(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2015 년 10 월 22 일 (22.10.2015)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2015/160154 A1

(51) 국제특허분류:
C12P 23/00 (2006.01) *C12N 13/00* (2006.01)
C12N 1/12 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2015/003668

(22) 국제출원일: 2015 년 4 월 13 일 (13.04.2015)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2014-0045962 2014 년 4 월 17 일 (17.04.2014) KR

(71) 출원인: **고려대학교산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION)** [KR/KR]; 136-701 서울시 성북구 안암로 145 고려대학교, Seoul (KR).

(72) 발명자: **심상준 (SIM, Sang Jun)**; 135-506 서울시 강남구 선릉로 221, 301-803, Seoul (KR). **홍민의 (HONG, Min-Eui)**; 136-701 서울시 성북구 안암로 145 고려대학교 창의관 615, Seoul (KR).

(74) 대리인: **이처영 (LEE, Cheo Young)** 등; 135-748 서울시 강남구 태헤란로 123 여삼빌딩 11 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.

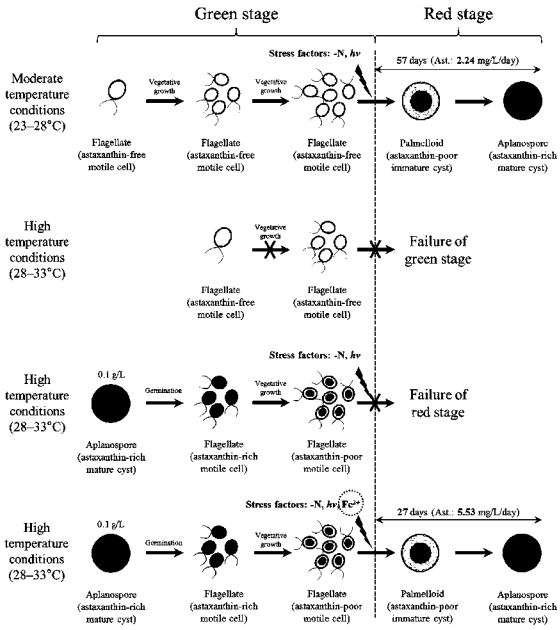
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS,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

공개:
— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

WO 2015/160154 A1

(54) Title: METHOD FOR INCREASING PRODUCTION OF ASTAXANTHIN IN *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS* BY MATURE SPORE INOCULATION AND IRON ION-MEDIATED HARBER-WEISS REACTION AT HIGH TEMPERATURE

(54) 발명의 명칭 : 고온에서 성숙 포자 접종 및 철이온매개 하버-바이스 반응에 의한 해마토코쿠스 플루비알리스 내 아스타잔틴 생산량 증진 방법



(57) Abstract: The present invention relates to a method for increasing the production of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* by a two-stage light cultivation process and, more specifically, to a method for increasing the production of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* cells by inoculating mature spores (cyst) and adding iron ions under high-temperature autotrophic conditions. The two-stage light cultivation process for the production of astaxanthin under autotrophic conditions using the sun during outdoor cultivation comprising inoculating mature spore (cyst) cells and adding iron ions, according to the present invention, can solve the problem that synthesis of astaxanthin is inhibited by excess generation of LROS(O_2^-, H_2O_2) by effectively converting LROS(O_2^-, H_2O_2) that is generated in a large amount under high-temperature conditions to MROS(O_2, OH·) and amplifying an intracellular lipid oxidation signal, thereby more economically increasing the production of astaxanthin. Such astaxanthin is useful in a variety of industrial fields as a potent antioxidant.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]

본 발명은 이단(two-stage) 광배양 공정으로 해마토코쿠스 플루비알리스 내 아스타잔틴의 생산량을 증진시키는 방법에 관한 것으로서, 구체적으로는 고온의 자가영양조건에서 성숙 포자(cyst)의 접종 및 철이온 첨가로 해마토코쿠스 플루비알리스 세포 내 아스타잔틴의 생산량을 증진시키는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 옥외배양 시 자가영양조건으로 태양을 이용한 아스타잔틴 생산에서 성숙 포자(cyst) 세포를 접종한 후 철이온을 첨가하는 이단(two-stage) 광배양 공정은 고온의 조건에서 다량 발생되는 LROS(O_2^-, H_2O_2)를 효과적으로 MROS(O_2, $OH\cdot$)로 전환하여 세포 내 지질 산화 신호를 증폭하여 LROS(O_2^-, H_2O_2)의 과량 발생에 의한 아스타잔틴 합성을 저해하는 문제점을 해결할 수 있으므로, 보다 경제적으로 아스타잔틴 생산을 증진시킬 수 있고 이러한 아스타잔틴은 강력한 항산화물질로서 다양한 산업분야에서 유용하다.

명세서

발명의 명칭: 고온에서 성숙 포자 접종 및 철이온매개 하버-바이스 반응에 의한 해마토코쿠스 플루비알리스 내 아스타잔틴 생산량 증진 방법

기술분야

[1] 본 발명은 이단(two-stage) 광배양 공정으로 해마토코쿠스 플루비알리스 내 아스타잔틴의 생산량을 증진시키는 방법에 관한 것으로서, 구체적으로는 고온의 자가영양조건에서 성숙 포자(cyst)의 접종 및 철이온 첨가로 해마토코쿠스 플루비알리스 세포 내 아스타잔틴의 생산량을 증진시키는 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

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

[4] 이러한 아스타잔틴은 효모 균주인 파피아 로드지마(Phaffia rthodozyma)와 버비박테리아(Bervibacterium)에서 생성되며, 또한, 해양 동물과 담수 동물에 많이 분포되어 있지만, 새우나 가재 등의 갑각류에서 추출된 아스타잔틴은 함량이 적고, 추출 과정이 어려워 적용되지 않고 있으며, 파피아 로드지마 균주는 성장률이 높으나 아스타잔틴의 수율이 낮다는 문제점을 가지고 있다.

[5] 이에, 지구상에서 아스타잔틴의 축적함량과 수율측면에서 가장 우수한 미세조류인 해마토코쿠스 플루비알리스(Haematococcus pluvialis)를 사용하여 빛에 의한 이산화탄소의 고정화와 동시에 아스타잔틴의 생산성을 높이기 위한 다양한 연구가 수행되고 있다.

[6] 종래 KR2005-0005341 A에서는 아스타잔틴을 생산할 수 있는 균주를 배양시켜 이러한 균주를 이용하여 고함량의 아스타잔틴을 생산하기 위한 방법으로 광조사량을 증가시켜서 미세조류에 의한 아스타잔틴의 생산량을 증가시키기 위한 연구가 이루어졌지만, 이 경우 특별한 형태의 반응기가 필요하고 높은 광

조사량을 위한 에너지 비용이 크다는 단점이 있다. 또한, KR2010-0105193 A에서는 방사선 조사를 이용하여 아스타잔틴의 생산방법을 개시하고 있으나, 방사선 조사 비용을 절감할 수 없는 문제점이 있다.

[7] 한편, 세포 성장 및 아스타잔틴 합성에 필요한 탄소원으로 오로지 이산화탄소만을 이용하는 자가영양조건에서 아스타잔틴 생산 유도를 위한 해마토코쿠스 플루비알리스의 가장 핵심적인 아스타잔틴 합성 촉진 인자는 바로 강력한 빛인데, 광원으로 태양을 활용했을 경우, 온실가스의 주범인 이산화탄소의 아스타잔틴 전환공정에 보다 경제성을 부여할 수 있고, 강력한 빛에 의해 아스타잔틴 합성이 촉진되는 반면, 태양광을 흡수하는 미세조류 광배양기 내 배지의 온도 상승에 따라 외부 박테리아에 의한 오염이 가속화되는 등의 다양한 문제점들이 야기된다.

[8] 따라서, 아스타잔틴 축적 능력이 우수한 해마토코쿠스 플루비알리스를 옥외에서 태양을 활용하여 산업적으로 이산화탄소 전환 공정에 이용하기 위해서는 고온의 자가영양조건에서의 느린 아스타잔틴 생산성 문제를 해결하는 것이 무엇보다 시급히 필요한 실정이다.

[9] 이에, 본 발명자들은 해마토코쿠스 플루비알리스를 옥외 태양광에서 배양하여 아스타잔틴 생산수율 향상 방법을 찾고자 예의 노력한 결과, 고온의 자가영양조건에서 성숙 포자(cyst)를 접종한 후 철이온을 첨가하는 이단(two-stage) 광배양 공정으로 해마토코쿠스 플루비알리스 세포 내 아스타잔틴의 생산량이 현저히 증가하는 것을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

[10]

[11] 발명의 요약

[12] 본 발명의 목적은, (a) 해마토코쿠스 플루비알리스의 성숙 포자(cyst)를 접종하여 증식(vegetative growth)시키는 단계; 및 (b) 질소가 결핍되고 철이온이 첨가된 자가영양조건에서 100-300μE/m^2/s의 광도를 조사하여 해마토코쿠스 플루비알리스 내 아스타잔틴의 생성을 유도하는 단계를 포함하는 해마토코쿠스 플루비알리스(Haematococcus pluvialis)의 배양에 의한 아스타잔틴의 생산량을 증진시키는 방법을 제공하는데 있다.

[13] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (a) 해마토코쿠스 플루비알리스의 성숙 포자(cyst)를 접종하여 증식(vegetative growth)시키는 단계; 및 (b) 질소가 결핍되고 철이온이 첨가된 자가영양조건에서 100-300μE/m^2/s의 광도를 조사하여 해마토코쿠스 플루비알리스 내 아스타잔틴의 생성을 유도하는 단계를 포함하는 해마토코쿠스 플루비알리스(Haematococcus pluvialis)의 배양에 의한 아스타잔틴의 생산량을 증진시키는 방법을 제공한다.

[14]

도면의 간단한 설명

[15] 도 1은 고온(30℃, 36℃)의 자가영양조건에서 철이온 매개 하버-바이스 반응을 통한 해마토코쿠스 플루비알리스의 아스타잔틴 생산 능력 증대를 위한 유도과정을 도식화한 개략도이다.

[16] 도 2는 자가영양조건에서 아스타잔틴 합성 동안 각각의 온도 조건(23 ℃, 30 ℃, 36 ℃)과 철이온의 첨가에 따른 해마토코쿠스 플루비알리스의 바이오매스 및 아스타잔틴 생합성 능력에 미치는 영향을 나타내는 결과이다.

[17] 도 3은 자가영양조건에서 아스타잔틴 합성 18일째 각각의 온도 조건(23 ℃, 30 ℃, 36 ℃)과 철이온의 첨가에 따른 해마토코쿠스 플루비알리스의 아스타잔틴 축적 정도를 나타낸 광학현미경 이미지 결과이다. (Scale bars = 40 μm)

[18] 도 4는 자가영양조건에서 아스타잔틴 합성 18일 동안 각각의 온도 조건(23 ℃, 30 ℃, 36 ℃)과 철이온의 첨가에 따른 해마토코쿠스 플루비알리스의 DCF 함량, SOD 활성 및 MDA 함량에 미치는 영향을 나타내는 결과이다.

[19] 도 5는 23 ℃ 온도의 자가영양조건에서 아스타잔틴 합성 촉진시, O2-를 인위적으로 방출하는 Methyl viologen의 농도와 철이온(Fe^{2+}) 증가에 따른 해마토코쿠스 플루비알리스의 아스타잔틴 축적 능력의 감소 및 이와 대조적으로 금속 이온매개 Fenton 반응에 의한 아스타잔틴 축적능력의 유지 및 증가 정도를 나타내는 결과이다.

[20] 도 6은 23 ℃에서 그린 스테이지로 배양된 세포를 고온 (23.4 - 33.5 ℃)의 자가영양조건에서 철이온을 첨가하여 해마토코쿠스 플루비알리스의 아스타잔틴 생산을 확인한 결과이다.

[21] 도 7은 고온 (23 ℃, 30 ℃, 33 ℃) 조건에서 성숙 포자(red cyst) 접종을 통한 그린 스테이지에서 해마토코쿠스 플루비알리스의 vegetative growth를 확인한 결과이다.

[22] 도 8은 여름철 고온의 자가영양조건에서 그린 스테이지로 15일간 배양 후 철이온을 첨가하여 레드 스테이지로 63일간 배양으로 해마토코쿠스 플루비알리스의 아스타잔틴 생산량 증가를 확인한 결과이다.

[23] 도 9는 옥외의 중온 및 고온(23-28℃ 및 28-33℃) 조건에서, 이단(two-stage: 그린 및 레드 스테이지) 광배양을 통한 해마토코쿠스 플루비알리스의 아스타잔틴 생산 능력 증대를 유도한 과정 및 결과를 나타낸 것이다.

[24]

[25] 발명의 상세한 설명 및 바람직한 구현예

[26] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[27]

[28] 본 발명에서는 고온의 자가영양조건에서 *H.pluvialis*의 생산량을 증가시켜 아스타잔틴을 대량 생산하기 위하여, 성숙 포자(cyst)를 접종하고 철이온이

첨가된 자가영양조건의 해마토코쿠스 플루비알리스 세포에 100-300μE/m²/s의 광도로 조사함으로써, 해마토코쿠스 플루비알리스 내 아스타잔틴의 생성을 유도하였다.

[29] 본 발명에서 사용한 미세 조류인 *H. pluvialis*는 자연계에 존재하는 생물체 중 아스타잔틴의 축적량이 가장 높으나, 이산화탄소를 유일한 탄소원으로 사용하는 자가영양조건에서는 아스타잔틴 생산성이 낮은 단점이 있다.

[30] 특히, 한국과 같은 여름철 태양은 강한 빛과 더불어 높은 온도(30 - 40℃)를 동반하게 되는데, 이러한 고온의 자가영양조건에서 해마토코쿠스 플루비알리스 세포에서 아스타잔틴 합성 시 아스타잔틴 생합성 능력이 현저히 감소하는 현상이 일어난다. 아스타잔틴 농도 및 생산성의 지속적인 감소로 세포가 극심한 환경적 스트레스에 견디지 못하고 결국 세포의 사멸이 초래되며, 고온(30 - 40℃)에서 생육이 활발한 박테리아에 의한 오염은 이런 문제를 더욱 심각하게 한다.

[31] 따라서, 본 발명은 일관점에서 (a) 해마토코쿠스 플루비알리스의 성숙 포자(cyst)를 접종하여 증식(vegetative growth) 시키는 단계; 및 (b) 질소가 결핍되고 철이온이 첨가된 자가영양조건에서 100-300μE/m²/s의 광도를 조사하여 해마토코쿠스 플루비알리스 내 아스타잔틴의 생성을 유도하는 단계를 포함하는 해마토코쿠스 플루비알리스(Haematococcus pluvialis)의 배양에 의한 아스타잔틴의 생산량을 증진시키는 방법에 관한 것이다.

[32] 본 발명에 있어서, 상기 배양온도는 25 ~ 40℃ 인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[33] 일반적인 봄의 중온 조건은 17.5 - 27.7℃이며, 여름의 고온조건은 23.4 ? 33.5℃이다. 따라서, 본 발명의 moderate temp는 23 - 28℃이며, high temp는 28 - 33℃인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[34] 본 발명에 있어서, 상기 자가영양조건은 광합성을 위한 무기 탄소원으로 3~4% 이산화탄소를 공급하는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[35] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계는 35μE/m²/s 이하의 광도를 조사하는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[36] 본 발명의 (a) 단계는“그린 스테이지”를 의미하며, 상기 “그린 스테이지”는 질소가 포함된 자가영양조건에 3~4% 이산화탄소를 공급하면서 35μE/m²/s 이하의 광도를 조사하는 낮은 스트레스의 배양조건을 의미한다.

[37] 본 발명의 (b) 단계는 “레드 스테이지”를 의미하며, 상기 “레드 스테이지”는 질소가 결핍된 자가영양조건에 3~4% 이산화탄소를 공급하면서 100-350μE/m²/s의 광도를 조사하는 높은 스트레스의 배양조건을 의미한다.

[38] 본 발명에 있어서, 상기 철이온은 Fe_2SO_4, $FeCl_2$, $FeCl_3$ 및 $Fe_2(SO_4)_3$로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 상기 철이온의 농도는 40-80μM인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[39] 본 발명에 있어서, 상기 철이온은 활성산소 O_2^- 및 H_2O_2 함량에 대하여 100-600 몰비로 첨가되는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[40] 본 발명에 있어서, 상기 아스타잔틴의 함량은 해마토코쿠스 플루비알리스 세포내 활성산소 O_2^- 및 H_2O_2가 활성산소 O_2 및 OH·로 전환에 의해 증진되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[41] 일반적으로 미세조류는 고온의 환경에 노출 시, 광합성을 담당하는 엽록체 안에서 틸라코이드(thylakoids)의 누출(leak), 심할 경우에는 분해(disintegration)가 발생한다. 이어서 틸라코이드의 산소흡수률(oxygen uptake rate)이 증폭되고, 캘빈회로(calvin cycle)를 통해 환원되지 못한 전자들이 Mehler Reaction(O_2 uptake + electron → O_2^-)에 의해 산소와 결합하여 O_2^-가 틸라코이드 안에 다량으로 생성된다. 이어서 세포는 과량 생산된 O_2^-로부터 세포 성분을 보호하기 위해 SOD(superoxide dismutase)를 발현시키게 되고, 생성된 O_2^-는 엽록체 내 SOD(superoxide dismutase)에 의해 H_2O_2로 전환된다. 결과적으로 고온의 환경은 미세조류 세포 내 다량의 H_2O_2를 발생시킨다.

[42] H_2O_2는 O_2^-와는 달리 확산을 통한 세포막 투과가 용이하기 때문에 엽록체 기관으로부터 나온 H_2O_2는 핵산, 미토콘드리아, 액포 등 다른 세포기관으로 세포 산화 관련 시그널을 전달하게 되며, 이때 카로티노제네시스(carotenogenesis)에 관련된 유전인자들 중 H_2O_2에 민감한 효소들을 직접적으로 비활성화시켜 결과적으로 해마토코쿠스 플루비알리스의 아스타잔틴 합성이 저해되었을 가능성이 있다.

[43] 한편, 식물체에서 카로티노이드는 색소체(plastid)안에서 배타적으로 합성된다고 보고된 바 있으나, 해마토코쿠스 플루비알리스는 스트레스 반응에 의하여 색소체 밖의 지질 소포(lipid vesicles, globules)에 아스타잔틴을 포함하는 카로티노이드를 축적한다. 앞서 언급하였듯이 H_2O_2는 O_2^-와는 달리 확산을 통한 세포막 투과가 용이하기 때문에 철이온 매개 펜톤 반응($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH\cdot$)은 색소체 밖에서도 충분히 발생한다. 그러므로 해마토코쿠스 세포는 철이온 매개 Haber-Weiss 반응을 통하여 과량 생성된 OH·로 인한 극심한 지질 산화로부터 자신을 방어하기 위하여 아스타잔틴 합성을 촉진 시켰을 가능성이 크다.

[44] 또한, O_2, OH·는 O_2^-, H_2O_2 보다 반응성이 높은 것으로 보고되었다. OH·는 0.3 msec(diffusion lengths of 1.7 - 20μm)의 매우 짧은 수명(lifetime)을 가지는 반면, H_2O_2는 E = 1.77 V, pKa 11.6의 강력한 2개의 전자 산화제(electron-oxidant)이지만, 생물학적 분자들(biological molecules)에 대한 반응성이 낮기 때문에 대부분의 H_2O_2에 의한 세포 손상은 Fe^{2+}와 같은 전이 금속(transition metal)이나 효소(enzyme)의 매개로 하여 H_2O_2의 O_2 및 OH·전환을 유도하여 발생한다. O_2^- 역시 적당히 높은 reduction potential(E = 0.94 V)을 가지고 있음에도 불구하고 여전히 생물학적 분자들(biological molecules)에 대한 반응성이 낮다.

[45] 따라서, 고온의 배양조건(30 - 40℃)에서 세포 내 다량 생성된 LROS(O_2^-, H_2O_2

)로부터 철이온 매개 Haber-Weiss 반응을 유도하여 상당 부분 전환된 MROS(O_2, OH·)는 PUFA(불포화 지방산)을 비롯한 각종 세포성분들을 산화시켜 결과적으로 MDA 함량이 증가하였을 가능성이 크다. 더욱이 실온(23℃)의 조건에서 $FeSO_4$을 추가적으로 첨가하지 않은 세포가 $FeSO_4$을 추가적으로 첨가한 세포에 비하여 MDA, 카로티노이드 함량이 더 높은 점으로 미루어보아 지질 산화는 Haber-Weiss 반응 시 철이온 농도와 LROS(O_2^-, H_2O_2)의 조절을 통하여 가속화될 수 있으며, 철이온과 LROS 함량비 조절(ratio control)이 자가영양조건에서 해마토코쿠스 플루비알리스 세포의 아스타잔틴 생산을 위해서 매우 중요한 요소임에 틀림이 없으며, 이에 따라, 세포 내 O_2^-의 H_2O_2 함량의 면밀하게 제어할 수 있다.

[46] 본 발명의 일 실시예에서는, 상기 철이온은 활성 산소 O_2^- 및 H_2O_2 함량에 대하여 100 내지 600 몰비로 첨가되는 것이 바람직하며, 상기 범위를 벗어나 활성 산소 O_2^- 및 H_2O_2 함량에 대하여 100 몰비 미만으로 첨가되는 경우에는 아스타잔틴 축적 효율이 떨어지는 문제점이 있을 수 있고, 활성 산소 O_2^- 및 H_2O_2 함량에 대하여 600 몰비를 초과하여 첨가되는 경우에는 부반응이 일어나 아스타잔틴 합성이 저해되는 문제점이 있을 수 있다.

[47] 본 발명에 있어서, 상기 아스타잔틴의 함량은 해마토코쿠스 플루비알리스 세포 내 활성산소 O_2^- 및 H_2O_2가 활성산소 O_2 및 OH·로 전환에 의해 증진되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[48] 본 발명의 다른 실시예에서는, 더욱 효율적인 아스타잔틴의 생산량 증진을 위하여, 고온의 배양 조건에서 그린 스테이지에서 성숙 포자 (red cyst) 접종을 통한 헤마토코쿠스 세포의 생산량을 조사하였으며, 이에 28-30℃의 고온자가배양조건의 그린 스테이지에서 성숙 포자 (red cyst) 접종 및 레드 스테이지에서 철이온의 첨가는 헤마토코쿠스 세포의 생산량과 생산수율을 현저히 증진시킬 수 있다.

[49]

[50] 본 발명의 용어 '자가영양조건'은 식물이 몸 밖에서 무기물을 양분으로 섭취하여 그것을 유기물로 합성할 수 있도록 하는 배지의 상태를 의미하며, '자가영양배양조건'이라고도 표현하며, 일반적으로 자가영양조건에서 광합성을 위한 무기 탄소원으로는 이산화탄소를 공급하고, 배지 조성은 $Ca(NO_3)_2$ 또는 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, KNO_3 또는 KCl, Na_2Glycerophosphate$\cdot 5H_2O$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, Tris-aminomethane, Thiamine, Biotin, Vitamin B12, PIV metal solution, Na_2EDTA, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 및 $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[51]

[52] 실시예

[53] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에

따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[54]

[55] 재료

[56] 본 발명에 사용된 균주는 Haematococcus pluvialis NIES-144로서 National Institute for Environmental Studies, Tsukuba, Japan으로부터 구입하여 사용하였다.

[57] 본 실시예에 사용된 배지의 종류는 모두 NIES-C 배지 및 NIES-N 배지 2가지이고, 이들의 구성성분을 하기 표 1에 나타내었다.

[58] 하기 표 1에서,

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

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

[61] - CO_2 supply: 3%(v/v)

[62] - 광조건: 20 μE/m²/s (for vegetative growth); 150 μE/m²/s (for inductive growth)

[63] - $FeSO_4$: 450 μM

[64] - MV (methyl viologen): 10-11M, 10-9M, 10-7M(artificial O2-generator)

[65] - H2DCFDA (carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacetate) 5 μM

[66] - DCF: H2DCFDA가 활성산소(O2-, H2O2)에 의해 산화되어 생성되는 물질

[67] - SOD(superoxide dismuase): SOD는 세포 내에서 O_2^-를 H_2O_2로 전환하는 효소

[68] - MDA(malondialdehyde): MDA는 세포 내 PUFA(polyunsaturated fatty acids)가 산소(O_2) 및 활성산소(O_2^-, H_2O_2 및 OH·)에 의해 산화되어 전환되는 2차 대사 물질로서, 세포 내 MDA 양을 통하여 세포의 산화 정도를 간접적으로 확인할 수 있는 일종의 산화 지표이다.

[69]

[70] 표 1

[Table 1]

NIES-C		NIES-N	
성분	함량(/L)	성분	함량(/L)
$Ca(NO_3)_2$	0.15 g	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.13 g
KNO3	0.10 g	KCl	0.07 g
Na_2Glycerophosphate$\cdot 5H_2O$	0.05 g	Na_2Glycerophosphate$\cdot 5H_2O$	0.05 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.04 g	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.04 g
Tris-aminomethane	0.05 g	Tris-aminomethane	0.05 g
Thiamine	0.01 ㎎	Thiamine	0.01 ㎎
Biotin	0.10 ㎍	Biotin	0.10 ㎍
Vitamin B12	0.01 ㎍	Vitamin B12	0.01 ㎍
PIV metal solution(per liter)Na_2EDTA 1 g$FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0.196 g$MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.036 g$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.022 g$CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 4 ㎎$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 2.5 ㎎	3 ㎖	PIV metal solution(per liter)Na_2EDTA 1 g$FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0.196 g$MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.036 g$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.022 g$CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 4 ㎎$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 2.5 ㎎	3 ㎖

[71]

[72] 실시예 1: 자가영양조건에서 다양한 고온의 배양조건 및 철이온 매개 Haber-Weiss 반응이 해마토코쿠스 플루비알리스의 바이오매스 및 아스타잔틴 축적에 미치는 영향

[73] 자가영양조건에서 다양한 고온의 배양조건 및 철이온 매개 Haber-Weiss 반응이 해마토코쿠스 플루비알리스의 아스타잔틴 축적에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 하기 실험을 수행하였다.

[74] 유기 탄소원이 결핍된 NIES-C 배지에서 낮은 광도의 빛(20μE/m^2/s)과 오직 이산화탄소만을 유일 탄소원으로 생육하여 대수기에 이른 세포 배양액(OD_{680} = 약 0.8) 내 세포를 NIES-N 배지로 옮겨서 증식을 억제하고, 강한 빛(150μE/m^2/s)과 함께 일반적인 실온의 배양 온도(23℃)와 고온의 배양 온도(30℃, 36℃) 그리고 이와 더불어 각각의 온도 조건에 철이온 매개 Haber-Weiss 반응을 유도하는 물질 $FeSO_4$ (450μM)을 첨가하였을 경우와 하지 않았을 경우를 나누어 배양 18일 동안 바이오매스 증가량 및 아스타잔틴 축적 정도를 분석하였다.

[75]

[76] 1-1: 바이오매스

[77] 도 2(A)에 나타낸 바와 같이, 자가영양 조건에서 온도의 증가로 인한

해마토코쿠스 플루비알리스의 바이오매스 생산 능력은 23℃에 비해서 30℃에서 30%, 36℃에서 57% 감소하는 것이 확인된 반면에, 배양 온도가 30℃이고, Fe^{2+}를 첨가하여 Haber Weiss 반응을 유도하였을 경우, 해마토코쿠스 플루비알리스의 바이오매스 생산 능력은 Fe^{2+}을 첨가하지 않고, 배양 온도가 23℃인 경우에 비해서 9% 증가한 것이 확인되었고, Fe^{2+}를 첨가하지 않고, 배양 온도가 30℃인 경우에 비해서 41% 증가한 것이 확인되었다.

[78] 또한, 배양 온도가 36℃인 경우, Fe^{2+}를 첨가하여 Haber-Weiss 반응을 유도하였을 때, 해마토코쿠스 플루비알리스의 바이오매스 생산 능력은 Fe^{2+}을 첨가하지 않고, 배양 온도가 23℃인 경우에 비해서 3% 증가한 것이 확인되었고, Fe^{2+}를 첨가하지 않고, 배양 온도가 30℃인 경우에 비해서 77% 증가한 것이 확인되었다.

[79]

[80] 1-2 : 아스타잔틴 축적

[81] 도 2(B)에 나타낸 바와 같이, 자가 영양의 조건에서 온도의 증가로 인한 해마토코쿠스 플루비알리스의 아스타잔틴 생산 능력은 배양온도가 23℃인 경우에 비해서 30℃에서 23%, 36℃에서 42% 감소하는 것이 확인된 반면에, 배양온도가 30℃이고, Fe^{2+}를 첨가하여 Haber Weiss 반응을 유도하였을 경우, 해마토코쿠스 플루비알리스의 아스타잔틴 생산 능력은 Fe^{2+}을 첨가하지 않고, 배양 온도가 23℃인 경우에 비해서 17% 증가한 것이 확인되었고, Fe^{2+}를 첨가하지 않고, 배양온도가 30℃인 경우에 비해서 66% 증가한 것이 확인되었다.

[82] 또한, 배양 온도가 36℃인 경우, Fe^{2+}를 첨가하여 Haber-Weiss 반응을 유도하였을 때, 해마토코쿠스 플루비알리스의 아스타잔틴 생산 능력은 Fe^{2+}를 첨가하지 않고, 배양 온도가 23℃인 경우에 비해서 7% 감소하였지만, Fe^{2+}를 첨가하지 않고, 배양 온도가 30℃인 경우에 비해서 152% 증가한 것이 확인되었다.

[83] 나아가, 2일 동안 아스타잔틴 합성을 수행하여 해마토코쿠스 세포의 아스타잔틴 축적 정도를 나타내는 광학현미경 사진으로 확인한 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이, 고온의 조건이 자가영양조건에서 해마토코쿠스 플루비알리스의 아스타잔틴 생산에 부적합하다는 것을 의미함과 동시에 고온에서 Haber-Weiss 반응의 도입이 해마토코쿠스 플루비알리스의 아스타잔틴 생산 능력의 유지에 효과적임을 확인하였다.

[84]

[85] 실시예 2: 자가영양조건에서 다양한 고온의 배양조건 및 철이온 매개 Haber-Weiss 반응이 해마토코쿠스 플루비알리스의 아스타잔틴 합성 초기 세포 내 활성산소 함량, SOD 활성도, 지질산화도 및 카로티노이드 함량에 미치는 영향

[86] 고온의 자가영양조건에서 아스타잔틴 합성 시, 해마토코쿠스 플루비알리스의 아스타잔틴 생합성 저해 현상을 규명하기 위하여, 하기 실험을 수행하였다.

[87] 먼저 유기 탄소원이 결핍된 NIES-C 배지에서 낮은 광도의 빛(20μE/m²/s)과 오직 이산화탄소만을 유일 탄소원으로 생육하여 대수기에 이른 세포 배양액(OD_{680} =약 0.8)을 NIES-N 배지로 옮겨서 증식을 억제하고, 강한 빛 (150μE/m²/s)과 함께 일반적인 실온의 배양 온도(23℃)와 고온의 배양 조건(30℃, 36℃) 그리고 이와 더불어 각각의 온도 조건에 철이온매개 Haber-Weiss 반응을 유도하는 물질 $FeSO_4$ (450μM)을 첨가하였을 경우와 하지 않았을 경우를 나누어 아스타잔틴 합성 조건을 조성한 후 배양 이틀 동안 세포 내 활성산소 함량(DCF 함량), SOD 활성도, 지질산화도(MDA 함량) 및 카로티노이드 축적 정도를 분석하였다.

[88] 그 결과, 도 4(A)에 나타낸 바와 같이, DCF 함량(활성산소 함량 - O_2^-, H_2O_2)은 고온의 조건(30℃, 36℃)에서 급격히 상승하였으나, 고온의 배양 조건에 $FeSO_4$ (450μM)을 첨가하여 Haber-Weiss 반응을 유도하였을 경우 활성산소 함량은 급격히 감소하였다.

[89] 또한, 도 4(B)에 나타낸 바와 같이, 아스타잔틴 합성 과정 중 SOD(superoxide dismutase) 활성은 전체적으로 증가하는 양상을 보였지만, 고온의 배양 조건(30℃, 36℃)에서 SOD 활성은 급격히 상승한 반면 고온의 배양 조건에 $FeSO_4$ (450μM)을 첨가하여 Haber-Weiss 반응을 유도하였을 경우 SOD 활성은 현저히 감소하였다. 이것은 세포 내 과량 발생한 O_2^-가 철이온 매개 Haber-Weiss 반응을 통하여 O_2로 효과적으로 전환되었기 때문인 것으로 볼 수 있다.

[90] 나아가, 도 4(C)에 나타낸 바와 같이, MDA(malodialdhyde) 함량은 고온의 조건(30℃, 36℃)에서 DCF함량(O_2^-, H_2O_2)과 정비례하여 상승하였으나, 고온의 배양조건(30 ℃, 36 ℃)에 $FeSO_4$ (450μM)을 첨가하여 Haber-Weiss 반응을 유도하였을 경우 MDA 함량은 더욱 증가하는 것이 확인되었다. 이는 고온에서 생산된 활성산소 O_2^-, H_2O_2가 철이온 매개 Haber-Weiss 반응에 의하여 신속히 O_2, OH·로 전환되어 세포 내 PUFA(불포화지방산)와 빠르게 반응하여 MDA 형성을 가속화하였기 때문인 것으로 보인다.

[91]

[92] 실시예 3: 실온(23 ℃)의 자가영양조건에서 O_2^-의 인위적인 발생과 철이온매개 Haber-Weiss 반응이 해마토코쿠스 플루비알리스의 아스타잔틴 합성 초기 세포내 아스타잔틴 축적에 미치는 영향

[93] 실온(23℃)의 자가영양조건에서 아스타잔틴 합성 시 해마토코쿠스 플루비알리스 세포 내 LROS(O_2^-, H_2O_2)의 증가로 인한 아스타잔틴 생합성 저해 현상을 규명하기 위하여, 유기 탄소원이 결핍된 NIES-C 배지에서 낮은 광도의 빛(20μE/m²/s)과 오직 이산화탄소만을 유일 탄소원으로 생육하여 대수기에 이른 세포 배양액(OD_{680} =약 0.8)을 NIES-N 배지로 옮겨서 증식을 억제하고, 강한 빛 (150μE/m²/s)과 함께 다양한 농도(10-11 내지 10-7 M)의 Methyl viologen을 첨가하여 O_2^-를 인위적으로 강도 별로 발생시키고, 이와 더불어 일반적인 실온의 배양 온도(23℃)에서 철이온매개 Haber-Weiss 반응을 유도하는 물질 $FeSO_4$ (450μM)을 첨가하였을 경우와 하지 않았을 경우를 나누어 아스타잔틴 합성

조건을 조성한 후 배양 4일째 세포 내 아스타잔틴 축적 정도를 분석하였다.

[94] 그 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이, 해마토코쿠스 플루비알리스는 매우 적은 양의 Methyl viologen에도 민감하게 반응하여 과량의 O_2^-가 발생되는 조건에서 아스타잔틴 축적 능력이 감소하는 것이 확인되었는데, 반면에 철이온의 첨가에 의한 LROS(O_2^-, H_2O_2)의 MROS(O_2, OH·)로 신속한 전환은 해마토코쿠스 플루비알리스의 아스타잔틴 축적 능력을 증진시켰다. 이는 실온(23℃)의 자가영양조건에서 해마토코쿠스 플루비알리스세포의 효과적인 아스타잔틴 생산을 위해서는 아스타잔틴 합성시, 세포내 O_2^-의 H_2O_2 함량의 면밀한 제어가 필요함을 의미한다.

[95]

[96] 실시예 4: 고온의 자가영양조건에서 성숙 포자(cyst)의 접종 및 철이온 첨가에 의한 아스타잔틴 생산 증가

[97] 4-1: 그린 스테이지에서 성숙 포자(cyst)의 접종

[98] 본 실시예에서는 이단(two-stage) 광배양 공정으로 해마토코쿠스 플루비알리스 내 아스타잔틴의 생산량이 증진되는 것을 확인하였다.

[99] 봄 (중온 조건: 17.5-27.3℃) 및 여름 (고온 조건: 23.4-33.5℃)의 평균 광도와 온도의 변화를 조사하여, 봄과 여름의 광도는 동일하게 유지하고 온도는 특별히 조절하지 않은 채, 옥외에서 헤마토코쿠스를 활용한 보다 경제적인 생물학적 이산화탄소 제거를 위한 공정의 조건을 조사하였다.

[100] 그린 스테이지 (질소가 포함된 자가영양조건에 3~4% 이산화탄소를 공급하면서 35μE/m²/s 이하의 광도를 조사하는 낮은 스트레스의 배양조건) 동안 23℃에서 배양된 green vegetative 세포를 옥외 여름철 고온 조건인 레드 스테이지 (질소가 결핍된 자가영양조건에 3~4% 이산화탄소를 공급하면서 100-350μE/m²/s의 광도를 조사하는 높은 스트레스의 배양조건)에서 철이온을 첨가하여 36일 동안 아스타잔틴의 생산량을 조사하였다.

[101] 그 결과, 50μM의 철이온 농도에서 효과적으로 헤마토코쿠스 세포의 아스타잔틴 생합성이 효과적으로 진행됨을 확인하였으며(도 6), 반면 철이온이 첨가되지 않은 광반응기 내 헤마토코쿠스 세포는 아스타잔틴 생합성이 저해되었다.

[102] 더욱 효과적인 아스타잔틴의 생산량 증진을 위하여, 고온의 배양 조건에서 그린 스테이지에서 성숙 포자(red cyst) 접종을 통한 헤마토코쿠스 세포의 vegetative growth 가능성 여부를 21일간 인도어 랩 스케일에서 확인하였다. 그 결과, 비록 고온의 배양조건에서 성숙 포자 (red cyst) 접종 시 23℃ 배양 온도 조건보다 lag phase는 이틀 정도 길어졌지만, 성공적으로 그린 스테이지가 진행되었다(도 7).

[103]

[104] 4-2: 그린 스테이지에서 성숙 포자(cyst) 세포의 접종 및 레드 스테이지에서 철이온 첨가

[105] 실시예 4-1의 결과에 따라, 여름철 고온의 자가영양조건의 그린 스테이지에서 성숙 포자(red cyst) 접종 및 레드 스테이지에서 철이온 첨가를 통하여, 헤마토코쿠스 세포의 아스타잔틴 생산량을 조사하였다. 그린 스테이지 배양은 15일간 수행하였으며, 철이온 첨가 후 레드 스테이지 배양은 63일간 수행하였다.

[106] 그 결과, 성숙 포자(red cyst) 접종 및 50μM의 철이온 첨가에 의해 헤마토코쿠스 세포의 아스타잔틴 생산량(mg/L/day)은 봄철 중온의 조건에서 옥외배양은 2.24 mg/L/day이고, 고온 배양조건에서는 3.29 mg/L/day로 147% 증가한 것으로 나타났다(도 8).

[107] 도 9는 옥외의 중온 및 고온(23-28℃ 및 28-33℃) 조건에서, 이단(two-stage: 그린 및 레드 스테이지) 광배양을 통한 해마토코쿠스 플루비알리스의 아스타잔틴 생산능 증대를 유도한 과정 및 결과를 나타낸 것으로, 중온의 그린 스테이지 및 철이온이 첨가되지 않은 레드 스테이지 배양조건 (57일간 2.24mg/L/day)에 비해 고온의 자가영양 그린 스테이지에서 성숙 포자(red cyst) 접종 및 레드 스테이지의 철이온 첨가 배양조건은 아스타잔틴 생산량 및 생산수율의 현저한 증가(27일간 5.53mg/L/day)를 나타냈다.

[108]

산업상 이용가능성

[109] 본 발명에 따르면, 옥외배양 시 자가영양조건으로 태양을 이용한 아스타잔틴 생산에서 성숙 포자(cyst)를 접종한 후 철이온을 첨가하는 이단(two-stage) 광배양 공정은 고온의 조건에서 다량 발생되는 LROS(O_2^-, H_2O_2)를 효과적으로 MROS(O_2, OH·)로 전환하여 세포 내 지질 산화 신호를 증폭하여 LROS(O_2^-, H_2O_2)의 과량 발생에 의한 아스타잔틴 합성을 저해하는 문제점을 해결할 수 있으므로, 보다 경제적으로 아스타잔틴 생산을 증진시킬 수 있고 이러한 아스타잔틴은 강력한 항산화물질로서 다양한 산업분야에서 유용하다.

[110]

[111] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

청구범위

[청구항 1] 다음 단계를 포함하는 해마토코쿠스 플루비알리스(Haematococcus pluvialis)의 배양에 의한 아스타잔틴의 생산량을 증진시키는 방법:
(a) 해마토코쿠스 플루비알리스의 성숙 포자(cyst)를 접종하여 증식(vegetative growth) 시키는 단계; 및
(b) 질소가 결핍되고 철이온이 첨가된 자가영양조건에서 100-300μE/m²/s의 광도를 조사하여 해마토코쿠스 플루비알리스 내 아스타잔틴의 생성을 유도하는 단계.

[청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 배양 온도는 25~40℃ 인 것을 특징으로 하는 아스타잔틴의 생산량을 증진시키는 방법.

[청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 자가영양조건은 광합성을 위한 무기 탄소원으로 3~4% 이산화탄소를 공급하는 것을 특징으로 하는 아스타잔틴의 생산량을 증진시키는 방법.

[청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 (a) 단계는 35μE/m²/s 이하의 광도를 조사하는 것을 특징으로 하는 아스타잔틴의 생산량을 증진시키는 방법.

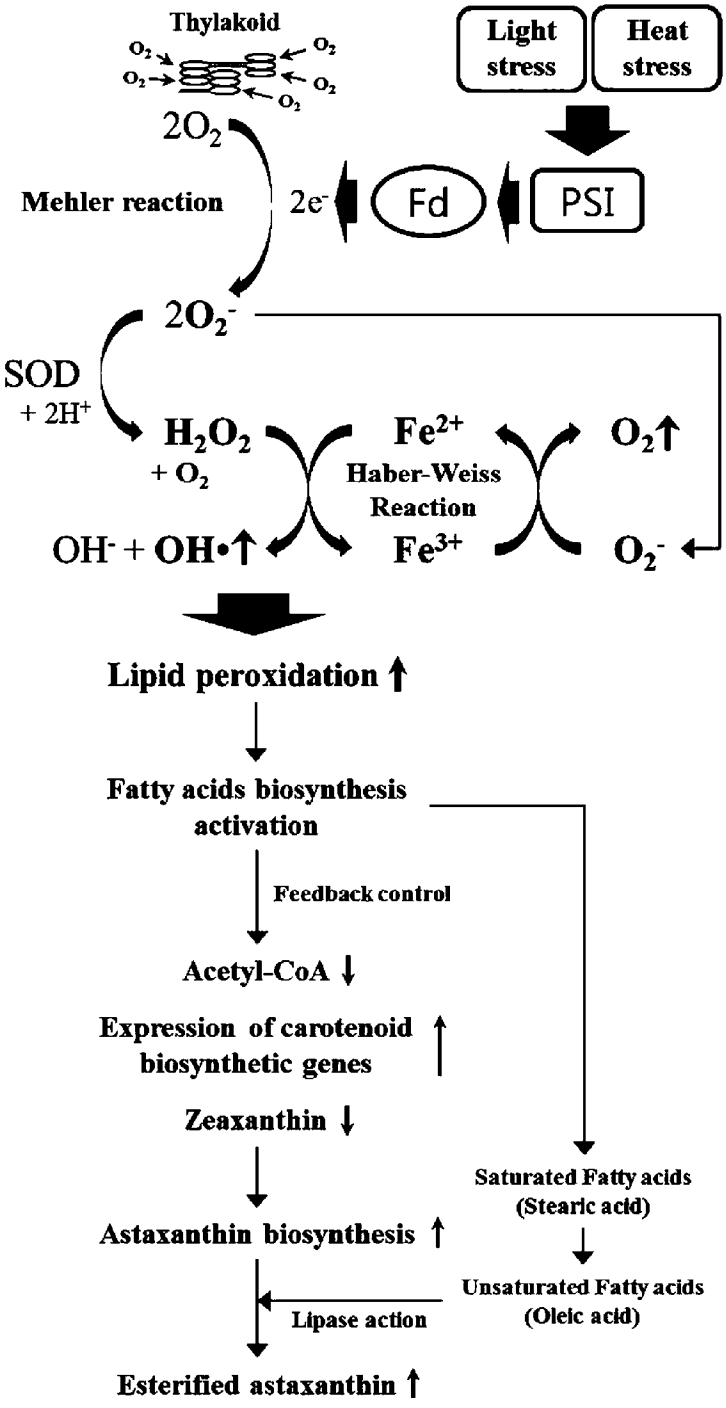
[청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 철이온은 Fe_2SO_4, $FeCl_2$, $FeCl_3$ 및 $Fe_2(SO_4)_3$로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 아스타잔틴의 생산량을 증진시키는 방법.

[청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 철이온의 농도는 40-80μM인 것을 특징으로 하는 아스타잔틴의 생산량을 증진시키는 방법.

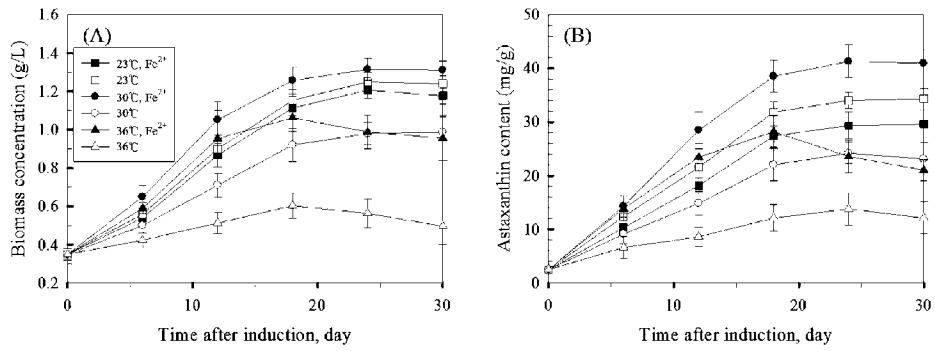
[청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 철이온은 활성산소 O_2- 및 H_2O_2 함량에 대하여 100-600 몰비로 첨가되는 것을 특징으로 하는 아스타잔틴의 생산량을 증진시키는 방법.

[청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 아스타잔틴의 함량은 해마토코쿠스 플루비알리스 세포내 활성산소 O_2^- 및 H_2O_2가 활성산소 O_2 및 OH·로 전환에 의해 증진되는 것을 특징으로 하는 아스타잔틴의 생산량을 증진시키는 방법.

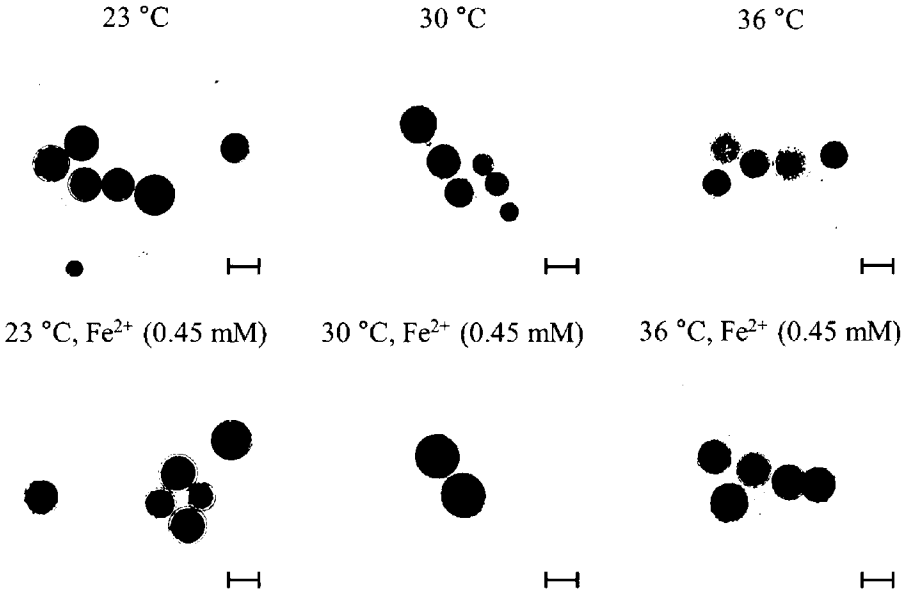
[Fig. 1]


Thylakoid
Light stress
Heat stress
2O2
Mehler reaction
2e-
Fd
PSI
2O2-
SOD
+ 2H+
H2O2
+ O2
Fe2+
Haber-Weiss Reaction
O2↑
OH- + OH•↑
Fe3+
O2-
Lipid peroxidation ↑
Fatty acids biosynthesis activation
Feedback control
Acetyl-CoA ↓
Expression of carotenoid biosynthetic genes ↑
Zeaxanthin ↓
Astaxanthin biosynthesis ↑
Saturated Fatty acids (Stearic acid)
Unsaturated Fatty acids (Oleic acid)
Lipase action
Esterified astaxanthin ↑

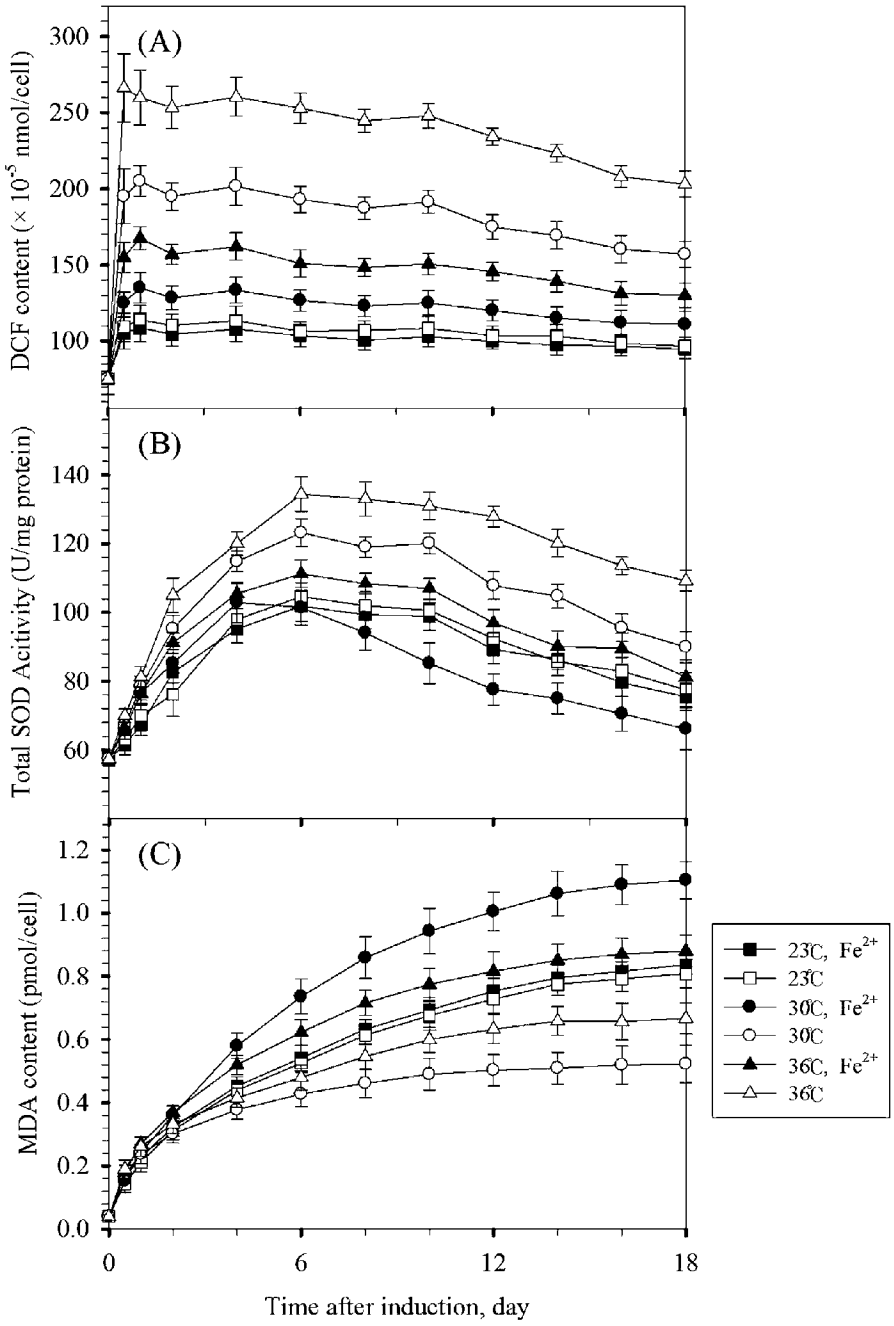
[Fig. 2]


(A)
Biomass concentration (g/L)
Time after induction, day
(B)
Astaxanthin content (mg/g)
Time after induction, day

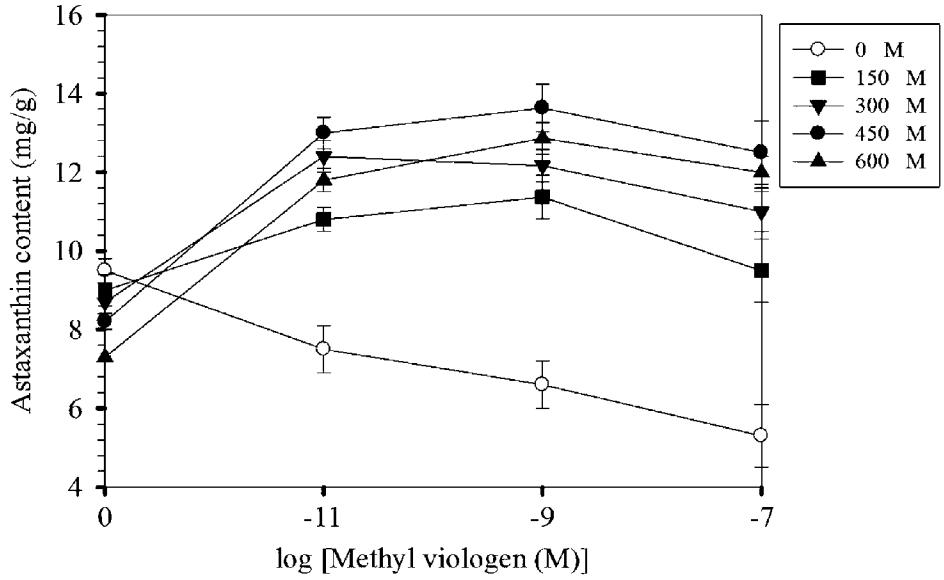
[Fig. 3]



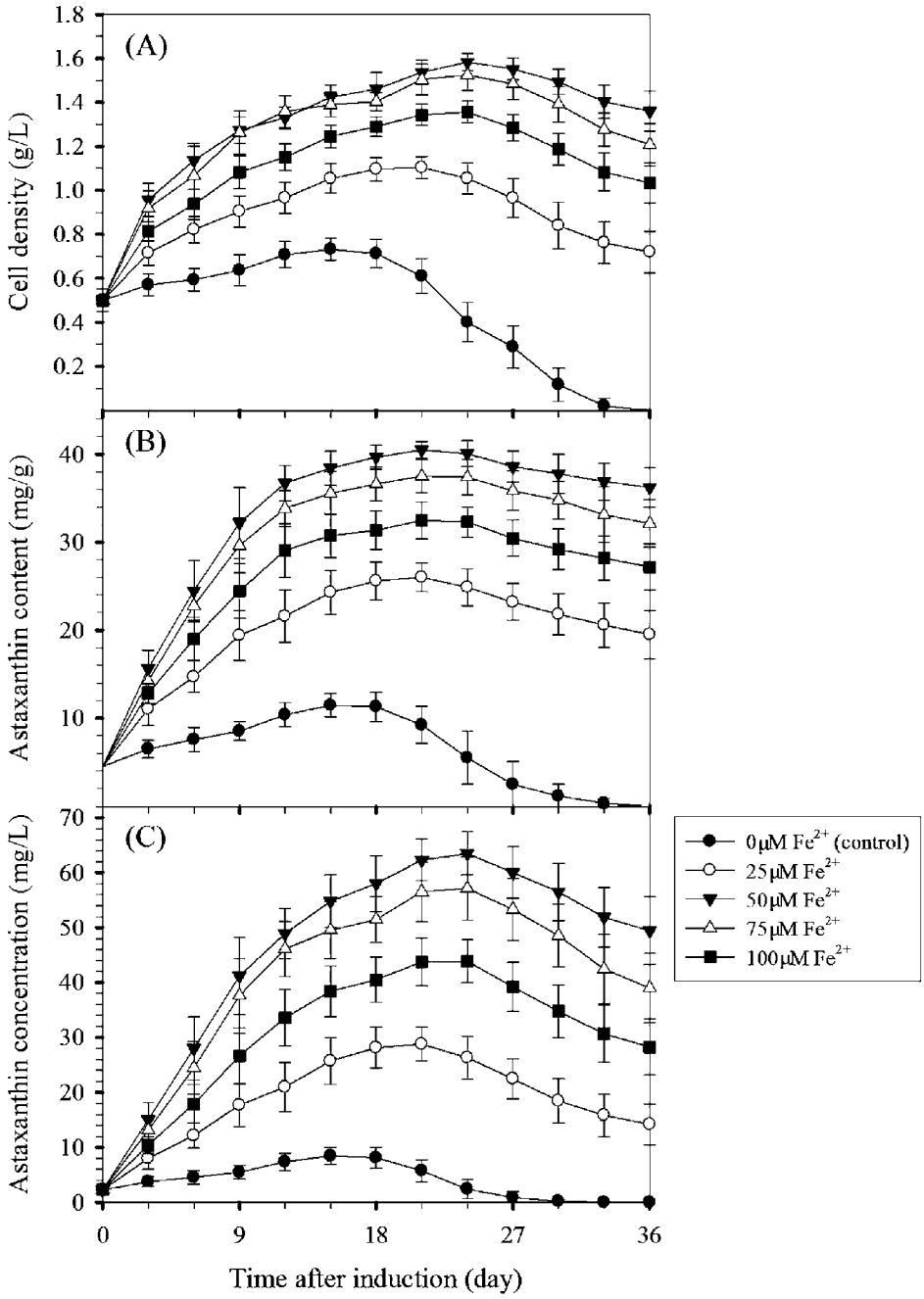
[Fig. 4]


(A)
DCF content (× 10^-5 nmol/cell)
300
250
200
150
100
(B)
Total SOD Acitivity (U/mg protein)
140
120
100
80
60
(C)
MDA content (pmol/cell)
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
6
12
18
Time after induction, day
23℃, Fe2+
23℃
30℃, Fe2+
30℃
36℃, Fe2+
36℃

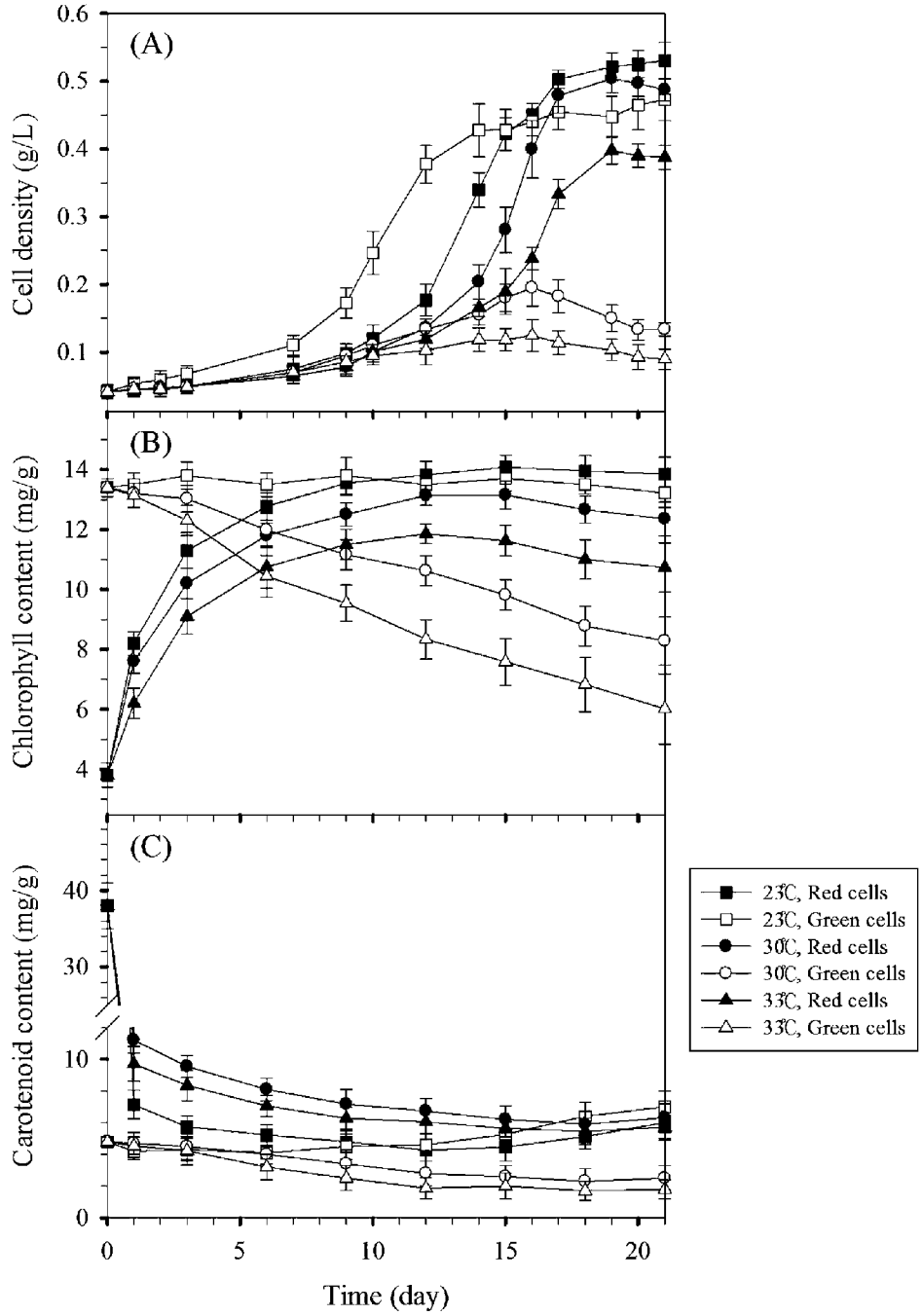
[Fig. 5]


16
14
12
10
8
6
4
Astaxanthin content (mg/g)
0
-11
-9
-7
log [Methyl viologen (M)]
0 M
150 M
300 M
450 M
600 M

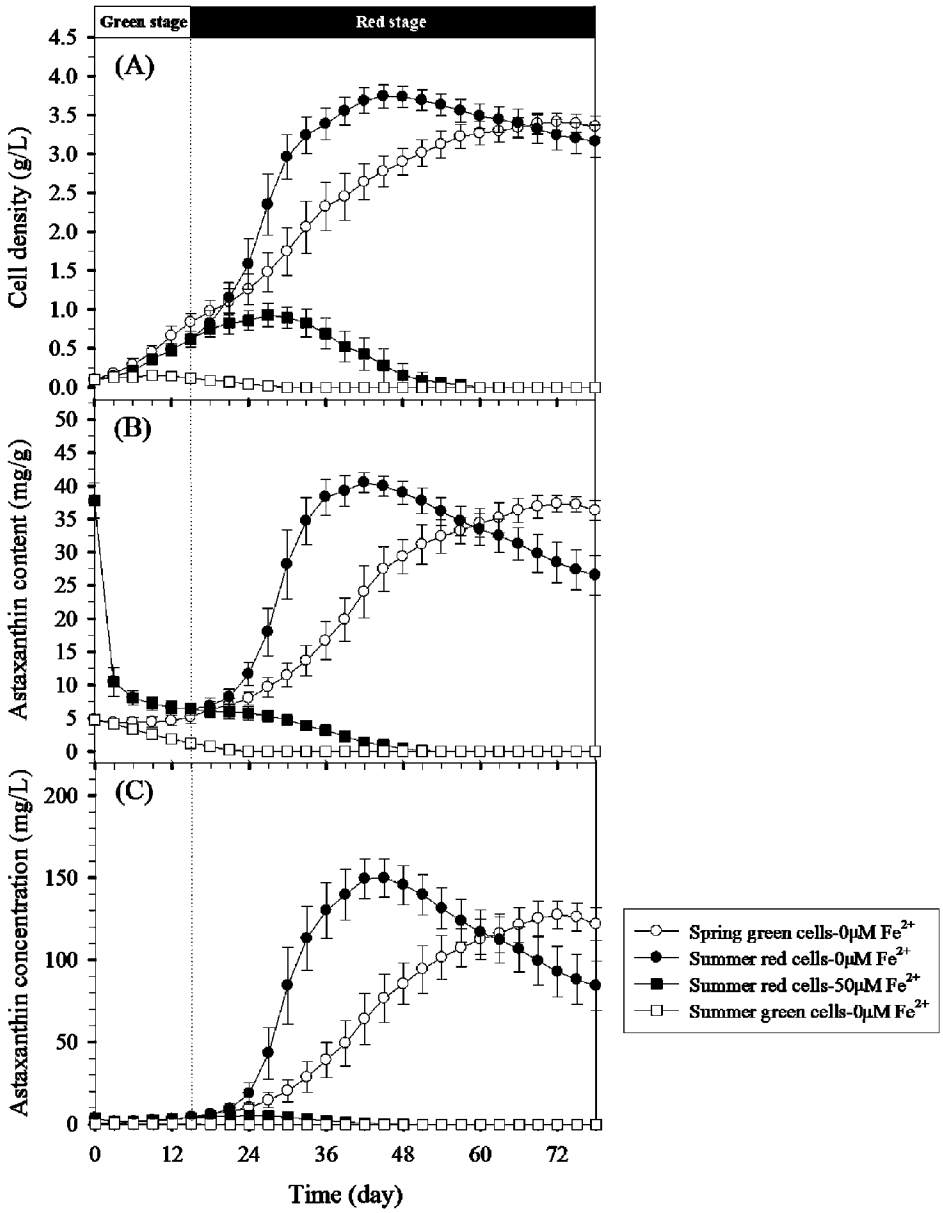
[Fig. 6]


(A)
Cell density (g/L)
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
(B)
Astaxanthin content (mg/g)
40
30
20
10
(C)
Astaxanthin concentration (mg/L)
70
60
50
40
30
20
10
0
0
9
18
27
36
Time after induction (day)
0μM Fe2+ (control)
25μM Fe2+
50μM Fe2+
75μM Fe2+
100μM Fe2+

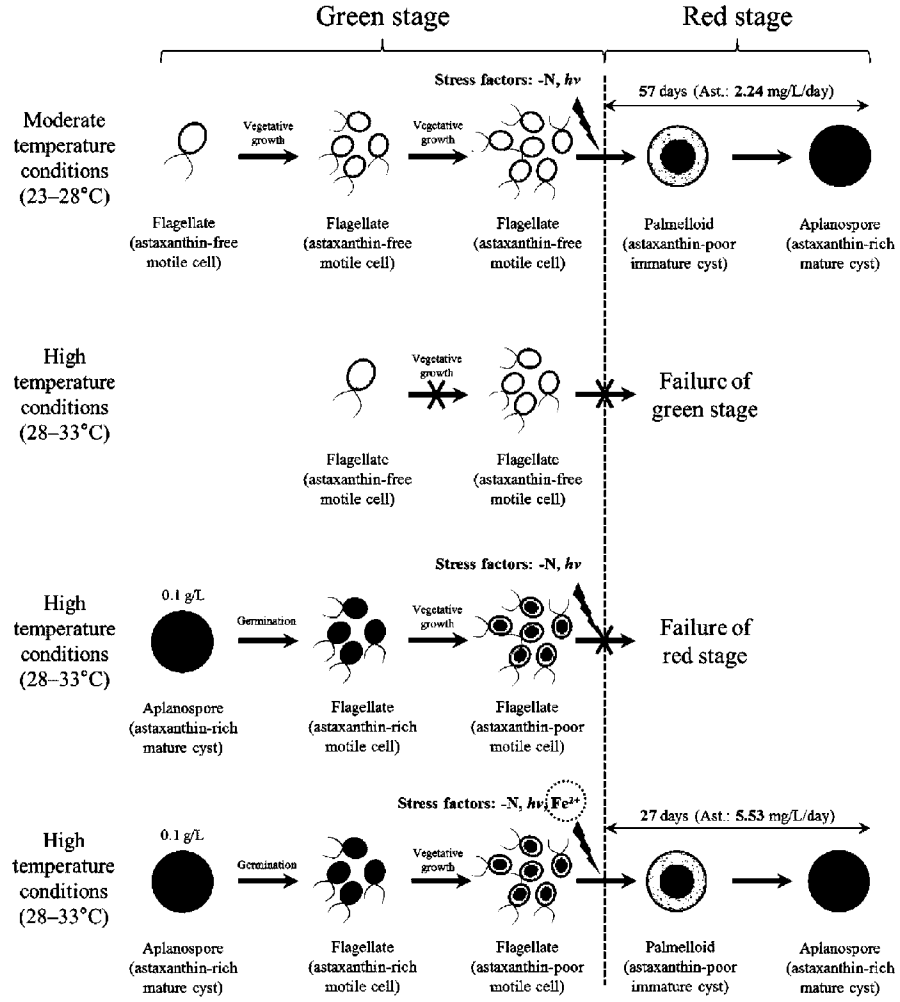
[Fig. 7]


(A)
Cell density (g/L)
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
(B)
Chlorophyll content (mg/g)
14
12
10
8
6
4
(C)
Carotenoid content (mg/g)
40
30
10
0
0
5
10
15
20
Time (day)
23℃, Red cells
23℃, Green cells
30℃, Red cells
30℃, Green cells
33℃, Red cells
33℃, Green cells

[Fig. 8]


Green stage
Red stage
(A)
(B)
(C)
Cell density (g/L)
Astaxanthin content (mg/g)
Astaxanthin concentration (mg/L)
Time (day)
Spring green cells-0μM Fe2+
Summer red cells-0μM Fe2+
Summer red cells-50μM Fe2+
Summer green cells-0μM Fe2+

[Fig. 9]


Green stage
Red stage
Moderate temperature conditions (23–28°C)
Stress factors: -N, hv
57 days (Ast.: 2.24 mg/L/day)
Vegetative growth
Vegetative growth
Flagellate (astaxanthin-free motile cell)
Flagellate (astaxanthin-free motile cell)
Flagellate (astaxanthin-free motile cell)
Palmelloid (astaxanthin-poor immature cyst)
Aplanospore (astaxanthin-rich mature cyst)
High temperature conditions (28–33°C)
Vegetative growth
Failure of green stage
Flagellate (astaxanthin-free motile cell)
Flagellate (astaxanthin-free motile cell)
Stress factors: -N, hv
High temperature conditions (28–33°C)
0.1 g/L
Germination
Vegetative growth
Failure of red stage
Aplanospore (astaxanthin-rich mature cyst)
Flagellate (astaxanthin-rich motile cell)
Flagellate (astaxanthin-poor motile cell)
Stress factors: -N, hv, Fe3+
27 days (Ast.: 5.53 mg/L/day)
High temperature conditions (28–33°C)
0.1 g/L
Germination
Vegetative growth
Aplanospore (astaxanthin-rich mature cyst)
Flagellate (astaxanthin-rich motile cell)
Flagellate (astaxanthin-poor motile cell)
Palmelloid (astaxanthin-poor immature cyst)
Aplanospore (astaxanthin-rich mature cyst)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2015/003668

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P 23/00(2006.01)i, C12N 1/12(2006.01)i, C12N 13/00(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)

C12P 23/00; A01G 33/00; C12N 15/01; A01H 13/00; C12N 1/12; C12N 13/00

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, hematococcus pluvialis, self-nutrition, iron ion

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2013-0001664 A (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 04 January 2013 See Abstract of the Invention and the claims	1-8
A	JP 05-068585 A (HIGASHIMARU SHOYU KK.) 23 March 1993 See Abstract of the Invention and Detailed Description of the Invention	1-8
A	KR 10-2009-0094888 A (SUH, Hee Dong) 09 September 2009 See Abstract of the Invention and the claims	1-8

☐ 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
"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	Date of mailing of the international search report
09 JULY 2015 (09.07.2015)	**10 JULY 2015 (10.07.2015)**

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/KR2015/003668

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2013-0001664 A	04/01/2013	KR 1356477 B1	29/01/2014
JP 05-068585 A	23/03/1993	JP 3163127 B2	08/05/2001
KR 10-2009-0094888 A	09/09/2009	KR 1046310 B1	07/07/2011

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2015/003668

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12P 23/00(2006.01)i, C12N 1/12(2006.01)i, C12N 13/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
C12P 23/00; A01G 33/00; C12N 15/01; A01H 13/00; C12N 1/12; C12N 13/00

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, 해마토코쿠스 플루비알리스, 자가영양, 철이온

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2013-0001664 A (고려대학교 산학협력단) 2013.01.04 발명의 요약 및 청구항 참조	1-8
A	JP 05-068585 A (HIGASHIMARU SHOYU KK) 1993.03.23 발명의 요약 및 발명의 상세한 설명 참조	1-8
A	KR 10-2009-0094888 A (서희동) 2009.09.09 발명의 요약 및 청구항 참조	1-8

☐ 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

"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	국제조사보고서 발송일
2015년 07월 09일 (09.07.2015)	2015년 07월 10일 (10.07.2015)

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

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2015/003668

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2013-0001664 A	2013/01/04	KR 1356477 B1	2014/01/29
JP 05-068585 A	1993/03/23	JP 3163127 B2	2001/05/08
KR 10-2009-0094888 A	2009/09/09	KR 1046310 B1	2011/07/07