

BSPE99361-11094-3

해양 광합성 미생물을 이용한 생광물화 기전 규명
Study of Mechanism by Marine Photosynthetic Microbes

2016. 09. 30

한 국 해 양 과 학 기 술 원

제 출 문

한국해양과학기술원장 귀하

본 보고서를 “ 해양 광합성 미생물을 이용한 생광물화 기전 규명 에 관한 연구”과제의 최종보고서로 제출합니다.

2016. 9. 30

과제책임자 : 정 광 환

참 여 연 구 원 : 김 세 환

“ : 박 영 상

보고서 초록

| | | | | | |
|--|----------------------------|--|--|-----------|--------|
| 과제번호 | PE99361 | 연구기간 | 2015. 8. 1 - 2016. 7. 31 (12개월) | | |
| 과제명 | 해양 광합성 미생물을 이용한 생광물화 기전 규명 | | | | |
| 과제책임자 | 정광환 | 참여연구원 수 | 총 : 2 명 내부: 2 명 외 부 : 명 | 연구비 | 66 백만원 |
| 연구기관명 및 소속부서명 | 서강대학교 생명과학과 | | | | |
| 국제공동연구 | | | | | |
| 요약 | | | | 보고서 면수 | 45 |
| <p>○ 해양 미세조류에서의 희소금속 탄산염의 생광물화 기전 규명</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Chlorella vulgaris</i>의 형질전환을 위한 벡터 개발 및 형질전환 조건을 확립함. - 생광물화에 관여하는 여러 가지 생체물질 (단백질/펩타이드) 규명: 외부에 생긴 생광물에는 함유된 단백질/펩타이드가 없었음. <p>○ 해양 조건에서의 Cs, Sr의 탄산염 형성 연구</p> <ul style="list-style-type: none"> - 해양조건에서 <i>C. vulgaris</i>에 의한 Sr 탄산염 형성의 방해요인을 확인 - 영향을 주는 이온으로는 Na⁺, Cl⁻, 강한 음이온성 물질 등 - 해양조건에서 <i>C. vulgaris</i>에 의해 생광물이 형성됨을 간접적 방법으로 확인(방사성 원소 ⁹⁰Sr의 제거율 측정을 통하여) - 하지만 민물조건에 비하여 1/3 정도 제거능력이 감소 <p>○ 희소금속 생광물화 기능이 보다 향상된 개량된 미세조류체 확보</p> <ul style="list-style-type: none"> - 향상된 기능의 미세조류체 분리 가능 확인 (DEP 기반 스크리닝) | | | | | |
| 색인어 (각 5개 이상) | 한 글 | 희소금속, 생광물화, 미세조류, 탄산염, 대량발현, 형질전환 | | | |
| | 영 어 | rare metals, biomineralization, microalgae, carbonate, mass expression, transformation | | | |

요 약 문

I. 제 목

해양 광합성 미생물을 이용한 생광물화 기전 규명

II. 과제의 목적 및 필요성

본 과제가 추구하는 중장기적인 과제목적은 1) 희소금속 생광물화 기전연구의 결과를 통해 얻어진 관련 단백질 또는 펩타이드를 대량생산하여 희소금속 대량포집에 이용하는 것, 2) 또한 본 연구를 통해 얻어진 개량된 미세조류체를 통하여 희소금속 대량포집 하는 것이며, 위 두 가지를 바탕으로 최종적으로는 3) 바이오를 응용한 희소금속의 포집 및 회수 가능한 원천 기술을 개발하는 것이다.

본 과제가 추구하는 최종 연구목표는 해양 미세조류에서의 희소금속 탄산염의 생광물화 기전을 규명하는 것으로서, 여러 가지 생체물질 (유전자, 단백질 또는 펩타이드)을 발굴하고 또한 향상된 단위시간당 생광물화 능력을 가진 개량된 미세조류체를 확보하는 것이다.

우리나라의 희소금속(Sr, Cs)의 확보가 중요해진 시점에서, 기존 희소금속 확보 관련 연구가 금속산화물계 흡착제 등 화학적 기술을 이용하는 실정인데 반해 본 연구는 보다 친환경적인 생물학적 방법을 이용한다는 점에서 학문적·환경적·경제적 중요성이 있다. 또한 본 연구성과는 희소금속 포집 뿐만 아니라 환경으로부터의 중금속 제거 및 방사능 물질 제염에도 응용할 수 있기 때문에 여러 가지 관점에서 유용한 연구이다.

III. 과제의 내용 및 범위

해양 미세조류에서의 희소금속 탄산염의 생광물화 기전을 규명하기 위해서, 본 연구과제에서는 먼저 *Chlorella vulgaris*에서의 생광물화 관련 유전자 규명을 하고자 하였다. 이를 위해서 selection marker 유전자를 포함한 *C. vulgaris* 특이적인 plasmid를 제작하고, *C. vulgaris*로의 plasmid transformation 조건 정립을 하고자 하였다. 그 후 random insertional mutagenesis를 통하여 mutant 개체를 선별하여 생광물화 관련 유전자를 동정하고자 하였다. 또, 생광물화 관련 단백질 또는 관련물질 규명을 위하여 반응액을 분리하여 관련 물질 존재유무를 조사하였다.

두 번째로, 해양조건에서의 Cs, Sr의 탄산염 형성 연구를 하였다. 염색법을 이용하여 직접 탄산염 크리스탈을 현미경으로 관찰하였으며, 여러 이온 조건에서 탄산염 형성을 관찰하였다. 반응액 중의 감소한 금속이온의 농도를 측정함으로써 담수와 해수에서 탄산염 형성량에 어떠한 차이가 있는지 알아보았다. 또한, DEP 기반기술을 통해 분리된 개체(WT)가 그렇지 않은 개체보다 담수 및 해수에서 더 나은 생광물화 효율을 보이는지 알아보았다.

마지막으로, 희소금속 생광물화 기능이 보다 향상된 개량된 미세조류체를 확보하기 위하여, mutagenesis 기술확보를 위한 연구를 하는 동시에, DEP 기반 고효율 세포분리 시스템을 이용하여 고효율 세포를 분리하였다. 여기서 분리된 세포가 실제로 더 나은 생광물화 효율을 보이는지 확인하였다.

IV. 과제결과

해양미세조류에서의 희소금속 탄산염의 생광물화 기전 규명과 관련, *Chlorella vulgaris*의 형질전환을 위한 벡터를 개발하는데 성공하였고 Glass bead 방법 및 Gold particle bombardment 방법을 이용한 형질전환의 조건을 확립하였다. 하지만 생광물화에 관여하는 여러 가지 생체물질 (단백질/펩타이드) 규명과 관련하여서는, 외부에 생긴 생광물에서는 어떠한 단백질/펩타이드도 검출할 수 없었다.

해양조건에서의 Cs, Sr의 탄산염 형성 연구와 관련, 해양조건에서 *C. vulgaris*에 의한 Sr 탄산염 형성의 방해요인을 확인하였는데, 영향을 주는 이온으로는 Na^+ , Cl^- , 강한 음이온성 물질 등이 있음을 확인하였다. 한편, 해양조건에서 *C. vulgaris*에 의해 생광물이 형성됨을 간접적 방법으로 확인(방사성 동위원소 ^{90}Sr 의 제거율 측정을 통하여)하였다. 하지만 민물조건에 비하여 1/3정도 제거능력이 감소하였다.

희소금속 생광물화 기능이 보다 향상된 개량된 미세조류체 확보와 관련, DEP 기반 스크리닝 방법을 통해 보다 향상된 기능의 미세조류체 분리가 가능함을 확인하였다.

V. 과제결과의 활용계획

본 연구를 통해 glass bead 및 gene bombardment를 이용한 유전자 도입 조건을 확립하였으므로, 향후 *C. vulgaris*로의 plasmid transformation 효율을 높이는 최적화 연구를 추가하는 한편, genomic DNA로의 random 유전자 도입을 유도하여 생광물화 관련 유전자를 규명할 것이다. 또한, 2E-GE, ICAT 기술로 프로테오믹을 분석하여 관련 단백질 및 펩타이드를 규명할 예정이다.

유전자 도입조건이 확립되었으므로, 앞으로는 random mutant를 DEP 스크리닝 하여 생광물화 기능이 보다 향상된 개체를 확보하는데 주력할 예정이다. 그 후 스케일업 및 실증화 연구를 함으로써 향후 실제 해양에서 희소금속을 포집하는 리액터를 개발하는데 본 기술이 활용될 수 있다.

SUMMARY 및 KEY WORDS

We aim to investigate the rare metal carbonate biomineralization mechanism by marine microbe. We tried to find out various biomaterials such as gene, protein or peptide which is involved in biomineralization, and secure the superior individual of algae that have superior ability of making higher amount of Cs, Sr carbonate crystals.

It is now important to secure more rare metals for a nation because of decreasing amount of buried rare metals. There are already existing chemical approaches to get rare metals, however, in this research we are planned to use biological approach to get rare metals, which is more environmental-friendly. Also, this research will also can be used not only to collect rare metals from the sea but also to remove radioactive metals from the environment.

We have studied of rare metal Cs, Sr carbonate formation mechanism with marine microbe. As a result, the vector construct that can be transformed into *C. vulgaris* was developed. Also, we have developed glass bead method and gold particle bombardment method for *C. vulgaris* transformation. Unfortunately, any peptide or protein was detected from the react solution for identification of a protein/peptide involved in biomineralization.

With regards to studying of Cs, Sr biomineral formation, we have studied obstacle factors for formation of Cs, Sr biominerals in the seawater condition. Na^+ , Cl^- , and strong anionic chemicals could affect the formation of Cs, Sr biominerals in the seawater condition. We have also studied that biomineral could be formed in the seawater conditions by *C. vulgaris* by indirect methods such as measurement method of radioactive Sr removal. However, the removal ability was decreased by 1/3 compared to fresh water.

With regards to securing for better individual for better biomineralization, we have confirmed that it is possible to screen better individual from the pool using DEP-based screening method.

Our study could be used to *C. vulgaris* transformation and random mutagenesis to investigate genes and proteins involved in the biomineralization in the near future. 2E-GE and ICAT techniques could also be used for identifying the peptides or proteins involved.

We will focus on having the best individual for rare metal biomineralization, and near future, we will develop the 1 liter and even more big reactors for the rare metal biominerals from the sea.

(KEY WORDS : 희소금속, 생광물화, 미세조류, 탄산염, 대량발현, rare metals, biomineralization, microalgae, carbonate, mass expression)

C O N T E N T S

Chapter 1. Introduction

- (1) Purpose of this study
- (2) Necessity of this study
- (3) The range of research

Chapter 2. Current technology development for home and abroad

- (1) Current technology development for home and abroad

Chapter 3. Performance and results

- (1) Study of rare metal Cs, Sr carbonate formation Mechanism with Marine Microbe
- (2) Analysis for Interference effect about ion constructing seawater(Na, Cl, Mg)
- (3) Securing of Marine Microalgae that enhance-modified function per unit time of biomineralization

Chapter 4. Level of achievement and contribution

- (1) Achievement
- (2) Methods for the purpose
- (3) Excellence of the result and contribution to relative technology

Chapter 5. Planning for application

- (1) Necessity for more studies
- (2) Application for other studies and future planning

Chapter 6. References

목 차

제 1 장 서론

- 제 1 절 과제의 목표
- 제 2 절 과제의 필요성
- 제 3 절 연구의 범위

제 2 장 국내외 기술개발 현황

- 제 1 절 국내외 기술개발 현황

제 3 장 과제수행 내용 및 결과

- 제 1 절 해양 미세조류에서의 희소금속 탄산염의 생광물화 기전 규명
- 제 2 절 생광물화에 영향을 주는 이온 조사
- 제 3 절 희소금속 생광물화 기능이 보다 향상된 개량 미세조류체 확보

제 4 장 과제목표 달성도 및 대외기여도

- 제 1 절 목표달성도
- 제 2 절 목표달성을 위한 과제수행 방법
- 제 3 절 결과의 우수성 및 관련분야 기술발전예의 기여도

제 5 장 과제결과의 활용계획

- 제 1 절 추가 연구의 필요성
- 제 2 절 타 연구에의 응용 및 기업화 추진방안

제 6 장 참고문헌

제 1 장 서론

제 1절. 과제의 목표

1. 최종목표

Sr, Cs 등의 알칼리(토) 희소금속 원소를 생광물화 하는 해양 미세조류의 생광물화 조건을 확립하고, 돌연변이 미세조류 분석을 통해 생광물화 관여 단백질/펩타이드 형성 유전자를 확보하는 동시에 생광물 분석을 통해 미세조류에서의 생광물화에 관여하는 단백질/펩타이드를 확보.

2. 세부연구내용 및 목표

- 해양 미세조류에서의 희소금속 탄산염의 생광물화 기전 규명
 - 생광물 형성 조건 확립: $>1 \text{ mg/ml}$ of 10^6 cells 달성
 - Drug 마커를 가진 다양한 미세조류를 미소유체시스템을 이용하여 생광물화 능력이 달라진 돌연변이를 분리함으로써 관련 유전자 발굴
 - 생광물화 관여 유전자 규명: 5개 이상
- 해양 조건에서의 Cs, Sr의 탄산염 형성 연구
 - 바닷물 조성 이온 (Na^+ , Cl^- , Mg^{2+})의 Interference 효과 분석
- 희소금속 생광물화 기능이 보다 향상된 개량된 미세조류체 확보
 - 발굴 유전자들을 발현시켜 돌연변이를 통한 활성 개량 및 특이성 조절

제 2절. 과제의 필요성

1. 희소금속 확보의 필요성

- 희소금속은 산업적인 가치가 매우 높음
- 희소금속은 전자, 철강, 국방, 에너지 산업 등 주로 하이테크 산업에 이용
- 그러나 대체물질이 존재하지 않으므로, 희소금속의 국가적 확보가 요구되는 상황

- 희소금속 자원의 편재성 및 희소성에 의한 공급 불안정성 및 조기고갈 우려로 국가적 차원의 전략적 접근이 필요
- 전 세계적으로 희소금속에 대한 수요는 매년 10 % 이상씩 증가하는 추세
- 그러나 매장이 대부분 중국, 칠레 등 특정 지역에 편중되어 있어 원활한 공급이 제한적임. 따라서 원활하고 지속적인 공급처의 확보가 필요
- 리튬의 경우 전 세계 리튬의 채굴가능 매장량은 1천 400만 톤 정도로 추정되는데, 이 중 상업적으로 채굴 가능한 매장량은 410만 톤 내외에 불과해 향후 7~8년 정도면 고갈될 것으로 예측
- 희소금속 확보를 위한 새로운 원천기술 개발이 필요
- 해수에는 육상매장량의 수백 ~ 수백 만배, 즉, 약 2천억 톤(170 ppb)의 희소금속이 녹아 있는 것으로 추정
- 선진국들은 이미 해수로부터 희소금속을 회수하는 기술을 개발하는 데에 투자 시작

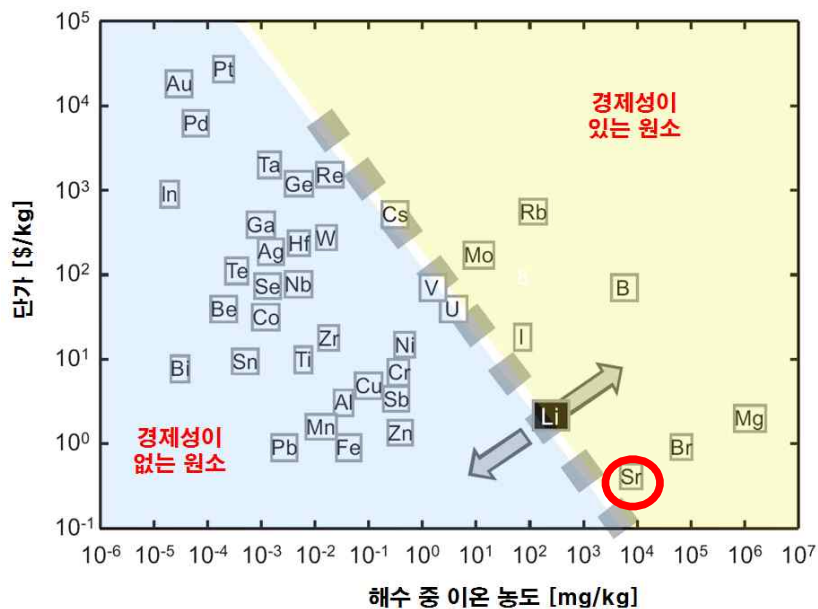


그림 1. 해수에서 회수되는 성분의 경제성 평가 (출처 : 吉塚和治, 近藤正聡, 海水からのリチウム回収, J. Plasma Fusion Res., 87(12), 795-800 (2011).

- 현재 해수에서 상업적으로 회수되고 있는 원소들은 Na, K, **Mg**, Br 화합물 등이 있으며 앞으로 회수시 경제성이 비교적 높은 것으로 Rb, **Sr**, **Cs**, Li, I, Mo, U, V 등이 있음.
- 현재 상업적으로 수입되고 있는 Cs과 Sr의 가격은 800\$/Kg, 0.78 \$/Kg이며 3년 전에 비해 가격이 약 2배가량 뛰었고, 점점 가격이 상승하므로 해양에서 회수하는 비용에 대한 가치가 높아지고 있음.

- 미세조류는 바이오 에너지 연구, 고부가가치 물질 생산 연구 등에 가장 활발히 사용되고 있는 친환경적인 연구 재료임. 최근 미세조류에 의한 희소금속의 생광물화 (Biomineralization) 현상이 보고된 바 있으므로, 이를 새로운 원천기술로 발전시킬 필요가 있음.

2. 상위목표와의 연계성

□ 국가적 아젠다(정부 140대 국정과제, 제3차 과학기술기본계획 등)와의 연계성

- 국정과제 1 (과학기술을 통한 창조 산업 육성), 국정과제 13 (해양 신성장 동력 창출 및 체계적 해양관리), 국정과제 24 (국가 과학기술 혁신역량 강화) 등의 국정과제와 연계성이 있으며, 이를 통해 국정목표 1 (일자리 중심의 창조 경제) 달성에 기여
 - 해양으로부터 희소금속을 추출하는 새로운 생물학적 기술을 개발함으로써 창조 산업 및 일자리 중심의 창조 경제 달성에 기여
- 30대 중점기술 중 7대 기술 (미래산업의 핵심 기반이 되는 ‘첨단 소재 기술’), 11대 기술 (무한자원인 태양광을 활용하는 ‘태양에너지 기술’), 21대 기술 (지구 온난화에 대응하는 ‘이산화탄소 포집, 저장, 이용기술’)과의 직·간접적 연계성
 - ‘첨단 소재의 원료 생산 기술’ : 미래 첨단 산업의 핵심 소재의 원료로 쓰이는 희소금속을 해양으로부터 확보할 수 있는 새로운 기술
 - ‘태양에너지 기술’ : 태양에너지를 통해 미세조류의 성장이 이루어지고 성장한 미세조류에 의해 생광물화가 이루어지는 기술
 - ‘이산화탄소 이용기술’ : 미세조류가 대규모로 성장하면서 대기 중의 이산화탄소가 유기물로 고정되는 효과가 있는 기술
- 해양수산 R&D 중장기 계획 중 해양수산 생명자원의 산업화 촉진 (해양수산생물 유래 소재 산업 육성) 및 해양 자원 및 해양 에너지 개발 활성화 중 해수 용존 자원 추출 기술 고도화 및 농축 해수 등을 활용한 산업 소재 개발과의 직·간접적 연계성

제 3절. 연구의 범위

| 세부연구목표 | 연구내용 | 연구범위 |
|---------------------------------|--|----------------------------------|
| 해양 미세조류에서의 희소금속 탄산염의 생광물화 기전 규명 | ○ 돌연변이 (target mutation)를 분리하여 Cs, Sr 희소금속 생광물화에 관여하는 유전자 규명 - 기존에 찾아낸 해양 미세조류 2종 사용 (<i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Haematococcus pluvialis</i>) - DEP, targeted mutation 방법 이용 | ○ 돌연변이 개체 분리 ○ 생광물화 관련 유전자 규명 |
| | ○ 생광물화에 관여하는 여러 가지 생체물질 (단백질/펩타이드) 규명 | ○ 생광물화 관련 생체물질 규명 |
| 생광물화에 영향을 주는 이온 조사 | ○ Sr 생광물화 형성조건에 Na ⁺ , Cl ⁻ , Mg ²⁺ 등 해수 주요이온의 interference 영향조사 | ○ 해수에서의 Sr 생광물화 조건 최적화 |
| | ○ Cs 생광물화 형성조건에 Na ⁺ , Cl ⁻ , Mg ²⁺ 등 해수 주요이온의 interference 영향조사 | ○ 해수에서의 Cs 생광물화 조건 최적화 |
| 생광물화 기능이 보다 향상된 개량된 미세조류체 확보 | ○ 발굴된 단백질/펩타이드의 세포에서의 발현을 위한 미세조류 형질전환 - Bombardment 기술 이용 | ○ 미세조류 형질전환 |
| | ○ 보다 향상된 단위시간당 생광물화 능력을 가진 개량된 미세조류체 확보 - 실험실 스케일에서 생광물화 능력향상 확인 - 희소금속 생광물의 <i>in vivo</i> 대량생산 발판 마련 | ○ 형질전환된 개체의 생광물화 능력향상 확인 |

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1절. 국내외 기술개발현황

1. 국내동향

가. 특허 동향 : 세슘, 스트론튬 등 알칼리 희소금속 관련 생물학적 제련(smelting) 기초 연구는 전무

○ 우라늄, 아연, 철, 니켈 등의 생물학적 용출 관련 특허는 다수 존재하나, 리튬, 세슘, 스트론튬 등의 희소금속 관련 생물학적 특허는 전무

○ 우리나라에 희소금속 관련 특허 출원은 아직까지는 ‘소재화와 회수·재활용 분야’가 중심

- 희소금속 소재 제조기술 연도별 특허 출원 추이<희소금속 소재 제조 기술 국내 특허 동향 분석 (J. Kor. Powd. Met. Inst., Vol. 21, No. 2, 2014) 참조>를 보면, 전체 2,162건 가운데 소재화 특허가 약 58.7%로 가장 높은 출원 점유율을 나타냈고, 회수·재활용 분야가 23.1%, 제련·정련 분야 11.1% 등

○ 대부분의 특허가 2000년도 후반에 출원된 것으로 보아, 최근 들어 연구의 급증 추세를 보임. 2010년 후반 들어서 ‘제련·정련, 고순도화 분야’의 출원 건수가 소폭으로 증가한 것으로 미루어 보아, 앞으로는 친환경적인 생물학적 제련 및 제조 관련 특허출원이 늘어날 것으로 예상

나. 연구 동향 : 박테리아 및 미세조류에 의한 희소금속(스트론튬)의 생광물화 현상이 보고되었지만, 그 자세한 기전은 알려지지 않음.

○ 갯벌 퇴적물에서 농화배양된 미생물에 의한 탄산스트론튬(strontianite, SrCO_3)의 침전 현상이 보고됨(영남대학교, 대한지질학회 학술대회, Vol. 2013, No. 10. p.413).

○ *Proteus mirabilis*, *Geobacter sulfurreducans*, *Gloeocapsa glucosan*, *Halomonas* sp. SR4, *Bacillus pasteurii* ATCC 11859 등의 미생물이 탄산스트론튬(SrCO_3) 생광물화에 관여(전남대학교, 중국 Chinese Academy of Sciences 등)

○ *Chlorella vulgaris*의 biomass/liquid 경계면에서 탄산스트론튬(SrCO_3)이 생성되며, 방사성 동위원소 ^{90}Sr 을 $^{90}\text{SrCO}_3$ 로 광물화시킴으로써 방사능 수치를 효과적으로 낮출 수 있었음(서강대학교, 한국원자력연구원, Lee et al., 2014년).

2. 국외동향

가. 특허 동향 : 희소금속의 생물학적인 제련 및 제조방법에 관한 특허는 전무

○ 국내에 출원된 국외특허와 관련하여, 제련·정련과 대체·저감 분야에서는 일본 출원인과 미국 출원인의 출원 활동이 활발함

- 희소금속이 이용되는 산업 중, 태양전지의 시장규모는 2016년 기준 모바일 분야 172만 달러, BIPV 분야는 93.5만 달러, 밀리터리 분야 38만 달러, 발전시설 분야 31만 달러의 시장이 형성될 것으로 예상(차세대 유기 태양전지 기술 및 시장 전망, 2010년, Displaybank)

나. 연구 동향 : 곰팡이 및 곤충 유래 효소에 의한 희소금속(스트론튬, 세슘)의 생광물화 현상이 보고되었지만, 그 자세한 기전은 알려지지 않음.

○ 다양한 morphology (branch-like, rod-like, flower-like, etc)를 가진 탄산스트론튬(SrCO_3)과 탄산바륨(BaCO_3)의 화학적 합성 방법을 개발(중국 Huangshan 대학)

○ 곰팡이류인 *Fusarium oxysporum*에 의한 탄산스트론튬(SrCO_3) 침전현상 보고(인도 National Chemical Laboratory, 2004년)

○ *Photinus pyralis* (firefly) luciferase에 의한 탄산세슘(Cs_2CO_3) 침전현상 보고(포르투갈 University of Porto)

3. 본 과제와 관련된 선행연구 분석

□ 미세조류인 *Chlorella vulgaris*에 의한 탄산스트론튬 형성

○ 본 연구실에서 수행한 연구에 의하면, 실험실에서 배양 중인 다양한 미세조류 및 광합성 세균(*Chlorella sorokiniana*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella vulgaris* KMMCC354, *Anabaena* PCC7120, *Haematococcus pluvialis*)에 대하여 탄산스트론튬 생성 여부를 조사한 결과, *Chlorella vulgaris*에서 탄산스트론튬 생성 확인

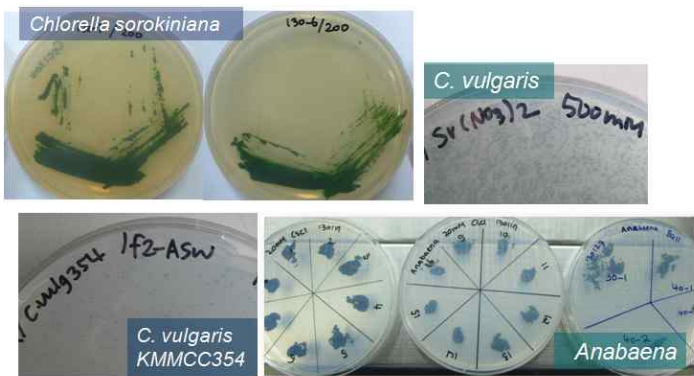


그림 2. 탄산스트론튬 생성 실험을 위한 다양한 미세조류 및 광합성 세균

○ SEM 및 EDS 분석 결과, 탄산스트론튬이 *Chlorella vulgaris* 세포 표면에서 생성되며 아주 소량은 세포 안으로 흡수

- 먼저 환경에 녹아있던 스트론튬 이온이 세포벽 바깥에 붙고, 활발한 광합성 작용으로 인한 carbonate (CO_3^{2-}) 이온의 국부적 증가에 의해 탄산스트론튬 크리스탈이 nucleation 되고 growth 할 것이라 추측

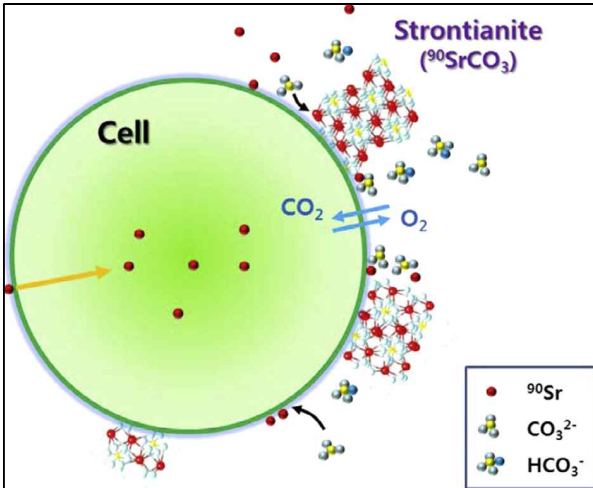


그림 3. 탄산스트론튬의 생성원리 모델 (Lee et al, Bioresour. Technol. 2014)

○ *Chlorella vulgaris*는 방사성 탄산스트론튬을 생성함으로써 모의 오염수 안의 방사성 수치를 낮춤.

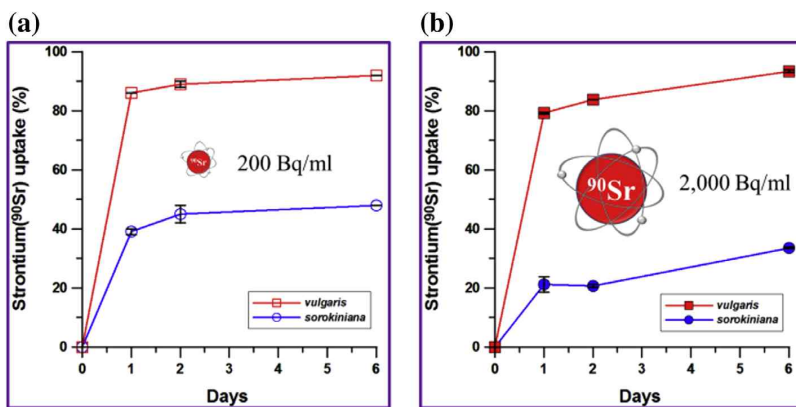
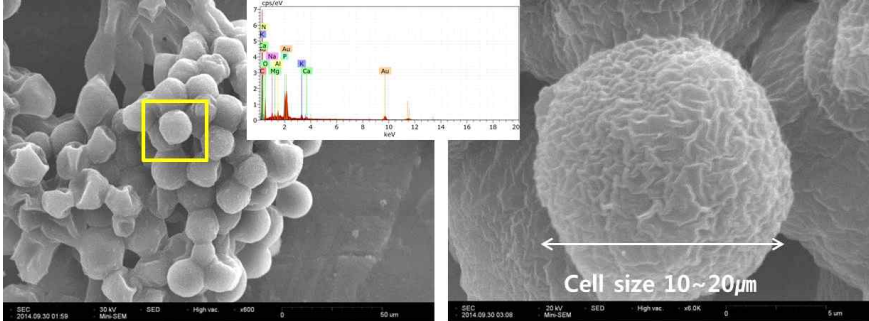


그림 4. 모의 오염수 안의 방사성 수치를 낮추어 주는 *Chlorella vulgaris* (Lee et al, Bioresour. Technol. 2014)

□ 다양한 미세조류에 의한 Sr^{+2} , Cs^+ 탄산염 형성 메커니즘

○ 또 다른 미세조류인 *Haematococcus pluvialis*는 스트론튬(Sr) 보다는 세슘(Cs) 방사성 동위원소를 모의 오염수에서 효과적으로 제거

- Cs 처리 전 EDS 분석결과를 통해, 주요성분인 C 이외에 N, P, Na, K, Ca, Mg 등으로 구성되어 있음을 확인, Cs 처리 후 K, Ca의 함량은 상대적으로 감소
- 세포 내 다양한 작용기 내 양이온들과 Cs의 이온교환반응 가능성 시사



Cs 3.7×10^2 Bq/ml - Ma 10^5 cells/ml

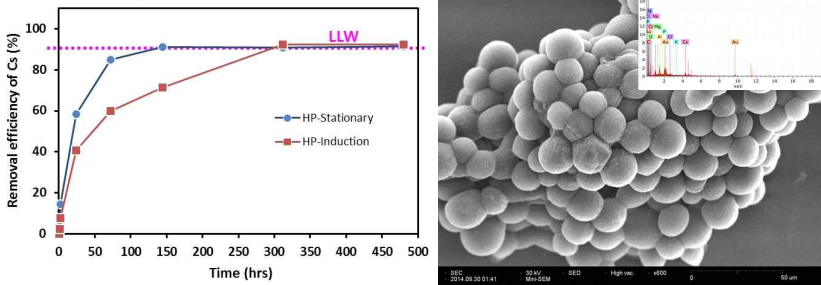


그림 5. Cs 처리 전 *H. pluvialis*의 SEM image와 EDS 분석결과 (윗쪽), 중준위(3.7×10^2 Bq/ml) 방사성 Cs 오염 담수환경 내 *H. pluvialis*의 성장상태에 따른 Cs 제거효율 (아랫줄왼쪽), Cs 처리 후 *H. pluvialis*의 SEM image와 EDS 분석 결과 (아랫줄오른쪽)

○ *Chlorella vulgaris*와 *Haematococcus pluvialis*에 의한 Sr^{+2} , Cs^+ 탄산염 생성여부 조사

- Sr^{+2} 이온 indicator인 0.2% sodium rhodizonate로 염색하여 관찰, 다른 이온에 대한 indicator로도 측정 필요

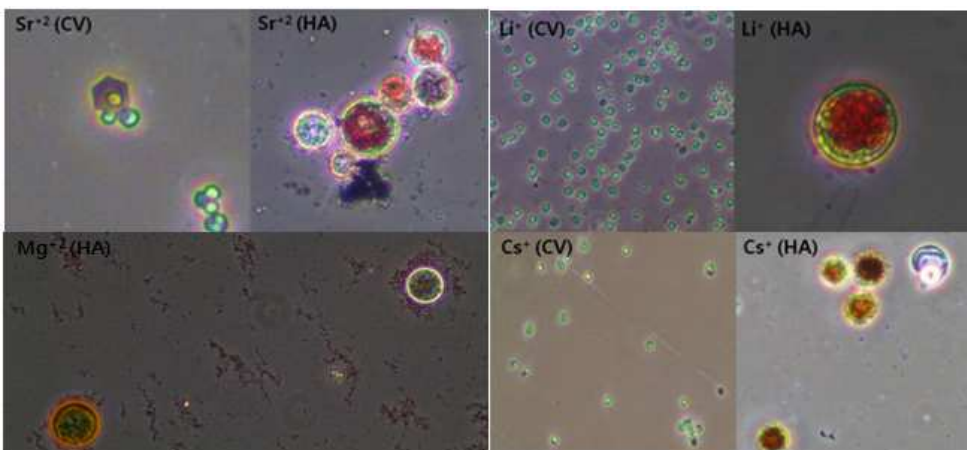


그림 6. 세포벽 바깥에서 생성되는 여러 가지 metal 탄산염 (x200)

○ *Chlorella vulgaris*에 의한 탄산스트론튬 생성 속도를 측정 한 결과, 5분 이내에 현미경에서 관찰 가능한 크기의 결정 형성 - 향후, 생성조건 최적화 필요

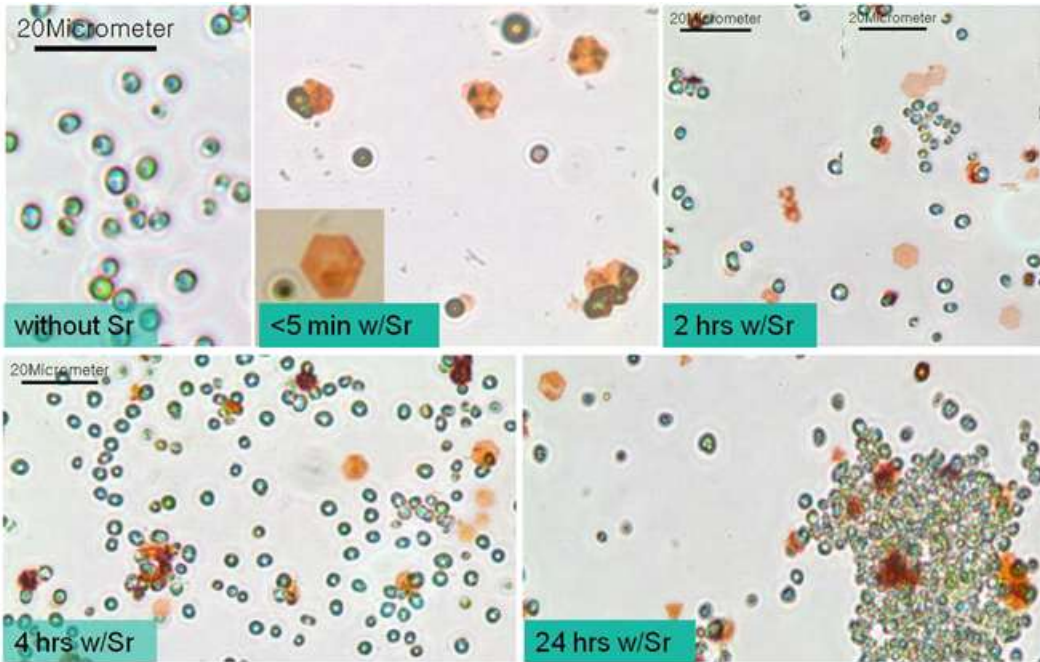


그림 7. *Chlorella vulgaris*에 의해 5분 이내에 생성되는 탄산스트론튬 크리스탈

□ 미세조류 유전자 조작 기술 - *Agrobacterium* 이용한 transfection 방법

○ 본 연구진은 원하는 유전자를 포함한 Ti plasmid를 가진 *Agrobacterium*을 infection 시키는 방법으로 형질전환이 어려운 바다 미세조류인 *Dunaliella tertiolecta*의 형질전환에 성공

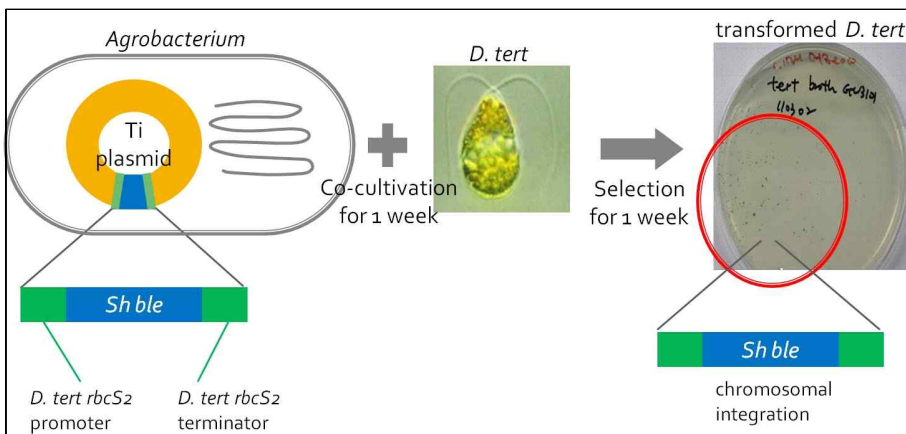


그림 10. *Agrobacterium*을 이용하여 미세조류를 형질전환하는 방법 (특허 등록번호 10-1317378, *Dunaliella*의 형질전환용 벡터)

4. 현기술의 한계 분석

- 기존 회소금속 확보 관련 연구는 금속산화물계 흡착제를 이용하는 것과 같은 화학적 기술이 대부분을 차지함, 보다 친환경적인 생물학적 기술의 부족
 - 회소금속을 소재로 한 생광물화 연구는 사례가 적고 성취도가 낮음
 - 회소금속의 생광물화 기전 규명 없이는 생광물화를 통한 회소금속 확보 기술개발에 어려움이 있음
 - 생광물화에 관여하는 단백질의 경우 대부분 세포막에 존재하는 막단백질로 예상되며, 막단백질에 관한 연구에는 많은 제약이 따름
 - 현재 미세조류 형질전환을 위한 분자생물학적 기술이 미흡

- 회소금속 생광물 대량생산 기술 개발을 위한 기초 연구 부족
 - 대량으로 생광물을 생성하기 위해 필요한 생광물화 관련 단백질과 펩타이드의 대량생산 연구가 전무
 - 대량으로 생광물을 생성하기 위해 필요한 효율적인 미세조류 필요

- 기존 미세조류 연구는 비료, 대체에너지, 식품 및 의약품, 폐수처리 연구 등에 치중
 - 빛에너지를 이용하는 미세조류를 이용한 회소금속 생광물화 연구는 환경오염 위험이 적은 재료이므로, 이를 이용한 보다 다양한 기술이 개발될 필요가 있음.

제 3 장 과제수행 내용 및 결과

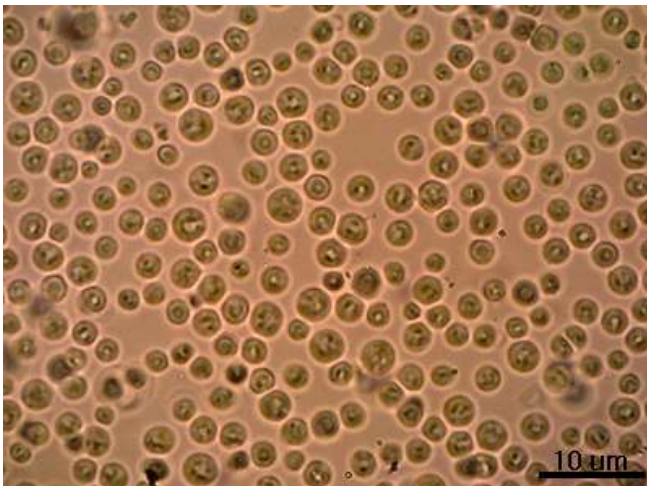
제 1절. 해양 미세조류에서의 희소금속 탄산염의 생광물화 기전 규명

1. 생광물화 관련 유전자 규명

희소금속 염의 생광물화에 관여하는 유전자를 규명하기 위해서는 먼저 *Chlorella vulgaris* (*C. vulgaris*)에 marker 유전자를 도입하여 insertional mutagenesis를 일으켜야 한다. 이후 생광물화 기능이 저하된 개체를 유전영동 방법(DEP)으로 스크리닝하기로 하였다.

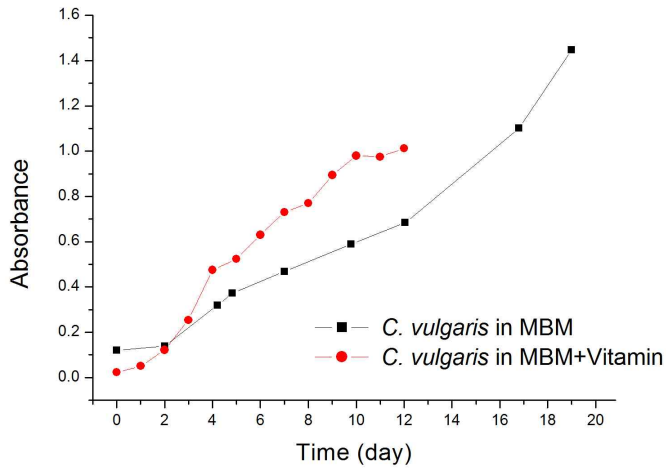
가. *C. vulgaris*에 유전자 도입을 위하여 Cell growth curve 확립

클로렐라(*Chlorella vulgaris*)는 배양을 위해 MBM 배지를 사용하였다. 배지의 조성은 Guillard and Riter (1962)와 Buillard (1975)의 배지 조성을 참고해서 조제되었고 미세조류 배양은 LED 광원 조건에서 배양하였다. 또 성장곡선의 확인은 해수산 클로렐라에 존재하는 색소의 흡광도를 spectrophotometer를 이용하여 측정함으로써 분석하였다.



| Composition | mg/L |
|---|--------|
| NaNO ₃ | 75 |
| NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O | 5.65 |
| Na ₂ EDTA | 4.16 |
| FeCl ₃ ·6H ₂ O | 3.15 |
| CuSO ₄ ·5H ₂ O | 0.01 |
| ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 0.022 |
| CoCl ₂ ·6H ₂ O | 0.01 |
| MnCl ₂ ·4H ₂ O | 0.18 |
| Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O | 0.006 |
| Vitamin B ₁₂ | 0.0005 |
| Vitamin B ₁ | 0.1 |
| Biotin | 0.0005 |
| sterilized natural seawater | 1L |

<그림 1. 해수산 클로렐라 (*Chlorella vulgaris* Strain No. KMMCC-354)의 현미경 확대 사진 (x600) 과 배지 조성>



<그림 2. 해수산 클로렐라(*Chlorella vulgaris*)의 초기 성장 곡선>

나. *C. vulgaris*에 유전자 도입을 하기 위해 필요한 marker 유전자 선정

먼저 *C. vulgaris*가 여러 가지 항생제에 대해 민감도가 어떠한지 알아보기 위하여, 실험실에서 보유하고 있는 다양한 종류의 항생제를 처리해보았다. 농도는 기존에 알려진 working concentration을 그대로 따랐다. 같은 농도의 *C. vulgaris*에 Ampicillin (50 ug/ml), Kanamycin (20 ug/ml), Chloramphenicol (34 ug/ml), Tetracyclin (50 ug/ml), Streptomycin (200 ug/ml)을 각각 처리하여 배양하였다. 그 결과, Tetracyclin에 생장이 저해되었고, Streptomycin 처리 시 성장하지 못하였다.



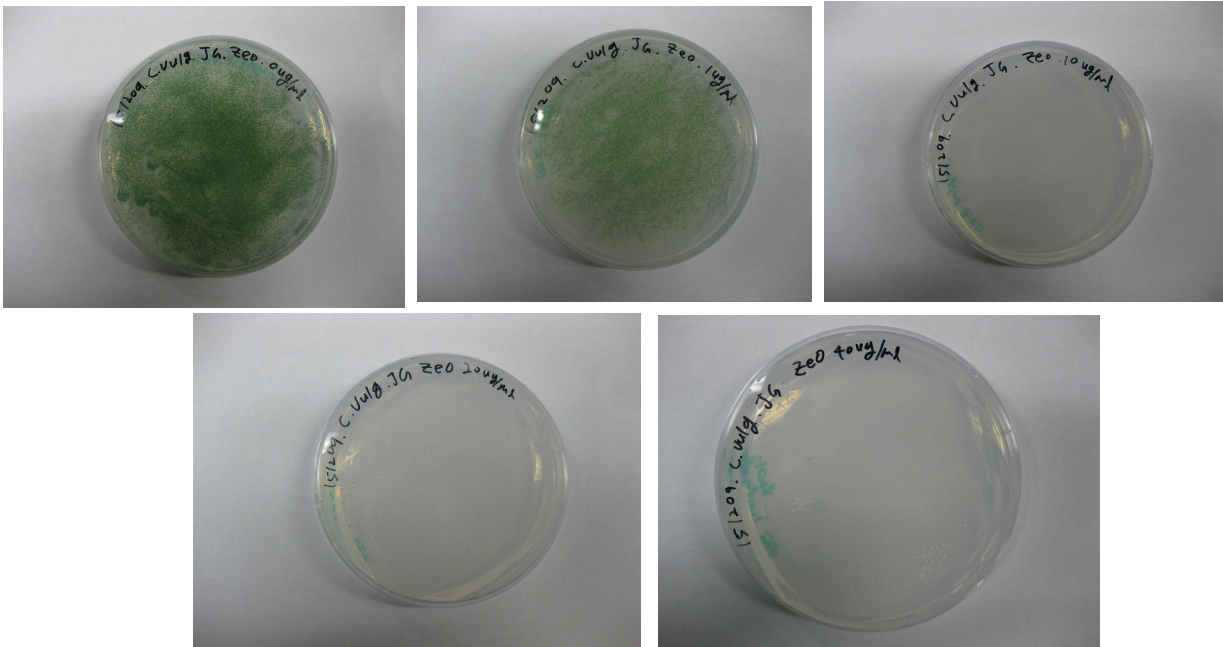
| | Ampicillin | Kanamycin | Chloramphenicol | Tetracyclin | Streptomycin |
|--------|------------|-----------|-----------------|-------------|--------------|
| 항생제저항성 | Yes | Yes | Yes | No | No |
| 적정농도 | 50 ug/ml | 20 ug/ml | 34 ug/ml | 50 ug/ml | 200 ug/ml |

<그림 3. *C. vulgaris*의 항생제 민감성 테스트>

다. Zeocin resistant gene (ble) 선정 및 Zeocin working concentration 결정

Eukaryotic algal selection marker로 많이 사용되는 bleomycin (ble)에 대한 항생제인 Zeocin에 대한 민감성 테스트를 실시하였다. *C. vulgaris*의 WT에서 Zeocin의 저항성이 어느

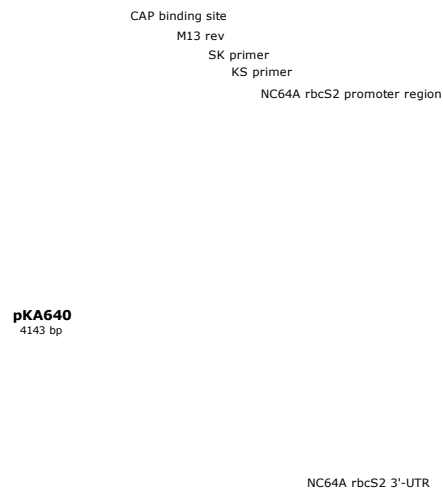
농도에서 유효한지 알기 위하여, Zeocin 의 농도별로 *C. vulgaris* WT를 통하여 확인하였다. Zeocin의 농도를 0 ug/ml, 1 ug/ml, 10 ug/ml, 20 ug/ml, 40 ug/ml 별로 생장을 확인하였다. 그 결과 10 ug/ml 에서의 플레이트 상에서 *C. vulgaris* WT의 배양이 되지 않음을 확인하여 실험 과정 중 Zeocin의 농도를 10 ug/ml로 정하였다.



<그림 4. Zeocin의 농도에 따른 *C. vulgaris* WT 배양. 왼쪽 위부터 0 ug/ml, 1 ug/ml, 10 ug/ml. 아래 왼쪽부터 20 ug/ml, 40 ug/ml>

라. pKA640 클로닝

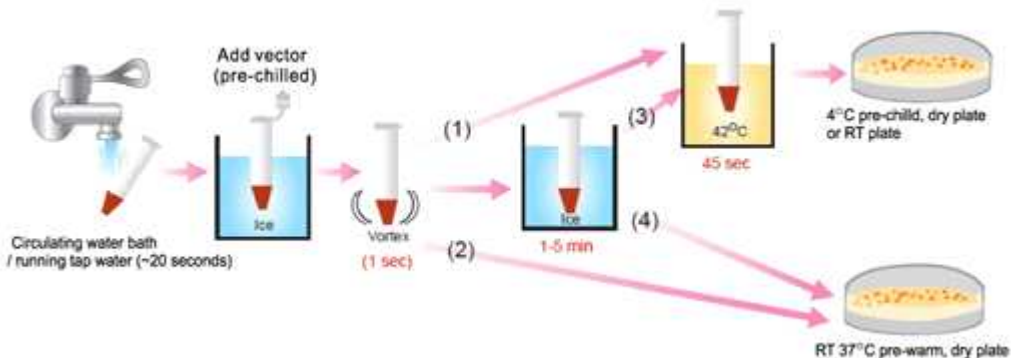
*C. vulgaris*에 도입할 vector를 아래 그림과 같이 준비하였다. *C. vulgaris*의 genome sequencing이 되어있지 않아서, 계통학적으로 비슷한 종인 *Chlorella variabilis* NC64A (이하 NC64A)의 genome sequence를 이용하였다. NC64A의 Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCo) small subunit 2 (*rbcS2*) gene의 promoter 및 terminator 부위를 예측하여 sequence를 얻어내고, NC64A *rbcS2* gene의 5'-UTR 및 3'-UTR sequence를 얻어낸 후, Sh ble gene과 fusion 하여 합성하였다(Cosmogenetech., Korea). 이때 *Streptomyces verticillus* bleomycin (Sh ble) gene의 중간에 두 개의 intron을 삽입하였는데, intron sequence으로는 NC64A *rbcS2* gene의 2번째 intron sequence를 이용하였다. 합성된 DNA fragment는 *SwaI/KpnI* 제한효소 처리하여 pSP124S vector에 cloning 하였고 이를 pKA640으로 명명하였다.



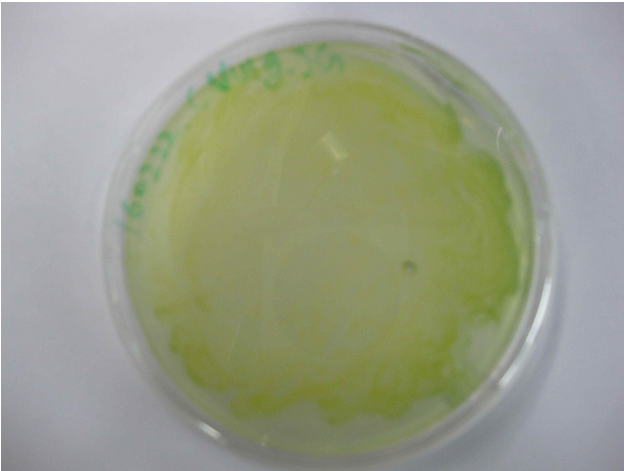
<그림 5. *C. vulgaris*에 도입할 marker 유전자(NC64A strain에서 유래한 프로모터 및 터미네이터 포함)가 cloning 된 vector map>

마. pKA640 plasmid를 *C. vulgaris* WT에 형질전환

유전자 합성을 통하여 이용하고자 하는 벡터에 Cloning한 plasmid를 *C. vulgaris* WT에 형질전환하기 위하여 두 가지 방법을 통하여 진행하였다. 첫 번째 방법은 Glass bead를 통한 A Simple and Rapid Glass Bead Transformation Method를 사용하였다. 이 방법은 Glass bead를 넣고 물리적 힘을 가하면 cell과의 물리적인 마찰을 통해 cell의 세포막에 구멍을 만들어 원하는 plasmid를 도입하는 방법이다. Glass bead를 사용하여 형질전환을 실행해 보았지만, 효율성이 떨어지며 형질전환이 잘 이루어 지지 않았음을 확인하였다.



<그림 6. Glass bead를 이용한 형질전환. 출처:www.genoprice.com>

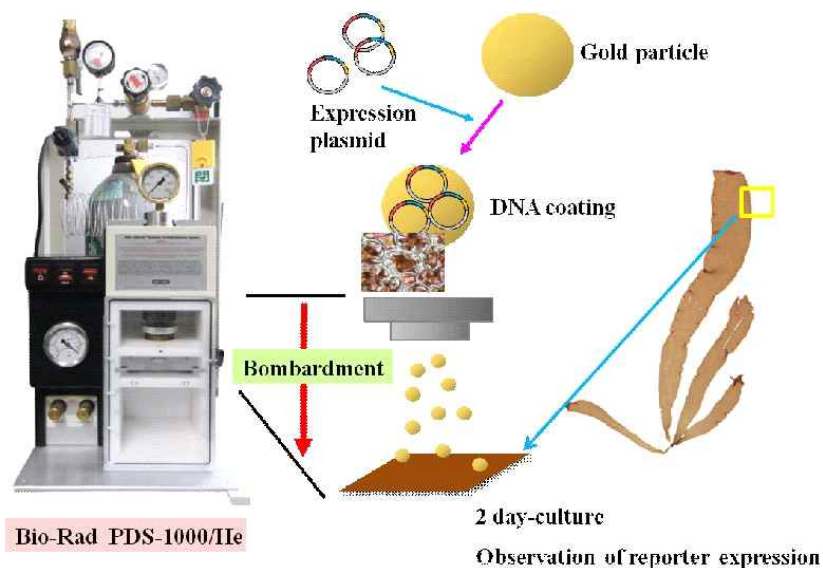


<그림 7. Glass bead를 사용한 형질전환 결과>

| Date | OD ₆₈₆ | Cell number | Concentration | Amount of DNA | Vortexing | Results |
|--------|-------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------|-----------|---------|
| 151214 | 0.6 | 5*10 ⁶ cells/ml | 5*10 ⁸ cells/ml | 5 ug linearized | 30 sec | NO |
| 151224 | 0.4 | 3*10 ⁶ cells/ml | 3*10 ⁹ cells/ml | 5 ug linearized | 15 sec | NO |

<그림 8. Glass bead를 사용한 형질전환 Data>

두 번째 방법으로는 plant transformation 방법인 gene gun을 이용한 gold particles bombardment을 사용하여 형질전환을 하였다. 이 기술은 미세입자 가속 또는 생체탄도학이라고도 부르지만, gene gun이라고 부르는 기계의 공식명칭은 microparticle bombardment이다. 미세입자로 plasmid를 감싸 형질전환 하는 방법이다. 미세 입자는 크기에 비해 아주 무겁기 때문에 세포를 잘 뚫고 들어간다. 미세 입자를 고속으로 세포 방향으로 날려 보내면서 주변을 강철 그물로 감싸서, 입자가 세포로 더 많이 날아가도록 한다. 세포 속으로 들어간 미세입자에 코팅된 DNA가 방출되어 식물의 유전체에 들어갈 수 있다. 우리는 이 미세입자를 gold로 사용하여 형질전환을 하였다. 그러나 아래 표와 같이 NC64 rbcS2 promoter-Sh ble(2 intron)이 cloning 된 pKA640의 경우는 형질 전환이 이루어 지지 않았다.



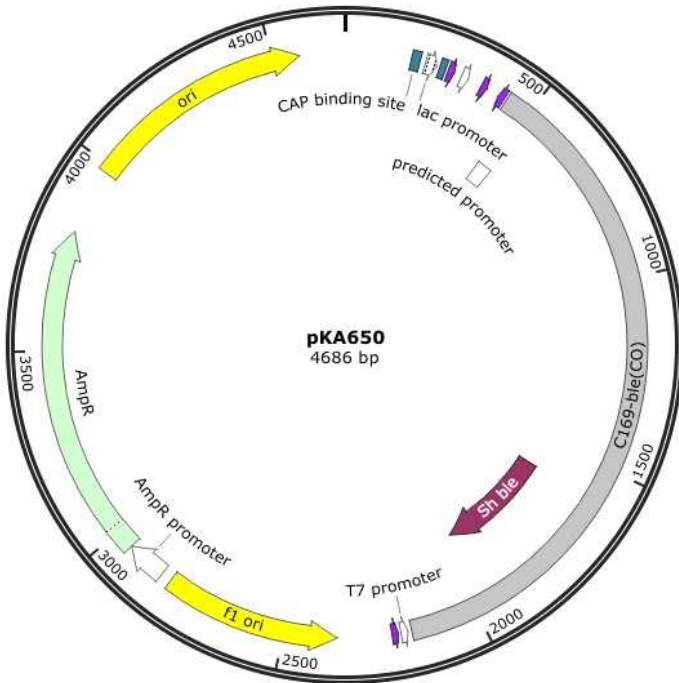
<그림 9. Gene gun을 이용한 gold particle bombardment. 출처:www.intechopen.com>

| OD ₆₈₆ | Cell number | Concentration | Amount of DNA | vacuum | Target distance | gold | He pressure | results |
|-------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------|--------|-----------------|-------------|-------------|---------|
| 0.5 (log) | 4x10 ⁶ cells/ml | 4x10 ⁹ cells/ml | 5 ug non-linearized | 29 Hg | 6 cm | 0.6 um gold | 1100 psi | No |

<그림 10. Gene gun을 이용한 gold particle bombardment Data >

마. pKA650 클로닝

이번에는 또 다른 계통학적으로 비슷한 종인 *Coccomyxa* C-169 (이하 C-169, 이전에는 *Chlorella vulgaris*로 알려져 있었으나 재명명됨)의 genome sequence를 이용하였다. C-169 strain의 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCo) small subunit 2 (rbcS2) gene의 promoter 및 terminator 부위를 예측하여 sequence를 얻어내고 Sh ble gene과 fusion 하여 합성하였다(Cosmogenetech., Korea). 이번에는 *Streptomyces verticillus* bleomycin (Sh ble) gene의 중간에 어떤 intron도 삽입하지 않았다. 합성된 DNA fragment는 *Swa*I/*Kpn*I 제한 효소 처리하여 pSP124S vector에 cloning 하였고 이를 pKA650으로 명명하였다.



<그림 11. *C. vulgaris*에 도입할 marker 유전자 (C-169 strain에서 유래한 프로모터 및 터미네이터 포함(회색부분, C169-ble(CO))가 cloning 된 vector map>

사. pKA650 plasmid를 *C. vulgaris* WT에 형질전환

C-169 rbcS2 promoter-Sh ble(no intron)이 cloning 된 pKA650을 가지고 1) glass bead 방법과 2) gold particle bombardment 방법 모두를 테스트 하였다.

Glass bead 방법을 이용한 형질전환.

| Date | OD ₆₈₆ | Cell number | Concentration | Amount of DNA | Vortexing | Results |
|--------|-------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------|-----------|---------|
| 160810 | 0.1 | 1*10 ⁶ cells/ml | 1*10 ⁸ cells/ml | 10 ug linearized | 15 sec | NO |
| 160811 | 0.3 | 1*10 ⁶ cells/ml | 1*10 ⁸ cells/ml | 10 ug linearized | 10 sec | NO |
| 160816 | 0.3 | 1*10 ⁷ cells/ml | 1*10 ⁹ cells/ml | 10 ug non-linearized | 20 sec | NO |

<그림 12. Glass bead를 사용한 형질전환 Data>

pKA640을 이용한 것과 같이 pKA650을 Glass bead를 사용하여 형질전환을 실행해 보았지만, 효율성이 떨어지며 형질전환이 잘 이루어 지지 않았음을 확인하였다.

아. Gold particle bombardment를 이용한 형질전환

pKA650을 가지고 plant transformation 방법인 gene gun을 이용한 gold particles bombardment를 사용하여 형질전환을 하였다.

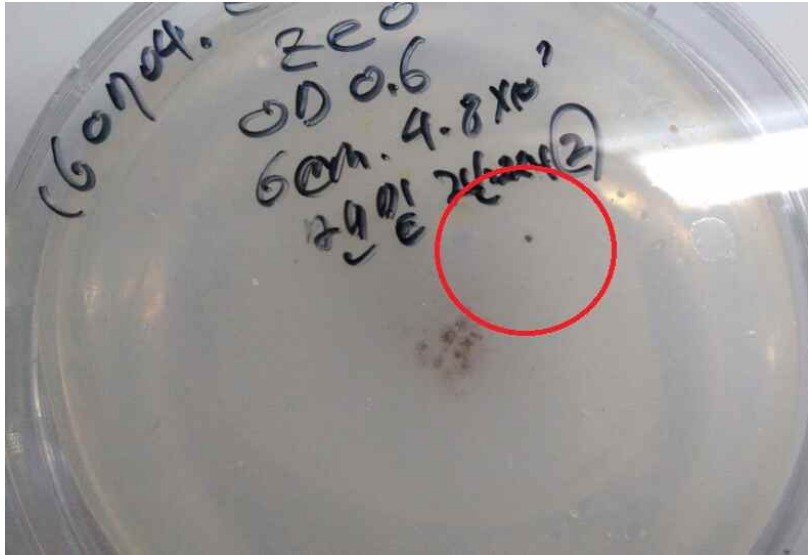
| Date | OD ₆₈₆ | Cell Density | Vacuum (inches Hg) | Target Distance | Helium Pressure | Result s |
|--------|-------------------|---|--------------------------|--------------------|--------------------|-------------|
| 160603 | 0.5 | 4.0*10 ⁷ per 60mm Diameter | 29 | 3,6,9 | 1300 | NO |
| 160607 | 0.7 | 6.0*10 ⁷ per 50mm Diameter | 29 | 3 | 1300 | NO |
| 160607 | 0.7 | 6.0*10 ⁸ per 50mm Diameter | 29 | 6 | 1300 | NO |
| 160607 | 0.7 | 6.0*10 ⁹ per 50mm Diameter | 29 | 9 | 1300 | NO |
| 160613 | 0.074 | 3.6*10 ⁶ per 50mm Diameter | 29 | 3,6,9 | 1300 | NO |
| 160614 | 0.1 | 3.6*10 ⁶ per 50mm Diameter | 29 | 3.6.9 | 1300 | NO |
| 160615 | 0.2 | 3.5*10 ⁶ per 50mm Diameter | 29 | 3.6.9 | 1300 | NO |
| 160616 | 0.3 | 4.0*10 ⁶ per 50mm Diameter | 29 | 3.6.9 | 1300 | NO |
| 160617 | 0.6 | 3.6*10 ⁶ per 50mm Diameter | 29 | 3.6.9 | 1300 | NO |
| 160629 | 0.1 | 4.8*10 ⁷ per 60mm Diameter | 29 | 3.6.9 | 1300 | NO |
| 160630 | 0.2 | 4.8*10 ⁷ per 60mm Diameter | 29 | 3.6.9 | 1300 | NO |
| 160701 | 0.3 | 4.8*10 ⁷ per 60mm Diameter | 29 | 3.6.9 | 1300 | NO |
| 160704 | 0.6 | 4.8*10 ⁷ per 60mm Diameter | 29 | 3.6.9 | 1300 | YES |
| 160711 | 0.1 | 1.0*10 ⁷ per 47mm Membrane | 29 | 3 | 1300 | NO |
| 160712 | 0.2 | 1.0*10 ⁷ per | 29 | 3 | 1300 | NO |

| 47mm Membrane 1.0*10 ⁷ per | | | | | | |
|---------------------------------------|------|------|----|---|------|----|
| 160713 | 0.3 | 47mm | 29 | 3 | 1300 | NO |
| 47mm Membrane 1.0*10 ⁷ per | | | | | | |
| 160714 | 0.6 | 47mm | 29 | 3 | 1300 | NO |
| 47mm Membrane 2.0*10 ⁷ per | | | | | | |
| 160815 | 0.07 | 47mm | 29 | 3 | 1300 | - |
| 47mm Membrane 2.0*10 ⁷ per | | | | | | |
| 160816 | 0.1 | 47mm | 29 | 3 | 1300 | - |
| 47mm Membrane 2.0*10 ⁷ per | | | | | | |
| 160818 | 0.3 | 47mm | 29 | 3 | 1300 | - |
| Membrane | | | | | | |

<그림 13. Gene gun을 이용한 gold particle bombardment Data >

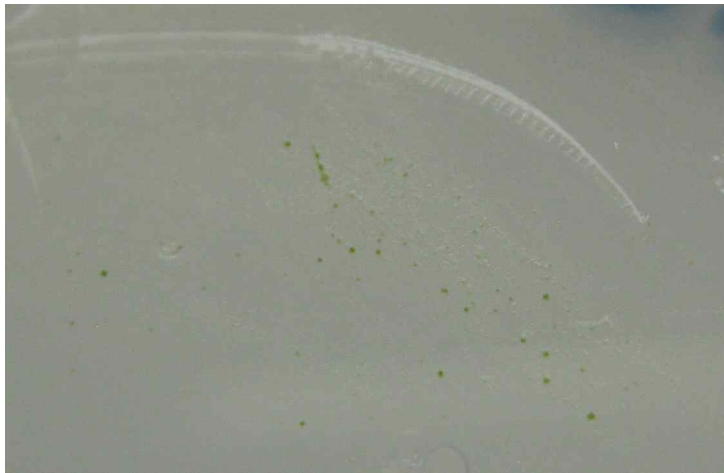
그림 13과 같이 gold particle bombardment를 활용하여 형질 전환을 시키기 위하여 여러 가지 조건을 바꾸어 주며 실험을 진행하였다. 우선 Vacuum과 Helium Pressure의 경우는 참고 문헌 값으로 고정하여, Cell stage와 농도, Gold particle의 분사 범위, Target Distance, Cell의 실험 환경을 고려하여 실험을 진행하였다.

조건을 확립하는 과정에서 Gene gun의 Gold particle의 분사 범위와 압력을 고려하여 47mm, 50mm, 60mm으로 실험을 하였고, Target Distance의 거리를 변화에 따라 진행하여 적정위치로 Target Distance 3으로 실험을 진행하였다. 또한 Cell stage가 많이 진행이 되면 미세조류의 막이 두꺼워지게 되어 실험이 어렵기 때문에 초기 stage부터 OD값의 변화에 따라 실험을 진행하였다. 또한 Cell의 밀도는 diameter에 따라 조절하여 실험을 진행하였다.



<그림 14. Gene gun을 이용한 gold particle bombardment Data >

Zeocin이 들어간 배지에서 선별을 하여 형질전환 된 *C. vulgaris* 가 그림 12에서 붉은 원 안 colony가 나타났음을 확인하였다. 이를 통해 Gene gun을 이용한 gold particle bombardment의 *C. vulgaris* 형질전환 조건으로써 OD 0.6, 60mm diameter, Target Distance 3을 확립하였다.



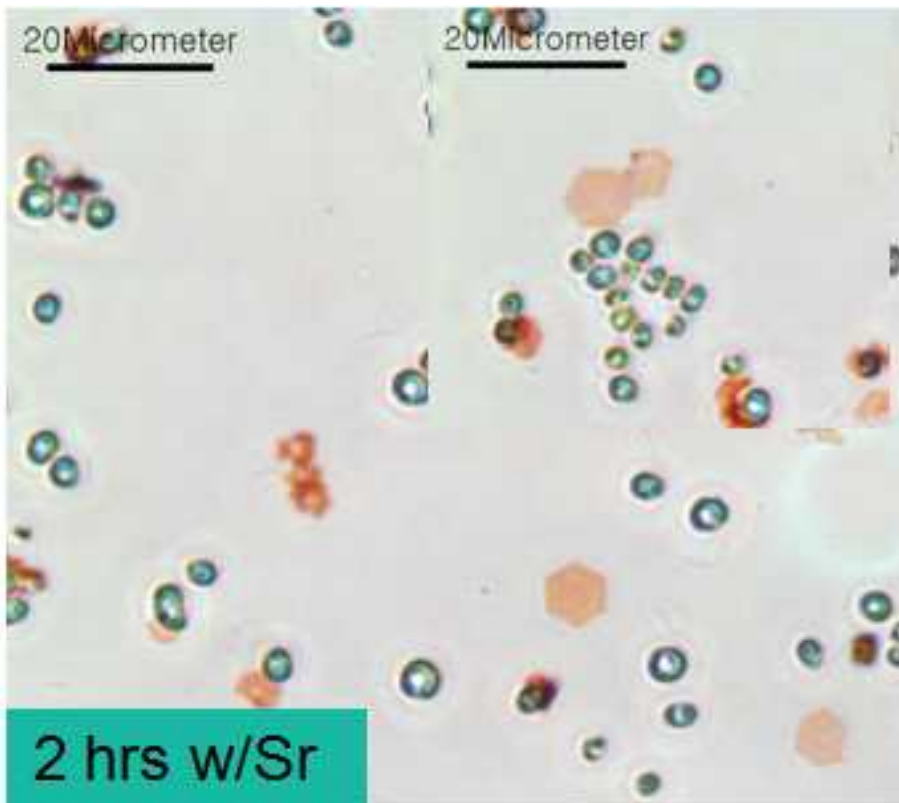
<그림 15. insertional mutagenesis을 통하여 형성된 콜로니>

형질전환으로 인해 얻어낸 *C. vulgaris*을 Zeocin을 통한 선택적 선별을 하였고, 그 결과 그림 15와 같은 콜로니를 형성함을 확인하였다.

자. 유전영동(dielectrophoresis)를 이용한 미세조류의 스크리닝

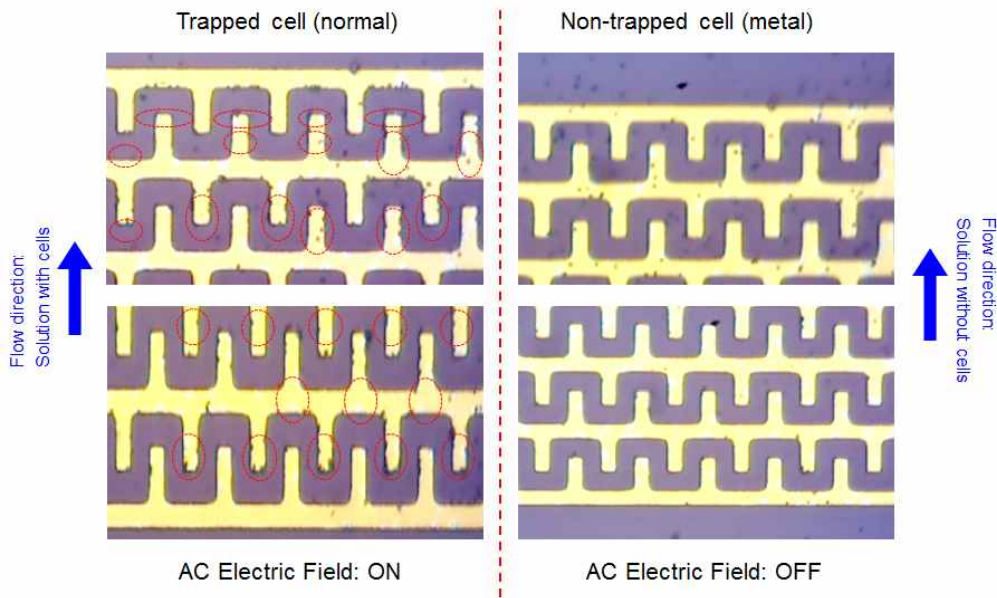
기존에 본 연구진의 연구에 따르면, 유전영동을 이용하면 특성이 다른 미세조류의 스크리닝이 고효율로 가능하다는 것을 밝힌 바 있다. 따라서 본 연구에서 얻어진 여러 형질전환체가 실제로 광생물화 관련 유전자를 밝히는 데 유용한 형질전환체인지 고효율로 스크리닝 할 수 있다. 그에 앞서서, wild-type *C. vulgaris*를 유전영동을 실시하여 특성이 서로 다른 개체를 분리하고, 이들 간에 얼마나 생광물 형성 능력에 차이가 있는지 알아보았다. 그 결과, 특성이 서로 다른 개체 무리 중 한 무리에서 생광물 형성 능력이 차이가 있는 것을 알 수 있었다(그림 13. red line). 따라서 개체 간에 natural한 variation이 어느 정도 존재함을 알 수 있었으며, 이는 아마도 개체 간의 생광물 형성 능력 차이에서 기인한 것이라고 사료된다. 본 연구를 바탕으로, 형질 전환 기술을 바탕으로 많은 형질 전환체를 얻어 낸 후 유용한 형질전환체를 스크리닝 할 예정이다.

(1) 비방사성 strontium과 반응시킨 *Chlorella vulgaris*를 이용하여 제작된 디바이스로 strontium 흡수율이 높은 미세조류를 분리하고 이를 확인함. *Chlorella vulgaris*를 비방사성 Strontium과 반응시켜 크리스탈이 생성됨을 확인한 후 이를 미세유체기반 균주 선별에 이용하였음.



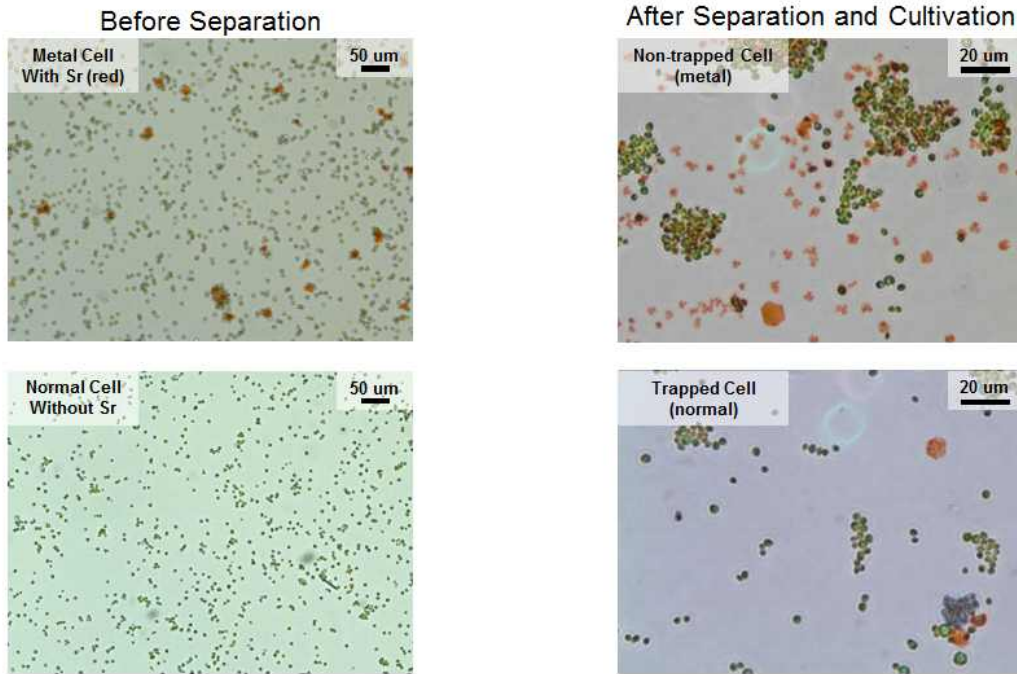
<그림 16. Strontium과 2시간 반응시킨 *Chlorella vulgaris*에서의 크리스탈 형성>

(2) 1.2 MHz, peak-to-peak 10V의 AC전압을 인가할 경우 일반 미세조류는 positive DEP force의 영향으로 미세전극에 붙어있게 되고, strontium을 많이 포함한 미세조류는 negative DEP의 영향으로 미세전극에서 멀어지게 됨. 여기에 약한 미소유체를 흘려주게 되면 일차적으로 부유하고 있는 strontium 함유량이 높은 미세조류가 수거되고, 이에 대한 수거 종료 후에 AC 전압을 끄고 일반 미세조류를 다른 채널로 수거하였음.



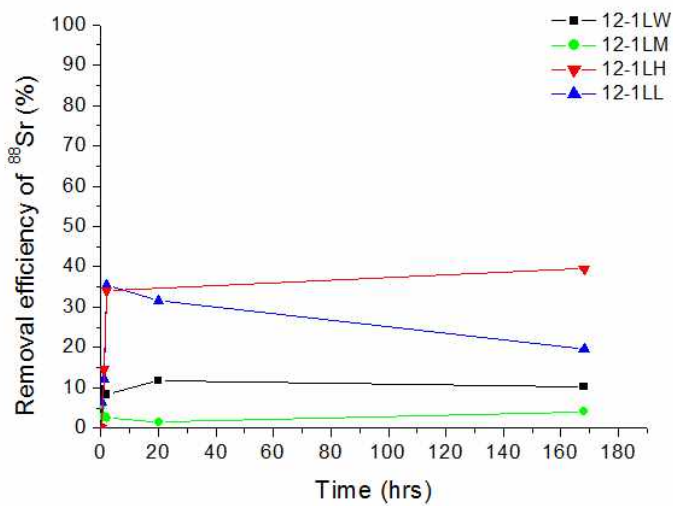
<그림 17. 유전영동을 이용한 strontium 함유량이 높은 미세조류의 선별>

(3) Strontium 생광물화가 높은 개체와 낮은 개체를 선별하고, 이를 각각 따로 배양한 후에, 0.2% sodium rhodizonate를 이용하여 성공적으로 Strontium 흡수율이 높은 개체 분리할 수 있음을 확인함.



Analytical reagent: 0.2% sodium rhodizionate

<그림 18. 제작된 미세유체시스템을 활용하여 Strontium 함유량이 높은 미세조류를 효율적으로 선별 가능함을 확인함>

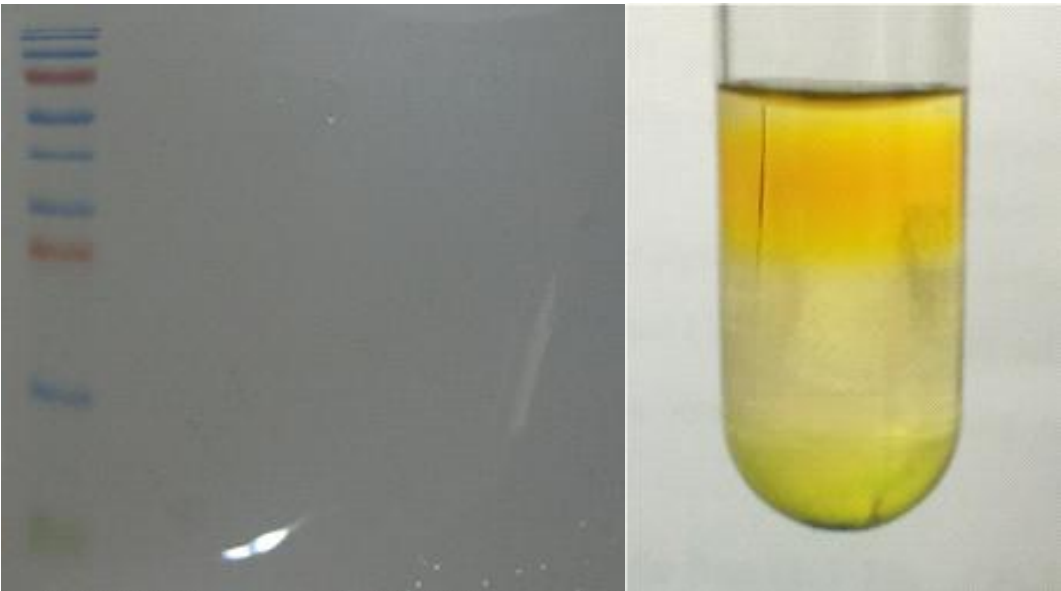


<그림 19. 유전영동 방법을 통해 생광물 형성 능력 차이를 보이는 *C. vulgaris*>

2. 생광물화 관련 단백질/펩타이드 규명

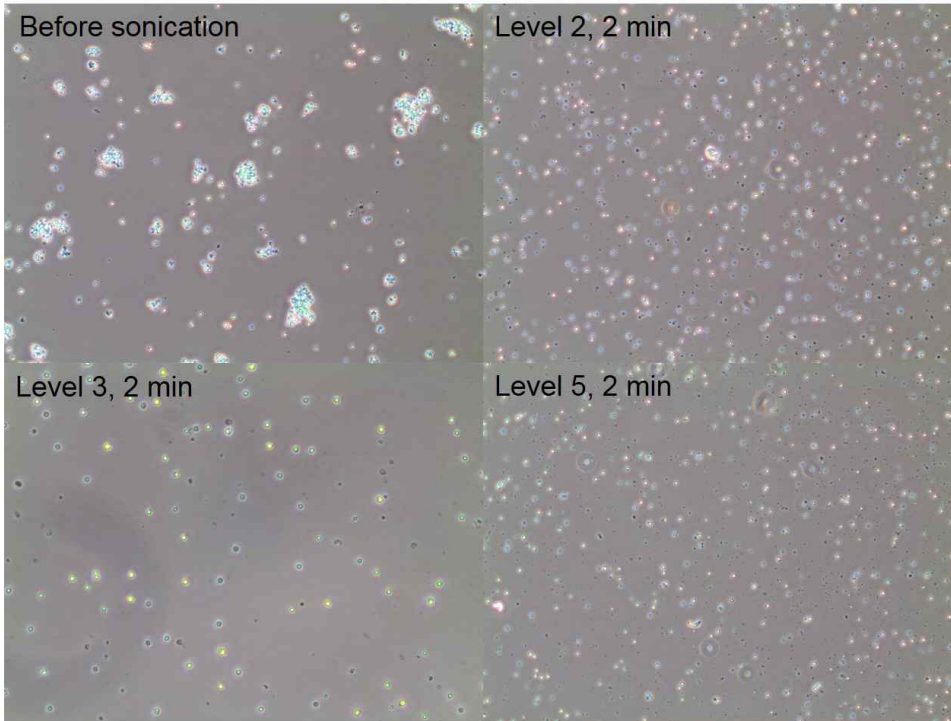
*C. vulgaris*를 통해 생성되는 생광물화에 관여하는 단백질/펩타이드를 규명하기 위하여, 미지의 물질을 분리하고자 하였다. 먼저, *C. vulgaris*에서 미지의 단백질이 분비되어 생광물화에 관여하거나 혹은 세포벽의 특정 단백질 또는 작용기가 생광물화에 관여할 것이라는 가정을 세웠다.

먼저, 미지의 단백질이 분비되어 작용하는 것이라면 생광물이 형성될 당시 supernatant에 많은 양의 단백질이 존재할 것이라고 가정하고 *C. vulgaris*와 $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$ 를 반응시키고 supernatant를 농축하여 SDS-PAGE로 확인을 해보았으나 아무것도 관찰할 수 없었다(아래 그림 왼쪽). 그 다음으로, 미지의 단백질-생광물 complex를 분리하기 위하여, *C. vulgaris*와 $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$ 를 반응시키고 현미경 상에 보이도록 0.4% sodium rhodizonate dye와 섞은 후 10-40% sucrose gradient에 loading하였다. 그 결과, 아래 그림과 같이 여러 개의 층이 분리되었는데, 각 fraction을 SDS-PAGE로 확인해보았으나 어떠한 단백질도 검출할 수 없었고, 또한 sucrose gradient loading 전에 현미경 상으로 생광물을 관찰할 수 있었던 것과는 다르게 현미경 상으로 어떠한 생광물도 관찰할 수 없었다. 아마도 높은 농도의 sucrose 때문에 생광물이 다시 녹은 것으로 사료되며 사진 상의 빨간 층은 sodium rhodizonate dye에 불과한 것으로 보인다.



<그림 20. 왼쪽: *C. vulgaris*와 $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$ 를 반응시킨 후 supernatant를 SDS-PAGE에 loading한 결과, 오른쪽: *C. vulgaris*와 $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$ 를 반응시킨 후 10~40% sucrose gradient에 loading한 결과>

다음으로, 세포벽의 특정 단백질 또는 작용기가 생광물화에 관여할 것이라는 가정 하에 *C. vulgaris*를 homogenize 방법으로 파쇄한 후 membrane fraction을 얻어 $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$ 와 반응시켜서 생광물이 형성되는지 알아보았다. 그 결과 membrane fraction은 성공적으로 얻어졌다. 그러나 membrane fraction에서 생광물이 형성되는지 염색법으로 확인하였더니 현미경상에서 관찰할 수 없었다.



<그림 21. Sonication 전과 후(level 2~5에서 2분간 파쇄)의 현미경 사진(x200). 염색법으로 확인하였으나, 생광물을 확인할 수 없었음>

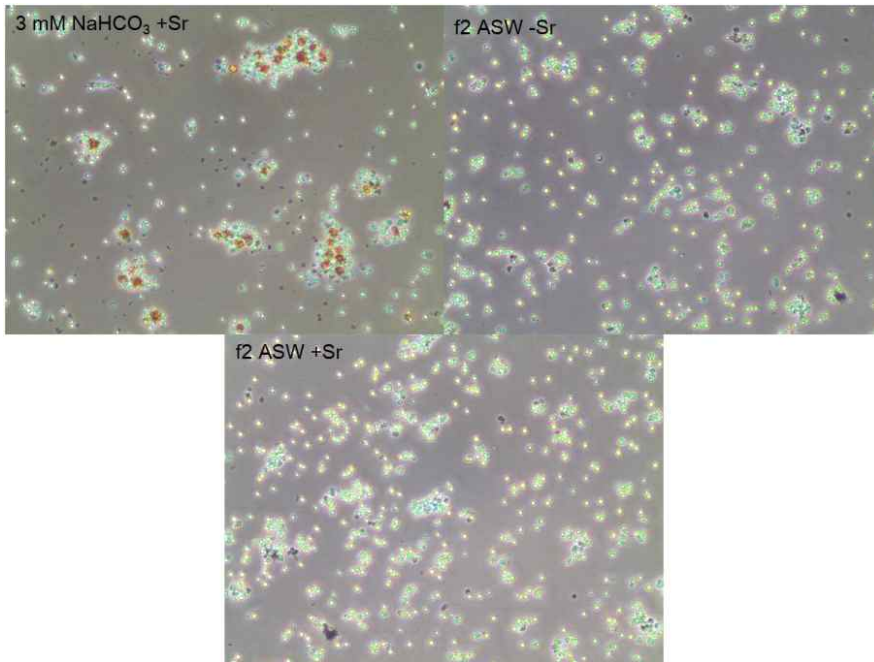
제 2절. 생광물화에 영향을 주는 이온 조사 (해양조건에서의 Cs, Sr의 탄산염 형성 연구)

1. 해수조건에서의 *C. vulgaris*에 의한 생광물화 가능 여부의 염색법으로 조사

장기적으로 해수에서 Sr을 얻어내기 위해서는 *C. vulgaris*에 의한 생광물화가 해수 조건에서도 효율적으로 이루어져야 한다. 기존 실험을 통해서는 3 mM NaHCO_3 용액에서 생광물 형성이 잘 되는 것을 확인하였다면, 이번에는 해수 조건에서도 생광물이 잘 형성되는지 확인하였다.

그림에서 알 수 있듯이 3 mM NaHCO₃ 용액에서는 Sr 생광물이 잘 형성이 된 반면, f2/ASW media (f2/artificial sea water media)에서는 Sr을 처리하지 않은 것과 처리한 것 사이에 현미경 상으로 차이가 없는 것으로 보아 Sr 생광물이 잘 형성되지 않거나 단순히 detection 되지 않아 현미경 상에서 관찰할 수 없음을 알 수 있다.

결론적으로, 해수조건에서의 *C. vulgaris*에 의한 생광물화는 염색 방법으로는 잘 확인할 수 없었다.



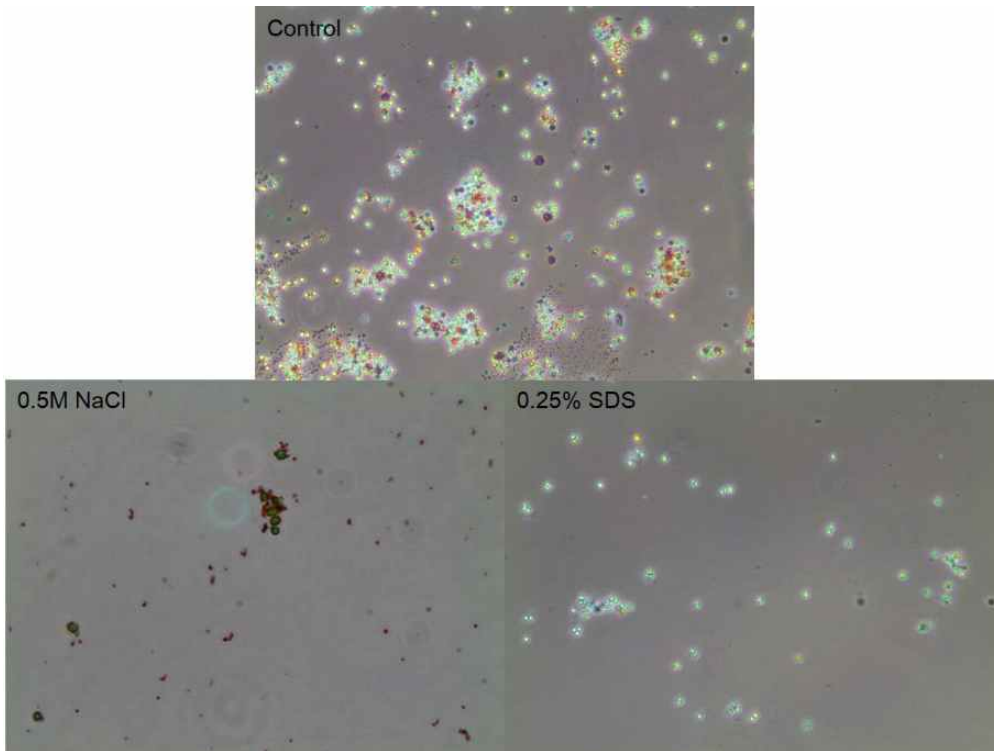
<그림 22. 해수 조건에서 *C. vulgaris*에 의한 생광물화 형성 여부(x200). 3 mM NaHCO₃ 용액에서는 Sr 생광물이 잘 형성이 된 반면(왼쪽 위), f2/ASW media (f2/artificial sea water media)에서는 Sr을 처리하지 않은 것(오른쪽 위)과 처리한 것(아래) 사이에 현미경 상으로 차이가 없음.>

- 1) 왼쪽 위: 3 mM NaHCO₃ 용액에 resuspension 한 *C. vulgaris*에 500 ppm (=2.36 mM Sr(NO₃)₂)을 첨가한 후 0.4% sodium rhidizionate 용액을 1:1 (v/v)로 처리함.
- 2) 오른쪽 위: 해수 조건을 모사한 f2/ASW 배지에 resuspension 한 *C. vulgaris*에 Sr을 처리하지 않고 0.4% sodium rhidizionate 용액을 1:1 (v/v)로 처리함.
- 3) 아래: 해수 조건을 모사한 f2/ASW 배지에 resuspension 한 *C. vulgaris*에 500 ppm (=2.36 mM Sr(NO₃)₂)을 첨가한 후 0.4% sodium rhidizionate 용액을 1:1 (v/v)로 처리함.

2. *C. vulgaris*에 의한 생광물화에 영향을 주는 이온 조사

그 다음으로는 생광물화에 영향을 주는 요인(이온 등)이 무엇인지 조사하였다. 먼저 3 mM NaHCO₃ 용액에서 *C. vulgaris*에 의한 생광물화가 잘 형성되는지 확인한 후(아래 그림의 Control) 최종농도 0.5 M NaCl 용액을 추가로 첨가한 결과, 이미 형성된 생광물이 용해되었고(왼쪽 아래), 0.25% SDS를 추가로 첨가하면 완전히 용해되었다(오른쪽 아래).

결론적으로, 생광물화에 영향을 주는 이온으로서는 Na⁺, Cl⁻, 또한 강한 음이온성 물질 등이 있는 것을 확인하였다.

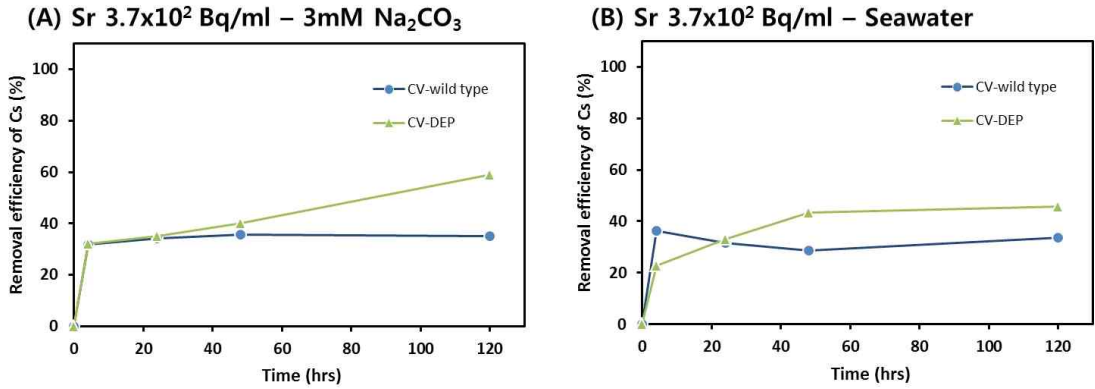


<그림 23. *C. vulgaris*에 의한 생광물화 형성에 영향을 주는 요인(x200). 3 mM NaHCO₃ 용액에서는 Sr 생광물이 잘 형성이 된 반면(위), 0.5 M NaCl을 추가하면 생광물이 다소 용해되고(왼쪽 아래), 0.25% SDS를 처리하면 완전히 용해됨(오른쪽 아래).>

3. 해수조건에서 *C. vulgaris*에 의한 방사성 동위원소(⁹⁰Sr) 제거 가능 확인

현미경으로 생광물화 결정을 관찰할 수 없었다면, 이번에는 간접적인 방법으로 해수에서 생광물 형성을 알아보았다. 이번에는 방사성 동위원소 Sr을 이용하여 그 제거율을 측정함으로써 알아보았다. 담수환경과 해수환경을 모사하였는데, 담수조건은 3 mM NaHCO₃ 용액을 사용하였고 해수조건은 실제 동해안에서 채취한 해수를 사용하였다.

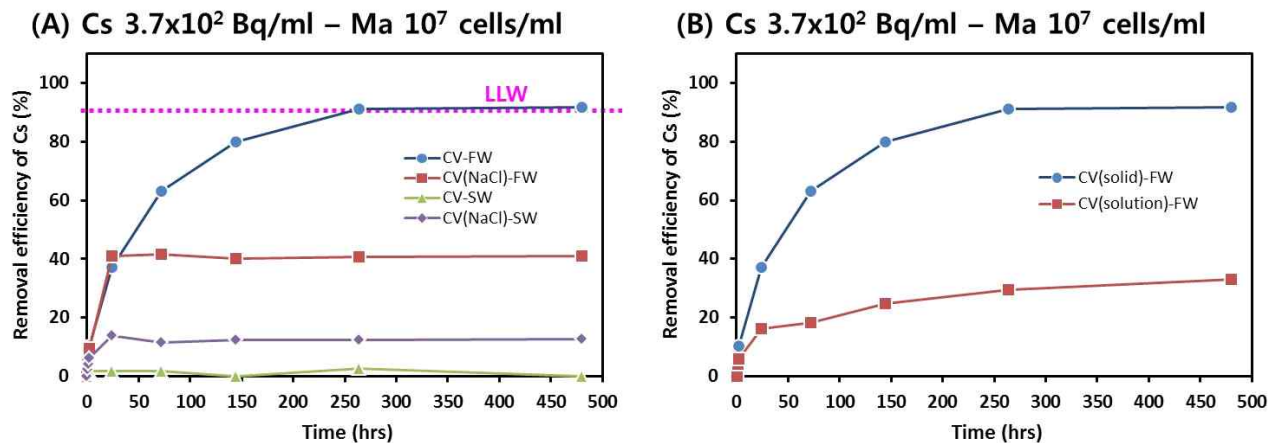
아래 그림에서 볼 수 있듯이, 해수에서도 중준위(3.7×10^2 Bq/ml) 방사성 Sr을 제거하는 것을 볼 수 있다((A), (B) blue line). 또한, DEP 기반 분리를 한 경우에 그렇지 않은 세포보다 담수/해수 모두에서 제거율이 더 높게 나타나는 것을 알 수 있다((A), (B) red line). 이 결과로 미루어 보아, *C. vulgaris*를 해수조건에 적응시킬 경우 Sr 제거가 가능함을 확인하였다.



<그림 24. 중준위(3.7×10^2 Bq/ml) 방사성 Sr 오염 담수/해수환경 내 *C. vulgaris*의 Sr 제거효율>

4. 해수조건에서 *C. vulgaris*에 의한 방사성 동위원소(^{137}Cs) 제거 가능 확인

마찬가지로 해수조건에서 *C. vulgaris*에 의한 방사성 동위원소 ^{137}Cs 가 얼마나 제거되는지 확인하였다. 담수조건 (CV-FW, blue line)에 비하여 해수조건(CV-SW, green line)에서 제거율이 현저히 떨어졌으며, 해수에 적응시키기 위해 해수조건에서 여러번 계대 배양한 개체 (CV(NaCl))를 해수조건에서 실험(CV(NaCl)-SW, purple line)하였을 때 다소 제거율이 높아졌다. 이 결과로 미루어 보아, *C. vulgaris*를 해수조건에 적응시킬 경우 Cs 제거가 가능함을 확인하였다.



<그림 25. 중준위(3.7×10^2 Bq/ml) 방사성 Cs 오염 담수/해수환경 내 (A) NaCl 유/무 배양 *C. vulgaris* (B) 액체/고체배지 배양 *C. vulgaris*의 Cs 제거효율>

<표1 각 균주의 흡착분배계수>

| 중준위 ¹³⁷ Cs (3.7x10 ² Bq/ml) | CV | CV(NaCl) | CV(solution) |
|--|-----|----------|--------------|
| K _d | 360 | 160 | 120 |

$$K_d = \frac{V}{m} \frac{C_i - C_f}{C_f}$$

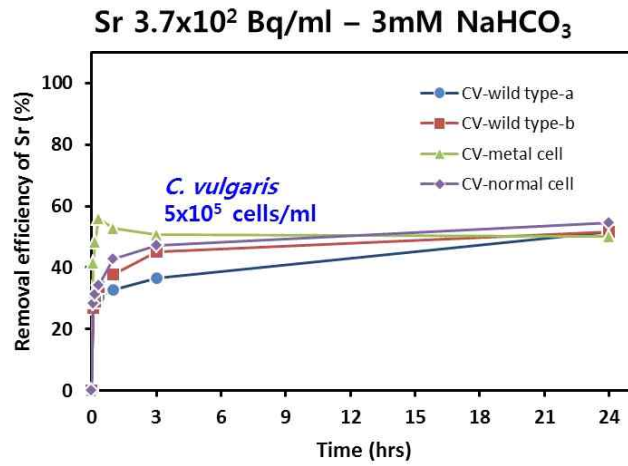
K_d(mL/g)는 분배계수(distribution coefficient), C_i 및 C_f는 각각 오염수 중의 흡착질의 초기 농도(Bq/mL) 및 흡착평형 후 오염수 중의 흡착질 평형 농도(Bq/mL), V는 오염수의 부피(mL), m은 흡착제의 양(g, wet weight)을 나타낸다. 20일 경과 시점이 흡착의 평형상태에 도달하기에 충분하다고 사료되어 이를 토대로 계산하였다. 초기 농도는 중준위(3.7x10² Bq/ml) 조건으로 계산하였으며, 세포 농도가 10⁷ cells/ml인 *C. vulgaris* (CV) 배양액 100 ml의 wet weight은 실험적으로 약 2.5 g 이었다. 해수조건에서 고염에 적응된 CV를 이용한 제거율이 약 1/3 정도 떨어진 것을 알 수 있다.

제 3절. 희소금속 생광물화 기능이 보다 향상된 개량 미세조류체 확보

1. 향상된 기능의 미세조류체 분리 가능 확인 (DEP기반 스크리닝)

C. vulgaris wild type의 Sr 제거효율과 유전영동으로 선별한 후의 Sr의 제거효율을 서로 비교하였다. 우선 Sr과 반응시킨 *C. vulgaris*로부터 Sr과 관계된 미세조류만을 유전영동을 통해 분리하여 분리된 세포(metal cell)를 다시 대량 배양하였으며, 분리되고 남은 나머지 세포(normal cell)도 분리하여 대량배양 하였다. 이 모두는 서로 동일한 세포수가 되도록 농축 후 Sr 제거실험에 사용하였다. *C. vulgaris*의 wild type은 배양 직후(wild type-a)와 유전영동 주입 직전(wild type-b)의 두 종류를 사용하였다. 세포수는 5×10⁵ cells/ml로 하였고 24시간 동안 Sr의 제거 효율을 모니터링 하였다.

담수환경을 모사한 Sr 3.7×10² Bq/ml의 모의폐액에서 *C. vulgaris* wild type과 normal cell의 경우 24시간까지 지속적으로 Sr의 제거효율이 증가한 반면, metal cell의 경우는 상대적으로 Sr 흡착속도가 현저히 빨라 1시간 이내에 Sr 제거효율이 최대치에 도달하였다.



<그림 26. 유전영동(DEP) 분리 후 *C. vulgaris* (CV-metal cell, green line)의 방사성 Sr 초기 제거효율이 다른 것에 비해 현저히 높음>

제 4장 과제목표 달성도 및 대외기여도

제 1절. 목표달성도

| 구 분 | % | 성취도 판단 | | | 특기사항 (우수성 또는 부진사유 등) |
|--------|-----|--------|----|----|--|
| | | 부진 | 정상 | 우수 | |
| 목표 달성도 | 75% | √ | | | <ul style="list-style-type: none"> - 해양조건에서 <i>C. vulgaris</i>에 의해 생광물이 형성됨을 간접적 방법으로 확인(방사성 원소 ^{90}Sr의 제거율 측정을 통하여) - 해양조건에서 <i>C. vulgaris</i>에 의한 Sr 탄산염 형성이 방해되는 요인을 확인 - 생광물화 기능이 우수한 형질전환체를 고효율로 스크리닝 하는 기술(DEP기반 스크리닝)을 확인 - 하지만, <i>C. vulgaris</i>에 유전자를 도입하는 방법 정립에 많은 시간이 소요됨. - 앞으로, 위의 방법을 이용하여 stable한 돌연변이 미세조류체를 유도한 후, 고효율 스크리닝을 통하여 관련 유전자를 규명할 예정 |

1. 정성적 성과

| 목표 | 달성내용 | 달성도 | 증빙자료 설명/제출 (필요시) |
|-------------------------------------|---|-------|------------------------|
| ○ 해양 미세조류에서의 희소금속 탄산염의 생광물화 기전 규명 | ○ 돌연변이를 이용한 생광물화 관여 유전자 발굴 달성하지 못함. ○ 생광물화에 관여하는 여러 가지 생체물질 (단백질/펩타이드) 규명 - 외부에 생긴 생광물에는 단백질/펩타이드가 없었음. | 75 % | |
| ○ 해양 조건에서의 Cs, Sr의 탄산염 형성 연구 | ○ 해양조건에서 <i>C. vulgaris</i> 에 의한 Sr 탄산염의 형성이 방해되는 요인을 확인 -영향을 주는 이온으로는 Na ⁺ , Cl ⁻ , 강한 음이온성 물질 등 ○ 해수조건에서 <i>C. vulgaris</i> 에 의해 방사성 동위원소(⁹⁰ Sr)가 제거됨(탄산염 형성)을 확인 -하지만 민물조건에 비하여 1/3 정도 제거능력이 감소 | 100 % | |
| ○ 희소금속 생광물화 기능이 보다 향상된 개량된 미세조류체 확보 | ○ 향상된 기능의 미세조류체 분리 가능 확인 (DEP 기반 스크리닝) | 85 % | |

2. 정량적 성과

| 구분 | 목표(건) | 달성 실적(건) | 주저자 실적 | 달성도 | 증빙자료(제출)* | 비고 |
|-------|-------|----------|--------|-----|-----------|-------------------------|
| 국외 논문 | SCI | 2 | 0 | | | |
| | SCIE | | | | % | |
| 국내 논문 | SCI | | | | % | |
| | SCIE | 2 | 0 | | % | |
| 특허출원 | 2 | 0 | | | | 클로렐라 형질전환 벡터 특허 출원 준비 중 |
| 기타 | 1 | 0 | | | | |

제 2절. 목표달성을 위한 과제수행 방법(효율성, 우수성 중심으로 기술)

| 목표 | 과제수행방법 (이론적·실험적 접근방법) | 구체적인 내용* |
|-------------------------------------|---|---|
| ○ 해양 미세조류에서의 희소금속 탄산염의 생광물화 기전 규명 | plasmid transformation | <ul style="list-style-type: none"> - 생광물화 관련 유전자 규명을 위하여 selection marker 유전자를 포함한 plasmid transformation을 수행함. - 본 연구진이 디자인한 독창적인 plasmid 사용 |
| ○ 해양 조건에서의 Cs, Sr의 탄산염 형성 연구 | 세포 파쇄, fractionation 및 sucrose gradient | <ul style="list-style-type: none"> - 생광물화 관련 단백질 또는 관련물질 규명을 위하여 반응액을 분리하여 조사 - 세포를 파쇄하여 fractionation 후 각 fraction을 분리하여 조사 - 본 연구진이 기존에 보유하고 있던 다년간의 막단백질 연구 경험으로 효율적 fractionation 방법 개발 |
| ○ 희소금속 생광물화 기능이 보다 향상된 개량된 미세조류체 확보 | DEP기반 고효율 세포분리 시스템 | <ul style="list-style-type: none"> - 고효율 고감도 기술인 DEP기반기술로 분리된 세포(metal cell)가 기존 세포보다 “담수/해수조건 모두에서” 생광물화에 효율적임을 확인 - 미세조류에서 탄산염 형성 방해요인으로서 Na^+, Cl^-, 강한 음이온성 물질 등을 처음으로 확인 |

제 3절. 결과의 우수성 및 관련분야 기술발전에의 기여도

- 해양조건에서 *C. vulgaris*에 의한 Sr 탄산염의 형성이 방해되는 요인을 염색법으로 확인하였음.
 - Sodium Rhodizonate 염색법으로 탄산염 크리스탈 detection 가능함을 확인
 - 영향을 주는 이온으로는 Na⁺, Cl⁻, 강한 음이온성 물질 등
- 해수조건에서 *C. vulgaris*에 의해 방사성 동위원소(⁹⁰Sr)가 제거됨(탄산염 형성)을 확인하였음.
 - 고효율 고감도 기술인 DEP기반기술로 분리된 세포(metal cell)가 기존 세포보다 “담수/해수조건 모두에서” 생광물화에 효율적임을 확인
 - 돌연변이 제작 (plasmid transformation 및 random mutagenesis) 없이도 자연적으로 형성된 pool 안에서 보다 효율적인 개체를 DEP 방법으로 스크리닝 가능하게 됨
- *C. vulgaris*에 랜덤하게 유전자를 도입하기 위한 벡터를 제작하였음.
 - 본 연구진이 plasmid를 독창적으로 디자인함.
 - *C. vulgaris*의 rbcS2 유전자의 promoter 부분, marker 유전자를 동시에 포함한 새로운 벡터
- 기존에 유전자 도입 방법이 정립되지 않았던 *C. vulgaris*에 대한 유전자 도입 방법을 정립하였으며, 향후 최적화 과정을 통하여 유전자 도입 효율을 높여야 함.
- *C. vulgaris*에 의해서 Sr 탄산염이 형성되는 것을 확인하였으므로, 향후 지속적 연구를 통하여 해수로부터 희소금속의 확보가 가능할 것으로 사료됨.

제 5 장 과제결과의 활용계획

제 1절. 추가 연구의 필요성

| 문제점 또는 원인 | 개선방향 또는 대책 |
|---|---|
| <p>○ <i>C. vulgaris</i>에 유전자를 도입하는 방법 정립에 많은 시간이 소요되어 생광물화 관련 유전자 규명(당초 계획 5개 이상)이 어려움</p> | <p>○ gene bombardment를 이용한 유전자 도입 조건을 확립하였으므로, 효율성을 높이는 최적화 연구를 추가하는 한편, 향후 genomic DNA로의 유전자 도입을 유도함으로써 stable한 cell line을 만들고, DEP 스크리닝을 함으로써 생광물화에 효율적인 개체를 골라낼 예정임</p> <p>○ 또한, 2E-GE, ICAT 기술로 프로테오믹스를 분석하여 관련 단백질 및 펩타이드를 규명할 예정</p> |
| <p>○ 희소급속 생광물화 기능이 보다 향상된 “mutant” 개체 스크리닝</p> <p>○ 효율적인 “<i>in vivo</i> 생광물화 시스템 (1리터급)” 개발 시도</p> | <p>○ 위에서 언급한대로 유전자 도입 조건이 확립되었으므로, 앞으로의 연구는 random mutant를 DEP 스크리닝 하여 기능이 보다 향상된 개체를 확보하는 데 주력할 예정</p> <p>○ 50 mL 실험실 수준의 <i>in vivo</i> 생광물화 시스템 제작하였으나, 효율문제로 1L급으로 스케일 업 하지 못하였으나, 향후 1년 내에 충분히 달성 가능</p> <p>○ 이후, 보다 큰 스케일 실험 후 실증화 과정이 필요함.</p> |

제 2절. 타 연구에의 응용 및 기업화 추진방안

1. 타 연구에의 응용 및 기업화 추진방안

가. 융합 생명공학 분야에의 응용 가능

- 희소금속 생광물화 관여 단백질 규명을 통해 신규 기능성 유전자 확보 및 연구 기반 확립
- 생광물화에 미세조류 모델 연구함으로써 관련 응용 연구의 범위 확장
- 생광물화 과정을 통한 희소금속 결정 분석을 위한 생물리학적 측정 기술 축적
- 분자 유전학, 광생물학, 프로테오믹스의 기술 공유로 인한 통합 연구 기술의 축적

나. 기업화 및 기술이전 가능성

- 생광물화 기전 규명에 따른 원천 기술에 대한 특허권 확보로 국가 기술 경쟁력 신장 및 기술 이전비 취득 가능
- 생광물화 이용 희소금속 추출 분야에서 선두적인 기업 설립 가능성

2. 기대효과

가. 국내연구자들에게 기술 및 자료 제공 확산

- 구축된 미세조류 생광물화 형성 관련 interactome을 국내연구자에게 internet (<http://polar.kbsi.re.kr/cyano/>)으로 공개하여 활용토록 함. 학술적 목적은 무료로 하되 상업화할 경우 라이선싱을 취하도록 함.

나. 미세조류 생광물화 및 관여 유전자 기능 규명으로 도출된 다양한 생광물화 경로 물질에 관해 국내 연구자와 공동 연구 도모

- 구축된 Yeast Two Hybrid 방법과 TAP-tagging 방법, 광신호 전달 네트워크 구축 방법 등을 대학 등에 전수하고 연계하여 산재적으로 진행되는 기능성 프로테옴 연구를 체계화하고 프로테옴 기술 개발 등 생명공학 분야 연구개발에 활용
- 해당 부분의 기기 연구 지원 시스템과 연계하여 국내 생명과학자에게 분석 지원 서비스를 제공하며, 기기교육이나 workshop을 통해서 해당 과제로부터 얻은 기술적 노하우를 국내 생명과학자에게 제공

다. 유전자 재조합을 통해 미세조류 형질을 전환하여 희소 금속을 생광물화 할 수 있는 해양 생명체 발굴하여 KIOST 기술개발이 국가 경제에 도움을 주는 창조적 융합과제가 될 수 있음.

제 6 장 참고문헌

- (1) SY Lee, KH Jung, JE Lee, KA Lee, S-H Lee, JY Lee, JK Lee, JT Jeong, S-Y Lee. 2014. Nov. 30. Photosynthetic biomineralization of radioactive ^{90}Sr via microalgal CO_2 absorption. *Bioresource Technol.* 172:449-452.
- (2) 해수에서 회수되는 성분의 경제성 평가 (출처 : 吉塚和治, 近藤正, 海水からのリチウム回, J. Plasma Fusion Res., 87(12), 795-800 (2011).
- (3) 희소금속 소재 제조 기술 국내 특허 동향 분석 (J. Kor. Powd. Met. Inst., Vol. 21, No. 2, 2014)
- (4) 갯벌 퇴적물에서 농화배양된 미생물에 의한 탄산스트론튬(strontianite, SrCO_3)의 형성, 영남대학교, 대한지질학회 학술대회, Vol. 2013, No. 10. p.413
- (5) 차세대 유기 태양전지 기술 및 시장 전망, 2010년, Displaybank
- (6) Debabrata Rautaray, Ambarish Sanyal, Suguna D. Adyanthaya, Absar Ahmad, and Murali Sastry. Biological Synthesis of Strontium Carbonate Crystals Using the Fungus *Fusarium oxysporum*. 2004. *Langmuir* 20, 6827-6833.
- (7) Development and application of bioanalytical methodologies based on firefly luciferase (*Photinus pyralis*), Simone Marin Marques, Doctoral Program in Chemistry, Department of Chemistry and Biochemistry, 2014, University of Porto
- (8) D.-M. Sun, Q.-S. Wu and Y.-P. Ding. A novel method for crystal control: synthesis and design of strontium carbonate with different morphologies by supported liquid membrane. *J. Appl. Cryst.* (2006). 39, 544-549.

주 의

1. 이 보고서는 한국해양과학기술원에서 수행한 주요사업의 연구결과 보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 한국해양과학기술원에서 수행한 주요사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.