



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0100858
(43) 공개일자 2014년08월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/12 (2006.01) *C12R 1/89* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0014164
(22) 출원일자 2013년02월07일
심사청구일자 2013년02월07일

(71) 출원인
군산대학교산학협력단
전라북도 군산시 대학로 558 (미룡동, 군산대학교)
(72) 발명자
김형섭
전북 군산시 축동로 34, 501동 601호 (수송동, 제일오투그란데2단지아파트)
조수근
전라북도 군산시 백토로 216 동신아파트 106동 1303호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인충현

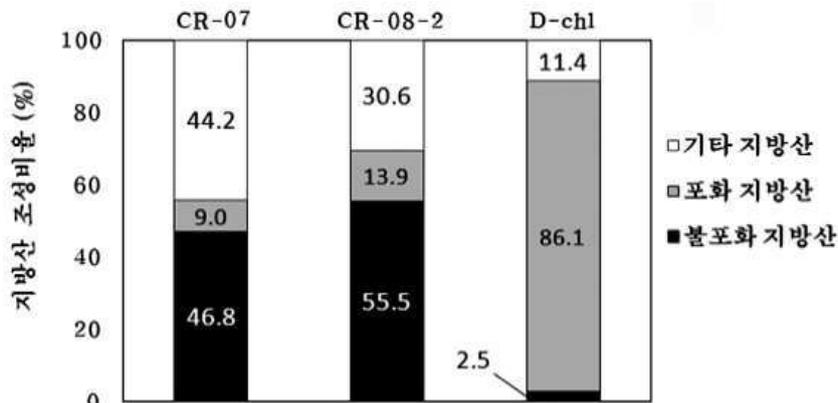
전체 청구항 수 : 총 2 항

(54) 발명의 명칭 수산양식용 식물 먹이생물인 은편모류 텔레아우락스 앰피옥제이아

(57) 요약

본 발명은 수산양식용 식물 먹이생물인 은편모류 텔레아우락스 앰피옥제이아(*Teleaulax amphioxeia*) HAPCC CR-08-2 균주[KCTC 12319BP]에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 염분변화에 대한 적응력이 뛰어나고, 종래 식물 먹이생물로 사용되는 클로렐라에 비하여 영양가가 우수하며, 동물플랑크톤의 성장 및 포란율을 향상시킬 뿐만 아니라 이매패류 유생에 먹이로 공급하였을 때 유생의 성장과 생존율을 증가시켰으며, 그 배양체는 항산화 활성을 가지는 수산양식용 식물먹이생물 텔레아우락스 앰피옥제이아에 관한 것이다.

대표도 - 도5



(72) 발명자

노정래

전북 군산시 하나운안1길 40, 308동 1304호 (나운동, 주공3단지아파트)

이원호

대전 서구 둔산북로 215, 13동 1003호 (둔산동, 가람아파트)

임환철

전북 군산시 미룡로 63, 105동 503호 (미룡동, 롯데인벤스가)

김중혁

전북 군산시 미룡로 41, 206동 1204호 (미룡동, 주공아파트2단지)

박중우

전라북도 전주시 완산구 용머리로 103-13 태하아파트 F동 202호

박희원

전북 군산시 하나운로 28, 202동 612호 (나운동, 세경아파트)

황병수

전북 군산시 산북로 162, 104동 110호 (산북동, 시영아파트)

하 나

서울 강서구 공항대로4가길 12-7, 402호 (공항동, 경동팰리스)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	110092-2
부처명	농림수산식품기술기획평가원
연구사업명	수산실용화기술개발
연구과제명	녹색 광생물 기술을 기반으로 한 다기능성 먹이생물의 대량생산 기술개발
기 여 율	1/1
주관기관	군산대학교
연구기간	2010.07.01 ~ 2012.06.30

특허청구의 범위

청구항 1

식물 먹이생물인 은편모류 텔레아우락스 앰피옥제이아(*Teleaulax amphioxeia*) HAPCC CR-08-2 균주[KCTC 12319BP].

청구항 2

텔레아우락스 앰피옥제이아(*Teleaulax amphioxeia*) HAPCC CR-08-2 균주[KCTC 12319BP]를 먹이생물로 공급하는 윤충류 및 이매패류의 배양방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 수산양식에서 어패류 종묘생산 시 필수적인 식물 먹이생물에 관한 것으로, 국내 연안에서 서식하는 미세조류 중에서 먹이생물로서 가치가 높은 새로운 종에 대한 것이다.

배경기술

[0002] 광생물 기술은 태양, 물, 이산화탄소를 주 영양원으로 하는 생물산업으로 지구온난화에 따른 온실가스를 저감함과 동시에 이들 생물재료로부터 인류에게 유용한 여러 가지 물질을 추출할 수 있는 대표적인 친환경 기술이다. 현재 광합성 미세조류는 해산 어패류 종묘생산을 위한 먹이생물과 클로렐라와 스피룰리나 등과 같이 생물체를 이용한 건강보조식품으로 상용화되었고, 기타 아스타산틴(astaxanthin)과 같은 색소를 이용한 항노화 물질 등의 생리활성물질, 수질정화, 이산화탄소 저감 및 바이오 에너지로까지 확대되어 실용화되었거나 연구를 진행하고 있다.

[0003] 국내에서 해산 어패류 종묘생산 시 사용되고 있는 식물 먹이생물 중 클로렐라류의 경우, 담수산 클로렐라는 동물 먹이생물인 윤충류를 배양할 때 필수적으로 사용되나, 영양성분이 적합하지 않아 이차적으로 영양강화 제품을 구입하여 사용하는 번거로움이 있고, 해산 클로렐라는 낮은 세포농도 및 이매패류 유생의 섭식률 및 생존율 저하 때문에 자치어 배양수조 내에서 수질 및 자치어의 안정과 직·간접적인 먹이 등 그린워터(green water)용으로만 주로 사용하고 있다. 또한 규조류, 침편모류, 담녹조류 등 여러 종류의 식물 먹이생물은 대부분 국내 연안에서 독자기술로 확보되지 않고 외국에서 분양받은 종들로, 이들 외국 분양 종들은 고밀도의 대량배양이 불가능하거나, 일부 종묘생산업자의 배양기술 숙련도에 따라 배양기술이 일반화되어 있지 않아 먹이배양에 따른 인력, 시간, 장소 등의 단점이 있고, 일부 식물 먹이생물을 수입하여 사용하고 있으나 낮은 수익성으로 패류 종묘생산업이 확대되지 못하는 이유가 되기도 하며, 해삼류와 같은 다양한 종류의 해산 여과섭식성 유생의 종묘생산 기술 개발에도 많은 어려움을 내포하고 있다.

[0004] 따라서, 건강한 어류종묘의 생산과 이매패류의 자연채묘 불안정에 따른 인공종패의 원활한 수급을 위해 국내 연안에서 서식하는 광합성 미세조류 중에서 영양성분이 높고 대량배양이 용이하며, 동물플랑크톤, 패류 또는 어류의 성장이나 생존율을 증진시킬 수 있는 식물 먹이생물이 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 광합성 미세조류 중에서 영양성분이 높고, 대량배양이 용이하며, 동물플랑크톤, 패류 또는 어류의 성장이나 생존율을 증진시킬 수 있는 새로운 식물 먹이생물을 살아있는 상태로 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0006] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 식물 먹이생물인 은편모류 텔레아우락스 앰피옥제이아 (*Teleaulax amphioxeia*) HAPCC CR-08-2 균주[KCTC 12319BP]를 제공한다.
- [0007] 또한, 본 발명은 텔레아우락스 앰피옥제이아(*Teleaulax amphioxeia*) HAPCC CR-08-2 균주[KCTC 12319BP]를 먹이 생물로 공급하는 윤충류 및 이매패류의 먹이공급 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0008] 본 발명의 텔레아우락스 앰피옥제이아(*Teleaulax amphioxeia*) HAPCC CR-08-2 균주[KCTC 12319BP]는 종래의 식물 먹이생물로 사용되는 클로렐라에 비하여 영양가가 우수하고, 염분에 대한 적응능력이 뛰어나며, 먹이로 사용 되었을 때 동물 먹이생물인 윤충류의 성장 및 포란율을 향상시키고, 체내의 고도불포화지방산 함량을 증진시키 며, 이매패류 유생에 먹이로 공급하였을 때 유생의 성장과 생존율을 증가시킨다. 그 배양체는 항산화 활성을 가 지므로 항산화 물질의 분리원이 될 수 있고, 이를 섭취하는 동물 먹이생물, 이매패류 및 어류에 항산화 기능성 을 부여하여 생존율을 증진시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0009] 도 1은 실시예 1에서 분리한 광생물 은편모류 채집 정점을 나타낸 것이다.
- 도 2는 실시예 2에서 균주별 농축배양체의 일반 영양성분의 조성비(수분 및 회분을 제외한 조성율, %)를 나타낸 것이다.
- 도 3은 실시예 4에서 은편모류 농축배양체(CR-07, CR-08-2)와 농축 클로렐라 제품의 일반 영양성분의 조성비(수 분 및 회분을 제외한 조성율, %)를 나타낸 것이다.
- 도 4는 실시예 4에서 은편모류 농축배양체(CR-07, CR-08-2)와 농축 클로렐라 제품의 어류 필수아미노산 및 비필 수아미노산의 조성비를 나타낸 것이다.
- 도 5는 실시예 4에서 은편모류 농축배양체(CR-07, CR-08-2)와 농축 클로렐라 제품의 지방산 조성비를 나타낸 것 이다.
- 도 6은 실시예 6에서 먹이생물의 균주에 따라 참굴 유생의 성장을 비교한 그래프이다.
- 도 7은 실시예 6에서 먹이생물의 균주에 따라 참굴 유생의 각장의 성장을 비교한 그래프이다.
- 도 8은 본 발명의 CR-08-2 균주를 광학현미경 400 배율에서 촬영한 사진이다.
- 도 9는 본 발명의 CR-08-2 균주의 염분 농도에 따른 일간 성장을 나타낸 그래프이다.
- 도 10은 본 발명의 CR-08-2 균주의 최대 일간 성장률을 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0010] 본 발명의 새로운 식물 먹이생물인 텔레아우락스 앰피옥제이아(*Teleaulax amphioxeia*)는 은편모조식물문 (Cryptophyta) 은편모강(Cryptophyceae)에 속하는 종으로, 2008년 12월 전라북도 김제시 심포항에서 채집하였고, 당시 수온은 10.5℃, 염분은 26.8 psu이었으며, 일반 영양성분, 아미노산 및 지방산 분석을 통해 종래의 식물 먹이생물로 사용되는 클로렐라에 비하여 영양가가 우수하고, 동물 먹이생물인 윤충류의 성장 및 포 란율을 향상시키고, 이매패류 유생에 먹이로 공급하였을 때 유생의 성장과 생존율을 증가시켰으며, 이 종의 배 양체는 항산화 활성을 나타내는 것으로서, 지금까지 보고되지 않은 신품종으로 판단되어, "텔레아우락스 앰피옥 제이아(*Teleaulax amphioxeia*) HAPCC CR-08-2"로 명명하여, 이를 한국생명공학연구원 생명자원센터에 2012년 11월 22일자로 기탁번호 KCTC 12319BP로 기탁하였다.
- [0011] 이하 실시예, 비교예 및 실험예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 하기 실시예는 본 발명을 설명하기

위한 예시적인 것일 뿐 이에 의해 본 발명의 기술적 사상의 범위가 한정되는 것은 아니다.

[0012] 실시예 1: 신규 식물 먹이생물 균주의 순수분리

[0013] 새로운 식물 먹이생물을 순수분리하기 위해 우리나라 서해 및 남해와 제주해역(도 1)에서 해수를 채수한 후, 미세관 피펫을 이용하여 광학현미경(Olympus BX-50) 하에서 은편모류 1세포를 분리한 다음, 염분 30 psu로 조절되고 규소성분을 제외시킨 f/2 배양액(f/2-Si)이 담긴 24구 배양판(24-well culture plate)에 넣고, 온도 20℃, 광도 50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 에서 배양하였다. 배양판에서 다른 배양구(well)에 비해 성장이 빠른 것으로 확인된 균주를 실험실 배양시스템(온도 20℃, 연속광(L:D=24:0), 광도 50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$)에서 연안해수를 30 psu로 조절한 후, f/2-Si 배양액을 사용하여 계대배양을 통해 균주를 유지시키면서 실험에 사용하였다.

[0014] 본 연구에서 확보한 신규 은편모류 식물 먹이생물 균주는 총 8개 균주로 18S rDNA 유전자 분석을 통해 CR-03(*Rhinnomonas* sp.)을 제외한 나머지 7개 균주가 텔레아우락스 앰피옥세이아(*Teleaulax amphioxeia*)로 분석되었고, 채집당시 수온은 5.4-28.9℃, 염분은 20.3-32.5psu이었다(표 1).

표 1

구분	종명	채집장소	수 온 (℃)	염 분 (psu)
CR-02	<i>Teleaulax amphioxeia</i>	전북 부안군 곰소만	12.0	30.3
CR-03	<i>Rhinnomonas</i> sp.	충남 태안군 모항항	11.5	30.8
CR-04	<i>Teleaulax amphioxeia</i>	전북 군산시 금강하구	5.4	20.6
CR-05	<i>Teleaulax amphioxeia</i>	제주 서귀포시 성산항	19.5	31.8
CR-06	<i>Teleaulax amphioxeia</i>	전남 신안군 흑산도항	15.2	32.5
CR-07	<i>Teleaulax amphioxeia</i>	경남 마산시 마산항	16.7	31.2
CR-08-1	<i>Teleaulax amphioxeia</i>	전북 김제시 심포항	10.5	26.8
CR-08-2	<i>Teleaulax amphioxeia</i>	전북 김제시 심포항	10.5	26.8

[0016] 실시예 2: 일반 영양성분 분석

[0017] 상기 실시예 1의 표 1의 순수분리된 은편모류 균주의 먹이생물학적 영양가치를 평가하기 위해 500리터 규모의 PC재질의 배양기에서 온도 20℃, 염분 30psu, 광도 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 연속광(명:암=24:00), 배양액 f/2-Si의 조건으로 배양하였다. 매일 세포밀도 계수를 통해 지수성장기 후반에 연속원심분리기를 통해 수확한 다음, 세포의 분해 및 성분의 변질을 막기 위해 PC재질의 병에 담아 암소에서 -20℃ 냉동·보관하였다. 신라대학교 식품분석센터에 의뢰하여 일반 영양성분(단백질, 지방, 탄수화물)을 분석하였고, 분석방법은 최신 식품공전(식품의약품안전청 고시 제2012-17호) 제 10항 일반 시험법에 따라 수행하였다(표 2). 각 영양성분의 시험결과는 검체 100g에 대한 질량 또는 백분율로 표시하였다.

표 2

성분	분석 시험법
수분	건조감량법(상압가열건조법)
회분	고온(550-600℃)에서 회화처리 후 질량측정
(조)단백질	단백질 분석기를 이용하는 방법
(조)지방	회제·콧트리브법
탄수화물	탄수화물 분석법(식품공전 1.1.4항 탄수화물)
아미노산	아미노산 자동분석기에 의한 정성 및 정량
지방산	제2법 (1.1.5.4. 지방산)

[0019]

[0020] 분석대상인 은편모류 농축 배양체는 액상의 검체로서, 8종류의 배양체에서 평균 수분 및 회분 함량은 검체 100g에 대하여 각각 약 95%와 약 3%로 나타났다. 이는 배양생물인 은편모류는 전형적인 해양 미세조류로서

배양환경이 염분농도 약 30psu의 해수라는 점이 반영된 결과이다. 3대 영양소(단백질, 지방, 탄수화물)의 성분 함량(mg/검체100g) 분석 결과, 단백질은 130~630 mg/100g, 지방은 10~290 mg/100g, 탄수화물은 750~1,600 mg/100g으로 다양하게 나타났다(표 3).

표 3

구분	단백질 (mg/100g)	지방 (mg/100g)	탄수화물 (mg/100g)
CR-MAL02	440	280	810
CR-MAL03	340	290	820
CR-MAL04	130	230	790
CR-MAL05	250	80	950
CR-MAL06	500	80	930
CR-MAL07	630	60	860
CR-MAL08-1	590	10	1,600
CR-MAL08-2	630	140	750

[0021]

[0022]

3대 영양소의 성분함량 비율(%)은 각 먹이균주에 따라 다소 차이를 보였는데(도 2), 고단백질(40% 이상)의 배양체는 CR-07, CR-08-2이었고, 고지방(18% 이상)의 배양체는 CR-02, CR-03, CR-04이었으며, 고탄수화물(60% 이상)의 배양체는 CR-04, CR-05, CR-06, CR-08-1이었다.

[0023]

은편모류 농축 배양체 CR-07, CR-08-2 균주는 일반 영양성분 중 단백질 함량이 각각 40.6%, 41.4%의 함량 비율로서 다른 균주에 비하여 높은 단백질 함량비를 보여(도 2), 본 발명에서 주요 실험대상 균주로 활용하였다. 영양성분 중 단백질은 생물조직, 효소, 호르몬 등의 주 구성성분임은 물론 체내 합성이 용이하지 않은 필수아미노산을 공급해주는 영양소로서, 영양학적 가치가 가장 높은 성분이다.

[0024]

실시예 3: 항산화 활성

[0025]

상기 실시예 1의 표 1의 은편모류 균주에 대한 기능성 화합물 탐색을 위해 각 균주를 2L규모로 배양한 후 이를 GF/C 여과지를 사용하여 여과하였고, 여과된 여과지를 100% 메탄올(MeOH) 용매 200ml에 넣어 24시간 썩 2회 초음파분해기(ultra sonication)를 사용하여 추출하였다. 그 후 부유물질을 제거하기 위하여 솜을 이용하였고, 여과액을 감압농축기(evaporator)로 농축 후 소금(salt)과 유기물질을 분배하기 위하여 물(H₂O)과 부탄올(butanol)로 분배를 실시한 후, 이어 부탄올 층을 다시 농축하여 지방산을 제거하기 위해 85% 메탄올과 n-헥산(hexane)을 사용하여 분배를 실시하였고 최종적으로 85% 메탄올 층을 얻었으며, 이 85% 메탄올 분액에 대하여 항산화 활성 검사를 실시하였다.

[0026]

항산화 활성을 보기 위하여 활성 라디칼 소거법을 이용하였는데, 이 때 사용된 방법은 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 라디칼 소거능을 실험하였고, DPPH 용액을 메탄올 1ml에 80µg로 조제하고 측정하고자 하는 각 균주의 추출물을 200ppm의 농도로 만든 후 여기에 각각 DPPH 용액을 40µl씩 넣어 분광광도계에서 517nm파장으로 흡광도를 측정하였다. 이 실험에서 양성대조군으로 비타민 C(Ascorbic acid)와 음성대조군으로 100% 메탄올 용액을 사용하였다.

[0027]

사용된 신규 은편모류 8개 균주의 추출물에 대하여 항산화 활성의 결과 값은 표 4와 같이, 본 발명균주인 CR-08-2 균주의 추출물에서 44%의 가장 높은 DPPH 소거능을 보여줌으로써, 같은 종 내에서도 매우 높은 항산화 활성도를 보여주었다. 따라서 본 균주는 수산양식용 먹이생물 및 영양보충제로서 활용하기 위한 연구가치가 높을 것으로 판단되며, 특히 배양체의 항산화 활성이 높을 경우 수산동물의 다양한 질병에 대한 면역력이 증가될 것으로 판단된다.

표 4

구분	CR-02	CR-03	CR-04	CR-05	CR-06	CR-07	CR-08-1	CR-08-2	Ascorbic acid
200ppm	9%	33%	11%	10%	9%	22%	13%	44%	100%

[0028]

[0029] **실시예 4: 담수산 클로렐라와 각종 영양성분 비교**

[0030] 국내에서 판매·유통되고 있는 농축클로렐라 제품은 어류 종묘생산시 윤충류 배양을 위해 가장 널리 사용되고 있는 식물 먹이생물이다. 은편모류 농축 배양체가 먹이생물로서의 가치를 평가하기 위해 유통되고 있는 농축클로렐라(이하 D-Ch1로 표기) 제품의 영양성분을 분석하고, 결과 자료를 본 발명 균주 중 단백질 함량이 높은 CR-07 및 CR-08-2의 은편모류 농축 배양체와 비교하였다. 2개 은편모류 균주의 대량 배양 및 수확은 실시예 2와 같은 방법으로 수행하였고, 배양체의 일반 영양성분, 아미노산 및 지방산 분석방법은 실시예 2와 같다.

[0031] 클로렐라는 배양방법이 단순하고 생물특성상 분열 및 증식속도가 빨라서 배양액 단위부피당 세포질량이 매우 크므로 영양성분 분석 결과에서 각 성분별 절대 함량은 은편모류 배양체보다 상대적으로 높게 나타났다(표 5).

[0032] 그러나 상기 표 5의 각 영양성분별 조성률을 은편모류 농축 배양체와 비교하면, 일반 영양성분의 경우 조성비가 거의 유사하였고(도 3), 필수아미노산의 조성율과 불포화 지방산 조성율 면에서는 오히려 은편모류 농축 배양체의 영양성분이 더 우수한 것으로 나타났다(도 4 내지 5).

표 5

[0033]

일반 영양성분		아미노산		지방산	
성분명	함량(mg)	성분명	함량(mg)	성분명	조성률(%)
단백질	7,310	Alanine	465.0	Caproic Acid	8.4
지방	1,140	Arginine*	299.0	Lauric Acid	-
탄수화물	2,760	Aspartic acid	448.0	Myristic Acid	0.9
		Cystine	43.0	unid. fatty acid.1	1.8
		Glutamic acid	533.0	Palmitic Acid	72.3
		Glycine	306.0	Palmitoleic Acid	-
		Histidine*	106.0	Heptadecanoic Acid	-
		Isoleucine*	143.0	Stearic Acid	2.6
		Leucine*	423.0	Oleic Acid	1.4
		Lysine*	456.0	Linoleic Acid	-
		Methionine*	110.0	unid. fatty acid.2	-
		Phenylalanine*	241.0	Linolenic Acid	-
		Proline	293.0	Eicosadienoic Acid	1.1
		Serine	208.0	Docosadienoic Acid	-
		Threonine*	233.0	EPA	-
		Tryptophan*	-	DHA	-
		Tyrosine	184.0	기타 지방산	11.5
		Valine*	232.0		

[0034] ※ 검체 100g에 대한 함량(mg) 또는 조성률(%)이며, 아미노산 항목 중 *표시는 어류필수아미노산

[0035] 지방산의 경우, 은편모류 농축 배양체에서 다양한 지방산이 존재하며(결과 미첨부), DHA와 EPA를 포함하여 높은 불포화 지방산 조성률(56%)을 보인 반면, 농축 클로렐라의 분석에서는 지방산이 다양하게 검출되지 않았고 불포화 지방산 조성률(2.5%)이 매우 낮았으며, 특히 DHA와 EPA는 검출되지 않았다(표 5). 은편모류 농축 배양체는 다양한 영양성분들이 고루 함유된 양질의 먹이생물로서 가치가 충분하다고 판단된다.

[0036] **실시예 5: 동물플랑크톤(윤충류)에 대한 먹이생물 기능성 검증**

[0037] **5-1. 윤충류의 섭식률**

[0038] 어류 및 갑각류 종묘생산시 이용되고 있는 동물플랑크톤인 윤충류 *B. plicatilis*(강릉원주대학교 해양생명공학부 먹이생물연구실 분양제공)를 대상으로 신규 식물 먹이생물 2개 균주(CR-07, CR-08-2)에 대한 먹이농도별 섭식률을 측정하기 위해 ml당 25,000, 50,000, 100,000, 150,000, 200,000 세포의 은편모류 먹이를 100 ml 삼각 플라스크(배양수 80 ml)에 채우고, 윤충류를 ml당 2 개체로 접종한 후 시간 경과(0.5, 1, 2, 3, 6, 12, 24시간)에 따른 균주의 농도 변화를 확인하였다. 시간 경과에 따라 배양수 중 먹이가 고루 분포하도록 한 후 1 ml를 취하여 루골 용액으로 고정한 다음, Sedgwick-Rafter chamber를 이용하여 광학현미경하에서 3회 반복 계수한

후, 평균 값을 산출하여 ml당 농도로 환산하였다. 수온(25℃) 및 염분(30 psu)을 설정하고, 광주기는 24시간 연속적으로 유지하였다. 먹이농도 변화에 따른 윤충류의 섭식률 산출은 다음과 같은 Michaelis-Menten 식에 대입하여 도식화하여 자료를 분석하였다.

[0039] [수학식 1]
 [0040] $GR=V(C_0-C_T)/N \times T$

[0041] V: 부피 (ml)

[0042] C_0 와 C_T : 각각 초기 및 최종 먹이농도 (cell ml⁻¹)

[0043] N: 윤충류의 개체수

[0044] T: 배양시간 (hr)

[0045] 식물 먹이생물 균주(CR-07, CR-08-2)에 대한 농도별 24 시간 후 윤충류의 섭식률을 조사한 결과는 다음과 같다 (표 6).

표 6

구분	Food concentration (cells)				
	25,000	50,000	100,000	150,000	200,000
CR-MAL07	1.89×10^5	4.48×10^5	8.73×10^5	1.49×10^6	1.66×10^6
CR-MAL08-2	2.31×10^5	4.39×10^5	9.66×10^5	1.39×10^6	1.82×10^6

[0047] 각 균주별 최대 섭식률은 유의한 차이를 발견하지 못하였으나, 먹이 농도가 증가할수록 윤충류의 시간 당 섭식률은 증가하는 경향을 보였고, CR-08-2를 200,000 세포 ml⁻¹로 공급한 실험구에서 1.82×10^6 cells ind.⁻¹hr⁻¹의 최대 섭식률을 나타냄으로써 윤충류의 적정 먹이 공급밀도를 확인하였다.

[0048] 5-2. 윤충류의 성장 및 포란율

[0049] 윤충류의 성장 및 포란율을 측정하기 위해 단백질 함량이 높고 향산화 활성을 보인 2개 균주(CR-07, 08-2)를 대상으로, 해산어류 종묘생산 시 널리 이용되고 있는 동물플랑크톤인 윤충류를 대상으로 이들의 성장 및 포란율을 측정하였다. 2개 균주를 배양한 후 50ml 시험관에 ml당 2.0×10^5 세포의 먹이를 공급하였으며, 수온(25℃)과 염분(30 psu)을 설정한 후 윤충류를 ml당 5 개체를 접종하고, 연속광(L:D=24:0)에서 7일 동안 윤충류를 배양하였다. 윤충류의 계수는 매일 1 ml씩 추출하여 해부현미경 하에서 이루어졌으며, 계수된 개체는 시험관에 재 수용하였고, 윤충류의 밀도, 포란율 및 일간 성장률을 계산하여 표 7에 나타내었다.

[0050] 시간이 경과함에 따라 윤충류의 성장이 증가하였고, 2개 균주를 비교할 때, 최대 성장밀도와 일간 성장률은 CR-08-2 균주가 유의적으로 높게 나타났고, 포란률은 CR-08-2 균주가 높았으나, CR-07 균주와 유의적인 차이는 없었다(P<0.05).

표 7

균주명	최대 성장밀도* (개체 ml ⁻¹)	포란율* (%)	일간성장률* (r)
CR-07	20 ± 3.61^b	23.6 ± 10.25^a	0.26 ± 0.034^b
CR-08-2	50 ± 1.55^a	26.3 ± 3.37^a	0.33 ± 0.004^a

[0052] * 서로 다른 알파벳 소문자는 유의적인 차이가 있음(p<0.05).

[0053] **실시예 6: 이매패류 유생에 대한 먹이생물 기능성 검증**

[0054] **6-1. 바지락 유생의 성장 및 생존율**

[0055] 바지락 *Ruditapes philippinarum* D형 유생을 대상으로 영양가가 높은 텔레아우락스 엠펜옥제이아 균주(CR-07, 08-2)에 따른 유생의 성장 및 생존율을 실험하였다. 실험은 3L 비이커(배양수 2L)를 이용하였고, 은편모류 균주는 배양해수 ml당 1.0×10^4 세포의 밀도로 공급하였으며, 바지락 D형 유생은 배양해수 ml당 1 개체로 접종하였다. 수온과 염분은 각각 20℃와 30 psu, 광주기는 24시간 연속적으로 유지하면서 12일간 3개의 반복구를 두어 실험하였다. 실험이 종료된 후에 바지락 유생의 성장(각장·각고)과 생존율을 조사하여 표 8에 나타내었다.

[0056] 각장에 대한 성장 결과를 보면, CR-08-2 균주와 CR-07 균주는 유의적인 차이는 없었으나(P<0.05), 각고 성장에서는 CR-08-2 균주가 CR-07 균주에 비해 유의적으로 높은 성장을 나타내었고, 바지락 유생의 생존율은 각 균주 별로 유의한 차이는 없었으나 CR-08-2 균주에서 다소 높은 생존율을 보였다.

표 8

[0057]

균 주	각 장 (μm)	각 고 (μm)	생존율 (%)
CR-07	153.2±2.83 ^a	133.2±2.84 ^b	39.5±6.00 ^a
CR-08-2	156.4±2.06 ^a	137.4±0.93 ^a	41.1±4.82 ^a

[0058] **6-2. 참굴 유생의 성장 및 생존율**

[0059] 참굴 *Crassostrea gigas*의 D형 유생을 대상으로 신규 은편모류 2개 균주(CR-07, CR-08-2)와 기존의 이매패류 유생의 먹이생물로 사용되는 규조류 키토세로스 속(*Chaetoceros* sp.) 3개 균주를 이용하여 이들 유생의 성장 및 생존율을 실험하였다. 식물 먹이생물의 농도는 배양해수 ml당 3.0×10^4 세포로 하였고, 1L 비이커(배양수 800 ml)에 참굴 유생을 20 개체씩 배양하였다. 수온과 염분은 각각 20℃와 30 psu를 유지하였고, 광주기는 24시간 연속적으로 유지하면서 12일간 3개의 반복구를 두어 실험하였다. 실험이 종료된 후에 참굴 유생의 성장(각장·각고)과 생존율을 조사하여 표 9, 도 6 및 도 7에 나타내었다.

[0060] 각장, 각고 및 생존율 모두 CR-08-2 균주가 CR-07 균주나 *Chaetoceros* sp. 에 비해 유의적으로 우수한 성장 및 생존율을 나타내었고, CR-07는 *Chaetoceros* sp. 에 비해서 유의적으로 성장 및 생존율이 좋았다.

표 9

[0061]

균 주	각 장 (μm)	각 고 (μm)	생존율 (%)
<i>Chaetoceros</i> sp.	91.25±2.47 ^c	80.30±2.20 ^c	9.80±2.14
CR-08-2	120.80±2.70 ^a	109.35±2.70 ^a	50.40±0.96
CR-07	101.30±2.30 ^b	91.90±2.42 ^b	20.40±2.22

[0062] **실시예 7: 윤충류의 영양강화 효과 비교**

[0063] 신규 식물 먹이생물 균주 CR-08-2과 기존의 윤충류 배양 시 사용되는 시판용 농축클로렐라를 이용하여 윤충류의 영양강화 효과를 비교분석하였다. 시판용 농축클로렐라를 공급하여 배양된 윤충류를 수거한 후, 절반은 분석용 시료로 냉동 보관하고, 나머지 절반은 500리터로 대량배양하여 농축시킨 CR-08-2 균주를 수온 25℃와 염분 30 psu에서 3시간 동안 공급한 후 수거하였다. 이들 두 시료를 냉동 보관한 후 아미노산과 지방산을 분석하여 각각 표 10 및 표 11에 나타내었다.

[0064] 본 발명의 HAPCC CR-08-2로 영양강화한 윤충류의 아미노산 성분함량은 농축 클로렐라와 거의 유사하였다(표

10).

[0065] 한편, 지방산 조성은 HAPCC CR-08-2로 영양강화 후 증가하였으며, 특히 해산어에 필수적인 EPA(C20:5n3)와 DHA(C22:6n3)와 같은 고도불포화지방산의 총량은 증가하였으며, 특히, EPA는 약 5배의 증가량을 보였던 반면 DHA는 미량으로 나타났다(표 11).

표 10

[0066]

종 류	영양강화 전 (농축클로렐라)	영양강화 후 (CR-08-2)
Alanine	2.25 ±0.14	2.04 ±0.17
Arginine*	2.27 ±0.22	2.04 ±0.32
Aspartic acid	5.36 ±0.69	4.60 ±0.50
Glutamic acid	6.30 ±0.70	5.60 ±0.61
Glycine	1.56 ±0.11	1.48 ±0.16
Histidine*	0.54 ±0.07	0.55 ±0.09
Isoleucine*	0.84 ±0.05	0.82 ±0.09
Leucine*	2.46 ±0.13	2.36 ±0.25
Lysine*	5.94 ±0.46	5.83 ±0.45
Methionine*	0.36 ±0.13	0.56 ±0.07
Phenylalanine*	1.35 ±0.11	1.37 ±0.16
Proline	1.91 ±0.10	1.91 ±0.21
Serine	2.26 ±0.10	2.20 ±0.24
Threonine*	1.12 ±0.09	1.09 ±0.13
Tyrosine	1.34 ±0.10	1.37 ±0.13
Valine*	1.14 ±0.06	1.10 ±0.11
Total	37.00	34.92

[0067] * 표시 성분은 어류의 필수아미노산임

표 11

[0068]

종 류	영양강화 전 (농축클로렐라) mg/100g(%)	영양강화 후 (CR-08-2) mg/100g(%)
C14:0	87.5 (2.2%)	91.3 (2.2%)
C15:0	66.0 (1.7%)	71.2 (1.8%)
C16:0	1139.8 (29.0%)	1177.0 (29.0%)
C16:1	100.2 (2.5%)	-
C17:0	51.8 (1.3%)	50.5 (1.2%)
C17:1	32.5 (0.8%)	34.1 (0.8%)
C18:0	238.0 (6.0%)	251.5 (6.2%)
C18:1 n9c	204.4 (5.2%)	218.9 (5.4%)
C18:1 n9t	102.2 (2.6%)	109.4 (2.7%)
C18:2 n6	1,197.1 (30.4%)	1,256.7 (31.0%)
C18:3 n6	9.8 (0.2%)	11.0 (0.3%)
C18:3 n3	131.8 (3.4%)	144.4 (3.6%)
C20:0	13.7 (0.3%)	12.0 (0.3%)
C20:1 n9	86.6 (2.2%)	93.9 (2.3%)
C20:2	205.8 (5.2%)	223.3 (5.5%)
C20:3 n6	89.6 (2.3%)	103.8 (2.6%)

C20:4 n6	13.9 (0.4%)	14.2 (0.4%)
C20:5 n3	5.6 (0.1%)	24.9 (0.6%)
C22:0	19.4 (0.5%)	16.2 (0.4%)
C22:1 n9	9.1 (0.2%)	31.3 (0.8%)
C22:2	8.9 (0.2%)	10.9 (0.3%)
C23:0	29.4 (0.7%)	30.0 (0.7%)
C24:0	31.9 (0.8%)	47.1 (1.2%)
C22:6 n3	-	trace
C24:1 n9	59.3 (1.5%)	33.9 (0.8%)
ΣFA	3,934.4 (100%)	4,057.5 (100%)
Σn-3 HUFA	137.4(3.49%)	169.2(4.17%)
Σn-6 HUFA	113.4(2.88%)	129.0(3.17%)

[0069] 실시예 8: 본 발명의 균주 동정

[0070] 상기 본 발명의 CR-08-2의 동정을 위하여 18S rDNA 유전자 분석을 실시하였다. 실험중주의 DNA를 추출하기 위해 세포농도가 약 1×10^5 cells ml^{-1} 이 되도록 배양한 후, 1ml의 각각의 배양체를 4°C, 12,000rpm 조건에서 15분간 원심 분리하여 펠렛(pellet)을 획득했다. 원심분리 후 상등액을 제거하고 3차 증류수 200 μ l를 넣어 위 원심분리 조건에서 동일한 작업을 2회 실시하여 해수의 염을 제거하였다. 염 제거 후 DNA extraction kit(Bioneer)를 사용하여 DNA를 추출하였으며, 추출 DNA는 -20°C에서 냉동 보관 후 PCR 작업을 진행하였다.

[0071] 추출된 DNA에서 중주의 small subunit (SSU) rDNA를 증폭하기 위하여 universal primers EukA(5'-CCG AAT TCG TDG ACA ACC TGG TTG ATC CTG CCA GT-3')와 EukB(5'-CCC GGG ATC CAA GCT TGA TCC TTC TGC AGG TTC ACC TAC-3')를 이용하였다(Medin et al. 1988). PCR 반응액은 1 × 완충용액, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 0.1% BSA, 5% DMSO, 2.5 U Ex Taq polymerase (Takara, Japan), 0.5 μ M 프라이머와 1 μ l의 주형을 포함하여 최종 50 μ l가 되도록 하였다(Bioneer, Seoul, Korea). PCR(polymerase chain reaction) 수행은 pre-denature는 94°C로 5분, denature는 95°C로 45초, annealing은 55°C에서 1분, elongation은 72°C로 3분, post-elongation은 72°C로 10분간 수행하였고 증폭반응은 40회 반복 수행하였다. PCR 산물은 1% 아가로즈 겔에 전개하고 EtBr로 염색 하여 UV하에서 DNA band를 확인하였다.

[0072] PCR 산물은 AccuPrep Purification Kit (Bioneer)을 이용하여 정제하였다. SSU rDNA 염기서열에 분석은 ABI PRISM 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, USA)에 의해 분석되었고 모든 염기서열은 ContigExpress alignment program (InforMax, Frederick, USA)과 NCBI Blast National Center for Biotechnology Information(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>)를 이용하여 염기서열을 확인하였다.

[0073] 최종 선별한 CR-08-2 균주의 SSU rDNA 염기서열은 서열번호 1과 같으며, 이에 따라 본 균주는 텔레아우락스 암피옥세이아 (*Teleaulax amphioxeia*)로 동정되었다. 상기 분리된 CR-08-2 균주는 군산대학교 내 유해원생생물은 행 HAPCC CR-08-2 균주로 명명하여, 한국생명공학연구원 생명자원센터에 2012년 11월 22일자로 기탁번호 KCTC 12319BP로 기탁하였다. 상기 균주를 광학현미경 400 배율에서 촬영하여 도 8에 나타내었다.

[0074] 실시예 9: 염분적응의 우수성

[0075] 새로운 식물먹이생물을 국내에서 옥외 대량배양시 이용할 수 있도록 옥외에서 측정될 수 있는 염분 범위인 10, 15, 20, 25, 30, 35 psu의 6개 실험구를 설정하고, 수온 20°C, 광도 100 $\mu E m^{-2} s^{-1}$ 의 연속광(명:암=24:00), 배양액 f/2-Si에서 10일간 3개의 반복구를 두어 성장실험을 하였다. 실험용 배양해수는 유리섬유여과지(GF/F)로 여과한 후 f/2-Si 배양액을 첨가하고 고온·고압 멸균한 후 사용하였고, 실험용기는 500ml PC병에 400ml의 실험 배양수를 채웠으며, 식물 먹이생물의 초기 농도를 5,000 cells ml^{-1} 로 조절한 후, 매일 5ml을 채수하여 세포농도를 광학 현미경으로 계수한 다음, 일간 세포농도와 지수성장 기간 중 일별 세포농도를 근거로 회귀곡선식을 구하여 지수 값으로 일간성장률을 계산하였다.

[0076] HAPCC CR-08-2 균주의 염분 농도에 따른 일간 성장 및 최대 일간 성장률은 도 9 및 도 10에 나타내었다. 가장 높은 염분 농도인 35psu 실험구를 제외한 모든 염분 농도에서 7일째까지 지속적인 성장이 이루어진 후 감소하였으나, 염분 35 psu 실험구에서는 8일째 최대 466×10^3 cells ml^{-1} 의 최대 생물량을 보였다. 최대 일간 성장률은

염분 20 psu 실험구에서 0.731로 가장 높았으나, 모든 염분 농도 실험구에서 큰 차이를 보이지 않음으로써 본 균주는 염분 변화에 매우 강한 우수한 균주임을 확인하였다. 따라서 본 균주는 옥외에서 대량배양시 다량의 강우에 따른 염분 농도 하락에도 충분히 성장을 유지할 수 있을 것으로 판단된다.

수탁번호

[0077]

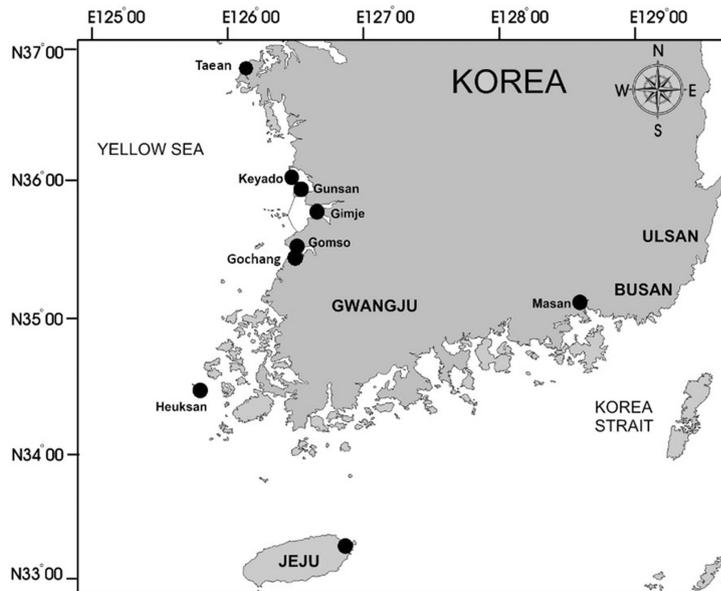
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC12319BP

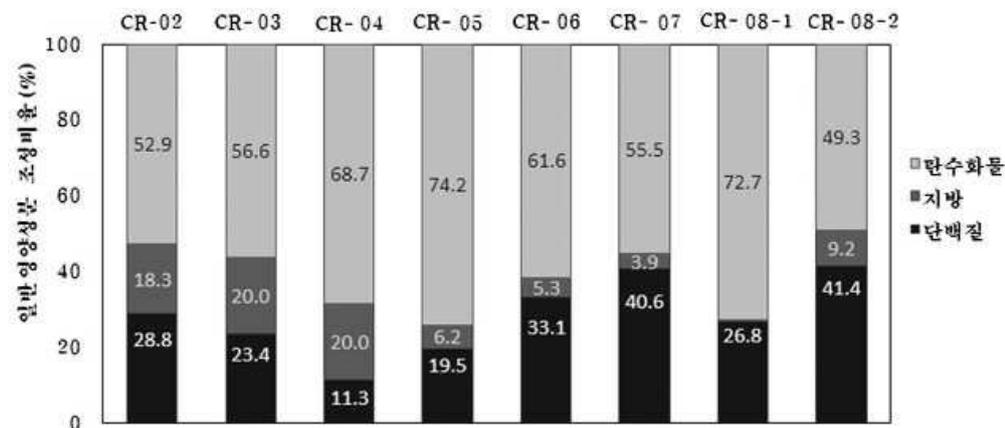
수탁일자 : 20121122

도면

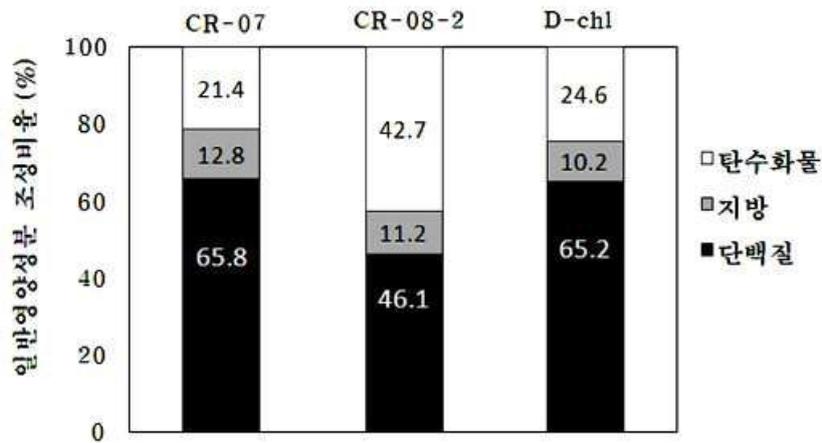
도면1



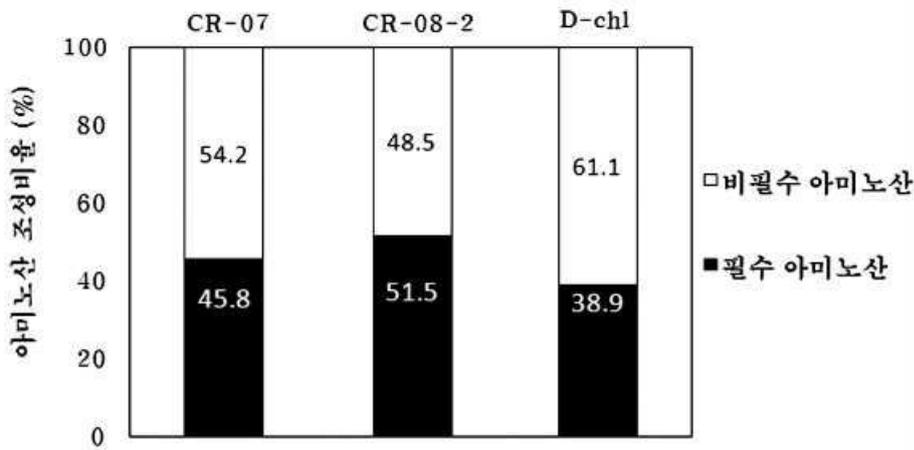
도면2



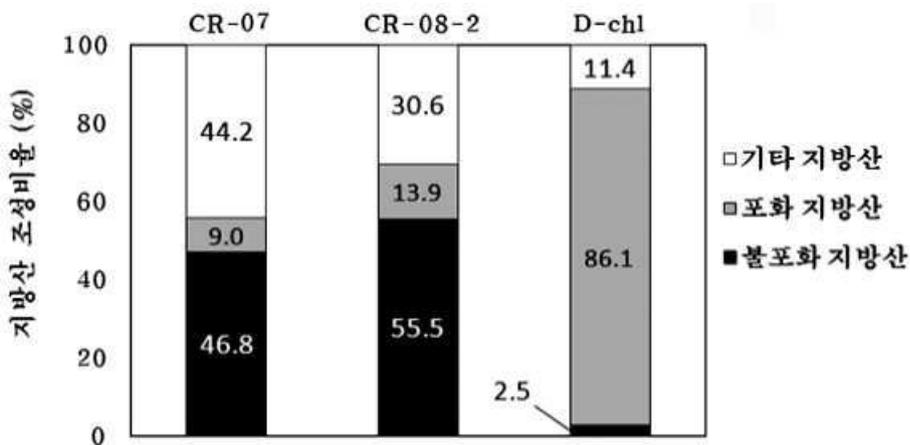
도면3



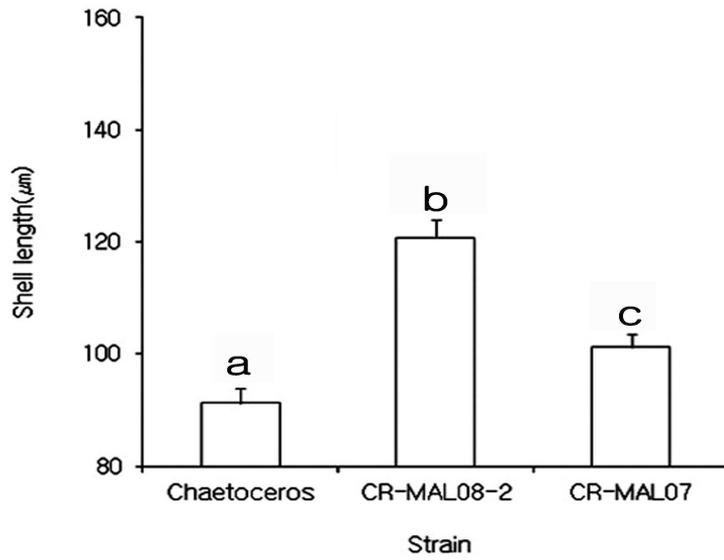
도면4



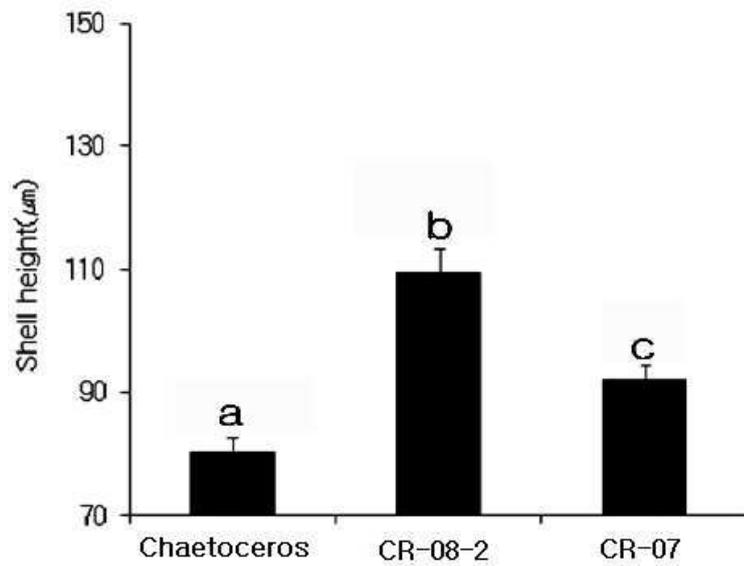
도면5



도면6



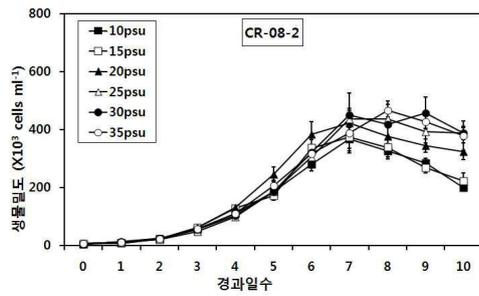
도면7



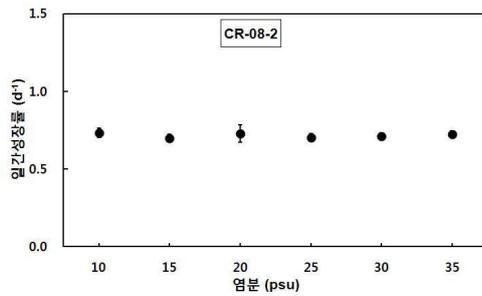
도면8



도면9



도면10



서열 목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Kunsan National University
 - <120> Teleaulax amphioxeia, the cryptophycean strain as a live-feed for mariculture
 - <130> HPC-3405
 - <160> 1
 - <170> Kopatent In 2.0
 - <210> 1
 - <211> 1654
 - <212> DNA
 - <213> Teleaulax amphioxeia
 - <400> 1
- ```

gtcttagtgt aataactctt atgaaactgc gaatggctca ttaaactcagt tatcgtttat 60
ttgatggtcc cttactacat ggataaccgt agtaattcta gagctaatac atgcacaaag 120
gcccgacttc ggaagggctg tatttattag atttaaagcc gacatttttt ggtgattcat 180

aataactttt cgaacctcat gcctttatgg tggaggatgat tcattcaaat ttctgcacct 240
tcaactttcg atggtaggat agaggcctac catggtttta acgggtgacg gagaattagg 300
gttcgattcc ggagagggag cctgagagac ggctaccaca tccaaggaag gcagcaggcg 360
cgcaaattac ccaatcccga ttccggggagg tagtgacaat aaataacaat acagggccaa 420

```

cggctctgtt attggaatga gaacaattta aacaccttaa cgaggatcaa ttagagggca 480  
 agtctggtgc cagcagccgc ggtaattcca gctctaatag cgtatattaa agttgttgca 540  
 gttaaaaagc tcgtagtcgg atgtcgggct cgggcaagct gtcggccttt ggtcggacgg 600  
  
 caggcttggg tctttctgcc tgaggaaccg gttgcttta acgagctgcc ggtggacgca 660  
 ggtcgtttac ttgaaaaaa ttagagtgtt caaagcaggc tagcgcttga atacattagc 720  
 atggaataat ggaataggac tttggtgcta ttttgttggg ttatgggacc gaagtaatga 780  
 ttaacaggga cagttggggc cgtttatatt tcgttgcag aggtgaaatt cttggattta 840  
 cgaaagataa acttctgcga aagcattcgg caaggatgtt ttcattgatc aagaacgaaa 900  
 gttaggggat cgaagacgat cagataccgt cgtagtctta accataaact atgccgacta 960  
 gggatcagtg gatgtcaatt tgcgactcca ttggcacctt gtgagaaatc aaagtttttg 1020  
  
 ggttccgggg ggagtatggt cgcaaggctg aaacttaaag gaattgacgg aagggcacca 1080  
 ccaggagtgg agcctgcggc ttaatttgac tcaacacggg gaaacttacc aggtccagac 1140  
 atagtaagga ttgacagatt gaaagctctt tcttgattct atgggtggtg gtgcatggcc 1200  
 gttcttagtt ggtggagtga tttgtctggt taattccggt aacgaacgag acctcagcct 1260  
 gctaactagt aacgcgaata tgattggcgt ctacttctta gagggactat ttgtgtttaa 1320  
 tgaatggaag tttgaggcaa taacaggtct gtgatgcct tagatgttct gggccgcacg 1380  
 cgcgctacac tgatgaacgc aacgagacga cctgtaccga aaggcatggg taaacttgtg 1440  
  
 aaagttcadc gtgatgggga tagattattg caattattaa tcttcaacga ggaattccta 1500  
 gtaagcgtga gtcacagct cgcgttgatt acgtccctgc cctttgtaca caccgccctg 1560  
 cgctcctacc gattgaatgg tccggtgaaa tcttcggatt gctggatagg agggcaacca 1620  
 cctatctgcg agaagttgct tgaaccttat catt 1654