(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0083326
(43) 공개일자 2025년06월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01) *C12N 15/10* (2017.01)
C12N 15/80 (2006.01) *C12N 15/90* (2006.01)
C12N 9/12 (2006.01) *C12N 9/14* (2006.01)
C12N 9/22 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/1137 (2013.01)
C12N 15/102 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0171409
(22) 출원일자 2023년11월30일
심사청구일자 2023년11월30일

(71) 출원인
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
노현수
경상남도 진주시 신안들말길 17, 104동 103호
최연재
경상남도 진주시 진주역로 114, 202동 2001호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
위병갑

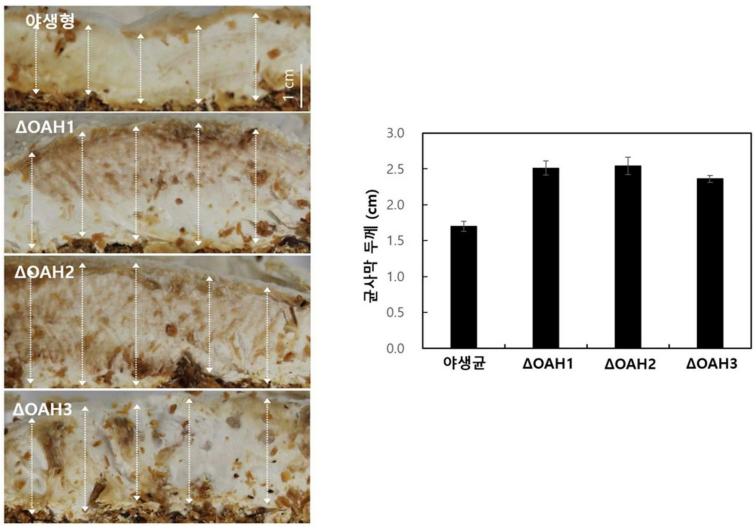
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **균사막 형성 능력이 우수한 곰팡이 균주 및 이의 제조 방법**

(57) 요 약

본 발명은 균사막 형성 능력이 우수한 곰팡이 균주 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 버섯균주의 균사막 물성 향상용 조성물은 버섯균주의 옥살아세트산분해효소(oxaloacetate acetylhydrolase) 활성을 감소 또는 불활성화시켜 버섯균주 배양시 생산되는 균사막의 물성을 향상시키는 효과가 있다. 우수한 물성을 가지는 균사막은 동물가죽을 대체하는 균사 가죽이나, 플라스틱을 대체하는 대체소재로 개발 가능하다.

대 표 도 - 도11



(52) CPC특허분류
C12N 15/80 (2013.01)
C12N 15/902 (2013.01)
C12N 9/1205 (2013.01)
C12N 9/14 (2013.01)
C12N 9/22 (2025.05)
C12Y 207/01119 (2013.01)
C12Y 307/01001 (2013.01)
C12N 2310/20 (2025.05)

(72) 발명자
엄혜랑
경상남도 진주시 호탄길14번길 8, 205호
양성혁
경상남도 진주시 망경로255번길 12
한희강
경상남도 진주시 가호로62번길 5-5, 302호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711187087
과제번호	2023R1A2C1007213
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	(유형1-1)중견연구
연구과제명	버섯 대체소재화를 위한 야생생존 형질 유전자의 유전자편집을 통한 순화연구
기 여 율	1/2
과제수행기관명	경상국립대학교
연구기간	2023.03.01 ~ 2024.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395070275
과제번호	PJ015165022021
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	차세대농작물신육종기술개발
연구과제명	미래시장 대응 유전자 교정기술 활용 양송이 육종 소재 개발
기 여 율	1/2
과제수행기관명	경상국립대학교
연구기간	2021.01.01 ~ 2021.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

옥살아세트산분해효소(oxaloacetate acetylhydrolase)을 코딩하는 유전자의 발현 또는 활성을 억제하는 제제를 포함하는, 버섯균주의 균사막 물성 향상용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 옥살아세트산분해효소(oxaloacetate acetylhydrolase)을 코딩하는 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 하는, 버섯균주의 균사막 물성 향상용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 제제는 안티센스 올리고뉴클레오티드(antisense oligonucleotide), siRNA, shRNA, miRNA, PNA(protein nucleic acid), ribozyme, CRISPR-cas9, T-DNA 또는 DNAzyme인 것을 특징으로 하는, 버섯균주의 균사막 물성 향상용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 물성은 균사막의 두께, 밀도 또는 인장강도인 것을 특징으로 하는, 버섯균주의 균사막 물성 향상용 조성물.

청구항 5

옥살아세트산분해효소(oxaloacetate acetylhydrolase)의 가이드RNA(gRNA) 및 Cas9(CRISPR associated protein 9)을 코딩하는 유전자를 포함하는, 버섯균주의 균사막 물성 향상용 재조합 벡터.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 가이드RNA(gRNA)는 서열번호 2 내지 5에서 선택되는 어느 하나의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 하는, 버섯균주의 균사막 물성 향상용 재조합 벡터.

청구항 7

옥살아세트산분해효소(oxaloacetate acetylhydrolase)의 활성이 감소 또는 불활성화된, 균사막 형성 능력이 우수한 재조합 버섯균주.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 버섯균주는 페렌니포리아(*Perenniporia*) 속 균주, 영지버섯(*Ganoderma*) 속 균주, 느타리버섯(*Pleurotus*) 속 균주, 구름버섯(*Trametes*) 속 균주. 덕다리버섯(*Laetiporus*) 속 균주 및 말굽버섯(*Fomes*) 속 균주로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는, 균사막 형성 능력이 우수한 재조합 버섯균주.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 페렌니포리아(*Perenniporia*) 속 균주는 장수버섯(*Perenniporia fraxinea*)인 것을 특징으로 하는, 균사막 형성 능력이 우수한 재조합 버섯균주.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 장수버섯은 *Perenniporia fraxinea* MT1(수탁번호: KCTC19123P)인 것을 특징으로 하는, 균사막 형성 능력이 우수한 재조합 버섯균주.

청구항 11

버섯균주에 대하여 옥살아세트산분해효소(oxaloacetate acetylhydrolase)를 코딩하는 유전자의 기능상실 돌연변이를 유발하는 단계;

하이그로마이신 포스포트랜스퍼라제(hygromycin phosphotransferase)를 코딩하는 유전자를 포함하는 상동재조합을 위한 DNA 단편을 제작하는 단계; 및

상기 DNA 단편을 이용한 상동재조합을 통해 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라제(hygromycin phosphotransferase)를 코딩하는 유전자를 옥살아세트산분해효소(oxaloacetate acetylhydrolase)를 코딩하는 유전자 내로 삽입하는 단계를 포함하는, 균사막 형성 능력이 우수한 재조합 버섯균주 제조방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 DNA 단편은 GPD 프로모터(GPD promoter)를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 균사막 형성 능력이 우수한 재조합 버섯균주 제조방법.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 GPD 프로모터는 서열번호 6의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 하는, 균사막 형성 능력이 우수한 재조합 버섯균주 제조방법.

청구항 14

제11항에 있어서,

하이그로마이신 포스포트랜스퍼라제(hygromycin phosphotransferase)를 코딩하는 유전자는 서열번호 7의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 하는, 균사막 형성 능력이 우수한 재조합 버섯균주 제조방법.

청구항 15

제11항에 있어서,

상기 DNA 단편은 서열번호 8의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 하는, 균사막 형성 능력이 우수한 재조합 버섯균주 제조방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 균사막 형성 능력이 우수한 곰팡이 균주 및 이의 제조 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 버섯은 대부분 담자곰팡이 균으로서 주로 죽은 식물체를 분해하는 1차 분해자로서 생태계 탄소순환의 핵심역할을 수행하고 있다. 버섯균은 유성생식 포자를 만들기 위하여 육안으로 관찰되는 자실체를 만드는 것을 제외하면, 생활사의 대부분을 세포가 연결된 균사의 형태로 자란다. 이러한 균사는 자연환경에서 기질의 내부를 파고들고 외부로 확장하면서 균사들 간의 복잡한 네트워크인 균사체를 만들 뿐 아니라, 장애물을 넘어 새로운 기질로 이동하기 위하여 균사끈이나 균사다발과 같은 고강도의 균사 집합체구조를 만든다.

[0004] 버섯 균사는 3차원적 공간을 점유하며 자랄 수 있기 때문에 적절한 배양조건이 주어지면 넓은 면적의 균사막을 형성할 수 있는데, 이러한 균사막은 일정한 가공 공정을 거치면 동물성 가죽을 대체하는 대체가죽으로 개발하거나 대체식품으로 개발 가능하다. 더불어 균사를 각종 농업부산물들과 결합시키면 다양한 건축용 소재나 플라스틱 대체소재 등으로 개발 가능하다.

[0005] 버섯 균사막을 대체가죽이나 대체소재로 활용하기 위해서는 버섯이 만드는 균사가 높은 강도를 가지고 있어야 하며, 균사막을 대면적으로 두텁게 배양할 수 있어야 한다. 하지만 버섯균의 배양이 진행될수록 균사막은 버섯균이 만드는 이차대사산물들로 인하여 갈색얼룩이 지고, 얼룩이 생긴 부분은 균사막의 강도가 약화되는 문제점이 발생하였다.

[0006] 이에 본 발명자들은 옥살산을 생성하는 옥살아세트산분해효소(oxaloacetase 혹은 oxaloacetate acetylhydrolase, OAH)의 기능이 불활성화된 재조합 곰팡이 균주를 제작하였으며, 상기 재조합 곰팡이 균주에 의해 생산된 균사막의 경우 균사막 강도 및 밀도가 강화되는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) J. Raman. Kim, D.S. Kim, H.S. Kim, D.S. Oh, H.J. Shin. (2022) Mycofabrication of Mycelium-Based Leather from Brown-Rot Fungi. J. Fungi. 8: 317-335

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 옥살아세트산분해효소(oxaloacetate acetylhydrolase)을 코딩하는 유전자의 발현 또는 활성을 억제하는 제제를 포함하는 버섯균주의 균사막 물성 향상용 조성물을 제공하는 데 있다.

[0010] 또한, 본 발명의 다른 목적은 옥살아세트산분해효소(oxaloacetate acetylhydrolase)의 가이드RNA(gRNA) 및

Cas9(CRISPR associated protein 9)을 코딩하는 유전자를 포함하는 버섯균주의 균사막 물성 향상용 재조합 벡터를 제공하는 데 있다.

[0011] 또한, 본 발명의 다른 목적은 옥살아세트산분해효소(oxaloacetate acetylhydrolase)의 활성이 감소 또는 불활성화된 균사막 형성 능력이 우수한 재조합 버섯균주를 제공하는 데 있다.

[0012] 또한, 본 발명의 다른 목적은 균사막 형성 능력이 우수한 재조합 버섯균주 제조방법을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 옥살아세트산분해효소(oxaloacetate acetylhydrolase)을 코딩하는 유전자의 발현 또는 활성을 억제하는 제제를 포함하는 버섯균주의 균사막 물성 향상용 조성물을 제공한다.

[0015] 이어서, 본 발명은 옥살아세트산분해효소(oxaloacetate acetylhydrolase)의 가이드RNA(gRNA) 및 Cas9(CRISPR associated protein 9)을 코딩하는 유전자를 포함하는 버섯균주의 균사막 물성 향상용 재조합 벡터를 제공한다.

[0016] 나아가, 본 발명은 옥살아세트산분해효소(oxaloacetate acetylhydrolase)의 활성이 감소 또는 불활성화된 균사막 형성 능력이 우수한 재조합 버섯균주를 제공한다.

[0017] 더하여, 본 발명은 버섯균주에 대하여 옥살아세트산분해효소(oxaloacetate acetylhydrolase)를 코딩하는 유전자의 기능상실 돌연변이를 유발하는 단계; 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라제(hygromycin phosphotransferase)를 코딩하는 유전자를 포함하는 DNA 단편을 제작하는 단계; 및 상기 DNA 단편을 이용한 상동재조합을 통해 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라제(hygromycin phosphotransferase)를 코딩하는 유전자를 옥살아세트산분해효소(oxaloacetate acetylhydrolase)를 코딩하는 유전자 내로 삽입하는 단계를 포함하는 균사막 형성 능력이 우수한 재조합 버섯균주 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0019] 본 발명에 따른 버섯균주의 균사막 물성 향상용 조성물은 버섯균주의 옥살아세트산분해효소(oxaloacetate acetylhydrolase) 활성을 감소 또는 불활성화시켜 버섯균주 배양시 생산되는 균사막의 물성을 향상시키는 효과가 있다. 우수한 물성을 가지는 균사막은 동물가죽을 대체하는 균사 가죽이나, 플라스틱을 대체하는 대체소재로 개발 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 있어서, 톱밥배지상 장수버섯 균주의 균사막 형성 결과를 나타낸 도이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 있어서, 장수버섯 균주의 균사막 분비물의 유기산 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 있어서, Cas9 발현벡터와 OAH 유전자를 타겟하는 gRNA 발현 벡터의 구조를 나타낸 도이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 있어서, 정제한 Cas9-gRNA 복합체의 OAH 유전자 DNA 절단 능력 확인 결과를 나타낸 도이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상동재조합을 위한 HR DNA 단편의 제작과정을 간단히 나타낸 도이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 있어서, Cas9-gRNA 복합체와 HR DNA 단편을 사용한 OAH 유전자 knockout 장수버섯 균주 제작과정을 간단히 나타낸 도이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 있어서, OAH 유전자 knockout 균주 제작과정을 통해 확보한 장수버섯 △OAH 형질전환체를 나타낸 도이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 있어서, △OAH 형질전환체의 염기서열 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 9는 본 발명의 일 실시예에 있어서, △OAH 형질전환체의 배양액내 pH 변화 관찰 결과를 나타낸 도이다.

도 10은 본 발명의 일 실시예에 있어서, △OAH 형질전환체의 배양액 내 Oxalic acid 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 11은 본 발명의 일 실시예에 있어서, △OAH 형질전환체의 균사막 두께 측정 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현 예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허 청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[0023] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(Terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시 예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 “포함”한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0024] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 '%'는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (w/w) %, 고체/액체는 (w/v) %, 그리고 액체/액체는 (v/v) %이다.

[0025] 이하, 본 발명에 대하여 보다 상세하게 설명하도록 한다.

[0027] 일 측면에서, 본 발명은 옥살아세트산분해효소(oxaloacetate acetylhydrolase)을 코딩하는 유전자의 발현 또는 활성을 억제하는 제제를 포함하는 버섯균주의 균사막 물성 향상용 조성물에 관한 것이다.

[0028] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 옥살아세트산분해효소(oxaloacetate acetylhydrolase)을 코딩하는 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다. 또한, 상기 서열번호 1의 서열과 70% 이상, 구체적으로 80% 이상, 보다 구체적으로는 90% 이상, 보다 더 구체적으로는 95% 이상, 가장 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열로서 실질적으로 옥살아세트산분해효소 활성을 나타내는 단백질을 발현 가능한 경우, 제한 없이 포함될 수 있다.

[0029] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 유전자의 발현을 억제하는 제제는 안티센스 올리고뉴클레오티드(antisense oligonucleotide), siRNA, shRNA, miRNA, PNA(protein nucleic acid), ribozyme, CRISPR/Cas9, T-DNA 및 DNAzyme로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0030] 본 명세서에서 사용된 용어, "안티센스 올리고뉴클레오타이드"이란 특정 mRNA의 서열에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 함유하고 있는 DNA 또는 RNA 또는 이들의 유도체를 의미하고, mRNA 내의 상보적인 서열에 결합하여 mRNA의 단백질로의 번역을 저해하는 특징이 있다. 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 서열은 타겟 유전자의 mRNA에 상보적이고 타겟 유전자의 mRNA에 결합할 수 있는 DNA 또는 RNA 서열을 의미하고 타겟 유전자의 mRNA의 번역, 세포질 내로의 전위(translocation), 성숙(maturation) 또는 다른 모든 전체적인 생물학적 기능에 대한 필수적인 활성을 저해할 수 있다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 길이는 6 내지 100 염기이고, 바람직하게는 10 내지 40 염기이다.

[0031] 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 효능을 증진시키기 위하여 하나 이상의 염기, 당 또는 골격(backbone)의 위치에서 변형될 수 있다(De Mesmaeker et al., Curr Opin Struct Biol., 5(3):343-55, 1995). 올리고뉴클레오타이드 골격은 포스포로티오에이트, 포스포트리에스테르, 메틸 포스포네이트, 단쇄 알킬, 시클로알킬, 단쇄 헤테로아토믹, 헤테로시클릭 당간 결합 등으로 변형될 수 있다. 또한, 안티센스 핵산은 하나 이상의 치환된 당모이어티(sugar moiety)를 포함할 수 있다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 변형된 염기를 포함할 수 있다.

[0032] 변형된 염기에는 하이포크잔틴, 6-메틸아데닌, 5-메틸 피리미딘(특히 5-메틸시토신), 5-하이드록시메틸시토신(HMC), 글리코실 HMC, 젠토비오실 HMC, 2-아미노아데닌, 2-티오우라실, 2-티오티민, 5-브로모우라실, 5-하이드록시메틸우라실, 8-아자구아닌, 7-데아자구아닌, N6 (6-아미노헥실)아데닌, 2,6-디아미노퓨린 등이 있다.

[0033] 본 명세서에서 사용된 용어, "siRNA"는 특정 mRNA의 절단(cleavage)을 통하여 RNAi(RNA interference) 현상을

유도할 수 있는 짧은 이중사슬 RNA를 의미한다. 타겟 유전자의 mRNA와 상동인 서열을 가지는 센스 RNA 가닥과 이와 상보적인 서열을 가지는 안티센스 RNA 가닥으로 구성된다. siRNA는 타겟 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 넉다운 방법 또는 유전자치료(gene therapy)의 방법으로 제공된다.

[0034] siRNA는 RNA끼리 짝을 이루는 이중사슬 RNA 부분이 완전히 쌍을 이루는 것에 한정되지 않고 미스매치(대응하는 염기가 상보적이지 않음), 벌지(일방의 사슬에 대응하는 염기가 없음) 등에 의하여 쌍을 이루지 않는 부분이 포함될 수 있다. 전체 길이는 10 내지 100 염기, 바람직하게는 15 내지 80 염기, 가장 바람직하게는 20 내지 70 염기이다. siRNA 말단 구조는 타겟 유전자의 발현을 RNAi 효과에 의하여 억제할 수 있는 것이면 평활(blunt) 말단 혹은 점착(cohesive) 말단 모두 가능하다. 점착 말단 구조는 3 말단 돌출한 구조와 5 말단 쪽이 돌출한 구조 모두 가능하다. 돌출하는 염기 수는 한정되지 않는다. 예를 들어, 염기 수로는 1 내지 8 염기, 바람직하게는 2 내지 6 염기로 할 수 있다. 또한, siRNA는 타겟 유전자의 발현억제 효과를 유지할 수 있는 범위에서 예를 들어, 한쪽 말단의 돌출 부분에 저분자 RNA(예를 들어, tRNA, rRNA, 바이러스 RNA와 같은 천연의 RNA분자 또는 인공의 RNA분자)를 포함할 수 있다. siRNA 말단구조는 양측 모두 절단 구조를 가질 필요는 없고, 이중사슬 RNA의 일방의 말단 부위가 링커 RNA에 의하여 접속된 스템-루프형(stem-loop) 구조일 수도 있다. 링커의 길이는 스템 부분의 쌍을 이루는 데 지장이 없는 길이면 특별히 한정되지 않는다.

[0035] 본 명세서에서 사용된 용어, "shRNA"는 단일 가닥으로 50-70개로 구성된 뉴클레오타이드를 의미하며, in vivo 상에서 스템-루프 구조를 이루고 있다. 5-10개의 뉴클레오타이드의 루프 부위 양쪽으로 상보적으로 19-29개의 뉴클레오타이드의 긴 RNA가 염기쌍을 이루어 이중가닥의 스템을 형성한다.

[0036] 본 명세서에서 사용된 용어, "miRNA(microRNA)"는 유전자 발현을 조절하며, 전장 20-50개 뉴클레오타이드, 바람직하게는 20-45개 뉴클레오타이드, 보다 바람직하게는 20-40개 뉴클레오타이드, 보다 더 바람직하게는 20-30개 뉴클레오타이드, 가장 바람직하게는 21-23개의 뉴클레오타이드로 구성된 단일 가닥 RNA 분자를 의미한다. miRNA는 세포 내에서 발현되지 않는 올리고뉴클레오타이드이며, 짧은 스템-루프 구조를 가진다. miRNA는 1 또는 2 이상의 mRNA(messenger RNA)와 전체 또는 부분적으로 상동성을 가지며, 상기 mRNA와 상보적인 결합을 통하여 타겟 유전자 발현을 억제시킨다.

[0037] 본 명세서에서 사용된 용어, "PNA(Peptide nucleic acid)"는 핵산과 단백질의 성질을 모두 가지고 있는 분자로서, DNA 또는 RNA와 상보적으로 결합이 가능한 분자를 의미한다. PNA는 핵산염기(nucleobase)가 펩티드 결합으로 연결된 유사 DNA로 1999년에 처음 보고되었다(문헌 [Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O, "Sequenceselective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide", Science 1991, Vol. 254: pp1497-1500]). PNA는 자연계에서는 발견되지 않고 인공적으로 화학적인 방법으로 합성된다.

[0038] PNA는 상보적인 염기서열의 천연 핵산과 혼성화(hybridization) 반응을 일으켜서 이중가닥을 형성한다. 길이가 같은 경우 PNA/DNA 이중가닥은 DNA/DNA 이중가닥보다, PNA/RNA 이중가닥은 DNA/RNA 이중가닥보다 안정하다. 펩티드 기본 골격으로는 N-(2-아미노에틸)글리신이 아미드 결합에 의해 반복적으로 연결된 것이 가장 흔히 쓰이며, 이 경우 펩티드 핵산의 기본골격(backbone)은 음전하를 띠는 천연 핵산의 기본골격과 달리 전기적으로 중성이다. PNA에 존재하는 4개의 핵산염기는 공간적 크기와 핵산염기 사이의 거리가 천연 핵산의 경우와 거의 같다. PNA는 화학적으로 천연 핵산보다 안정할 뿐 아니라 핵산분해효소(nuclease)나 단백질분해효소(protease)에 의해 분해되지 않아 생물학적으로도 안정하다.

[0039] 본 명세서에서 사용된 용어, "리보자임(ribozyme)"은 리보자임의 서열에 대해서 완전히 또는 부분적으로 상동성인 서열을 갖는 핵산 분자를 분해할 수 있는 촉매적 RNA 분자이다. 표적 RNA와 특이적으로 짝을 이루고, 특정의 위치에서 포스포디에스테르 골격을 분해시킴으로써 표적 RNA를 기능적으로 불활성화시키는 RNA 리보자임을 코드화한 리보자임 이식유전자를 디자인할 수 있다. 이러한 분해를 수행함에 있어서, 리보자임은 그 자체가 변화되지 않으며, 따라서 재순환하여 다른 분자를 분해시킬 수 있다. 상기 리보자임은 리보자임 서열을 통합시킨 RNA 올리고뉴클레오티드의 형태로 세포에 대해 직접 표적화될 수 있거나, 원하는 리보자임 RNA를 코드화한 발현 벡터로서 세포 내에 도입될 수 있다. 리보자임은 안티센스 올리고뉴클레오티드에 대해서 기술된 것과 대체로 동일한 방식으로 사용 및 적용될 수 있다.

[0040] 본 명세서에서 사용된 용어, “CRISPR/Cas9”은 크리스퍼(Clustered regularly interspaced short palindromic repeat, CRISPR) 유전자 가위라 불리는 게놈 편집 방법으로, 특정 염기서열에 특이적으로 결합하는 RNA(gRNA)와 특정한 염기서열을 자르는 가위 역할인 Cas9 nuclease로 구성되며, CRISPR/Cas9 시스템으로 불린다. 이러한 CRISPR/Cas9 시스템을 이용하면 세포나 동물에 플라스미드(Plasmid) DNA를 도입하여 특정 유전자의 기능을 억제

할 수 있는 녹아웃(knockout)이 가능하다.

[0041] 본 명세서에서 사용된 용어, "T-DNA"는 Agrobacterium 종의 Ti(tumor-inducing) 플라스미드의 전달(transfer) DNA로서 숙주 식물세포의 핵으로 전달되는 DNA 절편을 말한다. T-DNA의 양 끝 가장자리에는 25 bp의 반복서열이 존재하며, 전달은 왼쪽 경계(border)에서 전달이 시작되어 오른쪽 경계에서 종료된다. 박테리아 T-DNA는 약 20,000 bp 길이로, 이들의 삽입에 의하여 타겟 유전자를 붕괴시킴으로써 삽입 돌연변이(insertional mutagenesis)를 일으키는 데에 사용되며, 삽입된 T-DNA 서열은 돌연변이를 일으킬 뿐 아니라 타겟 유전자를 표지하기도 한다.

[0042] 본 명세서에서 사용된 용어, "DNAzyme"은 단일 가닥 RNA를 절단하는 촉매 DNA 분자로, 표적 RNA 서열에 대하여 매우 선택적이고 이로써 전령 RNA를 표적으로 하여 특정 유전자를 하향 조절하는 데 사용될 수 있다.

[0043] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 물성은 균사막의 두께, 밀도 또는 인장강도일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0045] 일 측면에서, 본 발명은 옥살아세트산분해효소(oxaloacetate acetylhydrolase)의 가이드RNA(gRNA) 및 Cas9(CRISPR associated protein 9)을 코딩하는 유전자를 포함하는 버섯균주의 균사막 물성 향상용 재조합 벡터에 관한 것이다.

[0046] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 가이드RNA(gRNA)는 서열번호 2 내지 5에서 선택되는 어느 하나의 염기서열로 표시되는 것일 수 있고, 바람직하게는 서열번호 3의 염기서열로 표시되는 것일 수 있다.

[0047] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 옥살아세트산분해효소(oxaloacetate acetylhydrolase)의 가이드RNA(guide RNA)는 옥살아세트산분해효소를 코딩하는 유전자의 4, 5 또는 6번째 엑손을 표적하는 것일 수 있고, 바람직하게는 5번째 엑손의 5 '-CGTGACCGTCCGTGCAACCA-3' 서열을 표적하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0048] 본 발명에서 사용되는 용어, "재조합"은 세포가 이종의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나, 또는 펩티드, 이종의 펩티드 또는 이종의 핵산에 의해 암호화된 단백질을 발현하는 세포를 지칭하는 것이다. 재조합 세포는 상기 세포의 천연 형태에서는 발견되지 않는 유전자 또는 유전자 절편을, 센스 또는 안티센스 형태 중 하나로 발현할 수 있다. 또한 재조합 세포는 천연 상태의 세포에서 발견되는 유전자를 발현할 수 있으며, 그러나 상기 유전자는 변형된 것으로서 인위적인 수단에 의해 세포 내 재도입된 것이다.

[0050] 나아가, 본 발명은 옥살아세트산분해효소(oxaloacetate acetylhydrolase)의 활성이 감소 또는 불활성화된 균사막 형성 능력이 우수한 재조합 버섯균주를 제공한다.

[0051] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 버섯균주는 페렌니포리아(*Perenniporia*) 속 균주, 영지버섯(*Ganoderma*) 속 균주, 느타리버섯(*Pleurotus*) 속 균주, 구름버섯(*Trametes*) 속 균주. 덕다리버섯(*Laetiporus*) 속 균주 및 말굽버섯(*Fomes*) 속 균주로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0052] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 페렌니포리아(*Perenniporia*) 속 균주는 장수버섯(*Perenniporia fraxinea*)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0053] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 장수버섯은 *Perenniporia fraxinea* MT1(수탁번호: KCTC19123P)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0055] 더하여, 본 발명은 버섯균주에 대하여 옥살아세트산분해효소(oxaloacetate acetylhydrolase)를 코딩하는 유전자의 기능상실 돌연변이를 유발하는 단계; 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라제(hygromycin phosphotransferase)를 코딩하는 유전자를 포함하는 상동재조합을 위한 DNA 단편을 제작하는 단계; 및 상기 DNA 단편을 이용한 상동재조합을 통해 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라제(hygromycin phosphotransferase)를 코딩하는 유전자를 옥살아세트산분해효소(oxaloacetate acetylhydrolase)를 코딩하는 유전자 내로 삽입하는 단계를 포함하는 균사막 형성 능력이 우수한 재조합 버섯균주 제조방법을 제공한다.

[0056] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 기능상실 돌연변이는 표적 유전자의 1개 이상의 일부 염기를 치환 또는 결실하여 이루어지는 것일 수 있다. 예를 들어 전장 DNA 중 0.1% 이상의 염기를 치환 또는 결실하여 이루어지는

것일 수 있다.

[0057] 본 발명에서 사용되는 용어, "결실(deletion)"은 유전자의 부분적, 실질적, 완전한 넉아웃(knock-out), 침묵(silencing), 비활성화 또는 하향조절(down-regulation)을 의미한다. 유전자를 결실시키는 방법으로는, 당해 기술분야에 알려진 방법을 제한 없이 사용할 수 있다.

[0058] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 기능상실 돌연변이는 CRISPR/Cas9 시스템에 의해 옥살아세트산분해효소(oxaloacetate acetylhydrolase)를 코딩하는 유전자의 이중나선을 절단하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0059] 일례로, CRISPR/Cas9 시스템은 특정 유전자를 RNA-가이드 엔도뉴클레아제에 의해 유전적으로 조작할 수 있다. 상기 유전적인 조작은 특정 유전자를 구성하는 핵산서열 내 PAM(Protospacer-adjacent Motif) 서열 중 또는 이의 5' 말단 및/또는 3' 말단에 인접하여 위치하는 연속하는 3bp 내지 25bp의 염기서열 부위 내의 하나 이상의 뉴클레오타이드의 결실 또는 삽입; 야생형 유전자와 상이한 하나 이상의 뉴클레오타이드로의 치환; 외부 유래의 하나 이상의 뉴클레오타이드 삽입 중 하나 이상의 핵산의 변형을 포함할 수 있다. 또한, 상기 PAM 서열은 Cas 단백질의 유래 미생물에 따라 상이할 수 있다.

[0060] 또한, 상기 기능상실 돌연변이는 CRISPR/Cas9 통한 유전자 편집 외에도, T-DNA와 같은 외래유전자를 이용하거나, TOS17과 같은 내생 트랜스포존을 이용하거나, 엑스레이(X-ray)나 감마레이(gamma-ray) 등을 주사하여 돌연변이를 유발하거나, RNAi 또는 안티센스 방법을 이용하여 수행할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0061] 본 발명에서 사용되는 용어, “상동재조합(Homologous Recombination, HR)”은 서로 상동성을 지닌 유전자 사슬의 좌위에서 연결 교환을 통해 일어나는 유전자 재조합을 의미한다.

[0062] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 상동재조합을 위한 DNA 단편은 GPD 프로모터(GPD promoter)를 더 포함하는 것일 수 있으며, 상기 GPD 프로모터는 서열번호 6의 염기서열로 표시되는 것일 수 있다.

[0063] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라제(hygromycin phosphotransferase)를 코딩하는 유전자는 서열번호 7의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다. 또한, 상기 서열번호 7의 서열과 70% 이상, 구체적으로 80% 이상, 보다 구체적으로는 90% 이상, 보다 더 구체적으로는 95% 이상, 가장 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열로서 실질적으로 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라제 활성을 나타내는 단백질을 발현 가능한 경우, 제한 없이 포함될 수 있다.

[0064] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 상동재조합을 위한 DNA 단편은 서열번호 8의 염기서열로 표시되는 것일 수 있다.

[0066] 이하, 본 발명의 실시예를 첨부된 도면을 참고하여 보다 상세하게 설명하도록 한다. 그러나, 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 것일 뿐, 이에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아닐 것이다.

[0068] **<실시예 1> 장수버섯 균사막 생성 유기산 성분 분석**

[0069] 장수버섯(*Perenniporia fraxinea* FF1141) 균주 배양시 형성되는 균사막의 구성성분을 조사하기 위하여 톱밥배지(참나무톱밥 50g, 미강 5g)로 25℃에서 15일간 배양하였다. 배양초기에는 배지위로 흰색 균사막이 형성되었으나, 배양에 진행됨에 따라 균사막 위에 갈색의 분비물이 분비되는 것을 관찰하였다. 이 분비물의 성분을 알아보기 위하여 HPLC 분석을 실시하였다. HPLC분석은 HPLC system (Ultimate 3000, Thermofisher Scientific, USA), Acclaim OA column 으로 분석하였다. 이동상으로 40 mM KH_2PO_4 buffer를 사용하였고 UV 검출 파장은 210 nm, column 온도는 30℃, 유속은 0.6 mL/min 이였다.

[0070] 그 결과, 도 1 및 2에 나타낸 바와 같이 균사막 위에 생성된 갈색얼룩(균사막 분비물)은 옥살산(oxalic acid)과 타르타르산(tartaric acid)을 주성분으로 포함하고 있는 것으로 나타났다.

[0072] **<실시예 2> OAH 유전자가 억제된 재조합 곰팡이 균주의 제작**

[0073] 곰팡이 균주의 옥살산 생산 능력을 감소시키기 위하여 유전자 편집 기술을 이용해 옥살아세트산분해효소

(oxaloacetate acetylhydrolase, OAH)를 코딩하는 OAH 유전자(서열번호 1)가 억제된 재조합 곰팡이 균주를 제작하였다.

[0074] 본 발명에서는 Cas9 단백질과 OAH 유전자에 이중나선절단(double-strand break, DSB)을 유발하는 gRNA를 조립한 후, Cas9-gRNA 복합체와 상동재조합(homologous recombination, HR)을 통하여 OAH 유전자를 파괴하는 DNA 단편을 동시에 장수버섯에 원형질체에 주입하여 OAH 유전자 결실을 유도하였다.

[0076] **2-1. 장수버섯 OAH 유전자 분석**

[0077] 공공 데이터베이스(https://mycocosm.jgi.doe.gov/Perfra1/Perfra1.home.html)에 등록된 장수버섯(*Perenniporia fraxinea* SS3) 유전체 정보 분석을 통하여 OAH 염기서열 정보를 확보하였다. 이 서열 정보를 바탕으로 4개의 gRNA를 디자인하였다(표 1 참조).

표 1

[0079]

gRNA	타겟서열(5‘-3’)	gRNA 염기서열(5‘-3’)	서열번호
gRNA1	TCATCGCGGACGCAGATACT	TCATCGCGGACGCAGATACTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTT	2
gRNA2	CGTGACCGTCCGTGCAACCA	CGTGACCGTCCGTGCAACCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTT	3
gRNA3	TCATCCCGTAGGTGATCATC	TCATCCCGTAGGTGATCATCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTT	4
gRNA4	TTCTTCCATGCCAAGTGGCT	TTCTTCCATGCCAAGTGGCTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTT	5

[0081] **2-2. Cas9-gRNA 복합체 제작**

[0082] 대장균내에서 Cas9-gRNA 복합체가 형성될 수 있도록, Cas9 단백질을 생산하는 발현벡터(pPtrc-Cas9)와 gRNA를 발현하는 벡터(pTOP-gRNA)로 대장균을 동시에 형질전환하였다(도 3 참조). 형질전환된 대장균을 0.2 mM IPTG로 induction 한 후 20℃, 14시간 배양하였다. 배양한 대장균을 원심분리한 후 초음파로 파쇄한 후, Cas9-gRNA 복합체를 Ni-NTA 컬럼 크로마토그라피를 통하여 부분 정제하였다. 이러한 방식으로 4가지 Cas9-gRNA 복합체를 획득하였다. 획득한 Cas9-gRNA 복합체의 활성을 PCR로 증폭한 OAH DNA절단능력으로 조사하였다.

[0083] 그 결과 도 4에 나타낸 바와 같이 4가지 Cas9-gRNA 복합체 모두 우수한 OAH DNA 절단 능력을 보였다. 이들 중 5번째 엑손을 표적으로하는 gRNA2를 사용하여 유전자 편집을 진행하였다.

[0085] **2-3. 상동재조합을 위한 DNA 단편 제작**

[0086] GPD promoter (P_{GPD}, 서열번호 6)에 의하여 발현되고, hygromycin phosphotransferase를 코딩하는 HPH 유전자(서열번호 7)를 OAH 유전자 사이에 삽입하기 위하여, 장수버섯 유전체 정보(https://mycocosm.jgi.doe.gov/Perfra1/Perfra1.home.html)로부터 GPD promoter 서열을 확보하고 PCR로 증폭하였다. HPH 유전자는 기존 pHAtC 벡터(https://www.addgene.org/78098/)로부터 PCR로 증폭하여 사용하였다. P_{GPD}와 HPH DNA 단편을 overlap PCR을 통하여 연결한 후, OAH의 5’ 영역 (5’-OAH, 498 bp)과 3’ 영역 (3’-OAH, 470 bp)을 overlap PCR을 통하여 연결하였다(도 5 참조). 이렇게 연결된 DNA 단편 (HR 단편, 서열번호 8)은 5’-OAH-P_{GPD}-HPH-3’-OAH의 구조를 가지며 총 길이는 3,064 bp 였다. PCR에 사용된 프라이머 정보는 표 2에 나타내었다.

표 2

[0088]

	Forward sequence	Reverse sequence
5’ OAH	AGCTCGTCGCCTTCCTATC	GAACGACCTGCGTCGCAATCGCCAAGTCTGG
Pgpd	GCGATTGCGACGCAGGTCGTTCAGGATTGG	GGCTTTTTCATGATTTGTGAGGTATCTGGATTGGC
HPH	CCTCACAAATCATGAAAAAGCCTGAACTCACCG	CACGTCTGCACTTACTACTATTCCTTTGCCCTCGGAC
3’ OAH	GAATAGTAGTAAGTGCAGACGTGTGCTTCATC	GCTGGGAGCTTTCTATGATTGAGC

[0090] **2-4. 장수버섯 원형질체 제작**

[0091] 장수버섯 균주(*Perenniporia fraxinea*)를 YMG 배지 (2% malt extract, 0.8% glucose, 0.8% yeast extract), 200 mL에 접종하여 120 RPM으로 4일 간 배양하였다. 배양된 균사를 Miracloth (Merck millipore, Massachusetts, USA)로 걸러낸 뒤 0.5 M sucrose를 이용하여 세척하였다. 이후 세포벽 분해효소 용액 (2% CW-lytic enzyme F1 (아미코젠, 진주시, 대한민국), 0.05% Chimax-N (아미코젠), 0.5 M sucrose 20 ml)으로 현탁한 후, 30℃에서 4시간 반응시켰다. 반응용액을 Miracloth에 부어서 균사를 걸러낸 뒤 걸러진 용액을 1000 xg, 10 min, 4℃의 조건으로 원심분리하고, 침전물을 STC buffer (50 mM Tris-HCl, 1 M sorbitol, 50 mM $CaCl_2 \cdot 2H_20$, 0.5 M sucrose, pH 8.0) 10 ml로 현탁하였다. 최종적으로 동일 조건에서 원심분리한 후 형질전환 실험에 사용하였다.

[0093] **2-5. Cas9-gRNA 복합체와 HR DNA 단편을 사용한 OAH 유전자 knockout 장수버섯 균주의 제작**

[0094] 장수버섯 유전체에서 OAH 유전자를 파괴하기 위하여 Cas9-gRNA2 복합체로 이중나선 절단을 유발하고, 상동재조합을 통하여 hygromycin phosphotransferase (HPH) 유전자가 OAH 유전자 내로 삽입된 OAH 유전자 knockout 균주를 hygromycin 배지로 선발하는 방법을 사용하였다(도 6 참조). 이를 위하여, 상기한 방법으로 제작한 원형질체 10^7개를 0.2 ml STC buffer 에 현탁한 후, Cas9-gRNA2 복합체 10 μg, HR DNA 단편 5 μg을 섞어준 다음 튜브를 얼음속에 40분간 방치하였다. 이후, PTC buffer (40% PEG4000, 50 mM $CaCl_2 \cdot 2H_20$, 50 mM Tris-HCl, 0.5 M sucrose, pH 8.0) 1 ml을 첨가하고 상온에서 20분간 방치하였다가, YMG agar plate (hygromycin 100 μg/ml 포함)에 도말하였다. 도말된 agar plate를 30℃에서 2주간 배양하며 살아나온 콜로니들을 회수하고, 이들을 YMG agar plate (hygromycin 200 μg/ml 포함)에 계대배양 하여 최종적으로 3개의 유전자 편집체를 확보하였다(도 7).

[0095] 상기한 △OAH 형질전환체의 OAH유전자 부근의 염기서열을 분석하였다. 그 결과 △OAH 형질전환체 모두 5’-OAH 영역과 3’-OAH 영역 사이에 PGPD-HPH 영역이 삽입되어 OAH 유전자가 파괴되었음을 확인하였다(도 8).

[0096] 본 발명에서 제조된 △OAH 형질전환체는 한국생명공학연구원 생물자원센터에 기탁하였으며, 미생물 기탁번호 KCTC19123P를 부여받았다.

[0098] **<실시예 3> 배양액 내 pH 분석**

[0099] 장수버섯야생형 균주와 △OAH 형질전환체를 YMG 배지에서 30일간 배양한 후 배양액의 pH를 조사하였다.

[0100] 그 결과 도 9에 나타낸 바와 같이 배양시작지점에서 배양액의 pH는 5.7 로 동일하였고, 접종 30일 이후의 배양액의 pH를 측정한 결과 야생형 균주의 경우 pH 3.8 로 감소하였다. 반면, △OAH 형질전환체의 경우 pH 5.49 (△OAH1), pH 5.41 (△OAH2), pH 5.47 (△OAH3) 로 pH 변화가 미미하였다. 이는 pH indicator (0.1% bromocresol green, 0.05% methyl red)를 이용한 실험에서도 동일한 결과를 보였다.

[0102] **<실시예 4> 배양액 내 oxalic acid 분석**

[0103] 장수버섯야생형 균주와 △OAH 형질전환체를 Czapek-Dox broth media (Duchefa Biochemie B.V, 2003 RV Haarlem, Netherlands) 에 접종하여 30일 배양하였다. 배양액은 Sepak C-18 (WAT020515, Waters, USA)로 세척

후 용출액을 HPLC system (Ultimate 3000, Thermofisher Scientific, USA), Acclaim OA column 으로 분석하였다. 이동상으로 40 mM KH_2PO_4 buffer를 사용하였고 UV 검출파장은 210 nm, column 온도는 30℃, 유속은 0.6 mL/min 이였다.

[0104] 그 결과, 도 10에 나타낸 바와 같이 장수버섯 야생형 균주 배양액에서는 oxalic acid 1.47 mM이 검출되었다. 반면, △OAH 형질전환체에서는 각각 약 0.6 mM, 0.88 mM, 0.47 mM로 측정됨을 확인할 수 있었다. 이는 야생형 균주에 비하여 현저히 낮은 수치로서, OAH 유전자의 파괴가 oxalic acid의 생합성을 저해한다는 것을 입증하는 결과이다.

[0106] **<실시예 5> 장수버섯 OAH 유전자 knockout 균주의 균사막 형성 특성**

[0107] △OAH 형질전환체와 야생형 균주를 톱밥배지에서 배양하며 균사막 형성 특성을 조사하였다. 톱밥배지 (톱밥 200 g, 미강 50 g, 물 500 ml)에 △OAH 형질전환체와 야생형 균주를 접종하고 28℃에서 1개월간 배양하였다. 배양 후 균사막의 두께를 측정하고, 균사막의 물리적 특성을 조사하기 위하여 균사막을 톱밥배지에서 분리한 후 압착 건조시켰다.

[0108] 그 결과, 도 11 및 표 3에 나타낸 바와 같이 배양 후 균사막의 두께의 경우 야생형 균주는 1.70±0.07 cm, △OAH1~3는 2.51±0.10 cm, 2.54±0.12 cm, 2.36±0.05 cm 로 야생형 균주에 비하여 1.5배 증가한 두께를 보였다. 균사의 밀도는 야생형 균주의 0.071 g/cm3에 비하여 △OAH1~3 균들의 밀도가 0.124, 0.098, 0.124로 1.4~1.7배 증가하였다. 특히 △OAH1의 인장강도는 1.537 MPa로 야생형 균주의 0.345 Mpa 에 비하여 4.45배 증가하였다. 이러한 결과는 oxalic acid의 생합성을 억제하면 고밀도, 고강도의 균사막을 얻을 수 있다는 것을 입증한다.

표 3

[0110]

	무게 (g)	밀도 (g/cm^3)	인장강도(MPa/m^2)
야생형 균주	0.715±0.069	0.071±0.007	0.345±0.057
△OAH1	1.238±0.116	0.124±0.012	1.537±0.280
△OAH2	0.981±0.087	0.098±0.009	0.591±0.199
△OAH3	1.240±0.075	0.124±0.007	0.563±0.208

[0112] 이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 구체적인 실시예를 상세하게 설명되었으나, 본 발명의 사상을 이해하는 당업자는 동일한 사상의 범위 내에서 다른 구성요소를 추가, 변경, 삭제 등을 통하여, 퇴보적인 다른 발명이나 본 발명 사상의 범위 내에 포함되는 다른 실시예를 용이하게 제안할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상술한 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구의 범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구의 범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

수탁번호

[0114]

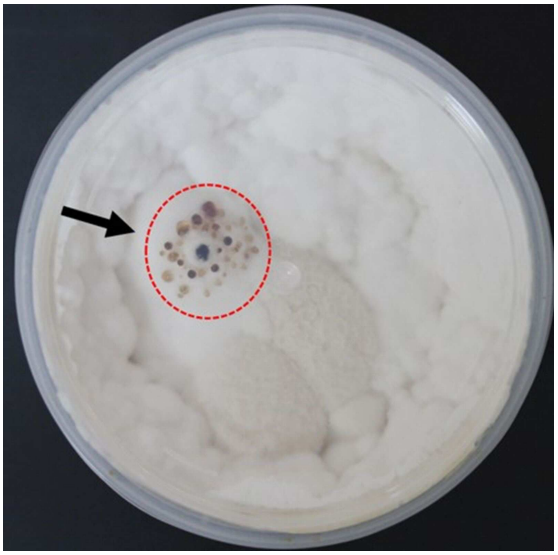
기탁기관명 : 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)

수탁번호 : KCTC19123P

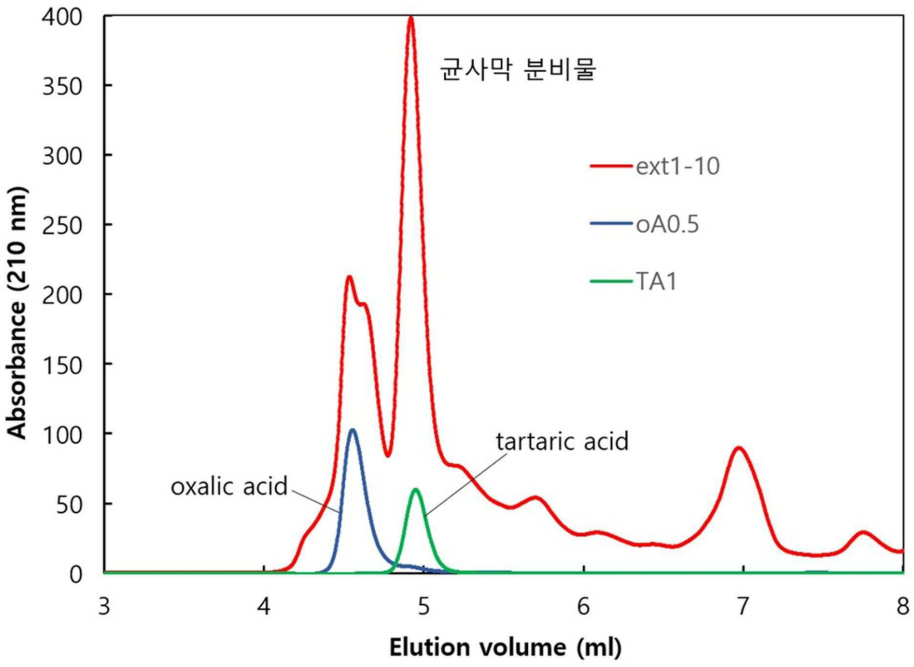
수탁일자 : 20231122

도면

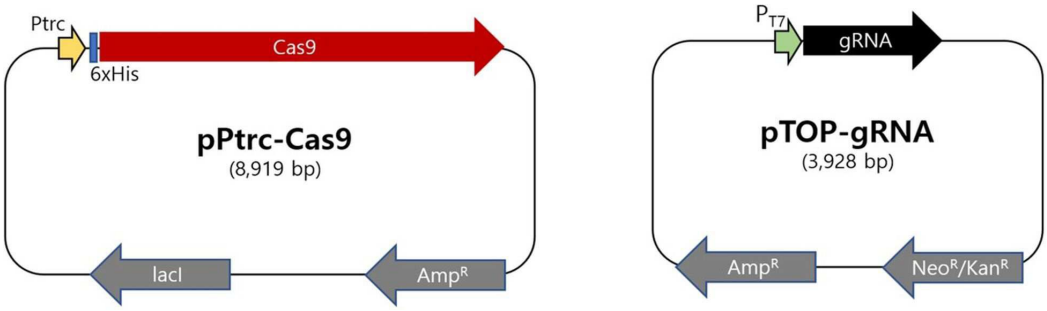
도면1



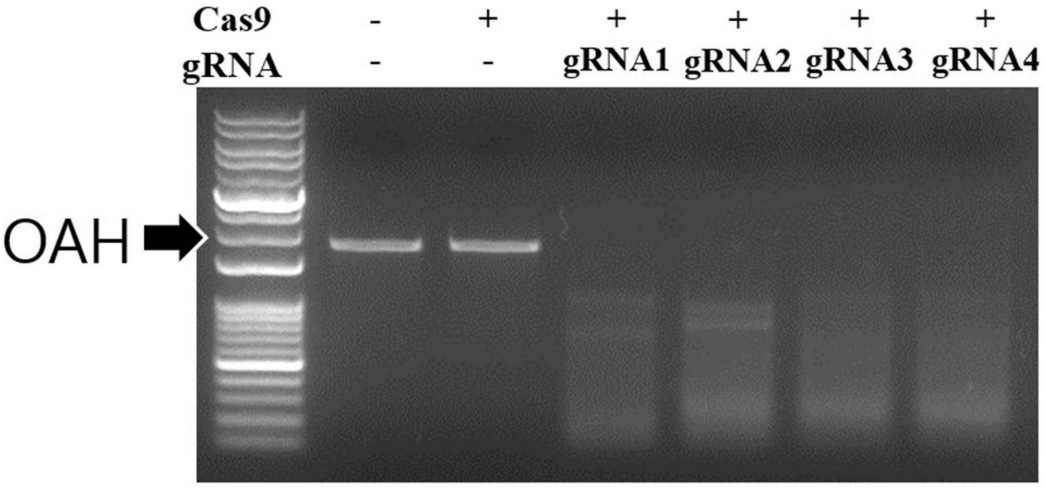
도면2



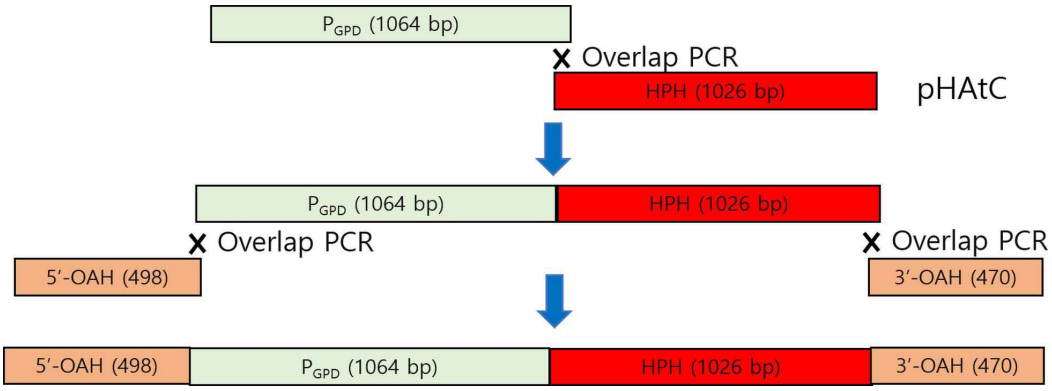
도면3



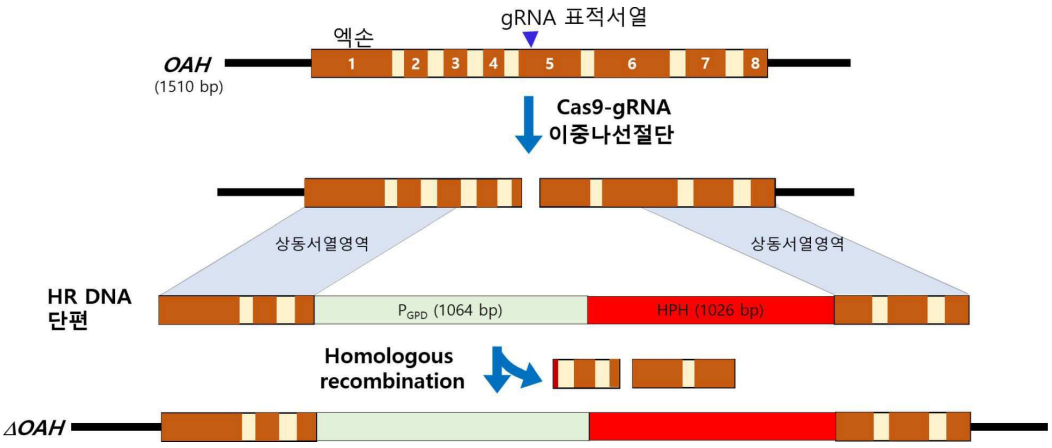
도면4


Cas9 - + + + + +
gRNA - - gRNA1 gRNA2 gRNA3 gRNA4
OAH

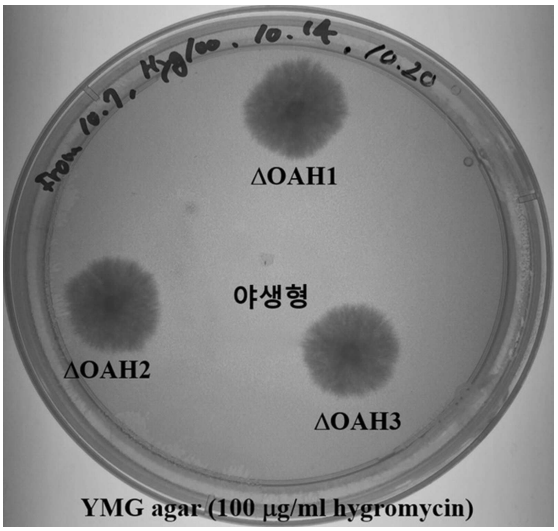
도면5


P_GPD (1064 bp)
Overlap PCR
HPH (1026 bp)
pHAtC
P_GPD (1064 bp)
HPH (1026 bp)
Overlap PCR
Overlap PCR
5′-OAH (498)
3′-OAH (470)
5′-OAH (498)
P_GPD (1064 bp)
HPH (1026 bp)
3′-OAH (470)

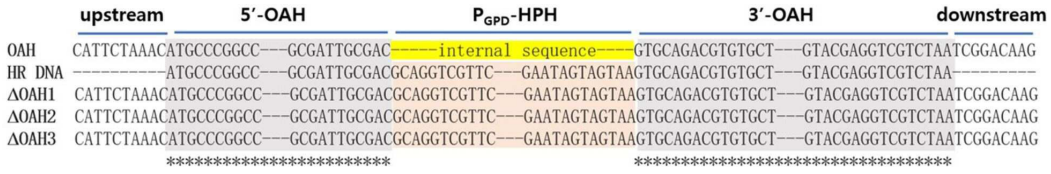
도면6


gRNA 표적서열
엑손
OAH
(1510 bp)
1 2 3 4 5 6 7 8
Cas9-gRNA
이중나선절단
상동서열영역
상동서열영역
HR DNA
단편
P_GPD (1064 bp)
HPH (1026 bp)
Homologous
recombination
ΔOAH

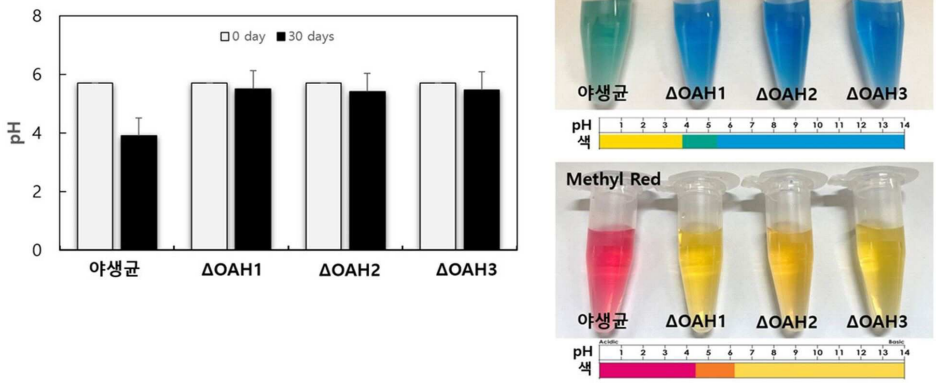
도면7


ΔOAH1
야생형
ΔOAH2
ΔOAH3
YMG agar (100 μg/ml hygromycin)

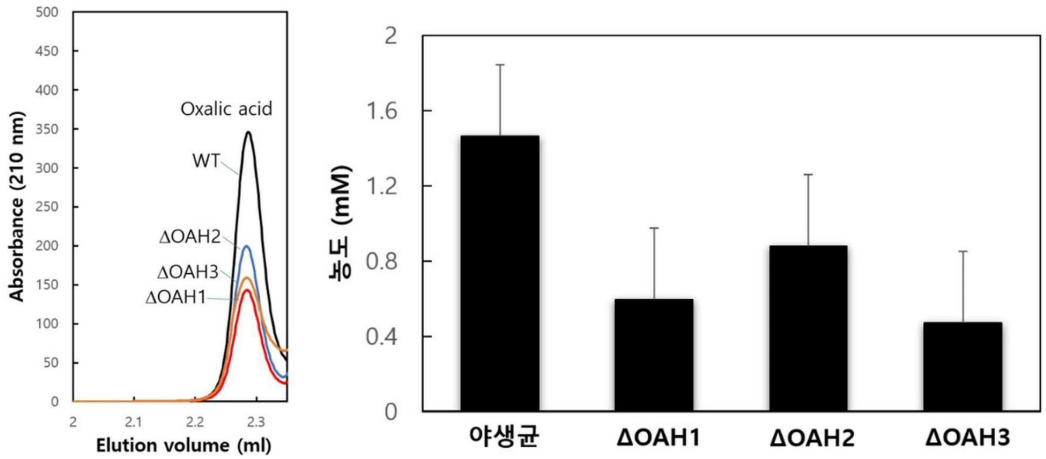
도면8


upstream
5′-OAH
PGPD-HPH
3′-OAH
downstream
OAH CATTCTAAACATGCCCGGCC---GCGATTGCGAC-----internal sequence----GTGCAGACGTGTGCT---GTACGAGGTCGTCTAATCGGACAAG
HR DNA ----------ATGCCCGGCC---GCGATTGCGACGCAGGTCGTTC---GAATAGTAGTAAGTGCAGACGTGTGCT---GTACGAGGTCGTCTAA---------
ΔOAH1 CATTCTAAACATGCCCGGCC---GCGATTGCGACGCAGGTCGTTC---GAATAGTAGTAAGTGCAGACGTGTGCT---GTACGAGGTCGTCTAATCGGACAAG
ΔOAH2 CATTCTAAACATGCCCGGCC---GCGATTGCGACGCAGGTCGTTC---GAATAGTAGTAAGTGCAGACGTGTGCT---GTACGAGGTCGTCTAATCGGACAAG
ΔOAH3 CATTCTAAACATGCCCGGCC---GCGATTGCGACGCAGGTCGTTC---GAATAGTAGTAAGTGCAGACGTGTGCT---GTACGAGGTCGTCTAATCGGACAAG

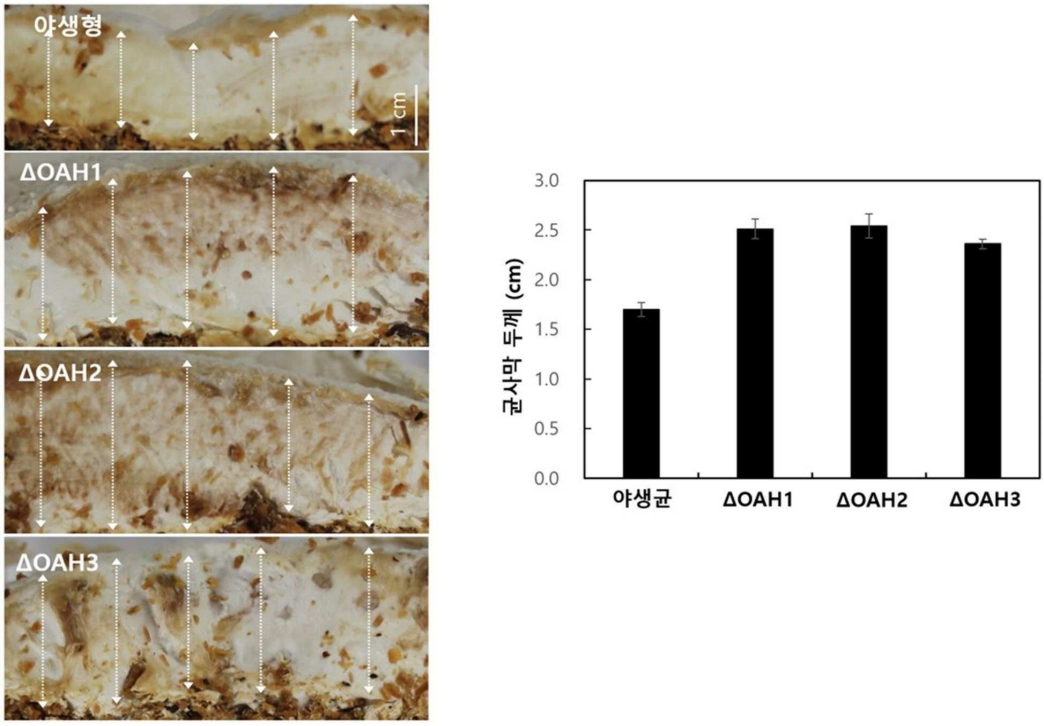
도면9


0 day
30 days
pH
8
6
4
2
0
야생균
ΔOAH1
ΔOAH2
ΔOAH3
Bromocresol Green
Methyl Red
pH
색

도면10


Absorbance (210 nm)
Elution volume (ml)
Oxalic acid
WT
ΔOAH2
ΔOAH3
ΔOAH1
농도 (mM)
야생균
ΔOAH1
ΔOAH2
ΔOAH3

도면11


야생형
1 cm
ΔOAH1
ΔOAH2
ΔOAH3
균사막 두께 (cm)
야생균
ΔOAH1
ΔOAH2
ΔOAH3

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.