있다.

[0045] 앞서 기술한 바와 같이, 본 발명에서 확립한 세포 성장 촉진을 위한 초음파 처리 조건을 적용하여 미세조류를 배양할 경우, 상기 미세조류의 세포 성장을 촉진시킬 수 있고, 미세조류 내에서 바이오매스 또는 아스타잔틴의 생성 및 축적을 증진시킬 수 있어, 궁극적으로 바이오매스 또는 아스타잔틴과 같은 유용물질들을 대량 생산할 수 있다.

[0046] 상기 초음파를 처리하는 단계는 20~40kHz의 저주파수, 20~80W 저출력, 3~15일의 초음파 처리 주기 및 5분의 초음파 처리 시간으로 수행할 수 있고, 바람직하게는 0kHz의 저주파수, 20W 저출력, 15일의 초음파 처리 주기 및 5분의 초음파 처리 시간으로 수행할 수 있다.

[0047] 이처럼 본 발명에 따른 초음파 처리 조건으로 미세조류를 자극할 경우, 미세조류에 과도한 스트레스를 유발하지 않으면서 효과적으로 미세조류의 세포 성장을 촉진시킬 수 있고 동시에 미세조류로부터 바이오매스 또는 아스타잔틴의 생산성을 향상시킬 수 있다.

[0048]

[0049] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0051] **<실시예 1>**

[0052] **헤마토코쿠스 라쿠스트리스의 배양**

[0053] 헤마토코쿠스 라쿠스트리스 미세조류는 OHM(Optimal Haematococcus Medium) 배지를 이용하여 배양하였다. 상기 배지의 조성은 증류수 1 L 당 KNO_3 0.41g, Na_2HPO_4 0.03g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.246g, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.11g, Fe(III)-citrate $\cdot H_2O$ 2.62mg, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.011mg, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.012mg, Cr_2O_3 0.075mg, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.98mg, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.12mg, SeO_2 0.005mg, Biotin 25㎍, Thiamine 17.5㎍, vitamin B_{12} 15㎍으로 함유되어 있다. 배양 전 상기 배지는 고압 멸균기를 이용하여 121℃, 20분 조건에서 살균하여 이용하였으며, 배양은 25℃, 50 ㎛ol m^{-2} s^{-1}의 백색광 하에서 0.2 vvm의 폭기로 진행하면서 수행하였다.

[0055] **<실시예 2>**

[0056] **헤마토코쿠스 라쿠스트리스의 세포 성장 증진을 위한 최적의 초음파 처리 조건 확립**

[0057] <2-1> 최적의 초음파 출력 조건 확인

[0058] 헤마토코쿠스 라쿠스트리스의 세포 성장 증진을 최대화시킬 수 있는 최적의 초음파 처리 조건을 확인하기 위해, 먼저 초음파 출력 조건을 각기 달리하면서 헤마토코쿠스 라쿠스트리스를 배양하였다. 구체적으로, 초기 세포 농도는 영양 단계의 세포 5×10^4 cell mL^{-1}로 설정하였고, 먼저, 초음파의 최적 출력 조건을 확립하기 위해, 초음파 발생기 ultrasonic generator 2000을 이용하여 각각 20, 40, 60, 80 W의 출력 조건으로 초음파를 가하였으며, 이때 초음파 주파수는 40kHz으로 하였고, 처리 주기는 15일, 처리 시간은 5분으로 설정하여 진행하였다. 또한 세포와 초음파 진동부의 거리는 10cm로 하였고, 매질은 25℃의 물 10L를 이용하여 수행하였다. 이후 각 초음파 처리 조건별로 배양한 헤마토코쿠스 라쿠스트리스로부터 세포 밀도를 분석하였고, 총 엽록소 함량 및 아스타잔틴 함량을 분석하였다.

[0059] 세포 밀도 분석을 통한 세포 성장 정도는 현미경과 혈구계를 이용하여 직접 계수하였고, 세포의 외형은 현미경을 이용하여 무작위로 선택된 100개 이상의 세포를 촬영하여 결정하였다.

[0060] 또한, 색소 함량은 분광광도계를 이용하여 측정하였다. 색소 분석을 위해 세포를 13,000rpm에서 10분간 원심분리하여 수확하고, 증류수로 2회 세척한 후 90% 아세톤과 비드비터를 이용하여 파쇄하였다. 이후 13,000rpm에서 1분간 원심분리하여 상층액을 분리하고 474, 646, 663nm에서 광학 밀도를 측정하였다. 엽록소 a (Chl a), 엽록소 b (Chl b), 총 엽록소 함량 및 아스타잔틴 수율(mg L^{-1})은 다음 식을 이용하여 계산되었다:

[0061] 엽록소 a (Chl a) = $12.21 \times OD_{663} - 2.81 \times OD_{646}$

[0062] 엽록소 b (Chl b) = $20.13 \times OD_{646} - 5.03 \times OD_{663}$

[0063] 총 엽록소 함량 = Chl a + Chl b

[0064] 아스타잔틴 수율 = $(OD_{474} - 0.0831) / 0.1426$

[0065]

[0066] 분석 결과, 도 2의 결과에 나타낸 바와 같이, 헤마토코쿠스 라쿠스트리스의 세포 성장과 엽록소 생산에 가장 효과적인 초음파 출력 조건은 저출력의 20W로 확인되었으며, 20W 출력 조건에서 초음파를 처리한 군은 초음파를 처리하지 않은 군에 비해 78.64%의 향상된 세포성장(세포밀도)를 보이는 것으로 나타났고, 40W, 60W 및 80W에 비해서도 세포성장 뿐만 아니라 엽록소의 생산도 더 우수한 것으로 나타났다.

[0068] <2-2> 최적의 초음파 처리 주기 확인

[0069] 초음파 처리 주기가 헤마토코쿠스 라쿠스트리스의 성장에 미치는 영향을 확인하기 위해 초음파의 출력은 <2-1>에서 확인한 최적의 조건인 20W로 설정하고, 초음파 처리 주기를 각각 3일, 9일, 15일로 하여 초음파를 처리하였다.

[0071] 분석 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이, 헤마토코쿠스 라쿠스트리스의 세포 성장과 엽록소 생산 및 아스타잔틴 생산에 가장 효과적인 주기는 15일인 것으로 나타났다. 본 발명에서 확인한 초음파 주기인 15일은 3일 및 9일에 비해 가장 높은 세포밀도 및 엽록소와 아스타잔틴의 함량 증가를 보였다. 세포밀도 및 총 엽록소 함량은 대조군에 비해 각각 50.00% 및 39.01% 증가한 것으로 나타났고, 세포 밀도가 증가함에 따라 아스타잔틴 수율도 14.33%로 증가한 것으로 나타났다.

[0072] 한편, 장시간 초음파 처리에 노출된 세포는 불가역적인 세포 손상을 초래할 수 있으며, 세포 내 효소의 활성이 상실되거나 감소되어 세포 활성을 잃게되는 문제점이 발생할 수 있다. 이러한 점에서 본 발명의 초음파 최적 처리 조건은 저출력 조건에서 15일에 단 1번의 초음파 처리만으로 헤마토코쿠스 라쿠스트리스의 생장 촉진 효과와 동시에 아스타잔틴과 같은 유용물질의 생산증가를 유도할 수 있다.

[0074] 이러한 결과를 통해, 본 발명자들은 헤마토코쿠스 라쿠스트리스의 생장을 촉진시킬 수 있는 최적의 초음파 처리 조건은 40kHz 주파수, 20W 출력, 5분의 처리 시간, 15일/1회의 처리 주기인 것을 알 수 있었다.

[0076] **<실시예 3>**

[0077] **초음파 처리에 따른 헤마토코쿠스 라쿠스트리스 세포의 미세구조에 미치는 영향 분석**

[0078] 본 발명자들은 본 발명에서 규명한 헤마토코쿠스 라쿠스트리스의 생장을 촉진시킬 수 있는 최적의 초음파 자극 조건을 처리할 경우, 미세조류의 세포벽의 변화를 투과전자현미경을 통해 관찰하였다. 이를 위해, 헤마토코쿠스 라쿠스트리스 세포를 25℃에서 3시간 동안 2.5% 글루타알데히드(glutaraldehyde)를 이용하여 고정시켰다. 이후 PBS(phosphate buffered saline) 버퍼로 세척한 후, 세포를 사산화오스뮴(osmium tetroxide)에 후고정하고 에탄올과 아세톤을 이용하여 탈수한 후, Epon 812에 포매하였다. Leica Ultracut UCT microtome을 이용하여 반박형 절편을 얻고, 이를 60kV에서 투과전자현미경으로 관찰하였다.

[0080] 분석 결과, 헤마토코쿠스 라쿠스트리스의 세포벽을 구성하고 있는 W1, W7 및 3중 시트(trilaminar sheets; W2, W4, W6)가 관찰되었는데, 본 발명의 초음파 처리에 의해 내부의 W2 층에는 아무런 손상 없이, W4 및 W6 층에서 작은 균열이 일관되게 관찰되었다. 즉, W4 및 W6 층에서 작은 균열로 인해 헤마토코쿠스 라쿠스트리스의 세포벽에 미세기공이 형성된 것을 확인할 수 있었다(도 5 참조).

[0081] 이러한 결과는 본 발명에서 확립한 초음파 처리 조건이 헤마토코쿠스 라쿠스트리스의 세포 파쇄를 유도하지 않으면서 세포벽 구조를 유지한 채 세포벽에 미세기공을 형성하여 영양분을 미세조류 내부로 용이하게 수송할 수 있도록 함으로써 헤마토코쿠스 라쿠스트리스의 세포 성장을 촉진시킬 수 있다는 것을 알 수 있었다.

[0083] **<실시예 4>**

[0084] **초음파 처리에 따른 헤마토코쿠스 라쿠스트리스의 세포성장, 질소 수송 또는 ROS 소거 관련 유전자의 발현 변화 분석**

[0085] 본 발명에서 확립한 초음파 처리 조건이 헤마토코쿠스 라쿠스트리스의 세포성장, 질소 수송 또는 ROS 소거 관련 유전자의 발현 수준을 변화시키는지 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 이를 위해 본 발명의 초음파 처리 조건으로 자극시킨 헤마토코쿠스 라쿠스트리스 및 초음파를 처리하지 않은 대조군 세포로부터 RNeasy Plant Mini Kit를 이용하여 총 RNA를 추출하였다. 이후 High-Capacity RNA-to-cDNA Kit를 사용하여 cDNA를 합성하였으며, 하기 표에 기재된 프라이머들을 사용하여 해당 유전자의 발현수준을 분석하였다. RT-qPCR은 StepOnePlus Real-Time PCR System으로 수행하였고 제조사의 지침에 따라 SYBR Select Master Mix를 사용하여 정량화하였다. 또한 40회의 RT-PCR 주기는 95℃에서 5분 동안 PCR 초기 활성화, 95℃에서 10초 동안 변성 및 60℃에서 22초 동안 어닐링 및 확장반응 조건으로 수행하였다. 여기서 *Actin* 유전자는 참조용으로 사용하였고, 각 유전자는 최소 2회 이상 분석하였다. RT-PCR에서 얻은 데이터는 StepOne을 이용하여 분석하였다.

표 1

[0086] 프라이머

타겟 유전자	정방향(5’->3’)	역방향(5’->3’)
actin	CACAAACTGGGATGACATGG	CAGTGGTGGTGAAGGAGTAG
minD	GGACATTGGCTTGAGGAATC	TGACGTTGAGGATGCTGTTG
transport	GTTTTGGGTGGGGATCATGT	CGATGATGTTGTCCACTGTC
SOD	CAGACGTTTCATCACAGTGT	TGAGTGGTGCTGGTGTTGGT
CAT	TTTCTGCTGGATGATGTGGG	AATAGGCTGCAAGGGGAAGA

[0087] 분석 결과, 세포 분열과 관련된 유전자인 *minD* 및 NO_3^-의 세포내로의 이동에 관여하는 수송체인 *nitrate/nitrite transport*의 mRNA 수준은 대조군에 비해 월등히 증가한 것으로 나타났고, 활성산소종(ROS) 소거와 관련된 유전자인 SOD(superoxide dismutase) 및 CAT(catalase)의 mRNA 수준도 대조군에 비해 증가한 것으로 나타났다. 구체적으로 대조군 대비 *minD* 및 *nitrate/nitrite transport*의 mRNA 수준은 각각 85.54% 및 58.92% 증가한 것으로 나타났고, SOD 및 CAT는 각각 10.10% 및 16.55% 증가한 것으로 나타났다. 한편, 대조군 대비 상기 유전자들의 증가 수준은 산화적 스트레스 관련 유전자의 발현증가에 비해 세포내로의 영양분 흡수 및 세포 분열에 따른 세포성장 관련 유전자들의 발현증가 수준이 더 높은 것으로 나타났다(도 6). 또한, 헤마토코쿠스 라쿠스트리스의 영양분(질소 및 인) 흡수 정도를 유도결합 플라즈마 분광 분석기를 사용하여 모니터링 하였는데, 도 7에 나타낸 바와 같이, 초음파로 자극된 헤마토코쿠스 라쿠스트리스는 질소와 인 영양분을 잘 흡수하는 것으로 나타났다.

[0089] 이러한 결과는 본 발명에 따른 초음파 자극이 세포 성장 및 영양분 수송 관련 유전자의 상향 조절을 유도함으로써 효과적으로 헤마토코쿠스 라쿠스트리스의 세포 성장을 촉진할 수 있음을 의미한다.

[0091] **<실시예 5>**

[0092] **초음파 처리에 따른 헤마토코쿠스 라쿠스트리스의 지방산 분석**

[0093] 상기 실시예 3의 결과를 통해 본 발명의 초음파 처리 조건에서 헤마토코쿠스 라쿠스트리스의 세포벽에는 미세기공이 형성되는 것을 확인할 수 있었다. 이에 본 발명자들은 초음파 처리가 세포벽의 유동성에 관여하는 지방산 조성에도 변화를 야기하는지 확인하기 위해, 지방산 성분 변화 여부를 분석하였다. 이를 위해 메탄올 추출법을 이용하여 헤마토코쿠스 라쿠스트리스로부터 지질을 추출하였다. 즉, 헤마토코쿠스 라쿠스트리스 바이오매스를 3,000g로 원심분리하고 동결건조하였다. 동결건조된 바이오매스 50mg을 1mL의 DMSO로 70℃에서 5분 동안 처리한 후, 5mL의 메탄올로 4℃에서 1시간 동안 추출하였다. 혼합물을 3,000g에서 원심분리하고, 상층액을 수집한 다음 펠렛을 4℃에서 15분 동안 메탄올로 재추출하였다. 메탄올 추출물에 동량의 Peroxide-free diethyl ether, n-hexane, 증류수를 첨가하여 혼합물을 만들었다. 혼합물을 분별 깔때기에서 진탕하고 원심분리하여 상부 상을 수집하였다. 하부 상은 아세트산을 첨가하여 pH 3~4로 산성화하고, 동량의 Peroxide-free diethyl ether과 n-hexane을 첨가하여 재추출하였다. 수집된 상부 상들을 질소 가스를 이용하여 증발 건조시키고 -20℃에서 유지하였다. 지질 분획은 1,000mg의 실리카 카트리지 Sep-Pack (SP)을 사용하여 수행되었다. 상기 지질 분획의 분리는, (1) 30mL의 chloroform을 이용하여 흡착제 컨디셔닝, (2) 20mg의 오일을 함유하는 1mL의 chloroform/oil 용액을 이용하여 시료 로딩, (3) 15mL의 chloroform:acetic acid (9:1, v:v)을 사용하여 흡착제 베드로부터 중성 지질 용출, (4) 20 mL의 아세톤:메탄올 (9:1, v:v)을 사용하여 당지질 용출 및 회수, (5) 20mL의 메탄올을 사용하여 인지질 용출 및 회수하는 과정으로 수행하였고, 각 분획은 원뿔형 바이알에 수집하고 질소 가스를 이용하여 증발 건조시켰다. 약 25~30mg의 분획한 지질을 밀폐 플라스크에 넣고 강하게 교반하면서 10% KOH methanolic solution 2mL를 첨가하였다. 플라스크를 밀폐하고 공기를 질소로 퍼지한 후, 플라스크를 80℃의 수조에서 45분 동안 가열하였다. 비(非)비누화 물질은 석유 에테르를 사용하여 추출되었다. 하부 상을 농축된 HCl로 처리하고 유리된 지방산을 석유 에테르로 추출하였다. 에테르 추출물을 질소 가스 하에서 건조시키고, 1.5mL의 BF3 용액(메탄올 용액 내 10%)을 첨가한 후 샘플을 80℃에서 30분 동안 배양하였다. 마지막으로, 지방산 메틸 에스테르(FAME)를 석유 에테르로 추출하고, 질소 가스 하에서 증발 건조시키고, 크로마토그래피 등

급의 헥산을 첨가하여 최종 부피를 100㎕로 설정하였다. FAME은 Agilent 7890 GC-FID system을 이용한 가스 크로마토그래피로 분석하였으며, 캐리어 가스는 18 cm s^{-1}의 고순도 수소를 이용하였다. GC 오븐은 140℃에서 5분 동안 유지한 후, 온도를 분당 4℃씩 240℃까지 증가시킨 후 15분 동안 등온을 유지하였다. 검출 한계는 0.01%였으며, TSBA6 데이터베이스를 사용하여 크로마토그래피를 분석하였다. FAME 식별 및 정량화는 MIDI에 의해 설명된 대로 Sherlock Microbial Identification System 및 Standard MIS Library Generation Software를 사용하여 수행하였다.

표 2

지방산 분석결과

Fatty acids	Control	Ultrasound
C11:0	0.08	0.06
C13:0	0.08	0.08
C14:0	0.72	1.09
C15:0	0.11	0.09
C16:0	37.30	38.90
C17:0	3.99	4.48
C18:0	1.69	1.08
C20:0	0.19	0.20
C16:1 n-7	0.88	0.80
C16:1 n-9	4.10	5.01
C17:1 n-6	2.06	tr
C17:1 n-8	0.13	0.16
C18:1 n-7	tr	0.28
C18:2 n-6	40.42	40.21
C18:3 n-6	4.03	3.74
C20:2 n-6	0.30	0.31
C20:4 n-6	3.93	3.52
SFA[a] (%)	44.16	45.98
MUFA[b] (%)	7.17	6.25
PUFA[c] (%)	48.68	47.78

[a]Saturated fatty acid.
[b]Monounsaturated fatty acid.
[c]Polyunsaturated fatty acid.

[0094]

[0096] 그 결과, 상기 표 2에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 초음파 처리 조건을 수행한 헤마토코쿠스 라쿠스트리스의 지질 성분은 초음파를 처리하지 않은 대조군과 큰 차이를 보이지 않는 것으로 나타났다.

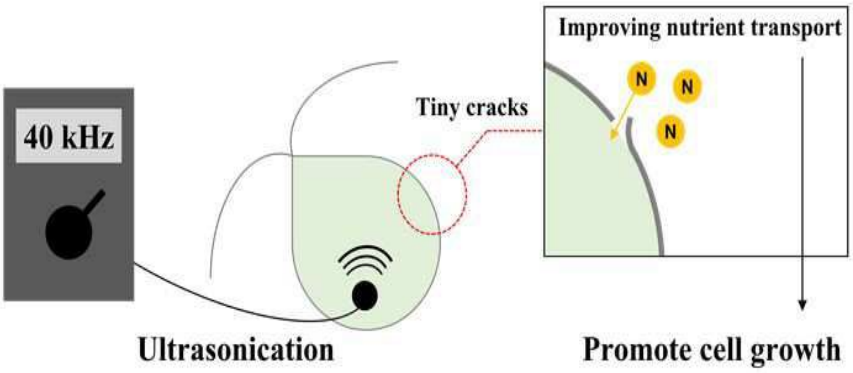
[0098] 이러한 결과는 본 발명에서 확립한 초음파 처리 조건은 헤마토코쿠스 라쿠스트리스의 세포막 유동성(membrane fluidity)에는 큰 영향을 주지 않으면서 세포의 성장을 효과적으로 촉진시킬 수 있음을 알 수 있었고, 이러한 세포 성장 촉진을 통해 헤마토코쿠스 라쿠스트리스로부터 아스타잔틴과 같은 유용물질을 효율적으로 대량 생산할 수 있음을 알 수 있었다.

[0100] 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다.

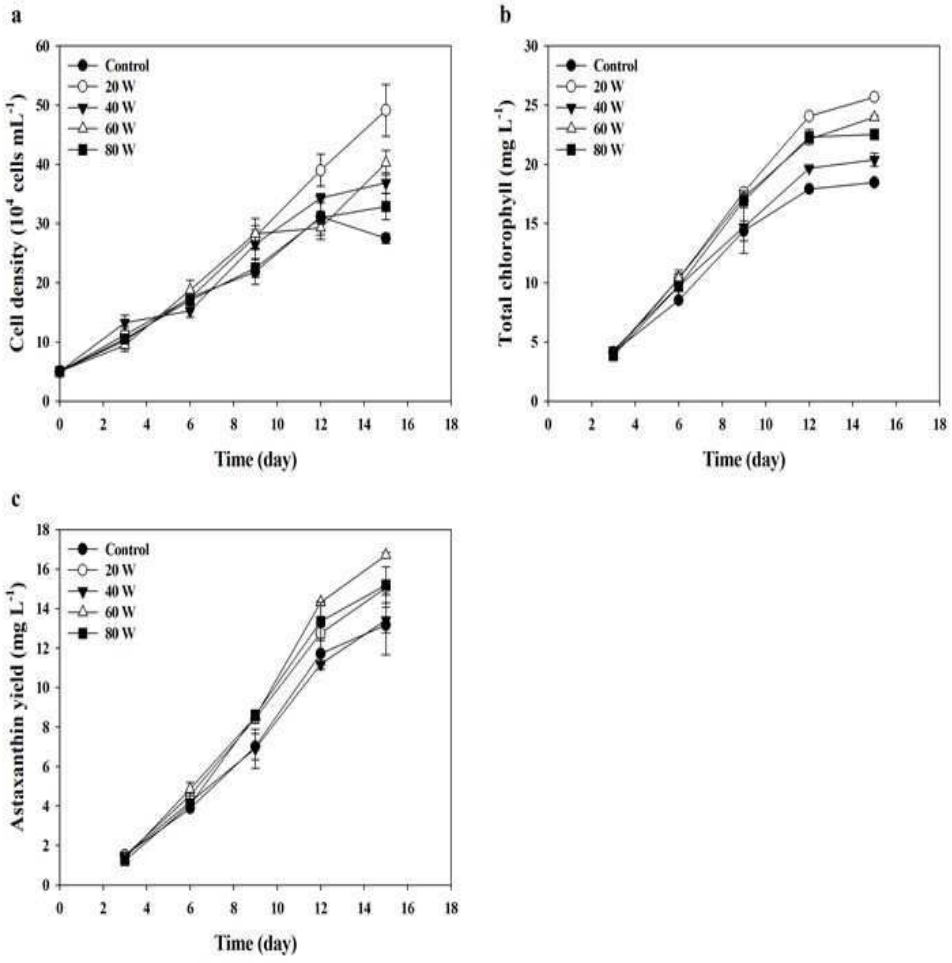
[0101]

도면

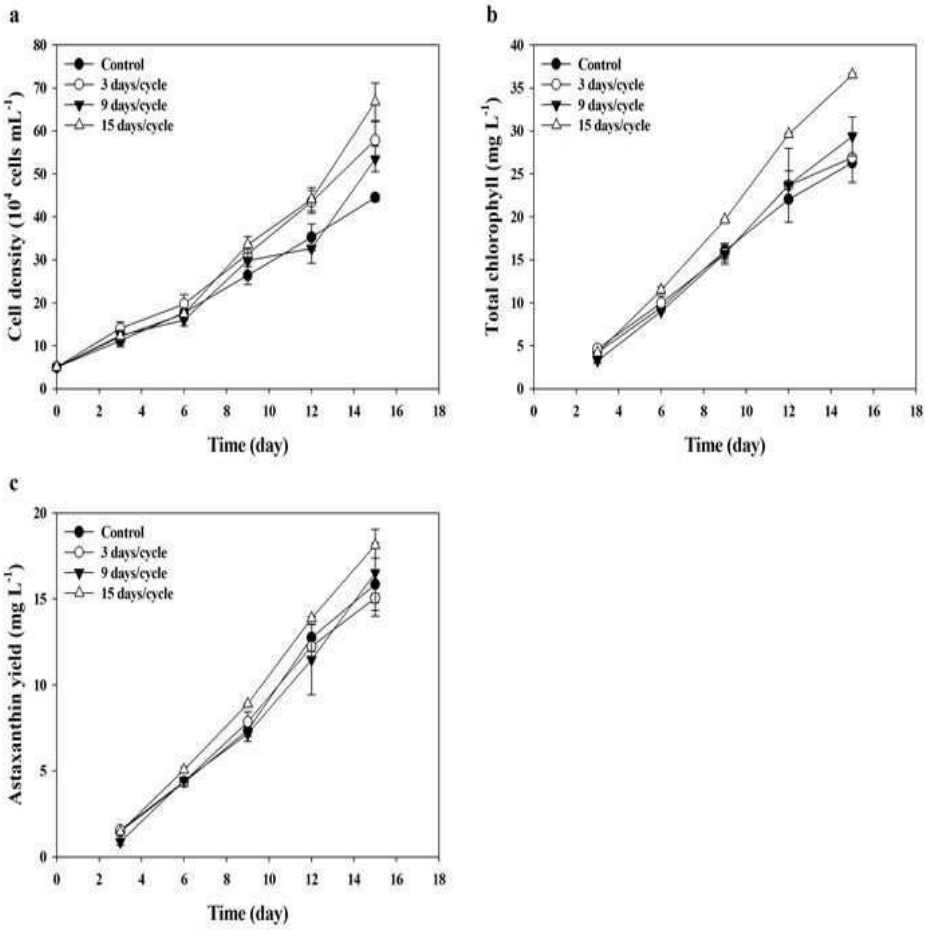
도면1



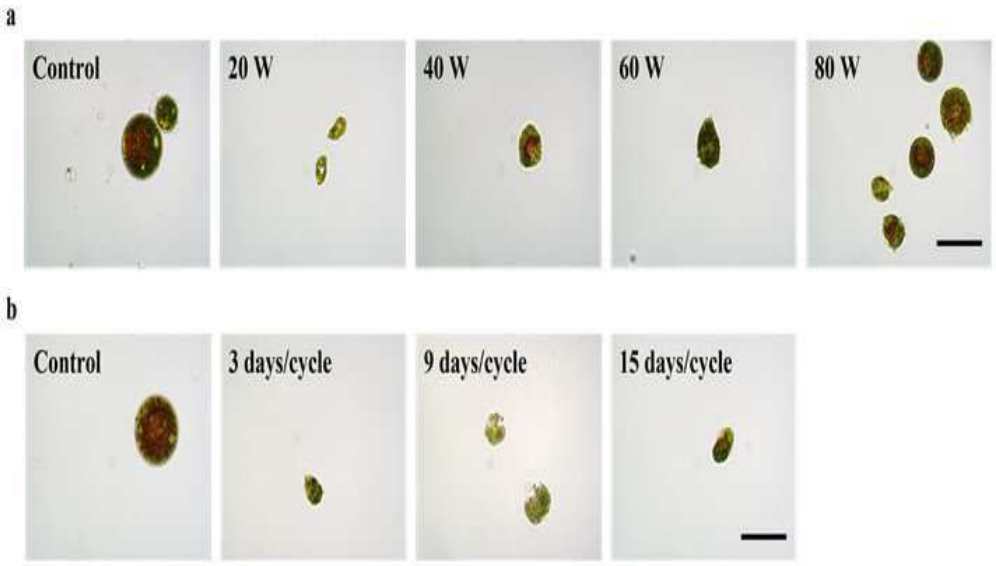
도면2



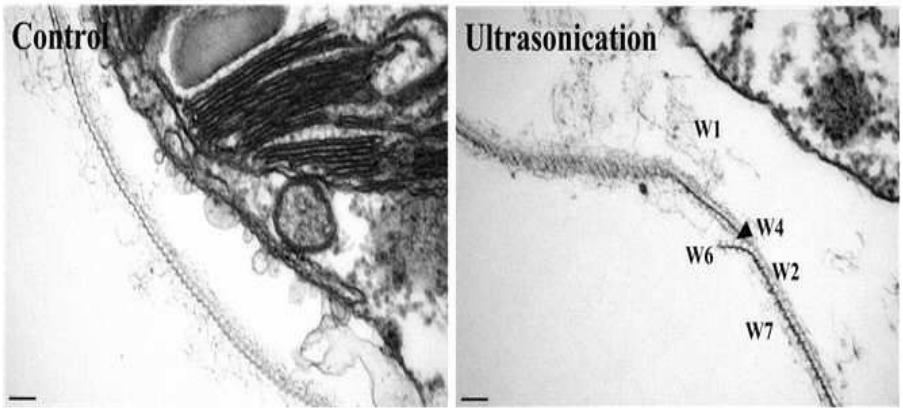
도면3


a
Control
3 days/cycle
9 days/cycle
15 days/cycle
Cell density (10^4 cells mL^{-1})
Time (day)
b
Control
3 days/cycle
9 days/cycle
15 days/cycle
Total chlorophyll (mg L^{-1})
Time (day)
c
Control
3 days/cycle
9 days/cycle
15 days/cycle
Astaxanthin yield (mg L^{-1})
Time (day)

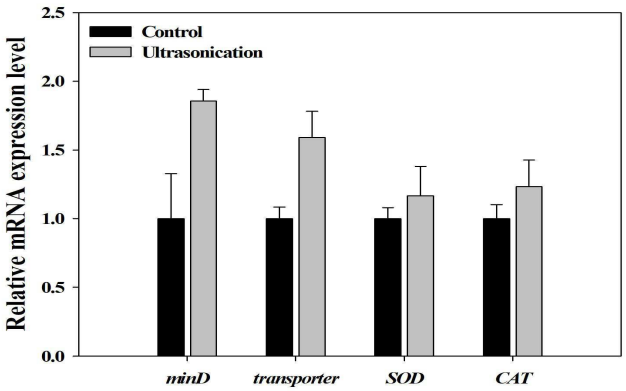
도면4


a
Control
20 W
40 W
60 W
80 W
b
Control
3 days/cycle
9 days/cycle
15 days/cycle

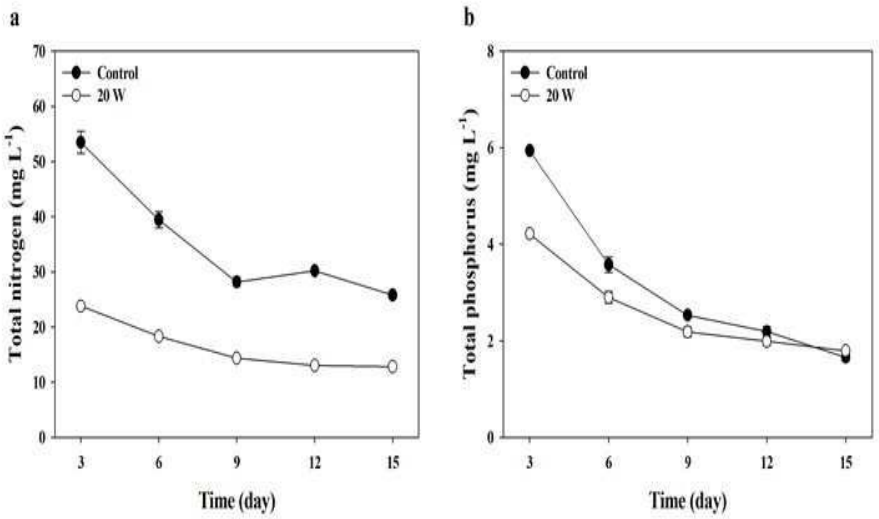
도면5


Control
Ultrasonication
W1
W4
W6
W2
W7

도면6


Relative mRNA expression level
Control
Ultrasonication
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
minD
transporter
SOD
CAT

도면7


a
b
Control
20 W
Total nitrogen (mg L-1)
Total phosphorus (mg L-1)
Time (day)
Time (day)