

제 출 문

표 지(주요사업)

(뒷면)	(측면)	(앞면)
<p>주 의 (편집순서9)</p> <p>(16 포인트 고딕체)</p> <p>↑ 15cm ↓</p>	<p>과 제 번 호 BSPE19180-056-12</p> <p>↑ 5cm ↓</p> <p>극지 미세조류 유래 천연 세포보호 물질의 안정적 대량 확보 및 효능분석 (20 포인트 중고딕체)</p> <p>Large-scale production and Clinical evaluation of CPS (Cell-Protecting Substance) from polar microalgae (16 포인트 신명조체)</p> <p>↑ 5cm ↓</p> <p>2020. 02. 28 (16 포인트 신명조체)</p> <p>한 국 해 양 과 학 기 술 원 부 설 극 지 연 구 소 (17 포인트 명조계열)</p> <p>↑ 4cm ↓</p>	<p>보고서발간번호 BSPE19180-056-12 (14포인트 중고딕체)</p> <p>극지연구소장 귀하</p> <p>본 보고서를 “극지 미세조류 유래 천연 세포보호 물질의 안정적 대량 확보 및 효능분석” 과제의 최종보고서로 제출합니다.</p> <p>2020. 02. 28</p> <p>연 구 책 임 자 : 김상희</p> <p>참 여 연 구 원 : 김일찬</p> <p>“ : 한세중</p> <p>“ : 윤의중</p> <p>“ : 강성호</p> <p>“ : 서현교</p> <p>“ : 최한구</p> <p>“ : 이영미</p> <p>“ : 서태건</p> <p>“ : 신승철</p>

“ : 김은재
 “ : 채현식
 “ : 민슬기
 “ : Phi-Kim Hoa
 “ : Xiaoxiao Zhong
 “ : 손동화
 “ : 양준영
 “ : 이호현
 “ : 송수지
 “ : 윤채원

보고서 초록

과제관리번호	PE19180	해당단계 연구기간	2017. 02. 01~ 2019. 12.31	단계 구분	1/ 1
연구사업명	중 사업명	기관목적사업			
	세부사업명	주요사업			
연구과제명	중 과제명				
	세부(단위)과제명	극지 미세조류 유래 천연 세포보호 물질의 안정적 대량 확보 및 효능분석			
연구책임자	김상희	해당단계 참여연구원수	총 : 20 명 내부 : 10 명 외부 : 10 명	해당단계 연구비	정부: 천원 기업: 천원 계: 1,160,000 천원/3년
연구기관명 및 소속부서명	극지생명과학연구부	참여기업명	-		
국제공동연구	상대국명 :	상대국연구기관명 :			
위탁연구	연구기관명 :	한국한의학연구원	연구책임자 :	채성욱	
	연구기관명 :	한양대학교	연구책임자 :	진연선	
	연구기관명 :	대구가톨릭대학교	연구책임자 :	민병선	
요약					보고서 면수 193
<p>○ 해조류, 미세조류들은 이미 지속가능한 생물자원으로 산업적 가치를 인정받고 있으며 특히 극지 같은 극한 환경에서 만들어내는 천연 방어물질들은 고효능 신물질로 화장품, 의약품계의 높은 관심을 받고 있음</p> <p>○ 남극 미세조류들이 항암, 항염, 항주름 효능 등 세포보호기능이 있음을 확인하였고 이 잠재적 효능 물질들을 CPS (Cell-Protecting Substance)라 명명하였음</p> <p>○ CPS 확보를 통해 기초 연구를 넘어 신소재로 극지자원 실용화 토대를 마련하고자 함</p> <p>○ 남극 미세조류 유래 천연 세포보호 물질 (CPS)의 대량 확보 기술 개발 및 활성 개량</p> <ul style="list-style-type: none"> - CPS 대량 생산을 위한 고농축 기술(>10⁶ cells/mL)과 배양액 1톤급 대량 배양 조건 개발 - 안정적 확보와 활성개량을 위한 재조합발현시스템 및 cell-line 구축 - 활성개량을 위한 원핵/진핵생물 재조합발현시스템 및 cell-line 구축 - 스크리닝을 통해 다양한 후보 CPS 발굴 <p>○ CPS 효능 분석 및 예비 임상 실험 완료</p> <ul style="list-style-type: none"> - CPS의 약리 효능 (항노화, 항알러지, 아토피개선) 검증 - CPS의 피부자극 및 알러지 반응 실험을 통한 안전성 검증 - CPS 분자 및 생리기전 연구로 효능의 과학적 검증과 작용 기전 규명 <p>○ CPS 실용화 유용성 검증</p> <ul style="list-style-type: none"> - CPS 활용 경제성 검증 - CPS 원료 등재 및 주름 개선 임상평가 검증 					
색인어 (각 5개 이상)	한글	남극 미세조류, 세포보호물질, 피부노화, 임상효능, 치료화장품			
	영어	Antarctic microalgae, Cell-protecting substance, Skin aging, Clinical efficacy, Therapeutic cosmetics			

연구 요약

I. 제 목

극지 미세조류 유래 천연 세포보호 물질의 안정적 대량 확보 및 효능분석

II. 연구개발의 목적 및 필요성

현재 전 세계는 갈수록 심화되고 있는 자원 고갈과 환경문제에 대한 대응책을 찾고자 노력 중이며 이러한 노력의 일환으로 지구상의 식물 및 동물 자원을 개발하기 위한 경쟁은 갈수록 심화되고 있다. 나고야 협정 등에 따라 국가 차원에서 생물자원의 권리를 확보하기 위한 노력이 활발하게 이루어지고 있으며 이미 육상에서는 신규 자원이 포화상태에 이르러 해양자원(marine product)으로 눈을 돌리고 있는 추세이다.

해조류, 미세조류들은 이미 지속가능한 생물자원으로 산업적 가치를 인정받고 있으며 기초 과학 및 기후변화 연구재료, 대체에너지, 먹이생물, 식품 및 의약품의 원료, 화장품의 원료, 건강보조식품 등 다양한 산업분야에 활용되고 있다. 특히 극지 같은 극한 환경에서 생물들이 만들어내는 천연 방어물질들은 새로운 고효능 유용물질로 화장품, 의학업계의 폭발적인 관심을 받고 있으며 관련 시장 규모도 빠르게 증가하고 있다.

그러나 극지 생물연구는 주로 세균을 중심으로 연구되어 왔으며 진핵 미세조류에 대한 연구는 초기단계이다. 다양한 종에 비하여 활용되고 있는 미세조류의 수는 일부에 한정되어 있어서 남북극 같은 극한지에서 새로운 종의 발굴과 기능성 탐색을 통해 유용 자원의 권리 확보 및 관련 시장 장악을 위한 노력이 필요한 시점이다.

본 연구팀은 기 확보한 남극 미세조류들에서 항염, 항주름 효능이 있는 세포보호물질(Cell protecting substance, CPS)들을 대량으로 확보하고 협력기관과 협동연구를 통해 고부가 피부질환 개선제, 피부관련 제품으로 개발하고자 하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

- 남극 미세조류 유래 천연 세포보호 물질 (CPS)의 안정적 대량 확보 기술 개발 및 활성 개량
 - CPS 대량 생산을 위한 고농축 기술(>10⁶ cells/mL)과 배양액 1톤급 대량 배양 기술 개발
 - 안정적 확보와 활성개량을 위한 재조합발현시스템 및 cell-line 구축
 - 활성개량을 위한 원핵/진핵생물 재조합발현시스템 및 cell-line 구축
 - 스크리닝을 통해 다양한 후보 CPS 발굴

- CPS 효능 분석 및 예비 임상 실험 완료
 - CPS의 기능 활성 (항노화, 항알러지, 아토피개선) 검증
 - CPS의 피부자극 및 알러지 반응 실험을 통한 안전성 검증
 - CPS 분자 및 생리기전 연구로 효능의 과학적 검증과 작용 기전 규명

- CPS 실용화 모색
 - CPS의 실용화 유용성 검증 (생산성, 단가 계산을 통한 경제성 검토)
 - 고품질 피부질환 개선제 (천연 동상연고, 고부가 기능성 화장품 등)의 제작을 통한 사업화 및 타 산업영역으로의 확대 모색

IV. 연구개발결과

1. 극지 미세조류 대량 확보
 - 가. 극지 미세조류 대량 배양 조건 스크리닝을 위해 협력업체인 비엠바이오(주)와 4개월에 걸쳐 온도, 빛, 배지 등 극지 미세조류 대량 배양조건을 set-up 한 결과 최종 400L당 약 30 ~ 50g/dw 생산에 성공하였다.
 - 나. 천연물질의 생리활성 연구와 고활성 분획물에 대한 신속한 공급을 위해 20L lab sized culture system 고안하고 특허 출원하였다.
 - 다. 극지 미세조류 유래 세포보호물질 CPS 대량 생산 균주를 구축하기 위해 효모 *Pichia pastoris* 와 GRAS (Generally Regarded As Safe) 생물인 유산균 *Bacillus subtilis* 에서 발현 시스템을 구축하였고, 활성과 안정성이 개량된 CPS1m의 대량 생산 시스템을 구축하였다.
 - 라. 극지미세조류 바이오매스의 연구소내 자체 대량생산을 통한 단가절감, 천연물질의 생리활성 연구와 고활성 분획물에 대한 신속한 공급을 위해 200L lab sized 광생물 반응기 개발과 27m³ 저온배양실을 구축하였다.
 - 마. 저온배양부스와 관형, 비닐백형 광생물반응기를 설치하여 타배양업체 제조비용 대비 저단가의 바이오매스를 생산하는 조건을 확립하였다. 정보통신기술(IoT)을 이용한 극지미세조류의 스마트배양부터 활성물질의 추출, 분리분석까지 통합적

공정시스템을 구축하였다(저온대량배양장치 특허 1건, 연구지원동 1층).

바. 극지미세조류 유래 프로모터를 이용한 저온 유도 발현백터를 구축하였고, P9 프로모터를 이용하는 CPS1 발현 백터 제작하였다. 미세조류에서 세포보호능 단백질 생산이 가능한 형질 전환체를 제작하였다.

2. 효능 CPS 후보군 선정

가. 인간세포주 스크리닝 분석을 통해 피부 노화방지 효능이 있는 5종의 극지 미세조류를 선별하였다

나. 피부 아토피 치료제의 원료인 다래 추출물(PG102, ViroMed사 특허)과 항염활성 비교시 극지 미세조류 3종의 항염 활성이 월등함을 확인하였다. 특히 농도 80 μ g/mL에서는 6배 이상 높은 효능을 보였다.

3. 효능 물질 분리

가. 후보 균주 중 KSF0108 용매분획에 대해 항염증, 항알러지 활성시험 완료하였으며 KSF0108 화합물의 NMR & MASS 등의 기기분석을 이용한 구조 동정 결과 cholesterol, β -sitosterol, hurgadacin, α -tochoperol 등 10종이 동정되었다. 이 중 compound 10은 신물질로 분석되었다.

나. *Micractinium* sp. KSF0031 미세조류의 용매 분획 후 각종 크로마토그래피를 이용하여 화합물 분리하였고, NMR 및 MASS 등을 이용하여 총8종의 화합물을 분리하였으며 이중 5번은 신물질로 분석되었다.

다. *Micractinium* sp. KSF0031의 7종의 화합물 생리활성 평가결과 Jurkat T 면역세포에서 IL-2 mRNA 억제활성은 신물질 (1)과 화합물 (5)에서 항염증활성이 있음을 확인하였다.

라. UV에 의한 항노화를 억제하는 활성이 있는 추출물 중 단일화합물 Glyceryl Eicosapentaenoate분리와 대량합성(10g)하였고, 극지 미세조류 유래 Glyceryl Eicosapentaenoate을 국제화장품원료집(ICID)에 등재하였다(2019.05.24. 상품명 : KOPRI-KIOM Eico glycerol, INCI 명칭 : Glyceryl Eicosapentaenoate. 이하 Epi glyceol로 표기).

마. 자극테스트 (KFDA, CTFA 가이드라인) 결과 Epi glyceol의 피부안정성 통과하였고, 세포독성, 세포보호, MMP-1 발현량 등 평가 항목에 대해 Epi glyceol은 세포독성이 없었으며 자외선에 의해 손상된 피부세포의 생존율을 회복시켰고 피부노화를 유발하는 단백질인 MMP-1의 발현을 억제하여 주름개선 효능이 있음을 확인하였다.

바. Epi glyceol의 임상평가가 통과되어 피험자 피부 이상반응 없이 피부주름이 감소함을 확인하였다(IRB 승인 번호: 제1-220777-A-N-02호-DICN19106, CRIS 승인 번호: PRE20190524-002. 식약처 허가 조건 마련).

사. 극지 미세조류 18종의 세포 추출물을 용매 분획 후 각종 크로마토그래피를 이용하여 주름개선 화합물 분리하였고, NMR 및 MASS 등을 이용하여 화합물의 구조 동정을 진행하였다.

4. 효능 향상, 기전연구

가. 극지 *Chaetoceros neogracile*에서 분리해 낸 저온활성 프로모터 1,225bp가 삽입된 형질전환체 *Chlamydomonas* 19개 line (성공률 50%)을 확보하였고 luciferase 활성을 확인하였다.

나. 저온에서 높은 성장률을 보이는 ArM29, KNF32의 계승 정보에서 저온활성 프로모터 후보군들 7개 선별하였고 저온활성 형질전환 미세조류를 제작하였다.

다. KSF0006의 메탄올의 CHCl₃, EtOAc, BuOH, H₂O 분획물을 24시간 처리한 후 자외선을 조사한 결과 BuOH 분획물과 H₂O 분획물에서 세포 보호 효능을 확인하였으며 H₂O 분획물에서는 control에 비해 세포보호 효능이 91.46% 까지 증가하는 것을 확인하였다. BuOH 분획물과 H₂O 분획물에서 UVB에 의해 감소하였던 hyaluronan의 발현량이 증가하고 MMP-1이 억제됨을 확인하였다.

라. CPS2 (protein)와 CPS1 3종 (CnAFP, CnAFP isoform, CnAFP mut3)을 24시간 처리한 후 자외선을 조사한 결과 CPS2과 CPS1에서 세포 보호 효능을 확인하였으며 CPS1에서는 control에 비해 세포보호 효능이 95.47 % 까지 증가하는 것을 확인하였고 MMP-1 억제 효능, hyaluronan의 발현량이 증가함을 확인하였다.

마. 시판 다래추출물보다 월등히 높은 항염 활성을 보이는 미세조류 3종을 확보하였으며 이들의 항염 효능이 대표적인 항염기작 NF-kB pathway와 관련이 있음을 확인하였다.

바. 임상시험을 수행하기 위하여 대용량 스케일로 제조된 *Micractinium* sp. KSF0031 Extract 소재의 세포독성 및 세포보호, MMP-1 발현량 시험을 수행하여 자외선에 의한 세포 보호효능과 MMP-1의 발현억제를 확인하였다.

사. 실험결과 KSF0031은 세포독성이 없었음을 확인하였고, 자외선에 의해서 손상된 피부세포의 생존율을 회복시켰고 피부노화를 유발하는 단백질인 MMP-1의 발현을 억제하여 주름선 효능이 있음을 확인하였다.

5. 약리효능 평가

가. 항알러지 효능이 있는 단일화합물 3개 신규 발견: *Chlamydomonas* sp. KSF0006에서 5Z-nonadecenoic acid과 1-hexanoyl glycerol, *Chlamydomonas* sp. KSF00100에서 δ -carotene에서 항알러지 효능을 확인하였다.

V. 연구개발결과의 활용계획

1. 신규 소재 Epi glycerol 국제화장품원료집(ICID)에 소재 등재(2019.05.24., 상품명 : KOPRI-KIOM Eico glycerol, INCI 명칭 : Glyceryl Eicosapentaenoate)하였고, 피부안정성 과 임상평가를 통과하였다. 자외선에 의한 세포손상 보호효능과 피부노화를 유발하는 단백질인 MMP-1의 발현을 억제하여 주름개선 효능을 보여 경제 타당성을 분석(날리지웍스 2019.04.08., B/C 2.74 ~ 4.11)하여 타당성을 확보하였으며, 산업화 소재 발굴 뿐 아니라 다양한 항목에서 편익이 창출될 가능성이 있으며 간접적 경제적 편익 및 타산업 파급효과 역시 활발하게 창출될 것으로 기대된다.
2. IoT 사물인터넷을 이용한 극지 미세조류 배양실 원격 모니터링/LED 제어시스템을 설비하여 극지 미세조류 배양실의 LED광도, 온도 알람 컨트롤을 스마트폰 및 PC에서 외부제어 가능하도록 설비함으로써 상시모니터링이 가능해졌으며, 극지미세조류 전용 배지와 광배양장치를 활용하여 극지미세조류 생산비용을 1/2 수준으로 절감할 것으로 기대된다.
3. 극지미세조류에서 항알러지 효능이 있는 단일화합물 3건을 추가발견 및 구조 동정하여 이를 활용시 항알러지제 또는 아토피, 천식등의 치료제로 개발될 가능성이 높다.

SUMMARY

I. Title

Large-scale production and Clinical evaluation of CPS (Cell-Protecting Substance) from polar microalgae

II. Purpose and Necessity of R&D

- Securing Large-scale production of CPS (Cell-Protecting Substance) developed from polar microalgae
- Establishing base for practical use of CPS as a cure material for skin disorder supported by clinical study

III. Contents and Extent of R&D

- Clinical evaluation of CPS
- Securing sustainable CPS production
 - developing technology for stable and large quantity production of CPS (>10⁶ cells/mL)
 - set-up recombination system and cell-line for large scale production and activity improvement of CPS
 - set-up eukaryotic/prokaryotic recombination system for increasing clinical activity of CPS
- Evaluating clinical efficacy of CPS
 - obtaining natural and purified CPS
 - studying molecular mechanism of CPS on skin cells
 - verifying functional activities (e.g., anti-aging, anti-allergy and atopy care) and clinical safety evaluation of CPS followed by KFDA guideline
- Studying the practical use of CPS
 - establishing foundation of practical use and manufacturing test product of CPS as cures for skin disorder
 - evaluating application efficacy of CPS (Economical efficiency investigation through productivity and the unit cost of production)

IV. R&D Results

1. Securing sustainable CPS production

- In order to screen the conditions for mass culture of polar microalgae, we searched for the mass culture conditions of polar microalgae such as temperature, light and medium over 4 months with our partner BM Bio Co., Ltd. The result was a successful production of about 30–50g / dw per 400L of final product.
- A 20L lab sized culture system which was patented by this project has been newly devised for the study of physiological activity of natural substances and supply of highly active fractions.
- In order to construct CPS mass-producing strains originated from polar microalgae, expression systems were constructed in yeast *Pichia pastoris* and *Bacillus subtilis*, which is a GRAS (Generally Regarded As Safe) organism. A mass production system of CPS1m with improved activity and stability was established.
- A 200L lab sized photobioreactor was developed and a 27m³ low temperature culture room was constructed. These equipment has reduced biomass production costs and using that enabled the study of natural substance bioactivity and studies for highly active fractions.
- An integrated process system has been established for the cultivation of polar microalgae, extraction of active substances, separation and analysis using IoT.
- Cold induced expression vectors were constructed using a polar microalgae-derived promoter, and a CPS1 expression vector was constructed using the P9 promoter. A transformant capable of producing cytoprotective protein in microalgae was constructed.

2. Screening of CPS candidate with activity

- Five polar microalgae with anti-aging effects were selected by applying to human cell lines.
- It was confirmed that the anti-inflammatory activity of the three polar microalgae was superior when comparing with the extracts of Korean kiwi, *Darae*, as the skin atopic remedy. In particular, it showed six times higher efficacy at 80μg / mL.

3. Efficacy substances separation

- Anti-inflammatory and anti-allergic activity was tested for KSF0108 solvent fractions among the candidate strains. As a result of structural identification using NMR & MASS analysis of KSF0108 compounds, 10 types including cholesterol, β-sitosterol, hurgadacin and α-tochoperol were identified. Compound 10 was analyzed as a new substance.
- After solvent fractionation of KSF0031 microalgae, compounds were separated by various chromatography, and 8 compounds were separated by using NMR and MASS. Compound 5 was analyzed as a new substance.
- As a result of evaluation of 7 types of compound in physiological activity of KSF0031, it was confirmed that IL-2 mRNA inhibitory activity in Jurkat T immune cells was showed as anti-inflammatory activity in new substance (1) and compound (5).
- A single compound, Glyceryl Eicosapentaenoate, was isolated and synthesized in bulk among extracts that inhibited anti-aging by UV.
- Glyceryl Eicosapentaenoate from polar microalgae was listed in the International Cosmetics Collection (ICID).
- As a result of stimulation test (KFDA, CTFA guideline), Epi glyceol passed the skin stability and that was not cytotoxic. The survival rate of skin cells damaged by UV light was restored and it was confirmed that the anti-wrinkle effect was showed by suppressing the expression of MMP-1, that causes skin aging.

- Clinical evaluation of Epi glyceol was passed, confirming that the skin wrinkles were reduced without skin adverse reactions.
- Eighteen extracts from polar microalgae were fractionated by solvent and using various chromatography separate anti-wrinkle compounds, and the structural identification of the compounds was carried out using NMR and MASS.

4. Efficacy improvement, mechanism research

- Nineteen lines of transformed *Chlamydomonas* with 1,225bp of low-temperature promoter, isolated from the polar *Chaetoceros neogracile*, were obtained and luciferase activity was confirmed.
- From the genome information of ArM29 and KNF32 showing high growth

rate at low temperature, 7 low temperature promoter candidate groups were selected and transformed microalgae showing low temperature activity were constructed.

- The cell protective effect against UV was confirmed in the BuOH fraction and the H₂O fraction of KSF0006. In the H₂O fraction, it was confirmed that the cytoprotective effect was increased by 91.46% compared to the control. The expression level of hyaluronan was decreased by inhibited UVB and MMP-1.
- In CPS2 and CPS1, the cell protective effect was confirmed. In CPS1, the cytoprotective effect was increased by 95.47% and the MMP-1 inhibitory effect and hyaluronan expression were increased.
- Three microalgae exhibited significantly higher anti-inflammatory activity than Korean kiwi extracts and their anti-inflammatory effects were confirmed to be related to the NF-κB pathway, a representative anti-inflammatory mechanism.
- To carry out the clinical test of KSF0031 extracts from large scale biomass, cytotoxicity, cytoprotection, and MMP-1 suppression were performed to confirm the cell protective effect against UV.
- As a result, it was confirmed that KSF0031 extracts had no cytotoxicity, restored the survival rate of skin cells damaged by UV light, and confirmed the wrinkle line efficacy by inhibiting the expression of MMP-1, that causes skin aging.

5. Pharmacological efficacy evaluation

- Three new anti-allergic single compounds: 5Z-nonadecenoic acid and 1-hexanoyl glycerol of *Chlamydomonas* sp. KSF0006 and δ-carotene of *Chlamydomonas* sp. KSF0100 showed anti-allergic effects.

V. Application Plans of R&D Results

1. The new material was listed in the Epi glycerol international cosmetic raw material collection (ICID,2019.05.24. Product: KOPRI-KIOM Eico glycerol, INCI name : Glyceryl Eicosapentaenoate) and passed the skin stability and clinical evaluation. The effect of protecting against cell damage by UV rays and the suppression of MMP-1, a protein that induces skin aging, was

shown to improve wrinkles. In addition to the discovery of industrializable materials, there is a possibility of generating benefits from various items. Indirect economic benefits and other industry ripple effects are also expected to be actively created.

2. IoT system able to monitor LED and temperature of polar microalgae cultivation was installed and the equipment was externally controllable and could be monitored at all times. It is expected to reduce polar microalgae production cost by half by using optimized medium and large-scale photobioreactor device.
3. Three additional compounds with anti-allergic efficacy in polar microalgae were additionally discovered and identified. If used, it can be developed as an anti-allergic agent or treatment for atopic or asthma.

C O N T E N T S

Chapter 1 Introduction

I. Objective and scope of research

1. Final goals
2. Annual goals and contents
3. Necessities of research

Chapter 2 Current R&D Status in Korea and Other Nations

I. Trends in technical development

1. Technical overview
2. Market status

II. Patent analysis range and trend

1. Scope of analysis
2. Search results
3. Current status of seaweed and microalgae technology development

III. Patent trend analysis by country

1. Technology development status of major market countries
2. Foreign patent application status in major markets
3. Identify the growth stage of the technology market
4. Major competitors
5. New market entrants

IV. Research paper Trends

1. Current status of research activities
2. Research status by seaweed and microalgae
3. Status of major journals
4. Investigation on competitors for seaweed and microalgae research

V. Competitiveness of industrialization using polar microalgae

Chapter 3 R&D Implementation Contents and Results

I. Contents and Results

1. Development of technology to secure mass culture of polar microalgae

1.1 Detailed Research Objectives 1. Secure CPS

- A. Secure a large amount of microalgae for CPS
- B. Recombinant expression system and cell-line construction for mass acquisition
- C. Construction of low temperature promoter expression system to improve activity

1.2 Detailed Research Objectives 2. Analysis of CPS efficacy

- A. Securing new CPS by screening active skin protection ingredients
- B. Validation, fraction and structure identification of Candidate CPSs
- C. Analysis and synthesis of new CPS compounds
- D. Development of anti-allergic and anti-inflammatory material from polar microalgae

1.3 Detailed Research Objectives 3. Commercialization of CPS

A. High quality skin disease improver preparation

(1) Clinical efficacy verification

B. Economic feasibility analysis

(1) Development of polar microalgae cultivation technology and new material economic analysis

Chapter 4 Degree of R&D Goal Achievement and Degree of Contribution to Outside Research Institute

I. Annual goal achievement

II. Three years research results

Chapter 5 Application Plans of R&D Results

I. Future research direction and achievement utilization plan

Chapter 6 References

목 차

제 1 장 서론

제1절 연구 목적 및 연구범위

1. 연구 목적
2. 연차별 연구목표 및 연구내용
3. 연구의 필요성

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제1절 기술동향 분석

1. 기술개요
2. 시장현황

제2절 특허 분석 범위 및 동향

1. 분석 범위
2. 검색 결과
3. 해조류, 미세조류 기술개발 현황

제3절 국가별 특허 동향 분석

1. 주요시장국 기술개발 현황
2. 주요시장국내 외국인 특허 출원 현황
3. 기술시장 성장 단계 파악
4. 주요 경쟁국 현황
5. 국내의 신규 시장 진입자

제4절 논문 동향

1. 분석대상 연구활동 현황
2. 해조류, 미세조류별 연구 현황
3. 주요 학술지 현황
4. 해조류, 미세조류 경쟁자 조사

제5절 극지 미세조류 산업화의 경쟁력

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절 연구개발 수행 내용 및 결과

1. 극지 미세조류 대량 배양 확보 기술 개발

(가) 세부연구목표1. CPS 대량 확보

- 1.1 CPS 생산 미세조류의 대량 확보
- 1.2 대량 확보를 위한 재조합 발현 시스템 및 cell-line 구축
- 1.3 활성 개량을 위한 저온 프로모터 발현 시스템 구축 (한양대 위탁)

(나) 세부연구목표2. CPS 효능 분석

- 2.1 피부보호성분 활성 스크리닝으로 신규 CPS 확보
- 2.2 후보 CPS 효능검증, 분획 및 구조 동정
- 2.3 신규 CPS 화합물의 분석 및 합성
- 2.4 극지 미세조류 유래 항알러지와 항염증 활성 소재 개발 (대구가톨릭대)

(다) 세부연구목표3. CPS 실용화

- 3.1 고품질 피부질환 개선제 실용화 준비
 - 가. 임상효력검증
- 3.2 경제성 타당성 검증
 - 가. 극지미세조류 배양기술개발과 이를 활용한 신소재 경제성 분석 수행

제 4장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

제1절 연차별 목표달성도

제2절 3개년 연구결과(실적)

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제1절 향후 연구방향 및 성과활용 계획

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 7 장 참고문헌

제1장 서론

제1절 연구목적 및 연구범위

1. 연구목적

피부질환 개선 신소재로서 극지 미세조류 유래 세포보호물질(CPS) 개발 및 기술 이전을 통한 실용화이다.

- 본 연구 소재는 지난 수년간 KOPRI의 연구자들이 극지에서 채집하여 독자적으로 보유한 세포주에 기초한다.
- 물질 이전 및 기업화 경험이 실적이 있는 협력기관들과 협동연구를 통해 사업 기간 내에 CPS 기술이전을 위한 가시적 성과 달성을 목표로 한다.

[연구범위]

- 극지 미세조류 유래 CPS의 안정적 대량 확보 기술 개발
- CPS 제조합발현시스템 개발 및 활성 개량
- CPS 효능 분석 및 예비 임상 검증
- 항노화, 항알러지, 아토피개선 활성 검증
- 피부자극 및 알러지 반응 실험을 통한 CPS 안전성 검증
- 분자 및 생리기전 연구로 CPS 활성 효능의 과학적 검증과 작용 기전 규명
- CPS 실용화 유용성 검증

2. 연차별 연구목표 및 연구내용

구분	년도	성과목표	연구내용
1차년도	2017	-극지 미세조류 대량배양 -CPS2 제조합 활성개량 cell-line 확보	-CPS 생산 미세조류의 최적 대량배양 조건 확립 -CPS2 세포보호 활성개량 및 진행/원핵 제조합생산시스템 구축
		-분획 분석 및 생리활성 화합물 분리 -CPS1,2,3 활성 검증	-2차대사산물의 성분분석 및 활성물질 분리
		-저온활성 프로모터 발현 시스템 구축 -CPS1 제조합물질 생산	-세포 기반 효능스크리닝(cell viability) -주름개선과 보습관련 인자 평가
		-극지 미세조류에서 화합물 분리 및 구조 결정	-MeOH 등 다양한 유기용매를 통한 분획, 유효물질 분리 및 구조 동정

		-항알러지 및 항염증 활성 평가	-분획물의 IL-2을 이용한 항알러지 및 항염증 활성평가
2차년도	2018	-GRAS 생물기반 고효율 CPS2의 제조합 cell-line 확보 -극지 미세조류 추출물 분석(계속)	-개량 CPS2 생산 cell-line 구축 -B. subtilis 기반으로 한 GRAS 대량배양 및 생산시스템 구축 -생리활성 화합물의 분리 및 구조 결정
		-CPS 약리효능 기전 연구	-피부세포 보호효능 관련 기전 규명 -피부세포보호 관련 인자 측정
		-저온활성 프로모터 발현 시스템 구축 -CPS2 제조합물 생산 공정 최적화	-저온활성 프로모터 적용 클라미도나스의 형질개량종 스크리닝 -CPS1,2의 최적 생산공정 프로토콜 확립
		-순수 분리화합물 활성평가 -활성후보 물질 대량 확보	-분리화합물의 IL-2 억제활성 및 NO 생성 억제활성 측정 -IL-2 및 iNOS 단백질 발현억제 확인
3차년도	2019	-CPS1, CPS2의 활성 검증 -CPS1, CPS2의 실용화 유용성 검증 -CPS3 후보 추출물 분석 -예비 임상효능평가	-CPS1, CPS2의 대량생산을 위한 플랜트 구축 준비 -CPS1, CPS2 산업화 유용성 검증 -추출물 및 활성 성분의 대량 배양법 개발 -시제품 제작 및 주름개선 효능평가 -피부자극테스트
		-CPS생산 저온활성 개량종 확보	-클라미도모나스 활성개량종에 대한 생리 실험
		-항알러지 및 항염증 활성 물질의 작용점 연구 -CPS활성을 이용한 제품화 가능성 타진	-IL2 억제활성 기전 검증 -iNOS & COX-2 억제활성 기전 검증 -항알러지 및 항염증 활성을 이용한 제품화 가능성 타진

3. 연구의 필요성

가. 국가·사회적 측면

국가적으로 생물자원 주권확보를 위해 중요한 생물자원의 지속적인 관리 및 보존이 필요하다. 해조류, 미세조류들은 이미 지속가능한 생물자원으로 산업적 가치를 인정받고

있으며 특히 극지 같은 극한 환경에서 만들어내는 천연 방어물질들은 고효능 신물질로 화장품, 의약품계의 높은 관심을 받고 있다.

나. 경제·산업적 측면

기초 과학 및 기후변화 연구재료, 대체에너지, 먹이생물, 식품 및 의약품의 원료, 화장품의 원료, 건강보조식품 등 다양한 산업분야에 활용되고 있다. 특히 극지 같은 극한 환경에서 생물들이 만들어내는 천연 방어물질들은 새로운 고효능 유용물질로 관련 시장 규모도 빠르게 증가하고 있다. 현재 전 세계 산업 신소재로 각광받고 있는 marine product 들인 해조류, 미세조류들의 활용 기술 사례를 피부 관련 제품들 중심으로 극지미세조류 활용가능성과 현 기술 수준을 파악하였다. '유로모니터 인터내셔널'의 시장조사에 의하면 2005년에 처음으로 지구촌 스킨케어 제품 시장이 390억불이 되었고 고령화로 인한 수요 증가로 2007년에는 600억불, 최근에는 1000억불 (100조원)로 노화예방 화장품시장은 그 어느 시장보다 지속적인 증가세를 유지할 것으로 예측되고 있다. 지금까지 사용해오던 화학제품 대체 천연 원료 선호도가 급증하면서 해조류, 미세조류 활용은 급증하고 있으며 이미 관련 제품들이 국내외에서 기능성 화장품으로 활발히 개발 중이다.

다. 문화적 측면

미세조류의 기초 연구 사례와 논문분석 결과 점유율이 높은 기술이 없는 것으로 보이며, 주목할 점은 타 천연물의 경우 피부외용제/화장품의 개발이 저조한 항여드름, 발모, 자외선 차단 기능성에 대한 연구도 다수 수행됨에 따라 극지 미세조류의 기능성 관련 시장성이 매우 넓은 것으로 보인다. 극지 생물연구가 기초연구에 그치지 않고 실용화 사업에 이용된다면 일반인에게도 극지 연구를 포함한 기초 연구의 중요성을 알리고, 국가 사회적 문제들이 튼튼한 기초연구를 통해 해결되어 질수 있다는 가능성을 보여줄 수 있다. 극지 연구에 대한 중요성을 인식시키고 투자와 지속적인 관심을 통해 새로운 기술과 부가가치를 창출하는데 반드시 필요하다는 것을 보여 줄 수 있다.

다. 기술적 측면

미세조류란 현미경적 크기의 단세포 광합성 생물로써, 체내에 지방산, 단백질, 탄수화물 등을 포함하며, 지구 전역에 광범위하게 분포하고 있는 매우 흔한 생물이며, 이산화탄소를 흡수하고 영양염류(N,P)와 태양광을 받아 산소와 물을 부산물로 방출하는 생물체이다. 전 세계적으로는 약 25,000여종, 우리나라에는 약 1,300여종이 존재하며 세포가 작으면서도 하루에서 2~3회 증식해 좁은 공간에서도 무제한 생산이 가능한 경제적 잠재력이 매우 높은 생물자원이다. 기초과학 및 기후변화 연구재료, 대체에너지, 먹이생물, 식품 및 의약품의 원료, 건강보조식품 등 다양한 분야에서 활용되고 있다 (미세조류 동향, 2014). 연구를 통해 항염, 보습, 주름개선 효능이 있는 극지 미세조류들의 CPS를 산업화하기 위한 기술개발을

수행하였다. 극지 미세조류들을 산업화하기 위해서 최우선 과제는 충분한 biomass를 얻을 수 있는 대량배양 시설 및 장비 개발이다. 극지 미세조류는 성장속도가 낮고 배양온도가 10도 이하로 유지해야 하는 등 까다로운 배양 조건과 노후유가 필요하기 때문이다. 이 같은 문제를 해결하기 위해 안정된 대량배양 시설과 저온유지 시스템, 최적의 저온 배양조건을 찾기 위한 연구를 수행하였고, 세포보호물질 CPS를 대량으로 생산하는데 성공하였다. CPS의 활성 및 독성 평가 방법론은 항알러지, 항염증성 활성도, 자외선 조사에 따른 피부 세포 효능 평가 등을 수행하였다. 본 과제의 대상 기술은 세포보호 기술이며, 이는 일차적으로 상처치료제 등에 활용될 수 있으며 제품화 등을 고려할 때 미백, 주름개선, 자외선 차단 등 식품의약품에서 인정하는 기능성 화장품 원료로의 개발, 여드름 치료제, 아토피 치료제 등으로도 개발이 확장될 수 있을 것으로 기대된다.

제2장 국내외 기술개발 현황

제1절 기술동향 분석

1. 기술개요

가. 해조류

- 바다에서 나는 조류의 통칭으로 크게 4가지로 분류된다.
(녹조류: 매생이 등 / 갈조류: 미역 등 / 남조류: 트리코테스뿔 등 / 홍조류 우뭇가사리 등)
- 각종 미네랄(potassium, magnesium, calcium) 및 비타민 C, A 및 B-12 등의 영양소를 풍부하게 함유하여 피부에 공급하여 몸 건강은 물론 보습, 항산화 등 피부미용에도 탁월한 효과가 있다. 비타민, 미네랄 및 항산화 물질, 심지어 필수 지방산까지도 풍부하게 공급할 뿐만 아니라 인체의 일산화탄소, 질소 및 인의 일일 폐기물을 '해독하는' 데 도움이 된다고 알려져 있다.

나. 미세조류

- 미세조류(microalgae, 微細藻類)란 바다나 강에 서식하는 현미경적 크기의 단세포 광합성 생물로써, 자연오일, 단백질, 탄수화물로 구성되어 있으며, 지구 전역에 광범위하게 분포하고 있는 생물이다. 약 35억년전 지구상에 출현하여 이산화탄소를 흡수하고 영양염류(N,P)와 태양광을 받아 산소와 물을 부산물로 방출했던 최초의 생물체이다(Chlorella, Schizochytrium, Aphanizomenon, Nostoc 등).
- 전 세계적으로는 약 25,000여종, 우리나라에는 약 1,300여종이 존재하며 세포가 작으면서도 하루에서 2~3회 증식해 좁은 공간에서도 무제한 생산이 가능한 경제적 잠재력이 매우 높은 생물자원이다.
- 기초과학 및 기후변화 연구재료, 대체에너지, 먹이생물, 식품 및 의약품의 원료, 건강보조식품 등 다양한 분야에서 활용되고 있다(미세조류 동향, 2014).
- 현재 미세조류는 다양한 기술 분야에 사용 중이며 농업 분야에서는 토양개량제 및 생물비료로, 대체 에너지 분야에서는 바이오에탄올, 디젤 등을 생산하기 위한 수단으로 사료 및 첨가제 분야에서는 동물, 어분 사료 또는 사료 첨가제 등으로, 식품/의약품 분야에는 일반식품, 건강보조식품, 의약품 등에 색소, 지방산 등을 이용하고 있으며 기타 폐수처리, 환경정화, 건축재료, 방사능 완화 등 다양한 분야에서 사용되고 있다.
- 이러한 미세조류를 증식, 배양하기 위한 최적의 조건 탐색 작업은 지속적으로 이루어지고 있다.

2. 시장현황

- 지구촌이 본격적인 고령화시대로 접어들면서 이제 젊은이를 위한 화장품은 저출산 인구감

소로 매출은 감소하지만 고령인구를 위한 노화예방화장품이 최대 시장으로 부상 중이다. 노화예방제품은 스킨케어에 중점을 두고 주름예방 화장품으로 화장품시장에 태풍의 눈으로 확대되고 있다.

- 지금까지 사용해오던 화학제품들이 자연제품 선호로 바뀌면서 조류 또는 미세조류 제품 등이 웰빙 트렌드 부상하여 해양연구의 활성화로 이뤄지게 되었다. 미세조류 또는 조류가 화장품, 다이어트 식품, 약제 원료로 대량으로 사용되기 시작한 것은 극히 최근이며, 특히 피부재생에 좋기 때문에 피부 힐링, 노폐물 제거제, 보디 팩, 얼굴 마스크 팩 등에 최고의 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다.
- 미세조류는 단백질, 비타민A, 당분, 철, 나트륨, 인, 마그네슘, 동, 칼슘 등을 다양하게 보유하고 있고 이러한 성분의 작용이 피부를 부드럽게 해주고 신선하고 촉촉하게 젊음을 유지한다고 알려져 있다.

가. 해조류

- 해양 성분에 초점 맞춘 일명 '마린 코스메틱' 인기와 더불어 해조류 추출물에 대한 관심이 높아지고 있으며 화장품 원료성분으로 뛰어난 피부미용 효과가 입증되었다.
- 울바 랠터카, 마스코필름 등 다양하나 보통 해조류 추출물이라고 표기되거나 brown algae, red algae, green algae 등 영문으로 표기하는 경우도 있다.
- 최근 아스타잔틴과 후코이단 등이 주목받는 주요 성분이다.
 - (1) 아스타잔틴: 홍조류에서 추출한 강력한 항산화 성분이며, 비타민E의 550배에 달하는 항산화 효과가 있다.
 - (2) 후코이단: 다시마, 미역 등 갈조류에만 함유된 미끌미끌한 성분으로 암세포의 자살을 유도하는 성분으로 유명세를 탔다가 최근에는 전세계적으로 화장품 원료로 사용되며 관심이 높아지고 있다. 히알루론산보다 몇 배 강력한 보습력이 있다고 알려져 있다.

- 2011~2015 출시된 바디케어 제품의 약 2%가 해조류 성분 함유 제품으로 갈조류(Oarweed*, Bladderwrack** 등) 함유한 글로벌 바디케어 제품은 해조류 미함유 제품과 비교하여 크게 3가지 기능(firming, slimming and anti-cellulite) 강조하는 경향을 나타낸다.

*Laminaria digitata extract (Oarweed)

**Fucus vesiculosus extract (Bladderwrack)

- 현재 화장품업계는 해조류의 화장품 신소재 개발 연구를 폭넓게 시도하고 있다.
 - (1) 아모레퍼시픽: 완도군과 MOU를 맺고 해조류 등 해양자원을 활용해 화장품 개발 중이다.

(2) 비오템: 희귀 해조 추출물 유스 알개 등 특허성분을 보유 중이다(뷰티한국 보도자료 2017.1.25).

(3) 네오젠 포어타이트 필링무스: 여러 해조류를 사용한 모공축소 화장품 출시하였다.

포어타이트 필링 무스 주요성분



<그림 1> 해조류 사용 화장품

(4) 1937년 설립된 북극해 근처의 노르웨이 기업, Algae는 *Ascophyllum nodosum*를 배양하여 항노화 및 주름개선 기능성 화장품(AlgaeEsthe)을 생산하고 있다.

- 흔히 제품에 기재되는 algae 화장품 원료 종들에는 *Ulva lactuca*, *Ascophyllum*, *Laminaria longicruris*, *Laminaria saccharine*, *Laminaria digitata*, *Alaria esculenta*, *various Porphyra species*, *Chondrus crispus*, 및 *Mastocarpus stellatus* 등이 있다.

나. 미세조류

- 천연화장품 원료로서의 알지는 노화방지(anti-aging)에 탁월한 성능을 보여준다는 사실이 알려지면서 석유대체에너지와 대안으로 출발한 알지 대량배양 생산, 보급이 화장품 시장에 부각되고 있다.

- 클로렐라나 스피롤리나는 건강보조식품으로 많은 회사에서 제품으로 출시하고 있고, 국내에서는 클로렐라 이유식, 영양제, 식품첨가물, 기능성 음료, 기능성 화장품 등의 상품이 개발 중에 있다.

- 미세조류의 시장 규모는 건강식품, 식품첨가물 또는 사료용으로 이용되는 클로렐라(*Chlorella*)의 경우 세계 시장이 380억\$ 이상, 시조카이트리움(*Schizochytrium*) 으로 생산한 DHA (docosahexaenoic acid)는 100억\$ 이상, 그 외 여러 미세조류에서 생산하는 carotenoid의 시장 규모도 각각 수억\$에 달한다.

- 클로렐라의 경우 1990년부터 수요가 급속히 확대되어 전 세계 연간 생산량은 약 5,000~7000톤에 이르며 매출액도 12.5억\$에 이르고 있다.

- ‘유로모니터 인터내셔널’의 시장조사에 의하면 2005년에 처음으로 지구촌 스킨케어 제품 시장이 390억불 정도가 되면서 헤어케어 분야 다음으로 큰 시장이 되었음. 하지만 고령화로 인한 수요 증가로 2007년에는 600억불이상의 시장이 되었고, 헤어케어 제품을 능가한 것으로 드러났다. 최근 1000억불 (100조원)시장으로 증가된 노화예방 화장품시장은 의류시장이나 그 여타 시장보다 지속적인 증가세를 유지할 것으로 예측된다.

- 미세조류 화장품은 아직까지 세상에 잘 알려져 있지 않지만, 최근 석유대안으로 미세조류 오일을 생산하기 위해 엑산모빌, BP, 웰사 등이 대규모 투자를 시작하면서 미세조류의 관심도가 높아지면서, 상용화에 소요되는 시간이 적게 드는 화장품원료 생산에 대한 기술이 각광받고 있다. 특히 화학약품을 사용하는 화장품 대체로 완전 천연원료 선호도가 급증하면서 미세조류의 활용은 급증할 것으로 예측된다.

- 미세조류를 이용한 화장품/피부외용제 개발현황은 아래와 같다.

(1) 일본의 고배환경에서는 각종 아미노산과 비타민이 풍부한 유글레나를 원료로 한 화장품 및 식품 개발을 목표로 양산 기술을 확보하였다(2014.9).

(2) ‘해양섬유복합소재 및 바이오플라스틱 소재 기술개발 사업’을 하는 해양바이오소재연구단 신화성 인하대 교수 연구팀은 2016년 스피롤리나를 이용하여 활성산소를 낮추고 상처 부위의 세포를 활성화하여 피부재생을 높인 나노소재를 개발하였다.

(3) 2016년 바이오벤처기업인 엠바이오(주)는 두나리엘라 추출물을 주요 성분으로 포함하는 ‘해무수’를 출시하였다.

(4) 낙동강 생명자원관은 미세조류 ‘시조카이트리움 속 PB-31 균주’ 추출물의 항염, 항산화 등 효과를 확인하여 파이코일바이오텍코리아(주)과의 기술이전 협약을 체결하였으며 1년 내에 상용화를 실시할 예정이다(2016.11.12. 기사).

(5) 한양대 생명과학과 (식물생명공학연구소) 진언선 교수는 크리스퍼 유전자가위를 도입해 경제적으로 활용도가 높은 미세조류 개량에 성공하여 주목받고 있다. 미세조류는 다른 생물체와 달리 독특한 세포벽과 기술적 부재로 고부가가치 소재를 얻을 수 있는 균주개량에 한계이고 방법도 많지 않으나, 크리스퍼 유전자가위를 이용하여 종 개량에 적용할 수 있다.

(6) algae 연구업체 (주)엔엘피(NLP)와 한국남부발전 업무협약체결(2011.04.04) “이산화탄소 빌리지 사업” 추진: 발전소에서 배출되는 이산화탄소와 온배수를 활용하여 미세조류 배양 / 바이오오일, 의약품, 화장품 등 원료생산 중이다.

(7) 프랑스의 비오템에서는 2015년 *Aphanizomenon flos aquae*와 *Laminaria ochroleuca*를 유효성분으로 포함하는 피부노화 개선용 프리미엄 라인인 블루테라피 라인을 출시하

었다.

(8) 프랑스의 남성 화장품 브랜드인 Polaar는, Arctic blue micro-algae를 유효성분으로 사용하는 고보습 크림 제품을 출시하였다.

선으로부터 피부를 보호하는 데에 도움을 주는 제품(「화장품법」 제2조제2호)에 대한 기능성(미백, 주름개선, 자외선 차단), 피부재생/보호 관련 소분류기술도 확인하였다.

제2절 특허 분석 범위 및 동향

1. 분석 범위

본 분석에서는 2017년 1월까지 출원공개 또는 출원등록된 한국(KIPO), 미국(USPTO), 일본(JPO), 유럽(EPO), 중국(SIPO) 특허청 및 국제특허(PCT)의 공개특허공보 및 등록특허공보를 분석 대상으로 하였다.

가. 분석대상 특허

<표 1> 검색 DB 및 검색범위

자료 구분	국가	검색 DB	분석구간	검색범위
공개·등록특허 (공개·등록일 기준)	한국 (KIPO)	WISDOMA IN	~ 2017.1 현재	특허공개 및 등록 전체문서
	미국 (USPTO)	WISDOMA IN		특허공개 및 등록 전체문서
	일본 (JPO)	WISDOMA IN		특허공개 및 등록 전체문서
	유럽 (EPO)	WISDOMA IN		특허공개 및 등록 전체문서
	중국 (SIPO)	WISDOMA IN		특허공개 및 등록 전체문서
	국제특허 (PCT)	WISDOMA IN		특허공개 전체문서

*유럽 19개 각국 특허청 : 유럽특허제도는 유럽특허조약의 회원국 사이에서 유효한 유럽특허를 부여하기 위해 만들어진 제도로서 유럽특허조약(EPC : European Patent Convention)에 따라 유럽특허청(EPO)에서 운영함. 유럽특허청(EPO)에 출원함과 관계없이 유럽의 각국 특허청에 출원한 특허를 포함하여 분석함(DE, FR, GB, AT, BE, CH, DD, DK, ES, FI, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RU, SE, SU).

**한국, 미국, 일본, 유럽 및 중국특허: 출원일 기준으로 분석하며, 일반적으로 특허출원 후 18개월이 경과된 때에 출원 관련정보를 대중에게 공개하고 있음. 따라서 아직 미공개 상태의 데이터가 존재하는 2015년7월~2017년1월 자료는 유효하지 않으므로 정량분석은 ~2014년까지 유효데이터로 분석함. 단, 구체적 기술에 대한 선행 특허 분석에는 가장 최근 특허자료까지 포함하여 분석함

나. 분석대상 기술

본 분석에서는 미세조류 및 해조류의 피부외용(화장료) 활용 기술을 전반으로 기술 범위를 확장하여 수행하였다. 특허 식품의약품안전처에서 고시한 '기능성화장품' 항목인, 피부의 미백에 도움을 주는 제품, 피부의 주름개선에 도움을 주는 제품, 피부를 곱게 태워주거나 자외

<표 2> 분석대상 기술분류 및 분류기준

대분류	중분류	소분류	기준
미세조류 및 해조류를 원료 로 한 피부의 용제 활용기술 (A)	해조류 (AA)	보습(AAA)	피부 보습
		주름개선 (AAB)	주름 개선
		미백(AAC)	미백 관련 기술, 기미·주근깨 개선 기술
		자외선 차단 (AAD)	자외선 차단
		발모(AAE)	발모, 탈모치료 기술, 기타 헤어 영양 관련 기술은 분석 대 상에서 제외
		항염/항자극 (AAF)	피부염증, 아토피, 피부자극 등 완화
		항산화(AAG)	항산화
		항노화(AAH)	항노화 기술 (주름개선, 보습, 항산화 등과 중복되 는 경우가 다수를 차지함)
		항여드름 (AAD)	여드름 개선
		보호/재생 (AAJ)	피부의 재생, 보호, 창상등의 치료 효 과
	기타(AAK)	수렴, 슬리밍, 모공 축소 등 기타 피부 관련 기능성	
	미세조류 (AB)	보습(ABA)	피부 보습
		주름개선 (ABB)	주름 개선
		미백(ABC)	미백 관련 기술, 기미·주근깨 개선 기술
		자외선 차단 (ABD)	자외선 차단
		발모(ABE)	발모, 탈모치료 기술, 기타 헤어 영양 관련 기술은 분석 대 상에서 제외
		항염/항자극 (ABF)	피부염증, 아토피, 피부자극 등 완화
		항산화(ABG)	항산화
		항노화(ABH)	항노화 기술 (주름개선, 보습, 항산화 등과 중복되 는 경우가 다수를 차지함)
		항여드름(ABI)	여드름 개선
보호/재생 (ABJ)		피부의 재생, 보호, 창상등의 치료 효 과	
기타(ABK)	수렴, 슬리밍, 모공 축소 등 기타 피부 관련 기능성		

2. 검색 결과

기술 범위와 기술을 통해 확보한 모집단(raw data) 특허의 명칭, 요약, 청구범위 분석을 통하
여 과제 내용과 유관한 경우 유효특허로 분류하고 나머지를 노이즈 특허로 분류하여 분석에
서 제외하였다. 특히 중국 특허 중 기능성에 대한 뚜렷한 언급 없이 단순한 혼합물 중 미세
조류 또는 해조류가 포함되어 여러 원료와 함께 나열된 경우 제외하였으며 마스크 팩 등 특
정 제형의 재료로 쓰이는 경우 유효특허에서 제외하였고 세정제 등 관련 기능성과 거리가
있는 경우도 유효특허에서 제외하였다.

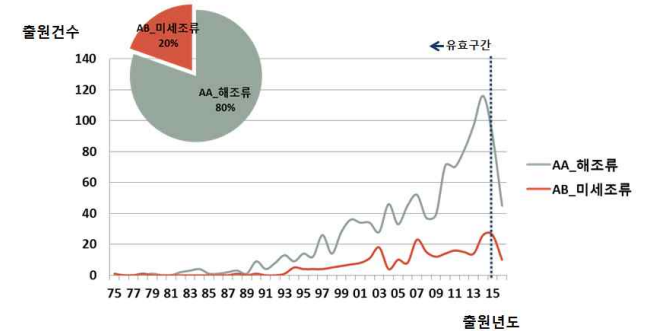
<표 3> 유효특허

중분류	특허 건수						계
	한국 (KIPO)	미국 (USPT O)	일본 (JPO)	유럽 (EPO)	중국 (SIPO)	PCT (WIPO)	
해조류(AA)	268	103	309	54	302	73	1,109
미세조류(AB)	39	43	78	20	64	26	270
합계	307	146	387	74	366	99	1,379

3. 해조류, 미세조류 기술개발 현황

가. 특허출원 동향

본 기술 분야에서 피부외용제/화장료 기술에 적용된 유효성분 분야는 해조류의 경우 전체의
80%, 미세조류는 20%를 차지하는 것으로 나타났다.



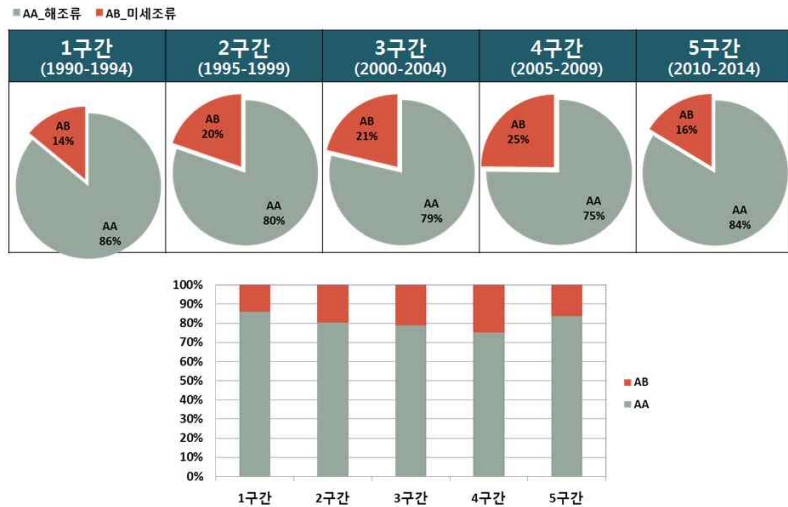
<그림 2> 중분류 출원동향

(1) 해조류

해조류의 경우 특히 2010년 후반 이후 기술 개발이 두드러지는 것으로 나타남. 2010년 이후 특허 출원 동향은 한국 및 중국에 의하여 주도되는 만큼, 해조류의 출원이 활발한 것은 해당 국가의 출원이 활발한데서 기인하는 것으로 보인다. 중국은 전 세계 해조류 양식 생산량의 73%를 차지할만큼 해조류에 대한 인식 및 접근성이 높으며 여러 물질을 활용하여 피부외용제/화장료를 개발하는 가운데 해조류를 첨가하는 경우가 많은 것으로 보인다. 중국은 2000년대 중반 이후 전반적인 기술분야에서 특허 출원이 증가하고 있으며, 비교적 개발이 용이하고 친숙한 자원을 활용한 본 기술분야에 대한 특허 출원이 활발하게 이루어지고 있는 것으로 보인다.

(2) 미세조류

미세조류의 경우 2000년대 초반 이후 완만한 출원 양상을 나타내고 있는데 주로 클로렐라와 스피룰리나 등 특정 미세조류 관련 기술에 집중되고 있다. 기타 미세조류 종의 활용은, 신규 미세조류의 동정 또는 배양기술 등 기반기술을 확보한 출원인을 중심으로 출원이 이루어지는 것으로 보인다. 이에 따라 전통적으로 양식하여 식품 등으로 활용되어 온 해조류보다 다수의 출원인에 의한 접근성이 떨어져 피부외용제/화장료 사용비용이 낮은 것으로 판단된다. 그러나 자원 발굴에 대한 각국의 경쟁이 심화되고 있는 만큼, 신규 미세조류에 대한 발굴 및 이에 대한 활용 특허 출원은 지속적으로 이루어질 것으로 보인다.



<그림 3> 구간별 출원비율

- 1구간(1990년~1994년), 2구간(1995년~1999년), 3구간(2000년~2004년), 4구간(2005년~2009년), 5구간(2010년~2014년)으로 나눈 구간별 중분류 출원비율을 확인하였다.

- 해조류 및 미세조류의 특허출원 비율은 1구간(1990년~1994년)에서는 미세조류가 14%를 차지하고 있었으나 2구간(1995년~1999년)에서는 20%로 증가하였고 이후 4구간(2005년~2009년)까지 점차적으로 출원비율이 증가하였으나 5구간에서 16%로 감소하였다. 이는 5구간(2010년~2014년)부터 중국의 출원이 급격하게 증가함에 따라, 해조류의 개발 비율이 높은 중국의 동향이 반영된 것으로 보인다.

나. 국가별, 분류군별 특허출원 현황

- 한국은 해조류의 출원이 268건, 미세조류 관련 출원이 39건이었으며 중국은 해조류의 출원이 302건, 미세조류 관련 출원은 64건이었다. 2000년대 전후반으로 기술개발이 활발했던 일본의 경우 해조류 출원이 309건, 미세조류 관련 출원이 78건으로 확인되었다. 일본은 분석 대상 특허 중 가장 다수의 미세조류 관련 출원을 진행하였으며 클로렐라, 스피룰리나, 헤마토크스, 클라미도모나스, 두날리엘라 등의 미세조류를 사용하였다.



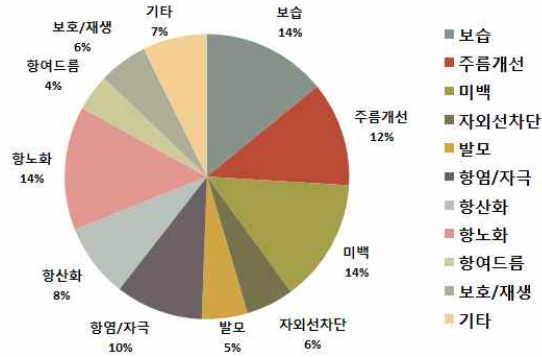
<그림 4> 국가별 중분류 특허출원

- 미국 및 유럽의 경우 미세조류 관련 기술의 출원비율이 높았으며 한국, 중국 및 일본의 경우 해조류의 출원비율이 높았다. 이는 미세조류의 절대적인 출원 건수가 적은데서 기인할 수도 있으나 전통적으로 친숙한 해조류의 출원이 매우 활발하게 이루어짐에 따른 것일 수 있다. 사용된 해조류로는 대표적으로 파래, 김, 감태, 미역, 우뚝가사리, 모자반 등이 확인되었다.

다. 기능성 별 특허출원 현황

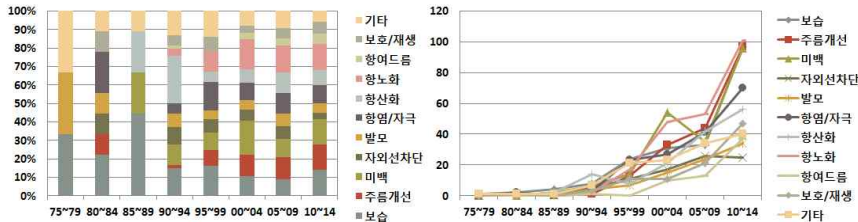
- 하나 이상의 기능성을 확인한 특허를 중복으로 처리하여 기술별로 분류하는 경우, 총 1,787건의 특허가 확보되었다(기존의 유효특허는 1,379건임). 소분류는 주름개선, 미백, 자외선 차단등의 기능성화장품 인정항목 이외에 피부보호/재생, 보습, 항염/자극(아토피 등 포

함), 항산화, 항노화(특허상에 항노화라고 언급되었으나 여러 기능성이 중복된 경우가 많았다. 참고적으로, 최근 3년(2012년 12월-2015년 12월)의 항노화 관련 권리를 획득한 한국 등록특허에서 관련 실험을 살펴보면, 주름개선 및 항산화 관련 실험의 비율이 높은 편이며 기타 미백, 항염 등의 실험이 그 뒤를 잇고 있다.



<그림 5> 소분류 특허출원 비율

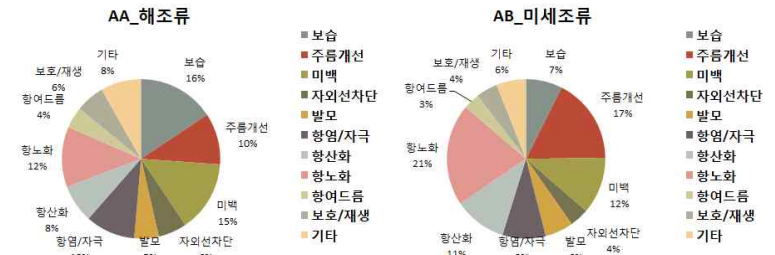
- 중복된 기능성을 지닌 특허의 수를 확인하였을 때, 2가지 기능성을 확인한 특허는 238건, 3가지 기능성은 55건, 4가지 기능성은 14건, 5가지 기능성은 6건 등이 있었다.
- 해조류 및 미세조류를 이용한 피부외용제 기술 중 가장 많은 비율을 차지하는 기능성은 보습, 항노화 및 미백 기능성으로 확인되었으며 각각 14%를 차지하고 있었다. 기타 주름개선과 항염 관련 기능성도 각각 12%, 10%를 차지하였다.



<그림 6> 구간별 출원 현황

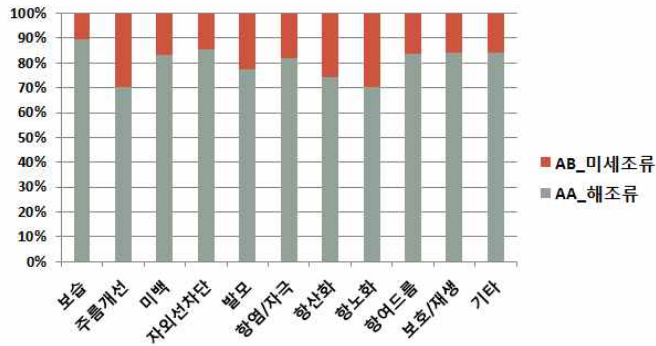
- 연도별, 구간별 출원 현황을 살펴보면, 출원이 증가하기 시작한 1990년대에는 항산화 관련 기능성을 확인한 특허가 다수를 차지하고 있다. 물질의 항산화 효과는 확인이 용이하기 때문에 거의 모든 천연물 연구에서 초기에 활성 확인이 이루어졌다.

- 그 후 항염, 보습 관련 기술이 발달하였는데 해조류의 경우 보습에 대하여 일반적으로 좋은 인식이 있기 때문에 초기 개발이 이루어진 것으로 보인다.
- 2000년대에는 여러 검증기법의 발달과 천연물을 이용한 기술의 발달이 이루어진 시기로 본격적인 연구가 이루어지면서 미백 및 항노화 기능성의 발달이 두드러지고 있다. 특히 미백의 경우 해당시가 기술 개발이 활발하였던 일본 화장품 업계의 주요 관심사였기 때문에 활발한 기술 개발이 이루어진 것으로 추정된다.
- 2000년대 중후반 이후에는 피부보호/재생 관련 특허의 비율이 다시 늘어나고 있으며 항산화, 항염 등의 기술 개발도 다시 증가하는 양상을 보인다. 이는 해당 시기에 자원발굴 경쟁이 증가하고 미세조류 또는 해조류의 청정에너지 생산 가능성 발견 등에 따른 여러 기술이 발달되면서 신규한 미세조류나 해조류의 기초 기능성 연구가 다시 증가하였기 때문으로 판단된다.
- 2010년 이후 기능성은 다양한 분야에서 다양하게 이루어지고 있으며 다시 보습 관련 기능성도 증가하고 있다. 2010이후의 기술 개발 양상은 한국 및 중국의 개발 양상에 따른 것이다.



<그림 7> 중분류별 소분류 비율

- 중분류의 소분류 점유율을 살펴보면, 해조류(AA)의 경우 보습, 미백, 항노화, 주름개선의 순으로 연구가 활발하게 진행되었고, 미세조류(AB)의 경우에는 항노화, 주름개선, 미백, 항산화 활성의 순으로 기술개발이 이루어졌다.



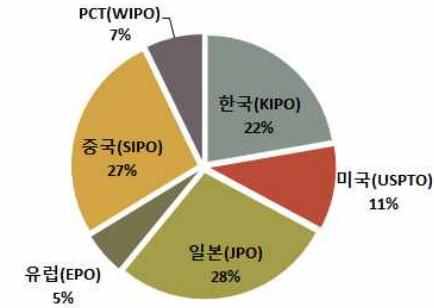
<그림 8> 소분류별 중분류 비율

- 소분류별 중분류 비율을 살펴보면, 항노화, 주름개선 및 항산화의 미세조류 연구 비율이 높게 나타났다. 미세조류의 경우 신규 중의 인체적용 기능성 탐색이 가장 초기에 이루어지는 항산화 활성에 대한 연구도 다수 이루어짐에 따라, 신규 중을 이용한 기술 개발이 이루어진 것으로 판단할 수 있다.

제3절 국가별 특허 동향 분석

1. 주요시장국 기술개발 현황

미세조류 및 해조류의 기능성 화장품(피부외용제) 관련 기술의 특허 출원은 1990년대 중반 이후 지속적으로 증가하는 양상을 나타내고 있다. 특히 2000년대 후반 약간의 정체기가 있었으나 2010년 이후 다시 급격한 증가 양상을 나타내고 있는데 일반적으로, 천연물의 추출물을 이용한 피부외용제(화장료) 기술은 2000년대 이후 일본의 출원 감소, 중국의 급격한 출원 증가, 한국의 완만한 출원 양상 등에 의하여 2000년대 초중반 이후 완만한 성장세를 나타내고 있다. 그러나 본 기술 분야의 경우 최근까지 지속적인 성장세를 나타내고 있음이 확인되었다.



<그림 9> 국가별 출원비율

- 국가별 출원 비율을 살펴보면, 일본이 28%, 중국이 27%, 한국이 22%를 차지하고 있으며 미국이 11%, 유럽이 5%, PCT 출원이 7%를 차지하고 있다

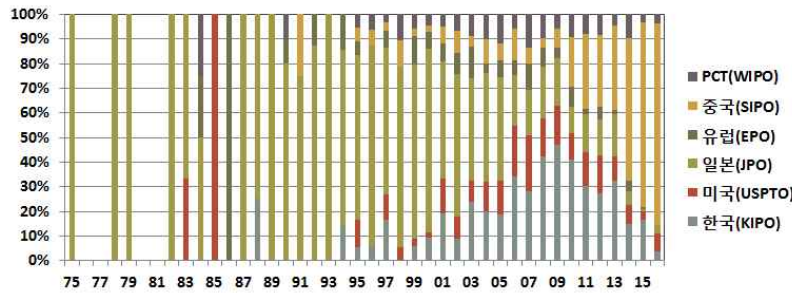
- 일반적으로 추출물을 이용한 기술 분야의 국가별 출원 비율 중 중국의 출원 비율이 현저하게 높은 편이나 본 기술 분야는 아직 중국의 진출이 활발하지 않은 것으로 보인다. 중국의 전반적인 과학기술 분야 특허 출원은 2000년도에 들어서 증가하는 경향을 보이는데 이는 중국 과학 기술의 전반적인 발달에서 기인한 것일 뿐 아니라 중국 정부 차원에서 지적재산권을 국가 발전의 전략자원과 국가 경쟁력 핵심요소로 인식함에 따라 2004년 국가지적재산권 전략을 제정하고 2007년 후진타오 총서기에 의한 국가지적재산권 전략 실시를 명확하게 한데 기인하여 이루어진 것이다. 특히 전통적으로 중국에서 사용해온 천연물을 여러 조합으로 혼합하여 다량의 건강기능식품, 의약품, 화장품 등에 대한 출원을 수행하고 있다.

- 그러나 본 과제 기술 분야인 미세조류 및 해조류는 전통적으로 활발하게 사용해온 물질이 아니기 때문에 기술의 발달이 2010년 이후부터, 타 천연물 기술 분야에 비하여 비교적 천천히 이루어지고 있는 것으로 판단된다.

- 천연물을 이용한 기술의 개발은 한국, 일본 및 중국에서 활발한 경향을 나타내며 일본의 경우 1990년대 후반에서 2000년대 초반까지 화장품 기술분야에서 두각을 나타내었다. 본 과제 기술분야인 미세조류 및 해조류의 기능성 피부외용제 기술에서도 일본은 1990년대 후반에서 2000년대 초반까지 출원이 다수 이루어졌으나 그 이후 감소하는 추세를 나타내었다. 그러나 2010년 이후 다시 증가하는 양상을 나타내고 있기 때문에 향후 모니터링이 요구된다.

- 미국 및 유럽의 본 기술 분야 특허 출원은 2000년대 이후 지속적인 출원이 이루어지고 있으나 기술의 출원 비율이 한국, 일본 및 중국에 비하여 낮기 때문에 전반적인 기술 개발을 주도하고 있지 못한 것으로 판단된다.

- 한국, 미국, 일본, 유럽, 중국 및 국제특허의 출원 비율을 연도별로 살펴보면, 2000년대 초반까지 일본의 출원 비율이 높았으며 이후 2000년대 후반 한국의 출원 비율이 높았다가 현재는 중국의 출원 비율이 매우 높은 것으로 나타난다. 일반적으로 중국은 천연물을 여러 가지 혼합하여 사용하는 경우가 많기 때문에 특허의 권리범위가 좁고 원천성이 낮은 경향을 나타낸다. 본 기술 분야의 경우에도 혼합하여 사용한 경우가 많기 때문에 중국 특허의 비율은 높으나 원천성은 낮은 것으로 보인다.



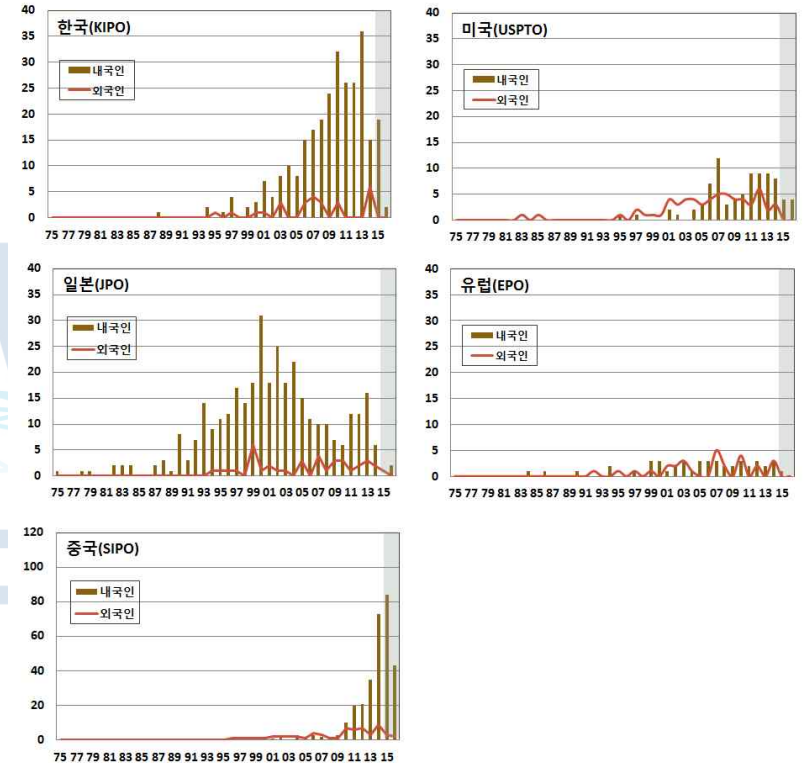
<그림 10> 국가별 연도별 출원비율

2. 주요시장국내 외국인 특허 출원 현황

주요시장국의 내외국인 출원 동향은 해외 출원인에게 시장이 얼마나 매력적인지, 또는 자국의 기술이 얼마나 발달하였는가를 알려주는 지표로 활용될 수 있는데 자국이 기술이 발달하였다면 자국 출원인에 의한 출원이 다수를 차지하겠지만, 반면 해외 출원인의 진입이 적은 것으로도 해석될 수 있다.

- 일반적인 기술의 경우, 외국인의 출원 비율은 15% 전후를 나타내는 것으로 보는데 본 기술 분야에서 한국은 내국인 출원 비율이 92%로 높은 편이며 일본도 내국인 출원 비율이 90%를 차지하고 있다. 그러나 미국 및 유럽의 특허 출원은 내국인 비율이 약 60% 전후를 차지하고 있는데 이는 미국 및 유럽의 경우 시장의 크기가 크기 때문에 해외의 시장 진입이 활발한 것으로 파악될 수 있다.

- 또한 개별국으로 진입하기 전에 출원하는 국제출원(PCT)의 경우, 미국 및 프랑스의 비율이 매우 높은 것을 알 수 있다. 원천성이 높은 기술이나 해외 시장에서도 시장성(상업성)이 높은 기술의 경우 고비용의 국제특허 출원이 이루어지게 되는데 미국과 프랑스의 경우 전체적인 특허의 출원 비율은 높지 않으나, 중요한 특허 출원 비율은 높은 것으로 나타났다.



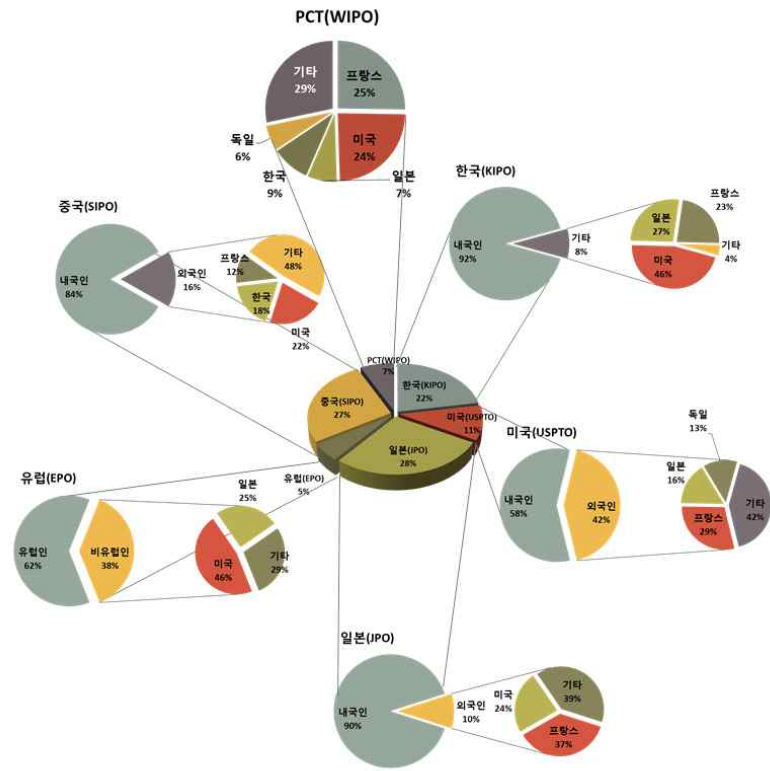
<그림 11> 내외국인 연도별 출원동향

- 한국에는 미국 및 일본의 출원 비율이 높았음. 일본의 경우 타 국가보다 인접한 한국에 대한 특허 출원이 활발하게 이루어졌다. 일본 국적인에 의한 특허 출원은 2000대 초반에 활발하게 나타났다.

- 중국의 경우 시장의 크기가 크기 때문에 시장에 제품을 내놓기 위한 외국인의 출원 비율이 한국보다 높은 것으로 파악된다. 또한 중국은 특허권 보호 의식이 낮은 편이었으며 자국기업 보호 경향으로 인해 외국 기업의 특허권 행사가 어려운 편이었으나 2010년 이후 특

히 소송이 급격하게 증가하고 있으며 특허권자의 승소율이 높은 편이므로 해외 기업의 중국내 출원 비율도 높아졌다.

- 본 기술분야에서 중국에 출원한 주요 외국인의 비율은 미국, 한국 및 프랑스의 순으로 높았는데, 화장품/피부외용제 중국시장에서 한국제품의 비율이 높기 때문에 이에 따라 한국 특허의 중국 출원 비율도 높은 것으로 보인다.



<그림 12> 내외국인 출원현황

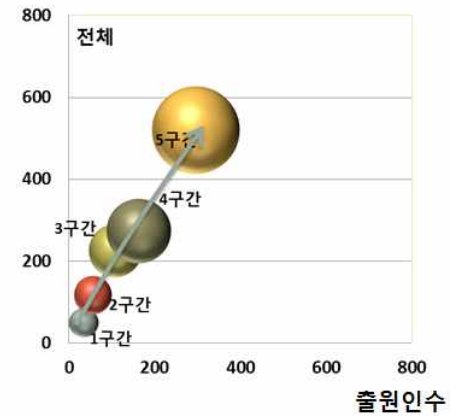
3. 기술시장 성장 단계 파악

국가별 특허의 출원건수와 출원인을 기준으로 한 본 기술분야의 기술성장단계를 파악하였다.

기술시장 성장단계는 보통 신기술이 출현하고 특허수와 출원인수가 적은 태동 단계, 특허 출원 건수와 출원인수가 함께 빠르게 증가하는 성장단계, 기술이 특허 출원건수는 정체하고 경쟁력 있는 출원인들 위주로 출원이 이루어져 출원인수가 정체 또는 감소하는 성숙단계, 특허 및 출원인수가 감소하는 쇠퇴단계가 있다. 필요에 의해서 기존 기술에 새로운 기술이 도입되거나 전체 기술 분야 중 특정 기술이 재평가 받아 발전하게 되는 경우 다시 특허 출원과 출원인수가 증가하는 회복 단계로 나뉠 수 있다.



출원건수

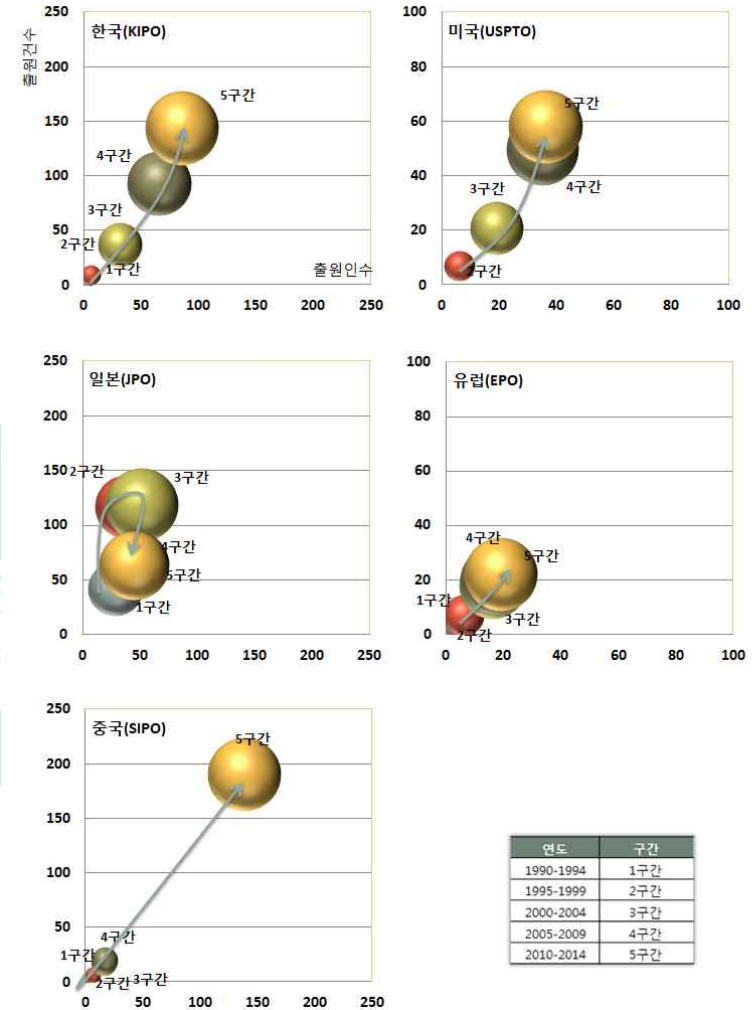


<그림 13> 기술시장 성장단계

- 해당 그래프는 본 분석대상인 미세조류 및 해조류의 기능성(피부외용제, 화장품) 기술 전체 및 분석 대상 국가(한국, 미국, 일본, 유럽 및 중국) 전체의 기술 위치를 포트폴리오로 나타낸 것으로 최근의 출원 동향을 5개의 구간으로 나누어 각각의 구간별 특허 출원인 수 및 출원 건수를 나타내어 특허 출원 동향을 통한 기술의 위치를 살펴볼 수 있다. 각 구간

은 1구간(1990년~1994년), 2구간(1995년~1999년), 3구간(2000년~2004년), 4구간(2005년~2009년), 5구간(2010년~2014년)으로 나누었다.

- 본 과제 기술은 현재 출원인수와 출원건수가 모두 증가하는 성장기에 위치하고 있다. 특히 4구간(2005년~2009년)에서 5구간(2010년~2014년) 사이에 급격한 출원인수 및 출원건수 증가가 나타난다. 성숙기는 출원건수는 감소하거나 지속되는 가운데 출원인수가 감소된 것으로 주요 출원인에 의한 기술 점유가 일어나 시장에서 기술 개발 경쟁이 줄어들 경우가 관찰된다. 4구간(2005년~2009년)에서 5구간(2010년~2014년) 사이에 출원 증가보다 출원인수 증가가 적은 것으로 보아 향후 성숙기에 도달할 수 있으며 지속적인 모니터링이 요구된다.



<그림 14> 각 출원국가별 기술시장 성장단계

- 국가별 기술 성장 단계를 살펴보면, 한국의 특히 기술 위치는 1구간(1990년~1994년)에서 2구간(1995년~1999년)까지는 태동기, 2구간(1995년~1999년)에서 5구간(2010년~2014년)까지는 성장기를 나타내고 있다. 특히 3구간(2000년~2004년)에서 4구간(2005년~2009년)까지 활발한 증가세를 나타내었으며 현재 5구간(2010년~2014년)에서는 전체적인 증가세는 감소하고 있

으며 출원인수의 감소가 나타나고 있어 향후 성숙기로 진입할 가능성이 높아 보인다.

- 미국의 경우 3구간(2000년~2004년)에서 4구간(2005년~2009년)사이 급격한 성장과 함께 출원인 감소가 확인되었으며 5구간(2010년~2014년)에서 출원인수의 감소 및 출원 건수의 정체에 다다르고 있어, 성숙기로 진입하고 있는 것으로 판단된다. 미국에서 본 기술 분야는 점차 주요 출원인에 의한 점유가 나타나고 있으며, 이는 미세조류 및 해조류를 이용한 피부외용제/화장료 기술 뿐 아니라 에너지 분야를 비롯한 전반적인 미세조류 및 해조류 사용 기술의 발달과 맞물려 있는 것으로 판단된다. 미세조류의 기능성 분야 이외에 물질 추출, 배양, 활용, 회수, 반응기/ 기술 분야는 현재 한국, 미국, 유럽 및 중국에서 폭발적인 성장세를 나타내고 있는데 자본이 거대하고 상업성이 높은 에너지 분야 기업의 출원이 큰 비중을 차지하고 있다. 미국의 경우 해당 기술 분야에서 시장성 및 기술성이 높은 기술의 출원이 많은 편이다(국제특허 출원 비율 높음).

- 일본은 1구간(1990년~1994년) 내지 2구간(1995년~1999년)에서 성장을 나타내었으나 3구간(2000년~2004년)에서 4구간(2005년~2009년)사이 쇠퇴기를 나타내었다. 그러나 5구간(2010년~2014년)은 4구간(2005년~2009년)과 유사한 출원건수 및 출원비율을 나타내기 때문에 향후 지속적인 쇠퇴 또는 회복기로의 진입 여부는 모니터링을 통하여 확인할 수 있다.

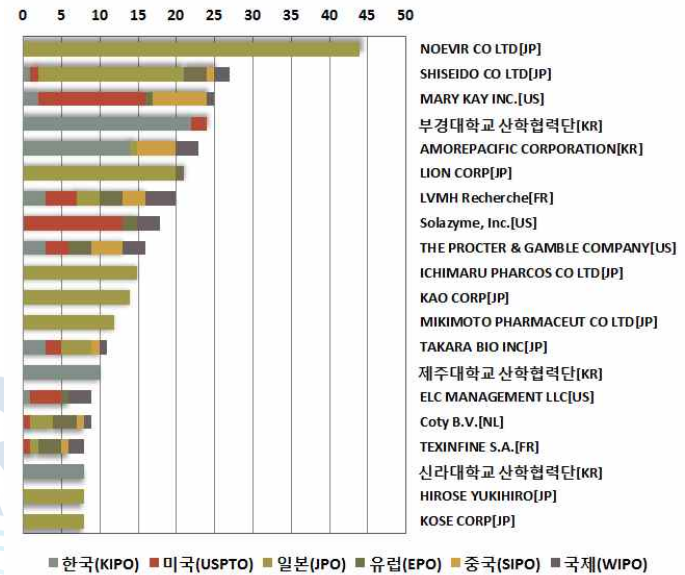
- 유럽의 경우 1구간(1990년~1994년) 내지 5구간(2010년~2014년)에서 지속적으로 출원 및 출원인이 증가하였으나 그 증가 비율이 높지 않고, 절대적인 출원건수가 적은 편이다.

- 중국은 1구간(1990년~1994년) 내지 4구간(2005년~2009년)에서 태동기를 나타내었으며 5구간(2010년~2014년)에서 급격한 출원인수 및 출원건수 증가를 나타내고 있어 현재 성장기이다. 중국은 현재 출원건수에서 차지하는 비율이 크기 때문에 전체적인 기술성장단계가 성장기에 위치하는데 큰 영향을 끼친다. 그러나 중국은 기업보다 개인의 출원 비율이 높은 편이고 특허에서 다수의 물질을 혼합하여 사용하는 등 기술의 성숙도가 낮은 편이기 때문에 향후 주요 출원인에 의한 시장 점유 및 이에 따른 성숙기 진입이 일어나지 않고 바로 쇠퇴기로 진입할 가능성이 있다.

4. 주요 경쟁국 현황

다출원 기준 주요 출원인을 나열하였으며, 주요 출원인의 특허 출원 대상 국가를 살펴보아 타겟 시장을 확인하였다.

주요출원인



<그림 15> 주요 출원인

- 일본의 NOEVIR CO LTD가 가장 많은 특허를 출원하였으며, 일본의 SHISEIDO CO LTD, 미국의 MARY KAY INC., 한국의 부경대학교 산학협력단, 한국의 AMOREPACIFIC CORPORATION, 일본의 LION CORP 등이 주요 출원인으로 확인되었다. 중국의 경우 전체 특허 출원에서 차지하는 비율은 높으나 대부분 개인출원에 의한 것이며, 여러 물질을 혼합하는 과정에서 미세조류 또는 해조류가 혼합한 단순 기술이 다수를 차지하기 때문에 뚜렷한 주요 출원인은 확인되지 않았다.

- 일본의 NOEVIR CO LTD는, 전체 매출에서 화장품이 차지하는 비율이 약 70%, 기타 의약품 및 건강기능식품이 차지하는 비율이 25% 정도인 기업으로 1964년 설립되었다. 주로 해조류를 이용한 미백 및 항노화 피부외용제 기술에 대한 출원을 수행하였다. 출원은 대부분 일본에서만 이루어졌으며 자국내 시장에 한정된 기업 활동을 하는 것으로 판단된다.

- 일본의 SHISEIDO CO LTD(시세이도)는 1972년 설립된 일본 화장품 생산 기업으로 스킨케어제품, 메이크업 제품, 기능성 화장품 등을 제조 판매하고 있다. 시세이도 그룹은 전세계 87개국에 진출해 110개의 지사와 약 2만 5천 개의 대리점을 가지고 있으며, 3만 2천

여 명의 직원을 보유하고 있다. 또한 일본 본사에 4곳을 포함해 아시아와 유럽, 미국 등에 11개의 R&D센터를 보유하고 있는 것으로 알려졌다. 2017년까지 매출 50% 이상을 해외 시장에서 올린다는 목표를 가지고 적극적인 해외 영업을 추진 중임. 매우 다양한 화장품 원료 관련 특허를 출원하고 있으며 미세조류 및 해조류의 출원도 다양하게 이루어지고 있음. 향노화, 미백 등에 대한 특허를 출원하였으며 일본이외에 한국, 미국, 유럽 및 중국에 특허를 출원하였다.

- MARY KAY INC(메리케이)는 미국 최대의 화장품 업체로, multi-level marketing/direct sales 판매 전략을 수행하고 있다. 1963년 설립되었으며 텍사스에 기반을 두고 있다. 화장품 및 자외선 차단제 등의 제품이 있으며 해외 진출을 시작한 초기(1997년)부터 중국 시장을 염두하여 현재 중국에 공장이 가동 중이다. 본 기술분야의 특허 출원 현황을 살펴보면, 자국인 미국 이외에 중국 출원 비율이 높은 것을 확인할 수 있다. 본 기술분야 중 주로 해조류를 이용한 향노화 관련 기술에 대한 특허를 출원하였다.

- 한국의 주요 출원인으로는 부경대학교 산학협력단, 제주대학교 산학협력단, 신라대학교 산학협력단이 확인되었다. 주요 출원인이 대부분 산학협력단으로, 아직 기업에 의한 진출은 활발하지 않은 것으로 보인다. 기업의 출원 및 기술 권리화는 제품화와 직접적으로 연결될 가능성이 높은 만큼 산학협력단에 의한 출원이 다수를 차지하는 현재의 상황은, 아직 시장의 경쟁이 활발하지 않은 것으로 이해될 수 있다. 이에 따라 시장 선점을 위한 기술 개발 및 상용화 노력이 시급하다.

5. 국내외 신규 시장 진입자

2012년에서 2016년 사이 새롭게 본 기술분야에서 특허 출원을 한 신규 시장 진입자 현황을 국가별로 아래의 표에 나타내었으며 이들은 향후 잠재적 경쟁자로 파악된다.

<표 4> 주요 IP시장국에서의 신규 시장 진입자(잠재적 경쟁자) ('11~'15)

한국(KIPO)		미국(USPTO)		일본(JPO)		유럽(EPO)		중국(SIPO)	
출원인명	건수	출원인명	건수	출원인명	건수	출원인명	건수	출원인명	건수
(주)아이투비	3	ELC MANAGEMENT LLC	4	TROPICAL TECHNOLOGY CENTER LTD,DAI ICHI KOGYO SEIYAKU CO LTD	3	AURORA ALGAE, INC.	1	DAOHE BIOTECHNOLOGY CO. LTD.	6
KIMBERLY- CLARK WORLDWIDE, INC.	3	Cappello; John V	2	KITAMI INSTITUTE OF TECHNOLOGY	2	BASF CORPORATION	1	QINGDAO HIFUN MARINE BIOLOGICAL TECHNOLOGY CO., LTD.	6
주식회사 바이오에프디 엔씨	3	I Commercial Marine Biology Institute, LLC	2	PANAC CO LTD	2	ELC MANAGEMENT LLC	1	YANG LILI	5
주식회사 파인바이오	3	부경대학교 산학협력단	2			EVONIK DEGUSSA GMBH	1	GONG CANFENG	4
(주)르에쓰	2					MARGNAT, Franck	1	PROYA COSMETICS CO., LTD.	4
김수경 서동구 차영주	2					MARY KAY INC.	1	QINGDAO MEDICAL PREVENTION DISINFECTION PROFESSIONAL TECHNOLOGY CENTER	4
장문식	2					MEDICAL BRANDS RESEARCH B.V.	1	SHANGHAI OCEAN UNIVERSITY	4
장진영	2					OURO FINO PARTICIPATIONS EMPRESARIAS S.A.	1	TAICANG ZHANGGEN MU BIOTECHNOLOGY CO., LTD.	4
재단법인 전남생물산업 진흥원	2					Pierre Fabre Dermo-Cosmetique	1	YU DINGDING	4
전라남도	2					SEDERMA	1		
주식회사 아미코스메틱	2					SENSIENT COSMETIC TECHNOLOGIES	1		

제4절 논문 동향

1. 분석대상 연구활동 현황

SCOPUS DB를 이용하여 미세조류 및 해조류의 피부외용, 화장품 관련 기능성에 대한 논문을 확보하였다.

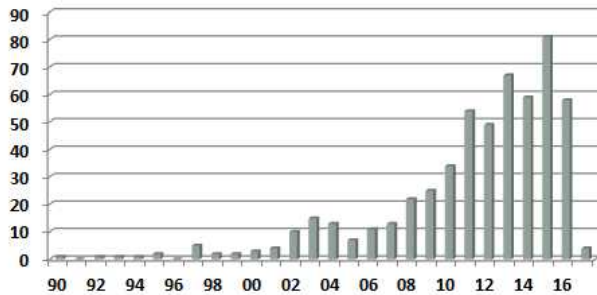
<표 5> 논문검색 DB 및 검색범위

자료 구분	국가	검색 DB	분석구간	검색범위
공개논문 (발표날짜 기준)	국내·외 논문	SCOPUS	~ 2017.01 현재	논문제목, 초록, 키워드

※ SCOPUS : 34,275개 저널을 보유하고 있으며, 이 중 SCIE급 저널이 8,159개로 전체 SCIE급 저널의 95%를 보유하고 있으며, SCI급 저널은 3,692개로 전체 SCI급 저널의 98%를 보유하고 있음

- 총 1,621건이 분석되었으며 담수조류 등의 노이즈 데이터를 제거한 뒤 확보한 유효논문은 총 545건이었다. 피부외용 또는 화장품과 관련한 연구 논문 발표는, 업적 유용가치가 높은 기술에 대하여 이루어지는 특허 출원보다 그 수가 매우 적은 양상을 나타내었다.

논문발표 동향



<그림 16> 연도별 연구동향

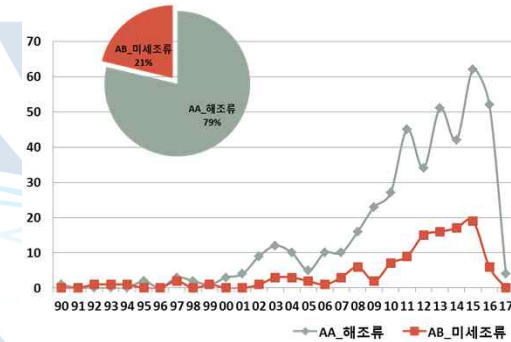
- 미세조류 및 해조류의 논문 발표를 통한 연구 동향을 살펴보면, 2000년대 초반 연구가 증가하는 양상을 나타내었다가 감소한 후 2000년대 후반 다시 증가하는 양상을 나타내고 있다. 2000년 이후에는 친환경 트렌드가 강화되고 미세조류 및 해조류의 활용도가 높아지면서 연구가 증가한 것으로 보인다. 초기에는 주로 배양 방법, 유용 물질 추출 방법에 대한 연구가 활발하게 진행되었으나 2000년도 후반에는 활용 방법과 연계된 연구가 활발히 진행

되는 경향을 나타내었다.

- 2000년대 후반 이후 지속적인 연구 증가 동향이 확인되고 있으며, 외적인 부분에 대한 관심 증가와 각국의 신규 생물자원에 대한 연구 경쟁이 심화되고 있기 때문에 본 기술분야에 대한 연구는 지속적인 증가세를 나타낼 것으로 추정된다.

- 본 연구 분야의 상세한 연구로는, 항염증, 상처치료/재생, 자외선 차단 등에 대한 내용이 확인되었으며 Fucoidan 등 해조류 또는 미세조류에서 분리한 성분에 대한 연구가 많은 편이다.

2. 해조류, 미세조류별 연구 현황



<그림 17> 연도별 중분류 동향

- 해조류에 대한 연구가 79%였으며 미세조류에 대한 연구가 21%를 차지하고 있다. 이는 특허 동향에서 해조류 관련 특허 출원의 비율이 80%, 미세조류 관련 특허 출원 비율이 20%인 것과 유사하며, 기술 분야 자체가 상업성과 연관이 높기 때문에 연구 비율과 특허 출원 비율이 유사한 것으로 판단된다.

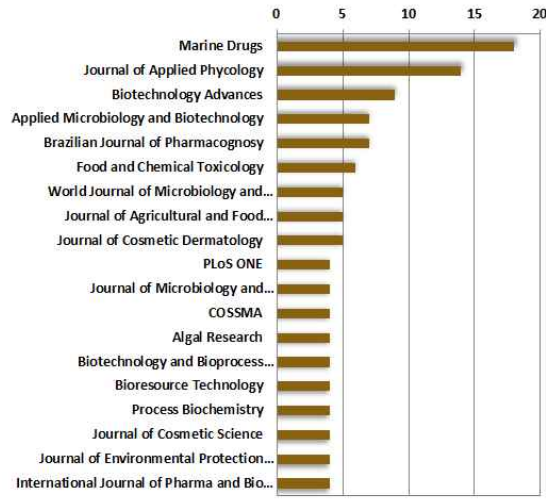
- 특히 해조류를 이용한 피부외용제/화장료 연구(AA)가 2000년대 초반 증가하였다가 감소하는 경향을 확연하게 드러내고 있으며 2000년대 중후반 이후 다시 증가하는 양상을 나타낸다. 미세조류 연구의 경우 2010년경부터 급격하게 발달하였다.

- 특허는 제품화 및 상용화를 위하여 유사 재료에 대한 다양한 권리범위를 설정하여 여러개를 출원할 수 있기 때문에 시장의 요구에 따라 출원 동향을 나타내지만, 연구 결과의 논문

출판은 학술적 가치의 발견을 요구하기 때문에 유사 재료의 연구 논문 출판에 한계가 있다. 이에 따라 신규 재료의 발굴이나 국가적 차원의 지원이 있는 경우 활발한 출판 동향을 나타내게 된다.

- 2010년 전후하여 해당 분야에 대한 연구의 필요성이 높아진 것으로 보이며 이에 따른 연구 증가 양상이 보였다. 특히 2010년 초반부터 미세조류에 대한 연구가 활발해진 것으로 보인다.

3. 주요 학술지 현황



<그림 18> 주요 학술지 현황

- 본 기술분야의 논문이 발행된 학술지를 살펴보면, Marine Drugs가 가장 다수를 차지하고 있으며, Journal of Applied Phycology, Biotechnology Advances, Applied Microbiology and Biotechnology 등이 있다.
- Marine Drugs는 2003년 발행되기 시작하였으며 SCIE 등급의 저널임. 2013년 impact factor 는 3.978로 확인되었으며, 해양 천연물질의 동정, 분리, 생물학적 활성 탐색 등 기초적인 분야에서부터 의학적 적용, 관련 임상 현황 등 활용분야에 대한 연구 논문을 발행하고 있다.
- Journal of Applied Phycology는 1989년부터 발행되었으며 impact factor 는 2.372임. 해양,

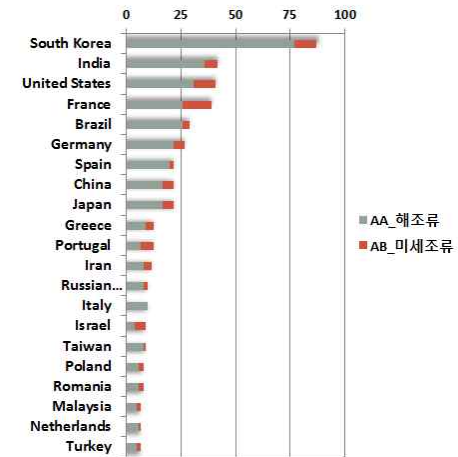
담수 또는 육상의 다양한 식물 관련 논문과 생태학, 식물 생리학등에 대한 연구 논문을 출판하고 있다.

- Biotechnology Advances는 리뷰 저널로, 매우 다양한 분야에 대한 연구 논문을 발행하고 있다. 기초생물학적인 연구에서부터 산업적용 가능한 기술, 농업기술, 의학기술, 환경에 대한 연구 내용까지 다양한 분야를 다루고 있다. 최근 5년간의 impact factor는 11.847점이다.
- 기타 본 기술 분야와 관련하여 여러 논문에 인용된 저널로는, Journal of Bioscience and Bioengineering, Trends in Biotechnology, Applied Microbiology and Biotechnology, Journal of Natural Products 등이 있다.

4. 해조류, 미세조류 경쟁자 조사

가. 국가별 학술연구 발표 현황

논문 저자의 소속 기관 국가의 정보를 이용하여 상위 20개 국가의 논문 발표 현황을 살펴본다.



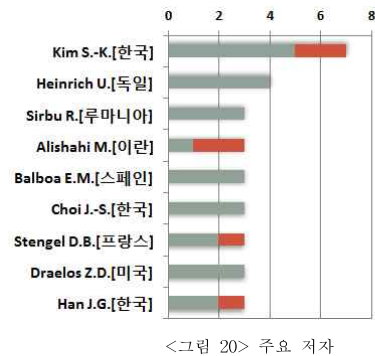
<그림 19> 국가별 논문 발표 순위

- 한국이 가장 다수를 차지한 것으로 나타났으며 그 다음으로 인도, 미국, 프랑스, 브라질, 독일 등의 연구가 확인되었다. 식생활 문화 중 해조류 및 미세조류, 특히 해조류에 대한 활

용도가 높았던 한국은 이에 대한 다양한 연구가 활발하게 진행된 것으로 보인다.

- 전통적으로 천연물 연구에 강세를 보였던 인도의 연구 비율도 높게 나타났으며 미국과 프랑스는 타 국가에 비하여 미세조류의 연구가 활발한 것으로 나타났다.
- 미세조류의 경우 선진국에서 에너지와 산업 소재 원료로 이용하기 위한 연구 및 기술개발이 활발하게 이루어지고 있다. 실제로 미국에서는 100여개가 넘는 미세조류 관련 기업 및 연구소가 있는 것으로 알려져 있다. 이에 따라 화장품 원료 분야에서도 미세조류의 연구 비율이 타 국가보다 높은 것으로 보인다.

나. 주요저자별 연구활동 현황



- 미세조류 및 해조류의 피부외용제/화장료 이용 연구의 주요 저자(첫저자) 현황을 살펴보면, 한국의 Kim S.-K., 독일의 Heinrich U., 루마니아의 Sirbu R., 이란의 Alishahi M., 스페인의 Balboa E.M. 등이 있다. 다양한 국가에서 연구를 수행한 것으로 나타났다.
- Marine Bioprocess Research Center, Pukyong National University의 Kim S.-K는 주로 해조류 또는 미세조류를 이용한 바이오에너지 생산을 위한 기반기술 및 고부가가치 기능성 소재화 기술에 대한 연구를 수행하였다.
- Heinrich U.는 독일의 Institut für Experimentelle Dermatologie Bzw. DermaTronnier, Universität Witten/Herdecke 소속으로, 해조류를 이용한 자외선 차단 기능 등 다양한 피부 관련 기능을 확인하였다.
- Sirbu R.는 루마니아의 Faculty of Pharmacy, Ovidius University 소속으로, 해양 생태계

에 대한 연구 및 해양에서 획득 가능한 고부가가치 원료에 대한 연구를 수행하고 있다.

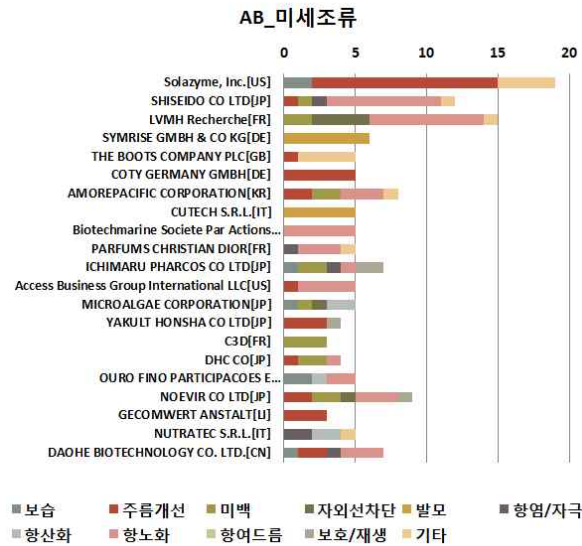
- 본 기술분야에서 연구 활동이 활발한 한국에서 주요 저자가 여럿 확인되었으며 RIS Center, Industry-Academic Cooperation Foundation, Silla University의 Choi J.-S., Department of Biomaterials Science and Engineering, Yonsei University의 Han J.G. 등이 있다.

제5절 극지 미세조류 산업화의 경쟁력

한국의 경우 항염/자극개선, 주름개선, 미백, 항노화의 순으로 연구가 활발하게 진행되었으며 미국의 경우 항노화, 주름개선 기술의 개발 비율이 높은 것을 알 수 있으며 서양의 경우 항노화나 주름개선에 대한 소비자의 욕구가 타 아시아 국가보다 높은 것으로 나타나고 있다. 동양권인 일본의 경우 미백, 보습, 항노화 기능성의 순으로 선호되고 있으며 중국의 경우 보습, 미백, 항노화의 순으로 기술개발이 이루어지고 있다.

해조류 및 미세조류의 소분류 연구 비율은 뚜렷하게 점유율이 높은 기술이 없는 것으로 나타났다. 이에 따라 다양한 해조류 및 미세조류의 기능성은 한곳에 편중되지 않은 것으로 보이며 눈에 띄는 강점은 타 천연물의 경우 피부외용제/화장료의 개발이 저조한 항여드름, 발모, 자외선 차단 기능성에 대한 연구도 다수 수행됨에 따라, 해조류 및 미세조류의 시장성이 매우 넓은 것을 확인하였다.

미세조류를 이용한 기술의 주요 출원인은 주름개선 기능성을 강조한 Solazyme, Inc.으로 확인되었으며 일본의 SHISEIDO CO LTD는 Scenedesmus, chlorella 등의 항노화 기능성, 프랑스의 LVMH Recherche는 Phaeodactylum 등의 항노화 및 자외선 차단 기능, 독일의 SYMRISE GMBH & CO KG는 Isochrysis sp 또는 Tetraselmis sp의 발모 기능성을 확인하였다. 영국의 THE BOOTS COMPANY PLC는 Haematococcus sp.를 이용한 전반적인 피부 개선에 대한 조성물 특허를 출원하였다.



<그림 21> 주요 출원인 기술개발 현황_미세조류

본 과제기술은 미세조류 및 해조류의 피부외용제/화장료 관련 기술로써, 미세조류 및 해조류의 피부외용제/화장료 관련 유효특허를 모두 선별한 후 내용확인 과정을 거쳐 피부재생/보호 관련 활성화와 식품의약품안전처에서 인정하는 기능성화장품 관련 활성화 등 11가지 주요 기능성으로 분류하여 특허동향 분석을 수행하였다.

본 과제기술분야의 전체 특허 출원은 1990년대 초중반 이후 지속적으로 증가하는 양상을 보이고 있으며, 2000년 전후반에는 일본의 출원이 두드러지며 2000년 중후반에는 한국의 특허 출원이, 현재는 중국의 활발하게 이루어지고 있다.

분석대상 주요 국가별 출원비율은 한국, 중국 및 일본이 22% 내지 28%로 나타났으며 이는 김, 미역, 우뚝가사리, 감태 등의 해조류가 전통적으로 이용되어 왔기 때문에 양식 또는 기술의 접근성이 높은 이유로 보인다. 또한 미국과 유럽에서는 미세조류와 해조류 중 해조류 연구 비율이 타 국가에 비하여 낮은 편이었다.

주요 출원인으로는 일본의 NOEVIR CO LTD, 일본의 SHISEIDO CO LTD, 미국의 MARY KAY INC., 한국의 부경대학교 산학협력단, 한국의 AMOREPACIFIC CORPORATION, 일본

의 LION CORP 등이 확인되었다. 출원 비율 중 다수를 차지하는 중국의 경우 전체 특허 출원에서 차지하는 비율은 높으나 대부분 개인출원인에 의하여 출원되었기 때문에 뚜렷한 주요 출원인은 확인되지 않았다.

해조류를 이용한 기술의 경우 전체 출원의 80%, 미세조류는 20%를 차지하였는데 해조류의 경우 특히 2010년 후반 이후 한국 및 중국에 의하여 주도되는 기술 개발이 두드러지는 것으로 나타났다. 미세조류의 경우 2000년대 초반 이후 완만한 출원 양상을 나타내고 있는데 주로 클로렐라와 스피룰리나 등 특정 미세조류 중에 한정된 관련 기술에 집중되고 있다.

소분류의 출원 동향을 살펴보면, 출원이 증가하기 시작한 1990년대에는 항산화 관련 기능성을 확인한 특허가 다수를 차지하고 있는데 물질의 항산화 효과가 확인이 용이하기 때문에 거의 모든 천연물 연구에서 초기에 활성 확인이 이루어지고 있다고 보면 된다. 그 후 항염, 보습 관련 기술이 발달하였는데 해조류의 경우 보습에도 일반적으로 좋은 인식이 있기 때문에 초기 개발이 다수 이루어진 것으로 보인다.

2000년대에는 여러 검증기법의 발달과 천연물을 이용한 기술의 발달이 이루어진 시기로 본격적인 연구가 이루어지면서 미백 및 항노화 기능성의 발달이 두드러지고 있으며 특히 미백에 관심이 많았던 일본 화장품 업계의 활발한 기술 개발이 이루어진 것으로 추정된다. 2000년대 중후반 이후에는 피부보호/재생 관련 특허의 비율이 다시 늘어나고 있으며 항산화, 항염 등의 기술 개발도 다시 증가하는 양상을 보이고 있다.

해조류의 경우 보습, 미백, 항노화, 주름개선 순으로 연구가 활발하게 진행되고 있는 반면 미세조류의 경우에는 항노화, 주름개선, 미백, 항산화 활성화 순으로 기술개발이 이루어졌다.

미세조류 기술분야의 주요 출원인은 관련 특허를 가장 많이 출원한 Solazyme, Inc.으로 확인되었고 주로 주름개선 활성으로 특허를 출원하였다. 또한 일본의 SHISEIDO CO LTD는 Scenedesmus, chlorella 등의 항노화 기능성, 프랑스의 LVMH Recherche는 Phaeodactylum 등의 항노화 및 자외선 차단 기능, 독일의 SYMRISE GMBH & CO KG는 Isochrysis sp 또는 Tetraselmis sp의 발모 기능성을, 영국의 THE BOOTS COMPANY PLC는 Haematococcus sp.를 이용한 전반적인 피부개선에 대한 조성물 특허를 출원한 것으로 조사되었다.

본 과제 관련 기술은 현재 출원인수와 출원건수가 모두 증가하는 성장기에 위치하고 있다고 보인다. 그러나 최근 특허 출원수 증가보다 출원인수 증가가 적은 경향을 나타냄에 따라 향

후 주요 출원인에 의한 기술 점유가 나타날 수 있으며 기술개발과 제품화를 통한 시장 선점이 중요한 시점이라고 판단된다.

제3장 연구수행 내용 및 결과

제1절 연구개발 수행 내용 및 결과

1. 극지미세조류 대량 배양 확보 기술 개발

(가) 세부연구목표1. CPS 대량 확보

1.1 CPS 생산 미세조류의 대량 확보

○ 극지 미세조류 유래 천연 세포보호 물질 (CPS)의 안정적 대량 확보 기술 개발 (>10⁶ cells/mL)

- 각 후보 미세조류들 KSF6, KSF31, KSF41, KSF59, KSF108, KSF213의 8, 12, 18, 20도 온도별 성장률을 측정하여 최적 온도와 배지를 결정하였다(그림 22, 표6).

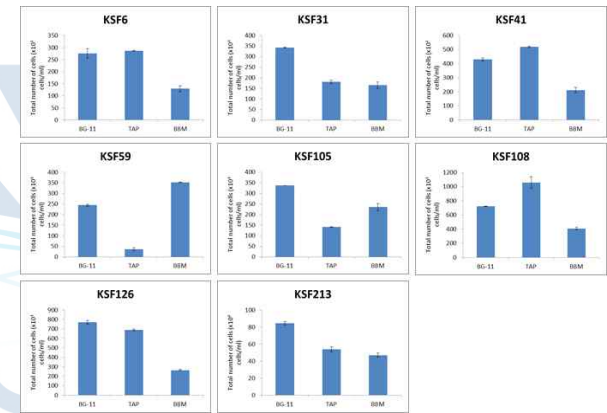


그림 22. 각 미세조류의 최적 배양배지 탐색

표 6. 남극 미세조류의 배양 최적배지와 온도

Antarctic microalga strain	Selected medium	Selected temperature
KSF0006	TAP	12℃
KSF0031	BG-11	12℃
KSF0041	TAP	8℃
KSF0059	BBM	4℃
KSF0105	BG-11	8℃
KSF0108	TAP	25℃
KSF0126	BG-11	12℃
KSF0213	BG-11	8℃

- 남극 미세조류 45 균주중 항암, 항염, 항주름 효능 스크리닝을 통해 추가 후보군들을 확보하였다.

- 협력업체인 비엠바이오(주)와 4개월에 걸쳐 온도, 빛, 배지 등 극지 미세조류 대량 배양조건을 set-up 한 결과 최종 400L당 약 30 ~ 50g/dw 생산에 성공하였다(그림 23).



그림 23. 비엠바이오 전경(오른쪽 위), 대량배양 전 seed culturing (오른쪽 아래), 각 400L 배양 tube 내에서 배양중인 미세조류 균주들

- 세포보호물질 생산을 위한 후보 극지미세조류인 KSF0031, KSF0105 세포주를 효율적으로 배양하기 위해 이전의 실험에서 온도와 배지를 결정하는 실험을 하였고, 선택된 배지의 조성을 달리하여 후보 균주의 배양에 최적화된 배지를 디자인하였다.
- 대량배양에 사용될 극지미세조류 KSF0031의 상온에서 성장가능성 및 온도범위를 추가적으로 조사하기 위해 12도, 18도, 22도, 27도의 온도조건으로 배양하였고, 그 결과는 뿐만 아니라 상온에서도 성장은 느리지만 지속적으로 성장하였다(그림 1).

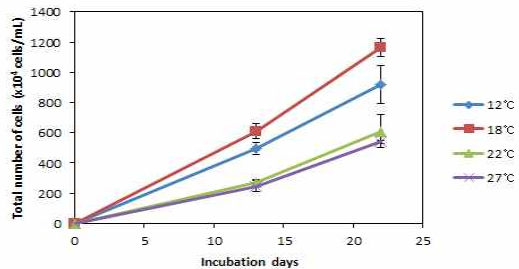


그림 24. KSF0031의 성장온도 실험

- 바이오매스 획득을 위해 KSF0031은 12~18도와 BG-11 배지, KSF0105은 8~12도와 BG-11 배지에서 생장이 가장 빠른 것으로 나타났고, 8도에서 BG-11배지의 성분을 최적화하는 실험을 진행하였다(표 7). BG-11의 9개의 주요구성성분 중 한가지씩 제거한

9개의 배지(pH 7±0.1)를 각각 만들어 두 균주를 접종하여 8도에서 2주간 배양하여 세포수를 측정하였다(그림 24).

표 7. KSF0031과 KSF0105 배양을 위한 BG-11 배지의 구성성분 elimination 실험

Component \ Medium No.	control	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1 NaNO ₃	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
2 K ₂ HPO ₄	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
3 MgSO ₄ ·7H ₂ O	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
4 CaCl ₂ ·2H ₂ O	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
5 Citric acid	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
6 Ammonium ferric citrate green	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
7 EDTANa ₂	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
8 Na ₂ CO ₃	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
9 Trace metal solution	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

표 8. KSF0031의 BG-11 배지구성성분 elimination 실험 결과

Variable	Component	Cells (x 10 ⁴ cells/mL)				평균	오차
		1차	2차	3차	4차		
X1	w/o NaNO ₃	1350	1600	1590	1350	1473	142
X2	w/o K ₂ HPO ₄	760	860	800	600	755	111
X3	w/o MgSO ₄ ·7H ₂ O	960	940	850	700	863	118
X4	w/o CaCl ₂ ·2H ₂ O	1040	1360	1800	1950	1538	416
X5	w/o Citric acid	1000	970	1600	1380	1238	305
X6	w/o AFCg	1170	1010	1650	1670	1375	336
X7	w/o EDTA·Na ₂	1300	1520	2170	1750	1685	372
X8	w/o Na ₂ CO ₃	1280	890	1500	1700	1343	347
X9	w/o Trace	1270	1450	1440	1580	1435	127
	All	1480	1410	2340	2100	1833	459

양하였고 세포수를 측정하였다(표 8, 표 9).

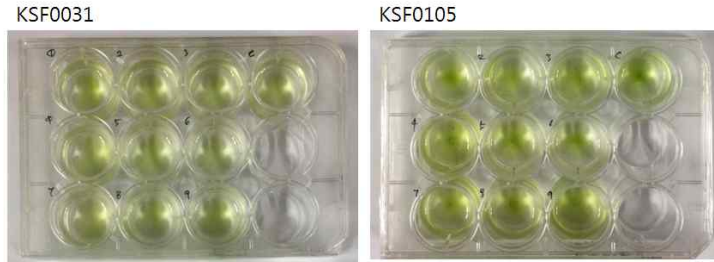


그림 25. BG-11성분을 달리한 배지에서 KSF0031과 KSF0105의 세포수 측정. 초기접종농도 KSF0031 1.2×10^6 cells/ml, KSF0105 3×10^6 cells/ml를 배양함.

- KSF0031의 배양 최적화를 위한 BG-11배지 elimination실험결과에서 배지구성성분중 Significant factor가 5개로 나타났고, 이는 K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, Citric acid, AFCg, Na_2CO_3 로 positive factor 였다. Non-significant factor는 $NaNO_3, CaCl_2 \cdot 2H_2O, EDTA \cdot Na_2, Trace$ 였다(표 8).

표 9. KSF0031의 BG-11 배지구성성분 elimination실험 통계분석결과

Variable	Component	-value (mM)	+value (mM)	Effect	T statistics	P value
X1	$NaNO_3$	0	17.6	360	1.69	0.102
X2	K_2HPO_4	0	0.23	1077.5	5.05	0.000
X3	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0	0.3	970	4.55	0.000
X4	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0	0.24	295	1.38	0.177
X5	Citric acid	0	0.031	595	2.79	0.009
X6	AFCg	0	0.021	457.5	2.14	0.040
X7	$EDTA \cdot Na_2$	0	0.0027	147.5	0.69	0.495
X8	Na_2CO_3	0	0.19	490	2.30	0.029
X9	Trace	0	0.058	397.5	1.86	0.072

- KSF0031의 BG-11배지 elimination실험을 통해 얻은 significant factor의 농도범위(기준 농도의 1/5배 (-), 1.1배 (0), 2배 (+))를 달리하여 배지를 제작하고 KSF0031을 배

표 10. KSF0031의 Plackett-Burman design (BG-11 stock 투입량)

RUN \ Component	$NaNO_3$	K_2HPO_4	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	Citric acid	AFCg	$EDTA \cdot Na_2$	Na_2CO_3	Trace	DW
1	100 μ l	200 μ l	20 μ l	100 μ l	20 μ l	200 μ l	100 μ l	20 μ l	10 μ l	9230 μ l
2	100 μ l	200 μ l	200 μ l	100 μ l	20 μ l	20 μ l	100 μ l	200 μ l	10 μ l	9050 μ l
3	100 μ l	200 μ l	200 μ l	100 μ l	200 μ l	20 μ l	100 μ l	20 μ l	10 μ l	9050 μ l
4	100 μ l	20 μ l	200 μ l	100 μ l	200 μ l	200 μ l	100 μ l	20 μ l	10 μ l	9050 μ l
5	100 μ l	200 μ l	20 μ l	100 μ l	200 μ l	200 μ l	100 μ l	200 μ l	10 μ l	8870 μ l
6	100 μ l	20 μ l	200 μ l	100 μ l	20 μ l	200 μ l	100 μ l	200 μ l	10 μ l	9050 μ l
7	100 μ l	20 μ l	20 μ l	100 μ l	200 μ l	20 μ l	100 μ l	200 μ l	10 μ l	9230 μ l
8	100 μ l	20 μ l	20 μ l	100 μ l	20 μ l	200 μ l	100 μ l	20 μ l	10 μ l	9410 μ l
9	100 μ l	110 μ l	110 μ l	100 μ l	110 μ l	110 μ l	100 μ l	110 μ l	10 μ l	9140 μ l

표 11. Plackett-Burman design for KSF0031 세포 농도 측정 결과

Run#	Description					Cells (x 10 ⁴ cells/mL)			평균	오차
	X2	X3	X5	X6	X8	1차	2차	3차		
1	+	-	-	+	-	1570	1560	1365	1498.3	66.7
2	+	+	-	-	+	2495	2040	1860	2131.7	189.0
3	+	+	+	-	-	2565	2400	1995	2320.0	169.3
4	-	+	+	+	-	1235	1025	1185	1148.3	63.3
5	+	-	+	+	+	1370	1275	1285	1310.0	30.1
6	-	+	-	+	+	1405	1335	1165	1301.7	71.3
7	-	-	+	-	+	1235	1360	1300	1298.3	36.1
8	-	-	-	-	-	1160	1410	1200	1256.7	77.5
9	0	0	0	0	0	2735	2500	2150	2461.7	170.0

- KSF0031의 BG-11배지를 Plackett-Burman design실험을 통해 얻은 significant factor는 positive effect를 나타낸 K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 와 negative effect를 나타낸 AFCg 성분이었다.

- KSF0031의 Plackett-Burman design 통계 분석 결과를 바탕으로 Box-Behnken design을 하였다. Positive effect factors: (+)는 BG-11 배지 기준농도의 2배, (-)는 (+)의 1/10 Negative effect factors: (+)는 BG-11 배지 기준농도, (-)는 (+)의 1/10 으로 하였다. 다른 factor (NaNO₃, CaCl₂·2H₂O, citric acid, EDTA·Na₂, Na₂CO₃,Trace)는 원래 농도로 투입하였다(표 12).

표 12. KSF0031 배지최적화를 위한 Box-Behnken design 의 significant factors의 농도 범위

No.	Name	농도범위 (mM)	비고
X2	K ₂ HPO ₄	0.046~0.46	기존 농도의 1/5배 (-), 1.1배 (0), 2배 (+)
X3	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.06~0.6	기존 농도의 1/5배 (-), 1.1배 (0), 2배 (+)
X6	AFCg	0.0021~0.021	기존 농도의 1/10배 (-), 0.55배 (0), 1배 (+)

- KSF0031의 Plackett-Burman design 통계 분석 결과를 바탕으로 1차 Box-Behnken design 실험 후 2차 배지를 설계하였다(표 13). Positive effect factors: (+)는 BG-11 배지 기준농도의 2배, (-)는 (+)의 1/10 Negative effect factors: (+)는 BG-11 배지 기준농도, (-)는 (+)의 1/10 으로 하였다(표 14). 다른 factor (NaNO₃, CaCl₂·2H₂O, citric acid, EDTA·Na₂, Na₂CO₃,Trace)는 원래 농도로 투입하였다(표 15). 설계된 배지에 KSF0031를 접종하고 2주후 세포수를 측정하고(표 16), 이를 기반으로 KSF0031배양을 위한 배지최적화를 완성하였다.

표 13. KSF0031 배지최적화를 위한 2차 Box-Behnken design (투입단위:µL)

RUN	NaNO ₃	K ₂ HPO ₄	MgSO ₄ .7H ₂ O	CaCl ₂ .2H ₂ O	Citric acid	AFCg	EDTA Na ₂	Na ₂ CO ₃	Trace metal solution	DW
1	100	20	20	100	100	55	100	100	10	9395
2	100	200	20	100	100	55	100	100	10	9215
3	100	20	200	100	100	55	100	100	10	9215
4	100	200	200	100	100	55	100	100	10	9035
5	100	20	110	100	100	10	100	100	10	9350
6	100	200	110	100	100	10	100	100	10	9170
7	100	20	110	100	100	100	100	100	10	9260
8	100	200	110	100	100	100	100	100	10	9080
9	100	110	20	100	100	10	100	100	10	9350
10	100	110	200	100	100	10	100	100	10	9170
11	100	110	20	100	100	100	100	100	10	9260
12	100	110	200	100	100	100	100	100	10	9080
13	100	110	110	100	100	55	100	100	10	9215
14	100	110	110	100	100	55	100	100	10	9215
15	100	110	110	100	100	55	100	100	10	9215

표 14. KSF0031 배지최적화를 위한 Box-Behnken design 의 significant factors

Run#	Description		
	X2	X3	X6
1	-	-	0
2	+	-	0
3	-	+	0
4	+	+	0
5	-	0	-
6	+	0	-
7	-	0	+
8	+	0	+
9	0	-	-
10	0	+	-
11	0	-	+
12	0	+	+
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

표 15. KSF0031 배지최적화를 위한 Box-Behnken design 의 significant factors의 농도 범위

No.	Name	농도범위 (mM)	비고
X2	K ₂ HPO ₄	0.046~0.46	기존 농도의 1/5배 (-), 1.1배 (0), 2배 (+)
X3	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.06~0.6	기존 농도의 1/5배 (-), 1.1배 (0), 2배 (+)
X6	AFCg	0.0021~0.021	기존 농도의 1/10배 (-), 0.55배 (0), 1배 (+)

표 16. 2차 Box-Behnken design을 통한 KSF0031 세포수 측정(단위: x10⁴ cell/mL)

	1차	2차	3차	평균	오차
1	1185.0	1130.0	875.0	1063.3	95.5
2	1115.0	1135.0	1280.0	1176.7	52.0
3	995.0	1145.0	1140.0	1093.3	49.2
4	1115.0	1710.0	1585.0	1470.0	181.1
5	960.0	1260.0	1130.0	1116.7	86.9
6	1575.0	1970.0	1980.0	1841.7	133.4
7	1165.0	1295.0	1060.0	1173.3	68.0
8	1115.0	1515.0	1820.0	1483.3	204.1
9	1170.0	1575.0	1490.0	1411.7	123.3
10	1655.0	2000.0	1855.0	1836.7	100.0
11	1240.0	1160.0	1305.0	1235.0	41.9
12	1630.0	1585.0	1530.0	1581.7	28.9
13	1270.0	1830.0	1800.0	1633.3	181.9
14	1190.0	1740.0	1545.0	1491.7	161.0
15	1245.0	1975.0	1525.0	1581.7	212.6

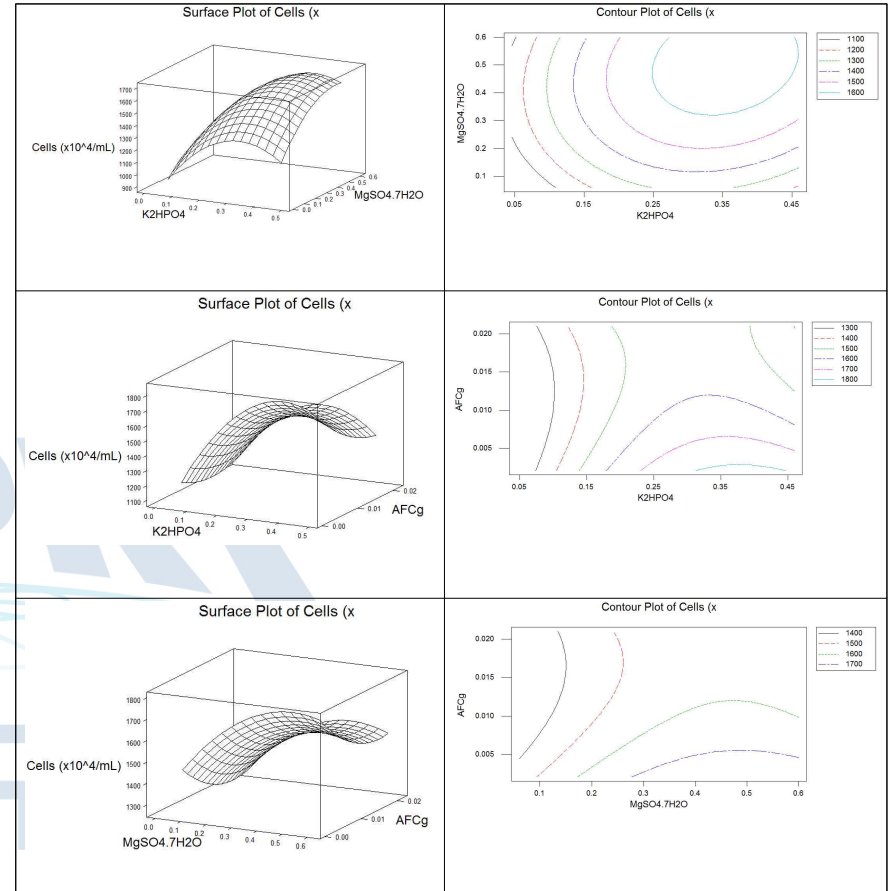


그림 26. 배지성분(MgSO₄·7H₂O, K₂HPO₄, AFCg)에 따른 three-dimensional response plot 분석

- 최적화 디자인을 통해 만들어진 modified BG-11배지 성분표를 완성하였다. K₂HPO₄의 함량이 0.23 mM에서 0.4 mM로 증가되었고 MgSO₄·7H₂O 성분 또한 0.3 mM에서 0.55 mM로 증가하였다. 반면에 AFCg의 경우 0.021 mM에서 0.0021 mM로 감소되었다(표 15). modified BG-11배지와 기존배지에 KSF0031를 접종하여 56일 동안 세포수의 변화를 측정함. 배양기간에 따라 최대 35% 향상된 세포수를 보였다(그림 27).

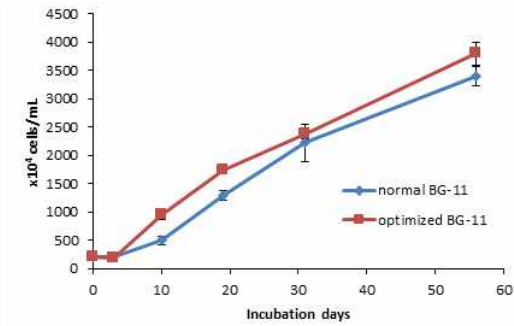


그림 27. 최적화된 BG-11배지와 기존배지에서 KSF0031의 성장 비교

표 17. KSF0031 배양을 위한 최적배지 성분표

Component	original BG-11(mM)	modified BG-11(mM)
NaNO ₃	17.6	17.6
K ₂ HPO ₄	0.23	0.4
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.3	0.55
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.24	0.24
Citric acid	0.031	0.031
AFCg	0.021	0.0021
EDTA·Na ₂	0.0027	0.0027
Na ₂ CO ₃	0.19	0.19
Trace	0.058	0.058

○ Lab scale 20리터 저온성 미세조류 배양기 제작

- 남극 미세조류 천연물질의 생리활성 연구와 고효성 분획물에 대한 신속한 공급을 위해 실험실에서 활용할 수 있는 소규모 배양장비를 구축하였다. Lab sized low temperature culture system을 고안하고 특허등록하였다(그림 28).

- 20리터 배양탱크는 폴리카보네이트 (polycarbonate)소재로 투명한 재질 사용, 너비 300 mm 이하, 높이는 530 mm 이하의 크기를 가지고 고온고압에 버티는 소재를 사용한 탱크, 유리재질의 병, 플라스크를 사용할 수 있도록 고안했으며 배양탱크 스크류 마개 부분에 공기주입구와 시료채취구, 압력배출구를 결합하였음. 공기주입구 라인에는 필터를 장착하여 공기공급기로부터 외부공기를 주입할 때 외부 미생물과 미세물질이 들어가는 것을 방지했다. 8개의 LED바를 미세조류 특성에 맞게 백색, 청색, 적색으로 장착할 수 있으며 광량을 늘리거나 줄이기 위해 장착된 LED바의 개수를 조절할 수 있다. 배양조건은 2도, 광량은 80 μmol photon m⁻²s⁻¹, 광주기는 16:8h light - dark cycle, 60RPM 교반, 공기공급 조건에서 0~80일 동안 가동하여 배양액 ml 당 1.05x10⁷(±50)의 세포수, 리터당 1.15g(±0.1)의 바이오매스를 확보하였다(그림 29).

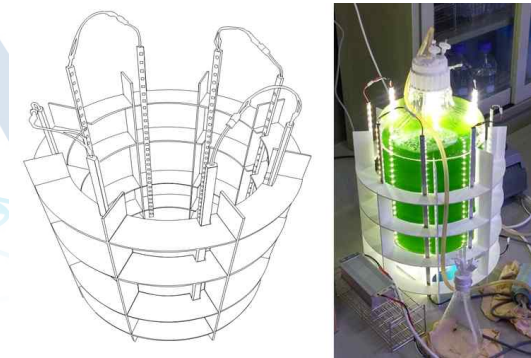


그림 28. 발명 고안된 미세조류 Lab scale 광배양기

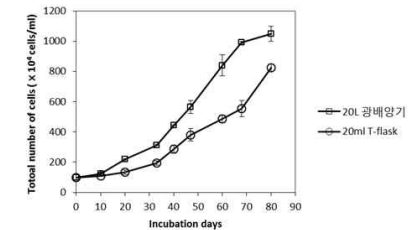


그림 29. 저온성 미세조류 배양기에서 저온성 미세조류 클라미도모나스(KNM0029C) 세포 성장 그래프

- 극지미세조류 대량배양을 위한 관형 광생물배양기(tubular photobioreactor)를 50리터 규모로 제작하여 약 23g의 KSF0031 바이오매스를 생산하였다. 소내 저온배양실 400리터급 광배양기와 함께 활용하여 전용 최적화배지제조 및 고효율광원을 개선하여 외주생산 대비 약 43%의 비용을 절감하였다(업체단가 100g당 240만원/극지연 135만원으로 절감).
- 비닐백형, 관형 광생물배양기를 이용한 극지미세조류의 톤 단위 대량배양부터 시간당 배양액 500리터 처리할 수 있는 연속식 원심분리기를 이용한 세포수확, 천연추출물의 농축 및 CPS분석까지 통합적 공정시스템 구축하였다. 극지연구소 기술지원실 협력으로 IoT 사물인터넷을 이용한 스마트 배양시스템 구축하여 미세조류 배양실 원격 모니터링/LED 제어시스템을 설비하였다. 지원동 미세조류 배양실의 LED조명, 온도 알람 컨트롤을 스마트폰 및 PC에서 외부제어 가능하도록 설비하였다(그림 30).

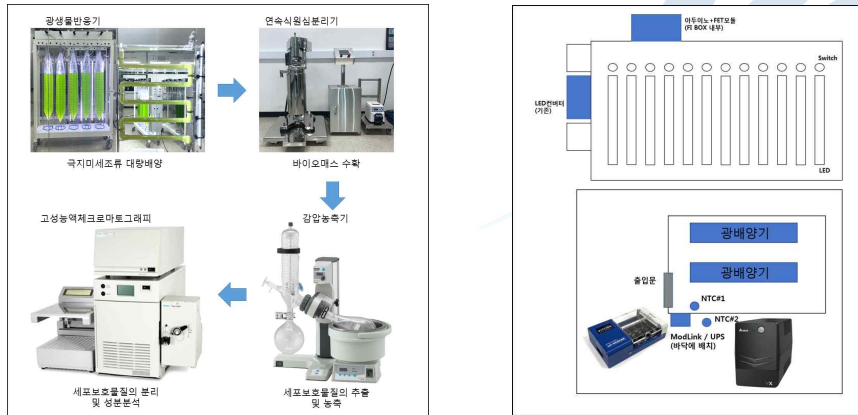


그림 30. 극지미세조류 유래 세포보호물질 생산공정과 IoT 스마트배양시스템 도식도

1.2 대량확보를 위한 제조합 발현 시스템 및 cell-line 구축

○ CPS1 제조합 단백질 합성 대량생산 수행

- 3' 말단부위에 히스티딘이 달려있는 CPS1 제조합 단백질을 대장균으로부터 발현시켜 sonication 후 상층액에 포함된 용해성 단백질 (soluble protein) 만을 얻어내어 히스티딘 레진을 사용하는 친화성 크로마토그래피 방법 (affinity chromatography) 을 통해 단백질을 정제하였다.
- 필요에 따라 20mM Tris-HCl 버퍼를 DPBS 버퍼로 바꾸어 줄 수 있으며 Amicon

사의 filter column을 사용하였다.

- 이들 단백질을 첨가해 제품화 했을 때 37℃에서 24시간동안 도포 시험을 통과해야 하므로 정제된 단백질의 온도 stability test를 실시하였다(그림 31).

	Control group (4℃, 24h 처리)			Experimental group (37℃, 24h 처리)		
처리 후, 육안 관찰						
좌측부터, - CnAFP isoform - CnAFP - CnAFP mut3				전반적으로 탁도가 증가하였으나, CnAFP isoform의 탁도가 눈에 띄게 증가		
Ice crystal의 형태로 보는 활성 변화	CnAFP isoform	CnAFP	CnAFP mut3	CnAFP isoform	CnAFP	CnAFP mut3
	Bursting growth	Bursting growth	Bursting growth	Gradual growth	Gradual growth	Gradual growth

그림 31. CPS1 정제 후 온도별 stability test와 항동결 활성변화 측정

- 37℃에서 24h 처리하는 경우에 세 종류의 AFP 모두 활성이 감소하는 것이 확인되었으며, control 대비 0~25% 수준까지 떨어지는 것이 관찰되었다.
- 특히, CPS1 isoform (ChAFP isoform)의 경우 protein aggregation이 눈에 띄게 관찰되는 것으로 보아 structure stability가 상대적으로 낮을 것으로 판단된다.

○ CPS2의 제조합 단백질 합성 cell-line 확보 및 대량생산 수행

- pET32a (+) 발현백터에 CPS2 유전자(NCBI accession number, KC707921)를 결합시켜 대장균에서 CPS2 단백질을 합성하는 단백질 발현백터 구축하였다(그림 6).
- 500 ml LB broth에 최종 1mM IPTG (isopropyl β-D-1 thiogalactopyranoside)를 첨가하여 형질전환된 pET32-CPS2 제조합 단백질 합성 후, 세포 초음파 파쇄 시 95% 이상의 용존 단백질 확보하였다. 3회 Ni-IDA (Ni-iminodiacetic acid) purification 수행하였고, 최종 단백질 정제 단계에서 각각의 튜브에 약 500 ul의 95% 이상의 정제도를 가진 최종 농도 5 mg/ml (in 1 ml)의 정제된 제조합 pET32-CPS2 단백질을 확보하였다.

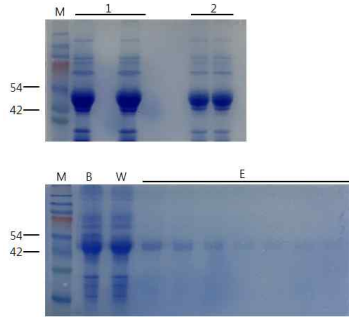


그림 32. pET32-CPS2 재조합 단백질의 발현 및 정제. (M, protein marker; 1, crude extracts; 2, soluble fractions after the sonication; B, binding flow-through in the purification steps; W, washing flow-through in the purification steps; E, continuous eluents (approximate 500 ul of each tube))

- 정제된 산물에 대하여 실온에서 1일간 방치 시, 단백질 용액의 탁도가 변화하지 않았고 비용존 물질 등이 생성되지 않아 안정적으로 실온에서 정제된 단백질 사용이 가능할 것으로 판단된다(그림 33).

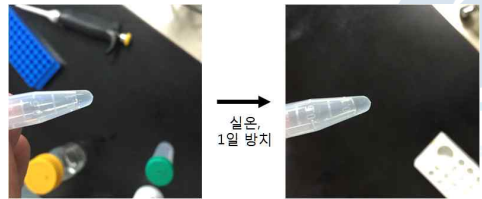


그림 33. 정제된 pET32-CPS2 단백질의 실온 안정성 검사 수행

- 정제된 pET32-CPS2 재조합 단백질의 버퍼 교환 및 안정적 물질형태 변환
 - 정제된 pET32a-CPS2 단백질이 용존되어 있는 버퍼 (20mM Tris, pH8.0)를 PBS (phosphate-buffered saline)로 치환시키기 위하여 centricon 사용하였다.
 - 1 ml의 정제된 단백질에 약 10 ml의 PBS 버퍼를 넣고 5500 rpm으로 원심분리하는 과정을 총 5회에 걸쳐 수행 후, 최종 1 ml의 PBS 버퍼기반 정제 단백질 획득하였다.
 - 약 16시간동안 동결건조 (Freeze-Dry)를 수행하여 버퍼에 용존된 정제 단백질을 안정적인 파우더 형태로 최종 5 mg으로 변환하였다(그림 34).

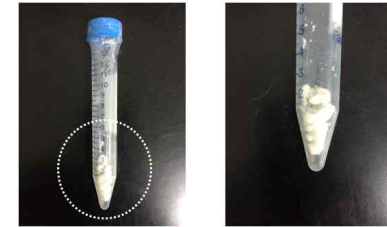


그림 34. 동결건조된 파우더 형태의 정제된 pET32-CPS2 단백질

- 100 ul의 PBS 버퍼에 동결건조된 정제 단백질의 일부를 용해시켜 단백질의 활성 측정 시, 약 0.4 ± 0.03 °C의 어는 점 강화활성이 측정되었으며, 6 방향의 눈꽃 모양의 얼음결정 형태(dendritic morphology)가 나타나는 것으로 관찰되어, 동결건조 단백질을 용해시켰을 경우에도 단백질 활성이 유지될 것으로 판단된다(그림 35).

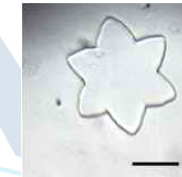


그림 35. 동결건조 후 PBS 버퍼에 용해된 정제 단백질의 정성적 활성 측정

○ 효모에서 CPS2 단백질 발현

- 진핵생물 단백질 발현시스템으로서 효모 *Pichia pastoris* (*P. pastoris*)를 선정하였고 세포 외부로 발현 단백질을 분비시키는 α -mating factor를 함께 발현시킴으로써 배지에서 CPS2를 수거할 수 있도록 pPICZaA 벡터에서 CPS2를 발현하였다.
- pPICZaA의 multiple cloning site에서 EcoRI와 XhoI 위치에 CPS2 유전자를 삽입 후 DH5a 대장균에 형질전환하여 CPS2 유전자 발현 플라스미드 제작하였다(그림 36).

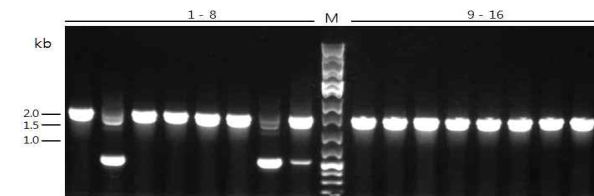


그림 36. pPICZaA 벡터에 포함된 AOX forward와 AOX reverse 프라이머를 사용한 DH5a에 형질전환된 발현벡터 내의 CPS2 유전자 포함 확인 실험 (M, DNA marker; 1- 16, DH5a transformants)

- pPICZaA-CPS2 플라스미드 CPS2 유전자 내에 염기서열 변이가 없음을 확인하였다.

- *P. pastoris* 숙주세포인 X-33을 최종 500 ml YPD 배지에 30℃에서 배양한 후, 0℃의 증류수로 2회 세척. 원심분리된 세포에 1 ml의 1M sorbitol을 넣어 혼합한 후, 이를 형질전환용 숙주세포로 사용하였다. SacI 제한효소로 절단된 pPICZαA-CPS2 플라스미드 10 ug을 형질전환용 숙주세포에 넣은 후, 전기천공법 (electroporation)을 사용하여 숙주세포에 삽입하였다. 항생제인 Zeocin이 첨가된 YPD 고체배지에 도말한 후 2-3일 후 콜로니 형성 확인하였다.
- 형성된 콜로니 내 pPICZαA-CPS2의 X-33 삽입여부를 확인하기 위하여 AOX forward-AOX reverse 프라이머를 사용하여 PCR 수행하였다(그림 37).

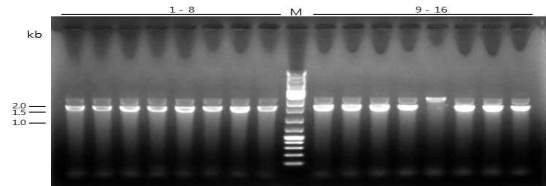


그림 37. pPICZαA 벡터에 포함된 AOX forward와 AOX reverse 프라이머를 사용한 X-33에 형질전환된 발현벡터 내의 CPS2 유전자 포함 확인 실험 (M, DNA marker; 1- 16, X-33 transformants)

- 정상적으로 pPICZαA-CPS2가 삽입된 transformant를 대상으로 단백질 발현 수행. BMGY (Buffered Glycerol-complex Medium)에 transformant를 접종하여 1일간 배양한 후, 배양된 세포들을 원심분리하여 회수하였다. BMMY (Buffered Methanol-complex Medium)에 회수된 세포를 부유시킨 후 24시간 마다 최종 5%의 methanol을 주입하여 지속적으로 단백질 발현 유도하였다.
- 48시간 동안 단백질 발현을 유도한 후, 세포 내외의 분획으로 나누어 단백질 발현 확인 결과, 세포 외부로 분비되는 CPS2 발현단백질이 탐지되지 않았다. 시간 별 세포내 단백질은 42 kDa과 75 kDa 부근에서 강한 발현 단백질 패턴이 확인되었다 (그림 38).

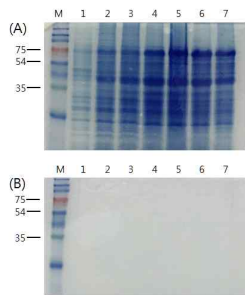


그림 38 pPICZαA-CPS2 발현 테스트 ((A) crude extracts; (B) culture media; M, protein marker; 1, negative control; 2, 6 hr induction; 3, 12 hr induction; 4, 18h induction; 5, 24 hr induction; 6, 36 hr induction; 48 hr induction)

- 48시간 발현시킨 세포를 초음파 파쇄 후 세포 내 단백질의 패턴을 분석한 결과, 약 42 kDa과 70 kDa에서 강한 단백질 밴드가 확인됨. His-tag primary antibody를 사용한 Western blot 분석을 통한 정확한 CPS2의 발현 단백질을 검증한 결과 70 kDa 크기의 단백질에서 밴드가 탐지되었다. CPS2 단백질의 크기가 약 35 kDa인 점을 감안할 때, CPS2는 *P. pastoris*에서 dimer를 형성하는 것으로 판단된다(그림 39).

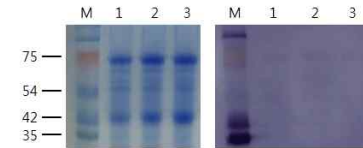


그림 39. *P. pastoris*에서 발현된 CPS2의 탐지 ((Left figure) Coomassie bands of three lanes from soluble fractions after the sonication; (Right figure) Western blot bands of three lanes from soluble fractions after the sonication; M, protein marker)

- GRAS (Generally Regarded As Safe) 생물 기반 CPS2 단백질 발현
 - pBE-S 벡터 (Takara)에 CPS2 유전자를 연결하여 대장균 DH5α에 형질전환시켜 GRAS 생물인 *Bacillus subtilis*에서 CPS2 단백질을 생산하였다(그림 40).

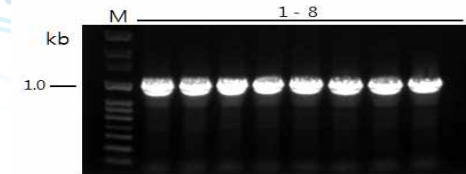


그림 40. pBE-S와 연결된 CPS2 유전자 확인 (M, DNA marker; 1-8, DH5α transformants)

- 173개의 서로 다른 signal peptide library와 pBE-S-CPS2 발현 플라스미드를 연결시키기 위해 플라스미드를 MluI 및 Eco52I 제한효소를 사용하여 절단한 후 signal peptide library mixture 및 HD In-Fusion enzyme (Takara)를 사용하여 서로 다른 signal peptide를 가진 pBE-S-CPS2 발현 플라스미드를 구축하였다.
- 상기 구축된 library를 DH5α에 형질전환한 후 각각 콜로니의 염기서열을 분석한 결과 총 70개의 다른 종류의 signal peptide가 결합된 발현 플라스미드 확보하였다.
- 각각의 pBE-S-CPS2 플라스미드를 *B. subtilis* 균주 RIK1285에 형질전환 수행하였다. RIK1295 균주를 LB broth에 접종하여 37℃에서 1일 종일 배양하였다. 200 ul의 균주를 5 ml의 SP1 medium (SP1 salt + 50% Glucose + Casamino acids/Yeast extracts)에 접종하여 5.5 시간동안 37℃, 180 rpm 으로 배양하였다. 1 ml의 배양된 균주를 4 ml의 SP2 medium (SP1 medium + 50 mM CaCl₂ + 250 mM MgCl₂)에

접종한 후 1.5 시간동안 37°C, 130 rpm 으로 배양함. 50 ul의 100 mM EGTA를 넣은 후 10분간 37°C, 130 rpm 으로 배양하여 형질전환용 RIK1285를 제작하였다. 각각의 발현 플라스미드를 위하여 300 ul씩 형질전환용 RIK1285를 분주한 후 1 ug의 발현 플라스미드를 도입하였다. 45 분간 37°C, 130 rpm 으로 배양한 후 300 ul의 LB broth를 첨가한 후 1 시간 추가 배양하였다. 원심분리하여 배양된 세포들을 수확한 후 100 ul의 LB broth로 부유시킨 후 항생제가 첨가된 LB agar plate에 도말하였다.

- 형성된 *B. subtilis* transformants를 항생제가 도입된 10 ml LB broth에 접종한 후 1일간 37°C, 180 rpm 으로 배양하였다. 6000 rpm으로 20분간 원심분리 후 배양배지 내로 분비된 발현 단백질의 존재 유무와 발현량을 Western blot 분석으로 탐지하였다(그림 41).

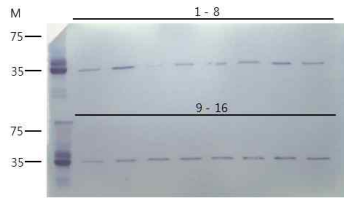


그림 41. signal peptide가 연결된 pBE-S-CPS2 단백질 발현 (RIK1285 transformants)

- 그림 16의 2번 transformant를 대상으로 단백질 확보량을 증가시키기 위해 1 L LB broth에 2일, 3일간 37°C, 150 rpm으로 연속 배양 후, 20 ul를 전기영동하여 단백질 발현량 확인 결과, Western blot image 상에서 강한 단백질 밴드가 확인되었다(그림 42).

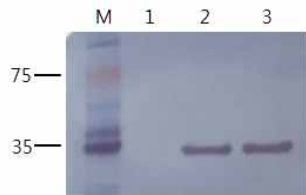


그림 42. 02번 signal peptide가 연결된 pBE-S-CPS2 단백질 (yybN-CPS2)의 1L에서의 발현 (M, protein marker; 1, negative control (vector only); 2, 2 day incubation; 3, 3 day incubation)

- 상기 발현 단백질을 농축하지 않은 상태에서 단백질의 열적안정 현상을 나노리터-오스모미터 (nanoliter-osmometer)를 사용하여 정량적으로 분석한 결과 -3.43°C에서 녹는점이 형성되었고, -3.80°C 부근에서 얼음결정이 성장하기 시작하였다. 본 단백질이 발현된 배양배지를 농축한 후 PBS 등 생리버퍼로 버퍼 교환 수행시 어는 점 강하활성이 증가될 것으로 판단된다(그림 43).

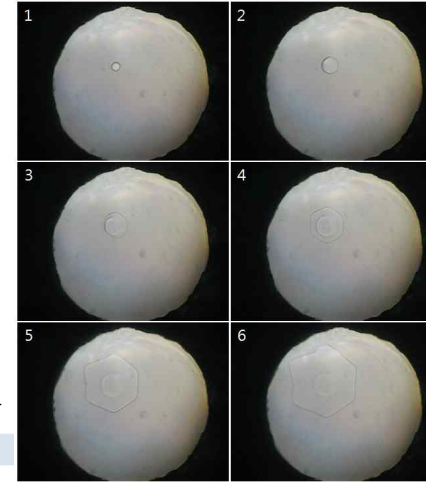


그림 43. 미농축 yybN-CPS2 단백질의 단일 얼음결정 형성 과정 (M, protein marker; 1, negative control (vector only); 2, 2 day incubation; 3, 3 day incubation)

○ GRAS 발현 시스템 및 cell-line 구축

- GRAS 균주인 *Bacillus subtilis* 기반의 CPS 발현 균주를 제작하기 위해, 활성과 안정성이 개량된 CPS1m 단백질을 인코딩하는 insert를 확보하였고, *B. subtilis*에서 발현하고 단백질을 분비하는 vector로 pHT43을 사용하였다(그림 44).

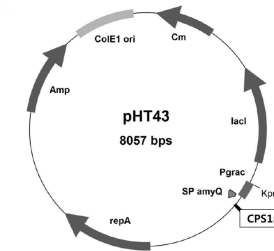


그림 44. *B. subtilis* 에서 CPS1m을 발현하는 plasmid

- pColdI vector 에 삽입된 CPS1m insert 부위를 XbaI 과 SmaI의 효소절단부위가 포함되도록 PCR반응하여 증폭하였음. 얻어진 insert 와 pHT43 vector를 두 효소로 처리하여 접합부위를 만들고, ligation하여 E.coli DH5a 균주에 형질전환하여 pHT43_CPS1m 을 발현하는 E.coli DH5a 균주를 제작하였고, colony PCR을 통해 insert를 확인하였다 (그림 45)

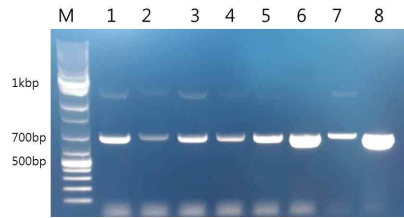


그림 45. pHT43_CPS1m을 발현하는 DH5a 균주의 colony PCR

- pHT43_CPS1m을 발현하는 DH5a 균주 7,8을 sequencing하였고, 8번 균주의 insert sequence가 염기서열 변이없이 제작되었음을 확인하였다(그림 46).



그림 46. pHT43_CPS1m을 발현하는 *E.coli* DH5a 균주의 sequencing 결과

- pHT43_CPS1m을 발현하는 *E.coli* DH5a 균주로부터 plasmid를 확보하였다. *B. subtilis* 균주인 WB800N를 40 ml LB(+sorbitol) 배지에 37°C에서 배양한 후, 0도에 Wash Solution으로 4회 세척. 원심분리된 세포에 1 ml의 1M sorbitol을 넣어 혼합한 후, 이를 형질전환용 숙주세포로 사용하였다. pHT43_CPS1m plasmid를 50 ng을 형질전환용 숙주세포에 넣은 후, 전기천공법 (electroporation)을 사용하여 숙주세포에 삽입하였다. 항생제인 chloramphenicol이 첨가된 LB 고체배지에 도말한 후 1-2일 후 콜로니 형성을 확인하였고 각 colony를 배양하여 DNA를 추출후 PCR증폭하여 insert를 확인하였다(그림 47).

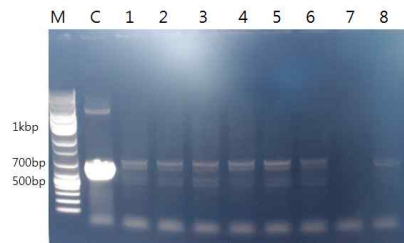


그림 47. pHT43_CPS1m을 발현하는 *B. subtilis* 균주의 colony PCR 결과. M, marker; C, positive control; 1-8, strains.

- 정상적으로 pHT43_CPS1m가 삽입된 transformant를 대상으로 단백질 발현을 위해 2×YT (16 g/L tryptone, 10 g/L yeast extract, 5 g/L NaCl)에 transformant를 접종하여 배양한 후 OD600 0.7-0.8에 세포농도를 보일 때 1 mM IPTG를 처리하고 0, 4, 8, 12, 24, 48시간 마다 배양액을 회수하였다. 상등액과 세포에서 단백질 발현을 SDS-PAGE에 전기영동하였고, Coomassie blue stain 시약을 통해 분석하였다(그림 48).
- 48시간 동안 단백질 발현을 유도한 후, 세포 내외의 분획으로 나누어 단백질 발현 확인 결과, 세포 외부로 분비되는 CPS1m 발현단백질이 24 kDa 부근에서 탐지되었다. 발현유도 후 4시간 후부터 단백질 분비가 확인되었고 48시간까지 지속되었지만 세포사멸이나 기타 스트레스 조건으로 인해 다른 단백질이 48시간에서 배양매지에서 일부 강하게 나타났다(그림 48).

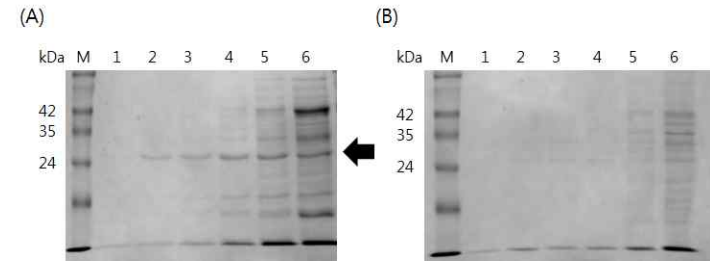


그림 48. pHT43_CPS1m을 발현하는 *B. subtilis* 균주의 배양액과 세포내 단백질발현분석. (A) Supernatant of culture medium. (B) Crude extract of pellet. M, marker; 1, 0 h induction; 2, 4 h induction; 3, 8 h induction; 4, 12 h induction; 5, 24 h induction; 6, 48 h induction.

- 제작된 *B. subtilis* 균주를 발현유도후 0, 6, 12, 16, 20, 24, 28시간마다 회수하여 CPS1m 단백질 발현을 Western blot 방법으로 확인하였다. 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 이용해 배양상등액으로부터 CPS1m의 발현을 검출확인하였다(그림 49).



그림 49. CPS1m을 발현하는 *B. subtilis* 균주의 배양상등액의 Western blot 결과 (His-tag protein antibody). M, marker; 1, 0 h induction; 2, 6 h induction; 3, 12 h induction; 4, 16 h induction; 5, 20 h induction; 6, 24 h induction; 7, 28 h induction.

○ 신규 CPS생산 재조합 저온 발현시스템 구축

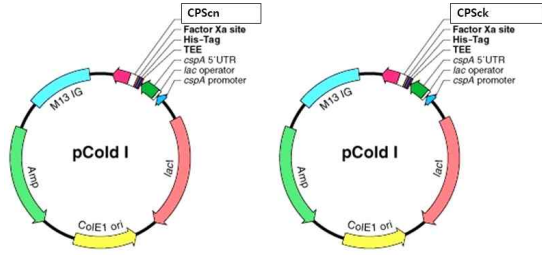


그림 50. CPS를 저온에서 발현하는 플라스미드 구축

- 남극 해수에서 발견된 규조류 *Chaetoceros neogracile*와 북극 담수 미세조류 *Chloromonas* sp. KNF0032로부터 결빙방지단백질을 인코딩하는 CPScn와 CPSck 유전자서열을 확보하였고 PCR을 통해 증폭함. 활성과 안정성이 개량된 저온 발현 벡터인 pCold I를 제한효소로 절단하여 결빙방지단백질 유전자를 각각 삽입하여 플라스미드를 구축하고 생산균주인 *E.coli* BL21 균주에 최종 형질전환하였음 (그림 50).
- 저온발현벡터인 pCold I에서 CPScn와 CPSck를 발현하는 균주를 sequencing하였고 insert sequence가 염기서열 변이없이 제작되었음을 확인하였다(그림 51, 그림 52).

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1402 bits(759)	0.0	759/759(100%)	0/759(0%)	Plus/Plus
Query 1	CACCGTCAGGAGAAACGTGGAGGCTTAGGGCGTCAGCTCGATGACGAAACCACTATCTGCT	60		
Sbjct 93	CAACCGTCAGGAGAAACGTGGAGGCTTAGGGCGTCAGCTCGATGACGAAACCACTATCTGCT	152		
Query 61	GTCAAGCTACTCACAGCAGGAAAGGTTTTGCCATTTTGACAAAACTGGTGTGACGACCCACC	120		
Sbjct 153	GTCAAGCTACTCACAGCAGGAAAGGTTTTGCCATTTTGACAAAACTGGTGTGACGACCCACC	212		
Query 121	GGTCCAACAGATCTGAAAAGGTGATATGGGCAAGGTCCTATCACAGGCGGGCCATCACG	180		
Sbjct 213	GGTCCAACAGATCTGAAAAGGTGATATGGGCAAGGTCCTATCACAGGCGGGCCATCACG	272		
Query 181	GGATTTGGTTTGATTACGGATCCGACGATACCACTTCTCCACATCCTCCCTTGTGACA	240		
Sbjct 273	GGATTTGGTTTGATTACGGATCCGACGATACCACTTCTCCACATCCTCCCTTGTGACA	332		
Query 241	GGACAGGTATTCGCATCAGACTACACATCCCCACACCCAATATGCTAACTGTAGCAGTC	300		
Sbjct 333	GGACAGGTATTCGCATCAGACTACACATCCCCACACCCAATATGCTAACTGTAGCAGTC	392		
Query 301	CTCGACATGCAAGCCGCATATGTTGATGCTGCAAGCCGCCCTGACCCCGACTACGTTGAG	360		
Sbjct 393	CTCGACATGCAAGCCGCATATGTTGATGCTGCAAGCCGCCCTGACCCCGACTACGTTGAG	452		
Query 361	CTTGGTGTGAAACATTGAGGGCCTCACTCTTGAACCTGGCCTATACAAGTGGGGACT	420		
Sbjct 453	CTTGGTGTGAAACATTGAGGGCCTCACTCTTGAACCTGGCCTATACAAGTGGGGACT	512		
Query 421	GATGCTACTTCACCAACAGCTCACCTTCGATGGTCTGACACTGATATTTGGATCTTG	480		
Sbjct 513	GATGCTACTTCACCAACAGCTCACCTTCGATGGTCTGACACTGATATTTGGATCTTG	572		
Query 481	CAGATCGATGGGGATGTCAAGCAGGAAAGCGGTGCAAAAAGTCAAACTCATTAAAGATGCC	540		
Sbjct 573	CAGATCGATGGGGATGTCAAGCAGGAAAGCGGTGCAAAAAGTCAAACTCATTAAAGATGCC	632		
Query 541	AAAGCTGAGAACATCTTTTGGCAGATTGGCGGCAAGACTGACTAGGCCAACCGTCCCAT	600		
Sbjct 633	AAAGCTGAGAACATCTTTTGGCAGATTGGCGGCAAGACTGACTAGGCCAACCGTCCCAT	692		
Query 601	GTTGAGGGTGTGTTCTCTGTAGCACAGCAATCACTTTCAAAAAGTGAAGCAGCATGAAT	660		
Sbjct 693	GTTGAGGGTGTGTTCTCTGTAGCACAGCAATCACTTTCAAAAAGTGAAGCAGCATGAAT	752		
Query 661	GGTGTGCACTAGCACAGCAGCAGTCAAGTTGGATCCGCTACGATCGTGAAGGAGTCC	720		
Sbjct 753	GGTGTGCACTAGCACAGCAGCAGTCAAGTTGGATCCGCTACGATCGTGAAGGAGTCC	812		
Query 721	GATGCGATGTGGATGTTGGGTGTGTGGCACCACCACTAA	759		
Sbjct 813	GATGCGATGTGGATGTTGGGTGTGTGGCACCACCACTAA	851		

그림 51. CPScn을 발현하는 *E.coli* 균주의 sequencing 결과

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1890 bits(1023)	0.0	1023/1023(100%)	0/1023(0%)	Plus/Plus
Query 94	GCCGAGGTACGTCGACGATGAATGCCATCTCTGGGGTACAAGTCAAGTGGGACATGCTCC			153
Sbjct 84	GCCGAGGTACGTCGACGATGAATGCCATCTCTGGGGTACAAGTCAAGTGGGACATGCTCC			143
Query 154	GTCAAAGATGGCAGGTGTTGCATTGCTGGGCTCGGGAGCTGGCAGCTACCCACTGGCC			213
Sbjct 144	GTCAAAGATGGCAGGTGTTGCATTGCTGGGCTCGGGAGCTGGCAGCTACCCACTGGCC			203
Query 214	GGCAAAACATCACCTACACCATTGATGCCAACACCAAGTCCATCTCTTTGAATGCGCG			273
Sbjct 204	GGCAAAACATCACCTACACCATTGATGCCAACACCAAGTCCATCTCTTTGAATGCGCG			263
Query 274	AGTGAAGATGACGTCCTTAACCATTTGATTCAGCCGTATACAGCGGGGACACCATCGACAAC			333
Sbjct 264	AGTGAAGATGACGTCCTTAACCATTTGATTCAGCCGTATACAGCGGGGACACCATCGACAAC			323
Query 334	TGCGACCCCTCCCTACTGGAAGTTCGGTGGCTGCAGCAATGCAAGCTTTGGTCAACACGACC			393
Sbjct 324	TGCGACCCCTCCCTACTGGAAGTTCGGTGGCTGCAGCAATGCAAGCTTTGGTCAACACGACC			383
Query 394	TTCAAGACATCACACGCAAGTGCATGCCACCAAGTCCAGCTCAGCCAGATGGG			453
Sbjct 384	TTCAAGACATCACACGCAAGTGCATGCCACCAAGTCCAGCTCAGCCAGATGGG			443
Query 454	CCGTGCGTTGCTGTCATTGGAAGAGTCAACCAAGCTCAAGACTGGATGTTTTCTATGTCA			513
Sbjct 444	CCGTGCGTTGCTGTCATTGGAAGAGTCAACCAAGCTCAAGACTGGATGTTTTCTATGTCA			503
Query 514	AAGAGACCTTCAACATCAGTGATTGCTGCTCTCCAGCCCTCTGCAATATCTCGTCTT			573
Sbjct 504	AAGAGACCTTCAACATCAGTGATTGCTGCTCTCCAGCCCTCTGCAATATCTCGTCTT			563
Query 574	GSTGGCGTCTTGCAAGTCTTGAACACAGTCAAGTGGTGCAGTGCAGACCATTTGTGACA			633
Sbjct 564	GSTGGCGTCTTGCAAGTCTTGAACACAGTCAAGTGGTGCAGTGCAGACCATTTGTGACA			623
Query 634	GGCGGGTCTTCAACCAACATCATGTGATCTGGGCGGTGCCATCCACACCAAGACGCA			693
Sbjct 624	GGCGGGTCTTCAACCAACATCATGTGATCTGGGCGGTGCCATCCACACCAAGACGCA			683
Query 694	TCCTGAAAGTGGTGGTACCAACCTTCAAGCAACACCGCAAGTGGATGGGGCTCCATC			753
Sbjct 684	TCCTGAAAGTGGTGGTACCAACCTTCAAGCAACACCGCAAGTGGATGGGGCTCCATC			743
Query 754	CAGTTCAAGGACCAACCGCTGCTGCTGGTGGCCAAAGTCAAGCAAGTGTGTCAG			813
Sbjct 744	CAGTTCAAGGACCAACCGCTGCTGCTGGTGGCCAAAGTCAAGCAAGTGTGTCAG			803
Query 814	CGCTGCACTTTCAACACACAGAAAGCCAAATCTCAATGGAGGTGCAATGCAAGTGCAGGA			873
Sbjct 804	CGCTGCACTTTCAACACACAGAAAGCCAAATCTCAATGGAGGTGCAATGCAAGTGCAGGA			863
Query 874	GGCAATGTGACGATCTTTGACACTGACTTTACTTTGCGAGCTGCCACCGAAGGGGACTGC			933
Sbjct 864	GGCAATGTGACGATCTTTGACACTGACTTTACTTTGCGAGCTGCCACCGAAGGGGACTGC			923
Query 934	GTGTACCTAGACTCATGTGCCAGCTATCACAAAGGACCAAGTGTGAAACAACAAGTGGACA			993
Sbjct 924	GTGTACCTAGACTCATGTGCCAGCTATCACAAAGGACCAAGTGTGAAACAACAAGTGGACA			983
Query 994	AACTGCTCCCTGAGTTTCAACCACTTGTGCTGCCCGCCAAACGGCAATGTCTGGTCCAGC			1053
Sbjct 984	AACTGCTCCCTGAGTTTCAACCACTTGTGCTGCCCGCCAAACGGCAATGTCTGGTCCAGC			1043
Query 1054	TGTGGCATTGCAAGGCTGCCGAATGTTCAAGCGGCAAGTCTCTGCACTCTGCCCGGCC			1113
Sbjct 1044	TGTGGCATTGCAAGGCTGCCGAATGTTCAAGCGGCAAGTCTCTGCACTCTGCCCGGCC			1103
Query 1114	CAG 1116			
Sbjct 1104	CAG 1106			

그림 52. CPSck을 발현하는 *E.coli* 균주의 sequencing 결과

- 염기서열 변이 없이 CPScn와 CPSck가 삽입된 transformant를 대상으로 단백질 발현 수행하였고, LB 배지(10 g/L tryptone, 5 g/L yeast extract, 5 g/L NaCl)에 transformant를 접종하여 37°C에서 배양한 후 OD600 0.7-0.8에 세포농도를 보일 때

배양온도를 15°C로 낮추며 1 mM IPTG를 처리하여 단백질 발현을 유도하였다. 발현유도 24시간 후 세포 배양액을 원심분리하여 배양액을 제거하고 세포를 회수하여 lysis buffer (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 5mM imidazole)로 현탁한 후 초음파 분쇄하여 발현된 각각 약 30kDa, 40kDa 크기의 용해성(soluble) 단백질을 확인하였다(그림 53, 그림 54).

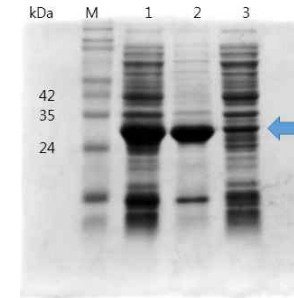


그림 53. pCold_LCPScn을 발현하는 BL21 균주의 저온발현 후 세포내 단백질발현분석. 약 30kDa 크기의 CPScn 발현이 확인됨. M, marker; 1, Whole cell; 2, insoluble protein; 3, soluble protein

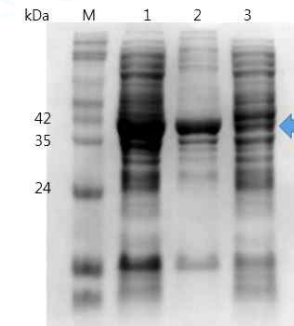


그림 54. pCold_LCPSck을 발현하는 BL21 균주의 저온발현 후 세포내 단백질발현분석. 약 40kDa 크기의 CPSck 발현이 확인됨. M, marker; 1, Whole cell; 2, insoluble protein; 3, soluble protein

- CPScn와 CPSck가 발현된 용해성 단백질부분을 농축하지 않은 상태에서 단백질의

열적이력 현상을 나노리터-오스모미터 (nanoliter-osmometer)를 사용하여 분석. 열의 성장이 억제되어 나타나는 얼음결정현상을 관찰하였다(그림 55).

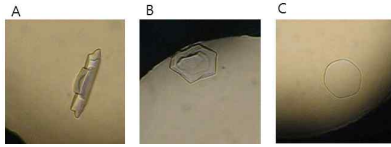


그림 55. 저온발현 유도 후 생산된 CPScn, CPSck 단백질 용액의 얼음결정 사진. (A) CPScn, (B) CPSck, (C) 20mM Tris-HCl buffer as control

- 극지 미세조류 유래의 프로모터를 이용한 배터 시스템을 구축하였다.

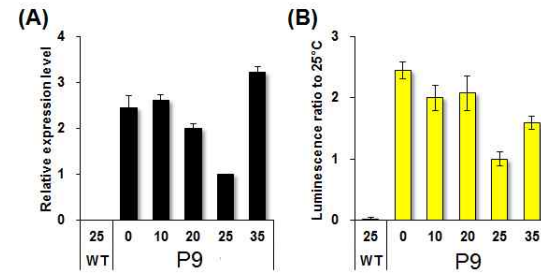


그림 57. 극조류 유래의 P9 프로모터의 온도에 따른 패턴. ((A) RNA 발현, (B) Luciferase 활성화)

1.3 활성 개량을 위한 저온프로모터 발현 시스템 구축 (한양대 위탁)

- 저온에서 높은 성장률을 보이는 ArM29, KNF32의 게놈 정보에서 저온활성 프로모터 후보군들 7개 선별 (표 2)
 - ArM29, KNF32의 gDNA, cDNA를 위해 배양 중이며 NCBI search를 통해 게놈 정보가 보고된 다른 미세조류들에서 homologous sequences를 비교 분석하였다.
 - 극지 *Chaetoceros neogracile*에서 분리해 낸 저온활성 프로모터 1,225bp가 삽입된 형질전환체 *Chlamydomonas* 19개 line (성공률 50%)을 확보하였고 luciferase 활성을 확인하였다 (그림 56)

- pChlamy3_GLuc를 배터의 주형으로 하는 극지 미세 조류인 *Chaetoceros neogracile*의 antifreeze protein 프로모터 (P9로 명명)의 온도에 따른 유전자 발현 및 활성 패턴을 확인하였다. 그림에서의 (A)는 mRNA 발현 수준이며, (B)는 Luciferase 활성 수준을 나타낸다. P9이 저온과 고온에서 negative control인 25°C 샘플에 비해서 mRNA의 발현이 약 2배 이상 증가하는 것을 확인하였다. Luciferase assay 결과, 2배의 발현이 증가하는 유사한 패턴을 확인하였다.

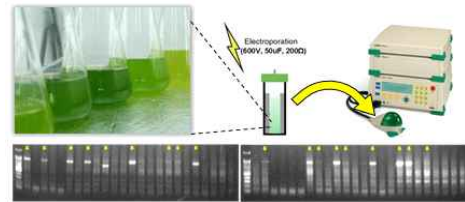


그림 56. 극지 미세조류에서 저온활성 프로모터를 발굴해 배터 클로닝을 진행 후 형질전환체 확보



그림 58. 전사인자에 따른 다양한 크기의 P9 배터 클로닝

- 저온활성 미세조류 형질전환체 제작

- 저온 발현에 영향을 미치는 전사인자를 찾기 위해서 P9을 다양한 크기로 잘라서 클로닝 완료하였다. 위의 그림에서 Full length는 전체길이의 프로모터, Shortened length 1~3은 각각 900bp, 600bp, 300bp로 자른 프로모터를 의미하고 각 사이즈에 따라서 포함되는 전사인자의 종류가 다르며, 길이는 임의로 설정하였다.

- 사이즈에 따라서 저온 발현여부를 확인하였는데, 특히 가장 짧게 잘린 S3의 경우에는 저온에 의해 발현이 증가되는 양상이 확인되지 않았다. 아마 해당 부분에 저온 반응에 영향을 주는 전사조절인자가 있을 것으로 예상된다(Ar1은 기존에 많이 사용되는 프로모터, FL은 full length promoter, S1, S2, S3는 각각 shortened

promoter 1, 2, 3).



그림 59. *Chlamydomonas reinhardtii* 형질전환체와 colony PCR 결과

- 녹조류 모델종인 *Chlamydomonas reinhardtii*에 전기천공법으로 형질전환 후에 antibiotics인 50 ug/mL의 Hygromycin가 포함된 배양액에서 살아남는 형질전환체 후보군을 확보함 4개 벡터(AR1, 300bp, 600bp, 900bp)에서 각각 24 colony씩 확보하였다(총 96 lines). Colony PCR을 통해 다양한 크기의 P9벡터의 삽입이 확인된 형질전환체를 각각 5 lines 이상 최종 선별하였다.

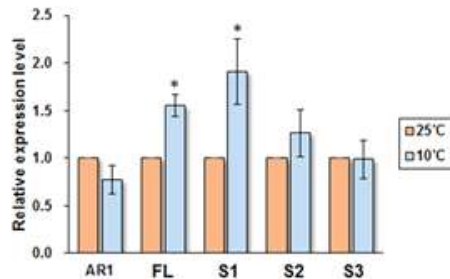


그림 60. 다양한 크기로 클로닝 된 P9 형질전환체를 사용하여, 저온 (10°C)에 노출된 샘플과 상온 (25°C)에 노출된 샘플의 상대적 mRNA 발현 수준 확인

- P9 프로모터의 형질전환체를 대상으로 25°C에 둔 샘플과 10°C에 둔 샘플의 상대적 mRNA 발현수준을 확인함. 상기 그림에서 AR1은 negative control, FL은 full length promoter, S1은 900bp의 shortened promoter, S2은 600bp의 shortened

promoter, 그리고 S3은 300bp의 shortened promoter를 의미한다. Negative control 인 AR1과 S3 형질전환체는 저온 (10도)에서 발현이 증가하지 않았으나, FL, S1, S2 는 저온에서 발현이 최대 2배까지 증가하였다.

- 극지 미세 녹조류의 프로모터가 삽입된 벡터 2종을 제작하였다.

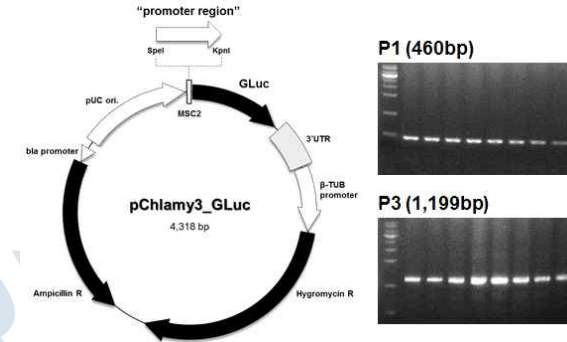
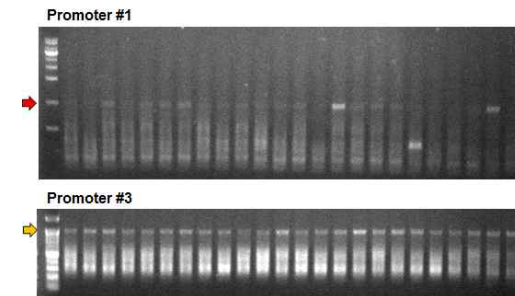


그림 61. P1, P3 프로모터의 모식도 및 클로닝 결과

- pChlamy3_GLuc를 벡터의 주형으로 하여 극지 미세 녹조류인 KNM0029C strain 프로모터 #1 (P1, long-chain acyl-CoA synthase)과 프로모터 #3 (P3, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase large subunit)의 프로모터의 클로닝을 하였다.



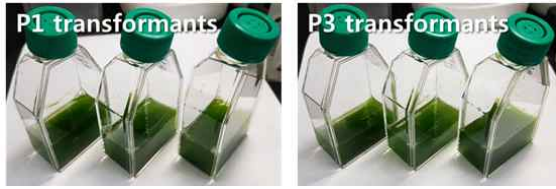


그림 62. 2종의 극지 녹조류 프로모터를 형질전환체 확보

- 형질전환 후, 고체에서 colony를 picking하여 Hygromycin 저항이 있는 것들을 1차 선별하고 액체배지에 자란 colony를 PCR을 통해서 각각의 벡터가 삽입된 형질전환체 3개 line씩 확보하였다.

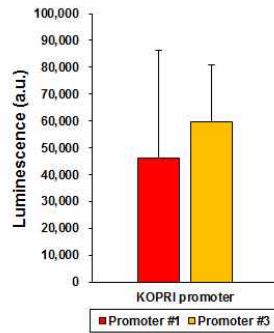


그림 63. 2종류의 극지 녹조류 프로모터 형질전환체의 luciferase 활성 결과

- 형질전환체의 Luciferase assay 결과를 통해 각각의 프로모터 P1, P3가 녹조 모델종인 *Chlamydomonas reinhardtii*에서 정상적으로 작동하는 것을 확인하였다.

○ RNA seq을 바탕으로 한 P1, P3의 전사체 발현 수준 연구

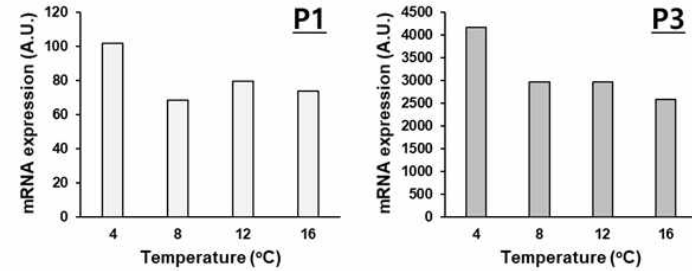


그림 64. 온도에 따른 극지 녹조류 P1, P3의 전사체 발현 수준 비교

- 연구 초기에 프로모터 타겟 선정을 위해 극지연구소에서 제공받은 RNA seq. 결과를 그래프로 표현한 결과, P1과 P3 모두 네 가지 온도 조건 (4°C, 8°C, 12°C, 16°C) 중 4°C에서 가장 높은 전사 수준을 나타내는 것을 확인할 수 있었다(그림 1). 이는 각각의 온도 조건에서 추출한 mRNA를 대상으로 RNA seq.을 통해서 얻은 RPKM값을 정리한 것이다. 데이터의 직접적인 비교는 할 수 없지만, 전반적으로 P3의 전사 수준이 더 높은 것으로 예상할 수 있었다.

- P1과 P3의 경우 프로모터로서 비록 다른 미세조류 종이긴 하지만 녹조류인 *Chlamydomonas reinhardtii* 내에서 충분히 높은 발현을 보일 것으로 예상된다.

○ 극지 미세 녹조류 프로모터의 저온 유도능 확인 (25°C에서 10°C 처리)

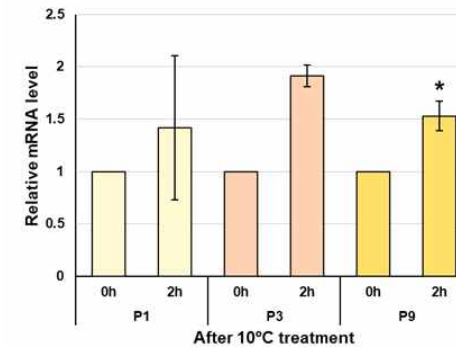


그림 65. 녹조류에서 유래한 P1, P3 프로모터와 규조류에서 유래한 P9 프로모터의 저온(10°C) 처리에 따른 mRNA level 비교 (P9의 결과는 이전에 보고한 것을 다시 사용)

- 녹조류에서 얻어낸 프로모터 P1과 P3가 각각 삽입된 클라미도모나스 형질전환체를 대상으로 25°C, 암조건에 적응시킨 후, 10°C, 암조건에 처리하였을 때의 mRNA 발현 비교를 관찰함 (n=2). 규조류에서 얻어낸 프로모터 P9의 결과는 패턴 비교를 위해 함께 표기하였다 (n=6). P1, P3 모두 P9와 동일하게 10°C 처리에서 발현이 증가하는 경향을 보이거나 (그림 2), 표본이 적어서 추가 확인이 요구된다. 그림 2의 결과는 그림 1의 결과와 마찬가지로 저온에서 mRNA 발현이 높아진다는 것을 나타낸다. 이는 P1, P3, P9 모두 저온 유도성 발현 벡터 제작에 이용될 수 있을 가능성을 보여준다.
- 본 과제에서는 저온 유도성 발현 시스템 개발을 목표로 하기 때문에 우선 P3 대신에 P9을 사용하여 전체적인 실험을 수행하였으나, 종합해보면, 향후에 저온에서 단백질 발현량을 증가시키고자 할 때 P3을 이용한 발현 벡터를 제작한다면 높은 수준의 단백질 발현을 얻을 수 있을 것이라고 예상된다.

○ 2종의 극지 미세 녹조류 프로모터 (P1, P3)와 1종의 극지 규조류의 프로모터 (P9)의 25°C와 10°C에서의 mRNA 발현 수준 비교

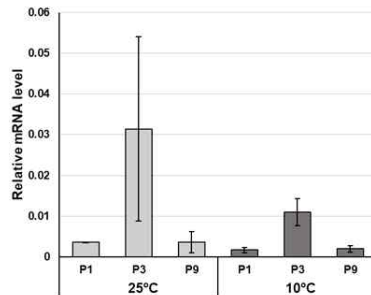


그림 66. 녹조류에서 유래한 P1, P3 프로모터와 규조류에서 유래한 P9 프로모터의 상온(25°C)과 저온(10°C)에서의 mRNA level 비교 (그림 2와 달리 각각 배양한 시료임)

- 녹조류에서 얻어낸 프로모터 P1과 P3가 각각 삽입된 클라미도모나스 형질전환체를 대상으로 25°C와 10°C에서 각각 12시간 이상 배양하였을 때의 mRNA 발현 비교를 관찰하였다 (n=2). mRNA 추출 시에 세포의 성장 조건이 달라서 25°C와 10°C 사이의 상대 비교는 할 수 없으나, 25°C와 10°C 각각의 온도에서 P3의 mRNA 발현량이 가장 많은 것이 확인되었다

(그림 3). 이는 그림 1의 결과와 유사한 패턴이며, P3가 세 종류의 프로모터 중에서 가장 mRNA 발현량이 높을 가능성을 보여준다. 저온에서 지속적으로 높게 발현하는 프로모터로는 P3가 가장 적합할 것으로 생각되나, 본 과제에서는 우선적으로 진행하고 있는 규조류 프로모터인 P9을 대상으로 발현 시스템을 개발하였다.

- 향후 녹조류 프로모터인 P3을 대상으로 발현 시스템을 개발한다면 비록 저온 유도성은 P9에 비해서는 낮지만, 기존에 *Chlamydomonas reinhardtii*에서 사용하고 있는 AR1 프로모터 만큼의 높은 발현 수준을 기대할 수 있을 것이다.

○ 극지 미세 규조류 프로모터 발현. 기존의 Luciferase 외의 다른 reporter gene의 발현을 확인하기 위해 mVenus 도입한 형질전환체의 저온 유도 관련 특성 확인

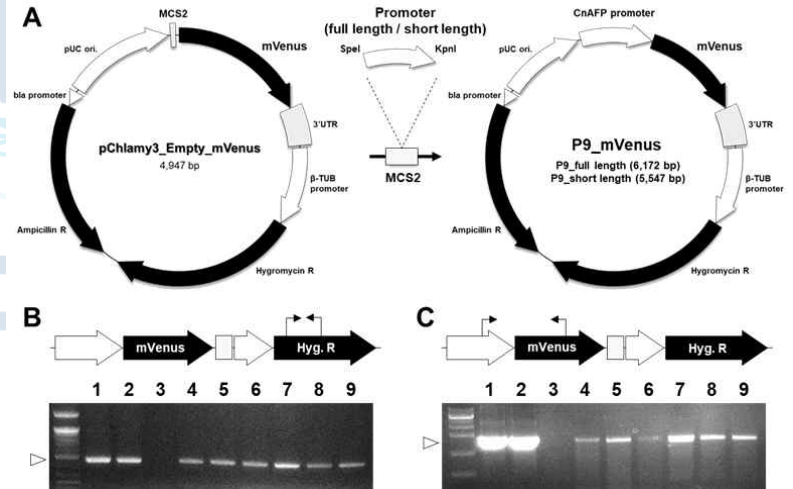


그림 67. 규조류에서 유래한 P9 프로모터를 포함한 mVenus 형광 단백질 발현 형질전환체 제작. (A) 벡터 모식도; (B) 클라미도모나스 형질전환체의 콜로니 PCR (Hygromycin 부위); (C) 클라미도모나스 형질전환체의 콜로니 PCR (프로모터+mVenus 부위)

- 규조류에서 유래한 프로모터 P9의 논문 작성을 위해 1차년도와 2차년도에서 사용하였던 Gaussia luciferase 외에 다른 리포터 유전자로 프로모터의 활성을 추가 확인하였다. 형광 단백질 발현 벡터는 형광 단백질인 mVenus의 앞부분에 프로모터를 포함하여 제작하였다. 이

는 기존의 Gaussia luciferase와 동일한 구조에 유전자만 달라진 것이다(그림 67A). Positive control로는 기존에 클라미도모나스 시스템에서 사용하는 AR1 프로모터를 사용하였다. 클라미도모나스 형질전환체는 콜로니 PCR을 이용해서 벡터 서열의 삽입을 확인하였고 (그림 67B, 67C), 그 결과 P9_full length, P9_short length를 각각 3개 lines 이상 확보하였다.

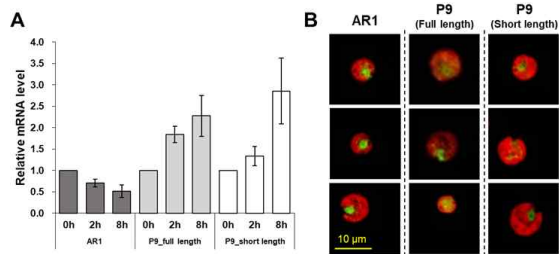


그림 68. P9 프로모터를 포함한 mVenus 형광 단백질 발현 벡터가 삽입된 클라미도모나스 형질전환체. (A) mRNA 발현 수준; (B) 형광 현미경 이미지

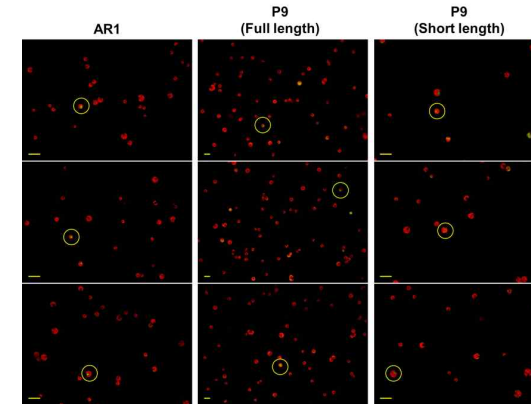


그림 69. 형광 현미경 이미지의 raw data (노란 원 표시는 그림 68B의 단일 세포 이미지)

- P9와 mVenus가 연결된 벡터가 삽입된 형질전환체를 대상으로 10°C 처리 후에 2h, 8h의 mRNA 발현 수준이 증가하는 경향을 보였다. 이는 Gaussia luciferase를 사용한 형질전환체의 결과와 동일하므로 P9의 저온 유도성 발현을 추가 확인하였다(그림 5A). mVenus 형광 단백질의 발현을 확인하기 위해서 형광 현미경을 통해 세포를 관찰 하였을 때, 붉은색의 auto-fluorescent를 나타내는 엽록체와 겹치지 않는 연녹색의 mVenus 신호를 세포질 부위에서 확인할 수 있었다(그림 68B). 그림 69에서는 형광 현미경으로 촬영한 많은 세포를 보여주고 있으며, 이 중에서 각 3개의 세포만을 그림 68B에 표기하였다. 그림 69에서 확인할 수 있는 것처럼 많은 세포 중에서 실제 mVenus 신호가 관찰되는 것은 매우 일부에 불과한데, 이는 미세조류에서 흔히 발견되는 전사 수준과 번역 수준의 차이에 따른 것으로 보인다.

○ 미세조류에서 CPS1 발현을 위한 P9 프로모터를 이용하는 발현 벡터 제작

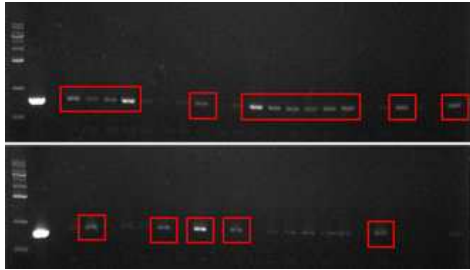


그림 70. P9::CPS1 박테라 삽입된 형질전환체의 콜로니 PCR 결과

- P9 프로모터에 CPS1의 CDS가 연결된 박테라 P9::CPS1이라고 할 때, 이 박테라 삽입된 형질전환체를 18개 line 얻었다 (그림 70)

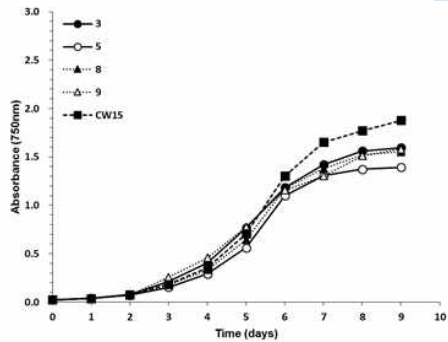


그림 71. 저온 (15°C) 에서의 성장곡선 비교

- 결빙방지 단백질인 CPS1이 발현되면 저온 (15°C) 에서도 잘 자랄 수 있을 것이라는 가정을 하고 실험을 수행하였을 때, 야생형과 큰 차이를 보이지 않거나 더디게 자라는 것을 확인하였다(그림 71). 아마도 CPS1가 결빙 스트레스에 대한 보호 기작이기 때문으로 예상된다.

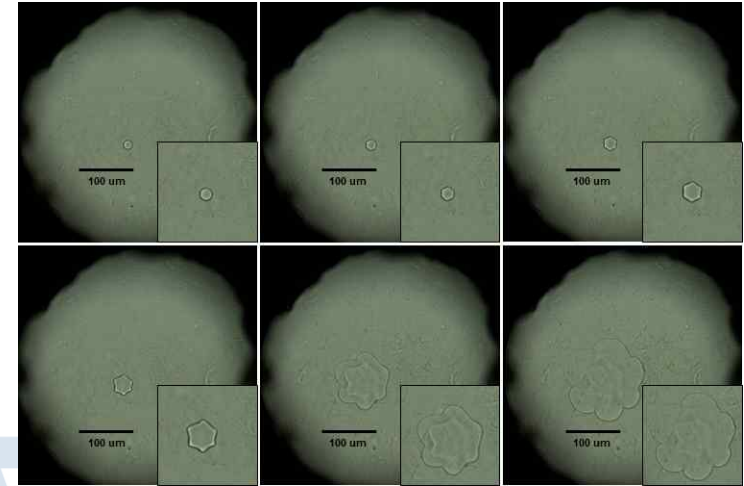


그림 72. 형질전환체 crude extract를 대상으로 한 ice crystal formation 실험

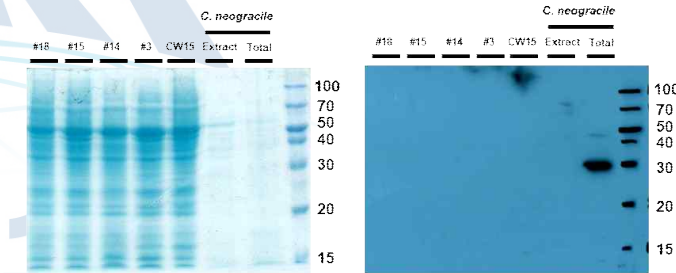


그림 73. 형질전환체의 단백질 발현 확인 (좌, SDS-PAGE 결과; 우, Western blot 결과)

- 저온 (15°C) 에서 자란 형질전환체의 biomass를 sonication으로 파쇄 하여 내부 단백질이 포함된 상층액만을 얻어내고 동결조건에서의 ice crystal formation을 관찰하였을 때, 원형의 결정 상태에서 어떠한 형태 변화 없이 ice crystal이 커지는 BSA와는 달리 crude extract에서는 특정 결정을 가지는 것이 확인되었다(그림 72). 따라서 Western blot을 통해 발현시키고자하는 CPS1의 발현이 일어나고 있는지 확인하였으나, target size에서 band가 확인되지 않았다(그림 73). 이 결과는 그림 9에서 보여지는 특성 ice crystal formation이 우리가 발현시키고자 한 CPS1에 의한 것이 아닌, 저온에서 증가하는 당류에 의해서 영향을 받았을 수 있음을 의미한다.

(나) 세부연구목표2. CPS 효능 분석

2.1 피부보호성분 활성 스크리닝으로 신규 CPS 확보

○ 항염활성 스크리닝 실시

① Nitric oxide(NO) 측정

- 남극 담수 미세조류 16종 건조중량 각 12g을 70%EtOH 추출한 후 vacuum dryer 기기를 이용하여 건조시킨 후 건조된 미세조류 pellet을 DMSO에 녹여 20mg/mL stock solution을 만든 후 항염활성 실험을 진행하였다(표 18).

표 18. 세포활성 실험을 위한 극지 미세조류균주의 에탄올 추출물의 건조량

Polar microalgae	Dried extract (mg)	Polar microalgae	Dried extract (mg)
KSF31	20	KSF220	14
KSF59	8	KSF221	20.8
KSF99	8.6	KSF222	25.1
KSF100	12.8	KSF225	8
KSF101	8.8	KSF226	15.6
KSF102	28.2	KNF4	19.2
KSF105	13.5	KNF6	13.1
KSF108	4.6	KNF8	9.8
KSF110	16.9	KNF22	9.7
KSF112	20.1	KNF24	10.2
KSF126	46.8	KNF28	11.4
KSF207	6.3	KNF30	7.8
KSF211	3.1	KNF32	8.7

- LPS/RAW264.7 cell system을 이용하였으며 LPS 처리 시 대식세포 RAW264.7 cell 에서 진행되는 NO 생성에 대한 미세조류 추출물의 억제작용을 확인하였다.
- 염증유발인자 LPS(0.5 μ g/mL)을 처리한 RAW264.7 cell에 다양한 농도의 미세조류 추출물(10, 20, 40, 80 μ g/mL)을 처리한 후 20-24시간 배양하였다.
- 세포 배양액 100 μ l와 100 μ l 그리스 시약 (Griess reagent: 0.5%의 sulphanilamide, 2.5%의 phosphoric acid 및 0.5%의naphthylethylenediamide)을 혼합한 후 540nm에서의 흡광도를 측정하여 NO 생성 측정하였다.
- ② 염증 유발인자인 Cytokine(IL-6, TNF- α)의 측정
 - 염증세포들이 침윤되면서 각종 염증유발인자인 TNF- α 와 인터루킨-6(IL-6) 측정하여 항염증 효과를 관찰할 수 있었다.
 - 염증유발인자 LPS(0.5 μ g/mL)을 처리한 RAW264.7 cell에 다양한 농도의 미세조류

추출물(10, 20, 40, 80 μ g/mL)을 처리한 후 20-24시간 배양하였다.

- 이들 전염증성 사이토카인을 세포 상층액에서 ELISA법(Mouse ELISA kit 이용)으로 정량하였다.
- 미세조류 16종 추출물의 농도별 세포독성을 마우스 대식세포 RAW264.7을 이용하여 측정하였다.
- 각 미세조류 추출물의 세포독성을 나타내지 않는 최대농도(주황색)을 구한 후, 이를 기준으로 낮은 농도에서 항염활성 측정하였다.
- 대부분 추출물 농도 40 μ g/mL 혹은 80 μ g/mL이상의 농도에서 독성을 보였다(그림 74).

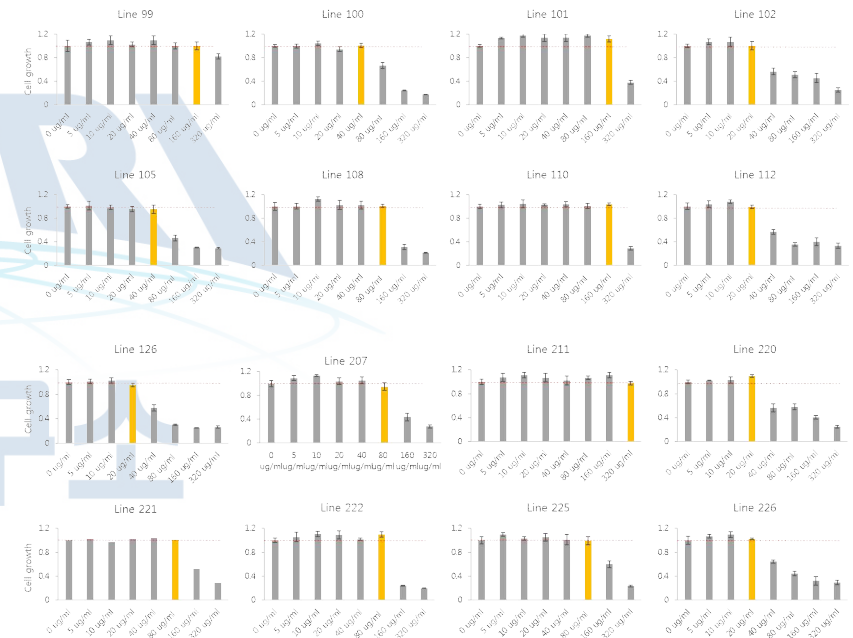


그림 74. 남극 미세조류 추출물들에 대한 대표적 세포독성 실험 결과

- 대식세포 RAW264.7을 이용하여 세포독성을 보이지 않는 농도구간에서 항염실험을 실시하였다.
- 미세조류 7종(#99, #100, #105, #108, #126, #220, #221)에서 높은 항염활성을 보였다(그림 75).
- 그 중에서 미세조류 3종(#100, #105, #126)은 다른 미세조류보다 낮은 농도(10 μ g/mL 혹은 20 μ g/mL)에서 높은 항염활성을 나타냈다(그림 75).

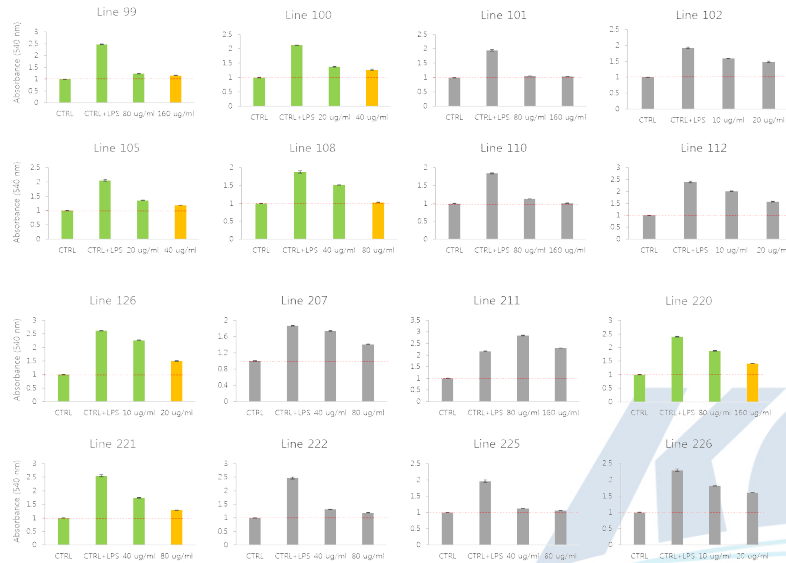


그림 75. 높은 항염 활성을 보이는 남극 미세조류들

③ 남극 담수 미세조류 3종 추출물에 대한 항염활성 및 메커니즘 기작 비교분석

- 뛰어난 항염활성을 보이는 미세조류 3종(#100, #105, #126) 추출물에 대한 비교분석 실시하였다.
- 그 결과 추출물 농도 의존적으로 NO 생성량이 감소되는 경향을 보였으며 다른 미세조류 추출물보다 #100에서 그 경향성이 뚜렷하다(그림 76).

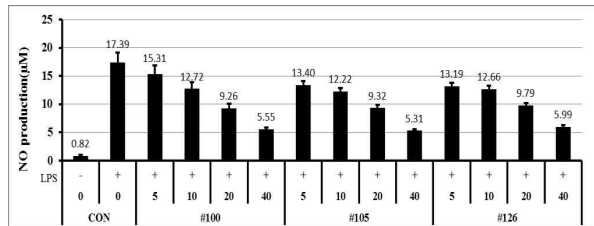


그림 76. 미세조류 3종 추출물간 NO 생성 비교 분석

- 다음으로 염증발생의 다른 지표물질인 IL-6 및 TNF- α 의 생성을 측정하였다.
- IL-6 생성량이 추출물 농도 의존적으로 감소하는 것을 보였으며 다른 미세조류보다 #100 추출물에서 감소 경향성이 뚜렷하다(그림 77).

- 하지만 TNF- α 생성에 대한 미세조류 추출물의 효과는 다른 지표물질(NO, IL-6)에 대한 효과보다 낮았다(그림 77).
- 다음으로 염증기작관련 마커유전자들의 발현을 qRT-PCR을 이용하여 측정하였다.
- 염증기작관련 유전자(COX-2, TNF- α , iNOS, IL-6) mRNA의 발현이 추출물의 농도에 비례해서 현저히 감소하였다(그림 78).

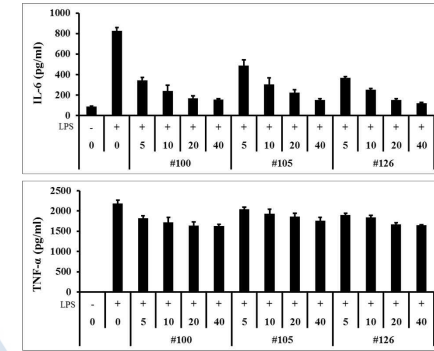
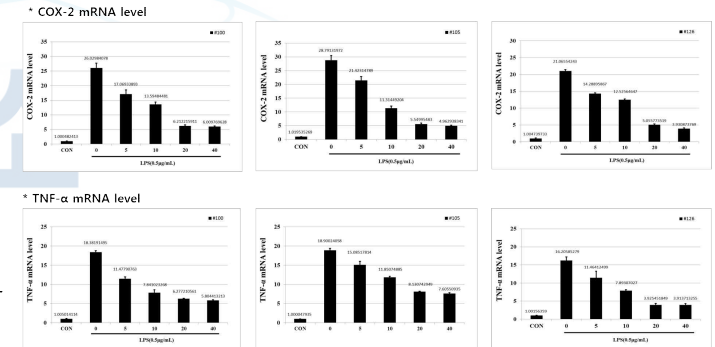


그림 77. 미세조류 추출물에 대한 IL-6 및 TNF- α 의 생성 측정 및 비교분석



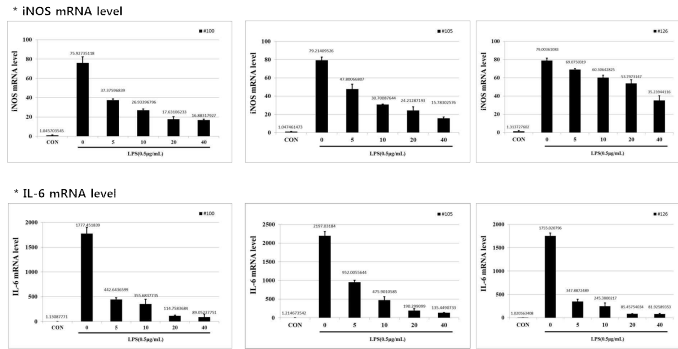


그림 78. 미세조류 추출물 처리에 따른 염증관련 유전자의 발현추경

- ④ 남극 담수 미세조류 3종과 다래 추출물의 항염 활성 비교실험
- 현재 다래 추출물은 피부 피부아토피치료제로 제품화되어 시판되고 있다.
 - 남극 담수 미세조류와 다래 추출물간 항염활성 비교연구에서 미세조류 추출물의 항염활성이 다래보다 월등히 뛰어나다(그림 79).
 - 예를 들어 모든 실험 농도에서 미세조류 추출물의 항염 활성이 다래보다 높았으며 특히 농도 80μg/mL에서는 6배 이상 높았다(그림 79, 80).

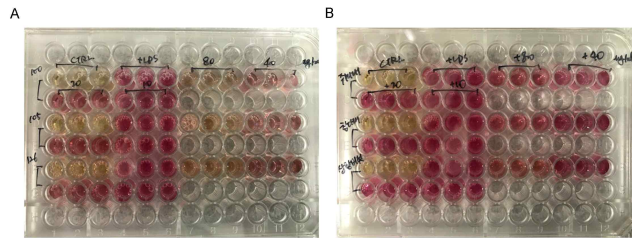


그림 79. 미세조류(#100, #105, #126) 추출물 A와 다래 추출물 B에 대한 NO 생성 그리스 시약 (Griess reagent) 분석법

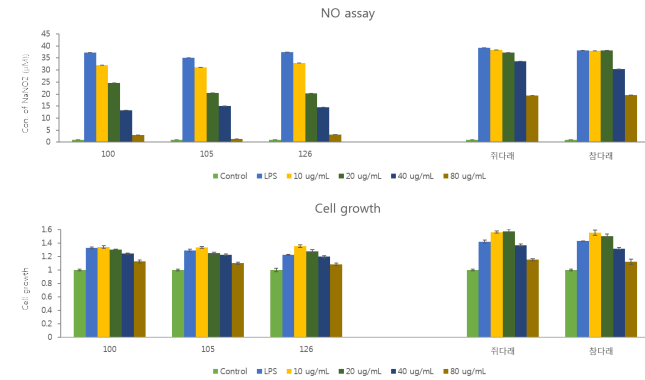


그림 80. 미세조류와 다래 추출물의 항염활성 비교분석

2.2 후보 CPS 효능검증, 분획 및 구조 동정

- 후보소재 KSF0006, KSF0031, KSF0041, KSF202로부터 항주름 개선제의 추출 및 소분획 제조
 - KSF0006, KSF0031, KSF0041, KSF202 각각에 메탄올 100ml을 넣고 실온에서 48 시간 동안 추출 (3반복) 후 추출물을 여과하고 농축기로 메탄올을 제거한 후 증류수 (메탄올:증류수 1:9비율) 200ml에 현탁함. 이 현탁액에 헥산(hexane) 200ml 넣고 혼합 후 물층으로부터 헥산층 분리 (3반복), 남은 물층에 에틸아세테이트(EtOAc) 넣고 혼합 후 물층으로부터 에틸아세테이트층 분리 (3반복), 다시 남은 물층에 부탄올 (butanol) 넣고 혼합 후 부탄올층 분리 (3반복) 후 남은 물에서 물층 분획물 제조하였다(그림 81).
 - TLC 는 normal phase silica gel TLC를 사용하였으며, 발색은 위의 그림처럼 254 nm의 UV 파장과 10% 황산 용액을 사용하였다(그림 82).
 - 사용 용매는 H (hexane):E (ethyl acetate)-7:3, C (chloroform):M (methanol)-9:1 및 8:2의 용매조성을 사용하였다.
 - Chlorophyll 은 녹색으로 검출되고, steroids 는 보라색으로 검출되었으며, 특히 부탄올 층에 스테로이드들이 다양하게 함유되어 있었다.
 - 물층에는 mono-, sugar, oligomer 당 성분들이 주로 함유 되어있음을 알 수 있었다.
 - 추출물 및 각각의 분획물들은 활성 실험을 위하여 협동, 위탁기관에 제공되었다.

○ 자외선손상에 따른 세포보호 효능이 있는 극지유래 후보 CPS 발굴

- 세포배양은 HaCaT (human keratinocyte)세포를 미국 세포주 은행 (American Type Culture Collection, ATCC)에서 분양받아, DMEM (10% 우테아 혈청 첨가, 1% 항생

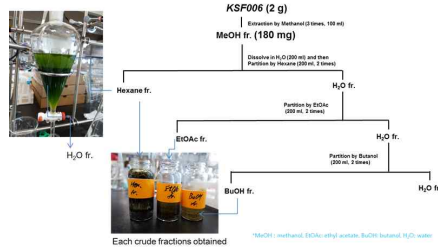


그림 81. 남극 미세조류 KSF006으로부터 활성 분획물 및 화합물 탐색 과정

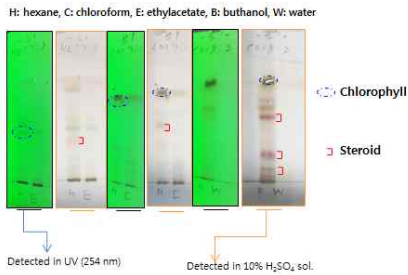


그림 82. 각 분획물들의 TLC 패턴 분석

제 포함) 배지에 현탁하여 37°C, 5% CO₂배양기에서 배양하고, 24시간 시료를 처리하여 후보소재의 세포독성을 확인하고 농도를 설정한 후, 후보소재를 24시간 처리한 후 자외선(UV Crosslinker, Ultra Lum)을 조사한 후 자외선에 의한 세포 보호효능을 확인하였다(그림 83).

- 극지연구소에서 제공받은 29 균주 중 자외선에 의한 세포 보호 효능이 있는 소재를 확인하였다.

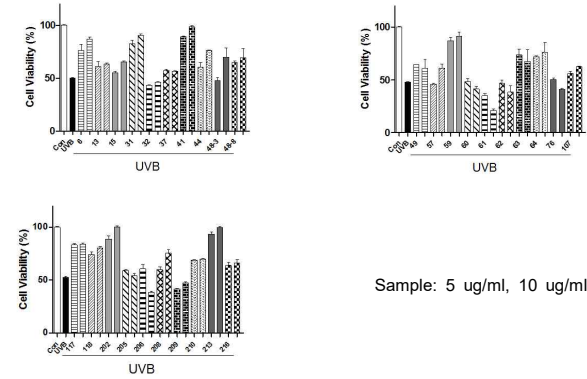


그림 83. 극지유래소재 KSF균주들의 세포보호 효능평가

○ 후보소재의 MMP-1 억제 효능평가

- MMP-1은 피부노화와 연관있는 단백질로 자외선과 같은 산화적 스트레스에 의해 증가하는 것으로 알려졌다. 본 실험에서는 산화적 손상으로부터 유도된 MMP-1의 억제 효능을 측정하기 위해 HaCaT 세포를 배양하여 다양한 농도로 시료를 처리한 후 Quantikine ELISA human pro MMP-1 kit (R&D systems, Minneapolis, MN, USA)를 사용하여 MMP-1을 측정하였다.

- 실험결과, UVB를 조사하면 MMP-1의 발현량이 증가하는데 MMP-1의 발현량을 감소시키는 효능이 있는 KSF 균주들을 확인할 수 있었다(그림 84).

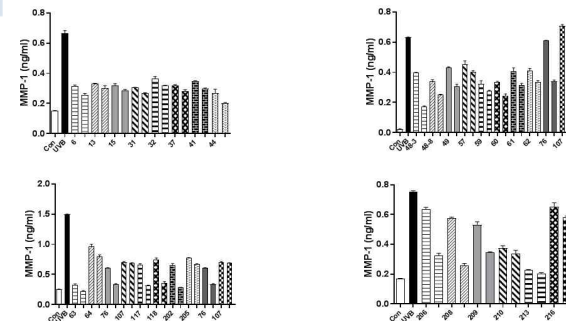


그림 84. 극지유래소재 KSF균주들의 MMP-1 효능평가

- 세포보호효능과 MMP-1저해 효능 스크린을 통하여 효능이 우수한 KSF0006의 메탄올의 CHCl₃, EtOAc, BuOH, H₂O 분획물을 제공 받았고 이의 세포 독성 및 자외선에 의한 세포 보호 효능을 확인하였다.

- 실험 결과 아무것도 처리하지 않는 control 그룹과 비교하여 10 ug/ml의 농도까지는 세포 독성을 나타내지 않았고 처리 농도를 1, 2.5, 5, 10 ug/ml 농도로 설정하여 자외선에 의한 세포 보호 효능을 확인하였다(표 19).

표 19. KSF0006 분획물의 세포독성 결과

	control	1 ug/ml	2.5 ug/ml	5 ug/ml	10 ug/ml	50 ug/ml	100 ug/ml
CHCl ₃ fr.	100	94.92	95.17	98.06	94.4	89.03	85.06
EtOAc fr.	100	99.45	93.94	104.05	94.29	93.46	79.49
BuOH fr.	100	95.66	97.6	98.14	98.29	91.56	89.87
H ₂ O fr.	100	104.57	108.08	110.8	110.61	110.1	111.45

- KSF0006의 메탄올의 CHCl₃, EtOAc, BuOH, H₂O 분획물을 2.5, 5, 10, 50 ug/ml 농도로 24시간 처리한 후 자외선을 조사한 결과 BuOH 분획물과 H₂O 분획물에서 세포 보호 효능을 확인하였으며 H₂O 분획물에서는 아무것도 처리하지 않은 control과 비교하여 세포보호 효능이 91.46% 까지 증가하는 것을 확인하였다(그림 85).

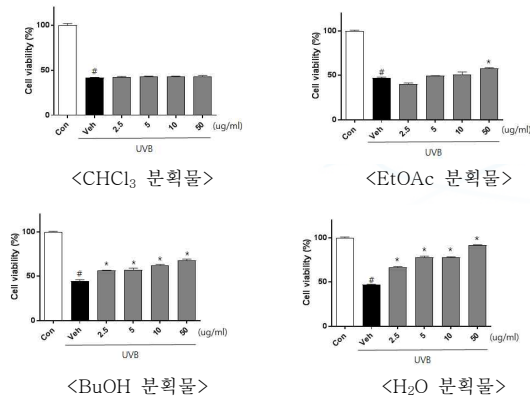


그림 85. 자외선에 의한 세포보호 효능.

#*p*<0.05, con vs vehicle, **p*<0.05, vehicle vs samples

- KSF0006의 메탄올의 CHCl₃, EtOAc, BuOH, H₂O 분획물을 2.5, 5, 10, 50 ug/ml 농도로 24시간 처리한 후 자외선을 조사하여 MMP-1의 발현량을 확인한 결과 BuOH 분획물과 H₂O 분획물에서 MMP-1 억제 효능을 확인하였다(그림 86).

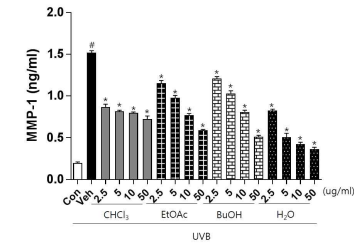


그림 86. KSF0006 분획물의 MMP-1 발현량
#*p*<0.05, con vs vehicle, **p*<0.05, vehicle vs samples

- KSF0006의 메탄올의 CHCl₃, EtOAc, BuOH, H₂O 분획물을 2.5, 5, 10, 50 ug/ml 농도로 24시간 처리 후 자외선을 조사하여 hyaluronan의 발현량을 확인한 결과 BuOH 분획물과 H₂O 분획물에서 UVB에 의해 감소하였던 hyaluronan의 발현량이 증가하는 것을 확인하였다(그림 87).

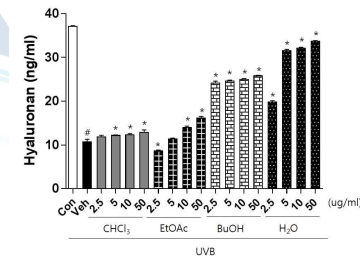


그림 87. KSF0006 분획물의 hyaluronan 발현량.
#*p*<0.05, con vs vehicle, **p*<0.05, vehicle vs samples

- 극지연구소에서 제공받은 소재 중 CPS2 (protein)와 CPS1 3종 (CnAFP, CnAFP isoform, CnAFP mut3)을 제공 받았고 이의 세포 독성 및 자외선에 의한 세포 보호 효능을 확인하였다.

- 실험 결과 아무것도 처리하지 않는 control 그룹과 비교하여 200 ug/ml의 농도까지는 세포 독성을 나타내지 않았고 처리 농도를 10, 50, 100, 200 ug/ml 농도로 설정하여 자외선에 의한 세포 보호 효능을 확인하였다(표 20).

표 20. CPS1, CPS2단백질의 세포독성 결과

	control	10 ug/ml	25 ug/ml	50 ug/ml	100 ug/ml	200 ug/ml	250 ug/ml
protein	100	95.89	93.37	98.71	98.77	101.55	96.28
ChAFP	100	107.78	110.19	101.1	99.2	109.24	94.91
ChAFP isoform	100	100.54	100.24	106	96.87	98.97	101.12
ChAFP mut3	100	85.84	93.75	104.26	102.13	102.01	98.22

- CPS2 (protein)와 CPS1 3종 (CnAFP, CnAFP isoform, CnAFP mut3)을 10, 50, 100, 200 ug/ml 농도로 24시간 처리한 후 자외선을 조사한 결과 CPS2과 CPS1에서 세포 보호 효능을 확인하였으며 CPS1에서는 아무것도 처리하지 않은 control과 비교하여 세포보호 효능이 95.47 % 까지 증가하는 것을 확인하였다(그림 88).

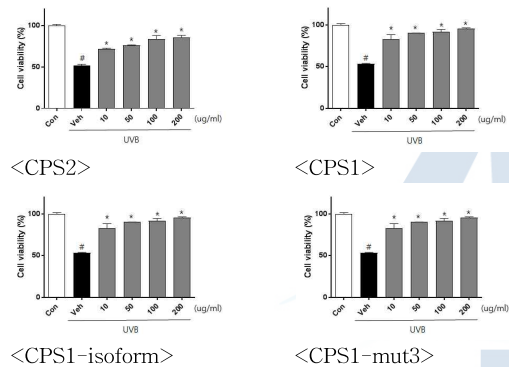


그림 88. CPS1, CPS2단백질의 자외선으로부터 세포보호 효능

- CPS2 (protein)와 CPS1 3종 (CnAFP, CnAFP isoform, CnAFP mut3)을 10, 50, 100, 200 ug/ml 농도로 24시간 처리한 후 자외선을 조사하여 MMP-1의 발현량을 확인한 결과 CPS1와 CPS2에서 MMP-1 억제 효능을 확인하였다.

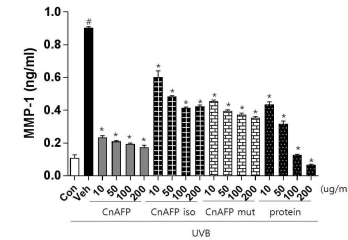


그림 89. CPS1, CPS2의 MMP-1발현량 #p<0.05, con vs vehicle, *p<0.05, vehicle vs samples

- CPS2와 CPS1 3종 (CnAFP, CnAFP isoform, CnAFP mut3)을 10, 50, 100, 200 ug/ml 농도로 24시간 처리한 후 자외선을 조사하여 hyaluronan의 발현량을 확인한 결과 CPS1와 CPS2에서 hyaluronan의 발현량이 증가함을 확인하였다(그림 90).

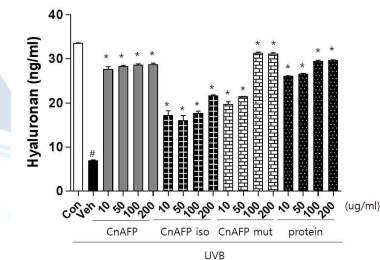


그림 90. CPS1, CPS2의 hyaluronan 발현량 #p<0.05, con vs vehicle, *p<0.05, vehicle vs samples

○ 후보 균주의 분획물 및 구조 동정

- KSF0108과 KSF0006에서 자외선 흡수 분석 (UV), 자외선 흡수 분석 (IR), 질량 분석 (Mass Spectroscopy), 핵자기 공명 스펙트럼 분석 (NMR Spectroscopy) 등 분광학적 방법을 이용해 생리활성 화합물의 구조를 분석하였다.

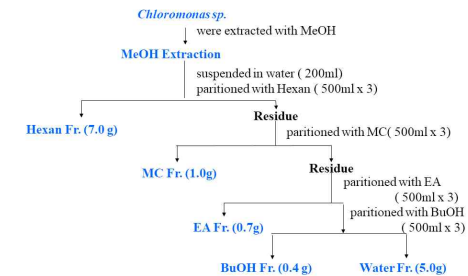


그림 91. Extraction and partition fraction from Chloromonas sp. KSF108

- Chloromonas sp. KSF0108에서 활성물질을 분리하기 위하여 시료 50 g을 MeOH로 추출하여 MeOH 추출물을 얻고, MeOH 추출물을 물에 현탁한 후 유기용매 hexane, CH₂Cl₂, EtOAc, BuOH로 분획하여 각각의 분획물 7.0 g, 1.0 g, 0.7 g, 0.4 g 및 5.0 g을 얻어 활성 측정을 하였다.
- Chloromonas sp. KSF0108 미세조류를 MeOH 추출액의 hexane, CH₂Cl₂, EtOAc, BuOH 용매분획물을 RAW264.7 cell에서 NO 생성억제 활성을 측정하였으나, 100 µg/mL 농도에서 강한활성은 측정되지 않았다.
- 각각의 용매분획물의 RAW264.7 cell에 대한 세포독성은 100 µg/mL 농도에서 약한 독성이 관찰되었다.

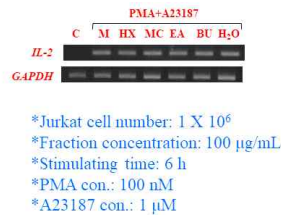


그림 92. IL-2 inhibition of fractions from Chloromonas sp. KSF108

- 각각의 용매분획물에 대해 Jurkat T를 이용해 IL-2 유리억제의 측정으로 항알러지 효과를 확인하였으나, 100 µg/mL 농도에서 강한활성은 측정되지 않았다.
- 활성 분획물에서 silica gel & RP C-18 고정상을 이용한 유효물질 분리하였고 분리된 화합물의 NMR & MASS 등의 기기분석을 이용한 구조 동정 결과 cholesterol, β-sitosterol, hurgadacin, α-tochoperol 등 10종이 동정되었다.

○미세조류 추출물의 자외선 손상 후 항노화 작용 기전 실험(한의학연구원)

- 피부 임상시험을 수행하기 위하여 대용량 스케일로 제조된 Micractinium sp. KSF0031 Extract 소재의 세포독성 및 세포보호, MMP-1 발현량 시험을 진행하였다.
- 세포배양은 HaCaT (human keratinocyte)세포를 DMEM (10% 우태아 혈청 첨가, 1% 항생제 포함) 배지에 현탁하여 37°C, 5% CO₂배양기에서 배양하고, 24시간 시료를 처리하였다.
- 후보소재의 세포독성을 확인하고 농도를 설정한 후, 후보소재를 24시간 처리한 후

자외선(UV Crosslinker, Ultra Lum)을 조사한 후 자외선에 의한 세포 보호효능과 MMP-1의 발현량과 피부 보습인자 (Hyaluronic acid, TGF-β)를 확인하였다.

- 실험결과 KSF0031은 세포독성이 없었음을 확인하였고, 자외선에 의해서 손상된 피부세포의 생존율을 회복시켰다. 또한 피부주름을 유발하는 단백질인 MMP-1의 발현을 억제하여 주름개선 효능이 있음을 확인하였다.

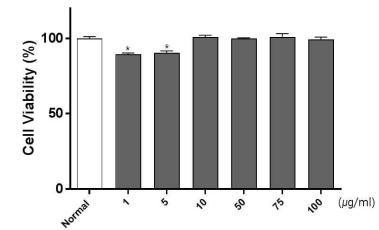


그림 93. Micractinium sp. KSF0031 소재의 세포독성. * p<0.05 vs normal group

- 피부 보습인자인 hyaluronic acid와 TGF-β는 피부세포에서 자외선에 의해 감소하는데 KSF0031에 의해 증가함을 확인함으로써 피부 보습에 효능이 있음을 확인하였다.

- 극지 연구소에서 스크리닝을 위하여 제공받았던 KSF0031 시료와 비교하여 임상시험을 수행하기 위해 대용량으로 제조된 Micractinium sp. KSF0031 Extract 소재의 효능(세포독성, MMP-1)이 동등함을 확인하였다.

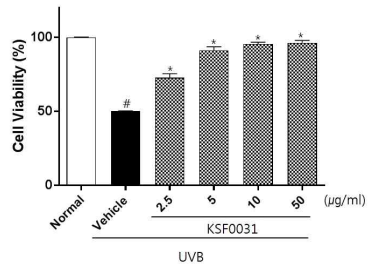


그림 94. *Microactinium* sp. KSF0031 소재의 자외선손상에 의한 세포보호 효능
$p < 0.05$ vs normal group,
* $p < 0.05$ vs vehicle group

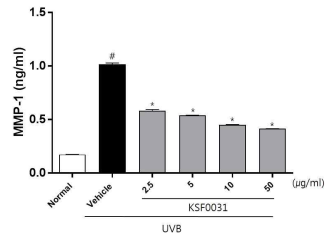


그림 95. *Microactinium* sp. KSF0031 소재의 자외선손상에 의한 MMP-1 억제 효능 # $p < 0.05$ vs normal group,
* $p < 0.05$ vs vehicle group

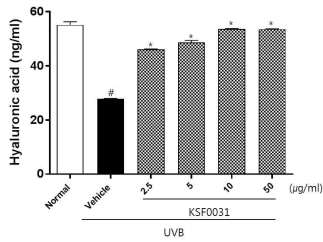


그림 96. *Microactinium* sp. KSF0031 소재의 자외선손상에 의한 보습 회복효능(# $p < 0.05$ vs normal group, * $p < 0.05$ vs vehicle group)

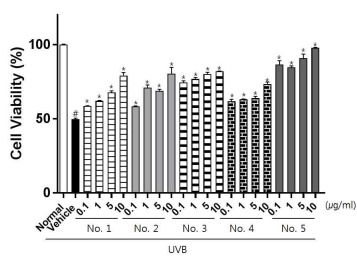
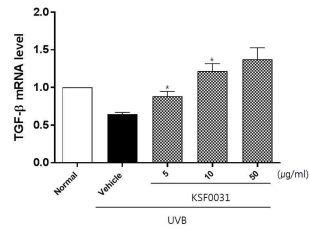
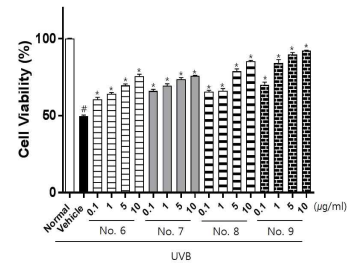


그림 97. *Microactinium* sp. KSF0031 화합물의 자외선손상에 의한 세포보호효능
$p < 0.05$ vs normal group, * $p < 0.05$ vs vehicle group



- *Microactinium* sp. KSF0031 Extract 소재에서 분리된 9개의 화합물을 제공받았으며 5번과 9번 화합물에서 UVB에 의한 세포 보호 효능이 있고 3, 5, 8, 9번에서 MMP-1의 억제 효능이 있음을 확인하였다.

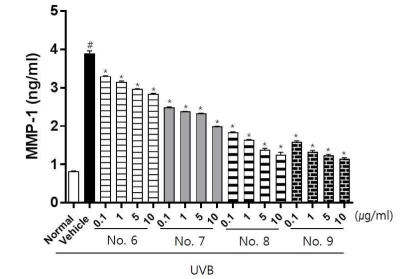
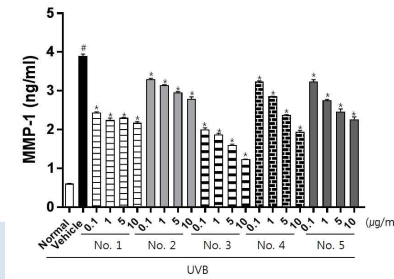


그림 98. *Microactinium* sp. KSF0031 화합물의 자외선손상에 의한 MMP-1 억제 효능.
$p < 0.05$ vs normal group, * $p < 0.05$ vs vehicle group

- 피부세포 보호 효능과 MMP-1 억제 효능이 확인된 화합물 3, 5, 8, 9번의 피부보습 효능을 확인한 결과 5, 9번의 효능이 가장 좋음을 확인하였다.

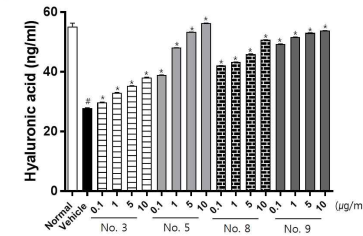


그림 99. *Microactinium* sp. KSF0031 화합물의 자외선손상에 의한 HA 증진 효능.
$p < 0.05$ vs normal group, * $p < 0.05$ vs vehicle group

○활성분획물 정제시 클로로필 제거 (극지연구소)

- 남극 미세조류 KSP0031번으로부터 열수추출법에 의한 클로로필의 제거 방법 개선 : 좌측은 클로로필 제거 전의 사진이며, 진한 녹색을 나타내고 있다. 우측의 사진은 추출법의 개선으로 클로로필을 현저히 제거한 추출액 상태이다.

- 피부독성 실험을 위한 KSP0031번 미세조류의 열수추출물 다량 확보 및 제공되었다.

- KSF0041번의 메탄을 추출물 제조 후 대구 가콜리대에 제공되었다.
- KSF0031번의 메탄을 추출물 제조 후 각각 hexan, 에틸아세테이트, 부탄올, 물 분획물 제조 및 실온에서 안정성 테스트를 실시하였다.

○CPS 후보물질 분획 및 구조 동정 (대구가대)

- *Chlamydomonas* sp. KSF0108 미세조류에서 11종의 분리화합물 활성평가를 하였다.
- *Chlamydomonas* sp. KSF0108 미세조류에서 분리한 11종의 화합물의 항염증활성 평가를 위해 RAW264.7 cell에 LPS를 처리한 후 NO 생성억제 정도를 측정하였다. 아래 그림과 같이 NO 생성억제 활성이 낮음을 확인하였다.



클로로필 제거 전 추출물 클로로필 제거 및 개선된 추출물

그림 100. 클로로필 제거 및 개선

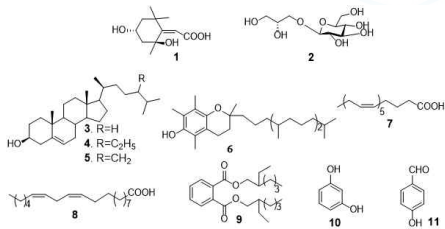


그림 101. Structure of compounds from *Chlamydomonas* sp. KSF0108

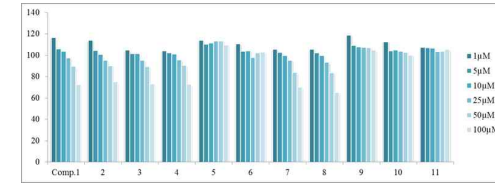


그림 102. Inhibition of NO production of compounds from *Chlamydomonas* sp. KSF0108

- 분리한 화합물(2, 5번 화합물 제외)에 대해 항알러지를 평가하기 위하여 Jurkat T cell에서 IL-2 생성억제 활성이 100 µM 농도에서 1, 7, 8번 화합물에서 확인되었다.

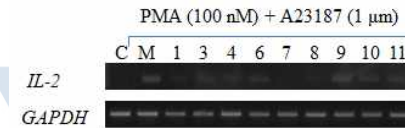


그림 103. IL-2 inhibition of compounds 1-11

- 활성물질의 *Micractinium* sp. KSF0031 미세조류에서 분리 및 구조동정
- *Micractinium* sp. KSF0031 미세조류의 용매 분획 후 각종 크로마토그래피를 이용하여 화합물 분리하였고, NMR 및 MASS 등을 이용하여 화합물의 구조 동정을 하였다.

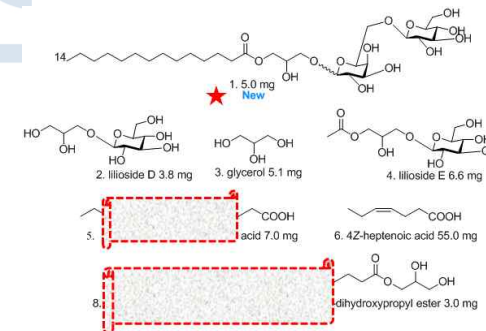


그림 104. KSF0031에서 분리한 8개 화합물 구조식

○ 극지 미세조류 시료의 국제화학품원료집(ICID)에 소재 등재 1

* ICID (International Cosmetic Ingredient Dictionary): 미국화장품협회(CTFA)에서 발행하는 화장품원료사전으로 화장품과 퍼스널케어에 사용가능한 원료리스트를 제공

1) 소재의 ICID 관련 서류를 준비하여 신청하여 등록 완료(2018.05.17)

2) 상품명 : KOPRI-KIOM KSF0031, INCI 명칭 : *Micractinium* sp. KSF0031 Extract



그림 105. ICID 등재 1

제공



Trade Name:
KOPRI-KIOM Eico glycerol

Assigned INCI Name:
Glyceryl Eicosapentaenoate

< INCI 명칭:Glyceryl Eicosapentaenoate> < 상품명 : KOPRI-KIOM Eico glycerol >

그림 106. ICID 등재 2

○ 비임상효력검증-세포독성 및 주름개선 평가

1) 방법

- 임상시험을 수행하기 위하여 대용량 스케일로 제조된 Glyceryl Eicosapentaenoate 소재의 세포독성 및 세포보호, MMP-1 발현량 시험을 진행함.

- 세포배양은 HaCaT (human keratinocyte)세포를 미국 세포주 은행 (American Type Culture Collection, ATCC)에서 분양받아, DMEM (10% 우태아 혈청 첨가, 1% 항생제 포함) 배지에 현탁하여 37°C, 5% CO2배양기에서 배양하고, 24시간 시료를 처리함.

- 후보소재의 세포독성을 확인하고 농도를 설정한 후, 후보소재를 24시간 처리한 후 자외선(UV Crosslinker, Ultra Lum)을 조사한 후 자외선에 의한 세포 보호효능과 MMP-1의 발현량을 확인함.

2) 결과

- 실험결과 Glyceryl Eicosapentaenoate은 세포독성이 없었음을 확인하였고, 자외선에 의해서 손상된 피부세포의 생존율을 회복시켰음. 또한 피부노화를 유발하는 단백질인 MMP-1의 발현을 억제하여 주름개선 효능이 있음을 확인함.

* CTFA는 전세계의 화장품제조업자 및 유통업자, 원료생산자 및 공급자, 부가제업자, 기타관련업체 등의 업체가 회원으로 가입되어 있는 미국화장품협회로서 인터넷주소는 <http://www.ctfa.org>

* ICID (International Cosmetic Ingredient Dictionary): 미국화장품협회(CTFA)에서 발행하는 화장품원료사전으로 화장품과 퍼스널케어에 사용가능한 원료리스트를 제공

○ 극지 시료의 피부 안전성(자극테스트) 평가 (KFDA, CTFA 가이드라인) (한의학연구원)

- 최고 연령자 49세, 최저 연령자 21세, 평균 연령 37.58세±9.69세의 총 31명의 선정기준과 제외기준에 부합하는 대상자가 인체 피부 일차자극 시험에 참여하였음. 등 부위에 시험물질을 도포하여 48시간 후 제거 하였고 첩포 제거 30분 후와 24시간 후를 관찰하여 Frosch & Kligman method에 의해 평가하였음

- 첩포농도 0.25%의 시험 결과 48시간 후 1명, 72시간 후 2명이 피부에서 경미한 자극을 보였음

○ 극지 미세조류 시료의 국제화장품원료집(ICID)에 소재 등재 2 (한국한의학연구원)

1) 소재의 ICID 관련 서류를 준비하여 신청하여 등록 완료(2019.05.24)

2) 상품명 : KOPRI-KIOM Eico glycerol, INCI 명칭 : Glyceryl Eicosapentaenoate

* ICID (International Cosmetic Ingredient Dictionary): 미국화장품협회(CTFA)에서 발행하는 화장품원료사전으로 화장품과 퍼스널케어에 사용가능한 원료리스트를

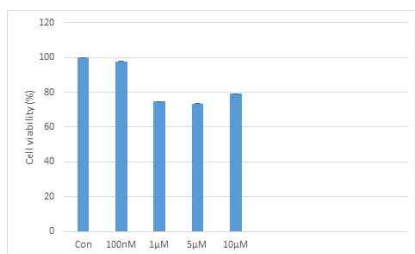


그림 107. Glyceryl Eicosapentaenoate의 세포독성

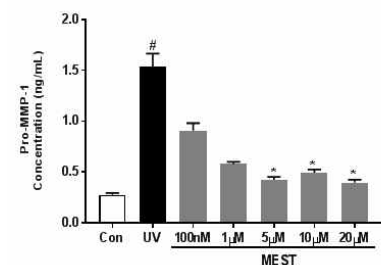


그림 108. Glyceryl Eicosapentaenoate의 MMP-1 억제 효능
$p < 0.05$ vs normal group
* $p < 0.05$ vs vehicle group

표 21. 극미세조류 샘플 추출리스트.

Sample name	건조시료 무게(g)	추출 용매	추출물 무게(mg)
KSF001	1	Methanol	226
KSF003	1	Methanol	268
KSF006	1	Methanol	177
KSF0013	1	Methanol	128
KSF0015	1	Methanol	186
KSF0019	1	Methanol	190
KSF0032	1	Methanol	224
KSF0037	1	Methanol	183
KSF0041	1	Methanol	229
KSF0044	1	Methanol	89
KSF0048-3(A)	1	Methanol	221
KSF0086	1	Methanol	205
KSF0092	1	Methanol	146
KSF0100	1	Methanol	225
KSF0108	1	Methanol	271
KSF0221	1	Methanol	251
KNM29C	1	Methanol	268
KNF008	1	Methanol	170

- 항노화 주름 개선 화합물의 유도체 합성
 - 화합물 1, 1-Eicosapentaenoyl glycerol (1, JY01-1934, CASNo.140670-39-9)의 합성

2.3 신규 CPS 화합물의 분석 및 합성

- 극미세조류의 배양 및 추출물 제조
 - 배양된 극미세조류 건조 시료 18종 (1 g)에 대해 Methanol 용매를 이용하여 실온에서 100 ml x 2회 추출하였다.
 - 추출물들은 회전식 농축 증발기를 이용하여 용매를 제거하였다.
 - 각각의 추출물들은 Table 1에 표기하였다.

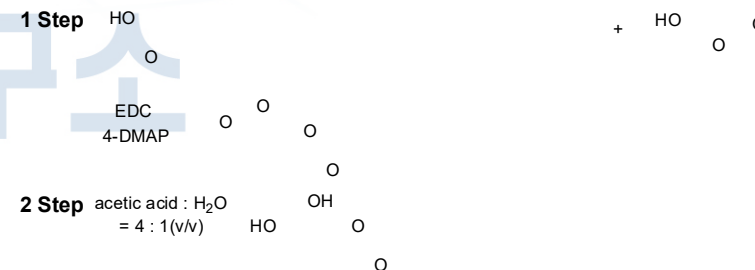


그림 109. 화합물 1, 1-Eicosapentaenoyl glycerol의 합성 (Reagents and Conditions; 1 Step : a dry MC, solketal, Eicosapentaenoic acid, EDC, 4-DMAP, room temperature, overnight; 2 Step : acetone, acetic acid : H₂O=4:1(v/v),NaHCO₃)

- 화합물의 합성방법(1): 1 단계: solketal (1eq, 0.165 mmol) 용액과 Eicosapentaenoic acid (1eq, 0.165 mmol) 용액에 EDC (1.2eq, 0.198 mmol)와 4-DMAP (0.2eq, 0.033 mmol)을 첨가하여 상온에서 진탕하여 하루정도 반응하였다. 혼합액을 감압농축기를

이용해 농축하고 물(30 mL)을 넣은후, Et₂O를 넣고 추출하였다(3X30 mL). 유기추출물을 brine으로 수세하고 anhydrous Na₂SO₄를 넣고 건조함. 잔여 용매를 감압농축기를 이용해 제거하고 실리카겔상에서 chromatography(HEX/EtOAc=8:1)하여 정제하였다.

- 2 단계: AcOH/H₂O (4:1,v/v; 2.5 mL)에 녹인 acetonide 용액을 50도에서 30분간 진탕하였다. NaHCO₃(saturated aq.; 5 mL) 첨가한 후 증류수 (15 mL)를 넣고, 혼합액을 EtOAc(3X30 mL)을 이용하여 추출하였다. 유기추출물을 brine으로 수세하고 anhydrous Na₂SO₄건조함. 잔여 용매를 감압농축기를 이용해 제거하고 실리카겔상에서 chromatography(HEX/EtOAc=gradient elution to 1:1 from 3:1)하여 정제하였다.

- 1-Eicosapentaenoyl glycerol (CASNo.140670-39-9): Yield = 52.19% ; colorless oil; R_f=0.28(1:1*n*-hexane-ethyl acetate); ¹HNMR(300MHz,CDCl₃-d₆):δ_H 5.38(m,1H), 4.20(m,2H), 3.93(m,1H), 3.69(dd, J=6Hz, 1H), 3.65(dd, J=6Hz, 1H), 2.84(m,8H), 2.37(t, J=6Hz, 2H), 2.11(m, 5H), 1.72(m, 2H), 0.98(t, 3H)

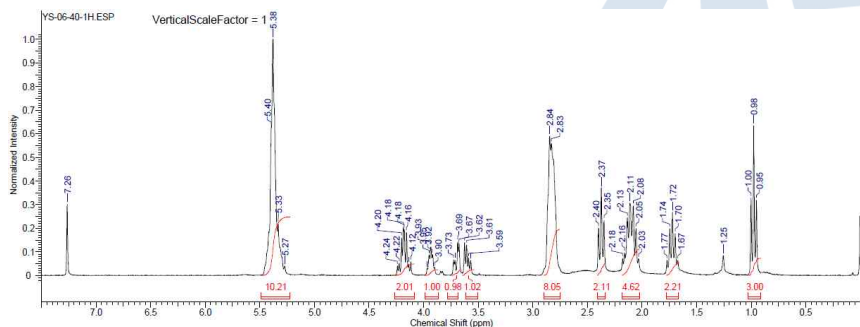


그림 110. 화합물 1, 1-Eicosapentaenoyl glycerol의 1H NMR spectrum.

- 화합물 2, Decursinol + EPA (2, JY02-1935)의 합성

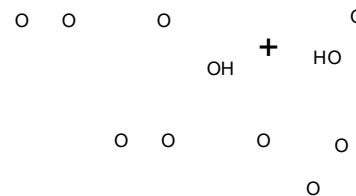


그림 111. 화합물 2, Decursinol + EPA의 합성 (Reagents and Conditions; a dry MC, Decursinol, Eicosapentaenoic acid, EDC, 4-DMAP, room temperature, overnight)

- 화합물의 합성방법(2): Decursinol (1eq, 0.165 mmol) 과 Eicosapentaenoic acid (1eq, 0.165 mmol) 용액에 EDC (1.2eq, 0.198 mmol) 와 4-DMAP (0.2eq, 0.033 mmol)를 첨가하고 상온에서 하루동안 반응시키고 감압농축기를 이용해 농축하였다. 물(30 mL)을 넣은후, Et₂O를 넣고 추출하였다(3X30 mL). 유기추출물을 brine으로 수세하고 anhydrous Na₂SO₄를 넣고 건조함. 잔여 용매를 감압농축기를 이용해 제거하고 실리카겔상에서 chromatography(HEX/EtOAc=5:1)하여 정제하였다.

- Decursinol + EPA (2, JY02-1935): Yield = 64.8 %; Yellow oil; R_f=0.34(8:1*n*-hexane-ethyl acetate); ¹HNMR(300MHz,CDCl₃-d₆):δ_H 7.58(d, J=9Hz, 1H), 7.15(s, 1H), 6.80(s, 1H), 6.23(d, J=9Hz, 1H), 5.35(m, 10H), 5.05(t, J=3Hz, 1H), 3.19(dd, J=6Hz, 1H), 2.83(m, 9H), 2.34(t, J=6Hz, 2H), 2.06(m, 4H), 1.68(m, 2H), 1.37(d, J=6Hz, 6H), 0.97(t, J=6Hz, 3H)

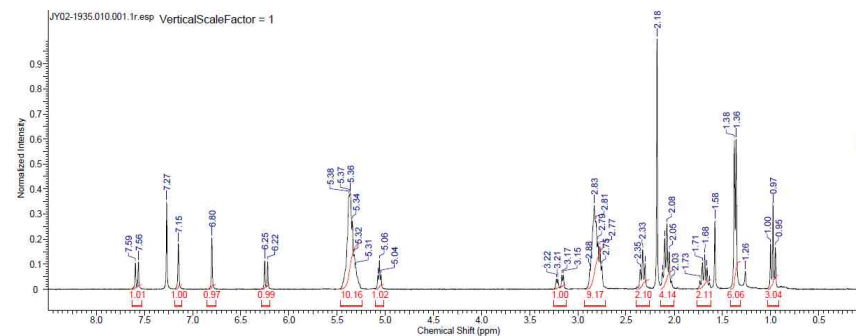


그림 112. 화합물 2, Decursinol + EPA의 1H NMR spectrum.

- 화합물 3, 4-Isopropyl cinnamoyl glycerol (3, JY06-19328)의 합성

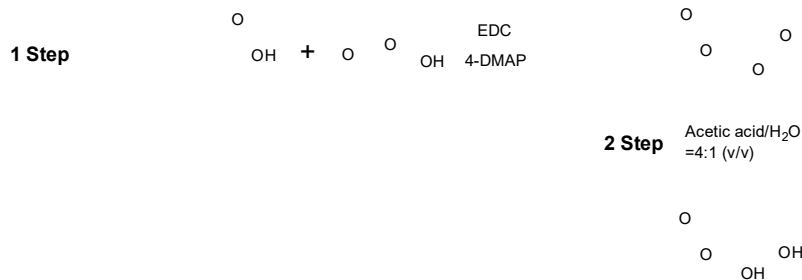


그림 113. 화합물 3, 4-Isopropyl cinnamoyl glycerol의 합성 (Reagents and Conditions: 1 Step : a dry MC, 4-Isopropyl cinnamic acid, solketal, EDC, 4-DMAP, room temperature, overnight; 2 Step : acetonide, acetic acid : H₂O=4:1(v/v),NaHCO₃)

- 화합물의 합성방법(3): 1 단계: solketal (1eq, 0.263mmol) 과 4-Isopropyl cinnamic acid (1eq, 0.263mmol) 용액에 EDC (1.2eq, 0.316mmol) 와 4-DMAP (0.2eq, 0.053mmol)를 첨가하였다. 상온에서 하루동안 반응시키고 감압농축기를 이용해 농축함. 물(30mL)을 넣은후, Et₂O를 넣고 추출하였다(3X30mL). 유기추출물을 brine으로 수세하고 anhydrous Na₂SO₄를 넣고 건조하고 잔여 용매를 감압농축기를 이용해 제거하고 실리카겔상에서 chromatography(HEX/EtOAc=8:1)하여 ester를 정제하였다.

- 2 단계: AcOH/H₂O (4:1,v/v;2.5mL)에 녹인 acetonide 용액을 50도에서 30분간 진탕함. NaHCO₃(saturated aq.;5mL) 첨가한 후 증류수 (15mL)를 넣고, 혼합액을 EtOAc(3X30mL)을 이용하여 추출함. 유기추출물을 brine으로 수세하고 anhydrous Na₂SO₄건조하였다. 잔여 용매를 감압농축기를 이용해 제거하고 실리카겔상에서 chromatography(HEX/EtOAc=gradient elution to 1:3 from 5:1)하여 4-Isopropyl cinnamoyl glycerol을 정제하였다.

- 4-Isopropyl cinnamoyl glycerol: Yield = 63.2 %; colorless oil; R_f=0.13(1:1n-hexane-ethyl acetate); ¹HNMR(300MHz,DMSO-d₆): δ_H 7.64(dd,J=6Hz, 3H), 7.31(d, J=6Hz, 2H), 6.565(d, J=15Hz, 1H), 4.945(d, J=3Hz, 1H), 4.64(t, J=3Hz,

1H), 4.105(dd, J=6Hz, 1H), 4.02(dd, J=6Hz, 1H), 3.715(q, J=3Hz, 1H), 3.392(m, 2H), 2.915(q, J=16.5Hz, 1H), 1.205(d, J=9Hz, 6H)

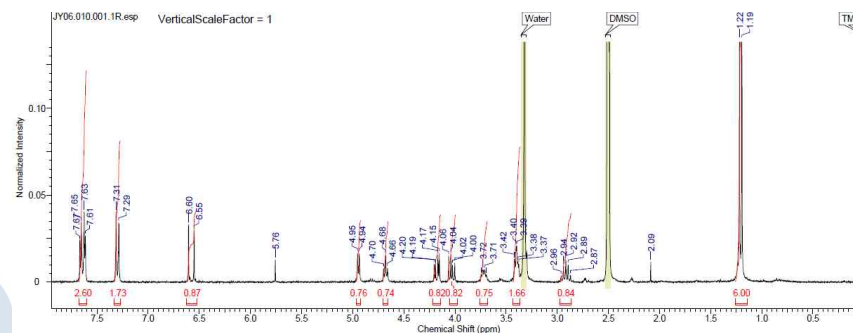


그림 114. 화합물 3, 4-Isopropyl cinnamoyl glycerol의 1H NMR spectrum.

- 화합물 4, 4-Methyl cinnamoyl glycerol (4, JY08-1944)의 합성

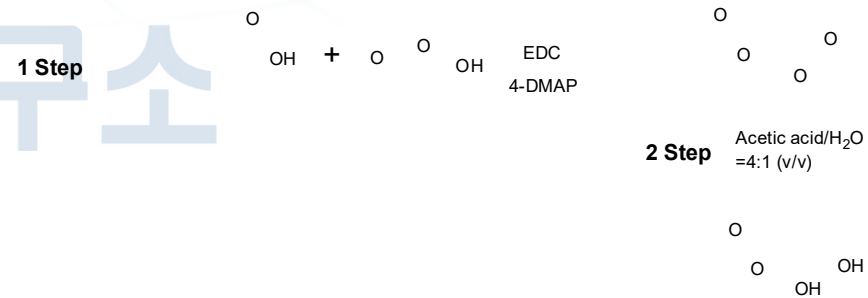


그림 115. 화합물 4, 4-Methyl cinnamoyl glycerol의 합성 (Reagents and Conditions: 1 Step : a dry MC, 4-Methyl cinnamic acid, solketal, EDC, 4-DMAP, room temperature, overnight; 2 Step : acetonide, acetic acid : H₂O=4:1(v/v),NaHCO₃)

- 화합물의 합성방법(4): 1 단계: solketal (1eq, 0.617mmol) 과 4-Methyl cinnamic

acid (1eq, 0.617mmol) 용액에 EDC (1.2eq, 0.740mmol) 와 4-DMAP (0.2eq, 0.123mmol)를 첨가하였다. 상온에서 하루동안 반응시키고 감압농축기를 이용해 농축하였다. 물(30mL)을 넣은후, Et₂O를 넣고 추출(3X30mL)하고 유기추출물을 brine으로 수세하고 anhydrous Na₂SO₄를 넣고 건조하였다. 잔여 용매를 감압농축기를 이용해 제거하고 실리카겔상에서 chromatography(HEX/EtOAc=5:1)하여 ester를 정제하였다.

- 2 단계: AcOH/H₂O (4:1,v/v;2.5mL)에 녹인 acetonide 용액을 50도에서 30분간 진탕하였다. NaHCO₃(saturated aq.;5mL) 첨가한 후 증류수 (15mL)를 넣고, 혼합액을 EtOAc(3X30mL)을 이용하여 추출하였다. 유기추출물을 brine으로 수세하고 anhydrous Na₂SO₄건조하였다. 잔여 용매를 감압농축기를 이용해 제거하고 실리카겔상에서 chromatography(HEX/EtOAc=gradient elution to 1:3 from 5:1)하여 4-Methyl cinnamoyl glycerol을 정제하였다.

- 4-Methyl cinnamoyl glycerol: Yield = 78.0 %; White solid; mp : 66.5°C; R_f=0.13(1:1*n*-hexane-ethyl acetate); ¹HNMR(300MHz,DMSO-d₆):δ_H 7.64(d, J=18Hz, 3H), 7.60(s, 2H), 6.575(d, J=18Hz, 1H), 4.94(d, J=6Hz, 1H), 4.675(t,J=6Hz, 1H), 4.165(dd, J=4.5Hz, 1H), 4.03(dd, J=6Hz, 1H), 3.72(sept, J=4Hz, 1H), 3.39(m, 2H)

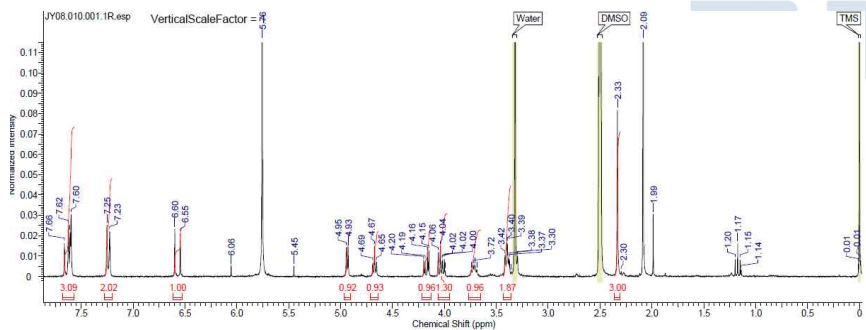


그림 116. 화합물 4, 4-Methyl cinnamoyl glycerol의 ¹H NMR spectrum

- 화합물 5, 2-Fluorocinnamoyl glycerol (5, JY10-19410)의 합성

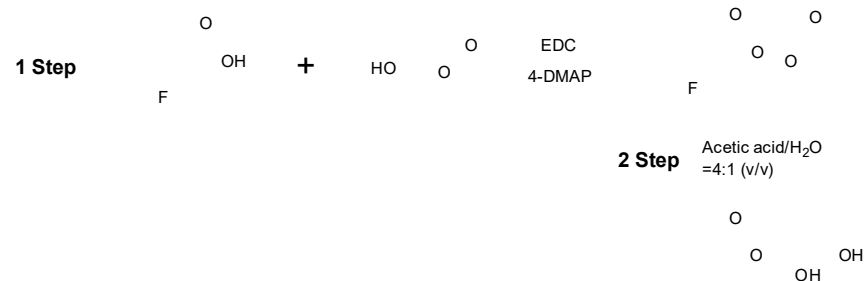


그림 117. 화합물 5, 2-Fluorocinnamoyl glycerol (5, JY10-19410)의 합성 Reagents and Conditions; 1 Step : a dry MC, 2-Fluoro cinnamic acid, solketal, EDC, 4-DMAP, room temperature, overnight; 2 Step : acetonide, acetic acid : H₂O=4:1(v/v),NaHCO₃

- 화합물의 합성방법(5): 1 단계: solketal (1eq, 1.204mmol) 과 2-Fluoro cinnamic acid (1eq, 1.204mmol) 용액에 EDC (1.2eq, 1.445mmol) 와 4-DMAP (0.2eq, 0.241mmol) 를 첨가하고 상온에서 하루동안 반응시키고 감압농축기를 이용해 농축하였다. 물 (30mL)을 넣은후, Et₂O를 넣고 추출하였다(3X30mL). 유기추출물을 brine으로 수세하고 anhydrous Na₂SO₄를 넣고 건조함. 잔여 용매를 감압농축기를 이용해 제거하고 실리카겔상에서 chromatography(HEX/EtOAc=5:1)하여 ester를 정제하였다.

- 2 단계: AcOH/H₂O (4:1,v/v;2.5mL)에 녹인 acetonide 용액을 50도에서 30분간 진탕하였다. NaHCO₃(saturated aq.;5mL) 첨가한 후 증류수 (15mL)를 넣고, 혼합액을 EtOAc(3X30mL)을 이용하여 추출하였다. 유기추출물을 brine으로 수세하고 anhydrous Na₂SO₄건조함. 잔여 용매를 감압농축기를 이용해 제거하고 실리카겔상에서 chromatography(HEX/EtOAc=gradient elution to 1:3 from 3:1)하여 2-Fluoro cinnamoyl glycerol을 정제하였다.

- 2-Fluoro cinnamoyl glycerol: Yield = 71.65 %; White solid; mp : 51°C; R_f=0.13(1:1*n*-hexane-ethyl acetate); ¹HNMR(300MHz,DMSO-d₆):δ_H 7.885(t, J=7Hz, 1H), 7.74(d,J=20Hz, 1H), 7.51(q, J=6Hz, 1H), 7.314(q, J=9Hz, 2H), 6.70(d, J=20Hz, 1H), 4.964(d, J=3Hz, 1H), 4.69(t, J=5Hz, 1H), 4.19(dd, J=4Hz, 1H), 3.72(dd, J=4Hz, 1H), 3.41(m,2H)

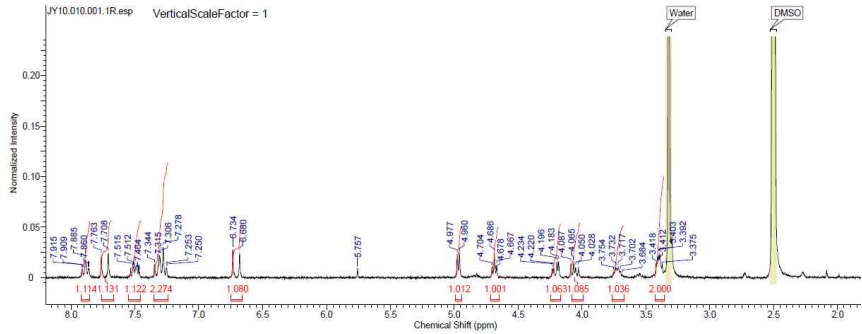


그림 118. 화합물 5, 2-Fluorocinnamoyl glycerol 의 1H NMR spectrum.

- 화합물 6, 3-Methyl cinnamoyl glycerol (6, JY05-19326)의 합성

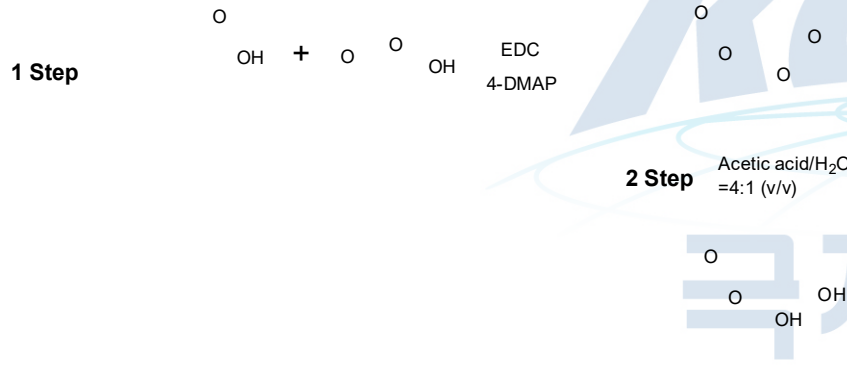


그림 119. 화합물 6, 3-Methyl cinnamoyl glycerol (6, JY05-19326)의 합성 (Reagents and Conditions; 1 Step : a dry MC, 3-Methyl cinnamic acid, solketal, EDC, 4-DMAP, room temperature, overnight; 2 Step : acetone, acetic acid : H₂O=4:1(v/v),NaHCO₃)

- 화합물의 합성방법(6): 1 단계: solketal (1eq, 0.308mmol) 과 3-Methyl cinnamic acid (1eq, 0.308mmol) 용액에 EDC (1.2eq, 0.370mmol) 와 4-DMAP (0.2eq, 0.062mmol)를 첨가하였다. 상온에서 하루동안 반응시키고 감압농축기를 이용해 농축하고 물(30mL)을 넣은후, Et₂O를 넣고 추출하였다(3X30mL). 유기추출물을 brine으로 수세하고 anhydrous Na₂SO₄를 넣고 건조하였다. 잔여 용매를 감압농축기를 이용해 제거하고 실리카겔상에서 chromatography(HEX/EtOAc=5:1)하여 ester를 정제하

였다.

- 2 단계: AcOH/H₂O (4:1,v/v;2.5mL)에 녹인 acetone 용액을 50도에서 30분간 진탕하고 NaHCO₃(saturated aq.;5mL) 첨가한 후 증류수 (15mL)를 넣고, 혼합액을 EtOAc(3X30mL)을 이용하여 추출하였다. 유기추출물을 brine으로 수세하고 anhydrous Na₂SO₄건조함. 잔여 용매를 감압농축기를 이용해 제거하고 실리카겔상에서 chromatography(HEX/EtOAc=gradient elution to 1:3 from 2:1)하여 3-Methyl cinnamoyl glycerol을 정제하였다.

- 3-Methyl cinnamoyl glycerol: Yield = 74.5 %; White solid; mp : 85.5°C; R_f=0.14(1:1n-hexane-ethyl acetate); ¹HNMR(300MHz,DMSO-d₆):δ_H 7.64(d,J=19Hz, 1H), 7.53(t, J=7Hz, 2H), 7.29(m, 2H), 6.62(d, J=19Hz, 1H), 4.945(d, J=3Hz, 1H), 4.68(t, J=6Hz, 1H), 4.13(dd, J=4.5Hz, 1H), 4.04(dd, J=4.5Hz, 1H), 3.72(sept, J=4Hz, 1H), 3.41(m, 2H)

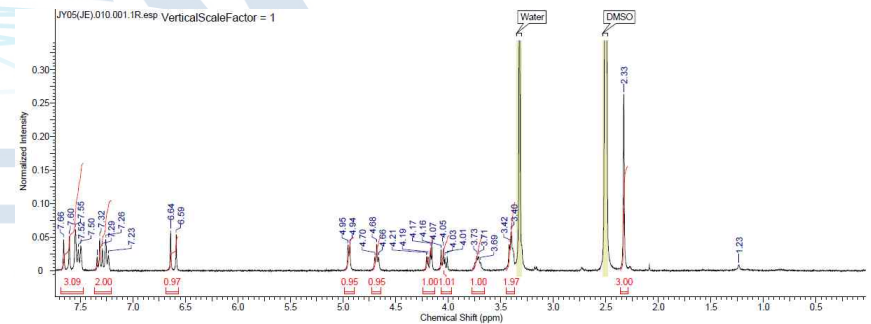


그림 120. 화합물 6, 3-Methyl cinnamoyl glycerol 1의 1H NMR spectrum.

- 화합물 7, Trans-Cinnamoyl glycerol (7, JY12-19410)의 합성

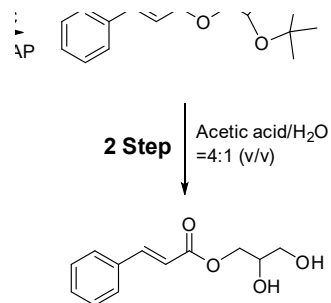


그림 121. 화합물 7, Trans-Cinnamoyl glycerol (7, JY12-19410)의 합성 (Reagents and Conditions; 1 Step : a dry MC, Trans-cinnamic acid, solketal, EDC, 4-DMAP, room temperature, overnight; 2 Step : acetone, acetic acid : H₂O=4:1(v/v),NaHCO₃)

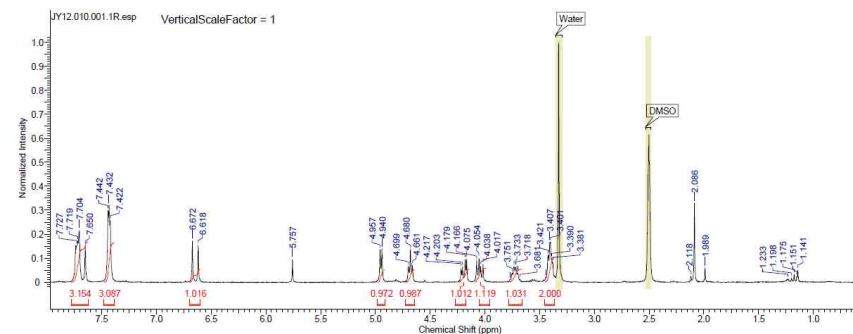


그림 122. 화합물 7, Trans-Cinnamoyl glycerol의 1H NMR spectrum.

- 화합물의 합성방법(7): 1 단계: solketal (1eq, 1.350mmol) 과 Trans-cinnamic acid (1eq, 1.350mmol) 용액에 EDC (1.2eq, 1.62mmol) 와 4-DMAP (0.2eq, 0.27mmol)를 첨가하였다. 상온에서 하루동안 반응시키고 감압농축기를 이용해 농축하고 물 (30mL)을 넣은후, Et₂O를 넣고 추출하였다(3X30mL). 유기추출물을 brine으로 수세하고 anhydrous Na₂SO₄를 넣고 건조하였다. 잔여 용매를 감압농축기를 이용해 제거하고 실리카겔상에서 chromatography(HEX/EtOAc=5:1)하여 ester를 정제하였다.
- 2 단계: AcOH/H₂O (4:1,v/v;2.5mL)에 녹인 acetone 용액을 50도에서 30분간 진탕하였다. NaHCO₃(saturated aq.;5mL) 첨가한 후 증류수 (15mL)를 넣고, 혼합액을 EtOAc(3X30mL)을 이용하여 추출하고 유기추출물을 brine으로 수세하고 anhydrous Na₂SO₄건조하였다. 잔여 용매를 감압농축기를 이용해 제거하고 실리카겔상에서 chromatography(HEX/EtOAc=gradient elution to 1:3 from 3:1)하여 Trans-cinnamoyl glycerol을 정제하였다.

- Trans- cinnamoyl glycerol: Yield = 21.5 %; colorless semi-solid; R_f=0.13(1:1*n*-hexane-ethyl acetate); ¹HNMR(300MHz,DMSO-d₆):δ_H 7.71(d,J=19Hz, 1H), 7.65(s, J=2H), 7.43(m, 3H), 6.65(d, J=19Hz, 1H), 4.945(d, J=3Hz, 1H), 4.68(t, J=6Hz, 1H), 4.17(dd, J=4.5Hz, 1H), 4.04(dd, J=4.5Hz, 1H), 3.73(sept, J=4Hz, 1H), 3.42(m, 2H)

그림 123. 화합물 8, 3-(Trifluoromethyl)cinnamoyl glycerol (8, JY14-19416)의 합성 (Reagents and Conditions; 1 Step : a dry MC, 3-(Trifluoromethyl) cinnamic acid, solketal, EDC, 4-DMAP, room temperature, overnight; 2 Step : acetone, acetic acid : H₂O=4:1(v/v),NaHCO₃)

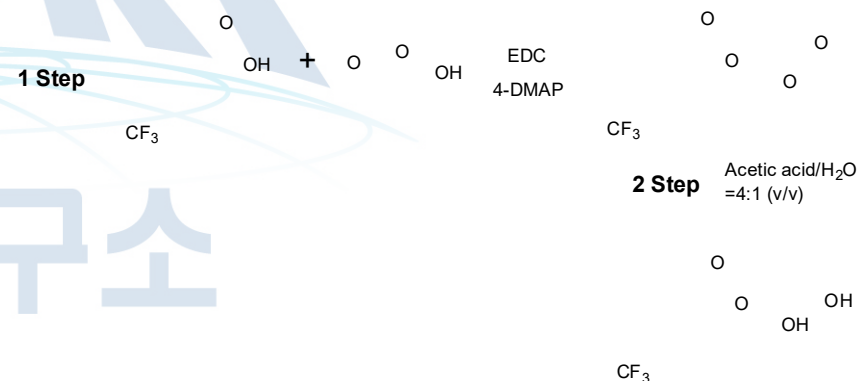


그림 123. 화합물 8, 3-(Trifluoromethyl)cinnamoyl glycerol (8, JY14-19416)의 합성 (Reagents and Conditions; 1 Step : a dry MC, 3-(Trifluoromethyl) cinnamic acid, solketal, EDC, 4-DMAP, room temperature, overnight; 2 Step : acetone, acetic acid : H₂O=4:1(v/v),NaHCO₃)

- 화합물의 합성방법(8): 1 단계: solketal (1eq, 0.925mmol) 과 3-(Trifluoromethyl) cinnamic acid (1eq, 0.925mmol) 용액에 EDC (1.2eq, 1.62mmol) 와 4-DMAP (0.2eq, 0.27mmol)를 첨가하였다. 상온에서 하루동안 반응시키고 감압농축기를 이용해 농축

하고 물(30mL)을 넣은후, Et₂O를 넣고 추출하였다(3X30mL). 유기추출물을 brine으로 수세하고 anhydrous Na₂SO₄를 넣고 건조하였다. 잔여 용매를 감압농축기를 이용해 제거하고 실리카겔상에서 chromatography(HEX/EtOAc=5:1)하여 ester를 정제하였다.

- 2 단계: AcOH/H₂O (4:1,v/v;2.5mL)에 녹인 acetone 용액을 50도에서 30분간 진탕하였다. NaHCO₃(saturated aq.;5mL) 첨가한 후 증류수 (15mL)를 넣고, 혼합액을 EtOAc(3X30mL)을 이용하여 추출하였다. 유기추출물을 brine으로 수세하고 anhydrous Na₂SO₄건조하였다. 잔여 용매를 감압농축기를 이용해 제거하고 실리카겔상에서 chromatography(HEX/EtOAc=gradient elution to 1:3 from 3:1)하여 Trans-cinnamoyl glycerol을 정제하였다.

- 3-(Trifluoromethyl) cinnamoyl glycerol: Yield = 62.8 %; White solid; mp : 51 °C; R_f=0.16(1:1*n*-hexane-ethyl acetate); ¹HNMR(300MHz,DMSO-d₆):δ_H 8.11 (dd,J=6Hz, 2H), 7.75(m, 3H), 6.85(d, J=20Hz, 1H), 4.94(d, J=3Hz, 1H), 4.68(t, J=6Hz, 1H), 4.20(dd, J=4.5Hz, 1H), 4.06(dd, J=4.5Hz, 1H), 3.73(sept, J=4Hz, 1H), 3.42(m, 2H)

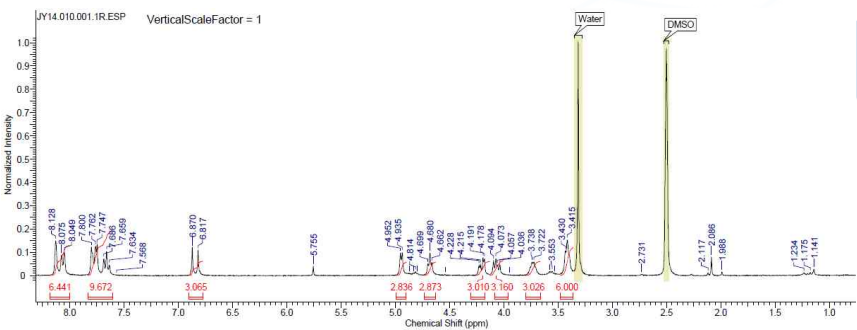


그림 124. 화합물 8, 화합물 8, 3-(Trifluoromethyl)cinnamoyl glycerol의 ¹H NMR spectrum.

- 화합물 9, 3-Bromo cinnamoyl glycerol (9, JY16-19416)의 합성



그림 125. 화합물 9, 3-Bromo cinnamoyl glycerol (9, JY16-19416)의 합성 (Reagents and Conditions; 1 Step : a dry MC, 3-Bromo cinnamic acid, solketal, EDC, 4-DMAP, room temperature, overnight; 2 Step : acetone, acetic acid : H₂O=4:1(v/v),NaHCO₃)

- 화합물의 합성방법(9): 1 단계: solketal (1eq, 0.881mmol) 과 3-Bromo cinnamic acid (1eq, 0.881mmol) 용액에 EDC (1.2eq, 1.057mmol) 와 4-DMAP (0.2eq, 0.176mmol) 를 첨가함. 상온에서 하루동안 반응시키고 감압농축기를 이용해 농축하였다. 물 (30mL)을 넣은후, Et₂O를 넣고 추출하였다(3X30mL). 유기추출물을 brine으로 수세하고 anhydrous Na₂SO₄를 넣고 건조하였다. 잔여 용매를 감압농축기를 이용해 제거하고 실리카겔상에서 chromatography(HEX/EtOAc=4:1)하여 ester를 정제하였다.

- 2 단계: AcOH/H₂O (4:1,v/v;2.5mL)에 녹인 acetone 용액을 50도에서 30분간 진탕하였다. NaHCO₃(saturated aq.;5mL) 첨가한 후 증류수 (15mL)를 넣고, 혼합액을 EtOAc(3X30mL)을 이용하여 추출함. 유기추출물을 brine으로 수세하고 anhydrous Na₂SO₄건조하였다. 잔여 용매를 감압농축기를 이용해 제거하고 실리카겔상에서 chromatography(HEX/EtOAc=gradient elution to 1:3 from 1:1)하여 3-Bromo cinnamoyl glycerol을 정제하였다.

- 3-Bromo cinnamoyl glycerol: Yield = 68.1 %; White solid; mp : 68.5°C; R_f=0.162(1:1*n*-hexane-ethyl acetate); ¹HNMR(300MHz,DMSO-d₆):δ_H 7.99 (s, 1H), 7.75(d, J=9Hz,1H), 7.62(m, 2H), 7.38(m, J=6Hz, 1H), 6.74(d, J=6Hz, 1H), 4.94(d, J=3Hz, 1H), 4.68(t, J=3Hz, 1H), 4.17(dd, J=4.5Hz, 1H), 4.05(dd, J=4.5Hz, 1H),

3.75(sept, J=4Hz, 1H), 3.42(m, 2H)

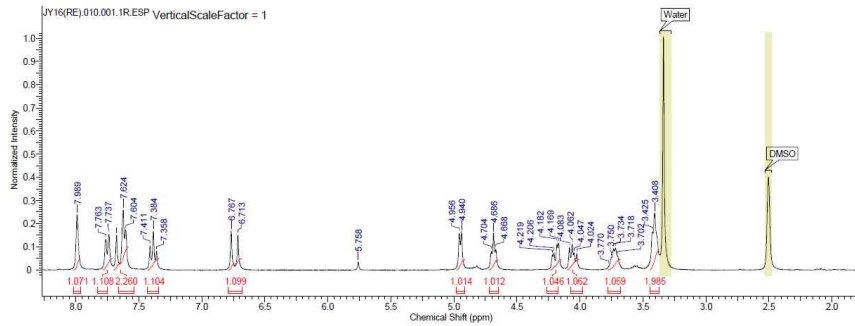


그림 126. 화합물 9, 3-Bromo cinnamoyl glycerol 의 1H NMR spectrum

2.4 극지 미세조류 유래 항알러지와 항염증 활성 소재 개발 (대구가톨릭대)

○ 미세조류에서 *Chlamydomonas* sp. KSF006에서 활성물질 분리 및 구조 동정

- 미세조류 *Chlamydomonas* sp. KSF006에서 활성물질을 분리하기 위하여 시료 110 g을 메탄올에 추출하여 MeOH 추출물을 얻고, MeOH 추출물을 물에 현탁 후 hexane, methylene chloride, ethyl acetate 및 BuOH로 용매분획 하였다. 용매분획 중 hexane 및 methylene chloride 분획에서 silica gel column 및 RP C-18 column과 유기용매의 조합으로 화합물 6종을 분리하였다.

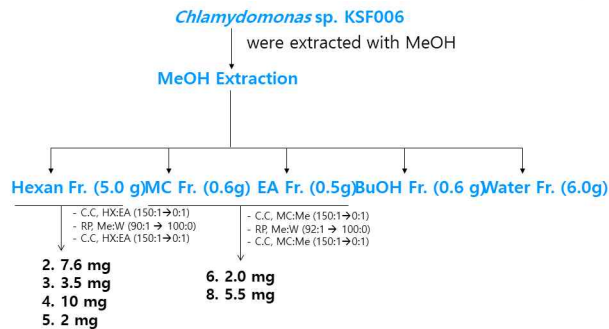


그림 127. *Chlamydomonas* sp. KSF006 추출 및 활성물질 분리

- 미세조류 *Chlamydomonas* sp. KSF006에서 분리한 6종의 화합물은 NMR 및 MASS 등의 기기분석으로 각각의 화합물은 butanoic acid (2), 4Z-heptanoic acid (3), 5Z-decenoic acid

(4), 5Z-nonadecenoic acid (5), 1-hexanoyl glycerol (6), lactam-유도체 (8)로 구조를 확인하였다.

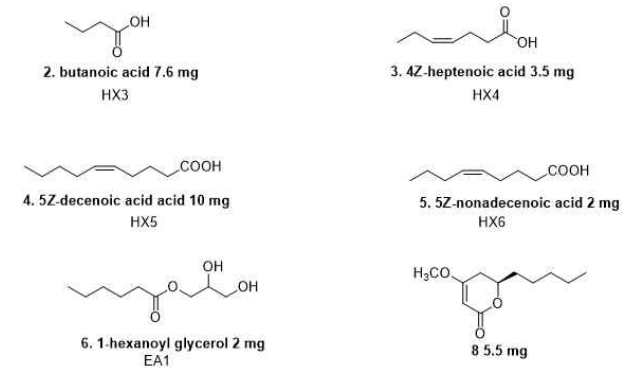


그림 128. *Chlamydomonas* sp. KSF006 분리 화합물 화학구조

- *Chlamydomonas* sp. KSF006에서 분리한 6종의 화합물 항염증 및 항알러지 활성 평가

☆ 항염증활성 측정

NO 생성억제 시험은 Griess reaction assay를 통해 RAW264.7 cell로 확인하며, 실험결과 *Chlamydomonas* sp. KSF006 분리한 화합물은 NO 생성억제 활성이 측정되지 않았다.

☆ 항알러지활성 측정

Jurkat T 면역세포에 일정농도 화합물을 30 분간 처리함. 그리고 PMA(100 nM)/A23187 (1 μM)로 30분간 배양한다. 실험액을 24 시간 배양한 후, 상등액을 Duoset Human IL-2 ELISA kit로 처리하여 IL-2 생성억제를 측정했다. 실험결과 *Chlamydomonas* sp. KSF006 분리한 화합물은 Jurkat T cell의 IL-2 mRNA 형성을 5Z-nonadecenoic acid (5), 1-hexanoyl glycerol (6)에서 억제되어 항알러지 활성이 확인되었다.

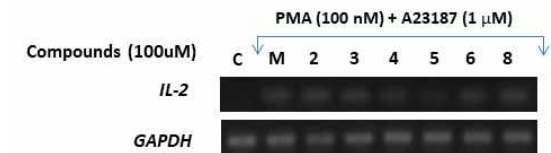


그림 129. 100 μ M농도에서 시료의 IL-2 생성억제 활성

○ 미세조류에서 *Chlamydomonas* sp. KSF100에서 활성물질 분리 및 구조동정

- 미세조류 *Chlamydomonas* sp. KSF100에서 활성물질을 분리하기 위하여 시료 110 g을 메탄올에 추출하여 MeOH 추출물을 얻고, MeOH 추출물을 물에 현탁 후 hexane, methylene chloride 및 ethyl acetate로 용매분획 하였다. 용매분획 중 hexane 분획을 silica gel column 및 RP C-18 column과 유기용매의 조합으로 화합물 2종을 분리하였다. 또한, methylene chloride 및 ethyl acetate 분획물을 합쳐 silica gel column 및 RP C-18 column과 유기용매의 조합으로 화합물 4종을 분리하였다. 미세조류 *Chlamydomonas* sp. KSF100에서 총 6종의 화합물을 분리하였다.

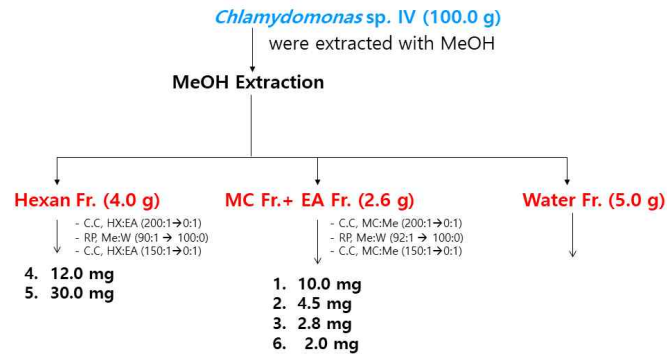


그림 130. *Chlamydomonas* sp. KSF100 추출 및 활성물질 분리

- 미세조류 *Chlamydomonas* sp. KSF100에서 분리한 6종의 화합물은 NMR 및 MASS 등의 기기분석으로 각각의 화합물은 δ -carotene (1), γ -carotene (2), eicosapentaenoic acid (3), tetradecan (4), linoleic acid (5), p-hydroxyphenol (6)로 구조를 확인하였다.

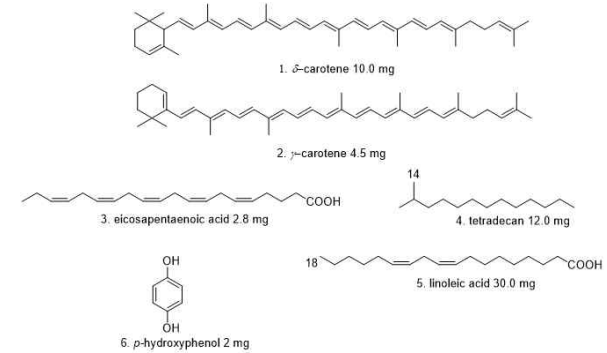


그림 131. *Chlamydomonas* sp. KSF100 분리 화합물 화학구조

- *Chlamydomonas* sp. KSF100에서 분리한 6종의 화합물 항염증 및 항알러지 활성 평가

☆ 항염증활성 측정

NO 생성억제 시험은 Griess reaction assay를 통해 RAW264.7 cell로 확인하며, 실험 결과 *Chlamydomonas* sp. KSF100 분리한 화합물은 NO 생성억제 활성이 측정되지 않았다.

☆ 항알러지활성 측정

Jurkat T 면역세포에 일정농도 화합물을 30 분간 처리함. 그리고 PMA(100 nM)/A23187 (1 μ M)로 30분간 배양한다. 실험액을 24 시간 배양한 후, 상등액을 Duoset Human IL-2 ELISA kit로 처리하여 IL-2 생성억제를 측정하였다. 실험결과 *Chlamydomonas* sp. KSF100 분리한 화합물은 Jurkat T cell의 IL-2 mRNA 형성을 δ -carotene (1)이 억제하여 항알러지 활성이 확인됨. δ -carotene (1)의 IC₅₀ 값을 얻기 위하여 0 - 100 μ M농도에서 실험한 결과 IC₅₀ 값은 100 μ M 이상임을 확인 하였다.

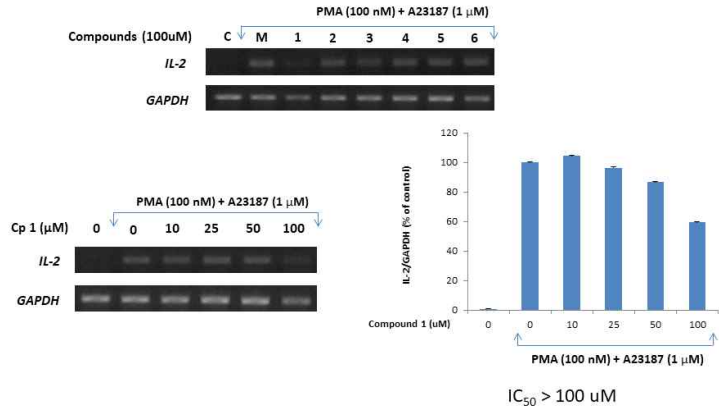


그림 132. *Chlamydomonas* sp. KSF100 화합물의 IL-2 생성억제 활성

- 미세조류에서 *Chlamydomonas* sp. KSF041에서 활성물질 분리 및 구조동정
 - 미세조류 *Chlamydomonas* sp. KSF041의 MeOH 추출물(21 g)에서 활성물질을 분리 하였다. MeOH 추출물을 물에 현탁 후 hexane, ethyl acetate 및 BuOH로 용매분획 하였다. 용매분획 중 ethyl acetate 분획을 silica gel column 및 RP C-18 column과 유기용매의 조합으로 화합물 3종을 분리하였다. 또한, BuOH 및 물 분획물을 합쳐 silica gel column 과 MC : MeOH : H₂O의 용매로 화합물 1종을 분리하였다. 미세조류 *Chlamydomonas* sp. KSF041에서 총 5종의 화합물을 분리하였다.

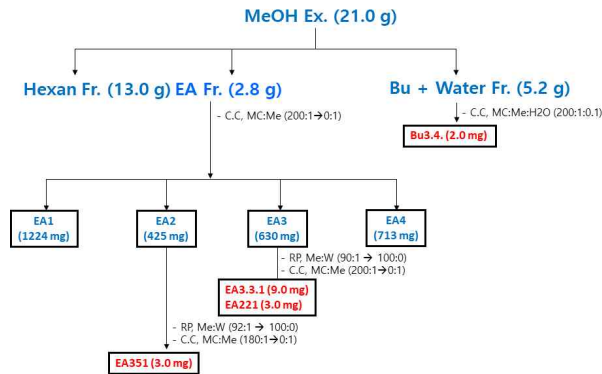


그림 133. *Chlamydomonas* sp. KSF041 추출 및 활성물질 분리

- 미세조류 *Chlamydomonas* sp. KSF041에서 분리한 4종의 화합물은 NMR 및 MASS 등의

기기분석으로 각각의 화합물의 구조를 확인하였다.

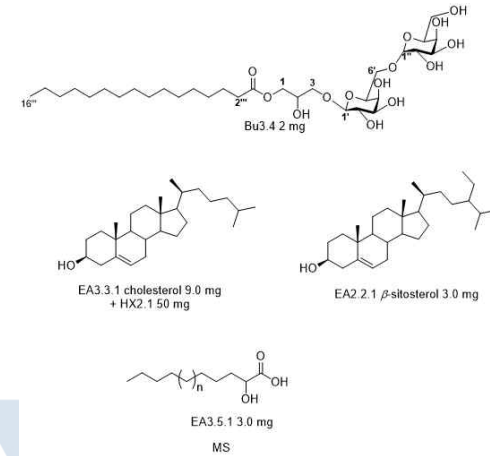


그림 134. *Chlamydomonas* sp. KSF041 분리 화합물 화학구조

- *Chlamydomonas* sp. KSF041에서 분리한 4종의 화합물 항염증 및 항알러지 활성 평가가 진행 중이다.
- 미세조류에서 *Chlamydomonas* sp. KSF059에서 활성물질 분리 및 구조동정
 - 미세조류 *Chlamydomonas* sp. KSF059의 활성물질을 분리하기 위하여 시료 110 g을 메탄올에 추출하여 MeOH 추출물을 얻고, MeOH 추출물을 물에 현탁 후 hexane, methylene chloride, ethyl acetate 및 BuOH로 용매분획 하였다. 용매분획 중 hexane, ethyl acetate 및 BuOH 분획에서 silica gel column 및 RP C-18 column과 유기용매의 조합으로 각각의 화합물 5종을 분리하였다.

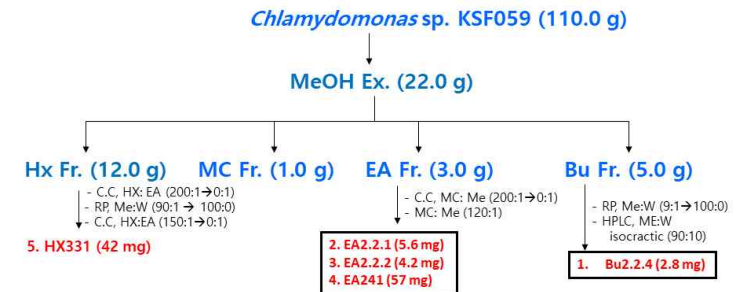


그림 135. *Chlamydomonas* sp. KSF059 추출 및 활성물질 분리

- 미세조류 *Chlamydomonas* sp. KSF059에서 분리한 5종의 화합물은 NMR 및 MASS 등의

기기분석으로 각각의 화합물의 구조를 확인하였다.

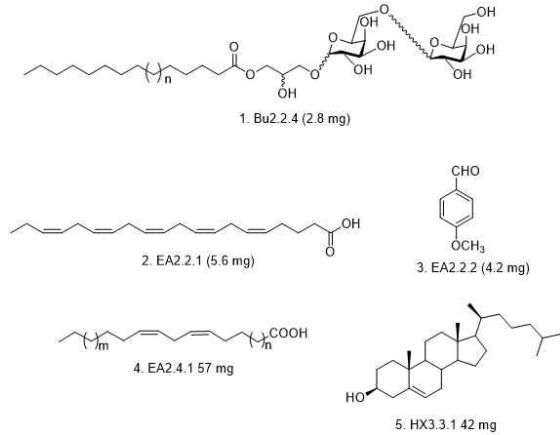


그림 136. *Chlamydomonas* sp. KSF059 분리 화합물 화학구조

- *Chlamydomonas* sp. KSF059에서 분리한 5종의 화합물 항염증 및 항알러지 활성 평가가 진행 중이다.

(다) 세부연구목표3. CPS 실용화

3.1 고품질 피부질환 개선제 실용화 준비

가. 임상효력검증

◎ 승인번호

- IRB : 제1-220777-A-N-02호-DICN19106

- CRIS : KCT0004021

◎ 시험방법

- (시험대상자 및 수) 피험자의 선정기준에 부합되고, 제외기준에 부합하지 않는 피험자를 선정함. 주름이 생성되기 시작하거나 이미 생성된 38-56세의 여성 피험자 24명(평균 연령 49.88 ± 34 세)에 대해서 임상평가를 수행하였다.

- (평가 기간) 12 주

- (시험제품) 극지미세조류 유래 성분

1) 시험군: 성분 0.1% 함유

2) 대조군: 성분 미함유

- (평가 방법) 본 시험목적에 적합한 피험자들을 선정 후 이중맹검과 무작위배정에 따라 시험제품과 대조제품을 각각 좌, 우측 시험부위에 사용함. 평가는 사용 전과 사용 4 주, 8 주, 12 주 후 시점에서 육안평가, 주름 파라미터 측정 피험자에 의한 설문평가 및 피부 안전성 평가를 실시하였다.

- (분석장비) 피부주름은 각 평가시점에서 Visioline® VL 650 (C + K, Germany) 및 Quantiride® (Monaderm, Monaco)를 이용하여 피부 레플리카 이미지를 분석하여 평가하였다. 이 측정기기는 제작한 SILFLO 레플리카를 기기내의 frame에 장착하고, 레플리카에 35 °의 각도로 빛을 투과 시켜 이미지를 촬영하였다. 촬영된 이미지는 녹색으로 그림자가 마크되며, 자동적으로 수치화하여 5 가지의 주름 파라미터 Skin roughness Rt, Maximum roughness Rm, Average roughness Rz, Smoothness d epth Rp, Arithmetic average roughness Ra를 분석하였다.

- (피부 안전성 평가) 피부자극테스트는 MFDS와 CTFA 가이드라인에 의거하여 실시하였다.

1) 방법

- 시험법: 인체피부 일차자극시험 (48 hrs Single Patch Test)

- 피험자: 선정기준과 제외기준에 부합하는 피험자 30명 이상

- 첩포 방법: 등 부위에 시험물질을 도포하여 48시간 후 제거

- 검사: 첩포 제거 30분 후와 24시간 후 관찰

- 평가기준: Frosch & Kligman, CTFA guidelines에 의해 평가

- 시험대상자 총 32 명이 전 과정에 참여함

- 피험자들의 평균 연령은 38.00±5.18세였으며, 최고 연령자는 49 세, 최저 연령자는 25 세임

◎ 시험결과

- (피부주름의 육안평가 분석) 시험군의 경우 제품 사용 8 주 및 12 주 후 시점에서 피부주름이 유의하게 감소하였으며 (p < 0.05), 군간 비교시, 제품 사용 8주 및 12주 후 시점에서 시험군의 피부주름이 대조군에 비해 유의하게 감소하였다(p < 0.05).

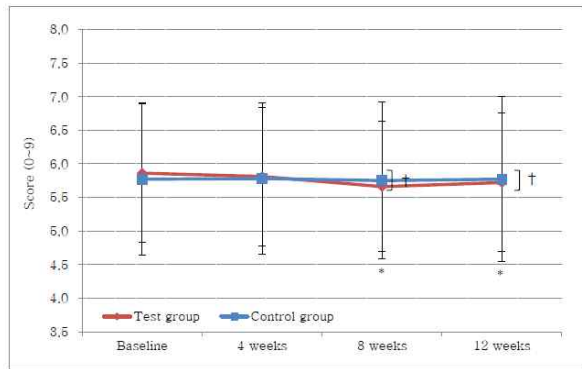


그림 137. 시험군과 대조군의 육안평가 결과

- (레플리카를 이용한 주름 파라미터 분석) 시험군의 경우 Rt 및 Rp 파라미터가 제품 사용 4 주, 8 주 및 12 주 시점에서, Rm 및 Rz 파라미터가 제품 사용 4 주 및 8 주 후 시점에서, Ra 파라미터가 제품 사용 8 주 후 시점에서 유의하게 감소하였다($p < 0.05$). 대조군의 경우 Rt, Rm, Rz 및 Ra 파라미터가 제품 사용 8 주 후 시점에서 유의하게 감소하였다($p < 0.05$). 군간 비교 시, Rt 및 Rm 파라미터가 제품 사용 4 주, 8 주 및 12 주 시점에서, Rp 파라미터가 제품 사용 4 주 및 8 주 후 시점에서, Rz 및 Ra 파라미터가 제품 사용 8 주 및 12 주 후 시점에서 시험군이 대조군에 비해 유의하게 감소하였다($p < 0.05$).

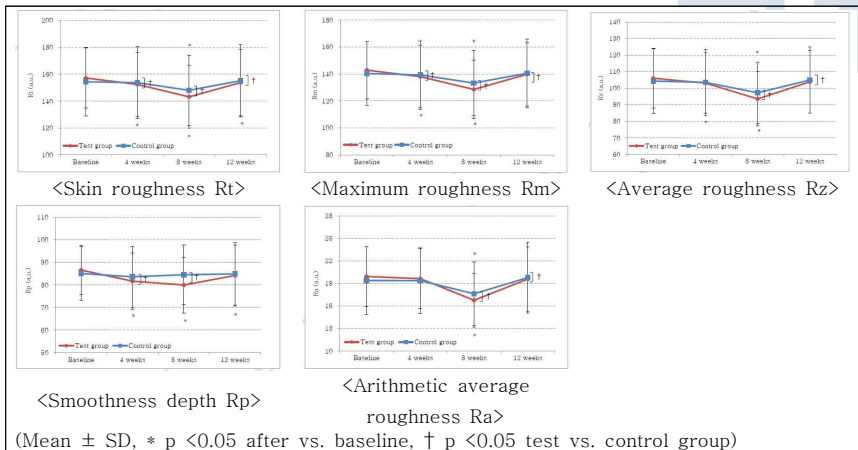


그림 138. 피부주름 육안평가 결과

- (안전성평가) 본 시험기간 동안 모든 피험자에게서 피부 이상반응은 관찰되지 않았고, 인체피부 일차자극 시험 결과, 본 시험물질에서 자극 반응이 나타나지 않았다.

표 22. 인체피부 안정성평가

No	Test sample	No. of responder	48hr				72hr				Reaction Grade				
			+1	+2	+3	+4	+1	+2	+3	+4	48h	72h	Mean		
1	Eico glycerol(EG)	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0
2	대조군	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0
3	Negative control	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0

◎ 결론

- 극지미세조류에서 유래한 물질에 대한 피부주름 개선효과 평가 결과 육안평가 및 5종의 주름파라미터 (Rt, Rm, Rz, Rp, Ra) 에서 유의한 개선 효과를 보였고 모든 피험자에게서 피부 이상반응은 관찰되지 않음
- 본 물질은 피부주름 개선에 도움을 주는 것으로 나타남

3.2 경제성 타당성 검증

가. 극지미세조류 배양기술개발과 이를 활용한 신소재 경제성 분석 수행

- (1) ㈜날리지웍스에서 극지연구소의 ‘극지생물 유전자원 활용 기술개발사업’ 경제성 분석 평가를 수행하였다.
- (2) 비용 추정

- ◎ 극지빙설조류의 배양기술개발과 유전정보를 활용한 신소재 탐색연구는 15억 원씩 5년 동안 지원 예정이다.
- 2020년부터 연구개발 활동을 수행하여 2024년까지 연간 15억 원씩 전체 75억 원 규모의 연구비를 추정하였다.

표 23. 극지빙설조류 배양기술개발과 유전정보 활용 신소재 탐색 연도별 비용 추정

구분	2020	2021	2022	2023	2024	합계
예산 (억 원)	15	15	15	15	15	75

(3) 경제적 편익 추정 전제

- ◎ 연구개발사업의 편익을 추정하기 위해서는 먼저 편익이 발생하기 시작하는 시점을 어떻게 결정할 것인지를 고려해야 한다.
- 일반적으로 연구개발투자 이후 편익이 발생되기까지는 일정 시간을 필요로 하므로, 해당 사업으로 인한 편익이 어느 시점부터 발생할 것인지를 예측하는 것은 편익 산정을 위해 중요하다.
 - 마찬가지로 편익 발생 시작 시점으로부터 얼마동안 해당 사업의 편익이 유효할지를 결정하는 문제도 편익 추정결과에 직접적으로 영향을 미친다.
 - 또한 최초 편익 발생시점과 편익기간의 결정은 편익을 현재가치로 환산하는 과정에서 할인율의 적용 정도에도 영향을 미친다.

(가) 편익 회임기간

- ◎ 연구개발사업에 대한 투자가 이루어진 후, 경제적인 편익 또는 효과가 발생하기 전까지의 시간적 지연은 편익 회임기간이라고 정의한다.
- 일반적으로 연구개발활동으로 인한 경제적 효과가 발생하기 위해서는 기술개발의 사업화 등의 과정을 거쳐야하기 때문에 상당한 시간이 소요된다.
 - 연구개발부문 예비타당성조사에서는 이 편익 회임기간 동안에는 경제적 편익이 발생하지 않는 것으로 간주한다.
 - Mansfield(1991)는 학술적 연구가 신제품 및 공정의 상용화로 이어지기까지 걸리는 시간을 분석한 결과, 기존에 관련 연구가 없었던 기초연구의 경우에는 평균적으로 7년, 기존 연구가 존재하는 응용기술 개발의 경우에는 평균적으로 6.4년이 걸리는 것으로 분석한다.
- ◎ 본 연구에서는 편익 회임기간을 5년으로 설정하여 분석을 수행하였다.
- 한국개발연구원(KDI)에서는 사업 주관부처가 사업계획서에 편익 회임기간을 제시하는 경우에는 이를 준용하되, 별도의 언급이 없을 경우에 기초연구는 5년, 응용 및 개발연구는 3년을 기본으로 사업특성을 고려하여 조정한다.
 - 연구개발을 통한 시제품 개발 후 표준화/인증, 양산준비 등을 고려한다면, 편익 발생까지의 시간적 지연인 편익 회임기간을 고려하는 것이 현실적이다.
 - 본 사업은 최종성으로 기술이전 및 제품화 2건을 목표로 하고 있으면서, 기반을 구축하는 특성을 함께 갖고 있어서 보수적으로 회임기간을 5년을 설정하여 분석을 수행한다.

(나) 편익 발생기간

- ◎ 연구개발활동의 결과에 근거한 경제적 효과들은 어느 시점에 일시적으로 발생하기보다는 다년도에 걸쳐서 발생하는 것이 일반적이므로, 해당 사업의 편익 발생 기간을 결정하는 것이 필요하다.
- 연구개발사업의 편익기간을 결정하기 위해서는 해당 기술의 특성을 최대한 반영하여 유효한 수명을 적용할 필요가 있다.
 - 이를 위해 자료의 정확한 근거와 타당성을 바탕으로 여러 방법론을 활용할 수 있으며, 적절한 방법론이 없을 경우에는 기술수명주기(Technology Cycle Time, TCT))를 도입하여 편익 발생기간을 산정한다.
- ◎ 기술수명주기는 특허의 서지정보를 이용해 정량적으로 산출되는 지표 중 하나로서, 인용된 특허들의 발행연도와 인용한 특허의 발생연도 차이값들의 중간값(median age)으로 정의된다.
- 즉, 인용-피인용 특허 시차의 중앙값으로 산출된 기술수명주기는 기술발전의 속도, 즉 혁신활동의 속도에 대한 정보를 제공함과 동시에 해당 특허에 포함된 기술의 유효수명을 의미한다.
 - 연구개발사업의 목표로 제시된 기술이 편익으로 발현되는 기간은 해당 기술이 특허를 통해 권리를 보호받고 후발 특허에 의해 영향력이 사라지지 않는 기간으로 해석된다.
- 따라서 세부분야별로 특허 인용분석을 통해 산출된 기술수명주기는 기술의 유효수명을 의미한다.
- ◎ 본 연구에서는 1960년부터 2017년까지 미국 등록특허 58개년 자료를 기준으로 국제특허분류(IPC) 클래스별 기술수명주기 중위수(median)를 산정하여 이에 근거한 편익 발생기간을 결정한다.
- 본 사업과 연관이 있는 키워드로 검색한 6개의 IPC 클래스의 기술수명주기 중위수의 평균값은 7.40년으로 약 8년으로 산출되었다.
 - 7.40년은 7년을 초과하는 값이므로, 분석의 편의를 위해 8년으로 결정
- 따라서 편익은 사업종료 후 회임기간을 고려하여 2028년부터 2035년까지 발생하는 것으로 가정한다.

표 24. 본 사업의 기술수명주기

IPC	설명	총건수	중양값
A01G	조식배양기술에 의한 식물의 번식; 단세포 조류의 배양; 식물세포배양	30,920	10
C12M	효소학 또는 미생물학을 위한 장치	8,364	9
C12N	미생물 또는 효소; 그 조성물; 미생물의 증식, 보존 또는 유지; 돌연변이 또는 유전자공학; 배지	28,429	7
C12P	발효 또는 효소를 사용하여 원하는 화학물질 또는 조성물을 합성하는 방법 또는 혼합물로부터 광학이성체를 분리하는 방법	7,892	8
C12Q	효소, 핵산 또는 미생물을 포함하는 측정 또는 시험방법; 그것을 위한 조성물 또는 시험지; 그 조성물을 조제하는 공정; 미생물학적 또는 효소학적 방법에 있어서의 상태응답 제어	20,540	8
G01N	재료의 화학적 또는 물리적 성질의 검출에 의한 재료의 조사 또는 분석 (면역분석 이외의 효소 또는 미생물을 포함하는 측정 또는 시험 방법)	249,302	7
		평균: 7.40년	

(4) 직접적 경제적 편익 추정

- ◎ 시장수요집근법은 시장가치 창출을 목적으로 하는 많은 연구개발사업의 경제성 분석에 대표적으로 활용되며, 본 연구에서도 이를 활용하여 경제적 편익을 산정하였다.
- 시장수요집근법에서는 해당 연구개발사업의 시행으로 미래 관련 시장에서 새롭게 창출되는 부가가치를 사업의 편익으로 간주하며, 이를 계산하기 위해 부가가치 창출에 영향을 미치는 다양한 변수를 고려한다.
- 본 연구에서 사업의 특성을 고려하여 신규 부가가치를 도출하기 위하여 경제적 가치를 추정하였다.

(가) 미래시장규모

- ◎ 본 사업의 결과물은 기능성화장품(UV차단 화장품), 기능성식품(항산화식품), 개발에 직접적으로 활용되므로, 본 연구에서는 사업의 결과물이 활용되는 (경제적 파급효과를 미치는) 국내 UV차단 화장품과 항산화식품 시장을 대상으로 미래시장규모를 추정하였다.
- UV차단 화장품 시장의 경우, 중소벤처기업부의 화장품 기술로드맵(2017-2019)의 시장규모 자료를 활용하여 미래시장규모를 추정하였다.
 - 동 자료의 수치를 기준으로 성장률을 누계하여 2035년까지의 미래시장규모 추정치 도출

표 25. 자외선차단 화장품 시장규모 및 전망치 (단위: 백만원)

구분	'15	'16	'17	'18	'19(p)	'20(p)
After-sun	630,989	685,696	745,146	809,749	879,955	956,247
Sun protection	451,776	480,418	510,877	543,267	577,709	614,336
합계	1,082,765	1,166,114	1,256,023	1,353,016	1,457,664	1,570,583

출처: http://smroadmap.smtech.go.kr/0201/view/m_code/A190/id/1717/idx/1717

- 항산화식품 시장의 경우, 한국농촌경제연구원(KREI)과 식품의약품안전처의 2017 농업전망 보고서에 명시된 2011~2015 기능성식품 시장규모와 항산화식품의 비중(18%)를 준용하여 미래시장규모를 추정하였다.
- 2011년부터 2015년까지의 연평균 성장률을 누계하여 2035년까지의 미래시장규모 추정하였다.

표 26. 기능성식품 생산액 현황

구분	총생산액 (억원)	총생산량 (톤)	내수용		수출용	
			생산액 (억원)	생산량 (톤)	생산액 (억원)	생산량 (톤)
2011	13,682	40,258	13,126	39,611	556	647
2012	14,091	34,599	13,507	33,735	584	864
2013	14,820	31,446	14,066	30,490	754	956
2014	16,310	30,545	15,640	29,500	670	1,045
2015	18,230	34,568	17,326	33,016	904	1,551

출처: 농업전망, 2017(KRED)

◎ 따라서, CAGR를 반영해 본 사업의 편익 발생기간인 2028년부터 2035년도의 미래시
장 규모를 추정하면 아래와 같다.

표 27. 편익 발생기간별 미래시장규모 추정치

연도	시장규모 (백만원)		
	UV차단 화장품	항산화 식품	합계
2030	2,532,480	623,918	3,156,398
2031	2,629,929	644,285	3,274,214
2032	2,727,379	664,652	3,392,031
2033	2,824,828	685,019	3,509,847
2034	2,922,278	705,386	3,627,664
2035	3,019,727	725,753	3,745,480
2036	3,117,177	746,120	3,863,297
2037	3,214,626	766,487	3,981,113
합계	22,988,424	5,561,620	28,550,044

(나) 사업기여율

- ◎ 사업기여율의 추정을 위해서는 본 사업이 기여 가능한 유사 연구개발사업을 파악해
야 하며, 관련 정부 연구개발사업을 NTIS DB를 통해 검색하였다.
- 최근 11년간 추진되고 있는 해양생물 관련 연구개발사업을 검색한 결과, 7개의 유사사
업을 도출하였다.
 - 편익 전제를 위해 도출한 본 사업의 편익발생기간(8년)과 회임기간(3년)을 준용하여
유사 기술이 소멸되지 않았을 것으로 가정이 가능한 유사사업을 검색하였다.
 - 유사사업비 소계는 203억원이며, 본 사업의 총 사업비는 100억원이다.

표 28. 유사사업 목록

사업	기간	총사업비 (백만원)	연평균 사업비 (백만원)
남극 고유생물의 저온적응 기작 규명과 활용가치 발굴	2014~2016	9,455	3,152
극지 고유생물 유래 대사체 실용 연구	2011~2013	4,041	1,347
극지 미세조류 유래 천연 세포보호 물질의 안정적 대량 확보 및 효능 분석	2017~2018	1,254	627.04
극지적용 고유생물 유래 대사체의 상용화 구축사업	2017~2019	3,113	1,038
차세대 시퀀싱 기술을 이용한 해양극지미세조류의 지질생합성 관련 전사체 대량해독 및 기능규명 연구	2012~2016	740	148
지질대사체학과 시스템생물학적 접근에 의한 해양극지미세조류의 지질 생합성 연구	2012~2015	480	120
극지생물 유래 유용 대사체 활용기반 구축	2016	1,199	1,199
		20,282	

- ◎ 본 사업의 기여가 가능한 관련 연구개발사업들의 연도별 연구비를 고려하여, 본 사업
의 사업기여율을 계산한 결과 7.4%임을 알 수 있다.
- 민간 연구개발 비중은 정확한 자료 확보에 한계가 있어 2016년 정부 연구개발투자액
(154,530.6억원)과 민간분야 연구개발투자액(539,524.7억원) 비율인 3.49를 적용하였다.
 - 유사 민간 연구개발비는 유사사업비(203억원)와 본 사업비(100억원)의 합에 3.49를 곱한
1,057억원으로 추정하였다.

표 29. 사업기여율 추정결과

구 분	총사업비(백만원)
유사사업 소계	20,282
본사업	10,000
유사 민간 연구개발	$(20,282+10,000)*3.49 = 105,684$
본사업 기여도	$10,000/(20,282+10,000+105,684) = 7.4\%$

(다) 연구개발 기여율

- ◎ 「제3차 과학기술기본계획」에서는 최근 데이터를 적용하여 새롭게 구한 연구개발 기여율 35.4%를 제시한 예가 있으며, KISTEP 예타 세부지침에서도 35.4% 사용을 권고하고 있는 바, 본 연구에서도 이를 준용하였다.
- 단, 「제4차 과학기술기본계획」에서는 연구개발 기여율 40%를 목표치로 제시하였다.

(라) 연구개발 사업화성공률

- ◎ 연구개발 사업화성공률을 산출하기 위해서는 관련 사업들의 사업화 성공 여부에 대한 자료, 또는 주관기관(극지연구소) 사업들의 사업화 성공률 자료가 필요하나, 자료 획득에 한계가 있다.
- 따라서 본 연구에서는 연구개발 사업화성공률을 국가 기술개발R&D의 평균 사업화성공률을 준용하여 22.8%¹⁾로 산정하여 분석을 수행하였다.

(마) 부가가치율

- ◎ 2014년 한국은행 산업연관표(2016)의 건강보조식품 산업과 화장품 산업의 부가가치율을 사용하였다.
- 건강보조식품 산업과 화장품 산업의 총 산출액을 부가가치액으로 나누어 부가가치율을 산출하였으며, 건강보조식품 산업의 부가가치율은 25.2%, 화장품 산업의 부가가치율은 26.8%로 산출되었다.
 - 건강보조식품산업 총산출액: 2,645,954백만원, 부가가치액: 668,053백만원
 - 화장품산업 총산출액: 8,219,415백만원, 부가가치액: 2,206,282백만원
 - 총 부가가치율: 26.5%

1) 2017 국정감사 (“1만 1849개 과제 중 2703개 과제 사업화 성공”)

(바) 총 편익 산출

◎ 본 사업의 부가가치 창출 편익을 계산한 결과는 아래와 같다.

표 30. 총 편익 산출 결과

연도	미래시장 규모	사업 기여율	연구개발 기여율	사업화 성공률	부가 가치율	편익
2028	3,156,398	7.4%	35.4%	22.8%	26.5%	4,957
2029	3,274,214	7.4%	35.4%	22.8%	26.5%	5,142
2030	3,392,031	7.4%	35.4%	22.8%	26.5%	5,327
2031	3,509,847	7.4%	35.4%	22.8%	26.5%	5,512
2032	3,627,664	7.4%	35.4%	22.8%	26.5%	5,697
2033	3,745,480	7.4%	35.4%	22.8%	26.5%	5,882
2034	3,863,297	7.4%	35.4%	22.8%	26.5%	6,067
2035	3,981,113	7.4%	35.4%	22.8%	26.5%	6,252

(5) 경제성 분석 결과

(가) 경제성 분석의 전제

- ◎ 연구개발사업에 대한 경제성 분석은 사회적 편익과 사회적 비용을 대상으로 해당 사업에 대한 투자의 적절성을 평가하기 위해 수행되었다.
- 사업 추진에 소요되는 사업비는 물론 추정된 편익 발생을 위해 소요되는 모든 비용을 분석에 포함한다.
- 일반적으로 공공투자시설의 경우 비용은 실질적으로 투자되어 쓰인 비용을 말하고 편익은 회수방법을 통한 실제 수익이 아닌 사회적 편익을 의미한다.
- 일반적으로 사업의 투자시점과 편익발생 시점이 일치하지 않기 때문에 비용과 편익에 사회적 할인율을 적용하여 특정 기준연도의 현재가치로 환산하여 분석을 진행하였다.
- ◎ 비용과 편익의 미래 흐름을 비교하기 위하여 사용되는 할인율은 자원의 기회비용에 따른 수익률을 나타낸다.
- 즉, 할인율은 투자 사업에 사용된 자본이 다른 투자 사업에 사용되었을 경우 얻을 수 있는 시간의 객관적인 가치를 나타낸다.
- 할인율 개념의 적용에 있어서는 많은 이견이 있으나 정부에 의해 주도되는 사업의 경우 사회적 할인율의 개념을 적용하고, 민간자본에 의해 추진되는 사업의 경우 시장이자율에 근거한 재무적 할인율을 적용한다.
- 사회적 할인율은 통상 시장이자율보다 낮은 수준으로 책정되는데, 그 이유는 사업의 주체가 주로 정부이고 정부입장에서 미래사업의 중요성이 더 높게 평가되어야 할 필요가 있기 때문이다.
- 대부분의 국가는 투자사업의 특성에 따른 할인율을 자국의 경제성장률, 물가상승률, 경제적 잠재능력 등을 고려하여 적용한다.
 - 일반적으로 개발도상국 사회간접자본의 경우 7~8% 이상의 할인율을, 선진국의 경우는 보통 5~6% 수준의 할인율을 적용한다.
 - 한국의 경우 한국개발연구원 예비타당성조사 지침에 의거하여 4.5%를 적용한다.²⁾
- ◎ 본 연구는 NPV, B/C, IRR을 통해 본 사업의 경제적 타당성을 분석하고 추가적으로 분석 과정에서의 불확실성을 고려하기 위해 민감도 분석을 수행한다.
- 본 연구의 연구계획서에 따라 2020년부터 2024년까지의 5년의 연구개발비를 사업비용으로 간주한다.
- 신규 부가가치는 회입기간과 기술수명주기를 고려하여 2028년부터 2035년까지 편익이 발생하는 것으로 가정한다.

- 본 사업의 연구개발비 투자시점 이전 해인 2019년 12월을 기준으로 모든 비용과 편익에 4.5% 사회적 할인율을 적용하여 현재가치로 환산하였다.
- 본 사업의 편익을 추정하는 과정에서 자료의 한계 및 부재 등으로 한계적으로 추정된 항목이 일부 존재하기 때문에, 편익 추정치 변화(당해연도 가치)를 통한 민감도 분석을 추가적으로 수행하여 불확실성 문제를 개선하였다.
- 경제성 분석에서는 $NPV \geq 0$, $B/C \geq 1$, $IRR \geq \text{사회적할인율인}$ 경우 일반적으로 해당 사업이 경제성이 있다고 판단한다.

(나) 경제성 분석 도출

- ◎ 본 연구의 모든 경제적 편익과 비용은 2019년 12월을 기준으로 사회적 할인율 4.5%를 적용하여 현재가치화하였으며, 편익 추정치 증감(-20~+20%)에 따른 5가지 시나리오를 대상으로 각각 경제성 분석을 진행한다.
- 먼저, 앞절에서 추정한 본 사업 편익에 따른 경제성 분석 결과, NPV는 16,063만원, B/C는 3.45, IRR은 11.58%로 본 사업이 경제적으로 타당함을 나타낸다.

표 31. 경제성 분석 결과 (편익 증감 0%)

연도	비용		편익	
	당해연도 가치	현재가치	당해연도 가치	현재가치
2020	1,500	1,433		
2021	1,500	1,368		
2022	1,500	1,306		
2023	1,500	1,248		
2024	1,500	1,192		
2025				
2026				
2027				
2028				
2029				
2030			4,957	2,987
2031			5,142	2,959
2032			5,327	2,928
2033			5,512	2,893
2034			5,697	2,855
2035			5,882	2,816
2036			5,697	2,604
2037			5,882	2,568
합계	7,500	6,546	44,094	22,609

2) 2017년 예비타당성조사 수행 총괄지침에 따라, 2017년 9월 8일부로 사회적 할인율을 기존의 5.5%에서 4.5%로 낮춰서 적용

◎ 본 사업의 편익 추정치를 20% 감소시켜 경제성 분석을 수행한 결과, NPV는 11,400
백만원, B/C는 2.74, IRR는 9.31%로 본 사업이 경제적으로 타당함을 나타낸다.

표 32. 경제성 분석 결과 (편익 증감 -20%)

연도	비용		편익	
	당해연도 가치	현재가치	당해연도 가치	현재가치
2020	15,000	1,433		
2021	15,000	1,368		
2022	15,000	1,307		
2023	15,000	1,248		
2024	15,000	1,192		
2025				
2026				
2027				
2028				
2029				
2030			3,965	2,390
2031			4,113	2,367
2032			4,261	2,342
2033			4,409	2,314
2034			4,557	2,284
2035			4,409	2,111
2036			4,557	2,083
2037			4,705	2,054
합계	7,500	6,546	34,979	17,946

◎ 본 사업의 편익 추정치를 10% 감소시켜 경제성 분석을 수행한 결과, NPV는 13,643
백만원, B/C는 3.08, IRR는 10.47%로 본 사업이 경제적으로 타당함을 나타낸다.

표 33. 경제성 분석 결과 (편익 증감 -10%)

연도	비용		편익	
	당해연도 가치	현재가치	당해연도 가치	현재가치
2020	1,500	1,433		
2021	1,500	1,368		
2022	1,500	1,306		
2023	1,500	1,248		
2024	1,500	1,192		
2025				
2026				
2027				
2028				
2029				
2030			4,461	2,688
2031			4,628	2,663
2032			4,794	2,635
2033			4,961	2,604
2034			5,127	2,570
2035			4,961	2,375
2036			5,127	2,344
2037			5,294	2,311
합계	7,500	6,546	39,351	20,189

◎ 본 사업의 편익 추정치를 10% 증가시켜 경제성 분석을 수행한 결과, NPV는 18,129
백만원, B/C는 3.77, IRR는 12.48%로 본 사업이 경제적으로 타당함을 나타낸다.

표 34. 경제성 분석 결과 (편익 증감 +10%)

연도	비용		편익	
	당해연도 가치	현재가치	당해연도 가치	현재가치
2020	1,500	1,433		
2021	1,500	1,368		
2022	1,500	1,306		
2023	1,500	1,248		
2024	1,500	1,192		
2025				
2026				
2027				
2028				
2029				
2030			5,452	3,286
2031			5,656	3,255
2032			5,859	3,220
2033			6,063	3,182
2034			6,266	3,141
2035			6,063	2,902
2036			6,266	2,865
2037			6,470	2,825
합계	7,500	6,546	48,096	24,676

◎ 본 사업의 편익 추정치를 20% 증가시켜 경제성 분석을 수행한 결과, NPV는 20,373
백만원, B/C는 4.11, IRR는 13.37%로 본 사업이 경제적으로 타당함을 나타낸다.

표 35. 경제성 분석 결과 (편익 증감 +20%)

연도	비용		편익	
	당해연도 가치	현재가치	당해연도 가치	현재가치
2020	1,500	1,433		
2021	1,500	1,368		
2022	1,500	1,306		
2023	1,500	1,248		
2024	1,500	1,192		
2025				
2026				
2027				
2028			-	-
2029			-	-
2030			5,948	3,584
2031			6,170	3,551
2032			6,392	3,513
2033			6,614	3,471
2034			6,836	3,427
2035			6,614	3,166
2036			6,836	3,125
2037			7,058	3,081
합계	7,500	6,546	52,468	26,919

- ◎ 민감도 분석을 위한 편익 증감 시나리오 모두에서 본 사업은 경제적 타당성을 갖는 것으로 나타낸다.
- NPV는 11,400백만원에서 20,373백만원, B/C는 2.74에서 4.11, IRR은 9.31%에서 13.37%로 모두 경제적 타당성 조건을 만족하였다.
- 따라서, 본 사업의 편익이 과대 혹은 과소 추정되었을 경우에도 충분한 경제적 타당성을 확보하고 있는 것을 알 수 있다.

표 36. 민감도 분석 결과

편익증감	-20%	-10%	0%	10%	20%
NPV(백만원)	11,400	13,643	16,063	18,129	20,373
B/C	2.74	3.08	3.45	3.77	4.11
IRR	9.31%	10.47%	11.58%	12.48%	13.37%

(6) 소결

- ◎ 본 사업은 극지 광합성조류의 자원화 및 유용소재를 개발하고, 유전정보의 자원화, 고효능 산업화 소재 발굴, 다양성확보 및 오픈DB구축의 3개 세부항목이 제시되었다.
- 극지광합성조류의 신규 균주 발굴, 생태, 생리, 유전정보 확보 (논문 및 균주 특허 확보)
- 난배양성 극지생물의 대량생산용 저온광배양 장치 등 배양기술 개발 (특허 확보)
- 산업화 소재 발굴로 식품의약품안전처 허가를 받기 위한 연구 및 소재 기술이전 성과 1건 이상
- ◎ 본 장에서는 사업 추진을 통해 발생할 수 있는 편익을 산출하고 이를 기반으로 해당 사업의 경제적 타당성을 살펴보았다.
- 본 사업의 최종 산출물로 인해 창출되는 신규 부가가치는 미래 관련 시장(항산화 식품, UV차단 화장품)의 규모를 기반으로 추정하였으며, 추정된 편익의 증감을 통한 민감도 분석을 수행하였다.
- 추정된 편익과 계획서의 비용을 기반으로 경제성 분석을 수행한 결과는 아래 표와 같다.

표 37. 경제성 분석 결과 요약

구분	분석 결과
NPV	11,400백만원 ~ 20,373백만원
B/C	2.74 ~ 4.11
IRR	9.31% ~ 13.37%

- ◎ 분석 과정에서의 불확실성을 고려한 민감도 분석 결과, 본 사업은 경제적 타당성을 확보하였다.
- ◎ 본 사업은 연구계획서상 일부 상업화(기술개발을 통한 특허성과)를 목적으로 하고 있으며, 유전정보 및 균주 확보 등의 기초 및 응용 연구개발의 성격도 띄고 있다.
- 본 연구에서는 항산화식품 산업, UV차단 화장품 산업에의 신규부가가치 창출효과만을 직접적 경제적 편익으로 산정하여 경제성 분석을 수행하였으며, 산학연 플랫폼 구축, 극지균주 seed bank 등을 통한 편익 창출은 별도로 고려하지 않았다.
 - 따라서, 본 사업의 편익은 본 연구에서 산정한 편익항목 이외에도 다양하게 창출될 가능성이 있으며, 간접적 경제적 편익 및 타산업 과급효과 역시 활발하게 창출될 것으로 판단된다.

- ◎ 본 사업에 대한 정확한 경제성 분석을 위해서는 명확한 최종 산출물 정의, 관련 산업 식별, 사업 종료 이후의 상업화 등의 후속연구 자료 등이 필요하다.
- 본 연구에서는 연구개발계획서의 총 사업비를 적절한 것으로 가정하고 경제성 분석을 수행하였다.
- 보다 정확한 미래 시장 규모 예측을 위해서는 극지 광합성조류 유용자원이 활용될 수 있는 산업, 제품, 서비스 등을 보다 명확하게 식별하는 것이 필요하며, 이를 위해서는 최종 산출물을 명확히 정의하는 것이 요구된다.
- 본 사업 종료 이후 구축된 극지 광합성조류 생명자원 DB, 바이오매스 등의 자원 활용 관련 추가적 비용 및 편익이 발생할 수 있으며, 보다 정확한 경제성 분석을 위해서는 이와 관련된 비용 및 편익을 추가적으로 고려할 필요가 있다.

(7) 경제성 분석 총괄

(가) 전체 비용 추정

- ◎ 극지 유전자원 활용 기술 연구는 3개의 연구 주제로 구성되어 5년간 300억 원의 규모로 연구활동을 수행한다.
- 극지빙설조류의 배양기술개발과 유전정보를 활용한 신소재 탐색연구는 연간 15억 원을 5년간 투입하여 75억 원 규모로 연구활동 수행한다.

표 38. 연도별 비용 추정

과제명	2020	2021	2022	2023	2024	합계
극지생물 저온성 효소의 기질 유용성 이용 유용물질 개발	25	25	25	25	25	125
극지해양 어류 유전자원의 지속가능한 활용기술	20	20	20	20	20	100
극지빙설조류의 배양기술개발과 유전정보 활용 신소재 탐색	15	15	15	15	15	75
합계	60	60	60	60	60	300

(나) 경제성 분석 결과

- 본 사업 편익에 따른 경제성 분석 결과, NPV는 41,383백만원, B/C는 2.58, IRR은 9.86%로 본 사업이 경제적으로 타당함을 나타낸다.

표 39. 본 사업 경제성 분석 결과 (편익 증감 0%)

연도	비용		편익					
	당해연도 가치	현재가치	과제1		과제2		과제3	
			당해연도 가치	현재가치	당해연도 가치	현재가치	당해연도 가치	현재가치
2020	6,000	5,730						
2021	6,000	5,472						
2022	6,000	5,226						
2023	6,000	4,991						
2024	6,000	4,766						
2025								
2026								
2027								
2028			5,977	3,949	2,283	1,509		
2029			6,150	3,881	2,345	1,480		
2030			6,329	3,814	3,296	1,986	4,957	2,987
2031			6,512	3,748	3,380	1,945	5,142	2,959
2032			6,701	3,683	3,466	1,905	5,327	2,928
2033			6,895	3,619	3,554	1,865	5,512	2,893
2034			7,095	3,556	3,644	1,827	5,697	2,855
2035			7,301	3,495	3,737	1,789	5,882	2,816
2036					1,006	460	5,697	2,604
2037					1,027	448	5,882	2,568
합계	30,000	26,185	52,961	29,745	27,737	15,213	44,094	22,609

◎ 본 사업의 편익 추정치를 20% 감소시켜 경제성 분석을 수행한 결과, NPV는 27,869
백만원, B/C는 2.06 IRR는 7.42%로 본 사업이 경제적으로 타당함을 나타낸다.

표 40. 경제성 분석 결과 (편익 증감 -20%)

연도	비용		편익	
	당해연도 가치	현재가치	당해연도 가치	현재가치
2020	6,000	5,730		
2021	6,000	5,472		
2022	6,000	5,226		
2023	6,000	4,991		
2024	6,000	4,766		
2025				
2026				
2027				
2028			6,608	4,366
2029			6,796	4,288
2030			11,665	7,030
2031			12,027	6,921
2032			12,395	6,812
2033			12,769	6,702
2034			13,149	6,591
2035			13,536	6,479
2036			5,362	2,451
2037			5,527	2,413
합계	30,000	26,185	99,834	54,054

◎ 본 사업의 편익 추정치를 10% 감소시켜 경제성 분석을 수행한 결과, NPV는 34,626
백만원, B/C는 2.32, IRR는 8.70%로 본 사업이 경제적으로 타당함을 나타낸다.

표 41. 경제성 분석 결과 (편익 증감 -10%)

연도	비용		편익	
	당해연도 가치	현재가치	당해연도 가치	현재가치
2020	6,000	5,730		
2021	6,000	5,472		
2022	6,000	5,226		
2023	6,000	4,991		
2024	6,000	4,766		
2025				
2026				
2027				
2028			7,434	4,912
2029			7,646	4,825
2030			13,123	7,908
2031			13,530	7,787
2032			13,944	7,664
2033			14,365	7,540
2034			14,792	7,415
2035			15,227	7,289
2036			6,032	2,758
2037			6,218	2,715
합계	30,000	26,185	112,313	60,811

◎ 본 사업의 편익 추정치를 10% 증가시켜 경제성 분석을 수행한 결과, NPV는 48,139
백만원, B/C는 2.84, IRR는 10.93%로 본 사업이 경제적으로 타당함을 나타낸다.

표 42. 경제성 분석 결과 (편익 증감 +10%)

연도	비용		편익	
	당해연도 가치	현재가치	당해연도 가치	현재가치
2020	6,000	5,730		
2021	6,000	5,472		
2022	6,000	5,226		
2023	6,000	4,991		
2024	6,000	4,766		
2025				
2026				
2027				
2028			9,086	6,004
2029			9,345	5,897
2030			16,040	9,666
2031			16,537	9,517
2032			17,043	9,367
2033			17,557	9,215
2034			18,080	9,062
2035			18,611	8,909
2036			7,373	3,370
2037			7,600	3,318
합계	30,000	26,185	137,271	74,324

◎ 본 사업의 편익 추정치를 20% 증가시켜 경제성 분석을 수행한 결과, NPV는 54,896
백만원, B/C는 3.10, IRR는 11.91%로 본 사업이 경제적으로 타당함을 나타낸다.

표 43. 경제성 분석 결과 (편익 증감 +20%)

연도	비용		편익	
	당해연도 가치	현재가치	당해연도 가치	현재가치
2020	6,000	5,730		
2021	6,000	5,472		
2022	6,000	5,226		
2023	6,000	4,991		
2024	6,000	4,766		
2025				
2026				
2027				
2028			9,912	6,550
2029			10,194	6,433
2030			17,498	10,544
2031			18,041	10,382
2032			18,592	10,218
2033			19,153	10,053
2034			19,723	9,886
2035			20,303	9,719
2036			8,043	3,677
2037			8,290	3,619
합계	30,000	26,185	149,750	81,081

- ◎ 민감도 분석을 위한 편익 증감 시나리오 모두에서 본 사업은 경제적 타당성을 갖는 것으로 나타났다.
- NPV는 11,400백만원에서 20,373백만원, B/C는 2.74에서 4.11, IRR은 9.31%에서 13.37%로 모두 경제적 타당성 조건을 만족하였다.
- 따라서, 본 사업의 편익이 과대 혹은 과소 추정되었을 경우에도 충분한 경제적 타당성을 확보하고 있는 것을 알 수 있다.

표 44. 민감도 분석 결과

편익증감	-20%	-10%	0%	10%	20%
NPV(백만원)	27,869	34,626	41,383	48,139	54,896
B/C	2.06	2.32	2.58	2.84	3.10
IRR	7.42%	8.70%	9.86%	10.93%	11.91%

제4장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

제1절 연차별 목표달성도

총연구기간내 연차별 목표 대비 달성율(%)					
구분	연차별 달성내용				연차별 계획대비 연구실적 달성율(B) (%)
	세부연구목표	연구내용	가중치 (A)	달성실적	
1년차 (2017)	1.CPS 대량 확보	1-1.극지미세조류 대량 배양 확보 기술 개발 (1건)	0.15	- 최적 배양조건을 확립하여 최종 400L당 50g/dw 생산에 성공 - 20L Lab scale culture system 고안	100
		1-2.대량확보를 위한 재조합 발현 시스템 및 cell-line 구축 (1건)	0.15	- 효모와 유산균에서 CPS1, CPS2를 대량 생산해 낼 수 있는 발현 시스템 구축 - 저온활성 프로모터를 가진 형질전환 미세조류 제작 성공	100
		1-3.활성 개량을 위한 저온프로모터 발현 시스템 구축			
	2.CPS 효능 분석	2-1.활성 후보 CPS 스크리닝	0.3	- 자외선에 의한 항노화 효능 균주 5종과 항염효능 균주 3종 확보 - 활성 효능 분획물을 확보하였고 이중 KSF0108에서 신물질 후보군 (compound 10) 확보	100
		2-2.피부보호 효능 검증 및 효능물질 분리 (1건)	0.4	- 논문 2편, 특허 1건	100
		2-3.표준화된 영향력지수 50 이상 논문 건수 (1건)			
	계		1.0		100

총연구기간내 연차별 목표 대비 달성율(%)					
구분	연차별 달성내용				연차별 계획대비 연구실적 달성율(B)(%)
	세부연구목표	연구내용	가중치(A)	달성실적	
2년차 (2018)	1. CPS 대량 확보	1-1. 극지미세조류 대량 배양 확보 기술 개발	0.1	-배양조건 개선으로 약 30% 비용 절감 -200리터 저온성 미세조류 배양실 시범시설 운영	100
		1-2. 대량확보를 위한 재조합 발현 시스템 및 cell-line 구축	0.1	-저온활성 프로모터를 삽입한 미세조류 형질전환체 제작 완료	
		1-3. 국내외 지적재산권 확보 건수	0.2	-특허 2건, 출원 1건, KPDC 3건 등록	100
		2-1. 자외선 손상 후 항노화, 항염 효능 검증	0.2	-항알리지 효능이 있는 단일화합물 2개 신규 발견 -자외선에 의한 생기는 주름개선 효능이 있는 단일화합물을 찾음	100
	2. CPS효능 분석	2-2. CPS의 안전성 검증 예비 임상 테스트	0.2	-효능균주 KSF0031 추출물의 인체적용시험 보고서 완료	100
		2-3. 해당논문 건수	0.2	논문 2편 (mrnIF 50이상 1편을 포함)	
		계	1.0		100

년도 (과제연차)	성과목표	성과지표 (예)	평가기준	가중치 (A)	목표 (B)	달성 (C)	달성도(%)	
							(D=C/B)	(A×D)
2019 (3차년도)	CPS 대량 확보	극지미세조류 대량 배양 확보 기술 개발	배양프로토콜 건수	10	1건	1건	100%	10
		국내외 지적재산권 확보 건수	특허 및 실용실안 건수	20	1건	3건	100%	20
	CPS효능 분석	CPS의 안전성 검증 예비 임상 테스트	예비 임상 테스트 건수	20	1건	1건	100%	20
		표준화된 영향력지수 50이상 논문건수	해당논문 건수	20	2건	5건	100%	20
	CPS실용화	경제적 타당성 검증	예비 임상 시제품 건수	15	1건	1건	100%	15
		고품질 피부질환 개선제 실용화 준비	임상결과보고서(식약처 평가 가이드라인)	15	1건	1건	100%	15
	계				100	-		100
	합 계				1.0	-		100%

제2절 3개년 연구결과(실적)

구분	주요 내용
자체 종합 평가의견	<ul style="list-style-type: none"> □ 본 과제는 지난 수년간 KOPRI 연구자들이 극지에서 채집하여 독자적으로 유지해온 극지 미세조류들의 과학적, 산업적 가치를 발굴하는데 목적이 있다. 선행 연구에서 세포주 실험 결과 항암, 항염, 항산화 효능이 있음을 확인하였으나 실용화를 위해서는 충분한 biomass 확보가 관건이었다. 특히 극지미세조류는 배양조건이 까다로워 전 세계적으로도 대량배양이 보고된 적이 없고 또한 환경 적응 특이대사산물들을 가지고 있음에도 상업적 활용 사례도 없었다. 따라서 본 과제에서는 1.대량배양, 2. 효능 분석으로 실용화를 위한 제약을 먼저 해결하고자 하였다. - 1. 대량배양 성과) 통합적 공정시스템과 IoT를 이용한 스마트 배양시스템 구축, 최적배양조건으로 외주생산 대비 약 43%의 비용을 절감, 유용단백질을 대량생산할 수 있는 저온 발현 형질전환체 제작 완료 □ UV에 의한 피부 노화를 억제에 탁월한 효능을 보인 균주들에 연구력을 집중하여 효능 물질 Epi glycerol을 분리했고 대량 합성(8g 이상)에 성공. 피부자극테스트와 인체적용 임상시험결과로 기준에 판매되는 물질대비 좋은 효능을 검증받았다. - 2. 효능분석 성과) 주름개선 효능 물질 Epi glycerol 합성, 미국 ICID원료동계, 단일물질 Epi glycerol로 식약처 인허가를 받은 임상테스트 통과, 항알러지 효능이 있는 화합물 3건 확보 □ 3년차에 계획되어 있던 시제품 제작과 임상평가를 2년차로 변경할 만큼 참여 연구자들이 선택과 집중을 한 덕분에 단기간에 효능소재 개발과 식약처 기준 임상평가를 완료하는 성과를 거둘 수 있었다고 판단된다.
1차년 (2017년) 성과 및 의의	<p>실적 (논문 3건)</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 극지 미세조류 대량 확보 <ul style="list-style-type: none"> - 극지 미세조류를 온도, 빛, 배지 등 대량 배양조건을 조절하여 최종 400L당 약 30 ~ 50g/dw 생산에 성공 - GRAS (Generally Regarded As Safe) 생물인 효모와 유산균에서 CPS를 대량 생산해 낼 수 있는 발현 시스템을 구축 ○ 효능 CPS 후보군 선정 <ul style="list-style-type: none"> - 자외선에 의한 피부노화 방지 효능이 있는 5개 균주를 선별하였고, 세포독성 없이 높은 항염 효능을 보이는 3개 균주 추가 - 이들 3개 균주는 다래 추출물유래 아토피 치료제 (알렉스 정)보다 더 강한 항염 효능을 나타내었음 ○ 효능 물질 분리

구분	주요 내용
	<ul style="list-style-type: none"> - 항염증, 항알러지 활성능의 KSF0108 화합물 구조 동정 결과 cholesterol, β-sitosterol, hurgadacin 등 10종 동정과 신규 물질(10# compound) 발견. ○ 효능 향상, 기전연구 <ul style="list-style-type: none"> - 극지 <i>Chaetoceros neogracile</i> 유래 저온활성 프로모터가 삽입되어 발현되는 형질전환체 (미세조류) 19개 line을 확보 - 호냉성 극지미세조류 ArM29, KNF32의 게놈 정보분석, 저온활성 프로모터 후보군들 7개 선별, 저온활성 발현시스템 구축 - KSF0006에서 UVB에 대한 세포보호 효능이 91.46% 증가된 유기용매 추출법 정립. Hyaluronan의 발현량 증가, MMP-1 억제 효능을 확인 - CPS1과 CPS2에서 자외선 세포 보호 효능을 확인. CPS1에서는 control에 비해 세포보호 효능이 95.47 % 증가하는 것을 확인하였고 MMP-1 억제 효능, hyaluronan의 발현량이 증가함을 확인 - 시판 다래추출물보다 월등히 높은 항염 활성을 보이는 미세조류 3종을 확보, 항염기작 NF-kB pathway와 관련이 있음을 확인
2차년 (2018년) 성과 및 의의	<p>실적 (논문 2건)</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 극지 미세조류 대량 확보기술개발 <ul style="list-style-type: none"> - 극지미세조류 바이오매스의 대량공급을 위해 200L lab sized 광생물반응기 개발과 27m³ 저온배양실 구축 - GRAS (Generally Regarded As Safe) 생물인 <i>Bacillus subtilis</i> 에서 활성과 안정성이 개량된 CPS1m 발현 시스템 구축 ○ 피부보호 효능 물질 분리 <ul style="list-style-type: none"> - <i>Micractinium</i> sp. KSF0031의 추출물을 NMR 및 MASS 등을 이용하여 총 8종 동정과 신규 물질(5# compound) 발견 - <i>Micractinium</i> sp. KSF0031의 2종의 화합물에서 항염증활성 검증 ○ 효능 향상, 기전 연구 <ul style="list-style-type: none"> - <i>Micractinium</i> sp. KSF0031 추출물의 자외선에 의한 세포 보호효능과 MMP-1(피부노화단백질)의 발현억제 확인 - <i>Micractinium</i> sp. KSF0031 추출물은 세포독성이 없고 손상된 피부세포의 생존율을 회복, 주름개선 효능이 있음을 검증 ○ 약리효능 평가 <ul style="list-style-type: none"> - <i>Micractinium</i> sp. KSF0031의 추출물에 대한 효능 성분의 피부 안전성 평가 실시(인체피부 일차자극시험)
3차년 (2019년) 성과 및 의의	<p>실적 (논문 5건, 투고진행 3건, 특허 3건, 출원진행 3건)</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ CPS 대량생산공정 시설구축 <ul style="list-style-type: none"> - 극지미세조류 톤 단위 배양부터 CPS 분석까지 신속히 처리할 수 있는 통합적 공정시스템과 IoT를 이용한 스마트 배양시스템 구축

구분	주요 내용
	<ul style="list-style-type: none"> - 극저미세조류 전용 최적화배지제조 및 고효율광원(관형 광배양기)를 개선하여 최대 35% 향상된 바이오매스 생산하였고, 외주생산 대비 약 43%의 비용을 절감함 ○ 신규 세포보호물질 확보 및 저온 발현시스템 구축 <ul style="list-style-type: none"> - 극저미세조류 유래 저온활성 프로모터 3종(P1, P3, P9)의 저온 발현 확인함. 저온활성 프로모터를 이용한 저온발현 시스템 구축 - 신규 미세조류 <i>Chlamydomonas</i> sp.인 KSF0006, KSF0041, KSF059, KSF0100의 추출물에서 항염증, 항알러지 활성이 있는 화합물을 확보 ○ 피부보호 효능 물질 분리 <ul style="list-style-type: none"> - <i>Chlamydomonas</i> sp. KSF0006, KSF0041, KSF059, KSF0100 추출물의 총22종 화합물에서 항노화 주름 개선 화합물의 대량 합성 - Epi glycerol 구조를 기반으로한 8종의 유도체 합성 완료 ○ 세포보호물질 임상효능 검증 및 시제품 제작 <ul style="list-style-type: none"> - 신규 발광소제 KOPRI-KIOM Eico glycerol 임상효능 평가시 세포독성이 없었으며 자외선에 의해 손상된 피부세포의 생존율을 회복시켰음. 피부노화 단백질인 MMP-1의 발현을 억제하여 주름개선 효능을 보임 - 자극테스트 평가 (KFDA, CTFA 가이드라인) 결과 피부안정성 검사 통과 - 식약처 인허가 인체적용 임상평가 확보



<논문 실적>

순서	해당 년도	해당 계정	논문제목	학술지명	게재일	최우수	등급*						저자명 / 소속						극지논문 여부**			
							1등급		2등급	3등급				제1저자		교신저자		공동저자				
							A	B		국내	해외	학술지	Proceeding	성명	소속	성명	소속	성명	소속	극지	비극지	
1	2017	PE17180 PM16040	Bioactivities of ethanol extract from the Antarctic freshwater microalga, <i>Chloromonas</i> sp.	International Journal of Medical Sciences	2017.04.28	77.27			●						서승석	극지	김상희	극지	양은진 (제2저자) 이성구 (제3저자) 윤의중 (제4저자) 한세종 (제5저자) 김일환 (제6저자)	극지	●	
2	2017	PE17180 PE17100	Comprehensive expression profiling and functional network analysis of porphyrin-334, one mycosporine-like amino acid (MLA), in human keratinocyte exposed with UV-radiation	Marine Drugs	2017.06.24	79.66			●						서승석	극지	김상희	극지	이성구 (제2저자) 윤의중 (제3저자) 한세종 (제4저자) 김일환 (제5저자)	극지	●	
3	2017	PE17180	Identification and Characterization of an Isoform Antifreeze Protein from the Antarctic Marine Diatom, <i>Chaetoceros neogracile</i> and Suggestion of the Core Region	Marine Drugs	2017.10.18	79.66			●						김민재	한양대 학교	진연선	한양대 학교	박윤호 정종식	마크로젠 극지	●	
4	2018	PE17180	Anti-inflammation and Anti-Cancer Activity of Ethanol Extract of Antarctic Freshwater Microalga, <i>Micractinium</i> sp.	International Journal of Medical Sciences	2018.06.12	70.78			●						서승석	극지	김상희	극지	홍주미 (제2저자) 김은재 (제3저자) 김선미 (제5저자) 김정운 (제6저자) 김일환 (제7저자)	극지	●	

5	2018	PE18180	Anti-inflammatory activity of compounds from the rhizome of <i>Cnidium officinale</i>	Archives of Pharmacol Research	2018.06.30	45.00												Huynh Nguyen Khanh Tran	대구가톨릭대학교	민병선	가톨릭대학교	윤의중(제4저자) 김상희(제5저자)	극지		●
6	2019	PE19180	Antarctic freshwater microalga, <i>Chloromonas reticulata</i> , suppresses inflammation and carcinogenesis	International Journal of Medical Sciences	2019.01.01	67.30												서승석	극지	김상희	극지	홍주미(제2저자) 김은재(제3저자) 채현식(제5저자) 김정은(제6저자) 김지희(제7저자) 김일환(제8저자)	극지		●
7	2019	PE18180 PE18210	Increased Productivity and Antifreeze Activity of Ice-binding Protein from <i>Flavobacterium frigidis</i> PS1 Produced using <i>Escherichia coli</i> as Bioreactor	Applied Biochemistry and Microbiology	2019.09.30	3.73												김은재	극지	한세중	극지	김정은(제2저자) 황지섭(제3저자) 김일환(제4저자) 이성구(제5저자) 김상희(제6저자) 이준혁(제7저자)	극지		●
8	2019	PE19180 PN15070	Enhancing Lipid Production in the Arctic Microalga <i>Chlamydomonas</i> sp. KNM0029C by Using Statistical Optimization of Medium Components	The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering	2019 Accepted													김은재	극지	한세중	극지	김상희(제3저자) 최한구(제4저자)	극지		●
9	2019	PE19180	The comprehensive roles of atranorin, a secondary metabolite from the Antarctic lichen <i>stereocaulon caespitosum</i> , in HCC tumorigenesis	Molecules	2019.04.10	54.55												전영준	오하이오대학	서승석	목포대학교	김상희(제2저자) 김지희(제3저자) 윤의중(제4저자)	극지		●
10	2019	PE17180	Heterologous gene expression using the cold-inducible CnAFP promoter in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Algal research	Under revision	76.88												김민재 김종래	한양대학교	진연선	한양대학교	김상희	극지		●
11	2019	PE18180	Investigation of chemical compounds from <i>Chlamydomonas</i> sp. KSF108 (<i>Chlamydomonadaceae</i>)	Biochemical Systematics and Ecology	2019.04	8.42												Huynh Nguyen Khanh Tran	대구가톨릭대학교	민병선	가톨릭대학교	윤의중(제3저자) 김상희	극지		●

12	2019	PE18180	Glycerols and fatty acids isolated from <i>Micractinium</i> sp. KSF0031	Biochemical Systematics and Ecology	투고중	8.42												Huynh Nguyen Khanh Tran	대구가톨릭대학교	김상희	민병선	극지대구가톨릭대학교	윤의중(제2저자)	극지		●
13	2019	PE18180	Immunosuppressive activity of chemical constituents from strain <i>Chlamydomonas</i> sp. KSF108 (<i>Chlamydomonadaceae</i>)	Natural Product Sciences	투고중														Huynh Nguyen Khanh Tran	대구가톨릭대학교	민병선	대구가톨릭대학교	윤의중(제4저자) 김상희(제5저자)	극지		●

* 논문 등급기준

- 최우수 : NSC 및 이에 준하는 학술지

- 1등급

▶ A : 전년도 JCR(Journal Citation Report)기준 IF(Impact Factor)값이 상위 20%이내 학술지

▶ B : SCI/SSCI 등재 학술지

- 2등급 : SCI/SSCI Expanded 등재 학술지

- 3등급 : 비 SCI/SSCI 등재 학술지

** 극지논문 여부 : 극지연구분야에서의 연구성과인지 여부 표기(평가시 비극지논문 1건은 0.5건으로 반영)

<특허실적>

순서	해당 연도	해당 계정	명칭	국가	출원		등록		비고
					국내	국외	국내	국외	
1	2019	PE18180	북극 미세조류 유래 신규 얼음결정 생성억제 단백질 및 그용도	대한민국	●				
2	2019	PE17180	클로로모나스 종 미세조류의 추출물을 함유하는 암 예방 또는 치료용 조성물	대한민국	●		●		
3	2019	PE17180	저온성 미세조류배양장치	대한민국	●		●		
4	2019	PE19180	결빙방지단백질의 프로모터 서열을 이용한 클라미도모나스 레인하르티의 저온 유도성 발현시스템	대한민국					출원예정
5	2019	PE18180	<i>Micractinium</i> sp. KSF0031 추출물 또는 이로부터 분리한 화합물을 포함하는 알레르기 질환 예방 또는 치료용 조성물	대한민국					출원예정
6	2019	PE19180	극지 미세조류 KSF0031 유래 화합물 Eico glycerol(EG)의 주름개선 효능 및 그 용도	대한민국					출원예정

<학술발표 실적>

순서	해당년도	제 목	회의명	발표자	발표일자	국가명
1	2019	Lipid formation by Arctic microalga Chlamydomonas sp. KNF0008 at low temperature	ISS2019 (23rd International Seaweed Symposium)	김은재 (제1저자) 정용식 (제2저자) 임수연 (제3저자) 김상희 (제4저자) 최한구 (제5저자) 한세중 (교신저자)	2019.04.29	대한민국
2	2019	Biofuel production using Arctic psychrophilic microalga Chlamydomonas sp. KNM0029C	ISS2019 (23rd International Seaweed Symposium)	김은재 (제1저자) 김상희 (제2저자) 최한구 (제3저자) 한세중 (교신저자)	2019.04.28	대한민국
3	2019	A new Chlorella species (Chlorophyta, Trebouxiophyceae) from Antarctica	ISS2019 (23rd International Seaweed Symposium)	채현식 (제1저자) 김상희 (제2저자) 최한구 (제3저자) 김한순 (제4저자) 김지희 (교신저자)	2019.04.28	대한민국
4	2019	Immunosuppressive compounds from Chlamydomonas sp. KSF108	The 50th Annual Meeting and Symposium of the Korean Society of Pharmacognosy	Huynh Nguyen Khanh Tran (제1저자) 김정아 (제2저자) 윤의중 (제3저자) 김상희 (제4저자) 민병선 (교신저자)	2019.11.28	대한민국



제5장 연구개발결과의 활용계획

제1절 향후 연구방향 및 성과활용 계획

구분	주요 내용
향후 연구 방향	<ul style="list-style-type: none"> ○ 효능검증과 원료등록이 완료된 극지미세조류 유래 신규 화합물 Eico glycerol의 항UV 주름개선 효능 증대 및 기술 고도화 후속 연구가 필요 - 항UV 주름개선 Eico glycerol의 대량 합성을 통한 단가 절감, 기술이전 추진 - 항UV 주름개선 Eico glycerol의 다양한 유도체 화합물들의 합성 및 효능증대 스크리닝 - 항UV 주름개선 Eico glycerol유도체의 분자, 생화학적 작용기전 연구 ○ 신규 화합물 Eico glycerol의 효능범위 확대와 유도체들의 추가 스크리닝을 통해 효능을 극대화하여 부가가치 상품 개발 및 기존 수입에 의존하던 원료 대체로 독자적 시장 개척 - Eico glycerol의 유사구조 화합물들이 심혈관 활성 및 대사질환에 효능이 있음이 보고되어 있어서 Eico glycerol과 유도체들의 효능 검증을 통해 활용 범위를 건강보조제, 약품소재로 넓힐 가능성 타진 - 확보한 항알러지, 항산화 효능 소재들의 산업화를 위한 기초 연구
성과 활용 계획	<ul style="list-style-type: none"> ○ 미세조류에서 생산된 polymer(PHAs, EPPs), polysaccharide 등은 석유화학 제품을 대체할 친환경 플라스틱, 의료용품 대체제로 떠오르고 있을 뿐 아니라 화상, 아토피 피부질환제 등 효능발달로 이어지고 있음 - 생산단가를 43% 절감한 배양시스템을 활용하여 산학연에 극지미세조류 접근 장벽을 낮추고 활용에 기여 - 지속적인 바이오매스를 확보할 수 있다는 장점을 최대한 살려 발균, 배양부터 활성물질 분리, 활성평가까지 다학제 협력 신성장 동력을 마련할 수 있음 ○ 극지미세조류를 보다 잘 활용하고 경제적인 생산성을 확보하기 위해 유전자 및 분자 생물학적 정보를 지속적으로 축적 - 극지 유전자 및 이들의 생합성 화합물 생성, 작용 분석을 통한 극지유래 생물의 자원화

제6장 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 해당사항 없음

제7장 참고문헌

1. Chisti Y (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv* 25 (3):294-306
2. Kumar K, Dasgupta CN, Nayak B, Lindblad P, Das D (2011) Development of suitable photobioreactors for CO₂ sequestration addressing global warming using green algae and cyanobacteria. *Bioresour Technol* 102 (8):4945-4953
3. Smith REH, Stapleford LC, Ridings RS (1994) The acclimated response of growth, photosynthesis, composition, and carbon balance to temperature in the psychrophilic ice diatom *Nitzschia seriata*. *J Phycol* 30 (1):8-16
4. Do H, Lee JH, Lee SG, Kim HJ (2012) Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of an ice-binding protein (FfIBP) from *Flavobacterium frigidum* PS1. *Acta Crystallogr F-Struct Biol Cryst Commun* 68 (7):806-809
5. Jung W, Gwak Y, Davies PL, Kim HJ, Jin E (2014) Isolation and Characterization of Antifreeze Proteins from the Antarctic Marine Microalga *Pyramimonas gelidicola*. *Mar Biotechnol*:1-11
6. Nogueira DPK, Silva AF, Araújo OQF, Chaloub RM (2014) Impact of temperature and light intensity on triacylglycerol accumulation in marine microalgae. *Biomass Bioenerg*. doi:10.1016/j.biombioe.2014.10.017
7. Bischoff HW, Bold HC (1963) IV. Some soil algae from Enchanted Rock and related algal species, vol 6318. *Phycological Studies*. Univ Texas Publ
8. Smith SW, Overbeek R, Woese CR, Gilbert W, Gillevet PM (1994) The genetic data environment an expandable GUI for multiple sequence analysis. *Comput Appl Biosci* 10 (6):671-675
9. Posada D, Crandall KA (1998) Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* (14):817-818
10. Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* (17): 754-755.
11. Stamatakis (2006) RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22:2688-2690
12. Guillard RRL (1975) Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: *Culture of marine invertebrate animals*. Springer, pp 29-60
13. Guillard RRL, Ryther JH (1962) Studies of marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Grun. *Can J Microbiol* 8 (2):229-239
14. Gorman DS, Levine RP (1965) Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the

- photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. Proc Natl Acad Sci USA 54 (6):1665
15. Thompson AS, Rhodes JC, Pettman I (1988) Culture collection of algae and protozoa: catalogue of strains. 5th edn. The Collection, Cumbria, U.K.
 16. Sasser M (1990) Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. Technical #101. MIDI
 17. Ettl H (1976) Die Gattung Chlamydomonas Ehrenberg. Beihefte zur Nova Hedwigia (49): 1-1122.
 18. Siaut M, Cui n  S, Cagnon C, Fessler B, Nguyen M, Carrier P, Beyly A, Beisson F, Triantaphylid s C, Li-Beisson Y (2011) Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves. BMC Biotechnol 11 (1):7
 19. Renaud SM, Thinh LV, Lambrinidis G, Parry DL (2002) Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. Aquaculture 211 (1):195-214
 20. Teoh M-L, Chu W-L, Marchant H, Phang S-M (2004) Influence of culture temperature on the growth, biochemical composition and fatty acid profiles of six Antarctic microalgae. J Appl Phycol 16 (6):421-430
 21. Knothe G (2008) "Designer" biodiesel: optimizing fatty ester composition to improve fuel properties. Energy Fuels 22 (2):1358-1364
 22. Liu L, Pohnert G, Wei D. (2016) Extracellular metabolites from industrial microalgae and their biotechnological potential. Marine Drugs. 14, 191
 23. 임팩트 (2016) 2016 화장품 시장동향 및 전망. imFact, 서울
 24. 농림수산물기술기획평가원 보고서 (2011)
 25. 최철만 (미세조류 동향, 2014)
 26. 대한임상피부치료연구회, <http://www.laserpro.or.kr/bbs/?t=rj>, 2016
 27. 세계의 피부질환 치료제 시장 전망, <http://www.giikorea.co.kr/report/gbi358647-global-dermatology-market-innovative-pipeline.html>, 2016
 28. 약사공론, http://www.kpanews.co.kr/article/medipharm/show.asp?idx=174252&n_category=D, 2016
 29. Algae becomes a favorite cosmetic ingredient, <http://www.algaeindustrymagazine.com/algae-becomes-a-favorite-cosmetic-ingredient/>
 30. Lumene 화장품, <http://www.lumene.com/en/product-categories/product-line>
 31. 해조류 추출물의 산업화, http://www.oilgae.com/non_fuel_products/algae_cosmetics.html
 32. 북극 해양 추출물 함유 화장품, http://www.eevia.fi/index.html#arctic_organics
 33. skyn iceland 화장품, <http://www.skyniceland.com/product-72-arctic-hydrating-balm>
 34. 조류 추출물 함유 대표 화장품 8종, <http://makeitbetter.net/better-you/9-great-new-beauty-products-made-with-algae/>



Research Paper

Bioactivities of ethanol extract from the Antarctic freshwater microalga, *Chloromonas* sp.

Sung-Suk Suh¹, Eun Jin Yang², Sung Gu Lee^{1,3}, Ui Joung Youn¹, Se Jong Han^{1,3}, Il-Chan Kim^{1,3} and Sanghee Kim^{1,3}*

- 1. Division of Polar Life Sciences, Korea Polar Research Institute, Incheon, 21990, Republic of Korea;
- 2. Department of Polar Ocean Environment, Korea Polar Research Institute, Incheon, 21990, Republic of Korea;
- 3. Department of Polar Science, University of Science and Technology, Incheon, 21990, Republic of Korea.

*Corresponding author: Dr. Sanghee Kim, Email: sangheekim@kopri.re.kr; Tel: 82-32-760-5515 Fax: 82-32-760-5509

© Ivyspring International Publisher. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY-NC) license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>). See <http://ivyspring.com/terms> for full terms and conditions.

Received: 2016.12.11; Accepted: 2017.03.29; Published: 2017.04.28

Abstract

Cancer is the principal cause of human death and occurs through highly complex processes that involve the multiple coordinated mechanisms of tumorigenesis. A number of studies have indicated that the microalgae extracts showed anticancer activity in a variety of human cancer cells and can provide a new insight in the development of novel anti-cancer therapy. Here, in order to investigate molecular mechanisms of anticancer activity in the Antarctic freshwater microalga, *Chloromonas* sp., we prepared ethanol extract of *Chloromonas* sp. (ETCH) and performed several *in vitro* assays using human normal keratinocyte (HaCaT) and different types of cancer cells including cervical, melanoma, and breast cancer cells (HeLa, A375 and Hs578T, respectively). We revealed that ETCH had the antioxidant capacity, and caused significant cell growth inhibition and apoptosis of cancer cells in a dose-dependent manner, whereas it showed no anti-proliferation to normal cells. In addition, ETCH had a significant inhibitory effect on cell invasion without the cytotoxic effect. Furthermore, ETCH-induced apoptosis was mediated by increase in pro-apoptotic proteins including cleaved caspase-3 and p53, and by decrease in anti-apoptotic protein, Bcl-2 in ETCH-treated cancer cells. Taken together, this work firstly explored the antioxidant and anticancer activities of an Antarctic freshwater microalga, and ETCH could be a potential therapeutic candidate in the treatment of human cancer.

Key words: Bioactivities, ethanol extract, *Chloromonas* sp.

Introduction

According to American Cancer Society (Cancer Facts and Figures 2016) it is estimated that the incidence of childhood cancer accounts for a large proportion of all cancer cases. In 2016, it was estimated that there are 10,380 new cases of cancer and among them 1,250 deaths of children occur due to cancer. Many scientists around the world are endeavoring to develop novel targeted therapies in human cancer treatments, which are capable for selectively killing cancer cells, not harmful to normal cells. For the successful development of such therapies, it is primarily necessary to better understand physiological and molecular differences between cancer and normal cells. Therefore, the studies

of new anti-cancer therapy can in part, improve comprehension of cancer biology mechanisms, selectively targeting molecular pathways thought to be critical for tumor survival, growth, and metastases [1-3]. In fact, in the last few decades the increasing incidence of human cancer has led to the progressive development of new anticancer agents through more systematic and scientific validation of a wide range of synthetic and natural substrates [4, 5]. According to the Pharmaceutical Research and Manufacturers of America, more than 800 anti-cancer agents have been shown to be effective in clinical trial. Among them many drugs were derived from the natural sources such as plant and microorganisms against various

<http://www.medsci.org>



Article

Comprehensive Expression Profiling and Functional Network Analysis of Porphyrin-334, One Mycosporine-Like Amino Acid (MAA), in Human Keratinocyte Exposed with UV-radiation

Sung-Suk Suh¹, Sung Gu Lee^{1,2}, Ui Joung Youn¹, Se Jong Han^{1,2}, Il-Chan Kim^{1,2,*} and Sanghee Kim^{1,2,*}

- 1. Division of Polar Life Sciences, Korea Polar Research Institute, Incheon 21990, Korea; sung-suk.suh@kopri.re.kr (S.-S.S.); holynine@kopri.re.kr (S.G.L.); uijoun@kopri.re.kr (U.J.Y.); hansj@kopri.re.kr (S.J.H.)

- 2. Department of Polar Science, University of Science and Technology, Incheon 21990, Korea

- * Correspondence: ickim@kopri.re.kr (I.-C.K.); sangheekim@kopri.re.kr (S.K.); Tel: +82-32-760-5515 (I.-C.K.); Fax: +82-32-760-5509 (S.K.)

Received: 24 April 2017; Accepted: 21 June 2017; Published: 24 June 2017

Abstract: Mycosporine-like amino acids (MAAs) have been highlighted as pharmacologically active secondary compounds to protect cells from harmful UV-radiation by absorbing its energy. Previous studies have mostly focused on characterizing their physiological properties such as antioxidant activity and osmotic regulation. However, molecular mechanisms underlying their UV-protective capability have not yet been revealed. In the present study, we investigated the expression profiling of porphyrin-334-modulated genes or microRNA (miRNAs) in response to UV-exposure and their functional networks, using cDNA and miRNAs microarray. Based on our data, we showed that porphyrin-334-regulated genes play essential roles in UV-affected biological processes such as Wnt (Wingless/Integrase-1) and Notch pathways which exhibit antagonistic relationship in various biological processes; the UV-repressed genes were in the Wnt signaling pathway, while the activated genes were in the Notch signaling. In addition, porphyrin-334-regulated miRNAs can target many genes related with UV-mediated biological processes such as apoptosis, cell proliferation and translational elongation. Notably, we observed that functional roles of the target genes for up-regulated miRNAs are inversely correlated with those for down-regulated miRNAs; the former genes promote apoptosis and translational elongation, whereas the latter function as inhibitors in these processes. Taken together, these data suggest that porphyrin-334 protects cells from harmful UV radiation through the comprehensive modulation of expression patterns of genes involved in UV-mediated biological processes, and that provide a new insight to understand its functional molecular networks.

Keywords: Mycosporine-like amino acids (MAAs); UV-radiation; porphyrin-334; microRNAs; Wnt pathway; Notch pathway

1. Introduction

Under exposure of environmental ultraviolet (UV) radiation, certain living organisms have developed characteristic defense mechanisms to diminish the adverse effects of UV radiation, including DNA damage and the production of reactive oxygen species (ROS) [1-3]. Recent studies have reported that many photosynthetic marine organisms can synthesize secondary metabolites with UV-absorbing capacity such as mycosporine-like amino acids (MAAs), as one of the most effective UV protection mechanisms [4,5]. These compounds have characteristic chemical structure with either

Mar. Drugs 2017, 15, 196; doi:10.3390/md15070196

www.mdpi.com/journal/marinedrugs

Article

Identification and Characterization of an Isoform Antifreeze Protein from the Antarctic Marine Diatom, *Chaetoceros neogracile* and Suggestion of the Core Region

Minjae Kim ¹, Yunho Gwak ¹, Woongsic Jung ^{2,*} and EonSeon Jin ^{1,*}

¹ Department of Life Science, College of Natural Sciences, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea; sciencekor89@gmail.com (M.K.); firstthero@macrogen.com (Y.G.)

² Division of Polar Life Science, Korea Polar Research Institute, KIOST, Incheon 406-840, Korea

* Correspondence: wchung@kopri.re.kr (W.J.); esjin@hanyang.ac.kr (E.J.); Tel.: +82-32-760-5542 (W.J.); +82-2-2220-2561 (E.J.)

Received: 13 September 2017; Accepted: 16 October 2017; Published: 18 October 2017

Abstract: Antifreeze proteins (AFPs) protecting the cells against freezing are produced in response to extremely low temperatures in diverse psychrophilic organisms, and they are encoded by multiple gene families. The AFP of Antarctic marine diatom *Chaetoceros neogracile* is reported in our previous research, but like other microalgae, was considered to probably have additional genes coding AFPs. In this paper, we reported the cloning and characterization of additional AFP gene from *C. neogracile* (*Cn-isoAFP*). *Cn-isoAFP* protein is 74.6% identical to the previously reported Cn-AFP. The promoter sequence of *Cn-isoAFP* contains environmental stress responsive elements for cold, thermal, and high light conditions. *Cn-isoAFP* transcription levels increased dramatically when cells were exposed to freezing (−20 °C), thermal (10 °C), or high light (600 μmol photon m^{−2} s^{−1}) stresses. The thermal hysteresis (TH) activity of recombinant Cn-isoAFP was 0.8 °C at a protein concentration of 5 mg/mL. Results from homology modeling and TH activity analysis of site-directed mutant proteins elucidated AFP mechanism to be a result of flatness of B-face maintained via hydrophobic interactions.

Keywords: Antarctic marine diatom; *Chaetoceros neogracile*; isoform antifreeze protein; antifreeze activity; 3D-structure modeling

1. Introduction

Antifreeze proteins (AFPs) are found in various organisms such as fishes, insects, plants, microalgae and even bacteria living in Arctic and Antarctic regions [1–3]. AFPs are able to decrease the freezing point of the fluid below its melting point and inhibit ice-recrystallization, which helps in survival of the organism at extremely low temperatures [4]. The basic mechanisms of the protein functions have been studied through structure predictions using protein modeling programs or structure identification using X-ray crystallography [5–11]. Like multicellular organisms, microalgal AFPs such as *Navicula glaciei* [12], *Fragilariopsis cylindrus* [13], *Chlamydomonas* sp. [14], *Chloromonas* sp. [15], and *Fragilariopsis* sp. [16], have also been studied using diverse analytic approaches. Interestingly, many microalgal AFPs are encoded with multiple genes, similar to other organisms [17,18]. The presence of multiple gene families of AFPs supports the notion that AFPs are required for psychrophilic organisms to adapt and survive in extremely low-temperature environments.

Based on previous research, the mechanism of AFPs has been considered as that an ice crystal binding activity and a reducing the freezing temperature are most probably due to an absorption-inhibition mechanism [4,19–22]. The “anchored clathrate water” mechanism was proposed



Research Paper

Anti-inflammation and Anti-Cancer Activity of Ethanol Extract of Antarctic Freshwater Microalga, *Micractinium* sp.

Sung-Suk Suh¹, Ju-Mi Hong², Eun Jae Kim^{2,4}, Seung Won Jung³, Sun-Mi Kim², Jung Eun Kim^{2,4}, Il-Chan Kim^{2,4} and Sanghee Kim^{2,4}

1. Department of Bioscience, Mokpo National University, Muan 58554, Republic of Korea
2. Department of Polar Life Sciences, Korea Polar Research Institute, Incheon 21990, Republic of Korea
3. South Sea Environment Research Department, Korea Institute of Ocean Science and Technology, Geoje, 656-830, Republic of Korea
4. Department of Polar Sciences, University of Science and Technology, Incheon 21990, Republic of Korea

Corresponding author: sangheekim@kopri.re.kr, Tel: 82-32-760-5515 Fax: 82-32-760-5509

© ivyspring International Publisher. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY-NC) license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>). See <http://ivyspring.com/terms> for full terms and conditions.

Received: 2018.04.01; Accepted: 2018.05.27; Published: 2018.06.12

Abstract

Inflammation mediated by the innate immune system is an organism's protective mechanism against infectious environmental risk factors. It is also a driver of the pathogenesis of various human diseases, including cancer development and progression. Microalgae are increasingly being focused on as sources of bioactive molecules with therapeutic potential against various diseases. Furthermore, the antioxidant, anti-inflammatory, and anticancer potentials of microalgae and their secondary metabolites have been widely reported. However, the underlying mechanisms remain to be elucidated. Therefore, in this study, we investigated the molecular mechanisms underlying the anti-inflammatory and anticancer activities of the ethanol extract of the Antarctic freshwater microalga *Micractinium* sp. (ETMI) by several *in vitro* assays using RAW 264.7 macrophages and HCT116 human colon cancer cells. ETMI exerted its anti-inflammatory activity by modulating the main inflammatory indicators such as cyclooxygenase (COX)-2, interleukin (IL)-6, inducible nitric oxide synthase (iNOS), tumor necrosis factor (TNF)- α , and nitric oxide (NO) in a dose-dependent manner. In addition, ETMI exerted cytotoxic activity against HCT116 cells in a dose-dependent manner, leading to significantly reduced cancer cell proliferation. Further, it induced cell cycle arrest in the G1 phase through the regulation of hallmark genes of the G1/S phase transition, including *CDKN1A*, and cyclin-dependent kinase 4 and 6 (*CDK4* and *CDK6*, respectively). At the transcriptional level, the expression of *CDKN1A* gradually increased in response to ETMI treatment while that of *CDK4* and *CDK6* decreased. Taken together, our findings suggest that the anti-inflammatory and anticancer activities of the Antarctic freshwater microalga, *Micractinium* sp., and ETMI may provide a new clue for understanding the molecular link between inflammation and cancer and that ETMI may be a potential anticancer agent for targeted therapy of colorectal cancer.

Key words: Inflammation, cancer, *Micractinium* sp., proinflammatory cytokines, HCT116

Introduction

Inflammation is a defense response mediated by the innate immune system to reinstate cellular homeostasis against foreign pathogenic agents that disrupt the integrity of cellular homeostasis [1-3]. The biological mechanisms underlying inflammatory processes, which comprise three distinct steps,

initiation, regulation, and resolution, are tightly regulated to maintain physiological and cellular homeostasis inside the organism [4, 5]. If the tissue is damaged due to a pathogenic infection, the cells of our body activate a signal pathway including cytokines and chemokines to cause an immune

<http://www.medsci.org>

RESEARCH ARTICLE

Anti-inflammatory activity of compounds from the rhizome of *Cnidium officinale*

Huynh Nguyen Khanh Tran¹ · Thao Quyen Cao¹ · Jeong Ah Kim² · Ui Joung Youn³ · Sanghee Kim³ · Mi Hee Woo¹ · Byung Sun Min¹Received: 19 April 2018 / Accepted: 20 June 2018 / Published online: 30 June 2018
© The Pharmaceutical Society of Korea 2018

Abstract Five new compounds, 9,3'-dimethoxyhierochin A (1), 6-oxo-*trans*-neocnidilide (2), (\pm)-(3*E*)-*trans*-6-hydroxy-7-methoxydihydrologistilide (3), (\pm)-cnidiumin (4), and 6-(1-oxopentyl)-salicylic acid methyl ester (5), together with twenty known compounds (6–25), were isolated from the rhizome of *Cnidium officinale*. The chemical structures of new compounds were established by NMR spectroscopic techniques, mass spectrometry, Mosher's method, and CD spectrum. Their anti-inflammatory activities were evaluated against lipopolysaccharide (LPS)-induced nitric oxide (NO) production in macrophage RAW 264.7 cells. Compounds 7, 13, and 14 showed inhibitory effects with IC₅₀ values of 5.1, 24.5, and 27.8 μ M, respectively. In addition, compounds 7, 13, and 14 reduced LPS-induced inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression and cyclooxygenase-2 (COX-2) protein in a concentration-dependent manner.

Keywords *Cnidium officinale* · Umbelliferae · Anti-inflammatory · NO inhibition

Introduction

Inflammation is a critical host immune response to infection or irritation, and contributes to the initiation and progress of many diseases, including multiple sclerosis, Parkinson's, and Alzheimer's disease (Mosmann 1983). Macrophages are a major cell type that participates in the inflammatory process by producing cytokines, chemokines, and various inflammatory mediators such as nitric oxide (NO), prostaglandin E₂ (PGE₂), interleukin (IL)-6, and tumor necrosis factor (TNF)- α (Heiss et al. 2001). NO is produced by inducible nitric oxide synthase (iNOS) in macrophages, hepatocytes, and renal cells, when stimulated, for example, with lipopolysaccharide (LPS), TNF- α , or IL-1 (Kundu and Surh 2008). The overproduction of NO by iNOS has been implicated in the pathology of some inflammatory disorders, including sepsis, inflammation-mediated tissue damage, and rheumatoid arthritis (Stuehr and Marletta 1985). Therefore, NO production should correlate with the inflammatory process, so that a change in NO levels (e.g., by inhibiting iNOS activity or iNOS protein induction) would represent a means of assessing the effects of compounds on the inflammatory process (Farrell et al. 1992). Cyclooxygenase (COX) is a rate-limiting enzyme that catalyzes the synthesis of prostanoids that mediate inflammation. Prostanoids include arachidonic acid metabolites such as prostaglandins, thromboxanes, and prostacyclins that cause vasodilation, edema, and pain associated with tissue injury. Two isoforms of COX are known, COX-1 and COX-2. Increased COX-2 gene

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s12272-018-1048-9>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

- ✉ Jeong Ah Kim
jkim6923@kmu.ac.kr
- ✉ Byung Sun Min
bsmin@cu.ac.kr

¹ College of Pharmacy, Drug Research and Development Center, Daegu Catholic University, Gyongsbuk 38430, Republic of Korea

² College of Pharmacy, Research Institute of Pharmaceutical Sciences, Kyungpook National University, Daegu 41566, Republic of Korea

³ Division of Life Sciences, Korea Polar Research Institute, Incheon 21990, Republic of Korea

Springer



Research Paper

Antarctic freshwater microalga, *Chloromonas reticulata*, suppresses inflammation and carcinogenesis

Sung-Suk Suh^{1†}, Ju-Mi Hong^{2†}, Eun Jae Kim², Seung Won Jung³, Hyunsik Chae², Jung Eun Kim^{2,4}, Ji Hee Kim^{2,5}, Il-Chan Kim^{2,5} and Sanghee Kim^{2,5}*

1. Department of Bioscience, Mokpo National University, Muan 58554, Republic of Korea
2. Division of Polar Life Sciences, Korea Polar Research Institute, Incheon, 21990, Republic of Korea
3. South Sea Environment Research Department, Korea Institute of Ocean Science and Technology, Geosje, 656-830, Republic of Korea
4. Department of Pharmacy, Graduate School, Sungkyunkwan University, Suwon 16419, Republic of Korea
5. Department of Polar Sciences, University of Science and Technology, Incheon 21990, Republic of Korea

*These authors contributed equally to this study

†Corresponding author: Email: sangheekim@kopri.re.kr, Tel: 82-32-760-5515 Fax: 82-32-760-5509

© Ivyspring International Publisher. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY-NC) license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>). See <http://ivyspring.com/terms> for full terms and conditions.

Received: 2018.10.23; Accepted: 2018.12.07; Published: 2019.01.01

Abstract

Inflammation triggered by the innate immune system is a strategy to protect organisms from the risk of environmental infection. However, it has recently become clear that inflammation can cause a variety of human diseases, including cancer. In this study, we investigated the effects of an ethanol extract of the Antarctic freshwater microalga, *Chloromonas reticulata* (ETCH), on inflammation and carcinogenesis in RAW 264.7 macrophages and HCT116 human colon cancer cells, respectively. ETCH exhibited significant anti-inflammatory activity through the dose-dependent modulation of major inflammatory markers such as COX-2, IL-6, iNOS, TNF- α , and NO production. For example, ETCH reduced LPS-induced upregulation of COX-2, IL-6, iNOS, and TNF- α mRNA levels, leading to a significant decrease in the levels of LPS-stimulated NO and IL-6 as well as TNF- α products. In contrast, ETCH exhibited dose-dependent cytotoxic activity against HCT116 cells, yielding a profound reduction in the proliferation of the cancer cells. Furthermore, ETCH induced G2 phase cell cycle arrest by transcriptionally regulating of genes involved in G2 / M transition including p21 (CDKN1A), cyclin B1 (CCNB1), and CDK1; CDKN1A mRNA levels were upregulated in response to ETCH, whereas CCNB1 and CDK1 were downregulated. This study reports for the first time anti-inflammatory and anti-cancer effects of, *C. reticulata* and provides new insights into the molecular mechanisms of the linkage between inflammation and cancer.

Key words: Inflammation cancer, *Chloromonas reticulata*, pro-inflammatory cytokines, HCT116

Introduction

Inflammation is the initial immune reaction that occurs when a foreign pathogenic agent disrupts cellular homeostasis and is an essential process for the survival of living organisms [1-3]. Chronic inflammation is likely to cause various diseases, including cancer. Therefore, if the inflammatory response is not controlled early, it may lead to the development of chronic infection, autoimmune diseases and metabolic disorders due to loss of function and homeostatic imbalance inside the living body [4-6]. Recent studies regarding increasing cancer

incidence in chronic inflammatory sites have shown that inflammation and cancer have a common signaling pathway through vicious cycle linkages [7-9]. Over the past decade it has become evident that the inflammatory response is responsible for tumor development, including initiation, malignant transformation, invasion and metastasis. For example, many studies show that an inflammatory microenvironment not only promotes cancer cell growth, but also can lead to DNA damage and genomic instability leading to increased mutation

<http://www.medsci.org>



Article

The Comprehensive Roles of ATRANORIN, A Secondary Metabolite from the Antarctic Lichen *Stereocaulon caespitosum*, in HCC Tumorigenesis

Young-Jun Jeon¹, Sanghee Kim^{2,3*}, Ji Hee Kim^{2,3}, Ui Joung Youn^{2,3} and Sung-Suk Suh^{4,*}

1. Comprehensive Cancer Center, The Ohio State University, Columbus, OH 43210, USA; jeon.81@osu.edu
 2. Division of Polar Life Sciences, Korea Polar Research Institute, Incheon 21990, Korea; sangheekim@kopri.re.kr (S.K.); jhlgae@kopri.re.kr (J.H.K.); uijoung@kopri.re.kr (U.J.Y.)
 3. Department of Polar Sciences, University of Science and Technology, Incheon 21990, Korea
 4. Department of Bioscience, Mokpo National University, Muan 58554, Korea
- * Correspondence: sunguksuh@mokpo.ac.kr; Tel.: +82-61-450-2346; Fax: +82-61-450-2349

Received: 16 March 2019; Accepted: 8 April 2019; Published: 10 April 2019



Abstract: Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most deadly genetic diseases, but surprisingly chemotherapeutic approaches against HCC are only limited to a few targets. In particular, considering the difficulty of a chemotherapeutic drug development in terms of cost and time enforces searching for surrogates to minimize effort and maximize efficiency in anti-cancer therapy. In spite of the report that approximately one thousand lichen-derived metabolites have been isolated, the knowledge about their functions and consequences in cancer development is relatively limited. Moreover, one of the major second metabolites from lichens, Atranorin has never been studied in HCC. Regarding this, we comprehensively analyze the effect of Atranorin by employing representative HCC cell lines and experimental approaches. Cell proliferation and cell cycle analysis using the compound consistently show the inhibitory effects of Atranorin. Moreover, cell death determination using Annexin-V and (Propidium Iodide) PI staining suggests that it induces cell death through necrosis. Lastly, the metastatic potential of HCC cell lines is significantly inhibited by the drug. Taken these together, we claim a novel functional finding that Atranorin comprehensively suppresses HCC tumorigenesis and metastatic potential, which could provide an important basis for anti-cancer therapeutics.

Keywords: hepatocellular carcinoma (HCC), lichen; atranorin; cell cycle; cell death

1. Introduction

In spite of explosively advancing technology regarding medical genetics, anti-cancer therapeutics remain challenging because of the complexity of tumorigenesis and cancer metastasis. In particular, hepatocellular carcinoma (HCC) is hepatic primary cancer and the sixth-ranked cause of cancer-related deaths worldwide. HCC is often caused by genetic mutations induced by chronic hepatic inflammation, viral infection and other environmental factors, and is often incurable when diagnosed at the late stage [1-3]. Regardless of a tremendous effort to cure this cancer, an EGFR inhibitor, sorafenib, has been only applied to patients whose effect is also limited in patients with a specific genetic background such as mutations in receptor tyrosine kinases in chemotherapy [4]. Therefore, other chemotherapeutic agents should be investigated and characterized.

To fully develop a chemotherapeutic drug for cancer to be marketed from in vitro bench work requires at least half a million US dollars, whose cost can reach around 3 billion US dollars in other reports [5-7]. Moreover, 10 representative chemotherapeutic drugs against cancers required around 10 years [5]. These are generally considered huge hindrances in anti-cancer therapies and



Investigation of chemical compounds from *Chlamydomonas* sp. KSF108 (Chlamydomonadaceae)

Huynh Nguyen Khanh Tran^a, Jeong Ah Kim^b, Ui Joung Youn^c, Sanghee Kim^c, Mi Hee Woo^b, Byung Sun Min^{b,*}

^aCollege of Pharmacy, Drug Research and Development Center, Daegu Catholic University, Gyeongsuk 38430, Republic of Korea
^bCollege of Pharmacy, Research Institute of Pharmaceutical Sciences, Kyungpook National University, Daegu 41566, Republic of Korea
^cDivision of Life Sciences, Korea Polar Research Institute, Incheon 21990, Republic of Korea



ARTICLE INFO

Keywords:
 Chlamydomonadaceae
 Chlamydomonas
 Norisoprenoid
 Chemotaxonomy

ABSTRACT

Nine compounds (1–9) including one norisoprenoid (1), one polyol-glycoside (2), three sterols (3–5), three phenols (6, 8, and 9), and one fatty acid (7) were isolated from *Chlamydomonas* sp. KSF108. Their chemical structures were established using NMR spectroscopic techniques and compared with published data. None of the compounds have been previously reported from the genus *Chlamydomonas* and they may therefore serve as chemotaxonomic markers for *Chlamydomonas* sp. KSF108 within the genus.

1. Subject and source

Microalgae are a polyphyletic group of unicellular photosynthetic eukaryotes comprising at least 40,000–70,000 species from various phyla such as Cyanophyta (blue algae), Rhodophyta (red algae), Chlorophyta (green algae), Pyrrophyta, Cryptophyta, Haptophyta, Heterokontophyta, and Streptophyta (Gimpel et al., 2015; Suh et al., 2017).

Chlamydomonas is a genus containing many species of green algae in the globally-distributed family Chlamydomonadaceae. Previous chemical investigation of the algae revealed the presence of carotenoids, fatty acids, sterols, mycosporine-like amino acids, phycobilins, polyketides, pectins, halogenated compounds, and toxins (Borowitzka, 2013; Leu et al., 2014; Cardozo et al., 2007; Hallmann, 2007; Milledge, 2011; Pulz et al., 2004).

The Antarctic freshwater microalga *Chlamydomonas* sp. KSF108 was collected from freshwater near King Sejong Antarctic Station (62° 13' S, 58° 47' W) in 2014 and maintained in Bold's basal medium (BBM) with incubation at 2–3 °C under continuous lighting from light-emitting diodes at an intensity of 35 μmol photons m⁻² s⁻¹.

Botanical identification was performed by Professor Sanghee Kim and the voucher specimen, *Chlamydomonas* sp. KSF108 (KPRI-KSF108), was deposited at the herbarium of the Division of Polar Life Sciences, Korea Polar Research Institute, Korea.

2. Previous work

Chemical studies have revealed that algae contain a variety of constituents, including fatty acids, sterols, carotenoids, mycosporine-like amino acids, phycobilins, polyketides, pectins, halogenated compounds, and toxins (Borowitzka, 2013; Leu et al., 2014; Cardozo et al., 2007; Hallmann, 2007; Milledge, 2011; Pulz et al., 2004). However, investigation into the chemical composition of extracts from the genus *Chlamydomonas* has been limited. Hence, we carried out a chemical investigation of *Chlamydomonas* sp. KSF108 in the present study.

3. Present study

3.1. General experiment procedures

The 1D and 2D NMR spectra were obtained using Varian Unity Inova 400 MHz and a Bruker Ascend™ 500 MHz spectrometer with tetramethylsilane (TMS) as an internal standard and the chemical shifts were recorded in δ values (ppm). Mass spectrum was recorded using a JEOL JMS-AX 300L spectrometer. Genomic DNA extraction of microalga *Chlamydomonas* sp. KSF108 was performed using a DNeasy Plant Mini Kit. PCR amplification of nuclear SSU rDNA was carried out using ExTaq polymerase and specific primers G01 and G07. Sequencing was analyzed by Macrogen, Inc. using an ABI 3730xl DNA Sequencer and the sequence was aligned using the Genetic Data Environment (GDE 2.2) program (Smith et al., 1994). The optimal model was determined

* Corresponding author.
 E-mail address: bsmin@cu.ac.kr (B.S. Min).

<https://doi.org/10.1016/j.bse.2018.12.009>

Received 21 September 2018; Received in revised form 23 November 2018; Accepted 22 December 2018
 0305-1978/ © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Increased Productivity and Antifreeze Activity of Ice-binding Protein from *Flavobacterium frigoris* PS1 Produced using *Escherichia coli* as Bioreactor

E. J. Kim^{a,b}, J. E. Kim^{a,c}, J. S. Hwang^b, I.-C. Kim^a, S. G. Lee^{b,d}, S. Kim^a, J. H. Lee^{b,d}, and S.J. Han^{a,b,*}

^aDivision of Polar Life Sciences, Korea Polar Research Institute, KIOST, Incheon, 21990 South Korea

^bDepartment of Polar Sciences, University of Science and Technology, Incheon, 21990 South Korea

^cDepartment of Pharmacy, Graduate School, Sungkyunkwan University, Suwon, 16419 South Korea

^dUnit of Polar Genomics, Korea, Polar Research Institute, Incheon, 21990 South Korea

*e-mail: hansj@kopri.re.kr

Received November 12, 2018; revised March 3, 2019; accepted April 22, 2019

Abstract—Ice-binding proteins (IBPs) inhibit the growth and recrystallization of intracellular ice, enabling polar organisms to survive at subzero temperatures. IBPs are promising materials in biomedical applications such as cryopreservation and the hypothermic storage of cells, tissues, and organs. In this study, recombinant IBP from the antarctic bacterium *Flavobacterium frigoris* PS1 (FfIBP) was produced by *Escherichia coli* used as bioreactor, to examine the feasibility of scale-up. Oxygen transfer was the most important factor influencing cell growth and FfIBP production during pilot-scale fermentation. The final yield of recombinant FfIBP produced by *E. coli* harboring the pET28a-FfIBP vector system was 1.6 g/L, 3.8-fold higher than that from the previously published report using pCold I-FfIBP vector system, and its thermal hysteresis activity was 2.5 °C at 9.7 μM. This study demonstrates the successful pilot-scale production of FfIBP.

Keywords: Antarctica, ice-binding protein, *Flavobacterium frigoris*, pilot-scale fermentation, thermal hysteresis
 DOI: 10.1134/S0003683819050077

Although the Arctic and the Antarctic are the coldest, windiest, and driest regions on Earth, they are the habitats of a variety of microorganisms. Psychrophiles and psychrotrophs are cold-tolerant organisms that can grow at low temperatures. They produce active biochemical substances and increase the polyunsaturated fatty acid content to improve membrane fluidity at low temperatures [1]. The sea and freshwater organisms inhabiting the Antarctic and Arctic are consistently exposed to low temperatures (sea water; –1.9–2.0 °C, fresh water; 0–5 °C) [2]. Ice binding proteins (IBPs) have been found in various psychrophilic and psychrotrophic organisms living at subzero temperatures, such as bacteria [1, 2], fungi [3–5], diatoms [6], plants [7–9], insects [10, 11], and fish [12]. IBPs, also called antifreeze proteins (AFPs), play key roles in inhibiting ice crystal growth and its recrystallization by adsorbing on the ice surface [8, 13]. They prevent cell injury and death due to intracellular ice formation and frozen cell membranes. Many antifreeze materials exist besides IBPs, such as ethylene glycol [14], dimethyl sulfoxide (DMSO) [15], poly(vinyl alcohol) [16], metallohelices [17], and polysaccharides [18]. Ethylene glycol can be used to cryopreserve biological tissues and organs [14], and DMSO is used in biology to decrease ice formation. However, ethylene glycol is

toxic when decomposed in the body [19], and DMSO induces cell lysis and apoptosis by increasing intracellular calcium levels [20]; the others mentioned do not yet have practical uses. Unlike these chemicals, IBPs obtained from natural organisms have low or no toxicity, and have been applied in biomedical research and other applications, such as tissues and organ cryopreservation, food preservation, and skin protection [21]. However, extracting IBPs directly from organisms has quantitative limitations and is cost-inefficient. Industrial application will require the heterologous expression of IBPs using large-scale bioreactors.

Our research team has previously investigated the properties of several IBPs from antarctic and arctic organisms, including *Leucosporidium* IBP (LeIBP), recently reclassified genus as *Glaciozyma* sp. AY30, FfIBP, and Type-III AFP [5, 22–25]. FfIBP was isolated from the bacterium *Flavobacterium frigoris* PS1, which inhabits antarctic marine ice. It has a higher thermal hysteresis (TH) activity than LeIBP, and has been produced in *Escherichia coli* using a cold shock induction system with the pCold I vector. Production of FfIBP using the pCold I vector system was advantageous in terms of protein stability, but it had the disadvantage of a long incubation time (over 50 h to reach a cell concentration of 6.3 g/L and protein production

배지 성분의 통계적 최적화를 이용한 북극 미세조류 *Chlamydomonas* sp. KNM0029C의 지질 생산 증대

김은재^{1,2}, 정용식^{1,3}, 김상희¹, 최한구¹, 한세종^{1,2*}

Enhancing Lipid Production in the Arctic Microalga *Chlamydomonas* sp. KNM0029C by Using Statistical Optimization of Medium Components

Eun Jae Kim^{1,2}, Woong Sic Jung^{1,3}, Sanghee Kim¹, Han-Gu Choi^{1*}, and Se Jong Han^{1,2*}

Received: 10 July 2019 / Revised: 30 July 2019 / Accepted: 30 July 2019
© 2019 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: A sequential statistical optimization was applied to the components of Tris-acetate-phosphate (TAP) medium, to enhance the cell density and lipid production of Arctic microalga *Chlamydomonas* sp. KNM0029C. The evaluation was performed through an elimination process and Plackett-Burman design to select for significant factors, contributing toward cell growth. NH₄Cl, MgSO₄·7H₂O, potassium phosphate, and trace elements were established as the effective components and used as variable factors in Box-Behnken design test, - a response surface methodology (RSM). The final optimized concentrations were 0.54, 0.16, 0.04, and 0.08 g/L of NH₄Cl, MgSO₄·7H₂O, potassium phosphate, and trace elements, respectively. Overall, 9.9% enhanced lipid production was achieved by using optimized TAP medium at 4°C. The

results of the present study could potentially contribute toward large-scale lipid production at low temperatures.

Keywords: arctic microalgae, *Chlamydomonas* sp. KNM0029C, lipid, response surface methodology, statistical optimization, tris-acetate-phosphate

1. INTRODUCTION

Bacteria, yeast, algae, and fungi, that inhabit cold environments, have developed various adaptations to compensate for the adverse effects of low temperatures [1]. Cold-adapted microorganisms are the source of valuable products, including cold-active enzymes, and antifreeze proteins [2,3]. Recently, the microalga *Chlamydomonas* sp. KNM0029C - a species, capable of oil production, was isolated from the Arctic sea [4]. The organism which displays high total fatty acid content, exhibits promising potential as a potent biodiesel producer at low temperatures. The major benefit of *Chlamydomonas* sp. KNM0029C is its ability to grow under cold climate conditions, most prominently during the winter season. Our study focuses on investigating the effective medium composition for optimal Arctic microalga growth, and establishing the efficient lipid production conditions for this microorganism. The classical medium optimization method of changing one independent variable, while keeping

¹한국해양과학기술원 분설 극지연구소 극지생물과학연구부
Division of Polar Life Sciences, Korea Polar Research Institute,
Incheon 21990, Korea
HGC: Tel: +82-32-760-5511, Fax: +82-32-760-5509,
e-mail: hchoi82@kopri.re.kr

²과학기술원대학원대학교 극지과학기술부
Department of Polar Sciences, University of Science and Technology,
Incheon 21990, Korea
SJH: Tel: +82-32-760-5521, Fax: +82-32-760-5509,
e-mail: hansj@kopri.re.kr

³지디이 연구소
Department of Research and Development, GDE, Siheung, Gyeonggi
14985, Korea

Manuscript Details

Manuscript number	ALGAL_2019_635
Title	Heterologous gene expression using the cold-inducible CnAFP promoter in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
Article type	Full Length Article

Abstract

To increase the availability of microalgae as producers of valuable compounds, it is necessary to develop novel systems for gene expression regulation. Among the diverse expression systems available in microalgae, none are designed to induce expression by low temperature. In this study, we explored a cold-inducible system using the antifreeze protein (AFP) promoter from a polar diatom, *Chaetoceros neogracile*. A vector containing the CnAFP promoter (pCnAFP) was generated to regulate nuclear gene expression, and reporter genes (Gaussia luciferase (GLuc) and mVenus fluorescent protein (mVenus)) were successfully expressed in the model microalga, *Chlamydomonas reinhardtii*. At low temperatures, the expression of these genes under the control of pCnAFP was higher than that under the control of AR1, a promoter that is widely used for gene expression in *C. reinhardtii*. Promoter truncation assays showed that cold-inducibility was still present even when pCnAFP was shortened to 600 bp, indicating the presence of a low-temperature response element between -600 and -477 bp. Our results show the feasibility of microalgal expression systems with cold-inducible promoters and the possibility to find novel low-temperature response factors in microalgae. Through further improvement, this cold-inducible expression system could be used to develop an expression tool that can be regulated more robustly than the currently available expression systems.

Keywords	Cold-inducible promoter, Antifreeze protein, Heterologous gene expression, <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> , Gaussia luciferase, Fluorescent protein
Taxonomy	Molecular Biology, Environmental Biotechnology, Engineering, Biotechnology
Manuscript category	Algal Biotechnology
Corresponding Author	EonSeon Jin
Order of Authors	Minjae Kim, Jongrae Kim, Sanghee Kim, EonSeon Jin
Suggested reviewers	Xianming Shi, Wolfram Weckwerth, Zhi-Fu Guo, Jon Pittman

Submission Files Included in this PDF

File Name [File Type]	
Cover letter.docx [Cover Letter]	
Highlights.docx [Highlights]	
Manuscript.docx [Manuscript File]	
Table.docx [Table]	
Conflicts of Interest.docx [Conflict of Interest]	
Supplementary data.docx [Supporting File]	

Submission Files Not Included in this PDF

File Name [File Type]	
Figures.zip [Figure]	

To view all the submission files, including those not included in the PDF, click on the manuscript title on your EVISE Homepage, then click 'Download zip file'.

Manuscript Details

Manuscript number BSE_2019_343
Title Glycerols and fatty acids isolated from *Micractinium* sp. KSF0031
Article type Full Length Article

Abstract

From the collected extract from King Sejong Antarctic Station, strain *Micractinium* sp. KSF0031, led to the isolation of one new monoacyldigalactosyl glycerol (1) and seven known compounds (2–8). Their chemical structures were established using extensive spectroscopic techniques, including 1D-, 2D-NMR, and MS, and compared with the published data. To the best of our knowledge, this is the first report to investigate the secondary metabolites from genus *Micractinium*. The monoacyldigalactosyl glycerol in *Micractinium* could serve as its chemotaxonomic markers.

Keywords Chlorellaceae; *Micractinium* sp. KSF0031; glycerol
Manuscript category Systematics
Manuscript region of origin Asia Pacific
Corresponding Author Byungsun Min
Corresponding Author's Institution bsmin@cu.ac.kr
Order of Authors Khanh Tran Huynh Nguyen, Ui Joung Youn, Jeong Ah Kim, Hyunsik Chae, Sanghee Kim, Byungsun Min
Suggested reviewers Heejung Yang, Bang Yeon Hwang, Do Thi Ha

Submission Files Included in this PDF

File Name [File Type]

Cover Letter.doc [Cover Letter]

Highlights.doc [Highlights]

graphic abstract.doc [Graphical Abstract]

Title page.doc [Title Page (with Author Details)]

KSF0031-BSE.doc [Manuscript File]

KSF0031-Supplementary.doc [Data in Brief]

To view all the submission files, including those not included in the PDF, click on the manuscript title on your EVISE Homepage, then click 'Download zip file'.



- **Manuscript Draft**
- **Manuscript Number:** 190099
- **Title:** Immunosuppressive activity of chemical constituents from strain *Chlamydomonas* sp. KSF108 (Chlamydomonadaceae)
- **Article Type:** Regular Article
- **Keywords:** Chlamydomonadaceae, *Chlamydomonas* sp. KSF108, Immunosuppressive, Anti-inflammatory, Cytotoxic activity, Anti-oxidant activity



‘극지생물 유전자원 활용 기술개발사업’ 경제성 분석

2019. 4.

(주)날리지웍스

5. 소결


- 본 사업은 극지 광합성조류의 자원화 및 유용소재를 개발하고, 유전정보의 자원화, 고효능 산업화 소재 발굴, 다양성 확보 및 오픈DB구축의 3개 세부항목이 제시되었음
- 극지광합성조류의 신규 균주 발굴, 생체, 생리, 유전정보 확보 (논문 및 균주 특허 확보)
- 난배양성 극지생물의 대량생산용 저온광배양 장치 등 배양기술 개발 (특허 확보)
- 산업화 소재 발굴로 식품의약품안전처 허가를 받기 위한 연구 및 소재 기술이전 성과 1건 이상
- 본 장에서는 사업 추진을 통해 발생할 수 있는 편익을 산출하고 이를 기반으로 해당 사업의 경제적 타당성을 살펴보았음
- 본 사업의 최종 산출물로 인해 창출되는 신규 부가가치는 미래 관련 시장(항산화 식품, UV차단 화장품)의 규모를 기반으로 추정하였으며, 추정된 편익의 증감을 통한 민감도 분석을 수행함
- 추정된 편익과 계획시의 비용을 기반으로 경제성 분석을 수행한 결과는 아래 표와 같음

<표 43> 경제성 분석 결과 요약


구분	분석 결과
NPV	11,400백만원 ~ 20,373백만원
B/C	2.74 ~ 4.11
IRR	9.31% ~ 13.37%

- 분석 과정에서의 불확실성을 고려한 민감도 분석 결과, 본 사업은 경제적 타당성을 확보하였음
- 본 사업은 연구계획서상 일부 상업화(기술개발을 통한 특허성격)를 목적으로 하고 있으며, 유전정보 및 균주 확보 등의 기초 및 응용 연구개발의 성격도 띠고 있음

<별첨> 극지미세조류 유래 세포보호물질의 화장품 원료물질 승인

Personal Care  Products Council

On-Line INFOBASE >> Ingredient Database

close window 

Glyceryl Eicosapentaenoate

- INCI Name: Glyceryl Eicosapentaenoate
- INCI Monograph ID: 34123
- Definition: Monograph development in progress.
- Trade Name(s): [Click here to view full list of Trade Names](#)
- International Buyers' Guide

Trade Name:
KOPRI-KIOM Eico glycerol

Assigned INCI Name:
Glyceryl Eicosapentaenoate

<별첨> 극지미세조류 유래 세포보호물질의 임상효력검증

1. 연구개요	
CRIS 등록번호	KCT0004021
연구고유번호	제1-220777-A-N-02호-DICN19106
요약제목	화장품 2종(시얼군/대조군)의 피부주름의 감소효과 확인을 위한 평가시험
연구제목	화장품 2종(시얼군/대조군)에 대한 피부주름 개선효과 평가시험
연구약어명	
식약처규제연구	아니오(No)
IND/IDE Protocol여부	아니오(No)
타등록시스템 등록여부	아니오(No)
타등록시스템/등록번호	
임상연구 요양급여 적용 신청 여부	해당연구 아님(Not applicable)
2. 임상연구윤리심의	
승인상태	제출 후 승인(Submitted approval)
승인번호	제1-220777-A-N-02호-DICN19106
승인일	2019-05-17
위원회명	주식회사 더마프론 기관생명윤리위원회
위원회주소	서울특별시 서초구 방배동 방배중앙로 30
위원회 전화번호	02-597-5434
자료모니터링위원회	아니오(No)

○ 임상효력검증

- 승인번호 IRB :제1-220777-A-N-02호-DICN19106, CRIS : KCT0004021

[주] 더마프론 인체적용시험보고서:Eico glycerol(EG)에 대한 피부주름 개선효과 평가시험]

뒷 면

(국내 과제용)

주 의

1. 이 보고서는 극지연구소에서 수행한 기본연구사업의 연구결과보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 극지연구소에서 수행한 기본연구사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.