(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0043701
(43) 공개일자 2013년05월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/12 (2006.01) *C07K 7/06* (2006.01)
A23L 1/305 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0107472
(22) 출원일자 2011년10월20일
심사청구일자 2011년10월20일

(71) 출원인
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 신선로 365 (용당동, 부경대학교)
(72) 발명자
김세권
부산광역시 동래구 사직2동 쌍용예가아파트 125동 1402호
류보미
부산광역시 수영구 남천바다로9번길 5, 협성엠파이어 아파트 101동 2703호 (광안동, 광안)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이덕록

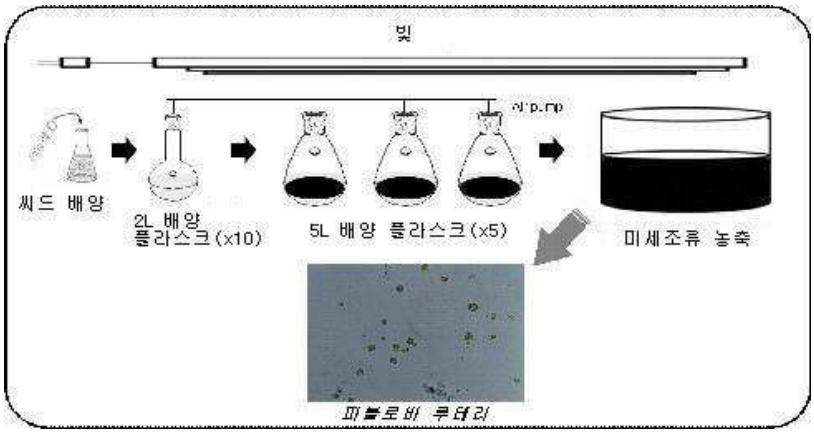
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 **캔디다 루고펠리쿨로사에 의해 발효된, 항산화 활성을 갖는 해양 미세조류 파블로바 루테리, 그로부터 유래된 펩타이드 및 이를 함유하는 항산화 기능성 건강식품용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 미세조류 파블로바 루테리 발효물 및 이 발효물이 포함하는 항산화 조성물에 관한 것으로 더욱 상세하게는 미세조류 파블로바 루테리의 최적성장·발효조건 및 이들 분해물이 포함하는 항산화 조성물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

강경화

부산광역시 남구 용소로19번길 62-6, 503호 (대연동, 성원하우스)

중-지 첸

부산광역시 남구 용소로 45, 대연캠퍼스 해양바이오프로세스연구단 (대연동, 부경대학교)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	M2010-01
부처명	국토해양부(마린바이오프로세스연구단)
연구사업명	해양생명공학사업
연구과제명	해양생물 유래 생리활성 펩타이드의 임상평가를 통한 제품화 및 산업화
주관기관	부경대학교
연구기간	2010.01.01 ~ 2013.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

파블로바 루테리(*Pavlova lutheri*)를 26.17℃, 35‰, 100.1μmolm^{-2}·s^{-1} 및 pH 9.2로 대량 배양한 후에 33.57℃, 236.38 rpm, 23.82 hrs 및 pH 6.17에서 *캔디다 루고펠리쿨로사*(*Candida rugopelliculosa*)에 의해 발효시키는 것을 특징으로 하는, 발효 파블로바 루테리의 제조방법.

청구항 2

제1항의 제조방법에 의하여 수득된 것을 특징으로 하는 항산화 활성을 갖는 발효 파블로바 루테리.

청구항 3

제2항의 발효 파블로바 루테리에서 유래되며 MPGPLSPL의 아미노산 서열을 가짐을 특징으로 하는 항산화 활성을 갖는 펩타이드.

청구항 4

제2항의 발효 파블로바 루테리 또는 제3항의 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 항산화 활성을 갖는 기능성 건강식품용 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 캔디다 루고펠리쿨로사(*Candida rugopelliculosa*)에 의해 발효된, 항산화 활성을 갖는 해양 미세조류 파블로바 루테리(*Pavlova lutheri*), 그로부터 유래된 펩타이드 및 이를 함유하는 항산화 기능성 건강식품용 조성물에 관한 것으로, 더욱 구체적으로는 해양미세조류인 파블로바 루테리(*pavlova lutheri*)를 배양한 후에 이를 캔디다 루고펠리쿨로사(*Candida rugopelliculosa*)로 발효시키기 위한 최적화 조건을 제공하고, 이들로부터 추출한 펩티드의 항산화 용도를 제공하기 위한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 최근 들어, 미세조류에 대한 관심이 전세계적으로 증가하고 있다. 미세조류는 단백질함량이 높을 뿐만 아니라, 영양성분이 높아 대체에너지원으로 가장 적합하다. 예를 들어, 보트리오코쿠스 브라우니이(*Botryococcus braunii*), 클로렐랄 종(*Chlorella sp.*), 두나리엘라 프리모렉탈(*Dunaliella primolectal*), 난노클로리스 종(*Nannochloris sp.*), 네오클로리스 올레오어번단스(*Neochloris oleoabundans*) 및 파리에토클로리스 종(*Parietochloris sp.*)과 같은 많은 미세조류 종이 적절한 조건 하에서 미세조류 세포 내에서 높은 함량의 단백질을 나타낼 수 있음이 보고되었다. 그러므로, 미세조류가 기능성 물질로서 매우 유용한 것으로 여겨지고 있다.

[0003] 그러나, 미세조류의 생화학적 조성은 이의 성장률, 환경 조건(온도, 영양상태, pH, 광주기 및 빛 강도 포함) 및 이의 생주기 단계에 따라 달라질 수 있다. 온도 및 빛 강도는 자연 환경에서 조류 성장을 조절하는 중요한 인자이며 또한 온도에 대한 성장 반응은 식물 플랑크톤 종의 증식을 조절하는데 필수적일 수 있다. 염도는 식물 플랑크톤 성장에 영향을 미치는 중요한 비생물적 요소임이 널리 알려져 있다. 따라서, 성장 특성은 수산양식 목적으로 사용될 파블로바 루테리의 양식 가능성을 평가하는데 중요한 요소이다. 세포수 또는 바이오매스; 및 생화학적 조성 면에서의 성장률은 필수 영양소에 의해 최적화될 수 있다.

[0004] 발효는 미생물이 자신이 가지고 있는 효소를 이용해 유기물을 분해시키는 과정을 지칭하는 것으로, 미생물이나 균류 등을 이용해 인간에게 유용한 물질을 얻는 점에서 부패와는 상이하다. 본 발명에서는 단백 가수분해 효모(proteolytic yeast)로 캔디다 루고펠리쿨로사가 사용된다. 캔디다 루고펠리쿨로사를 이용한 발효를 위해서는 pH, 온도, 진탕 속도(shaking speed), 발효시간 등이 중요하게 작용을 한다. 이들의 최적화 조건을 통해 보다

흡수가 잘되는 미세조류 추출물을 얻을 수 있다.

[0005] 자유 라디칼 및 활성 산소종(reactive oxygen species; ROS)은 다양한 형태의 활성 산소이며 종종 생물학적 반응 또는 외재성 인자의 산화에 의해 발생한다. 생물 시스템에서의 산화방지제는 산화 손상을 방어하고 세포의 주요 시그널링 경로에 관여하는 것을 포함하는 많은 기능을 갖는다. 세포 내에서 산화방지제의 주요 작용은 ROS 작용에 의해 야기된 손상을 예방하는 것이다. 최근에는, 산화방지제가 풍부한 음식을 섭취함으로써 산화 스트레스 및 노화-관련 질환을 예방하는 것에 대해 관심이 집중되고 있다. 게다가, 천연 산화방지제가 다양한 식물로부터 분리되고 있으나, 미세조류는 천연 산화방지제의 공급원으로서 관심을 받고 있지 않다. 입증된 산화방지제에 기인하여, 미세조류를 ROS 분자에 의해 야기된 산화 손상을 예방하거나 지연시킬 수 있는 중요한 천연 항산화 물질의 대안으로서 간주할 수 있었다.

[0006] 효소적 단백 가수분해물이 이의 위장관 흡착에 의해 본연의 단백질 및 유리 아미노산 둘 다 보다 좀더 효과적인 것으로 보이므로 인간의 영양섭취에 적합한 단백질 공급원으로 보고되었다. 그러므로, 단백 가수분해물이 영양학적 및 기능적 특성을 개선시키기 위해 특정 제형의 형태로 널리 사용되고 있다. 이들은 단백질 성분이 유리 아미노산의 혼합물로만 구성된 기본식에 대해 중요한 이점을 나타낸다. 영양학적 산물에서 가장 일반적으로 사용되는 단백질 공급원은 카제인, 유장 단백질 및 대두 단백질이다. 이러한 점에서, 미세조류 바이오 매스는 약리학적 영양물에 적합한 효소적 단백 가수분해물을 개발하기 위한 혁신적인 단백질 생공급원을 대표할 것이다. 살아있는 세포의 산화 손상을 최소화하고 식품의 산화 훼손을 방지하기 위해 식물 물질과 같은 자연물질로부터 신규하고 안전한 항산화제를 찾고자 하는 시도가 전세계적으로 이루어지고 있다. 최근에는, 미세조류에서 항균 또는 항산화 화합물과 같은 높은 가치의 화합물의 존재 여부 및 생리학적 특성에 초점을 맞춘 많은 연구가 실행되고 있다. 미세조류 가수분해물에서의 단백질의 질 및 기능적 특성에 대한 지식이 늘어감에 따라 식품이나 식이요법제품의 잠재적인 첨가제로서의 용도를 이해하는데 유용할 것이다. 그러나, 미세조류의 다양한 생물학적 기능에도 불구하고, 미세조류의 효과적인 적용방법은 비효율적인 배양 방법 및 높은 생산비용 때문에 여전히 제한되고 있다.

[0007] 현재까지 사용되고 있는 미세조류는 클로렐라, 스피루리나 등 매우 제한적이다. 예컨대, 대한민국 특허등록 제1008899730000호 (등록일: 2009.03.16, 공개번호 제1020090025431호, 공개일: 2009.03.11) '미세녹조류를 이용한 항산화, 주름개선, 항여드름·항염증및 미백효능을 가지는 기능성 추출물 및 그의 제조방법'에서 미세조류 *Tetraselmis suecica*의 항산화 기능에 대하여 기재하고 있고, 대한민국 등록특허 제1005124820000호 (등록일: 2005.08.29, 공개번호: 제1020040095125호, 공개일: 2004.11.12) '항산화 활성을 지닌 곰피 추출물로부터 분리한 플로로탄닌류를 함유하는 조성물'에는 곰피에서 추출된 특정 화합물의 항산화 활성이 기재되어 있으나, 미세조류 파블로바 루테리에 관한 연구 및 이들의 발효를 통한 효능의 증대, 활성에 대하여는 아직 보고된 바가 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 1. 대한민국 특허등록 제1008899730000호 (등록일: 2009.03.16, 공개번호 제1020090025431호, 공개일: 2009.03.11)

(특허문헌 0002) 2. 대한민국 등록특허 제1005124820000호 (등록일: 2005.08.29, 공개번호: 제1020040095125호, 공개일: 2004.11.12)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 상기와 같은 점들을 감안하여 안출한 것으로 미세조류 파블로바 루테리의 최적 성장 조건을 확립하고 발효를 통해 항산화활성을 갖게 되는 파블로바 루테리 및 그 유래의 펩타이드, 및 이들을 함유하는 항산화 활성을 갖는 기능성 건강식품용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명의 상기 목적은 파블로바 루테리의 염도, 온도, pH 및 빛 강도 조건에 따른 세포밀도를 측정하여 최적 성장 조건을 확립하고, 이의 가수분해물을 제조한 후 이들의 항산화 활성을 평가하여 우수한 항산화 활성을 갖는 가수분해물을 선별함으로써 달성하였다.

[0011] 또한, 본 발명에서는 상기 발효 파블로바 루테리 또는 이로부터 유래된 펩타이드를 함유하는 기능성 건강식품 조성물을 제공하며, 본원에서 정의되는 '기능성 건강식품'은 건강기능식품에 관한 법률 제 6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미한다.

[0012] 또한, 본원에서 정의되는 '유효성분'이라 함은 내재된 약리작용에 의해 그 효능 및 효과를 직접 또는 간접적으로 발현한다고 기대되는 물질 또는 물질군(약리학적 활성성분 등이 밝혀지지 않은 생약 등을 포함한다)으로서 주성분을 포함하는 것을 의미한다.

[0013] 본 발명의 발효 파블로바 루테리 또는 이로부터 유래된 펩타이드를 건강식품으로 사용할 경우, 이들 물질을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용되고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합양은 그의 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 발효 파블로바 루테리 또는 이로부터 유래된 펩타이드는 식품 조성물의 총 중량 기준으로 0.01 내지 99.9 중량%의 범위로 첨가될 수 있다.

[0014] 본 발명에 따른 건강식품용 조성물은 발효 파블로바 루테리 또는 이로부터 유래된 펩타이드 외에 식품 제조 시 허용 가능성 첨가물을 혼합하거나, 기타 활성성분을 포함하여 당업자에게 자명한 통상의 형태(과자, 음료 등)로 제공될 수 있다.

발명의 효과

[0015] 본 발명은 파블로바 루테리의 대량생산을 위한 최적의 성장 조건을 확립하고, 우수한 항산화 효능을 갖는 이의 가수분해산물 및 이를 포함하는 조성물을 제공하는 뛰어난 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 연속적인 대량 배양 시스템의 흐름도이다.

도 2는 연속 발효 시스템의 흐름도이다.

도 3은 파블로바 루테리 밀도에 대한 온도 및 염도의 효과를 나타내는 입체 곡선 및 반응 표면 곡선 (광도 = 150 μmol $m^{-2}s^{-1}$, pH = 8.35, 시간 = 7일)의 그래프이다.

도 4는 파블로바 루테리 밀도에 대한 온도 및 광도의 효과를 나타내는 입체 곡선 및 반응 표면 곡선 (염도 = 30 ‰, pH = 8.35, 시간 = 7일)의 그래프이다.

도 5는 파블로바 루테리 밀도에 대한 온도 및 pH의 효과를 나타내는 상응하는 입체 곡선 및 반응 표면 곡선 (염도 = 30 ‰, 광도 = 150 μmol $m^{-2}s^{-1}$, 시간 = 7일)의 그래프이다.

도 6은 파블로바 루테리 밀도에 대한 온도 및 시간의 효과를 나타내는 상응하는 입체 곡선 및 반응 표면 곡선 (염도 = 30 ‰, 광도 = 150 μmol $m^{-2}s^{-1}$, pH = 8.35)의 그래프이다.

도 7은 파블로바 루테리 밀도에 대한 염도 및 광도의 효과를 나타내는 입체 곡선 및 반응 표면 곡선 (온도 = 25 ℃, pH = 8.35, 시간 = 7일)의 그래프이다.

도 8은 파블로바 루테리 밀도에 대한 염도 및 pH의 효과를 나타내는 입체 곡선 및 반응 표면 곡선 (온도 = 25℃, 광도 = 150 μmol $m^{-2}s^{-1}$, 시간 = 7일)의 그래프이다.

도 9는 파블로바 루테리 밀도에 대한 염도 및 시간의 효과를 나타내는 입체 곡선 및 반응 표면 곡선 (온도 = 25

℃, 광도 = 150 μmol $m^{-2}s^{-1}$, pH = 8.35)의 그래프이다.

도 10은 파블로바 루테리 밀도에 대한 광도 및 pH의 효과를 나타내는 상응하는 입체 곡선 및 반응 표면 곡선 (온도 = 25℃, 염도 = 30 ‰, 시간 = 7일)의 그래프이다.

도 11은 파블로바 루테리 밀도에 대한 광도 및 시간의 효과를 나타내는 입체 곡선 및 반응 표면 곡선 (온도 = 25℃, 염도 = 30 ‰, pH = 8.35)의 그래프이다.

도 12는 파블로바 루테리 밀도에 대한 pH 및 시간의 효과를 나타내는 입체 곡선 및 반응 표면 곡선 (온도 = 25 ℃, 염도 = 30 ‰, 광도 = 150 μmol $m^{-2}s^{-1}$)의 그래프이다.

도 13은 캔디다 루고펠리쿨로산 발효에 대한 온도 및 진탕 속도 효과를 나타내는 입체 곡선 및 반응 표면 곡선 (시간 = 120 hrs, pH = 7.5)의 그래프이다.

도 14는 캔디다 루고펠리쿨로산 발효에 대한 온도 및 시간 효과를 나타내는 입체 곡선 및 반응 표면 곡선(시간 = 120 hrs, pH = 7.5)의 그래프이다.

도 15는 캔디다 루고펠리쿨로산 발효에 대한 온도 및 pH 효과를 나타내는 입체 곡선 및 반응 표면 곡선(진탕 속도 = 120 rpm, 시간 = 12 hrs)의 그래프이다.

도 16은 캔디다 루고펠리쿨로산 발효에 대한 진탕 속도 및 시간 효과를 나타내는 상응하는 입체 곡선 및 반응 표면 곡선(온도 = 35 ℃, pH = 7.5)의 그래프이다.

도 17은 캔디다 루고펠리쿨로산 발효에 대한 진탕 속도 및 pH 효과를 나타내는 입체 곡선 및 반응 표면 곡선(온도 = 35 ℃, 시간 = 12 hrs)의 그래프이다.

도 18은 캔디다 루고펠리쿨로사 발효에 대한 시간 및 pH 효과를 나타내는 입체 곡선 및 반응 표면 곡선(온도 = 35 ℃, 진탕 속도 = 160 rpm)의 그래프이다.

도 19는 ESR 분광계로 측정된, 발효 파블로바 루테리 가수분해물(0.01 - 1000 μg/mL)의 유리 라디칼 소거 활성을 나타낸 그래프로, 그 결과가 3회 독립 실험의 평균 ± SE 값으로 표기되었다.

도 20은 MTT 분석으로 측정된 발효 파블로바 루테리 가수분해물(10 - 100 μg/mL)의 세포 생존도를 나타낸 그래프로, 그 결과가 3회 독립 실험의 평균 ± SE 값으로 표기되었다.

도 21은 H_2O_2 단독 처리된 대조군 대비 발효된 파블로바 루테리 가수분해물로 처리된 세포에서의 형광 평균값의 유의한 감소를 나타내는 유세포분석 그래프 및 막대 그래프이다($P < 0.01$).

도 22는 Hiprep 16/10 DEAE FF 음이온 교환 크로마토그래피에서 0 내지 2 M NaCl의 선형 구배로 용출시켜서 발효 파블로바 루테리 가수분해물에서 분리한 FPLC 분획물의 흡광도를 나타낸 그래프이다.

도 23은 세포 생존도 및 인간 피부 섬유아세포내 ROS 농도에 대한 FPLC 분획물의 효과를 나타낸 그래프로, FPLC 분획물(100 μg/mL)의 세포 생존도는 MTT 분석으로 검출하였고(23A), aHDF는 H_2DCFDA에 노출한 후에 TGF-β1 (2 ng/mL)와 함께 배양하고, 이어서 유세포분석기에 의해 DCF 형광을 측정한 것으로(23B), 샘플을 포함하거나 포함하지 않고 처리한 세포에서의 평균 형광 강도 차이를 나타낸 것이다.

도 24는 215 nm에서 UV 검출기를 사용하여 이동상으로 0 내지 30% 아세토니트릴을 1 mL/min 유속으로 사용하여 Promesphere $10C_{18}$ 컬럼 상에서 발효 파블로바 루테리에 대한 분획물의 역상 HPLC 패턴을 나타낸 그래프이다.

도 25는 세포 생존도 및 인간 피부 섬유아세포내 ROS 농도에 대한 HPLC 분획물의 효과를 나타낸 그래프로, HPLC 분획물(100 μg/mL)의 세포 생존도는 MTT 분석으로 검출하였고(25A), aHDF는 H_2DCFDA에 노출한 후에 TGF-β1 (2 ng/mL)와 함께 배양하고, 이어서 유세포분석기에 의해 DCF 형광을 측정한 것으로(25B), 샘플을 포함하거나 포함하지 않고 처리한 세포에서의 평균 형광 강도 차이를 나타낸 것이다.

도 26은 Synchropak RPP-100 분석용 컬럼에서 발효 파블로바 루테리 가수분해물에 대한 분획물 IV-2를 0.1% TFA를 함유한 아세토니트릴(0 내지 15%)을 선형 구배로 용출시킨 RP-HPLC 리크로마토그램(rechromatogram)이다.

도 27은 세포 생존도 및 인간 피부 섬유아세포내 ROS 농도에 대한 HPLC 분획물의 효과를 나타낸 그래프로, HPLC 분획물(100 μg/mL)의 세포 생존도는 MTT 분석으로 검출하였고(27A), aHDF는 H_2DCFDA에 노출한 후에 TGF-β1 (2

ng/mL)와 함께 배양하고, 이어서 유세포분석기에 의해 DCF 형광을 측정한 것으로(27B), 샘플을 포함하거나 포함하지 않고 처리한 세포에서의 평균 형광 강도 차이를 나타낸 것이다.

도 28은 YMC-Pack Pro C18 컬럼 상에서 정제된, 최고 활성의 발효 파블로바 루테리 가수분해물에서 활성 분획물(분획물 IV-2-I)의 추가 분리를 나타낸 그래프로, HPLC 조작은 이동상으로 10% 아세토니트릴을 1mL/min 유속으로 사용하여 실시하였다.

도 29는 발효 파블로바 루테리 펩타이드(FPP)의 분자량 스펙트럼(A) 및 아미노산 서열(B)을 나타낸 것으로, MS/MS 실험은 나노-ESI 소스를 장착한 Q-TOF 탠덤 질량 분석계(Micromass Co., 영국 맨체스터 소재) 상에서 실시하였으며, 활성 펩타이드의 시퀀싱은 PepSeq de nove 시퀀싱 알고리즘을 사용하여 실시하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 본 발명은 하기 실시예에 의해 보다 구체적으로 설명되지만, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 목적으로, 본 발명의 권리범위가 이에 한정되지 않음이 당업자들에게 명백히 이해될 것이다.

[0018] 재료

[0019] 배양용 화학약품과 발효 관련 시약은 깁코 비알엘, 라이프 테크놀러지스 (Gibco BRL, Life Technologies, 미국 소재)에서 구입하고, 다른 모든 시약은 시판되는 가장 순수한 형태이었다. 1,1-다이페닐-2-피크릴-하이드라질(DPPH), 5,5-다이메틸-1-피롤리딘-N-옥사이드(DMPO), $FeSO_4$, H_2O_2 및 리보플라빈을 비롯한 라디칼 시험 화합물은 시그마 케미칼 캄파니(Sigma Chemical Co., 미국 미주리주 세인트 루이스 소재)에서 구입하였다.

[0020] 세포 배양을 위해, 둘베코 변형 이글 배지(Dulbecco's Modified Eagle's Medium: DMEM), 소태아혈청 (FBS) 및 다른 세포 배양 물질을 론자(Ronza)에서 구입하였다. 모든 항체는 산타 크루즈 바이오테크놀러지(Santa Cruz Biotechnology, 미국 캘리포니아주 산타 크루즈 소재) 및 셀 시그날링 테크놀러지(Cell Signaling Technology, 미국 매사츄세츠주 베벌리 소재)에서 입수하였다. 사용된 모든 화합물은 상업적으로 시판되는 가장 순수한 형태이었다.

[0021] 세포 배양 및 실험 계획

[0022] 본 실험에 사용된 미세조류는 파블로바 루테리 (균주 KMMCCH-003)로, 대한민국 해양 미세조류 배양 센터(Korea Marine Microalga Culture Center)에서 입수하였고, 문헌[Guillard, 1975]에 기재된 바와 같은 표준 조건(Guillard's f/2 배지) 하에 증식시켰다. 접종된 배양-배지를 2ℓ들이 플라스크 상에서 규조토와 함께 1ℓ 배지로 농축시켰다.

[0023] 전통적인 실험 방법은 시간과 에너지가 많이 소모되는 방법이기 때문에 모든 실험 입력 및 출력 결과 간의 관계를 확립하기가 곤란하다. 또한, 전통적인 실험 방법에서는 일정 실험 조건이 고정되어 있으므로, 다른 조건에 대한 예측이 불확실하다. 이러한 문제점을 해결하기 위해, 실험 횟수를 최소화하면서 변수 효과 및 그 반응을 연구하기 위한 보다 나은 실험 계획(DOE: Design of Experiment)의 확립이 필요하다.

[0024] 반응 표면 방법(RSM: Reaction Surface Methodology)은 실험을 고안하고, 모델을 확립하며, 요인 효과를 평가하고 요인의 최적 조건을 검색하기 위한 통계적 기술의 총칭으로, RSM은 또한 하나 이상의 측정된 반응 및 중요한 입력 요인 간의 관계를 정량화하는 방법이다. RSM에 근거한 DOE에 의하면, 모든 가능한 조합을 실험하지 않고도 최소한의 실험 횟수로 최적 배합을 구할 수 있다. 또한, 특정 반응 수준에 대하여 상이한 변수의 입력 수준이 결정될 수 있다. 따라서, DOE는 RSM을 이용한 최적 조건을 결정하기 위해서 최소 횟수의 실험을 수행하면서 변수의 최적화 공정에 사용될 수 있다.

[0025] 따라서, 본 발명에서는 미세조류 파블로바 루테리 대량 배양 증식의 최적화 조건을 결정하기 위해, 중심 합성계획법(CCD: Central Composite Design) 및 반응 표면 방법(RSM)을 이용하였다.

[0026] 파블로바 루테리 대량 배양 증식의 최적화 조건 결정을 위해 100 mL 작업량중 1 x 10^5 cell/mL의 파블로바 루테리로 250 mL들이 플라스크에서 배양하였다. 증식 특징 연구를 위해, 1 x 10^5 cell/mL 파블로바 루테리의 배양

물을 F/2 배지에 보관하였다. 배양 온도(X_1, ℃), 염도(X_2, ‰), 빛 강도(X_3, μmol $m^{-2}s^{-1}$) 및 pH (X_4)를 비롯한 4개의 독립적인 변수가 RSM을 위해 선택되었다(표 1). 각 변수의 5개 레벨을 각각 최저, 저, 중간, 고 및 최고에 해당하는 -2.38, -1, 0, 1 및 2.38로 코드화하였다.

[0027] 5개 레벨의 4개 변수를 사용하는 총 50회의 중심 합성 계획법(CCD)이 이용되었다(표 2). 중심 합성 계획법에서 pure error sum of squares의 추정치를 위해 6회 반복검증법(replicate)이 사용되었다. 실험은 무작위로 하여 무관한 요인으로 인해 관찰 반응에서 설명되지 않는 가변성 효과를 최대화하였다. 하기와 같은 전체 2차 방정식을 이 모델에 사용하였다.

$$Y = \beta_0 + \sum_{j=1}^{k} \beta_j X_j + \sum_{j=1}^{k} \beta_{jj} X^2_j + \sum_{i<j} \sum \beta_{ij} X_i X_j$$

[0028]

[0029] 상기에서, Y는 반응 추정치이고, β_0, β_j, β_{jj} 및 β_{ij}는 각각 절편, 선형성, 제곱(square) 및 상호작용의 회귀계수이며, X_i 및 X_j는 암호 처리된 독립 변수이다. 실험은 3회 반복 실시하였고, 평균값이 주어졌다.

[0030] 중심 합성에 따르면, 총 5회 실험을 동시에 실시하고, 독립 변수가 표 1 및 2에 기재된 바와 같을 때 종속 변수 파블로바 루테리의 밀도(Y)가 결정된다. 하기 표 1은 '반응 표면 방법을 이용한 파블로바 루테리 증식 조건 최적화의 분산 및 레벨'을 나타낸 것이고, 표 2는 '반응 표면 방법을 이용한 파블로바 루테리 증식 조건의 최적화 실험 계획 및 결과'를 나타낸 것이다.

표 1

[0031]

변수	파라미터	코드화된 가변 레벨				
		-2.38	-1	0	1	+2.38
온도(℃)	X_1	15	20	25	30	35
염도(‰)	X_2	20	25	30	35	40
광도(μmol $m^{-2}s^{-1}$)	X_3	50	100	150	200	250
pH	X_4	6.5	7.5	8.3	9.2	10.1
시간(일)	X_5	0	3.5	7	10.5	14

표 2

Runs	Coded levels of variable					관찰값	Runs	Coded levels of variable					관찰값
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5			X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	
Factorial portion													
1	-1	-1	-1	-1	-1	11.503	27	-1	1	-1	1	1	66.428
2	1	-1	-1	-1	-1	10.785	28	1	1	-1	1	1	68.523
3	-1	1	-1	-1	-1	12.039	29	-1	-1	1	1	1	57.235
4	1	1	-1	-1	-1	11.322	30	1	-1	1	1	1	59.33
5	-1	-1	1	-1	-1	19.938	31	-1	1	1	1	1	64.885
6	1	-1	1	-1	-1	9.252	32	1	1	1	1	1	66.98
7	-1	1	1	-1	-1	10.505	Star portion						
8	1	1	1	-1	-1	9.788	33	-2.38	0	0	0	0	30.724
9	-1	-1	-1	1	-1	12.091	34	2.38	0	0	0	0	27.204
10	1	-1	-1	1	-1	11.374	35	0	-2.38	0	0	0	39.92
11	-1	1	-1	1	-1	12.628	36	0	2.38	0	0	0	44.002
12	1	1	-1	1	-1	11.911	37	0	0	-2.38	0	0	46.702
13	-1	-1	1	1	-1	10.558	38	0	0	2.38	0	0	41.477
14	1	-1	1	1	-1	9.841	39	0	0	0	-2.38	0	42.403
15	-1	1	1	1	-1	11.094	40	0	0	0	2.38	0	44.903
16	1	1	1	1	-1	10.377	41	0	0	0	0	-2.38	3.591
17	-1	-1	-1	-1	1	55.753	42	0	0	0	0	2.38	70.883
18	1	-1	-1	-1	1	40.895	Center portion						
19	-1	1	-1	-1	1	63.403	43	0	0	0	0	0	43.509
20	1	1	-1	-1	1	65.498	44	0	0	0	0	0	43.509
21	-1	-1	1	-1	1	54.209	45	0	0	0	0	0	43.509
22	1	-1	1	-1	1	56.304	46	0	0	0	0	0	43.509
23	-1	1	1	-1	1	61.859	47	0	0	0	0	0	43.509
24	1	1	1	-1	1	63.954	48	0	0	0	0	0	43.509
25	-1	-1	-1	1	1	58.779	49	0	0	0	0	0	43.509
26	1	-1	-1	1	1	60.874	50	0	0	0	0	0	43.509

[0032]

[0033] 회귀 분석을 실시하여서, 실험 데이터를 사용한 반응 함수를 적용하였다. 반응 표면의 개념은 독립 변수의 반응을 따르는 독립 및 종속 변수 간의 관계를 표기하므로 반응 표면 모델 반응식을 결정한다(Farooq et al., 1997). 표 3에 1차 다항식 (X_1, X_2, X_3), 2차 다항식 (X_1X_1, X_2X_2, X_3X_3), 교차 다항식 (cross polynomials) (X_1X_2, X_1X_3, X_2X_3)와 상수의 계수 및 p-값을 나타내었다. p-값은 일반적으로 변수 유의도를 확인하기 위해 사용되고, 각 독립 변수 간의 상호작용 강도(interation strength)를 반영한다. p-값이 적을수록 상응 변수가 보다 유의함을 나타낸다. '파블로바 루테리 증식 조건의 중심 조성 계획 실험의 데이타로부터 회귀 결과'는 하기 표 3과 같다.

표 3

파라미터	세포 밀도 ($x10^5$ cells ml^{-1})	
	계수	p-값
상수	43.0187	0.0001*
X_1	-0.5604	0.5715
X_2	1.8973	0.0625
X_3	-0.2338	0.8130
X_4	0.9661	0.3319
X_5	21.7011	0.0001*
X_1X_2	0.8413	0.4661
X_1X_3	0.2182	0.8494
X_1X_4	0.8413	0.4661
X_1X_5	0.4848	0.6736
X_2X_3	-0.8413	0.4661
X_2X_4	-0.2182	0.8494
X_2X_5	2.6196	0.0289*
X_3X_4	2.6196	0.4661
X_3X_5	-0.8413	0.8511
X_4X_5	0.2157	0.2130
X_1^2	-3.0119	0.0016*
X_2^2	-0.7143	0.4154
X_3^2	-0.3381	0.6986
X_4^2	-0.4253	0.6345
X_5^2	-1.5495	0.0835

* 95% 신뢰도에서 유의 (P < 0.05).

[0034]

[0035] 표 4에 나타난 바와 같이, X_5에 대한 p-값은 0.05보다 훨씬 적었고, 이는 변수 시간이 세포 증식에 보다 유의적이었음을 나타낸다.

표 4

[0036] 2차 모델에서 분산 분석

반응	소스	DF	SS	MS	F-값	p-값
	회귀					
세포 밀도	1차	5	2061.03	2061.03	49.63	0.002*
	2차	10	38.96	38.96	9.38	0.005*
	벡터 외적	5	68.18	68.18	16.42	0.213
	전체 모델	20	2168.17	2168.17	75.43	
	나머지					
	적합도 결여	22	120.43	54.74	3.213	0.084
	순오차	7	0	0		
	전체 오차	15	120.43	54.74		
	총합	35	2288.6			

비고: DF (자유도), SS (제곱합), MS (평균제곱).
결정계수 (R^2)=0.9472, 조정 R^2 = 0.9107
* 95% 신뢰도에서 유의함 (P < 0.05)

[0037] 또한, X_2X_5 p 값(0.0289)은 0.05보다 작으며, 이는 염도 및 시간의 상호작용 강도가 조건이어서, 이들 둘다가 세포 증식에 대한 영향에서 보다 의존적임을 나타내었다. 적합도(fit) 결여는 모델의 적절성을 나타내며, 이는 p 값 > 0.05일 때 유의하다. 여기에서, 모델의 적합도가 결여된 p 값은, p 값이 0.084일 때(>0.05)에 모델이 유의함을 나타내었다. 2차 회귀 모델의 ANOVA는 만족스러운 결정 계수(R^2 = 0.9472)를 가지며 매우 유의함(p < 0.05)을 나타내었고, 이는 반응에서 가변도의 94.72 %가 하기의 2차 모델 방정식에 의해 설명될 수 있음을 의미한다:

$$Y = 43.0187 + 21.7011X_5 + 2.6196X_2X_5 - 3.0119X_1^2$$

[0038]

[0039] 파블로바 루테리 증식에 있어서 5개 파라미터의 상호작용 및 이들의 최적 농도를 반응 표면 방법으로도 분석하였다. 3차원 반응 표면 곡선 및 각각의 입체 곡선(contour plot)이 도 3 내지 12에 제시되어 있다. 반응 표면이 볼록한 것으로 나타났으며, 이는 최적 조건이 잘 정의되어 있고 각 변수에 대해 최대값이 존재함을 나타낸다. 이러한 결과는 t-시험에서 얻어진 결과와 잘 일치하였다. 반응 표면 분석에 따르면, 파블로바 루테리의 세포 밀도(증식)는 독립 변수 조건이 각각 26.17 ℃, 35 ‰, 100.1 μmol $m^{-2}s^{-1}$, pH 9.2 및 10.5일이고 다른 변수가 0 수준으로 유지될 때에 약 70.27%이었다 (표 5).

표 5

[0040] 파블로바 루테리 증식에 대한 반응 최적화 및 검증

반응	표적 값	최적 조건	예측값
세포 밀도(Y)	최대	X_1 = 26.17 ℃	70.27 ± 1.1
		X_2 = 35 ‰	
		X_3 = 100.1 μmol $m^{-2}s^{-1}$	
		X_4 = pH 9.2	
		X_5 = 10.5 일	

[0041] 증식 측정

[0042] 실험 2주가 종결된 후에, 세포 농축물을 수거하고, 카운트 챔버(Sedgewick-Rafter: 등록상표)를 이용하여 24시간마다 계수하였다. 모든 실험 배양물을 수거하여서 명암 사이클의 동일 시기에서의 영양 한계(nutrient limitation)를 피하였다. 그리고, Leica CTR 6000 현미경(Wetzlar, 독일 소재)으로 세포 이미지를 수득하였다. 파블로바 루테리의 비증식률(μ)을 하기 수식(Guillard, 1975)을 이용하여 계산하였다:

$$\mu\,(d^{-1}) = \frac{\ln(X_1/X_0)}{t_1 - t_0}$$

[0043]

[0044] 상기에서, X_0 및 X_1은 각각, 접종 및 최대 파블로바 루테리 밀도 사이에서 선택된 시간 간격에 있는 제1(t_0) 및 제2(t_1)에서의 파블로바 루테리 밀도이다. 각 샘플의 증식 곡선을 위해 3차례 실험물을 계수하고 평균값을 이용하였다.

[0045] 대량 배양 및 멤브레인의 붕괴

[0046] F/2 영양 배지, 규산 나트륨(Na_2SiO_3) 및 흔량의 금속 용액이 풍부한 오토클레이브된 인공 해수 배지를 포함한 5 ℓ 용기에서 파블로바 루테리의 대량 배양을 10주동안 실시하였다. 대량 배양 조건은 RSM 방법에서 최적 증식

조건으로 결정된 26.17℃, 35‰, 100.1μmolm^{-2}·s^{-1} 및 pH 9.2이었다. 파블로바 루테리를 배양한 농축물을 GF/A 와트만 여과지(Whatman filters)로 여과한 후에, 미세 분말이 되도록 분쇄하고, 2시간동안 50℃에서 세포막 붕괴 효소인 셀룰라아제를 사용하여 가수분해하고, 생물질(raw material) 2중량%에 건조 분말 농축물로 첨가하고, 동결건조하고, 사용할 때까지 -20℃로 보관하였다.

[0047] 실험예 1: 파블로바 루테리의 일반 조성

[0048] 동결건조된 파블로바 루테리의 일반 조성을 AOAC (1990) 방법을 약간 변형하여 결정하고, 두보이스 등(1956)의 방법에 따라 페놀-황산 방법에 의해 탄수화물 함량을 3회 반복실험에 의해 결정하였다. 그 결과, 높은 함량의 조 단백질, 탄수화물, 조 수분(crude moisture), 지질 및 회분을 함유하는 것으로 나타났다.

표 6

[0049] 파블로바 루테리의 일반 조성

조성	함량(%)
수분 (%)	17.53±0.07
회분 (%)	7.14±0.05
조 지질(%)	14.86±0.03
조 단백질(%)	36.58±0.04
탄수화물(%)	23.27±0.07
전체	100

[0050] 실험예 2: 파블로바 루테리의 아미노산 분석

[0051] 단백질은 일반적으로 3 내지 20개의 아미노산 잔기를 함유하는 것 이외에 특수한 생물학적 활성을 나타내는 아미노산으로 구성된 작은 펩타이드로 구성되어 있으며, 이들의 활성은 상기 아미노산 조성 및 서열에 의해 결정된다.

[0052] 아미노산 조성 분석을 위해, 동결건조된 파블로바 루테리 50 mg을 밀봉-진공 앰플에 있는 6.0 N HCl을 사용하여 110℃에서 24시간동안 가수분해하였다. 아미노산을 바이오크롬(Biochrom) 20 아미노산 분석기(Pharmacia Biotech., 영국 캠브리지 소재) 상에서 착색 반응제로 닌하이드린을 사용하여 단일 이온-교환 수지 컬럼(4.0 · 150 mm)에서 결정하였다.

[0053] 유리 아미노산 결정을 위해서는, 동결건조된 파블로바 루테리 1.0g을 빙욕 중 빙냉된 6.0%(v/v) 과염소산 20 mL와 함께 2분동안 12,000 rpm으로 2회 균질화하였다. 이어서, 균질화된 샘플을 30분동안 얼음에서 배양한 후에 15분동안 2000 rpm으로 원심분리하였다. 잔사를 전술한 바와 같이 20 mL 빙냉 과염소산으로 재추출하고 원심분리하였다. 제1 및 제2 추출물로부터의 상청액을 합하고, 와트만 제41호 여과지에 여과시켰다. 33% (w/v) KOH 용액을 이용하여 여액의 pH를 7.0으로 조정하고, 2000 rpm으로 10분동안 원심분리하여서 과염소산 칼륨 침전물을 제거하였다. 10M HCl 용액을 이용하여 상청액을 pH 2.2로 산성화시키고, 이어서 증류수로 50 mL로 희석하였다. 추출물 2 mL를 깨끗한 시험관으로 옮기고, 여기에 구리산 리튬 완충액 2 mL (pH 2.2)을 첨가하였다. 이어서, 상기와 동일한 아미노산 분석기에서 샘플을 분석하였다.

[0054] 파블로바 루테리 가수분해물의 조성 비율은 하기 표 7에 요약되어 있으며, 아미노산 잔기/100개 총 아미노산 잔기로 표기하였다. 파블로바 루테리 가수분해물은 높은 함량의 아스파르트산, 글루탐산, 알라닌 및 류신을 함유하였다. 파블로바 루테리 가수분해물의 각각의 유리 아미노산의 함량이 표 8에 나타나 있다. 주요 유리 아미노산은 발린, 루이신, 알라닌 및 페닐알라닌으로 밝혀졌다.

표 7

[0055] 파블로바 루테리의 아미노산 조성

아미노산	함량(%)
Asp.	9.86
Thr.	4.26

Ser.	4.06
Glu.	12.96
Pro.	4.84
Gly.	5.8
Ala	8.51
Val.	6.58
Ile.	4.51
Leu.	9.28
Tyr.	1.68
Phe.	5.54
His.	3.55
Lys.	5.93
Arg.	3.29
Met.	4.38
Cys.	3.35
Trp.	1.61
전체	100

표 8

[0056] 파블로바 루테리의 유리 아미노산 조성

유리 아미노산	함량(%)
포스포세린	0.023
타우린	0.13
포스포에탄올아민	-
우레아	-
L-아스파르트산	0.112
L-트레오닌	0.173
L-세린	0.084
아스파라긴	-
L-글루탐산	0.232
L-α-아미노아디프산	-
L-프롤린	0.25
L-글리신	0.12
L-알라닌	0.614
L-시트룰린	0.204
L-α-아미노부티르산	-
L-발린	0.365
L-시스틴	-
L-메티오닌	0.04
L-이소루이신	0.261
L-루이신	0.493
L-티로신	0.129
L-페닐알라닌	0.346
β-Alanine	-
DL-β-아미노이소부티르산	-
γ-아미노부티르산	0.097
L-오르니틴	0.069
L-라이신	0.245
1-메틸-L-히스티딘	-
L-히스티딘	0.011
3-메틸-L-히스티딘	0.002
L-카로신	-
L-아르기닌	0.007
전체	4.007

[0057] 실험예 2: 실험실 배양 실험을 이용한 캔디다 루고펠리쿨로사 배양

[0058] 가수분해 효모인 캔디다 루고펠리쿨로사(KCTC 7629)를 생명자원센터(Korea Collection for Type Cultures: KCTC)에서 입수하고, 글루코즈-펩톤-효모 추출물(GPY, 4% 글루코즈, 0.5% 펩톤, 0.5% 효모 추출물) 아가에서 4℃로 유지하였다. GPYA 상에서 증식한 4개 균개(mycelial mat)(6-mmφ)를 잘라내어 글루코즈-효모 추출물(GY) 500 mL 내로 최소량의 질소 공급원에 접종시켜서 1ℓ 들이 플라스크의 질소 공급원 효과를 확인하였다.

[0059] 단백 가수분해 발효물에 파블로바 루테리 가수분해물 10g을, 본 발명에 사용된 캔디다 루고펠리쿨로사를 함유한 GY 배지 1ℓ 중에 첨가하였다. 발효 온도(X_1, ℃), 진탕 속도(X_2,rpm), 반응 시간(X_3, hrs) 및 pH (X_4)를 포함한 4개 독립 변수를 이용한 증식 관계를 확립하기 위한 실험이 RSM을 이용한 추가적인 최적화 연구를 위해 선택되었다. 각 변수의 4개 레벨은 각각 최저, 저, 중간, 고 및 최고 값에 해당하는 -2, -1, 0, 1 및 2로 코드화하였다.

[0060] 4개 레벨의 4개 변수 및 총 30회의 CCD를 연구에 사용하였다. 소프트웨어 디자인-익스퍼트(The software Design-Expert, 버전 8.0, Stat-Ease, Inc., 미국 미네소타주 미네아폴리수 소재)를 실험 계획, 데이터 분석 및 2차 모델 확립을 위해 사용하였다. 변수 각각의 효과 및 그 조합 효과를 이해하기 위해서 소프트웨어를 이용하여 반응 표면 그래프를 얻었다. RSM의 실험 준비는 표 9 및 10에 나타난 바와 같다.

[0061] 4개 파라미터의 농도를 0(zero) 수준에 고정된 다른 요인과 함께 중심 포인트로 삼았다(표 10). 각 요인에 대한 각각의 낮은 수준 및 높은 수준을 표 9에 나타낸 바와 같이 코드화하였다. 회귀 분석에 의한 실험 데이터의 적합은 하기와 같은 2차 다항식 모델을 발생시켰다:

[0062]
$$Y = 49.832 + 0.424X_2 + 19.562X_3 + 1.161X_1X_3 + 0.5X_2X_3 - 0.521X_3X_4 - 2.539X_1^2 - 1.359X_4^2$$

[0063] 상기에서, Y는 캔디다 루고펠리쿨로사 발효의 예측된 탁도 제거(%)이고, X_1, X_2, X_3 및 X_4는 각각 온도, 진탕 속도, 발효 시간 및 pH의 코드화 값이다. 파블로바 루테리를 사용한 GY 배지의 탁도는 캔디다 루고펠리쿨로사에 의한 단백 가수분해 발효 동안에 단백질을 보다 작은 크기의 단백질, 펩타이드로 가수분해되도록 하기 위한 지표로 이용되었다.

[0064] '반응 표면 방법을 이용한 파블로바 루테리 증식 조건에 대한 캔디다 루고펠리쿨로사 발효 최적화의 변수 및 농도'를 하기 표 9에, '반응 표면 방법을 이용한 파블로바 루테리 조건에 대한 캔디다 루고펠리쿨로사 발효 최적화의 실험 계획 및 결과'를 하기 표 10에 나타내었다.

표 9

[0065]

변수	파라미터	코드화된 변수 레벨				
		-2	-1	0	1	2
온도(℃)	X_1	25	30	35	40	45
진탕 속도(rpm)	X_2	80	120	160	200	240
시간 (hrs)	X_3	0	6	12	18	24
pH	X_4	5.5	6.5	7.5	8.5	9.5

표 10

Runs	Coded levels of variable				관찰값
	X_1	X_2	X_3	X_4	
Factorial portion					
1	-1	-1	-1	-1	63.457
2	-1	-1	-1	1	42.833
3	-1	-1	1	-1	25.786
4	-1	-1	1	1	49.833
5	-1	1	-1	-1	24.453
6	-1	1	-1	1	86.669
7	-1	1	1	-1	65.707
8	-1	1	1	1	49.833
9	1	-1	-1	-1	23.953
10	1	-1	-1	1	49.833
11	1	-1	1	-1	51
12	1	-1	1	1	64.207
13	1	1	-1	-1	26.667
14	1	1	-1	1	64.957
15	1	1	1	-1	27.5
16	1	1	1	1	25.286
Star portion					
17	-2	0	0	0	49.833
18	2	0	0	0	67.388
19	0	-2	0	0	45.417
20	0	2	0	0	66.638
21	0	0	-2	0	39.667
22	0	0	2	0	11.205
23	0	0	0	-2	39.141
24	0	0	0	2	68.138
Center portion					
25	0	0	0	0	49.825
26	0	0	0	0	65.888
27	0	0	0	0	28
28	0	0	0	0	26.167
29	0	0	0	0	49.833
30	0	0	0	0	47.917

[0066]

[0067] 표 11은 '파블로바 루테리 조건에 대한 캔디다 루고펠리쿨로사 발효의 중심 조성 계획 실험의 데이터로부터 회귀 결과'를 나타낸 것이고, 표 12는 '2차 모델의 분산 분석'을 나타낸 것으로, 이들 모두는 ANOVA에 의해 시험된 수학식 정합의 유의도를 나타낸다.

표 11

파라미터	탁도 제거 (%)	
	계 수	p-값
상수	49.832	0.0001*
X_1	-0.008	0.9631
X_2	0.424	0.0207*
X_3	19.562	0.0001*
X_4	0.313	0.0757
X_1X_2	0.000	1.0000
X_1X_3	1.161	0.0001*
X_1X_4	0.000	1.0000
X_2X_3	0.500	0.0249*
X_2X_4	0.000	1.0000
X_3X_4	-0.521	0.0202*
X_1^2	-2.539	0.0001*
X_2^2	-0.026	0.8685
X_3^2	-0.156	0.3244
X_4^2	-1.359	0.0001*

* 95% 신뢰도에서 유의함 (P < 0.05).

[0068]

표 12

[0069]

반응	소스	DF	SS	MS	F-값	p-값
	회귀					
탁도	1차	4	919.11	919.11	1427.39	0.011*
	2차	6	2.99	2.99	4.65	0.021*
	벡터 외적	4	22.82	22.82	35.45	0.12
	전체 모델	14	944.92	944.92	1467.48	
	나머지					
	적합도 결여	10	9.66	0.97	8.3449	0.0621
	순오차	5	0	0		
	총계적 오류	15	9.66	0.97		
	총합	29	954.58			
비고: DF (자유도), SS (제곱합), MS (평균제곱). 결정계수 (R^2)=0.9472, 조정 R^2 = 0.9107 * 95% 신뢰도에서 유의함 (P < 0.05)						

[0070] 변수의 적절성을 확인하기 위해 p-테스트로부터 얻은 p-값을 사용하였다. 따라서, 진탕 속도(X_2), 발효 시간(X_3) 및 X_1X_3, X_2X_3, X_3X_4 값을 비롯한 독립 변수가 $p < 0.05$에 따르면 유의하다. 이는 이들이 제한 영양배지로 작용할 수 있고, 이들 농도에서의 작은 변화도 증식 속도 또는 생성물 형성 또는 이들 둘다를 심각한 정도로 변화시킬 수 있음을 나타낸다.

[0071] 또한, R^2는 관찰된 반응값에서 얼마나 많은 가변도가 실험 변수 및 이들의 상호작용에 의해 설명될 수 있는지의 척도를 제공한다. 본 발명에서 계수 값은 반응에서의 가변도의 99.9%가 모델에 의해 설명될 수 있음을 의미한다. 본 시험에서는 99.9%보다 다소 낮은 0.9472 (조정 R^2는 0.9107)을 얻었다.

[0072] 파블로바 루테리에 대한 캔디다 루고펠리쿨로사 발효에 있어서 4개 파라미터의 상호작용 및 이들의 최적 농도를 반응 표면 방법에 의해 추가 분석하였다. 3차원 반응 표면 serve 및 각각의 입체 그래프가 도 13 내지 18에 제공되어 있다. 반응 표면은 볼록하고, 이는 최적 조건이 잘 정의되고 이들은 각 변수에 대하여 최대치로 존재함을 시사한다. 이러한 결과는 p-테스트에서 얻어진 것과 잘 일치하였다. 반응 표면 분석에 따르면, 파블로바 루테리에 대한 캔디다 루고펠리쿨로사 발효(증식)에 의한 탁도 제거는 독립 변수의 조건이 각각 33.57 ℃, 236.38 rpm, 23.82 hrs 및 pH 6.17이고 다른 변수가 0 수준일 때에 약 88.03%이었다. (표 13).

표 13

[0073] 파블로바 루테리에 대한 캔디다 루고펠리쿨로산 발효의 반응 최적화 및 검증

반응	목표 값	최적 조건	예측 값
탁도 제거(Y)	최대	X_1 = 33.57 ℃	88.03 ± 1.1
		X_2 = 236.38 rpm	
		X_3 = 23.82 hrs	
		X_4 = pH 6.17	

[0074] 발효된 파블로바 루테리의 대량 배양은 RSM 방법에 따라 최적 증식 조건에 의해 이루어졌다. 동결건조된 발효 파블로바 루테리 가수분해물은 표 14에 기재된 일반 조성을 갖는 것으로 결정되었다.

표 14

[0075]

조성	함량 (%)
수분 (%)	13.03±0.05
회분 (%)	18.61±0.01
조 지질(%)	11.27±0.04
조 단백질 (%)	35.20±0.01
탄수화물 (%)	21.34±0.04
총	100

[0076] 발효 전의 표 8과 비교하여, 발효 동안에 조 단백질 함량에는 특별한 변화가 보이지 않았다. 따라서, 단백질분해 효모인 캔디다 루고펠리쿨로사 작용에 의한 작은 단백질 및 펩타이드의 생성을 확인하기 위해 아미노산 조성을 분석하였다.

[0077] 발효 파블로바 루테리 가수분해물의 아미노산의 조성 비율은 아미노산 잔기/100개의 아미노산 잔기로 요약 및 표기되었다(표 15).

표 15

[0078] 파블로바 루테리에 대한 캔디다 루고펠리쿨로사 발효로 인한 아미노산 조성

아미노산	함량(%)
Asp.	11.61
Thr.	2.91
Ser.	5.00
Glu.	11.22
Pro.	6.80
Gly.	8.28
Ala	5.82
Val.	5.56
Ile.	3.57

Leu.	7.26
Tyr.	2.58
Phe.	6.64
His.	3.96
Lys.	2.91
Arg.	6.15
Met.	4.94
Cys.	3.66
Trp.	1.11
전체	100

[0079] 발효 파블로바 루테리 가수분해물은 다량의 산성 아미노산(아스파르트산, 글루탐산), 알라닌 및 루이신을 함유하였으며, 특히 발효 기간에 따라 아스파르트산, 프롤린, 글리신, 페닐알리닌 및 아르기닌이 증가한 것으로 나타났다.

[0080] 발효 파블로바 루테리 가수분해물의 개별 유리 아미노산의 함량을 표 16에 나타내었으며, 주요 유리 아미노산은 발린, 루이신 및 알라닌으로 밝혀졌다.

표 16

[0081] 캔디다 루고펠리쿨로사 발효된 파블로바 루테리의 유리 아미노산 조성

유리 아미노산	함량(%)
포스포세린	0.061
타우린	0.291
포스포에탄올아민	-
우레아	-
L-아스파르트산	0.293
L-트레오닌	0.567
L-세린	0.266
아스파라긴	-
L-글루탐산	0.847
L-α-아미노아디프산	-
L-프롤린	0.17
L-글리신	0.273
L-알라닌	1.292
L-시트룰린	0.017
L-α-아미노부티르산	-
L-발린	1.07
L-시스틴	-
L-메티오닌	0.114
L-이소루이신	0.742
L-루이신	1.072
L-티로신	0.455
L-페닐알라닌	0.735
β-알라닌	-
DL-β-아미노이소부티르산	-
γ-아미노부티르산	0.304
L-오르니틴	0.214
L-라이신	0.456
1-메틸-L-히스티딘	-
L-히스티딘	0.03
3-메틸-L-히스티딘	0.024
L-카로신	-
L-아르기닌	0.05
전체	9.343

[0082] 상기에서 알 수 있듯이, 대부분의 유리산이 발효 동안에 표 8에 비해 증가하였다. 이들 화합물은 발효 동안에 발생하는 생화학 반응을 통해 미생물 작용(주로 미생물 효소)에 의해 유리된다.

[0083] 아스파르트산, 프롤린, 페닐알라닌 및 아르기닌과 같이 발효에 의해 변화된 아미노산은 피부 작용 재생과 같이 유리한 생리적 작용을 갖는 것으로 널리 알려져 있다. 이러한 결과는 발효 파블로바 루테리 가수분해물이 피부 재생에 치료적 효과를 가짐을 의미한다.

[0084] 실험예 3: 탁도 제거 결정

[0085] 발효 배양액을 0.9% NaCl 용액을 이용하여 10배 희석하였다. 상기 용액의 탁도를 752 N 분광광도계(Shanghai Precision & Scientific Instrument Corp., 중국 소재)를 이용하여 600 nm에서 검출하였다.

[0086] 이들 실험값은 탁도를 나타내는 도 13a 내지 도 18b의 y값으로 확인되었다.

[0087] 실험예 4: 유리 라디칼 억제 활성

[0088] 산화 스트레스에 관련된 유리 라디칼(DPPH, 하이드록실, 수퍼옥사이드, 알킬)에 대한 펩타이드의 억제 효과를 연구하기 위해서 JES-FA ESR 분광법(JEOL Lts., 일본 동경 소재)을 이용하여 논문 [Qian et al., 2008]에 따라 실험하였다. 다양한 유리 라디칼 발생에 대한 발효 파블로바 루테리 가수분해물의 소거능을 100 ㎍/mL 처리에서 비교하였다.

[0089] 각 라디칼 소거 활성을 하기 수학식에 따라 계산하였으며, 여기서 H 및 H_0는 각각 샘플을 포함하거나 포함하지 않은 라디칼 시그널의 상대 피크 높이이다.

[0090]
$$\text{라디칼 소거 활성} = \left[\frac{1-H}{H_0}\right] \times 100\,\%$$

[0091] DPPH (2,2-다이페닐-1-피크리하이드라질) 라디칼 소거 활성은 하기와 같이 측정하였다. 각 샘플로부터의 30 ㎕을 에탄올 용액중 DPPH (60 μM) 30 ㎕에 첨가하였다. 10 초동안 격렬하게 혼합한 후에, 상기 용액을 100 ㎕들이 석영 모세관으로 옮기고, ESR 분광광도계 구멍에 장착하였다. 스핀 부가물을 정확히 2분 후에 ESR 분광광도계 상에서 측정하였다.

[0092] 하이드록실 라디칼 분석은 펜톤(Fenton) 라디칼에 의해 하이드록실 라디칼을 발생시키고, 스핀 트랩 DMPO (5,5-다이메틸-1-피롤린 n-옥사이드)와 신속하게 반응시켰다: 생성된 DMPO-OH 부가물을 ESR 분광광도계로 검출하였다. ESR 스펙트럼을 이용하여 0.3 M DMPO 20 μL, 10 mM $FeSO_4$ 20 μL 및 10 mM H_2O_2 20 μL와 함께 인산염 완충액 (pH 7.4)중에서 혼합한지 2.5분후에 ESR 스펙트럼을 기록하였다.

[0093] 수퍼옥사이드 라디칼 분석은 리보플라빈/EDTA 용액을 UV 조사하여서 수퍼옥사이드 라디칼을 발생시켰다. 0.3 mM 리보플라빈, 1.6 mM EDTA, 800 mM DMPO 및 다양한 농도의 샘플을 함유하는 반응 혼합물을 1분동안 UV 램프 하에 365 nm에서 조사하였다. 측정을 위해 ESR 분광광도계의 100 μL들이 석영 모세관으로 상기 혼합물을 옮겼다.

[0094] 도 19에 나타난 바와 같이, 발효 파블로바 루테리 가수분해물은 유리 라디칼, 특히 하이드록실 라디칼의 발생에 대해 투여량 의존적으로 유의한 소거 활성을 나타냈으며, 이는 발효 파블로바 루테리 가수분해물의 항산화능을 나타낸다. ESR 시그널은 ·OH에 대하여 DMPO와 경쟁하는 ·OH 소거제의 존재에 의해 억제되었다. 이 실험으로부터, 발효 파블로바 루테리 가수분해물은 전자 공여체로서 작용하고 하이드록실 라디칼과 반응하여 이들을 보다 안정한 생성물로 전환시키며 라디칼 사슬 반응을 종결시킴이 명확해졌다. 발효 파블로바 루테리 가수분해물의 강한 하이드록실 라디칼 소거능은 산화 스트레스로부터의 보호 효과에 기인한 것일 수 있다. 또한, 발효 파블로바 루테리 가수분해물은 세포 생체물질의 라디칼 매개 산화를 보호할 수 있는 강력한 항산화제 화합물임을 알 수 있다.

[0095] 실험예 5: In vivo 실험

[0096] 멸균 조건 하의 성인 피부 섬유아세포(aHDFs)를 양영일 교수(대한민국 인제 대학교 임상연구소 병리학부)로부터 입수하였다. 10% 열 불활성화된 FBS 및 1% 항생-항진균 용액(Lonza, 독일 콜론 소재)으로 보충된 DMEM에서 세포를 배양하고, 5 내지 10 계대를 실험에 사용하였다. 세포를 5% CO_2 가습 배양기 내에서 37℃로 T-75 조직 배양 플라스크(Nunc, 덴마크)에서 배양하였다. 샘플의 세포독성 수준을 MTT 분석을 이용하여 측정하고, 여기서 상기 세포는 5 x 10^3 세포/웰의 밀도로 96 웰 플레이트로 옮기고, 샘플(10, 50, 100 μg/mL)로 처리하거나 샘플로 처리하지 않았다(Hansen et al., 1989). 24시간 배양 후에, 1 mg/mL MTT 100 μL을 첨가하고, 4시간 더 배양하였다. MTT를 제거하고, DMSO (100 μL)를 첨가하여서 포르마잔 결정을 용해시키고, 광학 밀도를 GENios(등록상표) 마이크로플레이트 리더 (Tecan Austria GmbH, 오스트리아)를 사용하여 540 nm에서 측정하였다. 세포 생존도를 대조군 대비 백분율로 정량하고, 투약량 반응 곡선을 작성하였다.

[0097] 세포내 ROS 형성 분석을 위해, 산환환원-민감성 형광 프로브 2,7-다이클로로플루오레신 다이아세테이트(DCFH-DA)를 사용하였다(Rosenkranz et al., 1992). 섬유아세포를 37℃로 30분동안 암실에서 20 μM DCFH-DA와 함께 배양하였다. 세포를 PBS로 3회 세척한 후에, 세포를 1시간동안 길항제와 함께 배양한 후에, 500 μM H_2O_2를 2시간동안 첨가하였다. 수거된 세포중 세포내 ROS 농도는 CELLQUEST 분석 소프트웨어(Becton Dickinson, 미국 캘리포니아주 마운틴 뷰 소재)가 장착된 FACS Calibur(상표명) 유세포 분석기를 이용하여 결정하였다 (세포형태 파라미터는 세포 사멸 및 ROS 생성 간의 관계를 나타낸다). 각 샘플에 대해, 10,000 이상의 현상이 획득되었고, 이어서 샘플의 유리 라디칼 소거 활성을 결정하기 위해서 세포내 평균 H_2DCF-DA 형광 강도로 표기하였다.

[0098] 섬유아세포에 대한 발효 파블로바 루테리 가수분해물의 세포독성 효과는 인간 피부 섬유아세포(HDF)에 대한 MTT 분석으로 분석하였다. 도 20에 도시된 바와 같이, 발효 파블로바 루테리 가수분해물은 처리 24시간 후에 임의의 시험한 농도(10, 50, 100 ㎍/mL)에서 섬유아세포에 대하여 유의한($P<0.01$) 독성 효과를 나타내지 않았다. 따라서, 발효 파블로바 루테리 가수분해물의 비독성 농도가 모든 실험에서 이용되었다.

[0099] 발효 파블로바 루테리 가수분해물-처리된 섬유아세포에서 세포내 ROS의 농도를 측정하기 위해서, 비특이적 ROS 농도에 대한 H_2DCFDA 형광 프로브를 이용하였다. 세포에서 방출된 DCF의 형광 시그널을 500 μM H_2O_2 처리로 강화하였으나, 발효 파블로바 루테리 가수분해물(10 내지 100㎍/mL)로 전처리된 세포에서는 형광 농도가 유의하게 억제되었다. 특히, 발효 파블로바 루테리 가수분해물(100㎍/mL) 처리는 대조군에 비해 DCF 형광 강도를 2.84배 감소시켰으며, 이는 발효 파블로바 루테리 가수분해물의 투여가 ROS 발생을 감소시킴을 의미한다(도 21).

[0100] 실험예 6: RNA 단리 및 정량적 역전사효소-폴리머라아제 연쇄 반응(RT-PCR) 분석

[0101] RNA 단리 및 RT-PCR 분석을 문헌[Ryu et al., 2009]에 따라 실시하였다. 전체 RNA를 샘플로 처리한 후에 섬유아세포로부터 추출하였다. 추출을 위해, 세포를 트리졸(Trizol: 등록상표)로 용해(lysis)시키고, 12,000 rpm에서 15분동안 25℃로 원심분리한 후에, 클로로포름을 첨가하였다. 아이소프로판올을 상청액에 1:1 비로 첨가하고, 원심분리하여서 RNA 펠릿을 얻었다. 에탄올로 세척한 후에, 추출된 RNA를 다이에틸 파이로카보네이트-처리된 RNAse-비함유 물에 용해시키고, GENios®

마이크로플레이트 리더(Tecan Austria GmbH)를 이용하여 260 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다. 동량의 RNA (1 μg)을 1x 역전사효소(RT) 완충액, 1 mM dNTP, 올리고(dT) 15 프라이머 500 ng, 몰로니 설치류 백혈병 바이러스 (MMLV) 역전사효소 140 U 및 RNase 40 U를 함유하는 마스터믹스(mastermix)에서 45분동안 42℃로 역전사시켰다. 폴리머라아제 사슬 반응(PCR)을 자동 와트만 써모사이클러(Biometra, 영국 켄트 소재)에서 실시하여서 TGF-β1, 1형 콜라겐 및 GAPDH를 증폭시켰다.

[0102] 목적하는 cDNA를 증폭하는데 사용되는 프라이머 서열은 하기와 같다:

[0103] TGF-β1 정방형 및 역방향 프라이머: 5'-CGA GTG CCA AAT GAA GAG GAC C-3' 및 5'-AAA CCT GAG CCA GAA CCT GAC G-3'

[0104] 1형 콜라겐 정방향 및 역방향 프라이머: 5'-CAG TCG CTT CAC CTA CAG CA-3' 및 5'-GGT GGA GGG AGT TTA CAC GA-3'

[0105] GAPDH 정방형 및 역방향 프라이머: 5'-GAA GGT CGG TGT GAA CGG ATT TGG C-3' 및 5'-CAT GTA GGC CAT GAG GTC

CAC CAC-3'.

[0106] 상기 반응은 전술한 바와 동일한 조건 하에 프라이머를 사용하여 실시하였다. 증폭 사이클은 95℃에서 45초, 60℃에서 1분 및 72℃에서 45초이었다. 30회 사이클 후에, 1.5% 아가로즈 겔 상에서 45분동안 100 V로 전기영동하여서 PCR 생성물을 분리하였다. 이어서, 겔은 1 mg/mL 에티듐 브로마이드를 사용하여 염색하고, AlphaEase1 겔 이미지 분석 소포트웨어(Alpha Innotech, 미국 캘리포니아주)를 사용하여 UV 빛으로 시각화하였다.

[0107] 본 분해물은 Hiprep 16/10 DEAE FF 이온-교환 컬럼 (1.6 x 10 cm, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) 상에서 FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography)(FPLC AKTA, Amersham Bioscience Co., Uppsala, Sweden)를 사용하여 분해물로부터 정제하였다. 분해물을 20 mM 아세트산나트륨 완충용액 (pH 4.0)으로 평형화시킨 HiPrep 16/10 DEAE FF 이온-교환 컬럼 상에 부하시키고, 62m/h 유속으로 동일 완충용액에서 NaCl (0 - 2 M)의 선형구배로 용출시켰다. 280 nm UV 흡광도를 4 mL 분획마다 관찰하고, 이어서 동결 건조된 분획물을 -80℃에서 동결 건조하였다. 분리된 분획물의 항산화 활성을 검사하고, 근섬유아세포 분화의 마커(marker)인 ROS 소거능을 가진 분획물을 하기와 같이 추가 정제하였다.

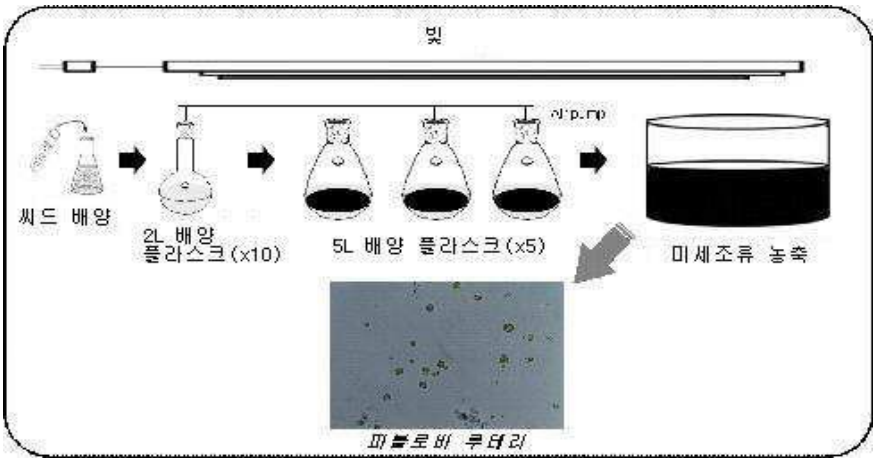
[0108] Primesphere $10C_{18}$ (20 mm×250 mm) 컬럼 상에서 아세토니트릴의 선형 구배(40분동안 0 내지 30%)로 1.0 mL/min 유속으로 역상 고성능 액상 크로마토그래피(RP-HPLC)를 이용하여 추가 정제를 실시하였다. 215 nm에서 용출 피크를 검출하고, 회전 증발기를 이용하여 활성 피크를 농축시켰다. 각각의 피크를 수거하여 동결건조시키고, 이들의 생활성(ROS 소거, 근섬유아세포 분화 표지가 활성을 증가시킴)을 평가하였다. 활성 분획물을 Synchropak RPP-100 분석용 컬럼에 넣고 0.1% FTA를 함유하는 아세토니트릴 선형 구배 (40분동안 14% v/v)로 1 mL/분 속도로 적용하였다. 용출 피크를 평가하고, YMC-Pack Pro C18 (20 mm × 250 mm) 컬럼에 활성 분획물을 로딩하고, 아세토니트릴 선형 구배(10%)로 40 분동안 1 mL/분 유속으로 하였다.

[0109] 각각의 피크를 검출하고, 이들의 활성을 확인하였다. 순수한 펩타이드를 아미노산 서열 분석하였다.

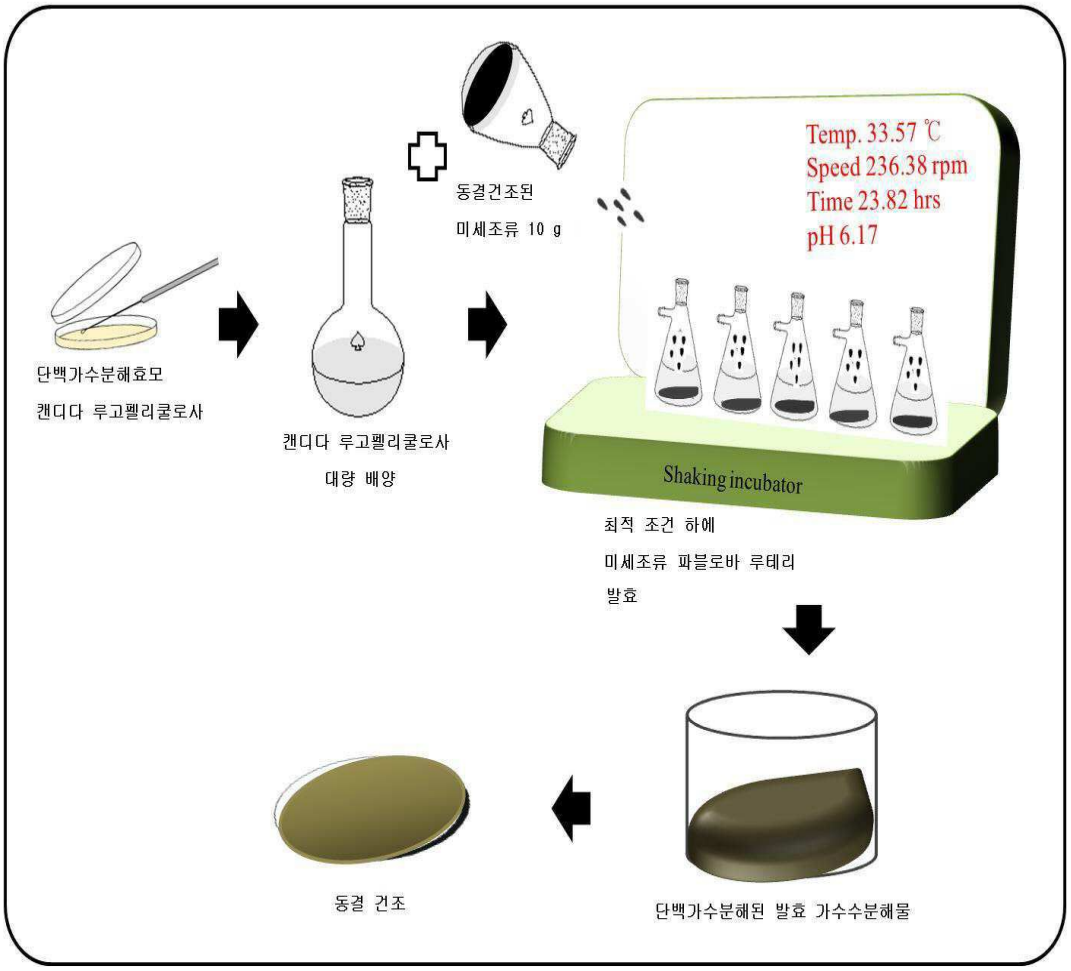
[0110] 정제된 펩타이드의 정확한 분자량 및 아미노산 서열은 정전분무 이온화(ESI) 소스가 결합된 Q-TOF 질량 분석계(Micromass, 영국 알트린캄 소재)를 이용하여 결정하였다. 정제된 펩타이드를 정전분무 소스에 주입하고, 메탄올/물(1:1, v/v)에 용해시키고, 그 분자량을 질량 분광계에서 이중 하전된 (M+2H)2+ 상태로 결정하였다. 분자량 결정 후에, 단편화를 위해 상기 펩타이드를 자동 선별하고,그의 서열 정보를 탠덤(tandem) 질량 분광(MS) 분석에 의해 구하였다. 정제된 펩타이드의 아미노산 서열은 MPGPLSPL로 결정되었다(분획물 IV-2-I, FPP; 793.01 Da, 도 29). ESI/MS 분광기에 의해 결정된 분자량은 서열에 따른 이론적 질량과 잘 일치하였다.

도면

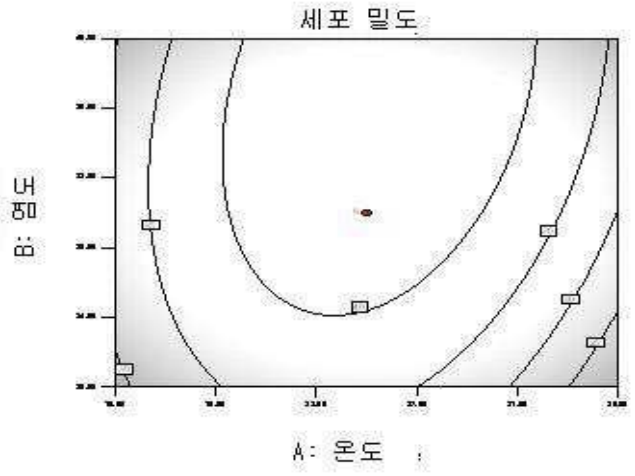
도면1



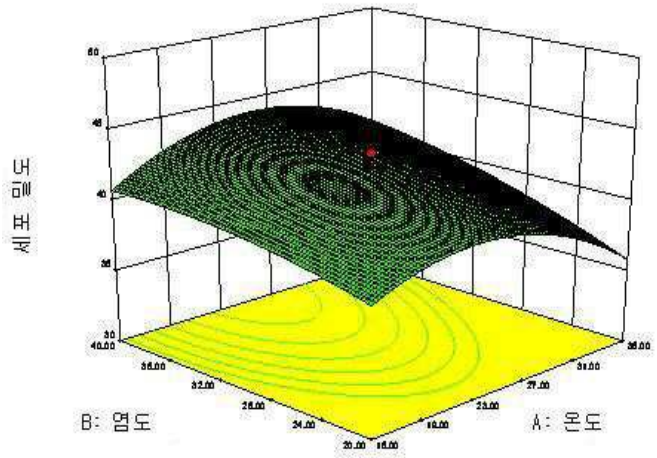
도면2


동결건조된
미세조류 10 g
Temp. 33.57 ℃
Speed 236.38 rpm
Time 23.82 hrs
pH 6.17
단백가수분해효모
캔디다 루고펠리쿨로사
캔디다 루고펠리쿨로사
대량 배양
Shaking incubator
최적 조건 하에
미세조류 파블로바 루테리
발효
동결 건조
단백가수분해된 발효 가수수분해물

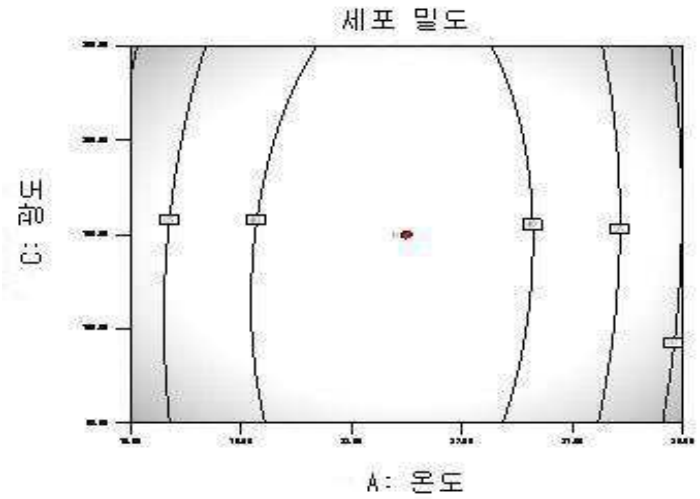
도면3a


세포 밀도
A: 온도

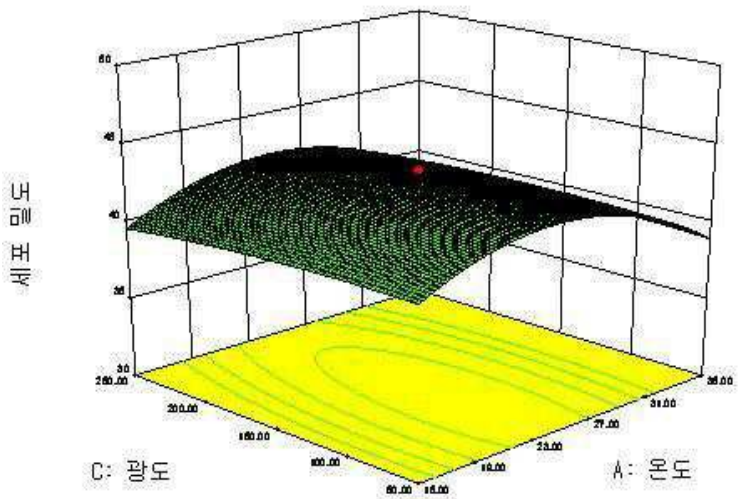
도면3b



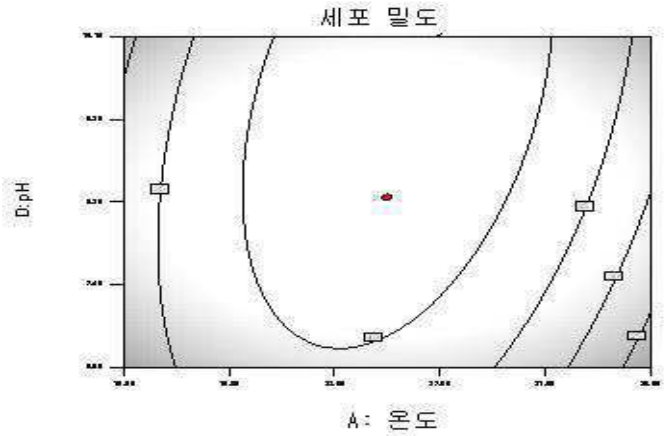
도면4a



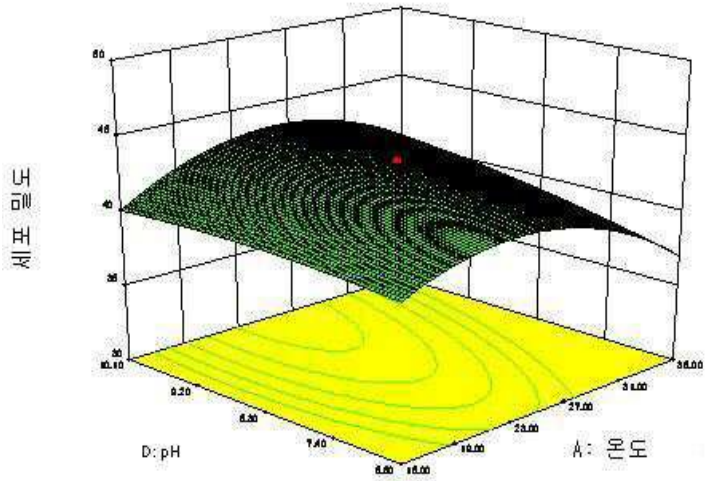
도면4b



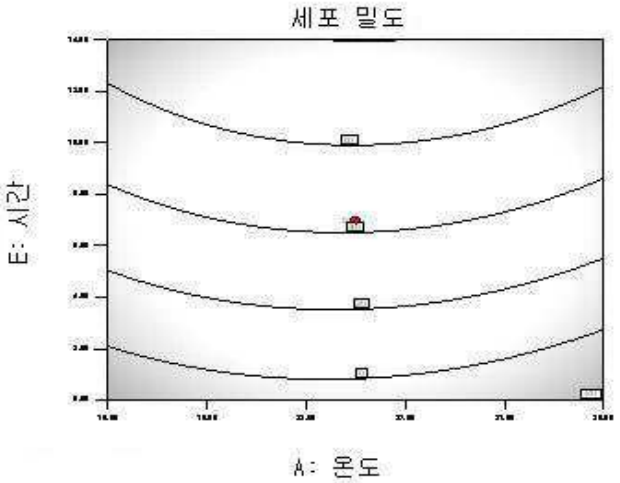
도면5a



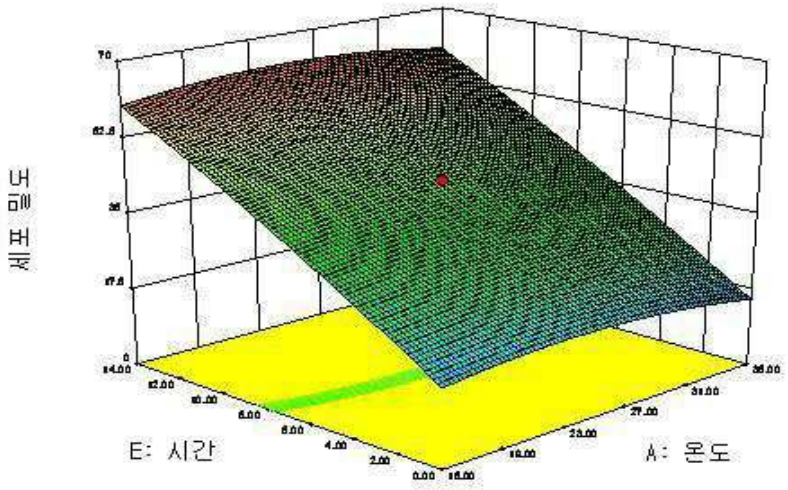
도면5b



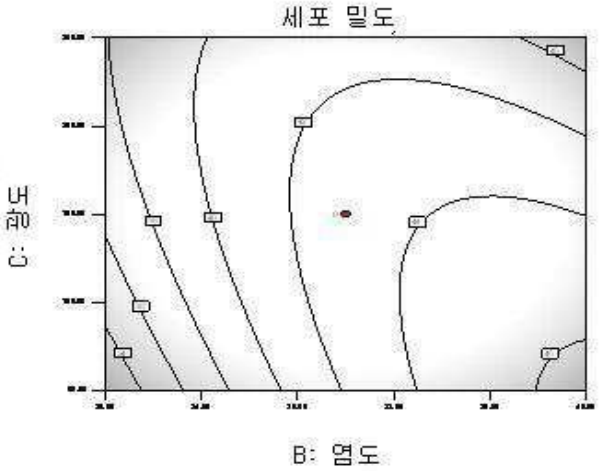
도면6a



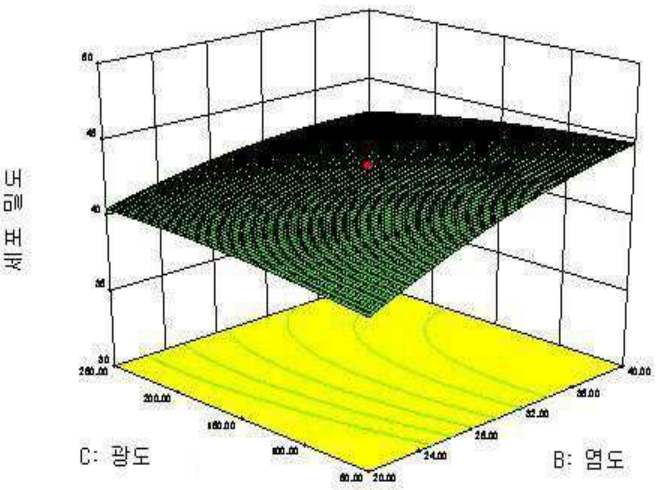
도면6b



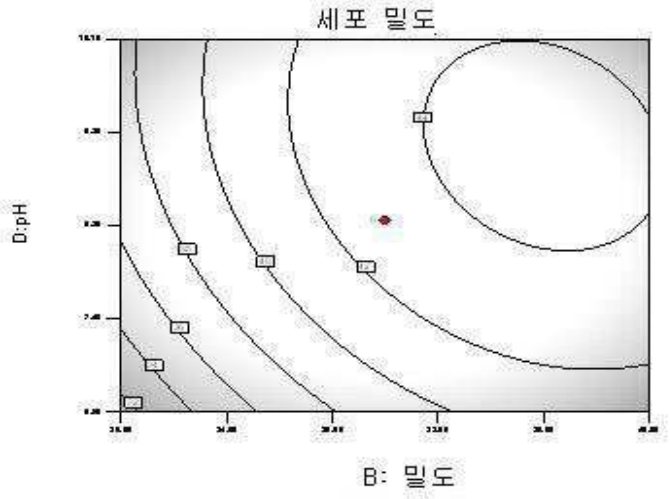
도면7a



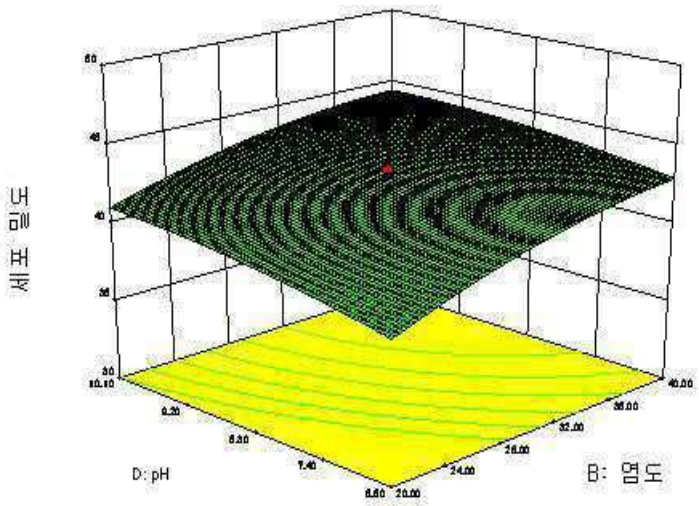
도면7b



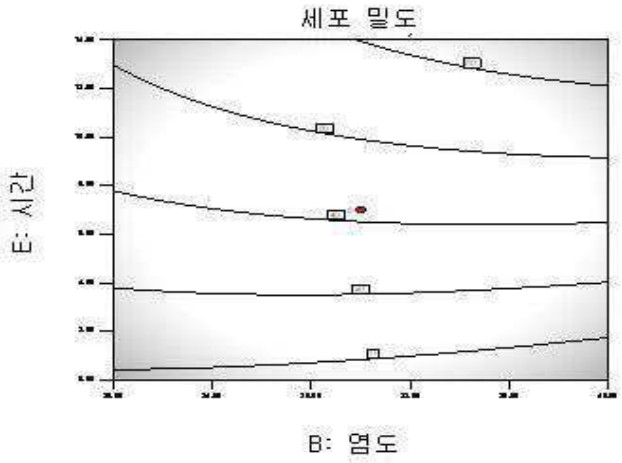
도면8a



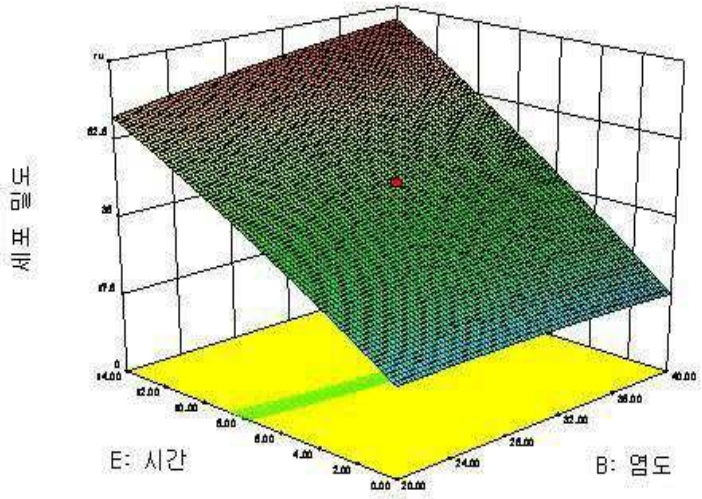
도면8b



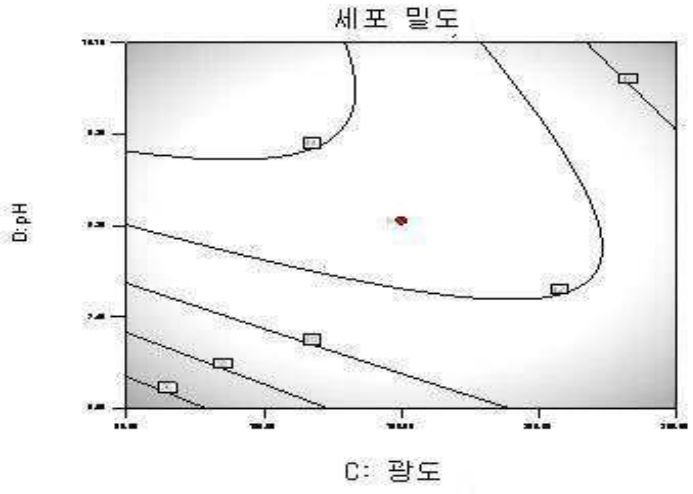
도면9a



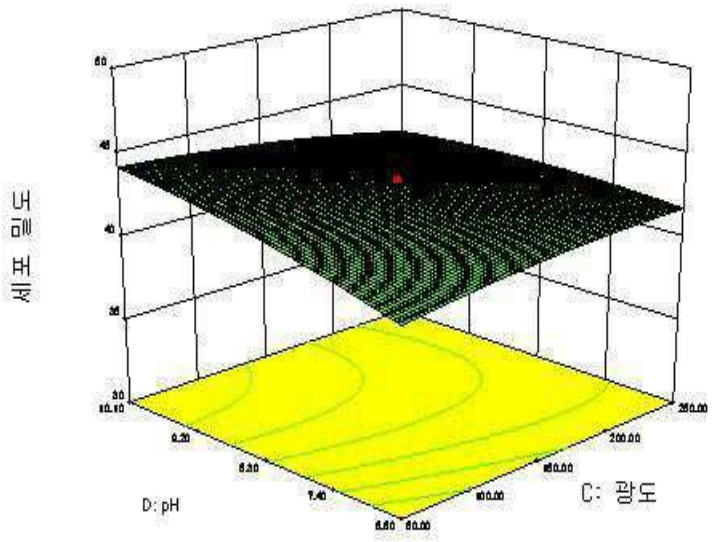
도면9b



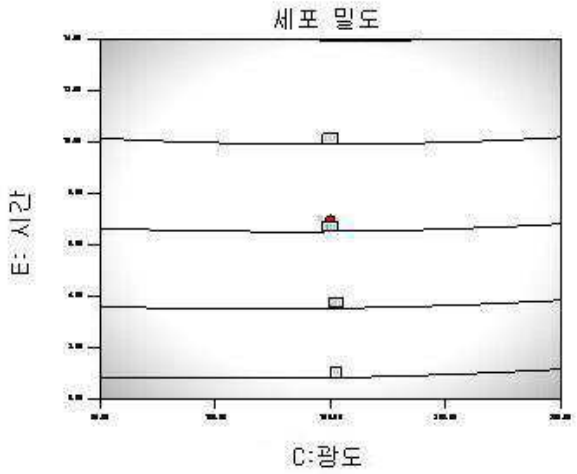
도면10a



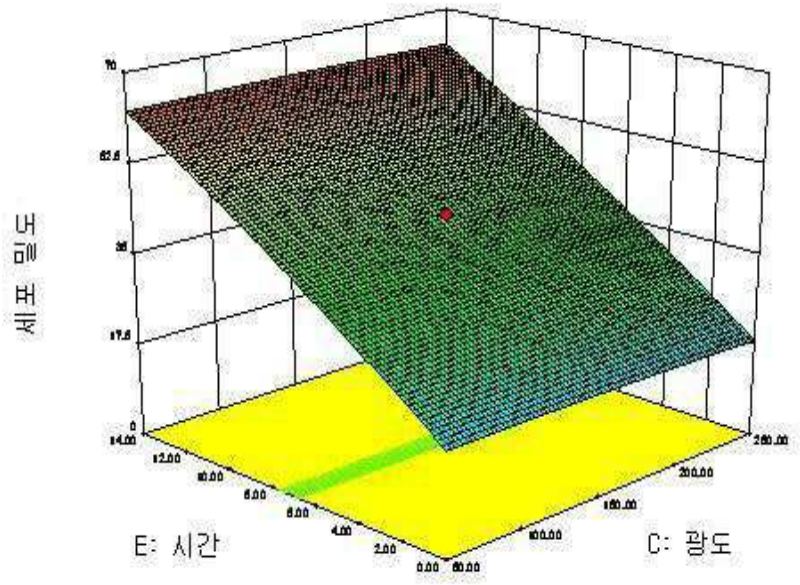
도면10b



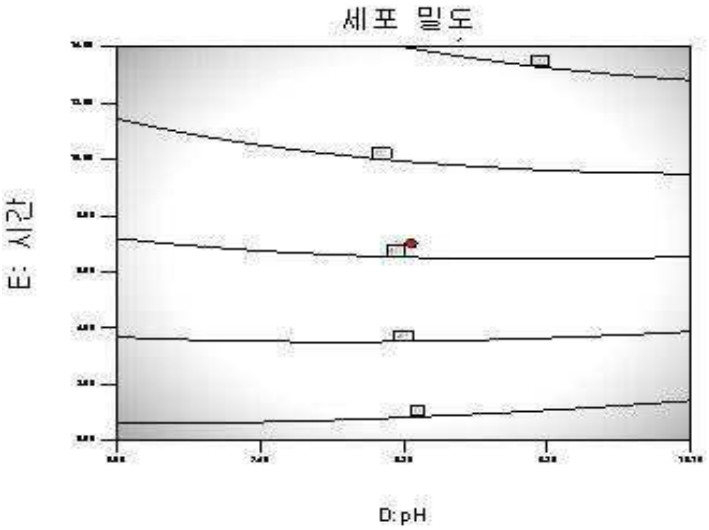
도면11a



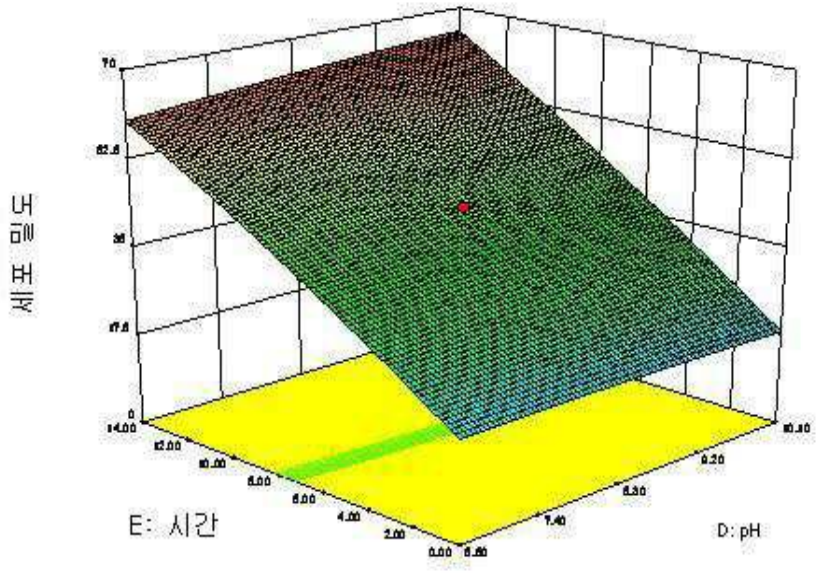
도면11b



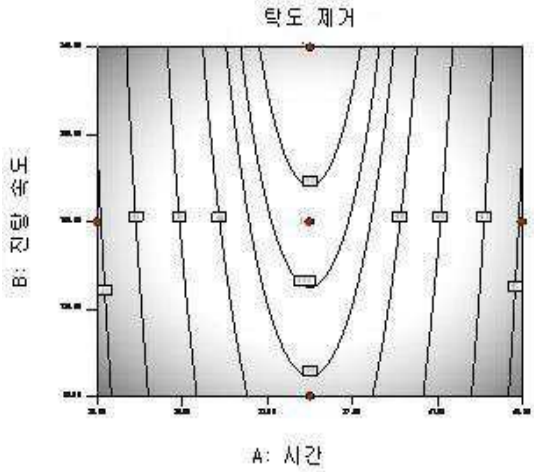
도면12a



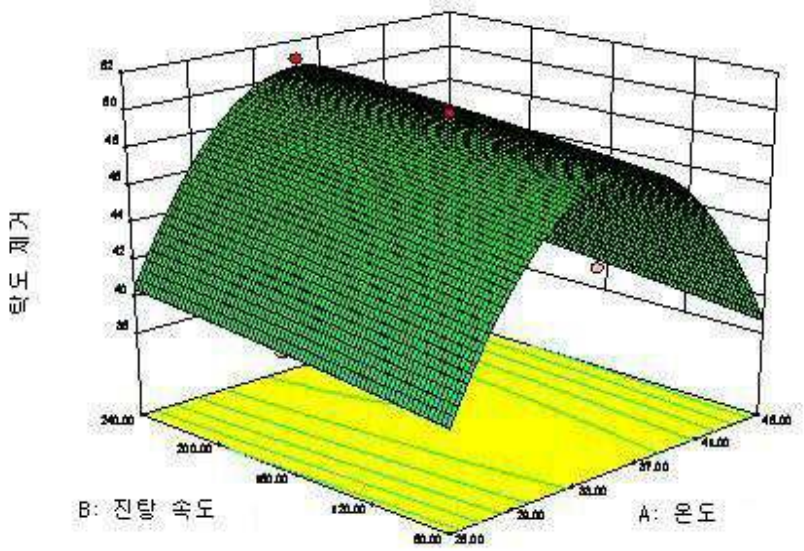
도면12b



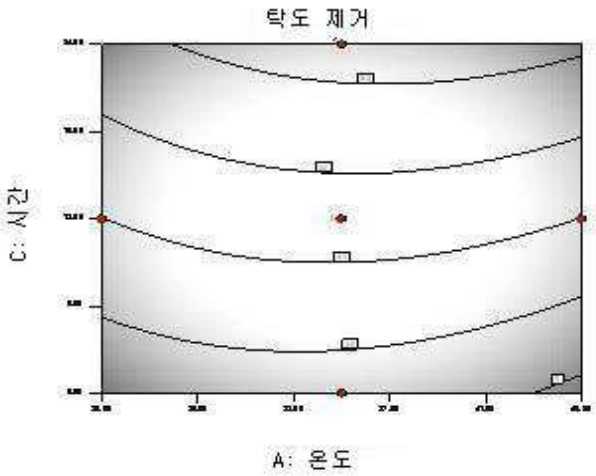
도면13a



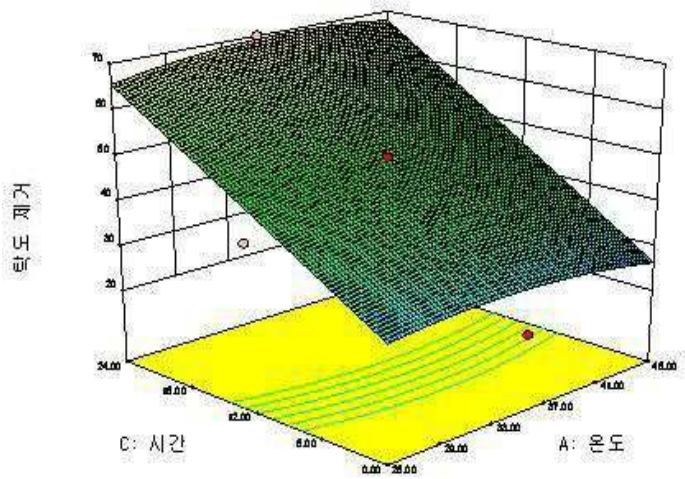
도면13b



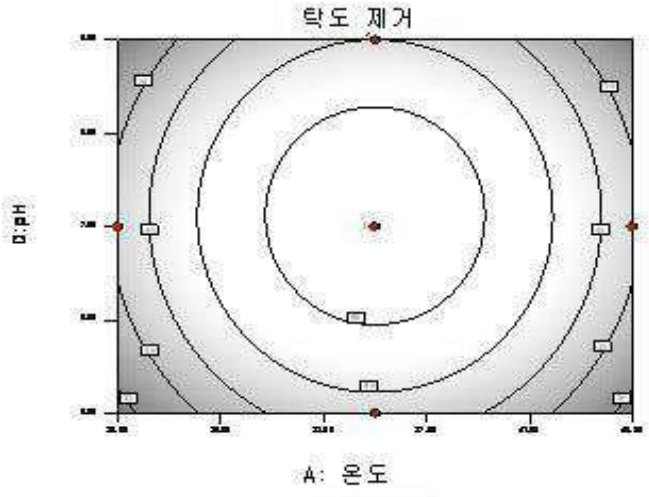
도면14a



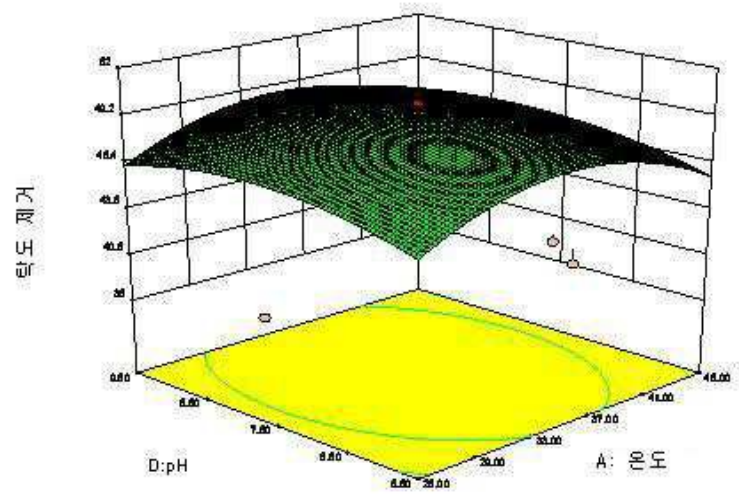
도면14b



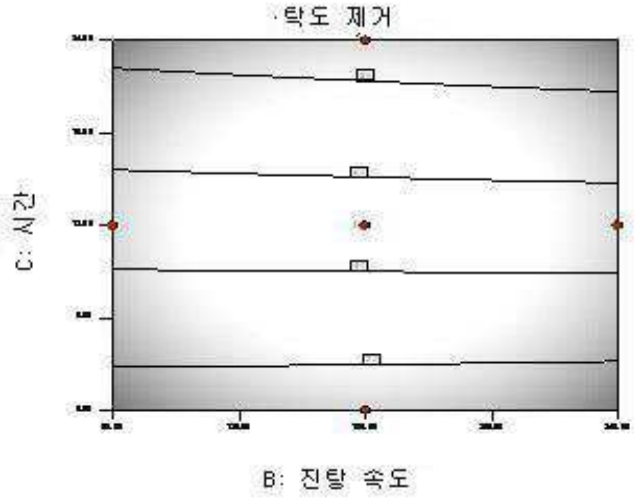
도면15a



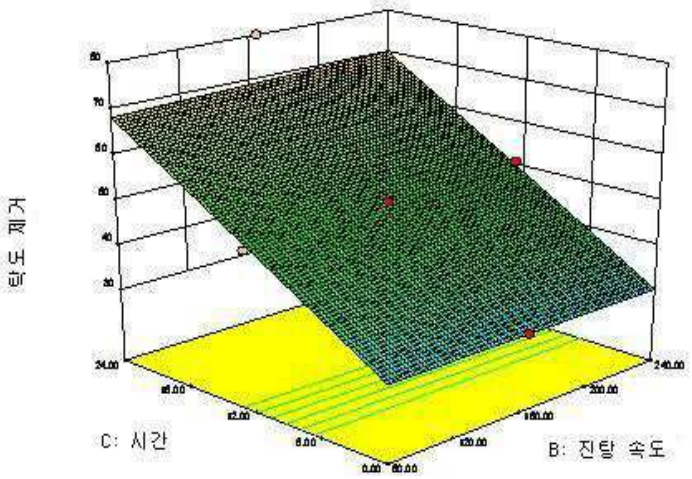
도면15b



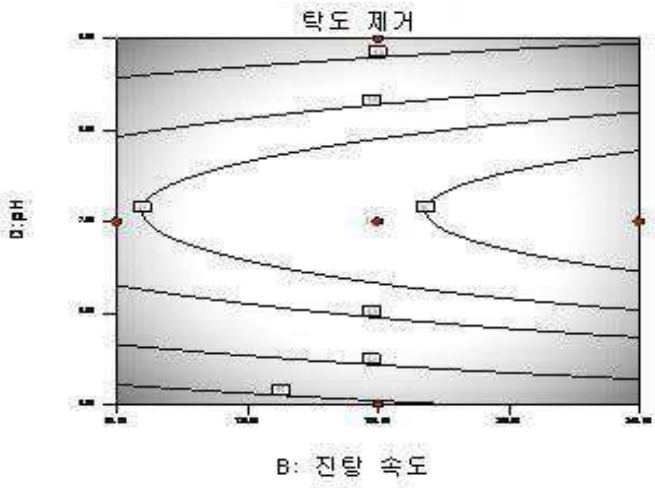
도면16a



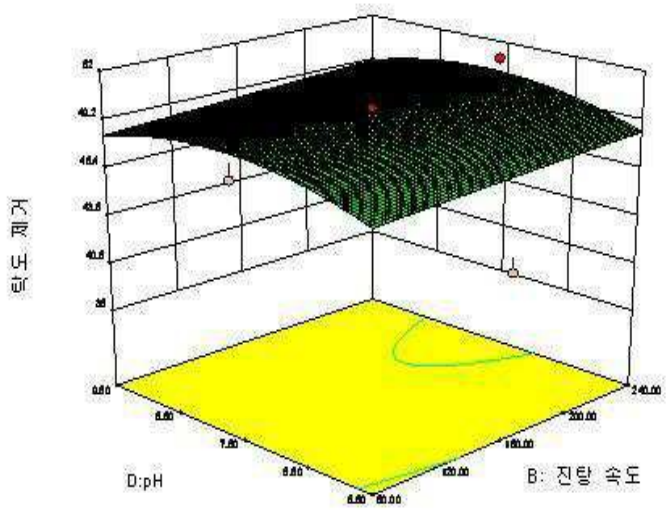
도면16b



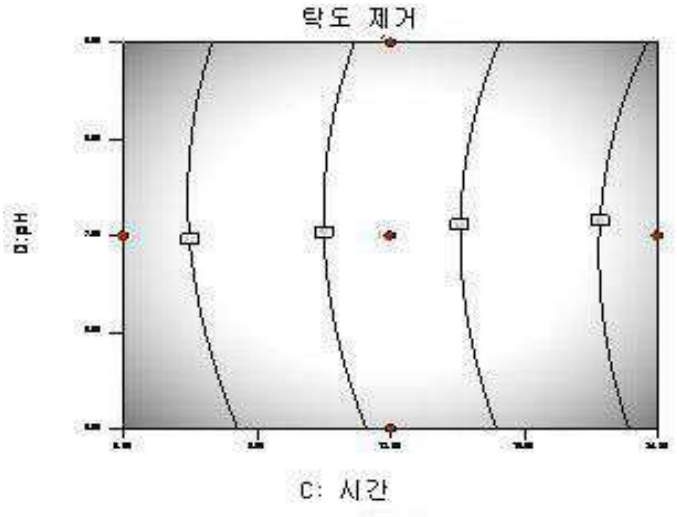
도면17a



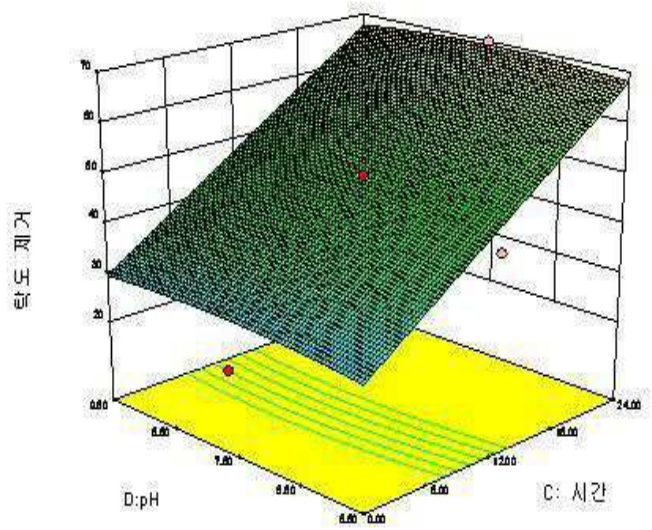
도면17b



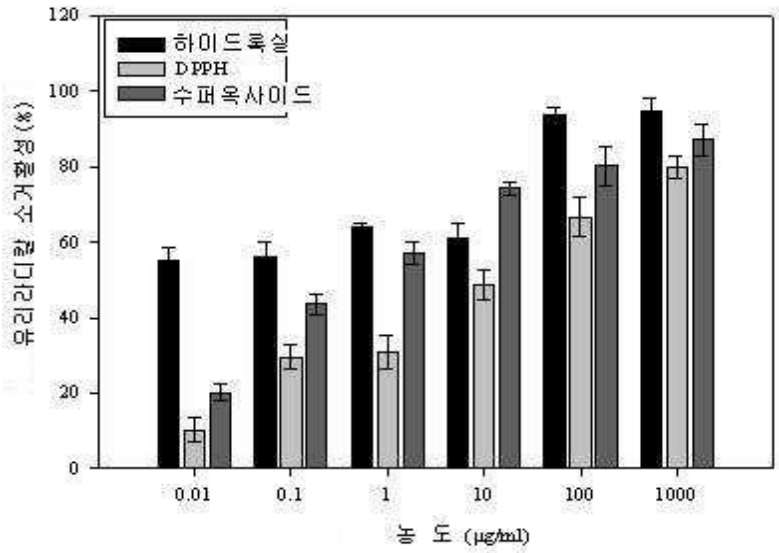
도면18a



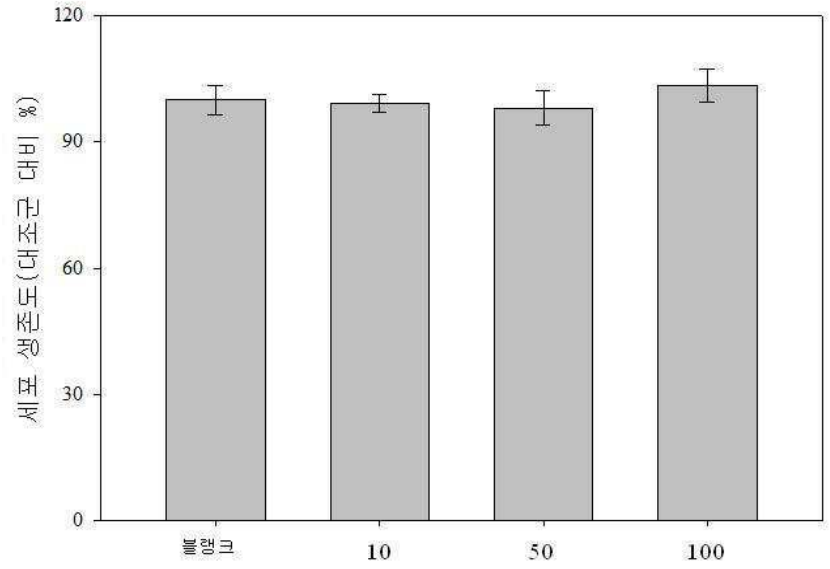
도면18b


탁도 제거
D:pH
C: 시간

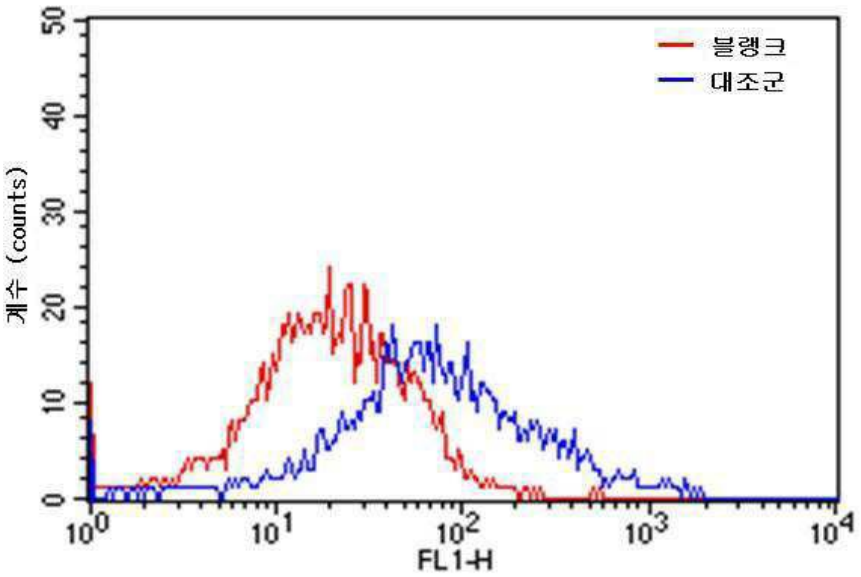
도면19


하이드록실
DPPH
수퍼옥사이드
유리라디칼 소거활성(%)
농 도 (μg/ml)
0.01
0.1
1
10
100
1000

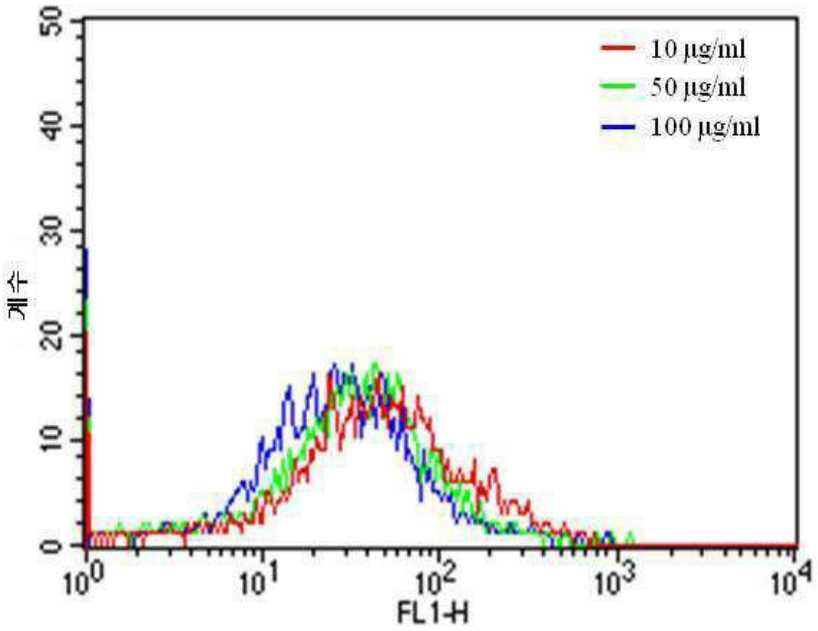
도면20


세포 생존도(대조군 대비 %)
120
90
60
30
0
블랭크
10
50
100

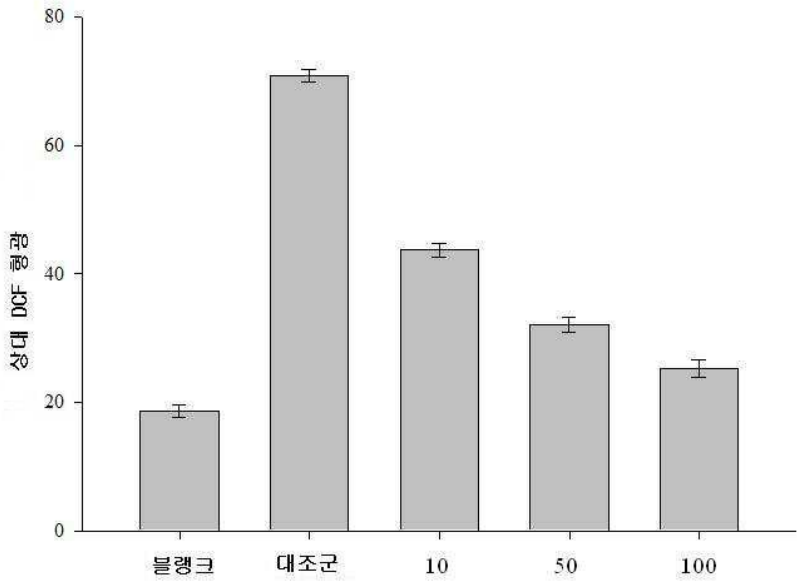
도면21a


계수 (counts)
50
40
30
20
10
0
블랭크
대조군
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
FL1-H

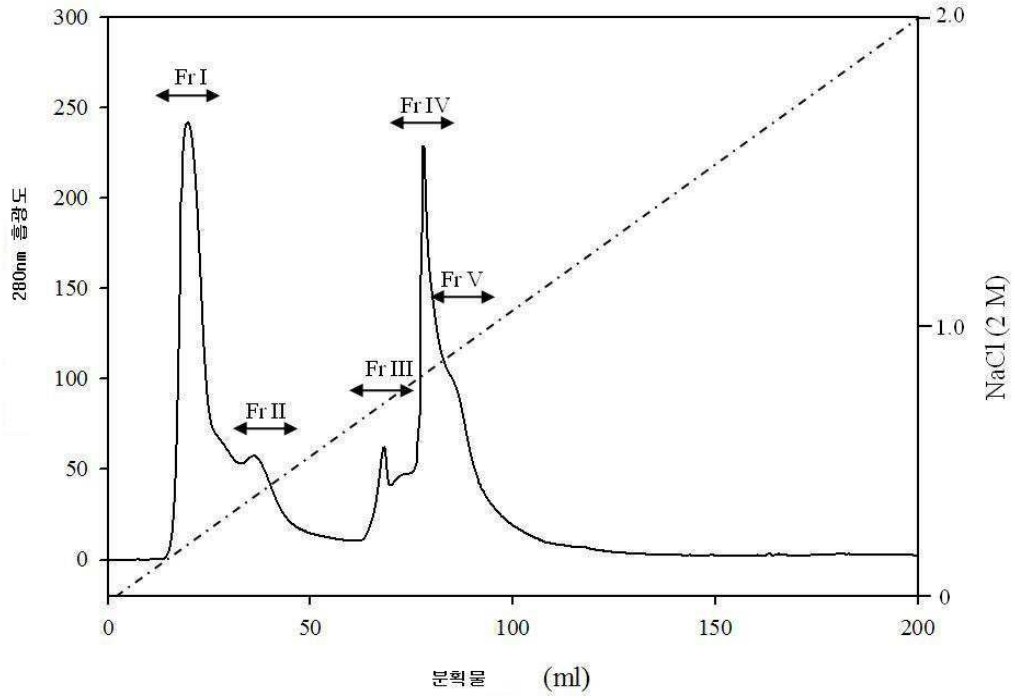
도면21b



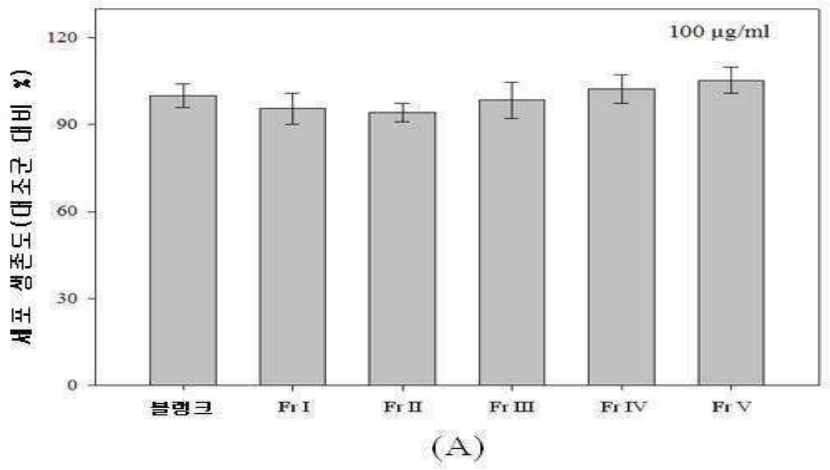
도면21c



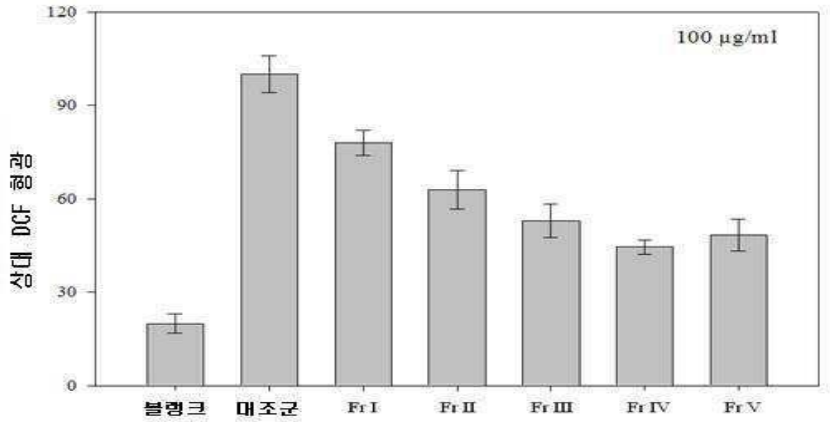
도면22


300
250
200
150
100
50
0
280nm 흡광도
Fr I
Fr II
Fr III
Fr IV
Fr V
2.0
1.0
0
NaCl (2 M)
0
50
100
150
200
분획물
(ml)

도면23

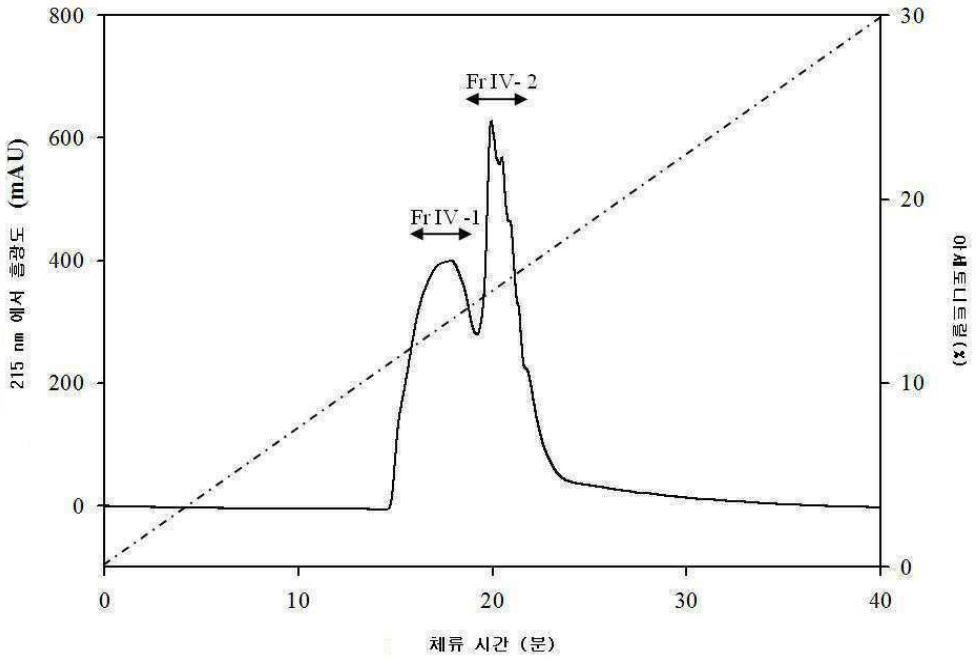

100 μg/ml
세포 생존도(대조군 대비 %)
120
90
60
30
0
블랭크
Fr I
Fr II
Fr III
Fr IV
Fr V

(A)

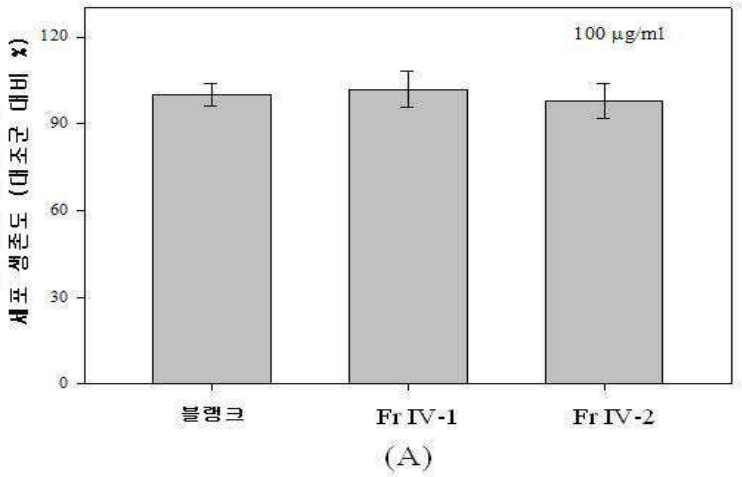

100 μg/ml
상대 DCF 형광
120
90
60
30
0
블랭크
대조군
Fr I
Fr II
Fr III
Fr IV
Fr V

(B)

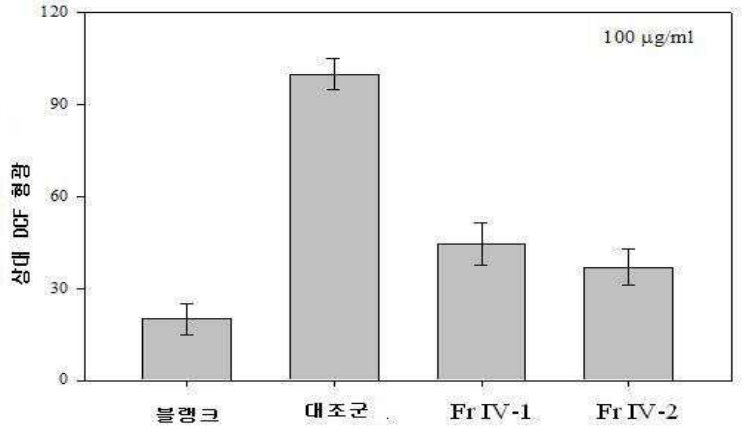
도면24


800
600
400
200
0
215 nm 에서 흡광도 (mAU)
30
20
10
0
에탄올 농도 (%)
Fr IV- 2
Fr IV -1
0
10
20
30
40
체류 시간 (분)

도면25

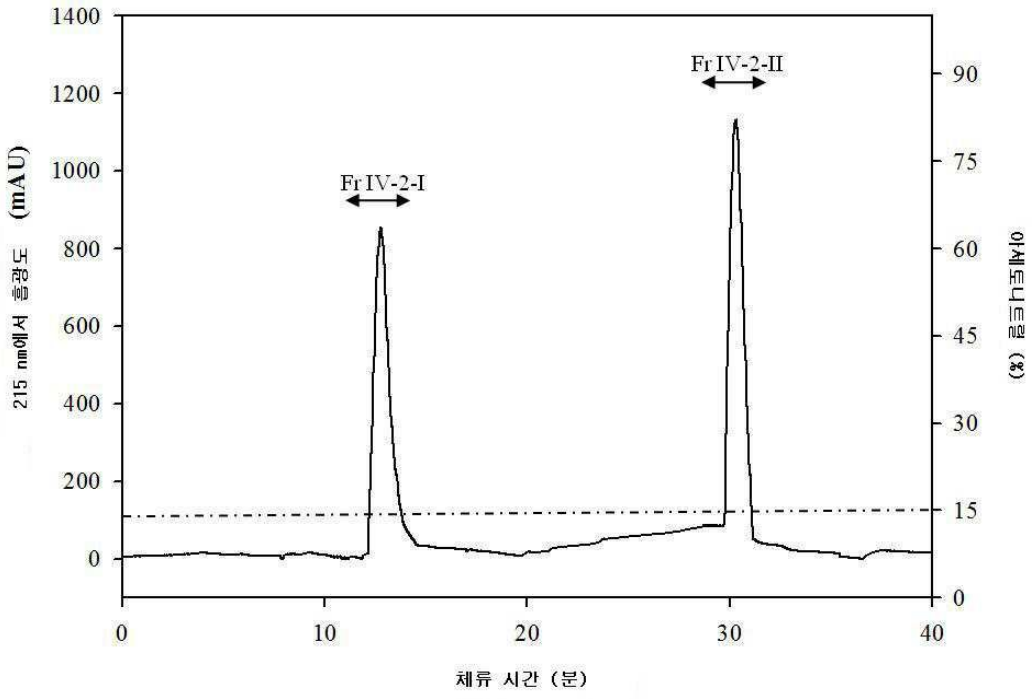

100 μg/ml
세포 생존도 (대조군 대비 %)
120
90
60
30
0
블랭크
Fr IV-1
Fr IV-2

(A)

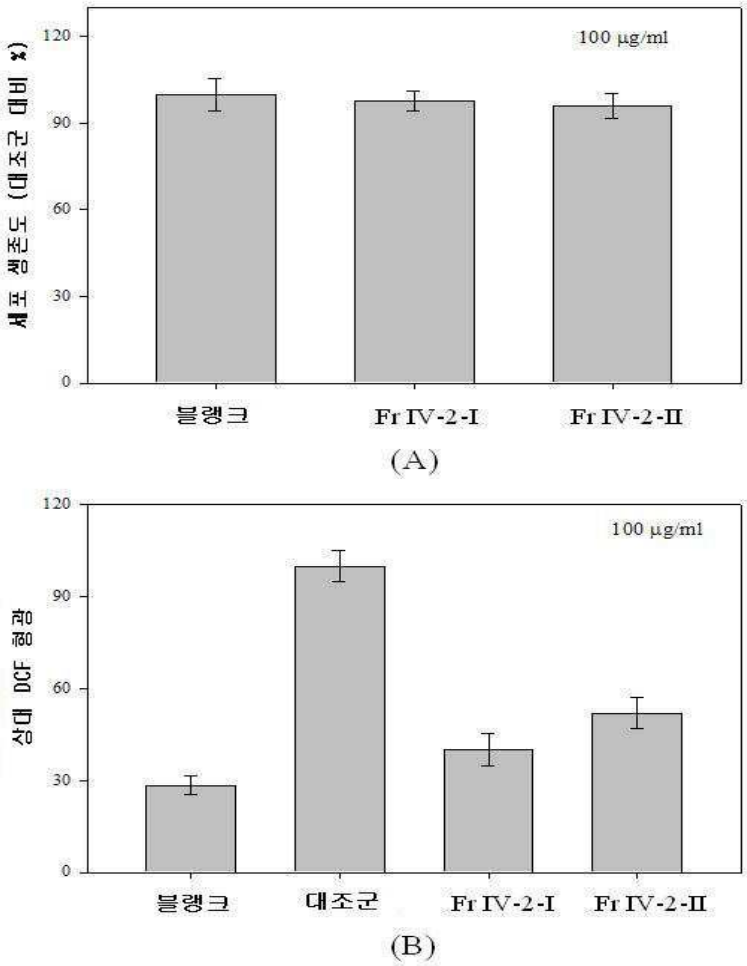

100 μg/ml
상대 DCF 형광
120
90
60
30
0
블랭크
대조군
Fr IV-1
Fr IV-2

(B)

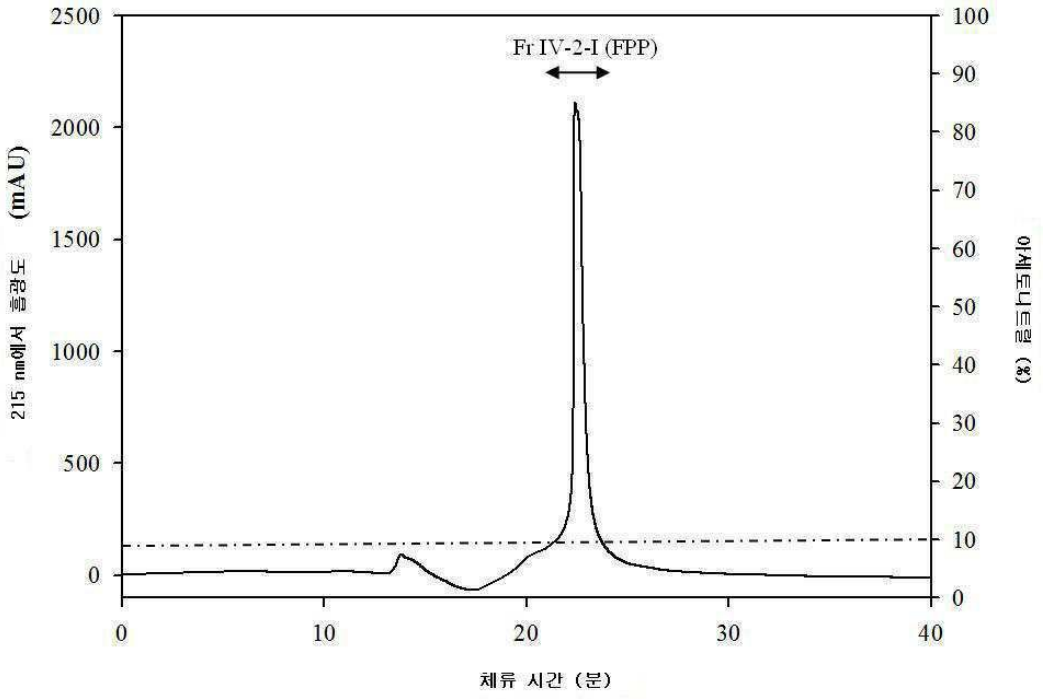
도면26


Fr IV-2-I
Fr IV-2-II
215 nm에서 흡광도 (mAU)
아세토니트릴 (%)
체류 시간 (분)
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
90
75
60
45
30
15
0
0
10
20
30
40

도면27

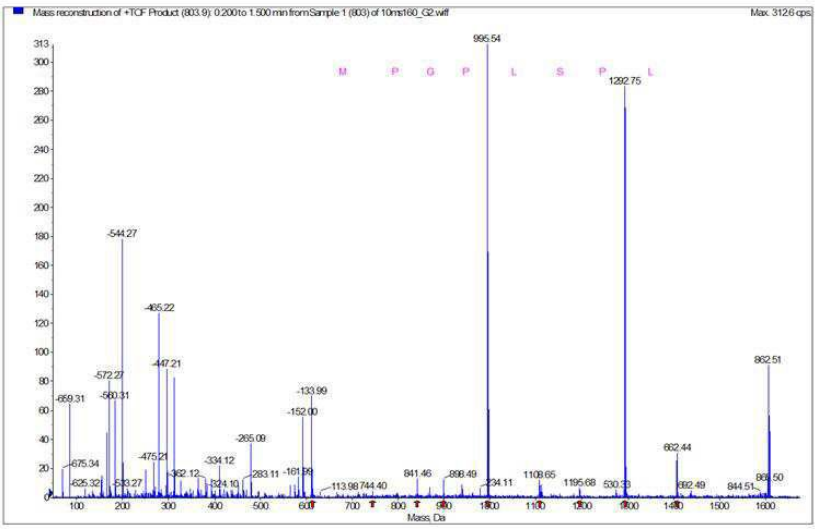

100 μg/ml
세포 생존도 (대조군 대비 %)
120
90
60
30
0
블랭크
Fr IV-2-I
Fr IV-2-II
(A)
100 μg/ml
상대 DCF 형광
120
90
60
30
0
블랭크
대조군
Fr IV-2-I
Fr IV-2-II
(B)

도면28

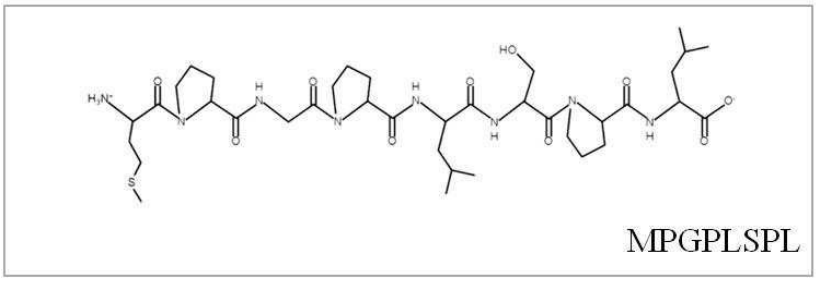

Fr IV-2-I (FPP)
215 nm에서 흡광도 (mAU)
아세토니트릴 (%)
체류 시간 (분)

도면29

(A)


M P G P L S P L
Mass, Da

(B)


MPGPLSPL

서 열 목 록

<110> Pukyong National University Industry-University Cooperation Foundation

<120> Microalga Pavlova lutheri having antioxidative activity fermented by Candida rugopelliculosa, a peptide derived therefrom and health food containing the fermented Pavlova lutheri or the peptide

<130> 20110705

<160> 1

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> Pavlova lutheri

<400> 1

Met Pro Gly Pro Leu Ser Pro Leu

1 5