

최 종 보 고 서

편집순서 1 (표지)

<p>(뒷면)</p> <p>F 1 8 0 1</p> <p>대 사 공 학 을 통 한 심 혈 관 건 강 증 진 고 기 능 발 효 오 일 생 산 기 술 개 발</p> <p>심 혈 관 건 강 증 진</p> <p>주 의 (편집순서 8)</p> <p>(15 포인트 고딕계열)</p> <p>↑ 6cm ↓</p>	<p>고 기 능 발 효 오 일 생 산 기 술 개 발</p> <p>↑ 3cm ↓</p>	<p>(앞면)</p> <p>발간등록번호 11-1543000-001025-01</p> <p>대사공학을 통한 심혈관 건강 증진 고기능 발효오일 생산 기술 개발에 관한 연구</p> <p>(18 포인트 고딕계열)</p> <p>(Development of technology for production of value-added microbial oil controlling cardiovascular disorders by metabolic engineering)</p> <p>(17 포인트 명조계열)</p> <p>한국생명공학연구원 (17 포인트 명조계열)</p> <p>↑ 9cm ↓</p> <p>농림축산식품부 (17포인트 명조계열)</p> <p>↑ 4cm ↓</p>
--	---	---

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “대사공학을 통한 심혈관 건강 증진 고기능 발효오일 생산 기술 개발에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2015 년 09 월 1 일

주관연구기관명 : 한국생명공학연구원

주관연구책임자 : 서 정 우

연 구 원 : 홍 원 경

연 구 원 : 허 선 연

연 구 원 : 박 장 민

연 구 원 : 박 혜 미

연 구 원 : 주 선 이

연 구 원 : 오 백 록

연 구 원 : 이 종 재

협동연구기관명 : (주)리얼바이오텍

협동연구책임자 : 양 오 연

연 구 원 : 이 영 진

요 약 문

I. 연구개발의 목적 및 필요성

고도불포화지방산 EPA 오일의 심혈관 질환 예방 및 치료 효능이 과학적으로 입증되어 왔음. 이에 따라 세계보건기구를 비롯한 각국의 공인기관들이 심장 건강을 위해 매일 1g 이상의 EPA 함유 오일을 꾸준히 섭취할 것을 권장하고 있음

EPA 오일의 세계시장 규모는 연간 5000억 원 이상으로 (원료시장), 건강기능성 식품 원료, 식품첨가제, 사료첨가제 등 다양하게 제품화되고 있으며, 특히 고순도 EPA 천연의약 제품의 매출규모는 연간 1.6조원임 (Pronova사 Omacor 등). 또한 고령인구의 증가 추세에 따라 대표적인 healthy aging 천연소재로서 EPA 오일의 수요는 더욱 증가할 것으로 예상됨

현재 상용 EPA 오일의 대부분은 심해성 어류의 기름, 어유 (魚油)로부터 얻고 있지만, 어유에는 유사 구조의 고도불포화지방산 DHA, 다이옥신, 중금속 등 다양한 불순물들이 존재할 뿐만 아니라 무분별한 포획으로 인한 해양생물자원의 고갈에 따라 어획량이 갈수록 감소하고 있고 전 세계적인 어획 규제가 점차 강화되고 있는 상황임

따라서 기존의 어유 추출공정을 대체하기 위한 새로운 고순도 EPA 오일을 안정적으로 생산할 수 있는 기술개발에 대한 관심이 고조되고 있는 데, 그 대표적인 방법이 EPA 오일 생산 미생물을 이용한 발효 공정이며, 향후 개발 기술은 막대한 상업적 가치를 지닐 것으로 판단됨

본 연구과에서는 대사공학을 통해 고도불포화지방산 Eicosapentaenoic acid (EPA)를 고농도로 함유하는 유기영양 미세조류 균주를 개발한 후, 이를 이용하여 심혈관질환의 예방·치료 효능을 지닌 고부가가치 발효 오일 소재를 고수율로 생산하는 기술을 개발하고자 하였음

II. 연구개발 결과

1. 유전체, 전사체 및 효소 활성 분석을 통해 Thraustochytrid 미세조류의 다중불포화지방산 합성 대사를 규명하였음

2. 유전공학 및 돌연변이 기술을 이용하여 다중불포화지방산 및 EPA의 함량이 증진된 균주를 개발하였음
3. Thraustochytrid 미세조류의 발효 배양을 위한 영양원, 공정변수의 최적화를 통해 EPA 오일 생산 공정을 확립하였으며, 500리터 파일럿 스케일 배양 공정을 확립하였음
4. Thraustochytrid 미세조류의 배양 균체로부터 EPA 고함유 유지를 추출, 농축하는 공정을 확립하였음
5. 동물실험을 통하여 Thraustochytrid 미세조류 EPA 고함유 오일의 효능 및 안전성을 검증하였음
6. 오메가-3 다중불포화지방산 고질혈증 의약의 국내외 시장 현황과 사업성을 분석하였음

III. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 특허 및 논문

- 특허 출원4건 (과제종료후 1건), 논문 3편 (2편 투고중), 학회발표 3건

2. 사업화

전세계 오메가-3 지방산 의약 시장 규모는 약 \$2.5B 수준이며, DHA와 EPA의 혼합 형태인 프로노바사의 오마코가 세계 시장을 주도하고 있으며, 일본 모찌다사의 에파델, 미국 아마린사의 바스세파 제품이 판매되고 있음. 국내에서도 프로노바사의 오마코 제품이 수입, 판매되고 있으며, 2007년 71.7억에서 2014년 400억원으로 시장규모가 급성장하고 있음. 오마코의 특허가 만료된 이후 대부분의 제약기업들이 제네릭 제품을 개발, 출시하고 있는 상황임

아직까지, Thraustochytrid 미세조류 오메가-3 다중불포화지방산의 고지혈증 의약품료로 상용화는 이루어지지 않고 상황임. Fish oil를 활용한 오메가-3 다중불포화지방산 고지혈증 의약 사업과 달리 Thraustochytrid 미세조류 기반은 발효 공정을 통해 오메가-3 다중불포화지방산의 생산, 확보가 가능하기 때문에 기존의 발효설비를 구비한 제약기업이 단독으로 사업화가 가능함. 따라서 기술 수요 기업체와 협의를 통해 기술개발, 공정개발, 효능검증 및 제품개발 과정을 거쳐 국내 시장은 물론 국내 시장의 진출이 가능할 것으로 전망됨.

SUMMARY

(영문 요약문)

I. Research objectives

It is scientifically proved that polyunsaturated fatty acids Eicosapentaenoic acid (EPA) oil can help prevent cardiovascular disease and positive therapeutic role. Accordingly, agencies from all over the world including World Health Organization recommend the daily consumption of at least 1g of EPA for heart health.

The annual world market for EPA oil product exceeds 500 billion won (raw material markets), and the product is used in various ways - food additives, animal feed additives. Especially, EPA natural medicinal products is 1.6 trillion market a year (Co., Ltd. Pronova, Omaco, etc.). In addition, the demand for EPA oil as a representative healthy aging natural material is expected to increase with the rising aging population in the world.

Most of the current commercial EPA oil is from fish oil in deep sea and this is considered unattractive one as it contains impurities such as dioxins and heavy metals. Also, World fishing regulation is increased to address drastic reduction of marine resources caused by the indiscriminate poaching.

Therefore, alternative sources of EPA are being sought and the representative way is a fermentation process using EPA oil production microorganisms. EPA oil production from micrororganism technology is determined to possess the enormous commercial value.

Our study aims to develop organic nutritional microalgae strains with a high concentration of polyunsaturated fatty acids EPA using metabolic engineering. With this technology, this study intends to develop technology to produce high-value fermentation oil that treats and prevents cardiovascular disease.

II. Results

1. Identified of Thraustochytrid microalgae polyunsaturated fatty acids synthesis pathway through genome, transcriptome and enzyme activity analysis

2. Improvement of microalgae strain containing high polyunsaturated fatty acids EPA through genetic engineering and traditional breeding methods UV, gamma irradiation, etc.)
3. Optimization of medium component and culture condition for EPA oil production and scale-up of process established
4. Extraction and concentration process of oil from Thraustochytrid microalgae containing high EPA are established
5. Verified the effectiveness and safety of Thraustochytrid microalgae oil containing high EPA through animal test
6. Analyzed a domestic/international market situation and a business feasibility of omega-3 polyunsaturated fatty acids chronic hyperinsulinemia medicine

III.. Research application

1. Patent and paper

- Four patent application, three foreign paper, three poster presentation

2. Commercialization

So far, Thraustochytrid microalgae omega-3 polyunsaturated fatty acids hyperlipidemia pharmaceutical raw materials is not ready to be used commercially. Unlike omega-3 polyunsaturated fatty acids hyperlipidemia medicine business using fish oil, Thraustochytrid microralgae base requires fermentation process where omega-3 polyunsaturated fatty acids is produced and obtained. This means pharmaceutical companies using existing fermentation equipment alone can be ready for commercialization.

CONTENTS

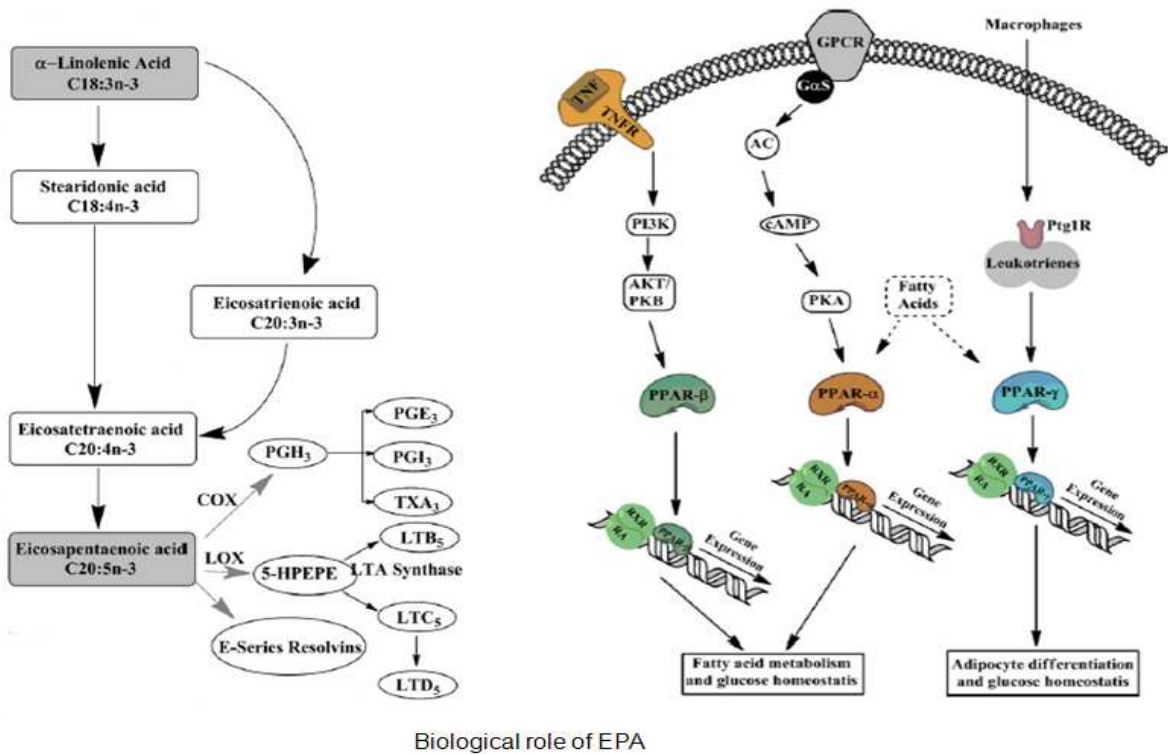
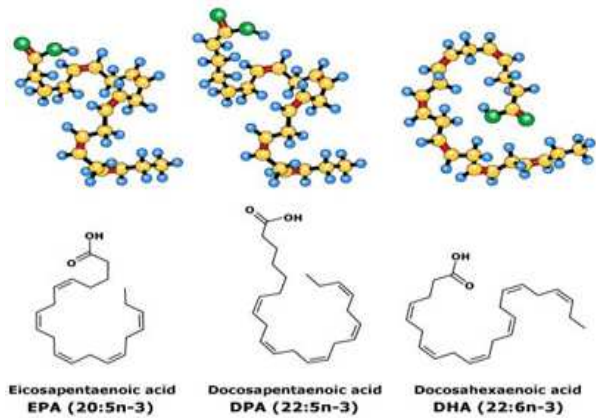
Chapter I	Project introduction	9
Chapter II	Current status of technology trends	14
Chapter III	Results	17
Chapter IV	Future perspectives	95
Chapter V	Achievement and application	97
Chapter VI	References	128

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	9
제 2 장	국내외 기술개발 현황	14
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	17
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	95
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획	97
제 6 장	참고문헌	128
첨부 특허, 논문, 시장 분석 보고서		

제 1 장 연구개발과제의 개요

◦ 1952년 옥스퍼드 대학의 싱클레어 박사가 북유럽 에스키모의 식생활에 대한 연구를 통해 오메가-3 (DHA, EPA) 오일의 중요성이 인식되어진 이후, 지금까지 수많은 과학자들의 연구 결과 EPA 오일의 다양한 생리학적 기능과 효능이 밝혀졌음. 과학적으로 입증된 가장 대표적인 효능은 심혈관 질환 예방 및 치료 효과이며, 이는 북유럽 에스키모의 낮은 심혈관질환 발병율과도 상관성이 있는 것으로 밝혀졌음



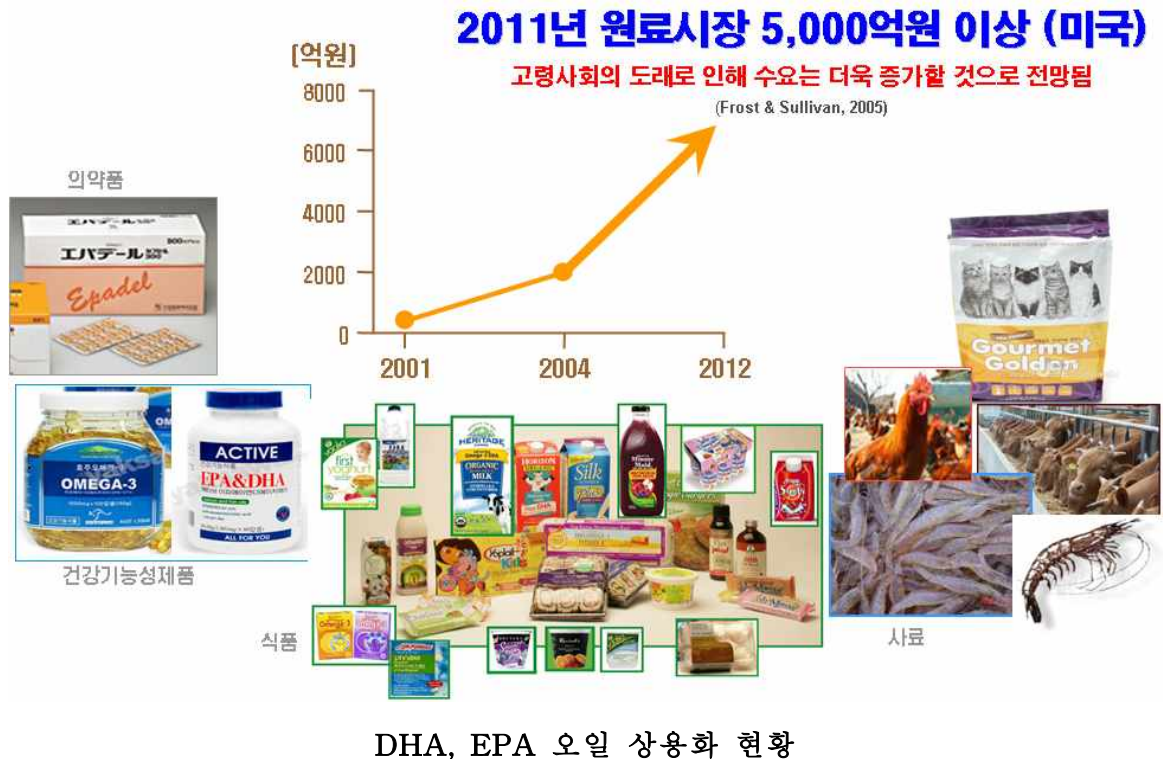
◦ 이러한 과학적 사실에 근거하여 세계보건기구 (WHO)를 비롯한 각국의 공인기관들이 심장 건강을 위해 매일 1g 이상의 DHA, EPA 함유 오일을 꾸준히 섭취할 것을 권장하고 있음

세계보건기구 권장섭취량

구분	함량 (g/day)
Infants	0.5
Adults	1.0
Patients (CHD)	1.0
Patients (HG)	2.0-4.0

CHD: coronary heart disease, HG: hyperglyceridemia

- DHA, EPA 오일의 세계시장 규모는 연간 5000억 원 이상으로 (원료시장), 건강기능성 식품 원료, 식품첨가제, 사료첨가제 등 다양하게 제품화되고 있으며, 특히 고순도 DHA, EPA 천연의약 제품의 매출규모는 연간 1.6조원임 (Pronova사 Omacor 등). 또한 고령인구의 증가 추세에 따라 대표적인 healthy aging 천연소재로서 EPA 오일의 수요는 더욱 증가할 것으로 예상됨





고순도 DHA, EPA 오일 고질혈증 천연의약

- 현재 상용 DHA, EPA 오일의 대부분은 심해성 어류의 기름, 어유 (魚油)로부터 얻고 있지만, 어유에는 다이옥신, 중금속 등 다양한 불순물들이 존재할 뿐만 아니라 무분별한 포획으로 인한 해양생물자원의 고갈에 따라 어획량이 갈수록 감소하고 있고 전 세계적인 어획 규제가 점차 강화되고 있는 상황임

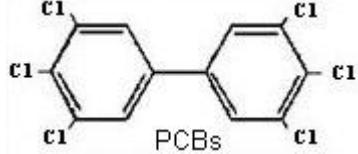
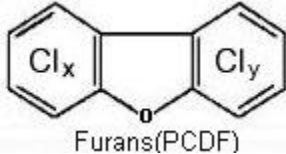
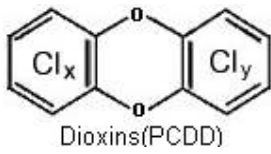
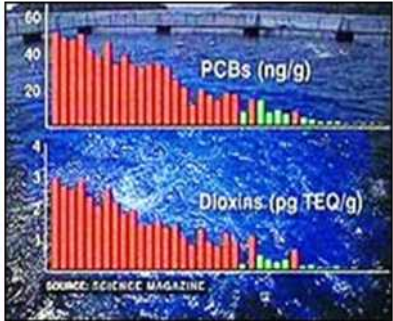
해양 어류의 체내에 축적된 DHA, EPA 오일 함량

Fresh tuna	70-360 (g/per day)
Sardines	60-90
Salmon	60-135
Mackerel	60-250
Herring	45-60
Rainbow trout	90-105
Halibut	90-225
Cod	375-750
Haddock	450
Catfish	450-600
Flounder/sole	210
Oyster (pacific/eastern/farmed)	75/195/240
Lobster	225-1275
Crab, Alaskan King	255
Shrimp	330
Clam	375
Scallop	525

- 최근에는 해양 환경오염이 심각해짐에 따라 어류에 PCBs나 Dioxin과 같은 독성 화학물질의 축적이 증가하고 있어, 어류 유지 사용에 대한 우려와 규제가 점차로 증가하고 있는 상황임. PCB는 절연유로 활용되다가 강한 독성과 잔류성으로 인해 1970년대에 사용이 금지된 화학물질이며, Dioxin은 여러 개의 염소가 붙어있는 방향족 화합물로 환경 잔류성이 매우 강한 생식계, 면역계, 호르몬 조절 기능 장애를 유발하는 발암물질임 (일일 허용 섭취량 미국기준 1 pg/Kg body 이하)



독성물질 오염

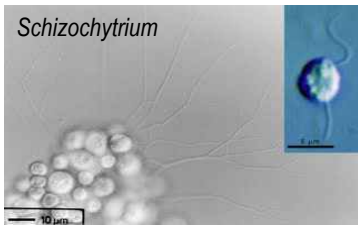
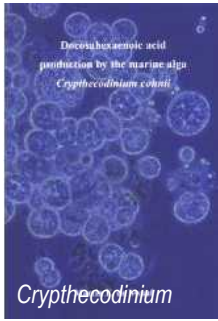


해양오염의 심화에 따른 어유 (魚油)내 환경호르몬 독성물질의 축적

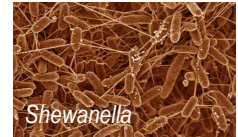
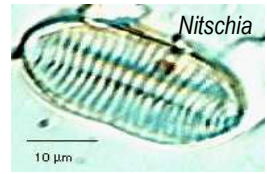
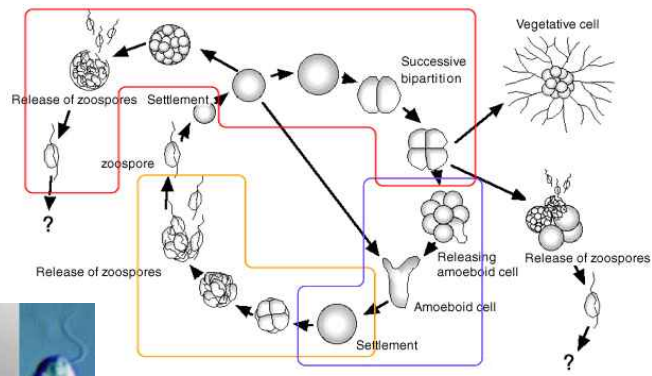
따라서 기존의 어유 추출공정을 대체하기 위한 새로운 고순도 DHA, EPA 오일을 안정적으로 생산할 수 있는 기술개발에 대한 관심이 고조되고 있는 데, 그 대표적인 방법이 DHA, EPA 오일 생산 미생물을 이용한 발효 공정이며, 향후 개발 기술은 막대한 상업적 가치를 지닐 것으로 판단됨

DHA, EPA 오일 미생물 발효공정의 장점

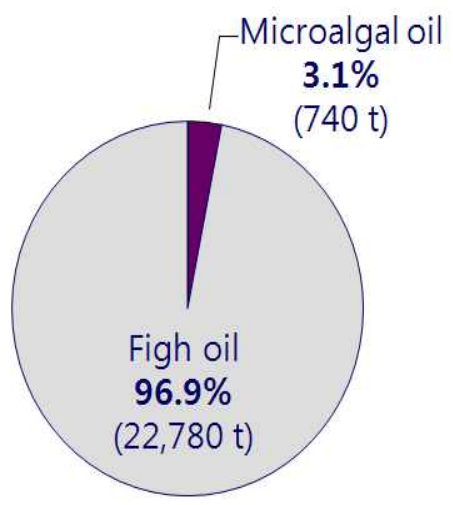
1. 해양 미세조류 미생물은 고농도의 다중 불포화지방산을 함유하고 있음 (40-50%)
2. 유전자 재조합 및 대사공학 기술을 이용하여 지질 생산 수율과 지방산의 종류 등 목적에 맞는 미세조류 균주의 개발이 용이함
3. 바이오리액터를 이용한 친환경 배양공정을 통하여 환경 요인(기후, 계절, 해양 오염 등)에 영향을 전혀 받지 않고, PCB, Dioxin 무함유 청정 고도불포화지방산을 안정적으로 생산이 가능함



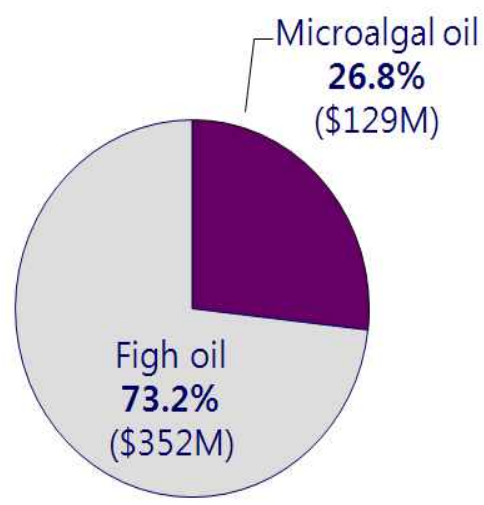
Schizochytrium속 해양미생물의 생활환



Marine microorganisms	
DHA	<i>Cryptothecodinium cohnii</i> <i>Schizochytrium</i> sp. <i>Tharustochytrium</i> sp.
EPA	<i>Nitschia laeva</i> <i>Shewanella baltica</i>



Production



Sales

미생물 발효오일의 시장 전망

본 과제에서는 고유지성 유기영양 미세조류의 대사공학 및 돌연변이를 통해 EPA 오일을 고수율로 생산하는 기술을 개발하고자 하며, 개발 기술은 듀풍사의 재조합 효모 기술과 차별화되는 새로운 고기능 EPA 오일 생산 기술로서 지적재산권의 확보가 가능할 것으로 판단됨

제 2 장 국내외 기술개발 현황

- 해양 미세조류를 비롯하여 EPA 오일을 함유하는 다수의 야생미생물들이 자연계로부터 분리되었지만, 야생 미생물들의 생산수율은 대체로 매우 낮은 수준이기 때문에 상용 공정으로 개발하기에는 적합하지 않음

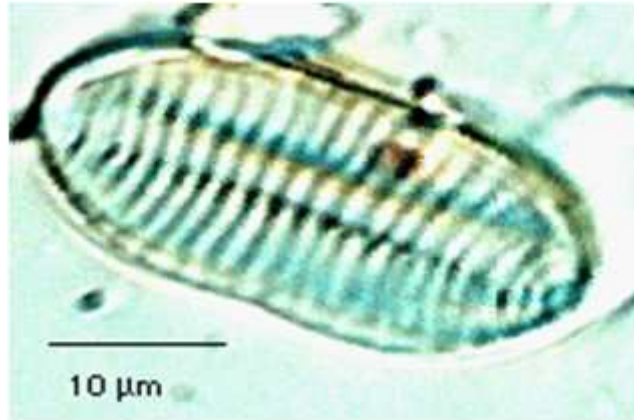
Comparison of EPA productivity of microalgae under various culture conditions^a

Organisms	Culture vessels	Culture modes	EPA productivity (mg l ⁻¹ day ⁻¹)
<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	Glass tubes	Batch	19.0
<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	Glass tanks	Continuous	25.1
<i>Isochrysis galbana</i>	Fermenters	Continuous	7.2
<i>Isochrysis galbana</i>	Fermenters	Continuous	15.3
<i>Monodus subterraneus</i>	Erlenmeyer flasks	Continuous	25.7
<i>Monodus subterraneus</i>	Flat plate reactors	Semi-continuous	58.9
<i>Isochrysis galbana</i>	Glass tubes	Semi-continuous	4.6
<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	Glass tubes	Semi-continuous	5.2
<i>Porphyridium cruentum</i>	Flasks	Batch	3.6
<i>Isochrysis galbana</i>	Cylindrical fermenters	Continuous	23.8
<i>Nannochloropsis</i> sp.	Tubular photobioreactors	Continuous	32.0
<i>Phaeodactylum tricorutum</i> ^b	Glass vessels	Batch	33.5
<i>Nitzschia laevis</i> ^c	Fermenters	Perfusion-cell bleeding	174.6

^a Unless specified, the microalgae were grown in photoautotrophic conditions.

^b The microalga was grown in mixotrophic growth conditions.

^c The microalga was grown in heterotrophic growth conditions.



EPA 오일 생합성 야생미생물 (*Nitzschia laevis*)

- 최근 듀폰 (Dupont)사가 유지성 효모의 유전자 재조합 변이체를 이용하여 EPA 오일의 고수율 생산기술을 개발하였으며 (EPA 함량 28%, 오일 수율 20%), 미국 식약청 (FDA)의 사용허가를 받아 관련 제품을 출시하였음 (2011)

FDA U.S. Food and Drug Administration A-Z Index Search

Home | Food | Drugs | Medical Devices | Vaccines, Blood & Biologics | Animal & Veterinary | Cosmetics | Radiation-Emitting Products | Tobacco Products

Share Email this Page Print this page Change Font Size

Food
Home > Food > Food Ingredients & Packaging > Generally Recognized as Safe (GRAS)

Agency Response Letter GRAS Notice No. GRN 000355

CFSAN/Office of Food Additive Safety

March 7, 2011

Matthias Liebergesell, Ph.D.
DuPont Applied Biosciences
Route 141 & Powder Mill Road
Wilmington, DE 19803

Re: GRAS Notice No. GRN 000355

Dear Dr. Liebergesell:

The Food and Drug Administration (FDA) is responding to the notice, dated August 30, 2010, that you submitted in accordance with the agency's proposed regulation, proposed 21 CFR 170.36 (62 FR 18938; April 17, 1997; Substances Generally Recognized as Safe (GRAS); the GRAS proposal). FDA received the notice on September 1, 2010, filed it on September 8, 2010, and designated it as GRAS Notice No. GRN 000355.

The subject of the notice is eicosapentaenoic acid (EPA)-rich triglyceride oil from *Yarrowia lipolytica* (EPA-rich oil). The notice informs FDA of the view of DuPont Applied BioSciences (DuPont) that EPA-rich oil is GRAS, through scientific procedures, for use as an ingredient in food categories as listed in 21 CFR 184.1472(a)(3) at a maximum intake of 3.0 grams per person per day (g/p/d) EPA and not to be combined or augmented with any other food ingredient containing EPA and/or another omega-3 fatty acid, docosahexaenoic acid.

Our use of "EPA-rich oil" in this letter should not be considered an endorsement or recommendation of that term as an appropriate common or usual name for the purpose of describing the substance in the ingredient statement of foods that contain that ingredient.



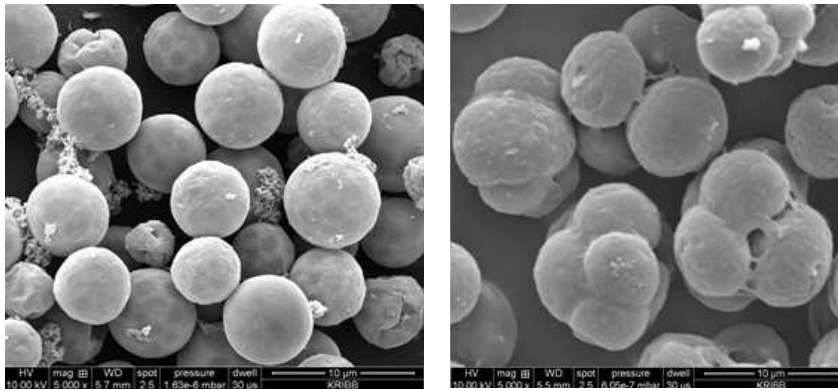
듀폰사의 유전자재조합 효모 (*Yarrowia lipolytica*) EPA 오일 제품

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 다중불포화지방산 생합성 대사 기작 분석

1. 유전체 분석

- 다중불포화지방산 생합성 대사를 이해하기 위해 다중불포화지방산 생성 Thraustochyrid 미세조류 2종의 유전체 분석을 수행하였음.



다중불포화지방산 고생성 Thraustochyrid 미세조류: A strain (좌), T strain (우)
(두 Thraustochyrid 균주는 서로 다른 형태적 특징을 보이는 것으로 관찰됨)

(1) Central Carbon Pathway

- 포도당으로부터 지방산을 생산하는 과정 중 Glycolysis는 포도당을 피루브산으로 분해 하는 과정으로, 당을 분해하여 에너지를 얻기 위한 물질대사이며 생산된 피루브산은 아세틸-CoA로 전환되어 지방산 합성이 이용됨. 포도당으로부터 지방산 합성 대사 경로 분석을 위하여 Thraustochyrid 미세조류의 Glycolysis 물질 대사경로의 유전체 분석을 실시함. 유전체 분석결과 Glycolysis에 필요한 10가지 효소가 존재하는 것이 확인되었음.

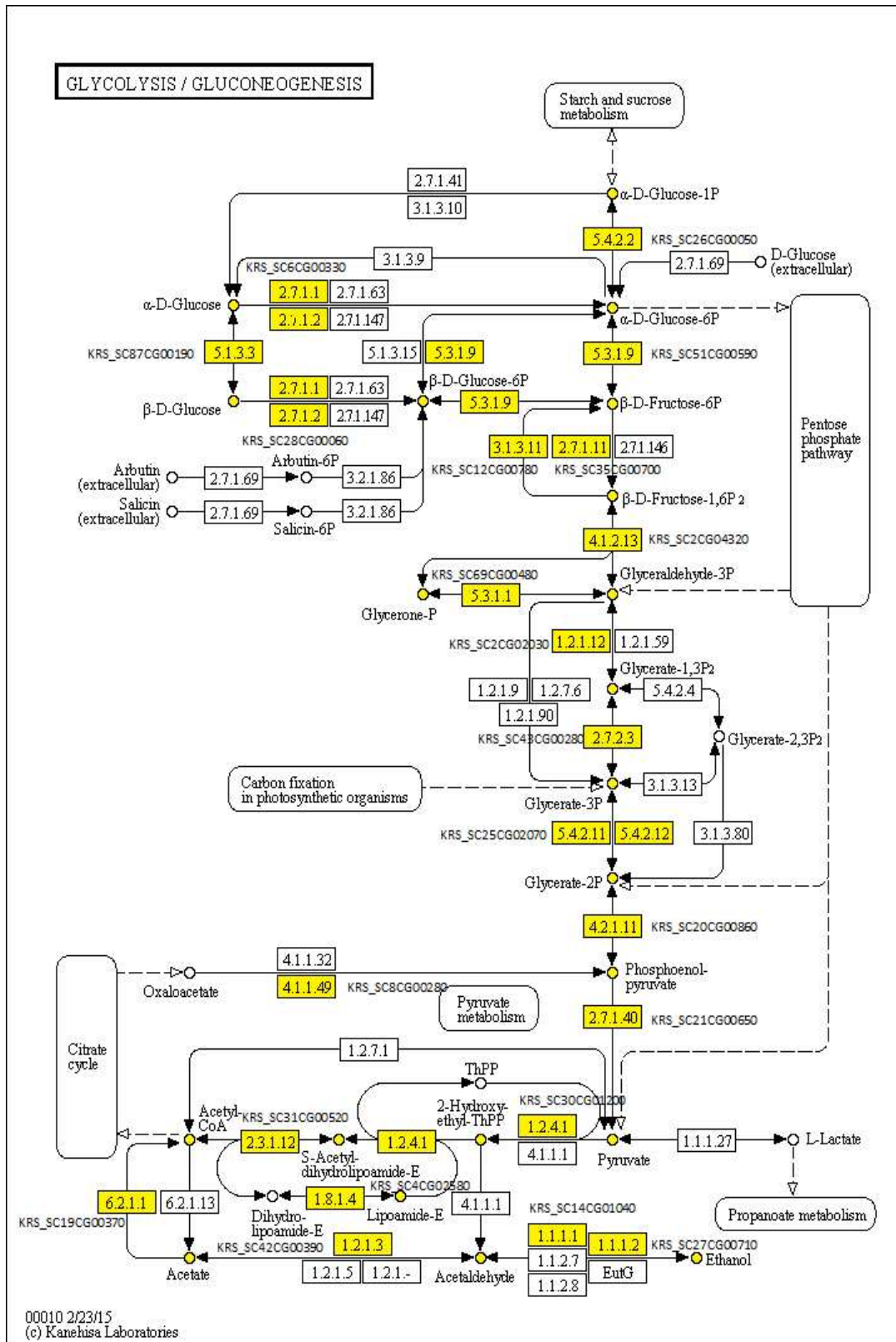
Glycolysis 대사과정 유전체 분석 결과

효소	A strain	T strain
Hexokinase	KRS_SC6CG00330	T.SH4_SC61CG00120
Phosphoglucose isomerase	KRS_SC51CG00590	T.SH4_SC8CG03420
Phosphofruktokinase	KRS_SC35CG00700	T.SH4_SC14CG01060
Fructose-bisphosphate aldolase	KRS_SC2CG04320	T.SH4_SC12CG00130
Triosephosphate isomerase	KRS_SC69CG00480	T.SH4_SC14CG01810
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	KRS_SC2CG02030 KRS_SC14CG00290	T.SH4_SC18CG00710 T.SH4_SC6CG01790
Phosphoglycerate kinase	KRS_SC43CG00280 KRS_SC13CG01800	T.SH4_SC29CG00030 T.SH4_SC47CG00210
Phosphoglycerate mutase	KRS_SC25CG02070	T.SH4_SC9CG01840
Enolase	KRS_SC20CG00860	T.SH4_SC9CG00470
Pyruvate kinase	KRS_SC21CG00650 KRS_SC86CG00370	T.SH4_SC5CG02360 T.SH4_SC9CG01090

- 추가적으로 아세틸-CoA 생산을 위한 효소를 보유하고 있었음.

아세틸-CoA 생합성 대사과정 유전체 분석 결과

효소	A strain	T strain
Pyruvate dehydrogenase	KRS_SC30CG01200	T.SH4_SC5CG06670
Dihydrolipoyllysine-resid ue acetyltransferase	KRS_SC31CG00520	T.SH4_SC45CG00390
Acetate--CoA ligase	KRS_SC19CG00370	T.SH4_SC18CG01940



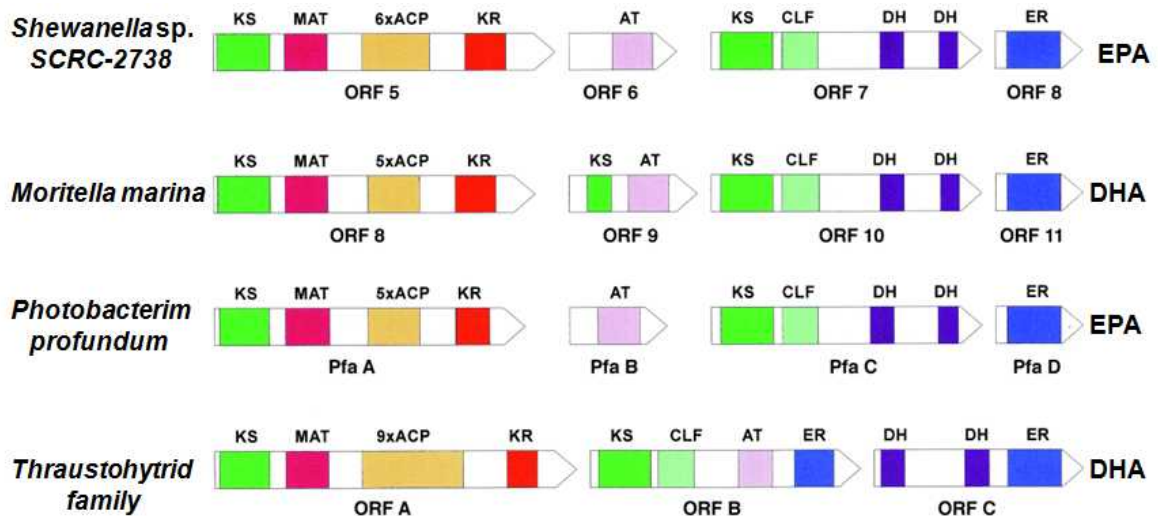
Thraustochytrid 미세조류의 Central carbon pathway

(2) 지방산 합성 대사

- 유전체 분석 결과, Thraustochytrid 미세조류 A strain과 T strain은 공통적으로 전형적인 type I fatty acid synthase 유전자를 보유하는 것으로 확인되었음. 또한 를 존재하는 것으로 확인되었음. 또한 다중불포화지방산의 생합성을 촉매하는 PuFA synthase 유전자를 공통적으로 보유하는 것으로 나타났음. 하지만, desaturase와 elongase 유전자 분석에서는 두 Thraustochytrid 균주가 매우 상이한 특징을 보이는 것으로 나타났음. T 균주에서는 delta-12, delta-6, delta-5, delta-4 desaturase 등 총 11종의 desaturase, elongase 유전자를 보유하는 것으로 나타난 반면 A 균주에서는 단지 4종의 desaturase, elongase 유전자가 발견되었음. 이러한 결과는 2종류의 Thraustochytrid 미세조류에서 서로 다른 다중불포화지방산 생합성 대사가 작동하고 있음을 시사함.

(1) PuFA synthase

- Shewanella, Moritella, Photobacterium속 해양 박테리아와 Thraustochytrid 미세조류 등에서 EPA 혹은 DHA의 생합성을 촉매하는 PKS-like PuFA synthase 들이 알려져 있음 (그림). 해양 박테리아의 PuFA synthase는 염색상에서 4개의 인접한 ORF에 의해 코딩되는 단백질에 다중불포화지방산 생합성을 촉매하는 기능성 도메인들이 분산되어 있음. 예로 Shewanella속의 PKS-like EPA synthase는 PfaA(multi-domain β -ketoacyl synthase: KS-MAT-ACPs-KR), PfaB (acyl transferase: AT), PfaC (multi-domain β -ketoacyl synthase: KS-CLF-DH-DH), PfaD (enoyl reductase: ER), PfaE (phosphopentetheine transferase: PPTase)로 구성된 복합 단백질 구조임. 한편 Thraustochytrid 미세조류는 3개의 인접한 ORF에 multiple domain이 분산되어 있는데, 본 연구에서 분석한 2종의 Thraustochytrid 미세조류의 유전체 정보에서도 마찬가지로의 PuFA synthase 유전자들이 발견되었음.



다중불포화지방산 생합성 PKS-like PuFA synthase

본 연구에 사용된 Thraustochytrid 미세조류 균주의 PuFA synthase 유전자

효소	A strain	T strain
Polyunsaturated fatty acid synthase subunit A (pfaA)	KRS_SC20CG00460	T.SH4_SC9CG00020
Polyunsaturated fatty acid synthase subunit B (pfaB)	KRS_SC20CG00450	T.SH4_SC9CG00010
Polyunsaturated fatty acid synthase subunit C (pfaC)	KRS_SC72CG00190	T.SH4_SC31CG00670

- Thraustochytrid A 균주와 T 균주의 PuFA synthase 유전자의 상동성을 분석한 결과, 2 종간에 상동성은 그다지 높지 않은 것으로 나타났으며, pfaB 유전자의 PCR 증폭 실험 결과에서도 두 균주에서 상당히 다른 결과를 보이는 것으로 나타났음.

```

[ GENETYX-WIN : Nucleotide Sequence Homology Data ]
Date : 2013.03.06

1st Nucleotide Sequence
File Name : contig00920_CH4_pufaB_net_complementary_ORF_OK
Sequence Size : 6147

2nd Nucleotide Sequence
File Name : contig206496_orf34_5382bp_PUFAB_A.KRS
Sequence Size : 5385

Unit Size to Compare = 6
Pick up Location = 1

[68.606% / 5431 bp] INT/OPT.Score : < 3728/ 10814 >

721' ATGCCCGTCGGCACGGGCCAGAACGTGTCCATGCCGCTGCACAAGGACAGCCAGGGCCTC
          * * * * *
1"          ATGCCTGTATCGGGAGACGGCATCTC

781' ACCCCGGGTGAGGGCGGCTCCATCATGGTCTCAAGCGTCTCGACGAT---GCCATCCGC
          * * * * *
27" GTACCCGCTTCACAAGG-ACAGTCAAGGT-CTCACCCCTGGTGAAGTGGTGCCATTATG

838' GACGGCGACCACATCTACGGCACCCCTTCTC---GGCG-CCA-ATGTCAGCAACTCCGGTA
          * * * * *
85" GTTCTCAAGCGCCTTGACGACGCTATTTCGCGATGGAGACCACATTTACGGTACTCTGCT-

893' CAGGTCTGCC-TC-TCAA-----GC-CCCTTCTCCCCAGCGAGAAAAAGTGCCTCATGGA
          * * * * *
144" CGGTGCTACCATCAGCAATGCTGGCTGTGGTCTTCCCCTCAAGCCGCACTTGCCACGGA

945' TACTTACACGGCGA-TCA-ACGTGCACCCGC-ACAAGATTTCAGTACGTCGAGTGCCA---
          * * * * *
204" GAAGTCTGCCTCATTGATACCTACAAGCGCGTCAACGTGCACCCGCACAAGATCCAGTA

999' CG-CCACCCGACGCCCCAGGGCGATCGTGTGAAATCGACGCCGTC AAGGCCCTGCTTTG
          * * * * *
264" CGTCGAGTGCCACGCAAC-GGGTACTCCCCAGGGAGACCCGCTTGAGATTG-ATGCCGTC

1058' AAGGCAAGGTCCCCCGTTTCGG--CACCACAAAGG--GCAACTTTGGACACACCCTCGTC
          * * * * *
322" AAGGCTTGCTTCGAGGCCAAGGTGCCTCGCTTTGGAAGCTCCAAGGGTAACTTTGGCCAC

1114' GCAGCCGGCTTTGCTGGTAT---GTGCAAGGTCTCTCT-CTCCATGAAGCATGGCATCAT
          * * * * *
382" AACTCTGTTGCACTGGTTTCGCAAGGCATGTGCAAGGTACTCTCTGCCATGAAGCATGGT

1170' CCCGCCACCCCGGGTATCGATGACGA--GACCAAGATGGACCTCTTG-TCGTCTCCGG
          * * * * *
442" -GTGATCCCGCCACTCCTGGTGTGATGATCTTCCCAAATGGACCCGCTTGTGGTCTC

1227' TGAGGCCATCCCATGGCCAGAGACCAACGGCGAGCCCAAGCGCGCGGTCTCTCGGCCTT
          * * * * *
501" TGAGCCATCCCATGGCCCGACACTGAGGGCGAGCCCAAGCGCGCTGGTCTCTCGGCCTT

```

Thraustochytrid 미세조류 A, T 균주 유래 pfaB 유전자의 상동성 비교

(2) Desaturase-elongase pathway

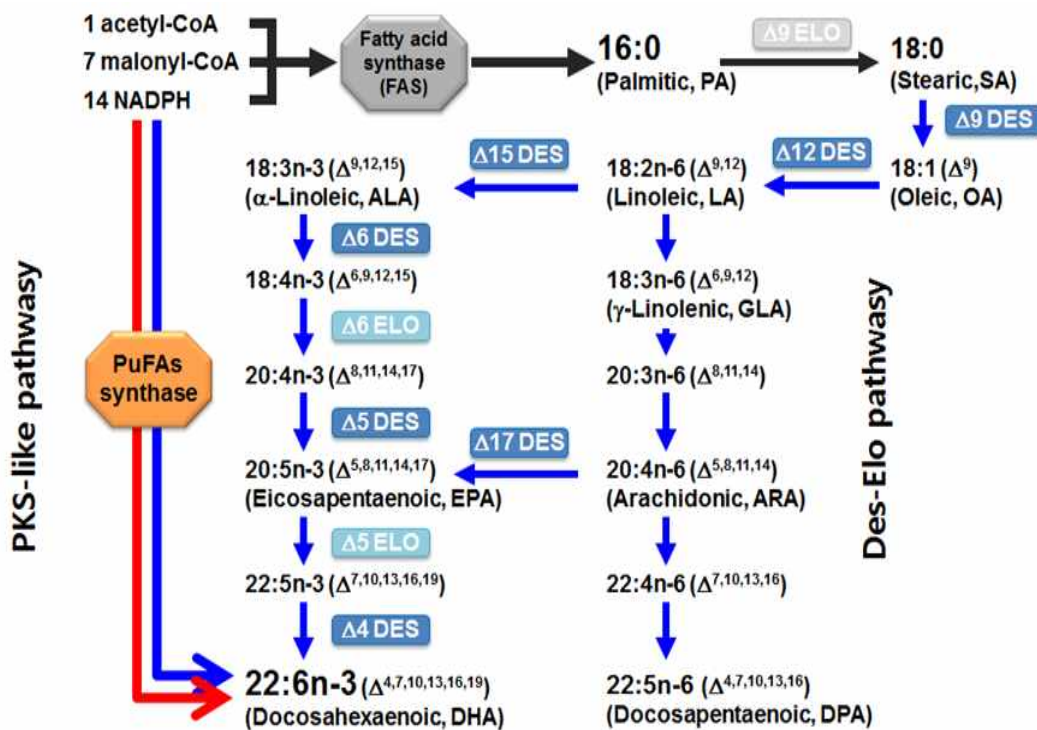
- 전형적인 지방산 생합성 효소인 typeI fatty acid synthase에 의해 합성된 팔미트산(C16:0)은 일련의 desaturase와 elongase의 반복 작용에 의해 EPA와 DHA 등 다양한 다중불포화 지방산으로 전환됨. Thraustochytrid A 균주의 유전체 분석에서 몇 종의 desaturase, elongase 유전자들이 발견되었음. A 균주에서 316개의 아미노산으로 구성된 stearoyl CoA delta-9 desaturase, 533 amino acid로 구성된 delta-6 desaturase, 300개 amino acid로 구성된 delta-5 desaturase, 444 amino acid로 구성된 delta-6 desaturase 유전자가 발견되었음. 또한 403 amino acid로 구성된 elongase 유전자가 발견되었음. 하지만, A 균주에서는 desaturase-elongase pathway에서 중요한 역할을 하는 올레익산(C18:1)을 리노레익산(C18:2)로 전환하는 delta-12 desaturase 유전자는 존재하지 않는 것으로 확인되었음. 이는 Thraustochytrid A 균주에서 DHA 등 다중불포화지방산의 생합성을 위해 PuFA synthase

가 중요한 역할을 함을 시사함.

- 한편, Thraustochytrid T 균주에서는 delta-12, delta-6, delta-5, delta-4 desaturase를 비롯하여 총 11종의 desaturase, elongase 유전자가 발견되었음. 이는 A 균주와 달리 T 균주에서는 desaturase-elongase pathway 또한 다중불포화지방산의 생합성에 관여함을 시사함.

Thraustochytrid 미세조류의 desaturase, elongase 유전자

효소	A strain	T strain
$\Delta 12$ desaturase	N/D	T.SH4_SC8CG03640
$\Delta 5$ desaturase	N/D	T.SH4_SC3CG03680
$\Delta 6$ desaturase	KRS_SC11CG00990	T.SH4_SC9CG0318
$\Delta 4$ desaturase	KRS_SC5CG02620	T.SH4_SC7CG00320
$\Delta 9$ elongase	KRS_SC1CG02650	T.SH4_SC10CG01690
$\Delta 6$ elongase	KRS_SC1CG02650	T.SH4_SC10CG01690
$\Delta 5$ elongase	N/D	T.SH4_SC5CG03150



Thraustochytrid 미세조류의 다중불포화지방산 생합성 대사회로

(A strain: 빨간색, Tstrain: 파란색)

2. 전사체 분석

- HiSeq 방법으로 Expressed Sequences Tag (EST) 분석을 통한 Thraustochytrid 미세조류의 유전자 발현을 분석하였음. 실험 결과, NGS blast hits 유전자 수와 거의 일치하는 약 10,900 개의 assembled transcripts 유전자를 확보하였음. Actin A, superoxide dismutase, polyubiquitin 등의 고발현 유전자들이 확인되었으며, 이는 고효율 형질전환시스템 개발에 활용되고 있음. 이외에도 house keeping 유전자인 alpha-Tubulin 등과 다중불포화지방산 합성 효소인 pfa 유전자도 효과적으로 활용될 수 있을 것으로 기대됨.

Expression level	Description	Accession
1	hypothetical protein MELLADRAFT_84525 [Melampsora larici-populina 98AG31]	EGF97697.1
2	hypothetical protein BRAFLDRAFT_59444 [Branchiostoma floridae]	XP_002609012.1
3	actin A [Peronospora viciae]	P26182.1
4	phosphatidylinositol kinase putative [Albugo laibachii Nc14]	CCA25557.1
5	oxidoreductase, short chain dehydrogenase/reductase family [Alcanivorax sp. DG881]	ZP_05042616.1
6	superoxide dismutase [Phytophthora sojae]	EGZ27871.1
7	hypothetical protein BATDEDRAFT_35572 [Batrachochytrium dendrobatidis JAM81]	EGF79103.1
8	predicted protein [Hordeum vulgare subsp. vulgare]	BAK02263.1
9	hypothetical protein AURANDRAFT_23053 [Aureococcus anophagefferens]	EGB10172.1
10	cell wall-associated hydrolase [Burkholderia multivorans ATCC 17616]	BAG46932.1
11	hypothetical protein CHLNCDRAFT_56419 [Chlorella variabilis]	EFN50816.1
12	hypothetical protein HMPREF9553_00243 [Escherichia coli MS 200-1]	ZP_07172160.1
13	heat shock 70 kDa protein [Phytophthora infestans T30-4]	XP_002902008.1
14	polyubiquitin [Aureococcus anophagefferens]	EGB08038.1
15	hypothetical protein Pmar_PMAR005409 [Perkinsus marinus ATCC 50983]	XP_002786669.1
16	ADP-ribosylation factor 2 [Haliotis discus discus]	ABO26676.1
17	hypothetical protein DICPUDRAFT_148247 [Dictyostelium purpureum]	XP_003284477.1
18	YALI0E13277p [Yarrowia lipolytica]	XP_503895.1
19	MC family transporter: phosphate [Ostreococcus lucimarinus CCE9901]	XP_001422245.1
20	Formate dehydrogenase [Methylobacter tundripaludum SV96]	ZP_08779344.1

Expressed Sequences Tag 분석을 통해 확인된 Thraustochytrid 미세조류의 고발현 유전자

- 각각 2일째와 4일째의 배양 균체로부터 total RNA를 추출하여 전사체를 분석하여 균체 증식 시기에 따른 유전자의 발현을 조사하였으며, RPKM (Read Per Kilobase per Million mapped reads)에 의해 유전자 발현 정도를 정량화 하였음.
- RPKM 값으로 보았을 때 예상대로 상시 발현되는 유전자는 actin, superoxide dismutase (SOD), heat shock protein (HSP)와 같은 일반적으로 알려져 있는 house keeping gene과 기본에너지대사와 관련된 pyruvate dehydrogenase, succinyltransferase, malate

dehydrogenase 같은 TCA cycle에 관련된 효소와 phosphoglycerate kinase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)같은 glycolysis에 관여하는 효소 들 인 것으로 확인되었음. 한편, fatty acid elongase, acetyl-Coenzyme A acyltransferase, Dihydroceramide delta(4)-desaturase-like protein 같은 lipid metabolism에 관여하는 단백질 도 대표적인 지질 고생산 균주의 특징으로 상시 발현되는 것을 확인할 수 있었음.

- 지질생산균주의 특징으로 상시 발현되는 것을 확인할 수 있음.

Thraustochytrid 미세조류에서 상시 고발현되는 유전자

Scaffold	Query			RPKM		Subject Protein	Accession No.	Score	Identity (%)
	Start	End	Length	2 Day	4 Day				
scaffold00006	217772	217999	228	30317	21239	actin A [Peronospora viciae]	P26182.1	8E-23	96
scaffold00016	146441	147459	1019	10611	6447	superoxide dismutase [Phytophthora sojae]	EGZ27871.1	2E-74	60
scaffold00067	146728	148842	2115	7144.6	10043	heat shock 70 kDa protein [Phytophthora infestans T30-4]	XP_002902008.1	0E+00	78
scaffold00073	104215	104868	654	7071.4	6545	polyubiquitin [Aureococcus anophagefferens]	EG808038.1	8E-80	96
scaffold00001	666208	670122	3915	5083	5191	inositol oxygenase [Phytophthora infestans T30-4]	XP_002997810.1	1E-94	65
scaffold00017	348078	350397	2320	2766.1	10862	AF308587_cytosolic aldolase [Fragaria x ananassa]	AAG21429.1	3E-110	60
scaffold00114	79901	82003	2103	2412.3	837.3	Sulfatase, family S1-15 [Zobellia galactanivorans]	YP_0047337882.1	8E-88	40
scaffold00015	243536	244875	1340	2118.5	10512	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, type I [Clostridium papyrosolvens DSM 2782]	ZP_08391206.1	6E-106	68
scaffold00007	230136	231701	1566	1821.9	730.9	acetyl-Coenzyme A acyltransferase 1 [Gallus gallus]	NP_001184217.1	7E-109	57
scaffold00115	18154	20487	2334	1344.7	2902	Malate dehydrogenase [Aeromonas veronii B565]	YP_004393585.1	3E-146	49
scaffold00154	125229	127400	2172	1304.9	6085	pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha [Phytophthora infestans T30-4]	XP_002906352.1	2E-121	58
scaffold00001	790074	792216	2143	1101.4	6596	choline/Carnitine O-acyltransferase, putative [Phytophthora infestans T30-4]	XP_002999784.1	5E-106	38
scaffold00105	150218	156292	6075	942.7	2311	methionine synthase, vitamin-B12 independent [Pseudonocardia sp. P1]	ZP_08122201.1	1E-65	40
scaffold00047	219326	222137	2812	873.6	2040	fatty acid desaturase [Glomerella graminicola M1.001]	EFQ32326.1	4E-26	50
scaffold00012	463000	465429	2430	832.3	1763	Cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase, putative [Perkinsus marinus ATCC 50983]	XP_002783517.1	7E-113	47
scaffold00005	414427	418272	3846	827	2665	cytochrome P450 [Phaeodactylum tricornutum CCAP 1055/1]	XP_002178830.1	3E-54	31
scaffold00367	23	2792	2770	733.4	1832	kinase domain-containing protein [Naegleria gruberi]	XP_002682147.1	3E-15	28
scaffold00365	5176	6604	1429	692.1	1249	elongation of very long chain fatty acids protein, putative [Phytophthora infestans T30-4]	XP_002908079.1	5E-61	47
scaffold00085	161321	163217	1897	641.7	5263	Phosphoglycerate kinase [Phytophthora infestans]	P24590.2	3E-144	64
scaffold00002	771301	772715	1415	575.9	1021	succinate, putative [Ichthyophthirius multifiliis]	EGR34326.1	2E-31	38
scaffold00095	62348	64472	2125	563.3	1138	dihydroliipoamide S-succinyltransferase [Dictyostelium discoideum AX4]	XP_643853.1	3E-94	52

- 한편, 균체 증식 초기에는 발현이 활발하지만, 증식 후기에는 발현량이 급격히 감소하는 유전자로는 lipase, esterase, lipolytic enzyme 등 lipid hydrolysis에 관여하는 유전자들이 확인되었는데, 이는 증식 후기의 지질 축적 대사와 관련이 있는 것으로 사료됨. ATP synthase, malate dehydrogenase 등 에너지 생성 대사 관여하는 효소의 유전자들의 발현이 배양 후기에 감소하는 것으로 나타났는데 이는 균체의 증식이 멈추는 것과 일치하는 결과로 사료됨.

Thraustochytrid 미세조류의 증식 초기에 고발현되는 유전자

Query				RPKM		Subject			Score	Identity (%)
Scaffold	Start	End	Length	2 Day	4 Day	Protein	Accession No.			
scaffold00002	589832	591370	1539	4026.8	0	malate dehydrogenase putative [Albugo laibachii Nc14]	CCA26568.1	9E-86	59	
scaffold00359	5126	5437	312	1559.8	64.6	ATP synthase F0 subunit 9 [Thraustochytrium aureum]	AAG23688.1	1E-19	98	
scaffold00024	285503	287865	2363	1556.3	494.1	glycerol kinase [Anaerolinea thermophila UNI-1]	YP_004175387.1	2E-168	58	
scaffold00010	349837	352089	2253	817	236.6	long chain fatty acid CoA ligase [Congregibacter litoralis KT71]	ZP_01103373.1	2E-110	41	
scaffold00207	18441	20902	2462	816.3	327	fatty oxidation complex, alpha subunit [Oceanicaulis alexandrii HTCC2633]	ZP_00952840.1	7E-152	45	
scaffold00214	83288	84601	1314	760.7	230.2	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase [Polysphondylium pallidum PN500]	EFA76563.1	2E-96	56	
scaffold00054	66517	68598	2082	419.5	20.3	DAHP synthase [Phytophthora infestans T30-4]	XP_002908379.1	1E-116	57	
scaffold00010	362059	364090	2032	386.6	0	AMP-dependent synthetase and ligase [Parvibaculum lavamentivorans DS-1]	YP_001411838.1	2E-104	39	
scaffold00038	84687	86126	1440	368.7	3.7	alpha/beta hydrolase fold domain protein [marine gamma proteobacterium HTCC2148]	ZP_05098243.1	1E-56	40	
scaffold00026	336737	337931	1195	325.5	2.8	Peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase [Danio rerio]	NP_001017227.1	1E-60	53	
scaffold00350	10629	10817	189	317.9	192	acetyl-CoA acetyltransferase [marine gamma proteobacterium HTCC2143]	ZP_01615077.1	1E-16	87	
scaffold00005	48097	49928	1832	248.8	29.3	Chaperone protein dnaJ [Thermobacillus composti KWC4]	ZP_08917149.1	2E-12	52	
scaffold00247	70390	73635	3246	238.8	404	acyl-CoA synthetase [Salpingoeca sp. ATCC 50818]	EGD75308.1	2E-112	36	
scaffold00170	78280	79656	1377	214.9	1	Non-specific lipid-transfer protein [Camponotus floridanus]	EFN74399.1	7E-113	54	
scaffold00006	302387	305230	2844	178.2	2.4	N-acetylgalactosamine 6-sulfate sulfatase (GALNS) [Rhodopirellula baltica SH 1]	NP_869796.1	9E-53	31	
scaffold00010	368456	370424	1969	167.8	20.8	long-chain-fatty-acid--CoA ligase [gamma proteobacterium NOR5-3]	ZP_05128699.1	1E-108	41	
scaffold00027	213167	216281	3115	150.2	53.3	glycerol-3-phosphate acyltransferase, putative [Phytophthora infestans T30-4]	XP_002900356.1	1E-48	40	
scaffold00002	29577	31809	2233	86.4	0	triacylglycerol lipase [Clostridium botulinum D str. 1873]	ZP_04861759.1	1E-50	38	
scaffold00038	87205	88368	1164	76.1	4.6	possible esterase [marine gamma proteobacterium HTCC2143]	ZP_01615160.1	2E-51	42	

- Type I fatty acid synthase, PuFA synthase, malic enzyme 등 지질 생합성 대사에 관여하는 대부분의 유전자들은 배양 후기에 발현이 증가하는 것으로 나타났음. 이는 Thraustochytrid 미세조류의 균체 증식 후기에 활발한 지질 생성과 일치하는 결과, 확인된 유전자들이 지질 생합성 대사에 관여하는 효소임을 시사하는 결과임.

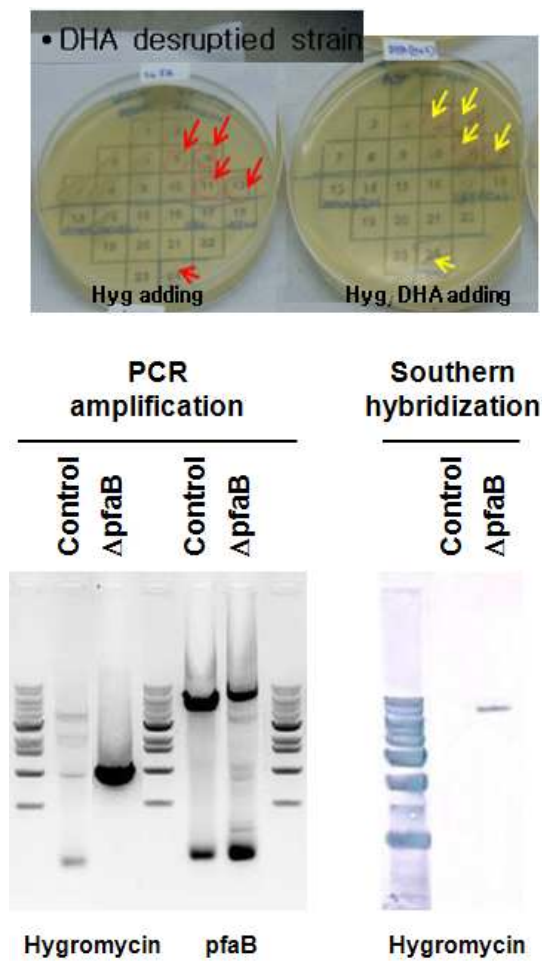
Thraustochytrid 미세조류의 증식 후기에 고발현되는 유전자

Query				RPKM		Subject			Score	Identity (%)
Scaffold	Start	End	Length	2 Day	4 Day	Protein	Accession No.			
scaffold00138	24865	29328	4464	468.2	7391	type I fatty acid synthase [Schizochytrium sp. ATCC 20888]	ABJ98780.1	0	81	
scaffold00023	147089	147904	816	361.7	1014	pyridoxamine 5'-phosphate oxidase [Dyadobacter fermentans DSM 18053]	YP_003084985.1	6E-53	55	
scaffold00112	63131	65383	2253	351.7	2296	biotin synthase [Ectocarpus siliculosus]	CBN74306.1	4E-135	67	
scaffold00174	97506	105742	8237	304.3	10195	acetyl-CoA carboxylase, putative [Phytophthora infestans T30-4]	XP_002997355.1	0	42	
scaffold00229	32210	34493	2284	251.5	1860	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase [Euphorbia pekinensis]	ABK56831.1	5E-94	52	
scaffold00237	45324	47709	2386	244.2	482.2	squalene synthase [Aurantiochytrium limacinum]	ABE97915.1	0	98	
scaffold00051	47681	55193	7513	188.1	1697	malic enzyme [Aedes aegypti]	XP_001651437.1	5E-142	52	
scaffold00138	29879	38294	8416	141.6	2549	type I fatty acid synthase [Schizochytrium sp. ATCC 20888]	ABJ98780.1	0	73	
scaffold00055	3	2680	2678	93.4	18263	polyunsaturated fatty acid synthase subunit A [Schizochytrium sp. ATCC 20888]	AAK72879.2	0	79	
scaffold00179	94239	100776	6538	58	5323	polyunsaturated fatty acid synthase subunit C [Schizochytrium sp. ATCC 20888]	AAK72881.2	0	80	
scaffold00300	1	3671	3671	39.3	4824	polyunsaturated fatty acid synthase subunit A [Schizochytrium sp. ATCC 20888]	AAK72879.2	0	84	

3. 지질 생합성 효소 기능 분석

(1) PuFA synthase

- Thraustochytrid 미세조류 PuFA synthase의 기능을 분석하기 위해 유전자 결손 변이균주를 제작하여 그 특성을 분석하였음. pfaB 유전자의 중간에 hygromycin 저항성 유전자를 삽입한 DNA cassette를 제작하여, 전기충격법으로 도입한 후 hygromycin이 함유된 배지에서 변이균주를 선별하였음.

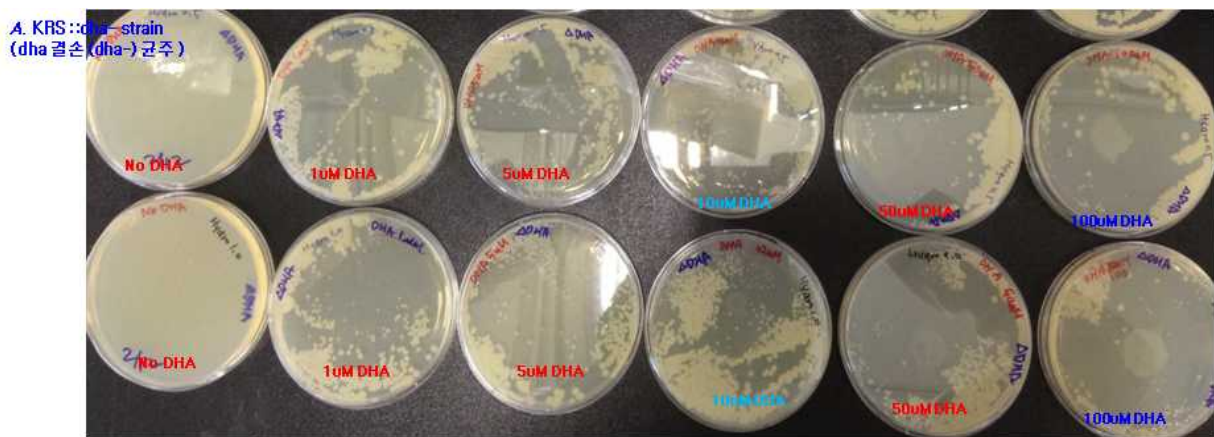


Thraustochytrid 미세조류 pfaB 변이균주의 제작

- 분리된 pfaB 변이균주의 특성을 분석한 결과, 흥미롭게도 pfaB 유전자가 결손 변이균주는 몇 세대 계대한 이후에 DHA auxotroph이 되는 것으로 나타났음. DHA를 함유하는 배지에서는 변이균주의 성장이 가능하였지만, DHA가 함유되지 않은 배지에서는 균체 성장이 이루어지지 않는

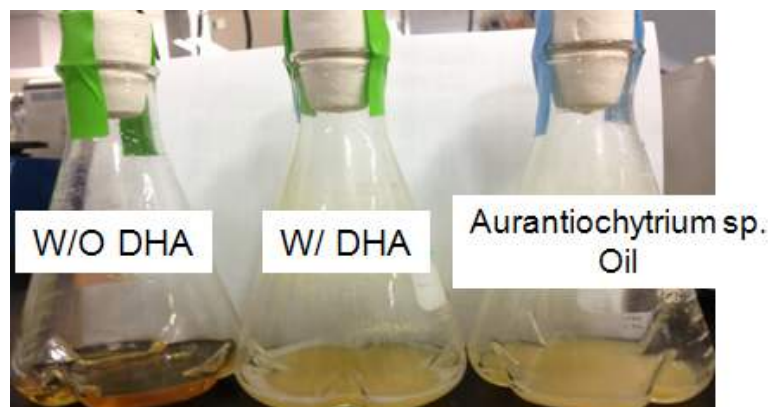
것으로 나타났다. DHA의 농도에 따른 변이균주의 균체 증식을 조사한 결과, 100 μM 이상의 농도에서는 균체 증식이 다소 감소하는 것으로 나타났다.

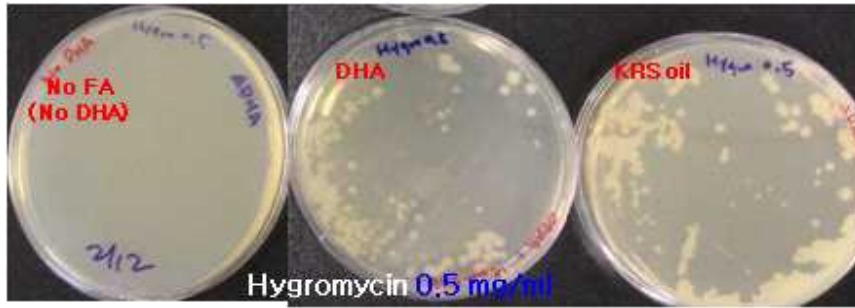
DHA (μM)	Control	ΔpfaB
0	27.2	0.3
5	25.5	26.7
10	22.0	28.3
50	21.3	23.3
100	22.2	16.4
200	21.2	17.3



Thraustochytrid 미세조류 pfaB 결손 변이균주의 DHA auxotroph 특성

- pfaB 결손 변이균주의 균체 성장은 야생균주로부터 추출한 DHA 함유 오일을 공급해주었을 때에도 회복이 되는 것으로 밝혀졌음. 현재로서는 Thraustochytrid 미세조류의 균체증식을 위해 필수적인 DHA의 생리적 기능을 알 수는 없지만, pfaB에 의해 코딩되는 PuFA synthase가 Thraustochytrid 미세조류에서 DHA의 생성에 중요한 역할을 함을 시사함.





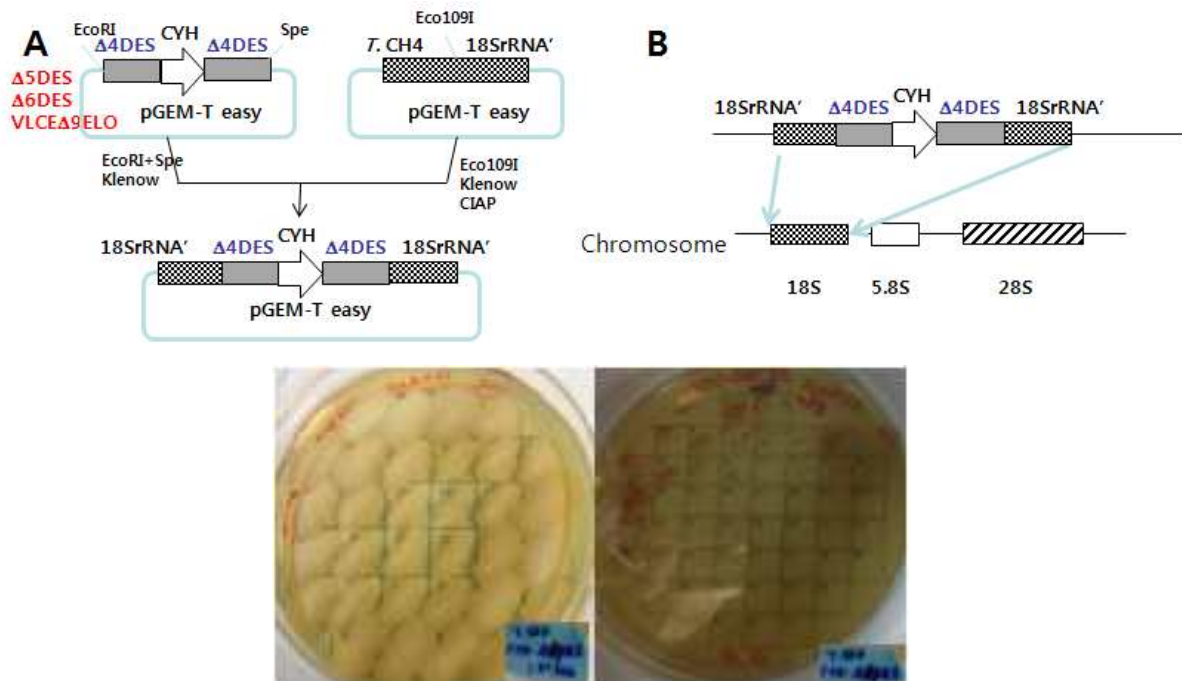
Thraustochytrid 오일 첨가에 의한 pfaB 결손 변이균주의 증식 회복

(2) Desaturase, elongase

- Thraustochytrid 미세조류에서 발견된 desaturase, elongase 유전자들의 발현 혹은 결손을 통해 각 효소들의 기능을 분석하였음.

Delta-4 desaturase

- 그림에서 보인 바와 같은 방법으로 delta-4 desaturase 유전자를 결손시킨 변이균주를 제작하였음.



Delta-4 desaturase 유전자 결손

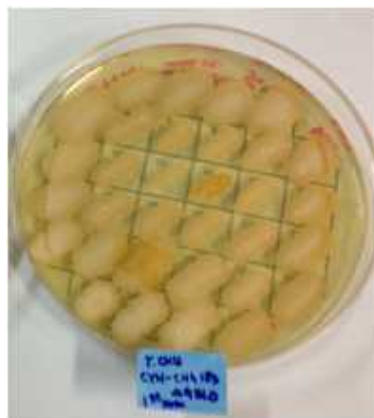
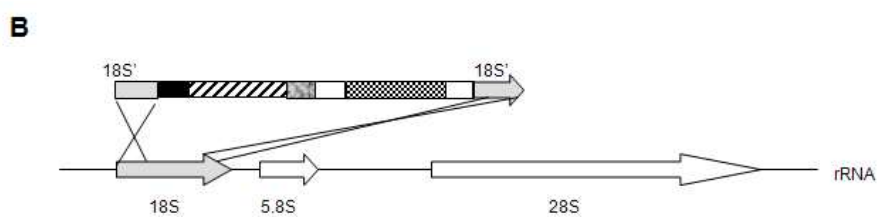
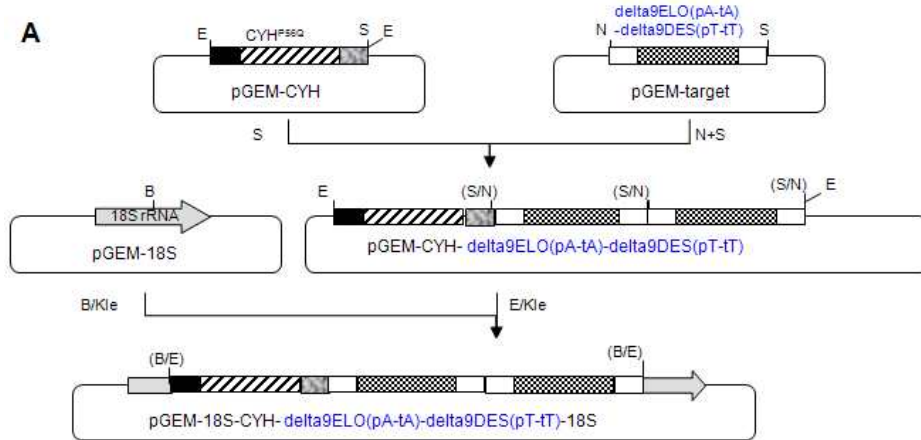
- 제작된 delta-4 desaturase 결손 변이균주의 지방산 조성을 분석한 결과, 야생균주와 비교해 팔미트산(C16:0)의 함량은 감소하고, 스테아릭산(C18:0)의 함량이 증가하는 것으로 나타났음. 아미노산 서열의 상동성 분석결과, 결손된 delta-4 desaturase가 delta-15 desaturase와도 64%의 높은 상동성을 보여 미세조류 세포내에서 실제의 기능은 리놀레익산(C18:2)를 알파리놀레익산(C18:3)으로 전환하는 기능을 하는 것으로 예측되며, 이는 결손 변이균주에서 스테아릭산의 함량이 증가하고, 알파리놀레익산 이후의 지방산 함량이 감소한 것과 연관성이 있는 것으로 사료됨.

Delta-4 desaturase 변이균주의 지방산 성분 분석

strain	7.196	8.618	10.138	11.55	12.981	16.179	16.277	18.527	18.638
	15:0			16:0	18:0	20:5		22:5	22:6
Control	1.620	5.387	20.744	16.725	4.749	1.488	4.596	12.191	31.140
1	5.406	2.370	65.596	4.596	10.086		1.270	2.533	6.739
2	4.619	3.832	59.443	9.088	10.046		0.972	3.375	7.008
3	5.461	3.357	59.248	10.209	10.529		0.608	2.824	5.393
4	5.174	1.444	50.146	3.697	9.517	1.003	2.852	7.276	15.133
	증가	감소	증가	감소	증가	감소	감소	감소	감소

Delta-9 elongase, delta-9 desaturase

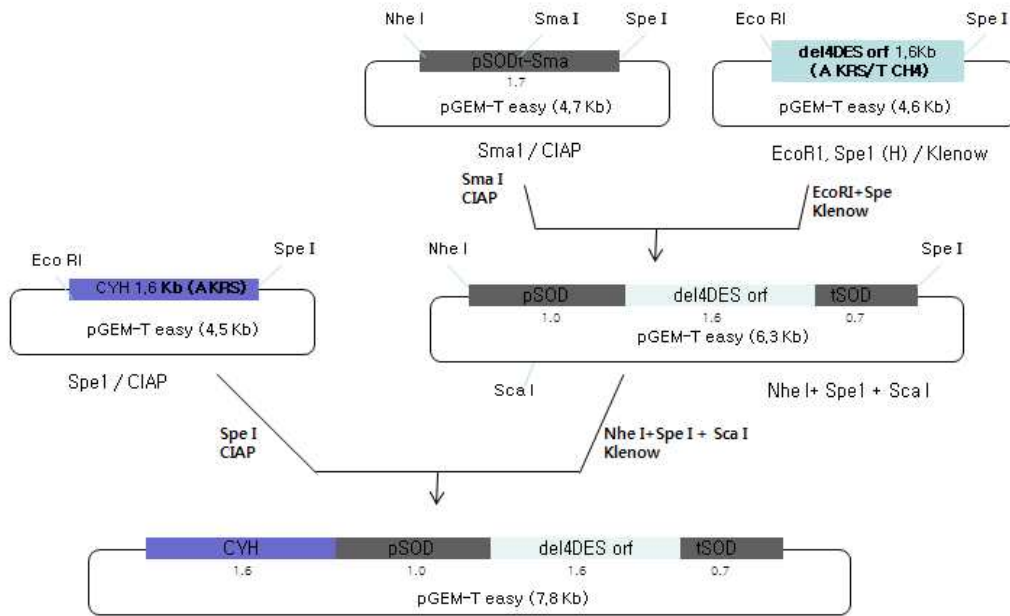
- 추가적으로 Δ9 desaturase, Δ9 elongase 상동성 유전자 발현 플라스미드를 제작하여 도입한 형질 전환 균주를 제작하였음. 선발된 형질전환 균주의 지방산 조성을 분석한 결과, stearic acid (18:0) 이후의 지방산이 증가하는 것으로 나타나 세포내에서 palmitic acid (16:0)를 stearic acid (18:0)로, steric acid를 oleic acid (18:1)로 전환하는 기능을 하는 것으로 사료됨.



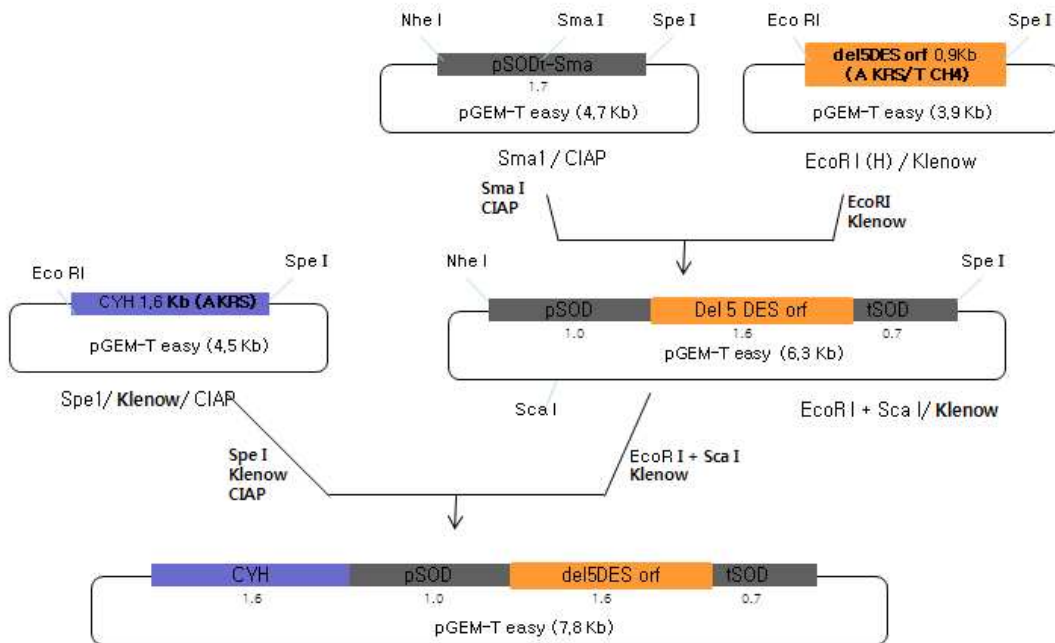
Delta-9 elongase, delta-9 desaturase 유전자 발현

strain	7.196	8.618	10.138	11.55	12.981	16.179	16.277	18.527	18.638
			15:0	16:0	18:0		20:5	22:5	22:6
Control	1.620	5.387	20.744	16.725	4.749	1.488	4.596	12.191	31.140
1	-	4.374	14.518	17.645	4.583	2.107	5.637	14.937	36.198
			감소			증가	증가	증가	증가

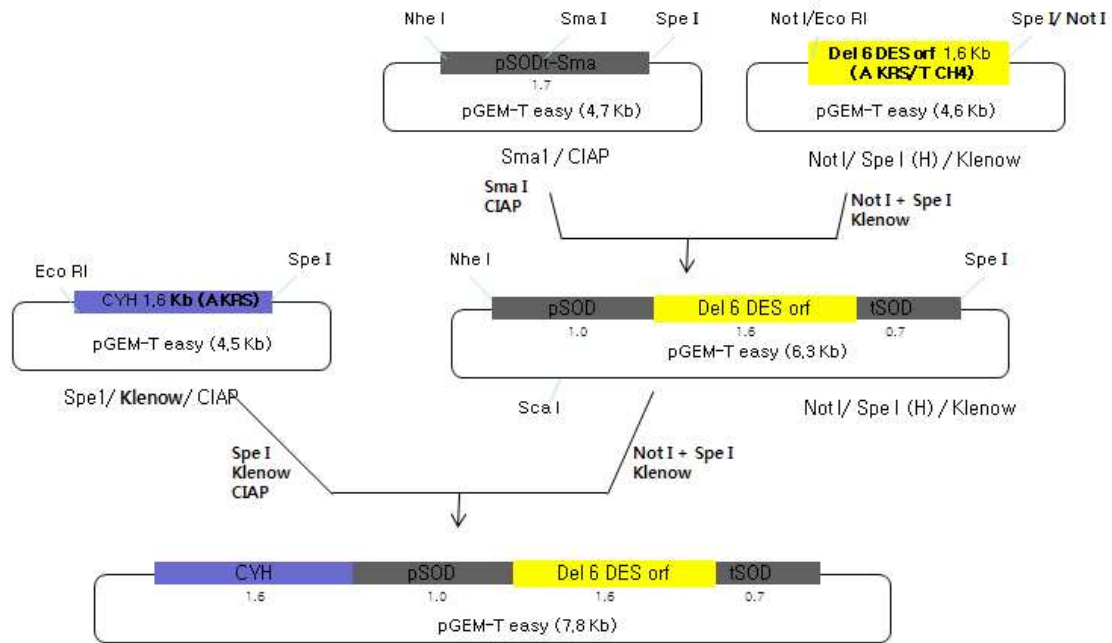
- 마찬가지로 다양한 desaturase, elongase 유전자들의 결손 혹은 발현 균주를 제작하여 지방산 분석을 통한 효소 기능을 분석하였음.



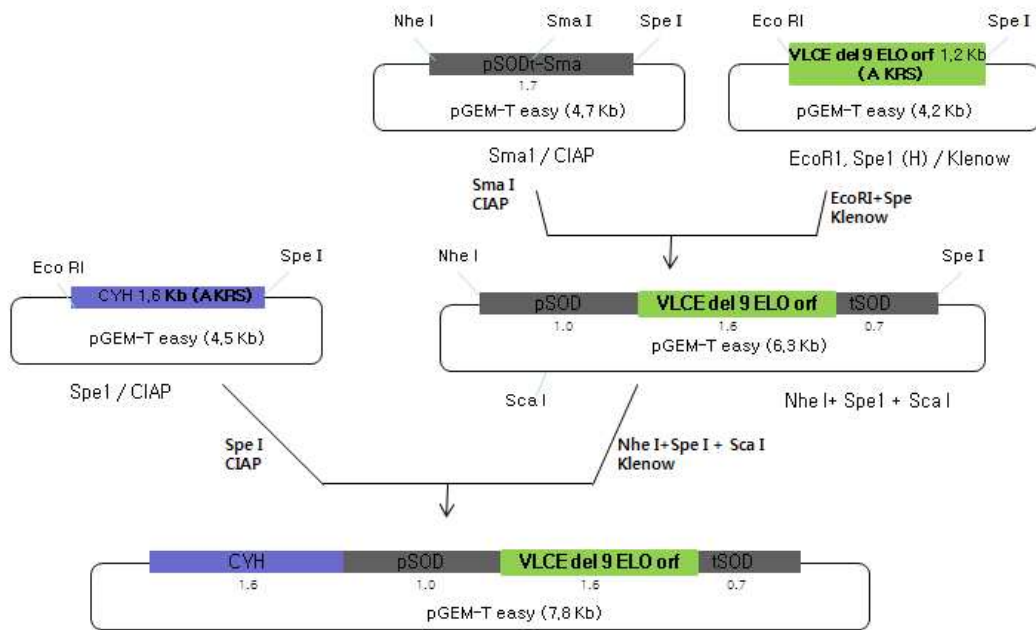
delta-4 desaturase 유전자 발현



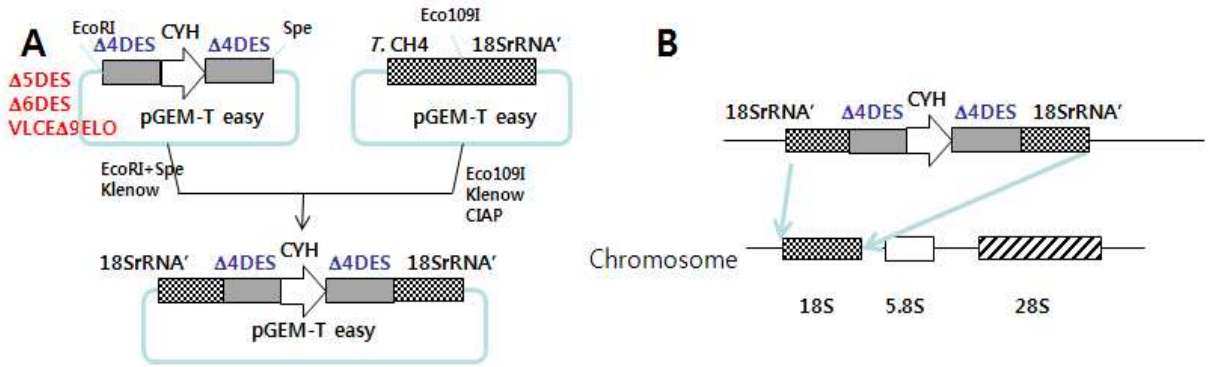
delta-5 desaturase 유전자 발현



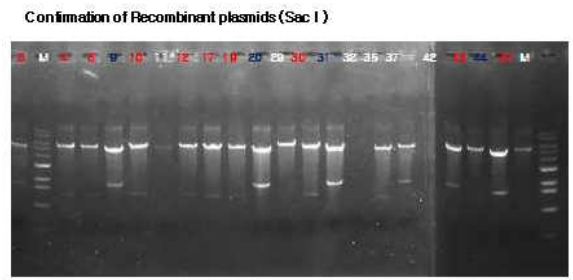
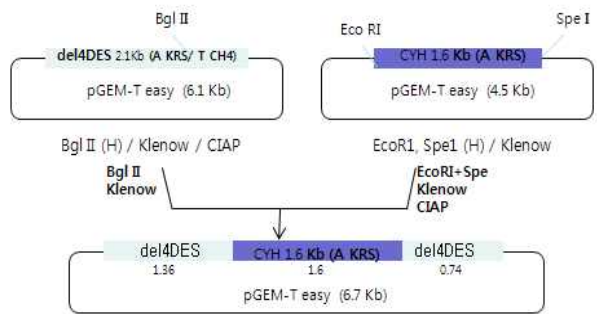
delta-6 desaturase 유전자 발현



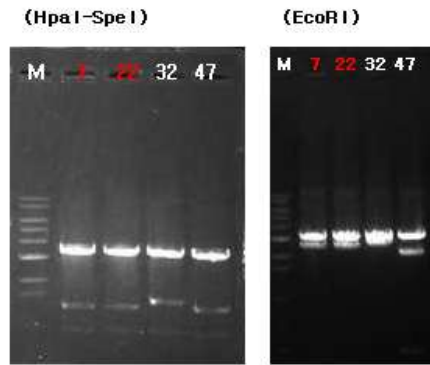
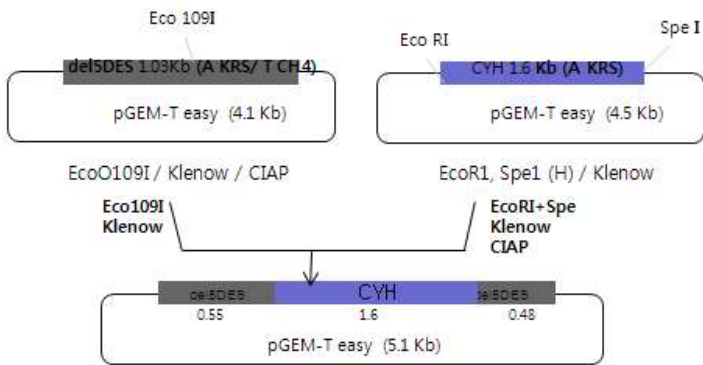
delta-9 desaturase 유전자 발현



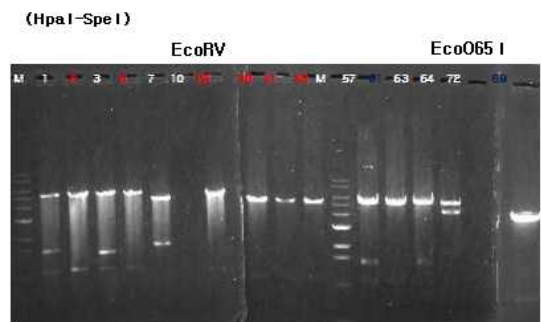
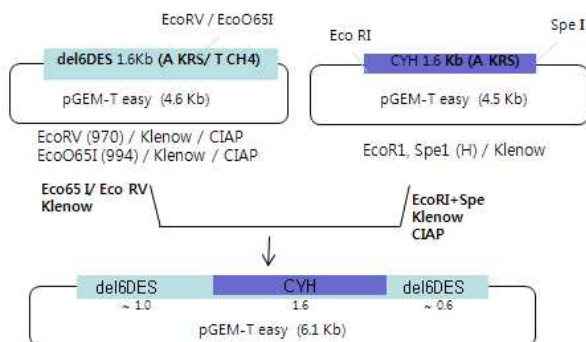
Desaturase, elongase 유전자 결손



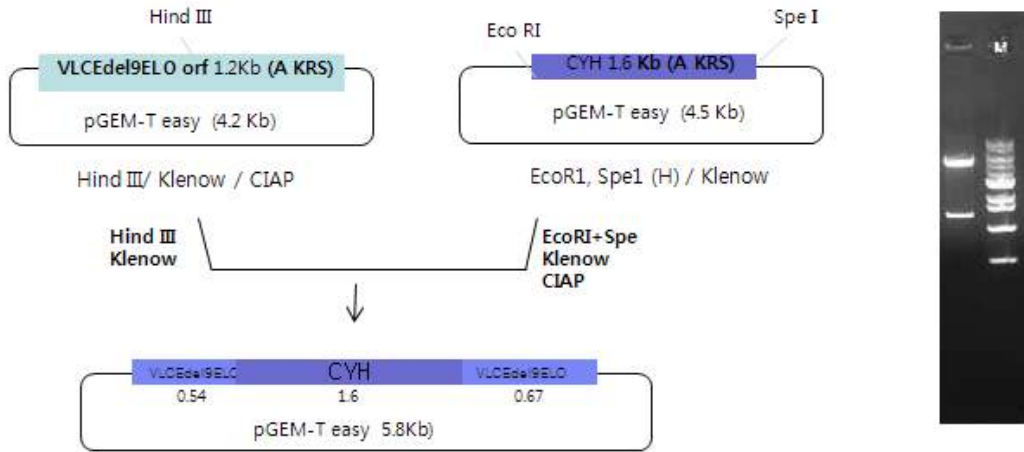
delta-4 desaturase 유전자 결손



delta-5 desaturase 유전자 결손



delta-6 desaturase 유전자 결손



delta-6 desaturase 유전자 결손

오메가-3 지방산 합성 desaturase, elongase 효소

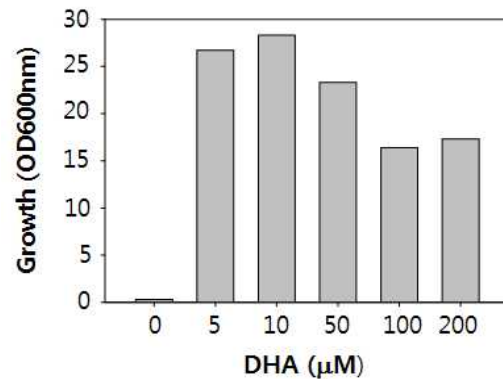
Gene	Catalysis
delta 9 elongase	16:0 → 18:0
delta 9 desaturase	18:0 → 18:1(n-9)
delta 12 desaturase	18:1(n-9) → 18:2(n-6)
delta 15 desaturase	18:2(n-6) → 18:3(n-3)
delta 6 desaturase	18:2(n-6) → 18:3(n-6) 18:3(n-3) → 18:4(n-3)
delta 6 elongase	18:3(n-6) → 20:3(n-6) 18:4(n-3) → 20:4(n-3)
delta 5 desaturase	20:3(n-6) → 20:4(n-6) 20:4(n-3) → 20:5(n-3) EPA
delta 5 elongase	20:4(n-6) → 22:4(n-6) 20:5(n-3) → 22:5(n-3)
delta 4 desaturase	22:4(n-6) → 22:5(n-6) 22:5(n-3) → 22:6(n-3) DHA

제 2 절 EPA 함량 증진 균주 개발

1. 유전공학을 통한 다중불포화지방산 생합성 대사 촉진

(1) DHA 특이적 PuFA synthase 유전자의 결손

- Aurantiochytrium속 유기영양 미세조류에서 오메가-3 지방산은 PKS(polyketide synthase)-like PuFA synthase의 작용에 의해 합성됨. PuFA synthase는 pfaA, pfaB, pfaC 유전자가 코드하는 세 단백질로 구성된 복합체로 작용하는 것으로 밝혀져 있음. Aurantiochytrium속 유기영양 미세조류에서 주로 옴의 합성을 촉매하는 PuFA synthase를 결실하기 하기 위해 pfaB 유전자의 중간 부위에 형질전환체 선별마커로 항생제 hygromycin 저항성 유전자를 삽입한 DNA cassette를 제작하여, 전기충격법으로 Aurantiochytrium 야생균주로 도입한 후, hygromycin이 첨가된 배지에서 자라는 형질전환체를 선별하였음. 선별된 hygromycin 내성 균주로부터 염색체 DNA를 분리하여 southern hybridization 방법으로 확인한 결과, hygromycin 저항성 유전자가 도입된 것을 확인할 수 있었음. 획득된 변이균주의 생리적 특성을 분석한 결과, **DHA auxotroph**인 것으로 확인되었음. 즉 DHA를 첨가해 준 배지에서는 균체 증식이 가능하였으며, DHA 농도 5-50 μM 에서 우수한 균체 증식을 보인 반면 100 μM 이상에서는 균체 성장이 감소하는 경향을 보였음.



Aurantiochytrium속 유기영양 미세조류 PuFA synthase 결실 변이균주의 오메가-3 지방산 의존적 균체 증식 특성

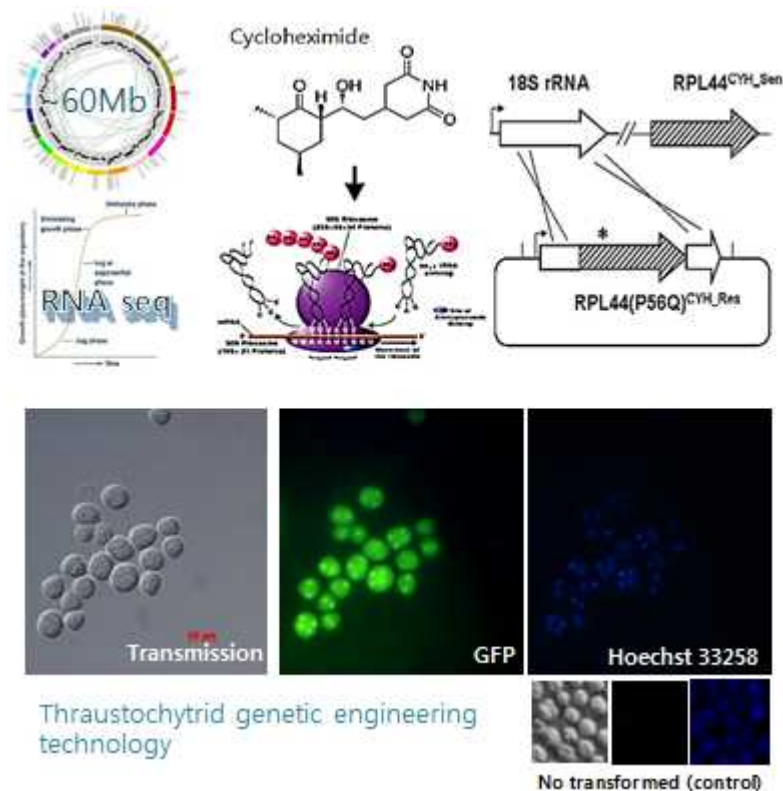
(2) Desaturase-elongase 대사 회로 촉진

- 그림에서 보인 바와 같이 생물체에서 지방산 생합성 효소(fatty acid synthase)의 작용에 의해 합성된 팔미트산(16:0)으로부터 desaturase 효소와 elongase 효소의 일련의 반복된 작용을 통해 다양한 다중불포화지방산이 만들어짐. 지질 생성 능력이 우수한

Thraustochytrid 미세조류에서 대표적인 오메가-3 다중불포화지방산인 EPA의 함량을 증진하기 위해, 유전공학 기술을 응용하여 desaturase와 elongase 유전자의 발현을 유도하였음.

Delta-9 elongase

- Desaturase-elongase 대사회로의 첫 번째 반응인 팔미트산(C16:0)을 스테아릭산(C18:0)으로 전환을 촉매하는 효소인 delta-9 elongase 유전자의 발현을 유도하였음. 전사체 분석 결과, Thraustochytrid 미세조류에서 발현 효율이 강력한 것으로 확인된 Actin 유전자의 전사개시인자와 전자종결인자를 이용하여 delta-9 elongase 유전자의 발현 시스템을 제작하였음. 이전 연구를 통해서 연구실에서 확보중인 Thrauschytrid 미세조류의 형질전환기술을 활용하여 delta-9 elongase 유전자가 도입된 형질전환균주를 선별배지(cycloheximide 200 ug/ml) 상에서 다수 선발한 후, 3회 이상의 계대배양을 통해 안정화된 형질전환 균주를 확보하였음.



Thraustochytrid 미세조류의 형질전환 시스템 (실험실 보유)

- 선발된 형질전환 균주들을 14-ml 시험관에서 3 ml 배지(glucose, 60 g/l; yeast extract, 10 g/l; Sea salt, 5 g/l)에 접종하여 28°C에서 60 시간동안 전배양을 실시하여 배양 균체의 흡

광도(OD600nm)를 측정된 후, 동일량의 균체를 250-ml 플라스크 (50 ml 배지)에 이식하여 72 시간 동안 본배양을 실시하면서 일정한 시간 간격으로 포도당 영양원의 이용, 균체 생육(OD600nm) 및 지질 생산량과 다중불포화지방산의 함량을 분석하였음.

- 균체 내의 오일 함량 분석을 위해 Burja 등의 Bligh-Dyer 방법을 이용하여 오일을 추출하였음. 125 mg의 건조균체에 클로로포름 6.25 ml, 메탄올 12.5 ml과 50 mM K₂HPO₄ buffer 용액 (pH 7.4)를 5 ml 첨가하여 28°C에서 200 rpm으로 1시간 동안 교반한 후, 클로로포름과 phosphate 버퍼를 각각 6.25 ml 첨가하여 약 30번 정도 섞어 준 다음 정치하였음. 분리된 하부의 유기용매 층 (약 12.5 ml)을 회수하여 80°C dry oven에서 약 30분 정도 건조한 후 오일의 무게를 측정하였음. 오일의 함량은 아래 식에 따라 결정하였음.

$$\text{Total lipid (g of oil per 100 g sample)} = [(W_L - W_D) / V_C] \times 100 / [V_P / W_S]$$

W_D was the weight of an empty aluminum dish (g);

W_L the weight of an aluminum dish with dried lipid residue (g);

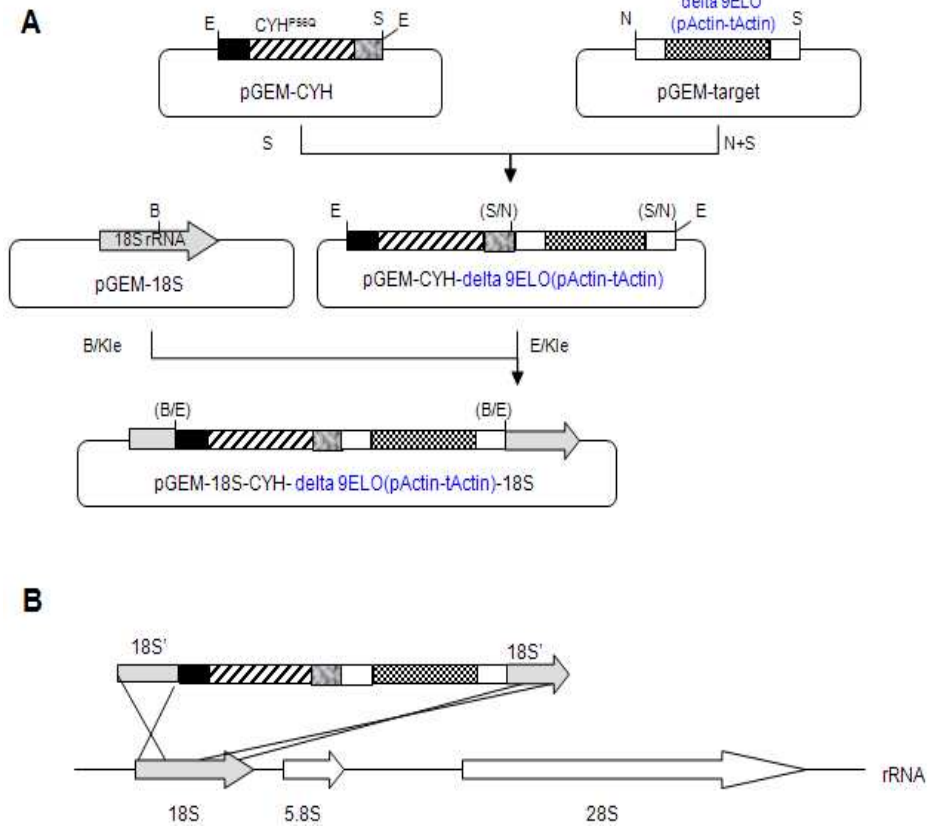
W_S the weight of sample (g);

V_C the total volume of chloroform in the graduated cylinder (ml); and

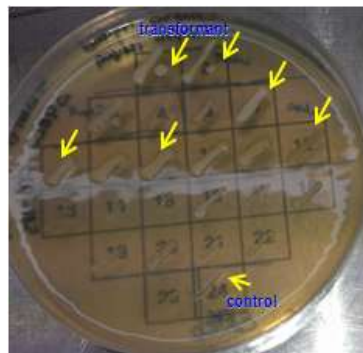
V_P the volume of chloroform transferred to the aluminum dish (ml).

- 지방산 조성의 분석을 위해 건조균체에 5% (v/v) 황산-메탄올 용액 3 ml을 첨가한 후 90°C에서 1시간 동안 반응하였음. 지방산 에스테르 반응산물을 0.6 ml 헥산으로 추출한 후 가스크로마토그래피 [GC; Hewlett Packard 6890N equipped with a flame-ionization detector (FID) and an HP-5 (30 m × 0.32 mm, 0.25 mm; Agilent Technologies) capillary column] 법으로 분석하였음. 컬럼의 온도는 150°C (after 2 min of holding)에서 270°C (with a further 2 min of holding)로 분당 7°C 씩 증가하였음.

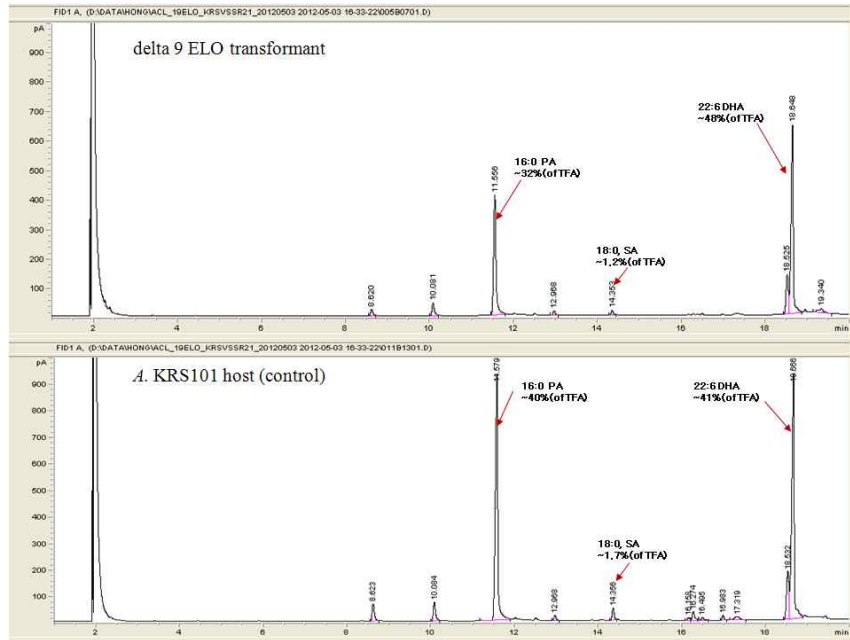
지질을 구성하는 지방산의 성분을 분석한 결과, delta-9 elongase 유전자 형질전환 균주는 모 균주와 비교해 팔미트산(C16:0)의 함량이 40%에서 32%로 감소한 반면 DHA(C22:6)의 함량은 41%에서 48%로 증가하는 양상을 보였음. 한편, 스테아릭산(C18:0)의 함량은 1.7%에서 1.2%로 약간 감소하였으며, EPA(C20:5)의 함량은 큰 변화를 보이지는 않는 것으로 나타났음.



Delta-9 elongase 유전자 발현 시스템



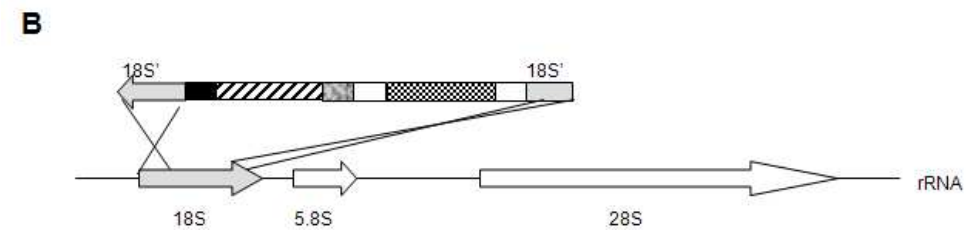
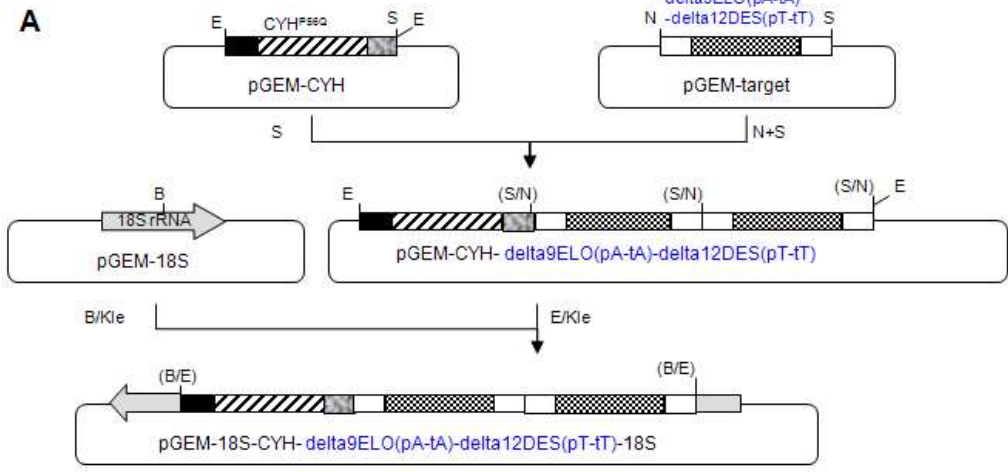
Delta-9 elongase 유전자 발현 Thraustochytrid 형질전환균주 선발



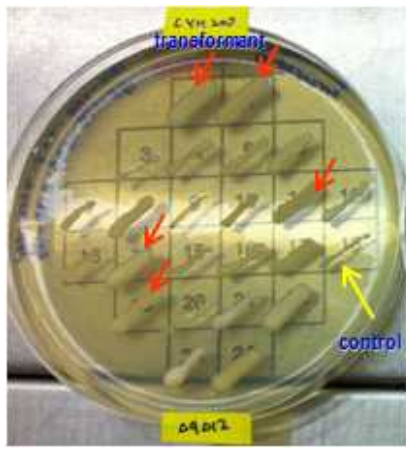
Delta-9 elongase 유전자 발현 형질전환 균주의 지방산 성분 분석

Delta-9 elongase/Delta-12 desaturase

- 상기와 마찬가지로 방법으로 delta-9 elongase 유전자와 delta-12 desaturase 유전자를 동시에 발현하는 시스템을 제작한 후 (그림), 이를 도입한 형질전환 균주를 제작하였음. Delta-12 desaturase 유전자의 발현을 위해서는 Thraustochytrid 미세조류의 tubulin 유전자의 전사개시인자와 전사종결인자를 이용하였음. 3회 이상의 계대배양을 통해 안정화된 형질전환 균주를 선발한 후 동일한 방법으로 액체배양을 실시하여 지질의 구성 지방산 성분을 기체 크로마토그래피법으로 분석하였음. 분석 결과, delta-9 elongase/Delta-12 desaturase 유전자를 발현한 형질전환 균주는 모균주에 비해 DHA(C22:6)의 함량이 49%에서 42%로 감소하는 반면 팔미트산(C16:0)의 함량은 34%에서 42%로 증가하는 양상을 보였음. 특히 EPA(C20:5)의 함량이 1.7%에서 3.2%로 증가하는 것으로 나타났음.

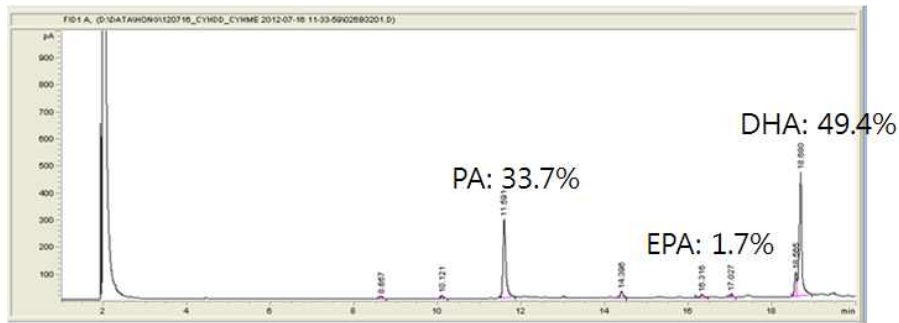


Delta-9 elongase/delta-12 desaturase 유전자 발현 시스템

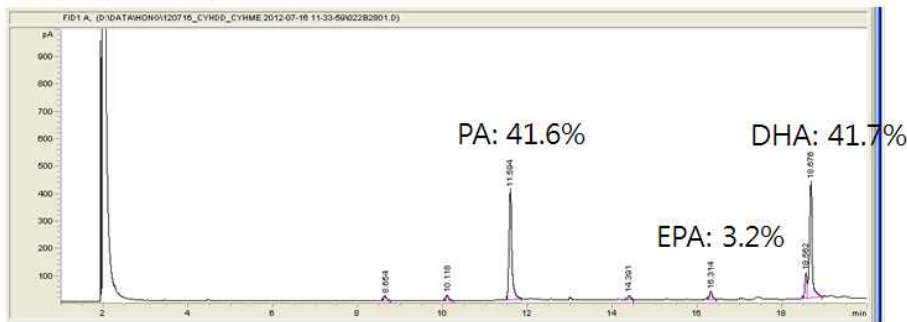


Delta-9 elongase/delta-12 desaturase 유전자 발현 Thraustochytrid 형질전환균주 선발

KRS control



18s-CYH- Δ 9ELO-12DES

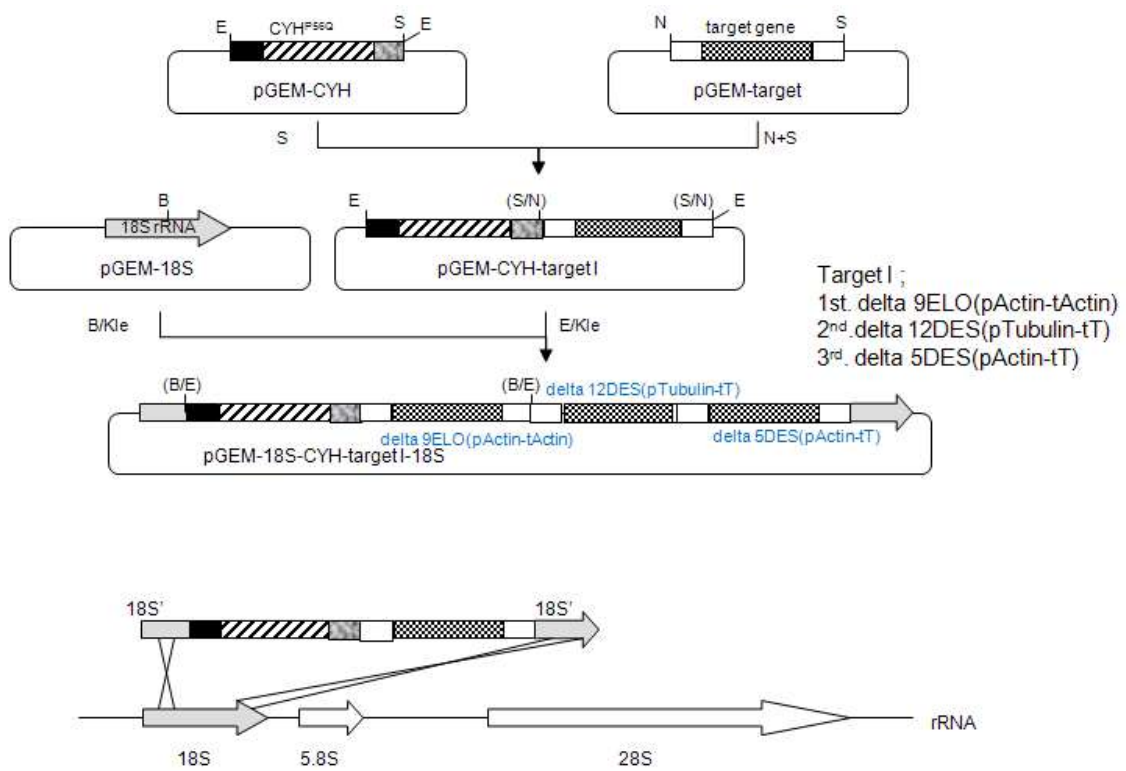


Delta-9 elongase/delta-12 desaturase 유전자 발현 형질전환 균주의 지방산 성분 분석

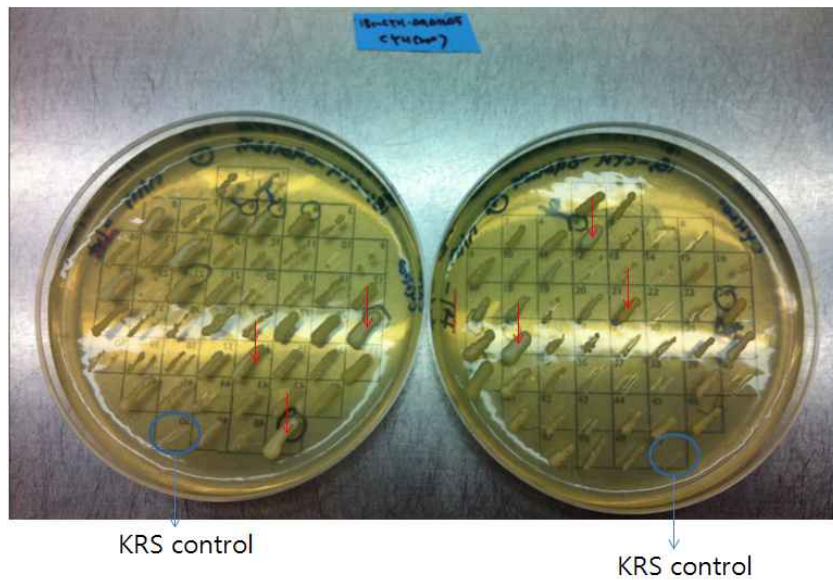
Delta-9 elongase/delta-12 desaturase/delta-5 desaturase

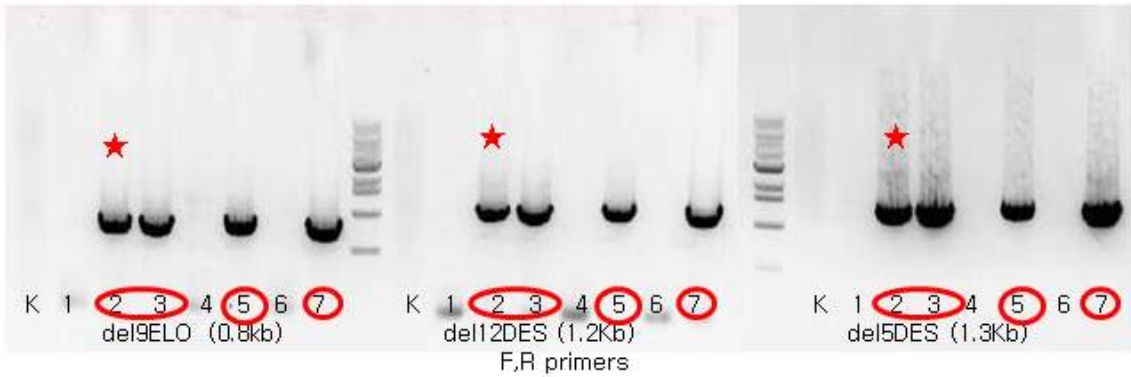
- 동일한 방법으로 delta-9 elongase 유전자, delta-12 desaturase 유전자, delta-5 desaturase 유전자를 동시에 발현하는 시스템을 제작한 후 (그림), 이를 도입한 형질전환 균주를 제작하였음. Delta-5 desaturase 유전자의 발현을 위해서는 Thraustochytrid 미세조류의 actin 유전자의 전사개시인자와 tubulin 유전자의 전사종결인자를 이용하였음. 3회 이상의 계대배양을 통해 안정화된 형질전환 균주를 선발하였으며, 유전자 도입 여부는 유전자 증폭기술을 이용하여 확인하였음. 상기와 동일한 방법으로 액체배양을 실시하여 지질의 구성 지방산 성분을 기체 크로마토그래피법으로 분석하였음.
- Delta-9 elongase/delta-12 desaturase/delta-5 desaturase 유전자를 도입한 형질전환 균주는 모균주에 비해 균체 증식이 다소 감소하는 경향을 보였으며, 지방산 분석 결과 모균주에 비해 함량은 약간 증가하였으며, 팔미트산과 EPA의 함량은 감소하는 경향을 보였음 (그림).
- 도입한 효소들의 활성을 분석하기 위해 균체 배양액에 기질인 팔미트산과 올레익산을 각각 100 μ M 농도로 첨가해 주었을 때 palmitic acid(100 μ M)와 올레익산 (100 μ M)을 첨가

약 2.9%의 EPA가 생성되는 것을 확인할 수 있었음.



Delta-9 elongase/delta-12 desaturase/delta-5 desaturase 유전자 발현 시스템 (pEPA1)

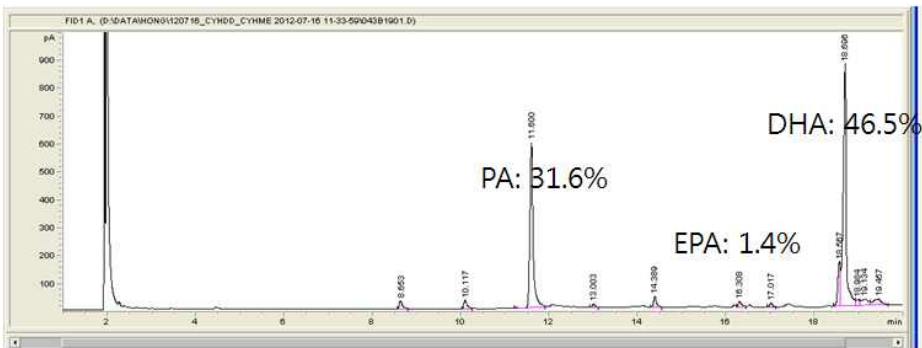




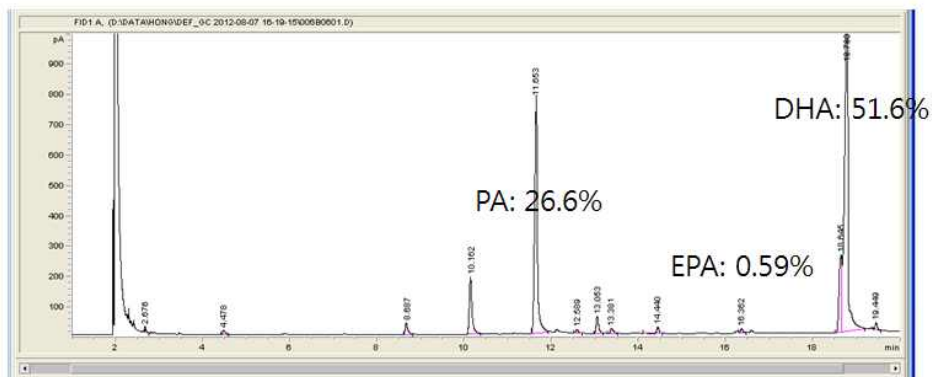
(★: Delta-9 elongase/delta-12 desaturase 발현 형질전환 균주)

Delta-9 elongase/delta-12 desaturase/delta-5 유전자 발현 Thraustochyrid
형질전환균주 선발

KRS control

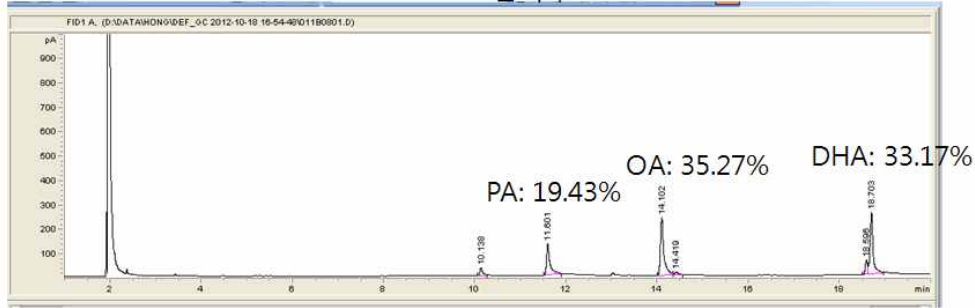


18s-CYH- Δ 9ELO-12DES-5DES

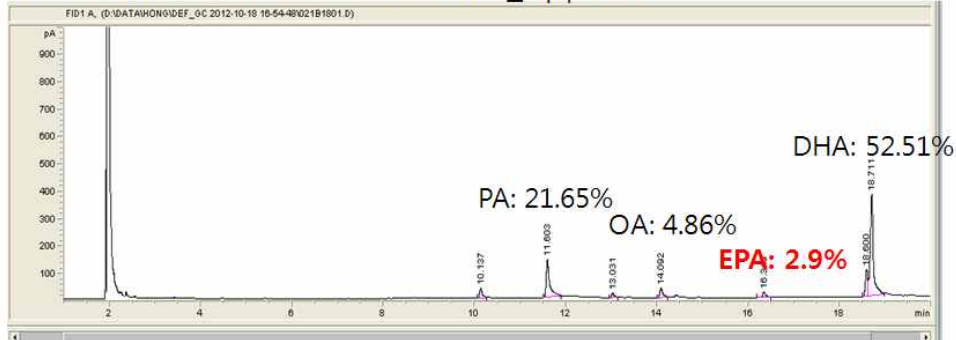


Delta-9 elongase/delta-12 desaturase/delta-5 유전자 발현 Thraustochyrid
형질전환균주의 지방산 분석

18s-CYH-Δ9ELO-12DES-5DES OA+PA 첨가후



18s-CYH-Δ9ELO-12DES-5DES OA+PA 첨가후 48hr

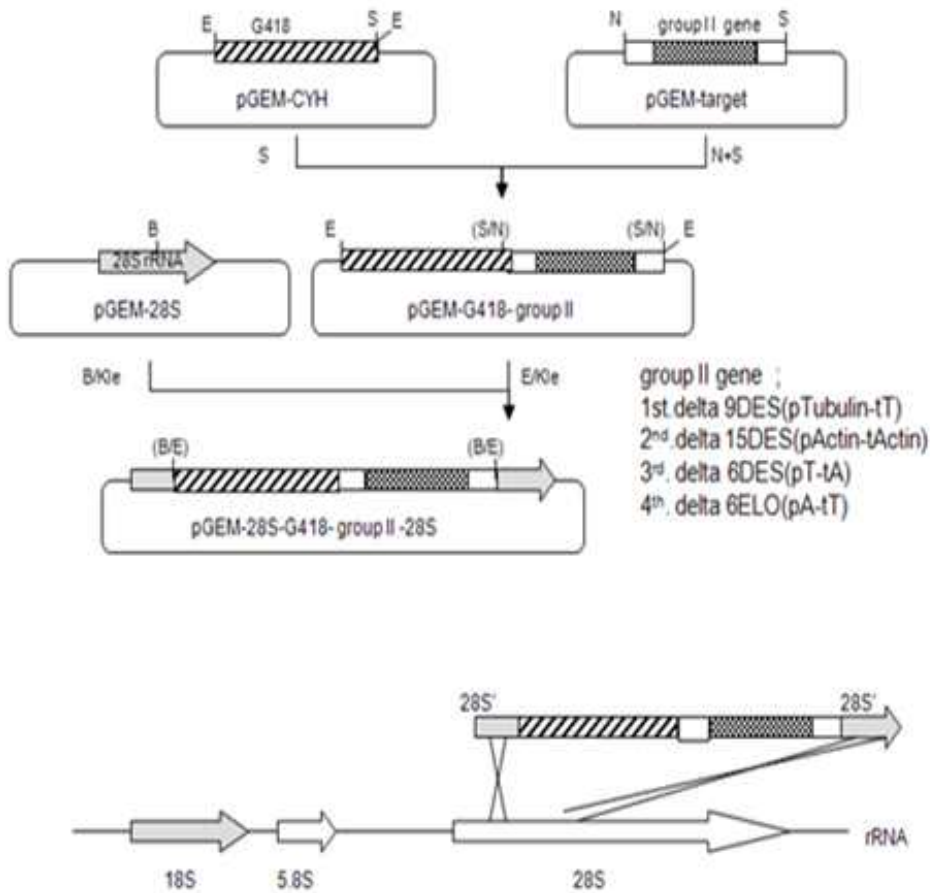


Delta-9 elongase/delta-12 desaturase/delta-5 유전자 발현 Thraustochytrid

형질전환균주의 효소 활성 분석

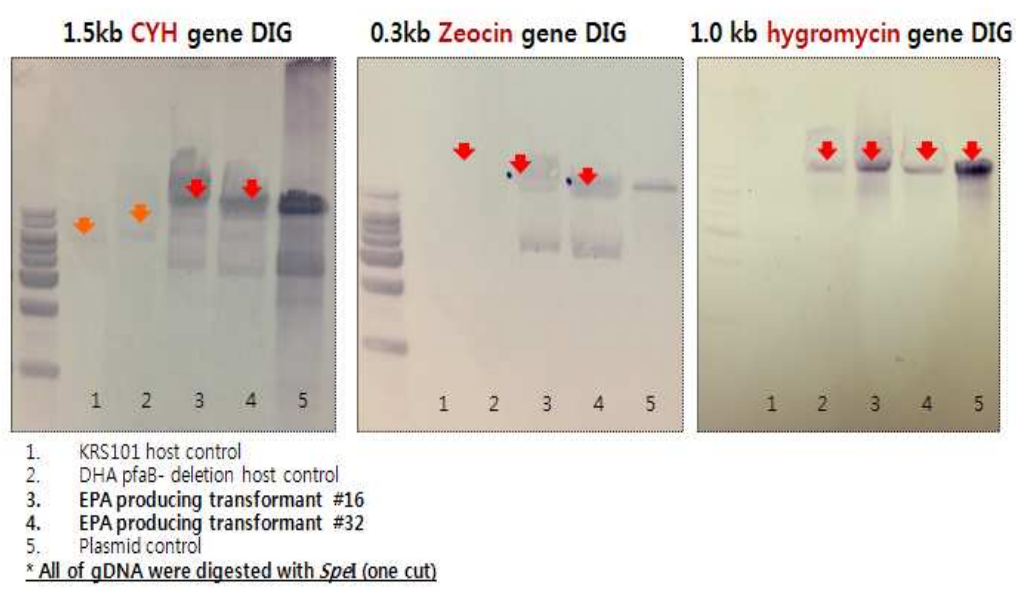
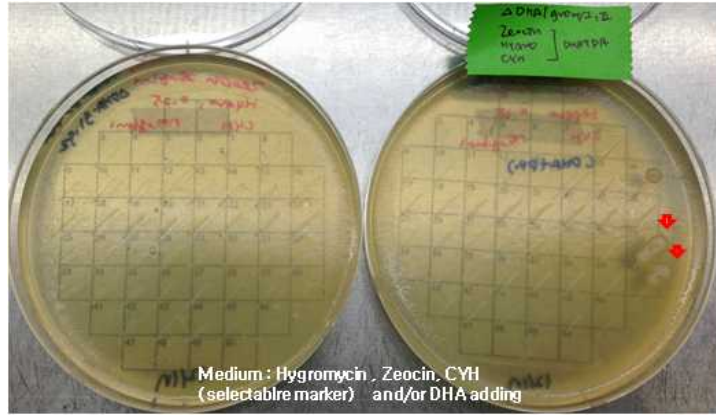
Delta-9 elongase/delta-12 desaturase/delta-5 desaturase (pEPAI)와 delta-9 desaturase/delta-15 desaturase/delta-6 desaturase/delta-6 elongase (pEPAII)

- 상기의 delta-9 elongase, delta-12 desaturase, delta-5 desaturase 유전자를 도입한 형질전환 균주에 추가적으로 delta-9 desaturase, delta-15 desaturase, delta-6 desaturase, delta-6 elongase를 도입한 형질전환 균주를 제작하였음. 유전자 발현을 위해 delta-9 desaturase 유전자는 tubulin 유전자의 전사개시인자와 actin 유전자의 전사종결인자, delta-15 desaturase 유전자는 actin 유전자의 전사개시인자와 전사종결인자, delta-6 desaturase 유전자는 tubulin 유전자의 전사개시인자와 actin 유전자의 전사종결인자, delta-6 elongase 유전자는 actin 유전자의 전사개시인자와 tubulin 유전자의 전사종결인자를 각각 사용하였음.



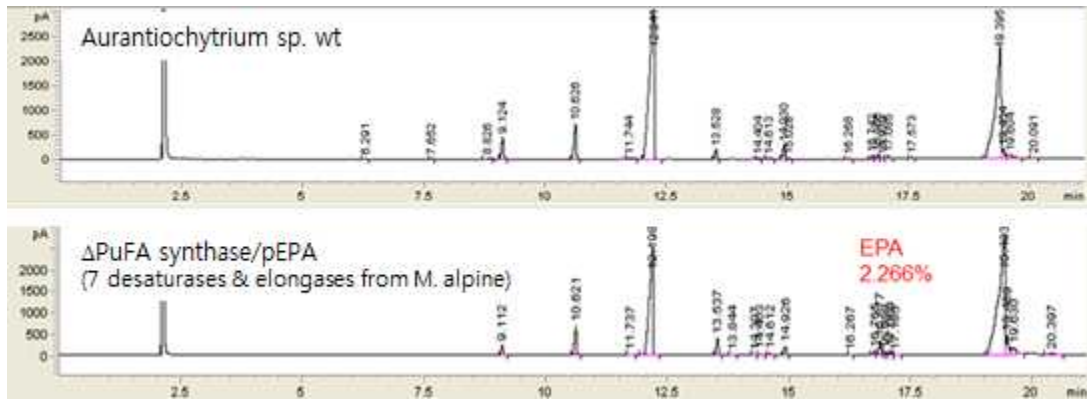
**Delta-9 desaturase/delta-15 desaturase/delta-6 desaturase/delta-6 elongase
 발현시스템 (pEPAII)**

- 형질전환체 선별마커로 cyloheximide 내성 유전자를 사용한 delta-9 elongase/delta-12 desaturase/delta-5 desaturase 유전자 발현 시스템과 달리, delta-9 desaturase/delta-15 desaturase/delta-6 desaturase/delta-6 elongase 발현시스템은 G418 항생제 내성 유전자를 선별마커로 사용하여 총 7종의 desaturase, elongase 유전자가 도입된 형질전환 균주를 제작하였으며, 서던블러팅 방법을 이용하여 확인하였음.



Delta-9 elongase/delta-12 desaturase/delta-5 desaturase (pEPAI)와 delta-9 desaturase/delta-15 desaturase/delta-6 desaturase/delta-6 elongase (pEPAII) 유전자가 도입된 Thraustochytrid 형질전환균주 선발

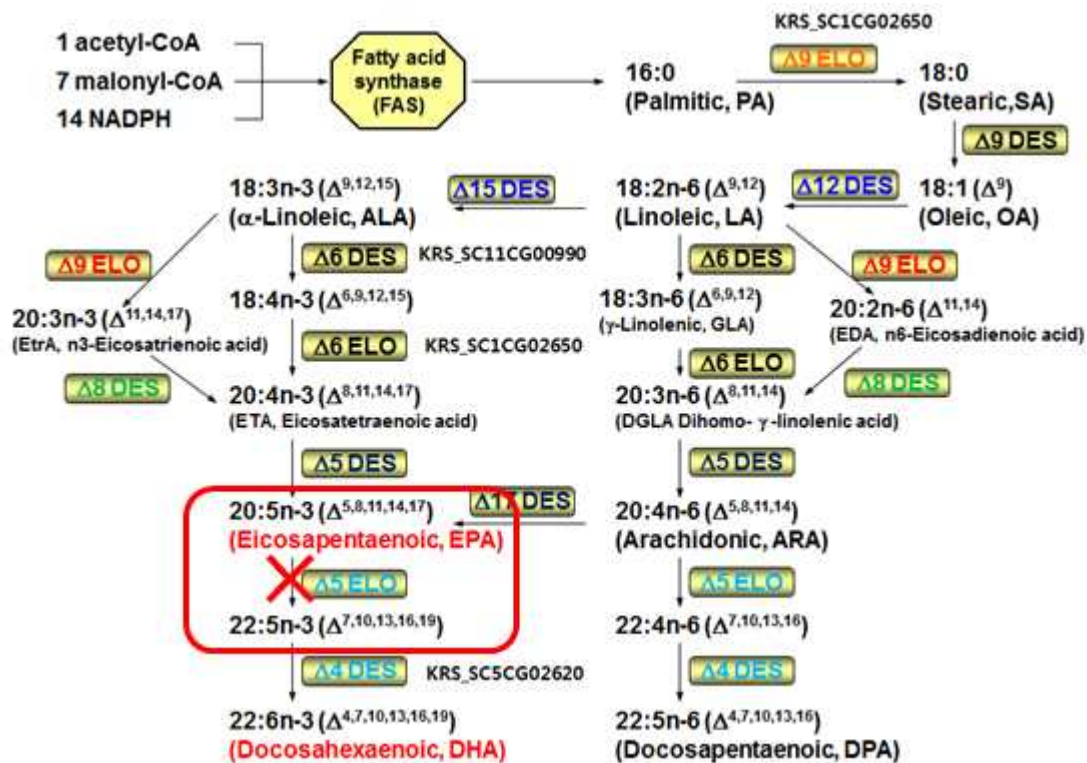
- 상기와 동일한 방법으로 7종의 desaturase, elongase 유전자가 도입된 형질전환 균주의 지방산 조성을 분석한 결과, EPA(C20:5)의 함량이 2.2%로 모균주와 비교해 2배 이상 증가하는 것으로 나타났음.



Delta-9 elongase/delta-12 desaturase/delta-5 desaturase (pEPAI)와 delta-9 desaturase/delta-15 desaturase/delta-6 desaturase/delta-6 elongase (pEPAII) 유전자가 도입된 Thraustochytrid 형질전환균주의 지방산 분석

(3) Delta-5 elongase 유전자 결손

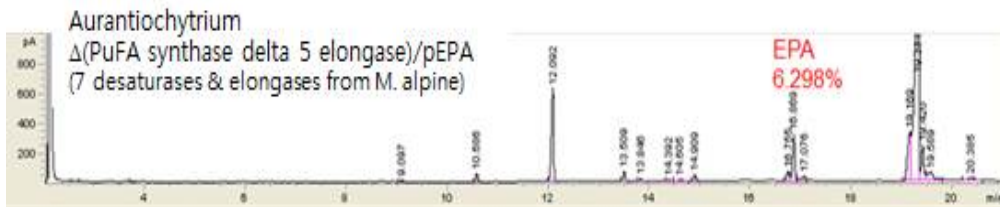
- 최종적으로 EPA의 함량을 증진하기 위해 delta-5 elongase 유전자가 결손된 변이균주를 제작하였음 (그림)





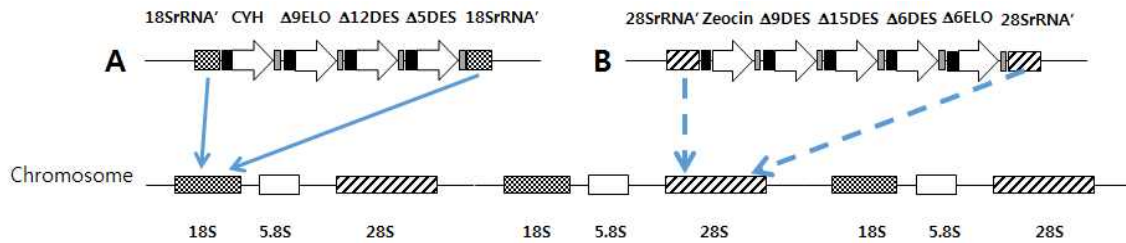
Delta-5 elongase 유전자가 결손된 Thraustochytrid 미세조류 변이균주의 제작

- 상기와 동일한 방법으로 3회 이상의 계대배양을 통해 안전화된 변이균주를 선발한 후, 액체 배양을 실시하여 지질의 지방산 성분 분석을 실시하였음. 그 결과 EPA의 함량이 6.3%로 모균주와 비교해 3배 정도 증가한 것으로 나타났음.



Delta-5 elongase 유전자가 결손된 Thraustochytrid 미세조류 변이균주의 지방산 분석

- 상기의 *M. alpina* 유래의 desaturase, elongase 유전자 발현시스템과 마찬가지로 Thraustochytrid 미세조류의 유전체 분석을 통해 확보된 desaturase, elongase 유전자의 발현 시스템을 제작(그림), 이를 도입한 Thraustochytrid 미세조류 형질전환균주의 지방산 성분을 분석한 결과, 마찬가지로 EPA의 함량이 증가하는 것으로 나타났음 (특허출원 준비중).

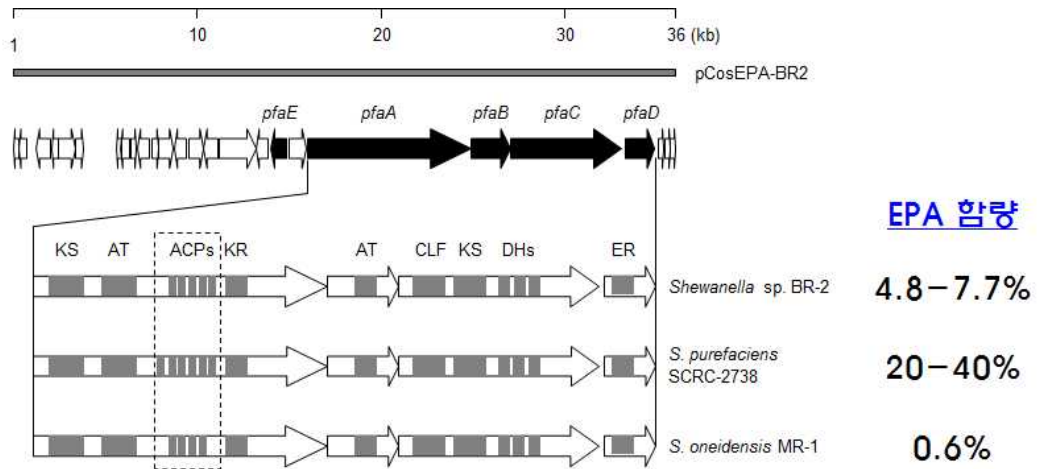


Genes
pEPA I(group I)
cyh-pdel9ELOt-TA
cyh-pdel9ELOt-pdel12dest-TA
cyh-pdel9ELOt-pdel5dest-pdel12DEST-TA
18s-cyh-pdel9ELOt-pdel5dest-pdel12DEST-18s-TA
18s-cyh-pdel9ELOt-pdel12dest-pdel5DEST-18s-TA
18s-pubi-hygro-tubi-pdel9ELOt-pdel5dest-pdel12DEST-18s-TA
pEPA II(group II)
pubi-zeocin-tubi-pdel6DEST-TA
zeocin-pdel6DEST-pdel6ELOt-TA
zeocin-pdel6DEST-pdel6ELOt-pdel15DEST-TA
zeocin-pdel6DEST-pdel6ELOt-pdel15DEST-pdel9dest-TA
28S-zeocin-del9DES-del15des-del6des-del6ELO-28S-TA

Thraustochytrid 미세조류 유래의 desaturase, elongase 유전자 발현 시스템

(4) 해양미생물 유래 EPA 특이적 PuFA synthase 유전자 발현

- Shewanella속의 몇몇 해양 박테리아는 PKS-like system을 이용하여 EPA를 생산하는 것으로 밝혀져 있음. Shewanella속의 PKS-like EPA synthase는 PfaA(multi-domain β -ketoacyl synthase: KS-MAT-ACPs-KR), PfaB (acyl transferase: AT), PfaC (multi-domain β -ketoacyl synthase: KS-CLF-DH-DH), PfaD (enoyl reductase: ER), PfaE (phosphopentetheine transferase: PPTase)로 구성된 복합 단백질 구조이며, 염색체상에서 각 유전자는 서로 인접해 존재하고 있음. 이전 연구에서 본 연구팀은 Shewanella속 해양박테리아의 PKS-like EPA synthase를 확보하였음.

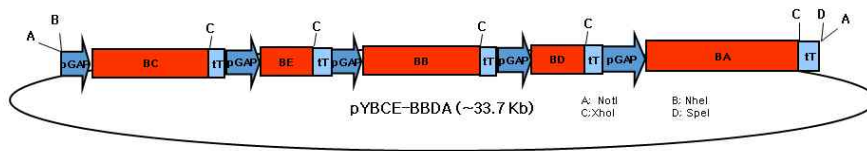


Twenty four complete and two truncated Orfs on approximately 36-kb insert DNA of pCosEPA-BR2 were presented. KS, β -ketoacyl-ACP (acyl carrier protein) synthase; AT, acyltransferase; ACPs, multiple ACPs; KR, β -ketoacyl-ACP reductase; CLF, chain length factor; DH, β -hydroxyacyl-ACP dehydratase/isomerase; ER, enoyl reductase.

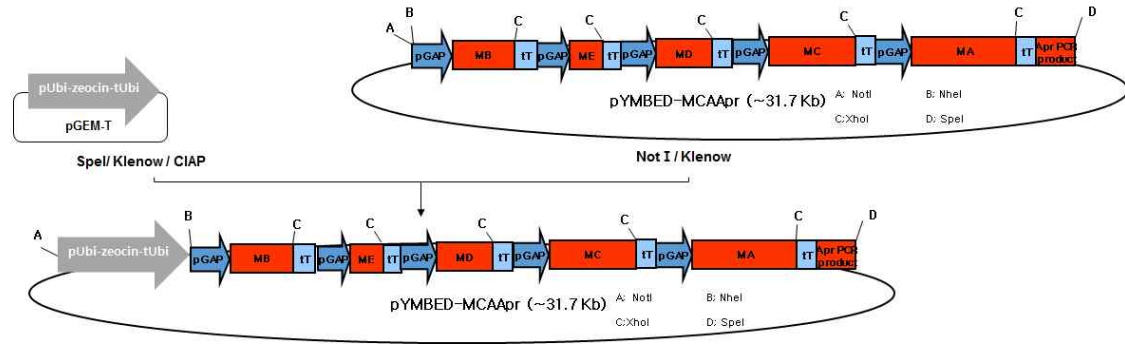
Shewanella속 해양박테리아의 PKS-like EPA synthase

- Shewanella속 BR2와 MR1 균주 유래의 PKS-like EPA synthase 유전자를 각각 glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAP) promoter와 alcohol oxidase 1 (AOX1) terminator에 연결한 후 각각의 만들어진 카세트를 연결하여 pYMBED-MCAApr와 pYBCE-BBDA 플라스미드를 제작하였으며, 미세조류 균주내로 도입하기 위해 우선 pYMBED-MCAApr에 zeocin 항생제 마커를 연결하여 최종 pYMBED-MCAApr-zeocin 플라스미드를 제작하였음. 제작된 플라스미드를 PuFA synthase가 결실된 Thraustochytrium 속 유기영양 미세조류 균주로 도입한 형질전환체를 제작하여 지방산 성분을 분석한 결과 두드러진 변화는 보이지 않는 것으로 나타났음. 향후 미세조류에서 적합한 전사 프로모터 및 종결인자 교체 등의 추가적인 연구를 수행할 필요가 있는 것으로 판단됨.

Shewanella sp. BR-2 유래 pfaA-E 발현 카세트 제작



Shewanella oneidensis MR-1 유래 pfaA-E 발현 카세트 제작



Shewanella속 PKS-like EPA synthase 유전자의 발현시스템

Retention time (min)	Fatty acid	T.ch4Δpfa B	YM-6	YM-7	YM-21	YM-29	YM-31	YM-34	YM-39	YM-49	YM-50
7.646					0.242		0.354				0.292
9.105			0.196								
10.61	HA(15:0)	7.774	8.59	9.559	10.649	9.464	10.163	9.742	9.325	9.661	10.304
12.078	PA(16:0)	2.606	4.035	3.404	2.954	3.141	2.829	3.566	3.553	3.651	2.779
13.304		0.369			0.664						0.244
13.527		5.155	5.053	4.42		4.245	4.862	4.38	4.266	3.936	3.878
14.293		0.191									
14.394		0.558									
14.915		0.679	0.923	1.004	0.664	0.866	0.683	0.894	0.779	0.868	0.909
16.771	ARA(20:4)	3.045	3.101	2.974	3.613	2.874	3.644	3.05	2.56	3.251	2.48
16.883	EPA(20:5)	8.363	8.265	8.206	9.088	8.226	8.021	9.3	8.179	9.5	6.76
16.982		0.281	0.368								0.284
17.084		0.666	0.746	1.007	0.862	1.096	0.869	0.932	0.643	0.987	0.729
17.181			0.367	0.434	0.341	0.3		0.268	0.241	0.303	0.241
18.183				1.767	1.99						
18.508		0.406									
18.686		0.583	0.718								
19.184		20.496	22.054	19.694	20.095	20.915	22.145	20.723	20	20.764	21.151
19.325	DHA(20:6)	42.27	37.984	37.246	38.407	40.33	37.7	39.625	40.646	39.781	41.454
19.416		3.36	2.811	3.11	2.956	3.471	3.585	3.436	3.02	3.638	3.593
19.594		2.122	2.63	3.403	3.39	3.964	4.182	3.329	3.627	3.659	3.668
19.722											0.549
20.413		1.075	2.158	3.772	0.948	1.109	0.961	0.755	2.962		0.685
LC-PUFA		82.667	81.202	81.613	81.69	82.285	81.107	81.418	81.878	81.883	81.594

Shewanella속 PKS-like EPA synthase 유전자 발현 Thraustochytrid 미세조류의 지방산 분석

(5) 결론

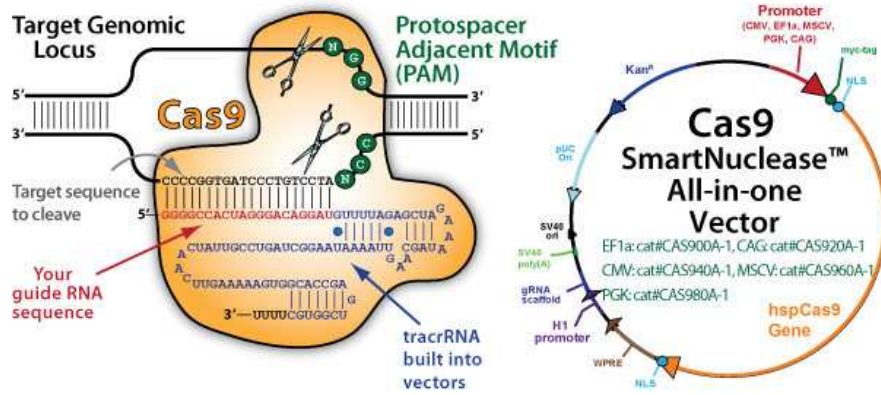
- 본 연구에서 Thraustochytrid 미세조류의 유전체 정보를 토대로 한 다중불포화지방산 생합성 대

사 유전자들의 발현 및 결손을 통해 EPA 지방산의 함량을 1% 내외에서 6.3%까지 6배 이상 증가할 수 있는 것으로 확인되었음. 향후 desaturase, elongase 유전자의 조합, 배치, 전사개시인자 및 종결인자를 최적화하는 추가적인 연구를 통해 EPA의 함량을 더욱 증가된 균주의 개발이 가능할 것으로 기대됨

유전공학을 통한 EPA 함량 증진

Genus	Genetic property		EPA (%TFA)	
Aurantiochytrium	wt		< 1	
Aurantiochytrium	PuFA synthase deficient		-	
Aurantiochytrium	PuFA synthase deficient	7 Desaturases & elongases from M. alpina	2.2	
Aurantiochytrium	PuFA synthase deficient	7 Desaturases & elongases from M. alpina	delta 5 elongase deficient	6.3

- 본 연구에서 유전공학 기술을 활용하여 DHA 생합성 유전자(DHA 특이적 PuFA synthase, delta-5 elongase 유전자)가 결손된 Thraustochytrid 미세조류 형질전환균주들에서 DHA의 함량이 여전히 높은 것으로 나타났음. 이는 생합성 유전자가 결손 변이DHA의 함량 또한 매우 높게 유지되는 것으로 나타났음. 이는 Thraustochytrid 미세조류의 multiploids 특성과 관계가 있을 것으로 사료됨. 향후 CRISPR/Cas9 기술을 활용한 multiploids 유전자 결손을 통해 DHA의 함량을 낮추고 EPA 함량이 증진된 균주의 개발이 가능할 것으로 기대됨.



CRISPR/Cas9 기술을 활용한 Thraustochytrid multipolids 유전자 결손 시스템 개발

2. 돌연변이를 통한 다중불포화지방산 생합성 대사 촉진

- 감마선(gamma ray) 조사 방법을 통해 EPA 함량이 증진된 Thraustochytrid 미세조류 변이 균주를 확보하기 위해 인근의 방사선 조사 시설을 활용한 Thraustochytrid 미세조류의 돌연변이 실험을 수행하였음 (한국원자력연구원, 정읍방사선과학연구소). Thraustochytrid 균주를 36시간 배양하여 45 ml을 취한 후 4500 rpm, 10 min 동안 원심분리하여, 상등액은 버리고 PBS buffer에 현탁한 후 감마선을 1시간 조사하여 (사멸률 약 99%) 균체를 적당히 희석하여 basal 배지 (glucose, 60 g/l; yeast extract, 10 g/l; Sea salt, 5 g/l; agar 15 g/l)에 도말하여 28°C에서 48 시간 동안 배양하였음. 약 200개 정도의 콜로니가 자라는 희석배수로 도말된 플레이트 상에서 상대적으로 빠른 균체 생육을 보이는 콜로니를 일차적으로 선별한 후, 플라스크 배양을 통하여 선별된 변이체들의 균체 생육, 오일 생성 및 DHA 함량을 분석하였음
- 액체 배양을 위하여 선별한 변이체들을 14-ml 시험관에서 3 ml 배지에 접종하여 60 시간동안 전배양하고, 배양 균체의 흡광도 (OD600nm)를 측정하여 동일량의 균체를 250-ml 플라스크 (50 ml 배지)에 이식하여 72 시간 동안 본배양 하면서, 일정한 시간 간격으로 포도당 영양원의 이용, 균체 생육 (OD600nm) 및 오일과 DHA의 생산량을 분석하였음.
- 균체 내의 오일 함량 분석을 위해 Burja 등의 Bligh-Dyer 방법을 이용하여 오일을 추출하였음. 125 mg의 건조균체에 클로로포름 6.25 ml, 메탄올 12.5 ml과 50 mM K₂HPO₄ buffer

용액 (pH 7.4)를 5 ml 첨가하여 28°C에서 200 rpm으로 1시간 동안 교반한 후, 클로로포름과 phosphate 버퍼를 각각 6.25 ml 첨가하여 약 30번 정도 섞어 준 다음 정치하였음. 분리된 하부의 유기용매 층 (약 12.5 ml)을 회수하여 80°C dry oven에서 약 30분 정도 건조한 후 오일의 무게를 측정하였음. 오일의 함량은 아래 식에 따라 결정하였음.

$$\text{Total lipid (g of oil per 100 g sample)} = [(W_L - W_D) / V_C] \times 100 / [V_P / W_S]$$

W_D was the weight of an empty aluminum dish (g);

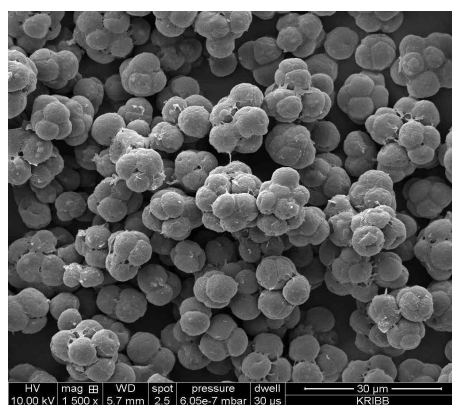
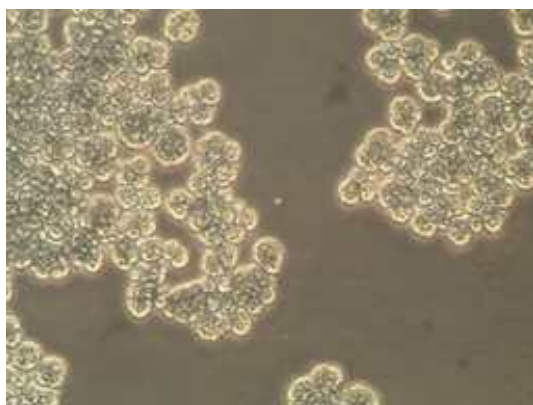
W_L the weight of an aluminum dish with dried lipid residue (g);

W_S the weight of sample (g);

V_C the total volume of chloroform in the graduated cylinder (ml); and

V_P the volume of chloroform transferred to the aluminum dish (ml).

- 지방산 조성의 분석을 위해 건조균체에 5% (v/v) 황산-메탄올 용액 3 ml을 첨가한 후 90°C에서 1시간 동안 반응하였음. 지방산 에스테르 반응산물을 0.6 ml 헥산으로 추출한 후 가스크로마토그래피 [GC; Hewlett Packard 6890N equipped with a flame-ionization detector (FID) and an HP-5 (30 m × 0.32 mm, 0.25 mm; Agilent Technologies) capillary column] 법으로 분석하였음. 컬럼의 온도는 150°C (after 2 min of holding)에서 270°C (with a further 2 min of holding)로 분당 7°C 씩 증가하였음.
- 상기의 돌연변이 실험을 수행하는 과정에 다중불포화지방산의 함량이 모균주와 비교해 크게 증가한 변이균주를 확보하였음 (그림). 지질의 지방산 구성성분을 기체크로마토그래피로 분석한 결과, 다중불포화지방산의 함량이 전체 지방산의 80% 이상인 것으로 나타났으며, 특히 9.4%의 매우 높은 EPA 함량을 보이는 것으로 나타났음.



다중불포화지방산의 함량이 증진된 변이균주

지방산	함량 (%)
15:0	8.79
16:0	2.66
17:0	5.16
18:0	0.88
20:1	0.39
20:2	0.68
20:4	3.56
20:5 (ω3)	9.38
22:5 (ω6)	21.56
22:6 (ω3)	42.27
22:5 (ω3)	3.76

제 3 절 EPA 함량 증진 균주의 배양 공정 최적화

1. 배지조성 최적화

(1) Thraustochytrid 미세조류 변이균주의 영양원 요구 특성 분석

- 선행연구에서 다중불포화지방산 함량이 증진된 변이균주의 다양한 영양원 이용 능력을 조사하였음. 기본 배지에 다양한 탄소원, 질소원 혹은 비해수염을 첨가하여 배양하여 균체 성장 및 오일 함량을 조사하였음. 기본 배지로는 탄소원 포도당 20 g/l, 질소원 효모 추출물 10 g/l, 인공해수염 5 g/l, KH_2PO_4 9 g/l를 함유한 배지를 사용하였음. 단일 콜로니를 기본 배지 15ml을 이용하여 28℃에서 120 rpm으로 3일간 전배양한 후 본 배양시에는 초기 접종 OD(optical density)가 1.5 정도 되게 새로운 배지에 접종하여 28℃에서 120 rpm으로 3일간 배양하였음. 원심분리법으로 회수한 균체를 PBS 버퍼(phosphate buffered saline, pH 7.2)로 3회 세척한 후 동결건조기에서 12시간 건조하여 건조균체중량을 측정하였음.
- DHA 함유 오일함량은 수정된 Bligh-Dyer법에 의하여 분석되었음. 건조 균체량 125 mg에 클로로포름 6.25ml, 메탄올 12.5ml, 50 mM K_2HPO_4 버퍼(pH 7.4) 5 ml을 가하여 28℃에서 200rpm으로 1시간 동안 반응한 후 클로로포름 6.25 ml, K_2HPO_4 버퍼 6.25 ml를 첨가하여 30회 정도 섞어준 후 30분 동안 방치하여 수층과 오일이 함유된 유기용매층으로 분리되도록 하였음. 미리 무게를 측정해둔 알루미늄 접시로 클로로포름 층을 옮긴 후 90℃에서 30분 동안 건조한 후 오일의 무게를 측정하였음. 전체 오일 함량은 아래와 같이 산출하였음.

$$\text{총 오일함량 (\%, 오일 g/건조균체량 100 g)} = (W_L - W_D) \times V_C \times 100 / V_P \times W_S$$

W_L : 알루미늄 접시의 무게, W_D : 알루미늄 접시 + 지질의 무게, V_C : 클로로포름의 총 부피,

V_P : 알루미늄 접시에 옮긴 클로로포름의 부피, W_S : 사용한 균체의 무게 (건조중량)

- 변이균주의 오일 중에 함유된 DHA의 함량은 기체크로마토그래피법으로 측정하였음. 적당량의 건조된 균체를 5% 메탄올-황산 용액 6ml에 현탁하여 90℃에서 1시간 동안 반응하여 지방산 에스테르를 생성한 다음 헥산 0.2ml로 추출하여 기체크로마토그래피로 분석하였음. 포도당 대신에 탄소원으로 프럭토스(fructose), 갈락토스(galactose), 자일로스(xylose), 락토즈(lactose), 말토즈(maltose), 수크로스(sucrose), 글리세롤(glycerol), 전분(starch)을 20 g/l

로 첨가한 경우, 아래 표에 나타난 바와 같이, 포도당에 비해 다소 감소하기는 하였지만 여전히 변이균주의 균체 성장이 가능하였음. 특히 전분(starch)을 제외한 다른 탄소원의 경우 글루코스(glucose)를 탄소원으로 이용하였을 때와 유사한 높은 다중불포화지방산 함량을 보였음.

변이 균주의 탄소원 영향

탄소원	세포건조중량 (g/l)	지질 (% DCW)	PUFA (% TFA)
프럭토스	2.50	10	79.19
갈락토스	2.22	9.38	79.86
자일로스	1.68	7.44	80.05
락토즈	1.72	8.48	78.51
말토즈	1.47	8.5	76.69
수크로스	1.7	7.35	77.62
전분	1.58	7.91	72.89
글리세롤	2.13	8.8	53.10
글루코스	2.55	10.62	80.07

- 효모 추출물 대신에 유기질소원으로 옥수수 침지액(corn steep liquor), 쇠고기 추출물(beef extract), 맥아추출물(malt extract), 펩톤(peptone), 트립톤(tryptone)을 10 g/l의 농도로 첨가해준 경우, 아래 표에 나타난 바와 같이, 변이균주는 균체 성장이 가능하였으나 다중불포화지방산의 함량은 효모 추출물을 사용하였을 때가 가장 높게 나타나는 것을 확인할 수 있었음. 또한 암모늄 아세테이트(2.3 g/l), 암모늄 나이트레이트(1.2 g/l), 암모늄 설페이트(2.9 g/l), 소듐 나이트레이트(2.6 g/l), 우레아(0.9 g/l)를 첨가하여 다양한 무기 질소염의 영향을 살펴본 결과, 아래 표에 나타난 바와 같이, 소듐 나이트레이트를 제외한 다른 무기 질소염은 다중불포화지방산 생산시 적합하지 않음을 확인할 수 있었음.

변이균주의 유기질소원 영향

유기질소원	세포건조중량 (g/l)	지질 (% DCW)	PUFA (% TFA)
옥수수 침지액	2.14	6.86	29.24
쇠고기 추출물	3.19	8.47	35.34
맥아추출물	2.58	6.80	34.54
펩톤	1.68	5.95	49.94
트립톤	2.41	6.19	63.77
효모추출물	2.55	10.62	80.07

변이균주의 무기질소원 영향

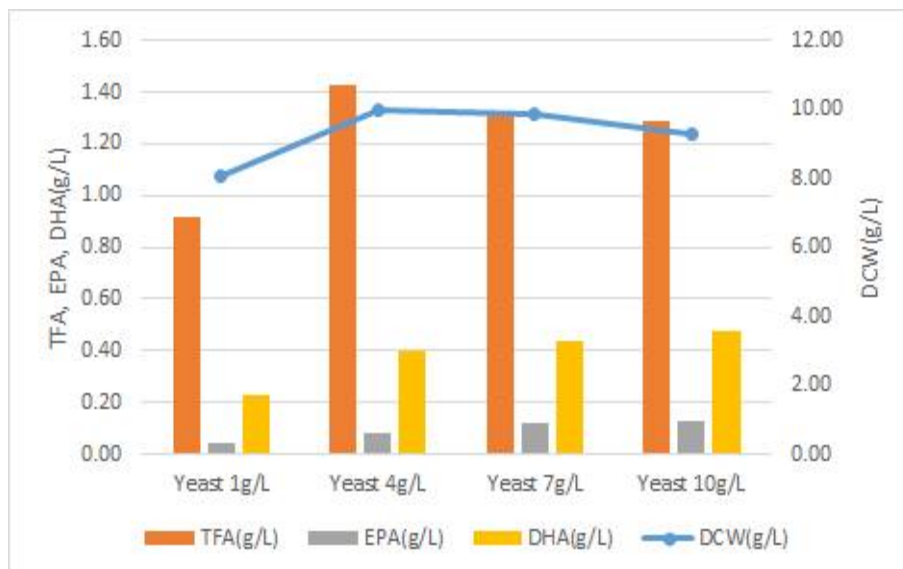
무기질소원	세포건조중량 (g/l)	지질 (% DCW)	PUFA (% TFA)
암모늄 아세테이트	2.13	6.98	47.06
암모늄 나이트레이트	1.12	5.42	44.76
암모늄 설페이트	1.17	5.98	47.06
소듐 나이트레이트	1.23	6.12	66.28
우레아	2.24	7.83	41.58

(2) 유기 질소원 농도의 영향

- 다중불포화지방산의 함량이 증진된 변이균주의 유기질소원 (yeast extract) 농도에 따른 영향을 살펴보기 위해 5 L 배양기를 이용하여 실험을 진행하였음. 기본 배지 조성을 glucose 30 g/l, KH_2PO_4 10 g/l, sea salt 5 g/l로 하였고 working volume 2.5 l, 접종량은 10%로 하

였음. 배양 조건은 28℃, 200 rpm, 공기공급량 2 vvm, 초기 pH 6.0으로 하였음. 비타민은 1 ml/L(Thiamine 9.5 mg/l, Vitamine B12 1 mg/l, Biotin 0.02 mg/l)를 첨가하였고. 기본 배지 조성에서 yeast extract 농도를 1, 4, 7, 10 g/l로 조건을 달리하여 실험을 진행하였음. 배양 시작 후12h 간격으로 샘플을 취하여 DCW (Dry cell weight), TFA (Total fatty acid), 지방산 (EPA, DHA등)을 분석하였음.

- Yeast extract 농도에 따른 영향 (배양 60시간째)을 아래 그림에 나타낸 바와 같이 yeast extract 7 g/l 농도에서 TFA 생산량 1.68 g/l로 가장 높게 나타났음. 아래 표에 나타낸 바와 같이 유기질소원 농도가 낮을수록 EPA 함량이 낮아졌으며, EPA 생산량은 yeast extract 10g/l에서 가장 높은 0.13g/l로 TFA에 약 9.3%를 나타냈음. 추후 실험의 yeast extract 농도는 10g/l로 하였음.



유기 질소원 농도의 영향

유기 질소원 농도에 따른 지방산 조성 분석

		C14:0	C15:0	C16:0	C17:0	C18:0	C20:4	C20:5 (ω -3)	C22:5 (ω -6)	C22:5 (ω -3)	C22:6 (ω -3)
	1 g/l	16.29	0.62	37.54	-	1.11	1.10	5.02	10.15	0.88	25.18
FA	4 g/l	13.50	1.05	34.16	-	0.93	1.49	5.82	12.44	1.01	27.83
(%)											
TFA)	7 g/l	7.29	0.94	28.66	-	0.97	2.15	8.82	15.24	1.30	32.97
	10 g/l	5.18	1.07	26.27	-	0.70	2.31	9.30	17.36	1.45	34.70

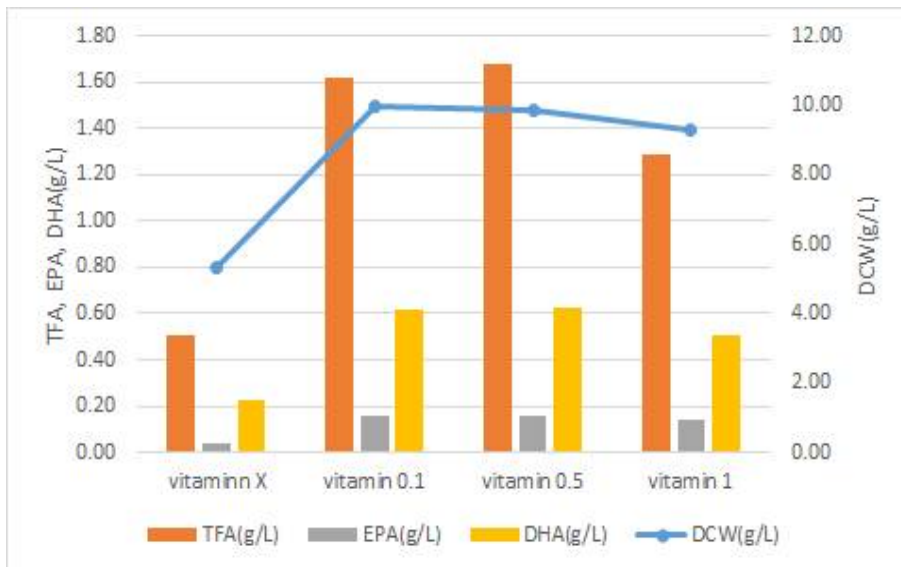
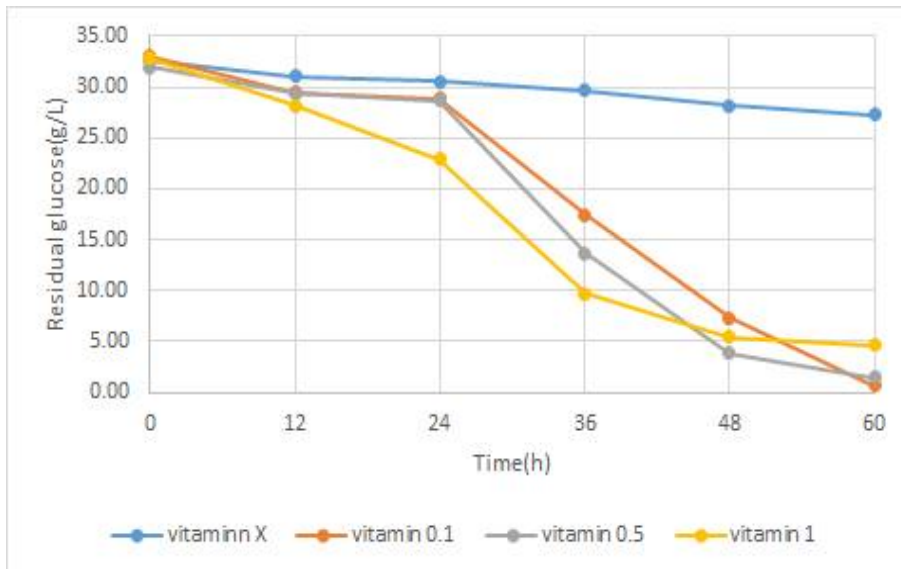
(3) 비타민 농도의 영향

- 다중불포화지방산의 함량이 증진된 변이균주의 비타민 농도에 따른 영향을 살펴보기 위해 5L 배양기를 이용하여 실험을 진행하였음. 기본 배지 조성을 glucose 30 g/l, KH_2PO_4 10 g/l, sea salt 5 g/l로 하였고 working volume 2.5 l, 접종량은 10%로 하였음. 배양 조건은 28°C, 200 rpm, 공기공급량 2.0 vvm, 초기 pH 6.0으로 하였음. 비타민 농도의 영향을 알아보기 위해 비타민을 각각 0.1 ml/l(Thiamine 0.95 mg/l, Vitamine B12 0.1 mg/l, Biotin 0.02 mg/l), 0.5 ml/l(Thiamine 4.75 mg/l, Vitamine B12 0.5 mg/l, Biotin 0.1 mg/l), 1 ml/l(Thiamine 9.5 mg/l, Vitamine B12 1 mg/l, Biotin 0.02 mg/l)를 첨가하였음. 배양 시작 후 12h 간격으로 샘플을 취하여 DCW(Dry cell weight), TFA (Total fatty acid), 지방산 (EPA, DHA등)을 분석하였음.
- 그 결과, 아래 그림에 나타낸 바와 같이 비타민을 첨가하지 않았을 때 배양 마지막 까지 약 5 g/l의 glucose만을 소모하는 반면, 비타민을 농도별 (0.1, 0.5, 1.0 ml/l)로 첨가한 실험군에서는 첨가된 glucose를 급격히 소비하였음. 아래 표에서와 같이 비타민의 농도가 높을수록 EPA 함량이 높아지는 것을 확인 하였으나, 최종적으로 EPA생산성을 확인했을 때 비타

민을 첨가한 실험군에서 모두 0.16g/L의 EPA생산량으로 비슷하게 나타났음. 변이균주의 배양에 효과적인 비타민 농도는 0.1 ml/l(Thiamine0.95 mg/l, Vitamine B12 0.1 mg/l, Biotin 0.02 mg/l)임을 확인 하였고, 추후 실험의 비타민 농도는 0.1 ml/l로 하였음.

비타민 농도에 따른 지방산 조성 분석

		C14:0	C15:0	C16:0	C17:0	C18:0	C20:4	C20:5 (ω -3)	C22:5 (ω -6)	C22:5 (ω -3)	C22:6 (ω -3)
	Vitamin X	-	9.86	5.31	-	2.39	2.59	8.06	20.15	2.09	44.44
FA	Vitamin 0.1	4.63	0.79	25.65	-	0.60	2.21	9.23	16.94	1.76	37.33
(% TFA)	Vitamin 0.5	4.55	0.76	24.68	-	0.57	2.22	9.97	16.89	1.60	38.01
	Vitamin 1	2.65	0.83	22.04	-	0.64	2.46	10.69	18.33	1.86	39.54

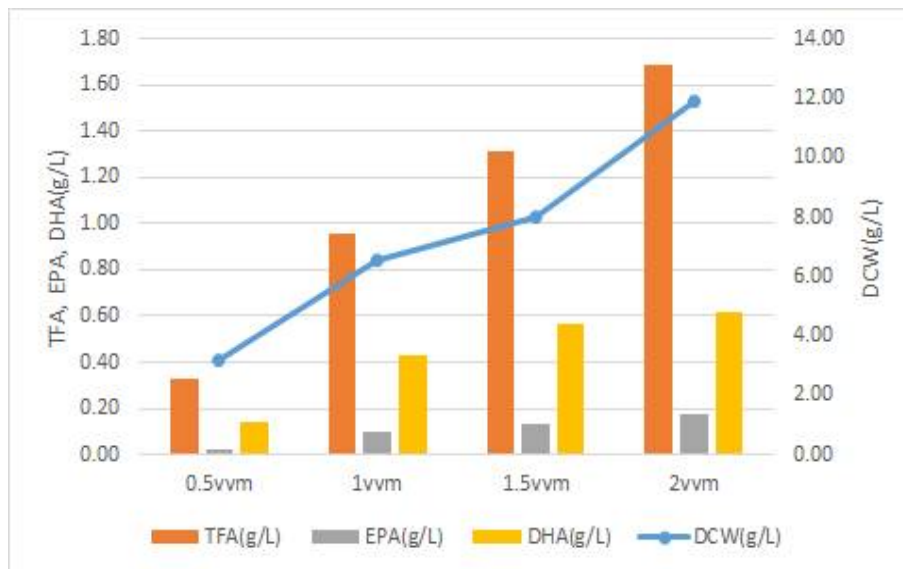


비타민 농도의 영향

2. 배양 공정 변수 최적화

(1) Aeration의 영향

- 다중불포화지방산의 함량이 증진된 변이균주의 aeration의 영향을 살펴보기 위해 5L 배양기를 이용하여 실험을 진행하였음. 기본 배지 조성을 glucose 30 g/l, KH_2PO_4 10 g/l, sea salt 5 g/l로 하였고 working volume 2.5 l, 접종량은 10%로 하였음. 배양 조건은 28°C, 200 rpm, 공기공급량 2.0 vvm, 초기 pH 6.0으로 하였으며. 비타민 농도는 0.1 ml/l(Thiamine 0.95 mg/l, Vitamine B12 0.1 mg/l, Biotin 0.02 mg/l)를 첨가하였음. aeration의 영향을 확인하기 위해 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 vvm으로 조건을 달리하여 실험을 진행하였음. 배양 시작 후 12h 간격으로 샘플을 취하여 DCW(Dry cell weight), TFA (Total fatty acid), 지방산 (EPA, DHA등)을 분석하였음.
- 그 결과, 아래 그림에 나타낸 바와 같이 2.0 vvm 조건에서 DCW 11.9g/l, TFA 1.69g/l, EPA 0.17 g/l로 가장 높은 생산량을 나타냈음. 또한 aeration이 높을수록 전체지방산중 EPA 함량이 높았으며, dlc균주의 배양에서 적합한 aeration량은 2.0 vvm으로 나타났음.



Aeration의 영향

미세조류 오일의 지방산 함량 분석

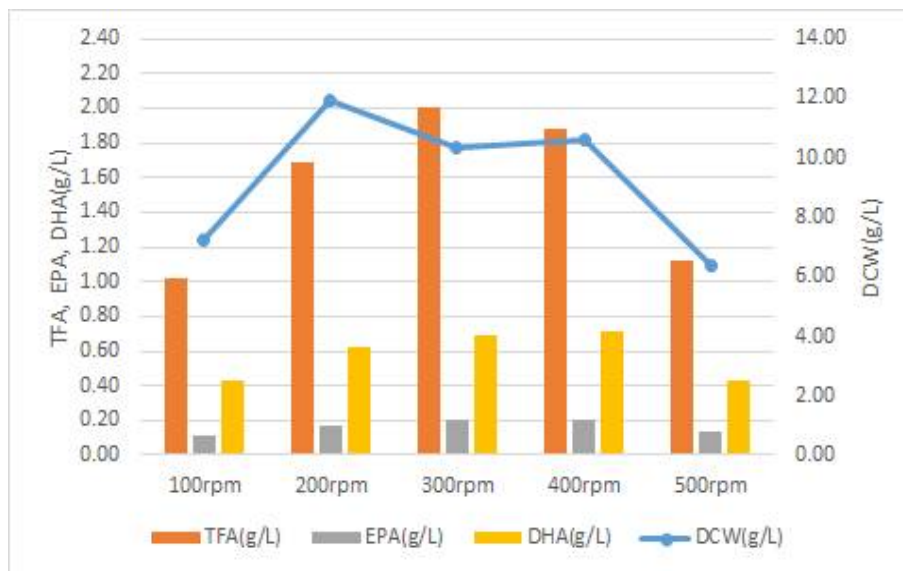
		C14:0	C15:0	C16:0	C17:0	C18:0	C20:4	C20:5 (ω-3)	C22:5 (ω-6)	C22:5 (ω-3)	C22:6 (ω-3)
	0.5 vvm	1.43	1.43	21.70	-	1.95	1.11	6.70	20.08	3.79	41.62
FA	1.0 vvm	0.90	0.95	16.44	-	0.89	1.62	10.00	20.94	3.81	44.84
(%)											
TFA)	1.5 vvm	0.91	1.02	18.41	-	0.40	1.78	10.16	20.64	3.52	43.08
	2.0 vvm	6.67	0.50	26.75	-	1.37	2.35	10.35	15.90	1.33	34.63

(2) 교반속도의 영향

- 다중불포화지방산의 함량이 증진된 변이균주의 교반속도의 영향을 살펴보기 위해 5L 배양기를 이용하여 실험을 진행하였음. 기본 배지 조성을 glucose 30 g/l, KH₂PO₄ 10 g/l, sea salt 5 g/l로 하였고 working volume 2.5 l, 접종량은 10%로 하였음. 배양 조건은 28℃, 200 rpm, 공기공급량 2.0 vvm, 초기 pH 6.0으로 하였으며, 비타민 농도는 0.1 ml/l(Thiamine 0.95 mg/l, Vitamine B12 0.1 mg/l, Biotin 0.02 mg/l)를 첨가하였음. 교반속도의 영향을 확인하기 위해 100, 200, 300, 400, 500rpm으로 조건을 달리하여 실험을 진행하였음. 배양 시작 후 12h 간격으로 샘플을 취하여 DCW(Dry cell weight), TFA (Total fatty acid), 지방산 (EPA, DHA등)을 분석하였음.
- 그 결과, 아래 그림에 나타낸 바와 같이 300 rpm 조건에서 EPA 0.21g/l (10.4%)로 가장 높은 생산량을 나타냈음. 또한, 아래 표에 나타낸 바와 같이 300 pm 조건에서 배양 36시간째 지질함량이 30.1%를 나타냈음. 300 rpm에서 높은 EPA 생산량 및 지질 함량을 나타냈음.

미세조류 오일의 지방산 함량 분석

	C14:0	C15:0	C16:0	C17:0	C18:0	C20:4	C20:5 (ω -3)	C22:5 (ω -6)	C22:5 (ω -3)	C22:6 (ω -3)
100rpm	0.75	1.35	15.26	-	-	3.45	11.32	21.28	3.21	42.51
200rpm	2.32	1.30	22.55	-	0.69	2.45	10.10	18.25	2.69	39.15
300rpm	6.67	0.50	28.75	-	1.37	2.35	10.30	15.90	1.33	34.63
400rpm	3.74	0.38	22.15	-	0.62	3.07	10.98	15.57	1.45	37.72
500rpm	2.62	0.38	18.54	-	0.81	3.56	11.98	17.11	1.90	38.70

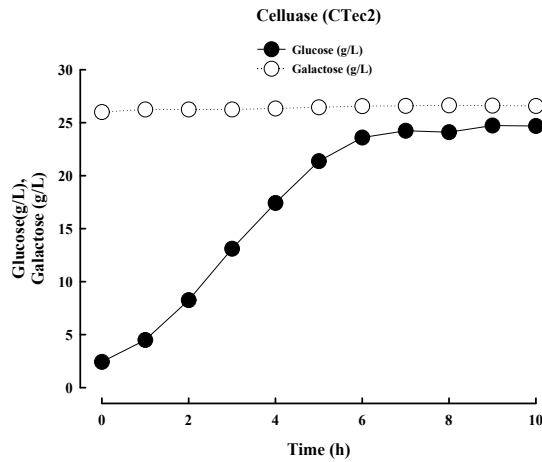


300rpm					
Time(h)	DCW (g/L)	Lipid (% Biomass)	TFA (g/l)	EPA (% TFA)	DHA (% TFA)
24h	7.17	21.63	1.55	3.56	45.41
36h	10.45	30.09	3.04	4.39	32.86
48h	11.31	22.46	2.54	8.01	33.32
60h	10.37	19.39	2.01	10.13	34.63

교반속도의 영향

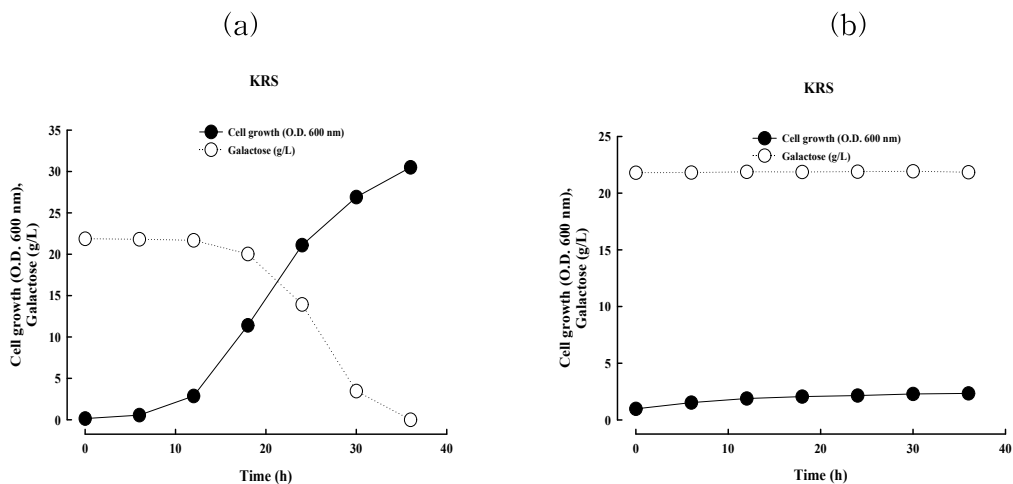
(3) 해조류 우뚝가사리를 이용한 *Thraustochytrid* 미세조류의 배양

- 우뚝가사리는 산전처리, 효소 전처리를 통해 galactose와 glucose를 얻을 수 있음. 산전처리는 100 g의 우뚝가사리에 H₂SO₄를 첨가하여 autoclave를 이용하여 128℃에서 35분 동안 열처리를 하였음. 8000 rpm에서 30분간 원심분리 하여 찌꺼기를 제거한 다음 CaCO₃를 첨가하여 pH 5.5로 중화하고 0.2 μm filter로 여과하여 사용하였음. 산전처리를 이용하여 우뚝가사리에 주요 당 성분인 agar를 가수분해 할 수는 있지만 cellulose는 거의 분해되지 않는 것으로 나타남. 따라서 추가적으로 우뚝가사리에 존재하는 cellulose를 가수분해하기 위해 Celluase (CTec2)를 첨가하고 37℃에서 200 rpm으로 6시간 가수분해 후 8000 rpm에서 30분간 원심분리 하여 찌꺼기를 제거하고 0.2 μm filter로 여과하여 사용하였음. 최종적으로 100 g의 우뚝가사리로부터 galactose 26.57 g/L, glucose 24.68 g/L를 얻었으며, 대부분이 단당류로 효과적으로 전환되어 미세조류 배양을 위한 탄소원으로 이용하였음.



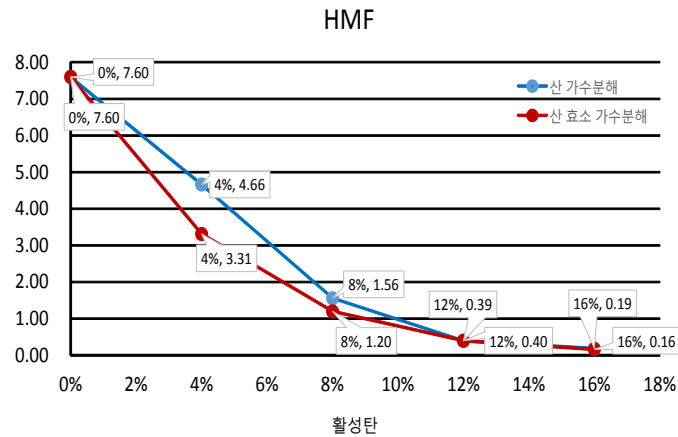
우뭇가사리 산/효소 가수분해

- 우선 우뭇가사리 산 가수분해액을 이용하여 유기영양 미세조류의 배양이 가능한 지 확인하기 위해 yeast extract 10 g/L, KH_2PO_4 9g/L, sea salt 5g/L를 기본배지로 하고 탄소원을 galactose와 우뭇가사리 산 가수분해물을 이용해서 Thraustochytrid 미세조류를 배양하였음. 배양 결과, galactose 배지에서는 36시간 만에 모든 galactose를 소모하면서 잘 자라는 반면 우뭇가사리 산 전처리 배지에서는 cell growth의 증가가 없었으며 galactose 소모량도 거의 없는 것으로 나타났음. 이는 산 가수분해 과정에서 생성되는 HMF의 독성에 의한 것으로 사료되며, 실제 우뭇가사리의 산 가수분해물 중에는 HMF가 7.6 g/L로 매우 높은 농도로 존재하는 것으로 확인되었음. 따라서 우뭇가사리 산 전처리액을 이용하여 KRS를 배양하기 위해서는 HMF의 제거 공정이 필요한 것으로 나타났음.



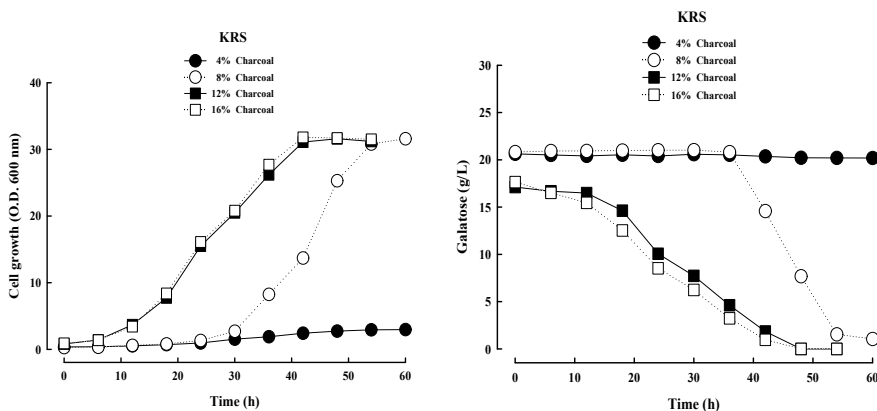
Galactose를 이용한 Thraustochytrid 미세조류의 배양(a)과 우뭇가사리 산 가수분해물의 독성(b)

- 우뭇가사리 산가수분해 과정에서 생성된 HMF를 제거하기 위해 활성탄을 가수 분해액에 4%, 8%, 12%, 16%의 농도로 첨가한 후 37°C에서 200 rpm으로 24 시간동안 처리하였음. 그 결과, 활성탄 처리 농도 12% 이상에서 95% 이상의 HMF가 제거되는 것으로 나타났음.



활성탄 처리에 의한 우뭇가사리 가수분해액 중의 HMF 제거

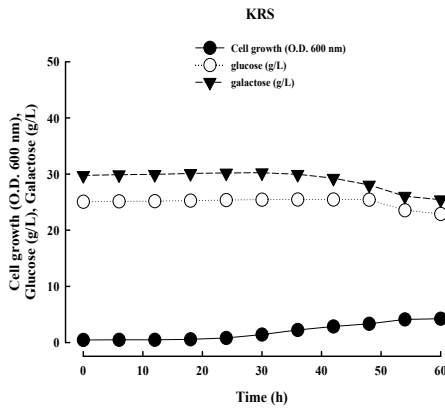
- 활성탄을 처리한 우뭇가사리 산가수분해액을 이용하여 *Thraustochytrid* 미세조류를 배양한 결과, 4%의 활성탄을 처리한 경우에는 미세조류가 성장하지 못하였지만, 8% 활성탄을 처리한 경우는 배양 30 시간째 부터 균체 증식이 증가하면서 54시간째에 galactose를 완전히 소비하였고, 12%와 16% 활성탄을 처리한 경우는 배양 초기부터 활발한 균체 증식이 발생하는 것으로 나타났음.



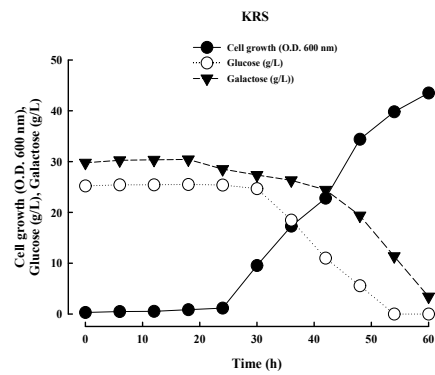
활성탄 처리 우뭇가사리 산 가수분해액을 이용한 *Thraustochytrid* 미세조류의 배양

- 마찬가지로 우뭇가사리 산-효소 가수분해액을 활성탄으로 처리한 후 *Thraustochytrid* 미세조류를 배양한 결과, 산 가수분해액과 유사하게 8%의 활성탄을 처리한 경우에 균체 증식이 가능한 것으로 나타났다. 탄소원의 함량이 높아지면서 산 가수분해물로 배양했을 때 보다 약 30% 정도 높게 균체 증식을 보였으며, glucose와 galactose를 동시에 이용하는 것으로 확인되었음. 우뭇가사리 산, 산-효소 가수분해액을 이용해 생성된 오메가-3 지방산 오일의 함량은 최대 건조균체량의 10%인 것으로 나타났다.

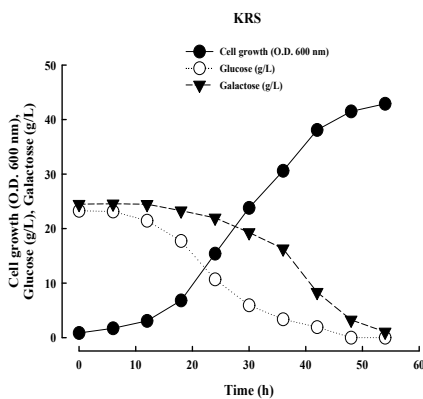
활성탄 4%



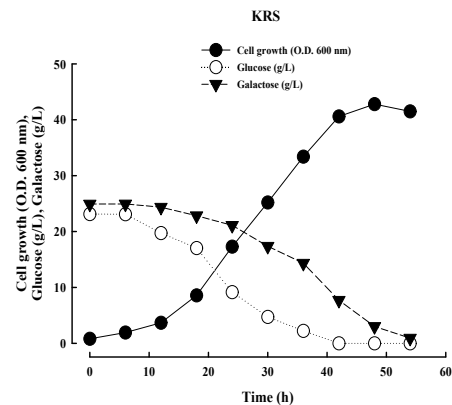
활성탄 8%



활성탄 12%



활성탄 16%



활성탄 처리 우뭇가사리 산-효소 가수분해물을 이용한 *Thraustochytrid* 미세조류의 배양

우뭇가사리 산, 산-효소 가수분해물을 이용한 *Thraustochytrid* 미세조류의 배양과
오메가-3 지방산 오일의 생산

Carbon source	Charcoal (%)	DCW (g/L)	Lipid (% Biomass)	TFA (g/l)	DHA (%TFA)	DHA (g/l)	productivity (mg/L/h)
galactose	-	17.8	8.52	1.52	41.99	0.64	17.69
Acid hydrolysa te	4	2.5	5.97	0.15	41.35	0.06	1.16
	8	19.5	8.54	1.67	40.30	0.67	12.45
	12	19.7	8.02	1.58	42.72	0.68	16.09
	16	19.9	8.25	1.65	46.25	0.76	18.13
Acid and enzyme hydrolysa te	4	5.5	8.53	0.48	41.64	0.20	3.31
	8	27.3	10.21	2.80	44.50	1.24	20.73
	12	28.3	8.55	2.43	50.21	1.22	29.01
	16	27.4	8.20	2.25	52.41	1.18	28.12

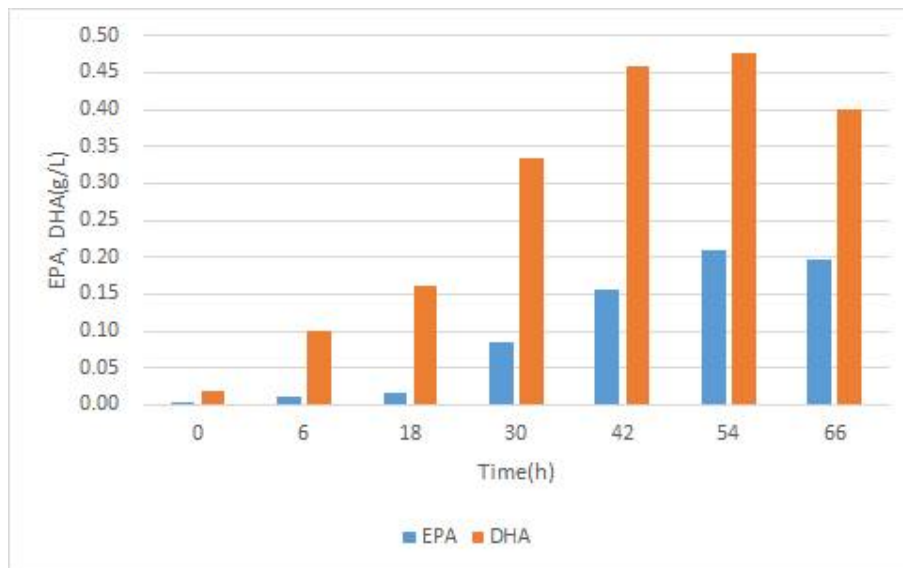
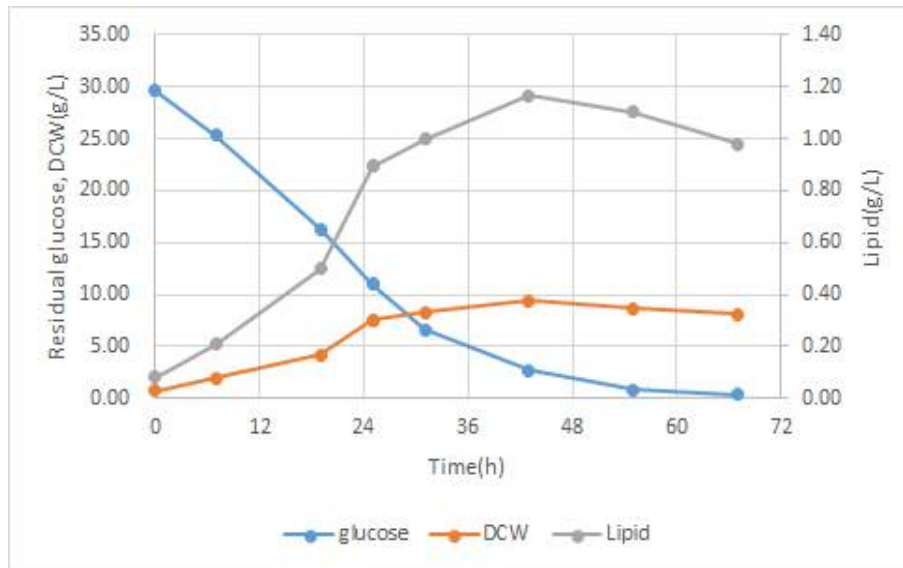
3. 스케일업 (500L 배양기)

(1) 50, 500리터 배양기 이용한 변이균주의 EPA생산

- 50리터와 500리터의 배양기를 이용하여 변이균주의 스케일업 배양 실험을 수행하였음. 기본 배지 조성을 glucose 30 g/l, KH₂PO₄ 10 g/l, sea salt 5 g/l로 하였고 working volume 2.5 l, 접종량은 10%로 하였음. 배양 조건은 28°C, 200 rpm, 공기공급량 1.0 vvm, 초기 pH 6.0으로 하였으며. 비타민 농도는 0.1 ml/l(Thiamine 0.9 5mg/l, Vitamine B12 0.1 mg/l, Biotin 0.02mg/l)를 첨가하였음. 배양온도는 28, pH를 6.5로 유지하고, 10 % 균체를 접종하여 100 rpm, 2.0 vvm으로 유지하였음. 생성된 오메가-3 지방산 오일은 미세조류 균체로부터 Bligh-Dyer 방법으로 추출하여 분석하였음 (125 mg의 건조균체에 클로로포름 6.25 ml, 메탄올 12.5 ml과 50 mM K₂HPO₄ buffer 용액 (pH 7.4)를 5 ml 첨가하여 28°C에서 200 rpm으로 1시간 동안 교반한 후, 클로로포름과 phosphate 버퍼를 각각 6.25 ml 첨가하여 약 30번 정도 섞어 준 다음 정지하였음. 분리된 하부의 유기용매 층 (약 12.5 ml)을 회수하여 80°C dry oven에서 약 30분 정도 건조한 후 오일의 무게를 측정).
- 50리터 배양기를 이용한 변이균주의 배양에서 43시간째 최대 약 9.41 g/L의 건조균체량이 얻어졌으며, 이때 전체 지방산 중 EPA함량은 약 15%로 0.16 g/l의 EPA생산량을 나타냈음.

지방산 함량 분석

	C14:0	C15:0	C16:0	C17:0	C18:0	C20:4	C20:5 (ω-3)	C22:5 (ω-6)	C22:5 (ω-3)	C22:6 (ω-3)
FA (% TFA)	0.96	0.38	17.17	-	0.54	3.26	15.02	19.75	2.26	39.42

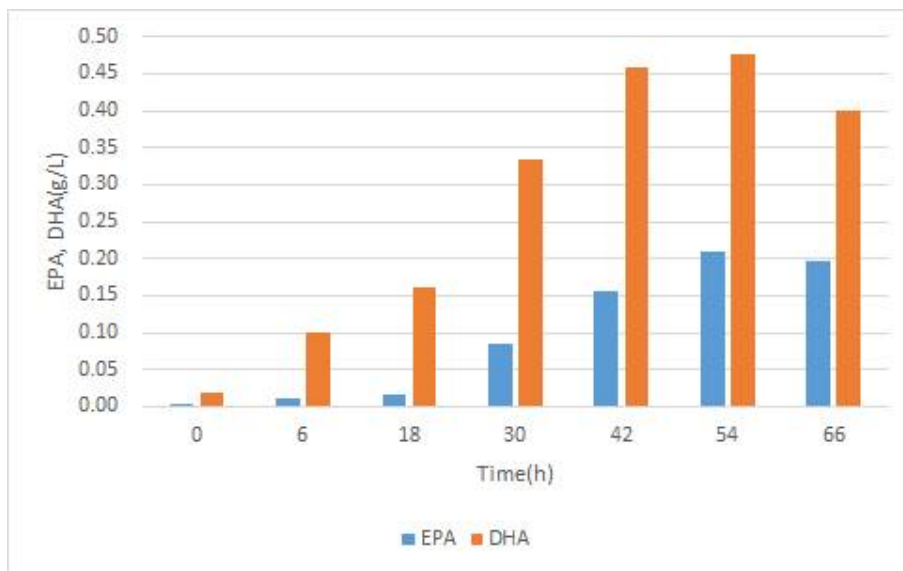
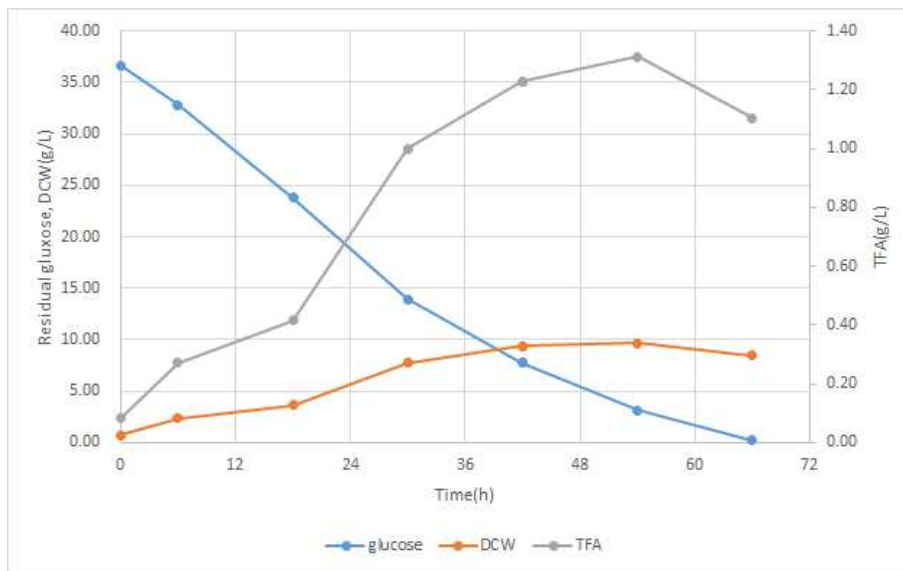


50리터 배양기를 이용한 변이균주 배양

- 500리터 배양기를 이용한 변이균주의 배양에서 54시간째 최대 약 9.64 g/L의 건조균체량이 얻어졌으며, 이때 전체 지방산 중 EPA함량은 약 17.16%로 0.21 g/l의 EPA생산량을 나타냈음.

지방산 함량 분석

	C14:0	C15:0	C16:0	C17:0	C18:0	C20:4	C20:5 (ω -3)	C22:5 (ω -6)	C22:5 (ω -3)	C22:6 (ω -3)
FA (% TFA)	0.78	0.34	15.76	-	0.80	4.21	17.16	21.07	2.11	37.30



500리터 배양기를 이용한 변이균주 배양

제 4 절 EPA 오일 추출 및 농축 공정 개발

1. EPA 오일 추출 및 농축 공정

(1) Direct methylation

- EPA 오일의 농축을 위해서는 건조 균체에서 오일 추출후 methylation 과정이 필요한데 이와같은 2단계 공정을 간소화를 위해 건조 균체에서 바로 FAME로 전환시키는 direct methylation 공정을 확립하였음.
- 500리터 배양에서 얻어진 건조균체 20g에 용매(메탄올:황산 (v/v) = 96:4) 250ml를 첨가하여 80℃에서 450rpm으로 8시간 교반하였음. 반응이 끝난 반응액에 100ml의 증류수와 50ml의 헥산을 첨가한 후 상층부의 헥산층을 분리하였음. 분리한 헥산층을 60℃ 드라이 오븐에 건조하였음.
- 그 결과, direct methylation방법으로 20g의 건조 균체로부터 1.89g의 오일을 얻어 63%의 회수율을 나타냈음. 지방산 조성은 아래표에 나타냈음.

지방산 함량 분석

	C14:0	C15:0	C16:0	C17:0	C18:0	C20:4	C20:5 (ω-3)	C22:5 (ω-6)	C22:5 (ω-3)	C22:6 (ω-3)
FA (% TFA)	0.78	0.34	15.76	-	0.80	4.21	17.16	21.07	2.11	37.30

(2) 요소부가법을 이용한 EPA 농축

- Direct methylation방법으로 얻어진 지방산을 요소를 이용하여 EPA 농축실험을 진행하였음.

추출한 FAME을 50 ml bottle에 0.5 g씩 분주한 후 요소를 FAME에 대한 2, 4, 6, 8 (w/w) 비율별로 각각 1, 2, 3, 4 g 첨가하였음. 메탄올을 메탄올 : urea = 1 : 5 (v/w)로 각각 5, 10, 15, 20 ml 첨가하고 60 ~ 65°C에서 200 rpm 교반속도로 투명하게 될 때까지 교반 후 각각 4°C와 20°C의 온도에서 overnight으로 cooling 하였음. 앞의 반응이 끝나면 요소가 다시 석출되는데 요소를 제외한 상등층을 분리한 후 증류수 10 ml과 첨가 5 ml을 첨가하여 약 2 분간 교반 후 13000 rpm으로 10분간 원심분리 하였음. 상등부의 hexane 층을 추출한 후 G. C를 이용하여 오일의 지방산 함량을 분석하였음.

- 그 결과, 변이균주 FAME의 경우 지질 : 요소 (w/ w) = 1 : 2와 cooling 온도 20°C에서 EPA 함량이 35%로 가장 높음을 확인하였음. 표의 EPA(C 20:5 ω-3)를 보면, 요소의 양이 많아질수록 탄소사슬의 개수가 낮은 지방산들과 불을 확률이 높아지기 때문에 DHA 함량은 높아지고 EPA 함량은 낮아졌음. cooling 온도의 경우, 온도가 높아질수록 요소가 석출되는 시간이 오래 걸리기 때문에 지방산들과 반응할 확률이 낮아지는 것으로 예상됨.

요소부가법 지방산 함량 분석

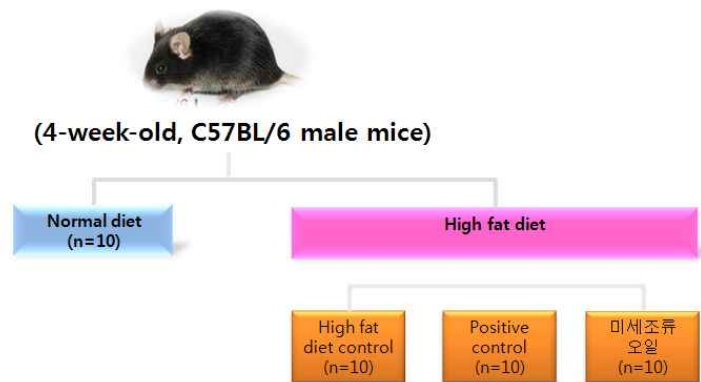
		FA (% TFA)	C14:0	C15:0	C16:0	C17:0	C18:0	C20:4	C20:5 (ω-3)	C22:5 (ω-6)	C22:5 (ω-3)	C22:6 (ω-3)
		FAME : 요소	0.48	0.18	15.54	-	0.91	3.28	14.24	23.67	4.16	35.90
Non urea fracti on	4 °C	1 : 2	-	-	-	-	-	4.58	29.85	20.75	-	44.81
		1 : 4	-	-	-	-	0.49	4.62	25.70	19.63	1.76	46.70
		1 : 6	-	-	-	-	0.37	4.15	21.05	23.99	2.59	47.72
		1 : 8					0.39	4.47	22.21	23.98	1.76	46.43
	20 °C	1 : 2	-	-	3.74	-	-	4.41	35.41	13.72	-	38.07
		1 : 4	-	-	2.20	-	-	4.67	31.28	14.23	0.91	43.12
		1 : 6	-	-	3.09	-	-	4.72	22.09	25.55	0.97	42.18
		1 : 8	-	-	4.34	-	-	4.83	20.48	25.12	1.25	42.75

제 6 절 EPA 오일의 효능 테스트

1. 미세조류 다중불포화 지방산 오일(미세조류 오일)의 체중 감량 효과 평가

- 일정기간의 고지방식이에 의해 자동적으로 비만/당뇨가 유발되는 C57BL/6 mice를 1주일 동안 고형식이(AIN-93 diet)를 급여하여 환경에 적응시킨 후 난괴법(randomized block design)에 의해 4군(NDC; normal diet control, HDC; high fat diet control, positive control(ex. fish oil), 미세조류오일 투여군) 으로 나눈 후 실험기간동안 실험군은 60% fat AIN-93 diet 고지방식이를 공급하고 물과 식이는 자유로이 섭취하도록 하여 실험을 수행하였음.

(1) 실험방법

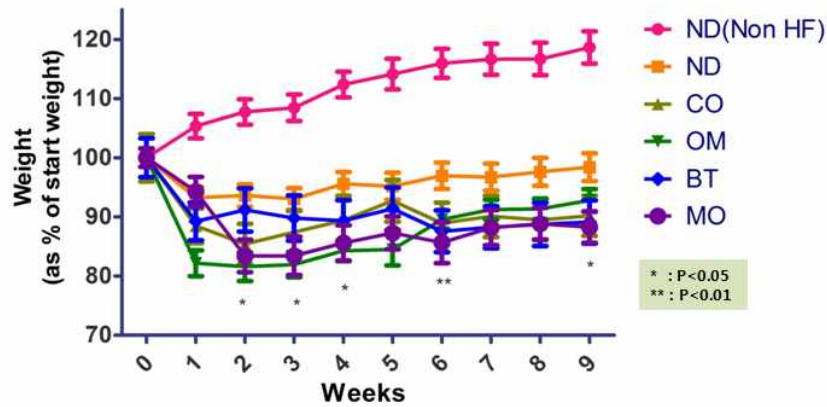


실험동물의 비만 유발 및 시료투여, 체중 증가량 조사

- 실험동물의 그룹을 설정하고, 4주 동안 고지방식이를 함으로써 비만을 유발시킴.
- 비만 유발을 확인한 후, 미세조류 오일 등의 시료를 각각의 동물에 경구 투여함.
- 실험에 사용된 동물은 생후 5주된 수컷 C57BL/6 생쥐로서, 4주간의 고지방식이에 의해 비만을 유발시킨 후 실험에 사용함.
- 실험디자인 설정: 총 6군으로 나눔.
- 비만유도 후 정상식으로 전환, 9주간 각 시료 투여 (5g/kg씩, 2일에 1회), 체중은 1주일에 한번씩 기록함.

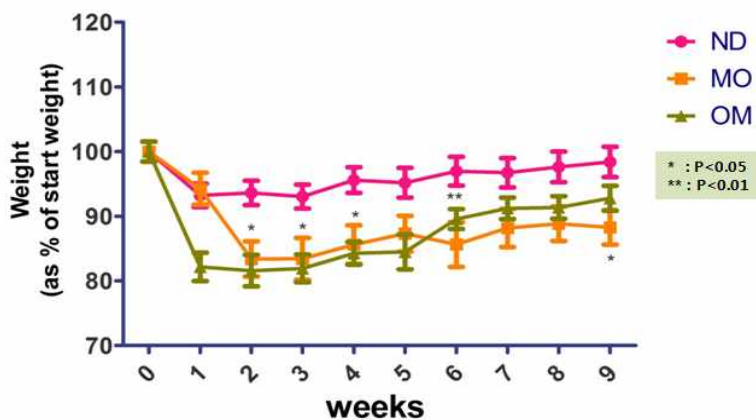
(2) 실험결과

- 4주간 고지방식이 섭취 후 비만이 유도된 C57BL/6N mice에 9주간 정상식을 하면서 각 시료를 투여했을 때 (5g/kg씩, 2일에 1회), 대조군 (PBS투여)에 비해 미세조류 다중불포화 지방산 오일을 투여한 실험군에서 2주째부터 유의성 있게 체중이 감소하는 것으로 나타남 (ND군에 비해 10% 정도 감소).



ND (Non HF) : 실험기간내에 high fat diet를 하지 않고 정상식이만 한 군, ND : 고지방식이 후 정상식을 하면서 PBS를 투여한 군, CO : 고지방식이 후 정상식을 하면서 corn oil을 투여한 군, OM : 고지방식이 후 정상식을 하면서 commercial fish 추출 omega-3 fish oil을 투여한 군, BT : 고지방식이 후 정상식을 하면서 beef tallow를 투여한 군, MO : 고지방식이 후 정상식을 하면서 미세조류 다중불포화 지방산 오일을 투여한 군

- 시험군중에서 미세조류 오일 (MO)과 Fish oil (OM)의 체중감소 효과가 다른 시험군에 비해 두드러지는 것으로 나타났는데, 두 군을 비교해 보면 투여기간이 증가할수록 fish oil 보다는 미세조류 오일(MO)의 체중 감소 효과가 더 우수한 것으로 나타남.



2. 미세조류 다중불포화 지방산 오일(미세조류 오일)의 혈중 지질 개선 효과

(1) 실험방법

혈중 지질 개선 효과 평가

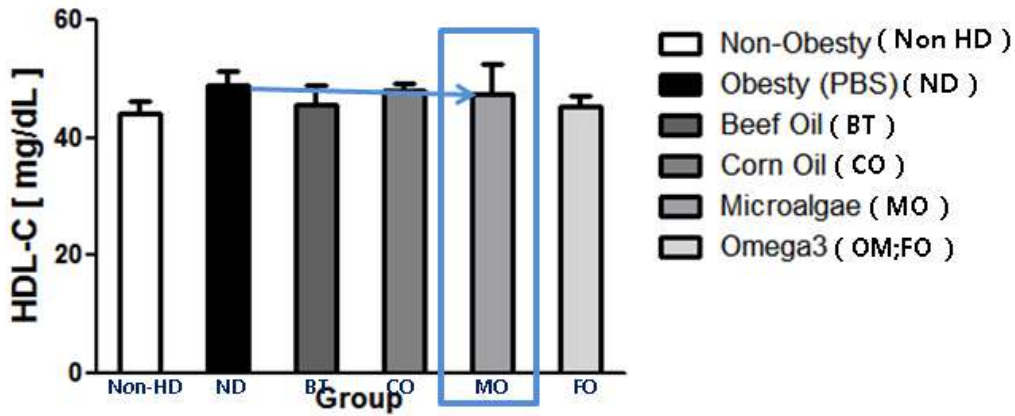
- 투여 종료 후 각 실험동물로 부터 혈액 채취
- 혈중 지질 농도 측정
- 혈액으로 부터 혈청 (serum) 분리
- 혈액분석기를 이용하여 중성지방 (TG), 총콜레스테롤 (TC), HDL 콜레스테롤 (HDL), LDL 콜레스테롤 (LDL) 함량 측정

간조직에서 지방 축적 억제 효과 평가

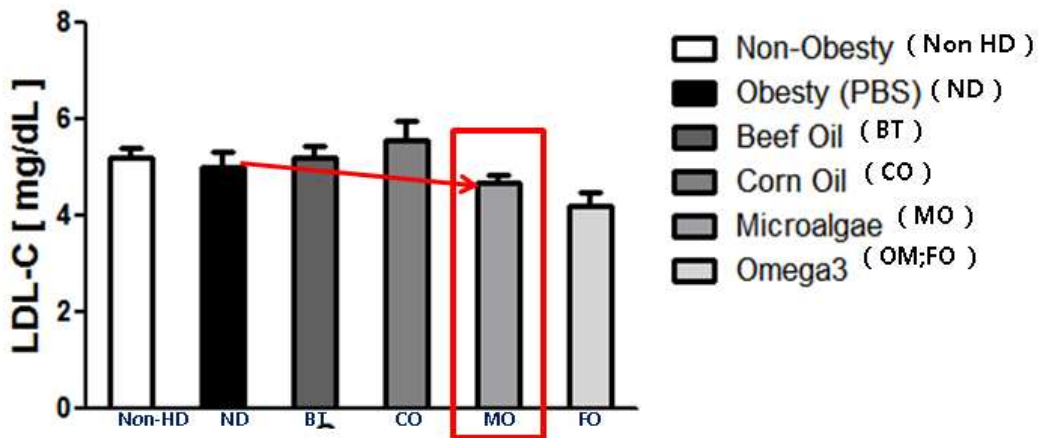
- 투여 종료 후 각 실험동물로 부터 간 조직 채취
- 조직 표본 제작
- Oil Red O 염색
- 채취한 간조직의 동결 (-80℃)
- 동결시료 절단 (6 μm 두께)
- 5% Oil Red O working solution 으로
- 염색
- Hematoxylin으로 대조염색
- 현미경하에서 지질함유 세포 측정

(2) 실험결과

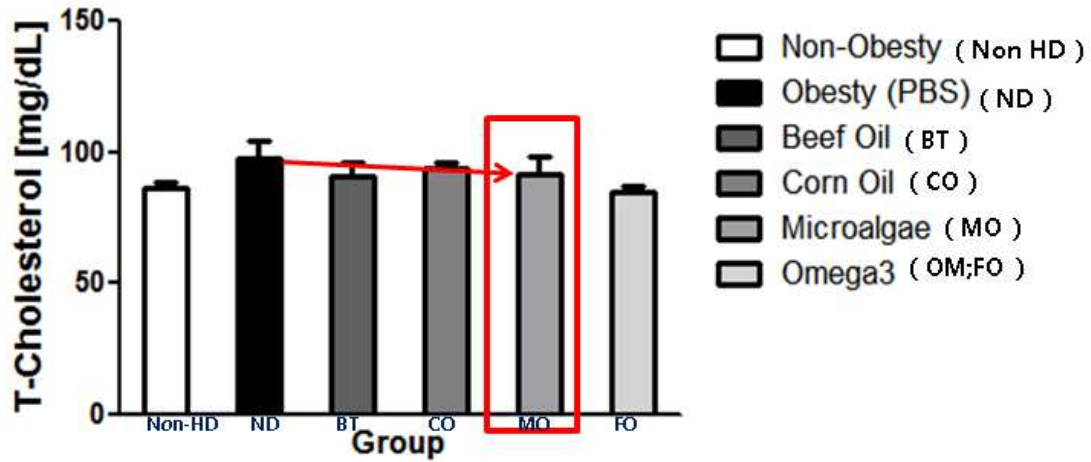
- HDL-Cholesterol (HDL) : 전 시험군의 혈액에서 대조군 (Non HD 또는 ND)에 비해 유의적으로 HDL-C의 농도 변화가 없는 것으로 나타남.



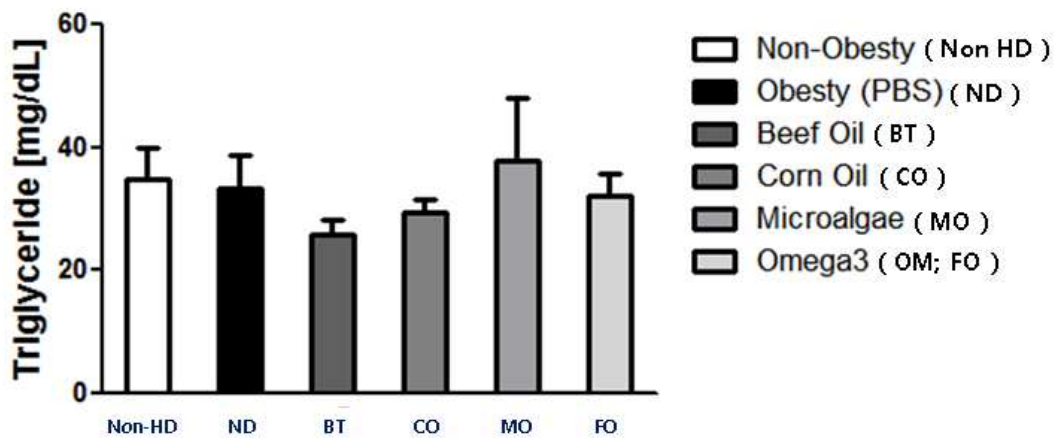
- LDL-Cholesterol (HDL-C) : 전 시험군의 혈액에서 대조군 (Non HD 또는 ND)에 비해 유의적으로 LDL- C의 농도 변화는 없는 것으로 보이나, MO 의 경우 ~10% 정도의 LDL-Cholesterol 감소효과를 나타냄.



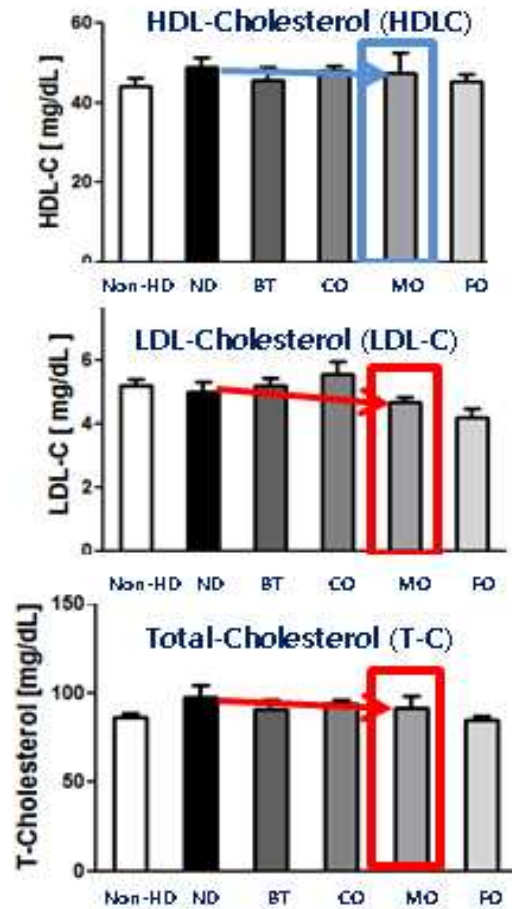
- Total-Cholesterol (T-C) : 전 시험군의 혈액에서 대조군 (Non HD 또는 ND)에 비해 유의적으로 T-C의 농도 변화는 없는 것으로 보이나, MO 의 경우 ~10% 정도의 Total Cholesterol 농도의 감소효과를 나타냄.



- Triglyceride (TG) : 전 시험군의 혈액에서 대조군 (Non HD 또는 ND)에 비해 유의적으로 TG의 농도 변화가 없는 것으로 나타남.



지방 축적 Cholesterol 감소효과



3. 미세조류 다중불포화 지방산 오일(미세조류 오일)의 간 조직내 지방 축적 억제 효과

(1) 실험방법

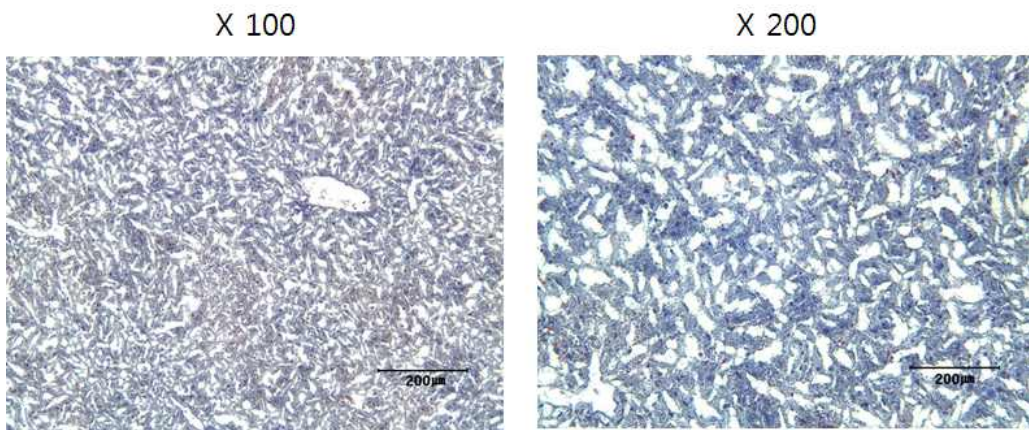
간조직에서 지방 축적 억제 효과 평가

- 투여 종료 후 각 실험동물로 부터 간 조직 채취
- 조직 표본 제작
- Oil Red O 염색
- 채취한 간조직의 동결 (-80℃)
- 동결시료 절단 (6 μm 두께)

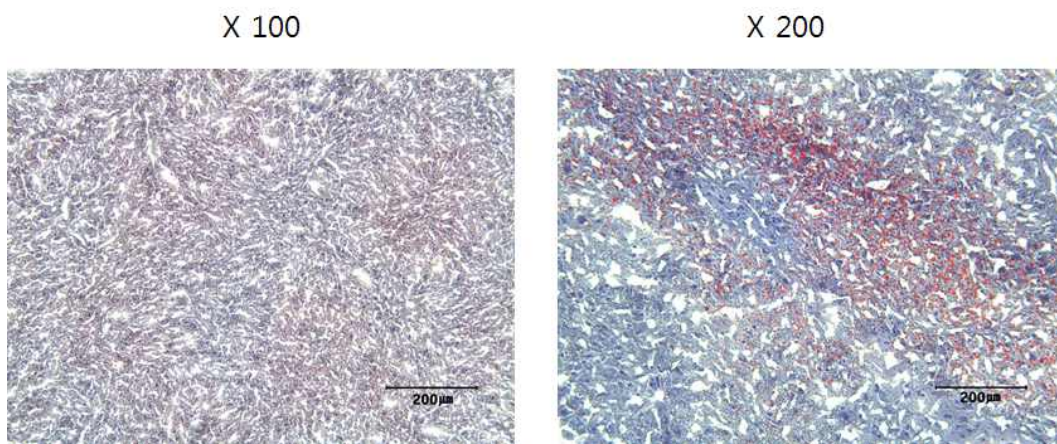
- 5% Oil Red O working solution 으로 염색
- Hematoxylin으로 대조염색
- 현미경하에서 지질함유 세포 측정

(2) 실험결과

- 비만 비유도군 (Non HD) : 간 조직내에서 지질이 축적된 세포가 거의 발견되지 않음.

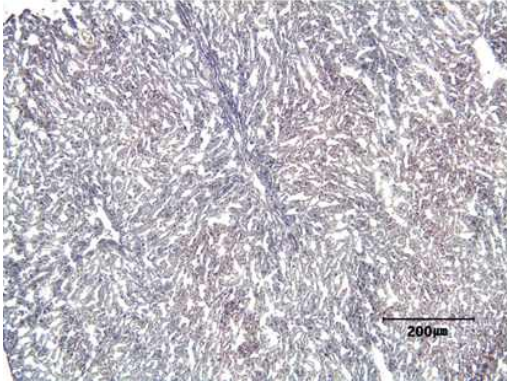


- 비만 유도 + 시료 비투여군 (ND) : 간 조직내에서 지방구 생성 정도로 보아 지질 축적이 심한 것으로 나타남.

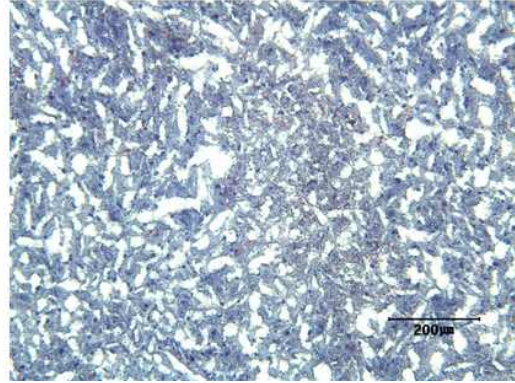


- 비만 유도 + 미세조류 오일 투여군 (MO) : 간 조직 내에서 지질 축적 정도가 약한 것으로 나타남.

X 100

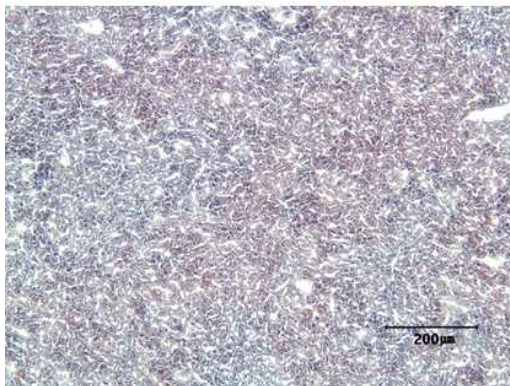


X 200

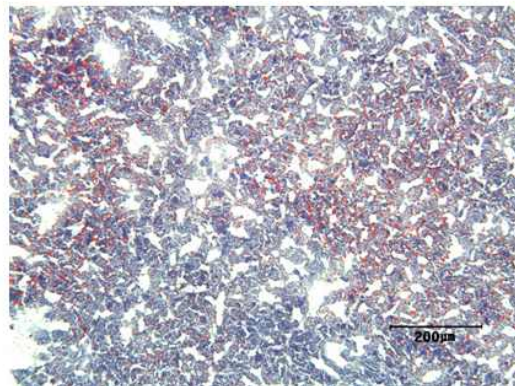


- 비만 유도 + corn oil 투여군 (CO) : 간 조직 내에서 지방구 생성 정도로 보아 지질 축적이 다소 심한 것으로 나타남

X 100

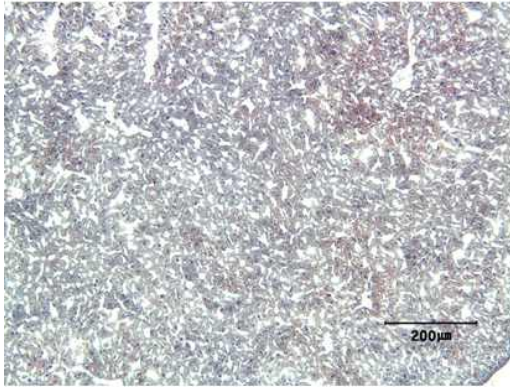


X 200

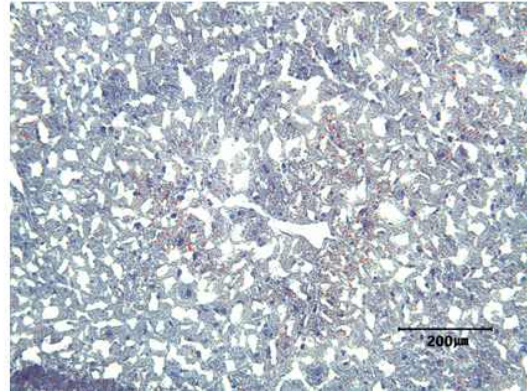


- 비만 유도 + beef tallow (우지) 투여군 (BT) : 간 조직 내에서 약간의 지질 축적이 관찰됨.

X 100

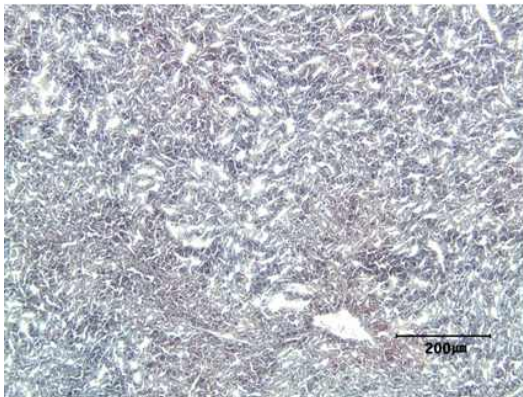


X 200

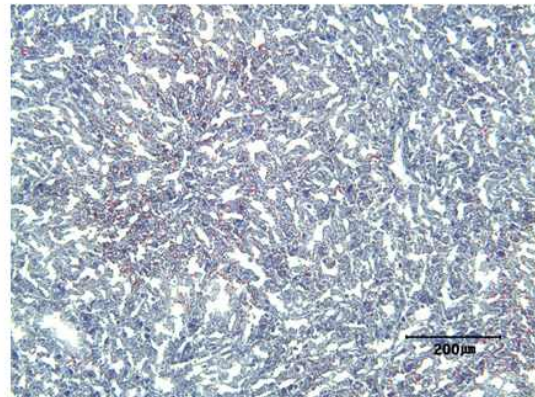


- 비만 유도 + fish oil 투여군 (OM) : 간 조직 내에서 약간의 지질 축적이 관찰됨.

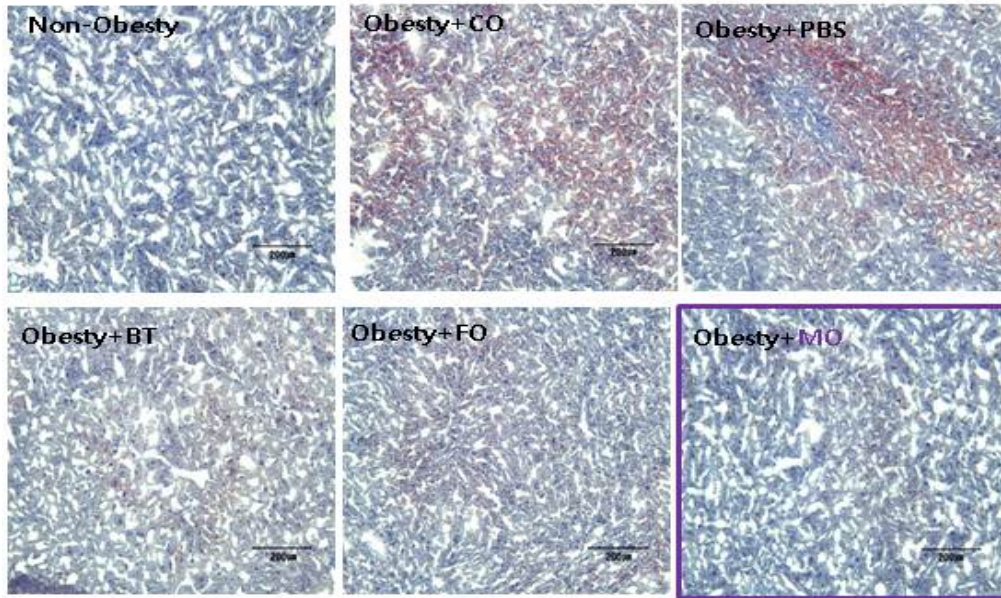
X 100



X 200



해양 미세조류 다중불포화 미세조류 오일의 간 조직내 지방 축적 억제 효과



ND: normal diet control, HD: high fat diet control, BT: beef tallow, CO: corn oil, FO: fish oil, MO: Microalgal oil

4. 결론

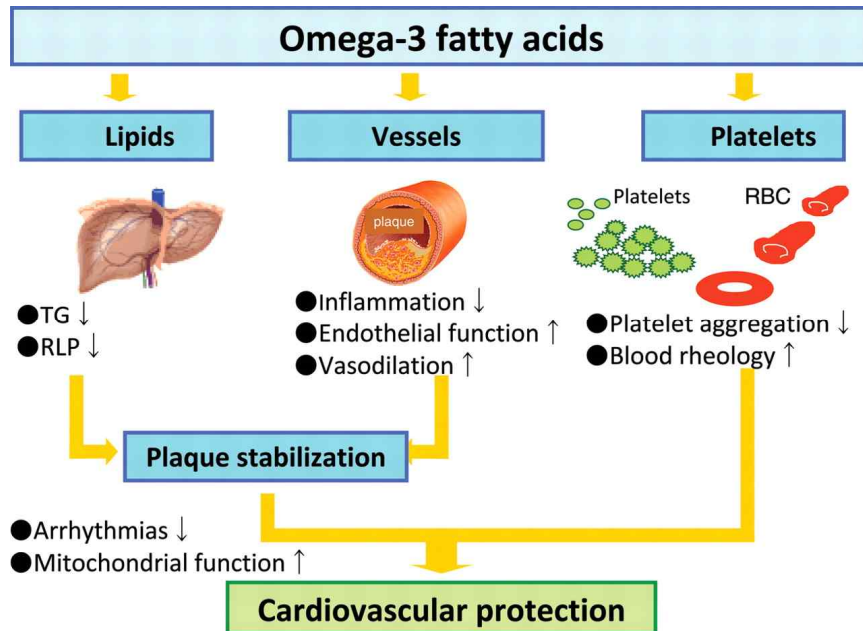
- 비만 고지방 식이 후 비만이 유도된 C57BL/6N mouse에 미세조류 오일 (MO)을 5g/kg body weight의 용량으로 2일에 1회, 9주간 투여했을 때 대조군 (ND군)에 비해 2주째부터 체중이 유의성 있게 감소하기 시작하여 실험 종료시까지 체중감소 효과가 유지됨.
- 비만 투여기간 동안 미세조류 오일 투여군(MO군)의 체중은 대조군(ND군)에 비해 10% 가량 감소되는 결과를 보임.
- 비만 미세조류 오일(MO)과 fish oil 투여군(OM;FO군)의 경우 체중 감소 효과가 둘 다 있었으나, 투여기간이 경과될 수록 (6주 이후 부터) 미세조류 오일(MO)에 의한 체중 감소 효과가 보다 뛰어난 결과를 보여 나타나 장기간 투여시 체중 감소 효과는 미세조류 오일 (MO)이 더 우수한 것으로 판단됨.
- 비만 그 밖에 beef tallow(BT)나 corn oil(CO) 투여군에서도 대조군(ND)에 비해 체중 감소 경향을 보였으나 뚜렷한 유의성은 나타나지 않음.

- 비만 체중 감소 효과와는 달리, 실험동물의 혈액을 분석한 결과 미세조류 오일(MO)에 의한 혈중 지질 개선효과는 나타나지 않음. 다른 시료들에 의해서도 혈청 내 HDL-C, LDL-C, T-C, TG의 농도에 있어 유의적인 변화는 없는 것으로 보이나, MO의 경우 ~10% 정도의 LDL-C 및 Total Cholesterol 농도의 감소효과를 나타냄.
- 비만 실험동물의 간 조직내 지질 축적을 억제하는 효과는 미세조류 오일 투여군(MO군)에서 가장 뚜렷한 것으로 나타남. 그 밖에 fish oil 투여군 (OM군) 및 beef talilow 투여군 (BT군)에서도 간 조직내 지질 축적이 대조군(ND군)에 비해 감소된 것으로 나타남.
- 비만 체중감소 효과 및 간 조직내의 지질 축적 억제 효과 면에서 실험동물에 투여된 시료 중에서 미세조류 오일(MO)에 의한 효과가 가장 우수한 것으로 나타나 미세조류 오일(MO)이 비만이 유도된 실험동물에 대한 항비만 효과가 있는 것으로 판단됨.
- 비만 추후 지질 대사 측면에서 혈중 지질 농도에 대한 영향이 없는 것으로 나타난 부분 및 기타 비만과 관련된 지표에 대한 영향을 평가하여 종합적인 측면에서 미세조류 오일의 항비만 효과를 입증해야 할 것으로 사료됨.

제 7 절 사업성 분석

1. 시장분석

- 고순도, 고농축 오메가-3 지방산은 고지혈증 치료제로 시판되고 있음.



오메가-3 다중불포화지방산 (DHA, EPA)의 심혈관 질환 효능

- 전세계 오메가-3 지방산 의약 시장 규모는 약 \$2.5B 수준이며, DHA와 EPA의 혼합 형태인 프로노바사의 오마코가 세계 시장을 주도하고 있으며, 일본 모찌다사의 에파텔, 미국 아마린사의 바스세파 제품이 판매되고 있음.

제품명	업체명	성분	매출
오마코	프로노바	EPA + DHA	1.8조원
에파텔	모찌다	EPA	5,000억원
바스세파	아마린	EPA	1,000억원



오메가-3 다중불포화지방산 (DHA, EPA) 고지혈증 제품

- 국내에서도 프로노바사의 오마코 제품이 수입, 판매되고 있으며, 2007년 71.7억에서 2014년 400억원으로 시장규모가 급성장하고 있음. 오마코의 특허가 만료된 이후 대부분의 제약기업들이 제네릭 제품을 개발, 출시하고 있는 상황임.

국내 고지혈증 시장 현황 (2007년 기준)

계열	매출액(억)	점유율(%)
statin	2766.3	84.4
simvastatin+ ezetimibe(바이토린)	203.8	5.9
fibrate(리피딜 슈프라 외)	138.4	4.2
atorvastatin+ amlodipine(카듀엣)	89	2.6
elcosapentaenoic acid(오마코)	71.7	2.1
ezetimibe(이지트롤)	14.2	0.4
nicotinic acid(니마스파노 외)	5.2	0.2

국내 오메가-3 고지혈증 시장 현황 (2015년 상반기)

품목	업체	상반기 처방액		증감률
		2015	2014	
오마코	건일제약	19652	21558	-8.8
오마론	영진약품	842		
시코	제일약품	507		
한미오메가	한미약품	186		
뉴마코	유유제약	178		
휴메가	안국약품	119		



Omega-3-Acid Ethyl Ester 90 1000mg (EPA EE 460mg, DHA EE 380mg, 알파-토코페롤 4mg)

2. 기술분석

- 현재 오메가-3 다중불포화지방산 고지혈증 의약 원료는 전량 fish oil로부터 추출, 농축 및 고순도 정제한 DHA와 EPA를 사용하고 있음.



기존 물고기 기름에 함유된 오메가-3 다중불포화지방산 고지혈증 의약 산업 공정

- 최근 해양 환경오염이 심각해짐에 따라 어류에 PCBs (Polychlorinated Biphenyls)나 Dioxin과 같은 독성 화학물질의 축적이 증가하고 있어, 어류 유지 사용에 대한 우려와 규제가 점차로 증가하고 있는 상황임. PCB는 절연유로 활용되다가 강한 독성과 잔류성으로 인해 1970년대에 사용이 금지된 화학물질이며, Dioxin은 여러 개의 염소가 붙어있는 방향

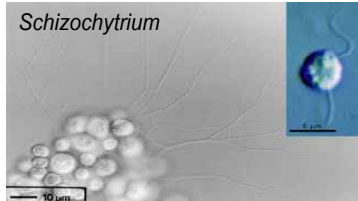
족 화합물로 환경 잔류성이 매우 강한 생식계, 면역계, 호르몬 조절 기능 장애를 유발하는 발암물질임 (일일 허용 섭취량 미국기준 1 pg/kg body 이하). 또한 2011년 일본의 후쿠시마 원자력발전소 폭발 사고로 인해 실제로 수산물 소비가 위축되고 관련 산업이 축소되고 있어 중속영양 유지성 미세조류에 의해 안전하게 생산되는 오메가-3 제품의 필요성이 더욱 강조될 것으로 예상됨. 따라서 기존의 어유 추출공정을 대체하기 위한 새로운 고순도의 DHA와 EPA 오일을 안정적으로 생산할 수 있는 기술개발에 대한 관심이 고조되고 있는데, 그 대표적인 방법이 DHA와 EPA 오일을 함유하는 유지성 미생물을 이용한 발효 공정이며, 향후 개발 기술은 막대한 상업적 가치를 지닐 것으로 판단됨.

- 유지성 미생물 중 Thraustochytrid 계열 미세조류는 바이오매스의 30% 이상의 오일을 생산하여 균체 내에 축적하며, 다중불포화지방산, 카로티노이드, 스쿠알렌 등 다양한 고기능 성분들이 함유되어 있어 어류 대체의 차세대 바이오오일 공급원로서 매우 유망함.

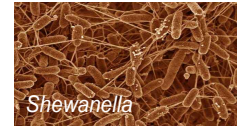
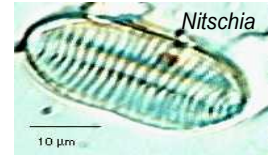
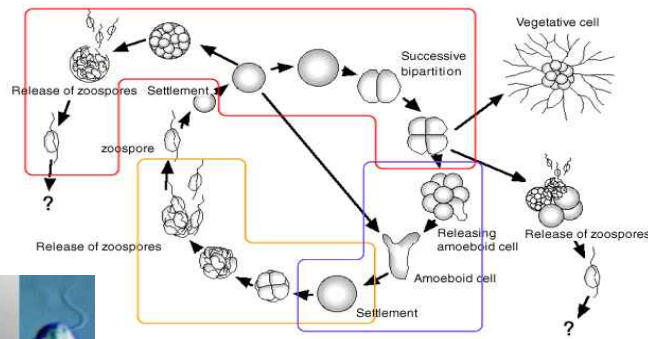
Fish Oil이 해로운 이유

생선에는 오일분비선이 없기 때문에 압착방법으로는 fish oil을 추출할 수 없습니다. 따라서 fish oil을 제품으로 만들려면 생선을 갈아서 즙을 내야 하기 때문에 소수를 제외한 대부분 시중의 fish oil 제품에는 불순물이 섞여있게 마련입니다.



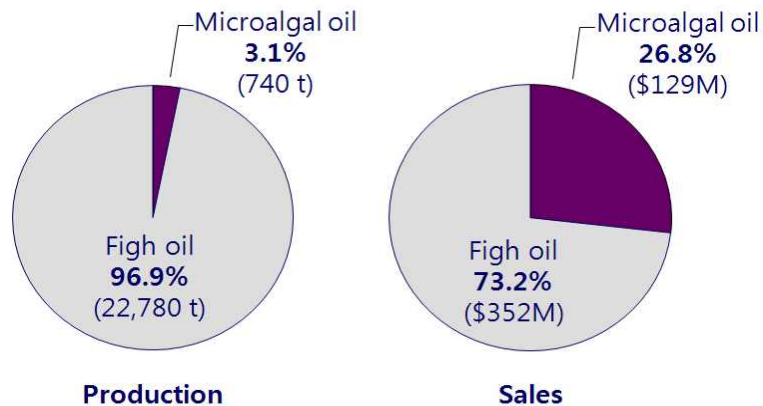


Schizochytrium속 해양미생물의 생활환



	Marine microorganisms
DHA	<i>Cryptocodinium cohnii</i> <i>Schizochytrium</i> sp. <i>Thraustochytrium</i> sp.
EPA	<i>Nitschia laeva</i> <i>Shewanella baltica</i>

- Thraustochytrid 미세조류의 오메가-3 다중불포화지방산을 이용한 건강기능성 및 식품첨가 제품은 이미 상용화가 이루어지고 있는 상황임. Thraustochytrid 미세조류의 오메가-3 다중불포화지방산은 생산량의 점유율 면에서는 전체 오메가-3 지방산 시장의 3%에 불과하지만, 매출액 면에서는 약 27%를 차지하고 있고, Thraustochytrid 미세조류의 오메가-3 다중불포화지방산이 물고기기름에 비해 매우 고가 제품으로 상용화가 이루어지고 있음을 시사하며, 향후 시장 규모가 더욱 확대될 것으로 기대됨. 대표적으로 미국 마르텍사, 론자사 등이 Thraustochytrid 미세조류 오메가-3 다중불포화지방산의 활용을 선도하고 있으며, 국내 다수의 기업체들이 이들로부터 원료오일을 수입하여 건강기능성의 제품을 제조, 판매중임. 또한 국내 기업으로는 유일하게 대상이 Thraustochytrid 미세조류를 이용한 오메가-3 다중불포화지방산 생산 기술을 확립하였음.



오메가-3 지방산의 시장 분석



Thraustochytrid 미세조류 오메가-3 지방산의 상용화 (미국 마르텍사)

- 아직까지, Thraustochytrid 미세조류 오메가-3 다중불포화지방산의 고지혈증 의약품으로 상용화는 이루어지지 않고 상황임. 이를 위해서는 고지혈증 의약품 주요 약효 성분인 EPA의 함량을 높이는 기술의 개발이 필요함. 따라서 본 연구에서 얻어진 결과는 Thraustochytrid 미세조류 오메가-3 다중불포화지방산 생산 기술은 고지혈증 의약품 제품 개발에 활용될 수 있음.
- 본 과제를 통해 개발한 균주를 이용한 발효의 오일 생산 능력은 현재 상용화가 진행 중인 기술들과 비슷한 수준이며, 특히 경제성 확보를 위해 중요한 생산성 면에서는 상대적으로 가장 우수한 것으로 판단됨

stain	Lipid production (g/L)	Lipid productivity (g/L-d)	Lipid conversion (g/g)	DHA Content (% w/w)	DHA production (g/L)	DHA productivity (g/L-d)
Schizochytrium sp. S31	84.9	23.6	?	20.6	35.3	9.8
Schizochytrium sp. CC44 (대상)	24.3	3.6	0.19	51.0	12.4	1.9
Aurantiochytrium sp.	25.4	16.9	0.21	33.6	8.5	5.7
Aurantiochytrium sp. LA3 (SK)	66.2	26.5	0.28	30.7	20.3	8.1
Schizochytrium sp. G13/2S	35.4	11.8	0.30	31.4	11.1	3.7
Schizochytrium sp. G13/2S	16	7.83	0.11	38.1	6.1	3.1
Schizochytrium sp. SH103	23.1	15.4	0.35	42.1	9.7	6.5

3. 사업화 계획

- Fish oil를 활용한 오메가-3 다중불포화지방산 고지혈증 의약 사업과 달리 Thraustochyrid 미세조류 기반은 발효 공정을 통해 오메가-3 다중불포화지방산의 생산, 확보가 가능하기 때문에 기존의 발효설비를 구비한 제약기업이 단독으로 사업화가 가능함.



- 참여기업을 비롯한 기술 수요 기업체 (종근당, 대상 등)와 협의를 통해 개발기술의 이전을 추진할 예정임.
- 향후 기술개량, 공정개발, 효능검증 및 제품개발을 추진할 예정임. 개발 기술을 활용한 예상 제품은 EPA 등 오메가-3 다중불포화지방산을 50-70% 농도로 함유하는 오일이며, 판매처는 오메가-3 다중불포화지방산의 고순도 정제 기술을 보유한 기업체임 (예: 바스프 등).
- 사업화 계획은 아래와 같으며, 참여기업은 우선적으로 발효설비를 확보할 예정임.

구 분		사 업 화 년 도				
		(2016 년) 과제종료후 1년	(2017 년) 과제종료후 2년	(2018 년) 과제종료후 3년	(2019 년) 과제종료후 4년	(2020 년) 과제종료후 5년
사 업 화 품 목		-	-	미세조류 오일	미세조류 오일	미세조류 오일
투 자 계 획	인 건 비(억원)	-	-	1	3	5
	재료비 및 설비투자비(억 원)	-	-	3	5	10
	경상운영비(억원)	-	-	1	2	5
	계(억원)	-	-	5	10	20
생 산 계 획				1톤	3톤	5톤
관매계획 (단위:억원)	내 수			1	10	30
	수 출			-	10	20
	계			1	20	50



참여기업 발효시설 (확보예정)

제 4 장 목표달성도 및 관련분야의 기여도

제 1 절 연차별 연구 목표 달성도

구분	연도	연구개발목표	수행연구결과	달성도
1차년도	2012	EPA 오일 생산 대사공학 유기영양 미세조류 균주 개발	<ul style="list-style-type: none"> EPA 오일 생합성 대사 유전자/효소 기능연구 대사공학을 통한 EPA 오일 생합성 미세조류 균주 개발 전통육종 기법을 이용한 유기영양 미세조류의 개량 	100%
2차년도	2013	대사공학 유기영양 미세조류 EPA 오일 생산 공정 최적화	<ul style="list-style-type: none"> 대사공학을 통한 EPA 오일 생산균주 개량 (EPA 함량 25% 이상) EPA 오일 생산 공정 연구 (5-500리터 배양기, 오일 함량 30% 이상) 	100%
3차년도	2014	대사공학 유기영양 미세조류 EPA 오일 추출 공정 및 효능, 안전성 검증	<ul style="list-style-type: none"> EPA 오일 추출, 정제 공정 개발 EPA 오일 효능, 안전성 검증 (마우스 식이 독성, 간/혈중 중성 지질 함량): 미세조류 오일의 안전성 자료 수집, 정리) 	100%

제 2 절 관련분야의 기여도

1. 과학적 측면

- 현재 오메가-3 다중불포화지방산 고지혈증 의약 원료는 전량 fish oil로부터 추출, 농축 및 고순도 정제한 DHA와 EPA를 사용하고 있음. 최근 해양 환경오염이 심각해짐에 따라 어류에 PCBs (Polychlorinated Biphenyls)나 Dioxin과 같은 독성 화학물질의 축적이 증가하고 있어, 어류 유지 사용에 대한 우려와 규제가 점차로 증가하고 있는 상황임. PCB는 절연유로 활용되다가 강한 독성과 잔류성으로 인해 1970년대에 사용이 금지된 화학물질이며, Dioxin은 여러 개의 염소가 붙어있는 방향족 화합물로 환경 잔류성이 매우 강한 생식계, 면역계, 호르몬 조절 기능 장애를 유발하는 발암물질임 (일일 허용 섭취량 미국기준 1 pg/kg body 이하). 또한 2011년 일본의 후쿠시마 원자력발전소 폭발 사고로 인해 실제적으로 수산물 소비가 위축되고 관련 산업이 축소되고 있어 종속영양 유지성 미세조류에 의해 안전하게 생산되는 오메가-3 제품의 필요성이 더욱 강조될 것으로 예상됨. 따라서 기존의 어유 추출공정을 대체하기 위한 새로운 고순도의 DHA와 EPA 오일을 안정적으로 생산할 수 있는 기술개발에 대한 관심이 고조되고 있는데, Thraustochytrid 계열 미세조류 유지는 안전한 오메가-3 다중불포화지방산의 공급원으로 역할을 할 수 있음.

2. 경제적 측면

- 전세계 오메가-3 지방산 의약 시장 규모는 약 \$2.5B 수준이며, DHA와 EPA의 혼합 형태인 프로노바사의 오마코가 세계 시장을 주도하고 있으며, 일본 모찌다사의 에파텔, 미국 아마린사의 바스세파 제품이 판매되고 있음. 국내에서도 프로노바사의 오마코 제품이 수입, 판매되고 있으며, 2007년 71.7억에서 2014년 400억원으로 시장규모가 급성장하고 있음. 오마코의 특허가 만료된 이후 대부분의 제약기업들이 제네릭 제품을 개발, 출시하고 있는 상황임.
- 아직까지, Thraustochytrid 미세조류 오메가-3 다중불포화지방산의 고지혈증 의약원료로 상용화는 이루어지지 않고 상황임. 이를 위해서는 고지혈증 의약원료 주요 약효 성분인 EPA의 함량을 높이는 기술의 개발이 필요함. 따라서 본 연구에서 얻어진 결과는 Thraustochytrid 미세조류 오메가-3 다중불포화지방산 생산 기술은 고지혈증 의약원료 제품 개발에 활용될 수 있음.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 연구개발 성과

1. 연구개발결과의 목표 및 실적

<정량적 목표항목>

	목표	달성	달성도(%)
EPA 함량	25% 이상	35.4%	142
오일 함량	30% 이상	30.1%	109
스케일업	500리터	500리터	111
논문	4편	3편	75 ¹
특허	3건	4건	133 ²
학회발표	3회	3회	100

1. 투고중 논문 2편
2. 과제종료후 1건 출원

2. 특허(지식재산권)

번호	종 류	명 칭	출원일	국 명	출원번호	발생차수
1	국내 특허	신규 당화효소 고효율성 곰팡이 TG2 균주 및 이를 이용한 바이오에탄올 생산 방법	2013-05-31	대한민국	10-2013-006273 5	1 차년도
2	국내 특허	트라우스토키트리드 미세조류의 형질전환체 및 이를 이용한 이눌린으로부터 바이오오일의 제조방법	2013-12-10	대한민국	10-2013-015311 4	2 차년도
3	국내 특허	고 함량의 다중불포화지방산을 함유하는 트라우스토키트리드 속 균주 및 이의 용도	2015-04-21	대한민국	10-2015-005581 6	3 차년도
4	국내 특허	고 함량의 다중불포화지방산을 함유하는 트라우스토키트리드 속 돌연변이 균주 GA 및 이의 용도	2015-04-21	대한민국	10-2015-005581 7	3 차년도
5	국내 특허	도코사엑사에노익산 오일 생산수율이 우수한 신규 Thraustochytrid 균주	2015-09-1	대한민국		3 차년도

관인생략
출원번호통지서

출원일자 2013.05.31
특기사항 심사청구(무) 공개신청(무) 창조번호(124)
출원번호 10-2013-0062735 (전수번호 1-1-2013-0487686-74)
출원인명칭 한국생명공학연구원(3-1999-034166-5)
대리인성명 이처영(9-2003-000118-9)
발명자성명 김철호 서정우 정유리 허선연 박장민
발명의명칭 신규 당화효소 고효성 공명이 TG2 균주 및 이를 이용한 바이오에탄올 생산 방법

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
※ 특허포(patent.go.kr) 접속 > 민원서비스다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보장이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보장할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허-실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마당-PCT/마드리드
※ 우선권 인정기간 : 특허-실용신안은 12개월, 상표-디자인은 6개월 이내
※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [권자권고환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

관인생략 출원번호통지서

출원일자 2013.12.10
 특기사항 심사청구(무) 공개신청(무) 참조번호(317)
 출원번호 10-2013-0153114 (접수번호 1-1-2013-1129413-54)
 출원인명칭 한국생명공학연구원(3-1999-034166-5)
 대리인성명 이처영(9-2003-000118-9)
 발명자성명 서정우 김철호 출원경 허선언
 발명의명칭 트라우스토키트ريد 미세조류의 형질전환체 및 이를 이용한 이눌린으로부터 바이오오일의 제조방법

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
 * 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
 * 특허포(patent.go.kr) 접속 > 민원서비스다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
 * 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허담당-PCT/마드리드
 * 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내
 * 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자특허청원가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
 * 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

관인생략
출원번호통지서

출원일자 2015.04.21
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(1)
출원번호 10-2015-0055816 (접수번호 1-1-2015-0385857-95)
출원인명칭 한국생명공학연구원(3-1999-034166-5)
대리인성명 최규환(9-2005-001504-0)
발명자성명 서정우 김철호 류승규 오백록 이영욱 주정현 허선연 홍원경
발명의명칭 고 함량의 다중불포화지방산을 함유하는 트라우스토키트리
대수 균주 및 이의 용도

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 : 0131(기라코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
※ 특허포(patent.go.kr) 접속 > 민원서비스다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마당-PCT/마드리드
※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내
※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

관인생략
출원번호통지서

출원일자 2015.04.21
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(2)
출원번호 10-2015-0055817 (접수번호 1-1-2015-0385864-15)
출원인명칭 한국생명공학연구원(3-1999-034166-5)
대리인성명 최규환(9-2005-001504-0)
발명자성명 서정우 김철호 오백복 주정현 허선연 홍원경
발명의명칭 고 항량의 다중불포화지방산을 함유하는 트라우스토키트리
대수 폴리머가 균주 GA 및 이의 용도

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경 (경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
※ 특허포(patent.go.kr) 접속 > 민원서비스다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마당-PCT/마드리드
※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내
※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [견자적고환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

3. 논문 게재/발표 실적

게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol. (No.)	국내외 구분	SCI 구분
		주저자	교신 저자	공동 저자				
2013	A transgene expression system for the marine microalgae <i>Aurantiochytrium</i> sp. KRS101 using a mutant allele of the gene encoding ribosomal protein L44 as a selectable transformation marker for cycloheximide resistance	홍원경	서정우	허선연, 오백록, 김철호, 손정훈, 양지원, Akihiko Kondo	Bioprocess Biosyst Eng	36:1191 - 1197	국외	SCI
2013	Large-scale production of microalgae lipids containing high levels of docosahexaenoic acid upon fermentation of <i>Aurantiochytrium</i> sp. KRS101	홍원경	서정우	유안나, 오백록, 박장민, 김철호, 손정훈, Akihiko Kondo	Food and Nutrition Sciences	4:1 - 5	국외	비SCI
2013	Characterization of a squalene synthase from the <i>Thraustochytrid</i> microalgae <i>Aurantiochytrium</i> sp. KRS101	홍원경	서정우	허선연, 박혜미, 김철호, 손정훈, 양지원, Akihiko Kondo	J Microbiol Biotechnol	23:759 - 765	국내	SCIE
2016	Improvement of lipid production via overexpression of two putative genes encoding ATP-citrate lyase and malic enzyme in <i>Thraustochytrid</i> microalgae	강지영	홍원경	강지영, 허선연, 김철호, 서정우, 홍원경	J Ind Microbiol Biotechnol (투고예정)		국외	SCI
2016	Direct production of 2,3-butanediol from Jerusalem artichoke tubers extract by a recombinant <i>Bacillus</i> sp. BRC1 with enhanced activity of inulinase	박장민	홍원경	오백록, 김철호, 서정우	Appl Biochem Biotech (투고예정)		국외	SCI
2016	Isolation and				J Ind		국외	SCI

	characterization of Thraustochytrid mutant strain showing enhanced production of polyunsaturated fatty acids				Microbiol Biotechnol (투고예정)			
--	--	--	--	--	-----------------------------------	--	--	--

A transgene expression system for the marine microalgae *Aurantiochytrium* sp. KRS101 using a mutant allele of the gene encoding ribosomal protein L44 as a selectable transformation marker for cycloheximide resistance

Won-Kyung Hong · Sun-Yeon Heo ·
Baek-Rock Oh · Chul Ho Kim · Jung-Hoon Sohn ·
Ji-Won Yang · Akihiko Kondo · Jeong-Woo Seo

Received: 31 July 2012 / Accepted: 5 October 2012 / Published online: 17 March 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2012

Abstract In the present study, we established a genetic system for manipulating the oleaginous heterotrophic microalgae *Aurantiochytrium* sp. KRS101, using cycloheximide resistance as the selectable marker. The gene encoding ribosomal protein L44 (RPL44) of *Aurantiochytrium* sp. KRS101 was first identified and characterized. Proline 56 was replaced with glutamine, affording cycloheximide resistance to strains encoding the mutant protein. This resistance served as a novel selection marker. The gene

encoding the $\Delta 12$ -fatty acid desaturase of *Mortierella alpina*, used as a reporter, was successfully introduced into chromosomal DNA of *Aurantiochytrium* sp. KRS101 via 18S rDNA-targeted homologous recombination. Enzymatic conversion of oleic acid (C18:1) to linoleic acid (C18:2) was detected in transformants but not in the wild-type strain.

Keywords *Aurantiochytrium* · Ribosomal protein · Cycloheximide resistance · Gene transformation

A. Kondo and J.-W. Seo are co-corresponding authors.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00449-012-0846-6) contains supplementary material, which is available to authorized users.

W.-K. Hong · S.-Y. Heo · B.-R. Oh · C. H. Kim ·
J.-W. Seo (✉)

Applied Microbiology Research Center, Bio-Materials
Research Institute, Korea Research Institute of Bioscience
and Biotechnology (KRIBB), Jeongeup,
Jeonbuk 580-185, Korea
e-mail: jwseo@kribb.re.kr

C. H. Kim
e-mail: kim3641@kribb.re.kr

J.-H. Sohn
Systems and Synthetic Biology Research Center, Korea
Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB),
Daejeon 305-333, Korea

J.-W. Yang
Department of Chemical and Biomolecular Engineering and
Advanced Biomass R&D Center, KAIST, 291 Daehakno,
Yuseong-gu, Daejeon 305-701, Korea

A. Kondo (✉)
Department of Chemical Science and Engineering, Graduate
School of Engineering, Kobe University, Kobe 657-8501, Japan
e-mail: akondo@kobe-u.ac.jp

Introduction

Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) including docosahexaenoic acid (DHA, C22:6 ω -3) and eicosapentaenoic acid (EPA, C20:5 ω -3) have attracted considerable attention from medical researchers and nutritionists because of the serological and cardiovascular benefits associated with such materials, and the positive influence of PUFAs on retinal and brain development [1, 2]. PUFAs are traditionally obtained from fish oils. However, alternative sources of PUFAs are currently required, because of overfishing and environmental pollution [3]. Thraustochytrids, heterotrophic marine microalgae, are an attractive source of PUFAs, and microalgal DHA-rich oils have been successfully introduced to the market [4–7].

The biosynthetic pathways to PUFAs in thraustochytrid microalgae have been extensively studied. Fatty acid desaturases and elongases which may be active in the standard pathway are found in thraustochytrids [8]. In most eukaryotic cells, linoleic acid (LA, C18:2 ω -6) is synthesized from oleic acid (OA, C18:1) in a reaction catalyzed by $\Delta 12$ -fatty acid desaturase; LA is next converted to γ -linolenic acid (GLA, C18:2 ω -6) via the action of a $\Delta 6$ -fatty acid desaturase; LA can also be converted to α -linolenic acid (ALA,

C18:3 ω -3) by ω 3 fatty acid desaturase. LA and ALA are so-called essential fatty acids (EFAs), being required for human production of ω -6 and ω -3 fatty acids. Humans lack Δ 12- and Δ 15-fatty acid desaturases and thus cannot synthesize the latter compounds de novo [9, 10]. Thus, Δ 12-fatty acid desaturase is a key enzyme of pathways leading to production of ω -6 and ω -3 fatty acids, including DHA. However, in some thraustochytrids that produce PuFAs de novo, the activity of this key enzyme is defective, and a polyketide synthase-like fatty acid synthesis pathway (involving the enzyme PuFA synthase) is recruited to synthesize PuFAs in microalgal strains such as *Aurantiochytrium* and *Schizochytrium* species [11, 12].

Currently, much attention is being devoted to genetic and metabolic engineering of thraustochytrids in an effort to improve the yield and composition of microalgal oil [13, 14]. To this end, versatile genetic systems facilitating thraustochytrid manipulation have been established over the past several years. Transformants are selected on the basis of resistance to antibiotics including G418, hygromycin B, and zeocin [14]. In the present study, we established a genetic system for manipulation of *Aurantiochytrium* sp. KRS101 [15], using cycloheximide resistance as the selectable marker.

Materials and methods

Microalgal strain and growth condition

Details of the Thraustochytrid microalgal strain *Aurantiochytrium* sp. KRS101 have previously been reported [15]. The microalgae was cultivated in 500-ml baffled flasks containing 50 ml of basal medium [glucose 60 g L⁻¹, yeast extract 10 g L⁻¹, dried natural sea salt (CJ Co., Seoul, Korea), 10 g L⁻¹] at 28 °C, with shaking at 125 rpm, for 3 days. The basal medium was supplemented with cycloheximide (CYH) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) at 0–200 μ M (maximum \sim 50 μ g mL⁻¹) when selection and maintenance of transformants were required.

Construction of DNA cassette encoding RPL44(P56Q) and a Δ 12-fatty acid desaturase

Whole genome sequencing of *Aurantiochytrium* sp. KRS101 was performed with 16.9 \times coverage by Hiseq (Macrogen, Seoul, Kore), resulting in the draft sequence consisting of approximately 56 Mb. Hiseq reads were aligned to reference genome using BWA's short read aligner at default settings and SAM (sequence alignment/map) generic format tool for storing nucleotide sequence alignment. The amino acid sequence of *Aurantiochytrium*

sp. KRS101 was obtained through the whole genome sequencing of the strain. The RPL44 (GenBank number JQ973665) sequence was homologous to the sequence of microalgal gene but had Pro as a residue at position 56. The mutant P56Q krsCYH was synthesized for further study (Bioneer, Taejon, Korea). A plasmid encoding ribosomal protein L44(P56Q) imparting cycloheximide-resistance to strains hosting that plasmid, was constructed by inserting a 1.5-kb CYH fragment encoding a mutant form of L44 (in which proline 56 was replaced with glutamine) into pGEMT-18S to yield pGEMT-18S-CYH. Next, a 2.4-kb fragment encoding a Δ 12-fatty acid desaturase from *Mortierella alpina* was inserted into the *Spe*I site of that plasmid, in same transcriptional orientation as that of the 18S rDNA gene, to form pGEMT-18S-CYH- Δ 12DES. The Δ 12-fatty acid desaturase gene of *M. alpina* strain (GenBank number AF417244.1) used for reporter gene as transformation system, was also synthesized (Bioneer, Taejon, Korea). The constitutive GAP promoter drove expression of the desaturase, and the AOX terminator was present at the C-terminus of the desaturase, as described previously [16].

Transformation of *Aurantiochytrium* sp. KRS101

Aurantiochytrium sp. KRS101 was cultured overnight in basal medium prior to preparation of *Aurantiochytrium* protoplasts, inoculated to fresh medium, and grown to early logarithmic phase, cell OD₆₀₀ was about 6–7. Cells were harvested by centrifugation at 4,000g for 15 min at 4 °C, washed twice with ice-cold sterile water, and resuspended and treated with 25 mM DTT in 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) for 10 min. The cells were washed twice more with ice-cold sterile water and resuspended in 1 M sorbitol. Protoplasts were prepared and transformed with 2 μ g amounts of linear DNA via electroporation (2.0 kV, 500 Ω , 50 μ F pulse) in a 0.2-cm cuvette; incubated in basal medium without selection for 16 h [17]; and next plated onto selective basal medium containing 0–50 μ g mL⁻¹ (\sim 200 μ M maximum) CYH. Growth proceeded at 28 °C for 3 days and individual colonies were picked and analyzed.

Southern blotting

A digoxigenin-based system was employed for Southern hybridization, following the instructions of the kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Five microgram amounts of genomic DNA were digested with *Hind*III, separated on 0.8 % (w/v) agarose gel, and transferred to Hybond N+ nylon membranes. A PCR-amplified 1.2 kb fragment of the Δ 12-fatty acid desaturase gene served as the probe used to detect genomic

interaction of the gene. The PCR cycle parameters were 94 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, and 72 °C for 1 min; 25 cycles were performed. Prehybridization, hybridization and detection (via chemiluminescence) were conducted by following the instructions of the kit manufacturer.

RT-PCR

Hot phenol was used to prepare total RNA from control cells and transformants encoding 18S-CYH-Δ12 and cDNA was synthesized using a High Capacity RNA-to-cDNA kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA), following the protocol of the kit manufacturer. Next, PCR amplification of the Δ12-fatty acid desaturase gene, [(primers: del12F (5'-atg gca cct ccc aac act att-3') and del12R (5'-tta ctt ctt gaa aaa gac cac-3')] and the CYH gene [primers: CYHF (5'-atg gtg aac gta ccc aag gag c-3') and CYHR (5'-tta gta ctg gtg gcc agc agc ct-3')] was performed. Fifty microliters of reaction mixture was prepared which included the following components: 10× Taq pol. Buffer 5 μL, 2.5 mM dNTP 4 μL, upstream primer (25 pmol μL⁻¹) 1 mL, downstream primer (25 pmol μL⁻¹) 1 mL, Taq polymerase (2.5 unit μL⁻¹) 1 mL, RT mixture 5 mL (500 ng μL⁻¹), distilled water up to 33 μL. The cycling parameters were 94 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, and 72 °C for 1 min; 25 cycles were performed. The experiments were performed twice.

Dry cell weight

Dry cell weight (DCW) was estimated by harvesting cells at 4,500g at 4 °C for 20 min. Each supernatant was discarded and each pellet washed three times with phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2). Resuspended cells were again harvested by centrifugation at 4,500g at 4 °C for 20 min. Each pellet was resuspended in 600 μL distilled water and transferred to a pre-weighed vial. Cell pellets were dried at 60 °C for 12 h using a speed vacuum concentrator (Biotron 4080C; Bucheon, Korea). Each vial was weighed and DCW value obtained.

Lipid analysis

Total lipid content was calculated using a modified (miniaturized) Bligh-Dyer method as described earlier [5, 18]. Dried cells (125 mg amounts) were placed in screw-cap test tubes, and 6.25 mL chloroform, 12.5 mL methanol, and 5 ml 50 mM K₂HPO₄ buffer (pH 7.4) were added to each tube. Samples were agitated for 1 h, shaking at 200 rpm, at 28 °C. Each sample was next transferred to a 50 mL graduated tube and 6.25 mL chloroform and 6.25 mL phosphate buffer were added. Each tube was inverted 30 times and the phases allowed to separate for 1 h before recovery of the bottom layer (approximately 12.5 mL). This liquid was transferred to a preweighed aluminum dish and the solvent evaporated over 30 min in a

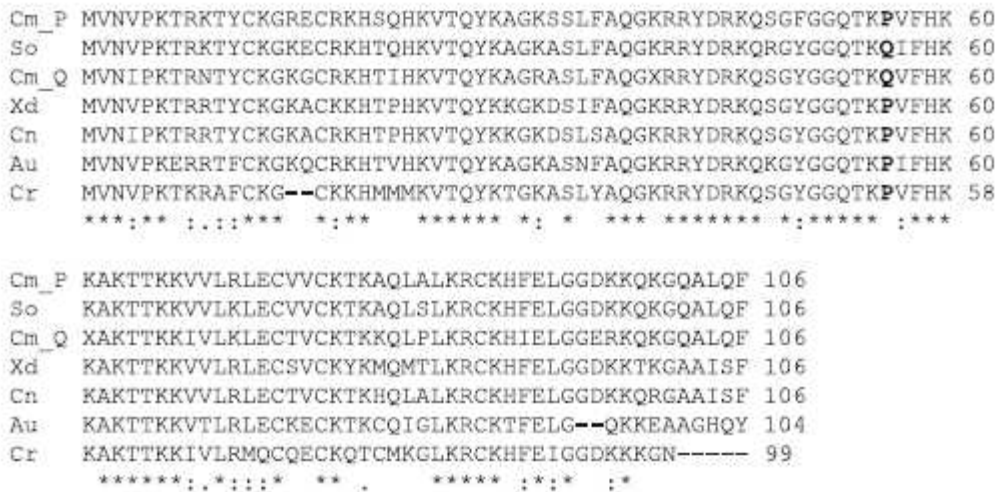


Fig. 1 Homology alignment of the deduced amino acid sequence of *Aurantiochytrium* sp. KRS101 RPL44 protein with other yeast and protozoa by CLUSTAL W2 of EMBL-EBI. At least four highly similar regions are defined. *Aurantiochytrium* sp. KRS101 developed resistance to cycloheximide upon mutagenesis converting the proline residue at position 56 to glutamine. Cm_P: *Candida maltosa* RPL41

(cycloheximide-sensitive, Proline-56), BAA07782; So: *Schwanniomyces occidentalis* RPL44, P31028; Cm_Q: *Candida maltosa* RPL41 (cycloheximide-resistant, Glutamine-56), BAA07783; Xd: *Xanthophylomyces dendrorhous* RPL44, O59870; Cn: *Cryptococcus neoformans* RPL44, P0CQ50; Au: *Aurantiochytrium* sp. KRS101 RPL44, JQ973665; Cr: *Chlamydomonas reinhardtii* RPL44, P49213

dry oven at 80 °C. After cooling, the dish and contents were weighed, and total lipid levels were determined gravimetrically (to yield the weight of lipid extracted) using the following equation:

$$\text{Total lipid (g of oil per 100 g sample)} = [(W_L - W_D) \times V_C \times 100] / [V_P \times W_S]$$

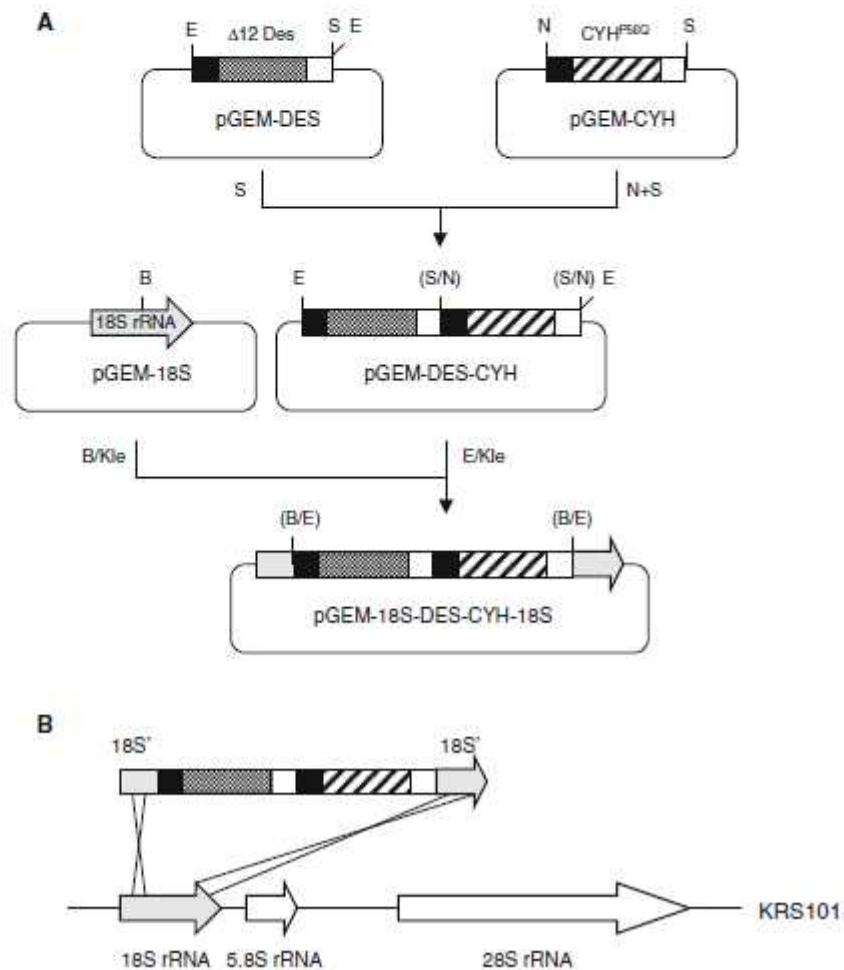
where W_D was the weight of an empty aluminum dish (g); W_L the weight of an aluminum dish with dried lipid residue (g); W_S the weight of sample (g); V_C the total volume of chloroform in the graduated cylinder (ml); and V_P the volume of chloroform transferred to the aluminum dish (ml).

Analysis of fatty acid composition

Dried cells were resuspended in 3 ml 4 % (v/v) methanolic sulfuric acid and heated at 90 °C for 1 h in sealed

vials. Fatty acid methyl esters (FAMES) were extracted into 0.3 ml hexane and analyzed via gas chromatography (Hewlett Packard 6890N; Ramsey, MN); the instrument was equipped with a flame-ionization detector and an HP-5 (30 m × 0.32 mm; 0.25 mm; Agilent Technologies; Santa Clara, CA). The column temperature was raised from 150 °C (after 2 min of holding) to 270 °C (with a further 2 min of holding) at a rate of 7 °C per min. Also, the extracted fatty acid methyl esters (FAMES) were analyzed by GC-MS. The cells were cultured in 0.15–0.2 mM CYH containing medium at 28 °C for 3 days, and then cultured for an additional 1 day after addition of 0.1 mM oleic acid (OA). Total fatty acids were extracted from freeze-dried cells and FAMES were subjected to GC-MS. The standards of OA methyl ester and LA methyl ester, which were also analyzed, were Sigma-Aldrich commercial products (Sigma-Aldrich, MO, USA).

Fig. 2 Strategies to construction of 18S rDNA-targeting plasmid and pGEMT-18S-CYH- Δ 12DES (a) and integrate into chromosomal DNA of *Aurantiochytrium* sp. KRS101 (b). The procedures to construct plasmids were presented in “Materials and methods” in detail. The DNA fragment including CYH fragment encoding a mutant form of RPL44 P56Q (in which proline 56 was replaced with glutamine) and 2.4-kb fragment encoding a Δ 12-fatty acid desaturase from *M. alpina* was allowed to be integrated into 18S rRNA region of chromosome by homologous recombination



Results and discussion

Identification of ribosomal protein L44 (RPL44) of the thraustochytrid microalgae *Aurantiochytrium* sp. KRS101

Cycloheximide inhibits eukaryotic protein biosynthesis by interfering with the translocation step during which two tRNAs and mRNA move relative to the ribosome. Cycloheximide thus blocks translational elongation. Resistance to cycloheximide can be achieved by changing residue 56 of the ribosomal protein RPL 44 (encoded by L44; GenBank accession number JQ973665) from Pro to Gln; this modification has been used to confer antibiotic resistance (used as a selection marker) upon several strains of yeast [19, 20]. We employed this approach to develop a useful transformation system for *Aurantiochytrium* sp. KRS101 (which is sensitive to cycloheximide). The amino acid sequence of *Aurantiochytrium* sp. KRS101 was obtained through the whole genome sequencing of the strain. The RPL44 (GenBank number JQ973665) sequence was homologous to the sequence of microalgal gene but had Pro as a residue at position 56. The mutant P56Q krsCYH was synthesized for further study (Bioneer, Taejeon, Korea). The microalgal gene had Pro as residue 56. The NCBI protein–protein BLAST showed that the deduced ribosomal protein RPL 44 amino acid sequence of *Aurantiochytrium* sp. KRS101 shared identity with other microalgae, yeast and fungus, is highly conserved. Homology alignment was analyzed by CLUSTAL W2 of EMBL-EBI (Fig. 1).

Construction of recombinant *Aurantiochytrium* sp. KRS101 expressing $\Delta 12$ -fatty acid desaturase using a mutant form of RPL44 as a selection marker

A plasmid used in development of transformation system for *Aurantiochytrium* sp. KRS101, with selection for cycloheximide resistance, was constructed as shown in Fig. 2. The plasmid encoded a mutant of *Aurantiochytrium* sp. KRS101 RPL44 in which amino acid residue 56 was changed from Pro to Gln (P56Q). In general, some thraustochytrids, including *Aurantiochytrium* and *Schizochytrium* species, employ (principally) a polyketide-like fatty acid synthesis method for PuFA synthesis, rather than a pathway featuring the activities of the standard desaturase and elongase. This is because the organisms lack a $\Delta 12$ -fatty acid desaturase that could convert oleic acid (OA; C18:1) to linoleic acid (LA; C18:2) [12]. Thus, $\Delta 12$ -fatty acid desaturase activity is key in terms of LA production, and the activity of this enzyme is rate-limiting when biosynthetic routes to ω -6 and ω -3 are active. Whole-genome sequencing revealed that *Aurantiochytrium* sp.

KRS101 expressed a PuFA synthase; thus, the fatty acid desaturase–elongase pathway is inactive in this organism. Based on this observation, a $\Delta 12$ -fatty acid desaturase gene from *Mortierella alpina*, under the control of the GAP promoter and to which the AOX terminator had been added [16], was used as a reporter gene in the present work (Fig. 2). A DNA fragment constructed from cDNAs encoding $\Delta 12$ -fatty acid desaturase and RPL44 was introduced into *Aurantiochytrium* sp. KRS101 via electroporation [21], and became inserted into chromosomal DNA via 18S rDNA-targeted homologous recombination. Transformants were selected by the ability to grow on plates with cycloheximide (110 ± 4 , $\sim 72 \pm 2$, and 14 ± 2 transformants at 31.3, 37.5, and $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ of concentrations).

Identification of recombinant *Aurantiochytrium* sp. KRS101 expressing $\Delta 12$ -fatty acid desaturase

Southern blotting of transformant genomic DNA, using a digoxigenin-labeled (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) PCR-amplified 1.2 kb fragment of the $\Delta 12$ -fatty acid desaturase gene as probe, confirmed that genomic integration had occurred. Signals (at several genomic positions) of 9.0 kb in transformants, but not in the control, indicated that the gene from *M. alpina* had been successfully introduced (Fig. 3). Because the introduced plasmid contained CYH and 18S rDNA genes, integration could thus occur at several sites. Expression of $\Delta 12$ -fatty acid desaturase in *Aurantiochytrium* transformants was confirmed by reverse transcriptase (RT)-PCR (Fig. 3).

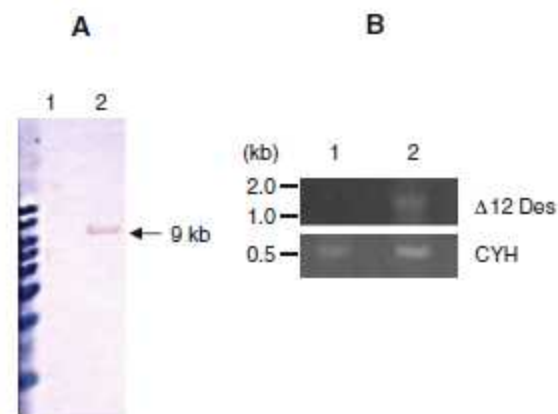


Fig. 3 Southern blotting of the $\Delta 12$ gene (a) and RT-PCR of the $\Delta 12$ and CYH genes (b), expressed in *Aurantiochytrium* sp. KRS101. **a** Genomic DNAs of the transformant 18S-CYH- $\Delta 12$ (right) and wild-type control (left), digested with the restriction enzyme *Hind*III, were subjected to Southern blotting. **b** Total RNA, extracted from the transformant 18S-CYH- $\Delta 12$ (right) and wild-type control (left), was transcribed to cDNA and subjected to RT-PCR. Independent experiments were performed twice for experimental replicates

Table 1 Comparison of *Aurantiochytrium* sp. KRS101 wild type and transformants harboring $\Delta 12$ DES

Strain	Dry cell weight (g L ⁻¹)	Lipid/DCW content		DHA/TFA content (%)
		(g L ⁻¹)	(%)	
Wild type	21.4 ± 1.11	6.3 ± 0.28	33.9	39.33
$\Delta 12$ DES	20.1 ± 1.24	6.0 ± 0.23	33.5	30.91

Data were expressed as mean ± SD, n = 3

Conversion of oleic to linoleic acid by recombinant *Aurantiochytrium* sp. KRS101 expressing $\Delta 12$ -fatty acid desaturase

Transformants were grown in 500-mL Erlenmeyer flasks each containing 100 mL of basal medium [glucose, 60 g L⁻¹; yeast extract, 1 g L⁻¹; artificial sea salt (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 5 g L⁻¹], at 28 °C with shaking at 120 rpm, for 3 days. Cells were harvested, freeze dried, and dry cell weight (DCW) was measured. Lipids were extracted via a modification of the method of Bligh and Dyer [15, 18] and lipid production was estimated after evaporation (under nitrogen) of measured aliquots of combined chloroform extracts to dryness. Fatty acid methyl esters (FAMES) were prepared and analyzed as described previously [15, 18]. *Aurantiochytrium* sp. KRS101 wild type, and transformants thereof, were similar in terms of DCW and total lipid production; the FAME patterns did not differ except for decrease of DHA content in the transformants (Table 1). This indicates that it is possible to introduce new functional genes into the microalgae employing an integrative vector targeting 18S rDNA loci, without significantly affecting lipid production. The decrease of DHA content might be related to the expression of the $\Delta 12$ -fatty acid desaturase, leading to the activation of desaturase-elongase pathway against PuFA synthase pathway. To confirm expression of the $\Delta 12$ -fatty acid desaturase in transformants, cells were incubated for an additional day in the presence of 0.1 mM oleic acid and conversion of OA to LA was examined. As expected, the transformant performed this conversion whereas the wild-type control did not (Fig. 4; Supplementary Fig. 1). This confirmed that the foreign gene was expressed and functional in *Aurantiochytrium* sp. KRS101. However, the conversion rate of OA to LA was 4.6 % less which indicates that the GAP promoter from *Hansenula polymorpha* does not function efficiently in *Aurantiochytrium*. Recently, EST analysis of *Aurantiochytrium* sp. KRS101 revealed that the promoters of the actin, tubulin, ubiquitin and GAP genes were highly active; these promoters are thus candidates for use in the development of effective genetic engineering system.

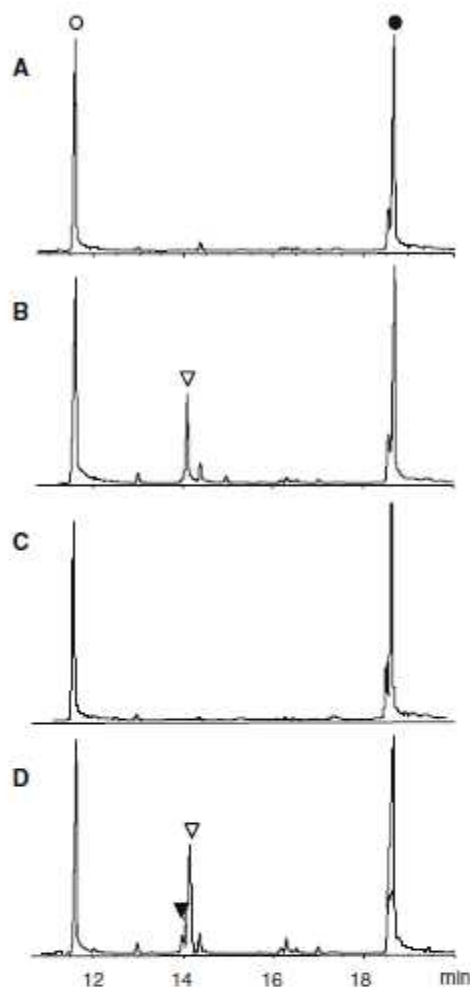


Fig. 4 Conversion of oleic acid (OA) to linoleic acid (LA) by *Aurantiochytrium* sp. KRS101 strains. Wild-type strain incubated **a** without and **b** with OA, a transformant hosting the $\Delta 12$ -fatty acid desaturase from *Mortierella alpina*, incubated **c** without and **d** with OA. GC-MS was used to confirm the identity of OA and LA. *Open circle* palmitic acid, *closed circle* docosahexaenoic acid, *open triangle* oleic acid, *closed triangle* linoleic acid. Two independent experiments were performed for experimental reproducibility confirmation

Conclusion

We modified RPL44, a component of the large ribosomal subunit, to create a dominant selectable marker expressed with the aid of native transcriptional and translational machinery. Our results indicate that 18S rDNA genes serve as suitable recombination site and the system can be used to introduce functional genes (such as those involved in PuFA synthesis) into the chromosome of *Aurantiochytrium*.

The microalgae can thus serve as an alternative system for overexpression of heterologous genes. Further work is required. The capacities of various promoters to drive the expression of target genes in *Aurantiochytrium* should be tested, and integration of foreign genes at multiple sites may be valuable. Also, optimization of transformation conditions and integration into various regions of rDNA may further increase conversion efficiency. Use of higher concentrations of cycloheximide might enable selection of transformants of higher copy number. Substantial improvements in transformation efficiency will facilitate the collection of larger pools of transformants.

Acknowledgments This work was supported the Advanced Biomass R&D Center of Korea (Grant No. 2010-0029737) funded by the Ministry of Education, Science and Technology and by the Ministry of Food, Agriculture, Forestry, and Fisheries, of the Republic Korea.

References

- Biondo PD, Brindley DN, Sawyer MB, Field CJ (2008) The potential for treatment with dietary long-chain polyunsaturated n-3 fatty acids during chemotherapy. *J Nutr Biochem* 19:787–796
- von Schacky C, Harris WS (2007) Cardiovascular benefits of omega-3 fatty acids. *Cardiovasc Res* 73:310–315
- Lee JH, O'Keefe JH, Lavie CJ, Harris WS (2009) Omega-3 fatty acid: cardiovascular benefits, sources and sustainability. *Nat Rev Cardiol* 6:753–758
- Bongiorni L, Jain R, Raghukumar S, Aggarwal RK (2005) *Thraustochytrium gaetnerium* sp. nov.: a new thraustochytrid stramenopilan protist from mangroves of Goa, India. *Protist* 156:303–315
- Burja AM, Radianingtyas H, Windust A, Barrow CJ (2006) Isolation and characterization of polyunsaturated fatty acid producing *Thraustochytrium* species: screening of strains and optimization of omega-3 production. *Appl Microbiol Biotechnol* 72:1161–1169
- Conquer JA, Holub BJ (1996) Supplementation with an algae source of docosahexaenoic acid increases (n-3) fatty acid status and alters selected risk factors for heart disease in vegetarian subjects. *J Nutr* 126:3032–3039
- Warude D, Joshi K, Harsulkar A (2006) Polyunsaturated fatty acids: biotechnology. *Crit Rev Biotechnol* 26:83–93
- Qiu X (2003) Biosynthesis of docosahexaenoic acid (DHA, 22:6-4,7,10, 13,16,19): two distinct pathways. *Prostag Leukotr Ess* 68:181–186
- Gill I, Valivety R (1997) Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, biological activities and applications. *Trends Biotechnol* 15:401–409
- Imis SM (1991) Essential fatty acids in growth and development. *Prog Lipid Res* 30:39–103
- Metz JG, Roesler P, Facciotti D, Levering C, Dittrich F, Lassner M, Valentine R, Lardizabal K, Domergue F, Yamada A, Yazawa K, Knauf V, Browse J (2001) Production of polyunsaturated fatty acids by polyketide synthases in both prokaryotes and eukaryotes. *Science* 293:290–293
- Okuyama H, Orikasa Y, Nishida T, Watanabe K, Morita N (2007) Bacterial genes responsible for the biosynthesis of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids and their heterologous expression. *Appl Environ Microbiol* 73:665–670
- Cheng RB, Lin XI, Wang ZK, Yang SJ, Rong H, Ma Y (2011) Establishment of a transgene expression system for the marine microalgae *Schizochytrium* by 18S rDNA-targeted homologous recombination. *World J Microbiol Biotechnol* 7:737–741
- Sakaguchi K, Matsuda T, Kobayashi T, Ohara J, Hamaguchi R, Abe E, Nagano N, Hayashi M, Ueda M, Honda D, Okita Y, Taoka Y, Sugimoto S, Okino N, Ito M (2012) Versatile transformation system that is applicable to both multiple transgene expression and gene targeting for Thraustochytrids. *Appl Environ Microbiol* 78:3193–3202
- Hong WK, Rairakhwada D, Seo PS, Park SY, Hur BK, Kim CH, Seo JW (2011) Production of lipids containing high levels of docosahexaenoic acid by a newly isolated microalgae, *Aurantiochytrium* sp. KRS101. *Appl Biochem Biotechnol* 164:1468–1480
- Hong WK, Kim CH, Heo SY, Luo LH, Oh BR, Rairakhwada D, Seo JW (2011) 1,3-Propanediol production by engineered *Hansenula polymorpha* expressing *dha* genes from *Klebsiella pneumoniae*. *Bioprocess Biosyst Eng* 34:231–236
- Cheng RB, Lin XZ, Wang ZK, Yang SJ, Rong H, Ma H (2011) Establishment of a transgene expression system for the marine microalgae *Schizochytrium* by 18S rDNA-targeted homologous recombination. *World J Microbiol Biotechnol* 27:737–741
- Lewis T, Nichols PD, McMeekin TA (2000) Evaluation of extraction methods for recovery of fatty acids from lipid-producing microheterotrophs. *J Microbiol Methods* 43:107–116
- Kim IG, Nam SK, Sohn JH, Rhee SK, AN GH, Lee SH, Choi ES (1998) Cloning of the ribosomal protein L41 gene of *Phaffia rhodozyma* and its use as a drug resistance marker for transformation. *Appl Environ Microbiol* 64:1947–1949
- Kondo K, Saito T, Kajiwara S, Takagi M, Misawa N (1995) A transformation system for the yeast *Candida utilis*: use of a modified endogenous ribosomal protein gene as a drug-resistant marker and ribosomal DNA as an integration target for vector DNA. *J Bacteriol* 177:7171–7177
- Herschleb J, Ananiev G, Schwartz DC (2007) Pulsed-field gel electrophoresis. *Nat Protoc* 2:677–684

Large-Scale Production of Microalgal Lipids Containing High Levels of Docosahexaenoic Acid upon Fermentation of *Aurantiochytrium* sp. KRS101

Won-Kyung Hong¹, Anna Yu¹, Baek-Rock Oh¹, Jang Min Park¹, Chul Ho Kim¹, Jung-Hoon Sohn², Akihiko Kondo^{3*}, Jeong-Woo Seo^{1*}

¹Applied Microbiology Research Center, Bio-Materials Research Institute, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Jeongeup, South Korea; ²Systems and Synthetic Biology Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Daejeon, South Korea; ³Department of Chemical Science and Engineering, Graduate School of Engineering, Kobe University, Kobe, Japan.
Email: *jwseo@kribb.re.kr

Received April 1st, 2013; revised May 2nd, 2013; accepted May 9th, 2013

Copyright © 2013 Won-Kyung Hong *et al.* This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ABSTRACT

In this study, large-scale production of microalgal lipid containing high levels of docosahexaenoic acid (DHA) by fermentation of *Aurantiochytrium* sp. KRS101 was performed. The microalgal strain yielded productivity of docosahexaenoic acid (DHA) productivity of 1.08 and 1.6 g/L/d by fermentation at 300-L and 5000-L scale stirrer-type bioreactor. The productivity was significantly enhanced upto 5.6 g/L/d by fermentation at 6000-L scale airlift-type bioreactor, probably due to the reduced shearing force. The microalgal lipid could be efficiently recovered by safe extraction methods such as ethanol extraction, hot water extraction or supercritical fluid extraction, promising commercial potential of the microalgal DHA-rich lipid in the food and feed industry.

Keywords: *Aurantiochytrium* sp.; Heterotrophic Microalga; Large-Scale Cultivation; Lipid; Docosahexaenoic Acid

1. Introduction

Oleaginous microalga of the Thraustochytrid family may be valuable sources of oil because at least 30% of dry biomass is lipid, and the content of omega-3 polyunsaturated fatty acids (PuFA) is high [1]. This is especially true of docosahexaenoic acid (DHA, C22:6n-3) which plays key roles in development of the brain and eye [2,3]. Additionally, the high levels of desirable fatty acids render microbial oil valuable as a feedstock for production of biofuel.

Many oleaginous microalgal strains synthesizing high levels of PuFAs have been described [4]. Perveen *et al.* [5] characterized a Thraustochytrid-like microorganism (termed Strain 12B) that exhibited DHA productivity of 2.8 g/L/d upon shake flask cultivation. The highest DHA productivity (3.7 g/L/d) reported to date was attained upon fermentation of *Schizochytrium limacinum* SR21 in a laboratory scale bioreactor [6]. Large-scale fermentation of microalgal strain has also been reported; *Schizochy-*

trium sp. HX-308 yielded DHA productivity values of 2.7 and 2.9 g/L/d when grown in 50-L and 1500-L bioreactor, respectively [7].

Recently, we isolated and identified a novel Thraustochytrid microalga (termed *Aurantiochytrium* sp. KRS101) that produced high levels of lipid and DHA (over 45% total fatty acids) [8]. Upon fed-batch fermentation in a 5-L bioreactor, good biomass levels and lipid production values (50 and 22 g/L, respectively) were obtained; DHA productivity (3.3 g/L/d) comparable to that of *S. limacinum* SR21 [6]. To evaluate the commercial potential of such fermentation, large-scale growth of the microalgal strain was studied and the results are described in the present report. Also, it is worth extraction methods of fatty acid from fermentative sources in especially industrial fields. Considering both the economic feasibility in industry and the safety of food additives, the relevant interest for this molecule and its biological activity, and starting from the consideration that better methods for the characterization and determination of fatty acid are needed, it is to propose a proper method for

*Corresponding authors.

the extraction and characterization of fatty acid from fermentative microalgae product.

2. Materials and Methods

2.1. Microalgal Strain and Media

Details of the Thraustochytrid microalgal strain *Aurantiochytrium* sp. KRS101 was previously reported [8]. The microalga was cultivated in 5-L baffled flasks containing 50 mL of basal medium [glucose (food grade), 60 g/L; yeast extract (food grade), 10 g/L; dried natural sea salt (CJ Co., Korea), 10 g/L] at 28°C, with shaking at 120 rpm, for 3 d.

2.2. Fermentation of *Aurantiochytrium* sp. KRS101

Cells were precultured in 5 L amounts of basal medium, with shaking at 120 rpm, for 3 d at 28°C. Precultures were transferred at 2.5% (v/v) of fermenter medium volume into 300-L bioreactor, or (in later work) into 5000-L stirrer-type and 6000-L airlift-type bioreactors. Culture aliquots were collected every 12 h for analysis of growth via measurement of absorbance at 600 nm. The fermentation conditions in the 300-L bioreactor were 28°C, stirring at 50 rpm, 0.5 w/v/min of air, and pH 7.0.

2.3. Lipid Extraction

For ethanol extraction, cell paste was sonicated for 5 min (each pulse was 5 s in duration followed by 5 s on ice on 300 W, 20 kHz) and added ethanol to final 50%. After centrifugation at 10,000 g for 5 min, the ethanol phase containing lipid was collected by rotary evaporation than analyzed fatty acid and its composition. For hot water extraction, cell paste was autoclaved at 121°C for 30 m and the liquid phase was collected than analyzed further process. The supercritical fluid (SCF) extraction was performed on 300 bar, 60°C and 180 m. Three independent experiments at least of all extraction process were made for each end-point.

2.4. Dry Cell Weight Analysis

Dry cell weight (DCW) was estimated by harvesting cells at 4500 g at 4°C for 20 m. Each supernatant was discarded and each pellet washed three times with phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2). Resuspended cells were again harvested by centrifugation at 4500 g at 4°C for 20 min. Each pellet was resuspended in 600 µL distilled water and transferred to a pre-weighed vial. Cell pellets were dried at 60°C for 12 h using a speed vacuum concentrator (Biotron 4080C). Each vial was weighed and DCW value estimated.

2.5. Lipid Analysis

Total lipid content was calculated using a modified (miniaturized) Bligh-Dyer method as described by Burja *et al.* [9]. Dried cells (125 mg amounts) were placed in screw-cap test tubes, and 6.25 mL chloroform, 12.5 mL methanol, and 5 ml 50 mM K₂HPO₄ buffer (pH 7.4) were added to each tube. Samples were agitated for 1 h, shaking at 200 rpm, at 28°C. Each sample was next transferred to a 50 mL graduated tube, and 6.25 mL chloroform and 6.25 mL phosphate buffer were added. Each tube was inverted 30 times and the phases allowed to separate for 1 h before recovery of the bottom layer (approximately 12.5 mL). This liquid was transferred to a preweighed aluminum dish and the solvent was evaporated over 30 m in a dry oven to 80°C. After cooling, the dish and contents were weighed, and total lipid levels were determined gravimetrically (to yield the weight of lipid extracted) using the following equation:

$$\text{Total lipid (g of oil per 100 g sample)} \\ = [(W_L - W_D) \times V_C \times 100] / [V_p \times W_s]$$

where W_D was the weight of an empty aluminum dish (g); W_L the weight of an aluminum dish with dried lipid residue (g); W_s the weight of sample (g); V_C the total volume of chloroform in the graduated cylinder (mL); and V_p the volume of chloroform transferred to the aluminum dish (mL).

2.6. Analysis of Fatty Acid Composition

Dried cells were resuspended in 3 mL 4% (v/v) methanolic sulfuric acid and heated at 90°C for 1 h in sealed vials. Fatty acid methyl esters (FAMES) were extracted into 0.3 mL hexane and analyzed via gas chromatography (GC; Hewlett Packard 6890 N; Ramsey, MN); the instrument was equipped with a flame-ionization detector (FID) and an HP-5 (30 m × 0.32 mm; 0.25 mm; Agilent Technologies; Santa Clara, CA). The column temperature was raised from 150°C (after 2 min of holding) to 270°C (with a further 2 m of holding) at a rate of 7°C per min.

3. Results and Discussion

3.1. Production of Microalgal Lipid by Cultivation of *Aurantiochytrium* sp. KRS101 in a Stirrer-Type Bioreactor

The oleaginous microalga *Aurantiochytrium* sp. KRS101 was first cultivated in a 300-L stirrer-type bioreactor in a working volume of 150 L of medium. As shown in Figure 1, glucose was completely consumed after 60 h of cultivation, yielding 11.8 g/L of DCW. The level of lipid in the cells was 4.9 g/L, indicating that conversion of glucose to lipid was rather low (7.3%, g/g). However, the

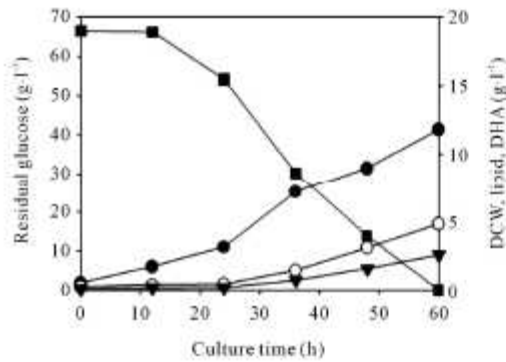


Figure 1. Cultivation of *Aurantiochytrium* sp. KRS101 in a 500-L bioreactor. Closed circles, dry cell weights; open circles, lipid contents; closed triangles, DHA contents; closed squares, residual glucose levels.

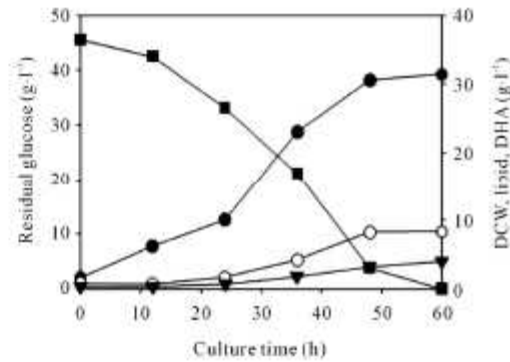


Figure 2. Cultivation of *Aurantiochytrium* sp. KRS101 in a 5000-L stirrer-type bioreactor. Closed circles, dry cell weights; open circles, lipid contents; closed triangles, DHA contents; closed squares, residual glucose levels.

DHA level in the microalgal lipid was extremely high (over 50% of total fatty acids). The DHA productivity level was 1.08 g/L/d.

Next, to determine whether the microalgal lipid could be produced in pilot-scale fermentation, the microalgal strain was cultivated in a 3000 L volume in a 5000-L scale stirrer-type bioreactor. The strain grew well upon large-scale fermentation, yielding a DCW of 30.5 g/L after 48 h of cultivation (Figure 2). The lipid level in cells was 8.2 g/L; the conversion rate of glucose to lipid was 19.6% (g/g). The DHA level and DHA productivity were 39.5% and 1.6 g/L/d, respectively (Table 1).

The DHA productivity values obtained in stirrer-type bioreactor, 1.08 and 1.6 g/L/d at 300-L and 5000-L scale bioreactors, respectively, were much less than seen upon laboratory scale fermentation in a 5-L stirrer-type bioreactor (3.3 g/L/d); the latter value was comparable to the highest level (3.7 g/L/d) of DHA productivity yet reported (upon fermentation of *S. limacinum* SR21) [6].

3.2. Pilot-Scale Production of Microalgal Lipid Using a 6000-L Airlift-Type Bioreactor

To examine whether the microalgal lipid production was affected by bioreactor type, an airlift-type bioreactor was employed. Notably, when the microalgal strain was cultivated in a 6000-L scale airlift-type bioreactor (3000 L working volume), cell growth (μ ; 0.090/h) and glucose consumption rate (q_s ; 0.115/h) were much higher than the values obtained upon fermentation in stirrer-type vessels (0.057/h and 0.064/h, respectively) (Figure 3). And the rate of lipid accumulation, and the final level were two-fold higher upon airlift-type fermentation (q_p ; 0.060/h and 16.3 g/L, respectively) than was the case when stirrer-type vessels were employed (q_p ; 0.039/h and 8.2 g/L, respectively). Subsequently, the final DHA

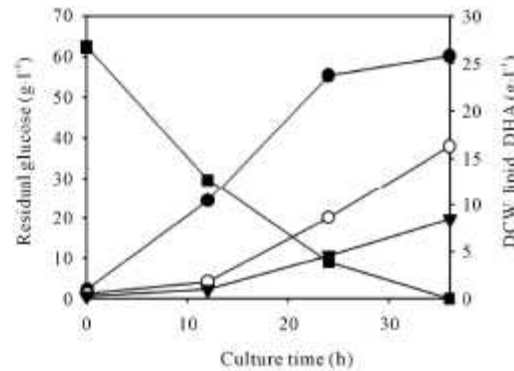


Figure 3. Cultivation of *Aurantiochytrium* sp. KRS101 in a 6000-L airlift-type bioreactor. Closed circles, dry cell weights; open circles, lipid contents; closed triangles, DHA contents; closed squares, residual glucose levels.

Table 1. Comparison of lipid production parameters upon large-scale cultivation of *Aurantiochytrium* sp. KRS101 in different types of bioreactors.

	Stirrer-type (5000-L scale)	Airlift-type (6000-L scale)
Lipid conversion rate (g g ⁻¹ glucose)	0.196	0.262
Lipid productivity (g L ⁻¹ day ⁻¹)	4.08	10.8
DHA content (% total fatty acids)	39.5	52.3

level obtained was higher upon airlift-type fermentation (Table 1). As the result, the DHA productivity was significantly elevated in the airlift-type bioreactor fermentation upto 5.6 g/L/d, which could be due to the decrease of shearing force in the airlift type.

When the commercial strain *S. limacinum* SR21 was employed to this end, the maximum DHA productivity

noted was 13.1 g/L/d upon fed-batch fermentation (in a volume of 14,000 gallons), after optimization of aeration [10]. Therefore, it may be expected that DHA productivity of *Aurantiochytrium* sp. KRS101 will be enhanced upon optimization of fermentation conditions.

3.3. Extraction of Microalgal Lipid Containing High Levels of Docosahexaenoic Acid

Four extraction methods were compared to recover DHA-rich microalgal lipid, *i.e.* the typical chloroform-methanol extraction method of Bligh-Dyer [9], ethanol extraction method with sonication, supercritical carbon dioxide extraction method [11] and hot water extraction method. The highest levels of lipid and docosahexaenoic acid was recovered from microalgal cells by chloroform-methanol extraction method recovered from microalgal cells were $58.7\% \pm 1.2\%$ of DCW and $47.4\% \pm 1.1\%$ of TFA by chloroform-methanol extraction method (Table 2). Aspect of the applications [12] of the microalgal lipid in food and feed industries, more safe extraction methods would be preferred. Ethanol extraction after ultrasonication gave approximately 90% extraction yield compared to that of the chloroform-methanol extraction method (Table 2). Whereas, supercritical carbon dioxide extraction method and hot water extraction methods resulted in much less 68% and 62% recovery yield compared to that of the chloroform-methanol extraction method. The composition of fatty acid in the lipids recovered was similar from four extraction methods (Table 2).

4. Conclusion

In this study, large-scale production of microalgal lipid containing high levels of DHA was successfully performed using 6000-L airlift-type bioreactor. The maximal productivity of DHA in the experiment reached at 5.6 g/L/d, which, to the best of our knowledge, is the highest productivity value yet reported. The microalgal lipid was effectively recovered by safe extraction methods applicable for food and feed industry. Thus, the mi-

Table 2. Comparison of lipid recovery by different lipid extraction method with pilot-scale fermentative microalgae product of *Aurantiochytrium* sp. KRS101.

	Oil recovery of DCW (%)	DHA content of TFA (%)
Chloroform-methanol extraction	58.7 ± 1.2	47.4 ± 1.1
Ethanol extraction with sonication	53.2 ± 1.1	43.5 ± 1.2
Supercritical carbon dioxide extraction	40 ± 1.2	41 ± 1.1
Hot water extraction	36.3 ± 1.7	44 ± 0.9

Data are expressed as means \pm SD. Three independent experiments were made for each end-point.

croalgal lipid would serve as a valuable source of PUFA.

5. Acknowledgements

This work was supported the Advanced Biomass R&D Center (2010-0029737) of Korea Grant funded by the Ministry of Education, Science and Technology and by the Ministry of Food, Agriculture, Forestry, and Fisheries of the Republic Korea.

REFERENCES

- [1] Y. Li, Z. Zhao and F. Bai, "High-Density Cultivation of Oleaginous Yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in Fed-Batch Culture," *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 41, No. 3, 2007, pp. 312-317. doi:10.1016/j.enzmictec.2007.02.008
- [2] M. Abbey, P. Clifton, M. Kestin, B. Belling and P. Nestel, "Effect of Fish Oil on Lipoproteins, Lecithin: Cholesterol Acyltransferase, and Lipid Transfer Protein Activity in Humans," *Arteriosclerosis*, Vol. 10, No. 1, 1990, pp. 85-94. doi:10.1161/01.ATV.10.1.85
- [3] L. Lauritzen, H. S. Hansen, M. H. Jorgensen and K. F. Michaelsen, "The Essentiality of Long Chain ω -3 Fatty Acids in Relation to Development and Function of the Brain and Retina," *Progress in Lipid Research*, Vol. 40, No. 1, 2001, pp. 1-94. doi:10.1016/S0163-7827(00)00017-5
- [4] Y. L. Ma, "Microbial Oils and Its Research Advance," *Chinese Journal of Bioprocess Engineering*, Vol. 4, 2006, pp. 7-11.
- [5] Z. Perveen, H. Ando, A. Ueno, Y. Ito, Y. Yamamoto, Y. Yamada, T. Takagi, T. Kaneko, K. Kogame and H. Okuyama, "Isolation and Characterization of a Novel Thraustochytrid-Like Microorganism that Efficiently Produces Docosahexaenoic Acid," *Biotechnology Letters*, Vol. 28, No. 3, 2006, pp. 197-202. doi:10.1007/s10529-005-5335-4
- [6] S. M. Rosa, M. A. Soria, C. G. Velez and M. A. Galvagno, "Improvement of a Two-Stage Fermentation Process for Docosahexaenoic Acid Production by *Aurantiochytrium limacinum* SR21 Applying Statistical Experimental Designs and Data Analysis," *Bioresour Technol*, Vol. 101, No. 7, 2010, pp. 2367-2374. doi:10.1016/j.biortech.2009.11.056
- [7] L. J. Ren, X. J. Ji, H. Huang, L. Qu, Y. Feng, Q. Q. Tong and R. K. Ouyang, "Development of a Stepwise Aeration Control Strategy for Efficient Docosahexaenoic Acid Production by *Schizochytrium* sp.," *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 87, No. 5, 2010, pp. 1649-1656. doi:10.1007/s00253-010-2639-7
- [8] W. K. Hong, D. Rairakhwada, P. S. Seo, S. Y. Park, B. K. Hur, C. H. Kim and J. W. Seo, "Production of Lipids Containing High Levels of Docosahexaenoic Acid by a Newly Isolated Microalga, *Aurantiochytrium* sp. KRS101," *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 164, No. 8, 2011, pp. 1468-1480.
- [9] A. M. Buja, H. Radianingtyas, A. Windust and C. J.

- Barrow, "Isolation and Characterization of Polyunsaturated Fatty Acid Producing *Thraustochytrium* Species: Screening of Strains and Optimization of Omega-3 Production," *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 72, No. 6, 2003, pp. 1161-1169.
[doi:10.1007/s00253-006-0419-1](https://doi.org/10.1007/s00253-006-0419-1)
- [10] R. B. Bailey, D. DiMasi, J. M. Hansen, P. J. Mirrasoul, C. M. Ruecker, G. T. Veeder, T. Kaneko and W. R. Barclay, "Enhanced Production of Lipids Containing Polyenoic Fatty Acid by Very High Density Cultures of Eukaryotic Microbes in Fermentors," US Patent 6607900 B2, 2003.
- [11] M. S. Uddin, H. Kishimura and B. S. Chun, "Isolation and Characterization of Lecithin from Squid (*Todarodes pacificus*) Viscera Decoiled by Supercritical Carbon Dioxide Extraction," *Journal of Food Science*, Vol. 76, No. 2, 2011, pp. c350-c354.
[doi:10.1111/j.1750-3841.2010.02039.x](https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.02039.x)
- [12] A. M. Sanghvi and Y. M. Lo, "Present and Potential Industrial Applications of Macro- and Microalgae," *Recent Patents on Food, Nutrition and Agriculture*, Vol. 2, No. 3, 2010, pp. 187-194.

Characterization of a Squalene Synthase from the Thraustochytrid Microalga *Aurantiochytrium* sp. KRS101

Hong, Won-Kyung¹, Sun-Yeon Heo¹, Hye-Mi Park¹, Chul Ho Kim¹, Jung-Hoon Sohn², Akihiko Kondo³, and Jeong-Woo Seo^{1*}

¹Applied Microbiology Research Center, Bio-Materials Research Institute, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Jeonbuk 580-185, Korea

²Systems and Synthetic Biology Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Daejeon 305-333, Korea

³Department of Chemical Science and Engineering, Graduate School of Engineering, Kobe University, Kobe 657-8501, Japan

Received: December 10, 2012 / Revised: February 27, 2013 / Accepted: February 28, 2013

The gene encoding squalene synthase (SQS) of the lipid-producing heterotrophic microalga *Aurantiochytrium* sp. KRS101 was cloned and characterized. The *krsSQS* gene is 1,551 bp in length and has two exons and one intron. The open reading frame of the gene is 1,164 bp in length, yielding a polypeptide of 387 predicted amino acid residues with a molecular mass of 42.7 kDa. The deduced *krsSQS* sequence shares at least four conserved regions known to be required for SQS enzymatic activity in other species. The protein, tagged with His₆, was expressed into soluble form in *Escherichia coli*. The purified protein catalyzed the conversion of farnesyl diphosphate to squalene in the presence of NADPH and Mg²⁺. This is the first report on the characterization of an SQS from a Thraustochytrid microalga.

Key words: *Aurantiochytrium*, squalene synthase, gene analysis, functional characterization

Squalene (2,6,10,15,19,23-hexamethyltetracos-2,6,10,14,18,22-hexaene) is a dehydrotriterpenic hydrocarbon (C₃₀H₅₀) containing six double bonds. Squalene is a key precursor of cholesterol, bile acids, and steroids in plants and animals, and is also a potential antioxidant [9, 16] used in the cosmetic industry as a moisturizing agent and an emollient; it serves as a natural antioxidant protecting cells from free radicals and reactive oxygen species. Squalene is also used in the food industry [14]. Squalene has been extensively investigated by the medical and pharmaceutical sectors because many studies have shown that the chemical

effectively inhibits chemically induced colon, lung, and skin cancers; has bactericidal and antifungal properties; markedly increases both cellular and nonspecific immune functions; and reduces serum cholesterol levels [7].

To date, the major commercial sources of squalene are the liver oils of deep-sea sharks, and plant seeds [5]. The consistent availability of shark liver oils is doubtful. International concern for marine ecology has grown, and seas are becoming contaminated with environmentally derived organic pollutants and heavy metals. Squalene is also found in the oils of plant seeds (e.g., olive oil [approx. 7 mg squalene/g] and the oil of *Amaranthus* seed [0–5.65 mg/g]) [5]. Not only are the levels of squalene low (1–61 mg/g), but local and seasonal variations in crop production increase industrial costs. Although yeasts have been investigated as a potential source of squalene, the levels of the chemical are generally very low (<0.43 mg/g), with the exception of *Pseudozyma* sp. (70.3 mg/g) [1, 6].

Microalgae are currently under intensive investigation as potential sources of useful natural products, including squalene [2]. The green microalga *Botryococcus braunii* has been reported to produce squalene when cultured under photoautotrophic conditions [13]. However, it is difficult to achieve high biomass levels under such conditions owing to light limitation. From an industrial viewpoint, a high cell density is required if microbial production processes are to be successfully commercialized. Microalgae that grow heterotrophically do not require light and attain high cell densities, and exhibit good productivities, when cultured on commercial scales. Thraustochytrids are a group of microalgae widely distributed in mangroves; the microbes grow well in heterotrophic culture. Such microbes are currently being used to produce polyunsaturated fatty acids, and some species contain relatively high amounts of

*Corresponding author

Phone: +82-63-570-5160; Fax: +82-63-570-5109;
E-mail: jwseo@kribb.re.kr

squalene, which can be easily purified by counter-current chromatography [5]. Thraustochytrid in the *Aurantiochytrium* genus-heterotrophic microbes belonging to the Stramenopiles is being investigated as a possible source of squalene [12].

Squalene synthase (SQS, E.C. 2.5.1.21) is a membrane-bound enzyme catalyzing the first dedicated step in the biosynthesis of sterols and other triterpenoids, and SQS is thought to play an important role in regulating isoprenoid biosynthesis in eukaryotes. SQS is a bifunctional enzyme initially catalyzing the condensation of two molecules of farnesyl diphosphate (FPP) to form presqualene diphosphate (PSPP), and next converting PSPP to squalene in a reaction requiring NADPH and Mg^{2+} (Fig. 1) [17]. In bacteria, these reactions are the first pathway-specific steps in hopanoid biosynthesis; hopanoids are pentacyclic triterpene lipids of bacterial membranes that exert stabilizing effects similar to those characteristic of membrane sterols in eukaryotes [10]. As SQS is a key enzyme regulating isoprenoid biosynthesis, the genes encoding the enzyme have been cloned from bacteria [10], yeasts [11], *Ganoderma lucidum*, protozoa, various animals, humans, and plants [15]. However, very little is known regarding the SQS gene of the Thraustochytrid *Aurantiochytrium*. In the present report, we describe the cloning, gene organization, heterologous expression, and

functional analysis of SQS from the strain *Aurantiochytrium* sp. KRS101 (*krsSQS*).

MATERIALS AND METHODS

Microalgal Strain and Growth Conditions

Details of the Thraustochytrid microalgal strain *Aurantiochytrium* sp. KRS101 (KCTC 11686BP) have been reported previously [4]. The microalga was cultivated in 500 ml baffled flasks, each containing 50 ml of basal medium [glucose, 60 g/l; yeast extract, 10 g/l; dried natural sea salt (CJ Co., Seoul, Korea), 10 g/l] at 28°C, with shaking at 125 rpm, for 2 days. *Escherichia coli* BL21 cells harboring plasmid pET28a-*krsSQS* or pET-28a (control) were grown overnight at 37°C in Luria-Bertani (LB) medium containing ampicillin (100 µg/ml). Aliquots (500 µl) of overnight cultures were added to 50 ml of fresh LB medium supplemented with 100 µg/ml ampicillin. When the OD_{600} values reached 0.5, recombinant gene expression was induced by addition of isopropylthio-β-galactoside (IPTG) to a final concentration of 1 mM; growth was continued further for 16 h at 23°C.

Cloning of the *Aurantiochytrium* sp. KRS101 *krsSQS* Gene and Synthesis of cDNA

Whole genome of *Aurantiochytrium* sp. KRS101 was read with 16.9X coverage by HiSeq, which resulted in a draft whole genome sequence. The HiSeq reads were aligned to reference genome using BWA's short read aligner at default settings and the SAM (Sequence AlignmentMap) generic format tool for storing the nucleotide sequence alignment (Macrogen, Seoul, Korea). The whole genome sequencing allowed alignment of the deduced sequence of *Aurantiochytrium* sp. KRS101 genes. To identify the *krsSQS* gene of *Aurantiochytrium* sp. KRS101, we examined the whole-genome sequence database and identified a candidate gene of 1,551 bp in length, with two exons and one intron. The *krsSQS* gene (GenBank Accession No. JX684107) has an open reading frame of 1,164 bp, encoding a polypeptide of 387 predicted amino acid residues, and our clone (please see below) carries an artificially introduced terminal *Neol* in the N-terminus and *Bam*HI restriction enzyme sites in the C-terminus.

Genomic DNA was extracted using a "mini-prep" kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and total RNA was isolated with the aid of the Isol-RNA Lysis Reagent (5Prime, Gaithersburg, MD, USA). Single-stranded cDNA was synthesized by reverse transcription of total RNA (at 25°C for 5 min in nuclease-free water) using an iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Genomic DNA containing the *krsSQS* gene was amplified using the forward primer P1 (5'-GCTAGCATGCCTAACAAACCT-3') and the reverse primer P2 (5'-GGATCCGTCAGAGTGGGTTTGGC-3'). Each 50 µl PCR mixture contained 5 µl of 10× PCR buffer, 2.5 mM of each deoxyribonucleotide triphosphate, 0.5 µM of either primer, 2 U *Taq* polymerase (Takara, Otsu, Japan), and 1 µg of genomic DNA. The PCR protocol featured 1 min of denaturation at 94°C, followed by 25 cycles each of 0.5 min at 94°C, 0.5 min at 55°C, and 1.5 min at 72°C. The final extension was performed over 7 min at 72°C. PCR products were visualized by agarose gel electrophoresis.

Comparison of *krsSQS* Protein Sequences and Phylogenetic Analysis

The *krsSQS* protein sequences of representative species, including *Aurantiochytrium* sp. KRS101 (the microalga), *Aphanomyces euteiches*

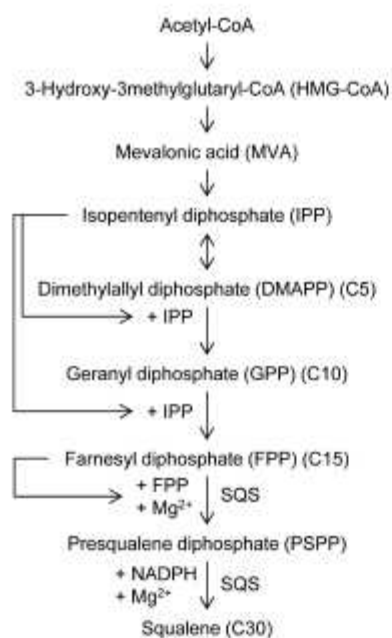


Fig. 1. The squalene biosynthesis pathway.

A simplified version of the steroid synthesis pathway with the intermediates isopentenyl pyrophosphate (IPP), dimethylallyl pyrophosphate (DMAPP), geranyl pyrophosphate (GPP), and squalene shown. Some intermediates are omitted.


```

EFW95406 -----
ACD03847 MGKLLQLALHPVEMKAALKLKF CRTPLFSIYDQSTSPYLLHCFELLNLT 50
CAQ55982 -----
XP_002180940 -----LAFCDLILVHVS 12
JX584107 -----
ABE97915 -----

EFW95406 -----I-----
ACD03847 -----MELNPELRNVVMLFYLVLRALDTIEDDMT----- 29
CAQ55982 -----RSFAAVIRELHPELRNCVTLFYLLLRALDTIEDDMG----- 86
XP_002180940 -----RSFAAVIRQLPDRLLVDILVYLVLRALDTIEDDTAF----- 50
JX584107 -----MPNKPDAPIRLAVGI FYIVLRALDTVEDDMNLS SFD SYVLEEDKK 45
ABE97915 -----MPNKPDAPIRLAVGI FYIVLRALDTVEDDMNLS SFD SYVLEEDKK 45

EFW95406 ----LDPELKI PMLRTFD----SKLNLKDWTFHGSGPNEKDRIVLVNF 70
ACD03847 ----IEHDLKIDLLRHFFH----EKLLLRKWSFDGNAPDVKDRAVLTDFE 127
CAQ55982 ----DSKTKIKMLQEFY----LKLNDTDL SIHGIG--EGDEATLLEQA 38
XP_002180940 ----ASPEEKIDYLLNFHR----TALADPDWNLQHVQ--QGDERLLQQF 90
JX584107 DVEDARSAAKQRI L L C Q F A Q R L S D S V E G N A D K H Q P L H G F G E G H E R E L I E N M 95
ABE97915 DVEDARSAAKQRI L L C Q F A Q R L S D S V E G N A D K H Q P L H G F G E G H E R E L I E N M 95

EFW95406 SILT-EYHKLQPKYQDI IKDVTRKMGNGMADYVVVNEEFNENGVATVKDYD 119
ACD03847 SILI-EFHKLKPEYQEVKEITEKMGNGMADYILDENYINLGLQTVHYDYD 176
CAQ55982 AIMNRSFASL PKDHQEI IADITKMGAGMAEFVVEVDMG--QGTVRTADYD 86
XP_002180940 PQCHRVIYAKLAAPSRRVVADV TARMATGMAEFVRKDLG--QGTNTTEQYN 138
JX584107 DAIVYGM SVLP P K L R Q V V L D I T E E M G V G M A G Y V S R D L K --N G T D D A K D F E 143
ABE97915 DAIVYGM SVLP P K L R Q V V L D I T E E M G V G M A G Y V S R D L K --N G T D D A K D F E 143

EFW95406 -----II-----III-----
ACD03847 LYCHYVAGLVGEG LTRMIAAADFGHPDLADK-MYLSDSMGLFLQKTNIIIR 168
CAQ55982 VYCHYVAGLVGEG LTRLIYAKFANESLYSN-EQLYESMGLFLQKTNIIIR 225
XP_002180940 NYCYVYVAGLVGEG LSR L F A S G L E A G S P V G K L -T G L S I S M G S F L Q K V N I I R 135
JX584107 NYCHYVAGLVGEG LSR L F A S G L E A G S P A G E -L H L S D M G L F L Q K T N I I R 187
ABE97915 QYCHYVAGTVGEG LTRIFASCGYCPADLVSH-RELWDAMGSSFLQRTNIIIR 192
QYCHYVAGTVGEG LTRIFASCGYCPADLVSH-RELWDAMGSSFLQRTNIIIR 192

EFW95406 DFREDLDDGRSFWFK EIWAKHTD-----KLANFAQPEHLQEALN-- 207
ACD03847 DYNE DLVDGRSFWFK EIWWSQYAP-----QLKDEMEKFENEQLGLD-- 264
CAQ55982 DYLED FVEGRTFWFK EIWKKHMG-----NLGDMRDPAKEEASLA-- 174
XP_002180940 DYLED YVDQRAF F W F Q S V W K K Y A A T -----D D L G Y F A Q S I G T D D G R D R A 230
JX584107 DYLED LVDGRAW F R S V W E L Y V T K D A E F G R S K S L S R L A D S A S I E A G H S T S 242
ABE97915 DYLED LVDGRAW F R S V W E L Y V T K D A E F G R S K S L S R L A D S A S I E A G L S T S 242

EFW95406 -----IV-----
ACD03847 --CSSELVNLVLDHVKDVLVYLSMVYDHS TYCFCAIPQVMAIATLALVYFQ 255
CAQ55982 --CINHLVLNALS HVIDVLT YLAGIHRQSTFQFCALPQVMAIATLVLVFN 312
XP_002180940 --CLNEMVFDALRHIPDCMEYLGGIHRHPDVFVFCAMPQVMAVATLAKLYN 222
JX584107 LGCLNELVTDAL ELVPC LTYLRLQCCQEI FRFCALPQVMAIATLQKCYH 280
ABE97915 --CLNHMIADALEMVGSCLSYLEALNDPDI SFCALPQVMAIATLSVCFD 290
--CINHMIA DALEMVGSCLSYLEALNDPDI SFCALPQVMAIATLSVRFD 290

EFW95406 NPVYVQKNVKIRKGETCSLILECRTYEG--VLNVPSRYLRV IHKCPVSD 303
ACD03847 NREVLHG NVKIRKGTTCYLILKSR LRG--CVELFDYLRDIKSKLAVQD 360
CAQ55982 NPKVFTGVV KVRREGTAAFLMEHSTMPK--VRGLFSNYIQVIQSKVKHTP 270
XP_002180940 NVNVFTGVV KIRKGLSCKLLLTNTLSQ--VHETFY----- 314
JX584107 NQKVPQGVV KIRKQAARIMLD MSPMEHPTIFELQ QNYLSWFARCTREIQ 340
ABE97915 NQKVPQGVV KIRKQAARIMLD MSPMEHPTIFELQ QNYLSWFARCAREIQ 340

EFW95406 PLYLEIGMKCGELEQFIEELNPNP SHLPKGL EPR-KTVYSELAQTKIRKD 352
ACD03847 PNFLKLN IQISKIEQFMEEMYQDK--LPPNVKPNETPIFLKVKE- RSRVD 407
CAQ55982 E-----RKAVLTRALEA I H D D K L E M P N M S G I T Y V A L F A L A G S L S Y L I G 313
XP_002180940 AKARRAATHDPQAQR TDN ICGK I I K V V D S K L Q C L Q E S G R P L G Q T H S D --- 387
JX584107 AKARRAATHDPQAQR TDN ICGK I I K V V D S K L Q C L Q E S G R P L G Q T H S D --- 387
ABE97915 AKARRAATHDPQAQR TDN ICGK I I K V V D S K L Q C L Q E S G R P L G Q T H S D --- 387

EFW95406 ADVAKKLWREQFACNAB LALIAVCVVTLLEKTF---- 385
ACD03847 DELVPTQEE EYKFNMVLS I I L S V L L G F Y Y I Y T L H R A 444
CAQ55982 KN-----GFVLPPLTAAF----- 326
XP_002180940m -----
JX584107 -----
ABE97915 -----

```

Fig. 3. Alignment of the amino acid sequence of the *krsSQS* of *Aurantiochytrium* sp. KRS101 with those of other *SQS*s.

At least four very similar regions are evident. Six sequences of *SQS*s of different species were retrieved from GenBank. The accession numbers are indicated. EFW95406, *Ogataea parapolyomorpha*; ACD03847, *Saccharomyces cerevisiae*; CAQ55982, *Aphanomyces eustiches*; XP_002180940, *Phaeoascus tricornutum*; JX584107, *Aurantiochytrium* *krs101*; ABE97915, *Aurantiochytrium limacinum*.

pellet washed three times with phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2). Reuspended cells were again harvested by centrifugation at $4,500 \times g$ at 4°C for 20 min. Each pellet was resuspended in 600 μl of distilled water and transferred to a pre-weighed vial. Cell pellets were dried at 60°C for 12 h using a speed vacuum concentrator (Biotron 4080C; Bucheon, Korea). Each vial was weighed and the DCW value obtained.

RESULTS

Identification of the *krsSQS* of *Aurantiocytrium* sp. KRS101

The whole-genome sequence database indicated that the *SQS* gene of *Aurantiocytrium* sp. KRS101 was 1,551 bp in length, and included two exons and one intron. The *SQS* protein was synthesized from an open reading frame 1,164 bp in length, yielding a polypeptide with a predicted 387 amino acid residues, a predicted MW of 42.7 kDa, and a predicted pI value of pH 5.03. RT-PCR was employed to isolate the open reading frame of *krsSQS* cDNA (Fig. 4). Comparison of the full gene sequence with that of the putative coding region indicated that the gene had two exons and one intron. It is noteworthy that the *krsSQS* gene contains an intron; the splice sites lie between TG and TT (nts 2–3 and 4–5, respectively) and TG and CC (nts 389–390 and 391–392, respectively) (Fig. 2).

Molecular Characterization of the *krsSQS* of *Aurantiocytrium* sp. KRS101

An NCBI BLAST search revealed that the deduced *krsSQS* sequence of *Aurantiocytrium* sp. KRS101 is 99.2% identical to that of a hypothetical protein of *Aurantiocytrium limacinum*, but is much less similar to *krsSQS* proteins of other microalgae, yeast, and fungal species, including *S. cerevisiae* (28%), *Candida albicans* (33%), and *Ogataea parapolymorpha* (33%) (Fig. 3). Alignment of the

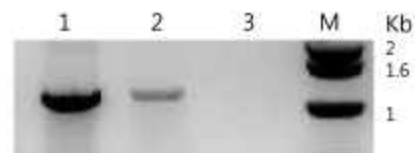


Fig. 4. RT-PCR of *krsSQS*.

M, marker; 1, *Aurantiocytrium* KRS101 cDNA; 2, *Aurantiocytrium* KRS101 gDNA; 3, No template.

Aurantiocytrium *krsSQS* with those of other species revealed at least four regions that are highly conserved in microalgae, yeast, and fungi. Among these species, Regions II, III, and IV are nearly identical.

Region I is relatively well conserved, although only a partial sequence from *Aphanomyces euteiches* is available. This region harbors a highly conserved aspartate-rich motif (DXXXD) ($^{24}\text{DTVED}^{28}$ in our enzyme). Region III is also very highly conserved among the superfamily of isoprenoid biosynthesis enzymes (class 1), as revealed by an NCBI BLAST protein search. Region III also contains an aspartate-rich motif ($^{193}\text{DYLED}^{197}$). The two aspartate-rich regions mediate binding of prenyl phosphates, and contain Mg^{2+} -binding sites and substrate-binding pockets. Region II is also conserved in the class 1 superfamily of enzymes involved in isoprenoid biosynthesis. Region IV harbors motifs responsible for catalysis of the second reaction; the likely NADPH-binding motifs are shown in bold in the *Aurantiocytrium* sequence from this region: **FCALPQVMAIATLSVCFDNQKVFQGVVKIRK**G. In Zhao *et al.* [17], this motif was essential for performance of the second enzymatic activity. C-Terminal SSQ amino acid sequences vary greatly among microalgal, yeast, and fungal proteins. A peroxisome-targeting signal 1 (PTS1) motif is evident; this is a tripeptide with the consensus sequence (S/A/C)-(K/R/H)-(L/A). The most common PTS1

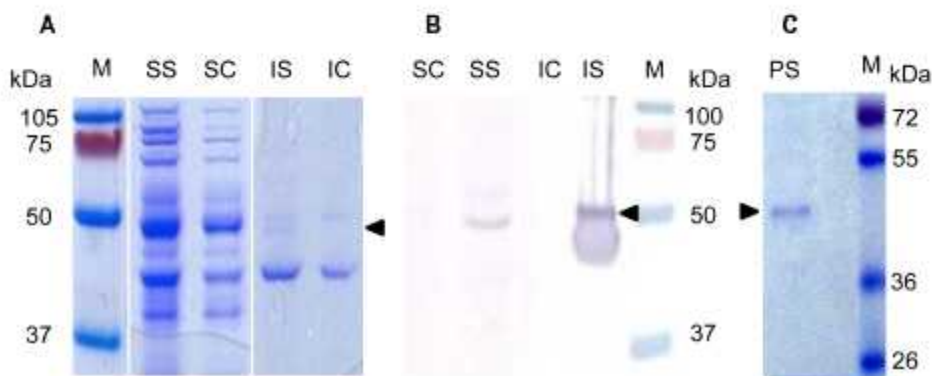


Fig. 5. SDS-PAGE (A and C) and Western blotting (B) of *Aurantiocytrium* sp. KRS101 *krsSQS* expressed in *E. coli*.

M, protein markers; SS, soluble *SQS* (BL21/pET-*krsSQS*); SC, soluble control (BL21/pET-28a); IS, insoluble *SQS* (BL21/pET-*krsSQS*); IC, insoluble control (BL21/pET-28a); PS, purified recombinant *SQS*.

is serine-lysine-leucine (SKL). However, a peroxisome-targeting signal of type 2 (PTS2) is a head region nonapeptide with the consensus sequence (R/K)-(L/V/I)-XXXXX-(H/Q)-(L/A/F) (where X is any amino acid); such a sequence may be found in the RIMLDMSPEHPTIFELQQNYLG FVLPLTAAFGKIIKVVDSKLQCLQESGRPLGQTHSD (the residues of interest are shown in bold) run of the *krsSQS* C-terminal region. This sequence is hydrophobic, and some reports have indicated that the sequence may function to anchor the protein to the membrane [3, 8, 11].

Heterologous Expression of *Aurantiochytrium* sp. KRS101 *krsSQS* in *E. coli*

E. coli BL21 cells harboring plasmid pET-*krsSQS* or pET-28a (control) were cultured as described in Materials and Methods. Both the protein mix including recombinant *krsSQS* protein (prepared from BL21/pET-*krsSQS*) and a control pET-28a protein mix were subjected to SDS-PAGE and Western blotting (Figs. 5A and 5B). *krsSQS* was not expressed in the cytosol of the recombinant but was evident in the insoluble fraction. Western blotting showed that the protein size (thus including the His-tag) was correct. No such band was observed in the control strain. Western immunoblotting showed that both soluble and insoluble recombinant *krsSQS*s specifically bound with anti-His-tag antibody, although the insoluble recombinant *krsSQS* expressed very low level. The recombinant protein was purified on an Ni-NTA affinity spin column under non-denaturing conditions, and the purified protein with approximately 43.3 kDa was detected (Fig. 5C).

Functional Characterization of the *krsSQS* of *Aurantiochytrium* sp. KRS101

To confirm that the *krsSQS* gene encoded functional SQS, the activity of the purified recombinant protein was measured

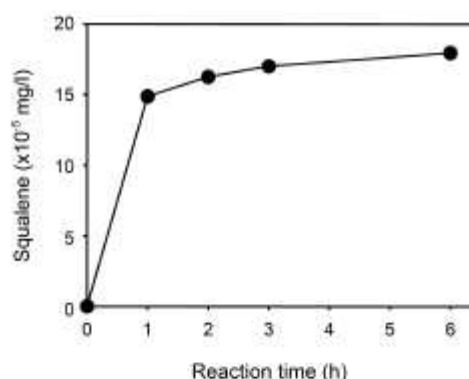


Fig. 6. Activity assay of recombinant *krsSQS* of *Aurantiochytrium* sp. KRS101 expressed in *E. coli*.

for conversion of FPP to squalene in the presence of NADPH and Mg^{2+} (Fig. 6). The catalytic product was identified as squalene by GC-MS analysis (Fig. 7).

DISCUSSION

Because SQS is a key enzyme regulating isoprenoid biosynthesis, SQS-encoding genes have been cloned from many microorganisms such as bacteria and yeast, plants, and human being. However, the SQS gene(s) of Thraustochytrid microalgae have been poorly studied. In the present report, we first identified the *SQS* gene of *Aurantiochytrium* sp. KRS101, and next characterized the *krsSQS* protein in both molecular and functional terms. Our results show that further work on *Aurantiochytrium* strains, and on gene expression systems in thraustochytrids, may render it

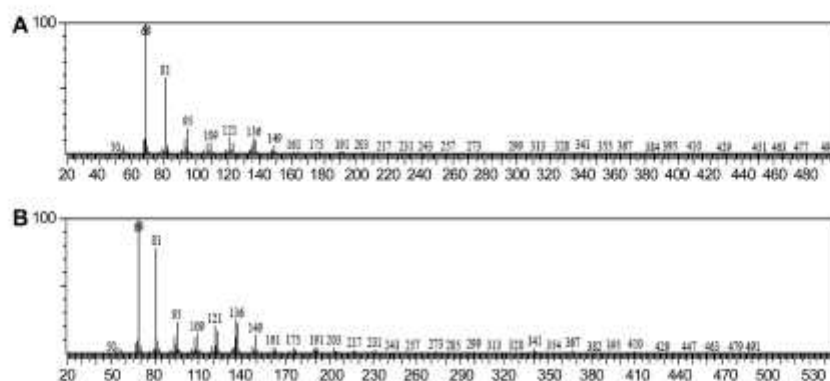


Fig. 7. GC-MS analysis of the product of the reaction catalyzed by recombinant *krsSQS* of *Aurantiochytrium* sp. KRS101 expressed in *E. coli*.

S: Total ion chromatograms (TICs). (A) Product extracted from an *in vitro* reaction mixture containing purified recombinant SQS; (B) Authentic squalene.

possible to use such strains for commercial production of squalene.

The *krsSQS* gene of *Aurantiochytrium* sp. KRS101 has one intron and two exons. A BLAST search revealed that the deduced SQS sequence of *Aurantiochytrium* sp. KRS101 is similar to those of other microalgae, yeast, and fungi; four protein regions are highly conserved in all *krsSQS* proteins. The SQS C-terminal region is hydrophobic and may function to anchor the protein to the membrane. Earlier reports suggested that deletion of the hydrophobic C-terminal SQS region facilitated expression of soluble protein [3]. However, the *krsSQS* protein was expressed to some extent in the cytosol, although most protein was insoluble. It is possible that addition of a His-tag to the C-terminus of *krsSQS* facilitated expression of the protein in a soluble form; histidine is a polar amino acid.

Recently, Thraustochytrid microalgae strains have been reported to produce high levels of squalene [12]. In the present report, we have gathered molecular and biochemical information relevant to squalene production by such microalgae. However, unfortunately, we could not detect squalene production in the *Aurantiochytrium* strain, although the active squalene synthase gene was expressed. Failure in the observation of squalene production might be due to production of compounds competing with fatty acids biosynthesis for the common precursor acetyl-CoA. The fatty acid production level is very high, being over 30% (w/w) of the dried biomass in the microalgal strain. We expect that a metabolic engineering strategy for increasing the expression level of *krsSQS* along with decreasing the fatty acid biosynthesis level could enhance squalene production in the microalgal strain.

Acknowledgments

This work was supported by a National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korea government (MEST) (No. 2011-0027171) and by the Ministry of Food, Agriculture, Forestry, and Fisheries, of the Republic Korea.

REFERENCES

- Chang, M. H., H. J. Kim, K. Y. Jahng, and S. C. Hong. 2008. The isolation and characterization of *Pseudozyma* sp. JCC 207, a novel producer of squalene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **78**: 963–972.
- Chen, G., K. W. Fan, F. P. Lu, Q. Li, T. Aki, F. Chen, and Y. Jiang. 2010. Optimization of nitrogen source for enhanced production of squalene from thraustochytrid *Aurantiochytrium* sp. *N. Biotechnol.* **27**: 382–389.
- Gupta, N., P. Sharma, R. J. Santosh Kumar, R. K. Vishwakarma, and B. M. Khan. 2012. Functional characterization and differential expression studies of squalene synthase from *Withania somnifera*. *Mol. Biol. Rep.* **39**: 8803–8812.
- Hong, W. K., D. Rainakhwada, P. S. Seo, S. Y. Park, B. K. Hur, C. H. Kim, and J. W. Seo. 2011. Production of lipids containing high levels of docosahexaenoic acid by a newly isolated microalga, *Aurantiochytrium* sp. KRS101. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **164**: 1468–1480.
- Jiang, Y., K. W. Fan, R. T. Wong, and F. Chen. 2004. Fatty acid composition and squalene content of the marine microalga *Schizochytrium mangrovei*. *J. Agric. Food Chem.* **52**: 1196–1200.
- Kaya, K., A. Nakazawa, H. Matsuura, D. Honda, I. Inouye, and M. M. Watanabe. 2011. Thraustochytrid *Aurantiochytrium* sp. 18W-13a accumulates high amounts of squalene. *BioSci. Biotechnol. Biochem.* **75**: 2246–2248.
- Kim, S. K. and F. Karadeniz. 2012. Biological importance and applications of squalene and squalane. *Adv. Food Nutr. Res.* **65**: 223–233.
- Kim, T. D., J. Y. Han, G. H. Huh, and Y. E. Choi. 2011. Expression and functional characterization of three squalene synthase genes associated with saponin biosynthesis in *Panax ginseng*. *Plant Cell Physiol.* **52**: 125–137.
- Ko, T. F., Y. M. Weng, and R. Y. Chiou. 2002. Squalene content and antioxidant activity of *Terminalia catappa* leaves and seeds. *J. Agric. Food Chem.* **50**: 5343–5348.
- Lee, S. and C. D. Poulter. 2008. Cloning, solubilization, and characterization of squalene synthase from *Thermosynechococcus elongatus* BP-1. *J. Bacteriol.* **190**: 3808–3816.
- LoGrasso, P. V., D. A. Soltis, and B. R. Boettcher. 1993. Overexpression, purification, and kinetic characterization of a carboxyl-terminal-truncated yeast squalene synthetase. *Arch. Biochem. Biophys.* **307**: 193–199.
- Nakazawa, A., H. Matsuura, R. Kose, S. Kato, D. Honda, I. Inouye, et al. 2012. Optimization of culture conditions of the thraustochytrid *Aurantiochytrium* sp. strain 18W-13a for squalene production. *Bioresour. Technol.* **109**: 287–291.
- Okada, S., T. P. Devarenne, and J. Chappell. 2000. Molecular characterization of squalene synthase from the green microalga *Botryococcus braunii*, race B. *Arch. Biochem.* **373**: 307–317.
- Tikekar, R. V., R. D. Ludescher, and M. V. Karwe. 2008. Processing stability of squalene in amaranth and antioxidant potential of amaranth extract. *J. Agric. Food Chem.* **56**: 10675–10678.
- Uchida, H., H. Yamashita, M. Kajikawa, K. Ohyama, O. Nakayachi, R. Sugiyama, et al. 2009. Cloning and characterization of a squalene synthase gene from a petroleum plant, *Euphorbia tirucalli* L. *Planta* **229**: 1243–1252.
- Wei, A. and T. Shibamoto. 2007. Antioxidant activities of essential oil mixtures toward skin lipid squalene oxidized by UV irradiation. *Cutan. Ocul. Toxicol.* **26**: 227–233.
- Zhao, R. Y., W. Xiao, H. L. Cheng, P. Zhu, and K. D. Cheng. 2010. Cloning and characterization of squalene synthase gene from *Fusarium fujikuroi* (Saw.) Wt. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **37**: 1171–1182.

4. 학회 발표 실적



FEMS 2013
5TH CONGRESS OF EUROPEAN MICROBIOLOGISTS

LEIPZIG, GERMANY
JULY 21-25, 2013

FEDERATION OF EUROPEAN MICROBIOLOGICAL SOCIETIES
FEMS

www.kenes.com/fems-microbiology

Call for Abstracts

Important dates:
Deadline for Abstract Submission: **February 11, 2013**
Early Registration Deadline: **April 15, 2013**



Federation of European Microbiological Societies 2013 연구결과 발표
(일시: 2013. 7. 21 - 25, 장소: 독일 라이프치히)



POSTER DISPLAY BRIEFING NOTES

10-15 August 2014

**Melbourne Convention and Exhibition Centre,
Melbourne, Australia**

International Association for Plant Biotechnology 연구결과 발표
(일시: 2014. 8. 10 - 15, 장소: 호주 멜버른 컨벤션 센터)



AOAIS 2014

3rd Asia-Oceania Algae Innovation Summit

17_{MON} - 20_{THU} November`14

Hotel ICC, Daejeon, Korea

Summit Guide



Organized by



International Organizing Committee



Korean Society of Photoscience

3rd Asia-Oceania Algae Innovation Summit 2014 연구결과 발표
(일시: 2014. 11. 17 - 20, 장소: 대전 호텔 ICC)

제 2 절 성과활용 계획

- 현재 오메가-3 다중불포화지방산 고지혈증 의약 원료는 전량 fish oil로부터 추출, 농축 및 고순도 정제한 DHA와 EPA를 사용하고 있음. 최근 해양 환경오염이 심각해짐에 따라 어류에 PCBs (Polychlorinated Biphenyls)나 Dioxin과 같은 독성 화학물질의 축적이 증가하고 있어, 어류 유지 사용에 대한 우려와 규제가 점차로 증가하고 있는 상황임. PCB는 절연유로 활용되다가 강한 독성과 잔류성으로 인해 1970년대에 사용이 금지된 화학물질이며, Dioxin은 여러 개의 염소가 붙어있는 방향족 화합물로 환경 잔류성이 매우 강한 생식계, 면역계, 호르몬 조절 기능 장애를 유발하는 발암물질임 (일일 허용 섭취량 미국기준 1 pg/kg body 이하). 또한 2011년 일본의 후쿠시마 원자력발전소 폭발 사고로 인해 실제로 수산물 소비가 위축되고 관련 산업이 축소되고 있어 종속영양 유지성 미세조류에 의해 안전하게 생산되는 오메가-3 제품의 필요성이 더욱 강조될 것으로 예상됨. 따라서 기존의 어유 추출공정을 대체하기 위한 새로운 고순도의 DHA와 EPA 오일을 안정적으로 생산할 수 있는 기술개발에 대한 관심이 고조되고 있는데, Thraustochytrid 계열 미세조류 유지는 안전한 오메가-3 다중불포화지방산의 공급원으로 역할을 할 수 있음.
- 아직까지, Thraustochytrid 미세조류 오메가-3 다중불포화지방산의 고지혈증 의약품원료로 상용화는 이루어지지 않고 상황임. 이를 위해서는 고지혈증 의약품원료 주요 약효 성분인 EPA의 함량을 높이는 기술의 개발이 필요함. 따라서 본 연구에서 얻어진 결과는 Thraustochytrid 미세조류 오메가-3 다중불포화지방산 생산 기술은 고지혈증 의약품원료 제품 개발에 활용될 수 있음.
- 전세계 오메가-3 지방산 의약 시장 규모는 약 \$2.5B 수준이며, DHA와 EPA의 혼합 형태인 프로노바사의 오마코가 세계 시장을 주도하고 있으며, 일본 모찌다사의 에파텔, 미국 아마린사의 바스세파 제품이 판매되고 있음. 국내에서도 프로노바사의 오마코 제품이 수입, 판매되고 있으며, 2007년 71.7억에서 2014년 400억원으로 시장규모가 급성장하고 있음. 오마코의 특허가 만료된 이후 대부분의 제약기업들이 제네릭 제품을 개발, 출시하고 있는 상황임.
- Fish oil를 활용한 오메가-3 다중불포화지방산 고지혈증 의약 사업과 달리

Thraustochytrid 미세조류 기반은 발효 공정을 통해 오메가-3 다중불포화지방산의 생산, 확보가 가능하기 때문에 기존의 발효설비를 구비한 제약기업이 단독으로 사업화가 가능함.



- 따라서 기술 수요 기업체와 협의를 통해 기술개량, 공정개발, 효능검증 및 제품개발 과정을 거쳐 국내 시장은 물론 국내 시장의 진출이 가능할 것으로 전망됨.

국내 오메가-3 고지혈증 시장 현황 (2015년 상반기)

품목	업체	상반기 처방액		증감률
		2015	2014	
오마코	건일제약	19652	21558	-8.8
오마론	영진약품	842		
시코	제일약품	507		
한미오메가	한미약품	186		
뉴마코	유유제약	178		
휴메가	안국약품	119		

제 6 장 참고문헌

1. Beopoulos A, Cescut J, Haddouche R, Uribelarrea JL, Molina-Jouve C, Nicaud JM (2009) *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. *Prog Lipid Res* 48:375 - 387
2. Economou CN, Makri A, Aggelis G, Pavlou S, Vayenas DV(2010) Semi-solid state fermentation of sweet sorghum for the biotechnological production of single cell oil. *Bioresource Tech* 101:1385 - 1388
3. Zhu LY, Zong MH, Wu H (2008) Efficient lipid production with *Trichosporon fermentans* and its use for biodiesel preparation. *Bioresource Tech* 99:7881 - 7885
4. Li Q, Du W, Liu D (2008) Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Appl Microbiol Biotechnol* 80:749 - 756
5. Easterling ER, French WT, Hernandez R, Licha M (2009) The effect of glycerol as a sole and secondary substrate on the growth and fatty acid composition of *Rhodotorula glutinis*. *Bioresource Tech* 100:356 - 361
6. Hu C, Zhao X, Zhao J, Wu S, Zhao ZK (2009) Effects of biomass hydrolysis by-products on oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Bioresource Tech* 100:4843 - 4847
7. Li Y, Zhao Z, Bai F (2007) High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture. *Enz Microbiol Tech* 41:312 - 317
8. Gouda MK, Omar SH, Aouad LM (2008) Single cell oil production by *Gordonia* sp. DG using agro-industrial wastes. *World J Microbiol Biotechnol* 24:1703 - 1711
9. Xu H, Miao X, Wu Q (2006) High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *J Biotechnol* 126:499 - 507
10. Yokochi T, Honda D, Higashihara T, Nakahara T (1998) Optimization of docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium limacinum* SR21. *Appl Microbiol Biotechnol* 49:72 - 76
11. Seraphim P, Michael K, George A (2004) Single cell oil (SCO) production by *Mortierella isabellina* grown on high-sugar content media. *Bioresour Tech* 95:287 - 291
12. Brooks SL, Mitchell A, Steffenson N (2000) Mothers, infants, and DHA. Implications for nursing practice. *Am J Matern Child Nurs* 25:71 - 75
13. Carlson SE (2009) Early determinants of development: a lipid perspective. *Am J Clin Nutr* 89:678S - 684S
14. Auestad N, Halter R, Hall RT, Blatter M, Bogle ML, Burks W, Erickson JR, Fitzgerald KM, Dobson V, Innis SM, Singer LT, Montalto MB, Jacobs JR, Qiu W, Bornstein MH (2001) Growth and development in term infants fed long-chain polyunsaturated fatty acids:

a double-masked, randomized, parallel, prospective, multivariate study. *Pediatrics* 108:372 - 381

15. Chi Z, Hu B, Liu Y, Frear C, Wen Z, Chen S (2007) Production of omega-3 polyunsaturated fatty acids from cull potato using an algae culture process. *Appl Biochem Biotechnol* 137 - 140: 805 - 815

16. Liang Y, Sarkany N, Cui Y, Yesuf J, Trushenski J, Blackburn J (2010) Use of sweet sorghum juice for lipid production by *Schizochytrium limacinum* SR21. *Bioresource Tech* 101:3623 - 3627

17. Hong WK, Rairakhwada D, Seo PS, Park SY, Hur BK, Ki CH, Seo JW (2011) Production of lipids containing high levels of docosahexaenoic acid by a newly isolated microalga, *Aurantiochytrium* sp. KRS101. *Appl Biochem Biotechnol* 164:1468 - 1480

18. Hargraves PE (2008) Allelopathy at the land/sea interface: microalgae and Brazilian pepper. *Mar Environ Res* 66:553 - 555

19. Gocke K, Corte's J, Murillo MM (2001) Planktonic primary production in a tidally influenced mangrove forest on the pacific coast of Costa Rica. *Rev Biol Trop* 49:279 - 288

20. Ariffin H, Hassan MA, Shah UKM, Abdullah N, Ghazali FM, Shirai Y (2008) Production of bacterial endoglucanase from pretreated oil palm empty fruit bunch by *Bacillus pumilus* EB3. *J Biosci Bioeng* 106:231 - 236

21. Millier GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31:426 - 428

22. Kongruang S, Han MJ, Breton CI, Penner MH (2004) Quantitative analysis of cellulose-reducing ends. *Appl Biochem Biotechnol* 113 - 116:213 - 231

23. Chi Z, Pyle D, Wen Z, Frear C, Chen S (2007) A laboratory study of producing docosahexaenoic acid from biodiesel-waste glycerol by microalgal fermentation. *Process Biochem* 42:1537 - 1545

24. Zhu Y, Li H, Zhou H, Chen G, Liu W (2010) Cellulose and cellodextrin utilization by the cellulolytic bacterium *Cytophaga hutchisonii*. *Bioresour Technol* 101:6432 - 6437

25. Jun HS, Qi M, Gong J, Egbosimba EE, Forsberg CW (2007) Outer membrane proteins of *Fibrobacter succinogenes* with potential roles in adhesion to cellulose and in cellulose digestion. *J Bacteriol* 189:6806 - 6815

26. Johnson DT, Taconi KA (2007) The glycerin glut: options for the value-added conversion of crude glycerol resulting from biodiesel production. *Environ Prog* 26:338 - 348

27. da Silva GP, Mack M, Contiero J (2009) Glycerol: a promising and abundant carbon

source for industrial microbiology. *Biotechnol Adv* 27:30 - 39

28. Pagliaro M, Ciriminna R, Kimura H, Rossi M, Pina CD (2007) From glycerol to value-added products. *Angewandte Chemie-International Edition* 46:4434 - 4440

29. Haas T, Wiegand N, Arntz D (1994) Process for the production of 1,3-propanediol. US patent, NO 5334778

30. Slauch LH, Powell JB, Forschner TC, Semple TC, Weinder PR (1995) Process for preparing 1,3-propanediol. US patent No 5463146

31. Bhatia SK, Kurian JV (2008) Biological characterization of Sorona polymer from corn-derived 1,3-propanediol. *Biotechnol Lett* 30:619 - 623

32. Hao J, Wang W, Tian J, Li J, Liu DH (2008) Decrease of 3-hydroxypropionaldehyde accumulation in 1,3-propanediol production by over-expressing dha T gene in *Klebsiella pneumoniae* TUAC01. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35:735 - 741

33. Nakamura CE, Whited GM (2003) Metabolic engineering for the microbial production of 1,3-propanediol. *Curr Opin Biotechnol* 14:454 - 459

34. Tong IT, Liao HH, Cameron DC (1991) 1,3-Propanediol production by *Escherichia coli* expressing genes from the *Klebsiella pneumoniae* dha regulon. *Appl Environ Microbiol* 57:3541 - 3546

35. Skraly FA, Lytle BL, Cameron DC (1998) Construction and characterization of a 1,3-propanediol operon. *Appl Environ Microbiol* 64:98 - 105

36. Sun J, van den Heuvel J, Soucaille P, Qu Y, Zeng AP (2003) Comparative genomic analysis of dha regulon and related genes for anaerobic glycerol metabolism in bacteria. *Biotechnol Prog* 19:263 - 272

37. Zheng P, Wereath K, Sun J, van den Heuvel J, Zeng AP (2006) Overexpression of genes of the dha regulon and its effects on cell growth, glycerol fermentation to 1,3-propanediol and plasmid stability in *Klebsiella pneumoniae*. *Process Biochem* 41:2160 - 2169

38. Yang G, Tian J, Li J (2007) Fermentation of 1,3-propanediol by a lactate deficient mutant of *Klebsiella oxytoca* under microaerobic conditions. *Appl Microbiol Biotechnol* 73:1017 - 1024

39. Zhang Y, Li Y, Du C, Liu M, Cao Z (2006) Inactivation of aldehyde dehydrogenase: a key factor for engineering 1,3-propanediol production by *Klebsiella pneumoniae*. *Metab Eng* 8:578 - 586

40. Zhao L, Zheng Y, Ma X, Wei D (2009) Effects of over-expression of glycerol dehydrogenase and 1,3-propanediol oxidoreductase on bioconversion of glycerol into

1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* under micro-aerobic conditions. *Bioprocess Biosyst Eng* 32:313 - 320

41. Zhang YP, Huang ZH, Du CY, Li Y, Cao ZA (2009) Introduction of an NADH regeneration system into *Klebsiella oxytoca* leads to an enhanced oxidative and reductive metabolism of glycerol. *Metab Eng* 11:101 - 106

42. Oh BR, Seo JW, Choi MH, Kim CH (2008) Optimization of culture conditions for 1,3-propanediol production from crude glycerol by *Klebsiella pneumoniae* using response surface methodology. *Biotechnol Bioprocess Eng* 13:524 - 532

43. Xiu ZL, Zeng AP (2008) Present state and perspective of downstream processing of biologically produced 1,3-propanediol and 2, 3-butanediol. *Appl Microbiol Biotechnol* 78:917 - 926

44. Seo MY, Seo JW, Heo SY, Baek JO, Rairakhwada D, Oh BR, Seo PS, Choi MH, Kim CH (2009) Elimination of by-product formation during production of 1,3-propanediol in *Klebsiella pneumoniae* by inactivation of glycerol oxidative pathway. *Appl Microbiol Biotechnol* 84:527 - 534

45. Bandaru VVR, Somalanka SR, Mendu DR, Madicherla NR, Chityala A (2006) Enzyme *Microb Technol* 38:209 - 214

46. Lee H, Song M, Hwang S (2003) Optimizing bioconversion of deproteinated cheese whey to mycelia of *Ganoderma lucidum*. *Process Biochem* 38:1685 - 1693

47. Kim JK, Oh BR, Shin HJ, Eom CY, Kim SW (2008) Statistical optimization of enzymatic saccharification and ethanol fermentation using food waste. *Process Biochem* 43:1308 - 1312

48. Myers RH, Montgomery DC (2002) Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments. Wiley, New York

49. Forage RG, Lin ECC (1982) dha System mediating aerobic and anaerobic dissimilation of glycerol in *Klebsiella pneumoniae* NCIB418. *J Bacteriol* 151:591 - 599

50. Meyer M, Dimroth P, Bott M (2001) Catabolite repression of the citrate fermentation genes in *Klebsiella pneumoniae*: evidence for involvement of the cyclic AMP receptor protein. *J Bacteriol* 183:5248 - 5256

특허, 논문, 제품(시장) 분석보고서

신청과제명	대사공학을 통한 심혈관 건강 증진 고기능 발효 오일 생산 기술 개발		
주관연구책임자	서 정 우	주관기관	한국생명공학연구원

1. 본 연구관련 국내외 기술수준 비교

개발기술명	관련기술 최고보유국	현재 기술수준		기술개발 목표수준	비교
		우리나라	연구신청팀		
EPA 발효 오일 생산 기술	미국	-	-	100	

- 1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미
- 2) 현재 기술수준은 선진국 100% 대비 우리나라 및 신청한 연구팀의 기술수준 표시
- 3) 기술개발 목표수준은 당해과제 완료 후 선진국 100% 대비 목표수준 제시
- 4) 부가설명이 필요한 경우 비교란에 작성

2. 특허분석

가. 특허분석 범위

대상국가	국내, 국외(미국, 일본, 유럽)
특허 DB	특허정보원 DB (www.kipris.or.kr)
검색기간	최근 20년간
검색범위	제목 및 초록

나. 특허분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명		EPA 오일 발효 오일 생산 기술
Keyword		Eicosapentaenoic
검색건수		169건
유효특허건수		48건
핵심특허 및 관련성	특허명	고농도의 에이코사펜타엔산을 생성하는 야로위아리폴리티카 균주
	보유국	미국 (듀폰사)
	등록년도	공개특허 10-2007-0085649 (WO 2006/052870)
	관련성(%)	90
	유사점	유전·대사공학을 통하여 고농도의 에이코사펜타엔산을 생성하는 유전자 재조합 미생물 균주를 개발
차이점	유지성 효모를 생산 숙주로 이용한 에이코사펜타엔산 생성 기술은 미국 듀폰사가 우리나라를 포함한 국제 특허권을 확보하고 있음. 자체적으로 확보중인 고유지성 유기영양 미세조류의 유전·대사공학 을 통해 고농도의 에이코사펜타엔산을 생산하는 균주를 개발하여 지적재산권 확보하고 사업화를 추진	

- 1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미
- 2) keyword는 검색어를 의미하며, 검색건수는 keyword에 의한 총 검색건수를, 유효특허건수는 검색한 특허 중 핵심(세부)개발기술과 관련성이 있는 특허를 의미
- 3) 핵심특허는 개발기술과의 관련성이 높고 인용도가 높은 특허를 기준으로 분석

3. 논문분석

가. 논문분석 범위

대상국가	미국, 일본, 유럽
논문 DB	pubmed DB (www.ncbi.nlm.nih.gov)
검색기간	최근 20년간
검색범위	제목, 초록 및 키워드

나. 논문분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명	EPA 오일 생합성 기술	
Keyword	Eicosapentaenoic acid	
검색건수	6,584건	
유효논문건수	237건	
핵심논문 및 관련성	논문명	Metabolic Engineering of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> for production of eicosapentaenoic acid, using a novel $\Delta 5$ -desaturase from <i>Paramecium tetraurelia</i>
	학술지명	Applied and Environmental Microbiology
	저자	Tavares S, Grotkjar T, Obsen T, Haslam, RP, Napier JA, Gunnarsson N
	게재년도	2011
	관련성(%)	80
	유사점	유전·대사공학을 통한 에이코사펜타엔산 생성 유전자 재조합 미생물 균주 개발
	차이점	기 확보중인 고유지성 유기영양 미세조류의 형질전환기술을 응용한 유전·대사공학을 통해 고농도의 에이코사펜타엔산 생성 산업 균주를 개발

- 1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미
- 2) keyword는 검색어를 의미하며, 검색건수는 keyword에 의한 총검색건수를, 유효논문건수는 검색한 논문 중 핵심(세부)개발기술과 관련성이 있는 논문을 의미
- 3) 핵심논문은 개발기술과의 관련성이 높고 인용도가 높은 논문을 기준으로 분석

4. 제품 및 시장 분석

가. 생산 및 시장현황

- 1) 국내 제품생산 및 시장 현황

심혈관질환 예방 효능 EPA 오일을 첨가한 고부가가치 식품의 수요는 고령화 사회가 도래함에 따라 더욱 증가할 것으로 전망됨. 기존 EPA 오일 공급 공정 (어유, 魚油)의 문제점으로 인해 미생물 발효 EPA 오일의 시장 점유가 점차 확대될 것으로 예측됨

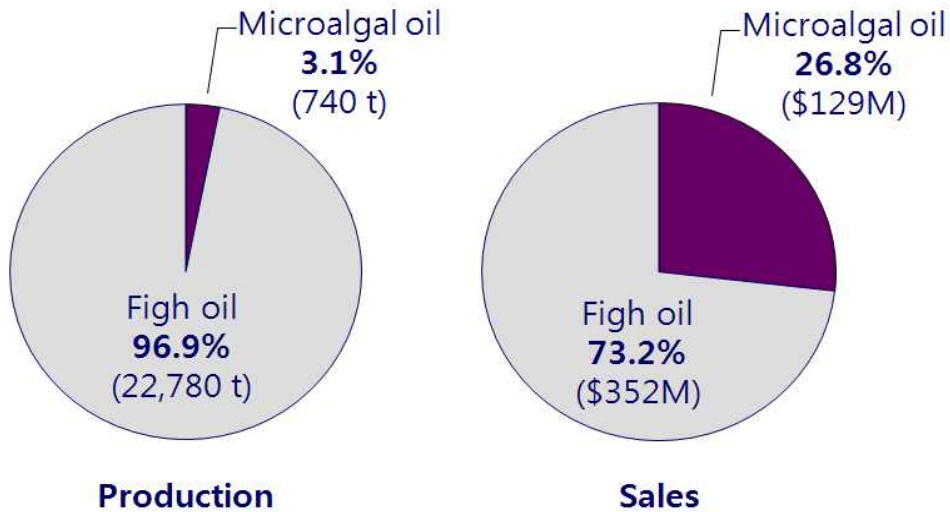
2) 국외 제품생산 및 시장 현황

○ EPA 함유 고도불포화지방산 오일 원료

	2006	2007	2008	2009	2010	2011
Volume (MT)	420.0	470.0	530.0	600.0	660.0	740.0
Revenue (\$ million)	73.0	83.0	93.0	104.0	116.0	129.0

(US Omega-3 and Omega-6 PUFA Ingredients Markets 2005 by Frost & Sullivan)

○ 미생물 발효오일의 시장 확대



나. 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

1) 산업화 방향 (제품의 특징, 대상 등)

○ 심혈관 건강 증진 고부가가치, 건강 기능성 식품은 물론 심혈관질환 예방 및 치료용 천

연의약품의 원료로 활용이 기대됨

2) 산업화를 통한 기대효과 (사업화 개시 이후)

(단위 : 백만원)

항 목 \ 산업화 기준	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	계
직접 경제효과	100	500	1,000	2,000	5,000	8,600
경제적 파급효과	1,000	5,000	10,000	20,000	50,000	86,000
부가가치 창출액			10,000	20,000	50,000	80,000
합 계	1,100	5,500	21,000	42,000	150,000	219,600

- ※ 직접 경제효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 제품의 매출액 추정치
- ※ 경제적 파급효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통한 농가소득효과, 비용절감효과 등 추정치
- ※ 부가가치 창출액 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 수출효과, 브랜드가치 등 추정치

5. 3P(특허,논문,제품)분석을 통한 연구추진계획

가. 분석결과 향후 연구계획(특허, 논문, 제품 측면에서 연구방향 제시)

1) 특허분석 측면

- 유지성 효모를 생산 속주로 이용한 에이코사펜타엔산 생성 기술은 미국 듀폰사가 우리나라를 포함한 국제 특허권을 확보하고 있음. 따라서 자체적으로 확보중인 **고유지성 유기영양 미세조류의 유전·대사공학**을 통해 고농도의 에이코사펜타엔산을 생산하는 산업균주의 개발과 지적재산권의 확보 전략이 적절함

2) 논문분석 측면

- 기 확보중인 **고유지성 유기영양 미세조류의 형질전환기술**을 응용한 유전·대사공학을 통해 고농도의 에이코사펜타엔산 생성 산업 균주를 개발이 필요함

3) 제품 및 시장분석 측면

- 심혈관질환 예방 효능 EPA 오일을 첨가한 고부가가치 식품의 수요는 고령화 사회가 도래함에 따라 더욱 증가할 것으로 전망됨. 기존 EPA 오일 공급 공정 (어유, 魚油)의 문제점으로 인해 미생물 발효 EPA 오일의 시장 점유가 점차 확대될 것으로 예측되며, 심혈관 건강 증진 고부가가치, 건강 기능성 식품은 물론 심혈관질환 예방 및 치료용 천연의

약품의 원료로 활용이 기대됨

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.