



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0060113
(43) 공개일자 2020년05월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/79 (2006.01) C12N 9/12 (2006.01)
C12P 7/64 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/79 (2013.01)
C12N 9/1241 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0145675
(22) 출원일자 2018년11월22일
심사청구일자 2018년11월22일

(71) 출원인
인하대학교 산학협력단
인천광역시 미추홀구 인화로 100(용현동, 인하대학교)
(72) 발명자
이철균
서울특별시 서초구 나루터로4길 49, 334동 601호
홍성주
인천광역시 미추홀구 용정공원로 33, 123동 205호
유단비
경기도 부천시 원종로107번길 14-12, 201동 604호
(74) 대리인
한윤호

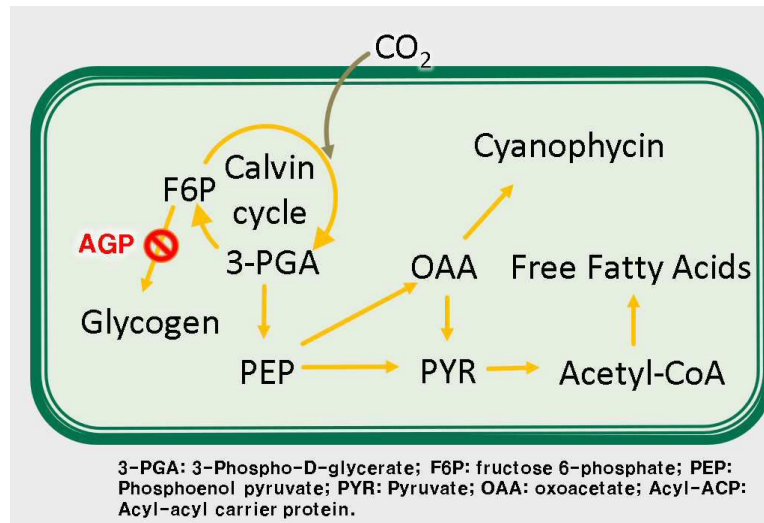
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **넥-아웃을 이용한 남조류의 지방산 함량 증대방법**

(57) 요약

본 발명은 AGP 유전자 넥-아웃을 이용한 남조류 지방산 함량 증대 방법에 관한 것으로 더 상세하게는 글리코겐(glycogen)을 합성하는 AGP(ADP-glucose pyrophosphorylase)가 넥-아웃되어 지방산 함량이 증대된 형질전환 시네코시스티스(synechocystis) 시아노박테리아 균주를 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12P 7/6409 (2013.01)

C12Y 207/07027 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2016M1A5A1027462

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 해양극지기초원천기술개발사업

연구과제명 유용 해양미세조류 게놈스케일 인실리코 모델구축 및 타겟 시뮬레이션

기 여 율 1/2

주관기관 인하대학교 산학협력단

연구기간 2016.05.01 ~ 2020.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2017R1A2B2002954

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구자사업

연구과제명 미세조류 기반 Green fuel cell factory 개발

기 여 율 2/2

주관기관 인하대학교 산학협력단

연구기간 2017.03.01 ~ 2020.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

글리코겐(glycogen)을 합성하는 AGP(ADP-glucose pyrophosphorylase)가 녹-아웃되어 지방산 함량이 증대된 형질전환 시네크코시스티스(*Synechocystis*) 속 균주.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 AGP 유전자 내에 항생제 내성 유전자가 삽입됨으로써 녹-아웃된, 균주.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 항생제 내성 유전자는 클로람페니콜(chloramphenicol) 저항성 유전자인, 균주.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 지방산은 리놀렌산, 올레산, 옥타데칸산, 팔미트산, 팔미토레익산 또는 리놀레산인 균주.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 AGP 유전자는 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 단백질을 암호화하는, 균주.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 AGP 유전자는 서열번호 2로 기재되는 핵산서열로 구성되는, 균주.

청구항 7

시네크코시스티스 속 남조류의 AGP 유전자 내에 항생제 내성 유전자가 삽입되어, 녹-아웃된 녹-아웃 AGP 유전자를 제조하는 단계;

상기 녹-아웃 AGP 유전자를 시네크코시스티스 속 숙주 균주에 형질도입하는 단계; 및

항생제에 내성을 갖는 균주를 선별함으로써 상기 녹-아웃 AGP 유전자가 상동재조합에 의해 게놈 DNA 내로 삽입된 형질전환 시네크코시스티스 속 숙주 균주를 선별하는 단계를 포함하는, 지방산 함량이 증대된 시네크코시스티스 속 균주의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 남조류의 지방산 함량 증대방법에 관한 것으로서, 더 상세하게는 녹-아웃을 이용한 형질전환 남조류의 지방산 함량 증대방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 고유가와 환경오염으로 현재의 화석연료 기반 사회의 문제점에 대한 개선이 전지구적으로 대두되고 있다. 따라

서 온실가스인 이산화탄소를 이용하여 화학적 에너지를 만드는 자연계 순환을 증진시킬 수 있는 환경 친화적이며 지속가능한 발전을 위한 자연계 에너지 전환이 필요하다.

[0003] 한편, 남조류(blue-green algae)는 지구의 탄소 및 질소 순환에서 필수불가결한 역할을 하며, 광범위한 서식환경(niches)에 분포되어 있고 매우 다양한 범위의 환경 조건에 대한 뛰어난 내성으로 인해 극지방 및 고산지대를 포함하는 가능한 거의 모든 환경에서 발견되고 있다. 남조류는 빛에너지를 흡수하여 세포 내에서 화학적 에너지로 전환할 수 있는 대사체계를 세포 내에 가지고 있는데 이들은 생태계의 1차 생산자로 태양 에너지를 이용하여 무기탄소원인 이산화탄소를 유기화합물로 합성함에 따라 생태계를 유지하는 중심역할을 수행하고 있고 이들이 합성하는 유기화합물 중 세포를 구성하고 있는 지방산(fatty acid)은 바이오디젤로 활용가능하기 때문에 청정 에너지원으로 주목받고 있다. 그러나 바이오디젤 생산을 위한 대표적인 남조류인 시네코시스티스(Synechocystis)를 이용한 생산기술은 시네코시스티스 내 지방산 함량이 적어 노동력과 생산비용이 증가하는 문제가 있다. 이와 관련하여 대한민국 공개특허 제2013-0043491호는 호냉성 신종 남조류 오실라토리아 세종엔시스를 이용한 바이오디젤의 제조 방법에 대해 개시하고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 그러나 상기 선행기술의 경우, 호냉성 남조류로 지방산 생산 수율이 미미하여 바이오디젤 제조를 위한 실용화에는 많은 경제적 비용이 소요되는 문제점이 있다.

[0005] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 포함하여 여러 문제점들을 해결하기 위한 것으로서, 형질전환 시스템을 통하여 남조류인 시네코시스티스(Synechocystis)의 지방산 함량을 효율적으로 증대할 수 있는 AGP 유전자 녹-아웃을 이용한 남조류 지방산 함량 증대방법을 제공하는 것을 목적으로 한다. 그러나 이러한 과제는 예시적인 것으로, 이에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명의 일 관점에 따르면, 글리코젠(glycogen)을 합성하는 AGP(ADP-glucose pyrophosphorylase)가 녹-아웃되어 지방산 함량이 증대된 형질전환 시네코시스티스(Synechocystis) 속 균주가 제공된다.

[0007] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 시네코시스티스 속 남조류의 AGP 유전자 내에 항생제 내성 유전자가 삽입되어, 녹-아웃된 녹-아웃 AGP 유전자를 제조하는 단계; 상기 녹-아웃 AGP 유전자를 시네코시스티스 속 숙주 균주에 형질도입하는 단계; 및 항생제에 내성을 갖는 균주를 선별함으로써 상기 녹-아웃 AGP 유전자가 상동재조합에 의해 게놈 DNA 내로 삽입된 형질전환 시네코시스티스 속 숙주 균주를 선별하는 단계를 포함하는, 지방산 함량이 증대된 시네코시스티스 속 균주의 제조방법이 제공된다.

발명의 효과

[0008] 상기한 바와 같이 이루어진 본 발명의 일 실시예에 따르면, AGP 유전자 녹-아웃 시스템을 이용하여 남조류 시네코시스티스(Synechocystis) 형질전환 식물체를 제조하고 이를 통한 바이오연료의 전구체인 지방산 생산 증대효과를 구현할 수 있다. 물론 이러한 효과에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

도면의 간단한 설명

[0009] 도 1은 AGP 유전자 녹-아웃(KO)를 통해 탄수화물 대사경로를 차단에 대한 대사 흐름을 개략적으로 나타낸 개요도이다.

도 2는 AGP 유전자의 항생제 저항성 유전자(cmR)가 포함된 재조합 DNA 조각이 pTOP V2 벡터에 삽입된 벡터의 모식도이다.

도 3은 AGP 녹-아웃(KO) 유전자가 도입된 형질전환체의 선별과정(A)과 PCR(B) 증폭 결과를 나타내는 사진이다.

도 4는 AGP 녹-아웃(KO) 유전자가 도입된 형질전환체에 의해 생산된 생체량(fresh cell weight)을 쿨터카운터(coulter counter)로 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 5는 AGP KO 녹-아웃 유전자가 도입된 형질전환체에 의해 생산된 지방산의 함량과 성분을 GC-Mass로 분석한

결과를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

용어의 정의:

본 문서에서 사용되는 용어 "남조류(blue-green algae)"는 광합성을 하는 미생물로서 여름철 갈수기에 저수지 수질이 악화될 때 수 일 내에 저수지 전체를 덮을 만큼 성장한다. 유성생식을 하지 않아 세균류와 같이 이분열로 증식하여서 분열생물이라고도 불린다. 시아노박테리아(cyanobacteria; 청녹색세균 또는 남색세균)라고 불리기도 하는데 식물성 플랑크톤으로서 서식범위가 매우 넓고, 최근 수자원의 부영양화와 함께 수화현상을 형성하는 *Anabaena*, *Microcystis*나 곰팡이 냄새 물질을 생산하는 *Anabaena*, *Phormidium*, *Oscillatoria* 등의 번식이 문제시 되고 있다. 남조류는 지구의 탄소 및 질소 순환에서 필수불가결한 역할을 하며, 광범위한 서식환경(niches)에 분포되어 있으며 매우 다양한 범위의 환경 조건에 대한 뛰어난 내성으로 인해 극지방 및 고산지대를 포함하는 가능한 거의 모든 환경에서 발견되고 있다.

본 문서에서 사용되는 용어 "AGP(ADP-glucose pyrophosphate)"는 광glucose-1-phosphate 및 ATP로부터 활성화된 글루코실 공여체인 ADP 글루코오스의 합성으로 식물체 및 식물에서 알파 1,4- 글루칸(글리코겐 또는 전분)의 생합성에서 매우 중요한 단계를 촉매한다.

발명의 상세한 설명:

본 발명의 일 관점에 따르면, 글리코겐(glycogen)을 합성하는 AGP(ADP-glucose pyrophosphorylase)가 녹-아웃되어 지방산 함량이 증대된 형질전환 시네코시스티스(*Synechocystis*) 속 균주가 제공된다.

상기 균주에 있어서, 상기 AGP 유전자 내에 항생제 내성 유전자가 삽입됨으로써 녹-아웃될 수 있고 상기 항생제 내성 유전자는 클로람페니콜(chloramphenicol) 저항성 유전자일 수 있다.

상기 균주에 있어서, 상기 지방산은 리놀렌산, 올레산, 옥타데칸산, 팔미트산, 팔미토레익산 또는 리놀레산일 수 있고 상기 AGP 유전자는 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 단백질을 암호화할 수 있으며 상기 AGP 유전자는 서열번호 2로 기재되는 핵산서열로 구성될 수 있다.

본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 시네코시스티스 속 남조류의 AGP 유전자 내에 항생제 내성 유전자가 삽입되어, 녹-아웃된 녹-아웃 AGP 유전자를 제조하는 단계; 상기 녹-아웃 AGP 유전자를 시네코시스티스 속 숙주 균주에 형질도입하는 단계; 및 항생제에 내성을 갖는 균주를 선별함으로써 상기 녹-아웃 AGP 유전자가 상동재조합에 의해 게놈 DNA 내로 삽입된 형질전환 시네코시스티스 속 숙주 균주를 선별하는 단계를 포함하는, 지방산 함량이 증대된 시네코시스티스 속 균주의 제조방법이 제공된다.

남조류는 태양에너지를 이용하여 무기탄소원인 이산화탄소를 유기화합물로 합성하여 생태계를 유지하는 중심 역할을 수행하고 있고 이들이 합성하는 유기화합물 중 세포를 구성하고 있는 지방산(fatty acid)은 바이오디젤로 활용가능하기 때문에 청정에너지원으로 주목받고 있는데 남조류인 시네코시스티스(*Synechocystis*)를 이용한 바이오디젤의 생산기술은 시네코시스티스 내 지방산 함량이 적어 생산성 면에서 문제가 존재하였다. 지방산 함량이 적은 이유는 흡수된 이산화탄소를 캘빈회로(calvin cycle)를 이용하여 삼탄당(triose)으로 전환시킨 후 80~85%가 당 합성경로로 이동하고, 10%만이 지방산 합성경로에 이용되기 때문이다. 이에 본 발명자들은 상기 문제를 해결하고자 예의노력한 결과 AGP 유전자를 형질전환 시스템을 통하여 시네코시스티스의 당 합성으로 이동하는 경로를 차단하여 지방산의 생산성을 향상시킬 수 있는 녹-아웃을 이용한 남조류의 지방산 함량 증대방법을 개발하였다.

본 발명자들은 미세조류가 에너지 저장 물질로서 탄수화물, 단백질, 지방산을 생산하는데 *Synechocystis sp.* PCC6803에서 대표적인 탄수화물 저장물질은 글리코겐(glycogen)으로 이의 합성 경로를 차단하면 에너지, 탄소 저장 흐름이 지방산 합성으로 향하여 지방산 생산량이 증가할 것이라고 예측하였다(도 1). Cyanobase의 자료와 KEGG를 활용하여, *Synechocystis sp.* PCC6803에서 글리코겐을 합성하는 ADP-glucose pyrophosphorylase를 녹-아웃(knockout) 시킨 *Synechocystis* 형질전환체를 설계하였다. 상기 *Synechocystis* PCC6803 균주는 탄수화물 합성에 관련된 ADP-glucose pyrophosphate 단백질을 코딩하는 유전자(AGP)를 제공하며, 이 유전자의 염기서열은 서열번호 1과 같다. AGP의 유전자 서열은 cyanobase의 자료를 활용하였다(http://genome.microbedb.jp/cyanobase/GCA_000009725.1/genes/slr1176).

목적유전자 서열 중간의 400 bp 정도를 결실(deletion) 시키고, *Synechocystis*의 형질전환을 확인하기 위해서

선별마커인 클로람페니콜(chloramphenicol) 저항성 유전자를 목적 유전자의 결실 부분에 삽입하였다. 그 후 야생형 *Synechocystis*인 대조군(WT)과 본 발명의 형질전환 균주는 배양액에 클로람페니콜을 첨가하여 배양하여 특정 대사 경로를 저해한 결과 실험군과 대조군의 세포성장 양상은 비슷하게 나타났다. 따라서 글리코젠을 합성하는 유전자의 녹아웃(knockout)은 지속적인 광조건 하에서 세포 성장에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났고 정체기에서 질소결핍 스트레스를 가한 결과 실험군의 탄수화물 함량 감소와 함께 지방 함량이 24% 증가한 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0021] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있는 것으로, 이하의 실시예는 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이다.

[0022] **실시예 1: 게놈 DNA 추출**

[0023] 본 발명자들은 남조류 시네코시스티스의 돌연변이종을 제조를 위해 시네코시스티스의 게놈 DNA를 추출하였다. 구체적으로, 고체배지에서 배양한 세포를 200 μ l STE 버퍼에 녹인 후 10 μ l 라이소자임(20 mg/ml)을 첨가하고 37℃에서 2시간 동안 반응시켰다. 이후 5 μ l 10% SDS 용액 및 20 μ l proteinase K를 첨가하고 60℃에서 2시간 반응시켰으며 200 μ l Tris buffer 및 400 μ l 페놀(phenol)을 첨가하였고 13,000 rpm에서 3분간 원심분리하였다. 그 후, 300 μ l 상등액을 새로운 미세원심분리 튜브(microcentrifuge tube)에 옮겨 담고 같은 부피의 페놀:클로로포름:IAA를 첨가한 후 다시 13,000 rpm에서 3분간 원심분리하였다. 이어서, 200 μ l 상등액을 새로운 미세원심분리 튜브에 옮긴 후 DNA 침전을 위해 상등액의 1/10 부피의 3M 초산나트륨(sodium acetate) 및 2 부피의 에탄올을 첨가하여 혼합하였고 짧게 원심분리한 후 상등액을 버리고 70% 에탄올을 이용하여 상기 침전된 DNA를 세척하였다. 마지막으로 70% 에탄올을 제거한 후 펠렛(pellet)을 상온에서 건조시킨 다음 상기 건조된 펠렛을 50 μ l TE buffer에 첨가하고 4℃에 저장하였다.

[0024] **실시예 2: Megaprimer PCR**

[0025] 본 발명자들은 *Synechocystis* sp. PCC6803에서 글리코젠을 합성하는 ADP-glucose pyrophosphorylase(EC:2.7.7.27)를 녹아웃(knockout)시킨 *Synechocystis* 형질전환체를 디자인하였다. 이를 위해 3개의 올리고뉴클레오타이드 프라이머(oligonucleotide primer)와 2번의 PCR로 AGP 유전자 속에 DNA 인서트(insert)로 항생제 유전자를 삽입하여 AGP 유전자의 결실 돌연변이(deletion mutant)를 제조하였다. 첫 번째 PCR에서는 추출한 gDNA를 주형(template)으로 유전자와 상동성이 있는 염기서열을 갖는 2종류의 PCR 산물을 제조하였고 상기 PCR 산물을 프라이머로 항생제 유전자를 주형으로 다시 증폭하여 유전자 기능을 결실시키는 DNA 인서트를 제조하였고 클로람페니콜(chloramphenicol)에 저항성을 갖는 CAT 유전자를 선별마커로 사용하였다.

[0026] 구체적으로 AGP 유전자(서열번호 1 및 2)의 앞쪽 유전자 지역(AGP1)과 뒤쪽 유전자 지역(AGP2)을 프라이머(서열번호 3 내지 6)를 이용하여 클로람페니콜 저항성 유전자를 주형으로 하는 DNA 인서트를 제작하였다. 상기 프라이머 중 AGP1-R과 AGP2-F는 AGP1과 AGP2가 클로람페니콜 저항성 유전자 서열을 포함할 수 있도록 각각 19개와 20개의 클로람페니콜 저항성 유전자 상동서열을 갖는다. 먼저 첫 번째 PCR은 polymerase 0.5 μ l, 버퍼 10 μ l, dNTP 4 μ l, 상기 기재된 프라이머 각각 5 μ l, 주형 DNA(*Synechocystis* 게놈 DNA) 200 ng와 증류수로 AGP1과 AGP2 DNA 조각을 제작하기 위해 수행되었다. 두 번째 PCR은 polymerase 0.5 μ l, 버퍼 10 μ l, dNTP 4 μ l, 프라이머(AGP1-F, AGP2-R)와 메가 프라이머(AGP1, AGP2) 각각 5 μ l, 주형 DNA(클로람페니콜 DNA) 200 ng와 증류수를 이용하여 AGP 유전자의 항생제 저항성 유전자(cmR)가 포함된 재조합 DNA 조각을 연결하기 위해 수행하였다. 모든 PCR 반응은 PrimeSTAR HS DNA polymerase(Takara, Japan)를 사용하였고 98℃에서 10초, 55℃에서 15초, 72℃에서 1분으로 30번 반복하였다. 상기 재조합 DNA 인서트를 양쪽 말단부위가 평활말단(blunt end)인 pTOP V2 벡터(Enzymomics, KOREA)에 라이게이즈(ligase)를 이용하여 결찰(ligation)한 후 시네코시스티스에 형질전환하였다(도 2). 상기 PCR 증폭에 사용한 프라이머의 핵산서열을 하기 표 1에 요약하였다.

표 1

[0027] 프라이머의 핵산서열 정보

프라이머	핵산서열(5'-->3')	서열번호
AGP1-F	CCCCTCGGTCTAAACTTGA	3
AGP1-R	CATAGCGCTCAATCAGCGTAGGGTTATGTCGGCATTGGT	4
AGP2-F	AATAGCCATCGAGTCAGTCCACAAACACCTAGTCCCGACTTT	5
AGP2-R	GCTATGGTGCGAGGAAAGAA	6

[0028] **실시예 3: 형질전환(transformation)**

[0029] 본 발명자들은 선향(pilus)이 있어 외부 DNA를 세포 내로 삽입시키는 것이 용이한 천연 형질전환체(natural transformant)인 시네코시스티스를 형질전환에 사용하였다. 구체적으로 시네코시스티스는 자연적인 수용성 세포(competent cell)이기 때문에 앞서 제작된 플라스미드를 배양액에 섞어 30℃에서 4시간 ~ 6시간 동안 배양하였다. *Synechocystis sp.* PCC6803의 형질전환체는 클로람페니콜을 25 µg/ml에서 75 µg/ml로 증가시킨 BG-11을 이용하여 선택하였고 완전한 분리(full segregation)을 위하여 4회 이상 스트리킹(streaking)을 진행하였다. 이후 1.5% 고체배지위에 0.75% agar를 첨가한 시네코시스티스 배양액을 부어 굳힌 후 낮은 광도($\leq 10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)의 30℃ 배양기에서 배양하였고 항생제는 세포가 자란 3 - 4일 후 아가(agar) 배지를 들고 플레이트 바닥에 주입하였다. 상기 항생제 주입 후 한 달간 고체배지를 관찰한 후 생성된 콜로니를 항생제를 포함하는 새 BG-11배지로 옮겨주고 PCR을 이용하여 재조합 DNA가 염색체(chromosome) 상에 삽입되었음을 확인하였다(도 3).

[0030] **실험예 1: 지방산 함량 분석**

[0031] 본 발명자들은 본 발명의 AGP 형질전환 균주의 균체 성장 및 탄수화물/지방산 함량을 분석하였다. 구체적으로 빛 에너지(light energy), 이산화탄소(CO₂), 글루코스(glucose)를 이용할 수 있는 혼합 영양 조건(mixotrophic condition)에서 세포 배양을 진행하였다. 실험은 250 ml 삼각 플라스크(erlenmeyer flask)에서 워킹 볼륨(working volume) 100 ml로 수행하였고 광원(light source)은 피코빌리단백질(phycobiliprotein)의 흡수파장을 포함하고 있는 오파장램프를 사용하였으며, 광도는 $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 로 유지하였다. 대조군은 세포최적 성장온도인 30℃에서 야생형 *Synechocystis sp.* PCC6803을 사용하였고 실험군은 적응을 위해 24℃에서 연속적으로 계대환 세포를 사용하였다. 또한 쿨터카운터(Multisizer 3, Beckman Coulter, USA)를 이용하여 수득한 세포크기, 개수, 농도 데이터를 통해 세포성장을 측정하였고 페놀 황산법(phenol-sulfuric method)을 이용하여 탄수화물을 측정하였으며 지방산은 동결건조시킨 세포를 에스테르교환반응(transesterification)을 이용하여 측정하였다. 지방산을 5%(v/v) 염화아세틸(acetyl chloride)을 포함한 메탄올에서 80℃, 1시간 조건으로 추출한 뒤, FID(Flame Ionization Detector)가 장착된 가스 크로마토그래피(model YL6500GC, 영린기기)를 이용하여 분석하였다. 이때 컬럼은 두께 0.2 µm, 내부직경 0.25 µm, 길이가 30 mm인 capillary column(HP-INNOWAX)을 사용하였고 운반기체는 헬륨을 사용하였다. 실험조건은 운반속도, 8 mL/min; 초기온도, 140℃; 초기정체시간, 2 min; 승온속도, 4℃/min; 최종온도, 240℃의 오픈 분석조건으로 약 35분간 분석을 진행하였다.

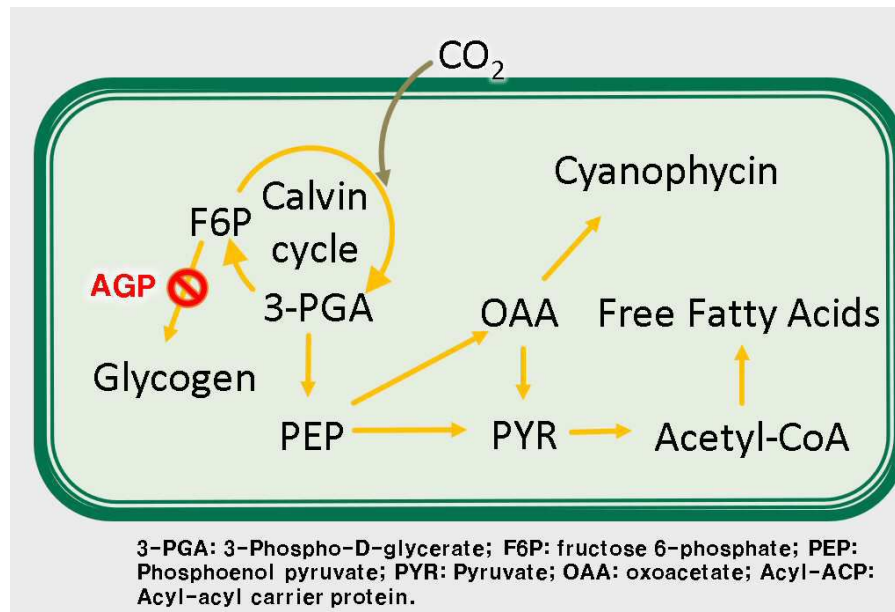
[0032] 그 결과 실험군과 대조군의 세포성장 양상은 비슷하게 나타났다(도 4). 따라서 글리코젠을 합성하는 유전자의 녹아웃(knockout)은 지속적인 광조건 하에서 세포 성장에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났고 정체기에서 질소결핍 스트레스를 가한 결과 실험군의 탄수화물 함량 감소와 함께 지방 함량이 24% 증가한 것을 확인하였다(도 5).

[0033] 결론적으로, 본 발명의 AGP(ADP-glucose pyrophosphorylase) 유전자 녹아웃을 이용한 형질전환 남조류 지방산 함량 증대 방법은 시네코시스티스의 당 합성으로 이동하는 경로를 차단하는 AGP 유전자의 형질전환 시스템을 통하여 탄수화물 함량 감소와 함께 지방산 함량이 증가한 것을 확인하였으므로 바이오연료의 전구체인 지방산 생산을 증대시키는데 유용하게 이용될 수 있다.

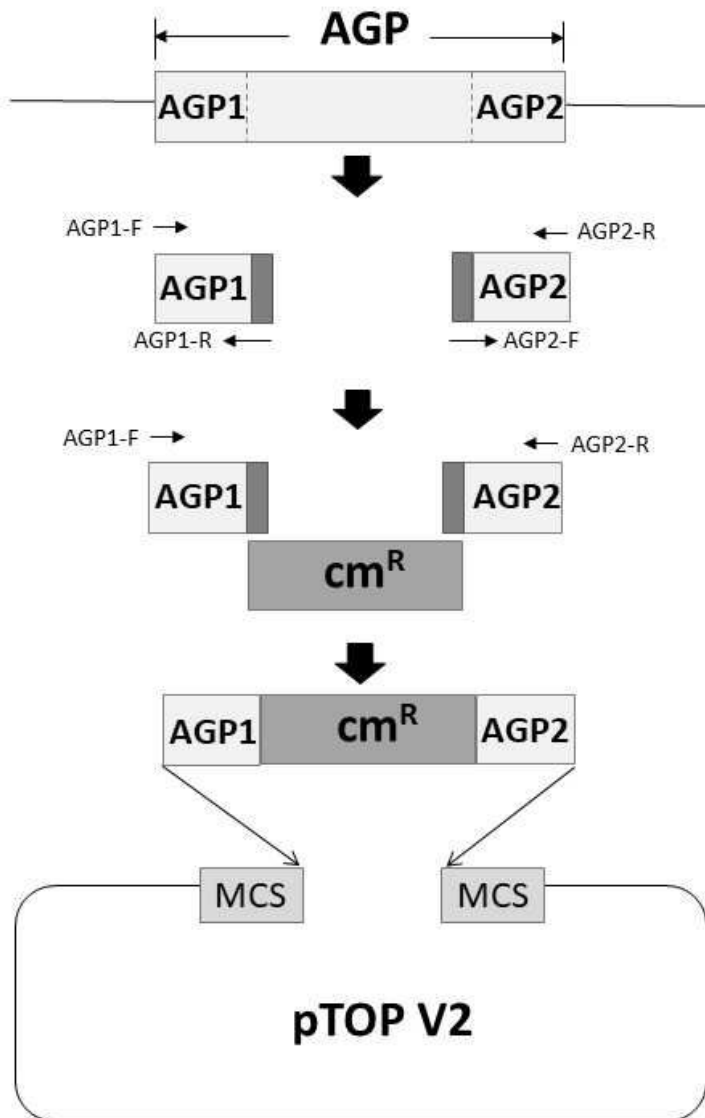
[0034] 본 발명은 상술한 실시예 및 실험예를 참고로 설명되었으나 이는 예시적인 것에 불과하며, 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 균등한 다른 실시예 및 실험예가 가능하다는 점을 이해할 것이다. 따라서 본 발명의 진정한 기술적 보호 범위는 첨부된 특허청구범위의 기술적 사상에 의하여 정해져야 할 것이다.

도면

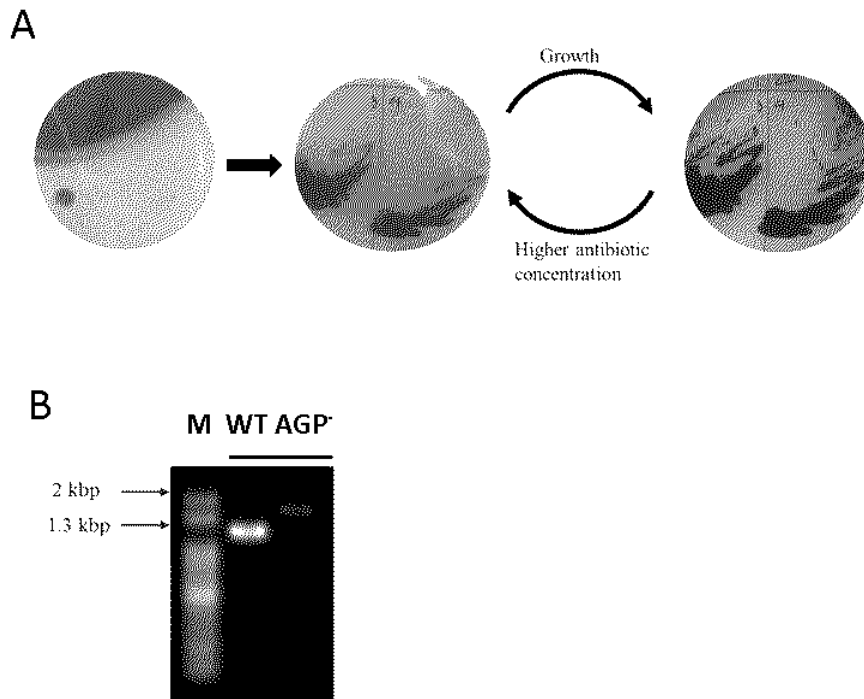
도면1



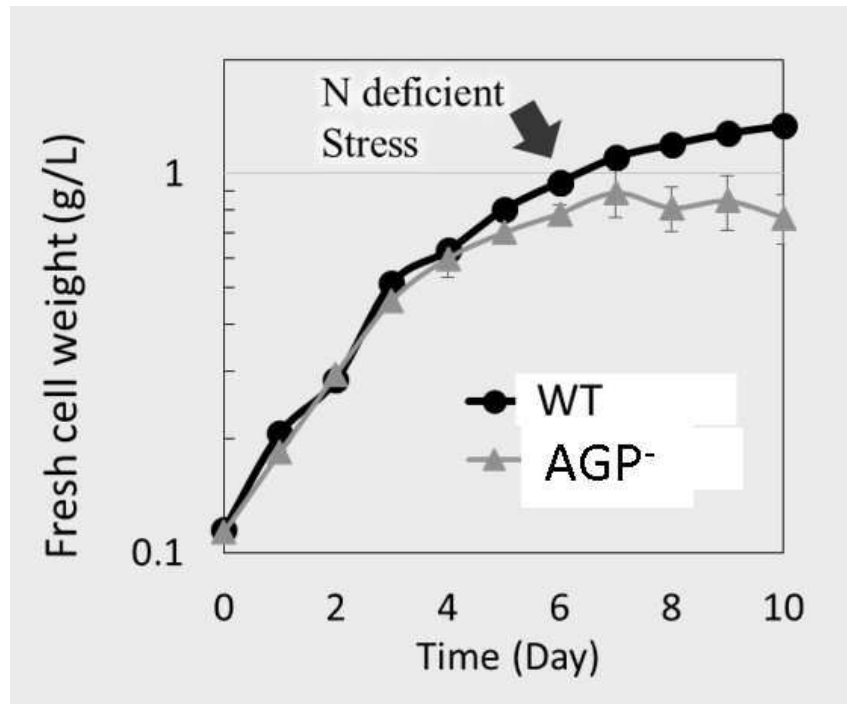
도면2



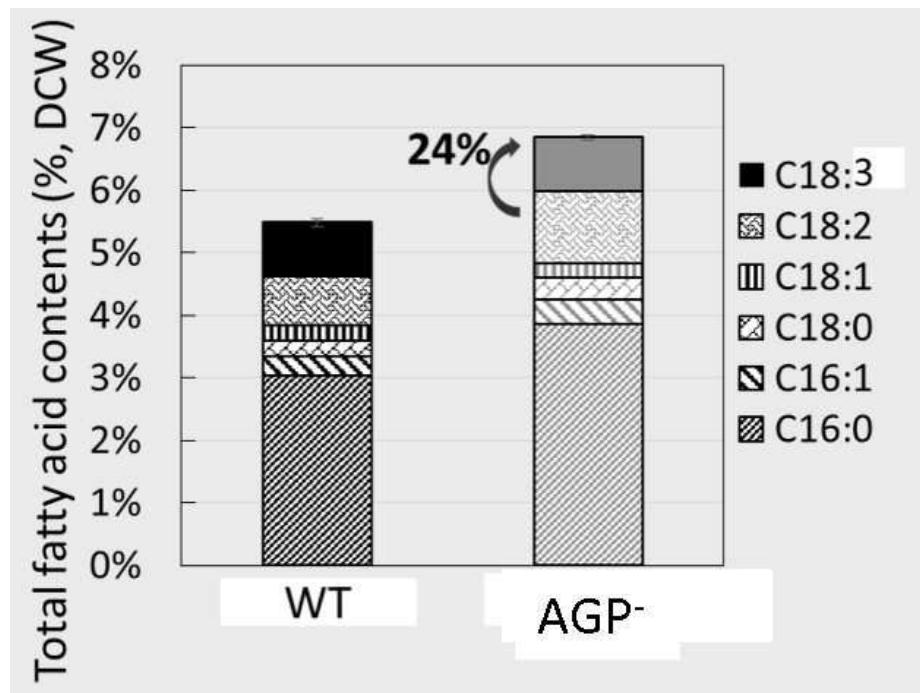
도면3



도면4



도면5



서열 목록

- <110> INHA-INDUSTRY PARTNERSHIP INSTITUTE
- <120> A method for improving fatty acid contents of cyanobacteria using knock-out
- <130> PD18-5716
- <160> 6
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 300
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> ADP-glucose pyrophosphorylase
- <400> 1

Met Asp Tyr Ala Gln Phe Val Lys Arg His Arg Glu Thr Asn Ala Asp

1 5 10 15

Ile Thr Leu Ser Val Val Pro Val Asp Asp Arg Lys Ala Pro Glu Leu

20 25 30

Gly Leu Met Lys Ile Asp Ala Gln Gly Arg Ile Thr Asp Phe Ser Glu

35 40 45

Lys Pro Gln Gly Glu Ala Leu Arg Ala Met Gln Val Asp Thr Ser Val
 50 55 60
 Leu Gly Leu Ser Ala Glu Lys Ala Lys Leu Asn Pro Tyr Ile Ala Ser
 65 70 75 80
 Met Gly Ile Tyr Val Phe Lys Lys Glu Val Leu His Asn Leu Leu Glu
 85 90 95

 Lys Tyr Glu Gly Ala Thr Asp Phe Gly Lys Glu Ile Ile Pro Asp Ser
 100 105 110
 Ala Ser Asp His Asn Leu Gln Ala Tyr Leu Phe Asp Asp Tyr Trp Glu
 115 120 125
 Asp Ile Gly Thr Ile Glu Ala Phe Tyr Glu Ala Asn Leu Ala Leu Thr
 130 135 140
 Lys Gln Pro Ser Pro Asp Phe Ser Phe Tyr Asn Glu Lys Ala Pro Ile
 145 150 155 160
 Tyr Thr Arg Gly Arg Tyr Leu Pro Pro Thr Lys Met Leu Asn Ser Thr

 165 170 175
 Val Thr Glu Ser Met Ile Gly Glu Gly Cys Met Ile Lys Gln Cys Arg
 180 185 190
 Ile His His Ser Val Leu Gly Ile Arg Ser Arg Ile Glu Ser Asp Cys
 195 200 205
 Thr Ile Glu Asp Thr Leu Val Met Gly Asn Asp Phe Tyr Glu Ser Ser
 210 215 220
 Ser Glu Arg Asp Thr Leu Lys Ala Arg Gly Glu Ile Ala Ala Gly Ile
 225 230 235 240

 Gly Ser Gly Thr Thr Ile Arg Arg Ala Ile Ile Asp Lys Asn Ala Arg
 245 250 255
 Ile Gly Lys Asn Val Met Ile Val Asn Lys Glu Asn Val Gln Glu Ala
 260 265 270
 Asn Arg Glu Glu Leu Gly Phe Tyr Ile Arg Asn Gly Ile Val Val Val
 275 280 285
 Ile Lys Asn Val Thr Ile Ala Asp Gly Thr Val Ile
 290 295 300

<210> 2
<211> 1320
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AGP nucleotide

<400> 2

gtgtgtgtgtt ggcaatcgag aggtctgctt gtgaaacgtg tcttagcgat tatcctgggc 60
ggtaggggccc ggacccgcct ctatccttta accaaactca gagccaaacc cgcagttccc 120
ttggccggaa agtaccgctt catcgatatt cccgtcagta attgcatcaa ctcagaaatc 180
gttaaaattt acgtccttac ccagtttaat tccgcctccc ttaaccgtca catcagccgg 240
gcctataatt ttcccgctt ccaagaagga ttgtggaag tctcgcgcgc ccaacaaacc 300
aaagataatc ctgattgggtt tcagggcact gctgatgcgg tacggcaata cctctggttg 360

tttagggaat gggacgtaga tgaatatctt attctgtccg gcgaccatct ctaccgcatg 420
gattacgccc aatttgtaa aagacaccgg gaaaccaatg ccgacataac cctttccgtt 480
gtgccgtgg atgacagaaa ggcacccgag ctgggcttaa tgaaaatcga cgcccagggc 540
agaattactg acttttctga aaagccccag ggggaagccc tccgggcat gcaggtggac 600
accagcggtt tgggcctaag tgcggagaag gctaagctta atccttacat tgcctccatg 660
ggcatttacg ttttcaagaa ggaagtattg cacaacctcc tggaaaaata tgaaggggca 720
acggactttg gcaaagaaat cattcctgat tcagccagtg atcacaatct gcaagcctat 780

ctctttgatg actattggga agacattggt accattgaag ccttctatga ggctaattta 840
gccctgacca aacaacctag tcccgacttt agtttttata acgaaaaagc ccccatctat 900
accaggggtc gttatcttcc cccacaaaa atgttgaatt ccaccgtgac ggaatccatg 960
atcggggaag gttgcatgat taagcaatgt cgcattccacc actcagtttt aggcattcgc 1020
agtcgcatg aatctgattg caccattgag gatactttgg tgatgggcaa tgatttctac 1080
gaatcttcat cagaacgaga caccctcaaa gccccggggg aaattgccgc tggcataggt 1140
tccggcacca ctatccgccg agccatcatc gacaaaaatg cccgcatcgg caaaaacgtc 1200

atgattgtca acaaggaaaa tgtccaggag gctaacgggg aagagttagg tttttacatc 1260
cgcaatggca tcgtagtagt gattaaaaat gtcacgatcg ccgacggcac ggtaatctag 1320
1320

<210> 3
<211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> AGP1-F
 <400> 3
 cccctcgggtt ctaaacttga 20
 <210> 4
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> AGP1-R

 <400> 4
 catagcgctc aatcagcgta gggttatgtc ggcattggt 39
 <210> 5
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> AGP2-F
 <400> 5
 aatagccatc gagtcagtc acaaacaacc tagtcccgac ttt 43
 <210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> AGP2-R
 <400> 6
 gctatggtgc gaggaagaa 20