(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0042652
(43) 공개일자 2023년03월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/79 (2006.01) *C12M 1/00* (2006.01)
C12N 1/12 (2006.01) *C12P 7/649* (2022.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/79 (2013.01)
C12M 21/02 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0117208
(22) 출원일자 2022년09월16일
심사청구일자 2022년09월16일
(30) 우선권주장
1020210125064 2021년09월17일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
심상준
서울특별시 영등포구 의사당대로 127, 102동 1401호
성영준
서울특별시 영등포구 여의동로3길 10, 201동 501호
이정섭
서울특별시 노원구 동일로 1456, 709동 504호
(74) 대리인
정은열, 김태훈

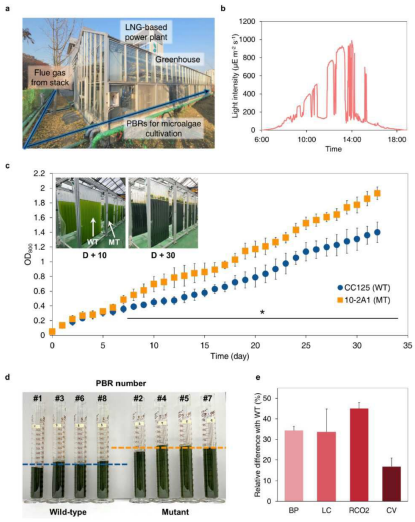
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 **변동광 조건에서 세포 성장성 및 지질 생산성이 우수한 돌연변이 미세조류**

(57) 요 약

본 발명은 광변동 조건하에서 높은 세포 성장률 및 지질 생산성을 갖는 돌연변이 미세조류에 관한 것이다.

대 표 도 - 도8



(52) CPC특허분류
C12N 1/12 (2019.02)
C12P 7/649 (2022.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711128194
과제번호	2020M3H7A1098295
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	유용물질생산을위한CarbontoX기술개발(R&D)
연구과제명	연소가스 내 CO2 직접 광생물전환을 위한 고효율 공정 원천 기술
기 여 율	1/1
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2021.01.27 ~ 2022.01.26

명 세 서

청구범위

청구항 1

수크로스 비발효성 2 슈퍼패밀리 단백질의 활성이 약화된 변동 광 조건에서 세포 성장성 및 지질 생산성이 향상된 돌연변이 미세조류.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 수크로스 비발효성 2 슈퍼패밀리 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 것인, 돌연변이 미세조류.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 단백질을 코딩하는 유전자는 SNF2(Cre06.g304000)인 것인, 돌연변이 미세조류.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 SNF2 유전자는 서열번호 2의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것인, 돌연변이 미세조류.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 돌연변이 미세조류는 수크로스 비발효성 2 슈퍼패밀리 단백질의 활성이 약화되지 않은 모균주에 비하여 변동 광 조건에서 세포 성장성 및 지질 생산성이 향상된 것인, 돌연변이 미세조류.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 미세조류는 클라미도모나스(Chlamydomonas) 속인 것인, 돌연변이 미세조류.

청구항 7

제6항에 있어서,

클라미도모나스 레인하티(Chlamydomonas reinhardtii)인 것인, 돌연변이 미세조류.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 돌연변이 미세조류는 수탁번호 KCTC18917P 또는 KCTC18918P으로 기탁된 것인, 돌연변이 미세조류.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 돌연변이 미세조류, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 포함하는, 바이오매스 또는 바이오연료 생산용 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 미세조류를 배양하는 단계를 포함하는 바이오매스 또는 바이오연료 생산방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 바이오연료는 바이오디젤인 것인, 생산방법.

청구항 12

제10항에 있어서,

생산된 바이오매스 또는 바이오연료를 회수하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 생산방법.

청구항 13

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 미세조류를 배양하는 단계를 포함하는 바이오매스 또는 바이오연료 생산성 증진방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 광변동 조건하에서 높은 세포 성장률 및 지질 생산성을 갖는 돌연변이 미세조류에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 탄소 격리를 위한 매력적인 바이오 플랫폼인 미세조류는 최근 바이오 연료, 수소 및 식품 공급원의 지속 가능한 생산을 위해 점점 더 많은 관심을 받고 있다. 이러한 미세조류 재배에 있어, 탄소발자국, 운영비, 에너지 소비를 최소화하기 위해 태양광과 산업용 CO2만을 사용하는 다양한 대규모 야외 배양 시스템이 개발되었다. 그러나, 외부 환경 조건이 가변성을 가져 미세조류 세포의 최적 성장을 방해한다. 특히, 구름과 태양의 위치 변화로 인한 날씨 변화와 광도(초에서 분)의 급격한 변동은 광합성에 중요한 빛의 안정적인 공급을 방해한다. 이러한 예측할 수 없는 조명 조건은 작물 및 미세조류를 포함한 다양한 광독립영양생물의 광합성 효율을 저하시키는 것으로 보고되고 있다.

[0004] 빛 변동에 대한 생리학적 특성을 기반으로 CRISPR-Cas9, 디자이너 뉴클레아제 및 RNA 간섭과 같은 고급 분자 도구를 사용하여 비광화학적 소광 조절 및 광 수확 안테나 크기 조절을 위한 조류 균주 개선이 이루어졌다. 그러

나, 이러한 유전 공학 노력에도 불구하고 그 잠재력을 고려하더라도 조류 산업의 급격한 확장은 없었다. 미세조류의 유전자 기능과 조절에 대한 제한된 이해로, 복잡한 빛 환경이 세포의 광생리에 영향을 미치는 방법에 대한 정보가 충분하지 않다. 따라서 이러한 한계를 보완하기 위해, 무작위 돌연변이 유발에 의해 생성된 돌연변이 라이브러리에서 원하는 형질의 균주를 분리할 수 있는 표현형 선택 접근법이 제시되었다. 그 중, 형광 활성화 세포 분류(FACS) 시스템은 생화학적 표현형 확인 및 웰 플레이트 분석을 포함하는 기존 세포 스크리닝 방법의 낮은 처리량을 극복하기 위해 균주 선택에 널리 사용되었다. 그러나, 이 방법은 높은 자본 및 운영 비용과 낮은 생존율 등의 한계가 있었으며, 이러한 단점을 극복하기 위해 액적 미세유체학이 첨단 미세유체 기술로 고처리량 스크리닝에 도입되었다. 비혼화성 상에 현탁된 마이크로미터 크기의 액적인 미세 방울은 T자형 미세 유체 채널에서 수성상과 오일상 사이의 접촉에 의해 생성될 수 있다. 미세 방울은 개별 반응기 역할을 할 수 있으므로, 조합 스크리닝, ddPCR(액적 디지털 중합효소 연쇄 반응) 및 단일 세포의 생리학적 연구를 포함한 대규모 병렬 실험이 가능하다. 또한, 초고속 생성 속도, 작은 샘플 볼륨, 향상된 감도 및 분석 시간 감소로 인해 미세 액적 기반 스크리닝 시스템은 높은 처리량 방식으로 큰 유전적 다양성을 탐색하는 데 큰 잠재력을 보여준다. 이러한 시스템은 실험실 진화에 지속적으로 기여하였으며 특별한 돌연변이 균주를 확보하는 데 사용될 수 있다.

[0005] 본 발명자는 이러한 미세액적 기반 스크리닝 시스템을 이용하여 고속으로 성장하는 신규 돌연변이 미세조류를 확인하였고 나아가 해당 신규 미세조류가 SNF2 유전자의 발현이 되지 않음을 확인하였으며, 이러한 돌연변이 미세조류가 성장 조절제를 보충하거나 배양 조건의 추가 최적화 없이도, 야외 배양에서 뛰어난 바이오매스 생산성을 나타내는 것을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 하나의 목적은 수크로스 비발효성 2 슈퍼패밀리 단백질의 활성이 약화된 변동 광 조건에서 세포 성장성 및 지질 생산성이 향상된 돌연변이 미세조류를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 돌연변이 미세조류, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 포함하는, 바이오매스 또는 바이오연료 생산용 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 미세조류를 배양하는 단계를 포함하는 바이오매스 또는 바이오연료 생산방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 미세조류를 배양하는 단계를 포함하는 바이오매스 또는 바이오연료 생산성 증진 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 본원에서 개시되는 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술되는 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 할 수 없다.

[0013] 또한, 당해 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 통상의 실험만을 사용하여 본 출원에 기재된 본 발명의 특정 양태에 대한 다수의 등가물을 인지하거나 확인할 수 있다. 또한, 이러한 등가물은 본 발명에 포함되는 것으로 의도된다.

[0014] 아울러, 본원의 명세서 전체에 있어서, 어떤 부분이 어떤 구성 요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성 요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0016] 본 발명은 종래 변동 광 조건에서 미세조류 세포 성장성이 느리고 지질 생산성이 낮은 문제의 해결을 위하여, 특정 단백질의 활성이 약화된 돌연변이 미세조류가 변동 광 조건에서도 보다 효과적으로 세포 성장성이 우수함과 동시에 지질 생산성이 향상될 수 있음을 새롭게 규명한 것에 기인한다.

[0017] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 바람직한 실시형태를 상세히 설명하기로 한다.

[0019] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 수크로스 비발효성 2 슈퍼패밀리 단백질의 활성이 약화된 변동 광 조건에서 세포 성장성 및 지질 생산성이 향상된 돌연변이 미세조류를 제공한다.

[0020] 본 발명의 용어, “미세조류” 광합성 작용을 하는 수중에 존재하는 식물 플랑크톤을 말한다. 50여만 종으로 해양 또는 담수에 존재하고, 온천, 심해 등의 열악한 환경에서도 생명력을 가지며, 바이오 연료 및 기능성 단백질로서 활용도가 높다고 보고된다.

[0021] 본 발명의 미세조류는 미세조류에서 특정 단백질의 활성이 약화하도록 변형된 돌연변이 미세조류일 수 있다.

[0022] 구체적으로, 상기 “돌연변이 미세조류”는 수크로스 비발효성 2 슈퍼패밀리 단백질의 활성이 약화되도록 변형된 미세조류일 수 있으며, 구체적으로는 수크로스 비발효성 2 슈퍼패밀리 단백질의 활성이 약화되지 않은 모균주에 비하여 변동 광 조건에서 세포 성장성 및 지질 생산성이 향상된 것이 특징이다.

[0023] 본 발명의 용어, “수크로스 비발효성 2 슈퍼패밀리 단백질”은 전사(transcription) 조절, 유사분열(mitosis) 중 염색체의 안정성 유지, 뉴클레오티드의 절단 복구, 재조합 경로, 복제후 갭 복구를 포함하는 DNA 손상과 관련된 복구와 같은 역할들을 다양한 종에서 수행할 수 있다.

[0024] 상기 수크로스 비발효성 2 슈퍼패밀리 단백질 단백질은 공지된 데이터 베이스인 NCBI Genbank에서 확인할 수 있다. 또한 이에 상응하는 활성을 가지면서 다른 유래의 단백질이라면 제한없이 포함될 수 있다. 구체적으로는, 상기 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 단백질일 수 있으며, 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되는 단백질, 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 단백질, 또는 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 단백질과 혼용되어 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0025] 상기 단백질은 서열번호 1 및/또는 상기 서열번호 1과 적어도 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 상동성(homology) 또는 동일성(identity)을 가지는 아미노산 서열일 수 있다. 또한, 이러한 상동성 또는 동일성을 가지며 상기 단백질에 상응하는 효능을 나타내는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질도 본 출원의 범위 내에 포함됨은 자명하다.

[0026] 더불어, 공지의 유전자 서열로부터 조제될 수 있는 프로브, 예를 들면, 상기 폴리펩티드를 암호화하는 염기서열의 전체 또는 일부에 대한 상보 서열과 엄격한 조건 하에 하이브리드화되는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 폴리펩티드로서, 수크로스 비발효성 2 슈퍼패밀리 단백질의 활성을 갖는 폴리펩티드도 제한 없이 포함될 수 있다.

[0027] 상기 수크로스 비발효성 2 슈퍼패밀리 단백질은 SNF2 유전자에 의해 코딩되는 것일 수 있다.

[0028] 본 발명에서 용어 "폴리뉴클레오티드"는 DNA 또는 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 가지며, 폴리뉴클레오티드에서 기본 구성 단위인 뉴클레오티드는 천연 뉴클레오티드 뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체도 포함할 수 있다(Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, Chemical Reviews, 90:543-584(1990) 참조).

[0029] 상기 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 수크로스 비발효성 2 슈퍼패밀리 단백질 또는 이의 기능적 단편의 활성을 갖는 단백질을 코딩할 수 있는 서열이라면 제한 없이 포함될 수 있다.

[0030] 일 예로, 상기 SNF2 유전자는 서열번호 2의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것일 수 있다.

[0031] 또한, 본 발명은 상기 유전자 서열을 모균주의 코돈 출연 빈도에 기반하여 코돈 최적화한 서열도 포함할 수 있음이 자명하다.

[0033] 본 발명에서 용어, “활성 약화”는 특정 단백질의 활성을 약화시키는 것을 말한다.

[0034] 특정 단백질 및/또는 유전자의 활성을 불활성화 하는 방법은 미생물이 가진 특징에 따라 당해 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 수행될 수 있다.

[0036] 상기 미세조류는 그 종류가 특별히 제한되지 않으나, 구체적으로는 클라미도모나스(Chlamydomonas) 속일 수 있으며, 보다 구체적으로는 클라미도모나스 레인하티(Chlamydomonas reinhardtii)일 수 있다.

[0037] 상기 "클라미도모나스 레인하티"는 두 개의 편모와 함께 헤엄치는 직경 약 10마이크로미터의 단세포 녹조류로, 하이드록시프롤린이 풍부한 당단백질로 이루어진 세포벽, 커다란 컵 모양의 엽록체, 커다란 피레노이드, 빛을 감지하는 안점을 가지고 있다.

[0038] 클라미도모나스 속 미세조류는 토양과 담수에 전 세계적으로 널리 분포되어 있는데, 그 중 클라미도모나스 레인하티는 연구가 많이 된 생물학적 모델 유기체이며, 부분적으로는 배양이 용이하고 유전학을 조작할 수 있는 능력이 있다. 클라미도모나스 레인하티는 조명이 있을 시 광독립영양적으로 자랄 수 있으나 유기 탄소가 공급되면 어둠 속에서도 자랄 수 있다. 상업적으로 클라미도모나스 레인하티는 바이오 의약품 및 바이오 연료 생산에 관심이 있을 뿐만 아니라 수소를 만드는 데 유용한 연구 도구로 알려져 있다.

[0039] 상기 클라미도모나스 레인하티는 클라미도모나스 라인하르드티와 혼용되어 사용될 수 있다.

[0040] 본 발명자들은 변동 광 조건에서 세포 성장성 및 지질 생산성이 향상된 신규 균주를 한국생명공학연구원 미생물자원센터에 기탁하여 기탁번호 KCTC18917P(2021.09.17). 또는 KCTC18918P(2021.09.17)를 부여받았다.

[0041] 본 출원의 제조된 돌연변이 균주는 모균주를 돌연변이시켜 원하는 변이주를 얻을 수 있다. 이때, 미생물의 돌연변이 유발은 해당 분야에서 널리 알려진 다양한 수단에 의해 수행될 수 있으며, 물리적 혹은 화학적 돌연변이 발생 둘 중의 하나의 방법을 사용할 수 있다. 예를 들어, 본 출원에 적합한 돌연변이 유발 요인으로 삽입 돌연변이 방식을 이용할 수 있으며, 그 외 물리적 돌연변이나 화학적 돌연변이 요인 모두 자유롭게 사용하여 돌연변이 균주를 제작할 수 있다.

[0042] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 클라미도모나스 레인하티를 모균주로 하여 돌연변이시켰을 때, 제조된 돌연변이 균주에서 SNF2 유전자 발현이 되지 않는 것을 확인함으로써, 제조된 클라미도모나스 레인하티 신규 균주가 변동 광 조건에서도 세포 성장성과 지질 생상성이 모균주 대비 현저히 증가되는 것을 확인하였다.

[0044] 본 발명의 또 다른 실시양태는 상기 돌연변이 미세조류, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 포함하는, 바이오매스 또는 바이오연료 생산용 조성물을 제공한다.

[0045] 상기 용어, "돌연변이 미세조류"는 상기에서 설명한 바와 같다.

[0046] 본 발명에서 용어, "이의 배양물" 본 발명의 클라미도모나스 레인하티 미세조류의 배양물을 의미하는 것으로, 본 발명의 미세조류를 배지에서 배양하여 생기는 배양 결과물을 말한다. 일 예로, 본 발명의 균주의 배양물의 여과액 또는 배양물을 원심분리한 배양 상등액을 포함할 수 있다.

[0047] 용어, "이의 파쇄물"은 본 발명의 클라미도모나스 레인하티 균주의 파쇄물로서, 상기 균주를 파쇄하여 방출될 수 있는 균주 내에 존재하는 모든 유용 물질을 포함하는 것을 의미한다.

[0048] 용어, "이의 추출물"은 본 발명의 클라미도모나스 레인하티 균주를 용매를 이용하여 추출한 추출물을 의미하는 것으로서, 용매는 공지된 것이라면 제한 없이 포함될 수 있고, 추출 방법 또한 제한 없이 포함될 수 있다.

[0049] 용어, "배양물의 추출물"은 본 발명의 클라미도모나스 레인하티 균주의 배양물을 용매를 이용하여 추출한 추출물을 의미하는 것으로서, 용매는 공지된 것이라면 제한 없이 포함될 수 있고, 추출 방법 또한 제한 없이 포함될 수 있다.

[0050] 용어, "파쇄물의 추출물"은 본 발명의 클라미도모나스 레인하티 균주 파쇄물을 용매를 이용하여 추출한 추출물을 의미하는 것으로서, 용매는 공지된 것이라면 제한 없이 포함될 수 있고, 추출 방법 또한 제한 없이 포함될 수 있다.

[0051] 상기 본 발명의 클라미도모나스 레인하티 균주, 이의 배양물, 이의 파쇄물, 이의 추출물, 상기 배양물의 추출물 또는 상기 파쇄물의 추출물은 조성물 대비 5~70 중량% 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로, 5 중량% 미만일 경우에는 그 효과가 미비하고, 70 중량%를 초과하는 경우에는 사용량 대비 효과 증가가 미미하여 비경제적일 수 있다.

[0053] 상기 용어, “배양”은 상기 돌연변이 미세조류가 성장할 수 있도록 하는 것으로서, 본 발명의 미세조류를 배양하기 위한 배지 및 배양조건은 숙주 세포에 따라 적절히 선택 이용할 수 있다. 영양배지는 숙주세포의 생육에 필요한 탄소원 무기질소원 또는 유기질소원을 포함하고 있는 것이 바람직하다. 탄소원으로는 글루코오스, 덱스트란, 가용성 전분, 수크로오스, 및 메탄올 등이 예시된다. 무기질소원 또는 유기 질소원으로는 암모늄염류, 질산염류, 아미노산, 콘스팁 리쿼(corn steep liquer), 펩톤, 카제인, 소 추출물, 대두백, 및 감자추출물 등이 예시된다. 필요에 따라 다른 영양소, 예를 들어 염화나트륨, 염화칼슘, 인산이수소나트륨, 염화마그네슘 같은 무기염, 비타민류, 및 항생물질(테트라사이클린, 네오마신, 암피실린, 및 카나마이 신)등을 포함할 수 있다. 배양시는 세포의 생육과 단백질의 대량 생산에 적합하도록 온도, 배지의 pH 및 배양 시간 등의 조건들을 적절하게 조절할 수 있다.

[0054] 보다 구체적으로, 본 발명에서의 상기 배양은 CO2를 포함하는 산업 배기가스를 활용한 광 배양일 수 있으며, 보다 구체적으로는 변동 광 조건에서 배양하는 것일 수 있다.

[0055] 본 발명에 따르면, 산업 배기가스 내 포함된 CO2를 단독 탄소원으로 활용하여 미세조류 바이오매스 및 해당 생물 유래 바이오연료 (바이오디젤)를 생성할 수 있다. 여기서, 산업 배기가스 내 포함된 CO2를 단독 탄소원으로 활용하여 미세조류 바이오매스 및 해당 생물 유래 바이오연료 (바이오디젤)를 생성할 수 있다. 상기 실제 산업 배기가스를 활용한 바이오매스 및 바이오연료 생 산은 광생물반응기에서 수행될 수 있으며 고농도 CO2 (CO2 약 13%, 질소 산화물 약 20 ppm, 황 산화물 약 32 ppm) 또는 저농도 CO2가 포함된 산업 배기가스를 해당 광생물반응기에 주입하여 수행될 수 있다.

[0056] 또한, 상기 실제 산업 배기가스를 활용한 바이오매스 및 바이오 연료 생산은 유동적인 광도 조사 및 가변적인 온도 조건이 나타나는 옥외조건에서 수행될 수 있다.

[0058] 본 발명의 또 다른 실시양태는 상기 클라미도모나스 레인하티 변이주를 이용하여 바이오매스 또는 바이오 연료를 생산하는 방법을 제공한다.

[0059] 또한, 본 발명의 또 다른 실시양태는 상기 클라미도모나스 레인하티 변이주를 이용하여 바이오매스 또는 바이오연료를 생산성 증진 방법을 제공한다.

[0060] 상기 용어, “돌연변이 미세조류”는 상기에서 설명한 바와 같다.

[0061] 구체적으로, 본 발명의 생산방법은 상기 클라미도모나스 레인하티 변이주를 배양하여 배양물을 수득하는 단계를 포함하며, 추가로 상기 수득한 배양물로부터 바이오매스 또는 바이오연료를 회수하는 단계를 포함할 수 있다.

[0062] 이때, 상기 “클라미도모나스 레인하티”, “바이오매스 또는 바이오연료” 및 “배양”에 대한 설명은 상기에서 서술한 바와 같다,

[0063] 상기 방법에 있어서, 상기 미세조류를 배양하는 단계는, 특별히 이에 제한되지 않으나, 공지된 회분식 배양방법, 연속식 배양방법, 유가식 배양방법 등에 의해 수행될 수 있으며, 일 예로는 유가식 배양방법으로 배양될 수 있다.

[0064] 이때, 배양조건은, 특별히 이에 제한되지 않으나, 염기성 화합물 (예: 수산화나트륨, 수산화칼륨 또는 암모니아) 또는 산성 화합물 (예: 인산 또는 황산)을 사용하여 적정 pH (예컨대, pH 5 내지 9, 구체적으로는 pH 6 내지 8, 가장 구체적으로는 pH 6.8)를 조절할 수 있고, 산소 또는 산소-함유 가스 혼합물을 배양 물에 도입시켜 호기성 조건을 유지할 수 있다. 배양온도는 20 내지 45 ℃, 구체적으로는 25 내지 40 ℃를 유지할 수 있고, 약 10 내지 200 시간 동안 배양할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 배양에 의하여 생산된 퓨트레신은 배지 중으로 분비되거나 세포 내에 잔류할 수 있다.

[0065] 아울러, 사용되는 배양용 배지는 세린, 글루타메이트, 글리신 또는 이들의 조합을 포함할 수 있고, 구체적으로는 글루타메이트 및 글리신 조합을 포함하는 것일 수 있다.

[0066] 상기 배양용 배지는 탄소 공급원, 질소 공급원 및/또는 인 공급원을 추가로 포함할 수 있으며, 그 외 공급원도 추가로 포함할 수 있다.

[0067] 본 발명의 상기 배양 단계에서 생산된 바이오매스 또는 바이오연료를 회수하는 방법은 배양방법에 따라 당해 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 배양액으로부터 목적하는 바이오매스 또는 바이오연료을 수집할 수 있다. 예를 들어, 원심분리, 여과, 음이온 교환 크로마토그래피, 결정화 및 HPLC 등이 사용될 수 있으며, 당해 분야에

공지된 적합한 방법을 이용하여 배지 또는 미생물로부터 목적하는 산물을 회수할 수 있다.

[0069] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 액적 미세유체 플랫폼(microsystem)을 사용하여 세포 성장률이 높은 돌연변이 균주를 선택하고 태양광 및 산업적 CO2 공급 조건에서 PBR(거시 시스템)에서 이러한 돌연변이 균주를 대규모 야외 배양한 결과, 본 발명의 돌연변이 균주는 배양 조건의 추가 최적화 없이 야생형 균주에 비해 향상된 바이오매스 생산성(34.38%), CO2 고정율(45.07%) 및 발열량(16.82%)을 나타내는 것을 확인하였다.

[0070] 이로써 그동안 미세조류 기반 CO2 생물전환에서 장애물이 되어온 야외 배양에서 최대 생산성을 달성할 수 있다.

발명의 효과

[0072] 본 발명에서 제공하는 클라미도모나스 레인하티 변이주는 변동 광 조건에서도 세포 성장성 및 지질 생산성이 우수하므로, 다양한 빛 조건과 관련된 세포의 생리학적 반응 및 대사 경로 분석과 같은 다양한 응용 분야에서 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0074] 도 1은 본 발명의 돌연변이 미세조류 제조에 관한 도이다.

도 2는 자연광 아래 야외 대량 재배에서 미세조류 생산성을 향상시키기 위한 미세 액적 접근법의 개략도이다.

도 3은 미세 액적 광생물 반응기 시스템에서 변동하는 조명 조건에서 미세조류의 광독립영양 배양을 나타낸다.

도 4는 빠르게 성장하는 돌연변이 균주의 스크리닝을 위한 겔 미세 방울의 밀도 구배 원심분리를 나타낸다.

도 5는 변동하는 빛 조건에서 선택된 MT 균주의 광합성 활성을 나타낸다.

도 6은 WT 및 돌연변이 균주의 세포 성장이 꾸준하고 변동하는 광 조건 하에서 배양되는 것을 확인한 도이다.

도 7은 참조 게놈 상의 HygR 삽입 부위 결정과 관련한 도이다.

도 8은 지질이 풍부한 바이오매스 생산을 위해 자연 햇빛과 LNG 연소 배가스를 활용한 미세조류의 실외 대량 배양 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0075] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0077] **실험예. 재료 및 방법**

[0078] **실험예 1. 미세조류 균주 및 배양 조건**

[0079] 클라미도모나스 라인하르드티(Chlamydomonas reinhardtii, C. reinhardtii) 야생형 균주 CC125를 미네소타 대학의 클라미도모나스 리소스 센터(Chlamydomonas Resource Center)에서 입수했다. 대표적인 모델 미세조류 종인 C. reinhardtii는 게놈 프로젝트를 수행한 최초의 조류이다. 따라서 C. reinhardtii를 돌연변이 균주의 추가 특성화로 잠재적인 생물학적 경로를 설명하기 위해, 본 발명에서 이용하였다. 배양 중 세포 농도를 최소 샘플 부피로 신속한 분석을 위해, UV-1800 UV 분광 광도계(Shi madzu, Japan)를 사용하여 800 nm에서 광학 밀도(OD)를 측정하여 모니터링하였다. 배양된 미세조류의 초기 농도는 실험실 규모와 대규모 배양 모두에서 OD800을 기준으로 0.05로 결정하였다.

[0081] **실험예 2. 미세유체 소자의 설계 및 제작**

[0082] 미세 액적의 생성, 배양 및 분리를 위한 미세 유체 장치를 AutoCAD(Autodesk, Inc., San Rafael, CA, USA)를

사용하여 설계하였다. 미세유체의 2차원 구조를 포토마스크 필름에 인쇄했다(Han & All Technology, Ansan, South Korea). 3차원 마스터 몰드를 표준 네거티브 포토리소그래피에 의해 네거티브 포토레지스트(SU-8 50; Microchem, Westborough, MA, USA)로 코팅된 실리콘 웨이퍼 위에 제작하였다. PDMS 기반 미세유체 시스템을 Sylgard 184 실리콘 엘라스토머 베이스와 경화제를 10:1 비율로 혼합하여 제조하였다. PDMS 프리폴리머를 마스터 몰드에 붓고, 데시케이터와 진공 펌프를 사용하여 가스를 제거한 후, 80℃의 오븐에서 12시간 동안 경화시켰다. 이후 생검 펀치를 사용하여 입구 및 출구 구멍을 펀칭하고, PDMS 슬래브를 O2 플라즈마 처리 후 유리 슬라이드에 접촉되도록 하여 비가역적 결합을 형성하여, 미세 유체 채널을 제작하였다. 안정적인 미세 액적 생성을 위해, 상기 제작된 미세유체를 사용 1일 전에 120℃에서 보관하여 소수성을 복원하였다.

[0084] **실험예 3. 겔 미세방울의 생성 및 겔화**

[0085] 60℃로 유지한 N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonic acid 배지에 돼지 피부 젤라틴(G1890; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 혼합하여 5% 용액을 제조하였다. 분산상 생성을 위해, 상기 용액을 세포 현탁액과 혼합하여 최종 세포 밀도가 5×10^5 cells mL^{-1}, 총 겔 농도가 2%가 되도록 하였다. 연속상으로 0.1%(w/w) Pico-Surf 계면활성제(Dolomite Microfluidics, Hertfordshire, UK)를 포함하는 저점도 플루오르화 오일(HFE-7500, ρ = 1.614g cm^{-3})을 사용하였다. 겔화 방지를 위해, 겔상이 적재된 용기와 연결된 튜브를 핫 플레이트와 튜빙 히터를 사용하여 30℃로 유지하였다. 미세 유체 흐름 제어 시스템(MFCS™; Fluigent, Kremlin-Bicetre, France)을 사용하여 각각 400mbar 및 320mbar에서 미세 유체 내부의 흐름 초점 구조에 분산 및 연속 상을 주입하였다. 겔화 촉진을 위해, 겔 미세 방울을 4℃에서 24시간 동안 배양하였다. 겔화 후, 조밀한 오일 상을 피펫을 사용하여 제거하고, Pico-Break(SF 000156; Sphere Fluidics, Cambridge, UK)을 1:1000의 부피비로 나머지 액적 층의 상단에 첨가하였다. Pico Break가 모든 미세 방울을 통과하여 바닥으로 가라앉으면, 미세 방울을 수상으로 옮기고, 피펫을 사용하여 세척하였다. 겔이 녹는 것을 방지하기 위해 모든 공정을 10℃ 이하에서 수행하였다.

[0087] **실험예 4. 변동하는 조명 조건 설정 및 조명 강도 추정**

[0088] 광변동 제어 시스템을 LED 바 어레이, 금속산화물 반도체 전계효과 트랜지스터(MOSFET) 모듈, 및 아두이노 UNO 광센서 시스템(컨트롤러)으로 구성하였다. 상기 LED 막대 어레이를 1,016 μmol 광자 $m^{-2}s^{-1}$의 최대 광 강도를 달성하기 위해, 여러 개의 12V LED 막대(색온도: 6,500K)를 조립하여 제작하였다. 높은 조명 조건은 재배 규모와 시스템에 따라 다를 수 있지만, 1,016 μmol 광자 $mm^{-2}s^{-1}$의 광 강도에서 성장 억제가 발생할 수 있으므로, 이러한 광도를 고조도 조건으로 설정하였다. 빛의 강도는 LED 막대의 출력으로 결정하고, Arduino UNO의 PWM(펄스 폭 변조) 신호로 조절할 수 있다. PWM 신호는 LED 바에 공급되는 신호의 양을 제어하는 MOSFET 모듈로 전송된다. 시변 PWM 신호 코드를 Arduino UNO에 로드하여 다양한 조명 변동을 구현하였다.

[0090] **실험예 5. 돌연변이 라이브러리의 제조**

[0091] 전기천공법으로 C. reinhardtii CC125의 핵 형질전환을 수행하여 삽입 미세조류 돌연변이를 제조하였다. 정방향(5'-AACACGTAAAAAGCGAGGA-3') 및 역방향(5'-GGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTG-3') 프라이머를 사용하여 PCR로 하이그로마이신 내성 유전자 카세트인 aph7''을 pChlamy3 벡터에서 증폭하였다. 돌연변이 스크리닝을 위해, pChlamy3 벡터의 PCR 증폭을 통해 얻은 하이그로마이신 내성 유전자 카세트의 전기천공으로 돌연변이 라이브러리를 제조하였다.

[0092] 그 결과, 야생형(WT) 균주는 하이그로마이신을 함유한 한천 플레이트에서 콜로니를 생성하지 않았다. 그러나 돌연변이(MT) 균주는 하이그로마이신 내성으로 인해 다중 콜로니를 형성하였다(도 1). 그 다음 무작위 삽입 돌연변이 유발로 생성된 MT 균주에서 하이그로마이신 내성 유전자가 게놈 DNA(gDNA)에 무작위로 삽입되었다(표 1). 이후 PureHelix™ Genomic DNA Prep Kit(NanoHelix, Daejeon, South Korea)를 사용하여 gDNA를 추출하였다.

표 1

Gene	Direction	Primer sequence
Hygromycin resistance (foreign gene)	Forward	5′-TCTTGCGCTATGACACTTCCA-3′
	Reverse	5′-CCAGTCTTGCCGGATCCTTAT-3′
Cre06.g304000	Reverse	5′-GCCCTCATCCCAGTCCTAGA-3′

[0093]

[0095] **실험예 6. 미세방울 PBR 시스템을 이용한 미세조류 세포 배양**

[0096] 미세조류 세포를 포함하는 미세 방울을 4,088 × 80 × 96,460 μm 구불구불한 미세 채널(각각 너비, 높이 및 길이)을 포함하는 미세 유체 칩으로 옮겼다. 미세 액적 증발을 방지하기 위해, 미세유체 칩을 습도가 높은 5% CO_2를 유지하는 투명한 용기에 보관하였다. 야외에서 햇빛 조건에서 배양할 수 있는 빠르게 성장하는 돌연변이 균주를 수득하기 위해, 인공 변동광을 1,016 μmol 광자 $mm^{-2}s^{-1}$의 최대 광 강도로 4분마다 설정하고, 24 μmol 광자 m2s1에서 시작하여 광 강도를 높였다. 미세 액적 내 미세 조류 세포의 현미경 이미지 및 형광 이미지를 매일 획득하고 육안으로 세포 수를 측정하였다.

[0098] **실험예 7. 겔 미세 방울의 회수**

[0099] 미세 액적의 겔화를 위해 미세 유체 칩을 4℃에서 보관하였다. 그 다음, 미세 액적을 미세 유체의 입구에 주입하고, 오일 상을 주사기를 사용하여 주입하여 미세 방울이 배출구를 통해 빠져나갈 수 있도록 하였다. 미세 채널을 빠져나가는 미세 방울을 피펫을 사용하여 밀도 구배의 상층에 조심스럽게 적재하였다. 그런 다음, 주사기를 스윙 버킷 로터에 고정하고 400 x g에서 5분 동안 원심분리하였다.

[0101] **실험예 8. 성장성 평가**

[0102] 미세 방울의 수동 수집을 위해 밀도 구배 내에 분포된 미세 방울이 포함된 주사기의 플런저를 수동으로 밀어 미세 방울을 12회 수집하였으며, 한 번의 회수로 103-219개의 균주를 얻었다. 이후 미세유체 채널을 통과한 미세 방울은 120초 동안 12회 순차적으로 수집되었으며, 한 번의 회수로 131-214개의 미세 조류 균주를 획득하였다. 수득한 균주를 50 μg mL-1 hygromycin B를 포함하는 tris-acetate-phosphate 배지(TAP) 한천 플레이트에 도말하였다. 한천 플레이트에 형성된 집락을 30 μg mL^{-1} 하이그로마이신 B가 보충된 200 μL의 TAP 배지를 포함하는 96-웰 마이크로타이터 플레이트로 옮겼다. 배양 1주 후, 세포를 평균 OD가 0.1인 48웰 마이크로타이터 플레이트에 접종하였다. CO2를 공급하기 위해 미세역가 플레이트를 통기성 필름으로 덮고 변동하는 빛 조건에서 3일 동안 배양하였다. 이 때 OD는 Infinite 200 PRO 마이크로플레이트 리더(Tecan Group Ltd., M¨ annedorf, Switzerland)를 사용하여 측정하였으며, 값은 box-and-whisker plot으로 표시하였다.

[0104] **실험예 9. 엽록소 형광 측정**

[0105] 초기 지수 단계에서 저조도(LL)의 50 μmol 광자 $mm^{-2}s^{-1}$에서 성장한 미세조류 세포를 수집하였다. 30㎍의 엽록소 a를 함유하는 세포 현탁액을 유리 섬유 필터에 로딩하고 리프 클립에 넣었다. 엽록소 형광은 FMS2 형광계(Hansatech, Norfolk, UK)를 사용하여 측정하였다. ΦPSII의 실제 양자 수율을 결정하기 위해, 암순응되지 않은 세포에 1에서 850 μmol 광자 $mm^{-2}s^{-1}$까지 단계적으로 증가하는 활성 광선을 조사하였다. 20초마다 0.7초에서 1,800 μmol 광자 $mm^{-2}s^{-1}$의 포화 플래시를 적용하여 화학광 조명(Fm') 동안 최대 형광을 측정하였다. 그런 다음, 정상 형광 수준을 나타내는 Fs를 측정하고, ΦPSII를 (Fm' -Fs)/Fm'로 계산하였다. 조명 조건의 변화에 따른 ΦPSII의 변화를 확인하기 위해, 저조도에서 측정된 ΦPSII를 기반으로 정규화를 통해 다른 조명 조건에서의 상대

ΦPSII를 계산하였다. 광계2 광화학의 최대 양자 수율(Fv/Fm)을 측정하기 위해, 필터에 로딩된 세포를 습도가 유지될 수 있는 페트리 접시에서 30분 동안 암순응(dark 적응) 처리하였다. 원적외선 조사 5분 후, 화학광 조명 전의 어둠 속에서 최대(Fm) 및 최소(F0) 형광 수준을 측정하였다. 이 때, 최대 가변 형광 Fv는 Fm과 F0의 차이에서 구하여 Fv/Fm을 계산할 수 있다.

[0107] **실험예 10. 전체 지놈 재배열**

[0108] 세포 배양 동안, 후기 지수기의 세포 현탁액 1mL를 수집하고, 1,977 x g에서 10분 동안 원심분리하여 세포 펠렛을 수확하였다. 제조사의 지침에 따라 PureHelix™ Genomic DNA Prep Kit(Nanohelix)를 사용하여 gDNA를 추출하고, 분광광도법(NanoDrop; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)을 수행하여 순도와 농도를 평가했다. Qubit 형광측정기(Thermo Fisher Scientific) 및 아가로스 겔 전기영동을 사용하여, 각각 샘플 및 무결성을 정량화했다. 전체 지놈 재배열은 TruSeq Nano DNA 샘플 준비 키트(Illumina, San Diego, CA, USA)를 사용하여 350bp 단편('판독'이라고 함)으로 구성된 DNA-seq 라이브러리를 먼저 구성하여 수행하였다. 그런 다음, PCR 산물은 NCBI 데이터베이스의 C. reinhardtii 참조 지놈을 사용하여, Illumina NovaSeq 150PE 플랫폼에서 시퀀싱하였다. HygR 유전자를 참조 게놈에 매핑하기 위해 독립형 BLASTn이 사용되었다. 또한 읽기를 매핑하기 위해 Bowtie2가 도입되었다. 참조 게놈의 삽입 부위를 확인하기 위해 프라이머 서열을 설계하였다(표 1). PCR 증폭을 위해 PrimeSTAR® GXL DNA 중합효소(Takara Bio Inc., Shiga, Japan)를 사용하여 제조업체의 지침에 따라 3단계 PCR을 수행하였다.

[0110] **실험예 11. 세포내 ROS 검출 및 측정**

[0111] 세포 내 ROS 생성 분석을 위해, 3 x 106 미세조류 세포를 1,500 x g에서 5분 동안 원심분리하여 수집했다. 세포를 디메틸 설폭사이드에 용해된 10μM의 세포 투과성 H2DCFDA(Invitrogen, Waltham, MA, USA)를 함유하는 인산염 완충 식염수(PBS) 완충액에 재현탁시켰다. 암실에서 23℃에서 30분간 진탕 배양한 후, 세포를 PBS로 2회 세척하여 잔류 H2DCFDA를 제거하였다. H2DCFDA의 형광 강도는 TECAN Infinite 200 PRO 마이크로플레이트 리더(M ¨ annedorf, Switzerland)를 사용하여 각각 492 nm 및 525 nm의 여기 및 방출 파장에서 측정하였다. H2DCFDA(Ex: 504 nm/Em: 525 nm) 및 엽록소 자가형광(Ex: 655 nm/Em: 667 nm) 조건에서 LMS 800 레이저 공초점 현미경(Carl Zeiss, Dresden, Germany)을 사용하여 세포 내 ROS를 시각화하였다.

[0113] **실험예 12. 야외 재배**

[0114] 미세조류 대량 배양을 위하여, 한국지역난방공사(경기도 성남시 분당구 백현동)에 유리온실을 설치하였다. 미세조류 공장은 조작된 MT의 재배를 위해 한국 정부의 허가하에 운영되었다. 연도 가스를 0.2 vvm의 통기 속도로 배양 배지에 주입하고, 150L의 작업 부피에서 세포를 배양할 수 있는 고분자 PBR(컬럼 두께: 90mm)은 이전에 보고된 PBR에서 수정하였다. 산업용 배가스를 이용한 대규모 배양에 적합한 비용 효율적인 완충 시스템을 사용하였다. 총 8개의 PBR(4개의 WT 균주 및 4개의 MT 균주)을 온실에 교대로 배치하여 다양한 태양 조사 조건을 구현하였다. 이후, 아두이노 광센서 시스템을 광도의 실시간 변화를 감지하기 위해 PBR 근처에 설치하였다. 또한, 지질 유도를 위해 200mM의 NaCl을 성숙한 미세조류 세포를 포함하는 각 PBR에 첨가하였다.

[0116] **실험예 13. 통계 처리**

[0117] 통계적 유의성은 Student's t-test(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001)를 이용하여 분석하였다.

[0119] **실시예 1. 태양광에 의한 미세조류 CO2 전환 개선을 위한 미세 액적 접근법 개요**

[0120] 액적 기반 미세 유체 시스템을 사용하여, 실제 태양 조사를 모방한 빛 변동 하에서 재배되는 빠르게 성장하는 C. reinhardtii 삽입 돌연변이 균주를 선택하였다. 미세 액적은 미세 조류의 광독립영양 배양을 위한 광생물반응기(PBR) 역할을 하며, 또한, 미세 방울은 미세 유체 채널 내에서 단일 층으로 분포될 수 있으므로 변동하는 빛을 포함한 다양한 광 자극이 개별 세포로 완전히 전달될 수 있다(도 2a). 미세 액적에 의해 캡슐화된 미세조

류 세포는 광합성을 통해 외부 환경으로부터 CO2를 고정시켜 바이오매스를 증가시킨다. 따라서, 상대적으로 높은 성장률을 보이는 돌연변이 균주를 포함하는 미세 방울은 다른 미세 방울보다 밀도가 높다. 미세 방울을 빠르게 분리하기 위해, 미세 방울의 겔화를 통한 상전이와 함께 밀도 구배 원심분리를 활용하였다(도 2a 및 도 2b). 밀도 구배 컬럼에 분포된 미세 방울은 단일 미세 방울만 통과할 수 있는 미세 채널에 주입되었다(도 2c). 따라서 단일 액적 수준에서 미세 액적을 분류하는 것이 가능하였다. 이를 통해 우수한 바이오매스 생산성을 나타내는 돌연변이 균주를 스크리닝할 수 있었다.

[0121] 그 결과, 우수한 생산성을 갖는 돌연변이 균주를 선택하여 대규모 야외 재배에 적용해 본 결과, 도 2d에서 확인할 수 있는 것과 같이, 자연광 조건에서 바이오매스 생산성이 향상되는 것을 확인할 수 있었다(도 2d).

[0123] **실시예 2. 미세 방울 PBR을 사용하여 변동하는 빛에서 미세 조류의 재배**

[0124] 미세 액적 PBR에 돌연변이 라이브러리를 적용해 본 결과, 미세 액적에 97개의 세포가 포함되어 성장 억제가 없는 WT 균주에 비해 36.4% 증가하는 것으로 확인할 수 있었다. 또한, 본 발명의 돌연변이 균주는 다양한 표현형을 나타내므로 세포 성장 단계에서 비교적 다양한 세포 수 분포가 관찰되었다(도 3e 및 도 3f). WT 균주는 1.9 세포의 표준 편차를 보인 반면, 본 발명의 돌연변이 균주는 22.5 세포의 표준 편차를 보여 11.8배 증가를 나타내는 것을 확인할 수 있었다(도 3).

[0126] **실시예 3. 밀도 구배 원심분리를 통한 빠르게 성장하는 돌연변이체의 스크리닝**

[0127] 마이크로 액적 내부에서 배양 3일 후 원심분리를 위해, 미세 액적을 포함하는 미세유체 칩을 4℃에서 보관하여 겔화하고, 겔 미세 방울을 회수하기 위해 추가 오일 상을 주입하여 채널에서 미세 방울을 방출하였다. 이후 회수된 미세 액적을 세포 밀도에 따른 분리를 위해 밀도 구배의 상부 층에 로딩한 후(도 4c), 밀도 구배의 상대적으로 높은 유체 저항으로 로드된 미세 방울은 즉시 가라앉지 않고 밀도 구배의 상층에 수집되었다. 원심분리 후, 미세 액적은 특정 미세 액적 밀도에 해당하는 밀도 구배 컬럼의 특정 위치에 분포되었다. 상대적으로 높은 세포 농도를 가진 미세 방울은 밀도 구배의 맨 아래에 위치할 수 있으므로 밴드 강도는 위에서 아래로 증가하여 넓은 액적 분포를 나타내었다(도 4c). 그런 다음 3D 프린터를 사용하여 주사기에 분산된 미세 방울을 바닥에서 순차적으로 검색하기 위해 맞춤형 유압 펌핑 시스템을 제조한 후, 주사기 펌프를 사용하여 정확한 수압 제어로 수직으로 고정된 주사기에 유체 압력을 가했다. 따라서 고밀도 미세 방울이 주사기 바닥에서 순차적으로 방출되어 미세 유체 채널에 주입되어 고밀도 미세 방울의 안정적인 회수를 할 수 있었다(도 4d). 미세 액적을 수동으로 수집하는 경우, 미세 액적 회수 순서가 증가함에 따라 돌연변이 균주의 전체 세포 성장이 감소하였으나, 동시에 회수된 돌연변이군에서도 돌연변이체 간의 성장편차는 상당히 컸다(도 4e).

[0128] 첫 번째 회수된 균주는 가장 높은 평균 성장(OD800 = 1.152)을 보였으며(도 4f), 평균 성장은 회수 시간이 증가함에 따라 감소했다. 마지막으로 회수된 균주(OD800 = 0.156)는 초기 균주에 비해 성장이 86.43% 감소한 것으로 나타났다. 특히, 최초 회수 시 수득된 모든 돌연변이 균주는 WT 균주에 비해 개선된 세포 성장을 나타냈다. 변동하는 광 조건하에서 향상된 세포 성장을 나타내는 균주를 추가로 특성화하기 위하여, WT 균주에 비해 성장률이 2.3배 증가한 2개의 돌연변이(MT) 균주(10-2A1 및 P4C1)를 선택하였다.

[0130] **실시예 4. 변동하는 조명 조건에서 선택된 돌연변이 균주의 광합성 성능**

[0131] 빛 조사에 대한 WT 및 MT 균주의 성장 역학을 조사하기 위해, 약 56,000μmol 광자 m-2s-1의 총 광 강도를 정상 또는 변동 조건에서 24시간 동안 제공하였다. 그 결과, 변동하는 조명 조건에서 MT 균주의 최종 세포 농도는 WT 균주에 비해 최대 1.85배까지 증가하는 것을 확인할 수 있었다($p < 0.001$)(도 5a). 결과적으로, WT 균주의 성장은 53.8% 감소한 반면, 본 발명의 MT 균주의 성장은 정상 광 조건과 비교하여 1.24%(10-2A1) 및 0.66%(P4C1) 증가하는 것을 확인하였다(도 6).

[0132] 이러한 관찰된 성장 차이를 유발할 수 있는 잠재적인 생물학적 경로 방법을 설명하기 위해, 변동하는 조명 조건에서 실시간으로 광합성 효율 지표의 변화를 모니터링했다. 광계2의 실제 양자 수율(ΦPSII)과 광계2 광화학의 최대 효율(Fv/Fm)은 각각 광합성 용량과 응력을 나타낸다. 낮은 강도와 *?*높은 강도의 빛이 교대로 세포에 공급됨에 따라 빛과 관련된 스트레스가 축적되어 시간이 지남에 따라 ΦPSII 값이 감소하는 것을 확인하였다(도 5c). ΦPSII의 전반적인 변화에도 불구하고, 본 발명의 MT 균주는 WT 균주보다 일관되게 더 높은 ΦPSII 값을

가지는 것을 확인하였다(10-2A1의 경우 $p < 0.05$). 특히, 본 발명의 MT 균주의 상대 Fv/Fm 값은 빛의 강도가 낮음, 높음, 낮음으로 순차적으로 변경되는 변동하는 빛 조건에서 WT 균주의 값보다 항상 상당히 높은 것을 확인할 수 있었다($p < 0.05$ 및 $p < 0.01$)(도 5d).

[0133] WT 균주의 상대 Fv/Fm의 최대 차이는 10-2A1 및 P4C1 MT 균주에 비해 각각 17.43% 및 15.44%였다. 광합성 효율 지표의 실시간 분석을 사용하여, 본 발명의 MT 균주가 세포 스트레스 요인으로 작용할 수 있는 강도의 빛의 지속적이고 빠른 변경에서도 WT 균주에 비해 향상된 광합성을 나타낸다는 것을 확인하였다. 이는 광독립영양 배양에서 광합성 효율을 개선하면 미세조류 세포의 전반적인 대사 경로를 활성화하여 스트레스 환경에서 지질 생합성 향상에 기여할 수 있음을 시사한다.

[0134] 미세조류 지질의 잠재적인 적용을 평가하기 위해, 수득한 바이오매스의 총 지질 함량 및 지방산 프로필이 질소 고갈 조건에서 확인하였다. 그 결과, 균형 잡힌 연료 특성을 가진 바이오디젤 생산을 위한 주요 성분인 올레산(C18:1 cis)의 함량이 WT보다 본 발명의 10-2A1 및 P4C1 MT 균주에서 2.91배 및 2.42배 높았다(표 2).

표 2

		CC125 (WT)	10-2A1 (MT)	P4C1 (MT)
FAME (mg/ 1 g of biomass)	C16:0	25.503 ± 2.041	37.757 ± 4.404	35.020 ± 3.631
	C16:1	0.909 ± 0.131	2.150 ± 0.378	2.044 ± 0.244
	C16:2	6.038 ± 0.160	3.678 ± 0.664	3.570 ± 0.418
	C16:3	6.041 ± 1.077	6.449 ± 0.386	4.993 ± 0.178
	C16:4	2.335 ± 0.210	3.456 ± 0.209	2.894 ± 0.237
	C18:0	1.863 ± 0.371	12.215 ± 1.473	10.235 ± 1.015
	C18:1 trans	3.794 ± 0.628	5.096 ± 0.388	4.359 ± 0.305
	C18:1 cis	5.386 ± 0.904	15.667 ± 1.010	13.029 ± 0.421
	C18:2 cis	7.280 ± 1.011	7.531 ± 0.288	5.856 ± 0.262
	C18:3n6	11.454 ± 1.917	13.907 ± 0.962	10.811 ± 0.440
	C18:3n3	1.790 ± 0.351	1.497 ± 0.131	1.147 ± 0.035
	C18:4n3	–	0.583 ± 0.061	0.471 ± 0.049
Total FAME (%)		7.239 ± 0.848	11.000 ± 1.044	9.451 ± 0.786
Total lipids (%)		16.768 ± 4.004	31.103 ± 0.108	29.437 ± 3.015

[0135]

[0136] 나아가, 10-2A1 MT 균주가 WT 균주에 비해 포화 지방산 메틸 에스테르(FAME) 및 단일 불포화 FAME 수준은 각각 1.83~2.27배 증가시켰음을 확인하였다(상기 표 2). 또한, 자유 라디칼 공격에 대한 반응성 부위를 제공할 수 있는 다중불포화 FAME의 비율은 WT와 MT 균주 간에 크게 다르지 않았으며, 이는 MT가 개선된 품질의 바이오디젤을 생산할 수 있음을 시사하는 것이다. 유사하게, 본 발명의 10-2A1 및 P4C1 MT 균주는 WT 균주에 비해, 증가된 전체 FAME(200.3% 및 143.4%) 및 지질 함량(269.3% 및 225.0%)을 나타냈다(상기 표 2). 이러한 확인은 지질이 풍부한 미세조류 바이오매스를 직접 연소 연료로 사용할 수 있음을 보여주는 것이다.

[0138] **실시예 5. HygR 삽입 부위의 식별 및 특성화**

[0139] 광합성 효율 형질의 원인 인자를 확인하기 위해, 외래 하이그로마이신 내성 유전자 카세트가 삽입된 gDNA 영역을 조사하였다. 구체적으로, 10-2A1 MT 균주의 WGRS(whole-genome resequencing)를 통해 얻은 유전자 판독에 대해 참조 게놈 매핑을 수행했으며, 이는 우수한 광합성 성능을 나타낸다.

[0140] 삽입 부위를 식별하기 위해, 독립형 BLASTn 및 Bowtie2를 사용하여 다단계 매핑 프로세스를 수행했다. 그 결과, 참조 게놈의 삽입 부위에 대한 두 개의 후보를 확인할 수 있었다: 염색체_6: 6497634-6498183 및 염색체_6: 8013466-8013825. 게놈 서열은 후보 부위의 양쪽으로 1,000 bp 확장되었다. 또한, C. reinhardtii v5.5의 게놈

데이터를 기반으로 이들 염기서열 부근에 위치한 관련 유전자에는 Cre06.g293051, Cre06.g293100, Cre06.g304000, Cre06.g349200, Cre06.g3492350, 및 Cre가 포함됨을 확인하였다.

[0141] 발현 수준에서 영향을 받는 유전자 후보를 결정하기 위해, 이러한 유전자의 코딩 서열 영역을 증폭할 수 있는 프라이머 쌍으로 역전사 PCR(RT-PCR)을 수행했다(표 3).

표 3

Gene	Direction	Primer sequence
RACK1 (housekeeping)	Forward	5′-AGGTCTGGAACCTGACCAACT-3′
	Reverse	5’-AAGCACAGGCAGTGGATGA-3′
Cre06.g293051	Forward	5’-CCAGTGGAGAACAGGCTCAC-3′
	Reverse	5′-CCATATCGTTCGGGTCCAGG-3′
Cre06.g293100	Forward	5′-CGGCTTCATCAGCGGACA-3′
	Reverse	5′-GATGCGGTCCAGAGAGGC-3′
Cre06.g304000	Forward	5′-AAGGTGCTGGGGTACAAGC-3′
	Reverse	5′-TGATCGGCTTGAGCAGCG-3′
Cre07.g349200	Forward	5′-TCAGCGCCTACAACTCCTACA-3′
	Reverse	5′-TCTTCTTGTCCTTGTCGTCCTTC-3′
Cre07.g349250	Forward	5′-TGCGCTTATCCTCAGCAAGA-3′
	Reverse	5′-CGTAGAACTCGTCCGGCTC-3′
Cre07.g349300	Forward	5′-ACCACGAGATTGTGGACGAG-3′
	Reverse	5′-CGCCCCTTAATTGCGATGC-3′

[0142]

[0143] 그 결과, WT와 10-2A1 MT 균주 사이에서 대부분의 유전자의 상대적인 발현에서 거의 차이를 확인할 수 없었다. 대조적으로, Cre06.g304000의 null 발현은 10-2A1 MT 균주에서 확인되었다. 또한, 하우스키핑 유전자 RACK1(활성화된 단백질 키나제 C1의 수용체)의 밴드는 WT 및 10-2A1 MT 균주 모두에서 명확하게 확인된 반면, Cre06.g304000에 대한 밴드는 10-2A1 MT 균주에서 관찰되지 않았다(도 7b). 결과적으로, 수크로스 비발효성 2 슈퍼패밀리 단백질을 코딩하는 SNF2(NCBI의 Cre06.g304000)의 돌연변이가 C. 레인하르트티 MT 10-2A1 균주에서 확인할 수 있었다.

[0144] 하이그로마이신 내성 유전자의 프로모터에서 Cre06.g304000으로 증폭할 수 있는 프라이머 세트를 설계하여 이 후보 영역에 외래 유전자가 삽입되었는지 여부를 확인하기 위해, PCR 분석을 수행하였다(표 1). 그 결과, 프로모터와 터미네이터(1,754 bp)와 gDNA의 일부(1,328 bp)를 포함하는 하이그로마이신 내성 유전자로 구성된 PCR 앰플리콘 밴드(3,082 bp)를 확인할 수 있었다(도 7c 및 7d). 이를 통해, 본 발명의 10-2A1 MT의 표현형이 Cre06. g304000의 파괴로 인한 것임을 확인할 수 있었다. SNF2의 기능과 관련하여 SWI2/SNF2 염색질 리모델링 ATPase를 암호화하는 유전자인 BRAHMA(BRM)가 고등 식물 Arabi dopsis thaliana에서 엽록소 생합성을 조절한다고 보고된다. 이러한 맥락에서 SNF2 유전자의 발현이 빛의 세기 변화에 따라 역조절됨을 확인하였다(도 7e). 변동하는 조명 조건에서 WT 및 MT 균주의 총 엽록소 함량은 점차 감소했다. 그럼에도 불구하고, 배양 0일, 1일 및 2일 후, MT 균주는 WT 균주보다 통계적으로 유의하게 높은 엽록소 함량을 각각 8%, 10% 및 14% 나타내었다(도 7f). 특히 세포 손상을 일으키는 활성산소종(ROS)은 엽록소 합성과 분해 과정에서 축적될 수 있다. 세포 내 ROS 생산을 조사하여 WT의 ROS 함량은 74% 증가하는 반면, 본 발명의 10-2A1 MT 균주의 ROS 함량은 변동하는 빛 조건에서 21% 감소한 것으로 나타났다(도 7g). 따라서, 변동하는 광 조건 하에서 2일 배양 후, 2',7'-디클로로디히드로플루오레세인 디아세테이트(H2DCFDA)(ROS 수준)의 형광 강도는 10-2A1 MT 균주에서 현저히 낮은 것으로 확인하였다(도 7h).

[0146] **실시예 6. 태양광과 공업용 CO2를 활용한 미세조류 실외 대량 배양**

[0147] 열병합 발전(CHP) 플랜트의 산업용 CO2를 활용하는 대규모(약 1.6t 규모) 실외 배양으로 변동하는 광 조건 하에서 본 발명의 10-2A1 MT 균주의 개선된 성장의 재현성을 확인하였다.

[0148] 구체적으로, 자연 햇빛 조건에서 선별된 균주가 자연광 조건에서 생산성에 영향을 미칠 수 있는지 평가하기 위해, CHP 공장 근처에 설치된 대규모 배양 시스템에서 미세조류를 배양했다. 발전소의 배기 가스 배출은 송풍기 시스템과 가스 이송 파이프를 통해 온실 내부로 운송되었다(도 8a). 온실은 비, 바람, 급격한 온도 변화와 같은 피해를 줄 수 있는 외부 요인으로부터 재배 시스템을 보호하도록 설계하였다. 구체적으로, 약 3%-6% CO2와 소량의 NOx 및 CO를 포함하는 연도 가스를 추가 가스 처리 없이 스파저를 통해 200L 고분자 PBR에 주입하였다. 미세조류 재배 중 다양한 태양 조건을 반영하기 위해, PBR을 각 균주에 대해 교대로 배열하고 PBR 사이에 외부 광도 센서를 설치했다. 태양광 조건과 인공 광원이 없는 조건에서 광 강도는 변동하는 패턴을 나타낸다(도 8b). 전체 광도는 태양의 고도에 따라 변했다. 그러나 광도의 최대값과 최소값은 구름의 움직임과 다양한 기상 변화로 인해 짧은 기간 동안 크게 변했다. 그 결과, 대량 배양 시 WT와 MT 균주는 배양 7일차와 유의한 성장 차이($p < 0.05$)를 보였고, 10-2A1 MT 균주의 최종 세포 밀도는 WT 균주보다 37.86% 더 높은 것을 확인하였다(도 8c). 특히, 세포 농도의 차이는 PBR 이미지에서 명확하게 나타났다(도 8c, 왼쪽 상단). 일반적인 야외 배양 조건을 고려할 때, PBR은 서로 다른 균주를 포함하고 근접해 있기 때문에 교차 오염이 발생할 수 있다. 교차 오염을 평가하기 위해, 각 PBR에 대해 하이그로마이신 내성 유전자의 PCR 증폭을 수행했으며, WT 균주를 포함하는 PBR에서 PCR 밴드가 없음으로 입증되는 바와 같이, 10-2A1 MT 균주가 오염되지 않음을 확인하였다(도 2a).

[0149] 배양 32일 후, 각 PBR에 대한 미세조류 바이오매스를 수확, 건조 및 정량화하였다. 그 결과, 모든 MT 균주 PBR(#2, #4, #5 및 #7)이 모든 WT 균주 PBR(#1, #3, #6 및 #8)보다 더 높은 바이오매스 생산성을 나타냄을 확인하였다(도 8d). 특히, 추가 성장 인자의 보충 및 추가 세포 배양 최적화 없이, 10-2A1 MT 균주는 현장 조건에서 WT 균주에 비해, 바이오매스 생산성이 34.38% 증가하고 지질 함량이 33.69% 증가했다(도 8e).

[0150] 한편, 본 발명의 MT 균주는 대규모 시스템에서 발생하는 태양광 역학, 자체 음영 및 혼합 유도 암광 주기 간의 복잡한 상호 작용으로 인해 소규모에서 나타나는 우수한 성능을 유지하지 못했다. 그럼에도 불구하고, 종래 보고와 비교하여, 유전자 조작된 Scenedesmus obliquus 돌연변이(2형 디아실글리세롤 아실트랜스퍼라제(DGAT) 유전자의 과발현)가 햇빛과 40L PBR을 사용한 미세조류 규모 확대 과정에서 바이오매스 생산성을 20.0% 증가시켰다. 특히, CO2 저감 능력의 관점에서, 바이오매스의 광독립영양적 생산 동안 고정된 CO2의 양을 나타내는 CO2 고정률은 탄소 함량 및 바이오매스 생산성 향상으로 45.07%(도 8e) 개선되었다. 추가 후처리 공정 없이도, 지질 함량이 높은 미세조류 바이오매스를 연소 연료로 직접 활용하는 것은 다운스트림 공정에서 탄소 재배출을 고려하여 에너지 수율을 극대화하는 효과적인 전략이 될 수 있음을 시사한다. 이러한 연료 연소 측면에서, 지질 함량이 상대적으로 높은 본 발명의 10-2A1 MT 균주의 바이오매스는 WT 균주에 비해 발열량이 16.82% 증가하는 것으로 확인할 수 있었다(도 8e).

[0152] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

수탁번호

[0154]

기탁기관명 : Korean Collection for Type Cultures (KCTC)

수탁번호 : KCTC18917P

수탁일자 : 20210917

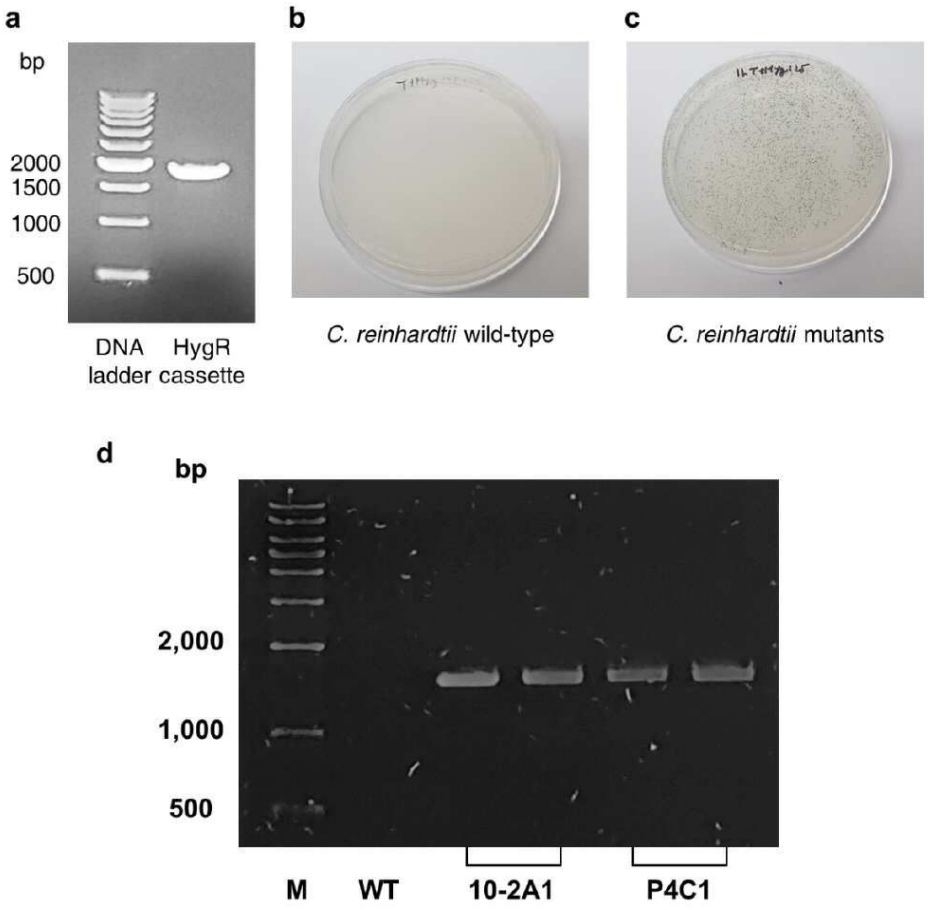
기탁기관명 : Korean Collection for Type Cultures (KCTC)

수탁번호 : KCTC18918P

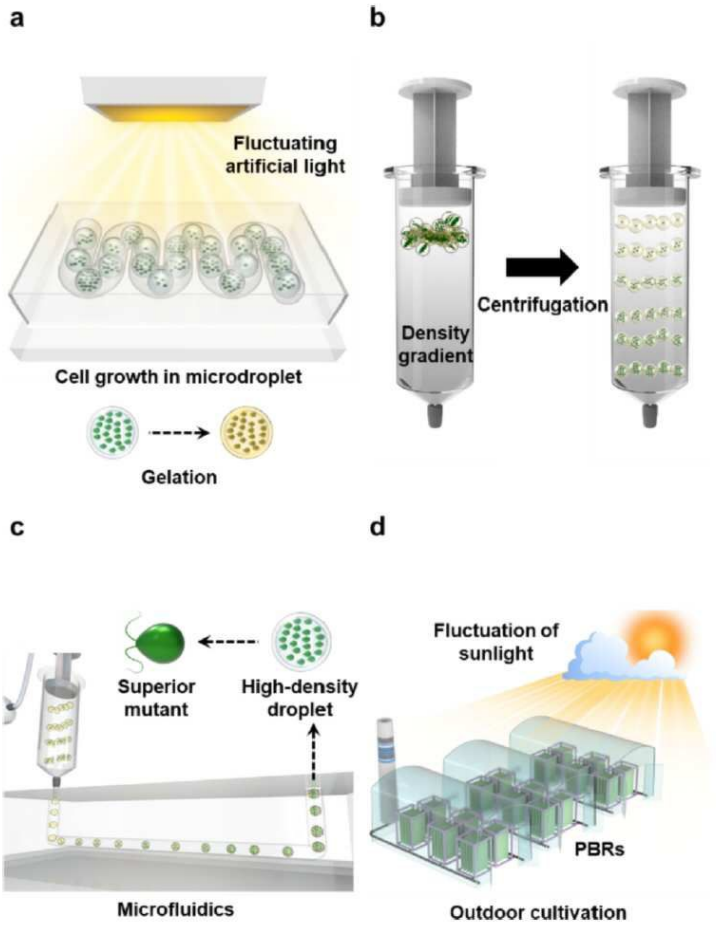
수탁일자 : 20210917

도면

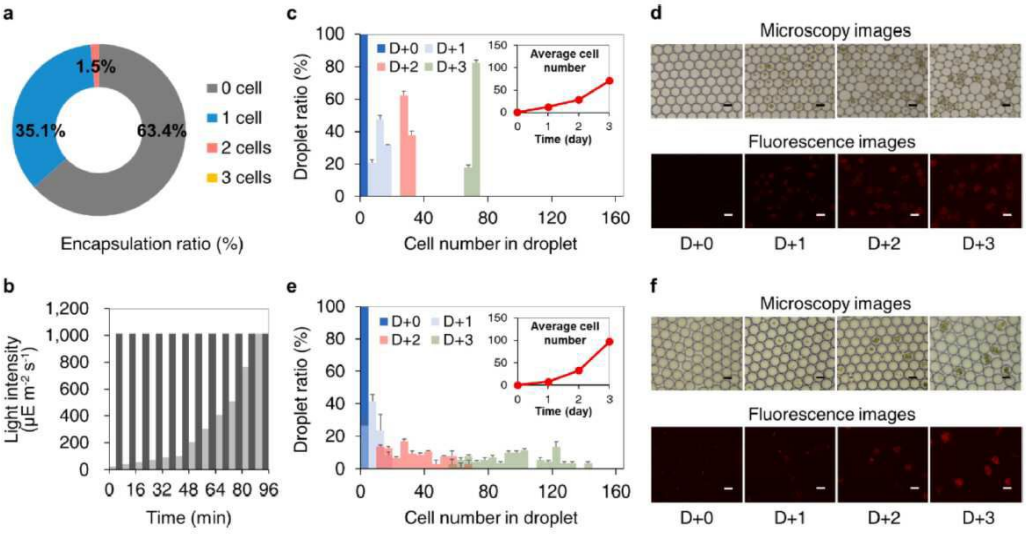
도면1



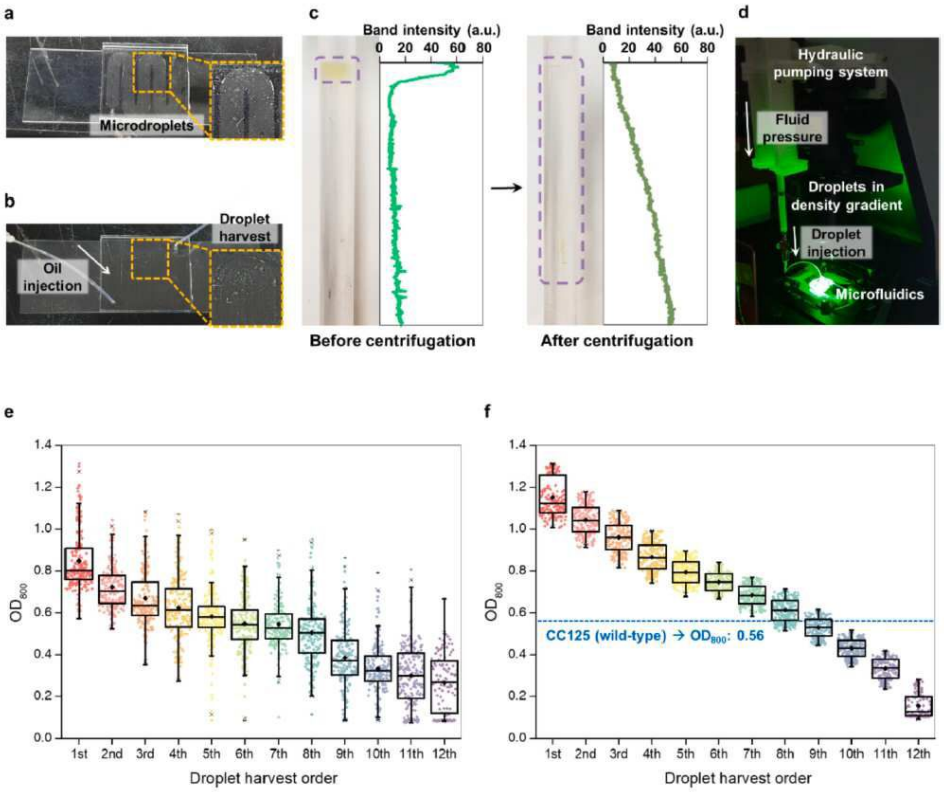
도면2


a
b
Fluctuating
artificial light
Cell growth in microdroplet
Gelation
Density
gradient
Centrifugation
c
d
Superior
mutant
High-density
droplet
Microfluidics
Fluctuation of
sunlight
PBRs
Outdoor cultivation

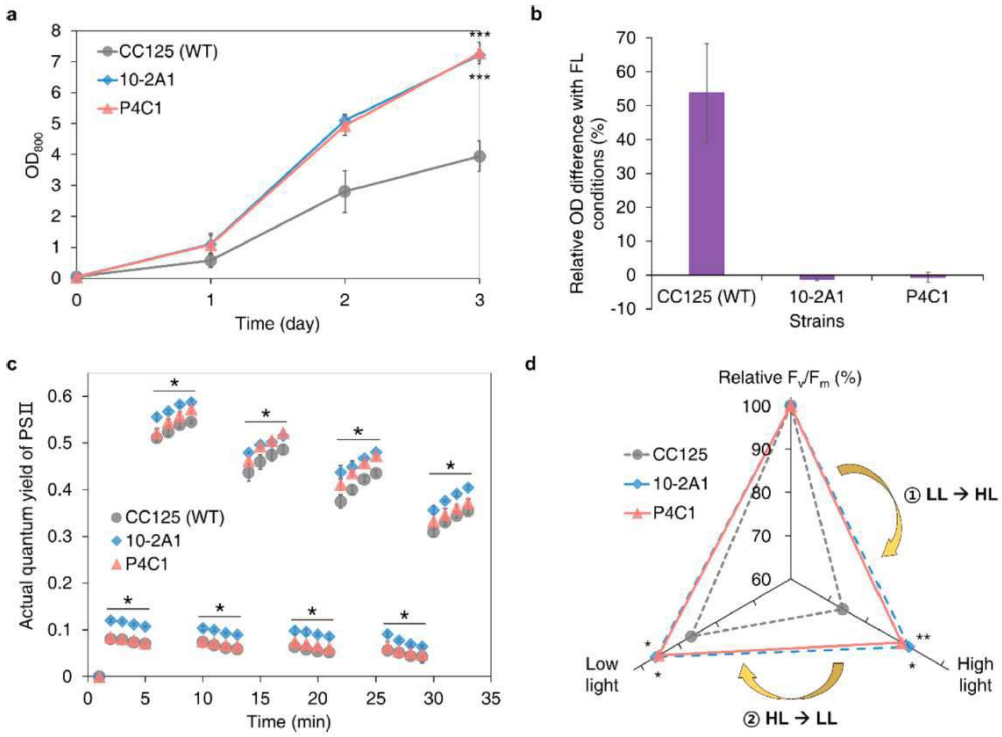
도면3


a
1.5%
35.1%
63.4%
0 cell
1 cell
2 cells
3 cells
Encapsulation ratio (%)
b
Light intensity
(μE m⁻² s⁻¹)
Time (min)
c
Droplet ratio (%)
D+0 D+1
D+2 D+3
Average cell number
Time (day)
Cell number in droplet
d
Microscopy images
Fluorescence images
D+0 D+1 D+2 D+3
e
Droplet ratio (%)
Cell number in droplet
f
Microscopy images
Fluorescence images
D+0 D+1 D+2 D+3

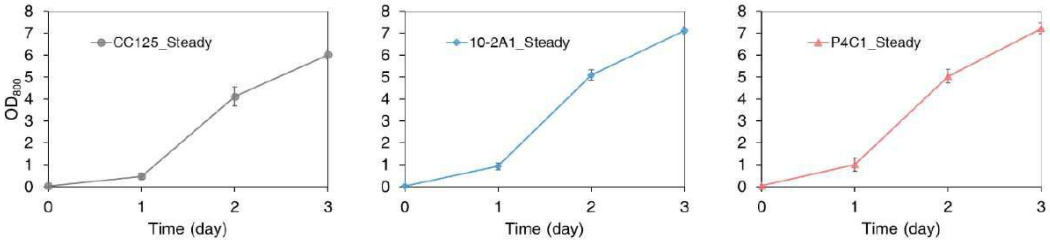
도면4


a
Microdroplets
b
Droplet harvest
Oil injection
c
Band intensity (a.u.)
0 20 40 60 80
Before centrifugation
After centrifugation
d
Hydraulic pumping system
Fluid pressure
Droplets in density gradient
Droplet injection
Microfluidics
e
OD600
Droplet harvest order
f
CC125 (wild-type) → OD800: 0.56
Droplet harvest order

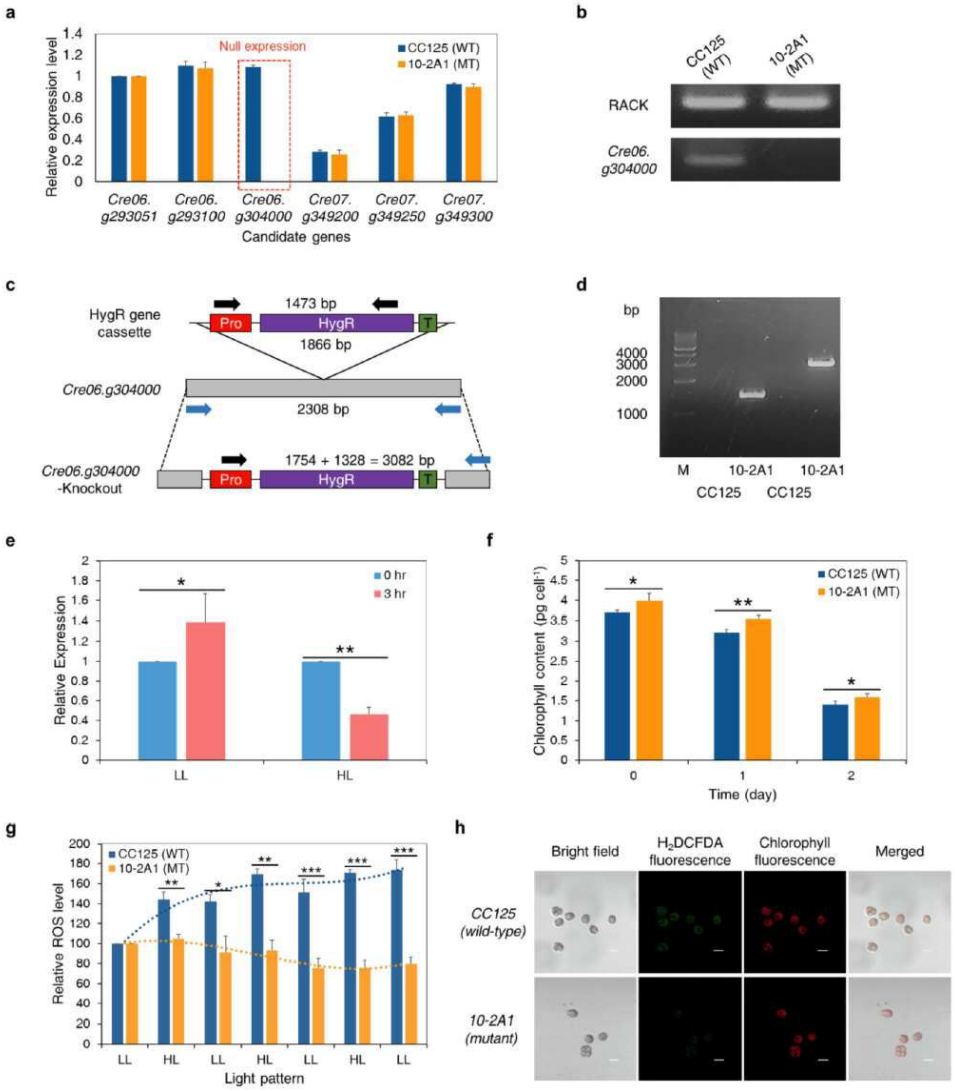
도면5


a
CC125 (WT)
10-2A1
P4C1
OD800
Time (day)
b
Relative OD difference with FL conditions (%)
CC125 (WT)
10-2A1
P4C1
Strains
c
Actual quantum yield of PSII
CC125 (WT)
10-2A1
P4C1
Time (min)
d
Relative Fv/Fm (%)
CC125
10-2A1
P4C1
① LL → HL
② HL → LL
Low light
High light

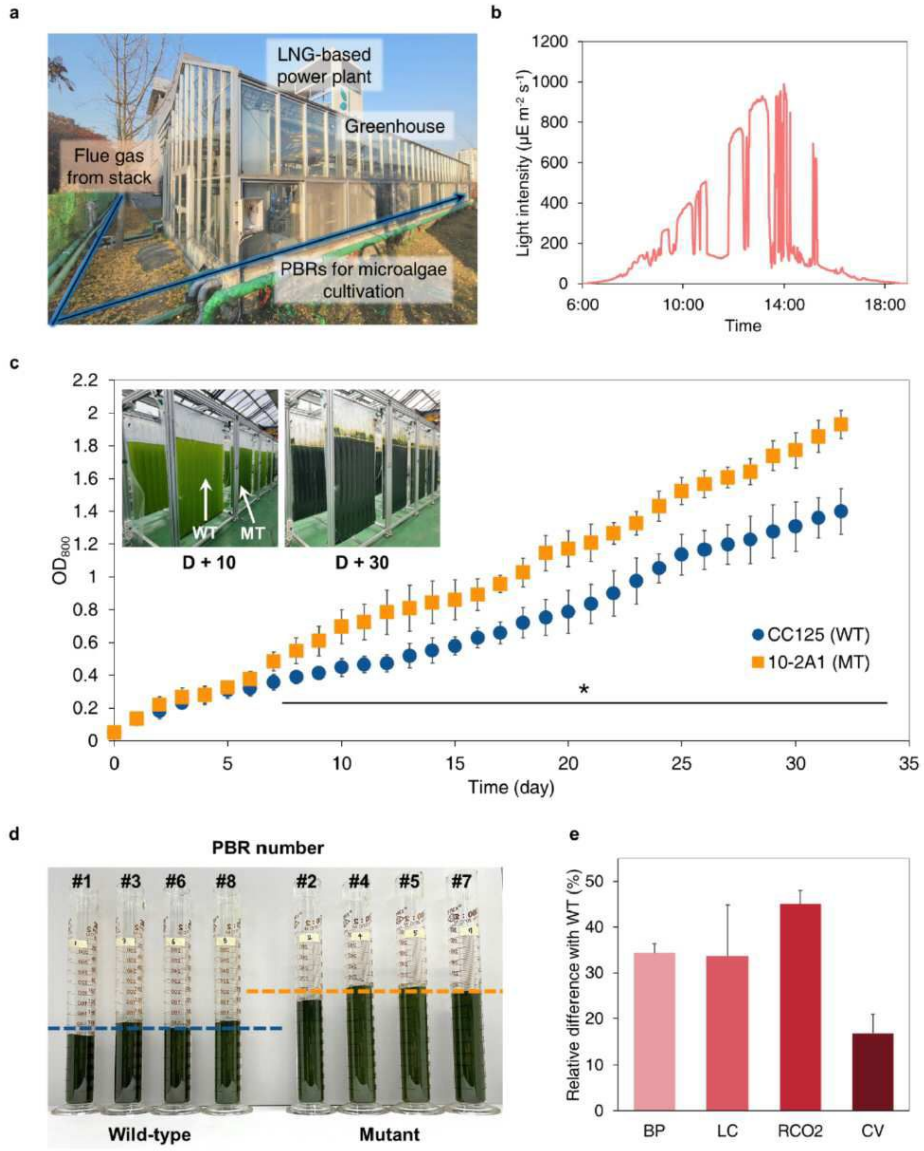
도면6


CC125_Steady
10-2A1_Steady
P4C1_Steady
OD800
Time (day)

도면7


a
Null expression
CC125 (WT)
10-2A1 (MT)
Relative expression level
Cre06. g293051
Cre06. g293100
Cre06. g304000
Cre07. g349200
Cre07. g349250
Cre07. g349300
Candidate genes
b
CC125 (WT)
10-2A1 (MT)
RACK
Cre06. g304000
c
HygR gene cassette
1473 bp
Pro
HygR
T
1866 bp
Cre06.g304000
2308 bp
Cre06.g304000 -Knockout
1754 + 1328 = 3082 bp
d
bp
4000
3000
2000
1000
M
10-2A1
10-2A1
CC125
CC125
e
0 hr
3 hr
Relative Expression
LL
HL
f
CC125 (WT)
10-2A1 (MT)
Chlorophyll content (pg cell-1)
Time (day)
g
CC125 (WT)
10-2A1 (MT)
Relative ROS level
LL
HL
LL
HL
LL
HL
LL
Light pattern
h
Bright field
H2DCFDA fluorescence
Chlorophyll fluorescence
Merged
CC125 (wild-type)
10-2A1 (mutant)

도면8



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.