



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0108103
(43) 공개일자 2013년10월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 7/64 (2006.01) *C11B 1/00* (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2012-7034055
 (22) 출원일자(국제) 2011년06월01일
 심사청구일자 없음
 (85) 번역문제출일자 2012년12월27일
 (86) 국제출원번호 PCT/US2011/038768
 (87) 국제공개번호 WO 2011/153246
 국제공개일자 2011년12월08일
 (30) 우선권주장
 61/350,363 2010년06월01일 미국(US)
 (뒷면에 계속)

(71) 출원인
디에스엠 아이피 어셋츠 비.브이.
 네덜란드 엔엘-6411 티이 헤르렌 헤트 오버룬 1
 (72) 발명자
체린코 스티븐 로버트
 미국 사우스 캐롤라이나주 29440 조지타운 프링글스 페리 로드 1678
커티스 로버트 코디
 미국 사우스 캐롤라이나주 29161 팀몬스빌 케일 야보로우 하이웨이 2353
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
제일특허법인

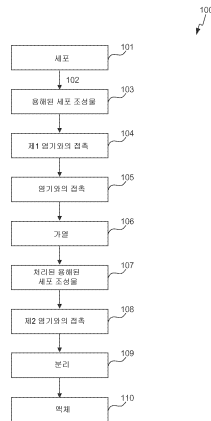
전체 청구항 수 : 총 59 항

(54) 발명의 명칭 **세포로부터의 지질의 추출 및 이로부터의 생성물**

(57) 요약

본 발명은 세포를 용해하는 단계, 세포를 염기 및/또는 염과 접촉시키는 단계, 및 지질을 분리하는 단계에 의해, 지질을 세포로부터 수득하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 본 발명의 방법에 의해 제조된 지질에 관한 것이다. 본 발명은 또한 특정 아니시딘 값, 과산화물 값 및/또는 인 함량을 갖는 미생물 지질에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

압트 커크 이

미국 메릴랜드주 21042 엘리콧 시티 폴 밀 로드 3874

버렌스 폴 위렌

미국 메릴랜드주 21042 엘리콧 시티 버터프루트 웨이 11413

한센 존 밀톤

미국 메릴랜드주 21042 엘리콧 시티 터프 밸리 골프 로드 2776 775

파이퍼 조셉 더블유 3세

미국 메릴랜드주 21157 웨스트민스터 나다인스 코트 776

스탈 트레이시 린

미국 메릴랜드주 21122 파사데나 테난트 하버 1016

저클 로스

미국 메릴랜드주 21771 마운트 에어리 헌팅톤 테라스 2108

버크 나스린 타바예

미국 켄터키주 40509 렉싱턴 오차드 그래스 로드 3240

라만 크리쉬나

미국 델라웨어주 19810 윌밍톤 웨스포드 드라이브 2507

라이언저 네일 프란시스

미국 켄터키주 40391 윈체스터 샌들우드 포인트 208

(30) 우선권주장

61/378,923 2010년08월31일 미국(US)

61/452,721 2011년03월15일 미국(US)

특허청구의 범위

청구항 1

미생물 세포 조성물의 pH를 8 이상으로 상승시키는 단계; 및
5중량% 미만의 유기 용매를 함유하는 지질을 세포 조성물로부터 분리하는 단계를 포함하는, 지질을 미생물 세포 조성물로부터 수득하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,
pH를 상승시키는 단계가 세포 조성물을 용해(lysing)하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,
pH를 상승시키는 단계가 세포 조성물을 항유화(demulsifying)시키는 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항중 어느 한 항에 있어서,
염을 세포 조성물에 첨가하여 세포 조성물을 항유화시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 5

제4항에 있어서,
염을 첨가하는 단계를 pH를 상승시키는 단계 후에 수행하는 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항중 어느 한 항에 있어서,
세포 조성물을 가열하여 세포 조성물을 항유화시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,
가열하는 단계를 pH를 상승시키는 단계 후에 수행하는 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항중 어느 한 항에 있어서,
세포 조성물의 pH를 다시 상승시켜 세포 조성물을 항유화시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서,
pH를 다시 상승시키는 단계를 염을 첨가하는 단계 또는 가열하는 단계 후에 수행하는 방법.

청구항 10

세포를 용해하여 용해된 세포 조성물을 형성하는 단계;
상기 용해된 세포 조성물의 pH를 8 이상으로 상승시켜 세포 조성물을 항유화시키는 단계;

염을 상기 용해된 세포 조성물에 첨가하여 세포 조성물을 항유화시키는 단계; 및
5중량% 미만의 유기 용매를 함유하는 지질을 항유화된 세포 조성물로부터 분리하는 단계를 포함하는 지질을 세포로부터 수득하는 방법.

청구항 11

세포 조성물의 pH를 8 이상으로 상승시켜 세포 조성물을 용해하고 세포 조성물을 항유화시키는 단계;
염을 상기 세포 조성물에 첨가하는 단계; 및
5중량% 미만의 유기 용매를 함유하는 지질을 항유화된 세포 조성물로부터 분리하는 단계를 포함하는, 지질을 세포 조성물로부터 수득하는 방법.

청구항 12

제10항 또는 제11항에 있어서,
용해된 세포 조성물을 가열하여 세포 조성물을 항유화시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 13

제12항에 있어서,
가열하는 단계를 염을 첨가하는 단계 후에 수행하는 방법.

청구항 14

제1항 내지 제13항중 어느 한 항에 있어서,
용해된 세포 조성물을 교반하여 세포 조성물을 항유화시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 15

제10항 내지 제14항중 어느 한 항에 있어서,
용해된 세포 조성물의 pH를 상승시켜 세포 조성물을 항유화시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 16

제15항에 있어서,
용해된 세포 조성물의 pH를 상승시키는 단계를 염을 첨가하는 단계 또는 가열하는 단계 후에 수행하는 방법.

청구항 17

제1항 내지 제16항중 어느 한 항에 있어서,
pH를 상승시키는 단계가 염기를 첨가함을 포함하는 방법.

청구항 18

제1항 내지 제17항중 어느 한 항에 있어서,
염기가 1 내지 12의 pK_a를 갖는 방법.

청구항 19

제14항 내지 제18항중 어느 한 항에 있어서,
용해된 세포 조성물을 휘젓기, 혼합, 배합, 진탕, 진동 또는 이들의 조합에 의해 교반하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 20

제1항 내지 제19항중 어느 한 항에 있어서,
용해가 기계적 처리, 물리적 처리, 화학적 처리, 효소적 처리 또는 이들의 조합을 포함하는 방법.

청구항 21

제20항에 있어서,
기계적 처리가 균질화인 방법.

청구항 22

제4항 내지 제21항중 어느 한 항에 있어서,
염을 용해된 세포 조성물의 중량을 기준으로 0.1 내지 20중량%의 양으로 첨가하는 방법.

청구항 23

제4항 내지 제22항중 어느 한 항에 있어서,
염이 알칼리 금속 염, 알칼리토 금속 염, 설페이트 염 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 24

제1항 내지 제23항중 어느 한 항에 있어서,
분리하는 단계가 원심분리를 포함하는 방법.

청구항 25

제1항 내지 제24항중 어느 한 항에 있어서,
50중량% 이상의 트라이글리세라이드를 포함하는 액체를 제공하는 방법.

청구항 26

제1항 내지 제25항중 어느 한 항에 있어서,
26 이하의 아니시딘 값을 갖는 액체를 제공하는 방법.

청구항 27

제10항 내지 제26항중 어느 한 항에 있어서,
세포가 미생물 세포인 방법.

청구항 28

제1항 내지 제9항 및 제27항중 어느 한 항에 있어서,
미생물 세포를 포함하는 발효 배양액을 농축하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 29

제10항 내지 제26항중 어느 한 항에 있어서,
세포가 종유인 방법.

청구항 30

제29항에 있어서,
종유가 해바라기씨, 카놀라씨, 평지씨, 아마씨, 피마자유씨, 코리앤더씨, 칼렌둘라씨 및 이들의 유전적으로 변형된 변이체인 방법.

청구항 31

제1항 내지 제30항중 어느 한 항에 있어서,
세포 또는 세포 조성물을 세척하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 32

제1항 내지 제31항중 어느 한 항에 있어서,
세포 또는 세포 조성물을 파스퇴르화시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 33

제1항 내지 제32항중 어느 한 항에 있어서,
용해된 세포 조성물을 농축하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 34

제1항 내지 제33항중 어느 한 항에 있어서,
액체를 정련하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 35

제34항에 있어서,
정련하는 단계가 정련, 탈검, 산 처리, 알칼리 처리, 착색, 가열, 표백, 탈취, 탈산성화 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 36

제1항 내지 제35항중 어느 한 항에 있어서,
교반 없이 지질을 펄핑함을 포함하는 지질을 수확하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 37

세포를 용해하여 용해된 세포 조성물을 형성하는 단계;
세포 조성물을 교반하여 세포 조성물을 함유화시키는 단계; 및
5중량% 미만의 유기 용매를 함유하는 지질을 함유화된 세포 조성물로부터 분리하는 단계를 포함하는, 지질을 세포로부터 수득하는 방법.

청구항 38

제37항에 있어서,
교반하는 단계가 350 내지 900cm/초의 팁 속도를 갖는 임펠러를 사용하여 세포 조성물을 교반함을 포함하는 방법.

청구항 39

제1항 내지 제38항중 어느 한 항에 따른 방법에 의해 수득된 지질.

청구항 40

제39항에 있어서,
하나 이상의 다가불포화 지방산을 포함하는 지질.

청구항 41

제39항 또는 제40항에 있어서,

35중량% 이상의 도코사헥사엔산을 포함하는 지질.

청구항 42

제39항 내지 제41항중 어느 한 항에 있어서,
3 이하의 전체 아로마 강도를 갖는 지질.

청구항 43

제39항 내지 제41항중 어느 한 항에 있어서,
2 이하의 전체 아로마틱 강도를 갖는 지질.

청구항 44

제39항 내지 제43항중 어느 한 항에 있어서,
26 이하의 아니시딘 값을 갖는 지질.

청구항 45

제39항 내지 제44항중 어느 한 항에 있어서,
100ppm 이하의 인 함량을 갖는 지질.

청구항 46

제39항 내지 제45항중 어느 한 항에 있어서,
5 이하의 과산화물 값을 갖는 지질.

청구항 47

제39항에 있어서,
20중량% 이상의 아이코사펜타엔산, 및 각각 5중량% 미만의 아라키돈산, 도코사펜타엔산 n-6, 올레산, 리놀레산, 리놀렌산, 아이코센산, 에루크산 및 스테아리돈산을 포함하는 지질.

청구항 48

제39항에 있어서,
10중량% 이상의 트리아실글리세롤 분획을 포함하되, 트리아실글리세롤 분획중 12중량% 이상의 지방산이 아이코사펜타엔산이고, 트리아실글리세롤 분획중 25중량% 이상의 지방산이 도코사헥사엔산이고, 트리아실글리세롤 분획중 5중량% 미만의 지방산이 아라키돈산인 지질.

청구항 49

제47항 또는 제48항에 있어서,
5 이하의 과산화물 값을 갖는 지질.

청구항 50

제39항 내지 제49항중 어느 한 항에 있어서,
조질 오일인 지질.

청구항 51

26 이하의 아니시딘 값, 5 이하의 과산화물 값, 100ppm 이하의 인 함량 및 5중량% 미만의 유기 용매를 갖는 조질 미생물 지질.

청구항 52

70중량% 이상의 트라이글리세라이드 분획을 포함하되, 트라이글리세라이드 분획중 도코사헥사엔산 함량이 50중량% 이상이고, 트라이글리세라이드 분획중 도코사펜타엔산 n-6 함량이 0.5중량% 이상 내지 6중량%이고, 오일이 26 이하의 아니시딘 값을 갖는 추출된 미생물 지질.

청구항 53

70중량% 이상의 트라이글리세라이드 분획을 포함하되, 트라이글리세라이드 분획중 도코사헥사엔산 함량이 40중량% 이상이고, 트라이글리세라이드 분획중 도코사펜타엔산 n-6 함량이 0.5중량% 이상 내지 6중량%이고, 도코사헥사엔산 대 도코사펜타엔산 n-6의 비가 6:1 초과이고, 오일이 26 이하의 아니시딘 값을 갖는 추출된 미생물 지질.

청구항 54

약 70중량% 이상의 트라이글리세라이드 분획을 포함하되, 트라이글리세라이드 분획중 도코사헥사엔산 함량이 60중량% 이상이고, 오일이 26 이하의 아니시딘 값을 갖는 추출된 미생물 지질.

청구항 55

제52항 내지 제54항중 어느 한 항에 있어서,
오일이 5 이하의 과산화물 값을 갖는 추출된 미생물 지질.

청구항 56

제52항 내지 제55항중 어느 한 항에 있어서,
오일이 100ppm 이하의 인 함량을 갖는 추출된 미생물 지질.

청구항 57

제52항 내지 제56항중 어느 한 항에 있어서,
조질 오일인 추출된 미생물 지질.

청구항 58

제50항, 제51항 및 제57항중 어느 한 항에 따른 조질 지질을 정련하는 단계를 포함하는, 지질을 수득하는 방법.

청구항 59

제58항에 있어서,
정련하는 단계가 가성 정련, 탈검, 산 처리, 알칼리 처리, 표백, 탈취, 탈산성화 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 세포를 용해하는 단계, 세포의 pH를 상승시키고/시키거나 세포를 염과 접촉시키는 단계, 및 지질을 분리하는 단계에 의해, 지질을 세포로부터 수득하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 본 발명의 방법에 의해 제조된 지질에 관한 것이다. 본 발명은 또한 특정 아니시딘 값, 과산화물 값 및/또는 인 함량을 갖는 미생물 지질에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 미생물 세포로부터 지질, 예컨대 다가불포화 지방산을 수득하기 위한 전형적인 방법은 발효조, 폰드 또는 생물 반응기에서 목적 지질을 제조하고, 미생물 세포 생물질을 포함하는 발효 배양액을 분리하고, 미생물 세포 생물질을 건조하고, 용매 추출에 의해 지질을 분리할 수 있는 미생물을 성장시키는 것을 포함한다. 분리의 단계들

은 발효 배양액을 물로 희석하고, 희석된 배양액을 원심분리하고, 미생물 세포를 용해하고, 수-불혼화성을 지질이 용해성인 혼합물, 예컨대 헥산에 첨가함으로써 세포내 지질을 추출함을 포함한다.

[0003] 지질을 미생물 세포로부터 제거하는 다른 추출 방법은 세포 벽을 분열시키기 위한 기계력(예컨대, 균질화), 효소적 처리 또는 화학적 처리를 사용하여 발효 배양액에 세포를 용해하는 것이다. 지질은 유기 용매, 예컨대, 이소프로필 알콜을 사용하여 지질, 미생물 세포 생물질을 포함하는 생성된 조성물로부터 추출될 수 있다. 지질은 조성물로부터 기계적으로 분리될 수 있고, 알콜은 지질 및 수성 생물질 폐 스트림으로부터 제거되어야 한다 (예컨대, 국제특허출원공개 제01/76385호 및 제01/76715호 참고).

[0004] 그러나, 상기 방법을 사용하는 지질의 산업적인 규모 제조는 대량의 휘발성 및 가연성 유기 용매를 필요로 하고, 이에 의해 해로운 작동 조건을 야기한다. 추출 공정에서의 유기 용매의 사용은 또한 방폭 지질 회수 시스템의 사용을 필요로 하고, 이에 의해 지질 회수 비용이 추가된다. 또한, 미생물 세포로부터의 지질의 추출에서 유기 용매의 사용은 완전한 용매 회수 시스템 또는 적절한 처분 방법을 요구하는 유기 용매 폐 스트림을 발생시키고, 지질 추출의 전체 제조 비용을 더욱 증가시킨다. 예를 들어, 휘발성 유기 화합물(VOC) 방출에 대한 엄격한 제한은 보다 큰 인력을 필요로 하고, 용기 및 다른 장비에 대한 비용을 추가한다.

[0005] 따라서, 유기 용매를 사용하지 않고 세포로부터 지질을 수득하는 방법에 대한 요구가 존재한다. 수개의 방법이 유기 용매의 사용 없이 세포로부터의 지질의 분리를 위해 제안되었다. 예를 들어, 미국특허 제6,750,048호는 수성 세척 공정을 제시하고, 이에 의해 실질적으로 유화되지 않은 지질이 수득될 때까지 에멀전을 수성 세척 용액으로 세척한다. 그러나, 일부 양태에서, 이러한 방법은 다중 세척 단계를 필요로 하고, 이는 실질적인 비용 및 시간을 요구한다. 미국특허 제7,431,952호는 용해된 세포를 원심분리하여 세포 벽 파편을 제거하고, 이어서 오일을 추출하고 정제하는 방법을 개시한다. 그러나, 이러한 방법은 대규모 추가 정제를 필요로 하는 조질 오일을 제공한다. 따라서, 요구되는 것은 세포로부터 지질을 추출하는데 휘발성 용매를 이용하지 않고, 용이하게 이용가능한 장비 및 고순도 지질을 제공하기 위한 최소 수의 단계를 사용하여 수행될 수 있는 방법이다.

발명의 내용

[0006] 본 발명은 세포 조성물의 pH를 8 이상으로 상승시키는 단계, 및 지질을 세포로부터 분리하되, 지질이 선택적으로 5중량% 또는 5부피% 미만의 유기 용매를 함유하는, 지질로부터 미생물 세포 조성물을 수득하는 방법에 관한 것이다.

[0007] 일부 양태에서, pH를 상승시키는 단계는 세포 조성물을 용해한다. 일부 양태에서, pH를 상승시키는 단계는 세포 조성물을 항유화시킨다.

[0008] 일부 양태에서, 상기 방법은 염을 세포 조성물에 첨가하여 세포 조성물을 항유화시키는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 염을 첨가하는 단계는 pH를 상승시키는 단계 후에 수행된다.

[0009] 일부 양태에서, 상기 방법은 용해된 세포 조성물을 가열하여 세포 조성물을 항유화시키는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 가열하는 단계는 pH를 상승시키는 단계 후에 수행된다.

[0010] 일부 양태에서, 상기 방법을 세포 조성물의 pH를 다시 상승시켜 세포 조성물을 항유화시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 양태에서, pH를 다시 상승시키는 단계는 염을 첨가하는 단계 또는 가열하는 단계 후에 수행된다.

[0011] 본 발명은 또한 세포를 용해하여 용해된 세포 조성물을 형성하는 단계, 용해된 세포 조성물의 pH를 8 이상으로 상승시켜 세포 조성물을 항유화시키는 단계, 염을 용해된 세포 조성물에 첨가하여 세포 조성물을 항유화시키는 단계, 및 지질을 항유화된 세포 조성물로부터 분리하는 단계를 포함하되, 상기 지질이 5중량% 또는 5부피% 미만의 유기 용매를 함유하는, 지질을 세포로부터 수득하는 방법에 관한 것이다.

[0012] 본 발명은 세포 조성물의 pH를 8 이상으로 상승시켜 세포 조성물을 용해하고 세포 조성물을 항유화시키는 단계, 염을 세포 조성물에 첨가하는 단계, 및 지질을 항유화된 세포 조성물로부터 분리하는 단계를 포함하되, 지질이 선택적으로 5중량% 또는 5부피% 미만의 유기 용매를 함유하는, 지질을 세포 조성물로부터 수득하는 방법에 관한 것이다.

[0013] 본 발명은 또한 세포를 용해하여 용해된 세포 조성물을 형성하는 단계, 세포 조성물을 교반하여 세포 조성물을 항유화시키는 단계, 및 지질을 항유화된 세포 조성물로부터 분리하는 단계를 포함하되, 상기 지질이 선택적으로 5중량% 또는 5부피% 미만의 유기 용매를 함유하는, 지질을 세포로부터 수득하는 방법에 관한 것이다.

- [0014] 일부 양태에서, 상기 방법을 용해된 세포 조성물을 가열하여 세포 조성물을 항유화시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 양태에서, 가열하는 단계는 염을 첨가하는 단계 후에 수행된다.
- [0015] 일부 양태에서, 상기 방법은 용해된 세포 조성물을 교반하여 세포 조성물을 항유화시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 양태에서, 교반은 5분 내지 96시간 동안 수행된다.
- [0016] 일부 양태에서, 교반하는 단계는 350 내지 900cm/초의 팁 속도(tip speed)를 갖는 임펠러로 교반함을 포함한다.
- [0017] 일부 양태에서, 상기 방법은 용해된 세포 조성물의 pH를 상승시켜 세포 조성물을 항유화시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 양태에서, 용해된 세포 조성물의 pH를 상승시켜 세포 조성물을 항유화시키는 단계는 염기의 첨가를 포함한다. 일부 양태에서, 제2 염기는 염의 첨가 또는 가열 후에 첨가된다.
- [0018] 일부 양태에서, 가열은 10분 내지 96시간 동안 수행된다.
- [0019] 일부 양태에서, 세포 조성물은 60℃ 내지 100℃의 온도까지 가열된다. 일부 양태에서, 세포 조성물은 90℃ 내지 100℃의 온도까지 가열된다.
- [0020] 일부 양태에서, pH를 상승시키는 단계는 염기의 첨가를 포함한다. 일부 양태에서, 염기는 1 내지 12의 pK_b를 갖는다.
- [0021] 일부 양태에서, 지질의 분리는 10℃ 내지 100℃의 온도에서 발생한다.
- [0022] 일부 양태에서, 상기 방법은 휘젓기, 혼합, 배합, 진탕, 진동 또는 이들의 조합에 의해 용해된 세포 조성물을 교반하는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 상기 방법은 용해된 세포 조성물의 0.1hp/1000gal 내지 10hp/1000gal에서 용해된 세포 조성물을 교반하는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 상기 방법은 200ft/분 내지 1,000ft/분의 팁 속도를 갖는 교반기로 용해된 세포 조성물을 교반하는 단계를 포함한다.
- [0023] 일부 양태에서, 용해하는 단계는 기계적 처리, 물리적 처리, 화학적 처리, 효소적 처리 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 양태에서, 기계적 처리는 균질화이다.
- [0024] 일부 양태에서, 염은 용해된 세포 조성물을 기준으로 0.1 내지 20%의 양으로 첨가된다. 일부 양태에서, 염은 용해된 세포 조성물에 용해된 세포 조성물의 중량을 기준으로 0.5 내지 15%의 양으로 첨가된다. 일부 양태에서, 염은 용해된 세포 조성물에 용해된 세포 조성물의 중량을 기준으로 2 내지 10%의 양으로 첨가된다.
- [0025] 일부 양태에서, 염은 알칼리 금속 염, 알칼리토 금속 염, 설페이트 염 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 양태에서, 염은 나트륨 클로라이드이다. 일부 양태에서, 염은 나트륨 설페이트이다.
- [0026] 일부 양태에서, 분리하는 단계는 원심분리를 포함한다. 일부 양태에서, 분리는 30℃ 내지 90℃의 온도에서의 원심분리를 포함한다.
- [0027] 일부 양태에서, 상기 방법은 50중량% 이상의 트라이글리세라이드를 포함하는 지질을 제공한다.
- [0028] 일부 양태에서, 상기 방법은 26 이하, 25 이하, 20 이하, 15 이하, 10 이하, 5 이하, 2 이하 또는 1 이하의 아니시딘 값을 갖는 지질을 제공한다.
- [0029] 일부 양태에서, 상기 방법은 5 이하, 4.5 이하, 4 이하, 3.5 이하, 3 이하, 2.5 이하, 2 이하, 1.5 이하, 1 이하, 0.5 이하, 0.2 이하 또는 0.1 이하의 과산화물 값을 갖는 지질을 제공한다.
- [0030] 일부 양태에서, 상기 방법은 100ppm 이하, 95ppm 이하, 90ppm 이하, 85ppm 이하, 80ppm 이하, 75ppm 이하, 70ppm 이하, 65ppm 이하, 60ppm 이하, 55ppm 이하, 50ppm 이하, 45ppm 이하, 40ppm 이하, 35ppm 이하, 30ppm 이하, 25ppm 이하, 20ppm 이하, 15ppm 이하, 10ppm 이하, 5ppm 이하, 4ppm 이하, 3ppm 이하, 2ppm 이하 또는 1ppm 이하의 인 함량을 갖는 지질을 제공한다.
- [0031] 일부 양태에서, 상기 방법은 중량을 기준으로 10% 이상, 15% 이상, 20% 이상, 25% 이상, 30% 이상, 35% 이상, 40% 이상, 45% 이상 또는 50% 이상의 목적 다가불포화 지방산(PUFA)을 포함한다. 일부 양태에서, 상기 방법은 중량을 기준으로 10% 이상, 15% 이상, 20% 이상, 25% 이상, 30% 이상, 35% 이상, 40% 이상, 45% 이상 또는 50% 중량% 이상의 도코사헥사엔산("DHA"), 및/또는 중량을 기준으로 10% 이상, 15% 이상 또는 20% 이상의 도코사펜타엔산("DPA n-6"), 및/또는 중량을 기준으로 10% 이상, 15% 이상 또는 20% 이상의 아이코사펜타엔산("EPA"), 및/또는 중량을 기준으로 10% 이상, 15% 이상, 20% 이상, 25% 이상, 30% 이상, 35% 이상, 40% 이상, 45% 이상 또는 50% 이상의 아라키돈산("ARA")을 갖는 지질을 제공한다.

- [0032] 일부 양태에서, 세포는 미생물 세포이다. 일부 양태에서, 상기 방법은 미생물 세포를 포함하는 발효 배양액을 농축하는 단계를 포함한다.
- [0033] 일부 양태에서, 세포는 종유이다. 일부 양태에서, 종유는 해바라기씨, 카놀라씨, 평지씨, 아마씨, 피마자유씨, 코리엔더씨, 칼렌둘라씨, 및 이들의 유전적으로 변형된 변이체로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0034] 일부 양태에서, 상기 방법은 세포 또는 세포 조성물을 세척하는 단계를 포함한다.
- [0035] 일부 양태에서, 상기 방법은 세포 또는 세포 조성물을 파스퇴르화시키는 방법을 포함한다.
- [0036] 일부 양태에서, 상기 방법은 용해된 세포 조성물을 농축시키는 단계를 포함한다.
- [0037] 일부 양태에서, 상기 방법은 지질을 정련하는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 정련하는 단계는 가성 정련, 탈검, 산 처리, 알칼리 처리, 냉각, 가열, 표백, 탈취, 탈산성화 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0038] 일부 양태에서, 상기 방법은 지질을 수확하는 단계를 포함하고, 이때 수확하는 단계는 교반 없이 지질을 펄핑하는 단계를 포함한다.
- [0039] 본 발명은 또한 본 발명의 방법중 어느 하나에 의해 수득된다.
- [0040] 일부 양태에서, 지질은 하나 이상의 다가불포화 지방산을 포함한다. 일부 양태에서, 지질은 중량을 기준으로 10% 이상, 15% 이상, 20% 이상, 25% 이상, 30% 이상, 35% 이상, 40% 이상, 45% 이상 또는 50% 이상의 PUFA를 포함한다. 일부 양태에서, 지질은 중량을 기준으로 10% 이상, 15% 이상, 20% 이상, 25% 이상, 30% 이상, 35% 이상, 40% 이상, 45% 이상 또는 50% 이상의 DHA, 및/또는 중량을 기준으로 10% 이상, 15% 이상 또는 20% 이상의 DPA n-6, 및/또는 중량을 기준으로 10% 이상, 15% 이상 또는 20% 이상의 EPA, 및/또는 중량을 기준으로 10% 이상, 15% 이상, 20% 이상, 25% 이상, 30% 이상, 35% 이상, 40% 이상, 45% 이상 또는 50% 이상의 ARA를 갖는다.
- [0041] 일부 양태에서, 지질은 3 이하의 전체 아로마 강도를 갖는다. 일부 양태에서, 지질은 2 이하의 전체 아로마틱 강도를 갖는다.
- [0042] 일부 양태에서, 지질은 10중량% 이상의 트리아실글리세롤 분획을 포함하고, 이때 트리아실글리세롤 분획중 12중량% 이상의 지방산은 아이코사헵타엔산이고, 트리아실글리세롤 분획중 25중량% 이상의 지방산은 도코사헥사엔산이고, 트리아실글리세롤 분획중 5중량% 미만의 지방산은 아라키돈산이다.
- [0043] 일부 양태에서, 지질은 20중량% 이상의 아이코사헵타엔산, 및 각각 5중량% 미만의 아라키돈산, 도코사헵타엔산 n-6, 올레산, 리놀레산, 리놀렌산, 아이코센산, 에루크산 및 스테아리돈산을 포함한다.
- [0044] 일부 양태에서, 지질은 26 이하, 25 이하, 20 이하, 15 이하, 10 이하, 5 이하, 2 이하 또는 1 이하의 아니시딘 값, 및/또는 5 이하, 4.5 이하, 4 이하, 3.5 이하, 3 이하, 2.5 이하, 2 이하, 1.5 이하, 1 이하, 0.5 이하, 0.2 이하 또는 0.1 이하의 과산화물 값, 및/또는 100ppm 이하, 95ppm 이하, 90ppm 이하, 85ppm 이하, 80ppm 이하, 75ppm 이하, 70ppm 이하, 65ppm 이하, 60ppm 이하, 55ppm 이하, 50ppm 이하, 45ppm 이하, 40ppm 이하, 35ppm 이하, 30ppm 이하, 25ppm 이하, 20ppm 이하, 15ppm 이하, 10ppm 이하, 5ppm 이하, 4ppm 이하, 3ppm 이하, 2ppm 이하 또는 1ppm 이하의 인 함량을 갖는다.
- [0045] 일부 양태에서, 지질은 조질 지질이다. 일부 양태에서, 조질 지질은 선택적으로 5중량% 또는 5부피% 미만의 유기 용매를 갖는다.
- [0046] 본 발명은 또한 26 이하의 아니시딘 값, 5 이하의 과산화물 값, 100ppm 이하의 인 함량 및 선택적으로 5중량% 또는 5부피% 미만의 유기 용매를 갖는 조질 미생물 지질에 관한 것이다.
- [0047] 일부 양태에서, 조질 미생물 지질은 26 이하, 25 이하, 20 이하, 15 이하, 10 이하, 5 이하, 2 이하 또는 1 이하의 아니시딘 값, 및/또는 5 이하, 4.5 이하, 4 이하, 3.5 이하, 3 이하, 2.5 이하, 2 이하, 1.5 이하, 1 이하, 0.5 이하, 0.2 이하 또는 0.1 이하의 과산화물 값, 및/또는 100ppm 이하, 95ppm 이하, 90ppm 이하, 85ppm 이하, 80ppm 이하, 75ppm 이하, 70ppm 이하, 65ppm 이하, 60ppm 이하, 55ppm 이하, 50ppm 이하, 45ppm 이하, 40ppm 이하, 35ppm 이하, 30ppm 이하, 25ppm 이하, 20ppm 이하, 15ppm 이하, 10ppm 이하, 5ppm 이하, 4ppm 이하, 3ppm 이하, 2ppm 이하 또는 1ppm 이하의 인 함량을 갖는다.
- [0048] 일부 양태에서, 조질 미생물 지질은 중량을 기준으로 10% 이상, 15% 이상, 20% 이상, 25% 이상, 30% 이상, 35% 이상, 40% 이상, 45% 이상 또는 50% 이상의 목적 PUFA를 갖는다. 일부 양태에서, 조질 미생물 지질은 중량을

기준으로 10% 이상, 15% 이상, 20% 이상, 25% 이상, 30% 이상, 35% 이상, 40% 이상, 45% 이상 또는 50% 이상의 DHA, 및/또는 10% 이상, 15% 이상 또는 20% 이상의 DPA n-6, 및/또는 중량을 기준으로 10% 이상, 15% 이상 또는 20% 이상의 EPA, 및/또는 중량을 기준으로 10% 이상, 15% 이상, 20% 이상, 25% 이상, 30% 이상, 35% 이상, 40% 이상, 45% 이상 또는 50% 이상의 ARA를 갖는다.

[0049] 본 발명은 또한 70중량% 이상의 트라이글리세라이드 분획을 포함하는 추출된 미생물 지질에 관한 것이고, 이때 트라이글리세라이드 분획중 도코사헥사엔산 함량은 50중량% 이상이고, 트라이글리세라이드 분획중 도코사펜타엔산 n-6 함량은 적어도 0.5 내지 6중량%이고, 오일은 26 이하의 아니시딘 값을 갖는다.

[0050] 본 발명은 또한 70중량% 이상의 트라이글리세라이드 분획을 포함하되, 트라이글리세라이드 분획중 도코사헥사엔산 함량이 40중량% 이상이고, 트라이글리세라이드 분획중 도코사펜타엔산 n-6 함량이 적어도 0.5 내지 6중량%이고, 도코사헥사엔산 대 도코사펜타엔산 n-6의 비가 6:1 초과이고, 오일이 26 이하의 아니시딘 값을 갖는 추출된 미생물 지질에 관한 것이다.

[0051] 본 발명은 또한 70중량% 이상의 트라이글리세라이드 분획을 포함하는 추출된 미생물 지질에 관한 것이고, 이때 트라이글리세라이드 분획중 도코사헥사엔산 함량은 60중량% 이상이고, 오일은 26 이하의 아니시딘 값을 갖는다.

[0052] 일부 양태에서, 추출된 지질은 26 이하, 25 이하, 20 이하, 15 이하, 10 이하, 5 이하, 2 이하 또는 1 이하의 아니시딘 값, 및/또는 5 이하, 4.5 이하, 4 이하, 3.5 이하, 3 이하, 2.5 이하, 2 이하, 1.5 이하, 1 이하, 0.5 이하, 0.2 이하 또는 0.1 이하의 과산화물 값, 및/또는 100ppm 이하, 95ppm 이하, 90ppm 이하, 85ppm 이하, 80ppm 이하, 75ppm 이하, 70ppm 이하, 65ppm 이하, 60ppm 이하, 55ppm 이하, 50ppm 이하, 45ppm 이하, 40ppm 이하, 35ppm 이하, 30ppm 이하, 25ppm 이하, 20ppm 이하, 15ppm 이하, 10ppm 이하, 5ppm 이하, 4ppm 이하, 3ppm 이하, 2ppm 이하 또는 1ppm 이하의 인 함량을 갖는다.

[0053] 일부 양태에서, 추출된 미생물 지질은 조질 지질 또는 조질 오일이다. 일부 양태에서, 조질 지질은 선택적으로 5중량% 또는 5부피% 미만의 유기 용매를 갖는다.

[0054] 본 발명은 또한 본 발명의 조질 지질을 정련하는 단계를 포함하는, 지질을 수득하는 방법에 관한 것이다. 일부 양태에서, 정련하는 단계는 가성 정련, 탈검, 산 처리, 알칼리 처리, 냉각, 가열, 표백, 탈취, 탈산성화 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

도면의 간단한 설명

[0055] 본원에 혼입되고 명세서의 일부를 형성하는 첨부된 도면은 본 발명을 설명하고, 명세서와 함께 또한 본 발명의 원리를 설명하고, 당업자가 본 발명을 수행하고 사용하도록 하는 역할을 한다.

도 1 내지 4는 본 발명의 방법을 기술하는 개략적인 흐름도를 제공한다.

도 5는 다양한 pH에서 용해된 세포 조성물의 시간에 걸친 전자 쌍자성 공명(EPR)을 제공하는 역할을 한다.

본 발명은 이제 첨부된 도면을 참고하여 기술될 것이다. 도면에서, 유사한 참고 번호는 동일하거나 기능적으로 유사한 요소를 포함한다. 또한, 참고 번호의 최좌측 숫자는 참고 번호가 처음 나타나는 도면을 확인할 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0056] 본 발명은 세포 조성물의 pH를 8 이상으로 상승시키는 단계, 및 지질을 세포 조성물로부터 분리하는 단계를 포함하되, 상기 지질이 선택적으로 5중량% 또는 5부피% 미만의 유기 용매를 함유하는, 지질을 미생물 세포 조성물로부터 수득하는 방법에 관한 것이다. 일부 양태에서, 상기 방법은 염을 세포 조성물에 첨가하여 세포 조성물을 항유화시키는 단계, 세포를 가열하여 세포 조성물을 항유화시키는 단계, 세포 조성물을 교반하여 세포 조성물을 항유화시키는 단계, 및 세포 조성물의 pH를 다시 상승시켜 세포 조성물을 항유화시키는 단계중 하나 이상을 추가로 포함한다.

[0057] 본 발명은 또한 세포를 용해하여 용해된 세포 조성물을 형성하는 단계, 용해된 세포 조성물의 pH를 8 이상으로 상승시켜 세포 조성물을 항유화시키는 단계, 염을 용해된 세포 조성물에 첨가하여 세포 조성물을 항유화시키는 단계, 및 지질을 항유화된 세포 조성물로부터 분리하는 단계를 포함하되, 상기 지질이 선택적으로 5중량% 또는 5부피% 미만의 유기 용매를 함유하는, 지질을 세포로부터 수득하는 방법에 관한 것이다. 세포는 미생물 세포

또는 중유 세포일 수 있다. 일부 양태에서, 상기 방법은 용해된 세포 조성물을 가열하여 세포 조성물을 항유화시키는 단계, 용해된 세포 조성물을 교반하여 세포 조성물을 항유화시키는 단계, 및 용해된 세포 조성물의 pH를 다시 상승시켜 세포 조성물을 항유화시키는 단계중 하나 이상을 추가로 포함한다.

[0058] 본 발명은 세포 조성물의 pH를 8 이상으로 상승시켜 세포 조성물을 용해하고 세포 조성물을 항유화시키는 단계, 염을 세포 조성물에 첨가하는 단계, 및 지질을 항유화된 세포 조성물로부터 분리하는 단계를 포함하되, 상기 지질이 선택적으로 5중량% 또는 5부피% 미만의 유기 용매를 함유하는, 지질을 세포 조성물로부터 수득하는 방법에 관한 것이다. 일부 양태에서, 상기 방법은 세포 조성물을 가열하여 세포 조성물을 항유화시키는 단계, 세포 조성물을 교반하여 세포 조성물을 항유화시키는 단계, 및 세포 조성물의 pH를 다시 상승시켜 세포 조성물을 항유화시키는 단계중 하나 이상을 추가로 포함한다.

[0059] 본 발명은 미생물 세포를 용해하여 용해된 세포 조성물을 형성하는 단계, 염기를 용해된 세포 조성물에 첨가하여 세포 조성물을 항유화시키는 단계, 및 지질을 항유화된 세포 조성물로부터 분리하는 단계를 포함하되, 상기 지질이 선택적으로 5중량% 또는 5부피% 미만의 유기 용매를 함유하는, 지질을 미생물 세포로부터 수득하는 방법에 관한 것이다. 일부 양태에서, 상기 방법은 염을 용해된 세포 조성물에 첨가하여 세포 조성물을 항유화시키는 단계, 용해된 세포 조성물을 가열하여 세포 조성물을 항유화시키는 단계, 용해된 세포 조성물을 교반하여 세포 조성물을 항유화시키는 단계, 및 제2 염기를 용해된 세포 조성물에 첨가하여 세포 조성물을 항유화시키는 단계중 하나 이상을 추가로 포함한다.

[0060] 본 발명은 또한 세포를 용해하여 용해된 세포 조성물을 형성하는 단계, 염기를 용해된 세포 조성물에 첨가하여 세포 조성물을 항유화시키는 단계, 염을 용해된 세포 조성물에 첨가하여 세포 조성물을 항유화시키는 단계, 및 지질을 항유화된 세포 조성물로부터 분리하는 단계를 포함하되, 상기 지질이 선택적으로 5중량% 또는 5부피% 미만의 유기 용매를 함유하는, 지질을 세포로부터 수득하는 방법에 관한 것이다. 세포는 미생물 세포 또는 중유 세포일 수 있다. 일부 양태에서, 상기 방법은 하나 이상의 다음 단계를 추가로 포함한다: 용해된 세포 조성물을 가열하여 세포 조성물을 항유화시키는 단계, 용해된 세포 조성물을 교반하여 세포 조성물을 항유화시키는 단계, 및 제2 염기를 용해된 세포 조성물에 첨가하여 세포 조성물을 항유화시키는 단계.

[0061] 본 발명은 또한 세포를 용해하여 용해된 세포 조성물을 형성하는 단계, 세포 조성물을 교반하여 세포 조성물을 항유화시키는 단계, 및 지질을 항유화된 세포 조성물로부터 분리하는 단계를 포함하되, 상기 지질이 선택적으로 5중량% 또는 5부피% 미만의 유기 용매를 함유하는, 지질을 세포로부터 수득하는 방법에 관한 것이다.

[0062] 본 발명은 또한 본 발명의 방법중 어느 하나에 의해 수득된 지질에 관한 것이다.

[0063] 본 발명은 또한 세포를 용해하여 용해된 세포 조성물을 형성하는 단계, 용해된 세포 조성물을 제1 염기와 접촉시키는 단계, 용해된 세포 조성물을 염과 접촉시키는 단계, 용해된 세포 조성물을 5분 내지 96시간 동안 가열하는 단계, 용해된 세포 조성물을 제2 염기와 접촉시키는 단계, 및 지질을 용해된 세포 조성물로부터 10℃ 내지 100℃의 온도에서 분리하는 단계를 포함하는, 지질을 세포로부터 수득하는 추출 방법에 관한 것이다.

[0064] 본 발명은 또한 세포를 용해하여 용해된 세포 조성물을 형성하는 단계, 용해된 세포 조성물을 염과 접촉시키는 단계, 용해된 세포 조성물을 5분 내지 96시간 동안 교반하여 처리된 용해된 세포 조성물을 제공하는 단계, 및 지질을 처리된 용해된 세포 조성물로부터 10℃ 내지 100℃의 온도에서 분리하는 단계를 포함하는, 지질을 세포로부터 수득하는 추출 방법에 관한 것이다.

[0065] 본 발명은 또한 세포를 용해하여 용해된 세포 조성물을 형성하는 단계, 용해된 세포 조성물을 염과 접촉시키는 단계, 및 지질을 용해된 세포 조성물로부터 10℃ 내지 100℃의 온도에서 분리하는 단계를 포함하는 지질을 세포로부터 수득하는 추출 방법에 관한 것이다.

[0066] 일부 양태에서, 염기 또는 제2 염기는 1 내지 12의 pK_b를 갖는다. 일부 양태에서, 염기 또는 제2 염기는 3 내지 5의 pK_b를 갖는다.

[0067] 일부 양태에서, 방법은 용해된 세포 조성물을 5분 내지 96시간, 10분 내지 96시간, 10분 내지 4시간, 12시간 내지 84시간 또는 24시간 내지 72시간 동안 교반하는 단계를 포함한다.

[0068] 일부 양태에서, 상기 방법은 교반, 혼합, 배합, 진탕, 진동 또는 이들의 조합에 의해 용해된 세포 조성물을 교반하는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 상기 방법은 용해된 세포 조성물의 0.1hp/1000gal 내지 10hp/1000gal로 용해된 세포 조성물을 교반하는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 상기 방법은 200ft/분 내지 1000ft/분의

임펠러 팁 속도로 교반기를 갖는 용해된 세포 조성물을 교반하는 단계를 포함한다.

- [0069] 일부 양태에서, 용해하는 단계는 기계적 처리, 물리적 처리, 화학적 처리, 효소적 처리 및 이들의 조합으로부터 선택된 공정을 포함한다.
- [0070] 일부 양태에서, 용해된 세포 조성물은 0.1 내지 20중량%, 0.5 내지 15중량% 또는 2 내지 10중량%의 용해된 세포 조성물의 양으로 염과 접촉된다.
- [0071] 일부 양태에서, 염은 알칼리 금속 염, 알칼리토 금속 염, 설페이트 염 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 양태에서, 염은 나트륨 클로라이드. 일부 양태에서, 염은 나트륨 설페이트이다.
- [0072] 일부 양태에서, 상기 방법은 용해된 세포 조성물을 5분 내지 96시간, 10분 내지 4시간, 12시간 내지 84시간 또는 24시간 내지 72시간 동안 가열하는 단계를 포함한다.
- [0073] 일부 양태에서, 분리하는 단계는 원심분리를 포함한다. 일부 양태에서, 분리하는 단계는 10℃ 내지 100℃의 온도에서의 원심분리를 포함한다.
- [0074] 일부 양태에서, 상기 방법은 세포를 포함하는 배양액의 용해 전 세척, 원심분리, 증발 또는 이들의 조합을 포함한다.
- [0075] 일부 양태에서, 상기 방법은 15의 아니시딘 값을 갖는 지질을 제공한다. 일부 양태에서, 상기 방법은 50중량% 이상 트라이글리세라이드를 포함하는 지질을 제공한다.
- [0076] 일부 양태에서, 상기 방법은 유기 용매를 용해된 세포 조성물에 첨가하지 않는다. 유기 용매는 극성 용매, 비-극성 용매, 수-혼화성 용매, 수-불혼화성 용매 및 이들의 조합을 포함한다.
- [0077] 일부 양태에서, 상기 방법은 세포를 포함하는 배양액을 농축하는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 상기 방법은 용해된 세포 조성물을 농축하는 단계를 포함한다.
- [0078] 본 발명은 또한 본원에 기술된 방법에 의해 제조된 지질에 관한 것이다. 일부 양태에서, 지질은 하나 이상의 다가불포화 지방산을 포함한다. 일부 양태에서, 지질은 10% 이상, 15% 이상, 20% 이상, 25% 이상, 30% 이상, 35% 이상, 40% 이상, 45% 이상 또는 50중량% 이상의 목적 PUFA를 포함한다. 일부 양태에서, 지질은 10% 이상, 15% 이상, 20% 이상, 25% 이상, 30% 이상, 35% 이상, 40% 이상, 45% 이상 또는 50중량% 이상의 DHA, 및/또는 10% 이상, 15% 이상 또는 20중량% 이상의 DPA n-6, 및/또는 10% 이상, 15% 이상 또는 20중량% 이상의 EPA, 및/또는 10% 이상, 15% 이상, 20% 이상, 25% 이상, 30% 이상, 35% 이상, 40% 이상, 45% 이상 또는 50중량% 이상의 ARA를 갖는다. 일부 양태에서, 지질은 26 이하, 25 이하, 20 이하, 15 이하, 10 이하, 5 이하, 2 이하 또는 1 이하의 아니시딘 값, 및/또는 5 이하, 4.5 이하, 4 이하, 3.5 이하, 3 이하, 2.5 이하, 2 이하, 1.5 이하, 1 이하, 0.5 이하, 0.2 이하 또는 0.1 이하의 과산화물 값, 및/또는 100ppm 이하, 95ppm 이하, 90ppm 이하, 85ppm 이하, 80ppm 이하, 75ppm 이하, 70ppm 이하, 65ppm 이하, 60ppm 이하, 55ppm 이하, 50ppm 이하, 45ppm 이하, 40ppm 이하, 35ppm 이하, 30ppm 이하, 25ppm 이하, 20ppm 이하, 15ppm 이하, 10ppm 이하, 5ppm 이하, 4ppm 이하, 3ppm 이하, 2ppm 이하 또는 1ppm 이하의 인 함량을 갖는다.
- [0079] 일부 양태에서, 지질은 10중량% 이상의 트리아실글리세롤 분획을 포함하되, 이때 트리아실글리세롤 분획중 12중량% 이상의 지방산은 아이코사헵타엔산이고, 트리아실글리세롤 분획중 25중량% 이상의 지방산은 도코사헥사엔산이고, 트리아실글리세롤 분획중 5중량% 미만의 지방산은 아라키돈산이다. 일부 양태에서, 지질은 26 이하, 25 이하, 20 이하, 15 이하, 10 이하, 5 이하, 2 이하 또는 1 이하의 아니시딘 값, 및/또는 5 이하, 4.5 이하, 4 이하, 3.5 이하, 3 이하, 2.5 이하, 2 이하, 1.5 이하, 1 이하, 0.5 이하, 0.2 이하 또는 0.1 이하의 과산화물 값, 및/또는 100ppm 이하, 95ppm 이하, 90ppm 이하, 85ppm 이하, 80ppm 이하, 75ppm 이하, 70ppm 이하, 65ppm 이하, 60ppm 이하, 55ppm 이하, 50ppm 이하, 45ppm 이하, 40ppm 이하, 35ppm 이하, 30ppm 이하, 25ppm 이하, 20ppm 이하, 15ppm 이하, 10ppm 이하, 5ppm 이하, 4ppm 이하, 3ppm 이하, 2ppm 이하 또는 1ppm 이하의 인 함량을 갖는다. 일부 양태에서, 지질은 조질 지질이다.
- [0080] 일부 양태에서, 지질은 20중량% 이상의 아이코사헵타엔산, 및 각각 5중량% 미만의 아라키돈산, 도코사헵타엔산 n-6, 올레산, 리놀레산, 리놀렌산, 아이코센산, 에루크산 및 스테아리돈산을 포함한다. 일부 양태에서, 지질은 26 이하, 25 이하, 20 이하, 15 이하, 10 이하, 5 이하, 2 이하 또는 1 이하의 아니시딘 값, 및/또는 5 이하, 4.5 이하, 4 이하, 3.5 이하, 3 이하, 2.5 이하, 2 이하, 1.5 이하, 1 이하, 0.5 이하, 0.2 이하 또는 0.1 이하의 과산화물 값, 및/또는 100ppm 이하, 95ppm 이하, 90ppm 이하, 85ppm 이하, 80ppm 이하, 75ppm 이하, 70ppm 이하, 65ppm 이하, 60ppm 이하, 55ppm 이하, 50ppm 이하, 45ppm 이하, 40ppm 이하, 35ppm 이하, 30ppm

이하, 25ppm 이하, 20ppm 이하, 15ppm 이하, 10ppm 이하, 5ppm 이하, 4ppm 이하, 3ppm 이하, 2ppm 이하 또는 1ppm 이하의 인 함량을 갖는다. 일부 양태에서, 지질은 조질 오일이다.

[0081] 본 발명은 또한 26 이하의 아니시딘 값, 5 이하의 과산화물 값, 100ppm 이하의 인 함량, 및 선택적으로 5중량% 또는 5부피% 미만의 유기 용매를 갖는 조질 미생물 지질에 관한 것이다. 일부 양태에서, 조질 미생물 지질은 26 이하, 25 이하, 20 이하, 15 이하, 10 이하, 5 이하, 2 이하 또는 1 이하의 아니시딘 값, 및/또는 5 이하, 4.5 이하, 4 이하, 3.5 이하, 3 이하, 2.5 이하, 2 이하, 1.5 이하, 1 이하, 0.5 이하, 0.2 이하 또는 0.1 이하의 과산화물 값, 및/또는 100ppm 이하, 95ppm 이하, 90ppm 이하, 85ppm 이하, 80ppm 이하, 75ppm 이하, 70ppm 이하, 65ppm 이하, 60ppm 이하, 55ppm 이하, 50ppm 이하, 45ppm 이하, 40ppm 이하, 35ppm 이하, 30ppm 이하, 25ppm 이하, 20ppm 이하, 15ppm 이하, 10ppm 이하, 5ppm 이하, 4ppm 이하, 3ppm 이하, 2ppm 이하 또는 1ppm 이하의 인 함량을 갖는다. 일부 양태에서, 조질 미생물 지질은 10% 이상, 15% 이상, 20% 이상, 25% 이상, 30% 이상, 35% 이상, 40% 이상, 45% 이상 또는 50중량% 이상의 목적 PUFA를 갖는다. 일부 양태에서, 조질 미생물 지질은 10% 이상, 15% 이상, 20% 이상, 25% 이상, 30% 이상, 35% 이상, 40% 이상, 45% 이상 또는 50중량% 이상의 DHA, 및/또는 10% 이상, 15% 이상 또는 20중량% 이상의 DPA n-6, 및/또는 10% 이상, 15% 이상 또는 20중량% 이상의 EPA, 및/또는 10% 이상, 15% 이상, 20% 이상, 25% 이상, 30% 이상, 35% 이상, 40% 이상, 45% 이상 또는 50중량% 이상의 ARA를 갖는다.

[0082] 본 발명은 또한 70중량% 이상의 트라이글리세라이드 분획을 포함하되, 트라이글리세라이드 분획중 도코사헥사엔산 함량이 50중량% 이상이고, 트라이글리세라이드 분획중 도코사헥타엔산 n-6 함량이 적어도 0.5 내지 6중량%이고, 오일이 26 이하의 아니시딘 값을 갖는 추출된 미생물 지질에 관한 것이다. 일부 양태에서, 추출된 지질은 26 이하, 25 이하, 20 이하, 15 이하, 10 이하, 5 이하, 2 이하 또는 1 이하의 아니시딘 값, 및/또는 5 이하, 4.5 이하, 4 이하, 3.5 이하, 3 이하, 2.5 이하, 2 이하, 1.5 이하, 1 이하, 0.5 이하, 0.2 이하 또는 0.1 이하의 과산화물 값, 및/또는 100ppm 이하, 95ppm 이하, 90ppm 이하, 85ppm 이하, 80ppm 이하, 75ppm 이하, 70ppm 이하, 65ppm 이하, 60ppm 이하, 55ppm 이하, 50ppm 이하, 45ppm 이하, 40ppm 이하, 35ppm 이하, 30ppm 이하, 25ppm 이하, 20ppm 이하, 15ppm 이하, 10ppm 이하, 5ppm 이하, 4ppm 이하, 3ppm 이하, 2ppm 이하 또는 1ppm 이하의 인 함량을 갖는다. 일부 양태에서, 추출된 지질은 조질 지질이다.

[0083] 본 발명은 또한 70중량% 이상의 트라이글리세라이드 분획을 포함하되, 트라이글리세라이드 분획중 도코사헥사엔산 함량이 40중량% 이상이고, 트라이글리세라이드 분획중 도코사헥타엔산 n-6 함량이 적어도 0.5 내지 6중량%이고, 도코사헥사엔산 대 도코사헥타엔산 n-6의 비가 6:1 초과이고, 오일이 26 이하의 아니시딘 값을 갖는 추출된 미생물 지질에 관한 것이다. 일부 양태에서, 추출된 지질은 26 이하, 25 이하, 20 이하, 15 이하, 10 이하, 5 이하, 2 이하 또는 1 이하의 아니시딘 값, 및/또는 5 이하, 4.5 이하, 4 이하, 3.5 이하, 3 이하, 2.5 이하, 2 이하, 1.5 이하, 1 이하, 0.5 이하, 0.2 이하 또는 0.1 이하의 과산화물 값, 및/또는 100ppm 이하, 95ppm 이하, 90ppm 이하, 85ppm 이하, 80ppm 이하, 75ppm 이하, 70ppm 이하, 65ppm 이하, 60ppm 이하, 55ppm 이하, 50ppm 이하, 45ppm 이하, 40ppm 이하, 35ppm 이하, 30ppm 이하, 25ppm 이하, 20ppm 이하, 15ppm 이하, 10ppm 이하, 5ppm 이하, 4ppm 이하, 3ppm 이하, 2ppm 이하 또는 1ppm 이하의 인 함량을 갖는다. 일부 양태에서, 추출된 지질은 조질 지질이다.

[0084] 본 발명은 또한 약 70중량% 이상의 트라이글리세라이드 분획을 포함하되, 트라이글리세라이드 분획중 도코사헥사엔산 함량이 60중량% 이상이고, 오일이 26 이하의 아니시딘 값을 갖는 추출된 미생물 지질에 관한 것이다. 일부 양태에서, 추출된 지질은 26 이하, 25 이하, 20 이하, 15 이하, 10 이하, 5 이하, 2 이하 또는 1 이하의 아니시딘 값, 및/또는 5 이하, 4.5 이하, 4 이하, 3.5 이하, 3 이하, 2.5 이하, 2 이하, 1.5 이하, 1 이하, 0.5 이하, 0.2 이하 또는 0.1 이하의 과산화물 값, 및/또는 100ppm 이하, 95ppm 이하, 90ppm 이하, 85ppm 이하, 80ppm 이하, 75ppm 이하, 70ppm 이하, 65ppm 이하, 60ppm 이하, 55ppm 이하, 50ppm 이하, 45ppm 이하, 40ppm 이하, 35ppm 이하, 30ppm 이하, 25ppm 이하, 20ppm 이하, 15ppm 이하, 10ppm 이하, 5ppm 이하, 4ppm 이하, 3ppm 이하, 2ppm 이하 또는 1ppm 이하의 인 함량을 갖는다. 일부 양태에서, 추출된 지질은 조질 지질이다.

[0085] 본 발명은 또한 종 크립테코디니움 코니이(*Cryptocodinium cohnii*)의 미생물로부터 추출되고, 100ppm 이하의 인 함량을 갖는 조질 지질에 관한 것이다. 일부 양태에서, 조질 지질은 26 이하, 25 이하, 20 이하, 15 이하, 10 이하, 5 이하, 2 이하 또는 1 이하의 아니시딘 값, 및/또는 5 이하, 4.5 이하, 4 이하, 3.5 이하, 3 이하, 2.5 이하, 2 이하, 1.5 이하, 1 이하, 0.5 이하, 0.2 이하 또는 0.1 이하의 과산화물 값, 및/또는 100ppm 이하, 95ppm 이하, 90ppm 이하, 85ppm 이하, 80ppm 이하, 75ppm 이하, 70ppm 이하, 65ppm 이하, 60ppm 이하, 55ppm 이하, 50ppm 이하, 45ppm 이하, 40ppm 이하, 35ppm 이하, 30ppm 이하, 25ppm 이하, 20ppm 이하, 15ppm

이하, 10ppm 이하, 5ppm 이하, 4ppm 이하, 3ppm 이하, 2ppm 이하 또는 1ppm 이하의 인 함량을 갖는다.

[0086] 본 발명은 또한 본 발명의 조질 지질을 정련하는 단계를 포함하는, 지질을 수득하는 방법에 관한 것이다. 일부 양태에서, 정련하는 단계는 가성 정련, 탈검, 산 처리, 알칼리 처리, 냉각, 가열, 표백, 탈취, 탈산성화 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0087] **개관**

[0088] 일반적으로, 본 발명의 방법은 지질을 추출하거나 달리 분리하기 위하여 유기 용매를 이용하지 않는다. 따라서, 일부 양태에서, 유기 용매는, 본 발명의 방법중에 지질을 추출하기에 충분한 양 또는 농도로 식물 물질을 포함하는 세포 배양액 또는 미생물 세포를 포함하는 발효 배양액에 첨가되지 않거나, 세포 조성물에 첨가되지 않거나, 용해된 세포 조성물에 첨가되지 않거나, 지질에 첨가되지 않는다. 일부 양태에서, 유기 용매는 세포 조성물, 용해된 세포 조성물 또는 항유화된 세포 조성물에 첨가될 수 있다. 이러한 양태에서, 유기 용매는 부피를 기준으로 5% 미만, 4% 미만, 3% 미만, 2% 미만, 1% 미만, 0.5% 미만, 0.1% 미만 또는 0.05% 미만의 농도로 첨가된다. 본원에 사용된 "유기 용매"는 하나 이상의 탄소 원자를 포함하는 용매를 지칭한다. 본원에 사용된 "용매"는 소수성 또는 친지성이고 지질이 아닌 약품을 지칭한다. 본원에 사용된 "소수성"은 물의 덩어리로부터 반발하는 약품을 지칭한다. 본원에 사용된 "친지성"은 지질을 용해하는 약품을 지칭한다. 본 발명의 방법에 사용되지 않는 유기 용매는, 비제한적으로, 극성 용매, 비-극성 용매, 수-혼화성 용매, 수-불혼화성 용매 및 이들의 조합을 포함한다. 유기 용매의 비제한적인 예는 치환된 및 비치환된 C₄-C₈ 알킬(예컨대, 헥산 등), C₅-C₁₂ 사이클로알킬, C₄-C₁₂ 알켄, C₁-C₈ 알콜(예컨대, iso-프로판올 등), C₁-C₈ 알데하이드, C₄-C₈ 에터, C₁-C₈ 에스터, C₆-C₁₂ 아릴, C₁-C₈ 아마이드, C₅-C₁₂ 헤테로아릴, 및 이들의 조합을 포함한다. 본원에 정의된 유기 용매는 선택적으로 용해된 세포 조성물에, 예를 들어, 용해된 세포 조성물과 접촉하기 위한 염기 및/또는 염의 성분으로서 첨가될 수 있다. 그러나, 이러한 양태에서 유기 용매는 용매에 의해 세포 조성물, 용해된 세포 조성물 또는 항유화된 세포 조성물로부터 실질적으로 추출되지 않는 농도(즉, 부피 또는 중량을 기준으로 5% 미만, 4% 미만, 3% 미만, 2% 미만, 1% 미만, 0.5% 미만, 0.1% 미만 또는 0.05% 미만의 농도)로 존재한다.

[0089] 일부 양태에서, 본 발명의 방법은 예컨대 물에 의한 세척을 포함하지 않거나, 상기 방법은 용해된 세포 조성물 또는 항유화된 세포 조성물의 세척의 수를 감소시킨다. "세척"은 조성물을, 예컨대, 물 또는 완충제로 희석하고, 물 또는 완충제를, 예컨대, 원심분리에 의해 제거하는 공정을 지칭한다. 세포 조성물의 세척은 세포로부터 수득된 지질의 전체 수율을 감소시킬 수 있다. 본 발명에서, 세척은 1회, 2회, 3회 또는 그 이상만큼 감소될 수 있다.

[0090] **정의**

[0091] 본원에 사용된 "지질" 또는 "오일"은 하나 이상의 지방산(예컨대 유리 지방산 및 지방산의 에스터), 포스포지질, 트리아실글리세롤(즉, 트리아실글리세라이드), 디아실글리세라이드, 모노아실글리세라이드, 리소포스포지질, 비누, 포스파타이드, 왁스, 스테롤 및 스테롤 에스터, 카로테노이드, 잔토피, 탄화수소, 당업자에게 공지된 다른 지질을 지칭한다. 지질은 극성 지질 및 중성 지질을 포함한다.

[0092] 본원에 사용된 "극성 지질"은 극성 기를 함유하고 극성 용매에 더욱 용이하게 가요성인 지질을 지칭한다. 극성 지질은 포스포지질을 포함한다. 본원에 사용된 "포스포지질"은 포스페이트 기를 갖는 지질을 지칭한다. 본원에 사용된 "중성 지질"은 극성 영역을 함유하지 않고 비-극성 용매에 더욱 용이하게 가요성인 지질을 지칭한다. 중성 지질은 트리아실글리세롤(TAG)을 포함한다.

[0093] 지방산은 탄소 사슬의 길이 및 포화 특성을 기준으로 분류된다. 지방산은 사슬에 존재하는 탄소수를 기준으로 단쇄, 중쇄 또는 장쇄로 지칭된다. 지방산은 이중 결합이 탄소 원자 사이에 존재하지 않는 경우 포화 지방산으로 지칭되고, 이중 결합이 존재하는 경우 불포화 지방산으로 지칭된다. 불포화된 장쇄 지방산은 단지 하나의 이중 결합이 존재하는 경우 모노불포화로 지칭되고, 하나 초과인 이중 결합이 존재하는 경우 다중불포화로 지칭된다.

[0094] 지질에 존재하는 지방산은 4 내지 28개의 탄소 원자를 가질 수 있다. 일부 양태에서, 지질은 하나 이상의 다가불포화 지방산을 포함한다. 다가불포화 지방산(PUFA)은 지방산의 메틸 말단으로부터 제1 이중 결합의 위치를 기준으로 분류된다: 오메가-3(n-3) 지방산은 제3 탄소에서 제1 이중 결합을 함유하는 반면, 오메가-6(n-6) 지방산은 제6 탄소에서 제1 이중 결합을 함유한다. 예를 들어, 도코사헥사엔산("DHA")은 22개 탄소의 사슬 길이 및 6개의 이중 결합을 갖는 오메가-3 장쇄 다가불포화 지방산(LCPUFA)이고, 종종 "22:6 n-3"으로서 지칭된다. 본원

의 목적을 위하여, 장쇄 다가불포화 지방산(LC-PUFA)을 18개 이상의 탄소쇄 길이를 갖는 지방산으로서 정의되고, 바람직하게는 3개 이상의 이중 결합을 함유하는 20개 이상의 탄소쇄 길이의 지방산이다. 오메가-6 시리즈의 LC-PUFA는 비제한적으로, 다이-호모-감마리놀레산(C20:3n-6), 아라키돈산(C20:4n-6)("ARA"), 도코사테트라엔산 또는 아드렌산(C22:4n-6), 및 도코사펜타엔산(C22:5n-6)("DPA n-6")을 포함한다. 오메가-3 시리즈의 LC-PUFA는, 비제한적으로, 아이코사트라이엔산(C20:3n-3), 아이코사테트라엔산(C20:4n-3), 아이코사펜타엔산(C20:5n-3)("EPA"), 도코사펜타엔산(C22:5n-3) 및 도코사헥사엔산(C22:6n-3)을 포함한다. LC-PUFA는 또한 22개 초과 탄소 및 4개 이상의 이중 결합을 갖는 지방산, 예컨대 비제한적으로 C24:6(n-3) 및 C28:8(n-3)을 포함한다.

[0095] 용어 "지방산", "다가불포화 지방산" 및 "PUFA"은 유리 지방산 형태, 및 다른 형태, 예컨대 트라이아실글리세롤(TAG) 형태, 포스포지질(PL) 형태 및 다른 에스터화된 형태를 포함한다. 본원에 사용된 용어 "에스터" 및 "에스터화된"는 PUFA 분자의 카복실산 기중 수소가 다른 치환기로 대체됨을 지칭한다. 전형적인 에스터는 당업자에게 공지되어 있고, 이의 논의는 각각 이의 전체 내용이 본원에 참고로서 혼입된 문헌[Higuchi, T. *et al.*, *Pro-drugs as Novel Delivery Systems*, Vol. 14, A.C.S. Symposium Series, *Bioreversible Carriers in Drug Design*, Edward B. Roche ed., Amer. Pharma. Assoc., Pergamon Press (1987)], 및 [*Protective Groups in Organic Chemistry*, McOmie ed., Plenum Press, New York (1973)]에서 제공된다. 통상적인 에스터의 예는 메틸, 에틸, 트라이클로로에틸, 프로필, 부틸, 펜틸, *tert*-부틸, 벤질, 나이트로벤질, 메톡시벤질 및 벤즈하이드릴을 포함한다.

[0096] 일부 양태에서, 지질은 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 35% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상 또는 80중량% 이상의 PUFA를 포함한다. 일부 양태에서, 지질은 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 35% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상 또는 80중량% 이상의 DHA를 포함한다. 일부 양태에서, 지질은 50% 미만, 40% 미만, 30% 미만, 20% 미만, 15% 미만, 10% 미만 또는 5중량% 미만의 EPA를 포함한다. 일부 양태에서, 지질은 중량을 기준으로 10% 미만, 5% 미만, 2% 미만, 1% 미만 또는 0.5% 미만의 스테롤을 포함한다. 일부 양태에서, 하나 이상의 PUFA는 하나 이상의 형태의 지질, 예컨대 트라이글리세라이드, 다이글리세라이드, 모노글리세라이드, 포스포지질, 유리 지방산, 에스터화된 지방산, 지방산의 알칼리 금속 염, 지방산의 알칼리토 금속 염, 및 이들의 조합을 포함한다.

[0097] 일부 양태에서, 본 발명의 방법에서 원심분리 후에 분리된 지질은 중량을 기준으로 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 50 내지 95%, 50 내지 90%, 50 내지 85%, 50 내지 80%, 50 내지 75%, 60 내지 95%, 60 내지 90%, 60 내지 85%, 70 내지 95%, 70 내지 90%, 70 내지 85%, 75 내지 95%, 75 내지 90% 또는 75 내지 85%의 트라이글리세라이드를 포함한다.

[0098] 일부 양태에서, 트라이글리세라이드는 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 35% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상 또는 80중량% 이상의 DHA를 포함한다. 일부 양태에서, 트라이글리세라이드는 중량을 기준으로 50% 이상, 40% 이상, 30% 이상, 20% 이상, 15% 이상, 10% 이상 또는 5% 이상의 EPA를 포함한다.

[0099] 본원에 논의된 바와 같이, 원심분리 후 지질의 추가 정련은 중량을 기준으로 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 99% 이상, 또는 80 내지 99.5%, 80 내지 99%, 80 내지 97%, 80 내지 95%, 80 내지 90%, 85 내지 99.5%, 85 내지 99%, 85 내지 97%, 85 내지 95%, 85 내지 90%, 90 내지 99.5%, 90 내지 99%, 90 내지 97%, 90 내지 95%, 95 내지 99.5%, 95 내지 99%, 95 내지 97%, 97 내지 99.5% 또는 98 내지 99.5%의 트라이글리세라이드를 포함하는 지질을 제공할 수 있다.

[0100] 본원에 사용된 "세포"는 지질-함유 생물질, 예컨대 식물 또는 미생물로부터 유도된 생물질을 지칭한다. 일부 양태에서, 적합한 식물 물질은, 비제한적으로, 식물 부분 및 종유를 포함한다. 종유는, 비제한적으로, 해바라기씨, 카놀라씨, 평지씨, 아마씨, 피마자유씨, 코리앤더씨, 칼렌둘라씨 등 및 이들의 유전적으로 변형된 변이체를 포함한다. 본원에 기술된 방법에 따라 식물 물질 및/또는 미생물, 예컨대 유성 미생물로부터 제조된 오일은 또한 식물성 오일로서 지칭된다. 조류 및/또는 균으로부터 제조된 오일은 또한 각각 조류 및/또는 균 오일로서 지칭된다.

[0101] 본원에 사용된 "미생물 세포" 또는 "미생물"은 조류, 세균, 균, 원생생물 및 이들의 조합과 같은 유기체, 예컨대, 단세포 유기체를 지칭한다. 일부 양태에서, 미생물 세포는 진핵생물 세포이다. 본 발명에 사용하기에 적합한 미생물 세포는, 비제한적으로, 골드 조류(예컨대, 스트라메노필레스 계의 미생물), 녹조류, 규조, 다이노플라겔레이트(예컨대, 크립테코디니움 속, 예를 들어, 크립테코디니움 코니이 또는 C. 코니이의 구성원을 포함하는 디노피시아에 속의 미생물), 효소(아스코미세스 또는 바시디오미세스) 및 무코르 및 모티에렐라 속의

균, 예컨대 비제한적으로 모티에렐라 알피나 및 모티에렐라 섉트. 수무터리를 포함한다. 본 발명에 사용하기에 적합한 미생물 세포는 또한 비제한적으로 하기 유기체의 균에서 발견되는 속을 포함한다: 스트라메노필레스, 하마 토레스, 프로터로모나드스, 오팔리네스, 데벨파이엘라, 다이플로프리스, 파브린톨리드스, 트라우스토키트리드, 바아오세시드스, 우마이세트스, 하이포키트리다오마이세트스, 코마티온, 레티쿨로스타에라, 펠라고모나스, 펠 라고코커스, 올리콜라, 아우레코커스, 파르말레스, 다이아톱스, 탄토피트스, 파에오피트스, 유스티그마토피트스, 라피도피트스, 시누리드, 약소디네스(예컨대, 리조크로물리나알레스, 페디넬라레스, 덕토 칼레스), 크리소머리달레스, 사시노크리시달레스, 하이드루달레스, 히버다이알레스 및 크로물리달레스.

[0102] 일부 양태에서, 본 발명에 사용하기 위한 미생물 세포는 라비린톨로미코타(*Labyrinthulomycota*) 문의 미생물이 다. 일부 양태에서, 라비린톨로미코타 문의 미생물 세포는 트라우스토키트리드(*thraustochytrid*), 예컨대 쉬조 키트리움(*Schizochytrium*) 또는 트라우스토키트리움(*Thraustochytrium*)이다. 본 발명에 따라서, 용어 "트라우 스토키트리드"는 트라우스토키트라이얼레스(*Thraustochytriales*) 목의 임의의 구성원을 지칭하고, 이는 트라우 스토키트라이아세아에(*Thraustochytriaceae*) 과를 포함하고, 용어 "라비린톨리드"는 라빈톨라레스 (*Labyrinthulales*) 목의 임의의 구성원을 지칭하고, 이는 라빈톨라세아에(*Labyrinthulaceae*) 과를 포함한다.

[0103] 라빈톨라세아에 과의 구성원은 종전에 트라우스토키트라이얼레스 목의 구성원으로 간주되었지만, 이러한 유기체 의 분류의 더욱 최근 개정에서, 라빈톨라세아에 과는 현재 라빈톨라레스 목의 구성원으로서 간주된다. 라빈톨 라레스 및 트라우스토키트라이얼레스는 둘다 라비린톨로미코타 문의 구성원으로서 간주된다. 분류 이론가들은 현재 일반적으로 스트라메노파일 계통의 조류 또는 조류형 원생동물물 갖는 미생물의 이러한 군 둘다를 위치시 킨다. 현재 트라우스토키트리드 및 라비린톨리드의 현재 분류학적 위치는 하기와 같이 요약될 수 있다:

[0104] 계: 스트라메노필라(크로미스타)

[0105] 문: 라비린톨로미코타(헤테로콘타)

[0106] 강: 라비린톨로미세테스(라비린톨라에)

[0107] 목: 라빈톨라레스

[0108] 과: 라빈톨라세아에

[0109] 목: 트라우스토키트라이얼레스

[0110] 과: 트라우스토키트라이아세아에

[0111] 본 발명의 목적을 위하여, 트라우스토키트리드로서 기술된 미생물의 균주는 하기 유기체를 포함한다: 목: 트라 우스토키트라이얼레스; 과: 트라우스토키트라이아세아에; 속: 트라우스토키트리움(종: sp., 아루디멘탈레, 아우 레움, 벤티콜라, 글로보섬, 킨네이, 모티분, 멀티루디멘탈레, 파키데르뭉, 프콜리페툼, 로세움 및 스트리아툼, 울케니아(종: sp., 아모에보이테아, 커구엘레니스, 미누타, 프로푼다, 라디아타, 사일렌스, 사르카리아나, 쉬조 키트롭스, 비수르겐시스), 요르켄시스 및 sp. BP-5601), 쉬조키트리움(종: sp., 아그레가툼, 리마세움, 만그로 베이, 미누툼 및 옥토스포툼), 자포노키트리움(종: sp., 마리눔), 아플라노키트리움(종: sp., 할리오티디스, 커 구엘렌시스, 프로푼다, 및 스토키노이, 알토리니아(종: sp., 크로우치이) 또는 엘리나(종: sp., 마리살바 및 시 노리피카). 본 발명의 목적을 위하여, 울케니아내에 기술된 종은 트라우스토키트리움 속의 구성원으로 간주될 것이다. 아루란티아코키트리움 및 오블로고스포라는 본 발명의 라비린톨로미코타 문에 포함되는 2개의 부가적 인 속이다. 일부 양태에서, 미생물 세포는 트라우토키스트리움 속, 쉬조키트리움 속 및 이들의 혼합물이다.

[0112] 본 발명에 사용하기에 적합한 미생물 세포는, 비제한적으로, 하기로부터 선택된 라비린톨리드이다: 목: 라빈톨 라레스, 과: 라빈톨라세아에, 속: 라비린톨라(종: sp., 알게리엔시스, 코에노시스티스, 카토니이, 마크로시티스, 마크로시티스 아틀란티카, 마크로시스티스 마크로시스티스, 마리나, 미누타, 로스코웬시스, 발카 노비이, 비텔리나, 비텔리나 파시피카, 비텔리나 비텔리나 및 줍피이), 라비린톨로이드(종: sp., 할리오티디스 및 요르켄시스), 라비린토크사(종: sp., 마리나), 다이프로프리스(종: sp., 아르체리), 피르호소루스(종: sp., 마리누스), 소로다이플로프리스(종: sp., 스테르코레아), 및 클라미도믹사(종: sp., 라비린톨로이드 및 몬타 나)(피르호소루스, 소로다이플로프리스 및 클라미도믹사의 정확한 분류학적 위치에 대해서는 일치하지 않았음).

[0113] 라비린톨로미코타 문의 속주 세포는, 비제한적으로, 기탁된 균주 PTA-10212, PTA-10213, PTA-10214, PTA- 10215, PTA-9695, PTA9696, PTA-9697, PTA-9698, PTA-10208, PTA-10209, PTA-10210, PTA-10211, SAM2179로서 기탁된 미생물(기탁자에 의해 "울케니아 SAM2179"로 명명됨), 임의의 트라우스토키트리움 종(예컨대 앞의 울케 니아 종, 예컨대 울케니아 비수르겐시스, 울케니아 아모에보이다, 울케니아 사르카리아나, 울케니아 프로푼다,

올케니아 라디아타, 올케니아 미누타 및 올케니아 sp. BP-5601), 및, 예컨대 트라우스토키트리움 스트리아툼, 트라우스토키트리움 아우레움, 트라우스토키트리움 로세움; 및 임의의 포노키트리움 종을 포함한다. 트라우스토키트라이얼레스의 균주는 비제한적으로 트라우스토키트리움 sp.(23B)(ATCC 20891); 트라우스토키트리움 스트리아툼(슈나이더)(ATCC 24473); 트라우스토키트리움 아우레움(골드스타인)(ATCC 34304); 트라우스토키트리움 로세움(골드슈타인)(ATCC 28210); 자포노키트리움 sp.(L1)(ATCC 28207); ATCC 20890; ATCC 20892; 임의의 상기 미생물로부터 유도된 돌연변이 균주; 및 이들의 혼합물을 포함한다. 쉬조키트리움은 비제한적으로 쉬조키트리움 아그레가툼, 쉬조키트리움 리마시눔, 쉬조키트리움 sp.(S31)(ATCC 20888), 쉬조키트리움 sp.(S8)(ATCC 20889), 쉬조키트리움 sp.(LC-RM)(ATCC 18915), 쉬조키트리움 sp.(SR 21), 기탁된 균주 ATCC 28209, 기탁된 쉬조키트리움 리마시눔 균주 IFO 32693, 임의의 상기 미생물로부터 유도된 돌연변이 균주, 및 이들의 혼합물을 포함한다. 일부 양태에서, 숙주 세포는 쉬조키트리움 또는 트라우스토키트리움이다. 쉬조키트리움은 연속적인 바이파디션 및 스포란기아 형성 둘다에 의해 복제될 수 있고, 이는 궁극적으로 주스포어를 방출한다. 그러나, 트라우스토키트리움은 단지 스포란기아 형성에 의해 복제되고, 이어서 주스포어를 방출한다. 일부 양태에서, 본 발명의 숙주 세포는 제조함 숙주 세포이다.

[0114] 본 발명에 사용하기 위한 미생물의 배양 조건은 비제한적으로, 효과적인 매질, 생반응기, 온도, 및 지질 생산을 허용하는 산소 조건을 포함한다. 효과적인 매질을 미생물 세포, 예컨대, 트라우스토키트라이얼레스 미생물 세포가 전형적으로 배양되는 임의의 매질을 지칭한다. 이러한 매질은 전형적으로 동화가능한 탄소, 질소 및 인 공급원 및 적절한 염, 광물, 금속 및 다른 영양분 예컨대 비타민을 갖는 수성 매질을 포함한다. 본 발명에 사용하기 위한 미생물 세포는 통상적인 발효 생반응기, 진탄 플라스크, 시험관, 마이크로티터 접시 및 페트리 접시에서 배양할 수 있다. 일부 양태에서, 배양은 제조함 세포에 적절한 온도, pH 및 산소 함량에서 수행된다.

[0115] 일부 양태에서, 미생물 세포는 12 g/L 이하, 5 g/L 이하 또는 3 g/L 이하의 나트륨 클로라이드의 염도 수준으로 성장할 수 있다.

[0116] 일부 양태에서, 미생물 세포는 오메가-3 및/또는 오메가-6 PUFA를 포함하는 미생물 세포를 생성한다. 일부 양태에서, 미생물 세포는 DHA, DPA (n-3), DPA (n-6), EPA, 아라키돈산(ARA) 등 및 이들의 조합을 포함하는 지질을 생성한다. PUFA를 포함하는 지질을 생성하는 미생물의 비제한적인 예는 상기 개시되고, 미국특허 제 5,340,594호, 제5,340,742호 및 제5,583,019호에서 발견되고, 이들 각각은 본원에 이의 전체 내용이 참고로서 혼입된다.

[0117] 일부 양태에서, 미생물 세포는 30중량% 이상의 지질, 35중량% 이상의 지질, 40중량% 이상의 지질, 50중량% 이상의 지질, 60중량% 이상의 지질, 70중량% 이상의 지질 또는 80중량% 이상의 지질을 포함한다. 일부 양태에서, 본 발명에 사용하기 위한 미생물 세포는 0.1g/L/h 이상의 DHA, 0.2 g/L/h 이상의 DHA, 0.3 g/L/h 이상의 DHA 또는 0.4 g/L/h 이상의 DHA를 생성할 수 있다.

[0118] **방법**

[0119] 본 발명의 방법은 세포 또는 세포 생물질을 용해하여 용해된 세포 조성물을 형성하는 단계를 포함한다. 본원에 사용된 용어 "세포 생물질"은 식물 또는 미생물 세포의 집단을 지칭한다. 본원에 사용된 용어 "용해하다" 및 "용해하는"은 세포 벽 및/또는 세포 막을 과열시키는 방법을 지칭한다. 일부 양태에서, 용해는 기계적 처리, 화학적 처리, 효소적 처리, 물리적 처리 또는 이들의 조합과 같은 공정을 포함한다.

[0120] 본원에 사용된 기계적 처리는 비제한적으로, 세포의 균질화, 세포에 대한 초음파처리, 세포의 냉각 압축, 세포의 분쇄, 및 이들의 조합을 포함한다. 일부 양태에서, 방법은 균질화에 의해 세포를 용해함을 포함한다. 일부 양태에서, 방법은 균질화기의 사용에 의한 세포의 용해를 포함한다.

[0121] 세포의 균질화는, 비제한적으로, 프렌치 압력 세포 압축, 초음파 처리기, 균질화기, 볼 밀, 로드 밀, 펄 밀, 비드 밀, 고압 연마 롤, 수직 샤프트 충격기, 산업적 배합기, 고 전단 혼합기, 패들 혼합기, 폴리트론 균질화기 등 및 이들의 조합을 사용하는 방법을 포함한다. 일부 양태에서, 세포는 선택적으로 가열된 균질화기를 통해 유도된다. 일부 양태에서, 적합한 균질화 고압 및/또는 저압에서 균질화기를 통한 1 내지 3회 통과를 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 균질화중의 압력은 150 bar 내지 1,400 bar, 150 bar 내지 1,200 bar, 150 bar 내지 900 bar, 150 bar 내지 300 bar, 300 bar 내지 1,400 bar, 300 bar 내지 1,200 bar, 300 bar 내지 900 bar, 400 bar 내지 800 bar, 500 bar 내지 700 bar 또는 600 bar일 수 있다.

[0122] 본원에 사용된 물리적인 처리는, 비제한적으로, 세포의 가열, 세포의 건조 등 및 이들의 조합을 포함할 수 있다.

- [0123] 세포의 가열은, 비제한적으로, 저항성 가열, 대류 가열, 스팀 가열, 유체 욕중 가열, 태양 에너지 가열, 집중된 태양 에너지 가열 등을 포함할 수 있고, 이는 탱크, 풀, 튜브, 도관, 플라스크 또는 다른 저장 장치에서 수행될 수 있다. 일부 양태에서, 세포는 이의 벽내 또는 벽상에 저항성 코일을 포함하는 탱크에서 가열된다. 일부 양태에서, 세포는 이를 통과하는 관을 포함하는 액체 욕에서 가열된다.
- [0124] 세포의 건조는, 비제한적으로, 기류로의 노출, 열로의 노출(예컨대, 대류 가열, 가열된 표면 등), 태양 에너지로의 노출, 냉동 건조(동결 건조), 분무 건조, 및 이들의 조합을 포함한다. 일부 양태에서, 건조를 세포를 선택적으로 가열된 회전 드럼에 적용하는 것을 포함한다.
- [0125] 본원에 사용된 화학적 처리는, 비제한적으로, 세포의 pH를 상승시키는 것, 세포를 화학 약품과 접촉시키는 것 등을 포함한다.
- [0126] 세포의 pH를 상승시키는 것은, 비제한적으로, 염기를 세포 조성물에 첨가하는 것을 포함한다. 일부 양태에서, 본 발명에 사용하기에 적합한 염기는, 비제한적으로, 하이드록사이드 염기(예컨대, LiOH, NaOH, KOH, Ca(OH)₂, 등 및 이들의 조합), 카보네이트 염기(예컨대, Na₂CO₃, K₂CO₃, MgCO₃, 등 및 이들의 조합), 바이카보네이트 염기(예컨대, LiHCO₃, NaHCO₃, KHCO₃, 등 및 이들의 조합), 및 이들의 조합을 포함한다. 염기는 고체(예컨대 결정, 과립, 펠렛 등) 또는 액체(예컨대 수용액, 알콜 용액, 예컨대 메탄올, 에탄올, 프로판올 등중 하이드록사이드 염기), 및 이들의 조합을 포함한다. 일부 양태에서, 세포 조성물의 pH는 8 이상, 9 이상, 10 이상, 11 이상, 12 이상, 또는 7 내지 13, 7 내지 12, 7 내지 11, 7 내지 10, 7 내지 9, 8 내지 13, 8 내지 12, 8 내지 11, 8 내지 10, 8 내지 9, 9 내지 12, 9 내지 11, 9 내지 10, 10 내지 12 또는 10 내지 11로 상승된다.
- [0127] 일부 양태에서, 세포의 pH의 상승은, 비제한적으로, 클로르알칼리 공정을 수행하는 것이다. 일부 양태에서, 나트륨 클로라이드 및 세포 조성물을 함유하는 발효 배양액을 전기분해시키고, 이는 나트륨 하이드록사이드의 형성을 야기한다. 나트륨 하이드록사이드의 형성은 세포의 pH를 상승시킨다. 일부 양태에서, 발효 배양액은 칼슘 클로라이드 또는 칼륨 클로라이드를 나트륨 클로라이드 대신에 또는 이에 더해서 포함할 수 있다. 이러한 발효 배양액의 전기 분해는 각각 칼슘 하이드록사이드 또는 칼륨 하이드록사이드의 형성을 야기하고, 이에 의해 세포의 pH를 상승시킨다.
- [0128] 효소적 용해는 세포의 세포 벽 또는 세포 막을, 세포를 하나 이상의 효소와 접촉시킴으로써 용해하는 것을 지칭한다. 본 발명에 사용하기에 적합한 효소는, 비제한적으로, 프로테아제, 셀룰라제, 헤미셀룰라제, 키틴아제, 펙틴아제 및 이들의 조합을 포함한다. 프로테아제의 비제한적인 예는 세린 프로테아제, 트레오닌 프로테아제, 시스테인 프로테아제, 아스파테이트 프로테아제, 메탈로프로테아제, 글루탐산 프로테아제, 알락카제 및 이들의 조합을 포함한다. 셀룰라제의 비제한적인 예는 수크라제, 말타제, 락타제, 알파-글루코시다제, 베타-글루코시다제, 아밀라제, 리소자일, 뉴라미니다제, 갈락토시다제, 알파-만노시다제, 글루코니다제, 히알루로니다제, 폴루라나제, 글루코세레브로시다제, 갈락토실세라미다제, 아세틸갈락토사미니다제, 푸코시다제, 헥소사미니다제, 이두로니다제, 말타제-글루코아밀라제 및 이들의 조합을 포함한다. 키틴나제의 비제한적인 예는 키토트라이오시다제를 포함한다. 펙티나제의 비제한적인 예는 펙토리아제, 펙토자임, 폴리갈락투로나제, 및 이들의 조합을 포함한다. 일부 양태에서, 일부 효소가 가열에 의해 활성화된다.
- [0129] 본원에 사용된 "용해된 세포 조성물"은 (용해된 세포로부터의) 지질과 조합된 하나 이상의 용해된 세포, 예컨대 세포 파편 및 세포의 다른 내용물, 및 선택적으로, 미생물 세포 또는 식물 물질을 함유하는 배양액을 포함하는 조성물을 지칭한다. 일부 양태에서, 식물 물질은 식물 물질 및 물을 포함하는 배양액 또는 매질에 함유된다. 일부 양태에서, 미생물 세포는 미생물 세포 및 물을 포함하는 발효 배양액 또는 매질에 함유된다. 일부 양태에서, 용해된 세포 조성물은 하나 이상의 용해된 세포, 세포 파편, 지질, 세포의 천연 내용물, 및 배양액으로부터의 수성 성분을 포함하는 조성물을 지칭한다. 일부 양태에서, 용해된 세포 조성물은 연속적인 수성 상 및 분산된 지질 상의 혼합물을 포함하는 수중유 오일의 형태이다. 일부 양태에서, 분산된 지질 상은 에멀전화된 용해된 세포 조성물의 중량을 기준으로 1 내지 60%, 1 내지 50%, 1 내지 40%, 1 내지 30%, 1 내지 20%, 5 내지 60%, 5 내지 50%, 5 내지 40%, 5 내지 30%, 5 내지 20%, 10 내지 60%, 10 내지 50%, 10 내지 40%, 20 내지 60%, 20 내지 50%, 20 내지 40%, 30 내지 60%, 30 내지 50% 또는 40 내지 60%의 농도로 존재한다.
- [0130] 이론에 얽매어려는 것은 아니지만, 본 발명의 방법이 에멀전화된 용해된 세포 조성물을 분해하거나 항유화시켜, 지질이 용해된 세포 조성물로부터 분리되도록 하는 것으로 여겨진다. 본원에 사용된 용어 "에멀전" 및 "에멀전화된"은 하나의 상 또는 층이 다른 상 또는 층에 분산된 2개 이상의 비혼화성 상 또는 층의 혼합물을 지칭한다. 본원에 사용된 용어 "파괴하고", "분해하다", "항유화시키다", "항유화", "항유화하는" 및 "파괴하는"은 에멀전

의 비혼화성 상 또는 층을 분리하는 방법을 지칭한다. 예를 들어, 에멀전화된 용해된 세포 조성물의 향유화 또는 파괴는 이에 의해 에멀전화된 용해된 세포 조성물이 하나 이상의 상 또는 층을 갖는 에멀전으로부터 2개 이상의 상 또는 층을 갖는 조성물로 변화하는 방법을 지칭한다. 예를 들어, 일부 양태에서, 본 발명의 방법은 에멀전화된 용해된 세포 조성물을 단일 상으로부터 2개 이상의 상으로 파괴한다. 일부 양태에서, 2개 이상의 상은 지질 상 및 수성 상을 포함한다. 일부 양태에서, 본 발명의 방법은 에멀전화된 용해된 세포 조성물을 하나 이상의 상으로부터 3개 이상의 상으로 파괴한다. 일부 양태에서, 3개의 상은 지질 상, 수성 상 및 고체 상을 포함한다. 일부 양태에서, 3개의 상은 지질 상, 에멀전 상 및 수성 상을 포함한다.

[0131] 일부 양태에서, 본 발명의 방법은 75% 이상의 에멀전, 80% 이상의 에멀전, 85% 이상의 에멀전, 90% 이상의 에멀전, 95% 이상의 에멀전, 99% 이상의 에멀전을 제거하거나 파괴함으로써 용해된 세포 조성물을 향유화시켜 향유화된 세포 조성물을 형성한다. 일부 양태에서, 본 발명의 방법은 중량 또는 부피를 기준으로 75%의 에멀전 내지 99%의 에멀전, 75%의 에멀전 내지 95%의 에멀전, 75%의 에멀전 내지 90%의 에멀전, 75%의 에멀전 내지 85%의 에멀전, 75%의 에멀전 내지 80%의 에멀전, 80%의 에멀전 내지 99%의 에멀전, 80%의 에멀전 내지 95%의 에멀전, 80%의 에멀전 내지 90%의 에멀전, 80%의 에멀전 내지 85%의 에멀전, 85%의 에멀전 내지 99%의 에멀전, 85%의 에멀전 내지 95%의 에멀전, 85%의 에멀전 내지 90%의 에멀전, 90%의 에멀전 내지 99%의 에멀전, 90%의 에멀전 내지 95%의 에멀전 또는 95%의 에멀전 내지 99%의 에멀전을 제거하거나 파괴함으로써 용해된 세포 조성물을 향유화시킨다.

[0132] 일부 양태에서, 세포의 용해 전에, 세포는 세척되고/되거나 파스퇴르화될 수 있다. 일부 양태에서, 세포의 세척은 물과 같은 수용액을 사용하여 임의의 세포의 수용성 또는 수분산성 화합물을 제거하는 것을 포함한다. 일부 양태에서, 세포는 1, 2, 3회 또는 그 이상 세척될 수 있다. 일부 양태에서, 세포의 파스퇴르화는 세포를 가열하여 임의의 바람직하지 않은 효소, 예컨대 지질을 열화시키거나 PUFA의 수율을 감소시킬 수 있는 임의의 효소를 불활성화시키는 것을 포함한다. 일부 양태에서, 세포는 먼저 세척되고, 이어서 파스퇴르화될 수 있다.

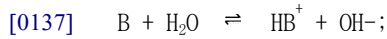
[0133] 일부 양태에서, 세포는 식물 생물체이고, 식물 생물체는 용해 전에 형성된다. 일부 양태에서, 식물 생물체는 식물로부터의 종유를 제거하거나 추출함으로써 형성된다. 일부 양태에서, 종유의 내부는 연마, 분쇄, 압축, 흡인, 파쇄 또는 이들의 조합에 의해 종유의 외부 껍질로부터 제거된다. 일부 양태에서, 껍질까인 종유는 당해 분야에 공지된 방법, 예컨대 종유가 압축기를 통과하도록 하여 껍질까인 종유를 케이크로 연마함으로써 균질화되거나 배출된다. 일부 양태에서, 물이 케이크에 첨가되어 에멀전화된 용해된 세포 조성물을 형성할 수 있다. 일부 양태에서, 에멀전화된 용해된 세포 조성물은 당해 분야에 공지된 방법을 사용하여 여과되어 임의의 과도한 껍질 단편을 용해된 세포 조성물로부터 제거할 수 있다.

[0134] 일부 양태에서, 제1 염기에 의한 용해된 세포 조성물의 처리는 에멀전화된 용해된 세포 조성물을 분해(즉, 향유화)한다. 일부 양태에서, 제2 염기에 의한 용해된 세포 조성물의 처리는 에멀전화된 용해된 세포 조성물을 분해(즉, 향유화)한다. 일부 양태에서, 염에 의한 용해된 세포 조성물의 처리는 에멀전화된 용해된 세포 조성물을 분해(즉, 향유화)한다. 일부 양태에서, 용해된 세포 조성물의 가열은 에멀전화된 용해된 세포 조성물을 분해(즉, 향유화)한다. 일부 양태에서, 용해된 세포 조성물의 교반은 에멀전화된 용해된 세포 조성물을 분해(즉, 향유화)한다. 일부 양태에서, 용해된 세포 조성물의 동시 가열 및 교반은 에멀전화된 용해된 세포 조성물을 분해(즉, 향유화)한다. 일부 양태에서, 하나 이상의 상기 처리는 에멀전화된 용해된 세포 조성물을 분해(즉, 향유화)한다.

[0135] 일부 양태에서, 본 발명의 방법은 세포 조성물의 pH를 상승시켜 세포 조성물을 용해 및/또는 향유화시키는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 본 발명의 방법은 용해된 세포 조성물의 pH를 상승시켜 용해된 세포 조성물을 향유화시키는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, pH의 상승은 세포 조성물 또는 용해된 세포 조성물을 염기와 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 양태에서, 본 발명의 방법은 용해된 세포 조성물을 염기와 접촉시켜 용해된 세포 조성물을 향유화시키는 것을 포함한다. 본원에 사용된 "접촉"은 세포 조성물 또는 용해된 세포 조성물을 제2 조성물과 (예컨대, 조성물을 세포 조성물 또는 용해된 세포 조성물에 첨가함으로써, 세포 조성물 또는 용해된 세포 조성물을 조성물에 첨가함으로써, 등) 조합하는 것을 포함한다. 본원에 사용된 "조성물"은 순수한 물질을 포함하거나, 2개 이상의 물질, 성분, 부형제, 분획 등의 조합을 포함한다. 용해된 세포 조성물을 제1 염기와 접촉시키는 단계는 용해된 세포 조성물의 pH를 상승시킨다. 일부 양태에서, 용해된 세포 조성물은 제2 염기와 접촉된다. 일부 양태에서, 용해된 세포 조성물 또는 향유화된 세포 조성물의 pH는 다시 상승된다. 일부 양태에서, pH의 제2 상승은 용해된 세포 조성물 또는 향유화된 세포 조성물을 제2 염기와 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 양태에서, 용해된 세포 조성물은 제1 염기와 접촉되고, 이어서, 가열, 교반 또는 이들의 조합

을 거치고, 이어서 제2 염기와 접촉되어 처리된 용해된 세포 에멀전을 제공한다.

[0136] 일부 양태에서, 제1 염기 및/또는 제2 염기는 1 내지 12, 1 내지 10, 1 내지 8, 1 내지 6, 1 내지 5, 2 내지 12, 2 내지 10, 2 내지 8, 2 내지 6, 2 내지 5, 3 내지 10, 3 내지 6, 3 내지 5, 4 내지 10, 4 내지 8, 4 내지 6, 5 내지 10 또는 5 내지 8의 pK_b 를 갖는다. 본원에 사용된 용어 " pK_b "는 염기의 염기 결합 상수(K_b)의 음성 로그함수를 지칭한다. K_b 는 물중 염기의 이온화를 위한 평형 상수를 지칭하고, 이때



[0138] 염기(B)의 K_b 는 다음과 같이 정의된다:

[0139]
$$K_b = \frac{[HB^+][OH^-]}{[B]}$$

[0140] 본 발명에 사용하기 적합한 염기는 비제한적으로, 하이드록사이드 염기(예컨대, LiOH, NaOH, KOH, Ca(OH)₂, 등 및 이들의 조합), 카본에이트 염기(예컨대, Na₂CO₃, K₂CO₃, MgCO₃, 등 및 이들의 조합), 바이카본에이트 염기(예컨대, LiHCO₃, NaHCO₃, KHCO₃, 등 및 이들의 조합), 및 이들의 조합을 포함한다. 염기는 고체(예컨대, 결정, 과립, 펠렛 등) 또는 액체(예컨대, 수용액, 알콜 용액, 예컨대 메탄올, 에탄올, 프로판올 등중 하이드록사이드 염기), 및 이들의 조합일 수 있다. 따라서, 용매는 본 발명에 사용하기 위한 염기에 선택적으로 존재할 수 있다. 본원에 사용된 "용매"는 소수성 또는 친지성인 약품을 지칭한다. 본원에 사용된 "소수성"은 물 덩어리에 반발하는 약품을 지칭한다. 본원에 사용된 "친지성"은 지질에 용해되는 약품을 지칭한다.

[0141] 일부 양태에서, 세포 조성물 또는 용해된 세포 조성물과 염기의 접촉은 용해된 세포 조성물의 pH를 상승시킨다. 일부 양태에서, 용해된 세포 조성물과 염기의 접촉은 용해된 세포 조성물의 pH를 8 이상, 9 이상, 10 이상, 11 이상, 12 이상 또는 7 내지 13, 7 내지 12, 7 내지 11, 7 내지 10, 7 내지 9, 8 내지 13, 8 내지 12, 8 내지 11, 8 내지 10, 8 내지 9, 9 내지 12, 9 내지 11, 9 내지 10, 10 내지 12 또는 10 내지 11의 pH로 상승시킨다. 일부 양태에서, 용해된 세포 조성물과 염기의 접촉은 8 이하, 7 이하, 6 이하 또는 5 이하, 또는 조성물보다 낮은 pH를 제공한다.

[0142] 일부 양태에서, 염기의 첨가에 의한 세포 조성물 또는 용해된 세포 조성물의 pH의 상승은 지질 산화를 억제하고, 이에 의해 용해된 세포 조성물내의 자유 라디칼의 양을 최소화시켜 본 발명의 방법으로부터 수득된 조직 지질이 낮은 과산화물 값(예컨대, 5 이하, 4.5 이하, 4 이하, 3.5 이하, 3 이하, 2.5 이하, 2 이하, 1.5 이하, 1 이하, 0.5 이하, 0.2 이하 또는 0.1 이하) 및/또는 낮은 아니시딘 값(예컨대, 26 이하, 25 이하, 20 이하, 15 이하, 10 이하, 5 이하, 2 이하 또는 1 이하)을 갖도록 한다. 본원에 사용된 용어 "과산화물 값" 또는 "PV"는 지질의 산화중에 발생하는 제1 반응 생성물, 예컨대 과산화물 및 하이드로퍼옥사이드의 측정치를 지칭한다. 본원에 사용된 과산화물 값은 meq/kg으로 측정된다. 본원에 사용된 용어 "아니시딘 값" 또는 "AV"는 지질의 산화중에 발생하는 제2 반응 생성물, 예컨대 알데하이드 및 케톤의 측정치를 지칭한다.

[0143] 일부 양태에서, 염기에 의한 pH 조정 후 용해된 세포 조성물내의 유리 라디칼은 일렉트론 파라마그네틱 레조넌스(Electron Paramagnetic Resonance) 분광기, 예컨대, 브루커 바이오스핀(Bruker BioSpin) e-스캔 EPR(시스템 번호 SC0274)(브루커 바이오스핀, 미국 매사추세츠주 빌레리카 소재)을 사용하여 검출된다. 일부 양태에서, 용해된 세포 조성물의 샘플은 EPR 측정 전에 탈이온수로 약 1:1 비로 희석된다. 일부 양태에서, EPR을 측정하기 위하여, 스핀 트랩 화학약품을 용해된 세포 조성물에 첨가한다. 일부 양태에서, 상기 스핀 트랩 화학약품은 당해분야에 공지된 임의의 스핀 트랩 화학약품, 예컨대 비제한적으로, POBN(α -(4-피리딜-1-옥사이드)-N-tert-부틸니트론) 또는 DMPO(5,5-다이메틸-1-피롤린-N-옥사이드)이다. 일부 양태에서, 상기 스핀 트랩 화학약품은 약 1.25 M이고, 약 50 μ L가 약 0.5 g의 용해된 세포 조성물 샘플에 첨가된다. 일부 양태에서, 스핀 트랩 화학약품을 함유하는 샘플을 실온(약 20°C)에서 배양한다. 일부 양태에서, 하기 분광기 변수가 사용된다: 약 86 Hz의 조절 주파수, 약 2 가우스의 조절 진폭, 약 5 mW의 마이크로파 전력, 약 20 초의 시간 상수, 약 10 초의 스위치 시간, 약 100 가우스의 스위치 너비, 및 약 8의 스캔 수. EPR이 시간에 걸쳐 측정되어 지질에 존재하는 유리 라디칼의 농도를 결정한다. 일부 양태에서, EPR은 4시간의 과정에 걸쳐 매시간 측정된다. 일부 양태에서, 용해된 세포 조성물은 상기 열거된 변수에서 4시간 후 0.15×10^6 미만, 0.14×10^6 미만, 0.13×10^6 미만, 0.12×10^6 미만, 0.11×10^6 미만, 0.1×10^6 미만, 0.09×10^6 미만, 0.08×10^6 미만, 0.07×10^6 미만, 0.06×10^6

미만, 또는 0.05×10^6 미만의 EPR 신호 강도(강도 또는 진폭)를 갖는다. 일부 양태에서, 용해된 세포 조성물은 0.05×10^6 내지 0.15×10^6 , 0.05×10^6 내지 0.14×10^6 , 0.05×10^6 내지 0.13×10^6 , 0.05×10^6 내지 0.12×10^6 , 0.05×10^6 내지 0.11×10^6 , 0.05×10^6 내지 0.1×10^6 , 0.05×10^6 내지 0.09×10^6 , 0.07×10^6 내지 0.15×10^6 , 0.07×10^6 내지 0.13×10^6 , 0.07×10^6 내지 0.11×10^6 , 0.08×10^6 내지 0.14×10^6 , 0.08×10^6 내지 0.12×10^6 , 0.08×10^6 내지 0.1×10^6 , 0.09×10^6 내지 0.13×10^6 또는 0.09×10^6 내지 0.11×10^6 의 EPR을 갖는다. 일부 양태에서, 상기 특정된 EPR에서 생성된 용해된 세포 조성물의 pH는 8 내지 12, 8 내지 11, 8 내지 10, 8 내지 9, 9 내지 12, 9 내지 11, 9 내지 10, 10 내지 12 또는 10 내지 11이다. 일부 양태에서, 상기 특정된 EPR 신호 강도를 갖는 용해된 세포 조성물은 26 이하, 25 이하, 20 이하, 15 이하, 10 이하, 5 이하, 2 이하 또는 1 이하의 AV를 갖는 조절 지질을 야기한다. 일부 양태에서, 상기 특정된 EPR을 갖는 용해된 세포 조성물은 5 이하, 4.5 이하, 4 이하, 3.5 이하, 3 이하, 2.5 이하, 2 이하, 1.5 이하, 1 이하, 0.5 이하, 0.2 이하 또는 0.1 이하의 PV를 갖는 조절 지질을 야기한다.

[0144] 일부 양태에서, 방법은 세포 조성물 또는 용해된 세포 조성물을 염과 접촉시켜 용해된 세포 조성물을 항유화시키는 단계를 포함한다. 본원에 사용된 "염"은 산으로부터의 수소 이온을 금속(예컨대, 알칼리 금속, 알칼리토 금속, 전이 금속 등)과 대체시킴으로써 형성된 이온성 화합물 또는 양으로 하전된 화합물(예컨대, NH_4^+ 등)을 지칭한다. 본원에 사용하기에 적합한 염은, 비제한적으로, 알칼리 금속 염, 알칼리토 금속 염 등 및 이들의 조합을 포함한다. 본 발명에 사용하기 위한 염에 존재하는 음으로 하전된 이온성 종은, 비제한적으로, 할라이드, 설페이트, 바이설페이트, 설파이트, 포스페이트, 수소 포스페이트, 이수소 포스페이트, 카본에이트, 바이카본에이트 등 및 이들의 조합을 포함한다. 일부 양태에서, 본 발명에 사용하기 위한 염은 하기로부터 선택된다: 나트륨 클로라이드, 나트륨 설페이트, 나트륨 카본에이트, 칼슘 클로라이드, 칼륨 설페이트, 마그네슘 설페이트, 모노나트륨 글루타메이트, 암모늄 설페이트, 칼륨 클로라이드, 철 클로라이드, 철 설페이트, 알루미늄 설페이트, 및 이들의 조합. 일부 양태에서, 염은 NaOH를 포함하지 않는다. 염은 고체(예컨대, 결정질, 비정형, 펠렛화된 및/또는 과립화된 형태), 및/또는 물, 알콜 등 및 이들의 조합을 함유하는 용액(예컨대, 희석 용액, 포화 용액 또는 수퍼-포화 용액)으로서 첨가될 수 있다.

[0145] 일부 양태에서, 염은 5 g/L 내지 25 g/L, 5 g/L 내지 10 g/L, 10 g/L 내지 15 g/L, 15 g/L 내지 20 g/L, 20 g/L 내지 25 g/L 또는 10 g/L 내지 20 g/L의 양으로 첨가된다.

[0146] 일부 양태에서, 세포 조성물 또는 용해된 세포 조성물의 온도는 염이 세포 조성물 또는 용해된 세포 조성물을 항유화시키는 단계에 첨가되는 경우 60°C 이하, 55°C 이하, 45°C 이하, 40°C 이하, 35°C 이하, 30°C 이하, 또는 25°C 이하이다. 일부 양태에서, 용해된 세포 조성물의 온도는 염이 세포 조성물 또는 용해된 세포 조성물을 항유화시키는 단계에 첨가되는 경우 0°C 내지 60°C, 0°C 내지 55°C, 0°C 내지 50°C, 0°C 내지 45°C, 0°C 내지 40°C, 0°C 내지 35°C, 0°C 내지 30°C, 0°C 내지 25°C, 20°C 내지 60°C, 20°C 내지 55°C, 20°C 내지 50°C, 20°C 내지 45°C, 20°C 내지 40°C, 20°C 내지 35°C, 20°C 내지 30°C, 30°C 내지 60°C, 30°C 내지 55°C, 30°C 내지 50°C, 30°C 내지 45°C, 30°C 내지 40°C, 30°C 내지 40°C, 40°C 내지 60°C, 40°C 내지 55°C, 40°C 내지 50°C 또는 50°C 내지 60°C이다.

[0147] 일부 양태에서, 상기 방법은 세포 조성물 또는 용해된 세포 조성물을 용해된 세포 조성물 또는 세포 조성물의 중량을 기준으로 20% 이하, 15% 이하, 10% 이하, 7.5% 이하, 5% 이하 또는 2% 이하의 염과 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 방법은 세포 조성물 또는 용해된 세포 조성물을 용해된 세포 조성물 또는 세포 조성물의 중량(예컨대, 총 배양액 중량)을 기준으로 0.1 내지 20%, 0.1 내지 15%, 0.1 내지 10%, 0.5 내지 20%, 0.5 내지 15%, 0.5 내지 10%, 0.5 내지 5%, 0.5 내지 4%, 0.5 내지 3%, 0.5 내지 2.5%, 0.5 내지 2%, 0.5 내지 1.5%, 0.5 내지 1%, 1 내지 20%, 1 내지 15%, 1 내지 10%, 1 내지 5%, 1 내지 4%, 1 내지 3%, 1 내지 2.5%, 1 내지 2%, 1 내지 1.5%, 1.5 내지 5%, 1.5 내지 4%, 1.5 내지 3%, 1.5 내지 2.5%, 1.5 내지 2%, 2 내지 20%, 2 내지 15%, 2 내지 10%, 2 내지 5%, 2 내지 4%, 2 내지 3%, 2 내지 2.5%, 2.5 내지 5%, 2.5 내지 4%, 2.5 내지 3%, 3 내지 5%, 3 내지 4%, 4 내지 5%, 5 내지 20%, 5 내지 15%, 5 내지 10%, 10 내지 20%, 10 내지 15% 또는 15 내지 20%의 염과 접촉시키는 단계를 포함한다. 예를 들어, 용해된 세포 조성물이 1,000 kg인 경우, 중량을 기준으로 0.5 내지 20%의 염과 접촉시키는 단계는 5 kg 내지 200 kg의 염과 용해된 세포 조성물의 조합을 필요로 한다.

[0148] 일부 양태에서, 상기 방법은 세포 조성물 또는 용해된 세포 조성물을 가열하여 용해된 세포 조성물을 항유화시

키는 단계를 포함한다. 일부 양태에서 세포 조성물 또는 용해된 세포 조성물은 염기 및/또는 염이 세포 조성물 또는 용해된 세포 조성물을 항유화시키기 위한 충분한 시간 동안 가열된다. 일부 양태에서, 상기 방법은 세포 조성물 또는 용해된 세포 조성물을 5분 이상, 10분 이상, 20분 이상, 30분 이상, 1시간 이상, 2시간 이상, 4시간 이상, 8시간 이상, 12시간 이상, 18시간 이상, 24시간 이상, 30시간 이상, 36시간 이상, 42시간 이상, 48시간 이상, 54시간 이상, 60시간 이상, 66시간 이상, 72시간 이상, 78시간 이상, 84시간 이상, 90시간 이상, 또는 96시간 이상 가열하는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 상기 방법은 용해된 세포 조성물을 5분 내지 96시간, 5분 내지 4시간, 5분 내지 2시간, 5분 내지 1시간, 10분 내지 4시간, 10분 내지 2시간, 10분 내지 1시간, 1시간 내지 96시간, 1시간 내지 84시간, 1시간 내지 72시간, 1시간 내지 60시간, 1시간 내지 48시간, 1시간 내지 36시간, 1시간 내지 24시간, 1시간 내지 4시간, 4시간 내지 96시간, 4시간 내지 84시간, 4시간 내지 72시간, 4시간 내지 60시간, 4시간 내지 48시간, 4시간 내지 36시간, 4시간 내지 24시간, 8시간 내지 96시간, 8시간 내지 84시간, 8시간 내지 72시간, 8시간 내지 60시간, 8시간 내지 48시간, 8시간 내지 36시간, 8시간 내지 24시간, 8시간 내지 12시간, 12시간 내지 96시간, 12시간 내지 84시간, 12시간 내지 72시간, 12시간 내지 60시간, 12시간 내지 48시간, 12시간 내지 36시간, 12시간 내지 24시간, 24시간 내지 96시간, 24시간 내지 84시간, 24시간 내지 72시간, 24시간 내지 60시간, 24시간 내지 48시간 또는 24시간 내지 36시간 동안 가열하는 단계를 포함한다.

[0149] 일부 양태에서, 세포 조성물 또는 용해된 세포 조성물은 10℃ 이상, 20℃ 이상, 25℃ 이상, 30℃ 이상, 35℃ 이상, 40℃ 이상, 45℃ 이상, 50℃ 이상, 55℃ 이상, 60℃ 이상, 65℃ 이상, 70℃ 이상, 75℃ 이상, 80℃ 이상, 85℃ 이상, 90℃ 이상, 95℃ 이상 또는 100℃ 이상의 온도에서 가열된다. 일부 양태에서, 방법은 세포 조성물 또는 용해된 세포 조성물을 10℃ 내지 100℃, 10℃ 내지 90℃, 10℃ 내지 80℃, 10℃ 내지 70℃, 20℃ 내지 100℃, 20℃ 내지 90℃, 20℃ 내지 80℃, 20℃ 내지 70℃, 30℃ 내지 100℃, 30℃ 내지 90℃, 30℃ 내지 80℃, 30℃ 내지 70℃, 40℃ 내지 100℃, 40℃ 내지 90℃, 40℃ 내지 80℃, 50℃ 내지 100℃, 50℃ 내지 90℃, 50℃ 내지 80℃, 50℃ 내지 70℃, 60℃ 내지 100℃, 60℃ 내지 90℃, 60℃ 내지 80℃, 70℃ 내지 100℃, 70℃ 내지 90℃, 80℃ 내지 100℃, 80℃ 내지 90℃ 또는 90℃ 내지 100℃의 온도에서 가열하는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 염은 가열중에 세포 조성물 또는 용해된 세포 조성물에 첨가될 수 있다.

[0150] 일부 양태에서, 세포 조성물 또는 용해된 세포 조성물은 밀폐된 시스템 또는 증발기를 갖는 시스템에서 가열될 수 있다. 일부 양태에서, 세포 조성물 또는 용해된 세포 조성물은 세포 조성물 또는 용해된 세포 조성물에 존재하는 물의 일부가 증발기에 의해 제거되도록 증발기를 갖는 시스템에서 가열될 수 있다. 일부 양태에서, 방법은 세포 조성물 또는 용해된 세포 조성물을 증발기를 갖는 시스템에서 가열하여 증량을 기준으로 세포 조성물 또는 용해된 세포 조성물에 존재하는 물의 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% 또는 50% 이하를 제거하는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 방법은 세포 조성물 또는 용해된 세포 조성물을 증발기를 갖는 시스템에서 가열하여 1 내지 50%, 1 내지 45%, 1 내지 40%, 1 내지 35%, 1 내지 30%, 1 내지 25%, 1 내지 20%, 1 내지 15%, 1 내지 10%, 1 내지 5%, 5 내지 50%, 5 내지 45%, 5 내지 40%, 5 내지 35%, 5 내지 30%, 5 내지 25%, 5 내지 20%, 5 내지 15%, 5 내지 10%, 10 내지 50%, 10 내지 45%, 10 내지 40%, 10 내지 35%, 10 내지 30%, 10 내지 25%, 10 내지 20%, 10 내지 15%, 15 내지 50%, 15 내지 45%, 15 내지 40%, 15 내지 35%, 15 내지 30%, 15 내지 25%, 15 내지 20%, 20 내지 50%, 20 내지 45%, 20 내지 40%, 20 내지 35%, 20 내지 30%, 20 내지 25%, 25 내지 50%, 25 내지 45%, 25 내지 40%, 25 내지 35%, 25 내지 30%, 30 내지 50%, 30 내지 45%, 30 내지 40%, 30 내지 35%, 35 내지 50%, 35 내지 45%, 35 내지 40%, 40 내지 50%, 40 내지 45% 또는 45 내지 50%의 물을 제거하는 단계를 포함한다.

[0151] 일부 양태에서, 상기 방법은 세포 조성물 또는 용해된 세포 조성물을 소정 시간 동안 용기내에 유지하여 용해된 세포 조성물을 항유화시키는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 상기 방법은 세포 조성물 또는 용해된 세포 조성물을 용기중에 5분 이상, 10분 이상, 20분 이상, 30분 이상, 1시간 이상, 2시간 이상, 4시간 이상, 8시간 이상, 12시간 이상, 18시간 이상, 24시간 이상, 30시간 이상, 36시간 이상, 42시간 이상, 48시간 이상, 54시간 이상, 60시간 이상, 66시간 이상, 72시간 이상, 78시간 이상, 84시간 이상, 90시간 이상 또는 96시간 이상 유지하는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 상기 방법은 세포 조성물 또는 용해된 세포 조성물을 5분 내지 96시간, 5분 내지 4시간, 5분 내지 2시간, 5분 내지 1시간, 10분 내지 4시간, 10분 내지 2시간, 10분 내지 1시간, 1시간 내지 96시간, 1시간 내지 84시간, 1시간 내지 72시간, 1시간 내지 60시간, 1시간 내지 48시간, 1시간 내지 36시간, 1시간 내지 24시간, 1시간 내지 4시간, 4시간 내지 96시간, 4시간 내지 84시간, 4시간 내지 72시간, 4시간 내지 60시간, 4시간 내지 48시간, 4시간 내지 36시간, 4시간 내지 24시간, 8시간 내지 96시간, 8시간 내지 84시간, 8시간 내지 72시간, 8시간 내지 60시간, 8시간 내지 48시간, 8시간 내지 36시간, 8시간 내지 24시간, 8시간 내지 12시간, 12시간 내지 96시간, 12시간 내지 84시간, 12시간 내지 72시간, 12시간 내지 60시간, 12시간 내지 48시간, 12시간 내지 36시간, 12시간 내지 24시간, 24시간 내지 96시간, 24시간 내지 84시간, 24시간 내지 72시간

간, 24시간 내지 60시간, 24시간 내지 48시간 또는 24시간 내지 36시간 동안 유지하는 단계를 포함한다.

- [0152] 일부 양태에서, 상기 방법은 산화방지제를 용해된 세포 에멀전과 접촉시키는 단계를 포함한다. 본 발명에 사용하기 위한 적합한 산화방지제는, 비제한적으로, 토크페롤, 토크트라이엔올, 폴리페놀, 레스버라트롤, 플라보노이드, 카로티노이드, 리코펜, 카로텐, 루테인, 아스코르브산, 아스코르빌 팔미테이트 등 및 이들의 조합을 포함한다.
- [0153] 일부 양태에서, 상기 방법은 에멀전화된 용해된 세포 조성물을 방지하는 단계를 포함하고, 이때 지질은 중력에 의해 에멀전화된 용해된 세포 조성물로부터 분리된다.
- [0154] 본원에 사용된 용어 "교반하는" 및 "교반"은 힘의 적용을 통해 용해된 세포 조성물의 운동에 영향을 주는 방법을 지칭한다. 일부 양태에서, 본 발명의 방법은 교반, 혼합, 배합, 진탕, 진동 또는 이들의 조합에 의해 세포 조성물 또는 용해된 세포 조성물을 교반하는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 세포 조성물 또는 용해된 세포 조성물을 교반하는 방법은 세포 조성물 또는 용해된 세포 조성물을 항유화시킨다.
- [0155] 일부 양태에서, 본 발명의 방법은 용해된 세포 조성물을 용해된 세포 조성물의 0.1hp/1,000gal 내지 10hp/1,000gal, 0.5hp/1,000gal 내지 8hp/1,000gal, 1hp/1,000gal 내지 6hp/1,000gal 또는 2hp/1,000gal 내지 5hp/1,000gal로 교반하는 단계를 포함한다.
- [0156] 일부 양태에서, 본 발명의 방법은 교반기를 사용하여 세포 조성물 또는 용해된 세포 조성물을 교반하는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 교반기는 염기 및/또는 염을 세포 조성물 또는 용해된 세포 조성물에 분산하는 분산 스타일 교반기이다. 일부 양태에서, 교반기는 하나 이상의 임펠러를 갖는다. 본원에 사용된 "임펠러"는 회전하는 경우 세포 조성물 또는 용해된 세포 조성물에 운동을 부여하도록 배열된 장치를 지칭한다. 본 발명에 사용하기 위한 적합한 임펠러는 직선 블레이드 임펠러, 러스톤 블레이드 임펠러, 축상 유동 임펠러, 라디얼 유동 임펠러, 오목 블레이드 디스크 임펠러, 고-효능 임펠러, 프로펠러, 패들, 터빈 등 및 이들의 조합을 포함한다. 일부 양태에서, 방법은 세포 조성물 또는 용해된 세포 조성물을 90ft/분 내지 1,200ft/분, 200ft/분 내지 1,000ft/분, 300ft/분 내지 800ft/분, 400ft/분 내지 700ft/분 또는 500ft/분 내지 600ft/분의 임펠러 팁 속도를 갖는 교반기로 교반하는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 방법은 세포 조성물 또는 용해된 세포 조성물을 350 cm/초 내지 900cm/초, 350 cm/초 내지 850cm/초, 350 cm/초 내지 800 cm/초, 350 cm/초 내지 750 cm/초, 350 cm/초 내지 700 cm/초, 350 cm/초 내지 650 cm/초, 350 cm/초 내지 600 cm/초, 350 cm/초 내지 550 cm/초, 350 cm/초 내지 500 cm/초, 350 cm/초 내지 450 cm/초, 350 cm/초 내지 400 cm/초, 400 cm/초 내지 900cm/초, 400 cm/초 내지 850cm/초, 400 cm/초 내지 800 cm/초, 400 cm/초 내지 750 cm/초, 400 cm/초 내지 700 cm/초, 400 cm/초 내지 650 cm/초, 400 cm/초 내지 600 cm/초, 400 cm/초 내지 550 cm/초, 400 cm/초 내지 500 cm/초, 400 cm/초 내지 450 cm/초, 450 cm/초 내지 900cm/초, 450 cm/초 내지 850cm/초, 450 cm/초 내지 800 cm/초, 450 cm/초 내지 750 cm/초, 450 cm/초 내지 700 cm/초, 450 cm/초 내지 650 cm/초, 450 cm/초 내지 600 cm/초, 450 cm/초 내지 550 cm/초, 450 cm/초 내지 500 cm/초, 500 cm/초 내지 900cm/초, 500 cm/초 내지 850cm/초, 500 cm/초 내지 800 cm/초, 500 cm/초 내지 750 cm/초, 500 cm/초 내지 700 cm/초, 500 cm/초 내지 650 cm/초, 500 cm/초 내지 600 cm/초, 500 cm/초 내지 550 cm/초, 550 cm/초 내지 900cm/초, 550 cm/초 내지 850cm/초, 550 cm/초 내지 800 cm/초, 550 cm/초 내지 750 cm/초, 550 cm/초 내지 700 cm/초, 550 cm/초 내지 650 cm/초, 550 cm/초 내지 600 cm/초, 600 cm/초 내지 900cm/초, 600 cm/초 내지 850cm/초, 600 cm/초 내지 800 cm/초, 600 cm/초 내지 750 cm/초, 600 cm/초 내지 700 cm/초, 600 cm/초 내지 650 cm/초, 650 cm/초 내지 900cm/초, 650 cm/초 내지 850cm/초, 650 cm/초 내지 800 cm/초, 650 cm/초 내지 750 cm/초, 650 cm/초 내지 700 cm/초, 700 cm/초 내지 900cm/초, 700 cm/초 내지 850cm/초, 700 cm/초 내지 800 cm/초, 700 cm/초 내지 750 cm/초, 750 cm/초 내지 900cm/초, 750 cm/초 내지 850cm/초, 750 cm/초 내지 800 cm/초, 800 cm/초 내지 900cm/초, 800 cm/초 내지 850cm/초 또는 850 cm/초 내지 900 cm/초의 임펠러 팁 속도를 갖는 교반기로 교반하는 단계를 포함한다. 본원에 사용된 "임펠러 팁 속도"는 중심 축의 주위를 회전함에 따른 임펠러의 최외부 부분의 속도를 지칭한다.
- [0157] 일부 양태에서, 교반(및 본원에 기술된 선택적으로 부가적인 단계)은 임펠러를 포함하는 용기에서 수행되고, 이때, 임펠러 직경 대 용기 부피의 비는 0.1 내지 0.5, 0.1 내지 0.4, 0.2 내지 0.5, 0.2 내지 0.4, 0.3 내지 0.5 또는 0.3 내지 0.4이다.
- [0158] 일부 양태에서, 교반(및 본원에 기술된 선택적으로 부가적인 단계)은 임펠러를 포함하는 용기에서 수행되고, 이때, 임펠러 직경 대 용기 부피의 비는 0.25 이상, 0.34 이상, 0.65 이상, 0.25 내지 0.65, 0.25 내지 0.33, 0.3 내지 0.6, 0.3 내지 0.5, 0.3 내지 0.4, 0.34 내지 0.65, 0.34 내지 0.6, 0.34 내지 0.55, 0.37 내지

0.55, 0.4 내지 0.65, 0.4 내지 0.6, 0.4 내지 0.5 또는 0.42 내지 0.55이다.

- [0159] 일부 양태에서, 교반은 세포 조성물 또는 용해된 세포 조성물이 10 내지 10,000, 1,000 내지 10,000, 1,500 내지 10,000 또는 2,000 내지 10,000의 레이놀드 수에 의해 기술된 유동 조건하에 위치하도록 세포 조성물 또는 용해된 세포 조성물을 혼합한다. 일부 양태에서, 교반중인 용해된 세포 에멀전은 2,000 이상, 3,000 이상 또는 5,000 이상 또는 2,000 내지 10,000, 3,000 내지 10,000 또는 5,000 내지 10,000의 레이놀드 수를 갖는다.
- [0160] 일부 양태에서, 방법은 세포 조성물 또는 용해된 세포 조성물을 5분 이상, 10분 이상, 20분 이상, 30분 이상, 1시간 이상, 2시간 이상, 4시간 이상, 8시간 이상, 12시간 이상, 18시간 이상, 24시간 이상, 30시간 이상, 36시간 이상, 42시간 이상, 48시간 이상, 54시간 이상, 60시간 이상, 66시간 이상, 72시간 이상, 78시간 이상, 84시간 이상, 90시간 이상 또는 96시간 동안 교반하는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 방법은 세포 조성물 또는 용해된 세포 조성물을 5분 내지 96시간, 5분 내지 4시간, 5분 내지 2시간, 5분 내지 1시간, 10분 내지 4시간, 10분 내지 2시간, 10분 내지 1시간, 1시간 내지 96시간, 1시간 내지 84시간, 1시간 내지 72시간, 1시간 내지 60시간, 1시간 내지 48시간, 1시간 내지 36시간, 1시간 내지 24시간, 1시간 내지 4시간, 4시간 내지 96시간, 4시간 내지 84시간, 4시간 내지 72시간, 4시간 내지 60시간, 4시간 내지 48시간, 4시간 내지 36시간, 4시간 내지 24시간, 8시간 내지 96시간, 8시간 내지 84시간, 8시간 내지 72시간, 8시간 내지 60시간, 8시간 내지 48시간, 8시간 내지 36시간, 8시간 내지 24시간, 8시간 내지 12시간, 12시간 내지 96시간, 12시간 내지 84시간, 12시간 내지 72시간, 12시간 내지 60시간, 12시간 내지 48시간, 12시간 내지 36시간, 12시간 내지 24시간, 20시간 내지 40시간, 24시간 내지 96시간, 24시간 내지 84시간, 24시간 내지 72시간, 24시간 내지 60시간, 24시간 내지 48시간 또는 24시간 내지 36시간 동안 교반하는 단계를 포함한다.
- [0161] 일부 양태에서, 방법은 세포 조성물 또는 용해된 세포 조성물을 동시에 교반 및 가열하여 세포 조성물 또는 용해된 세포 조성물을 항유화시키는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 방법은 세포 조성물 또는 용해된 세포 조성물을 10℃ 이상, 20℃ 이상, 25℃ 이상, 30℃ 이상, 35℃ 이상, 40℃ 이상, 45℃ 이상, 50℃ 이상, 55℃ 이상, 60℃ 이상, 65℃ 이상, 70℃ 이상, 75℃ 이상, 80℃ 이상, 85℃ 이상, 90℃ 이상, 95℃ 이상 또는 100℃ 이상의 온도에서 교반하는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 방법은 세포 조성물 또는 용해된 세포 조성물을 10℃ 내지 100℃, 10℃ 내지 90℃, 10℃ 내지 80℃, 10℃ 내지 70℃, 20℃ 내지 100℃, 20℃ 내지 90℃, 20℃ 내지 80℃, 20℃ 내지 70℃, 30℃ 내지 100℃, 30℃ 내지 90℃, 30℃ 내지 80℃, 30℃ 내지 70℃, 40℃ 내지 100℃, 40℃ 내지 90℃, 40℃ 내지 80℃, 50℃ 내지 100℃, 50℃ 내지 90℃, 50℃ 내지 80℃, 50℃ 내지 70℃, 60℃ 내지 100℃, 60℃ 내지 90℃, 60℃ 내지 80℃, 70℃ 내지 100℃, 70℃ 내지 90℃, 80℃ 내지 100℃, 80℃ 내지 90℃ 또는 90℃ 내지 100℃의 온도에서 교반하는 단계를 포함한다.
- [0162] 일부 양태에서, 용해된 세포 조성물의 형성, 용해된 세포 조성물과 염기의 접촉 또는 용해된 세포 조성물의 pH의 상승, 용해된 세포 조성물과 염의 접촉, 용해된 세포 조성물의 가열 및 용해된 세포 조성물의 교반의 다양한 조합이 단일 용기에서 발생할 수 있다. 일부 양태에서, 세포 조성물의 형성, 세포 조성물과 염기의 접촉 또는 세포 조성물의 pH의 상승, 세포 조성물과 염의 접촉, 세포 조성물의 가열 및 세포 조성물의 교반의 다양한 조합이 단일 용기에서 발생할 수 있다. 일부 양태에서, 단일 용기는 발효 용기를 포함한다. 일부 양태에서, 발효 용기는 20,000 L 이상, 50,000 L 이상, 100,000 L 이상, 120,000 L 이상, 150,000 L 이상, 200,000 L 이상 또는 220,000 L 이상의 부피를 가질 수 있다. 일부 양태에서, 발효 용기는 20,000 L 내지 220,000 L, 20,000 L 내지 100,000 L, 20,000 L 내지 50,000 L, 50,000 L 내지 220,000 L, 50,000 L 내지 150,000 L, 50,000 L 내지 100,000 L, 100,000 L 내지 220,000 L, 100,000 L 내지 150,000 L, 100,000 L 내지 120,000 L, 150,000 L 내지 220,000 L, 150,000 L 내지 200,000 L 또는 200,000 L 내지 220,000 L의 부피를 가질 수 있다.
- [0163] 일부 양태에서, 용기에서 형성된 세포 조성물 또는 용해된 세포 조성물의 양은 하나 이상의 교반 용기에 전달될 수 있다. 일부 양태에서, 교반 용기는 20,000 L 이상, 30,000 L 이상, 40,000 L 이상 또는 50,000 L 이상의 부피를 가질 수 있다. 일부 양태에서, 교반 용기는 20,000 L 내지 50,000 L, 20,000 L 내지 40,000 L, 20,000 L 내지 30,000 L, 30,000 L 내지 50,000 L, 30,000 L 내지 40,000 L 또는 40,000 L 내지 50,000 L의 교반 부피를 가질 수 있다.
- [0164] 일부 양태에서, 교반 용기는 하기 특성의 임의의 조합을 가질 수 있다. 일부 양태에서, 교반 용기는 2개의 임펠러를 가질 수 있다. 일부 양태에서, 임펠러는 러스톤 블레이드 임펠러이다. 일부 양태에서, 임펠러는 가장 작은 임펠러의 직경 이상의 거리만큼 서로 떨어진다. 일부 양태에서, 임펠러는 팁에서 팁까지 30 inch 내지 40 inch, 33 inch 내지 37 inch, 33 inch, 34 inch, 35 inch, 36 inch 또는 37 inch이다. 일부 양태에서, 교반 용기는 10,000 L 이상, 20,000 L 이상, 30,000 L 이상, 40,000 L 이상 또는 50,000 L 이상의 부피를 갖는다.

일부 양태에서, 교반 용기는 90 inch 내지 110 inch, 95 inch 내지 105 inch, 98 inch, 99 inch, 100 inch, 101 inch 또는 102 inch의 내부 직경을 갖는다. 일부 양태에서, 제1 임펠러는 교반 용기의 저부로부터 15 inch 내지 20 inch, 16 inch 내지 19 inch 또는 17 inch 내지 18 inch에 위치하고, 제2 임펠러는 제1 임펠러의 60 inch 내지 80 inch, 65 inch 내지 75 inch, 68 inch, 69 inch, 70 inch, 71 inch, 72 inch, 73 inch, 74 inch 또는 75 inch 상부에 위치한다. 일부 양태에서, 용해된 세포 조성물은 50 rpm 이상, 60 rpm 이상 또는 70 rpm 이상으로 교반된다. 일부 양태에서, 용해된 세포 조성물은 50 rpm 내지 70 rpm, 50 rpm 내지 60 rpm 또는 60 rpm 내지 70 rpm으로 교반된다.

[0165] 일부 양태에서, 세포 조성물, 용해된 세포 조성물 또는 지질은 세포 조성물, 용해된 세포 조성물 또는 지질을 용기로부터 펌핑시킴으로써, 용기로부터 수확된다. 일부 양태에서, 세포 조성물, 용해된 세포 조성물 또는 지질은 용기의 교반 없이 용기로부터 수확된다. 일부 양태에서, 세포 조성물, 용해된 세포 조성물 또는 지질은 교반 없이 세포 조성물, 용해된 세포 조성물 또는 지질을 용기로부터 펌핑시킴으로써, 용기로부터 수확된다. 일부 양태에서, 세포 조성물, 용해된 세포 조성물 또는 지질은 공기 유입 없이 용기로부터 수확된다. 일부 양태에서, 상기 기술에 의한 세포 조성물, 용해된 세포 조성물 또는 지질의 수확은 낮은 아니시딘 값(예컨대, 26 이하, 25 이하, 20 이하, 15 이하, 10 이하, 5 이하, 2 이하 또는 1 이하) 및/또는 낮은 인 함량(예컨대, 100ppm 이하, 95ppm 이하, 90ppm 이하, 85ppm 이하, 80ppm 이하, 75ppm 이하, 70ppm 이하, 65ppm 이하, 60ppm 이하, 55ppm 이하, 50ppm 이하, 45ppm 이하, 40ppm 이하, 35ppm 이하, 30ppm 이하, 25ppm 이하, 20ppm 이하, 15ppm 이하, 10ppm 이하, 5ppm 이하, 4ppm 이하, 3ppm 이하, 2ppm 이하 또는 1ppm 이하)을 갖는 조질 지질을 야기한다.

[0166] 본원에 기술된 바와 같이, 본 발명은 용해된 세포 조성물과 제1 염기의 접촉 또는 용해된 세포 조성물의 pH의 상승, 용해된 세포 조성물과 염의 접촉, 용해된 세포 조성물의 가열, 및 용해된 세포 조성물의 교반에 의한 처리된 용해된 세포 조성물의 제공의 다양한 조합을 이용한다. 본원에 기술된 바와 같이, 본 발명은 세포 조성물과 제1 염기의 접촉 또는 세포 조성물의 pH의 상승, 세포 조성물과 염의 접촉, 세포 조성물의 가열, 및 세포 조성물의 교반에 의한 처리된 세포 조성물의 제공의 다양한 조합을 이용한다. 처리된 세포 조성물 또는 처리된 용해된 세포 조성물은 비처리된 세포 조성물 또는 처리된 용해된 세포 조성물에 비해 적어도 부분적으로 항유화된다. 따라서, 처리된 세포 조성물 또는 처리된 용해된 세포 조성물은 원심분리기에 위치될 수 있고, 지질이 이로부터 분리될 수 있다.

[0167] 일부 양태에서, 예컨대 제1 염기와 접촉에 의한 세포 조성물 또는 용해된 세포 조성물의 pH의 상승 후, 세포 조성물 또는 용해된 세포 조성물의 가열 및/또는 세포 조성물 또는 용해된 세포 조성물의 교반은 처리된 세포 조성물 또는 처리된 용해된 세포 조성물의 pH를 감소시킬 수 있다. 지질이 원심분리에 의해 처리된 세포 조성물 또는 처리된 용해된 세포 조성물로부터 더욱 효과적으로 분리되도록, 처리된 세포 조성물 또는 처리된 용해된 세포 조성물의 pH가, 예컨대, 처리된 세포 조성물 또는 처리된 용해된 세포 조성물과 제2 염기의 접촉에 의해 다시 상승된다. 일부 양태에서, 처리된 용해된 세포 조성물과 제2 염기의 접촉은 처리된 세포 조성물 또는 처리된 용해된 세포 조성물의 pH를 상승시킨다. 일부 양태에서, 처리된 세포 조성물 또는 처리된 용해된 세포 조성물은 제2 염기와 접촉되어 처리된 세포 조성물 또는 처리된 용해된 세포 조성물의 pH를 7 이상, 7.5 이상, 8 이상, 8.5 이상, 9 이상, 9.5 이상, 10 이상, 10.5 이상, 11 이상, 11.5 이상 또는 12 이상까지 상승시킨다. 일부 양태에서, 처리된 세포 조성물 또는 처리된 용해된 세포 조성물은 제2 염기와 접촉되어 처리된 용해된 세포 조성물의 pH를 7 내지 13, 7 내지 12, 7 내지 11, 7 내지 10, 7 내지 9, 7 내지 8, 7 내지 7.5, 7.5 내지 8, 8 내지 13, 8 내지 12, 8 내지 11, 8 내지 10, 8 내지 9, 8 내지 8.5, 8.5 내지 9, 9 내지 12, 9 내지 11, 9 내지 10, 9 내지 9.5, 9.5 내지 10, 10 내지 12 또는 10 내지 11까지 상승시킨다.

[0168] 일부 양태에서, 처리된 세포 조성물 또는 처리된 용해된 세포 에멀전의 pH는 7 이하, 6 이하, 5 이하, 4 이하 또는 3 이하이다.

[0169] 본 발명의 방법은 지질을 처리된 세포 조성물 또는 처리된 용해된 세포 조성물로부터 분리하는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 지질은 용해된 세포 에멀전으로부터 용해된 세포 에멀전과 제2 염기의 접촉 후, 용해된 세포 에멀전의 교반 후 또는 용해된 세포 에멀전과 염의 접촉 후, 예를 들어, 처리된 용해된 세포 에멀전을 지질이 처리된 용해된 세포 에멀전으로부터 분리되기에 충분한 시간 동안 방치함으로써 (예컨대, 별개 층으로서) 분리된다. 이어서, 지질은, 예를 들어 경사분리, 스키밍, 버큐밍, 펌핑, 흡입, 인발, 시포닝, 또는 처리된 용해된 세포 에멀전의 표면으로부터의 지질의 다른 제거법에 의해 제거될 수 있다.

[0170] 일부 양태에서, 분리는 처리된 세포 조성물 또는 처리된 용해된 세포 조성물의 원심분리(예컨대, 30°C 내지 100

℃의 온도에서)를 포함하고, 이에 의해, 원심분리는 지질을 처리된 세포 조성물 또는 처리된 용해된 세포 조성물로부터 분리한다.

[0171] 일부 양태에서, 방법은 처리된 세포 조성물 또는 처리된 용해된 세포 조성물을 10℃ 이상, 20℃ 이상, 25℃ 이상, 30℃ 이상, 35℃ 이상, 40℃ 이상, 45℃ 이상, 50℃ 이상, 55℃ 이상, 60℃ 이상, 65℃ 이상, 70℃ 이상, 75℃ 이상, 80℃ 이상, 85℃ 이상, 90℃ 이상, 95℃ 이상 또는 100℃ 이상의 온도에서 원심분리하는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 방법은 처리된 세포 조성물 또는 처리된 용해된 세포 조성물을 10℃ 내지 100℃, 10℃ 내지 90℃, 10℃ 내지 80℃, 20℃ 내지 100℃, 20℃ 내지 90℃, 20℃ 내지 80℃, 25℃ 내지 100℃, 25℃ 내지 90℃, 25℃ 내지 80℃, 25℃ 내지 75℃, 30℃ 내지 100℃, 30℃ 내지 90℃, 30℃ 내지 80℃, 40℃ 내지 100℃, 40℃ 내지 90℃, 40℃ 내지 80℃, 50℃ 내지 100℃, 50℃ 내지 90℃, 50℃ 내지 80℃, 50℃ 내지 70℃, 60℃ 내지 100℃, 60℃ 내지 90℃, 60℃ 내지 80℃, 60℃ 내지 70℃, 70℃ 내지 100℃ 또는 70℃ 내지 90℃의 온도에서 원심분리하는 단계를 포함한다.

[0172] 일부 양태에서, 원심분리는 1 kg/분 내지 500 kg/분, 1 kg/분 내지 400 kg/분, 1 kg/분 내지 300 kg/분, 1 kg/분 내지 200 kg/분, 1 kg/분 내지 100 kg/분, 1 kg/분 내지 75 kg/분, 1 kg/분 내지 50 kg/분, 1 kg/분 내지 40 kg/분, 1 kg/분 내지 30 kg/분, 1 kg/분 내지 25 kg/분, 1 kg/분 내지 10 kg/분, 10 kg/분 내지 500 kg/분, 10 kg/분 내지 400 kg/분, 10 kg/분 내지 300 kg/분, 10 kg/분 내지 200 kg/분, 10 kg/분 내지 100 kg/분, 10 kg/분 내지 75 kg/분, 10 kg/분 내지 50 kg/분, 10 kg/분 내지 40 kg/분, 10 kg/분 내지 30 kg/분, 20 kg/분 내지 500 kg/분, 20 kg/분 내지 400 kg/분, 20 kg/분 내지 300 kg/분, 20 kg/분 내지 200 kg/분, 20 kg/분 내지 100 kg/분, 20 kg/분 내지 75 kg/분, 20 kg/분 내지 50 kg/분, 20 kg/분 내지 40 kg/분, 25 kg/분 내지 500 kg/분, 25 kg/분 내지 400 kg/분, 25 kg/분 내지 300 kg/분, 25 kg/분 내지 200 kg/분, 25 kg/분 내지 100 kg/분, 25 kg/분 내지 75 kg/분, 25 kg/분 내지 50 kg/분, 30 kg/분 내지 60 kg/분, 30 kg/분 내지 50 kg/분, 30 kg/분 내지 40 kg/분, 50 kg/분 내지 500 kg/분, 100 kg/분 내지 500 kg/분 또는 200 kg/분 내지 500 kg/분의 (원심분리기로의 처리된 세포 조성물 또는 처리된 용해된 세포 조성물의) 공급 속도로 수행된다.

[0173] 분리에 필요한 총 시간은 처리된 세포 조성물 또는 처리된 용해된 세포 조성물의 부피에 따라 변할 수 있다. 분리를 위한 전형적인 총 시간(예컨대, 원심분리 시간)은 0.1시간 이상, 0.2시간 이상, 0.5시간 이상, 1시간 이상, 2시간 이상, 4시간 이상, 6시간 이상, 8시간 이상, 10시간 이상, 12시간 또는 0.1시간 내지 24시간, 0.5시간 내지 24시간, 1시간 내지 12시간, 2시간 내지 10시간 또는 4시간 내지 8시간이다.

[0174] 일부 양태에서, 본 발명의 방법은 처리된 세포 조성물 또는 처리된 용해된 세포 조성물을 1,000 g 내지 25,000 g, 1,000 g 내지 20,000 g, 1,000 g 내지 10,000 g, 2,000 g 내지 25,000 g, 2,000 g 내지 20,000 g, 2,000 g 내지 15,000 g, 3,000 g 내지 25,000 g, 3,000 g 내지 20,000 g, 5,000 g 내지 25,000 g, 5,000 g 내지 20,000 g, 5,000 g 내지 15,000 g, 5,000 g 내지 10,000 g, 5,000 g 내지 8,000 g, 10,000 g 내지 25,000 g, 15,000 g 내지 25,000 g, 또는 1,000 g 이상, 2,000 g 이상, 4,000 g 이상, 5,000 g 이상, 7,000 g 이상, 8,000 g 이상, 10,000 g 이상, 15,000 g 이상, 20,000 g 이상 또는 25,000 g 이상의 원심력으로 원심분리하는 단계를 포함한다. 본원에 사용된 "g"는 표준 중력 또는 약 9.8 m/s²를 지칭한다. 일부 양태에서, 본 발명의 방법은 처리된 세포 조성물 또는 처리된 용해된 세포 조성물을 4,000 rpm 내지 14,000 rpm, 4,000 rpm 내지 10,000 rpm, 6,000 rpm 내지 14,000 rpm, 6,000 rpm 내지 12,000 rpm, 8,000 rpm 내지 14,000 rpm, 8,000 rpm 내지 12,000 rpm 또는 8,000 rpm 내지 10,000 rpm으로 원심분리하는 단계를 포함한다.

[0175] 일부 양태에서, 본 발명의 방법은 지질을 처리된 세포 조성물 또는 처리된 용해된 세포 조성물로부터의 지질의 분리 후에 건조하여 지질로부터 물을 제거하는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 지질의 건조는, 비제한적으로, 지질을 가열하여 물을 증발시키는 것을 포함한다. 일부 양태에서, 건조 후, 지질은 지질의 중량%를 기준으로 3% 미만, 2.5% 미만, 2% 미만, 1.5% 미만, 1% 미만, 0.5% 미만, 0.1% 미만 또는 0%의 물 함량을 갖는다. 일부 양태에서, 건조 후, 지질은 지질의 중량%를 기준으로 0 내지 3%, 0 내지 2.5%, 0 내지 2%, 0 내지 1.5%, 0 내지 1%, 0 내지 0.5%, 0.1 내지 3%, 0.1 내지 2.5%, 0.1 내지 2%, 0.1 내지 1.5%, 0.1 내지 1%, 0.1 내지 0.5%, 0.5 내지 3%, 0.5 내지 2.5%, 0.5 내지 2%, 0.5 내지 1.5%, 0.5 내지 1%, 1 내지 3%, 1 내지 2.5%, 1 내지 2%, 1 내지 1.5%, 1.5 내지 3%, 1.5 내지 2.5%, 1.5 내지 2%, 2 내지 3%, 2 내지 2.5% 또는 2.5 내지 3%의 물 함량을 갖는다.

[0176] 일부 양태에서, 방법은 가성 정련, 탈검, 알칼리 정련, 표백, 탈취, 탈산성화 등 및 이들의 조합으로부터 선택된 하나 이상의 방법에 의해 지질을 정련하여 하나 이상의 포스포지질, 유리 지방산, 포스파타이드, 유색체, 스테롤, 악취 물질 및 다른 불순물을 제거하는 단계를 추가로 포함한다. 본원에 사용된 "정련된 오일"은 정련된

조질 지질 또는 조질 오일이다. 본원에 사용된 "조질 지질" 또는 "조질 오일"은 정련된 지질 또는 오일이다. 일부 양태에서, 향유화된 세포 조성물로부터 분리된 지질은 조질 지질이다.

- [0177] 본 발명의 다양한 예시적인 방법이 도 1 내지 4에 개략적으로 기술된다. 도 1을 참고하면, 일부 양태에서, 본 발명은 세포(101)를 용해(102)하여 용해된 세포 조성물(103)을 형성하는 단계를 포함하는, 지질(110)을 세포(101)로부터 수득하는 방법(100)에 관한 것이다. 용해된 세포 조성물은 제1 염기(104)와 접촉되어 용해된 세포 조성물(103)을 향유화시키고, 염(105)과 접촉되어 용해된 세포 조성물(103)을 향유화시키고, 예컨대, 10분 내지 96시간 동안 가열되어(106), 처리된 용해된 세포 조성물(107)을 제공한다. 처리된 용해된 세포 조성물(107)은 제2 염기(108)와 접촉되고 예컨대, 10℃ 내지 100℃의 온도에서 분리되어(109) 지질(110)을 제공한다.
- [0178] 도 2를 참고하면, 일부 양태에서, 본 발명은 세포(101)를 용해하여(102) 용해된 세포 조성물(103)을 형성하는 단계를 포함하는, 지질(210)을 세포로부터 수득하는 방법(200)에 관한 것이다. 이어서, 용해된 세포 조성물은 염기(204)와 접촉되어 용해된 세포 조성물(103)을 향유화시키고, 처리된 용해된 세포 조성물(207)을 제공한다. 처리된 용해된 세포 조성물(207)은 예컨대, 10℃ 내지 100℃의 온도에서 분리되어(209) 지질(210)을 제공한다.
- [0179] 도 3을 참고하면, 일부 양태에서, 본 발명은 세포(101)를 용해(102)하여 용해된 세포 조성물(103)을 형성하는 단계를 포함하는, 지질(310)을 세포로부터 수득하는 방법(300)에 관한 것이다. 이어서, 용해된 세포 조성물은 염(305)과 접촉되어 용해된 세포 조성물(103)을 향유화시키고 처리된 용해된 세포 조성물(307)을 제공하고, 이는 예컨대, 10℃ 내지 100℃의 온도에서 분리되어(309) 지질(310)을 제공한다.
- [0180] 도 4를 참고하면, 일부 양태에서, 본 발명은 세포(101)를 용해(102)하여 용해된 세포 조성물(103)을 포함하는, 지질(410)을 세포로부터 수득하는 방법(400)에 관한 것이다. 이어서, 용해된 세포 조성물은 염(405)과 접촉되어 용해된 세포 조성물(103)을 향유화시키고, 예컨대, 5분 내지 96시간 동안 교반되고(401), 선택적으로 가열(402)되어 처리된 용해된 세포 조성물(407)을 제공한다. 이어서, 처리된 용해된 세포 조성물은 예컨대, 10℃ 내지 100℃의 온도에서 분리되어(409) 지질(410)을 제공한다.
- [0181] 일부 양태에서, 본 발명의 방법은 미생물 세포를 포함하는 배양액, 식물 물질을 포함하는 배양액을 농축하는 단계 및/또는 용해된 세포 조성물을 농축하는 단계를 포함한다. 본원에 사용된 "농축하는"은 조성물로부터 물을 제거함을 지칭한다. 농축은, 비제한적으로, 증발, 화학적 건조, 원심분리 등 및 이들의 조합을 포함할 수 있다.
- [0182] 일부 양태에서, 미생물 세포를 포함하는 배양액 또는 식물 물질을 포함하는 배양액을 농축하여 배양액의 중량을 기준으로 4% 이상, 5% 이상, 10% 이상, 15% 이상, 20% 이상, 25% 이상 또는 30% 이상의 지질 농도를 제공한다. 일부 양태에서, 미생물 세포를 포함하는 배양액 또는 식물 물질을 포함하는 배양액을 농축하여 배양액의 중량을 기준으로 4 내지 40%, 4 내지 30%, 4 내지 20%, 4 내지 15%, 5 내지 40%, 5 내지 30%, 5 내지 20%, 10 내지 40%, 10 내지 30%, 10 내지 20%, 15 내지 40%, 15 내지 30%, 20 내지 40%, 20 내지 30%, 25 내지 40% 또는 30 내지 40%의 지질 농도를 제공한다.
- [0183] 일부 양태에서, 세포 조성물 또는 용해된 세포 조성물을 농축하여 용해된 세포 조성물의 중량을 기준으로 4% 이상, 5% 이상, 10% 이상, 15% 이상, 20% 이상, 25% 이상 또는 30% 이상의 지질 농도를 제공한다. 일부 양태에서, 세포 조성물 또는 용해된 세포 조성물을 농축하여 용해된 세포 조성물의 중량을 기준으로 4 내지 40%, 4 내지 30%, 4 내지 20%, 4 내지 15%, 5 내지 40%, 5 내지 30%, 5 내지 20%, 10 내지 40%, 10 내지 30%, 10 내지 20%, 15 내지 40%, 15 내지 30%, 20 내지 40%, 20 내지 30%, 25 내지 40% 또는 30 내지 40%의 지질 농도를 제공한다.
- [0184] 일부 양태에서, 본 발명의 방법에 의해 제조된 지질은 2 이하의 전체 아로마 강도를 갖는다. 본원에 사용된 용어 "전체 아로마 강도"는 감각 분석가의 패널에 의해 지질에 대해 제공된 후각 감각 등급을 지칭한다. 본원에 사용된 용어 "감각 분석가"는 물질의 감각 특징에 대해 등급을 매기고/매기거나 피드백을 제공하는 훈련된 개인을 지칭한다.
- [0185] 일부 양태에서, 본 발명의 방법에 의해 제조된 지질은 3 이하의 전체 아로마틱 강도를 갖는다. 본원에 사용된 용어 "전체 아로마틱 강도"는 감각 분석가의 패널에 의해 지질에 대해 제공된 미각 또는 맛 감각 등급을 지칭한다. 일부 양태에서, 유니버설 스펙트럼(Universal Spectrum) 묘사 분석 방법이 샘플의 아로마 및 아로마틱 특성을 평가하는데 사용된다. 이러한 방법은 0 내지 15의 강도 등급(이때 0 = 검출되지 않음, 15 = 매우 강한 강도)을 사용하여 오일의 아로마 및 아로마틱 속성을 측정한다.
- [0186] 일부 양태에서, 본 발명의 방법에 의해 제조된 지질은 비린맛으로서 특징지어지는 뒷맛을 갖지 않는다. 본원에

사용된 용어 "뒤틀맛"은 감각 분석가의 패널에 의해 특징지어지는 지질내 향미 감각의 지속을 지칭한다.

[0187] 일부 양태에서, 본 발명의 방법은 5 이하, 4.5 이하, 4 이하, 3.5 이하, 3 이하, 2.5 이하, 2 이하, 1.5 이하, 1 이하, 0.5 이하, 0.2 이하 또는 0.1 이하의 과산화물 값(PV)을 갖는 조질 지질을 제공한다. 본원에 사용된 용어 "과산화물 값" 또는 "PV"는 지질의 산화중에 발생하는 제1 반응 생성물, 예컨대 과산화물 및 하이드로과산화물의 측정치를 지칭한다. 일부 양태에서, PV는 지질의 품질의 지표이고, 낮은 PV(즉, 5 이하)를 갖는 지질에서 발생한 산화의 정도는 5 초과 PV를 갖는 지질보다 증가된 안정성 및 감각 프로파일을 나타낸다. 일부 양태에서, 상기 논의된 바와 같이 염기를 용해된 세포 조성물에 첨가하는 것은 용해된 세포 조성물의 pH를 상승시키고, 지질 산화를 억제하고, 이에 의해 본 발명의 방법으로부터 수득된 조질 지질이 낮은 PV(즉, 5 이하)를 갖도록 용해된 세포 조성물내의 유리 라디칼의 양을 최소화시킨다.

[0188] 일부 양태에서, 본 발명의 방법은 26 이하, 25 이하, 20 이하, 15 이하, 10 이하, 5 이하, 2 이하 또는 1 이하의 아니시딘 값(AV)을 갖는 조질 지질을 제공한다. 본원에 사용된 용어 "아니시딘 값" 또는 "AV"는 지질의 산화중에 발생한 제2 반응 생성물, 예컨대 알데하이드 및 케톤의 측정치를 지칭한다. 일부 양태에서, AV는 지질의 품질 및 지질내에 발생한 산화의 정도의 지표이다. 낮은 AV(즉, 26 이하)를 갖는 지질은 26 초과 AV를 갖는 지질보다 증가된 안정성 및 감각 프로파일을 나타낸다. 일부 양태에서, 상기 논의된 바와 같이 염기를 용해된 세포 조성물에 첨가하는 것은 용해된 세포 조성물의 pH를 상승시키고, 지질 산화를 억제하고, 이에 의해 본 발명의 방법으로부터 수득된 조질 지질이 낮은 AV(즉, 26 이하)를 갖도록 용해된 세포 조성물내의 유리 라디칼의 양을 최소화시킨다.

[0189] 일부 양태에서, 본 발명의 방법은 100ppm 이하, 95ppm 이하, 90ppm 이하, 85ppm 이하, 80 ppm 이하, 75ppm 이하, 70ppm 이하, 65ppm 이하, 60ppm 이하, 55ppm 이하, 50ppm 이하, 45ppm 이하, 40ppm 이하, 35ppm 이하, 30ppm 이하, 25ppm 이하, 20ppm 이하, 15ppm 이하, 10ppm 이하, 5ppm 이하, 4ppm 이하, 3ppm 이하, 2ppm 이하 또는 1ppm 이하의 인 함량을 갖는 조질 지질을 제공한다.

[0190] 일부 양태에서, 본 발명의 방법은 추출이 용매(예컨대, 비전형적인 헥산 추출 또는 프리오렉스(Friolex, 등록상표) 공정(웨스트팔리아 세퍼레이터 아게(Westfalia Separator AG), 독일))를 사용하여 수행된 경우보다 낮은 아니시딘 값, 낮은 과산화물 값, 낮은 인 함량 및/또는 높은 추출 수율을 갖는 조질 지질을 제공한다. 프리오렉스 공정은 미국특허 제5,928,696호 및 국제특허출원공개 제01/76385호 및 제01/76715호(각각 본원에 이의 전체 내용이 참고로서 혼입된다)에 기술된 수용성 유기 용매에 의한 지질의 추출 방법이다.

[0191] 일부 양태에서, 용해된 세포 조성물의 가열은 제2 반응 생성물(예컨대, 알데하이드 및 케톤)을 야기하여 용해된 세포 조성물에 존재하는 단백질을 사용하는 메일라드(Maillard) 반응과 유사한 반응에 참여한다. 상기 반응은 지질의 산화를 감소시키는 산화방지제 활성을 갖는 제품을 생성하는 것으로 여겨진다. 일부 양태에서, 부가적인 단백질, 예컨대, 콩 단백질을 용해된 세포 조성물에 첨가하여 산화방지제 활성을 증가시킬 수 있다. 지질 산화의 감소는 지질의 AV를 감소시키고, 지질의 임의의 뒤틀맛을 감소시키고/시키거나 지질의 안정성을 증가시킨다. 일부 양태에서, 안정성은 5% 이상, 10% 이상, 15% 이상 또는 20% 이상 증가한다.

[0192] 일부 양태에서, 본 발명의 방법에 의해 추출된 지질, 지질의 추출 후 잔류하는 생물질 또는 이들의 조합이 식품 또는 식품 성분, 예컨대 유아 식품내 성분, 영아 제형, 음료, 소스, 낙농 식품(예컨대, 우유, 요거트, 치즈 및 아이스크림), 오일(예컨대, 쿠킹 오일 또는 샐러드 드레싱), 및 베이킹된 식품; 영양 보충제(예컨대, 캡슐 또는 정제 형태; 임의의 비인간 동물(예컨대, 이들의 생성물(예컨대, 고기, 우유 또는 달걀)이 인간에 의해 소비됨)을 위한 사료 또는 사료 보충제; 식품 보충제; 및 약학 제품(직접 또는 부가물 치료 적용)으로서 직접 사용될 수 있다. 용어 "동물"은 애니말리아(*Animalia*) 계에 속하는 임의의 유기체를 지칭하고, 임의의 인간 동물, 및 이들로부터 생성물(예컨대, 우유, 달걀, 가금류 고기, 소고기, 돼지고기 또는 양고기)이 유래하는 비인간 동물을 포함한다. 일부 양태에서, 지질 및/또는 생물질이 해산 식품에 사용될 수 있다. 해산 식품은 비제한적으로 어류, 새우 및 조개로부터 유래한다. 용어 "생성물"은 이러한 동물로부터 유래하는 임의의 생성물, 예컨대 비제한적으로 고기, 달걀, 우유 또는 다른 생성물을 포함한다. 지질 및/또는 생물질은 이러한 동물에게 공급되고, 다가불포화 지질은 식육, 우유, 달걀, 또는 이러한 동물의 다른 생성물에 혼입되어 지질의 함량을 증가시킬 수 있다.

[0193] **미생물 지질**

[0194] 일부 양태에서, 본 발명은 본 발명의 방법에 따라 추출된 미생물 지질에 관한 것이다. 일부 양태에서, 조질 미생물 지질은 26 이하, 25 이하, 20 이하, 15 이하, 10 이하, 5 이하, 2 이하 또는 1 이하의 아니시딘 값, 및/또

는 5 이하, 4.5 이하, 4 이하, 3.5 이하, 3 이하, 2.5 이하, 2 이하, 1.5 이하, 1 이하, 0.5 이하, 0.2 이하 또는 0.1 이하의 과산화물 값, 및/또는 100ppm 이하, 95ppm 이하, 90ppm 이하, 85ppm 이하, 80ppm 이하, 75ppm 이하, 70ppm 이하, 65ppm 이하, 60ppm 이하, 55ppm 이하, 50ppm 이하, 45ppm 이하, 40ppm 이하, 35ppm 이하, 30ppm 이하, 25ppm 이하, 20ppm 이하, 15ppm 이하, 10ppm 이하, 5ppm 이하, 4ppm 이하, 3ppm 이하, 2ppm 이하 또는 1ppm 이하의 인 함량을 갖는다. 일부 양태에서, 조질 미생물 지질은 중량 또는 부피를 기준으로 5% 미만, 4% 미만, 3% 미만, 2% 미만 또는 1% 미만의 유기 용매를 갖는다. 일부 양태에서, 조질 미생물 지질은 중량을 기준으로 10% 이상, 15% 이상, 20% 이상, 25% 이상, 30% 이상, 35% 이상, 40% 이상, 45% 이상 또는 50% 이상의 목적 PUFA를 갖는다. 일부 양태에서, 조질 미생물 지질은 중량을 기준으로 10% 이상, 15% 이상, 20% 이상, 25% 이상, 30% 이상, 35% 이상, 40% 이상, 45% 이상 또는 50% 이상의 DHA, 및/또는 중량을 기준으로 10% 이상, 15% 이상 또는 20% 이상의 DPA n-6, 및/또는 중량을 기준으로 10% 이상, 15% 이상 또는 20% 이상의 EPA, 및/또는 중량을 기준으로 10% 이상, 15% 이상, 20% 이상, 25% 이상, 30% 이상, 35% 이상, 40% 이상, 45% 이상 또는 50% 이상의 ARA를 갖는다. 일부 양태에서 본 발명의 방법에 따라 추출된 조질 미생물 지질은 용매를 사용하여 추출을 수행한 경우(예컨대, 전형적인 헥산 추출 또는 프리오렉스 공정(웨스트팔리아 세퍼레이터, 독일))보다 낮은 아니시딘 값, 낮은 과산화물 값, 낮은 인 함량 및/또는 높은 추출 수율을 갖는 조질 지질을 제공한다.

[0195] 단리된 트라우스토키트리드 미생물의 제1 세트로부터 추출된 지질

[0196] 일부 양태에서, 본 발명은 또한 미국특허출원공개 제2010/0239533호 및 국제특허출원공개 제2010/107415호(각각 본원에 이의 전체 내용이 참고로서 혼입된다)에 기술된 트라우스토키트리드로부터 추출된 미생물 지질에 관한 것이다. 일부 양태에서, 상기 방법은 트라우스토키트리드를 배양액에서 성장시켜 생물질을 제조하는 단계 및 오메가-3 지방산을 포함하는 지질을 생물질로부터 추출하는 단계를 포함한다. 지질은 새로이 수확된 생물질로부터 추출되거나, 부패를 방지하는 조건하에 저장된 종전에 수확된 생물질로부터 추출될 수 있다. 공지된 방법이 본 발명의 트라우스토키트리드를 배양하여 배양액으로부터 생물질을 단리하고, 생물질로부터 추출된 오일의 지방산 프로파일을 분석하는데 사용될 수 있다(예컨대, 미국특허 제5,130,242호 참고, 이의 전체 내용은 본원에 참고로서 혼입된다). 지질은 본 발명의 방법에 따라 추출될 수 있다.

[0197] 본 발명의 미생물 지질은 하기를 비롯한 미생물로부터 유래하는 임의의 지질일 수 있다: 추가 가공 없이 미생물의 생물질로부터 추출된 조질 오일; 조질 미생물 오일의 추가 가공 단계, 예컨대 정련, 표백, 및/또는 탈취에 의해 취득된 정련된 오일; 조질 또는 정련된 미생물 오일을 회석함으로써 취득된 회석된 미생물 오일; 또는 조질 또는 정련된 미생물 오일을 추가 정제 방법으로 처리하여 오일중 지방산(예컨대, DHA)의 농도를 증가시킴으로써 취득된 강화된 오일.

[0198] 일부 양태에서, 미생물 지질은 중량을 기준으로 0% 이상, 0.1% 이상, 0.2% 이상, 0.5% 이상, 약 1% 이상, 1.5% 이상, 2% 이상 또는 5% 이상의 스테롤 에스터 분획을 포함한다. 일부 양태에서, 미생물 지질은 중량을 기준으로 0 내지 1.5%, 0 내지 2%, 0 내지 5%, 1 내지 1.5%, 0.2 내지 1.5%, 0.2 내지 2% 또는 0.2 내지 5중량%의 스테롤 에스터 분획을 포함한다. 일부 양태에서, 미생물 지질은 중량을 기준으로 5% 미만, 4% 미만, 3% 미만 또는 2% 미만의 스테롤 에스터 분획을 포함한다.

[0199] 일부 양태에서, 미생물 지질은 중량을 기준으로 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상 또는 90% 이상의 트라이글리세라이드 분획을 포함한다. 일부 양태에서, 미생물 지질은 65 내지 95%, 75 내지 95% 또는 80 내지 95% 또는 97중량% 또는 98중량%의 트라이글리세라이드 분획을 포함한다.

[0200] 일부 양태에서, 미생물 지질은 중량을 기준으로 0.5% 이상, 1% 이상, 1.5% 이상, 2% 이상, 2.5% 이상 또는 5% 이상의 유리 지방산 분획을 포함한다. 일부 양태에서, 미생물 지질은 중량을 기준으로 0.5 내지 5%, 0.5 내지 2.5%, 0.5 내지 2%, 0.5 내지 1.5%, 0.5 내지 1%, 1 내지 2.5%, 1 내지 5%, 1.5 내지 2.5%, 2 내지 2.5% 또는 2 내지 5%의 유리 지방산 분획을 포함한다. 일부 양태에서, 미생물 지질은 중량을 기준으로 5% 미만, 4% 미만, 3% 미만, 2% 미만 또는 1% 미만의 유리 지방산 분획을 포함한다.

[0201] 일부 양태에서, 미생물 지질은 중량을 기준으로 0.5% 이상, 1% 이상, 1.5% 이상, 2% 이상 또는 5% 이상의 스테롤 분획을 포함한다. 일부 양태에서, 미생물 지질은 중량을 기준으로 0.5 내지 1.5%, 1 내지 1.5%, 0.5 내지 2%, 0.5 내지 5%, 1 내지 2% 또는 1 내지 5%의 스테롤 분획을 포함한다. 일부 양태에서, 미생물 지질은 중량을 기준으로 5% 미만, 4% 미만, 3% 미만, 2% 미만 또는 1% 미만의 스테롤 분획을 포함한다.

[0202] 일부 양태에서, 미생물 지질은 중량을 기준으로 1.5% 이상, 2% 이상, 2.5% 이상, 3% 이상, 3.5% 이상 또는 5% 이상의 다이글리세라이드 분획을 포함한다. 일부 양태에서, 미생물 지질은 중량을 기준으로 1.5 내지 3%, 2 내

지 3%, 1.5 내지 3.5%, 1.5 내지 5%, 2.5 내지 3%, 2.5 내지 3.5% 또는 2.5 내지 5%의 다이글리세라이드 분획을 포함한다.

[0203] 일부 양태에서, 미생물 지질은 오일의 중량을 기준으로 2% 미만, 1.5% 미만, 1% 미만 또는 0.5% 미만의 비누화 불가능한 물질을 포함한다.

[0204] 미생물 오일에 존재하는 지질 부류, 예컨대 트라이글리세라이드 분획은 플래쉬 크로마토그래피에 의해 분리되고 박막 크로마토그래피(TLC)에 의해 분석되거나, 당해 분야에 공지된 다른 방법에 의해 분리되고 분석된다.

[0205] 일부 양태에서, 미생물 지질, 및/또는 트라이글리세라이드 분획, 유리 지방산 분획, 스테롤 분획, 다이글리세라이드 분획, 및 이들의 조합으로부터 선택된 하나 이상의 분획은 40% 이상, 45% 이상, 50% 이상, 55% 이상, 60% 이상, 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상 또는 80중량% 이상의 DHA를 포함한다. 일부 양태에서, 미생물 지질 및/또는 트라이글리세라이드 분획, 유리 지방산 분획, 스테롤 분획, 다이글리세라이드 분획, 및 이들의 조합으로부터 선택된 하나 이상의 분획은 40 내지 45%, 40 내지 50%, 40 내지 60%, 50 내지 60%, 55 내지 60%, 40 내지 65%, 50 내지 65%, 55 내지 65%, 40 내지 70%, 40 내지 80%, 50 내지 80%, 55 내지 80%, 60 내지 80% 또는 70 내지 80중량% DHA를 포함한다. 일부 양태에서, 미생물 지질은 중량을 기준으로 45% 이하, 40% 이하, 35% 이하, 30% 이하, 25% 이하, 20% 이하, 15% 이하 또는 13% 이하의 DHA를 포함하는 스테롤 에스터 분획을 포함한다. 일부 양태에서, 미생물 지질 및/또는 트라이글리세라이드 분획, 유리 지방산 분획, 스테롤 분획, 다이글리세라이드 분획, 및 이들의 조합으로부터 선택된 하나 이상의 분획은 중량을 기준으로 10% 이하, 9% 이하, 8% 이하, 7% 이하, 6% 이하, 5% 이하, 4% 이하, 3% 이하, 2% 이하 또는 1% 이하의 EPA를 포함한다. 일부 양태에서, 미생물 지질 및/또는 트라이글리세라이드 분획, 유리 지방산 분획, 스테롤 분획, 다이글리세라이드 분획, 및 이들의 조합으로부터 선택된 하나 이상의 분획은 중량을 기준으로 2 내지 3%, 2 내지 3.5%, 2.5 내지 3.5%, 2 내지 6%, 2.5 내지 6%, 3.0 내지 6%, 3.5 내지 6%, 5 내지 6% 또는 2 내지 10%의 EPA를 포함한다. 일부 양태에서, 미생물 지질 및/또는 스테롤 에스터 분획, 트라이글리세라이드 분획, 유리 지방산 분획, 스테롤 분획, 다이글리세라이드 분획, 극성 분획(예컨대 포스포지질 분획), 및 이들의 조합으로부터 선택된 하나 이상의 분획은 EPA가 실질적으로 부재하다. 일부 양태에서, 미생물 지질 및/또는 스테롤 에스터 분획, 트라이글리세라이드 분획, 유리 지방산 분획, 스테롤 분획, 다이글리세라이드 분획, 극성 분획(예컨대 포스포지질 분획), 및 이들의 조합으로부터 선택된 하나 이상의 분획은 5:1 이상, 7:1 이상, 9:1 이상, 10:1 이상, 15:1 이상, 20:1 이상, 25:1 이상, 30:1 이상 또는 50:1 이상의 DHA 대 EPA의 중량 비를 포함하고, 이때 미생물 지질 및/또는 하나 이상의 분획은 중량을 기준으로 10% 이하의 EPA를 포함한다. 일부 양태에서, 미생물 지질 및/또는 스테롤 에스터 분획, 트라이글리세라이드 분획, 유리 지방산 분획, 스테롤 분획, 다이글리세라이드 분획, 극성 분획(예컨대 포스포지질 분획), 및 이들의 조합으로부터 선택된 하나 이상의 분획은 5:1 이상 및 20:1 미만의 DHA 대 EPA의 중량 비를 포함한다. 일부 양태에서, DHA 대 EPA의 중량 비는 5:1 내지 18:1, 7:1 내지 16:1 또는 10:1 내지 15:1이다. 일부 양태에서, 미생물 지질 및/또는 스테롤 에스터 분획, 트라이글리세라이드 분획, 유리 지방산 분획, 스테롤 분획, 다이글리세라이드 분획, 극성 분획(예컨대 포스포지질 분획), 및 이들의 조합으로부터 선택된 하나 이상의 분획은 중량을 기준으로 0.1 내지 0.25%, 0.2 내지 0.25%, 0.1 내지 0.5% 또는 0.1 내지 1.5%의 ARA를 포함한다. 일부 양태에서, 미생물 지질 및/또는 스테롤 에스터 분획, 트라이글리세라이드 분획, 유리 지방산 분획, 스테롤 분획, 다이글리세라이드 분획, 극성 분획(예컨대 포스포지질 분획), 및 이들의 조합으로부터 선택된 하나 이상의 분획은 중량을 기준으로 1.5% 이하, 1% 이하, 0.5% 이하, 0.2% 이하 또는 0.1% 이하의 ARA를 포함한다. 일부 양태에서, 미생물 지질 및/또는 스테롤 에스터 분획, 트라이글리세라이드 분획, 유리 지방산 분획, 스테롤 분획, 다이글리세라이드 분획, 극성 분획(예컨대 포스포지질 분획), 및 이들의 조합으로부터 선택된 하나 이상의 분획은 ARA가 실질적으로 부재하다. 일부 양태에서, 미생물 지질 및/또는 스테롤 에스터 분획, 트라이글리세라이드 분획, 유리 지방산 분획, 스테롤 분획, 다이글리세라이드 분획, 극성 분획(예컨대 포스포지질 분획), 및 이들의 조합으로부터 선택된 하나 이상의 분획은 20:1 이상, 30:1 이상, 35:1 이상, 40:1 이상, 60:1 이상, 80:1 이상, 100:1 이상, 150:1 이상, 200:1 이상, 250:1 이상 또는 300:1 이상의 DHA 대 ARA의 중량 비를 포함한다. 일부 양태에서, 미생물 지질 및/또는 스테롤 에스터 분획, 트라이글리세라이드 분획, 유리 지방산 분획, 스테롤 분획, 다이글리세라이드 분획, 극성 분획(예컨대 포스포지질 분획), 및 이들의 조합으로부터 선택된 하나 이상의 분획은 중량을 기준으로 0.5 내지 1%, 0.5 내지 2%, 0.5 내지 2.5%, 0.5 내지 3%, 0.5 내지 3.5%, 0.5 내지 5%, 0.5 내지 6%, 1 내지 2%, 2 내지 3%, 2 내지 3.5%, 1 내지 2.5%, 1 내지 3%, 1 내지 3.5%, 1 내지 5% 또는 1 내지 6%의 DPA n-6을 포함한다. 일부 양태에서, 미생물 지질 및/또는 스테롤 에스터 분획, 트라이글리세라이드 분획, 유리 지방산 분획, 스테롤 분획, 다이글리세라이드 분획, 극성 분획(예컨대 포스포지질 분획), 및 이들의 조합으로부터 선택된 하나 이상의 분획은 중량을 기준으로 6% 이하, 5% 이하, 3% 이하, 2.5% 이하, 2% 이하, 1% 이하 또는 0.5% 이하의 DPA n-6을 포함한다. 일부 양태에서, 미생물 지질 및/또는 스테롤 에스터 분획,

트라이글리세라이드 분획, 유리 지방산 분획, 스테롤 분획, 다이글리세라이드 분획, 극성 분획(예컨대 포스포지질 분획), 및 이들의 조합으로부터 선택된 하나 이상의 분획은 DPA n-6이 실질적으로 부재하다. 일부 양태에서, 미생물 지질 및/또는 스테롤 에스터 분획, 트라이글리세라이드 분획, 유리 지방산 분획, 스테롤 분획, 다이글리세라이드 분획, 극성 분획(예컨대 포스포지질 분획), 및 이들의 조합으로부터 선택된 하나 이상의 분획은 6:1 초과, 8:1 이상, 10:1 이상, 15:1 이상, 20:1 이상, 25:1 이상, 50:1 이상 또는 100:1 이상의 DHA 대 DPA n-6의 중량 비를 포함한다. 일부 양태에서, 미생물 지질 및/또는 스테롤 에스터 분획, 트라이글리세라이드 분획, 유리 지방산 분획, 스테롤 분획, 다이글리세라이드 분획, 극성 분획(예컨대 포스포지질 분획), 및 이들의 조합으로부터 선택된 하나 이상의 분획은 중량을 기준으로 각각 5% 이하, 4% 이하, 3% 이하, 2% 이하, 1.5% 이하, 1% 이하 또는 0.5% 이하의 리놀렌산(18:2 n-6), 리놀렌산(18:3 n-3), 아이코센산(20:1 n-9) 및 에루크산(22:1 n-9)을 포함한다. 일부 양태에서, 미생물 지질 및/또는 스테롤 에스터 분획, 트라이글리세라이드 분획, 유리 지방산 분획, 스테롤 분획, 다이글리세라이드 분획, 극성 분획(예컨대 포스포지질 분획), 및 이들의 조합으로부터 선택된 하나 이상의 분획은 중량을 기준으로 5% 이하, 4% 이하, 3% 이하, 2% 이하, 1.5% 이하 또는 1% 이하의 헵타데칸산(17:0)을 포함한다. 일부 양태에서, 미생물 지질 및/또는 하나 이상의 분획은 0.01 내지 5중량%, 0.05 내지 3중량% 또는 0.1 내지 1중량%의 헵타데칸산을 포함한다.

[0206] 일부 양태에서, 추출된 미생물 지질은 70중량% 이상의 트라이글리세라이드 분획을 포함하고, 이때 트라이글리세라이드 분획중 도코사헥사엔산 함량은 50중량% 이상이고, 트라이글리세라이드 분획중 도코사헥사엔산 n-6 함량은 0.5 이상 내지 6중량%이고, 오일은 26 이하의 아니시딘 값을 갖는다. 일부 양태에서, 추출된 미생물 지질은 70중량% 이상의 트라이글리세라이드 분획을 포함하고, 이때 트라이글리세라이드 분획중 도코사헥사엔산 함량은 40중량% 이상이고, 트라이글리세라이드 분획중 도코사헥사엔산 n-6 함량은 0.5 이상 내지 6중량%이고, 도코사헥사엔산 대 도코사헥사엔산 n-6의 비는 6:1 초과이고, 지질은 26 이하의 아니시딘 값을 갖는다. 일부 양태에서, 추출된 미생물 지질은 70중량% 이상의 트라이글리세라이드 분획을 포함하고, 이때 트라이글리세라이드 분획중 도코사헥사엔산 함량은 60중량% 이상이고, 지질은 26 이하의 아니시딘 값을 갖는다. 일부 양태에서, 임의의 상기 지방산 프로파일을 갖는 추출된 미생물 지질은 26 이하, 25 이하, 20 이하, 15 이하, 10 이하, 5 이하, 2 이하 또는 1 이하의 아니시딘 값 및/또는 5 이하, 4.5 이하, 4 이하, 3.5 이하, 3 이하, 2.5 이하, 2 이하, 1.5 이하, 1 이하, 0.5 이하, 0.2 이하 또는 0.1 이하의 과산화물 값, 및/또는 100ppm 이하, 95ppm 이하, 90ppm 이하, 85ppm 이하, 80ppm 이하, 75ppm 이하, 70ppm 이하, 65ppm 이하, 60ppm 이하, 55ppm 이하, 50ppm 이하, 45ppm 이하, 40ppm 이하, 35ppm 이하, 30ppm 이하, 25ppm 이하, 20ppm 이하, 15ppm 이하, 10ppm 이하, 5ppm 이하, 4ppm 이하, 3ppm 이하, 2ppm 이하 또는 1ppm 이하의 인 함량을 갖는다. 일부 양태에서, 임의의 상기 지방산 프로파일을 갖는 추출된 미생물 지질은 ATCC 기탁 번호 PTA-9695, PTA-9696, PTA-9697 또는 PTA-9698로 기탁된 트라우스토키트리드 종의 특성을 갖는 단리된 트라우스토키트리드 미생물로부터 추출된다. 일부 양태에서, 임의의 상기 지방산 프로파일을 갖는 추출된 미생물 지질은 조질 지질이다. 일부 양태에서, 조질 지질은 5중량% 또는 5부피% 미만의 유기 용매를 갖는다. 일부 양태에서, 본 발명의 방법의 방법에 따라 추출된 미생물 지질은 용매를 사용하여 추출을 수행한 경우(예컨대, 전형적인 헥산 추출 또는 프리오렉스 공정(웨스트 팔리아 세퍼레이터, 독일))보다 낮은 아니시딘 값, 낮은 과산화물 값, 낮은 인 함량 및/또는 높은 추출 수율을 갖는 조질 지질을 제공한다.

[0207] 단리된 트라우스토키트리드 미생물의 제2 세트로부터 추출된 지질

[0208] 일부 양태에서, 본 발명은 또한 미국특허출원 제12/729,013호 및 국제특허출원 제PCT/US2010/028175호(각각 본원에 이의 전체 내용이 참고로서 혼입된다)에 기술된 트라우스토키트리드로부터 추출된 미생물 지질에 관한 것이다. 일부 양태에서, 상기 방법은 트라우스토키트리드를 배양액에서 성장시켜 생물질을 제조하는 단계 및 오메가-3 지방산을 포함하는 지질을 생물질로부터 추출하는 단계를 포함한다. 지질은 새로이 수확된 생물질로부터 추출되거나, 부패를 방지하는 조건하에 저장된 종전에 수확된 생물질로부터 추출될 수 있다. 공지된 방법이 본 발명의 트라우스토키트리드를 배양하여 배양액으로부터 생물질을 단리하고, 생물질로부터 추출된 오일의 지방산 프로파일을 분석하는데 사용될 수 있다(예컨대, 미국특허 제5,130,242호 참고, 이의 전체 내용은 본원에 참고로서 혼입된다). 지질은 본 발명의 방법에 따라 추출될 수 있다.

[0209] 본 발명의 미생물 지질은 하기를 비롯한 미생물로부터 유래하는 임의의 지질일 수 있다: 추가 가공 없이 미생물의 생물질로부터 추출된 조질 오일; 조질 미생물 오일의 추가 가공 단계, 예컨대 정련, 표백, 및/또는 탈취에 의해 수득된 정련된 오일; 조질 또는 정련된 미생물 오일을 희석함으로써 수득된 희석된 미생물 오일; 또는 조질 또는 정련된 미생물 오일을 추가 정제 방법으로 처리하여 오일중 지방산(예컨대, DHA)의 농도를 증가시킴으로써 수득된 강화된 오일.

- [0210] 일부 양태에서, 미생물 지질은 중량을 기준으로 0% 이상, 0.1% 이상, 0.2% 이상, 0.5% 이상, 1% 이상, 1.5% 이상, 2% 이상 또는 5% 이상의 스테롤 에스터 분획을 포함한다. 일부 양태에서, 미생물 지질은 중량을 기준으로 0 내지 1.5%, 0 내지 2%, 0 내지 5%, 1 내지 1.5%, 0.2 내지 1.5%, 0.2 내지 2% 또는 0.2 내지 5%의 스테롤 에스터 분획을 포함한다. 일부 양태에서, 미생물 지질은 중량을 기준으로 5% 이하, 4% 이하, 3% 이하, 2% 이하, 1% 이하, 0.5% 이하, 0.3% 이하, 0.2% 이하, 0.5% 이하, 0.4% 이하, 0.3% 이하 또는 0.2% 이하의 스테롤 에스터 분획을 포함한다.
- [0211] 일부 양태에서, 미생물 지질은 중량을 기준으로 35% 이상, 40% 이상, 45% 이상, 50% 이상, 55% 이상, 60% 이상, 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상 또는 90% 이상의 트리아실글리세롤 분획을 포함한다. 일부 양태에서, 미생물 지질은 중량을 기준으로 35 내지 98%, 35 내지 90%, 35 내지 80%, 35 내지 70%, 35 내지 70%, 35 내지 65%, 40 내지 70%, 40 내지 65%, 40 내지 55%, 40 내지 50%, 65 내지 95%, 75 내지 95%, 75 내지 98%, 80 내지 95%, 80 내지 98%, 90 내지 96%, 90 내지 97%, 90 내지 98%, 90%, 95%, 97% 또는 98%의 트리아실글리세롤 분획을 포함한다.
- [0212] 일부 양태에서, 미생물 지질은 중량을 기준으로 10% 이상, 11% 이상, 12% 이상, 13% 이상, 14% 이상, 15% 이상, 16% 이상, 17% 이상, 18% 이상, 19% 이상 또는 20% 이상의 다이아실글리세롤 분획을 포함한다. 일부 양태에서, 미생물 지질은 중량을 기준으로 10 내지 45%, 10 내지 40%, 10 내지 35%, 10 내지 30%, 15 내지 40%, 15 내지 35% 또는 15 내지 30%의 다이아실글리세롤 분획을 포함한다. 일부 양태에서, 미생물 지질은 중량을 기준으로 0.2% 이상, 0.3% 이상, 0.4% 이상, 0.5% 이상, 1% 이상, 5% 이상, 10% 이상, 11% 이상, 12% 이상, 13% 이상, 14% 이상, 15% 이상, 16% 이상, 17% 이상, 18% 이상, 19% 이상 또는 20% 이상의 1,2-다이아실글리세롤 분획을 포함한다. 일부 양태에서, 미생물 지질은 중량을 기준으로 0.2 내지 45%, 0.2 내지 30%, 0.2 내지 20%, 0.2 내지 10%, 0.2 내지 5%, 0.2 내지 1%, 0.2 내지 0.8%, 0.4 내지 45%, 0.4 내지 30%, 0.4 내지 20%, 0.4 내지 10%, 0.4 내지 5%, 0.4 내지 1%, 0.4 내지 0.8%, 0.5 내지 1%, 0.5 내지 0.8%, 10 내지 45%, 10 내지 40%, 10 내지 35%, 10 내지 30%, 15 내지 40%, 15 내지 35%, 15 내지 30% 또는 15 내지 25%의 다이아실글리세롤 분획을 포함한다. 일부 양태에서, 미생물 지질은 0.1% 이상, 0.2% 이상, 0.5% 이상, 1% 이상, 2% 이상, 2.5% 이상 또는 3%의 1,3-다이아실글리세롤 분획을 포함한다.
- [0213] 일부 양태에서, 미생물 지질은 중량을 기준으로 0.3% 이상, 0.4% 이상, 0.5% 이상, 1% 이상, 1.5% 이상, 2% 이상 또는 5% 이상의 스테롤 분획을 포함한다. 일부 양태에서, 미생물 지질은 중량을 기준으로 0.3 내지 5%, 0.3 내지 2%, 0.3 내지 1.5%, 0.5 내지 1.5%, 1 내지 1.5%, 0.5 내지 2%, 0.5 내지 5%, 1 내지 2% 또는 1 내지 5중량%의 스테롤 분획을 포함한다. 일부 양태에서, 미생물 지질은 중량을 기준으로 5% 이하, 4% 이하, 3% 이하, 2% 이하, 1.5% 이하 또는 1% 이하의 스테롤 분획을 포함한다.
- [0214] 일부 양태에서, 미생물 지질은 중량을 기준으로 2% 이상, 5% 이상 또는 8% 이상의 포스포지질 분획을 포함한다. 일부 양태에서, 미생물 지질은 중량을 기준으로 2 내지 25%, 2 내지 20%, 2 내지 15%, 2 내지 10%, 5 내지 25%, 5 내지 20%, 5 내지 20%, 5 내지 10% 또는 7 내지 9중량%의 포스포지질 분획을 포함한다. 일부 양태에서, 미생물 지질은 중량을 기준으로 20% 미만, 15% 미만, 10% 미만, 9% 미만 또는 8% 미만의 포스포지질 분획을 포함한다. 일부 양태에서, 미생물 지질은 포스포지질이 실질적으로 부재한다.
- [0215] 일부 양태에서, 미생물 지질은 오일의 중량을 기준으로 2% 미만, 1.5% 미만, 1% 미만 또는 0.5% 미만의 비누화 불가능한 물질을 포함한다.
- [0216] 미생물 지질에 존재하는 지질 부류, 예컨대 트리아실글리세롤 분획은 플래쉬 크로마토그래피에 의해 분리되고 박막 크로마토그래피(TLC)에 의해 분석되거나, 당해 분야에 공지된 다른 방법에 의해 분리되고 분석될 수 있다.
- [0217] 일부 양태에서, 미생물 지질 및/또는 트리아실글리세롤 분획, 유리 지방산 분획, 스테롤 분획, 다이아실글리세롤 분획, 및 이들의 조합으로부터 선택된 하나 이상의 분획은 중량을 기준으로 5% 이상, 10% 이상, 10% 초과, 12% 이상, 13% 이상, 14% 이상, 15% 이상, 16% 이상, 17% 이상, 18% 이상, 19% 이상, 20% 이상, 25% 이상, 30% 이상, 35% 이상, 40% 이상 또는 45%의 EPA를 포함한다. 일부 양태에서, 미생물 지질 및/또는 트리아실글리세롤 분획, 유리 지방산 분획, 스테롤 분획, 다이아실글리세롤 분획, 및 이들의 조합으로부터 선택된 하나 이상의 분획은 중량을 기준으로 5 내지 55%, 5 내지 50%, 5 내지 45%, 5 내지 40%, 5 내지 35%, 5 내지 30%, 10 내지 55%, 10 내지 50%, 10 내지 45%, 10 내지 40%, 10 내지 35%, 10 내지 30% 이상, 12 내지 55% 이상, 12 내지 50% 이상, 12 내지 45% 이상, 12 내지 40% 이상, 12 내지 35% 이상 또는 12 내지 30%, 15 내지 55%, 15 내지 50%, 15 내지 45%, 15 내지 40%, 15 내지 35%, 15 내지 30%, 15 내지 25%, 15 내지 20%, 20 내지 55%, 20 내지 50%, 20 내지 45%, 20 내지 40% 또는 20 내지 30%의 EPA를 포함한다. 일부 양태에서, 미생물 지질 및/또는 트

라이아실글리세롤 분획, 다이아실글리세롤 분획, 스테롤 분획, 스테롤 에스터 분획, 유리 지방산 분획, 포스포지질 분획, 및 이들의 조합으로부터 선택된 하나 이상의 분획은 중량을 기준으로 5% 이상, 10% 이상, 15% 이상, 20% 이상, 25% 이상, 30% 이상, 35% 이상, 40% 이상, 50% 이상 또는 60중량% 이상의 DHA를 포함한다. 일부 양태에서, 미생물 지질 및/또는 트라이아실글리세롤 분획, 다이아실글리세롤 분획, 스테롤 분획, 스테롤 에스터 분획, 유리 지방산 분획, 포스포지질 분획, 및 이들의 조합으로부터 선택된 하나 이상의 분획은 중량을 기준으로 5 내지 60%, 5 내지 55%, 5 내지 50%, 5 내지 40%, 10 내지 60%, 10 내지 50%, 10 내지 40%, 20 내지 60%, 25 내지 60%, 25 내지 50%, 25 내지 45%, 30 내지 50%, 35 내지 50% 또는 30 내지 40중량%의 DHA를 포함한다. 일부 양태에서, 미생물 지질 및/또는 트라이아실글리세롤 분획, 다이아실글리세롤 분획, 스테롤 분획, 스테롤 에스터 분획, 유리 지방산 분획, 포스포지질 분획, 및 이들의 조합으로부터 선택된 하나 이상의 분획은 중량을 기준으로 10% 이하, 9% 이하, 8% 이하, 7% 이하, 6% 이하, 5% 이하, 4% 이하, 3% 이하, 2% 이하 또는 1% 이하의 DHA를 포함한다. 일부 양태에서, 미생물 지질 및/또는 트라이아실글리세롤 분획, 다이아실글리세롤 분획, 스테롤 분획, 스테롤 에스터 분획, 유리 지방산 분획, 포스포지질 분획, 및 이들의 조합으로부터 선택된 하나 이상의 분획은 중량을 기준으로 1 내지 10%, 1 내지 5%, 2 내지 5%, 3 내지 5% 또는 3 내지 10%의 지방산인 DHA를 포함한다. 일부 양태에서, 미생물 지질 및/또는 트라이아실글리세롤 분획, 다이아실글리세롤 분획, 스테롤 분획, 스테롤 에스터 분획, 유리 지방산 분획, 포스포지질 분획, 및 이들의 조합으로부터 선택된 하나 이상의 분획은 중량을 기준으로 0.1 내지 5%, 0.1 내지 5% 미만, 0.1 내지 4%, 0.1 내지 3%, 0.1 내지 2%, 0.2 내지 5%, 0.2 내지 5% 미만, 0.2 내지 4%, 0.2 내지 3%, 0.2 내지 2%, 0.3 내지 2%, 0.1 내지 0.5%, 0.2 내지 0.5%, 0.1 내지 0.4%, 0.2 내지 0.4%, 0.5 내지 2%, 1 내지 2%, 0.5 내지 1.5% 또는 1 내지 1.5중량%의 ARA를 포함한다. 일부 양태에서, 미생물 지질 및/또는 트라이아실글리세롤 분획, 다이아실글리세롤 분획, 스테롤 분획, 스테롤 에스터 분획, 유리 지방산 분획, 포스포지질 분획, 및 이들의 조합으로부터 선택된 하나 이상의 분획은 중량을 기준으로 5% 이하, 5% 미만, 4% 이하, 3% 이하, 2% 이하, 1.5% 이하, 1% 이하, 0.5% 이하, 0.4% 이하, 0.3% 이하, 0.2% 이하 또는 0.1% 이하의 ARA를 포함한다. 일부 양태에서, 미생물 지질 및/또는 트라이아실글리세롤 분획, 다이아실글리세롤 분획, 스테롤 분획, 스테롤 에스터 분획, 유리 지방산 분획, 포스포지질 분획, 및 이들의 조합으로부터 선택된 하나 이상의 분획은 ARA가 실질적으로 부재하다. 일부 양태에서, 미생물 지질 및/또는 트라이아실글리세롤 분획, 다이아실글리세롤 분획, 스테롤 분획, 스테롤 에스터 분획, 유리 지방산 분획, 포스포지질 분획, 및 이들의 조합으로부터 선택된 하나 이상의 분획은 중량을 기준으로 5%, 5% 미만, 4% 이하, 3% 이하, 2% 이하, 1% 이하, 0.75% 이하, 0.6% 이하 또는 0.5% 이하의 DPA n-6을 포함한다. 일부 양태에서, 미생물 지질 및/또는 트라이아실글리세롤 분획, 다이아실글리세롤 분획, 스테롤 분획, 스테롤 에스터 분획, 유리 지방산 분획, 포스포지질 분획, 및 이들의 조합으로부터 선택된 하나 이상의 분획은 DPA n-6이 실질적으로 부재하다. 일부 양태에서, 미생물 지질 및/또는 트라이아실글리세롤 분획, 다이아실글리세롤 분획, 스테롤 분획, 스테롤 에스터 분획, 유리 지방산 분획, 포스포지질 분획, 및 이들의 조합으로부터 선택된 하나 이상의 분획은 중량을 기준으로 5% 이하, 5% 미만, 4% 이하, 3% 이하 또는 2% 이하의 올레산(18:1 n-9), 리놀레산(18:2 n-6), 리놀렌산(18:3 n-3), 아이코센산(20:1 n-9), 에루크산(22:1 n-9), 스테아리돈산(18:4 n-3) 또는 이들의 조합을 갖는 지방산을 포함한다.

[0218] 일부 양태에서, 추출된 미생물 지질은 20중량% 이상의 아이코사헵타엔산, 및 각각 5중량% 미만의 아라키돈산, 도코사헵타엔산 n-6, 올레산, 리놀레산, 리놀렌산, 아이코센산, 에루크산 및 스테아리돈산을 포함한다. 일부 양태에서, 추출된 미생물 지질은 10중량% 이상의 트라이아실글리세롤 분획을 포함하고, 이때 트라이아실글리세롤 분획중 12중량% 이상의 지방산은 아이코사헵타엔산이고, 트라이아실글리세롤 분획중 25중량% 이상의 지방산은 도코사헵사엔산, 트라이아실글리세롤 분획중 5중량% 미만의 지방산은 아라키돈산이다. 일부 양태에서, 임의의 상기 지방산 프로파일을 갖는 추출된 미생물 지질은 26 이하, 25 이하, 20 이하, 15 이하, 10 이하, 5 이하, 2 이하 또는 1 이하의 아니시딘 값, 및/또는 5 이하, 4.5 이하, 4 이하, 3.5 이하, 3 이하, 2.5 이하, 2 이하, 1.5 이하, 1 이하, 0.5 이하, 0.2 이하 또는 0.1 이하의 과산화물 값, 및/또는 100ppm 이하, 95ppm 이하, 90ppm 이하, 85ppm 이하, 80ppm 이하, 75ppm 이하, 70ppm 이하, 65ppm 이하, 60ppm 이하, 55ppm 이하, 50ppm 이하, 45ppm 이하, 40ppm 이하, 35ppm 이하, 30ppm 이하, 25ppm 이하, 20ppm 이하, 15ppm 이하, 10ppm 이하,

5ppm 이하, 4ppm 이하, 3ppm 이하, 2ppm 이하 또는 1ppm 이하의 인 함량을 갖는다. 일부 양태에서, 임의의 상기 지방산 프로파일을 갖는 추출된 미생물 지질은 ATCC 기탁 번호 PTA-10208, PTA-10209, PTA-10210, PTA-10211, PTA-10212, PTA-10213, PTA-10214 또는 PTA-10215로 기탁된 트라우스토키트리드 종의 특성을 갖는 단리된 트라우스토키트리드 미생물로부터 추출된다. 일부 양태에서, 임의의 상기 지방산 프로파일을 갖는 추출된 미생물 지질은 조질 지질이다. 일부 양태에서, 조질 지질은 5중량% 또는 5부피% 미만의 유기 용매를 갖는다. 일부 양태에서 본 발명의 방법의 방법에 따라 추출된 미생물 지질은 용매를 사용하여 추출을 수행한 경우(예컨대, 전형적인 헥산 추출 또는 프리오렉스 공정(웨스트팔리아 세퍼레이터, 독일))보다 낮은 아니시딘 값, 낮은 과산화물 값 및/또는 낮은 인 함량을 갖는 조질 지질을 제공한다.

[0219] 일부 양태에서, 본 발명의 방법중 어느 하나에 의해 수득된 지질은 20중량% 이상의 아이코사펜타엔산, 각각 5중량% 미만의 아라키돈산, 도코사펜타엔산 n-6, 올레산, 리놀레산, 리놀렌산, 아이코센산, 에루크산 및 스테아리돈산을 포함한다. 일부 양태에서, 본 발명의 방법중 어느 하나에 의해 수득된 지질은 10중량% 이상의 트리아실글리세롤 분획을 포함하고, 이때 트리아실글리세롤 분획중 12중량% 이상의 지방산은 아이코사펜타엔산이고, 트리아실글리세롤 분획중 25중량% 이상의 지방산은 도코사헥사엔산이고, 트리아실글리세롤 분획중 5중량% 미만의 지방산은 아라키돈산이다. 일부 양태에서, 상기 지방산 프로파일중 하나를 갖는 본 발명의 방법중 어느 하나에 의해 수득된 지질은 26 이하, 25 이하, 20 이하, 15 이하, 10 이하, 5 이하 또는 2 이하 또는 1 이하의 아니시딘 값 및/또는 5 이하, 4.5 이하, 4 이하, 3.5 이하, 3 이하, 2.5 이하, 2 이하, 1.5 이하, 1 이하, 0.5 이하, 0.2 이하 또는 0.1 이하의 과산화물 값, 및/또는 100ppm 이하, 95ppm 이하, 90ppm 이하, 85ppm 이하, 80ppm 이하, 75ppm 이하, 70ppm 이하, 65ppm 이하, 60ppm 이하, 55ppm 이하, 50ppm 이하, 45ppm 이하, 40ppm 이하, 35ppm 이하, 30ppm 이하, 25ppm 이하, 20ppm 이하, 15ppm 이하, 10ppm 이하, 5ppm 이하, 4ppm 이하, 3ppm 이하, 2ppm 이하 또는 1ppm 이하의 인 함량을 갖는다. 일부 양태에서, 상기 지방산 프로파일중 하나를 갖는 본 발명의 방법중 어느 하나에 의해 수득된 지질은 ATCC 기탁 번호 PTA-10208, PTA-10209, PTA-10210, PTA-10211, PTA-10212, PTA-10213, PTA-10214 또는 PTA-10215로 기탁된 트라우스토키트리드 종의 특성을 갖는 단리된 트라우스토키트리드 미생물로부터 추출된다. 일부 양태에서, 상기 지방산 프로파일중 하나를 갖는 본 발명의 방법중 어느 하나에 의해 수득된 지질은 조질 지질이다. 일부 양태에서, 조질 지질은 5중량% 또는 5부피% 미만의 유기 용매를 갖는다. 일부 양태에서 본 발명의 방법에 따라 추출된 지질은 용매를 사용하여 수행된 경우(예컨대, 전형적인 헥산 추출 또는 프리오렉스 공정(웨스트팔리아 세퍼레이터, 독일))보다 낮은 아니시딘 값, 낮은 과산화물 값, 낮은 인 함량 및/또는 높은 추출 수율을 갖는 조질 지질을 제공한다.

[0220] **크립테코디니움 코나이 종의 단리된 미생물로부터 추출된 지질**

[0221] 일부 양태에서, 본 발명은 또한 크립테코디니움 코나이 종의 미생물로부터 추출된 조질 지질에 관한 것이다. 일부 양태에서, 방법은 크립테코디니움 코나이 종의 미생물을 배양액에서 성장시켜 생물질을 생성하는 단계 및 오메가-3 지방산을 포함하는 지질을 생물질로부터 추출하는 단계를 포함한다. 지질은 새로이 수확된 생물질로부터 추출될 수 있거나, 부패를 방지하는 조건하에 저장된 종전에 수확된 생물질로부터 추출될 수 있다. 공지된 방법은 크립테코디니움 코나이 종의 미생물의 배양하고, 생물질을 배양액으로부터 단리하는데 사용될 수 있다(예컨대, 미국특허 제7,163,811호 참고, 이의 전체 내용은 본원에 참고로서 혼입된다). 지질은 본 발명의 방법에 따라 추출될 수 있다.

[0222] 일부 양태에서, 본 발명의 추출 방법에 따라 크립테코디니움 코나이 종의 미생물로부터 추출된 조질 지질은 전형적인 헥산 추출 방법에 비해 낮은 인 함량을 가질 수 있다. 일부 양태에서, 크립테코디니움 코나이 종의 미생물로부터 추출된 조질 지질은 100ppm 이하, 95ppm 이하, 90ppm 이하, 85ppm 이하, 80ppm 이하, 75ppm 이하, 70ppm 이하, 65ppm 이하, 60ppm 이하, 55ppm 이하, 50ppm 이하, 45ppm 이하, 40ppm 이하, 35ppm 이하, 30ppm 이하, 25ppm 이하, 20ppm 이하, 15ppm 이하, 10ppm 이하, 5ppm 이하, 4ppm 이하, 3ppm 이하, 2ppm 이하 또는 1ppm 이하의 인 함량을 포함한다. 일부 양태에서, 조질 오일은 26 이하, 25 이하, 20 이하, 15 이하, 10 이하, 5 이하 또는 2 이하 또는 1 이하의 아니시딘 값 및/또는 5 이하, 4.5 이하, 4 이하, 3.5 이하, 3 이하, 2.5 이하, 2 이하, 1.5 이하, 1 이하, 0.5 이하, 0.2 이하 또는 0.1 이하의 과산화물 값을 갖는다. 일부 양태에서 본 발명의 방법의 방법에 따라 추출된 조질 미생물 지질은 용매를 사용하여 추출을 수행한 경우(예컨대, 전형적인 헥산 추출 또는 프리오렉스 공정(웨스트팔리아 세퍼레이터, 독일))보다 낮은 아니시딘 값, 낮은 과산화물 값, 낮은 인 함량 및/또는 높은 추출 수율을 갖는 조질 지질을 제공한다.

[0223] 본 발명을 일반적으로 기술하였지만, 추가의 이해가 본원에 제공된 실시예를 참고하여 획득될 수 있다. 이러한 실시예는 단지 설명의 목적을 위해 제공되고, 제한의 의도는 아니다. 하기 실시예는 비제한적으로 본 발명의 방법 및 이러한 방법에 의해 제조된 지질을 설명한다. 다양한 조건 및 변수의 변형 및 변경이 통상적으로 세포

로부터의 지질의 추출에서 수행될 수 있고, 이는 당업자에게 명백하고, 본 발명의 사상 및 범주에 속한다.

[0224] **실시예**

[0225] **실시예 1**

[0226] 미생물 세포(쉬조키트리움)를 함유하는 세포 배양액(20,000 kg)을 60℃까지 가열하였다. 효소(즉, 알칼라제(Alcalase) 2.4 L FG 0.5%)를 세포 생물질에 첨가하여 세포를 용해하고, 에멀전화된 용해된 세포 조성물을 형성하였다. 에멀전화된 용해된 세포 조성물을 먼저 용해된 세포 조성물의 pH가 10.4 내지 10.6이 될 때까지 제1 염기(NaOH, 250 kg의 50% w/w 용액)로 처리하였다. 이어서, 염(고체 NaCl, 2중량%의 용해된 세포 조성물)을 용해된 세포 조성물에 첨가하였다. 이어서, 용해된 세포 조성물을 85℃ 내지 102℃의 온도에서 가열하고, 이 온도에서 24시간 내지 70시간 동안 유지하였다. 이어서, 제2 염기(NaOH, 50% w/w 용액, 40 kg)를 용해된 세포 조성물에 pH가 8 초과가 될 때까지 첨가하였다. 이어서, 용해된 세포 조성물을 원심분리하여 용해된 세포 조성물을 3개의 상으로 분리하였다: 지질 층을 함유하는 상부 상, 에멀전 층을 함유하는 중간 상, 및 고체 층을 함유하는 하부 상. 이어서, 용해된 세포 조성물을 30 kg/분의 공급 속도로 6,000 rpm에서 작동하는 웨스트팔리아 RSE110 센트리퓨지(Westfalia RSE110 Centrifuge)(웨스트팔리아 세퍼레이터 인더스트리 게엠베하(Westfalia Separator Industry GmbH, 독일))를 사용하여 40℃ 내지 80℃에서 원심분리하여 지질을 용해된 세포 조성물로부터 분리하였다. 원심분리는 3개의 상을 제공하였다: 지질을 함유하는 상부 상, 에멀전을 함유하는 중간 상, 및 고체/액체 에멀전을 함유하는 하부 상. 용해된 세포 조성물의 pH는 원심분리중에 7.5 내지 8.5로 유지되었다. 전체 20,000 kg의 회분을 원심분리하기 위한 총 시간은 약 10 내지 11시간이었다. 지질 층이 분리되었고, 약 1중량%의 수분 함량을 가졌다.

[0227] **실시예 2**

[0228] 미생물 세포(크립테코디니움 코니이)를 함유하는 세포 배양액(500 g)을 배양액의 중량을 기준으로 약 7% 생물질로부터 13.5% 생물질까지 농축하였다, 배양액을 10,000 psi(2회 통과)의 압력에서 균질화시켜 용해된 세포 조성물을 형성하였다. 용해된 세포 조성물을 염기(즉, NaOH, 10 g의 50% w/w 용액)로 용해된 세포 조성물의 pH가 10.4 내지 10.6이 될 때까지 처리하였다. 염(고체 NaCl, 용해된 세포 조성물의 중량을 기준으로 2%의 양)을 용해된 세포 조성물에 첨가하였다. 이어서, 용해된 세포 조성물을 85℃ 내지 92℃의 온도까지 가열하고, 이러한 온도 범위에서 15분 내지 2시간 동안 유지하였다. 이어서, 용해된 세포 조성물을 70℃ 내지 90℃의 온도에서 5,400 rpm으로 작동하는 벤치 탑 시그마 6K15 센트리퓨지(Bench Top Sigma 6K15 Centrifuge)(시그마 레보르젠 트리푸겐 게엠베하(SIGMA Laborzentrifugen GmbH, 독일))를 사용하여 원심분리하여 용해된 세포 조성물을 3개의 상으로 분리하였다: 지질을 함유하는 상부 상, 에멀전을 함유하는 중간 상, 및 고체/액체 에멀전을 함유하는 하부 상. 원심분리 동안 용해된 세포 조성물의 pH는 6.5 내지 8.5에서 유지되었다. 총 원심분리 시간은 5분이었다. 지질 층을 분리하고, 약 1중량%의 수분 함량을 가졌다.

[0229] **실시예 3**

[0230] 미생물 세포(쉬조키트리움)를 함유하는 세포 배양액(20,000 kg)을 60℃까지 가열하였다. 효소(즉, 알칼라제 2.4 L FG 0.5%)를 세포 생물질에 첨가하여 세포를 용해하여 용해된 세포 조성물을 형성하였다. 이어서, 염(고체 Na₂SO₄, 2,000 kg 또는 10%, 용해된 세포 조성물의 중량 기준)을 용해된 세포 조성물에 첨가하였다. 이어서, 용해된 세포 조성물을 실온에서 24시간 내지 48시간 동안 교반하였다. 이어서, 용해된 세포 조성물을 40℃ 내지 75℃에서 40 kg/분의 공급물 속도로 6,000 rpm으로 작동하는 웨스트팔리아 RSE110 센트리퓨지(웨스트팔리아 세퍼레이터 인더스트리 게엠베하, 독일))를 사용하여 원심분리하여 지질을 용해된 세포 조성물로부터 분리하였다. 원심분리는 3개의 상을 제공하였다: 지질을 함유하는 상부 상, 에멀전을 함유하는 중간 상, 및 고체/액체 에멀전을 함유하는 하부 상. 전체 20,000 kg의 회분을 원심분리하는 총 시간은 약 8 내지 9시간이었다. 지질 층을 원심분리된 용해된 세포 조성물로부터 분리하였다.

[0231] **실시예 4**

[0232] 미생물 세포(ATCC 기탁 번호 PTA-10208)를 함유하는 파스퇴르화된 세포 배양액(500 g)을 제공하였다. 효소(즉, 알칼라제 2.4 L FG 0.5%)를 세포 생물질에 첨가하여 세포를 용해하고 에멀전화된 용해된 세포 조성물을 형성하였다. 에멀전화된 용해된 세포 조성물을 제1 염기(즉, 25% 용액의 NaOH)로 처리하여 용해된 세포 조성물의 pH를 10.5까지 조정하였다. 이어서, 염(고체 NaCl, 2%의 양, 용해된 세포 조성물의 중량 기준)을 용해된 세포 조

성물에 첨가하였다. 이어서, 용해된 세포 조성물을 95℃의 온도까지 가열하고, 이러한 온도 수준을 2시간 동안 용해된 세포 조성물을 교반하면서 유지하였다. 이어서, 제2 염기(즉, 25% 용액의 NaOH)를 용해된 세포 조성물에 pH가 8.3이 될 때까지 첨가하였다. 이어서, 용해된 세포 조성물을 5,100 rpm으로 5분 동안 원심분리하여 용해된 세포 조성물을 분리하고, 지질 층 및 작은 에멀전 층을 수득하였다.

[0233] 실시예 5

[0234] 미생물 세포(ATCC 기탁 번호 PTA-9695)를 함유하는, 농축되고 파스퇴르화된 세포 배양액(500 g)을 제공하였다. 효소(즉, 알칼라제 2.4 L FG 0.5%)를 세포 생물질에 첨가하여 세포를 용해하고, 에멀전화된 용해된 세포 조성물을 형성하였다. 에멀전화된 용해된 세포 조성물을 염기(즉, 25% 용액의 NaOH)로 처리하여 용해된 세포 조성물의 pH를 10.5로 조정하였다. 이어서, 염(고체 NaCl, 2%의 양, 용해된 세포 조성물의 중량 기준)을 용해된 세포 조성물에 첨가하였다. 이어서, 용해된 세포 조성물을 95℃의 온도까지 가열하고, 이러한 온도 수준에서 1시간 동안 용해된 세포 조성물을 교반하면서 유지하고, pH를 8.5로 강하시켰다. 총 10 mL의 발효 배양액에서 1시간 후, 약 1 mL 층의 오일(지질) 및 약 6 mL 층의 에멀전이 존재하였다. 용해된 세포 조성물을 총 220분 동안 가열하고, 에멀전 층이 사라지기 시작하였다. 이어서, 용해된 세포 조성물을 5,100 rpm으로 5분 동안 원심분리하여 용해된 세포 조성물을 분리하였다. 지질의 추출 수율은 58.8 중량%이었다. 조질 오일의 아니시딘 값(AV)은 11.3이었다. 세포 파손 수율은 93 내지 95중량%의 범위이었다.

[0235] 실시예 6

[0236] ATCC 기탁 번호 PTA-9695로 기탁된 단리된 트라우스토키텐리드의 미생물 세포를 함유하는 파스퇴르화된 세포 배양액(473 g)을 제공하였다. 효소(즉, 알칼라제 2.4 L FG 0.5%)를 세포 생물질에 첨가하여 세포를 용해하고 에멀전화된 용해된 세포 조성물을 형성하였다. 에멀전화된 용해된 세포 조성물을 제1 염기(즉, 25% 용액의 NaOH)로 처리하여 용해된 세포 조성물의 pH를 10.62까지 조정하였다. 이어서, 염(고체 NaCl, 2%의 양, 용해된 세포 조성물의 중량 기준)을 용해된 세포 조성물에 첨가하였다. 이어서, 용해된 세포 조성물을 95℃의 온도까지 가열하고, 이러한 온도 수준에서 3시간 동안 용해된 세포 조성물을 교반하면서 유지하였다. 이어서, 제2 염기(즉, NaOH의 25% 가성 용액)를 용해된 세포 조성물에 pH가 8.13이 될 때까지 첨가하였다. 이어서, 용해된 세포 조성물을 5,100 rpm으로 5분 동안 원심분리하여 용해된 세포 조성물을 분리하고, 동량의 지질 층 및 에멀전 층을 수득하였다. pH의 상승이 지질 층의 수율을 증가시켰는지 결정하기 위하여, 부가적인 제2 염기(즉, 25% 용액의 NaOH)를 분리된 용해된 세포 조성물에 pH가 9.02가 될 때까지 첨가하고, 용해된 세포 조성물을 다시 5,100 rpm으로 5분 동안 원심분리하였다. 이는 유사한 수율의 지질 층을 생성하였다. 부가적인 제2 염기를 다시 분리된 용해된 세포 조성물에 pH가 10.12가 될 때까지 첨가하고, 용해된 세포 조성물을 다시 5,100 rpm으로 5분 동안 원심분리하였다. 다시, 이는 유사한 수율의 지질 층을 생성하였다.

[0237] 실시예 7

[0238] 미생물 세포(ATCC 기탁 번호 PTA-9695)를 함유하는 파스퇴르화된 세포 배양액(470 g)을 제공하였다. 세포 생물질을 기계적으로 균질화시켜 세포를 용해하고, 에멀전화된 용해된 세포 조성물을 형성하였다. 에멀전화된 용해된 세포 조성물을 제1 염기(즉, 25% 용액의 NaOH)로 처리하여 용해된 세포 조성물의 pH를 10.5으로 조정하였다. 이어서, 염(고체 NaCl, 2%의 양, 용해된 세포 조성물의 중량 기준)을 용해된 세포 조성물에 첨가하였다. 이어서, 용해된 세포 조성물을 95℃의 온도까지 가열하고, 이러한 온도 수준에서 3시간 동안 용해된 세포 조성물을 교반하면서 유지하였다. 이어서, 제2 염기(즉, 25% 용액의 NaOH)를 용해된 세포 조성물에 pH가 8.07이 될 때까지 첨가하였다. 이어서, 용해된 세포 조성물을 5,100 rpm으로 5분 동안 원심분리하여 용해된 세포 조성물을 분리하고, 지질 층 및 에멀전 층을 수득하고, 이때 에멀전 층은 지질 층보다 크다. pH의 상승이 지질 층의 수율을 증가시켰는지 결정하기 위하여, 부가적인 제2 염기를 분리된 용해된 세포 조성물에 pH가 9.11이 될 때까지 첨가하고, 용해된 세포 조성물을 다시 5,100 rpm으로 5분 동안 원심분리하였다. 이는 유사한 수율의 지질 층을 생성하였다. 부가적인 제2 염기를 다시 분리된 용해된 세포 조성물에 pH가 10.09가 될 때까지 첨가하고, 용해된 세포 조성물을 다시 5,100 rpm으로 5분 동안 원심분리하였다. 다시, 이는 유사한 수율의 지질 층을 생성하였다.

[0239] 실시예 8

[0240] 미생물 세포(크립테코디니움 코니이)를 함유하는 세포 배양액을 감소된 바이오틴 시험 발효조에서 사용하였다. 20,000 kg의 세척되고 농축되고 파스퇴르화된 배양액을 수확하였다. 이는 파스퇴르화의 개시 시 철수하였다. 약 1일 동안 유지하고, 전달하고, 균질화시켰다. 물질을 813 bar/1회 통과로 균질화시키고, 처리 탱크에 다시

수집하였다. 현미경 검사를 통해, 약 80%의 세포가 용해된 것으로 평가되었다.

[0241] 배양액을 처리가 시작되기 전에 약 40℃로 가열하였다. pH가 10.5로 조정되고, 2% NaCl을 첨가하고, 66℃까지 가열하였다. 이러한 지점에서, 상당한 오일 층이 이미 형성되었고, pH는 1 내지 2시간 후 9.5로 강하되었다. 배양액을 66℃에서 밤새 유지하였다.

[0242] 다음 날, 배양액을 155 mm 고리 댐이 설치된 웨스트팔리아 RSE-110상에서 원심분리하였다. 점도는 40℃에서 약 180 cP였다. 원심분리기를 48 kg/분으로 경질 상에서 5 내지 10 psi 역압 및 중질 상에서 30 psi 역압으로 공급하였다. 공급 온도를 70℃로 유지하였다. 어떠한 오일도 수 상에 존재하지 않았고, 단지 수개의 점적이 이 소프로필 알콜을 첨가한 후에 보였다.

[0243] 표 1은 본 과정으로부터 수득된 조질 오일상에서 수행된 분석의 결과를 나타낸다.

[0244] [표 1]

[0245] 실시예 8의 방법을 사용하여 수득한 조질 오일의 명세

% 오일	87.79
DHA (mg/g)	531.02
% DHA	60.49
PV	1.95 (0.6*)
AV	15
%FFA	0.18
인 (ppm)	8.65
구리 (ppm)	0.22
철 (ppm)	0.7
납 (ppm)	0.63

[0246]

[0247] * 원심분리된 오일의 PV.

[0248] 제공된 20,000 kg의 배양액중에서, 10.5중량%(2,100 kg)가 생물질이였다. 생물질중에서, 50중량%가 오일(1,050 kg)이였다. 오일중에서, 58.9중량%가 DHA(618 kg)이였다. 상기 방법을 실행한 후, 지질 층에 592.5 kg의 물질이 존재하고, 이들중 약 87.8중량%(520.2 kg)가 오일이였다. 따라서, 생물질로부터 오일의 추출 수율은 49.5%이였다. 이러한 오일중에서, 60.5중량%(314.6 kg)는 DHA이였고, 이에 의해 생물질로부터 51중량% DHA의 추출 수율을 수득하였다.

[0249] 실시예 9

[0250] 미생물 세포(쉬조키트리움)를 함유하는, 세척되고 농축되고 파스퇴르화된 세포 배양액(약 500g)을 제공하였다. 배양액을 사전 세포 용해 단계 없이 염기(즉, 25% 용액의 NaOH)로 화학적으로 처리하였다. 염기의 첨가는 배양액의 pH를 5.8 내지 11.2로 상승시켰다. 염기의 첨가 및 pH의 상승은 세포를 용해하여 용해된 세포 조성물을 형성하였다. 이어서, 염(고체 Na₂SO₄, 5%의 양, 용해된 세포 조성물의 중량 기준)을 용해된 세포 조성물에 첨가하였다. 이어서, 용해된 세포 조성물을 90℃ 내지 95℃의 온도까지 가열하고, 이러한 온도 수준에서 90분 동안 유지하고, 용해된 세포 조성물의 pH는 9.7까지 강하되었다. 90분 후, 45 mL의 발효 배양액에 대해 약 2.5 mL의 오일 층이 존재하였고, 수분 손실은 없었다. 3시간 후, pH는 9.2까지 강하되었다. 이어서, 용액을 약 5,100 rpm으로 5분 동안 원심분리하여 용해된 세포 조성물을 분리하고, 지질 층을 수득하고, 지질의 추출 수율은 81중량%이였다. 조질 오일의 아니시딘 값(AV)은 20.1이였다. 세포 파손 수율은 92 내지 98중량%의 범위이였다.

[0251] 실시예 10

[0252] 미생물 세포(쉬조키트리움)를 함유하는, 세척되고 농축되고 파스퇴르화된 세포 배양액(약 500g)을 제공하였다. 배양액을 염기(즉, 25% 용액의 NaOH)로 사전 세포 용해 단계 없이 화학적으로 처리하였다. 염기의 첨가는 배양액의 pH를 4.8로부터 11까지 상승시켰다. 염기의 첨가 및 pH의 상승은 세포를 용해하여 용해된 세포 조성물을 형성하였다. 이어서, 염(고체 NaCl, 2%의 양, 용해된 세포 조성물의 중량 기준)을 용해된 세포 조성물에 첨가하였다. 이어서, 용해된 세포 조성물을 90℃ 내지 95℃의 범위의 온도까지 가열하고, 이러한 온도 수준에서 3.5시간 동안 유지하고, 용해된 세포 조성물의 pH는 8.7로 강하되고, 수분 손실은 전혀 존재하지 않았다. 이어서, 용액을 약 5,100 rpm으로 5분 동안 원심분리하여 용해된 세포 조성물을 분리하고, 지질 층을 수득하였다. 지질의 추출 수율은 3.5시간 후 92중량%이였다.

[0253] 용해된 세포 조성물의 일부를 6시간 동안 유지하였고, 용해된 세포 조성물의 pH는 8.6으로 강하되었다.

이어서, 용액을 약 5,100 rpm으로 5분 동안 원심분리하여 용해된 세포 조성물을 분리하고, 지질 층을 수득하였다. 지질의 추출 수율은 6시간 후 89중량%이었다. 조질 오일의 아니시딘 값(AV)은 14.4이었다. 세포 파손 수율은 95중량%이었다.

[0254] 실시예 11

[0255] 미생물 세포(쉬조키트리움)를 함유하는, 세척되고 농축되고 파스퇴르화된 세포 배양액(약 500g)을 제공하였다. 배양액을 염기(즉, 50% 용액의 NaOH)로 사전 세포 용해 단계 없이 화학적으로 처리하였다. 염기의 첨가는 배양액의 pH를 5.8로부터 11.2까지 상승시켰다. 염기의 첨가 및 pH의 상승은 세포를 용해하여 용해된 세포 조성물을 형성하였다. 이어서, 염(고체 NaCl, 2%의 양, 용해된 세포 조성물의 중량 기준)을 용해된 세포 조성물에 첨가하였다. 이어서, 용해된 세포 조성물을 70℃까지 진공하에 가열하여 수 함량을 88.7%로부터 85.5%까지 감소시켰다. 증발중에, pH는 10.36으로 강하되었다. 이어서, 용액을 약 5,100 rpm으로 5분 동안 원심분리하여 용해된 세포 조성물을 분리하고, 지질 층을 수득하였다. 지질의 추출 수율은 83.9중량%이었다. 조질 오일의 아니시딘 값(AV)은 10.5이었다. 세포 파손 수율은 93.17중량%이었다.

[0256] 용해된 세포 조성물을 70℃까지 진공하에 가열하여 수 함량을 88.7%로부터 79.2%까지 감소시킨 것을 제외하고는, 상기 방법을 반복하였다. 지질의 추출 수율은 수 함량을 79.2%로 감소시키는 경우 87.5중량%이고, 세포 파손 수율은 92.3중량%이었다. 상기 방법을 또한 반복하여 수 함량을 88.7%로부터 80.8%까지 감소시켰다. 지질의 추출 수율은 수 함량을 80.8%로 감소시키는 경우 90중량%이고, 세포 파손 수율은 95.9중량%이었다.

[0257] 실시예 12

[0258] 미생물 세포(쉬조키트리움)를 함유하는, 세척되고 농축되고 파스퇴르화된 세포 배양액(약 500g)을 제공하였다. 배양액을 염기(즉, 50% 용액의 NaOH)로 사전 세포 용해 단계 없이 화학적으로 처리하였다. 염기의 첨가는 배양액의 pH를 5.6으로부터 11.1까지 상승시켰다. 염기의 첨가 및 pH의 상승은 세포를 용해하여 용해된 세포 조성물을 형성하였다. 이어서, 용해된 세포 조성물을 밀봉된 시스템에서 40분 동안 90℃까지 가열하였다. 40분 후, 40 mL의 발효 배양액에 대해 1 mL의 오일(지질) 층이 존재하였다. 이어서, 용액을 약 5,100 rpm으로 5분 동안 원심분리하여 용해된 세포 조성물을 분리하고, 지질 층을 수득하였다. 지질의 추출 수율은 85.1중량%이었다. 조질 오일의 아니시딘 값(AV)은 16.3이었다. 세포 파손 수율은 97.6중량%이었다.

[0259] 실시예 13

[0260] 미생물 세포(쉬조키트리움)를 함유하는, 세척되고 농축되고 파스퇴르화된 세포 배양액(약 500g)을 제공하였다. 배양액을 염기(즉, 50% 용액의 NaOH)로 사전 세포 용해 단계 없이 화학적으로 처리하였다. 염기의 첨가는 배양액의 pH를 4.9로부터 11.2까지 상승시켰다. 염기의 첨가 및 pH의 상승은 세포를 용해하여 용해된 세포 조성물을 형성하였다. 이어서, 용해된 세포 조성물을 실온에서 4시간 동안 혼합하였다. 이어서, 용액을 약 5,100 rpm으로 5분 동안 원심분리하여 용해된 세포 조성물을 분리하고, 작은 지질 층을 수득하였다.

[0261] 용해된 세포 조성물의 일부를 실온에서 약 96시간 동안 혼합하였다. 이어서, 용액을 약 5,100 rpm으로 5분 동안 원심분리하여 용해된 세포 조성물을 분리하고, 큰 지질 층을 수득하였다. 지질의 추출 수율은 61.4중량%이었고, 조질 오일의 아니시딘 값(AV)은 22.6이었다.

[0262] 실시예 14

[0263] 미생물 세포(ATCC 기탁 번호 PTA-9695)를 함유하는, 세척되고 농축되고 파스퇴르화된 세포 배양액(약 500g)을 제공하였다. 배양액을 염기(즉, 50% 용액의 NaOH)로 사전 세포 용해 단계 없이 화학적으로 처리하였다. 염기의 첨가는 배양액의 pH를 5.6으로부터 11.1까지 상승시켰다. 염기의 첨가 및 pH의 상승은 세포를 용해하여 용해된 세포 조성물을 형성하였다. 이어서, 용해된 세포 조성물을 70℃ 내지 75℃의 범위에서 3시간 동안 가열하였다. 이어서, 용액을 약 5,100 rpm으로 5분 동안 원심분리하여 용해된 세포 조성물을 분리하고, 지질 층을 수득하였다. 지질의 추출 수율은 84.4중량%이었다.

[0264] 용해된 세포 조성물의 일부를 총 5시간 동안 가열하였다. 이어서, 용액을 약 5,100 rpm으로 5분 동안 원심분리하여 용해된 세포 조성물을 분리하고, 작은 지질 층을 수득하였다. 지질의 추출 수율은 87.3중량%이었다. 세포 파손 수율은 89.1중량%이었다.

[0265] 실시예 15

[0266] 미생물 세포(쉬조키트리움)를 함유하는, 세척되고 농축되고 파스퇴르화된 세포 배양액(약 500g)을 제공하였다.

배양액을 염기(즉, 50% 용액의 NaOH)로 사전 세포 용해 단계 없이 화학적으로 처리하였다. 염기의 첨가는 배양액의 pH를 7.3으로부터 11까지 상승시켰다. 염기의 첨가 및 pH의 상승은 세포를 용해하여 용해된 세포 조성물을 형성하였다. 이어서, 염(고체 Na_2SO_4 , 5%의 양, 용해된 세포 조성물의 중량 기준)을 용해된 세포 조성물에 첨가하였다. 이어서, 용해된 세포 조성물을 90°C의 온도까지 가열하고, 이러한 온도 수준에서 2시간 동안 유지하였다. 90°C의 온도를 추가로 2 내지 4시간 동안 유지하고, 용해된 세포 조성물을 함유하는 용기를 개방하여 물이 증발되게 하였다. 이어서, 용액을 약 5,100 rpm으로 5분 동안 원심분리하여 용해된 세포 조성물을 분리하고, 지질 층을 수득하였다. 지질의 추출 수율은 70중량% 초과이었다. 조질 오일의 아니시딘 값(AV)은 11.6이었다.

[0267] 실시예 16

[0268] 미생물 세포(ATCC 기탁 번호 PTA-9695)를 함유하는 세포 배양액(9,925 kg)을 제공하였다. 세포 배양액을 중량을 기준으로 1:1 비로 물로 희석하여 20,000 kg의 희석된 배양액을 형성하였다. 희석 전의 배양액의 고체 함량은 16.13중량%이었고, 희석 후는 8.25중량%이었다. 희석된 배양액을 혼합하고, 탈슬러지 원심분리기를 6,400 rpm으로 사용하여 세포의 수용성 또는 수분산성 화합물을 제거하였다. 원심분리기로부터의 농축물(10,250 kg)이 수집되고, 10.5중량%의 고체 함량을 가졌다. 수집된 농축물을 62°C 내지 64°C까지 가열하여 농축물을 파스퇴르화시켰다. 효소(즉, 알칼라제 2.4 L FG 0.5%)를 파스퇴르화된 농축물에 첨가하여 세포를 용해하고, 에멀전화된 용해된 세포 조성물을 형성하였다. 에멀전화된 용해된 세포 조성물을 염기(즉, 25% 용액의 NaOH)로 처리하여 용해된 세포 조성물의 pH를 11로 조정하였다. 이어서, 염(고체 Na_2SO_4 , 5%의 양, 용해된 세포 조성물의 중량 기준)을 용해된 세포 조성물에 첨가하였다. 이어서, 용해된 세포 조성물을 95°C의 온도까지 가열하고, 이러한 온도 수준에서 10시간 내지 12시간 동안 용해된 세포 조성물을 교반하면서 유지하였다. 교반 후, 용해된 세포 조성물의 pH는 8.6이었고, 매우 작은 에멀전 층이 존재하였다. 교반 탱크를 60°C까지 냉각하고, 용해된 세포 조성물의 pH를 냉각하면서 9.6까지 상승시켰다. 용해된 세포 조성물의 pH가 인산 첨가에 의해 8.2까지 저하되었다. 인산 첨가는 지질 층 및 매우 작은 에멀전 층의 분리를 방해하지 않았다. 이어서, 용해된 세포 조성물을 5,100 rpm으로 48 kg/분의 공급 속도에서 5분 동안 60°C 내지 63°C에서 원심분리하여 용해된 세포 조성물을 분리하고, 1.7 내지 2.3중량%의 수분 함량을 갖는 지질 층을 수득하였다.

[0269] 실시예 17

[0270] 미생물 세포(크립테코디니움 코니이)를 함유하는, 세척되고 농축되고 파스퇴르화된 세포 배양액(500 g)을 제공하였다. 배양액을 8,000 내지 12,000 psi(2회 통과)의 압력에서 균질화시켜 용해된 세포 조성물을 형성하였다. 용해된 세포 조성물을 염기(즉, NaOH의 12.5% 용액)로 용해된 세포 조성물이 7.8 내지 8.2의 pH에 도달할 때까지 처리하였다. 염(고체 Na_2SO_4 , 5%의 양 용해된 세포 조성물의 중량을 기준으로)을 용해된 세포 조성물에 첨가하였다. 이어서, 용해된 세포 조성물을 60°C의 온도까지 가열하고, 이러한 온도에서 유지하였다. 용해된 세포 조성물의 pH를, 염기(즉, NaOH의 12.5% 용액)를 10 내지 15시간 동안 수분 손실이 거의 없거나 전혀 없는 밀폐된 시스템에서 첨가함으로써, 7.8 내지 8.2 수준으로 유지하였다. 이어서, 용해된 세포 조성물을 약 5,100 rpm으로 5분 동안 원심분리하여 용해된 세포 조성물을 분리하고, 오일 층을 수득하였다. 40 mL의 샘플중 약 2 mL의 오일 층을 생성하였다. 오일의 추출 수율은 73중량%이었다. 조질 오일의 아니시딘 값(AV)은 13.5이었다. 세포 파손 수율은 82 내지 86중량%이었다.

[0271] 실시예 18

[0272] 미생물 세포(쉬조키트리움)를 함유하는 파스퇴르화된 세포 배양액(1,000 g)을 제공하였다. 효소(즉, 알칼라제 2.4 L FG 0.5%)를 세포 생물질에 첨가하여 세포를 용해하고 에멀전화된 용해된 세포 조성물을 형성하였다. 에멀전화된 용해된 세포 조성물을 염기(즉, NaOH의 12.5% 용액)로 처리하여 용해된 세포 조성물의 pH를 7.21로부터 10.52까지 조정하였다. 이어서, 염(고체 NaCl, 2%의 양, 용해된 세포 조성물의 중량 기준)을 용해된 세포 조성물에 첨가하였다. 이어서, 배양액을 4개의 분획으로 분리하고, 이때 각각의 분획은 4개의 상이한 온도 및 시간에서 유지되었다: 1) 시험 1은 90°C에서 22시간 동안 유지되었다; 2) 시험 2는 90°C에서 2시간 동안 및 이어서 25°C에서 20시간 동안 유지되었다; 3) 시험 3은 60°C에서 22시간 동안 유지되었다; 4) 시험 4는 25°C에서 22시간 동안 유지되었다. 이어서, 개별 시험을 추가 pH 조정 없이 원심분리하였다. 시험 1, 2 및 3의 경우, 배양액을 약 6,600 rpm(4,800의 관성력(g-force))으로 5분 동안 원심분리하여 용해된 세포 조성물을 분리하였다. 시험 4의 분리가 4,800의 관성력에서 양호하지 못하므로(<20%), 관성력을 15,000으로 증가시키고, 배양액을 15,000의 관성력에서 5분 동안 스피닝하였다. 중량%인 지질의 추출 수율 및 아니시딘 값(AV)을 하기

표에 열거한다.

[0273] [표 2]

[0274] 용해된 세포 조성물의 가열 시간 및 온도가 변하는 경우의 조건 및 결과

시험 번호	처리 시간 및 온도	원심분리 조건	AV	오일 수율 (%)
1	22 시간 동안 90°C	pH = 6.22 관성력 = 4,800	58.7	51.4
2	2 시간 동안 90°C, 20 시간 동안 25°C	pH = 8.19 관성력 = 4,800	109.2	82.2
3	22 시간 동안 60°C	pH = 8.38 관성력 = 4,800	91.2	27.2
4	22 시간 동안 25°C	pH = 10.03 관성력 = 15,000	105.2	55.7

[0275]

[0276] 표 2의 아니시딘 값은 예상치보다 높았다. 이전 실시예와 본 실시예 사이의 하나의 차이는 용해된 세포 조성물이 지질이 추출되기 전에 긴 시간 동안 방치된다는 것이다. 추출 전의 긴 시간이 용해된 세포 조성물에 존재하는 용해된 산소의 산화를 야기하는 것으로 가정된다. 이어서, 증가된 산화는 아니시딘 값의 증가를 야기한다. 최장 시간 동안의 최고 온도에서 가열된 시험(시험 1)의 최저 아니시딘 값을 갖는다는 사실은 용해된 세포 조성물의 용해된 산소 함량이 일반적으로 온도가 증가함에 따라 감소하므로 이러한 가정을 지지한다. 따라서, 증가된 아니시딘 값은 용해된 세포 조성물로부터의 지질 추출에서 지연의 결과인 예외인 것으로 여겨진다. 제조에 있어서, 용해된 세포 조성물로부터의 지질 추출에서 지연 시간이 없을 것이고, 아니시딘 값은 26 이하의 아니시딘 값의 종전 결과와 일치할 것이다.

[0277] 실시예 19

[0278] 미생물 세포(쉬조키트리움)를 함유하는, 파스퇴르화된 세포 배양액(1,000 g)을 제공하였다. 이어서, 배양액을 3개의 분획으로 나누고, 다음과 같이 희석하였다: 1) 시험 1은 전혀 희석되지 않고, 대조군 분획으로서 역할을 하였다; 2) 시험 2는 물에 의해 25% 희석되었다; 3) 시험 3은 물에 의해 50% 희석되었다. 효소(즉, 알칼라제 2.4 L FG 0.5%)를 세포 생물질에 첨가하여 세포를 용해하고 에멀전화된 용해된 세포 조성물을 형성하였다. 에멀전화된 용해된 세포 조성물을 염기(즉, NaOH의 12.5% 용액)로 처리하여 용해된 세포 조성물의 pH를 6.8로부터 10.6까지 조정하였다. 이어서, 염(고체 NaCl, 2%의 양, 용해된 세포 조성물의 중량 기준)을 용해된 세포 조성물에 첨가하였다. 이어서, 배양액을 90°C까지 가열하고, 20시간 동안 유지하였다. 유지 시간 후, 각각의 시험에 대한 배양액을 2개로 분리하고, 이때 하나의 반은 그대로 원심분리되고, 다른 반은 원심분리 전에 약 8.5로 조정된 pH를 가졌다. 이어서, 분획을 둘다 약 8,545 rpm(8,000의 관성력)으로 5분 동안 원심분리하였다. 중량 %인 지질의 추출 수율은 아니시딘 값(AV)을 하기 표에 열거한다.

[0279] [표 3]

[0280] 파스퇴르화된 배양액의 회석이 변하는 경우의 조건 및 결과

시험 번호	회석 여부	원심분리 조건	AV	오일 수율 (%)
1	회석 안함	pH = 6.0 관성력 = 8,000	51.8	81.2
1a	회석 안함	pH = 8.4 관성력 = 8,000	44.3	78.1
2	물에 의한 25% 회석	pH = 5.5 관성력 = 8,000	76.1	88.9
2a	물에 의한 25% 회석	pH = 8.4 관성력 = 8,000	85.3	82.1
3	물에 의한 50% 회석	pH = 5.7 관성력 = 8,000	68.5	85.0
3a	물에 의한 50% 회석	pH = 8.5 관성력 = 8,000	79.6	84.0

[0281]

[0282] 표 3의 아니시딘 값은 예측치보다 높았다. 종전 실시예(실시예 18을 제외함)와 본 실시예 사이의 하나의 차이 점은 용해된 세포 조성물인 지질이 추출되기 전에 긴 시간 동안 방치되는 것이다. 추출 전의 긴 시간이 용해된 세포 조성물에 존재하는 용해된 산소의 산화를 야기하는 것으로 가정된다. 이어서, 증가된 산화는 아니시딘 값의 증가를 야기한다. 따라서, 증가된 아니시딘 값은 용해된 세포 조성물로부터의 지질 추출에서 지연의 결과인 예외인 것으로 여겨진다. 제조에 있어서, 용해된 세포 조성물로부터의 지질 추출에서 지연 시간이 없을 것이고, 아니시딘 값은 26 이하의 아니시딘 값의 종전 결과와 일치할 것이다.

[0283] 실시예 20

[0284] 염을 첨가하는 시점(예컨대, 균질화 전후) 및 염이 양이 변함을 제외하고는 실시예 2에 기술된 방법을 사용하여 다양한 발효 로트로부터 수득된 세포 배양액을 처리한다. 생성된 분리된 지질을 분석하고, 분석물을 표 4에 제공한다.

[0285] [표 4]

[0286] 염 첨가의 시점 및 첨가된 염의 양이 변화하는 본 발명의 방법을 사용하여 수득된 지질의 명세

발효 로트	P2137	P2137	P4167	P4167	P2137	P2137
NaCl*의 첨가	전	전	후	후	후	후
중량% NaCl	2	5	2	5	5	5
% 액체*	27	37	51	72	59	15
중량% 출발 고체	13	12.9	19.2	19.2	13.3	7.5 ⁺
원심분리 전 중량% 고체	19.7	21.7	19.7	20.1	20.2	8.6

[0287]

[0288] * NaCl의 첨가가 균질화 전후에 수행되었다; % 지질은 트라이글리세라이드 형태중 지질의 백분율을 지칭한다.

[0289] ⁺ 이러한 실험을 회석하여 출발 고체의 낮은 백분율을 갖는다.

[0290] 표 4에 제공된 데이터는 균질화 후에 염을 첨가하는 것이 균질화 전에 염을 첨가하는 것보다 높은 % 지질 값을 야기함을 나타낸다. 표 4에 제공된 데이터는 또한 샘플의 회석이 보다 낮은 값을 야기함을 나타낸다.

[0291] 실시예 21

[0292] 미생물 세포(쉬조키트리움)로부터 수득된 알칼라제 효소 처리된 용해된 세포 조성물의 샘플을 사용하였다. 샘플은 약 5.5의 pH를 가졌다. 샘플을 보다 작은 4개의 샘플로 나누고, 나트륨 하이드록사이드를 첨가함으로써 샘플중 3개의 pH를 각각 약 7.4, 약 10.5 및 약 12로 조정하였다. 샘플을 탈이온수에 의해 1:1 비로 희석하였다. POBN (α-(4-피리딜-1-옥사이드)-N-tert-부틸니트론, 1.25 M; 50 μL)을 스핀 트랩 화학약품으로서 각각

0.5 g의 회석된 샘플에 첨가하였다. 샘플을 브루커 바이오스핀 e-스캔 EPR(일렉트론 파라마그네틱 레조넌스) 분광기(시스템 번호 SC0274)(브루커 바이오스핀, 미국 매사추세츠주 빌러리카)로 측정하여 지질 산화로부터 존재하는 유리 라디칼의 양을 측정하였다. 샘플을 실온(20°C)에서 배양하고, 샘플을 함유하는 각각 50 µL의 POBN을 하기 분광기 변수를 사용하여 pH를 조정 한 후 4시간 동안 1시간 간격으로 시험하였다: 86 Hz의 조절 진동수, 2.11 가우스의 조절 진폭, 5.19 mW의 마이크로파 전력, 20.48 초의 시간 상수, 10.49 초의 스윙 시간, 100 가우스의 스윙 너비, 및 8의 스캔수. EPR 분광기 관독의 결과를 도 5에 제공한다.

[0293] 도 5의 데이터는 초기에 유리 라디칼의 수준이 pH 5.5의 샘플의 경우 가장 높고, pH 10.5 및 12의 샘플의 경우 가장 낮음을 나타낸다. 데이터는 또한 4시간에 걸쳐 라디칼 형성의 속도가 pH 10.5의 경우 가장 낮고 pH 5.5의 샘플의 경우 가장 높음을 나타낸다. 데이터는 또한 용해된 세포 조성물로의 염기의 첨가가 지질 산화이고, 이에 따라, 조절 지질 및 정련된 오일중 낮은 AV를 야기한다.

[0294] **실시예 22**

[0295] 종유를 평지씨 식물로부터 추출하고, 이어서 연마 밀을 통과시켜 종유의 외부 껍질을 분쇄하고 파괴하였다. 종유의 껍질을 공지된 수단, 예컨대 흡인에 의해 까서 종유의 껍질로부터 식육(내부)를 제거하였다. 이어서, 압축기를 통과하도록 하여 껍질까인 종유를 케이크로 연마하여 종유의 세포를 용해함으로써, 껍질까인 종유를 균질화시키거나 배출하였다. 물을 첨가하여 에멀전화된 용해된 세포 조성물을 형성하였다. 에멀전화된 용해된 세포 조성물을 여과하여 임의의 과량의 껍질 단편을 용해된 세포 조성물로부터 제거하였다. 에멀전화된 용해된 세포 조성물을 염기(즉, 25% 용액의 NaOH)로 처리하여 용해된 세포 조성물의 pH를 11까지 조정하였다. 이어서, 염(고체 NaCl, 2%의 양, 용해된 세포 조성물의 중량을 기준으로)을 용해된 세포 조성물에 첨가하였다. 이어서, 용해된 세포 조성물을 90°C의 온도까지 가열하고, 이러한 수준에서 6시간 내지 48시간 동안 용해된 세포 조성물을 교반하면서 유지하였다. 이어서, 용해된 세포 조성물을 5,100 rpm으로 5분 동안 원심분리하여 용해된 세포 조성물을 분리하고, 지질 층 및 에멀전 층을 수득하였다.

[0296] **실시예 23**

[0297] **핵산 추출에 의해 수득된 조절 지질의 비교 분석**

[0298] 실시예 2에 기술된 방법을 사용하여 로트로부터 수득된 조절 지질을 분석하여 다양한 명세를 측정하였다. 부가적인 조절 지질을 실시예 2에 이용된 동일한 미생물 세포에 대한 전형적인 핵산 추출 공정을 사용하여 수득하였다. 핵산 추출 공정은 15 내지 20중량%의 고체의 용액을 수득하기 위한 발효 배양액의 건조, 분무 건조된 생물 질로의 핵산의 첨가를 포함한다. 이어서, 용액을 균질화시켜 세포를 용해하여 용해된 세포 조성물을 형성하였다. 용해된 세포 조성물을 원심분리하고, 지질 및 핵산을 함유하는 층을 제거하였다. 이어서, 핵산을 지질로부터 제거하였다. 분석 결과를 표 1에 제공한다.

[0299] [표 5]

[0300] 본 발명 또는 핵산 추출 공정을 사용하여 수득된 지질의 명세

발효 로트	A	B	C	D	E	F	G
추출 방법	실시예 2	핵산	핵산	핵산	핵산	핵산	핵산
AV*	5.9	ND	ND	ND	14.7	17.18	6.7
PV*	1.21	0.65	1.56	0.46	ND	0.85	0.3
% 액체*	89.61	86.94	84.31	86.75	85.53	86.05	86.54
DHA (mg/g)	537.47	508.15	459.32	465.31	510.49	495.82	506.33
% DHA*	59.98	58.39	54.49	53.65	59.71	57.68	58.51

[0301] * AV = 아니시딘 값; PV = 과산화물 값; % 지질은 트라이글리세라이드 형태중 지질의 백분율을 지칭한다; % DHA는 지질중 DHA의 백분율을 지칭한다.

[0303] 표 5에 제공된 데이터는 본 발명의 방법에 의해 수득된 조절 지질이 전형적인 핵산 추출 공정에 의해 제조된 지질에 비해 우수한 아니시딘 값, 지질 백분율, DHA의 양 및 DHA 백분율을 나타냄을 증명한다.

[0304] **프리오렉스 공정에 의해 수득된 조절 지질의 비교 분석**

[0305] **실시예 24**

[0306] 실시예 1 및 3에 기술된 방법을 사용하여 다양한 발효 로트로부터 수득된 조절 지질이 다양한 명세를 측정하기

위해 분석되었다. 부가적인 조질 지질을, 미국특허 제5,928,696호 및 국제특허출원공개 제01/76385호 및 제 01/76715호에 기술된 바와 같이 지질을 수용성 유기 용매에 의해 추출하는 공정인 프리오렉스 공정(웨스트팔리아 세퍼레이터, 독일)을 사용하여 수득하였다. 분석 결과를 표 6에 제공한다.

[0307] [표 6]

[0308] 본 발명 또는 프리오렉스 공정의 방법을 사용하여 수득된 지질의 명세

발효 로트	A	B	B	B	B	C	C	C
추출 방법	실시예 1	실시예 1	실시예 3	실시예 1 ^a	실시예 1 ^b	실시예 1	실시예 1	프리오렉스
AV [*]	3.1	1.6	3.9	300	7.1	3.5	4	36
PV [*]	1.8	0.17	0.14	6.16	0.34	0	0	0.35
% 액체 [*]	96.27	93.67	92.55	87.20	94.42	95.14	94.31	93.92
DHA (mg/g)	452.4	458.16	455.17	414.66	471.55	416.41	416.05	415.38
추출 수율 (%)	93.5	87	ND	96	ND	94	94	94

[0309]

[0310] * AV = 아니시딘 값; PV = 과산화물 값; % 지질은 트라이글리세라이드 형태중 지질의 백분율을 지칭한다.

[0311] a: 용해된 세포 조성물을 가열하지 않았다.

[0312] b: 용해된 세포 조성물을 추출 전에 3주 동안 방치하였다.

[0313] 표 6에 제공된 데이터는 본 발명의 방법에 의해 수득된 조질 지질이 프리오렉스 공정에 의해 제조된 지질에 비해 우수한 아니시딘 값(용해된 세포 조성물이 가열되지 않은 경우 수득된 지질을 제외함)을 나타냄을 증명한다. 본 발명의 방법에 의해 제조된 지질은 프리오렉스 공정을 사용하여 제조된 지질의 아니시딘 값의 4.4 내지 19.7%인 아니시딘 값을 나타낸다.

[0314] 본 발명의 방법에 의해 제조된 지질은 증가된 안정성을 갖는 것으로 여겨진다. 예를 들어, 표 6에 제시된 바와 같이, 본 발명의 방법을 사용하여 지질을 용해된 세포 조성물로부터 추출하였다, 이때 용해된 세포 조성물을 추출 공정 전에 3주 동안 방치하였다. 용해된 세포 조성물중 지질의 아니시딘 값이 시간에 따라 증가하는 것으로 여겨지고, 이에 따라, 3주 전의 오래된 용해된 세포 조성물로부터 추출된 지질이 증가된 아니시딘 값을 가질 것으로 예측된다. 그러나, 표 6에 제시된 바와 같이, 본 발명의 방법을 사용하여 3주 전의 오래된 용해된 세포 조성물로부터 수득된 지질은 프리오렉스 공정에 의해 제조된 지질의 아니시딘 값의 19.7%인 아니시딘 값을 갖는다.

[0315] 실시예 25

[0316] 실시예 16에 기술된 방법을 사용하여 미생물 세포(ATCC 기탁 번호 PTA-9695)의 배양액으로부터 수득된 지질이 분석되어 다양한 명세를 결정하였다. 부가적인 조질 지질을, 미국특허 제5,928,696호 및 국제특허출원공개 제 01/76385호 및 제01/76715호에 기술된 바와 같이 지질을 수용성 유기 용매에 의해 추출하는 공정인 프리오렉스 공정(웨스트팔리아 세퍼레이터, 독일)을 사용하여 수득하였다. 분석 결과를 표 7에 제공한다.

[0317] [표 7]

[0318] 조질 지질 비교

	실시예 16	프리오렉스
% 오일	9.19	93.73
DHA (mg/g)	570.68	574.33
% DHA	62.1	61.27
% FFA	1.13	0.22
PV	0	0.74
AV	10	73.9
철 (ppm)	0.11	0
구리 (ppm)	0.67	0.3
납 (ppm)	0.21	0
인 (ppm)	5.22	7.20
추출 수율 (%)	61.4	45.3

[0319]

[0320] 표 7에 제공된 데이터는 본 발명의 방법에 의해 수득된 조질 지질이 프리오렉스 공정에 의해 제조된 지질에 비해 우수한 아니시딘 값(AV) 및 과산화물 값(PV)을 나타냄을 증명한다. 데이터는 또한 본 발명의 방법에 의해 수득된 지질의 추출 수율이 프리오렉스 공정에 의해 수득된 지질의 추출 수율에 비해 우수함을 증명한다.

[0321] 실시예 26

[0322] 조질 지질의 정련

[0323] 실시예 1에 약속된 방법 및 프리오렉스 공정을 사용하여 조질 지질을 수득하였다. 조질 지질을 다음과 같이 순차적으로 더욱 가공하였다: 1) 탈검 및 가성 정련; 2) 표백; 3) 냉각 여과; 및 4) 산화방지제에 의한 탈취. 조질 지질, 가성 정련된 지질, 표백된 지질 및 탈취된 지질에 대한 데이터를 표 8a 및 8b에 제공한다. 정련된 오일의 비교를 표 9에 제공한다.

[0324] [표 8a]

[0325] 프리오렉스 공정으로부터 수득된 지질(실시예 24)

공정 단계	FFA %	PV	AV	DHA (mg/g)	수율 % (액체)	수율 % (DHA)
조질 액체	0.28	0.37	33.6	413.6	N/A	N/A
가성 정련된 액체	<0.1	0.29	--	416.4	85.7	86.3
표백된 액체	<0.1	0.16	13.9	413.1	71.5	70.9
여과된 액체	<0.1	0.19	13.3	424.86	70.3	76.0
탈취된 액체 w/AOX*	0.06	<0.1	14.3	401.5	96.6	89.4

[0326]

[0327] * AOX는 산화방지제를 지칭한다.

[0328] [표 8b]

[0329] NaCl을 사용하는 추출 공정으로부터 수득된 지질(실시예 1)

공정 단계	FFA %	PV	AV	DHA (mg/g)	수율 % (액체)	수율 % (DHA)
조질 액체	1.36	0	3.5	406.7	N/A	N/A
가성 정련된 액체	<0.1	0.27	2.3	410.8	85.9	86.7
표백된 액체	<0.1	0.16	0.8	404.3	97.0	95.5
여과된 액체	<0.1	0.37	1.0	414.1	59.3	60.7
탈취된 액체 w/AOX	0.06	<0.1	1.8	379.9*	94.9	87.1

[0330]

[0331] * 주의: 고 유성 해바라기 오일(HOSO)에 의한 증가된 희석은 DHA(mg/g)의 감소 원인이다.

[0332] [표 9]

[0333] 정련된 오일 비교

	프리오렉스 (실시예 24)	실시예 1
DHA (mg/g)	401.5	379.9*
% DHA	42.69	40.18
FFA%	0.06	0.06
PV	<0.1	<0.1
AV	14.3	1.8
철 (ppm)	0.05	<0.02
구리 (ppm)	<0.02	<0.02
납 (ppm)	<0.1	<0.1
비스 (ppm)	<0.1	<0.1
수은 (ppm)	<0.01	<0.01
% 수분 및 휘발성 물질	<0.01	<0.01
불검화물 (%)	1.17	1.33
IR 에 의한 트랜스-지방산 (%)	<1	<1

[0334]

[0335] * 주의: HOSO에 의한 증가된 회석은 DHA(mg/g)의 감소 원인이다.

[0336] 표 8a, 표 8b 및 표 9에 제공된 데이터는 본 발명의 방법에 의해 정련된 오일이 프리오렉스 공정에 의해 제조된 정련된 오일보다 낮은 아니시딘 값을 가짐을 증명한다.

[0337] 실시예 27

[0338] 감각 프로파일 비교

[0339] 실시예 26에서 수득된 정련된 오일을 8 내지 12명의 감각 분석가의 패널에 의해 분석하였다. 감각 분석가는 아로마, 아로마틱 및 뒷맛을 기준으로 다양한 지질 명세를 등급화하여 각각의 지질에 대한 "전체 아로마 강도"를 제공하였다. 유니버설 스펙트럼 묘사 분석 방법을 샘플의 아로마 및 아로마틱 특성을 평가하는데 사용하였다. 이러한 방법은 0 내지 15의 강도 등급(이때 0 = 검출되지 않음, 15 = 매우 강한 강도)을 사용하여 오일의 아로마 및 아로마틱 속성을 측정한다. 감각 데이터의 결과를 표 10에 제공한다.

[0340] [표 10]

[0341] 프리오렉스 공정에 의해 제조된 지질(실시예 24) 및 본 발명의 방법에 의해 제조된 지질(실시예 1)의 감각 명세

	명세						
	아로마						
	전체 강도	비린 해양 콤플렉스	그린 콤플렉스	초본성	견과류 볶음	페인트	기타
프리오렉스	3	1	1	1	0	0	0
실시예 1	2	0	1	1	0	0	0
	아로마틱						
	전체 강도	비린 해양 콤플렉스	그린 콤플렉스	초본성	견과류 볶음	페인트	기타
프리오렉스	4	1	1	2	0	0	0
실시예 1	3	0	1	2	0	0	0
	뒷맛						
	프리오렉스	Herbal/slightly fishy					
실시예 1	Herbal						

[0342]

[0343] 표 10에 제공된 데이터는 본 발명의 방법에 의해 제조된 정련된 오일이 프리오렉스 공정에 의해 정련된 오일에 비해 우수한 감각 데이터를 나타냄을 증명한다. 상기 제시된 바와 같이, 본 발명의 방법에 의해 제공된 지질은 3 및 2의 전체 아로마 강도를 가졌고, 프리오렉스 지질은 각각 4 및 3의 전체 아로마 강도를 제공하였다.

[0344] 실시예 28

[0345] **비교 실시예**

[0346] 유기 용매의 사용 없이 미생물로부터 지질을 수득하는 추출 공정은 미국특허 제6,750,048호에 개시된다. 본 발명의 방법에 의해 제조된 조질 지질로부터 수득된 정련된 오일 및 미국특허 제6,750,048호에 개시된 추출 공정에 의해 제조된 조질 지질의 비교가 표 11에 제공된다.

[0347] [표 11]

[0348] 본 발명의 방법에 의해 제조된 지질(실시예 1) 및 미국특허 제6,750,048호에 개시된 공정에 의해 제조된 지질의 비교 데이터

	실시예 1	미국특허 제 6,750,048 호
DHA (mg/g)	379.9	346
% DHA	40.18	37.3
FFA%	0.06	ND
PV	<0.1	0.46
AV	1.8	ND
철 (ppm)	<0.02	0.26
구리 (ppm)	<0.02	<0.05
납 (ppm)	<0.1	<0.20
비소 (ppm)	<0.1	<0.20
수은 (ppm)	<0.01	<0.20
% 수분 및 휘발성 물질	<0.01	0.02
불검화물 (%)	1.33	ND
IR 에 의한 트랜스-지방산 (%)	<1	ND

[0349]

[0350] 표 11에 제공된 데이터는 본 발명의 방법에 의해 제조된 조질 지질로부터 수득된 정련된 오일이 미국특허 제 6,750,048호에 개시된 추출 공정에 의해 제조된 조질 지질에 비해 우수한 특성을 나타냄을 증명한다.

[0351] **실시예 29**

[0352] 단리된 트라우스토키트리드(ATCC 기탁 번호 PTA-9695)를 분류학적 분류에 대해 특성화시켰다.

[0353] 샘플을 건조중에 조건대 서식지로부터 수집하였다. 물, 퇴적물, 살아있는 식물 물질 및 쇠퇴하는 식물/동물 파편을 멸균 50 mL 관에 위치시켰다. 물에 함께 각각의 샘플의 부분을 단리 매질의 고체 아가르 플레이트상에 펼쳤다. 단리 매질은 500 mL의 인공 해수, 500 mL의 증류수, 1 g의 글루코스, 1 g의 글리세롤, 13 g의 아가르, 1 g의 글루탐에이트, 0.5 g의 효소 추출물, 0.5 g의 카세인 하이드로리세이트, 1 mL의 비타민 용액(100 mg/L 티아민, 0.5 mg/L 바이오틴, 0.5 mg B₁₂), 1 mL의 미량 광물 용액(PII 금속, 1L 당 하기 성분을 함유함: 6.0 g FeCl₃6H₂O, 6.84 g H₃BO₃, 0.86 g MnCl₂4H₂O, 0.06 g ZnCl₂, 0.026 CoCl₂6H₂O, 0.052 g NiSO₄H₂O, 0.002 g CuSO₄5H₂O 및 0.005 g Na₂MoO₄2H₂O), 및 각각 500 mg의 페니실린 G 및 스트렙토마이신 설페이트로 이루어졌다. 아가르 플레이트를 20 내지 25°C에서 암실에서 항온처리하였다. 2 내지 4일 후, 아가르 플레이트를 확대하여 검사하고, 세포의 콜로니를 멸균 이쑤시개를 사용하여 집고, 매질의 새로운 플레이트에 다시 스트리킹하였다. 세포를 오염된 유기체가 제거될 때까지 반복적으로 스트리킹하였다.

[0354] 아가르 플레이트로부터의 콜로니를 반-강도 해수 및 오토클레이빙된 새로이 부화된 염수 새우 유충의 (1 mL) 현탁액을 갖는 페트리 접시에 전달하였다. 염수 새우 유충은 2 내지 3일 후, 스포란지어의 클러스트와 함께 매우 과성장하였다. 방출된 주스포어는 방출 시 쌍편모이었고, 성숙한 스포란지어로부터 활동적으로 헤엄쳤고, 이의 벽 잔사는 스포어가 방출된 후 선명하게 보였다(상 콘트라스트로). 스포란지어는 12.5 μm 내지 25 μm 직경으로 측정되었고, 주스포어는 크기가 2.5 μm 내지 2.8 μm x 4.5 μm 내지 4.8 μm이었다. 개별 스포란지어 당 8 내지 24개의 스포어가 존재하였다. 정착한 주스포어는 커졌고, 신속하게 이원 분할을 경험하여 테트라드, 옥타드 및 최종적으로 스포란지어의 클러스터가 되었다. 테트라드 형성은 스포란지어의 성숙 전에 매우 초기 단계에서 개시되었다. 이러한 특성은 쉬조키트리움 속과 일치한다.

[0355] 단리된 트라우스토키트리드(ATCC 기탁 번호 PTA-9695)는 공지된 종에 대한 이의 18s rRNA의 유사성을 기준으로 추가로 특성화된다. 트라우스토키트리드(ATCC 기탁 번호 PTA-9695)로부터의 전체 게놈 DNA는 표준 과정(문헌

[Sambrook J. and Russell D. 2001. Molecular cloning: A laboratory manual, 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York])으로부터 제조되었고, 18s rRNA 유전자의 PCR 증폭에 사용되었다. 18s rRNA 유전자의 PCR 증폭은 종전에 기술된 프라이머에 의해 수행되었다(문헌[Honda et. al., J. Eukaryot. Microbiol. 46(6) 1999]). 염색체 DNA 주형을 사용하는 PCR 조건은 다음과 같다: 50 µL 전체 부피중 0.2 µM dNTP, 0.1 µM 각각의 프라이머, 8% DMSO, 200 ng 염색체 DNA, 2.5 U 푸울트라(PfuUltra, 등록 상표) II 융합 HS DNA 폴리머라제(스트라타젠(Stratagene)) 및 1X 푸울트라 완충제(스트라타젠). PCR 프로토콜은 하기 단계를 포함하였다: (1) 2분 동안 95°C; (2) 45초 동안 95°C; (3) 30초 동안 55°C; (4) 2분 동안 72°C; (5) 40회 사이클 동안 2 내지 4 단계 반복; (6) 5분 동안 72°C; 및 (7) 6°C에서 유지.

[0356] PCR 증폭은 상기 염색체 주형을 사용하여 예측된 크기를 갖는 별개의 DNA 생성물을 생성하였다. PCR 생성물을 제조자의 설명에 따라 벡터 pJET1.2/블런트(퍼멘타스(Fermentas))로 클로닝하였고, 삽입 서열을 공급된 표준 프라이머를 사용하여 결정하였다.

[0357] 표 12는 트라우스토키트리드(ATCC 기탁 번호 PTA-9695)로부터의 18s rRNA 서열과 미국국가생물정보센터(National Center for Biotechnology Information, NCBI) 전자 데이터베이스내의 DNA 서열과의 비교를 나타낸다. 간략하게, "% 동일성"을 벡터NTI 프로그램(인비트로젠(Invitrogen))의 "얼라인X(AlignX)" 프로그램의 매트릭스 "swgapdnmt"(DNA 정렬에 대한 표준)를 점수매김으로써 결정하였다. "% 적용 범위"는 NCBI 전자 데이터베이스로부터의 베이직 로컬 얼라인먼트 서치 툴(Basic Local Alignment Search Tool, BLAST)의 결과로부터 취해지고, 정렬된 분절에 포함되는 의문 길이의 백분율이다.

[0358] [표 12]

[0359] 18s rRNA 서열의 비교

트라우스토키트리드	% 동일성 계산 1	% 적용 범위 계산 2
트라우스토키트리움 아그레가툼 (p)	98	90
트라우스토쿠트리다에 종 HU1	84	86
트라우스토쿠트리다에 종 8-7	84	91
트라우스토키트리움 멀티루디멘탈레	81	88
트라우스토쿠트리다에 종 PW19	81	85
쉬조키트리움 종 ATCC 20888	81	95

[0360]

[0361] (p): 부분 서열을 나타냄.

[0362] 표 12에 제시된 바와 같이, % 동일성에 관하여, 트라우스토키트리드(ATCC 기탁 번호 PTA-9695)의 18s rRNA 유전자 서열이 문헌[Honda, D. et al., J. Euk. Micro. 46(6): 637-647(1999)]에 제공된 티. 아그레가툼의 18s rRNA 유전자 서열과 비록 동일하지는 않지만 밀접하게 관련된다. 트라우스토키트리움 아그레가툼에 관해 공개된 18s rRNA 서열은 부분 서열이고, 서열의 중간에 약 71개의 DNA 뉴클레오티드 갭을 갖는다. % 적용 범위에 관하여, 본 발명의 단리물의 18s rRNA 유전자 서열은 트라우스토키트리움 아그레가툼보다 쉬조키트리움 sp. ATCC 20888과 더욱 밀접하게 관련된다.

[0363] 고도로 보존된 단백질, 예컨대 액틴 및 베타-투불린은 유기체 사이의 계통발생 관계를 평가하는 표지자로서 18s rRNA 유전자와 함께 광범위하게 사용되었다(문헌[Baldauf, S. M. Am. Nat. 154, S178(1999)]). 트라우스토키트리드(ATCC 기탁 번호 PTA-9695)로부터의 전체 게놈 DNA가 또한 액틴 및 베타-투불린 유전자 둘다의 PCR 증폭을 위한 주형으로서 사용되었다. PCR 증폭을 트라우스토키트리움 아그레가툼으로부터의 액틴 및 베타-투불린 DNA 서열부터 보존된 영역으로 지정된 프라이머에 의해 수행하였다.

[0364] 염색체 DNA 주형을 사용하는 PCR 조건은 다음과 같다: 50 µL 전체 부피중 0.2 µM dNTP, 각각 0.1 µM 프라이머, 8% DMSO, 200 ng 염색체 DNA, 2.5 U 헤르쿨라제(Herculase, 등록상표) II 융합 DNA 폴리머라제(스트라타젠), 및 1X 헤르쿨라제 완충제(스트라타젠). PCR 프로토콜은 하기 단계를 포함하였다: (1) 2분 동안 95°C; (2) 30초 동안 95°C; (3) 30초 동안 55°C; (4) 2분 동안 72°C; (5) 40회 사이클 동안 단계 2

내지 반복; (6) 5분 동안 72℃; 및 (7) 6℃에서 유지.

[0365] PCR 증폭은 상기 염색체 주형을 사용하여 예측된 크기를 갖는 별개의 DNA 생성물을 생성하였다. 각각의 PCR 생성물을 제조자의 설명에 따라 벡터 pJET1.2/블린트(퍼멘타스)로 클로닝하였고, 각각의 삽입 서열을 공급된 표준 프라이머를 사용하여 결정하였다.

[0366] 표 13은 공중 데이터베이스에서 이용가능한 액틴 서열과 비교되는 트라우스토키트리드(ATCC 기탁 번호 PTA-9695)로부터의 액틴 아미노산 서열에 대한 동일성을 나타낸다. 동일성을 벡터NTI 프로그램의 "얼라인X" 프로그램내의 매트릭스 "blosum62mt2"(단백질 정렬에 대한 표준)를 점수매김으로써 결정하였다.

[표 13]

[0368] 액틴 단백질 서열 % 동일성의 비교

트라우스토키트리드	% 동일성
트라우스토키트리다에 종 RT49	98
쉬조키트리움 종 ATCC 20888	96
트라우스토키트리움 스트리아툼	96
트라우스토키트리움 아그레가툼	96
자포노키트리움 마리눔	95
트라우스토키트리움 아우레움	95

[0369]

[0370] 표 14는 공중 데이터베이스에서 이용가능한 베타-투불린 서열과 비교되는 트라우스토키트리드(ATCC 기탁 번호 PTA-9695)로부터의 베타-투불린 아미노산 서열에 대한 동일성을 나타낸다. 동일성을 벡터NTI 프로그램의 "얼라인 X" 프로그램내의 매트릭스 "blosum62mt2"(단백질 정렬에 대한 표준)를 점수매김으로써 결정하였다.

[표 14]

[0372] 베타-투불린 단백질 서열 % 동일성의 비교

트라우스토키트리드	% 동일성
아플라노키트리움 케르구엘렌스	100
아플라노키트리움 스토키노이	100
자포노키트리움 마리눔	100
라비린툴라 종 N8	100
트라우스토키트리다에 종 RT49	100
트라우스토키트리움 아그레가툼	100
트라우스토키트리다에 종 HU1	100
트라우스토키트리움 아우레움	100
트라우스토키트리움 kinnei	100
트라우스토키트리다에 종 #32	100
트라우스토키트리다에 종 PW19	100
쉬조키트리움 아그레가툼	100
쉬조키트리움 종 ATCC 20888	100

[0373]

[0374] 상기 특성을 기준으로, 단리된 트라우스토키트리드(ATCC 기탁 번호 PTA-9695)는 새로운 쉬조키트리움 종을 나타

내는 것으로 여겨지고, 이에 따라 쉬조키토리움 sp. ATCC PTA-9695로서 또한 지정된다.

[0375] 실시예 30

[0376] 단리된 트라우스토키트리드(ATCC 기탁 번호 PTA-9695)는 하기한 바와 같이 변화하는 배양 조건하에 높은 수준의 세포 성장을 생성하였다. 전형적인 매질 및 배양 조건은 표 15에 제시된다. 또한, 높은 수준의 지방산 및 DHA가 관찰된다(즉, 50중량% 초과 무수 세포 중량은 지방산이었고, 50중량% 초과 지방산 메틸 에스터는 DHA이었다).

[0377] [표 15]

[0378] 용기 매질

성분	농도	범위
NaCl	g/L 12.5	0-25, 5-20 또는 10-15
KCl	g/L 1.0	0-5, 0.25-3 또는 0.5-2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	g/L 5.0	0-10, 2-8 또는 3-6
(NH ₄) ₂ SO ₄	g/L 0.6	0-10, 0.25-5 또는 0.5-3
CaCl ₂	g/L 0.29	0.1-5, 0.15-3 또는 0.2-1
T 154 (효소 추출물)	g/L 6.0	0-20, 1-15 또는 5-10
KH ₂ PO ₄	g/L 1.2	0.1-10, 0.5-5 또는 1-3

오토클레이브 후 (금속)

시트르산	mg/L 3.5	0.1-100, 1-50 또는 2-25
FeSO ₄ ·7H ₂ O	mg/L 10.30	0.1-100, 1-50 또는 5-25
MnCl ₂ ·4H ₂ O	mg/L 3.10	0.1-100, 1-50 또는 2-25
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	mg/L 3.10	0.1-100, 1-50 또는 2-25
CoCl ₂ ·6H ₂ O	mg/L 0.04	0.001-1, 0.005-0.5 또는 0.01-0.1
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	mg/L 0.04	0.001-1, 0.005-0.5 또는 0.01-0.1
CuSO ₄ ·5H ₂ O	mg/L 2.07	0.1-100, 0.5-50 또는 1-25
NiSO ₄ ·6H ₂ O	mg/L 2.07	0.1-100, 0.5-50 또는 1-25

오토클레이브 후 (비타민)

티아민	mg/L 9.75	0.1-100, 1-50 또는 5-25
비타민 B12	mg/L 0.16	0.1-100, 0.1-10 또는 0.1-1
Ca ^{1/2} -판토텐에이트	mg/L 3.33	0.1-100, 0.1-50 또는 1-10

오토클레이브 후 (탄소)

글루코스	g/L 30.0	5-150, 10-100 또는 20-50
------	----------	------------------------

질소 공급물:

성분	농도	범위
NH ₄ OH	mL/L 21.6	0-150, 10-100 또는 15-50

[0379]

[0380] 전형적인 배양 조건은 하기 조건을 포함한다:

[0381] pH 약 6.5 내지 약 8.5, 약 6.5 내지 약 8.0 또는 약 7.0 내지 약 7.5

[0382] 온도: 약 17 내지 약 30℃, 약 20 내지 약 25℃ 또는 약 22 to 약 23 ℃

[0383] 용해된 산소: 약 5 내지 약 100% 포화, 약 10 내지 약 80% 포화 또는 약 20 내지 약 50% 포화

[0384] 제어된 글루코스: 약 5 내지 약 50 g/L, 약 10 내지 약 40 g/L

[0385] 또는 약 20 내지 약 35 g/L.

- [0386] pH 7.0에서 20% 용해된 산소와 함께 22.5°C에서 8200 ppm Cl⁻를 갖는 탄소 및 질소-공급된 배양물에서, 단리물은 70중량%의 지방산 함량을 갖는, 7일의 배양 후 140 g/L의 무수 세포 중량을 생성한다. 밀폐된 루프 암모니아 공급물을 사용하고, pH를 7.0으로 유지하였다. 오메가-3 생산성은, 7일내에 4.7 g/L EPA(5중량%의 지방산) 및 56.3 g/L DHA(57중량%의 지방산)와 함께, 이러한 조건하에 8.92 g/(L*일)이었다.
- [0387] pH 7.0에서 20% 용해된 산소와 함께 22.5°C에서 3640 ppm Cl⁻를 갖는 탄소 및 질소-공급된 배양물에서, 단리물은 58중량%의 지방산 함량을 갖는, 7일의 배양 후 82 g/L의 무수 세포 중량을 생성한다. 오메가-3 생산성은, 7일내의 2.1 g/L EPA(4.3중량%의 지방산) 및 28.5 g/L DHA(58.7중량%의 지방산)와 함께, 이러한 조건하에 4.5 g/(L*일)이었다.
- [0388] pH 7.0에서 20% 용해된 산소와 함께 22.5°C에서 980 ppm Cl⁻를 갖는 탄소 및 질소-공급된 배양물에서, 단리물은 58중량%의 지방산 함량을 갖는, 7일의 배양 후 60 g/L의 무수 세포 중량을 생성한다. 오메가-3 생산성은, 7일내의 1.1 g/L EPA(3.4중량%의 지방산) 및 18.4 g/L DHA(56.8중량%의 지방산)와 함께, 이러한 조건하에 2.8 g/(L*일)이었다.
- [0389] **실시예 31**
- [0390] 오일을 단리된 트라우스토키트리드(ATCC 기탁 번호 PTA-9695)의 생물질 샘플(샘플 A)로부터 추출하였다. 생물질 샘플을 pH 7.0에서 20% 용해된 산소와 함께 22.5°C에서 980 ppm Cl⁻를 갖는 탄소 및 질소-공급된 배양물에서 생성하였다. 오일을 핵산 추출 공정에 의해 생물질 샘플 A로부터 추출하여 미생물 오일 샘플 A1을 수득하였다. 간단하게, 건조된 생물질을 약 2시간 동안 스테인레스 스틸 관 및 스테인레스 스틸 볼 베어링을 사용하여 핵산으로 연마하였다. 슬러리를 진공 여고하고, 여액을 수집하였다. 핵산을 회전 증발기를 사용하여 제거하였다. 프리오렉스 공정(지이에이 웨스트팔리아 세퍼레이터 유케이 리미티드(GEA Westfalia Separator UK Ltd.), 영국 밀톤 케인스)을 사용하여 오일을 생물질 샘플 A로부터 추출하여 미생물 오일 샘플 A2를 수득하였다. 저압 플래쉬 크로마토그래피를 사용하여 개별적인 지질 부류를 미생물 오일 샘플 A1 및 A2로부터 단리하고, 각각의 부류의 중량%를 측정하였다. 각각의 부류의 지방산 프로파일을 지방산 메틸 에스터(FAME)로서 화염 이온화 검출(GC-FID)과 함께 기체 크로마토그래피를 사용하여 측정하였다.
- [0391] **플래쉬 크로마토그래피** - 플래쉬 크로마토그래피를 사용하여 조질 오일에 존재하는 지질 부류를 분리하고, 오일에 존재하는 각각의 부류의 중량%를 측정하였다. 크로마토그래피 시스템은 석유 에터 및 에틸 아세테이트로 구성된 3 mL/분의 이동상과 함께 실리카 겔 60(이엠디 케미칼(EMD Chemical), 미국 뉴저지주 깁스타운)을 이용하였다. 단계 구배를 사용하여 컬럼으로부터 각각의 지질 부류를 선택적으로 용리하였다. 이동상 구배는 100% 석유 에터로부터 출발하여 50% 에틸 아세테이트(이어서, 100% 메탄올 세척)로 마무리하였다. 분획을 길슨(Gilson) FC 204 라지-베드 분획 수집기(길슨 인코포레이티드(Gilson, Inc.), 미국 위스콘신주 미들톤)를 사용하여 10 mL 시험관에 수집하였다. 각각의 관을 박막 크로마토그래피(TLC)에 의해 분석하고, 개별적인 지질 부류를 함유하는 관(예측되는 체류 인자(Rf)를 갖는 TLC 플레이트상 단일 점에 의해 판단됨)을 채우고, 농축 건조하고, 칭량하였다. 이어서, 총 분획 함량을 중량에 의해 측정하였다.
- [0392] **TLC 분석** - 박막 크로마토그래피를 실리카 겔 플레이트상에서 수행하였다. 플레이트를 석유 에터 : 에틸 에터 : 아세트산(80:20:1)으로 구성된 용매 시스템을 사용하여 용리하고, 요오드 증기를 사용하여 시각화하였다. 이어서, 각각의 점의 Rf 값을 각각의 지질 부류에 대해 보고된 문헌 값과 비교하였다.
- [0393] **지방산 분석** - 생물질의 샘플 및 단리된 지질 부류를 FAME인 지방산 조성물에 대해 분석하였다. 샘플을 칭량하여 직접 스크류 캡 시험관에 넣고, 톨루엔중 1 mL의 C19:0 내부 표준(누체크(NuCheck), 미국 미네소타 엘리시안) 및 메탄올중 2 mL의 1.5 N HCl을 각각의 관에 첨가하였다. 관을 간단히 와동시키고, 100°C에서 2시간 동안 가열 블록에 위치시켰다. 관을 가열 블록으로부터 제거하여 냉각하고, 물중 1 mL의 포화 NaCl을 첨가하였다. 관을 다시 와동시키고, 원심분리하고, 상부(유기) 층의 부분을 GC 바이알에 위치시키고, GC-FID에 의해 분석하였다. FAME를 누-체크-프렙(Nu-Chek-Prep) GLC 참고 표준(누-체크 프렙 인코포레이티드(Nu-Chek Prep, Inc.), 미국 미네소타 엘리시안)을 사용하여 생성된 3-점 내부 표준 보정 곡선을 사용하여 정량화시키고, 체류 시간을 기준으로 시험적으로 확인하였다. 존재하는 지방산을 mg/g 및 총 FAME의 %로서 표시했다.
- [0394] 조질 오일을 핵산에 용해시키고, 컬럼의 두부에 적용함으로써 샘플 A1을 제조하였다. 플래쉬 크로마토그래피를 사용하는 샘플의 분획화 후, 조질 오일의 중량을 기준으로 스테롤 에스터 분획은 1.2중량%를 차지하였고, 트라이아실글리세롤(TAG) 분획은 82.7중량%를 차지하였고, 유리 지방산(FFA) 분획은 0.9중량%를 차지하였고, 다이아

실글리세롤(DAG) 분획은 2.9중량%를 차지하였다. 샘플 A1 조질 오일 및 단리된 분획의 총 지방산 프로파일을 각각 mg/g 및 % FAME로서 계산된 하기 표 16 및 표 17에 제시한다.

[0395] [표 16]

[0396] mg/g FAME으로 계산된 샘플 A1 지방산 프로파일

	생물질	조질 오일	스테롤 에스터	TAG	FFA	DAG
중량%	NA	38%	1.2%	82.7%	0.9	2.9%
지방산	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)
C12:0*	0.6	0.0	1.9	3.2	1.7	0.0
C14:0*	5.7	13.6	12.8	20.2	13.0	17.6
C14:1*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C15:0	1.3	3.4	3.1	3.1	2.1	2.6
C16:0*	105.5	239.5	222.2	274.3	183.3	225.1
C16:1*	0.0	0.0	0.8	0.0	0.8	0.0
C18:0*	6.4	16.4	43.1	16.8	9.8	14.0
C18:1 N9*	0.0	3.8	1.9	3.3	1.0	3.5
C18:1 N7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C18:2 N6*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:0*	1.8	5.5	13.0	4.7	2.0	2.9
C18:3 N3*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:1 N9*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C18:4 N3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6	0.0
C20:2 N6*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:3 N6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C22:0*	0.0	0.8	7.3	0.8	0.0	1.2
C20:4 N7	0.0	0.0	0.8	0.0	0.0	0.0
C20:3 N3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4 N6*	1.0	3.4	0.0	2.6	2.0	1.9
C22:1 N9*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4 N5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4 N3	1.5	4.1	1.5	3.5	2.1	2.1
C20:5 N3*	18.2	39.5	3.5	38.4	30.6	42.8
C24:0*	0.0	0.0	6.3	0.0	0.0	0.0
C22:4 N9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C24:1 N9*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C22:5 N6*	11.9	29.5	8.9	26.9	14.8	18.7
C22:5 N3*	1.1	4.7	0.9	3.6	3.4	2.7
C22:6 N3*	253.5	569.7	107.3	556.5	352.8	451.4
모든 FAME 의 합	408.6	934.0	435.4	958.0	620.1	786.4

[0397]

[0398] [표 17]

[0399] 총 FAME의 %인 샘플 A1 지방산 프로파일

지방산	생물질 % FAME	조질 오일 % FAME	스테롤 에스터 % FAME	TAG % FAME	FFA % FAME	DAG % FAME
C12:0*	0.1	0.0	0.4	0.3	0.3	0.0
C14:0*	1.4	1.5	2.9	2.1	2.1	2.2
C14:1*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C15:0	0.3	0.4	0.7	0.3	0.3	0.3
C16:0*	25.8	25.6	51.0	28.6	29.6	28.6
C16:1*	0.0	0.0	0.2	0.0	0.1	0.0
C18:0*	1.6	1.8	9.9	1.8	1.6	1.8
C18:1 N9*	0.0	0.4	0.4	0.3	0.2	0.4
C18:1 N7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C18:2 N6*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:0*	0.4	0.6	3.0	0.5	0.3	0.4
C18:3 N3*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:1 N9*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C18:4 N3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0
C20:2 N6*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:3 N6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C22:0*	0.0	0.1	1.7	0.1	0.0	0.1
C20:4 N7	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0
C20:3 N3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4N6*	0.3	0.4	0.0	0.3	0.3	0.2
C22:1 N9*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4 N5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4 N3	0.4	0.4	0.4	0.4	0.3	0.3
C20:5 N3*	4.5	4.2	0.8	4.0	4.9	5.4
C24:0*	0.0	0.0	1.4	0.0	0.0	0.0
C22:4 N9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C24:1 N9*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C22:5 N6*	2.9	3.2	2.1	2.8	2.4	2.4
C22:5 N3*	0.3	0.5	0.2	0.4	0.5	0.3
C22:6 N3*	62.0	61.0	24.6	58.1	56.9	57.4
FAME %의 합	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

[0400]

[0401] 조질 오일을 헥산에 용해시키고, 컬럼의 두부에 적용함으로써 샘플 A2를 제조하였다. 플래쉬 크로마토그래피를 사용하는 샘플의 분획화 후, 조질 오일의 중량을 기준으로 스테롤 에스터 분획은 0.8중량%를 차지하였고, 트라이아실글리세롤(TAG) 분획은 83.4중량%를 차지하였고, 유리 지방산(FFA) 분획은 1.8중량%를 차지하였고, 다이아실글리세롤(DAG) 분획은 5.6중량%를 차지하였다. 샘플 A2 조질 오일 및 단리된 분획의 총 지방산 프로파일을 각각 mg/g 및 % FAME로서 계산된 하기 표 18 및 표 19에 제시한다.

[0402] [표 18]

[0403] mg/g FAME으로 계산된 샘플 A2 지방산 프로파일

	생물질	조질 오일	스테롤 에스터	TAG	FFA	DAG
종량%	NA	NA	0.8%	83.4%	1.8%	5.6%
지방산	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)
C12:0*	0.6	0.0	0.0	1.5	0.0	1.0
C14:0*	5.7	13.2	8.9	14.1	9.5	5.4
C14:1*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C15:0	1.3	3.3	2.8	3.4	2.1	2.2
C16:0*	105.5	233.7	183.8	246.1	159.7	137.3
C16:1*	0.0	0.0	0.0	0.8	0.0	0.0
C18:0*	6.4	16.6	23.6	16.9	11.3	5.6
C18:1 N9*	0.0	7.6	5.0	4.3	2.4	2.6
C18:1 N7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C18:2 N6*	0.0	2.2	0.7	1.6	0.8	5.1
C20:0*	1.8	5.2	12.1	5.5	2.6	1.1
C18:3 N3*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:1 N9*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C18:4 N3	0.0	0.0	0.0	0.8	1.0	0.0
C20:2 N6*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:3 N6	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0
C22:0*	0.0	0.7	6.0	1.3	0.8	0.0
C20:4 N7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:3 N3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4 N6*	1.0	3.0	0.0	3.1	2.3	1.2
C22:1 N9*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4 N5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4 N3	1.5	4.1	1.4	4.3	2.7	1.0
C20:5 N3*	18.2	38.6	2.7	38.6	39.5	45.5
C24:0*	0.0	0.0	4.7	0.6	0.0	0.3
C22:4 N9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C24:1 N9*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C22:5 N6*	11.9	28.2	8.6	29.6	18.0	14.7
C22:5 N3*	1.1	3.4	0.0	3.5	2.5	2.2
C22:6 N3*	253.5	566.7	102.2	575.0	475.3	447.2
모든 FAME 의 합	408.6	926.5	362.3	951.3	730.4	672.5

[0404]

[0405] [표 19]

[0406] 총 FAME의 %인 샘플 A2 지방산 프로파일

	생물질	조질 오일	스테롤 에스터	TAG	FFA	DAG
지방산	% FAME	% FAME	% FAME	% FAME	% FAME	% FAME
C12:0*	0.1	0.0	0.0	0.2	0.0	0.2
C14:0*	1.4	1.4	2.4	1.5	1.3	0.8
C14:1*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C15:0	0.3	0.4	0.8	0.4	0.3	0.3
C16:0*	25.8	25.2	50.7	25.9	21.9	20.4
C16:1*	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0
C18:0*	1.6	1.8	6.5	1.8	1.5	0.8
C18:1 N9*	0.0	0.8	1.4	0.5	0.3	0.4
C18:1 N7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C18:2 N6*	0.0	0.2	0.2	0.2	0.1	0.8
C20:0*	0.4	0.6	3.3	0.6	0.4	0.2
C18:3 N3*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:1 N9*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C18:4 N3	0.0	0.0	0.0	0.1	0.1	0.0
C20:2 N6*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:3 N6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C22:0*	0.0	0.1	1.7	0.1	0.1	0.0
C20:4 N7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:3 N3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4 N6*	0.3	0.3	0.0	0.3	0.3	0.2
C22:1 N9*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4 N5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4 N3	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.2
C20:5 N3*	4.5	4.2	0.7	4.1	5.4	6.8
C24:0*	0.0	0.0	1.3	0.1	0.0	0.0
C22:4 N9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C24:1 N9*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C22:5 N6*	2.9	3.0	2.4	3.1	2.5	2.2
C22:5 N3*	0.3	0.4	0.0	0.4	0.3	0.3
C22:6 N3*	62.0	61.2	28.2	60.4	65.1	66.5
FAME %의 합	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

[0407]

[0408] 샘플 A1 및 A2를 각각 전형적인 헥산 추출 및 프리오렉스 공정을 사용하여 추출하였음에 유의한다. 표 16 내지 19의 지방산 프로파일은 본 발명의 방법을 사용하여 샘플을 추출하는 경우와 실질적으로 동일할 것으로 기대된다.

[0409] 실시예 32

[0410] 실시예 31에 기술된 바와 같이 프리오렉스 공정을 사용하여 발효 배양액으로부터 오일을 추출한 후, 조질 오일을 정련, 표백 및 탈취 단계를 통해 추가로 처리하여 최종 오일을 수득하였다. 최종 오일을 고도 유성 해바라기 오일로 희석하여 약 400 mg/g의 DHA 함량을 갖는, 마무리처리된 시판중인 오일을 수득하였다. 개별적인 지질 부류를 단리하고, 각각의 부류의 지방산 프로파일을 지방산 메틸 에스터(FAME)로서 화염 이온화 검출(GC-FID)과 함께 기체 크로마토그래피를 사용하여 측정하였다.

[0411] 플래쉬 크로마토그래피 - 플래쉬 크로마토그래피를 사용하여 조질 오일에 존재하는 지질 부류를 분리하고, 오일에 존재하는 각각의 부류의 중량%를 측정하였다. 크로마토그래피 시스템은 석유 에터 및 에틸 아세테이트로 구성된 3 mL/분의 이동상과 함께 실리카 겔 60(이엠디 케미칼, 미국 뉴저지주 깁스타운)을 이용하였다. 단계 구배를 사용하여 컬럼으로부터 각각의 지질 부류를 선택적으로 용리하였다. 이동상 구배는 100% 석유 에터로부터 출발하여 50% 에틸 아세테이트(이어서, 100% 메탄올 세척)로 마무리하였다. 분획을 길슨 FC 204 라지-베드 분획 수집기(길슨 인코포레이티드, 미국 위스콘신주 미들톤)를 사용하여 10 mL 시험관에 수집하였다. 각각의 관을 박막 크로마토그래피(TLC)에 의해 분석하고, 개별적인 지질 부류를 함유하는 관(예측되는 체류 인자(Rf)를 갖는 TLC 플레이트상 단일 점에 의해 판단됨)을 채우고, 농축 건조하고, 칭량하였다. 이어서, 총 분획 함량을 중량에 의해 측정하였다.

[0412] TLC 분석 - 박막 크로마토그래피를 실리카 겔 플레이트상에서 수행하였다. 플레이트를 석유 에터 : 에틸 에터 : 아세트산(80:20:1)으로 구성된 용매 시스템을 사용하여 용리하고, 요오드 증기를 사용하여 시각화하였다. 이어서, 각각의 점의 Rf 값을 각각의 지질 부류에 대해 보고된 문헌 값과 비교하였다.

[0413] 지방산 분석 - 최종 오일 샘플 및 단리된 지질 부류를 FAME인 지방산 조성물에 대해 분석하였다. 샘플을 칭량

하여 직접 스크류 캡 시험관에 넣고, 톨루엔중 1 mL의 C19:0 내부 표준(누책, 미국 미네소타 엘리시안) 및 메탄올중 2 mL의 1.5 N HCl을 각각의 관에 첨가하였다. 관을 간단히 와동시키고, 100℃에서 2시간 동안 가열 블록에 위치시켰다. 관을 가열 블록으로부터 제거하여 냉각하고, 물중 1 mL의 포화 NaCl을 첨가하였다. 관을 다시 와동시키고, 원심분리하고, 상부(유기) 층의 부분을 GC 바이알에 위치시키고, GC-FID에 의해 분석하였다. FAME를 누-체크-프랩 GLC 참고 표준(누-체크 프랩 인코포레이티드, 미국 미네소타 엘리시안)을 사용하여 생성된 3-점 내부 표준 보정 곡선을 사용하여 정량화시키고, 체류 시간을 기준으로 시험적으로 확인하였다. 존재하는 지방산을 mg/g 및 총 FAME의 %로서 표시했다.

[0414] 250 mg의 최종 오일을 600 µL의 헥산에 용해시키고, 컬럼의 두부에 적용하였다. 플래쉬 크로마토그래피를 사용하는 샘플의 분획화 후, 최종 오일의 중량을 기준으로 스테롤 에스터 분획은 1.2중량%를 차지하였고, 트리아실글리세롤(TAG) 분획은 92.1중량%를 차지하였고, 유리 지방산(FFA) 분획은 2.1중량%를 차지하였고, 스테롤 분획은 1.1중량%를 차지하였고, 다이아실글리세롤(DAG) 분획은 2.8중량%를 차지하였다.

[0415] 모든 분획의 TLC 분석은 FFA 및 스테롤 분획이 TAG 및 DAG와 각각 혼합되었음을 나타냈다. 프리오렉스 최종 오일 및 단리된 분획의 총 지방산 프로파일을 각각 mg/g 및 % FAME로서 계산된 하기 표 20 및 표 21에 제시한다.

[0416] [표 20]

[0417] mg/g FAME으로 계산된 지방산 프로파일

	최종 오일	스테롤 에스터	TAG	FFA	스테롤	DAG
중량%	NA	1.2	92.1	2.1	1.1	2.8
지방산	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)
C12:0*	0.0	0.0	1.0	0.0	1.2	0.6
C14:0*	11.5	5.1	11.3	6.0	9.6	5.7
C14:1*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C15:0	2.3	0.0	2.3	1.2	2.0	1.9
C16:0*	183.3	80.0	180.8	99.9	149.3	132.2
C16:1*	0.0	0.0	0.9	0.0	0.8	0.6
C18:0*	19.6	17.5	19.6	7.5	16.2	6.7
C18:1 N9*	243.3	242.8	249.6	62.9	190.5	84.0
C18:1 N7	1.9	1.7	2.0	0.8	1.9	0.9
C18:2 N6*	13.8	5.6	13.8	6.2	14.3	9.1
C20:0*	4.3	6.6	4.5	1.5	3.6	1.4
C18:3 N3*	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0
C20:1 N9*	0.0	0.0	0.8	0.0	0.8	0.0
C18:4 N3	0.0	0.0	0.7	1.3	0.9	0.4
C20:2 N6*	0.0	0.0	0.6	0.0	0.0	0.0
C20:3 N6	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0
C22:0*	3.3	61.0	3.2	1.1	3.0	1.2
C20:4 N7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:3 N3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4 N6*	1.7	0.0	2.3	1.4	1.9	1.3
C22:1 N9*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4 N5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4 N3	2.4	4.5	3.0	2.2	2.6	1.3
C20:5 N3*	28.1	3.0	27.7	38.6	25.6	43.2
C24:0*	1.4	64.3	1.4	0.0	2.0	1.0
C22:4 N9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C24:1 N9*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C22:5 N6*	20.0	7.6	21.0	10.1	17.2	14.4
C22:5 N3*	2.8	0.0	3.1	3.7	3.4	2.9
C22:6 N3*	407.1	72.5	417.4	443.6	350.5	428.5
모든 FAME의 합	936.1	572.1	967.6	688.0	797.3	737.3

[0418]

[0419] [표 21]

[0420] 총 FAME의 %인 지방산 프로파일

	최종 오일	스테롤 에스터	TAG	FFA	스테롤	DAG
지방산	% FAME	% FAME	% FAME	% FAME	% FAME	% FAME
C12:0*	0.0	0.0	0.1	0.0	0.2	0.1
C14:0*	1.2	0.9	1.2	0.9	1.2	0.8
C14:1*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C15:0	0.2	0.0	0.2	0.2	0.2	0.3
C16:0*	19.6	14.0	18.7	14.5	18.7	17.9
C16:1*	0.0	0.0	0.1	0.0	0.1	0.1
C18:0*	2.1	3.1	2.0	1.1	2.0	0.9
C18:1 N9*	26.0	42.4	25.8	9.1	23.9	11.4
C18:1 N7	0.2	0.3	0.2	0.1	0.2	0.1
C18:2 N6*	1.5	1.0	1.4	0.9	1.8	1.2
C20:0*	0.5	1.1	0.5	0.2	0.5	0.2
C18:3 N3*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:1 N9*	0.0	0.0	0.1	0.0	0.1	0.0
C18:4 N3	0.0	0.0	0.1	0.2	0.1	0.1
C20:2 N6*	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0
C20:3 N6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C22:0*	0.4	10.7	0.3	0.2	0.4	0.2
C20:4 N7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:3 N3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4N6*	0.2	0.0	0.2	0.2	0.2	0.2
C22:1 N9*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4 N5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4 N3	0.3	0.8	0.3	0.3	0.3	0.2
C20:5 N3*	3.0	0.5	2.9	5.6	3.2	5.9
C24:0*	0.2	11.2	0.1	0.0	0.2	0.1
C22:4 N9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C24:1 N9*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C22:5 N6*	2.1	1.3	2.2	1.5	2.2	1.9
C22:5 N3*	0.3	0.0	0.3	0.5	0.4	0.4
C22:6 N3*	43.6	12.7	43.1	64.5	44.0	58.1
FAME %의 합	100	100	100	100	100	100

[0421]

[0422] 표 20 및 21의 지방산 프로파일이 프리오렉스 공정을 사용하여 추출된 샘플로부터 획득되었음에 유의한다. 표 20 및 21의 지방산 프로파일은 본 발명의 방법을 사용하여 샘플을 추출하는 경우와 실질적으로 동일할 것으로 기대된다.

[0423] 실시예 33

[0424] 단리된 트라우스토키트리드(ATCC 기탁 번호 PTA-9695)의 2-일된 접종원 플라스크를 980 ppm Cl⁻(트라우스토키트리드 매질)을 갖는 탄소 및 질소-공급된 배양물에서 제조하였다.

[0425] 돌연변이 생성을 하기 과정에 따라 수행하였다:

[0426] 멸균 T=2일된 플라스크 약 50 mL를 멸균 40 mL 유리 균질화기에 부었다. 배양물은 균질화기에서 50 플런지를 수용하였다. 배양물을 피펫팅하고, 멸균 50 μm 메쉬 필터를 통해 여과하고, 50 mL 멸균 관에 위치시켰다(보다 작은 클러스터 및 단일 세포가 50 μm 메쉬를 통과하게 하면서, 메쉬는 보다 큰 콜로리의 클럼프를 보유하는 수단으로서 사용되었다). 완전히 농축된 매서레이트를 멸균 50 mL 관에서 수집하였다. 불린 배양물을 와동시키고, 1:100 배 이하의 수준의 희석을 트라우스토키트리드 매질을 함유하는 관에서 수행하였다. 희석된 매서레이트 샘플을 200 μL의 접종원을 트라우스토키트리드 매질 아가르 페트리 접시(100 x 15 mm, 4 또는 5개의 유리 비드(3 mm 유리 비드)를 함유함)에 첨가하기 전에 와동시켰다. 비드가 접종원 플레이트 주위에 균일하게 퍼지게 하는 노력으로 각각의 플레이트를 적절히 교반하였다. 플레이트로부터 비드를 버리고, 플레이트를 약 5분 동안 방치하여 건조하였다. 과정이 흐릿한 빛에서 수행되므로, 멸균 후드 및 인접하는 영역내의 빛을 끈다. 과정을 단지 간접적으로 및 흐릿하게 실행할 수 있는데 이용가능한 최소한의 빛만 존재한다.

[0427] 5개의 복제 플레이트를 샘플을 조사하면서 뚜껑을 오픈 XL 가교결합기(스펙트로닉스 코퍼레이션(Spectronics Corporation), 미국 뉴욕)의 바닥에 위치시켰다. 가교결합기는 전력을 μJ로 전달하고, 수준을 90% 내지 95% 사멸을 달성하도록 하였다. 5개의 복제 대조군 플레이트를 동일한 프로토콜을 사용하여 돌연변이 생성되지 않은 세포로 접종하였다. 이러한 세포 수를 % 사멸을 계산하는데 사용하였다. 조사가 마무리되면, 플레이트를

취하고, 뚜껑을 교체하고, 플레이트를 파라필름 및 알루미늄 호일내의 랩으로 썼다. 손상된 유전자를 치료할 수 없도록 플레이트가 첫 주에는 암실에서 성장하는 것이 필요하였다.

[0428] 콜로니를 계수하기 전에, 플레이트를 약 10 일 동안 22.5°C 방에 위치시켰다. 최종 계수가 수행되면, 개별적인 콜로니를 멸균 접종 루프를 찍어 새로운 트라우스토키트리드 매질 플레이트상에 다시 스트리킹하였다. 각각의 콜로니를 개별 플레이트상에서 평판배양하였다. 플레이트가 밀집하게 성장함에 따라, 접종 루프를 사용하여 샘플을 취하고 50 mL의 트라우스토키트리드 매질을 함유하는 멸균 250 mL 진탕 플라스크로 접종하였다. 이러한 플라스크를 22.5°C 방에서 200 rpm의 진탕기상에 위치시켰다. T=7일에, 진탕 플라스크 배양물을 50 mL 멸균 관으로 수집하였다. pH를 취하고, 샘플을 스피닝하여 생물질 펠렛을 수집하였다. 각각의 샘플을 세정하고 다시 스피닝하기 전에 이소프로필 알콜 및 증류수의 50:50 혼합물에 재현탁시켰다. 수집된 펠렛을 동결 건조하고, 칭량하고, FAME 분석을 수행하였다. 표 22 내지 28의 데이터는 상기 과정에 의해 생성된 돌연변이를 나타낸다.

[0429] [표 22a]

[0430] 트라우스토키트리드 균주 ATCC 기탁 번호 PTA-9695의 돌연변이

지방산	ATCC PTA-9695	돌연변이 1	돌연변이 2	돌연변이 3	돌연변이 4	돌연변이 5	돌연변이 8	돌연변이 9	돌연변이 10
% 08.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 09.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 10.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 11.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 11.1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 12.0	0.10	0.10	0.08	0.08	0.13	0.07	0.11	0.08	0.08
% 12.1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 13.0	0.11	0.11	0.17	0.13	0.12	0.18	0.11	0.15	0.14
% 13.1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 14.0	1.79	1.85	1.49	1.37	2.36	1.29	1.85	1.72	1.57
% 14.1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 15.1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 16.0	30.98	28.75	29.96	29.97	30.33	29.86	30.97	30.11	29.20
% 16.1	0.27	0.20	0.31	0.14	0.25	0.27	0.16	0.27	0.24
% 16.2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 16.3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 17.0	0.12	0.15	0.13	0.17	0.27	0.12	0.16	0.13	0.13
% 18.0	1.29	1.22	1.38	1.47	1.22	1.57	1.25	1.34	1.34
% 18.1 n-9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 18.1 n-7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 18.2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 18.3 n-6	0.00	0.03	0.00	0.00	0.07	0.00	0.03	0.00	0.00
% 18.3 n-3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 18.4 n-3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20.0	0.39	0.36	0.42	0.45	0.34	0.46	0.37	0.40	0.40
% 20.1 n-9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20.2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20.3 n-9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20.3 n-6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20.3 n-3	0.37	0.38	0.32	0.42	0.44	0.32	0.41	0.33	0.36
% 20.4 ARA	0.55	0.55	0.94	0.57	0.80	0.89	0.60	0.73	0.75

[0431]

[0432] [표 22b]

지반산	대조군 ATCC PTA-9695	물연변이 1	물연변이 2	물연변이 3	물연변이 4	물연변이 5	물연변이 8	물연변이 9	물연변이 10
% 20:5 n-3 EPA	2.62	2.94	3.01	2.40	3.64	2.83	2.54	2.81	2.81
% 22:0	0.08	0.08	0.09	0.09	0.07	0.10	0.07	0.09	0.09
% 22:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 22:2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 22:3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 22:4 n-6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 22:5 n-6	3.19	3.19	2.94	3.43	3.35	2.87	3.34	3.01	3.15
% 22:5 n-3	0.18	0.18	0.21	0.23	0.20	0.18	0.20	0.17	0.18
% 22:6 n-3 DHA	56.88	58.63	57.56	57.85	54.87	57.98	56.62	57.53	58.52
% 24:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 24:1	0.00	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.09	0.00
% 지반	46.83	46.10	31.23	47.39	49.78	30.62	54.71	37.72	37.87
% 비공지 물질	0.85	0.46	0.35	0.51	0.51	0.36	0.50	0.38	0.39

[0433]

[0434] [표 23a]

[0435] 트라우스토키프리드 균주 ATCC 기탁 번호 PTA-9695의 돌연변이

지배산	대조군 ATCC PTA-9695	돌연변이 11	돌연변이 13	돌연변이 14	돌연변이 15	돌연변이 16	돌연변이 20	돌연변이 21	돌연변이 22
% 08:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 09:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 10:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 11:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 11:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 12:0	0.10	0.10	0.08	0.09	0.11	0.11	0.09	0.09	0.10
% 12:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 13:0	0.11	0.15	0.16	0.14	0.13	0.12	0.17	0.16	0.13
% 13:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 14:0	1.79	1.89	1.43	1.75	1.83	1.98	1.76	1.77	1.81
% 14:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 15:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 16:0	30.98	31.08	30.27	29.92	31.79	30.18	28.84	30.05	30.81
% 16:1	0.27	0.32	0.26	0.28	0.21	0.24	0.23	0.23	0.33
% 16:2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 16:3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 17:0	0.12	0.24	0.15	0.13	0.15	0.12	0.14	0.16	0.14
% 18:0	1.29	1.36	1.44	1.31	1.36	1.21	1.28	1.34	1.33
% 18:1 n-9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 18:1 n-7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 18:2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 18:3 n-6	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00
% 18:3 n-3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 18:4 n-3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20:0	0.39	0.38	0.42	0.39	0.40	0.37	0.37	0.38	0.38
% 20:1 n-9	0.00	0.00	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20:2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20:3 n-9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20:3 n-6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20:3 n-3	0.37	0.43	0.36	0.33	0.36	0.37	0.33	0.35	0.34
% 20:4 ARA	0.55	0.79	0.72	0.80	0.64	0.62	0.83	0.73	0.69
% 20:5 n-3-EPA	2.62	3.17	2.72	2.97	2.52	2.66	3.03	2.90	2.87
% 22:0	0.08	0.08	0.09	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08

[0436]

[0437] [표 23b]

지반산	대조군 ATCC PTA-9695	돌연변이 11	돌연변이 13	돌연변이 14	돌연변이 15	돌연변이 16	돌연변이 20	돌연변이 21	돌연변이 22
% 22-1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 22-2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 22-3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 22-4 n-6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 22-5 n-6	3.19	3.25	3.06	2.97	3.07	3.16	2.98	3.01	3.02
% 22-5 n-3	0.18	0.20	0.19	0.17	0.19	0.16	0.17	0.18	0.18
% 22-6 n-3-DHA	56.88	55.17	57.52	57.63	56.02	57.38	58.58	57.45	56.65
% 24-0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 24-1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.07	0.00	0.00	0.08
% 지방	46.83	46.19	37.00	38.41	48.46	47.32	37.71	40.23	43.55
% 비공지 물질	0.85	0.47	0.39	0.36	0.47	0.44	0.37	0.39	0.38

[0438]

[0439] [표 24a]

[0440] 트라우스토키프리드 균주 ATCC 기탁 번호 PTA-9695의 돌연변이

지반산	대조군 ATCC PTA-9695	돌연변이 24	돌연변이 26	돌연변이 27	돌연변이 29	돌연변이 30	돌연변이 33	돌연변이 34	돌연변이 35
% 08:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 09:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 10:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 11:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 11:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 12:0	0.10	0.11	0.09	0.09	0.08	0.08	0.10	0.11	0.09
% 12:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 13:0	0.11	0.12	0.13	0.14	0.16	0.14	0.12	0.12	0.10
% 13:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 14:0	1.79	1.98	1.71	1.69	1.63	1.66	1.93	2.01	1.59
% 14:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 15:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.70	0.54	0.39
% 16:0	30.98	30.61	30.32	30.21	29.70	29.50	30.26	32.28	30.78
% 16:1	0.27	0.19	0.22	0.22	0.26	0.26	0.29	0.26	0.16
% 16:2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 16:3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 17:0	0.12	0.15	0.18	0.16	0.13	0.13	0.26	0.16	0.12
% 18:0	1.29	1.24	1.31	1.31	1.32	1.30	1.32	1.37	1.34
% 18:1 n-9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10	0.11	0.09
% 18:1 n-7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 18:2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 18:3 n-6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 18:3 n-3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 18:4 n-3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20:0	0.39	0.37	0.39	0.40	0.40	0.39	0.37	0.40	0.40
% 20:1 n-9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.13	0.14
% 20:2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20:3 n-9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20:3 n-6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20:3 n-3	0.37	0.38	0.37	0.35	0.35	0.35	0.35	0.00	0.00
% 20:4 ARA	0.55	0.61	0.59	0.69	0.68	0.32	0.34	0.24	0.28
% 20:5 n-3-EPA	2.62	2.62	2.70	2.85	2.90	2.91	3.28	2.51	2.59
% 22:0	0.08	0.08	0.08	0.08	0.09	0.08	0.08	0.08	0.08

[0441]

[0442] [표 24b]

지반산	대조군 ATCC PTA-9695	돌연변이 24	돌연변이 26	돌연변이 27	돌연변이 29	돌연변이 30	돌연변이 33	돌연변이 34	돌연변이 35
% 22-1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 22-2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 22-3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 22-4 n-6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 22-5 n-6	3.19	3.10	3.11	3.05	3.10	3.11	3.43	3.26	3.56
% 22-5 n-3	0.18	0.16	0.18	0.19	0.18	0.18	0.18	0.15	0.24
% 22-6 n-3 DHA	56.88	57.03	57.46	57.46	57.96	58.52	55.92	54.96	56.73
% 24-0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 24-1	0.00	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.07	0.07	0.07
% 지반	46.83	47.80	43.50	38.86	38.60	38.16	46.95	46.43	51.55
% 비공지 물질	0.85	0.45	0.42	0.39	0.37	0.82	1.25	1.23	1.25

[0443]

[0444] [표 25a]

[0445] 트라우스토키프리드 균주 ATCC 기탁 번호 PTA-9695의 돌연변이

지발산	대조군 ATCC PTA-9695	돌연변이 36	돌연변이 37	돌연변이 38	돌연변이 39	돌연변이 40	돌연변이 42	돌연변이 43	돌연변이 44
% 08:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 09:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 10:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 11:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 11:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 12:0	0.10	0.00	0.11	0.00	0.11	0.09	0.08	0.12	0.09
% 12:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 13:0	0.11	0.44	0.09	0.24	0.12	0.11	0.12	0.08	0.15
% 13:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 14:0	1.79	1.25	1.99	1.48	1.96	1.76	1.43	2.17	1.75
% 14:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 15:1	0.00	2.12	0.48	0.71	0.54	0.55	0.36	0.62	0.50
% 16:0	30.98	26.95	28.04	32.28	30.84	30.25	25.77	43.37	30.18
% 16:1	0.27	0.00	0.26	0.23	0.22	0.21	0.10	1.05	0.22
% 16:2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 16:3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 17:0	0.12	0.95	0.13	0.28	0.16	0.16	0.10	0.26	0.13
% 18:0	1.29	1.58	1.11	1.79	1.30	1.29	1.25	2.21	1.34
% 18:1 n-9	0.00	0.37	0.08	0.25	0.09	0.09	0.12	0.09	0.10
% 18:1 n-7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.00
% 18:2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 18:3 n-6	0.00	0.00	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 18:3 n-3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 18:4 n-3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20:0	0.39	0.34	0.31	0.43	0.38	0.39	0.36	0.61	0.40
% 20:1 n-9	0.00	0.00	0.00	0.43	0.00	0.14	0.15	0.15	0.49
% 20:2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20:3 n-9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20:3 n-6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20:3 n-3	0.37	0.00	0.00	0.00	3.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20:4 ARA	0.55	0.41	0.31	0.24	0.27	0.24	0.30	0.35	0.23
% 20:5 n-3-EPA	2.62	5.36	2.77	4.00	2.72	2.80	3.21	3.47	2.80
% 22:0	0.08	0.00	0.07	0.14	0.07	0.08	0.07	0.14	0.08

[0446]

[0447] [표 25b]

지방산	대조군 ATCC PTA-9695	돌연변이 36	돌연변이 37	돌연변이 38	돌연변이 39	돌연변이 40	돌연변이 42	돌연변이 43	돌연변이 44
% 22:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 22:2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 22:3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 22:4 n-6	0.00	0.00	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 22:5 n-6	3.19	2.40	3.94	2.57	3.48	3.29	3.89	2.37	3.33
% 22:5 n-3	0.18	0.00	0.19	0.00	0.17	0.17	0.30	0.33	0.17
% 22:6 n-3-DHA	56.88	57.52	58.57	54.20	56.24	57.09	60.99	41.61	56.76
% 24:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 24:1	0.00	0.00	0.08	0.00	0.08	0.09	0.08	0.06	0.09
% 지방	46.83	12.73	54.86	18.08	45.74	42.59	42.48	56.44	41.20
% 비공지 물질	0.85	0.29	1.36	0.73	1.28	1.20	1.31	0.90	1.20

[0448]

[0449] [표 26a]

[0450] 트라우스토키프리드 균주 ATCC 기탁 번호 PTA-9695의 돌연변이

지반산	대조군 ATCC PTA- 9695	돌연변이 45	돌연변이 46	돌연변이 47	돌연변이 48	돌연변이 49	돌연변이 50	돌연변이 51	돌연변이 52
% 08.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 09.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 10.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 11.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 11.1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 12.0	0.10	0.10	0.13	0.11	0.07	0.09	0.09	0.09	0.11
% 12.1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 13.0	0.11	0.11	0.10	0.09	0.13	0.09	0.13	0.10	0.09
% 13.1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 14.0	1.79	1.79	2.07	1.86	1.52	1.62	1.78	1.78	1.85
% 14.1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 15.1	0.00	0.41	0.76	0.57	0.46	0.48	0.55	0.53	0.53
% 16.0	30.98	28.79	24.90	30.07	29.07	31.21	30.46	30.79	32.53
% 16.1	0.27	0.19	0.24	0.18	0.17	0.17	0.18	0.21	0.22
% 16.2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 16.3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 17.0	0.12	0.11	0.24	0.16	0.12	0.14	0.17	0.18	0.15
% 18.0	1.29	1.24	1.07	1.28	1.41	1.43	1.36	1.48	1.35
% 18.1 n-9	0.00	0.08	0.07	0.09	0.09	0.08	0.10	0.09	0.06
% 18.1 n-7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 18.2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 18.3 n-6	0.00	0.00	0.12	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 18.3 n-3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 18.4 n-3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20.0	0.39	0.36	0.29	0.37	0.42	0.42	0.39	0.40	0.41
% 20.1 n-9	0.00	0.15	0.13	0.11	0.24	0.13	0.19	0.16	0.19
% 20.2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20.3 n-9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20.3 n-6	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20.3 n-3	0.37	0.00	0.12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20.4 ARA	0.55	0.29	0.65	0.26	0.18	0.21	0.22	0.24	0.24
% 20.5 n-3									
EPA	2.62	3.05	4.28	2.66	2.93	2.46	2.71	2.94	2.44

[0451]

[0452] [표 26b]

지반산	대조군 ATOC PTA- 9695	돌연변이 45	돌연변이 46	돌연변이 47	돌연변이 48	돌연변이 49	돌연변이 50	돌연변이 51	돌연변이 52
% 22:0	0.08	0.07	0.06	0.07	0.09	0.09	0.08	0.08	0.08
% 22:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 22:2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 22:3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 22:4 n-6	0.00	0.06	0.07	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 22:5 n-6	3.19	3.59	4.28	3.46	3.07	3.32	3.17	3.18	3.24
% 22:5 n-3	0.18	0.25	0.27	0.18	0.17	0.17	0.16	0.17	0.17
% 22:6 n-3-DHA	56.88	57.74	58.32	56.70	58.65	56.45	56.83	56.19	55.06
% 24:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 24:1	0.00	0.07	0.15	0.10	0.10	0.11	0.10	0.10	0.07
% 지방	46.83	48.91	58.95	54.80	35.41	48.60	44.93	43.01	51.33
% 비공지 물질	0.85	1.55	1.63	1.57	1.09	1.35	1.31	1.28	1.19

[0453]

[0454] [표 27a]

[0455] 트라우스토키프리드 균주 ATCC 기탁 번호 PTA-9695의 돌연변이

지반산	대조군 ATCC PTA-9695	돌연변이 53	돌연변이 54	돌연변이 55	돌연변이 56	돌연변이 57	돌연변이 58	돌연변이 60	돌연변이 61	돌연변이 65
% 08:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 09:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 10:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 11:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 11:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 12:0	0.10	0.09	0.08	0.12	0.08	0.08	0.08	0.08	0.10	0.08
% 12:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 13:0	0.11	0.11	0.12	0.08	0.09	0.13	0.16	0.14	0.09	0.14
% 13:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 14:0	1.79	1.74	1.63	2.13	1.67	1.59	1.59	1.59	1.85	1.58
% 14:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 15:1	0.00	0.53	0.52	0.48	0.51	0.52	0.45	0.50	0.51	0.48
% 16:0	30.98	30.13	29.54	33.01	31.08	29.37	30.65	29.39	31.15	30.03
% 16:1	0.27	0.21	0.23	0.26	0.26	0.14	0.25	0.22	0.26	0.25
% 16:2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 16:3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 17:0	0.12	0.15	0.14	0.14	0.14	0.16	0.12	0.13	0.14	0.13
% 18:0	1.29	1.30	1.30	1.37	1.38	1.37	1.46	1.30	1.30	1.35
% 18:1 n-9	0.00	0.08	0.08	0.00	0.06	0.11	0.09	0.10	0.07	0.07
% 18:1 n-7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 18:2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 18:3 n-6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 18:3 n-3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 18:4 n-3	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20:0	0.39	0.38	0.39	0.40	0.42	0.38	0.43	0.39	0.39	0.41
% 20:1 n-9	0.00	0.19	0.16	0.13	0.19	0.20	0.17	0.14	0.13	0.21
% 20:2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20:3 n-9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20:3 n-6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20:3 n-3	0.37	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20:4 ARA	0.55	0.25	0.21	0.26	0.22	0.25	0.51	0.20	0.24	0.19
% 20:5 n-3-EPA	2.62	2.75	2.78	2.81	2.67	2.78	5.76	2.72	2.59	2.82
% 22:0	0.08	0.08	0.08	0.08	0.09	0.08	0.09	0.08	0.08	0.09

[0456]

[0457] [표 27b]

지반산	대조군 ATOC PTA-9695	돌연변이 53	돌연변이 54	돌연변이 55	돌연변이 56	돌연변이 57	돌연변이 58	돌연변이 60	돌연변이 61	돌연변이 65
% 22:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 22:2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 22:3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 22:4 n-6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.06	0.00
% 22:5 n-6	3.19	3.47	3.20	3.25	3.19	3.43	2.62	3.30	3.42	3.18
% 22:5 n-3	0.18	0.18	0.18	0.17	0.17	0.20	0.59	0.17	0.17	0.17
% 22:6 n-3 DHA	56.88	56.99	58.07	54.04	56.38	57.76	54.09	58.21	55.91	57.56
% 24:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 24:1	0.00	0.09	0.09	0.07	0.10	0.09	0.11	0.10	0.07	0.08
% 지방	46.83	45.83	39.59	48.81	41.92	43.97	33.96	36.97	50.40	36.21
% 비공지 물질	0.85	1.28	1.19	1.19	1.29	1.35	0.77	1.24	1.48	1.17

[0458]

[0459] [표 28a]

[0460] 트라우스토키프리드 균주 ATCC 기탁 번호 PTA-9695의 돌연변이

지방산	대조군 ATCC PTA- 9695	돌연변이 66	돌연변이 67	돌연변이 68 ATCC PTA- 9696	돌연변이 69	돌연변이 70 ATCC PTA- 9697	돌연변이 71	돌연변이 72 ATCC PTA- 9698	돌연변이 73	돌연변이 74
% 08.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 09.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 10.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 11.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 11.1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 12.0	0.15	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.13	0.00	0.00
% 12.1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 13.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 13.1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.22	0.00	0.00	0.00
% 14.0	2.42	2.29	2.07	2.09	2.11	2.21	2.27	2.29	1.97	2.05
% 14.1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.19	0.00	0.00	0.00
% 15.1	0.55	0.47	0.48	0.47	0.47	0.44	0.46	0.40	0.50	0.47
% 16.0	39.19	31.02	26.20	25.84	27.79	28.14	28.89	33.49	24.50	23.95
% 16.1	0.43	0.19	0.00	0.00	0.00	0.00	0.19	0.21	0.00	0.00
% 16.2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 16.3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 17.0	0.16	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.13	0.00	0.00
% 18.0	1.67	1.68	1.22	1.22	1.44	1.49	1.51	2.24	1.11	1.02
p-9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 18.1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
n-7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 18.2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 18.3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
n-6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 18.3	0.00	0.18	0.20	0.21	0.19	0.17	0.22	0.16	0.22	0.22
p-3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 18.4	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
n-3	0.49	0.41	0.32	0.31	0.35	0.37	0.44	0.52	0.29	0.27
% 20.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20.1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
n-9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

[0461]

[0462] [표 28b]

지탄산	대조군 ATCC PTA- 9695	돌연변이 66	돌연변이 67	돌연변이 68 ATCC PTA- 9696	돌연변이 69	돌연변이 70 ATCC PTA- 9697	돌연변이 71	돌연변이 72 ATCC PTA- 9698	돌연변이 73	돌연변이 74
% 20.2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20.3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.15	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20.3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20.3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20.4	0.18	0.16	0.33	0.27	0.24	0.37	0.30	0.27	0.38	0.39
% 20.5	1.76	2.30	3.86	3.97	3.32	4.12	3.09	2.74	4.43	4.53
% 20.5	0.33	0.46	0.35	0.44	0.48	0.38	0.43	0.12	0.35	0.34
% 22.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 22.1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 22.2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 22.3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 22.4	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 22.5	2.62	2.83	3.17	2.66	2.72	2.95	3.46	2.79	3.17	3.19
% 22.5	0.18	0.18	0.46	0.42	0.34	0.61	0.25	0.27	0.48	0.57
% 22.6	49.52	57.01	60.60	61.42	59.74	58.03	55.62	53.06	61.83	62.23
% 24.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 24.1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 24.1	52.70	49.32	48.51	49.49	48.80	53.65	40.38	63.40	48.27	46.63
% 비균지	0.35	0.82	0.73	0.66	0.67	0.73	2.46	1.18	0.78	0.76

[0463]

[0464] 실시예 34

[0465] 미생물 단리

[0466] 샘플을 간조중에 조간대 서식지로부터 수집하였다. 물, 퇴적물, 살아있는 식물 물질 및 쇠퇴하는 식물/동물 파편을 멸균 50 mL 관에 위치시켰다. 물에 함께 각각의 샘플의 부분을 단리 매질의 고체 아가르 플레이트상에 펼쳤다. 단리 매질은 500 mL의 인공 해수, 500 mL의 증류수, 1 g의 글루코스, 1 g의 글리세롤, 13 g의 아가르, 1 g의 글루탐에이트, 0.5 g의 효소 추출물, 0.5 g의 카세인 하이드로리세이트, 1 mL의 비타민 용액(100 mg/L 티아민, 0.5 mg/L 바이오틴, 0.5 mg B₁₂), 1 mL의 미량 광물 용액(PII 금속, 1L 당 하기 성분을 함유함: 6.0 g FeCl₃6H₂O, 6.84 g H₃BO₃, 0.86 g MnCl₂4H₂O, 0.06 g ZnCl₂, 0.026 CoCl₂6H₂O, 0.052 g NiSO₄H₂O, 0.002 g CuSO₄5H₂O 및 0.005 g Na₂MoO₄2H₂O), 및 각각 500 mg의 페니실린 G 및 스트렙토마이신 설페이트로 이루어졌다. 아가르 플레이트를 20 내지 25℃에서 암실에서 항온처리하였다. 2 내지 4일 후, 아가르 플레이트를 확대하여 검사하고, 세포의 콜로니를 멸균 이쑤시게를 사용하여 집고, 매질의 새로운 플레이트에 다시 스트리킹하였다. 세포를 오염된 유기체가 제거될 때까지 반복적으로 스트리킹하였다. 단리된 미생물중 2개를 ATCC 기탁 번호 PTA-10212 및 PTA-10208로 기탁하였다.

[0467] ATCC 기탁 번호 PTA-10212로 기탁된 단리된 미생물의 분류학적 특성

- [0468] ATCC 기탁 번호 PTA-10212("PTA-10212")로 기탁된 단리된 미생물의 배양물은 가지적인 단리된 포낭자균이 없는 백색의 습윤 더러워진 콜로니로서 나타났다.
- [0469] PTA-10212를 고체 및 액체 FFM, 고체 KMV, KMV 슬러쉬(1%), KMV 배양액 및 MH 배양액상에서 성장시켜 성장 특성을 추가로 조사하였다. PTA-10212는 KMV 및 MH상에서 빨리 성장하는 것으로 관찰되었다(예컨대, 문헌[Porter D., 1989. *Phylum Rhyzomyces*. In Margulis, L., Corliss, J.O., Melkonian, M., Chapman, D.J.(Eds.) Handbook of Protozoa, Jones and Bartlett, Boston, pp. 388-398(KMV); Honda et al., Mycol. Res. 102:439-448 (1998) (MH)]; 및 미국특허 제5,130,242호(FFM) 참고).
- [0470] 하기 관찰을 KMV 매질 및 MH 배양액에서의 72시간 성장 후에 고체 FFM 매질상에서 수일에 걸쳐 PTA-10212의 성장 후에 수행하였다. 스포란지어는 임의의 매질내에서/매질상에서 클럼핑되지 않았고, 매우 작았다(5 내지 10 μm). PTA-10212는 슈조키트리움 분열 패턴의 풍부한 테트라드 특성을 나타내지 않았다. 아메바성 세포는 새로운 고체 매질로의 전달 후 약 24시간에 나타났다. 이러한 아메바성 세포는 수일 후 사라졌고, 액체 또는 슬러쉬 매질에서 명백하지 않았다. 액체 매지에서 성장 시 "플라스크의 바닥상 작은 모래알"의 외관을 갖는, 문헌[Yokoyama, R. et al., Mycoscience 48(6): 329-341 (2007)]에 기술된 아우란티오키트리움 (*Aurantiochytrium*)과 달리, PTA-10212는 플라스크의 바닥에 침강하지 않았지만 KMV 및 MH 액체 매질 둘다에 현탁되었다. 스포란지어는 전형적인 슈조키트리움 또는 올리고키트리움과 같이 밀집되지 않았고, 또한 PTA-10212에는 없는 견고한 외부 원형질 망상조직을 가졌다. 대부분의 종이 시간에 걸친 스포란지어의 분열에 의한 보다 작은 스포란지어 또는 동화 세포의 성장성 분열을 겪지만, PTA-10212는 아령-형상의 신장된 동화 세포를 형성하였고, 이때 분리된 아령의 말단으로 당겨진 얇은 협부를 형성하였다. 생성된 세포는 작은 동화 세포인 것으로 나타났다. 아메바성 세포의 아령 형상 동화 세포로의 직접적인 변형은 관찰되지 않았다. 전형적인 쌍편모 주스포어는 헤엄치는 것으로 관찰되었지만 상대적으로 드물었다. PTA-10212는 비증식성이고, 성장성 분열에 의해 분열한다. 비록 주스포어가 헤엄치는 것으로 관찰되었지만, 주스포어의 직접적인 방출은 관찰되지 않았다. 성장성 세포는 매우 작았다(2 μm 내지 5 μm).
- [0471] PTA-10212는 유동-통과 기술을 사용하여 추가로 검사되었다. 이때 현미경 슬라이드가 반-강도 해수의 점적에서 아가르-성장된 콜로니의 작은 부분을 현탁시킴으로써 제조되었다. 이러한 기술을 사용하여, 제1 스포란지어가 구형이고 직경이 약 10 μm 인 것으로 관찰되었다. 벽은 매우 얇고, 나머지는 프로토플라스트의 이원 분열이 개시되는 경우에 관찰되지 않았다. 반복된 이원 분열은 8 내지 16개의 보다 작은(4 내지 5 μm 직경) 부차적인 스포란지어를 생성하였다. 부차적인 스포란지어는 다시 비정형 프로토플라스트를 방출하기 전에 수시간 동안 무활동으로 있다. 비정형 프로토플라스트는 핀칭 및 폴딩에 의해 분열되고, 초기에 전형적인 아령-형상 중간 단계를 생성하고, 최종적으로 4 내지 8개의 작은 구형체(직경 2.5 내지 2.8 μm)를 생성하였다. 후자는 수분 내지 1 내지 2시간 이하 동안 휴지하고, 이어서 형상이 변하였고(신장하였고), 쌍편모 주스포어(2.3 내지 2.5 x 3.7 내지 3.9 μm)로 돌아왔다. 주스포어가 많았고, 휴지하는 경우 정확히 측정할 수 있다. 이어서, 주스포어는 원형을 탈피하여 발생의 새로운 사이클을 시작하였다. 주스포어는 시사이오이도키트리움 미누툼보다 크고, 울케니아 비수르겐시스보다 작았다.
- [0472] PTA-10212를 공지된 종에 대한 이의 18s rRNA 유전자의 유사성을 기준으로 더욱 특성화시켰다. 게놈 DNA를 표준 과정에 의해 PTA-10212로부터 제조하였다(예를 들어, 문헌[Sambrook J. and Russell D. 2001. Molecular cloning: A laboratory manual, 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York] 참고). 간단하게: (1) 500 μL 의 세포를 미드-로그 배양물로부터 원심분리 하였다. 세포를 다시 원심분리하고, 모든 미량의 액체를 편협한 튜브를 사용하여 세포 펠렛으로부터 제거하였다; (2) 펠렛을 200 μL 용해 완충제(20 mM 트리스 pH 8.0, 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 프로테인아제 K, 50 mM NaCl, 10 mM EDTA pH 8.0, 0.5% SDS)로 재현탁하였다; (3) 세포를 50°C에서 1시간 동안 용해하였다; (4) 용해 혼합물을 상-잠금 겔(피엘쥐-에펜도르프 (PLG-Eppendorf)) 2 mL 관으로 피펫팅하였다; (5) 동부피의 P:C:I를 첨가하고 1.5시간 동안 혼합하였다; (6) 관을 12,000 x g로 5분 동안 원심분리하였다; (7) 수성 상을 상기 PLG 관내의 겔로부터 제거하고, 동부피의 클로로폼을 수성 상에 첨가하고, 30분 동안 혼합하였다; (8) 관을 14,000 x g로 약 5분 동안 원심분리하였다; (9) 상부 층(수성 상)을 클로로폼으로부터 피펫팅하고, 새로운 관에 위치시켰다; (10) 0.1 부피의 3 M NaOAc를 첨가하고 혼합하였다(수회 전화됨); (11) 2 부피의 100% EtOH를 첨가하고, 이러한 단계에서 형성하는 게놈 DNA 침전물과 혼합하였다(수회 전화됨); (12) 관을 4°C에서 미세원심분리기에서 14,000 x g로 약 15분 동안 원심분리하였다; (13) 액체를 관의 바닥에 남아있는 게놈 DNA와 함께 부었다; (14) 펠렛을 0.5 mL 70% EtOH로 세척하였다; (15) 관을 4°C에서 미세원심분리기에서 14,000 x g로 약 5분 동안 원심분리하였다; (16) EtOH를 적절히 붓고,

계놈 DNA 펠렛을 건조하였다; (17) 적합한 부피의 H₂O 및 RNase를 계놈 DNA 펠렛에 직접 첨가하였다. 18s rRNA 유전자의 PCR 증폭을 종전에 기술된 프라이머로 수행하였다(문헌[Honda et. al., J. Euk. Micro. 46(6): 637-647 (1999)]). 염색체 DNA 주형을 사용하는 PCR 조건은 다음과 같다: 50 µL 전체 부피중 0.2 µM dNTP, 각각 0.1 µM 프라이머, 8% DMSO, 200 ng 염색체 DNA, 2.5 U 헤르쿨라제 II 용합 DNA 폴리머라제(스트라타젠), 및 헤르쿨라제 완충제(스트라타젠). PCR 프로토콜은 하기 단계를 포함하였다: (1) 2분 동안 95°C; (2) 35초 동안 95°C; (3) 35초 동안 55°C; (4) 1분 30초 동안 72°C; (5) 30회 사이클 동안 단계 2 내지 4 반복; (6) 5분 동안 72°C; 및 (7) 4°C에서 유지.

[0473] PCR 증폭은 상기 염색체 주형을 사용하여 예측되는 크기를 갖는 별개 DNA 생성물을 생성하였다. PCR 생성물을 제조자의 지시에 따라 벡터 pJET1.2/블런트(퍼멘타스)로 클로닝하였고, 불활성 서열을 공급된 표준 프라이머를 사용하여 측정하였다.

[0474] 계통발생 분석은 PTA-10212를 트라우스토키트리움 파키데르움 및 트라우스토키트리움 아그레가툼을 중간 지지와 함께 포함하는 계통에 위치시켰다. T. 파키데르움의 스포란지어는 매우 두꺼운 세포 벽을 가진다. 트라우스토키트리움 아그레가툼은 불투명한 포낭자균의 명백히 가시적인 클럼프를 형성한다. PTA-10212는 이러한 특성을 나타내지 않는다. 많은 아메바성 세포의 존재는 다른 분류군, 예컨대 울케니아, T. 가에르트네리움, A. 리미아시눔 및 S. 만그로베이에 기술되어 있지만, 이러한 분류군과 관련된 기술은 단리물의 관찰된 특성과는 상이하다. 또한, PTA-10212는 이러한 분류군중 어느 것에도 계통발생 친화성을 나타내지 않는다.

[0475] 표 29는 ATCC 기탁 번호 PTA-10212로 기탁된 미생물로부터의 18s rRNA 서열과 NCBI 전자 데이터베이스내의 DNA 서열의 비교를 나타낸다. % 동일성을 상이한 계산을 사용하여 측정하였다. "계산 1"은 비-동족 영역 또는 부분 서열로부터의 서열에서 발생하는 "갭"을 고려한다(얼라인X-벡터NTI 결합 설정). "계산 2"는 갭에 대한 계산된 벌칙을 포함하지 않는다(얼라인X-벡터NTI "동일성" 매트릭스 설정).

[0476] [표 29]

[0477] 18s rRNA 서열의 비교

트라우스토키트리드	% 동일성 계산 1	% 동일성 계산 2
트라우스토키트리움 파키데르움	85%	93%
트라우스토키트리움 아그레가툼 (p)	83%	92%
트라우스토키트리움 가에르트네리움	82%	92%
울케니아 비수르겐시스	82%	92%
쉬조키트리움 종 PTA-9695	80%	92%
쉬조키트리움 만그로베이	80%	91%
쉬조키트리움 종 ATCC 20888	80%	90%
아우란티오키트리움 리미아시눔	79%	90%

[0478]

[0479] (p): 부분 서열을 나타낸다.

[0480] 표 29에 제시된 바와 같이, % 동일성에 관하여, ATCC 기탁 번호 PTA-10212로 기탁된 미생물로부터의 18s rRNA 유전자 서열이 NCBI 데이터베이스에서 이용가능한 18s rRNA 유전자 서열과 비록 동일하지는 않지만 관련된다. 일반적으로, 유기체가 상이한 속 또는 종에 속하면서 18s rRNA 유전자 서열과 밀접하게 관련될 수 있음이 인정된다.

[0481] 상기 특성을 기준으로, 단리된 미생물(ATCC 기탁 번호 PTA-10212)은 신규한 트라우스토키트리움 종을 나타내는 것으로 여겨지고, 이에 따라 또한 트라우스토키트리움 sp. ATCC PTA-10212로서 지정된다.

[0482] ATCC 기탁 번호 PTA-10208로 기탁된 단리된 미생물의 분류학적 특성

[0483] ATCC 기탁 번호 PTA-10208("PTA-10208")로 기탁된 단리된 미생물은 미국특허출원공개 제2010/0239533호 및 국제특허출원공개 제2010/107415호에 기술된 ATCC 기탁 번호 PTA-9695("PTA-9695")로 기탁된 미생물의 아-단리물(sub-isolate)(배양물로부터 단리되고 신규한 분리물 및 개별 배양물로서 유지되는 개별 세포)로서 확인되었다.

[0484] PTA-10208은 분류학적 특성을 PTA-9695와 공유한다. PTA-9695는 성숙한 스포란지어로부터 활동적으로 헤엄치고, 방출 시 쌍편모이고, 이의 벽 잔사는 스포어가 방출된 후 선명하게 보였다(상 콘트라스트로). PTA-9695 스포란지어는 12.5 μm 내지 25 μm 직경으로 측정되었고, 주스포어는 크기가 2.5 μm 내지 2.8 μm x 4.5 μm 내지 4.8 μm 이었다. 개별 PTA-9695 스포란지어 당 8 내지 24개의 스포어가 존재하였다. 정착한 PTA-9695 주스포어는 커졌고, 신속하게 이원 분할을 경험하여 테트라드, 옥타드 및 최종적으로 스포란지어의 클러스터가 되었다. 테트라드 형성은 스포란지어의 성숙 전에 매우 초기 단계에서 개시되었다. 이러한 특성은 쉬조키티리움 속과 일치한다. % 동일성에 관하여, PTA-10208과 공유되는 PTA-9695 18s rRNA 유전자 서열은 문헌[Honda, D. et al., J. Euk. Micro. 46(6): 637-647 (1999)]에 제공된 트라우스토키티리움 아그레가툼의 18s rRNA 유전자 서열과 동일하지는 않지만 밀접하게 관련있는 것으로 밝혀졌다. 트라우스토키티리움 아그레가툼에 대해 공개된 18s rRNA 서열은 부분 서열이고, 서열의 중간에 약 71 DNA 뉴클레오티드 갭을 갖는다. PTA-9695는 신규한 쉬조키티리움 종을 나타내는 것으로 여겨진다. 또한, 아-단리물 PTA-10208은 또한 쉬조키티리움 sp. ATCC PTA-10208로서 지정된다.

[0485] 실시예 35

[0486] ATCC 기탁 번호 PTA-10212로 기탁된 단리된 미생물의 성장 특성

[0487] 단리된 미생물(ATCC 기탁 번호 PTA-10212)을 하기한 바와 같이 개별 발효 실행에서 성장 특성에 대해 조사하였다. 전형적인 매질 및 배양 조건을 표 30에 제시한다.

[0488] [표 30]

[0489] PTA-10212 용기 매질

성분	농도	범위
Na ₂ SO ₄	g/L	31.0 0-50, 15-45 또는 25-35
NaCl	g/L	0.625 0-25, 0.1-10 또는 0.5-5
KCl	g/L	1.0 0-5, 0.25-3 또는 0.5-2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	g/L	5.0 0-10, 2-8 또는 3-6
(NH ₄) ₂ SO ₄	g/L	0.44 0-10, 0.25-5 또는 0.05-3
MSG·1H ₂ O	g/L	6.0 0-10, 4-8 또는 5-7
CaCl ₂	g/L	0.29 0.1-5, 0.15-3 또는 0.2-1
T 154 (효소 추출물)	g/L	6.0 0-20, 0.1-10 또는 1-7
KH ₂ PO ₄	g/L	0.8 0.1-10, 0.5-5 또는 0.6-1.8

오토클레이브 후 (금속)

시트르산	mg/L	3.5 0.1-5000, 10-3000 또는 3-2500
FeSO ₄ ·7H ₂ O	mg/L	10.30 0.1-100, 1-50 또는 5-25
MnCl ₂ ·4H ₂ O	mg/L	3.10 0.1-100, 1-50 또는 2-25
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	mg/L	3.10 0.01-100, 1-50 또는 2-25
CoCl ₂ ·6H ₂ O	mg/L	0.04 0-1, 0.001-0.1 또는 0.01-0.1
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	mg/L	0.04 0.001-1, 0.005-0.5 또는 0.01-0.1
CuSO ₄ ·5H ₂ O	mg/L	2.07 0.1-100, 0.5-50 또는 1-25
NiSO ₄ ·6H ₂ O	mg/L	2.07 0.1-100, 0.5-50 또는 1-25

오토클레이브 후 (비타민)

티아민	mg/L	9.75 0.1-100, 1-50 또는 5-25
비타민 B12	mg/L	0.16 0.01-100, 0.05-5 또는 0.1-1
Ca ^{1/2} -판토텐에이트	mg/L	2.06 0.1-100, 0.1-50 또는 1-10
바이오틴	mg/L	3.21 0.1-100, 0.1-50 또는 1-10

오토클레이브 후 (탄소)

글리세롤	g/L	30.0 5-150, 10-100 또는 20-50
------	-----	-----------------------------

질소 공급물:

성분	농도
MSG·1H ₂ O	g/L 17 0-150, 10-100 또는 15-50

[0490]

[0491] 전형적인 배양 조건은 다음을 포함한다:

[0492] pH 약 6.5 내지 약 9.5, 약 6.5 내지 약 8.0 또는

[0493] 약 6.8 내지 약 7.8;

[0494] 온도: 약 15 내지 약 30℃, 약 18 내지 약 28 또는

[0495] 약 21 내지 약 23 ℃;

[0496] 용해된 산소: 약 0.1 내지 약 100% 포화, 약 5 내지 약 50% 포화 또는 약 10 내지 약 30% 포화; 및/또는

[0497] 제어된 글리세롤: 약 5 내지 약 50 g/L, 약 10 내지 약 40 g/L 또는

[0498] 약 15 내지 약 35 g/L.

[0499] pH 7.3에서 20% 용해된 산소와 함께 22.5℃에서 1000 ppm Cl⁻를 갖는 탄소(글리세롤) 및 질소-공급된 배양물에서, PTA-10212는 10 L 발효조 부피중 138시간 배양 후 26.2 g/L의 무수 세포 중량을 생성하였다. 지질 수율은 7.9 g/L이고; 오메가-3 수율은 5.3 g/L이고; EPA 수율은 3.3 g/L이고; DHA 수율은 1.8 g/L이다. 지방산 함량은 30.3중량%이고; EPA 함량은 41.4%의 지방산 메틸 에스터(FAME)이고; DHA 함량은 26.2%의 FAME이고. 이러한 조건하에 0.57 g/L/일 EPA 생산성 및 0.31 g/L/일 DHA 생산성과 함께 지질 생산성은 1.38 g/L/일이고, 오메가-

3 생산성은 0.92 g/L/일이었다.

[0500] pH 7.3에서 20% 용해된 산소와 함께 22.5°C에서 1000 ppm Cl^- 를 갖는 탄소(글리세롤) 및 질소-공급된 배양물에서, PTA-10212는 10 L 발효조 부피중 189시간 배양 후 38.4 g/L의 무수 세포 중량을 생성하였다. 지질 수율은 18 g/L이고; 오메가-3 수율은 12 g/L이고; EPA 수율은 5 g/L이고; DHA 수율은 6.8 g/L이다. 지방산 함량은 45 중량%이고; EPA 함량은 27.8%의 FAME이고; DHA 함량은 37.9%의 FAME이고. 이러한 조건하에 0.63 g/L/일 EPA 생산성 및 0.86 g/L/일 DHA 생산성과 함께 지질 생산성은 2.3 g/L/일이고, 오메가-3 생산성은 1.5 g/L/일이다.

[0501] pH 6.8 내지 7.7에서 20% 용해된 산소와 함께 22.5°C에서 1000 ppm Cl^- 를 갖는 탄소(글리세롤) 및 질소-공급된 배양물에서, PTA-10212는 10 L 발효조 부피중 189시간 배양 후 13 g/L의 무수 세포 중량을 생성하였다. 지질 수율은 5.6 g/L이고; 오메가-3 수율은 3.5 g/L이고; EPA 수율은 1.55 g/L이고; DHA 수율은 1.9 g/L이다. 지방산 함량은 38중량%이고; EPA 함량은 29.5%의 FAME이고; DHA 함량은 36%의 FAME이다. 이러한 조건하에 0.20 g/L/일 EPA 생산성 및 0.24 g/L/일 DHA 생산성과 함께, 지질 생산성은 0.67 g/L/일이고, 오메가-3 생산성은 0.4 g/L/일이다.

[0502] pH 6.6 내지 7.2에서 20% 용해된 산소와 함께 22.5 내지 28.5°C에서 1000ppm Cl^- 를 갖는 탄소(글리세롤) 및 질소-공급된 배양물에서, PTA-10212는 10 L 발효조 부피중 191시간 배양 후 36.7 g/L 내지 48.7 g/L의 무수 세포 중량을 생성하였다. 지질 수율은 15.2 g/L 내지 25.3 g/L이고; 오메가-3 수율은 9.3 g/L 내지 13.8 g/L이고; EPA 수율은 2.5 g/L 내지 3.3 g/L이고; DHA 수율은 5.8 g/L 내지 11 g/L이다. 지방산 함량은 42.4% 내지 53중량%이고; EPA 함량은 9.8% 내지 22%의 FAME이고; DHA 함량은 38.1% 내지 43.6%의 FAME이다. 이러한 조건하에 0.31 g/L/일 내지 0.41 g/L/일 EPA 생산성 및 0.72 g/L/일 내지 1.4 g/L/일 DHA 생산성과 함께, 지질 생산성은 1.9 g/L/일 내지 3.2 g/L/일이고, 오메가-3 생산성은 1.2 g/L/일 내지 1.7 g/L/일이다.

[0503] ATCC 기탁 번호 PTA-10208로 기탁된 단리된 미생물의 성장 특성

[0504] 단리된 미생물(ATCC 기탁 번호 PTA-10208)을 하기 개별 발효 실험에서 성장 특성에 대해 조사하였다. 전형적인 매질 및 배양 조건을 표 31에 제시한다.

[0505] [표 31]

[0506] PTA-10208 용기 매질

성분	농도	범위
Na ₂ SO ₄	g/L	8.8 0-25, 2-20 또는 3-10
NaCl	g/L	0.625 0-25, 0.1-10 또는 0.5-5
KCl	g/L	1.0 0-5, 0.25-3 또는 0.5-2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	g/L	5.0 0-10, 2-8 또는 3-6
(NH ₄) ₂ SO ₄	g/L	0.42 0-10, 0.25-5 또는 0.05-3
CaCl ₂	g/L	0.29 0.1-5, 0.15-3 또는 0.2-1
T 154 (효소 추출물)	g/L	1.0 0-20, 0.1-10 또는 0.5-5
KH ₂ PO ₄	g/L	1.765 0.1-10, 0.5-5 또는 1-3

오토클레이브 후 (금속)

시트르산	mg/L	46.82	0.1-5000, 10-3000 또는 40-2500
FeSO ₄ ·7H ₂ O	mg/L	10.30	0.1-100, 1-50 또는 5-25
MnCl ₂ ·4H ₂ O	mg/L	3.10	0.1-100, 1-50 또는 2-25
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	mg/L	9.3	0.01-100, 1-50 또는 2-25
CoCl ₂ ·6H ₂ O	mg/L	0.04	0-1, 0.001-0.1 또는 0.01-0.1
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	mg/L	0.04	0.001-1, 0.005-0.5 또는 0.01-0.1
CuSO ₄ ·5H ₂ O	mg/L	2.07	0.1-100, 0.5-50 또는 1-25
NiSO ₄ ·6H ₂ O	mg/L	2.07	0.1-100, 0.5-50 또는 1-25

오토클레이브 후 (비타민)

티아민	mg/L	9.75	0.1-100, 1-50 또는 5-25
Ca ^{1/2} -판토텐에이트	mg/L	3.33	0.1-100, 0.1-50 또는 1-10
바이오틴	mg/L	3.58	0.1-100, 0.1-50 또는 1-10

오토클레이브 후 (탄소)

글루코스	g/L	30.0	5-150, 10-100 또는 20-50
------	-----	------	------------------------

질소 공급물:

성분	농도
NH ₄ OH	mL/L 23.6 0-150, 10-100 또는 15-50

[0507]

[0508] 전형적인 배양 조건은 다음을 포함한다:

[0509] pH 약 6.5 내지 약 8.5, 약 6.5 내지 약 8.0 또는

[0510] 약 7.0 내지 약 8.0;

[0511] 온도: 약 17 내지 약 30℃, 약 20 내지 약 28℃ 또는

[0512] 약 22 내지 약 24 ℃;

[0513] 용해된 산소: 약 2 내지 약 100% 포화, 약 5 내지 약 50% 포화 또는 약 7 내지 약 20% 포화; 및/또는

[0514] 제어된 글루코스: 약 5 내지 약 50 g/L, 약 10 내지 약 40 g/L 또는 약 20 내지 약 35 g/L.

[0515] pH 7.0에서 질소 공급 동안 20% 용해된 산소 및 이후 10% 용해된 산소와 함께 22.5℃에서 1000 ppm C⁻¹를 갖는 탄소(글루코스) 및 질소-공급된 배양물에서, PTA-10208은 10 L 발효조 부피중 200시간 배양 후 95 g/L의 무수 세포 중량을 생성하였다. 지질 수율은 53.7 g/L이고; 오메가-3 수율은 37 g/L이고; EPA 수율은 14.3 g/L이고; DHA 수율은 21 g/L이다. 지방산 함량은 57중량%이고; EPA 함량은 27.7%의 FAME이고; DHA 함량은 39.1%의 FAME이다. 이러한 조건하에 1.7 g/L/일 EPA 생산성 및 2.5 g/L/일 DHA 생산성과 함께, 지질 생산성은 6.4 g/L/일이고, 오메가-3 생산성은 4.4 g/L/일이다.

- [0516] pH 7.5에서 질소 공급 동안 20% 용해된 산소 및 이후 10% 용해된 산소와 함께 22.5℃에서 1000 ppm $C1^-$ 를 갖는 탄소(글루코스) 및 질소-공급된 배양물에서, PTA-10208은 10 L 발효조 부피중 139시간 배양 후 56 g/L의 무수 세포 중량을 생성하였다. 지질 수율은 53 g/L이고; 오메가-3 수율은 34 g/L이고; EPA 수율은 11.5 g/L이고; DHA 수율은 22 g/L이다. 지방산 함량은 58중량%이고; EPA 함량은 21.7%의 FAME이고; DHA 함량은 41.7%의 FAME이다. 이러한 조건하에 2 g/L/일 EPA 생산성 및 3.8 g/L/일 DHA 생산성과 함께, 지질 생산성은 9.2 g/L/일이고, 오메가-3 생산성은 5.9 g/L/일이다.
- [0517] pH 7.0에서 질소 공급 동안 20% 용해된 산소 및 이후 10% 용해된 산소와 함께 22.5℃에서 1000 ppm $C1^-$ 를 갖는 탄소(글루코스) 및 질소-공급된 배양물에서, PTA-10208은 2000 L 발효조 부피에서 167시간 배양 후 93.8 g/L의 무수 세포 중량을 생성하였다. 지질 수율은 47.2 g/L이고; 오메가-3 수율은 33.1 g/L이고; EPA 수율은 10.5 g/L이고; DHA 수율은 20.4 g/L이다. 지방산 함량은 50.6중량%이고; EPA 함량은 23%의 FAME; DHA 함량은 42.6%의 FAME이다. 이러한 조건하에 1.5 g/L/일 EPA 생산성 및 2.9 g/L/일 DHA 생산성과 함께, 지질 생산성은 6.8 g/L/일이고, 오메가-3 생산성은 4.7 g/L/일이다.
- [0518] pH 7.0에서 질소 공급 동안 20% 용해된 산소 및 이후 10% 용해된 산소와 함께 22.5℃에서 1000 ppm $C1^-$ 를 갖는 탄소(글루코스) 및 질소-공급된 배양물에서, PTA-10208은 2000 L 발효조 부피에서 168시간 배양 후 105 g/L의 무수 세포 중량을 생성하였다. 지질 수율은 46.4g/L이고; 오메가-3 수율은 33 g/L이고; EPA 수율은 10.7 g/L이고; DHA 수율은 20.3 g/L이다. 지방산 함량은 43.9중량%이고; EPA 함량은 24%의 FAME이고; DHA 함량은 43.7%의 FAME이다. 이러한 조건하에 1.5 g/L/일 EPA 생산성 및 2.9 g/L/일 DHA 생산성과 함께, 지질 생산성은 6.6 g/L/일이고, 오메가-3 생산성은 4.7 g/L/일이다.
- [0519] pH 7.0에서 질소 공급 동안 20% 용해된 산소 및 이후 10% 용해된 산소와 함께 22.5℃에서 1000 ppm $C1^-$ 를 갖는 탄소(글루코스) 및 질소-공급된 배양물에서, PTA-10208은 2000 L 발효조 부피에서 168시간 배양 후 64.8 g/L의 무수 세포 중량을 생성하였다. 지질 수율은 38.7 g/L이고; 오메가-3 수율은 29.9 g/L이고; EPA 수율은 8.5 g/L이고; DHA 수율은 16.7 g/L이다. 지방산 함량은 59.6중량%이고; EPA 함량은 23%의 FAME이고; DHA 함량은 42.3%의 FAME이다. 이러한 조건하에 1.2 g/L/일 EPA 생산성 및 2.3 g/L/일 DHA 생산성과 함께, 지질 생산성은 5.53 g/L/일이고, 오메가-3 생산성은 3.8 g/L/일이다.
- [0520] 실시예 36
- [0521] 미생물 균주 ATCC PTA-10208 및 PTA-10212의 지방산 프로파일
- [0522] 생물질의 4개의 샘플(PTA-10208 샘플 1; PTA-10208 샘플 2; PTA-10212 샘플 1; PTA-10212 샘플 2)을 용매 추출에 의해 총 조질 오일 함량에 대해 분석하고, 지질 부류를 고 성능 액체 크로마토그래피/증발성 광 산란 검출(HPLC/ELSD)에 의해 측정하고, 트리아실글리세롤(TAG)을 HPLC/질량 분광법(HPLC/MS)에 의해 측정하고, 지방산(FA) 프로파일을 화염 이온화 검출(GC-FID)과 함께 기체 크로마토그래피로 측정하였다. 각각의 동결 건조된 생물질의 조질 지질 함량을 헥산에 의한 용매 연마를 사용하여 측정하고, 직접 에스터 교환에 의해 생성된 FAME(mg/g)의 합과 비교하고, 생성된 지방산 메틸 에스터(FAME)를 GC/FID 분석에 의해 정량화시켰다. 추출된 조질 지질중 지방산을 또한 에스터 교환에 의해 정량화시키고, 생성된 FAME의 GC/FID 분석에 의해 정량화시켰다. 모든 중성 지질(NL) 및 유리 지방산(FFA)의 중량%를 ELSD 및 대기압 화학적 이온화-MS(APCI-MS) 동정과 함께 정상 상 HPLC를 사용하여 추출된 조질 지질에서 측정하였다. 상기 방법은 스테롤 에스터(SE), TAG, 유리 지방산(FFA), 1,3-다이아실글리세롤(1,3-DAG), 스테롤, 1,2-다이아실글리세롤(1,2-DAG) 및 모노아실글리세롤(MAG)을 분리하고 정량화시켰다. 결과를 하기 표 32 및 33에 제시한다. 표 32 및 33의 지방산 프로파일을 용매를 사용하여 추출된 샘플로부터 수득함에 유의한다. 표 32 및 33의 지방산 프로파일은 샘플이 본 발명의 방법을 사용하여 추출되는 경우와 실질적으로 동일할 것으로 기대된다.
- [0523] TAG 및 포스포지질(PL)을 생물질의 4개의 샘플(PTA-10208 샘플 1; PTA-10208 샘플 2; PTA-10212 샘플 1; PTA-10212 샘플 2)로부터 추출된 조질 오일로부터 분리하였다. TAG를 저압 플래쉬 크로마토그래피를 사용하여 분리하고, PL을 고체 상 추출(SPE)을 사용하여 분리하였다. 각각의 분리된 분획의 동일성을 박막 크로마토그래피(TLC)에 의해 확인하였다. 분리된 TAG 및 PL 분획의 지방산 프로파일을 FAME로서 GC-FID를 사용하는 직접 에스터 교환에 따라 측정하였다. 결과를 하기 표 34 및 35에 제시한다.
- [0524] 분리된 지질 부류의 총 조질 오일 함량 및 지방산 프로파일을 또한 미생물 균주 ATCC PTA-10212로부터의 2개의 부가적인 생물질 샘플(PTA-10212 샘플 3 및 PTA-10212 샘플 4)에 대해 측정하였다. 조질 오일을 헥산 추출에

의해 각각의 샘플로부터 수득하고, 개별적인 지질 부류를 저압 플래쉬 크로마토그래피를 사용하여 분리하였다. 생물질, 조질 오일 및 분리된 분획의 지방산 프로파일을 FAME로서 GC-FID를 사용하여 측정하였다. 결과를 하기 표 36 내지 39에 제시한다. 표 36 내지 39의 지방산 프로파일이 전형적인 헥산 추출을 사용하여 샘플로부터 수득됨에 유의한다. 표 36 내지 39의 지방산 프로파일은 샘플이 본 발명의 방법을 사용하여 추출되는 경우와 실질적으로 동일할 것으로 기대된다.

[0525] 개별적인 지질 부류를 프리오렉스 공정을 사용하여 사전에 추출된 미생물 균주 ATCC PTA-10212(PTA-10212 샘플 5)의 조질 오일 샘플로부터 분리하고, 각각의 부류의 지방산 프로파일을 FAME로서 GC-FID를 사용하여 측정하였다. 결과를 하기 표 40 및 41에 제시한다. 표 40 및 41의 지방산 프로파일이 프리오렉스 공정을 사용하여 샘플로부터 수득됨에 유의한다. 표 40 및 41의 지방산 프로파일은 샘플이 본 발명의 방법을 사용하여 추출되는 경우와 실질적으로 동일할 것으로 기대된다.

[0526] 개별적인 지질 부류를 ELSD 및 APCI-MS 동정과 함께 정상 HPLC를 사용하여 미생물 균주 ATCC PTA-10208(PTA-10208 샘플 3)의 조질 오일 샘플로부터 분리하였다.

[0527] **실험 과정**

[0528] **조질 오일 추출** - 조질 오일을 용매 연마를 사용하여 동결-건조된 생물질의 샘플로부터 추출하였다. 예를 들어, 약 3 g의 생물질을 스웨디쉬(Swedish) 관에 칭량하여 넣었다. 3개의 볼 베어링 및 30 mL의 헥산을 스웨디쉬 관에 첨가하고, 네오프렌 스타퍼로 밀봉하고, 진탕기에 2시간 동안 위치시켰다. 생성된 슬러리를 부호너 깔대기 및 와트만 여과지를 사용하여 여과하였다. 여과된 액체를 수집하고, 용매를 진공하에 제거하고, 잔류하는 조질 지질의 양을 중량에 의해 측정하였다.

[0529] **지방산 분석** - 생물질의 샘플, 추출된 조질 지질 및 분리된 지질 부류를 FAME인 지방산 조성물에 대해 분석하였다. 간단하게, 동결-건조된 생물질 및 분리된 지질 부류를 칭량하여 직접 스크류 캡 시험관에 넣고, 조질 오일 샘플을 헥산에 용해시켜 약 2 mg/mL의 농도를 제공하였다. 내부 표준을 함유하는 톨루엔 및 메탄올중 1.5 N HCl을 각각의 관에 첨가하였다. 관을 와동시킨 후, 캐핑하고, 100°C까지 2시간 동안 가열하였다. 관을 냉각시키고, 물중 포화 NaCl을 첨가하였다. 관을 다시 와동시키고, 원심분리하여 층을 분리하였다. 이어서, 유기 층의 일부를 GC 바이알에 위치시키고, GC-FID에 의해 분석하였다. FAME를 누-체크-프렙 GLC 참고 표준(누체크, 미국 미네소타 엘리시안)을 사용하여 생성된 3-점 내부 표준 보정 곡선을 사용하여 정량화시켰다. 추출물에 존재하는 지방산을 mg/g 및 총 FAME의 %로서 표시했다. 샘플내 지질 함량을 GC-FID에 의해 분석되는 경우의 내부 표준에 대해 동등한 반응으로 추정하여 평가하였다.

[0530] HPLC/ELSD/MS 방법 -

기기 아길런트 1100 HPLC, 올텍 3300 ELSD, 아길런트 1100
MSD
컬럼 페노메넥스 루나 실리카, 250 x 4.6 mm,
5 μm 입자 크기 w/ 가드 컬럼
이동상 A - 99.5% 헥산 (옵니솔브)
0.4% 이소프로필 알코올(옵니솔브)
0.1% 아세트산
B - 99.9% 에탄올 (옵니솔브, 95:5 에탄올:IPA)
0.1% 아세트산

구배

시간, 분	% A	% B
0	100	0
5	100	0
15	85	10
20	0	100
25	0	100
26	100	0
35	100	0

컬럼 온도 30°C
유속 1.5 mL/분
주사 부피 5 μL
ELSD 검출 온도 35°C, 기체 유동 1.2 L/분
MSD 질량 범위 200 - 1200, 발효조 225 V
건조 기체 온도 350°C
기화기 온도 325°C
모세관 전압 3500 V
코로나 전류 10 μA

[0531]

[0532] 고체 상 추출 - PL 분획을 백 엘루트(Vac Elut) 장치(베리언 인코포레이티드(Varian Inc.), 미국 팔로 알토)에 위치된 2 g 아미노프로필 카트리지(바이오티지(Biotage), 스웨덴 옘살라)를 사용하는 고체 상 추출(SPE)에 의해 조질 지질로부터 분리하였다. 카트리지를 15 mL의 헥산으로 컨디셔닝하고, 각각 약 60 mg의 샘플을 1 mL CHCl₃에 용해시키고, 카트리지에 적용하였다. 컬럼을 15 mL의 2:1 CHCl₃:이소프로필 알코올로 세척하여 모든 중성 지질을 용리하고, 폐기하였다. 이어서, 지방산을 에터중 15 mL의 2% 아세트산(HOAc)으로 용리하고, 폐기하였다. PL 부분은 15 mL의 6:1 메탄올:클로로폼에 의해 용리되고, 수집되고, 질소하에 건조되고, 칭량되었다.

[0533]

플래쉬 크로마토그래피 - 플래쉬 크로마토그래피를 사용하여 조질 오일에 존재하는 지질 부류를 분리하였다. 헥산에 용해된 약 200 mg의 조질 오일을 컬럼의 두부상에 주입하였다. 크로마토그래피 시스템은 석유 에터 및 에틸 아세테이트로 구성된 5 mL/분(표 6 및 7) 및 3 mL/분(표 8 내지 13)의 이동상과 함께 실리카 겔 60(이엠디 케미칼, 미국 뉴저지주 김스타운)을 이용하였다. 단계 구배를 사용하여 컬럼으로부터 각각의 지질 부류를 선택적으로 용리하였다. 이동상 구배는 100% 석유 에터로부터 출발하여 50% 에틸 아세테이트로 마무리하였다. 분획을 길슨 FC 204 라지-베드 분획 수집기(길슨 인코포레이티드, 미국 위스콘신주 미들턴)를 사용하여 10 mL 시험관에 수집하였다. 각각의 관을 박막 크로마토그래피(TLC)에 의해 분석하고, 개별적인 지질 부류를 함유하는 관(예측되는 체류 인자(Rf)를 갖는 TLC 플레이트상 단일 점에 의해 판단됨)을 채우고, 농축 건조하고, 칭량하였다. 이어서, 총 분획 함량을 중량에 의해 측정하였다.

[0534]

TLC 분석 - 박막 크로마토그래피를 실리카 겔 플레이트상에서 수행하였다. 플레이트를 석유 에터 : 에틸 에터 : 아세트산(80:20:1)으로 구성된 용매 시스템을 사용하여 용리하고, 요오드 증기를 사용하여 시각화하였다. 이어서, 각각의 점의 Rf 값을 각각의 지질 부류에 대해 보고된 문헌 값과 비교하였다.

[0535]

TAG 및 PL 분획의 분석 - 단리된 TAG 및 PL 분획을 지방산 메틸 에스터(FAME)로서 지방산 조성물에 대해 분석하였다. TAG 분획을 헥산에 용해시켜 약 1 내지 2 mg/mL의 농도를 제공하였다. 용액의 1 mL 분취량을 농축하여 진공하에 건조하였다. 내부 표준을 함유하는 톨루엔 및 메탄올중 1.5 N HCl을 각각의 관에 첨가하였다. 관을 와동시킨 후, 캐핑하고, 100°C까지 2시간 동안 가열하였다. 내부 표준 및 HCl 메탄올을 PL 분획을 함유하는 관에 직접 첨가하고, 가열하였다. 관을 냉각시키고, 물중 포화 NaCl을 첨가하였다. 관을 다시 와동시키고, 원심 분리하여 층을 분리하였다. 이어서, 유기 층의 일부를 GC 바이알에 위치시키고, GC-FID에 의해 분석하였다. FAME를 누-체크-프랩 GLC 502B 참고 표준(누체크, 미국 미네소타 엘리시안)을 사용하여 생성된 3-점 내부 표준 보정 곡선을 사용하여 정량화시켰다. 추출물에 존재하는 지방산을 mg/g 및 총 FAME의 %로서 표시했다.

- [0536] **결과**
- [0537] **PTA-10208 샘플 1**
- [0538] PTA-10208 샘플 1에 대한 생물질 및 추출된 조질 지질의 지방산 프로파일을 GC/FID를 사용하여 측정하였다. 생물질중 지방산을 28.6 mg의 생물질을 칭량하여 FAME 관에 직접 넣음으로써 동일 반응계에서 에스터 교환시켰고, 추출된 조질 지질의 샘플을, 55.0 mg의 조질 지질을 칭량하여 50 mL 부피 플라스크에 넣고, 1 mL를 별개 FAME 관에 전달함으로써, 제조하였다. 생물질의 평가된 조질 지질 함량이 FID 검출과 함께 GC를 사용하여 53.2%(FAME의 합계)임을 측정하고, 52.0%(wt/wt) 지질을 무수 생물질로부터 추출하여, 총 지질의 97.8% 회수를 제공하였다. 조질 지질은 GC/FID에 의해 91.9% 지방산(FAME의 합계)인 것으로 측정되었다. 조질 지질에 함유된 주요 지방산은 C16:0(182.5 mg/g), C20:5 n-3(186.8 mg/g) 및 C22:6 n-3(423.1 mg/g)이었다.
- [0539] 추출된 조질 지질의 지질 부류 프로파일을 55.0 mg의 조질 지질을 칭량하여 50 mL 부피 플라스크에 넣고, 분취량을 HPLC/ELSD/MS 분석을 위해 HPLC 바이알에 전달함으로써 측정하였다. HPLC/ELSD/MS 분석에 따르면, 조질 지질은 0.2% 스테롤 에스터(SE), 95.1% TAG, 0.4% 스테롤 및 0.5% 1,2-다이아실글리세롤(DAG)을 함유하였다. 5%의 TAG 분획은 TAG 피크 직후 용리하는 피크를 포함하지만, 인식가능한 질량 스펙트럼을 제공하지는 않았다.
- [0540] 플래쉬 크로마토그래피에 의해 측정된 이러한 샘플로부터 단리된 TAG는 약 92.4%의 조질 오일을 구성하였다. PL는 SPE 단리 후의 중량 또는 TLC에 의해 검출되지 않았다. TAG에 함유된 주요 지방산(>50 mg/g)은 C16:0(189 mg/g), C20:5 n-3(197 mg/g) 및 C22:6 n-3(441 mg/g)이었다.
- [0541] **PTA-10208 샘플 2**
- [0542] PTA-10208 샘플 2에 대한 생물질 및 추출된 조질 지질의 지방산 프로파일을 GC/FID를 사용하여 측정하였다. 생물질중 지방산을 32.0 mg의 생물질을 칭량하여 FAME 관에 직접 넣음으로써 동일 반응계에서 에스터 교환하였고, 추출된 조질 지질의 샘플을, 60.1 mg의 조질 지질을 칭량하여 50 mL 부피 플라스크에 넣고, 1 mL를 별개 FAME 관에 전달함으로써, 제조하였다. 생물질의 평가된 조질 지질 함량이 FID 검출과 함께 GC를 사용하여 52.4%(FAME의 합계)임을 측정하고, 48.0%(wt/wt) 지질을 무수 생물질로부터 추출하여, 총 지질의 91.7% 회수를 제공하였다. 조질 지질은 GC/FID에 의해 95.3% 지방산(FAME의 합계)인 것으로 측정되었다. 조질 지질에 함유된 주요 지방산은 C16:0(217.5 mg/g), C20:5 n-3(169.3 mg/g) 및 C22:6 n-3(441.1 mg/g)이었다.
- [0543] 추출된 조질 지질의 지질 부류 프로파일을 60.1 mg의 조질 지질을 칭량하여 50 mL 부피 플라스크에 넣고, 분취량을 HPLC/ELSD/MS 분석을 위해 HPLC 바이알에 전달함으로써 측정하였다. HPLC/ELSD/MS 분석에 따르면, 조질 지질은 0.2% SE, 95.7% TAG, 0.3% 스테롤 및 0.7% 1,2-DAG를 함유하였다. 5.1%의 TAG 분획은 TAG 피크 직후 용리하는 피크를 포함하지만, 인식가능한 질량 스펙트럼을 제공하지는 않았다.
- [0544] 이러한 샘플로부터 단리된 TAG는 약 93.9%의 조질 오일을 구성하였다. PL는 SPE 단리 후의 중량 또는 TLC에 의해 검출되지 않았다. TAG에 함유된 주요 지방산(>50 mg/g)은 C16:0(218 mg/g), C20:5 n-3(167 mg/g) 및 C22:6 n-3(430 mg/g)이었다.
- [0545] **PTA-10208 샘플 3**
- [0546] ATCC 기탁 번호 PTA-10208(샘플 PTA-10208 3)로 기탁된 미생물로부터의 조질 오일 샘플을 HPLC/ELSD/MS를 사용하여 분석하였다. 총 98.38%의 지질을 회수하였고, 이때 스테롤 에스터(SE) 분획은 0.32%를 차지하였고, TAG 분획은 96.13%를 차지하였고, 1,3-다이아실글리세롤(DAG) 분획은 0.22%를 차지하였고, 1,2-DAG 분획은 0.78%를 차지하였고, 스테롤 분획은 0.93%를 차지하였고.
- [0547] **PTA-10212 샘플 1**
- [0548] PTA-10212 샘플 1에 대한 생물질 및 추출된 조질 지질의 지방산 프로파일을 GC/FID를 사용하여 측정하였다. 생물질중 지방산을 27.0 mg의 생물질을 칭량하여 FAME 관에 직접 넣음으로써 동일 반응계에서 에스터 교환시켰고, 추출된 조질 지질의 샘플을, 52.5 mg의 조질 지질을 칭량하여 50 mL 부피 플라스크에 넣고, 1 mL를 별개 FAME 관에 전달함으로써, 제조하였다. 생물질의 평가된 조질 지질 함량이 FID 검출과 함께 GC를 사용하여 38.3%(FAME의 합계)임을 측정하고, 36.3%(wt/wt) 지질을 무수 생물질로부터 추출하여, 총 지질의 94.6% 회수를 제공하였다. 조질 지질은 GC/FID에 의해 83.2% 지방산(FAME의 합계)인 것으로 측정되었다. 조질 지질에 함유된 주요 지방산은 C16:0(328.5 mg/g), C20:5 n-3(90.08 mg/g) 및 C22:6 n-3(289.3 mg/g)이었다.
- [0549] 추출된 조질 지질의 지질 부류 프로파일을 52.5 mg의 조질 지질을 칭량하여 50 mL 부피 플라스크에 넣고, 분취

량을 HPLC/ELSD/MS 분석을 위해 HPLC 바이알에 전달함으로써 측정하였다. HPLC/ELSD/MS 분석에 따르면, 조질 지질은 0.2% SE, 64.2% TAG, 1.9% FFA, 2.8% 1,3-DAG, 1.4% 스테롤, 18.8% 1,2-DAG 및 0.5% MAG를 함유하였다. 3.4%의 TAG 분획은 TAG 피크 직후 용리하는 피크를 포함하지만, 인식가능한 질량 스펙트럼을 제공하지는 않았다.

[0550] 이러한 샘플로부터 단리된 TAG는 약 49.8%의 조질 오일을 구성하였다. 단리된 PL은 약 8.1%의 조질 오일을 구성하였다. TAG 분획에 함유된 주요 지방산(>50mg/g)은 C16:0(400 mg/g), C20:5 n-3(91 mg/g) 및 C22:6 n-3(273 mg/g)이었다. PL 분획에 함유된 주요 지방산(>50mg/g)은 C16:0(98 mg/g), C20:5 n-3(33 mg/g), 및 C22:6 n-3(227 mg/g)이었다.

[0551] PTA-10212 샘플 2

[0552] PTA-10212 샘플 2에 대한 생물질 및 추출된 조질 지질의 지방산 프로파일을 GC/FID를 사용하여 측정하였다. 생물질중 지방산을 29.5 mg의 생물질을 칭량하여 FAME 관에 직접 넣음으로써 동일 반응계에서 에스터 교환시켰고, 추출된 조질 지질의 샘플을, 56.5 mg의 조질 지질을 칭량하여 50 mL 부피 플라스크에 넣고, 1 mL를 별개 FAME 관에 전달함으로써, 제조하였다. 생물질의 평가된 조질 지질 함량이 FID 검출과 함께 GC를 사용하여 40.0%(FAME의 합계)임을 측정하고, 41.3%(wt/wt) 지질을 무수 생물질로부터 추출하여, 총 지질의 106.1% 회수를 제공하였다. 조질 지질은 GC/FID에 의해 82.8% 지방산(FAME의 합계)인 것으로 측정되었다. 조질 지질에 함유된 주요 지방산은 C16:0(327.3 mg/g), C20:5 n-3(92.5 mg/g) 및 C22:6 n-3(77.6 mg/g)이었다.

[0553] 추출된 조질 지질의 지질 부류 프로파일을 56.5 mg의 조질 지질을 칭량하여 50 mL 부피 플라스크에 넣고, 분취량을 HPLC/ELSD/MS 분석을 위해 HPLC 바이알에 전달함으로써 측정하였다. HPLC/ELSD/MS 분석에 따르면, 조질 지질은 0.2% SE, 58.2% TAG, 2.3% FFA, 3.4% 1,3-DAG, 1.7% 스테롤, 23.4% 1,2-DAG 및 0.6% MAG를 함유하였다. 3.3%의 TAG 분획은 TAG 피크 직후 용리하는 피크를 포함하지만, 인식가능한 질량 스펙트럼을 제공하지는 않았다.

[0554] 이러한 샘플로부터 단리된 TAG는 약 51.9%의 조질 오일을 구성하였다. 단리된 PL은 약 8.8%의 조질 오일을 구성하였다. TAG 분획에 함유된 주요 지방산(>50mg/g)은 C16:0(402 mg/g), C20:5 n-3(92 mg/g) 및 C22:6 n-3(245 mg/g)이었다. PL 분획에 함유된 주요 지방산(>50mg/g)은 C16:0(121 mg/g), C20:5 n-3(48 mg/g) 및 C22:6 n-3(246 mg/g)이었다.

[0555] [표 32]

[0556] PTA-10208 및 PTA-10212 생물질 및 추출된 조질 지질의 지방산 프로파일(mg/g)

	PTA-10208 샘플 1	PTA-10208 샘플 1	PTA-10208 샘플 2	PTA-10208 샘플 2	PTA-10212 샘플 1	PTA-10212 샘플 1	PTA-10212 샘플 2	PTA-10212 샘플 2
	생물질	조질 액체	생물질	조질 액체	생물질	조질 액체	생물질	조질 액체
지방산	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)
C12:0	1.47	2.43	1.80	3.14	0.99	1.90	0.87	1.91
C14:0	11.62	20.12	16.72	31.03	5.51	12.91	5.97	13.69
C14:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C15:0	2.43	3.75	3.60	6.22	9.13	20.42	9.39	20.81
C16:0	105.04	182.47	117.72	217.49	145.87	328.45	147.87	327.27
C16:1	0.00	0.00	0.06	0.01	6.26	14.53	7.46	16.89
C18:0	5.37	8.96	4.77	8.37	6.77	15.39	6.77	15.15
C18:1 n-9	0.00	3.26	0.00	3.09	0.03	4.04	0.08	5.87
C18:1 n-7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C18:2 n-6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C20:0	1.48	1.79	1.40	1.85	1.60	3.09	1.67	3.20
C18:3 n-3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C20:1 n-9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C18:4 n-3	0.91	1.61	1.10	2.00	2.28	2.56	2.21	2.64
C20:2 n-6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C20:3 n-6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C22:0	0.10	0.00	0.08	0.00	0.30	0.12	0.35	0.24
C20:4 n-7	0.81	0.45	0.67	0.41	0.00	0.00	0.00	0.00
C20:4 n-6	7.22	12.23	6.84	12.18	1.19	2.26	1.31	2.32
C22:1 n-9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C20:4 n-5	0.63	0.52	0.00	0.46	0.00	0.00	0.00	0.00
C20:4 n-3	3.45	5.45	3.33	5.58	0.00	2.40	0.00	2.34
C20:3 n-3	0.09	0.00	0.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C20:5 n-3	107.31	186.83	92.99	169.32	40.32	90.08	43.15	92.54
C22:4 n-9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C24:0	0.60	0.00	0.52	0.00	2.81	6.83	2.74	6.53
C24:1 n-9	1.55	3.26	0.85	2.04	0.43	1.34	0.42	1.24
C22:5 n-6	9.66	15.84	10.27	17.98	2.42	4.68	2.32	4.21
C22:5 n-3	20.44	35.13	9.92	17.50	2.41	4.94	2.69	5.23
C22:6 n-3	246.98	423.10	245.96	444.08	139.58	289.34	137.35	277.57
FAME 합	527.15	907.18	518.71	942.75	367.89	805.29	372.63	799.68

[0557]

[0558] [표 33]

[0559] PTA-10208 및 PTA-10212 생물질 및 추출된 조질 지질의 지방산 프로파일(%)

	PTA-10208 샘플 1	PTA-10208 샘플 1	PTA-10208 샘플 2	PTA-10208 샘플 2	PTA-10212 샘플 1	PTA-10212 샘플 1	PTA-10212 샘플 2	PTA-10212 샘플 2
	생물질	조질 역체	생물질	조질 역체	생물질	조질 역체	생물질	조질 역체
지방산	% FAME	% FAME	% FAME	% FAME	% FAME	% FAME	% FAME	% FAME
C12:0	0.28	0.27	0.35	0.33	0.27	0.24	0.23	0.24
C14:0	2.20	2.22	3.22	3.29	1.50	1.60	1.60	1.71
C14:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C15:0	0.46	0.41	0.69	0.66	2.48	2.54	2.52	2.60
C16:0	19.93	20.11	22.70	23.07	39.65	40.79	39.68	40.93
C16:1	0.00	0.00	0.01	0.00	1.70	1.80	2.00	2.11
C18:0	1.02	0.99	0.92	0.89	1.84	1.91	1.82	1.89
C18:1 n-9	0.00	0.36	0.00	0.33	0.01	0.50	0.02	0.73
C18:1 n-7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C18:2 n-6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C20:0	0.28	0.20	0.27	0.20	0.43	0.38	0.45	0.40
C18:3 n-3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C20:1 n-9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C18:4 n-3	0.17	0.18	0.21	0.21	0.62	0.32	0.59	0.33
C20:2 n-6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C20:3 n-6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C22:0	0.02	0.00	0.01	0.00	0.08	0.02	0.09	0.03
C20:4 n-7	0.15	0.05	0.13	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00
C20:4 n-6	1.37	1.35	1.32	1.29	0.32	0.28	0.35	0.29
C22:1 n-9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C20:4 n-5	0.12	0.06	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00
C20:4 n-3	0.65	0.60	0.64	0.59	0.00	0.30	0.00	0.29
C20:3 n-3	0.02	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C20:5 n-3	20.36	20.59	17.93	17.96	10.96	11.19	11.58	11.57
C22:4 n-9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C24:0	0.11	0.00	0.10	0.00	0.76	0.85	0.74	0.82
C24:1 n-9	0.29	0.36	0.16	0.22	0.12	0.17	0.11	0.16
C22:5 n-6	1.83	1.75	1.98	1.91	0.66	0.58	0.62	0.53
C22:5 n-3	3.88	3.87	1.91	1.86	0.65	0.61	0.72	0.65
C22:6 n-3	46.85	46.64	47.42	47.10	37.94	35.93	36.86	34.71
FAME %의 합	100	100	100	100	100	100	100	100

[0560]

[0561] [표 34]

[0562] PTA-10208 및 PTA-10212 단리된 TAG의 지방산 프로파일

	PTA-10208 샘플 1	PTA-10208 샘플 1	PTA-10208 샘플 2	PTA-10208 샘플 2	PTA-10212 샘플 1	PTA-10212 샘플 1	PTA-10212 샘플 2	PTA-10212 샘플 2
지방산	FAME (mg/g)	% FAME	FAME (mg/g)	% FAME	FAME (mg/g)	% FAME	FAME (mg/g)	% FAME
C12:0	2.57	0.27	3.35	0.36	0.00	0.00	0.00	0.00
C14:0	21.07	2.23	31.37	3.41	14.05	1.61	14.45	1.69
C14:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C15:0	3.89	0.41	6.17	0.67	23.27	2.66	23.14	2.71
C16:0	189.28	20.07	218.78	23.75	399.51	45.75	402.43	47.07
C16:1	0.00	0.00	0.00	0.00	15.23	1.74	17.62	2.06
C18:0	9.21	0.98	8.07	0.88	22.70	2.60	23.10	2.70
C18:1 n-9	3.35	0.36	3.64	0.40	6.12	0.70	7.48	0.87
C18:1 n-7	0.00	0.00	0.00	0.00	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
C18:2 n-6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C20:0	1.86	0.20	1.55	0.17	4.76	0.55	5.32	0.62
C18:3 n-3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C20:1 n-9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C18:4 n-3	1.64	0.17	2.00	0.22	2.25	0.26	2.24	0.26
C20:2 n-6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C20:3 n-6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C22:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.55	0.06	0.89	0.10
Un- known	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C20:4 n-7	0.39	0.04	0.05	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00
C20:3 n-3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C20:4 n-6	12.79	1.36	11.82	1.28	2.33	0.27	2.25	0.26
C22:1 n-9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C20:4 n-5	0.39	0.04	0.07	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00
C20:4 n-3	5.52	0.59	5.09	0.55	2.87	0.33	2.98	0.35
C20:5 n-3	197.14	20.90	166.68	18.10	91.17	10.44	91.78	10.74
C24:0	0.00	0.00	0.00	0.00	6.93	0.79	7.36	0.86
C22:4 n-9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C24:1 n-9	1.08	0.11	<0.1	<0.1	0.00	0.00	0.00	0.00
C22:5 n-6	15.88	1.68	16.57	1.80	4.01	0.46	3.39	0.40
C22:5 n-3	36.05	3.82	16.00	1.74	4.53	0.52	5.07	0.59
C22:6 n-3	440.99	46.76	429.83	46.67	273.02	31.26	245.38	28.70
FAME 합	943.11	-	921.03	-	873.31	-	854.89	-
총 % FAME	-	100.00	-	100.00	-	100.00	-	100.00

[0563]

[0564] [표 35]

[0565] PTA-10212 단리된 PL의 지방산 프로파일

	PTA-10212 샘플 1	PTA-10212 샘플 1	PTA-10212 샘플 2	PTA-10212 샘플 2
지방산	FAME (mg/g)	% FAME	FAME (mg/g)	% FAME
C12:0	0.00	0.00	0.00	0.00
C14:0	0.93	0.22	1.89	0.39
C14:1	0.00	0.00	0.00	0.00
C15:0	3.44	0.82	5.07	1.05
C16:0	98.29	23.50	120.98	25.00
C16:1	1.15	0.27	3.07	0.63
C18:0	3.25	0.78	3.72	0.77
C18:1 n-9	1.12	0.27	0.95	0.20
C18:1 n-7	<0.1	<0.1	0.02	0.003
C18:2 n-6	0.00	0.00	0.00	0.00
C20:0	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
C18:3 n-3	0.00	0.00	0.00	0.00
C20:1 n-9	0.00	0.00	0.00	0.00
C18:4 n-3	3.71	0.89	3.24	0.67
C20:2 n-6	0.00	0.00	0.00	0.00
C20:3 n-6	0.00	0.00	0.00	0.00
C22:0	0.00	0.00	0.00	0.00
비공지 물질	42.33	10.12	44.71	9.24
C20:4 n-7	0.00	0.00	0.00	0.00
C20:3 n-3	0.00	0.00	0.00	0.00
C20:4 n-6	0.84	0.20	1.54	0.32
C22:1 n-9	0.00	0.00	0.00	0.00
C20:4 n-5	0.00	0.00	0.00	0.00
C20:4 n-3	<0.1	<0.1	0.27	0.06
C20:5 n-3	33.39	7.98	47.91	9.90
C24:0	<0.1	<0.1	0.01	0.001
C22:4 n-9	0.00	0.00	0.00	0.00
C24:1 n-9	0.00	0.00	0.00	0.00
C22:5 n-6	3.08	0.74	3.82	0.79
C22:5 n-3	<0.1	<0.1	0.66	0.14
C22:6 n-3	226.68	54.20	246.09	50.85
FAME 합	418.21	-	483.94	-
총 % FAME	-	100	-	100

[0566]

[0567] PTA-10212 샘플 3

[0568] PTA-10212 샘플 3에 대한 생물질의 지질 함량은 FAME의 합계로서 34%인 것으로 평가되고, 용매 추출 후 수득된 조질 오일의 양은 37중량%이고, 생물질에 존재하는 지방의 109% 회수를 제공한다. 플래쉬 크로마토그래피를 사용하는 분획화 후, 약 46%의 조질 오일을 TAG로서 단리하고, 28%를 DAG로서 단리하였다. 조질 오일은 309 mg/g DHA 및 264 mg/g EPA를 함유하였다. 단리된 TAG는 341 mg/g DHA 및 274 mg/g EPA를 함유하였다. 단리된 DAG 분획은 262 mg/g DHA 및 237 mg/g EPA를 함유하였다. 생물질, 추출된 조질 오일 및 단리된 분획의 총 지방산 프로파일을 각각 mg/g 및 % FAME로서 계산된 하기 표 36 및 표 37에 제시한다.

[0569] [표 36]

[0570] PTA-10212 샘플 3 생물질 및 추출된 조질 지질의 지방산 프로파일(mg/g)

	생물질	조질 오일	TAG	DAG
총량%	NA	37.2%	46.0%	27.9%
지방산	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)
C12:0	0.0	0.0	0.0	0.0
C14:0	3.6	10.3	11.5	9.4
C14:1	0.0	0.0	0.0	0.0
C15:0	4.1	10.6	9.8	6.6
C16:0	70.5	181.8	231.7	111.3
C16:1	6.7	19.1	18.7	17.1
C18:0	2.4	10.2	14.2	0.0
C18:1 n-9	0.0	6.7	0.0	0.0
C18:1 n-7	0.0	1.2	0.0	0.0
C18:2 n-6	0.0	1.8	0.0	0.0
C20:0	0.0	2.4	0.0	0.0
C18:3 n-3	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:1 n-9	0.0	0.3	0.0	1.7
C18:4 n-3	1.9	3.4	3.2	4.4
C20:2 n-6	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:3 n-6	0.0	0.0	0.0	0.0
C22:0	3.3	0.0	0.0	0.0
C20:4 n-7	0.0	2.1	1.5	0.0
C20:3 n-3	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4 n-6	6.8	17.9	21.4	13.8
C22:1 n-9	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4 n-5	0.0	1.3	1.3	0.0
C20:4 n-3	3.0	8.5	10.9	6.4
C20:5 n-3	102.0	263.6	274.2	237.4
C24:0	0.0	1.7	3.9	0.0
C22:4 n-9	0.0	0.0	0.0	0.0
C24:1 n-9	0.0	0.0	4.2	0.0
C22:5 n-6	3.2	8.3	10.7	6.1
C22:5 n-3	3.8	10.4	15.1	6.6
C22:6 n-3	131.2	309.4	341.1	261.9
FAME 합	342.4	871.1	973.2	682.6

[0571]

[0572] [표 37]

[0573] PTA-10212 샘플 3 생물질 및 추출된 조질 지질의 지방산 프로파일(%)

	생물질	조질 오일	TAG	DAG
총량%	NA	37.2%	46.0%	27.9%
지방산	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)
C12:0	0.0	0.0	0.0	0.0
C14:0	1.1	1.2	1.2	1.4
C14:1	0.0	0.0	0.0	0.0
C15:0	1.2	1.2	1.0	1.0
C16:0	20.6	20.9	23.8	16.3
C16:1	2.0	2.2	1.9	2.5
C18:0	0.7	1.2	1.5	0.0
C18:1 n-9	0.0	0.8	0.0	0.0
C18:1 n-7	0.0	0.1	0.0	0.0
C18:2 n-6	0.0	0.2	0.0	0.0
C20:0	0.0	0.3	0.0	0.0
C18:3 n-3	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:1 n-9	0.0	0.0	0.0	0.2
C18:4 n-3	0.6	0.4	0.3	0.6
C20:2 n-6	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:3 n-6	0.0	0.0	0.0	0.0
C22:0	1.0	0.0	0.0	0.0
C20:4 n-7	0.0	0.2	0.2	0.0
C20:3 n-3	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4 n-6	2.0	2.1	2.2	2.0
C22:1 n-9	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4 n-5	0.0	0.1	0.1	0.0
C20:4 n-3	0.9	1.0	1.1	0.9
C20:5 n-3	29.8	30.3	28.2	34.8
C24:0	0.0	0.2	0.4	0.0
C22:4 n-9	0.0	0.0	0.0	0.0
C24:1 n-9	0.0	0.0	0.4	0.0
C22:5 n-6	0.9	1.0	1.1	0.9
C22:5 n-3	1.1	1.2	1.6	1.0
C22:6 n-3	38.3	35.5	35.1	38.4
총 % FAME	100.0	100.0	100.0	100.0

[0574]

[0575] PTA-10212 샘플 4

[0576] PTA-10212 샘플 4는 FAME의 합계로서 측정된 약 23% 지질을 함유하고, 이들중 107%는 헥산 추출에 의해 회수되었다. 플래쉬 크로마토그래피를 사용하는 분획화 후, 약 42%의 조질 오일을 TAG로서 단리하고, 18%를 DAG로서 단리하였다. 조질 오일은 275 mg/g DHA 및 209 mg/g EPA를 함유하였다. 단리된 TAG는 296 mg/g DHA 및 205 mg/g EPA를 함유하였다. 단리된 DAG 분획은 245 mg/g DHA 및 219 mg/g EPA를 함유하였다. 생물질, 추출된 조질 오일 및 단리된 분획의 지방산 프로파일을 하기 표 38(mg/g) 및 표 39(% FAME)에 제시한다.

[0577] [표 38]

[0578] PTA-10212 샘플 4 생물질 및 추출된 조질 지질의 지방산 프로파일(mg/g)

	생물질	조질 오일	TAG	DAG
총량%	NA	24.7%	42.2%	18.4%
지방산	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)
C12:0	0.0	0.0	2.1	2.4
C14:0	2.0	8.3	9.8	9.6
C14:1	0.0	0.0	0.0	0.0
C15:0	4.8	16.8	0.4	0.9
C16:0	63.3	210.6	285.7	138.0
C16:1	1.6	6.7	7.4	7.5
C18:0	2.8	12.2	19.9	4.6
C18:1 n-9	0.0	3.7	0.7	1.1
C18:1 n-7	0.0	0.0	0.3	1.2
C18:2 n-6	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:0	0.0	3.3	6.0	1.5
C18:3 n-3	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:1 n-9	0.0	0.0	0.7	1.2
C18:4 n-3	1.4	3.8	3.6	5.0
C20:2 n-6	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:3 n-6	0.0	0.0	0.4	0.0
C22:0	1.5	0.0	1.9	0.0
C20:4 n-7	0.0	0.0	0.9	0.6
C20:3 n-3	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4 n-6	2.5	10.1	13.0	10.3
C22:1 n-9	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4 n-5	0.0	0.0	0.8	0.7
C20:4 n-3	1.4	6.3	8.6	6.0
C20:5 n-3	57.6	209.1	205.4	219.0
C24:0	0.0	2.6	0.8	0.0
C22:4 n-9	0.1	0.0	0.0	0.0
C24:1 n-9	0.0	0.0	1.1	0.5
C22:5 n-6	1.4	6.1	7.9	4.5
C22:5 n-3	4.0	15.8	20.8	12.9
C22:6 n-3	87.7	275.0	296.4	244.8
FAME 합	232.2	790.1	894.8	672.4

[0579]

[0580] [표 39]

[0581] PTA-10212 샘플 4 생물질 및 추출된 조질 지질의 지방산 프로파일(%)

	생물질	조질 오일	TAG	DAG
중량%	NA	24.7%	42.2%	18.4%
지방산	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)
C12:0	0.0	0.0	0.2	0.4
C14:0	0.9	1.0	1.1	1.4
C14:1	0.0	0.0	0.0	0.0
C15:0	2.1	2.1	0.0	0.1
C16:0	27.3	26.7	31.9	20.5
C16:1	0.7	0.8	0.8	1.1
C18:0	1.2	1.5	2.2	0.7
C18:1 n-9	0.0	0.5	0.1	0.2
C18:1 n-7	0.0	0.0	0.0	0.2
C18:2 n-6	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:0	0.0	0.4	0.7	0.2
C18:3 n-3	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:1 n-9	0.0	0.0	0.1	0.2
C18:4 n-3	0.6	0.5	0.4	0.7
C20:2 n-6	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:3 n-6	0.0	0.0	0.0	0.0
C22:0	0.6	0.0	0.2	0.0
C20:4 n-7	0.0	0.0	0.1	0.1
C20:3 n-3	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4 n-6	1.1	1.3	1.5	1.5
C22:1 n-9	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4 n-5	0.0	0.0	0.1	0.1
C20:4 n-3	0.6	0.8	1.0	0.9
C20:5 n-3	24.8	26.5	23.0	32.6
C24:0	0.0	0.3	0.1	0.0
C22:4 n-9	0.0	0.0	0.0	0.0
C24:1 n-9	0.0	0.0	0.1	0.1
C22:5 n-6	0.6	0.8	0.9	0.7
C22:5 n-3	1.7	2.0	2.3	1.9
C22:6 n-3	37.8	34.8	33.1	36.4
총 % FAME	100.0	100.0	100.0	100.0

[0582]

[0583] PTA-10212 샘플 5

[0584] 조질 오일을 PTA-10212의 생물질로부터 프리오렉스 공정(지이에이 웨스트팔리아 세퍼레이터 유케이 리미티드 (GEA Westfalia Separator UK Ltd.), 영국 밀톤 케인스)에 의해 추출하여 미생물 오일 PTA-10212 샘플 5를 수득하였다. 개별적인 지질 부류를 저압 플래쉬 크로마토그래피에 의해 PTA-10212 샘플 5로부터 분리하고, 각각의 부류의 중량%를 측정하였다. 각각의 부류의 지방산 프로파일을 GC-FID에 의해 측정하였다.

[0585] 간단하게, 240 mg의 조질 오일을 600 μ L의 헥산에 용해시키고, 컬럼의 두부에 적용함으로써, 샘플을 제조하였다. 플래쉬 크로마토그래피를 사용하는 샘플의 분획화 후, 모든 분획의 합한 중량은 240 mg이었고, 100% 회수를 제공하였다. 스테롤 에스터 분획은 0.9%를 차지하고, TAG 분획은 42.6%를 차지하고, 유리 지방산(FFA) 분획은 1.3%를 차지하고, 스테롤 분획은 2.2%를 차지하고, DAG 분획은 41.6%를 차지하였다. 프리오렉스 조질 오일 및 분리된 분획의 총 지방산 프로파일을 각각 mg/g 및 % FAME로서 계산된 표 40 및 표 41에 제시한다.

[0586] [표 40]

[0587] PTA-10212 샘플 5 조질 오일의 지방산 프로파일(mg/g)

	조질 오일	TAG	DAG
중량%	NA	42.6%	41.6%
지방산	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)
C12:0	0	0.7	1.0
C14:0	7.7	7.7	8.5
C14:1	0	0.0	0.0
C15:0	10.3	11.7	9.3
C16:0	179.3	217.7	134.6
C16:1	18.1	16.3	25.9
C18:0	8.1	13.2	2.3
C18:1 n-9	4.7	8.4	0.7
C18:1 n-7	0	1.8	1.0
C18:2 n-6	1.8	3.3	0.7
C20:0	1.9	3.6	0.2
C18:3 n-3	0	0.0	0.0
C20:1 n-9	0	0.7	1.0
C18:4 n-3	3.1	2.8	3.8
C20:2 n-6	0	0.0	0.0
C20:3 n-6	0	0.6	0.4
C22:0	0	1.5	0.0
C20:4 n-7	0	1.0	0.7
C20:3 n-3	0	0.0	0.0
C20:4 n-6	12.7	16.1	13.6
C22:1 n-9	0	0.0	0.0
C20:4 n-5	0	1.5	0.8
C20:4 n-3	6.5	9.3	6.4
C20:5 n-3	213.3	223.7	252.8
C24:0	2.3	4.4	0.6
C22:4 n-9	0	1.9	0.9
C24:1 n-9	0	0.0	0.0
C22:5 n-6	7.9	9.5	8.3
C22:5 n-3	13	20.6	9.7
C22:6 n-3	305.6	327.4	353.8
FAME 합	796.6	905.3	837.4

[0588]

[0589] [표 41]

[0590] PTA-10212 샘플 5 조질 오일의 지방산 프로파일(%)

	조질 오일	TAG	DAG
지방산	% FAME	% FAME	% FAME
C12:0	0	0.1	0.1
C14:0	1	0.9	1.0
C14:1	0	0.0	0.0
C15:0	1.3	1.3	1.1
C16:0	22.5	24.0	16.1
C16:1	2.3	1.8	3.1
C18:0	1	1.5	0.3
C18:1 n-9	0.6	0.9	0.1
C18:1 n-7	0	0.2	0.1
C18:2 n-6	0.2	0.4	0.1
C20:0	0.2	0.4	0.0
C18:3 n-3	0	0.0	0.0
C20:1 n-9	0	0.1	0.1
C18:4 n-3	0.4	0.3	0.5
C20:2 n-6	0	0.0	0.0
C20:3 n-6	0	0.1	0.0
C22:0	0	0.2	0.0
C20:4 n-7	0	0.1	0.1
C20:3 n-3	0	0.0	0.0
C20:4 n-6	1.6	1.8	1.6
C22:1 n-9	0	0.0	0.0
C20:4 n-5	0	0.2	0.1
C20:4 n-3	0.8	1.0	0.8
C20:5 n-3	26.8	24.7	30.2
C24:0	0.3	0.5	0.1
C22:4 n-9	0	0.2	0.1
C24:1 n-9	0	0.0	0.0
C22:5 n-6	1	1.1	1.0
C22:5 n-3	1.6	2.3	1.2
C22:6 n-3	38.4	36.2	42.3
총 % FAME	100	100	100

[0591]

[0592] 실시예 37

[0593] 조질 오일을 정련, 표백 및 탈취를 통해 추가로 처리하여 정련된 오일을 수득하였다. 정련된 오일을 고 유성 해바라기 오일로 희석하여 약 400 mg/g의 DHA 함량을 갖는 최종 오일을 수득하였다. 개별적인 지질 부류를 분리하고, 각각의 부류의 지방산 프로파일을 FAME로서 GC-FID를 사용하여 측정하였다.

[0594] PTA-10208 최종 오일

[0595] 분리된 TAG 분획(표 44 및 45) 및 분리된 스테롤/DAG 분획(표 46 및 47)내에 결합된 프로파일을 비롯한, PTA-10208 최종 오일 1 내지 5에 대한 지방산 프로파일을 표 42 및 43에 요약한다.

[0596] 최종 오일중 개별적인 지질 부류를 ELSD 및 APCI-MS 확인과 함께 플래쉬 크로마토그래피(표 48) 및 정상 HPLC (표 49)를 사용하여 측정하였다.

[0597] [표 42]

[0598] PTA-10208 최종 오일의 지방산 프로파일(mg/g)

	PTA-10208 최종 오일 1	PTA-10208 최종 오일 2	PTA-10208 최종 오일 3	PTA-10208 최종 오일 4	PTA-10208 최종 오일 5
지방산	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)
C12:0	2.5	2.4	2.8	2.7	2.7
C14:0	16.1	14.9	21.0	18.4	17.5
C14:1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C15:0	3.8	3.6	4.4	3.9	3.9
C16:0	192.1	179.1	193.1	184.3	194.6
C16:1	0.4	0.5	0.5	0.5	0.5
C17:0	0.6	0.5	0.9	0.8	2.1
C18:0	12.8	13.9	11.5	12.3	12.9
C18:1 n-9	23.5	82.0	25.7	26.0	29.5
C18:1 n-7	0.2	0.7	0.1	0.1	0.1
C18:2 n-6	3.7	8.1	4.0	4.1	4.3
C20:0	4.3	4.1	3.7	4.0	4.0
C18:3 n-3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:1 n-9	<0.1	0.1	<0.1	<0.1	<0.1
C18:4 n-3	2.4	2.5	2.8	2.7	2.8
C20:2 n-6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:3 n-6	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1
C22:0	1.2	1.8	1.0	1.1	1.1
C20:4 n-7	1.7	1.6	1.7	1.8	1.6
C20:3 n-3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4 n-6	12.9	12.1	13.5	13.5	13.3
C22:1 n-9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4 n-5	1.6	1.4	1.5	1.7	1.5
C20:4 n-3	6.0	5.7	6.0	6.0	6.1
C20:5 n-3	173.8	163.3	196.4	209.6	197.9
C24:0	1.4	1.6	1.3	1.3	1.0
C22:4 n-9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C24:1 n-9	3.4	3.2	2.3	2.6	2.3
C22:5 n-6	14.9	14.0	14.4	13.0	12.9
C22:5 n-3	43.9	41.3	32.8	40.3	36.9
C22:6 n-3	394.8	373.7	373.2	374.3	364.2
FAME 합	918.1	932.2	914.7	925.1	914.1

[0599]

[0600] [표 43]

[0601] PTA-10208 최종 오일의 지방산 프로파일(%)

	PTA-10208 최종 오일 1	PTA-10208 최종 오일 2	PTA-10208 최종 오일 3	PTA-10208 최종 오일 4	PTA-10208 최종 오일 5
지방산	% FAME	% FAME	% FAME	% FAME	% FAME
C12:0	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
C14:0	1.8	1.6	2.3	2.0	1.9
C14:1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C15:0	0.4	0.4	0.5	0.4	0.4
C16:0	20.9	19.2	21.1	19.9	21.3
C16:1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0.1
C17:0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2
C18:0	1.4	1.5	1.3	1.3	1.4
C18:1 n-9	2.6	8.8	2.8	2.8	3.2
C18:1 n-7	<0.1	0.1	<0.1	<0.1	<0.1
C18:2 n-6	0.4	0.9	0.4	0.4	0.5
C20:0	0.5	0.4	0.4	0.4	0.4
C18:3 n-3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:1 n-9	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
C18:4 n-3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
C20:2 n-6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:3 n-6	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
C22:0	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1
C20:4 n-7	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
C20:3 n-3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4 n-6	1.4	1.3	1.5	1.5	1.5
C22:1 n-9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4 n-5	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
C20:4 n-3	0.7	0.6	0.7	0.7	0.7
C20:5 n-3	18.9	17.5	21.5	22.7	21.6
C24:0	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1
C22:4 n-9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C24:1 n-9	0.4	0.3	0.2	0.3	0.2
C22:5 n-6	1.6	1.5	1.6	1.4	1.4
C22:5 n-3	4.8	4.4	3.6	4.4	4.0
C22:6 n-3	43.0	40.1	40.8	40.5	39.9

[0602]

[0603] [표 44]

[0604] 단리된 TAG 지방산 프로파일: PTA-10208 최종 오일(mg/g)

	PTA-10208 최종 오일 1	PTA-10208 최종 오일 2	PTA-10208 최종 오일 3	PTA-10208 최종 오일 4	PTA-10208 최종 오일 5
지방산	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)
C12:0	2.5	2.3	2.7	2.5	2.6
C14:0	16.3	15.1	21.3	18.6	18.1
C14:1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C15:0	3.9	3.6	4.4	4.0	4.0
C16:0	194.2	181.9	196.1	186.1	199.8
C16:1	0.4	0.4	0.6	0.5	0.7
C17:0	0.6	0.5	0.9	0.8	0.8
C18:0	12.9	14.2	11.7	12.5	13.2
C18:1 n-9	24.3	84.0	26.8	26.1	34.0
C18:1 n-7	0.1	0.7	0.1	0.1	0.3
C18:2 n-6	3.2	7.7	3.4	3.5	4.0
C20:0	4.4	4.2	3.8	4.0	4.2
C18:3 n-3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:1 n-9	<0.1	0.2	<0.1	<0.1	0.1
C18:4 n-3	2.5	2.4	2.8	2.6	2.7
C20:2 n-6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:3 n-6	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1
C22:0	1.2	1.9	1.0	1.1	1.1
C20:4 n-7	1.7	1.6	1.8	1.8	1.7
C20:3 n-3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4 n-6	13.2	12.3	13.8	13.7	13.8
C22:1 n-9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4 n-5	1.6	1.5	1.6	1.7	1.5
C20:4 n-3	6.1	5.7	6.1	5.9	6.2
C20:5 n-3	176.0	166.1	199.0	211.2	204.2
C24:0	1.2	1.3	1.0	1.1	1.2
C22:4 n-9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C24:1 n-9	3.3	3.2	2.2	2.5	2.4
C22:5 n-6	15.0	14.2	14.7	13.2	13.5
C22:5 n-3	44.4	42.0	33.3	40.5	38.3
C22:6 n-3	397.9	378.4	376.4	375.5	375.5
FAME 합	926.9	945.7	925.5	929.6	944.1

[0605]

[0606] [표 45]

[0607] 단리된 TAG 지방산 프로파일: PTA-10208 최종 오일(%)

	PTA-10208 최종 오일 1	PTA-10208 최종 오일 2	PTA-10208 최종 오일 3	PTA-10208 최종 오일 4	PTA-10208 최종 오일 5
지방산	% FAME	% FAME	% FAME	% FAME	% FAME
C12:0	0.3	0.2	0.3	0.3	0.3
C14:0	1.8	1.6	0.3	0.3	0.3
C14:1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C15:0	0.4	0.4	0.5	0.4	0.4
C16:0	20.9	19.2	21.2	20.0	21.2
C16:1	<0.1	<0.1	0.1	0.1	0.1
C17:0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
C18:0	1.4	1.5	1.3	1.3	1.4
C18:1 n-9	2.6	8.9	2.9	2.8	3.6
C18:1 n-7	<0.1	0.1	<0.1	<0.1	<0.1
C18:2 n-6	0.3	0.8	0.4	0.4	0.4
C20:0	0.5	0.4	0.4	0.4	0.4
C18:3 n-3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:1 n-9	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
C18:4 n-3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
C20:2 n-6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:3 n-6	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
C22:0	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1
C20:4 n-7	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
C20:3 n-3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4 n-6	1.4	1.3	1.5	1.5	1.5
C22:1 n-9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4 n-5	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
C20:4 n-3	0.7	0.6	0.7	0.6	0.7
C20:5 n-3	19.0	17.6	21.5	22.7	21.6
C24:0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
C22:4 n-9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C24:1 n-9	0.4	0.3	0.2	0.3	0.3
C22:5 n-6	1.6	1.5	1.6	1.4	1.4
C22:5 n-3	4.8	4.4	3.6	4.4	4.1
C22:6 n-3	42.9	40.0	40.7	40.4	39.8

[0608]

[0609] [표 46]

[0610] 단리된 스테롤/DAG 지방산 프로파일: PTA-10208 최종 오일(mg/g)

	PTA-10208 최종 오일 1	PTA-10208 최종 오일 2	PTA-10208 최종 오일 3	PTA-10208 최종 오일 4	PTA-10208 최종 오일 5
지방산	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)
C12:0	1.9	2.1	2.9	2.1	1.9
C14:0	9.9	9.5	9.7	10.3	8.0
C14:1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C15:0	2.4	2.3	2.2	2.3	2.0
C16:0	132.6	128.6	110.1	116.8	106.4
C16:1	0.2	0.3	<0.1	0.3	0.4
C17:0	0.3	0.2	0.3	0.3	0.3
C18:0	7.3	8.1	6.4	6.8	6.1
C18:1 n-9	15.0	55.1	47.4	19.0	30.1
C18:1 n-7	0.4	0.7	0.1	<0.1	0.2
C18:2 n-6	13.1	16.7	21.6	13.5	18.4
C20:0	2.0	2.1	1.2	1.8	1.4
C18:3 n-3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:1 n-9	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
C18:4 n-3	2.3	2.4	2.4	2.4	2.0
C20:2 n-6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:3 n-6	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
C22:0	0.6	1.0	0.5	0.6	0.5
C20:4 n-7	0.8	0.9	2.1	0.9	0.7
C20:3 n-3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4 n-6	5.7	5.8	4.8	6.1	4.5
C22:1 n-9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4 n-5	<0.1	<0.1	<0.1	0.6	<0.1
C20:4 n-3	2.7	2.7	2.1	2.7	2.0
C20:5 n-3	92.9	94.5	91.9	111.6	84.8
C24:0	1.2	1.3	1.1	1.1	1.3
C22:4 n-9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C24:1 n-9	1.9	2.0	1.2	1.5	1.2
C22:5 n-6	7.8	8.0	6.7	7.0	5.5
C22:5 n-3	22.2	22.9	13.9	20.7	14.2
C22:6 n-3	246.3	252.7	223.5	240.3	196.3
FAME 합	569.3	619.8	552.1	568.7	488.2

[0611]

[0612] [표 47]

[0613] 단리된 스테롤/DAG 지방산 프로파일: PTA-10208 최종 오일(%)

	PTA-10208 최종 오일 1	PTA-10208 최종 오일 2	PTA-10208 최종 오일 3	PTA-10208 최종 오일 4	PTA-10208 최종 오일 5
지방산	% FAME	% FAME	% FAME	% FAME	% FAME
C12:0	0.3	0.3	0.5	0.4	0.4
C14:0	1.7	1.5	1.8	1.8	1.6
C14:1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C15:0	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
C16:0	23.3	20.8	19.9	20.5	21.8
C16:1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0.1
C17:0	0.0	0.0	0.1	0.1	0.1
C18:0	1.3	1.3	1.2	1.2	1.2
C18:1 n-9	2.6	8.9	8.6	3.3	6.2
C18:1 n-7	0.1	0.1	<0.1	<0.1	<0.1
C18:2 n-6	2.3	2.7	3.9	2.4	3.8
C20:0	0.4	0.3	0.2	0.3	0.3
C18:3 n-3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:1 n-9	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
C18:4 n-3	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
C20:2 n-6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:3 n-6	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
C22:0	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1
C20:4 n-7	0.1	0.1	0.4	0.2	0.1
C20:3 n-3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4 n-6	1.0	0.9	0.9	1.1	0.9
C22:1 n-9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4 n-5	<0.1	<0.1	<0.1	0.1	<0.1
C20:4 n-3	0.5	0.4	0.4	0.5	0.4
C20:5 n-3	16.3	15.2	16.6	19.6	17.4
C24:0	0.2	0.2	0.2	0.2	0.3
C22:4 n-9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C24:1 n-9	0.3	0.3	0.2	0.3	0.2
C22:5 n-6	1.4	1.3	1.2	1.2	1.1
C22:5 n-3	3.9	3.7	2.5	3.6	2.9
C22:6 n-3	43.3	40.8	40.5	42.3	40.2

[0614]

[표 48]

[0615]

[0616] 플래쉬 크로마토그래피에 의한 지질 부류 분리(중량%)

역체 클래스 분리	PTA-10208 최종 오일 1	PTA-10208 최종 오일 2	PTA-10208 최종 오일 3	PTA-10208 최종 오일 4	PTA-10208 최종 오일 5
TAG	93.4	95.4	94.0	95.7	95.1
스테롤/DAG	3.1	2.9	2.6	3.0	2.9
회수 (%)	96.5	98.3	96.6	98.7	98.0

[0617]

[표 49]

[0618]

[0619] HPLC-ELSD에 의한 지질 부류 분리(중량%)

	스테롤 에스터	TAG	FFA	스테롤	1,3- DAG	1,2- DAG	MAG	총
PTA-10208 최종 오일 1	0.4	90.8	ND	0.8	0.5	0.5	N.D.	93.0
PTA-10208 최종 오일 2	0.4	88.5	ND	0.6	0.6	0.6	N.D.	90.7
PTA-10208 최종 오일 3	0.3	89.4	ND	0.8	0.6	0.5	N.D.	91.6
PTA-10208 최종 오일 4	0.3	88.0	ND	0.8	0.5	0.5	N.D.	90.1
PTA-10208 최종 오일 5	0.3	86.3	ND	0.7	0.8	0.5	N.D.	88.6
PTA-10208 최종 오일 6	0.36	100.76	ND	0.84	0.54	0.61	N.D.	103.11

[0620]

[0621] ND= 검출되지 않음.

[0622] PTA-10212 최종 오일

[0623] PTA-10212 최종 오일

DHA는 PTA-10212 최종 오일에 41.63% 및 366.9 mg/g으로 존재하는 반면, EPA는 16.52%로 존재한다. 개별적인

지방산 프로파일을 측정하고, 표 50에 요약한다.

[0624] [표 50]

[0625] PTA-10212 최종 오일의 지방산 프로파일(% FAME)

지방산	% FAME
C6:0	ND
C7:0	ND
C8:0	ND
C9:0	ND
C10:0	ND
C11:0	ND
C12:0	ND
C13:0	ND
C14:0	0.84
C14:1	ND
C15:0	1.33
C16:0	27.09
C16:1	1.03
C17:0	0.34
C17:1	ND
C18:0	1.26
C18:1 n-9	2.14
C18:1 n-7	0.18
C19:0	ND
C18:2 n-6	0.58
C20:0	0.32
C18:3 n-3	ND
C20:1 n-9	ND
C18:3 n-6	ND
C20:2 n-6	0.26
C20:3 n-6	ND
C22:0	0.14
C20:3 n-3	ND
C20:4 n-6	1.34
C22:1 n-9	ND
C23:0	ND
C20:5 n-3	16.53
C24:0	0.53
C24:1 n-9	ND
C22:5 n-6	1.50
C22:5 n-3	1.30
C22:6 n-3	41.63
비공지 물질	0.87

[0626]

[0627] ND= 검출되지 않음.

[0628] **실시예 38**

[0629] ATCC 기탁 번호 PTA-10208 및 10212로 기탁된 단리된 미생물의 2-일된 접종원 플라스크를 표 30 및 31에 따른 매질중에서 탄소 및 질소-공급된 배양물로서 제조하였다.

[0630] 돌연변이 생성을 하기 과정에 따라 수행하였다:

[0631] 멸균 T=2일된 플라스크 약 50 mL를 멸균 40 mL 유리 균질화기에 부었다. 배양물은 균질화기에서 50 플런지를 수용하였다. 배양물을 피펫팅하고, 멸균 50 μm 메쉬 필터를 통해 여과하고, 50 mL 멸균 관에 위치시켰다(보다 작은 클러스터 및 단일 세포가 50 μm 메쉬를 통과하게 하면서, 메쉬는 보다 큰 콜로리의 클럼프를 보유하는 수단으로서 사용되었다). 완전히 농축된 매서레이트를 멸균 50 mL 관에서 수집하였다. 불린 배양물을 와동시키고, 1:100 배 이하의 수준의 희석을 수행하였다. 희석된 매서레이트 샘플을 200 μL의 접종원을 매질 아가르 플레이트(100 x 15 mm, 4 또는 5개의 유리 비드(3 mm 유리 비드)를 함유함)에 첨가하기 전에 와동시켰다. 비드가 접종원 플레이트 주위에 균일하게 퍼지게 하는 노력으로 각각의 플레이트를 적절히 교반하였다. 플레이트로부터 비드를 버리고, 플레이트를 약 5분 동안 방치하여 건조하였다. 과정이 흐릿한 빛에서 수행되므로, 멸균 후드 및 인접하는 영역내의 빛을 끈다. 과정을 단지 간접적으로 및 흐릿하게 실행할 수 있는데 이용가능한 최소한의 빛만 존재한다.

[0632] 5개의 복제 플레이트를 샘플을 조사하면서 뚜껑을 뗀 XL 가교결합기(스펙트로닉스 코포레이션, 미국 뉴욕)의 바

닥에 위치시켰다. 가교결합기는 전력을 μJ 로 전달하고, 수준을 90% 내지 95% 사멸을 달성하도록 하였다. 5개의 복제 대조군 플레이트를 동일한 프로토콜을 사용하여 돌연변이 생성되지 않은 세포로 접종하였다. 이러한 세포 수를 % 사멸을 계산하는데 사용하였다. 조사가 마무리되면, 플레이트를 취하고, 뚜껑을 교체하고, 플레이트를 파라필름 및 알루미늄 호일내의 랩으로 썼다. 손상된 유전자를 치료할 수 없도록 플레이트가 첫 주에는 암실에서 성장하는 것이 중요하였다.

[0633] 콜로니를 계수하기 전에, 플레이트를 약 10 일 동안 22.5°C 방에 위치시켰다. 최종 계수가 수행되면, 개별적인 콜로니를 멸균 접종 루프로 찍어 새로운 매질 플레이트상에 다시 스트리킹하였다. 각각의 콜로니를 개별 플레이트상에서 평판배양하였다. 플레이트가 밀집하게 성장함에 따라, 접종 루프를 사용하여 샘플을 취하고 50 mL의 매질을 함유하는 멸균 250 mL 진탕 플라스크로 접종하였다. 이러한 플라스크를 22.5°C 방에서 200 rpm의 진탕기상에 위치시켰다. T=7일에, 진탕 플라스크 배양물을 50 mL 멸균 관으로 수집하였다. pH를 취하고, 샘플을 원심분리하여 생물질 펠렛을 수집하였다. 각각의 샘플을 세정하고 다시 원심분리하기 전에 이소프로필 알콜 및 증류수의 50:50 혼합물에 재현탁시켰다. 수집된 펠렛을 동결 건조하고, 칭량하고, FAME 분석을 수행하였다. 표 51 및 52의 데이터는 상기 과정에 의해 각각 PTA-10208 및 PTA-10212로부터 생성된 돌연변이를 나타낸다.

[0634] [표 51]

[0635] PTA-10208 돌연변이

지방산	대조군 PTA-10208	돌연변이 1 PTA-10209	돌연변이 2 PTA-10210	돌연변이 3 PTA-10211
% 08:0	0.00	0.00	0.00	0.00
% 09:0	0.00	0.00	0.00	0.00
% 10:0	0.00	0.00	0.00	0.00
% 11:0	0.00	0.00	0.00	0.00
% 11:1	0.00	0.00	0.00	0.00
% 12:0	0.11	0.10	0.22	0.19
% 12:1	0.00	0.00	0.00	0.00
% 13:0	0.19	0.19	0.15	0.16
% 13:1	0.00	0.00	0.00	0.00
% 14:0	1.94	1.82	2.98	2.59
% 14:1	0.00	0.00	0.00	0.00
% 15:1	2.66	2.22	1.76	1.66
% 16:0	24.87	24.97	23.71	25.01
% 16:1	0.20	0.25	0.07	0.07
% 16:2	0.00	0.00	0.00	0.00
% 16:3	0.00	0.00	0.00	0.00
% 17:0	1.49	1.21	0.62	0.66
% 18:0	1.13	1.14	0.91	1.01
% 18:1 n-9	0.07	0.07	0.06	0.06
% 18:1 n-7	0.00	0.00	0.00	0.00
% 18:2	0.00	0.00	0.00	0.00
% 18:3 n-6	0.00	0.00	0.05	0.04
% 18:3 n-3	0.09	0.08	0.17	0.14
% 18:4 n-3	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20:0	0.31	0.33	0.24	0.30
% 20:1 n-9	0.00	0.04	0.00	0.00
% 20:2	0.00	0.00	0.05	0.00
% 20:3 n-9	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20:3 n-6	0.12	0.13	0.08	0.04
% 20:3 n-3	0.42	0.42	0.08	0.06
% 20:4 ARA	0.68	0.67	1.44	1.11
% 20:5 n-3 EPA	6.56	6.47	11.99	9.87
% 22:0	0.07	0.07	0.06	0.07
% 22:1	0.00	0.00	0.00	0.00
% 22:2	0.11	0.09	0.10	0.08
% 22:3	0.00	0.00	0.00	0.00
% 22:4 n-6	0.00	0.00	0.00	0.00
% 22:5 n-6	2.32	2.36	2.36	2.36
% 22:5 n-3	0.48	0.66	0.66	0.52
% 22:6 n-3 DHA	51.58	52.27	48.17	49.35
% 24:0	0.00	0.00	0.00	0.00
% 24:1	0.00	0.00	0.00	0.00
% 지방	47.87	49.41	66.00	63.12
% 비공지 물질	4.61	4.45	4.07	4.64

[0636]

[0637] [표 52]

[0638] PTA-10212 돌연변이

지방산	대조군 PTA-10212	돌연변이 1 PTA-10213	돌연변이 2 PTA-10214	돌연변이 3 PTA-10215
% 08:0	0.00	0.00	0.00	0.00
% 09:0	0.00	0.00	0.00	0.00
% 10:0	0.00	0.00	0.00	0.00
% 11:0	0.00	0.00	0.00	0.00
% 11:1	0.00	0.00	0.00	0.00
% 12:0	0.00	0.00	0.00	0.00
% 12:1	0.00	0.00	0.00	0.00
% 13:0	0.00	0.00	0.21	0.20
% 13:1	0.00	0.00	0.00	0.00
% 14:0	0.68	0.77	0.62	0.97
% 14:1	0.00	0.00	0.00	0.00
% 15:1	0.00	0.00	0.00	0.00
% 16:0	17.36	19.94	15.27	23.61
% 16:1	1.45	2.33	1.40	2.57
% 16:2	0.00	0.00	0.00	0.00
% 16:3	0.00	0.00	0.00	0.00
% 17:0	0.20	0.21	0.18	0.27
% 18:0	0.78	0.82	0.79	0.81
% 18:1 n-9	0.00	0.00	0.00	0.00
% 18:1 n-7	0.18	0.27	0.20	0.19
% 18:2	0.00	0.00	0.00	0.00
% 18:3 n-6	0.00	0.00	0.00	0.00
% 18:3 n-3	0.00	0.00	0.00	0.00
% 18:4 n-3	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20:0	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20:1 n-9	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20:2	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20:3 n-9	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20:3 n-6	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20:3 n-3	0.90	0.77	0.99	0.66
% 20:4 ARA	1.43	1.32	1.65	0.72
% 20:5 n-3 EPA	13.33	14.93	14.14	8.54
% 22:0	0.00	0.00	0.00	0.00
% 22:1	0.00	0.00	0.00	0.00
% 22:2	0.00	0.00	0.00	0.00
% 22:3	0.00	0.00	0.00	0.00
% 22:4 n-6	0.00	0.00	0.00	0.00
% 22:5 n-6	2.39	1.95	2.59	2.18
% 22:5 n-3	0.73	0.79	0.80	0.68
% 22:6 n-3 DHA	59.18	54.31	59.89	56.39
% 24:0	0.00	0.00	0.00	0.00
% 24:1	0.00	0.00	0.00	0.00
% 지방	45.69	38.08	42.88	48.48
% 비공지 물질	1.38	1.58	1.27	2.19

[0639]

[0640] 실시예 39

[0641] 미생물 세포(쉬조키트리움)를 함유하는 2개의 세포 배양액(약 13.3 kg)을 20 L 발효조에서 60℃까지 가열하였다. 발효조는 15 cm의 직경을 갖는 2개의 6-블레이드 러쉬톤 임펠러를 가졌다. 상부 임펠러는 12 L 마크에 위치하고, 하부 임펠러는 상부 임펠러 아래로 10 cm에 위치하였다. 제1 세포 배양액을 307 cm/초로 계속 교반하였다. 제2 세포 배양액을 464 cm/초로 계속 교반하였다. 효소(즉, 알칼라제 2.4 L FG 0.5%)를 세포 생물질에 첨가하여 세포를 용해하고 에멀전화된 용해된 세포 조성물을 형성하였다. 에멀전화된 용해된 세포 조성물을 먼저 용해된 세포 조성물의 pH가 10.4 내지 10.6이 될 때까지 염기(NaOH, 250 kg의 50% w/w 용액)로 처리하였다. 이어서, 염(고체 NaCl, 2%의 양, 용해된 세포 조성물의 중량 기준)을 용해된 세포 조성물에 첨가하였다. 이어서, 용해된 세포 조성물을 90℃의 온도까지 가열하고, 이러한 온도 수준에서 20시간 동안 유지하였다. 각각의 세포 배양액의 샘플을 취하고, pH를 8.0으로 조정하고, 50 mL 시험관에 위치시켰다. 시험관을 원심 분리하고, 오일 추출 데이터를 측정하였다. 오일 추출 데이터를 표 53에 제공한다.

[0642] [표 53]

[0643] pH 8.0에서 50 mL 관에서 시험하는 추출로부터의 결과

307 cm/초			
추출을 위해 시험된 습윤 배양액 (g)	회수된 오일의 질량 (g)	% 수율 (오일/배양액)	%수율 (오일/고체)*
49.990	3.881	7.76	27.81
50.814	2.747	5.41	19.36
50.772	2.418	4.76	17.05
464 cm/초			
추출을 위해 시험된 습윤 배양액 (g)	회수된 오일의 질량 (g)	% 수율 (오일/ 배양액)	%수율 (오일/고체)*
51.154	7.067	13.81	49.13
51.092	7.055	13.81	49.11
50.132	6.606	13.18	46.86

[0644]

[0645] * 비처리되고 파스퇴르화된 배양액의 고체 함량을 기준으로 한다.

[0646] 표 53에 제공된 데이터는 보다 높은 교반 속도가 회수된 오일의 보다 큰 질량, 배양액으로부터의 오일의 보다 큰 % 수율, 및 비처리되고 파스퇴르화된 배양액의 고체 함량으로부터의 오일의 보다 큰 % 수율을 야기함을 증명한다.

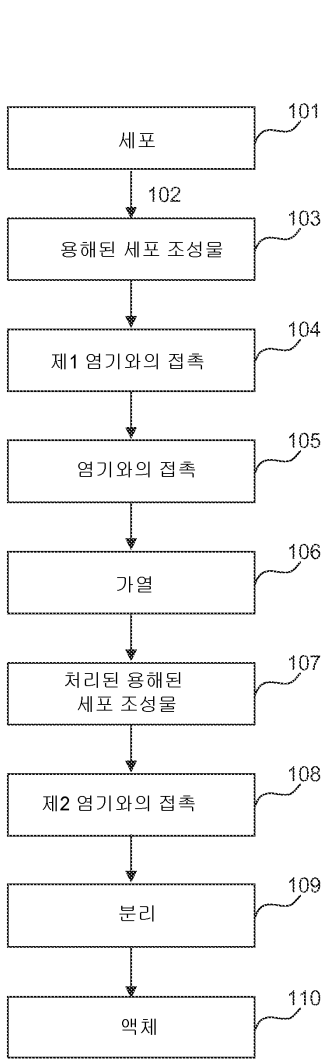
[0647] 결론

[0648] 본원에 기술된 모든 다양한 양태 또는 선택사항이 임의의 변형 및 모든 변이와 조합될 수 있다. 본 발명이 일부 양태를 참고하여 구체적으로 제시되고 기술되었지만, 단지 예로서 제공된 것이고, 비제한적이고 형태 및 세부사항의 다양한 변화가 본 발명의 사상 및 범주를 벗어남이 없이 수행될 수 있음이 당업자에게 이해될 것이다. 따라서, 본 발명의 너비 및 범주는 상기 예시적인 양태중 어떠한 것에 의해서도 제한되지 않아야 하고, 단지 하기 청구범위 및 이의 등가물에 의해 한정되어야 한다.

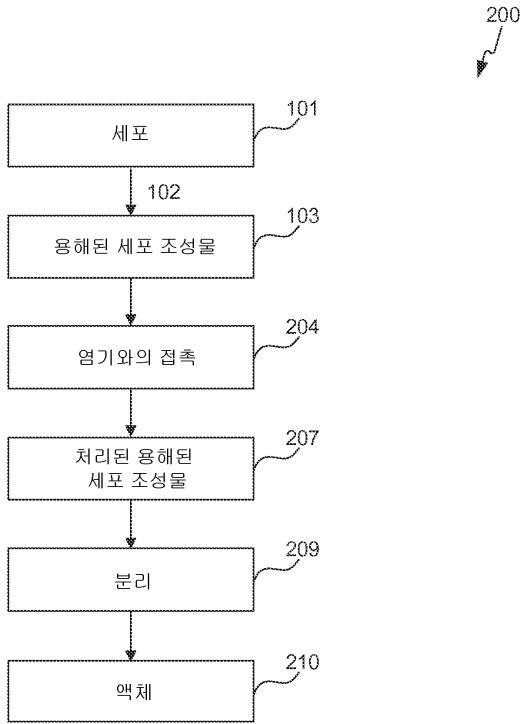
[0649] 본원에 인용된 모든 문헌, 예컨대 학술 논문 또는 초록, 공개되거나 상응하는 미국 또는 외국의 특허출원, 허여된 특허 또는 외국의 특허 또는 임의의 다른 문헌은 각각 이의 전체 내용, 예컨대 인용문헌에 제공된 모든 데이터, 표, 도면 및 글을 본원에 참고로서 혼입한다.

도면

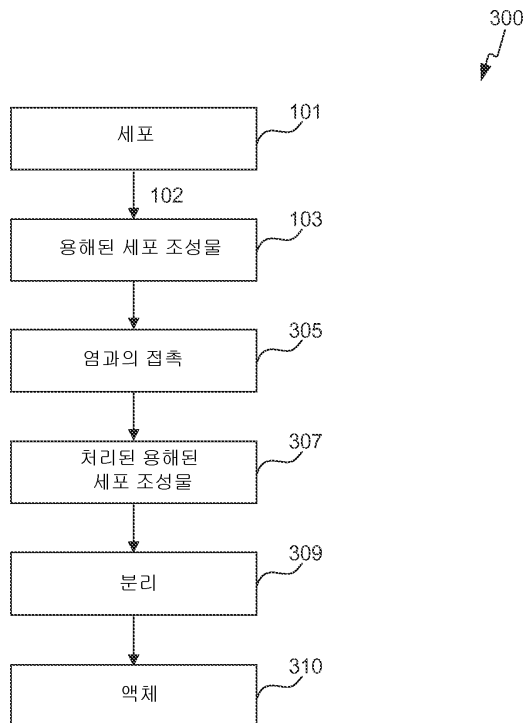
도면1



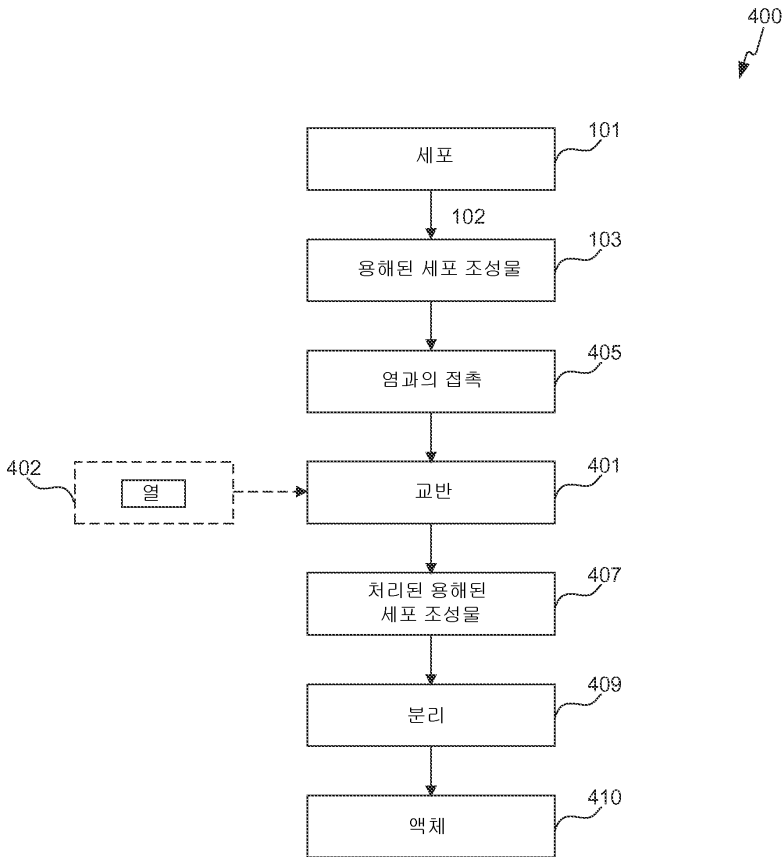
도면2



도면3



도면4



도면5

EPR 분광법을 사용하는 알칼리 처리의 효과

