



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0040446
(43) 공개일자 2020년04월20일

(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 10-2018-0120372
(22) 출원일자 2018년10월10일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
심상준
서울특별시 강남구 선릉로 221, 301동 803호
황성원
서울특별시 서초구 서초중앙로2길 48, 501호
(74) 대리인
정은열

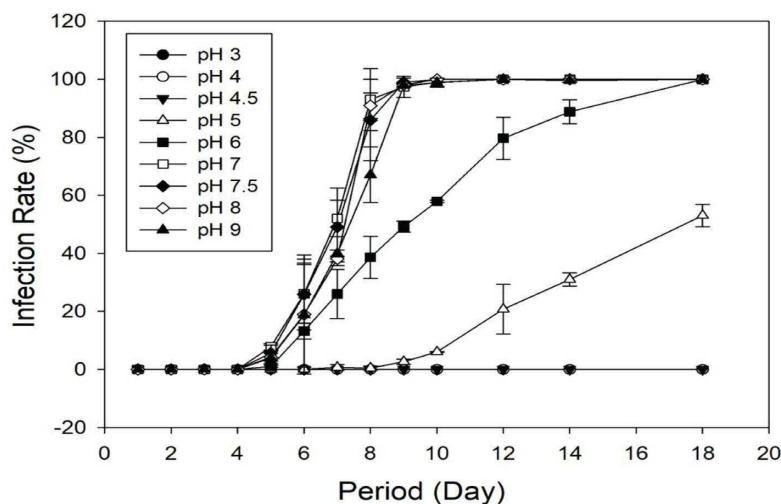
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 pH 조절을 이용한 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양방법

(57) 요약

본 발명은 pH 조절을 이용한 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양방법에 관한 것으로서, 본 발명의 산성 조건의 배지에서 헤마토코쿠스 플루비알리스(Haematococcus pluvialis)를 배양하는 공정을 포함하는 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양방법은 배양 pH 조절이라는 간단한 방법을 통해 오염균에 의한 헤마토코쿠스 플루비알리스의 사멸을 완전히 방지할 수 있으므로 미생물 오염에 의한 헤마토코쿠스 플루비알리스 세포의 바이오매스 및 아스타잔틴 생산 능력 감소 현상 등의 문제점을 해결할 수 있고, 세포 배양시 미생물에 의한 오염 비활성화 상태를 장기간 유지할 수 있어, 헤마토코쿠스 플루비알리스 세포로부터 보다 일률적으로 바이오매스 및 아스타잔틴을 생산할 수 있을 뿐만 아니라, 이렇게 생산된 아스타잔틴은 강력한 항산화물질로서 의학, 식품학, 화장품 원료 등의 다양한 산업 분야에서 다양하게 활용할 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1415153959
 부처명 산업통상자원부
 연구관리전문기관 한국에너지기술평가원
 연구사업명 에너지기술개발사업
 연구과제명 배기가스내 이산화탄소 포집 및 탄소자원화 하이브리드 동시처리 공정 개발
 기 여 율 60/100
 주관기관 한국지역난방공사 미래개발원
 연구기간 2018.07.01 ~ 2019.04.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711073343
 부처명 과학기술정보통신부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 Korea CCS 2020
 연구과제명 생물학적 이산화탄소 고속전환 유기 자원화 기술
 기 여 율 30/100
 주관기관 고려대학교
 연구기간 2018.04.01 ~ 2019.01.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711070882
 부처명 과학기술정보통신부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 (이공)중견연구자지원_도약연구
 연구과제명 생물공정의 실시간 고속 모니터링을 위한 나노 플라즈몬 검지 플랫폼 기술 개발
 기 여 율 10/100
 주관기관 고려대학교
 연구기간 2018.04.01 ~ 2019.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

산성 조건의 배지에서 헤마토코쿠스 플루비알리스(Haematococcus pluvialis)를 배양하는 공정을 포함하는 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 산성 조건은 pH 5.5 이하인 것을 특징으로 하는 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 산성 조건은 배양 초기에는 pH 4 내지 4.5이고, 배양 기간 동안에는 pH 5.5 이하로 유지되는 조건인 것을 특징으로 하는 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 산성 조건은 배지에 산을 첨가함으로써 조정되며,

상기 산은 황산, 염산, 질산, 아세트산, 시트르산, 숙신산, 인산, 말산, 부티르산, 프로피온산, 옥살산, 글루콘산, 타르타르산, 프탈산, 탄산 및 아스코르브산으로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 배지는 MES 버퍼를 포함하는 것을 특징으로 하는 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양방법.

청구항 6

제1항에 따른 방법을 이용한 아스타잔틴의 제조방법.

발명의 설명

기술분야

[0001]

본 발명은 pH 조절을 이용한 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양방법에 관한 것으로서, 상세하게는 헤마토코쿠스 플루비알리스를 배양할 시 배양 초기 또는 배양 기간 동안 배지의 pH를 산성 조건으로 조절함으로써 외부 미생물에 의한 오염을 방지하여 헤마토코쿠스 플루비알리스 세포의 바이오매스 및 아스타잔틴 생산 능력을 증진시킬 수 있는 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

일반적으로 적색을 띄는 케토카로티노이드(Ketocarotenoid)인 아스타잔틴(Astaxanthin, 3,3'-dihydroxy- β , β' -carotene-4,4'-dione)은 베타-카로틴(β -carotene)과 같은 화학적 구조를 가진 카로티노이드계 색소의 일종으로, 유해 활성산소를 없애는 항산화 기능성 물질로 베타-카로틴에 비해 양쪽 말단에 하이드록실기(-OH)와 케톤기(=O)를 하나씩 더 가지는 독특한 분자 구조적 특성 때문에 기존의 항산화 물질보다 월등히 높은 항산화 활성을 갖는다. 아스타잔틴은 대표적인 항산화제인 비타민 E보다 500배, 베타-카로틴보다 20배 정도 높은 항산화 활성을 지닌다. 이러한 높은 항산화 활성기능으로 인해 아스타잔틴은 의약품, 식품 첨가제 및 동물과 치

어의 사료 첨가제로 널리 사용되고 있고, 그 수요량 및 활용 범위가 급격히 확대될 것으로 예상되고 있다.

- [0003] 이러한 아스타잔틴은 효모 균주인 파피아 로드지마(*Phaffia rthodozyma*)와 버비박테리아(*Bervibacterium*)에서 생성되며, 또한, 해양 동물과 담수 동물에 많이 분포되어 있지만, 새우나 가재 등의 갑각류에서 추출된 아스타잔틴은 함량이 적고, 추출 과정이 어려워 적용되지 않고 있으며, 파피아 로드지마 균주는 성장률이 높으나 아스타잔틴의 수율이 낮다는 문제점을 가지고 있다.
- [0004] 이에, 지구상에서 아스타잔틴의 축적함량과 수율 측면에서 가장 우수한 미세조류인 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*)를 사용하여 빛에 의한 이산화탄소의 고정화와 동시에 아스타잔틴의 생산성을 높이기 위한 다양한 연구가 수행되고 있다.
- [0005] 그러나 미세조류를 이용한 생물학적 시스템을 실제 산업체에서 발생하는 배가스 내 이산화탄소의 포집에 적용하기 위해서는 현실적으로 보다 경제성을 갖춘 미세조류 대량배양시스템이 필요하나, 외부 미생물과 같은 오염원에 의한 헤마토코쿠스 플루비알리스의 바이오매스 및 아스타잔틴 생산성 감소는 경제성을 감소시키는 문제점이 있고, 이러한 현상은 scale-up을 위한 대량배양으로 진행될수록 상황은 더욱 악화되어 금전적 타격을 초래한다.
- [0006] 진술한 바와 같이 헤마토코쿠스 플루비알리스의 대량 배양에서 가장 큰 난제는 박테리아, 곰팡이, 다른 미세조류 중(*Scenedesmus* sp. or *Chlorella* sp.)에 의한 오염이며(Pandey 2013, Gutman et al 2009, Shah 2016), 그 중에서도 곰팡이의 한 종류로 알려진 *Paraphysoderma sedebokerenses* 는 매우 빠른 속도로 헤마토코쿠스 셀을 감염시켜 3-4일 안에 모든 셀을 사멸시키기 때문에 가장 심각하게 여겨진다(Gutman 2009).
- [0007] 관련하여, U.S. Patent Application No. 14/351,540에서는 fungicide를 이용하여 미생물에 의한 오염률을 낮추는 방안 및 배양 온도를 낮은 온도(10-22 ℃)로 낮추는 연속 장치를 이용하는 방법을 제시하고 있으나 그 효과가 완전하지 않고 비용이 많이 든다는 문제가 있고, U.S. Patent No. 9,113,607 와 U.S. Patent No. 9,392,793에서는 과산화수소(hydrogen peroxide)와 salt를 주입하여 미생물에 의한 오염을 감소시키는 방법을 개시하고 있으나, 과산화수소는 빠른 시간 내에 (대략 2시간) 모두 증발하기 때문에 추가적인 감염 여부를 모니터링함과 동시에 해당 방법을 반복적으로 수행해야 한다는 번거로움이 있다.
- [0008] 또한, 헤마토코쿠스 셀이 다른 미세 조류에 비해 성장 속도가 매우 느리기 때문에 오염원에 취약할 뿐만 아니라 진술한 방법들은 모두 오염균이 발견된 이후에 추가적인 오염을 방지하기 위한 방법이기 때문에 *Paraphysoderma sedebokerenses* 와 같이 헤마토코쿠스 셀을 매우 빠른 속도로 감염시키는 곰팡이에 의해 감염될 경우 근본적인 해결책이 될 수 없다는 문제점이 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 헤마토코쿠스 플루비알리스의 대량 배양의 장기적인 운행 시 공정의 특성상 순수배양의 어려움으로 발생하는 외부 미생물들에 의한 오염으로 인해 헤마토코쿠스 플루비알리스 세포로부터 바이오매스 및 아스타잔틴 생산성 감소, 이에 따른 이산화탄소 전환 효율 감소 등의 문제점을 해결하고, 배양기간 내에 오염균이 유입되는 가능성 뿐만 아니라 오염균이 이미 존재하는 환경에서도 오염균으로부터의 감염을 방지할 수 있는 새로운 헤마토코쿠스 플루비알리스의 배양방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0010] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여,
- [0011] 산성 조건의 배지에서 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*)를 배양하는 공정을 포함하는 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양방법을 제공한다.
- [0012] 본 발명에 따르면, 상기 산성 조건은 pH 5.5 이하일 수 있다. 또한, 상기 산성 조건은 배양 초기에는 pH 4 내지 4.5이고, 배양 기간 동안에는 pH 5.5 이하로 유지되는 조건일 수 있다.
- [0013] 본 발명에 따르면, 상기 산성 조건은 배지에 산을 첨가함으로써 조정되며, 상기 산은 황산, 염산, 질산, 아세트산, 시트르산, 숙신산, 인산, 말산, 부티르산, 프로피온산, 옥살산, 글루콘산, 타르타르산, 프탈산, 탄산 및 아스코르브산으로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있다.
- [0014] 본 발명에 따르면, 상기 배지는 MES 버퍼를 포함할 수 있다.

[0015] 본 발명은 또한, 상기 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양방법을 이용하여 아스타잔틴을 제조하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0016] 본 발명의 산성 조건의 배지에서 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*)를 배양하는 공정을 포함하는 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양방법은 배양 pH 조절이라는 간단한 방법을 통해 오염균에 의한 헤마토코쿠스 플루비알리스의 사멸을 완전히 방지할 수 있으므로 미생물 오염에 의한 헤마토코쿠스 플루비알리스 세포의 바이오매스 및 아스타잔틴 생산능력 감소 현상 등의 문제점을 해결할 수 있고, 세포 배양시 미생물에 의한 오염 비활성화 상태를 장기간 유지할 수 있어, 헤마토코쿠스 플루비알리스 세포로부터 보다 일률적으로 바이오매스 및 아스타잔틴을 생산할 수 있을 뿐만 아니라, 이렇게 생산된 아스타잔틴은 강력한 항산화물질로서 의학, 식품학, 화장품 원료 등의 다양한 산업분야에서 다양하게 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양 배지에 *Paraphysoderma sedebokerenses* 곰팡이 오염균을 접종하여 배양시 배양 배지의 초기 pH에 따른 감염률을 측정된 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양 배지에 *Paraphysoderma sedebokerenses* 곰팡이 오염균을 접종하여 배양시 배양 배지의 초기 pH에 따른 배양 0, 6, 8, 10일차 감염률을 나타낸 그래프 및 배양 배지의 색 변화를 나타낸 사진이다.

도 3은 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양 배지에 *Paraphysoderma sedebokerenses* 곰팡이 오염균을 접종하여 배양시 배양 배지의 초기 pH가 4인 경우와 pH가 7.5(대조군)인 경우의 배양 10일차 헤마토코쿠스 플루비알리스의 현미경 이미지이다.

도 4는 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양 배지 배양시 배양 배지의 초기 pH가 3, 4, 7.5인 경우의 성장성을 비교한 결과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 이하, 본 발명을 더욱 구체적으로 설명하기로 한다.

[0020] 본 발명에서는 헤마토코쿠스 플루비알리스의 대량 배양의 장기적인 운행 시 공정의 특성상 순수배양의 어려움으로 발생하는 외부 미생물들에 의한 오염으로 인해 헤마토코쿠스 플루비알리스 세포로부터 바이오매스 및 아스타잔틴 생산성 감소, 이에 따른 이산화탄소 전환 효율 감소 등의 문제점을 해결하고, 배양기간 내에 오염균이 유입되는 가능성 뿐만 아니라 오염균이 이미 존재하는 환경에서도 오염균으로부터의 감염을 방지할 수 있는 새로운 헤마토코쿠스 플루비알리스의 배양방법을 제공하고자 한다.

[0021] 이를 위해, 본 발명은 산성 조건의 배지에서 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*)를 배양하는 공정을 포함하는 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양방법을 제공한다.

[0022] 이때, 상기 산성 조건은 배양의 전체 과정에서 pH 5.5 이하로 유지되는 것이 바람직하며, 특히 하기 실시예의 결과로부터 알 수 있는 바와 같이, 미생물에 의한 오염을 완전히 차단하면서도 셀을 큰 손실 없이 성장시키기 위해서는 배양 초기에는 배양 초기에는 pH 4 내지 4.5, 배양 기간 동안에는 pH 5.5 이하로 유지되는 것이 가장 바람직하다.

[0023] 본 발명의 배양에 사용하는 배지는 헤마토코쿠스 플루비알리스를 생육하여 소정의 조건 하에서 아스타잔틴을 생산할 수 있는 것이라면 모두 가능하며, 바람직하게는 질소원, 무기 염류 및 필요에 따라 비타민류 등을 함유하는 배지일 수 있다.

[0024] 무기 질소원으로는, 질산암모늄, 황산암모늄, 염화암모늄, 인산암모늄 등의 암모늄염류, 질산칼륨 등의 질산염류, 암모니아 및 우레아로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있다. 첨가량은 질소원의 종류에 따라 상이하며 통상적으로는 배지 1 ℓ 에 대하여 0.1-20 g, 바람직하게는 0.2-10 g 일 수 있다.

[0025] 유기 질소원으로는, 예를 들어, 콘스텝리커 (여과 처리물을 포함한다), 과마 미디어, 콩깻묵, 대두 분말, 피넛 밀, 디스틸러즈 솔러블, 건조 효모, 글루탐산 소다로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있다. 첨가 농도

는 질소원의 종류에 따라 상이하며 통상적으로 0-80 g/ℓ, 바람직하게는 0-30 g/ℓ 일 수 있다.

- [0026] 무기 질소원 및 유기 질소원은 배양 전 배지에 첨가하거나, 배양 도중에 축차적 또는 연속적으로 추가 공급할 수도 있다.
- [0027] 무기 염류로는, 예를 들어, 인산염류, 황산마그네슘, 염화마그네슘 등의 마그네슘염류, 황산철, 염화철 등의 철염류, 염화칼슘, 탄산칼슘 등의 칼슘염류, 탄산나트륨, 염화나트륨 등의 나트륨염류, 황산망간 등의 망간염류, 염화코발트 등의 코발트염류, 황산구리 등의 구리 염류, 황산아연 등의 아연염류, 몰리브덴산나트륨 등의 몰리브덴염류, 황산니켈 등의 니켈염류, 셀렌산나트륨 등의 셀렌염류, 붕산 및 요오드화칼륨으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있다. 첨가량은 무기염의 종류에 따라 상이하며 통상적으로 배지 1 ℓ 에 대하여 0.0001-15 g일 수 있다. 무기 염류는 배양 전 배지에 첨가하거나, 배양 도중에 축차적 또는 연속적으로 추가 공급할 수도 있다.
- [0028] 비타민류로는, 예를 들어, 시아노코발라민, 리보플라빈, 판토텐산, 피리독신, 티아민, 아스코르브산, 엽산, 니아신, p-아미노벤조산, 비오틴, 이노시톨, 콜린 등을 사용할 수 있다. 첨가 비율은 비타민류의 종류에 따라 상이하며 통상적으로 배지 1 ℓ 에 대하여 0.001-1000 mg 이고, 바람직하게는 0.01-100 mg 일 수 있다. 비타민류는 배양 전 배지에 첨가하거나, 배양 도중에 축차적 또는 연속적으로 추가 공급할 수도 있다.
- [0029] 본 발명에 사용된 배지는 산성 조건의 pH를 유지하기 위해 MES 버퍼를 더 포함할 수 있으며, 구연산 버퍼, 수산화나트륨 수용액, 수산화칼륨 수용액, 탄산나트륨 수용액, 암모니아수, 암모니아 가스, 황산 수용액 또는 이들의 혼합물을 pH 조정제로 사용할 수도 있다.
- [0030] 또한, 상기 산성 조건은 배지에 산을 첨가함으로써 조정되며, 상기 산은 황산, 염산, 질산, 아세트산, 시트르산, 숙신산, 인산, 말산, 부티르산, 프로피온산, 옥살산, 글루콘산, 타르타르산, 프탈산, 탄산 및 아스코르브산으로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있다.
- [0031] 또한, 상기 헤마토코쿠스 플루비알리스의 배양은 적절한 배양 용기에서 실시된다. 배양 용기는 배양 용량에 따라 적절히 선택할 수 있으며, 예를 들어, 시험관, 플라스크, 발효조, 광생물 반응기 등을 들 수 있다.
- [0032] 배양 온도는 15 내지 80 ℃, 바람직하게는 20-35 ℃, 보다 바람직하게는 23-30 ℃ 일 수 있으며, 통상적으로 1-90 일간, 바람직하게는 5-60 일간, 보다 바람직하게는 5-30일간 배양할 수 있다.
- [0034] 본 발명은 또한, 상기 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양방법을 이용하여 아스타잔틴을 제조하는 방법을 제공한다.
- [0036] 이하, 실시예를 통해서 본 발명을 더욱 구체적으로 설명하기로 하되, 하기 실시예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니다.
- [0038] **재료**
- [0039] 본 발명에 사용된 균주는 Haematococcus pluvialis NIES-144로서 National Institute for Environmental Studies, Tsukuba, Japan으로부터 구입하여 사용하였다.
- [0040] 본 실험에 사용된 배지의 종류는 모두 NIES-C 배지 및 NIES-N 배지 2가지이고, 이들의 구성성분을 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

NIES-C		NIES-N	
성분	함량(/L)	성분	함량(/L)
Ca(NO ₃) ₂	0.15 g	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.13 g
KNO ₃	0.10 g	KCl	0.07 g
Na ₂ Glycerophosphate·5H ₂ O	0.05 g	Na ₂ Glycerophosphate·5H ₂ O	0.05 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.04 g	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.04 g
Tris-aminomethane	0.05 g	Tris-aminomethane	0.05 g
Thiamine	0.01 mg	Thiamine	0.01 mg
Biotin	0.10 μg	Biotin	0.10 μg
Vitamin B12	0.01 μg	Vitamin B12	0.01 μg
PIV metal solution (per liter)	3 ml	PIV metal solution (per liter)	3 ml
Na ₂ EDTA 1 g		Na ₂ EDTA 1 g	
FeCl ₃ ·6H ₂ O 0.196 g		FeCl ₃ ·6H ₂ O 0.196 g	
MnCl ₂ ·4H ₂ O 0.036 g		MnCl ₂ ·4H ₂ O 0.036 g	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O 0.022 g		ZnSO ₄ ·7H ₂ O 0.022 g	
CoCl ₂ ·6H ₂ O 4 mg		CoCl ₂ ·6H ₂ O 4 mg	
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O 2.5 mg		Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O 2.5 mg	

[0041]

[0042]

[0043]

[0044]

[0045]

[0046]

[0047]

[0049]

[0050]

[0051]

[0052]

[0053]

상기 표 1에서,

- NIES-C 배지: autotrophic medium (자가영양배지, 목적: 생장)

- NIES-N 배지: autotrophic medium (자가영양배지, 목적: 생육억제, 광유발, 아스타잔틴 생산)

- 배지 부피 : 150 mL(플라스크), 20 L(옥외 광배양기)

- CO₂ supply : 3~5%(v/v)

- 광조건 : 20 μE/m²/s during 'green' stage(vegetative growth); 150 μE/m²/s during 'red' stage(inductive growth)

실시예. 배양 배지의 pH에 따른 *Paraphysoderma sedebokerenses* 곰팡이 오염균에 의한 감염률 측정 및 배양 배지의 pH가 헤마토코쿠스의 성장에 미치는 영향 측정

로그대수기 (exponential phase) 상태의 헤마토코쿠스를 pH 3~9 까지 범위의 배지(pH 3, 4, 4.5, 5, 6, 7, 7.5(control, 대조군), 8, 9) 30ml에 O.D (680nm)= 0.5 농도로 접종하고 *P. sedebokerenses* 곰팡이 오염균을 각 20 μl 씩 접종하여 배양하면서 감염률(%)을 확인하였다. 접종한 *P. sedebokerenses* 곰팡이 오염균은 7일 간격으로 헤마토코쿠스 셀을 접종하여 유지시켜온 상태로, 헤마토코쿠스 셀 기준 2×10^5 cell/ml 농도에서 곰팡이 균 오염률이 70~80 % 범위에 올 때의 셀을 사용하여 실험을 진행하였다. 감염률은 광학현미경과 cell counter (hemocytometer)로 감염률(%) = 감염된 셀 수/전체 셀 수 x 100 으로 계산하였다.

또한, 상기 곰팡이 오염균을 접종하지 않고, 배양 배지의 초기 pH를 3, 4, 7.5로 설정하여 배지의 pH가 헤마토코쿠스 플루비알리스의 성장에 미치는 영향을 측정하였다.

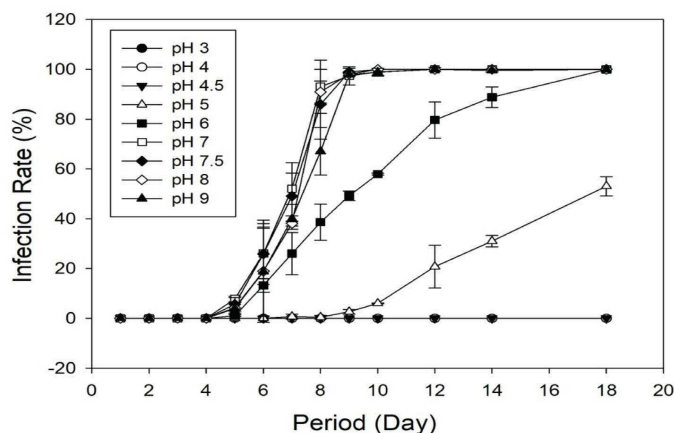
도 1은 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양 배지에 *Paraphysoderma sedebokerenses* 곰팡이 오염균을 접종하여 배양 시 배양 배지의 초기 pH에 따른 감염률을 측정한 결과를 나타내며, 도 2는 배양 배지의 초기 pH에 따른 배양 0, 6, 8, 10일차 감염률을 나타낸 그래프 및 배양 배지의 색 변화를 나타낸 사진이며, 도 3은 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양 배지에 *Paraphysoderma sedebokerenses* 곰팡이 오염균을 접종하여 배양 시 배양 배지의 초기 pH가 4 인 경우와 pH가 7.5(대조군)인 경우의 배양 10일차 헤마토코쿠스 플루비알리스의 현미경 이미지이다.

도 4는 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양 배지 배양 시 배양 배지의 초기 pH가 3, 4, 7.5인 경우의 성장성을 비교한 결과를 나타낸 그래프이다.

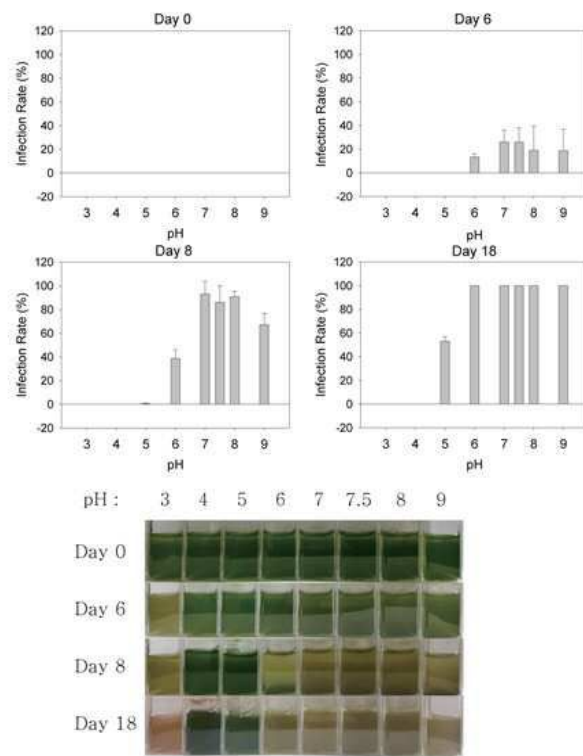
- [0054] 실험 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 배지의 초기 pH 3, pH 4, pH 4.5인 경우를 제외하고는 모두 배양 18일 차에 오염률이 대략 40-100%에 이르는 것으로 나타났다. 또한, 도 2에 나타난 바와 같이 pH가 7-8로 중성 내지 약 염기성 범위인 경우 약 8일만에 오염률이 80% 이상으로 나타났으며, 배양 18일 차에는 pH 6-9 범위의 셀의 오염률을 100%로 배양된 셀이 모두 오염되는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 도 2의 사진에서 배양 0일 차에 초록색이었던 셀들이 오염되어 갈색으로 변한 것을 통해서도 확인할 수 있다. 또한, 배지의 초기 pH가 5인 경우에는 배양 18일 차에 오염률이 약 50%로 나타났으며(도 1, 2), 30일 내에 오염률이 100%에 이르는 것을 확인하였다(도면 미도시). 반면, 배지의 초기 pH가 3, 4, 4.5 인 경우 배양 18일 차에 오염된 셀이 전혀 관찰되지 않았으며(도 1, 2), 배양 30일 까지도 오염률이 0%로 유지되는 것을 확인하였다(도면 미도시). 이러한 결과는 도 3의 현미경 이미지에서 초기 pH가 7.5인 배지에서는 배양 10일차에 곰팡이 균에 의해 셀이 모두 오염되어 갈색으로 변한 반면, 초기 pH가 4인 배지에서는 셀이 깨끗한 상태를 유지하는 것을 통해서도 확인할 수 있다.
- [0055] 또한, 도 4에 나타난 바와 같이 배양 배지의 초기 pH가 3인 경우에는 셀의 성장성이 매우 떨어지는 것을 확인할 수 있는 반면, pH 4에서는 셀이 pH 7.5에 비해서는 약 10-20% 덜 성장하지만 큰 손실 없이 잘 성장하는 것을 확인할 수 있다.
- [0056] 또한, 헤마토코쿠스 플루비알리스의 배양 과정을 통해 배양 배지의 pH가 상승하는 것을 확인하였으며, 구체적으로 배양 배지의 초기 pH가 4인 경우에는 셀이 성장하면서 배양 30일 차에 pH가 5까지 상승하며, 초기 pH가 5인 경우에는 배양 30일 차에 pH가 5.5를 넘어서까지 상승하는 것을 확인하였다 (도면 미도시).
- [0057] 이러한 결과들을 종합적으로 고려해 볼때, 헤마토코쿠스 플루비알리스의 성장성 저해에 큰 영향을 미치지 않으면서, 곰팡이 균에 의한 오염을 완전히 차단하기 위해서는 배양 배지의 초기 pH를 4 내지 4.5로 설정하고, 배양 기간 동안 배양 배지의 pH를 5.5 이하로 유지시켜 주는 것이 바람직하다는 것을 확인하였다.

도면

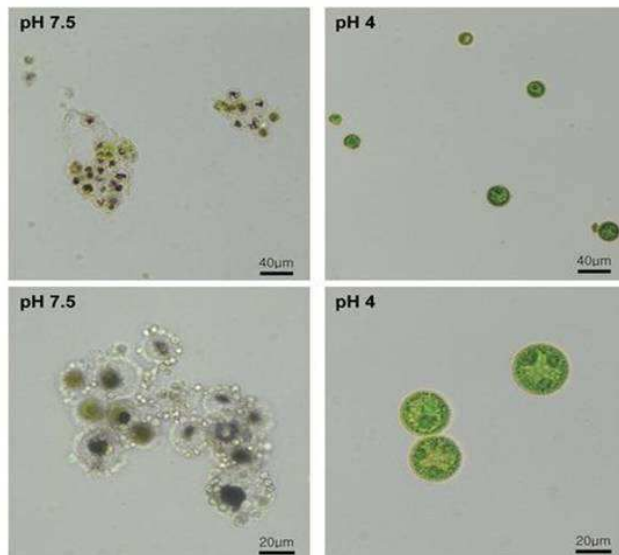
도면1



도면2



도면3



도면4

