



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0017162
(43) 공개일자 2019년02월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/12 (2006.01) C12P 7/64 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/12 (2019.02)
C12P 7/64 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0101541
(22) 출원일자 2017년08월10일
심사청구일자 2018년10월08일

(71) 출원인
더 유니버시티 오브 브리티쉬 콜롬비아
캐나다 브리티쉬 콜롬비아 브이6티 1제트3 밴쿠버
#103-6190 애그로노미 로드 유니버시티 인터스트
리 리에이중 오피스
한양대학교 산학협력단
서울특별시 성동구 왕십리로 222(행당동, 한양대
학교내)
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암
동5가)
(72) 발명자
이재혁
캐나다, 밴쿠버, 대학로 6270번지
주선주
캐나다, 밴쿠버, 대학로 6270번지
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이처영, 장제환

전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 아미노산 보충을 이용한 미세조류에서 가치 있는 화합물질과 바이오연료 전구체 향상

(57) 요약

본 발명의 목적은 미세조류 배양 성장에서 지질 생산을 자극하는 기술을 밝히는 것이다. 또한, 본 발명의 목적은 성장 배지의 제거 및 교체를 필요로 하지 않는 단일 집단 미세조류 지질 생산 기술을 제공하는 것이다. 본 발명의 또 다른 목적은 미세조류에 의해 생산되는 다른 고 부가가치 화학 물질의 생산을 증가시키는 것이다. 나아가,

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도1

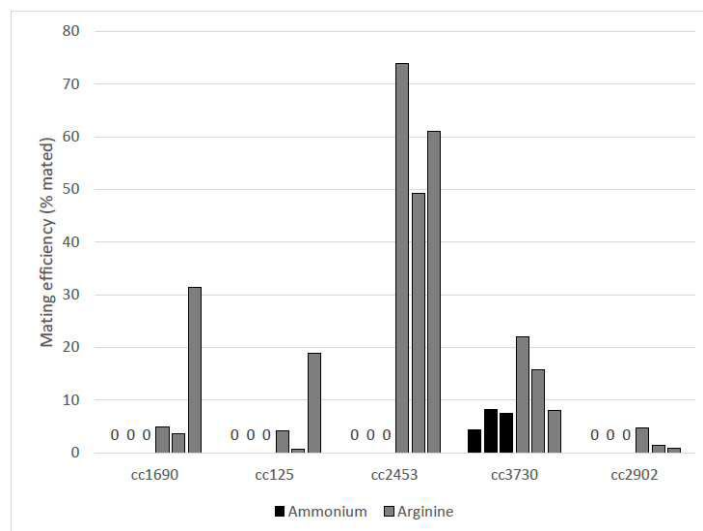


Figure 1 – Mating efficiency of cells cultured with arginine compared to ammonium.

본 발명이 적용되는 범위는 미세조류에 한정되지 않고, N-결핍 반응을 유도할 수 있는 임의의 아미노산 보충 유기체에도 적용된다. 미세조류의 배양을 위한 질소원으로서 아미노산을 사용하는 것은 상기 목적 및 다른 목적을 달성하기 위한 방법을 제공한다. 구체적으로, 아르기닌은 배우자형성, 지질 생산 및 N-결핍 유전자 조절을 포함하나, 이에 한정되지 않는 N-결핍 반응을 유도하는 동시에 세포 성장 및 증식을 도와주는 것이 입증되었다. 아르기닌 섭취와 대사 경로에 기초하여, 아르기닌과 동화 작용 경로를 공유하는 다른 아미노산 또한 미세조류에 거의 동일한 효과를 가져올 것으로 예상된다.

(52) CPC특허분류

C12P 7/649 (2013.01)

Y02E 50/10 (2013.01)

(72) 발명자

제이콥 문즈

캐나다, 밴쿠버, 대학로 6270번지

셀리 놀란

캐나다, 밴쿠버, 대학로 6270번지

심상준

서울특별시 강남구 선릉로 221, 301동 803호 (도곡동, 도곡렉슬아파트)

김영환

충청남도 서천군 장항읍 장산로101번길 75 (송림리, 국립해양생물자원관)

성영준

서울특별시 영등포구 여의동로3길 10, 201동 501호 (여의도동, 여의도자이아파트)

진언선

서울특별시 중구 퇴계로90길 74, 103동 802호 (신당동, 래미안신당하이베르아파트)

서승범

경기도 군포시 고산로151번길 26-23, 105동 805호 (당정동, 당정마을엘지아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014M1A8A1049278

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 (재)한국이산화탄소포집및처리연구개발센터

연구사업명 거대과학연구개발사업(Korea CCS 2020사업)

연구과제명 생물학적 이산화탄소 고속전환 유기 자원화 기술

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2016.06.01 ~ 2017.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

아르기닌(arginine)을 포함하는 배지에서 미세조류(microalgae)를 배양하여 질소-결핍 반응(N-starvation response)을 유도하는 단계를 포함하는 지질의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 아르기닌의 농도는 5 내지 10mM인 것을 특징으로 하는 지질의 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 질소-결핍 반응은 배우자형성(gametogenesis)을 유도하는 것을 특징으로 하는 지질의 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 질소-결핍 반응은 *NIT1*, *NRT2.1*, *AMT4*, *LAO1* 및 *THB1*으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 유전자의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는 지질의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 개선된 영양 보충을 통해 미세조류(microalgae)에서 지질 생성을 자극하여 영양 결핍 없이 조류가 생산할 수 있는 고 부가가치 화합물질의 양을 증가시키는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003]

전통적인 식물 기름에 비해 대규모 생합성 지질 생산을 위한 미세조류(microalgae) 플랫폼의 장점은 높은 광합성 효율, 경작을 위한 땅에 대한 낮은 의존성 및 높은 세포 당 지질함량을 포함하나, 이에 국한되지는 않는다. 미세조류는 영양 스트레스 하에서, 바이오연료(biofuels)를 위한 지질 뿐만 아니라 다양한 가치 있는 화합물을 축적하는 것으로 알려져 있다. 지질 생성을 자극하는 가장 영향력 있는 스트레스는 질소(N) 결핍 스트레스이다. 한편, 모든 유기체는 생명의 기본적인 기초 물질, 핵산 및 아미노산에 대해 질소를 요구하며, 질소가 없으면 세포는 성장하고 분열할 수 없다. 다른 영양 스트레스도 마찬가지로 세포 주기 정지를 일으킨다. 따라서 영양 스트레스 하에 생성되는 조류-유래 가치 있는 화학 물질의 생산 수율과 효율은 각각 영양 결핍이 개시될 때 세포의 수와 조류 배지로부터 영양을 제거하는 필요한 기술에 의해 제한된다. 현재의 기술로 대규모의 미세 조류 지질 생산을 달성하기 위해서는 미세 조류를 성장이 포화될 때까지 영양이 풍부한 배지에서 성장시켜야 하며, 모든 성장 배지를 제거하고 영양이 없는 배지로 대체해야 한다. 대규모의 조류 배지에서 현재의 기술을 이용하여 성장 배지를 제거하고 대체하기 위해 요구되는 에너지 비용은 추출된 조류-유래 생성물의 이익보다 크므로 비용이 많이 소요된다. 성장 배지에서 지질 생성을 자극하는 기술은 영양이 풍부한 성장 배지를 제거하고 영양이 없는 배지로 대체하는 에너지 집약적인 단계를 제거하는 데 필요하다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0005] (비특허문헌 0001) Chen W, Zhang C, Song L, Sommerfeld M, Hu Q (2009) A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae. Journal of Microbiological Methods 77: 41-47
- (비특허문헌 0002) Matsuda Y, Tamaki S, Tsubo Y (1978) Mating type specific induction of cell wall lytic by agglutination of gametes in Chlamydomonas reinhardtii. Plant and Cell Physiology 19: 1253-1261

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명의 목적은 미세조류 배양 성장에서 지질 생성을 자극하는 기술을 밝히는 것이다. 또한, 본 발명의 목적은 성장 배지의 제거 및 교체를 필요로 하지 않는 단일 집단 미세조류 지질 생산 기술을 제공하는 것이다. 본 발명의 또 다른 목적은 미세조류에 의해 생산되는 다른 고 부가가치 화학 물질의 생산을 증가시키는 것이다. 나아가, 본 발명이 적용되는 범위는 미세조류에 한정되지 않고, N-결핍 반응을 유도할 수 있는 임의의 아미노산 보충 유기체에도 적용된다.

과제의 해결 수단

- [0008] 미세조류의 배양을 위한 질소원으로서 아미노산의 사용은 상기 목적을 달성하기 위한 방법을 제공한다. 구체적으로, 아르기닌(arginine)은 N-결핍 반응(N-starvation responses)을 유도하는 동시에 세포 성장 및 증식을 도와주는 것이 입증되었으며, 상기 N-결핍 반응은 배우자형성(gametogenesis), 지질 생산 및 N-결핍 유전자 조절을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 아르기닌 섭취와 대사 경로에 기초하여, 아르기닌과 동화 작용 경로(assimilatory pathways)를 공유하는 다른 아미노산 또한 미세조류에 거의 동일한 효과를 가져올 것으로 예상된다.

발명의 효과

- [0010] 본 발명은 세포 주기 성장 및 증식을 유지함과 동시에 미세조류에서 가치 있는 화학 물질 및 바이오연료 전구체의 생성을 자극하는 방법을 제공한다. 본 발명에 따른 방법은 가치 있는 화학 물질의 생산을 위해 성장 배지를 제거하고 영양 결핍 배지로 대체하는 에너지 집약적인 단계를 요구하지 않는다. 따라서, 본 발명에 따른 방법은 다량의 조류-유래 고 부가가치 화학 물질과 바이오연료 전구체를 생산하는 데보다 비용 효율적인 수단이다.

도면의 간단한 설명

- [0012] 도 1은 아르기닌 배양 세포에서 질소 결핍 반응인 gametogenesis를 나타낸 것이다.
- 도 2는 질소 결핍 조건에서 gametogenesis 수준을 나타낸 것이다.
- 도 3은 아르기닌 배양 세포가 다른 N-결핍 반응을 활성화시킴에도 불구하고, 세포 주기 정지 또는 광합성 단백질의 분해를 일으키지 않는 것을 나타낸 것이다.
- 도 4는 암모늄(ammonium) 배양 세포와 달리 질소 결핍된 세포를 연상시키는 아르기닌 배양 세포에서 발생하는 지질 축적을 Nile Red로 시각화하여 나타낸 것이다.
- 도 5는 아르기닌 배양 세포가 암모늄 배양 세포와 비교하여 비정상적인 형태학적(morphological) 변화가 없음을 나타낸 것이다.
- 도 6은 아르기닌 배양 세포가 최적 질소, 암모늄으로 성장한 세포보다 중성 지질 수준이 더 높은 것을 나타낸

것으로, 중성 지질을 염색하는 Nile Red로 동등한 수의 세포를 염색하여 나타난 형광 수준을 통해 측정된 것이다.

도 7은 질소 결핍 조건에서 중성 지질의 수준을 나타낸 것으로, 중성 지질을 염색하는 Nile Red로 동등한 수의 세포를 염색하여 나타난 형광 수준을 통해 측정된 것이다.

도 8은 지방산 메틸 에스터(fatty acid methyl esters)로 측정된 총 지질의 양이 최적 질소, 암모늄 배양 세포보다 아르기닌 배양 세포에서 증가됨을 나타낸 것이다.

도 9는 3일 동안 질소가 결핍된 세포에서 지방산 메틸 에스터(fatty acid methyl esters)로 측정된 총 지질의 양을 나타낸 것이다.

도 10은 아르기닌 배양 세포가 최적 질소, 암모늄으로 성장한 세포보다 트리아실글리세롤(triacylglycerol) 수준이 더 높은 것을 나타낸 것이다.

도 11은 3일 동안 질소가 결핍된 세포에서 트리아실글리세롤(triacylglycerol)의 수준을 나타낸 것이다.

도 12 내지 도 21은 질소 동화(assimilation)에서의 유전적 결함에 관계 없이 아르기닌 배양 세포에서 N-결핍 반응 유전자가 활성화된 것을 나타낸 것으로, 이는 아르기닌 배양 세포에서 N-결핍 반응이 유발된다는 것을 시사한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0013] 본 발명은 영양 스트레스 하에서 생성된 지질 및 다른 가치 있는 생성물의 생산을 증가시키는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 방법은 아미노산 보충(amino acid-supplementation)을 통해 세포의 성장 및 증식을 유지하면서 질소(N)-결핍 반응(N-starvation response)을 자극하는 것을 포함한다. 미세조류(microalgae)를 이용하여 개념을 증명하지만, 본 발명의 범위 및 사상은 직접적 환경으로부터 직접 아미노산을 동화할 수 있는 천연 또는 기타의 모든 유기체를 포함한다. 아미노산은 유기체에 의해 흡수되고, 세포에 의해 감지되지 않고 직접 대사 경로로 동화되어 N-결핍 반응의 억제를 우회한다.
- [0014] 본 발명의 목적은 건강하고 증식하는 세포에서 통상적으로 영양 결핍 조건 하에서만 발생하는 지질과 같은 가치 있는 화학 물질의 생산을 촉진하는 것이다. N-결핍은 미세조류에서 가치 있는 지질 생산을 유도하는 데 가장 영향력 있는 영양 스트레스다. 본 발명은 성장 배지로부터 영양을 제거하는 에너지 집약적인 단계를 회피함으로써, 유기체에서 유용한 화학 물질의 생산을 위한 영양 결핍을 요구하는 현재 방법을 개선한 방법을 제공한다. 생산된 가치 있는 화학 물질은 추출 및/또는 기계적인 가공과 같은 현재 기술을 통해 수득할 수 있다. 지질의 주요한 잠재적 응용 기술은 바이오연료(biofuel)에 대한 전구체로서의 응용이다. 일반적으로 세포는 지질 항상성을 조절하여 지질이 영양 결핍 조건 하에서만 풍부하게 존재하며, 영양이 풍부한 조건에서는 매우 낮은 수준으로 존재한다. 본 발명에 따르면, 영양소가 풍부한 미세조류 세포에서 지질 함량을 증가시키고, N-결핍 반응 경로를 유발시킬 수 있다.
- [0015] 유일한 N-공급원으로서 변형시키지 않고 미세조류 세포로 이동시킬 수 있는 아르기닌(arginine)과 같은 아미노산을 이용하면 세포 증식의 희생 없이 트리아실글리세롤(triacylglycerols; TAGs) 또는 지방소립(lipid droplet)의 생성을 촉진하는 것을 확인하였다. 이러한 조건 하에서 N-결핍의 다른 요소가 유도되는 것을 확인하였으며, 여기에는 N-결핍 반응 유전자의 상향 조절이 포함되나, 이에 한정되는 것은 아니다. 아미노산이 직접적으로 혼입되어 lipid droplet 형성과 같은 N-결핍 반응을 유발할 때, 세포가 생체 이용 가능한(bioavailable) N의 수준을 정확하게 감지하지 못한다는 가설을 세웠다. 생체 이용 가능한 N의 척도로서 유기체에 의해 감지되는 후보 분자는 NH_4^+ (암모늄이온) 또는 글루타민(glutamine), 글루타메이트(glutamate)와 같은 그의 직접적인 유도체를 포함한다. 따라서, 이들 중간체를 통해 가공될 필요가 없는 동화된 아미노산은 N-감지 메커니즘을 우회할 수 있다.
- [0016] 아미노산-보충물은 아미노산 전달체를 통해 세포 내로의 수송에 의한 성장을 뒷받침 할 수 있는 아르기닌 또는 임의의 다른 아미노산을 포함하며, 이어서 대사 경로에 직접 혼입된다.
- [0018] 본 발명의 일 실시예에서, N-결핍 반응은 아미노산 보충(amino acid supplementation)으로 배양된 세포에서 활성화된다. 아미노산이 세포 배양물에 첨가되고, N-결핍 반응은 성 발달(도 1 내지 도 2), 지질 축적(도 4 내지 도 11) 및 N-결핍 유도 유전자 조절 경로(도 12 내지 도 21)를 포함할 수 있다.

[0019] 본 발명의 다른 실시예에서, 아미노산으로 세포를 배양해도 세포 성장 및 증식은 배제되지 않았다(도 3).

[0021] 방법

[0023] 배우자 접합 효율(*mating efficiency*) 분석

[0024] 배우자 접합 능력의 계산은 Matsuda *et al.*, 1978.에 기술된 바와 같이 수행되었다. 1mL NF-TAP의 TAP plates에서 10일 동안 성장된 1×10^7 cells을 재현탁시키고, 낮은 광량($30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)의 24-well plate에서 5시간 동안 배양하여 세포를 준비하였다. 1mL 부피 동량의 상대 배우자와 혼합한 후, 혼합된 세포들을 24-well plate에 옮기고 22°C $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 광량에서 1시간 동안 배양하였다. 1시간 경과 후, 세포를 glutaraldehyde로 고정시키고(최종 농도 2%), 4개의 flagella를 갖는 접합된 세포와 2개의 flagella를 갖는 접합되지 않은 세포의 수를 혈구계(hemocytometer) 및 위상차현미경(phase contrast microscopy)을 이용하여 측정하였다. 다음의 공식을 통해 접합능력을 계산하였다:

[0025]
$$\text{접합 효율}(\%) = \{ (4 \text{ 편모 세포 수}) \times 2 \times 100 \} / \{ (4 \text{ 편모 세포 수}) \times 2 + (2 \text{ 편모 세포 수}) \}$$

[0027] 지질 함량의 반-정량(*semi-quantitative*) 분석

[0028] 중성 지질 측정은 Chen *et al.*, 2009에 요약된 바와 같이 Nile red, DMSO 및 plate reader를 사용하여 수행되었다. 세포를 8mM ammonium 또는 arginine TAP의 100mL에서 전 배양(*precultured*) 하였다. 전 배양된 것으로부터 mid-log phase 세포를 사용하여 8mM ammonium 또는 arginine TAP의 100mL에 2×10^5 cells/mL의 최종 농도로 접종하였다. 남은 ammonium 전 배양 mid-log 세포를 2 번 세척하고 NF-TAP에 재현탁하여 하기 기술된 바와 같이 3일 후에 측정하였다. 8mM ammonium 또는 arginine TAP cultures의 mid-log phase 동안, 6.66×10^6 cells을 3,000xg에서 3분 동안 수득하고, 새로운 배지 400 μL 에 재현탁시켰다. DMSO(20% 최종 농도) 100 μL 와 1mg/mL Nile red(0.6 $\mu\text{g/mL}$ 최종 농도) 0.3 μL 를 혼합하여 세포를 준비하였다. 혼합 후, 준비된 세포(2×10^6 cells) 150 μL 를 불투명하고 검은색인 평평한 바닥의 96-well plate에 넣고, 어두운 곳에서 20분 동안 실온에서 배양하였다. Ex: 530/25nm 및 Em: 590/35nm를 이용한 Biotek Synergy HT plate reader로 측정하였다. 지방산 메틸 에스터(fatty acid methyl esters) 및 트리아실글리세롤(triacylglycerols)의 정량적 측정은 상기 설명한 것과 동일하게 배양된 세포를 사용하여 GC/MS로 수행하였다.

[0030] 현미경 관찰(*Microscopy*)

[0031] 지질 함량의 반-정량 측정에서 설명한 것과 같이 세포를 배양하였다. Mid-log 세포를 1mL gamteolysin에 재현탁시키고, 낮은 광량($30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 하에서 30분 동안 배양하여 Nile red로 염색하기 전 세포벽을 제거하였다. 일단 세포벽이 제거되면, 세포를 Nile red(최종 농도 10 $\mu\text{g/mL}$)로 염색하고, 어두운 곳에서 20분 동안 실온에서 배양하였다. 그 후 세포를 glutaraldehyde(최종 농도 2%)로 고정시키고 Zeiss Axioskop 및 Axio Cam 503 color로 이미지화 하였다. Nile red 이미지는 Ex: BP 450-490nm 및 Em: LP 515nm로 설정된 필터를 사용하여 촬영되었다.

[0033] 광합성 효율(*Photosynthesis efficiency*) 및 클로로필 정량(*chlorophyll quantification*)

[0034] 지질 함량의 반-정량 측정에서 설명한 것과 같이 세포를 배양하였다. Mid-log phase에서, 10분간의 암전 적응 후 pulse amplitude modulation fluorometer로 클로로필 형광(fluorescence)을 측정하였다. Photosystem II (ΦPSII)의 작동 효율은 $\Phi\text{PSII} = (F_m - F_s) / F_m$ 으로 계산되었으며, 여기서 F_m 은 최대 형광이고, F_s 는 정상 상태 형광이다. 클로로필 함량은 3,500xg에서 600 μL 의 culture를 3분 동안 수득하여 mid-log phase에서 측정하였다. 상등액을 pellet에 닿지 않게 버리고, 1.2mL의 80% acetone을 첨가하였다. 각 샘플을 고속으로 40초 동안 vortexing 하였다. 그 다음, 샘플을 16,000xg에서 5분간 원심 분리하였다. 상등액의 흡광도를 720, 664, 647,

645nm에서 측정하였다. Arnon Formula 및 Melis's Correction을 이용하여 10^6 cells 당 총 chlorophyll과 Chlorophyll a/b ratio를 계산하였다.

[0036] *qPCR*

[0037] Mid-log phase에 도달할 때까지 100mL의 8mM ammonium TAP 배지에서 세포를 전 배양 하였다. 전 배양 세포를 사용하여 실험 배양액에 2×10^5 cells/mL의 최종 농도로 접종하였다. 실험 배양액이 mid-log phase에 도달하면 3,000xg에서 3분 동안 수득하고, NF-TAP로 2회 세척한 뒤, 5mL NF-TAP에 재현탁시킨다. 낮은 광량($30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)에서 2시간 또는 24시간 동안 배양되었다. 그 다음, 세포를 3,000xg에서 3분 동안 수득하여 3mL의 새로운 배지에 재현탁시키고, $\sim 3 \times 10^7$ cells의 3개 부분 표본으로 나누었다. 그 후 세포를 신선한 배지로 두 번 세척하고, 3,000xg에서 3분 동안 수득한 다음, 1분 동안 최고 속도로 회전시켜 남아있는 모든 배지를 제거한 다음 액체 질소로 급속 냉동시켰다. qPCR은 SYBR Green(ThermoFisher Scientific, MA, USA)을 사용하여 CFX Connect Instrument(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 수행하였다. 각 반응은 15 μL 의 최종 부피로 만들었으며, 다음을 사용하였다: 0.113 μL 각 20 μM primer, 7.5 μL Fast SYBR Green Master Mix(ThermoFisher Scientific, MA, USA) 및 6.28 μL MilliQ water. CFX Connect run protocol은 95°C, 6분; 및 95°C, 15초의 45 cycles; 60°C, 30초; 72°C, 30초에서 각 cycle의 마지막에서의 형광 측정을 이용하였다. 용융 곡선과 2% agarose gel 전기 영동을 통해 증폭의 특이성(specificity)을 확인하였다. 증폭률(Ct)은 $\Delta \Delta \text{Ct}$ 방법을 사용하여 계산 하였다. 샘플은 두 개의 technical replicates과 세 개의 biological replicates으로 실행되었다. 하우스키핑 유전자(housekeeping gene)로 Receptor of activated kinase C(RCK1) gene을 이용하였다.

도면

도면1

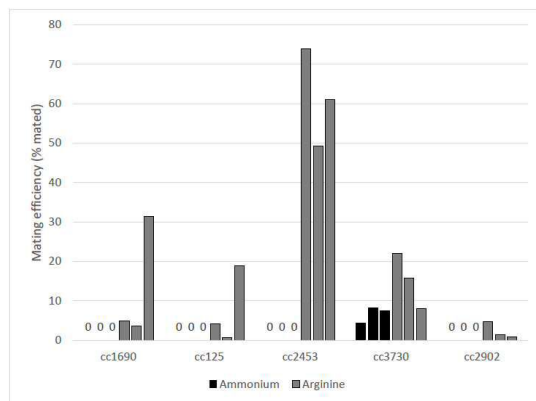


Figure 1 – Mating efficiency of cells cultured with arginine compared to ammonium.

도면2

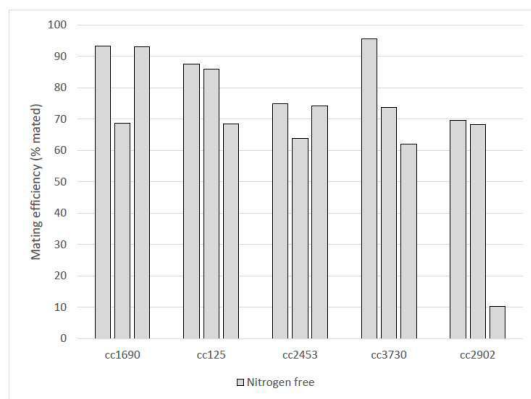


Figure 2 – Mating efficiency of cells cultured in nitrogen-free conditions.

도면3

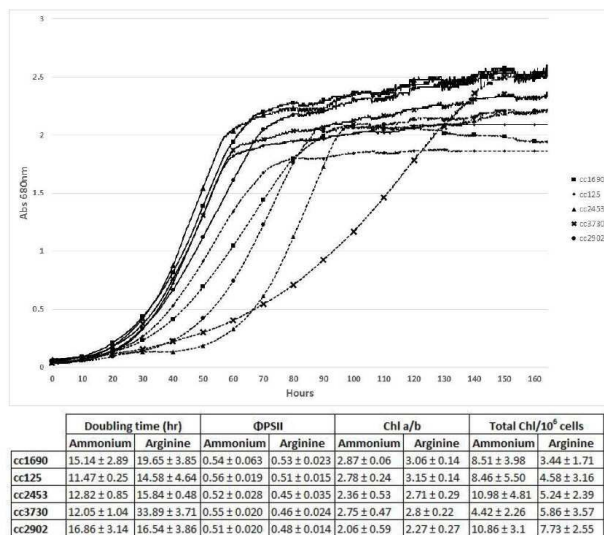


Figure 3 – Arginine supplementation growth curves and photosynthetic parameters compared to ammonium supplementation across different genetic backgrounds.

도면4

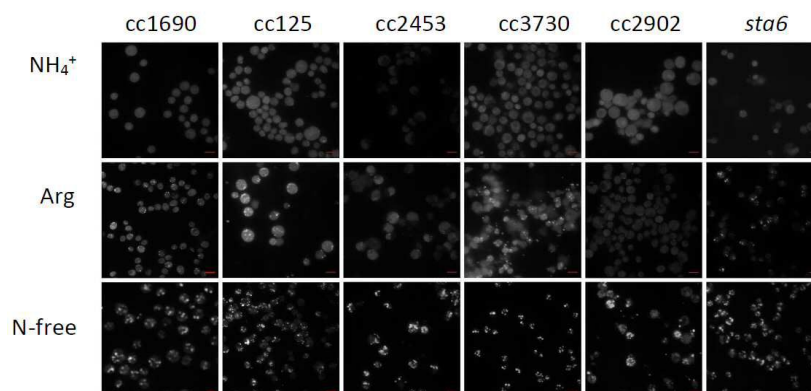


Figure 4 – Fluorescence of neutral lipids stained with Nile Red in different genetic backgrounds.

도면5

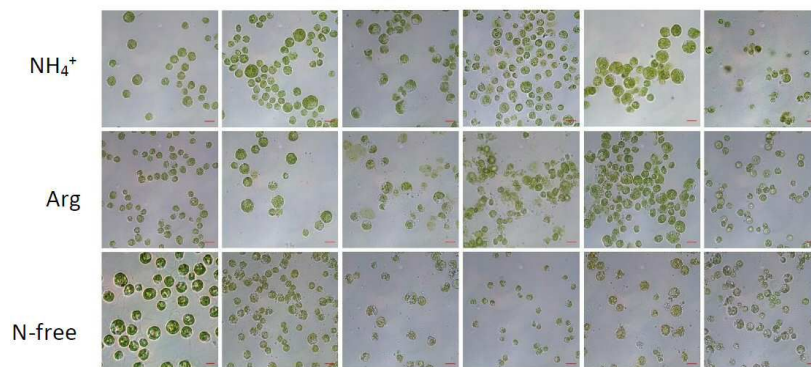


Figure 5 – Bright field images of Nile Red stained samples in different genetic backgrounds.

도면6

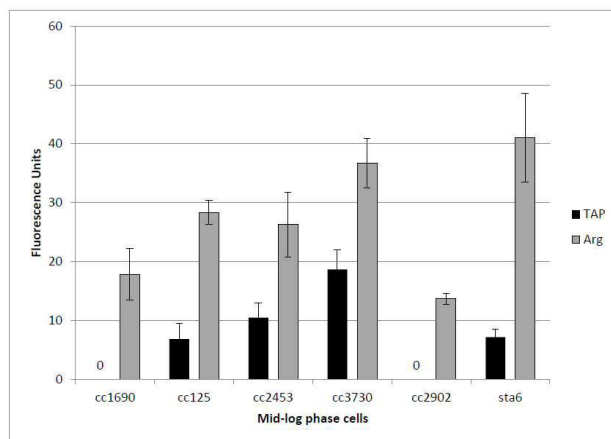


Figure 6 – Fluorescence of neutral lipids stained with Nile Red in cells cultured with arginine compared to ammonium quantified with a plate spectrophotometer.

도면7

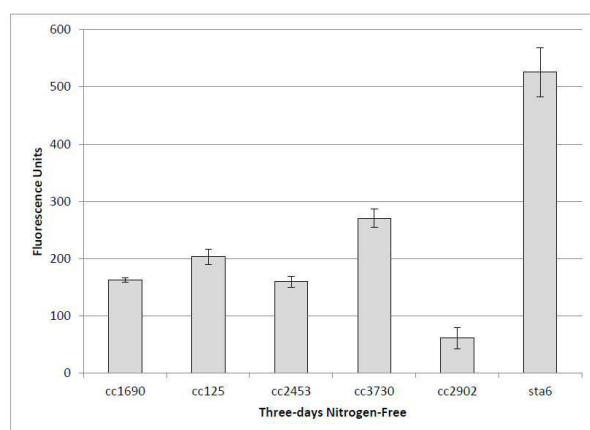


Figure 7 – Fluorescence of neutral lipids stained with Nile Red in cells cultured for three days in N-free media quantified with a plate spectrophotometer.

도면8

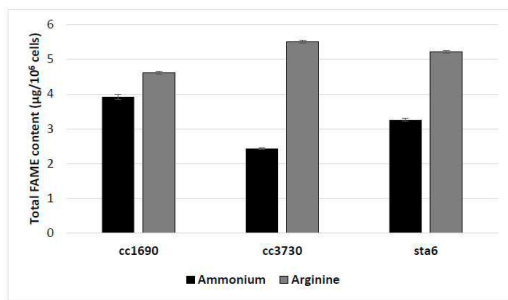


Figure 8 – Fatty acid methyl ester (FAME) quantification with mass spectrometry across different genetic backgrounds in cells cultured with arginine compared to ammonium.

도면9

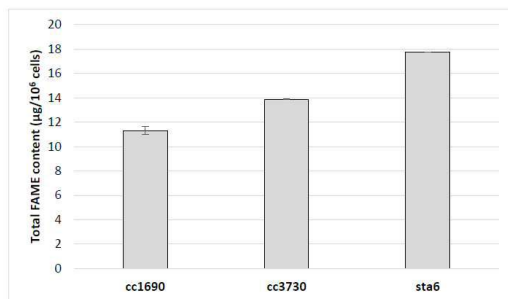


Figure 9 – Fatty acid methyl ester (FAME) quantification with mass spectrometry across different genetic backgrounds in cells cultured for three days in N-free media.

도면10

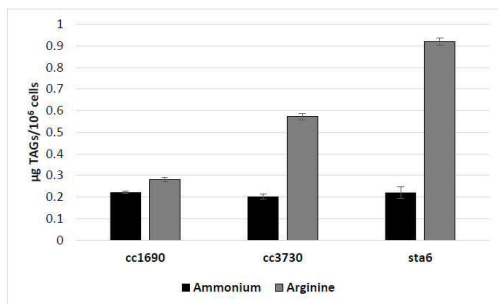


Figure 10 – Triacylglycerol quantification with mass spectrometry across different genetic backgrounds in cells cultured with arginine versus ammonium.

도면11

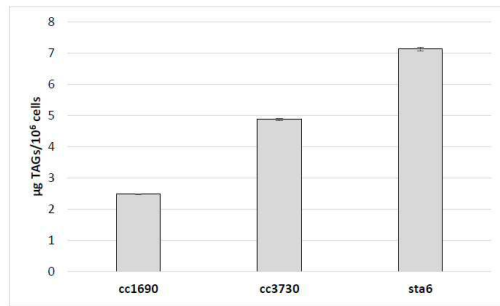


Figure 11 – Triacylglycerol quantification with mass spectrometry across different genetic backgrounds in cells starved of nitrogen for three days.

도면12

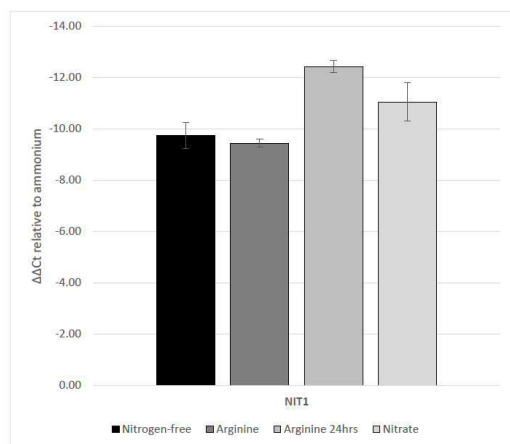


Figure 12 – N-starvation responsive gene, *NIT1*, expression in cc1690 (*NIT1*; *NIT2*).

도면13

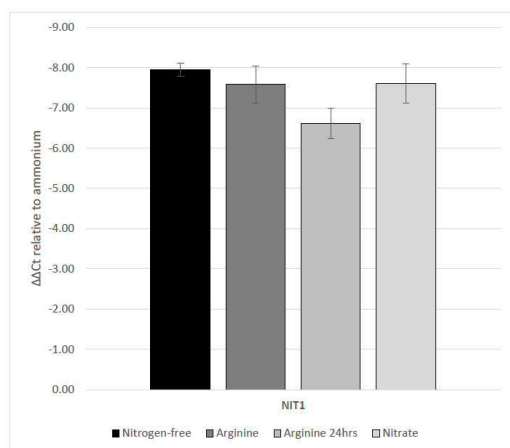


Figure 13 – N-starvation responsive gene, *NIT1*, expression in cc125 (*nit1*; *nit2*).

도면14

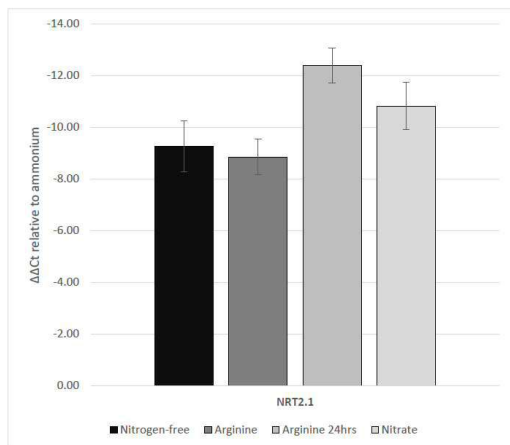


Figure 14 – N-starvation responsive gene, *NRT2.1*, expression in cc1690 (*NIT1*; *NIT2*).

도면15

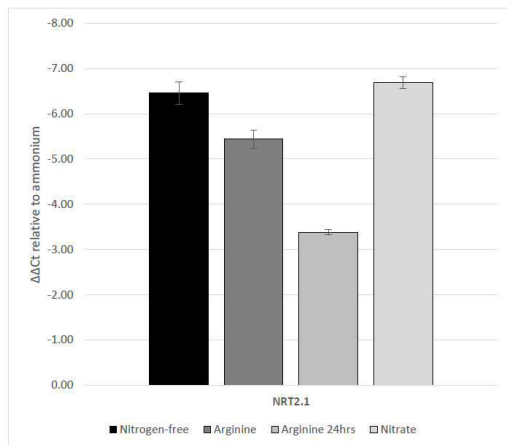


Figure 15 – N-starvation responsive gene, *NRT2.1*, expression cc125 (*nit1*; *nit2*).

도면16

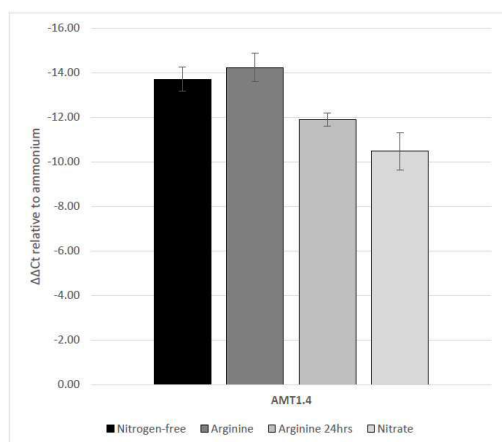


Figure 16 – N-starvation responsive gene, *AMT4*, expression in cc1690 (*NIT1*; *NIT2*).

도면17

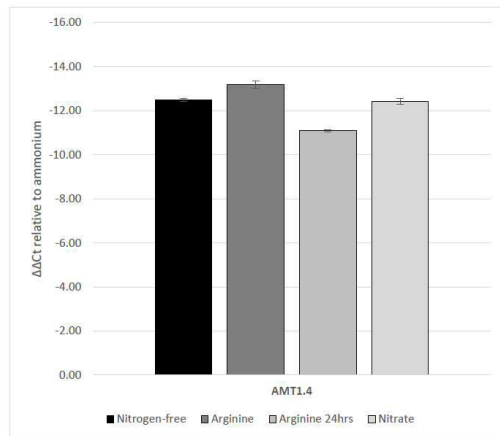


Figure 17 – N-starvation responsive gene, *AMT4*, expression in cc125 (*nit1; nit2*).

도면18

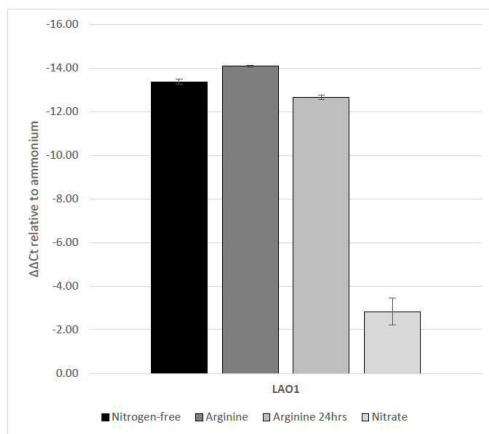


Figure 18 – N-starvation responsive gene, *LAO1*, expression in cc1690 (*NIT1; NIT2*).

도면19

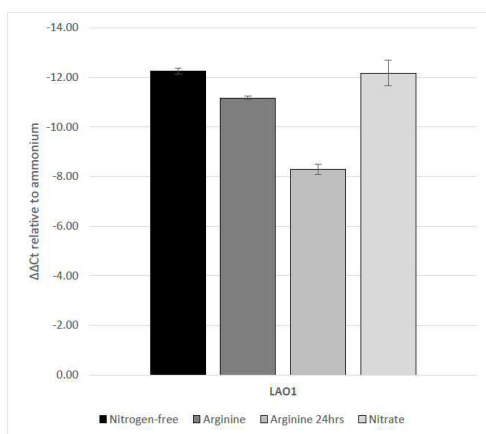


Figure 19 – N-starvation responsive gene, *LAO1*, expression in cc125 (*nit1; nit2*).

도면20

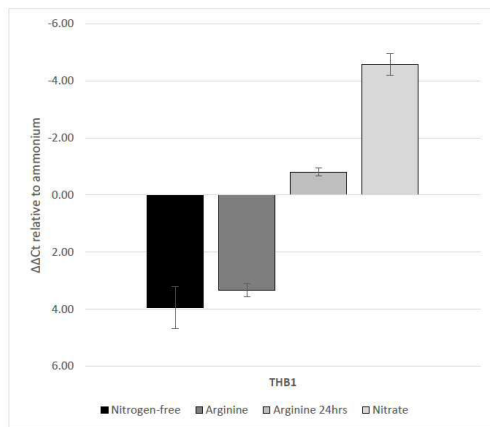


Figure 20 – N-starvation responsive gene, *THB1*, expression in cc1690 (*NIT1*; *NIT2*).

도면21

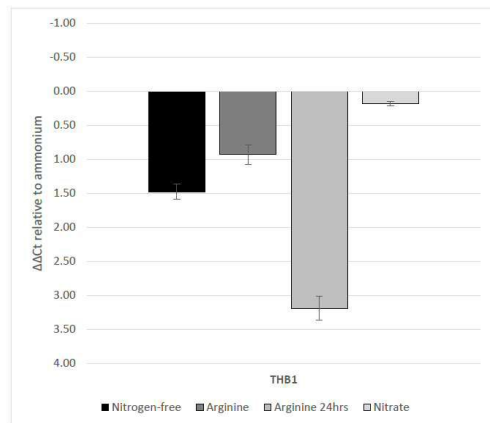


Figure 21 – N-starvation responsive gene, *THB1*, expression in cc125 (*nit1*; *nit2*).