



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0041366
(43) 공개일자 2013년04월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/12 (2006.01) C12P 7/64 (2006.01)
C12R 1/89 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-7007702(분할)
(22) 출원일자(국제) 2004년10월01일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2011-7003779
원출원일자(국제) 2004년10월01일
심사청구일자 2011년02월18일
(85) 번역문제출일자 2013년03월26일
(86) 국제출원번호 PCT/US2004/032383
(87) 국제공개번호 WO 2005/035775
국제공개일자 2005년04월21일
(30) 우선권주장
60/508,505 2003년10월02일 미국(US)

(71) 출원인
마텍 바이오사이언스 코퍼레이션
미합중국 메릴랜드 21045 콜롬비아 도빈로드
6480
(72) 발명자
비현스, 바울 더블유.
미국 메릴랜드주 21042 엘리코트시 버터후르츠 웨
이 11413
툼슨, 존 엠.
미국 메릴랜드주 21228 볼티모어 세미놀 애비뉴
405
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 양영환

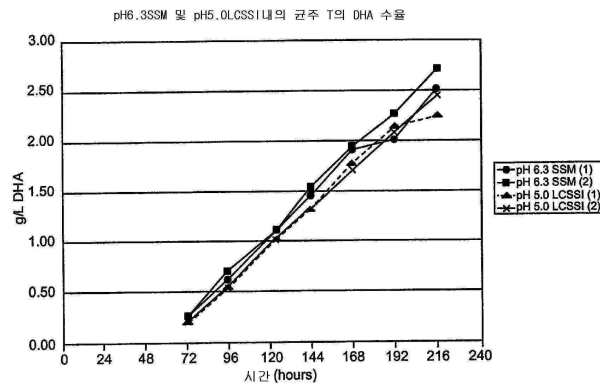
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 변형량의 염소 및 칼륨을 사용하는 미세조류 중에 고농도 디에치에이의 생산

(57) 요약

낮은 농도의 염소를 사용하는, 종속영양생물 해양 와편모충류(dinoflagellate) *Cryptocodinium*을 포함한 해양 미세조류(marine microalgae)에 의한 고불포화 지방산의 생산방법이 기술된다. 구체적으로, 나트륨 이온 및 칼륨 이온 농도를 조정하여 낮은 염소 배지에 성장하면서 해양 미생물에 의한 고불포화 지방산의 생산을 증가시키는 방법이 기술된다. 본 발명은 또한 낮은 pH 농도에서 해양 미생물에 의한 고불포화 지방산의 생산방법에 관한 것이며 또한 낮은 pH 내성 균을 생산하는 방법을 포함한다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

에피티, 키르크.

미국 메릴랜드주 21045 콜롬비아 레드 헤븐 로드
6303

페이퍼, 요셉 더블유. 3세

미국 메릴랜드주 21136 레이스터스톤 트윈 놀스 씨
클 2420

원, 제임스 피.

미국 메릴랜드주 21044 콜롬비아 우드 엘브스 웨이
11040

립메이어, 제임스, 카세이.

미국 메릴랜드주 21045 콜롬비아 라이스게이트 런
5364

피크탈리, 자우아드

미국 켄터키주 40509 렉싱턴 징거밀 레인 554

한슨, 존

미국 켄터키주 40509 렉싱턴 셰필드 플레이스 1184

특허청구의 범위

청구항 1

크립테코디니움 코니(*Cryptocodinium cohnii*) 종의 종속영양생물 미세조류를 배양하기 위한, 0.025 g/L 내지 2 g/L 농도의 염소 이온, 0.95 g/L 내지 10 g/L 농도의 칼륨 이온, 및 나트륨 이온을 포함하는 배양 배지의 용도.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 일반적으로 배양 배지 중에 변형량의 염소 및 칼륨을 사용하여 해양 미생물에 의한 고 불포화 지방산의 생산방법에 관한 것이다. 더욱 구체적으로 본 발명은 저 염소 이온 및 고 칼륨 이온 환경에서 배양함을 포함하는 비부식성 조건하의 발효기 중에 종속영양생물 해양 와편모충류(dinoflagellate), 크립테코디니움(*Cryptocodinium*)을 포함한 해양 미세조류(marine microalgae)를 배양하여 고농도의 도코사헥사엔산(DHA)를 생산하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 낮은 pH농도에서 해양 미생물에 의해 DHA를 포함한 고불포화 지방산의 생산방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 인간 내의 장쇄 오메가-3 지방산의 증가된 식이 섭취의 유리한 효과는 심장혈관 및 염증성 질환 (즉 관절염 및 아테롬성 동맥경화증)의 감소, 우울증의 감소, 세 번째 3개 월기에서 회태기간의 증가 및 종양성장 억제를 포함하는 것으로 상세히 잘 기록되어 있다. 고농도의 여러 가지 종속영양식물 해양 미생물은 *Cryptocodinium* 속을 포함하여 고농도의 이들 중요한 필수 지방산을 생산하는 것으로 밝혀졌다 (Jian and Chen, 프로세스 생화학 35 (2000) 1205-1209; Jiang and Chen, Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, (1999) Vol. 23, 508-513; Vazhappilly and Chen, Journal of the American Oil Chemists Society, (1998) Vol. 75, No. 3 p 393-397; Kyle, 미국특허 제5,407,957호; 미국특허 5,397,591호; 미국특허 5,492,938호 및 미국특허 제 5,711,983호).

[0003] *Cryptocodinium cohnium*은 가장 중요한 장쇄 오메가-3 지방산 중의 하나인 DHA (C22:6n-3)의 생산을 위해 사용하는데 가장 바람직한 유기균 중의 하나이다. *C. cohnii*는 DHA가 인식가능한 양으로 이 유기균에 의해 생산된 유일한 다불포화 지방산 (PUFA)이기 때문에 유리하다. 다른 유기균은 지질중에 두 개 이상의 다불포화 지방산 (PUFA)를 생산하며 또한 이들의 지질 프로파일의 복잡성은 (예, 특수한 적용에 바람직한 범위에 벗어나는 상이한 PUFA의 비로 인하여 또는 오일 중의 다른 바람직하지 않은 PUFA의 존재로 인하여) 일부 식품 및 약학 분야에서 이들의 오일의 사용을 제한할 수 있다. 해양환경에서, *Cryptocodinium cohnii*는 통상적으로 충분한 염도 해수에서 발견되며 그 자체로 높은 염소 농도의 환경에서 성장하는데 적합하다. 사실, *C. cohnii*에 대해 발표된 연구에서 대부분의 배양은 성장 및 DHA 생산이 해수의 약 20% 이상의 염도에서 가장 좋다 (Jiang and Chen). 20% 해수에 해당하는 염소이온 농도는 약 3870 ppm 염소이온 또는 3.87 g/l 염소이온이다 (Horne 1969).

[0004] 터틀 및 로에브리치 (1975)는 *C. cohnii*의 최적성장 배지를 개발하였다. 기술된 배지는 342 밀리몰(mM)의 염화 나트륨 농도를 함유하였다. 342mM 염화나트륨 용액 중에서 나트륨 이온 및 염소 이온의 리터당 동등한 그람은 7.86g/L 나트륨 이온 및 12.12g/L 염소이온이다.

[0005] 비치 및 홀쯔 (1973)은 소정 범위의 NaCl 농도 (0.3%, 1.8% 및 5.0% (각각 1.82 g/l, 10.9g/l 및 30.3g/l 염소 이온)에 걸쳐 *C. cohnii*를 배양할 때 지질 수율 (10^9 세포 당 mg으로 표시)이 NaCl 농도가 감소함에 따라 저하됨을 보고하였다. 0.3% NaCl에서 지질 수율은 5.0% NaCl에서 지질농도의 대략 3분의 1이었다. 더욱 최근에, 지양 및 첸 (1999)은 세 개의 균주의 *Cryptocodinium cohnii*를 가지고 세포성장 및 DHA 함량에 대한 염도의 영향을 검사하고, 모든 경우에 세포 및 DHA 수율에 대한 최적 성장률은 5 g/L 내지 9 g/L의 염화 나트륨 (이는 3.0 내지 5.5g/L 염소이온에 해당함)인 것을 발견하였다.

[0006] 해수의 천연 염소농도 (19,353 ppm, 또는 19.35 g/l 염소이온) (Horne 1969, 페이지 151)는 스테인리스 강 발효기 내의 부식을 촉진한다. 예를 들면, 발효기를 제조하는데 사용되는 스테인리스 강의 두 개의 공통 등급 중에서, 304-스테인리스 강은 염소 농도가 30 ppm (0.3g/l 염소이온)을 초과할 때 부식에 민감하며, 또한 316-스테인리스 강은 염소 농도가 1000 ppm (1 g/l 염소이온)을 초과할 때 부식에 민감하다. 염소 부식에 더욱 내성이

있는 다른 등급의 스테인리스 강이 존재하지만, 이들은 극히 비싸고 또한 일반적으로 매우 비싼 화합물의 제조에 사용되는 발효 장치에 사용될 뿐이다.

[0007] 배양 배지 중에 염소 농도를 낮춤으로써 스테인리스 강 발효기의 부식을 최소화시킬 수 있는 것으로 예측할 수 있지만, 실제로 이것은 쉬운 일이 아니다. 바다로부터 유도되는 해양 미세 조류는 일반적으로 배양으로 성장했을 때 성장 및 지질 생산을 유지시키기 위해 특정 량의 염소 이온, 바람직하게는 염화나트륨을 필요로 한다.

[0008] 그러나 DHA와 같은 오메가-3 다불포화 지방산의 생산농도를 유지하면서 낮은 염소 농도에서 해양 미세조류를 성장시키기 위한 지금까지 시도는 성공적이지 못하였다. 지앙 및 첸 (1999)은 약 3033ppm 또는 3g/l의 염소농도에 해당하는, 5g/L 미만의 NaCl 농도에서 현저한 DHA 수율을 입증할 수 없었다.

[0009] 2002년 6월 25일자 허여된 바르클레이의 미국특허 제6,410,281호는 염화나트륨 농도를 저하시킬 때 상실된 나트륨을 대체하기 위해 비-염화 나트륨 염을 치환시켜 낮은 염소 배지에서 *Thraustochytrium sp.* 및 *Schizochytrium sp.* 등의 광염도성 유기균의 성장방법을 제공한다.

[0010] 여기에는 대부분의 상업적으로 바람직한 생산 용기, 스테인리스 강 및 배양 발효기에서 부식을 억제 또는 방지하면서 *Cryptocodinium cohnii*로부터 고수율의 DHA를 생산할 수 있는 방법에 대한 필요성이 존재한다. 이 방법은 바람직하게 300ppm 미만의 염소를 함유하는 배지에서 미생물의 효과적인 성장을 가능하게 해야 한다. 3백 ppm 염소는 지앙 및 첸 (1999)에 의해 입증된 최저 염소 농도보다 10-18배 더 낮은 농도를 나타내며 이는 *Cryptocodinium* 균의 생산에 최적이다.

[0011] 미생물 발효의 또 하나의 바람직한 특성은 균 발효에서 박테리아 성장을 억제하기 위해 낮은 pH (약 pH=5.0 정도 또는 그 미만)에서 세포를 성장시키는 능력이다. 그러나 문헌은 *Cryptocodinium*이 중성 pH에서(약 pH 7에서) 가장 잘 성장하는 것을 지적하고 있다. *Phycologia* Vol. 14(1) 1-8 (1975)에서 터틀 및 로에브르치는 *Cryptocodinium* 성장에 대한 pH 최적치는 6.6이며, 성장은 pH 5.5 미만에서 “매우 느림”임을 개시한다. DHA의 정상 성장 및 생산을 유지하면서 낮은 pH에서 *Cryptocodinium*을 성장시키는 균주 및/또는 방법에 대한 필요가 존재하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 염화나트륨이 발효기의 부식 문제의 원인이 되는 *Cryptocodinium*의 배양배지에서 염화 나트륨 농도를 최소화하기 위한 시도에서, 본 발명자들은 약 4.5g/L NaCl (2.73 g/l 염소이온에 상응함)에서 얻어지는 것과 유사한 DHA 수율을 유지하면서, 염소 이온의 감소 (300 ppm 또는 0.3 g/L 염소 이온으로 감소)를 보충하기 위하여 배양 배지에서 나트륨 및 바람직하게는 칼륨염을 조절함으로써 염화나트륨 농도를 감소시킬 수 있다는 것을 놀랍게도 발견하였다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명자들은 정상 “높은 염소” 배지에서의 성장에 비하여 건조 중량, 지방 함량 또는 DHA 함량에 역효과를 미치지 않고 실질적으로 저하된 염소 농도 (약 0.3g/l 이하의 염소 이온)로 배지에서 *Cryptocodinium*을 성장시키는 배양 조건을 입증하였다. 비교할 만한 DHA 수율을 얻는 것은 단순히 배지에서 염화 나트륨을 다른 나트륨 염으로 대체하는 문제가 아니다. 사실, 다른 나트륨 염 (즉 황산나트륨)으로부터의 동등 량의 나트륨으로 염화 나트륨을 치환하는 것은 높은 염소 조절 사례에 상응하는 DHA 수율을 생기게 하지 않았지만, 배양의 DHA 수율에 추가 감소를 실질적으로 생기게 하였다. 대신에 본 발명자들은 (4.5g/l NaCl 또는 17%의 해수에서 대하여)칼륨 농도가 현저하게 증가하였을 때 최선의 DHA 수율이 얻어진다는 것을 놀랍게도 발견하였다. 예기치 않게, 나트륨 량의 실질적 감소 및 나트륨 농도의 증가는 배지의 염소 농도의 감소를 보충하는데 효과적이었다.

발명의 효과

[0014] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 배양 배지에서 디노피세아에(Dinophyceae) 과의 종속영양생물 미세조류를 배양함으로써 도코사헥사엔산(DHA)을 생산하는 방법을 포함한다. 상기 배지는 약 2 g/l 정도 또는 그 이상의 농도의 염소 이온 및 약 0.25g/l 정도 또는 그 이상의 농도의 칼륨 이온을 포함한다. 이 실시태양에서 미세조류는 7일 배양의 리터당 적어도 약 0.04g DHA를 생산한다. 7일 배양은 일반적으로 약 5×10^6 세포/ml 또는 약 5×10^9 세포/리터를 갖는다. 따라서 7일에 약 0.2 g/l DHA를 갖는 배양은 약 0.04 g DHA/ 10^9 세포를 함유한다. 바람직

한 실시태양에서 미세조류는 *Cryptocodinium*속이다. 더욱 바람직한 미세조류는 *Cryptocodinium cohnii*이다. 바람직하게, 염소이온 농도는 약 1 g/l 정도 또는 그 미만, 바람직하게 약 0.3g/l 정도 또는 그 미만이다. 바람직하게 칼륨 이온은 약 0.4 g/l 정도 또는 그 이상, 및 더욱 바람직하게 약 0.8g/l 정도 또는 그 이상이다. 바람직하게 칼륨 이온 공급원은 황산칼륨이다. 바람직한 실시태양에서 배지는 추가로 나트륨 이온 농도가 약 1 g/l 내지 약 8 g/l이 되도록 나트륨 이온 공급원을 포함한다. 더욱 바람직하게 나트륨 이온은 약 1.5g/l 내지 약 5g/l이다. 바람직한 나트륨 이온 공급원은 황산 나트륨이다. 본 발명에는 이 방법에 의해 생산된 바이오매스(biomass)가 포함된다.

[0015] 또 하나의 실시태양에서 본 발명은 배양 배지에서 디노피세아에과의 종속영양생물 미세조류를 배양함으로써 DHA를 생산하는 방법을 포함한다. 배지는 약 2g/l 정도 또는 그 미만의 농도로 염소 이온, 약 0.25g/l 정도 또는 그 이상의 농도로 칼륨 이온, 및 약 27:1 wt:wt 정도 또는 그 미만의 나트륨:칼륨의 비로 존재하는 나트륨 이온을 포함한다. 이 실시태양에서 미세조류는 7일 배양 리터당 적어도 약 0.2g DHA 또는 0.04g DHA/10⁹ 세포를 생산한다. 바람직한 실시태양에서 미세조류는 *Cryptocodinium*속이다. 더욱 바람직한 미세조류는 *Cryptocodinium cohnii*이다. 바람직하게, 염소이온 농도는 약 1g/l 정도 또는 그 미만, 더욱 바람직하게 약 0.3g/l 정도 또는 그 미만이다. 바람직하게 칼륨 이온은 약 0.4 g/l 정도 또는 그 이상, 및 더욱 바람직하게 약 0.8g/l 정도 또는 그 이상이다. 바람직하게 칼륨 이온 공급원은 황산칼륨이다. 배지는 추가로 나트륨 이온이 칼륨 이온의 중량 27배 (중량) 미만의 비로 배지에 존재하도록(27:1 나트륨:칼륨 wt:wt로 표현됨) 나트륨 이온 공급원을 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 나트륨:칼륨 비는 약 15:1 미만이다. 약 4:1의 나트륨:칼륨 비가 더욱 바람직하다. 바람직한 나트륨 이온 공급원은 황산 나트륨이다. 본 발명에는 이 방법에 의해 생산된 바이오매스가 포함된다.

[0016] 본 발명자들은 DHA를 포함하여, 지질의 성장 및 생산의 상업적으로 실질적 속도를 유지하면서 *Cryptocodinium*이 배지에서 실질적으로 저하된 pH 수준으로 성장시키는 배양 배지 조건 및 균을 확인하였다. 또 하나의 실시태양에서 본 발명은 배양 배지에서 디노피세아에과의 종속영양생물 미세조류를 배양하며, 여기서 상기 배지가 약 6 미만의 pH를 가지며 또한 상기 미세조류가 적어도 약 0.04 g DHA/10⁹ 세포를 생산하는 DHA의 생산방법을 포함한다. 상기 배지는 약 2g/l 정도 또는 그 미만 농도의 염소 이온, 약 0.25 g/l 정도 또는 그 이상의 농도로 칼륨 이온 및 약 27:1 wt:wt 나트륨:칼륨 정도 또는 그 미만의 비로 존재하는 나트륨 이온을 추가로 포함할 수 있다. 이 실시태양에서 미세조류는 *Cryptocodinium* 속이다. 더욱 바람직한 미세조류는 *Cryptocodinium cohnii*이다. 바람직한 실시태양에서 pH는 약 pH 5.5 정도 또는 그 미만이며, 더욱 바람직하게 약 pH 5.0 정도 또는 그 미만이며 또한 더더욱 바람직하게 약 pH 4.5 정도 또는 그 미만이다. 바람직한 실시태양에서 상기 배지는 약 2 g/l 정도 또는 그 미만, 바람직하게 약 1 g/l 정도 또는 그 미만, 더더욱 바람직하게 약 0.3 g/l 정도 또는 그 미만의 염소이온을 추가로 포함한다. 상기 배지는 또한 약 0.25 g/l 정도 또는 그 이상, 약 0.4 g/l 정도 또는 그 이상, 및 더더욱 바람직하게 약 0.8 g/l 정도 또는 그 이상의 농도로 칼륨 이온을 포함한다. 바람직하게 칼륨이온 공급원은 황산 칼륨이다. 바람직한 실시태양에서 상기 배지는 추가로 나트륨 이온 농도가 약 1 g/l 내지 약 8 g/l이 되도록 나트륨 이온 공급원을 포함한다. 더욱 바람직하게 나트륨 이온은 약 1.5g/l 내지 약 5g/l이다. 바람직한 나트륨 이온 공급원은 황산나트륨이다. 본 발명에는 이 방법에 의해 생산된 바이오매스가 포함된다.

[0017] 본 발명은 디노피세아에과의 낮은 pH 내성 종속영양생물 미세조류의 선택방법으로 이 방법은 DHA의 수율이 약 0.04 g DHA/10⁹ 세포 정도 또는 그 이상이 될 때까지 낮은 pH 배지에서 상기 미세조류를 부배양함을 포함한다. 바람직한 실시태양에서 pH는 약 6 정도 또는 그 미만, 약 5 정도 또는 그 미만, 약 4.5 정도 또는 그 미만이다. 본 발명에는 이 방법에 의해 생산된 바이오매스가 포함된다.

[0018] 본 발명의 이들 및 다른 목적, 특징 및 이점은 다음 최선 태양 설명, 도면 및 특허청구범위로부터 명백하게 될 것이다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 pH 6.3 및 3g/l 염소 이온 (pH 6.3 SSM으로 표시)에서 성장된 *C. chonii* 균 T-HF 및 낮은 pH에 적합하고 pH 5 및 1g/l 염소이온 (pH 5.0 LCSSI로 표시)에서 성장된 *C. cohnii* 균 T-HF의 복제를 위해 DHA 수율의 시간 과정을 나타내는 그래프이다.

도 2는 pH 6.3 및 3g/l 염소 이온 (pH 6.3 SSM으로 표시)에서 성장된 *C. chonii* 균 T-HF 및 낮은 pH에 적합하

고 pH 4.5 및 1g/l 염소이온 (pH 5.0 LCSSI로 표시)에서 성장된 *C. cohnii* 균 T-HF의 복제를 위해 DHA 수율의 시간 과정을 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 본 발명은 디노피세아에 과의 해양 미세조류의 성장에 사용되는 높은 염화나트륨 농도에 의해 생긴 발효기 부식의 상술한 문제점을 해결한다. 본 발명자들은 배양 배지에 변형량의 염소 및 칼륨을 사용함으로써, 낮은 염화나트륨 조건하에 DHA의 디노피세아에 과의 해양 미세조류를 상업적으로 생존 가능한 정도로 성장시키고 또한 DHA를 생산하는 배양 배지 성분들을 발견하였다. 더욱 구체적으로, 본 발명자들은 염화나트륨을 비-부식성 농도로 감소시켜 생기는 나트륨의 손실이 배양 배지 중에 칼륨 농도를 증가시킴으로써 적어도 부분적으로 상쇄될 수 있음을 발견하였다.
- [0021] 본 발명은 또한 박테리아의 성장을 동시에 억제하면서 디노피세아에 과의 해양 미세조류를 성장시키는 상술한 문제점을 해결한다. 더욱 구체적으로, 본 발명은 해양 유기균이 낮은 pH에 내성이 있도록 해양 미생물을 배양하는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 낮은 pH에 내성 있는 이러한 미생물의 균주를 제공한다. 본 발명자들에 의해 제공된 낮은 pH-내성 균은 낮은 pH 수준에서 세포 밀도로 성장하여 더욱 중성 pH 수준에서 성장하는 균에 의해 얻어진 것에 상응할 만한 DHA 생산수준을 달성할 수 있다. 이것은 본 발명의 개념이 하기에 상세히 설명하는 바와 같이 다른 생산 유기균 및 다른 원하는 PUFA에 용이하게 적용될 수 있기 때문에 본 발명에 의해 포함된 기술의 일 예에 불과하다.
- [0022] 본 발명의 한 실시태양은 다음 성분들, 즉 약 2g/L 미만의 농도의 염소이온, 및 약 0.25g/L 이상의 농도의 칼륨 이온을 포함하는 배양 배지에서 디노피세아에 과의 종속영양생물 미세조류를 배양하며, 여기서 상기 미세조류가 7-일 배양의 리터당 적어도 약 0.2g의 DHA를 생산하는 도코사헥사엔산 (DHA)의 생산방법을 포함한다. 7일 배양은 일반적으로 약 0.04g DHA/10⁹ 세포에서 생기는 5 x 10⁹ 세포/ml을 갖는다. 바람직한 실시태양에서 종속영양생물 미세조류는 적어도 약 0.04 g DHA/10⁹ 세포, 적어도 약 0.06 g DHA/10⁹ 세포, 적어도 약 0.08 g DHA/10⁹ 세포, 적어도 약 0.10 g DHA/10⁹ 세포, 적어도 약 0.12 g DHA/10⁹ 세포, 적어도 약 0.14 g DHA/10⁹ 세포, 적어도 약 0.16 g DHA/10⁹ 세포, 적어도 약 0.18 g DHA/10⁹ 세포, 적어도 약 0.20 g DHA/10⁹ 세포, 적어도 약 0.22 g DHA/10⁹ 세포, 적어도 약 0.24 g DHA/10⁹ 세포, 적어도 약 0.26 g DHA/10⁹ 세포, 적어도 약 0.28 g DHA/10⁹ 세포, 또는 적어도 약 0.30 g DHA/10⁹ 세포를 생산한다. 여기서 사용되는 배양 배지에서 영양소의 농도는 집중물의 제조와 같은 공정 중의 이전 단계에 걸쳐 수행된 특정한 영양소를 포함하는 배양단계 초기에 배지중의 영양소의 농도를 언급한다.
- [0023] 본 발명에 적합한 미생물은 디노피세아에 (*dinoflagellates*)과의 멤버들을 포함하는 종속영양생물 미세조류를 포함한다. 이런 과의 바람직한 멤버는 *Crypthecoladinium* 속의 멤버이다. *Crypthecoladinium* 속의 바람직한 멤버는 *C. cohnii*이다. *Crypthecoladinium cohnii*는 성장을 위해 감소된 탄소 공급원을 필요로 하는 절대적 종속영양생물이며 또한 DHA가 인식할 만한 양으로 존재하는 유일한 다불포화 지방산인 지방산 프로파일을 함유한다. 적절한 유기균은 천연 환경으로부터 수집을 포함하여, 다수개의 공중이 입수가 가능한 공급원으로부터 유래할 수 있다. 예를 들면, 아메리칸 타입 컬처 컬렉션(ATCC)은 현재 45개의 입수 가능한 *Crypthecoladinium cohnii* 균을 목록하고 있다: ATCC 번호 30021, 30334-30348, 30541-30543, 30555-30557, 30571, 30572, 30772-30775, 30812, 40750, 50050-50060, 및 50297-50300. 여기서 사용되는 특정한 미생물 또는 특정 유형의 유기균은 야생 균, 변종 또는 재조합 유형을 포함한다.
- [0024] 본 발명의 대상이며 또한 이하에 더욱 상세히 설명되는 나트륨, 염소 및 칼륨 농도와는 달리, 본 발명의 배지의 다른 성분들은 상업적으로 실시가능한 수준으로 DHA의 성장 및 생산을 촉진하는 당 업계에 공지된 성분들일 수 있으며 또한 미국특허 제5,130,242호, 미국특허 제5,407,957호, 미국특허 제5,397,591호, 미국특허 제5,492,938호, 및 미국특허 제5,711,983호에 기술된 바와 같은 성분들을 포함한다. 이들 특허는 명세서 전반에 참고로 도입한다. 더욱 구체적으로 탄소 공급원, 예를 들어 글루코오스, 다양한 전분, 당밀, 분쇄 옥수수 등이 사용될 수 있다. 친화성 유기 또는 무기 질소 공급원이 또한 배양 배지에 포함된다. 질소 공급원은 질산염, 우레아, 암모늄염, 아미노산 등을 포함할 수 있다. 친화성 인의 공급원(source of assimilable phosphorous)이 또한 제공될 수 있다. 배지는 또한 단세포 미생물의 종속영양생물 성장을 증진시키는 특정되지 않거나 특정된 화합물들인 미생물 성장인자의 공급원을 함유할 수 있으며 또한 효모 또는 다른 추출물, 토양 추출물 등을 포함할 수 있다. *C. cohnii* 및 관련 유기균의 성장 배지의 구체 예는 예를 들어 지양 및 쉐, 프로세스 생화학 35

(2000) 1205-1209; 지양 및 첸, Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, (1999) Vol.23, 508-513; Vazhappilly and Chen, Journal of the American Oil Chemists Society, (1998) Vol. 75, No. 3 p 393-397에서 발견할 수 있다. 본 발명과 함께 사용하기에 바람직한 배지의 구체 예는 예를 들어 하기 실시예 편에서 발견할 수 있다.

[0025] 본 발명의 배지의 한 태양에서, 염소 이온 농도는 배양물의 리터당 약 2 그램 또는 약 2000ppm 정도 그 미만, 더욱 바람직하게 약 1.9g/l 정도 또는 그 미만, 더욱 바람직하게 약 1.8g/l 정도 또는 그 미만, 더욱 바람직하게 약 1.7g/l 정도 또는 그 미만, 더욱 바람직하게 약 1.6g/l 정도 또는 그 미만, 더욱 바람직하게 약 1.5g/l 정도 또는 그 미만, 더욱 바람직하게 약 1.4g/l 정도 또는 그 미만, 더욱 바람직하게 약 1.3g/l 정도 또는 그 미만, 더욱 바람직하게 약 1.2g/l 정도 또는 그 미만, 더욱 바람직하게 약 1.1g/l 정도 또는 그 미만, 더욱 바람직하게 약 1.0g/l 정도 또는 그 미만, 더욱 바람직하게 약 0.9g/l 정도 또는 그 미만, 더욱 바람직하게 약 0.8g/l 정도 또는 그 미만, 더욱 바람직하게 약 0.7g/l 정도 또는 그 미만, 더욱 바람직하게 약 0.6g/l 정도 또는 그 미만, 더욱 바람직하게 약 0.5g/l 정도 또는 그 미만, 더욱 바람직하게 약 0.4g/l 정도 또는 그 미만, 및 가장 바람직하게 약 0.3g/l 정도 또는 그 미만의 농도로 존재한다. 또 다른 실시태양에서 최소 염소농도는 적어도 약 0.025 g/l, 적어도 약 0.05g/l, 또는 적어도 약 0.1g/l이다. 배지의 염소이온 성분은 바람직하게는 염소 염으로부터 유도되며 이때 바람직한 염은 염화나트륨이다. 배지에서 다른 염소 공급원은 염화나트륨 및 염화 칼슘을 포함한다. 염소 이온의 공급원은 배지에 하나 이상의 염소-함유 화합물을 포함할 수 있으며 또한 배지의 pH를 조절하는데 사용될 수 있는 염산은 물론 $MnCl_2$ 및 $FeCl_3$ 을 포함할 수 있다.

[0026] 본 발명의 배지의 또 하나의 태양에서, 칼륨이온 농도는 약 0.25g/L 초과이다. 칼륨이온은 일반적으로 해수 중에 낮은 농도로 존재하며, 대략 0.38g/l 해수이다. 해양 미세조류의 성장에 대해 당업계에 공지된 배양배지는 해수의 조성을 밀접하게 수반하며, 칼륨이온의 농도는 일반적으로 동일 또는 그 이하이다. 예를 들면 Tuttle 및 Loeblich (1975)는 대략 0.35g/l 칼륨이온과 대등한 9mM KCl을 기술하고 있다. Handbook of Phycological Methods (Janet R. Stein, Ed., Cambridge University Press, 1973)에는 배지중의 칼륨 이온이 대략 0.36g/l 칼륨이온과 대등한 염화칼륨으로서 9.83mM인 것으로 기술되어 있다. 하나의 실시태양에서 본 발명은 약 0.39g/l 이상의 농도로 칼륨 이온을 포함한다. 본 발명자들은 칼륨이온이 역가(threshold level)보다 크면 배양이 광범위한 칼륨이온 농도에서 잘 성장하며 상업적으로 생존 가능한 수준의 DHA를 생기게 하면서, 칼륨이온의 정확한 농도에 비교적 덜 민감하다는 것을 밝혀냈다. 바람직하게, 더 낮은 범위의 칼륨이온 농도는 적어도 약 0.2 g/l, 적어도 약 0.25 g/l, 적어도 약 0.3 g/l, 적어도 약 0.35 g/l, 적어도 약 0.4 g/l, 적어도 약 0.45 g/l, 적어도 약 0.5 g/l, 적어도 약 0.6 g/l, 및 적어도 약 0.7 g/l이다. 바람직하게, 더 높은 범위의 칼륨이온 농도는 최대 약 10 g/l, 최대 약 6 g/l, 최대 약 4 g/l, 최대 약 3 g/l, 최대 약 2.8 g/l, 최대 약 2.6 g/l, 최대 약 2.4 g/l, 최대 약 2.2 g/l, 최대 약 2 g/l, 최대 약 1.9 g/l, 최대 약 1.8 g/l, 최대 약 1.7 g/l, 최대 약 1.6 g/l, 최대 약 1.5 g/l, 및 최대 약 1 g/l이다. 칼륨이온의 가장 바람직한 농도는 약 0.75 g/l, 0.8 g/l, 0.85 g/l, 0.9 g/l 및 0.95 g/l이다. 칼륨이온의 바람직한 범위는 약 0.45 g/l 내지 약 1.5 g/l, 더욱 바람직하게 약 0.5 g/l 내지 약 1.2 g/l, 더욱 바람직하게 약 0.6 g/l 내지 약 1 g/l, 더더욱 바람직하게 약 0.7 g/l 내지 약 0.9 g/l, 및 가장 바람직하게 약 0.8 g/l이다.

[0027] 칼륨이온 공급원은 특히 디노피세아에 과의 세포배양 및 미세조류에 적합한 특성의 칼륨 염으로부터 유도할 수 있다. 칼륨이온은 배지에서 염의 혼합물로부터 유도될 수 있다. 바람직한 칼륨염은 다른 것 중에서 염화칼륨, 황산칼륨, 초산칼륨, 중탄산칼륨, 인산칼륨을 포함한다. 바람직한 칼륨이온 공급원은 황산나트륨이다.

[0028] 본 발명의 한 태양에서 채취시 배양으로부터 DHA 수득량은 본 발명의 배지에서 성장하지 않은 배양으로부터 DHA 수득량보다 더 크다. 하나의 실시태양에서 본 발명의 방법을 사용하여 낮은 염소 농도를 사용한 DHA수율은 7-일 배양의 리터당 적어도 0.2 그램 DHA 또는 $0.04g\ DHA/10^9$ 세포이다.

[0029] 본 발명의 또 하나의 태양에서 배지는 또한 염화나트륨 이외의 나트륨 이온의 추가 공급원을 함유할 수 있다. 본 발명자들은 나트륨 이온농도가 본 발명에 중요하지 않다는 것을 밝혀냈다. 본 발명의 해양 유기균의 배양은 나트륨 이온의 정확한 농도에 비교적 민감하지 않으며, 잘 성장하며 또한 일정 범위의 나트륨 이온 농도에서 비교적 생존 가능한 수준의 DHA를 생기게 한다. 황산나트륨, 탄산나트륨, 탄산수소나트륨, 및 초산나트륨을 포함하여 많은 상이한 나트륨 이온 공급원이 본 발명에 적합하다. 바람직한 추가적인 나트륨 이온 공급원은 황산나트륨이다. 바람직한 실시태양에서 배지는 적어도 약 1g/l 나트륨 이온 내지 약 8g/l 나트륨 이온을 함유한다. 상기 범위의 더 낮은 말단에서, 바람직한 나트륨 이온 농도는 적어도 약 1 g/l, 적어도 약 1.5 g/l, 적어도 약 2 g/l, 및 적어도 약 2.5 g/l이다. 바람직하게, 더 높은 범위의 나트륨이온 농도는 최대 약 15 g/l, 최대 약

12 g/l, 최대 약 10 g/l, 최대 약 9 g/l, 최대 약 8 g/l, 최대 약 7 g/l, 최대 약 6 g/l, 최대 약 5.5 g/l, 최대 약 5 g/l, 최대 약 4.5 g/l, 최대 약 4 g/l이다. 나트륨이온의 가장 바람직한 농도는 약 2.75 g/l, 3 g/l, 3.25 g/l, 3.5 g/l 및 3.75 g/l이다. 나트륨이온의 바람직한 범위는 약 1.5 g/l 내지 약 7.5 g/l, 더욱 바람직하게 약 2.0 g/l 내지 약 6 g/l, 및 더욱 바람직하게 약 2.5 g/l 내지 약 5 g/l이다. 가장 바람직한 실시태양에서 나트륨 이온은 적어도 약 3g/l 내지 약 3.5 g/l이다. 나트륨 이온의 가장 바람직한 농도는 약 3.25 g/l이다. 전술한 바와 같이, 배양물은 정확한 농도의 나트륨에 비교적 민감하지 않다. 따라서 더 높은 농도조차 사용할 수 있다. 그러나 약 8 g/l 이상의 나트륨 농도가 이용되면, 배양 수율은 약간 떨어지기 시작한다.

[0030] 또 하나의 실시태양에서 본 발명은 배양 배지에서 디노피세아에 과의 종속영양생물 미세조류를 배양하여 DHA를 생산하는 방법을 포함한다. 상기 배지는 약 2 g/l 정도 또는 그 미만의 농도의 염소 이온, 약 0.25 g/L 정도 또는 그 이상의 농도의 칼륨 이온; 및 약 27:1 wt:wt 나트륨:칼륨 정도 또는 그 미만의 비율의 나트륨 이온을 포함한다. 이 실시태양에서 미세조류는 7일 배양의 리터당 적어도 약 0.2 g DHA 또는 0.04 g DHA/10⁹ 세포를 생산한다. 이 실시태양에서 상기 배양 배지는 약 27:1 중량:중량 정도 또는 그 미만의 칼륨 이온과 일정 비로 나트륨 이온을 함유한다. 해수에서 나트륨 이온 대 칼륨 이온 비는 대략 27.3:1이다. 다시 말하면 나트륨 이온의량은 칼륨 이온의량보다 약 27.3배 더 높다. 본 발명에서 발명자들은 나트륨 이온에 대하여 칼륨 이온을 증가시키면 배양물로부터 DHA의 수율이 증가하는 것을 발견하였다. 나트륨 이온 대 칼륨 이온의 바람직한 비는 약 27:1 정도 또는 그 미만, 약 25:1 정도 또는 그 미만, 약 23:1 정도 또는 그 미만, 약 21:1 정도 또는 그 미만, 약 19:1 정도 또는 그 미만이다. 더욱 바람직하게는 약 17:1 정도 또는 그 미만, 약 15:1 정도 또는 그 미만, 약 13:1 정도 또는 그 미만, 약 11:1 정도 또는 그 미만이다. 특히 더욱 바람직하게는 약 9:1 정도 또는 그 미만, 약 7:1 정도 또는 그 미만, 또는 약 5:1 정도 또는 그 미만이다. 바람직한 비는 약 4:1이다.

[0031] 또 하나의 실시태양에서 본 발명은 배양 배지에서 디노피세아에 과의 종속영양생물 미세조류를 배양하며, 여기서 상기 배지가 약 6 미만의 pH를 가지며 또한 상기 미세조류가 7일 배양의 리터당 적어도 약 0.2 g DHA 또는 0.04 g DHA/10⁹ 세포를 생산하는 DHA의 생산방법을 포함한다. 바람직한 실시태양에서 pH는 약 5.5 정도 또는 그 미만, 더욱 바람직하게 약 5 정도 또는 그 미만이다. 바람직한 실시태양에서 pH는 약 4.5 정도 또는 그 미만이다. 바람직한 실시태양에서 배지는 약 2 g/L 정도 또는 그 미만, 바람직하게 약 1 g/L 정도 또는 그 미만, 더더욱 바람직하게 약 0.3 g/L 정도 또는 그 미만의 염소 이온 농도를 추가로 포함한다. 상기 배지는 또한 약 0.25 g/l 정도 또는 그 이상, 약 0.4 g/l 정도 또는 그 이상, 및 더더욱 바람직하게 약 0.8 g/l 정도 또는 그 이상의 농도로 칼륨 이온을 포함하는 것이 바람직하다. 바람직하게 칼륨이온 공급원은 황산칼륨이다. 바람직한 실시태양에서 상기 배지는 나트륨 이온 농도가 약 1g/l 내지 약 8g/l이 되도록 나트륨 이온 공급원을 추가로 포함한다. 더욱 바람직하게, 나트륨 이온은 약 1.5g/l 내지 약 5g/l이다. 바람직한 나트륨 이온 공급원은 황산 나트륨이다. 이 실시태양에는 이 방법에 의해 생산된 바이오매스가 포함된다.

[0032] 또 하나의 실시태양에서 본 발명은 디노피세아에 과의 종의 낮은 pH 내성 균의 제조방법 및 이렇게 하여 생산된 균을 포함한다. 이 방법은 배양물이 원하는 양의 DHA를 생산할 때까지 원하는 디노피세아에 종을 부 배양하여 낮은 pH 배지를 제조함을 포함한다. 부배양(subculturing)은 다음 방법으로 수행할 수 있다. 원하는 디노피세아에 종의 접종물은 낮은 pH 배지에 위치시키며 또한 정해진 양의 시간, 바람직하게 7일 성장시킨다. 시간 양은 중요하지 않지만, 균이 성장하기에 노쇄하기 이전에 충분한 시간을 가지도록 선택해야 한다. 배양물의 DHA의 수율을 계산한다. 원하는 양 미만이면 추가의 부배양은 다음 방법으로 수행한다. 새로운 낮은 pH 배지를 준비하여 낮은 pH 경작 배양물로 접종한 다음 적절한 양의 시간 동안 배양한다. 배양물의 DHA의 수율을 계산한다. DHA의 수율이 원하는 양 미만이면 부배양은 DHA의 원하는 수율이 성취될 때까지 반복한다. 내성을 선택하는 바람직한 pH는 약 6 또는 그 이하, 바람직하게 약 5.5 또는 그 이하, 더더욱 바람직하게 약 5 또는 그 이하, 및 가장 바람직하게 약 4.5 또는 그 이하이다. 이 방법을 수행하는 배지는 당업계에 공지된 특정한 배양 배지이며 원하는 수준으로 조절된 pH를 갖는다. 부배양을 수행하는 바람직한 배지는 실시예 1에 기술된 배지이다.

[0033] 본 발명은 또한 발명의 방법 중의 하나에 의해 생산된 바이오매스를 포함한다.

[0034] 유기균에 부합하는 배양조건 및 본 발명의 방법은 당업계에 공지된 방법으로 수행할 수 있으며 또한 미국특허 5,130,242호, 미국특허 5,407,957호, 미국특허 5,397,591호, 미국특허 5,492,938호 및 미국특허 5,711,983호에 기술된 방법을 포함하며, 또한 최적조건은 당업자들에 의해 용이하게 결정할 수 있다. 요컨대, 배양은 적절한 발효기, 바람직하게 교반 탱크 발효기 또는 에어 리프트 발효기에서 수행할 수 있으며, 이는 미생물에 산소 공급원을 제공한다. 미생물의 교반은 용해된 산소농도가 배양물의 성장 및 DHA의 생산을 지지하는데 충분하면서, 교반이 미생물을 절단 또는 그렇지 않으면 손상시키지 않는 수준에서 유지시켜야 한다. 바람직한 수준의 용해

산소는 포화 농도의 적어도 10%이다. 더욱 바람직하게, 용해산소의 농도는 약 10% 내지 약 50%의 공기 포화 농도로 유지된다.

[0035] 배양은 특정한 생명-지속 온도에서 수행할 수 있다. 일반적으로 미생물은 약 15℃ 내지 약 34℃ 범위의 온도에서 성장할 것이다. 바람직하게 온도는 약 20℃ 내지 약 28℃에서 유지된다.

[0036] 유기균은 원심분리, 응집 또는 여과와 같이 당 업계의 기술자에게 알려진 통상적인 수단으로 채취할 수 있으며 또한 곧바로 가공처리하거나 또는 추가의 가공을 위해 건조할 수 있다. 각각의 경우에 지질을 추출할 수 있다. 여기서 사용되는 용어 “지질”은 인지질, 유리 지방산, 지방산 에스테르, 트리아실글리세롤, 디아실글리세라이드, 모노아실글리세라이드, 리소포스포리피드, 비누, 포스파타이드, 스테롤 및 스테롤 에스테르, 카로테노이드, 크산토피 (예, 옥시카로테노이드), 탄화수소, 및 기타 당업자에게 알려진 지질을 포함한다. 당업자에게 잘 이해되는 바와 같이, 본 발명에서 언급된 DHA는 이들 다양한 지질 형태일 수 있으며, 또한 유리 지방산으로 제한되지 않는다. 상이한 유형의 지질성분은 사용되는 추출기술에 따라 추출할 수 있다. 지질은 유효한 량의 용매로 추출할 수 있다. 적절한 용매는 당업자들에 의해 결정할 수 있다. 극성 지질 (예, 인지질)은 일반적으로 극성 용매 (예, 클로로포름/메탄올)로 추출하며 또한 중성지질 (예, 트리글리세롤)은 일반적으로 비극성 용매 (예, 헥산)으로 추출한다. 바람직한 용매는 순수 헥산이다. 헥산 대 건조 바이오매스의 적절한 비는 건조 바이오매스의 킬로그램당 약 4 리터의 헥산이다. 헥산은 바람직하게 약 50℃의 온도에서 약 2시간 동안 교반 반응용기 중에 바이오매스와 함께 혼합한다. 혼합 후, 바이오매스는 여과하며 오일을 함유하는 헥산으로부터 분리한다. 헥산은 당업자들에게 공지된 증류기술에 의해 오일로부터 제거한다. 통상적인 지유증자 가공처리 장치는 여과, 분리 및 증류를 수행하는데 적합하다. 당업자들에게 공지된 추가적인 가공처리 단계는 특별한 적용에 필요하거나 적합한 경우 수행할 수 있다. 지질 회수의 다른 방법은 여기에 참고로 소개되는 다음 문헌들에 기술되어 있다: “오일 및 극성 지질-함유 순수 원료 물질의 분획방법”이란 명칭의 PCT공보 WO 0176715호, “알코올 및 원심분리를 사용하는 오일 및 지질-함유 순수 원료물질의 분획방법”이란 명칭의 PCT 공보 WO 0176385호, “무용매 추출방법”이란 명칭의 PCT공보 WO 0153512호.

[0037] 본 발명은 구체적인 유기물 및 방법에 대해 기술하면서 당업계의 통상의 기술자에게 적당히 입수할 수 있는 바와 같이 모든 이러한 치환, 변형 및 최적화를 포함한 여기에 기술된 방법에 따라 입수 가능하고 유용한 모든 방법 및 균주를 포함하는 것으로 의도된다. 다음 실시예 및 시험결과는 예시 목적으로 제공되며 또한 발명의 범위를 제한하는 의도가 아니다.

[0038] [실시예]

[0039] 실시예 1

[0040] 이 실시예는 4.5g/l NaCl로 표준 스크린 배지 (SSM)의 제조를 기술한다. 배지를 제조하기 위해, 제1 단계는 표 1에 나탄낸 바와 같이 최종 목적 용적의 90%의 증류수에 다음 화합물들을 첨가함을 포함한다. 모든 화합물은 시그마 알드리치, 세이트 루이스, MO에서 시판중이다.

표 1

[0041] 오토클레이브 전에 배지의 양 및 최종 농도

화합물	최종농도	첨가된 염소 이온 량 (g/l)	첨가된 칼륨 이온 량 (g/l)	첨가된 나트륨 이온 량 (g/l)
CaCl ₂ -2H ₂ O ¹	0.3 g/l	0.09		
MgSO ₄ -7H ₂ O	1.25 g/l			
NaCl	4.5 g/l	3		1.5
MES	10.7 g/l			
MSG	1.5 g/l			
타스톤154	0.5 g/l			
KH ₂ PO ₄	0.014 g/l		.004	
KCl	0.14 g/l	0.067	0.073	
CuSO ₄ -5H ₂ O	0.15 X 10 ⁻³ g/l			
CoCl ₂ -6H ₂ O	0.3 X 10 ⁻³ g/l	무시		

H ₃ BO ₃	10 X 10 ⁻³ g/l			
MnCl ₂ ·4H ₂ O	4.5 X 10 ⁻³ g/l	무시		
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.3 X 10 ⁻³ g/l			
NaOH (pH 6.3으로 조절)	1.16 g/l			0.67
FeCl ₂ ²	6 X 10 ⁻³ g/ml	무시		
티아민 ³	1 X 10 ⁻³ g/l			
바이오틴 ⁴	2 X 10 ⁻⁶ g/l			
글루코오스 ⁴	50 g/l			
각 이온의 합계		3.16	0.08	2.17

¹염화칼슘 이수화물은 28.7% 염화물과 함께 244g/mol이다.

²별개로 오토클레이브 되고 배지 포스트-오토클레이브에 멸균방식으로 첨가된 저장용액; 2주마다 새로 만듦.

³0.2 마이크론 여과기를 통해 멸균되고 4℃에서 암실에 저장된 저장용액. 배지 포스트-오토클레이브에 멸균방식으로 첨가됨.

⁴별개로 오토클레이브 된 저장용액. 배지 포스트-오토클레이브에 저장방식으로 첨가됨.

멸균 수로 오토클레이브 된 배지를 100% 용적까지 만든다. 스크린 실험을 위해, 35ml의 SSM 배지는 멸균 250ml 엘렌메이어 플라스크에 첨가한다. 1 x 10⁵ 세포/ml의 초기 세포농도에 대해 플라스크 마다 1ml의 접종물을 첨가한다. 접종물은 5-6일 된 배양물이다. 배양물은 회전 135rpm의 회전 교반기 상에 26.5℃에서 성장한다.

실시예 2

이 실시예는 1.41 g/l NaCl로 1000 ppm 염소이온 스크린 배지 (SSM)의 제조를 기술한다 (이는 염화칼슘 및 염화칼륨과 함께 대략 1000ppm, 1g/l 염소 이온을 생성한다). 배지를 제조하기 위해, 제1 단계는 표 2에 나타낸 바와 같이 최종 목적 용적의 90%의 탈이온 증류수에 다음 화합물들을 첨가함을 포함한다. 모든 화합물은 시그마알드리치, 세이트 루이스, MO에서 시판중이다.

표 2

오토클레이브 전에 배지의 양 및 최종 농도

화합물	최종농도	첨가된 염소이온 량 (g/l)	첨가된 칼륨이온 량 (g/l)	첨가된 나트륨 이 온 량 (g/l)
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.3 g/l	0.09		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.25 g/l			
NaCl	1.41 g/l	0.85		0.47
MES	10.7 g/l			
MSG	1.5 g/l			
타스톤154	0.5 g/l			
KH ₂ PO ₄	0.014 g/l		0.004	
KCl	0.14 g/l	0.067	0.073	
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.15 X 10 ⁻³ g/l			
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.3 X 10 ⁻³ g/l	무시		
H ₃ BO ₃	10 X 10 ⁻³ g/l			
MnCl ₂ ·4H ₂ O	4.5 X 10 ⁻³ g/l	무시		
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.3 X 10 ⁻³ g/l			

NaOH (pH 6.3으로 조절)	1.6 g/l			0.67
FeCl ₂ ¹	6 X 10 ⁻³ g/ml	무시		
티아민 ²	1 X 10 ⁻³ g/l			
바이오틴 ²	2 X 10 ⁻⁶ g/l			
글루코오스 ³	50 g/l			
각 이온의 합계		1.00	0.08	1.14

¹ 별개로 오토클레이브 되고 배지 포스트-오토클레이브에 멸균방식으로 첨가된 저장용액; 2주마다 새로 만듦.

² 0.2 마이크론 여과기를 통해 멸균되고 4℃에서 암실에 저장된 저장용액. 배지 포스트-오토클레이브에 멸균방식으로 첨가됨.

³ 별개로 오토클레이브 된 저장용액. 배지 포스트-오토클레이브에 저장방식으로 첨가됨.

오토클레이브 배지를 멸균수로 100% 용적까지 만든다. 스크린 실험을 위해, 35ml의 SSM 배지는 멸균 250ml 엘렌 베이어 플라스크에 첨가한다. 1 x 10⁵ 세포/ml의 초기 세포 농도에 대해 플라스크 마다 1ml의 집종물을 첨가한다. 집종물은 5-6일 된 배양물이다. 배양물은 회전 135rpm의 회전 교반기 상에 26.5℃에서 성장한다.

실시예 3

이 실시예는 0.211g/l NaCl로 300ppm 염소이온 스크린 배지(SSM)의 제조를 기술한다 (이는 염화칼슘 및 염화칼륨과 함께 0.3 g/l 염소이온을 생성한다). 배지를 제조하기 위해, 제1 단계는 표 3에 나타난 바와 같이 최종 목적 용적의 90%의 탈이온 증류수에 다음 화합물들을 첨가함을 포함한다. 모든 화합물은 시그마 알드리치, 세이트 루이스, MO에서 시판중이다.

표 3

오토클레이브 전에 배지의 양 및 최종 농도

화합물	최종농도	첨가된 염소이온 량 (g/l)	첨가된 칼륨이온 량 (g/l)	첨가된 나트륨 이 온 량 (g/l)
CaCl ₂ -2H ₂ O	0.3 g/l	0.09		
MgSO ₄ -7H ₂ O	1.25 g/l			
NaCl	0.211 g/l	0.13		0.07
MES	10.7 g/l			
MSG	1.5 g/l			
타스톤154	0.5 g/l			
KH ₂ PO ₄	0.014 g/l		0.004	
KCl	0.14 g/l	0.067	0.073	
CuSO ₄ -5H ₂ O	0.15 X 10 ⁻³ g/l			
CoCl ₂ -6H ₂ O	0.3 X 10 ⁻³ g/l	무시		
H ₃ BO ₃	10 X 10 ⁻³ g/l			
MnCl ₂ -4H ₂ O	4.5 X 10 ⁻³ g/l	무시		
ZnSO ₄ -7H ₂ O	0.3 X 10 ⁻³ g/l			
NaOH (pH 6.3으로 조절)	1.16 g/l			0.67
FeCl ₂ ¹	6 X 10 ⁻³ g/ml	무시		
티아민 ²	1 X 10 ⁻³ g/l			
바이오틴 ²	2 X 10 ⁻⁶ g/l			
글루코오스 ³	50 g/l			
각 이온의 합계		0.30	0.08	0.74

- [0057] ¹별개로 오토클레이브 되고 배지 포스트-오토클레이브에 멸균방식으로 첨가된 저장용액; 2주마다 새로 만듦.
- [0058] ²0.2 마이크론 여과기를 통해 멸균되고 4℃에서 암실에 저장된 저장용액. 배지 포스트-오토클레이브에 멸균방식으로 첨가됨.
- [0059] ³별개로 오토클레이브 된 저장용액. 배지 포스트-오토클레이브에 저장방식으로 첨가됨.
- [0060] 오토클레이브 배지를 멸균수로 100% 용적까지 만든다. 스크린 실험을 위해, 35ml의 SSM 배지는 멸균 250ml 엘렌메이어 플라스크에 첨가한다. 1×10^5 세포/ml의 초기 세포 농도에 대해 플라스크 마다 1ml의 접종물을 첨가한다. 접종물은 5-6일 된 배양물이다. 배양물은 회전 135rpm의 회전 교반기 상에 26.5℃에서 성장한다.
- [0061] 실시예 4
- [0062] 이 실시예는 pH 6.3 SSM에서 *Cryptocodinium cohnii*의 성장 및 채취 절차를 기술한다.
- [0063] SSM 배지는 시험하는 배지에 따라 실시예 1-3의 하나에 기술되어 있다. 추가적인 배지 성분을 제조하고 실시예 1-3에 기술된 바와 같이 배지에 첨가하였다. 채취 전의 모든 단계는 멸균 조건에서 수행하였다.
- [0064] 접종 배양물을 제조하기 위하여 다음 절차를 사용하였다. 250ml의 엘렌메이어 플라스크에 49ml의 SSM (실시예 1에 기술됨)은 250ml 엘렌메이어 플라스크에 첨가하였다. *C. cohnii* 균주 T-HF의 5일 된 배양물 1ml (균주 T-HF는 반복적으로 배양된 유기균 ATCC 40750으로 확인함)을 첨가하였다. 배양 플라스크는 빛이 없는 27℃ 배양기에서 135rpm으로 회전하는 교반기에 위치시켰다. 성장 3일 후, 배양물은 멸균 후드에 이동시키고 1ml을 제거하고 코울터 카운터(Coulter Counter)를 사용하여 계수하였다 (Coulter Z2 입자 계수 및 크기 분석기, 벡크만 코울터 회사에서 입수). 세포 계수는 1.0×10^5 세포/ml의 세포밀도에서 신규 50ml 배양을 개시하는데 사용해야 하는 접종배양물의 양을 계산하는데 사용된다.
- [0065] 상이한 매체 성분을 시험하기 위하여 적절한 배지는 하기 기술된 바와 같이 제조하며 멸균 250 ml 엘렌메이어 플라스크에 주입한다. 앞서 계산된 접종물의 양은 엘렌메이어 플라스크에서 제조된 배지를 함유하는 배양 플라스크 내로 옮긴다. 배양 플라스크는 빛이 없는 27℃ 배양기에서 135rpm으로 회전하는 교반기에 위치시켰다. 성장의 7일 후 배양물은 다음과 같이 채취하였다.
- [0066] 50ml 원심 튜브(VWR Scientific으로부터 입수)을 각 배양마다 라벨하고 증량하였다. 또 하나의 원심분리 튜브를 각 배양마다 라벨 하였지만 증량하지 않았다. 이어서 배양물을 라벨된 50ml 튜브에 부었다. 용적을 기록하고 세포 계수를 코울터 Z2 입자 계수 및 크기 분석기로 수행하였다. pH를 측정하였다.
- [0067] 배양물의 절반을 용기 증량 50ml 튜브에 붓고 이소프로필 러빙 알콜 (IPA)의 70% 용액을 튜브 속의 총 용적이 50ml이 되도록 첨가하였다. 배양물은 튜브를 2회 내지 3회 진도시켜서 혼합하였다. 이어서 배양물은 소르발 제너럴 퍼포스 RC-3 원심분리기를 사용하여 4000rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 상등액을 부어 제거하였다. 배양물의 다른 절반은 펠렛의 상부에 붓고 IPA의 70% 용액으로 시작하여 단계를 반복하였다. 이어서 펠렛을 다음 절차를 사용하여 39% IPA로 2회 세척하였다: 세포 펠렛에 35mL 39% IPA를 첨가하고; 10초간 완전 속도로 관(VWR Scientific으로부터 보르텍스 게니에-2를 사용함)을 와동하고; 수집 후, 펠렛은 적어도 48시간 냉동 건조하였다.
- [0068] 펠렛(바이오매스)를 함유하는 튜브를 증량하고 바이오매스의 건조중량을 계산하였다. 건조중량은 다음과 같이 계산하였다: 바이오매스를 함유하는 튜브의 중량 마이너스 튜브의 포장용기 중량을 측정함. 이 수를 채취시 배양물의 기록 값으로 나눔, 1000으로 나눔.
- [0069] 지방산 조성(및 %DHA)은 모리슨 및 스미스, “불화붕소-메탄올로 지질로부터 지방산 메틸에스테르 및 디메틸 아세탈의 제조”, Vo. 5, 1964에 기술된 절차에 따라 결정할 수 있으며, 또한 American Oil Chemist's Society Official Methods는 해수 오일중에 장쇄 지방산 및 에이코사펜타엔산(EPA) 및 DHA를 정량하는데 사용하였다. 요컨대, 시료는 표준량의 오일 (내부 표준)과 혼합하고, 0.5N 메탄올 수산화 나트륨으로 검화하고, 삼불화 붕소/메탄올로 유도하였다. 지방산 메틸 에스테르를 추출하고 발염 이온화 검출기로 가스 크로마토그래피 상에서 분석하였다 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m Restek FAMEWAX#12497 칼럼을 사용하여 휴렛 팩커드 5890 시리즈 II 플러스 기체 크로마토그래피).

[0070] 실시예 5

[0071] 이 실시예는 선행기술 배지를 사용하여 낮은 NaCl 농도에서 *C. cohnii*의 성장 및 DHA의 생산을 기술한다.

[0072] NaCl을 함유하지 않는 1리터의 SSM을 만들어 오토클레이브 하였다. 4주의 농축 NaCl을 제조하였다 (135g/l, 90g/l, 및 22.5g/l). 48.75ml 의 SSM 마이너스 NaCl 배지 및 1.25ml의 근사 NaCl 주를 함유하는 각각의 교반 플라스크에 첨가하였다. 두 개의 대조군을 고정하였다: 실시예 1에 기술된 바와 같은 정상 SSM을 사용하는 4.5g/l NaCl, 및 첨가된 NaCl 없이 SSM을 사용하는 NaCl 없음. 각각의 NaCl 농도의 복제물을 사용하였다.

[0073] 성장 및 채취는 실시예 4에 기술된 바와 같이 수행하였다. 표 5는 이 실시예의 결과를 기술한다. 모든 번호는 두 가지 배양물의 평균으로 주어진다.

표 5

[0074] 감소 량의 NaCl을 함유하는 SSM에서 성장된 *C. cohnii*에 대한 바이오매스, % DHA, % 지방, 및 DHA 수율

g/l NaCl	g/l 염소이온 ¹	바이오매스 건조중량 g/l	지방내의 %DHA (wt/wt)	바이오매스내의 %지방 (wt/wt)
4.5	2.73	3.53	51.63	52.45
3.38	2.05	3.66	51.55	47.83
2.25	1.37	3.85	52.19	48.40
1.73	0.68	2.73	54.65	54.59
0.56	0.34	2.70	55.48	48.81
0	0	1.99	51.00	34.19

[0075] ¹염화나트륨만으로부터 염소이온의 량 (0.20g/l)을 반영함. 실시예 1-3 참조

[0076] 표 5는 감소 량의 NaCl을 함유하는 SSM중에 성장된 *C. cohnii*에 대한 바이오매스 수율, % 지방, 및 DHA 수율을 나타낸다. 배양물 내에 첨가된 NaCl의 량이 감소함에 따라, 바이오매스 수율 및 지방 농도는 감소하여 감소된 수율의 DHA를 생성한다.

[0077] 실시예 6

[0078] 이 실시예는 실시예 1에 기술된 배양 배지에서 4.5g/l NaCl로 얻어진 DHA의 수율을 기술한다.

[0079] 배양물은 실시예 4에 기술된 바와 같이 성장시켰다. 표 6은 이 실시예의 결과를 나타낸다.

표 6

[0080] 실시예 1의 SSM에서 성장된 *C. cohnii*에 대한 바이오매스, % DHA, % 지방, 및 DHA 수율

(g/l) 염화나트륨	(g/l) 황산나트륨	(g/l) 염소이온 ¹	(g/l) 나트륨이온	지방중 %DHA (wt/wt)	바이오매스중 %지방 (wt/wt)	바이오매스 건조중량 (g/l)
4.5g/l		2.73	1.77	53.9	65.03	3.1

[0081] ¹염화나트륨만으로부터 염소이온의 량을 반영함.

[0082] 실시예 7

[0083] *이 실시예는 황산칼륨 및 황산 나트륨 형태로 다양한 농도의 칼륨 이온 및 나트륨 이온을 사용하여 낮은 염소 배지에서 *C. cohnii*의 성장 및 DHA의 생산을 기술한다.

[0084] 낮은 염소 SSM은 0.18g/l 초산칼슘을 사용하며 염화칼슘 및 염화칼륨을 생략하여 실시예 3에 기술된 방법으로 제조하였다. 0.16 g/l, 0.80 g/l, 1.6 g/l, 3.2 g/l, 및 4.8 g/l의 K₂SO₄ 농도의 모든 가능한 결합물은 두 개의 치수 매트릭스를 사용하여 4.9 g/l, 9.8 g/l, 14.7 g/l, 19.6 g/l 및 24.5 g/l의 Na₂SO₄ 농도에 대해 시험하였다. 모든 배양물은 실시예 4에 기술된 바와 같이 성장시켰다. 이 결과는 표 7에 나타낸다.

표 7

[0085] 변화하는 농도의 황산칼륨 및 황산나트륨으로 배지중에 성장된 *C. cohnii*에 대한 바이오매스, % DHA, % 지방, 및 DHA 수율의 비교

플라스크	g/L K ₂ SO ₄	g/L Na ₂ SO ₄	나트륨 이온 ¹ (g/l)	칼륨 이온(g/l)	DW g/L	지방내의 %DHA (wt/wt)	바이오매스내의 %지방(wt/wt)
1	0.16	4.90	1.77	0.07	2.55	57.97	60.80
2	0.16	9.80	3.35	0.07	1.53	52.39	41.45
3	0.16	14.70	4.93	0.07	-	-	-
4	0.16	19.60	6.53	0.07	0.75	42.88	13.28
5	0.16	24.50	8.11	0.07	0.71	41.46	12.11
6	0.80	4.90	1.77	0.36	3.79	56.76	63.19
7	0.80	9.80	3.35	0.36	4.03	55.11	64.96
8	0.80	14.70	4.93	0.36	3.66	55.14	64.39
9	0.80	19.60	6.52	0.36	3.07	56.88	58.12
10	0.80	24.50	8.11	0.36	2.91	57.37	53.65
11	1.60	4.90	1.77	0.72	3.74	55.90	63.46
12	1.60	9.80	3.35	0.72	3.83	55.00	65.43
13	1.60	14.70	4.93	0.72	3.49	56.48	60.09
14	1.60	19.60	6.53	0.72	3.18	54.71	54.92
15	1.60	24.50	8.11	0.72	2.83	54.82	49.02
16	3.20	4.90	1.77	1.44	3.51	54.42	63.99
17	3.20	9.80	3.35	1.44	3.36	55.40	61.12
18	3.20	14.70	4.93	1.44	3.40	55.61	59.34
19	3.20	19.60	6.53	1.44	3.07	57.07	59.44
20	3.20	24.50	8.11	1.44	2.77	57.00	57.07
21	4.80	4.90	1.77	2.15	2.82	54.94	57.43
22	4.80	9.80	3.35	2.15	2.81	53.97	58.12
23	4.80	14.70	4.93	2.15	2.94	54.26	58.75
24	4.80	19.60	6.52	2.15	2.82	55.53	56.88
25	4.80	24.50	8.11	2.15	2.50	57.02	53.00

[0086] ¹ 0.45 g/l 염화나트륨 또는 0.18g/l 나트륨 이온에 의해 첨가된 나트륨 이온을 포함한다.

[0087] 표 7에 나타난 결과는 증가된 칼륨 농도가 높은 염소 농도에서 얻어진 것과 비교할 수 있을 정도로 *C. cohnii*의 성장 및 수율의 원인이 되는 것을 지적하고 있다. 이 실시예에서 개선효과는 시험된 제2차 최저 농도인 0.8 g/l 황산나트륨에서 나타났으며, 그 후에 황산칼륨의 량에 비교적 민감하지 않았다. 시험된 황산칼륨의 최고농도 즉 4.8g/l에서는 수율의 약간 감소가 나타났다. 성장 및 DHA 수율은 또한 사용된 황산나트륨의 량에 비교적 민감하지 않은 것으로 나타났다. 그러나 성장 및 수율은 약 19.6 g/l 황산나트륨에서 출발하여, 증가하는 량의 황산나트륨이 사용되기 때문에 약간 떨어졌다. g/L로 DHA의 량을 기본으로 최선 결함은 (실시에 3에 기술된 바와 같은) 정상 낮은 염소-SSM 상에서 칼륨 5x 증가 및 나트륨 2x 증가를 나타내는 0.8 g/L K₂SO₄ 및 9.8 g/L Na₂SO₄; 또한 (실시에 3에 기술된) 정상 낮은 염소-SSM에 대해 칼륨 5x 증가 및 나트륨 2x 증가를 나타내는 1.6 g/L K₂SO₄ 및 9.8 g/L Na₂SO₄를 사용하는 것이다.

[0088] 실시예 8

[0089] 이 실시예는 일정 범위의 황산칼륨, 0.32g/l, 0.64 g/l, 0.96 g/l, 1.28 g/l, 1.60 g/l 및 1.9 g/l, 및 황산나트륨 4.9g/l 및 9.8g/l을 함유하는 배지를 사용하여 *C. cohnii*의 성장 및 DHA의 생산의 개선을 입증한다.

[0090] 낮은 염소 SSM은 실시예7에 기술된 방법으로 제조하였으며 또한 배양물은 실시예 4에 기술된 바와 같이 성장시켰다. 그 결과는 표 8에 나타난다.

표 8

[0091] 변하는 량의 황산칼륨 및 황산나트륨으로 배지중에 성장된 *C. cohnii*에 대해 얻어진 바이오매스, % DHA, % 지

방, 및 DHA 수율의 비교

플라스크	g/L K ₂ SO ₄	g/L Na ₂ SO ₄	DW g/L	지방내의 %DHA (wt/wt)	바이오매스내의 % 지방 (wt/wt)	나트륨 이온 ¹ (g/l)	칼륨이온 (g/l)
1	0.32	4.90	3.22	57.76	75.22	1.77	0.14
2	0.32	9.80	3.05	57.61	66.15	3.35	0.14
3	0.64	4.90	3.49	58.66	61.45	1.77	0.29
4	0.64	9.80	3.47	58.50	63.22	3.35	0.29
5	0.96	4.90	3.43	58.45	59.98	1.77	0.43
6	0.96	9.80	3.66	51.91	58.03	3.35	0.43
7	1.28	4.90	3.51	58.72	58.67	1.77	0.57
8	1.28	9.80	3.67	56.93	75.09	3.35	0.57
9	1.60	4.90	3.32	57.16	65.76	1.77	0.72
10	1.60	9.80	3.57	56.89	62.11	3.35	0.72
11	1.90	4.90	3.36	56.15	59.95	1.77	0.85
12	1.90	9.80	3.54	54.74	60.42	3.35	0.085

[0092] ¹0.45 g/l 염화나트륨에 첨가된 나트륨 이온 또는 0.18g/l 나트륨 이온을 포함함.

[0093] 표 8에 나타난 결과는 최적 DHA 수율이 1.28 g/L K₂SO₄ 및 9.8 g/L Na₂SO₄ 의 농도에서 발생함을 보여주었다. 표 8에 나타난 결과는 추가의 칼륨에 대한 영향이 0.32g/l 정도 낮은 농도의 황산칼륨에서 볼 수 있으며 또한 1.90g/l를 통하여 비교적 일정하게 나타남을 지적한다. 성장 및 수율은 4.9g/l 또는 9.8g/l의 황산나트륨에 대해 비교적 민감하지 않다.

[0094] 실시예 9

[0095] 다음 실시예는 pH 5에서 성장하기에 적합한 *C. cohnii*를 배양 함을 기술한다.

[0096] *C. cohnii* 균주 T-HF는 배양 개시 시 배지의 pH가 pH 5인 것을 제외하고는 실시예 1에 기술된 배지 중에서 실시예 4에 기술된 방법으로 교반 플라스크에서 배양하였다. 7일 후, 배양으로부터 접종물은 동일 조건하에 pH 7에서 새로운 배양을 개시하는데 사용하였다. 초기에 pH 5에서 성장은 느리지만 여러 번 이동 후에 DHA 수율이 증가하기 시작했으며 또한 시간 경과에 따라 pH 6.3에서 성장된 배양으로부터 나타난 수율에 근접하여 낮은 pH 균주를 생성하였다. 도 1 참조. 7일 성장기간의 종료시에 배양물의 pH는 5.4인 것으로 나타났다. 완충제 시트레이트, 말레이트, 아세테이트 및 락테이트를 사용하는 균에 적합한 시도들은 균주 T-HF에 대한 완충제 독성효과로 인하여 성공적이지 못하였다.

[0097] 이어서 낮은 pH 균주는 상술한 pH 5 배지에서 성장했지만, pH는 5.0으로 유지했다. 낮은 pH 적합 균주는 pH 5 및 pH 5.4에서 동등하게 성장했다.

[0098] 실시예 10

[0099] 다음 실시예는 pH 6.3 및 2730 ppm 염소이온 배지에서 성장된 *C. cohnii* 균주 T-HF 및 pH 5 및 1000 ppm 염소이온 배지에서 낮은 pH 균주로부터 DHA 수율의 비교를 기술한다.

[0100] *C. cohnii* 균주 T-HF는 실시예 1에 기술된 바와 같은 배지에서 실시예 4에 기술된 바와 같이 성장시켰다. *C. cohnii* 균주는 첨가된 황산칼륨 및 황산나트륨으로 실시예 2에 기술된 바와 같은 낮은 염소 배지에서 성장시켰다. 각각의 실험은 두 번 수행하였으며 또한 모든 플라스크는 DHA 수율의 동력학을 결정하기 위해 매일 채취하여 DHA 수율의 동력학을 결정하였다. 그 결과는 도 1에 나타난다. 도 1은 DHA 수율의 동력학이 두 개의 상이한 배지 조건에서 거의 동일함을 나타낸다.

[0101] 실시예 11

[0102] 다음 실시예는 *C. cohnii* 균주 T-HF를 2730ppm 염소이온 배지에서 pH 4.5에서 성장에 적합하게 하기 위한 시도들을 기술한다.

[0103] *C. cohnii* 균주 T-HF는 배지 중에 일정농도의 유기 질소를 유지시키면서 배지를 pH 4.5로 조절하고 MSG의 절반을 라이신으로 대체하는 것을 제외하고는 실시예 10에 기술된 방법으로 성장시켰다.

[0104] 배양을 반복한 후에, pH 5 또는 pH 6.3에서 나타난 수율의 약 3분의 1의 DHA 수율이 얻어졌다.

- [0105] 실시예 12
- [0106] 다음 실시예는 칼륨 농도를 조절하여 pH 4.5에서 DHA 수율 및 *C. cohnii* 성장조건을 정의하기 위한 시도들을 기술한다.
- [0107] A. 계승실험은 pH 4.5에서 2.73 g/l 염소 이온에서 수행하여 (0.16g/l 내지 3.2g/l)의 효과를 평가하였다. 그 결과는 더 높은 농도의 칼륨 이온이 실시예 1에 기술된 배지로 pH 6.3에서 *C. cohnii*에 대해 얻어진 수율의 대략 삼분의 이로 증가함을 보여주었다.
- [0108] B. 계승실험은 염소이온 농도가 1.0 g/l에서 일정하게 유지하는 것을 제외하고는 상기 파트 A에 기술된 방법으로 수행하였다. 그 결과는 더 높은 농도의 칼륨 이온이 실시예 1에 기술된 배지로 pH 6.3에서 *C. cohnii*에 대해 얻어진 수율의 대략 삼분의 이로 DHA 수율을 증가함을 보여주었다. (상기 파트 A에 기술된) 2.73 g/l 염소이온 및 1.0 g/l 염소이온에서 얻어진 DHA 수율은 비교할 만하였다.
- [0109] 실시예 13
- [0110] 이 실시예는 실시예 12에 기술된 pH 4.5 균주 및 pH 6.3, 1.0 g/L 염소이온에서 균주 T-HF를 사용하여 얻어진 DHA의 수율을 비교하는 시간 경과 실험을 기술한다.
- [0111] 실시예 12의 pH 4.5는 실시예 4에 기술된 방법 다음에 교반 플라스크에서 표 9에 명시된 바와 같은 낮은 염소, pH 4.5 배지에서 성장시켰다. *C. cohnii* 균주 T-HF는 실시예 1에 기술된 배지를 사용하여 실시예 4에 기술된 방법으로 성장시켰다. pH 4.5 실험의 접종물은 pH 4.5에서 제조하였으며 또한 접종물의량은 pH 4.5에서 세포의 클럼핑으로 인하여 평가하였다.

표 9

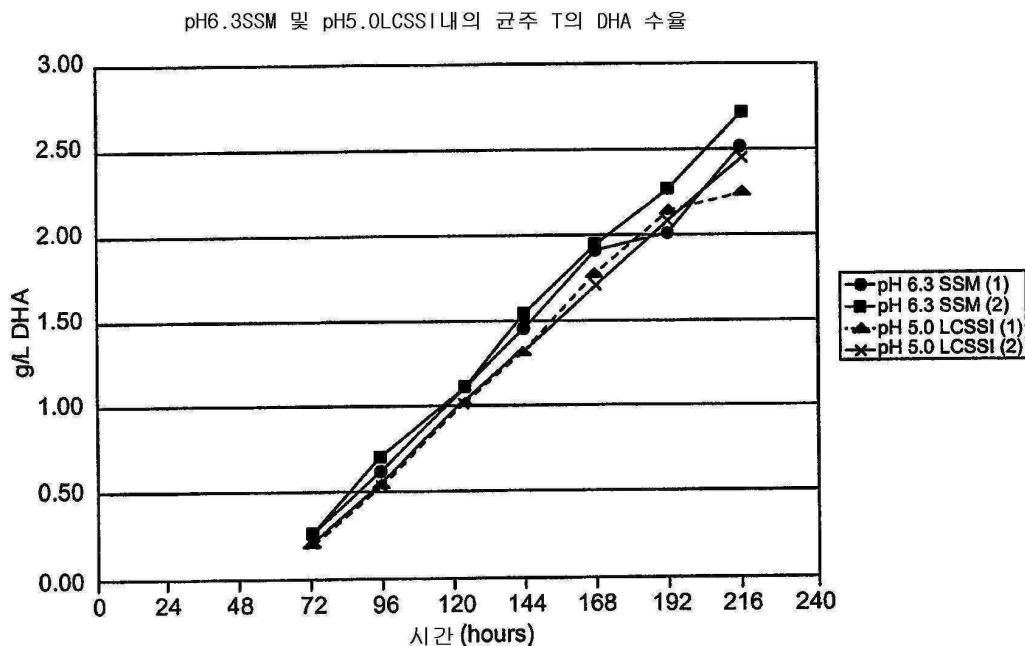
- [0112] 낮은 염소, pH 4.5 배지

화합물	최종농도	첨가된 염소 이온 량 (g/l)	첨가된 칼륨 이온 량 (g/l)	첨가된 나트륨 이온 량 (g/l)
CaCl ₂ -2H ₂ O ¹	0.3 g/l	0.09		
MgSO ₄ -7H ₂ O	1.25 g/l			
NaCl	1.41 g/l	0.86		0.55
MES	10.7 g/l			
MSG	0.75 g/l			
타스톤154	0.5 g/l			
라이신-HCl	0.37 g/l			
KH ₂ PO ₄	0.014 g/l		0.004	
K ₂ SO ₄	0.15		0.07	
Na ₂ SO ₄	3.46			1.12
CuSO ₄ -5H ₂ O	0.15 X 10 ⁻³ g/l			
H ₃ BO ₃	10 X 10 ⁻³ g/l			
MnCl ₂ -4H ₂ O	4.5 X 10 ⁻³ g/l	무시		
ZnSO ₄ -7H ₂ O	0.3 X 10 ⁻³ g/l			
NaOH (pH 6.3으로 조절)	1.16 g/l			0.67
FeCl ₂ ¹	6 X 10 ⁻³ g/l	무시		
티아민 ²	1 X 10 ⁻³ g/l			
바이오틴 ²	2 X 10 ⁻³ g/l			
글루코오스 ³	50 g/l			
각 이온의 합계		0.30	0.08	0.74

- [0113] 플라스크는 매일 채취하여 DHA 수율의 동력학을 측정하였다. 실험예의 결과 (도 2)는 pH 4.5에서 DHA 수율이 pH 6.3에서보다 항상 더 낮았지만, 시간 함수로서 DHA 수율의 증가율이 각각의 pH에서 거의 동일하였음을 나타낸다. 이것은 pH 4.5에서 배양물이 pH 6.3에서 배양물과 동일한 비율로 DHA를 축적할 수 있으나, pH 6.3에 비하여 pH 4.5에서 성장된 배양물의 DHA 수율에 락(lag)이 존재하였음을 시사한다.
- [0114] 이 결과는 주어진 초과 시간, 즉 대략 24시간, pH4.5에서 DHA 수율이 pH 6.3에서와 동일하였음을 보여준다. pH 4.5에서 DHA 축적에서 지연으로 락이 원인이 되었으며, 그 결과 pH 4.5 배양물이 동일 연령의 pH 6.3 배양물보다 더 낮은 DHA수율을 가졌는지 여부, 또는 동등량의 접종물을 접종하지 않은 pH 4.5 배양에 의해 락이 생겼는지 여부가 분명하지 않다. pH 4.5에서, 정확한 세포계수의 배양물을 얻을 수 없는 균주 T-HF 세포 클럼프, 및 사용할 접종물의 양을 평가해야 한다. 따라서 pH 4.5 배양물은 덜 접종물을 접종하며 따라서 DHA 수율의 운동량에 겹보기 락의 원인이 되었음이 가능하다.
- [0115] 그럼에도 이들 데이터는 pH 4.5에서 낮은 pH 적합 *C. cohnii* 균주 및 동일 배양배지를 사용하여, 동일 DHA 수율이 배양시간이 연장되면 pH 6.3에서 배양배지로서 달성할 수 있다.
- [0116] 실시예 14
- [0117] 상기 실시예 13에 기술된 이온 농도를 추가로 최적화하고, 또한 실시예 10에 기술된 기술을 사용하여 pH 5로 적당하게 한 *C. cohnii* 균주 T-HF를 부 배양함을 수행하여 락 시간을 감소시키며, 이는 실시예 1에 기술된 바와 같은 배지로 pH 6.3에서 성장한 *C. cohnii*에 대해 얻어진 수율에 비교할 만한 pH 4.5에서 7-일 DHA 수율을 생길게 한다.
- [0118] 본 발명의 실시의 원칙, 바람직한 실시태양 및 양상은 전술한 명세서에 기술되어 있다. 그러나 여기서 보호받으려는 발명은 제한적이지 않고 예시적인 것으로 간주되는 것과 같이 특별한 형태로 제한되는 것으로 해석해서는 아니 된다. 변형 및 변화는 본 발명의 정신을 이탈하지 않고 당업계의 기술자에 의해 이루어질 수 있다. 따라서 발명을 실시하기 위한 전술한 최선택양은 본래 예시적으로 간주되어야 하며 첨부된 특허청구범위에 기술된 바와 같은 본 발명의 범위 및 정신으로 제한하는 것이 아니다.

도면

도면1



도면2

