

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2018-0040471 (43) 공개일자 2018년04월20일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 1/12 (2006.01) C12P 7/64 (2006.01) C12R 1/89 (2006.01)		(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(52) CPC특허분류 C12N 1/12 (2013.01) C12P 7/64 (2013.01)		(72) 발명자 심상준 서울특별시 강남구 선릉로 221, 301동 803호 (도곡동, 도곡렉슬아파트)
(21) 출원번호	10-2016-0174591	곽호석 서울특별시 중랑구 겸재로29길 27, 102동 1004호 (면목동, 아남리치카운티아파트)
(22) 출원일자	2016년12월20일	김영환 서울특별시 성북구 안암로 145, 창의관 615호 (안암동5가, 고려대학교안암캠퍼스)
심사청구일자	2016년12월20일	(74) 대리인 이처영, 장제환
(30) 우선권주장	1020160132021 2016년10월12일 대한민국(KR)	

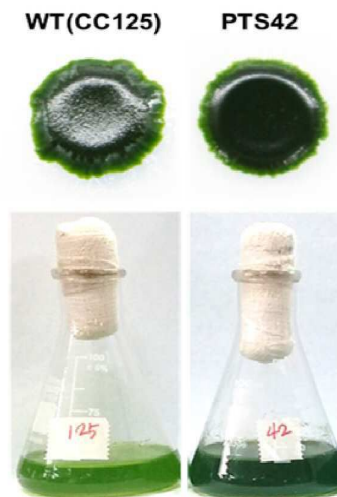
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **주광성 및 광합성 효율이 향상된 미세조류**

(57) 요약

본 발명은 주광성 및 광합성 효율이 향상된 미세조류에 관한 것으로, 보다 상세하게는 클라미도모나스 레인하디티 (*Chlamydomonas reinhardtii*)의 돌연변이 PTS42 (KCTC18499P) 미세조류 및 이의 용도에 관한 것이다. 본 발명에 따른 주광성이 뛰어나 광민감성 및 광합성 효율이 향상된 미세조류 PTS42는 야생형 균주보다 이산화탄소 전환 바이오매스화가 우수하고, 최대 광합성 속도 및 지질 축적능 또한 높아 이산화탄소 저장 효과뿐 아니라 바이오연료 생산 공정을 구축하기 위한 광합성 균주로 유용하다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12R 1/89 (2013.01)

Y02E 50/10 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014M1A8A1049278

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 (재)한국이산화탄소포집및처리연구개발센터

연구사업명 거대과학연구개발사업(Korea CCS 2020사업)

연구과제명 생물학적 이산화탄소 고속전환 유기 자원화 기술

기 여 율 1/3

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2016.06.01 ~ 2017.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20152010201900

부처명 산업통산자원부

연구관리전문기관 한국에너지기술평가원

연구사업명 에너지기술개발사업

연구과제명 미세조류를 이용한 이산화탄소의 고부가가치 상품 전환

기 여 율 1/3

주관기관 한국지역난방공사

연구기간 2016.06.01 ~ 2017.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016R1A2A1A05005465

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원사업

연구과제명 생물공정의 실시간 모니터링을 위한 나노플라즈몬 검지 플랫폼의 기술 개발

기 여 율 1/3

주관기관 고려대학교

연구기간 2016.06.01 ~ 2017.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

주광성 및 광합성 효율이 향상된 클라미도모나스 레인하디티 (*Chlamydomonas reinhardtii*)의 돌연변이 PTS42 (KCTC18499P) 미세조류.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 미세조류는 지질 생산성이 증가된 것을 특징으로 하는 미세조류.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 미세조류는 바이오매스 생산성이 증가된 것을 특징으로 하는 미세조류.

청구항 4

제1항의 미세조류를 배양하여 지질을 생성하는 단계를 포함하는 지질의 제조방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 배양은 300 내지 750 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 광량에서 수행하는 것을 특징으로 하는 지질의 제조방법.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 배양은 5% CO₂ 및 23℃의 조건에서 수행하는 것을 특징으로 하는 지질의 제조방법.

청구항 7

제1항의 미세조류를 배양하여 바이오매스를 생성하는 단계를 포함하는 바이오매스의 생산방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 배양은 300 내지 750 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 광량에서 수행하는 것을 특징으로 하는 바이오매스의 생산방법.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 배양은 5% CO₂ 및 23℃의 조건에서 수행하는 것을 특징으로 하는 바이오매스의 생산방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 주광성 및 광합성 효율이 향상된 미세조류에 관한 것으로, 보다 상세하게는 클라미도모나스 레인하디티 (*Chlamydomonas reinhardtii*)의 돌연변이 PTS42 (KCTC18499P) 미세조류 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 화석 연료의 사용과 대기 중 이산화탄소의 증가로 인해 다양한 환경문제가 대두됨에 따라 대체 에너지원 개발이 요구되고 있다. 태양 에너지는 지속적이고 무한한 에너지원으로 1시간 동안 지구에 공급되는 에너지는 전 세계의 연간 소비되는 에너지를 충당할 수 있는 양이기 때문에 태양에너지를 사용가능한 연료로 전환하는 것은 현재 에너지 고갈 문제를 해결할 수 있는 궁극적인 해결책을 제공할 수 있다.
- [0004] 조류는 광합성을 통해 태양으로부터 공급되는 120 TW의 절반 이상을 바이오매스, 지질 등의 유용 에너지원으로 전환 가능한 생물체로 새로운 에너지 자원으로 각광 받고 있다. 그러나 광합성 생물 중 자체가 가지고 있는 낮은 광합성 효율은 무한한 태양 에너지를 전환하는데 한계를 지닌다. 이론적인 최대 광합성 효율은 지속적 광 조건에서 8~10% 이지만, 현실적으로는 유동적인 빛의 세기 및 강한 빛에 의한 광합성 저해 작용으로 인하여 이를 달성하기 어렵다. 이로 인하여 미세조류 대량 배양에서 반응기 표면에 존재하는 세포는 강한 빛에 의해 광산화적인 피해를 입고, 반응기 안쪽의 존재하는 세포는 전달되는 광 에너지가 낮아 광합성 저해를 받게 되어 최대 95%의 광 에너지 전환 효율을 떨어뜨린다. 따라서 광 에너지를 흡수하고 사용하는 것에 대한 균형 조절이 광합성 생물을 활용한 공정의 생산성을 향상시키는데 필수적이다.
- [0005] 조류의 광합성 효율을 높이는 방법 중 하나로 클로로필 안테나의 크기를 줄이는 방법이 사용되는데 광합성 기작은 가장 복잡한 생화학 작용 중 하나로써 100개 이상의 유전자가 관여하여 조절하고, 전자 전달계, 이산화탄소 고정 및 광합성 색소를 합성하기 위해서는 수많은 단백질과 조효소가 필요하다. 따라서 클로로필 b 합성을 저해하여 안테나 크기를 줄이는 방법을 통한 광합성 효율 증가 방법은 궁극적인 해결책으로는 충분하지 않아 좀 더 효율적인 선별 방법이 요구된다.
- [0006] 조류는 진화적으로 빛 자극에 대하여 방향성을 감지하고, 동시에 원하는 위치로 이동할 수 있는 주광성을 가진다. 주광성이 없는 경우, 다양한 빛 자극에 대하여 광손상 (Photodamage) 혹은 광합성 저해 현상이 발생할 수 있다. 따라서 조류의 주광성 조절능은 최적의 광합성을 위한 중요한 요인 중 하나로 볼 수 있다.
- [0007] 이에, 본 발명자들은 기존 야생형 균주보다 빠른 세포 성장성 및 우수한 지질 생산성을 가지는 균주를 선별하고 자 예의 노력한 결과, 미세조류의 주광성을 활용하여 세포 단위로 빛에 대한 주광성이 우수한 균주를 선별하면 쉽고 효율적으로 광합성 효율 및 성장성이 향상된 균주를 확보할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명의 목적은 주광성 및 광합성 효율이 향상된 클라미도모나스 레인하디티 (*Chlamydomonas reinhardtii*)의 돌연변이 PTS42 (KCTC18499P) 미세조류 및 이를 이용한 지질 또는 바이오매스의 생산방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0011] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 주광성 및 광합성 효율이 향상된 클라미도모나스 레인하디티 (*Chlamydomonas reinhardtii*)의 돌연변이 PTS42 (KCTC18499P) 미세조류를 제공한다.
- [0012] 본 발명은 또한, 상기 미세조류를 배양하여 지질을 생성하는 단계를 포함하는 지질의 제조방법을 제공한다.
- [0013] 본 발명은 또한, 상기 미세조류를 배양하여 바이오매스를 생성하는 단계를 포함하는 바이오매스의 생산방법을

제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명에 따른 주광성이 뛰어나 광민감성 및 광합성 효율이 향상된 미세조류 PTS42는 야생형 균주보다 이산화탄소 전환 바이오매스화가 우수하고, 최대 광합성 속도 및 지질 축적능 또한 높아 이산화탄소 저감 효과뿐만 아니라 바이오연료 생산 공정을 구축하기 위한 광합성 균주로 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 야생형 클라미도모나스 레도 1은 야생형 클라미도모나스 레인하디티 균주 CC125와 주광성 및 광합성 효율이 향상된 돌연변이 PTS42 균주의 고체 배지 내 이미지와 플라스크 배양 이미지이다.

도 2는 야생형 균주와 돌연변이 PTS42 균주의 광학현미경 이미지이다.

도 3은 야생형 균주와 돌연변이 PTS42 균주 단세포의 평균 지름 크기를 나타낸 그래프이다.

도 4는 야생형 균주와 돌연변이 PTS42 균주 단세포의 평균 세포 부피를 나타낸 그래프이다.

도 5는 야생형 균주와 돌연변이 PTS42 균주의 빛 자극에 대해 반응하는 분당 세포 수를 나타낸 히스토그램이다.

도 6은 야생형 균주와 돌연변이 PTS42 균주의 주광성에 따라 일정한 거리를 이동하는데 걸리는 평균 시간의 역수를 나타낸 그래프이다.

도 7은 야생형 균주와 돌연변이 PTS42 균주의 주광성에 따른 평균 도달하는 세포 수 히스토그램의 왜곡도(skewness)를 나타낸 그래프이다.

도 8은 야생형 균주와 돌연변이 PTS42 균주의 광합성 효율을 보여주는 지표 중 하나인 광계II의 효율을 나타낸 그래프이다.

도 9는 야생형 균주와 돌연변이 PTS42 균주의 강한 빛 조건과 약한 빛 조건에서의 플라스크 배양 이미지이다.

도 10은 야생형 균주와 돌연변이 PTS42 균주의 광합성 효율을 보여주는 지표 중 하나인 최대 산소발생 속도를 나타낸 그래프이다.

도 11은 야생형 균주와 돌연변이 PTS42 균주의 광합성 효율을 보여주는 지표 중 하나인 순양자수율(apparent quantum yield)을 나타낸 그래프이다.

도 12는 야생형 균주와 돌연변이 PTS42 균주의 광합성 효율을 보여주는 지표 중 하나인 NPQ (Non-photochemical quenching, 형광소멸)을 나타낸 그래프이다.

도 13은 야생형 균주와 돌연변이 PTS42 균주의 5 L 규모 광생물반응기 내에서 배양한 이미지이다.

도 14는 야생형 균주와 돌연변이 PTS42 균주의 5 L 규모 광생물반응기 내 세포의 광학현미경 이미지와 회수된 바이오매스 생산량을 나타낸 이미지이다.

도 15는 야생형 균주와 돌연변이 PTS42 균주의 5 L 규모 광생물반응기 내 세포 성장 그래프를 나타낸 그래프이다.

도 16은 5 L 규모 광생물반응기에서 돌연변이 PTS42 균주의 빛의 세기에 따른 세포 성장성을 나타낸 그래프이다.

도 17은 야생형 균주와 돌연변이 PTS42 균주의 지질 생산성을 나타낸 그래프이다.

도 18은 야생형 균주와 돌연변이 PTS42 균주의 삽입 하이그로마이신 내성 유전자에 대한 서던 블롯 결과이다.

도 19는 PTS42 균주의 genomic DNA에서 하이그로마이신 내성 유전자가 삽입된 위치를 PCR로 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술

분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

- [0020] 본 발명에서는 광합성 효율 및 성장성이 향상된 미세조류를 선별하여 빠른 세포 성장성과 더불어 지질 생산성도 우수한 미세조류를 제공함으로써 이산화탄소의 생물학적 자원화 공정의 경제성을 확보하고 상용화를 위한 발판을 마련하기 위해, 미세조류의 주광성을 이용하여 세포 단위로 빛에 대한 주광성이 우수한 균주를 확보하였다. 이렇게 확보된 균주는 기존의 균주에 비해 주광성이 약 1.8배, 최대 광합성 속도의 경우에는 낮은 광량에서는 41%, 높은 광량에서는 57%가 향상되었으며, 지질 축적능 또한 약 4배 정도 높게 나타났다.
- [0021] 본 발명자들은 상기 돌연변이 신균주를 클라미도모나스 레인하디티 PTS42라 명명하였으며, 2016년 9월 6일자로 한국생명공학연구원 생물자원센터 (KCTC)에 기탁하여 수탁번호 KCTC18499P를 부여받았다.
- [0022] 따라서, 본 발명은 일관점에서 주광성 및 광합성 효율이 향상된 클라미도모나스 레인하디티 (*Chlamydomonas reinhardtii*)의 돌연변이 PTS42 (KCTC18499P) 미세조류에 관한 것이다.
- [0023] 본 발명의 용어 "미세조류(microalgae)"는 광합성 색소를 가지고 광합성을 하는 단세포 생물들에 대한 통칭으로, 태양광 등 빛을 에너지원으로 이산화탄소를 고정화시키고 광합성을 하여 성장하는 마이크로 단위의 크기를 갖는 수중 생물을 말한다. 본 실시예에 따른 미세조류는 녹조류, 규조류, 홍조류, 편모류, 담록조류, 갈색 편모조류, 황녹색조류, 와편모류, 또는 남조류 등을 포함할 수 있다.
- [0024] 본 발명에 있어서, 상기 미세조류는 지질 생산성이 증가된 것을 특징으로 할 수 있으며, 또한 상기 미세조류는 바이오매스 생산성이 증가된 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0025] 본 발명은 다른 관점에서, 클라미도모나스 레인하디티 (*Chlamydomonas reinhardtii*)의 돌연변이 PTS42 (KCTC18499P) 미세조류를 배양하여 지질을 생성하는 단계를 포함하는 지질의 제조방법에 관한 것이다.
- [0026] 본 발명은 또 다른 관점에서, 클라미도모나스 레인하디티 (*Chlamydomonas reinhardtii*)의 돌연변이 PTS42 (KCTC18499P) 미세조류를 배양하여 바이오매스를 생성하는 단계를 포함하는 바이오매스의 생산방법에 관한 것이다.
- [0027] 본 발명에 있어서, 상기 배양은 300 내지 750 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 광량에서 수행하는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 상기 배양은 5% CO₂ 및 23℃의 조건에서 수행하는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0028] 본 발명에서 용어 "지질"이란 미세조류를 구성하는 물질 중 물에는 녹지 않고 유기용매에 잘 녹는 것으로서 그 성분이나 화학구조에 따라 단순지질과 복합지질로 나눌 수 있으며 또한 중성지방, 글리세롤 인지질, 글리세롤 당지질, 카로티노이드 및 스테로이드 등이 있다. 특히 미세조류의 지질은 중성지방을 많이 포함하고 있고 석유계 기름과 유사한 분자구조를 가지고 있으며 함유량은 콩의 10배, 땅콩의 7~8배에 달한다.
- [0029] 본 발명의 용어 "바이오매스(biomass)"란, 광합성에 의하여 생성되는 다양한 조류(藻類) 및 식물 자원, 즉 나무, 풀, 농작물의 가지, 잎, 뿌리, 열매 등을 의미한다.
- [0030] 본 발명에 있어서, 상기 바이오매스는 고농도의 염을 포함하는 배지에서 배양되어 세포내 지질함량이 증가된 클로렐라 소로키니아나 HS 균주, 상기 균주를 포함하는 배양물, 배양분획물 등으로 해석될 수 있고, 상기 바이오매스는 바이오디젤의 제조원료로서 사용될 수 있다.
- [0032] [실시예]
- [0033] 이하 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 이에 의해 본 발명의 기술적 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [0035] 실시예 1: 돌연변이 미세조류 균주 제작 및 선별 방법
- [0036] 클라미도모나스 레인하디티 (*Chlamydomonas reinhardtii*) CC125의 야생형 균주는 미국 클라미도모나스 자원 센

터 (Chlamydomonas Resource Center)에서 분양 받았다. 야생형 균주에 삽입돌연변이 유발법 (insertional mutation)을 통해 무작위 돌연변이를 제작하였다. 하이그로마이신 (Hygromycin) 항생제에 대한 내성 서열이 포함된 1,700 kb의 유전자를 전기천공법 (electroporation)을 통해 야생형 균주 세포 안에 무작위로 삽입하였다. 배양된 세포를 $15\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 농도의 하이그로마이신이 포함된 TAP 고체 배지 (표 1)에 도말하여 돌연변이 미세조류 균주를 확보하였다.

표 1

TAP-C 배지 구성성분

TAP-C Medium	
성분	함량 (in 1L water)
TAP salts (in 1L water)	25 ml
NH ₄ Cl 15.0 g	
MgSO ₄ 7H ₂ O 4.0 g	
CaCl ₂ 2H ₂ O 2.0 g	0.375 ml
Phosphate solution (in 100 ml water)	
K ₂ HPO ₄ 28.8 g	
KH ₂ PO ₄ 14.4 g	1.0 ml
Hutner' s trace elements	
EDTA disodium salt 50 g (250 ml water)	
ZnSO ₄ 7H ₂ O 22 g (100 ml water)	
H ₃ BO ₃ 11.4 g (200 ml water)	
MnCl ₂ 4H ₂ O 5.06 g (50 ml water))	
CoCl ₂ 6H ₂ O 1.61 g (50 ml water)	
CuSO ₄ 5H ₂ O 1.57 g (50 ml water)	
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ 4H ₂ O 1.10 g (50 ml water)	2.42 g
FeSO ₄ 7H ₂ O 4.99 g (50 ml water)	
Tris base	1.0 ml
HCl	

제작된 10,000여종의 돌연변이 균주는 대수증식기에 접어들었을 때, 멸균한 용기에 옮겨 혼합한 뒤, 주광성 기반 선별용 마이크로 장치에 넣어 빛 자극을 통해 빛에 대한 반응성이 우수한 균주만 선별 및 분리하였다 (국내 공개특허 공보 10-2014-0094143호). 이후 선별된 돌연변이 균주들의 성장성을 비교 분석하여 가장 성장성이 우수한 균주를 최종적으로 선별하였다.

그 결과, PTS42 (KCTC18499P)의 돌연변이 미세조류 균주를 선별하였다 (도 1).

실시예 2: 세포 크기 분석

야생형 균주 CC125와 돌연변이 PTS42 균주의 광학 현미경 이미지로 세포의 크기를 비교하였다.

그 결과, 도 2와 같이 돌연변이 균주의 세포 크기가 작은 특징을 알 수 있다.

이를 이미지 분석 프로그램 Image J를 활용하여 분석한 결과, 지름은 약 40-45%, 부피는 약 50-55%정도 크기가 감소한 것을 알 수 있었다 (도 3 및 도 4).

실시예 3: 주광성 분석

야생형 균주와 돌연변이 PTS42 균주의 빛 자극에 대한 주광성을 세포 단위로 분석하기 위해 국내 공개특허 공보 10-2014-0094143호에서 개발된 미세유체 장치를 활용하여 측정하였다.

$70\ \mu\text{mol photons m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ 의 세기로 빛 자극에 대하여 30분간 일정거리 (3 cm)를 이동하는 분당 세포수를 측정하는 결과, PTS42 균주의 경우, 빛 조사 이후 3-5분 내에 대부분의 세포가 도달하는 것을 알 수 있다 (도 5). 이는

야생형 균주보다 평균적으로 빛에 대한 반응성이 빠름을 보여주는 것이다.

- [0049] 이러한 결과를 통계적으로 분석하여 평균적으로 빛에 의해 일정거리 (3 cm)를 도달하는 데 걸리는 시간의 역수를 나타내었다. 즉, 그래프가 높을수록 빛에 반응하여 이동하는 속도가 평균적으로 빠른 것을 보여준다.
- [0050] 그 결과, 도 6에 나타난 것과 같이 PTS42가 야생형 균주보다 빛에 반응하여 이동하는 속도가 약 1.89배 향상된 것을 알 수 있었다.
- [0051] 그 다음, 분 (min)당 일정거리 도달 세포 수에 대한 히스토그램의 통계적 왜곡도 (skewness)를 나타냈다. 이러한 왜곡도 값이 클수록 빛에 대한 반응성과 속도가 높음을 보여준다.
- [0052] 그 결과, PTS42 균주의 경우 야생형 균주에 비하여 빛에 대한 광민감성 및 광반응성이 월등히 향상되었음을 확인하였다 (도 7).

[0054] 실시예 4: 광합성 효율 분석

- [0055] 야생형 균주와 돌연변이 PTS42 균주의 광합성 효율 측정 지표 중 하나인 광계II의 효율을 분석하였다. 이를 위하여 세포 내 클로로필 a 양을 측정하여 30 μ g 양에 해당되는 동일 기준의 세포 양을 유리섬유필터 (Glass Microfiber filter)에 옮겨 Fluorescence Monitoring System II 장비를 활용하여 측정하였다.
- [0056] 그 결과, PTS42 균주는 야생형 균주와 비교하여 광계II의 효율이 약 20% 정도 향상된 것을 보여준다 (도 8).
- [0057] 그 다음, 야생형 균주와 돌연변이 PTS42 균주를 50 μ mol photons $m^{-2} s^{-1}$ 의 낮은 빛 세기 조건 및 300 μ mol photons $m^{-2} s^{-1}$ 의 높은 빛 세기 조건의 두 가지 다른 빛 세기 조건에서 플라스크 배양을 실시하고 (도 9), 이러한 두 가지 조건에서 최대 산소 발생속도와 순양자수율 (apparent quantum yield)을 측정하여 분석하였다. 최대 산소발생 속도는 광합성의 결과 생성되는 산소를 측정하여 분석하는 것으로 광합성 효율을 나타내는 지표 중 하나이며, 순양자수율 (apparent quantum yield) 역시 광합성 효율 관련 지표이다.
- [0058] 그 결과, 돌연변이 PTS42 균주의 경우, 낮은 빛의 세기와 높은 빛의 세기 두 가지 조건 모두에서 야생형 균주보다 최대 산소 발생속도가 향상되었으며, 특히 빛의 세기가 강해지면 광합성에 의해 발생하는 산소 양의 차이가 늘어남을 알 수 있었다 (도 10). 즉, 돌연변이 PTS42는 빛의 세기가 일정 정도까지 강해질수록 광합성 효율이 더욱더 증가하는 특징을 나타냈다. 또한, 순양자수율 (apparent quantum yield) 분석에서도 산소 발생 속도와 동일하게 저광도 및 고광도 두 가지 조건 모두 야생형 균주보다 돌연변이 PTS42가 높은 것을 확인하였고, 특히 빛의 세기가 강해질수록 야생형 균주보다 증가하는 폭이 커져 광합성 효율이 크게 증가함을 확인하였다 (도 11).
- [0059] 마지막으로, 광합성을 위해 투입된 빛 에너지 중 광합성에 사용되지 못하고 소멸하는 에너지를 나타낸 NPQ 값을 측정하였다. NPQ 값은 작을수록 광합성 효율이 높음을 나타낸다.
- [0060] 그 결과, 야생형 균주나 돌연변이 PTS42 균주 모두 50 μ mol photons $m^{-2} s^{-1}$ 의 낮은 광도 조건에서는 NPQ 값이 거의 차이가 없었으나, 빛의 세기가 강해지면 돌연변이 PTS42 균주는 광합성 효율이 향상되는 것을 알 수 있었다 (도 12).

[0062] 실시예 5: 광생물반응기 내 성장성 및 지질 생산성 분석

- [0063] 야생형 균주와 돌연변이 PTS42 균주를 5 L 규모의 광생물반응기 내에서 300 μ mol photons $m^{-2} s^{-1}$ 의 빛 세기 및 5% CO₂를 활용한 배양조건으로 3일간 배양하고 (도 13), 야생형 균주와 돌연변이 PTS42 균주의 세포 성장성을 비교 분석하였다.
- [0064] 그 결과, PTS42 균주의 최대 바이오매스 생산량은 약 1.7 g/L로 야생형 균주보다 약 1.8배 이상 바이오매스 생산성이 향상된 것을 확인할 수 있었다 (도 15).
- [0065] 또한, PTS42의 경우 빛의 세기가 강해질수록 광합성 효율이 향상되는 것을 실시예 4를 통해 확인하였기 때문에 빛 세기를 증가시키면서 5 L 규모 광생물반응기 내 바이오매스 생산성을 비교 분석하였다.

[0066] 그 결과, PTS42 균주는 $750 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 고광도 빛의 세기까지는 바이오매스 생산성이 증가하여 1.74 g/L/d까지 나타났으나, 그 이상의 고광도 빛의 세기에서는 바이오매스 생산성이 저해됨을 확인하였다 (도 16).

[0067] 야생형 균주와 돌연변이 PTS42 균주의 지질 생산성을 비교한 결과, 총 지방산 (total fatty acid)을 기준으로 야생형 균주보다 돌연변이 PTS42가 약 8배 이상 지질 생산성이 향상된 것을 확인하였다 (도 17). 이러한 결과는 이산화탄소 전환 관련 광합성 효율뿐 아니라 지질 생산성 또한 향상되어 경제적인 미세조류 공정 구축의 가능성을 보여주는 것이다.

[0069] 실시예 6: 돌연변이 균주 PTS42의 Genomic DNA 내 삽입 위치 분석

[0070] 돌연변이 균주에 삽입된 유전자 위치를 분석하기 위하여, 삽입된 유전자 양쪽의 flanking 서열과 상보적으로 결합 가능한 프라이머들을 활용한 PCR 분석을 하였다. 사용된 각 프라이머들은 [표 2]에 나타내었다.

표 2

서열번호	이름	서열 (5' →3')	용도
1	UP3	GACTCACCTCCCAGAATTCCTGG	Specific primer for upstream sequence (primary)
2	UP2	TCGTTCCGCAGGCTCGCGTAGG	Specific primer for upstream sequence (Secondary)
3	UP1	TCGAGAAGTAACAGGGATTCTGTGTCATG	Specific primer for upstream sequence (Tertiary)
4	DP4	CCTCGAGGTGTTTCGAGGAGACCC	Specific primer for downstream sequence (primary)
5	DP3	CGCTGGATCTCTCCGGCTTCACC	Specific primer for downstream sequence (Secondary)
6	DN1	GAACTGGCGCAGTTCCTCTG	Specific primer for downstream sequence (Tertiary)
7	RMD227	NTCGWGWTSNAGC	Degenerate primer
8	42R	GGACACCAAGAYAGCAAGAAGAAGC	Sequence specific primer for mutant PTS42

[0072] PCR을 이용한 서열 분석은 공지의 TAIL-PCR과 PCR-SP 방법을 사용하여 분석하였다 (Dent R. M. *et al.*, *Plant Physiol.* 137:545-556, 2005; Matsuo T. *et al.*, *Genes Dev.* 22:918-930, 2008; Ochman H. *et al.*, *Genetics* 120:621-623, 1988).

[0073] 또한, 서던 블롯 분석을 위해 10 μ g의 genomic DNA를 PstI 효소 1ml을 넣고 37℃에서 배양하여 DNA를 여러 가닥으로 절단하였다. 절단된 DNA는 양전하를 띠는 나일론 맴브레인 (Nylon membrane, Zeta-Probe)에 흡착시킨 후, 삽입된 유전자와 상보적으로 결합 가능한 프로브를 넣어 결합시켰다. 프로브는 다음과 같은 프라이머 (서열번호 9 및 10)를 사용하여 제작하였으며, 흡착된 프로브를 통해 삽입된 유전자를 알 수 있도록 라벨링을 하였다.

[0074] 서열번호 9 : 5' -AGGTCTTCCCGAACTGCTG-3' (HgPrF)

[0075] 서열번호 10 : 5' -AGAGGAACTGCGCCAGTTCC-3' (HgPrR)

[0076] 그 결과, PTS42 균주의 경우, 무작위 삽입법을 통해 들어간 하이그로마이신 내성 유전자가 Genomic DNA의 두 부위에 들어가 있음을 알 수 있었다 (도 18). 그 중 한 부위의 유전자 위치를 밝혔고, PCR을 통해 확인하였다 (도 19). [표 3]에서와 같이 PTS42의 Zinc finger 단백질 합성을 조절하는 유전자 위치에 하이그로마이신 내성 유전자가 삽입된 것을 알 수 있었다.

표 3

돌연변이	위치	Protein ID	기능 (Function)	서열결정 방법
PTS42	Promoter (B)	516641	Protein binding; PHD-type zinc finger	TAIL-PCR & PCR-SP

B: Both flanking sequences were identified
 Protein ID was obtained from JGI Chlamydomonas v4.0
 Funtion was described based on the JGI Chlamydomonas v4.0

[0079] 이상으로 본 발명의 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다. 본 발명의 단순한 변형 내지 변경은 이 분야의 통상의 지식을 가진 자에 의하여 용이하게 이용될 수 있으며, 이러한 변형이나 변경은 모두 본 발명의 영역에 포함되는 것으로 볼 수 있다.

수탁번호

[0081]

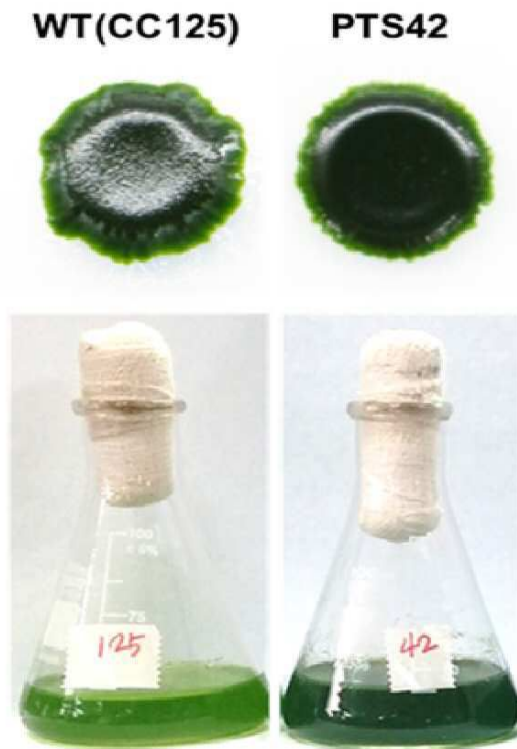
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC18499P

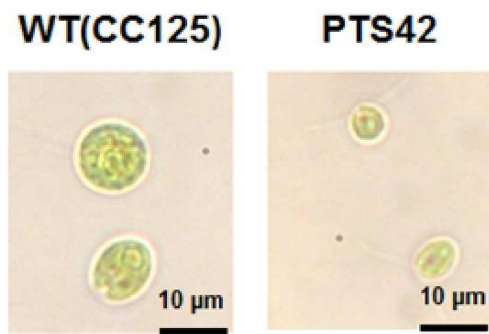
수탁일자 : 20160906

도면

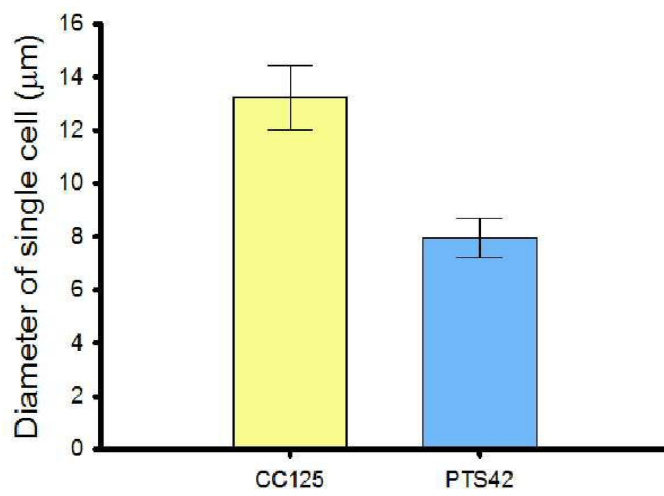
도면1



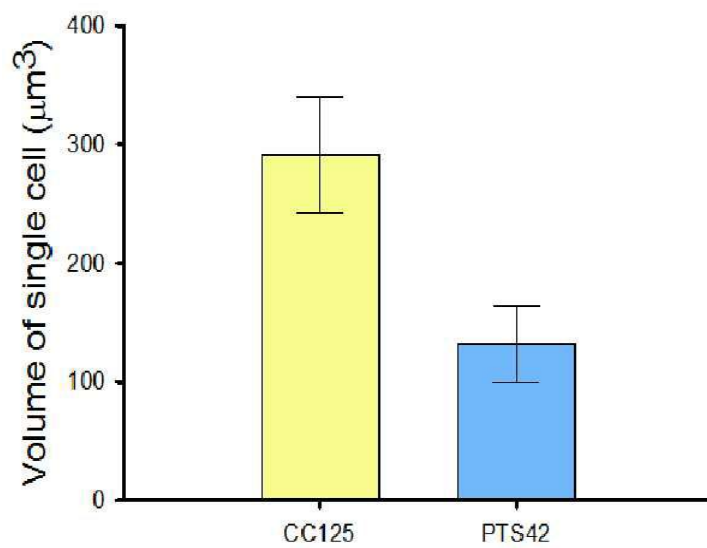
도면2



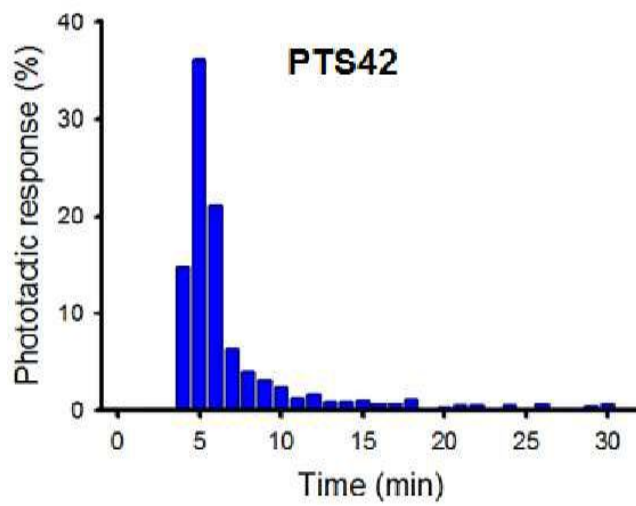
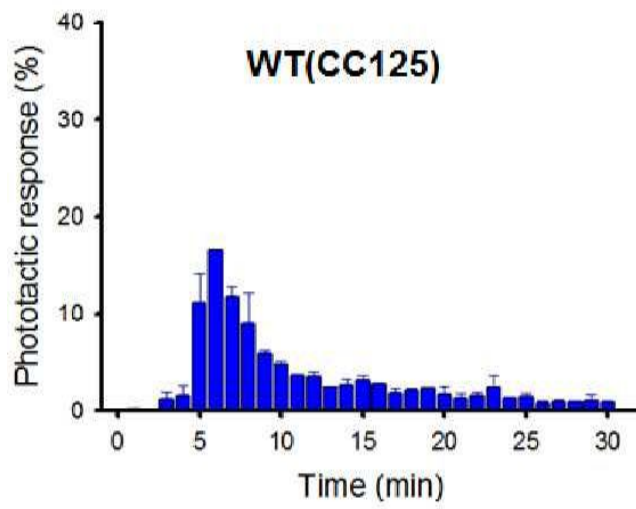
도면3



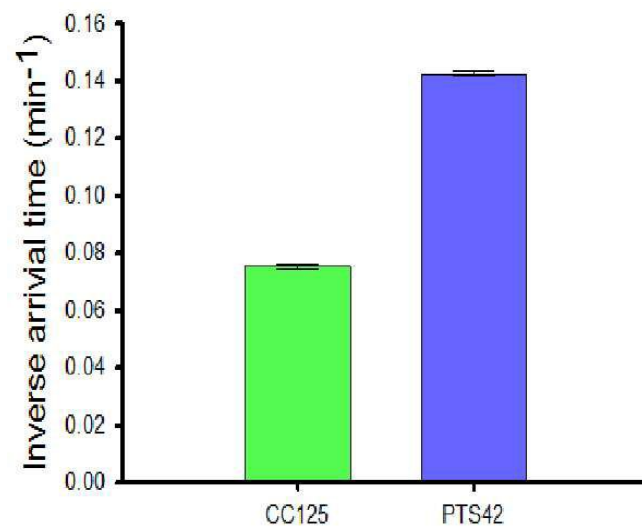
도면4



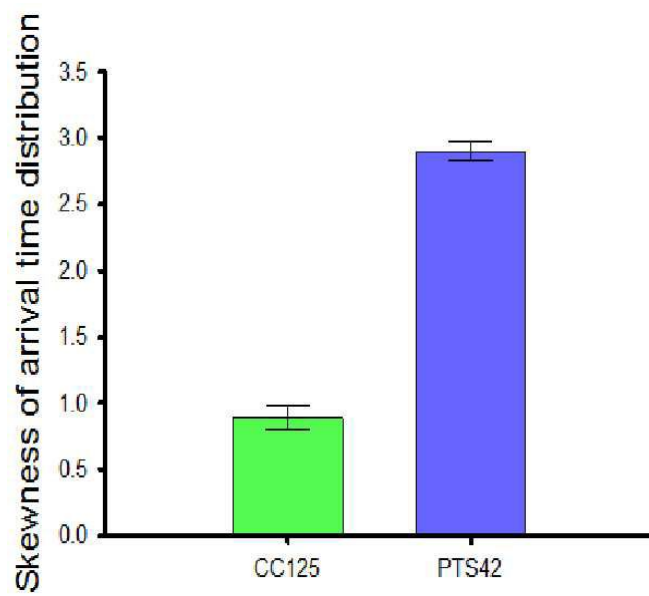
도면5



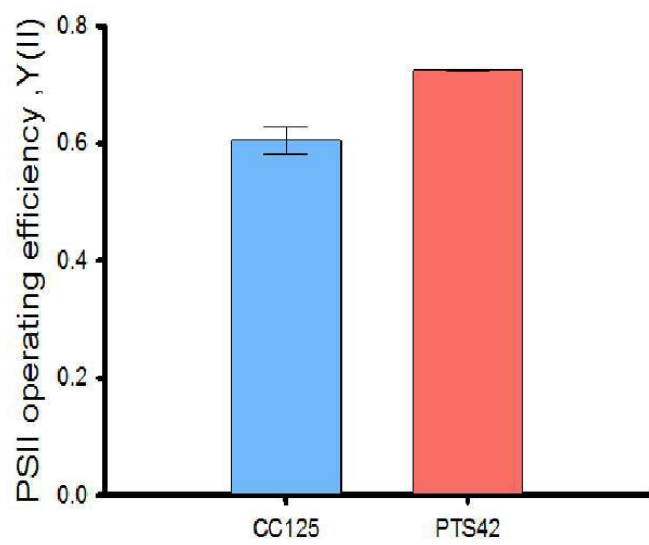
도면6



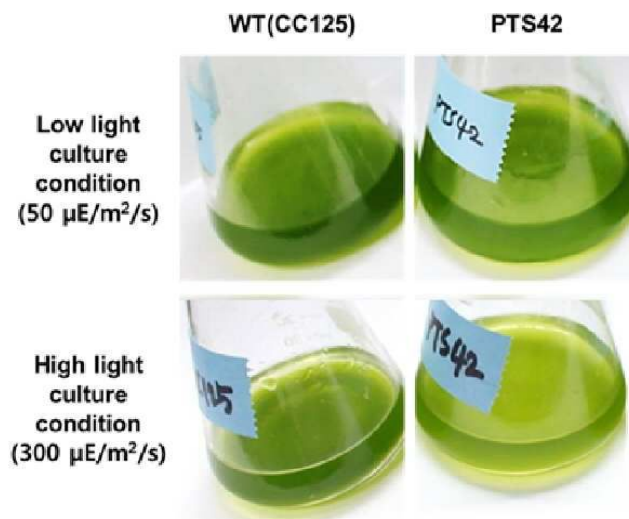
도면7



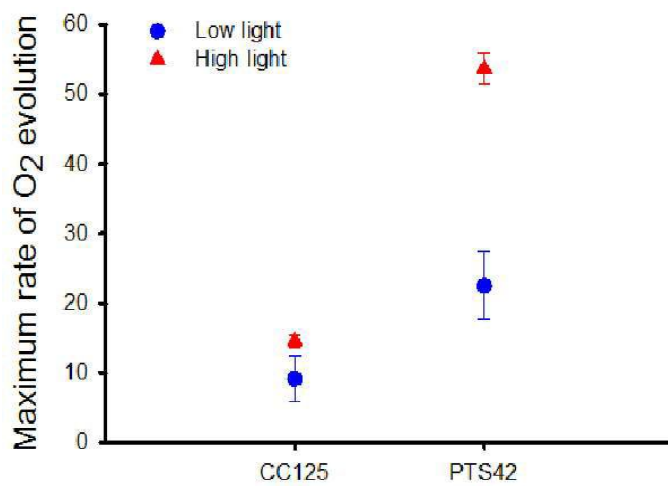
도면8



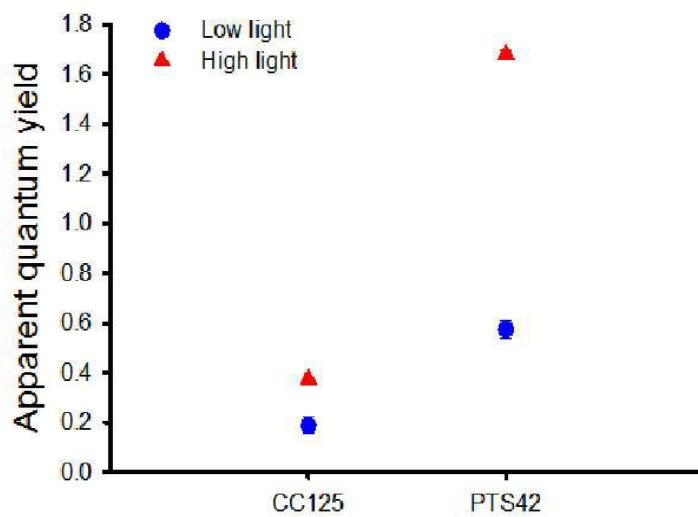
도면9



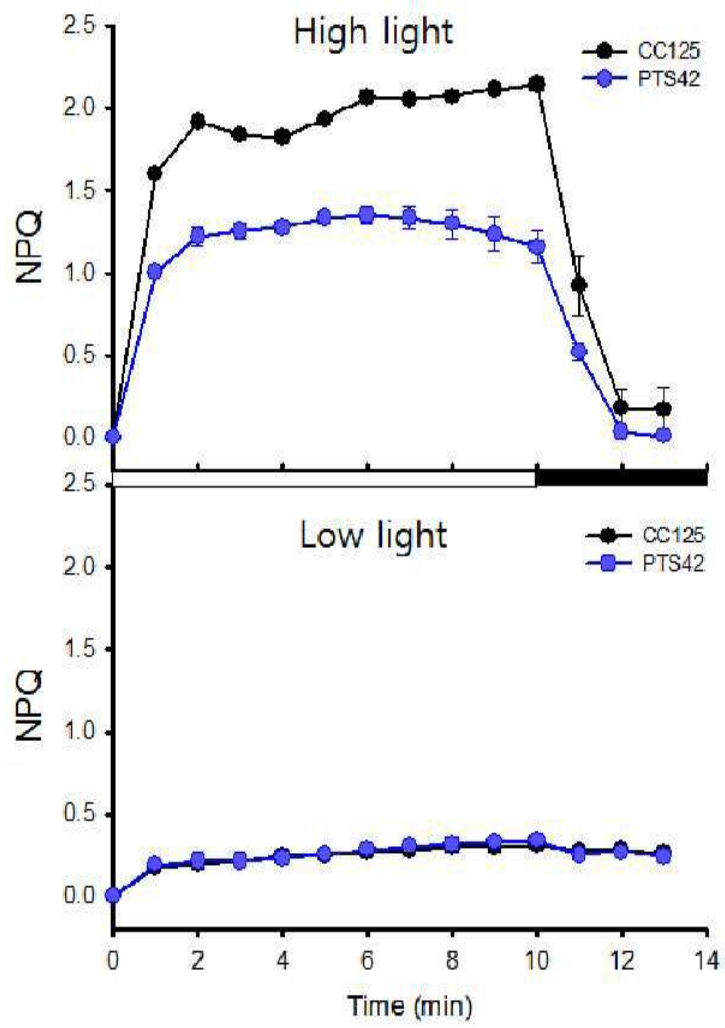
도면10



도면11



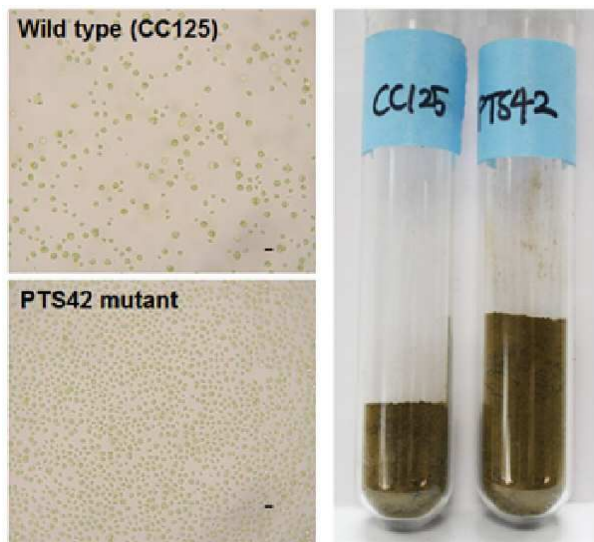
도면12



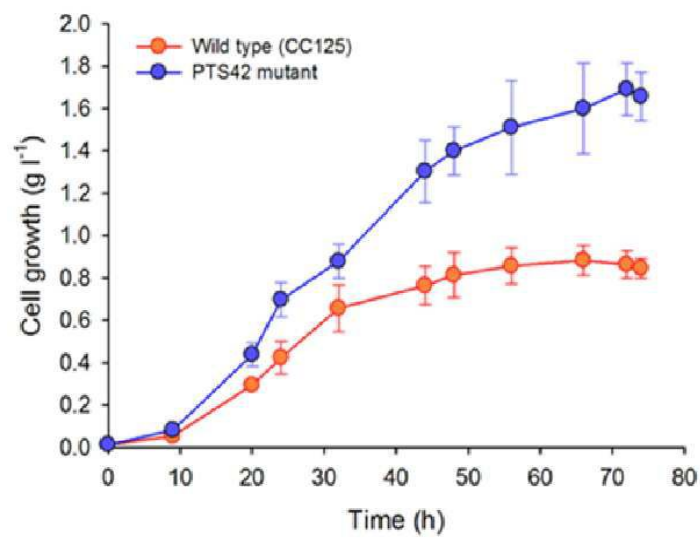
도면13



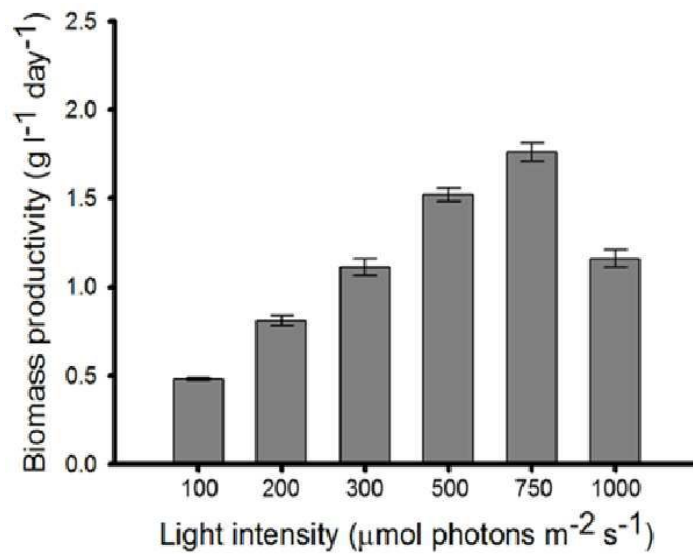
도면14



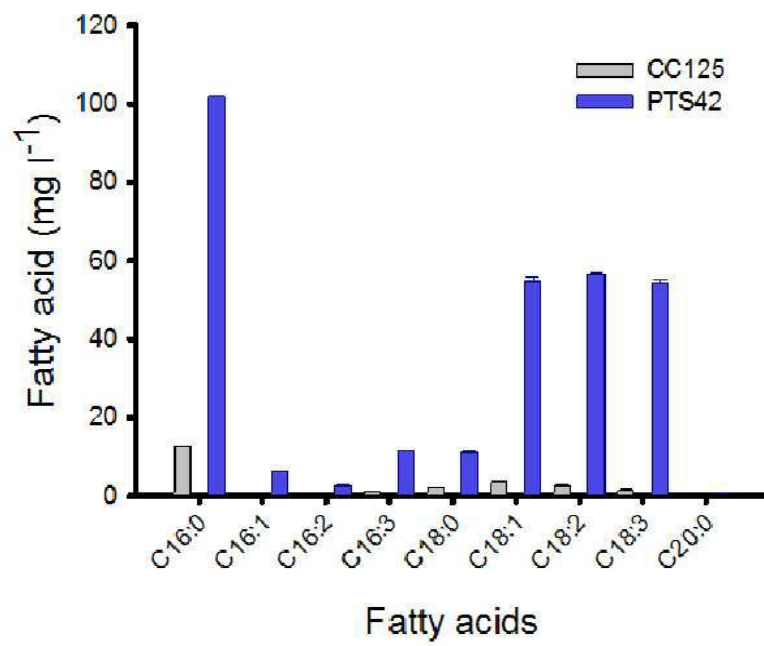
도면15



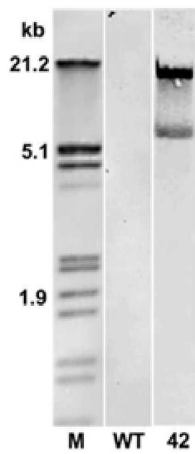
도면16



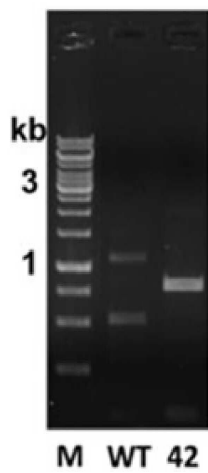
도면17



도면18



도면19



서열 목록

- <110> Korea University Research and Business Foundation
- <120> Microalgal with Improved Phototactic Response and Photosynthetic Efficiency
- <130> P16-B338
- <150> KR 10-2016-0132021
- <151> 2016-10-12
- <160> 10
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 23
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> UP3

<400> 1
gactcacctc ccagaattcc tgg 23

<210> 2
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> UP2
<400> 2
tcgttccgca ggctcgcgta gg 22

<210> 3
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> UP1
<400> 3
tcgagaagta acagggattc ttgtgtcatg 30

<210> 4
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> DP4
<400> 4
cctcgagggtg ttcgaggaga ccc 23

<210> 5
<211> 23
<212>
> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> DP3
<400> 5
cgctggatct ctccggcttc acc 23

<210> 6
<211> 20
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DN1

<400> 6

gaactggcgc agttcctctg

20

<210> 7

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RMD227

<400> 7

ntcgwgtsc nagg

14

<210> 8

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 42R

<400> 8

ggacaccaag ayagcaagaa gaagc

25

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HgPrF

<400> 9

aggtcttccc ggaactgctg

20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HgPrR

<400> 10

agaggaactg cgccagtcc

20