

발간등록번호

11-1543000-000656-01

**진균 인산가수분해효소(phytase) 발현  
가축사료용 미세조류와 식물 개발 및 산업화**  
(Development and industrialization of transgenic  
microalgae and plants expressing fungal phytase  
for feeding animal)

배재대학교

농림축산식품부

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “진균 인산가수분해효소(phytase) 발현 가축사료용 미세조류와 식물 개발 및 산업화에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2014년 11월 21일

주관연구기관명 : 배재대학교

주관연구책임자 : 최창원

세부연구책임자 : 최창원

연 구 원 : 김세창

연 구 원 : 오성

연 구 원 : 김성대

협동연구기관명 : 제주대학교

협동연구책임자 : 고석민

협동연구기관명 : 제주대학교

협동연구책임자 : 정동기

협동연구기관명 : (주)글로벌 씨앤비

협동연구책임자 : 안근훈

# 요 약 문

## I. 제 목

진균 피타아제(인산가수분해효소; phytase) 발현 가축사료용 미세조류와 식물 개발 및 산업화에 관한 연구

## II. 연구개발의 목적

- (1) 아스퍼스니둘란스의 내열성 • 내산성 피타아제 유전자 발현 미세조류 및 식물 생산
- (2) 피타아제 유전자 발현 미세조류 및 식물의 사료화
- (3) 형질전환 생물의 동물 실험 안전성 및 인분해 효율과 사료가치 검증
- (4) 단위가축종에 따른 적절한 사료첨가 수준 및 제형 개발 및 안정성 검증 모델 설정
- (5) 대량 생산용 제형 펠렛 및 효소 코팅 제형 틀 제작 및 최적 조건 확립

## III. 연구개발 내용 및 범위

- (1) 아스퍼질러스 니둘란스의 피타아제 유전자 클로닝, 대장균내 발현, 재조합단백질(rPhy-E) 분리정제 및 다클론항체 생산
- (2) 아스퍼질러스 니둘란스의 피타아제 유전자 클로닝, 식물 내 발현 및 재조합단백질(rPhy-P)의 효소활성 및 특성 규명
- (3) 광종속영양 조건에서 클로렐라의 성장 및 바이오매스 증대를 위한 개량된 배지 조성 개발
- (4) 아스퍼질러스 니둘란스의 피타아제 유전자의 미세조류 내 발현 및 재조합단백질(rPhy-C)의 효소활성 및 특성 규명
- (5) 형질전환 클로렐라 불가리스의 아스퍼질러스 니둘란스 피타아제 활성을 증가시키기 위한 기질첨가 배지 개발
- (6) 활성 피타아제를 안정적으로 생산하는 부평초 개발
- (7) 피타아제 유전자 도입미세조류 및 식물의 유용성 및 안전성을 위한 동물실험 모델 개발
- (8) 미세조류 및 식물체 사료 첨가제 사료 제형 연구

## IV. 연구개발결과

- (1-1) 아스퍼질러스 니둘란스의 피타아제 유전자 PCR합성 및 재조합 발현벡터에 도입
- (1-2) 재조합 발현벡터를 대장균에 형질전환한 후 형질전환 콜로니 선별
- (1-3) 재조합단백질(rPhy-E) IPTG 유도 발현 및 분리정제
- (1-4) 재조합단백질(rPhy-E)에 대한 항체 생산 및 검정
- (2-1) 아스퍼질러스 니둘란스의 피타아제 유전자 PCR합성 및 서플벡터 구축
- (2-2) 서플벡터로부터 유전자발현카세트를 절단하여 식물발현벡터 내로 클로닝
- (2-3) 식물발현벡터를 아그로박테리아에 형질전환한 후 형질전환 콜로니 선별
- (2-4) *Nicotiana benthamiana*에 agroinfiltration 및 피타아제 유전자 식물발현 검정(RT-PCR 및 Real-time RT-PCR)
- (2-5) 재조합단백질(rPhy-P) 식물합성 검정 및 특성 규명(당화)
- (2-6) rPhy-P의 피타아제 효소활성, 최적 pH, 최적 온도, 열안정성 및 기질 특이성 분석
- (3-1) 클로렐라 불가리스 배양을 위한 배지조성, 배양조건, 성장곡선 및 성장률 분석
- (3-2) 탄소원 및 질소원, 농도 결정
- (3-3) 탄소원+질소원 혼합비율 결정, 바이오매스 및 생화학적 구성분 분석
- (3-4) 미세조류 공생균 리조비움의 셀룰레이즈 활성을 이용하여 미강의 셀룰로오스 분해 및 이를 이용한 미세조류 대량배양 대체 탄소원 기질 생산

- (4-1) 아스퍼질러스 니들란스의 피타아제 유전자 함유 유전자발현카세트를 절단하여 미세조류 발현벡터 내로 클로닝
- (4-2) 클로렐라 불가리스 형질전환을 위한 전기천공법 조건 확립 및 하이그로마이신 농도 결정
- (4-3) 클로렐라 불가리스 형질전환 균주 선발 및 배양
- (4-4) 피타아제 유전자 클로렐라 발현 검정(PCR, RT-PCR 및 Real-time RT-PCR)
- (4-5) 재조합단백질(rPhy-C) 클로렐라 합성 검정 및 특성 규명
- (4-6) rPhy-C의 피타아제 효소활성, 최적 pH, 최적 온도, 열안정성 분석
- (4-7) 형질전환 피타아제 동물실험
  
- (5-1) rPhy-C의 피타아제 효소활성 증진을 위한 배지 조성
- (5-2) 9 종류 기질과 농도에 따른 성장곡선 분석
- (5-3) 9 종류 기질과 농도가 첨가된 배지에서 성장한 형질전환 클로렐라의 피타아제 활성 측정
  
- (6-1) 재분화 효율이 높은 부평초 라인의 확보: 종 분류 및 선발(캘러스 형성능)
- (6-2) 부평초 형질전환
  - ① 효율적인 형질전환체 선발을 위한 제조제와 항생제 처리농도의 결정
  - ② 부평초 핵 형질전환용 벡터제작 및 형질전환
  - ③ 형질전환 부평초의 검정(서던블롯 분석)
  - ④ 부평초의 엽록체 형질전환용 벡터제작
  - ⑤ 형질전환(엽상체 후면 유전자총 분사 및 캘러스에 직접 유전자총 분사)
  - ⑥ 캘러스 재분화 유도 및 도입유전자의 유무 PCR 검정
- (6-3) 형질전환 부평초 라인에서의 피타아제 효소활성 및 최적 온도 결정
- (6-4) 형질전환 부평초 대량증식
  
- (7-1) 생체의 기능성 평가
  - ① 줄기세포 배양을 통한 역가 및 후성유전학적 변화: ICR 마우스 뼈속 골수세포로부터 분리한 중간엽줄기세포를 이용하여 피타아제의 세포활성 효과
  - ② 사료 첨가제를 처리한 생쥐의 뼈에서의 인 성분의 변화
  - ③ 상업용 재조합 피타아제 사료 첨가제를 이용한 육계 성장도 검증
- (7-2) 형질전환 피타아제 부평초를 이용한 동물실험: 마우스
  - ① 사료 처리구 및 양 결정
  - ② 각 사료의 미네랄 분석
  - ③ 인 이용성 및 성장률 분석
  - ④ 형질전환 피타아제 부평초의 사료로서의 안전성 검증: 간, 근육, 내장이 DNA를 PCR 검증
  - ⑤ 사료 처리구 마우스의 미네랄 성분구성 분석
- (7-3) 형질전환 phytase 부평초를 이용한 동물실험: 육계
  - ① 사료 처리구 및 양 결정
  - ② 각 사료 처리구의 성장률 및 뼈 인 함유량 분석
  - ③ 형질전환 피타아제 부평초의 사료로서의 안전성 검증: 간 DNA를 PCR 검증
  - ④ 사료 처리구 육계의 골 미네랄 성분 분석
  - ⑤ 각 사료 처리구 육계의 분변내 인 함유량 분석
  - ⑥ 체중 증가와 각 사료 구성분의 효과 시뮬레이션 삼차원 그래프 모델링
- (7-4) 형질전환 피타아제 부평초를 이용한 동물실험: 산란계
  - ① 사료 처리구 및 양 결정
  - ② 각 사료 처리구의 산란계의 계란 집란 및 난중, 난각, 호유니트 측정
  - ③ 각 사료 처리구 산란계의 경골 미네랄(P, Ca, Mg, Zn) 함유량 분석
  - ④ 각 사료 처리구 산란계의 체중 분석

- ⑤ 각 사료 처리구 산란계의 분변내 미네랄(P, Ca, Mg, Zn) 함유량 분석
- ⑥ 각 사료 처리구 산란계에 있어서 총사료소비량 경향

- (8-1) 피타아제 발현 형질전환 클로렐라 총단백질의 사료제형
- (8-2) 피타아제 발현 형질전환 부평초의 사료제형
- (8-3) 비가열 방식 개발을 위한 효소액 코팅 기술 도입
- (8-4) 펠렛의 투수율과 수분 저항을 분석
- (8-5) 위내 용해도 실험

## V. 연구성과 및 성과활용 계획

### (1) 성과

- ① 핵심기술 1건의 기술이전
- ② 국내출원 3건
- ③ SCI 학술지 논문게재 3건
- ④ 국제 컨퍼런스 최우수논문발표 수상 1건
- ⑤ 홍보 1건

### (2) 향후 성과

- ① 특허출원 0건
- ② SCI 학술지 논문게재 4건/ 비SCI 논문 3건

### (3) 활용 계획

- ① 핵심기술의 기업체 기술이전
- ② 개발된 항체, 발현벡터시스템 관련 국내 연구자에게 공급
- ③ 클로렐라 및 부평초의 사료첨가 효과에 의한 사료학적 영양을 최종 검토하여 토종사료원 활용
- ④ 기존 코팅 기술을 개조하여 맞춤형 코팅 기술 개발

# SUMMARY

## (영문요약문)

### I. R&D Title

Development and industrialization of transgenic microalgae and plants expressing fungal phytase for feeding animal

### II. R&D Purpose

- (1) Production of transgenic microalgae and plants expressing *Aspergillus nidulans* phytase with thermostability and acid-resistance
- (2) Transgenic microalgae and plants, expressing fungal phytase for animal feeding supplements
- (3) Experimental animals trial with transformed microalgae and plants to determine safety, release phosphate from phytate and feeding quality
- (4) Determination of the optimal amounts of feeding supplements for monogastric animal species, the formulation of shape and the establishment of safety model
- (5) Manufacturing template for pellet shape and enzyme coating for the mass-production and the determination of its optimal condition

### III. R&D Approach and Direction

- (1) *A. nidulans phy* gene cloning, its expression in *Escherichia coli*, purification of recombinant protein(rPhy-E), and production of polyclonal antibody against rPhy-E
- (2) *A. nidulans phy* gene cloning, its expression in *Nicotiana benthamiana*, characterization of the recombinant protein Phy(rPhy-P) and determination of phytase activity of rPhy-P
- (3) Growth of *Chlorella vulgaris* under photoheterotrophic culture and effect of modified BG-11 medium on the increase of *C. vulgaris* biomass
- (4) *A. nidulans phy* gene cloning, its expression in *C. vulgaris*, characterization of the recombinant protein Phy(rPhy-C) and determination of phytase activity of rPhy-C
- (5) Substrates supplementation into a growth medium for the increase phytase activity of transformed *C. vulgaris* cells
- (6) Production of transgenic duckweed expressing functionally active phytase of *A. nidulans*
- (7) Modeling of experimental animals using *C. vulgaris* and duckweed expressed *phy* gene for their safety and availability
- (8) Formulation of manufacturing shape with transformed microalgae and plants as feeding additives

### IV. R&D Methods & Results

- (1-1) PCR synthesis of *A. nidulans phy* gene and cloning into a bacterial expression vector
- (1-2) *E. coli* transformation with a recombinant expression vector and selection of transformed colonies
- (1-3) IPTG induction of rPhy-E and its purification
- (1-4) Production of antibody against rPhy-E and assay of its cross-reaction with antigen
  
- (2-1) PCR synthesis of *A. nidulans phy* gene and construction of a shuttle vector
- (2-2) Digest a gene expression cassette containing *phy* gene from the shuttle vector and cloning into a plant expression vector
- (2-3) Transformation of a recombinant expression vector into *Agrobacterium* and selection of transformed colonies

- (2-4) Agroinfiltration into *Nicotiana benthamiana* and determination of *phy* gene in agroinfiltrated plants by RT-PCR and Real-time RT-PCR
- (2-5) Determination of a recombinant protein rPhy-P in agroinfiltrated plants by Western blot analysis and its characterization(glycosylation)
- (2-6) Determination of a phytase activity of rPhy-P, its optimal pH, optimal temperature, thermostability and substrate specificity
  
- (3-1) Analysis of medium composition, culture condition, growth curve and growth rate for *C. vulgaris* culture
- (3-2) Carbon and nitrogen sources and their concentration
- (3-3) Effect of carbon and nitrogen mixture ratio on *C. vulgaris* growth and analysis of biomass and biochemical constituents under given condition
- (3-4) Degradation of cellulose from rice bran using cellulase producing microalgae symbiotic *Rhizobium* sp. and production of alternative carbon source for microalgae mass culture
  
- (4-1) Digestion of gene expression cassette containing *A. nidulans phy* gene and its cloning into microalgae expression vector
- (4-2) Establishment of electroporation condition and hygromycin concentration for *C. vulgaris* transformation
- (4-3) Selection of transformed cells and their culture
- (4-4) Analysis of *phy* gene expression in transformed *C. vulgaris* by PCR, RT-PCR and Real-time RT-PCR
- (4-5) Determination of a recombinant protein rPhy-C in transformed *C. vulgaris* by Western blot analysis and its characterization
- (4-6) Determination of a phytase activity of rPhy-C, its optimal pH, optimal temperature and thermostability
- (4-7) Analysis of experimental animals administered with rPhy-C
  
- (5-1) Modified medium composition to increase phytase activity of rPhy-C
- (5-2) Effect of substrates supplemented into BG-11GH medium on the growth of transformed *C. vulgaris*
- (5-3) Determination of a phytase activity in transformed *C. vulgaris* grown on BG-11GH medium supplemented with various substrates
  
- (6-1) Collection of duckweed lines with highly efficient regeneration rate: classification of species and their selection by callus forming ability
- (6-2) Duckweed transformation
  - ① Determination of herbicide and antibiotic concentration, respectively, for the efficient selection of transformants
  - ② Vector construction for nuclear transformation of duckweed and transformation
  - ③ Analysis of transformed duckweed by Southern blot hybridization
  - ④ Vector construction for chloroplast transformation of duckweed
  - ⑤ Transformation by particle bombardment into thallus and callus
  - ⑥ Induction of callus regeneration and PCR analysis for the presence of transgene
- (6-3) Determination of a phytase activity in transformed duckweed lines and the optimal temperature for the enzyme activity
- (6-4) Mass production of transformed duckweed plants

(7-1) In vitro assay of phytase function

- ① Effect of the phytase on mouse mesenchymal cells during in vitro culture with phytase
- ② Concentration of phosphorus in mouse bone with or without supplemental phytase
- ③ Growth effect of the broiler chick with phytase contained feed during feeding period

(7-2) Experimental animal trial with transgenic duckweed plants: Mouse

- ① Experimental matrix for the mouse growth using transgenic plant expressed *phy* gene
- ② Comparison of mineral components among treatment group in the feeding supplement
- ③ Sampling matrix in mouse for the phosphorous component analysis and growth of mouse after feeding treatment with *phy* gene expressed plant
- ④ Safety confirmation of mouse by the genetic contamination PCR analysis from *phy* gene expressed plant
- ⑤ Mineral components of individual animal for the major mineral

(7-3) Experimental animal trial with transgenic duckweed plants: Broiler chicken

- ① Formulation and composition of the experimental feed ingredient diets for 0 to 28 day-old broiler chickens
- ② Growth of broiler after treatment feeding with *phy* gene expressed plant and effect of phytase supplementation on the performance of broiler chicks
- ③ PCR analysis of liver for *phy* gene from broiler chicken
- ④ Effect of phytase supplementation on bone mineralization in broilers
- ⑤ Effect of phytase and non-phytase supplementation on the broiler growth performance and phosphorus concentration in the feces samples
- ⑥ 3D-surface plot for weight gain and the influence of the factors ingredient formulated for the broiler feed

(7-4) Experimental animal trial with transgenic duckweed plants: Layer chicken

- ① Formulation and composition of the experimental feeds including the detail of ingredients used during the preparation of feeds for layer chickens
- ② Pattern of relative increase in egg weights, shell thickness and Whole unit of the treatment groups over the period of study
- ③ Comparison of overall mean levels of minerals among the phytase and non-phytase supplemented groups in tibia of laying hens
- ④ Pattern of relative increase in body weights of the treatment groups over the period of study
- ⑤ Comparison of overall mean levels of minerals excreted in feces of laying hens among the phytase and non-phytase supplemented groups
- ⑥ Trends observed for the FCR in the treatment groups during the period of study

(8-1) Animal feeding formulation of phytase-expressed *Chlorella* total protein

(8-2) Animal feeding formulation of phytase-expressed duckweed plants

(8-3) Pellet formular morphology of plant feeding by nano coating technology and enzyme + amylase coating

(8-4) Analysis for the moisture permeability after solidating of pellet formular

(8-5) Experiment pellet melting in stomach

## V. Significance & Application

### (1) Achievement

- ① Transfer of the technical know-how for the platform technology: 1
- ② Domestic patent application : 3
- ③ Publication of SCI-indexed journal papers: 3



- ④ Best session paper award in International Conference: 1
- ⑤ Publicity: 1
- (2) Predicted post-project achievement
  - ① Domestic patent application : 0
  - ② Publication of SCI-indexed journal papers: 4 / non-SCI-indexed journal papers: 3
- (3) Application plan
  - ① Transfer of the technical know-how for the platform technology
  - ② Distribution of antibody and expression vector system to domestic researcher who has an interest
  - ③ Industrialization of Chlorella and duckweed as animal feeding resources
  - ④ Improved coating technology for animal feed resources

# CONTENTS

## (영 문 목 차)

Chapter 1. R&D concept...	p12
Chapter 2. Progress in international and domestic R&D...	p14
Chapter 3. R&D results and discussion...	p17
Chapter 4. Accomplishment of R&D plan and contribution to related science community...	p101
Chapter 5. R&D achievement and its application...	p104
Chapter 6. International collection of scientific information during R&D...	p108
Chapter 7. R&D facilities and equipment...	p112
Chapter 8. Cited references...	p113

## 목 차

- 제 1 장 연구개발과제의 개요 ... 12 쪽
- 제 2 장 국내외 기술개발 현황 ... 14 쪽
- 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 ... 17 쪽
- 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 ... 101 쪽
- 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 ... 104 쪽
- 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 ... 108 쪽
- 제 7 장 연구시설·장비 현황 ... 112 쪽
- 제 8 장 참고문헌 ... 113 쪽

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 1. 연구개발의 목적

가. 연구개발의 최종목표

- (1) 아스퍼질러스 니둘란스(*Aspergillus nidulans*)의 내열성 • 내산성 피타아제(phytase) 유전자 발현 미세조류 및 식물 생산
- (2) 피타아제 유전자 발현 미세조류 및 식물의 사료화
- (3) 형질전환 생물의 동물 실험 안전성 및 인분해 효율과 사료가치 검증
- (4) 단위가축종에 따른 적절한 사료첨가 수준 및 제형 개발 및 안정성 검증 모델 설정
- (5) 대량 생산용 제형 펠렛 및 효소 코팅 제형 틀 제작 및 최적 조건 확립

나. 과제별(세부 · 협동) 연구개발의 목표

(세부1) 활성 피타아제를 안정적으로 생산하는 미세조류 개발

- ① 아스퍼질러스 니둘란스의 내열성 • 내산성 피타아제 유전자 발현 미세조류 생산
- ② 피타아제가 안정적으로 고발현 되는 형질전환 미세조류 선발 및 대량증식
- ③ 형질전환 미세조류에서 발현된 피타아제의 내산성, 내열성 등 효소 안정성 검정

(협동1) 활성 피타아제를 안정적으로 생산하는 부평초 개발

- ① 효율적인 부평초 도입용 피타아제 발현벡터 제작
- ② 피타아제가 안정적으로 고발현 되는 형질전환 부평초 라인 선발 및 대량증식
- ③ 형질전환 부평초에서 발현된 피타아제 효소활성 검정
- ④ 형질전환 부평초에서 발현된 피타아제 내산성, 내열성 등 효소 안정성 검정
- ⑤ 형질전환 부평초에서 피타아제 유전자 및 효소의 후대 안정성 검정

(협동2) 피타아제 유전자 도입 미세조류 • 식물의 유용성 및 안전성을 위한 동물실험 모델 개발

- ① 사료가치 작물로서의 유용성 판정을 위한 동물 사양실험 모델 및 최적의 안정성 검증
- ② 인분해 효율 측정 및 사양실험을 통한 가축 생산성 검증과 환경친화적 사료 첨가제 개발

(협동3) 진균 피타아제 발현 가축사료용 미세조류 및 식물의 산업화

- ① 미세조류 및 식물체 사료 첨가제 사료 제형 연구
- ② 동물 내 용해 및 사료 배분을 조정에 의한 최적의 경제성 분석
- ③ 대량 생산용 제형 펠렛 및 효소 코팅 제형 틀 제작 및 최적 조건 확립

## 2. 연구개발의 필요성 및 범위

가. 주요 사료작물 수급 및 가격 동향

(1) 사료작물 생산현황

- ① 미국 농무성 자료에 따르면 2011-2012년 옥수수, 수수, 보리, 호밀 및 귀리 등의 세계적 생산량은 11억 5천만 톤으로 이중에 6억 6천 3백만 톤이 사료로 활용되었음(총생산량의 57%)
- ② 미국의 경우 2012년 밀 총생산량(6억 9천 5백만 톤; 출처: Robert Couse-Baker)의 21%가 사료로 사용되었음
- ③ 최근 빈번하게 발생하는 세계적 기후변동으로 인한 생산량 감소로 인해 2013년 세계적 곡물 공급 부족 초래

④ 이로 인한 애그플레이션(Agflation)은 세계 각국의 식량, 식료품과 사료 등의 가격 상승을 연계적으로 촉발시켜 당시 세계 경제에 인플레이션 압력을 고조시킨 바 있음

(2) 글로벌 곡물가격 동향.

- ① 최근 바이오에너지 원료용으로서 작물 생산이 증가하면서 지속적으로 수입 곡물가격 상승
- ② 곡물 가격이 상승함에 따라서 축산농가는 비싼 가격에 사료를 구입해야 하고, 그나마 물량 확보의 어려움으로 인해 이중고에 시달리고 있으며 이로 인해 축산소득 감소함
- ③ 축산농가의 경영 개선을 위해서 생삼비가 적게 들면서 수량성이 높은 대체 사료작물 개발이 필요함

나. 피타아제의 필요성

- ① 최근에 축산폐수로 인한 환경 및 수질오염문제는 상수도원뿐만이 아니라, 청정 해역인 연안까지 오염의 수위를 높여가고 있는 현실임
- ② 오염원 가운데 특히 인은 동물에 필수적인 영양소이지만, 곡물사료에 존재하는 인의 대부분은 가축이 이용할 수 없는 형태로 존재하므로, 대부분의 인이 배설되어 환경오염의 주원인이 되기 때문에 고가의 무기인을 사료에 첨가하고 있는 실정임
- ③ 피타아제는 피트산(phytic acid) 및 피트산염(phytate) 형태의 무기인을 분해하는 효소로, 단위동물의 사료에 첨가하면, 가축의 인 흡수율을 높일 뿐 아니라 배설되는 인의 함량도 줄이게 되어 환경보호의 이점이 있음
- ④ 식물 유래 식품에 분포된 피트산은 인간에게도 미네랄 감소와 부족을 야기함
- ⑤ 피트산염은 불용성 미네랄과 혼합하여 인간의 장에 흡수가 되지 않으므로 영양결핍을 야기할 뿐만 아니라 곡물의 생산량 및 성분의 질에 영향을 미침
- ⑥ 위와 같은 문제를 해결하기 위해 국제적으로 피트산염을 분해할 수 있는 효소에 관심이 고조됨

다. 피타아제 시장 동향

- ① 현재 효소 세계시장은 24억불 규모로 추정되며 이중 테크니컬 효소(technical enzyme) 분야는 12억불, 식품 첨가제분야는 8억 달러, 동물 사료 분야는 2억 달러에 이르는 것으로 추산됨
- ② 특히 동물사료 첨가분야의 피타아제는 5억 달러(국내는 약 120-150억원/년)의 경제적 가치가 있는 것으로 알려져 있고, 국제적으로 그 가치는 매년 5% 정도씩 증가함
- ③ 미국의 경우 돼지사료로는 5127만 7600톤을, 닭의 사료용으로는 4528만9000톤이 생산되기 때문에 의무적으로 피타아제를 첨가할 경우 시장규모가 상당할 것으로 예상됨
- ④ 세계시장규모가 아직 정확히 조사된 바는 없으나, 유럽의 일부 국가와 미국의 일부 주에서는 현재 피타아제를 첨가하지 않은 사료에 한해서는 판매를 규제하는 등 각국의 환경규제가 강화되고 있어 피타아제의 시장이 상당히 확대될 것으로 전망함
- ⑤ 총액 2조 7000억 원에 해당하는 국내 총사료 시장환경을 고려할 때 상용화가 될 경우 국내 수요량도 클 것으로 전망함

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 1. 피타아제 개발 동향

#### 가. 미생물 유래 피타아제

- ① 피타아제는 원래 네덜란드에서 인을 감소시키기 위한 농업용 목적으로 사용함
- ② 피타아제 효소 분리 및 특성에 대한 연구는 주로 세균, 효모, 진균 유래 효소를 중심으로 1990년대 후반에 연구가 활발히 이루어짐
- ③ 1991년 처음으로 상용화한 후 주로 사료작물로부터 인의 이용성/소화성을 증진시키기 위해 사용되고 있음
- ④ 초기에는 주로 진균 유래 피타아제를 활용하였으나 최근에는 세균 유래 피타아제 및 개량 피타아제로 확대됨
- ⑤ 신제품은 기존제품과 비교하여 단위 유닛(U) 당 인의 방출 활성이 우수하므로 사료의 피트산염을 효과적으로 분해할 수 있음
- ⑥ 대량생산을 위한 시스템 구축에 관한 연구로서는 미생물의 경우 대장균, 바실러스, 캔디다(*Candida*), 효모 및 아스퍼질러스에 대하여 이루어짐 [Lei 등, 2007; Singh 등, 2011]

#### 나. 재조합 피타아제

##### (1) 효모발현

- ① *A. niger* 피타아제 유전자(*phyA*)를 *S. cerevisiae*에서 발현: 세포외 분비, 내산성 pH(2-2.5 및 5-5.5), 내열성(55-60°C), 당화 [Han 등, 1999]
- ② *A. niger* 피타아제 유전자를 분비용 발현벡터인 pPICZαA에 클로닝하여 *Pichia pastoris*에 형질전환시킨 후 BYMY배지에서 4일간 배양하여 발현한 결과 야생형 *A. niger*의 피타아제보다 30000배 활성 증가하였고, 90°C에서 5분 가열 후에도 70% 효소활성 유지함 [Zhao 등, 2007]
- ③ 피타아제 유전자 돌연변이 발현
  - ㉠ *A. niger* NRRL 3135 피타아제 유전자를 이황화 결합이 제거되도록 점돌연변이화하여 *Pichia pastoris*에서 발현한 결과 효소활성 완전히 상실함 [Mullaney 등, 2010]
  - ㉡ *A. niger* SK-57 균주의 피타아제 유전자를 *P. pastoris*에 발현시킨 것과 비교하여 *phyA*로부터 인트론성 염기 제거, 코돈 최적화 및 합성 신호펩타이드를 장착하도록 돌연변이한 후 *P. pastoris*에 발현시킨 결과 생산량과 효소활성이 크게 증가함 [Xiong 등, 2005]
- ④ *A. fumigatus* 균주로부터 1459 bp *phy* 유전자를 합성하여 *P. pastoris*에 발현시켜 세포외 분비 효소 생산: 당화 재조합 피타아제의 분자량 88 kDa, 활성 51 U/mg, 최적 pH 5.5, 최적 온도 55°C [Guo 등, 2008]
- ⑤ 중성 피타아제 유전자(*phyC*)를 *P. pastoris*에서 발현: 메탄올 혼합배지(Methanol-complex Medium)에서 유도된 세포외 효소활성은 17.6 U/ml, 밀기울추출물 배지에서 유도된 효소활성은 18.5 U/ml로서 야생형보다도 90배 증가함, 최적 온도 70°C, 최적 pH 7.5 [Zou 등, 2006]
- ㉢ *Bacillus licheniformis*의 중성 피타아제 유전자에 *S. cerevisiae*의 α-mating factor를 장착한 후 *AOX1* 프로모터 조절아래서 *P. pastoris*에서 발현: 최적 온도 60°C, 최적 pH 7.5

[Wang 등, 2011]

- ⑥ *Citrobacter amalonaticus*의 *appA* 유전자를 *P. pastoris*에서 발현: 생산량 4.2 mg/mL, 효소활성 15000 U/mL, 최적 pH 4.5, 최적 온도 55°C [Luo 등, 2007]
- ⑦ *Eupenicillium parvum*의 피타아제 유전자를 분비용 발현벡터인 pPICZαA에 클로닝하여 *Pichia pastoris*에 형질전환시킨 발현: 당화, 광범위한 pH 2.5-8.0 유효활성, 최적 pH 5.5, 최적온도 50°C [Fugthong 등, 2010]
- ⑧ 효모발현은 대량생산 측면에서 장점이 있으나, 동물사료로 활용시 알레르기 반응을 유발할 수 있고, 발효과정을 통한 고비용의 발효과정 및 생산시설의 완벽한 멸균상태가 요구되는 단점있음

## (2) 박테리아 발현

- ① *Buttiauxella* sp.의 피타아제 유전자 *appA*를 *E. coli*에서 발현한 결과 재조합단백질의 피타아제 활성 최적 pH는 4.5, 최적온도 55°C [Shi 등, 2008]
- ② *Pseudomonas syringae*의 *phyM* 유전자를 *E. coli*에서 발현 [Cho 등, 2005]
- ③ 대장균의 피타아제 유전자 *appA*를 클로닝하여 *Pseudomonas putida*에 재조합단백질 발현: 최적 pH 4.0 및 최적온도 55°C [Dharmsthiti 등, 2005]
- ④ *Bacillus subtilis*의 *phyC* 유전자를 *Lactobacillus plantarum*에서 발현 [Kerovuo & Tynkkynen, 2000]

## (3) Aspergillus 피타아제 유전자 식물 발현

- ① 알팔파, 아라비도시스, 카놀라, 옥수수, 목화, 감자, 벼, 참깨, 대두콩, 클로버, 담배, 밀 등에서 발현함 [Li 등, 1997; Lucca 등, 2001; Ullah 등, 2002; Ponstein 등, 2002; Ullah 등, 2003; Brinch-Pedersen 등, 2003; Mudge et al., 2003; George 등, 2004, 2005; Drakakaki 등, 2005; Jin 등, 2005; Chen 등, 2008; Liu 등, 2011]
- ② 식물발현 피타아제는 동물사료로서의 활용가치 뿐만 아니라, 비료로 오염된 토양에 인을 제거하는 환경정화 용도로 활용할 수 있음
- ③ 식물 뿌리에 피타아제 유전자를 과대발현하면 근권부의 효소활성을 증가시켜 토양으로부터 인의 동화작용을 촉진 [Liu 등, 2011; Richardson 등, 2001]

## 2. 미세조류 배양 및 형질전환 동향

### (1) 미세조류 배양

#### ① 클로렐라 불가리스(*Chlorella vulgaris*)

- ㉠ 영역: Eukaryota, 계: Plantae, 문: Chlorophyta, 강: Trebouxiophyceae, 목: Chlorellales, 과: Chlorellaceae, 속: *Chlorella*, 종: *Chlorella vulgaris*
- ㉡ 미세조류 중에서 식량원 및 영양원을 목적으로 상업적으로 배양되는 녹조류(green algae) 클로렐라 불가리스와 *C. protothecoides*는 자가영양(autotrophic), 종속영양(heterotrophic), 광종속영양(photoheterotrophic) 및 혼합영양(mixotrophic) 조건에서 배양 가능함
- ㉢ 자가영양은 광 조건에서 대기에 함유된 이산화탄소(CO<sub>2</sub>)를 바이오매스, 단백질, 지질, 생리활성물질(예: 클로로필)로 전환하는 방식 [Chisti, 2007; Spolaore 등, 2006]
- ㉣ 이와 같은 자가영양 방식은 배양된 세포밀도가 낮기 때문에 녹조류의 대량생산에 문제점

갖음 [Isleten-Hosoglu 등, 2013]

- ㉓ 종속영양은 암 조건에서도 단시간 내에 녹조류의 성장률, 바이오매스 및 지질함량을 증대시킬 수 있기 때문에 녹조류 바이오매스의 생산가를 낮출 수 있는 대체 배양 방식임 [Cheirslip & Torpeee, 2012]
- ㉔ 미세조류 중에서 소수의 종들이 종속영양 배양 조건에 적응할 수 있는 것으로 알려졌는데, 대다수가 클로렐라 속으로 분류됨 [Isleten-Hosoglu 등, 2012]
- ㉕ 녹조류가 유기물질을 분해하여 혼합영양을 할 수 있는 능력을 가졌다는 연구결과는 광에너지가 녹조류 성장에 절대적 제한요인이 아님을 암시함
- ㉖ 혼합영양 조건에서도 유기탄소원(organic carbon substrates)이 성장을 촉진함으로써 암 조건에서도 바이오매스 손실을 크게 줄임
- ㉗ 특별히 회분식배양(batch culture) 시스템은 녹조류 세포 농도와 체적 생산을 크게 증가시킬 수 있는 가능성을 제공함 [Chojnacka & Noworyta, 2004]
- ㉘ 예를 들어 클로렐라 불가리스를 혼합영양 조건에서 배양하면 자가영양이나 타가영양 조건보다도 더 신속하게 성장할 수 있기 때문에 단시간내에 정체기(stationary phase)에 도달하여 더 많은 바이오매스 및 지질함량을 생산함 [Heredia-Arroyo 등, 2011, Kong 등, 2011].
- ㉙ 다른 예로 포도당(glucose)을 첨가한 배지에서 *C. protothecoides*를 혼합영양 배양했을 때 타가영양보다도 지질함량이 69% 더 증가되었고 이산화탄소는 61.5% 덜 방출함 [Xiong 등, 2010].
- ㉚ 혼합영양은 녹조류 세포구성분과 기능성물질을 생산하는데 가장 이상적인 방식임
- ㉛ 위와 같은 연구에 근거하여 경제적으로 유용한 대사물을 산업적으로 활용하기 위해서는 혼합영양 배양시스템에서 신속하게 성장할 수 있는 미세조류를 탐색하는 것이 중요함

## (2) 미세조류 형질전환

### ① 방법

- ㉑ 유리구슬(glass bead) 혹은 silicon carbide whisker 진탕법
- ㉒ 전기천공법(electroporation)
- ㉓ 유전자총 분사법(biolistic particle bombardment)
- ㉔ polyethylene glycol(PEG) 방법
- ㉕ 아그로박테리움 매개 유전자 이식법(Agrobacterium-mediated gene transfer)

### ② 미세조류 형질전환 선택 항생제

- ㉑ 블레오마이신(bleomycin)
- ㉒ 스펙티노마이신(spectinomycin)
- ㉓ 스트렙토마이신(streptomycin)
- ㉔ 파로마이신(paromomycin)
- ㉕ 하이그로마이신(hygromycin)
- ㉖ 클로람페니콜(chloramphenicol)

### ③ 항생제 하이그로마이신 B를 처리한 배지에서 형질전환 클로렐라 선발

- ㉑ 클로렐라는 가나마이신(kanamycin)에 민감하지 않음
- ㉒ 클로렐라는 클로람페니콜에 민감하지 않음



## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### <제 1 세부과제>

아스퍼질러스 니들란스의 피타아제 유전자 클로닝, 대장균내 발현, 재조합단백질(rPhy-E) 분리정제 및 다클론항체 생산

[Cloning and expression of *Aspergillus nidulans phy* gene in *Escherichia coli* and production of polyclonal antibody against Phy recombinant protein, rPhy-E]

#### 1. 아스퍼질러스 니들란스 cDNA libraries

피타아제(*phy*) 유전자를 합성하기 위하여 활용된 PCR 반응의 주형(template)은 배재대학교 생명공학과 채순기 교수로부터 제공받은 아스퍼질러스 니들란스 지놈(genome) cDNA libraries이다.

#### 2. PCR 합성 및 발현벡터 구축

##### (1) 피타아제 유전자 특이적 프라이머(primer)

- ① PCR 증폭을 위해 NCBI GenBank 데이터베이스에 등록된 아스퍼질러스 니들란스의 *phyB* 유전자 염기서열(U59803.1)을 참고하여 다음과 같이 고안한 특정 염기서열을 프라이머로 활용함
- ② 진행프라이머(forward primer): 5'-GAATTCGCTTTTTTTCACGGTCGCTCTT-3'
- ③ 역행프라이머(reverse primer): 5'-GTCGACTAGGGTAAAACAAGTCTTCCA-3'
- ④ 상기 프라이머는 *EcoRI* 제한효소 절단부위(밑줄), 하기 프라이머는 *SaI* 제한효소 절단부위(밑줄) 함유함

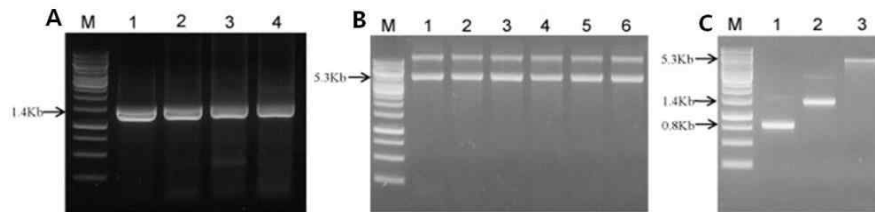
##### (2) PCR 반응

- ① (1)에 제시한 아스퍼질러스 니들란스 cDNA libraries를 주형으로 PCR을 실시하였다.
- ② PCR 반응액(총 50 $\mu$ l)은 5 $\mu$ l 10x 완충액(Dakara Bio. Inc., Japan), 2 $\mu$ l DNA(최종농도: 10ng), 4 $\mu$ l dNTPs(2.5mM), 1 $\mu$ l 각각 진행 및 역행 프라이머(50pM), 3-9 $\mu$ l 25mM MgCl<sub>2</sub>(최종농도: 1.5-4.5mM), 0.5 $\mu$ l(1U) *ExTaq* 중합효소를 포함하였다.
- ③ PCR 반응은 DNA를 95 $^{\circ}$ C에서(2분, 1사이클) 변성(denaturation)시킨 후, 35사이클 연속 반응(변성: 94 $^{\circ}$ C에서 1분, annealing: 58 $^{\circ}$ C에서 2분, 증폭: 72 $^{\circ}$ C에서 3분)을 거쳐 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 7분 동안 더 처리하였다.
- ④ 위에 서술한 실험 결과, MgCl<sub>2</sub> 농도에 상관없이 표적 밴드인 피타아제 유전자가 합성되었고 DNA 밴드의 크기는 1398bp로 관찰되었다(도 1A).

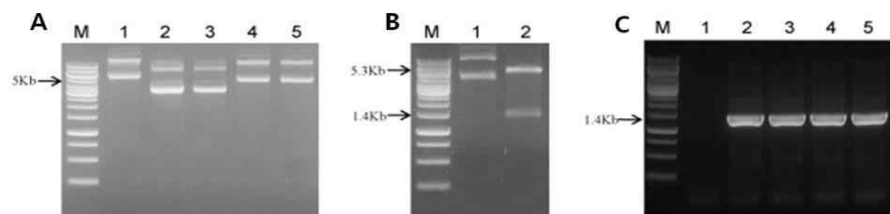
##### (3) PCR 증폭 피타아제 유전자 DNA를 pET28a 벡터로 클로닝

- ① pET28a 벡터: PCR 반응으로 증폭한 피타아제 유전자 DNA를 pET28a 벡터(도 1B)에 클로닝하기 위해 Novagen으로부터 구입하였다.
- ② 클로닝
  - ㉠ 표적유전자 피타아제 클로닝을 위해 상기 2-(2)에서 PCR로 증폭한 피타아제 유전자

- DNA를 제한효소 *EcoRI*과 *SaI*으로 절단하고(도 1C, 레인 2), 동일한 제한효소로 절단한 pET28a 벡터(도 1C, 레인 3)와 연결(ligation)을 실시하였다.
- ㉔ 연결 반응액은 다음과 같이 혼합하고 37°C에서 4시간 반응시켰다.
    - 1 $\mu$ l 피타아제 유전자 DNA, 6 $\mu$ l pET28a 벡터, 1.5 $\mu$ l 10x buffer, 5.5 $\mu$ l 증류수, 1 $\mu$ l T4 DNA 리가아제(Fermentas, Canada)
  - ㉕ 형질전환은 반응혼합액 중 5 $\mu$ l를 대장균 BL21에 첨가한 후 얼음으로 채운 용기에 30분 처리하였다가 42°C에서 1분 열 충격 후 Luria-Bertani(LB) 액체배지를 첨가하고 37°C 온도에서 배양하였다.
  - ㉖ 가나마이신(30 $\mu$ g/ml)을 함유한 LB 고체배지에 대장균을 도말하여 형질전환된 콜로니를 선발하고, 선발된 형질전환균을 LB(+가나마이신) 액체배지에 접종하여 37°C 온도에서 배양하였다.
  - ㉗ 배양액을 수거하여 저속 원심분리하여 상층액은 제거한 후, 침전물을 수확하였다. High Speed Plasmid Kit(Geneaid, Taiwan)를 이용하여 제조사의 지침에 따라서 침전물로부터 재조합 플라스미드를 분리정제하고 pET-phy라고 명명하였다(도 2A).
  - ㉘ 상기와 같이 실시하여 획득된 pET-phy에 표적유전자 피타아제가 제대로 삽입되었는가를 검정하기 위해 첫째로 pET-phy에 제한효소 *EcoRI*과 *SaI*으로 처리한 결과 표적유전자 크기의 DNA 밴드가 확인되었다(도 2B, 레인 2).
  - ㉙ 둘째로 pET-phy DNA를 주형으로 상기 2-(가)-①에 제시한 프라이머를 이용하여 PCR을 실시한 결과 표적 DNA가 합성되었다(도 2C).
  - ㉚ 셋째로 pET-phy의 염기서열을 결정하여 표적유전자가 벡터에 제대로 삽입되어 코돈 프레임(codon frame)에 문제가 없음을 확인하였다.



도 1. 피타아제 유전자 합성 및 pET28a 벡터 분리정제 과정. A는 아스퍼질러스 니들란스 cDNA libraries로부터 피타아제 유전자 특이적 프라이머를 이용하여 피타아제 유전자를 PCR로 합성 및 증폭한 후 전기영동을 실시한 후 ethidium bromide로 염색한 1% 아가로스젤(agarose gel). 반응액에서 염화마그네슘(MgCl<sub>2</sub>) 농도가 1.5-4.5 mM(레인 1-4)이 되도록 조절한 후 증폭함. B는 pET28a 벡터를 분리정제한 후 1% 아가로스젤에서 확인함. C는 합성된 피타아제 유전자와 분리정제된 pET28a 벡터를 제한효소 *EcoRI*과 *SaI*으로 각각 절단한 후 아가로스젤에서 확인함



도 2. 재조합플라스미드 pET-phy 합성 과정. A는 아가로스젤로부터 분리정제한 피타아제 유전자를 pET28a 벡터에 연결하는 과정(레인 1,3,5). B는 피타아제 유전자가 재조합플라스미드에 존재함을 증명하기 위해 제한효소 *EcoRI*과 *SaI*으로 절단함(레인 1은 무처리 pET-phy, 레인 2는 제한효소 처리 pET-phy). C는 PCR 합성을 통해서 피타아제 유전자가 pET-phy에 존재하는 가를 확인함

### 3. Phy재조합단백질(rPhy-E) 발현 및 생산

#### (1) IPTG 발현 유도 및 분석

- ① 재조합 피타아제 유전자의 단백질 발현을 유도하기 위해 pET-phy를 함유한 대장균을 LB(+가나마이신) 액체배지에 OD<sub>600nm</sub> 값이 0.6이 될 때까지 배양하였다.
- ② 유당 오페론(Lac operon)에 의해 조절되는 단백질 발현을 위해 유당 대신 농도별(최종농도 1, 3, 5 mM)로 Isopropyl-β-D-1-thio-galactopyrannoside(IPTG)를 배지에 첨가하고 37°C에서 4시간 더 배양한 후 최적조건을 결정하였다.
- ㉔ 배양 시료별로 수확하고 10000 rpm에서 5분간 원심분리하여 침전된 대장균을 하기에 명시된 현탁완충액에 녹인 후 다시 원심분리하여 침전물을 수확하고 현탁완충액으로 녹여 시료를 준비하였다.
- ㉔ 시료에 초음파(15-20 pulses) 분해를 1분 간격으로 4회(30초/1회) 실시하였다.
- ㉔ 용해된 시료는 저속원심분리한 후 상층액과 침전물 분획으로 각각 나누어 수확하였다.
- ㉔ 상층액에 존재하는 총단백질은 수용성 분획, 침전물에 존재하는 총단백질은 불용성 분획이라 명명하였다.
- ㉔ 수용성 분획과 불용성 분획(현탁완충액에 녹임)을 SDS-PAGE 분석하였다.
  - 현탁완충액: 20mM Tris-HCl(pH7.5)

#### (2) Phy-6XHis 융합단백질 분리정제

- ㉔ (4)-①-㉔에서 얻어진 불용성 분획을 얼음이 담긴 비이커에 15분간 처리하였다가 용해완충액(lysis buffer)으로 녹인 후 실온에서 15분 정도 진탕하였다.
- ㉔ 용해물을 12,000 rpm에서 20분 원심분리하고 상층액을 수확하였다.
- ㉔ Phy-6XHis 융합단백질 분리정제는 변성조건(8M Urea)에서 제조사 지침에 따라서 하기에 명시한 3가지 완충액을 이용하여 Ni-NTA resin(Qiagen, USA) 크로마토그래피를 이용하여 용리하였다.
  - 용해완충액: 100mM 제1인산나트륨(NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 10mM Tris-HCl, 8M 요소(urea, pH8.0)
  - 세척완충액: 100mM 제1인산나트륨, 10mM Tris-HCl, 8M 요소(pH6.3)
  - 용리완충액: 100mM 제1인산나트륨, 10mM Tris-HCl, 8M 요소(pH5.9)

#### ③ SDS-PAGE 분석: 분자량 및 과대발현 조사

- ㉔ (4)-①-㉔에서 추출된 분획물 뿐만 아니라 분리정제 과정의 각 단계가 완료될 때 마다 시료를 확보하여 변성완충액을 첨가하고 3-5분간 가열한 후 변성된 시료를 준비된 SDS함유 15% 폴리아크릴아마이드젤(polyacrylamide gel)에 적재하여 SDS-PAGE 전기영동을 실시하였다.
- ㉔ 전기영동이 완료된 후 젤을 쿠마지블루 용액(methanol: glacial acetic acid: water, 5:1:5, v/v/v 혼합액에 0.05% Coomassie brilliant blue R-250를 용해시킴)으로 염색하여

단백질을 분석하였다.

- ㉔ SDS-PAGE 분석한 결과, 재조합단백질은 불용성 분획에서 첨가된 IPTG 농도와 상관없이 과대발현되었고, 분자량은 약 56kDa으로 관찰되었다(도 3A). 따라서, 다단계 세척 및 용리를 통해 분리정제된 재조합단백질(도 3B)을 rPhy-E로 명명하였고 정량 후 실험동물에 주사하기 위한 항원으로 준비되었다.

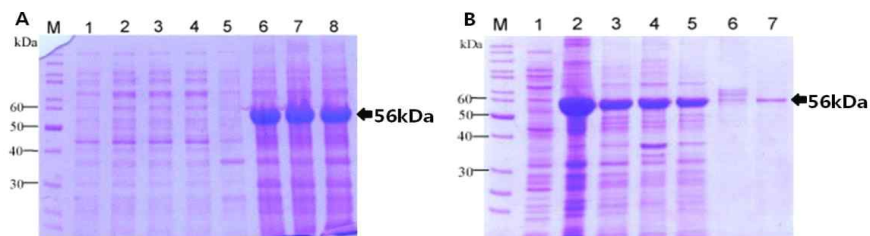


Fig. 3. 재조합벡터 pET-phy로 형질전환한 대장균에서 재조합단백질(rPhy-E)을 발현하고 분리정제하는 과정. A는 rPhy-E 발현을 유도하기 위해 배지에 다양한 농도의 IPTG(레인 1,5는 피타아제 유전자가 결여된 pET28a 벡터-무처리구, 레인 2,6: 1mM, 레인 3,7: 3mM, 레인 4,8: 5mM)를 처리하고 37°C에서 4시간 배양한 후 저속원심분리하여 대장균을 수확하고 용해한 대장균 용해물의 수용성 분획(레인 1-5)과 불용성 분획(레인 6-8). B는 변성조건에서 Ni-NTA resin 크로마토그래피를 통해서 rPhy-E를 분리정제함(레인 1: pET-28a 벡터로만 형질전환 시킨 대장균 용해물의 불용성 분획(음성대조구), 레인 2: 1mM IPTG 처리하여 배양한 pET-phy 형질전환 대장균 용해물의 불용성 분획, 레인 3,4: B완충용액으로 flow-through, 레인 5는 C완충용액으로 세척, 레인 6,7은 D완충용액으로 용리함)

#### 4. 재조합단백질(rPhy-E)에 대한 항체 생산 및 검정

##### (1) rPhy-E 주사 및 채혈

##### ① 항혈청(antisera) 생산

㉔ 항원: 분리정제된 rPhy-E

㉔ 실험동물 : Sprague-Dawley 쥐(6주령) 수컷

##### ② 주사 3회(2주 간격) 및 채혈(최종 주사 1주일 후)

㉔ 1차 주사: 재조합단백질(농도 100 $\mu$ g)+프로인드 완전 면역반응 항진제(Freund's complete adjuvant)  $\Rightarrow$  채혈

㉔ 2차 주사: 재조합단백질(농도 100 $\mu$ g)+프로인드 완전 면역반응 항진제  $\Rightarrow$  채혈

㉔ 3차 주사: 재조합단백질(농도 100 $\mu$ g)+프로인드 완전 면역반응 항진제  $\Rightarrow$  채혈

##### ③ 다클론항체 정제

㉔ 채혈된 항혈청으로부터 Phy-IgG 분리정제를 위해 밀리포어(Millipore)사로부터 항체 분리정제 키트(Montage) 및 Prosep-G media를 구입하여 제조사의 지침에 따라 다음과 같이 시도하였다.

㉔ 먼저 항혈청을 PROSEP-G media를 이용하여 10ml 부착완충액(binding buffer)A와 평형화(equilibration)한 후, 0.22 $\mu$ m Sterflip-GP 장치를 이용하여 항혈청에 존재하는 불순물을 제거하였다.

㉔ 여과된 항혈청은 부착완충액A로 희석(1:1, v/v)하여 스핀콜럼(spin column)에 적재한 후, 150g에서 20분 동안 원심분리하였다.

- ㉔ 스피ن콜럼에서 탈부착된 불순물을 제거하기 위해 10ml 부착완충액A를 첨가한후 200g에서 2분 동안 원심분리하였다.
- ㉕ 부착된 IgG는 10ml 용리완충액B2로 용리한 후, pH를 중성으로 유지시키기 위해서 1.3ml 중화완충액C가 들어있는 새로운 스피ن콜럼으로 옮겼다.
- ㉖ 원심분리(500g, 5분)후 IgG를 함유한 상층액을 모아 Amicon Ultra-15 원심분리필터 장치를 이용하여 탈염(desalting) 및 농축하였다.
  - 부착완충액A: 1.5M glycine-NaOH, 3M NaCl, 0.1% 아지드화나트륨(sodium azide), pH 9.0
  - 용리완충액B2: 0.2M glycine-HCl, 0.1% 아지드화나트륨, pH 2.5
  - 중화완충액C: 1M Tris-HCl, 0.1% 아지드화나트륨, pH 9.0

## (2) rPhy-E에 대한 다클론항체의 탐색

- ① 시료를 변성완충액을 첨가하고 3-5분간 가열한 후 변성된 시료를 준비된 SDS 함유 폴리아크릴아마이드젤에 적재하여 SDS-PAGE 전기영동을 실시하였다.
- ② 전기영동이 완료된 후 젤은 염색하지 않고 면역학적 분석을 위해 전기이동법으로 젤내의 단백질을 니트로셀룰로오스 멤브레인(nitrocellulose membrane)으로 이동시켰다.
- ③ 비특이적 반응을 억제하기 위해 니트로셀룰로오스 멤브레인에 5% 무지방 분유를 1x PBS에 녹여 만든 블로킹 용액(blocking solution)에 담근 후, 교반기위에서 1시간 동안 처리한 후 0.03% Tween-20이 함유된 1x PBS 완충액으로 세척하였다.
- ㉗ 1x PBS 완충용액: 140 mM NaCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.7 mM KCl, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.4)
- ④ 일차항체는 (5)-(나)에서 분리정제한 IgG를 1X PBS로 희석하여(1:1,000, v/v) 사용하였고, 이차항체는 1x PBS로 희석(1:7,000, v/v)한 goat anti-rat IgG alkaline phosphatase conjugate(Sigma Co., USA)를 사용하였다.
- ⑤ 일차항체 및 이차항체는 각각 1 시간씩 반응시켰고, 각 단계 후 3회 세척하였다.
- ⑥ 니트로셀룰로오스 멤브레인을 nitroblue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate 함유된 발색완충액에 처리하여 발색시킨 후 항원-항체반응을 관찰하였다.
- ㉘ 발색완충액: 100 mM Tris, 100mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9.5
- ⑦ 위의 웨스턴블롯 방법으로 재조합단백질을 탐색한 결과, 항원인 rPhy-E와 강하고 선명하게 반응하였다(도 4). 위의 결과에서 고안된 rPhy-E에 대한 다클론항체는 자연계에서 아스퍼질러스 니들란스 피타아제 생산균주를 탐색 선발할 수 있고, 그 효소의 특성 규명에 적용할 수 있다. 또한 효모나 식물에서 아스퍼질러스 니들란스 피타아제 유전자를 발현할 경우에도 생산된 재조합단백질 Phy의 효소활성, 최적 pH, 열저항성 등의 특성규명에 활용할 수 있다.

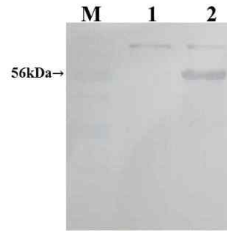


Fig. 4. rPhy-E에 대한 항혈청을 채혈한 후 분리정제한 다클론 IgG를 1차항체로 실시한 웨스턴블롯(Western blot) 분석. pET-28a 벡터로만 형질전환 시킨 대장균으로부터 추출한 총단백질(레인 1)과 pET-phy를 형질전환 시킨 대장균으로부터 추출한 총단백질(레인 2)

# 아스퍼질러스 니둘란스의 피타아제 유전자 클로닝, 식물 내 발현 및 재조합단백질(rPhy-P)의 효소활성 및 특성 규명

[Cloning and expression of *Aspergillus nidulans phy* gene in *Nicotiana benthamiana* for the characterization of phytase activity of Phy recombinant protein (rPhy-P)]

## 1. 아스퍼질러스 니둘란스 피타아제 유전자 cDNA 클론

피타아제 유전자를 합성하기 위하여 활용된 PCR 반응의 주형은 아스퍼질러스 니둘란스의 지놈 cDNA libraries로부터 합성한 후 pET28a 벡터에 클로닝한 pET-phy를 사용하였다.

## 2. PCR 합성 및 셔틀(Shuttle) 벡터 구축

(1) 본 연구에서 활용된 프라이머는 아스퍼질러스 니둘란스의 피타아제 유전자 특이적 프라이머 및 셔틀벡터를 돌연변이화하는 프라이머로서 표1에 제시하였다.

Table 1. PCR 반응에 이용된 프라이머

Template	primer	nucleotide sequences (5'→3')
pRTL2	M1-RTL-F <sup>1</sup>	GAAAATTTTCACCATTACGAACGATAGCCCGGCACTCATC
	M1-RTL-R <sup>2</sup>	GATGAGTGCCCGCGGTATCGTTTCGTAATGGTGAAAATTTTC
pET-phy	phy2-F <sup>3</sup>	CCGCGGCAATGGCTTTTTTCACG
	phy2-R <sup>4</sup>	GGTACCTTATAGGGTAAAACAAGTCTTCCA
pRTL2-MS-phy	M2-RTL-F <sup>5</sup>	TTACGAACGATAGCCAATGGCAATGGCTTTTTTC
	M2-RTL-R <sup>6</sup>	GAAAAAAGCCATTGCCATGGCTATCGTTCGTAA
pPZP212-phy	phy3-F	CCGCGGCATCTCATGTTTGGGGT
	phy3-R	TCTAGAGGGGCTTCCGGCACC
<i>N. benthamiana</i> total RNA	phy-domain-F <sup>7</sup>	CAGAGTCGAAGAGTAAGGCGTAC
(mock and agroinfiltrated)	phy-domain-R <sup>7</sup>	GTAGAACTTGGCACCCGAATCAAC
<i>N. benthamiana</i> total RNA	5.8s rRNA-F <sup>8</sup>	GTGATCTGT GGAAGGATCATTGTGC
(mock and agroinfiltrated)	5.8s rRNA-R <sup>8</sup>	CGTTAATCATCCGACACGAACGC-

<sup>1,2</sup>상기 프라이머는 제한효소 *Ncd* 절단부위를 *SacI* 절단부위(밑줄)로 치환시키는 점돌연변이용 진행 및 역행 프라이머

<sup>3</sup>상기 진행 프라이머는 *SacI* 제한효소 절단부위(밑줄) 포함

<sup>4</sup>상기 역행 프라이머는 *KpnI* 제한효소 절단부위(밑줄) 포함

<sup>5,6</sup>상기 프라이머는 개시코돈(ATG) 복구를 위한 점돌연변이용 진행 및 역행 프라이머

<sup>7</sup>상기 프라이머는 피타아제 domain 합성용 Real-Time PCR 진행 및 역행 프라이머

<sup>8</sup>상기 프라이머는 5.8s rRNA 합성용 Real-Time PCR 진행 및 역행 프라이머

(2) 셔틀벡터 점돌연변이(site-directed mutagenesis; SDM) 디자인

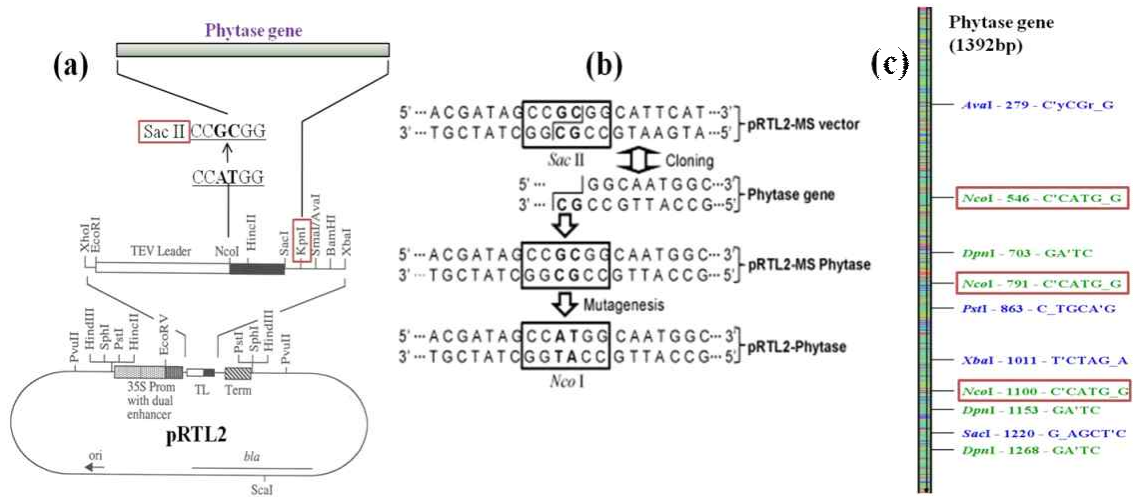
① 셔틀벡터 pRTL2의 유전자발현카세트(gene expression cassette; GEC)에는 제한효소 *Ncd* 절단부위가 존재하는데(5'-CCATGG-3'), 절단부위 옆기 중 ATG 서열을 피타아제 유전자의 단백질 합성 개시코돈으로 활용하고자 하였다(도. 1a,b).

② 그러나 피타아제 유전자의 옆기서열 분석 결과 유전자 내에도 3개의 *Ncd* 절단부위가



존재함을 확인하였다(도. 1c).

- ③ 따라서 접돌연변이 PCR을 실행하여 pRTL2의 *Ncd* 절단부위의 2개 염기 AT를 GC로 치환시켜 클로닝 부위를 *Sac*I 절단부위(5'-CCGCGG)로 변경하는 전략을 고안하였다(도. 1a,b).



도 1. 아스퍼질러스 니들란스의 피타아제 유전자를 pRTL2 vector로 삽입하기 위한 전략. pRTL2 유전자발현카세트는 35S 프로모터(promoter), TEV 선도서열(leader sequence), 전사종결부위(terminator) 및 클로닝을 위한 *Ncd* 부위를 포함하고 있음 (a). *Ncd* 부위의 AT 염기를 GC 염기로 돌연변이화 시켜 *Sac*I 부위로 변경함 (b). 피타아제 유전자는 3개의 *Ncd* 부위를 포함함 (c)

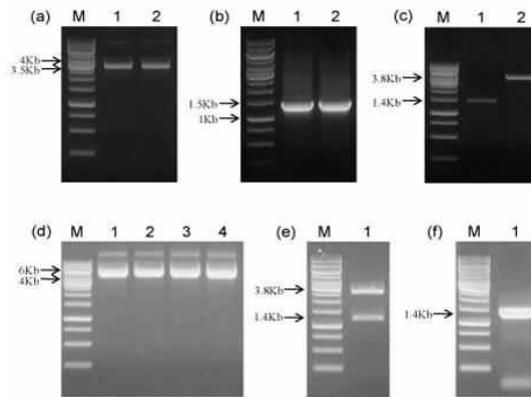
### (3) 셔틀벡터 1차 접돌연변이 PCR

- ① 표1에 제시한 M1-RTL-F와 M1-RTL-R 프라이머를 이용하여 pRTL2 벡터를 주형으로 PCR을 실시하였다.
- ② PCR 반응혼합액(총 50 $\mu$ l)은 5 $\mu$ l 10x 완충액(Stratagene, USA), 10 $\mu$ l 주형 DNA(최종농도: 10ng), 1 $\mu$ l 각각 2.5mM dNTPs, 1 $\mu$ l 각각 forward 및 reverse 프라이머(50 $\mu$ M), 1 $\mu$ l(2.5U/ul) *PfuUltra*<sup>TM</sup> DNA 중합효소(Stratagene, USA)를 포함하였다.
- ③ PCR 반응은 DNA를 함유한 반응혼합액을 95 $^{\circ}$ C에서(30초, 1 사이클) 변성시킨 후, 15사이클 연속 반응(변성: 95 $^{\circ}$ C에서 30초, annealing: 55 $^{\circ}$ C에서 1분, 증폭: 68 $^{\circ}$ C에서 5분) 처리하였다.
- ④ 위와 같이 증폭된 PCR산물은 *Dpn*I(10U)와 *PfuUltra*<sup>TM</sup> DNA 중합효소(2.5U)를 37 $^{\circ}$ C에서 30분 및 72 $^{\circ}$ C에서 30분 처리하여 메틸화(methylation)된 주형 DNA와 하이브리드를 제거하였다.
- ⑤ 돌연변이 pRTL2에 존재하는 nick(nick)은 *E. coli* XL1-Blue competent cell에 형질전환시켜 복구하였다.
- ⑥ 실험 결과, 돌연변이 pRTL2를 합성하였고, 이를 pRTL2-MS라고 명명하였다(도 2a).
- ⑦ 표적유전자를 pRTL2-MS의 GEC 부위에 삽입하기 위해 표 1에 제시한 phy2-F와 phy2-R 프라이머와 pET-phy를 주형으로 이용하여 PCR을 수행하였다.



(4) 피타아제 유전자 증폭 PCR

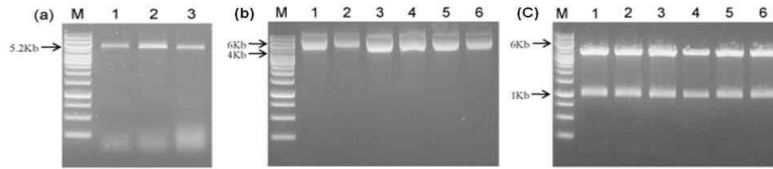
- ① PCR 반응혼합액(총 50 $\mu$ l)은 5 $\mu$ l 10x 완충액(Takara, Japan), 2 $\mu$ l 주형 DNA(최종농도: 10ng), 4 $\mu$ l dNTPs(최종농도2.5mM), 1 $\mu$ l 진행 및 역행 프라이머(50 $\mu$ M), 1.5mM MgCl<sub>2</sub>(최종농도), 0.5 $\mu$ l(2.5U) *Taq* 중합효소(Takara, Japan)를 포함하였다.
- ② PCR 반응은 DNA를 함유한 반응혼합액을 95 $^{\circ}$ C에서(2분, 1 사이클) 변성시킨 후, 35사이클 연속 반응(변성: 94 $^{\circ}$ C에서 1분, annealing: 59 $^{\circ}$ C에서 2분, 증폭: 72 $^{\circ}$ C에서 3분)을 거쳐 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 7분 동안 더 처리하였다.
- ③ 실험 결과, 표적 밴드인 피타아제 유전자가 합성되었고 그 DNA 밴드의 크기는 1.4 Kb로 관찰되었다(도 2b).



도 2. 아스퍼질러스 니들란스 피타아제 유전자를 함유한 돌연변이 pRTL2(pRTL2-MS) 벡터 구축. (a) 점돌연변이 PCR에 의한 pRTL2-MS 벡터 합성(레인 1,2). (b) PCR 증폭된 피타아제 유전자(레인 1,2). (c) 제한효소(*SadI* 및 *KpnI*)로 절단된 피타아제 유전자와 pRTL2-MS. (d) 형질전환된 대장균 XL1-Blue로부터 재조합벡터 pRTL2-MS1-phy 분리정제. (e) 피타아제 유전자의 존재 유무를 제한효소 *SadI* 및 *KpnI*으로 확인. (f) 피타아제 유전자의 존재 유무를 phy2-F와 phy2-R를 이용한 PCR로 확인함. M: DNA 사다리(ladder) 마커

(5) 피타아제 유전자 DNA를 pRTL2-MS 벡터로 클로닝

- ① (3)에서 돌연변이시킨 pRTL2-MS 벡터와 (4)에서 PCR 증폭한 피타아제 유전자 DNA 각각을 PCR quick-spin<sup>TM</sup> (Intron, Korea)를 이용하여 제조사 지침에 따라서 아가로스겔로부터 분리하였다.
- ② 각 DNA를 제한효소 *SadI*와 *KpnI*으로 절단하고(도 2c) 연결을 실시하였다.
- ③ 연결 반응액은 다음과 같이 혼합하고 16 $^{\circ}$ C에서 반응시켰다.  
- 6 $\mu$ l *phy* DNA(10ng/ $\mu$ l), 2 $\mu$ l pRTL2-MS DNA(5ng/ $\mu$ l), 2 $\mu$ l 10x buffer, 9 $\mu$ l 증류수, 1 $\mu$ l T4 DNA 리가아제(Fermentas, Canada)
- ④ 반응액 중 5 $\mu$ l를 대장균 XL1-Blue 형질전환에 이용하였다.
- ⑤ 형질전환은 열 충격법(42 $^{\circ}$ C에서 1.5분)을 사용하였다.
- ⑥ 카베니실린(50 $\mu$ g/ml)을 함유한 LB 고체배지에 대장균을 도말하여 형질전환 콜로니를 선발하였다.

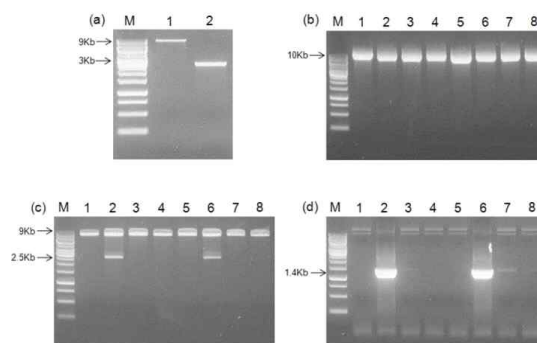


도 3. 아스퍼질러스 니둘란스 피타아제 유전자를 함유한 pRTL2-MS2-phy 벡터의 점돌연변이. (a) *DpnI*으로 절단한 PCR 증폭산물(레인 1,2,3), (b) 대장균으로부터 분리정제한 pRTL2-MS2-phy 벡터, (c) 제한효소로 절단한(*HindIII* 및 *PstI*) pRTL2-MS2-phy. M: DNA 사다리(ladder) 마커

### 3. 식물발현벡터 구성, 아그로박테리아(*Agrobacterium*) 형질전환 및 agroinfiltration

#### (1) 식물발현벡터 pPZP212 구성

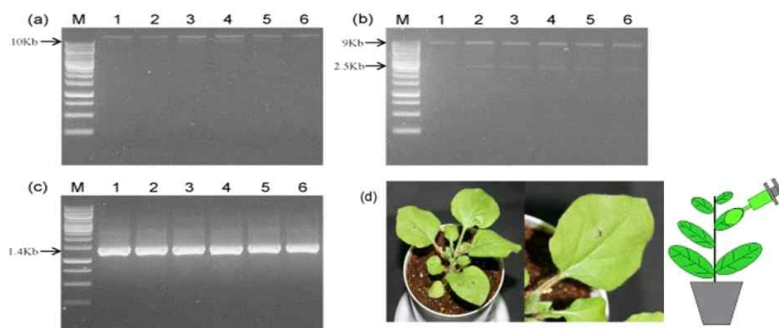
- ① 재조합플라스미드 pRTL2-MS2-phy로부터 제한효소 *HindIII*를 처리하여 GEC를 분리하였다(도 4a, 레인 2).
- ② GEC를 pPZP212의 T-DNA에 삽입하기 위하여 pPZP212벡터를 동일한 제한효소로 절단하였다(도 4a, 레인 1).
- ③ 제한효소 처리된 2 조각의 DNA를 T4DNA 리가아제를 이용하여 실온에서 연결하였다.
- ④ 연결 반응액을 대장균 XL1-Blue에 형질전환한 후 스펙티노마이신( $100\mu\text{g}/\text{ml}$ )을 함유한 LB 고체배지에 첨가하여 콜로니를 선발하였다.
- ⑤ 선발된 형질전환균주를 LB(+스펙티노마이신) 액체배지에서 배양하여 pPZP212-phy를 분리정제하였다(도 4b).
- ⑥ pRTL2-MS2-phy로부터 유래된 GEC부위가 pPZP212-phy에 존재하는가를 결정하기 위해 제한효소 *HindIII*를 처리하였다.
- ⑦ 그 결과 GEC가 재조합벡터에 올바르게 삽입된 것을 확인하였다(도 4c).
- ⑧ 표1에 명시된 phy3-F와 phy3-R 프라이머를 이용하여 PCR로 탐색한 결과 pPZP212-phy에 피타아제 유전자가 존재함을 확인하였다(도 4d).



도 4. 식물발현벡터 pPZP212 구축. (a) *HindIII*로 절단한 pPZP212 벡터(레인 1)와 pRTL2-MS2-phy를 *HindIII*로 절단하여 유전자발현카세트의 분리(레인 2). (b) 대장균 XL1-Blue로부터 재조합벡터 pPZP212-phy 분리정제. (c) 유전자발현카세트의 존재 유무를 pPZP212-phy를 *HindIII*로 절단하여 확인. (d) pPZP212-phy 내에 존재하는 피타아제 유전자를 phy3-F 및 phy3-R 프라이머를 이용하여 PCR로 확인. M: DNA 사다리(ladder) 마커

#### (2) 아그로박테리아 형질전환 및 agroinfiltration

- ① 식물발현 재조합플라스미드인 pPZP212-phy를 전기천공법에 의해 *Agrobacterium tumefaciens* C58C1에 형질전환시켰다.
- ② 스펙티노마이신(100 $\mu$ g/ml), 스트렙토마이신(100 $\mu$ g/ml), 젠타마이신(100 $\mu$ g/ml) 및 리팜피신(50 $\mu$ g/ml) 4종 항생제가 함유된 LB 고체배지위에 균주를 도말하였다.
- ③ 균주를 27 $^{\circ}$ C에서 배양한 후 형질전환된 콜로니를 선발하였다.
- ④ 선발된 형질전환균주 중 일부를 상기에 명시한 4종의 항생제가 함유된 LB 액체배지에서 배양한 후 재조합플라스미드를 분리정제하였다(도 5a).
- ⑤ 제한효소 *Hind*III를 처리하여 GEC가 재조합벡터에 올바르게 삽입된 것을 확인하였다(도 5b).
- ⑥ 또한 표1에 제시된 phy3-F와 phy3-R 프라이머를 이용하여 피타아제 유전자를 PCR로 탐색하였다(도 5c).
- ⑦ pPZP212-phy를 가지고 있는 형질전환균주를 4종의 항생제가 함유된 LB 액체배지에서 철야 배양한 후 6000g에서 침전시켰다.
- ⑧ 침전물을 접종완충용액에 녹이고 균주의 농도를 OD<sub>600nm</sub>=1.0으로 적정하였다.
- ⑨ 균주를 바늘이 제거된 3ml 주사기에 채우고 어린 *Nicotiana benthamiana* 식물의 상엽에 주입한 후(도 5d) 접종식물을 식물생장실(12시간 광, 26 $^{\circ}$ C)에 두었다.



도 5. 전기천공법에 의해 재조합벡터 pPZP212-phy를 *Agrobacterium tumefaciens* C58C1으로 형질전환시킴. M: DNA 사다리(ladder) 마커. (a) 형질전환된 아그로박테리아로부터 pPZP212-phy의 분리정제. (b) 유전자발현카세트의 존재 유무를 pPZP212-phy를 *Hind*III로 절단하여 확인. (c) pPZP212-phy 내에 존재하는 피타아제 유전자를 phy3-F 및 phy3-R 프라이머를 이용하여 PCR로 확인. (d) 아그로박테리아를 주입한 *Nicotiana benthamiana* 잎

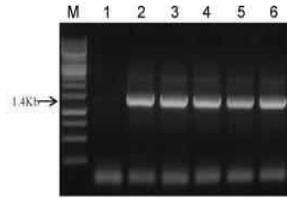
#### 4. 피타아제 유전자 식물발현 검정

##### (1) RT(역전사)-PCR로 피타아제 유전자 발현 검정

- ① pPZP212-phy를 함유한 아그로박테리움을 주입한 후 1-5일 동안 매일 동일한 크기의 잎을 수확하여 피타아제 유전자의 일시적발현(transient expression)을 RT-PCR로 조사하였다.
- ② 잎을 액체질소로 마쇄하고 RNeasy plant mini 키트(Qiagen, USA)를 이용하여 제조사 지침에 따라서 총 RNA를 분리한 후 RT-PCR을 다음과 같이 수행하였다.
- ③ 반응액(총 20 $\mu$ l)은 500ng의 total RNA, phy3-F(1 $\mu$ l)와 phy3-R(1 $\mu$ l) 프라이머를 Maxime RT-PCT PreMix Kit(iNtRON Biotechnology, 한국)에 포함한 후 혼합하였다 .
- ④ 이 반응혼합액을 45 $^{\circ}$ C에서 RT반응(30분, 1사이클)을 수행한 후 94 $^{\circ}$ C에서(5분, 1사이클)

RT반응을 불활성화시키고 35사이클 연속반응(변성: 94℃에서 1분, 프라이머 annealing: 59℃에서 2분, 증폭: 72℃에서 3분)을 거쳐 마지막으로 72℃에서 7분 동안 더 처리하였다.

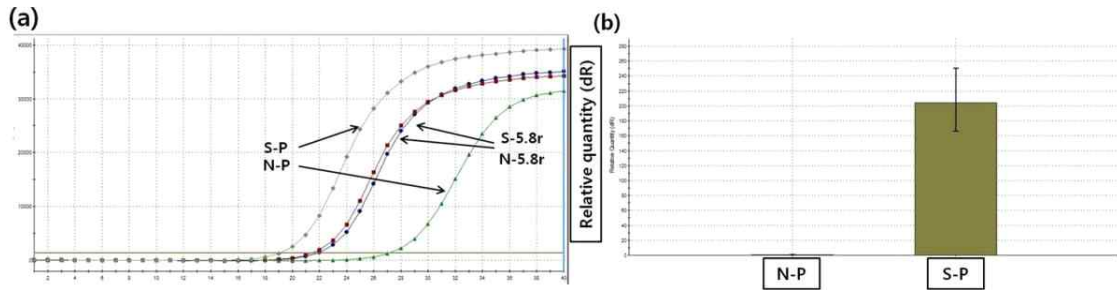
⑤ 실험 결과, 1.4 Kb의 밴드가 모든 시료에서 관찰되었다(도 6).



도 6. pPZP212-phy를 함유한 아그로박테리아를 주입한 *Nicotiana benthamiana* 잎에서 피타아제 mRNA 발현 유무를 RT-PCR로 분석. 레인 1은 음성대조구(mock infiltrated control), 레인 2-6은 아그로박테리아를 주입후 1, 2, 3, 4, 5일에 수확한 잎. M: DNA 사다리(ladder) 마커

## (2) Real-time RT-PCR로 피타아제 유전자 발현 검정

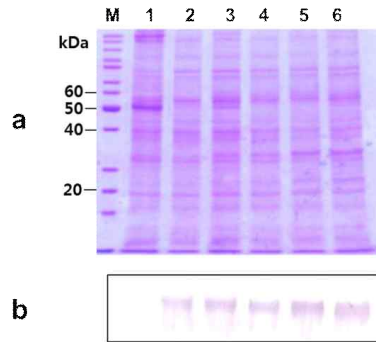
- ① pPZP212-phy를 함유한 아그로박테리움을 주입한 후 5일차 시료의 잎을 수확하였다.
- ② 잎을 액체질소로 마쇄하고 RNeasy plant mini 키트(Qiagen, USA)를 이용하여 제조사 지침에 따라서 총 RNA를 분리한 후 RT를 다음과 같이 수행하였다.
- ③ 반응혼합액(총 20 $\mu$ l)은 100ng의 총 RNA(아그로박테리아를 주입한 잎 시료) 및 1 $\mu$ l phy-domain-R 프라이머와 1 $\mu$ l 5.8s rRNA-R 프라이머를 각각, 0.5 $\mu$ l(100U) M-MLV 역전사효소(Promega, USA), 4 $\mu$ l 5x RT buffer, 8 $\mu$ l dNTP, 0.5 $\mu$ l(20U) RNase 억제제(Takara, Japan)를 포함하였고, 이 반응혼합액을 42℃에서 RT반응(60분, 1사이클), 99℃에서(5분, 1사이클) RT반응을 불활성화시켰다.
- ④ qPCR 반응액(총 20 $\mu$ l)은 1 $\mu$ l cDNA(1ng/ $\mu$ l), 10 $\mu$ l Brilliant III 2x SYBR Green QPCR Master Mix(Agilent Technologies, USA), 1 $\mu$ l 10pM 진행 및 역행 프라이머(표 1), 7 $\mu$ l 증류수로 혼합하였다.
- ⑤ qPCR 반응은 Stratagene Mx3005P 시퀀클러(Agilent Technologies, USA)를 이용하여 95℃에서(15분, 1사이클) 및 40사이클 연속반응(변성: 95℃에서 10초, 프라이머 annealing과 extension: 60℃에서 40초) 처리하였다.
- ⑥ 모든 반응에 아그로박테리아를 주입한 *N. benthamiana*로부터 합성한 5.8s rRNA를 내재유전자 대조구로 이용하였다.
- ⑦ 시료의 평균 C<sub>t</sub> 값(도 7a)
  - ㉠ 피타아제 유전자 함유 아그로박테리움을 주입한 잎 : 19.11
  - ㉡ 피타아제 유전자 함유 아그로박테리움을 주입한 잎의 5.8s rRNA: 21.47
  - ㉢ 음성대조구 잎의 5.8s rRNA: 21.90
  - ㉣ 음성대조구 잎: 27.21
- ⑧ 피타아제 유전자 mRNA 상대적 발현 수준은 음성대조구 잎에 비교하여 피타아제 유전자 함유 아그로박테리움을 주입한 잎에서 200 배 높게 측정되었다(도 7b).



도 7. Real-time PCR 분석. (a) Real-time PCR 결과. (b) 아그로박테리움 주입 5일차 잎(S-P)과 음성대조구 잎(N-P)의 피타아제 유전자 발현 수준을 비교함

(3) 웨스턴블롯 분석으로 재조합단백질(rPhy-P) 검정

- ① pPZP212-phy를 함유한 아그로박테리움을 주입한 후 1-5일 동안 매일 동일한 크기의 잎을 수확하여 시료를 준비하였다.
- ② 시료를 1x PBS로 마쇄하고 원심분리하여 상층액을 수거한 후 분석시료로 준비하였다.
- ③ 준비된 분석시료에 변성완충액을 첨가하고 3-5분간 가열한 후 변성된 시료를 준비된 SDS함유 10% 폴리아크릴아마이드 젤 2개에 적재하여 SDS-PAGE 전기영동을 실시하였다.
- ④ 전기영동이 완료된 후 1개의 젤을 쿠마지블루용액으로 염색하여 단백질을 분석하였다(도 8a).
- ⑤ SDS-PAGE 전기영동이 완료된 후 다른 하나의 젤은 염색을 생략하고 면역학적 분석을 위해 전기이동법으로 단백질을 니트로셀룰로오스 멤브레인(NCM)으로 이동시켰다.
- ⑥ 비특이적 반응을 억제하기 위해 5% 무지방 분유를 1x PBS에 녹여 만든 블로킹 용액에 NCM을 담근 후, 교반기위에서 1시간 동안 처리한 후 0.03% Tween-20이 함유된 1x PBS 완충용액으로 세척하였다.
- ⑦ 일차항체는 대장균에서 발현한 재조합단백질 rPhy-E에 대해 생산한 Phy IgG를 1x PBS로 희석하여(1:1,000, v/v) 사용하였다.
- ⑧ 이차항체는 1x PBS로 희석(1:7,000, v/v)한 goat anti-rat IgG alkaline phosphatase conjugate(Sigma Co., USA)를 사용하였다.
- ⑨ 일차항체 및 이차항체는 각각 1 시간씩 반응시켰고, 각 단계 후 3회 세척하였다.
- ⑩ nitroblue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate가 함유된 발색완충액에 NCM을 처리하여 발색시킨 후 항원-항체반응을 관찰하였다.
  - ㉠ 1x PBS 완충용액: 140mM NaCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.7mM KCl, 1.8mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(pH 7.4)
  - ㉡ 발색완충액: 100mM Tris, 100mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9.5
- ⑪ 웨스턴블롯 분석 결과, 재조합단백질 rPhy-P는 아그로박테리움을 주입한 잎 모든 시료(1-5일차)에서 잘 발현되었고, 분자량은 약 62kDa으로 관찰되었다(도 8b).
- ⑫ rPhy-P의 분자량을 이론적으로 계산하면 51kDa이기 때문에 10kDa의 차이는 당화(glycosylation)에 의한 것으로 추정된다.



도 8. pPZP212-phy를 함유한 아그로박테리아를 주입한 *Nicotiana benthamiana* 앞에서 추출한 재조합 피타아제 단백질. (a) 쿠마지블루 연색한 10% SDS-PAGE 젤; (b) 동일한 젤(a)의 웨스턴블롯 분석. M, 분자량 마커; 레인 1, 음성대조구 앞; 레인 2-6, 아그로박테리아를 주입한 후 1, 2, 3, 4, 5일차 앞

## 5. 재조합단백질 rPhy-P의 특성 규명

### (1) rPhy-P의 당화 분석

#### ① Schiff's 시약 염색법

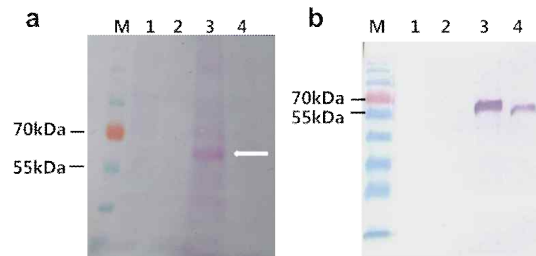
- ㉠ rPhy-P의 당화 정도를 분석하기 위해 pPZP212-phy를 함유한 아그로박테리움을 주입 5일 후 잎을 수확하여 시료를 준비하였다.
- ㉡ 시료를 1x PBS로 마쇄하고 원심분리하여 상층액을 수거한 후 분석시료로 준비하였다.
- ㉢ 10% SDS-PAGE를 실시하고 젤을 50%(v/v) 메탄올에 천천히 교반시키면서 철야 처리하였다.
- ㉣ 젤을 증류수에 20분 세척한 후에 2% 과요오드산(periodic acid)에 15분 처리하여 산화시켰다가 증류수에 2회 세척하였다(2분/1회).
- ㉤ 젤을 Schiff's 시약(Sigma, USA)에 핑크색이 나타날 때까지 교반하면서 염색한 후 2회 증류수로 세척하였다.
- ㉥ 젤을 2%(w/v) 중아황산소다(sodium metabisulfite)에 담가두었다.
- ㉦ 실험 결과, pPZP212-phy를 함유한 아그로박테리움 주입 5일 후 잎에서 추출한 Phy-P 재조합단백질이 당화되었음을 입증하였다(도 9a, 레인 3). 그러나 (5)-②에서 제시한 방법으로 동일한 시료에 PNGase F를 처리한 것은 탈당화되어 염색되지 않았다(도 9a, 레인 4).

#### ② 탈당화효소를 이용한 재조합단백질 rPhy-P 분석

- ㉠ rPhy-P의 당화 정도를 분석하기 위해 peptide-N-glycosidase F(PNGase F, Sigma, USA)를 시료에 처리하였다.
- ㉡ 시료(50 $\mu$ g)를 함유한 45 $\mu$ l 50mM 인산나트륨(sodium phosphate, pH7.5) 용액에 5 $\mu$ l 변성용액(0.2% SDS, 100mM 2-mercaptoethanol)를 첨가하고, 100 $^{\circ}$ C에서 10분간 단백질을 변성시켰다.
- ㉢ 반응혼합액을 15% Triton X-100를 처리하고 5 $\mu$ l PNGase F(500U/ml)를 첨가한 후 37 $^{\circ}$ C에서 3시간 처리하였다.
- ㉣ 100 $^{\circ}$ C에서 5분간 열처리하여 반응을 중지시키고 10% SDS-PAGE 및 웨스턴블롯 분석을 수행하였다.
- ㉤ 실험 결과, 효소처리 시료는 탈당화되어 약 56kDa 밴드로 관찰되었고, 무처리 시료는



62kDa으로 관찰되었다. 따라서 rPhy-P가 당화되었음을 다시 입증되었다(도 9b).



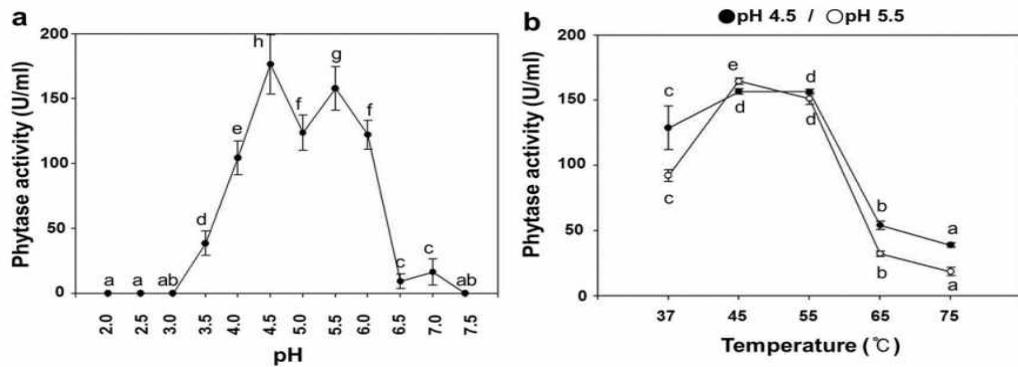
도 9. pPZP212-phy를 함유한 아그로박테리아를 주입 후 5일차 *Nicotiana benthamiana* 앞에서 추출한 총단백질에서 당화된 rPhy-P 탐색. (a) Schiff's 시약으로 염색한 10% SDS-PAGE 젤. M, 분자량 마커; 레인 1, 분리정제한 rPhy-E; 레인 2, 음성대조구 앞에서 추출한 총단백질; 레인 3, 5일차 *N. benthamiana* 앞에서 추출한 총단백질에 peptide-*N*-glycosidase F를 무처리; Lane 4, 5일차 *N. benthamiana* 앞에서 추출한 총단백질에 peptide-*N*-glycosidase F를 처리. (b) 아그로박테리아를 주입한 후 5일차 *N. benthamiana* 앞에서 추출한 총단백질과 음성대조구에서 추출한 총단백질의 웨스턴블롯 분석. 레인 1과 3은 peptide-*N*-glycosidase F 처리전 시료; 레인 2와 4는 peptide-*N*-glycosidase F 처리후 시료

## (2) 재조합단백질 rPhy-P의 효소활성, 최적 pH, 최적 온도 및 열안정성

### ① rPhy-P의 피타아제 활성 및 최적 pH

- ㉠ 총단백질 추출물: 음성대조구 및, 아그로박테리아 주입 후 5일차 및 증류수 블랭크(blank)
- ㉡ 반응완충용액 4종
  - 50mM 글라이신(pH 2.0-2.5)
  - 50mM 초산나트륨(pH 3.5-5.5)
  - 50mM MES(pH6.0-6.5)
  - 50mM HEPES(pH7.0-7.5)
- ㉢ 기질: 각 반응완충용액 300 $\mu$ l에 sodium phytate(2mM)과 CaCl<sub>2</sub>(1mM)을 함유시켰다.
- ㉣ 기질을 함유한 각 반응완충용액에 75 $\mu$ l 시료(10 $\mu$ g)를 첨가하고 55 $^{\circ}$ C에서 30분간 처리하였다.
- ㉤ 375 $\mu$ l 5% 트리클로로아세트산(trichloroacetic acid)을 첨가하여 반응을 종료하였다.
- ㉥ 발색시약을 750 $\mu$ l 첨가하고 5분 처리하였다.
  - 발색시약: 5.5% 황산에 용해한 1.5%(w/v) 몰리브덴산암모늄(ammonium molybdate, 4 vols): 2.7%(w/v) 황산제일철(ferrous sulfate, 1 vol)
- ㉦ 분광광도계로 흡광치 700nm에서 흡광치 측정하여 표준곡선(standard curve)의 값과 비교측정하였다.
  - 증류수 블랭크 흡광치를 0으로 만든 후 음성대조구 및 추출물의 흡광치를 측정
  - 아그로박테리아 주입 후 5일차 및 추출물의 흡광치는 음성대조구 및 추출물의 흡광치를 뺀 값으로 측정
- ㉧ 표준곡선은 제2인산칼륨(K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 용액을 농도별로 희석하여 흡광치 700nm에서 측정하였다.

- ㉔ 피타아제 1 유닛(U)은 1분당 1 $\mu$ mol Pi를 방출하는데 필요한 효소양으로 환산하였다.
  - ㉕ 특이적 활성(specific activity)은 U/ $\mu$ g 총단백질로 환산하였다.
  - ㉖ 효소활성은 2번 분석의 평균치 $\pm$ 표준편차로 계산하였다(시료당 3개 반복 /1회 분석)
  - ㉗ 실험 결과, 아스퍼질러스 니들란스 피타아제 유전자를 발현시킨 *N. benthamiana*의 앞에서 피타아제의 활성을 가진 재조합단백질이 생산되었다.
  - ㉘ 아스퍼질러스 니들란스 재조합단백질의 피타아제 활성은 기존에 보고된 아스퍼질러스 종들의 PhyA(최적 pH 5.5) 및 PhyB(최적 pH 2.5)와는 다소 차이가 있었다.
  - ㉙ 위에 언급한 실험조건에서 2개의 최적 pH (pH 4.5에서 최고 활성과 pH 5.5에서도 높은 활성)를 보였다(도 10a).
- ② rPhy-P의 피타아제 활성 최적 온도
- ㉚ (2)-①에서 최고 활성을 나타낸 pH 4.5와 5.5 조건에서 최적온도 및 내열성을 측정하였다.
  - ㉛ 총단백질 추출물: 음성대조구 및, 아그로박테리아 주입 후 5일차 잎 및 증류수 블랭크
  - ㉜ 반응완충용액: 초산나트륨(pH4.5와 pH5.5)
  - ㉝ 기질: 2가지 반응완충용액 300 $\mu$ l에 sodium phytate(2mM)과 CaCl<sub>2</sub>(1mM)을 함유시켰다.
  - ㉞ 온도: 37 $^{\circ}$ C, 45 $^{\circ}$ C, 55 $^{\circ}$ C, 65 $^{\circ}$ C, 75 $^{\circ}$ C
  - ㉟ 나머지 반응조건은(2)-①과 동일하였다.
  - ㊱ 실험 결과 2가지 pH 조건에서 유사하게 최적 활성이 45-55 $^{\circ}$ C에서 관찰되었다(도 10b).
  - ㊲ 그러나 65-75 $^{\circ}$ C에서는 효소활성이 약 1/3 수준으로 감소하였다.
  - ㊳ 위의 결과는 피타아제 유전자를 돌연변이에 의해 열에 대한 안정성을 더 증가시켜야 할 필요성이 있음을 암시한다.
  - ㊴ 예를 들어 당화가 잘되는 아미노산 서열을 고려할 필요성이 있다. 그러나 변경부위는 효소-기질 부착과는 관계없는 부위가 고려 대상이다.

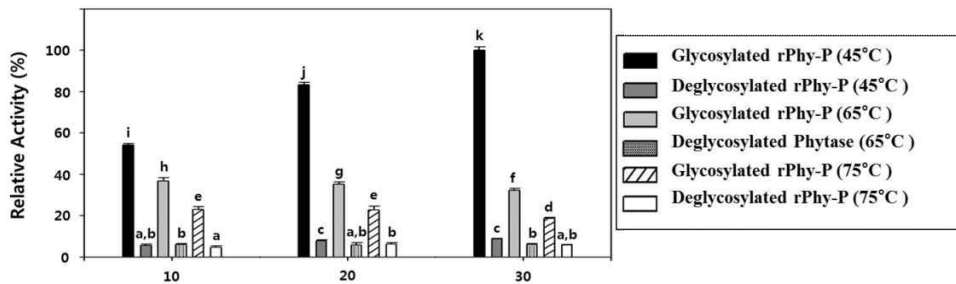


도 10. 아그로박테리아 주입 후 5일차 *Nicotiana benthamiana* 앞에서 발현된 피타아제 활성. (a) 총단백질의 피타아제 활성에 미치는 pH의 효과. 다양한 pH 조건에서의 효소활성은 55 $^{\circ}$ C, 30분 처리 후 측정되었다. 사용된 완충용액은 다음과 같다: 50mM glycine(pH 2.0-2.5), 50mM sodium acetate(pH 3.5-5.5), 50mM MES(pH6.0-6.5), 50mM HEPES(pH7.0-7.5). (b) 총단백질의 피타아제 활성에 미치는 온도의 효과. 효소활성은 pH 4.5와 5.5 조건아래서 온도 37-75 $^{\circ}$ C 및 30분 처리 후 측정되었다. 데이터는 특이적 활성으로 표현되었고 각 수치는 평균 $\pm$ 표준편차( $n = 6$ )

③ rPhy-P의 탈당화 처리에 따른 열안정성(thermostability)



- ㉔ (2)-①에서 최고 활성을 나타낸 pH 4.5 조건에서 온도 및 탈당화 처리에 따른 내열성을 측정하였다.
- ㉕ 총단백질 추출물: 음성대조구 외, 아그로박테리아 주입 후 5일차 외 및 증류수 블랭크에 탈당화효소 PNGase-F를 처리한 시료와 무처리 시료
- ㉖ 반응완충용액: 초산나트륨(pH4.5)
- ㉗ 기질: 2가지 반응완충용액 300 $\mu$ l에 sodium phytate(2mM)과 CaCl<sub>2</sub>(1mM)을 함유시켰다.
- ㉘ 온도 처리: 45 $^{\circ}$ C, 65 $^{\circ}$ C, 75 $^{\circ}$ C
- ㉙ 반응시간: 10-30분
- ㉚ 나머지 반응조건은(6)-①과 동일하였다.
- ㉛ 탈당화 처리하지 않은 rPhy-P는 45 $^{\circ}$ C에서 10분 후 상대적 피타아제 활성이 54%에서 30분 후 100%에 도달하였다(도 11).
  - 반면에 탈당화 처리된 rPhy-P는 45 $^{\circ}$ C에서 10분 후 상대적 피타아제 활성이 6%로 급격히 감소되었다.
- ㉜ 탈당화 처리하지 않은 rPhy-P는 65 $^{\circ}$ C에서 10분 후 상대적 피타아제 활성이 37%로 감소하였으나 30분 후도 32%를 유지하였다.
  - 반면에 탈당화 처리된 rPhy-P는 65 $^{\circ}$ C에서 10분 후 상대적 피타아제 활성이 6%로 급격히 감소되었다.
- ㉝ 탈당화 처리하지 않은 rPhy-P는 75 $^{\circ}$ C에서 10분 후 상대적 피타아제 활성이 23%로 감소하였으나 30분 후도 18%를 유지하였다.
  - 반면에 탈당화 처리된 rPhy-P는 75 $^{\circ}$ C에서 10분 후 상대적 피타아제 활성이 5%로 급격히 감소되었다.

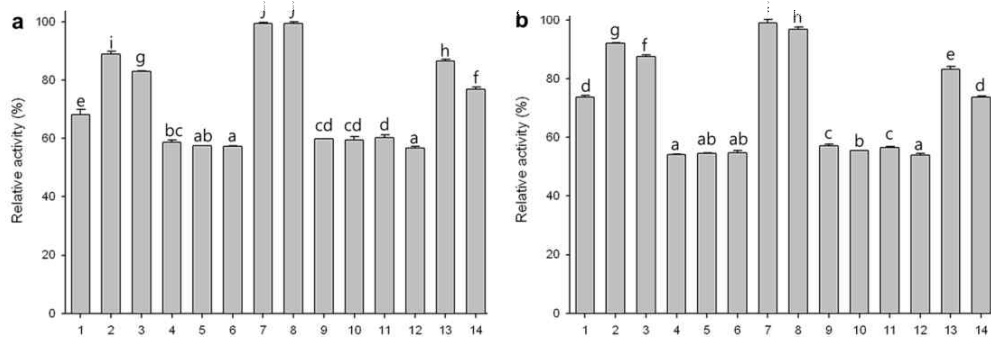


도 11. rPhy-P의 피타아제 활성의 열안정성에 미치는 당화 및 탈당화 효과를 45, 65 및 75 $^{\circ}$ C에 10 - 30분 처리 후 측정함. 데이터는 상대활성으로 표현되었고 각 수치는 평균 $\pm$ 표준편차이다( $n = 6$ ). 막대그래프에 표시된 알파벳은 유의한 차이를 나타냄( $p < 0.05$ )

### (3) 재조합단백질 rPhy-P의 기질 특이성

- ① pH 4.5 조건에서 기질에 따른 rPhy-P의 특이성을 측정하였다.
- ② 총단백질 추출물: 음성대조구 외, 아그로박테리아 주입 후 5일차 외 및 증류수 블랭크
- ③ 반응완충용액: 초산나트륨
- ④ 기질: 반응완충용액 300 $\mu$ l에 도 12에 명시한 기질 2mM을 함유시켰다.
- ⑤ 온도 처리: 45 $^{\circ}$ C, 55 $^{\circ}$ C
- ⑥ 반응시간: 30분

- ⑦ 나머지 반응조건은(6)-①과 동일하였다.
- ⑧ 실험 결과, rPhy-P는 45°C 및 55°C에서 광범위한 기질 특이성을 나타내었다.
- ⑨ 특히 AMP, ATP, ADP, tripolyphosphate, pyrophosphate, acetyl phosphate, sodium phosphate에 높은 상대활성을 보였다.
- ⑩ 기질 중 tripolyphosphate가 최고 상대활성을 나타내었다.



도 12. 45°C(a) 및 55°C(b)에서 rPhy-P의 기질 특이성. 시험한 모든 기질의 농도는 2mM을 사용하였다. 1, AMP; 2, ATP; 3, ADP; 4, ethanolamine phosphate; 5, O-phospho-l-serine; 6, β-glycerophosphate; 7, tripolyphosphate; 8, pyrophosphate; 9, pyridoxal-5-phosphate; 10, fructose-6-phosphate; 11, glucose-6-phosphate; 12, glucose-1-phosphate; 13, acetyl phosphate; 14, sodium phytate. 데이터는 상대활성으로 표현되었고 각 수치는 평균±표준편차이다(n = 3). 막대그래프에 표시된 알파벳은 유의한 차이를 나타냄(p < 0.05)

## 광중속영양 조건에서 클로렐라의 성장 및 바이오매스 증대를 위한 개량된 배지

[Modification of culture medium for the enhancement of *Chlorella* growth and biomass under photoheterotrophic condition]

### 가. 미세조류 대량배양을 위한 개량 BG-11배지 조성

#### 1. 미세조류

##### (1) 균주

클로렐라 불가리스(*Chlorella vulgaris*) AG40004를 한국생명공학원 균주은행으로부터 분양받아 BG-11배지(pH 7.5)에 배양하여 공시균주로 유지하였다.

##### (2) BG-11배지 조성

g/L: NaNO<sub>3</sub>, 1.5; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.04; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.075; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.036; Citric acid, 0.006; Ammonium ferric citrate green, 0.006; Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O, 0.001; Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.02; 1ml trace metal solution(g/L: H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 2.86; MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 1.81; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.222; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.39; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.079; Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.0494).

##### (3) 배양조건

- ① 진탕배양기
- ② 배양온도: 27℃
- ③ 회전속도: 170 rpm
- ④ 광: 4000 Lux, 24 시간

##### (4) 광학밀도(optical density; OD)와 성장률 분석

- ① 아래 (3), (4) 및 (5)에 제시된 각 처리구에서 배양한 미세조류의 성장곡선을 분석하기 위하여 분광광도계를 이용하여 광학밀도(OD<sub>595 nm</sub>)를 측정하였다.
- ② 성장률(growth rate)은 다음과 같은 공식 [Huang 등, 2002]으로 증식률(proliferous rate; K)과 평균세대시간(average generation time; G)을 계산하여 분석하였다.

$$\textcircled{a} K = \frac{\log OD_t - \log OD_0}{T} \times 3.322 \quad (\text{OD}_t: 7\text{일차 OD값}; \text{OD}_0: 0\text{일차 OD값}; T: \text{배양기간})$$

$$\textcircled{b} G(d) = \frac{0.301}{K}$$

- ③ 통계적 분석을 위해 각 처리구(3반복)의 평균값 비교는 던컨의 다중비교검정(Duncan's multiple range test)에 의해 유의성이 검증되었다.

#### 2. 영양원

##### (1) 탄소원

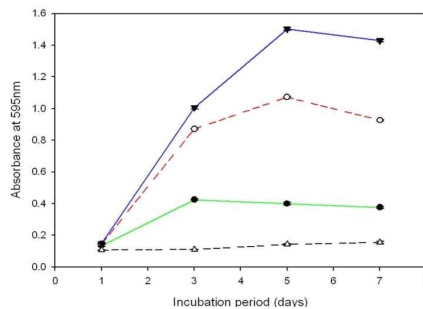
###### ① 포도당 농도

- ② 포도당을 농도별(1mM, 3mM, 5mM)로 첨가한 BG-11배지에 클로렐라 불가리스를 접종한 후 7일간 배양하면서 2일 간격으로 광학밀도를 측정하였다.

- 기본적으로 BG-11배지에 함유된 탄소원은 0.0036% 구연산(citric acid), 질소원은 0.15% 질산나트륨, 탄소+질소 복합원은 0.0006% 구연산철암모늄(Ammonium ferric citrate green)이 함유됨
- 따라서 BG-11배지에 함유된 탄소원과 질소원은 그 함량이 부족하기 때문에 미세조류의 성장과 생화학적 성분을 합성하는데 제한적임
- 따라서 BG-11배지에 포도당을 첨가하는 것이 일반적임 [Zhou 등, 2011]
- ㉠ 클로렐라 불가리스는 진탕배양기(온도: 27°C, 회전속도: 170 rpm, 광: 4000 Lux, 24 시간)에서 배양되었다.
- ㉡ 광중속영양 조건에서 각 처리구/3 반복 수행하였으며, 초기 OD 범위는 0.11-0.15로 측정되었다.

② 성장곡선

- ㉢ 실험결과(도 1), BG-11배지에 부가한 포도당 농도에 관계없이 클로렐라 불가리스는 새로운 배지 조건에 적응을 위한 1일간의 유도기(lag phase)를 거쳐 증식기(exponential phase)로 전환되었다.
- ㉣ 클로렐라 불가리스는 포도당 5mM을 첨가한 배지에서 가장 급속한 성장을 보여주었고 5일간 지속된 증식기는 포도당의 양이 감소함에 따라서 정체기(stationary phase)로 전환되었다.
- ㉤ 반면에 클로렐라 불가리스는 포도당 1mM을 첨가한 배지에서 완만한 성장을 나타내다가 배양 3일 후 정체기에 도달하였다.
- ㉥ 1mM, 3mM 및 5mM 포도당을 각각 첨가한 BG11배지에서 배양 7일 후 클로렐라 불가리스의 OD 값은 무첨가한 BG-11배지와 비교하여 약 4배, 9배 및 15배 증가한 것으로 측정되었다.



도 1. BG-11배지(△--△)에 탄소원인 포도당 1mM(●—●), 3mM(○-○), 5mM(▼—▼)을 각각 첨가하고 클로렐라 불가리스를 접종한 후 7일간 배양하면서 광학밀도(OD)를 595 nm에서 측정한 성장도이다. 각 처리구의 OD 값은 3반복의 평균치±표준편차

③ 성장률

- ㉦ 분석한 결과 표 1은 도 1의 성장곡선과 일치한다.
- ㉧ BG-11배지에 첨가한 포도당 농도를 1mM에서 5mM로 증가시켰을 때, 클로렐라 불가리스의 증식률은 유의성있게 증가한 반면 평균세대시간은 유의성있게 감소하였다.
- ㉨ 5mM 포도당을 첨가한 BG-11배지와 무첨가한 BG-11배지를 비교했을 때, 증식률은 6배 높았고 평균세대시간은 1/6배 단축되었다.

[표 1] 농도별 포도당을 첨가한 BG-11배지에서 성장한 클로렐라 불가리스의 증식률(K)과 평균세대시간(G)

배지	K	G
BG11	0.09±0.01(a)	3.34±0.35(a)
+ Glucose 1mM	0.25±0.01(b)	1.23±0.04(b)
+ Glucose 3mM	0.44±0.01(c)	0.68±0.01(c)
+ Glucose 5mM	0.54±0.00(d)	0.55±0.00(d)

\*상기 값은 평균값±표준편차(n=3) 이며 ( )안의 문자는 유의성있는 차이를 명시함(P<0.05)

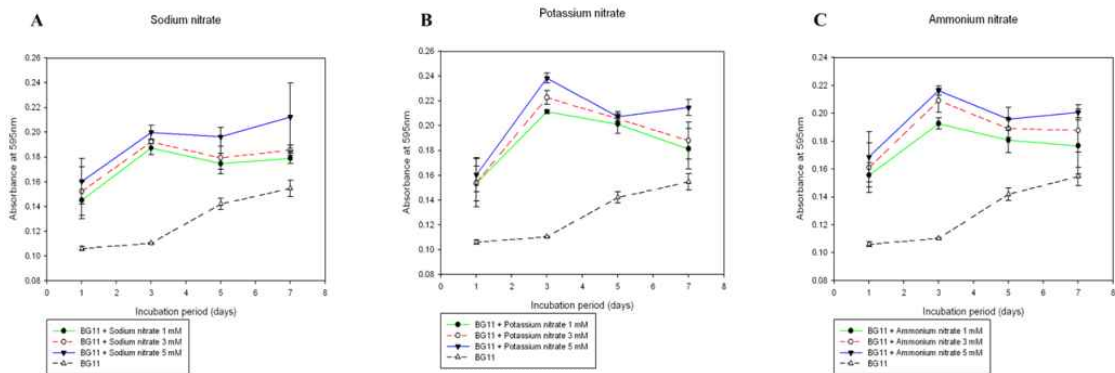
(2) 무기질소원

① 무기질소원 종류 및 농도

- ㉠ 무기질소원(질산나트륨, 질산칼륨, 질산암모늄) 각각을 농도별(1mM, 3mM, 5mM)로 첨가한 BG-11배지에 클로렐라 불가리스를 접종한 후 7일간 배양하면서 2일 간격으로 광학밀도를 측정하였다.
- ㉡ 클로렐라 불가리스는 진탕배양기(온도: 27°C, 회전속도: 170 rpm, 광: 4000 Lux, 24 시간)에서 배양되었다.
- ㉢ 광중속영양 조건에서 각 처리구/3 반복 수행하였으며, 광학밀도 초기 범위는 0.17-0.23으로 측정되었다.

② 성장곡선

- ㉠ 실험결과, 질산나트륨(도 2A), 질산칼륨(도 2B) 및 질산암모늄(도 2C)을 첨가한 BG-11배지와 무첨가한 BG-11배지에서 자란 클로렐라 불가리스의 성장곡선을 비교하였다. 주어진 농도에 따라서 다소 증가된 OD 값이 측정되었다.
- ㉡ 성장곡선을 비교했을 때 무첨가한 BG-11배지에서 클로렐라 불가리스는 배양 3일 후에 증식기를 시작하여 7일째까지 완만하게 진행되었다.
- ㉢ 반면에 3 종류의 무기질소원을 각각 첨가한 BG-11배지에서 주어진 농도에 관계없이 클로렐라 불가리스는 배양 1일 후부터 증식기를 시작하여 3일째 정체기에 도달한 후 7일째까지 완만하게 감소하였다.
- ㉣ 배양 7일 후 측정된 최대 OD 값은 무처리한 BG-11배지와 비교하여 다소 증가하였으나, 상기에서 포도당을 첨가한 BG-11배지에서 측정된 OD 값의 약 1/7 수준이었다.
- ㉤ 아마도 BG-11배지에 존재하는 0.15% 질산나트륨이 클로렐라 불가리스 배양에 부족하지 않은 양으로 무기질소원의 추가적 첨가는 필요하지 않은 것으로 사려된다.



도 2. 무기질소원인 질산나트륨(A), 질산칼륨(B), 질산암모늄(C)을 1mM(●—●), 3mM(○—○) 및 5mM(▼—▼)을 각각 BG-11배지(△—△)에 첨가하고 클로렐라 불가리스를 접종한 후 7일간 배양하면서 흡광치를 595 nm에서 측정한 성장도이다. 각 처리구의 OD 값은 3반복의 평균치±표준편차

③ 성장률

- ㉔ 상기의 무기질소원을 농도별로 첨가한 BG-11배지를 무첨가한 BG-11배지와 비교했을 때, 클로렐라 불가리스의 증식률은 더 낮았고, 평균세대시간도 더 길었다(표 2).
- ㉕ 이 결과는 BG-11배지에 질산 질소원이 포화상태에 도달하여 성장에 제한요인이 되었음을 암시한다.

[표 2] 농도별 무기질소원을 첨가한 BG-11배지에서 성장한 클로렐라 불가리스의 증식률(K)과 평균세대시간(G)

배지 / 농도	K	G
BG11	0.09±0.019(a)	3.34±0.35(a)
+ Sodium nitrate 1 mM	0.05±0.02(b)	6.53±2.87(ab)
+ Sodium nitrate 3 mM	0.049±0.02(b)	8.93±7.39(bc)
+ Sodium nitrate 5 mM	0.07±0.02(ab)	4.69±1.34(a)
+ Potassium nitrate 1 mM	0.04±0.00(b)	7.47±0.30(b)
+ Potassium nitrate 3 mM	0.05±0.01(b)	6.71±2.58(ab)
+ Potassium nitrate 5 mM	0.07±0.01(ab)	4.37±0.89(a)
+ Ammonium nitrate 1 mM	0.03±0.01(c)	11.75±4.82(c)
+ Ammonium nitrate 3 mM	0.04±0.05(bc)	8.27±1.50(bc)
+ Ammonium nitrate 5 mM	0.04±0.02(bc)	8.02±3.02(bc)

\*상기 값은 평균값±표준편차(n=3) 이며 ( )안의 문자는 유의성있는 차이를 명시함(P<0.05)

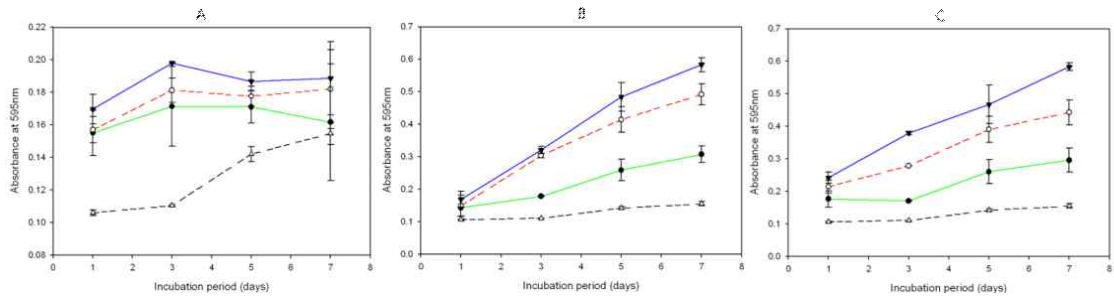
(3) 유기질소원(요소, 펩톤, 효모추출물)

① 유기질소원 종류 및 농도

- ㉔ 각 유기질소원을 농도별(1mM, 3mM, 5mM)로 첨가한 BG-11배지에 클로렐라 불가리스를 접종한 후 7일간 배양하면서 2일 간격으로 광학밀도를 측정하였다.
- ㉕ 클로렐라 불가리스는 진탕배양기(온도: 27℃, 회전속도: 170 rpm, 광: 4000 Lux, 24 시간)에서 배양되었다.
- ㉖ 광중속영양 조건에서 각 처리구/3 반복 수행하였으며, 광학밀도 초기 범위는 0.17-0.23으로 측정되었다.

② 성장곡선

- ㉔ 실험결과, 유기질소원에 따라서 다른 결과가 관찰되었다.
- ㉕ 무기질소원 실험결과와 유사하게 요소를 첨가한 BG-11배지에서 클로렐라 불가리스는 주어진 농도에 따라서 무첨가한 BG-11배지와 비교하여 다소 증가된 OD 값이 측정되었다(도 3A).
- ㉖ 한편 무첨가한 BG-11배지와 비교하여 펩톤(도 3B) 및 효모추출물(도 3C) 각각을 농도별(1mM, 3mM 및 5mM)로 첨가한 BG-11배지에서 배양 7일 후 클로렐라 불가리스의 OD 값은 약 2.5배, 4~4.5배 및 6배 증가한 것으로 측정되었다.
- ㉗ 그러나 포도당을 첨가한 BG-11배지에서 측정된 OD 값의 약 1/2.5 수준이었다.



도 3. 유기질소원인 요소(A), 펩톤(B), 효모추출물(C)을 1mM(●—●), 3mM(○--○) 및 5mM(▼—▼) 각각 BG-11배지(△--△)에 첨가하고 클로렐라 불가리스를 접종한 후 7일간 배양하면서 흡광치를 595 nm에서 측정한 성장도이다. 각 처리구의 OD 값은 3반복의 평균치±표준편차

### ③ 성장률

- ㉠ 상기의 유기질소원을 농도별로 첨가한 BG-11배지에서 클로렐라 불가리스의 증식률과 평균세대시간은 질소원에 따라서 다양하였다(표 3).
- ㉡ 요소를 농도별로 첨가한 BG-11배지의 경우는 무기질소원을 농도별로 첨가한 BG11배지와 유사한 결과를 보였다.
- ㉢ 펩톤과 맥아추출물의 농도를 1mM에서 5mM로 증가시킨 BG-11배지의 경우 클로렐라 불가리스의 증식률은 다소 증가한 반면 평균세대시간은 약간 감소하였으나 유의성은 없었다.

[표 3] 농도별 유기질소원을 첨가한 BG-11배지에서 성장한 클로렐라 불가리스의 증식률(K)과 평균세대시간(G)

배지 /	농도	K	G
BG11		0.09±0.019(a)	3.34±0.35(ab)
+ Urea	1 mM	0.07±0.03(a)	8.07±18.49(b)
+ Urea	3 mM	0.03±0.3(a)	21.89±25.87(c)
+ Urea	5 mM	0.02±0.02(a)	15.34±7.32(bc)
+ Peptone	1 mM	0.19±0.04(b)	1.68±0.41(a)
+ Peptone	3 mM	0.29±0.04(c)	1.05±0.17(a)
+ Peptone	5 mM	0.30±0.03(c)	1.01±0.12(a)
+ Yeast extract	1 mM	0.12±0.04(ab)	2.57±0.72(ab)
+ Yeast extract	3 mM	0.17±0.049(b)	1.78±0.37(a)
+ Yeast extract	5 mM	0.21±0.01(bc)	1.42±0.10(a)

\*상기 값은 평균값±표준편차(n=3)이며 ( )안의 문자는 유의성있는 차이를 명시함(P<0.05)

### (4) 아미노산(글라이신, 알지닌)

#### ① 아미노산 종류 및 농도

- ㉠ 유기질소원인 각 아미노산을 농도별(1mM, 3mM, 5mM)로 첨가한 BG-11배지에 클로렐라 불가리스를 접종한 후 7일간 배양하면서 2일 간격으로 광학밀도를 측정하였다.
- ㉡ 클로렐라 불가리스는 진탕배양기(온도: 27℃, 회전속도: 170 rpm, 광: 4000 Lux, 24 시간)에서 배양되었다.



㉔ 광중속영양 조건에서 각 처리구/3 반복 수행하였으며, 광학밀도 초기 범위는 0.17-0.23으로 측정되었다.

② 성장곡선

㉑ 아미노산 실험결과는 아미노산에 따라서 다른 성장곡선이 관찰되었다.

㉒ 글라이신 1mM 및 3mM을 첨가한 BG-11배지에서 클로렐라 불가리스는 완만한 증식기를 지나 배양 5일 후부터 정체기에 도달한 반면, 5mM을 첨가한 BG-11배지에서 클로렐라 불가리스는 배양 5일까지는 급격한 증식기와 7일까지는 완만한 증식기를 보였다(도 4A).

㉓ 무처리한 BG-11배지와 비교하여 배양 후 7일 후에 측정된 OD 값은 약 2.5배(1mM), 4.5배(3mM) 및 6.6배(5mM)로 증가하였다.

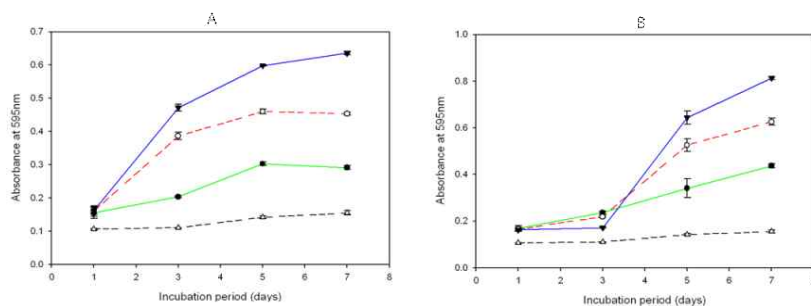
㉔ 그러나 글라이신 5mM 농도의 OD값은 상기에서 포도당 5mM을 첨가한 BG-11배지에서 측정된 OD 값의 약 1/2.3 수준이었다.

㉕ 알지닌의 경우 농도에 관계없이 3일간의 유도기를 거쳐 증식기로 전환되었다(도 4B).

㉖ 알지닌 1mM 을 첨가한 BG-11배지에서 클로렐라 불가리스는 완만한 증식기가 배양 후 7일까지 지속된 반면, 3mM과 5mM을 첨가한 BG-11배지에서 클로렐라 불가리스는 배양 후 7일까지는 급격한 증식기를 보였다.

㉗ 무처리한 BG-11배지와 비교하여 배양 후 7일 후에 측정된 OD 값은 약 4배(1mM), 6배(3mM) 및 8배(5mM)로 증가하였다.

㉘ 그러나 알지닌 5mM 농도의 OD 값은 상기에서 포도당 5mM을 첨가한 BG-11배지에서 측정된 OD 값의 약 1/1.9 수준이었다.



도 4. 유기질소원인 글라이신(A)과 알지닌(B)을 1mM(●—●), 3mM(○--○) 및 5mM(▼—▼) 각각 BG-11배지(△--△)에 첨가하고 클로렐라 불가리스를 접종한 후 7일간 배양하면서 흡광치를 595 nm에서 측정한 성장도이다. 각 처리구의 OD 값은 3반복의 평균치±표준편차

③ 성장률

㉑ 표 4에 나타난 아미노산 농도별로 첨가한 BG-11배지에서 클로렐라 불가리스의 증식률과 평균세대시간은 도 4의 성장곡선과 일치하였다.

㉒ 특별히 5mM 알지닌을 첨가한 BG-11배지와 무첨가한 BG-11배지를 비교했을 때, 증식률은 4.3배 높았고 평균세대시간은 1/4.3배로 단축되었다.



[표 4] 농도별 아미노산 질소원을 첨가한 BG-11배지에서 성장한 클로렐라 불가리스의 증식률(K)과 평균세대시간(G)

배지 /	농도	K	G
BG11		0.09±0.019(a)	3.34±0.35(a)
+ Glycine	1 mM	0.15±0.02(ab)	1.99±0.27(ab)
+ Glycine	3 mM	0.25±0.02(b)	1.21±0.10(b)
+ Glycine	5 mM	0.33±0.01(c)	0.92±0.04(c)
+ Arginine	1 mM	0.23±0.02(b)	1.32±0.12(b)
+ Arginine	3 mM	0.32±0.01(c)	0.94±0.04(c)
+ Arginine	5 mM	0.39±0.01(d)	0.78±0.02(d)

\*상기 값은 평균값±표준편차(n=3) 이며 ( )안의 문자는 유의성있는 차이를 명시함(P<0.05)

(5) 탄소원+질소원 혼합

① 처리구 조합 및 농도

㉠ 질소원 중 클로렐라 불가리스 성장에 가장 효과가 탁월한 알지닌과 탄소원인 포도당을 다음과 같이 혼합하였다

- 처리구 1: 5mM 포도당+1mM 알지닌, 처리구 2: 5 mM 포도당+5mM 알지닌, 처리구 3: 1mM 포도당+5mM 알지닌

㉡ 각 처리구를 첨가한 BG-11배지에 클로렐라 불가리스를 접종한 후 7일간 배양하면서 2 일 간격으로 광학밀도를 측정하였다.

㉢ 클로렐라 불가리스는 진탕배양기(온도: 27°C, 회전속도: 170 rpm, 광: 4000 Lux, 24 시간)에서 배양되었다.

㉣ 광중속영양 조건에서 각 처리구/3 반복 수행하였으며, 광학밀도 초기 범위는 0.2로 측정되었다.

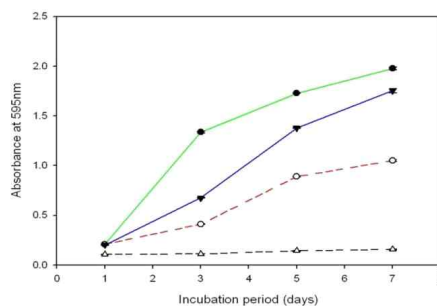
② 성장곡선

㉠ 본 실험 전에는 탄소원+질소원 조합 처리구 중에서 5mM 포도당+5mM 알지닌을 첨가한 BG-11배지에서 클로렐라 불가리스성장이 가장 탁월한 효과를 보일 것으로 기대하였다.

㉡ 그러나 예상과 달리 5mM 포도당+1mM 알지닌을 첨가한 배지에서 클로렐라 불가리스 성장이 가장 탁월한 것으로 관찰되었다(도 5).

㉢ 무처리한 BG-11배지와 비교하여 배양 7일 후에 측정된 OD 값은 약 20배 증가하였다.

㉣ 따라서 본 결과는 탄소원과 질소원의 C/N 비율이 클로렐라 불가리스의 성장에 미치는 매우 중요한 요인임을 입증하였다.



도 5. BG-11배지( $\Delta-\Delta$ )에 포도당 5mM+알지닌 1mM( $\bullet-\bullet$ ), 포도당 5mM+알지닌 5mM( $\blacktriangledown-\blacktriangledown$ ), 포도당 1mM+알지닌 5mM( $\circ-\circ$ )을 각각 첨가하고 클로렐라 불가리스를 7일간 배양하면서 OD 595 nm에서 측정된 성장곡선이다. 각 처리구의 OD 값은 3반복의 평균치±표준편차

③ 성장률

- ㉠ 포도당과 알지닌을 조합하여 첨가한 BG-11배지에서 클로렐라 불가리스의 증식률과 평균세대시간은 Fig. 5의 성장곡선과 일치하였다.
- ㉡ 특별히 포도당 5mM+알지닌 1mM을 첨가한 BG-11배지와 무첨가한 BG-11배지를 비교했을 때, 증식률은 6배 높았고 평균세대시간은 1/10.8배로 단축되었다(표 5).

[표 5] 탄소원+질소원 농도 조합을 첨가한 BG-11배지에서 성장한 클로렐라 불가리스의 증식률(K)과 평균세대시간(G)

배지	K	G
BG11	0.09±0.01(a)	3.34±0.35(a)
+ Glucose 5 mM + Arginine 1 mM	0.54±0.01(b)	0.31±0.01(b)
+ Glucose 1 mM + Arginine 5 mM	0.39±0.01(c)	0.43±0.01(c)
+ Glucose 5 mM + Arginine 5 mM	0.52±0.01(b)	0.31±0.01(b)

\*상기 값은 평균값±표준편차(n=3)이며 ( )안의 문자는 유의성있는 차이를 명시함(P<0.05)

(6) 바이오매스 및 생화학적 구성분 분석

① 처리구 조합 및 농도에 따른 바이오매스

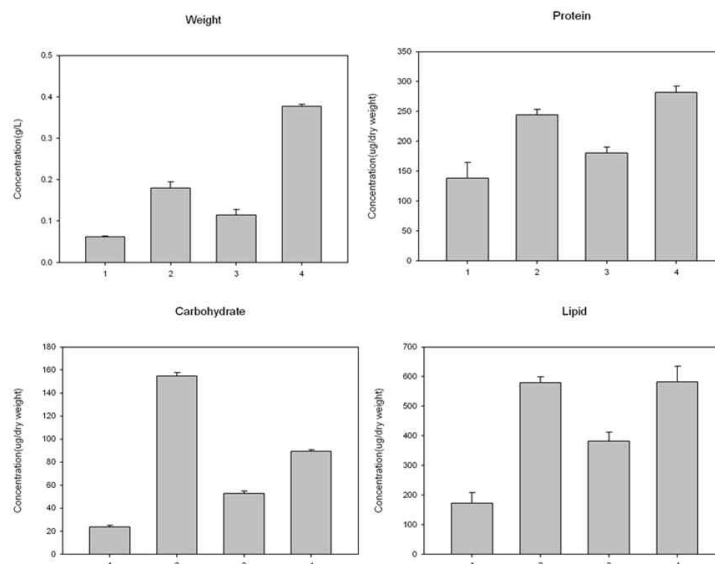
- ㉠ 탄소원 단독, 질소원 단독 및 탄소원+질소원 혼합이 클로렐라 불가리스 바이오매스에 미치는 영향을 조사하기 위하여 3개 처리구를 조사하였다.
- ㉡ 각 처리구는 3반복 수행하였다.
  - 처리구 1: 5mM 포도당
  - 처리구 2: 5mM 알지닌
  - 처리구 3: 5mM 포도당+1mM 알지닌
- ㉢ 각 처리구를 BG-11 배지에 첨가한 후 클로렐라 불가리스를 접종하고 배양 7일 후 원심 분리(10,000rpm, 5분)하여 배양액으로부터 세포를 수확하여 시료로 사용하였다.
- ㉣ 각 시료는 증류수로 2회 세척하여 동결건조 후 건물중(dry weight)을 측정하였다.
- ㉤ 실험결과, BG-11+5mM 포도당 단독, BG-11+5mM 알지닌 단독 및 BG-11+5mM 포도당+1mM 알지닌 혼합 배지에서 생산된 클로렐라 불가리스의 바이오매스는 BG-11 배지에서 생산된 바이오매스와 비교하여 각각 2.9배, 1.9배, 6배 증가되었다(도 6A).
- ㉥ 따라서 BG-11+5mM 포도당+1mM 알지닌 조합배지가 바이오매스 생산에 최적 조건으로 판명되었다.

② 생화학적 성분 분석

- ㉠ 수용성 총단백질 함량의 분석은 Lowry 방법으로 [Lowry 등, 1951] 분석하였다. 각 처리구 3 반복 동결건조 시료 5μg, 증류수 145μL 및 로우리 용액 800μL를 1.5mL 원심분리 튜브에 넣고, 초음파세포파쇄기로 세포를 파쇄하여 혼합한 후 암 조건의 실온에서 20분간 정치하였다. Folin-Ciocalteu's Phenol 시약 100μL를 각 튜브에 넣고, 반응액을 즉시

혼합한 후 1시간 암 조건의 실온에서 정치한 후 560nm에서 흡광치를 측정하였다.

- ㉔ 총탄수화물 함량의 분석은 앤쓰론(Anthrone) 시험으로 [van Handel, 1985a] 결정하였다. 각 처리구 3 반복 동결건조 시료 5mg, 2% 황산나트륨(sodium sulphate) 200 $\mu$ L를 1.5mL 원심분리 튜브에 넣고, 초음파세포파쇄기로 세포를 파쇄한 후 13,000rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 수확하였다. 15mL 튜브에 상등액 100 $\mu$ L를 옮긴 후 앤쓰론 반응액 2mL를 혼합하고 12분간 100 $^{\circ}$ C에서 가열하였다. 시료를 냉각시킨 후 625nm에서 흡광치를 측정하였다.
- ㉕ 총지질 함량의 분석은 van Handel [1985b]과 Waburg & Yuval [1996]의 방법을 변형하였다. 각 처리구의 3 반복 동결건조 시료 1mg 클로로포름:메탄올(1 chloroform : 2 methanol, v/v) 750 $\mu$ L 및 증류수 100 $\mu$ L를 1.5mL 원심분리 튜브에 넣고, 초음파세포파쇄기로 세포를 파쇄한 후 혼합하였다. 혼합액에 클로로포름 250 $\mu$ L 및 증류수 250 $\mu$ L를 추가하고 혼합한 후 10,000rpm에서 5분간 원심분리하였다. 하층액 250 $\mu$ L를 수확하여 새 튜브로 옮기고 건조한 후 농축 황산용액 500 $\mu$ L를 첨가하고 혼합하였다. 혼합액을 100 $^{\circ}$ C에서 10분 가열 후 냉각시켰다. 100 $\mu$ L를 수확하여 새 튜브로 옮긴 후 phospho-vanillin 반응액 900 $\mu$ L를 첨가하여 색 반응이 나타나도록 30분간 실온에서 혼합한 후 530nm에서 흡광치를 측정하였다.
- ㉖ 위의 방법으로 수행한 실험결과(도 6B, 6C, 6D), BG-11 배지에서 성장한 클로렐라 불가리스의 생화학적 성분은 총지질(17.3% 건물중), 총단백질(14% 건물중), 탄수화물(2% 건물중) 함량 순서로 구성됨이 판명되었고, BG-11+5mM 포도당+1mM 알지닌 혼합배지에서 성장한 클로렐라 불가리스의 생화학적 성분은 총지질(58% 건물중), 총단백질(28% 건물중), 총탄수화물(9% 건물중) 함량 순서로 구성됨이 판명되었다.
- ㉗ 결과적으로 BG-11 배지와 비교하여 BG-11+5mM 포도당+1mM 알지닌 혼합배지에서 총지질은 3.3배, 총단백질은 2배, 총탄수화물은 4.6배 증가되었다.
- ㉘ 한편 총탄수화물의 최대함량은 BG-11+5mM 포도당 배지에서 측정되었다. 이 결과는 클로렐라 불가리스의 탄수화물 함량이 BG-11배지에 부가한 질소원보다는 탄소원인 포도당 농도에 크게 영향을 받는다는 것을 암시하였다.



도 6. BG-11배지(1)에 포도당 5mM(2), 알지닌 5mM(3), 포도당 5mM+알지닌 1mM(4)을 각각 첨가하고 클로렐라 불가리스를 접종한 후 7일간 배양한 후 원심분리하여 수확한 후 각 처리구에서 바이오매스, 단백질, 탄수화물 및 지질 함량을 비교한 그래프

## 나. 미세조류 공생균 리조비움의 셀룰레이즈 활성을 이용하여 미강의 셀룰로스 분해 및 이를 이용한 미세조류 대량배양 탄소원 기질 생산

### 1. 미세조류로부터 공생균의 분리, 동정 및 배양

#### (1) 분리 및 배양

- ① 클로렐라 불가리스 배양액을 멸균된 증류수 10mL에 현탁하였다.
- ② 이 현탁액을 10<sup>-6</sup>까지 멸균증류수로 희석한 후 LB 아가(g/L: Bacto-tryptone, 10; yeast extract, 5; NaCl; 10, pH 7.5, agar, 15) 배지에 도말하여 콜로니를 형성하는 균주를 분리하였다.

#### (2) 동정

- ① 분리된 공생균의 생화학적 특성분석 결과 표 6과 같이 운동성, 키틴 가수분해, 아조카제인 가수분해에서 양성반응을 보였으나, 젤라틴 가수분해에서 음성반응을 보였다.
- ② 또한 16s rDNA 분석으로 염기서열을 동정한 결과 도 7과 같았다.
- ③ 상기 균주의 형태 관찰, 생화학적 특성분석 및 16s rDNA 분석 결과 리조비움 종(*Rhizobium* sp.)으로 확인되어, 공생균을 리조비움(*Rhizobium* sp.) OS1으로 명명하였다.

Rhizobium-OS1 1336bp

```
GGGAGTGGCAGACGGGTGAGTAAACGCGTGGGAAACATACCCTTTCCTGCGGAATAGCTCCGGGAAACTGGAATTAATAC
CGCATACGCCCTACGGGGGAAAGATTATCGGGGAAGGATGGCCCGCTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGTAAGGC
CTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAAAGATGATCAGCCAGATTGGGACGAGAGACGGCCAAACTCCATAC
GGGAGGCAGCAGTGGGAAATATGGACAATGGGCGCAAGCCIGATCCAGCCATGCCCGGIGAGTGAAGAAGCCCTTA
GGGTTGTAAGGCTCTTTCACCGGAGAAGATAATGACGGIATCCGGAGAAGAAAGCCCGGCTAACCTCGTGCCAGCAGC
GCGCGTAATACGAAGGGGGCTAGCCTTGTTCGGAATTACTGGGCCTAAAGCGCACGTAAGGCGGATAATTAAGCTCAGGG
GTGAATCCCAAGGCTCAACTCTGSACTGCGCTTTSATACTGGGTATCTTGAATATGGAAAGGTAAGTGGAAATCCGGA
GTGTAGAGGTGAATTCGTAGATATTCCGAGGAACACCAGTGGCGAAAGGCGGCTTACTGTCCATTACTGACGCTGAG
GTGCGAAAGCGTGGGGAGCAACACAGGATTAGATACCCTGGTGTCCACCGCGTAAACGATGAATGTTAGCCGTCGGC
AGTATACGTTCCGGTGGCGCAGCTAACGCTAAACATTCGCGCTGGGGAGTACGGTCCGAAGATTAAACTCAAGGA
ATTGAGGCGGCGCCCGCAGAGCGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACCGCGCAAGCACTTACCAAGCTCTTGA
TTCGGGTTTGGCAGTGGAGACATTTGCTTTCAGTTAGGCCTGACCCAGAACAGGCTGTCATGGCTGTCGTCAGCTC
GTGCTGTGAGATGTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTCGCCCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCAGCTA
AGGGACTGCCGCTGATAAGCCGAGAGGAAAGGTGGGGATGACGTCAGTCCCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCACAC
CACGTCTACAAATGGTGGTACAGTGGGACCGGAGACAGCGGATGTCGAGCTAATCTCCAAAGCCATCTCAGTTGGGA
TTGCACCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATGCTCGGTTGAATACGTTCCCG
GGCCTTGTACACACCGCCCGTCAACCCATGGGAGTTGGTTTACCCGAAGGTAGTGGCTAACCCGAAGGAGGCGAGCT
AACCAACG
```

도 7. 리조비움(*Rhizobium* sp.) OS1의 rDNA 염기서열

[표 6] 클로렐라 불가리스로부터 분리한 리조비움 OS1의 생화학적 특성

생화학적 특성	반응	
그람 염색	-	
운동성	+	
LB배지에 첨가된 NaCl(w/v)	0% NaCl	+
	2% NaCl	+
	3% NaCl	+
	4% NaCl	+
키틴 가수분해	+	
아조카제인 가수분해	+	
젤라틴 가수분해	-	

#### (3) 공생균의 고유 항생제내성(intrinsic antibiotic resistance) 분석

- ① 공생균의 항생제 내성을 분석하기 위하여 필터로 멸균한 3종의 항생제 티멘틴(timentin), 앰피실린(ampicillin) 및 가나마이신(kanamycin)을 농도별(최종농도 0µg/ml, 250µg/ml,

500µg/ml, 750µg/ml, 1000µg/ml)로 멸균된 LB 배지 및 BG-11 배지에 후처리하였다.

- ② 순수분리된 공생균을 배지에 접종한 후 28°C에서 3일간 진탕 배양하였다.
- ③ 각 처리구의 배양액을 수거하여 분광광도계를 이용하여 흡광치(OD<sub>600 nm</sub>)를 측정하였고 공생균의 생존을 관찰하기 위하여 LB 아가 평판배지에 접종하여 7일간 관찰하였다.
- ④ 관찰 결과, 공생균의 항생제 저항성은 배지에 따라서 표 7과 같이 다양한 결과를 보였다. 티멘틴을 처리한 LB 배지에서는 500µg/ml 농도까지 저항성을 보인 반면에, 동 항생제를 처리한 BG-11 배지에서는 250µg/ml 농도까지 저항성을 보였다.
- ⑤ 앰피실린을 처리한 LB 배지에서는 1250µg/ml 농도까지 저항성을 보인 반면에, 동 항생제를 처리한 BG-11 배지에서는 5개 농도 처리구에서 전혀 저항성을 보이지 않았다.
- ⑥ 가나마이신을 처리한 LB 배지에서는 1000µg/ml 농도까지 저항성을 보인 반면에, 동 항생제를 처리한 BG-11 배지에서는 250µg/ml 농도까지 저항성을 보였다.

[표 7] 리조비움 OS1의 항생제 저항성

Antibiotics / Concentration (µg/ml)	timentin		ampicillin		kanamycin	
	LB	BG-11	LB	BG-11	LB	BG-11
0	+	+	+	+	+	+
250	+	±	+	-	+	+
500	+	-	+	-	+	-
750	-	-	+	-	+	-
1000	-	-	+	-	+	-
1250	-	-	±	-	-	-

## 2. 리조비움의 셀룰로오스(cellulose) 분해능 및 셀룰레이즈(cellulase) 효소활성

### (1) 셀룰로오스 분해능 분석

- ① 분리된 공생균주를 CMC 아가 고체배지(1% carboxymethylcellulose, 1% peptone, 0.2% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.03% MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.25% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.2% gelatin, 1% agar, pH 7.0)에 도말하였다.
- ② 24-48 시간 후 투명한 형성 유무를 0.5% 콩고레드(Congo red)로 30분 염색하고 1M 염화나트륨으로 세척하여 확인하였다(도 8).

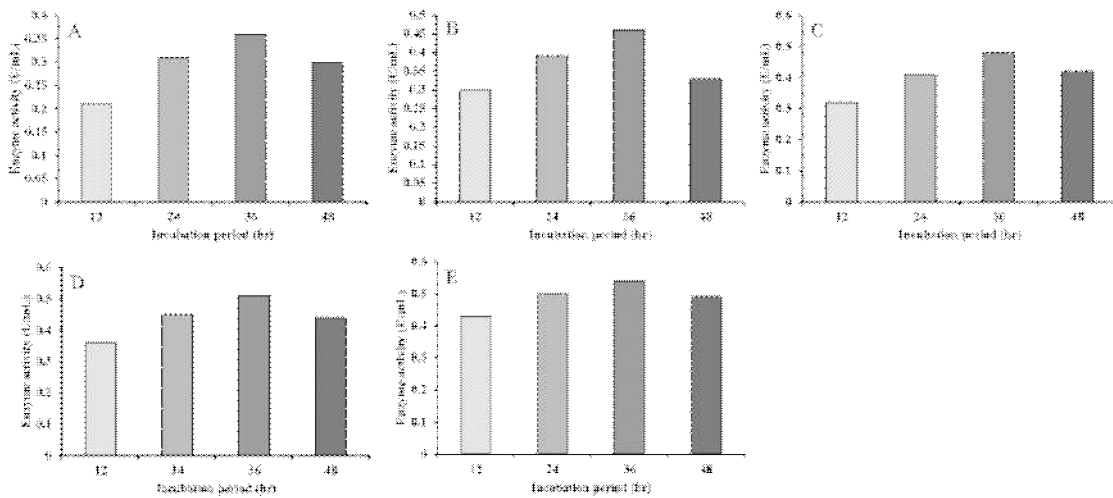


도 8. 공생균인 리조비움(Rhizobium sp.) OS1 콜로니가 세포밖으로 셀룰레이즈를 분비하여 기질인 CMC를 분해하여 투명환을 형성하는 사진

### (2) 배양시간 및 기질농도에 따른 셀룰레이즈 효소활성

- ① 공생균주를 멸균된 CMC 농도별(0.1%, 0.5%, 1%, 1.5%, 2%)로 액체배지(1% peptone, 0.2% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.03% MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.25% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7.0)에 접종한 후 48시간 동안 배양하였다.
- ② 배양액을 원심분리(10,000 rpm, 10분)하여 상등액을 조효소액 시료로 수확하였다.

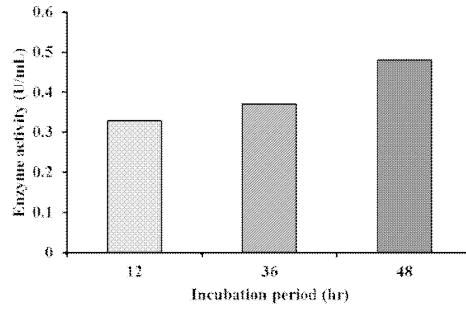
- ③ 셀룰레이즈 활성은 dinitrosalicylic acid(DNS) 시약을 이용하여 50mM citrate(pH 4.8) 용액에 용해된 CMC로부터 방출되는 환원당을 측정하였다.
- ④ 조효소액 0.5mL를 0.5mL citrate 용액에 첨가하여 50도에서 30분 처리하고 3mL DNS 시약을 첨가한 후 100도에서 10분 가열 후 반응을 종료하였다.
- ⑤ 시료는 540nm에서 시료를 제외한 모든 반응액(블랭크) 값에 대한 흡광도로 결정하였고, 셀룰레이즈 활성 1U는 1 $\mu$ M 포도당을 방출하는데 필요한 효소량으로 표현하였다.
- ⑥ 실험결과, 주어진 시간과 농도에서는 36시간 2% CMC 농도에서 배양한 공생균주의 배양액에서 가장 높은 활성이 측정되었다.
- ⑦ 그 이후(48 시간)에는 활성이 점차 감소되는 경향을 보였다(도 9).
- ⑧ 따라서 위의 실험조건에서는 리조비움 배양 후 36시간이 셀룰레이즈 분비의 최적시간임이 제시되었다.



도 9. 리조비움 OS1을 농도별(0.1%:A, 0.5%:B, 1%:C, 1.5%:D, 2%:E) CMC 액체배지에서 시간별 성장에 따른 셀룰레이즈의 활성을 분석함

- (3) 미강 첨가 BG-11 배지에서 배양시간에 따른 셀룰레이즈 효소활성
  - ① 상기 균주를 1% 미강이 첨가된 BG-11 배지에서 48 시간 동안 배양하였다.
  - ② 배양액을 원심분리(10,000 rpm, 10분)하여 상등액을 조효소액 시료로 수확하였고, 셀룰레이즈 활성 측정은 위에 명시한 (2)의 방법과 같다.
  - ③ 실험결과, 1% 미강이 첨가된 BG-11 배지에서 상기 균주를 48시간 배양한 시료에서 최대 효소활성을 보였다.
  - ④ CMC 기질과 달리 배양시간이 증가함에 따라서 셀룰레이즈 활성이 점차 증가하는 경향을 보였다(도 10).
  - ⑤ 따라서 리조비움이 분비하는 셀룰레이즈에 의해서 미강으로부터 셀룰로오스가 분해되는 현상을 발견하였다.
  - ⑥ 위의 실험을 통해서 광중속영양 조건에서 클로렐라 불가리스의 성장 및 바이오매스를 향상시키기 위해 농업부산물인 미강을 함유한 배지에 공생균을 선처리하여 미강의 구성분인 셀룰로오스를 분해하여 단위체 형태로 전환시켰다.
  - ⑦ 이러한 분해산물을 첨가한 배지는 포도당을 대체할 수 있는 매우 경제적인 탄소원이기

때문에 클로렐라 불가리스의 성장을 촉진시키고 바이오매스를 증대할 수 있기 때문에 식품, 의약품 및 바이오에너지의 생산에 매우 유용한 방법으로 고려된다.



도 10. 미강 1%를 첨가한 BG-11 배지에서 리조비움 OS1의 시간별 성장에 따른 셀룰레이즈의 활성

# 아스퍼질러스 니둘란스의 피타아제 유전자의 미세조류 내 발현 및 재조합단백질(rPhy-C)의 효소활성 및 특성 규명

[Expression of *Aspergillus nidulans* phy gene in *Chlorella vulgaris* for the characterization of phytase activity of Phy recombinant protein (rPhy-C)]

## 1. 아스퍼질러스 니둘란스의 피타아제 유전자 클로넬라 내 발현벡터 구축

### (1) 아스퍼질러스 니둘란스 피타아제 cDNA 클론

피타아제 유전자를 합성하기 위하여 활용된 PCR 반응의 주형은 아스퍼질러스 니둘란스의 지놈 cDNA libraries로부터 합성한 후 pET28a 벡터에 클로닝하여 보유하고 있는 pET-phy이다.

### (2) PCR 합성

#### ① 피타아제 유전자 프라이머

㉠ 피타아제 유전자 합성 프라이머는 아스퍼질러스 니둘란스 피타아제 유전자 특이적 프라이머로서 아래에 제시하였다(밑줄은 *Ncd* 절단부위).

- phyC-F: 5'-CCATGGTGGCTTTTTTCACGGTCGCTCTTTC-3'

- phyC-R: 5'-CCATGGATAGGGTAAAACAAGTCTTCCAGTTCC-3'

㉡ 원형 및 돌연변이 피타아제 유전자 활성 영역부위 합성 프라이머

- phyD-F: 5'-CCATGGTCTCTCACGTGTGGGGGCATGA-3'

- phyD-R: 5'-CCATGGTGGGGCTCCCGGCACA-3'

#### ② 3가지 표적 피타아제 유전자 PCR 합성

㉠ 원형 피타아제 유전자 합성

㉡ 원형 피타아제 유전자 활성 영역부위 합성

㉢ 돌연변이 피타아제(algae optimized codon) 유전자 활성 영역부위 합성

- 원형 피타아제 유전자 활성 영역부위와 돌연변이 피타아제 유전자 활성 영역부위의 염기서열 상동성을 분석한 결과 85.7%(아미노산 상동성 100%)로 측정되었다.

### (3) PCR 합성 조건

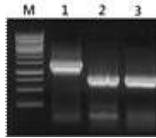
① PCR 반응에 이용된 프라이머를 제외하고는 3개 표적 유전자의 반응액 조성 및 조건은 동일하였다.

② PCR 반응혼합액(총 50 $\mu$ l)은 5 $\mu$ l 10X 완충액(Takara, Japan), 10 $\mu$ l 주형 DNA(최종농도: 10ng), 4 $\mu$ l dNTPs(2.5mM), 1 $\mu$ l 각 진행 및 역행 프라이머(50pM), 3 $\mu$ l MgCl<sub>2</sub>(최종농도 1.5mM), 0.5 $\mu$ l(1U) ExTaq 중합효소(Takara, Japan)를 포함하였다.

③ PCR 반응은 DNA를 함유한 반응혼합액을 95 $^{\circ}$ C에서(2분, 1 사이클) 변성시킨 후, 30사이클 연속 반응(변성: 94 $^{\circ}$ C에서 1분, annealing: 56 $^{\circ}$ C에서 2분, 증폭: 72 $^{\circ}$ C에서 3분)을 거쳐 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 7분 동안 더 처리하였다.

④ 실험 결과, 표적 밴드인 원형 피타아제 유전자 1.4kb, 원형 피타아제 유전자 활성 영역부위 및 돌연변이 피타아제 유전자 활성 영역부위는 각각 0.8kb로 합성되었다(도 1).

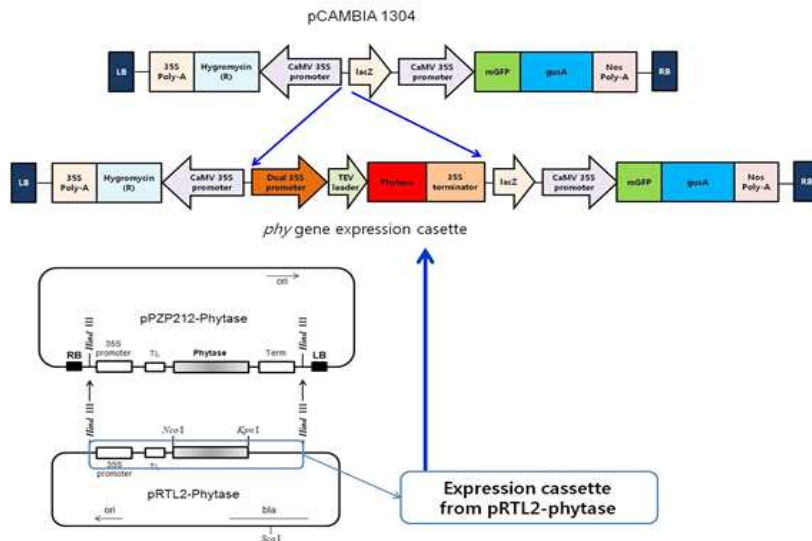




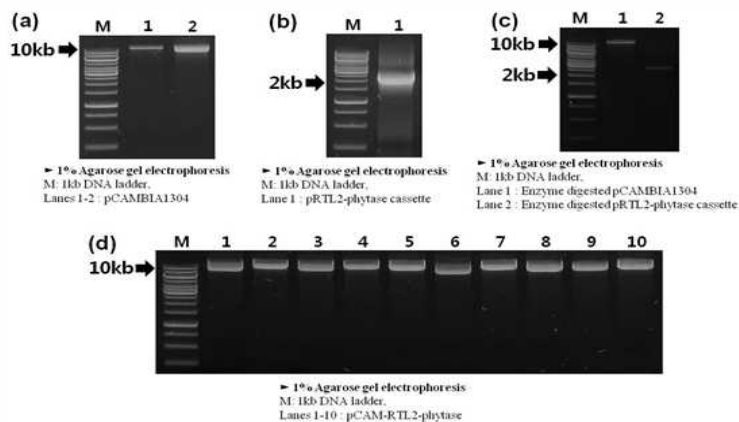
도 1. PCR 증폭 산물의 1% 아가로스 전기영동 젤. 피타아제 유전자(레인 1), 돌연변이 피타아제 유전자 영역부위(레인 2), 원형 피타아제 유전자 영역부위(레인 3)

(4) 발현벡터 구성

- ① 1차년도에 식물발현벡터를 구축하여 *Nicotiana benthamina* 식물에서 피타아제 발현에 성공을 하였을 때 이용했던 셔틀벡터 pRTL2-phy를 활용하기로 전략을 세웠다.
- ② pRTL2-phy 벡터에서 유전자발현카세트를 분리한 후 도 2에 제시한 바와 같이 발현벡터 재구성을 설계하였다.
- ③ pRTL2-phy에 제한효소 *HindIII*를 처리하여 피타아제 유전자를 함유한 발현카세트를 분리한 후 도 3과 같이 pCAMBIA1304 벡터에 연결하였다.



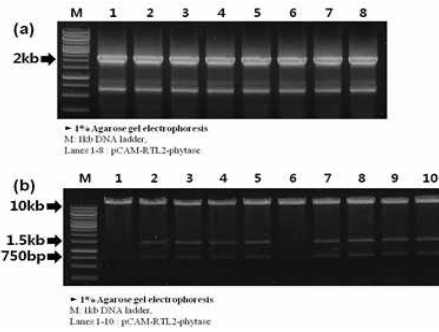
도 2. 재조합 발현벡터 구축 전략. pRTL2-phy로부터 피타아제 유전자를 포함한 발현카세트를 절단하여 pCAMBIA1304로 클로닝



도 3. 재조합 발현벡터 구축. (a) 대장균으로부터 pCAMBIA1304의 분리정제, (b) pRTL2-phy를 *HindIII*로 절단하여 피타아제 유전자 발현카세트 분리, (c) *HindIII*로

절단한 pCAMBIA1304(레인 1)에 유전자발현카세트 연결(레인 2), (d) 대장균으로부터 재조합 발현벡터 pCAM-RTL2-phy 분리정제

- ④ 분리된 재조합벡터 pCAM-RTL2-phy에 피타아제 유전자의 유무를 확인하기 위해 피타아제 유전자 프라이머를 이용하여 PCR을 실시한 결과 피타아제 유전자 DNA 밴드가 합성되었고(도 4a), 제한효소 *Hind*III로 pCAM-RTL2-phy 벡터를 절단한 후 피타아제 유전자 DNA 밴드가 성공적으로 삽입됨을 확인하였다(도 4b).



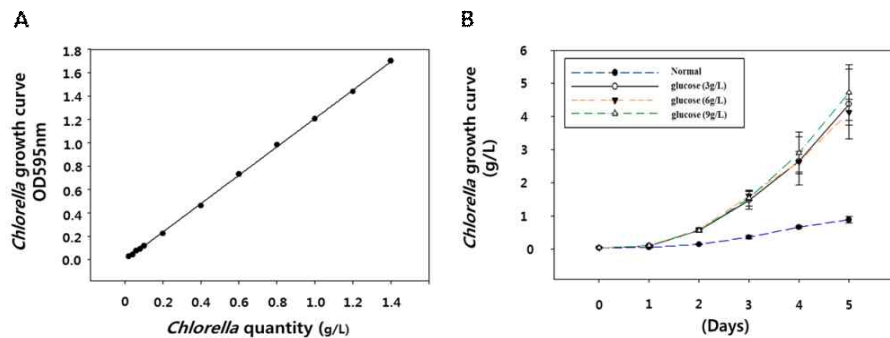
도 4. pCAM-RTL2-phy 벡터로부터 피타아제 유전자 DNA 증폭 (a), 제한효소 *Hind*III로 절단하여 피타아제 유전자 확인 (b)

## 2. 클로렐라 불가리스 형질전환을 위한 competent cell 배양

### (1) 탄소원

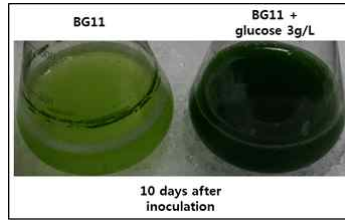
#### ① 포도당(glucose) 농도 결정

- ㉞ 먼저 3g/L(17mM), 6g/L(34mM), 9g/L(51mM) 포도당을 각각 BG-11 배지에 첨가한 후 야생형 클로렐라 불가리스를 접종하고, 1일 간격으로 5일간 흡광치(OD<sub>595nm</sub>)를 측정하여 성장 표준곡선(도 5A)을 이용하여 바이오매스를 환산하였다(도 5B).



도 5. BG-11 배지에서 성장한 야생형 클로렐라 불가리스의 바이오매스 측정을 위한 표준곡선 (A), 포도당 17, 34 및 51mM을 각각 첨가한 BG-11 배지에서 5일간 성장한 클로렐라 불가리스의 바이오매스 결정

- ㉞ 실험결과, 포도당 농도 3개 처리구간에 바이오매스의 차이가 없으므로, 포도당 17mM을 선택하여 BG-11 배지에 첨가한 후 클로렐라 불가리스를 배양하였다.
- ㉞ 포도당 17mM을 첨가한 BG-11 배지를 BG-11G로 명명하였다.



도 6. BG-11 배지와 포도당 17mM을 첨가한 BG-11 배지(BG-11G)에서 성장한 클로렐라 불가리스 세포밀도 비교

### 3. 클로렐라 불가리스 형질전환 및 형질전환균주(transformant) 선발

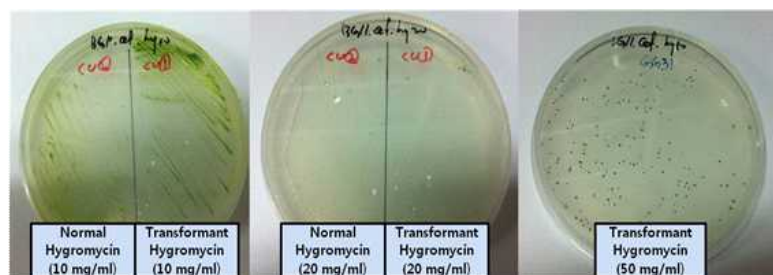
(1) 클로렐라 불가리스 형질전환을 위한 전기천공법 조건

- ① 재조합벡터를 전기천공법으로 클로렐라 불가리스를 형질전환시켰다.
- ② pCAM-RTL2-phy를 클로렐라 불가리스에 형질전환시킨 후 하이그로마이신 B 최종농도 10 $\mu$ g/L, 20 $\mu$ g/L, 50 $\mu$ g/L를 첨가한 BG11-G 아가 배지에 도말하였다.
- ③ 표 1에 제시된 전기천공법 최적조건을 이용하였다.

[표 1] 다른 전계강도(electric field strength)에서 클로렐라 불가리스의 형질전환 효율

Field strength (V/cm)	Transformation success (%)
2000	0 (0/33)
1800	46 (57/123)
1600	25 (17/68)
1400	41 (21/51)
1200	18(6/33)
1000	0 (0/26)

② 실험 결과, 하이그로마이신 B 10-20 $\mu$ g/mL 농도에서는 비형질전환균주(non-transformant)도 자라는 것이 관찰되었으나, 50 $\mu$ g/mL 농도에서는 형질전환균주만 자라는 것이 확인되었다(도 7).



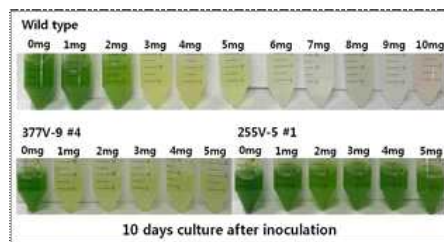
도 7. 클로렐라 불가리스 형질전환균주 선발을 위한 BG-11G 아가 배지에 첨가 하이그로마이신 최적 농도 결정

(2) 클로렐라 불가리스 형질전환균주 액체배양을 위한 하이그로마이신 B 농도 결정

- ① 이전에 보고된 논문에 따르면 외래유전자를 형질전환한 미세조류는 하이그로마이신 B 첨가 배지에서 배양할 때 외래유전자를 일시적발현(transient expression)한 후 사멸한다고 보고되었다.

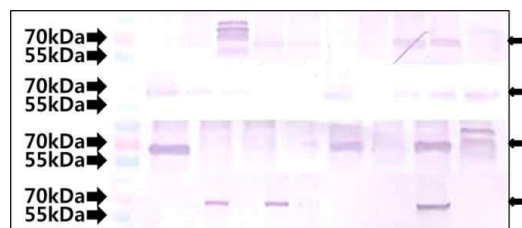
② 형질전환균주의 액체배양(1차)

- ㉠ 고체배지와 달리 클로렐라 불가리스 형질전환균주는 하이그로마이신 B 50 $\mu$ g/mL 함유된 BG11-G 배지에서 배양한 결과 3일 이내 사멸하였다.
- ㉡ 따라서 BG-11G 액체배지에 다양한 농도의 하이그로마이신 B(1-10 $\mu$ g/mL)을 첨가하여 고체배지에서 선발된 형질전환균주를 접종하여 10일간 배양하였다.
  - 야생형 클로렐라 불가리스는 하이그로마이신 B 1 $\mu$ g/L 농도에서는 성장되었으나 2 $\mu$ g/L부터 성장이 억제되어 3 $\mu$ g/L부터 사멸되기 시작하였다.
- ㉢ 선발된 클로렐라 불가리스 형질전환균주 중 255-5#1만이 하이그로마이신 B 5 $\mu$ g/mL 함유된 BG11-G 배지에서는 접종 후 10일 이상 생존하였으나, 형질전환균주 377V-9 #4는 하이그로마이신 B 1 $\mu$ g/mL에서도 점차 사멸하였다(도 8).



도 8. 다양한 농도의 하이그로마이신 B를 첨가한 BG-11G 액체배지에 10 일간 배양한 비형질전환 및 형질전환 클로렐라 불가리스

- ③ 따라서 클로렐라 불가리스 형질전환균주 45개의 콜로니를 하이그로마이신 B 5 $\mu$ g/mL을 첨가한 BG11-G 배지에서 7일간 배양한 후 원심분리하여 수확하였다.
  - ㉠ 침전물을 수확한 후 추출용액(50mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 1mM EDTA, 10mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 0.01% Triton X-100)으로 현탁하였다.
  - ㉡ 현탁액을 유발을 이용하여 마쇄한 후 10,000rpm에서 5분간 원심분리하였다.
  - ㉢ 쥐에서 생산한 다클론항체(대장균에서 발현한 rPhy-E 재조합단백질에 대한 항체)로 단백질 발현을 웨스턴 블롯으로 검정한 결과 22개 균주(49%)에서 밴드가 탐색되었고, 이 밴드를 재조합단백질 rPhy-C라 명명하였다.
  - ㉣ 22개 균주에서 발현된 rPhy-C의 양은 다양하였다(도 9).

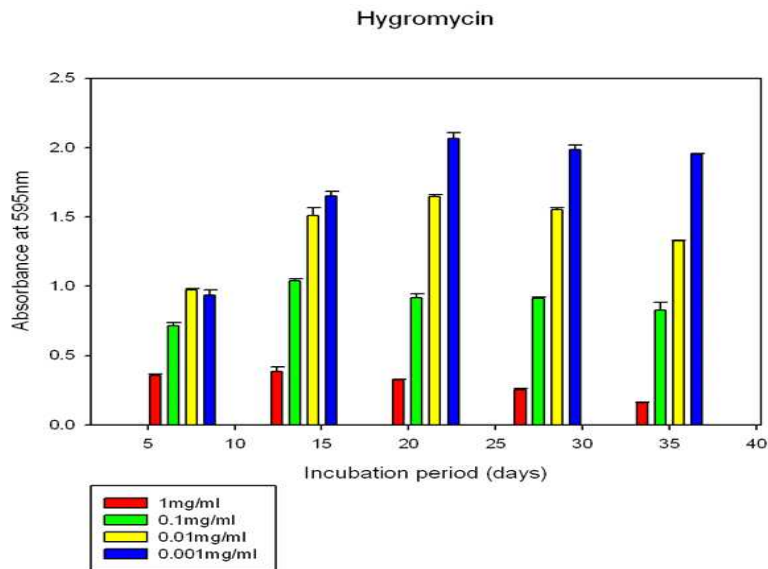


도 9. rPhy-E에 대한 다클론항체를 이용한 웨스턴 블롯 분석으로 아스퍼질러스 니들란스 피타아제를 발현하는 형질전환 클로렐라 불가리스의 탐색함

④ 형질전환균주의 액체배양(2차)

- ㉠ 따라서 하이그로마이신 B 1 $\mu$ g/mL, 0.1 $\mu$ g/mL, 0.001 $\mu$ g/mL, 0.001 $\mu$ g/mL 각각이 함유된 BG11-G 배지에서 선발된 클로렐라 불가리스 형질전환균주 8개씩 5주간 배양하였다.

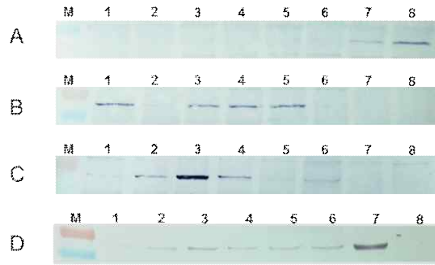
- ㉔ 선발된 클로렐라 불가리스 형질전환균주를 하이그로마이신 B 1 $\mu$ g/mL 첨가된 BG11-G 배지에서 배양한 결과 2주부터 정체기에 도달한 후 5일 후부터 점차 사멸하였다.
- ㉕ 선발된 클로렐라 불가리스 형질전환균주를 하이그로마이신 B 0.1 $\mu$ g/mL 첨가된 BG11-G 배지에서 배양한 결과 2주부터 정체기에 도달한 후 성장이 억제되었다.
- ㉖ 선발된 클로렐라 불가리스 형질전환균주를 하이그로마이신 B 0.01 $\mu$ g/mL 첨가된 BG11-G 배지에서 배양한 결과 3주부터 정체기에 도달한 후 성장이 억제되었다.
- ㉗ 선발된 클로렐라 불가리스 형질전환균주를 하이그로마이신 B 0.001 $\mu$ g/mL 첨가된 BG11-G 배지에서 배양한 결과 3주부터 정체기에 도달하였으나 성장 결과가 가장 높았다(도 10).



도 10. BG-11G 배지에 첨가된 농도별 하이그로마이신 B(1 $\mu$ g/mL, 0.1 $\mu$ g/mL, 0.001 $\mu$ g/mL, 0.001 $\mu$ g/mL)가 형질전환 클로렐라 불가리스의 5주간 성장에 미치는 효과

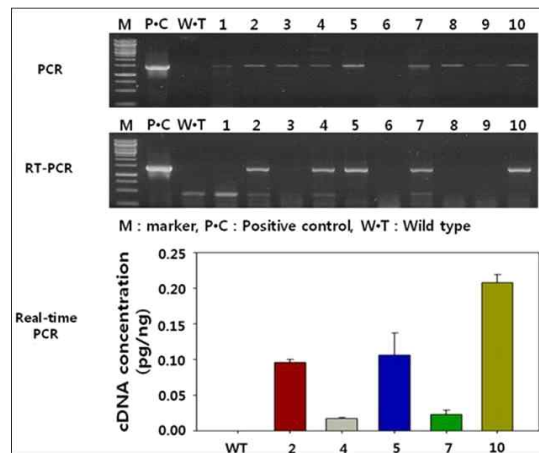
⑤ 재조합단백질 rPhy-C의 발현 검정

- ㉘ 위 시료중 14일 배양한 각 시료를 수확하여 원심분리 후 상등액을 채취하여 SDS-PAGE 및 다클론항체를 이용하여 웨스턴블롯 분석을 실시하였다.
  - 실험 결과, 하이그로마이신 B 농도에 따라서 rPhy-C를 발현하는 형질전환균주 수가 다양하였다; 1 $\mu$ g/mL: 2 균주, 0.1 $\mu$ g/mL: 4 균주, 0.001 $\mu$ g/mL: 5 균주, 0.001 $\mu$ g/mL: 6균주(도 11).
  - 클로렐라 불가리스에서 발현한 rPhy-C분자량은 약 62 kDa으로 측정되어 1차년도에 연구되었던 식물발현 rPhy-P와 유사한 분자량을 보였다.
- ㉙ 위의 결과에 근거해서 하이그로마이신 B 0.001 $\mu$ g/mL이 첨가된 BG-11G 배지를 BG-11GH 배지라 명명하고, 이를 형질전환균주의 액체배양에 사용하였다.



도 11. 다양한 농도의 하이그로마이신 B를 첨가한 BG-11 배지에서 2주간 성장한 형질전환 클로렐라 불가리스로부터 추출한 총단백질의 웨스턴블롯 분석: 1µg/mL(A), 0.1µg/mL(B), 0.001µg/mL(C), 0.001µg/mL(D)

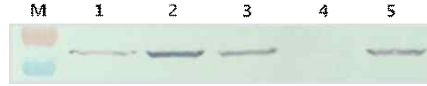
- ⑥ 고체배지에서 선발한 형질전환균주 10개를 BG-11GH 배지에 접종하고 4주간 배양한 후 아래와 같이 검증하였다(도 12).
- ㉠ 10개 시료로부터 DNA를 추출하여 피타아제 유전자의 유무를 확인하기 위해 PCR을 실시하였다.
    - 피타아제 유전자 DNA: 형질전환균주 10개 중 8개 균주에서 합성되었다.
  - ㉡ 10개 시료로부터 총 RNA를 추출하여 피타아제 유전자 mRNA의 유무를 확인하기 위해 RT-PCR을 실시하였다.
    - 피타아제 유전자 mRNA: 형질전환균주 10개 중 5개 균주에서 합성되었다.
  - ㉢ 10개 시료로부터 총 RNA를 추출하여 피타아제 유전자 mRNA의 발현 정도를 확인하기 위해 RT-PCR 및 real-time qPCR을 실시하였다.
    - 피타아제 유전자 발현량: 5개 균주의 유전자 발현 정도는 다양하였고, 그 중에 10번 균주의 발현량이 가장 높았다.



도 12. BG-11GH 배지에서 성장한 형질전환 클로렐라 불가리스의 분석: PCR로 피타아제 유전자의 유무를 탐색, 피타아제 mRNA의 유무를 RT-PCR로 탐색, 피타아제 발현정도를 real-time qPCR로 측정함

- ㉣ 10번 균주의 총단백질을 주별로 추출하여 SDS-PAGE 및 다클론항체를 이용하여 웨스턴 블롯 분석을 실시하였다.
  - 10번 균주의 rPhy-C는 배양 4주까지 탐색되었다(도 13).





도 13. 웨스턴블롯 분석을 이용하여 형질전환 클로렐라 불가리스에서 추출한 총단백질로부터 rPhy-C 확인합(레인 1-3 및 5: 1, 2, 3, 4주 후 BG-11GH에서 배양한 형질전환 균주로부터 추출한 총단백질, 레인 4: 4주간 하이그로마이신 B 무처리 배양)

#### 4. 재조합단백질 rPhy-C의 피타아제 활성

##### (1) 재조합단백질 rPhy-P의 효소활성, 최적 pH 및 최적 온도성

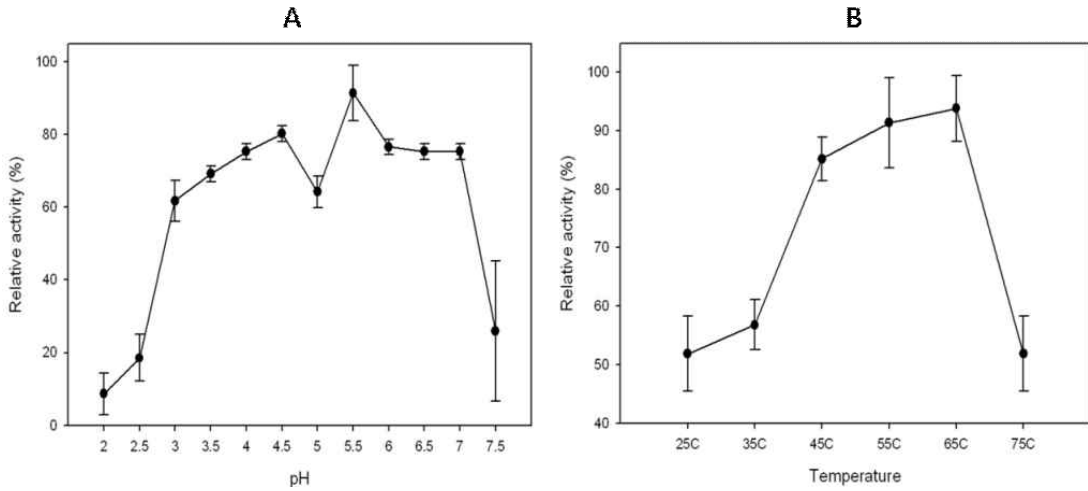
###### ① rPhy-C의 피타아제 활성 및 최적 pH

- ㉠ 시료: 총단백질 추출물(2주 배양한 비형질전환 클로렐라 불가리스, 2주 배양한 형질전환 클로렐라 불가리스 #10)
- ㉡ 반응완충용액 4종
  - 50mM 글라이신(pH 2.0-2.5)
  - 50mM 초산나트륨(pH 3.5-5.5)
  - 50mM MES(pH6.0-6.5)
  - 50mM HEPES(pH7.0-7.5)
- ㉢ 기질: 각 반응완충용액 300 $\mu$ l에 sodium phytate(2mM)과 CaCl<sub>2</sub>(1mM)을 함유시켰다.
- ㉣ 기질을 함유한 각 반응완충용액에 75 $\mu$ l 시료(10 $\mu$ g)를 첨가하고 55 $^{\circ}$ C에서 30분간 처리하였다.
- ㉤ 375 $\mu$ l 5% 트리클로로아세트산을 첨가하여 반응을 종료하였다.
- ㉥ 발색시약을 750 $\mu$ l 첨가하고 5분 처리하였다.
  - 발색시약: 5.5% 황산에 용해한 1.5%(w/v) 몰리브덴산암모늄(4 vols): 2.7%(w/v) 황산제일철(1 vol)
- ㉦ 분광광도계로 흡광치 700nm에서 흡광치 측정하여 표준곡선의 값과 비교측정하였다.
  - 완충용액 블랭크 흡광치를 0으로 만든 후 비형질전환 클로렐라 불가리스로부터 추출한 단백질의 흡광치를 측정
  - 형질전환 클로렐라 불가리스 추출 단백질의 흡광치는 비형질전환 클로렐라 불가리스로부터 추출한 단백질의 흡광치를 뺀 값으로 측정
- ㉧ 표준곡선은 제2인산칼륨 용액을 농도별로 희석하여 흡광치 700nm에서 측정하였다.
- ㉨ 피타아제 1 유닛(U)은 1분당 1 $\mu$ mol Pi를 방출하는데 필요한 효소양으로 환산하였다.
- ㉩ 특이적 활성은 U/ $\mu$ g 총단백질로 환산하였다.
- ㉪ 효소활성은 평균치 $\pm$ 표준편차로 계산하였다(시료당 3개 반복)
- ㉫ 위에 언급한 실험조건에서 최적 pH는 5.5에서 가장 높은 활성을 보였다(도 14A).

###### ② rPhy-C의 피타아제 활성 최적 온도

- ㉠ 최고 활성을 나타낸 pH 5.5 조건에서 최적온도를 측정하였다.
- ㉡ 시료: 총단백질 추출물(2주 배양한 비형질전환 클로렐라 불가리스, 2주 배양한 형질전환 클로렐라 불가리스 #10)
- ㉢ 반응완충용액: 초산나트륨(pH 5.5)
- ㉣ 기질: 2가지 반응완충용액 300 $\mu$ l에 sodium phytate(2mM)과 CaCl<sub>2</sub>(1mM)을 함유시켰다.
- ㉤ 온도: 25 $^{\circ}$ C, 35 $^{\circ}$ C, 45 $^{\circ}$ C, 55 $^{\circ}$ C, 65 $^{\circ}$ C, 75 $^{\circ}$ C

- ㉞ 나머지 반응조건은 (1)과 동일하였다.
- ㉟ 실험 결과 최적 활성이 65°C에서 관찰되었다(도 14B).
- ㊱ 그러나 75°C에서는 효소활성이 급격히 감소하였다.



도. 14. (A) 55°C 온도 및 30분 처리조건에서 다양한 pH에 따른 sodium phytate에 대한 rPhy-C의 피타아제 활성. 사용된 반응완충용액은 다음과 같다: 50mM glycine(pH 2.0-2.5), 50mM sodium acetate(pH 3.5-5.5), 50mM MES(pH6.0-6.5) and 50mM HEPES(pH7.0-7.5). (B) pH 5.5 및 30분 처리조건에서 다양한 온도(25-75°C)에 따른 sodium phytate에 대한 rPhy-C의 피타아제 활성. 데이터는 상대활성으로 표현되었고 각 수치는 평균±표준편차(n = 6)

(3) 재조합단백질 rPhy-C의 정량적 평가

- ① 2주 배양한 비형질전환 클로렐라 불가리스와 형질전환 클로렐라 불가리스 #10의 활성비교

[표 2] 형질전환 클로렐라 불가리스로부터 추출한 rPhy-C의 피타아제 활성

Sample	Volume (mL)	Protein (mg/mL)	Activity (U/mL)	Specific activity (U/mg)	Total activity (U)	Total protein (mg)	Total activity (U/L)	Total protein (mg/L)
Wild-type	0.2	2.8	0.3024	0.108	0.06	0.56	6.64	62.03
Transformant	0.2	3.4	2.5534	0.751	0.51	0.68	56.6	75.47

- ② BG-11GH 배지에 탄소원과 질소원을 첨가하고 2주 배양한 형질전환 클로렐라 불가리스 #10의 바이오매스와 피타아제 활성

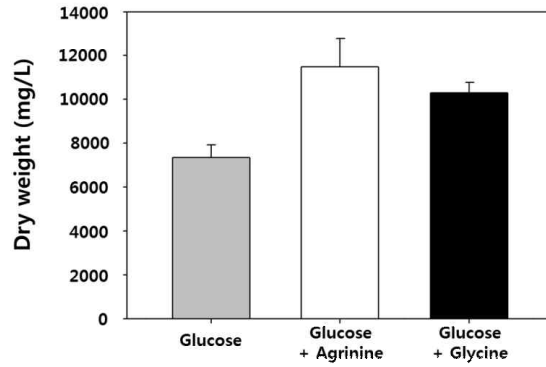
㉠ 바이오매스

- 최고 바이오매스는 10mM 포도당과 2mM 알기닌을 첨가한 BG-11GH 배지에서 측정되었다(도 15).

㉡ 피타아제 활성

- 최고 바이오매스는 10mM 포도당과 2mM 알기닌을 첨가한 BG-11GH 배지에서 측정되었다(표 3).





도 15. 하이그로마이신 B(최종농도 0.001 $\mu$ g/mL)를 함유한 BG-11 배지에 첨가한 포도당(10 mM)과 아미노산(2mM 알기닌 및 2 mM 글라이신)에서 성장한 형질전환 클로렐라 불가리스의 바이오매스

[표 3] 하이그로마이신 B(최종농도 0.001 $\mu$ g/mL)를 함유한 BG-11 배지에 첨가한 포도당(10 mM)과 아미노산(2mM 알기닌 및 2 mM 글라이신)에서 성장한 형질전환 클로렐라 불가리스로부터 추출한 rPhy-C의 피타아제 활성

Sample	Dry weight (mg/L)	Total activity (U/L)	Total protein (mg/L)
Glucose 10 mM	7343.486	70.635	122.99
+ Arginine 2 mM	11472.43	110.364	148.88
+ Glycine 2 mM	10304.99	99.144	173.79

# 형질전환 클로렐라 불가리스의 아스퍼질러스 니들란스 피타아제 활성을 증가시키기 위한 기질첨가 배지

[Culture medium supplemented with various substrates to increase *Aspergillus nidulans* phytase activity of transformed *Chlorella vulgaris*]

## 1. 아스퍼질러스 니들란스의 피타아제 유전자 발현 클로렐라 불가리스 배양

### 가. 재료 및 방법

#### (1) 배지조성 및 배양조건

- ① BG-11GH 배지: 17mM 포도당 + 1mg/mL 하이그로마이신 B(최종농도:1 $\mu$ g/L)를 첨가한 BG-11 배지(pH 7.5)
- ② 기질
  - ㉠ 농도: 1, 5, 10mM
  - ㉡ 종류: AMP, ADP, ATP, tripolyphosphate, pyrophosphate, pyridoxal-5-phosphate, fructose-6-phosphate, glucose-6-phosphate, sodium phytate
  - ㉢ 3반복/각 처리구
  - ㉣ 20mL 배양/각 처리구
- ③ 광중속영양
  - ㉠ 진탕배양기
  - ㉡ 배양온도: 27 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C
  - ㉢ 회전속도: 170 rpm
  - ㉣ 광: 4000 $\pm$ 300 Lux, 24 시간

#### (2) 미세조류

- ① 형질전환 클로렐라 불가리스
- ② 접종원 OD
  - ㉠ AMP 처리구: 0.13
  - ㉡ ADP 처리구: 0.15
  - ㉢ ATP 처리구: 0.11
  - ㉣ tripolyphosphate 처리구: 0.18
  - ㉤ pyrophosphate 처리구: 0.18
  - ㉥ pyridoxal-5-phosphate 처리구: 0.08
  - ㉦ fructose-6-phosphate 처리구: 0.21
  - ㉧ glucose-6-phosphate 처리구: 0.18
  - ㉨ sodium phytate 처리구: 0.13

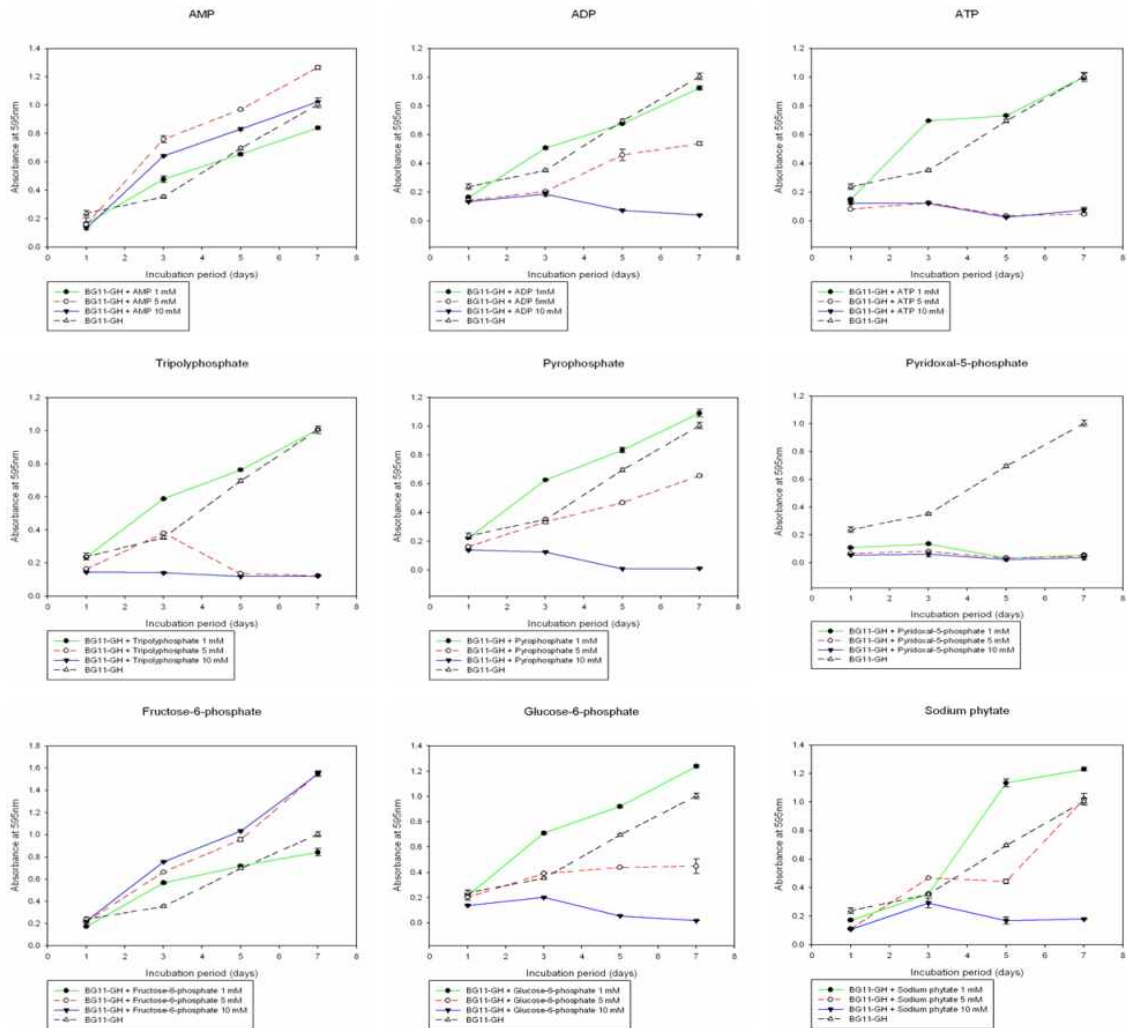
#### (3) 광학밀도(optical density; OD)와 성장곡선 분석

- ① 1-7일간 일별 시료
- ② 위 (1)에 제시된 각 처리구에서 배양한 미세조류의 성장곡선을 분석하기 위하여 분광광도계를 이용하여 광학밀도(OD<sub>595 nm</sub>)를 측정하였다.

## 나. 결과

### (1) BG-11GH 배지에 첨가한 기질 및 농도에 따른 형질전환 균주의 성장(도 1)

- ① 배양 7일 후 대조구인 BG-11GH 배지와 비교하여 AMP 5mM을 첨가한 BG-11GH 배지에서 상대적으로 약 1.3배 증가된 OD 값을 보였다.
- ② 배양 7일 후 대조구인 BG-11GH 배지와 비교하여 ADP 1mM을 첨가한 BG-11GH 배지와 유사한 OD 값을 보였다
- ㉠ BG-11GH 배지에 첨가한 ADP 농도가 높을수록 성장이 더 억제되었다.
- ③ 배양 7일 후 대조구인 BG-11GH 배지와 비교하여 ATP 1mM을 첨가한 BG-11GH 배지와 유사한 OD 값을 보였다
- ㉠ 5와 10mM ATP를 첨가한 BG-11GH 배지에서 형질전환균주의 성장이 거의 억제되었다.
- ④ 배양 7일 후 대조구인 BG-11GH 배지와 비교하여 tripolyphosphate 1mM을 첨가한 BG-11GH 배지와 유사한 OD 값을 보였다
- ㉠ 5와 10mM tripolyphosphate를 첨가한 BG-11GH 배지에서 형질전환균주의 성장이 완벽하게 억제되었다.
- ⑤ 배양 7일 후 대조구인 BG-11GH 배지와 비교하여 pyrophosphate 1mM을 첨가한 BG-11GH 배지에서 약간 증가된 OD 값을 보였다.
- ㉠ 10mM pyrophosphate를 첨가한 BG-11GH 배지에서 형질전환균주의 성장이 완벽하게 억제되었다.
- ⑥ 농도에 상관없이 pyridoxal-5-phosphate를 첨가한 BG-11GH 배지에서 형질전환균주의 성장이 완벽하게 억제되었다.
- ⑦ 배양 7일 후 대조구인 BG-11GH 배지와 비교하여 fructose-6-phosphate 5와 10mM을 첨가한 BG-11GH 배지에서 상대적으로 약 1.6배 증가된 OD 값을 보였다.
- ⑧ 배양 7일 후 대조구인 BG-11GH 배지와 비교하여 glucose-6-phosphate 1mM을 첨가한 BG-11GH 배지에서 상대적으로 약 1.3배 증가된 OD 값을 보였다.
- ㉠ 10mM glucose-6-phosphate를 첨가한 BG-11GH 배지에서 형질전환균주의 성장이 완벽하게 억제되었다.
- ⑨ 배양 7일 후 대조구인 BG-11GH 배지와 비교하여 sodium phytate 1mM을 첨가한 BG-11GH 배지에서 상대적으로 약 1.2배 증가된 OD 값을 보였다.
- ㉠ 10mM sodium phytate를 첨가한 BG-11GH 배지에서 형질전환균주의 성장이 완벽하게 억제되었다.



도 1. 다양한 피타아제 기질을 첨가한 BG-11GH 배지에서 배양한 형질전환 클로렐라 불가리스의 성장곡선. 흡광치는 7일간 OD<sub>595nm</sub>에서 측정되었고 각 수치는 평균값±표준편차(n=3)

## 2. 기질 첨가된 BG-11GH 배지에서 성장한 형질전환 클로렐라 불가리스의 피타아제 활성화. 재료 및 방법

### (1) 시료준비

- ① 기질 및 농도별 처리구 배양 7일 후 시료(3반복)
  - ㉠ 액체질소를 담은 유발에 넣고 마쇄하여 분말화
  - ㉡ 분말을 50mM sodium nitrate에 현탁하여 10000rpm에서 10분간 원심분리 후 상등액 수거함
- ② 조단백질 추출액 시료를 Bio-Rad 제조사의 kit를 이용하여 총단백질 정량함

### (2) 피타아제 효소활성 측정

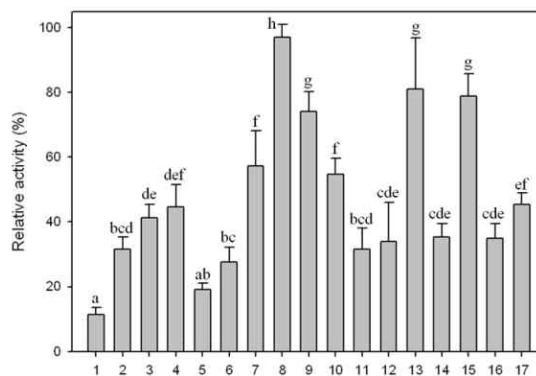
- ① Ferrous sulfate-molybdenum 방법
  - ㉠ 조단백질 추출액 시료(75μl: 10μg 총단백질)를 300μl 기질용액과 혼합
    - 기질용액: 2mM sodium phytate를 함유한 50mM sodium acetate, pH 5.5
  - ㉡ 혼합액을 45 및 55℃에서 30분 반응시킴

- ㉔ 5% trichloroacetic acid(375 $\mu$ l)를 첨가하여 반응을 중단시키고 신선하게 준비한 phosphomolybdate 발색시약(750 $\mu$ l)를 첨가함
  - 발색시약: 5.5%(v/v) 황산에 1.5%(w/v) ammonium molybdate를 용해: 2.7% ferrous sulfate 용액 = 4:1(v/v)
- ㉕ 5분 후 발색반응을 분광광도계를 이용하여 흡광치 700nm에서 측정함
  - 음성대조구: 야생형 클로렐라 불가리스 조단백질 추출액
- ② Standard curve는 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 용액을 농도별로 희석하여 흡광치 700nm에서 측정함
  - 피타아제 1 유닛(U)은 1분당 1 $\mu$ mol Pi를 방출하는데 필요한 효소양으로 환산함

## 나. 결과

(1) BG-11GH 배지에 첨가한 기질 및 농도에 따른 형질전환 균주의 효소활성(도 2)

- ① 최고 효소활성은 1mM tripolyphosphate를 첨가한 BG-11GH 배지에서 성장한 형질전환균주
  - ㉔ 대조구인 BG-11GH 배지의 상대적 효소활성은 11.3%
  - ㉕ 대조구인 BG-11GH 배지와 비교하여 8.6배 증가
- ② 2번째 효소활성은 10mM fructose-6-phosphate를 첨가한 BG-11GH 배지에서 성장한 형질전환균주
- ③ 3번째 효소활성은 5mM glucose-6-phosphate를 첨가한 BG-11GH 배지에서 성장한 형질전환균주



도 2. BG11-GH 배지에 첨가한 다양한 기질 및 농도가 피타아제 활성에 미치는 영향(sodium phytate, 65°C, pH 5.5). BG-11G 배지(라인 1), + AMP 1, 5 and 10mM (라인 2-4), + ATP 1mM(라인 5), + ADP 1 및 5 mM(라인 6,7), + tripolyphosphate 1 mM(라인 8), pyrophosphate 1 및 5mM(라인 9,10), fructose-6-phosphate 1, 5 및 10mM(라인 11-13), glucose-6-phosphate 1 및 5mM(라인 14,15), + sodium phytate 1 및 5mM(라인 16-17).

## <제 1 협동과제>

### 활성 피타아제를 안정적으로 생산하는 부평초 개발

#### 1. 재분화 효율이 높은 부평초 라인의 확보

형질전환식물 제작에 있어서 가장 중요한 요소 중의 하나인 대상식물의 재분화 능력은 형질 전환효율에 지대한 영향을 미치므로, 제1협동과제에서 대상으로 하는 부평초에 있어서 재분화 능력이 탁월한 라인을 선발하기 위한 연구를 우선적으로 수행하였다.

##### (1) 재분화 효율이 높은 부평초 선발을 위한 종분류

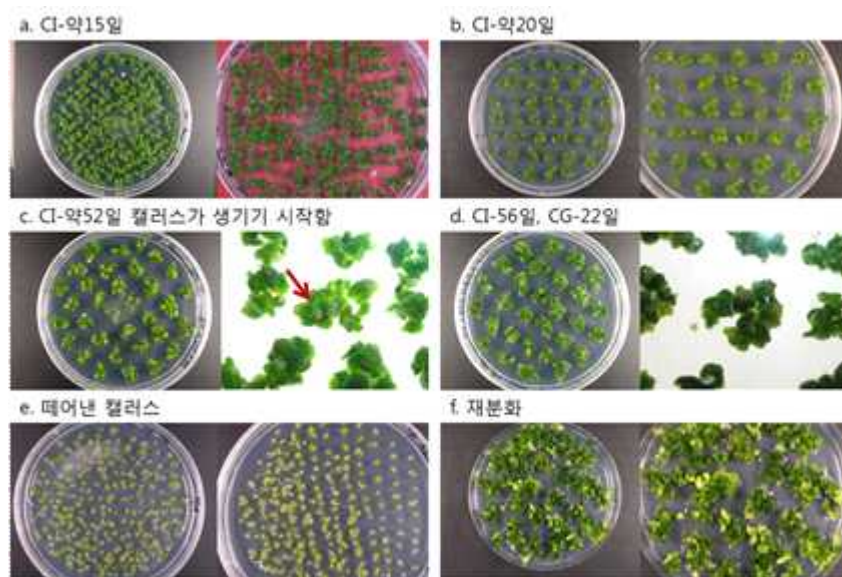
- ① 부평초는 지리적인 종(isolate)에 따라 재분화 능력이 각각 다른 것으로 알려져 있는데, 본 연구에서는 형질전환 효율을 높이기 위하여 재분화 능력이 탁월한 종의 선발을 지속적으로 수행하였다.
- ② 현재 본 연구실에서 기내배양 하여 유지하고 있는 부평초는 6종류로, 2종은 대전에서 수집한 것이고 4종은 제주도에서 수집한 것이다.
- ㉠ 정확한 종 분류를 위해 아주대, 제주대와 공동으로 종분류를 수행한 결과, 대전에서 수집한 2종의 부평초는 부평초속의 부평초(*Spirodela polyrrhiza*)과 부평초속의 쯤부평초(*Lemna perpusilla*)로 동정되었다.
- ③ 제주도의 애월지역에서 1종, 용수지역에서 1종, 하가지역에서 2종이 수집되었는데 대전에서 수집한 부평초와 비교할 때 부평초의 특성인 하나의 엽상체에 하나의 뿌리를 갖고 있으나 엽상체 색, 모양, 뿌리의 길이, 성장상태 등이 상이하여 동일 종이라고 분류하기 어려울 것으로 판단된다.
- ④ 현재 국내학회에서 보고된 국내 자생하는 부평초의 종류는 부평초(*Spirodela polyrrhiza* L.), 쯤부평초(*Lemna perpusilla* Torr.), 분부평초(*Wolffia arrhiza*) 3종(국가표준식물목록) 뿐이므로 실험에서 구분을 위하여 애월(Aewol)라인, 용수(Yongsoo)라인, 대전(Dajeon)라인으로 구분하였다.
- ⑤ 하가지역에서 수집된 2종 중 1종(Haga2)은 부평초와 유사한 모양의 엽상체를 가지고 있으나 부평초속 특성인 다수의 뿌리를 갖는다.
- ㉠ 국내에서는 미기록종으로, 쯤부평초(*Spirodella punctata*)일 것으로 예상된다(2014년 7월 16일자 제민일보, 국립생물자원관)
- ⑥ 하가지역에서 채집된 다른 1종은 쯤부평초로, 대전에서 수집한 부평초와 생김새나 성장속도 등이 유사하나 뿌리의 숫자가 좀 더 많고 엽상체 뒷면의 붉은 빛의 차이가 나기 때문에 이 역시 하가(Haga)라인으로 구분하였다.

##### (2) 재분화 능력이 탁월한 부평초 선발

- ① 형질전환 효율에 결정적인 영향을 미치는 재분화 능력이 탁월한 부평초를 확보하기 위하여, 기내 배양종의 총 6종의 부평초를, 기 확립한 재분화 배지조성으로 캘러스 형성능 및 개체로의 재분화능을 조사하였다.
- ② J. Li 등(2004)이 발표한 논문에서는 *Spirodela* 1종과 *Lemna* 2종에서 각각의 캘러스유도, 유지, 재분화 배지 조성을 확립하였으나 논문에 사용한 종과 본 연구실에서 배양중인 종

이 동일종인지 판단 할 수 없으므로 각 배지조성에 대하여 6종 모두에 있어서 캘러스 형성능력과 재분화 능력을 조사하였다.

- ③ 그 결과, 6종 중 애월라인이 PT배지(Pretreatment medium : WP medium containing 1.5% galactose, 50 mg/L dicamba, 2 mg/L BA)에서 2주 배양 후 CI배지(캘러스 유도; Callus induction) 및 CG배지(캘러스 형성; Callus growth)에서 수 주간 배양하는 경우와 CI배지(1/2MS medium containing B5 vitamins, 1% sorbitol, 3.5 mg/L 2,4-D, 15 mg/L dicamba, 1 mg/L 2iP)에서 6~7주 배양한 후 CG배지(WP medium containing 2% sorbitol, 1 mg/L 2,4-D, 5 mg/L NAA, 0.5 mg/L TDZ)로 옮겨 배양하는 두 가지 경우에서 유사한 정도로 캘러스를 형성하였다.
- ④ 대전라인에서도 캘러스와 유사한 조직 덩어리를 형성하였으나 조직이 매우 치밀하고 단단하며 증식하지도 않고 재분화 또한 되지 않아 실험에 사용하지 않았다.
  - ㉞ 형질전환 실험에 사용하는 캘러스는, CI배지에서 6~7주 배양 한 후 CG배지로 옮기는 방법으로 유도하였다.
- ⑤ 캘러스는 딸엽상체가 생기는 부위에서 형성되는데, 애월라인의 경우 흰색의 불투명한 도자기색을 띄며, 엽상체로 부터 캘러스를 분리하여 CG배지에서 배양 할 때 재분화 또는 노화됨에 따라 연녹색, 진녹색 과정을 거쳐 녹기가 짙어졌다.
- ⑥ CG배지에서 약 2주 배양되면 점차적으로 녹기가 짙어지며 노화 또는 재분화가 진행되므로 이후의 실험에는 분리 후 3주이내의 건강한 캘러스를 이용하였고 실험에 필요한 캘러스를 얻기 위하여 주기적으로 엽상체로 부터 캘러스를 유도하였다(도 1).

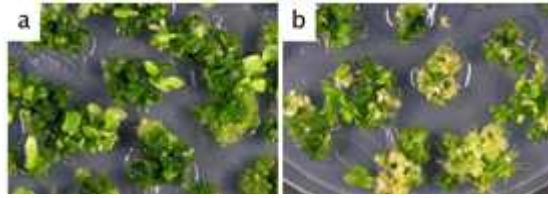


도 1. 부평초 애월라인의 캘러스 유도과 재분화 과정

- ⑦ 애월라인에서 유도된 캘러스를 재분화 시키기 위하여 두 가지의 FR배지(Frond regeneration medium)를 비교하였을 때 WP배지에 0.5% sucrose, 1 mg/L TDZ가 첨가된 경우가 WP배지에 0.5% sucrose, 1% sorbitol, 1 mg/L 2iP를 첨가하였을 때 보다 엽상체를 많이 형성하였다(도 2-a). 후자의 경우 엽상체 보다는 뿌리가 풍성히 유도되어 자라는 것이 관찰 되었다(도 2-b).



도 2. 부평초 Aewol line 켈러스의 재분화 과정

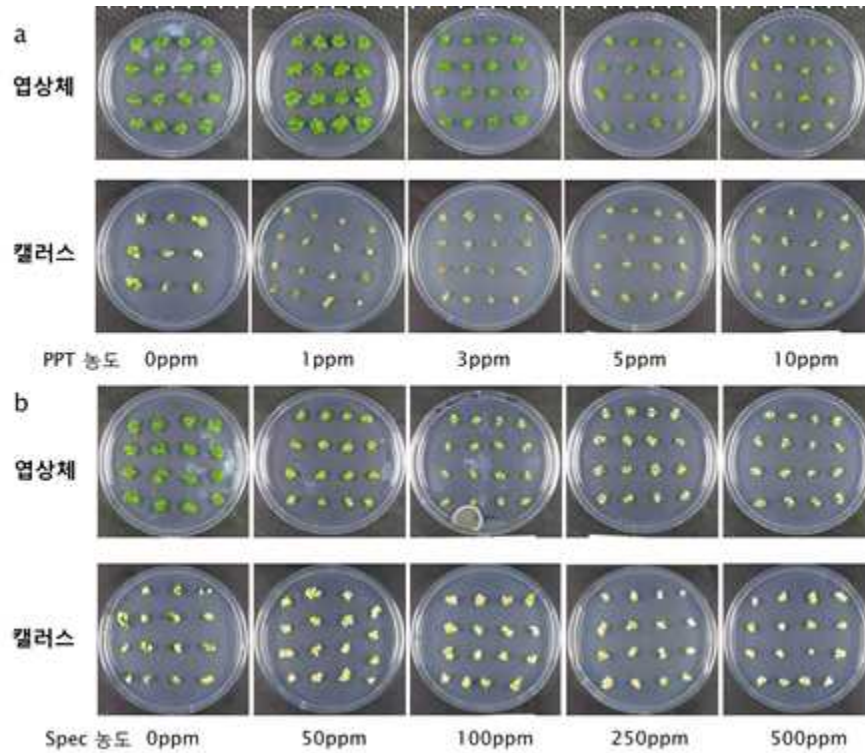


## 2. 부평초의 형질전환

(1) 효율적인 형질전환체 선발을 위한 제조제와 항생제의 처리농도의 결정

- ① 형질전환된 세포의 선발을 위하여 야생형 부평초의 PPT(phosphinothricin)와 스펙티노마이신에 대한 감수성을 확인 하였다.
- ② PPT 농도는 0부터 1, 3, 5, 10mg/L로 처리하였고 스펙티노마이신은 0부터 50, 100, 250, 500mg/L로 처리 하였다.
  - ㉠ 기본배지는 1%의 sucrose가 첨가된 WP배지를 사용하였으며 켈러스나 엽상체를 치상하고 광조건에서 배양하며 관찰하였다.
  - ㉡ 그 결과, 애월라인의 엽상체의 경우 PPT 5mg/L부터 엽상체의 태두리가 갈색으로 변해가며 성장속도가 줄어들었다.
  - ㉢ 그러나 완전히 고사하지 않았으며 10mg/L에서도 급격한 성장둔화와 갈변을 나타내었으나 완전히 고사하지는 않았다.
- ③ 애월라인의 켈러스는 PPT가 1mg/L가 첨가된 배지부터 켈러스가 증식하지 않았으며 갈색으로 변하면서 고사하였다(도 3-a).
  - ㉠ 애월라인이 5mg/L의 PPT에서도 살아 남은 반면에 대전라인은 동일 농도의 배지에서 고사하였는데 이 결과는 애월라인이 대전라인과 다른 종일 가능성을 시사한다.
- ④ 스펙티노마이신이 첨가된 배지에 엽상체를 치상하고 관찰 하였을 때 모엽상체로 부터 새로 성장하는 딸엽상체가 백색과 자색을 띄면서 고사되는 것이 관찰되었다.
  - ㉠ 엽상체는 50mg/L부터 스펙티노마이신에 의한 백화를 나타냈는데 그 효과가 크지 않아 형질전환체의 선발배지에는 100ppm으로 처리 하였다.
- ⑤ 켈러스 역시 50ppm에서는, 0ppm에 비해 녹기가 저해되고 켈러스 덩어리 조직의 밀집도가 약화되는 현상이 나타났으며 선발을 위한 스펙티노마이신의 농도는 100ppm으로 결정 하였다(도 3-b).
- ⑥ 용수라인은 애월라인과 동일한 감수성 정도를 나타내었다 (데이터 미제시).
- ⑦ 대전라인의 엽상체는 PPT mg/L의 배지에서 완전히 고사하였으며, 스펙티노마이신은 50 ppm을 처리하였을 때 거의 고사하였다.





도 3. 애월라인의 PPT 및 스펙티노마이신 감수성

(2) 부평초 핵형질전환용 벡터제작 및 형질전환

- ① 부평초 핵형질전환을 위한 벡터를 제작하기 위하여 주관기관에서 분양받은 피타아제 유전자를 벡터IG2에 도입하여 핵형질전환 벡터 IG2PHY를 완성하였다 (Fig. 4).
- ② 이 벡터는 형질전환세포의 선발마커로 제초제저항성 유전자인 PPT 유전자를 가지고 있으며, 목표유전자의 발현조절 프로모터는 ubiquitin 프로모터를 사용하고 있다.
- ③ 벡터제작 완료 후, 각 연결부위 및 도입 유전자는 염기서열 결정을 통해 확인하였다(데이터 미제시).

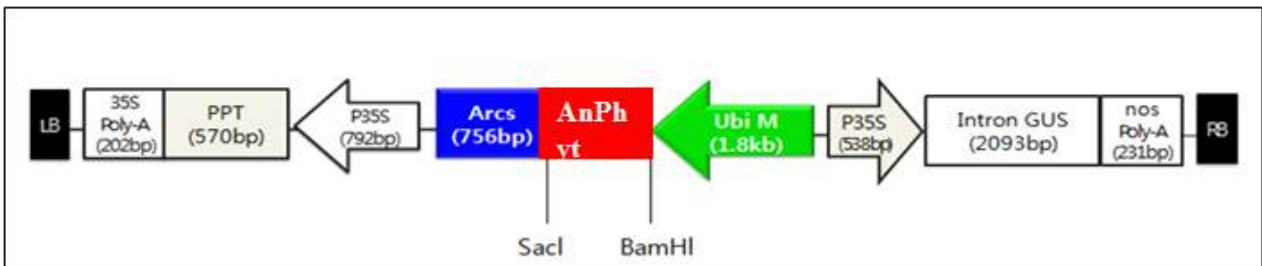


Fig 4. 부평초 핵형질전환벡터 IG2PHY

- ② 지금까지 부평초 형질전환에 대한 보고는, 전세계적으로도 5편 정도에 불과하여 형질전환이 매우 어려운 것으로 알려져 있다.
- ③ 1차년도 연구수행을 통해 본 연구팀에서 기 확립한 형질전환법인 아그로박테리움을 매개한 엽상체 직접도입법과 Yunsh 등(2007)이 보고한 겔러스 도입법을 각각 사용하였다.

- ㉔ 대전라인을 대상으로 한 엽상체 직접 도입법은 엽상체를 날카로운 칼날을 이용하여 상처를 내고, 100mg/L의 acetosiringone이 첨가된 아그로박테리아 현탁액에 상처난 엽상체를 침지하는 방법으로 수행하였다.
- ③ 그 결과 형질전환 엽상체를 단시간에 만들 수는 있는 장점이 있었지만, 리포터유전자 (GUS)의 단백질 발현을 확인한 결과 부평초 엽상체의 일부에서만 발현되는 것으로 확인되었다(도 5).
- ㉕ 이 결과는, 형질전환 시 아그로박테리움 공존배양 기간(3일) 동안에, 분열속도가 빠른 부평초가 이미 2 내지 3장의 새로운 엽상체를 만들기 때문에 선발과정에서 생존하는 엽상체는, 형질전환이 된 세포와 형질전환이 되지 않은 세포가 혼재하는 키메라(chimera) 조직일 가능성을 배제할 수 없다.
- ㉔ 이를 증명하기 위해서는 잎 조직 부위별 서던블롯 분석 등의 추가 실험이 필요하다고 사료되었다.

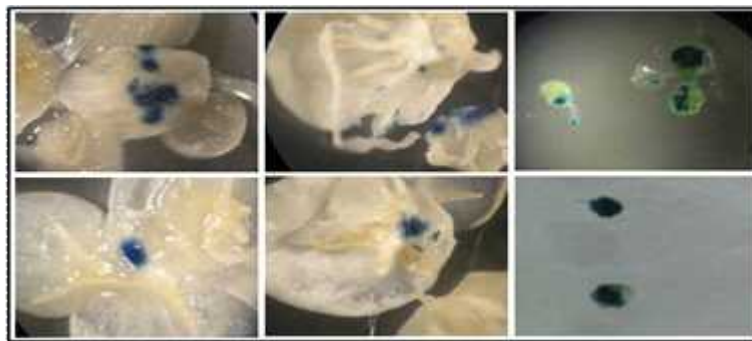


Fig. 5. 형질전환된 대전라인에서의 GUS 분석

- ④ 한편, 애월라인의 캘러스를 이용한 부평초 형질전환은 Vunsh 등(2007)이 보고한 형질전환 프로토콜을 일부 수정하여 수행하였다.
- ㉕ 아그로박테리움의 감염효율을 높이기 위하여, 유전자총 분사법(particle bombardment)를 사용하여 DNA를 코팅하지 않은 금입자(gold particle)로 캘러스에 상처를 낸 후, IG2PHY를 가진 *A.t* EHA105 균주로 접종하였다.
- ㉔ CG배지에서 3일간 공존배양 후, PPT 5mg/L, cefotaxim 300mg/L가 첨가된 FR배지에서 2주 간격으로 배지를 교환하면서 수 개월간 배양하였다(도 6).
- ㉕ 재분화 되어 생긴 엽상체를 PPT 5mg/L가 첨가된 액체 WP 1% sucrose 배지에 현탁배양하여 증식시켰다(도 6-e).

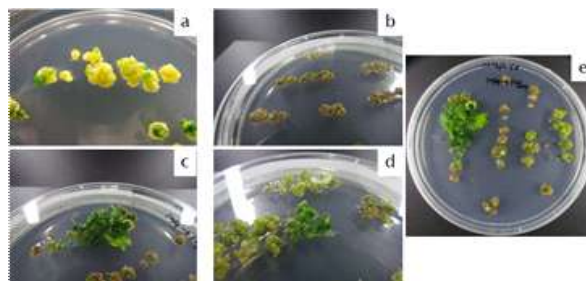
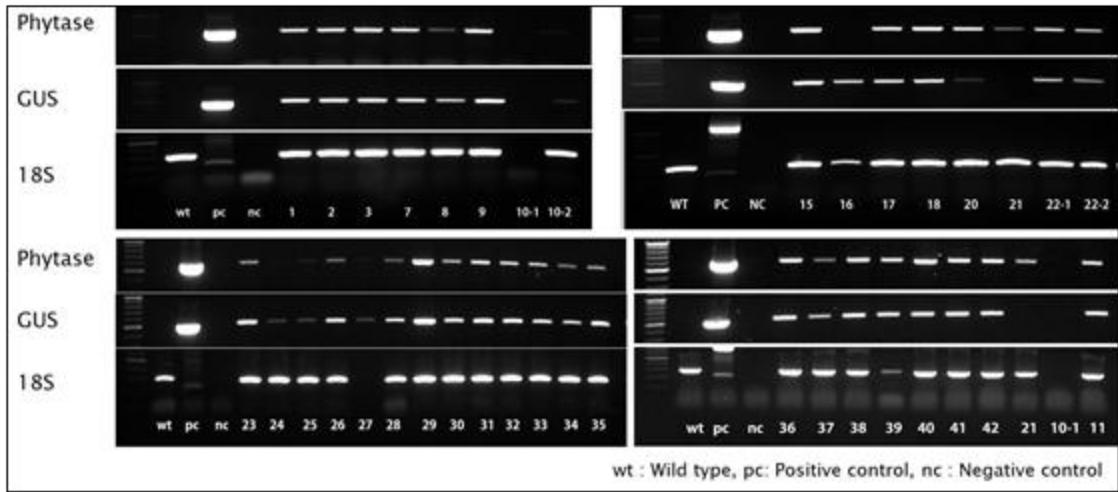


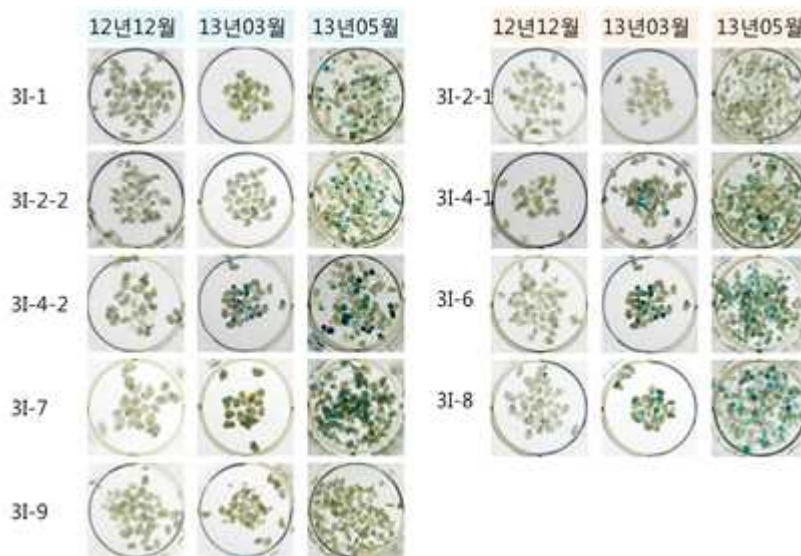
Fig. 6. 형질전환된 애월라인 캘러스의 재분화

⑤ 모든 라인에 대하여 5% chelex를 이용한 간이 PCR방법으로 피타아제 유전자와 GUS 유전자를 증폭하여 형질전환 여부를 확인 한 결과, 모든 라인에서 유전자의 도입이 확인 되었다(도 7).

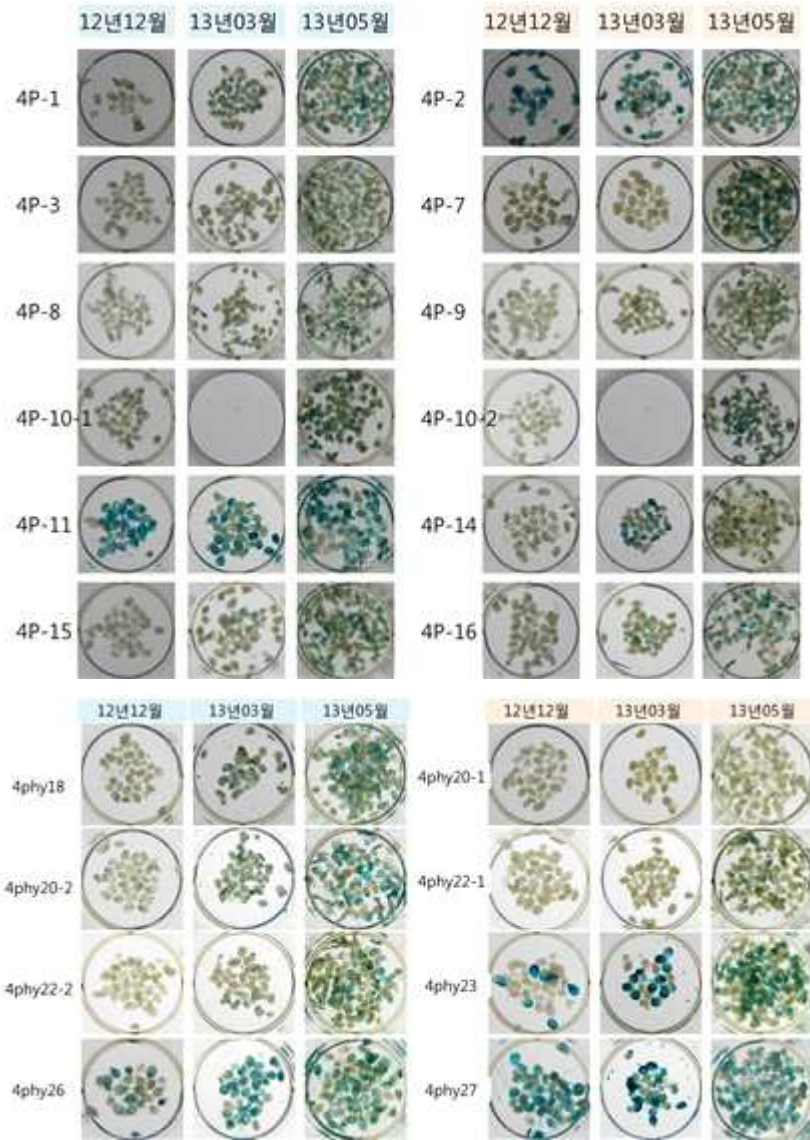


도 7. PCR을 통한 애월라인의 도입유전자 확인

- ⑥ 리포터 유전자인 GUS유전자의 발현 분석을 통하여 유전자의 도입과 안정적인 발현에 대하여 확인 하여 보고자 모든 라인에 대하여 GUS 염색을 실시하였는데, 각 라인별로 다양한 발현패턴을 나타내었으며 하나의 라인 내에도 발현패턴이 다르게 나타나는 라인도 있었다(도 8).
- ⑦ 모엽상체에 붙어있는 딸엽상체에서만 발현이 관찰되는 패턴이 다수의 라인에서 관찰되었으며, 전체에서 GUS발현이 확인되는 엽상체와 GUS 발현이 전혀 확인되지 않는 엽상체가 혼합되어 있는 라인도 있었다.





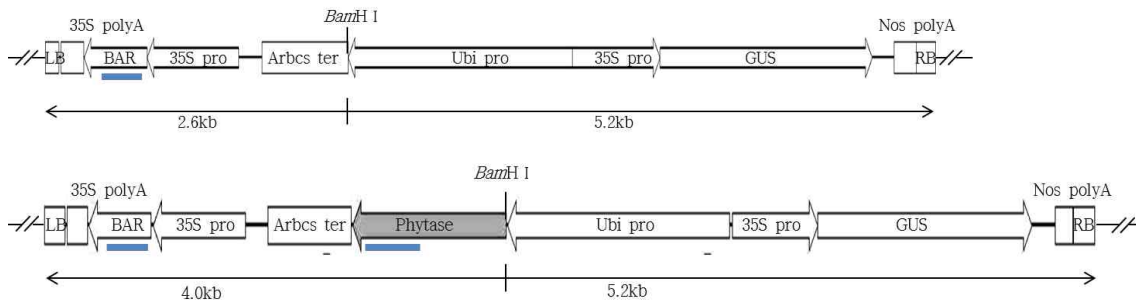


도 8. 형질전환 부평초에서의 GUS assay

(3) 형질전환 부평초의 검정

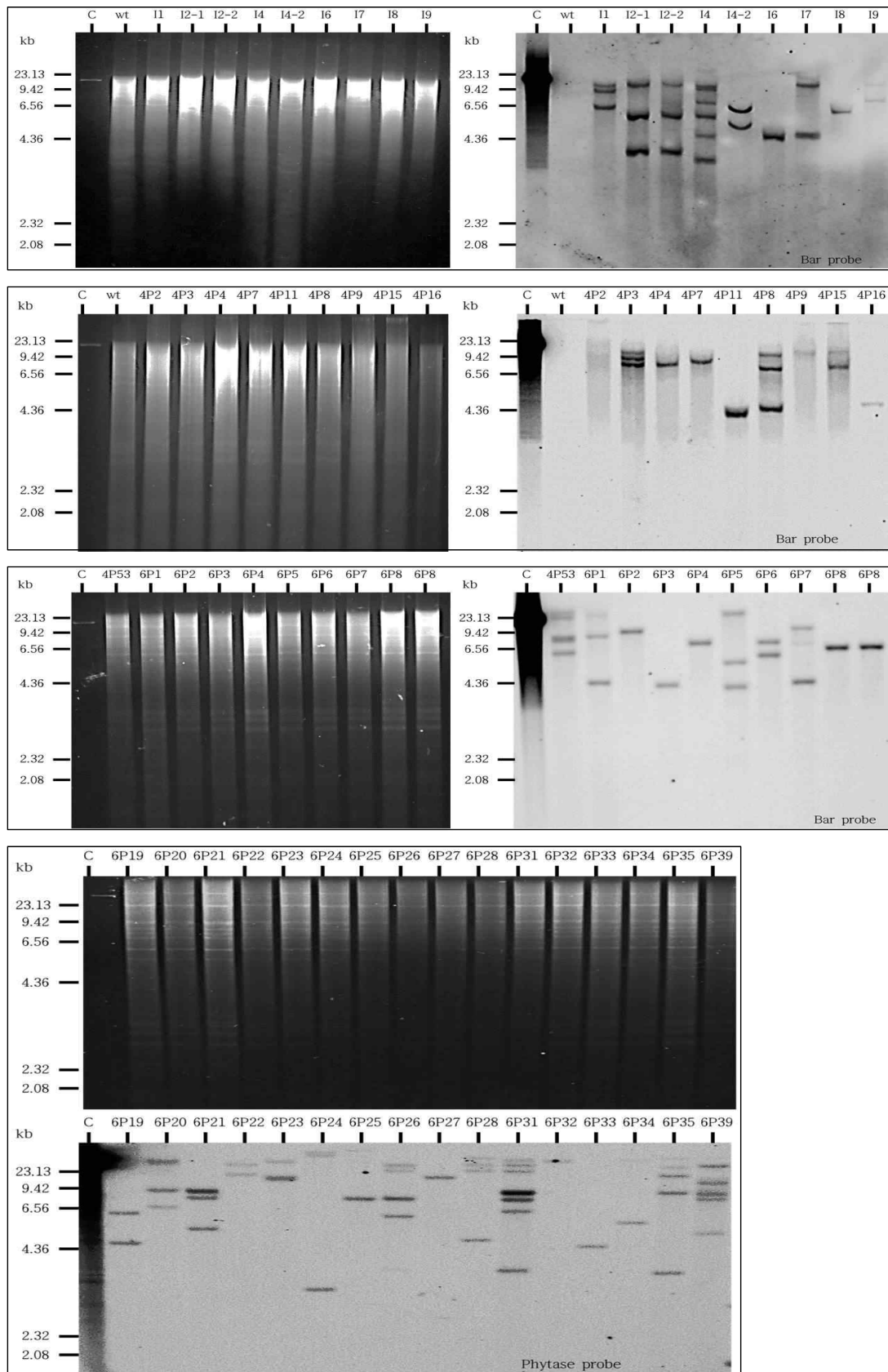
- ① 형질전환 부평초에서의 도입유전자 및 복제(copy) 수를 확인하기 위하여 총 81개 형질전환 부평초 라인에 대하여 서던블랏을 수행하였다.
- ㉠ 우선, 서던블랏 분석에 필요한 지놈 DNA를 추출하기 위하여 2002년 Yun Xiali 등이 발표한 논문의 방법을 이용하였다.
- ㉡ 액체질소를 이용하여 곱게 분쇄한 조직에 용해완충액{25mM Tris-HCl(pH8.0), 50mM EDTA, 0.5% SDS, 2%  $\beta$ -Mercapto ethanol(v/v)}를 처리하고 56°C에서 20분 이상 반응시켰다.
- ㉢ 부평초에는 당과 단백질이 다량 포함되어 있기 때문에 용해 후 1회 PCI(Phenol-Chloroform-Isoamylalcohol=25:24:1, v/v/v) 및 2회의 CI(Chloroform-Isoamylalcohol) 처리과정을 수행하였다.
- ② 야생형과 형질전환 애월라인 부평초로부터 추출한 DNA는 *Bam*HI를 이용하여 절단 후 1% 아가로스 겔에서 장시간 영동하여 절단된 게놈 DNA가 충분히 분리되도록 하였다.

- ③ 탈퓨린화, 변성, 중화 과정을 거친 젤의 DNA는 20x SSC(0.3M Sodium citrate, 3M NaCl) 조건에서 니트로셀룰로스 멤브레인(GE Healthcare)으로 블랏하였다.
- ④ Bar와 피타아제 유전자 서열에 분자교잡(hybridization)되는 탐침구(probe)는 Dig-labeling system(Roche)을 이용한 PCR반응을 거쳐 합성하였으며 항체는 Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments(Roche), 탐색 기질은 CDP star(GE Healthcare)를 사용하였다.



도 9. 부평초 핵 형질전환용 벡터 IG2(상), IG2-Phy(하)의 T-DNA 영역

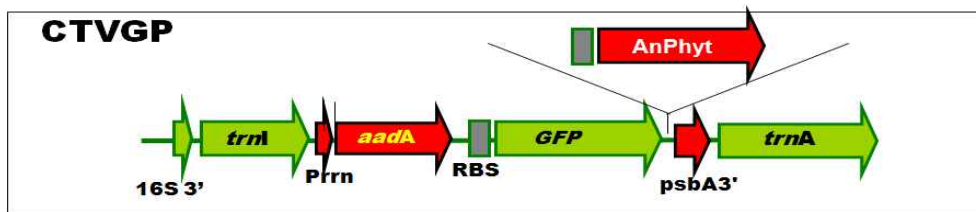
- ⑤ 생육장에 등으로 누락된 라인을 제외하고 검정한 총 81개 라인중 단일 copy가 도입된 것은 33개, 2개 도입은 22개, 3개 도입은 15개, 4개는 3개, 5개는 4개, 6개는 2개의 copy가 도입된 것으로 확인 되었다.
- ㉠ 가장 많은 copy가 도입된 2개의 라인에서는 총 7개의 밴드가 검출되었다(도 10).
- ⑥ 캘러스를 액체 배지 환경에서 형질전환된 아그로박테리움으로 감염 시킨 후 부서진 조각 별로 나누어 배양하였기 때문에 각 캘러스 조각에서 분화된 형질전환체는 각각 독립적인 확률이 높다.
- ㉠ 라벨에 -1, -2(예 3I2-1, 3I2-2)는 동일한 캘러스 군집에서 먼저 재분화된 엽상체와 늦게 재분화된 엽상체를 구분하기 위하여 사용하였는데 8개의 라인(3I2-1, -2, 3I4-1, -2, 4P20-1, -2, 4P22-1, -2) 중 2개의 라인(3I4-1, 3I4-2)은 서던블랏 수행 결과 독립라인인 것으로 나타났다.



도 10. 서던블롯 분석결과(일부), C; 양성대조구

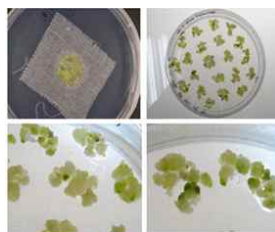
(4) 부평초의 엽록체형질전환

- ① 부평초의 엽록체 형질전환을 위한 벡터를 제작하기 위하여 한국생명공학연구원에서 분양받은 CTVG 벡터에 피타아제 유전자를 도입하여 엽록체형질전환벡터 CTVGP를 완성하였다(도 11).
- ㉠ 본 벡터는 동질적 재조합 부위(homologous recombination site)인 *trnI*와 *trnA* 부위를 양말단에 가지고 있으며, 리보솜 RNA 프로모터(ribosomal RNA promoter; *rrnP*)로 촉진되는 선발마커 스펙티노마이신 내성 유전자인 *aadA*, 리포터 유전자(GFP), 목표유전자인 피타아제가 다시스트론성(polycistronic)하게 연결되어 있다.
- ㉡ 각 연결부위 및 도입 유전자는 염기서열 결정을 통해 PCR 오류가 없음을 확인하였다(데이터 미제시).



도 11. 부평초 엽록체형질전환벡터 CTVGP

- ② 부평초의 엽록체형질전환법은 현재까지, 미국의 Biolex사에서 등록한 특허 1건 외에는 논문으로 보고된 바가 없으므로 등록특허에 기재된 프로토콜을 바탕으로 본 연구팀에서 확립한 재분화 배지조성을 추가한, 엽상체를 이용하는 방법과 캘러스를 이용하는 두 가지 방법을 사용하였다.
- ③ 엽록체 형질전환을 수행하기 전에, 등록특허에서 사용한 유전자총 기종과 본 연구팀이 보유한 기종이 서로 다르기 때문에 예비실험을 통해 유전자총 분사조건을 검토하여 분사거리 9cm가 최적의 조건임을 확인하였다(데이터미제시).
- ④ 우선, 엽상체에 직접 분사하는 방법에서는, 엽상체 뒷면에 직접 분사를 수행하여 3일간 공존배양 후, 재분화 및 스펙티노마이신이 첨가된 선발배지에 치상하여 형질전환 캘러스를 유도하였다.
- ㉠ 그러나 선발배지에서 유도되는 캘러스는 전혀 없었다.
- ㉡ 한편, 캘러스에 직접 분사하는 방법에서는, 애월라인에서 유도한 캘러스를 CG배지 중앙에 직경 3cm정도의 원형으로 모아 배치하고 유전자총 분사에 의해 캘러스가 배지 밖으로 비산되는 것을 막기 위해 멸균 거즈를 덮고 유전자총 분사를 수행하였다(도 12).



도 12. 부평초 엽록체형질전환 및 형질전환 세포 선발과정

- ⑤ 유전자총 분사를 수행한 캘러스는 3일간 암조건에서 공존배양 후 100mg/L 스펙티노마이신이 첨가된 CG배지에 치상하여 2주 간격으로 배지를 교환하면서 3개월간 선발과정을 거쳐 100mg/L 스펙티노마이신이 첨가된 FR배지에 치상하여 재분화를 유도하였다.
- ⑥ 선발배지에서 녹색을 띠기 시작한 캘러스 개체를 2등분 하여, 한쪽 캘러스 개체는 계속 증식에 이용하고, 나머지 캘러스 개체에서는 지놈 PCR을 이용하여 도입유전자의 유무를 확인하였다.
- ⑦ 그 결과, 일부 개체에서 목표유전자의 증폭을 확인할 수 있었다(도 13).
  - ㉠ 동시에, 유전자총 분사시 사용된 벡터플라스미드가 캘러스에 잔존해 있을 가능성을 조사하기 위하여 벡터의 엽록체 게놈 도입부위 바깥에 존재하는 오피실린 내성 유전자의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행한 결과 특이밴드가 증폭되지 않음을 확인하였다.
- ⑧ 총 37차에 걸쳐 유전자총 분사를 수행하였으나, 완전한 개체로 재분화되는 형질전환체를 얻는데는 성공하지 못하였다.

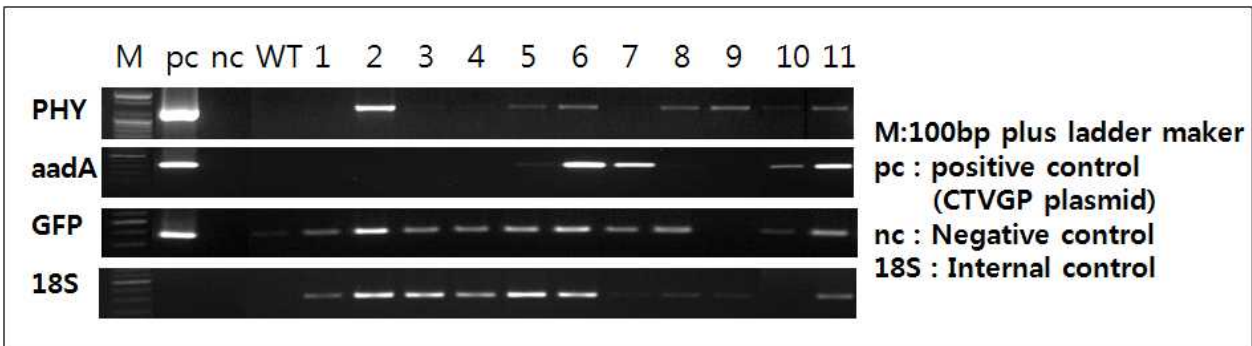


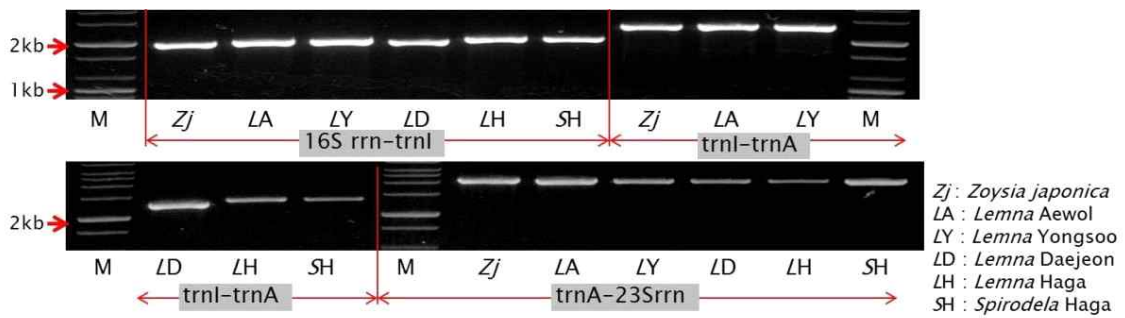
Fig. 13. Putative 엽록체형질전환 부평초 캘러스에서의 도입유전자 확인

- ⑨ 한편, 본 연구에서의 CTVGP 벡터제작에 사용된 엽록체형질전환벡터(CTVG)의 근본 유래는, 담배의 엽록체 게놈의 염기서열(16SRNA등 보존성이 높은 배열)로 부터 제작된 범용(universal) 벡터로, 일반적으로 타 식물 중에도 가능한 벡터로 알려져 있다.
  - ㉠ 그러나 부평초는 단자엽식물로, 쌍자엽식물인 담배와는 일부 염기서열이 다를 수 있기 때문에, 정상적인 재조합이 일어나고 있지 않을 가능성도 배제할 수 없다.
  - ㉡ 위 문제를 해결하기 위하여, 부평초로부터 유래하는 엽록체 지놈의 DNA단편(homologous recombination site)을 증폭하여, 담배벡터의 염기서열과 비교분석, 이를 토대로 부평초 전용 엽록체 형질전환벡터를 신규로 제작하였다.
- ⑩ 한국생명공학연구원으로부터 분양 받은 CTVG 벡터에는 엽록체 게놈으로의 상동재조합을 위하여 담배엽록체 게놈의 16Srrn-trnI, trnA-23Srrn 서열을 포함하고 있다.
  - ㉠ 그러나 NCBI에서 검색한 *Lemma gibba*, *Lemma minor*의 trnI, trnA영역과 담배(*Nicotiana tabacum*)의 동일 영역을 비교하면 trnI의 상동성은 약88%, trnA 영역은 약84%로, 높지 않은 상동성으로 인해 재조합 빈도가 떨어질 가능성이 있다.
  - ㉡ 따라서 보유중인 부평초들의 16Srrn-trnI-trnA-23Srrn 영역을 클로닝하여 염기서열을 비교하고 최종적으로 애월라인으로 부터 엽록체 형질전환용 벡터를 제작하였다.
- ⑪ 각각의 부평초라인으로부터 지놈 DNA를 추출, NCBI에서 얻어진 염기서열을 토대로 프



라이머를 제작하여 16Srrn-trnI, trnI-trnA, trnA-23Srrn 단편을 PCR을 통해 증폭하였다(도 14).

- ⑫ 클로닝을 통해 얻어진 염기서열과 NCBI에서 검색된 *Lemna minor*(*Lm*), *Lemna gibba*(*Lg*), *Spirodela polyrrhiza*(*Sp*)의 trnI-trnA 서열의 상동성을 비교하여 정리한 결과, 부평초 애월라인과 용수라인은 동일 종이며 *Lemna gibba*보다 *Lemna minor*일 가능성이 크다는 것을 알 수 있었다(도 15).
- ⑬ 부평초 대전라인은 *Spirodela*속 보다는 *Lemna*에 가까우나 *gibba*나 *minor*와 동종은 아닌 것으로 예상된다.
- ⑭ 하가라인은 *Spirodela polyrrhiza*(*Sp*)일 가능성이 크며, 엽상체는 부평초와 유사하고 부평초와 같이 다수의 뿌리를 가진 하가라인은 *Lemna*보다 *Spirodela* 속과 관계가 가까우므로 애월라인 및 대전라인과는 서로 다른 종 일 것으로 판단된다.



도 14. 부평초의 16Srrn-trnI, trnI-trnA, trnA-23Srrn 영역 증폭

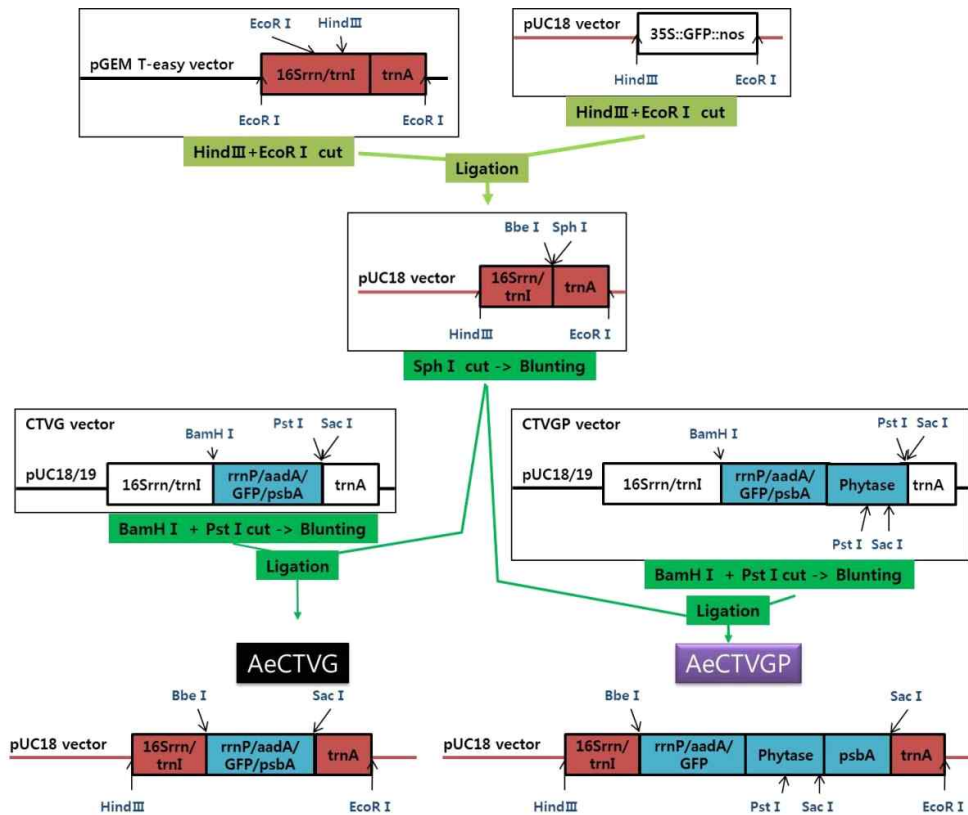
Identities	LA	LY	LD	LH	SH	<i>Lm</i>	<i>Lg</i>	<i>Sp</i>
LA	-	<b>99.84</b>	96.23	96.76	95.81	<b>99.73</b>	99.37	95.81
LY		-	96.07	96.61	95.66	<b>99.58</b>	99.21	95.66
LD			-	93.91	92.92	96.13	95.71	92.97
LH				-	98.11	96.51	96.15	98.11
SH					-	95.56	95.20	<b>99.69</b>
<i>Lm</i>						-	99.31	95.86
<i>Lg</i>							-	95.41
<i>Sp</i>								-

도 15. 부평초 엽록체 게놈의 trnI-trnA 영역 비교

LA : *Lemna Aewol*, LY : *Lemna Yongsoo*, LD : *Lemna Daejeon*, LH : *Lemna Haga*, SH : *Spirodela Haga*, *Lm* : *Lemna minor*, *Lg* : *Lemna gibba*, *Sp* : *Spirodela polyrrhiza*

- ⑬ 한편, 애월라인 trnI와 trnA 영역 사이에는 *SphI* 제한효소 인식 부위가 존재하여 아래의 도 16과 같이 rrnP/aadA/GFP/psbA 카세트 단편을 *SphI* 인식 부위에 삽입하는 방법으로 상동재조합부위로 애월라인의 엽록체 지놈 염기서열을 갖는 AeCTVG와 AeCTVGP를 제작하였다.

㉔ 현재, 제작된 벡터로 유전자총 분사를 수행하여 추가적으로 엽록체 형질전환체의 제작을 진행 중에 있다.

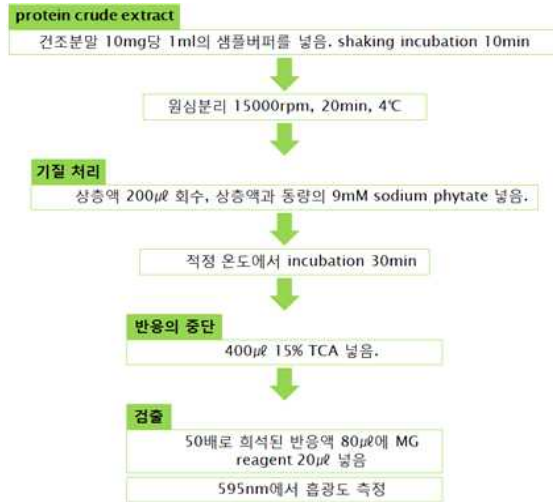


도 16. 부평초 애월라인 엽록체 형질전환용 벡터 제작 과정

### 3. 형질전환 부평초에서의 피타아제 효소활성 검정

#### (1) 피타아제 효소활성 분석조건 확립

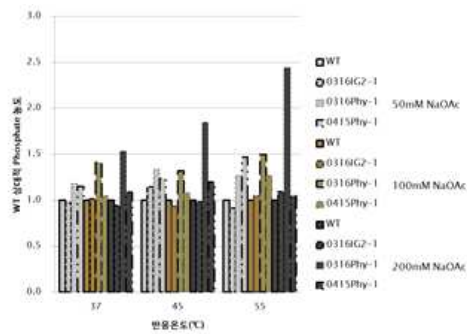
- ① 형질전환 부평초에서의 피타아제의 효소활성을 검정하기 위한 분석조건 확립을 위하여 우선, SensoLyte MG Phosphate assay kit(ANASPEC)을 이용하여 피타아제 활성을 측정하였다(도 17).
- ② 샘플은 55℃에서 3일 이상 건조한 후 막자사발로 분쇄한 야생형 및 형질전환 부평초 분말을 이용하였다.

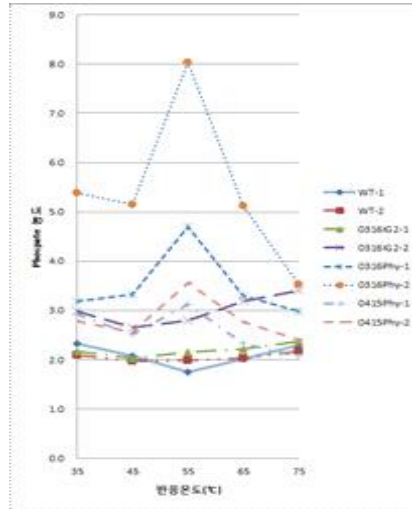


도 17. 피타아제 활성 측정법

- ② 우선, 형질전환체에서 발현되는 피타아제 효소가 최적의 활성을 나타내는 조건을 검토하기 위하여 샘플버퍼의 초산나트륨(sodium acetate)의 농도와 온도를 조작변인으로 실험하였다.
- ㉠ 초산나트륨 농도는 50, 100 및 200mM로 처리 하고 반응온도는 고정하였을 때 200 mM의 샘플버퍼에서 낮은 농도일 때 보다 높은 효소 활성을 나타내었다(도 18).
- ③ 최적의 반응온도를 검토하기 위하여, 위 실험에서 얻은 결과를 바탕으로, 샘플버퍼는 200 mM 초산나트륨으로 고정하고, 효소반응 온도를 35°C에서 75°C까지 10°C간격으로 하여 실험한 결과 55°C가 최적의 반응온도임이 확인 되었다(도 19).

도 18. 형질전환 부평초 애월라인에서의 초산나트륨 농도에 따른 피타아제 활성

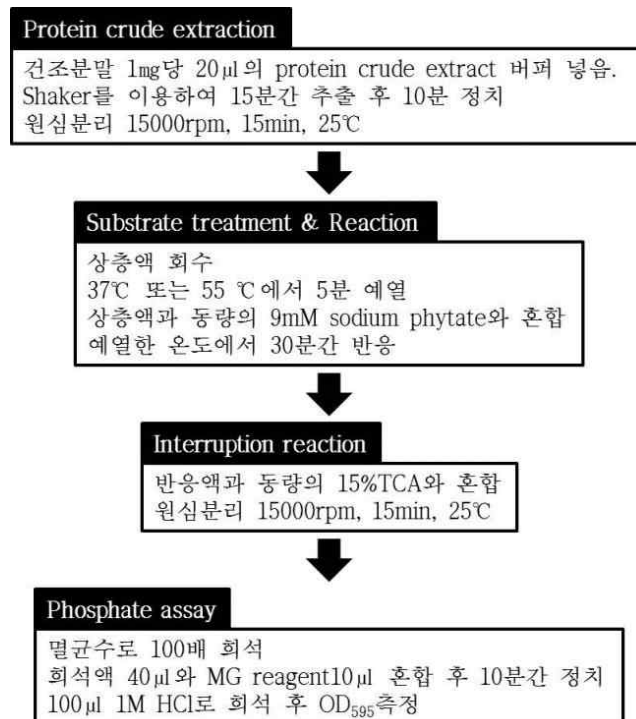




도 19. 형질전환 부평초 애월라인에서의 반응온도에 따른 피타아제 활성

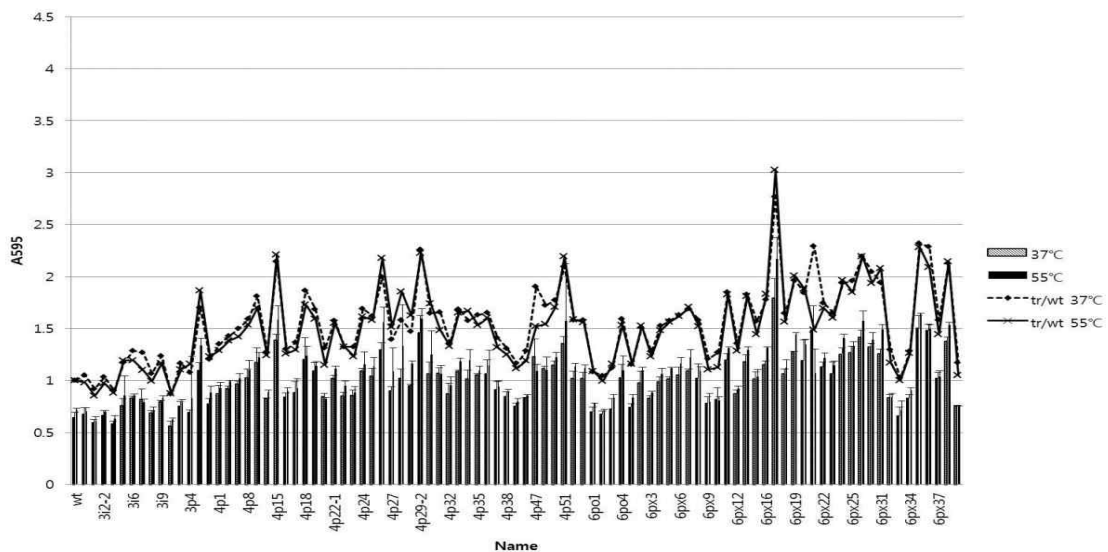
(2) 형질전환 부평초에서의 피타아제 활성 분석

- ① 선행 실험에서 건조 샘플의 효소 활성은 조단백질 추출액의 초산나트륨 농도가 200mM 일 때, 반응온도가 55°C일 때 최적의 활성을 나타내는 것으로 나타났다. 따라서 실험에서 조단백질 추출액의 초산나트륨 농도는 200mM로 하고, 반응온도는 동물의 체온과 유사한 37°C뿐 아니라 최적온도인 55°C에서도 실험을 수행하였다(도 20).



도 20. 조단백질 추출액의 피타아제 활성측정법 (개량)

- ② 55℃에서 건조된 부평초를, 막자사발을 이용하여 곱게 분쇄하고 샘플 파우더 1mg당 조단백질 추출액을 20 $\mu$ l 넣은 후 혼합하여 현탁하였다.
- ㉠ 실험 결과로 얻어진 A595 값은 부평초 추출물의 sodium phytate 분해능력과 비례한다.
- ㉡ 형질전환체의 A595값을 야생형과 비교 할 때 공벡터가 도입된 라인들은 37℃에서 평균 1.1배 높았고 55℃에서는 거의 유사하였다.
- ㉢ 한편, 피타아제 유전자가 도입된 라인들은 37℃, 55℃에서 평균 1.4배 높은 값을 나타내었다. 10개의 독립라인이 두 반응온도 모두에서 야생형에 비해 2배 이상 높은 활성을 나타내었고 55℃에서는 야생형에 비해 활성이 약 3배 높은 라인도 있었다.
- ㉣ 그래프에서 형질전환체/야생형은 형질전환체의 A595값을 WT의 A595값으로 나눈 것으로 각 라인 별 야생형 상대적 피타아제 활성을 나타낸다.
- ㉤ 반응온도 55℃에서 A595값이 피타아제 유전자가 도입된 라인뿐만 아니라 야생형 및 공벡터가 도입된 라인의 경우에서도 높았으나 야생형과 상대적으로 비교하였을 때는 거의 동일하였다. 이는 피타아제 작용보다 고온에 의해 무기인산이 유리된 것으로 사료된다(도 21).



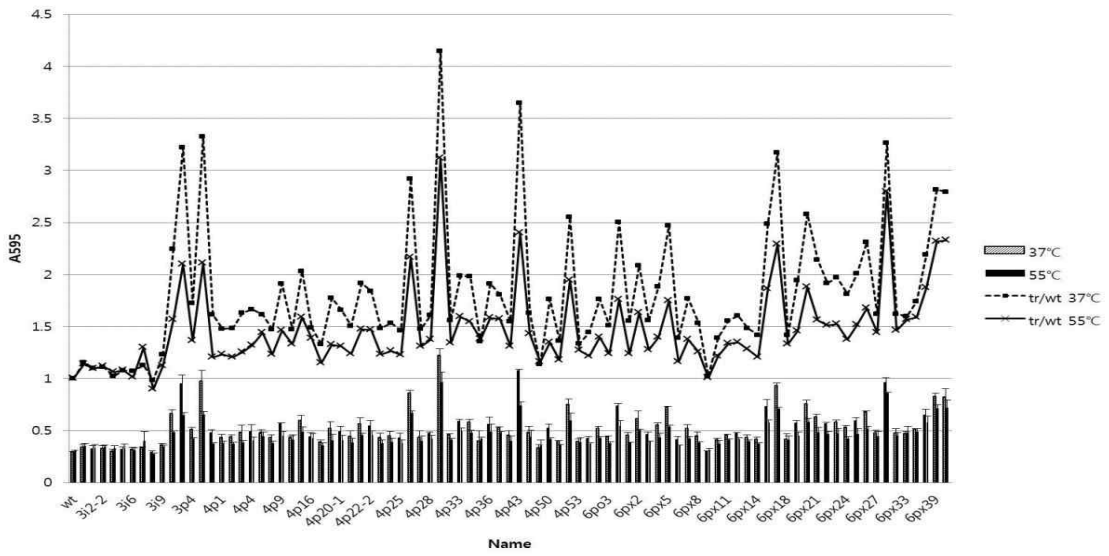
도 21. 건조된 형질전환 부평초의 피타아제 활성

- ③ 건조샘플을 이용하여 효소의 활성을 확인한 이유는 사료로 실용화 하고자 할 때 건조된 부평초가 비건조 상태보다 보관과 취급이 용이하기 때문이다.
- ④ 그러나 실험조건(55℃건조)에서 건조 상태에 따라서 결과가 크게 달라져 비건조샘플의 효소 활성을 추가로 측정하였다(도 22)
  - ㉠ 비건조샘플은 액체질소를 이용하여 곱게 마쇄하였으며 샘플 1mg당 조단백질 추출액을 5  $\mu$ l 넣어 혼합하여 현탁하였다. 이후의 과정은 건조샘플과 동일하게 하였다.
  - ㉡ 건조되지 않은 부평초로 실험한 결과, 공벡터가 도입된 라인들은 야생형과 다르지 않았으나 피타아제 유전자가 도입된 라인은 야생형에 비해 37℃에서는 평균 2.0배, 55℃에서는 평균 1.5배 높은 활성을 나타내었다.
- ⑤ 대부분의 라인이 37℃에서 더 높은 활성을 나타내었고 37℃에서는 21개 라인이 2배 이상

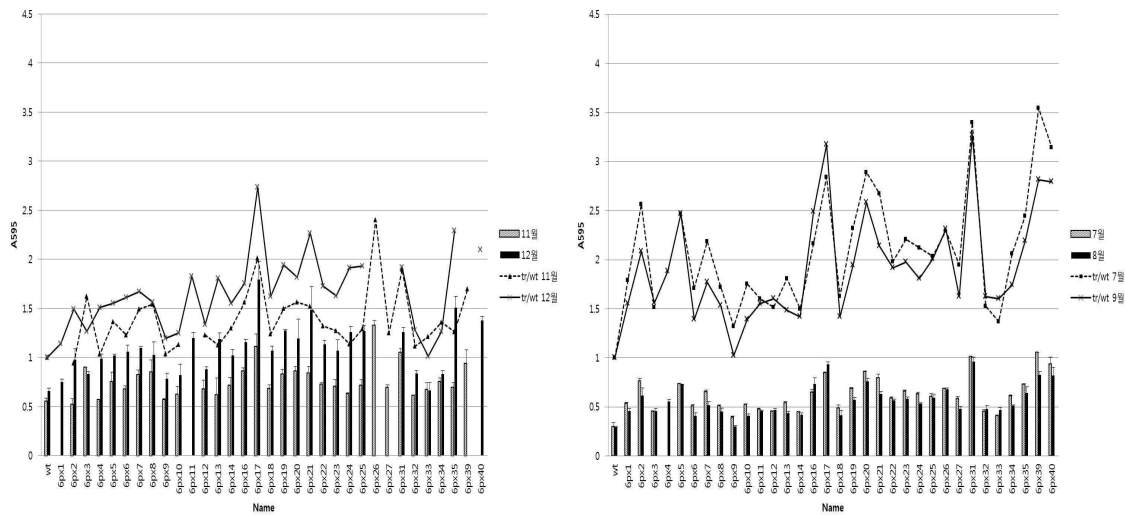
의 활성을 나타내었으나 55°C에서는 그 수가 크게 줄어 9개의 라인에서만 야생형에 비해 2배 이상의 활성을 유지하였다.

㉔ 활성이 가장 높게 나온 라인은 반응온도 37°C에서 4.1배 정도 높은 활성을 나타내었다 (도 23).

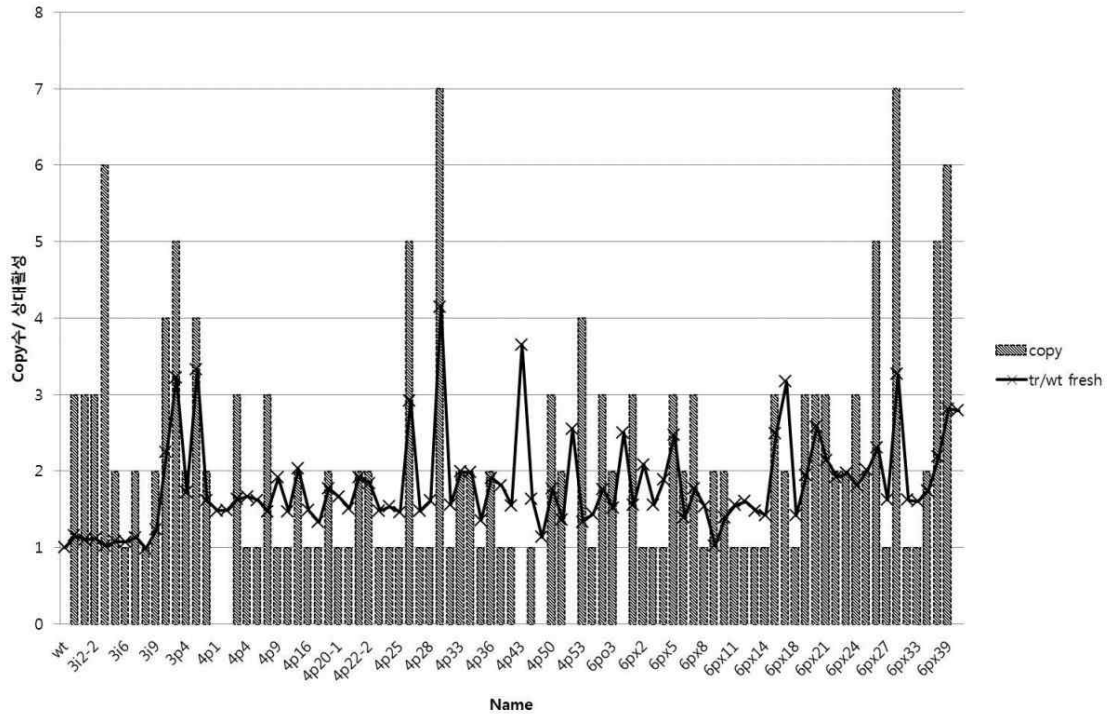
㉕ 한편, 서던블롯으로 확인된 유전자 copy수와 비건조된 형질전환 부평초의 피타아제 활성을 비교할 때, 도입유전자의 copy수가 많은 라인에서 효소의 활성도 높은 양상을 나타냈다(도 24).



도 22. 비건조된 형질전환 부평초의 피타아제 활성



도 23. 형질전환 부평초의 피타아제 활성 재현성. 좌; 건조된 부평초, 우; 비 건조된 부평초



도 24. 도입된 유전자 수와 피타아제 활성의 관계

(3) 부평초 대량증식

- ① 부평초는 2배로 증식하는데 소요되는 시간이 2일 정도이기 때문에, 바이오매스 생산에 가장 경제적인 식물로 대량생산 비용이 매우 저렴하다.
- ② 부평초는 생산에 특별한 시설이나 장비가 필요하지 않다.

(4) 부평초의 건조분말 제조

- ① 부평초의 대량증식을 위하여 다수의 배양병을 이용하여, 1차년도에서 확립한 최적의 증식조건(고온 및 장일조건 등)으로 배양하였다.
- ② 계대배양 시 회수한 부평초는 계대배양 시 마다 55℃에서 건조시킨 후 협동기관에 제공하였다.

## <제 2 협동과제>

### 피타아제 유전자 도입미세조류 및 식물의 유용성 및 안전성을 위한 동물실험 모델 개발

#### 1. 생체의(in vitro) 기능성 평가

##### (1) 줄기세포 배양을 통한 역가 및 유전자 후성유전학적 변화

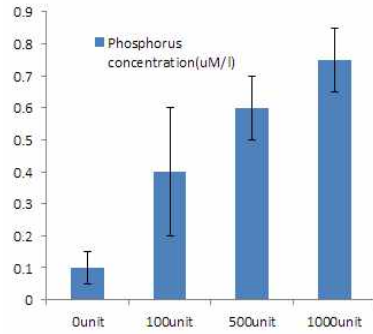
- ① 본 연구를 수행하면서 미리 확립되었던 ICR 마우스의 뼈속의 골수세포로부터 분리한 중간엽줄기세포를 이용하여 본 연구에서 사용한 피타아제의 세포활성 효과를 측정하였다.
- ② 중간엽줄기세포는 최소 20번의 계대배양을 통하여 안정화된 세포를 사용하였으며, 본 연구실에서 배양하여 보유하고 있는 ICR 마우스의 중간엽줄기세포를 이용하여 실제로 피타아제의 생체외 활성을 측정하기 위하여 수행하였다.
- ③ 본 실험에 사용한 피타아제는 실험용으로 세포 배양에도 사용 가능한 제품을 구입하여 처리하였다.
- ④ 실제로 본 연구의 1차 산물인 형질전환 식물체가 완성되어 실험에 사용되기 전에 실험조건과 발현 조건을 검증하기 위하여 수행하였다.
- ⑤ 수행결과(도 1), 세포내 뼈 형성 단백질로 알려진 Bone gla protein(BGP)의 발현율을 RT-PCR를 통하여 검증하였다.
  - ㉠ BGP는 비타민 k-의존성 칼슘 결합 단백질로서 조골세포와 초기 뼈형성에 매우 중요한 단백질이다.
  - ㉡ 본 연구에서는 이 단백질의 발현 유무를 통하여 피타아제의 세포내 활성을 검증하고 향후 사료에 첨가 된 후에 가축에서의 뼈 형성에 관여하는 기작을 밝히고자 수행하였다.
- ⑥ 결과적으로 일정정도의 용량으로는 큰 차이를 보이지 않고 있지만 양을 급격하게 줄이거나 완전 배제했을 경우에도 발현이 되는 것을 확인할 수 있었다.
  - ㉠ 결과적으로 피타아제가 뼈 형성에 상승효과는 매우 높지만 배제 되었을 경우에도 성장에 관련된 유전자의 경우는 소량으로도 발현되는 것을 알 수 있다.
  - ㉡ 향후 사료로 첨가되었을 때 이러한 효과를 검증한다면 피타아제의 사료 내 첨가량을 결정하여 경제적 용량을 정하는데 매우 중요한 결과를 본 실험을 통하여 얻을 수 있었다.



도 1. 농도별 피타아제(sodium phytase) 첨가배지에서 생쥐의 중간엽줄기세포를 배양시 피타아제가 미치는 효과. 레인 1-6: 0.5%, 0.3%, 0.1%, 0.05%, 0.01%, 0%



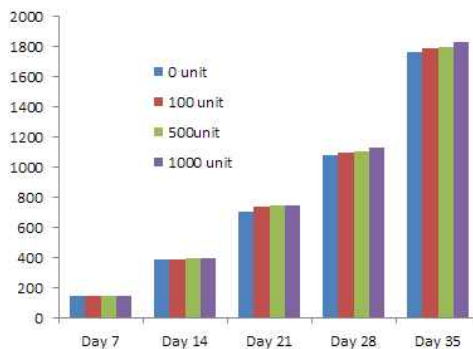
(2) 사료 첨가제를 처리한 생쥐의 뼈에서의 인 성분의 변화



도 2. 피타아제 첨가 사료를 섭취한 생쥐의 뼈에 함유된 인의 농도

- ① 본 실험의 결과는 무작위로 선발된 생쥐의 사료에 첨가된 피타아제의 처리량에 따른 생쥐의 뼈속의 인 성분의 상대적 비교를 나타낸 그래프이다.
- ㉠ 실제로 처리된 기간은 25일간 진행하였으며, 각 처리구별 5 마리를 구획하여 실험을 실시하고 실험 후 모두 희생시킨 후 뼈속 인의 성분을 검색하였다.
- ㉡ 결과적으로, 피타아제 양의 변화는 생태계도 쉽게 빠르게 적응하여 변화함을 관찰 할 수 있었다.
- ㉢ 측정방법은 일반적으로 사용되는 소화 방법(550℃)에서 1시간 회분화한 후 산으로 처리하여 흡광도를 측정하였다.
- ② 도 2의 결과처럼 피타아제의 처리가 증가함에 따라 인의 함량이 증가함을 관찰 할 수 있었다.
- ③ 이 실험 결과를 토대로 실제 본 연구에서 목적으로 하는 형질전환 식물체의 효과에 대한 상대적 효과를 확보하기 위한 기초 결과로서 매우 유의미한 결과를 얻을 수 있었다.

(3) 상업용 재조합 피타아제 사료 첨가제를 이용한 검증



도 3. 급이기간 동안 피타아제 첨가 사료가 육계의 성장에 미치는 효과

- ① 위 그림은 육계 총 각 실험구당 100수를 공시하여 피타아제 첨가 사료를 이용하여 성장률의 기준을 잡기 위한 실험으로 진행되었다.
- ② 본 과제에서는 대조구 설정을 위한 피타아제 첨가 사료를 통하여 기준 실험을 육계를

이용하여 진행했다.

- ㉔ 육계의 경우에는 피타아제의 효과가 처리구와 무처리구에서 확연하게 나타나고 있음을 확인할 수 있었다.
- ㉕ 그러나 피타아제의 양을 계속해서 증가시켜도 증가량에 따른 차이는 크게 나타나지 않았다.
- ㉖ 재미있게도 일정 정도의 한계점을 지나면 체내에서의 피타아제의 이용성이 떨어지는 것이 아닌가 생각되며 추후 연구를 통하여 밝혀야 할 것으로 사료된다.
- ㉗ 만일, 피타아제의 체내 이용성이 일정정도에서 효과를 극대화 된다면 본 연구팀이 만든 사료첨가제 내에서의 피타아제의 유전자 발현이 적을 경우에도 효과적으로 사료 첨가제의 역할을 할 수 있을 것으로 사료된다.

## 2. 형질전환 피타아제 부평초를 이용한 동물실험

### (1) 쥐 실험

- ① 마우스의 경우는 실험적 오류를 줄이기 위하여 누드마우스와 일반 마우스를 병행하여 사용하였다.
- ② 처리구는 한번 처리할 때 사료량을 10g으로 결정하고 총량에 맞추어 그룹별 본 연구에서 사용된 피타아제 발현 형질전환 부평초 건조중량으로 결정하였으며 상업용 는 선행연구의 논문의 실험량에 따라 결정하였다.
- ③ 표 1에서 보는 바와 같이 대조구는 일반 사료와 유전자가 전이되지 않은 부평초로 구성되어 있으며 형질전환 피타아제는 일반 상업용 피타아제와 표와 같이 처리하여 배치하였다.

[표 1] 피타아제 유전자 발현 형질전환식물을 이용한 생쥐 성장을 위한 실험 매트릭스

Quantity	Group A1	Group B1	Group C1	Group C01
Feed	10 g	9.999 g	5g	5 g
rPhytase	0	0.001 g	0	0
Transgenic Plant	0	0	5 g	0
WT plant	0	0	0	5 g
Total	10 g	10 g	10 g	10 g

Group A1: 1 (control, no treatment)

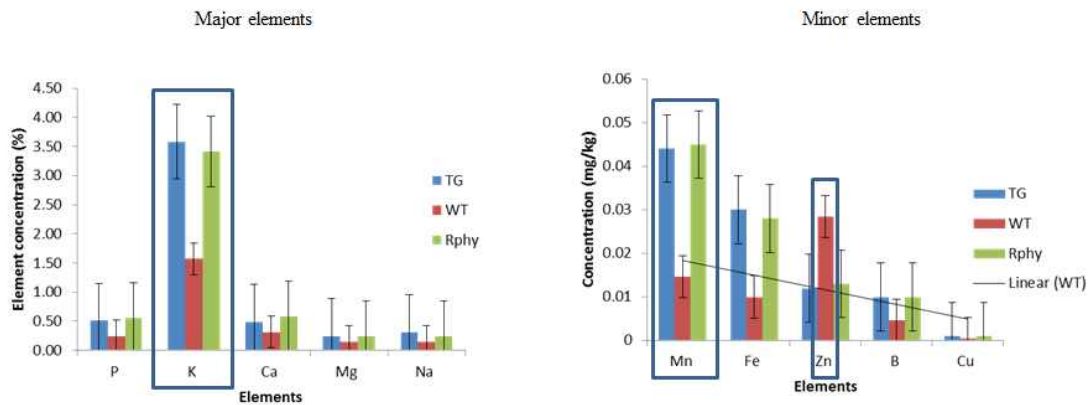
Group B1: 2 (treated with rPhytase), 500 U/ Kg feed. rPhytase 5000U/g

Group C1: 2 (treated with Transgenic phytase-plant/ TG-plant). 5g of plant/ day for treatment

Group C01: 2 (treated with WT plant). 5g of plant/ day for treatment.

- ④ 인 이용성 분석을 위한 각 실험구로부터 시료 측정을 아래 Table 2와 같이 수행하였다.
- ⑤ 또한 어린 주령의 누드마우스(4주령)를 사용하여 각 실험구별 성장률을 측정하였다(표 3, 도 5).
- ⑥ 그리고 사료 첨가제의 첨가 효과를 측정하거나 결과치에 대하여 보정을 위해 본 연구에서 사용한 첨가물의 성분 분석도 또한 매우 중요한 요소이다.
- ㉔ 도 4에서 보는 바와 같이 주요 미네랄과 미량 미네랄에서 K, Mn 의 경우는 형질전환 식물에서 높게 나타나고 있었으며 반면에 Zn의 경우는 야생형 부평초가 더 높은 것으로 분석되었다.

- ㉞ 이러한 기본적인 상태를 토대로 실험을 수행하였다.
- ㉟ 본 연구에서는 총 4주간의 연구를 진행했고 2년차 시점에서 분석된 결과는 1단계 2단계로 분석해 볼 때 도 5와 표 2와 같이 4주간의 성장을 측정하고 최종적으로 각 실험구에서 조직, 분, 뼈 등을 채취하여 각각의 실험구를 실험방법에 따라 분류하고 분석하게 되었다.
- ㊱ 표 2의 경우는 총 처리한 샘플수와 샘플 매트릭스(matrix)를 나타내고 있으며 표 3과 도 5의 경우는 1단계 성장률을 보여주는 결과이다.
- ㊲ 재조합 피타아제가 첨가된 그룹 B1 과 형질전환 식물체인 C1에서 타 그룹에서보다 성장에 차이가 나고 있음을 관찰 할 수 있었다.
- ㊳ 그러나 2주간의 성장비교로서 최소 4주의 결과를 첨가해야 의미가 있다고 판단된다.
- ㊴ 2단계 실험 시 추가 결과를 분석하고자 한다.



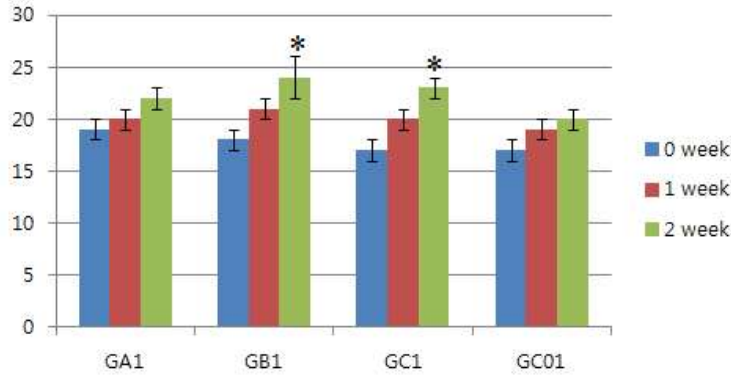
도 4. 사료 처리구간에 미네랄 성분 비교

[표 2] 인 구성분 분석을 위한 생쥐 조직시료의 매트릭스

Item	Group A1	Group B1	Group C1	Group C01
Tissue	5	5	3	4
Bone	10	10	5	5
Muscle	7	7	5	5
Feces	10	10	10	10
Total	32	32	23	24

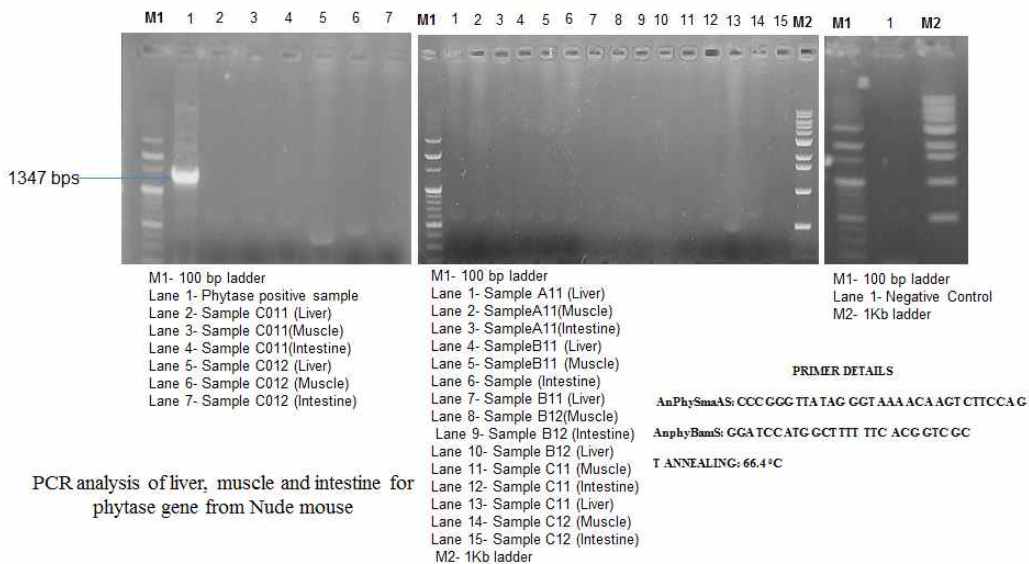
[표 3] 피타아제 발현 식물을 급이한 후 생쥐의 주별 성장

Item	Group A1	Group B1	Group C1	Group C01
0 week	19	18	17	17
1 week	20	20	20	19
2 week	22	24	23	20



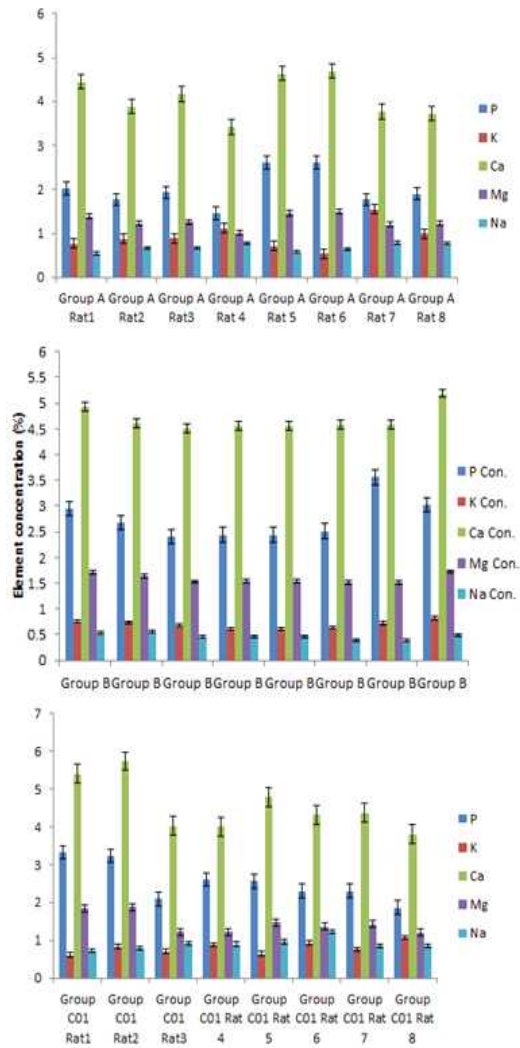
도 5. 피타아제 발현 식물을 급이한 생쥐의 체중 증감

- ⑩ 이 분석 실험이 진행되는 동안 제1협동 과제에서 수행한 형질전환 개구리밥(부평초)의 사료로서의 안전성 검증이 주요 연구 항목이기 때문에 본 연구에서는 이에 대한 검증을 수행하였다.
- ㉔ 제1협동과제로부터 넘겨받은 시료를 마우스에 섭취시킨 후 일부 마우스의 간, 근육, 내장으로 부터 전 처리구로부터 DNA를 추출하고 이를 이용하여 아래 도 6에 나타난 DNA 프라이머 정보를 이용하여 PCR를 수행하였다.
- ㉕ 수행한 결과는 도 6와 같으며 결과적으로 형질전환 식물을 섭취한 마우스에 주요 장기에서 전혀 피타아제 유전자가 검출되지 않음을 확인하였다. 현재 결과를 볼 때 본 연구에서 사용한 방법은 가축 안전성에 대하여 정확한 방법으로 판단되는 DNA 분석법을 통하여 신뢰도 있는 결과를 보여주었다.
- ㉖ 그러나 실제 실용화를 위해서는 매우 심도 있는 조사가 필요한 부분으로 향후, 실제 식품으로의 가치를 가지는 경제동물의 경우는 더 많은 안전성 테스트가 필요할 것으로 생각한다.



도 6. 피타아제 발현 식물을 급이한 생쥐의 다양한 조직에서 오염 여부 및 안전성 확인을 위한 PCR 분석

- ⑪ 본 연구계획에서 가장 중요한 요점은 피타아제의 동물분내에서의 분해 후 생체내에 이용성에 대한 실용화 기술개발로서 본 동물 실험을 통하여 유용성이 검증되어 있지만, 그 연구 결과에 더하여 무엇보다 중요한 것은 안전성에 있다고 볼 수 있다.
- ㉓ 향후, 식물에서 대량 생산된 형질전환 사료 첨가제가 동물의 유전적 변화에 영향을 주지 않고 오염에서도 안전하다면 이 연구의 성공 가능성이 매우 높다.
- ㉔ 그러한 측면에서 본 연구의 결과는 모든 실험구에서 전혀 공여체 유래의 유전자가 검출되지 않아서 매우 고무적인 결과이다.
- ⑫ 그리고 본 연구에서 처리한 식물체가 동물의 개체간 변이를 어떻게 반영할까 궁금하여 평균값과 함께 개별 쥐의 결과를 함께 분석하여 보았다.
- ㉕ 결과적으로 각 실험구에서의 처리구간의 큰 차이점은 발견하지 못했고, 특정 미네랄의 불균형은 실제 외부에서 도입한 식물체 의존적인 흡수에 의하여 나타날 수 있다고 생각된다(도 7).
- ㉖ 그러므로 이에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 생각된다.



도 7. 각 개체 동물별 주요 미네랄 구성분

(2) 육계 실험

- ① 피타아제 발현 형질전환 부평초를 이용한 육계실험은 육계 부화장으로부터 1일령 병아리를 200수 구입하여 제주대학교 부속 실습센터 육추장에서 수행되었다.
- ② 표 4와 같이 총 4개 그룹으로 나누고 표에서 보는 바와 같이 구획하여 실험을 수행하였다.
- ③ 육계에서의 기본 사료의 구성요소는 표 4와 같다. 이 구성에서 재조합 피타아제와 피타아제 형질전환 부평초의 첨가 기능을 정확하게 구분하여 구획되어 있는 상태에서 10g의 일반사료에 피타아제 발현 부평초를 혼합하여 사료로 제공하였다.
- ④ 또한 전체 사료의 구성은 표 5에 표시한 상태로 전체 실험구에 동일하게 전 실험기간을 통하여 적용되었다.

[표 4] 피타아제 유전자 발현 형질전환식물을 급이한 육계의 성장

Quantity	Group A3	Group B3	Group C3	Group C03
Feed	20 g	19.998 g	10 g	10 g
rPhytase	0	0.002 g	0	0
Transgenic Plant	0	0	10 g	0
WT plant	0	0	0	10 g
Total	20 g	20 g	20 g	20 g

[표 5] 실험기간 동안 28일령 육계에게 급이할 사료 구성분 및 포몰레이션

Ingredients	Experimental diet (%)				
	Control	(A1)	B1	C1	C01
Maize	65.00		65.00	65.00	65.00
Soybean meal	30.00		30.00	30.00	30.00
Deoiled rice bran	0.60		0.60	0.60	0.60
Salt	0.20		0.20	0.20	0.20
Vitamin premix*	0.10		0.10	0.10	0.10
Trace mineral**	0.10 <sup>a</sup>		0.10 <sup>b</sup>	0.10 <sup>b</sup>	0.10 <sup>b</sup>
Calcium carbonate	1.00		1.00	1.00	1.00
Dicalcium phosphate	1.00		0.50	0.50	0.50
DL-methionine	0.14		0.14	0.14	0.14
Lysine	0.10		0.10	0.10	0.10
Sand	0.08		0.08	0.08	0.08
Poultry oil	1.76		1.76	1.76	1.76
Supplements					
rPhytase <sup>1</sup>	--		0.2g of rPlant/ day/broiler	--	--
Phytase t-Plant <sup>2</sup>	--		--	2g of tplant/ day/broiler	--
WT Plant <sup>#</sup>	--		--	--	4.4 g of plant/ day/broiler

\* Vitamin premix (U/kg diet)= Vitamin A, 15,000 IU; D, 3,000, ICU; E, 100 mg; K, 4 mg; B1, 2 mg; B2, 15 mg; B5, 25 mg; B6, 8 mg; B3, 60 mg; B12, 0.25 mg; Folic acid, 2.5mg; Biotin, 0.2 mg, (Bhanja et al., 2005). \*\* Trace mineral (mg/kg diet). <sup>a</sup>Co, 10; I, 1; Se, 0.2; Fe, 50; Mn, 70; Zn, 100; Cu, 10(Rousseau et al., 2012). <sup>b</sup>Co, 10; I, 1; Se, 0.2; Mn, 70; Fe, 50; Cu, 10. <sup>1</sup>Recombinant phytase; <sup>2</sup>Transgenic plant with phytase; <sup>#</sup>Wild type plant leaves powder.



[표 6] 피타아제 첨가가 육계 실험에 미치는 효과

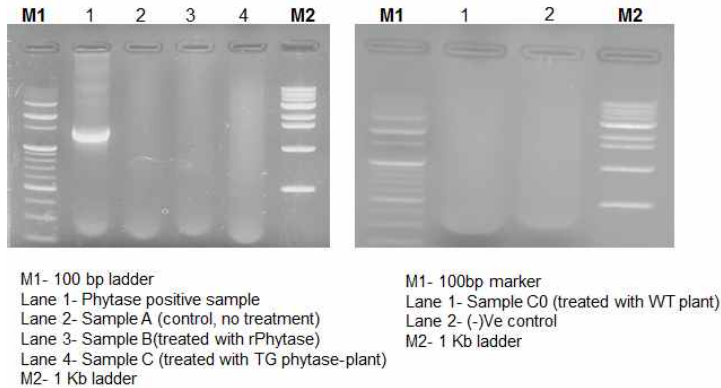
Age of birds and duration treatment													
Group	21 days old (0 week)	28 days old (1 <sup>st</sup> week)			35 days old (2 <sup>nd</sup> week)			42 days old (3 <sup>rd</sup> week)			49 days old (4 <sup>th</sup> week)		
	IW <sup>#</sup>	W <sub>L</sub> <sup>#</sup>	FI <sup>#</sup>	FCR	W <sub>L</sub> <sup>#</sup>	FI <sup>#</sup>	FCR	W <sub>L</sub> <sup>#</sup>	FI <sup>#</sup>	FCR	W <sub>L</sub> <sup>#</sup>	FI <sup>#</sup>	FCR
A	51.50 <sup>NS</sup> ±0.4	114.87 <sup>NS</sup> ±0.29	20.33 ±0.42	0.31	261.5 <sup>NS</sup> ±0.80	27.22 ±0.28	0.13	416.89 <sup>NS</sup> ±0.68	80.06 ±1.03	0.21	731.43 <sup>NS</sup> ±0.83	95.41 ±0.56	0.14
B	50.28 <sup>a</sup> ±0.3	157.88 <sup>b</sup> ±1.5	18.29 ±1.08	0.16	226.7 <sup>c</sup> ±1.8	26.06 ±0.61	0.14	543.97 <sup>c</sup> ±1.2	80.43 ±1.09	0.16	980.84 <sup>c</sup> ±2.5	98.69 ±1.15	0.10
C	47.5 <sup>a</sup> ±2.7	158.88 <sup>b</sup> ±2.21	17.1 ±0.70	0.15	297.5 <sup>c</sup> ±2.02	25.3 ±0.69	0.10	542.81 <sup>d</sup> ±2.68	78.39 ±1.83	0.15	993.0 <sup>d</sup> ±2.64	107.78 ±1.29	0.11
D	51.7 <sup>a</sup> ±0.75	148.7 <sup>b</sup> ±2.8	18.4 ±1.14	0.18	312.9 <sup>c</sup> ±1.8	31.43 ±0.75	0.12	428.26 <sup>d</sup> ±1.22	67.66 ±1.11	0.17	775.28 <sup>d</sup> ±2.4	106.19 ±0.70	0.14

Values are Mean ± SD

# the unit of the weights was measured in gram

IW- Initial Weight of the broiler; W<sub>L</sub>-Live weight of birds at the time of experimental period, FI-Food Intake, FCR (feed conversion ratio)- FI/ W<sub>L</sub>-IW

<sup>abcd</sup>Mean values with same superscripts in the same row are not significantly different (P<0.05). NS- Non significant



도 8. 육계의 간 조직에서 피타아제 유전자 PCR 탐색

- ② 총 실험기간은 4주에 걸쳐 49일령이 될 때까지 진행하였다.
- ㉠ 일반적으로 육계는 출하일령이 30일 이후 상황에 따라 조절되는 품종으로 빠른 성장기간에 처리구와 대조구간의 유의적 차이를 검토하는 것도 본 연구의 목적을 달성하는데 매우 중요한 요인이라 판단하였다.
- ③ 표 6에서 보면, 본 연구자가 가설로 설정한 상태와 유사하게 나타나고 있었는데 재조합 피타아제를 첨가한 실험구와 부평초 처리군이 타 처리군에 비하여 높은 성장을 보이고 있었다.
- ㉠ 부평초와 사료만 처리한 처리구 D의 경우는 처리구 A와 유사한 성장을 보이고 있었다. 일반적인 사양보다 피타아제 처리 사양에서 성장이 빠른 것을 관찰 할 수 있었다.
- ㉡ 그런데 재미있는 결과가 처리구 D에서 부평초 처리구와 일반 사료 처리구가 전체 사료량은 동일한 상태에서 약간 처리한 상황에서 영양 결핍 없이 유사한 성장을 보이고 있었다.
- ④ 전체적인 결과를 검토해 보면 피타아제 발현 형질전환 부평초 실험에서 육계의 경우는 매우 좋은 결과를 보이고 있다고 말 할 수는 없지만 부평초가 사료 대체제의 기능을 함께 지니고 있음을 확인 할 수 있었다.
- ㉠ 향후, 부평초의 사료 가치에 대한 새로운 연구가 필요할 것으로 생각된다.

- ㉔ 주령별 결과를 살펴보면 처음 시작할 때의 육계의 무게는 처리구 C의 평균 무게가 타 처리구에 비하여 낮게 시작하였다.
- ㉕ 그러나 1주일이 지나면서 성장률의 속도가 급격하게 나타나면서 처리구 B와 유사하게 피타아제의 효과로 볼 수 있는 지표가 나타남을 관찰할 수 있었다.
- ㉖ 그리고 전체 사양기간에 걸쳐 처리구 B 와 C에 있어 사료효율이 가장 좋게 나타나고 있음을 관찰할 수 있었다.
- ㉗ 이 결과를 토대로 본 연구에서는 유전적 오염과 안전성만 문제가 안 된다면 부평초의 사료가치와 함께 피타아제 발현 형질전환 부평초의 체내 인분해 효율에 의한 사료효율이 재조합 피타아제 제품과 동일하거나 그 이상으로 나오는 것 확인할 수 있었다.
- ⑤ 이 연구 결과는 향후, 종자주권의 차원에서 우리나라 토종자원의 사료가치를 재확인한 중요한 연구 결과라 할 수 있으며, 더불어 생명공학 기술에 의한 새로운 자원이 개발되었음을 알 수 있다.
- ㉘ 특히, 부평초(\*일명:개구리밥)는 수질환경에서 매우 높은 정화능력을 가지고 있으며, 호수나 강에서 분뇨에 의한 인 성분이 과다로 유출되었을 때 부영양화를 정화시키는 능력을 시험해 볼 수 있는 중요한 환경정화 지표 식물이 될 수 있다고 생각한다.
- ㉙ 부평초의 성장 속도 또한 매우 빨라서 일년에 다수에 걸쳐 수확할 수 있고 이를 건조하여 다시 사료 작물로 사용할 수 있는 유용한 후보 자원이라 고려할 수 있다.
- ⑥ 이러한 요구를 충족시키기 위한 필요조건은 무엇보다도 안전성을 먼저 고려할 수 있다. 따라서 본 연구에서도 이를 검증하기 위하여 실험이 종료된 육계의 조직 중 간 조직을 추출하여 DNA를 통하여 외부 피타아제 유전자의 오염 여부를 PCR 방법으로 검사하였다 (도 8).
- ㉚ 결과를 살펴보면 양성대조구인 부평초 피타아제 유전자는 선명하게 증폭이 되는 반면, 샘플에서는 전혀 증폭이 되지 않는 것을 확인하였고 그 외 샘플 오염을 측정 할 수 있는 음성대조구에서도 전혀 검출이 되지 않았음을 확인 할 수 있다.
- ㉛ 이 결과는 실제 실용화나 산업화를 위해서는 더 강화된 안전 기준을 통하여 검사를 해야 하겠지만, 실험실 수준에서는 오염되지 않았음을 확인 할 수 있었다.
- ㉜ 이 결과를 토대로 향후, 산업화를 위한 추가 연구를 진행 할 수 있을 것으로 사료된다.

[표 7] 피타아제 첨가가 육계의 골광화(bone mineralization)에 미치는 효과

Mineral	Groups			
	A	B	C	D
P	8.34±0.78 <sup>d</sup>	8.53±0.77 <sup>c</sup>	9.22±1.31 <sup>a</sup>	8.51±0.61 <sup>c</sup>
Ca	17.82±1.10 <sup>d</sup>	19.55±1.80 <sup>b</sup>	20.16±3.13 <sup>a</sup>	18.12±1.59 <sup>c</sup>
Mg	0.28±0.04 <sup>c</sup>	0.29±0.03 <sup>b</sup>	0.30±0.04 <sup>a</sup>	0.27±0.02 <sup>d</sup>
Zn	0.53±0.07 <sup>a</sup>	0.53±0.08 <sup>a</sup>	0.45±0.08 <sup>d</sup>	0.51±0.05 <sup>a</sup>

Values are Mean ± SD

The unit is expressed in percentage

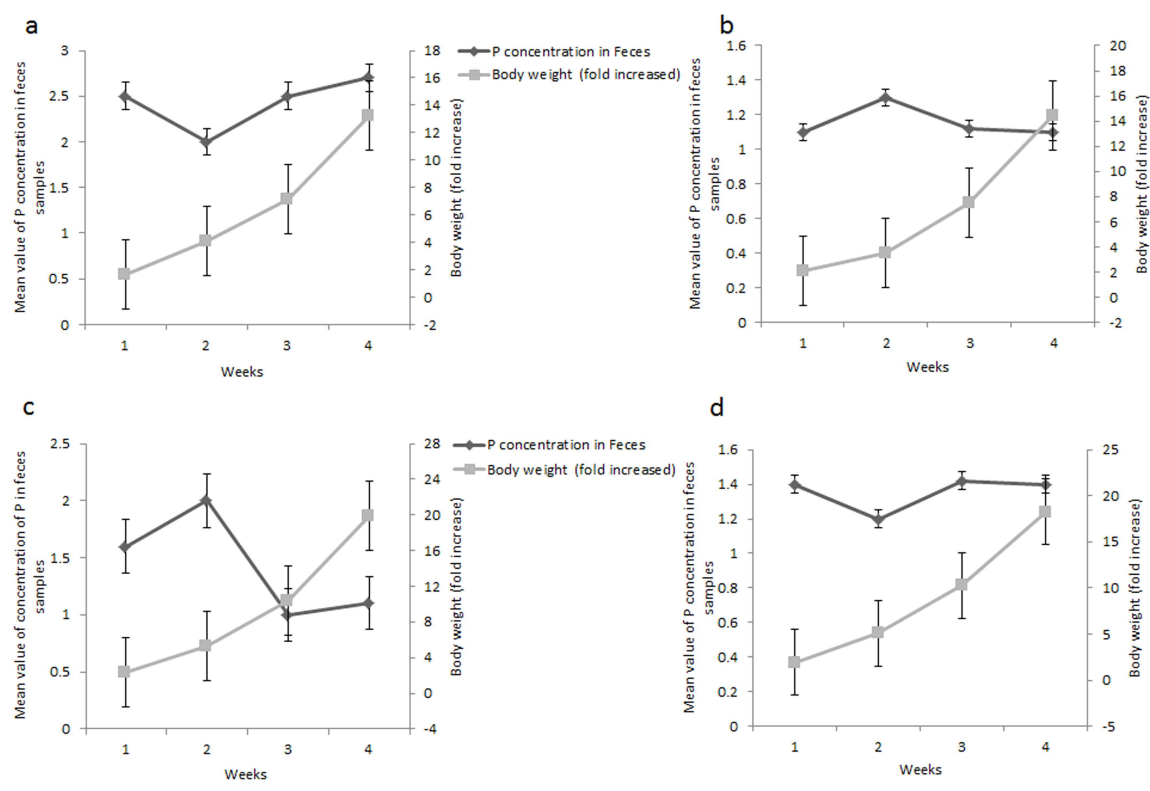
<sup>abcd</sup>Mean values with same superscripts in the same row are not significantly different (P<0.05).

- ⑦ 사양 성장 실험을 종료한 후 육계의 각 처리구로부터 뼈에 침착된 광물질을 분석하여 본



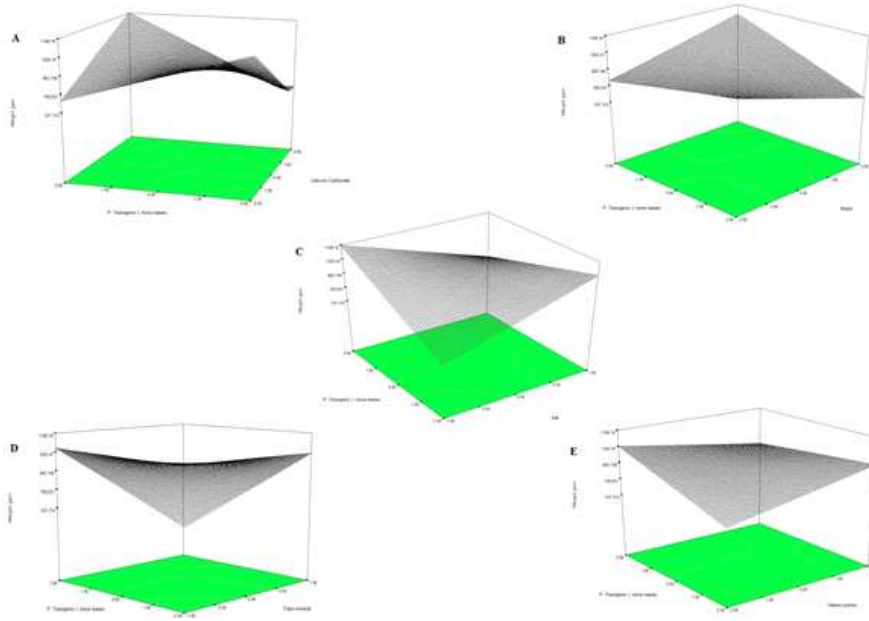
연구를 통하여 공급하였던 피타아제 발현 부평초의 효과를 검증하고자 하였다.

- ㉔ 49일째 되는 날 급이실험을 중단하고 전 실험개체를 도계한 후 이 중 뼈를 발골하여 마우스 실험방법과 같이 회분처리한 다음 분광광도법과 원소분석법을 이용하여 성분 분석을 의뢰 한 후 결과를 다음과 같이 얻을 수 있었다(표 7).
- ㉕ 결과를 살펴보면 유의성은 높지 않지만 무처리구인 A 그룹, D 그룹에 비하여 B와 C 그룹의 경우 인(P)의 침착도가 높은 것을 관찰 할 수 있다.
- ㉖ 실제로 인의 농도가 높다는 의미는 성장발육에 필요한 성분 그리고 골격의 강건성에 필요한 광물질이 대조구에 비하여 높게 사용되고 있다는 이야기가 된다.
- ㉗ 궁극적으로 동일한 사료에 추가 첨가된 피타아제에 의하여 인과 칼슘의 활용도가 높은 결과를 얻을 수 있었던 것은 동일한 조건에서 처리구 효과가 있었다고 해석 할 수 있다.
- ㉘ 이를 좀 더 세밀하게 검증하기 위해서는 한 가지 추가 실험이 필요한데, 전 실험 기간에 육계로부터 계분을 시기별로 채취하여 계분내 인의 함유량을 단위 무게당 측정을 할 수 있다면 동일한 사료 내 첨가된 인이 체내에서 흡수율이 좋을 경우 계분내에 함유율이 매우 낮을 것으로 예상 할 수 있다.
- ㉙ 이러한 결론을 얻기 위하여 도 9와 같은 실험을 통하여 매주 일정시간의 계분의 인을 분석하고 이를 토대로 육계의 성장률과 비교한 결과를 얻을 수 있었다.
- ㉚ 결과를 살펴보면 각 처리구별로 성장률과 계분내 인 함유율과의 상관관계는 C 그룹인 피타아제 발현 형질전환 부평초 처리구에서 성장과 반비례하게 계분 함유율이 떨어지는 것을 관찰 할 수 있었다.
- ㉛ 그러나 A 와 D 그룹의 경우는 큰 상관없이 성장이 지속될수록 인의 함유율도 증가함을 확인 할 수 있고 B 그룹의 경우는 약간 감소하는 경향을 보여주고 있었다.
- ㉜ 이 결과를 토대로 본 연구를 토대로 진행했던 피타아제 발현 부평초가 재조합 피타아제 와 비교해서도 유사하거나 더 나은 결과를 얻을 수 있었음을 확인 할 수 있었다.
- ㉝ 그리고 더하여 부평초의 사료적 가치를 앞선 결과에서 확인 할 수 있었다.
- ㉞ 실제로 현재 시판되고 있는 피타아제의 가격 경쟁력은 그리 크지 못하다.
- ㉟ 그러나 부가적 가치인 환경정화 가치와 영양적 가치를 검토해 보면 단백질 함량이 높은 것으로 나타나서 좀 더 추가적인 연구와 안정성이 배가 된다면 경제적 가치가 매우 높을 것으로 사료된다.



도 9. 피타아제 첨가사료와 무첨가사료가 육계의 성장 및 분변의 인 농도에 미치는 효과. - - - ■ - - -, 체중 증가; - - -◆- - -, 분변 시료의 인 농도. (A) 대조구의 체중 및 분변의 인 농도(그룹 A); (B) 재조합 피타아제 처리구의 체중 및 분변의 인 농도(그룹 B); (C) 피타아제 발현 형질전환 부평초 처리구의 체중 및 분변의 인 농도(그룹 C); (D) 야생형 부평초 처리구의 체중 및 분변의 인 농도(그룹 D).

- ⑪ 이러한 결과를 도출하면서 데이터에 대한 부가적 효과, 우리가 실험구로 선정했던 일반적 사료 구성에 피타아제 발현 형질전환 부평초와 재조합 피타아제의 효과를 분석하면서 사료 구성중에 우리가 실험구로 선정했던 구성에 효과를 미치는 요인을 보정해야만 우리가 선정한 연구 설정의 정확도를 도출 할 수 있을 것 같아서 도 10 과 같이 모델 프로그램을 이용하여 각 구성 요소 중 Ca 효과, 옥수수 전분 효과, 염분의 효과 광물질의 효과 그리고 비타민의 효과를 시뮬레이션 수행한 결과이다.
- ㉓ 도 10에서 보는 바와 같이 Ca의 효과가 가장 크고 나머지는 유사하게 나타나고 있으며 전분의 효과가 상승효과를 약간 나타내고 있음을 알 수 있었다.
- ㉔ 결론적으로 우리가 사용한 실험구에서의 환경 효과는 그리 크지 않다는 결론을 내리고 우리가 사용한 피타아제 발현 형질전환 부평초가 본 연구에서는 유의적인 발현을 통하여 육계에서는 성장 효과와 인분해 및 흡수 효과에 역할을 했음을 확인할 수 있었다.



도 10. A-E. 육계의 체중 증가 및 사료 구성분 요인의 영향 분석을 위한 3차원 도면그래프. (A) 다른 변수를 영점화(zero level)했을 때 탄산칼슘과 피타아제 발현 형질전환 부평초가 체중증가에 미치는 영향; (B) 다른 변수를 영점화했을 때 옥수수과 피타아제 발현 형질전환 부평초가 체중증가에 미치는 영향; (C) 다른 변수를 영점화했을 때 엽과 피타아제 발현 형질전환 부평초가 체중증가에 미치는 영향; (D) 다른 변수를 영점화했을 때 미량 미네랄과 피타아제 발현 형질전환 부평초가 체중증가에 미치는 영향; (E) 다른 변수를 영점화했을 때 비타민 혼합물과 피타아제 발현 형질전환 부평초가 체중증가에 미치는 영향

- ⑫ 1주차 연구를 통하여 분변내 인 함유량을 측정된 결과 상업용 피타아제에서는 매우 높은 분해율을 보이고 있다.
  - ㉠ 현재 결과만 보고 측정된 결과 형질전환 부평초의 발현이 미세하게 차이가 나고 있음을 볼 수 있었다.
  - ㉡ 그러나 총 4주의 결과를 가지고 종합적으로 분석하여야 결론을 내릴 수 있었다.
  - ㉢ 기존 연구 결과 [Greiner 등, 2006]와 비교하였다.
    - 형질전환 알파파의 경우 무기인태 공급을 대체할 수준의 체내 인소화율을 보여주고 있다고 발표하였다.
    - 용량으로 볼 때 알파파 총중량의 1.5% 수준의 수용성단백질 형태로 피타아제를 생산하도록 개발되었고 이 알파파 사료가 육계의 인 소화율을 충분하게 증진시킨다고 보고하였다.
    - 본 연구의 경우에도 유의적인 변화는 보이고 있는데 향후 추가 실험을 진행한 후 결론을 내릴 수 있을 것 같다.

### (3) 산란계 실험

- ① 본 연구에서 가장 좋은 효과를 얻은 실험은 육계실험이었다.
  - ㉠ 육계의 경우에는 실험기간처럼, 사육기간도 매우 짧아서 농가에서 보통 최단 28일부터

40일 안에 모두 출하하기 때문에 단기간에 경제적 가치를 얻어야만 산업화와 실용화가 가능하다.

- ② 그러나 산란계의 경우는 보통 산란을 시작하여 1년 정도를 활용하기 때문에 지속적인 효과를 기대해야만 산업적 가치를 계산 할 수 있다.
- ㉠ 산란계의 경우 이런 관점에서 실험을 디자인했다.
- ㉡ 실험방법은 육계와 동일한 조건에서 수행하였으며 실험기간을 2개월로 정하여 장기적인 결과를 도출하도록 하였다.

[표 8] 실험기간 동안 산란계에게 급이할 사료 구성분 및 포물레이션

Ingredients	Experimental diet (%/Kg)			
	A <sup>+</sup>	B <sup>++</sup>	C <sup>+++</sup>	D <sup>++++</sup>
Maize	65.00	65.00	65.00	65.00
Soybean meal	30.00	30.00	30.00	30.00
Deoiled rice bran	0.60	0.60	0.60	0.60
Salt	0.20	0.20	0.20	0.20
Vitamin premix*	0.10	0.10	0.10	0.10
Trace mineral**	0.10	0.10	0.10	0.10
Calcium carbonate	1.00	1.00	1.00	1.00
Dicalcium phosphate	1.00	1.00	1.00	1.00
DL-methionine	0.14	0.14	0.14	0.14
Lysine	0.10	0.10	0.10	0.10
Sand	0.08	0.08	0.08	0.08
Poultry oil	1.76	1.76	1.76	1.76
Supplements				
rPhytase <sup>®</sup>	----	1.2g of rPlant/ day/ layers	----	----
Phytase t-Plant <sup>®</sup>	----	----	2g of t-plant/ day/ layers	----
WT Plant <sup>#</sup>	----	----	----	4.4 g of plant/ day/ layers
Nutrient composition				
Crude protein (%)	19.5	19.54	19.62	19.62
Crude fat (%)	5.0	5.0	5.0	5.0
Crude fiber (%)	7.0	7.0	7.25	7.4
Calcium (%)	0.7	0.7	0.7	0.7
Total phosphorus (%)	0.9	0.9	1.1	1.07
Non phytate phosphorus (%)	0.3	0.3	0.3	0.3
Methionine (%)	0.5	0.5	0.5	0.5
Lysine (%)	1.15	1.15	1.15	1.15
DCP (%) <sup>‡</sup>	16.8	16.8	17.1	17.1
ADE (kcal/kg) <sup>§</sup>	3,550	3,550	3,550	3,550
Phytase activity (FTU /kg)	0	500	500	0

- ③ 그리고 또한 산란계의 경우는 알의 품질에 대한 피타아제의 효과를 검증하기 위하여 난중, 난각 및 홀유닛을 계산하여 이를 통하여 본 연구에서 의도했던 피타아제 발현형질전환 부평초의 효과에 대하여 검증할 수 있었다.

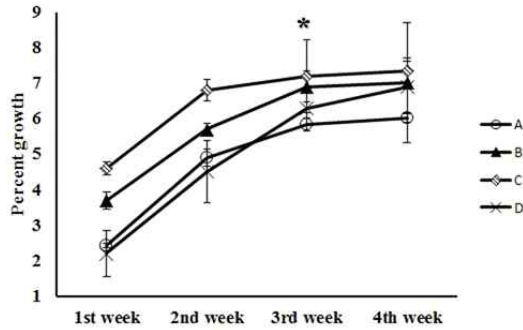
- ㉠ 먼저, 육계 실험과 같은 구성으로 대조구 일반사료를 A 처리구로, 상업용 제조합 피타아제를 B 처리구, 피타아제 발현 형질전환 부평초를 C 처리구, 일반 부평초를 처리구 D로 명명하고 실험을 진행하였다.
- ㉡ 급이를 시작한 후 1주일부터 집란을 실시하였으며 집란한 계란의 경우는 난중, 난각, 홀유닛을 계산하여 평균값을 계산하여 상대적 비교를 하였다.
- ㉢ 전 실험기간을 통해 얻어진 결과는 표 9에 나타내었다.
- ㉣ 표에서 보는바와 같이 산란계의 정강이 뼈로부터 추출한 상태에서 각 처리구 당 유의성은 관찰되지 않았다.
- ㉤ 특히, 본 연구대상인 피타아제 발현 형질전환 부평초 실험구에서는 타 처리구와의 차이를 발견할 수 없었다.
- ㉥ 칼슘의 농도도 제조합 피타아제보다 낮게 나오고 타 처리구와도 크게 차이가 나지 않았으며 인의 경우에도 약간 높은 결과치를 보였지만 유의적인 결과는 나타내지 않았음을 확인 할 수 있었다.
- ㉦ 그리고 체중 측정 결과는 도 11에서 나타난 것과 같이 약간 상회하는 결과를 전 실험기간(4주간: 체중실험의 경우 4주간 수행)을 통하여 확인할 수 있었다.
- ㉧ 육계 실험과는 달리 산란계에서는 성장이 이미 완성된 상태에서 산란이 시작되기 때문에 이러한 효과는 미비할 것으로 생각되며 산란계의 주된 목적이 체중 증가가 아니기 때문에 경제적 가치를 이 결과를 가지고 계산할 수는 없을 것으로 생각된다.
- ㉨ 그리고 피타아제의 첨가 효과는 무처리구에 비하여 나타남을 결과를 통하여 입증되었고 이 결과가 산란계의 경제적 가치인 난중, 난각 및 홀유닛에 미치는 영향을 분석해 볼 수 있을 것으로 생각되어 그에 대한 연구결과를 분석하였다(도 12).
- ㉩ 도 12에서는 난중의 효과는 크게 나타나지 않았으나, 난각에 대한 유의성은 매우 높게 나타남을 그래프를 통하여 확인할 수 있다.
- ㉪ 재미있게도 부평초 처리구인 C 와 D에서 유의적으로 난각이 두껍게 나오는 것을 관찰할 수 있는데, 피타아제 처리구가 가장 높게 나타나고 있었다.
- ㉫ 부평초의 사료가치를 검토해 볼 때 난각의 경제적 가치를 계산해 보면 어느 정도 첨가제로서도 가능성이 있지 않을까 생각하며 향후, 연구할 가치가 충분하다고 생각한다.

[표 9] 피타아제 처리구와 무처리구 사료를 급이한 산란계의 경골에 함유된 미네랄의 전반적 평균 수준 비교

Mineral	Groups			
	A	B	C	D
P	6.36±0.53 <sup>a</sup>	7.14±0.29 <sup>a</sup>	7.33±0.22 <sup>b</sup>	7.07±0.61 <sup>a</sup>
Ca	13.24±1.10 <sup>a</sup>	16.11±0.28 <sup>b</sup>	14.63±0.62 <sup>c</sup>	12.20±1.19 <sup>a</sup>
Mg	0.25±0.02 <sup>NS</sup>	0.28±0.02 <sup>NS</sup>	0.26±0.02 <sup>NS</sup>	0.27±0.02 <sup>NS</sup>
Zn	0.79±0.05 <sup>a</sup>	0.62±0.03 <sup>b</sup>	0.62±0.03 <sup>b</sup>	0.61±0.05 <sup>b</sup>

Values are expressed as Mean±SD.

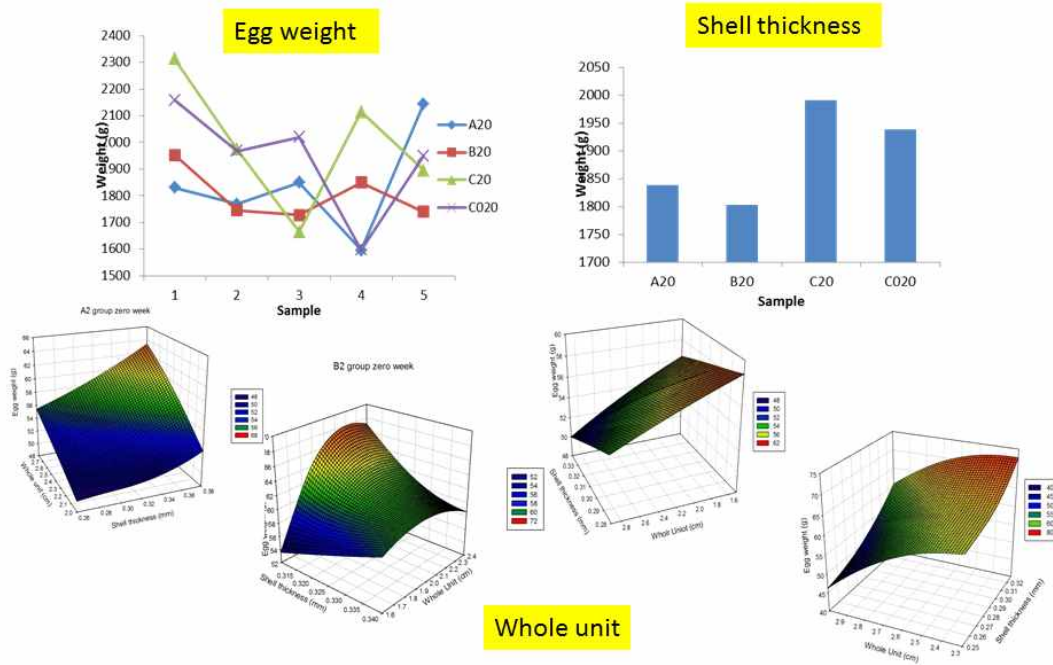
<sup>abcd</sup>Mean values within a row not sharing a common superscrip tletter were significantly different, P<0.05. Mineral levels are expressed in percentage.



도 11: 실험기간 동안 처리구의 상대적 체중 증가 양상은 대조구와 유의성있는 차이를 나타냄 ( $P < 0.05$ ).

- A: 피타아제 무처리 정상 사료(서울사료, 제주시)를 공급한 산란계
- B: 대장균에서 발현한 재조합 피타아제(Biomin phytase 5000, Biomin, South Korea)
- C: 피타아제 발현 형질전환 부평초의 잎 분말을 첨가한 사료를 공급한 산란계
- D: 야생형 형질전환 부평초의 잎 분말을 첨가한 사료를 공급한 산란계

Group A2: Negative control, (n=5). Only Feed  
 Group B2: Supplemented with rPhytase (n= 5), 250 U/kg feed, rPhytase 5000U/g.  
 Group C2: Supplemented with Phytase transgenic Plant (TG-plant) (n=5). 10g of TG plant/ day/ Laying Hens. 5 days/ 50 g/ total dose.  
 Group C02: Supplemented with WT-Plant (n=5). 10g of WT-Plant/ day/ Laying Hens. 5 days/ 50 g/ total dose.



도 12. 실험기간 동안 처리구의 난중, 난각 두께 및 홀유닛 지수의 상대적 증가 양상

- ④ 홀유닛 지수는 계란의 신선함과 난황의 성분에 따라 다양하게 나타나는 결과인데 처리구 C에서 타 처리구보다 균일하게 유지됨을 확인 할 수 있었다.
- ㉠ 그러나 어떤 영향에 의하여 그렇게 유지되고 효과를 보이는지에 대한 결론을 내리기에 는 실험 가설 자체와 그에 대한 기초 정보가 없는 상태에서 어렵다고 볼 수 있다.
- ㉡ 광물질의 성분비를 분석해 본다면 답을 찾을 수 있을 것으로 생각하지만 좀 더 검토가 필요한 결과라 할 수 있다.
- ㉢ 산란계 실험에서도 계란의 광물질 농도를 측정할 실험을 수행하였다(표 10).

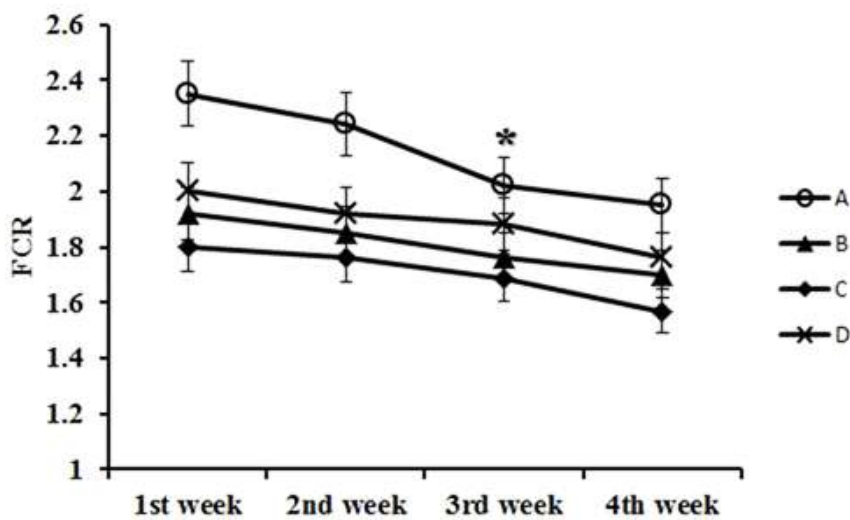


[표 10] 피타아제 처리구와 무처리구 사료를 급이한 산란계의 분변에 배출된 미네랄의 전반적 평균 수준 비교

Mineral	Groups			
	A	B	C	D
P	2.8±0.19 <sup>a</sup>	1.8±0.2 <sup>a</sup>	0.84±0.3 <sup>b</sup>	2.4±0.3 <sup>a</sup>
Ca	5.2±0.29 <sup>a</sup>	4.3±0.21 <sup>b</sup>	3.8±0.44 <sup>b</sup>	4.2±0.37 <sup>b</sup>
Mg	1.9±0.25 <sup>NS</sup>	1.6±0.20 <sup>NS</sup>	1.5±0.14 <sup>NS</sup>	1.8±0.12 <sup>NS</sup>
Na	2.2±0.20 <sup>a</sup>	1.7±0.43 <sup>ab</sup>	1.7±0.13 <sup>b</sup>	2.4±0.11 <sup>a</sup>

Values are expressed as Mean±SD.

<sup>abcd</sup>Mean values within a row not sharing a common superscript letter were significantly different, P<0.05. Mineral levels are expressed in percentage. NS- Non significant.



도 13. 실험기간 동안 처리구에서 관찰된 사료전환효율(FCR) 경향은 대조구와 유의성있는 차이를 나타냄(P<0.05).

A: 피타아제 무처리 정상 사료(서울사료, 제주시)를 공급한 산란계

B: 대장균에서 발현한 재조합 피타아제(Biomin phytase 5000, Biomin, South Korea)

C: 피타아제 발현 형질전환 부평초의 잎 분말을 첨가한 사료를 공급한 산란계

D: 야생형 형질전환 부평초의 잎 분말을 첨가한 사료를 공급한 산란계

- ⑤ 결과적으로 산란계의 계분에서 우리가 처리한 피타아제 발현 형질전환 부평초 처리그룹에서 가장 적은 양의 인이 검출되었다.
- ㉔ 전체적으로 다른 광물질의 경우에서도 매우 낮은 검출비율을 보여주고 있다.
- ㉕ 처음에 체중과 배내 인 농도가 높지 않아서 다른 효과가 있다고 생각했는데 본 연구에서 의도했던 인 흡수 능력은 현재 처리구 C 인 형질전환 부평초에서 가장 높게 나타나고 있음을 관찰 할 수 있었다.
- ㉖ 결과를 분석해 보면 산란계의 경우 난각의 두께가 가장 유의적으로 두꺼운 이유는 인의 흡수와 칼슘의 흡수를 좀더 원활하게 진행시켜 난각의 칼슘 공급에 대사작용에 큰 영향을 끼친 것으로 추정된다.
- ㉗ 본 결과를 종합하여 산란계에서도 난각의 품질 향상에 본 연구에서 사용한 형질전환

부평초의 효과가 나타났다고 평가해도 될 것 같다.

- ㉞ 이러한 결과는 향후 추가 연구를 통하여 좀 더 안전성과 경제성 분석 실험을 통하여 사료의 종자 주권을 지키는 중요한 연구 소재가 될 것으로 사료된다.



### <제 3 협동과제>

## 미세조류 및 식물체 사료 첨가제 사료 제형 연구

### 1. 이론적 실험적 접근방법



도 1. 피타아제 발현 형질전환식물의 사료 제형화를 위한 펠릿 형성

### 2. 미세조류 및 부평초 제형화

#### (1) 피타아제 발현 형질전환 클로렐라 총단백질의 사료제형(도 2)

- ① 세부1과제에서 공급한 피타아제 발현 형질전환 클로렐라로부터 총단백질을 추출하였다.
- ② 추출된 총단백질에 포도당(최종 농도 1%) 및 전분(최종 농도 10%)를 첨가하였다.
- ③ 동결건조기(Eyela FDU-2000)을 이용하여 48시간 동안 동결건조하였다.

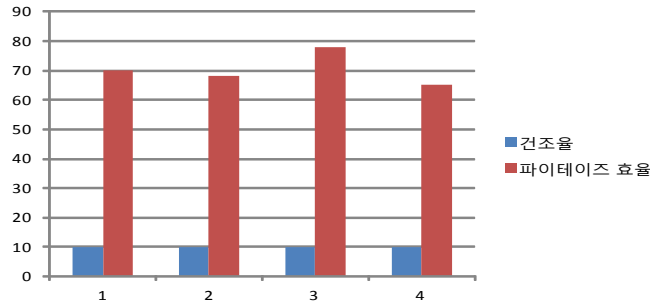


도 2. 피타아제 발현 형질전환 클로렐라 총단백질의 코팅 및 분말화

(2) 피타아제 발현 형질전환 부평초의 사료제형

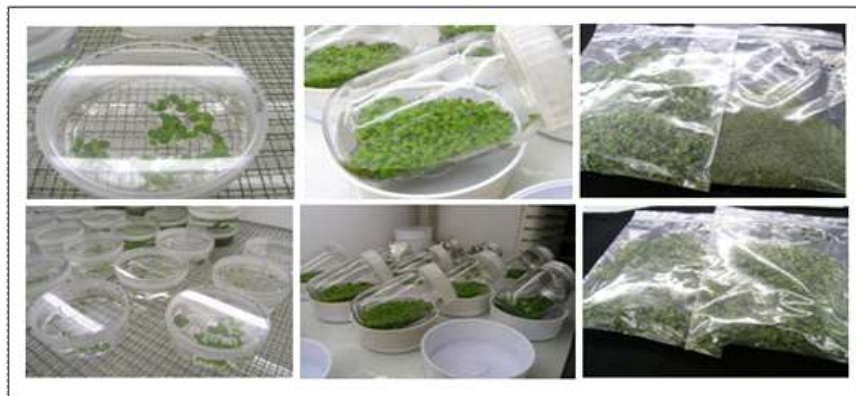
① 건조 제제화 실험

- ㉠ 열풍건조법
- ㉡ 분무 건조
- ㉢ 첨가제 및 효소 발효 건조 효능 분석



도 3. 피타아제 활성 보존을 위한 열풍 건조 시스템의 개발

- ② 건조율은 10%내에서 성공적으로 제조하였으며 피타아제 성분 보존은 그림에서 보는 바와 같이 고체 제형 자연건조가 가장 효율이 좋은 것으로 나타났다.
- ㉠ 기계 도입시 제형을 형성한 후에 이를 이용하여 건조하는 방식이 시간과 비용이 가장 적게 드는 방식은 온풍건조인데 현재는 자연건조 방식이 효율이 가장 좋았다.
- ㉡ 그러나 제조 시간이 너무 많이 걸리는 단점이 있어 사료 첨가제로서의 경제적 가치가 높지 않을 것 같다.
- ㉢ 이 부분에 대한 연구는 좀 더 효율성을 검토하여 연구를 추가로 진행해야 할 것 같다.



도 4. 부평초의 대량증식 및 건조샘플 제조

③ 분말화

- ㉠ 협동과제 1에서 제공한 건조된 부평초를 분말화 하였다(도 4).
- ㉡ 사료 제제를 포함하는 조성물을 기계형 믹서에 넣고 30분간 혼합함.
- ㉢ 분쇄기로 옮겨 20분간 작동시킨 다음 분말 정도가 분말사료 정도보다 고운 70-100 메쉬로 분쇄함
- ㉣ 분쇄된 조성물을 팽화기에 넣고 수증기를 이용하여 팽화시킨 다음 직경 9 ~ 10 mm의

펠렛으로 성형하고, 펠렛을 클러로 냉각함.

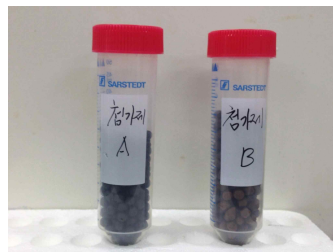
### 3. 비가열 방식 개발을 위한 효소액 코팅 기술 도입

#### ① 효소액의 펠렛(pellet) 제조

- ㉠ 성형된 펠렛 사료 1Kg에 대해 α-아밀라아제 0.1 g과 산성 프로테아제 0.2 g을 반응기에 혼합
- ㉡ 가축사료에 사용하는 유지 50g를 혼합 한 후 42~56℃로 배양

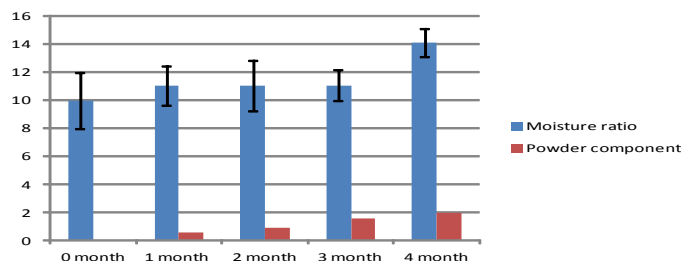
#### ② 코팅방법

- ㉢ 분사식(Spray식) 코팅방법: 효소액을 펠렛 1kg에 대하여 20ml씩을 분사식으로 코팅
- ㉣ 흡착식 코팅방법: 교반 가능한 코팅 용기에 펠렛 1kg 당 효소액 20ml씩을 소량씩 뿌려 주면서 코팅
  - 본 기업에서는 연구소내 배양기를 보유하고 있어 육계용 펠렛 제형을 위하여 유지와 사료 첨가제의 혼합율을 비교하여 제형을 형성하였음
  - 현재 제형의 강도가 닭의 사료나 돼지의 사료로 피타아제 첨가 혹은 실제 사료작물과 혼합할 경우에도 큰 문제없이 펠렛 제형을 유지하고 기존 사료 펠렛 강도를 유지하고 있음을 확인하였음
  - 코팅 기술은 흡착식 코팅을 고려하여 교반기를 구입하여 본 연구 목적에 맞게 교정한 상태임



도 5. 식물 사료의 펠렛 형태. A: 나노 코팅(nano coating) 기술, B: 효소 + 아밀라아제 코팅

- ② 본 기업 연구진에 의하여 제조된 형태의 제형을 이용하여 외주 업체를 통하여 전문 성형 제조 시설에서 본 연구진이 원하는 형태의 사료 첨가제 펠렛이 제조되었음
- ③ 이 펠렛의 투수율과 수분 저항율을 측정한 결과 적절한 체내에서 분해되고 이전 보관 상태나 사료포내 저장기간에 경과하여도 제형이 부서지는 문제는 해결된 것으로 사료됨(도 6)



도 6. 펠렛 제형으로 고형화 후 수분 투과율 분석

#### 4. 위내 용해도 시험

- ① 가축위액 제조 : 물에 10% 염산을 가하여 pH가 3.0(가축의 위액 pH 2 - 5)이 되도록 제조하여 용해도 측정에 따른 적절한 펠릿화 및 코팅화 결정
- ② 가축 위액을 협동2에서 공급받으면서 본 기업의 연구소에서 위액과 산도에 따른 펠릿화 연구를 진행하고 있지만 현재 유의적인 결과는 도출하지 못하고 있어 향후에는 이 결과를 중심으로 피타아제의 위내 산도에 따른 흡수율 변화에 맞는 제형을 개발함

#### 5. 형질전환 미세조류 및 부평초의 안전성 평가

- ① LMO의 환경안전성 공인증 방안에 있어서는, 개발완료 후 최소 2개 기관 이상의 LMO 환경위해성 평가기관 (한국생명공학연구원, 제주대 등)에 의뢰하여 환경위해성 평가를 받을 계획임
- ② LMO의 상용화를 위한 국내의 제반규정에 의거하여 형질전환 미세조류 및 부평초의 위해성 평가를 진행할 계획임
  - ㉠ 형질전환체와 비형질전환체에서의 metabolite 비교 분석
  - ㉡ 영양성분 비교분석
  - ㉢ 실질적 동등성 검정

#### 6. 향후 산업화를 위한 시장 타당성 조사

- ① 전문 컨설턴트를 통해 현재 및 향후 국내외 시장 규모 및 가능성을 조사하겠음
- ② 전문 컨설턴트를 통해 국내외 시판제품과의 가격 경쟁력 비교 분석하겠음
- ③ 전문 컨설턴트를 통해 생산비용 분석하겠음

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	관련분야의 기술발전 기여도
1차 년도 (2011)	제1세부	- <i>A. nidulans</i> 의 <i>phy</i> 유전자 합성	100	-유전자 합성기술
		- <i>A. nidulans phy</i> 유전자 대장균( <i>Escherichia coli</i> ) 발현, Phy제조합단백질 분리정제 및 항체생산	100	-유전자 대장균내 발현 -제조합단백질 분리정제 -항체 생산 기술
		- <i>A. nidulans</i> 의 <i>phy</i> 유전자 식물( <i>Escherichia coli</i> ) 발현 및 제조합단백질의 phytase 효소활성 규명, 내열성·내산성 결정 및 기질 특이성 분석	100	-식물발현 벡터 구축 -제조합단백질 발현 -제조합단백질 효소활성 -제조합단백질 특성규명
		- 미세조류 발현용 벡터 구축	100	-발현벡터 구축 기술
	제1협동	- 효율적인 발현벡터 제작 및 목표유전자 도입	100	-발현벡터 제작기술
		- 부평초 형질전환체 확인 및 도입 phytase 유전자 발현분석	100	-유전자 발현 분석기술
	제2협동	- In vitro 기능성 평가	100	-세포배양을 통한 기능성
		- 마우스 실험-분내 및 경골인 함량	100	-마우스 실험을 통한 인분해 효능 검증 기술
		- 육계사양시험-사양성적,분내 및 경골 인함량	100	-유전자 도입 식물 실험
		- 산란계사양시험-사료섭취량, 분내인함량, 경골인함량, 산란율 측정	100	-사료가치 높음
		- 위장내 산도 분석 및 활성 측정	90	-분석 결과 도출의 어려움 발생
	제3협동	- 기존 사료 성분과의 배합 비율에 따른 제형 분석	100	-기존 펠렛 사료 제형 완결
		- 가축 종류에 따른 제형 크기 결정 및 TMR 형태 결정	100	-펠렛기기에 맞추어 첨가제 수준 결정 가능
		- 산란계용 제형 결정 및 NRC 표준 조정	100	-산란계 사료 특성상 펠렛대 가루 비율 조정 가능
		- 육계용 제형에 따른 성분비 조정	100	-육계용 고단백 유지사료와의 혼합 비율 조정 가능
		- 효소 제형의 가열시 파괴 보호를 위한 코팅 제형 기술 개발	100	-코팅 기술 도입 완결

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	관련분야의 기술발전 기여도
2차 년도 (2012)	제1세부	- <i>A. nidulans</i> 의 <i>phy</i> 유전자 클로닝 내 발현	100	-발현벡터 구축기술
		- 산업용 scale 대량생산을 위한 <i>Chlorella</i> 배양 최적조건 확립	100	-미세조류 대량배양 기술
		- <i>Chlorella</i> 내 phytase 발현 재조합단백질의 실험동물 검정	100	-재조합단백질 동물실험 검정기술
	제1협동	- Phytase 생산 형질전환 부평초 개발	100	-형질전환 기술
		- 형질전환 부평초 대량증식 및 효소 안정성 확보	100	-대량증식 기술
	제2협동	- 마우스 실험-분내 및 경골인 함량	100	-안전성검사를 위한 유전자 검사 -식이성과 세포내 기능성 검증
		- 육계사양시험-사양성적, 분내 및 경골인 함량	100	-병아리 사육조건 -인흡수율 -도체 검사
		- 산란계 사양시험-사료섭취량, 분내인함량, 경골인함량, 산란율 측정, 난품질 측정	100	-난각 및 난내 성분 검증 -유전자 안전성 검증
		- 수정란를 통한 후대 전이 병아리의 기능성 및 유전체 안정성 검증	90	-후대 병아리 안전성 검증
	제3협동	- 1차년도 동물내 흡수 결과에 따른 조정 제형 결정	100	-제형 형태 -투수율 검증
		- 체내 흡수 간접 실험에 따른 펠렛화 제형 결정	100	-체내 흡수율 검증을 위한 동물 실험 완료
		- 효소 코팅 방법 개발 및 이를 이용한 체내 흡수율 최적 조건의 제형 결정	100	-효소 코팅의 투수율 검증
		- 1차년도 결과 분석에 의한 경제성을 고려한 혼합 비율 결정과 전체 사료 비중을 고려한 체내 인분해 배합비 결정	100	-혼합비율 결정 완료
		- 전체사료비와 비교하여 최적의 경제적 제형 결정 및 제조 기술 확립	90	-경제성 효율 검증 완료
		- 제형제작 및 육계를 이용한 현장 사양 실험(퐁미, 섭취율, 성장률)	100	-완료

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	관련분야의 기술발전 기여도
3차 년도 (2013)	제1세부	- Phy-C 재조합단백질 생산량 및 활성도를 증가시키는 배지 시스템 확립	100	-배지시스템 확립
		- Phy-C 재조합단백질 고발현 클로렐라 균주의 대량증식	100	-대량증식 기술 확립
		- Phy-C 재조합단백질의 실험동물 검정	100	-변의 인함량 감소
	제1협동	- Phytase 생산 형질전환 부평초 생산	100	-형질전환체 생산
		- Phytase의 안정적 고발현 라인 대량증식	100	-고발현 대량증식
		- 형질전환체의 후대 안정성 검정	100	-후대안정성 평가
		- 형질전환 부평초의 안전성 평가	70	-안전성 평가
	제2협동	- 축종에 따른 적정 첨가제 수준 결정 및 인분 해 최적 효율 결정	100	-닭 실험과 쥐 실험으로 검증 완료
		- 사료 첨가제형에 따른 기능성 검증 및 위장내 산도 분석 및 활성 측정	100	-위장관내 산도 측정이 실험기구의 어려움으로 결과 불안정
		- 육계의 생산성 검증률 통한 육질 분석	100	-육계 사육의 경제성 높게 나타남
		- 유전자 안전성 검증 및 계란내 이행 여부 검 증 및 분내 이행성 효과 검증	100	-유전자 이행 결과를 전혀 발견할 수 없었음
	제3협동	- 축종에 따른 적정 첨가제 수준 결정 및 인분 해 효율 최적 효율 결정에 따른 제형 변형	100	-제형의 변화에 따른 차이 없음
		- 위장내 소화 흡수율과 경제성을 고려한 최종 산업용 제형 개발	90	-흡수율 측정의 어려움 붕착
		- 대량 생산용 제형 개발 및 틀 제작, 그리고 효 소 코팅기술에 의한 체내 인 분해 효율 검정	100	-코팅기술의 아웃 소싱 및 자체 개발



## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

가. 연구개발결과의 성과 및 활용목표 대비 실적

(1) 연구성과 목표

(단위 : 건수)

구분		특허		신품종			유전자원 등록	논문		기타	
		출원	등록	품종명칭 명칭등록	품종생산 수입판매 신고	품종보호		SCI	비SCI		
						출원					등록
1차 년도	목표							1	1		
	달성							0	0		
2차 년도	목표	1						2	1		
	달성	0						0	0		
3차 년도	목표	2						2	1	0	
	달성	3						3	0	1	
계	목표	3						5	3		
	달성	3						3	0		

\*최우수 논문 발표(Best session paper: Stable expression of *Aspergillus nidulans* phy gene in *Chlorella vulgaris*), 5<sup>th</sup> International Conference on Medical, Biological and Pharmaceutical Sciences (ICMBPS, 2014), Penang, Malaysia

(2) 연구성과 활용

(단위 : 건수)

구분		기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수	목표	2	1	0	0	3	0
	달성	1	0	0	0	1	0

\* 언론홍보: IPET 칼럼

(3) 연구성과 활용 계획

구분	핵심 기술 명
①	Phy 재조합단백질(rPhy-E) 생산기술 및 다클론항체 생산기술
②	식물 내 발현백터 구축기술 및 Phy재조합단백질(rPhy-P)의 효소활성 및 특성규명 기술
③	광종속영양(Photoheterotrophic) 조건에서 클로렐라의 성장 및 바이오매스 증대를 위한 개발된 비지11배지 조성 개발/ 공생균을 이용한 클로렐라 대량 증식법
④	아스퍼질러스 니들란스의 <i>phy</i> 유전자의 미세조류 내 발현 및 Phy재조합단백질(rPhy-C)의 효소활성 및 특성 규명 기술
⑤	형질전환 클로렐라 불가리스의 아스퍼질러스 니들란스 phytase 활성을 증가시키기 위한 기질첨가 배지 개발
⑥	부평초 고효율 형질전환기술
⑦	부평초 엽록체형질전환용 백터 개발
⑧	형질전환 부평초의 사료적 가치와 인분해 능력에 대한 실험적 가치
⑨	육계에서의 성장률과 계분내의 함유량 최소로 인한 기능적 검증 결과
⑩	산란계의 난각 효과 및 계분내 최소 함유량 확인을 통한 효율 검증
⑪	제형형태를 가축의 종류에 따라 변형가능 기술
⑫	위장간내 산 보호 코팅제 개발(어려운 난관으로 다각도 검토 중인 난제임)
⑬	코팅기술에 의한 산업화 여부 검토

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	대장균내 발현 재조합단백질에 대한 항체를 국내 연구자들에게 공급
②의 기술	개발한 백터를 필요로 하는 국내 연구자들에게 제공하여 관련 분야에서의 연구 활성화 기대
③의 기술	특허출원 및 기업체 기술이전(공생균을 이용한 클로렐라 대량 증식법)
④의 기술	논문 게재 및 클로렐라의 사료 첨가 효과에 의한 사료학적 영양을 검토하여 토종 사료원 개발
⑤의 기술	특허출원
⑥의 기술	국내의 부평초 활용 연구자들에게 기술을 보급함으로써 부가가치가 높은 부평초 연구의 활성화가 기대됨
⑦의 기술	개발한 백터를 필요로 하는 국내 연구자들에게 제공하여 관련 분야에서의 연구 활성화 기대
⑧의 기술	부평초의 사료 첨가 효과에 의한 사료학적 영양을 검토하여 토종 사료원 개발가능 (연구과제 제안)
⑨의 기술	국내처럼 저체중 단기 사육 육계사양에서 경제적 가치가 매우 높은 효율 높은 부평초 생산 가능 및 기술이전 예정
⑩의 기술	산란계의 계분에 의한 환경 오염 최소화 및 난각 효율 개선에 대한 유전체 분석 과제 제안
⑪의 기술	가축별 하드웨어를 개발하고 매뉴얼화 활용
⑫의 기술	인체 제산제를 기본으로 효율적인 제산제 개발에 좀 더 연구가 절실하게 필요함
⑬의 기술	기존 코팅 기술을 개조하여 맞춤형 코팅 기술 개발

\* 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등

(단위 : 건수)

4차 년도	목표	2							3	1	
	달성										
5차 년도	목표	0							1	2	
	달성										

\* 특허출원 준비중:

- 1) 활성 phytase를 생산하는 형질전환 부평초의 제조방법
- 2) 공생균을 이용한 클로렐라 대량증식법

\*\* 논문투고중

- 1) PVJ-14-208(SCIE) and entitled "Impact of a novel phytase derived from *Aspergillus nidulans* and expressed in transgenic *Lemna minor* on the performance, mineralization in bone and phosphorous excretion in laying hens" (Pakistan Veterinary Journal)

\*\*\* 논문투고 준비중:

- 1) A high-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation system of duckweed
- 2) Production of phytase in transgenic duckweed, *Lemna minor*
- 3) Establishment of *Chlorella vulgaris* transformation for the transient expression of *Aspergillus nidulans phy* gene
- 4) Influence of supplementation of transgenic *Lemna minor* with phytase gene on growth performance and tibia mineral composition in broiler chicken
- 5) Effect of supplementation of transgenic *Lemna minor* with phytase gene and its safety in the animal model
- 6) Effective phytase supplementation for the thick egg shell formation in the lay hen without any genetic contamination

나. 논문게재 성과

게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol. (No.)	국내외 구분	SCI 구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2014	Expression of <i>Aspergillus nidulans phy</i> Gene in <i>Nicotiana benthamiana</i> Produces Active Phytase with Broad Specificities	T.-K. Oh, S. Oh	C.W. Choi	S. Kim, J.S. Park, N. Vinod, K.M. Jang, S.C. Kim, S.-M. Ko, D.K. Jeong, R. Udayakumar	International Journal of Molecular Sciences	15	국외	SCI (IF:2.339)
2014	Agrobacterium-mediated genetic transformation of <i>Withania somnifera</i> using nodal explants	R. Udayakumar	C.W. Choi	S. Kasthuriengan, T.S. Mariashibu, J.J. Sahaya Rayan, A. Ganapathi, S.C. Kim, J.J. Kim	Acta Physiologiae Plantarum	36	국외	SCI (IF:1.524)
2014	Transcriptome analysis of mistletoe ( <i>Viscum album</i> ) haustorium development	S.M. Ko	S.W. Kim	Y.K. Kwon, J.H. Kim, I.-J. Song, H.-Y. Lee, D.-W. Choi, J.R. Liu	Horticulture, Environment, and Biotechnology	55(4)	국내	SCI (IF:0.491)

다. 특허 성과

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원 연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2014	클로렐라 불가리스의 성장 및 바이오매스 증대를 위한 배지 조성	배재대학교 산학협력단	한국	10-2014-0141493					
2014	활성 피타제를 생산하는 형질전환 부평초 식물체의 제조 방법 및 그에 따른 식물체	제주대학교 산학협력단	한국	10-2014-0151529					
2014	미세조류로부터 분리한 공생균 리조비움의 셀룰레이즈 활성을 이용한 미강의 셀룰로오스 분해	조돈영 (주)글로벌씨 앤비 대표	한국	10-2014-0151948					

라. 기술료 징수 현황

기 징수액	당해년도 징수액	향후 징수액	합계

마. 사업화 현황

사업화명	사업화내용	사업화 업체 개요				기대출액	당해년도 대출액	대출액 합계
		업체명	대표자	종업원수	사업화형태			

바. 인력활용/양성 성과

(1) 인력지원 성과

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
11	2	5	4		5	6		5	6

(2) 장·단기 연수지원 성과

장기 (2월 이상)		단기 (2월 미만)	
국내	국외	국내	국외

(3) 산업기술인력 양성 성과

프로그램명	프로그램 내용	교육기관	교육 개최회수	총 교육시간	총 교육인원

사. 경제사회 파급효과

산업지원 성과 (단위 : 건)				고용창출 성과 (단위 : 명)		
기술지도	기술이전	기술평가	합계	창업	사업체 확장	합계
	1					

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

### 1. 피타아제 합성 생물 및 효소 특성 정보

#### (1) 진균

- ① 세포외 분비하는 곰팡이 유래 피타아제는 *Aspergillus ficum*에서 처음 발견되었고, (phytate, phytic acid, myo-inositol) hexakisphosphate [ $InsP_6$ ], pentakisphosphate [ $InsP_5$ ], tetrakisphosphate [ $InsP_4$ ], triphosphate [ $InsP_3$ ]에 대해 다양한 친화성을 가짐
  - ㉠ *A. ficum* 피타아제 효소는 식물 및 기타 미생물의 피타아제보다 sodium phytate, *p*-Nitrophenyl phosphate, sodium  $\beta$ -glycerophosphate, fructose-1,6-diphosphate 등 다양한 기질에 대한 우수한 특이성 및 친화성을 가짐
  - ㉡ pH 2.5-3.0 및 4.5-5.5에서 최적 활성을 보이기 때문에 가축에 급여시 위장내의 산도 pH 2.0-3.0에서도 효과적으로 작용함
  - ㉢ 일반적인 사료는 고온처리하여 제조하는데, 첨가되는 *A. ficum* 피타아제는 80°C 이상 가열 후에도 효소활성에는 변화가 없을 정도로 내열성 가짐
- ② *A. niger* 307
  - ㉠ 50일령 포자를 접종원으로 배양했을 때 최대 생산성을 보임
  - ㉡ 최적활성 pH 2.5와 5.0, 최적온도 56°C와 58°C
- ③ *A. niger* ATCC 9142
  - ㉠ 세포외분비 피타아제의 분자량은 84 kDa
  - ㉡ 최적활성 pH 5.0, 최적온도 65°C
- ④ *A. niger* van Teighem
  - ㉠ 당화단백질, pI 3.8
- ⑤ *A. niger* NCIM 563
  - ㉠ 세포외분비 피타아제 2종: PhyI 및 PhyII
  - ㉡ PhyI은 SDS-PAGE상에서 분자량 66 kDa, 젤 여과(gel-filtration) 크로마토그래피에서 분자량 264 kDa, 사량체로 구성, 광범위한 pH(1.5-9.0)에서 유효활성, 최적 pH: 2.5, pI: 3.55, 광범위한 기질특이성
  - ㉢ PhyII는 단량체, 분자량 150-160 kDa, pH 3.5-9.0 범주에서 유효활성, 최적 pH: 5.0, pI: 3.91, sodium phytate에만 기질 특이성, 1mM  $Ag^+$ 와  $Hg^{2+}$ 에 효소활성 강력히 억제됨
- ⑥ 기타 진균의 피타아제
  - ㉠ *Mucor hiemalis*: 당화된 산성 인산분해효소(acid phosphatase)로서 최적활성 pH 5.0-5.5, 최적온도 55°C 및 내열성(80°C에서 5분) 및 광범위한 pH에서 유효 활성 나타냄
  - ㉡ *Schizophyllum commune* 피타아제의 최적활성 pH 5.0, 최적온도 50°C, 냉장조건에서 112일간 초기활성의 38% 유지함
  - ㉢ *Rhizopus oryzae* 피타아제는 분자량 34 kDa, 최적활성 pH 1.5 및 5.5, 최적온도 45°C
  - ㉣ *Cladosporium* sp.: 피타아제는 분자량 32.6 kDa, 최적활성 pH 3.5, 최적온도 40°C
- ④ *A. niger*의 피타아제 유전자(*phyA*)를 클로닝한 후 이 유전자를 다시 *A. niger*에 형질전환시켜 피타아제 생산을 10배 증진함
- ⑤ 곰팡이를 이용할 경우는 비교적 고농도 생산은 되나 배양이 어렵다는 단점이 있으며, 세균을 이용할 경우는 중성에서 활성을 갖는 피타아제가 생성되거나 세포외 분비가

곤란하여 고농도 피타아제 생산을 유도하지 못하는 문제점

- ⑥ 미생물의 인분해효소는 균주, 질소원, 탄소원, 기질성분, 배지의 종류, pH 조건에 따라 효소활성 및 생산성이 다양함
  - ㉠ 적정 농도의 인(1-5 mg  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ /고체배지) 첨가시 *A. carbonaris*의 성장, 피타아제 생산 및 인산분해가 촉진된 반면, 고농도(50-100 mg)의 인 첨가시 균주성장, 효소생산 및 인산분해가 오히려 억제됨
  - ㉡ 배지에 첨가된 염의 종류 및 농도에 따라 차이점: *A. ficum*에서  $\text{Co}^{2+}$  및  $\text{Mn}^{2+}$ 의 첨가는 피타아제 활성이 촉진된 반면,  $\text{Cu}^{2+}$ 와  $\text{Zn}^{2+}$ 의 첨가는 오히려 효소활성 억제함

## (2) 세균

- ① 피타아제를 분비하는 대다수가 *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas* sp., *Klebsiella* sp.
  - ㉠ *Bacillus* sp.: 피타아제는 분자량 44 kDa 및 124 kDa; 최적 활성 pH 7.0; 최적온도 70°C
  - ㉡ *Citrobacter braakii*: 피타아제는 세포내 효소로서 분자량은 47 kDa, 최적 활성 pH 4.0, 최적온도 50°C
  - ㉢ *Klebsiella pneumoniae*: 피타아제는 분자량 45 kDa, 최적활성 pH 4.0, 최적온도 45°C
  - ㉣ *Lactobacillus sanfranciscensis*: 피타아제는 분자량 50 kDa, 최적활성 pH 6.0, 최적온도 45°C
  - ㉤ *Mitsuokella jalaludinii*: 피타아제의 최적활성 pH 7.0, 최적온도 39°C

## (3) 효모

- ① *Candida krusei*: 세포벽에 분포하는 피타아제의 최적활성 pH 2.5 및 5.5, 최적온도 40°C
- ② *Kodamaea ohmeri*: 세포외분비 피타아제는 분자량 98.2 kDa, 최적활성 pH 5.0, 최적온도 65°C
- ③ *Saccharomyces cerevisiae*: 세포외분비 산성 피타아제는 젤 여과 크로마토그래피 정제 후 분자량 630 kDa, Endoglycosidase 처리 후 446 kDa, SDS-PAGE에서 분자량이 55 kDa, 최적활성 pH 3.6, 최적온도 40°C, 1mM  $\text{Fe}^{3+}$ 와  $\text{Hg}^{2+}$ 에 효소활성 완전히 억제됨, 5mM  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Sn}^{2+}$  처리시 효소활성 강력히(최대 91%) 억제됨, 광범위한 기질특이성

## (4) 식물

- ① 벼, 밀, 옥수수, 대두콩, 귀리, 호밀, 상추, 녹두, 잠두, 오일종자, 담배 등에서 보고됨.
  - ㉠ 보리의 피타아제는 분리정제 결과 2개의 분획 PI(66 kDa 및 124 kDa; 최적 활성 pH 6.0; 최적온도 55°C) 및 PII(96 kDa, 최적 활성 pH 5.0; 최적온도 50°C)로 구성
  - ㉡ 개암(*Corylus avellana* L.) 종자의 피타아제는 용해성 산성 인산분해효소로서 최적 활성 pH 5.0, 분자량은 72 kDa, 당화
  - ㉢ 귀리의 피타아제는 분자량 67 kDa, 최적활성 pH 5.0, 최적온도 38°C
  - ㉣ 호밀의 피타아제는 분자량 67 kDa, 최적활성 pH 6.0, 최적온도 45°C
  - ㉤ 담배의 피타아제는 산성 인산분해효소로서 뿌리에서 분비되는 활성 보임

- ② 일반적으로 종자발아시 피타아제 활성증가 및 피트산 감소
- ③ 식물 유래 피타아제는 광범위한 기질 특이성을 나타냄

## 2. 미세조류 배양의 영양원 정보

### ① 탄소원(carbon source)

- ㉠ 유기탄소원과 무기탄소원
- ㉡ 포도당, 설탕(sucrose), 아세트산(acetate), 숙신산(succinate), 글리세린(glycerine)과 글리세롤(glycerol) 등과 같은 유기탄소원은 미세조류의 바이오매스 생산을 증진시킴
- ㉢ 한편 해리형(dissociated type;  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{KHCO}_3$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ )과 비해리형(undissociated type;  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{CO}_3$ )으로 분류되는 무기탄소원은 클로로필, 색소체 및 광합성 과정을 증진시킴 [Richmond, 1990; Tsukada 등, 1997; Kong 등, 2011]
- ㉣ 상기와 같은 탄소원 종류와 농도에 따라서 녹조류 바이오매스, 클로로필 함량 및 지질 함량에 크게 영향을 미침
- ㉤ 특별히 포도당은 혼합영양 배양조건에서 농도에 따라서 클로렐라 불가리스의 세포성장에 중요한 역할을 수행함
- ㉥ 예를 들면, 0.1% 포도당은 바이오매스와 클로로필 함량을 증진시킨다. 0.5% 포도당은 바이오매스와 지질 함량은 증가시키나 클로로필 함량은 억제하였다. 2% 포도당은 바이오매스 생산을 증진시키나, 5% 이상은 오히려 바이오매스 생산을 억제하였다 [Liang 등, 2009]

### ② 질소원(nitrogen source)

- ㉠ 미세조류의 성장과 바이오매스, 지질 함량 및 클로로필 함량에 영향을 주는 질소원은 두 번째로 중요한 영양원 [Richmond, 2004; Brennan & Owende, 2010; Virthie 등, 2010]
- ㉡ 다양한 미세조류의 지질 함량은 질소 기아(starvation) 환경에서 오히려 더 높다는 보고도 있음 [Converti 등, 2009; Dean 등, 2010]
- ㉢ 질소원의 경우에도 유기질소원{요소(urea), 펩톤(peptone), 맥아추출물(malt extract), 쇠고기추출물(beef extract), 효모추출물(yeast extract), 아미노산 등}과 무기질소원{질산암모늄(ammonium nitrate), 황산암모늄(ammonium sulfate), 질산칼륨(potassium nitrate), 질산나트륨(sodium nitrate) 등}으로 구분
- ㉣ 녹조류 혼합영양 배양에 사용되는 두 가지 질소원은 종류와 농도에 따라서 배양시 장단점을 제공한다. 이들 중에 질산암모늄, 황산암모늄, 펩톤 및 쇠고기추출물은 클로렐라 불가리스 배양액 pH를 4 이하로 심하게 낮추는 반면, 질산칼륨과 요소는 배양액의 pH를 7.2 전후에서 유동적으로 유지시킴
- ㉤ 요소와 펩톤과 같은 유기질소원은 클로렐라 불가리스의 바이오매스 생산 및 클로로필 함성에 부정적인 영향을 미치는 반면에 지질 함량은 증가시킴
- ㉥ 한편, 혼합영양 조건에서 다른 종의 클로렐라를 배양하였을 때 요소와 맥아추출물은 질산칼륨 혹은 질산나트륨과 비교하여 바이오매스와 생산성을 더 증가시켰다. 배지에 질산칼륨을 첨가하여 클로렐라 불가리스의 배양한 경우에 성장률, 바이오매스, 바이오매스 생산성 및 지질 함량이 최대로 획득되었고 요소를 첨가하여 배양한 경우에는 클로로필 함량 및 생산성이 최대로 획득됨 [Leesing 등, 2014]
- ㉦ 다른 종류의 유기질소원은 아미노산으로서 광합성세균(cyanobacteria) 배양에 사용한



보고는 있으나 [Rawson 등, 1985; Rubin & Madgan, 1986; Hustede 등, 1993; Merugu 등, 2010], 녹조류 배양에서는 거의 보고되지 않음

- ㉠ 광합성세균은 저농도(1mM 이하) 아미노산을 질소원으로 이용하는 능력을 갖고있으나 배양 결과는 종에 따라서 다양함 [Neilson & Douduruff, 1973; Neilson & Larsson, 1980; Vashampayan, 1982]
- ㉡ 저농도 아미노산이 광합성세균의 성장에 요구되지만, 고농도 아미노산은 성장을 억제함 [Rawson 등, 1985; Klemme 등, 1989; Merugu 등, 2010]
- ③ 질소에 대한 탄소의 최적비율(C/N ratio)
  - ㉢ 미세조류의 구성요소  $CH_{1.7}O_{0.4}N_{0.15}P_{0.0094}$ 를 고려할 때 평균적으로 총 바이오매스의 10%(w/w)가 질소원이고 20%(w/w)가 탄소원으로 고려되는데 [Osward, 1988], 따라서 질소에 대한 탄소의 최적비율은 약 5~10으로 추론됨 [Cho 등, 2011]
  - ㉣ 이러한 관점에서 탄소원과 질소원의 C/N 비율은 미세조류의 혼합영양 배양시 성장률, 바이오매스 함량과 생산성 및 대사산물 합성에 가장 중요한 영양 요인임
  - ㉤ 예를 들면 *Chlorella saccharophila*의 타가영양 배양시 포도당+펩톤 혹은 글리세롤+펩톤의 농도 비율은 바이오매스 생산성에 상당한 영향을 미침 [Isleten-Hosoglu 등, 2012]
  - ㉥ 다른 예로 타가영양 배양시 포도당+질산나트륨의 최적 농도를 첨가한 Bristol 배지에서도 *Chlorella zofingiensis*의 최대 성장률과 바이오매스 함량이 획득되었음 [Wang & Peng, 2008]
  - ㉦ 또한 다른 종의 클로렐라를 배양한 경우에도 0.1% 질산나트륨을 함유한 Bristol 배지에 첨가한 포도당 농도를 2%에서 4%로 증가시키면 바이오매스와 지질 함량이 점차 증가되었으나, 포도당 농도를 5%로 증가시킨 경우에는 바이오매스와 바이오매스 생산성이 오히려 감소됨 [Leesing 등, 2014]
  - ㉧ 클로렐라 불가리스의 경우 고농도(0.6%) 중탄산칼륨(potassium bicarbonate)과 저농도(0.1%) 질산나트륨을 혼합한 배지에서 바이오매스 생산성이 최대로 획득됨
  - ㉨ 위와 같은 보고는 탄소원과 질소원이 미세조류의 바이오매스와 지질 함량에 중요한 역할을 수행하고 있으나, 두 영양원의 농도가 지나치게 높을 경우에는 역효과가 나타날 수 있음을 암시함

## 제 7 장 연구시설·장비 현황

\* 도입·개발한 연구시설·장비 현황 및 국가과학기술종합정보시스템 장비 등록번호를 기술

## 제 8 장 참고문헌

- Brennan L, Owende P (2010) Biofuels from microalgae - a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew. Sust. Energy Rev.* 14: 557-577.
- Brinch-Pedersen H, Hatzack F, Sørensen LD, Holm PB (2003) Concerted action of endogenous and heterologous phytase on phytic acid degradation in seed of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) *Transgenic Res.* 12: 649-659.
- Cheirsilp B, Torpee S (2012) Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. *Bioresour. Technol.* 110: 510-516.
- Chen R, Xue G, Chen P, Yao B, Yang W, Ma Q, Fan Y, Zhao Z, Tarczynski MC, Shi J (2008) Transgenic maize plants expressing a fungal phytase gene, *Transgenic Res.* 17: 633-643.
- Chisti Y (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* 25: 294-306.
- Cho J, Lee C, Kang S, Lee J, Lee H, Bok J, Woo J, Moon Y, Choi Y (2005) Molecular cloning of a phytase gene (*phy M*) from *Pseudomonas syringae* MOK1. *Curr. Microbiol.* 51: 11-15.
- Cho S, Luong TT, Lee D, Oh Y-K, Lee T (2011) Reuse of effluent water from a municipal wastewater treatment plant in microalgae cultivation for biofuel production. *Bioresour. Technol.* 18: 8639-8645.
- Chojnacka K, Noworyta A (2004) Evaluation of *Spirulina* sp. growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures. *Enzyme Microb. Technol.* 34: 461-465.
- Dharmsthiti S, Chalernpornpaisarn S, Kiatiyajarn M, Chanpokapaiboon A, Klongsithidej Y, Techawiparut J (2005) Phytase production from *Pseudomonas putida* harbouring *Escherichia coli* *appA*. *Process Biochem.* 40: 789-793.
- Drakakaki G, Marcel S, Glahn RP, Lund EK, Pariagh S, Fisher R, Christou P, Stoger E (2005) Endosperm specific coexpression of recombinant soybean ferritin and *Aspergillus* phytase in maize results in significant increases in the levels of bioavailable iron. *Plant Mol. Biol.* 59: 869-880.
- Fugthong A, Boonyapakron K, Sornlek W, Tanapongpipat S, Eurwilaichitr L, Pootanakit K (2010) Biochemical characterization and in vitro digestibility assay of *Eupenicillium parvum* (BCC17694) phytase expressed in *Pichia pastoris*. *Protein Express. Purif.* 70: 60-67.
- George TS, Richardson AE, Hadobas PA, Simpson RJ (2004) Characterisation of transgenic *Trifolium subterraneum* L. which expresses phyA and releases extracellular phytase: growth and P nutrition in laboratory media and soil. *Plant Cell Environ.* 27: 1351-1361.
- George TS, Simpson RJ, Hadobas PA, Richardson AE (2005) Expression of a fungal phytase gene in *Nicotiana tabacum* improves phosphorus nutrition of plants grown in amended soils. *Plant Biotechnol. J.* 3: 129-140.

- Guo M, Hang H, Zhu T, Zhuang Y, Chu J, Zhang S (2008) Effect of glycosylation on biochemical characterization of recombinant phytase expressed in *Pichia pastoris*. *Enzyme Microb. Technol.* 42: 340-345.
- Han Y, Lei XG (1999) Role of glycosylation in the functional expression of an *Aspergillus niger* phytase gene (*phyA*) in *Pichia pastoris*. *Arch. Biochem. Biophys.* 364: 83-90
- Heredia-Arroyo T, Wei W, Ruan R, Hu B (2011) Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* and its potential application for the oil accumulation from non-sugar materials. *Biomass Bioenerg.* 35: 2245-2253.
- Huang XH, Li CL, Liu CW, Zeng DQ (2002) Studies on the Ecological Factors of *Oocystis borgei*. *J. Zhanjiang Ocean Univ.* 22(3): 8-12.
- Hustede E, Steinbüchel A, Schlegel HG (1993) Relationship between the photoproduction of hydrogen and the accumulation of PHB in non-sulphur purple bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39: 87-93.
- Isleten-Hosoglu M, Gultepe I, Elibol M (2012) Optimization of carbon and nitrogen sources for biomass and lipid production by *Chlorella saccharophila* under heterotrophic conditions and development of Nile red fluorescence based method for quantification of its neutral lipid content. *Biochem. Eng. J.* 61: 11-19.
- Isleten-Hosoglu M, Ayyıldız-Tamis D, Zengin G, Elibol M (2013) Enhanced growth and lipid accumulation by a new *Ettlia texensis* isolate under optimized photoheterotrophic condition. *Bioresour. Technol.* 131: 258-265.
- Jiménez Ruiz N, Cerón García MDC, Sanchez Mirón A, Belarbi Haftaloui EH, García Camacho F, Molina Grima E (2009). Lipids accumulation in *Chlorella protothecoides* through mixotrophic and heterotrophic cultures for biodiesel production. *New Biotechnol.* 25: S266.
- Jin UH, Chun JA, Han MO, Lee JW, Yi YB, Lee SW, Chung CH (2005) Sesame hairy root cultures for extra-cellular production of a recombinant fungal phytase. *Process Biochem.* 40: 3754-3762.
- Kerovuo J, Tynkkynen S (2000) Expression of *Bacillus subtilis* phytase in *Lactobacillus plantarum* 755. *Lett. Appl. Microbiol.* 30: 325-329.
- Klemme JH (1989) Organic nitrogen metabolism of phototrophic bacteria. *A Van Leeuw. J. Microbiol.* 55: 197-219.
- Kong W, Song H, Cao Y, Yang H, Hua S, Xia C (2011) The characteristics of biomass production, lipid accumulation and chlorophyll biosynthesis of *Chlorella vulgaris* under mixotrophic cultivation. *Afr. J. Biotechnol.* 10: 11620-11630.
- Leesing R, Papone T, Puangbut M (2014) effect of nitrogen and carbon sources on growth and lipid production from mixotrophic growth of *Chlorella* sp. KKU-S2. *Inter. J. Biol. Vet. Agric. Food Eng.* 8: 366-369.
- Lei XG, Porres JM (2003) Phytase enzymology, applications, and biotechnology. *Biotech. Lett.* 25: 1787-1794.
- Li J, Hegeman CE, Hanlon RW, Lacy GH, Denbow DM, Grabau EA (1997) Secretion of

- active recombinant phytase from soybean cell-suspension cultures. *Plant Physiol.* 114: 1103-1111.
- Liang Y, Sarkany N, Cui Y (2009) Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnol. Lett.* 31: 1043-1049.
- Liu JF, Wang XF, Li QL, Li X, Zhang GY, Li MG, Ma ZY (2011) Biolistic transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) with the *phyA* gene from *Aspergillus ficuum*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 106: 207-214.
- Lowry OH, Rosebrough 000NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Luo H, Huang H, Yang P, Wang Y, Yuan T, Wu N, Yao B, Fan A (2007) A Novel Phytase *appA* from *Citrobacter amalonaticus* CGMCC 1696: Gene Cloning and Overexpression in *Pichia pastoris*. *Curr. Microbiol.* 55:185-192.
- Lucca P, Hurrell R, Potrykus I (2001) Genetic engineering approaches to improve the bioavailability and the level of iron in rice grains. *Theor. Appl. Genet.* 102: 392-397
- Merugu R, Girisham S, Reddy SM (2010) Bioproduction of hydrogen by *Rhodobacter capsulatus* KU002 isolated from leather effluents. *Inter. J. Hydrogen Energ.* 35: 9591-9597.
- Mudge SR, Smith FW, Richardson AE (2003) Root-specific and phosphate-regulated expression of phytase under the control of a phosphate transporter promoter enables *Arabidopsis* to grow on phytate as a sole P source. *Plant Sci.* 165: 871-878.
- Mullaney WJ, Locavare H, Sethumadhavan K, Boone S, Lei XG, Ullah AHJ (2010) Site-directed mutagenesis of disulfide bridges in *Aspergillus niger* NRRL 3135 phytase (PhyA), their expression in *Pichia pastoris* and catalytic characterization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87: 1367-1472.
- Neilson AH, Doudoroff M (1973). Ammonia assimilation in blue-green algae. *Arch. Mikrobiol.* 89: 15-22.
- Neilson, AH, Larsson T (1980) The utilization of organic nitrogen for growth of algae: physiological aspects. *Physiol. Plantarum* 48: 542-553.
- Oswald WJ (1988) In M. B. Borowitzda (ed). *Microalgae and Wastewater Treatment*, Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp 254-260.
- Rawson DM (1985) The effects of exogenous amino acids on growth and nitrogenase activity in the cyanobacterium *Anabaena cylindrica* PCC 7122. *J. Gen. Microbiol.* 131: 2549-2554.
- Richardson AE, Hadobas PA, Hayes JE (2001) Extracellular secretion of *Aspergillus* phytase from *Arabidopsis* roots enables plants to obtain phosphorus from phytate. *Plant J.* 25: 641-649.
- Richmond A (2004) *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*, first ed. Blackwell Science, Oxford.
- Rubin CA, Madigan MT (1986) Amino acid and ammonia metabolism by the halophilic

- nonsulfur purple bacterium *Rhodospirillum rubrum*. FEMS Microbiol. Lett. 34: 73-77.
- Selle, P.H *et al.* (2007) Microbial phytase in poultry nutrition. *Animal Feed Science and Technology*, 135: 1-41.
- Shi P, Huang H, Wang Y, Luo H, Wu B, Meng K, Yang P, Yao B (2008) A novel phytase gene *appA* from *Buttiauxella* sp. GC21 isolated from grass carp intestine. *Aquaculture* 275: 70-75.
- Singh B, Gotthard Kunze G, Satyanarayana T (2011) Developments in biochemical aspects and biotechnological applications of microbial phytases. *Biotechnol Mole. Biol. Rev.* 6: 69-87.
- Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E, Isambert A (2006). Commercial application of microalgae. *J. Biosci. Bioeng.* 101:87-96.
- Ullah AHJ, Sethumadhavan K, Mullaney EJ, Ziegelhoffer T, Austin-Phillips S (2002) Cloned and expressed fungal *phyA* gene in alfalfa produces a stable phytase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290: 1343-1348.
- Ullah AHJ, Sethumadhavan K, Mullaney EJ, Ziegelhoffer T, Austin-Phillips S (2003) Fungal *phyA* gene expressed in potato leaves produces active and stable phytase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 306: 603-609.
- van Handel E (1985a) Rapid determination of glycogen and sugars in mosquitoes. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 1: 299-301.
- van Handel E (1985b) Rapid determination of total lipids in mosquitoes. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 1: 302-304.
- Vashampayan A (1982). Amino acid nutrition in the blue-green alga *Nostoc muscorum*. *New Phytol.* 90: 545-549.
- Virthie B, Desikan R, Santosh SK, Subburamu K, Sanniyasi E, Bux F (2010) Effects of parameters affecting biomass yield and thermal behaviour of *Chlorella vulgaris*. *J. Biosci. Bioeng.* 111: 377-382.
- Warburg MS, Yuval B (1996) Effects of diet and activity on lipid levels of adult Mediterranean fruit flies. *Physiol. Entomol.* 21: 151-158.
- Wang Y, Peng J (2008) Growth-associated biosynthesis of astaxanthin in heterotrophic *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta). *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24: 1915-1922.
- Wang Q, Fu S-J, Sun J-Y, Weng X-Y (2011) Characterization of a thermostable alkaline phytase from *Bacillus licheniformis* ZJ-6 in *Pichia pastoris*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 27: 1247-1253.
- Xiong A-S, Yao Q-H, Peng R-H, Han P-L, Cheng Z-M, Li Y (2005) High level expression of a recombinant acid phytase gene in *Pichia pastoris*. *J. Appl. Microbiol.* 98: 418-428.
- Xiong W, Gao C, Yan D, Wu C, Wu Q (2010) Double CO<sub>2</sub> fixation in photosynthesis-fermentation model enhances algal lipid synthesis for biodiesel production. *Bioresour. Technol.* 101: 2287-2293.
- Zhao D-M, Wang M, Mu X-J, Sun M-L, Wang X-Y (2007) Screening, cloning and overexpression of *Aspergillus niger* phytase (*phyA*) in *Pichia pastoris* with favourable

characteristics. *Lett. Appl. Microbiol.* 45: 522-528.

Zhou W, Li Y, Min M, Hu B, Chen P, Ruan R (2011) Local bioprospecting for high lipid producing microalgal strains to be grown on concentrated municipal wastewater for biofuel production. *Bioresour. Technol.* 102: 6909-6919.

Zou L-K, Wang H-N, Pan X, Xie T, Wu Q, Xie Z-W, Zhou W-R (2006) Design and expression of a synthetic *phyC* gene encoding the neutral phytase in *Pichia pastoris*. *Acta Biochim. Biophys. Sinica* 38: 803-811.



## 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.