



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0136190
(43) 공개일자 2019년12월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/12 (2006.01) C12P 7/64 (2006.01)
C12R 1/89 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/12 (2019.02)
C12P 7/6427 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0061546
(22) 출원일자 2018년05월30일
심사청구일자 2018년05월30일

(71) 출원인
한국생명공학연구원
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
(72) 발명자
김지형
대전광역시 유성구 과학로 125
한지은
경기도 수원시 영통구 도청로 65 자연엔힐스테이
트 5403동 201호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인주원

전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 신규한 로보스페라 인시사(*Lobosphaera incisa*)K-1 미세조류 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 한국 서해에서 분리한 새로운 단세포성 미세조류를 발굴하여, 분리주의 생화학적, 분자적 및 형태학적 특성에 대한 분석을 한 결과 로보스페라 인시사(*Lobosphaera incisa*) K-1으로 분류되었고, 지질에 있는 아라키돈산(C20:4 ω6) 조성이 상대적으로 매우 높은 것을 확인하였다. 또한 알파-리놀레닉산(C18:3 ω3)과 에이코사펜타엔산(C20:5 ω3)을 포함하는 오메가-3 계열의 지방산 비율이 높았으며, 이는 생물공학 응용에 대한 신규성과 고부가가치 물질로 분류되는 오메가-3 또는 오메가-6 다중불포화지방산(PUFAs)의 생산에 매우 유용할 것임을 확인하였다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12R 1/89 (2013.01)

(72) 발명자

김혜권

대전광역시 유성구 과학로 125

윤선우

대전광역시 유성구 과학로 125

정대균

대전광역시 유성구 과학로 125

임세라

대전광역시 유성구 과학로 125

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 KGM4691814

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 국가과학기술연구회

연구사업명 주요사업(2015-2018)

연구과제명 인플루엔자 범용 백신 개발 및 아쥬번트 연구사업

기여율 1/1

주관기관 한국생명공학연구원

연구기간 2018.01.01 ~ 2018.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

로보스페라 인시사(*Lobosphaera incisa*) K-1(기탁번호 KCTC 12888BP) 균주

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 균주는 불포화지방산을 생산하는 것을 특징으로 하는 균주

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 불포화지방산은 오메가-3 및 오메가-6를 포함하는 것을 특징으로 하는 균주

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 오메가-3는 알파 리놀레닉산(α -linolenic acid), 및 에이코사펜타엔산(eicosapentaenoic acid)을 포함하는 것을 특징으로 하는 균주

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 오메가-6는 아라키돈산(arachidonic acid)인 것을 특징으로 하는 균주

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 균주는 서열번호 1로 표시되는 18S rRNA 염기서열을 가지는 것을 특징으로 하는 균주

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 균주는 서열번호 2로 표시되는 내부전사지역(ITS region) 염기서열을 가지는 것으로 하는 균주

청구항 8

(a) 제1항의 로보스페라 인시사(*Lobosphaera incisa*) K-1(기탁번호 KCTC 12888BP) 균주를 배양하는 단계; 및
(b) 상기 (a)단계에서 수득한 균체(biomass) 또는 배양액에서 불포화지방산을 추출하는 단계;를 포함하는, 불포화지방산의 생산 방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 불포화지방산은 오메가-3 및 오메가-6를 포함하는 것을 특징으로 하는 생산 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신규한 로보스페라 인시사(*Lobosphaera incisa*) K-1 미세조류 및 이의 용도에 관한 것으로서, 상세하게는 상기 균주는 아라키돈산(arachidonic acid, C20:4 ω 6), 알파 리놀레닉산(α -linolenic acid, C18:3 ω 3), 에이코사펜타노익산(eicosapentaenoic acid, EPA, C20:5 ω 3)를 포함하는 오메가-3, 오메가-6 등의 고부가가치가 높은 불포화지방산을 생산할 수 있는 세포공장의 주요 원천으로 사용할 수 있다.

배경 기술

[0003] 미세조류는 바이오 연료의 생산을 위한 대체 생물자원으로써 활발히 연구되어 왔다. 그러나 최근 미세조류 관련 연구는 미세조류를 항균제, 항산화제, 다중불포화지방산, 인간과 동물을 위한 영양 보충제 등의 고부가가치 대사산물의 생산자로 이용하는 방향으로 변화하고 있다(Vanthoor-Koopmans et al., 2013). 미세조류는 다량의 탄수화물, 단백질, 지질 등을 포함하고 있으나, 이러한 성분이 특정 종과 분리주에 따라 급격하게 달라지는 것이 실용화를 위한 문제점으로 보고된다(Guedes et al., 2011). 따라서 고부가가치 대사산물의 분리에 사용될 수 있는 유리한 특성을 지닌 적절한 미세조류 종(또는 주)을 발굴하는 것이 매우 중요하다고 하겠다.

[0004] 미세조류에서 발견되는 다양한 고부가가치 대사산물 중 다중불포화지방산은 잠재적인 치료제 및 영양학적 응용 가능성으로 최근 초점이 집중되고 있다(Pulz and Gross, 2004). 현재 오메가-3 또는 오메가-6 다중불포화지방산의 주요 식품 공급원은 해산 어류와 패류이지만, 다중불포화지방산의 대부분은 미세조류 섭식을 통한 생물농축으로 이들 생물체에 축적되며, 동물 자체는 다중불포화지방산을 합성하는 것에 대한 제한된 능력을 가지고 있다. 따라서 미세조류는 양식업에서 가장 중요한 사료 첨가제 혹은 사료 중 하나가 되었다(Tonon et al., 2002; Guedes et al., 2011). 게다가 미세조류는 불쾌한 냄새가 없고 중금속 오염의 위험이 적기 때문에 인간을 위한 다중불포화지방산의 공급원으로써 어류 기름보다 경쟁적인 이점을 가지고 있다(Guil-Guerrero et al., 2000). 그러므로 미세조류 유래 다중불포화지방산은 음식과 사료 모두에서 매우 유망한 생명공학적 잠재력을 지니고 있으며, 몇몇 미세조류의 다중불포화지방산 생산물은 이미 상업적으로 이용 가능하다(Pulz and Gross, 2004).

[0005] 보다 상세하게 설명하자면, 예로서 오메가-3 불포화 지방산(ω -3 unsaturated fatty acid)은 오메가-3 고도 불포화 지방산(ω -3 highly unsaturated fatty acid)라고도 불리우며, 대표적으로는 도코사헥사엔산(Docosahexaenoic acid, DHA), 에이코사펜타엔산(Eicosapentaenoic acid, EPA), 아라키돈산(Arachidonic acid, ARA), 도코사펜타엔산(Docosapentaenoic acid, DPA), 및 알파-리놀레닉산 등이 알려져 있다.

[0006] 도코사헥사엔산 및 에이코사펜타엔산은 체내에서 합성되지 않는 필수 지방산의 일종으로서, 주로 식품을 통해서 섭취하여야 한다. 도코사헥사엔산은 인간이나 동물의 망막, 정액 및 두뇌조직에 풍부하게 존재하며, 특히 두뇌 지방의 60%를 구성하고 있는 필수 지방산이다. 도코사헥사엔산은 아라키돈산(arachidonic acid, ARA)과 함께 유아의 두뇌, 눈, 신경체계의 건강한 발달을 위해 중요한 것으로 알려져 있다. 또한 최근에는 암부터 관절염에 걸린 수많은 질병과 심혈관 질환 및 정신적인 장애의 예방과 치료에 효과가 있음이 보고되고 있다.

[0007] 도코사헥사엔산을 포함한 오메가-3 불포화 지방산의 주요 공급원은 청어, 연어, 다랑어 등의 생선에서 추출한 어유(漁油)이다. 그러나 지속적인 어유 공급의 어려움과 어유의 중금속 및 유기화학 물질에 의한 오염이 문제되어, 미생물 배양에 의한 도코사헥사엔산을 포함한 오메가-3 불포화 지방산의 제조방법에 대한 연구가 진행되고 있다.

[0008] 로보스페라 인시사(*Lobosphaera incisa*) (Reisigl, 1964)는 *Trebouxiophyceae* (녹조식물)에 속하는 구형의 단세포 미세 조류이다. 이것은 고산 토양, 담수 서식지 및 이끼류 원시생물로부터 발견이 보고되었다(Watanabe et al., 1996; Tourasse et al., 2015). 이 종은 원래 마이르메시아(*Myrmecia*)속으로 지정되었으나 그 다음엔 파리에토클로리스(*Parietochloris*)속으로, 그 이후엔 로보스페라(*Lobosphaera*)로 재분류되었다(Friedl, 1995; Watanabe et al., 1996; Karsten et al., 2005). 이 고지질 미세조류는 약학적으로 유용한 오메가-6 장쇄다중 불포화지방산 중의 하나인 아라키돈산(AA, C20:4 ω 6)이 가장 풍부한 식물원으로, 외국에서 상당히 연구가 많이

되고 있다(Bigogno et al., 2002a, 2002b; Khozin-Goldberg et al., 2002; Tourasse et al., 2014; Abu-Ghosh et al., 2015; Tourasse et al., 2015).

[0009] 2010년 이래로 우리는 생명공학적인 응용을 위해 유용 세포 성분을 지닌 자생미세조류 (또한 남조류)를 선별해왔다(Jeon et al., 2015; Kim et al., 2015a, 2015b; Kim and Kang, 2016; Kim et al., 2017). 본 연구에서 우리는 한국 서해의 갯벌에서 신규한 자생 로보스페라 인시사(*L. incisa*)의 분리주를 발굴하였으며, 또한 분리된 고지질 미세조류의 형태학적, 분자적 그리고 생화학적인 특성을 분석하여, 그것들의 생명공학적 응용에 대한 가능성을 평가하였다. 본 미세조류주는 한국에서 처음으로, 또한 해양 환경으로부터 세계 최초로 분리된 유용성이 확인된 *L. incisa* 종 균주다.

[0010] 최근 미세조류 연구에 대한 초점은 미세조류가 바이오 연료 이외에 고부가 가치 대사산물을 생산하기 위한 가능성을 조사하는 방향으로 변화했다. 고지질 미세조류인 로보스페라 인시사(*L. incisa*)는 식물에서 기원한 아라키돈산의 풍부한 구성 때문에 상대적으로 활발히 연구되고 있다. 본 발명은 생명공학적 응용을 위한 충분한 가능성을 가지고 있는 신규 미세조류 분리주 로보스페라 인시사(*L. incisa*) K-1의 특성을 확인하여 완성하게 되었다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0012] (특허문헌 0001) JP 3042673 B2
 (특허문헌 0002) JP 3659985 B2
 (특허문헌 0003) CN 104232701 A
 (특허문헌 0004) CN 107614676 A
 (특허문헌 0005) CN 102329826 A
 (특허문헌 0006) US 20150044738 A1
 (특허문헌 0007) KR 101576480 B1

비특허문헌

- [0013] (비특허문헌 0001) 1) Abu-Ghosh, S., Pal-Nath, D., Markovitch, D., Solovchenko, A., Didi-Cohen, S., Portugal, I., et al. (2015). A novel source of dihomogamma-linolenic acid: Possibilities and limitations of DGLA production in the high-density cultures of the Δ5 desaturase-mutant microalga *Lobosphaera incisa*. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 117(6), 760-766.
- (비특허문헌 0002) 2) AOAC. (2006). *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, 18th ed. AOAC International, Gaithersburg, Maryland.
- (비특허문헌 0003) 3) Becker, E. W. (2007). Micro-algae as a source of protein. *Biotechnol. Adv.* 25, 207-210.
- (비특허문헌 0004) 4) Bigogno, C., Khozin-Goldberg, I., Cohen, Z. (2002a). Accumulation of arachidonic acid-rich triacylglycerols in the microalga *Parietochloris incisa* (Trebuxiophyceae, Chlorophyta). *Phytochemistry* 60(2), 135-143.
- (비특허문헌 0005) 5) Bigogno, C., Khozin-Goldberg, I., Boussiba, S., Vonshak, A., Cohen, Z. (2002b). Lipid and fatty acid composition of the green oleaginous alga *Parietochloris incisa*, the richest plant source of arachidonic acid. *Phytochemistry* 60(5), 497-503.
- (비특허문헌 0006) 6) Brown, M. R., and Jeffrey, S. W. (1992). Biochemical composition of microalgae from the green algal classes Chlorophyceae and Prasinophyceae. 1. Amino acids, sugars and pigments. *J.*

Exp. Mar. Biol. Ecol. 161 91-113.

(비특허문헌 0007) 7) Falaise, C., François, C., Travers, M. A., Morga, B., Haure, J., Tremblay, R., et al. (2016). Antimicrobial compounds from eukaryotic microalgae against human pathogens and diseases in aquaculture. Mar. Drugs 14(9), 159.

(비특허문헌 0008) 8) Friedl, T. (1995). Inferring taxonomic positions and testing genus level assignments in coccoid green lichen algae: a phylogenetic analysis of 18S ribosomal sequences from Dictyochloropsis reticulata and from members of the genus Myrmecea (Chlorophyta, Trebouxiophyceae cl. nov.). J. Phycol. 31, 632-639.

(비특허문헌 0009) 9) Guedes, A. C., Amaro, H. M., Barbosa, C. R., Pereira, R. D., Malcata, F. X. (2011). Fatty acid composition of several wild microalgae and cyanobacteria, with a focus on eicosapentaenoic, docosahexaenoic and α -linolenic acids for eventual dietary uses. Food Res. Int. 44(9), 2721-2729.

(비특허문헌 0010) Guil-Guerrero, J. L., Belarbi, H., Reboloso-Fuentes, M. M. (2000). Eicosapentaenoic and arachidonic acids purification from the red microalga Porphyridium cruentum. Bioseparation 9, 299-306.

(비특허문헌 0011) 10) Guiry, M. D., and Guiry, G. M. (2018). AlgaeBase. World-wide electronic publication. National University of Ireland, Galway. Available at: <http://www.algaebase.org/> (accessed on 1 February 2018).

(비특허문헌 0012) 11) Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp. Ser. 41: 95-98.

(비특허문헌 0013) 12) Henley, W. J., Hironaka, J. L., Guillou, L., Buchheim, M. A., Buchheim, J. A., Fawley, M. W., et al. (2004). Phylogenetic analysis of the 'Nannochloris-like' algae and diagnoses of Picochlorum oklahomensis gen. et sp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). Phycologia 43(6), 641-652.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0014] 본 발명은 아라키돈산 외에도 여러 가지 유용한 다중불포화지방산을 생산할 수 있는 신규 미세조류 분리주 로보스페라 인시사(*L. incisa*) K-1를 제공하는데 목적이 있다.
- [0015] 또한 본 발명은 고부가가치 오메가-3 및 오메가-6 다중불포화지방산의 생산을 할 수 있는 신규 균주를 제공하는데 그 목적이 있다.
- [0016] 또한 본 발명은 상기 신규 미세조류를 이용한 불포화지방산을 제조하는 방법을 제공하는데 그 목적이 있다.

과제의 해결 수단

- [0018] 본 발명은 신규한 미세조류로서 로보스페라 인시사(*Lobosphaera incisa*) K-1(기탁번호 KCTC 12888BP) 균주를 제공한다.
- [0019] 본 발명에서 상기 균주는 불포화지방산을 생산하며, 상기 불포화지방산은 오메가-3 및 오메가-6를 포함한다. 보다 구체적으로는 상기 오메가-3는 알파-리놀레닉산(α -linolenic acid), 및 에이코사펜타엔산(eicosapentaenoic acid)을 포함하고, 상기 오메가-6는 아라키돈산(arachidonic acid)을 포함한다. 또한 본 발명의 균주는 서열번호 1로 표시되는 18S RNA 염기서열을 가지고 있으며, 서열번호 2로 표시되는 내부전사지여(ITS) 염기서열을 가지고 있다.
- [0020] 또한 본 발명은 (a) 상기 로보스페라 인시사(*Lobosphaera incisa*) K-1(기탁번호 KCTC 12888BP) 균주를 배양하는 단계; 및 (b) 상기 (a)단계에서 수득한 균체(biomass) 또는 배양액에서 불포화지방산을 추출하는 단계;를 포

함하는, 불포화지방산의 생산 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0022] 본 발명에서 제공하는 신규 미세조류 로보스페라 인시사(*L. incisa*) K-1은 인간 건강을 증진하기 위해 널리 인정 받는 고부가 가치 오메가-3 및 오메가-6 장쇄다중 불포화지방산(특히, 아라키돈산과 에이코사펜타엔산)의 생산을 할 수 있어 미세조류 기반 세포공장으로 사용할 수 있다.
- [0023] 또한, 장쇄다중불포화지방산을 포함하는 의약품, 화장품, 환경 복원 등의 원료 및 공정에 광범위하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0025] 도 1은 로보스페라 인시사(*L. incisa*)의 형태학적 분석을 나타낸다.
- 도 2는 로보스페라 인시사(*L. incisa*) 초미세구조 분석을 위한 투과전자현미경 이미지를 나타낸다.
- 도 3은 18S rRNA 염기서열 기반 로보스페라 인시사(*L. incisa*)의 계통도를 나타낸다.
- 도 4는 내부전사지역(ITS region) 염기서열 기반 로보스페라 인시사(*L. incisa*)의 계통도를 나타낸다.
- 도 5는 다른 미세조류 배양 배지에서의 K-1 분리주의 바이오매스 생산을 비교한 결과를 나타낸다.
- 도 6은 배양 배지에서 온도에 따른 성장 특성을 나타낸다.
- 도 7은 배양 배지에서 염도에 따른 성장 특성을 나타낸다.
- 도 8은 배양 배지에서 pH 에 따른 성장 특성을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0026] 이하, 하기 실시예에 의하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 그러나 본 발명은 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 사상과 범위 내에서 여러 가지 변형 또는 수정할 수 있음은 이 분야에서 통상의 기술자에게는 명백한 것이다.
- [0027] 이때, 사용되는 기술 용어 및 과학 용어에 있어서 다른 정의가 없다면, 이 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 통상적으로 이해하고 있는 의미를 가지며, 하기의 설명 및 첨부 도면에서 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있는 공지 기능 및 구성에 대한 설명은 생략한다.
- [0029] 실시예 1.
- [0030] <미세조류 분리 및 배양 조건>
- [0031] 단세포성 구형 미세조류는 2015년 5월에 한국 서해(36° 53' 35.0' N 126° 19' 40.8' E)의 갯벌에서 수집된 해양 침전물로부터 분리되었다. 채수 표본은 96 웰 플레이트 안의 BG-11 배지(미국, Sigma-Aldrich)에서 100 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ 의 광도(12시간/12시간 명암 사이클)로 섭씨 25도에서 배양되었다. 조류 세포는 완전한 분리주가 얻어질 때까지 위에 언급한 것과 동일한 조건에서 BG-11 고체배지(1.5% 한천)에서 반복적으로 계대 배양하였다. 이 연구에서 이 후의 모든 분석은 위에서 언급한 것과 같은 조건에서 배양된 무균의 미세조류 세포를 사용하여 수행하였다.
- [0033] 실시예 2.
- [0034] <마이크로스코피(Microscopy)>
- [0035] 분리된 미세조류의 일반적인 형태는 광학현미경(Eclipse 80i; Nikon Co., Japan)을 통해 조사되었고, 세포의 사이즈는 영상 분석기(NIS-Elements BR 3.0; Nikon Co., Japan)로 측정되었다. 초미세구조 분석은 서울대학교의

농업생명과학대학 농생명과학공동기기원에서 전계 방사형 주사전자현미경(AURIGA; Carl Zeiss, Germany)과 투과 전자현미경(JEM1010; JEOL Ltd., Japan)을 각각 이용하여 수행되었다.

[0037]

실시예 3.

[0038]

<분석(Molecular identification and phylogenetic analysis)>

[0039]

미세조류의 유전자 DNA는 Plant DNA 분리 시약(일본, Takara)를 사용하여 제조업체의 방법을 따라서 추출하였다. 18S rRNA 유전자와 D1/D2 영역(ITS1-5.8S rRNA-ITS2-28S rRNA, 이하 ITS 영역)을 포함한 18S-28S ITS(내부 전사 스페이서) 영역은 각각 유니버설 NS1/NS3/NS8 프라이머와 ITS1/ITS4/LR3R 프라이머(Jeon et al., 2015)를 사용하여 증폭되었다. 증폭된 단편들은 마크로젠사(Macrogen Inc.) (한국, 서울)에서 염기 서열을 분석하였다. 증폭된 18S rRNA와 ITS 영역의 염기서열들은 BlastN 분석을 사용하여 GenBank 데이터베이스와 비교되었고, Clustal X (version 1.83) (Thompson et al., 1997)과 BioEdit Sequence Alignment Editor (version 7.1.0.3) (Hall, 1999)을 사용하여 녹조식물 문의 다른 동족들과 상응하는 염기 서열로 정렬되었다. 미세조류 18S rRNA 유전자의 계통발생학적 분석은 Jukes-Cantor distance matrix를 이용한 Neighbor-Joining(NJ) 방법과 HKY 모델을 이용한 maximum-likelihood(ML) 방법을 사용하여 수행되었다. ITS 영역은 NJ와 maximum parsimony (MP) 방법으로 계통발생학적 분석되었다. 계통분류도는 MEGA ver. 7.0 (Kumar et al., 2016)을 사용하여 재구성되었고, 신뢰성은 bootstrap 분석으로 1,000 복제 수행함으로써 평가되었다. 미세조류의 명명법은 Algae Base (<http://www.algaebase.org>) (Guiry and Guiry, 2018)을 따랐다.

[0041]

실시예 4.

[0042]

<성장 특성(Growth characteristics)>

[0043]

분리된 미세조류는 BG-11 배지 외에, Tris-acetate phosphate (TAP) 배지 (미국, Thermo Fisher Scientific), Guillard's (f/2) 배지 (미국, Sigma-Aldrich), 변형된 Bold's Basal 배지 (미국, Sigma-Aldrich)를 포함하는 다른 상업적으로 이용 가능한 조류 배양 배지에서 위에서 설명한 것과 동일한 조건으로 배양하여 성장능을 비교하였다. 세포 밀도 측정을 위해 배양물 20ml는 GF/C 여과 필터(영국, Whatman Ltd., Maidstone)를 통하여 여과되었고, 총 생물량은 50℃의 오븐에서 하루 동안 건조하기 전과 후의 여과 종이의 무게를 제어 측정하였다. 분리주의 성장량은 실험의 시작과 끝에서의 건조 중량의 차이를 일수로 나누어 계산하였다. 이 결과에 기초하여, 위에서 언급한 것과 동일한 조건으로 BG-11 배지에서 배양된 미세조류 분리주의 성장 특성은, 변종을 제외하고 pH 범위는 3~11(NaOH 또는 HCl을 사용하여 조정됨)이며, 염분 변화는 0~50 psu(NaCl을 사용하여 조정됨)이며, 온도 범위는 섭씨 10~50℃이다.

[0045]

실시예 5.

[0046]

<세포 구성 분석(Analysis of cellular components)>

[0047]

BG-11 배지에서 배양되고 동결 건조된 미세조류 세포들 안에 있는 전체 주성분(탄수화물, 단백질, 지질, 수분, 회분)의 비율은 공정분석화학자협회(AOAC) (AOAC, 2006)의 공정분석법 방법을 따라 측정하였다. 세포 안에 있는 아미노산, 단당류, 지방산(FAs)는 이전에 설명한 대로 측정하였다(Kim et al., 2015b).

[0049]

실시예 6.

[0050]

<미생물 기탁 및 염기 서열 (Accession numbers of nucleotide sequences and strain deposition)>

[0051]

로보스페라 인시사(*L. incisa*) K-1의 18S rRNA와 ITS 영역의 염기 서열은 각 등록 번호 KT119888, KT119889으로 GenBank에 기탁되었다. 로보스페라 인시사(*L. incisa*) K-1의 살아있는 무균 배양체는 한국생명공학연구원의 생물자원센터(KCTC)에 등록 번호 KCTC 12888BP로 기탁되었다.

[0053]

실시예 7.

[0054] <형태학적 분석(Morphology and ultrastructure)>

[0055] LM 및 SEM 검사 결과에 의하면, 미세조류 분리주는 주로 생체 이동성이 없는 비부착성 및 비운동성, 구형 또는 난형 (직경 9-13 μm)의 식물 세포로 확인되었다. 미세조류 세포는 형태학적으로 다양한 변이를 가지고 있는 측벽에 깊게 갈라진 엽록체를 가지고 있으며, 세포 벽의 두께는 구형 세포에서 거의 균일했다. 성숙 세포는 단핵 세포였으며, 4-32개의 자생포자는 모세포의 세포벽을 뚫고 방출되었다(도 1 참고). 미세조류 세포의 초미세구조는 투과전자현미경을 사용하여 조사되었으며, 핵, 엽록체, 피레노이드, 미토콘드리아, 전분 과립, 지질 입자 등 여러 세포 기관이 관찰되었다(도 2A-C). 분리된 미세조류에서 발견된 측벽의 엽록체는 틸라코이드막을 평행으로 가로지르는 피레노이드를 포함했다. 로보스페라 인시사(*L. incisa*)(Watanabe et al., 1996)의 분류학적 동정에 대한 주요 특징으로 고려되고 있는 피레노이드의 존재는 신규 분리된 미세조류가 로보스페라(*Lobosphaera*) 속으로 분류될 수 있음을 반증하였다. 전분 과립 및 지질 입자의 축적은 세포 안에서 거의 관찰되지 않았다.

[0056]
[0057] 실시예 8.

[0058] <계통 분석(Molecular identification and taxonomic characterization)>

[0059] 분리주의 18S rRNA (1,627bp)와 ITS 영역(1,157bp)의 염기 서열은 GenBank 데이터베이스의 이용 가능한 다른 미세조류들을 이용하여 분석되었다. 획득한 18S rRNA 염기 서열을 쿼리 서열로써 이용한 BlastN 조사는 가장 가까운 관련된 종은 *Lobosphaera* 속의 모식종인 로보스페라 티롤렌시스(*L. tirolensis*) ASIB S234 (GenBank accession no. AB006051)와 로보스페라 인시사(*L. incisa*) SAG 2466 (GenBank accession no. KMO20046)로 밝혀졌고, 둘 다 99.7%의 동일한 서열 동일성을 나타냈다. 분리주 K-1의 염기 서열은 또한 *P. ovoidea* ACKU 177-03 와도 99.7%의 서열 동일성을 보였으나 미세조류는 파리에토클로리스(*Parietochloris*)속의 모식종인 *P. alveolaris* UTEX 836과 단지 97.0% 서열 동일성을 나타냈다. 이 밖에도, 분리주의 ITS 영역과 GenBank에 존재하는 녹조류의 염기 서열 비교는 로보스페라 인시사(*L. incisa*) SAG 2466 (GenBank accession no. KMO20046)과 93.1%로 가장 높은 서열 동일성을 나타냈고, 클로렐라 엘립소이데아(*Chlorella ellipsoidea*) IAM C-87 (GenBank accession no. D17810)와는 89.4%, *C. sorokiniana* UTEX1665 (GenBank accession no. KJ676113)와는 83.5%의 서열 유사도를 나타냈다. 이 결과에 기초하여, 새롭게 분리된 미세조류는 로보스페라(*Lobosphaera*) 속으로 분류되었다.

[0060] *Trebouxiophyceae* 구성원에 대한 최근의 여러 분자 계통 발생 분석에서 로보스페라(*Lobosphaera*) 속의 모호한 분류학적 위치가 지적되었지만(Henley et al., 2004; Karsten et al., 2005), 분리주의 분류학적 위치를 결정하기 위해 구형의 단세포인 녹조식물에서 유래된 24 개의 18S rRNA와 7 개의 ITS 영역 서열의 데이터 세트를 사용하여 자세한 계통 발생 분석을 수행했다. ML방법을 이용하여 분석된 계통분류도 또한 GenBank에서 이용할 수 있는 *Ettlia*, *Myrmecea*, *Parietochloris* 및 로보스페라(*Lobosphaera*) 속에서 분류된 미세조류주가 서로 명확하게 분리될 수 없음을 보여 주었다. 그러나 신규 분리된 미세조류주는 다른 관련 미세조류주들 중 로보스페라 인시사(*L. incisa*) SAG 2466과 다른 그룹을 명확하게 형성했다(도 3 참조). 더불어 NJ 방법을 이용하여 수행한 계통분류도 분석도 유사한 결과가 확인되었다. MP방법을 이용한 ITS 영역의 계통발생 분석은 또한 로보스페라 인시사(*L. incisa*) 2466 주와 함께 미세조류 분리주가 그룹화 되었으나, 분기에서 보이는 것처럼 분리된 계통으로 형성되었다(도 4 참조). 유사한 계통분류도 형상이 NJ 방법으로 사용할 때 얻어졌다. 현재 가장 많이 연구되고 있는 로보스페라 인시사(*L. incisa*) SAG 2468 미세조류주의 18S 와 ITS 염기 서열이 GenBank에 없기 때문에 우리는 이용할 수 있는 다른 모든 로보스페라 인시사(*L. incisa*) 주와 직접 비교할 수 없었으나, 이용할 수 있는 다른 로보스페라 인시사(*L. incisa*) 주와 비교했을 때 우리의 미세조류 분리주는 타 미세조류주와 독특한 차이를 보였다. 이 결과에 기초하여, 금번 분리된 미세조류는 최종적으로 신규한 로보스페라 인시사(*L. incisa*) K-1 주로 동정 및 확인되었다. 우리는 미세조류를 새로운 고유 생물자원으로써 사용하기 위한 가능성을 평가하기 위하여 미세조류의 성장과 생화학적 특성들을 더 조사하였다.

[0062] 실시예 9.

[0063] <성장 특성(Growth characteristics)>

[0064] 로보스페라 인시사(*L. incisa*) SAG 2468은 일반적으로 BG-11 배지에서 배양된다(Bigogno et al., 2002a, 2002b; Khozin-Glodberg et al., 2002; Tourasse et al., 2014; Abu-Ghosh et al., 2015). 향후의 응용을 위

하여 BG-11 배지와 상업적으로 이용할 수 있는 다른 미세조류 배양 배지에서 K-1 분리주의 바이오매스 생산을 비교했다(도 5 참조). BBM 배지에서 로보스페라 인시사(*L. incisa*) K-1의 성장은 BG-11 배지에서 성장과 어떤 주목할만한 차이 없이 비슷했다. 그러나 TAP 배지에서는 성장은 관찰되지 않았다. 총 바이오매스 생산은 f/2 배지에서 다소 감소했으며 뭉쳐진 세포가 응집된 그룹이 배양 플라스크의 바닥에 침전하는 것으로 관찰되었다. 이러한 결과를 바탕으로, 추후 세포 생화학적 성분 분석에 있어서 BG-11 배지가 미세조류 바이오매스 생산을 위해 선택되었으며, 배양 배지에서의 성장 특성은 다른 pH, 염도, 온도 조건 하에서 결정되었다(도 6 내지 8 참조). 최종적으로 K-1 분리주는 BG-11 배지에서 섭씨 10~35 °C의 온도 범위에서 배양될 수 있었으며 25~30°C도 사이에서 제일 빠른 성장이 관찰되었다. 또한, 분리주는 넓은 범위의 염도(0~50 psu 범위)와 pH(4~10 범위) 하에서 배양될 수 있었다. 그러나 최적의 성장은 염도 범위 0~30 psu, pH 범위 6~9에서 기록되었다.

[0066] 실시예 10.

[0067] <구성성분 분석(Cellular components)>

[0068] 미세조류 생물자원으로써 로보스페라 인시사(*L. incisa*) K-1의 가능성을 평가하기 위해서 세포 성분을 분석하였다. 로보스페라 인시사(*L. incisa*) K-1의 전체 세포 성분의 총 구성은 Chlorophyceae 강에 속하는 다른 미세조류에서 보고된 것과 유사하였다(Becker, 2007). 동결건조된 미세조류 세포에서 회분, 탄수화물, 지질, 단백질의 함량은 각 $6.2 \pm 0.0\%$, $28.1 \pm 0.6\%$, $20.4 \pm 0.3\%$, and $43.5 \pm 0.3\%$ 으로 결정되었다. 현재 여러 미세조류 종류(주로 클로렐라 (*Chlorella*))는 건강보조식품으로 사용되며 이것의 세포 단백질 함량은 미세조류의 영양학적 가치를 결정하는 주요 요소로 간주된다(Spolaore et al., 2006). 본 발명에서는 또한 로보스페라 인시사(*L. incisa*) K-1은 상대적으로 높은 비율의 조단백질을 함유하고 있어 상업적으로 이용 가능한 다른 미세조류 종류들과 비슷하게 건강보조식품으로 사용할 가능성 있는 것으로 확인되었다(Spolaore et al., 2006).

[0069] 또한 로보스페라 인시사(*L. incisa*) K-1의 아미노산, 당당류, 지방산의 구성을 분석하였다. 로보스페라 인시사(*L. incisa*) K-1에 존재하는 총 아미노산 중 38.3% 는 필수 아미노산이었다. 주요 아미노산은 글루탐산(12.6%), 아스파르트산(10.6%), 알라닌(10.9%)이며, 메티오닌과 시스테인은 검출되지 않았다(하기 표 1 참조).

표 1

	Asp	Thr	Ser	Glu	Gly	Ala	Cys2	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	His	Lys	NH ₄	Arg	Pro	Total
Contents (mg/g)	5.6	2.4	2.9	6.7	2.7	5.8	-	3.5	-	2.5	5.2	0.6	2.6	2.1	4.3	1.1	3.6	1.7	53.4
Compositions (%)	10.6	4.5	5.4	12.6	5.1	10.9	-	6.6	-	4.7	9.7	1.2	4.8	4.0	8.0	2.0	6.7	3.2	100

[0071]

[0073] 이전에 보고된 다른 녹조식물들처럼(Brown and Jeffrey, 1992), D-갈락토스 (32.2%)와 D-글루코스 (25.1%)가 로보스페라 인시사(*L. incisa*) K-1에서 대부분의 당당류로 확인되었다(하기 표 2 참조).

표 2

Monosaccharides (%)	Contents (mg/g)	Compositions (%)
L(-) Fucose	5.4	3.3
L(-) Rhamnose	11.8	7.1
D(+) Arabinose	1.3	0.8
D(+) Galactose	53.2	32.2
D(+) Glucose	41.2	25.1
D(+) Mannose	32.1	19.4
D(+) Xylose	20.0	12.1
Total	164.9	100.0

[0075]

[0077]

로보스페라 인시사(*L. incisa*) K-1에서 지방산은 포화지방산(SFAs) (18.9%), 단일불포화지방산(MUFAs) (12.9%), 다중불포화지방산(68.2%)으로 이루어졌다. 우리는 로보스페라 인시사(*L. incisa*) K-1의 지방산 구성을 더 상세히 평가했고, 가장 활발히 연구되고 있는 로보스페라 인시사(*L. incisa*) SAG 2468와 비교했다(Bigogno et al., 2002b) (하기 표 3 참조).

표 3

Fatty acids	<i>L. incisa</i> K-1		<i>L. incisa</i> SAG 2468 ^a
	Contents (mg/g)	Compositions (%)	
C14:0	tr ^b	0.1	
C15:0	0.1	0.7	
C16:0	2.8	16.8	10.1
C16:1 ω 11			1.8
C16:1 ω 7			tr
C16:1 ω 9	0.1	0.7	
C16:2 ω 6	0.4	2.4	1.3
C16:3 ω 3	0.7	4.2	0.9
C16:4 ω 3	0.1	0.3	
C18:0	0.2	1.0	2.5
C18:1 ω 7			4.2
C18:1 ω 9	1.8	11.1	12.2
C18:2 ω 6	3.2	19.0	17.2
C18:3 ω 3	3.9	23.2	2.0
C18:3 ω 6	0.2	0.9	0.8
C18:4 ω 3	0.1	0.6	
C20:1 ω 9	tr	0.2	
C20:3 ω 6			1.0
C20:4 ω 6	2.5	15.0	42.5
C20:5 ω 3	0.4	2.6	0.7
C24:0	0.1	0.3	
C24:1 ω 9	0.1	0.9	
Σ SFAs	3.2	18.9	12.6
Σ MUFAs	2.0	12.9	18.2
Σ PUFAs	11.5	68.2	66.4
Total	16.7	100.0	97.2

[0079]

[0081] 분리주의 전반적인 지방산 분석결과는 몇몇 특정 성분을 제외하고 대체로 SAG 2468 주와 유사한 경향을 나타내었다(Bigogno et al., 2002b). 로보스페라 인시사(*L. incisa*) K-1 주의 지질은 주로 엘라이드산(C18:1 ω 9, 11.1%), 리놀레익산(C18:2 ω 6, 19.0%), 아라키돈산(C20:4 ω 6, 15.0%)과 같은 C18, C20 지방산을 포함했다. 그러나 로보스페라 인시사(*L. incisa*) K-1의 지방산 구성은 SAG 2468 주와 뚜렷하게 달랐다. 첫 번째로, 로보스페라 인시사(*L. incisa*) K-1은 오메가-3 지방산의 전구체인 알파-리놀레닉산(C18:3 ω 3, 23.2%)을 높은 비율로 포함했고, 이것은 오메가-3 지방산 계열의 전구물질이며, 이는 인체에서 생산되지 않아 인간의 식단에 필수적이다(Wall et al., 2010). 이것은 K-1 주가 로보스페라 인시사(*L. incisa*)의 알려진 다른 로보스페라 인시사(*L. incisa*) 분리주와 달리 리놀레익산으로부터 알파-리놀레닉산을 합성할 수 있는 오메가-3 불포화효소를 생산한다는 것을 나타낸다(Guedes et al., 2011). 두 번째로, 실제 구성은 낮지만 우리의 분리주는 에이코사펜타엔산(C20:5 ω 3, 2.6%)을 이것의 전구체인 에이코사테트라엔산(C20:4 ω 3)없이도 생산할 수 있었으며, 이것은 로보스페라 인시사(*L. incisa*) K-1이 아라키돈산으로부터 에이코사펜타엔산을 직접 합성할 수 있는 Δ 17-불포화효소를 가질 수 있음을 시사한다(Guedes et al., 2011). 이러한 생화학적 특성은 또한 한국 서해로부터 새롭게 분리된 로보스페라 인시사(*L. incisa*) K-1의 신규성을 뒷받침한다.

[0083] 이러한 결과를 바탕으로, 로보스페라 인시사(*L. incisa*) K-1은 인간 건강을 증진하기 위해 널리 인정 받는 고부가 가치 오메가-3 및 오메가-6 장쇄다중 불포화지방산(특히, 아라키돈산과 에이코사펜타엔산)의 생산을 위한 미세조류 생물공장으로써 잠재적으로 강한 이점을 가지고 있다(Tapiero et al., 2002). 더 나아가, 장쇄다중불포화지방산의 항균(Falaise et al., 2016) 및 항바이러스 작용(Kohn et al., 1980; Thomar et al., 1987)이 검증되었기 때문에, 장쇄다중 불포화지방산이 풍부한 새롭게 분리된 미세조류는 또한 의약품, 화장품, 환경 복원과 같이 광범위하게 응용될 수 있다. 현재 미세조류의 바이오매스 생산성과 실용화를 위한 장쇄다중불포화지방산, 특히 아라키돈산과 에이코사펜타엔산 축적을 증가시키기 위해 로보스페라 인시사(*L. incisa*) K-1의 배양을 위한 최적의 조건을 결정하기 위한 추가 연구가 진행 중이다.

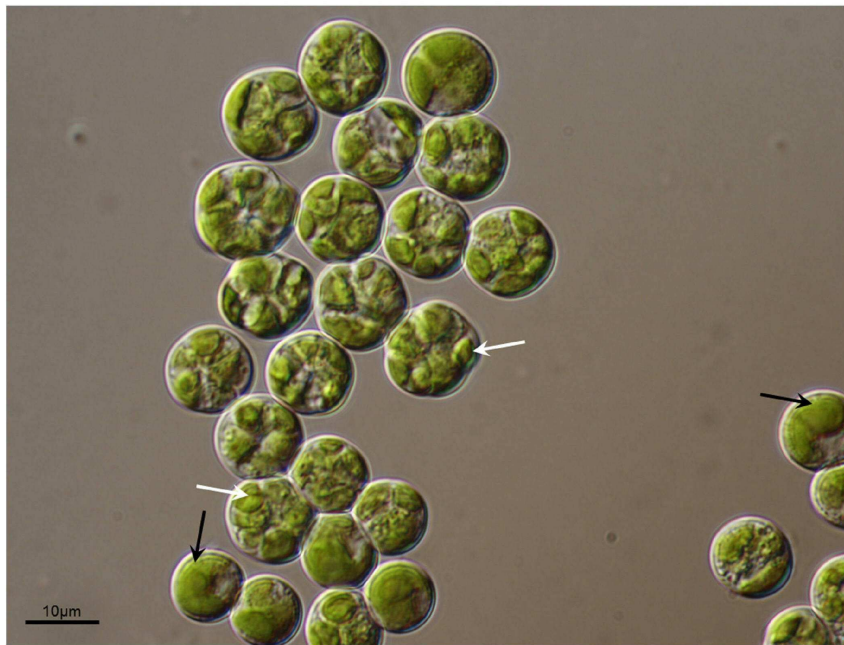
[0085] 상술한 특징의 실시예에 한정되지 아니하며, 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 본원 발명의 요지를 벗어남이 없이 다양한 변형 실시가 가능함은 물론이다. 따라서, 본 발명의 범위는 위의 실시예에 국한해서 해석되어서는 안되며, 후술하는 특허청구범위 뿐만 아니라 이 특허청구범위와 균등한 것들에 의해 정해져야 할 것이다.

수탁번호

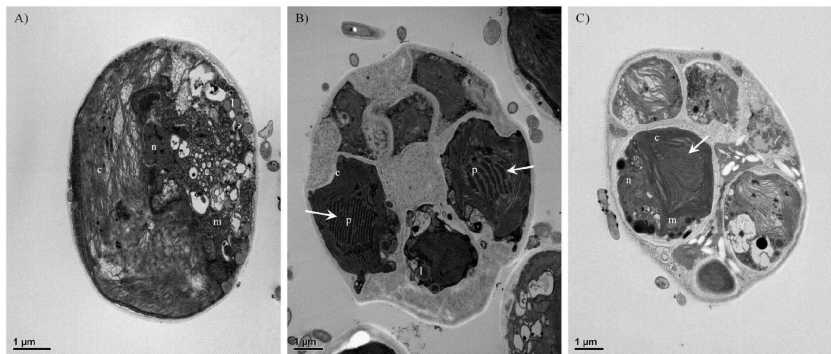
[0087] 기탁기관명 : 한국생명공학연구원
 수탁번호 : KCTC12888BP
 수탁일자 : 20150831

도면

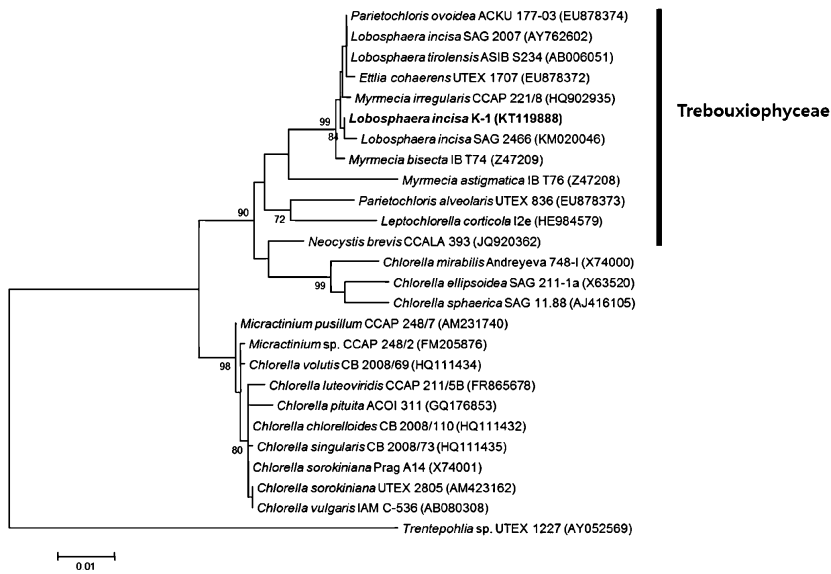
도면1



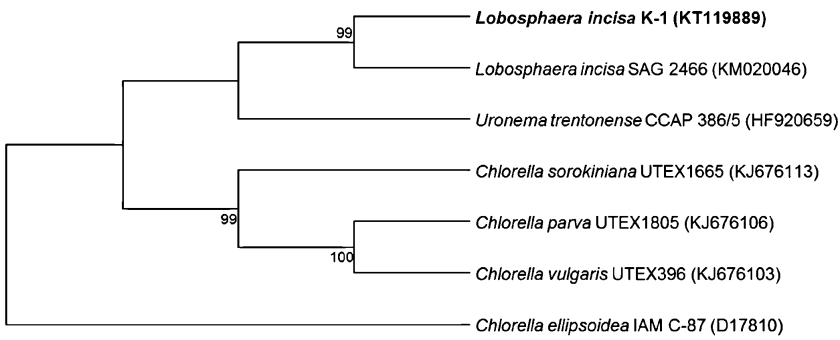
도면2



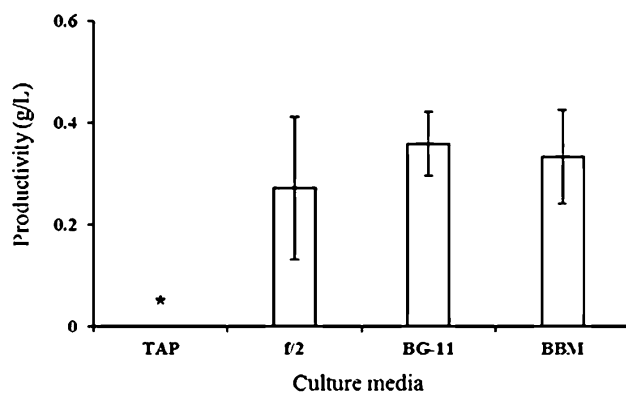
도면3



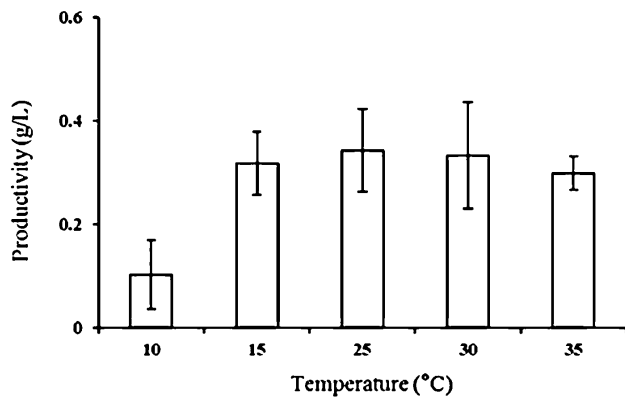
도면4



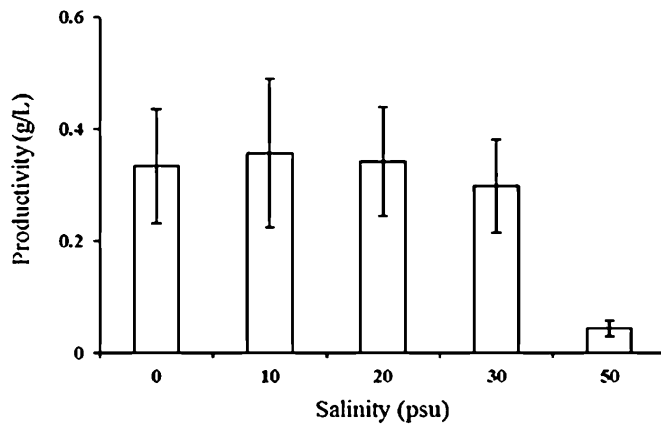
도면5



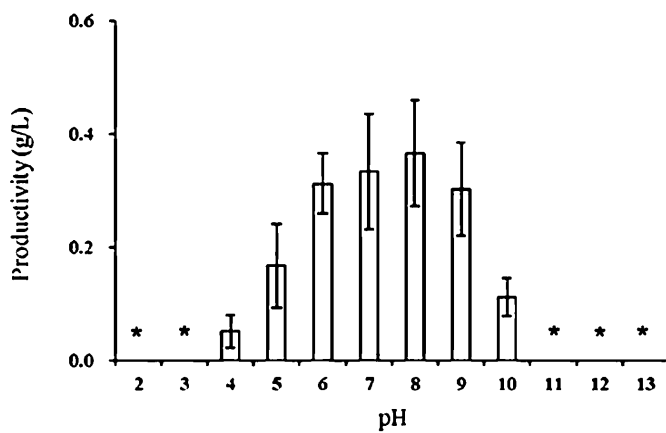
도면6



도면7



도면8



서열목록

- <110> KRIBB
- <120> Novel microalgae of *Lobosphaera incisa* K-1 and its use
- <130> M18-5192
- <160> 2
- <170> KopatentIn 2.0

<210> 1
 <211> 1627
 <212> RNA
 <213> Lobosphaera incisa
 <400> 1

gcgaatggct cattaatca gttatagttt atttgatggg accttactac tcggataacc 60
 gtagtaattc tagagctaat acgtgcgtaa atccccactt ctggaaggga cgtatttatt 120
 agataaaagg ccgaccgggc tctgcccgac tcgctgggtaa tcatgataac ttcacgaatc 180
 gcatggcctc tgtgccggcg atgtttcatt caaatttctg ccctatcaac tttcgtatgg 240

aggatagagg cctaccatgg tggtaacggg tgaccggagga ttagggttcg attccggaga 300
 gggagcctga gaaacggcta ccacatccaa ggaaggcagc aggcgcgcaa attaccaat 360
 cctgattcag ggaggtagt acaataaata acaataccgg gctttttcaa gtctggtaat 420
 tggaatgagt acaatctaaa tcccttaacg aggatcaatt ggagggcaag tctggtgcca 480
 gcagccgagg taattccagc tccaatagcg tatatttaag ttgttgcaat taaaaagctc 540
 gtagttggat ttcgggtggg cgatgtcggg ccgccgtttc ggtgtgcact ggcagcgcct 600
 accttctgc cggggacggg ctctctgggct taactgtccg ggaccggag tcggcgaggt 660

tactttgagt aaattagagt gttcaaagca ggcctacgct ctgaatacat tagcatggaa 720
 taacacgata ggactctggc ctatcttgtt ggtctgtggg accggagtaa tgattaagag 780
 ggacagtcgg gggcattcgt atttcattgt cagaggtaga attcttggat ttatgaaaga 840
 cgaacttctg cgaagcatt tgccaaggat gttttcatta atcaagaacg aaagtgggg 900
 gctcgaagac gattagatac cgtcctagtc tcaaccataa acgatgccga ctagggattg 960
 gaggggtgtt attgatgacc cctccagcac cttatgagaa atcaaagttt ttgggttccg 1020
 gggggagtat ggtcgaagg ctgaaactta aaggaattga cggaagggca ccaccaggcg 1080

tggagcctgc ggcttaattt gactcaacac gggaaaaactt accaggtcca gacatagtga 1140
 ggattgacag attgagagct ctttcttgat tctatgggtg gtggtgcatg gccgttctta 1200
 gttggtgggt tgccttgta ggttgattcc ggtaacgaac gagacctcag cctgctaaat 1260
 agtcacggtt ggttcttcca gccggccgac ttcttagagg gactattggc gactagccaa 1320
 tggaaagtgt aggcaataac aggtctgtga tgcccttaga tgttctgggc cgcacgcgcg 1380
 ctacactgat gcattcaacg agcctagcct ggaccgagag gttcgggtaa tctttgaaac 1440
 tgcactgtga tggggataga ttattgcaat tattaatctt caacgaggaa tgcctagtaa 1500

gcgcgagtca tcaactcgg ttgattacgt ccatgccctt tgtacacacc gccctcgtt 1560

cctaccgatt ggggtgtgctg gtgaagcttt cggattggcg actgctgacg gttccccgcc 1620
cgctgtc 1627
<210> 2
<211> 1157
<212> DNA
<213> Lobosphaera incisa K-1 ITS region
<400> 2
cgctcaatct cctcgattgc tgccgggtgc tccgggcgct ggccccgctg cggccccagg 60
ctcaccttcc cccccgggga ggccctgggg cccgcatgtc ggggtccaac cctgcttaac 120
cagcaggcga cggfccagcg ggccgggagg gctcggttcc tctttcggga ggtccggcct 180
gaccgctgac caaacaacc tttcaccca aaaccatcct ctgaagcttg cggagaccgg 240
cctggccggc tccttcaaac caaagacaac tctcaacaac ggatatctag gctcccgtaa 300
cgatgaagaa cgcagcgaaa tgcgatacgt agtgtgaatt gcagaattcc gtgaaccatc 360
gaatctttga acgcatatg cgctcgagge ttcgcccgag agcatgtctg cctcagcgtc 420
ggtcacatcc ctcacacct ccccttgttt tgcaaatggg ctgggccctg gatctggccg 480
tgtcggctgc cccgtgtggc cgagtcggct gaagctcaga ggcttgagca agcggccatt 540
caaccgggca tcaacttggg ggggtggcctt cgggctgcga agccgttgat ggccggggga 600
cttgctgggg gcctgcagga acaccgccc ccgacaggag ggctgggtgc gactcacctt 660
tcgacctgag atcaggcaag aacaccgct gaacttaagc atatcactaa gcggaggaaa 720
agaaactaac caggattccc ctatagcgg cgagcgaacc gggaagagcc caacttgaaa 780
atctccaggc cttgcctggc gaattgtagt ctatagaagc gccctctgcg gcaggtcgcg 840
cccaagtccc ctgggagggg gcgtcagaga gggtgagaac cccgtcggcg cgcgcctgtc 900
cgctccacga ggcgctttcg cagagtcggg ttgtttggga atgcagcca aagcaggtgg 960
taaatccat ctaaggctaa atactgacgg gagaccgata gcgaacaagt accgttgagg 1020
gaaagatgaa aagaactttg aaaagagagt taaaagtgct tgaaattgtt gaagggggaa 1080
gagattggaa gcctcgggtg cccaaggct tatgccggcc tcacggcccg ctgcatgtgc 1140
tgggtgctgg tcaacat 1157