



- (51) 국제특허분류: C12P 23/00 (2006.01) C12N 1/12 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2015/001530
- (22) 국제출원일: 2015년 2월 16일 (16.02.2015)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2014-0089342 2014년 7월 15일 (15.07.2014) KR
- (71) 출원인: 한국에너지기술연구원 (KOREA INSTITUTE OF ENERGY RESEARCH) [KR/KR]; 305-343 대전시 유성구 가정로 152 (장동), Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 이규복 (LEE, Kyu Bock); 305-335 대전시 유성구 농대로 55 (궁동, 대동빌리지) G 동 2 호, Daejeon (KR). 오유관 (OH, You Kwan); 305-720 대전시 유성구 가정로 65 (신성동, 대림두레아파트) 107 동 304 호, Daejeon (KR). 라마사미프라빈 쿠마 (RAMASAMY, Praveen Kumar); 305-343 대전시 유성구 가정로 152 (장동) 210 호, Daejeon (KR). 이지예 (LEE, Ji Ye); 343-010 충청남도 당진시 복문로 15 (읍내동, 당진 1 차푸르지오) 101 동 404 호, Chungcheongnam-do (KR). 주국택 (CHUE, Kuck Tack); 305-761 대전시 유성구 엑스포로

448 (전민동, 엑스포아파트) 407 동 1204 호, Daejeon (KR).

(74) 대리인: 김정수 (KIM, Jung Su); 138-827 서울시 송파구 올림픽로 360 (방이동) 5 층, Seoul (KR).

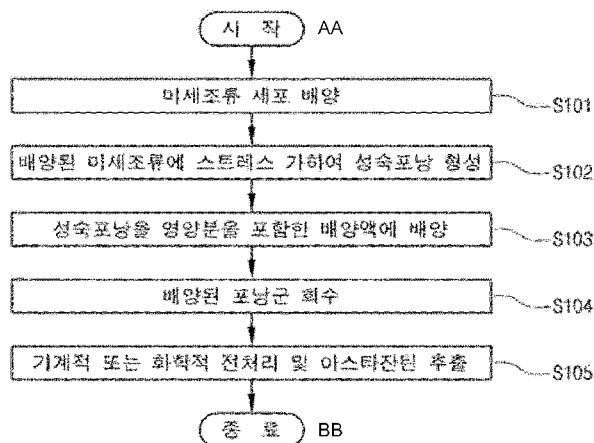
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

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

[다음 쪽 계속]

(54) Title: METHOD FOR EFFECTIVELY EXTRACTING ASTAXANTHIN FROM MICROALGAE BY USING CELL REDIFFERENTIATION

(54) 발명의 명칭 : 세포 재분화를 이용하여 미세조류로부터 아스타잔틴을 효율적으로 추출하는 방법



- S101 ... Culture microalgal cells
 S102 ... Form mature cysts by applying stress to cultured microalgae
 S103 ... Culture mature cysts in culture solution containing nutrients
 S104 ... Recovery cultured cyst group
 S105 ... Perform mechanical or chemical pretreatment and extract astaxanthin
 AA ... Start
 BB ... End

(57) Abstract: The present invention relates to a method for more effectively extracting astaxanthin, which is accumulated in a high concentration, from microalgal cells by obtaining microalgal cells of which the cell walls are weakened by redifferentiating the microalgal cells. The method for effectively extracting astaxanthin from microalgae comprises the steps of: (a) culturing microalgae; (b) forming mature cysts in which astaxanthin is accumulated, by applying stress to the cultured microalgae; (c) obtaining a culture solution containing mature cysts, divided cysts, released cysts and cyst walls by culturing the mature cysts in which astaxanthin is accumulated, in a culture solution containing nutrients so as to redifferentiate the same; (d) recovering a cyst group containing mature cysts, divided cysts, released cysts and cyst walls from the culture solution obtained in step (c); and (e) extracting astaxanthin by pretreating the recovered cyst group by a mechanical method or chemical pretreatment.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]



OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, **공개:**
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

본 발명은 미세조류 세포를 재분화시켜 세포벽이 약화된 미세조류 세포를 얻음으로써 미세조류 세포로부터 고농도로 축적된 아스타잔틴을 보다 효율적으로 추출하는 방법에 관한 것으로, 미세조류로부터 아스타잔틴(astaxanthin)을 효율적으로 추출하는 방법은 (a) 미세조류를 배양하는 단계와, (b) 배양된 상기 미세조류에 스트레스를 가하여 아스타잔틴을 축적한 성숙포낭(mature cyst)을 형성시키는 단계와, (c) 상기 아스타잔틴을 축적한 성숙포낭을 영양분이 포함된 배양액에 배양하여 재분화시킴으로써 성숙포낭, 분할포낭, 방출포낭 및 포낭벽을 포함한 배양액을 얻는 단계와, (d) 상기 단계 (c)에서 얻어진 상기 배양액에서 성숙포낭, 분할포낭, 방출포낭 및 포낭벽을 포함하는 포낭군을 회수하는 단계 및 (e) 상기 회수된 포낭군을 기계적 방법 또는 화학적 전처리하여 아스타잔틴을 추출하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.

명세서

발명의 명칭: 세포 재분화를 이용하여 미세조류로부터 아스타잔틴을 효율적으로 추출하는 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 미세조류로부터 아스타잔틴을 효율적으로 추출하는 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 미세조류(미세조류 세포)를 재분화시켜 세포벽이 약화된 미세조류를 얻음으로써 미세조류로부터 고농도로 축적된 아스타잔틴을 보다 효율적으로 추출할 수 있는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 적색의 케토카로티노이드(Ketocarotenoid)인 아스타잔틴(Astaxanthin, 3,3'-dihydroxy- β,β' -carotene-4,4'-dione)은 식물 및 미세조류 등에서만 생산하며, 동물 체내에서 자체합성이 불가능하여 외부에서 공급이 필요한 불포화성 이소프렌 유도체의 일종이다. 이러한 아스타잔틴은 홍색 해조류에 다량 함유되어 있고, 이를 먹이로 하는 적색 또는 황색의 열대어나 갑각류에도 함유되어 있다.
- [3] 상기 아스타잔틴은 자외선 조사로부터 피부를 방어할 수 있으며, 노화와 관련있는 망막황반의 퇴화(AMD)를 개선할 수 있고, 화학물질에 의해 발생하는 암으로부터 방어할 수 있으며, 고밀도 지방단백을 증가시키고, 면역시스템을 강화할 수 있는 장점이 있다. 특히, 막 인지질과 다른 지질들을 과산화로부터 보호하는데 뛰어난 능력이 있으며, 항산화 능력이 베타카로틴이나 다른 카로티노이드와 비교할 때 약 20 배 정도 우수하고 기준에 항산화제로 가장 널리 알려져 있는 비타민 E보다 약 500 배 정도 높다.
- [4] 이러한 높은 항산화 활성기능으로 인해 아스타잔틴은 의약품료, 식품 첨가제 및 화장품 등 정밀 화학물질 제조 원료로 널리 사용되고 있고, 그 수요량 및 활용 범위가 급격히 확대될 것으로 예상된다.
- [5] 상기 아스타잔틴은 효모균주인 파피아 로드지마(*Phaffia rhodozyma*)와 조류인 헤마토코쿠스 종(*Haematococcus*) 및 버비박테리아(*Brevibacterium*)에서 생성되며, 해양동물과 담수동물에 많이 분포되어 있지만(Phytochemistry, 15; 1003, 1976), 새우나 가재 등의 갑각류에서 추출된 아스타잔틴은 함량이 적고, 추출과정이 어려워 적용되지 않고 있으며, 파피아로드지마 균주는 성장률이 높으나 아스타잔틴의 생산성이 적고, 단단한 세포벽 때문에 추출에도 많은 어려운 점이 있다.
- [6] 또한 녹조류 헤마토코쿠스 종(*Haematococcus*)은 효모 파피아 로드지마에 비해 월등히 높은 아스타잔틴 축적량을 가지고 있으나, 낮은 성장속도와 두꺼운 세포벽 및 낮은 세포밀도와 같은 문제점으로 인해 빠른 성장성을 갖는 파피아 로드지마보다 선호성 및 산업성이 미약하다. 하지만, 높은 아스타잔틴의

축적량을 가지고 있는 헤마토코쿠스 종(Haematococcus)의 단단한 세포벽을 효율적으로 파괴하여 축적된 아스타잔틴을 추출할 수 있다면, 고농도의 아스타잔틴을 회수할 수 있을 것이다.

- [7] 따라서 아스타잔틴의 상업화를 위해서는 헤마토코쿠스 종의 세포 내에 축적된 아스타잔틴의 고효율 추출방법의 개발이 요구되고 있다. 지금까지 제시된 대표적 헤마토코쿠스 종(Haematococcus)의 아스타잔틴 추출 방법은 헤마토코쿠스 종을 배양하여 성숙포낭(Mature Cyst) 단계에서 아스타잔틴의 추출이 이루어졌다. 이 때, 배양 시 영양분을 공급하지 않는 등 스트레스 환경 하에서 포낭이 노화됨에 따라 아스타잔틴을 고농도로 축적시킬 수 있으나, 성숙포낭 단계에서는 세포벽이 매우 단단하여 세포벽의 파쇄가 어려운 단점이 있다.
- [8] 지금까지 제시된 대표적인 헤마토코쿠스 종으로부터 아스타잔틴을 추출하는 방법으로, 예를 들어, 미국특허 제 4,871,551호 및 미국특허 제 6,022,701호에는 수분을 완전히 제거한 균주를 액체 질소로 냉동시킨 후 임팩트 밀(High speed impact mill or jet mills)을 이용하여 분말화하고, 이를 통하여 균주의 세포벽을 파괴시켜 아스타잔틴을 추출할 수 있는 기술이 개시되어 있다.
- [9] 또한, 대한민국 특허공개 제 2000-0072136호에는 헤마토코쿠스 종을 물에 현탁시켜 마이크로웨이브를 사용하여 아스타잔틴을 추출하는 기술이 개시되어 있고, 또한, Appl. Environ. Microbiol., 35; 1155, 1978에는 헤마토코쿠스 종을 물리적 균질화기(Homogenizer)와 같은 기계를 사용하여 세포벽을 파괴한 후 용매로 아스타잔틴을 추출하는 물리적 방법 및 세포벽을 분해하는 효소, 즉 셀룰라아제, 펙틴나아제, 프로테아제 등을 이용하여 세포벽을 파괴한 후 아스타잔틴을 추출하는 생물학적 방법 등이 개시되고 있다.
- [10] 그러나 종래 기술에 있어서 상기와 같은 방법들은 헤마토코쿠스 종의 성숙포낭(mature cyst) 상태에서 실시되며 이는 두꺼운 세포벽으로 인해 아스타잔틴 추출 시, 낮은 추출 속도와 높은 아스타잔틴 파괴율, 많은 노동력 및 고처리 비용 등의 문제점들이 존재하여 상업적으로 널리 이용되지 못하는 문제가 있다. 따라서 헤마토코쿠스 종(Haematococcus)을 이용한 아스타잔틴의 상업적 대량 생산을 위해서는 균주로부터 고농도의 아스타잔틴을 효율적으로 추출할 수 있는 새로운 고효율 아스타잔틴 분리 공정이 필요하다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [11] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 미세조류를 재분화시켜 아스타잔틴을 포함하고 있는 포낭의 세포벽을 약화시킴으로써, 미세조류로부터 고농도로 축적된 아스타잔틴을 보다 효율적으로 추출하는 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [12] 본 발명에 따른 미세조류로부터 고농도의 아스타잔틴을 효율적으로 추출하는

방법은, (a) 미세조류를 배양하는 단계와, (b) 배양된 상기 미세조류에 스트레스를 가하여 아스타잔틴을 축적한 성숙 포낭(mature cyst)을 형성시키는 단계와, (c) 상기 아스타잔틴을 축적한 성숙 포낭을 영양분이 포함된 배양액에 배양하여 재분화시킴으로써 성숙포낭, 분할포낭, 방출포낭 및 포낭벽을 포함한 배양액을 얻는 단계와, (d) 상기 단계 (c)에서 얻어진 상기 배양액에서 성숙포낭, 분할포낭, 방출포낭 및 포낭벽을 포함하는 포낭군을 회수하는 단계 및 (e) 상기 회수된 포낭군을 기계적 방법 또는 화학적 전처리하여 아스타잔틴을 추출하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[13] 또한, 본 발명에 따른 미세조류로부터 아스타잔틴을 효율적으로 추출하는 방법은, 상기 단계 (a)에서, 상기 미세조류는 헤마토코커스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*)인 것을 특징으로 한다.

[14] 또한, 본 발명에 따른 미세조류로부터 아스타잔틴을 효율적으로 추출하는 방법은, 상기 단계 (b)에서, 상기 미세조류에 스트레스를 가하는 방법은 질소원이 고갈된 배지에서의 배양, 인산염이 고갈된 배지에서의 배양, 설정된 온도 충격, 일광, 소금이 첨가된 배지에서의 배양, CO₂를 고정된 배지에서의 배양 및 아세테이트(CH₃COO-)첨가 배지에서의 배양 중 선택된 어느 하나에서 배양하는 것을 특징으로 한다.

[15] 또한, 본 발명에 따른 미세조류로부터 아스타잔틴을 효율적으로 추출하는 방법은, 상기 단계 (c)에서, 상기 영양분을 포함한 배지는 최적의 미세조류 재분화에 필요한 비제한적 수준의 영양소를 갖는 배지를 포함하는 것을 특징으로 하며, 상기 영양소는 질산염, 인산염, 비타민 중 적어도 어느 하나를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[16] 또한, 본 발명에 따른 미세조류로부터 아스타잔틴을 효율적으로 추출하는 방법은, 상기 단계 (c)에서, 상기 성숙포낭, 분할포낭, 방출포낭 및 포낭벽을 포함하는 배양액은 재분화율이 70 % 이하에 해당하는 것을 얻는 것을 특징으로 한다.

[17] 또한, 본 발명에 따른 미세조류로부터 아스타잔틴을 효율적으로 추출하는 방법은, 상기 단계 (c)에서, 상기 분할포낭과 방출포낭은 성숙포낭의 재분화에 의해 세포벽의 강도가 약해진 것을 특징으로 한다.

[18] 또한, 본 발명에 따른 미세조류로부터 아스타잔틴을 효율적으로 추출하는 방법은, 상기 단계 (d)에서, 상기 분할세포와 방출세포를 회수하는 방법은 원심분리, 막 여과, 부상분리 및 화학침전 중 선택된 어느 하나의 방법인 것을 특징으로 한다.

[19] 또한, 본 발명에 따른 미세조류로부터 아스타잔틴을 효율적으로 추출하는 방법은, 상기 단계 (e)에서, 상기 기계적 전처리는 압력파쇄 또는 호모제니제이션(homogenization)에 의한 방법인 것을 특징으로 한다.

[20] 또한, 본 발명에 따른 미세조류로부터 아스타잔틴을 효율적으로 추출하는 방법은, 상기 단계 (e)에서, 상기 화학적 전처리는 이온성 액체를 이용한 방법인

것을 특징으로 한다.

[21] 또한, 본 발명은 미세조류로부터 아스타잔틴을 효율적으로 추출하는 방법에 의해 제조된 아스타잔틴을 제안한다.

[22] 아울러, 본 발명은 상기 아스타잔틴을 화장품 용도, 사료용 또는 식품첨가물에 사용하는 방법을 제안한다.

발명의 효과

[23] 본 발명에 따르면 미세조류 세포를 재분화시켜 세포벽이 약화된 미세조류 세포를 얻음으로써 미세조류 세포로부터 고농도로 축적된 아스타잔틴을 보다 효율적으로 추출하는 방법을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[24] 도 1은 본 발명에 따른 미세조류로부터 아스타잔틴을 효율적으로 추출하는 방법을 나타내는 흐름도이다.

[25] 도 2는 본 발명에 따른 헤마토코커스 플루비알리스의 성숙포낭에서 재분화를 거쳐 나타나는 세포타입, 즉 a)성숙 포낭, b)분할 포낭, c)방출 포낭, d)포낭 벽을 나타낸 사진이다.

[26] 도 3은 본 발명의 실시예에 따라 압력파쇄(french press)에 의한 기계적 전처리를 이용하여 헤마토코커스 플루비알리스 세포의 재분화율에 따른 세포당 아스타잔틴 추출량을 나타낸 결과 그래프이다.

[27] 도 4는 본 발명의 실시예에 따라 호모제니제이션(homogenization)에 의한 기계적 전처리를 이용하여 헤마토코커스 플루비알리스 세포의 재분화율에 따른 세포당 아스타잔틴 추출량을 나타낸 결과 그래프이다.

[28] 도 5는 본 발명의 실험예에 따라 헤마토코커스 플루비알리스 세포의 성숙포낭에 상압 및 60 °C 조건 하에서 이온성 액체([Bmim]MeSO₄)와 반응시켜 20 분이 경과한 후의 광학현미경 사진이다.

[29] 도 6은 본 발명의 실험예에 따라 헤마토코커스 플루비알리스 세포의 분할포낭에 상압 및 상온 조건 하에서 이온성 액체([Bmim]MeSO₄)와 반응시켜 수분이 경과한 후의 광학현미경 사진이다.

[30] 도 7은 본 발명의 실험예에 따라 헤마토코커스 플루비알리스 세포의 방출포낭에 상압 및 상온 조건 하에서 이온성 액체([Bmim]MeSO₄)와 반응시킨 직후 및 2분이 경과한 후의 광학현미경 사진이다.

[31] 도 8은 본 발명의 비교예에 따라 각각 성분을 달리한 6 가지 NIES-C 배지에 옮겨 배양 후 옮긴 시점을 기준으로 매 6 시간마다 재분화율을 나타낸 결과 그래프이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[32] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[33] 도 1은 본 발명에 따른 미세조류 세포로부터 아스타잔틴을 추출하는 방법을 나타내는 흐름도이다. 도면에 나타낸 바와 같이, 본 발명은 미세조류 세포

재분화를 이용하여 미세조류 세포로부터 아스타잔틴을 효율적으로 추출하는 방법을 제공한다.

- [34] 본 발명의 아스타잔틴의 생산 방법은 미세조류로부터 아스타잔틴(astaxantin)의 추출에 있어서, 미세조류를 배양하는 단계(S101)와, 배양된 상기 미세조류에 스트레스를 가하여 아스타잔틴을 축적한 성숙 포낭(mature cyst)을 형성시키는 단계(S102)와, 상기 아스타잔틴을 축적한 성숙 포낭을 영양분이 포함된 배양액에 배양하여 재분화시킴으로써 성숙포낭, 분할포낭, 방출포낭 및 포낭벽을 포함한 배양액을 얻는 단계(S103)와, 상기 단계 S103에서 얻어진 상기 배양액에서 성숙포낭, 분할포낭, 방출포낭 및 포낭벽을 포함하는 포낭군을 회수하는 단계(S104) 및 상기 회수된 포낭군을 기계적 또는 화학적 전처리하여 아스타잔틴을 추출하는 단계(S105)를 포함한다.
- [35] 여기서, 상기 단계(S101)는 미세조류를 배양하는 단계로, 이 미세조류의 배양을 통해 지수기의 미세조류 세포를 얻을 수 있다.
- [36] 또한, 상기 미세조류는 헤마토코커스 플루비알리스(Haematococcus pluvialis)를 사용하는 것이 적합하다.
- [37] 또한, 이 단계(S101)에서 배양 조건 및 배양 배지는 당해 분야에 널리 알려져 있는 조건 및 배지를 그대로 이용하면 되며, 예를 들어, pH 7.5의 NIES-C 배지를 사용할 수 있다.
- [38] 그리고, 상기 단계 S102는 단계 S101를 거친 헤마토코커스 플루비알리스에 스트레스를 가하여 아스타잔틴을 축적한 성숙포낭을 형성시키는 단계로, 상기 스트레스를 가하는 방법은 질소원이 고갈된 배지에서의 배양, 인산염이 고갈된 배지에서의 배양, 높은 온도 충격, 일광, 소금이 첨가된 배지에서의 배양, CO₂를 고정된 배지에서의 배양 및 아세테이트(CH₃COO-)첨가 배지에서의 배양 중 선택된 어느 하나 또는 그 이상의 조합된 환경을 조성하는 것이 바람직하다.
- [39] 이 중 상기 질소원이 고갈된 배지는 특별히 그 종류가 제한되지 않으며, 예를 들어, 후술된 NIES-C 배지에서 질소원이 고갈된 배지인 NIES-N 배지를 이용할 수 있으며 구체적으로 NIES-C 배지의 조성물 중 Ca(NO₃)₂ 0.15 g/L와 KNO₃ 0.10 g/L를 각각 CaCl₂·2H₂O 0.13 g/L와 KCl 0.07g/L로 대체한 배지를 사용할 수 있다.
- [40] 그리고, 상기 단계 S103은, 단계 S102를 거쳐 형성된 성숙포낭(mature cyst)을 영양분이 포함된 배양액에 배양하여 재분화시킴으로써 성숙포낭, 분할포낭, 방출포낭 및 포낭벽을 포함한 배양액을 얻는 단계로, 이러한 재분화를 통해 성숙포낭, 분할포낭, 방출포낭의 세포벽의 강도를 약화시켜 각 포낭에 포함된 아스타잔틴의 추출을 용이하게 할 수 있다.
- [41] 여기서, 상기 영양분을 포함한 배지는 최적의 세포 재분화에 필요한 비제한적 수준의 영양소를 갖는 배지이며, 상기 영양소는 질산염, 인산염, 비타민 중 적어도 어느 하나를 포함하는 것이 바람직하다.
- [42] 구체적인 예로는, pH 7.5의 NIES-C 배지를 사용할 수 있다. 특히, 본 단계에서 상기 배양액에 포함된 질산염, 인산염 또는 비타민 중 적어도 어느 하나에

- 속하는 조성물의 농도 및 조성을 달리하여 재분화 속도를 조절할 수 있다.
- [43] 또한, 상기 성숙포낭, 분할포낭, 방출포낭 및 포낭벽을 포함하는 배양액은 재분화율이 70 % 이하에 해당하는 것을 얻는 것이 바람직한데, 이는 분할포낭 및 방출포낭이 가장 많이 분포하는 범위에 해당하며, 결과적으로 아스타잔틴의 추출율이 가장 높게 나타나기 때문이다.
- [44] 참고로, 전체 포낭을 성숙포낭, 분할포낭, 방출포낭 및 포낭벽의 4 종류로 구분하는 경우, 상기 재분화율은 성숙포낭, 분할포낭, 방출포낭 및 포낭벽 중 분할포낭, 방출포낭 및 포낭벽이 차지하는 비율을 말한다.
- [45] 상기 단계 S104는, 단계 S103에서 얻어진 상기 배양액에서 성숙포낭, 분할포낭, 방출포낭 및 포낭벽을 포함하는 포낭균을 회수하는 단계로서, 예를 들어 원심분리, 막여과, 부상분리 또는 화학침전 등을 통해 회수할 수 있다.
- [46] 상기에서 언급한 회수하는 방법은 당해 분야에 널리 알려져 있는 방법으로 수행할 수 있으며, 본 발명의 특징이 아니므로 본 명세서에서 자세한 설명은 생략하기로 한다.
- [47] 아울러, 상기 단계 S105에서, 회수된 포낭균을 기계적 또는 화학적 전처리하여 아스타잔틴을 추출하는 방법은 특별히 그 종류가 제한되지 않으며, 예를 들어, 압력과쇄 또는 호모제니제이션에 의한 기계적 전처리 및 이온성 용액의 첨가에 의한 화학적 전처리 중 선택된 어느 하나의 방법에 의해 실시될 수 있다. 이 단계(S105)에서 세포를 추출하는 기계적 또는 화학적 전처리 방법은 당해 분야에 널리 알려져 있는 통상적인 방법으로 실시될 수 있으므로 본 명세서에서 자세한 설명은 생략하기로 한다.
- [48] <실시예>
- [49] 본 발명에 사용된 균주는 *Haematococcus pluvialis* NIES-144로서 National Institute for Environmental studies, University of Tokyo, Japan으로부터 구입되었다. 또한, 본 실험에 사용된 배지의 종류는 모두 2가지로서 NIES-C 및 NIES-N 배지이고, 이들의 구성성분을 하기 [표 1]에 나타내었다.
- [50] 또한, 상기 NIES-C 및 NIES-N 배지의 pH는 7.5에 맞추었고 0.2 μ m 필터를 이용하여 멸균하였다.
- [51] [표 1] NIES-C 배지 및 NIES-N 배지의 구성성분

[52]

NIES-C		NIES-N	
성분	합량(/L)	성분	합량(/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	

[53] (1) 배양 단계

[54] Agar 배지에서 자란 헤마토코커스 플루비알리스(NIES-144)의 군집 하나를 250 mL 삼각플라스크에 도달된 100 mL의 NIES-C 배지에 옮겨 배양하였다. 이때, 상기 배양은 25°C 및 150 rpm 조건 하의 진탕배양기(IS-971RF, Lab Companion, Korea)로 배양하였으며, 이때 4개의 백색형광램프를 이용하여 14 일간 40 μmol/m²s의 광도로 연속 조사하였다.

[55] 이어서, 광생물 반응기를 이용한 회분식 배양을 수행하였으며, 상기 배양은 Prex 유리로 제작된 기포탑 광생물반응기(bubble-column photobioreactor, b-PBR) (길이, 35 cm; 내경, 3.7 cm; 배양용량, 500 mL)에서 수행되었다. 이때, 접종 농도는 초기 optical density (OD, 680 nm) 0.1로 설정하였으며, 상기 기포탑 광생물반응기의 하단부에 5 %(v/v) CO₂ in air를 0.4 vvm로 연속적으로 공급하였다.

[56] 여기서, 공급되는 가스는 0.2 μm PTFE 주사기필터(Minisart SRP15, Satorius stedium biotech., Germany)를 이용하여 여과하였고 유량조절장치(MKP, Korea)와 유량계(Dwyer instruments Inc., USA)를 이용하여 반응기에 공급하였다.

[57] 또한, 상기 배양은 25 °C에서 25 μmol/m²·s의 광도로 12 시간 주기의 light/dark 조건으로 세팅된 광생물배양기 (Photoincubator) (GC-300, JEIO TECH, Korea)에서 15 일간 수행되었다. 그 결과, 헤마토코커스 플루비알리스가 분화하여 지수기의 헤마토코커스 플루비알리스 세포들을 얻었다.

[58] (2) 스트레스를 가하는 단계

[59] 상기 (1)의 배양 결과 얻어진 지수기의 헤마토코커스 플루비알리스 세포들은 3000 rpm으로 2 분 동안 원심분리하여 수확하였고, 멸균된 증류수로 세척한 후

300 mL 깔대기 형태의 광생물 반응기에 도달된 NIES-N 배지에 옮겨 아스타잔틴 축적을 유도하였다.

- [60] 이때, 접종농도는 초기 OD(680 nm) 0.9로 설정하였으며, 광생물반응기의 하단부에 5 % (v/v) CO₂ in air를 0.4 vvm로 연속적으로 공급하였다. 또한, 상기 광생물반응기는 69 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ 의 광도로 26 °C에서 15일간 배양시켰다.
- [61] 그 결과, 헤마토코커스 플루비알리스 세포에 적색 물질이 축적된 성숙포낭을 얻었다.
- [62] (3) 재분화 단계
- [63] 상기 (2)에서 얻어진 헤마토코커스 플루비알리스의 성숙포낭을 3000 rpm으로 2분간 원심분리하여 수확하였으며, 멸균된 증류수로 세척한 후 NIES-C 배지에 옮겨 배양하였다.
- [64] 여기서, 상기 배양은 25 °C, 150 rpm, 40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ 로 설정된 조건하의 진탕배양기(IS-971RF, Lab Companion, Korea)에서 24시간 동안 수행되었다. 그 결과, 헤마토코커스 플루비알리스의 성숙포낭이 재분화되어 성숙포낭, 분할포낭, 방출포낭 및 포낭벽을 포함하는 배양액을 얻었다.
- [65] (4) 회수 단계
- [66] 상기 (3)에서 재분화를 거친 포낭들을 회수하기 위하여 4000 rpm에서 2분간 원심분리하여 상기 포낭들을 수확한 후 증류수로 세척하였다.
- [67] (5) 추출 단계
- [68] 상기 (4)에서 회수된 포낭들로부터 아스타잔틴을 추출하기 위하여 후술되는 압력과쇄에 의한 기계적 전처리, 호모제니제이션(homogenization)을 이용한 기계적 전처리 또는 이온성 용액의 첨가에 의한 화학적 전처리를 수행함으로써 아스타잔틴을 추출하였다.
- [69] 1. 압력과쇄(French Press)를 이용한 기계적 전처리 및 아스타잔틴 추출
- [70] 상기 실시예 (4)에서 회수된 포낭들을 high pressure 파쇄법(French pressure cell press, Thermo Electron Corporation, USA)을 이용하여 30000 psi에서 파쇄하였다.
- [71] 이후, 파쇄된 포낭 1mL에 에틸아세테이트(ethyl acetate) 5 mL를 첨가한 후 방치하여 에틸아세테이트 층과 물 층으로 층 분리가 일어나도록 하였다.
- [72] 그리고, 에틸아세테이트 층과 물 층으로 분리가 일어난 용액을 1 mL로 증발 농축하여 아스타잔틴 추출물을 얻었다.
- [73] 상기에서 얻어진 아스타잔틴 추출물의 양을 측정하기 위해서, 상기 아스타잔틴 추출물에 1 mL의 0.025 N NaOH 메탄올 용액을 첨가하여 검화(saponification)하고 교반한 후 4 °C에서 70분간 보관하였다.
- [74] 이후, variable wavelength detector (VWD)와 250 X 4.6-mm YMC 카르테노이드(carotenoid) 컬럼이 장착된 고성능 액체크로마토그래피(High-performance liquid chromatography, HPLC, Agilent 1260 series, Agilent, USA)를 이용하여 아스타잔틴 추출물의 양을 측정하였다.
- [75] 이동상은 메탄올, MTBE(methyl tertiary butyl ether) 및 1 % phosphoric acid로

구성되었으며, 유량, 주입용량 및 검출 파장은 각각 1.0 ml/min, 20 μ L 및 474 nm로 맞추었다. 또한, 자유 아스타잔틴(free astaxanthin)을 분리하기 위해서 기울기 용리를 이용하였다(메탄올:MTBE:1%Phosphoric acid = 81 : 15 : 4, 15 분; 81 : 15 : 4에서 16 : 80 : 4, 27 분; 81 : 15 : 4, 35 분).

[76] 상기의 기계적 방법을 통한 아스타잔틴의 추출은 후술되는 재분화율에 따라 분류된 포낭들을 대상으로 반복하여 수행하였다.

[77] 여기서, 상기 재분화율은 실시예 (4)에서 얻어진 전체 포낭을 성숙포낭, 분할포낭, 방출포낭, 포낭벽의 4 종류로 구분하여 이 중 분할포낭, 방출포낭 및 포낭벽이 차지하는 비율을 말하며, 이를 위한 각 포낭 수 측정에는 improved Neubauer counting chamber (C-Chip, DHC-N01, iNCYTO, Korea)을 사용하였다.

[78] 또한, 상기 실시예 (3)의 재분화를 시작한 시점으로부터 매 6시간마다 실시예 (4)의 방법으로 포낭들을 회수하여 재분화율을 구하였다.

[79] 도 3은 상기에서 구한 헤마토코커스 플루비알리스 세포의 재분화율에 따른 아스타잔틴의 추출량을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

[80] 도 3에 도시한 바와 같이 헤마토코커스 플루비알리스 세포의 재분화율이 증가함에 따라 아스타잔틴 추출량이 증가하여 약 60 %에서 아스타잔틴 추출량이 약 76 pg/cell로 최대치를 나타냈다. 이후 점차 감소하여 분화율이 약 70 % 정도가 되었을 때에는 분화 전과 비슷한 추출량을 나타냈다.

[81] 2. 호모제니제이션(homogenization)을 이용한 기계적전처리 및 아스타잔틴 추출

[82] 상기 실시예 (4)에서 회수된 세포를 호모제니제이션(homogenization)을 이용하여 기계적 파쇄 후 아스타잔틴을 추출하였다.

[83] 상기 호모제니제이션은 in-line disperser (Colloid mill, ESYN μ -TRON LAB/P, Korea)를 이용하여 수행하였다. 세포 약 1 g/L를 회전자(rotor)와 고정자(stator)의 간극을 0.1 mm로 고정하여 7000 rpm의 속도로 60 분 동안 반응시켜 파쇄 여부를 확인한 후 아스타잔틴 추출량을 측정하였다. 아스타잔틴 추출은 3 mL의 배양액을 취하고 3 mL의 에틸아세테이트를 더하여 격렬하게 혼합한 후 3000 rpm에서 10분간 원심분리하여 층분리 하였다.

[84] 그 후 1 mL의 에틸아세테이트를 증발농축한 후 앞에서 설명한 아스타잔틴 추출물의 양을 측정하는 방법에 따라 HPLC로 정량하였다.

[85] 그 결과 파쇄하는 시간이 증가할수록 세포의 평균 크기는 작아지고 세포의 개수는 늘어나는 경향을 보였으며, 60분 동안 파쇄했을 시에는 15 ~ 60 μ m 범위에 있는 세포들이 파쇄되어 세포의 개수와 크기가 줄어들고, 2 ~ 15 μ m 범위에 있는 세포들의 잔해가 늘어난 것이 관찰됐다. 특히 24 시간 동안 성숙포낭 분화과정을 거친 세포의 수가 최대인 것을 확인할 수 있었다.

[86] 또한, 상기 기계적 파쇄 과정을 거친 세포를 현미경으로 관찰한 결과 분할포낭의 세포파쇄가 가장 쉽게 일어나는 것을 확인 할 수 있었다.

[87] 또한, 고정자와 회전자 사이에서 세포가 충돌, 전단력, 진공현상

(cavitation)등을 통해 세포 내부 물질이 서로 섞이고 내부 벽 또한 파쇄된 것을 확인 할 수 있었다.

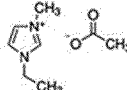
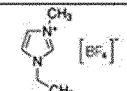
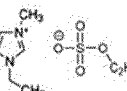
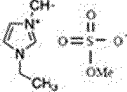
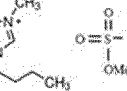
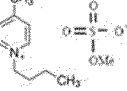
[88] 도 4에 도시한 바와 같이 재분화율이 낮을수록 아스타잔틴의 추출율이 적게 나타났는데 이는 분화가 되지 않은 성숙포낭의 경우 세포파쇄가 이루어지지 않기 때문이다.

[89] 또한, 재분화율이 증가함에 따라 아스타잔틴 추출율의 급격한 증가를 보이다가 약 60%에서 아스타잔틴의 추출율이 약 90 pg/cell로 최대 추출율을 보인 후 감소하였다.

[90] 3. 이온성 액체를 이용한 화학적 전처리 및 아스타잔틴 추출

[91] 상기 실시예 (3)의 과정을 거쳐 재분화율이 60 % 이상이 됐을 때, 배양액 중 1 mL를 취하여 4000 rpm 에서 2 분간 원심분리하여 세포를 수확한 후 증류수로 세척하였다. 수확된 세포는 [표 2]의 (A) 내지 (F)에 해당하는 다양한 종류의 이온성액체 500 μ L와 30분간 28 $^{\circ}$ C에서 반응시키고 4000 rpm으로 2 분간 원심분리하여 이온성액체 층을 분리함으로써 아스타잔틴을 추출하였다.

[92] [표 2]

이온성액체		구조
이름	약자	
1-ethyl-3-methylimidazolium acetate	[Emim]OAc	
1-ethyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate	[Emim]BF ₄	
1-ethyl-3-methylimidazolium ethylsulfate	[Emim]EtSO ₄	
1-ethyl-3-methylimidazolium methylsulfate	[Emim]MeSO ₄	
1-butyl-3-methylimidazolium methylsulfate	[Bmim]MeSO ₄	
1-butyl-3-methylpyridinium methylsulfate	[Bmpy]MeSO ₄	

[94] <실험예>

[95] 상기 실시예 (4)에서 회수된 포낭 중 성숙포낭을 상온 및 60 $^{\circ}$ C의 온도 분위기에서 20 분 동안 이온성 액체인 1-butyl-3-methylimidazolium과 반응시켰다. 이를 광학현미경(Zeiss Imager A2 fluorescence microscope, Zeiss, Germany)을 이용하여 관찰하였고 그 결과를 도 5에 나타냈다.

[96] 도 5에 나타낸 바와 같이, 상온에서 뿐만 아니라 60 $^{\circ}$ C에서도 성숙포낭의 형태 등에 있어서 어떠한 변화도 관찰되지 않았다.

- [97] 또한, 상기에서 회수된 포낭 중 분할포낭 및 방출포낭을 상온에서 20분 동안 이온성 액체인 1-butyl-3-methylimidazolium과 반응시켰다.
- [98] 이를 광학현미경(Zeiss Imager A2 fluorescence microscope, Zeiss, Germany)을 이용하여 관찰하였고 그 결과를 도 6 및 도 7에 나타냈다.
- [99] 도면에 나타난 바와 같이, 분할포낭 및 방출포낭의 경우 수분 이내에 붉은색 아스타잔틴이 추출되는 것을 확인하였다. 따라서, 성숙포낭이 재분화된 형태인 분할포낭 및 방출포낭이 이온성 액체를 통한 아스타잔틴 추출에 적합한 것을 확인할 수 있었다.
- [100] <비교예>
- [101] 상기 실시예 (2)에서 얻은 헤마토코커스 플루비알리스의 성숙포낭을 300 0rpm으로 2 분간 원심분리하여 수확하였으며, 멸균된 증류수로 세척한 후 [표 3]과 같이 각각 성분을 달리한 6 가지 NIES-C 배지로 옮겨 배양하였다. 이에 따라 얻어진 포낭들을 성숙포낭, 분할포낭, 방출포낭 및 포낭벽의 4 종류로 구분하여 옮긴 시점을 기준으로 매 6 시간마다 재분화율을 구하였으며, 그 결과를 도 8에 나타내었다.
- [102] 도 8의 (A) 내지 (F)에 도시된 바와 같이 시간이 경과함에 따라 재분화율이 증가하는 것을 관찰하였다.
- [103] 또한, 24시간이 경과했을 시의 재분화율은 각각 도 8의 (A) 배지를 사용했을 시에는 82.35 %, (B) 배지를 사용했을 시에는 63.89 %, (C) 배지를 사용했을 시에는 84.21 %, (D) 배지를 사용했을 시에는 81.48 %, 그리고 (E) 및 (F) 배지를 사용했을 시에는 100 %로 나타났다. 따라서, 시간에 따른 재분화율이 배지의 구성에 따라 변화가 있음을 확인하였다.

[104] [표 3]

[105]

Treatment	배지농도(NIES-C)	각 구성성분 농도
(A)	1 X	—
(B)	0.5 X	—
(C)	2 X	—
(D)	1 X	2 X vitamins
(E)	1 X	2 X nitrate
(F)	1 X	2 X vitamins & nitrate

산업상 이용가능성

- [106] 본 발명에 따르면, 미세조류 세포를 재분화시켜 세포벽이 약화된 미세조류 세포를 얻음으로써 세포로부터 고농도로 축적된 아스타잔틴을 보다 용이하게

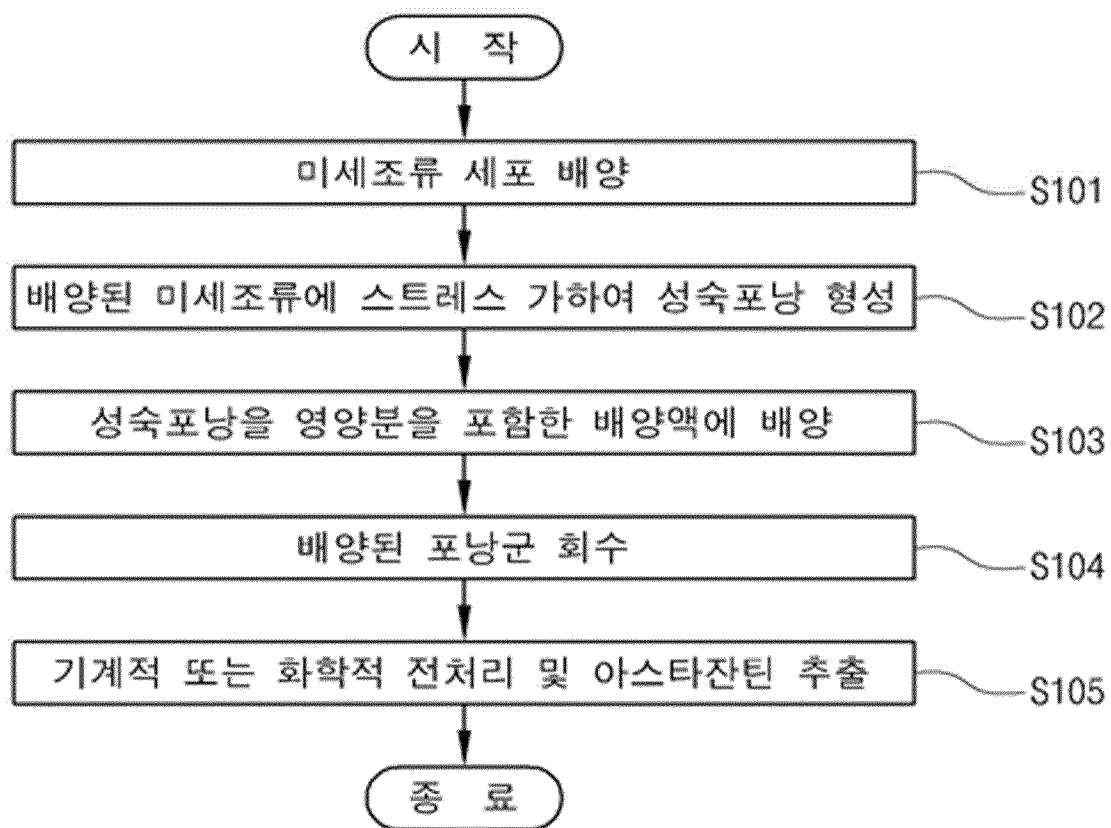
추출할 수 있어, 치어의 사료, 의약품, 식품첨가제로 사용되는 아스타잔틴을 보다 효율적으로 추출할 수 있다.

청구범위

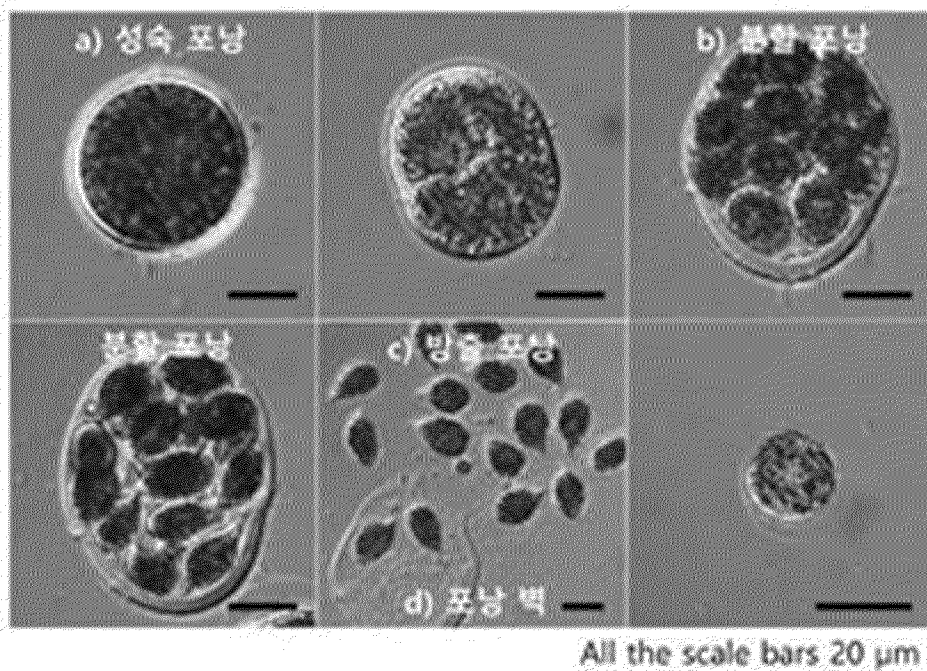
- [청구항 1] 미세조류로부터 아스타잔틴(astaxantin)의 추출에 있어서,
 (a) 미세조류를 배양하는 단계;
 (b) 배양된 상기 미세조류에 스트레스를 가하여 아스타잔틴을 축적한 성숙 포낭(mature cyst)을 형성시키는 단계;
 (C) 상기 아스타잔틴을 축적한 성숙 포낭을 영양분이 포함된 배양액에 배양하여 재분화시킴으로써 성숙포낭, 분할포낭, 방출포낭 및 포낭벽을 포함한 배양액을 얻는 단계;
 (d) 상기 단계 (c)에서 얻어진 상기 배양액에서 성숙포낭, 분할포낭, 방출포낭 및포낭벽을 포함하는 포낭군을 회수하는 단계; 및
 (e) 상기 회수된 포낭군을 기계적 방법 또는 화학적 전처리하여 아스타잔틴을 추출하는 단계를 포함하는 미세조류로부터 아스타잔틴을 효율적으로 추출하는 방법.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서,
 상기 단계 (a)에서, 상기 미세조류는 헤마토코커스 플루비알리스(Haematococcus pluvialis)인 것을 특징으로 하는 미세조류 세포로부터 아스타잔틴을 효율적으로 추출하는 방법.
- [청구항 3] 제 1항에 있어서,
 상기 단계 (b)에서, 상기 미세조류에 스트레스를 가하는 방법은 질소원이 고갈된 배지에서의 배양, 인산염이 고갈된 배지에서의 배양, 설정된 온도 충격, 일광, 소금이 첨가된 배지에서의 배양, CO₂를 고정된 배지에서의 배양 및 아세테이트(CH₃COO-)첨가 배지에서의 배양 중 선택된 어느 하나에서 배양하는 것을 특징으로 하는 미세조류로부터 아스타잔틴을 효율적으로 추출하는 방법.
- [청구항 4] 제 1항에 있어서,
 상기 단계 (c)에서, 상기 영양분을 포함한 배지는 최적의 미세조류 재분화에 필요한 비제한적 수준의 영양소를 갖는 배지를 포함하는 것을 특징으로 하는 미세조류로부터 아스타잔틴을 효율적으로 추출하는 방법.
- [청구항 5] 제 4항에 있어서,
 상기 영양소는 질산염, 인산염, 비타민 중 적어도 어느 하나를 포함하는 것을 특징으로 하는 미세조류로부터 아스타잔틴을 효율적으로 추출하는 방법.
- [청구항 6] 제 1항에 있어서,
 상기 단계 (c)에서, 상기 성숙포낭, 분할포낭, 방출포낭 및 포낭벽을 포함하는 배양액은 재분화율이 70 % 이하에 해당하는

- 것을 얻는 것을 특징으로 하는 미세조류로부터 아스타잔틴을 효율적으로 추출하는 방법.
- [청구항 7] 제 1항에 있어서,
상기 단계 (c)에서, 상기 분할 포낭 및 방출 포낭은 성숙 포낭의 재분화에 의해 세포벽의 강도가 약해진 것을 특징으로 하는 미세조류로부터 아스타잔틴을 효율적으로 추출하는 방법.
- [청구항 8] 제 1항에 있어서,
상기 단계 (d)에서, 상기 분할세포와 방출세포를 회수하는 방법은 원심분리, 막 여과, 부상분리 및 화학침전 중 선택된 어느 하나의 방법인 것을 특징으로 하는 미세조류로부터 아스타잔틴을 효율적으로 추출하는 방법.
- [청구항 9] 제 1항에 있어서,
상기 단계 (e)에서, 상기 기계적 전처리는 압력파쇄(french press) 또는 호모제니제이션(homogenization)에 의한 방법인 것을 특징으로 하는 미세조류로부터 아스타잔틴을 효율적으로 추출하는 방법.
- [청구항 10] 제 1항에 있어서,
상기 단계 (e)에서, 상기 화학적 전처리는 이온성 액체를 이용한 방법인 것을 특징으로 하는 미세조류로부터 아스타잔틴을 효율적으로 추출하는 방법.
- [청구항 11] 제 1항 내지 제 10항 중 어느 한 항의 미세조류로부터 아스타잔틴을 효율적으로 추출하는 방법에 의해 제조된 아스타잔틴.
- [청구항 12] 제 11항의 아스타잔틴을 화장품 용도, 사료용 또는 식품첨가물에 사용하는 방법.

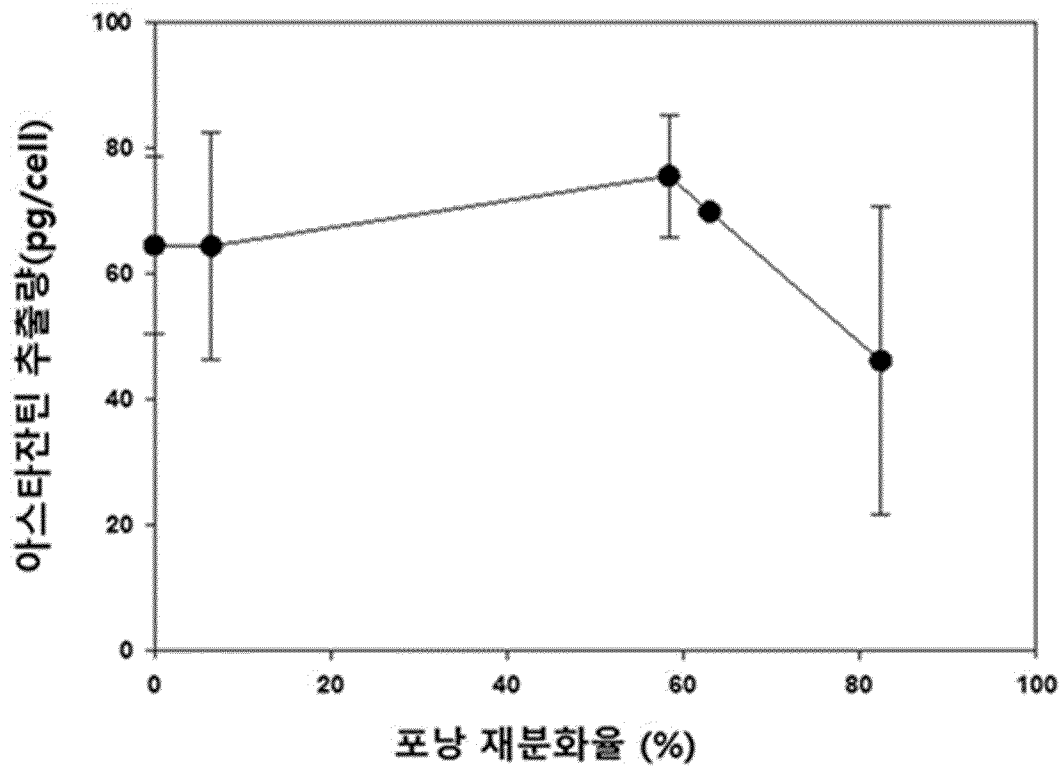
[Fig. 1]



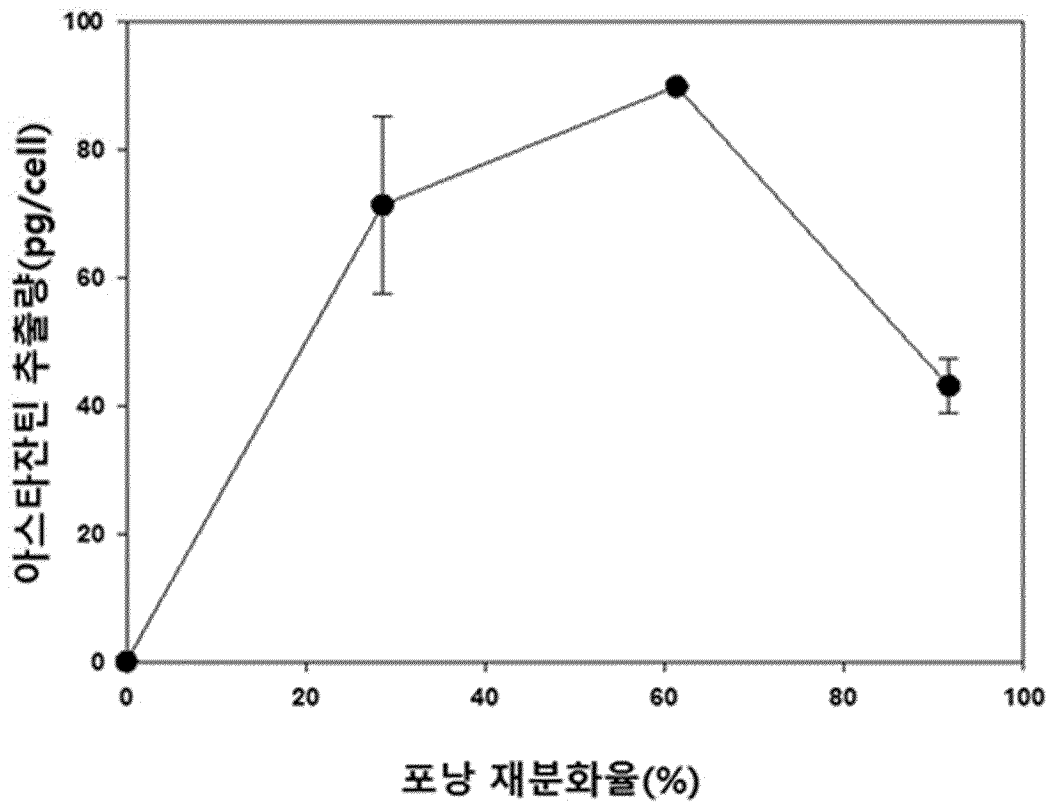
[Fig. 2]



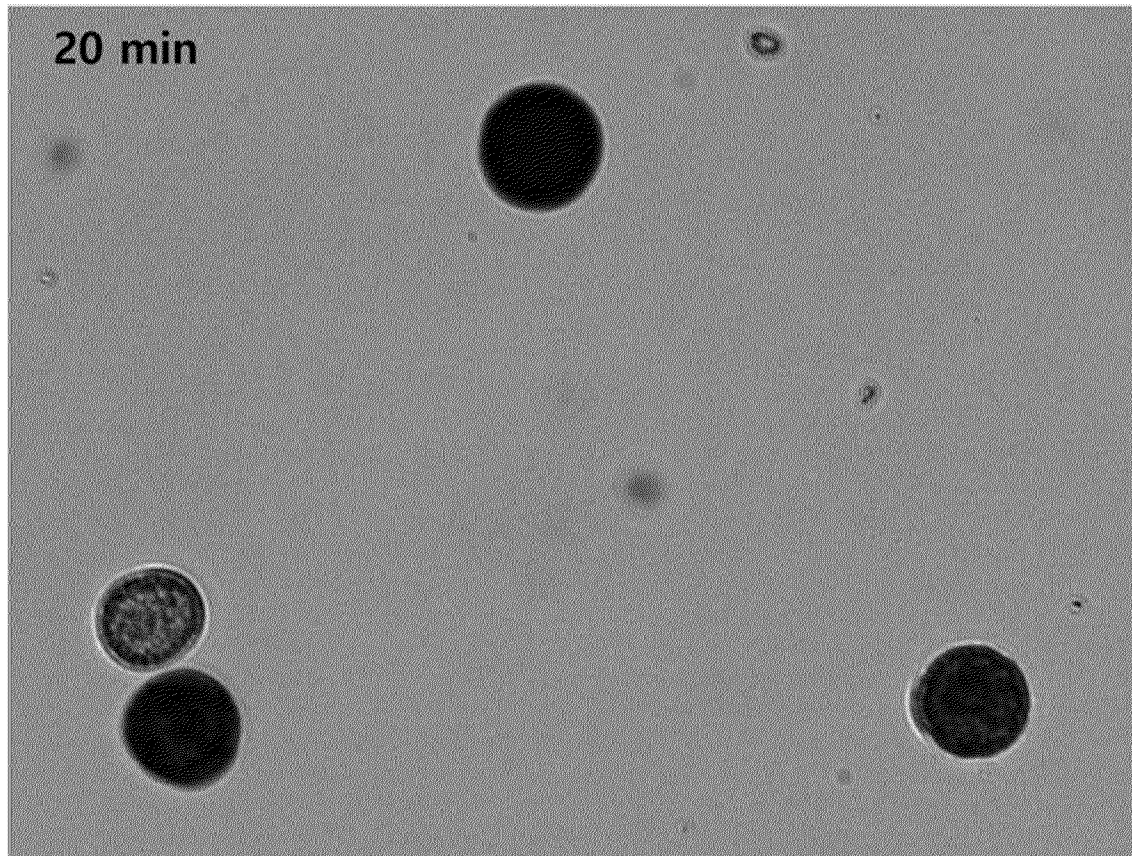
[Fig. 3]



[Fig. 4]

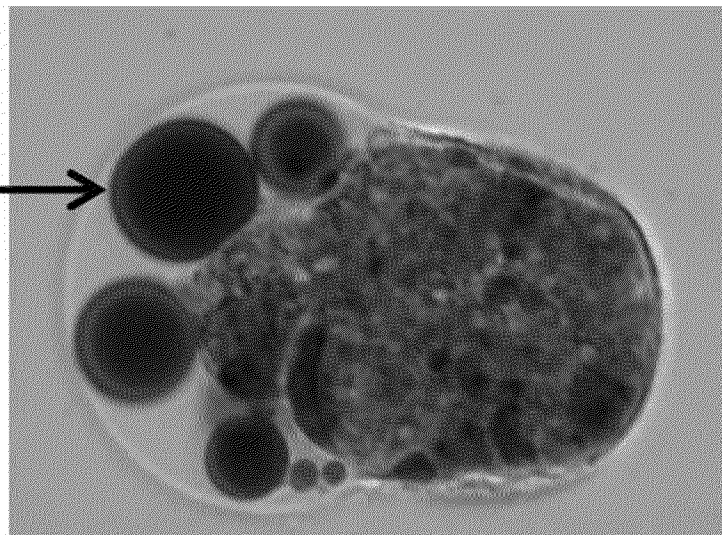


[Fig. 5]

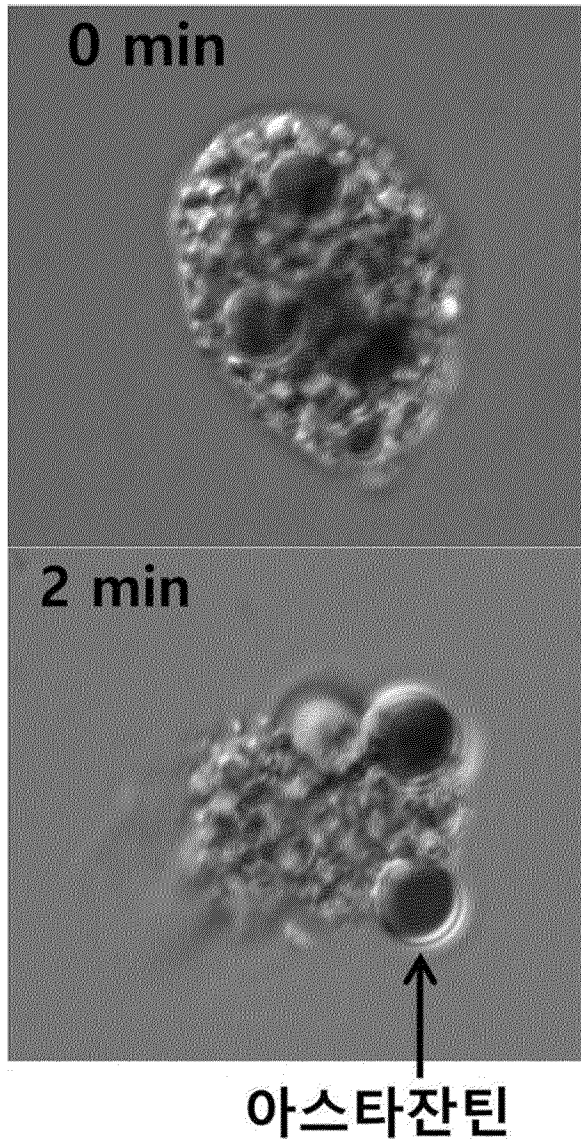


[Fig. 6]

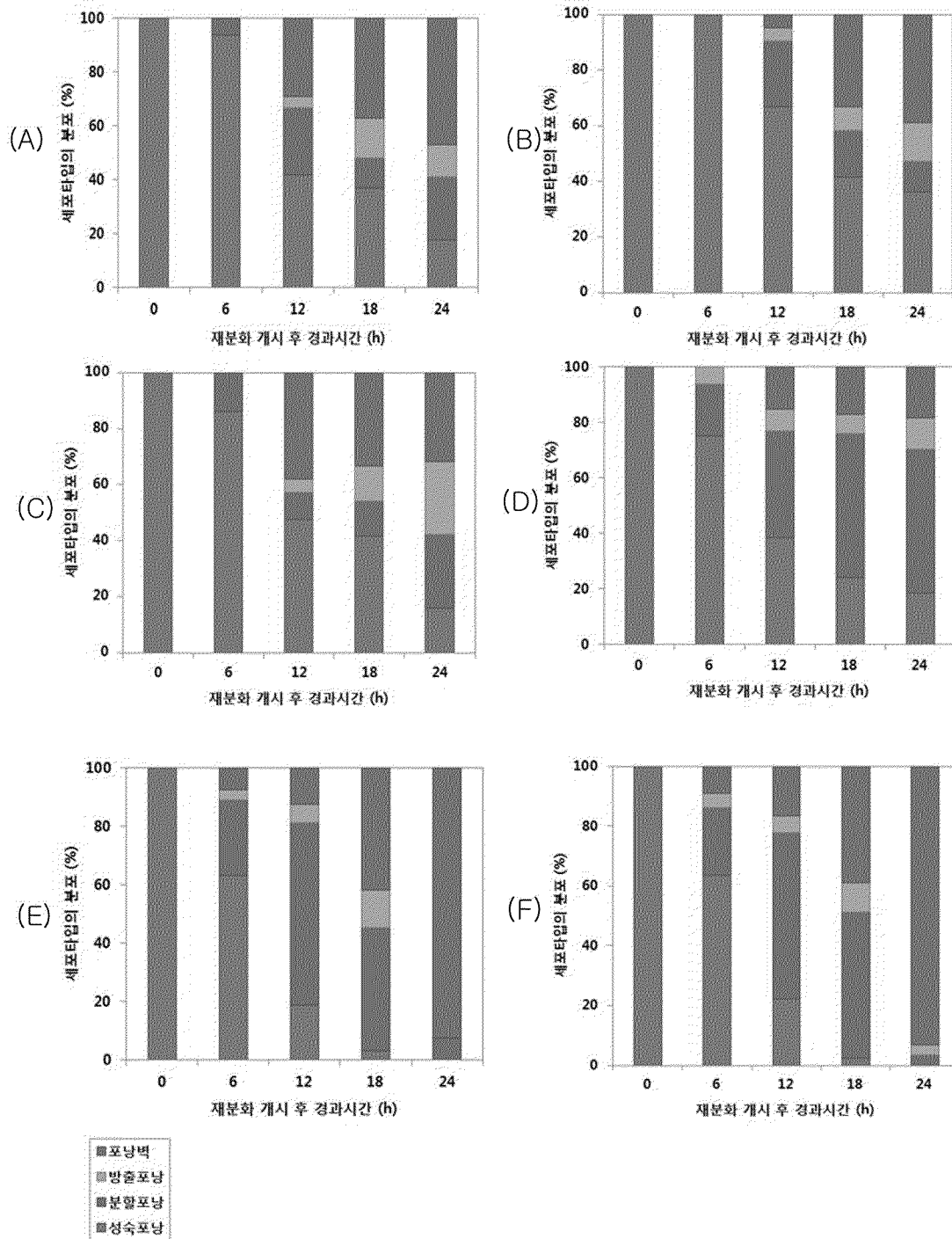
아스타잔틴 →



[Fig. 7]



[Fig. 8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/001530**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C12P 23/00(2006.01)i, C12N 1/12(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)

C12P 23/00; C12N 1/12

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: astaxanthin, microalgae, Haematococcus pluvialis, redifferentiation, cyst wall, cell wall, extraction

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2014-0075869 A (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 20 June 2014 See abstract and the claims	1-10
X		11,12
A	KR 10-0708386 B1 (RESEARCH & BUSINESS FOUNDATION SUNGKYUNKWAN UNIVERSITY) 18 April 2007 See abstract and the claims	1-10
X		11,12
A	JP 05-068585A (HIGASHIMARU SHOYU KK.) 23 March 1993 See abstract and the claims	1-10
X		11,12



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

"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

"I" 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 MAY 2015 (15.05.2015)

Date of mailing of the international search report

15 MAY 2015 (15.05.2015)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2015/001530

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2014-0075869 A	20/06/2014	NONE	
KR 10-0708386 B1	18/04/2007	JP 04-504987 B2 JP 2007-22216 8A US 2007-0196894 A1 US 7785823 B2	14/07/2010 06/09/2007 23/08/2007 31/08/2010
JP 05-068585A	23/03/1993	JP 3163127 B2	08/05/2001

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12P 23/00(2006.01)i, C12N 1/12(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12P 23/00; C12N 1/12

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: 아스타잔틴, 미세조류, Haematococcus pluvialis, 재분화, 포낭벽, 세포벽, 추출

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2014-0075869 A (고려대학교 산학협력단) 2014.06.20	1-10
X	요약 및 청구항 참조	11, 12
A	KR 10-0708386 B1 (성균관대학교산학협력단) 2007.04.18	1-10
X	요약 및 청구항 참조	11, 12
A	JP 05-068585A (HIGASHIMARU SHOYU KK) 1993.03.23	1-10
X	요약 및 청구항 참조	11, 12

☐ 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

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2015년 05월 15일 (15.05.2015)

국제조사보고서 발송일

2015년 05월 15일 (15.05.2015)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



대한민국 특허청

(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,

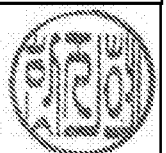
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 ++82 42 472 7140

심사관

한지혜

전화번호 +82-42-481-3335



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2014-0075869 A	2014/06/20	없음	
KR 10-0708386 B1	2007/04/18	JP 04-504987 B2 JP 2007-22216 8A US 2007-0196894 A1 US 7785823 B2	2010/07/14 2007/09/06 2007/08/23 2010/08/31
JP 05-068585A	1993/03/23	JP 3163127 B2	2001/05/08