



(19) 대한민국특허청(KR)  
 (12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2009년11월04일  
 (11) 등록번호 10-0925290  
 (24) 등록일자 2009년10월29일

(51) Int. Cl.

*C12P 7/64* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2002-7009661  
 (22) 출원일자 2001년01월26일  
 심사청구일자 2006년01월24일  
 (85) 번역문제출일자 2002년07월26일  
 (65) 공개번호 10-2003-0013368  
 (43) 공개일자 2003년02월14일  
 (86) 국제출원번호 PCT/US2001/002715  
 (87) 국제공개번호 WO 2001/54510  
 국제공개일자 2001년08월02일

(30) 우선권주장  
 60/178,588 2000년01월28일 미국(US)

(56) 선행기술조사문현

US05130242 A1

WO1999024448 A2

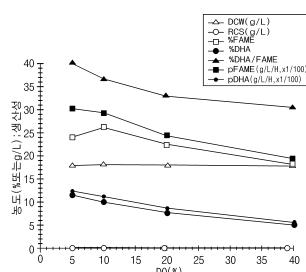
전체 청구항 수 : 총 69 항

심사관 : 김상준

(54) 발효기 내에서 진핵 미생물의 고밀도 배양에 의한 고도불포화 지방산을 함유하는 지질의 증진된 생산 방법

**(57) 요약**

본 발명은 지질, 특히 고도불포화 지방산을 함유하는 지질을 생산할 수 있는 진핵 미생물을 성장시키는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 진핵 미생물의 지질을 생산하기 위한 방법을 제공한다.

**대 표 도 - 도1**

DHA/FAME에 대한 D0의 효과

| D0 (%) | RCS (g/L) | DOW (g/L) | FAME (g/L) | DHA (%) | DHA/FAME (%) | pFAME (g/L/h) x 100 | pDHA (g/L/h) x 100 |
|--------|-----------|-----------|------------|---------|--------------|---------------------|--------------------|
| 0.0    | 18.1      | 5.0       | 2.0        | 24.4    | 11.3         | 40.0                | 0.302              |
| 5.0    | 18.3      | 4.9       | 1.8        | 26.3    | 9.6          | 36.7                | 0.292              |
| 10.0   | 18.0      | 4.1       | 1.3        | 22.6    | 7.4          | 33.0                | 0.244              |
| 20.0   | 17.8      | 3.2       | 1.0        | 18.2    | 5.6          | 30.6                | 0.191              |
| 40.0   | 17.8      | -         | -          | 18.2    | 5.6          | 30.6                | 0.059              |

## (72) 발명자

**한센, 존, 웨**

미국91910캘리포니아주풀라비스타베이요나루프563

**미라소울, 피터, 제이.**

미국92107

캘리포니아주샌디에고카탈리나블리바드1241

**베일리, 리차드, 비.**

미국92014캘리포니아주텔마카미뉴트카멜13412

**웨더, 죠지, 티., III**

미국92126캘리포니아주래모나메인스트리트2674

**가네코, 다쓰오**

미국92126캘리포니아주샌디에고캐넌포인트레인7753

**바클레이, 윌리암, 알.**

미국80303콜로라도주보울더파노라마드라이브7356

## (81) 지정국

국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바레인, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 리히텐슈타인, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬란드, 일본, 케냐, 키르키즈스탄, 북한, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베이라, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 슬로베니아, 슬로바키아, 타지키스탄, 투르크맨, 터키, 트리니다드토바고, 우크라이나, 우간다, 미국, 우즈베키스탄, 베트남, 폴란드, 포르투칼, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 아랍에미리트, 안티구와바부다, 코스타리카, 도미니카, 알제리, 모로코, 탄자니아, 남아프리카, 벨리즈, 모잠비크, 에콰도르, 필리핀

AP ARIPO특허 : 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 시에라리온, 가나, 감비아, 짐바브웨

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르키즈스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크맨

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 리히텐슈타인, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투칼, 스웨덴, 핀란드, 사이프러스

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디브와르, 카메룬, 가봉, 기니, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고, 기니 비사우, 적도 기니

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

트라우스토키트리드(Thraustochytrid) 미생물의 발효를 비알코올 탄소원과 제한 영양소원을 함유하는 배지에서 수행하고, 상기 비알코올 탄소원과 제한 영양소원을 발효 배지에 첨가하여 상기 발효 배지의 생물량 밀도를 건조 세포 중량을 기준으로 100 g/L 이상으로 증가시키고, 건조 세포 중량을 기준으로 100 g/L 이상의 생물량 밀도를 가지는 배지의 발효에 의해 고도불포화 지방산을 함유하는 지질을 생산하는 것을 포함하는, 미생물에 의해 생산되는 전체 지질의 15% 이상을 고도불포화 지질로서 생산할 수 있는 트라우스토키트리드 미생물로부터 고도불포화 지방산을 함유하는 지질을 생산하는 방법으로, 상기 발효 배지 내의 용존산소 수준이 (a) 상기 방법을 90 시간 이상 수행하되, 처음 24 시간 동안은 8%로 유지시키고, 24 시간부터 40시간 까지는 4%로 유지시키며, 40 시간부터 상기 방법의 종료시까지는 0.5% 미만으로 유지시킴, (b) 상기 방법을 90시간 이상 수행하되, 40 시간 이후부터 종료시까지 0.5% 미만으로 유지시킴, (c) 포화도의 3% 미만, 및 (d) 포화도의 1% 미만으로 이루어진 그룹 중에서 선택됨을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 2

삭제

### 청구항 3

삭제

### 청구항 4

삭제

### 청구항 5

삭제

### 청구항 6

삭제

### 청구항 7

삭제

### 청구항 8

삭제

### 청구항 9

제1항에 있어서, 발효 배지의 생물량 밀도가 건조 세포 중량을 기준으로 100 g/L 이상일 때, 부가의 제한 영양소원이 전혀 없이 탄소원을 첨가하여 지질 생산을 유발하는 영양소 제한 조건을 유발하는 것인 방법.

### 청구항 10

삭제

### 청구항 11

삭제

### 청구항 12

삭제

### 청구항 13

제1항에 있어서, 상기 비알코올 탄소원이 탄수화물을 포함하는 것인 방법.

**청구항 14**

제1항에 있어서, 상기 제한 영양소원이 질소원, 탄소원, 인산염원, 비타민원, 미량 금속원 및 다량 금속원, 실리카원 및 이들의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택된 영양소원을 포함하는 것인 방법.

**청구항 15**

제1항에 있어서, 상기 제한 영양소원이 미량 금속원 및 다량 금속원의 황산염 및 염화물염, 및 이들의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택되는 미량 금속원 및 다량 금속원으로 이루어지는 군 중에서 선택되는 것인 영양소원을 포함하는 것인 방법.

**청구항 16**

제1항에 있어서, 상기 제한 영양소원이 질소원을 포함하는 것인 방법.

**청구항 17**

제1항에 있어서, 상기 제한 영양소원이 무기 암모늄염을 포함하는 것인 방법.

**청구항 18**

제1항에 있어서, 상기 제한 영양소원이 수산화암모늄을 포함하는 것인 방법.

**청구항 19**

제1항에 있어서, 상기 발효 배지의 pH를 상기 제한 영양소원에 의해 조절하는 것인 방법.

**청구항 20**

제1항에 있어서, 상기 발효 배지의 온도가 20°C 이상인 것인 방법.

**청구항 21**

제1항에 있어서, 상기 방법이 지질을 0.5 g/L/hr 이상의 평균 속도로 생산하는 것인 방법.

**청구항 22**

제1항에 있어서, 상기 방법이 지질을 0.5 g/L/hr 이상의 평균 속도로 생산하고, 지질의 15% 이상이 고도불포화 지질인 것인 방법.

**청구항 23**

제1항에 있어서, 상기 방법이 지질을 0.5 g/L/hr 이상의 평균 속도로 생산하고, 오메가-3 및 오메가-6 지방산의 전체량이 지질의 20% 이상인 것인 방법.

**청구항 24**

제1항에 있어서, 상기 방법이 지질을 0.5 g/L/hr 이상의 평균 속도로 생산하고, 상기 지질의 25% 이상이 도코사헥사엔산인 것인 방법.

**청구항 25**

삭제

**청구항 26**

삭제

**청구항 27**

삭제

**청구항 28**

삭제

**청구항 29**

삭제

**청구항 30**

제1항에 있어서, 상기 미생물이 폴리케타이드 신타제 유전자를 함유하는 것인 방법.

**청구항 31**

제1항에 있어서, 상기 미생물이 트라우스토키트리움 (*Thraustochytrium*), 쇠조키트리움 (*Schizochytrium*) 및 이들의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택되는 것인 방법.

**청구항 32**

삭제

**청구항 33**

삭제

**청구항 34**

제1항에 있어서, 상기 방법이 평균 0.2 g/L/hr 이상의 속도로 도코사헥사엔산을 생산하는 것인 방법.

**청구항 35**

제1항에 있어서,

(a) 상기 발효 배지로부터 물을 제거하여 건조 미생물을 제공하고,

(b) 상기 건조 미생물로부터 상기 지질을 단리시키는 것을 추가로 포함하고, 여기서, 미생물의 지질의 15% 이상이 고도불포화 지방산인 것인 방법.

**청구항 36**

제1항에 있어서,

(a) 발효 배지를 처리하여 미생물 세포를 세포막이 투과성 있게 하거나, 용해시키거나 또는 파열시키고,

(b) 지질 또는 물 에멀젼을 파괴시키는 것을 돋기 위한 약제의 도움 하에 또는 도움없이 중력 분리에 의해 발효 배지로부터 지질을 회수하는 것을 추가로 포함하고, 여기서, 미생물 지질의 15% 이상은 고도불포화 지방산인 것인 방법.

**청구항 37**

삭제

**청구항 38**

제1항에 있어서,

(a) 앞선 원심분리없이 상기 발효 배지로부터 물을 증발하여 건조 미생물을 제공하고,

(b) 상기 건조 미생물로부터 지질을 단리시키는 것을 추가로 포함하고,

여기서, 미생물 지질의 15% 이상은 고도불포화 지방산인 것인 방법.

**청구항 39**

삭제

**청구항 40**

삭제

**청구항 41**

삭제

**청구항 42**

삭제

**청구항 43**

삭제

**청구항 44**

삭제

**청구항 45**

삭제

**청구항 46**

삭제

**청구항 47**

삭제

**청구항 48**

제1항에 있어서, 상기 방법이 유가식(fed-batch) 공정을 이용하는 것인 방법.

**청구항 49**

제1항에 있어서, 상기 방법이 회분식 공정 또는 연속 공정을 이용하는 것인 방법.

**청구항 50**

제1항에 있어서, 배지의 발효에 의해 고도불포화 지방산을 함유하는 지질을 생산할 때, 발효 배지의 생물량 밀도가 건조 세포 중량을 기준으로 150 g/L 이상인 것인 방법.

**청구항 51**

제1항에 있어서, 상기 방법이 미생물에 의해 생산된 전체 지질의 15% 이상을 고도불포화 지질로서 생산하는 것인 방법.

**청구항 52**

제1항에 있어서, 상기 방법이 미생물에 의해 생산되는 전체 지질의 15% 이상을 도코사헥사엔산으로서 생산하는 것인 방법.

**청구항 53**

제1항에 있어서, 발효 배지 내의 용존 산소 양은 발효기의 헤드-스페이스 내의 산소 양을 조절함으로써 조절되는 것인 방법.

**청구항 54**

제53항에 있어서, 발효 배지 내의 용존 산소의 양은 발효기의 헤드-스페이스 내의 산소 양을 조절함으로써 조절되는 것과 발효 배지가 교반되는 속도를 조절함으로써 조절되는 것으로 이루어진 군 중에서 선택된 단계에 의해 조절되는 것인 방법.

#### 청구항 55

제35항에 있어서, 미생물 지질의 15% 이상이 도코사헥사엔산인 것인 방법.

#### 청구항 56

제36항에 있어서, 미생물 지질의 15% 이상이 도코사헥사엔산인 것인 방법.

#### 청구항 57

제38항에 있어서, 미생물 지질의 15% 이상이 도코사헥사엔산인 것인 방법.

#### 청구항 58

삭제

#### 청구항 59

삭제

#### 청구항 60

트라우스토키트리드 미생물의 발효를 탄소원을 함유하는 배지에서 수행하고, 상기 탄소원을 유가식 공정에서 발효 배지에 첨가하여 상기 발효 배지의 생물량 밀도를 건조 세포 중량을 기준으로 100 g/L 이상으로 증가시키고, 건조 세포 중량을 기준으로 100 g/L 이상의 생물량 밀도를 가지는 배지의 발효에 의해 고도불포화 지방산을 함유하는 지질을 생산하는 것을 포함하는, 생물량의 20% 이상을 지질로서 생산할 수 있는 트라우스토키트리드 미생물로부터 고도불포화 지방산을 함유하는 지질을 생산하는 방법으로, 상기 발효 배지 내의 용존산소 수준이 (a) 상기 방법을 90 시간 이상 수행하되, 처음 24 시간 동안은 8%로 유지시키고, 24 시간 부터 40시간 까지는 4%로 유지시키며, 40 시간부터 상기 방법의 종료시까지는 0.5% 미만으로 유지시킴, (b) 상기 방법을 90시간 이상 수행하되, 40 시간 이후부터 종료시까지 0.5% 미만으로 유지시킴, (c) 포화도의 3% 미만, 및 (d) 포화도의 1% 미만으로 이루어진 그룹 중에서 선택됨을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 61

제60항에 있어서, 상기 배지의 발효에 의해 고도불포화 지방산을 함유하는 지질을 생산할 때, 발효 배지의 생물량 밀도가 건조 세포 중량을 기준으로 150 g/L 이상인 것인 방법.

#### 청구항 62

제60항에 있어서, 상기 방법이 0.5 g/L/hr 이상의 평균 속도로 지질을 생산하는 것인 방법.

#### 청구항 63

제60항에 있어서, 상기 미생물이 트라우스토키트리움 (*Thraustochytrium*), 쉬조키트리움 (*Schizochytrium*) 및 이들의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택되는 것인 방법.

#### 청구항 64

제60항에 있어서, 상기 방법이 0.2 g/L/hr 이상의 평균 속도로 도코사헥사엔산을 생산하는 것인 방법.

#### 청구항 65

트라우스토키트리드 미생물의 발효를 비알코올 탄소원과 제한 영양소원을 함유하는 배지에서 수행하고, 상기 비알코올 탄소원과 제한 영양소원을 발효 배지에 첨가하여 상기 발효 배지의 생물량 밀도를 건조 세포 중량을 기준으로 100 g/L 이상으로 증가시키고, 건조 세포 중량을 기준으로 100 g/L 이상의 생물량 밀도를 가지는 배지의 발효에 의해 고도불포화 지방산을 함유하는 지질을 생산하는 것을 포함하는, 생물량의 20% 이상을 지질로서 생

산할 수 있는 트라우스토키트리드 미생물로부터 고도불포화 지방산을 함유하는 지질을 생산하는 방법으로, 상기 발효 배지 내의 용존산소 수준이 (a) 상기 방법을 90 시간 이상 수행하되, 처음 24 시간 동안은 8%로 유지시키고, 24 시간 부터 40시간 까지는 4%로 유지시키며, 40 시간부터 상기 방법의 종료시까지는 0.5% 미만으로 유지시킴, (b) 상기 방법을 90시간 이상 수행하되, 40 시간 이후부터 종료시까지 0.5% 미만으로 유지시킴, (c) 포화도의 3% 미만, 및 (d) 포화도의 1% 미만으로 이루어진 그룹 중에서 선택됨을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 66

제65항에 있어서, 상기 방법이 유가식 공정을 이용하는 것인 방법.

#### 청구항 67

제65항에 있어서, 상기 배지의 발효에 의해 고도불포화 지방산을 함유하는 지질을 생산할 때, 발효 배지의 생물량 밀도가 건조 세포 중량을 기준으로 150 g/L 이상인 것인 방법.

#### 청구항 68

제65항에 있어서, 상기 방법이 0.5 g/L/hr 이상의 평균 속도로 지질을 생산하는 것인 방법.

#### 청구항 69

제65항에 있어서, 상기 미생물이 트라우스토키트리움 (*Thraustochytrium*), 쉬조키트리움 (*Schizochytrium*) 및 이들의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택되는 것인 방법.

#### 청구항 70

제65항에 있어서, 상기 방법이 0.2 g/L/hr 이상의 평균 속도로 도코사헥사엔산을 생산하는 것인 방법.

#### 청구항 71

트라우스토키트리드 미생물의 발효를 탄소원을 함유하는 배지에서 수행하고, 상기 탄소원을 유가식 공정에서 발효 배지에 첨가하여 상기 발효 배지의 생물량 밀도를 건조 세포 중량을 기준으로 100 g/L 이상으로 증가시키고, 건조 세포 중량을 기준으로 100 g/L 이상의 생물량 밀도를 가지는 배지의 발효에 의해 고도불포화 지방산을 함유하는 지질을 생산하는 것을 포함하는, 미생물에 의해 생산되는 전체 지질의 15% 이상을 고도불포화 지질로서 생산할 수 있는 트라우스토키트리드 미생물로부터 고도불포화 지방산을 함유하는 지질을 생산하는 방법으로, 상기 발효 배지 내의 용존산소 수준이 (a) 상기 방법을 90 시간 이상 수행하되, 처음 24 시간 동안은 8%로 유지시키고, 24 시간 부터 40시간 까지는 4%로 유지시키며, 40 시간부터 상기 방법의 종료시까지는 0.5% 미만으로 유지시킴, (b) 상기 방법을 90시간 이상 수행하되, 40 시간 이후부터 종료시까지 0.5% 미만으로 유지시킴, (c) 포화도의 3% 미만, 및 (d) 포화도의 1% 미만으로 이루어진 그룹 중에서 선택됨을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 72

제71항에 있어서, 상기 배지의 발효에 의해 고도불포화 지방산을 함유하는 지질을 생산할 때, 발효 배지의 생물량 밀도가 건조 세포 중량을 기준으로 150 g/L 이상인 것인 방법.

#### 청구항 73

제71항에 있어서, 상기 방법이 0.5 g/L/hr 이상의 평균 속도로 지질을 생산하는 것인 방법.

#### 청구항 74

제71항에 있어서, 상기 미생물이 트라우스토키트리움 (*Thraustochytrium*), 쉬조키트리움 (*Schizochytrium*) 및 이들의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택되는 것인 방법.

#### 청구항 75

제71항에 있어서, 상기 방법이 0.2 g/L/hr 이상의 평균 속도로 도코사헥사엔산을 생산하는 것인 방법.

#### 청구항 76

트라우스토키트리드 미생물의 발효를 탄소원과 제한 영양소원을 함유하는 배지에서 수행하고, 상기 탄소원과 제한 영양소원을 배지에 첨가하여 상기 발효 배지의 생물량 밀도를 건조 세포 중량을 기준으로 100 g/L 이상으로 증가시키고, 건조 세포 중량을 기준으로 100 g/L 이상의 생물량 밀도를 가지는 배지의 발효에 의해 고도불포화 지방산을 함유하는 지질을 생산하며, 지질을 0.5 g/L/hr 이상의 평균 속도로 생산하고, 미생물에 의해 생산되는 전체 지질의 15% 이상이 고도불포화 지질인 것을 포함하는, 생물량의 20% 이상을 지질로서 생산할 수 있는 트라우스토키트리드 미생물을 성장시키는 방법으로, 상기 발효 배지 내의 용존산소 수준이 (a) 상기 방법을 90 시간 이상 수행하되, 처음 24 시간 동안은 8%로 유지시키고, 24 시간 부터 40시간 까지는 4%로 유지시키며, 40 시간 부터 상기 방법의 종료시까지는 0.5% 미만으로 유지시킴, (b) 상기 방법을 90시간 이상 수행하되, 40 시간 이후부터 종료시까지 0.5% 미만으로 유지시킴, (c) 포화도의 3% 미만, 및 (d) 포화도의 1% 미만으로 이루어진 그룹 중에서 선택됨을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 77

제76항에 있어서, 상기 방법이 유가식 공정을 이용하는 것인 방법.

#### 청구항 78

제76항에 있어서, 상기 배지의 발효에 의해 고도불포화 지방산을 함유하는 지질을 생산할 때, 발효 배지의 생물량 밀도가 건조 세포 중량을 기준으로 150 g/L 이상인 것인 방법.

#### 청구항 79

제76항에 있어서, 상기 미생물이 트라우스토키트리움 (*Thraustochytrium*), 쉬조키트리움 (*Schizochytrium*) 및 이들의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택되는 것인 방법.

#### 청구항 80

제76항에 있어서, 상기 방법이 0.2 g/L/hr 이상의 평균 속도로 도코사헥사엔산을 생산하는 것인 방법.

#### 청구항 81

트라우스토키트리드 미생물의 발효를 탄소원과 제한 영양소원을 함유하는 배지에서 수행하고, 상기 탄소원과 제한 영양소원을 배지에 첨가하여 상기 발효 배지의 생물량 밀도를 건조 세포 중량을 기준으로 100 g/L 이상으로 증가시키고, 건조 세포 중량을 기준으로 100 g/L 이상의 생물량 밀도를 가지는 배지의 발효에 의해 고도불포화 지방산을 함유하는 지질을 생산하며, 상기 미생물은 생물량의 20% 이상을 고도불포화 지방산들을 함유하는 지질로서 생산할 수 있는 것인, 트라우스토키트리드 미생물을 성장시키는 방법으로, 상기 발효 배지 내의 용존산소 수준이 (a) 상기 방법을 90 시간 이상 수행하되, 처음 24 시간 동안은 8%로 유지시키고, 24 시간 부터 40시간 까지는 4%로 유지시키며, 40 시간부터 상기 방법의 종료시까지는 0.5% 미만으로 유지시킴, (b) 상기 방법을 90 시간 이상 수행하되, 40 시간 이후부터 종료시까지 0.5% 미만으로 유지시킴, (c) 포화도의 3% 미만, 및 (d) 포화도의 1% 미만으로 이루어진 그룹 중에서 선택됨을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 82

제81항에 있어서, 상기 방법이 유가식 공정을 이용하는 것인 방법.

#### 청구항 83

제81항에 있어서, 상기 배지의 발효에 의해 고도불포화 지방산을 함유하는 지질을 생산할 때, 발효 배지의 생물량 밀도가 건조 세포 중량을 기준으로 150 g/L 이상인 것인 방법.

#### 청구항 84

제81항에 있어서, 상기 방법이 0.5 g/L/hr 이상의 평균 속도로 지질을 생산하는 것인 방법.

#### 청구항 85

제81항에 있어서, 상기 미생물이 트라우스토키트리움 (*Thraustochytrium*), 쉬조키트리움 (*Schizochytrium*) 및 이들의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택되는 것인 방법.

**청구항 86**

제81항에 있어서, 상기 방법이 0.2 g/L/hr 이상의 평균 속도로 도코사헥사엔산을 생산하는 것인 방법.

**청구항 87**

트라우스토키트리드 미생물을 발효 배지에서 성장시켜 발효 배지의 생물량 밀도를 증가시키는 단계,

발효 배지의 생물량 밀도가 건조 세포 중량을 기준으로 100 g/L 이상일 때, 상기 미생물이 지질을 생산하도록 허용하는 단계,

상기 지질을 회수하는 단계를 포함하고, 여기서, 지질의 15% 이상은 고도불포화 지질인 것인 미생물 지질을 생산하는 방법으로, 상기 발효 배지 내의 용존산소 수준이 (a) 상기 방법을 90 시간 이상 수행하되, 처음 24 시간 동안은 8%로 유지시키고, 24 시간 부터 40시간 까지는 4%로 유지시키며, 40 시간부터 상기 방법의 종료시까지는 0.5% 미만으로 유지시킴, (b) 상기 방법을 90시간 이상 수행하되, 40 시간 이후부터 종료시까지 0.5% 미만으로 유지시킴, (c) 포화도의 3% 미만, 및 (d) 포화도의 1% 미만으로 이루어진 그룹 중에서 선택됨을 특징으로 하는 방법.

**청구항 88**

제87항에 있어서, 상기 방법이 유가식 공정을 이용하는 것인 방법.

**청구항 89**

제87항에 있어서, 미생물이 지질을 생산하도록 허용하는 단계 동안, 발효 배지의 생물량 밀도가 건조 세포 중량을 기준으로 150 g/L 이상인 것인 방법.

**청구항 90**

제87항에 있어서, 상기 방법이 0.5 g/L/hr 이상의 평균 속도로 지질을 생산하는 것인 방법.

**청구항 91**

제87항에 있어서, 상기 미생물이 트라우스토키트리움 (*Thraustochytrium*), 쉬조키트리움 (*Schizochytrium*) 및 이들의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택되는 것인 방법.

**청구항 92**

제87항에 있어서, 상기 방법이 0.2 g/L/hr 이상의 평균 속도로 도코사헥사엔산을 생산하는 것인 방법.

**청구항 93**

트라우스토키트리드 미생물의 발효를 탄소원 및 제한 영양소원을 함유하는 발효 배지에서 수행하는 단계,

탄소원 및 제한 영양소원을 발효 배지에 첨가하여 발효 배지의 생물량 밀도를 건조 세포 중량을 기준으로 100 g/L 이상으로 증가시키는 단계,

발효 배지가 건조 세포 중량을 기준으로 100 g/L 이상의 밀도를 가질 때 지질을 생산하는 단계, 및

미생물 지질을 회수하는 단계를 포함하고, 여기서, 미생물 지질의 15% 이상은 고도불포화 지질인 것인 미생물 지질을 생산하는 방법으로, 상기 발효 배지 내의 용존산소 수준이 (a) 상기 방법을 90 시간 이상 수행하되, 처음 24 시간 동안은 8%로 유지시키고, 24 시간 부터 40시간 까지는 4%로 유지시키며, 40 시간부터 상기 방법의 종료시까지는 0.5% 미만으로 유지시킴, (b) 상기 방법을 90시간 이상 수행하되, 40 시간 이후부터 종료시까지 0.5% 미만으로 유지시킴, (c) 포화도의 3% 미만, 및 (d) 포화도의 1% 미만으로 이루어진 그룹 중에서 선택됨을 특징으로 하는 방법.

**청구항 94**

제93항에 있어서, 상기 방법이 유가식 공정을 이용하는 것인 방법.

**청구항 95**

제93항에 있어서, 상기 지질을 생산하는 단계 동안, 발효 배지의 생물량 밀도가 건조 세포 중량을 기준으로 150 g/L 이상인 것인 방법.

**청구항 96**

제93항에 있어서, 상기 방법이 0.5 g/L/hr 이상의 평균 속도로 지질을 생산하는 것인 방법.

**청구항 97**

제93항에 있어서, 상기 미생물이 트라우스토키트리움 (*Thraustochytrium*), 쉬조키트리움 (*Schizochytrium*) 및 이들의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택되는 것인 방법.

**청구항 98**

제93항에 있어서, 상기 방법이 0.2 g/L/hr 이상의 평균 속도로 도코사헥사엔산을 생산하는 것인 방법.

**청구항 99**

삭제

**청구항 100**

삭제

**청구항 101**

삭제

**청구항 102**

삭제

**청구항 103**

삭제

**청구항 104**

삭제

**청구항 105**

삭제

**청구항 106**

삭제

**청구항 107**

삭제

**청구항 108**

삭제

**청구항 109**

삭제

**청구항 110**

삭제

청구항 111

삭제

청구항 112

삭제

청구항 113

삭제

청구항 114

삭제

청구항 115

삭제

청구항 116

삭제

청구항 117

삭제

청구항 118

삭제

청구항 119

삭제

청구항 120

삭제

청구항 121

삭제

청구항 122

삭제

청구항 123

삭제

청구항 124

삭제

청구항 125

삭제

청구항 126

삭제

청구항 127

삭제

청구항 128

삭제

청구항 129

삭제

청구항 130

삭제

청구항 131

삭제

## 명세서

### 기술 분야

<1> 본 발명은 미생물을 성장시키고 미생물의 지질을 회수하기 위한 신규한 방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 미생물의 고도불포화 지질의 생산 방법에 관한 것이다.

### 배경기술

<2> 진핵 미생물에서 고도불포화 지방산 (2 이상의 불포화 탄소-탄소 결합을 함유하는 지방산)의 생산은 분자 산소의 존재 (즉, 호기적 조건)를 요구하는 것으로 일반적으로 믿어져 왔다. 이는 모든 비기생성 진핵 미생물의 지방산에서 형성된 시스 (cis) 이중 결합이 직접적 산소 의존적 불포화 반응 (산화적 미생물 불포화효소 (desaturase)계)에 관여하는 것으로 믿어지기 때문이다. 분자 산소를 요구하는 것으로 알려진 다른 진핵 미생물 지질은 진균 및 식물의 스테롤, 옥시카로테노이드 (즉, 크산토필), 유비퀴논 및 이들 지질로부터 제조된 화합물 (즉, 2차 대사산물)을 포함한다.

<3> 몇몇 진핵 미생물 (예를 들어 조류; 진균류 (효모 포함); 및 원생생물)이 발효기 내에서 고도불포화 지방산의 우수한 생산자로서 입증되었다. 그러나, 초고밀도 배양 (특히 상업 규모에서 약 100 g/L 미생물 생물량 초과)은 고도불포화 지방산 함량을 감소시키고 따라서 고도불포화 지방산 생산성을 저하시킬 수 있다. 이것은 부분적으로는 발효 브로쓰 내의 고농도의 미생물에 의해 나타나는 높은 산소 요구량으로 인한 높은 용존 산소 수준을 유지시키는 곤란함을 포함한 여러 요인에 의해 일어날 수 있다. 보다 높은 용존 산소 수준을 유지하는 방법은 폭기 속도를 증가시키고(거나) 폭기를 위해 공기 대신 순수 산소를 사용하고(거나) 발효기 내의 교반 속도를 증가시키는 것을 포함한다. 이들 해결책은 일반적으로 지질 생산의 비용과 발효 장치의 자본 비용을 증가시키고, 추가의 문제를 일으킬 수 있다. 예를 들어, 폭기 증가는 높은 세포 밀도에서 발효기 내에 심한 포말 형성 문제를 쉽게 일으킬 수 있고, 혼합 증가는 발효 브로쓰 내의 전단력 증가로 인한 미생물 세포 파괴를 일으킬 수 있다 (이는 지질이 산화되고(되거나) 효소에 의해 분해될 수 있는 발효 브로쓰 내에 지질을 방출시킨다). 미생물 세포 파괴는 지질 형성을 유도하기 위해 질소 제한 또는 고갈에 처하여 세포벽이 보다 약하게 되는 세포에서 문제가 증가된다.

<4> 그 결과, 지질 생산 진핵 미생물이 매우 높은 세포 농도에서 성장되는 경우, 그의 지질은 일반적으로 단지 매우 적은 양의 고도불포화 지방산을 함유한다. 예를 들어, 효모 리포마이세스 스타케이 (*Lipomyces starkeyi*)를 153 g/L의 밀도로 성장시키면 탄소원으로서 알코올을 사용하여 140시간에서 83 g/L의 지질 농도를 얻었다. 그러나, 100 g/L 초과의 농도에서 효모의 고도불포화 지방산 함량은 평균으로 총 지방산의 단지 4.2%이었다 (20-30 g/L의 세포 밀도에서 총 지방산의 11.5%의 높은 값으로부터 감소됨) [Yamauchi 등, *J. Ferment. Technol.*, 1983, 61, 275-280]. 이는 단지 약 3.5 g/L의 고도불포화 지방산 농도와 단지 약 0.025 g/L/hr의 평균 고도불포화 지방산 생산성을 일으킨다. 부가적으로, 효모 지질에서 보고된 유일한 고도불포화 지방산은 C18:2이었다.

<5> 다른 효모 로도토롤라 글루티누스 (*Rhodotorula glutinis*)는 약 0.49 g/L/hr의 평균 지질 생산성을 갖지만, 또

한 그의 지질 내에 전체 고도불포화 지방산 함량이 적어서 (총 지방산의 15.8%, 14.7% C18:2 및 1.2% C18:3), 연속식 배양에서 단지 약 0.047 g/L/hr 및 0.077 g/L/hr의 유가식 (fed-batch) 배양에서 고도불포화 지방산 생산성을 야기하는 것으로 입증되었다.

- <6> 본 발명자들 중 한명은 트라우스토키트리알레스 (*Thraustochytriales*) 목의 몇몇 해양 미세조류 (*microalgae*)가 특히 낮은 염도 수준에서 및 특히 매우 낮은 염화물 수준에서 성장될 때, 발효기 내에서 고도불포화 지방산의 뛰어난 생산자일 수 있음을 이전에 입증하였다. 다른 발명자들은 59 g/L의 세포 밀도로 120시간으로 성장시켰을 때, 약 0.158 g/L/hr의 평균 고도불포화 지방산 (DHA, C22:6n-3; 및 DPA, C22:5n-6) 생산성을 보이는 트라우스토키트리드 (*Thraustochytrids*)을 기술하였다. 그러나, 상기 생산성은 종래의 스테인레스강 발효기에서 심한 부식을 일으킬 수 있는 농도인 약 50% 해수의 염도에서만 성취되었다.
- <7> 고도불포화 지방산 및 특히 고도 불포화 지방산, 예를 들어 C18:4n-3, C20:4n-6, C20:5n3, C22:5n-3, C22:5n-6 및 C22:6n-3을 함유하는 미생물 지질의 생산 비용은, 부분적으로는 높은 고도불포화 지방산 함유 진핵 미생물이 성장되는 제한된 밀도 및 이를 높은 세포 농도와 높은 생산성을 성취하기 위해 요구되는 보다 높은 온도에서 제한된 산소 이용성 때문에 높게 남아있다.
- <8> 따라서, 고도불포화 지방산을 함유하는 지질의 증가된 생산을 더욱 촉진시키는 미생물을 고농도에서 성장시키기 위한 방법이 필요하다.
- <9> <발명의 개요>
- <10> 본 발명은 그의 생물량의 적어도 약 20%를 지질로서 생산할 수 있는 진핵 미생물을 성장시키는 방법 및 지질을 생산하는 방법을 제공한다. 바람직하게는 지질은 하나 이상의 고도불포화 지방산을 함유한다. 상기 방법은 진핵 미생물을 포함하는 발효 배지에 탄소원, 바람직하게는 비알코올 탄소원 및 제한 영양소원을 첨가하는 것을 포함한다. 바람직하게는, 탄소원과 제한 영양소원은 발효 배지의 생물량 밀도를 적어도 약 100 g/L로 증가시키기에 충분한 속도로 첨가된다.
- <11> 본 발명의 한 측면에서, 발효 조건은 생물량 밀도 증가기 및 지질 생산기를 포함하며, 여기서 생물량 밀도 증가는 탄소원과 제한 영양소원을 첨가하는 것을 포함하고, 지질 생산기는 지질 생산을 유도하는 조건을 형성시키기 위해 제한 영양소원을 첨가하지 않으면서 탄소원을 첨가하는 것을 포함한다.
- <12> 본 발명의 다른 측면에서, 지질 생산기 동안 발효 배지 내에 존재하는 용존 산소의 양은 생물량 밀도 증가기 동안 발효 배지 내에 존재하는 용존 산소의 양보다 더 적다.
- <13> 본 발명의 또 다른 측면에서, 미생물은 조류, 진균류 (효모 포함), 원생생물, 박테리아 및 이들의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택되고, 여기서 상기 미생물은 고도불포화 지방산 또는 그의 합성에 분자 산소를 요구하는 것으로 일반적으로 믿어지는 다른 지질을 생산할 수 있다. 본 발명의 특히 유용한 미생물은 포화의 약 3% 미만의 발효 배지 산소 수준에서 지질을 생산할 수 있는 진핵 미생물이다.
- <14> 본 발명의 또 다른 측면에서, 미생물은 유가식 공정으로 성장된다.
- <15> 본 발명의 또 다른 측면은 발효 공정의 후반 동안 발효 배지 내에 포화의 약 3% 미만의 산소 수준을 유지시키는 것을 제공한다.
- <16> 본 발명의 다른 실시태양은
- <17> (a) 발효 배지에서 진핵 미생물을 성장시켜 상기 발효 배지의 생물량 밀도를 적어도 약 100 g/L로 증가시키는 단계;
- <18> (b) 상기 미생물이 상기 지질을 생산하도록 하기에 충분한 발효 조건을 제공하는 단계; 및
- <19> (c) 상기 지질을 회수하는 단계
- <20> {여기서, 상기 지질의 약 15% 초과가 고도불포화 지질이다}
- <21> 를 포함하는 진핵 미생물 지질을 생산하기 위한 방법을 제공한다.
- <22> 본 발명의 다른 측면은
- <23> (d) 상기 발효 배지로부터 물을 제거하여 건조 미생물을 제공하는 단계; 및
- <24> (e) 상기 건조 미생물로부터 상기 지질을 단리하는 단계

- <25> 를 포함하는 지질 회수 방법을 제공한다.
- <26> 바람직하게는, 물 제거 단계는 앞선 원심분리 없이 발효 배지를 드럼-건조기 상에 직접 접촉시키는 것을 포함한다.
- <27> 본 발명의 다른 측면은
- <28> (d) 발효 브로쓰를 처리하여 미생물 세포를 투과성으로 만들거나, 용해시키거나 또는 파열시키는 단계; 및
- <29> (e) 지질/물 에멀젼을 파괴시키는 것을 돋기 위한 수용성 용매의 도움 하에 또는 도움 없이 중력 분리, 바람직하게는 원심분리에 의해 발효 브로쓰로부터 지질을 회수하는 단계
- <30> 를 포함하는 지질 회수 방법을 제공한다.
- <31> 바람직하게는, 미생물 세포는 단계 (c) (d)에서 발효기 또는 유사한 용기 내에서 처리된다.
- <32> 본 발명의 추가의 측면에서, 미생물의 고도불포화 지방산 함량을 풍부하게 하기 위한 방법을 제공한다. 상기 방법은 미생물을 용존 산소 수준이 10% 미만인 성장 배지에서 발효시키는 것을 포함한다.
- <33> 본 발명의 추가의 측면은 산출물 및 미생물을 생산하기 위한 종속영양 (heterotrophic) 방법이다. 상기 방법은 폴리케타이드 신타제 (polyketide synthase) 유전자를 포함하는 미생물을 성장 배지 내에서 배양하고, 배양액 내의 용존 산소 수준을 약 10% 미만으로 유지시키는 것을 포함한다.

### 발명의 상세한 설명

- <35> 본 발명은 예를 들어, 조류, 진균류 (효모 포함), 원생생물 및 박테리아와 같은 미생물을 성장시키기 위한 방법을 제공한다. 바람직하게는, 미생물은 조류, 원생생물 및 이들의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택된다. 더욱 바람직하게는, 미생물은 조류이다. 또한, 본 발명의 방법은 다양한 지질 화합물, 특히 불포화 지질, 바람직하게는 고도불포화 지질 (즉, 적어도 2개의 불포화 탄소-탄소 결합, 예를 들어, 이중 결합을 포함하는 지질), 및 더욱 바람직하게는 고도 불포화 지질 (즉, 4 또는 그 이상의 불포화 탄소-탄소 결합을 포함하는 지질), 예를 들어 오메가-3 및(또는) 오메가-6 고도불포화 지방산 (도코사헥사엔산 (즉, DHA) 포함) 및 다른 천연 불포화, 고도불포화 및 고도 불포화 화합물을 생산하기 위해 사용할 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "지질"은 인지질; 유리 지방산; 지방산의 에스테르; 트리아실글리세롤; 스테롤 및 스테롤 에스테르; 카로테노이드; 크산토필 (예를 들어, 옥시카로테노이드); 탄화수소; 이소프레노이드-유도 화합물 및 당업계의 숙련인에게 공지된 다른 지질을 포함한다.
- <36> 더 특히, 본 발명의 방법은 진핵 미생물의 고도불포화 지방산, 카로테노이드, 진균 스테롤, 피토스테롤, 크산토필, 유비퀴논 및 불포화 탄소-탄소 결합을 생산하기 위해 산소를 요구하는 것 (즉, 호기적 조건)으로 일반적으로 믿어지는 다른 이소프레노이드-유도 화합물, 및 그의 2차 대사산물을 생산하는데 있어서 유용하다. 구체적으로, 본 발명의 방법은 고도불포화 지방산(들)을 생산하는 미생물을 성장시키는데 있어서 및 미생물의 고도불포화 지방산(들)을 생산하기 위해서 유용하다.
- <37> 본 발명의 방법은 매우 다양한 미생물을 성장시키고 그러한 미생물에 의해 생산된 화합물을 함유하는 고도불포화 지질을 얻기 위해 사용할 수 있지만, 간결함, 편의 및 예시를 위해, 본 발명의 상세한 설명에서는 오메가-3 및(또는) 오메가-6 고도불포화 지방산을 포함하는 지질을 생산할 수 있는 미생물, 특히 DHA (또는 밀접하게 관련된 화합물, 예를 들어 DPA, EPA 또는 ARA)를 생산할 수 있는 미생물을 성장시키기 위한 방법을 논의할 것이다. 바람직한 미생물은 미세조류, 진균류 (효모 포함), 원생생물 및 박테리아를 포함한다. 바람직한 미생물의 한 군은 미세조류 및 조류 유사 미생물을 포함하는 스트라메노필레스 (Stramenopiles)로 불리는 미생물군의 구성원이다. 스트라메노필레스는 다음 미생물 군들을 포함한다: 하마토데 (Hamatores), 프로테로모나드 (Proteromonads), 오페라인 (Opalines), 디벨로페이엘라 (Developayella), 디플로프리스 (Diplophrys), 라브린톨리드 (Labrinthulids), 트라우스토키트리드, 비오세시드 (Biosecids), 오오마이세트 (Oomycetes), 히포키트리디오마이세트 (Hypochytridiomycetes), 코메이션 (Commaton), 레티콜로스파라 (Reticulosphaera), 펠라고모나스 (Pelagomonas), 펠라고코커스 (Pelagococcus), 올리콜라 (Ollicola), 아우레오코커스 (Aureococcus), 파르말레스 (Parmales), 규조류 (Diatoms), 크산토피테스 (Xanthophytes), 갈조식물 (Phaeophytes) (갈조류), 유스티그마토피테스 (Eustigmatophytes), 라피도피테스 (Raphidophytes), 시누리드 (Synurids), 악소다인 (Axodines) {리조크로몰리날레스 (Rhizochromulinaales), 페디네랄레스 (Pedinellales), 딕티오칼레스 (Dictyochales) 포함}, 크리소메리달레스 (Chrysomeridales), 사르시노크리시탈레스 (Sarcinochrysidales), 히

드루랄레스 (Hydrurales), 히베르디알레스 (Hibberdiales) 및 크로무리날레스 (Chromulinales). 미세조류의 다른 바람직한 군은 크립테코듐 (Cryptocodium) 속의 구성원을 포함하는 녹조류 및 와편모조류 (dinoflagellates)의 구성원을 포함한다. 더 특히, 본 발명의 바람직한 실시태양은 해양 미생물, 특히 조류, 예를 들어 트라우스토키트리알레스 목의 트라우스토키트리드, 더 구체적으로 트라우스토키트리움 (*Thraustochytrium*) 및 쉬조키트리움 (*Schizochytrium*) 속의 트라우스토키트리알레스 (전문을 본원에 참고로 포함시킨 공동 양도된 미국 특히 제5,340,594호와 제5,340,742호 (둘 모두 Barclay에게 허여됨)에 개시되어 있는 트라우스토키트리알레스 포함)을 성장시키기 위한 방법에 관하여 논의할 것이다. 많은 전문가들이 울케니아 (*Ulkenia*)가 별개의 속이 아니라, 사실은 쉬조키트리움 속의 일부라는 것에 동의하는 것에 주목해야 한다. 본원에 사용되는 쉬조키트리움 속은 울케니아를 포함할 것이다.

<38> 바람직한 미생물은 폴리케타이드 신타제계를 통해 관심있는 화합물을 생산할 수 있는 미생물들이다. 그러한 미생물은 내인성 폴리케타이드 신타제계를 갖는 미생물 및 폴리케타이드 신타제계가 유전 공학적으로 도입된 미생물을 포함한다. 폴리케타이드는 항생제 및 약물학적 특성을 포함한 다양한 생물학적 활성을 갖는 구조적으로 다양한 천연 산출물이다. 폴리케타이드의 탄소 사슬 주체의 생합성은 폴리케타이드 신타제에 의해 촉매된다. 구조적 및 기계적으로 관련된 지방산 신타제들과 마찬가지로, 폴리케타이드 신타제는 탄소 사슬을 2개의 탄소들을 동시에 신장시키는 아실 티오에스테르들 사이의 반복적 탈카르복실성 축합을 촉매한다. 그러나, 지방산 신타제들과는 달리, 폴리케타이드 신타제는 최종 산출물에서 구조적 변이성을 생성시킬 수 있다. 개별적인 폴리케타이드 신타제계는 아세테이트 이외의 출발 유닛을 사용함으로써, 메틸- 또는 에틸-말로네이트를 신장 유닛으로 이용함으로써 및 각각의 축합 이후 형성된 베타-케토기에 대한 케토환원, 탈수 및 에노일 환원의 환원 사이클을 변화시킴으로써 이를 수행할 수 있다. 본원에서 특히 관심있는 것은 탈수 단계에 의해 도입되는 탄소-탄소 이중 결합이 최종 산출물 내에 보유될 수 있다는 것이다. 또한, 이들 이중 결합은 초기에는 트랜스 배위로 있지만, 이들은 효소적 이성화에 의해 DHA (및 관심있는 다른 고도불포화 지방산)에서 발견되는 시스 배위로 전환될 수 있다. 데하이드라제 및 이성화 반응은 모두 분자 산소의 부재 하에 일어날 수 있다.

<39> 바람직하게는, 본 발명에 따라 산출물 및 미생물을 생산하기 위한 종속영양 방법이 제공된다. 상기 방법은 바람직하게는 미생물이 폴리케타이드 신타제계를 함유하는 성장 배지 내에서 미생물을 배양하는 것을 포함한다. 바람직하게는, 용준 산소 수준은 약 8% 미만, 더 바람직하게는 약 4% 미만, 더 바람직하게는 약 3% 미만, 및 더 바람직하게는 약 1% 미만에서 유지된다.

<40> 그러나, 본 발명은 전체로서 그렇게 제한되는 것으로 의도되지 않으며, 당업계의 숙련인은 본 발명의 개념이 본원에 논의한 기술에 따라 다양한 다른 화합물 (다른 지질 조성물 포함)을 생산하는 다른 미생물에 적용가능할 것임을 알 것임을 이해해야 한다.

<41> 조류에 의한 지질의 비교적 일정한 생산 속도를 가정하면, 보다 높은 생물량 밀도는 부피당 생산되는 지질의 총량을 보다 많이 할 것임이 쉽게 이해된다. 조류를 성장시키기 위한 현재의 통상적인 발효 방법은 약 50 내지 약 80 g/L 또는 그 미만의 생물량 밀도를 생성한다. 본 발명자들은 본 발명의 방법을 이용함으로써, 현재 공지된 생물량 밀도보다 유의하게 더 높은 생물량 밀도를 달성할 수 있음을 발견하기에 이르렀다. 바람직하게는, 본 발명의 방법은 적어도 약 100 g/L, 더 바람직하게는 적어도 약 130 g/L, 더욱 더 바람직하게는 적어도 약 150 g/L, 더욱 더 바람직하게는 적어도 약 170 g/L, 가장 바람직하게는 200 g/L 초과의 생물량 밀도를 생산한다. 따라서, 그러한 높은 생물량 밀도에서, 조류의 지질 생산 속도가 약간 감소되더라도, 부피당 전체 지질 생산 속도는 현재 공지된 공정보다 유의하게 더 높다.

<42> 트라우스토키트리알레스 목의 미생물의 성장시키기 위한 본 발명의 방법은 미생물을 포함하는 발효 배지에 탄소 원과 제한 영양소원을 발효 배지의 생물량 밀도를 상기한 바와 같이 증가시키기에 충분한 속도로 첨가하는 것을 포함한다. 본원에 사용되는 용어 "제한 영양소원"은 성장 배지로부터 제한 영양소가 고갈될 때 그의 부재가 미생물이 더욱 성장하거나 또는 복제하는 것을 실질적으로 제한하는 점에서 미생물의 성장에 필수적인 영양소원 (영양소 자체를 포함)을 나타낸다. 그러나, 다른 영양소가 여전히 풍부하므로, 유기체는 계속해서 세포내 및 (또는) 세포외 산출물을 만들어 축적할 수 있다. 특정한 제한 영양소를 선택함으로써, 축적되는 산출물의 종류를 조절할 수 있다. 따라서, 제한 영양소원을 특정 속도로 제공하면 미생물의 성장 속도와 원하는 산출물 (예를 들어, 지질)의 생산 또는 축적을 모두 조절할 수 있다. 1종 이상의 기질 (예를 들어, 탄소원 및 제한 영양소원)이 중량으로 첨가되는 상기 발효 방법은 일반적으로 유가식 발효 방법으로 칭한다. 기질이 배치 발효 공정에 첨가될 때 존재하는 다량의 탄소원 (예를 들어, 60 g/L의 생물량 밀도당 약 200 g/L 또는 그 이상)은 미생물에 대해 유해 효과를 갖는 것으로 밝혀졌다. 어떠한 이론에 매이지는 않지만, 그러한 많은 양의 탄소원은 미생물에 대해 유해 효과 (삼투 스트레스 포함)를 일으키고, 미생물의 초기 생산성을 억제하는 것으로 믿어진다.

본 발명의 방법은 미생물의 상기한 생물량 밀도를 달성하기 위해 충분한 양의 기질을 제공하면서도 상기 바람직하지 않은 유해 효과를 피한다.

&lt;43&gt;

미생물을 성장시키기 위한 본 발명의 방법은 생물량 밀도 증가기를 포함할 수 있다. 생물량 밀도 증가기에서, 발효 공정의 1차 목적은 상기한 생물량 밀도를 얻기 위해 발효 배지 내의 생물량 밀도를 증가시키는 것이다. 탄소원 첨가 속도는 대개 미생물의 생산성 또는 전달 기체로부터 액체 브로쓰로 및 액체 브로쓰로부터 열을 제거하기 위한 발효 장비의 불충분한 용적으로 인한 미생물의 생존력에 유의한 유해 효과를 일으키지 않는 특정 수준 또는 범위로 유지된다. 발효 공정 동안 특정 미생물에 필요한 탄소원의 양의 적절한 범위는 당업계의 통상의 기술자에게 잘 알려져 있다. 바람직하게는, 본 발명의 탄소원은 비알코올 탄소원, 즉, 알코올을 함유하지 않는 탄소원이다. 본원에서 사용되는 "알코올"은 1개의 히드록시기를 갖는 4개 이하의 탄소 원자를 갖는 화합물, 예를 들어, 메탄올, 에탄올 및 이소프로판올을 나타내지만, 본 발명의 목적상 히드록시 유기산, 예를 들어 락트산 및 유사 화합물을 포함하지는 않는다. 더 바람직하게는, 본 발명의 탄소원은 프룩토스, 글루코스, 수크로스, 몰라세스 및 전분을 포함하지만 이에 제한되지 않는 탄수화물이다. 다른 적합한 단순 및 복합 탄소원 및 질소원은 상기한 특허들에 개시되어 있다. 그러나, 전형적으로, 탄수화물, 바람직하게는 옥수수 시럽이 1차 탄소원으로서 사용된다. 히드록시 지방산, 트리글리세라이드, 및 디- 및 모노글리세라이드 형태의 지방산이 또한 탄소원으로서 작용할 수 있다.

&lt;44&gt;

특히 바람직한 질소원은 요소, 질산염, 아질산염, 콩 단백질, 아미노산, 단백질, 옥수수 침액 (steep liquor), 효모 추출물, 동물 부산물, 무기 암모늄염, 더 바람직하게는 황산염, 수산화물의 암모늄염 및 가장 바람직하게는 수산화암모늄이다. 다른 제한 영양소원은 탄소원 (상기한 바와 같은), 인산염원, 비타민원 (예를 들어 비타민 B<sub>12</sub>원, 판토텐산염원, 티아민원) 및 미량 금속원 (예를 들어 아연원, 구리원, 코발트원, 니켈원, 철원, 망간원, 몰리브덴원)과 다량 금속원 (예를 들어 마그네슘원, 칼슘원, 나트륨원, 칼륨원 및 실리카원 등)을 포함한다. 미량 금속원과 다량 금속원은 이들 금속의 황산염 및 염화물염 (비제한적인 예로서 MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O; MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O; ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O; CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O; CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O; NiSO<sub>4</sub> · 6H<sub>2</sub>O; FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O; CaCl<sub>2</sub>; K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; KC<sub>1</sub>; 및 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)을 포함할 수 있다.

&lt;45&gt;

질소원으로서 암모늄이 사용되는 경우, 발효 배지는 염기 첨가 또는 완충제에 의해 조절하지 않는 경우 산성으로 된다. 1차 질소원으로서 수산화암모늄이 사용되는 경우, 이는 pH 조절을 위해 또한 사용될 수 있다. 트라우스토키트리알레스 목, 특히 트라우스토키트리움 및 쉬조키트리움 속의 트라우스토키트리알레스의 미생물은 넓은 pH 범위에 걸쳐, 예를 들어, 약 pH 5 내지 약 pH 11에 걸쳐 성장할 것이다. 특정 미생물의 발효를 위해 적절한 pH 범위는 당업계의 숙련인의 지식 내에 있다.

&lt;46&gt;

미생물을 성장시키기 위한 본 발명의 방법은 또한 생산기를 포함할 수 있다. 이 기에서, 미생물에 의한 기질의 1차적 사용은 생물량 밀도를 증가시키는 것이 아니라 지질을 생산하기 위해 기질을 사용하는 것이다. 지질은 생물량 밀도 증가기 동안 미생물에 의해 또한 생산되지만; 상기한 바와 같이, 생물량 밀도 증가기에서 1차적 목표는 생물량 밀도를 증가시키기 위한 것임을 이해해야 한다. 전형적으로, 생산기 동안 제한 영양소 기질의 첨가는 감소되거나 또는 바람직하게는 중단된다.

&lt;47&gt;

이전에는 발효 배지 내의 용존 산소의 존재가 진핵 미생물에 의한 고도불포화 화합물 (오메가-3 및(또는) 오메가-6 고도불포화 지방산 포함)의 생산에서 중대한 것으로 일반적으로 믿어졌다. 따라서, 발효 배지 내의 비교적 다량의 용존 산소가 바람직한 것으로 일반적으로 믿어졌다. 그러나 놀랍고도 예기치 않게, 본 발명자들은 생산기 동안 용존 산소 수준이 감소될 때 지질 생산 속도가 극적으로 증가된다는 것을 발견하기에 이르렀다. 따라서, 생물량 밀도 증가기 동안 발효 배지 내의 용존 산소 수준은 바람직하게는 포화의 적어도 약 8%, 바람직하게는 포화의 적어도 약 4%인 반면, 생산기 동안 발효 배지 내의 용존 산소는 포화의 약 3% 또는 그 미만, 바람직하게는 포화의 약 1% 또는 그 미만, 더 바람직하게는 포화의 약 0%로 감소된다. 발효의 초기에는 DO는 포화 또는 그 부근일 수 있고, 미생물이 성장함에 따라 상기 낮은 DO 설정점으로 내려간다. 본 발명의 하나의 특정 실시태양에서, 발효 배지 내의 용존 산소 수준의 양은 발효 공정 동안 변화한다. 예를 들어, 약 90시간 내지 약 100시간의 총 발효 시간을 갖는 발효 공정에 있어서, 발효 배지 내의 용존 산소 수준은 처음 24시간 동안 약 8%로, 약 24시간째 내지 약 40시간째에 약 4%로, 및 약 40시간째 내지 발효 공정의 종료까지 약 0.5% 또는 그 미만으로 유지된다.

&lt;48&gt;

발효 배지 내에 존재하는 용존 산소의 양은 발효기의 헤드-스페이스 내의 산소의 양을 조절함으로써, 또는 바람직하게는 발효 배지가 교반되는 (또는 뒤섞이는) 속도를 조절함으로써 조절할 수 있다. 예를 들어, 높은 교반

(또는 뒤섞는) 속도에서는 낮은 교반 속도에서보다 발효 배지 내의 용존 산소의 양이 비교적 높다. 예를 들어, 약 14,000 갤런 용적의 발효기에서, 약 90시간 내지 약 100시간의 총 발효 공정 시간에 대해 상기 논의한 용존 산소 수준을 달성하기 위해, 교반 속도는 처음 12시간 동안 약 50 rpm 내지 약 70 rpm으로, 약 12시간째 내지 약 18시간 동안 약 55 rpm 내지 약 80 rpm으로, 및 약 18시간째 내지 발효 공정의 종료까지 약 70 rpm 내지 약 90 rpm으로 설정된다. 발효 배지 내의 용존 산소의 특정 양을 달성하기 위해 필요한 교반 속도의 특정 범위는 당업계의 통상의 기술자에 의해 쉽게 결정될 수 있다.

<49> 본 발명의 방법에 바람직한 온도는 적어도 약 20°C, 더 바람직하게는 적어도 약 25°C, 가장 바람직하게는 적어도 약 30°C이다. 냉수가 온수보다 더 많은 양의 용존 산소를 보유할 수 있음이 이해될 것이다. 따라서, 보다 높은 발효 배지 온도는 용존 산소의 양을 감소시키는 부가적인 이점이 있으며, 이는 상기한 바와 같이 특히 요망된다.

<50> 특정 미생물은 발효 배지 내에 특정량의 염분 미네랄을 필요로 할 수 있다. 이를 염분 미네랄, 특히 염화 이온은 발효기 및 다른 하류 가공 장치의 부식을 일으킬 수 있다. 발효 배지 내에 존재하는 비교적 다량의 염화 이온으로 인한 상기한 바람직하지 않은 효과를 방지하거나 감소시키기 위해, 본 발명의 방법은 나트륨원으로서 발효 배지 내에 비-염화물 함유 나트륨염, 바람직하게는 황산나트륨을 사용하는 것을 또한 포함할 수 있다. 더 특히, 발효의 나트륨 요구치의 상당한 부분을 비-염화물 함유 나트륨염으로서 공급한다. 예를 들어, 발효 배지 내의 약 75% 미만, 더 바람직하게는 약 50% 미만 및 더 바람직하게는 약 25% 미만의 나트륨을 염화나트륨으로서 공급한다. 본 발명의 미생물은 약 3 g/L 미만, 더 바람직하게는 약 500 mg/L 미만, 더 바람직하게는 약 250 mg/L 미만, 더 바람직하게는 약 60 mg/L 내지 약 120 mg/L의 염화물 농도에서 성장될 수 있다.

<51> 비-염화물 함유 나트륨염은 소다회 (탄산나트륨과 산화나트륨의 혼합물), 탄산나트륨, 중탄산나트륨, 황산나트륨 및 이들의 혼합물을 포함할 수 있고, 바람직하게는 황산나트륨을 포함한다. 소다회, 탄산나트륨 및 중탄산나트륨은 발효 배지의 pH를 증가시키는 경향이 있어서, 배지의 적당한 pH를 유지하기 위해 조절 단계를 필요로 한다. 황산나트륨의 농도는 미생물의 염도 요구치를 충족하기에 효과적이며, 바람직하게는 나트륨 농도 (Na의 g/L로서 표시함)는 적어도 약 1 g/L, 더 바람직하게는 약 1 g/L 내지 약 50 g/L 범위, 더 바람직하게는 약 2 g/L 내지 약 25 g/L 범위이다.

<52> 미생물을 접종하고, 성장시키고 회수하기 위한 각종 발효 파라미터는 전문을 본원에 참고로 포함시킨 미국 특허 제5,130,242호에 상세히 논의되어 있다. 발효 배지로부터 미생물을 단리하기 위해 원심분리, 여과, 한외여과, 따루어붓기 및 용매 증발을 포함한 현재 공지된 임의의 단리 방법을 이용할 수 있다. 본 발명자들은 본 발명의 방법으로부터 생긴 그러한 높은 생물량 밀도 때문에, 미생물을 회수하기 위해 원심분리를 이용할 때 물을 첨가하여 발효 배지를 회석시키는 것이 바람직하며, 이는 생물량 밀도를 감소시켜 발효 배지로부터 미생물의 보다 효과적인 분리를 가능하게 한다는 것을 발견하기에 이르렀다.

<53> 본 발명에서 달성되는 매우 높은 생물량 밀도는 또한 미생물 지질의 회수를 위한 "무용매" 방법을 용이하게 한다. 발효기 내에서 세포를 용해시키기 위한 바람직한 방법은 전문을 본원에 참고로 포함시킨 미국 특허 가출원 제60/177,125호 {발명의 명칭 "SOLVENTLESS EXTRACTION PROCESS", 2000년 1월 19일자 출원}, 미국 특허 출원 제\_\_\_\_호 {발명의 명칭 "SOLVENTLESS EXTRACTION PROCESS", 2001년 1월 19일자 출원}, 및 PCT 특허 출원 제호 {발명의 명칭 "SOLVENTLESS EXTRACTION PROCESS", 2001년 1월 19일자 출원}에 기재되어 있다. 일단 세포가 발효기 내에서 투과성으로 되거나, 파괴되거나 또는 용해되면 지질을 회수하기 위한 바람직한 방법 (지질 에멀젼을 파괴시키고 지질-풍부 분획이 회수될 수 있도록 하는)은 전문을 본원에 참고로 포함시킨 국제 출원 공개 제WO 96/05278호에 개략된 탈오일 (deoiling) 방법을 포함한다. 상기 방법에서, 수용성 화합물, 예를 들어, 알코올 또는 아세톤을 오일/물 에멀젼에 첨가하여 에멀젼을 파괴시키고, 생성된 혼합물은 중력 분리, 예를 들어, 원심분리에 의해 분리시킨다. 상기 방법은 또한 에멀젼을 파괴하기 위한 다른 약제 (수용성 및(또는) 지용성)을 사용하도록 변형될 수 있다.

<54> 별법으로, 미생물은 예를 들어, 발효 배지를 드럼-건조기 장치와 같은 건조기와 직접 (즉, 예비-농축 없이, 예를 들어, 원심분리에 의해) 접촉시킴으로써, 즉, 직접 드럼-건조기 회수 공정에 의해 발효 배지로부터 물을 증발시킴으로써 발효 배지로부터 건조형으로 회수된다. 미생물을 단리시키기 위해 직접 드럼-건조기 회수 공정을 사용하는 경우, 전형적으로 증기 가열된 드럼-건조기를 사용한다. 또한 직접 드럼-건조기 회수 공정을 이용하는 경우, 발효 배지의 생물량 밀도는 바람직하게는 적어도 약 130 g/L, 더 바람직하게는 적어도 약 150 g/L, 가장 바람직하게는 적어도 약 180 g/L이다. 보다 낮은 생물량 밀도에서는 발효 배지는 드럼을 유의하게 냉각시키기에 충분한 양의 물을 포함하여 미생물의 불완전한 건조를 일으키기 때문에, 상기한 높은 생물량 밀도는 직접

드럼-건조기 회수 공정에 일반적으로 요망된다. 분무 건조를 포함한 세포를 건조시키는 다른 방법은 당업계의 통상의 기술자에게 잘 알려져 있다.

<55> 본 발명의 방법은 적어도 약 0.5 g/L/hr, 바람직하게는 적어도 약 0.7 g/L/hr, 더 바람직하게는 적어도 약 0.9 g/L/hr, 가장 바람직하게는 적어도 약 1.0 g/L/hr의 평균 지질 생산 속도를 제공한다. 또한, 본 발명의 방법에 의해 생산된 지질은 고도불포화 지질을 약 15% 초과, 바람직하게는 약 20% 초과, 더 바람직하게는 약 25% 초과, 더욱 더 바람직하게는 약 30% 초과, 가장 바람직하게는 약 35% 초과의 양으로 포함한다. 지질은 건조된 미생물로부터 또는 발효 배지 내의 미생물로부터 회수할 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 방법에서 미생물에 의해 생산된 지질의 적어도 약 20%가 오메가-3 및(또는) 오메가-6 고도불포화 지방산이고, 바람직하게는 지질의 적어도 약 30%가 오메가-3 및(또는) 오메가-6 고도불포화 지방산이며, 더 바람직하게는 지질의 적어도 약 40%가 오메가-3 및(또는) 오메가-6 고도불포화 지방산이다. 별법으로, 본 발명의 방법은 적어도 약 0.2 g의 오메가-3 지방산 (예를 들어, DHA)/L/hr, 바람직하게는 적어도 약 0.3 g의 오메가-3 지방산 (예를 들어, DHA)/L/hr, 더 바람직하게는 적어도 약 0.4 g의 오메가-3 지방산 (예를 들어, DHA)/L/hr, 가장 바람직하게는 적어도 약 0.5 g의 오메가-3 지방산 (예를 들어, DHA)/L/hr의 평균 오메가-3 지방산 (예를 들어, DHA) 생산 속도를 제공한다. 별법으로, 본 발명의 방법은 적어도 약 0.07 g의 오메가-6 지방산 (예를 들어, DPAn-6)/L/hr, 바람직하게는 적어도 약 0.1 g의 오메가-6 지방산 (예를 들어, DPAn-6)/L/hr, 더 바람직하게는 적어도 약 0.13 g의 오메가-6 지방산 (예를 들어, DPAn-6)/L/hr, 가장 바람직하게는 적어도 약 0.17 g의 오메가-6 지방산 (예를 들어, DPAn-6)/L/hr의 평균 오메가-6 지방산 (예를 들어, DPAn-6) 생산 속도를 제공한다. 또한 별법으로, 지질의 적어도 약 25%, 바람직하게는 적어도 약 30%, 더 바람직하게는 적어도 약 35%, 가장 바람직하게는 적어도 약 40% (총 지방산 메틸 에스테르를 기준으로)가 DHA이다.

<56> 미생물, 그로부터 추출된 지질, 지질 추출후 남아있는 생물량 또는 이들의 조합물은 식품 성분, 예를 들어 음료, 소스, 낙농 기초 식품 (예를 들어, 우유, 요구르트, 치즈 및 아이스크림) 및 구운 상품; 영양 보충물 (캡슐 또는 정제형으로); 고기 또는 산출물이 사람에 의해 소비되는 임의의 동물을 위한 사료 또는 사료 보충물; 유아식 및 유아용 유동식을 포함한 식품 보충물; 및 약품 (직접 또는 보조 치료 용도로)에서의 성분으로 직접 사용될 수 있다. 용어 "동물"은 동물계에 속하는 임의의 유기체를 의미하며, 비제한적으로 가금류 고기, 해산 식품, 소고기, 돼지고기 또는 새끼양고기가 유래되는 임의의 동물을 포함한다. 해산식품은 비제한적으로 생선, 새우 및 조개로부터 유래된다. 용어 "산출물"은 비제한적으로 계란, 우유 또는 다른 산출물을 포함한 상기 동물로부터 유래된 고기 이외의 임의의 산출물을 포함한다. 상기한 동물에게 먹일 때, 고도불포화 지질은 이들 지질의 함량을 증가시키기 위해 식육, 우유, 계란 또는 상기 동물의 다른 산출물 내로 포함시킬 수 있다.

<57> 본 발명의 추가의 목적, 이점 및 신규한 특징은 하기 실시예를 검토함으로써 당업계의 숙련인에게 명백해질 것이고, 이를 실시예는 제한적인 것으로 의도되지 않는다.

### 실시예

<58> 본 실시예에서 사용된 쉬조키트리움 균주는 매우 다양한 발효 조건 하에서 2가지 1차 고도불포화산, DHAn-3과 DPAn-6을 일반적으로 약 3:1의 비율로 생산하고, 소량의 다른 고도불포화산, 예를 들어 EPA 및 C20:3을 생산한다. 따라서, 하기 실시예에서는 단지 DHA의 양을 나열하였지만, 상기 개시한 비율을 사용하여 생산된 DPA(n-6)의 양을 용이하게 계산할 수 있다.

<59> <실시예 1>

<60> 본 실시예는 지질 생산성에 대한 발효 배지 내의 산소 함량의 효과를 예시한다.

<61> 각종 수준의 용존 산소 함량에서 쉬조키트리움 ATCC No. 20888의 발효 결과를 측정하였다. 결과를 도 1에 도시하였고, 여기서 RCS는 잔류 당 농도이고, DCW는 건조 세포 중량이다.

<62> <실시예 2>

<63> 본 실시예는 또한 최종 생물량 산출물의 DHA 함량 (건조 중량%)에 대한 발효 배지 내의 낮은 산소 함량의 효과를 예시한다.

<64> 대규모 발효기에서 배양된 쉬조키트리움 종 세포 내의 DHA 함량에 대한 낮은 산소 함량의 효과를 모방하기 (mimic) 위해 250 mL 일렌마이어 플라스크에서 "축소 규모 (scale-down)" 실험을 수행하였다. 쉬조키트리움 종 (ATCC 20888)을 04-4 배지에서 배양하였다. 상기 배양 배지는 탈이온수 중에 용해된 리터당 함량 기준의 다음

성분들로 이루어졌다:  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  12.61g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.2g;  $\text{KCl}$  0.25 g;  $\text{CaCl}_2$  0.05 g; 글루탐산일나트륨 7.0 g; 글루코스 10 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5 g;  $\text{NaHCO}_3$  0.1 g; 효모 추출물 0.1 g; 비타민 혼합물 1.0 mL; PII 금속 1.00 mL. PII 금속 혼합물은 리터당 6.0 g  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , 0.29 g  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 6.84 g  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0.86 g  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0.06 g  $\text{ZnCl}_2$ , 0.026 g  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.052 g  $\text{NiSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.002 g  $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  및 0.005 g  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 을 함유한다. 비타민 혼합물은 리터당 100 mg 티아민, 0.5 mg 비오틴 및 0.5 mg 시아노코발아민을 함유한다. 배양 배지의 pH를 7.0으로 조정한 후, 여과 멸균시켰다.

<65> 상기 축소 규모 실험에서는 플라스크 내에 상이한 부피의 배양 배지를 갖는 진탕 플라스크에서 세포를 배양하고, 거의 꽉찬 플라스크 (예를 들어 250 mL 진탕 플라스크 내에 200 mL)는 진탕기 테이블 상에서 잘 혼합되지 않아 세포가 성장함에 따라 낮은 용존 산소 조건이 발생할 것이라는 것을 기본 아이디어로 한다. 따라서, 실험에서 다음 4가지 처리 조건을 확립하여 각각 2회씩 수행하였다: (1) 50 mL 배양 배지로 충전된 250 mL 플라스크; (2) 100 mL 배양 배지로 충전된 250 mL 플라스크; (3) 150 mL 배양 배지로 충전된 250 mL 플라스크; 및 (4) 200 mL 배양 배지로 충전된 250 mL 진탕 플라스크. 8개의 플라스크 각각에 처리 1의 조건 하에 28°C 및 220 rpm에서 진탕기 테이블 상에서 04-4 배지 내에서 배양한 쉬조키트리움의 48시간 배양물로부터의 세포를 접종하였다. 실험을 위한 8개의 플라스크 모두를 인큐베이터 (28°C) 내의 진탕기 테이블 (220 rpm)에 놓고 암소에서 48시간 동안 배양하였다. 실험 종료시에 각 플라스크 내의 용존 산소 (DO) 수준을 YSI 용존 산소 측정기로 측정하였고, 배양 배지의 pH 및 세포의 건조 중량과 그의 지방산 함량도 또한 측정하였다. 결과를 하기 표 1에 개략하였다.

### 표 1

<66> 쉬조키트리움 종의 장쇄 고도 불포화 지방산 함량 (DHA 건조 중량%)에 대한 낮은 용존 산소 농도의 효과를 조사한 축소 규모 실험의 결과

| 배지 (mL) | FAME (%TFA) | DHA (건조 중량%) | 생물량 (g/L) | 최종 pH | DO (포화 %) |
|---------|-------------|--------------|-----------|-------|-----------|
| 50      | 16.5        | 7.4          | 4.2       | 7.4   | 31        |
| 100     | 17.0        | 6.5          | 3.9       | 7.2   | 29        |
| 150     | 22.4        | 9.2          | 2.7       | 7.0   | 11        |
| 200     | 35.9        | 14.5         | 1.8       | 6.9   | 3         |

<67> 상기 결과는 지질 함량 (% FAME로서) 및 DHA 함량 (건조 중량%)가 낮은 용존 산소 수준에서 배양된 세포에서 보다 높고, 용존 산소 수준이 낮을수록 지질 및 DHA 함량이 더 높다는 것을 나타낸다. 이것은 산소가 불포화 (이중) 결합 형성에 필수적인 것으로 일반적으로 믿어지기 때문에 예상치 못한 것이다. DHA는 최고 불포화 지방산의 하나이기 때문에, 낮은 용존 산소 수준에서 그렇게 많은 DHA가 형성되었다는 것은 놀라운 것이다. 생물량 생성은 용존 산소 수준이 감소함에 따라 저하되었지만, DHA 함량은 증가하였다. 따라서, 생물량의 형성을 최대화하기 위해 보다 높은 용존 산소 수준을 갖고, 이어서 장쇄 지방산 생산을 최대화하기 위해 보다 낮은 용존 산소 수준을 갖는 성장 상태를 갖는 것이 유리하다.

<68> <실시예 3>

<69> 본 실시예는 본 발명의 방법의 재현성을 예시한다.

<70> 공정 작업 부피가 1,200 갤런인 발효기를 사용하여 미생물을 생산하였다. 생성된 발효 브로쓰를 농축시키고, 드럼-건조기를 사용하여 미생물을 건조하였다. 생성된 미생물의 분취액으로부터 지질을 추출하고 정제하여, 정련되고 표백된 탈취 오일을 얻었다. 지질 분석 이전에 영양 보충을 위해 약 3,000 ppm의 d-l-a-토코페릴 아세테이트를 첨가하였다.

<71> 쉬조키트리움 ATCC No. 20888의 9회 발효를 수행하고 결과를 하기 표 2에 나타냈다. 처음 24시간 동안 용존 산소 수준은 약 8%이었고, 그후에는 약 4%이었다.

### 표 2

&lt;72&gt; 쉬조 키트리움 종으로부터 DHA 생산을 위한 유가식 발효 결과

| 번호                  | 발효기간 (hr) | 수율 <sup>1</sup> (g/L) | DHA <sup>2</sup> (%) | FAME <sup>3</sup> (%) | 생산성 <sup>4</sup> |
|---------------------|-----------|-----------------------|----------------------|-----------------------|------------------|
| 1                   | 100.3     | 160.7                 | 17.8                 | 49.5                  | 0.285            |
| 2                   | 99.8      | 172.4                 | 19.4                 | 51.3                  | 0.335            |
| 3                   | 84.7      | 148.7                 | 14.4                 | 41.4                  | 0.253            |
| 4                   | 90.2      | 169.5                 | 19.7                 | 53.9                  | 0.370            |
| 5                   | 99.0      | 164.1                 | 12.5                 | 38.9                  | 0.207            |
| 6                   | 113.0     | 187.1                 | 19.7                 | 47.2                  | 0.326            |
| 7                   | 97.0      | 153.5                 | 13.7                 | 41.0                  | 0.217            |
| 8                   | 92.8      | 174.8                 | 16.4                 | 48.6                  | 0.309            |
| Aver. <sup>5</sup>  | 97.1      | 166.4                 | 16.7                 | 46.5                  | 0.288            |
| Std. <sup>6</sup>   | 8.4       | 12.3                  | 2.9                  | 5.4                   | 0.058            |
| CV <sup>7</sup> (%) | 8.7       | 7.4                   | 17.3                 | 11.7                  | 20.2             |

1. 생물량 밀도의 실제 수율  
 2. 세포 건조 중량%로서의 DHA 함량  
 3. 세포 건조 중량%로서의 총 지방산 함량 (메틸 에스테르로서 측정)  
 4. (DHA의 g)/L/hr  
 5. 평균  
 6. 표준편차  
 7. 변이 계수. 5% 미만의 변이 계수값은 방법이 우수한 재현성을 갖는 것을 의미하고, 5% 내지 10%의 값은 방법이 양호한 재현성을 갖는 것을 의미하며, 10% 내지 20%의 값은 방법이 적당한 재현성을 갖는 것을 의미한다.

&lt;73&gt; 발효기 내의 부피가 약 1,200 갤런에 도달할 때까지 옥수수 시럽을 공급하고, 이 시점에서 옥수수 시럽 첨가를 중지하였다. 일단 잔류 당 농도가 5 g/L 미만으로 떨어지면 발효 공정을 중지하였다. 접종시부터 최종 종료시 까지 전형적인 기간은 약 100시간이었다.

&lt;74&gt; 최종 산출물의 회분 함량을 감소시키고 원심분리 단계 동안의 상 분리를 개선시키는 것을 돋기 위해 발효 브로쓰, 즉 발효 배지를 물을 사용하여 약 2:1의 비율로 희석하였다. 농축된 세포 페이스트를 160°F (약 71°C)로 가열하고 Blaw Knox 이중 드럼 건조기 (42"×36")로 건조시켰다. 그러나, 미생물은 앞선 원심분리 없이 드럼 건조기 상에서 직접 건조시키는 것이 바람직하다.

&lt;75&gt; 표 2의 각 시험 번호의 분취액으로부터 추출한 지질의 분석 결과를 하기 표 3에 요약하였다.

**표 3**

&lt;76&gt; 표 2에 나타낸 유가식 발효에서 생성된 미생물 생물량의 분석

| 번호                  | FAME에 비한 DHA% <sup>1</sup> | 총 지질 (중량%) |
|---------------------|----------------------------|------------|
| 1                   | 36.0                       | 72.3       |
| 2                   | 37.8                       | 70.3       |
| 3                   | 34.8                       | 61.5       |
| 4                   | 36.5                       | 74.8       |
| 5                   | 32.1                       | 52.8       |
| 6                   | 41.7                       | 67.7       |
| 7                   | 33.4                       | 49.9       |
| 8                   | 33.7                       | 61.4       |
| 평균                  | 35.8                       | 63.8       |
| 표준 편차 <sup>3</sup>  | 3.0                        | 9.1        |
| CV <sup>4</sup> (%) | 8.5                        | 14.2       |

|  |
|--|
| 1. 표 2 참조.   |
| 2. 상기 논의 참조.   |
| 3. 표준편차  |
| 4. 변이 계수. 5% 미만의 변이 계수값은 방법이 우수한 재현성을 갖는 것을 의미하고, 5% 내지 10%의 값은 방법이 양호한 재현성을 갖는 것을 의미하며, 10% 내지 20%의 값은 방법이 적당한 재현성을 갖는 것을 의미한다. |

<77> 다른 언급이 없으면, 실시예 전체에 걸쳐 사용된 발효 배지는 다음 성분들을 포함하고, 여기서 처음 숫자는 공청 표적 농도를 나타내고, 괄호 내의 숫자는 허용가능한 범위를 나타낸다: 황산나트륨 12 g/L (11-13); KC1 0.5 g/L (0.45-0.55); MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 2 g/L (1.8-2.2); Hodag K-60 소포제 0.35 g/L (0.3-0.4); K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.65 g/L (0.60-0.70); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g/L (0.9-1.1); (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 g/L (0.95-1.1); CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.17 g/L (0.15-0.19); 95 DE 옥수수 시럽 (고형물 기준) 4.5 g/L (2-10); MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O 3 mg/L (2.7-3.3); ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 3 mg/L (2.7-3.3); CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 0.04 mg/L (0.035-0.045); Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.04 mg/L (0-0.045); CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 2 mg/L (1.8-2.2); NiSO<sub>4</sub> · 6H<sub>2</sub>O 2 mg/L (1.8-2.2); FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 10 mg/L (9-11); 티아민 9.5 mg/L (4-15); 비타민 B<sub>12</sub> 0.15 mg/L (0.05-0.25) 및 판토텐산칼슘 3.2 mg/L (1.3-5.1). 또한, 28% NH<sub>4</sub>OH 용액을 질소원으로서 사용하였다.

<78> 건조 미생물의 회분 함량은 약 6 중량%이었다.

<79> <실시예 4>

<80> 본 실시예는 14,000 갤런 규모에서 미생물의 생산성에 대한 발효 배지 내의 감소된 용존 산소 수준의 효과를 예시한다.

<81> 실시예 3에서 설명한 절차를 이용하여, 상기 언급한 미국 특허 제5,340,594호와 제5,340,742호에 개시된 단리 방법을 사용하여 얻을 수 있는 야생형 균주 쉬조키트리움을 사용하여 14,000 갤런의 공청 부피 발효를 수행하였다. 발효 배지 내의 용존 산소 수준은 처음 24시간 동안 약 8%이었고, 24시간째 내지 40시간째에 약 4%이었으며, 40시간째 내지 발효 공정의 종료까지 약 0.5%이었다. 발효 배지 공정에서의 보다 낮은 용존 산소 수준의 결과를 하기 표 4에 나타냈다.

**표 4**

<82> 감소된 용존 산소 농도에서의 쉬조키트리움의 14,000 갤런 규모의 유가식 발효의 결과

| 번호 | 발효기간 (hr) | 수율 (g/L) | %DHA | %FAME | FAME에 비한 %DHA | DHA 생산성 (DHA g/L/hr) |
|----|-----------|----------|------|-------|---------------|----------------------|
| 1  | 82.0      | 179.3    | 21.7 | 52.4  | 41.4          | 0.474                |
| 2  | 99.0      | 183.1    | 22.3 | 55.0  | 40.5          | 0.412                |
| 3  | 72.0      | 159.3    | -    | -     | 40.9          | -                    |
| 4  | 77.0      | 161.3    | -    | -     | 43.2          | -                    |
| 5  | 100.0     | 173.0    | 23.9 | 53.3  | 44.9          | 0.413                |
| 6  | 102.0     | 183.3    | 21.6 | 50.8  | 42.6          | 0.388                |
| 7  | 104.0     | 185.1    | 23.7 | 55.0  | 43.1          | 0.422                |
| 8  | 88.0      | 179.3    | 22.3 | 52.6  | 42.4          | 0.454                |
| 9  | 100.0     | 166.4    | 22.5 | 53.5  | 42.1          | 0.374                |
| 10 | 97.0      | 182.6    | 22.8 | 51.6  | 44.1          | 0.429                |
| 11 | 87.5      | 176.5    | 19.8 | 45.6  | 43.5          | 0.399                |
| 12 | 67.0      | 170.8    | 18.8 | 48.1  | 39.1          | 0.479                |
| 13 | 97.0      | 184.9    | 23.2 | 52.7  | 44.0          | 0.442                |
| 14 | 102.0     | 181.9    | 23.6 | 52.9  | 44.6          | 0.421                |
| 15 | 102.0     | 186.9    | 19.9 | 47.8  | 41.8          | 0.365                |
| 16 | 97.0      | 184.4    | 19.6 | 45.5  | 43.0          | 0.373                |
| 17 | 98.0      | 174.7    | 19.7 | 45.1  | 43.7          | 0.351                |

|     |       |       |       |      |      |       |
|-----|-------|-------|-------|------|------|-------|
| 18  | 103.5 | 178.8 | 18.3  | 44.5 | 41.2 | 0.316 |
| 19  | 102.0 | 173.7 | 15.8  | 43.1 | 36.7 | 0.269 |
| 20  | 94.0  | 190.4 | 19.3  | 46.9 | 41.1 | 0.391 |
| 21  | 72.0  | 172.5 | 22.8  | 52.8 | 43.2 | 0.546 |
| 22  | 75.0  | 173.1 | 21.0  | 51.7 | 40.8 | 0.485 |
| 23  | 75.0  | 152.7 | 20.3  | 50.3 | 40.4 | 0.413 |
| 24  | 75.5  | 172.5 | 21.9  | 51.7 | 42.3 | 0.500 |
| 25  | 61.0  | 156.4 | 17.3  | 45.7 | 37.8 | 0.444 |
| 26  | 74.5  | 150.6 | 20.2  | 50.1 | 40.2 | 0.408 |
| 27  | 70.5  | 134.3 | 14.8  | 40.6 | 36.6 | 0.282 |
| 28  | 75.5  | 146.1 | 21.3  | 49.7 | 42.8 | 0.412 |
| 29  | 82.0  | 174.3 | 21.4  | 50.4 | 42.5 | 0.455 |
| 30  | 105.0 | 182.3 | 21.7  | 50.7 | 42.8 | 0.377 |
| 31  | 66.0  | 146.2 | 16.4  | 44.6 | 36.7 | 0.363 |
| Avg | 87.2  | 171.5 | 20.6  | 49.5 | 41.6 | 0.409 |
| Std | 13.9  | 14.1  | 2.4   | 3.8  | 2.3  | 0.061 |
| CV  | 16.0% | 8.2%  | 11.6% | 7.7% | 5.5% | 15.0% |

&lt;83&gt; &lt;실시예 5&gt;

&lt;84&gt; 본 실시예는 41,000 갤런 규모에서 미생물의 생산성에 대한 발효 배지 내의 감소된 용존 산소 수준의 효과를 예시한다.

&lt;85&gt; 실시예 4에서와 동일한 절차를 사용하여, 발효를 41,000 갤런 발효기에 수행하였다. 상기 규모에서 표적 화합물 농도를 유지시키기 위해 배양 배지 부피를 증가시켰다. 결과를 하기 표 5에 나타냈다.

**표 5**

&lt;86&gt; 쉬조키트리움의 41,000 갤런 규모 발효

| 번호  | 발효기간<br>(hr) | 수율 (g/L) | %DHA | %FAME | FAME에 비한 %DHA | DHA 생산성 (DHA<br>g/L/hr) |
|-----|--------------|----------|------|-------|---------------|-------------------------|
| 1   | 75.0         | 116.1    | 17.3 | 46.1  | 37.4          | 0.268                   |
| 2   | 99.0         | 159.3    | 17.4 | 47.0  | 37.1          | 0.280                   |
| 3   | 103.0        | 152.6    | 16.0 | 47.2  | 33.8          | 0.237                   |
| 4   | 68.0         | 136.8    | 17.9 | 45.9  | 39.1          | 0.360                   |
| 5   | 84.0         | 142.0    | 17.5 | 47.0  | 37.2          | 0.296                   |
| Avg | 85.8         | 141.4    | 17.2 | 46.6  | 36.9          | 0.288                   |
| Std | 15.1         | 16.6     | 0.7  | 0.6   | 1.9           | 0.046                   |
| CV  | 17.5%        | 11.8%    | 4.2% | 1.3%  | 5.2%          | 15.8%                   |

&lt;87&gt; &lt;실시예 6&gt;

&lt;88&gt; 본 실시예는 본 발명의 발효 방법에 대한 여분량의 질소의 효과를 예시한다.

&lt;89&gt; 실시예 4와 유사한 절차를 이용하여 4세트의 250 리터 규모의 유가식 실험을 수행하였다. 2개의 대조군 실험과 2개의 여분량의 암모니아 함유 실험 (정상 함량의 1.15× 및 1.25×)을 수행하였다. 결과를 하기 표 6에 나타냈다.

**표 6**

&lt;90&gt;

## 쉬조키트리움의 발효에 대한 여분량의 암모니아의 효과

| 발효기간<br>(hr)  | 수율 (g/L) | 생물량 생산성     | 전환 효율 | DHA 함량 | FAME 함량 | DHA 생산성     |
|---|----------|-------------|-------|--------|---------|-------------|
| 당 표적: 7 g/L, 염기 pH 설정점: 5.5, 산 pH 설정점: 7.3, $1.0 \times \text{NH}_3$  |          |             |       |        |         |             |
| 48  | 178      | 3.71 g/L/hr | 51.5% | 10.7%  | 37.8%   | 0.40 g/L/hr |
| 60  | 185      | 3.08 g/L/hr | 46.9% | 16.3%  | 47.2%   | 0.50 g/L/hr |
| 72  | 205      | 2.85 g/L/hr | 45.2% | 17.4%  | 47.4%   | 0.50 g/L/hr |
| 84  | 219      | 2.61 g/L/hr | 43.8% | 17.1%  | 45.5%   | 0.45 g/L/hr |
| 90  | 221      | 2.46 g/L/hr | 44.1% | 18.4%  | 48.9%   | 0.45 g/L/hr |
| 당 표적: 7 g/L, 염기 pH 설정점: 5.5, 산 pH 설정점: 7.3, $1.15 \times \text{NH}_3$ |          |             |       |        |         |             |
| 48  | 171      | 3.56 g/L/hr | 55.6% | 12.0%  | 36.3%   | 0.43 g/L/hr |
| 60  | 197      | 3.28 g/L/hr | 54.6% | 9.4%   | 38.4%   | 0.31 g/L/hr |
| 72  | 191      | 2.65 g/L/hr | 52.8% | 9.4%   | 40.0%   | 0.25 g/L/hr |
| 84  | 190      | 2.26 g/L/hr | 52.5% | 10.0%  | 42.5%   | 0.23 g/L/hr |
| 90  | 189      | 2.10 g/L/hr | 52.2% | 9.2%   | 43.3%   | 0.19 g/L/hr |
| 당 표적: 7 g/L, 염기 pH 설정점: 5.5, 산 pH 설정점: 7.3, $1.25 \times \text{NH}_3$ |          |             |       |        |         |             |
| 48  | 178      | 3.71 g/L/hr | 56.4% | 11.5%  | 33.7%   | 0.43 g/L/hr |
| 60  | 179      | 2.98 g/L/hr | 48.6% | 10.3%  | 36.0%   | 0.31 g/L/hr |
| 72  | 180      | 2.50 g/L/hr | 48.8% | 12.0%  | 37.6%   | 0.30 g/L/hr |
| 84  | 181      | 2.15 g/L/hr | 46.1% | 13.6%  | 40.1%   | 0.29 g/L/hr |
| 90  | 185      | 2.06 g/L/hr | 45.7% | 12.6%  | 40.7%   | 0.26 g/L/hr |
| 당 표적: 7 g/L, 염기 pH 설정점: 5.5, 산 pH 설정점: 7.3, $1.0 \times \text{NH}_3$  |          |             |       |        |         |             |
| 48  | 158      | 3.29 g/L/hr | 55.7% | 13.1%  | 36.5%   | 0.43 g/L/hr |
| 60  | 174      | 2.90 g/L/hr | 48.9% | 17.9%  | 39.2%   | 0.52 g/L/hr |
| 72  | 189      | 2.63 g/L/hr | 45.7% | 21.0%  | 39.4%   | 0.55 g/L/hr |
| 84  | 196      | 2.33 g/L/hr | 44.1% | 22.4%  | 40.1%   | 0.52 g/L/hr |
| 90  | 206      | 2.29 g/L/hr | 44.8% | 22.1%  | 40.3%   | 0.51 g/L/hr |

&lt;91&gt;

일반적으로, 여분량의 질소가 첨가된 2개의 배치에서 DHA 생산성의 상당한 감소가 관찰되었기 때문에, 여분량의 질소는 발효 성능에 부정적인 효과를 갖는다. 표 6에 나타낸 바와 같이, 대조군 배치에서 최종 DHA 수준은 총 세포 건조 중량의 18.4% 및 22.1%였고, 여분량의 질소가 보충된 배치에서는 9.2% ( $1.15 \times$  암모니아) 및 12.6% ( $1.25 \times$  암모니아)이었다.

&lt;92&gt;

&lt;실시예 7&gt;

&lt;93&gt;

본 실시예는 본 발명의 발효 방법의 운동학적 프로파일을 보여준다.

&lt;94&gt;

실시예 4와 유사한 절차를 이용하여 1000 갤런 규모의 유가식 실험을 수행하였다. 발효 방법의 운동학적 프로파일을 표 7에 나타냈다.

**표 7**

&lt;95&gt;

쉬조키트리움의 1,000 갤런 규모 유가식 발효에 대한 운동학적 프로파일

| 발효기간<br>(hr) | 수율 (g/L) | 생물량 생산성     | 전환 효율 | %DHA 함량 | %FAME 함량 | DHA 생산성     |
|--------------|----------|-------------|-------|---------|----------|-------------|
| 24           | 118      | 4.92 g/L/hr | 78.2% | 7.4     | 18.8     | 0.36 g/L/hr |
| 30           | 138      | 4.60 g/L/hr | 60.3% | 10.6    | 30.9     | 0.49 g/L/hr |
| 36           | 138      | 3.83 g/L/hr | 46.6% | 11.6    | 36.5     | 0.44 g/L/hr |
| 42           | 175      | 4.17 g/L/hr | 49.8% | 13.4    | 41.7     | 0.56 g/L/hr |
| 48           | 178      | 3.71 g/L/hr | 45.1% | 18.7    | 52.8     | 0.69 g/L/hr |

|     |     |             |       |      |      |               |
|-----|-----|-------------|-------|------|------|---------------|
| 48* | 164 | 3.42 g/L/hr | 41.5% | 15.3 | 33.1 | 0.52 g/L/hr   |
| 54  | 196 | 3.63 g/L/hr | 45.7% | 16.6 | 51.2 | 0.60 g/L/hr   |
| 60  | 190 | 3.17 g/L/hr | 41.7% | 16.9 | 33.9 | 0.54 g/L/hr   |
| 72  | 189 | 2.62 g/L/hr | 39.1% | 15.6 | 31.8 | 0.41 g/L/hr   |
| 84  | 195 | 2.32 g/L/hr | 38.5% | 16.4 | 32.7 | 0.38 g/L/hr   |
| 90  | 200 | 2.22 g/L/hr | 39.0% | 18.8 | 33.3 | 0.42 g/L/hr   |
| 90  | 171 | 1.90 g/L/hr | 33.3% | 22.2 | 61.6 | 0.42 g/L/hr** |

\* 2개의 별개의 샘플을 48시간에서 분석하였다.  
\*\* 이는 세척된 건조-세포 중량 (DCW) 샘플에 대한 것이다. 다른 보고된 값은 비세척 샘플에 대한 것이다.

&lt;96&gt;

&lt;실시예 8&gt;

&lt;97&gt;

본 실시예는 생산성에 대한 탄소원의 양의 효과를 예시한다.

&lt;98&gt;

다양한 양의 탄소원을 사용하여 실시예 4의 공정을 이용하여 3가지 상이한 발효 공정을 수행하였다. 결과를 하기 표 8에 나타냈다.

**표 8**

&lt;99&gt;

쉬조키트리움의 발효에 대한 다양한 양의 탄소원에 대한 발효 결과

| 발효기간<br>(hr) | 수율 (g/L) | 탄소 총전량 | 전환 효율 | %DHA 함량 | %FAME 함량 | 생산성 (g/L/hr) |
|--------------|----------|--------|-------|---------|----------|--------------|
| 90           | 171      | 51.3%  | 33.3% | 22.2    | 61.6     | 0.42         |
| 94           | 122      | 40.5%  | 30.1% | 19.1    | 57.3     | 0.25         |
| 59           | 73       | 20.0%  | 36.5% | 11.9    | 40.8     | 0.15         |

&lt;100&gt;

&lt;실시예 9&gt;

&lt;101&gt;

본 실시예는 생물량, 지질 및 가장 구체적으로는 DHA로의 탄소 전환 효율에 대한 영양소 제한의 효과를 예시한다.

&lt;102&gt;

하기 화합물 (공청 농도)로 이루어진 기초 성장 (ICM-2) 배지에서 2 리터 부피의 Applikon 발효기에서 쉬조키트리움 ATCC No. 20888을 배양함으로써 영양소 제한의 효과를 조사하기 위한 연속 배양 실험을 수행하였다: 그룹 I 성분: Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (18.54 g/L), MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O (2.0 g/L) 및 KCl (0.572 g/L); 그룹 II 성분 (각각 개별적으로 제조 함): 글루코스 (43.81 g/L), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1.28 g/L), CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O (0.025 g/L) 및 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (6.538 g/L); 그룹 III 성분: Na<sub>2</sub>EDTA (6.0 mg/L), FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O (0.29 mg/L), H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (6.84 mg/L), MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O (0.86 mg/L), ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O (0.237 mg/L), CoCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O (0.026 mg/L), Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O (0.005 mg/L), CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O (0.002 mg/L) 및 NiSO<sub>4</sub> · 6H<sub>2</sub>O (0.052 mg/L); 및 그룹 IV 성분: 티아민 HC1 (0.2 mg/L), 비타민 B<sub>12</sub> (0.005 mg/L), 판토텐산칼슘 (0.2 mg/L). 그룹 I과 그룹 II는 오토클레이브 멸균시킨 반면, 그룹 III과 그룹 IV는 발효기에 첨가하기 전에 여과 멸균시켰다. 이어서 성장 배지에 쉬조키트리움을 접종하고 최대 세포 밀도가 성취될 때까지 30°C, pH 5.5 및 포화의 20%의 용존 산소의 조절된 조건 하에 성장시켰다.

&lt;103&gt;

이어서, 멸균 ICM-2 공급 배지를 발효기 내에 펌핑하고 동시에 정상 상태에 도달할 때까지 0.06 hr<sup>-1</sup>의 희석 속도를 유지하기에 충분한 유속으로 쉬조키트리움 세포를 함유하는 브로쓰를 제거함으로써 연속 운전 방식을 확립하였다. 영양소 제한의 효과를 조사하기 위해, 특정 필요 영양소를 함유하는 화합물을 상기 영양소가 유출구 세포 함유 브로쓰에서 고갈되도록 ICM-2 공급 배지 내에서 저하시켜, 세포의 성장을 상기 특정 필요 영양소의 부재에 의해 제한시켰다. 일단 각 조건에 대한 정상 상태 운전이 확립되면, 최종 브로쓰 건조 생물량, 잔류 글루코스 및 제한 영양소 농도, 세포의 지질 함량 및 세포의 DHA 함량을 측정하였다. 글루코스의 생물량으로의

전환 효율은 소비된 총 글루코스를 형성된 총 건조 생물량으로 나누어 산출하여, 백분율 기초로 표시하였다.

<104> 하기 표에 나열된 각각의 개별 영양소에 대한 상기 실험을 반복하여 각각의 개별 영양소에 의한 성장 제한의 효과를 연구하였다. 최종 결과를 하기 표에 요약하였다.

**표 9**

<105> 쉬조키트리움 종의 생물량 수율, 전환 효율 (글루코스→생물량), 지질 함량 및 DHA 함량에 대한 영양소 제한의 효과

| 제한 영양소              | 생물량 <sup>1</sup> (g/1) | Yx/s <sup>2</sup> | RCS <sup>3</sup> (g/1) | 지질 함량 <sup>4</sup> (%) | DHA 함량 <sup>5</sup> (%) |
|---------------------|------------------------|-------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
| 글루코스                | 18.7                   | 46.8              | 0.0                    | 19.8                   | 7.3                     |
| 질소                  | 14.5                   | 36.3              | 0.6                    | 47.5                   | 10.3                    |
| 인산염                 | 17.8                   | 44.5              | 0.8                    | 37.0                   | 8.2                     |
| 티아민                 | 7.5                    | 18.8              | 7.7                    | 11.1                   | 4.0                     |
| 아연                  | 16.0                   | 40.0              | 1.3                    | 27.8                   | 7.2                     |
| 구리                  | 14.0                   | 35.0              | 10.4                   | 13.8                   | 5.3                     |
| 코발트                 | 14.5                   | 36.3              | 0.0                    | 22.2                   | 6.9                     |
| 니켈                  | 17.8                   | 44.5              | 0.0                    | 21.9                   | 8.0                     |
| 철                   | 15.9                   | 39.8              | 3.5                    | 18.5                   | 7.2                     |
| 망간                  | 12.5                   | 31.3              | 3.4                    | 26.1                   | 8.0                     |
| 마그네슘                | 13.9                   | 34.8              | 5.3                    | 18.7                   | 6.4                     |
| 칼슘                  | 16.7                   | 41.8              | 4.3                    | 18.7                   | 6.4                     |
| 비타민 B <sub>12</sub> | 19.6                   | 49.0              | 0.0                    | 17.5                   | 6.3                     |
| 몰리브덴                | 18.9                   | 47.3              | 0.0                    | 19.3                   | 7.0                     |
| 판토텐산염               | 19.2                   | 48.0              | 0.0                    | 20.4                   | 6.7                     |
| 나트륨                 | 17.9                   | 44.8              | 1.8                    | 21.8                   | 8.2                     |
| 칼륨                  | 13.0                   | 32.5              | 8.8                    | 14.1                   | 5.3                     |

1. 건조 생물량의 농도 (g/리터)  
 2. 수율 계수 (생산된 생물량%/소비된 글루코스)  
 3. 브로쓰 내의 잔류 글루코스 농도 (g/리터)  
 4. 건조 생물량의 지질 함량 (g 지질 (FAME로서)/g 건조 생물량)  
 5. 건조 생물량의 DHA 함량 (g DHA/g 건조 생물량)

<106> 상기 표로부터, 질소 제한이 세포 내에 DHA를 가장 많이 축적시키고, 이어서 인산염, 나트륨, 니켈, 망간, 글루코스 (탄소), 아연 및 철의 순임을 알 수 있다. 이러한 정보는 배치 발효에 상기 영양소들 중 하나 이상을 세포 성장을 제한하기에 충분한 속도로 공급함으로써 상업적으로 이용할 수 있다. 가장 바람직한 경우에, 질소는 세포의 DHA 함량을 최대화하기 위해 배치 발효에 제한 방식으로 공급된다. 다른 영양소 (또는 이들의 혼합물)는 생물량 또는 다른 가치있는 산출물의 생산을 최대화하기 위해 제한 방식으로 공급될 수 있다. 평가하지 않은 다른 생물학적으로 필요한 원소 또는 영양소, 예를 들어 황을 또한 상기 발효 조절 전략에서 제한 영양소로서 사용할 수 있다.

<107> 본 발명은 각종 실시태양에서 각종 실시태양, 그의 하위 조합과 하위 세트를 포함한 실질적으로 본원에 기술하고 개시한 바와 같은 성분, 방법, 공정, 시스템 및(또는) 장치를 포함한다. 당업계의 숙련인은 본원에 개시된 내용을 이해한 후 본 발명의 실시 및 이용 방법을 쉽게 이해할 것이다. 본 발명은 각종 실시태양에서 성능 개선, 용이한 성취 및(또는) 실행 비용 감소를 위해 이전의 장치 또는 방법에 사용될 수 있었던 임의의 항목이 존재하지 않는 것을 포함한 본원 또는 그의 각종 실시태양에서 서술되고(되거나) 기술되지 않은 항목이 존재하지 않는 장치와 방법을 제공하는 것을 포함한다.

<108> 본 발명의 상기 논의는 예시와 설명의 목적으로 제시한 것이다. 상기 설명은 본 발명을 본원에 개시된 형태(들)로 제한하는 것을 의도하지 않는다. 본 발명의 상세한 설명이 하나 이상의 실시태양과 특정 변화 및 변형의 설명을 포함하고 있지만, 예를 들어 본 발명의 개시 내용을 이해한 후 당업자의 기술 및 지식 내에 있을

수 있는 다른 변화와 변형도 본 발명의 범위 내에 포함된다. 임의의 특허청구가능한 주제를 공개하고자 의도하지 않으면서 본원에 개시되는지와 상관없이 청구된 것에 대한 대안의, 상호교환가능한 및(또는) 균등한 구조, 기능, 범위 또는 단계를 포함한, 허용되는 정도의 대안의 실시태양을 포함하는 권리를 획득하고자 의도한다.

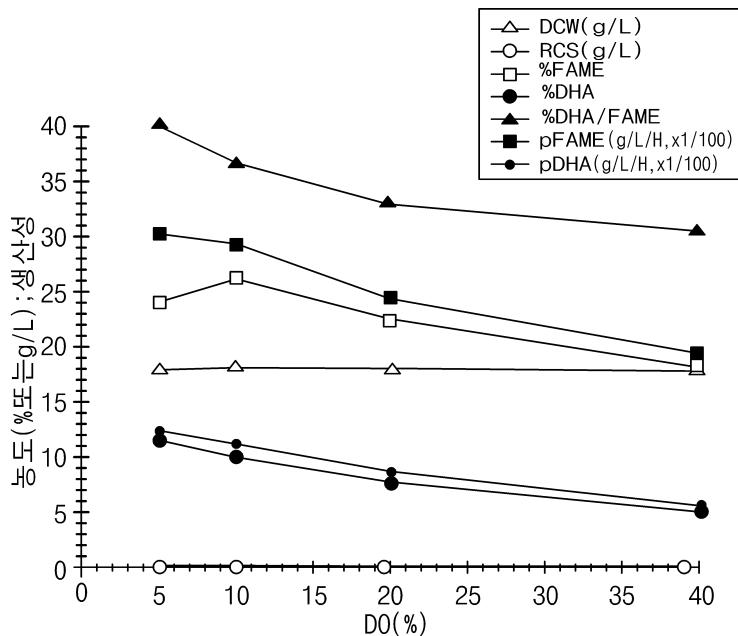
### 도면의 간단한 설명

&lt;34&gt;

도 1은 미생물의 각종 지질 생산 파라미터/발효 배지 중의 용존 산소의 양의 표 및 플롯도이다.

### 도면

#### 도면1



DHA/FAME에 대한 D0의 효과

| D0 (%) | RCS (g/L) | DCW (g/L) | FAME (g/L) | DHA (g/L) | FAME (%) | DHA (%) | DHA/FAME (%) | pFAME (g/L/h) | pDHA (g/L/h) |
|--------|-----------|-----------|------------|-----------|----------|---------|--------------|---------------|--------------|
| 5      | 0.0       | 18.1      | 5.0        | 2.0       | 24.4     | 11.3    | 40.0         | 0.302         | 0.121        |
| 10     | 0.0       | 18.3      | 4.9        | 1.8       | 26.3     | 9.6     | 36.7         | 0.292         | 0.107        |
| 20     | 0.0       | 18.0      | 4.1        | 1.3       | 22.6     | 7.4     | 33.0         | 0.244         | 0.080        |
| 40     | 0.0       | 17.8      | 3.2        | 1.0       | 18.2     | 5.6     | 30.6         | 0.191         | 0.059        |