



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년02월13일  
(11) 등록번호 10-2767149  
(24) 등록일자 2025년02월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12P 23/00 (2006.01) C12N 1/12 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
C12P 23/00 (2013.01)  
C12N 1/12 (2019.02)  
(21) 출원번호 10-2018-7010298  
(22) 출원일자(국제) 2016년09월09일  
심사청구일자 2021년09월06일  
(85) 번역문제출일자 2018년04월11일  
(65) 공개번호 10-2018-0069808  
(43) 공개일자 2018년06월25일  
(86) 국제출원번호 PCT/EP2016/071270  
(87) 국제공개번호 WO 2017/042315  
국제공개일자 2017년03월16일  
(30) 우선권주장  
15184899.1 2015년09월11일  
유럽특허청(EPO)(EP)  
(56) 선행기술조사문헌  
KR1020140075869 A\*  
Bioresource Technology, 2014, Vol.158,  
pp.329-335 1부.\*  
KR1020150028613 A  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
애드 아스트라 이에이치에프  
아이슬란드 109 레이카비크 피뷔셀 35  
(72) 발명자  
포돌라 비요른  
독일 50969 쾰른 헤르뮐하이머 슈트라세 74  
멜코니안 미하엘  
독일 53797 로마어 엑스뮐레 10  
(74) 대리인  
(뒷면에 계속)  
리앤목특허법인

전체 청구항 수 : 총 16 항

심사관 : 한지혜

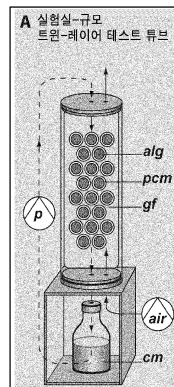
(54) 발명의 명칭 아스타크산틴을 제조하기 위해 헤마토코쿠스 종을 배양하는 방법

(57) 요약

아스타크산틴의 제조를 위해 헤마토코쿠스 종을 배양하는 방법으로서,

- 기질을 제공하는 단계, - 상기 기질의 표면에 헤마토코쿠스 종을 배열하는 단계, - 상기 기질에 배열된 헤마토코쿠스 종을 배양 과정 초기부터 높은 광 강도로 노출시키고, 및 상기 헤마토코쿠스 종을 낮은 광 에너지에 노출  
(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



시켜 초기 배양을 수행하는 제1 단계에 이어, 상기 *헤마토크쿠스* 종을 상기 제1 단계에서 적용한 것보다 더 높은 광 에너지에 노출시켜 상기 *헤마토크쿠스* 종을 후속 배양하는 제2 단계로 이루어진 *헤마토크쿠스* 종의 2-단계 배양 과정을 피하여, 아스타크산틴 형성을 유도하는 단계, 및 선택적으로 - 상기 배양된 *헤마토크쿠스* 종을 수확하는 단계 및/또는 - 아스타크산틴을 분리하는 단계를 포함하는 것인 방법.

(72) 발명자

**코스타 키페르슈토크 알리스**

독일 50969 쾰른 바이에르슈트라세르베크 6

**세베스첸 페트라**

헝가리 2750 너지뢰로시 브. 토트 페렌츠 우트치 10

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

아스타크산틴 (astaxanthin)의 제조를 위해 *헤마토코쿠스* 종 (*Haematococcus* species)을 배양하는 방법으로서,

- 기질 (substrate)을 제공하는 단계,
- 상기 기질의 표면에 *헤마토코쿠스* 종을 배열하는 (arranging) 단계,
- 상기 기질에 배열된 *헤마토코쿠스* 종을 배양 과정 초기부터 높은 광 강도로 노출시키고, 상기 높은 광 강도는  $200 \mu\text{mol}$  광자  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  또는 그 이상이고, 및

상기 *헤마토코쿠스* 종을 낮은 광 에너지에 노출시켜 초기 배양을 수행하는 제1 단계에 이어, 상기 *헤마토코쿠스* 종을 상기 제1 단계에서 적용한 것보다 더 높은 광 에너지에 노출시켜 상기 *헤마토코쿠스* 종을 후속 배양하는 제2 단계로 이루어진 *헤마토코쿠스* 종의 2-단계 배양 과정을 피하여, 아스타크산틴 형성을 유도하는 단계, 및

- 아스타크산틴을 분리하는 단계를 포함하는 것인 방법으로서,

상기 제1 단계에서 낮은 광 에너지는  $50 \mu\text{mol}$  광자  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  내지  $200 \mu\text{mol}$  광자  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  미만이고,

상기 제2 단계에서 더 높은 광 에너지는 적어도  $200 \mu\text{mol}$  광자  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  인 것인 방법.

#### 청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 아스타크산틴을 분리하는 단계 이전에, 배양된 *헤마토코쿠스* 종을 수확하는 단계를 더 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 3

청구항 2에 있어서, 상기 아스타크산틴은 수확된 *헤마토코쿠스* 종으로부터 분리되는 것인 방법.

#### 청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 *헤마토코쿠스* 종은 *헤마토코쿠스 플루비알리스* (*Haematococcus pluvialis*)인 것인 방법.

#### 청구항 5

청구항 1 내지 4 중 어느 한 항에 있어서, 상기 기질은 시트-형 (sheet-like) 물질인 것인 방법.

#### 청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 시트-형 물질기질은 다공성 시트인 것인 방법.

#### 청구항 7

청구항 5에 있어서, 상기 시트-형 물질은 종이, 셀룰로스 에스테르, 셀룰로스 아세테이트, 혼합된 셀룰로스 에스테르, 셀룰로스, 셀룰로스 니트레이트, 폴리아미드, 폴리에스테르, 및 폴리올레핀으로 구성된 그룹으로부터 선택되는 것인 방법.

#### 청구항 8

바이오매스 생산성을 증가시키고 동시에 아스타잔틴 생산을 유도 및 증가시키기 위해 높은 광 강도 하에서 1 단계 배양으로 기질 상에서 *헤마토코쿠스* 의 바이오필름 배양하는 것을 포함하고, 상기 높은 광 강도는  $200 \mu\text{mol}$

광자  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  또는 그 이상인, 개선된 아스타크산틴의 생산 방법.

#### 청구항 9

청구항 8에 있어서, 상기 아스타크산틴은 수확된 *헤마토코쿠스* 종으로부터 분리되는 것인 방법.

#### 청구항 10

청구항 8에 있어서, 상기 *헤마토코쿠스* 종은 *헤마토코쿠스 플루비알리스* (*Haematococcus pluvialis*)인 것인 방법.

#### 청구항 11

청구항 8 내지 10 중 어느 한 항에 있어서, 상기 기질은 시트-형 (sheet-like) 물질인 것인 방법.

#### 청구항 12

청구항 11에 있어서, 상기 시트-형 물질은 다공성 시트인 것인 방법.

#### 청구항 13

청구항 11에 있어서, 상기 시트-형 물질은 종이, 셀룰로스 에스테르, 셀룰로스 아세테이트, 혼합된 셀룰로스 에스테르, 셀룰로스, 셀룰로스 니트레이트, 폴리아미드, 폴리에스테르 및 폴리올레핀으로 구성된 그룹으로부터 선택되는 것인 방법.

#### 청구항 14

청구항 8 내지 10 중 어느 한 항에 있어서, 상기 배양 동안 14/10 시간의 광/암 주기를 5%  $\text{CO}_2$  와 조합하여 사용되는 것인 방법.

#### 청구항 15

청구항 8 내지 10 중 어느 한 항에 있어서, 상기 아스타크산틴의 양은  $4 \text{ g m}^{-2}$  보다 높은 것인 방법.

#### 청구항 16

청구항 8 내지 10 중 어느 한 항에 있어서, 낮은 광 노출은 필수적이지 않고, 상기 낮은 광은  $50 \mu\text{mol 광자 m}^{-2} \text{s}^{-1}$  내지  $200 \mu\text{mol 광자 m}^{-2} \text{s}^{-1}$  미만인 것인 방법.

### 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 아스타크산틴 (astaxanthin)을 제조하기 위해 *헤마토코쿠스* 종 (*Haematococcus* species)을 배양하는 개량된 방법에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 미세조류 (microalga)인 *헤마토코쿠스 플루비알리스* (*Haematococcus pluvialis*)는 그의 2차 대사 화합물인 아스타크산틴으로 알려져 있고, 이는 높은 색소침착 (pigmentation) 및 항산화 (antioxidant) 능력을 갖는다. 이의 착색 특성은 연어와 새우 살의 분홍빛을 띠는 색상을 증가시키기 위해 주로 양식 (aquaculture)에서 사용된다 (Lorenz & Cysewski 2000). 항산화제로서, 아스타크산틴은 인간의 건강 보충 제품으로 시판되고 있다 (AstaReal, Algatechnologies Ltd, Cyanotech Ltd, Nutrex Hawaii Ltd, Fuji Health Science Inc. 참조). 오늘날 아스타크산틴의 주요 공급원은 화학 합성이다 (CARDAX 및 BASF 참조, 동물 사료 용도로만 허용됨).

[0003] 그러나, 천연 공급원으로부터의 아스타크산틴은 더 좋은 생체이용률 및 항산화 능력을 보여주는 몇가지 연구 및 천연 또는 "바이오 (bio)" 제품에 대한 소비자의 일반적인 선호도로 인해 관심이 증가되고 있고, 높은 가치를 지니고 있다 (Nguyen 2013).

- [0004] 그럼에도 불구하고, *에이취. 플루비알리스* (*H. pluvialis*)에 의한 아스타크산틴의 생산은 여전히 비용이 많이 들고, 도전적인 기술이다. 어느 정도까지, 이는 *에이취. 플루비알리스*에 의한 아스타크산틴 생산은 세포 분열이 중단되었을 때 보통 일어난다는 사실에 기반한다. 아스타크산틴 생산은 특정 스트레스 요인, 가령 높은 광 강도 ( $200 \mu\text{mol 광자 m}^{-2} \text{s}^{-1}$  이상), 염 스트레스 및 영양 결핍에 의해 유도된다 (Aflalo et al. 2007).
- [0005] 그러므로, 최근 배양 방법 (cultivation methods)은 2 단계로 구성된다: (i) 배양 파라미터가 충분한 바이오매스 (biomass)를 제공하기 위해 높은 세포 밀도의 생산에 최적인 "그린 단계 (green phase)" (광 강도:  $50\text{--}200 \mu\text{mol 광자 m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; 온도:  $20\text{--}25^\circ\text{C}$ ; pH 6.5-8); 및 (ii) 세포 분열의 현저한 감소 또는 중지와 함께, 아스타크산틴 생산 및 축적을 증강시키기 위해 스트레스가 적용되는 "레드 (red)" 단계. 결과적으로, 산물로서의 아스타크산틴에 대한 견해와 함께, 수립된 기술은 전체 생산 기간의 약 50%에 기여하는 비생산 그린 단계로 고통받고 있다 (Suh et al. 2006; Aflalo et al. 2007). 또한, 2-단계 절차는 2개의 개별의 생물반응기 시스템 (bioreactor systems)에 대한 요구 사항에 따라 더 많은 기술적 노력을 필요로 한다: 낮은 광 강도를 제공하기 위해, 상기 그린 단계는 주로 실내에 위치하고, 광화학적 스트레스를 피하기 위해 인공 광원으로 조명되는 반면에, 상기 레드 단계는 실외 광생물반응기 (outdoor photobioreactors)에서 볼 수 있는 높은 일사량 (solar irradiances)이 유익하다.
- [0006] 불연속 2-단계 방법의 명백한 단점 외에도, 최근 배양 시스템은 관형 반응기 (tubular reactors) 및 개방된 연못 (open ponds)에서 현탁 성장에 기반한다 (Lorenz and Cysewski 2000). 그러나, 이들 시스템은 예를 들면 구축, 작업 및 유지하는데 많은 비용이 드는 것으로 잘 알려져 있다 (Ozkan et al. 2012). 생물반응기 디자인의 최근 진보에서 바이오필름 (biofilm)-기반 생물반응기가 현탁-타입 생물반응기의 상기 단점의 일부를 극복할 수 있는 잠재력을 제공하는 것이 입증되었다 (예컨대, Berner et al. 2014). 구체적으로, *에이취. 플루비알리스*는 낮은 광 강도에서 다공성 기질 생물반응기를 사용하여 바이오필름에서 성공적으로 성장되었다 (Wan et al. 2014; Yin et al. 2015; Zhang et al. 2014). 아스타크산틴 형성이 또한 졸-겔 고정화된 살아있는 미세조류 (sol-gel immobilized living microalgae)에서도 개시되었다 (Fiedler et al 2007).
- [0007] 본 발명의 목적은 바이오매스 생산력을 증가시키고 아스타크산틴 생산을 유도 및 증가시키기 위해 높은 광 강도를 사용하는 1-단계 절차로 *해마토코쿠스*의 바이오필름 (고정된) 배양을 사용하여 향상된 아스타크산틴 생산을 제공하는데 있다. 본 발명의 또다른 목적은 최근 기술의 2-단계 절차의 단점을 피하는데 있다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0008] 본 발명의 목적은 아스타크산틴의 제조를 위해 *해마토코쿠스* 종을 배양하는 방법에 의해 해결되고, 상기 방법은 하기 단계들을 포함한다:
- [0009] - 기질 (substrate)을 제공하는 단계,
- [0010] - 상기 기질의 표면에 *해마토코쿠스* 종을 배열하는 (arranging) 단계,
- [0011] - 상기 기질에 배열된 *해마토코쿠스* 종을 배양 과정 초기부터 높은 광 강도로 노출시키는 단계 및
- [0012] - 상기 *해마토코쿠스* 종을 낮은 광 에너지에 노출시켜 초기 배양을 수행하는 제1 단계에 이어, 상기 *해마토코쿠스* 종을 상기 제1 단계에서 적용한 것보다 더 높은 광 에너지에 노출시켜 상기 *해마토코쿠스* 종을 후속 배양하는 제2 단계로 이루어진 *해마토코쿠스* 종의 2-단계 배양 과정을 피하여, 아스타크산틴 합성을 유도하는 단계;
- [0013] - 선택적으로, 상기 배양된 *해마토코쿠스* 종을 수확하는 단계; 및/또는
- [0014] - 상기 아스타크산틴을 분리하는 단계.
- [0015] 본 발명은 낮은-광 노출하에 제1 단계 (그린 단계)에서 *해마토코쿠스* 종의 세포 물질 (cell mass)의 충분한 양을 생성하고 또한 높은 광 강도에서 아스타크산틴 형성을 유도하기 위해 세포 물질의 충분한 양을 형성하는 것이 필수적이지 않다는 예상치 못한 발견에 기반한다.
- [0016] 2-단계 배양인 최근 기술에 따른 *해마토코쿠스* 종, 구체적으로 *에이취. 플루비알리스*의 배양과는 대조적으로, 본 발명의 제조 방법은, 구체적으로 바이오필름 광생물반응기의 적용에 의해 제공되는 적은 유지 및 수확 비용

과 함께 높은 광 강도하에 바이오매스와 아스타크산틴 모두의 한-단계 배양을 제공한다.

[0017] 본 발명에 따르면, 용어 높은 광 강도 (high light intensities)는 당분야의 통상의 지식을 가진 자에 의해 상대적 용어가 아닌 구체적인 용어로서, 예를 들면 적어도 약 150, 200, 250 또는 500  $\mu\text{mol}$  광자  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  또는 그 이상과 동등한 것으로 이해된다.

[0018] 스트레스 요인 (stress factors)은 *해마토코쿠스* 중, 구체적으로 *에이취*. *플루비알리스*에서 아스타크산틴 생산을 유도하는 환경적 영향, 가령 150  $\mu\text{mol}$  광자  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  이상의 광 강도 (light intensities), 염도 (salinity) (0.8% NaCl), 30 °C 초과인 온도 및 영양 결핍 (nutrient starvation), 구체적으로 질소 및 인의 영양 결핍이 있고, 다른 결핍도 또한 역할을 할 수 있다. 구체적으로, 본원에서 개시된 바와 같이 바이오필름에서 성장한 *해마토코쿠스* 중, 구체적으로 *에이취*. *플루비알리스*의 세포에서 아스타크산틴 함량은 높은 광 강도 이외에 질소 또는 인 공급원이 없는 배지로 상기 세포를 처리할 때 약 50%까지 증가될 수 있다. 동일한 설정에서, 성장 표면당 전체 아스타크산틴 생산력은 질소 및/또는 인 결핍의 적용으로 대략 최대 15%까지 증가될 수 있다.

[0019] *에이취*. *플루비알리스*를 배양하는데 사용된 광은 규칙적으로 300 nm 내지 780 nm 범위의 UV 및 가시광이다.

[0020] 높은 광 강도 (약 1,000  $\mu\text{mol}$  광자  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )에서 *에이취*. *플루비알리스*의 바이오매스 생산에 대한 몇가지 데이터가 존재하지만, 아스타크산틴 축적은 낮고, 높은 광이 영양 한계와 결부되는 경우에만 발생한다 (Del Rio et al. 2005; Garcia-Malea Lopez et al. 2006). 본 발명에 따르면, 전체 배양 공정은 (자연) 조명의 높은 강도하에 일-단계로 수행될 수 있고, 수확 방법에 따라, 높은 바이오매스 생산력, 높은 아스타크산틴 함량 및 높은 아스타크산틴 생산력을 갖는 연속 제조 공정에 최적화될 수 있다. 785  $\mu\text{mol}$  광자  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 광 강도에서 10일에 걸쳐서, 바이오매스 생산력은 16 g의 건조 물질 (dry matter)  $\text{m}^{-2} \text{d}^{-1}$  만큼 높을 수 있고, 건조 물질의 2-2.5 %의 아스타크산틴 함량을 갖는다. 그러므로, 상기 아스타크산틴 생산력은 0.39 mg  $\text{m}^{-2} \text{d}^{-1}$ 에 도달할 수 있다. 종래의 2-단계 접근법에서, 상기 값은 두번째 단계, 즉 레드-단계에서만 더 낮아지는 경향이 있었다. 두 단계의 전체 기간을 고려한 더 정확한 산출에서 Wang et al. (2013)에 의해 관찰된 바와 같이 더욱 낮아질 것이다.

[0021] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 *해마토코쿠스* 종은 *해마토코쿠스 플루비알리스*이다. 본 발명은 *에이취*. *플루비알리스*를 참조하여 더 개시될 것이다. 당 분야의 통상의 지식을 가진 자라면 *에이취*. *플루비알리스*와 관련된 개시내용이 아스타크산틴을 생산할 수 있는 *해마토코쿠스*의 다른 종에도 또한 유효하다는 것을 이해한다.

[0022] 본 발명의 다른 구체예에서, 상기 제1 단계 (그린 단계)에서 낮은 광 에너지는 약 50  $\mu\text{mol}$  광자  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  내지 약 200  $\mu\text{mol}$  광자  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  미만이다.

[0023] 또다른 구체예에서, 상기 제2 단계 (레드 단계)에서 더 높은 광 에너지는 적어도 약 200  $\mu\text{mol}$  광자  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 구체적으로 적어도 약 500  $\mu\text{mol}$  광자  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 이다.

[0024] 본 발명의 다른 구체예에서, *해마토코쿠스*는 물질 (기질)의 표면에서 배양된다.

[0025] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 물질은 시트-형 (sheet-like) 물질이다.

[0026] 본 발명의 다른 구체예에서, 상기 시트-형 물질은 다공성 (porous)이다.

[0027] 본 발명의 부가의 구체예에서, 상기 시트-형 물질은 종이, 셀룰로스 에스테르, 구체적으로 셀룰로스 아세테이트, 혼합된 셀룰로스 에스테르, 셀룰로스, 셀룰로스 니트레이트, 폴리아미드, 폴리에스테르 및/또는 폴리올레핀으로 구성된 그룹으로부터 선택된다.

## 도면의 간단한 설명

[0028] 도 1은 실험실-규모 (laboratory-scale)의 트윈-레이어 (Twin-Layer) 테스트 튜브를 나타낸다.

도 2는 다른 광 강도에서 배양된 *에이취*. *플루비알리스*에 의한 바이오매스 및 아스타크산틴 생산을 나타낸다.

도 3은 본원에서 제시되는 바와 같이 10일의 일-단계 공정의 *에이취*. *플루비알리스*의 바이오매스 ( $\text{g m}^{-2}$ ) 및 아스타크산틴 ( $\text{g m}^{-2}$ ) 생산력을 "그린 단계"와 "레드 단계"를 각 5일씩 조합시킨 가상의 (hypothetical) PSBR 2-단계 공정과 비교하였다.



# 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0029] WO 2005/010140 A1에서, 바이오필름에서 미세조류를 배양하고, 이를 성장시키고, 및 아스타크산틴을 수확하는 특히 유용한 방법, 구체적으로 본 발명에서 사용하기 위한 다공성 기질이 개시되어 있다. 이 참고문헌은 참조로 포함된다. 도 1은 실험실-규모의 트윈-레이어 테스트 튜브를 나타낸다. 다양한 광 및 CO<sub>2</sub> 조건하에 바이오필름에서 미세조류를 배양하기 위해 Schultze et al. (2015)에 의해 제시된 바와 같은, alg - 고정된 미세조류, pcm - 미세조류에 대한 담체로서 폴리카르보네이트 멤브레인 (membrane), gf - 유리 섬유 매트, air 공기 공급을 위한 멤브레인 펌프, cm - 배양 배지. WO 2005/010140 A1에서 개시된 원리를 실현하는 다공성 기질 생물반응기의 다른 실험실-규모의 변형은 Liu et al. (2013); Murphy et al. (2012); Nowack et al. (2005)에 의해 개시되어 있고, 이는 참조로 포함된다.
- [0030] 바이오필름 배양을 위해 최대 수 평방 미터의 기질 표면을 제공하는 이러한 특별한 기술의 스케일 업 개발 (scaled up developments)은 Naumann et al. (2013) 및 Zhang et al. (2015)에 의해 개시되어 있고, 모두 참조로 포함된다.
- [0031] *에이취. 플루비알리스*는 Zhang et al. (2014), Wan et al. (2014) 및 Yin et al. (2015)에 의해 제시된 장치를 사용하여 낮은 광 강도에서 다공성 기질 생물반응기를 사용하여 성장시켰다.
- [0032] 다공성 기질 생물반응기의 이러한 변형에서 *에이취. 플루비알리스*를 배양하는 대신에, *에이취. 플루비알리스*는, 2개의 주요 표면을 나타내지 않는, 다른 기질 상의 바이오필름에 고정되어 성장될 수 있다. 이는 상기 바이오필름의 표면에 적용되는 배양 배지와 함께 공급되는 플라스틱 또는 콘크리트 구조물 동일 수 있다.
- [0033] 이러한 배양 절차를 사용하여, *에이취. 플루비알리스*는 높은 광 강도에서 배양될 수 있고, 처리될 수 있다.
- [0034] 도 2는 하기 실시예 1에 개시되는 바와 같은 실험에서 5 %의 보충 (supplementary) CO<sub>2</sub>를 갖는 다른 광 수준에서 *에이취. 플루비알리스*의 배양을 나타낸다. (현탁 배양의 그린 단계와 비교되는) 45  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 낮은 광 강도에서, 아스타크산틴 생산은 없었고, 단지 중간 정도의 바이오매스 생산력에 도달하였다. 약 530 및 785  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 높은 광 강도는 바이오매스와 아스타크산틴 생산력을 동시에 증가시켰고, (i) 높은 광에 의한 아스타크산틴 유도는 현탁-타입 생물반응기에서 관찰되는 바와 같이 성장을 저해하지 않았고, 또한 (ii) 아스타크산틴의 생산은 연속 일 단계 공정으로 수행될 수 있어서, 이는 비-생산적인 (그린) 성장 단계를 겪지 않는다는 것을 보여주었다. 최대 아스타크산틴 생산력은 785  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 에 도달했다. 높은 광은 약 0.39 g 아스타크산틴  $\text{m}^{-2} \text{d}^{-1}$ 의 전체 아스타크산틴 생산력을 유도했고, 이는 실험 기간 동안 선형이었고, 10일의 성장 후에 3.3 g  $\text{m}^{-2}$ 에 도달했다. 배양 기간이 더 길어지면, 아스타크산틴은 4 g  $\text{m}^{-2}$ 보다 높을 수 있고, 1,013  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 더 높은 광 강도에서, 아스타크산틴 생산력은 0.32 g  $\text{m}^{-2} \text{d}^{-1}$ 로 여전히 높았다 (데이터는 개시되지 않음). 가상의 2-단계 시나리오가 본 발명에 따른 일-단계 시스템과 생산력을 비교하기 위해 제작되었다.
- [0035] 도 3은 본원에서 제시되는 바와 같이 16일의 일-단계 공정의 *에이취. 플루비알리스*의 바이오매스 ( $\text{g m}^{-2} \pm \text{SD}$ , n=3; 도 3 (A)) 및 전체 아스타크산틴 ( $\text{g m}^{-2} \pm \text{SD}$ , n=3; 도 3 (B)) 생산력을, "그린 단계"와 "레드 단계"를 각 8일씩 조합시킨 PSBR 2-단계 공정과 비교하여, 광이 유일하게 적용된 스트레스 요인인 경우 일-단계 접근법과 2-단계 접근법의 효율을 비교하였다. 상기 일-단계 접근법은 16일 동안 1,000  $\mu\text{mol}$  광자  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 에 노출시키는 것으로 구성되고 (검정색 네모), 반면에 상기 2-단계 접근법은 8일 동안은 90  $\mu\text{mol}$  광자  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  및 8일 동안은 1,000  $\mu\text{mol}$  광자  $\text{m}^{-2}$ 에 노출시키는 것으로 구성된다 (회색 네모). 수직의 점선은 광 강도가 2-단계 접근법의 경우 전환된 시점을 나타낸다. 광/암 주기는 14/10 시간이고, 통기는 전체 배양 기간 동안 5% CO<sub>2</sub>가 보충되었다. 바이오매스는 각 배양 단계에서, 매우 다른 속도로 선형으로 증가하였다 (도 3 (A)). 5.4 g  $\text{m}^{-2} \text{d}^{-1}$ 의 성장 속도가 낮은 광에서 관찰되었고, 높은 광으로 전환되었을 때 17.2 g  $\text{m}^{-2} \text{d}^{-1}$ 로 증가되었다. 상기 값은 상기 일-단계 접근법에서 1,000  $\mu\text{mol}$  광자  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 로 직접 배양하는 처음 8일 동안에 수득된 것과 유사했다. 또한, 8 일째에, 현존량 (standing crop)은, 상기 2-단계 접근법의 48.2 g  $\text{m}^{-2}$ 와 비교하여, 상기 일-단계 접근법에서 3 배 더 높은, 146 g  $\text{m}^{-2}$ 이었다. 유사한 경향이 전체 아스타크산틴 값을 분석할 때 관찰되었고: 상기 2-단계 그룹

에서의 축적은 높은 광에서만, 상기 일-단계 접근법의 처음 8일 동안 관찰된 것과 유사한 속도로 발생했다: 각각  $0.34$  및  $0.35 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  (도 3 (B)). 8일째에, 아스타크산틴 수득율은  $1,000 \mu\text{mol}$  광자  $\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  에서  $2.5 \text{ g m}^{-2}$  이었고,  $90 \mu\text{mol}$  광자  $\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 에서  $0.08 \text{ g m}^{-2}$ 이었으며, 이는 32배 증가되었다. 이러한 차이는 높은 광에 노출된 후에 폐기되었고, 아스타크산틴 생산은 16일째에 두 그룹에서  $2.8 \text{ g m}^{-2}$ 에 도달하였다. 그러나, 상기 2-단계 시스템에서, 이는 상기 일-단계 접근법에서보다 2배 더 긴 시간을 필요로 했다. 그러므로, 높은 조도의 효과는 노출의 시작과는 무관했다. 즉, 낮은 광의 그린 단계를 사용하면 높은 생산력을 방해하고, 유사한 수득율에 도달하기 위해 더 긴 배양 기간을 필요로 하고, 이는 비용 및 오염 위험을 증가시킨다.

[0036] 본 발명에 따르면, 배양 후에, *에이취. 플루비알리스*는, 물질을 블로우 오프 (blow off)하기 위한 에어 블레이드 (air blade) 또는 다른 적합한 도구에 의한 스크래핑 (scraping) 또는 분리 (detachment)와 같은 기계적 힘의 효과, 또는 계면활성제 및/또는 유기 용매에 의한 처리와 같은 화학적 처리에 의해, 상기 지지체, 구체적으로 천공된 지지체로부터 유리될 (loosened) 수 있다.

[0037] 다른 구체예에서, 상기 *에이취. 플루비알리스*는 상기 천공된 지지체와 함께 수확될 수 있다. 이는 상기 지지체 상에 잔류하는 *에이취. 플루비알리스*가 분해되어, 예를 들면 추출에 의해 성분들을 수득하는 것이 실용적일 수 있다. 상기 추출된 *에이취. 플루비알리스* 또는 세포 파편 (cellular debris)은 상기 지지체와 함께 상기 추출물로부터 기계적으로 분리될 수 있다.

[0038] 또 다른 구체예에서, (적은) 부피의 액체 (예컨대 물, 배양 배지)가 상기 고정된 *에이취. 플루비알리스*를 상기 천공된 지지체로부터 씻어내기 위해 사용되어, 추가의 프로세싱 (아스타크산틴의 농축, 건조, 및/또는 추출)을 위한 *에이취. 플루비알리스*의 진한 현탁물을 수득할 수 있거나, 또는 *에이취. 플루비알리스*는 유동 배양 배지 (flowing culture medium)에서 유리된 바이오매스를 수집함으로써 수득될 수 있다.

[0039] 구체적으로, *에이취. 플루비알리스*는 건조 후에 상기 지지체로부터 유리될 수 있고, 그 후에 수집될 수 있다.

[0040] 다른 구체예에서, *에이취. 플루비알리스*는 상기 지지체로부터 유리되어, 건조 후에 또는 건조 없이, 또는 아스타크산틴의 추출 없이 사용될 수 있다.

[0041] 또다른 구체예에서, 아스타크산틴의 추출은, *에이취. 플루비알리스*가 상기 기질에 남아있고 아스타크산틴이 *에이취. 플루비알리스*로부터 화학물질에 의해 제거될 때, 화학물질, 가령 용매, 구체적으로 유기 용매에 의한 처리에 의해 수행될 수 있다.

[0042] 구체적으로, 건조되거나 또는 농축된 *에이취. 플루비알리스* 세포로부터 아스타크산틴의 추출은 유기 용매를 사용하는 방법 (Dong *et al.*, 2014) 가령 염산 전처리에 이은 아세톤 추출, 헥산/이소프로판올 혼합물 용매 추출, 메탄올 추출에 이은 아세톤 추출, 또는 다른 천연 오일 가령 대두유 또는 팜유에 의해 수행될 수 있다. 아스타크산틴은 또한 *에이취. 플루비알리스* 세포의 분쇄 (crushing) 후에 이산화탄소를 사용하는 초임계 추출 (supercritical extraction) (예컨대 Nobre *et al.*, 2006)에 의해 수득될 수 있다.

[0043] 본 발명은 하기 비-제한적인 실시예에 의해 개시된다.

[0044] 실시예 1

[0045] 실험 설정

[0046] 벤치 스케일 (Bench scale) 바이오필름 광생물반응기

[0047] 사용된 벤치 스케일 트윈-레이어 광생물반응기 (photobioreactor: PBR)는 Schultze *et al* (2015)에 의해 개시되어 있고, 이는 참조로 포함된다. 간단하게, 상기 시스템은 폴리비닐클로라이드 (polyvinylchloride: PVC) 지지체 상에 투명한 PMMA 튜브 (50 cm 길이, 12 cm 직경) 내부에 수직으로 놓인 유리 섬유 매트 (50 x 10 cm)로 구성된다. 배양 배지는 연동 펌프 (peristaltic pump)에 의해 일정하게 순환된다. 이는 상기 유리 섬유 상부에 적용되어, 중력에 의해 아래로 퍼지면서, 상기 PVC 지지체 내부에 놓인 배지 저장소 (medium reservoir)로 되돌아간다. 상기 시스템에 1 L의 배양 배지가 공급되고, 이는 매 2-3일에 교환되어 조류 성장을 위한 영양소 제한을 피한다. 통기는 상기 PVC 튜브 내부에 공급된다.

[0048] 상기 생물반응기의 접종을 위해, *에이취. 플루비알리스* 현탁 배양액이 농축되었고, 그 후 Naumann *et al* (2013)에 의해 개시되고 본원에 참조로 포함된 폴리카르보네이트 멤브레인 (PC40,  $0.4 \mu\text{m}$  공극 크기, 25 mm 직경, Whatman, Dassel, Germany) 상에서 여과되어,  $5 \text{ g m}^{-2}$ 의 초기 바이오매스 밀도를 수득하였다. 필터를 그 후에



상기 PBRs에서 습윤 유리 섬유 매트위에 놓았다.

- [0049] 상기 일-단계 접근법의 경우, 영양소-풍부 배양 배지가 실험 기간동안 사용되었고, 다른 광 강도가 평가되었다. 비교를 위해, 2-단계 실험이 낮은 광에서 수행되었다. 완전한 배양 배지는 초기에 성장을 위해 사용되었다. 6 일 후에, 상기 배지를 변경함으로써, 즉 질소 공급원을 제외하고 및/또는 부가의 염 (0.8%)을 가하여 스트레스가 유발되었다.
- [0050] 시료채취 및 건조 중량의 측정
- [0051] 각 시료채취 시점에서, 적어도 3개의 필터가 각 PBR로부터 수집되었다. 상기 접종 부위에서 과도하게 성장한 바이오매스가 제거되었고, 상기 필터를 일정 중량으로 동결 건조시켰다. 건조 중량은 중량측정으로 (gravimetrically) 결정되었고, 바이오매스는 아스타크산틴을 분석할 때까지 -20 °C로 보관하였다.
- [0052] 아스타크산틴 결정
- [0053] 아스타크산틴은 Li et al (2012)에 의해 개시된 바와 같이 분광광도측정으로 (spectrophotometrically) 결정되었다. 동결 건조된 바이오매스 시료는 디메틸 술폭시드 (DMSO, Merck, Darmstadt, Germany)로 추출되었고, 70 °C에서 5분 동안 인큐베이트된 후, 5분 동안 4000 g로 원심분리되었다. 추출은 무색의 펠렛 (pellet)이 수득될 때까지 반복되었다. 상층액이 수집되었고, 530 nm에서 OD가 측정되었다 (Infinite M200 plate reader, Tecan, Mannedorf, Switzerland). 완전한 추출을 필요로 하는 경우, 세포를 샌드(sand)와 그라인딩하여 분쇄시켰다. 아스타크산틴 농도는 DMSO에 용해되고 희석시킨 아스타크산틴 표준 (98.6% 순도, Dr. Ehrenstorfer, Ausburg, Germany)에 의해 제작된 검정 곡선에 기반하여 결정되었다.
- [0054] 또한, 미세조류 성장을 촉진하는데 적합한 다른 인공 또는 천연 배양 배지가 *에이취. 플루비알리스* 배양을 위해 사용될 수 있다.
- [0055] 보충의 CO<sub>2</sub>는 구체적으로 높은 광 조건하에 바이오매스 성장을 촉진하는데 유익하지만, 필수적인 것은 아니다.
- [0056] 광원은 일반적으로 인공 조명일 수 있고, 자연 일광을 사용할 수 있고, 일광의 사용이 경제적인 이유로 (구체적으로 높은 강도가 필요한 경우) 바람직할 수 있다.

[0057]

참고문헌

- Aflalo C, Meshulam Y, Zarka A, Boussiba S (2007) On the Relative Efficiency of Two- vs. One-stage Production of Astaxanthin by the Green Alga *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnol Bioeng* 98:300–305. doi: 10.1002/bit.21391
- Berner F, Heimann K, Sheehan M (2014) Microalgal biofilms for biomass production. *J Appl Phycol*. doi: 10.1007/s10811-014-0489-x
- Del Río E, Acién FG, García-Malea MC, et al (2005) Efficient one-step production of astaxanthin by the microalga *Haematococcus pluvialis* in continuous culture. *Biotechnol Bioeng* 91:808–815. doi: 10.1002/bit.20547
- Dong, S., Huang, Y., Zhang, R., Wang, S., & Liu, Y. (2014). Four Different Methods Comparison for Extraction of Astaxanthin from Green Alga *Haematococcus pluvialis*, 2014
- Fiedler, D., Hager, U., Franke, H., Soltmann, U., Böttcher, H., (2007) Algae biocers: astaxanthin formation in sol-gel immobilised living microalgae. *J. Mater. Chem.* 2007, 17, 261-266
- García-Malea LópezMC, Sánchez EDR, Casas López JL, et al (2006) Comparative analysis of the outdoor culture of *Haematococcus pluvialis* in tubular and bubble column photobioreactors. *J Biotechnol* 123:329–342. doi: 10.1016/j.jbiotec.2005.11.010
- Li Y, Miao F, Geng Y, et al (2012) Accurate quantification of astaxanthin from *Haematococcus* crude extract spectrophotometrically. *Chinese J Oceanol Limnol* 30:627–637. doi: 10.1007/s00343-012-1217-5
- Liu T, Wang J, Hu Q, et al (2013) Attached cultivation technology of microalgae for efficient biomass feedstock production. *Bioresour Technol* 127:216–222. doi: 10.1016/j.biortech.2012.09.100
- Lorenz RT, Cysewski GR (2000) Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends Biotechnol* 18:160–167.
- Murphy T, Fleming E, Bebout L, et al (2012) A Novel Microbial Cell Cultivation Platform for Space Applications. In: 1st Annual International Space Station Research and Development Conference. Denver, CO: American Astronomical Society (AAS). pp 335–339
- Naumann T, Çebi Z, Podola B, Melkonian M (2013) Growing microalgae as aquaculture feeds on twin-layers: a novel solid-state photobioreactor. *J Appl Phycol* 25:1413–1420. doi: 10.1007/s10811-012-9962-6
- Nguyen K (2013) Astaxanthin: a comparative case of synthetic vs. natural production. *Chem Biomol Eng Publ Other Work* 1:1–11.

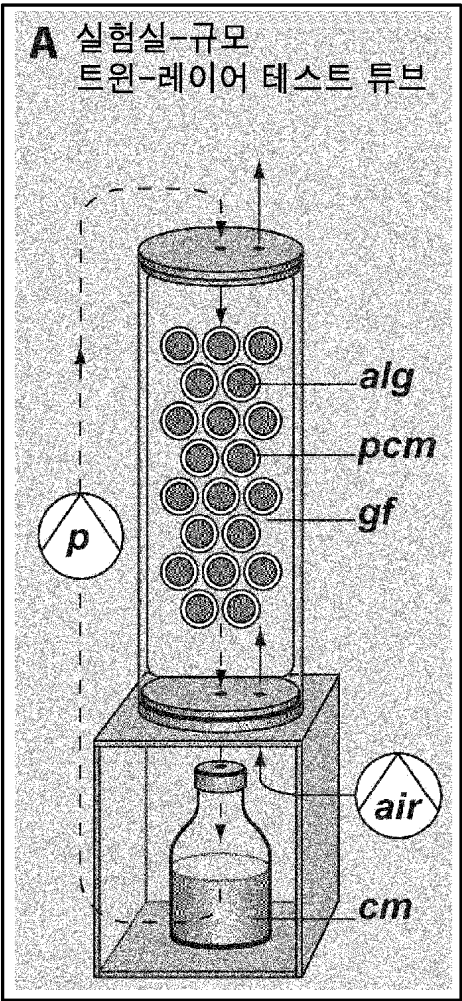
[0058]

- Nobre, B., Marcelo, F., Passos, R., Beirao, L., Palavra, A., Gouveia, L., & Mendes, R. (2006). Supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin and other carotenoids from the microalga *Haematococcus pluvialis*. *European Food Research and Technology*, 223, 787–790. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1007/s00217-006-0270-8>
- Nowack ECM, Podola B, Melkonian M (2005) The 96-well Twin-Layer system: A novel approach in the cultivation of microalgae. *Protist* 156:239–251. doi: 10.1016/j.protis.2005.04.003
- Olivieri G, Salatino P, Marzocchella A (2014) Advances in photobioreactors for intensive microalgal production: configurations, operating strategies and applications. *J Chem Technol Biotechnol* 89:178–195. doi: 10.1002/jctb.4218
- Ozkan A, Kinney K, Katz L, Berberoglu H (2012) Reduction of water and energy requirement of algae cultivation using an algae biofilm photobioreactor. *Bioresour Technol* 114:542–8. doi: 10.1016/j.biortech.2012.03.055
- Schultze LKP, Simon M-V, Li T, et al (2015) High light and carbon dioxide optimize surface productivity in a Twin-Layer biofilm photobioreactor. *Algal Res* 8C:37–44. doi: 10.1016/j.algal.2015.01.007
- Suh IS, Joo H-N, Lee C-G (2006) A novel double-layered photobioreactor for simultaneous *Haematococcus pluvialis* cell growth and astaxanthin accumulation. *J Biotechnol* 125:540–6. doi: 10.1016/j.jbiotec.2006.03.027
- Wan M, Hou D, Li Y, et al (2014) The effective photoinduction of *Haematococcus pluvialis* for accumulating astaxanthin with attached cultivation. *Bioresour Technol* 163C:26–32. doi: 10.1016/j.biortech.2014.04.017
- Wang J, Sommerfeld MR, Lu C, Hu Q (2013) Combined effect of initial biomass density and nitrogen concentration on growth and astaxanthin production of. *Algae* 28:193–202.
- Yin S, Wang J, Chen L, Liu T (2015) The water footprint of biofilm cultivation of *Haematococcus pluvialis* is greatly decreased by using sealed narrow chambers combined with slow aeration rate. *Biotechnol Lett*. doi: 10.1007/s10529-015-1864-7
- Zhang L, Chen L, Wang J, et al (2015) Attached cultivation for improving the biomass productivity of *Spirulina platensis*. *Bioresour Technol* 181:136–142. doi: 10.1016/j.biortech.2015.01.025
- Zhang W, Wang JJ, Wang JJ, Liu T (2014) Attached cultivation of *Haematococcus pluvialis* for astaxanthin production. *Bioresour Technol* 158C:329–335. doi: 10.1016/j.biortech.2014.02.044

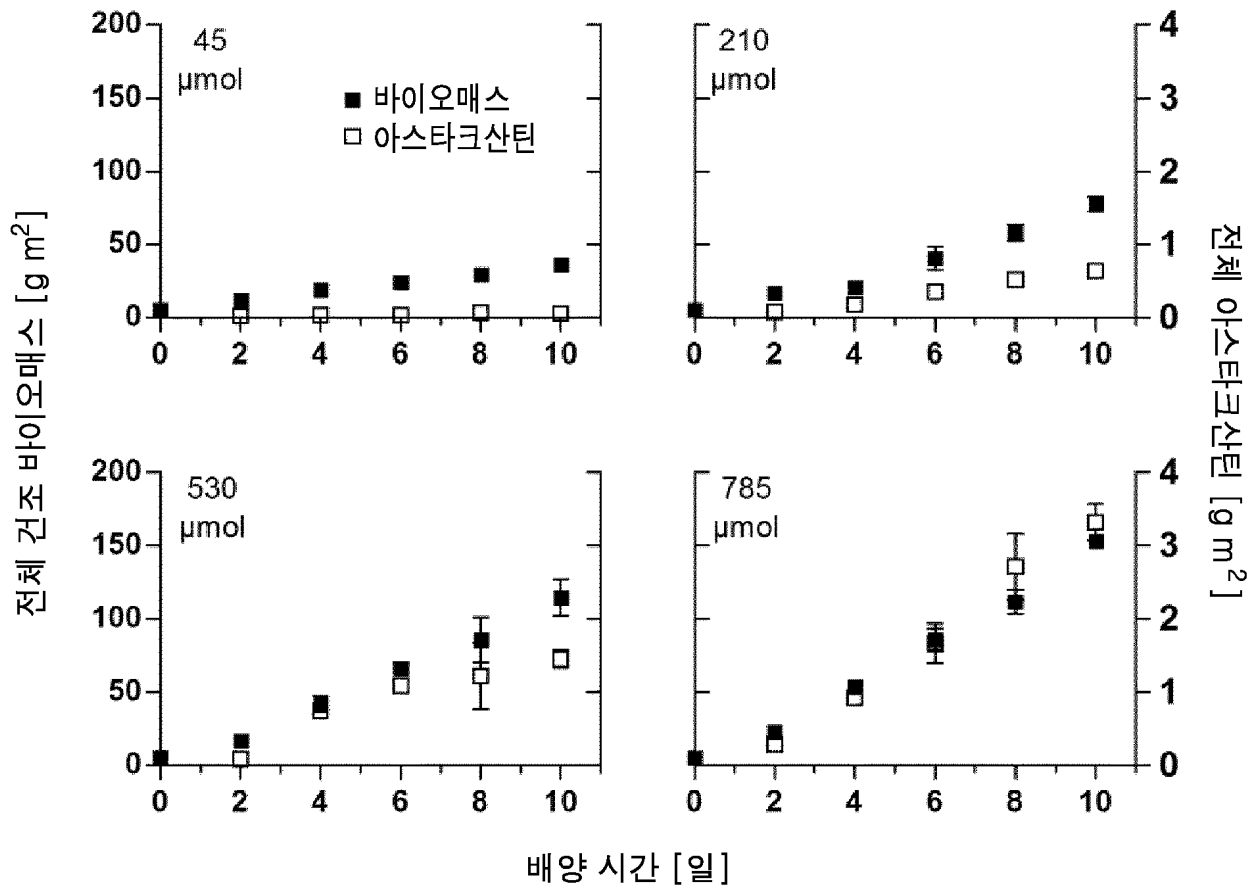


도면

도면1



도면2



도면3

