

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2022년 10월 6일 (06.10.2022)



(10) 국제공개번호

WO 2022/211302 A1

(51) 국제특허분류:

C12N 1/12 (2006.01)

C12P 23/00 (2006.01)

C12N 13/00 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2022/003382

(22) 국제출원일:

2022년 3월 10일 (10.03.2022)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2021-0040921 2021년 3월 30일 (30.03.2021) KR

(71) 출원인: 고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION)

[KR/KR]: 02841 서울특별시 성북구 안암로 145, Seoul (KR).

(72) 발명자: 최윤이 (CHOI, Yoon E); 02841 서울특별시 성북구 안암로 145, Seoul (KR). 박윤환 (PARK, Yun

Hwan); 02856 서울특별시 성북구 고려대로28길 21, Seoul (KR).

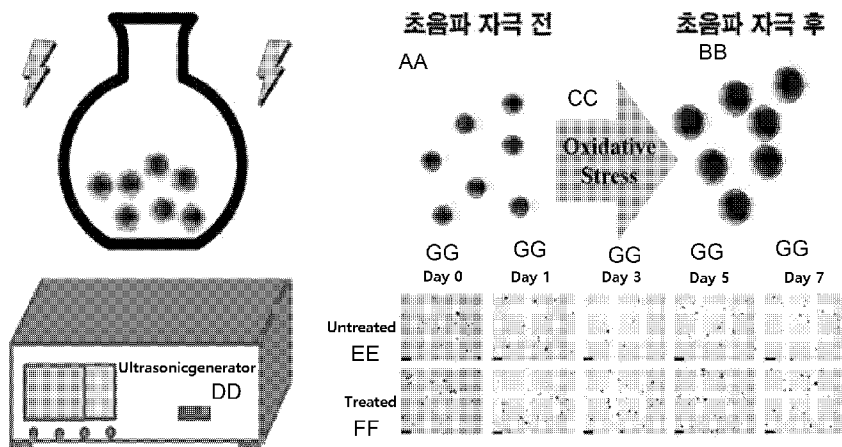
(74) 대리인: 특허법인 남앤남 (NAM & NAM); 04516 서울특별시 중구 서소문로 95, 3층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE,

(54) Title: METHOD FOR ENHANCING BIOSYNTHESIS OF HIGH VALUE-ADDED SUBSTANCE DERIVED FROM MICROALGAE BY INTRODUCING ULTRASONIC STIMULUS

(54) 발명의 명칭: 초음파 자극의 도입을 통한 미세조류 유래 고부가가치 물질 생합성 증대법



AA ... Before ultrasonic stimulation
BB ... After ultrasonic stimulation
CC ... Oxidative Stress
DD ... Ultrasonic generator
EE ... Untreated
FF ... Treated
GG ... Day

(57) Abstract: The present invention relates to a method for increasing a content of astaxanthin in microalgae through ultrasonic stimulation. The method according to the present invention can effectively increase the content of astaxanthin in microalgae through ultrasonication during microalgal cultivation and thus can be advantageously used for producing the high value-added substance astaxanthin.

(57) 요약서: 본 발명은 초음파 자극을 통한 미세조류 내 아스타잔틴(Astaxanthin)의 함량을 증대시키는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 방법은 미세조류 배양 과정 중 초음파 처리를 통해 미세조류 내 아스타잔틴(astaxanthin)의 함량을 효과적으로 증대시킬 수 있는바, 고부가가치 물질인 아스타잔틴 생산을 위해 유용하게 사용될 수 있다.

[다음 쪽 계속]

LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

명세서

발명의 명칭: 초음파 자극의 도입을 통한 미세조류 유래 고부가 가치 물질 생합성 증대법

기술분야

- [1] 본 발명은 초음파 자극을 통한 미세조류 내 아스타잔틴(Astaxanthin)의 함량을 증대시키는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 적색의 케토카로티노이드(Ketocarotenoid)인 아스타잔틴(Astaxanthin, 3,3'-dihydroxy- β , β' -carotene-4,4'-dione)은 동물의 체내합성이 불가능한 불포화성 이소프렌 유도체의 일종으로서, 베타-카로틴에 비하여 양쪽 말단기에 하이드록실기(-OH)와 케톤기(=O)를 하나씩 더 가지고 있는데, 이와 같은 아스타잔틴의 독특한 분자 구조적 특성으로 인하여 기존의 항산화 물질보다 항산화 활성이 월등히 높으며, 특히 비타민 C보다 약 6000배 높은 항산화 능력을 가지고 있는 것으로 알려져 있다.
- [3] 이러한 높은 항산화 활성기능으로 인해 아스타잔틴은 의약품, 식품 첨가제, 착색제 및 동물과 치어의 사료 첨가제 등으로 널리 사용되고 있어, 그 수요량 및 활용 범위가 급격히 확대될 것으로 예상되고 있으며, 눈 건강에도 좋은 것으로 알려져 의약품, 식품 첨가제 등 다양한 분야에 활용되고 있다.
- [4] 미세조류인 헤마토코쿠스 종(*Haematococcus*)은 높은 광량, 질소원 부족 등의 스트레스를 받으면 세포벽이 두꺼워지면서 세포 내에 아스타잔틴을 축적하는 것으로 알려져 있다. 기존에는 아스타잔틴의 생산량을 늘리기 위해 헤마토코쿠스의 배양 환경의 환경적 요소(광 주기, 광 세기, 온도, 배지 조성 등)를 조절하는 형태의 기술이 접목되었다.
- [5] 다만, 이러한 직접적인 성장환경을 조절하는 기술은 여러 가지 배양 조건(배지 조성, 온도, 광 세기 등)과 바이오메스 생산성과 관련된 변수를 확인해야하며 기존 방법은 아스타잔틴 생합성과 바이오메스 생산성 사이에서의 최적화하기 어렵다는 단점이 존재한다.
- [6] 이에 본 발명자는 아스타잔틴 생산을 보다 증대시킬 수 있는 방법에 대해 예의 연구하던 중, 헤마토코쿠스의 아스타잔틴 생합성 시기에 초음파 자극을 적용하는 경우 헤마토코쿠스 종의 아스타잔틴 생합성이 효과적으로 촉진되는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 따라서 본 발명의 목적은 미세조류 내 아스타잔틴(astaxanthin)의 함량을 효과적으로 증대시킬 수 있는 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [8] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서,
 [9] 본 발명은 a) 미세조류를 배양하는 단계; 및 b) 상기 미세조류에 초음파를 처리하는 단계를 포함하는, 미세조류 내 아스타잔틴(astaxanthin)의 함량을 증대시키는 방법을 제공한다.
 [10] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 미세조류는 헤마토코쿠스 플루비아리스(*Haematococcus pluvialis*)일 수 있다.
 [11] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 a) 단계에서 미세조류는 적색의 휴면 포낭 세포 형태로 배양할 수 있다.
 [12] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 b) 단계에서 초음파는 30-50 kHz 세기로 처리할 수 있다.
 [13] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 b) 단계에서 초음파는 1일(day) 당 10-30분씩 1-6일 동안 처리할 수 있다.

발명의 효과

- [14] 본 발명에 따른 방법은 미세조류 배양 과정 중 초음파 처리를 통해 미세조류 내 아스타잔틴(astaxanthin)의 함량을 효과적으로 증대시킬 수 있는바, 고부가가치 물질인 아스타잔틴 생산을 위해 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [15] 도 1은 본 발명에 따른 미세조류에 초음파 자극을 주는 방법을 간략하게 보여주는 모식도이다.
 [16] 도 2는 초음파 자극 부여에 따른 미세조류 생애주기별 헤마토코쿠스 종의 세포 생존율을 나타낸 것이다(2a: Green stage, 2b: brown stage, 3c: red stage).
 [17] 도 3은 헤마토코쿠스(적색 세포) 중에 주기적인 초음파 자극을 부여한 후 시간경과에 따른 세포수, 건중량, 세포 크기, 총 아스타잔틴 함량 및 세포 당 아스타잔틴 함량 변화를 확인한 것이다(3a: 세포수, 3b: 건중량, 3c: 세포 크기, 3d: 총 아스타잔틴 함량, 3e: 세포 당 아스타잔틴 함량).
 [18] 도 4a는 헤마토코쿠스(적색 세포) 중에 주기적인 초음파 자극을 부여한 후 시간경과에 따른 활성산소(ROS)의 변화를 확인한 것이며, 도 4b는 헤마토코쿠스(적색 세포) 중에 주기적인 초음파 자극에 따른 아스타잔틴 생합성 관련 유전자(*BKT*, *CHY*)의 발현량을 확인한 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [19] 본 발명자들은 미세조류에 초음파 처리하여 아스타잔틴의 생산량을 증대시킬 수 있다는 것을 확인하고, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.
 [20] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.
 [21] 본 발명은 초음파를 처리하여 미세조류 내 아스타잔틴(astaxanthin)의 함량을 증대 시키는 방법을 제공한다.
 [22] 본 발명의 "미세조류(microalgae)"는 크기 50 μm 이하의 단세포 조류로서, 자연계의 먹이사슬에서 최하위에 위치하여 광합성 색소를 가지며 광합성을

통해 유기물을 생산하는 독립영양생물이다. 미세조류의 대표종으로 규조류(diatom)와 와편모조류(dinophyta)를 들 수 있다.

- [23] 상기 미세조류는 파피아(*Phaffia*)속, 파라코커스(*Paracoccus*)속, 및 헤마토코커스(*Haematococcus*)속의 군으로부터 선택되는 어느 하나에 속하는 미세조류일 수 있으나, 본 발명과 같이 초음파 처리에 의해 아스타잔틴(astaxanthin)의 함량을 증대되는 미세조류라면 이에 제한되는 것은 아니며, 바람직하게는, 헤마토코커스 플루비아리스(*Haematococcus pluvialis*)일 수 있다.
- [24] 본 발명의 "헤마토코커스(*Haematococcus*)"는 난형 또는 구형의 형태이며, 전단에 2개의 편모가 있어 헤엄을 치는 단세포 녹조류로서, 세포 본체의 원형질은 약간 떨어져서 세포벽으로 둘러싸여 있고, 그 사이에는 한천과 같은 용액이 풍부하며, 원형질과 세포벽은 방사상인 다수의 세포질 실로 연결되어 있으며, 아스타잔틴을 축적하여 홍색을 나타내는 것이 많다. 2분열인 무성생식과 동형 배우자에 의한 유성생식을 하는 것으로 알려졌고, 부적당한 환경에서는 편모를 상실한 영양체의 3~4배 크기의 구상체가 되어 아스타잔틴을 다량으로 축적한 아키네트(akinet)를 형성하며, 상기 아키네트는 환경이 호전되면 분열하여 4, 8 또는 16개의 유주자를 형성하고, 유주자는 방출 후 영양세포가 된다. 바위 위의 물이 고여 있는 곳 등에서 생육한다.
- [25] 본 발명의 "아스타잔틴(astaxanthin)"은 카로티노이드의 하나로서, 가재나 새우 등의 갑각류에 가장 많이 보이지만 생선의 살, 금눈돔의 표피 등 동물계에 굉장히 널리 분포하는 조오카로티노이드의 대표적인 것이다. 또한, 하등 식물에서도 관찰할 수 있는데, 유리 상태 혹은 에스테르로서 존재하고 있는 것 외에, 단백질과 결합하여 여러 가지 색의 색소 단백질로서 존재하는 것도 많다.
- [26] 본 발명에 따른 미세조류 내 아스타잔틴(astaxanthin)의 함량을 증대시키는 방법은 a) 미세조류를 배양하는 단계; 및 b) 상기 미세조류에 초음파를 처리하는 단계를 포함할 수 있다.
- [27] 본 발명의 상기 미세조류는 헤마토코커스 종일 수 있으며, 더욱 자세하게는 헤마토코커스 플루비아리스(*Haematococcus pluvialis*)일 수 있다.
- [28] 본 발명의 상기 a) 단계는 미세조류를 배양하는 단계로서, 자세하게는 미세조류를 적색의 휴면 포낭 세포 형태로 배양하는 단계일 수 있다.
- [29] 미세조류의 일종인 헤마토코커스 플루비아리스(*Haematococcus pluvialis*)는 외부 성장 환경에 따라 크게 두 가지 형태, 즉 두개의 편모를 가지고 유평하는 녹색의 성장 세포 형태(green vegetative cells)와 이동성이 없는 적색의 휴면 포낭 세포 형태(red cyst cells)로 나뉜다. 우호적 환경에서 녹색의 성장 세포가 안정적으로 성장하다가 여러 가지 외부 환경 조건 변화에 따라 발생하는 비우호적 환경에 노출 시 녹색의 세포들은 자기 보호 기작에 따라 적색의 포낭 세포로 전환하며, 이러한 적색의 휴면단계에서 아스타잔틴을 다량 축적하는 것으로 알려져 있다.

- [30] 본 발명의 하기 실시예에서는 헤마토코쿠스 세포 주기에 따른 초음파 자극 부여 시 세포 생존율을 확인하였으며, 그 결과 Green, Brown stage의 헤마토코쿠스 세포는 초음파 자극에 견디지 못하고 사멸하나, 적색의 휴면 포낭 세포 형태(red cyst cells)의 경우 초음파 자극을 충분히 견딜 수 있음을 확인하였다(도 2 및 표 1 참조).
- [31] 따라서 본 발명의 미세조류 내 아스타잔틴(astaxanthin)의 함량을 증대시키는 방법에 있어서, 상기 a) 단계의 미세조류는 적색의 휴면 포낭 세포 형태로 배양하는 것이 바람직하다.
- [32] 본 발명의 상기 b) 단계는 미세조류에 초음파를 처리하는 단계로서, 자세하게는 상기 a) 단계를 통해 배양된 적색의 휴면 포낭 세포 형태의 미세조류에 초음파를 특정 세기로 반복하여 처리하는 단계이다.
- [33] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 b) 단계에서 초음파는 30 ~ 50 kHz 세기로 처리할 수 있다.
- [34] 초음파 세기가 30 kHz 미만인 경우 자극이 어려울 수 있으며, 초음파 세기가 50 kHz 초과인 경우 세포 생존이 어려울 수 있다.
- [35] 본 발명의 다른 실시예에 있어서, 상기 b) 단계에서 초음파는 1일(day) 당 10-30분씩 1-6일 동안 처리할 수 있다.
- [36] 초음파는 1일당 10-30분씩 6일 초과하여 처리하는 경우 초음파의 자극에 따른 세포 생존이 어려운 문제점이 있다.
- [37] 본 발명의 하기 실시예에서는 지속적 초음파 자극 부여에 따른 헤마토코쿠스 성장 변화를 확인하였다. 그 결과 지속적인 초음파 자극을 통해 헤마토코쿠스 세포수가 감소하였으나(도 3a 및 표 2 참조), 반면에 세포의 건중량은 대조군에 비하여 높은 현상을 확인하였다(도 3b 및 표 3 참조). 이와 같은 현상은 초음파 자극 부여 시 대조군에 비하여 헤마토코쿠스 세포의 크기의 변화에 의해 유도되었을 것으로 예상된다(도 3c 및 표 4 참조). 또한, 초음파 자극 부여 시 총 아스타잔틴 생합성량은 일정 시기(Day 2)에 최대값에 도달하고 감소하는 것을 보여주었다(도 3d 및 표 5 참조). 한편, 세포 당 아스타잔틴 함량의 경우 초음파 자극 부여 시 지속적으로 증대되는 것으로 나타났으며(도 3e 및 표 6 참조), 초음파 자극 부여를 통해 아스타잔틴의 생합성이 증대되는 것을 확인하였다.
- [38] 상기와 같은 결과를 통해, 미세조류에 지속적 초음파 자극 부여하는 경우 세포수가 감소하는 반면, 세포 크기가 변화하며 이와 더불어 세포 내 아스타잔틴의 생합성이 증대되는 것을 알 수 있었다.
- [39] 따라서 본 발명의 미세조류 내 아스타잔틴(astaxanthin)의 함량을 증대시키는 방법에 있어서, 상기 b) 단계에서 미세조류에 처리하는 초음파 처리는 30-50 kHz 세기의 초음파를 1일(day) 당 10-30분씩 1-6일 동안 처리할 수 있다.
- [40]
- [41] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들

실시예에 한정되는 것은 아니다.

발명의 실시를 위한 형태

[42] <실시예 1>

[43] 헤마토코쿠스 배양 및 성장, 아스타잔틴 측정

[44] 본 실험에서는 헤마토코쿠스 플루비아리스(*Haematococcus pluvialis*) 종을 이용하였다. 본 실험에 활용한 헤마토코쿠스 플루비아리스는 미국 UTEX에서 연구목적으로 구매하여 사용하였다. 배양 배지는 OHM 배지를 이용하였으며, 1L 3차 증류수에 0.41g KNO₃, 0.03g Na₂HPO₄, 0.246g MgSO₄·7H₂O, 0.11g CaCl₂·2H₂O, 2.62mg Fe(III)-citrate·H₂O, 0.011mg CoCl₂·6H₂O, 0.12mg CuSO₄·5H₂O, 0.075mg Cr₂O₃, 0.98mg MnCl₂·4H₂O, 0.12mg Na₂MoO₄·2H₂O, 0.005mg SeO₂, 50ug biotin, 35ug 티아민(비타민 B1), 그리고 30ug 비타민 B12를 첨가하였다. 배지는 121°C에서 20분간 멸균을 한 후 사용하였다. 실험을 위해 250 mL 둥근바닥플라스크(DURAN 제조)에 150 mL의 배지를 주입하였으며 접종 세포 수는 10×10⁵ cells/mL가 되도록 하였다. 빛 광량은 50 μmolm⁻²s⁻¹, 온도 25°C에서 배양하였고, 1 vvm의 공기를 주입하였다.

[45] 헤마토코쿠스 세포 수는 Hemacytometer(Hausser Scientific 제조)를 이용하여 측정하였다. 건중량은 1.45 μm 공극 크기를 가진 필터를 이용하여 측정하였다. 아스타잔틴 함량 측정은 bead-beater(BioSpec 제조)를 이용하여 헤마토코쿠스 세포를 90% 아세톤(SAMCHUN 제조)과 마이크로비드(micro-bead)가 담긴 튜브에 담아 파쇄하고 13000rpm에서 원심분리하여 상층액을 분리한 다음 분광광도계(GENESYS 제조)를 이용하여 측정하였다. 획득한 상층액의 경우 474 nm에서 측정을 진행하였으며, 산출된 아스타잔틴 계산식인 (OD₄₇₄ - 0.0831)/0.1426을 이용하여 계산하였다(단위: mg/L).

[46]

[47] <실시예 2>

[48] 초음파 자극 방법

[49] 도 1은 헤마토코쿠스 세포에 초음파 자극을 부과하기 위한 방법을 나타낸 모식도이다. 초음파 자극을 주기 위하여 초음파 세척장치(Ultrasonic cleaner, 성동초음파, SD-200H)를 이용하였다. 150 mL의 세포를 250 mL의 둥근 플라스크에 담아 조심스럽게 흔든 후 플라스크를 초음파 세척장치 안에 넣어 40 kHz 세기의 초음파 자극을 30분간 주었다.

[50]

[51] <실시예 3>

[52] 헤마토코쿠스 세포 주기에 따른 초음파 자극 부여 시 세포 생존율 변화

[53] 본 발명의 방법에 따라 헤마토코쿠스 세포의 세포 주기(Green, Brown, Red)에 따라 초음파 자극을 부여함에 따라 세포 수 변화 확인을 통해 세포 생존율을 확인하였다. 세포의 생존율을 확인하기 위하여 Hemacytometer(Hausser Scientific

제조)와 Trypan Blue Stain(logosbio 제조)를 사용하였다.

- [54] 그 결과 도 2 및 표 1에서 나타낸 바와 같이, 초음파 자극을 주었을 때 헤마토코쿠스의 세포 주기에 따라 세포의 생존율 변화를 확인할 수 있다. 상기 결과에 따르면 Green, Brown stage의 헤마토코쿠스 세포는 초음파 자극에 견디지 못하고 사멸하나(도 2a 및 2b), 적색 헤마토코쿠스 세포의 경우 초음파 자극을 충분히 견딜 수 있음을 확인할 수 있다(도 2c).

[55]

[56] [표1]

헤마토코쿠스 세포의 세포 주기에 따른 초음파 자극 부여 시 세포 생존율

세포 주기	초음파 자극 부여 후 시간 경과에 따른 세포 생존율(%)				
	5분	10분	15분	20분	30분
Green	78.95	34.74	21.05	9.47	4.21
Brown	76.19	69.05	54.76	54.29	54.76
Red	98.04	98.04	96.08	92.16	92.16

[57]

[58] <실시예 4>

[59] 지속적 초음파 자극 부여에 따른 헤마토코쿠스 성장 변화

- [60] 본 발명의 방법에 따라 헤마토코쿠스 적색 세포에 초음파 자극을 주지 않은 대조군과 30분 주기로 매일 30분씩 초음파 자극을 부여하였을 때 세포의 변화를 측정하였다.

- [61] 그 결과 지속적인 초음파 자극을 통해 헤마토코쿠스 세포수가 감소함을 알 수 있었다(도 3a 및 표 2 참조). 하지만 세포 수가 감소하였음에도 불구하고 세포의 건중량은 대조군에 비하여 높은 현상을 확인할 수 있었다(도 3b 및 표 3 참조). 이와 같은 현상은 초음파 자극 부여 시 대조군에 비하여 헤마토코쿠스 세포의 크기의 변화에 의해 유도되었을 것으로 예상된다(도 3c 및 표 4 참조). 이와 동일하게 초음파 자극 부여 시 총 아스타잔틴 생합성량은 일정 시기(Day 2)에 최대값에 도달하고 감소하는 것을 보이며(도 3d 및 표 5 참조), 이와 같은 현상은 세포수 감소에 의해 총 아스타잔틴 함량의 감소를 유발하였음을 알 수 있다. 하지만 세포 당 아스타잔틴 함량의 경우 초음파 자극 부여 시 지속적으로 증대되는 것으로 보아(도 3e 및 표 6 참조), 초음파 자극 부여를 통해 아스타잔틴의 생합성이 증대되는 것을 확인할 수 있다.

[62]

[63] [표2]

헤마토코쿠스 적색 세포에 초음파 자극에 따른 세포 밀도

	세포 밀도 (*10 ⁴ cells mL ⁻¹)						
	0일	1일	2일	3일	4일	5일	6일
대조군	5	4.5	4.8	4	3.7	3.2	3.2
처리군	5	4.3	4	3.8	2.7	1.8	1.3

[64]

[65] [표3]

헤마토코쿠스 적색 세포에 초음파 자극에 따른 건중량

	건중량 (gL ⁻¹)						
	0일	1일	2일	3일	4일	5일	6일
대조군	0.2222	0.2222	0.1889	0.2278	0.1889	0.1944	0.2111
처리군	0.2222	0.3000	0.2889	0.3167	0.2556	0.2556	0.2389

[66]

[67] [표4]

헤마토코쿠스 적색 세포에 초음파 자극에 따른 세포 직경

	세포 직경 (μm)		
	1일	3일	5일
대조군	26.38	27.03	25.28
처리군	31.43	33.77	33.83

[68]

[69] [표5]

헤마토코쿠스 적색 세포에 초음파 자극에 따른 아스타잔틴 함량

	아스타잔틴 함량 (mgL ⁻¹)						
	0일	1일	2일	3일	4일	5일	6일
대조군	5.6328	5.6515	4.6253	4.4663	2.1732	3.5640	3.0147
처리군	5.6328	7.2971	8.1480	5.2938	5.5720	4.0666	3.6272

[70]

[71] [표6]

헤마토코쿠스 적색 세포에 초음파 자극에 따른 세포 당 아스타잔틴 함량

	세포 당 아스타잔틴 함량 (pg cell ⁻¹)						
	0일	1일	2일	3일	4일	5일	6일
대조군	112.6554	125.5883	95.6964	111.6585	59.2689	112.5477	95.2009
처리군	112.6554	168.3959	203.6992	138.1011	208.9472	221.8197	272.0440

[72]

[73] <실시예 5>

[74] 초음파 자극 부여에 따른 적색 헤마토코쿠스 세포의 ROS 및 유전자 발현량 변화

[75] 본 발명의 방법에 따라 헤마토코쿠스 적색 세포에 초음파 자극을 주지 않은 대조군과 실험군의 세포 내 ROS(활성산소)를 측정하였다. ROS 수치변화 측정을 위해 30분 동안 초음파 처리 후 미세조류 세포를 수확하였다. ROS를 검출하기 위해 니트로블루테트라졸륨(NBT; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)을 이용하여 세포 내 염색을 진행하여 ROS 측정을 진행하였다.

[76] 간략하게는, 13,000rpm에서 원심 분리하여 1mL의 세포를 수확하고 0.2 mL의 0.2 % (w/v) NBT에 재현탁시켰다. 12시간 동안 배양한 후, 세포를 원심 분리하고 0.5mL의 50% (v/v) 빙초산에 반응시켰다. 그 이후 비드비터를 사용하여 염색된 세포를 파쇄하였다. 추출된 상층액은 560nm 파장에서 UV-Vis 분광광도계를 사용하여 흡광도 값을 기반으로 ROS 수치를 측정하였다.

[77] 그 결과 초음파 자극 부여와 맞추어 세포 내 활성산소가 증가함을 관찰하였다(도 4a 참조). 이와 같은 현상은 헤마토코쿠스에 초음파 자극이 산화 자극(Oxidative stress)으로 작용하는 것으로 예측되며, 그에 따른 반응으로 세포 내 아스타잔틴 생합성이 촉진된다는 뒷받침 근거로 작용할 수 있다.

[78] 또한, 초음파 자극 부여 시 실험군에서의 아스타잔틴 생합성 관련 유전자 발현량 변화를 대조군과 비교하였다.

[79] 간략하게는, 제조사의 프로토콜에 따라 RNeasy mini kit (Qiagen, CA, USA)를 이용하여 *H. pluvialis*에서 Total RNA를 분리하였다. 샘플의 핵산 농도는 260 nm에서 분광 광도계를 이용하여 측정하였다. RNA의 순도는 OD260/OD280 비율로 계산되었다. 그런 다음 AMPIGENE® cDNA 합성 키트(Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA)를 사용하여 cDNA를 합성한 다음 제조업체의 프로토콜을 따라 진행하였다. 총 RNA(4μg)와 2xRT 효소 혼합물을 반응 튜브에서 혼합하고 42°C에서 30분동안 배양하고 85°C에서 10분 동안 비활성화한 다음 얼음에서 빠르게 냉각하였다. 아스타잔틴 생합성 관련 유전자인 BKT(NCBI Gene ID : D45881) 및 CHY(NCBI Gene ID : AF162279)의 발현은 정량적 역전사 PCR(qRT-PCR)과정으로 측정하였다. RNA에 대한 정량적 RT-PCR은

AMPIGENE® qPCR Green Mix Lo-ROX (Enzo Life Sciences)를 사용하여 95°C에서 15초동안 40사이클, 60°C에서 30초 동안 CFX connect Real-Time PCR (Bio-Rad) (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 제조업체의 지침에 따라 진행하였다. 여기에 사용된 유전자 특이적 프라이머는 하기 표 7에서 나타내었다.

[80]

[81] [표7]

Real-Time PCR에 사용된 프라이머 서열

유전자	프라이머 서열(5'→3')	
<i>BKT</i>	포워드	GGCACTAATGGTCGAGCAGAA
	리버스	ACAATGAAGACTGCGGCGATG
<i>CHY</i>	포워드	CATTGCCATCTTCGCCACCTA
	리버스	GGGCAGTCCATTGGATGATTGG

[82]

[83] 그 결과 대조군에 비하여 초음파 처리군의 경우 *BKT* 유전자가 약 39배, *CHY* 유전자가 약 25배 증가하였음을 확인하였다(도 4b 참조). 이를 통해 초음파 자극의 경우 적색 헤마토코쿠스의 산화 자극원으로 작용하며, 이에 대한 반응으로 아스타잔틴 생합성을 증대시키는 것을 확인하였다.

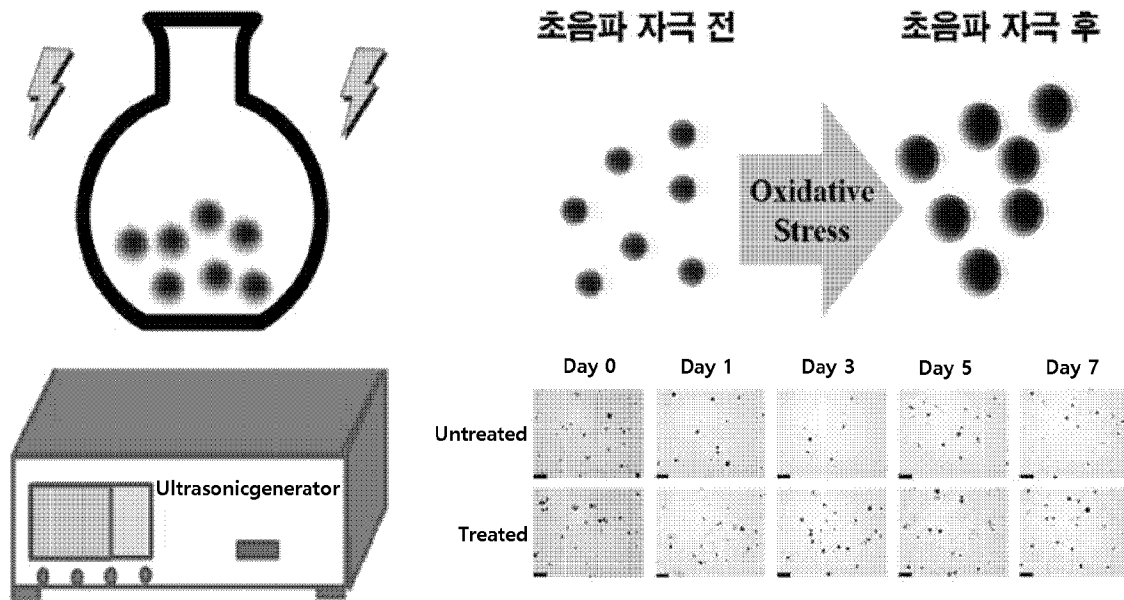
[84]

[85] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

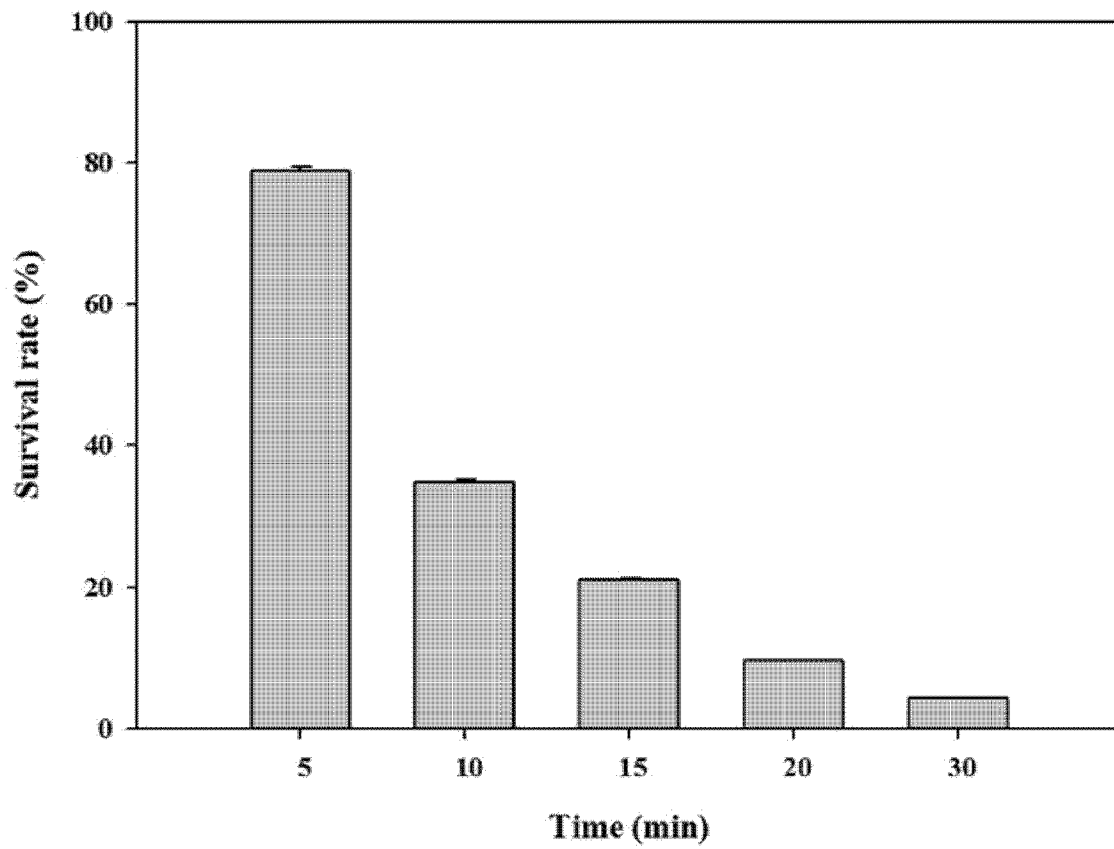
청구범위

- [청구항 1] a) 미세조류를 배양하는 단계; 및
b) 상기 미세조류에 초음파를 처리하는 단계를 포함하는, 미세조류 내 아스타잔틴(astaxanthin)의 함량을 증대시키는 방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 미세조류는 헤마토코쿠스 플루비아리스(*Haematococcus pluvialis*)인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 a) 단계에서 미세조류는 적색의 휴면 포낭 세포 형태로 배양하는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 b) 단계에서 초음파는 30-50 kHz 세기로 처리하는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 b) 단계에서 초음파는 1일(day) 당 10-30분씩 1-6일 동안 처리하는 것을 특징으로 하는, 방법.

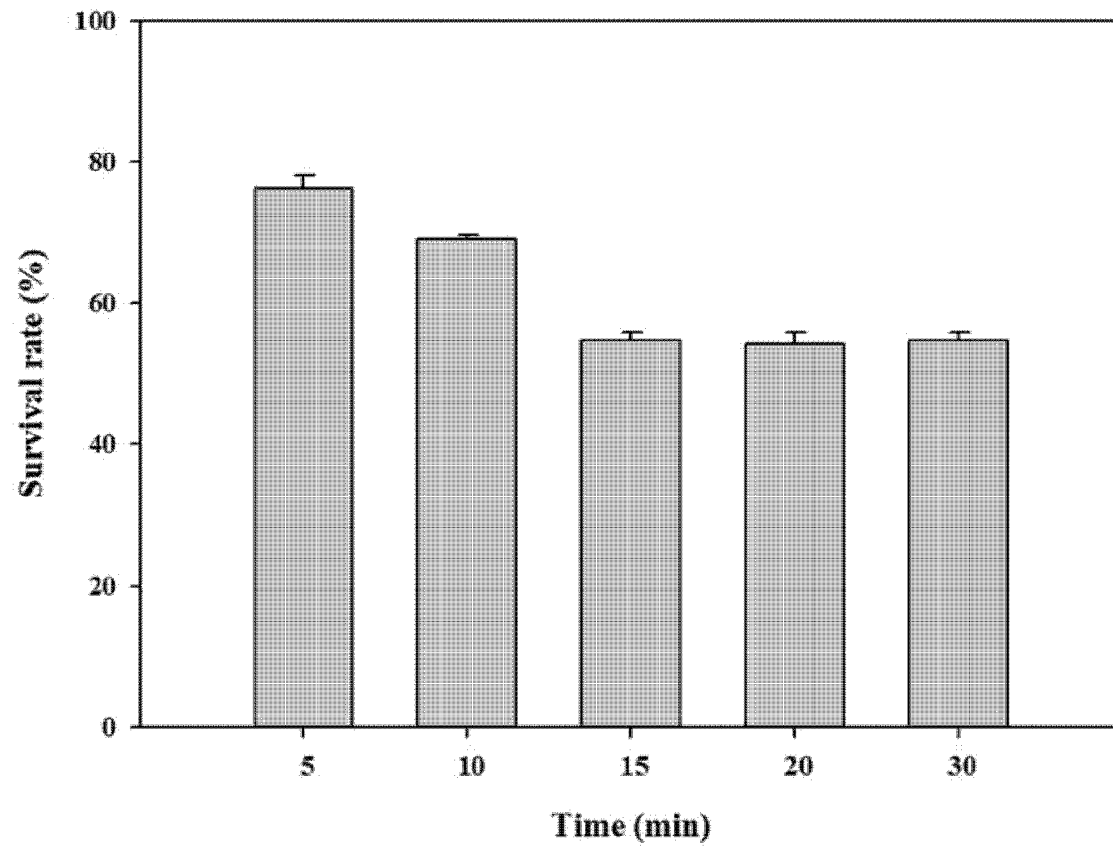
[도1]



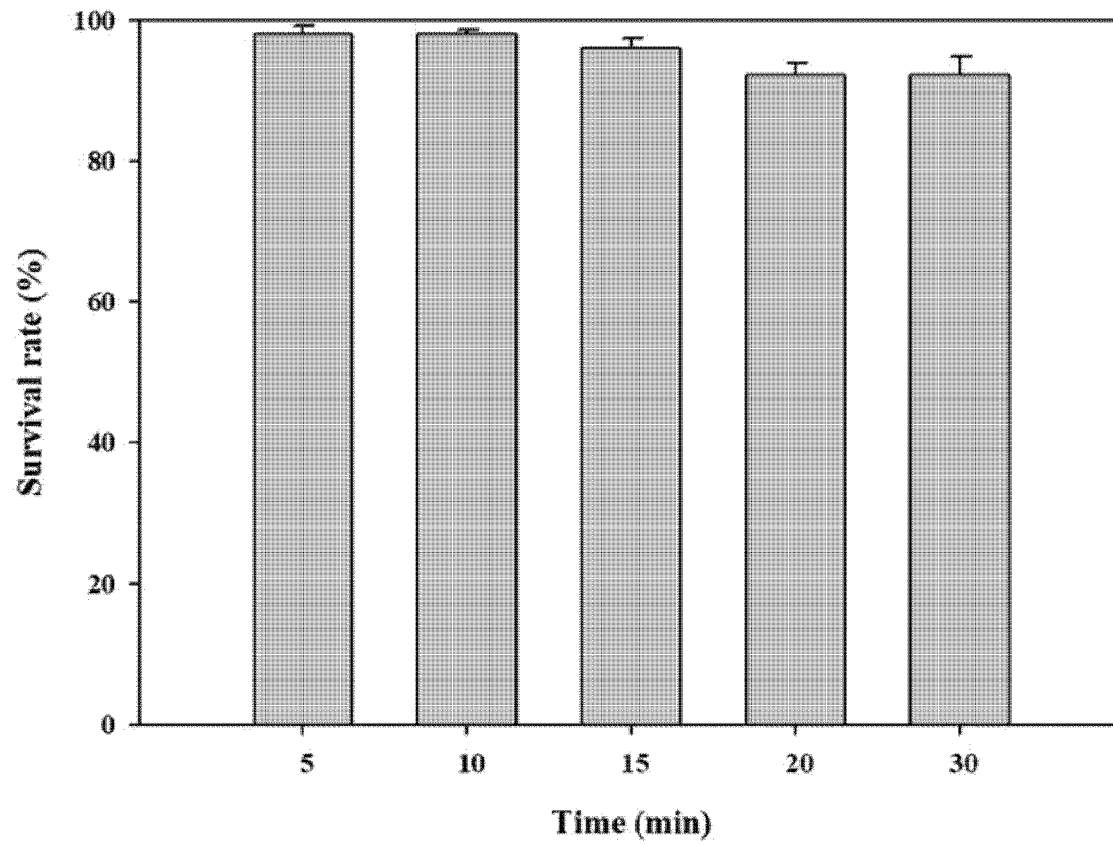
[도2a]



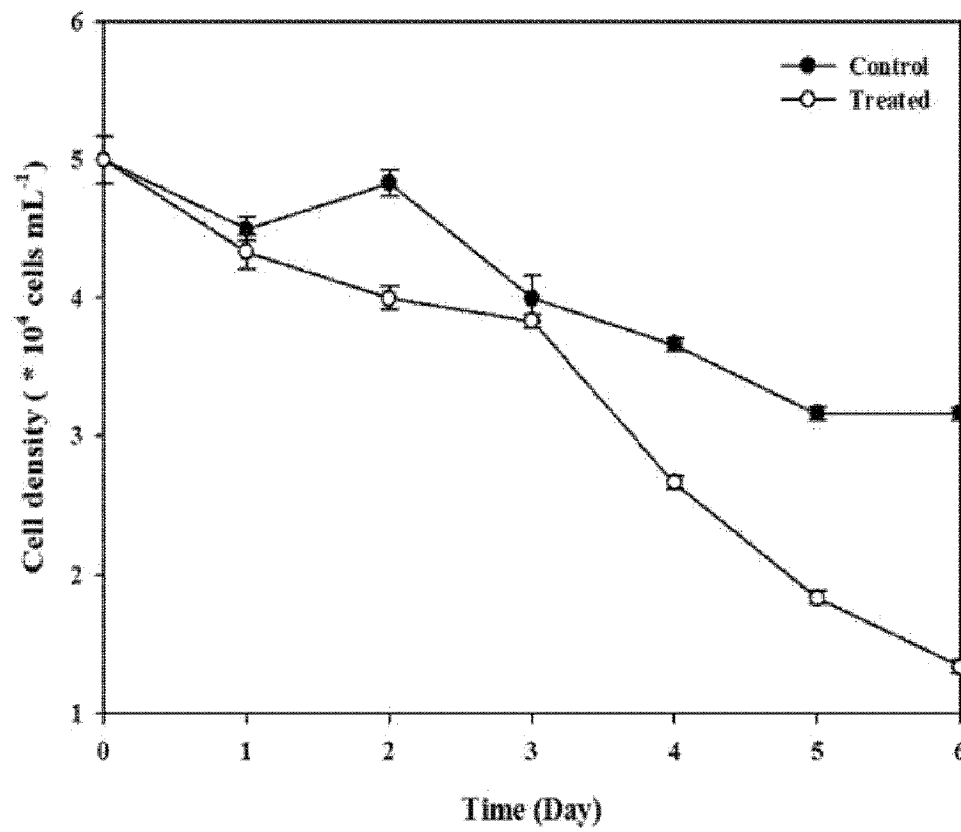
[도2b]



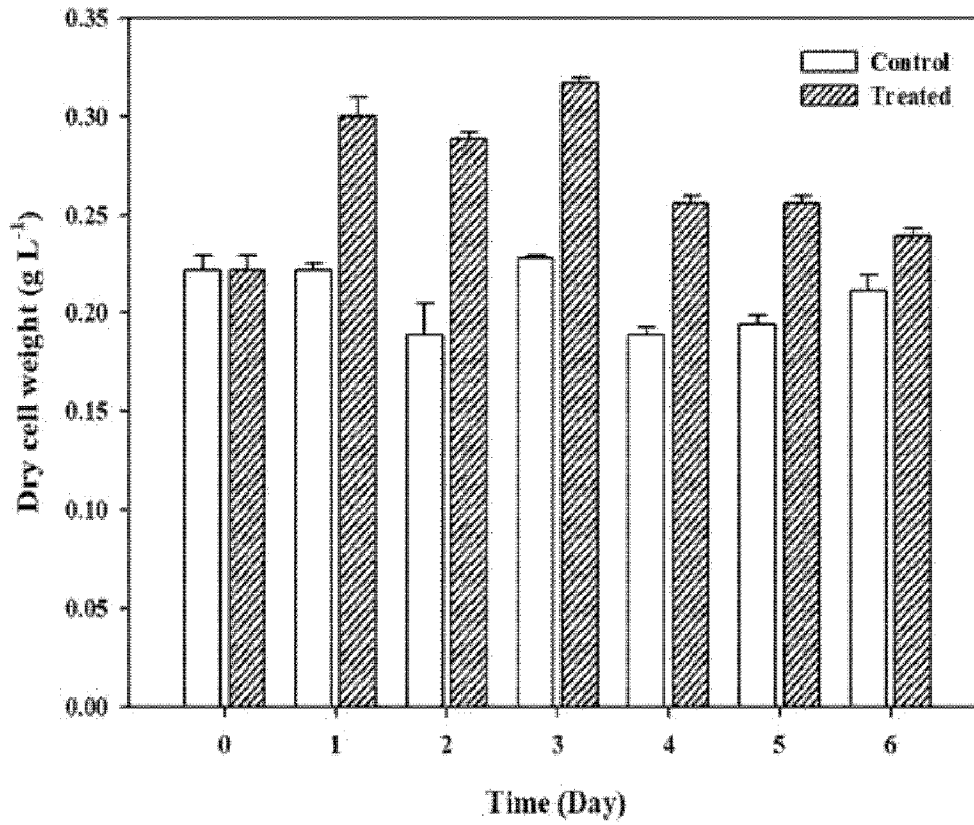
[도2c]



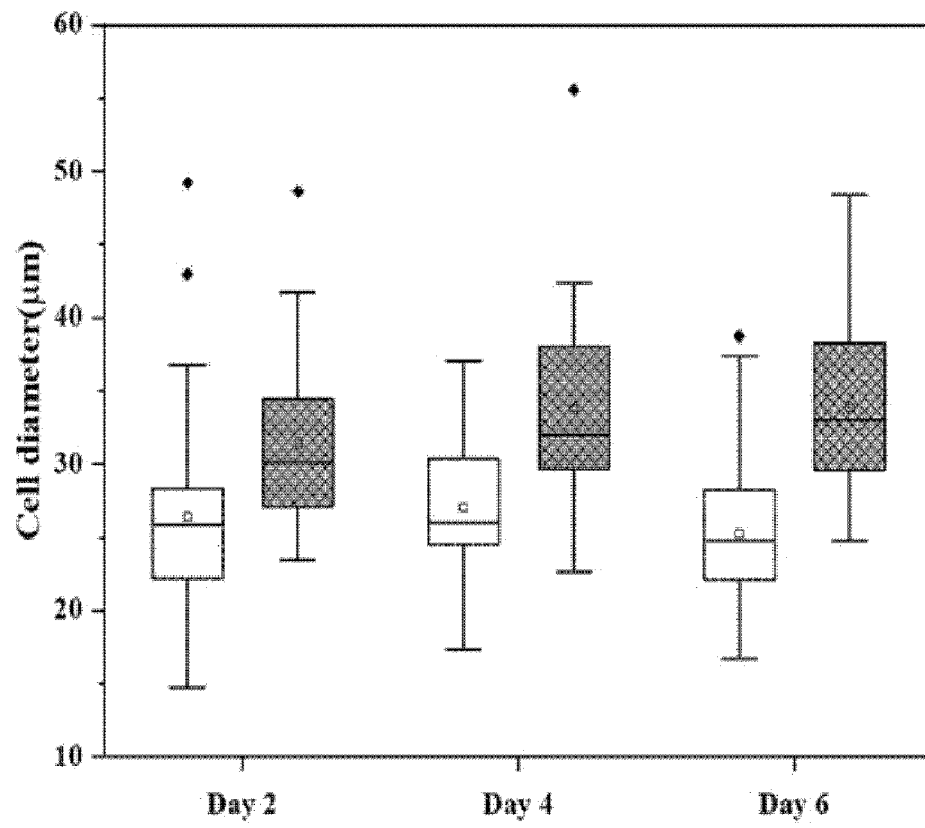
[도3a]



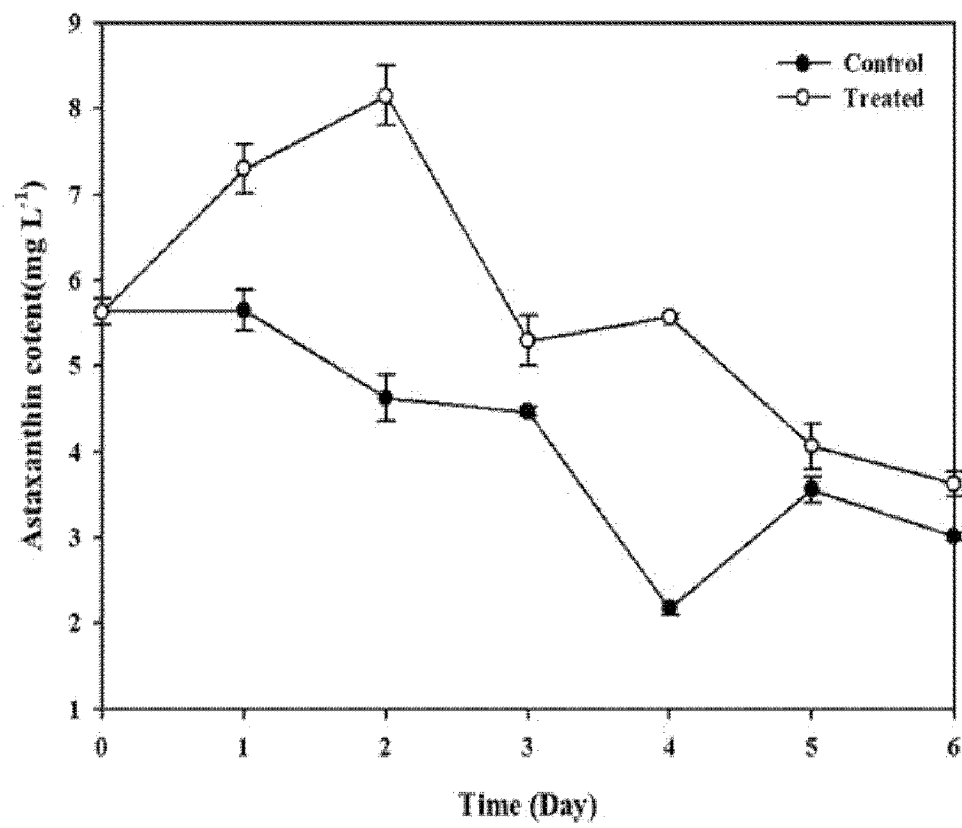
[도3b]



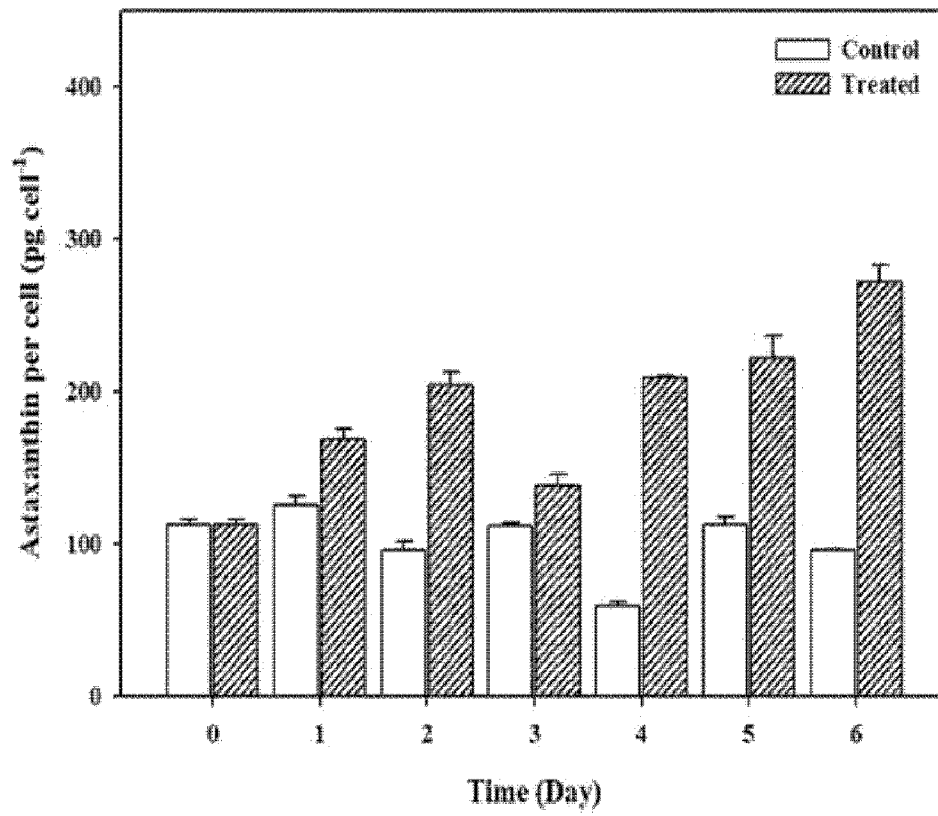
[도3c]



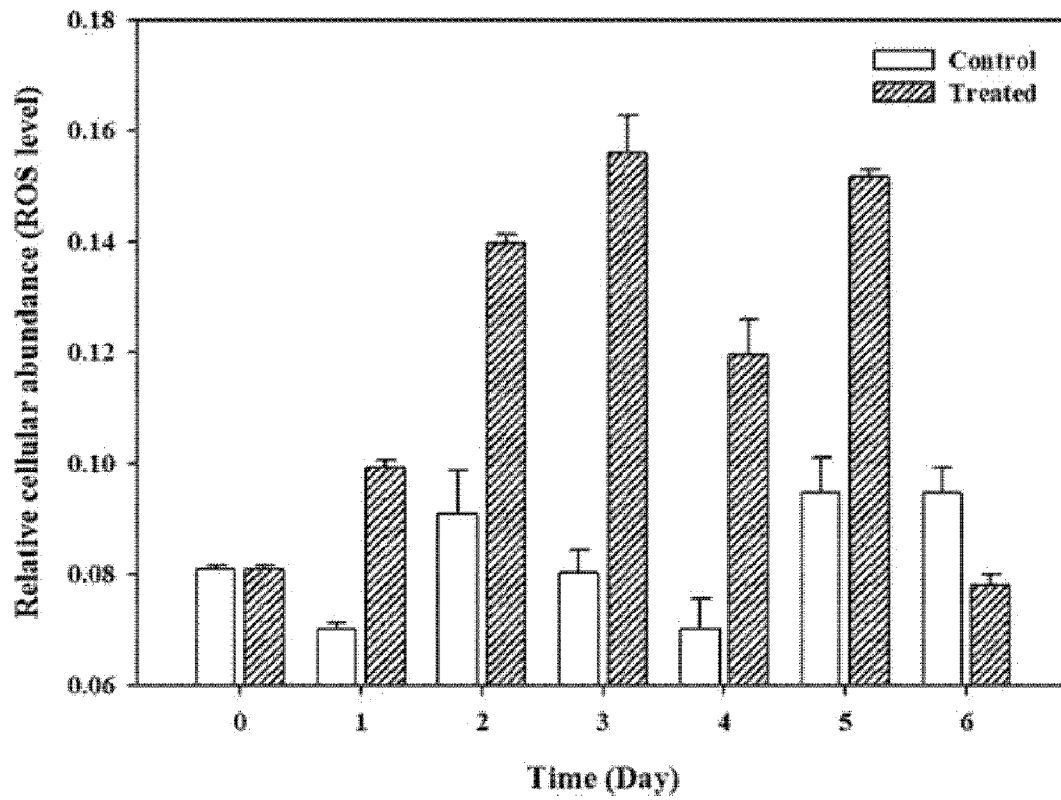
[도3d]



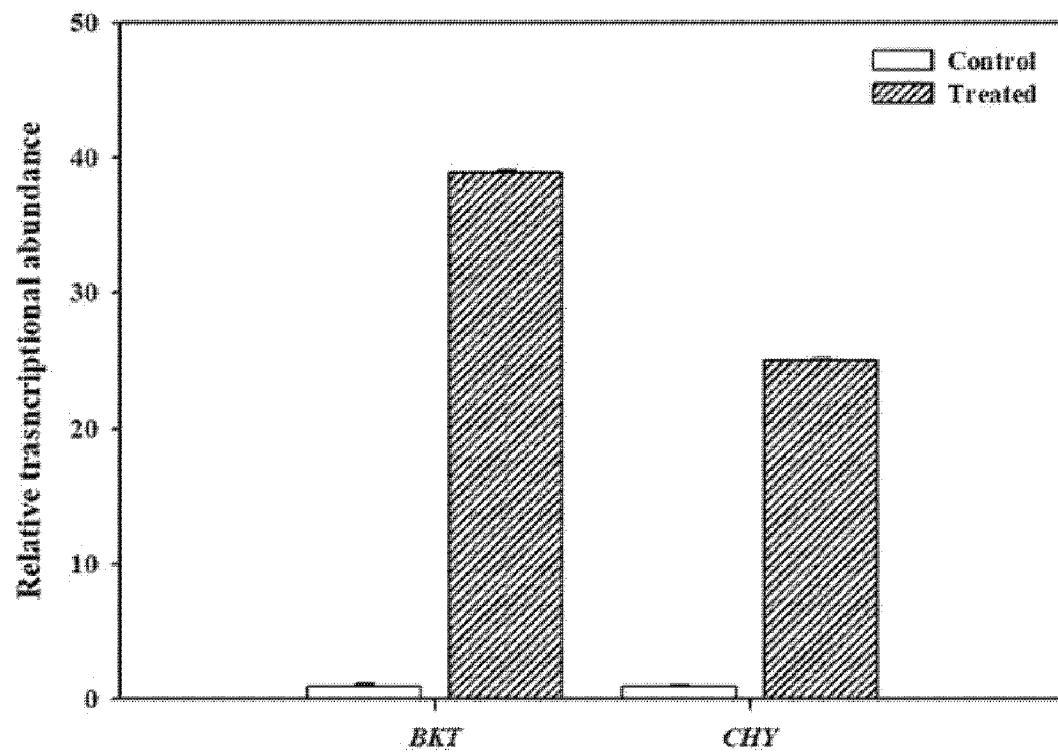
[도3e]



[도4a]



[도4b]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/003382

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N 1/12(2006.01)i; C12N 13/00(2006.01)i; C12P 23/00(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N 1/12(2006.01); C07C 49/603(2006.01); C12N 13/00(2006.01); C12P 23/00(2006.01); C12P 7/64(2006.01) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models: IPC as above Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 미세조류(microalgae), 초음파 처리(ultrasound treatment), 아스타잔틴(astaxanthin), 헤마토코쿠스 플루비아리스(Haematococcus pluvialis), 적색 휴면 포낭 세포(red cyst cell)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PAN-UTAI, Wanida et al. Combination of mechanical and chemical extraction of astaxanthin from Haematococcus pluvialis and its properties of microencapsulation. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 2021 (online publication date:26 March 2021), vol. 33, Article No. 101979, pp. 1-10. See abstract; and pages 1-2.	1-5
X	CN 106086002 A (YANGZHOU UNIVERSITY) 09 November 2016 (2016-11-09) See abstract; and claims 1-6.	1-5
X	KR 10-2015-0054525 A (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) 20 May 2015 (2015-05-20) See paragraphs [0022] and [0040]-[0041]; and claims 1, 5 and 13.	1-5
A	KR 10-2014-0125506 A (KOREA INSTITUTE OF ENERGY RESEARCH) 29 October 2014 (2014-10-29) See entire document.	1-5
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 15 June 2022		Date of mailing of the international search report 15 June 2022
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/003382

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2014-015841 A2 (EAST CHINA UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY et al.) 30 January 2014 (2014-01-30) See entire document.	1-5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2022/003382

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	106086002	A	09 November 2016	CN	106086002	B	06 August 2019
KR	10-2015-0054525	A	20 May 2015	None			
KR	10-2014-0125506	A	29 October 2014	KR	10-1477204	B1	29 December 2014
WO	2014-015841	A2	30 January 2014	US	2015-0252391	A1	10 September 2015
				WO	2014-015841	A3	20 March 2014

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 1/12(2006.01)i; C12N 13/00(2006.01)i; C12P 23/00(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 1/12(2006.01); C07C 49/603(2006.01); C12N 13/00(2006.01); C12P 23/00(2006.01); C12P 7/64(2006.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 미세조류(microalgae), 초음파 처리(ultrasound treatment), 아스타잔틴(astaxanthin), 헤마토코쿠스 플루비아리스(Haematococcus pluvialis), 적색 휴면 포낭 세포(red cyst cell)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	PAN-UTAI, WANIDA 등, "Combination of mechanical and chemical extraction of astaxanthin from Haematococcus pluvialis and its properties of microencapsulation", Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2021(온라인 공개일:2021.03.26), 33권, Article No.101979, 페이지 1-10 요약; 및 페이지 1-2 참조.	1-5
X	CN 106086002 A (YANGZHOU UNIVERSITY) 2016.11.09 요약; 및 청구항 1-6 참조.	1-5
X	KR 10-2015-0054525 A (서울대학교산학협력단) 2015.05.20 단락 [0022], [0040]-[0041]; 및 청구항 1, 5, 13 참조.	1-5
A	KR 10-2014-0125506 A (한국에너지기술연구원) 2014.10.29 전체 문헌 참조.	1-5
A	WO 2014-015841 A2 (EAST CHINA UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY 등) 2014.01.30 전체 문헌 참조.	1-5
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2022년06월15일(15.06.2022)		국제조사보고서 발송일 2022년06월15일(15.06.2022)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호

PCT/KR2022/003382

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
CN 106086002 A	2016/11/09	CN 106086002 B	2019/08/06
KR 10-2015-0054525 A	2015/05/20	없음	
KR 10-2014-0125506 A	2014/10/29	KR 10-1477204 B1	2014/12/29
WO 2014-015841 A2	2014/01/30	US 2015-0252391 A1	2015/09/10
		WO 2014-015841 A3	2014/03/20