



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0048940
(43) 공개일자 2013년05월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 1/12 (2006.01) *A23K 1/16* (2006.01)

C12R 1/89 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-0113876

(22) 출원일자 2011년11월03일

심사청구일자 2011년11월03일

기술이전 희망 : 기술양도, 실시권허여, 기술지도

(71) 출원인

부경대학교 산학협력단

부산광역시 남구 신선로 365 (용당동,
부경대학교)

(72) 발명자

허성범

부산광역시 기장군 기장읍 동서길 100-2

배진희

부산광역시 남구 용소로8번길 33 (대연동)

(74) 대리인

위병갑

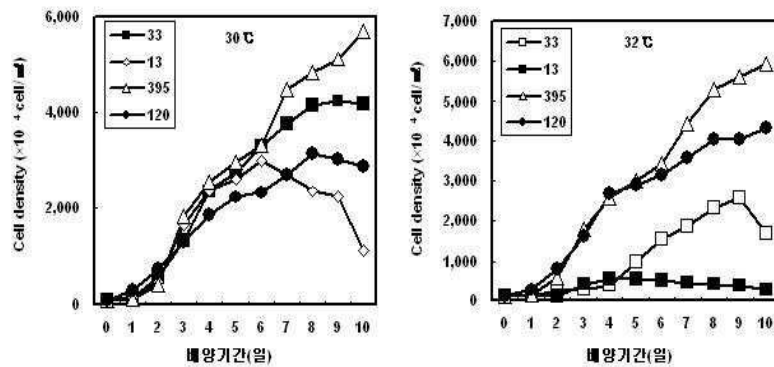
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 고온에서 성장 가능한 나노클로리스 속 신균주 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 고온에서 성장 가능한 신균주인 나노클로리스 속 및 이의 용도에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 30℃~32℃의 고온에서 성장 가능한 로티퍼(Rotifer) 배양용 나노클로리스 속(*Nannochloris* sp.) KCTC 11965BP 미세조류(일명, 'KMMCC-395'라고 함), 상기 미세조류 및 이의 배양액을 포함하는 로티퍼 사료용 조성물, 상기 로티퍼 사료용 조성물을 유효성분으로 포함하는 수산사료용 제제 및 상기 본 발명의 신균한 미세조류를 이용한 저온수기의 로티퍼 대량 배양방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 신균한 나노클로리스 속(*Nannochloris* sp.) KCTC 11965BP 미세조류는 고온인 30℃~32℃의 조건 하에서도 다른 종래 미세조류에 비해 성장률이 월등히 우수하고 해수의 염분 조건 하에서도 성장 가능한 내염성을 가지고 있으며, 이를 먹이로 하여 배양한 로티퍼는 각종 생리활성 기능을 하는 아미노산과 필수지방산을 풍부히 함유하고 있어, 궁극적으로 로티퍼와 같은 플랑크톤의 배양과 이러한 플랑크톤을 먹이로 하는 어류의 양식 산업에 사료로서 매우 유용하게 사용할 수 있는 효과가 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	D10807410H320000110
부처명	국토해양부
연구사업명	해양생명공학기술개발사업
연구과제명	유용플랑크톤자원 기탁등록 보존기관
주관기관	부경대학교
연구기간	2010.07.01 ~ 2011.06.30

특허청구의 범위

청구항 1

30℃~32℃의 고온에서 성장 가능한 로티퍼(Rotifer) 배양용 나노클로리스 속(*Nannochloris* sp.) KCTC 11965BP 미세조류.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 로티퍼는 브라키오누스 플리카틸리스(*Brachionus plicatilis*)인 것을 특징으로 하는 로티퍼(Rotifer) 배양용 나노클로리스 속(*Nannochloris* sp.) KCTC 11965BP 미세조류.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 미세조류는 로티퍼의 성장에 필요한 아미노산 및 불포화지방산의 함량을 증가시켜 로티퍼의 성장을 촉진시키는 것을 특징으로 하는 로티퍼(Rotifer) 배양용 나노클로리스 속(*Nannochloris* sp.) KCTC 11965BP 미세조류.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 미세조류는 염분이 15~35psu(practical salinity unit)인 조건에서 내염성을 갖는 것을 특징으로 하는 로티퍼(Rotifer) 배양용 나노클로리스 속(*Nannochloris* sp.) KCTC 11965BP 미세조류.

청구항 5

제1항의 나노클로리스 속(*Nannochloris* sp.) KCTC 11965BP 미세조류 또는 이의 배양액을 포함하는 로티퍼(Rotifer) 사료용 조성물.

청구항 6

제5항의 로티퍼(Rotifer) 사료용 조성물을 유효성분으로 포함하는 수산사료용 제제.

청구항 7

제1항의 미세조류를 먹이로 이용하여 고온수기인 7월~8월 동안 로티퍼(Rotifer)를 대량 배양하는 방법.

청구항 8

고수온기인 7월~8월 동안 30℃~32℃의 온도에서 배양하는 단계를 포함하는 제1항의 KCTC 11965BP 미세조류를 대량 배양하는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 고온에서 성장 가능한 신균주 나노클로리스 속 및 이의 용도에 관한 것으로서, 고온에서도 대량배양이 용이하고 로티퍼의 먹이로 사용할 수 있는 신균주인 나노클로리스 속 KCTC 11965BP 미세조류, 이를 포함하는 로티퍼 사료용 조성물, 고수온기에 로티퍼를 배양하는 방법 및 수산사료용 제제에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 수산생물이 자연계에서 먹이의 대상으로 삼는 살아 있는 동식물을 먹이생물이라 하는데, 해양미세조류는 천해양

식 동물의 종묘 생산 시 중요한 먹이생물이 된다. 또한, 해양미세조류는 해양생태계의 1차 생산자로서 해양의 생물생산력을 좌우하는 역할을 한다.

[0003] 로티퍼(Rotifer)는 1960년대에 최초로 개발된 참돔 *Pagrus major* 치어의 먹이생물로서, 크기가 작고 운동성이 약한 특징이 있으며, 고밀도 배양이 가능하여 해산 어류의 인공 종묘 생산 시 가장 널리 이용되는 초기 동물성 먹이생물 중 하나이다(Fukusho K. 1989. Biology and mass production of the rotifer, *Brachionus plicatilis*. *Int J Aqu Fish Technol* 1, 232-240).

[0004] 이러한 로티퍼의 대량배양을 위한 먹이생물로 미세조류와 효모가 현재 이용되고 있는데, 미세조류의 경우 *Nannochloropsis*, *Chlorella* 및 *Nannochloris* 가 사용되고 있고, 효모로는 빵효모인 *Saccharomyces cerevisiae* 와 해양효모인 *Candida utilis* 가 대표적이다.

[0005] 그러나 효모는 미세조류에 비해 보다 경제적이란 점에서 사용하기 용이하지만, 로티퍼의 성장에 필요한 불포화지방산이 부족한 문제점이 있다(Watanabe T, *et al.* 1980. Relationship between dietary value of brine shrimp *Artemia salina* and their content of ω -yeast highly unsaturated fatty acids. *Bull Jap Soc Sci Fish* 46, 35-41). 따라서 이러한 문제점을 해결하기 위해 빵효모에 오징어유를 유화시킨 ω -yeast를 개발하였으나(Hirayama K and Funamoto H. 1983. Supplement effect of several nutrient on nutritive deficiency of baker's yeast for population growth of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Nippon suisan Gakkaishi* 49, 505-510), 이 역시 미세조류에 비해 영양가가 떨어지고 수질 오염을 발생시키는 문제점이 있다.

[0006] 따라서 대부분의 부화장에서는 로티퍼의 대량 배양을 위해 고비용이 든다는 단점에도 불구하고 여전히 살아 있는 미세조류를 선호하고 있다.

[0007] 로티퍼 배양을 위해 사용되는 미세조류들, 특히 *Chlorella*, *Nannochloris*, Eustigmatophyceae의 *Nannochloropsis*은 대량배양이 용이하고 단백질 및 고도불포화지방산의 함량이 높아 로티퍼의 배양에 적합하다.

[0008] 한편, 이러한 로티퍼의 배양에 사용되는 미세조류라도 30℃ 이상의 고수온기에는 갑자기 폐사하는 예가 많고, 10℃ 이하의 저수온기에는 성장이 매우 낮아, 특히 고수온기인 여름과 저수온기인 겨울에는 로티퍼의 대량배양에 많은 어려움이 따르고 있다(Fukusho K, *et al.* 1985. Food value of a rotifer, *Brachionus plicatilis* cultured with *Tetraselmis tetrathele* for larvae of a flounder *Paralichthys olivaceus*. *Bull Natl Res Aquacult* 7, 29-36; Hur SB 1991. The selection of optimum phytoplankton species for rotifer culture during cold and warm seasons their nutritional value for marine finfish larvae. In : Rotifer and Microalgae Culture Systems, Proceedings of a U.S. - Asia Workshop, Fulks W and Main K, eds. *The Oceanic Institute*. 163-173).

[0009] 따라서 고수온기와 저수온기에 생존률 및 대량배양이 용이하여 로티퍼의 배양에 적합한 신규한 미세조류의 개발이 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 이에 본 발명자들은 고수온기에 대량배양이 용이하고 로티퍼의 먹이생물로 적합한 신규한 미세조류인 나노클로리스 속(*Nannochloris* sp.)를 처음으로 분리 및 동정함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0011] 따라서 본 발명의 목적은 30℃~32℃의 고온에서 성장 가능한 로티퍼(Rotifer) 배양용 나노클로리스 속(*Nannochloris* sp.) KCTC 11965BP 미세조류를 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 본 발명에 따른 상기 나노클로리스 속(*Nannochloris* sp.) KCTC 11965BP 미세조류 또는 이의 배양액을 포함하는 로티퍼(Rotifer) 사료용 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 다른 목적은 본 발명에 따른 상기 로티퍼(Rotifer) 사료용 조성물을 유효성분으로 포함하는 수산사료용 제제를 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 다른 목적은 본 발명에 따른 상기 나노클로리스 속(*Nannochloris* sp.) KCTC 11965BP 미세조류를 먹이로 이용하여 고온수기인 7월~8월 동안 로티퍼(Rotifer)를 대량 배양하는 방법을 제공하는 것이다.

[0015] 또한, 본 발명의 다른 목적은 고수온기인 7~8월 동안 30℃~32℃의 온도에서 배양하는 단계를 포함하는 상기 나

노클로리스 속(*Nannochloris* sp.) KCTC 11965BP 미세조류를 대량 배양하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0016] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 30℃~32℃의 고온에서 성장 가능한 로티퍼(Rotifer) 배양용 나노클로리스 속(*Nannochloris* sp.) KCTC 11965BP 미세조류를 제공한다.
- [0017] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 로티퍼는 *Brachionus plicatilis*일 수 있다.
- [0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 미세조류는 로티퍼의 성장에 필요한 아미노산 및 불포화지방산의 함량을 증가시켜 로티퍼의 성장을 촉진시킬 수 있다.
- [0019] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 미세조류는 염분이 15~35psu(practical salinity unit)인 조건에서 내염성을 가질 수 있다.
- [0020] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 상기 나노클로리스 속(*Nannochloris* sp.) KCTC 11965BP 미세조류 또는 이의 배양액을 포함하는 로티퍼(Rotifer) 사료용 조성물을 제공한다.
- [0021] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 상기 로티퍼(Rotifer) 사료용 조성물을 유효성분으로 포함하는 수산사료용 제제를 제공한다.
- [0022] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 상기 나노클로리스 속(*Nannochloris* sp.) KCTC 11965BP 미세조류를 먹이로 이용하여 고온수기인 7월~8월 동안 로티퍼(Rotifer)를 대량 배양하는 방법을 제공한다.
- [0023] 또한, 본 발명은 고수온기인 7~8월 동안 30℃~32℃의 온도에서 배양하는 단계를 포함하는 상기 나노클로리스 속(*Nannochloris* sp.) KCTC 11965BP 미세조류를 대량 배양하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0024] 본 발명에 따른 신규한 나노클로리스 속(*Nannochloris* sp.) KCTC 11965BP 미세조류는 고온인 30℃~32℃의 조건 하에서도 다른 종래 미세조류에 비해 성장률이 월등히 우수하고 해수의 염분 조건 하에서도 성장 가능한 내염성을 가지고 있으며, 이를 먹이로 하여 배양한 로티퍼는 각종 생리활성 기능을 하는 아미노산과 필수지방산을 풍부히 함유하고 있어, 궁극적으로 로티퍼와 같은 동물플랑크톤의 배양과 이러한 동물플랑크톤을 먹이로 하는 어패류의 양식 산업에 먹이생물 및 사료로서 매우 유용하게 사용할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [0025] 도 1은 본 발명에 따른 신규주인 나노클로리스 속(*Nannochloris* sp.) KCTC 11965BP(KMMCC 395)과 다른 미세조류들을 대상으로 30℃와 32℃의 고온에서 배양하여 기간경과에 따른 세포밀도를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 2는 본 발명에 따른 신규주인 나노클로리스 속(*Nannochloris* sp.) KCTC 11965BP(KMMCC 395)과 다른 미세조류들을 먹이로 사용하여 배양한 로티퍼의 성장률을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 3은 본 발명에서 분리 및 동정한 신규주의 계통발생학적 분석을 계통수(Phylogenetic tree)로 나타낸 것이다.
- 도 4a는 본 발명에 따른 신규주인 나노클로리스 속(*Nannochloris* sp.) KCTC 11965BP(KMMCC 395)의 염분이 30psu인 배양조건에서의 성장률을 나타낸 그래프이다.
- 도 4b는 본 발명에 따른 신규주인 나노클로리스 속(*Nannochloris* sp.) KCTC 11965BP(KMMCC 395)의 염분이 15psu인 배양조건에서의 성장률을 나타낸 그래프이다.
- 도 5는 본 발명에 따른 나노클로리스 속(*Nannochloris* sp.) KCTC 11965BP(KMMCC 395)와 다른 미세조류들을 먹이로 사용하여 배양한 로티퍼의 성장률을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0026] 본 발명은 고온에서도 성장이 우수하여 고온수기인 여름철 동안 로티퍼의 대량 배양을 위한 먹이 공급 부족을 해결할 수 있는 신규한 로티퍼(Rotifer) 배양용 나노클로리스 속(*Nannochloris* sp.) 미세조류를 제공한다는 데 그 특징이 있다.

- [0027] 일반적으로 로티퍼는 댐, 저수지 등 유속이 완만한 담수역에서 주로 발견되는 윤형동물문(Rotifera)의 동물플랑크톤으로, 지금까지 알려진 바로는 전 세계적으로 2500 여종이 분포하고 있다.
- [0028] 이러한 로티퍼는 수산생물의 먹이생물로 사용되고 있는데, 먹이생물이란 수서생물(aquatic creature)이 어린 시기에 먹게 되는 식물 및 동물플랑크톤을 의미한다. 또한, 로티퍼는 수산생물, 특히 자어에게 필요한 영양분을 고루 갖추고 있어 시중에 판매되고 있는 배합사료보다 훨씬 우수한 먹이생물이 될 수 있다.
- [0029] 뿐만 아니라 실제로 수산 분야에서 증식 및 양식 대상 생물이 되는 어류인 자어를 비롯하여, 무척추동물 중 일부는 수정란에서 부화된 후 먹이로서 로티퍼를 섭취해야만 생존할 수 있다. 이처럼 로티퍼 없이는 수산 증양식 분야의 생물들을 사육하는 것 자체가 불가능하므로, 로티퍼는 이들 수서생물 종묘의 대량 생산시 유용한 먹이생물로서 그 산업적 가치를 인정받고 있다.
- [0030] 한편, 해산어의 종묘 생산 과정에서 먹이생물로 이용 가능한 로티퍼는 배양하는 과정에서 로티퍼의 먹이가 되는 미세조류의 종류에 따라 큰 영향을 받고 있으며(Hirayama et.al., 1979), 특히 여름철에는 수온의 온도가 높아 로티퍼의 먹이가 되는 미세조류가 폐사하는 예가 많아 대량배양이 어려운 문제점이 있다.
- [0031] 이에 본 발명에서는 여름철에도 로티퍼의 대량 배양을 가능하게 할 수 있는 신규한 로티퍼 배양용 미세조류를 발굴하기 위해, 서해안 염전에서 식물플랑크톤을 수집한 후, 고온에서도 성장이 활발한 신규한 미세조류를 분리 및 동정하였고, 18S rRNA의 염기서열을 분석하여 계통학적 분류를 조사한 결과, 동일한 염기서열을 갖는 미세조류는 존재하지 않았으며, 계통학적으로 나노클로리스 속(*Nannochloris* sp.)에 속하는 것을 확인할 수 있었다(도 3 참조).
- [0032] 따라서 본 발명자들은 본 발명에서 분리 및 동정한 신규한 미세조류를 2011.06.14일자로 한국생명공학연구원 미생물자원센터에 기탁하여 기탁번호 KCTC 11965BP를 부여받았고 이를 “나노클로리스 속(*Nannochloris* sp.) KCTC 11965BP 미세조류”로 명명하였다.
- [0033] 본 발명에서 분리 및 동정한 상기 나노클로리스 속(*Nannochloris* sp.) KCTC 11965BP 미세조류는 고온, 바람직하게는 30℃~32℃의 고온에서도 생장 또는 성장이 활발한 특징이 있다.
- [0034] 본 발명의 일실시예에 따르면, 본 발명의 상기 신규 미세조류의 고온 성장 특징이 다른 미세조류들에 비해 현저하게 우수함을 확인하기 위해 부경대학교 한국해양미세조류은행(Korea Marine Microalgae Culture center, KMMCC)으로부터 분양 받은 KMMCC-33: *Nannochloropsis* sp., KMMCC-13: *Nannochloropsis oceanica*, KMMCC-120: *Chlorella vulgaris* 미세조류들과 본 발명의 신규 미세조류를 대상으로 30℃ 와 32℃의 고온에서 성장률을 비교한 결과, 30℃ 와 32℃에서 모두 본 발명의 신규 미세조류인 나노클로리스 속(*Nannochloris* sp.) KCTC 11965BP가 가장 높은 성장률을 보였다(도 1 및 2 참조). 30℃에서 클로렐라 불가리스(*Chlorella vulgaris*) KCTC 11964BP와 나노클로롭시스 속(*Nannochloropsis* sp.) KMMCC-33도 나쁘지 않은 성장률이지만 32℃의 성장률을 보면 클로렐라 불가리스(*Chlorella vulgaris*) KCTC 11964BP와 나노클로롭시스 속(*Nannochloropsis* sp.)의 미세조류에 비해 2배 이상의 높은 성장률을 보이는 것으로 나타났다(도 1 참조).
- [0035] 또한, 본 발명에서 분리 및 동정한 나노클로리스 속(*Nannochloris* sp.) KCTC 11965BP 미세조류는 내염성을 갖는 특징이 있으며, 특히 10psu ~ 35psu의 염도 조건 하에서도 활발한 성장을 보이는 특징이 있다.
- [0036] 본 발명에서 동정된 신규 미세조류는 로티퍼의 배양을 위한 먹이용 미세조류로 사용할 수 있는데, 현재 순수 해수역에 서식하는 로티퍼는 10 여종이 있는 것으로 알려져 있고, 담수 유래종 중 일부는 담수와 해수의 중간 정도 수준의 염도를 나타내는 영역, 즉 자연 수역의 기수(汽水, brackish water) 영역에 적응하여 서식하는 것으로 알려져 있다.
- [0037] 따라서 해수뿐만 아니라 기수 영역에 서식하는 로티퍼의 배양을 위해서는 이의 먹이가 되는 미세조류도 내염성을 갖는 것이 필수적일 수 있다.
- [0038] 이에 본 발명자들은 본 발명에서 동정한 나노클로리스 속(*Nannochloris* sp.) KCTC 11965BP 미세조류의 내염성 정도를 측정하기 위해, 본 발명의 일실시예에서 15psu 및 30psu의 염도 조건 하에 미세조류의 성장 정도를 조사한 결과, 다른 미세조류들에 비해 본 발명의 나노클로리스 속(*Nannochloris* sp.) KCTC 11965BP 미세조류가 15psu 및 30psu의 염도 조건 모두에서 월등한 성장률을 보이는 것으로 나타났다(도 4a 및 4b 참조).
- [0039] 상기에서 염도 단위로 사용한 "psu"는 실용 염분 단위인 practical salinity unit를 의미하는 것으로서, 해수 1kg에 녹아 있는 용존 물질의 g 질량의 비(psu)로 염분을 나타낸 것이다. 일반적으로 해수의 평균 염도는 35psu

의 염분을 나타낸다고 알려져 있으나 연안은 강우량에 따라 염분의 변화가 심하다.

- [0040] 따라서 본 발명에 따른 신규 미세조류는 염분 농도가 낮은 염전의 저수지에서 채집되어, 10psu ~ 35psu의 염도 조건 하에서도 활발한 성장을 보이는 것으로 나타나 해수 조건 하에서도 배양이 용이한 특징이 있다. 일반적으로 해수보다는 낮은 농도의 기수에서 채취되고 분리되는 생물은 곧바로 해수에 옮기면 염분 적응에 실패하여 폐사하는 경우가 많으나 본 발명의 신규 미세조류는 염분 농도의 변화 폭이 큰 염전에서 분리되었으므로 염분 적응에 실패할 우려가 없다.
- [0041] 나아가 본 발명자들은 신규한 나노클로리스 속(*Nannochloris* sp.) KCTC 11965BP 미세조류가 로티퍼의 배양에 유용한 성분인 아미노산 및 지방산의 성분과 함량을 충분히 가지고 있는 지를 분석하였다.
- [0042] 본 발명의 일실시예에 따른 결과에 의하면, 대조군인 다른 미세조류에 비해 본 발명의 신규 미세조류의 아미노산의 함량이 월등히 더 높은 것으로 나타났으며 필수아미노산 및 비필수아미노산 함량 모두 다른 대조군에 비해 높았다. 특히 필수아미노산에서는 leusine이 높게 나타났고 비필수아미노산에서는 glutamic acid가 비교적 높게 나타났다(표 3참조).
- [0043] 또한, 지방산 분석 결과, 신규한 나노클로리스 속(*Nannochloris* sp.) KCTC 11965BP 미세조류의 경우 다른 미세조류보다 생체 내에서 중요한 기능을 담당하고 있는 불포화지방산의 함량이 월등히 많은 것으로 나타났으며, 이중 EPA(eicosapentaenoic acid) 및 DHA(decosaheptaenoic acid)과 이를 포함하는 고도불포화지방산(polyunsaturated fatty acids, PUFA)의 함량은 비교적 높았고 특히 단일불포화지방산(monoun-saturated fatty acids)의 함량은 월등히 많이 함유되어 있는 것으로 나타났다(표 4 참조).
- [0044] 고도불포화지방산 중 EPA(eicosapentaenoic acid) 및 DHA(decosaheptaenoic acid)는 등푸른 생선류에 많이 포함되어 있는 것으로 알려져 있으며, 특히 어린 동물들의 성장발육과 면역력 증강에 필수적인 역할을 하는 것으로 알려져 있고, 양식용 어류의 경우에도 치어기에 충분한 양의 EPA나 DHA를 공급받지 못하면 면역기능이 저하되어 치사율이 높고 성어기에 성장 장애가 두드러질 뿐만 아니라 채색이 불량하여 상품성이 현저히 저하되는 문제가 있어 EPA나 DHA는 치어의 먹이용 영양성분으로서 반드시 공급되어야 하는 성분들이다.
- [0045] 이러한 점에 비추어 볼 때, 본 발명에서 분리 및 동정한 신규한 나노클로리스 속(*Nannochloris* sp.) KCTC 11965BP 미세조류는 로티퍼 내의 아미노산과 불포화지방산, 특히 단일불포화지방산(monoun-saturated)과 고도불포화지방산의 함량을 풍부히 할 수 있어, 본 발명의 미세조류로 양식한 치어 등의 수산생물은 영양학적인 면에서 우수할 수 있다.
- [0046] 그러므로 본 발명은 본 발명에 따른 신규한 나노클로리스 속(*Nannochloris* sp.) KCTC 11965BP 미세조류 또는 이의 배양액을 포함하는 로티퍼 사료용 조성물을 제공할 수 있다.
- [0047] 상기 로티퍼 사료용 조성물은 유효성분으로서 신규한 나노클로리스 속(*Nannochloris* sp.) KCTC 11965BP 미세조류 또는 상기 미세조류의 배양액을 포함할 수 있는데, 상기 미세조류의 배양액은 미세조류를 포함한 배양액일 수 있고, 또는 배양액 중의 배양배지를 제거하고 농축된 균체만을 회수하기 위해 원심분리 또는 여과과정을 거쳐 수득한 농축 균체를 포함할 수 있으며 농축된 균체는 통상적인 방법에 따라 냉동(frozen)하거나 또는 냉동건조(lyophilized)하여 그 활성을 잃지 않도록 보존할 수 있다. 바람직하게 상기 미세조류 및 상기 미세조류의 배양액은 살아있는 미세조류를 사용할 수 있다.
- [0048] 또한, 본 발명은 상기 로티퍼 사료용 조성물을 유효성분으로 포함하는 수산사료용 제제를 제공할 수 있다.
- [0049] 본 발명에 따른 상기 수산 사료용 제제는 양식어패류의 먹이생물, 사료첨가제 또는 각 양식 어패류에 따라 시판되는 사료조성물에 상기 본 발명의 사료용 제제를 첨가한 형태로서 제조될 수 있으며, 상기 양식 어패류에 이에 제한되지는 않으나 로티퍼를 먹이로 하는 어류라면 모두 포함할 수 있으며, 예를 들면, 어류의 자치어, 갑각류(새우, 게, 가재, 닭새우 등) 및 두족류(문어, 오징어, 낙지 등)의 유생일 수 있다.
- [0050] 본 발명은 본 발명에서 발굴한 신규한 나노클로리스 속(*Nannochloris* sp.) KCTC 11965BP 미세조류를 이용한 로티퍼의 대량 배양 방법을 제공할 수 있는데, 특히 고온수기 동안 로티퍼를 대량 배양하는 방법을 제공할 수 있다.
- [0051] 나아가 본 발명은 30℃~32℃의 고온에서 배양하는 단계를 포함하는 상기 나노클로리스 속(*Nannochloris* sp.) KCTC 11965BP 미세조류를 대량 배양하는 방법을 제공할 수 있다.
- [0052] 앞서 기재한 바와 같이 본 발명에 따른 신규 나노클로리스 속(*Nannochloris* sp.) KCTC 11965BP 미세조류는

30~32℃의 고온에서도 생장이 활발히 이루어지는 특징이 있어 상기 신규 미세조류를 사용할 경우, 고온수기인 여름철 동안에도 옥외에서 로티퍼를 대량 배양할 수 있다.

[0053] 상기 로티퍼의 대량 배양 방법은 로티퍼 배양 방법과정에서 종래 먹이 대신 본 발명의 신규 나노클로리스 속(*Nannochloris* sp.) KCTC 11965BP 미세조류를 먹이로 사용하여 배양할 수 있으며, 로티퍼 배양 방법으로는 회분(batch)배양 방법, 반 연속 배양 방법 및 고밀도 배양 방법이 있으며, 이들 중 어느 하나의 방법으로 배양할 수 있다.

[0054] 상기 회분 배양 방법은 가장 일반적인 배양 방법으로 비교적 소형의 배양수조를 여러 개 사용하여 배양하는 방법이고, 상기 반 연속 배양 방법은 비교적 대형의 수조에서 배양하고 일정기간 동안 매일 같은 수조에서 일정량의 로티퍼를 수확한 후 수확한 만큼의 양에 해당되는 배양수를 로티퍼의 먹이나 새로운 배양수를 보충하여 배양하는 방법이다. 또한 상기 고밀도 배양 방법은 로티퍼의 개체밀도를 ml당 10,000~20,000개체로 유지하면서 배양하는 방법으로 이는 로티퍼 개체수가 증가함으로써 발생하는 산소부족과 암모니아의 농도 증가를 제어하는 시스템을 설치하여 배양하는 방법이다.

[0055] 따라서 본 발명에서 제공하는 로티퍼 대량 배양 방법은 상기 기술된 방법 중 어느 것으로도 배양할 수 있으며, 본 발명의 신규 미세조류 또는 이를 포함하는 로티퍼 사료용 조성물을 로티퍼 배양수에 첨가하거나 로티퍼의 사료에 첨가하여 사용함으로써 배양할 수 있다.

[0056] 또한, 본 발명에서 제공하는 상기 배양 방법은 고온수기, 바람직하게는 7월~8월 동안에도 로티퍼를 대량으로 배양할 수 있다.

[0057]

[0058] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

[0059] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0060] <실시예 1>

[0061] 신규주인 나노클로리스 속(*Nannochloris* sp.) KCTC 11965BP의 분리

[0062] <1-1> 균주의 분리

[0063] 본 발명자들은 고온에서도 생육 발달이 활발하고 대량배양이 가능하여 로티퍼의 배양용 먹이로 사용 가능한 새로운 미세조류를 발굴하기 위해 전북 부안군 염전에서 20 μm의 식물플랑크톤네트를 사용하여 조수를 채취하였고, 한천 고체 배지(LDM 배지, 표1 참조)에 도말하여 배양한 후, 생장을 보이는 균주를 분리하였다. 이후, 생장을 보이는 균주들을 대상으로 고온인 30℃~32℃에서도 생장이 활발한 균주를 분리하기 위해, 상기 분리된 각 균주들을 대상으로 30℃~32℃의 온도가 유지되는 조건하에서 해수용 배양액으로 알려진 f/2배지(표 2 참조)를 이용하여 균주를 배양시켰다. 또한 형태학적 분석 및 균학적 특성을 분석하였다.

[0064] <1-2> 선별된 균주의 동정

[0065] a. 형태학적 동정

[0066] 상기 실시예 <1-1>에서 선별된 균주들 대상으로 현미경을 통해 균주의 형태학적 모양을 관찰하였다.

[0067] 관찰 결과, 동정된 균주의 세포는 소형 녹조류로 구형의 형태를 갖는 것으로 관찰되었고, 직경은 1~3 μm이며 편모가 없어 운동성을 가지지 않는 것으로 관찰되었다(결과 미도시).

[0068] b. 분자생물학적 동정

[0069] 상기 실시예 <1-1>에서 선별된 균주의 분자생물학적 동정을 위해 당업계에서 사용되고 있는 18S ribosomal RNA의 염기서열을 분석하였다.

[0070] 그 결과, 본 발명에서 동정한 균주는 나노클로리스 속에 속하는 균주인 것으로 나타났고, 분류상 위치는 *Chlorophyceae* - *Chlorococcales* - *Chlorellaceae*- *Nannochloris*에 속하는 것으로 조사되었으며, 특히

Nannochloris sp.에 속하는 것으로 분석되었다. 이에 본 발명자들은 상기 동정한 균주의 염기서열을 분석하였고, 그 염기서열을 서열번호 1에 나타내었으며, 이러한 염기서열을 갖는 균주는 기존에 존재하지 않는 신규한 균주임을 확인함으로써, 2011년 06월 14일자로 한국생명공학연구원 미생물자원센터에 기탁하여 기탁번호 KCTC 11965BP를 부여받았다. 이하 본 발명에서는 상기 동정한 신규균주를 “*Nannochloris* sp. KCTC 11965BP”로 명명하였다.

[0071] c. 균학적 동정

[0072] 상기 동정한 신규균주인 *Nannochloris* sp. KCTC 11965BP 균주의 균학적 특징을 조사하였는데, 조사 결과, 광합성에 의한 광독립 영양생육을 할 수 있는 것으로 나타났고, 생육 온도는 30℃ 이상의 고온에서도 잘 성장하는 특징이 있는 것으로 나타났으며, 특히 30℃~32℃의 온도에서 성장이 우수한 것으로 나타났다.

[0073] 또한 생육 가능한 염분은 여과해수와 증류수를 혼합하여 15 psu와 30 psu로 구분하여 제조한 후, 이들 조건에서 생육을 조사한 결과, 15 psu와 30 psu 모두에서 생육 가능한 것으로 조사되었으며(도 4a와 4b 참조), 생육 조도는 $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1} \sim 100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 범위인 것으로 조사되었다.

[0074] 특히 상기 염분 조건 하에서의 생육 조사는 본 발명의 신규균주인 *Nannochloris* sp. KCTC 11965BP(일명, 'KMMCC-395'라고 함)와 대조균으로 부경대학교 한국해양미세조류은행으로부터 분양받은 KMMCC-79: *Chlorella salina*, KMMCC-95: *Chlorella vulgaris*, KMMCC-58: *Nannochloris* sp., KMMCC-117: *Nannochloris* sp., KMMCC-33: *Nannochloropsis* sp., KMMCC-13: *Nannochloropsis oceanica*를 사용하였다.

[0075] <실시예 2>

[0076] 고온에서의 균주 성장 분석

[0077] 본 발명자들은 로티퍼의 대량배양에 큰 문제가 되었던 여름철 먹이 공급 부족의 문제를 해결하기 위해 본 발명에서 동정한 신규균주를 여름철 로티퍼의 먹이로 용이하게 사용할 수 있는지를 확인하기 위해, 고온에서 대량 배양이 가능한지를 조사하였다. 즉, 여름철 고온수의 조건 하에서도 세포의 성장이 활발하여 잘 성장하는 미세조류는 여름철 로티퍼의 옥외 대량배양에 용이하게 사용할 수 있기 때문이다. 이에 고온인 30℃와 32℃에서 본 발명에서 동정한 신규균주와 다른 미세균주들을 대상으로 성장 정도를 비교 분석하였다. 이때 비교를 위해 사용한 상기 미세균주들 또한 로티퍼 배양을 위해 사용되는 균주로서 KMMCC-33: *Nannochloropsis* sp., KMMCC-13: *N. oceanica*, KMMCC-120: *Chlorella vulgaris*를 사용하였으며, 이들 균주는 부경대학교 한국해양미세조류은행으로부터 분양받아 사용하였다. 이들 각 균주들은 f/2배지에 100×10^4 cell/mL의 밀도로 접종하고 15psu의 염분 조건 하에서 $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 연속 조명으로 10일간 배양한 후, 혈구계산판을 사용하여 세포를 매일 동일 시간에 4회 반복 계수하고, Guillard의 방법으로 성장률을 계산하였다[$\text{sgr} = 3.322 \times \log(N_1/N_0)/t$, (t : 접종 후 배양 일수, N_0 , N_1 : 접종 후 및 t 일 후의 세포 밀도)].

[0078] 또한 본 발명에서 모든 실험 결과의 통계 처리는 One-way ANOVA test를 실시하였으며, 처리 평균간의 유의성 ($P < 0.05$)은 Duncan's multiple range test로 하였다. 모든 통계분석은 SPSS (SPSS Inc., 2008; Ver. 17) program을 사용하였다.

[0079] 그 결과, 도 1, 2에 나타난 바와 같이, 30℃와 32℃에서의 성장률은 본 발명에서 동정한 신규균주인 *Nannochloris* sp. KCTC 11965BP(KMMCC-395)가 가장 높은 성장률을 보였으며, 30℃에서 클로렐라 불가리스(*Chlorella vulgaris*) KCTC 11964BP와 나노클로롭시스 속(*Nannochloropsis* sp.) KMMCC-33도 나쁘지 않은 성장률이지만 32℃의 성장률을 보면 클로렐라 불가리스(*Chlorella vulgaris*) KCTC 11964BP와 나노클로롭시스 속(*Nannochloropsis* sp.) 포함 다른 대조균인 미세조류에 비해 2배 이상의 높은 성장률을 보이는 것으로 나타남에 따라 고수온기의 로티퍼 대량배양에 매우 적합한 균주인 것을 알 수 있었다.

[0080] <실시예 3>

[0081] 영양 성분 분석

[0082] 나아가 본 발명자들은 본 발명에서 동정한 *Nannochloris* sp. KCTC 11965BP균주의 영양성분을 분석하기 위해 아

미노산과 지방산을 분석하였는데, 이를 위해 상기 기술된 동일한 방법으로 배양된 *Nannochloris* sp. KCTC 11965BP 균주를 대수성장기 종료시에 수확한 다음, 수확한 세포들을 분석 전까지 -80℃에서 냉동 보관하여 이후 실험을 수행하였으며, 이때 비교분석을 위해 본 발명에서 동정한 균주 이외에 KMMCC-33: *Nannochloropsis* sp., KMMCC-13: *N. oceanica*, KMMCC-120: *Chlorella vulgaris*를 사용한 시료들을 사용하였다. 즉, 비교분석을 위해 사용한 각 균주들 및 이들 균주로 배양한 로티퍼를 대조군 시료로 사용하였다.

[0083] 먼저 아미노산 분석을 위해 상기 냉동 보관한 각 수확 세포 20 mg을 시험관에 넣고, 6N HCl 15 mL를 가하여 밀봉한 후 110℃에서 24시간 가수분해하였다. 이 분해액을 여과한 후 감압 건조하여 HCl을 완전히 제거한 다음, sodium dilution buffer(pH 2.2)로 25 mL가 되도록 정량한 다음, 이 용액을 일정량 취하여 아미노산 자동분석기 S433(Sykam, Germany)를 이용하여 닌히드린(ninhydrin) 방법으로 분석하였다. 분석조건은 column size 4 mm × 150 mm, 흡광도 570 nm 및 440 nm, 용액 흐름 속도 0.25 mL/min, 버퍼 흐름 속도 0.45 mL/min, 반응기 온도 120℃, 반응기 크기 15 m, 분석시간을 65분으로 하여 분석하였다.

[0084] 또한, 지방산 분석은 15 mL 시험관에 상기에서 사용한 동일한 일정량의 시료(20 mg 이상)에 10% BF₃- methanol 2 mL를 첨가하고 질소로 충전한 다음, 85℃에서 1시간 30분간 가열하여 메틸 에스테르화 하였다(Morrison and Smith, 1964; Budge, 1999). 시료는 약 40℃로 냉각한 후 물과 헥산을 첨가하여 지방산을 분리 추출하였다. 추출된 지방산은 HP autosampler가 설치된 HP GC 6890 Plus(Agilent, USA)를 이용하여 분석하였는데, 지방산 분석에 사용된 GLC는 DB-225(20 m × 0.1 mm, i.d., 0.1 μm film thickness, J&W Scientific, Agilent Technologies, USA)를 이용하였다. 분석 조건은 컬럼 온도가 60~195℃ (25℃/min)가 되도록 하였고, 승온 조건 195~205℃ (3℃/min), 205~230℃ (8℃/min), 주입 온도 250℃, 검출 온도 250℃, 수송 가스 He (60cm/sec)을 사용하였다. 지방산의 분석은 동일조건에서 분석한 standard(PUFA 1, 10 및 37 component FAME Mix, Supelco, Ontario, Canada)를 이용하여 동정하였다.

[0085] 분석 결과, 각 미세조류에 대한 아미노산 분석과 지방산 분석 결과는 하기 표 3 및 4에 기재하였으며, 본 발명의 신크균주가 다른 균주보다 월등히 아미노산의 함유량이 높은 것으로 보였고 모든 아미노산을 고루 함유하고 있는 것을 알 수 있었다. 지방산의 경우 신크균주는 *Nannochloropsis* 보다는 낮으나 비교적 높은 값을 보였으며, *Chlorella* 보다는 높은 EPA 값을 나타내었다.

표 1

LDM 배지 조성표 (Starr, 1978)	
Bristol solution	100 mL
Biotin	0.25 μg
Vitamin B ₁₂	0.15 μg
PIV metal solution	6 mL
Tryptone	1 g
Agar	12 g
Filtered Sea water	900 mL
Bristol solution stock	
NaNO ₃	10.0 g/400 mL dH ₂ O
CaCl ₂	1.0 g/400 mL dH ₂ O
MgSO ₄ ·7H ₂ O	3.0 g/400 mL dH ₂ O
K ₂ HPO ₄	3.0 g/400 mL dH ₂ O
KH ₂ PO ₄	7.0 g/400 mL dH ₂ O
NaCl ₂	1.0 g/400 mL dH ₂ O
10 mL of each stock solution is added to 940 mL of distilled water. To this add a drop 1.0% FeCl ₃ solution.	
PIV metal solution	
Na ₂ - EDTA	750 mg
FeCl ₂ ·6H ₂ O	97 mg
MnCl ₂ ·4H ₂ O	41 mg
ZnCl ₂	5 mg
CoCl ₂ ·6H ₂ O	2 mg
Na ₂ MoO ₄	4 mg
Distilled water	1,000 mL

[0086]

표 2

f/2 배지 조성표 (Guillard 1975)			
NaNO ₃	1 mL	Primary trace metals	
NaH ₂ PO ₄ ·9H ₂ O	1 mL	CuSO ₄ ·5H ₂ O	9.8 g/L dH ₂ O
Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	1 mL	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	6.3 g/L dH ₂ O
trace metal solution	1 mL	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	22.0 g/L dH ₂ O
vitamin solution	0.5 mL	CoCl ₂ ·6H ₂ O	10.0 g/L dH ₂ O
filtered seawater	950 mL	MnCl ₂ ·4H ₂ O	180.0 g/L dH ₂ O
Stock solution		vitamin solution	
NaNO ₃	75 g/L	work stock	
NaH ₂ PO ₄ ·9H ₂ O	5 g/L	Vitamine B ₁₂	1 mL
Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	30g/L	Biotin	10 mL
Trace metal solution		ThiamineHCl	200 mg
FeCl ₃ ·6H ₂ O	3.15 g	distilled water	1,000 mL
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	4.36 g	Primary stock	
Primary trace metals	1 mL each	Vitamine B ₁₂	1.0 g/L dH ₂ O
distilled water	1,000 mL	Biotin	0.1 g/L dH ₂ O

[0087]

표 3

미세조류의 아미노산 함량 분석(%)

Amino acid	KMMCC No.		395 (본 발명 실험주)	
	33	13	395	120
Arginine	3.16	3.33	4.29	2.59
Histidine	1.12	1.31	2.52	1.42
Isoleucine	2.15	2.72	3.13	2.18
Leucine	4.07	5.06	6.38	4.28
Lysine	3.07	3.66	4.61	2.73
Phenylalanine	2.74	2.97	4.29	2.55
Threonine	2.22	2.62	3.42	2.04
Valine	2.93	3.39	3.87	2.60
Alanine	3.08	3.61	6.20	3.94
Aspartic acid	4.39	5.02	7.49	5.02
Glutamic acid	6.96	8.12	13.05	6.77
Glycine	2.59	3.23	4.08	2.87
Proline	7.29	6.40	3.89	2.70
Serine	1.93	2.16	3.10	2.33
Tyrosine	1.84	1.98	2.68	1.70
Total	49.54	55.58	72.97	45.72
EAA	21.46	25.06	32.51	20.39
NEAA	28.08	30.52	40.49	25.33
EAA/NEAA	0.76	0.82	0.80	0.80

KMMCC-33: *Nannochloropsis* sp., KMMCC-13: *Nannochloris oculata*,
 KMMCC-395: *Nannochloris* sp., KMMCC-120: *Chlorella vulgaris*, EAA: essential
 amino acid, NEAA: non-essential amino acid

[0088]

표 4

미세조류의 지방산 함량 분석(%)

Fatty acid	KMMCC No.	33	13	395 (본 발명 신균주)	120
8:0		0.41	0.20	0.09	0.40
10:0		0.26	0.20	-	-
11:0		0.07	-	0.19	0.21
12:0		0.29	0.30	-	-
13:0		0.87	0.30	0.22	0.23
14:0		4.28	4.20	3.50	2.25
14:1		0.64	0.20	0.36	1.20
15:0		0.29	-	0.27	0.37
15:1		0.19	-	0.40	0.61
16:0		17.49	24.30	15.40	10.96
16:1		25.75	19.00	8.69	3.04
17:0		0.18	-	1.18	7.55
17:1		0.74	-	3.24	11.66
18:0		0.19	0.60	2.99	0.99
18:1n-7		3.31	10.20	29.59	5.64
18:2n-7		4.50	5.70	5.73	2.924
18:3		-	0.20	-	-
18:3n-6		0.16	-	0.11	22.32
18:3n-3		0.16	-	4.87	-
20:0		0.06	-	8.21	24.64
20:1		0.05	-	4.12	0.94
20:2		0.05	-	1.66	-
20:3		0.16	0.90	0.11	-
20:4		0.38	3.10	-	-
21:0		4.07	-	0.71	0.34
20:5n-3		34.88	19.20	6.28	3.74
22:0		-	-	-	-
22:1		0.02	-	-	-
22:2		0.10	-	2.09	-
24:0		0.03	-	-	-
22:6n-3		0.29	-	-	-
others		-	11.30	-	-
TOTAL		100	100	100	100
Saturated		28.49	30.10	32.76	47.94
Monounsaturated		30.70	29.40	46.40	23.09
Polyunsaturated		40.69	29.10	20.85	29.98
EPA+DHA		35.17	19.20	6.28	3.74

KMMCC-33: *Nannochloropsis* sp., KMMCC-13: *N. oceanica*, KMMCC-395: *Nannochloris* sp., KMMCC-120: *Chlorella vulgaris*, EPA: eicosapentaenoic acid, DHA: docosahexaenoic acid

[0089]

[0090] 본 발명의 신균주로 로티퍼를 배양한 결과는 도 5에 나타난 바와 같이 *Nannochloropsis*에 비하면 낮은 값을 보였으나 *Chlorella*에 비하면 월등히 높은 값을 보였다.

[0091] 이러한 결과를 토대로 본 발명자들은 본 발명에서 분리 및 동정한 신균주인 *Nannochloris* sp. KCTC 11965BP를 로티퍼의 먹이용 미세균주로 사용할 경우 로티퍼의 성장을 촉진 시키는 아미노산 성분과 지방산 성분이 많아 로티퍼의 성장을 촉진시키는 효과가 있음을 확인하였고 대다수의 다른 균주들이 30℃이상의 고수온기에 갑자기 폐사하는 경우가 많은데 반해 본 발명의 신균주인 *Nannochloris* sp. KCTC 11965BP는 고온인 30~32℃에서도 성장이 활발한 특성을 가지고 있어 특히 여름철 로티퍼의 배양을 위한 먹이용 균주로 사용할 수 있는 효과가 있다.

[0092] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

수탁번호

[0093]

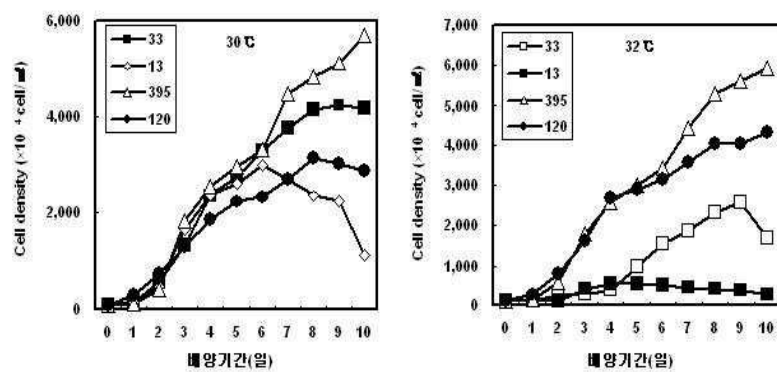
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC11965BP

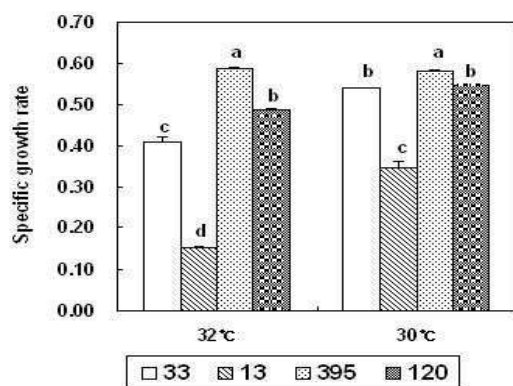
수탁일자 : 20110614

도면

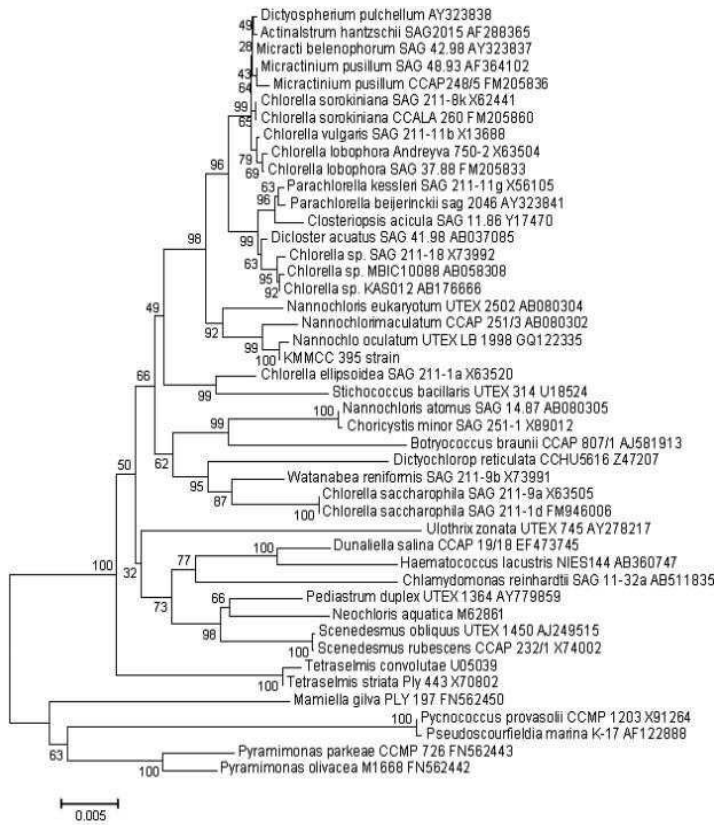
도면1



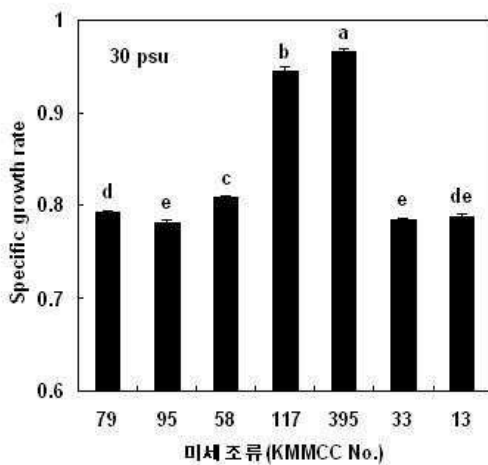
도면2



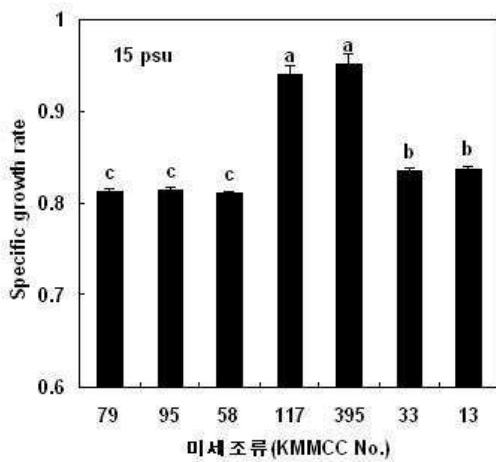
도면3



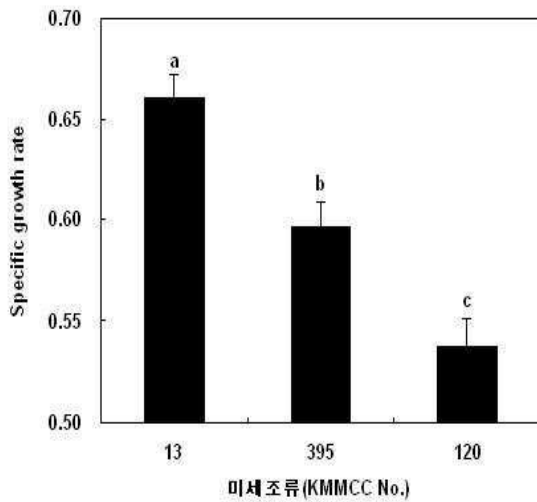
도면4a



도면4b



도면5



서열 목록

- <110> Industry Academic Cooperation Foundation of Pukyong National University
- <120> Novel Nannochloris sp. capable high temperature growth and use thereof
- <130> NP11-1218
- <160> 1
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 1669
- <212> DNA
- <213> Nannochloris sp.(KCTC 11965BP)-DNA sequence
- <400> 1

ggctcattaa atcagttata gtttatttga tggtagctac ttactcggat aaccgtagta	60
attctagagc taatacgtgc gcacatcccg acttctggaa gggacgtatt tattagataa	120
aagcccgacc ggatttttcc gactcgcggg gactcatgat aacttcacga atcgcatggc	180
ctcgtgccgg cgatgtttca ttcaaatttc tgccctatca acttttgatg gtaggataga	240
ggcctacat ggtggtaacg ggtgacggag aattagggtt cgattccgga gagggagcct	300
gagaaacggc taccacatcc aaggaaggca gcaggcgcgc aaattaccca atcctgacac	360
agggaggtag tgacaataaa taacaatacc gggccttttg tctggtaatt ggaatgagta	420
caacctaacc accttaacga ggatcaattg gagggcaagt ctggtgccag cagccgcggg	480
aattccagct ccaatagcgt atatttaagt tgctgcagtt aaaaagctcg tagttggatt	540
tcgggtgggg cctgccgggc cgccgtttcg gtgtgcactg gccgggcccc ccttgttgcc	600
ggggacgggc tcttgggctt cgctgtccgg gaccggaggt cggcgaggtt actttgagta	660
aattagagtg ttcaaagcag gcctacgtc tgaatacatt agcatggaat aacacgatag	720
gactctggcc tatcctgttg gtctgtagga ccggagtaat gattaagagg gacagtcggg	780
ggcattcgta tticattgtc agaggtgaaa ttcttggatt tatgaaagac gaactactgc	840
gaaagcattt gccaaagatg ttttcattaa tcaagaacga aagttggggg ctcgaagacg	900
attagatacc gtctagtct caaccataaa cgatgccgac tagggatcgg cgggtgtttt	960
tttgatgacc ccgccggcac cttatgagaa atcaaagttt ttgggttccg gggggagtat	1020
ggctcgcaagg ctgaaactta aaggaattga cggaagggca ccaccaggcg tggagcctgc	1080
ggcttaattt gactcaacac gggaaaactt accagggtcca gacatagtga ggattgacag	1140
attgagagct ctttcttgat tctatgggtg gtgggtcatg gccgttctta gttggtgggt	1200
tgccttgta ggttgattcc ggtaacgaac gagacctcag cctgctaact agtcacgcgt	1260
gctccggcac gggcgggact tcttagaggg actattggcg actagccaat ggaagcatga	1320
ggcaataaca ggtctgtgat gcccttagat gttctgggcc gcacgcgcgc tacactgatg	1380
cattcaacga gcctatcctt ggccgagagg tccgggtaat ctttgaatct gcatcgtgac	1440
ggggatagat tattgcaatt attaatcttc aacgaggaat gcctagtaag cgcaagtcac	1500
cagcttgctg tgattacgtc cctgcccttt gtacacaccg ccgctcgtc ctaccgattg	1560
ggtgtgctgg tgaaatgtc ggattggcgg cttggggcgg tttccgccct tggctgtcga	1620
gaagttcatt aaacctccc acctagagga aggagaaatc gtaacaagg	1669