

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2013-0001664 (43) 공개일자 2013년01월04일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 15/01 (2006.01) C12N 1/12 (2006.01) A01H 13/00 (2006.01) A01H 1/06 (2006.01)		(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울 성북구 안암동5가 1
(21) 출원번호 10-2011-0097608	(22) 출원일자 2011년09월27일 심사청구일자 2011년09월27일	(72) 발명자 심상준 서울특별시 강남구 선릉로 221, 301동 803호 (도곡동, 도곡렉슬아파트)
(30) 우선권주장 1020110062497 2011년06월27일 대한민국(KR)		홍민희 서울특별시 성북구 안암로 145, 창의관 615호 (안암동5가, 고려대학교)
		곽호석 서울특별시 중랑구 검재로29길 27, 아남리치카운티 아파트 102동 1004호 (면목동)
		(74) 대리인 특허법인충현

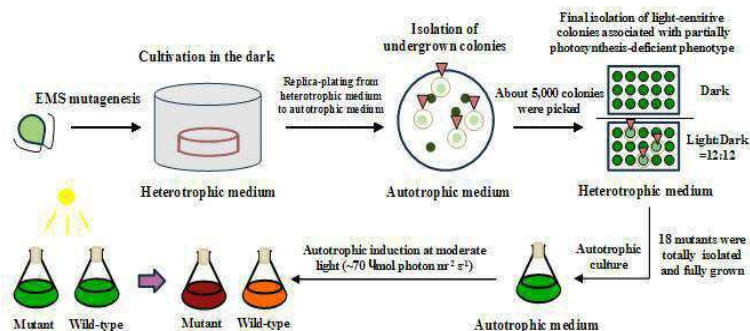
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 광민감성 증가로 인한 아스타잔틴 생산력이 향상된 고휘유발 헤마토코쿠스 돌연변이체 및 이의 선별방법

(57) 요약

본 발명은 아스타잔틴의 생산성이 향상된 헤마토코쿠스 플루비알리스(Haematococcus pluvialis) 돌연변이체 PPM 160(KCTC18218P)에 관한 것으로서, 본 발명에 따른 헤마토코쿠스 돌연변이 세포는 부분적 광합성 결핍에 따른 광민감성의 증가와 이로 인한 아스타잔틴 합성 능력이 우수하여, 이 세포를 옥외배양의 자가영양조건에서의 광유발에 활용한다면 보다 경제적인 아스타잔틴의 생산성을 기대할 수 있고, 아스타잔틴은 강력한 항산화 물질로서 의학, 식품학 등의 산업분야에서 다양하게 활용할 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2011K000102
부처명	한국생명공학연구원
연구사업명	이산화탄소저감및처리기술개발사업
연구과제명	이산화탄소 저감을 위한 고효율 미세조류 배양공정 개발
주관기관	고려대학교 산학협력단
연구기간	2011.04.01 ~ 2012.03.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	20100029728
부처명	한국연구재단
연구사업명	(원천)글로벌프론티어
연구과제명	에탄올 생산을 위한 미세조류의 수확 및 전처리 기술 개발
주관기관	고려대학교 산학협력단
연구기간	2010.10.22 ~ 2011.08.21

특허청구의 범위

청구항 1

아스타잔틴의 생산성이 향상된 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*) 돌연변이체 PPM 160. (KCTC18218P)

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 PPM 160은 PS II 광계의 50-80%의 부분적 결핍에 의해서 광유발 능력이 향상되어 아스타잔틴의 생산성이 향상된 것을 특징으로 하는 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*) 돌연변이체 PPM 160. (KCTC18218P)

청구항 3

(a) 헤마토코쿠스 플루비알리스를 에틸메탄설포네이트로 화학적 돌연변이시키고 암조건으로 고체유기영양배지에서 생육시키는 단계;

(b) 상기 생육시킨 돌연변이 균체 중에서 정상적인 균체를 고체자가영양배지에 replica-planting 방법으로 옮긴 후에 생육이 불충분한 균체로부터 광민감성이 증가한 돌연변이체를 선별하는 단계;

(c) 상기 선별된 돌연변이체를 생장시킨 후, 광유발 시험을 수행하여 광유발 능력이 향상된 돌연변이체를 재차 선별하는 단계;를 포함하는 아스타잔틴의 생산성이 향상된 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*) 돌연변이체의 생산방법.

청구항 4

제 3 항에 있어서,

상기 (c) 단계는 자가영양배지에서 $70 \text{ } \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 광조건으로 20-25 °C에서 광유발 시험을 수행한 것을 특징으로 하는 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*) 돌연변이체의 생산방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 아스타잔틴 생산력이 향상된 고평유발 헤마토코쿠스 돌연변이체에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 돌연변이에 의한 광합성의 부분적 결함과, 이로 인하여 광민감성이 증가하여 아스타잔틴의 생산성이 향상된 헤마토코쿠스 돌연변이체 및 이를 선별하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 적색을 띄는 케토카로티노이드(Ketocarotenoid)인 아스타잔틴(Astaxanthin, 3,3'-dihydroxy- β , β '-carotene-4,4'-dione)은 베타-카로틴(β -carotene)과 같은 화학적 구조를 가진 카로티노이드계 색소의 일종으로, 유해 활성산소를 없애는 항산화 기능성 물질로 베타-카로틴에 비해 양쪽 말단기에 하이드록실기(-OH)와 케톤기(=O)를 하나씩 더 가지는 독특한 분자 구조적 특성 때문에 기존의 항산화 물질보다 월등히 높은 항산화 활성을 갖는다.

[0003] 아스타잔틴은 대표적인 항산화제인 비타민 E보다 500배, 베타-카로틴보다 20배 정도 높은 항산화 활성을 지닌다. 이러한 높은 항산화 활성기능으로 인해 아스타잔틴은 의약품, 식품 첨가제 및 동물과 치어의 사료 첨가제로 널리 사용되고 있고, 그 수요량 및 활용 범위가 급격히 확대될 것으로 예상되고 있다.

[0004] 이러한 아스타잔틴은 효모 균주인 파피아 로드지마(*Phaffia rhodozyma*)와 버비박테리아(*Brevibacterium*)에서 생성되며, 또한, 해양 동물과 담수 동물에 많이 분포되어 있지만, 새우나 가재 등의 갑각류에서 추출된 아스타잔틴은 함량이 적고, 추출 과정이 어려워 적용되지 않고 있으며, 파피아 로드지마 균주는 성장률이 높으나 아스타잔틴의 생산성이 적고, 단단한 세포벽 때문에 추출에도 많은 어려움이 있다.

- [0005] 미세조류인 헤마토코쿠스 플루비알리스(Haematococcus pluvialis)는 지구상에서 아스타잔틴의 축적량과 수율 측면에서 가장 우수하며, 특히 이 균주로부터 빛에 의한 이산화탄소의 고정화와 동시에 아스타잔틴의 생산성을 높이기 위한 다양한 연구가 수행되고 있다.
- [0006] 일반적으로 자가영양조건에서 아스타잔틴의 생산을 위한 헤마토코쿠스 플루비알리스의 유일한 유발원은 바로 강력한 빛이다. 하지만 자가영양조건에서 이들의 빛에 의한 유발시 아스타잔틴의 축적량은 높아질 수 있지만, 목표함량에 도달하기까지 상당히 많은 시간이 소요된다는 단점이 있다. 특히, 태양을 활용한 옥외배양시에는 태양이란 광원이 빛의 세기가 일정하지 않고, 연속적이지 않기 때문에 이러한 문제는 더욱 심각해진다.
- [0007] 따라서, 가장 우수한 아스타잔틴 축적 능력을 보유한 헤마토코쿠스 플루비알리스를 산업적으로 이용하기 위해서는 이산화탄소를 활용한 자가영양 조건에서 아스타잔틴의 느린 생산성 문제를 해결하는 것이 시급히 필요한 실정이다.
- [0008] 선행특허로서, 특허출원 제2002-0027551호에서는 파피아 로도지마를 돌연변이시켜 카로티노이드의 생산성을 모균주보다 약 2 배 이상 향상시키고, 이러한 변이주를 깻잎추출액과 함께 배양함으로써 카로티노이드 생산성을 더욱 향상시키는 기술에 대해 개시되어 있고, 특허출원 제2001-0028382호에서는 대체 옥시다제 저해제에 대한 내성의 변화에 의해 아스타잔틴 생산성이 향상된 파피아 로도지마 변이주에 대해 개시되어 있으며, 등록특허 제 0191671호에서는 파피아 로도지마를 돌연변이시켜 카로티노이드 생산성을 모균주보다 약 2 배 이상 향상시키고 또한 대사경로 저해제의 존재하에 효모를 배양함으로써 생산성을 향상시키는 기술에 대해서 개시되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 따라서, 본 발명이 해결하고자 하는 첫 번째 과제는 자가영양조건에서 유발하되 옥외 배양시보다 우수한 헤마토코쿠스 세포의 유발능력을 확보하기 위하여, 광합성의 부분적 결함에 따른 광민감성의 증가로 인하여 적은 광량에서도 보다 효과적으로 아스타잔틴을 합성할 수 있는 고휘발 돌연변이 세포를 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명이 해결하고자 하는 두 번째 과제는 광합성의 부분적 결함에 따른 광민감성의 증가로 인하여 적은 광량에서도 보다 효과적으로 아스타잔틴을 합성할 수 있는 고휘발 돌연변이 세포를 선별하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 본 발명은 상기 첫 번째 과제를 달성하기 위하여,
- [0012] 아스타잔틴의 생산성이 향상된 헤마토코쿠스 플루비알리스(Haematococcus pluvialis) 돌연변이체 PPM 160(KCTC18218P)을 제공한다.
- [0013] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 PPM 160은 PS II 광계의 50-80%의 부분적 결핍에 의해서 광유발 능력이 향상되어 아스타잔틴의 생산성이 향상된 것을 특징으로 한다.
- [0014] 본 발명은 상기 두 번째 과제를 달성하기 위하여,
- [0015] (a) 헤마토코쿠스 플루비알리스를 에틸메탄설포네이트로 화학적 돌연변이시키고 암조건으로 고체유기영양배지에서 생육시키는 단계;
- [0016] (b) 상기 생육시킨 돌연변이 균체 중에서 정상적인 균체를 고체자가영양배지에 replica-planting 방법으로 옮긴 후에 생육이 불충분한 균체로부터 광민감성이 증가한 돌연변이체를 선별하는 단계;
- [0017] (c) 상기 선별된 돌연변이체를 생장시킨 후, 광유발 시험을 수행하여 광유발 능력이 향상된 돌연변이체를 재차 선별하는 단계;를 포함하는 아스타잔틴의 생산성이 향상된 헤마토코쿠스 플루비알리스(Haematococcus pluvialis) 돌연변이체 PPM 160(KCTC18218P)의 생산방법을 제공한다.
- [0018] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 (c) 단계는 자가영양배지에서 $70 \text{ } \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 광조건으로 20-25 °C 에서 광유발 시험을 수행할 수 있다.

발명의 효과

[0019] 본 발명에 따른 헤마토코쿠스 돌연변이 세포는 부분적 광합성 결핍에 따른 광민감성의 증가와 이로 인한 아스타잔틴 합성 능력이 우수하여, 이 세포를 옥외배양의 자가영양조건에서의 광유발에 활용한다면 보다 경제적인 아스타잔틴의 생산성을 기대할 수 있고, 아스타잔틴은 강력한 항산화 물질로서 의학, 식품학 등의 산업분야에서 다양하게 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 고광유발 (Highly photosensitive) 헤마토코쿠스 돌연변이체를 선별하는 전체적인 과정을 도식화한 개략도이다.

도 2a 내지 도 2b는 자가영양조건에서 야생세포와 돌연변이세포 PPM 160의 성장특성(Cell density, Cell number)을 나타내는 그래프이다.

도 3은 자가영양조건에서 야생세포와 돌연변이세포 PPM 160의 성장과정 중 형태학적 변화를 나타낸 광학현미경 이미지이다.

도 4a 내지 도 4b는 자가영양조건에서 야생세포와 돌연변이세포 PPM 160의 성장과정 중 엽록소함량, 카로티노이드/엽록소 비율 및 배지 안에 첨가되었던 질소원의 소모율을 나타내는 그래프이다.

도 5a 내지 도 5b는 자가영양조건에서 야생세포와 돌연변이세포 PPM 160의 광화학적 특성을 분석한 그래프이다.

도 6는 자가영양조건에서 야생세포와 돌연변이세포 PPM 160의 광유발시 성장특성을 실험한 것이다.

도 7a 내지 도 7b는 자가영양조건에서 야생세포와 돌연변이세포 PPM 160의 광유발시 아스타잔틴 축적능력을 보여주는 그래프이다.

도 8은 자가영양조건에서 야생세포와 돌연변이세포 PPM 160의 $150 \text{ } \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 조건에서 광유발시 6 일째의 형태학적 변화를 관찰한 광학현미경 이미지이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0022] 본 발명은 고감도 광유발 능력에 의한 아스타잔틴 생산 능력이 증대한 헤마토코쿠스 플루비알리스 돌연변이체를 제공한다.

[0023] 본 발명은 우수한 아스타잔틴 축적능력을 보유한 헤마토코쿠스 플루비알리스의 이산화탄소를 활용한 자가영양조건에서의 아스타잔틴 합성시 발생하는 느린 생산성 문제를 거시적 공정적 관점이 아닌 미시적 관점에서 균주자체 PS II(photosystem II) 광계의 부분적 결핍에 의한 고감도 광유발 능력으로 극복하였다.

[0024] 결과적으로, PS II(photosystem II) 광계의 부분적 결핍에 의한 고감도 광유발 능력의 유도는 야생세포대비 활성산소(ROS: Reactive oxygen species) 발생 및 공급의 가속화와 동시에 잔여 질소원에 의한 광유발 저해 현상을 극복하게 함으로서 자가영양조건에서 헤마토코쿠스 플루비알리스의 광유발에 의한 아스타잔틴 생산성이 크게 증대하였으며, 보다 낮은 광유발 조건에서 그 효과의 차이가 극명함을 알 수 있었다.

[0025] 특히, 본 발명은 헤마토코쿠스 플루비알리스를 통한 이산화탄소의 고정화와 동시에 고농도의 아스타잔틴을 생산하기 위한 자가영양 배양 시스템의 구축과 산업화를 하는 데 있어 가장 핵심적인 요소들 중의 하나인 광원의 선정, 그 중에서도 옥외 배양시 활용되는 태양의 활용가치의 극대화시킨 것이다.

[0026] 결과적으로 옥외배양에서 광유발시 충분한 양의 광원이 확보되지 않는 지역에서 아스타잔틴을 생산함에 있어서 본 발명에 따른 헤마토코쿠스 플루비알리스 돌연변이체를 활용할 수 있다.

[0027] 또한, 본 발명은 자가영양조건에서의 헤마토코쿠스 세포의 낮은 아스타잔틴 생산성을 극복하기 위하여 균주자체의 돌연변이를 통한 광유발 능력의 증대로 인한 아스타잔틴의 생합성 능력의 향상을 도모한 것을 특징으로 한다.

[0028] 본 발명은 EMS(Ethyl methansulphonate)에 의해 돌연변이된 균체들을 암조건으로 고체유기영양배지(heterotrophic medium)에서 생육하게 한 후, 정상적으로 생육한 세포들을 고체자가영양배지(autotrophic medium)에 replica-plating 기법을 활용하여 옮긴 후, undergrown한 돌연변이 균체들로부터 광민감성이 증가한

돌연변이체들을 1차 선별하는 것을 특징으로 한다.

[0029] 본 발명은 다음으로 고체자가영양배지(autotrophic medium)에서 undergrown한 돌연변이 균체들로부터 액체유기 영양배지(heterotrophic medium)에서 생육시 보다 빛에 민감한 돌연변이체의 연속적 선별을 통하여 부분적 광합 능력의 저해로 인한 광민감성이 증가한 돌연변이체의 2차 선별하는 것을 특징으로 한다.

[0030] 본 발명은 부분적 광합성능력의 저해로 인한 광민감성이 증가한 돌연변이체들로부터 자가영양배지 (autotrophic medium)와 보다 광유발실험을 moderate light조건($70 \text{ umol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)에서 수행함으로써 보다 낮은 광조건에서 유발능력이 우수한 돌연변이체의 3차 선별하는 것을 특징으로 한다.

[0031] 이에 따라 본 발명에서 최종 선별한 PPM 160 돌연변이체는 PS II시스템의 부분적 결함으로 인하여 야생세포보다 세포내 활성산소의 발생 및 공급이 가속화되었으며, 헤마토크스 세포의 자가영양조건에서 광유발에 의한 아스타잔틴 생산시 낮은 광조건에서도 보다 효과적임을 확인할 수 있었다.

[0032] 이하, 바람직한 실시예를 들어 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이에 의하여 제한되지 않는다는 것은 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 자명할 것이다.

[0033] <실시예>

[0034] 본 발명에 사용된 균주는 Haematococcus pluvialis NIES-144로서 National Institute for Environmental Studies, Tsukuba, Japan으로부터 구입되었다. 본 실험에 사용된 배지의 종류는 모두 3가지로서 NIES-C, NIES 그리고 NIES-N 배지이고, 이들의 구성성분을 하기 [표 1]에 나타내었다.

[0035] NIES-C 배지: autotrophic medium (자가영양배지, 목적: 생장)

[0036] NIES 배지: heterotrophic medium (유기영양배지, 목적: 생장)

[0037] NIES-N 배지: autotrophic medium (자가영양배지, 목적: 광유발)

[0038] CO₂ supply : 3%(v/v)

[0039] 광조건 : $20 \text{ umol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (for vegetative growth); $70 \text{ umol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (for inductive growth); $150 \text{ umol photo m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (for inductive growth)

표 1

[0040]

NIES-C		NIES-N	
성분	함량(/L)	성분	함량(/L)
Ca(NO ₃) ₂	0.15 g	CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.13 g
KNO ₃	0.10 g	KCl	0.07 g
Na ₂ Glycerophosphate · 5H ₂ O	0.05 g	Na ₂ Glycerophosphate · 5H ₂ O	0.05 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.04 g	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.04 g
Tris-aminomethane	0.05 g	Tris-aminomethane	0.05 g
Thiamine	0.01 mg	Thiamine	0.01 mg
Biotin	0.10 μg	Biotin	0.10 μg
Vitamin B12	0.01 μg	Vitamin B12	0.01 μg

PIV metal solution (per liter)	3 ml	PIV metal solution (per liter)	3 ml
Na ₂ EDTA 1 g		Na ₂ EDTA 1 g	
FeCl ₃ · 6H ₂ O 0.196 g		FeCl ₃ · 6H ₂ O 0.196 g	
MnCl ₂ · 4H ₂ O 0.036 g		MnCl ₂ · 4H ₂ O 0.036 g	
ZnSO ₄ · 7H ₂ O 0.022 g		ZnSO ₄ · 7H ₂ O 0.022 g	
CoCl ₂ · 6H ₂ O 4 mg		CoCl ₂ · 6H ₂ O 4 mg	
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O 2.5 mg		Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O 2.5 mg	

- [0041] 실시예 1.
- [0042] *Haematococcus pluvialis*(NIES-144) 야생 세포를 $20 \text{ umol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 세기의 빛을 12시간:12시간 광주기 조건으로 23 °C에서 생육시켰다. 세포배양이 late-exponential 단계에 접어들면 세포배양액 ($0.5 \times 10^6 \text{ cells ml}^{-1}$)을 취하여 멸균된 증류수로 washing한 후 0.2%(v/w) of EMS (Ethyl methansulphonate)로 30 °C에서 1시간 동안 배양시킨다. 이때 EMS 화학적 돌연변이처리 후 세포의 생존률은 대략 30%였다.
- [0043] 화학적 돌연변이 기법으로 처리된 균체들을 멸균된 증류수로 washing한 후 고체 NIES 배지(10 mM sodium acetate 함유) 위에 200-500 cells/plate로 도말하고 암조건에서 생육시켰다.
- [0044] 한 달 후 자란 콜로니들을 NIES-C 배지 (10 mM sodium acetate 비함유)에 replica-plating시킨 후 3%(v/v) CO₂의 연속적인 공급과 12시간:12시간 광주기 조건으로, $20 \text{ umol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 의 광조건으로 23 °C에서 생육시켰다.
- [0045] 한 달 후 replica-plating에 의해 NIES-C 배지에서 undergrown하게 자란 돌연변이체들로부터 96 well microplate를 활용하여 유기영양조건에서 배양시 광조건에서 암조건보다 상대적으로 생육이 지연되는 경향을 보이는 균주들을 선별하였다.
- [0046] 다음으로, 선별된 돌연변이체들을 NIES-C 배지에서 생장시킨 다음 NIES-N 유발배지에서 3%(v/v) CO₂의 연속적인 공급과 연속적인 $70 \text{ umol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 의 광조건으로 23 °C에서 유발시험을 수행하였다. 이러한 선별방법에 따라 최종적으로 선별된 PPM 160 돌연변이체가 가장 우수한 광유발 능력을 보여주었다.
- [0047] 본 발명에 따라 선별한 돌연변이체를 PPM 160이라 명명하고, 2011년 8월 31일자로 한국생명공학연구원 미생물자원센터에 기탁번호 KCTC18218P, 미생물의 명칭 *Haematococcus pluvialis* NIES-144로 기탁하였다.
- [0048] 실험예 1. 야생 세포와 돌연변이 세포 PPM 160의 자가영양 조건에서의 영양 생장(vegetative growth) 능력 비교
- [0049] PPM 160 돌연변이 세포의 광민감성 때문에 야생 세포와 PPM 160은 암조건에서 유기탄소원을 함유한 NIES 배지에서 생육하였다. 대수기에 이른 각각 세포배양액($\text{OD}_{680} = \sim 0.5$)의 10%(v/v) 정도를 취하여 자가영양 조건에서 비교하였다.
- [0050] 하기 도 2에서 보는 바와 같이, 자가영양 배양 과정에서 PPM 160 돌연변이 세포의 세포수는 20-22% 감소한 반면(하기 도 2a), 세포농도는 오히려 28-30% 증가하였다(하기 도 2b). 이는 도 3에서 보는 바와 같이 vegetative growth는 감소하였지만 encystment의 진행으로 inductive growth가 증가하였기 때문이다. 즉, 세포수에서는 감소현상을 보였지만, 단위세포 당 세포 크기 및 질량은 증가하였음을 알 수 있다. 일부의 세포들은 붉은색의 아스타잔틴을 부분적으로 축적한 것도 확인되었다. 이러한 현상의 원인은 PS II 광계의 부분적 손실로 인한 광저해에 의해 전자전달(linear electron transport)의 감소에 따른 이산화탄소 고정화 능력의 감소와 세포내부에서 발생한 활성산소의 증가에 따른 것이다.
- [0051] 실험예 2. 야생 세포와 돌연변이 세포 PPM 160의 자가영양 조건에서의 색소형성 변화 비교
- [0052] 자가영양 배양과정 동안 세포 내부의 색소의 변화 추이를 측정하였다. 하기 도 4a에서 보이는 바와 같이 PPM

160 돌연변이 세포의 경우 배양 6 일째를 기점으로 점점 엽록소가 줄어들었다. 이는 야생세포의 헤마토코쿠스 플루비알리스의 세포낭 형성(encystment)과정 중 발생하는 일반적인 현상이다.

[0053] 또한, 야생 세포는 성장하는 동안 일정한 카로티노이드/엽록소 비율을 유지한 반면 PPM 160 돌연변이 세포는 역시 6 일째를 기점으로 감소하였다. 결과적으로 카로티노이드/엽록소 비율을 배양 12 일째 PPM 160 돌연변이 세포가 야생세포에 비해 175% 정도 증가하였다.

[0054] 실험예 3. 야생 세포와 돌연변이 세포 PPM 160의 자가영양 조건에서의 질소원 감소를 비교

[0055] 부분적으로 제한된 이산화탄소 고정화 능력은 PPM 160 돌연변이 세포의 질소원 고정화 능력을 일부 감퇴시켰다. 도 4b에서 보이는 바와 같이 PPM 160 돌연변이세포의 경우 대략 0.4 mM 정도의 질소원이 배양 10 일째 남아있었다. 자가영양조건에서 배양과정 중 완전히 소모되지 않은 잉여 질소원에 의한 유발 저해현상은 전체적인 유발과정을 오래 걸리게 하고, 비효율적으로 만들었다. 하지만, 잔여질소원은 PPM 160 돌연변이 세포의 유발능력을 감퇴시키지 않았다. 이것은 부분적 PS II 광계의 결손에 따른 광민감성이 이러한 잔여 질소원에 따른 광유발 저해현상 문제를 극복하는데 매우 효과적임을 의미하는 것이다.

[0056] 실험예 4. 야생 세포와 돌연변이 세포 PPM 160의 광화학적 특성 비교

[0057] 광화학적 분석을 위해 자가영양 배양조건에서 4 일간 자란 야생 세포와 PPM 160 돌연변이 세포를 사용하였다. 이러한 조건에서 PPM 160 돌연변이 세포는 green flagellate 상태를 유지하였기 때문이다. 도 5a에서 보는 바와 같이, PPM 160의 실제적 PS II 광계 효율은 50-80% 감소하였으며, 돌연변이 세포의 광민감성은 PS II 광계 효율의 감소와 연관이 있음을 알 수 있다.

[0058] 하지만, 77 K에서의 엽록소 방출 스펙트럼을 통하여 그러한 PS II 광계의 변형은 돌연변이에 의한 PS II 안테나 크기의 변형과는 상관없음을 알 수 있다.(하기 도 5b)

[0059] 실험예 5. 야생 세포와 돌연변이 세포 PPM 160의 자가영양 조건에서의 Inductive growth 능력 및 아스타잔틴 생산성 비교

[0060] 자가영양 조건에서의 아스타잔틴 생산능력에 광민감성의 증대가 미친 영향을 관찰하기 위하여 자가영양 조건에서 자란 야생 세포와 돌연변이 세포 PPM 160를 두 종류의 광에서(강도, $70 \text{ umol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, $150 \text{ umol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)에서 유발시켰다.

[0061] 하기 도 6 및 도 7에서 보는 바와 같이, 돌연변이 세포 PPM 160의 inductive growth 능력과 아스타잔틴 축적률은 야생 세포에 비해 증가하였다. 도 8은 $150 \text{ umol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 의 광조건에서 유발 시 6 일째 세포들의 형태학적 변화를 현미경으로 관찰한 것이다. 결과적으로 PPM 160의 광 강도 $150 \text{ umol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 과 $70 \text{ umol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 에서 최고 아스타잔틴 함량 및 최고 아스타잔틴 농도는 야생세포대비 115%, 132% 그리고 236%, 246%로 각각 증가하였다.(하기 표 2). 이러한 광민감성에 의한 증가한 유발능력은 활성산소의 양적 증가에 따른 것이다.

표 2

[0062]

구분	광($150 \text{ umol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)		광($70 \text{ umol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	
	최대 아스타잔틴 함량	최대 아스타잔틴 농도	최대 아스타잔틴 함량	최대 아스타잔틴 농도
야생 세포	56.9	98.6	18.3	30.7
PPM 160	65.4	130.8	43.3	75.7

수탁번호

[0063]

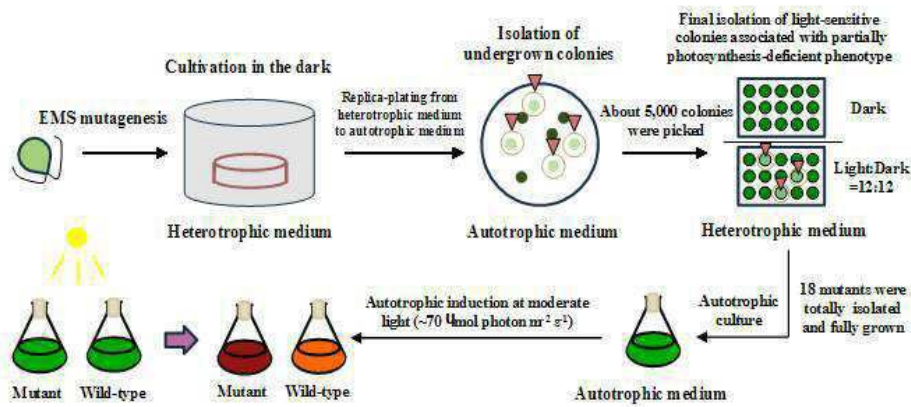
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC18218P

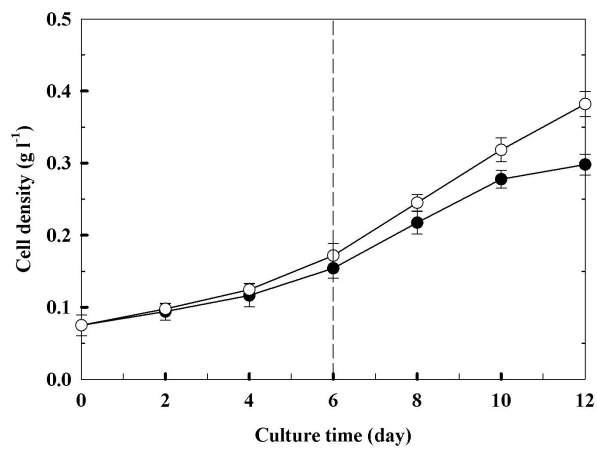
수탁일자 : 20110831

도면

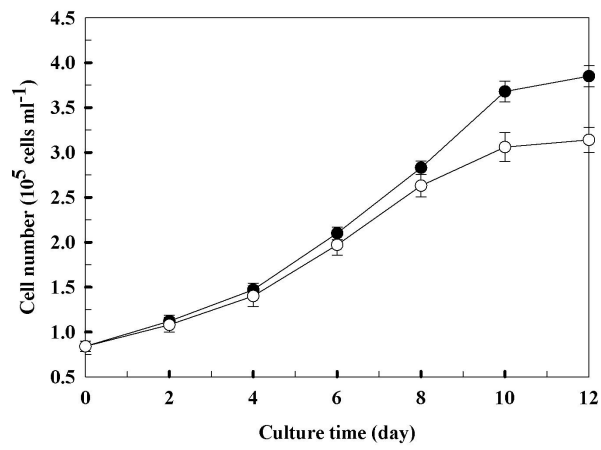
도면1



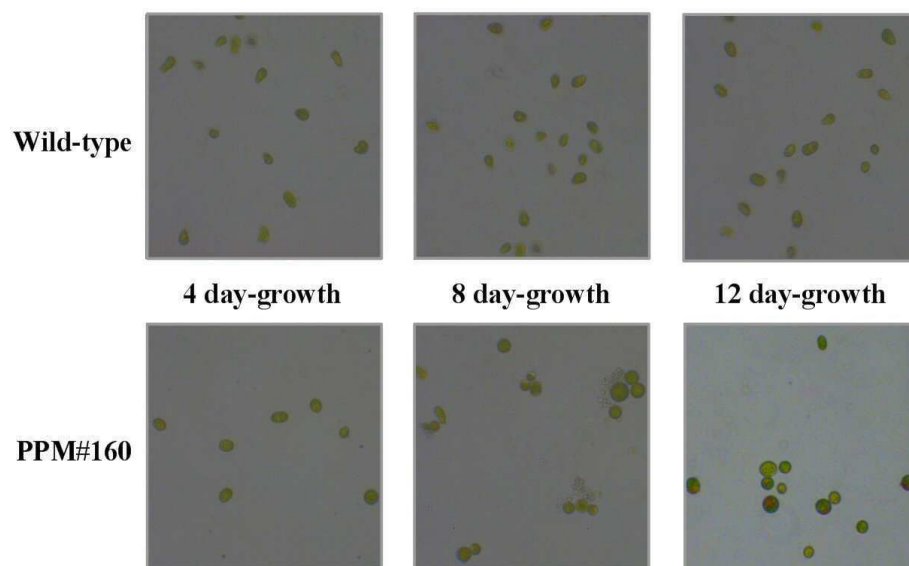
도면2a



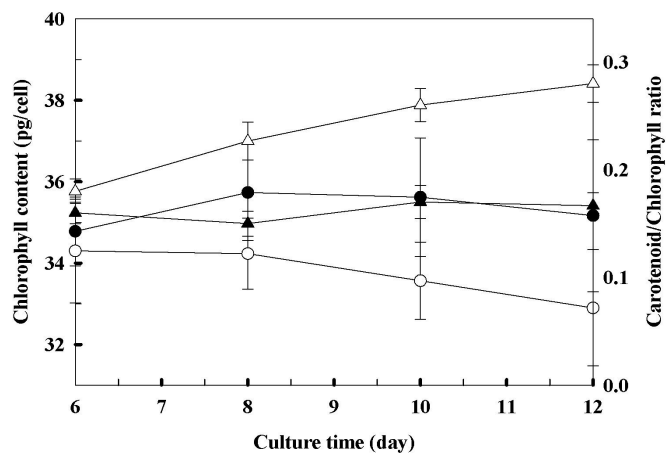
도면2b



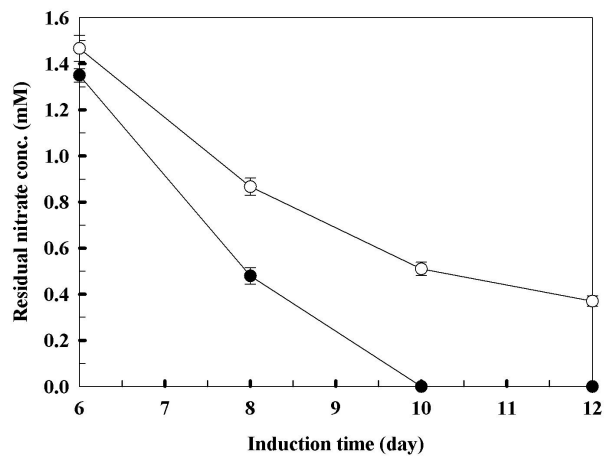
도면3



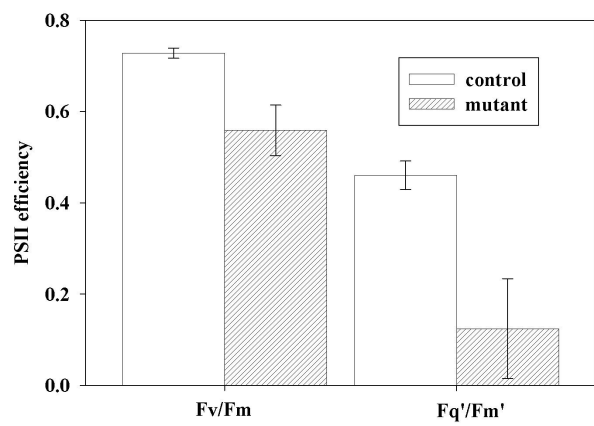
도면4a



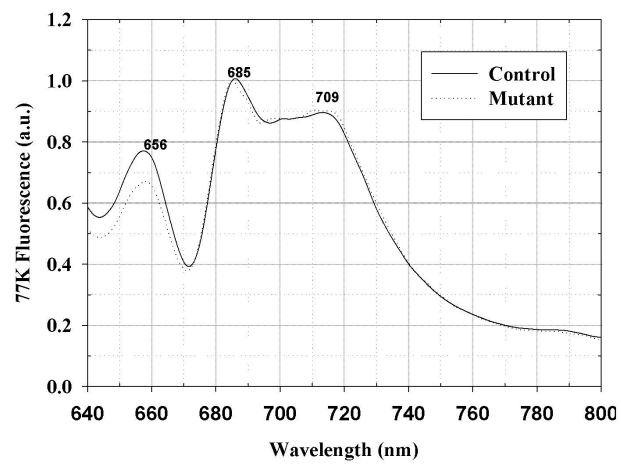
도면4b



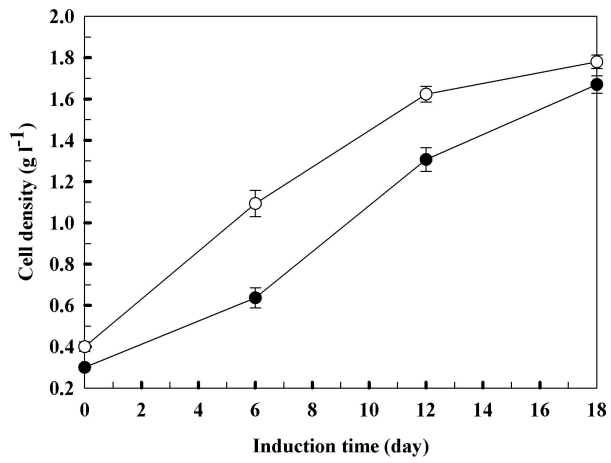
도면5a



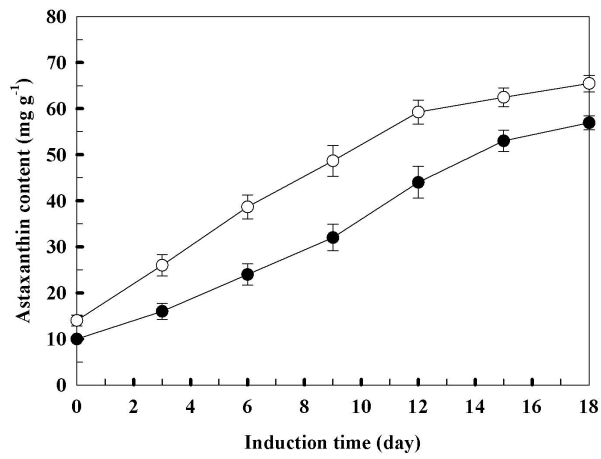
도면5b



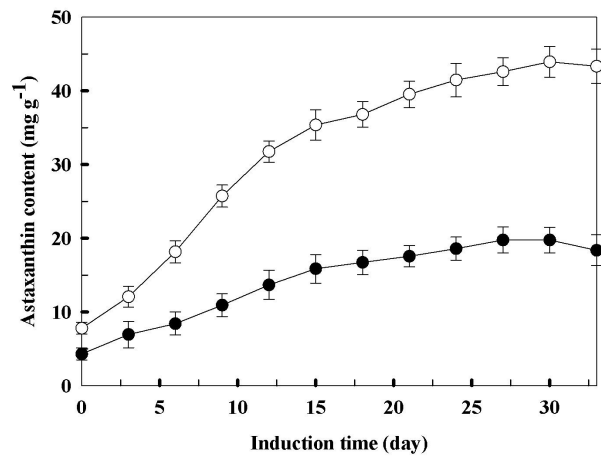
도면6



도면7a

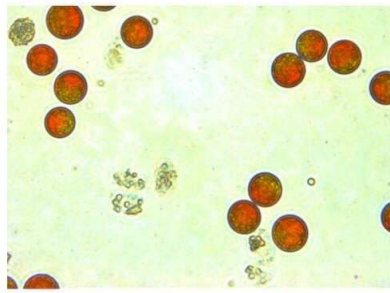


도면7b



도면8

Wild-type



6 day-induction

PPM#160

