



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0145348
(43) 공개일자 2020년12월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/12 (2006.01) C12P 23/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/12 (2019.02)
C12P 23/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0074226
(22) 출원일자 2019년06월21일
심사청구일자 2019년06월21일

(71) 출원인
전북대학교산학협력단
전라북도 전주시 덕진구 백제대로 567 (덕진동1가)
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
김대근
전라북도 익산시 평동로 530-7, 201동 1104호(평화동, 클래식아파트)
최윤이
서울특별시 동대문구 약령시로 25, 103동 1101호(제기동, 안암골 벽산아파트)
홍창희
서울특별시 영등포구 여의대로6길 17, 에이동 1202호(여의도동, 공작아파트)
(74) 대리인
염홍서, 고윤호, 이철희

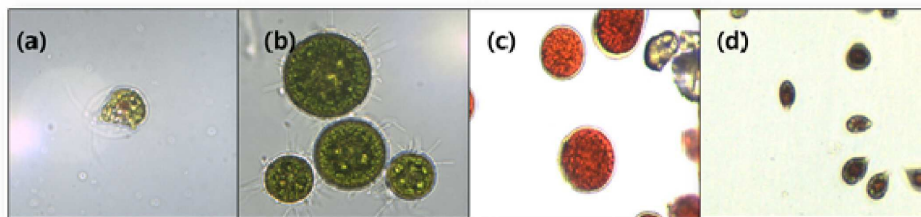
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 헤마토코쿠스의 적색세포로 부터 편모를 생성시키는 방법을 포함하는 배양방법과 바이오매스 배양생산방법

(57) 요약

본 발명은 아스타잔틴의 생산 등을 위해 배양되는 헤마토코쿠스의 새로운 접종 방법 및 이를 통한 바이오매스 생산에 관한 것이다. 헤마토코쿠스는 배양의 초기 단계에 세포의 성장이 느린 단점이 존재하므로 이를 극복하기 위해 새로운 형태의 접종 시드 (휴면단계의 적색 세포 및 이를 유도한 편모달린 적색 세포)를 적용하여, 적색광 조사를 통한 탈 휴면 단계 유도, 그리고 바이오매스 및 아스타잔틴의 효율적인 성장을 달성하였다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	20170488
부처명	해양수산부
과제관리(전문)기관명	해양수산과학기술진흥원
연구사업명	해양수산생명공학기술개발
연구과제명	미세조류(Euglena sp.)의 베타글루칸 생산성 개선을 위한 해양 미생물 응용기술 개
발	
기여율	1/2
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2017.11.01 ~ 2020.01.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2019002790009
부처명	환경부
과제관리(전문)기관명	한국환경산업기술원
연구사업명	생태모방 기반 환경오염관리 기술개발사업
연구과제명	중금속 오염환경에서 미세조류 및 미생물의 군집형태를 모사한 수질정화 시스템 개
발	
기여율	1/2
과제수행기관명	전북대학교
연구기간	2019.04.17 ~ 2019.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

헤마토코쿠스의 적색세포로 부터 편모를 생성시키는 방법으로서,
편모 없는 적색세포에 적색광을 24 내지 48시간 조사하는 단계를 포함하는 편모를 생성시키는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,
상기 편모없는 적색 세포에 대하여 $150\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ 이하의 광량을 조사하는 것을 특징으로 하는 편모를 생성시키는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,
사용되는 OHM 배지의 10% 이상의 영양염이 공급되는 것을 특징으로 하는
편모를 생성시키는 방법.

청구항 4

헤마토코쿠스의 편모 없는 적색 세포를 활용하여 접종하는 배양방법.

청구항 5

적색 편모 세포를 배양하여 바이오매스 및 세포수를 증가시키는 단계를 포함하는 헤마토코쿠스의 배양방법.

청구항 6

제5항에 있어서,
 $250\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ 이상의 광량에서 배양하는 것을 특징으로 하는 헤마토코쿠스의 배양방법.

청구항 7

편모없는 적색 세포 단계;
상기 편모없는 적색 세포 단계에서 적색광을 24 내지 48시간 조사하여 편모를 생성한 적색 세포를 만드는 단계;와
상기의 적색 편모 세포를 배양에 적용하여 바이오매스 및 세포수를 높이는 단계;를 포함하는 헤마토코쿠스 바이오매스 배양생산방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 아스타잔틴의 생산 등을 위해 사용되는 헤마토코쿠스의 배양단계에 착안한 배양방법 및 바이오매스 생산에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 기존에는 아스타잔틴의 생산량을 늘리기 위하여 헤마토코쿠스를 초기에 녹색 세포의 상태로 접종하여 특정 과장

의 광을 조사하는 형태의 배양기술이 사용되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0003] 하지만 헤마토코쿠스는 배양의 초기 단계에 세포의 성장이 느린 단점이 존재하므로 이를 극복하기 위해 새로운 형태의 접종 시드를 적용하여 바이오매스 및 아스타잔틴의 효율적인 성장을 달성하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0004] 본 발명은 기존과 달리 휴면기의 적색 세포를 접종세포로 설정하고, 이 적색세포로부터 세포 분열 및 편모를 보유한 적색 세포 상태로 만들어 바이오매스 및 아스타잔틴을 생산하는 일련의 과정을 포함한다. 적색 헤마토코쿠스의 편모를 생성시키는 방법은 헤마토코쿠스의 편모없는 적색 세포에 적색광을 24 내지 48시간 조사하는 단계를 포함한다.

[0005] 본 발명의 편모를 생성시키는 방법에 있어서, 상기 편모 없는 적색 세포에 대하여 $150\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ 이하의 광량을 조사하는 것을 특징으로 한다.

[0006] 본 발명의 편모를 생성시키는 방법에 있어서, 사용되는 OHM 배지의 10% 이상의 영양염이 공급되는 것을 특징으로 한다.

[0007] 본 발명의 헤마토코쿠스의 배양방법은 헤마토코쿠스의 편모 없는 적색 세포를 활용하여 적색 편모 세포로 유도하여 접종하는 것을 특징으로 한다.

[0008] 본 발명의 헤마토코쿠스의 배양방법은 적색 편모 세포를 배양하여 바이오매스 및 세포수를 증가시키는 단계를 포함한다.

[0009] 본 발명에 있어서, 헤마토코쿠스를 $250\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ 이상의 광량에서 배양하는 것을 특징으로 한다.

[0010] 본 발명의 헤마토코쿠스 바이오매스는, 적색 편모 없는 세포 단계에서 적색광을 24 내지 48시간 조사하여 편모를 생성한 적색 세포를 만드는 단계와 상기의 적색 편모 세포를 배양에 적용하여 바이오매스 및 세포수를 높이는 단계를 포함하는 배양방법으로 얻어진다.

발명의 효과

[0011] 휴면단계의 헤마토코쿠스를 접종에 활용함으로써, 다른 접종 세포의 준비가 필요 없이 아스타잔틴 생산 공정이 마무리 된 세포를 바로 접종시킬 수 있다는 높은 활용성이 있다. 또한, 휴면단계의 적색세포를 접종하여, 적색광 조사를 통하여 유도된 움직이는 적색 세포를 헤마토코쿠스 배양에 사용하는 것은 바이오매스 성장성 및 아스타잔틴 생산성의 증가에 효과적이다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 4단계 세포의 형태 (a:1단계, b:2단계, c:3단계, d:4단계)

도 2는 1단계 및 2단계 비교 바이오매스

도 3은 1단계 및 2단계 비교 세포 수

도 4는 우측에 광원을 배치한 결과

도 5는 2단계 및 3단계 비교 바이오매스

도 6은 2단계 및 3단계 비교 세포 수

도 7은 적색 세포의 시간에 따른 분화(a: 적색과장; b: 청색 및 백색 과장)

도 8은 광 파장에 따른 세포 수의 변화

도 9는 광량에 따른 세포의 변화

도 10은 영양염 공급에 따른 세포의 변화

도 11은 접종 세포 형태에 따른 바이오매스

도 12는 접종 세포 형태에 따른 세포 수

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0013] 본 발명의 권리범위는 특허청구범위에 의하여 정해진다. 본 발명의 실시에는 본 발명의 이해를 돕기 위해 기재된다. 따라서, 본 발명의 권리범위가 기재된 실시예에 의해 한정되는 것은 아니며, 기재된 실시예에 근거하여 본 발명의 속하는 기술분야의 전문가에 의해 변형가능한 내용에 대하여도 본 발명의 권리가 미친다. 본 발명의 실시예는 다음과 같다.
- [0014] 본 실험에 사용된 헤마토코쿠스 세포의 형태는 4단계(도 1)로 구분한다.
- [0015] 즉, 1 단계 세포는 편모 있는 녹색 세포(MG), 2단계 세포는 편모 없는 녹색 세포(IG), 3 단계 세포는 편모 없는 적색 세포(IR), 4단계 세포는 편모 있는 적색 세포(MR)이다.
- [0016] 1. 편모 유무에 따른 다양한 광 세기 조건에서 바이오매스 및 세포수 성장 비교
- [0017] - 편모가 헤마토코쿠스 성장에 미치는 영향을 확인하기 위해 1단계 및 2단계 세포를 각기 동일한 바이오매스로 접종하여 배양을 진행 하였다. 배양 결과 1단계 세포가 가장 높은 바이오매스 성장율을 보였으며(도 2), 특히 광량이 $120\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ 조건에서 $240\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ 조건보다 높은 바이오매스 생산성이 확인 되었는데, 이는 $240\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ 조건에서 4일차 세포수가 급격히 감소하는 것으로 보아 광 세기가 높아 광 저해 현상으로 인한 영향을 받은 것으로 판단 된다(도 3). 편모가 세포의 바이오매스 성장에 기여한 원인을 확인 하고자 주광성 테스트를 진행 하였다. 주광성은 편모가 있는 미세조류에서 보고되는 현상으로 세포의 필요에 의해 광이 있는 장소로 세포 스스로가 이동하는 현상을 의미한다. 플레이트 디쉬에 각기 1단계 및 2단계 세포를 배치하여 우측에서만 광을 조사하고 나머지 부분은 암막 처리 하여 30분을 방치 하였다. 그 결과 1단계 세포는 우측으로 녹색의 띠가 나타나 세포가 이동한 것을 확인 할 수 있었으며(도 4), 본 실험에서 1단계 세포가 가장 높은 바이오매스 성장을 나타낸 것이 세포가 광 조건에 따라 배양액 내부를 이동하며 광량에 대한 노출을 스스로 조절하였기 때문으로 판단된다.
- [0018] 2. 아스타잔틴 유무에 따른 다양한 광 세기 조건에서 바이오매스 및 세포수 성장 비교
- [0019] - 헤마토코쿠스 세포 내 아스타잔틴 함량이 세포의 성장에 주는 영향을 확인하기 위해 2단계 및 3단계 세포를 서로 비교하였다. 그 결과 아스타잔틴을 함유하고 있는 3단계 세포가 가장 높은 바이오매스 생산성을 확인 하였다(도 5). 특히 배양 초기에는 3단계 세포보다 2단계 세포가 성장이 빠른 것으로 나타났는데, 접종 후 2일까지 세포수를 보면 3단계 세포는 세포 수 가 급격히 증가하는 것을 확인 할 수 있다(도 6). 세포수의 증가 이후에 세포의 감소 없이 바이오매스가 급격히 높아지는 것을 확인 하였다. 반면 $240\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ 에서 2단계 세포는 초기 3일까지는 바이오매스의 증가가 가장 높게 나타났으나, 이후 세포수의 급격한 감소와 함께 바이오매스 성장이 낮아지는 것을 확인 하였다. 따라서 본 결과를 볼 때 높은 광에서 바이오매스의 증가를 유지하기 위해서는 세포의 사멸을 막는 것이 중요하며, 이때 아스타잔틴이 함유된 경우 높은 광 세기에서도 세포의 사멸을 억제하는 것으로 판단된다.
- [0020] 3. 아스타잔틴을 함유한 편모 있는 세포 유도에 대한 광 파장에 대한 연구
- [0021] - 상기 결과를 볼 때 편모가 있는 세포를 활용하는 것이 세포가 효과적으로 광을 이용할 수 있으며, 아스타잔틴을 함유하고 있을 때 고 광량에서 세포의 사멸을 억제하며 바이오매스의 성장을 높일 수 있음을 확인 하였다. 따라서 이러한 결과를 바탕으로 적색 세포를 이용했을 때 일부 나타났던 편모가 있는 적색 세포를 유도하는 연구를 수행해 보았다.
- [0022] - 빛은 다양한 파장으로 나누어지며, 파장에 따라서 세포에 대한 자극이 다르기 때문에 각각 660nm를 피크로 가지는 적색광, 450nm를 피크로 가지는 청색광, 그리고 일반적인 3파장 범위를 가지는 백색 광원을 사용하여 적색 편모 세포의 유도를 비교해 보았다. 그 결과 적색 파장 광원을 사용하였을 때 약 36시간 정도 시간이 지난후 대부분의 세포가 분화하여 적색 편모 상태가 된 것을 확인 할 수 있었다(도 7). 반면 백색과 청색의 파장에서는 현미경 및 세포수의 증가를 비교해 볼 때 적색 파장보다 낮은 분화율을 보이는 것으로 확인 되었다(도 8). 따라서 효과적으로 편모와 아스타잔틴을 함유한 세포를 만드는 방식은 적색 광을 이용했을 때가 가장 좋은 효과를 나타내는 것으로 판단된다.

[0023] 4. 세포의 상태와 광 세기에 따른 움직이는 적색의 세포 생산 비교

[0024] - 미세조류의 분화 및 반응은 빛의 세기와 관련이 있을 수 있기 때문에 다양한 광량에서 4단계의 세포를 사용하여 초기 3일의 세포 형태의 변화를 비교하여 보았다(도 9, 도 10). 그 결과 3단계 적색 세포를 사용하여 $150\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ 이하의 광량을 조사하여 배양하였을 때 적색으로 움직이는 4단계 세포가 나타나는 것을 확인 할 수 있었다. 특히 $250\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ 이상의 높은 광량에서는 여전히 세포가 광 자극을 받아 적색 구형의 세포 형태를 유지하는 것으로 나타나 $150\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ 이하의 낮은 광량의 조건에서 움직이는 세포가 생성되는 것으로 판단된다. 다만 4단계의 세포의 상태를 유지하기 위해서는 $150\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ 이하의 광량에서는 오히려 아스타잔틴 함량이 낮아져 버리는 현상이 나타났는데 $250\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ 이상의 광량에서는 적색을 유지하면서 성장하는 것을 확인 하였다. 따라서 일단 4단계의 세포를 확보한 다음에는 높은 광량에서 이를 유도할 수 있는 방법도 가능할 것으로 판단된다. 다만 이러한 움직이는 세포의 발생은 배지의 영양성분이 존재하는 조건에서만 나타나는 것으로 확인 되었다. 사용되는 OHM (Optimal Haematococcus Medium) 배지는 1L 당 KNO_3 0.41g, Na_2HPO_4 0.03g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.246g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.11g 과 $\text{Fe(III)citrate} \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2.62mg, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.011mg, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.012mg, Cr_2O_3 0.075mg, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.98mg, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.12mg, SeO_2 0.005mg 및 biotin 25ug, thiamine 17.5ug, B12 15ug 함유되어 있으며 이만큼 함유된 배지의 상태를 100%라고 할 때, 전체 영양성분의 10% 수준 이상 공급해 줄 경우 4단계 세포가 확인 되었다. 따라서 10% 이상의 영양염 공급이 필요한 것으로 판단 된다.

[0025] 5. 적색 편모 세포(4단계)를 활용한 아스타잔틴의 생산 비교

[0026] - 위 연구를 통해 얻어진 4단계의 편모 있는 적색 세포를 활용하여 광 세기에 따른 바이오매스 및 세포 수의 변화를 확인 해 보았다(도 11, 도 12). 그 결과 4단계 적색 편모를 가진 세포를 활용하여 접종하였을 때 가장 높은 바이오매스의 성장을 보이는 것을 확인 하였다. 특히 세포 수 역시 초기에 빠르게 증가하여, 바이오매스가 증가함에도 세포수의 감소가 2단계 녹색 세포의 경우처럼 높게 나타나지 않음을 확인 하였다. 아스타잔틴 생산성도 4단계 편모 적색 세포의 경우 초기 1.6% 수준의 아스타잔틴 함량으로 시작해서 5일 후 배양이 종료되는 시점까지 유사한 수준의 아스타잔틴 함량을 유지하고 있었으며, 이 결과는 3단계 적색 세포의 아스타잔틴 함량과 비교해도 차이가 없는 수준이다. 오히려 바이오매스 생산성이 4단계 세포가 더 높아 최종 아스타잔틴 생산성은 4단계 세포가 21.4mg/L 수준으로 가장 높은 아스타잔틴 생산성을 보이는 것을 확인 하였다(표 1).

표 1

[0027] 배양 조건에 따른 아스타잔틴 함량의 변화 (%)

	광량	0	1	2	3	4	5	mg/L 환산
mg80	80	0.00	0.00	0.00	0.00	0.30	0.54	4.4
mg120	120	0.00	0.00	0.00	0.14	0.40	0.60	5.5
mg240	240	0.00	0.00	0.19	0.56	1.18	1.28	10.7
mr80	80	1.64	0.97	0.25	0.00	0.00	0.22	1.6
mr120	120	1.63	1.22	0.37	0.22	0.32	0.43	3.9
mr240	240	1.61	1.43	1.28	1.42	1.65	1.97	21.4
ig80	80	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.35	1.9
ig120	120	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10	0.35	2.1
ig240	240	0.00	0.00	0.07	0.25	0.58	0.98	6.5
ir80	80	2.25	1.48	1.13	0.33	0.00	0.17	1.1
ir120	120	2.27	1.50	1.38	0.38	0.27	0.42	3.2
ir240	240	2.27	1.93	1.83	1.73	1.77	1.93	17.3

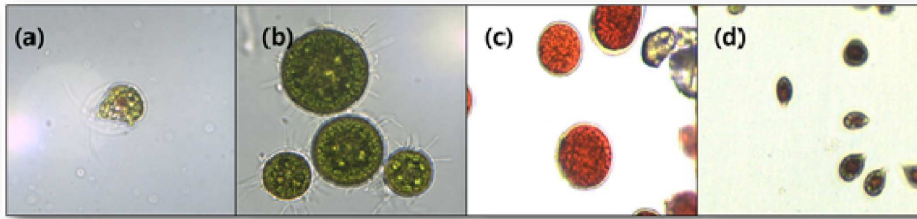
부호의 설명

[0029] 1: 1단계 세포

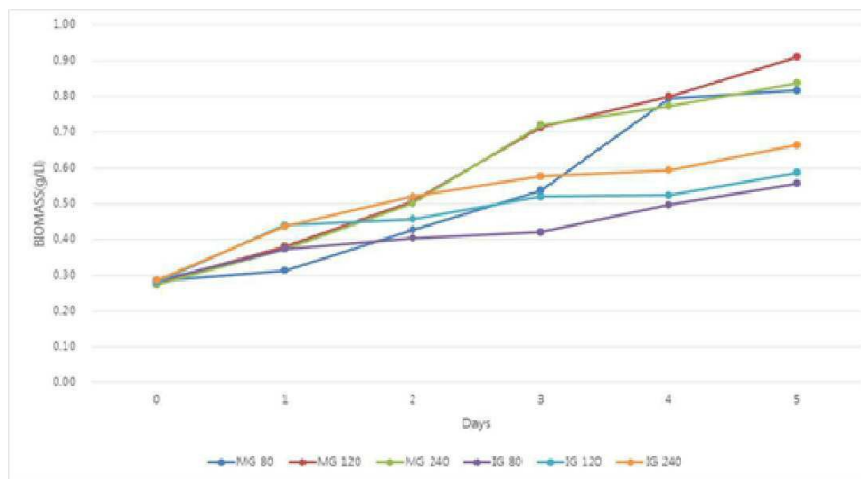
2: 2단계 세포

도면

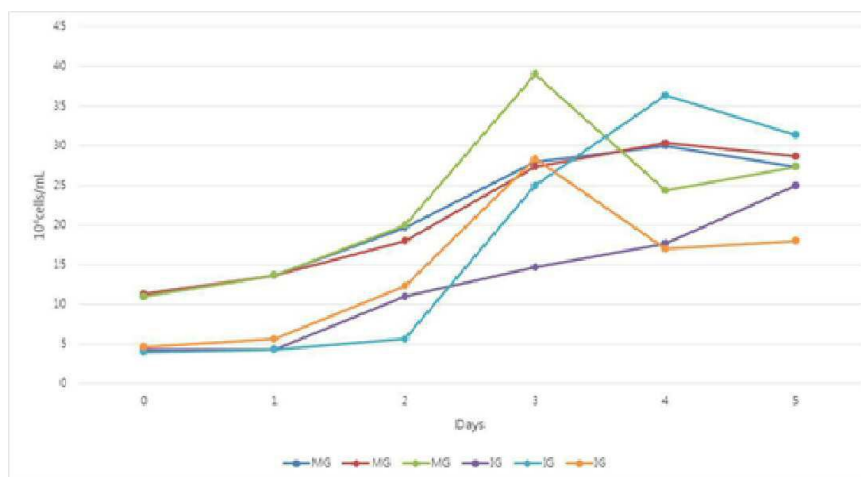
도면1



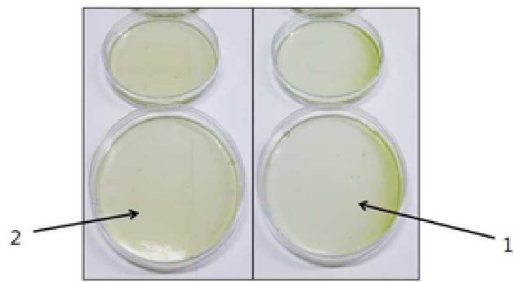
도면2



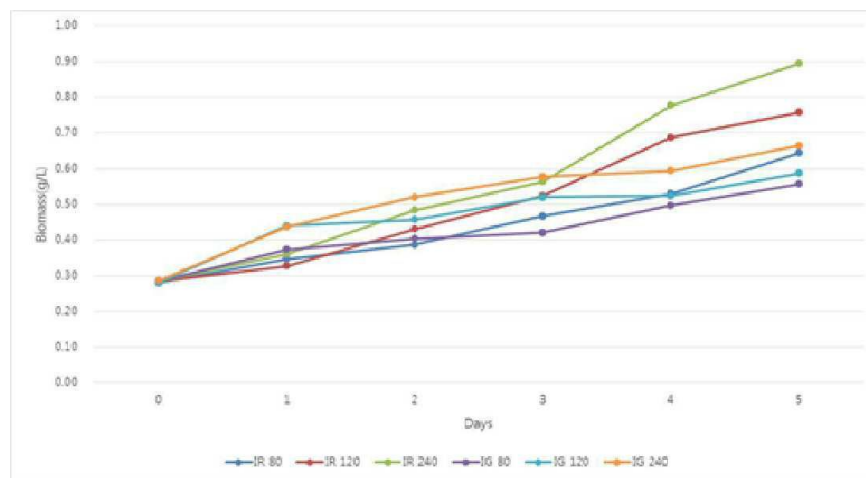
도면3



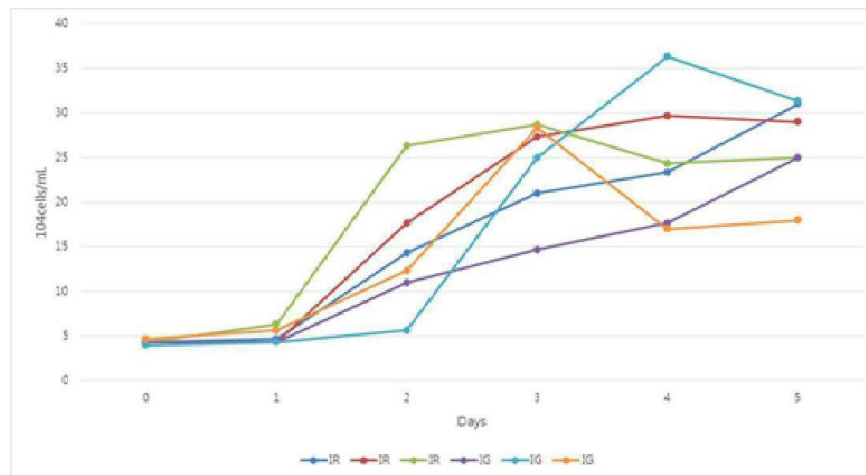
도면4



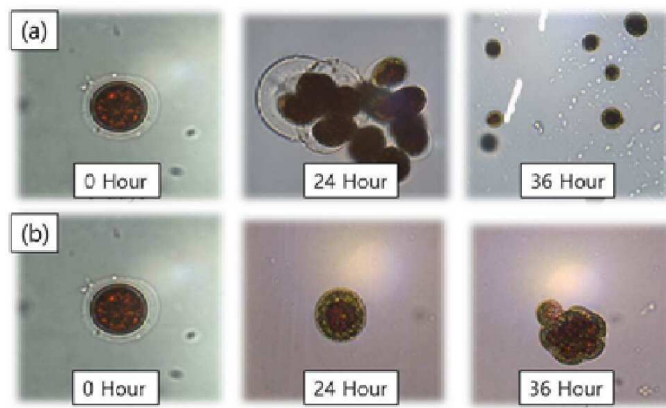
도면5



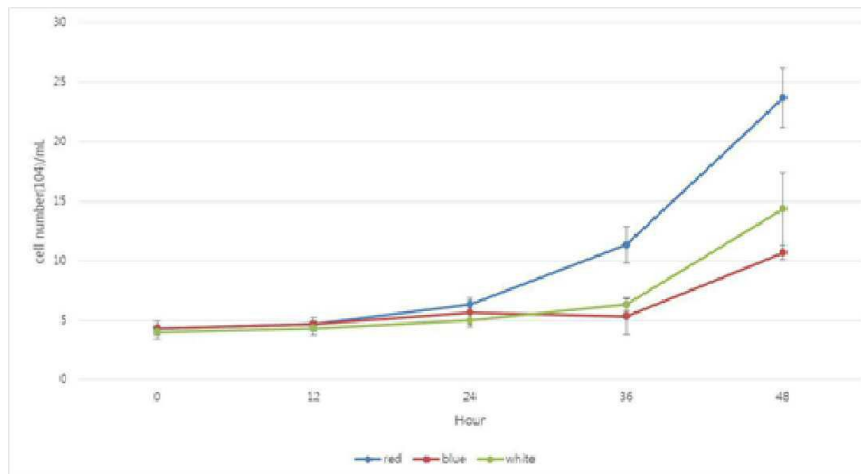
도면6



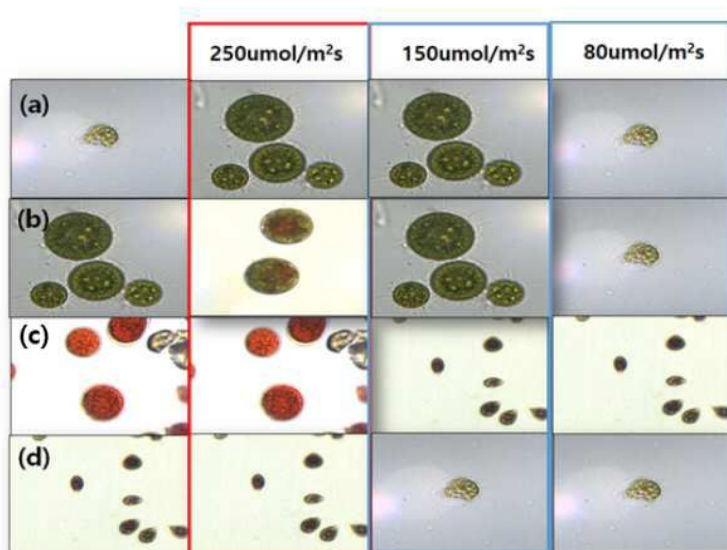
도면7



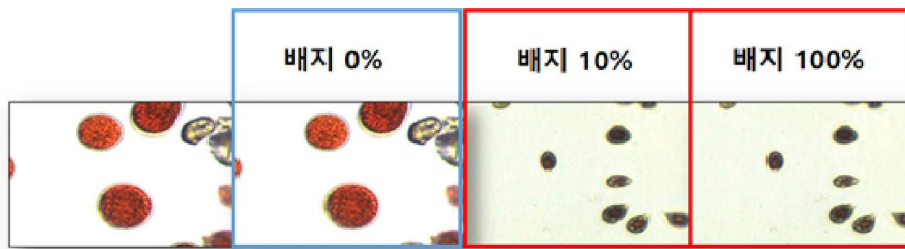
도면8



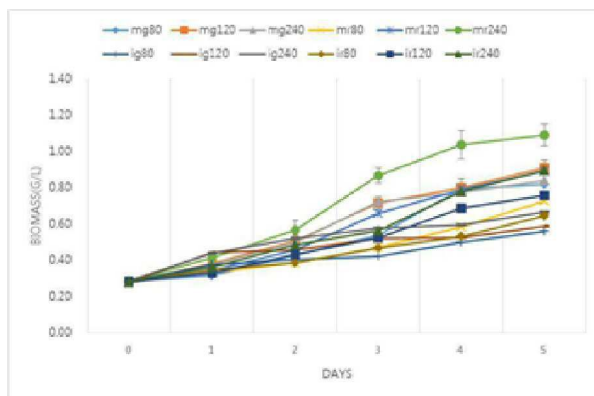
도면9



도면10



도면11



도면12

