



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년05월29일

(11) 등록번호 10-1523255

(24) 등록일자 2015년05월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12P 5/00 (2006.01) *C11B 1/00* (2006.01)
C12M 1/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-7027618

(22) 출원일자(국제) 2008년06월02일

심사청구일자 2013년06월03일

(85) 번역문제출일자 2009년12월31일

(65) 공개번호 10-2010-0031527

(43) 공개일자 2010년03월22일

(86) 국제출원번호 PCT/US2008/065563

(87) 국제공개번호 WO 2008/151149

국제공개일자 2008년12월11일

(30) 우선권주장

60/941,581 2007년06월01일 미국(US)

(뒷면에 계속)

(56) 선행기술조사문헌

Journal of Biotechnology. 2006, Vol.126,
pp.499-507*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

솔라짐, 인코포레이티드

미합중국, 캘리포니아 94080, 사우스 샌프란시스코, 게이트웨이 블러바드 225

(72) 발명자

트립버, 도날드, 이.

미국 94080-1906 캘리포니아 사우스 샌프란시스코 에클스 애비뉴 561

임, 정순

미국 94080-1906 캘리포니아 사우스 샌프란시스코 에클스 애비뉴 561

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 남앤드남

전체 청구항 수 : 총 50 항

심사관 : 한지혜

(54) 발명의 명칭 미생물에서 오일의 생성

(57) 요 약

본 발명은 미생물에서 오일, 연료, 유지화학품 및 기타 화합물을 생성하는데 유용한 방법 및 조성물을 제공한다. 특히, 본 발명은 오일-함유 미생물 및 이러한 미생물의 저가 배양 방법을 제공한다. 본 발명은 또한, 예를 들어 리파아제, 수크로오스 운반체, 수크로오스 전화효소, 프로토키나아제, 다당류-분해 효소, 지방산 아실-ACP 티오에스테라아제, 지방산 아실-CoA/알데히드 환원효소, 지방산 아실-CoA 환원효소, 지방산 알데히드 환원효소, 지방산 알데히드 데카르보닐라아제, 및/또는 아실 담체 단백질을 엔코딩하는 외인성 유전자를 함유하는 미생물 세포를 제공한다. 본 발명은 또한 재생가능한 디젤, 바이오디젤 및 재생가능한 제트 연료와 같은 수송 연료를 제조하는 방법을 포함한다.

(72) 발명자

딜론, 해리슨, 애프.

미국 94080-1906 캘리포니아 사우스 샌프란시스코
에클스 애비뉴 561

데이, 안토니, 지.

미국 94080-1906 캘리포니아 사우스 샌프란시스코
에클스 애비뉴 561

프랭클린, 스캇

미국 94080-1906 캘리포니아 사우스 샌프란시스코
에클스 애비뉴 561

코레글리오티, 안나

미국 94080-1906 캘리포니아 사우스 샌프란시스코
에클스 애비뉴 561

(30) 우선권주장

60/959,174 2007년07월10일 미국(US)

60/968,291 2007년08월27일 미국(US)

61/024,069 2008년01월28일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

건조 세포 중량의 10% 이상을 지질로서 함유하고, 수크로오스 전화효소를 엔코딩하는 외인성 유전자를 포함하는 미세조류 세포.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 수크로오스 전화효소가 분비성 수크로오스 전화효소인 미세조류 세포.

청구항 3

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 미세조류가 아크난테스 오리엔탈리스(*Achnanthes orientalis*), 아그메넬룸 (*Agmenellum*), 암피프로라 히알린(*Amphiprora hyaline*), 암포라 코페이포르미스(*Amphora coffeiformis*), 암포라 코페이포르미스 리니아(*Amphora coffeiformis linea*), 암포라 코페이포르미스 평타타(*Amphora coffeiformis punctata*), 암포라 코페이포르미스 타일로리(*Amphora coffeiformis taylori*), 암포라 코페이포르미스 테누이스 (*Amphora coffeiformis tenuis*), 암포라 델리카티시마(*Amphora delicatissima*), 암포라 델리카티시마 카피타타 (*Amphora delicatissima capitata*), 암포라 종(*Amphora sp.*), 아나바에나(*Anabaena*), 안키스트로데스무스 (*Ankistrodesmus*), 안키스트로데스무스 팔카투스(*Ankistrodesmus falcatus*), 보에켈로비아 후그란디아 (*Boeckelovia hoglandii*), 보로디넬라 종(*Borodinella sp.*), 보트리오콕시이스 브라우니아(*Botryococcus braunii*), 보트리오코커스 수데티쿠스(*Botryococcus sudeticus*), 브락테오코커스 마이너(*Bracteococcus minor*), 브락테오코커스 데미오누클레아투스(*Bracteococcus medionucleatus*), 카르테리아(*Carteria*), 카에토세로스 그라실리스(*Chaetoceros gracilis*), 카에토세로스 뮤엘레리(*Chaetoceros muelleri*), 카에토세로스 뮤엘레리 서브살슘(*Chaetoceros muelleri subsalsum*), 카에토세로스 종(*Chaetoceros sp.*), 클로렐라 아니트라타 (*Chlorella anitrata*), 클로렐라 안타르크тика(*Chlorella Antarctica*), 클로렐라 아우레오비리디스(*Chlorella aureoviridis*), 클로렐라 캔디다(*Chlorella candida*), 클로렐라 캡슐레이트(*Chlorella capsulate*), 클로렐라 테시케이트(*Chlorella desiccate*), 클로렐라 엘립소이데아(*Chlorella ellipsoidea*), 클로렐라 에메르소니아 (*Chlorella emersonii*), 클로렐라 푸스카(*Chlorella fusca*), 클로렐라 푸스카 var. 바쿠올라타(*Chlorella fusca var. vacuolata*), 클로렐라 글루코트로파(*Chlorella glucotropha*), 클로렐라 인퓨시오눔(*Chlorella infusionum*), 클로렐라 인퓨시오눔 var. 악토필라(*Chlorella infusionum var. actophila*), 클로렐라 인퓨시오눔 var. 오세노필라(*Chlorella infusionum var. auxenophila*), 클로렐라 캐슬러리(*Chlorella kessleri*), 클로렐라 로보포라(*Chlorella lobophora*) (균주 SAG 37.88), 클로렐라 루테오비리디스(*Chlorella luteoviridis*), 클로렐라 루테오비리디스 var. 오레오비리디스(*Chlorella luteoviridis var. aureoviridis*), 클로렐라 루테오비리디스 var. 루테센스(*Chlorella luteoviridis var. lutescens*), 클로렐라 미니아타(*Chlorella miniatia*), 클로렐라 미누티시마(*Chlorella minutissima*), 클로렐라 뮤타빌리스(*Chlorella mutabilis*), 클로렐라 뉄투르나 (*Chlorella nocturna*), 클로렐라 오발리스(*Chlorella ovalis*), 클로렐라 파르바(*Chlorella parva*), 클로렐라 포토필라(*Chlorella photophila*), 클로렐라 프링세이미아(*Chlorella pringsheimii*), 클로렐라 프로토테코이드 (*Chlorella protothecoides*) (UTEX 균주 1806, 411, 264, 256, 255, 250, 249, 31, 29, 25 종 임의의 것 포함), 클로렐라 프로토테코이드 var. 액시디콜라(*Chlorella protothecoides var. acidicola*), 클로렐라 레귤라리스(*Chlorella regularis*), 클로렐라 레귤라리스 var. 미니마(*Chlorella regularis var. minima*), 클로렐라 레귤라리스 var. 웜브리카타(*Chlorella regularis var. umbricata*), 클로렐라 레이시클리아(*Chlorella reisigliae*), 클로렐라 사카로필라(*Chlorella saccharophila*), 클로렐라 사카로필라 var. 엘립소이데아 (*Chlorella saccharophila var. ellipsoidea*), 클로렐라 살리나(*Chlorella salina*), 클로렐라 심플렉스 (*Chlorella simplex*), 클로렐라 소로키니아나(*Chlorella sorokiniana*), 클로렐라 종(*Chlorella sp.*), 클로렐라 스파에리카(*Chlorella sphaerica*), 클로렐라 스티그마토포라(*Chlorella stigmatophora*), 클로렐라 반니엘리아 (*Chlorella vanniellii*), 클로렐라 불가리스(*Chlorella vulgaris*), 클로렐라 불가리스 에프 테르티아 (*Chlorella vulgaris f. tertia*), 클로렐라 불가리스 var. 오토토트로피카(*Chlorella vulgaris var. autotrophica*), 클로렐라 불가리스 var. 비리디스(*Chlorella vulgaris var. viridis*), 클로렐라 불가리스 var. 불가리스(*Chlorella vulgaris var. vulgaris*), 클로렐라 불가리스 var. 불가리스 에프 테르티아(*Chlorella vulgaris var. vulgaris f. tertia*), 클로렐라 불가리스 var. 불가리스 에프 비리디스(*Chlorella vulgaris var. vulgaris f. viridis*).

vulgaris f. viridis), 클로렐라 크산텔라(*Chlorella xanthella*), 클로렐라 조평기엔시스(*Chlorella zofingiensis*), 클로렐라 트레보우시오이드(*Chlorella trebouxioides*), 클로렐라 불가리스(*Chlorella vulgaris*), 클로로코콤 인퓨시오눔(*Chlorococcum infusionum*), 클로로코콤 종(*Chlorococcum sp.*), 클로로고니움(*Chlorogonium*), 크로모나스 종(*Chroomonas sp.*), 크리소스파에라 종(*Chrysosphaera sp.*), 크리코스파에라 종(*Cricosphaera sp.*), 크립테코디니움 코흐니이(*Cryptothecodinium cohnii*), 크립토모나스 종(*Cryptomonas sp.*), 시클로텔라 크립티카(*Cyclotella cryptica*), 시클로텔라 메네지니아나(*Cyclotella meneghiniana*), 시클로텔라 종(*Cyclotella sp.*), 두날리엘라 종(*Dunaliella sp.*), 두날리엘라 바르다윌(*Dunaliella bardawil*), 두날리엘라 비오쿨라타(*Dunaliella bioculata*), 두날리엘라 그라눌레이트(*Dunaliella granulate*), 두날리엘라 마리팀(*Dunaliella maritime*), 두날리엘라 미누타(*Dunaliella minuta*), 두날리엘라 파르바(*Dunaliella parva*), 두날리엘라 페이르세이(*Dunaliella peircei*), 두날리엘라 프리몰렉타(*Dunaliella primolecta*), 두날리엘라 살리나(*Dunaliella salina*), 두날리엘라 테리콜라(*Dunaliella terricola*), 두날리엘라 테르티올렉타(*Dunaliella tertiolecta*), 두날리엘라 비리디스(*Dunaliella viridis*), 에레모스파에라 비리디스(*Eremosphaera viridis*), 에레모스파에라 종(*Eremosphaera sp.*), 엘립소이돈 종(*Ellipsoidon sp.*), 유글레나(*Euglena*), 프란세이아 종(*Franceia sp.*), 프라길라리아 크로토넨시스(*Fragilaria crotonensis*), 프라길라리아 종(*Fragilaria sp.*), 글레오캅사 종(*Gleocapsa sp.*), 글로에오탐니온 종(*Gloethamnion sp.*), 히메노모나스 종(*Hymenomonas sp.*), 이소크리시스 아프. 갈바나(*Isochrysis aff. galbana*), 이소크리시스 갈바나(*Isochrysis galbana*), 레포신클리스(*Lepocinclis*), 미크락티니움(*Micractinium*) (UTEXLB 2614), 모노라피디움 미누툼(*Monoraphidium minutum*), 모노라피디움 종(*Monoraphidium sp.*), 난노클로리스 종(*Nannochloris sp.*), 난노클로롭시스 살리나(*Nannochloropsis salina*), 난노클로롭시스 종(*Nannochloropsis sp.*), 나비쿨라 악셉타타(*Navicula acceptata*), 나비쿨라 비스칸테라에(*Navicula biskanterae*), 나비쿨라 슈도테넬로이드(*Navicula pseudotenuelloides*), 나비쿨라 펠리쿨로사(*Navicula pelliculosa*), 나비쿨라 사프로필라(*Navicula saprophila*), 나비쿨라 종(*Navicula sp.*), 네프로클로리스 종(*Nephrochloris sp.*), 네프로셀미스 종(*Nephroselmis sp.*), 니츠키아 커뮤니스(*Nitzschia communis*), 니츠키아 알렉산드리나(*Nitzschia alexandrina*), 니츠키아 커뮤니스(*Nitzschia communis*), 니츠키아 디시파타(*Nitzschia dissipata*), 니츠키아 프러스툴룸(*Nitzschia frustulum*), 니츠키아 한츠슈이아나(*Nitzschia hantzschiana*), 니츠키아 인코스피쿠아(*Nitzschia inconspicua*), 니츠키아 인터미디아(*Nitzschia intermedia*), 니츠키아 미크로세팔라(*Nitzschia microcephala*), 니츠키아 푸실라(*Nitzschia pusilla*), 니츠키아 푸실라 엘립티카(*Nitzschia pusilla elliptica*), 니츠키아 푸실라 모노엔시스(*Nitzschia pusilla monoensis*), 니츠키아 쿼드란글라(*Nitzschia quadrangular*), 니츠키아 종(*Nitzschia sp.*), 오크로모나스 종(*Ochromonas sp.*), 오오시스티스 파르바(*Oocystis parva*), 오오시스티스 푸실라(*Oocystis pusilla*), 오오시스티스 종(*Oocystis sp.*), 오실라토리아 립네тика(*Oscillatoria limnetica*), 오실라토리아 종(*Oscillatoria sp.*), 오실라토리아 서브레비스(*Oscillatoria subbrevis*), 파라클로렐라 캐슬리(*Parachlorella kessleri*), 파스케리아 악시도필라(*Pascheria acidophila*), 파블로바 종(*Pavlova sp.*), 파구스(*Phagus*), 포르미디움(*Phormidium*), 플라티모나스 종(*Platymonas sp.*), 플로로크리시스 카르테아에(*Pleurochrysis carterae*), 플로로크리시스 덴테이트(*Pleurochrysis dentate*), 프로로크리시스 종(*Pleurochrysis sp.*), 프로토테카 위케르하미이(*Prototheca wickerhamii*), 프로토테카 스타그노라(*Prototheca stagnora*), 프로토테카 포르토리센시스(*Prototheca portoricensis*), 프로토테카 모리포르미스(*Prototheca moriformis*), 프로토테카 족파이(*Prototheca zopfii*), 슈도클로렐라 아쿠아티카(*Pseudochlorella aquatica*), 피라미모나스 종(*Pyramimonas sp.*), 피로보트리스(*Pyrobotrys*), 로도코커스 오파쿠스(*Rhodococcus opacus*), 사르시노이드 크리소파이트(*Sarcinoid chrysophyte*), 씬데스무스 아르마투스(*Scenedesmus armatus*), 스키조키트리움(*Schizochytrium*), 스피로기라(*Spirogyra*), 스피룰리나 플라텐시스(*Spirulina platensis*), 스티코코커스 종(*Stichococcus sp.*), 시네코코커스 종(*Synechococcus sp.*), 테트라에드론(*Tetraedron*), 테트라셀미스 종(*Tetraselmis sp.*), 테트라엘미스 수에시카(*Tetraselmis suecica*), 탈라시오시라 웨이스플로기이(*Thalassiosira weissflogii*), 및 비리디엘라 프리데리시아나(*Viridiella fridericiana*)로 구성된 군으로부터 선택되는 미세조류 세포.

첨구항 4

제 3항에 있어서, 상기 미세조류가 브락테오코커스(*Bracteococcus*), 클로렐라(*Chlorella*), 파라클로렐라(*Parachlorella*), 프로토테카(*Prototheca*), 슈도클로렐라(*Pseudochlorella*) 및 씬데스무스(*Scenedesmus*)로 구성된 군으로부터 선택되는 미세조류 세포.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 미세조류가 클로렐라 프로토테코이드(*Chlorella protothecoides*) 또는 프로토테카 모리포르미스(*Prototheca moriformis*)인 미세조류 세포.

청구항 6

삭제

청구항 7

수크로오스 전화효소를 엔코딩하는 외인성 유전자를 포함하는 미세조류의 집단을, 미세조류가 이들의 건조 세포 중량의 10% 이상을 지질로서 축적할 때까지 고정된 탄소원을 포함하는 배양 배지에서 배양하는 단계, 및 상기 미세조류로부터 지질을 단리시키는 단계를 포함하는, 지질을 생산하는 방법.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 수크로오스 전화효소 유전자가 분비성 수크로오스 전화효소를 엔코딩하는 방법.

청구항 9

제 7항에 있어서, 상기 고정된 탄소원이 탈증합된 셀룰로직 물질, 사탕수수 주스, 사탕무 및 당밀로 구성된 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 10

제 7항에 있어서, 상기 배양 배지가 사탕수수 주스, 사탕무 주스 및 당밀로 구성된 군으로부터 선택된 공급원으로부터 제공된 수크로오스를 포함하는 방법으로서, 상기 사탕수수 주스, 사탕무 주스 또는 당밀이 50 μ M 이상의 수크로오스 농도를 갖는 방법.

청구항 11

제 10항에 있어서, 상기 사탕수수 주스, 사탕무 주스 또는 당밀이 500 μ M 이상의 수크로오스 농도를 갖는 방법.

청구항 12

제 11항에 있어서, 상기 사탕수수 주스, 사탕무 주스 또는 당밀이 5mM 이상의 수크로오스 농도를 갖는 방법.

청구항 13

제 12항에 있어서, 상기 사탕수수 주스, 사탕무 주스 또는 당밀이 50mM 이상의 수크로오스 농도를 갖는 방법.

청구항 14

제 13항에 있어서, 상기 사탕수수 주스, 사탕무 주스 또는 당밀이 500mM 이상의 수크로오스 농도를 갖는 방법.

청구항 15

제 7항에 있어서, 미세조류로부터 지질을 단리시키는 단계가 기계적 수단에 의해 미세조류를 용해시키는 것을 포함하는 방법.

청구항 16

제 7항에 있어서, 상기 배양 배지가 제한된 질소를 포함하는 방법.

청구항 17

제 7항에 있어서, 상기 미세조류가 이들의 건조 세포 중량의 60% 이상을 지질로서 축적하는 방법.

청구항 18

제 7항에 있어서, 미세조류로부터 수득한 지질로부터 식품을 형성하는 추가 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 19

제 7항에 있어서, 에스테르 가수분해, 트랜스에스테르화, 수소화처리, 수소화분해, 탈산화 및/또는 이성질화에 의해 상기 지질을 화학적으로 변경시키는 추가 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 20

제 7항 내지 제 19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 미세조류가 아크난테스 오리엔탈리스(*Achnanthes orientalis*), 아그메넬룸(*Agmenellum*), 암피프로라 히알린(*Amphiprora hyaline*), 암포라 코페이포르미스(*Amphora coffeiformis*), 암포라 코페이포르미스 리니아(*Amphora coffeiformis linea*), 암포라 코페이포르미스 평타타(*Amphora coffeiformis punctata*), 암포라 코페이포르미스 타일로리(*Amphora coffeiformis taylori*), 암포라 코페이포르미스 테누이스(*Amphora coffeiformis tenuis*), 암포라 멜리카티시마(*Amphora delicatissima*), 암포라 멜리카티시마 카피타타(*Amphora delicatissima capitata*), 암포라 종(*Amphora sp.*), 아나바에나(*Anabaena*), 안키스트로데스무스(*Ankistrodesmus*), 안키스트로데스무스 팔카투스(*Ankistrodesmus falcatus*), 보에켈로비아 후그란디아(*Boekelovia hoglandii*), 보로디넬라 종(*Borodinella sp.*), 보트리오콕시아스 브라우니아(*Botryococcus braunii*), 보트리오코커스 수데티쿠스(*Botryococcus sudeticus*), 브락테오코커스 마이너(*Bracteococcus minor*), 브락테오코커스 테미오누클레아투스(*Bracteococcus medionucleatus*), 카르테리아(*Carteria*), 카에토세로스 그라실리스(*Chaetoceros gracilis*), 카에토세로스 뮤엘레리(*Chaetoceros muelleri*), 카에토세로스 뮤엘레리 서브살슘(*Chaetoceros muelleri subsalsum*), 카에토세로스 종(*Chaetoceros sp.*), 클로렐라 아니트라타(*Chlorella anitratata*), 클로렐라 안타르크티카(*Chlorella Antarctica*), 클로렐라 아우레오비리디스(*Chlorella aureoviridis*), 클로렐라 캔디다(*Chlorella candida*), 클로렐라 캡슐레이트(*Chlorella capsulate*), 클로렐라 데시케이트(*Chlorella desiccata*), 클로렐라 엘립소이데아(*Chlorella ellipsoidea*), 클로렐라 에메르소니아(*Chlorella emersonii*), 클로렐라 푸스카(*Chlorella fusca*), 클로렐라 푸스카 var. 바쿠올라타(*Chlorella fusca var. vacuolata*), 클로렐라 글루코트로파(*Chlorella glucotropha*), 클로렐라 인퓨시오눔(*Chlorella infusionum*), 클로렐라 인퓨시오눔 var. 악토필라(*Chlorella infusionum var. actophila*), 클로렐라 인퓨시오눔 var. 오세노필라(*Chlorella infusionum var. auxenophila*), 클로렐라 캐슬리리(*Chlorella kessleri*), 클로렐라 로보포라(*Chlorella lobophora*) (균주 SAG 37.88), 클로렐라 루테오비리디스(*Chlorella luteoviridis*), 클로렐라 루테오비리디스 var. 오래오비리디스(*Chlorella luteoviridis var. aureoviridis*), 클로렐라 루테오비리디스 var. 루테센스(*Chlorella luteoviridis var. lutescens*), 클로렐라 미니아타(*Chlorella minata*), 클로렐라 미누티시마(*Chlorella minutissima*), 클로렐라 뮤타빌리스(*Chlorella mutabilis*), 클로렐라 녹튜르나(*Chlorella nocturna*), 클로렐라 오발리스(*Chlorella ovalis*), 클로렐라 파르바(*Chlorella parva*), 클로렐라 포토필라(*Chlorella photophila*), 클로렐라 프링세이미아(*Chlorella pringsheimii*), 클로렐라 프로토테코이드(*Chlorella protothecoides*) (UTEX 균주 1806, 411, 264, 256, 255, 250, 249, 31, 29, 25 중 임의의 것 포함), 클로렐라 프로토테코이드 var. 액시디콜라(*Chlorella protothecoides var. acidicola*), 클로렐라 레귤라리스(*Chlorella regularis*), 클로렐라 레귤라리스 var. 미니마(*Chlorella regularis var. minima*), 클로렐라 레귤라리스 var. 웜브리카타(*Chlorella regularis var. umbricata*), 클로렐라 레이시글리아(*Chlorella reisigliai*), 클로렐라 사카로필라(*Chlorella saccharophila*), 클로렐라 사카로필라 var. 엘립소이데아(*Chlorella saccharophila var. ellipsoidea*), 클로렐라 살리나(*Chlorella salina*), 클로렐라 심플렉스(*Chlorella simplex*), 클로렐라 소로키니아나(*Chlorella sorokiniana*), 클로렐라 종(*Chlorella sp.*), 클로렐라 스파에리카(*Chlorella sphaerica*), 클로렐라 스티그마토포라(*Chlorella stigmatophora*), 클로렐라 반니엘리아(*Chlorella vanniellii*), 클로렐라 불가리스(*Chlorella vulgaris*), 클로렐라 불가리스 에프 테르티아(*Chlorella vulgaris f tertia*), 클로렐라 불가리스 var. 오토토트로피카(*Chlorella vulgaris var. autotrophica*), 클로렐라 불가리스 var. 비리디스(*Chlorella vulgaris var. viridis*), 클로렐라 불가리스 var. 불가리스(*Chlorella vulgaris var. vulgaris*), 클로렐라 불가리스 var. 불가리스 에프 테르티아(*Chlorella vulgaris var. vulgaris f tertia*), 클로렐라 불가리스 var. 불가리스 에프 비리디스(*Chlorella vulgaris var. vulgaris f viridis*), 클로렐라 크산텔라(*Chlorella xanthella*), 클로렐라 조팡기엔시스(*Chlorella zofingiensis*), 클로렐라 트레보우시오이드(*Chlorella trebouxoides*), 클로렐라 불가리스(*Chlorella vulgaris*), 클로로코콤 인퓨시오눔(*Chlorococcum infusionum*), 클로로코콤 종(*Chlorococcum sp.*), 클로로고니움(*Chlorogonium*), 크로모나스 종(*Chroomonas sp.*), 크리소스파에라 종(*Chrysosphaera sp.*), 크리코스파에라 종(*Cricosphaera sp.*), 크립테코디니움 코흐니아이(*Cryptothecodium cohnii*), 크립토모나스 종

(*Cryptomonas* sp.), 시클로렐라 크립티카(*Cyclotella cryptica*), 시클로렐라 메네지니아나(*Cyclotella meneghiniana*), 시클로렐라 종(*Cyclotella* sp.), 두날리엘라 종(*Dunaliella* sp.), 두날리엘라 바르다월 (*Dunaliella bardawil*), 두날리엘라 비오쿨라타(*Dunaliella bioculata*), 두날리엘라 그라눌레이트(*Dunaliella granulate*), 두날리엘라 마리팀(*Dunaliella maritime*), 두날리엘라 미누타(*Dunaliella minuta*), 두날리엘라 파르바(*Dunaliella parva*), 두날리엘라 페이르세이(*Dunaliella peircei*), 두날리엘라 프리몰렉타(*Dunaliella primolecta*), 두날리엘라 살리나(*Dunaliella salina*), 두날리엘라 테리콜라(*Dunaliella terricola*), 두날리엘라 테르티올렉타(*Dunaliella tertiolecta*), 두날리엘라 비리디스(*Dunaliella viridis*), 두날리엘라 테르티올렉타(*Dunaliella tertiolecta*), 에레모스파에라 비리디스(*Eremosphaera viridis*), 에레모스파에라 종 (*Eremosphaera* sp.), 엘립소이돈 종(*Ellipsoidon* sp.), 유글레나(*Euglena*), 프란세이아 종(*Franceia* sp.), 프라길라리아 크로토넨시스(*Fragilaria crottonensis*), 프라길라리아 종(*Fragilaria* sp.), 글레오캅사 종 (*Gleocapsa* sp.), 글로에오탐니온 종(*Gloethamnion* sp.), 히메노모나스 종(*Hymenomonas* sp.), 이소크리시스 아프. 갈바나(*Isochrysis aff. galbana*), 이소크리시스 갈바나(*Isochrysis galbana*), 레포신클리스 (*Lepocinclis*), 미크락티니움(*Micractinium*), 미크락티니움(*Micractinium*) (UTEXLB 2614), 모노라피디움 미누툼(*Monoraphidium minutum*), 모노라피디움 종(*Monoraphidium* sp.), 난노클로리스 종(*Nannochloris* sp.), 난노클로롭시스 살리나(*Nannochloropsis salina*), 난노클로롭시스 종(*Nannochloropsis* sp.), 나비쿨라 악셉타타 (*Navicula acceptata*), 나비쿨라 비스칸테라에(*Navicula biskanterae*), 나비쿨라 슈도테넬로이드(*Navicula pseudotenebrioides*), 나비쿨라 펠리콜로사(*Navicula pelliculosa*), 나비쿨라 사프로필라(*Navicula saprophila*), 나비쿨라 종(*Navicula* sp.), 네프로클로리스 종(*Nephrochloris* sp.), 네프로셀미스 종 (*Nephroselmis* sp.), 니츠키아 커뮤니스(*Nitzschia communis*), 니츠키아 알렉산드리나(*Nitzschia alexandrina*), 니츠키아 커뮤니스(*Nitzschia communis*), 니츠키아 디시파타(*Nitzschia dissipata*), 니츠키아 프러스톨룸 (*Nitzschia frustulum*), 니츠키아 한츠수이아나(*Nitzschia hantzschiana*), 니츠키아 인코스피쿠아(*Nitzschia inconspicua*), 니츠키아 인터미디아(*Nitzschia intermedia*), 니츠키아 미크로세팔라(*Nitzschia microcephala*), 니츠키아 푸실라(*Nitzschia pusilla*), 니츠키아 푸실라 엘립티카(*Nitzschia pusilla elliptica*), 니츠키아 푸실라 모노엔시스(*Nitzschia pusilla monoensis*), 니츠키아 쿼드란큘라(*Nitzschia quadrangularis*), 니츠키아 종 (*Nitzschia* sp.), 오크로모나스 종(*Ochromonas* sp.), 오오시스티스 파르바(*Oocystis parva*), 오오시스티스 푸실라(*Oocystis pusilla*), 오오시스티스 종(*Oocystis* sp.), 오실라토리아 립네티카(*Oscillatoria limnetica*), 오실라토리아 종(*Oscillatoria* sp.), 오실라토리아 서브레비스(*Oscillatoria subbrevis*), 파라클로렐라 캐슬러리 (*Parachlorella kessleri*), 파스케리아 악시도필라(*Pascheria acidophila*), 파블로바 종(*Pavlova* sp.), 파구스(*Phagus*), 포르미디움(*Phormidium*), 플라티모나스 종(*Platymonas* sp.), 플리로크리시스 카르테아에 (*Pleurochrysis carterae*), 플리로크리시스 덴테이트(*Pleurochrysis dentata*), 프리로크리시스 종 (*Pleurochrysis* sp.), 프로토테카 위케르하미이(*Prototheca wickerhamii*), 프로토테카 스타그노라(*Prototheca stagnora*), 프로토테카 포르토리센시스(*Prototheca portoricensis*), 프로토테카 모리포르미스(*Prototheca moriformis*), 프로토테카 족파이(*Prototheca zopfii*), 슈도클로렐라 아쿠아티카(*Pseudochlorella aquatica*), 피라미모나스 종(*Pyramimonas* sp.), 피로보트리스(*Pyrobotrys*), 로도코커스 오파쿠스(*Rhodococcus opacus*), 사르시노이드 크리소파이트(*Sarcinoid chrysophyte*), 씬데스무스 아르마투스(*Scenedesmus armatus*), 스키조카트리움(*Schizochytrium*), 스피로기라(*Spirogyra*), 스피룰리나 플라텐시스(*Spirulina platensis*), 스티코코커스 종(*Stichococcus* sp.), 시네코코커스 종(*Synechococcus* sp.), 테트라에드론(*Tetraedron*), 테트라셀미스 종 (*Tetraselmis* sp.), 테트라엘미스 수에시카(*Tetraselmis suecica*), 탈라시오시라 웨이스플로기이 (*Thalassiosira weissflogii*), 및 비리디엘라 프리데리시아나(*Viridiella fridericiana*)로 구성된 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 21

제 20항에 있어서, 상기 미세조류가 브락테오코커스(*Bracteococcus*), 클로렐라(*Chlorella*), 파라클로렐라 (*Parachlorella*), 프로토테카(*Prototheca*), 슈도클로렐라(*Pseudochlorella*) 및 씬데스무스(*Scenedesmus*)로 구성된 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 22

제 21항에 있어서, 상기 미세조류가 클로렐라 프로토테코이드(*Chlorella protothecoides*) 또는 프로토테카 모리포르미스(*Prototheca moriformis*)인 방법.

청구항 23

제 19항에 있어서, 상기 지질을 트랜스에스테르화하여 지방산 에스테르 및 글리세롤을 생성하고, 상기 글리세롤을 탄소원으로 이용하기 위하여 제 2 미세조류 배양액에 첨가하는 방법.

청구항 24

제 23항에 있어서, 지질 성분을 생성하기 위하여 사용된 미세조류와 제2 미세조류 배양액의 미세조류가 동일한 종인 방법.

청구항 25

삭제

청구항 26

(a) 미세조류의 집단을 고정된 탄소원의 존재하에 배양하는 단계로서, (i) 미세조류가 외인성 수크로오스 전화효소를 발현시키고, (ii) 미세조류가 이들의 건조 세포 중량의 10% 이상을 지질로서 축적시키고, (iii) 고정된 탄소원이 사탕수수 주스, 사탕수수, 사탕무, 당밀 또는 기타 수크로오스-함유 공급원료로 구성된 군으로부터 선택되는 단계,

(b) 배양된 미생물로부터 지질 성분을 단리시키는 단계, 및

(c) 단리된 지질 성분을 1회 이상 화학 반응시켜 지방산 에스테르 및/또는 알칸을 생성함으로써 연료를 생성하는 단계를 포함하는, 연료를 생성하는 방법.

청구항 27

제 26항에 있어서, 상기 1회 이상의 화학 반응이 트랜스에스테르화, 수소화처리, 수소화분해, 틸산소화 및 이성질화로 구성된 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 28

제 26항 또는 제 27항에 있어서, 미세조류가 클로렐라 또는 프로토테카 속인 방법.

청구항 29

제 28항에 있어서, 상기 미세조류가 클로렐라 프로토테코이드(*Chlorella protothecoides*) 또는 프로토테카 모리포르미스(*Prototheca moriformis*)인 방법.

청구항 30

삭제

청구항 31

(a) 탈중합된 셀룰로직 물질을 제1 탄소원으로서 포함하는 배양 배지에서 미세조류의 집단을 상기 미세조류가 이들의 건조 세포 중량의 60% 이상을 지질로서 축적할 때까지 종속영양 조건하에서 배양하는 단계, 및

(b) 상기 미세조류로부터 지질을 단리시키는 단계를 포함하는, 지질을 생성하는 방법.

청구항 32

제 31항에 있어서, 상기 탈중합된 셀룰로직 물질이 자일로스를 포함하는 방법.

청구항 33

제 32항에 있어서, 미세조류가 글루코오스에서만 배양된 경우보다 상기 배양 단계에서 지질 생성 수준이 더 높은 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 34

제 31항에 있어서, 상기 탈중합된 셀룰로직 물질이 글루코오스 및 자일로스를 포함하는 방법.

청구항 35

제 31항에 있어서, 상기 배양 배지가 무균성인 방법.

청구항 36

제 31항에 있어서, 상기 탈중합된 셀룰로직 물질이 사탕수수 벼개스, 쌀겨, 옥수수대, 밀짚, 쌀짚, 사탕무 펄프, 감귤 펄프, 감귤 껌질, 활엽수 간별, 침엽수 간별, 나무 조각, 텁질먼지, 펄프 밀 폐기물, 도시 종이 폐기물, 잔디 깍기, 스위치그래스, 하이브리드 포플러 나무, 억새, 섬유 케인 및 섬유 수수로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 물질인 방법.

청구항 37

제 36항에 있어서, 상기 탈중합된 셀룰로직 물질이 사탕수수 벼개스인 방법.

청구항 38

제 36항에 있어서, 상기 탈중합된 셀룰로직 물질이 옥수수 섬유인 방법.

청구항 39

제 36항에 있어서, 상기 탈중합된 셀룰로직 물질이 억새인 방법.

청구항 40

제 31항에 있어서, 상기 미세조류가 제한된 질소 조건 하에 배양되는 방법.

청구항 41

제 31항에 있어서, 상기 지질이 50% 이상의 C18:1을 포함하는 방법.

청구항 42

제 31항에 있어서, 상기 지질이 3% 이상의 C18:0 및 8% 이상의 C16:0을 포함하는 방법.

청구항 43

제 31항에 있어서, 상기 미세조류가 이들 건조 세포 중량의 65% 이상을 지질로서 축적시키는 방법.

청구항 44

제 43항에 있어서, 상기 미세조류가 이들 건조 세포 중량의 70% 이상을 지질로서 축적시키는 방법.

청구항 45

제 31항에 있어서, 미세조류로부터 지질을 단리시키는 단계가 미세조류를 용해시키고 유기 용매를 이용하여 지질을 회수하는 것을 포함하는 방법.

청구항 46

제 45항에 있어서, 상기 유기 용매가 헥산인 방법.

청구항 47

제 31항에 있어서, 셀룰로직 물질을 효소로 처리함으로써 탈중합된 배양 배지의 셀룰로직 물질을 생성하는 것을 더 포함하는 방법.

청구항 48

제 31항 내지 제 47항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 미세조류가 아크난테스 오리엔탈리스(*Achnanthes orientalis*), 아그메넬룸(*Agmenellum*), 암피프로라 히알린(*Amphiprora hyaline*), 암포라 코페이포르미스(*Amphora coffeiformis*), 암포라 코페이포르미스 리니아(*Amphora coffeiformis linea*), 암포라 코페이포르미스

평타타(*Amphora coffeiformis punctata*), 암포라 코페이포르미스 타일로리(*Amphora coffeiformis taylori*), 암포라 코페이포르미스 테누이스(*Amphora coffeiformis tenuis*), 암포라 델리카티시마(*Amphora delicatissima*), 암포라 델리카티시마 카피타타(*Amphora delicatissima capitata*), 암포라 종(*Amphora sp.*), 아나바에나(*Anabaena*), 안키스트로데스무스(*Ankistrodesmus*), 안키스트로데스무스 팔카투스(*Ankistrodesmus falcatus*), 보에켈로비아 후그란디이(*Boekelovia hoglandii*), 보로디넬라 종(*Borodinella sp.*), 보트리오콕시이스 브라우니이(*Botryococcus braunii*), 보트리오코커스 수데티쿠스(*Botryococcus sudeticus*), 브락테오코커스 마이너(*Bracteococcus minor*), 브락테오코커스 데미오누클레아투스(*Bracteococcus medionucleatus*), 카르테리아(*Carteria*), 카에토세로스 그라실리스(*Chaetoceros gracilis*), 카에토세로스 뮤엘레리(*Chaetoceros muelleri*), 카에토세로스 뮤엘레리 서브살슘(*Chaetoceros muelleri subsalsum*), 카에토세로스 종(*Chaetoceros sp.*), 클로렐라 아니트라타(*Chlorella anitata*), 클로렐라 안타르크тика(*Chlorella Antarctica*), 클로렐라 아우레오비리디스(*Chlorella aureoviridis*), 클로렐라 캔디다(*Chlorella candida*), 클로렐라 캡슐레이트(*Chlorella capsulate*), 클로렐라 테시케이트(*Chlorella desiccata*), 클로렐라 엘립소이데아(*Chlorella ellipsoidea*), 클로렐라 에메르소니이(*Chlorella emersonii*), 클로렐라 푸스카(*Chlorella fusca*), 클로렐라 푸스카 var. 바쿠올라타(*Chlorella fusca var. vacuolata*), 클로렐라 글루코트로파(*Chlorella glucotropha*), 클로렐라 인퓨시오눔(*Chlorella infusionum*), 클로렐라 인퓨시오눔 var. 악토필라(*Chlorella infusionum var. actophila*), 클로렐라 인퓨시오눔 var. 오세노필라(*Chlorella infusionum var. auxenophila*), 클로렐라 캐슬러리(*Chlorella kessleri*), 클로렐라 로보포라(*Chlorella lobophora*) (군주 SAG 37.88), 클로렐라 루테오비리디스(*Chlorella luteoviridis*), 클로렐라 루테오비리디스 var. 오레오비리디스(*Chlorella luteoviridis var. aureoviridis*), 클로렐라 루테오비리디스 var. 루테센스(*Chlorella luteoviridis var. lutescens*), 클로렐라 미니아타(*Chlorella minata*), 클로렐라 미누티시마(*Chlorella minutissima*), 클로렐라 뮤타빌리스(*Chlorella mutabilis*), 클로렐라 녹투르나(*Chlorella nocturna*), 클로렐라 오발리스(*Chlorella ovalis*), 클로렐라 파르바(*Chlorella parva*), 클로렐라 포토필라(*Chlorella photophila*), 클로렐라 프링세이미아(*Chlorella pringsheimii*), 클로렐라 프로토테코이드(*Chlorella protothecoides*) (UTEX 군주 1806, 411, 264, 256, 255, 250, 249, 31, 29, 25 종 임의의 것 포함), 클로렐라 프로토테코이드 var. 액시디콜라(*Chlorella protothecoides var. acidicola*), 클로렐라 레귤라리스(*Chlorella regularis*), 클로렐라 레귤라리스 var. 미니마(*Chlorella regularis var. minima*), 클로렐라 레귤라리스 var. 웜브리카타(*Chlorella regularis var. umbricata*), 클로렐라 레이시글리이(*Chlorella reisiglii*), 클로렐라 사카로필라(*Chlorella saccharophila*), 클로렐라 사카로필라 var. 엘립소이데아(*Chlorella saccharophila var. ellipsoidea*), 클로렐라 살리나(*Chlorella salina*), 클로렐라 심플렉스(*Chlorella simplex*), 클로렐라 소로키니아나(*Chlorella sorokiniana*), 클로렐라 종(*Chlorella sp.*), 클로렐라 스파에리카(*Chlorella sphaerica*), 클로렐라 스티그마토포라(*Chlorella stigmatophora*), 클로렐라 반니엘리이(*Chlorella vanniellii*), 클로렐라 불가리스(*Chlorella vulgaris*), 클로렐라 불가리스 에프 테르티아(*Chlorella vulgaris f tertia*), 클로렐라 불가리스 var. 오토토트로피카(*Chlorella vulgaris var. autotrophica*), 클로렐라 불가리스 var. 비리디스(*Chlorella vulgaris var. viridis*), 클로렐라 불가리스 var. 불가리스(*Chlorella vulgaris var. vulgaris*), 클로렐라 불가리스 var. 불가리스 에프 테르티아(*Chlorella vulgaris var. vulgaris f tertia*), 클로렐라 불가리스 var. 불가리스 에프 비리디스(*Chlorella vulgaris var. vulgaris f viridis*), 클로렐라 크산텔라(*Chlorella xanthella*), 클로렐라 조핑기엔시스(*Chlorella zofingiensis*), 클로렐라 트레보우시오이드(*Chlorella trebouxoides*), 클로렐라 불가리스(*Chlorella vulgaris*), 클로로코콤 인퓨시오눔(*Chlorococcum infusionum*), 클로로코콤 종(*Chlorococcum sp.*), 클로로고니움(*Chlorogonium*), 크로모나스 종(*Chroomonas sp.*), 크리소스파에라 종(*Chrysosphaera sp.*), 크리코스파에라 종(*Cricosphaera sp.*), 크립테코디니움 코흐니이(*Cryptothecodium cohnii*), 크립토모나스 종(*Cryptomonas sp.*), 시클로텔라 크립티카(*Cyclotella cryptica*), 시클로텔라 메네지니아나(*Cyclotella meneghiniana*), 시클로텔라 종(*Cyclotella sp.*), 두날리엘라 종(*Dunaliella sp.*), 두날리엘라 바르다월(*Dunaliella bardawil*), 두날리엘라 비오쿨라타(*Dunaliella bioculata*), 두날리엘라 그라눌레이트(*Dunaliella granulata*), 두날리엘라 마리팀(*Dunaliella maritime*), 두날리엘라 미누타(*Dunaliella minuta*), 두날리엘라 파르바(*Dunaliella parva*), 두날리엘라 페이르세이(*Dunaliella peircei*), 두날리엘라 프리몰렉타(*Dunaliella primolecta*), 두날리엘라 살리나(*Dunaliella salina*), 두날리엘라 테리콜라(*Dunaliella terricola*), 두날리엘라 테르티올렉타(*Dunaliella tertiolecta*), 에레모스파에라 비리디스(*Eremosphaera viridis*), 에레모스파에라 종(*Eremosphaera sp.*), 엘립소이돈 종(*Ellipsoidon sp.*), 유글레나(*Euglena*), 프란세이아 종(*Franceia sp.*), 프라길라리아 크로토넨시스(*Fragilaria crotonensis*), 프라길라리아 종(*Fragilaria sp.*), 글레오캡사 종(*Gleocapsa sp.*), 클로에오탐니온 종(*Gloeoethamnion sp.*), 히메노모나스 종(*Hymenomonas sp.*), 이소크리시스

아프. 갈바나(*Isochrysis aff. galbana*), 이소크리시스 갈바나(*Isochrysis galbana*), 레포신클리스 (*Lepocinclis*), 미크락티니움(*Micractinium*), 미크락티니움(*Micractinium*) (UTEXLB 2614), 모노라피디움 미누툼(*Monoraphidium minutum*), 모노라피디움 종(*Monoraphidium sp.*), 난노클로리스 종(*Nannochloris sp.*), 난노클로롭시스 살리나(*Nannochloropsis salina*), 난노클로롭시스 종(*Nannochloropsis sp.*), 나비쿨라 악셉타타 (*Navicula acceptata*), 나비쿨라 비스칸테라에(*Navicula biskanterae*), 나비쿨라 슈도테넬로이드(*Navicula pseudoteneelloides*), 나비쿨라 펠리쿨로사(*Navicula pelliculosa*), 나비쿨라 사프로필라(*Navicula saprophila*), 나비쿨라 종(*Navicula sp.*), 네프로클로리스 종(*Nephrochloris sp.*), 네프로셀미스 종 (*Nephroselmis sp.*), 니츠키아 커뮤니스(*Nitschia communis*), 니츠키아 알렉산드리나(*Nitzschia alexandrina*), 니츠키아 커뮤니스(*Nitzschia communis*), 니츠키아 디시파타(*Nitzschia dissipata*), 니츠키아 프러스톨룸 (*Nitzschia frustulum*), 니츠키아 한츠슈이아나(*Nitzschia hantzschiana*), 니츠키아 인코스피쿠아(*Nitzschia inconspicua*), 니츠키아 인터미디아(*Nitzschia intermedia*), 니츠키아 미크로세팔라(*Nitzschia microcephala*), 니츠키아 푸실라(*Nitzschia pusilla*), 니츠키아 푸실라 엘립티카(*Nitzschia pusilla elliptica*), 니츠키아 푸실라 모노엔시스(*Nitzschia pusilla monoensis*), 니츠키아 쿼드란글라(*Nitzschia quadrangular*), 니츠키아 종 (*Nitzschia sp.*), 오크로모나스 종(*Ochromonas sp.*), 오오시스티스 파르바(*Oocystis parva*), 오오시스티스 푸실라(*Oocystis pusilla*), 오오시스티스 종(*Oocystis sp.*), 오실라토리아 럼네тика(*Oscillatoria limnetica*), 오실라토리아 종(*Oscillatoria sp.*), 오실라토리아 서브레비스(*Oscillatoria subbrevis*), 파라클로렐라 캐슬리 (*Parachlorella kessleri*), 파스케리아 악시도필라(*Pascheria acidophila*), 파블로바 종(*Pavlova sp.*), 파구스(*Phagus*), 포르미디움(*Phormidium*), 플라티모나스 종(*Platymonas sp.*), 플로로크리시스 카르테아에 (*Pleurochrysis carterae*), 플로로크리시스 덴테이트(*Pleurochrysis dentate*), 프로로크리시스 종 (*Pleurochrysis sp.*), 프로토테카 위케르하미이(*Prototheca wickerhamii*), 프로토테카 스타그노라(*Prototheca stagnora*), 프로토테카 포르토리센시스(*Prototheca portoricensis*), 프로토테카 모리포르미스(*Prototheca moriformis*), 프로토테카 족파이(*Prototheca zopfii*), 슈도클로렐라 아쿠아티카(*Pseudochlorella aquatica*), 피라미모나스 종(*Pyramimonas sp.*), 피로보트리스(*Pyrobotrys*), 로도코커스 오파쿠스(*Rhodococcus opacus*), 사르시노이드 크리소파이트(*Sarcinoid chrysophyte*), 씬데스무스 아르마투스(*Scenedesmus armatus*), 스키조카트리움(*Schizochytrium*), 스피로기라(*Spirogyra*), 스피룰리나 플라텐시스(*Spirulina platensis*), 스티코코커스 종(*Stichococcus sp.*), 시네코코커스 종(*Synechococcus sp.*), 테트라에드론(*Tetraedron*), 테트라셀미스 종 (*Tetraselmis sp.*), 테트라엘미스 수에시카(*Tetraselmis suecica*), 탈라시오시라 웨이스플로기이 (*Thalassiosira weissflogii*), 및 비리디엘라 프리데리시아나(*Viridiella fridericiana*)로 구성된 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 49

제 48항에 있어서, 상기 미세조류가 클로렐라 또는 프로토테카 속인 방법.

청구항 50

제 49항에 있어서, 상기 미세조류가 클로렐라 프로토테코이드인 방법.

청구항 51

제 49항에 있어서, 상기 미세조류가 프로토테카 모리포르미스인 방법.

청구항 52

제 31항에 있어서, 상기 배양 단계가 광의 부재하에 수행되는 방법.

청구항 53

제 31항에 있어서, 상기 미세조류가 절대 종속영양생물인 방법.

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

청구항 101

삭제

청구항 102

삭제

청구항 103

삭제

청구항 104

삭제

청구항 105

삭제

청구항 106

삭제

청구항 107

삭제

청구항 108

삭제

청구항 109

삭제

청구항 110

삭제

청구항 111

삭제

청구항 112

삭제

청구항 113

삭제

청구항 114

삭제

청구항 115

삭제

청구항 116

삭제

청구항 117

삭제

청구항 118

삭제

청구항 119

삭제

청구항 120

삭제

청구항 121

삭제

청구항 122

삭제

청구항 123

삭제

청구항 124

삭제

청구항 125

삭제

청구항 126

삭제

청구항 127

삭제

청구항 128

삭제

청구항 129

삭제

청구항 130

삭제

청구항 131

삭제

청구항 132

삭제

청구항 133

삭제

청구항 134

삭제

청구항 135

삭제

청구항 136

삭제

청구항 137

삭제

청구항 138

삭제

청구항 139

삭제

청구항 140

삭제

청구항 141

삭제

청구항 142

삭제

청구항 143

삭제

청구항 144

삭제

청구항 145

삭제

청구항 146

삭제

청구항 147

삭제

청구항 148

삭제

청구항 149

삭제

청구항 150

삭제

청구항 151

삭제

청구항 152

삭제

청구항 153

삭제

청구항 154

삭제

청구항 155

삭제

청구항 156

삭제

청구항 157

삭제

청구항 158

삭제

청구항 159

삭제

청구항 160

삭제

청구항 161

삭제

청구항 162

삭제

청구항 163

삭제

청구항 164

삭제

청구항 165

삭제

청구항 166

삭제

청구항 167

삭제

청구항 168

삭제

청구항 169

삭제

청구항 170

삭제

청구항 171

삭제

청구항 172

삭제

청구항 173

삭제

청구항 174

삭제

청구항 175

삭제

청구항 176

삭제

청구항 177

삭제

청구항 178

삭제

청구항 179

삭제

청구항 180

삭제

청구항 181

삭제

청구항 182

삭제

청구항 183

삭제

청구항 184

삭제

청구항 185

삭제

청구항 186

삭제

청구항 187

삭제

청구항 188

삭제

청구항 189

삭제

청구항 190

삭제

청구항 191

삭제

청구항 192

삭제

청구항 193

삭제

청구항 194

삭제

청구항 195

삭제

청구항 196

삭제

청구항 197

삭제

청구항 198

삭제

청구항 199

삭제

청구항 200

삭제

청구항 201

삭제

청구항 202

삭제

청구항 203

삭제

청구항 204

삭제

청구항 205

삭제

청구항 206

삭제

청구항 207

삭제

청구항 208

삭제

청구항 209

삭제

청구항 210

삭제

청구항 211

삭제

청구항 212

삭제

청구항 213

삭제

청구항 214

삭제

청구항 215

삭제

청구항 216

삭제

청구항 217

삭제

청구항 218

삭제

청구항 219

삭제

청구항 220

삭제

청구항 221

삭제

청구항 222

삭제

청구항 223

삭제

청구항 224

삭제

청구항 225

삭제

청구항 226

삭제

청구항 227

삭제

청구항 228

삭제

청구항 229

삭제

청구항 230

삭제

청구항 231

삭제

청구항 232

삭제

청구항 233

삭제

청구항 234

삭제

청구항 235

삭제

청구항 236

삭제

청구항 237

삭제

청구항 238

삭제

청구항 239

삭제

청구항 240

삭제

청구항 241

삭제

청구항 242

삭제

청구항 243

삭제

청구항 244

삭제

청구항 245

삭제

청구항 246

삭제

청구항 247

삭제

청구항 248

삭제

청구항 249

삭제

청구항 250

삭제

청구항 251

삭제

청구항 252

삭제

청구항 253

삭제

청구항 254

삭제

청구항 255

삭제

청구항 256

삭제

청구항 257

삭제

청구항 258

삭제

청구항 259

삭제

청구항 260

삭제

청구항 261

삭제

청구항 262

삭제

청구항 263

삭제

청구항 264

삭제

청구항 265

삭제

청구항 266

삭제

청구항 267

삭제

청구항 268

삭제

청구항 269

삭제

청구항 270

삭제

청구항 271

삭제

청구항 272

삭제

청구항 273

삭제

청구항 274

삭제

청구항 275

삭제

청구항 276

삭제

청구항 277

삭제

청구항 278

삭제

청구항 279

삭제

청구항 280

삭제

청구항 281

삭제

청구항 282

삭제

청구항 283

삭제

청구항 284

삭제

청구항 285

삭제

청구항 286

삭제

청구항 287

삭제

청구항 288

삭제

청구항 289

삭제

청구항 290

삭제

청구항 291

삭제

청구항 292

삭제

청구항 293

삭제

청구항 294

삭제

청구항 295

삭제

청구항 296

삭제

청구항 297

삭제

청구항 298

삭제

청구항 299

삭제

청구항 300

삭제

청구항 301

삭제

청구항 302

삭제

청구항 303

삭제

청구항 304

삭제

청구항 305

삭제

청구항 306

삭제

청구항 307

삭제

청구항 308

삭제

청구항 309

삭제

청구항 310

삭제

청구항 311

삭제

청구항 312

삭제

청구항 313

삭제

청구항 314

삭제

청구항 315

삭제

청구항 316

삭제

청구항 317

삭제

청구항 318

삭제

청구항 319

삭제

청구항 320

삭제

청구항 321

삭제

청구항 322

삭제

청구항 323

삭제

청구항 324

삭제

청구항 325

삭제

청구항 326

삭제

청구항 327

삭제

청구항 328

삭제

청구항 329

삭제

청구항 330

삭제

청구항 331

삭제

청구항 332

삭제

청구항 333

삭제

청구항 334

삭제

청구항 335

삭제

청구항 336

삭제

청구항 337

삭제

청구항 338

삭제

청구항 339

삭제

청구항 340

삭제

청구항 341

삭제

청구항 342

삭제

청구항 343

삭제

청구항 344

삭제

청구항 345

삭제

청구항 346

삭제

청구항 347

삭제

청구항 348

삭제

청구항 349

삭제

청구항 350

삭제

청구항 351

삭제

청구항 352

삭제

청구항 353

삭제

청구항 354

삭제

청구항 355

삭제

청구항 356

삭제

청구항 357

삭제

청구항 358

삭제

청구항 359

삭제

청구항 360

삭제

청구항 361

삭제

청구항 362

삭제

청구항 363

삭제

청구항 364

삭제

청구항 365

삭제

청구항 366

삭제

청구항 367

삭제

청구항 368

삭제

청구항 369

삭제

청구항 370

삭제

청구항 371

삭제

청구항 372

삭제

청구항 373

삭제

청구항 374

삭제

청구항 375

삭제

청구항 376

삭제

청구항 377

삭제

청구항 378

삭제

청구항 379

삭제

청구항 380

삭제

청구항 381

삭제

청구항 382

삭제

청구항 383

삭제

청구항 384

삭제

청구항 385

삭제

청구항 386

삭제

청구항 387

삭제

청구항 388

삭제

청구항 389

삭제

청구항 390

삭제

청구항 391

삭제

청구항 392

삭제

청구항 393

삭제

청구항 394

삭제

청구항 395

삭제

청구항 396

삭제

청구항 397

삭제

청구항 398

삭제

청구항 399

삭제

청구항 400

삭제

청구항 401

삭제

청구항 402

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001]

관련 출원의 교차-참조

본 출원은 2007년 6월 1일 출원된 미국가출원 60/941,581; 2007년 7월 10일 출원된 미국가출원 60/959,174; 2007년 8월 27일 출원된 미국가출원 60/968,291; 및 2008년 1월 28일 출원된 미국가출원 61/024,069의 우선권을 주장하며, 이들의 기술은 모든 목적을 위해 그 전체로서 본원에 참조로서 포함한다.

[0003]

본 발명의 분야

본 발명은 미생물로부터 만들어진 오일, 연료, 및 유지화학품(oleochemicals)의 생성에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 미세조류(microalgae), 효모 및 진균을 포함하는 오일-함유 미생물, 및 산업에 이용되거나 에너지 또는 식품원으로서 이용되는 지질, 지방산 에스테르, 지방산, 알데히드, 알코올 및 알칸을 포함하는 유용한 화합물을 생성하기 위해 이러한 미생물을 배양하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0005] 화석 연료는 수억년에 걸쳐 지구의 지각에서 열과 압력으로의 노출에 의해 미정제 오일, 석탄, 천연 가스, 또는 중유로 전환된 부폐된 식물 및 동물로부터 형성된, 매장된 유기 물질의 연소성 지질학적 퇴적물에 대한 일반적인 명칭이다.
- [0006] 보통의 대화에서, 미네랄 연료로서도 공지된 화석 연료는 석탄, 오일 및 천연 가스와 같은 다른 탄화수소-함유 천연 자원과 동의적으로 사용된다. 화석 연료의 사용은 대규모 산업 개발을 가능하게 하였고 물레방아뿐 아니라 난방용 빨감이나 토탄의 연소도 대부분 대신하였다. 화석 연료는 유한적인 재생불가능한 자원이다.
- [0007] 전기를 발생시킬 때, 화석 연료의 연소로부터의 에너지는 종종 터빈에 동력을 공급하도록 이용된다. 더 오래된 발생방식은 종종 연료의 연소에 의해 생성된 스텁을 이용하여 터빈을 돌렸으나, 보다 새로운 동력 장치에서는, 연료의 연소에 의해 생성된 가스가 직접 가스 터빈을 돌린다. 20세기 및 21세기에 세계적인 현대화로, 화석 연료, 특히 오일에서 유래된 가솔린으로부터의 에너지에 대한 갈증이 주요 지역적 및 세계적인 마찰의 원인 중 하나이다.
- [0008] 인간에 의한 화석 연료의 연소는 복사력을 허용하고 세계적인 온난화의 원인이 되는 온실 가스 중 하나인 이산화탄소 방출의 가장 큰 공급원이다. 미국에서, 90%를 초과하는 온실 가스 방출이 화석 연료의 연소로부터 나온다. 추가로, 산화질소, 이산화황, 휘발성 유기 화합물(VOC) 및 중금속과 같은 다른 공기 오염물질이 생성된다.
- [0009] 인간의 활동은 주로 화석 연료 연소로부터 이산화탄소를 방출시킴에 의해 온실 가스의 수준을 상승시키나, 예컨대 메탄과 같은 다른 가스들이 무시해도 좋을 정도는 아니다. 여러 온실 가스의 농도는 더 높은 이산화탄소 농도를 초래하는 화석 연료의 연소 및 삼림 별채와 같은 인간 활동으로 인해 시간에 따라 증가해 왔다. 세계적인 온난화 가설에 따르면, 산업 및 농업으로부터의 온실 가스가 최근 관찰된 세계적인 온난화에서 주요 역할을 담당해 왔다.
- [0010] 세계적인 경제에 의한 에너지에 대한 증가된 요구도 탄화수소의 비용에 증가된 압력을 주고 있다. 에너지는 차치하고, 플라스틱 및 화학품 제조를 포함하는 많은 산업이 이들의 제조 공정을 위해 공급원으로서 탄화수소의 이용가능성에 크게 의존적이다. 현재 공급원에 대한 비용-효과적인 대안이 에너지 및 이러한 원료 비용에 대한 상승 압력을 완화시키는데 도움이 될 수 있었다.

발명의 상세한 설명

- [0011] 일 양태에서, 본 발명은 다양한 구체예에서, 리파아제, 수크로오스 운반체, 수크로오스 전화효소, 프력토키나아제, 다당류-분해 효소, 지방산 아실-ACP 티오에스테라아제, 지방산 아실-CoA/알데하이드 환원효소, 지방산 아실-CoA 환원효소, 지방산 알데하이드 환원효소, 지방산 알데하이드 테카르보닐라아제, 및 아실 담체 단백질(ACP)로 구성된 군으로부터 선택된 단백질을 엔코딩하는 외인성 유전자를 함유하는 미세조류 세포, 유질(oleaginous) 효모, 또는 진균을 포함할 수 있는 미생물을 제공하는 발명에 관한 것이다. 미생물(예컨대, 미세조류 세포)는, 예를 들어 표 1로부터 선택될 수 있다. 특정 구체예에서, 세포는 클로렐라(*Chlorella*) 속의 종들, 예컨대 클로렐라 푸스카(*Chlorella fusca*), 클로렐라 프로토테코이드(*Chlorella protothecoides*), 클로렐라 피레노이도사(*Chlorella pyrenoidosa*), 클로렐라 캐슬러리(*Chlorella kessleri*), 클로렐라 불가리스(*Chlorella vulgaris*), 클로렐라 사카로필라(*Chlorella saccharophila*), 클로렐라 소로키니아나(*Chlorella sorokiniana*) 또는 클로렐라 엘립소이데아(*Chlorella ellipsoidea*)이다. 다른 구체예에서, 미생물은 크립토코커스 쿠르바투스(*Cryptococcus curvatus*), 크립토코커스 테리콜루스(*Cryptococcus terriculus*), 캔디다 종(*Candida sp.*), 리포마이세스 스타르케이(*Lipomyces starkeyi*), 리포마이세스 리포페(*Lipomyces lipofer*), 엔도마이콥시스 베르날리스(*Endomycopsis vernalis*), 로도토룰라 글루티니스(*Rhodotorula glutinis*), 로도토룰라 그라실리스(*Rhodotorula gracilis*), 및 야로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*)로 구성된 군으로부터 선택된 유질 효모이다. 여전히 다른 구체예에서, 미생물은 모르티에렐라(*Mortierella*) 속의 종들, 모르티에렐라 비나세아(*Mortierella vinacea*), 모르티에렐라 알핀(*Mortierella alpina*), 피티움 데바리아눔(*Pythium debaryanum*), 뮤코 시르시넬로이드(*Mucor circinelloides*), 아스페질러스 오크라세우스(*Aspergillus ochraceus*), 아스페질러스 테레우스(*Aspergillus terreus*), 페니실리움 일라시눔(*Pennicillium lilacinum*), 헨세눌로(*Hensenu*) 속의 종, 카에토미움(*Chaetomium*) 속의 종, 클라도스포리움(*Cladosporium*) 속의 종, 말브란케아(*Malbranchea*) 속의 종, 리조푸스(*Rhizopus*) 속의 종, 및 피티움(*Pythium*) 속의 종들로 구성된 군으로부터 선택된 진균이다. 다른 구체예에서, 본 발명은 세균 속주에서 탄화수소 변형 효소의 발현을 포함하며, 예컨대 재생가능한 디젤을 생성하는 대장균(*E. coli*) 및 바실라(*Bacillus*) 방법이다. 일 구체예에서, 상기 방법은 (a) 미생물의 집단을 고정된 탄소원의 존재하에 배양하는 단계로서, (i) 미생물이 이들의 건조 세포 중량의 적어도 10%를 지질로서 축적시키

고, (ii) 고정된 탄소원이 글리세롤, 탈중합된 셀룰로직 물질, 수크로오스, 당밀, 글루코오스, 아라비노오스, 갈락토오스, 크실로오스, 프럭토오스, 아라비노오스, 만노오스, 아세테이트 및 상기의 임의의 조합물로 구성된 군으로부터 선택되는 단계, (b) 지질 성분을 배양된 미생물로부터 단리시키는 단계, 및 (c) 단리된 지질 성분을 1회 이상 화학적 반응시켜 직쇄 알칸을 생성함으로써 재생가능한 디젤을 생성하는 단계를 포함한다.

[0012] 또 다른 양태에서, 본 발명은 바로 위에 개시된 방법에 따라 제조된 액체 탄화수소의 조성물에 관한 것이고, 여기서 조성물은 ASTM D975의 명세에 따른다.

[0013] 또 다른 양태에서, 본 발명은 제트 연료를 생성하는 방법에 관한 것이다. 일 구체예에서, 상기 방법은 (a) 미생물의 집단을 고정된 탄소원의 존재하에 배양하는 단계로서, (i) 미생물이 이들의 건조 세포 중량의 적어도 10%를 지질로서 축적시키고, (ii) 고정된 탄소원이 글리세롤, 탈중합된 셀룰로직 물질, 수크로오스, 당밀, 글루코오스, 아라비노오스, 갈락토오스, 크실로오스, 프럭토오스, 아라비노오스, 만노오스, 아세테이트 및 상기의 임의의 조합물로 구성된 군으로부터 선택되는 단계, (b) 지질 성분을 배양된 미생물로부터 단리시키는 단계, (c) 단리된 지질 성분을 1회 이상 화학적 반응시켜 직쇄 알칸을 생성하는 단계, 및 (d) 직쇄 알칸을 크래킹(cracking)시켜 제트 연료를 생성하는 단계를 포함한다.

[0014] 또 다른 양태에서, 본 발명은 바로 위에 개시된 방법에 따라 제조된 액체 탄화수소의 조성물에 관한 것이고, 여기서 조성물은 ASTM D1655의 명세에 따른다.

[0015] 또 다른 양태에서, 본 발명은 동일한 종의 야생형 세포에 비해 지질 경로 효소를 변경된 수준으로 발현시키도록 유전적으로 공학처리되고/거나 선택된 미세조류 세포 또는 효모 세포에 관한 것이다. 일부 경우에, 본 세포와 야생형 세포 둘 모두를 동일한 조건하에 성장시킬 때, 본 세포는 야생형 세포에 비해 더 많은 지질을 생성한다. 일부 경우에, 세포는 야생형 세포보다 지질 경로 효소를 더 높은 수준으로 발현시키도록 유전적으로 공학처리되고/거나 선택되었다. 일부 경우에, 지질 경로 효소는 피루베이트 데하이드로제나아제, 아세틸-CoA 카르복실라아제, 아실 담체 단백질, 및 글리세롤-3 포스페이트 아실트랜스퍼라아제로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 경우에, 세포는 야생형 세포보다 지질 경로 효소를 더 낮은 수준으로 발현하도록 유전적으로 공학처리되고/거나 선택되었다. 세포가 지질 경로 효소를 더 낮은 수준으로 발현시키는 적어도 일 구체예에서, 지질 경로 효소는 시트레이트 합성효소를 포함한다.

[0016] 일부 구체예에서, 상기 개시된 미세조류 또는 효모 세포는 지방산 합성의 총체적인 조정제를 야생형 세포에 비해 변경된 수준으로 발현시키도록 유전적으로 공학처리되고/거나 선택됨으로써, 다수의 지방산 합성 유전자는 발현 수준이 야생형 세포에 비해 변경된다. 일부 경우에, 지질 경로 효소는 지방산을 변형시키는 효소를 포함한다. 일부 경우에, 지질 경로 효소는 스테아로일-ACP 불포화화효소 및 글리세롤지질 불포화화효소로부터 선택된다.

[0017] 또 다른 양태에서, 본 발명은 하나 이상의 외인성 유전자를 함유하는 오일-생성 미생물에 관한 것이고, 여기서 외인성 유전자는 지방산 아실-ACP 티오에스테라아제, 지방산 아실-CoA 환원효소, 지방산 알데히드 환원효소, 지방산 아실-CoA/알데히드 환원효소, 지방산 알데히드 데카르보닐라아제, 및 아실 담체 단백질로 구성된 군으로부터 선택된 단백질(들)을 엔코딩한다. 일부 경우에, 미생물은 클로렐라 프로토태코이드(*Chlorella protothecoides*), 클로렐라 미누티시마(*Chlorella minutissima*), 클로렐라 에메르소니아(*Chlorella emersonii*), 클로렐라 소로키니아나(*Chlorella sorokiniana*), 클로렐라 엘립소이데아(*Chlorella ellipsoidea*), 또는 클로렐라 종(*Chlorella sp.*)이다. 다른 경우에, 미생물은 본원에 개시된 다른 종이다. 일 구체예에서, 외인성 유전자는 자극에 반응하여 유도될 수 있거나 억제될 수 있는 프로모터에 작동가능하게 결합된다. 일부 경우에, 자극은 외부에서 제공된 소형 분자, 열, 냉 및 빛으로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 경우에, 외인성 유전자는 세포 구획에서 발현된다. 일부 구체예에서, 세포 구획은 엽록체원형질 및 사립체로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0018] 일 구체예에서, 외인성 유전자는 지방산 아실-ACP 티오에스테라아제를 엔코딩한다. 일부 경우에, 외인성 유전자에 의해 엔코딩된 티오에스테라아제는 아실 담체 단백질(ACP)로부터 8 내지 18개-탄소 지방산의 절단을 촉매화한다. 일부 경우에, 외인성 유전자에 의해 엔코딩된 티오에스테라아제는 ACP로부터 10 내지 14개-탄소 지방산의 절단을 촉매화한다. 일 구체예에서, 외인성 유전자에 의해 엔코딩된 티오에스테라아제는 ACP로부터 12개-탄소 지방산의 절단을 촉매화한다.

[0019] 일 구체예에서, 외인성 유전자는 지방산 아실-CoA/알데히드 환원효소를 엔코딩한다. 일부 경우에, 외인성 유전자에 의해 엔코딩된 환원효소는 상응하는 일차 알코올로의 20 내지 30개-탄소 지방산 아실-CoA의 환원을 촉매화

한다. 일부 경우에, 외인성 유전자에 의해 엔코딩된 환원효소는 상응하는 일차 알코올로의 8 내지 18개-탄소 지방산 아실-CoA의 환원을 촉매화한다. 일부 경우에, 외인성 유전자에 의해 엔코딩된 환원효소는 상응하는 일차 알코올로의 10 내지 14개-탄소 지방산 아실-CoA의 환원을 촉매화한다. 일 구체예에서, 외인성 유전자에 의해 엔코딩된 환원효소는 도데카놀로의 12개-탄소 지방산 아실-CoA의 환원을 촉매화한다.

[0020] 일 구체예에서, 외인성 유전자는 지방산 아실-CoA 환원효소를 엔코딩한다. 일부 경우에, 외인성 유전자에 의해 엔코딩된 환원효소는 상응하는 알데히드로의 8 내지 18개-탄소 지방산 아실-CoA의 환원을 촉매화한다. 일 구체예에서, 외인성 유전자에 의해 엔코딩된 환원효소는 도데카놀로의 12개-탄소 지방산 아실-CoA의 환원을 촉매화한다.

[0021] 적어도 일 구체예에서, 본 발명의 미생물은 하나 이상의 외인성 수크로오스 이용 유전자를 추가로 함유한다.

[0022] 또 다른 양태에서, 본 발명은 두 개의 외인성 유전자를 함유하는 미생물에 관한 것이고, 여기서 제1 외인성 유전자는 지방산 아실-ACP 티오에스테라아제를 엔코딩하고 제2 외인성 유전자는 지방산 아실-CoA 환원효소, 지방산 아실-CoA/알데히드 환원효소, 및 아실 담체 단백질로 구성된 군으로부터 선택된 단백질을 엔코딩한다. 일부 경우에, 미생물은 클로렐라 미누티시마(*Chlorella minutissima*), 클로렐라 에메르소니아(*Chlorella emersonii*), 클로렐라 소로키니아나(*Chlorella sorokiniana*), 클로렐라 엘립소이데아(*Chlorella ellipsoidea*), 클로렐라 종(*Chlorella sp.*), 또는 클로렐라 프로토테코이드(*Chlorella protothecoides*)이다. 일부 경우에, 미생물은 본원에 개시된 다른 종이다. 일부 경우에, 두 외인성 유전자는 각각 자극에 반응하여 유도될 수 있는 프로모터에 작동가능하게 결합되어 있다. 일부 경우에, 각 프로모터는 동일한 자극에 반응하여 유도될 수 있다.

[0023] 일 구체예에서, 제1 외인성 유전자에 의해 엔코딩된 티오에스테라아제는 ACP로부터 8 내지 18개-탄소 지방산의 절단을 촉매화한다. 일부 구체예에서, 제2 외인성 유전자는 상응하는 일차 알코올로의 8 내지 18개-탄소 지방산-CoA의 환원을 촉매화하는 지방산 아실-CoA/알데히드 환원효소를 엔코딩한다. 일부 경우에, 제1 외인성 유전자에 의해 엔코딩된 티오에스테라아제는 ACP로부터 10 내지 14개-탄소 지방산의 절단을 촉매화하고, 제2 외인성 유전자는 상응하는 일차 알코올로의 10 내지 14개-탄소 지방산-CoA의 환원을 촉매화하며, 여기서 티오에스테라아제 및 환원효소는 동일한 길이의 탄소 사슬에 대해 작용한다. 일 구체예에서, 제1 외인성 유전자에 의해 엔코딩된 티오에스테라아제는 ACP로부터 12개-탄소 지방산의 절단을 촉매화하고, 제2 외인성 유전자는 상응하는 알데히드로의 8 내지 18개-탄소 지방산-CoA의 환원을 촉매화한다. 일부 구체예에서, 제2 외인성 유전자는 상응하는 알데히드로의 8 내지 18개-탄소 지방산-CoA의 환원을 촉매화하는 지방산 아실-CoA 환원효소를 엔코딩한다.

[0024] 일부 구체예에서, 제2 외인성 유전자는 지방산 아실-CoA 환원효소를 엔코딩하고, 미생물은 지방산 알데히드 데카르보닐라아제를 엔코딩하는 제3 외인성 유전자를 추가로 함유한다. 일부 경우에, 제1 외인성 유전자에 의해 엔코딩된 티오에스테라아제는 ACP로부터 8 내지 18개-탄소 지방산의 절단을 촉매화하고, 제2 외인성 유전자에 의해 엔코딩된 환원효소는 상응하는 일차 알코올로의 8 내지 18개-탄소 지방산 아실-CoA의 환원을 촉매화하며, 제3 외인성 유전자에 의해 엔코딩된 데카르보닐라아제는 상응하는 알칸으로의 8 내지 18개-탄소 지방산 알데히드의 전환을 촉매화하는데, 여기서 티오에스테라아제, 환원효소 및 데카르보닐라아제는 동일한 길이의 탄소 사슬에 대해 작용한다.

[0025] 일부 구체예에서, 제2 외인성 유전자는 자연히 지방산 아실-ACP 티오에스테라아제와 공동-발현되는 아실 담체 단백질을 엔코딩한다.

[0026] 일부 구체예에서, 제2 외인성 유전자는 아실 담체 단백질을 엔코딩하고, 미생물은 지방산 아실-CoA 환원효소 및 지방산 아실-CoA/알데히드 환원효소로 구성된 군으로부터 선택된 단백질을 엔코딩하는 제3 외인성 유전자를 추가로 함유한다. 일부 경우에, 제3 외인성 유전자는 지방산 아실-CoA 환원효소를 엔코딩하고, 미생물은 지방산 알데히드 데카르보닐라아제를 엔코딩하는 제4 외인성 유전자를 추가로 함유한다.

[0027] 또 다른 양태에서, 본 발명은 미생물 집단에서 문자를 생성하는 방법에 관한 것이다. 일 구체예에서, 상기 방법은 배양 배지에서 미생물의 집단을 배양하는 것을 포함하는데, 여기서 미생물은 (i) 지방산 아실-ACP 티오에스테라아제를 엔코딩하는 제1 외인성 유전자, 및 (ii) 지방산 아실-CoA/알데히드 환원효소를 엔코딩하는 제2 외인성 유전자를 함유하고, 미생물은 아실 담체 단백질 (ACP)에 결합된 지방산을 합성하고, 지방산 아실-ACP 티오에스테라아제는 ACP로부터 지방산의 절단을 촉매화하며, 추가 가공을 통해 지방산 아실-CoA를 산출하고, 지방산 아실-CoA/알데히드 환원효소는 알코올로의 아실-CoA의 환원을 촉매화한다.

[0028]

미생물 집단에서 분자를 생성하는 방법의 일 구체예에서, 미생물은 클로렐라 미누티시마(*Chlorella minutissima*), 클로렐라 에메르소니아(*Chlorella emersonii*), 클로렐라 소로키니아나(*Chlorella sorokiniana*), 클로렐라 엘립소이데아(*Chlorella ellipsoidea*), 클로렐라 종(*Chlorella sp.*) 또는 클로렐라 프로토테코이드(*Chlorella protothecoides*)이다. 다른 경우에, 미생물은 본원에 개시된 또 다른 종의 미생물이다. 일부 경우에, 배양 배지는 글리세롤을 함유한다. 일 구체예에서, 글리세롤은 트랜스에스테르화 공정의 부산물이다. 일부 경우에, 배양 배지는 글리세롤과 하나 이상의 다른 고정된 탄소원을 함유한다. 일 구체예에서, 하나 이상의 다른 고정된 탄소원이 수크로오스이다. 일부 경우에, 모든 글리세롤 및 모든 하나 이상의 다른 고정된 탄소원은 발효 맨 처음에 미생물에 제공된다. 일부 경우에, 글리세롤 및 하나 이상의 다른 고정된 탄소원은 발효를 진행하면서 미리 결정된 비율로 미생물에게 공급된다. 본 발명의 일부 배양 방법에서, 제1 기간 동안 글리세롤을 하나 이상의 다른 고정된 탄소원 없이 미생물에 제공하고, 제1 기간의 끝에 하나 이상의 다른 고정된 탄소원을 제공하며, 미생물은 하나 이상의 다른 고정된 탄소원의 존재하에 제2 기간 동안 배양된다.

[0029]

일부 구체예에서, 외인성 유전자는 제1 자극에 반응하여 유도될 수 있는 프로모터에 작동가능하게 결합된다. 일부 경우에, 상기 방법은 제1 자극을 제공하고, 미생물의 집단을 제1 기간 동안 제1 자극의 존재하에 인큐베이션시켜 알코올을 제공하는 것을 추가로 포함한다. 일부 경우에, 상기 방법은 배양 배지 및 미생물을 포함하는 수성 바이오매스(biomass)로부터 알코올을 추출하는 것을 추가로 포함한다.

[0030]

일부 구체예에서, 제1 외인성 유전자에 의해 엔코딩된 티오에스테라아제는 ACP로의 8 내지 18개-탄소 지방산의 절단을 촉매화하고, 제2 외인성 유전자에 의해 엔코딩된 환원효소는 상응하는 일차 알코올로의 8 내지 18개-탄소 지방산 아실-CoA의 환원을 촉매화하며, 여기서 티오에스테라아제와 환원효소는 동일한 길이의 탄소 사슬에 대해 작용한다. 일부 경우에, 제1 외인성 유전자에 의해 엔코딩된 티오에스테라아제는 ACP로의 10 내지 14개-탄소 지방산의 절단을 촉매화하고, 제2 외인성 유전자에 의해 엔코딩된 환원효소는 상응하는 일차 알코올로의 10 내지 14개-탄소 지방산 아실-CoA의 환원을 촉매화하며, 여기서 티오에스테라아제와 환원효소는 동일한 길이의 탄소 사슬에 대해 작용한다. 일 구체예에서, 제1 외인성 유전자에 의해 엔코딩된 티오에스테라아제는 ACP로의 12개-탄소 지방산의 절단을 촉매화하고, 제2 외인성 유전자에 의해 엔코딩된 환원효소는 도데카놀로의 12개-탄소 지방산 아실-CoA의 환원을 촉매화한다. 일부 경우에, 미생물은 아실 담체 단백질을 엔코딩하는 제3 외인성 유전자를 추가로 함유한다. 일부 구체예에서, 제3 외인성 유전자는 자연히 지방산 아실-ACP 티오에스테라아제와 공동-발현되는 아실 담체 단백질을 엔코딩한다.

[0031]

또 다른 양태에서, 본 발명은 미생물 집단에서 지질 분자를 생성하는 방법에 관한 것이다. 일 구체예에서, 상기 방법은 배양 배지에서 미생물의 집단을 배양하는 것을 포함하는데, 여기서 미생물은 (i) 지방산 아실-ACP 티오에스테라아제를 엔코딩하는 제1 외인성 유전자, 및 (ii) 지방산 아실-CoA/알데히드 환원효소를 엔코딩하는 제2 외인성 유전자를 함유하고, 미생물은 아실 담체 단백질(ACP)에 결합된 지방산을 합성하고, 지방산 아실-ACP 티오에스테라아제는 ACP로부터 지방산의 절단을 촉매화하며, 추가 가공을 통해 지방산 아실-CoA를 산출하고, 지방산 아실-CoA 환원효소는 알데히드로의 아실-CoA의 환원을 촉매화한다. 일부 경우에, 미생물은 클로렐라 미누티시마(*Chlorella minutissima*), 클로렐라 에메르소니아(*Chlorella emersonii*), 클로렐라 소로키니아나(*Chlorella sorokiniana*), 클로렐라 엘립소이데아(*Chlorella ellipsoidea*), 클로렐라 종(*Chlorella sp.*) 또는 클로렐라 프로토테코이드(*Chlorella protothecoides*)이다. 다른 경우에, 미생물은 본원에 개시된 또 다른 종의 미생물이다.

[0032]

일부 구체예에서, 외인성 유전자는 제1 자극에 반응하여 유도될 수 있는 프로모터에 작동가능하게 결합되고, 상기 방법은 제1 자극을 제공하고, 미생물의 집단을 제1 기간 동안 제1 자극의 존재하에 인큐베이션시켜 알데히드를 제공하는 것을 추가로 포함한다. 일 구체예에서, 상기 방법은 배양 배지 및 미생물의 집단을 포함하는 수성 바이오매스로부터 알데히드를 추출하는 것을 추가로 포함한다.

[0033]

일부 구체예에서, 제1 외인성 유전자에 의해 엔코딩된 티오에스테라아제는 ACP로의 8 내지 18개-탄소 지방산의 절단을 촉매화하고, 제2 외인성 유전자에 의해 엔코딩된 환원효소는 상응하는 일차 알코올로의 8 내지 18개-탄소 지방산 아실-CoA의 환원을 촉매화하며, 여기서 티오에스테라아제와 환원효소는 동일한 길이의 탄소 사슬에 대해 작용한다. 일부 경우에, 미생물은 알칸으로의 알데히드의 전환을 촉매화하는 지방산 알데히드 데카르보닐라아제를 엔코딩하는 제3 외인성 유전자를 추가로 함유한다.

[0034]

일부 경우에, 외인성 유전자는 제1 자극에 반응하여 유도될 수 있는 프로모터에 작동가능하게 결합되고, 상기 방법은 제1 자극을 제공하고, 미생물의 집단을 제1 기간 동안 제1 자극의 존재하에 인큐베이션시켜 알칸을 제공하는 것을 추가로 포함한다. 일 구체예에서, 상기 방법은 배양 배지 및 미생물의 집단을 포함하는 수성 바이오

매스로부터 알칸을 추출하는 것을 추가로 포함한다.

[0035] 일부 경우에, 제1 외인성 유전자에 의해 엔코딩된 티오에스테라아제는 ACP로의 8 내지 18개-탄소 지방산의 절단을 촉매화하고, 제2 외인성 유전자에 의해 엔코딩된 환원효소는 상응하는 알데히드로의 8 내지 18개-탄소 지방산 아실-CoA의 환원을 촉매화하며, 제3 외인성 유전자에 의해 엔코딩된 데카르보닐라아제는 상응하는 알칸으로의 8 내지 18개-탄소 알데히드의 전환을 촉매화하고, 여기서 티오에스테라아제, 환원효소 및 데카르보닐라아제는 동일한 탄소 사슬 길이에 대해 작용한다. 일부 구체예에서, 미생물은 아실 담체 단백질을 엔코딩하는 제3 외인성 유전자를 추가로 함유한다. 일부 경우에, 제3 외인성 유전자는 자연히 지방산-ACP 티오에스테라아제와 공동-발현되는 아실 담체 단백질을 엔코딩한다. 일부 경우에, 미생물은 알칸으로의 알데히드의 전환을 촉매화하는 지방산 알데히드 데카르보닐라아제를 엔코딩하는 제4 외인성 유전자를 추가로 함유한다.

[0036] 몇몇 방법에서, 배양 배지는 글리세롤을 함유한다. 일 구체예에서, 글리세롤은 트랜스에스테르화 공정의 부산물이다. 일부 경우에, 배양 배지는 글리세롤과 하나 이상의 다른 고정된 탄소원을 함유한다. 일 구체예에서, 하나 이상의 다른 고정된 탄소원이 수크로오스이다. 일부 경우에, 모든 글리세롤 및 모든 하나 이상의 다른 고정된 탄소원은 발효 맨 처음에 미생물에 제공된다. 일부 경우에, 글리세롤 및 하나 이상의 다른 고정된 탄소원은 발효를 진행하면서 미리 결정된 비율로 미생물에게 공급된다. 일 구체예에서, 제1 기간 동안 글리세롤을 하나 이상의 다른 고정된 탄소원 없이 미생물에 제공하고, 제1 기간의 끝에 하나 이상의 다른 고정된 탄소원을 제공하며, 미생물은 하나 이상의 다른 고정된 탄소원의 존재하에 제2 기간 동안 배양된다.

[0037] 또 다른 양태에서, 본 발명은 미생물 집단에서 지정된 탄소 사슬 길이를 갖는 지방산 분자를 제조하는 방법에 관한 것이다. 일 구체예에서, 상기 방법은 배양 배지에서 지질-생성 미생물의 집단을 배양하는 것을 포함하며, 여기서 미생물은 탄소 사슬 길이에 특이적인 활성을 갖는 지방산 아실-ACP 티오에스테라아제를 엔코딩하는 외인성 유전자를 함유하고, 미생물은 아실 담체 단백질(ACP)에 결합된 지방산을 합성하며, 티오에스테라아제는 지방산이 특정 탄소 사슬 길이로 합성되었을 때 ACP로부터 지방산의 절단을 촉매화한다. 일부 경우에, 미생물을 클로렐라 미누티시마(*Chlorella minutissima*), 클로렐라 에메르소니(*Chlorella emersonii*), 클로렐라 소로키니아나(*Chlorella sorokiniana*), 클로렐라 엘립소이데아(*Chlorella ellipsoidea*), 클로렐라 종(*Chlorella sp.*) 또는 클로렐라 프로토테코이드(*Chlorella protothecoides*)이다. 다른 경우에, 미생물은 본원에 개시된 또 다른 종의 미생물이다.

[0038] 일부 구체예에서, 외인성 유전자는 제1 자극에 반응하여 유도될 수 있는 프로모터에 작동가능하게 결합되고, 상기 방법은 제1 자극을 제공하고, 미생물의 집단을 제1 기간 동안 제1 자극의 존재하에 인큐베이션시키는 것을 추가로 포함한다. 일부 경우에, 상기 방법은 배양 배지 및 미생물의 집단을 포함하는 수성 바이오매스로부터 지방산을 추출하는 것을 추가로 포함한다.

[0039] 일부 경우에, 미생물은 아실 담체 단백질을 엔코딩하는 제2 외인성 유전자를 추가로 함유한다. 일부 구체예에서, 제2 외인성 유전자는 자연히 지방산 아실-ACP 티오에스테라아제와 공동-발현되는 아실 담체 단백질을 엔코딩한다. 일 구체예에서, 아실-ACP 티오에스테라아제는 ACP로부터 8 내지 18개-탄소 지방산의 절단을 촉매화한다.

[0040] 일부 경우에, 배양 배지는 글리세롤을 함유한다. 일 구체예에서, 글리세롤은 트랜스에스테르화 공정의 부산물이다. 일 구체예에서, 배양 배지는 글리세롤과 하나 이상의 다른 고정된 탄소원을 함유한다. 일 구체예에서, 하나 이상의 다른 고정된 탄소원이 수크로오스이다. 일부 경우에, 모든 글리세롤 및 모든 하나 이상의 다른 고정된 탄소원은 발효 맨 처음에 미생물에 제공된다. 일부 경우에, 글리세롤 및 하나 이상의 다른 고정된 탄소원은 발효를 진행하면서 미리 결정된 비율로 미생물에게 공급된다. 일 구체예에서, 제1 기간 동안 글리세롤을 하나 이상의 다른 고정된 탄소원 없이 미생물에 제공하고, 제1 기간의 끝에 하나 이상의 다른 고정된 탄소원을 제공하며, 미생물은 하나 이상의 다른 고정된 탄소원의 존재하에 제2 기간 동안 배양된다.

[0041] 또 다른 양태에서, 본 발명은 외인성 유전자를 함유하는 미세조류 세포에 관한 것이고, 여기서 외인성 유전자는 리파아제, 수크로오스 운반체, 수크로오스 전화효소, 프럭토키나아제, 또는 다당류-분해 효소로 구성된 군으로부터 선택된 단백질을 엔코딩한다. 일부 경우에, 세포는 클로렐라 미누티시마(*Chlorella minutissima*), 클로렐라 에메르소니(*Chlorella emersonii*), 클로렐라 소로키니아나(*Chlorella sorokiniana*), 클로렐라 엘립소이데아(*Chlorella ellipsoidea*), 클로렐라 종(*Chlorella sp.*) 또는 클로렐라 프로토테코이드(*Chlorella protothecoides*)이다. 다른 경우에, 세포는 본원에 개시된 또 다른 종의 미세조류이다.

[0042] 일부 구체예에서, 외인성 유전자는 프로모터에 작동가능하게 결합된다. 일부 경우에, 프로모터는 자극에 반응

하여 유도되거나 억제될 수 있다. 다양한 구체예에서, 자극은 외부에서 제공된 소형 분자, 열, 냉 및 빛으로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 경우에, 외인성 유전자는 세포 구획에서 발현된다. 일부 구체예에서, 세포 구획은 엽록체원형질 및 사립체로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0043] 일부 경우에, 유전자는 표 9로부터 선택된 리파아제와 70% 이상의 아미노산 동일성을 갖는 리파아제를 엔코딩한다. 일 구체예에서, 리파아제는 노보자임-435이다. 일 구체예에서, 다당류-분해 효소는 클로렐라(*Chlorella*) 바이러스에 내인성이다.

[0044] 또 다른 양태에서, 본 발명은 두 외인성 유전자를 함유하는 미세조류 세포에 관한 것이고, 여기서 제1 외인성 유전자는 리파아제를 엔코딩하고 제2 외인성 유전자는 다당류-분해 효소를 엔코딩한다. 일부 경우에, 외인성 유전자는 각각 프로모터에 작동가능하게 결합된다. 일부 경우에, 외인성 유전자는 각각 자극에 반응하여 유도될 수 있는 프로모터에 작동가능하게 결합되어 있다. 일부 경우에, 외인성 유전자는 각각 동일한 자극에 반응하여 유도될 수 있는 프로모터에 작동가능하게 결합된다. 일부 경우에, 외인성 유전자는 각각 다른 프로모터를 유도하지 않는 하나 이상의 자극에 반응하여 유도될 수 있는 프로모터에 작동가능하게 결합된다.

[0045] 또 다른 양태에서, 본 발명은 미생물에서 지질 분자를 제조하는 방법에 관한 것이다. 일 구체예에서, 상기 방법은 (a) (i) 리파아제를 엔코딩하는 외인성 유전자, 및/또는 (ii) 다당류-분해 효소를 엔코딩하는 외인성 유전자를 함유하는 미생물을 세포 밀도를 증가시키기에 충분한 제1 기간 동안 배양시키는 단계로서, 외인성 유전자(들)는 자극에 반응하여 유도될 수 있는 프로모터에 작동가능하게 결합되어 있는 단계, (b) 자극을 제공하는 단계, 및 (c) 미생물을 자극의 존재하에 제2 기간 동안 인큐베이션시키는 단계를 포함한다.

[0046] 또 다른 양태에서, 본 발명은 미생물에서 지질 분자를 제조하는 방법에 관한 것이다. 일 구체예에서, 상기 방법은 (a) 세포 밀도를 증가시키기에 충분한 제1 기간 동안 지질-생성 미생물을 배양시키는 단계, (b) 미생물과 직접 접촉시에 미생물을 감염시키고 용해시킬 수 있는 바이러스를 제공하는 단계, 및 (c) 미생물을 제2 기간 동안 인큐베이션시켜 용해된 수성 바이오매스를 생성하는 단계를 포함한다. 일 구체예에서, 상기 방법은 지질 분자를 용해된 수성 바이오매스로부터 추출하는 것을 추가로 포함한다.

[0047] 또 다른 양태에서, 본 발명은 외인성 유전자를 함유하는 미세조류 세포에 관한 것이고, 외인성 유전자는 지질 경로 효소에 대한 공동인자를 엔코딩하거나 공동인자 합성에 관여하는 단백질을 엔코딩한다.

[0048] 또 다른 양태에서, 본 발명은 지질-생성 미생물을 배양시키는 방법에 관한 것이다. 일 구체예에서, 상기 방법은 미생물을 충분한 양의 지질 경로 효소에 대한 하나 이상의 공동인자(들)의 존재하에 배양시켜 미생물의 지질 수율을 상기 하나 이상의 공동인자가 존재하지 않는 미생물의 지질 수율에 비해 증가시키는 것을 포함한다. 일부 경우에, 하나 이상의 공동인자는 하나 이상의 지질 경로 효소에 의해 요구되는 비타민이다. 일 구체예에서, 하나 이상의 공동인자는 비오틴이다. 일부 경우에, 하나 이상의 공동인자는 하나 이상의 공동인자를 제공하기 위해 유전적으로 공학처리된 미생물을 배양액에 포함시킴에 의해 제공된다.

[0049] 또 다른 양태에서, 본 발명은 미생물을 발효시키는 방법에 관한 것이고, 이 방법은 글루코오스 및 크실로오스를 포함하는 혼합물을 에너지원으로서 미생물에 제공하는 것을 포함한다. 일 구체예에서, 혼합물은 리그닌을 추가로 포함한다. 일 구체예에서, 혼합물은 퍼퓨랄의 하나 이상의 종을 추가로 포함한다. 일부 경우에, 혼합물은 탈중합된 셀룰로직 물질이다. 일부 경우에, 혼합물은 하나 이상의 수크로오스 이용 효소를 추가로 포함한다. 일 구체예에서, 혼합물은 수크로오스 전화효소를 포함한다.

[0050] 일부 경우에, 미생물은 브락테오코코스 마이너(*Bracteococcus minor*), 클로렐라 엘립소이데아(*Chlorella ellipsoidea*), 클로렐라 케슬러리(*Chlorella kessleri*), 클로렐라 루테오비리디스(*Chlorella luteoviridis*), 브락테오코코스 메디오누클레아투스(*Bracteococcus medionucleatus*), 클로렐라 미누티시마(*Chlorella minutissima*), 클로렐라 오발리스(*Chlorella ovalis*), 클로렐라 프로토테코이드(*Chlorella protothecoides*), 클로렐라 사카로필라(*Chlorella saccharophila*), 클로렐라 소로키니아나(*Chlorella sorokiniana*), 클로렐라 종(*Chlorella sp.*), 클로렐라 불가리스(*Chlorella vulgaris*), 파라클로렐라 케슬러리(*Parachlorella kessleri*), 프로토테카 모리포르미스(*Prototheca moriformis*), 및 슈도클로렐라 아쿠아티카(*Pseudochlorella aquatica*)로 구성된 군으로부터 선택된다. 다른 경우에, 미생물은 본원에 개시된 다른 종의 미생물이다. 일부 경우에, 미생물은 하나 이상의 지질 변형 효소, 탄화수소 변형 효소, 또는 수크로오스 이용 효소를 엔코딩하는 외인성 유전자를 발현시키도록 유전적으로 공학처리되었다.

[0051] 또 다른 양태에서, 본 발명은 미세조류를 배양시키는 방법에 관한 것이고, 이 방법은 미세조류를 셀룰로직 물질, 5-탄소 당, 6-탄소 당, 및 아세테이트로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 탄소 기질을 포함하는 공

급원료를 포함하는 배양 배지에서 배양시키는 것을 포함한다. 일부 경우에, 탄소 기질은 글루코오스이고, 미세조류는 클로렐라(*Chlorella*), 파라클로렐라(*Parachlorella*), 슈도클로렐라(*Pseudochlorella*), 브락테오코커스(*Bracteococcus*), 프로토테카(*Prototheca*) 및 씬데스무스(*Scenedesmus*)로 구성된 군으로부터 선택된 속에 속한다. 일부 경우에, 탄소 기질은 크실로오스이고, 미세조류는 클로렐라(*Chlorella*), 슈도클로렐라(*Pseudochlorella*), 및 프로토테카(*Prototheca*)로 구성된 군으로부터 선택된 속에 속한다. 일부 경우에, 탄소 기질은 수크로오스이고, 미세조류는 클로렐라(*Chlorella*) 및 브락테오코커스(*Bracteococcus*)로 구성된 군으로부터 선택된 속에 속한다. 일부 경우에, 탄소 기질은 프력토오스이고, 미세조류는 클로렐라(*Chlorella*), 파라클로렐라(*Parachlorella*), 프로토테카(*Prototheca*) 및 씬데스무스(*Scenedesmus*)로 구성된 군으로부터 선택된 속에 속한다. 일부 경우에, 탄소 기질은 아라비노오스이고, 미세조류는 클로렐라 종(*Chlorella sp.*)이다. 일부 경우에, 탄소 기질은 만노오스이고, 미세조류는 클로렐라(*Chlorella*), 파라클로렐라(*Parachlorella*), 브락테오코커스(*Bracteococcus*), 프로토테카(*Prototheca*) 및 씬데스무스(*Scenedesmus*)로 구성된 군으로부터 선택된 속에 속한다. 일부 경우에, 탄소 기질은 갈락토오스이고, 미세조류는 브락테오코커스(*Bracteococcus*), 파라클로렐라(*Parachlorella*), 클로렐라(*Chlorella*), 슈도클로렐라(*Pseudochlorella*), 브락테오코커스(*Bracteococcus*) 및 프로토테카(*Prototheca*)로 구성된 군으로부터 선택된 속에 속한다. 일부 경우에, 탄소 기질은 아세테이트이고, 미세조류는 클로렐라(*Chlorella*), 파라클로렐라(*Parachlorella*) 및 프로토테카(*Prototheca*)로 구성된 군으로부터 선택된 속에 속한다.

[0052] 일 구체예에서, 배양 배지는 하나 이상의 수크로오스 이용 효소를 추가로 포함한다. 일부 경우에, 미세조류는 하나 이상의 지질 변형 효소, 탄화수소 변형 효소, 또는 수크로오스 이용 효소를 엔코딩하는 외인성 유전자를 발현하도록 유전적으로 공학처리되었다. 일부 경우에, 배양 배지는 수크로오스 전화효소를 포함한다.

[0053] 또 다른 양태에서, 본 발명은 다수의 미세조류 세포를 탈중합된 셀룰로직 물질의 존재하에 정위시키는 것을 포함하여, 미세조류를 배양하는 방법에 관한 것이다. 일부 경우에, 미세조류는 글리세롤, 수크로오스, 글루코오스, 아라비노오스, 갈락토오스, 크실로오스, 프력토오스, 아라비노오스, 만노오스, 아세테이트, 및 상기의 임의의 조합물로 구성된 군으로부터 선택된 추가의 고정된 탄소원의 존재하에 배양된다. 일 구체예에서, 미세조류는 하나 이상의 수크로오스 이용 효소의 존재하에 배양된다.

[0054] 일부 경우에, 미세조류는 브락테오코커스(*Bracteococcus*) 속의 종, 클로렐라(*Chlorella*) 속의 종, 파라클로렐라(*Parachlorella*) 속의 종, 프로토테카(*Prototheca*) 속의 종, 또는 슈도클로렐라(*Pseudochlorella*) 속의 종으로부터 선택된다. 일부 경우에, 미세조류는 브락테오코커스 마이너(*Bracteococcus minor*), 클로렐라 엘립소이데아(*Chlorella ellipsoidea*), 클로렐라 캐슬러리(*Chlorella kessleri*), 클로렐라 루테오비리디스(*Chlorella luteoviridis*), 브락테오코커스 메디오누클레아투스(*Bracteococcus medionucleatus*), 클로렐라 미누티시마(*Chlorella minutissima*), 클로렐라 오발리스(*Chlorella ovalis*), 클로렐라 프로토테코이드(*Chlorella protothecoides*), 클로렐라 사카로필라(*Chlorella saccharophila*), 클로렐라 소로키니아나(*Chlorella sorokiniana*), 클로렐라 종(*Chlorella sp.*), 클로렐라 불가리스(*Chlorella vulgaris*), 파라클로렐라 캐슬러리(*Parachlorella kessleri*), 프로토테카 모리포르미스(*Prototheca moriformis*), 및 슈도클로렐라 아쿠아티카(*Pseudochlorella aquatica*)로부터 선택된다. 일부 경우에, 미세조류는 본원에 개시된 또 다른 종의 미세조류이다.

[0055] 일부 구체예에서, 미세조류는 하나 이상의 지질 변형 효소, 탄화수소 변형 효소, 또는 수크로오스 이용 효소를 엔코딩하는 외인성 유전자를 발현하도록 유전적으로 공학처리되었다. 일 구체예에서, 하나 이상의 수크로오스 이용 효소는 수크로오스 전화효소이다. 일 구체예에서, 하나 이상의 지질 변형 효소는 스테아릴-ACP 불포화화효소, 글리세롤지질 불포화화효소, 피루베이트 테하이드로제나아제, 아세틸-CoA 카르복실라아네, 및 글리세롤-3-포스페이트 아실트랜스퍼라아제로부터 선택된다. 일부 경우에, 하나 이상의 탄화수소 변형 효소는 지방산 아실-ACP 티오에스테라아제, 지방산 아실-CoA 환원효소, 지방산 알데히드 환원효소, 지방산 아실-CoA/알데히드 환원효소, 지방산 알데히드 테카르보닐라아제, 및 아실 담체 단백질로부터 선택된다.

[0056] 또 다른 양태에서, 본 발명은 지질-생성 미생물을 배양하는 방법에 관한 것이고, 이 방법은 미생물을 아세트산의 존재하에 고정된 질소원을 부재시켜 배양하는 것을 포함한다. 일부 경우에, 미생물은 미생물에 의한 지질 수율을 아세트산의 부재하에서의 미생물의 지질 수율에 비해 증가시키는 충분한 양의 아세트산의 존재하에 배양되고, 여기서 배양 조건은 다른 모든 점에서 두 배양간에 동일하다.

[0057] 또 다른 양태에서, 본 발명은 미생물의 집단과, 글루코오스, 크실로오스, 및 리그닌 및 퍼퓨랄의 종으로 구성된 군으로부터 선택된 분자를 포함하는 배양 배지를 함유하는 미생물 배양액에 관한 것이다. 일부 경우에, 미생물

은 브락테오코커스 마이너(*Bracteococcus minor*), 클로렐라 엘립소이데아(*Chlorella ellipsoidea*), 클로렐라 캐슬러리(*Chlorella kessleri*), 클로렐라 루테오비리디스(*Chlorella luteoviridis*), 브락테오코커스 메디오누 클레아투스(*Bracteococcus medionucleatus*), 클로렐라 미누티시마(*Chlorella minutissima*), 클로렐라 오발리스(*Chlorella ovalis*), 클로렐라 프로토테코이드(*Chlorella protothecoides*), 클로렐라 사카로필라(*Chlorella saccharophila*), 클로렐라 소로키니아나(*Chlorella sorokiniana*), 클로렐라 종(*Chlorella sp.*), 클로렐라 불가리스(*Chlorella vulgaris*), 파라클로렐라 캐슬러리(*Parachlorella kessleri*), 프로토테카 모리포르미스(*Prototheca moriformis*), 및 슈도클로렐라 아쿠아티카(*Pseudochlorella aquatica*)로부터 선택된다. 일부 경우에, 미생물은 본원에 개시된 또 다른 종의 미생물이다.

[0058] 또 다른 양태에서, 본 발명은 미세조류를 배양하는 방법에 관한 것이다. 일 구체예에서, 상기 방법은 (a) 종속 영양 성장을 수행할 수 있는 미세조류를 제공하는 단계, (b) 미세조류 세포를 성장 배지에 정위시키는 단계로서, 성장 배지가 탈중합된 셀룰로직 물질을 포함하는 단계, 및 (c) 미세조류를 세포가 성장하기에 충분한 기간 동안 인큐베이션시키는 단계를 포함한다.

[0059] 또 다른 양태에서, 본 발명은 바이오디젤(biodiesel)을 제조하는 방법에 관한 것이다. 일 구체예에서, 상기 방법은 (a) 지질-생성 미생물을 제1 미생물 배양액에서 배양시키고, (b) 제1 미생물 배양액에 의해 생성된 바이오매스로부터 지질을 회수하고, (c) 지질을 트랜스에스테르화시켜 지방산 에스테르(들) 및 글리세롤을 생성하고, (d) 글리세롤을 제2 미생물 배양액에 첨가시키는 것을 포함한다. 일부 경우에, 제1 및 제2 미생물 배양액은 동일한 종의 미생물의 배양액이다. 일부 경우에, 제2 미생물 배양액은 파라클로렐라 캐슬러리(*Parachlorella kessleri*), 클로렐라 프로토테코이드(*Chlorella protothecoides*), 브락테오코커스 메디오누 클레아투스(*Bracteococcus medionucleatus*), 프로토테카 모리포르미스(*Prototheca moriformis*), 클로렐라 미누티시마(*Chlorella minutissima*), 클로렐라 종(*Chlorella sp.*), 및 클로렐라 소로키니아나(*Chlorella sorokiniana*)로 구성된 군으로부터 선택된 미생물을 포함한다. 다른 경우에, 제2 미생물 배양액은 본원에 개시된 또 다른 종의 미생물을 포함한다.

[0060] 또 다른 양태에서, 본 발명은 글리세롤 및 하나 이상의 다른 고정된 탄소원의 존재하에 미생물을 배양시키는 것을 포함하는 발효 방법에 관한 것이다. 일부 경우에, 글리세롤과 하나 이상의 다른 고정된 탄소원이 동시에 소정의 비율로 미생물에 제공된다. 일부 경우에, 모든 글리세롤과 하나 이상의 다른 고정된 탄소원이 발효 맨처음에 미생물에 제공된다. 일부 경우에, 모든 글리세롤 및 하나 이상의 다른 고정된 탄소원은 발효를 진행하면서 미리 결정된 비율로 미생물에게 공급된다. 본 방법의 일 구체예에서, 제1 기간 동안 글리세롤을 하나 이상의 다른 고정된 탄소원 없이 미생물에 제공하고, 제1 기간의 끝에 하나 이상의 다른 고정된 탄소원을 제공하며, 미생물은 하나 이상의 다른 고정된 탄소원의 존재하에 제2 기간 동안 배양된다. 일 구체예에서, 하나 이상의 다른 고정된 탄소원이 제2 기간 동안 미리 결정된 비율로 미생물에게 공급된다. 일부 경우에, 모든 하나 이상의 다른 고정된 탄소원이 제1 기간의 끝에 미생물에 제공된다. 본 방법의 일 구체예에서, 하나 이상의 다른 고정된 탄소원이 글리세롤 없이 제1 기간 동안 미생물에 제공되고, 글리세롤이 제1 기간의 끝에 제공되며, 미생물은 글리세롤의 존재하에 제2 기간 동안 배양된다. 일 구체예에서, 글리세롤은 트랜스에스테르화 공정의 부산물이다. 일 구체예에서, 글리세롤은 산성화(acidulated)된다. 또 다른 구체예에서, 글리세롤은 비-산성화(non-acidulated)된다. 일부 경우에, 하나 이상의 다른 고정된 탄소원은 글루코오스이다. 일부 경우에, 하나 이상의 다른 고정된 탄소원은 탈중합된 셀룰로직 물질이다. 일 구체예에서, 하나 이상의 다른 고정된 탄소원은 수크로오스이다.

[0061] 또 다른 양태에서, 본 발명은 미생물의 집단, 글리세롤 및 크실로오스, 글루코오스 및 수크로오스로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 당을 포함하는 발효기에 관한 것이다. 일 구체예에서, 글리세롤은 지질 트랜스에스테르화 공정의 부산물이다. 일부 경우에, 미생물은 파라클로렐라 캐슬러리(*Parachlorella kessleri*), 클로렐라 프로토테코이드(*Chlorella protothecoides*), 브락테오코커스 메디오누 클레아투스(*Bracteococcus medionucleatus*), 프로토테카 모리포르미스(*Prototheca moriformis*), 클로렐라 미누티시마(*Chlorella minutissima*), 클로렐라 종(*Chlorella sp.*), 및 클로렐라 소로키니아나(*Chlorella sorokiniana*)로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 경우에, 미생물은 본원에 개시된 또 다른 종이다.

[0062] 또 다른 양태에서, 본 발명은 미생물을 발효시키는 방법에 관한 것이다. 일 구체예에서, 상기 방법은 트랜스에스테르화 공정으로부터의 글리세롤 부산물을 고정된 탄소 에너지의 유일한 공급원으로서 제공하는 것을 포함한다. 일 구체예에서, 어떠한 광 에너지도 미생물에 제공되지 않는다. 또 다른 구체예에서, 광 에너지가 미생물에 제공된다. 일부 경우에, 미생물은 파라클로렐라 캐슬러리(*Parachlorella kessleri*), 클로렐라 프로토테코이드(*Chlorella protothecoides*), 브락테오코커스 메디오누 클레아투스(*Bracteococcus medionucleatus*), 프로토테

카 모리포르미스(*Prototheca moriformis*), 클로렐라 미누티시마(*Chlorella minutissima*), 클로렐라 종(*Chlorella sp.*), 및 클로렐라 소로키니아나(*Chlorella sorokiniana*)로부터 선택된다. 다른 경우에, 미생물은 본원에 개시된 또 다른 종이다.

[0063] 또 다른 양태에서, 본 발명은 외인성 수크로오스 이용 유전자를 함유하는 미생물에 관한 것이다. 일 구체예에서, 유전자는 수크로오스 운반체를 엔코딩한다. 일 구체예에서, 유전자는 수크로오스 전화효소를 엔코딩한다. 일 구체예에서, 유전자는 프력토키나아제를 엔코딩한다. 일부 경우에, 미생물은 클로렐라 미누티시마(*Chlorella minutissima*), 클로렐라 에메르소니이(*Chlorella emersonii*), 클로렐라 소로키니아나(*Chlorella sorokiniana*), 클로렐라 엘립소이데아(*Chlorella ellipsoidea*), 클로렐라 종(*Chlorella sp.*), 또는 클로렐라 프로토테코이드(*Chlorella protothecoides*)로 구성된 군으로부터 선택된 종이다. 다른 경우에, 미생물은 본원에 개시된 다른 종이다.

[0064] 또 다른 양태에서, 본 발명은 클로렐라 프로토테코이드(*Chlorella protothecoides*), 클로렐라 에메르소니이(*Chlorella emersonii*), 또는 클로렐라 미누티시마(*Chlorella minutissima*) 종의 세포에 관한 것이고, 세포는 외인성 유전자를 함유한다. 일부 경우에, 외인성 유전자는 수크로오스 운반체, 수크로오스 전화효소, 지질 변형 효소, 탄화수소 변형 효소 및 프력토키나아제로 구성된 군으로부터 선택된 단백질을 엔코딩한다. 일부 구체예에서, 단백질은 세포외 공간으로 분비된 수크로오스 전화효소이다. 일부 구체예에서, 단백질은 세포질로 표적화된 수크로오스 전화효소이다.

[0065] 또 다른 양태에서, 본 발명은 미생물의 집단과, (i) 수크로오스 및 (ii) 수크로오스 전화효소를 포함하는 배양 배지를 함유하는 미생물 배양액에 관한 것이다.

[0066] 또 다른 양태에서, 본 발명은 미생물의 집단과, (i) 당밀 및 (ii) 수크로오스 전화효소를 포함하는 배양 배지를 함유하는 미생물 배양액에 관한 것이다.

[0067] 또 다른 양태에서, 본 발명은 미생물의 집단과, (i) 수크로오스, (ii) 리그닌, 및 (iii) 수크로오스 전화효소를 포함하는 배양 배지를 함유하는 미생물 배양액에 관한 것이다.

[0068] 상기 개시된 다양한 미생물 배양액에서, 미생물은 하나 이상의 외인성 수크로오스 이용 유전자를 함유한다. 일부 구체예에서, 수크로오스 이용 유전자는 수크로오스 운반체, 수크로오스 전화효소, 헥소키나아제, 글루코키나아제, 또는 프력토키나아제를 엔코딩한다. 일 구체예에서, 수크로오스 전화효소는 미생물의 집단에 의해 발현된 외인성 수크로오스 전화효소 유전자에 의해 엔코딩된 분비될 수 있는 수크로오스 전화효소이다. 일부 경우에, 미생물은 지질 경로 효소 또는 탄화수소 변형 효소를 엔코딩하는 하나 이상의 외인성 유전자를 함유한다.

[0069] 또 다른 양태에서, 본 발명은 수크로오스 이용 유전자를 엔코딩하는 cDNA, 및 항생제 하이그로마이신 또는 항생제 G418에 대해 내성을 부여하는 단백질을 엔코딩하는 cDNA를 포함하는 핵산에 관한 것이다.

[0070] 상기 개시된 다양한 방법, 조성물, 세포, 미생물, 세균, 미생물 배양액, 발효기 등의 구체예에서, 미생물 또는 세균은 달리 명시되지 않는 한, 미세조류, 유질 효모, 진균, 또는 세균일 수 있다. 일부 경우에, 미생물은 표 1에 나열된 미세조류로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 경우에, 미생물은 클로렐라(*Chlorella*) 속의 종이다. 일부 경우에, 미생물은 클로렐라 아니트라타(*Chlorella anitrata*), 클로렐라 안타르크티카(*Chlorella antarctica*), 클로렐라 아우레오비리디스(*Chlorella aureoviridis*), 클로렐라 캔디다(*Chlorella Candida*), 클로렐라 캡슐라타(*Chlorella capsulata*), 클로렐라 데식카타(*Chlorella desiccata*), 클로렐라 엘립소이데아(*Chlorella ellipsoidea*), 클로렐라 에메르소니이(*Chlorella emersonii*), 클로렐라 푸스카(*Chlorella fusca*), 클로렐라 푸스카 var. 바쿠올라타(*Chlorella fusca var. vacuolata*), 클로렐라 글루코트로파(*Chlorella glucotropha*), 클로렐라 인퓨시오눔(*Chlorella infusionum*), 클로렐라 인퓨시오눔 var. 악토필라(*Chlorella infusionum var. Actophila*), 클로렐라 인퓨시오눔 var. 아우세노필라(*Chlorella infusionum var. Auxenophila*), 클로렐라 케슬러리(*Chlorella kessleri*), 클로렐라 루테오비리디스(*Chlorella luteoviridis*), 클로렐라 루테오비리디스 var. 아우레오비리디스(*Chlorella luteoviridis var. aureoviridis*), 클로렐라 루테오비리디스 var. 루테센스(*Chlorella luteoviridis var. Lutescens*), 클로렐라 미니아타(*Chlorella miniata*), 클로렐라 미누티시마(*Chlorella minutissima*), 클로렐라 무타빌리스(*Chlorella mutabilis*), 클로렐라 녹투르나(*Chlorella nocturna*), 클로렐라 파르바(*Chlorella parva*), 클로렐라 포토필라(*Chlorella photophila*), 클로렐라 프링세이미이(*Chlorella pringsheimii*), 클로렐라 프로토테코이드(*Chlorella protothecoides*), 클로렐라 레귤라리스(*Chlorella regularis*), 클로렐라 레귤라리스 var. 미니마(*Chlorella regularis var. minima*), 클로렐라 레귤라리스 var. 웜브리카타(*Chlorella regularis var. umbricata*), 클로렐라 레이시클리이(*Chlorella*

reisiglii), 클로렐라 사카로필라(*Chlorella saccharophila*), 클로렐라 사카로필라 var. 엘립소이데아(*Chlorella saccharophila* var. *ellipsoidea*), 클로렐라 살리나(*Chlorella salina*), 클로렐라 심플렉스(*Chlorella simplex*), 클로렐라 소로키니아나(*Chlorella sorokiniana*), 클로렐라 종(*Chlorella sp.*), 클로렐라 스파에리카(*Chlorella sphaerica*), 클로렐라 스티그마토포라(*Chlorella stigmatophora*), 클로렐라 반니엘리아(*Chlorella vanniei*), 클로렐라 불가리스(*Chlorella vulgaris*), 클로렐라 불가리스 에프. 테르티아(*Chlorella vulgaris f. tertia*), 클로렐라 불가리스 var. 아이리디스(*Chlorella vulgaris var. airidis*), 클로렐라 불가리스 var. 불가리스(*Chlorella vulgaris var. vulgaris*), 클로렐라 불가리스 var. 불가리스 에프. 비리디스(*Chlorella vulgaris var. vulgaris f. viridis*), 클로렐라 크산텔라(*Chlorella xanthella*), 및 클로렐라 조핀지엔시스(*Chlorella zofingiensis*)로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 경우에, 미생물은 크립토코커스 쿠르바투스(*Cryptococcus curvatus*), 크립토코커스 테리콜루스(*Cryptococcus terricolus*), 캔디다 종(*Candida sp.*), 립포마이세스 스타르케이(*Lipomyces starkeyi*), 립포마이세스 리포퍼(*Lipomyces lipofer*), 엔도마이콥시스 베르날리스(*Endomycopsis vernalis*), 로도토룰라 글루티니스(*Rhodotorula glutinis*), 로도토룰라 그라실리스(*Rhodotorula gracilis*), 및 야로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*)로 구성된 군으로부터 선택된 유질 효모이다. 일부 경우에, 미생물은 모르티에렐라(*Mortierella*) 속의 종, 모르티에렐라 비나세아(*Mortierella vinacea*), 모르티에렐라 알핀(*Mortierella alpina*), 피티움 데바리아눔(*Pythium debaryanum*), 뮤코 시르시넬로이드(*Mucor circinelloides*), 아스퍼질러스 오크라세우스(*Aspergillus ochraceus*), 아스퍼질러스 테레우스(*Aspergillus terreus*), 페니실리움 일락시눔(*Pennicillium lilacinum*), 헨세눌로(*Hansenulo*) 속의 종, 카에토미움(*Chaetomium*) 속의 종, 클라도스포리움(*Cladosporium*) 속의 종, 말브란케아(*Malbranchea*) 속의 종, 리조푸스(*Rhizopus*) 속의 종, 및 피티움(*Pythium*) 속의 종으로 구성된 군으로부터 선택된 진균이다.

[0071] 상기 개시된 다양한 구체예에서, 미생물은 하나 이상의 외인성 수크로오스 이용 유전자를 함유할 수 있다. 일부 경우에, 수크로오스 이용 유전자는 수크로오스 운반체, 수크로오스 전화효소, 헥소키나아제, 글루코키나아제, 또는 프력토키나아제를 엔코딩한다.

[0072] 상기 개시된 다양한 구체예에서, 미생물은 지질 경로 효소를 엔코딩하는 하나 이상의 외인성 유전자를 함유할 수 있다. 일부 경우에, 지질 경로 효소는 스테아로일-ACP 불포화화효소, 글리세롤지질 불포화화효소, 피루베이트 데하이드로게나아제, 아세틸-CoA 카르복실라아제, 아실 담체 단백질, 및 글리세롤-3 포스페이트 아실트랜스페라아제로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0073] 상기 개시된 다양한 구체예에서, 미생물은 탄화수소 변형 효소를 엔코딩하는 하나 이상의 외인성 유전자를 함유할 수 있다. 일부 경우에, 탄화수소 변형 효소는 지방산 아실-ACP 티오에스테라아제, 지방산 아실-CoA/알데히드 환원효소, 지방산 아실-CoA 환원효소, 지방산 알데히드 환원효소, 지방산 알데히드 데카르보닐라아제, 및/또는 아실 담체 단백질로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0074] 상기 개시된 다양한 구체예 중 임의의 둘 이상을 함께 조합시켜 본 발명의 범위 내에 포함되는 추가의 구체예를 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0075] 도 1은 다양한 유형의 글리세롤의 존재하에 추가 글루코오스와 함께 그리고 추가 글루코오스 없이 배양시킬 때, 클로렐라(*Chlorella*)의 다수의 종 및 균주의 리터 당 건조 세포 중량을 나타낸다.

[0076] 도 2는 추가의 글루코오스와 함께 다양한 유형의 글리세롤의 존재하에 배양시킬 때, 클로렐라(*Chlorella*)의 다수의 종 및 균주의 리터 당 건조 세포 중량을 나타낸다.

[0077] 도 3은 추가의 글루코오스와 함께 다양한 유형의 글리세롤의 존재하에 배양시킬 때, 클로렐라(*Chlorella*)의 다수의 종 및 균주의 배양액 중 상대 지질 농도를 나타낸다.

[0078] 도 4는 다양한 유형의 글리세롤의 존재하에 추가 글루코오스와 함께 그리고 추가 글루코오스 없이 배양시킬 때, 클로렐라(*Chlorella*)의 다수의 종 및 균주의 배양액 중 지질 농도를 나타낸다.

[0079] 도 5는 추가의 글루코오스와 함께 다양한 유형의 글리세롤의 존재하에 배양시킬 때 (글리세롤은 글루코오스 이후에 순차적으로 첨가됨), 클로렐라(*Chlorella*)의 두 가지 종 및 균주의 건조 세포 중량의 퍼센트로서 지질을 나타낸다.

[0080] 도 6은 추가의 글루코오스와 함께 다양한 유형의 글리세롤의 존재하에 배양시킬 때, 클로렐라(*Chlorella*)의 두

가지 종 및 균주의 건조 세포 중량의 퍼센트로서 지질을 나타낸다.

[0082] 도 7은 2% 글루코오스 및 1% 글루코오스 + 1% 시약 등급 글리세롤의 존재하에 배양시킬 때, 클로렐라(*Chlorella*)의 다수의 종 및 균주의 배양액 중 상대 지질 농도를 나타낸다.

[0083] 도 8은 글루코오스의 존재하에 시약 등급의 글리세롤과 함께 그리고 글리세롤 없이 배양시킬 때 (글리세롤은 글루코오스와 차례로 또는 함께 첨가됨), 클로렐라(*Chlorella*)의 다수의 종 및 균주의 건조 세포 중량의 퍼센트로서 지질을 나타낸다.

[0084] 도 9는 추가의 글루코오스와 함께 다양한 유형의 글리세롤의 존재하에 배양시킬 때 (글리세롤은 글루코오스와 차례로 또는 함께 첨가됨), 클로렐라(*Chlorella*)의 다수의 종 및 균주의 배양액의 상대 지질 농도를 나타낸다.

[0085] 도 10은 추가의 글루코오스와 함께 다양한 유형의 글리세롤의 존재하에 배양시킬 때 (글리세롤은 글루코오스와 차례로 또는 함께 첨가됨), 클로렐라(*Chlorella*)의 다수의 종 및 균주의 리터 당 건조 세포 중량을 나타낸다.

[0086] 도 11(a)는 글루코오스, 시약-등급 글리세롤, 비-산성화된 바이오디젤 부산물 글리세롤, 및 글리세롤과 글루코오스의 조합물의 존재하에 배양시킬 때, 스피룰리나 플라텐시스(*Spirulina platensis*)의 건조 세포 중량의 퍼센트로서 지질을 나타낸다.

[0087] 도 11(b)는 다양한 유형의 글리세롤 및 글리세롤과 글루코오스의 조합물의 존재하에 배양시킬 때, 나비쿨라 펠리콜로사(*Navicula pelliculosa*)의 건조 세포 중량의 퍼센트로서 지질을 나타낸다.

[0088] 도 12(a)는 다양한 유형의 글리세롤 및 글리세롤과 글루코오스의 조합물의 존재하에 배양시킬 때, 씬데스무스 아르마투스(*Scenedesmus armatus*)의 건조 세포 중량의 퍼센트로서 지질을 나타낸다.

[0089] 도 12(b)는 다양한 유형의 글리세롤 및 바이오디젤 부산물 글리세롤과 글루코오스의 조합물의 존재하에 배양시킬 때, 씬데스무스 아르마투스(*Scenedesmus armatus*)의 리터 당 건조 세포 중량을 나타낸다.

[0090] 도 13은 다양한 유형의 글리세롤 및 비-산성화된 바이오디젤 부산물 글리세롤과 글루코오스의 조합물의 존재하에 배양시킬 때, 나비쿨라 펠리콜로사(*Navicula pelliculosa*)의 리터 당 건조 세포 중량을 나타낸다.

[0091] 도 14는 추가의 글루코오스와 함께 산성화되고 비-산성화된 바이오디젤 부산물 글리세롤의 존재하에 배양시킬 때 (글리세롤은 글루코오스와 차례로 또는 함께 첨가됨), 씬데스무스 아르마투스(*Scenedesmus armatus*) 및 나비쿨라 펠리콜로사(*Navicula pelliculosa*)의 리터 당 건조 세포 중량을 나타낸다.

[0092] 도 15는 크실로오스 또는 글루코오스 단독에 비해 클로렐라(*Chlorella*)의 성장에 대한 크실로오스와 글루코오스의 조합물의 상승적인 효과를 나타낸다.

[0093] 도 16은 외인성 유전자를 함유하는 클로렐라 프로토테코이드(*Chlorella protothecoides*) 형질전환체의 유전자형을 도시한다.

[0094] 도 17은 클로렐라 프로토테코이드(*Chlorella protothecoides*)의 코돈 사용을 도시한다.

[0095] 도 18은 D. 살리나(*D. salina*) 및 클로렐라 피레노이도사(*Chlorella pyrenoidosa*)의 코돈 사용을 도시한다.

[0096] 도 19은 (a) 시약 등급의 글리세롤; (b) 비-산성화된 바이오디젤 부산물 글리세롤; 및 (c) 산성화된 바이오디젤 부산물 글리세롤을 도시하며, 이를 모두는 실시예에 개시된 실험에 사용되었다.

[0097] 도 20은 글루코오스 및 프력토오스에 대한 클로렐라 프로토테코이드(*Chlorella protothecoides*)의 성장을 도시한다.

[0098] 도 21은 1% 수크로오스에 대한 클로렐라 푸스카(*Chlorella fusca*)의 성장을 도시한다.

[0099] 도 22는 1% 수크로오스에 대한 클로렐라 케슬라리(*Chlorella kessleri*)의 성장을 도시한다.

[0100] 도 23은 수크로오스 전화효소의 존재 또는 부재하에 글루코오스, 수크로오스, 또는 여러 당밀 샘플(BS1, BS2 및 HTM으로 지정됨) 중 하나를 존재시켜 배양시킬 때, 클로렐라 프로토테코이드(*Chlorella protothecoides*)의 리터 당 건조 세포 중량을 나타낸다.

[0101] 도 24는 수크로오스 전화효소의 존재 또는 부재하에 글루코오스, 수크로오스, 또는 여러 당밀 샘플(BS1, BS2 및 HTM으로 지정됨) 중 하나를 존재시켜 배양시킬 때, 상대 세포 밀도에 의해 측정된 클로렐라 프로토테코이드(*Chlorella protothecoides*)의 성장을 나타낸다.

- [0102] 도 25는 세 개의 상이한 프로모터 (CMV, CV 및 HUP1으로 지정됨) 및 서브클로닝에 유용한 제한 부위를 지니는 효모 전화효소(SUC2)의 다양한 플라스미드 구성물의 예를 도시한다.
- [0103] 도 26은 외인성 수크로오스 전화효소 유전자를 함유하는 암실에서 수크로오스에 대해 선택된 클로렐라 프로토테코이드(*Chlorella protothecoides*) 형질전환체의 유전자형을 도시한다.
- [0104] 도 27은 *S. 세레비지애*(*S. cerevisiae*)로부터 분비된 수크로오스 전화효소를 엔코딩하는 유전자로 형질전환된 클로렐라 프로토테코이드(*Chlorella protothecoides*)의 유전자형을 도시한다.
- [0105] 도 28은 *S. 세레비지애*(*S. cerevisiae*)로부터 분비된 수크로오스 전화효소를 엔코딩하는 유전자로 형질전환된 클로렐라 미누티시마(*Chlorella minutissima*) 및 클로렐라 에메르소니(*Chlorella emersonii*)의 유전자형을 도시한다.
- [0106] 도 29는 본 발명의 방법에 따라 생성되고 실시예 27에 개시된 재생가능한 디젤 생성물의 분석에 의해 생성된 가스 크로마토그래피를 설명한다.
- [0107] 도 30은 본 발명의 방법에 따라 생성되고 실시예 27에 개시된 재생가능한 디젤 생성물에 대한 비등점 분포 플롯을 도시한다.

발명의 상세한 설명

I. 정의

- [0110] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 분야의 당업자에 의해 보통 이해되는 의미를 갖는다. 하기 참조문헌은 당업자에게 본 발명에서 사용된 다수의 용어의 일반적인 정의를 제공한다: Singleton *et al.*, *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology* (2nd ed. 1994); *The Cambridge Dictionary of Science and Technology* (Walker ed., 1988); *The Glossary of Genetics*, 5th Ed., R. Rieger *et al.* (eds.), Springer Verlag (1991); and Hale & Marham, *The Harper Collins Dictionary of Biology* (1991). 본원에서 사용된 대로, 하기 용어는 달리 명시되지 않는 한 다음 의미를 지니는 것으로 여겨진다.
- [0111] 핵산에 대한 언급에서 사용된 "미세조류에서 활성인"은 미세조류에서 기능성인 핵산을 언급한다. 예를 들어, 유전자이식 미세조류에 항생제 내성을 제공하기 위해 항생제 내성 유전자 운반에 사용된 프로모터는 미세조류에서 활성이다. 미세조류에서 활성인 프로모터의 예는 특정 조류 종에 내인성인 프로모터 및 식물 바이러스에서 발견된 프로모터이다.
- [0112] "아실 담체 단백질" 또는 "ACP"는 4'-포스포판테인 부분의 원위 티올에서 티올 에스테르로서 지방산 합성 동안 발생하는 아실 사슬에 결합되는 단백질이고 지방산 합성효소 복합체의 성분을 포함한다. 지방산 아실-ACP 티오에스테라아제와 관련하여 아실 담체 단백질에 대한 언급에서 "자연히 공동-발현되는"은 ACP 및 티오에스테라아제가 이들이 유래된 조직 또는 유기체에서 자연적으로 공동-발현되는 것을 의미하는데, 그 이유는, 예컨대 두 효소를 엔코딩하는 유전자가 공통의 조절 서열의 조절하에 있거나 이들이 동일한 자극에 반응하여 발현되기 때문이다.
- [0113] "아실-CoA 분자" 또는 "아실-CoA"는 코엔자임 A의 4-포스포판테인 부분의 원위 티올에서 티올 에스테르 결합을 통해 코엔자임 A에 공유적으로 부착된 아실 부분을 포함하는 분자이다.
- [0114] "무균"은 다른 살아있는 유기체에 의한 오염이 없는 유기체의 배양액을 의미한다.
- [0115] "바이오디젤"은 디젤 엔진에서 연료로서 사용하기 적합한 생물학적으로 생성된 지방산 알킬 에스테르이다.
- [0116] "바이오매스"라는 용어는 세포의 성장 및/또는 번식에 의해 생성된 물질을 언급한다. 바이오매스는 세포 및/또는 세포내 내용물 뿐만 아니라 세포외 물질도 함유할 수 있다. 세포외 물질로는 이로 제한되는 것은 아니나 세포에 의해 분비되는 화합물이 있다.
- [0117] "생물반응기"는 세포가, 임의로 혼탁액에서 배양되는 봉입체 또는 부분 봉입체를 의미한다.
- [0118] 본원에서 사용된 "촉매"는 생성물의 일부가 되지 않으면서 생성물로의 반응물의 화학적 반응을 촉진하거나 증진 시킬 수 있는, 분자 또는 매크로분자 복합체와 같은 제제를 언급한다. 따라서, 촉매는 반응의 속도를 증가시키고, 이후 촉매는 또 다른 반응물에 대해 작용하여 생성물을 형성할 수 있다. 촉매는 일반적으로 반응이 보다 신속하거나 낮은 온도에서 속행되도록 반응에 요구되는 전체적인 활성화 에너지를 저하시킨다. 따라서, 반응

평형이 더욱 신속하게 달성될 수 있다. 촉매의 예는 생물학적 촉매인 효소, 비생물학적 촉매인 열, 및 화석 오일 정제 공정에 이용되는 금속 촉매를 포함한다.

[0119] "셀룰로직 물질"은 글루코오스 및 크실로오스를 포함하는 셀룰로오스의 소화 생성물, 및 임의로 이당류, 올리고당류, 리그닌, 페퓨랄 및 다른 화합물과 같은 추가의 화합물을 의미한다. 셀룰로직 물질의 공급원의 비제한적인 예로는 사탕수수 베개스(bagasses), 사탕무 펄프, 옥수수대, 우드 칩(wood chip), 톱밥 및 스위치그래스(switchgrass)가 있다.

[0120] 용어 "공동-배양", 및 "공동-재배"와 같은 이의 변이형은 동일한 생물반응기에 둘 이상의 세포 유형의 존재를 언급한다. 둘 이상의 세포 유형은 둘 모두가 미세조류와 같은 미생물일 수 있거나, 상이한 세포 유형과 배양되는 미세조류 세포일 수 있다. 배양 조건은 둘 이상의 세포 유형의 성장 및/또는 번식을 촉진하는 것이거나 나머지에 대한 세포 성장을 유지하면서 둘 이상의 세포 중 하나 또는 이의 서브셋의 성장 및/또는 번식을 촉진하는 것일 수 있다.

[0121] 본원에서 사용된 "공동인자"라는 용어는 효소가 이의 효소적 활성을 수행하기 위해 요구되는, 기질 이외의 임의의 분자를 언급하기 위해 이용된다.

[0122] 본원에서 사용된 "장보적인 DNA" ("cDNA")는 메신저 RNA(mRNA)의 역전사 또는 증폭 (예컨대, 중합효소 연쇄 반응("PCR")을 통해)에 의해 일반적으로 수득되는, mRNA의 DNA 표시이다.

[0123] 용어 "배양된" 및 이의 변이형은 의도된 배양 조건의 사용에 의한 하나 이상의 세포의 성장 (세포 크기, 세포의 함유량, 및/또는 세포 활성의 증가) 및/또는 번식 (유사분열을 통한 세포 수의 증가)의 의도적인 촉진을 언급한다. 성장과 번식 둘 모두의 조합을 증식이라고 부를 수 있다. 하나 이상의 세포는 미세조류와 같은 미생물의 세포일 수 있다. 의도된 조건의 예는 규정된 배지의 사용 (pH, 이온 강도, 탄소원과 같은 공지된 특징을 지님), 명시된 온도, 산소 장력, 이산화탄소 수준, 및 생물반응기에서의 성장을 포함한다. 이 용어는 종국에 화석화되어 지질 미정제 오일을 생성하는 유기체의 자연적인 성장과 같이, 자연에서의 미생물의 성장이나 번식 또는 달리 직접적인 인간 개입이 없는 미생물의 성장 또는 번식을 언급하는 것이 아니다.

[0124] 본원에서 사용된 "세포용해"라는 용어는 저장성(hypotonic) 환경에서 세포의 용해를 언급한다. 세포용해는 세포의 내부로의 과도한 삼투현상 또는 물의 이동 (과수화)에 의해 야기된다. 세포는 내부에서 물의 삼투압을 견딜 수 없어서 파열된다.

[0125] 본원에서 사용된 "발현 벡터" 또는 "발현 구성물"이라는 용어는 재조합에 의해 또는 합성에 의해, 숙주에서 특정 핵산의 전사를 허가하는 일련의 명시된 핵산 엘리먼트를 지니도록 생성된, 핵산 구성물을 언급한다. 발현 벡터는 플라스미드, 바이러스, 또는 핵산 단편의 일부일 수 있다. 통상적으로, 발현 벡터는 프로모터에 작동가능하게 연결된 전사되는 핵산을 포함한다.

[0126] "외인성 유전자"는 세포로 형질전환되는 핵산을 언급한다. 형질전환된 세포는 재조합 세포로서 언급될 수 있으며, 여기에 추가의 외인성 유전자(들)가 도입될 수 있다. 외인성 유전자는 형질전환되는 세포에 관해 상이한 종 (및 그래서 이종인), 또는 동일한 종 (및 그래서 동종인)으로부터 올 수 있다. 동종 유전자의 경우에, 이것은 유전자의 내인성 복사체에 대해 세포 계놈의 상이한 위치를 차지한다. 이종 유전자는 세포에 하나를 초과하는 복사체로 존재할 수 있다. 외인성 유전자는 계놈으로의 삽입체로서 또는 에피솜 분자로서 세포에 유지될 수 있다.

[0127] "외부에서 제공된"은 세포 배양액의 배양 배지에 제공된 분자를 기술한다.

[0128] 본원에서 사용된 "지방산 아실-ACP 티오에스테라아제"는 지질 합성 동안 아실 담체 단백질(ACP)로부터 지방산의 절단을 촉매화하는 효소이다.

[0129] 본원에서 사용된 "지방산 아실-CoA/알데히드 환원효소"는 일차 알코올로의 아실-CoA 분자의 환원을 촉매화하는 효소이다.

[0130] 본원에서 사용된 "지방산 아실-CoA 환원효소"는 알데히드로의 아실-CoA 분자의 환원을 촉매화하는 효소이다.

[0131] 본원에서 사용된 "지방산 알데히드 데카르보닐라아제"는 알칸으로의 지방산 알데히드의 전환을 촉매화하는 효소이다.

[0132] 본원에서 사용된 "지방산 알데히드 환원효소"는 일차 알코올로의 알데히드의 환원을 촉매화하는 효소이다.

- [0133] "고정된 탄소원"은 주위 온도 및 압력에서 고체 또는 액체 형태로 존재하는, 바람직하게는 유기성인, 탄소를 함유하는 분자(들)를 의미한다.
- [0134] 본원에서 사용된 "진균"은 균류계로부터의 키탄질의 세포벽을 특징으로 하는 종속영양 유기체를 의미한다.
- [0135] "균질액"은 물리적으로 봉고된 바이오매스를 의미한다.
- [0136] 본원에서 사용된 "탄화수소"는 (a) 수소와 탄소 원자만을 함유하며, 탄소 원자가 공유적으로 결합되어 수소 원자가 부착된 선형, 분지형, 고리형, 또는 부분적으로 고리형인 백본을 형성하는 분자; 또는 (b) 주로 수소와 탄소 원자만을 함유하고 하나 내지 네 개의 화학적 반응에 의해 수소와 탄소 원자만을 함유하도록 전환될 수 있는 분자를 언급한다. 후자의 비제한적인 예로는 하나의 탄소와 하나의 수소 원자 사이에 산소 원자를 함유하여 알코올 분자를 형성하는 탄화수소 뿐만 아니라 단일 산소 원자를 함유하는 알데히드가 있다. 알코올을 탄소와 수소 원자만을 함유하는 탄화수소로 환원시키는 방법은 널리 공지되어 있다. 탄화수소의 또 다른 예는, 유기 기가 산소 산에서 수소 원자 (또는 하나를 초과)로 교체된 에스테르이다. 탄화수소 화합물의 분자 구조는 천연 가스의 성분인 메탄 (CH_4) 형태의 가장 단순한 것부터 미정제 오일, 석유 및 역청에서 발견되는 아스팔텐과 같이 매우 크고 매우 복잡한, 예컨대 몇몇 분자까지 다양하다. 탄화수소는 가스질, 액체 또는 고체 형태나, 이들 형태의 임의의 조합물일 수 있고, 백본의 인접한 탄소 원자들간에 하나 이상의 이중 또는 삼중 결합을 지닐 수 있다. 따라서, 이 용어는 선형, 분지형, 고리형 또는 부분 고리형의 알칸, 알켄, 지질 및 과라핀을 포함한다. 예로는 프로판, 부탄, 펜탄, 헥산, 옥탄, 트리올레인, 및 스쿠알렌이 있다.
- [0137] "탄화수소 변형 효소"는 탄화수소의 공유 구조를 변경시키는 효소를 언급한다. 탄화수소 변형 효소의 예는 리파아제, 지방산 아실-ACP 티오에스테라아제, 지방산 아실-CoA/알데히드 환원효소, 지방산 아실-CoA 환원효소, 지방산 알데히드 환원효소, 및 지방산 알데히드 데카르보닐라아제를 포함한다. 지방산, 알코올, 알데히드, 알칸, 또는 그로부터 유래된 다른 화합물을 포함하는, 탄화수소 변형 효소의 효소적 활성에 의해 생성된 화합물이 본원에서 탄화수소 또는 지질과 상호교환적으로 언급된다.
- [0138] "수소:탄소 비"라는 용어는 원자-대-원자 기준으로 분자에서 탄소 원자에 대한 수소 원자의 비율을 언급한다. 이 비율은 탄화수소 분자에서 탄소와 수소 원자의 수를 나타내기 위해 이용될 수 있다. 예를 들어, 가장 높은 비율을 갖는 탄화수소가 메탄 CH_4 (4:1)이다.
- [0139] "소수성 분획"은 수성상에 비해 소수성 상에서 더욱 용해성인 물질의 부분 또는 분획을 언급한다. 소수성 분획은 물에서 실제로 불용성이고 일반적으로 비극성이다.
- [0140] 본원에서 사용된 "지질 수율을 증가시킨다"라는 것은, 예를 들어 배양액의 리터 당 세포의 건조 중량을 증가시키거나, 지질을 구성하는 세포의 비율을 증가시키거나, 단위 시간 당 배양액 부피의 리터 당 지질의 전체적인 양을 증가시킴에 의해, 미생물 배양의 생산성을 증가시키는 것을 언급한다.
- [0141] "유도될 수 있는 프로모터"는 특정 자극에 반응하여 작동가능하게 결합된 유전자의 전사를 매개하는 것이다.
- [0142] 본원에서 사용된 "작동가능하게 결합된"이란 조절 서열 (통상적으로 프로모터) 및 결합된 서열과 같은 두 서열 간에 기능적 결합을 언급한다. 프로모터가 외인성 유전자의 전사를 매개할 수 있는 경우, 프로모터는 이 유전자와 작동가능하게 결합된 것이다.
- [0143] "동일반응계내(*in situ*)"라는 용어는 "그 위치에" 또는 "이의 원래 위치에"를 의미한다. 예를 들어, 배양액은 촉매를 분비시키는 제1 미세조류와 기질을 분비하는 제2 미생물을 함유할 수 있고, 여기서 제1 및 제2 세포 유형은 물질의 추가 분리 또는 가공을 요구하지 않으며 공동-배양액에서 동일반응계내 발생하는 특정 화학적 반응에 필요한 성분들을 제공한다.
- [0144] "영양소의 제한된 농도"는 배양되는 유기체의 번식을 제한하는 배양액에서의 농도이다. "영양소의 비제한적인 농도"는 주어진 배양 기간 동안 최대 번식을 뒷받침하는 농도이다. 따라서, 주어진 배양 기간 동안 생성된 세포의 수는 영양소가 비제한적일 때보다 제한된 농도의 영양소가 존재할 때 더 낮다. 영양소가 최대 번식을 뒷받침하는 것보다 큰 농도로 존재할 때, 영양소가 배양액에 "과량"으로 존재한다고 한다.
- [0145] 본원에서 사용된 "리파아제"는 수불용성 지질 기질에서 에스테르 결합의 가수분해를 촉매화하는 수용성 효소이다. 리파아제는 글리세롤 및 지방산으로의 지질의 가수분해를 촉매화한다.
- [0146] 본원에서 사용된 "지질 경로 효소"는 지질 대사, 즉 지질 합성, 변형 또는 분해에서 역할을 담당하는 임의의 효

소이다. 이 용어는 지질뿐만 아니라 단체 단백질을 화학적으로 변형시키는 단백질을 포함한다.

[0147] "지질"은 비극성 용매(예컨대 에테르 및 클로로포름)에 용해될 수 있고 물에 비교적 또는 전혀 불용성인 탄화수소의 부류이다. 지질 분자는 자연에서 소수성인 대부분 긴 탄화수소 꼬리로 구성되기 때문에 이러한 특성을 지닌다. 지질의 예로는 지방산(포화되거나 불포화됨); 글리세리드 또는 글리세롤지질(예컨대 모노글리세리드, 디글리세리드, 트리글리세리드 또는 중성 지방, 및 포스포글리세리드 또는 글리세로포스포리피드); 비글리세리드(스핑고리피드, 콜레스테롤 및 스테로이드 호르몬을 포함하는 스테롤 지질, 테르페노이드를 포함하는 페르놀지질, 지방산 알코올, 왁스, 및 폴리케타이드); 및 복잡한 지질 유도체(당-결합된 지질, 또는 당지질, 및 단백질-결합된 지질)가 있다. "지방"은 "트리아실글리세리드"라고 불리는 지질의 서브그룹이다.

[0148] 본원에서 사용된 "용해물"이라는 용어는 용해된 세포의 내용물을 함유하는 용액을 언급한다.

[0149] 본원에서 사용된 "용해"라는 용어는, 종종 완전성을 손상시키는 기계적, 바이러스성 또는 삼투 메카니즘에 의해 적어도 일부의 세포내 내용물을 방출시키기에 충분한, 생물학적 유기체의 형질막 및 임의로 세포벽의 파괴를 언급한다.

[0150] 본원에서 사용된 "용해시키는"이라는 용어는 적어도 일부의 세포내 내용물을 방출시키기에 충분한, 생물학적 유기체 또는 세포의 세포막 및 임의로 세포벽을 봉괴시키는 것을 언급한다.

[0151] "미세조류"는 엽록체원형질을 함유하고 임의로 광합성을 수행할 수 있는 진핵 미생물 또는 광합성을 수행할 수 있는 원핵 미생물 유기체를 의미한다. 미세조류는 고정된 탄소원을 에너지로서 대사시킬 수 없는 절대 광영양체뿐만 아니라 고정된 탄소원과 떨어져 혼자서 생존할 수 있는 종속영양체를 포함한다. 미세조류는 클라미도모나스(*Chlamydomonas*)와 같이, 세포 분열 직후 자매 세포로부터 분리된 단세포 유기체를 언급할 수 있고, 또한 두 별개의 세포 유형의 단순한 다세포 광합성 미생물인, 예를 들어 볼복스(*Volvox*)와 같은 미생물을 언급할 수 있다. "미세조류"는 클로렐라(*Chlorella*) 및 두날리엘라(*Dunaliella*)와 같은 세포도 언급할 수 있다. "미세조류"는 아그메넬룸(*Agmenellum*), 아나바에나(*Anabaena*), 및 피로보트리스(*Pyrobotrys*)와 같은 세포-세포 부착을 나타내는 다른 미생물의 광합성 유기체도 포함한다. "미세조류"는 특정 쌍편모조류 조류종과 같이, 광합성을 수행하는 능력을 잃어버린 절대 종속영양 미생물도 포함한다.

[0152] "미생물(microorganism)" 및 "미생물(microbe)"이라는 용어는 본원에서 미시 단세포 유기체를 언급하기 위해 상호교환적으로 사용된다.

[0153] 본원에서 사용된 "유질 효모"는 이의 건조 세포 중량의 10%를 초과하는 중량을 자연적으로 지질로서 축적할 수 있거나 유전자 공학처리의 결과로서 그렇게 할 수 있는 효모를 의미한다. 유질 효모는 야로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*)와 같은 유기체뿐 아니라 건조 세포 중량의 10%를 초과하는 중량을 지질로서 축적하도록 공학처리된 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)와 같은 효모의 공학처리된 균주를 포함한다.

[0154] 본원에서 사용된 "삼투 쇼크"라는 용어는 삼투압의 급격한 감소 이후 용액 중 세포의 파열을 언급한다. 삼투 쇼크는 때로 세포의 세포성분들을 용액으로 방출시키기 위해 유도된다.

[0155] "광생물반응기"는 이의 적어도 일부가 적어도 부분적으로 투명하거나 부분적으로 개방되어 있어서, 이를 통해 빛이 통과할 수 있고, 여기서 하나 이상의 미세조류 세포가 배양되는 컨테이너를 언급한다. 광생물반응기는 폴리에틸렌 백 또는 에를렌마이어 플라스크의 경우에서와 같이 밀폐될 수 있거나, 야외 못의 경우에서와 같이 주위로 개방될 수 있다.

[0156] 본원에서 사용된 "다당류-분해 효소"는 임의의 다당류의 가수분해 또는 탈중합화를 촉매화할 수 있는 임의의 효소를 언급한다. 예를 들어, 셀룰라아제는 셀룰로오스의 가수분해를 촉매화한다.

[0157] "다당류" ("글리칸"으로서도 불림)는 글리코시드 결합에 의해 함께 연결된 단당류로 구성된 탄수화물이다. 셀룰로오스는 특정 식물 세포벽을 구성하는 다당류의 예이다. 셀룰로오스는 크실로오스 및 글루코오스와 같은 단당류뿐 아니라 더 큰 이당류 및 올리고당류를 산출하도록 효소에 의해 탈중합될 수 있다.

[0158] 생물반응기와 관련하여 "포트(port)"는 가스, 액체 및 세포와 같은 물질의 유입 또는 유출을 허락하는 생물반응기의 개구를 언급한다. 포트는 일반적으로 광생물반응기로부터 통하는튜빙에 연결된다.

[0159] "프로모터"는 핵산의 전사를 지시하는 핵산 조절 서열의 어레이로서 정의된다. 본원에서 사용된 대로, 프로모터는, 중합효소 II 타입 프로모터의 경우에, TATA 엘리먼트와 같은, 전사의 개시 부위에 근접한 필수 핵산 서열을 포함한다. 프로모터는 또한 원위 인핸서 또는 리프레서 엘리먼트도 임의로 포함하는데, 이들은 전사 개시

부위로부터 수 천개 염기쌍만큼 멀리 정위될 수 있다.

[0160] 본원에서 사용된 대로, 예컨대 세포나 핵산, 단백질 또는 벡터에 관해 사용된 "재조합"이라는 용어는, 세포, 핵산, 단백질 또는 벡터가 외인성 핵산이나 단백질의 도입 또는 원시 핵산이나 단백질의 변경에 의해 변형되었거나, 세포가 그렇게 변형된 세포로부터 유래된 것을 나타낸다. 따라서, 예컨대 재조합 세포가 발현 중이거나 전혀 발현되지 않은, 세포의 원시(비재조합) 형태 내에서 발견되지 않은 유전자를 발현시키거나, 달리 비정상적으로 발현되는 원시 유전자를 발현시킨다. 본원에서 "재조합 핵산"이라는 용어는 일반적으로, 예컨대 중합효소 및 엔도누클레아제를 이용한 핵산의 조작에 의해 자연에서 보통은 발견되지 않는 형태로 시험관내에서 최초에 형성된 핵산을 의미한다. 이러한 방식으로, 상이한 서열의 작동가능한 결합이 달성된다. 따라서, 선형 형태의 단리된 핵산 또는 보통은 연결되지 않는 DNA 분자를 리게이션시킴에 의해 시험관내에서 형성된 발현 벡터는 둘 모두가 본 발명의 목적을 위한 재조합인 것으로 고려된다. 일단 재조합 핵산이 제조되어 숙주 세포 또는 유기체로 재도입되면, 이것은 비재조합에 의해, 즉 시험관내 조작이라기보다 숙주 세포의 생체내 세포 기구를 이용하여 복제될 것으로 이해된다; 그러나, 일단 재조합에 의해 생성된 이러한 세포는, 후속하여 비재조합에 의해 복제되더라도, 여전히 본 발명의 목적을 위해 재조합인 것으로 고려된다. 유사하게, "재조합 단백질"은 재조합 기술을 이용하여 제조된 단백질, 즉 상기 묘사된 재조합 핵산의 발현을 통해 제조된 단백질이다.

[0161] 본원에서 사용된 "재생가능한 디젤"이라는 용어는 지질의 수소화 및 탈산소화를 통해 생성된 알칸 (예컨대, C₁₀:0, C₁₂:0, C₁₄:0, C₁₆:0 및 C₁₈:0)을 언급한다.

[0162] 본원에서 사용된 "초음파처리"라는 용어는 음파 에너지의 사용에 의한, 세포와 같은 생물학적 물질의 파괴 공정을 언급한다.

[0163] "퍼퓨랄의 종"은 동일한 기본 구조적 특성을 보유하는 2-프란카르복스알데히드 또는 이의 유도체를 언급한다.

[0164] 본원에서 사용된 "대(stover)"는 곡물을 수확한 후 남아 있는 농작물의 건조된 줄기 및 잎을 언급한다.

[0165] "수크로오스 이용 유전자"는 발현될 때, 수크로오스를 에너지원으로서 이용하는 세포의 능력을 돋는 유전자이다. 수크로오스 이용 유전자에 의해 엔코딩된 단백질을 "수크로오스 이용 효소"로서 본원에 언급하고 이는 수크로오스 운반체, 수크로오스 전화효소, 및 글루코키나아제 및 프리토키나아제와 같은 혼소키나아제를 포함한다.

[0166] "폐수"는 통상적으로 세척수, 세탁수, 변, 소변 및 다른 액체나 반-액체 쓰레기를 함유하는 물 쓰레기이다. 이것은 도시 폐기물 및 부차적으로 처리된 오수의 일부 형태를 포함한다.

[0167] 누클레오티드 또는 아미노산 동일성 퍼센트를 결정하는 서열 비교를 위해, 통상적으로 하나의 서열이 참조 서열로서 작용하고, 시험 서열을 이에 대해 비교한다. 서열 비교 알고리듬을 이용할 때, 시험 및 참조 서열을 컴퓨터에 입력하고, 필요한 경우, 서브서열 좌표를 지정하고, 서열 알고리듬 프로그램 파라메터를 지정한다. 서열 비교 알고리듬은 이후 지정된 프로그램 파라메터에 기초하여 참조 서열에 대한 시험 서열(들)의 서열 동일성 퍼센트를 산출한다.

[0168] 비교를 위한 서열의 최적 정렬이, 예컨대 문헌[Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981)]의 국소 상동성 알고리듬, 문헌[Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970)]의 상동성 정렬 알고리듬, 문헌[Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988)]의 유사성에 대한 검색 방법, 이러한 알고리듬의 전산화된 임플러먼테이션 (GAP, BESTFIT, FASTA, and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), 또는 시각적 검사 (일반적으로 Ausubel et al 참조, 상술함)에 의해 수행될 수 있다.

[0169] 서열 동일성 및 서열 유사성 퍼센트를 결정하기에 적합한 알고리듬의 또 다른 예가 BLAST 알고리듬인데, 이것은 문헌[Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990)]에 개시되어 있다. BLAST 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 내셔널 센터 포 바이오테크놀로지 인포메이션 (웹 주소 www.ncbi.nlm.nih.gov에서)을 통해 공개적으로 이용가능하다. 이 알고리듬은 조회 서열에서 길이 W 의 짧은 낱말을 확인함에 의해 높은 점수의 서열 쌍(HSP)을 먼저 동정하는 것을 포함하며, 이는 데이터베이스 서열에서 동일한 길이의 낱말과 정렬될 때 일부 포지티브-값의 역치 점수 T 에 매칭되거나 이를 만족시킨다. T 는 인근 낱말 점수 역치로서 언급된다 (Altschul et al, 상술함). 이러한 초기의 인근 낱말 히트(hit)는 이들을 함유하는 더 긴 HSP를 찾기 위한 검색을 개시하는 시드로서 기능한다. 낱말 히트는 이후, 누적 정렬 점수가 증가될 수 있는 한 각 서열에 따라 양 방향으로 연장된다. 누적 점수는 누클레오티드 서열의 경우, 파라메터 M (매칭 잔기의 쌍에 대한 보상 점수; 항상 >0) 및 N (미스매칭 잔기에 대한 페널티 점수; 항상 <0)을 이용하여 계산된다. 아미노산 서열의 경우, 누적 점수를 계산

하기 위해 점수 매트릭스를 이용한다. 각 방향에서 낱말 히트의 연장은, 누적 정렬 점수가 이의 달성된 최대값으로부터 X 양만큼 떨어질 때; 누적 점수가 하나 이상의 네거티브-점수 잔기 정렬의 축적으로 인해 0 또는 그 미만이 될 때; 또는 서열의 한쪽 말단에 도달할 때 중단된다. 핵산 또는 폴리펩티드가 본 발명의 범위 내에 있는지를 확인하기 위해, BLAST 프로그램의 디폴트 파라메터가 적합하다. BLAST 프로그램 (누클레오티드 서열의 경우)은 디폴트로서 11의 낱말 길이 (W), 10의 기대값 (E), M=5, N=-4, 및 양 가닥의 비교를 이용한다. 아미노산 서열의 경우, BLASTP 프로그램은 디폴트로서 3의 낱말 길이 (W), 10의 기대값 (E), 및 BLOSUM62 점수 매트릭스를 이용한다. TBLATN 프로그램 (누클레오티드 서열의 경우 단백질 서열 이용)은 디폴트로서 3의 낱말 길이 (W), 10의 기대값 (E), 및 BLOSUM62 점수 매트릭스를 이용한다 (Henikoff & Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915 (1989) 참조).

[0170]

서열 동일성 퍼센트를 계산하는 것 외에, BLAST 알고리듬은 두 서열간 유사성의 통계적 분석도 수행한다 (예컨대, Karlin & Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5787 (1993) 참조). BLAST 알고리듬에 의해 제공된 유사성의 한 척도는 최소 합계 확률 ($P(N)$)인데, 이것은 두 누클레오티드 또는 아미노산 서열간 매칭이 우연히 발생할 확률을 표시한다. 예를 들어, 핵산은, 참조 핵산에 대해 시험 핵산의 비교시 최소 합계 확률이 약 0.1 미만이고, 더욱 바람직하게는 약 0.01 미만이고, 가장 바람직하게는 약 0.001 미만일 때 참조 서열과 유사한 것으로 고려된다.

[0171]

II. 총론

[0172]

본 발명은 특정 미생물을 수송 연료, 석유화학 산업, 및/또는 식품 및 미용 산업에 사용되는 오일, 연료, 및 다른 탄화수소 또는 지질 조성물을 경제적으로 및 다양으로 제공하기 위해 이용할 수 있다는 견해를 일부 전제로 한다. 적합한 미생물은 미세조류, 유질 효모, 및 진균을 포함한다. 본 발명에 사용되는 바람직한 미세조류의 속은 지질-생성 미세조류인 클로렐라(*Chlorella*)이다. 지질의 트랜스에스테르화는 바이오디젤로서 유용한 장쇄지방산 에스테르를 산출한다. 다른 효소적 및 화학적 공정을 변경시켜 지방산, 알데히드, 알코올, 알칸 및 알켄을 생성할 수 있다. 본 출원은 오일, 연료, 및 유기화학품으로의 전환에 적합한 지질의 생성을 촉진하는 특징을 갖는 유기체를 제공하기 위해 클로렐라(*Chlorella*) 및 유사한 미생물을 포함하는 미생물의 다수의 종 및 균주의 유전자 변형 방법을 기술한다. 일부 적용에서, 재생가능한 디젤, 제트 연료, 또는 다른 탄화수소 화합물이 생성된다. 본 출원은 증가된 생산성 및 증가된 지질 수율, 및/또는 본원에 개시된 조성물의 더욱 비용-효과적인 생성을 위한 미세조류의 배양 방법도 기술한다.

[0173]

특정 구체예에서, 본 출원은 하나 이상의 외인성 유전자로 미세조류의 균주를 유전적으로 공학처리하는 것을 기술한다. 예를 들어, 바이오디젤에 적합한 높은 수준의 트리아실글리세리드(TAG)를 생성하는 미세조류가 리파아제를 발현하도록 공학처리될 수 있고, 이는 미세조류의 TAG의 트랜스에스테르화를 촉진할 수 있다. 리파아제는 유도될 수 있는 프로모터를 이용하여 임의로 발현될 수 있어서, 세포가 먼저 발효기에서 바람직한 밀도로 성장한 다음 회수되고, 이후 리파아제를 발현시키는 프로모터의 유도가, 임의로 충분한 알코올의 존재하에 유도되어 TAG를 지방산 에스테르로 전환시킬 수 있다.

[0174]

일부 미세조류 지질은 세포막과 세포의 다른 비수성 부분에 격리된다. 따라서, 트랜스에스테르화 반응의 수율을 증가시키기 위해, 지질로의 리파아제의 접근성을 증가시키도록 세포를 용해시키는 것이 이로울 수 있다. 세포 파괴를, 예를 가압된 스텀의 첨가를 통해 기계적으로 수행하거나, 미세조류 세포를 용해시키는 바이러스를 적용시키거나, 유전자를 발현시켜 세포에서 용해 단백질 생성하거나, 미세조류 세포를 용해시키는 제제로 배양액을 처리함에 의해 수행할 수 있다. 세포 파괴를 위한 미세조류의 스텀 처리가, 예를 들어 미국특허 6,750,048에 개시되어 있다.

[0175]

예를 들어, 용균 바이러스로부터의 유전자와 같은, 미세조류 세포를 용해시키는 유전자를 발현시키는 높은 수준의 TAG를 생성하는 미세조류를 유전자 공학처리하는 것도 본원에 개시된다. 이러한 유전자는 유도될 수 있는 프로모터를 이용하여 발현될 수 있어서, 세포가 먼저 발효기에서 바람직한 밀도로 성장한 다음 회수되고, 세포를 용해시키는 유전자를 발현시키는 프로모터가 유도될 수 있다. 예를 들어, 다당류-분해 효소를 엔코딩하는 유전자를 발현시켜 세포를 용해시킬 수 있다.

[0176]

임의로, 리파아제는 세포내 구획에서 발현될 수 있고, 여기서 이것은 트랜스에스테르화까지 미세조류 지질의 대부분과 여전히 분리된 채로 남아있다. 일반적으로, 제조물로부터 물을 실질적으로 제거하고/거나 과량의 알코올을 첨가한 후 트랜스에스테르화를 수행하는 것이 바람직하다. 리파아제는 물뿐만 아니라 알코올을 트랜스에스테르화에서 기질로서 이용할 수 있다. 물 이용시, 지질은 히드록실 부분에 친수계이션되어 에스테르보다는 극성인 지방산을 생성한다. 메탄올과 같은 알코올 이용시, 지질은 메틸기에 친수계이션되어 통상적으로 수송

연료에 바람직한, 비극성 지방산 에스테르를 생성한다. 조건이 지방산 에스테르를 생성하는 트랜스에스테르화에 적합해질 때까지 미세조류 지질에 리파아제가 노출되는 것을 제한하기 위해, 리파아제를, 예를 들어 엽록체 원형질, 미토콘드리아, 또는 다른 세포 소기관에서 발현시킬 수 있다. 이러한 구획화된 발현은 세포가 파괴된 후까지 세포 지질의 대부분으로부터 리파아제를 격리시킨다.

[0177] 다른 특정 구체예에서, 본 출원은 다양한 탄화수소 화합물을 제공하도록 하나 이상의 외인성 유전자를 지니는 미세조류, 유질 효모, 세균, 또는 진균의 균주를 유전적으로 공학처리하는 것을 기술한다. 예를 들어, 자연적으로 또는 유전적 변형을 통해 높은 수준의 지질을 생성할 미세조류를 공학처리하여 (또는 추가로 공학처리됨) 지질 합성 동안 아실 담체 단백질(ACP)로부터 지방산의 절단을 촉진시킬 수 있는 외인성 지방산 아실-ACP 티오에스테라아제를 발현시킬 수 있다. 이러한 지방산은 회수되거나, 세포 내에서 추가의 효소적 가공을 통해 다른 탄화수소 화합물을 산출할 수 있다. 임의로, 지방산 아실-ACP 티오에스테라아제는 유도될 수 있는 프로모터에 작동가능하게 결합된 유전자로부터 발현될 수 있고/거나 세포내 구획에서 발현될 수 있다.

[0178] 지방산 아실-ACP 티오에스테라아제는 특정 탄소 사슬 길이를 갖는 성장하는 지방산 (지방산 합성 동안)에 대한 이의 특이성에 기초하여 선택될 수 있다. 예를 들어, 지방산 아실-ACP 티오에스테라아제는 8 내지 34개 탄소 원자, 바람직하게는 8 내지 18개 탄소 원자, 및 보다 바람직하게는 10 내지 14개 탄소 원자 범위의 탄소 사슬 길이에 대해 특이성을 지닐 수 있다. 12개 탄소 원자를 지니는 지방산에 대한 특이성이 가장 바람직하다.

[0179] 추가로, 본 발명은 둘 이상의 외인성 유전자, 예컨대 다당류-분해 효소를 엔코딩하는 것과 같은 용균 유전자 및 리파아제를 발현시키는 미세조류의 유전적으로 공학처리된 균주를 제공한다. 하나 또는 둘 모두의 유전자는 유도될 수 있는 프로모터를 이용하여 발현될 수 있고, 이는 이러한 유전자의 상대적인 발현 타이밍이 지질 수율과 지방산 에스테르로의 전환을 개선시키기 위해 제어될 수 있게 한다. 본 발명은 또한 수크로오스를 대사시키는 지질-생성 미생물을 공학처리하기 위한 벡터 및 방법을 제공하는데, 이것은 공학처리된 세포가 사탕수수 또는 다른 공급원료를 오일, 연료, 유지화학품 등을 생성하기에 적합한 지질로 전환시킬 수 있도록 하므로 유리한 특성이다.

[0180] 다른 구체예에서, 본 발명은 둘 이상의 외인성 유전자, 예컨대 이들의 조합된 작용이 알코올 생성물을 산출하는 지방산 아실-ACP 티오에스테라아제 및 지방산 아실-CoA/알데히드 환원효소를 발현시키는 미생물 (예컨대, 미세조류, 유질 효모, 세균 또는 진균)의 유전적으로 공학처리된 균주를 제공한다. 본 발명은 제한없이 지방산 아실-ACP 티오에스테라아제 및 길이-특이적 지방산을 생성하는 자연히 공동-발현되는 아실 담체 단백질, 또는 알데히드를 생성하는 지방산 아실-ACP 티오에스테라아제와 지방산 아실-CoA 환원효소를 포함하는, 외인성 유전자의 다른 조합물을 추가로 제공한다. 본 발명은 또한 알칸 또는 알켄을 생성하는 지방산 아실-ACP 티오에스테라아제, 지방산 아실-CoA 환원효소, 및 지방산 알데히드 테카르보닐라아제의 조합물을 제공한다. 외인성 유전자 중 하나 이상은 유도될 수 있는 프로모터를 이용하여 발현될 수 있다.

[0181] 본 발명은, 예를 들어 요망되는 성장 특성을 갖는 미세조류를 제공하고/거나 생성되는 지질의 양 및/또는 품질을 개선시키는 미세조류의 변형을 추가로 제공한다. 예를 들어, 미세조류는 지질 경로로의 탄소 흐름을 증가시키고/거나 지질 경로를 변형시켜 세포에 의해 생성되는 지질의 비율 또는 특성을 유리하게 변경시키도록 공학처리될 수 있다.

[0182] 본 출원은, 하나는 고정된 탄소원 (예컨대 수크로오스)의 운반체를 엔코딩하고 두 번째는 수크로오스 전화효소를 엔코딩하는, 둘 이상의 외인성 유전자를 발현시키도록 미세조류의 균주를 유전적으로 공학처리하는 것을 기술한다. 생성된 발효될 수 있는 유기체는 생물학적 탄화수소를 생성하기 위해 이전에 공지된 방법으로 수득될 수 있었던 것에 비해 낮은 제조 비용으로 탄화수소를 생성한다. 상기 개시된 두 외인성 유전자의 삽입은 지시된 및/또는 임의의 돌연변이발생을 통해 다당류 생합성의 과정과 조합될 수 있고, 이것은 둘 더 많은 탄소 흐름을 탄화수소 생성으로 돌린다. 개별적으로 및 조합하여, 영양 전환, 탄화수소 생성을 변경시키는 공학처리 및 외인성 효소로의 처리는 미생물에 의해 생성되는 탄화수소 조성을 변경시킨다. 이 변경은 생성되는 탄화수소의 양, 다른 탄화수소에 비해 생성된 하나 이상의 탄화수소 종의 양, 및/또는 미생물에서 생성된 탄화수소 종의 유형에서의 변화일 수 있다. 예를 들어, 미세조류는 더 높은 양 및/또는 비율의 TAG를 생성하도록 공학처리될 수 있다.

III. 오일- 또는 지질-생성 미생물

[0183] 적합한 지질 또는 탄화수소를 생성하는 임의의 종의 유기체를 이용할 수 있으나, 자연적으로 높은 수준의 적합한 지질 또는 탄화수소를 생성하는 유기체가 바람직하다. 미생물에 의한 탄화수소의 생성은 문헌[Metzger et

al. Appl Microbiol Biotechnol (2005) 66: 486-496 and A Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from Algae, NREL/TP-580-24190, John Sheehan, Terri Dunahay, John Benemann and Paul Roessler (1998)]에서 검토된다.

[0185] 본 발명에 사용되는 미생물의 선택에 영향을 미치는 고려사항으로는 오일, 연료, 및 유지화학물을 생성하기에 적합한 지질 또는 탄화수소의 생성에 추가하여, (1) 세포 중량의 비율로서 높은 지질 함량; (2) 성장의 용이성; (3) 유전적 공학처리의 용이성; 및 (4) 바이오매스 가공의 용이성이 있다. 특정 구체예에서, 야생형 또는 유전적으로 공학처리된 미생물은 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 또는 적어도 70% 또는 이를 초과하는 지질이 존재하는 세포를 생성한다. 바람직한 유기체는 종속영양적으로 성장하거나 (광의 부재하에 당상에서), 예를 들어 본원에 개시된 방법을 이용하여 그렇게 되도록 공학처리될 수 있다. 형질전환의 용이성 및 미생물에서 기능성인 항시적이고/거나 유도될 수 있는 프로모터 및 선택가능한 마커의 이용가능성이 유전적 공학처리의 용이성에 영향을 미친다. 가공에 고려할 사항으로는, 예를 들어 세포를 용해시키는 효과적인 수단의 이용가능성이 있을 수 있다.

A. 조류

[0186] 본 발명의 일 구체예에서, 미생물은 미세조류이다. 본 발명에 따라 이용될 수 있는 미세조류의 비제한적인 예를 표 1에서 볼 수 있다.

표 1. 미세조류의 예

아크난테스 오리엔탈리스(*Achnanthes orientalis*), 아그메넬룸(*Agmenellum*), 암피프로라 히알린(*Amphiprora hyaline*), 암포라 코페이포르미스(*Amphora coffeiformis*), 암포라 코페이포르미스 리니아(*Amphora coffeiformis linea*), 암포라 코페이포르미스 평타타(*Amphora coffeiformis punctata*), 암포라 코페이포르미스 타일로리(*Amphora coffeiformis taylori*), 암포라 코페이포르미스 테누이스(*Amphora coffeiformis tenuis*), 암포라 델리카티시마(*Amphora delicatissima*), 암포라 델리 카티시마 카피타타(*Amphora delicatissima capitata*), 암포라 종(*Amphora sp.*), 아나바에나(*Anabaena*), 앙키스트로데스무스(*Ankistrodesmus*), 앙키스트로데스무스 팔카투스(*Ankistrodesmus falcatus*), 보에켈로비아 후그란디아(*Boekelovia hooglandii*), 보로디넬라 종(*Borodinella sp.*), 보트리오콕시아스 브라우니아(*Botryococcus braunii*), 보트리오코커스 수데티 쿠스(*Botryococcus sudeticus*), 브락테오코커스 마이너(*Bracteococcus minor*), 브락테오코커스 데미오 누클레아투스(*Bracteococcus medionucleatus*), 카르테리아(*Carteria*), 카에토세로스 그라실리스(*Chaetoceros gracilis*), 카에토세로스 뮤엘레리(*Chaetoceros muelleri*), 카에토세로스 뮤 엘레리 서브살슘(*Chaetoceros muelleri subsalsum*), 카에토세로스 종(*Chaetoceros sp.*), 클로렐라 아 니트라타(*Chlorella anitratata*), 클로렐라 안타르크티카(*Chlorella Antarctica*), 클로렐라 아우레오비 리디스(*Chlorella aureoviridis*), 클로렐라 캔디다

[0190]

(*Chlorella candida*), 클로렐라 캡슐레이트(*Chlorella capsulate*), 클로렐라 데시케이트(*Chlorella desiccate*), 클로렐라 엘립소이데아(*Chlorella ellipsoidea*), 클로렐라 에메르소니이(*Chlorella emersonii*), 클로렐라 푸스카(*Chlorella fusca*), 클로렐라 푸스카 var. 바쿠올라타(*Chlorella fusca var. vacuolata*), 클로렐라 글루코트로파(*Chlorella glucotropha*), 클로렐라 인퓨시오눔(*Chlorella infusionum*), 클로렐라 인퓨시오눔 var. 악토필라(*Chlorella infusionum var. actophila*), 클로렐라 인퓨시오눔 var. 오세노필라(*Chlorella infusionum var. auxenophila*), 클로렐라 캐슬러리(*Chlorella kessleri*), 클로렐라 로보포라(*Chlorella lobophora*) (균주 SAG 37.88), 클로렐라 루테오비리디스(*Chlorella luteoviridis*), 클로렐라 루테오비리디스 var. 오레오비리디스(*Chlorella luteoviridis var. aureoviridis*), 클로렐라 루테오비리디스 var. 루테센스(*Chlorella luteoviridis var. lutescens*), 클로렐라 미니아타(*Chlorella minata*), 클로렐라 미누티시마(*Chlorella minutissima*), 클로렐라 뮤타빌리스(*Chlorella mutabilis*), 클로렐라 놀투르나(*Chlorella nocturna*), 클로렐라 오발리스(*Chlorella ovalis*), 클로렐라 파르바(*Chlorella parva*), 클로렐라 포토필라(*Chlorella photophila*), 클로렐라 프링세이미이(*Chlorella pringsheimii*), 클로렐라 프로토테코이드(*Chlorella protothecoides*) (UTEX 균주 1806, 411, 264, 256, 255, 250, 249, 31, 29, 25 중 임의의 것 포함), 클로렐라 프로토테코이드 var. 액시디콜라(*Chlorella protothecoides var. acidicola*), 클로렐라 레귤라리스(*Chlorella regularis*), 클로렐라 레귤라리스 var. 미니마(*Chlorella regularis var. minima*), 클로렐라 레귤라리스 var. 움브리카타(*Chlorella regularis var. umbriacata*), 클로렐라 레이시글리이(*Chlorella reisiglpii*), 클로렐라 사카로필라(*Chlorella saccharophila*), 클로렐라 사카로필라 var. 엘립소이데아(*Chlorella saccharophila var. ellipsoidea*), 클로렐라 살리나(*Chlorella salina*), 클로렐라 심플렉스(*Chlorella simplex*), 클로렐라 소로키니아나(*Chlorella sorokiniana*), 클로렐라 종(*Chlorella sp.*), 클로렐라 스파에리카(*Chlorella sphaerica*), 클로렐라 스티그마토포라(*Chlorella stigmatophora*), 클로렐라 반니엘리이(*Chlorella vanniellii*), 클로렐라 불가리스(*Chlorella vulgaris*), 클로렐라 불가리스 에프 테르티아(*Chlorella vulgaris f tertia*), 클로렐라 불가리스 var. 오토토트로피카(*Chlorella vulgaris var. autotrophica*), 클로렐라 불가리스 var. 비리디스(*Chlorella vulgaris var. viridis*), 클로렐라 불가리스 var. 불가리스(*Chlorella vulgaris var. vulgaris*), 클로렐라 불가리스 var. 불가리스 에프 테르티아(*Chlorella vulgaris var. vulgaris f tertia*), 클로렐라 불가리스 var. 불가리스 에프 비리디스(*Chlorella vulgaris var. vulgaris f viridis*), 클로렐라 크산텔라(*Chlorella xanthesella*), 클로렐라 조평기엔시스(*Chlorella zofingiensis*), 클로렐라 트레보우시오이드(*Chlorella trebouxoides*), 클로렐라 불가리스(*Chlorella vulgaris*), 클로로코콤
인퓨시오눔(*Chlorococcum infusionum*), 클로로코콤 종(*Chlorococcum sp.*),
클로로고니움(*Chlorogonium*), 크로모나스 종(*Chroomonas sp.*), 크리소스파에라 종(*Chrysosphaera sp.*), 크리코스파에라 종(*Cricosphaera sp.*), 크립테코디니움 코흐니이(*Cryptothecodium cohnii*), 크립토모나스 종(*Cryptomonas sp.*), 시클로렐라 크립티카(*Cyclotella cryptica*), 시클로렐라 메네지니انا(*Cyclotella meneghiniana*), 시클로렐라 종(*Cyclotella sp.*), 두날리엘라 종(*Dunalieilla sp.*), 두날리엘라 바르다윌(*Dunalieilla bardawil*), 두날리엘라 비오쿨라타(*Dunalieilla bioculata*), 두날리엘라 그라놀레이트(*Dunalieilla granulata*), 두날리엘라 마리팀(*Dunalieilla maritime*), 두날리엘라 미누타(*Dunalieilla minuta*), 두날리엘라 파르바(*Dunalieilla parva*), 두날리엘라 페이르세이(*Dunalieilla peircei*), 두날리엘라 프리몰렉타(*Dunalieilla primolecta*), 두날리엘라 살리나(*Dunalieilla salina*), 두날리엘라 테리콜라(*Dunalieilla terricola*), 두날리엘라 테르티올렉타(*Dunalieilla tertiolecta*), 두날리엘라 비리디스(*Dunalieilla viridis*),

[0191]

두날리엘라 테르티올렉타(*Dunaliella tertiolecta*), 에레모스파에라 비리디스(*Eremosphaera viridis*), 에레모스파에라 종(*Eremosphaera sp.*), 엘립소이돈 종(*Ellipsoidon sp.*), 유글레나(*Euglena*), 프란세이아 종(*Franceia sp.*), 프라길라리아 크로토넨시스(*Fragilaria crotensis*), 프라길라리아 종(*Fragilaria sp.*), 글레오캡사 종(*Gleocapsa sp.*), 글로에오탐니온 종(*Gloethamnion sp.*), 히메노모나스 종(*Hymenomonas sp.*), 이소크리시스 아프. 갈바나(*Isochrysis aff. galbana*), 이소크리시스 갈바나(*Isochrysis galbana*), 레포신클리스(*Lepocinclis*), 미크락티니움(*Micractinium*), 미크락티니움(*Micractinium*)(UTEXLB 2614), 모노라피디움 미누툼(*Monoraphidium minutum*), 모노라피디움 종(*Monoraphidium sp.*), 난노클로리스 종(*Nannochloris sp.*), 난노클로롭시스 살리나(*Nannochloropsis salina*), 난노클로롭시스 종(*Nannochloropsis sp.*), 나비쿨라 악셉타타(*Navicula acceptata*), 나비쿨라 비스칸테라에(*Navicula biskanterae*), 나비쿨라 슈도테넬로이드(*Navicula pseudotenebrioides*), 나비쿨라 펠리쿨로사(*Navicula pelluculosa*), 나비쿨라 사프로필라(*Navicula saprophila*), 나비쿨라 종(*Navicula sp.*), 네프로클로리스 종(*Nephrochloris sp.*), 네프로셀미스 종(*Nephroselmis sp.*), 니츠키아 커뮤니스(*Nitzschia communis*), 니츠키아 알렉산드리나(*Nitzschia alexandrina*), 니츠키아 커뮤니스(*Nitzschia communis*), 니츠키아 디시파타(*Nitzschia dissipata*), 니츠키아 프러스툴룸(*Nitzschia frustulum*), 니츠키아 한츠슈이아나(*Nitzschia hantzschiana*), 니츠키아 인코스피쿠아(*Nitzschia inconspicua*), 니츠키아 인터미디아(*Nitzschia intermedia*), 니츠키아 미크로세팔라(*Nitzschia microcephala*), 니츠키아 푸실라(*Nitzschia pusilla*), 니츠키아 푸실라 엘립티카(*Nitzschia pusilla elliptica*), 니츠키아 푸실라 모노엔시스(*Nitzschia pusilla monoensis*), 니츠키아 워드란글라(*Nitzschia quadrangular*), 니츠키아 종(*Nitzschia sp.*), 오크로모나스 종(*Ochromonas sp.*), 오오시스티스 파르바(*Oocystis parva*), 오오시스티스 푸실라(*Oocystis pusilla*), 오오시스티스 종(*Oocystis sp.*), 오실라토리아 럼네티카(*Oscillatoria limnetica*), 오실라토리아 종(*Oscillatoria sp.*), 오실라토리아 서브레비스(*Oscillatoria subbrevis*), 파라클로렐라 캐슬리(*Parachlorella kessleri*), 파스케리아 악시도필라(*Pascheria acidophila*), 파블로바 종(*Pavlova sp.*), 파구스(*Phagus*), 포르미디움(*Phormidium*), 플라티모나스 종(*Platymonas sp.*), 플뢰로크리시스 카르테아에(*Pleurochrysis carterae*), 플뢰로크리시스 덴테이트(*Pleurochrysis dentate*), 프로토크리시스 종(*Pleurochrysis sp.*), 프로토테카 위케르하미아(*Prototheca wickerhamii*), 프로토테카 스타그노라(*Prototheca stagnora*), 프로토테카 포르토리센시스(*Prototheca portoricensis*), 프로토테카 모리포르미스(*Prototheca moriformis*), 프로토테카 족피아(*Prototheca zopfii*), 슈도클로렐라 아쿠아티카(*Pseudochlorella aquatica*), 피라미모나스 종(*Pyramimonas sp.*), 피로보트리스(*Pyrobotrys*), 로도코커스 오파쿠스(*Rhodococcus opacus*), 사르시노이드 크리소파이트(*Sarcinoid chrysophyte*), 썬데스무스 아르마투스(*Scenedesmus armatus*), 스키조키트리움(*Schizochytrium*), 스피로기라(*Spirogyra*), 스피룰리나 플라텐시스(*Spirulina platensis*), 스티코코커스 종(*Stichococcus sp.*), 시네코코커스 종(*Synechococcus sp.*), 테트라에드론(*Tetraedron*), 테트라셀미스 종(*Tetraselmis sp.*), 테트라엘미스 수에시카(*Tetraselmis suecica*), 탈라시오시라 웨이스플로기아(*Thalassiosira weissflogii*), 및 비리디엘라 프리데리시아나(*Viridiella fridericiana*)

1. 클로렐라

[0192] 본 발명의 바람직한 구체예에서, 미생물은 클로렐라(*Chlorella*) 속, 바람직하게는 클로렐라 프로토테코이드(*Chlorella protothecoides*), 클로렐라 엘립소이데아(*Chlorella ellipsoidea*), 클로렐라 미누티시마(*Chlorella minutissima*), 또는 클로렐라 에메르소니아(*Chlorella emersonii*)이다.

[0193] 클로렐라(*Chlorella*)는 필룸 클로로피타(*phylum Chlorophyta*)에 속하는 단일-세포 녹색 조류의 속이다. 이것은 형상에 있어서 직경이 약 2 내지 10 μm 인 구상이고, 편모가 없다. 클로렐라(*Chlorella*)의 일부 종이 자연적으로 종속영양성이다.

[0194] 클로렐라(*Chlorella*), 특히 클로렐라 프로토테코이드(*Chlorella protothecoides*)는 이의 높은 지질, 특히 바이오디젤에 적합한 장쇄 지질 조성으로 인해 본 발명에 사용하기에 바람직한 미생물이다. 또한, 이 미세조류는 본원의 실시예에서 입증된 대로 종속영양적으로 성장하여 유전적으로 공학처리될 수 있다.

[0195] 본 발명의 바람직한 구체예에서, 이식유전자의 발현에 사용된 미생물은 클로렐라(*Chlorella*) 속, 바람직하게는 클로렐라 프로토테코이드(*Chlorella protothecoides*), 클로렐라 미누티시마(*Chlorella minutissima*), 또는 클로렐라 에메르소니아(*Chlorella emersonii*)이다. 예컨대 클로렐라(*Chlorella*)에서 이식유전자 발현의 예를 문헌에서 찾아볼 수 있다 (예를 들어, *Current Microbiology* Vol. 35 (1997), pp. 356-362; Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao. 2000 Jul;16(4):443-6; *Current Microbiology* Vol. 38 (1999), pp. 335-341; *Appl Microbiol Biotechnol* (2006) 72: 197-205; *Marine Biotechnology* 4, 63-73, 2002; *Current Genetics* 39:5, 365-370 (2001); *Plant Cell Reports* 18:9, 778-780, (1999); *Biologia Plantarum* 42(2): 209-216, (1999); *Plant Pathol. J* 21(1): 13-20, (2005) 참조). 또한 본원의 실시예를 참조한다. 원핵 미세조류를 포함하는 다른 지질-생성 미세조류도 공학처리될 수 있다 (Kalscheuer et al., *Applied Microbiology and Biotechnology*,

Volume 52, Number 4 / October, 1999 참조).

[0197] **2. 클로렐라(*Chlorella*) 종의 동정**

[0198] 본 발명에 사용되는 클로렐라(*Chlorella*)의 종은 계놈의 특정 표적 영역을 증폭시켜 동정될 수 있다. 예를 들어, 특정 클로렐라(*Chlorella*) 종 또는 균주의 동정은 프라이머를 이용한 핵 및/또는 엽록체원형질 DNA의 증폭과 서열화 및 계놈의 임의의 영역을 이용한 방법을 통해, 예를 들어 문헌[Wu et al, *Bot. Bull. Acad. Sin.* (2001) 42:115-121 Identification of *Chlorella* spp. isolates using ribosomal DNA sequences]에 개시된 방법을 이용하여 달성될 수 있다. 당업자는 리보솜 내부 전사된 스페이서 (ITS1 및 ITS2 rDNA), 18S rRNA, 및 다른 보존된 계놈 영역의 증폭 및 서열화와 같은 널리 확립된 계통발생학적 분석 방법을 클로렐라(*Chlorella*) 뿐만 아니라 본원에 개시된 방법을 이용할 수 있는 다른 탄화수소 및 지질 생성 유기체의 종을 동정하기 위해 이용할 수 있다. 조류의 동정 및 분류 방법의 예에 대하여 예컨대 문헌[*Genetics*, 2005 Aug;170(4):1601-10 and *RNA*, 2005 Apr;11(4):361-4]을 참조한다.

[0199] **B. 유질 효모**

[0200] 본 발명의 일 구체예에서, 미생물은 유질 효모이다. 본 발명에 따라 이용될 수 있는 유질 효모의 비제한적인 예를 표 2에서 찾아볼 수 있다.

[0201] 표 2. 유질 효모의 예

[0202] 크립토코커스 쿠르바투스(*Cryptococcus curvatus*), 크립토코커스 테리콜루스(*Cryptococcus terriculus*), 캔디다 종(*Candida sp.*), 리포마이세스 스타르케이(*Lipomyces starkeyi*), 림포마이세스 리포퍼(*Lipomyces lipofer*), 엔도미콥시스 베르날리스(*Endomycopsis vernalis*), 로도토룰라 글루티니스(*Rhodotorula glutinis*), 로도토룰라 그라실리스(*Rhodotorula gracilis*), 및 야로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*)

[0203] **C. 기타 진균**

[0204] 본 발명의 일 구체예에서, 미생물은 진균이다. 본 발명에 따라 사용될 수 있는 진균의 비제한적인 예를 표 3에서 찾아볼 수 있다.

[0205] 표 3. 진균의 예

[0206] 모르티에렐라(*Mortierella*), 모르티에틀라 비나세아(*Mortierella vinacea*), 모르티에렐라 알핀(*Mortierella alpina*), 피티움 데바리아눔(*Pythium debaryanum*), 뮤코 시르시넬로이드(*Mucor circinelloides*), 아스페질러스 오크라세우스(*Aspergillus ochraceus*), 아스페질러스 테레우스(*Aspergillus terreus*), 페니실리움 일락시눔(*Penicillium italicinum*), 헨세눌로(*Hansenula*), 카에토미움(*Chaetomium*), 클라도스포리움(*Cladosporium*), 말브란케아(*Malbranchea*), 리조푸스(*Rhizopus*), 및 피티움(*Pythium*)

[0207] **D. 세균**

[0208] 본 발명의 일 구체예에서, 미생물은 세균이다.

[0209] 대장균(*E. coli*)과 같은 세균에서 외인성 유전자의 발현예가 널리 공지되어 있다; 예를 들어 문헌[*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Sambrook et al. (3d edition, 2001, Cold Spring Harbor Press)] 참조.

[0210] **IV. 미생물을 배양하는 방법**

[0211] 미생물은 유전자 조작을 수행할 목적과 후속적인 탄화수소의 생성을 목적으로 배양된다 (예컨대, 지질, 지방산, 알데히드, 알코올 및 알칸). 전자의 배양 유형은 초기에, 적어도 출발 미생물이 성장할 수 있는 조건하에 소규모로 수행된다. 예를 들어, 출발 미생물이 광영양체라면, 초기 배양이 빛의 존재하에 수행된다. 배양 조건은 미생물이 빛에 독립적으로 성장하도록 진화되거나 공학처리된 경우 변화될 수 있다. 탄화수소 생성을 목적으로 한 배양은 일반적으로 대규모로 수행된다. 바람직하게는, 고정된 탄소원이 존재한다. 기간의 일부 또는 전 기간 동안 배양액을 빛에 노출시킬 수도 있다.

[0212] 미세조류는 액체 배지에서 배양될 수 있다. 배양액은 생물반응기 내에 함유될 수 있다. 임의로, 생물반응기는

빛이 들어오지 못하게 한다. 대안적으로, 미세조류를 고정된 탄소원을 함유하는 광생물반응기에서 배양시켜 빛이 세포에 부딪히게 할 수 있다. 그럼에도 불구하고 미세조류 세포를, 심지어 세포가 운반하고 이용하는 고정된 탄소원의 존재하에 (즉, 혼합영양성) 빛에 노출시켜도 이것은 암실에서 세포를 배양하는 것에 비해 성장을 가속시킨다. 배양 조건 파라메터는 총 탄화수소 생성, 생성되는 탄화수소 종의 조합, 및/또는 탄화수소 종의 생성을 최적화하도록 조작될 수 있다. 일부 경우에, 예컨대, 빛이 배양액에 닿지 않게 하는 극히 큰 (4000 리터 및 초과) 발효기를 이용할 때, 세포를 암실에서 배양하는 것이 바람직하다.

[0213] 미세조류 배양 배지는 통상적으로 고정된 질소원, 미량 원소, 임의로 pH 유지를 위한 완충제, 및 포스페이트와 같은 성분들을 함유한다. 다른 성분으로는 아세테이트 또는 글루코오스와 같은 고정된 탄소원, 및 특히 해수 미세조류를 위한 염화나트륨과 같은 염이 있을 수 있다. 미량 원소의 예로는, 예를 들어 $ZnCl_2$, H_3BO_3 , $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 및 $(NH_4)_6Mo_7O_24 \cdot 4H_2O$ 의 개개 형태의 아연, 봉소, 코발트, 구리, 망간, 및 몰리브덴이 있다.

[0214] 고정된 탄소원 상에서 성장할 수 있는 유기체의 경우, 고정된 탄소원은, 예를 들어 글루코오스, 프럭토오스, 수크로오스, 갈락토오스, 크실로오스, 만노오스, 람노오스, N-아세틸글루코사민, 글리세롤, 플로리도시드, 및/또는 글루코론산일 수 있다. 하나 이상의 탄소원(들)이 적어도 약 $50 \mu M$, 적어도 약 $100 \mu M$, 적어도 약 $500 \mu M$, 적어도 약 $5 mM$, 적어도 약 $50 mM$, 및 적어도 약 $500 mM$ 의 농도의 하나 이상의 외부에서 제공된 고정된 탄소원(들)으로 공급될 수 있다. 일부 미세조류 종은 빛의 부재하에 글루코오스 또는 아세테이트와 같은 고정된 탄소원을 이용하여 성장될 수 있다. 이러한 성장은 종속영양 성장으로서 공지되어 있다. 클로렐라 프로토테코이드(*Chlorella protothecoides*)의 경우, 예를 들어 종속영양 성장이 바이오매스의 높은 생성 및 세포 중 높은 지질 함량의 축적을 초래한다.

[0215] 일부 미생물은 도시 폐기물, 부차적으로 처리된 오수, 폐수 및 고정된 탄소의 다른 공급원과 같은 화합물의 이종성 공급원, 및 설페이트, 포스페이트 및 니트레이트와 같은 다른 영양소인 고정된 탄소원 상에서 자연적으로 성장하거나 성장하도록 공학처리될 수 있다. 오수 성분은 탄화수소의 생성에서 영양원으로서 기능하고, 배양액은 탄화수소의 값싼 공급원을 제공한다.

[0216] 배양 배지의 pH, 미량 원소의 실제 및 농도 및 다른 배지 성분과 같은 다른 배양 파라메터들도 조작될 수 있다.

A. 광합성 성장

[0218] 미세조류를 빛의 존재하에 성장시킬 수 있다. 미세조류 세포의 배양액을 때리는 광자의 수뿐만 아니라 광장 스펙트럼 및 일당 암:명 시간의 비와 같은 다른 파라메터들도 조작될 수 있다. 미세조류는 천연광뿐만 아니라 천연광과 인공광의 동시 및/또는 교대적인 조합에서도 배양될 수 있다. 예를 들어, 클로렐라(*Chlorella*) 속의 미세조류를 일광 시간 동안 천연광 하에서 배양하고 밤 시간 동안 인공광 하에서 배양시킬 수 있다.

[0219] 미세조류와 같은 미생물을 성장시키기 위한 광생물반응기의 가스 함량을 조작할 수 있다. 광생물반응기의 부피 중 일부는 액체보다 가스를 함유할 수 있다. 가스 입구는 가스를 광생물반응기로 주입하는데 이용될 수 있다. 공기, 공기/ CO_2 혼합물, 아르곤 등과 같은 영족 가스를 포함하는 임의의 가스를 광생물반응기로 주입할 수 있다. 광생물반응기로의 가스의 유입 속도도 조작될 수 있다. 광생물반응기로의 가스 흐름의 증가는 미세조류 배양액의 탁도를 증가시킨다. 광생물반응기로 가스를 운반하는 포트의 배치도 주어진 가스 유속에서 배양액의 탁도에 영향을 줄 수 있다. 공기/ CO_2 혼합물은 특정 유기체의 최대 성장을 위해 CO_2 의 최적 량을 발생시키도록 조절될 수 있다. 미세조류는 100% 공기에서보다, 예를 들어 3% CO_2 /97% 공기 하에서 빛을 비출 때 현저하게 빠르게 성장한다. 3% CO_2 /97% 공기에는 공기에서 발견된 것보다 CO_2 가 약 100배 더 많다. 예를 들어, 약 99.75% 공기:0.25% CO_2 , 약 99.5% 공기:0.5% CO_2 , 약 99.0% 공기:1.00% CO_2 , 약 98.0% 공기:2.0% CO_2 , 약 97.0% 공기:3.0% CO_2 , 약 96.0% 공기:4.0% CO_2 , 및 약 95.00% 공기: 5.0% CO_2 의 공기: CO_2 혼합물이 생물반응기 또는 광생물반응기로 주입될 수 있다.

[0220] 미세조류 배양액은 스피닝 블레이드 및 임펠러, 배양액의 진동, 교반 바, 가압된 가스의 주입, 및 다른 기계와 같은 장치를 이용하여 혼합될 수 있다.

[0221] 광생물반응기는 가스, 고체, 반고체 및 액체를 미세조류를 함유하는 챔버로 유입시킬 수 있는 포트를 지닐 수 있다. 포트는 일반적으로 튜빙이나 물질을 운반하는 다른 수단에 부착된다. 예를 들어, 가스 포트는 가스를 배양액으로 운반한다. 광생물반응기로의 펌핑 가스는 세포에 CO_2 및 다른 가스를 공급하고 배양액에 산소를 공

급하도록 기능함으로써 탁도를 야기한다. 배양액의 탁도의 양은 숫자로서 변화되고 가스 포트의 위치가 변경된다. 예를 들어, 가스 포트는 원통 폴리에틸렌 백의 바닥을 따라 정위될 수 있다. 미세조류는 CO_2 가 공기에 첨가되어 광생물반응기로 버블링될 때 더욱 빠르게 성장한다. 예를 들어, 5% CO_2 :95% 공기 혼합물을 보트리오코커스(*Botryococcus*) 세포를 함유하는 광생물반응기로 주입시킨다 (예를 들어, *J Agric Food Chem.* 2006 Jun 28;54(13):4593-9; *J Biosci Bioeng.* 1999;87(6):811-5; and *J Nat Prod.* 2003 Jun;66(6):772-8 참조).

[0222] 광생물반응기를 하나 이상의 광원에 노출시켜 미세조류에 광생물반응기의 표면으로 유도된 빛을 통해 에너지원으로서 빛을 제공한다. 바람직하게는 광원이 세포가 성장하기에 충분하나 산화 손상을 야기하거나 광억제 반응을 야기할 정도로 강하지 않은 강도를 제공한다. 일부 경우에, 광원은 태양의 범위를 모방하거나 일주 모방하는 파장 범위를 지닌다. 다른 경우에, 상이한 파장 범위를 이용한다. 광생물반응기를 외부 또는 온실이나 일광이 표면을 때리도록 하는 다른 설비에 둘 수 있다. 보트리오코커스(*Botryococcus*) 속의 종에 대한 바람직한 광자 강도는 25 내지 500 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 이다 (예를 들어 *Photosynth Res.* 2005 Jun;84(1-3):21-7 참조).

[0223] 광생물반응기는 바람직하게는 배지가 유입하도록 하는 하나 이상의 포트를 지닌다. 하나의 물질만이 포트로 들어오거나 나가야 할 필요는 없다. 예를 들어, 포트는 배양 배지가 광생물반응기로 흐르도록 이용된 이후에 샘플링, 가스 유입, 가스 배출, 또는 다른 목적을 위해 이용될 수 있다. 일부 경우에, 광생물반응기를 배양 맨처음에 배양 배지로 채우고 배양액이 접종된 후에 더 이상의 성장 배지가 주입되지 않는다. 바꾸어 말해, 미세조류가 재생되고 수가 증가하는 기간 동안 미세조류 바이오매스를 수성 배지에서 배양시킨다; 그러나 수성 배양 배지의 양은 그 기간을 통털어 광생물반응기를 통해 흐르지 않는다. 따라서, 일부 구체예에서, 수성 배양 배지는 접종 후에 광생물반응기를 통해 흐르지 않는다.

[0224] 다른 경우에, 배양 배지는 미세조류가 재생되고 수가 증가하는 기간을 통털어 광생물반응기를 통해 흐를 수 있다. 일부 구체예에서, 배지는 접종 후에, 그러나 세포가 요망되는 밀도에 도달하기 전에 광생물반응기로 주입된다. 바꾸어 말해, 가스 유입 및 배지 유입의 난류 양상은 상기 미세조류의 수에 있어서 요망되는 증가가 달성될 때까지 미세조류의 재생을 위해 유지되지 않는다.

[0225] 광생물반응기는 바람직하게는 가스가 유입되도록 하는 하나 이상의 포트를 지닌다. 가스는 CO_2 와 같은 영양소를 제공할 뿐 아니라 배양 배지에서 난류를 제공하도록 기능할 수 있다. 난류는 광생물반응기로 들어오는 가스가 배양액의 표면으로 버블링될 수 있도록 가스 유입 포트를 수성 배양 배지의 높이 아래에 정위시킴에 의해 달성될 수 있다. 하나 이상의 가스 배출 포트는 가스가 나오도록 함으로써, 광생물반응기에서 압력 증가를 예방한다. 바람직하게는 가스 배출 포트가, 오염성 미생물이 광생물반응기로 들어오는 것을 막는 "일-원(one-way)" 밸브로 통한다. 일부 경우에, 세포는 미세조류가 재생되고 수가 증가하는 기간 동안 광생물반응기에서 배양되나, 가스 유입에 의해 야기된 배양 배지 전체에 걸친 현저한 난류성 소용돌이를 갖는 난류 양상은 그 기간 내내 유지되지 않는다. 일부 경우에, 가스 유입에 의해 야기된 배양 배지 전체에 걸친 현저한 난류성 소용돌이를 갖는 난류 양상은 미세조류가 재생되고 수가 증가하는 기간 내내 유지될 수 있다. 일부 경우에, 광생물반응기의 규모 및 소용돌이의 규모간에 소정 범위의 비가 미세조류가 재생되고 수가 증가하는 기간 동안 유지되지 않는다. 일부 경우, 그러한 범위가 유지될 수 있다.

[0226] 광생물반응기는 바람직하게는 배양액을 샘플링하기 위해 이용될 수 있는 하나 이상의 포트를 지닌다. 바람직하게는, 샘플링 포트는 배양액의 무균 특성의 손상성을 변경시키지 않으며 반복적으로 이용될 수 있다. 샘플링 포트는 샘플의 흐름이 중단되거나 개시되도록 하는 밸브 또는 기타 장치를 지니도록 구성될 수 있다. 대안적으로, 샘플링 포트는 연속 샘플링을 가능하게 할 수 있다. 광생물반응기는 바람직하게는 배양액의 접종을 가능하게 하는 하나 이상의 포트를 지닌다. 이러한 포트는 배지 또는 가스 유입과 같은 다른 목적으로도 이용될 수 있다.

B. 종속영양 성장

[0228] 상기 개시된 미생물의 광합성 성장에 대안적으로, 일부 미생물은 고정된 탄소원이 성장 및 지질 축적을 위한 에너지를 제공하는 종속영양 성장 조건하에 배양될 수 있다.

[0229] 본 발명에 따른 하나의 종속영양 배양 방법에서, 지질 트랜스에스테르화의 부산물로서 생성된 미정제, 부분 정제, 또는 정제된 글리세롤을, 예를 들어 지질-생성 미생물 배양액을 발효시키기 위한 공급원료로서 적용시킬 수 있다. 따라서, 본 발명은 제1 미생물 배양액에서 미생물 (예컨대, 미세조류)을 배양시키고; 배양액으로부터 미생물 지질을 회수하고; 상기 개시된 대로 미생물 지질을 트랜스에스테르화시켜 지방산 에스테르(들) 및 글리세

률을 생성하고; 글리세롤을 공급원료로서 제2 미생물 배양액에 첨가시키는 것을 포함한다. 제1 및 제2 미생물 배양액은 그럴 필요는 없으나, 동일한 미생물의 배양액일 수 있다. 요망되는 경우, 연속 시스템을 고안할 수 있어서 배양액으로부터 회수된 지질에서 생성된 글리세롤을 동일한 배양액으로 피드백시킬 수 있다.

[0230] 본 발명은 클로렐라(*Chlorella*), 나비쿨라(*Navicula*), 씬데스무스(*Scenedesmus*), 및 스피룰리나(*Spirulina*) 속의 미생물을 포함하는, 진핵 및 원핵 미생물 둘 모두의 다수의 속의 발효를 위한 글리세롤의 이용을 포함하는 현저하게 개선된 배양 파라메터를 제공한다. 실시예에서 입증된 대로, 클로렐라(*Chlorella*), 나비쿨라(*Navicula*), 씬데스무스(*Scenedesmus*), 및 스피룰리나(*Spirulina*) 뿐만 아니라 다른 다수의 클로렐라(*Chlorella*) 종 및 균주의 배양액을 포함하는, 극도로 분기된 진화적 계통의 미생물은 정제된 시약-등급 글리세롤뿐 아니라, 바이오디젤 트랜스에스테르화로부터의 산성화되고 비산성화된 글리세롤 부산물을 상에서도 매우 잘 성장한다. 일부 경우에, 클로렐라(*Chlorella*) 균주와 같은 미세조류는 글루코오스가 존재하는 경우보다 글리세롤이 존재하는 경우에 더 빠르게 세포 분화를 겪는다. 이러한 경우에, 세포 밀도를 신속하게 증가시키도록 세포에 먼저 글리세롤을 공급한 다음 글루코오스를 공급하여 지질을 축적하는 2-단계 성장 공정이 지질이 생성되는 효율을 개선시킬 수 있다. 트랜스에스테르화 공정의 글리세롤 부산물을 이용하는 것은 생성 공정으로 되돌릴 때 상당한 경제적 이익을 제공한다. 글리세롤과 글루코오스의 혼합물과 같은 다른 공급 방법도 제공된다. 이러한 혼합물을 공급하는 것도 동일한 경제적 이익을 획득한다. 또한, 본 발명은 글리세롤을 지니는 다양한 조합물에서 수크로오스와 같은 대안적인 당을 미세조류에 공급하는 방법을 제공한다. 본 발명에 의해 제공된 이러한 이익은 원핵 및 진핵 둘 모두를 포함하는 극도로 분기된 진화적 계통으로부터의 미생물에 대해 본원에서 입증되었는데, 이는 미생물 발효를 위한 본 발명의 유용성을 입증하는 것이다.

[0231] 클로렐라 프로토테코이드(*Chlorella protothecoides*)의 성장 및 번식을 위한 표준 방법이 공지되어 있다 (예를 들어, Miao and Wu, *J. Biotechnology*, 2004, 11: 85-93 and Miao and Wu, *Biosource Technology* (2006) 97:841-846 참조). 본 발명은 또한 클로렐라(*Chlorella*)에 대한 신규한 성장 조건을 제공한다. 예를 들어, 클로렐라(*Chlorella*)의 다수의 종 및 종 내에 있는 다수의 균주를 바이오디젤 트랜스에스테르화로부터의 글리세롤 부산물을 포함하는, 글리세롤의 존재하에 성장시킬 수 있다.

[0232] 탄화수소 생성을 위해, 본원에 개시된 본 발명의 재조합 세포를 포함하는 세포를 바람직하게는 다량으로 배양하거나 발효시킨다. 배양은 예로서 혼탁 배양액에서와 같이 큰 액체 부피일 수 있다. 다른 예는 세포 성장 및 번식과 협력하여 큰 바이오매스로 증량되는 세포의 소형 배양뿐만 아니라 탄화수소 생성으로 시작하는 것을 포함한다. 생물반응기 또는 강철 발효기를 이용하여 큰 배양 부피를 수용할 수 있다. 맥주 및/또는 와인의 생성에 이용되는 것과 유사한 발효기가 적합한데, 그 이유는 이것이 에탄올의 생성에 이용되는 매우 큰 발효기이기 때문이다.

[0233] 발효기에서의 배양을 위한 적합한 영양소원이 제공된다. 이에는 하기 중 하나 이상과 같은 원료 물질이 있다: 고정된 탄소원, 예컨대 글루코오스, 옥수수 전분, 탈중합된 셀룰로직 물질, 수크로오스, 사탕수수, 사탕무, 락토오스, 유청, 또는 당밀; 지방원, 예컨대 지방 또는 식물성유; 질소원, 예컨대 단백질, 대두박, 콘스텝 리커(cornsteep liquor), 암모니아 (순수하거나 염 형태), 니트레이트 또는 니트레이트 염, 또는 분자 질소; 및 인공급원, 예컨대 포스페이트 염, 추가로, 발효기는 온도, pH, 산소 장력 및 이산화탄소 수준과 같은 배양 조건의 조절을 허락한다. 임의로, 산소 또는 질소와 같은 가스상 성분을 액체 배양액을 통해 버블링시킬 수 있다. 밀, 감자, 쌀 및 수수와 같은 다른 전분(글루코오스)원이 있다. 다른 탄소원으로는 공업용급 글리세롤과 같은 공정류(process stream), 흑액, 아세테이트와 같은 유기산 및 당밀이 있다. 탄소원은 혼합물로서도 제공될 수 있는데, 예컨대 수크로오스와 탈중합된 사탕무 펄프의 혼합물이 있다.

[0234] 발효기는 세포가 이들의 성장 주기의 다양한 단계를 겪도록 이용될 수 있다. 예로서, 탄화수소-생성 세포의 접종물이 배지에 도입된 후, 세포가 성장을 시작하기 전에 지연기(lag period)에 도입될 수 있다. 지연기 이후에, 성장 속도는 꾸준히 증가하여 로그기 (log phase) 또는 대수증식기 (exponential phase)로 들어간다. 대수증식기 이후에 영양소의 감소 및/또는 독성 물질의 증가로 인해 다시 성장 속도가 느려진다. 이렇게 느려진 후, 성장이 중단되고, 세포는 세포에 제공되는 특정 환경에 따라 고정기 (stationary phase) 또는 안정기 (steady state)로 들어간다.

[0235] 본원에 개시된 세포에 의한 탄화수소 생성은 로그기 또는 영양소가 공급되거나 여전히 이용가능한 고정기를 포함하는 그 이후에 일어날 수 있어서, 세포 분열의 부재하에서도 탄화수소의 생성이 지속되게 한다.

[0236] 바람직하게는, 본원에 개시되고 당 분야에 공지된 조건을 이용하여 성장한 미생물은 적어도 약 20 중량%의 지질, 바람직하게는 적어도 약 40 중량%, 보다 바람직하게는 적어도 약 50 중량%, 및 가장 바람직하게는 적어도

약 60 중량%의 지질을 포함한다.

[0237] 다수의 종, 및 클로렐라(*Chlorella*)의 종 내에 있는 다수의 균주가 트랜스에스테르화로부터의 글리세롤 부산물의 존재하에, 당량의 시약 등급 글리세롤의 존재하에서보다 더 잘 작용한다는 것은 놀라운 발견이다. 트랜스에스테르화로부터의 글리세롤 부산물은 일반적으로 글리세롤 이외에 잔류하는 메탄올 및 기타 오염물질을 함유한다. 예를 들어, 도 1-6은 클로렐라 프로토테코이드(*Chlorella protothecoides*) 및 클로렐라 케슬러리(*Chlorella kessleri*)의 균주가 지질 트랜스에스테르화 반응으로부터의 산성화되고 비산성화된 글리세롤 부산물에 대해 순수한 시약 등급 글리세롤 상에서 성질할 때보다 더 양호한 생산성을 나타냄을 입증한다. 씬데스무스(*Scenedesmus*) 및 나비쿨라(*Navicula*) 미세조류와 같은 다른 미생물도 트랜스에스테르화로부터의 글리세롤 부산물의 존재하에, 당량의 시약 등급 글리세롤의 존재하에서보다 더 양호하게 작용할 수 있다.

[0238] 리터 당 건조 세포 중량: 도 1은 바이오디젤 글리세롤 부산물에 대한 건조 세포 중량이 순수한 글리세롤보다 더 높았고, 이러한 경향이 세포가 글리세롤에서만 성장되거나 글루코오스와 조합하여 성장될 때 그대로 유지됨을 입증한다. 도 2는 클로렐라(*Chlorella*)의 추가의 균주들에서의 동일한 경향을 나타낸다. 도 12(b)는 씬데스무스 아르마투스(*Scenedesmus armatus*)의 리터 당 건조 세포 중량이 순수한 시약 등급 글리세롤보다 산성화되고 비산성화된 바이오디젤 부산물 글리세롤 상에서 더 높음을 입증한다.

[0239] 리터 당 지질 함량: 도 3 및 4는 클로렐라(*Chlorella*)의 다수의 종 및 클로렐라(*Chlorella*)의 종 내에 있는 다수의 균주에서, 리터 당 지질 수준은, 세포가 동등한 농도의 순수한 시약 등급 글리세롤의 존재하에 배양될 때보다 바이오디젤 글리세롤 부산물의 존재하에 배양될 때 더 높음을 입증한다.

[0240] 세포 중량의 비율로서의 지질: 도 5 및 6은 클로렐라(*Chlorella*)의 다수의 종 및 클로렐라(*Chlorella*)의 종 내에 있는 다수의 균주가 동등한 농도의 순수한 시약 등급 글리세롤의 존재하에 배양될 때보다 바이오디젤 글리세롤 부산물의 존재하에 배양될 때 건조 세포 중량의 더 높은 비율을 지질로서 축적시킴을 입증한다. 도 11은 스피룰리나 플라텐시스(*Spirulina platensis*) 및 나비쿨라 펠리콜로사(*Navicula pelluculosa*) 둘 모두가 동등한 농도의 순수한 시약 등급 글리세롤의 존재하에 배양될 때보다 바이오디젤 글리세롤 부산물의 존재하에 배양될 때 건조 세포 중량의 더 높은 비율을 지질로서 축적시킬 수 있음을 입증한다. 도 12(a)는 씬데스무스 아르마투스(*Scenedesmus armatus*)가 동등한 농도의 순수한 시약 등급 글리세롤의 존재하에 배양될 때보다 바이오디젤 글리세롤 부산물의 존재하에 배양될 때 건조 세포 중량의 더 높은 비율을 지질로서 축적시킬 수 있음을 입증한다.

[0241] 또 다른 놀라운 결과는 클로렐라(*Chlorella*)와 같은 미세조류 및 클로렐라(*Chlorella*) 종 내에 있는 다수의 균주, 및 씬데스무스(*Scenedesmus*), 나비쿨라(*Navicula*), 및 스피룰리나(*Spirulina*)와 같은 다른 미세조류를 포함하는 미생물의 다수의 종이 글루코오스만이 존재하는 것에 의해 글리세롤과 글루코오스의 혼합물이 존재하는 경우에 바이오디젤 생산자로서 더 양호한 특성을 나타낸다는 것이다.

[0242] 리터 당 지질 함량: 도 7은 2% 글루코오스가 존재하는 경우보다 1% 글리세롤/1% 글루코오스가 존재하는 경우에 클로렐라(*Chlorella*)가 배양액의 리터 당 더 높은 수준의 지질을 축적할 수 있음을 입증한다.

[0243] 리터 당 건조 세포 중량: 도 12(b)는 씬데스무스 아르마투스(*Scenedesmus armatus*)의 리터 당 건조 세포 중량이 2% 글루코오스가 존재하는 경우보다 1% 바이오디젤 부산물 글리세롤/1% 글루코오스의 존재하에 배양될 때 더 높다는 것을 입증한다. 도 13은 나비쿨라 펠리콜로사(*Navicula pelluculosa*)의 리터 당 건조 세포 중량이 2% 글루코오스가 존재하는 경우보다 1% 바이오디젤 부산물 글리세롤/1% 글루코오스의 존재하에 배양될 때 더 높다는 것을 입증한다.

[0244] 세포 중량의 비율로서의 지질: 도 8은 클로렐라(*Chlorella*)가 글루코오스만을 존재시켜 배양될 때보다 동일한 농도 (중량%) 혼합물의 글리세롤과 글루코오스의 존재하에 배양될 때 건조 세포 중량의 더 높은 비율을 지질로서 축적시킬 수 있음을 입증한다. 도 11(a)는 스피룰리나 플라텐시스(*Spirulina platensis*)가 글루코오스만을 존재시켜 배양될 때보다 동일한 농도 (중량%) 혼합물의 시약 등급 글리세롤과 글루코오스뿐만 아니라 바이오디젤 부산물 글리세롤과 글루코오스의 존재하에 배양될 때 건조 세포 중량의 더 높은 비율을 지질로서 축적시킬 수 있음을 입증한다. 도 11(b)는 나비쿨라 펠리콜로사(*Navicula pelluculosa*)가 글루코오스만을 존재시켜 배양될 때보다 동일한 농도 (중량%) 혼합물의 시약 등급 글리세롤과 글루코오스뿐만 아니라 바이오디젤 부산물 글리세롤과 글루코오스의 존재하에 배양될 때 건조 세포 중량의 더 높은 비율을 지질로서 축적시킬 수 있음을 입증한다. 도 12(b)는 씬데스무스 아르마투스(*Scenedesmus armatus*)가 글루코오스만을 존재시켜 배양될 때보다 동일한 농도 (중량%) 혼합물의 바이오디젤 부산물 글리세롤과 글루코오스의 존재하에 배양될 때 건조 세포 중량의 더 높은 비율을 지질로서 축적시킬 수 있음을 입증한다.

- [0245] 추가의 예상치못한 발견은 글리세롤과 글루코오스를 클로렐라(*Chlorella*), 씬데스무스(*Scenedesmus*), 및 나비쿨라(*Navicula*)와 같은 미세조류를 포함하는 미생물에 글리세롤과 글루코오스의 단일 회분 혼합물로서가 아니라 순차적으로 첨가하는 것이 추가의 수율 증가를 생성할 수 있다는 것이다. 클로렐라(*Chlorella*)의 다수의 종 및 클로렐라(*Chlorella*)의 종 내에 있는 다수의 균주의 이러한 속성을 바이오디젤 글리세롤 부산물 및 시약 등급 글리세롤 둘 모두의 존재하에 시험하였다.
- [0246] 세포 중량의 비율로서의 지질: 도 8은 클로렐라(*Chlorella*)가 동일한 양의 글리세롤과 글루코오스를 실험 초기에 함께 첨가할 때보다 글리세롤을 제1 기간 동안 배양액에 첨가한 다음 글루코오스를 첨가하고 제2 기간 동안 배양을 지속했을 때 건조 세포 중량의 더 높은 비율을 지질로서 측정할 수 있음을 입증한다.
- [0247] 리터 당 지질 함량: 도 9는 클로렐라(*Chlorella*)가 동일한 양의 글리세롤과 글루코오스를 실험 초기에 함께 첨가할 때보다 글리세롤과 글루코오스를 순차적으로 첨가할 때 배양액의 리터 당 높은 수준의 지질을 나타냄을 도시한다. 이러한 경향은 산성화된 바이오디젤 부산물 글리세롤, 비산성화된 바이오디젤 부산물 글리세롤 또는 시약 등급 글리세롤을 이용할 때 관찰되었다.
- [0248] 리터 당 건조 세포 중량: 도 10은 동일한 양의 글리세롤과 글루코오스를 실험 초기에 함께 첨가할 때보다 글리세롤과 글루코오스를 순차적으로 첨가할 때 배양액의 리터 당 더 높은 건조 세포 중량을 측정시키는 두 상이한 종의 클로렐라(*Chlorella*)의 네 상이한 균주를 나타낸다. 이러한 경향은 산성화된 바이오디젤 부산물 글리세롤, 비산성화된 바이오디젤 부산물 글리세롤 또는 시약 등급 글리세롤을 이용할 때 관찰되었다. 도 14(a) 및 (b)는 씬데스무스 아르마투스(*Scenedesmus armatus*) 및 나비쿨라 펠리쿨로사(*Navicula pelluculosa*)가 동일한 양의 글리세롤과 글루코오스를 실험 초기에 함께 첨가할 때보다 바이오디젤 부산물 글리세롤만을 제1 기간 동안 배양액에 첨가하고 이후 글루코오스를 첨가할 때 리터 당 건조 세포 중량의 증가를 나타낼 수 있음을 입증한다.
- [0249] 미생물 지질 생성에 있어서, 세 상이한 마커의 생산성 (리터 당 건조 세포 중량, 지질의 리터 당 그램, 및 건조 세포 중량의 지질로서의 비율)이 바이오디젤 부산물의 이용 및 탄소원의 일시적인 분리에 의해 개선된다. 따라서, 본 발명은 원핵 및 진핵생물 둘 모두를 포함하는, 진화 나무의 고도로 분기된 영역으로부터의 미생물의 다수의 종에서 단위 시간 당 더 높은 양의 지질을 생성하는 신규한 방법을 제공한다. 글리세롤을 이용하는 본원에 개시된 지질 및 탄화수소의 제조 방법은 미세조류에 한정되지 않으며 글리세롤을 에너지원으로서 이용할 수 있는 임의의 미생물에 대해 이용될 수 있다.
- [0250] 본 발명에 따른 대안적인 종속영양 성장 방법에서, 미생물을 탈중합된 셀룰로직 바이오매스를 공급원료로서 이용하여 배양할 수 있다. 셀룰로직 바이오매스 (예컨대, 옥수수대와 같은 여물)는 저렴하며 용이하게 이용할 수 있다; 그러나, 효모에 대해 이러한 물질을 공급원료로서 이용하려는 시도는 실패하였다. 특히, 이러한 공급원료는 효모 성장을 억제하는 것으로 밝혀졌고, 효모는 셀룰로직 물질로부터 생성된 5-탄소당을 이용할 수 없다 (예컨대, 반-셀룰로오스로부터의 크실로오스). 대조적으로, 미세조류는 가공된 셀룰로직 물질 상에서 성장할 수 있다. 따라서, 본 발명은 셀룰로직 물질 및/또는 5-탄소당의 존재하에 미세조류를 배양시키는 방법을 제공한다. 셀룰로오스 물질은 일반적으로 하기를 포함한다:
- | [0251] | 성분 | 건조 중량% |
|--------|--------|--------|
| [0252] | 셀룰로오스 | 40-60% |
| [0253] | 반셀룰로오스 | 20-40% |
| [0254] | 리그닌 | 10-30% |
- [0255] 적합한 셀룰로직 물질은 초본 및 목질 에너지 작물뿐만 아니라, 농작물, 즉 식물 부분, 본래 식품 또는 섬유 생성물의 산지로부터 이동하지 않은 주로 줄기 및 잎으로부터의 찌꺼기를 포함한다. 예로는 농업 폐기물, 예컨대 사탕수수 벼개스, 쌀겨, 옥수수 섬유 (줄기, 잎, 껌데기, 및 속 포함), 밀짚, 쌀짚, 사탕무 펄프, 감귤 펄프, 감귤껍질; 산림 폐기물, 예컨대 활엽수 및 침엽수 간벌, 및 벌채 작업으로부터의 활엽수 및 침엽수 잔여물; 나무 폐기물, 예컨대 제재 폐기물 (나무 조각, 텁질먼지) 및 펄프 밀 폐기물; 도시 폐기물, 예컨대 도시 고형 폐기물의 종이 과편, 도시 나무 폐기물 및 도시 그린 폐기물, 예컨대 도시 잔디 깍기; 및 목조 폐기물이 있다.
- [0256] 추가의 셀룰로직으로는 스위치그래스, 하이브리드 포플러 나무, 및 억새와 같은 전용 셀룰로직 수확물, 섬유 케인(cane) 및 섬유 수수가 있다. 이러한 물질로부터 생성된 5-탄소당은 크실로오스를 포함한다.
- [0257] 놀랍게도, 클로렐라(*Chlorella*)의 일부 종은 본원에서 단독의 글루코오스 또는 크실로오스 상에서 배양될 때보

다 글루코오스와 크실로오스의 조합물 상에서 배양될 때 더 높은 수준의 생산성을 나타내는 것으로 나타났다. 이러한 상승적인 효과는 셀룰로직 물질과 같은 크실로오스와 글루코오스의 조합물 상에서 클로렐라(*Chlorella*)의 배양을 가능하게 하는 현저한 이익을 제공하며, 이는 도 15에 도시되어 있다.

[0258] 상기 개시된 방법들과 임의로 조합하여 사용될 수 있는 본 발명에 따른 여전히 또 다른 대안적인 종속영양 성장 방법에서, 일례로 사탕수수 또는 사탕무로부터 생성된 수크로오스를 공급원료로서 이용한다. 하기 "미생물 공학처리"라는 제목의 섹션에 더욱 상세하게 개시된 대로, 지질 생성은 탄소원으로서 수크로오스를 이용하는 클로렐라(*Chlorella*)와 같은 미생물의 공학처리를 통해 촉진되거나 더욱 효율적으로 수행될 수 있다. 예를 들어, 수크로오스 운반체 및 수크로오스 전화효소의 발현은 클로렐라(*Chlorella*)가 수크로오스를 배양 배지로부터 세포로 운반하여 수크로오스를 가수분해함으로써 글루코오스와 프리토오스를 산출할 수 있게 한다. 임의로, 프리토키나아제는 내인성 헥소키나아제 활성이 프리토오스의 인산화를 최대화하기에 충분하지 않은 경우에도 발현될 수 있다. 적합한 수크로오스 운반체의 예는 젠뱅크(Genbank) 수탁 번호 CAD91334, CAB92307, 및 CAA53390이다. 적합한 수크로오스 전화효소의 예는 젠뱅크 수탁 번호 CAB95010, NP_012104 및 CAA06839이다. 적합한 프리토키나아제의 예는 젠뱅크 수탁 번호 P26984, P26420 및 CAA43322이다. 이러한 유전자 중 하나 이상을 엔코딩하는, 클로렐라(*Chlorella*)를 포함하는 미세조류의 형질전환을 위한 벡터는 본원에 개시된 대로 설계될 수 있다.

[0259] 수크로오스 전화효소의 분비는 수크로오스를 세포로 운반할 수 있는 운반체의 발현에 대한 요구를 피할 수 있다. 이것은 분비된 전화효소가 수크로오스의 분자를 글루코오스 분자 및 프리토오스 분자로 전환하는 것을 촉매화하기 때문인데, 이들 두 분자 모두는 본원에 개시된 미생물에 의해 운반되고 이용될 수 있다. 예를 들어, 분비 시그널 (예컨대, 서열번호 15(효모로부터), 서열번호 16(고등 식물로부터), 서열번호 17(진핵 컨센서스 분비 시그널), 및 서열번호 18(고등 식물 및 진핵 컨센서스로부터의 시그널 서열의 조합)의 서열)을 지니는 수크로오스 전화효소 (예컨대 서열번호 14)의 발현은 세포 외부에 전화효소 활성을 발생시킨다. 예를 들어 클로렐라(*Chlorella*)에서 활성인 분비 시그널은 문헌[Hawkins et al., Current Microbiology Vol. 38 (1999), pp. 335-341]을 참조한다. 본원에 개시된 유전자 공학처리 방법에 의해 가능한 이러한 단백질의 발현은 세포가 이미 세포외 글루코오스를 에너지원으로서 이용할 수 있어서 수크로오스를 세포외 에너지원으로 이용하게 한다. 본원에서 입증된 대로 세포외 프리토오스 및 세포외 글루코오스 둘 모두를 에너지원으로서 이용할 수 있는 클로렐라 프로토테코이드(*Chlorella protothecoides*), 클로렐라 미누티시마(*Chlorella minutissima*), 및 클로렐라 에메르소니이(*Chlorella emersonii*)와 같은 세포에서, 전화효소의 분비는 효율적이고 저렴한 에너지원으로서 수크로오스를 이용하는데 필요한 유일한 촉매적 활성을 제공할 수 있다.

[0260] 예를 들어, 도 26에 도시된 대로, 클로렐라 프로토테코이드(*Chlorella protothecoides*)는 세 개의 프로모터 (코올리플라위 모자이크 바이러스 35S 프로모터 (CMV), 클로렐라 바이러스 프로모터 (CV), 또는 클로렐라 HUP1 프로모터 (HUP1)) 중 하나의 조절 제어하에 수크로오스 전화효소 유전자로 공학처리될 수 있다. 본 실시예에 이용된 수크로오스 전화효소 유전자는 *C. protothecoides* (*C. protothecoides*) 코돈 이용을 최적화하기 위한 *S. cerevisiae* (*S. cerevisiae*) SUC2 유전자로의 변형을 포함한다. 최적화된 유전자의 cDNA 및 아미노산 서열은 각각 서열번호 8 및 서열번호 19에 상응한다. 형질전환에 사용된 플라스미드 구성물의 도해는 도 25에 제시된다. 본원에 개시된 것과 같은 분비될 수 있는 수크로오스 전화효소의 발현은 당밀, 사탕수수 쥬스, 및 세포 발효를 위한 다른 수크로오스-함유 공급원료의 이용을 가능하게 한다.

[0261] 유사하게, 도 27 및 28은 각각 CMV 프로모터의 조절하에 *S. cerevisiae*로부터의 수크로오스 전화효소 유전자를 이용한 클로렐라 프로토테코이드(*Chlorella protothecoides*)와, 클로렐라 미누티시마 (*Chlorella minutissima*) 및 클로렐라 에메르소니이(*Chlorella emersonii*)의 형질전환 결과를 도시한다.

[0262] 분비될 수 있는 외인성 수크로오스 전화효소를 발현시키는 미생물의 성장 가능성이, 실시예에 추가로 상세하게 개시된 대로, 전화효소를 클로렐라 프로토테코이드(*Chlorella protothecoides*)의 배양 배지에 첨가함에 의해 예시된다. 도 23 및 24는 클로렐라(*Chlorella*) 세포가 순수한 시약-등급 글루코오스 상에서 성장하는 것과 같이 사탕수수 가공으로부터의 폐기 당밀에서도 성장하는 놀라운 결과를 예시한다; 사탕수수 가공의 이러한 저가 폐기 생성물의 이용은 탄화수소 및 기타 오일의 생성에 있어서 상당한 비용 절감을 제공할 수 있다. 당밀은 다수의 미생물에게 유해하고 이들의 성장을 저지시키는 리그닌 및 다른 셀룰로직 폐기 생성물을 함유하나, 클로렐라 (*Chlorella*) 세포는 이러한 독물질의 존재하에서 잘 자라는 것이 발견되었다. 도 23-24는 세포외 수크로오스 전화효소의 존재 또는 부재하에 글루코오스 또는 수크로오스 상에서의 성장과 비교하여, 당밀의 독특한 세 공급원 (BS1, BS2 및 HTM으로 지정됨) 상에서의 세포의 성장을 도시한다.

[0263] 대안적으로, 수크로오스 전화효소는 수크로오스가 세포로 들어가게 하는 임의의 탄수화물 운반체를 발현시키는 세포에서는 물론 수크로오스 운반체를 발현시키는 세포에서 세포내 발현될 수 있다.

[0264] 외래 유전자는 실시예 12에 개시된 대로 클로렐라 프로토테코이드(*Chlorella protothecoides*)로 형질전환되고 발현되었다. 수크로오스 이용 효소의 발현은 동일하거나 유사한 방법 및 벡터 설계를 이용하여 수립될 수 있다.

[0265] 생물반응기를 종속영양 성장 방법에 사용하기 위해 적용시킬 수 있다. 이해되는 바와 같이, 광합성 성장 방법에서 세포에 이용가능한 빛을 형성하기 위해 만들어진 규정은 본원에 개시된 종속영양 성장 방법에서 고정된-탄소원을 이용할 때에는 불필요하다.

[0266] 본원에 개시된 공정 조건 및 종속영양 성장 방법의 특정 예를 임의의 적합한 수단과 조합시켜 미생물 성장 및 지질 생성의 효율을 개선시킬 수 있다. 또한, 본 발명은 상기 개시된 방법에 사용하기에 더욱 적합한 미생물을 제공하기 위해 미세조류와 같은 미생물의 선택 및/또는 유전적 공학처리를 포함한다. 예를 들어, 증가된 증식 및/또는 지질 (예컨대 지방산) 생성을 위해 상기 개시된 임의의 공급원료를 사용하는 능력이 보다 큰 미생물이 본 발명의 범위 내에 있다.

C. 혼합영양 성장

[0268] 혼합영양 성장은 세포를 성장시키고 탄화수소를 생성하는 에너지원으로서 빛과 고정된 탄소원(들) 둘 모두를 사용한다. 혼합영양 성장은 광생물반응기에서 수행될 수 있다. 미세조류는 다양한 유형의 투명하거나 반투명한 재료로 된 밀폐된 광생물반응기에서 성장하고 유지될 수 있다. 이러한 물질은 플렉시글라스®(Plexiglas) 봉입체, 유리 봉입체, 폴리에틸렌과 같은 물질로 제조된 백, 투명하거나 반투명한 파이프, 및 기타 물질을 포함할 수 있다. 미세조류는 수로형 연못, 침전지, 및 다른 비-엔클로징된 컨테이너와 같은 개방 광생물반응기에서 성장하고 유지될 수 있다.

D. 성장 배지

[0270] 본 발명의 방법에 따라 유용한 미생물은 전 세계적으로 다양한 장소 및 환경에서 발견된다. 이들이 다른 종으로부터 단리되고 진화적 분기를 초래한 결과, 지질 및/또는 탄화수소 구성성분의 최적의 성장 및 생성을 위한 특정 성장 배지는 예측하기 어려울 수 있다. 일부 경우에, 미생물의 특정 균주는 일부 억제 성분의 존재로 인해 또는 미생물의 특정 균주에 의해 요구되는 몇몇 필수 영양 요건의 부재로 인해 특정 성장 배지 상에서 성장할 수 없을 수 있다.

[0271] 고체 및 액체 성장 배지는 일반적으로 광범한 범위의 공급원으로부터 이용가능하고, 미생물의 광범하게 다양한 균주에 적합한 특정 배지를 제조하기 위한 지시는, 예를 들어 하기에서 온라인으로 찾아볼 수 있다 (<http://www.utex.org/>, a site maintained by the University of Texas at Austin for its culture collection of algae (UTEX)). 예를 들어, 다양한 담수 및 염수 배지는 하기 표 4에 도시된 것들을 포함한다.

표 4. 예시적인 조류 배지

담수 배지	염수 배지
1/2 CHEV 이원자 배지	1% F/2
1/3 CHEV 이원자 배지	1/2 부화된 해수 배지
1/5 CHEV 이원자 배지	1/2 Erdschreiber 배지
1:1 DYIII/PEA + Gr+	1/2 토양+해수 배지
2/3 CHEV 이원자 배지	1/3 토양+해수 배지

[0273]

<u>2X CHEV 이원자 배지</u>	1/4 ERD
<u>Ag 이원자 배지</u>	1/4 토양 + 해수 배지
<u>Allen 배지</u>	1/5 토양 + 해수 배지
<u>BG11-1 배지</u>	2/3 부화된 해수 배지
<u>Bold 1NV 배지</u>	20% Allen + 80 % ERD
<u>Bold 3N 배지</u>	2X Erdreich's 배지
<u>보트리오코커스 배지</u>	2X 토양 + 해수 배지
<u>Bristol 배지</u>	5% F/2 배지
<u>CHEV 이원자 배지</u>	S/3 토양 + 해수 아가 배지
<u>Chu's 배지</u>	인공 해수 배지
<u>CR1 이원자 배지</u>	BG11-1 + .36% NaCl 배지
<u>CR1+ 이원자 배지</u>	BG11-1 + 1% NaCl 배지
<u>CR1-S 이원자 배지</u>	Bold 1NV: Erdreich (1:1)
<u>시아니디움 배지</u>	Bold 1NV: Erdreich (4:1)
<u>Cyanophycean 배지</u>	Bristol-NaCl 배지
<u>Desmid 배지</u>	Dasycladales 해수 배지
<u>DYIII 배지</u>	부화된 해수 배지
<u>유클레나 배지</u>	Erdreich's 배지
<u>HEPES 배지</u>	ES/10 부화된 해수 배지
<u>J 배지</u>	ES/2 부화된 해수 배지
<u>Malt 배지</u>	ES/4 부화된 해수 배지
<u>MES 배지</u>	F/2 배지
<u>변형된 Bold 3N 배지</u>	F/2+NH4
<u>변형된 COMBO 배지</u>	LDM 배지
<u>N/20 배지</u>	변형된 2 X CHEV
<u>오크로모나스 배지</u>	변형된 2 X CHEV + 토양
<u>P49 배지</u>	변형된 인공 해수 배지
<u>풀리토엘라 배지</u>	변형된 CHEV
<u>프로테오스 배지</u>	포르피리디움 배지
<u>설조류 배지</u>	토양 + 해수 배지
<u>토양 추출 배지</u>	SS 이원자 배지
<u>토양수 : BAR 배지</u>	
<u>토양수 : GR- 배지</u>	
<u>토양수 : GR-/NH4 배지</u>	
<u>토양수 : GR+ 배지</u>	
<u>토양수 : GR+/NH4 배지</u>	
<u>토양수 : PEA 배지</u>	
<u>토양수 : Peat 배지</u>	
<u>토양수 : VT 배지</u>	
<u>스파클리나 배지</u>	
<u>Tap 배지</u>	
<u>Trebouxia 배지</u>	
<u>Volvocacean 배지</u>	
<u>Volvocacean-3N 배지</u>	
<u>Volvox 배지</u>	
<u>Volvox- 텍스트로오스 배지</u>	
<u>Waris 배지</u>	
<u>Waris+ 토양 추출 배지</u>	

[0274]

특정 예에서, 클로렐라 프로토테코이드(*Chlorella protothecoides*) (UTEX 31)를 배양하기에 적합한 배지는 프로테오스 배지를 포함한다. 이 배지는 무균 배양에 적합하고, 1g의 프로테오스 웨톤을 1 리터의 브리스톨 배지에 첨가함에 의해 1L 부피의 배지 (pH ~6.8)가 제조될 수 있다. 브리스톨 배지는 2.94 mM의 NaNO_3 , 0.17 mM의 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.3 mM의 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.43 mM, 1.29 mM의 KH_2PO_4 , 및 1.43 mM의 NaCl을 수용액으로 포함한다. 1.5% 아가 배지의 경우, 15g의 아가를 1L의 용액에 첨가할 수 있다. 용액을 덮고 오토클레이빙한 다음, 사용 전에 냉각된 온도에서 저장한다.

[0276]

본 발명의 방법에 사용하기 적합한 다른 배지는 상기 확인된 URL을 참고하거나, SAG, CCAP, 또는 CCALA와 같은 미생물의 배양액을 보유하는 다른 조직을 참고함에 의해 용이하게 규명될 수 있다. SAG는 고팅겐 유니버시티의 컬쳐 콜렉션 오브 앤게 (Göttingen, Germany)를 나타내고, CCAP는 스코티시 어소시에이션 포 며린 사이언스 (Scotland, United Kingdom)에 의해 관리되는 조류 및 원생동물의 컬쳐 콜렉션을 나타내며, CCALA는 인스티튜트 오브 바티니의 조류 실험실의 컬쳐 콜렉션을 나타낸다 (Trebon, Czech Republic).

E. 지질 수율의 증가

공정 조건을 조정하여 특정 용도에 적합한 지질 수율을 증가시키고/거나 생산 비용을 감소시킬 수 있다. 예를 들어, 특정 구체예에서, 미생물 (예컨대, 미세조류)를 제한된 농도의 하나 이상의 영양소, 예컨대 탄소 및/또는

질소, 인 또는 황의 존재하에 글루코오스와 같은 과량의 고정된 탄소 에너지를 제공하면서 배양한다. 질소 제한은 질소가 과량으로 제공된 배양액에서의 미생물 지질 수율에 비해 미생물의 지질 수율을 증가시키는 경향이 있다. 특정 구체예에서, 지질 수율의 증가는 적어도 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 75%, 100%, 200%, 300%, 400%, 또는 500%이다. 미생물은 총 배양 기간의 일부 동안이나 전체 기간 동안 제한된 양의 영양소의 존재하에 배양될 수 있다. 특정 구체예에서, 영양소 농도는 총 배양 기간 동안 적어도 2회의 제한된 농도와 비제한된 농도로 순환된다.

[0279] 지질 수율을 증가시키기 위해, 아세트산을 지질-생성 미생물 (예컨대 미세조류)을 위한 공급원료에 적용시킬 수 있다. 아세트산은 지방산 합성 (즉, 아세틸-CoA)을 개시하는 대사 시점에 직접 공급되므로; 배양액에 아세트산을 제공하는 것은 지방산 생성을 증가시킬 수 있다. 일반적으로, 미생물을 충분한 양의 아세트산의 존재하에 배양시켜, 특히, 아세트산의 부재하에서의 미생물의 지질(예컨대, 지방산) 수율에 비해 미생물의 지질 수율 및/또는 미생물의 지방산 수율을 증가시킨다.

[0280] 또 다른 구체예에서, 지질 수율은 지질 경로 효소(예컨대, 지방산 합성 효소)에 대한 하나 이상의 공동인자(들)의 존재하에 지질-생성 미생물(예컨대, 미세조류)을 배양함에 의해 증가된다. 일반적으로, 공동인자(들)의 농도는 공동인자(들)의 부재하에서의 미생물의 지질 수율에 비해 미생물의 지질 (예컨대, 지방산) 수율을 증가시키기에 충분한다. 특정 구체예에서, 공동인자(들)을 엔코딩하는 외인성 유전자를 함유하는 미생물(예컨대, 미세조류)을 배양액에 포함시킴에 의해 공동인자(들)가 배양액에 제공된다. 대안적으로, 공동인자(들)는 공동인자의 합성에 참여하는 단백질을 엔코딩하는 외인성 유전자를 함유하는 미생물 (예컨대, 미세조류)를 포함시킴에 의해 배양액에 제공될 수 있다. 특정 구체예에서, 적합한 공동인자는 지질 경로 효소에 의해 요구되는 임의의 비타민, 예를 들어 비오틴, 판토테네이트를 포함한다. 본 발명에 사용하기 적합한 공동인자를 엔코딩하거나 이러한 공동인자의 합성에 참여하는 유전자가 널리 공지되어 있고 상기 개시된 것들과 같은 기술 및 구성물을 이용하여 미생물 (예컨대, 미세조류)에 도입될 수 있다.

V. 지질 경로 공학처리

[0282] 본 발명의 일부 구체예에서, 본 발명의 미생물은 생성된 지질의 특성 및/또는 비율을 변경시키고/거나 지질로의 탄소 흐름을 증가시키도록 변형된다. 이 경로는 추가로 또는 대안적으로 지질의 효소적 가공을 통해 생성된 다양한 탄화수소 분자의 특성 및/또는 비율을 변경시키도록 변형될 수 있다.

A. 생성된 지질이나 탄화수소의 특성 또는 비율의 변경

[0284] 미세조류의 경우, 일부 야생형 세포는 이미 양호한 성장 특성을 지니고 있으나 요망되는 유형 또는 양의 지질을 생성하지 않는다. 예로는 피로보트리스(*Pyrobotrys*), 포르미디움(*Phormidium*), 아그메넬룸(*Agmenellum*), 카르테리아(*Carteria*), 레포신클리스(*Lepocinclis*), 피로보트리스(*Pyrobotrys*), 니츠슈이아(*Nitzschia*), 레포신클리스(*Lepocinclis*), 아나바에나(*Anabaena*), 유글레나(*Euglena*), 스피로기라(*Spirogyra*), 클로로코쿰(*Chlorococcum*), 테트라에드론(*Tetraedron*), 오실라토리아(*Oscillatoria*), 파거스(*Phagus*), 및 클로로고니움(*Chlorogonium*)이 있고, 이들은 도시 하수 또는 폐수에서 성장하는 요망되는 성장 특성을 지닌다. 클로렐라(*Chlorella*) 및 다른 미생물의 종 뿐만 아니라 이러한 세포도 개선된 지질 생성 특성을 지니도록 공학처리될 수 있다. 요망되는 특성은 단위 부피 및/또는 단위 시간 당 지질 수율의 최적화, 탄소 사슬 길이 (예컨대, 탄화수소 공급원료를 필요로 하는 바이오디젤 생성 또는 산업 적용을 위해)의 최적화, 이중 또는 삼중 결합 수의 감소, 임의로 0까지 감소, 고리 및 시클릭 구조의 제거 또는 배제, 및 지질이나 다른 지질 집단 중의 특정 종들의 수소:탄소 비 감소를 포함한다. 또한, 적합한 탄화수소를 생성하는 미세조류도 더욱 요망되는 탄화수소 산출을 지니도록 공학처리될 수 있다. 이러한 미세조류의 예로는 클로렐라(*Chlorella*) 속의 종들이 있다.

1. 지방산 합성에서 분지점을 제어하는 효소의 조절

[0286] 특정 구체예에서, 지방산 합성을 위한 대사에서 분지점을 제어하는 하나 이상의 중요한 효소는 지질 생성을 개선하도록 상향조절되거나 하향조절될 수 있다. 상향조절은, 예를 들어 세포를 전사를 증가시키는 강력한 프로모터 및/또는 인핸서 엘리먼트를 이용하여 관심있는 효소를 엔코딩하는 유전자가 발현되는 발현 구성물로 형질전환시킴에 의해 달성될 수 있다. 이러한 구성물은 형질전환체가 선택될 수 있도록 선택가능한 마커를 포함할 수 있고, 이것은 구성물의 증폭 및 엔코딩된 효소의 발현 수준을 증가시킬 수 있다. 본 발명의 방법에 따른 상향조절에 적합한 효소의 예는 피루베이트를 아세틸-CoA로 전환시키는 역할을 하는 (미세조류로부터의 일부 예는 젠뱅크 수탁 번호 NP_415392; AAA53047; Q1XDM1; 및 CAF05587을 포함한다) 피루베이트 데하이드로게나아제를 포함한다. 피루베이트 데하이드로게나아제의 상향조절은 아세틸-CoA의 생성을 증가시킬 수 있으므로, 지방산

합성을 증가시킨다. 아세틸-CoA 카르복실라아제는 지방산 합성의 초기 단계를 촉매화한다. 따라서, 효소는 지방산의 생성을 증가시키도록 상향조절될 수 있다 (미세조류로부터의 일부 예는 젠뱅크 수탁 번호 BAA94752; AAA75528; AAA81471; YP_537052; YP_536879; NP_045833; 및 BAA57908을 포함한다). 지방산 생성은 지방산 합성 동안 커지는 아실 사슬을 지니는 아실 담체 단백질(ACP)의 상향조절에 의해서도 증가될 수 있다 (미세조류로부터의 일부 예는 젠뱅크 수탁 번호 A0TOF8; P51280; NP_849041; YP_874433을 포함한다). 글리세롤-3-포스페이트 아실트랜스퍼라아제는 지방산 합성의 속도-제한 단계를 촉매화한다. 이 효소의 상향조절은 지방산 생성을 증가시킬 수 있다 (미세조류로부터의 일부 예는 젠뱅크 수탁 번호 AAA74319; AAA33122; AAA37647; P44857; 및 AB094442를 포함한다). 전술한 단백질이 클로렐라(*Chlorella*) 속의 종들을 포함하는 미세조류에서의 발현을 위한 후보들이다.

[0287] 관심있는 효소의 하향조절은, 예컨대 안티센스, 촉매적 RNA/DNA, RNA 간섭(interference)(RNA), "녹-아웃", "녹-다운", 또는 다른 돌연변이발생 기술을 이용하여 달성될 수 있다. 효소 발현/기능은 또한 인트라보디(intrabody)를 이용하여 억제될 수 있다. 본 발명의 방법에 따른 하향조절에 적합한 효소의 예로는 아세틸-CoA 를 트리카르복실산 (TCA) 사이클의 일부로서 소비하는 시트레이트 합성효소가 있다. 시트레이트 합성효소의 하향조절은 더 많은 아세틸-CoA를 지방산 합성 경로로 강제할 수 있다.

2. 지방산 합성 유전자의 총체적인 조정제의 조절

[0289] 총체적인 조정제는 지방산 생합성 경로의 유전자의 발현을 조절한다. 따라서, 지방산 합성의 하나 이상의 총체적인 조정제는 적절한 경우 다수의 지방산 합성 유전자의 발현을 각각 억제하거나 개선시키고, 궁극적으로 지질생성을 증가시키기 위해 상향조절되거나 하향조절될 수 있다. 예로는 스테롤 조절 엘리먼트 결합 단백질(SREBP), 예컨대 SREBP-1a 및 SREBP-1c (예를 들어 젠뱅크 수탁 번호 NP_035610 및 Q9WTN3 참조)가 있다. 총체적인 조정제는, 예를 들어 제어 포인트 효소의 조절과 관련하여 상기 개시된 대로 상향조절되거나 하향조절될 수 있다.

3. 탄화수소 변형 효소의 조절

[0291] 본 발명의 방법은 세포를 탄화수소 변형 효소를 엔코딩하는 하나 이상의 유전자, 예를 들어 지방산 아실-ACP 티오에스테라아제 (수탁 번호는 표 5의 예 참조), 지방산 아실-CoA/알데히드 환원효소 (수탁 번호는 표 6의 예 참조), 지방산 아실-CoA 환원효소 (수탁 번호는 표 7의 예 참조), 지방산 알데히드 데카르보닐라아제 (수탁 번호는 표 8의 예 참조), 지방산 알데히드 환원효소, 또는 스쿠알렌 합성 효소 유전자 (젠뱅크 수탁 번호 AF205791 참조)로 형질전환시키는 것도 포함한다. 일부 구체예에서, 지방산 아실-ACP 티오에스테라아제 및 자연히 공동-발현되는 아실 담체 단백질을 엔코딩하는 유전자는, 임의로 다른 탄화수소 변형 효소를 엔코딩하는 하나 이상의 유전자를 이용하여 세포로 형질전환될 수 있다. 다른 구체예에서, ACP 및 지방산 아실-ACP 티오에스테라아제는 이들이 특정 조직 또는 기관에서 자연히 공동-발현되는지 공동-발현되지 않는지와 무관하게, 둘이 함께 본 발명의 미생물 및 방법에 이용될 때, 이익을 부여하는 서로에 대한 친화성을 지닐 수 있다. 따라서, 본 발명은 이러한 효소들의 자연히 공동-발현되는 쌍뿐만 아니라 ACP로부터 길이-특이적 탄소 사슬의 절단을 촉진하도록 서로 상호작용하기 위한 친화성을 공유하는 쌍 둘 모두를 고려한다.

[0292] 여전히 다른 구체예에서, 불포화화효소를 엔코딩하는 외인성 유전자는 다른 탄화수소 변형 효소를 엔코딩하는 하나 이상의 유전자와 함께 세포로 형질전환되어 탄화수소 포화와 관련된 변형을 제공할 수 있다. 스테아로일-ACP 불포화화효소 (예컨대, 젠뱅크 수탁 번호 AAF15308; ABM45911; 및 AAY86086 참조)는 예를 들어 스테아로일-ACP의 올레오일-ACP로의 전환을 촉매화한다. 이러한 유전자의 상향조절은 세포에 의해 생성된 일불포화된 지방산의 비율을 증가시킬 수 있는 반면; 하향조절은 일불포화도의 비율을 감소시킬 수 있다. 유사하게, ω -6 지방산 불포화화효소, ω -3 지방산 불포화화효소, 또는 ω -6-올레에이트 불포화화효소와 같은 하나 이상의 글리세롤지질 불포화화효소의 발현을 조절하여 불포화된 지방산 대 포화된 지방산의 비를 변경시킬 수 있다. 일부 구체예에서, 불포화화효소는 요망되는 탄소 사슬 길이에 관해 선택될 수 있어서, 불포화화효소가 특정된 탄소-길이 기질, 또는 특정된 범위 내의 탄소-길이를 지니는 기질 내에서 위치 특이적 변형을 만들어낼 수 있다.

[0293] 특정 구체예에서, 본 발명의 미생물은 지방산 아실-ACP 티오에스테라아제, 지방산 아실-CoA/알데히드 환원효소, 지방산 아실-CoA 환원효소, 지방산 알데히드 환원효소, 지방산 알데히드 데카르보닐라아제, 또는 자연히 공동-발현되는 아실 담체 단백질로부터 선택된 하나 이상의 외인성 유전자를 발현하도록 유전적으로 공학처리된다. 적합한 발현 방법은 리파아제 유전자의 발현과 관련하여 상기 개시되었고, 다른 방법들 중에서도 유도될 수 있는 발현 및 구획으로 나뉜(compartmentalized) 발현을 포함한다.

[0294]

여하한 특정 이론이나 세포 메카니즘에 매이길 원치 않으며, 지방산 아실-ACP 티오에스테라아제는 지질 합성 동안 아실 담체 단백질 (ACP)로부터 지방산을 절단한다. 추가의 효소적 가공을 통해, 절단된 지방산이 이후 코엔자임에 조합되어 아실-CoA 분자를 산출한다. 이러한 아실-CoA는 알데하이드를 생성하기 위한 지방산 아실-CoA 환원효소뿐만 아니라 알코올을 생성하기 위한 지방산 아실-CoA/알데하이드 환원효소의 효소적 활성에 대한 기질이다. 상기 규명된 지방산 아실-CoA 환원효소의 작용에 의해 생성된 알데하이드는 알코올을 생성하기 위한 지방산 알데하이드 환원효소, 또는 알칸이나 알켄을 생성하기 위한 지방산 알데하이드 데카르보닐라아제에 의한 추가 효소적 활성에 대한 기질이다.

[0295]

바로 위에 개시된 효소는 특정 수의 탄소 원자를 포함하는 기질에 대해 작용하기 위한 특이성을 지닌다. 예를 들어, 지방산 아실-ACP 티오에스테라아제는 ACP로부터 12개의 탄소 원자를 지니는 지방산을 절단하기 위한 특이성을 지닐 수 있다. 일부 구체예에서, ACP 및 길이-특이적 티오에스테라아제는 서로에 대해 친화성을 지닐 수 있어서 이들이 조합물로서 특히 유용하게 되게 한다 (예컨대, 외인성 ACP 및 티오에스테라아제 유전자는 이들이 유래된 특정 조직 또는 기관에서 자연히 공동-발현될 수 있다). 따라서, 다양한 구체예에서, 미생물은 기질에 함유된 탄소 원자의 수와 관련하여 효소적 활성 (예컨대, ACP로부터 지방산의 절단, 아실-CoA의 알데하이드 또는 알코올로의 환원, 또는 알데하이드의 알칸으로의 전환)을 촉매화하는 특이성을 갖는 단백질을 엔코딩하는 외인성 유전자를 함유할 수 있다. 다양한 구체예에서, 효소적 특이성은 8 내지 34개의 탄소 원자, 바람직하게는 8 내지 18개의 탄소 원자, 및 보다 바람직하게는 10 내지 14개의 탄소 원자를 지니는 기질에 대한 것일 수 있다. 가장 바람직한 특이성은 12개의 탄소 원자를 지니는 기질에 대한 것이다. 다른 구체예에서, 특이성은 20 내지 30개의 탄소 원자에 대한 것일 수 있다.

[0296]

본 발명의 미생물 및 방법에 사용하기 적합한 지방산 아실-ACP 티오에스테라아제는 제한없이 표 5에 열거된 것들을 포함한다.

[0297]

표 5. 지방산 아실-ACP 티오에스테라아제 및 젠뱅크 수탁 번호

[0298]

움벨루라이아 칼리포르니카(<i>Umbellularia californica</i>) 지방산 아실-ACP 티오에스테라아제 (젠뱅크 #AAC49001)
신나모롬 캄포라(<i>Cinnamomum camphora</i>) 지방산 아실-ACP 티오에스테라아제 (젠뱅크 #Q39473)
움벨루라이아 칼리포르니카(<i>Umbellularia californica</i>) 지방산 아실-ACP 티오에스테라아제 (젠뱅크 #Q41635)
미리스티카 프래그란스(<i>Myristica fragrans</i>) 지방산 아실-ACP 티오에스테라아제 (젠뱅크 #AAB71729)
미리스티카 프래그란스(<i>Myristica fragrans</i>) 지방산 아실-ACP 티오에스테라아제 (젠뱅크 #AAB71730)
엘라에이스 귀닌시스(<i>Elaeis guineensis</i>) 지방산 아실-ACP 티오에스테라아제 (젠뱅크 #ABD83939)
엘라에이스 귀닌시스(<i>Elaeis guineensis</i>) 지방산 아실-ACP 티오에스테라아제 (젠뱅크 #AAD42220)
포풀러스 토멘토사(<i>Populus tomentosa</i>) 지방산 아실-ACP 티오에스테라아제 (젠뱅크 #ABC47311)
아라비듐시스 탈리아나(<i>Arabidopsis thaliana</i>) 지방산 아실-ACP 티오에스테라아제 (젠뱅크 #NP_172327)
아라비듐시스 탈리아나(<i>Arabidopsis thaliana</i>) 지방산 아실-ACP 티오에스테라아제 (젠뱅크 #CAA85387)
아라비듐시스 탈리아나(<i>Arabidopsis thaliana</i>) 지방산 아실-ACP 티오에스테라아제 (젠뱅크 #CAA85388)
고시피움 히르수툼(<i>Gossypium hirsutum</i>) 지방산 아실-ACP 티오에스테라아제 (젠뱅크 #Q9SQI3)
쿠페아 란세올라타(<i>Cuphea lanceolata</i>) 지방산 아실-ACP 티오에스테라아제 (젠뱅크 #CAA54060)
쿠페아 후케리아나(<i>Cuphea hookeriana</i>) 지방산 아실-ACP 티오에스테라아제 (젠뱅크 #AAC72882)
쿠페아 칼로펠라 아종 메소스테몬(<i>Cuphea calophylla</i> subsp. <i>mesostemon</i>) 지방산 아실-ACP 티오에스테라아제 (젠뱅크 #ABB71581)
쿠페아 란세올라타(<i>Cuphea lanceolata</i>) 지방산 아실-ACP 티오에스테라아제 (젠뱅크 #CAC19933)
엘라에이스 귀닌시스(<i>Elaeis guineensis</i>) 지방산 아실-ACP 티오에스테라아제 (젠뱅크 #AAL15645)
쿠페아 후케리아나(<i>Cuphea hookeriana</i>) 지방산 아실-ACP 티오에스테라아제 (젠뱅크 #Q39513)
고시피움 히르수툼(<i>Gossypium hirsutum</i>) 지방산 아실-ACP 티오에스테라아제 (젠뱅크 #AAD01982)
비티스 비니페라(<i>Vitis vinifera</i>) 지방산 아실-ACP 티오에스테라아제 (젠뱅크 #CAN81819)
가르시니아 망고스타나(<i>Garcinia mangostana</i>) 지방산 아실-ACP 티오에스테라아제 (젠뱅크 #AAB51525)
브라시카 준세아(<i>Brassica juncea</i>) 지방산 아실-ACP 티오에스테라아제 (젠뱅크 #ABI18986)

[0299]

마드후카 롱기풀리아(*Madhuca longifolia*) 지방산 아실-ACP 티오에스테라아제 (젠햄크 #AAX51637)
 브라시카 나푸스(*Brassica napus*) 지방산 아실-ACP 티오에스테라아제 (젠햄크 #ABH11710)
 오리자 사티바(*Oryza sativa*) (인디카 컬티바-그룹(indica cultivar-group)) 지방산 아실-ACP 티오에스테라아제 (젠햄크 #EAY86877)
 오리자 사티바(*Oryza sativa*) (자포니카 컬티바-그룹(japonica cultivar-group)) 지방산 아실-ACP 티오에스테라아제 (젠햄크 #NP_001068400)
 오리자 사티바(*Oryza sativa*) (인디카 컬티바-그룹) 지방산 아실-ACP 티오에스테라아제 (젠햄크 #EAY99617)
 쿠파아 후케리아나(*Cuphea hookeriana*) 지방산 아실-ACP 티오에스테라아제 (젠햄크 #AAC49269)

[0300]

본 발명의 미생물 및 방법에 사용하기 적합한 지방산 아실-CoA/알데히드 환원효소는 제한없이 표 6에 열거된 것들을 포함한다.

[0301]

표 6. 젠햄크 수탁 번호로 열거된 지방산 아실-CoA/알데히드 환원효소

[0302]

AAC45217, YP_047869, BAB85476, YP_001086217, YP_580344, YP_001280274, YP_264583, YP_436109, YP_959769, ZP_01736962, ZP_01900335, ZP_01892096, ZP_01103974, ZP_01915077, YP_924106, YP_130411, ZP_01222731, YP_550815, YP_983712, YP_001019688, YP_524762, YP_856798, ZP_01115500, YP_001141848, NP_336047, NP_216059, YP_882409, YP_706156, YP_001136150, YP_952365, ZP_01221833, YP_130076, NP_567936, AAR88762, ABK28586, NP_197634, CAD30694, NP_001063962, BAD46254, NP_001030809, EAZ10132, EAZ43639, EAZ07989, NP_001062488, CAB88537, NP_001052541, CAH66597, CAE02214, CAH66590, CAB88538, EAZ39844, AAZ06658, CAA68190, CAA52019, 및 BAC84377

[0303]

본 발명의 미생물 및 방법에 사용하기 적합한 지방산 아실-CoA 환원효소는 제한없이 표 7에 열거된 것들을 포함한다.

[0304]

표 7. 젠햄크 수탁 번호로 열거된 지방산 아실-CoA 환원효소

[0305]

NP_187805, AB014927, NP_001049083, CAN83375, NP_191229, EAZ42242, EAZ06453, CAD30696, BAD31814, NP_190040, AAD38039, CAD30692, CAN81280, NP_197642, NP_190041, AAL15288, 및 NP_190042

[0306]

본 발명의 미생물 방법에 사용하기 적합한 지방산 알데히드 테카르보닐라아제는 제한없이 표 8에 열거된 것들을 포함한다.

[0307]

표 8. 젠햄크 수탁 번호로 열거된 지방산 알데히드 테카르보닐라아제

[0308]

NP_850932, ABN07985, CAN60676, AAC23640, CAA65199, AAC24373, CAE03390, ABD28319, NP_181306, EAZ31322, CAN63491, EAY94825, EAY86731, CAL55686, XP_001420263, EAZ23849, NP_200588, NP_001063227, CAN83072, AAR90847, 및 AAR97643

[0309]

자연히 공동-발현되는 지방산 아실-ACP 티오에스테라아제 및 아실 담체 단백질의 조합물이 본 발명의 미생물 및 방법에 사용하기 적합하다.

[0310]

탄화수소 변형 효소의 추가의 예는 다음 임의의 미국특허에 함유되거나, 언급되거나 또는 여기에 함유되거나 언급된 핵산 서열에 의해 엔코딩된 아미노산 서열을 포함하고: 6,610,527; 6,451,576; 6,429,014; 6,342,380; 6,265,639; 6,194,185; 6,114,160; 6,083,731; 6,043,072; 5,994,114; 5,891,697; 5,871,988; 6,265,639, 이는 추가로 젠햄크 수탁 번호: AA018435; ZP_00513891; Q38710; AAK60613; AAK60610; AAK60611; NP_113747; CAB75874; AAK60612; AAF20201; BAA11024; AF205791; 및 CAA03710로 기술된다.

[0311]

본 발명의 미생물 및 방법에 사용하기 적합한 다른 효소는 표 5-8에 열거된 단백질 중 하나와 적어도 70%의 아미노산 동일성을 지니고 상응하는 효소적 활성 (예컨대, 아실 담체 단백질로부터 지방산의 절단, 알데히드 또는 알코올로의 아실-CoA의 환원, 또는 알칸으로의 알데히드의 전환)을 나타내는 것들을 포함한다. 추가의 구체예에서, 효소적 활성은 상기 개시된 서열 중 하나와 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 99%의 동일성을 갖는 서열로 존재하며, 이들 모두는 충분히 명시

된 대로 본원에 참조로서 포함된다.

[0312] 상기 개시된 탄화수소 변형 효소는 지방산 아실-ACP 티오에스테라아제가 지질 합성 동안 아실 담체 단백질(ACP)로부터 지방산을 절단함에 의해 미생물(예컨대, 미세조류, 유질 효모, 또는 진균) 또는 미생물의 접단으로부터 다양한 탄화수소를 생성하는데 유용하다. 추가의 효소적 가공을 통해, 절단된 지방산이 이후 코엔자임에 조합되어 아실-CoA 분자를 산출한다. 이러한 아실-CoA는 알데히드를 생성하기 위한 지방산 아실-CoA 환원효소뿐만 아니라 알코올을 생성하기 위한 지방산 아실-CoA/알데히드 환원효소의 효소적 활성에 대한 기질이다. 상기 규명된 지방산 아실-CoA 환원효소의 작용에 의해 생성된 알데히드는 알코올을 생성하기 위한 지방산 알데히드 환원효소, 또는 알칸이나 알켄을 생성하기 위한 지방산 알데히드 데카르보닐라아제에 의한 추가 효소적 활성에 대한 기질이다.

[0313] 탄화수소 변형 효소는 특정 수의 탄소 원자를 포함하는 기질에 대해 작용하기 위한 특이성을 지닌다. 예를 들어, 지방산 아실-ACP 티오에스테라아제는 ACP로부터 12개의 탄소 원자를 지니는 지방산을 절단하기 위한 특이성을 지닐 수 있다. 따라서, 다양한 구체예에서, 미생물은 기질에 함유된 탄소 원자의 수와 관련하여 효소적 활성(예컨대, ACP로부터 지방산의 절단, 아실-CoA의 알데히드 또는 알코올로의 환원, 또는 알데히드의 알칸으로의 전환)을 촉매화하는 특이성을 갖는 단백질을 엔코딩하는 외인성 유전자를 함유할 수 있다. 다양한 구체예에서, 효소적 특이성은 8 내지 34개의 탄소 원자, 바람직하게는 8 내지 18개의 탄소 원자, 및 보다 바람직하게는 10 내지 14개의 탄소 원자를 지니는 기질에 대한 것일 수 있다. 가장 바람직한 특이성은 12개의 탄소 원자를 지니는 기질에 대한 것이다. 다른 구체예에서, 특이성은 20 내지 30개의 탄소 원자에 대한 것일 수 있다.

[0314] 일부 구체예에서, 본원에 개시된 방법에 의해 생성된 지방산, 또는 상응하는 일차 알코올, 알데히드, 알칸 또는 알켄은 적어도 약 8개, 적어도 약 10개, 적어도 약 12개, 적어도 약 14개, 적어도 약 16개, 적어도 약 18개, 적어도 약 20개, 적어도 약 22개, 적어도 약 24개, 적어도 약 26개, 적어도 약 28개, 적어도 약 30개, 적어도 약 32개 또는 적어도 약 34개의 탄소 원자 또는 이를 초과하는 탄소 원자를 함유한다. 산업적 적용을 위한 바이오 디젤, 재생가능한 디젤, 또는 제트 연료, 또는 상응하는 일차 알코올, 알데히드, 알칸 및 알켄을 생성하기 위해 바람직한 지방산은 적어도 약 8개 또는 이를 초과하는 탄소 원자를 함유한다. 특정 구체예에서, 상기 지방산 및 기타 상응하는 탄화수소 분자는 포화(탄소-탄소 이중 또는 삼중 결합이 없다); 일불포화(단일의 이중 결합); 폴리 불포화(두 개 이상의 이중 결합); 선형(고리형 아님); 및/또는 이들의 구조에 분자를 거의 또는 전혀 지니지 않는다.

[0315] 발현되는 외인성 유전자의 요망되는 조합을 선택함에 의해, 당업자는 이후에 수성 바이오매스로부터 추출될 수 있는, 미생물에 의해 야기되는 생성물을 재단할 수 있다. 예를 들어 미생물은 (i) 지방산 아실-ACP 티오에스테라아제를 엔코딩하는 외인성 유전자; 및, 임의로 (ii) 자연히 공동-발현되는 아실 담체 단백질 또는 지방산 아실-ACP 티오에스테라아제에 달리 친화성을 지니는 아실 담체 단백질(또는 반대로); 및, 임의로 (iii) 지방산 아실-CoA/알데히드 환원효소 또는 지방산 아실-CoA 환원효소를 엔코딩하는 외인성 유전자; 및, 임의로 (iv) 지방산 알데히드 환원효소 또는 지방산 알데히드 데카르보닐라아제를 엔코딩하는 외인성 유전자를 함유할 수 있다. 미생물은 하기 개시된 대로 배양될 때 ACP에 결합되는 지방산을 합성하고 지방산 아실-ACP 티오에스테라아제는 ACP로부터 지방산의 절단을 촉매화함으로써 추가의 효소적 가공을 통해 지방산 아실-CoA 분자를 생성한다. 존재하는 경우, 지방산 아실-CoA/알데히드 환원효소는 알코올로의 아실-CoA의 환원을 촉매화한다. 유사하게, 지방산 아실-CoA 환원효소는 존재하는 경우 알데히드로의 아실-CoA의 환원을 촉매화한다. 지방산 아실-CoA 환원효소를 엔코딩하는 외인성 유전자가 존재하여 알데히드 생성물을 산출하도록 발현되는 구체예에서, 제3 외인성 유전자에 의해 엔코딩된 지방산 알데히드 환원효소가 알코올로의 알데히드의 환원을 촉매화한다. 유사하게, 지방산 알데히드 데카르보닐라아제는 존재하는 경우 알칸이나 알켄으로의 알데히드의 전환을 촉매화한다.

[0316] 이러한 효소를 엔코딩하는 유전자는 클로렐라 프로토테코이드(*Chlorella protothecoides*)와 같이 중요한 지질 생성을 나타내는 것으로 이미 공지된 세포로부터 수득될 수 있다. 지질 생성에 관여하는 것으로 이미 공지된 유전자, 예컨대 이중 결합을 포화시키는 효소를 엔코딩하는 유전자는 수용체 세포로 개별적으로 형질전환될 수 있다. 그러나, 본 발명을 실시하기 위하여, 유전자가 요구되는 지에 관한 연역적인 가설을 만들 필요는 없다. 상이한 유전자를 함유하는 DNA, 예컨대 양호한 지질-생성 유기체로부터의 cDNA의 라이브러리를 수용체 세포로 형질전환시킬 수 있다. cDNA는 미세조류에서 활성인 프로모터에 작동가능하게 결합되는 것이 바람직하다. 라이브러리에 의해 형질전환된 상이한 수용체 미세조류 세포가 라이브러리로부터의 상이한 유전자를 수용한다. 개선된 지질 생성능을 지니는 형질전환체를 당업계에 공지된 스크리닝 방법, 예를 들어 HPLC, 가스 크로마토그래피, 및 탄화수소 분석의 질량 분광법을 통해 규명한다(이러한 분석의 예로서, 문현[Biomass and Bioenergy Vol. 6. No. 4. pp. 269-274 (1994); Experientia 38; 47-49 (1982); and Phytochemistry 65 (2004) 3159-

3165] 참조). 이후 이러한 형질전환체를 원래 라이브러리로 추가로 형질전환시키고/거나 임의로 이종교배시켜 개선된 지질 생성능을 지니는 추가 라운드의 유기체를 생성한다. 요망되는 특성을 획득하는 모든 유기체를 개발하기 위한 일반적인 절차가 예컨대 미국특허 6,716,631에 개시되어 있다. 이러한 방법은, 예컨대 DNA 단편의 라이브러리를 다수의 세포에 도입시킴으로써 단편 중 하나 이상이 세포의 게놈 또는 에피솜에서 세그먼트와 재조합되어 변형된 세포를 생성하는 것을 포함한다. 이후 변형된 세포를 요망되는 기능의 획득을 위해 변화된 변형 세포에 대해 스크리닝한다. 형질전환을 위한 벡터 및 방법은 리파아제 유전자의 발현과 관련하여 논의된 것과 유사하다.

[0317] 더욱이, 감산(subtractive) 라이브러리를 이용하여 전사가 상이한 조건하에 유도되는, 특히 바이오디젤 생성이나 산업적 적용을 위한 공급원료로서 유용한 탄화수소의 생성을 위한 미생물을 배양하는데 적용되는 조건하에 유도되는 유전자를 동정할 수 있다. 감산 라이브러리는 두 상이한 샘플간 차이를 반영하는 누클레오티드 서열을 함유한다. 이러한 라이브러리는, 각 샘플로부터의 폴리뉴클레오티드 (예컨대, mRNA, cDNA, 증폭된 서열)의 집단을 변성시키고 하이브리드화시키는 단계를 포함하는 절차에 의해 제조된다. 두 서열 모두에 공통인 서열을 하이브리드화하고 제거하여, 샘플간 상이한 서열을 남긴다. 이러한 방식으로, 특정 조건하에 유도된 서열들을 동정할 수 있다. 이 기술은, 예를 들어 지질 (예컨대, 지방산) 생성 및 특히, 임의의 요망되는 배양 조건하에 지질 생성을 증가시키는데 유용한 유전자를 동정하기 위해 적용될 수 있다. 감산 하이브리드화 기술은 본 발명에 따른 발현 구성물에 유용한 프로모터, 예컨대 유도될 수 있는 프로모터를 동정하는데에도 적용될 수 있다.

[0318] 따라서, 예를 들어 감산 라이브러리는 독립영양에 의해서나 (고정된 탄소원 없이 빛에서) 종속영양에 의해서 (고정된 탄소원의 존재하에 암실에서) 성장된 미생물 배양액으로부터 제조될 수 있다. 특히, 종속영양 유전자는 고정된 탄소원의 존재하에 암실 성장 동안 유도될 수 있으므로 암실 종속영양 세포로부터의 서열에서 독립영양 세포로부터의 서열을 감산시킴에 의해 생성된 라이브러리에 존재할 수 있다. 감산 라이브러리는 또한 기질을 대사시키는 임무를 담당하는 유전자를 동정하기 위해 글루코오스와 같은 특정 탄소 기질이 첨가된 배양액으로부터 제조될 수 있다. 과량 대 제한된 질소의 존재하에 성장한 배양액으로부터 제조된 감산 라이브러리를 이용하여 탄화수소 축적 생성과 대조적으로 세포 분열을 제어하는 유전자를 동정할 수 있다. 지질(예컨대, 지방산)이 첨가된 배양액으로부터의 감산 라이브러리의 제조는 이의 과발현이 지방산 생성을 증가시키는 유전자를 동정하는데 도움이 될 수 있다. 더욱 구체적으로, 첨가된 지방산을 이용할 수 있는 세포의 배양액으로 지방산을 첨가하는 것은 지방산 생성을 하향조절하는 지방산 합성 유전자의 하향조절을 초래할 것이다. 하나 이상의 이러한 유전자의 과발현은 반대되는 효과를 지닐 것이다.

B. 지질 경로로의 증가된 탄소 흐름

[0320] 일부 미세조류는 상당한 양의 비지질 대사산물, 예컨대 다당류를 생성한다. 다당류 생합성이 세포가 이용할 수 있는 총 대사 에너지의 상당한 비율을 이용할 수 있으므로, 지질-생성 세포의 돌연변이발생에 이어 감소되거나 배제된 다당류 생성에 대해 스크리닝하는 것은 더 높은 수율의 지질을 생성할 수 있는 신규한 균주를 발생시킨다.

[0321] 페놀: 황산 검정은 탄수화물은 검출한다 (Hellebust, *Handbook of Phycological Methods*, Cambridge University Press, 1978; and Cuesta G., et al., *J Microbiol Methods*. 2003 Jan;52(1):69-73 참조). 1,6-디메틸메틸렌 블루 검정은 음이온 다당류를 검출한다 (예를 들어, *Braz J Med Biol Res.* 1999 May;32(5):545-50; *Clin Chem.* 1986 Nov;32(11):2073-6 참조).

[0322] 다당류도 HPLC, 크기 배제 크로마토그래피, 및 음이온 교환 크로마토그래피와 같은 방법을 통해 분석될 수 있다 (예를 들어, Prosky L, Asp N, Schweizer TF, DeVries JW & Furda I (1988) Determination of insoluble, soluble and total dietary fiber in food and food products: Interlaboratory study. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 71, 1017±1023; *Int J Biol Macromol.* 2003 Nov;33(1-3):9-18 참조). 다당류도 젤 전기영동을 이용하여 검출될 수 있다 (예를 들어, *Anal Biochem.* 2003 Oct 15;321(2):174-82; *Anal Biochem.* 2002 Jan 1;300(1):53-68 참조).

VI. 지질 및 탄화수소를 회수하는 방법

[0323] 본 발명의 세포에 의해 생성된 탄화수소(예컨대, 지질, 지방산, 알데히드, 알코올 및 알칸)를 임의의 편리한 수단에 의해 수확하거나 달리 수집할 수 있다. 예를 들어, 세포로부터 분비된 탄화수소를 원심분리시켜 수성층의 오염물질 및 임의로 여하한 고체 물질로부터 침전물로서 원심분리 후 소수성 층의 탄화수소를 분리한다. 세포 또는 세포 분획을 함유하는 물질을 프로테아제로 처리하여 원심분리 전이나 후에 오염성 단백질을 분해시킬 수

있다. 일부 경우에, 오염성 단백질이 단백질의 제거시에 탄화수소를 형성하는 탄화수소 또는 탄화수소 전구체에 가능하게는 공유적으로 결합된다. 다른 경우에, 탄화수소 분자는 단백질도 함유하는 제조물이다. 프로테아제를 단백질을 함유하는 탄화수소 제조물에 첨가하여 단백질을 분해시킬 수 있다 (예를 들어, 스트렙토마이세스 그리세우스(*Streptomyces griseus*)로부터의 프로테아제를 이용할 수 있다 (SigmaAldrich catalog number P5147)). 소화 후에, 탄화수소는 잔류하는 단백질, 웨티드 단편, 및 아미노산으로부터 정제되는 것이 바람직하다. 이러한 정제는, 예를 들어 원심분리 및 여과와 같은 상기 나열된 방법에 의해 달성될 수 있다.

[0325] 세포의 탄화수소도 살아있는 미세조류 세포로부터 생체내 추출될 수 있고, 이것은 이후 세포의 노출에 이어, 살아있는 세포와, 추출 용매의 소수성 분획 및 탄화수소의 분리에 의해 생물반응기, 다른 살균 환경에서는 무독성 추출 용매로 돌려 보내지고, 여기서 분리된 살아있는 세포는 이후 스테인레스 강 발효기 또는 광생물반응기와 같은 배양 컨테이너로 돌려보내진다 (Biotechnol Bioeng. 2004 Dec 5;88(5):593-600 and Biotechnol Bioeng. 2004 Mar 5;85(5):475-81 참조).

[0326] 탄화수소는 또한 전(whole) 세포 추출에 의해 단리될 수 있다. 이 세포는 먼저 "세포 용해"라는 제목의 섹션에 개시된 대로 파괴되고, 그 다음 세포내 및 세포막/세포벽-결합된 탄화수소뿐만 아니라 세포외 탄화수소를, 예컨대 상기 개시된 원심분리를 이용하여 전 세포 매스로부터 수집할 수 있다.

[0327] 탄화수소 및 지질을 상기 방법에 의해 생성된 세포 용해물로부터 분리하는 다양한 방법을 이용할 수 있다. 예를 들어, 탄화수소는 헥산과 같은 소수성 용매로 추출될 수 있다 (Frenz et al. 1989, Enzyme Microb. Technol., 11:717 참조). 탄화수소는 또한 액화 (예를 들어, Sawayama et al. 1999, Biomass and Bioenergy 17:33-39 and Inoue et al. 1993, Biomass Bioenergy 6(4):269-274 참조); 오일 액화 (예를 들어, Minowa et al. 1995, Fuel 74(12):1735-1738 참조); 및 초임계 CO₂ 추출 (예를 들어, Mendes et al. 2003, Inorganica Chimica Acta 356:328-334 참조)을 이용하여 추출될 수 있다.

[0328] 미아오(Miao) 및 유우(Wu)는 클로렐라 프로토테코이드(*Chlorella protothecoides*)의 배양액으로부터 미세조류 지질을 회수하는 프로토콜을 기술하고, 여기서 세포는 원심분리에 의해 회수되고, 종류수로 세척되며, 동결 건조에 의해 건조되었다. 생성된 세포 분말을 모터에서 분쇄시킨 다음 n-헥산으로 추출하였다 (Miao and Wu, Biosource Technology (2006) 97:841-846).

A. 세포 용해

[0330] 미생물에서 생성된 세포내 지질 및 탄화수소를, 일부 구체예에서 미생물의 세포를 용해시킨 후 추출한다. 일단 추출하면, 지질 및/또는 탄화수소를 추가로 정제시켜 오일, 연료, 또는 유지화학품을 생성한다.

[0331] 배양을 완료한 후에, 미생물을 발효 액체배지로부터 분리시킬 수 있다. 임의로, 분리를 원심분리에 의해 수행하여 농축된 페이트스를 생성한다. 원심분리는 미생물로부터 상당한 양의 세포내 물을 제거하지 않으며 전조 단계가 아니다. 이후 바이오매스를 세척액 (예컨대, DI 수)으로 세척하여 발효 액체배지 및 조직파편을 제거할 수 있다. 임의로, 세척된 미생물의 바이오매스를 세포 파괴 이전에 건조시킬 수 있다 (오븐 건조, 동결건조). 대안적으로, 발효가 완료됐을 때 세포를 발효 액체배지의 일부 또는 전부로부터 분리하지 않고 용해시킬 수 있다. 예를 들어, 세포가 용해될 때 세포는 1:1 (v:v) 미만의 세포 대 세포외 액체의 비일 수 있다.

[0332] 지질 및/또는 탄화수소를 함유하는 미생물을 용해시켜 용해물을 생성할 수 있다. 본원에 상세된 대로, 미생물을 용해시키는 단계 (세포 용해로서도 언급됨)는 열-유도 용해, 염기 첨가, 산 첨가, 프로테아제 및 다당류 분해 효소, 예컨대 아밀라아제와 같은 효소 이용, 초음파 이용, 기계적 용해, 삼투 쇼크 이용, 용균 바이러스로 감염, 및/또는 하나 이상의 용균 유전자의 발현을 포함하는 임의의 편리한 수단에 의해 달성될 수 있다. 용해는 미생물에 의해 생성된 세포내 분자를 방출시키도록 수행된다. 미생물을 용해시키는 이를 방법들 각각은 단일 방법으로 이용되거나 조합하여 동시에 또는 순차적으로 이용될 수 있다.

[0333] 세포 파괴 정도는 현미경 분석에 의해 관찰될 수 있다. 본원에 개시된 방법들 중 하나 이상을 이용하여, 통상적으로 70%를 초과하는 세포 파괴가 관찰된다. 바람직하게는 세포 파괴가 80%를 초과하고, 보다 바람직하게는 90%를 초과하고, 가장 바람직하게는 약 100%이다.

[0334] 특정 구체예에서, 미생물은 성장 후에 용해되어, 예를 들어 추출이나 추가 가공을 위한 세포의 지질 및/또는 탄화수소의 노출을 증가시킨다. 리파아제 발현 (예컨대, 유도될 수 있는 프로모터를 통한) 또는 세포 용해의 타이밍은 지질 및/또는 탄화수소의 수율을 최적화하도록 조정될 수 있다. 다수의 용해 기술이 하기에 개시된다. 이러한 기술들을 개별적으로 또는 조합하여 이용할 수 있다.

1. 열-유도 용해

본 발명의 바람직한 구체예에서, 미생물을 용해시키는 단계는 미생물을 함유하는 세포의 혼탁액의 가열을 포함한다. 이 구체예에서, 미생물을 함유하는 발효 액체배지 (또는 발효 액체배지로부터 단리된 미생물의 혼탁액)를 미생물, 즉 미생물의 세포벽과 막이 분해되거나 파괴될 때까지 가열한다. 통상적으로, 가해진 온도는 50°C 이상이다. 더 높은 온도, 예컨대 적어도 30°C, 적어도 60°C, 적어도 70°C, 적어도 80°C, 적어도 90°C, 적어도 100°C, 적어도 110°C, 적어도 120°C, 적어도 130°C 또는 이를 초과하는 온도가 보다 효율적인 세포 용해를 위해 이용된다.

열 처리에 의해 세포를 용해시키는 것은 미생물을 비등시킴에 의해 수행될 수 있다. 대안적으로, 열 처리 (비 등 없이)는 오토클레이브에서 수행될 수 있다. 열 처리된 용해물을 추가의 처리를 위해 냉각시킬 수 있다.

세포 파괴는 스텀 처리에 의해, 즉 가압된 스텀의 첨가를 통해 수행될 수도 있다. 세포 파괴를 위한 미세조류의 스텀 처리가 예를 들어 미국특허 6,750,048에 개시되어 있다.

2. 염기를 이용한 용해

본 발명의 또 다른 바람직한 구체예에서, 미생물을 용해시키는 단계는 미생물을 함유하는 세포의 혼탁액에 염기를 첨가하는 것을 포함한다.

염기는 사용된 미생물의 단백질성 화합물의 적어도 일부를 가수분해시킬 만큼 충분히 강해야 한다. 단백질을 용해시키기 위해 유용한 염기는 화학 분야에 공지되어 있다. 본 발명의 방법에 유용한 예시적인 염기는 이로 제한되는 것은 아니나 리튬, 나트륨, 칼륨, 칼슘 및 이들의 혼합물의 히드록사이드, 카르보네이트 및 비카르보네이트를 포함한다. 바람직한 염기는 KOH이다. 세포 파괴를 위한 미세조류의 염기 처리가 예를 들어 미국특허 6,750,048에 개시되어 있다.

3. 산성 용해

본 발명의 또 다른 바람직한 구체예에서, 미생물을 용해시키는 단계는 미생물을 함유하는 세포의 혼탁액에 산을 첨가하는 것을 포함한다. 산 용해는 농도가 10-500 mM이거나, 바람직하게는 40-160 mM인 산을 이용하여 수행될 수 있다. 산 용해는 바람직하게는 상기 실온 (예컨대, 40-160°, 및 바람직하게는 50-130°의 온도)에서 수행된다. 보통의 온도인 경우 (예컨대, 실온 내지 100°C 및 특히 실온 내지 65°), 산 처리는 편리하게 초음파처리 또는 다른 세포 파괴 방법과 조합될 수 있다.

4. 효소를 이용한 세포 용해

본 발명의 또 다른 바람직한 구체예에서, 미생물을 용해시키는 단계는 효소를 이용하여 미생물을 용해시키는 것을 포함한다. 미생물을 용해시키기 위한 바람직한 효소는 프로테아제 및 다당류-분해 효소, 예컨대 헤미셀룰라아제 (예컨대, 아스페질러스 나이거(*Aspergillus niger*)로부터의 헤미셀룰라아제; Sigma Aldrich, St. Louis, MO; #H2125), 펙티나아제 (예컨대, 리조푸스 종(*Rhizopus sp.*)으로부터의 펙티나아제; Sigma Aldrich, St. Louis, MO; #P2401), 만나웨이(Mannaway) 4.0 L (노보자임), 셀룰라아제 (예컨대, 트리코더마 비리데 (*Trichoderma viride*)로부터의 셀룰로오스; Sigma Aldrich, St. Louis, MO; #C9422), 및 드리셀라아제 (예컨대, 바시디오마이세테스 종(*Basidiomycetes sp.*)으로부터 드리셀라아제; Sigma Aldrich, St. Louis, MO; #D9515)이다.

a) 셀룰라아제

본 발명의 바람직한 구체예에서, 미생물을 용해시키기 위한 셀룰라아제는 임의로 클로렐라(*Chlorella*) 또는 클로렐라(*Chlorella*) 바이러스로부터의 다당류-분해 효소이다.

b) 프로테아제

프로테아제, 예컨대 스트렙토마이세스 그리세우스(*Streptomyces griseus*) 프로테아제, 키모트립신, 프로티나아제 K, 문현[Degradation of Polylactide by Commercial Proteases, Oda Yet al., Journal of Polymers and the Environment, Volume 8, Number 1, January 2000, pp. 29-32(4)]에 열거된 프로테아제, 및 다른 프로테아제가 미생물을 용해시키기 위해 이용될 수 있다. 이용될 수 있는 다른 프로테아제로는 알칼라아제(Alcalase) 2.4 FG (노보자임) 및 플라보우르자임(Flavourzyme) 100 L (노보자임)이 있다.

c) 조합

[0351] 전술한 프로테아제 및 다당류-분해 효소의 임의의 조합을 포함하는 프로테아제 및 다당류-분해 효소의 임의의 조합물도 이용할 수 있다.

5. 초음파를 이용한 세포 용해

[0352] 본 발명의 또 다른 바람직한 구체예에서, 미생물을 용해시키는 단계가 초음파를 이용하여, 즉 초음파처리에 의해 수행된다. 따라서, 세포가 고 주파수 사운드로도 용해될 수 있다. 사운드는 전기적으로 생성되고 금속 텁을 통해 적절하게 놓축된 세포 혼탁액으로 운반될 수 있다. 이러한 음파처리 (또는 초음파처리)는 세포 혼탁액에서 공동의 생성에 기초하여 세포의 완전성을 파괴시킨다.

6. 기계적 용해

[0353] 본 발명의 또 다른 바람직한 구체예에서, 미생물을 용해시키는 단계는 기계적 용해에 의해 수행된다. 세포는 기계적으로 용해되고 임의로 균질화되어 탄화수소 (예컨대, 지질) 수집을 촉진시킬 수 있다. 예를 들어, 압력 분쇄기를 이용하여 세포 함유 슬러리를 제한된 오리피스 밸브를 통해 펌핑할 수 있다. 고압 (1500 바아 이하) 을 적용시킨 다음, 배출 노즐을 통해 즉시 팽창시킨다. 세포 파괴는 세 상이한 메카니즘에 의해 달성된다: 밸브 상에 충돌, 오리피스에서 높은 액체 전단 응력, 및 배출시 급격한 압력 강하로 세포의 파열 야기. 이 방법은 세포내 분자들을 방출시킨다.

[0354] 대안적으로, 볼 밀을 이용할 수 있다. 볼 밀에서, 세포는 비드와 같은 소형 연마용 입자와 함께 혼탁액에서 교반된다. 세포는 전단 응력, 비드 사이에서의 분쇄 및 비드와의 충돌로 인해 파괴된다. 비드는 세포를 파괴시켜 세포의 내용물을 방출시킨다. 세포는 또한 예컨대 블렌딩 (예컨대, 고속 또는 예로서 웨어링 블렌더(Waring blender)), 프렌치(french) 프레스, 또는 심지어 약한 세포벽의 경우에는 세포를 파괴하기 위해 원심분리를 사용하여, 전단 응력에 의해 파괴될 수 있다.

7. 삼투 쇼크 (세포용해)에 의한 세포 용해

[0355] 본 발명의 또 다른 바람직한 구체예에서, 미생물을 용해시키는 단계는 삼투 쇼크를 적용시킴에 의해 수행된다.

8. 용균 바이러스로 감염

[0356] 본 발명의 바람직한 구체예에서, 미생물을 용해시키는 단계는 미생물을 용균 바이러스로 감염시키는 것을 포함한다. 매우 다양한 바이러스가 본 발명에 사용하기 적합한 미생물을 용해시키는 것으로 공지되어 있고, 특정 미생물에 대하여 특정 용균 바이러스를 선택하고 이용하는 것은 당업자의 기술 수준 내에 있다.

[0357] 예를 들어, 파라메시움 부르사리아 클로렐라(*Paramecium bursaria chlorella*) 바이러스 (PBCV-1)는 특정 단세포, 진핵 클로렐라-유사 녹색 조류에서 복제되고 이를 용해시키는 큰 정20면체 플라크-형성 이중 가닥 DNA 바이러스 그룹의 원형이다 (피코드나비리대 패밀리, 클로로바이러스 속). 따라서, 배양액을 적합한 클로렐라 바이러스로 감염시킴에 의해 임의의 민감한 미세조류가 용해될 수 있다. 예를 들어, 문헌[*Adv. Virus Res.* 2006;66:293-336; *Virology*, 1999 Apr 25;257(1):15-23; *Virology*, 2004 Jan 5;318(1):214-23; *Nucleic Acids Symp. Ser.* 2000;(44):161-2; *J Virol.* 2006 Mar;80(5):2437-44; and *Annu. Rev. Microbiol.* 1999;53:447-94]을 참조한다.

9. 자가용해 (용균 유전자의 발현)

[0358] 본 발명의 또 다른 바람직한 구체예에서, 미생물을 용해시키는 단계는 자가용해를 포함한다. 이 구체예에서, 본 발명에 따른 미생물은 미생물을 용해시킬 용균 단백질을 생성하도록 유전적으로 공학처리된다. 이 용균 유전자는 유도될 수 있는 프로모터를 이용하여 발현되어, 세포가 먼저 발효기에서 요망되는 밀도로 성장한 다음 프로모터가 유도되어 용균 유전자를 발현시키고 세포를 용해시킬 수 있다. 일 구체예에서, 용균 유전자는 다당류-분해 효소를 엔코딩한다.

[0359] 다른 특정 구체예에서, 용균 유전자는 용균 바이러스로부터의 유전자이다. 따라서, 예를 들어 클로렐라 바이러스로부터의 용균 유전자는 *C. protothecoides*(*C. protothecoides*)와 같은 클로렐라(*Chlorella*) 속의 조류 세포에서 발현될 수 있다.

[0360] 적합한 발현 방법은 리파아제 유전자의 발현과 관련하여 본원에 개시되어 있다. 용균 유전자의 발현은 바람직하게는 유도될 수 있는 프로모터, 예컨대 소형 분자, 빛, 열, 및 다른 자극의 존재와 같은 자극에 의해 유도된 미세조류에서 활성인 프로모터를 이용하여 수행된다. 클로렐라 바이러스로부터의 용균 유전자는 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌[*Virology* 260, 308-315 (1999); *FEMS Microbiology Letters* 180 (1999) 45-53;

Virology 263, 376-387 (1999); and *Virology* 230, 361-368 (1997)]을 참조한다.

B. 지질과 탄화수소의 추출

[0366] 본 발명의 미생물에 의해 생성된 지질과 탄화수소는 유기 용매를 이용한 추출에 의해 회수될 수 있다. 일부 경우에, 바람직한 유기 용매는 헥산이다. 통상적으로, 유기 용매는 용해물 성분들의 사전 분리 없이 용해물에 직접 첨가된다. 일 구체예에서, 상기 개시된 방법들 중 하나 이상에 의해 생성된 용해물을 지질 및/또는 탄화수소 성분들이 유기 용매와 용액을 형성하도록 하는 충분한 기간 동안 유기 용매와 접촉시킨다. 일부 경우에, 용액을 이후 정제시켜 요망되는 특정 지질 또는 탄화수소 성분들을 회수할 수 있다. 헥산 추출 방법은 당 분야에 널리 공지되어 있다.

VII. 지질과 탄화수소를 가공하는 방법

A. 효소적 변형

[0369] [0370] 본원에 개시된 대로 세포에 의해 생성된 탄화수소 (예컨대, 지질, 지방산, 알데히드, 알코올 및 알칸)를 리파아제를 포함하는 하나 이상의 효소를 이용하여 상기 개시된 대로 변형시킬 수 있다. 탄화수소가 세포의 세포외 환경에 있을 때, 하나 이상의 효소를 효소가 탄화수소를 변형시키거나 탄화수소 전구체로부터의 이의 합성을 완성시키는 조건하에 그 환경에 첨가시킬 수 있다. 대안적으로, 탄화수소는 효소와 같은 하나 이상의 촉매를 첨가하기 전에 세포의 물질로부터 부분적으로 또는 완전히 단리될 수 있다. 이러한 촉매들은 외생적으로 첨가되며, 이들의 활성은 세포 외부에서 또는 시험관내에서 나타난다.

B. 열적 및 기타 촉매적 변형

[0371] [0372] 본원에 개시된 대로 세포에 의해 생체내에서 생성되거나 시험관내에서 효소적으로 변형된 탄화수소를 통상적인 수단에 의해 임의로 추가로 가공할 수 있다. 가공은 크기를 감소시키는 "크래킹(cracking)"을 포함하므로, 탄화수소 분자의 수소:탄소 비를 증가시킬 수 있다. 촉매적 및 열적 크래킹 방법은 탄화수소 및 트리글리세리드 오일 가공에서 통상적으로 이용된다. 촉매적 방법은 고체 산 촉매와 같은 촉매의 이용을 포함한다. 촉매는 실리카-알루미나 또는 제올라이트일 수 있고, 이는 탄소-탄소 결합의 이종용해 또는 비대칭 파괴를 야기시켜 카르보케이션(carbocation) 및 수소화 음이온을 초래한다. 이러한 반응성 중간체는 이후 재배열이나 또 다른 탄화수소와의 수소화 이동을 겪게 된다. 따라서, 반응물은 중간체를 재생성하여 자기-번식성 사슬 메카니즘을 초래 할 수 있다. 탄화수소는 또한 그 안에 있는 탄소-탄소 이중 또는 삼중 결합의 수를 임의로 0까지 감소시키도록 가공될 수 있다. 탄화수소는 또한 그 안에 있는 고리 또는 고리형 구조를 제거하거나 배제하도록 가공될 수 있다. 탄화수소는 또한 수소:탄소 비를 증가시키도록 가공될 수 있다. 이것은 수소 첨가 ("수소화") 및/또는 더 작은 탄화수소로의 탄화수소의 "크래킹"을 포함할 수 있다.

[0373] 열적 방법은 탄화수소 크기를 감소시키기 위해 상승된 온도 및 압력을 이용하는 것을 포함한다. 약 800°C의 상승된 온도 및 약 700kPa의 압력을 이용할 수 있다. 이러한 조건은 종종 수소-부화(rich) 탄화수소 분자를 언급하기 위해 사용되는 용어인 "빛"을 생성하는 한편 (광자 흐름과 구별됨), 상대적으로 수소가 고갈된 더 큰 탄화수소 분자도 축합에 의해 생성한다. 이 방법은 동종용해 또는 대칭 파괴를 제공하고 알槛을 생성하며, 이는 임의로 상기 개시된 대로 효소적으로 포화될 수 있다.

[0374] 효소적 및 열적 방법은 탄화수소 가공 및 오일 정제를 위한 설비에서 일반적이다. 따라서, 본원에 개시된 대로 세포에 의해 생성된 탄화수소를 수집하고 통상적인 수단을 통해 가공하거나 정제할 수 있다. 미세조류-생성된 탄화수소의 하이드로크래킹에 대한 보고서는 문헌[*Hillen et al. (Biotechnology and Bioengineering, Vol. XXIV:193-205 (1982))*]을 참조한다. 대안적인 구체예에서, 분획을 또 다른 촉매, 예컨대 유기 화합물, 열, 및/또는 무기 화합물로 처리한다. 바이오디젤로의 지질의 가공을 위해, 트랜스에스테르화 공정을 본원의 섹션 IV에 개시된 대로 이용한다.

[0375] 본 발명의 방법을 통해 생성된 탄화수소는 다양한 산업적 적용에서 유용하다. 예를 들어, 거의 모든 유형의 세제 및 세정 제조물에 이용되는 음이온 계면활성제인 선형 알킬벤젠 설포네이트(LAS)의 생성은 일반적으로 10-14 개의 탄소 원자의 사슬을 포함하는 탄화수소를 이용한다. 예를 들어, 미국특허 6,946,430; 5,506,201; 6,692,730; 6,268,517; 6,020,509; 6,140,302; 5,080,848; 및 5,567,359를 참조한다. LAS와 같은 계면활성제를 퍼스널 케어 조성물 및 세제의 제조에 이용할 수 있고, 예컨대 미국특허 5,942,479; 6,086,903; 5,833,999; 6,468,955; 및 6,407,044에 개시되어 있다.

VIII. 디젤 비히클 및 제트 엔진에 사용하기 적합한 연료를 생성하는 방법

[0377] 화석 연료로부터 유래된 출발 물질을 대체할 수 있는 재생가능한 바이오디젤 출발 물질을 이용할 수 있고, 이의 사용이 바람직하기 때문에, 바이오디젤, 재생가능한 디젤 및 제트 연료와 같은 연료 중 생물학적 기원의 탄화수소 성분의 사용에 대한 관심이 증가되고 있다. 생물학적 물질로부터 탄화수소 성분을 생성하는 방법에 대한 요구가 시급하다. 본 발명은 본원에 개시된 방법에 의해 생성된 지질을 바이오디젤, 재생가능한 디젤, 및 제트 연료를 생성하기 위한 생물학적 물질로서 이용하여 바이오디젤, 재생가능한 디젤, 및 제트 연료를 생성하는 방법을 제공함에 의해 이러한 요구를 충족시킨다.

[0378] 전통적인 디젤 연료는 파라핀 탄화수소에 풍부한 석유 중류액이다. 이들은 370° 내지 780°F만큼 높은 비등 범위를 지니며, 이것은 디젤 엔진 비히클과 같은 압축 발화 엔진에서의 연소에 적합하다. 어메리칸 소사이어티 오브 테스팅 앤드 머티리얼스 (ASTM)는 세탄 수, 흐림점, 인화점, 점도, 아닐린점, 황 함량, 물 함량, 회분 함량, 구리 스트립 부식, 및 탄소 잔류물과 같은 기타 연료 특성의 허용될 수 있는 범위에 따라, 비등 범위에 따른 디젤의 등급을 확립한다. 기술적으로, 바이오매스로부터 유래되거나 달리 적합한 ASTM 명세를 충족시키는 임의의 탄화수소 중류액 물질은 디젤 연료 (ASTM D975), 제트 연료 (ASTM D1655), 또는 바이오디젤 (ASTM D6751)로서 정의될 수 있다.

[0379] 추출 후, 본원에 개시된 미생물의 바이오매스로부터 회수된 지질 및/또는 탄화수소 성분을 화학적 처리하여 디젤 비히클 및 제트 엔진에 사용되는 연료를 제조할 수 있다.

A. 바이오디젤

[0380] 바이오디젤은 제공 공급원료에 따라 -금색에서 짙은 갈색까지- 색이 다양한 액체이다. 이것은 실제 물과 혼화될 수 있고, 높은 비등점과 낮은 중기압을 지닌다. 바이오디젤은 디젤-엔진 비히클에서 사용되는 디젤-동등한 가공된 연료를 언급한다. 바이오디젤은 생분해될 수 있고 무독성이다. 통상적인 디젤 연료에 비해 바이오디젤의 추가의 이점은 보다 낮은 엔진 마모성(wear)에 있다.

[0382] 통상적으로, 바이오디젤은 C14-C18 알킬 에스테르를 포함한다. 다양한 공정이 본원에 개시된 대로 생성되고 단리된 바이오매스나 지질을 디젤 연료로 전환시킨다. 바이오디젤을 생성하는 바람직한 방법은 본원에 개시된 대로 지질의 트랜스에스테르화에 의해서이다. 바이오디젤로서 사용하기에 바람직한 알킬 에스테르는 메틸 에스테르 또는 에틸 에스테르이다.

[0383] 본원에 개시된 방법에 의해 생성된 바이오디젤은 단독으로 이용되거나 최신식 디젤-엔진 비히클에서 임의의 농도로 통상적인 디젤 연료와 블렌딩될 수 있다. 통상적인 디젤 연료(석유 디젤)와 블렌딩될 때, 바이오디젤은 약 0.1% 내지 약 99.9%로 존재할 수 있다. 세계 상당 지역에서 임의의 연료 믹스 중 바이오디젤의 양을 지정하기 위해 "B" 인자로서 공지된 시스템을 이용한다. 예를 들어, 20%의 바이오디젤을 함유하는 연료는 B20으로 분류된다. 순수한 바이오디젤은 B100으로서 언급된다.

[0384] 바이오디젤은 가정용 및 상업용 보일러에서 난방 연료로서도 사용될 수 있다. 현존하는 기름 보일러는 고무 부분을 함유할 수 있고 바이오디젤을 가동시키기 위해 전환을 요구할 수 있다. 전환 공정은 일반적으로 비교적 단순하며, 바이오디젤이 강력한 용매이므로 고무 부분을 합성 부분으로 교환하는 것을 포함한다. 이러한 강력한 용매능으로 인해, 바이오디젤을 연소시키는 것은 보일러의 효율을 증가시킬 것이다.

[0385] 바이오디젤은 순수한 초저유황 디젤 (Ultra-Low Sulfur Diesel, ULSD)의 윤활성을 증가시키기 위해 디젤의 제형에서 첨가제로서 사용될 수 있는데, 이것은 사실상 황 내용물을 지니지 않으므로 유리하다.

[0386] 바이오디젤은 석유디젤보다 양호한 용매이며, 이는 종래에 석유디젤로 운행되었던 운송수단의 연료 관 내의 잔여물을 퇴적물을 분해시키는데 사용될 수 있다.

1. 바이오디젤의 생산

[0388] 바이오디젤은 오일 풍부한 바이오매스 내에 함유된 트리글리세리드의 트랜스에스테르화에 의해 생산될 수 있다. 따라서, 본 발명의 다른 양태에서는 바이오디젤을 생산하는 방법이 제공된다. 바람직한 하나의 구체예에서, 바이오디젤을 생산하는 방법은 (a) 본원에 개시된 방법을 이용하여 지질 함유 미생물을 배양하는 단계, (b) 지질 함유 미생물을 용해시켜 용해물을 생성시키는 단계, (c) 용해된 미생물로부터 지질을 분리하는 단계, 및 (d) 지질 조성물을 트랜스에스테르화시켜 바이오디젤을 생성하는 단계를 포함한다.

[0389] 미생물을 성장시키고, 미생물을 용해시켜 용해물을 생성하고, 용해물을 유기 용매를 포함하는 배지 중에서 처리하여 이종 혼합물을 형성시키고, 처리된 용해물을 지질 조성물로 분리하는 방법은 상기 기술되었고, 이는 또한

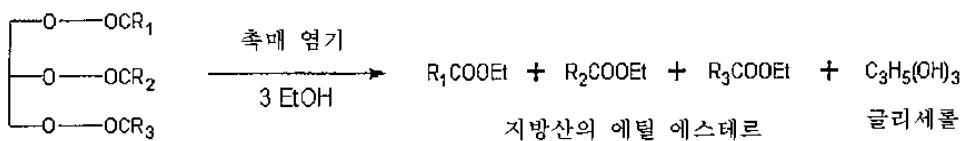
바이오디젤의 생산 방법에 사용될 수 있다.

지질 조성물은 트랜스에스테르화되어 바이오디젤로 유용한 장쇄 지방산 에스테르를 생산할 수 있다. 바람직한 트랜스에스테르화 반응이 하기 약술되어 있는데, 여기에는 염기 촉매화된 트랜스에스테르화 및 재조합 리파아제를 이용한 트랜스에스테르화가 포함된다.

염기 촉매화된 트랜스에스테르화 과정에서는, 트리아실글리세리드가 알코올, 예컨대 메탄올 또는 에탄올과 알칼리성 촉매, 전형적으로는 수산화칼륨의 존재하에서 반응한다. 이 반응으로 메틸 또는 에틸 에스테르 및 글리세린(글리세롤)이 부산물로 형성된다.

a) 일반적인 화학적 공정

동물 및 식물 오일은, 전형적으로 3가 알코올, 글리세롤과 유리 지방산의 에스테르인 트리글리세리드로 구성된다. 트랜스에스테르화에서, 트리아실글리세리드(TAG)에서의 글리세롤은 단체 알코올, 예컨대 메탄올 또는 에탄올로 대체된다. 전형적인 반응 도식이 하기되어 있다:



트리글리세리드

상기 도식에서, 알코올이 염기로 탈양성자화되어 더 강력한 친핵체가 된다. 일반적으로, 에탄올 또는 메탄올은 상당히 과량(50배 이하)으로 사용된다. 일반적으로, 이 반응은 지나치게 천천히 진행되거나 전혀 진행되지 않을 것이다. 열 및 산 또는 염기가 반응이 더욱 신속하게 진행되는 것을 돋기 위해 사용될 수 있다. 산 또는 염기는 트랜스-에스테르화 반응에 의해서는 소모되지 않으므로, 이들은 반응물이 아니라 촉매이다. 거의 모든 바이오디젤은 염기-촉매화된 기술을 이용하여 생산되는데, 이 기술에서는 단지 저온 및 저압 만이 요구되고 98% 초과의 저화 수율을 생성하다(다. 출발 오일은 수분 함량 및 유리 지방산 함량이 낮아야 한다).

b) 재조합 리파아제의 이용

트랜스에스테르화는 또한 염기 대신 효소, 예컨대 리파아제를 이용하여 실험적으로 수행되었다. 리파아제-촉매화된 트랜스에스테르화는 예를 들어 실온 내지 80°C의 온도, 및 1:1 초과, 바람직하게는 약 3:1의 TAG 대 저급 알코올의 몰비에서 수행될 수 있다.

트랜스에스테르화에 사용하기에 적합한 리파아제에는 이들로 제한되는 것은 아니나, 하기 표 9에 나열된 것들이 포함된다. 트랜스에스테르화에 유용한 리파아제의 다른 예는 예를 들어, 미국 특허 번호 제4,798,793호; 4,940,845호; 5,156,963호; 5,342,768호; 5,776,741호 및 WO 89/01032호에서 확인되다.

표 9 트래스에스테르화에 사용하기에 적합한 리파아제

Aspergillus niger lipase ABG73614, *Candida antarctica* lipase B (novozym-435) CAA83122, *Candida cylindracea* lipase AAR24090, *Candida lipolytica* lipase (Lipase L; Amano Pharmaceutical Co., Ltd.), *Candida rugosa* lipase (e.g., Lipase-OF; Meito Sangyo Co., Ltd.), *Mucor miehei* lipase (Lipozyme IM 20), *Pseudomonas fluorescens* lipase AAA25882, *Rhizopus japonicas* lipase (Lilipase A-10FG) Q7M4U7_1, *Rhizomucor miehei* lipase B34959, *Rhizopus oryzae* lipase (Lipase F) AAF32408, *Serratia marcescens* lipase (SM Enzyme) ABI13521, *Thermomyces lanuginosa* lipase CAB58509, Lipase P (Nagase ChemteX Corporation), and Lipase QLM (Meito Sangyo Co., Ltd., Nagoya, Japan)

바이오디젤에 적합한 지방산 에스테르를 생산하기 위해 리파아제를 사용하는 것에 대한 하나의 도전은 리파아

제의 가격이 강 염기 과정에 의해 사용된 수산화나트륨(NaOH)의 가격보다 훨씬 더 고가라는 것이다. 이러한 도전은 재사용될 수 있는 부동화된 리파아제를 사용함으로써 해소되었다. 그러나, 부동화된 리파아제의 활성은, 리파아제에 기초한 과정이 생산 비용의 측면에서 강 염기 과정과 경쟁할 수 있도록 최소의 주기 수 동안 재사용된 후에도 유지되어야만 한다. 부동화된 리파아제를, 트랜스에스테르화에 전형적으로 사용된 저급 알코올로 중독시킨다(poisoning). 미국 특허 번호 제6,398,707호(위 등(Wu et al.)에게 2002년 6월 4일 자로 등록됨)는 부동화된 리파아제의 활성을 향상시키고 감소된 활성을 갖는 부동화된 리파아제를 재생시키는 방법을 기술하고 있다.

[0402] 특정의 구체예에서, 재조합 리파아제는 리파아제가 작용하는 지질을 생산하는 동일한 미생물 중에서 발현된다. 적합한 재조합 리파아제에는, 상기 표 9에 나열되고/되거나 상기 표 9에 나열된 유전자뱅크 수탁 번호를 갖는 것들, 또는 상기 표 9에 나열된 리파아제 중 하나와 70% 이상의 아미노산 상동성을 가지며 리파아제 활성을 나타내는 폴리펩티드가 포함된다. 추가의 구체예에서, 효소적 활성은 상기 기술된 서열 중 하나와 약 75% 이상, 약 80% 이상, 약 85% 이상, 약 90% 이상, 약 95% 이상, 또는 약 99% 이상의 상동성을 갖는 서열에 존재하며, 이들 모두는 충분히 기재된 바와 같이 본원에 참조로 포함된다. 리파아제 및 선택가능한 마커를 엔코딩하는 DNA는 바람직하게는 코돈-최적화된 cDNA이다. 미세조류 중에서의 발현을 위해 유전자를 리코딩하는 방법이 미국 특허 번호 제7,135,290호에 기술되어 있다.

2. 표준

[0404] 바이오디젤에 대한 일반적인 국제 표준은 EN 14214이다. ASTM D6751은 미국 및 캐나다에서 참조된 가장 일반적인 바이오디젤 표준이다. 독일에서는 DIN EN 14214가 사용되며 영국에서는 BS EN 14214를 준수해야 한다.

[0405] 생성물이 이들 표준에 충족되는지를 측정하기 위한 기초적인 산업 시험에는 전형적으로 가스 크로마토그래피, HPLC 등이 포함된다. 품질 표준을 충족하는 바이오디젤은 50mL/kg 초과의 독성도 등급(LD₅₀)을 갖는 매우 비독성의 것이다.

B. 재생가능한 디젤

[0407] 재생가능한 디젤은 알칸, 예컨대 C16:0 및 C18:0을 포함하므로, 이들은 바이오디젤과 구분가능하다. 높은 품질의 재생가능한 디젤은 ASTM D975 표준을 충족한다.

[0408] 본 발명의 방법에 의해 생산된 지질은 재생가능한 디젤을 생산하기 위한 공급원료로 제공될 수 있다. 따라서, 본 발명의 다른 양태에서는, 재생가능한 디젤을 생산하는 방법이 제공된다. 재생가능한 디젤은 적어도 3개의 공정에 의해 생산될 수 있다: 열수 처리(수소화처리); 수소화가공; 및 간접적 액화. 이들 공정은 비-에스테르 증류물을 생산한다. 이러한 공정 동안, 본원에 기술된 바와 같이 생산되고 분리된 트리아실글리세리드가 알칸으로 전환된다.

[0409] 바람직한 하나의 구체예에서, 재생가능한 디젤을 생산하는 방법은 (a) 본원에 개시된 방법을 이용하여 지질 함유 미생물을 배양하고, (b) 미생물을 용해하여 용해물을 생성시키고, (c) 용해된 미생물로부터 지질을 분리하고, (d) 지질을 탈산소화 및 수소화처리하여 알칸을 생산하고, 이에 의해 재생가능한 디젤을 생산하는 것을 포함한다. 재생가능한 디젤을 생산하기에 적합한 지질은 유기 용매, 예컨대 헥산을 이용하여 미생물 바이오매스로부터 추출을 통해, 또는 미국 특허 번호 제5,928,696호에 기술된 것과 같은 다른 방법을 통해 얻어질 수 있다.

[0410] 몇몇의 방법에서, 미생물 지질은 먼저 수소화처리에 의해 분해되어 탄소쇄 길이 및 포화 이중 결합을 각각 감소시킨다. 이후, 이 물질이 마찬가지로 수소화처리와 관련하여 이성체화된다. 나프타 분획이 이후 증류를 통해 제거될 수 있고, 그 후 추가 증류에 의해, D975 표준에 충족하는 디젤 연료 중의 목적하는 성분들을 기화시키고 증류시키고, D975 표준을 충족시키는 위해 목적하는 성분보다 더 무거운 성분들은 남아 있게 된다. 트리글리세리드 오일을 포함하는 오일을 화학적으로 개질시키는 수소화처리, 수소첨가분해(hydrocracking), 탈산소화 및 이성체화 방법은 당업계에 널리 공지되어 있다. 이에 대해서는 예를 들어 유럽 특허 출원 EP1741768 (A1), EP1741767 (A1), EP1682466 (A1); EP1640437 (A1); EP1681337 (A1); EP1795576 (A1); 및 미국 특허 제 7,238,277; 6,630,066; 6,596,155; 6,977,322; 7,041,866; 6,217,746; 5,885,440; 6,881,873호를 참조하길 바란다.

1. 수소화처리

[0412] 재생가능한 디젤의 생산 방법에 대한 하나의 바람직한 구체예에서, 지질을 처리하여 알칸을 생산하는 것은 지질

조성물을 수소화처리함으로써 이루어진다. 열수 처리에서, 전형적으로 바이오매스는 고온 및 고압의 물 중에서 반응하여 오일 및 전류 고형물을 형성한다. 전환 온도는 전형적으로 300° F 내지 660° F이며, 압력은 물이 주로 액체로 유지되게 하는데 충분한 100 내지 170 표준 대기압(atm)이다. 반응 시간은 대략 15 내지 30분이다. 반응이 완료된 후에, 유기물이 물로부터 분리된다. 이에 의해 디젤에 적합한 증류물이 생산된다.

[0413] 2. 수소화가공

"그린 디젤"로도 지칭되는 재생가능한 디젤은 전통적인 수소화처리 기술에 의해 지방산으로부터 생산될 수 있다. 트리글리세리드 함유 오일은 석유와의 공동 공급물로서 또는 전용 공급물로서 수소화가공될 수 있다. 상기 생성물은 ASTM D975 사양을 충족하는 디젤 연료이다. 따라서, 재생가능한 디젤의 생산 방법에 대한 다른 바람직한 구체예에서, 지질 조성물을 처리하여 알칸을 생산하는 것은 지질 조성물을 수소화가공함으로써 수행된다.

재생가능한 디젤을 제조하는 몇몇의 방법에서, 트리글리세리드를 처리하는 제 1 단계는 이중 결합을 포화시키기 위해 수소화가공시킨 다음, 수소 및 촉매의 존재하의 고온에서 탈산소화시키는 것이다. 몇몇의 방법에서, 수소화 및 탈산소화는 동일한 반응에서 일어난다. 다른 방법에서, 탈산소화는 수소화 전에 일어난다. 이후 이성체화가 또한 수소 및 촉매의 존재하에서 임의로 수행된다. 나프타 성분은 바람직하게는 증류를 통해 제거된다. 이에 대해서는 예를 들어 미국 특허 제5,475,160호(트리글리세리드의 수소화); 5,091,116호(탈산소화, 수소화 및 가스 제거); 6,391,815호(수소화); 및 5,888,947호(이성체화)를 참고하길 바란다.

[0416] 석유 정련기는 공급물을 수소로 처리함으로써 불순물을 제거하기 위해 수소화가공을 이용한다. 수소화가공에서의 전환 온도는 전형적으로 300° F 내지 700° F이다. 압력은 전형적으로 40 내지 100atm이다. 반응 시간은 전형적으로 대략 10 내지 60분이다.

[0417] 고체 촉매가 특정 반응속도를 증가시키고, 특정 생산물에 대해 선택도를 개선시키고, 수소 소모를 최적화하기 위해 사용된다.

[0418] 수소화처리 및 수소화가공은 궁극적으로 공급물의 분자량을 감소시킨다. 트리글리세리드 함유 오일의 경우에, 트리글리세리드 분자는, 수소화가공 조건 하에서 4개의 탄화수소 분자, 즉 프로판 분자, 및 전형적으로 C8 내지 C18 범위 내의 3개의 더 중질의(heavy) 탄화수소 분자로 감소된다.

[0419] 3. 간접적 액화

[0420] 전통적인 초저유황 디젤은 2단계 공정에 의해 임의 형태의 바이오매스로부터 생산될 수 있다. 먼저, 바이오매스가, 수소 및 일산화탄소가 풍부한 가스상 혼합물인 합성가스로 전환된다. 이후, 합성 가스는 액체로 촉매로 전환된다. 전형적으로, 액체의 생산은 피셔-트로프쉬(Fisher-Tropsch: FT) 합성법을 이용하여 수행된다. 이 기술은 석탄, 천연 가스 및 중유에 적용된다. 따라서, 재생가능한 디젤의 생산 방법에 대한 더욱더 바람직한 다른 구체예에서, 지질 조성물을 처리하여 알칸을 생산하는 것은 지질 조성물의 간접적인 액화에 의해 수행된다.

[0421] C. 제트 연료

[0422] 2006년 미국에서의 제트 연료 연간 사용량은 약 210억 갤론(약 800억 리터)에 달하였다. 항공기 연료는 투명하거나 밀짚 색깔이다(straw-colored). 가장 일반적인 연료는 항공기 A-1로 분류된 무연/파라핀 오일 베이스의 연료로서, 이것은 국제적 표준 세트의 사양으로 생산된다. 항공기 연료는 다수의 상이한 탄화수소, 가능하게는 수천종 또는 그 이상만큼 많은 수의 탄화수소의 혼합물이다. 이들의 크기 범위(분자량 또는 탄소수)는 생성물에 대한 요건, 예를 들어 동결점 또는 발연점에 의해 제한된다. 케로센 타입의 항공기 연료(제트 A 및 제트 A-1을 포함하는)는 약 8 내지 16개 탄소수의 탄소수 분포를 갖는다. 와이드-컷(wide-cut) 또는 나프타-타입의 항공기 연료(제트 B를 포함하는)는 전형적으로 약 5 내지 15개 탄소의 탄소수 분포를 갖는다.

[0423] 둘 모두의 항공기 연료(제트 A 및 제트 B)는 다수의 첨가제를 포함할 수 있다. 유용한 첨가제에는 이들로 제한되는 것은 아니나, 항산화제, 정전기방지제, 부식 억제제 및 연료 시스템 아이싱(icing) 억제제 (FSII)가 포함된다. 항산화제는 고무화(gumming)되는 것을 방지하며, 이들은 대개 알킬화된 폐놀, 예를 들어 AO-30, AO-31, 또는 AO-37을 기재로 한다. 정전기방지제는 정전기를 방산시키고 스파킹(sparking)을 방지한다. 활성 성분으로서 디노닐나프틸설플론(DINNSA)을 갖는 스타디스(Stadis) 450이 그 예이다. 부식 억제제, 예를 들어 DCI-4A는 민간 및 군수용 연료로 사용되며, DCI-6A는 군수용 연료로 사용된다. FSII 제제에는 예를 들어 Di-EGME가 포함된다.

[0424] 용액은 제트 연료를 함유하는 블렌딩된 조류 연료이다. 본 발명은 그러한 용액을 제공한다. 본 발명의 방법으로 생산된 지질은 제트 연료를 생산하기 위한 공급원료로 제공될 수 있다. 따라서, 본 발명의 다른 양태에서, 제트 연료를 생산하는 방법이 제공된다. 본 발명의 방법으로 생산된 지질로부터 제트 연료를 생산하는 2개의 방법이 본원에서 제공된다: 유동상 촉매 분해 공정(fluid catalytic cracking: FCC) 및 수소첨가탈산소화 공정(hydrodeoxygenation: HDO).

1. 유동상 촉매 분해 공정

[0425] [0426] 유동상 촉매 분해 공정(FCC)은 올레핀, 특히 중질의 미정제 분획으로부터 프로필렌을 생산하는데 사용되는 하나의 방법이다. 문헌에는 식물성 오일, 예컨대 카놀라 오일을 FCC를 이용하여 가공하여 가솔린 연료로 유용한 탄화수소 스트림을 생산할 수 있는 것으로 보고되어 있다.

[0427] 본 발명의 방법에 의해 생산된 지질은 올레핀으로 전환될 수 있다. 상기 공정은 FCC 구역을 통해 생산된 지질을 유동시키는 것과 제트 연료로 유용한 올레핀으로 구성된 생성물 스트림을 수집하는 것을 포함한다. 생산된 지질은 분해 조건에서 분해용 촉매와 접촉되어, 제트 연료로 유용한 탄화수소와 올레핀을 포함하는 생성물 스트림을 제공한다.

[0428] 하나의 바람직한 구체예에서, 제트 연료를 생산하는 방법은 (a) 본원에 개시된 방법을 이용하여 지질 함유 미생물을 배양시키고, (b) 지질 함유 미생물을 용해시켜 용해물을 생성하고, (c) 용해물로부터 지질을 분리하고, (d) 지질 조성물을 처리하여 제트 연료를 생산하는 것을 포함한다.

[0429] 제트 연료를 생산하는 방법에 대한 하나의 바람직한 구체예에서, 지질 조성물은 유동상 촉매 분해 구역을 통해 유동할 수 있으며, 상기 방법은, 일 구체예에서 지질 조성물을 분해 조건에서 분해용 촉매와 접촉시켜 C₂-C₅ 올레핀을 포함하는 생성물 스트림을 제공하는 것을 포함할 수 있다.

[0430] 이 방법의 특정 구체예에서, 지질 조성물 중에 존재할 수 있는 임의의 오염물을 제거하는 것이 바람직할 수 있다. 따라서, 지질 조성물을 유동상 촉매 분해 구역을 통해 유동시키기 전에, 지질 조성물을 전처리한다. 전처리는 지질 조성물을 이온 교환 수지와 접촉시키는 것을 포함할 수 있다. 이온 교환 수지는 산성 이온 교환 수지, 예컨대 앰버리스트(Amberlyst)TM-15이며, 이것은 지질 조성물이 상류 또는 하류로 유동하는 반응기 내에서 충으로 사용될 수 있다. 다른 전처리는 지질 조성물을 산, 예컨대 황산, 아세트산, 질산 또는 염산과 접촉시킴에 의해 온화한 산 세척물을 포함할 수 있다. 접촉은 대개 주위 온도 및 대기압에서 물은 산 용액을 사용하여 이루어진다.

[0431] 임의로 전처리된 지질 조성물은 FCC 구역으로 유동하고, 여기서 탄화수소질 성분들이 올레핀으로 분해된다. 촉매 분해는 지질 조성물을 반응 구역 내에서 미분된 미립자 물질로 구성된 촉매와 접촉시킴에 의해 수행된다. 상기 반응이 촉매 분해로, 이것은 수소첨가분해(hydrocracking)에 반대되며, 이 반응은 수소가 첨가되지 않거나 수소가 소모되는 가운데 수행된다. 분해 반응이 진행됨에 따라, 상당량의 코크가 촉매 상에 퇴적된다. 촉매는 고온에서 촉매로부터의 코크를 재생 구역 중에서 연소시킴으로써 재생된다. 본원에서 "코크화된 촉매(coked catalyst)"로 지칭되는 코크 함유 촉매는, 계속하여 반응 구역으로부터 재생시킬 재생 구역으로 이동하며, 이는 재생 구역으로부터의 본질적으로 코크 비함유의 재생된 촉매로 대체된다. 다양한 가스상 스트림에 의한 촉매 입자의 유동화(fluidization)로 인해서 촉매가 반응 구역과 재생 구역 사이에서 이동될 수 있다. 탄화수소, 예컨대 본원에 기술된 지질 조성물의 탄화수소를 촉매의 유동상 스트림 중에서 분해시키고, 촉매를 반응 구역과 재생 구역 사이에서 이동시키고, 재생장치 중에서 코크를 연소시키는 방법은 FCC 공정의 당업자에게 널리 공지되어 있다. C₂-C₅ 올레핀을 생산하도록 지질 조성물을 분해시키는데 유용한 예시적인 FCC 응용에 및 촉매가 미국 특허 번호 제 6,538,169, 7,288,685호에 기술되어 있는데, 이들의 전문은 본원에 참고로 포함된다.

[0432] 일 구체예에서, 본 발명의 지질 조성물을 분해하는 것은 FCC 구역의 라이저(riser) 구역 또는 대안적으로는 리프트(lift) 구역에서 일어난다. 지질 조성물이 노즐에 의해 라이저 내로 도입되어 지질 조성물의 신속한 기화가 일어난다. 촉매를 접촉시키기 전에, 지질 조성물은 통상적으로 약 149°C 내지 약 316°C(300°F 내지 600°F)의 온도를 지닐 것이다. 촉매는 배합 용기로부터 라이저로 유동하며, 여기서 촉매는 약 2초 또는 그 미만의 시간 동안 지질 조성물과 접촉한다.

[0433] 배합된 촉매 및 반응된 지질 조성물 증기는 이후, 라이저의 최상부로부터 출구를 통해 배출되고, 올레핀을 포함하는 분해된 생성물 증기 스트림, 및 상당량의 코크로 커버되며 일반적으로 "코크화된 촉매"로도 지칭되는 촉매 입자 회수물로 분리된다. 목적하는 생성물이 원치않는 다른 생성물로 추가 전환되는 것을 촉진시킬 수 있는 지

질 조성물과 촉매의 접촉 시간을 최소화시키기 위해, 와류 아암(swirl arm)과 같은 임의 배열의 분리기가 생성물 스트림으로부터 코크화된 촉매를 신속하게 제거하는데 사용할 수 있다. 분리기, 예를 들어 와류 아암 분리기는 챔버의 상부에 위치하고, 스트리핑 구역은 챔버의 하부에 위치한다. 와류 아암 장치에 의해 분리된 촉매는 스트리핑 구역 내로 적혀된다. 경질 올레핀을 포함하는 분해된 탄화수소 및 몇몇의 촉매를 포함하는 분해된 생성물 중기 스트림은 사이클론과 소통되는 도관을 통해 챔버를 빠져나온다. 사이클론은 입자 농도를 매우 낮은 수준으로 감소시키기 위해 생성물 중기 스트림으로부터 남아있는 촉매 입자를 제거한다. 이후, 생성물 중기 스트림은 분리 용기의 최상부로 빠져나온다. 사이클론에 의해 분리된 촉매는 분리 용기로 반송된 다음 스트리핑 구역으로 반송된다. 이 스트리핑 구역에서 흡착된 탄화수소가 촉매 표면으로부터 스텁과의 향류(counter-current) 접촉에 의해 제거된다.

[0434] 낮은 탄화수소 부분압은 경질 올레핀의 생산을 지지하도록 작동한다. 따라서, 라이저 압력은 약 172 내지 241kPa(25 내지 35 psia)에서 설정되며, 탄화수소 부분압은 약 35 내지 172kPa(5 내지 25psia)에서, 바람직하게는 약 69 내지 138kPa(10 내지 20psia)에서 설정된다. 이러한 탄화수소의 상대적으로 낮은 부분압은, 희석제가 지질 조성물의 10 내지 55중량%, 바람직하게는 지질 조성물의 약 15중량%이도록 스텁을 희석제로 사용함으로써 얻어진다. 건조 가스와 같은 다른 희석제가 등가의 탄화수소 부분압에 도달하게 하는데 사용될 수 있다.

[0435] 라이저 출구에서 분해된 스트림의 온도는 약 510°C 내지 621°C(950° F 내지 1150° F)이 될 것이다. 그러나, 566°C(1050° F)을 상회하는 라이저 출구 온도는 더욱 많은 건조 가스 및 더욱 많은 올레핀을 생성한다. 반면, 라이저 출구 온도가 566°C(1050° F) 미만이면 더욱 적은 에틸렌 및 프로필렌이 생성된다. 따라서, 약 566°C 내지 약 630°C의 바람직한 온도 및 약 138kPa 내지 약 240kPa(20 내지 35psia)의 바람직한 온도에서 FCC 공정을 실시하는 것이 바람직하다. 이 공정에 대한 다른 조건은 촉매 대 지질 조성물의 비이며, 이 비는 약 5 내지 약 20, 및 바람직하게는 약 10 내지 약 15로 가변될 수 있다.

[0436] 제트 연료를 생산하는 방법에 대한 하나의 구체예에서, 지질 조성물은 FCC 반응기의 리프트 부분 내로 도입된다. 리프트 부분에서의 온도는 매우 고온으로, 약 700°C(1292° F) 내지 약 760°C(1400° F)의 범위일 것이고, 촉매 대 지질 조성물의 비는 약 100 내지 약 150이다. 지질 조성물을 리프트 부분 내로 도입시키면 상당량의 프로필렌 및 에틸렌이 생성될 것으로 예상된다.

[0437] 생성된 가스 및 액체 탄화수소 생성물은 가스 크로마토그래피, HPLC 등에 의해 분석될 수 있다.

2. 수소첨가탈산소화 공정

[0439] 본원에 기술된 바와 같이 생산된 지질 또는 지질 조성물을 이용하여 제트 연료를 생산하는 방법에 대한 다른 구체예에서, 지질 조성물 또는 지질의 구조는 수소첨가탈산소화 공정(HDO)으로 지칭되는 공정으로 분해된다.

[0440] HDO는 수소에 의한 산소의 제거를 의미하는데, 즉 물질 구조의 분해와 함께 산소가 제거되는 것을 의미한다. 올레핀계 이중 결합은 수소화되고, 임의의 황 및 질소 화합물이 제거된다. 황 제거는 수소첨가탈황 공정(hydrodesulphurization: HDS)으로 불려진다. 전처리 및 원료 물질(지질 조성물 또는 지질)의 순도는 촉매의 서비스 수명에 기여한다.

[0441] 일반적으로 HDO/HDS 단계에서, 수소는 공급원료(지질 조성물 또는 지질)과 혼합된 다음, 혼합물이 병류 흐름(co-current flow)으로 단일상 또는 2개의 상 공급원료로 촉매 층을 통과한다. HDO/MDS 단계 후에, 생성물 분획이 분리되고, 개별의 이성체화 반응기로 이동한다. 생물학적 출발 물질에 대한 이성체화 반응기는 문현(FI 100 248)에 병류식 반응기로 기재되어 있다.

[0442] 탄화수소 공급물, 예를 들어 본원에서의 지질 조성물 또는 지질을 수소화시킴으로써 연료를 생산하는 방법은 또한, 지질 조성물 또는 지질을 수소 가스와의 병류식 흐름으로서 제 1 수소화 구역으로 통과시킴으로써 수행될 수 있고, 이후 탄화수소 유출물은, 수소 가스를 탄화수소 유출물에 대한 역류식 흐름으로서 제 2의 탄화수소 구역으로 이동시킴으로써 제 2 탄화수소 구역에서 추가로 수소화된다. C₂-C₅ 올레핀을 생산하기 위해 지질 조성물을 분해시키는데 유용한 예시적인 HDO 응용예 및 촉매는 미국 특허 번호 제 7,232,935호에 기술되어 있고, 이의 전문은 본원에 참고로 포함된다.

[0443] 전형적으로, 수소첨가탈산소화 단계에서, 생물학적 성분, 예컨대 본원에서의 지질 조성물 또는 지질의 구조가 분해되고, 산소, 질소, 인 및 황 화합물, 및 경질의 탄화수소가 가스로서 제거되고, 올레핀 결합은 수소화된다. 이 공정의 제 2 단계, 즉 소위 이성체화 단계에서는, 탄화수소 사슬을 분지시키고 저온에서 파라핀의 성능을 개선시키기 위해서 이성체화가 수행된다.

[0444] 분해 공정의 제 1 단계, 즉 HDO 단계에서, 수소 가스, 및 수소화되는 본원에서의 지질 조성물 또는 지질은 병류식 또는 향류식 흐름으로서 HDO 촉매 층 시스템으로 이동하며, 상기 촉매 층 시스템은 하나 또는 그 초과의 촉매 층(들), 바람직하게는 1 내지 3개의 촉매 층을 포함한다. HDO 단계는 전형적으로 병류식으로 작동된다. 둘 또는 그 초과의 촉매 층을 포함하는 HDO 촉매 층 시스템의 경우에, 하나 또는 그 초과의 촉매 층은 향류식 흐름 원리를 이용하여 작동될 수 있다.

[0445] HDO 단계에서, 압력은 20 내지 150bar, 바람직하게는 50 내지 100bar로 가변하고, 온도는 200 내지 500°C로 가변하며, 바람직하게는 300 내지 400°C의 범위 내이다.

[0446] HDO 단계에서, 원소주기율표의 VII족 및/또는 VIB족 금속을 함유하는 공지된 수소화 촉매가 사용될 수 있다. 바람직하게는, 상기 수소화 촉매는 지지된 Pd, Pt, Ni, NiMo, 또는 CoMo 촉매이며, 지지체는 알루미나 및/또는 실리카이다. 전형적으로, NiMo/Al₂O₃ 및 CoMo/Al₂O₃ 촉매가 사용된다.

[0447] HDO 단계 전에, 본원에서의 지질 조성물 또는 지질은 임의로 더욱 온화한 조건 하에서의 사전수소화에 의해 처리되어 이중 결합의 부반응을 방지할 수 있다. 상기한 사전수소화는 50 내지 400°C의 온도 및 1 내지 200bar의 수소 압력에서, 바람직하게는 150 내지 250°C의 온도 및 10 내지 100bar의 수소 압력에서 사전수소화 촉매의 존재하에서 수행된다. 상기 촉매는 원소주기율표 상의 VIII족 및/또는 VIB족 금속을 함유할 수 있다. 바람직하게는, 사전수소화 촉매는 지지된 Pd, Pt, Ni, NiMo, 또는 CoMo 촉매이며, 지지체는 알루미나 및/또는 실리카이다.

[0448] 수소를 함유하는 HDO 단계로부터의 가스상 스트림은 냉각되고, 이후 일산화탄소, 이산화탄소, 질소, 인 및 황화합물, 가스상의 경질 탄화수소 및 다른 불순물이 이로부터 제거된다. 압축 후에, 정제된 수소 또는 재사용된 수소가 제 1 촉매 층 및/또는 촉매 층 사이로 다시 반송되어 배출된 가스 스트림을 보충할 수 있다. 물이 응축된 액체로부터 제거된다. 액체가 제 1 촉매 층 또는 촉매 층 사이로 이동한다.

[0449] HDO 단계 후에, 생성물에 이성체화 단계가 실시된다. 불순물이 가능한한 완전하게 제거된 다음 탄화수소가 이성체화용 촉매와 접촉되는 것이 상기 공정에서 중요하다. 이성체화 단계는 임의의 스트리핑 단계를 포함하는데, 이 단계에서 HDO 단계로부터의 반응 생성물이 수증기 또는 적합한 가스, 예컨대 경질 탄화수소, 질소 또는 수소를 사용하여 스트리핑함으로써 정제된다. 임의의 스트리핑 단계는 이성체화용 촉매의 상류에 위치한 장치(여기서, 가스 및 액체가 서로 접촉됨) 내에서 향류식으로, 또는 실제적인 이성체화 반응기 전의, 향류식 원리를 이용하는 개별의 스트리핑 장치 내에서 수행된다.

[0450] 스트리핑 단계 후에, 수소 가스, 및 본원에서의 수소화된 지질 조성물 또는 지질, 및 임의로 n-파라핀 혼합물이 하나 또는 다수개의 촉매 층(들)을 포함하는 반응성 이성체화 장치로 이동한다. 이성체화 단계의 촉매 층들은 병류식으로 또는 향류식으로 작동될 수 있다.

[0451] 향류식 흐름 원리가 이성체화 단계에 적용되는 것이 상기 공정에서 중요하다. 이성체화 단계에서, 이는 임의의 스트리핑 단계 또는 이성체화 반응 단계 또는 둘 모두를 향류식으로 수행함으로써 구현된다.

[0452] 이성체화 단계 및 HDO 단계는 동일한 압력 용기 또는 개별의 압력 용기에서 수행될 수 있다. 임의의 사전수소화가 개별 압력 용기 중에서 또는 HDO 및 이성체화 단계와 동일한 압력 용기 중에서 수행될 수 있다.

[0453] 이성체화 단계에서, 압력은 20 내지 150bar의 범위 내에서, 바람직하게는 20 내지 100bar의 범위 내에서 가변하고, 온도는 200 내지 500°C, 바람직하게는 300 내지 400°C의 범위 내이다.

[0454] 이성체화 단계에서, 당업계에 공지된 이성체화용 촉매가 사용될 수 있다. 적합한 이성체화용 촉매는 분자 체 및/또는 VII족 금속 및/또는 캐리어를 포함한다. 바람직하게는, 이성체화용 촉매는 SAPO-11 또는 SAP041 또는 ZSM-22 또는 ZSM-23 또는 페리어라이트(ferrierite) 및 Pt, Pd 또는 Ni 및 Al₂O₃ 또는 SiO₂를 포함한다. 전형적인 이성체화용 촉매는 예를 들어, Pt/SAPO-11/Al₂O₃, Pt/ZSM-22/Al₂O₃, Pt/ZSM-23/Al₂O₃ 및 Pt/SAPO-11/SiO₂이다.

[0455] 디젤 연료 또는 이의 성분으로 유용한 생물 기원의 고품질 탄화수소 성분이 생성물로 얻어지며, 상기 탄화수소 성분의 저온에서의 밀도, 세탄 수(cetane number) 및 성능은 우수하다.

IX. 미생물 공학처리

[0456] 상기 주지된 바와 같이, 본 발명의 특정 구체예에서는, 지질 생산을 향상시키기 위해 미생물을 유전학적으로

개질시키고, 미생물에 의해 생성된 성분의 특성 또는 비율을 변경시키고, 또는 다양한 공급원료 물질에 대한 새로운 성장 특성을 개선시키거나 제공하는 것이 바람직하다. 클로렐라, 특히 클로렐라 프로토테코이드, 클로렐라 미누티시마, 클로렐라 소로키니아나, 클로렐라 엘립소이데아, 클로렐라 sp. 및 클로렐라 에메르소니아가 본 원에 기술된 유전 공학처리 방법에 사용하기 위한 바람직한 미생물이며, 다른 클로렐라 종 뿐만 아니라 다른 다양한 미생물이 사용될 수 있다.

[0458] 프로모터, cDNA 및 3'UTR, 및 벡터의 다른 요소가 순수 공급원으로부터 분리된 단편을 이용한 클로닝 기술을 통해 생성될 수 있다[참조: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook et al. (3rd edition, 2001, Cold Spring Harbor Press); 및 미국 특허 제 4,638,202호]. 대안적으로, 요소들은 공지된 방법을 사용하여 합성에 의해 생성될 수 있다[참조: Gene. 1995 Oct 16; 164(1): 49-53].

A. 발현을 위한 코돈-최적화

[0459] 미생물에서 발현시킬 폴리펩티드, 예를 들어 리파아제 및 선택가능한 마커를 엔코딩하는 DNA는 바람직하게는 코돈-최적화된 Cdna이다. 미세조류에서의 발현을 위해 유전자를 리코딩하는 방법은 미국 특허 7,135,290호에 기술되어 있다. 코돈 최적화에 대한 추가 정보는 예를 들어 유전자뱅크의 코돈 사용 데이터베이스에서 입수가능하다. 비제한적인 예로서, 클로렐라 피레노이도사, 두나리엘라 살리나, 및 클로렐라 프로토테코이드에서의 코돈 사용은 각각 하기 표 10, 11 및 12에 나타나 있다.

표 10. 클로렐라 피레노이도사에서의 코돈 사용

Phe	UUU	39 (0.82)	Ser	UCU	50 (1.04)
	UUC	56 (1.18)		UCC	60 (1.25)
Leu	UUA	10 (0.20)		UCA	6 (0.96)
	UUG	46 (0.91)		UCG	43 (0.89)
Tyr	UAU	15 (0.59)	Cys	UGU	46 (0.77)
	UAC	36 (1.41)		UGC	73 (1.23)
ter	UAA	9 (0.00)	ter	UGA	43 (0.00)
ter	UAG	15 (0.00)	Trp	UGG	69 (1.00)
Leu	CUU	49 (0.97)	Pro	CCU	80 (0.98)
	CUC	73 (1.45)		CCC	88 (1.08)
	CUA	22 (0.44)		CCA	93 (1.14)
	CUG	103 (2.04)		CCG	65 (0.80)
His	CAU	50 (0.88)	Arg	CGU	39 (0.76)
	CAC	3 (1.12)		CGC	63 (1.23)
Gln	CAA	59 (0.84)		CGA	46 (0.90)
	CAG	2 (1.16)		CGG	47 (0.92)
Ile	AUU	24 (0.69)	Thr	ACU	32 (0.67)
	AUC	61 (1.76)		ACC	76 (1.60)
	AUA	19 (0.55)		ACA	41 (0.86)
Met	AUG	42 (1.00)		ACG	41 (0.86)
Asn	AAU	26 (0.75)	Ser	AGU	23 (0.48)
	AAC	3 (1.25)		AGC	67 (1.39)
Lys	AAA	32 (0.54)	Arg	AGA	51 (1.00)
	AAG	86 (1.46)		AGG	61 (1.19)
Val	GUU	36 (0.75)	Ala	GCU	57 (0.79)
	GUC	54 (1.13)		GCC	97 (1.34)
	GUA	30 (0.63)		GCA	89 (1.23)
	GUG	71 (1.49)		GCG	47 (0.65)
Asp	GAU	60 (0.95)	Gly	GGU	35 (0.60)
	GAC	66 (1.05)		GGC	78 (1.33)
Glu	GAA	41 (0.68)		GGA	54 (0.92)
	GAG	80 (1.32)		GGG	67 (1.15)

[0463]

표 11. 두나리엘라 살리나에서의 바람직한 코돈 사용

TTC (Phe)	TAC (Tyr)	TGC (Cys)	TAA (Stop)
TGG (Trp)	CCC (Pro)	CAC (His)	CGC (Arg)
CTG (Leu)	CAG (Gln)	ATC (Ile)	ACC (Thr)
AAC (Asn)	AGC (Ser)	ATG (Met)	AAG (Lys)
GCC (Ala)	GAC (Asp)	GGC (Gly)	GTG (Val)
GAG (Glu)			

[0464]

표 12. 클로렐라 프로토테코이드에서의 바람직한 코돈 사용

TTC (Phe)	TAC (Tyr)	TGC (Cys)	TGA (Stop)
TGG (Trp)	CCC (Pro)	CAC (His)	CGC (Arg)
CTG (Leu)	CAG (Gln)	ATC (Ile)	ACC (Thr)
GAC (Asp)	TCC (Ser)	ATG (Met)	AAG (Lys)
GCC (Ala)	AAC (Asn)	GGC (Gly)	GTG (Val)
GAG (Glu)			

[0466]

[0467]

B. 프로모터

[0468]

형질전환되는 조류에 대해 내인성인 프로모터, 및 형질전환되는 조류에 대해 내인성이지 않은 프로모터를 포함하는 다수의 프로모터(즉, 다른 조류로부터의 프로모터, 더 고급 식물로부터의 프로모터, 및 식물 바이러스 또는 조류 바이러스로부터의 프로모터)가 미세조류에서는 활성이다. 미세조류에서 활성인 외인성 및/또는 내인성 프로모터, 및 미세조류에서 가능성인 항생제 내성 유전자는 예를 들어 하기 문헌에 기술되어 있다:

Curr Microbiol. 1997 Dec;35(6):356-62 (Chlorella vulgaris); Mar Biotechnol (NY). 2002 Jan;4(1):63-73 (Chlorella ellipsoidea); Mol Gen Genet. 1996 Oct 16;252(5):572-9 (Phaeodactylum tricornutum); Plant Mol Biol. 1996 Apr;31(1):1-12 (Volvox carteri); Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Nov 22;91(24):11562-6 (Volvox carteri); Falciatore A, Casotti R, Leblanc C, Abrescia C, Bowler C, PMID: 10383998, 1999 May;1(3):239-251 (Laboratory of Molecular Plant Biology, Stazione Zoologica, Villa Comunale, I-80121 Naples, Italy) (Phaeodactylum tricornutum and Thalassiosira weissflogii); Plant Physiol. 2002 May;129(1):7-12. (Porphyridium sp.); Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Jan 21;100(2):438-42. (Chlamydomonas reinhardtii); Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Feb;87(3):1228-32. (Chlamydomonas reinhardtii); Nucleic Acids Res. 1992 Jun 25;20(12):2959-65; Mar Biotechnol (NY). 2002 Jan;4(1):63-73 (Chlorella); Biochem Mol Biol Int. 1995 Aug;36(5):1025-35 (Chlamydomonas reinhardtii); J Microbiol. 2005 Aug;43(4):361-5 (Dunaliella); Yi Chuan Xue Bao. 2005 Apr;32(4):424-33 (Dunaliella); Mar Biotechnol (NY). 1999 May;1(3):239-251. (Thalassiosira and Phaeodactylum); Koksharova,

[0469]

Appl Microbiol Biotechnol 2002 Feb;58(2):123-37 (various species); Mol Genet Genomics. 2004 Feb;271(1):50-9 (Thermosynechococcus elongates); J. Bacteriol. (2000), 182, 211-215; FEMS Microbiol Lett. 2003 Apr 25;221(2):155-9; Plant Physiol. 1994 Jun;105(2):635-41; Plant Mol Biol. 1995 Dec;29(5):897-907 (Synechococcus PCC 7942); Mar Pollut Bull. 2002;45(1-12):163-7 (Anabaena PCC 7120); Proc Natl Acad Sci U S A. 1984 Mar;81(5):1561-5 (Anabaena (various strains)); Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Mar 27;98(7):4243-8 (Synechocystis); Wirth, Mol Gen Genet 1989 Mar;216(1):175-7 (various species); Mol Microbiol, 2002 Jun;44(6):1517-31 and Plasmid, 1993 Sep;30(2):90-105 (Fremyella diplosiphon); Hall et al. (1993) Gene 124: 75-81 (Chlamydomonas reinhardtii); Gruber et al. (1991). Current Micro. 22: 15-20; Jarvis et al. (1991) Current Genet. 19: 317-322 (Chlorella)

[0470]

[0471] 추가 프로모터는 미국 특허 6,027,900호의 표 1을 참고한다.

[0472] 외인성 유전자를 발현하는데 사용된 프로모터는 이 유전자에 자연적으로 연결된 프로모터일 수 있거나 이종의 유전자일 수 있다. 몇몇의 프로모터는 미세조류의 하나 초과의 종에서 활성이다. 다른 프로모터들은 종-특이적이다. 바람직한 프로모터에는 클라미도모나스 레인하드티로부터의 RBCS2와 같은 프로모터, 및 콜리플라워 모자이크 바이러스(CMV) 및 클로렐라 바이러스와 같은 바이러스 프로모터가 포함되며, 이들은 미세조류의 다수 종에서 활성인 것으로 확인되었다[참조: Plant Cell Rep. 2005 Mar; 23 (10-11): 727-35; J. Microbiol. 2005 Aug; 43(4): 361-5; Mar Biotechnol (NY.) 2002 Jan; 4(1): 63-73]. 다른 구체예에서, 보트리오코쿠스 말레이트 데히드로게나아제 프로모터, 예컨대 서열번호 3의 임의 부분을 포함하는 핵산, 또는 클라미도모나스 레인하드티 RBCS2 프로모터 (서열번호 4)가 사용될 수 있다. 임의로, 적어도 10, 20, 30, 40, 50 또는 60개의 누클레오파이드 또는 그 초과의 이들 서열을 함유하는 프로모터가 사용된다. 클로렐라 속(genus)의 종에 내인성인 바람직한 프로모터는 서열번호 1 및 서열번호 2이다.

[0473] 클로렐라에서 외인성 유전자를 발현하는데 유용한 바람직한 프로모터는 본 출원의 서열 목록에 나열되어 있으며, 그 예로는 클로렐라 HUP1 유전자 (서열번호 1) 및 클로렐라 엘립소이데아 니트레이트 환원효소 프로모터 (서열번호 2)가 있다. 클로렐라 바이러스 프로모터는 또한 클로렐라에서 유전자, 예컨대 미국 특허 6,395,965호의 서열번호 1 내지 7을 발현시키는데 사용될 수 있다. 클로렐라에서 활성인 부가적인 프로모터는 예를 들어 문현(Biochem Biophys Res Commun. 1994 Oct 14; 204 (1): 187-94; Plant Mol Biol. 1994 Oct; 26 (1): 85-93; Virology. 2004 Aug 15; 326(1): 150-9; and Virology. 2004 Jan 5; 318(1): 214-23)에서 확인할 수 있다.

C. 선택가능한 마커

[0474] 광범위한 선택가능한 마커중 임의의 것이 클로렐라를 형질전환시키는데 유용한 이식유전자 작제물에 사용될 수 있다. 선택가능한 적합한 마커의 예에는 니트레이트 환원효소 유전자, 히그로마이신 포스포트랜스퍼라아제 유전자(HPT), 네오마이신 포스포트랜스퍼라아제 유전자, 및 블레 유전자가 포함되는데, 이들 유전자는 플레오마이신에 내성을 제공한다. 항생제에 대한 미세조류의 감도를 측정하는 방법은 널리 공지되어 있다[참조: Mol Gen Genet. 1996 Oct 16; 252(5): 572-9].

[0475] 더욱 구체적으로, 문현(Dawson et al. (1997), Current Microbiology 35: 356-362 (이의 전문이 본원에 참고로 포함됨))에는 NR-결핍된 클로렐라 소로키니아나 돌연변이체에 대한 선택가능한 마커로서 클로렐라 불가리스로부터 니트레이트 환원효소 (NR) 유전자의 사용이 기술되어 있다. 또 다른 문현(Kim et al. (2002), Mar. Biotechnol. 4: 63-73 (이의 전문이 본원에 참고로 포함됨))에는 클로렐라 엘립소이데아를 형질전환시키기 위한 선택가능한 마커로서 HPT 유전자의 사용이 개시되어 있다. 다른 문현(Huang et al. (2007), App. Microbiol. Biotechnol. 72: 197-205 (이의 전문이 본원에 참고로 포함됨))에는 클로렐라 sp. DT에 대해 선택가능한 마커로서 Sh ble의 사용이 보고되어 있다.

D. 유도가능한 발현

[0476] 본 발명은 또한 관심있는 유전자를 발현시키기 위한 유도가능한 프로모터의 사용을 제공한다. 특히, 리파아제 유전자를 발현시키기 위해 유도가능한 프로모터를 사용하면, 미생물 성장 후 필요에 따라 조건이 조절된 경우

리파아제를 생성시켜, 예를 들어 세포의 붕괴, 반응 혼합물의 물 함량의 감소, 및/또는 TAG의 지방산 에스테르로의 전환을 유도하기에 충분한 알코올의 첨가 후에 트랜스에스테르화를 향상시킨다.

[0479] 본 발명에 유용한 유도가능한 프로모터에는 자극, 예컨대 외부적으로 제공된 소분자(예를 들어, 서열번호 1에서 와 같은 글루코오스), 온도(열 또는 냉기), 빛 등에 반응하여 작동가능하게 연결된 유전자의 전사를 조절하는 것들이 포함된다. 적합한 프로모터는 본질적으로 침묵 유전자의 전사, 바람직하게는 실질적으로 낮은 수준에서 전사되는 작동가능하게 연결된 유전자의 전사를 활성화시키거나 상향조절할 수 있다. 후자의 경우에, 리파아제의 전사 수준은 바람직하게는 발현되는 미생물의 성장을 심각하게 방해하지 않는다.

[0480] 클로렐라에서의 이식유전자의 발현은, 클로렐라 헥소스 운반체 유전자(서열번호 1)를 유도하는 프로모터와 같은 프로모터를 통해 유도가능하게 수행될 수 있다. 이 프로모터는 배지 내 글루코오스의 존재에 의해 강하게 활성화된다.

E. 2개 또는 그 초과의 외인성 유전자의 발현

[0481] 추가로, 유전자 공학처리된 미생물, 예컨대 미세조류는 둘 또는 그 초과의 외인성 유전자, 예컨대 리파아제 및 용균 유전자, 예를 들어 다당류 분해하는 효소를 엔코딩하는 것을 포함하며 발현할 수 있다. 하나 또는 둘 모두의 유전자는 이들 유전자의 상대적 타이밍을 조절하여 지질 생산량 및 지방산 에스테르로의 전환율을 향상시킬 수 있는 유도가능한 프로모터를 이용하여 발현될 수 있다. 둘 또는 그 초과의 외인성 유전자의 발현은 동일한 유도가능한 프로모터의 제어 하에서 또는 상이한 유도가능한 프로모터의 제어 하에서 이루어질 수 있다. 후자의 상황에서, 제 1 외인성 유전자의 발현은 제 1 시간(이 동안 제 2 외인성 유전자의 발현은 유도되거나 유도되지 않을 수 있다) 동안 유도될 수 있고, 제 2 외인성 유전자의 발현은 제 2 시간(이 동안 제 1 외인성 유전자의 발현은 유도되거나 유도되지 않을 수 있다) 동안 유도될 수 있다. 수크로오스를 대사하기 위해 지질 생성 미생물을 공학처리하는 벡터 및 방법이 본원에서 제공되는데, 이 점은 이에 의해 공학처리된 세포가 사탕수수 공급원료를 지질로 전환시킬 수 있기 때문에 유리한 특징이 된다.

[0482] 둘 또는 그 초과의 외인성 유전자, 예컨대 지방산 아실-ACP 티오에스테라아제 및 지방산 아실-CoA/알데히드 환원효소(이들의 조합된 작용에 의해 알코올 생성물이 생성된다)를 발현하는 미생물(예를 들어, 미세조류, 유질(oleaginous) 효모, 박테리아 또는 곰팡이)의 유전자 공학처리된 균주가 또한 본원에서 제공된다. 제한없이 알데히드를 생성하기 위해 지방산 아실-ACP 티오에스테라아제 및 지방산 아실-CoA 환원효소를 포함하는 외인성 유전자의 다른 조합물이 추가로 제공된다. 또한, 본원은 알칸을 생성하기 위한 지방산 아실-ACP 티오에스테라아제, 지방산 아실-CoA 환원효소, 및 지방 알데히드 테카르보닐라아제의 조합물을 제공한다. 하나 또는 그 초과의 외인성 유전자는 유도가능한 프로모터를 이용하여 발현될 수 있다.

[0483] 본 발명에 사용하기에 적합한 추가의 개질의 예에는 둘 또는 그 초과의 외인성 유전자, 고정된 탄소 공급원(예컨대 수크로오스)의 운반체를 엔코딩하는 것, 및 제 2의 엔코딩되는 수크로오스 전화효소 효소를 발현시키기 위한 미세조류의 유전자 공학처리된 균주가 포함된다. 생성되는 발효가능한 유기체로부터, 생물학적 탄화수소 생산에 대한 종래 공지된 방법에 의해 얻어질 수 있는 것보다 더 적은 제조 비용으로 탄화수소가 생산된다. 상기 기술된 2개의 외인성 유전자의 삽입은 지향되고/되거나 랜덤한 돌연변이형성을 통해 다당류 생합성의 붕괴와 조합될 수 있으며, 이것은 탄화수소 생성으로의 더욱 큰 탄소 플러스를 가능케한다. 개별적으로 및 조합하여, 영양 전환(trophic conversion), 탄화수소 생산을 변경시키기 위한 공학처리, 및 외인성 효소를 사용한 처리에 의해, 미생물에 의해 생성된 탄화수소 조성이 변경된다. 상기 변경은 생산된 탄화수소 양, 다른 탄화수소에 대해 생성된 하나 또는 그 초과의 탄화수소 종의 양, 및/또는 미생물에서 생산된 탄화수소 종의 타입에서의 변경일 수 있다. 예를 들어, 미세조류는 더욱 많은 양 및/또는 더 높은 백분율의 TAG를 생산하도록 공학처리될 수 있다.

F. 구획화된 발현

[0484] 본 발명은 또한 관심있는 유전자의 구획화된 발현을 제공한다. 특히, 특정의 구체예에서 하나 또는 그 초과의 세포 구획으로 리파아제의 발현을 표적화하는 것이 유리할 수 있는데, 상기 세포 구획에서는 리파아제가 트랜스에스테르화 반응이 개시될 때까지 대부분의 세포 지질로부터 격리된다. 표적화하기 위한 바람직한 세포소기관은 엽록체원형질, 미토콘드리아 및 소포체이다.

1. 엽록체원형질에서의 발현

[0485] 본 발명의 일 구체예에서, 미생물에서 폴리펩티드의 발현은 엽록체원형질로 표적화된다. 엽록체원형질에 대한 이종 유전자의 발현을 표적화하는 방법은 공지되어 있고, 이것이 본 발명에 사용될 수 있다. 외래 유전자 생성

물을 엽록체원형질 내로 표적화하는 방법은 문현(Shrier et al., EMBO J. (1985) 4: 25 32)에 기술되어 있다. 핵 유전자 생성물을 엽록체원형질 내로 전위시키기 위한 트랜지트 웨티드(transit peptide)의 사용에 대해서는, 또 다른 문현(Tomai et al. Gen. Biol. Chem. (1988) 263: 15104 15109 및 미국 특허 제 4,940,835호)을 참고 할 수 있다. 단백질 이동을 엽록체원형질로 지향시키는 방법 또한 문현(Kenauf TIBTECH (1987) 5: 40 47)에서 고찰된다. 클로렐라에 대해 내인성인 서열을 표적화하는 엽록체원형질, 예컨대 엽록체원형질로 표적화되는 단백질을 엔코딩하는 클로렐라 핵 계놈에서의 유전자가 공지되어 있다; 예를 들어, 유전자뱅크 수탁 번호 AY646197 및 AF499684를 참고하길 바란다.

[0489] 와지닌젠 UR-플랜트 리서치 인더내셔널(Wageningen UR-Plant Research International)은 이종 단백질을 엽록체 원형질 스트로마(세포질) 환경 내로 전달하여 이종의 막 시스템을 가로질러 왕복하기 위해 크리сан테움 모리폴리 웜 소 서브단위 단백질(*Chrysanthemum morifolium* small subunit protein)의 분비 신호를 사용하는 IMPACTVECTOR 1.4 벡터를 판매하고 있다. 상기 단백질은 신호 웨티드를 적절하게 가공할 수 있도록 하기 위해 성숙 루비스코 단백질의 첫번째의 11개 아미노산에 융합되어 있다[참조: Wong et al., Plant Molecular Biology 20: 81-93 (1992)]. 신호 웨티드는 RbcS 유전자로부터의 천연 인트론을 함유한다.

[0490] 다른 방법에서, 엽록체원형질 계놈은 이종 단백질을 발현하기 위해 유전자 공학처리된다. 수용체 세포를 외래 DNA로 코팅된 고속 텅스텐 마이크로프로젝털(microparticles)을 사용하여 충격을 가하는 클라미도모나스 레인 하드틸(녹조류)의 엽록체원형질의 안정한 형질전환 기술이 기술되었다. 이에 대해서는 예를 들어 문현(Boynton et al., Science (1988) 240: 1534 1538; Blowers et al. Plant Cell (1989) 1: 123 132 and Debuchy et al., EMBO J. (1989) 8: 2803 2809)을 참고하길 바란다. 텅스텐 마이크로프로젝털스를 이용한 형질전환 기술은 다른 문현(Klein et al., Nature (London) (1987) 7: 70 73)에 기술되어 있다. 식물 및 미세조류 둘 모두에 대한 엽록체원형질 형질전환의 다른 방법이 공지되어 있다. 이에 대해서는 예를 들어 문현(미국 특허 5,693,507호; 6,680,426호; 및 Plant Physiol. 2002 May; 129(1): 7-12; 및 Plant Biotechnol J. 2007 May; 5(3): 402-12)을 참고하길 바란다.

[0491] 미국 특허 번호 제 6,320,101호(카풀란 등에게 2001년 11월 20일자로 등록됨; 이의 전문은 본원에 참고로 포함됨)에 기술되어 있듯이, 세포는 세포 당 엽록체원형질의 수를 약 1개로 감소시키기 위해 화학적으로 처리될 수 있다. 따라서, 이종의 핵산이 하나 이상의 이종 핵산 분자를 엽록체원형질 내로 도입시키기 위해 입자 충격을 통해 세포 내로 도입될 수 있다. 상기 이종 핵산은, 이것이 엽록체원형질에 고유한 효소에 의해 용이하게 수행되는 동종 재조합을 통해 엽록체원형질의 계놈 내로 통합될 수 있도록 선택된다. 이를 위해, 이종 핵산은 관심 있는 유전자에 부가하여 엽록체원형질 계놈으로부터 유래하는 하나 이상의 핵산 서열을 포함한다. 또한, 상기 이종 핵산은 전형적으로 선택가능한 마커를 포함한다. 이 기술에 관련한 추가 상세사항은 미국 특허 번호 제 4,945,050호 및 5,693,507호에서 확인되며, 이를 특허는 본원에 참고로 포함된다. 따라서, 폴리웨티드는 엽록체원형질의 단백질 발현 시스템에 의해 생성될 수 있다.

[0492] 미국 특허 번호 제 7,135,620호(다니엘 등에게 2006년 11월 14일 자로 등록됨; 본원에 참고로 포함됨)는 엽록체 원형질 발현 벡터 및 관련된 방법을 기술하고 있다. 발현 카세트는 엽록체원형질 내에서 코딩 서열을 적절하게 발현시키는 적절한 제어 서열 및 코딩 서열을 포함하는 DNA 작제물이다. 전형적인 발현 카세트는 하기 성분들을 포함한다: 미생물 유전자 또는 엽록체원형질 유전자, 예컨대 엽록체원형질 내에서 관심있는 폴리웨티드를 엔코딩하는 DNA 서열의 전사 및 번역을 제공할 *psbA*로부터의 5' 미번역 구역; 관심있는 폴리웨티드를 엔코딩하는 DNA 서열; 및 번역 및 전사 종결 구역, 예컨대 도입된 유전자의 RNA를 안정화시켜 외래 유전자 발현을 향상시킬 수 있는 엽록체원형질 유전자의 3' 역방위 반복 구역. 상기 카세트는 임의로 항생제 내성 유전자를 포함할 수 있다.

[0493] 전형적으로, 발현 카세트는 적절한 계놈 내로 삽입하기 위한 편리한 제한 부위로 측면이 접해있다(flanked). 발현 카세트는 발현 카세트의 엽록체원형질 계놈 내로의 안정한 통합을 촉진시키기 위해 엽록체원형질 DNA로부터의 DNA 서열, 특히 동종 재조합에 의해 측면이 접해있다. 대안적으로는, 발현 카세트는 통합되지 않은 상태로 유지될 수 있는데, 어느 경우에서든 발현 카세트는 전형적으로 복제의 엽록체원형질 기원을 포함하며, 이것은 엽록체원형질 내에서 이종 DNA의 복제를 제공할 수 있다.

[0494] 발현 카세트는 일반적으로 엽록체원형질 내에서 발현할 수 있는 유전자로부터의 프로모터 구역을 포함한다. 프로모터 구역은 엽록체원형질 유전자, 예컨대 시금치 또는 배로부터의 *psbA* 유전자로부터 얻을 수 있는 프로모터, 또는 옥수수로부터의 *rbcL* 및 *atpB* 프로모터 구역 및 *Rrna* 프로모터를 포함할 수 있다. 프로모터의 예는 문현(Hanley-Bowdoin and Chua, TIBS (1987) 12: 67 70; Mullet et al., Plant Molec Biol. (1985) 4:

39 54; Hanley-Bowdoin (1986) PhD. Dissertation, the Rockefeller University; Krebbers et al., Nucleic Acids Res. (1982) 10: 4985 5002; Zurawaki et al., Nucleic Acids Res. (1981) 9: 3251 3270; and Zurawski et al., Proc. Nat'l Acad Sci. U.S.A. (1982) 79: 7699 7703)에 기술되어 있다. 다른 프로모터가 동정될 수 있고, 이렇게 동정된 프로모터의 상대적인 강도는, 관심있는 5'의 프로모터를 프로모터없는 마커 유전자에 위치시키고, 예를 들어 상대적으로 강한 엽록체원형질 프로모터인 psbA 유전자로부터의 프로모터로부터 얻어진 전사에 대한 이의 유효성을 확인함으로써 평가될 수 있다. 이종 유전자 발현의 유효성은 또한 다양한 기술 중 임의의 것으로 향상될 수 있다. 이러한 기술에는, 이종 유전자에 대해 세로로 나란한(tandem) 5'에 삽입된 다수 프로모터, 예를 들어 이종 psbA 프로모터를 사용하는 것, 인핸서 서열의 부가 등이 포함된다.

[0495] 클로렐라 엽록체원형질에서 활성인 다수의 프로모터가 클로렐라 엽록체원형질, 예컨대 유전자뱅크 수탁 번호 NC_001865(클로렐라 불가리스 엽록체원형질, 완전한 게놈)에서 확인된 것들에서 외인성 유전자의 발현을 위해 사용된다.

[0496] 이종 유전자의 유도가능한 발현의 제공이 요망되는 경우에, (3' 말단에서) 전사 및/또는 번역 수준에서의 조절을 제공하는 서열을 함유하는 5' 미변역된 구역 및/또는 유도가능한 프로모터가 발현 카세트 내에 포함될 수 있다. 예를 들어, 5' 미변역된 구역은 발현이 빛에 의해 조절가능한 유전자로부터 비롯된 것일 수 있다. 유사하게, 3' 역방위 반복 구역은 이종 유전자의 RNA를 안정화시키는데 사용될 수 있었다. 유도가능한 유전자는 관심 있는 특정의 자극에 반응하는 향상된 발현 및 자극의 부재하에서 낮은 발현 또는 무발현에 의해 동정될 수 있다. 예를 들어, 빛 유도가능한 유전자는 빛을 사용한 조사 동안에 향상된 발현이 일어나는 경우에 동정될 수 있는 반면, 실질적으로 감소된 발현 또는 무발현은 적은 양의 빛 또는 무광 하에서 일어난다. 녹조류로부터의 빛 조절된 프로모터는 공지되어 있다[참조: Mol Genet Genomics. 2005 Dec; 274(6): 625-36].

[0497] 사용되는 종결 구역은 주로 편의상 어느 하나일 것인데, 이는 종결 구역이 엽록체원형질 및 박테리아 중에서 비교적 교체가능한 것으로 여겨지기 때문이다. 종결 구역은 자연적으로 전사 개시 구역에 존재할 수 있고, 자연적으로 관심 있는 DNA 서열에 존재할 수 있거나, 다른 공급원으로부터 입수될 수 있다. 이에 대해서는 예를 들어 문현(Chen and Orozo, Nucleic Acids Res. (1988) 16: 8411)을 참고하길 바란다.

[0498] 발현 카세트는 다수의 방법에 의해 관심 있는 식물 세포로 형질전환될 수 있다. 이를 방법에는 예를 들어, 바이오리스틱(biolistic) 방법(참조: Sanford, Trends In Biotech. (1988) 6: 299 302, 미국 특허 번호 제 4,945,050호; 전기천공(참조: Fromm et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA) (1985) 82: 5824 5828); 레이저, 미세조사 또는 DNA를 엽록체원형질 내로 도입할 수 있는 임의의 다른 방법이 포함된다.

[0499] 미세조류와 같은 미생물에 사용하기에 적합한 엽록체원형질 벡터의 추가 설명은 미국 특허 번호 제 7,081,567호 (쥬(Xue) 등에게 2006년 7월 25일자로 등록됨); 6,680,426호(다니엘 등에게 2004년 1월 20일자로 등록됨); 및 5,693,507호(다니엘 등에게 1997년 12월 2일자로 등록됨)에서 확인된다.

[0500] 클로렐라의 핵 게놈에서 발현된 단백질은 엽록체원형질 표적화 신호를 사용하여 엽록체원형질로 표적화될 수 있다. 클로렐라에 내인성인 엽록체원형질 표적화 서열, 예컨대 엽록체원형질로 표적화되는 단백질을 엔코딩하는 클로렐라 핵 게놈에서의 유전자는 공지되어 있다; 이에 대해서는 유전자뱅크 수탁 번호 AY646197 및 AF499684를 참고하길 바란다. 단백질은 또한 유전자를 엽록체원형질 게놈 내로 직접 삽입함으로써 클로렐라 엽록체원형질에서 발현될 수도 있다. 엽록체원형질의 형질전환은 전형적으로 동종 재조합을 통해 일어나며, 엽록체원형질 게놈 서열이 표적화하는 벡터를 형성하는 것으로 공지되어 있다면 실시될 수 있다[클로렐라 엽록체원형질의 완전 게놈 서열에 대해서는 유전자뱅크 수탁 번호 NC_001865 참조]. 엽록체원형질의 형질전환에 대한 상세사항에 대해서는 본원의 전술한 부분을 참고하길 바란다.

2. 미토콘드리아에서의 발현

[0502] 본 발명의 다른 구체예에서, 미생물에서 폴리펩티드의 발현은 미토콘드리아로 표적화된다. 외래 유전자 생성물을, 녹색 미세조류 내에서 것을 포함하여(참조: Mol Genet. 1993 Jan; 236(2-3): 235-44) 미토콘드리아 내로 표적화하는 방법(참조: Boutry et al. Nature (London) (1987) 328: 340 342)은 기술되었다.

[0503] 예를 들어, 적합한 분비 신호를 엔코딩하는 발현 벡터가 미토콘드리아에 대해 이종인 단백질을 표적화할 수 있다. 와지닌진 유알-플랜트 서치 인터내셔널로부터 판매되는 IMPACTVECTOR 1.5 벡터는 미토콘드리아 매트릭스 내에서 단백질을 전달하는 것으로 확인된 효모 CoxIV 분비 신호를 사용한다. 상기 단백질은 신호 웹티드를 적절하게 처리할 수 있도록 하기 위해 효모 CoxIV 단백질의 첫번째의 4개 아미노산에 융합된다[참조: Kohler et al. Plant J 11: 613-621 (1997)]. 녹색 미세조류에서 기능성인 것들을 포함하는 다른 미토콘드리아 표적화 서

열은 공지되어 있다[참조: FEBS Lett. 1990 Jan 29; 260(2): 165-8; and J Biol Chem. 2002 Feb 22; 277(8): 6051-8].

[0504] 클로렐라의 핵 계놈에서 발현된 단백질은 미토콘드리아 표적화 신호를 사용하여 미토콘드리아로 표적화될 수 있다. 미토콘드리아 단백질 표적화 및 형질전환의 상세사항에 대해서는 본원의 전술한 부분을 참고하길 바란다.

3. 소포체에서의 발현

[0506] 본 발명의 다른 구체예에서, 미생물에서 폴리펩티드의 발현은 소포체로 표적화된다. 발현 벡터 내에 적절한 보유 또는 분류 신호를 포함시키면 단백질이 소포체(ER) 내에 유지되어 Golgi 내로 하류로 이동하지 않는다. 예를 들어, 와지닌진 유알-플랜트 리서치 인터내셔널로부터 판매되는 IMPACTVECTOR 1.3 벡터는 널리 공지된 KDEL 보유 또는 분류 신호를 포함한다. 이 벡터를 사용하는 경우, ER 보유는, 발현 수준을 5배 또는 그 초과로 개선시키는 것으로 보고되었다는 점에서 실제적인 이점을 갖는다. 이에 대한 주 이유는, ER이 세포질에서 존재하는 것보다 더 낮은 농도 및/또는 발현된 단백질의 번역후 분해를 담당하는 상이한 프로테아제를 함유하는 것으로 추정된다. 녹색 미세조류에서 기능성인 ER 보유 신호는 공지되어 있다[참조: Proc Natl Acad Sci USA 2005 Apr 26; 102(17):6225-30].

G. 형질전환

[0508] 세포는 예를 들어, 바이오리스틱스, 전기천공, 유리비드 형질전환 및 실리콘 카바이드 단결정 형질전환을 포함하는 임의의 적합한 기술로 형질전환될 수 있다[본원의 실시예 참조].

[0509] 이식유전자를 클로렐라 내로 도입시키기 위한 임의의 편리한 기술이 본 발명에 사용될 수 있다. 도슨(Dawson) 등(상술한 (1997) 문헌)은 클로렐라 불가리스로부터의 니트레이트 환원효소(NR) 유전자를 NR-결핍된 클로렐라 소로키니아나 돌연변이체 내로 도입시키기 위해 마이크로프로젝팅 충격을 사용하여 안정한 형질전환체를 생성시키는 것을 기술하였다. 간단히 말해, 0.4 마이크론의 텅스텐 비드를 플라스미드로 코팅시키고; 3×10^7 C. 소로키니아나 세포를 비선택적인 아가 플레이트의 중심의 1/3로 스프레딩시키고, PDS-1000/He 바이오리스틱 입자 전달[®] 시스템(Biolistic Particle Delivery[®] system)(바이오-라드)으로 충격을 가하였다.

[0510] 이식유전자를 클로렐라 내로 도입시키는 바람직한 방법은 문현(Kim et al. (2002), Biotechnol. 4:63-73)에 기술된 방법이다. 킵은 CaCl_2 및 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 사용하여 클로렐라 엘립소이데아 프로토플라스트의 형질전환을 보고하고 있다. 특히, C. 엘립소이데아 세포를 1 내지 $2 \times 10^8/\text{ml}$ 의 밀도로 성장시킴으로써 프로토플라스트를 제조하였다. 세포들을 회수하고 1600g에서 5분 동안 원심부리하여 세척하고, 0.6M 소르비톨, 0.6M 만니톨, 4% (중량/부피) 셀룰로오스(칼바이오켐), 2% (중량/부피) 마세라아제 (칼바이오켐) 및 50 유닛의 펩티나아제 (시그마)를 함유하는 5ml 포스페이트 완충액 (pH 6.0)에 재현탁시켰다. 세포 혼탁액을 25°C에서 16시간 동안 암실에서 완만하게 진탕시키면서 인큐베이션하였다. 생성된 프로토플라스트를 400g에서 5분 동안 원심분리시켜 수거하였다. 웰렛을 0.6M 소르비톨 및 0.6M 만니톨을 함유하는 5ml의 f/2 배지 중에 서서히 재현탁시키고, 400g에서 5분 동안 원심분리하였다. 이 웰렛을 50mM CaCl_2 를 함유하는 0.6M 소르비톨/만니톨 용액 1 ml 중에 재현탁시켰다. 이후, 5mg의 이식유전자 DNA를, 25 μg 의 소 가슴샘 DNA (시그마)와 함께, 0.4ml에서 10^7 내지 10^8 프로토플라스트가 되도록 첨가하였다. 실온에서 15분 후에, 200 μl 의 PNC(40% 폴리에틸렌 글리콜 4000, 0.8M NaCl , 50 mM CaCl_2)를 첨가하고, 실온에서 30분 동안 천천히 혼합하였다. 이후에, 0.6M 소르비톨/만니톨 용액, 1% 효모 추출물 및 1% 글루코오스가 공급된 0.6ml f/2 배지를 첨가하고, 형질전환된 세포를 세포벽 재생을 위해 암실에서 25°C에서 12시간 동안 인큐베이션하였다. 유사한 방법은 이식유전자를 엔코딩하는 수은함유 환원효소를 클로렐라 sp. DT에 도입시키기 위해 후양 등(상기 (2007) 문헌 참조)에 의해 사용되었다.

[0511] 전기천공이 또한 클로렐라를 형질전환시키는데 사용되었다. 문현(Maruyama et al. (2004), Biotechnology Techniques 8: 821-826; 이의 전문은 본원에 참고로 포함됨)에 보고된 바와 같이, 이 기술은 이식유전자를 정지상에서 세포로부터 제조된 클로렐라 사카로필라 c-211-1a의 프로토플라스트 내로 도입시키는데 사용되었다. 도입된 폴리펩티드의 임시 발현이 600 내지 900 V/cm의 필드 강도 및 약 400ms의 월스 지속력하에서 확인되었는데, 상기 조건에서 70kDa FITC-덱스트란에 대한 높은 막 투과율이 확인되었다.

[0512] 클로렐라에서 이식유전자 발현의 예가 하기 문헌에서 확인될 수 있다:

Current Microbiology Vol. 35 (1997), pp. 356–362; Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao. 2000 Jul;16(4):443-6; Current Microbiology Vol. 38 (1999), pp. 335–341; Appl Microbiol Biotechnol (2006) 72: 197–205; Marine Biotechnology 4, 63–73, 2002; Current Genetics 39:5, 365–370 (2001); Plant Cell Reports 18:9, 778–780, (1999); Biologia Plantarum 42(2): 209–216, (1999); Plant Pathol. J 21(1): 13–20, (2005)).

[0513] [0514] 또한 본원에서의 실시예도 참고하길 바란다.

[0515] 유질 효모(예를 들어, 야로위아 리폴리티카)에서 이식유전자의 발현 예가 문헌에서 확인될 수 있다[참조: Bordes et al., J Microbiol Methods, Jun 27 (2007)]. 곰팡이(예를 들어, 모르티에렐라 알핀, 뮤코르 시르시넬로이데스 및 아스퍼길루스 오크라세우스)에서 이식유전자 발현의 예가 문헌에서 확인될 수 있다[참조: Microbiology, Jul; 153(Pt. 7): 2013–25 (2007); Mol Genet Genomics, Jun; 271(5): 595–602 (2004); Curr Genet, Mar; 21(3): 215–23 (1992); Current Microbiology, 30(2): 83–86(1995); Sakuradani, NISR Research Grant, "Studies of Metabolic Engineering of Useful Lipid-producing Microorganisms" (2004); and PCT/JP2004/012021]. *E. Coli*와 같은 박테리아에서 외인성 유전자의 발현 예는 공지되어 있다[참조: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook et al. (3rd edition, 2001, Cold Spring Harbor Press)].

[0516] 본 발명에 따라 미생물의 형질전환을 위한 벡터는 당업자에게 친숙한 공지된 기술로 제조될 수 있다. 다수 클로렐라 종의 형질전환에 사용된 작제물의 누클레오타이드 서열은 서열번호 25에 상응한다. 일 구체예에서, 미세조류와 같은 미생물에서 리파아제 유전자의 발현을 위한 예시적인 벡터 설계는 미세조류에서 활성인 프로모터와 작동가능하게 연결된 리파아제를 엔코딩하는 유전자를 포함한다. 다르게는, 상기 벡터가 관심있는 유전자와 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하지 않는 경우, 유전자는 이것이 벡터 통합 지점에서 외인성 프로모터에 작동가능하게 연결되도록 세포 내로 형질전환될 수 있다. 형질전환 시에 프로모터를 사용하지 않는 방법은 미세조류에서 작용하는 것으로 입증되었다[참조: Plant Journal 14:4, (1998), pp. 441–447]. 벡터는 또한 예를 들어 항생제 또는 제초제에 내성을 부여하는 단백질을 엔코딩하는 제 2 유전자, 즉 선택가능한 마커를 포함할 수 있다. 임의로, 하나 또는 둘 모두의 유전자(들)는 폴리아데닐화 신호를 포함하는 3'의 미번역된 서열로 뒤 따른다. 2개의 유전자를 엔코딩하는 발현 카세트는 벡터 내에서 또는 개별 벡터 상에서 물리적으로 연결될 수 있다. 개별 벡터 분자가 세포를 형질전환시키기 위해 동시에 사용되는, 미세조류의 공동-형질전환이 또한 사용될 수 있다[참조: Protist 2004 Dec; 155(4): 381–93]. 형질전환된 세포는 임의로, 내성 결핍 세포 카세트가 성장하지 않는 조건 하에서 항생제 또는 다른 선택가능한 마커의 존재하에서 성장하는 능력을 기초로 선택될 수 있다.

[0517] 특히, 특히 출원 및 공보를 포함하는 본원에 인용된 모든 참고문헌은, 이전에 구체적으로 포함되었든지 그렇지 않든지 간에, 이의 전문이 본원에 참고로 포함된다. 본원에 인용된 공보는 본 발명과 함께 사용될 수 있는 시약, 방법론 및 개념을 설명하고 개시하기 위해 인용된 것이다. 본원에서의 어느 것도, 상기 참고문헌들이 본원에 기술된 발명에 관련된 선행기술임을 인정하는 것으로 해석되어서는 안된다.

[0518] 본 발명을 이의 특정 구체예와 관련하여 설명하겠지만, 추가 변경이 이루어질 수 있음이 이해될 것이다. 본원은 일반적으로 본 발명의 원리를 구현하며, 본 발명의 분야에 공지되거나 통상의 실시 내에 있고 본원에서 이전에 설명된 본질적인 특징들에 적용될 수 있는 본 발명의 개시내용으로부터 벗어나는 것을 포함하는, 본 발명의 임의의 변경, 사용 또는 개작을 포함하는 것으로 의도된다.

실시 예

[0519] 하기 실시예는 예시를 위한 것으로 청구된 발명을 제한하려는 것은 아니다.

실시예 1

[0521] 더 유니버시티 오브 텍사스 컬쳐 컬렉션(The University of Texas culture collection)으로부터의 클로렐라 균주를 글리세롤 및 글루코오스에 대한 성장에 대해 시험하였다. 하기하는 클로렐라 종 및 균주를 배양하였다: 클로렐라 캐슬러리(균주 263, 397, 398, 2228); 클로렐라 소로키니아나(균주 1663, 1665, 1669, 1671, 1810);

클로렐라 사카로필라(2911; 2469); 클로렐라 프로토테코이드(31, 249, 250, 264). 각각의 균주를 고체 배지로부터 25ml 액체 배이스 배지(2g/L 효모 추출물, 2.94 mM NaNO₃, 0.17mM CaCl₂ · 2H₂O, 0.3mM MgSO₄ · 7H₂O, 0.4mM K₂HPO₄, 1.28mM KH₂PO₄, 0.43mM NaCl) 내로 접종시키고, 75 μ Em⁻²s⁻¹의 빛 세기 하에서 72시간 동안 27°C에서 진탕시키면서 성장시켰다. 이를 배양액을 각각의 균주를, 2ml의 (a) 배이스 배지만; (b) 0.1% 글루코오스를 함유하는 배이스 배지, 및 (c) 0.5% 시약 등급의 글리세롤(EM Science, 카탈로그 #GX0185-6)를 함유하는 24웰 플레이트 내로 ml 당 1×10^5 세포의 최종 밀도로 접종시키는데 사용하였다. 플레이트를 암실에 두고 27°C에서 72시간 동안 진탕시키면서 성장시켰다. 3개의 조건에서 성장한 각각의 균주 샘플을 중류수 중에서 1.9:1로 회석시키고, 흡광도를 몰리큘러 디바이씨즈 스펙트라맥스(Molecular Devices SpectraMax) 340PC에서 600nm에서 판독하였다. 모든 균주들은 단지 배이스 배지와 비교하여 글루코오스 및 글리세롤의 존재하에서 성장하는 것으로 나타났다.

[0522] 실시예 2

균주 및 배지: 클로렐라 프로토테코이드 #1 (균주 250), #2 (균주 264) 및 클로렐라 캐슬레리 #1 (균주 398)를 텍사스 대학(미국 텍사스 오스틴에 소재함)의 더 컬쳐 컬렉션 오브 알개(The Culture Collection of Algae)로부터 입수하였다. 스톡 배양액을 개질된 프로테오스 배지 상에 유지시켰다. 개질된 프로테오스 배지는 리터 당 0.25g의 NaNO₃, 0.09g K₂HPO₄, 0.175g K₂HPO₄, 0.025g CaCl₂ · 2H₂O, 0.075g MgSO₄ · 7H₂O 및 2g의 효모 추출물로 구성되었다(g/L). 바이오디젤 생산으로부터의 글리세롤 폐물(산성화된 글리세롤(AG) 및 비-산성화된 글리세롤(NAG))을 임페리얼 웨스턴 프로덕츠(Imperial Western Products: 미국 캘리포니아 셀마)로부터 입수하였다. "순수" 또는 "시약 등급" 글리세롤은 EM 사이언스(미크 KGA의 계열사), 카탈로그 #GX0185-6으로부터 입수하였다.

실험 계획 및 성장 측정: 각각의 균주에 대해서, 1ml의 하기한 상이한 배지를 24웰 플레이트에서 제조하였다:

[0525] 1. 프로테오스 + 1% 순수 글리세롤

[0526] 2. 프로테오스 + 1% 산성화된 글리세롤

[0527] 3. 프로테오스 + 1% 비-산성화된 글리세롤

[0528] 4. 프로테오스 + 1% 순수 글리세롤 + 1% 글루코오스 (72시간 후에 첨가됨)

[0529] 5. 프로테오스 + 1% 산성화된 글리세롤 + 1% 글루코오스 (72시간 후에 첨가됨)

[0530] 6. 프로테오스 + 1% 비-산성화된 글리세롤 + 1% 글루코오스 (72시간 후에 첨가)

[0531] 각각의 균주를 상이한 배지에 5×10^5 세포/ml 농도로 접종하였다. 배양액을 암실에 저장하고, 이것을 430rpm에서 라브네트(Labnet: 영국 베크셔에 소재함)제품인 오비탈 진탕기로 교반하였다. 최초 성장 72시간 후에, 1% (w/v) 글루코오스를 #4, 5 및 6에 첨가하고 추가 24시간 동안 배양하였다. 건조 세포 중량을 측정하기 위해, 각 배양액 1ml를 에펜도르프(Eppendorf) 5415C 원심분리기에서 5분 동안 5,000rpm에서 원심분리하여 펠렛화하였다. 상청을 제거한 후에, 세포 펠렛을 -80°C에서 동결시키고 실험실 수준의 냉동 건조기(미국 미주리 랩콩코)에서 냉동건조시켰다. 결과가 도 1에 표시되어 있다.

[0532] 실시예 3

균주 및 배지: 클로렐라 프로토테코이드 #1 (균주 250), #3 (균주 249) 및 클로렐라 캐슬러리 #2 (균주 397)를 텍사스 대학(미국 텍사스 오스틴)의 더 컬쳐 컬렉션 오브 앤게로부터 입수하였다. 스톡 배양액을 개질된 프로테오스 배지 상에 유지시켰다(실시예 2 참조).

실험 설계 및 성장 측정: 각각의 균주에 대해서, 하기 상이한 배지 1ml를 24웰 플레이트 중에서 제조하였다:

[0535] 1. 프로테오스 + 1% 순수 글리세롤 + 1% 글루코오스

[0536] 2. 프로테오스 + 1% 산성화된 글리세롤 + 1% 글루코오스

[0537] 3. 프로테오스 + 1% 비-산성화된 글리세롤 + 1% 글루코오스

[0538] 각각의 균주를 상이한 배지에 5×10^5 세포/ml 농도로 접종하였다. 배양액을 암실에 두고 랩네트(영국 베크셔)

제품인 오비탈 진탕기로 430rpm에서 진탕시켰다. 96시간 후에, 세포 성장을 건조 세포 중량에 대해 측정하였다 (실시예 2 참고). 결과가 도 2에 표시되어 있다.

[0539] 실시예 4

균주 및 배지: 클로렐라 프로토테코이드 #3 (균주 249), #4 (균주 31) 및 클로렐라 캐슬러리 #2 (균주 397)를 텍사스 대학(미국 텍사스 오스틴)의 더 컬쳐 컬렉션 오브 앤게로부터 입수하였다. 스톡 배양액을 개질된 프로테오스 배지 상에 유지시켰다(실시예 2 참조).

실험 설계 및 성장 측정: 각각의 균주에 대해서, 하기 상이한 배지 1ml를 24웰 플레이트 중에서 제조하였다:

1. 프로테오스 + 1% 순수 글리세롤 + 1% 글루코오스

2. 프로테오스 + 1% 산성화된 글리세롤 + 1% 글루코오스

3. 프로테오스 + 1% 비-산성화된 글리세롤 + 1% 글루코오스

각각의 균주를 상이한 글리세롤(순수, 산성화시키거나 비-산성화된)을 함유하는 배지에 5×10^5 세포/ml 농도로 접종하였다. 배양액을 암실에 두고 랩네트(영국 버크셔) 제품인 오비탈 진탕기로 430rpm에서 진탕시켰다. 96시간 후에, 지질 내용물을 측정하였다. 세포 중의 지질 내용물의 양을 측정하기 위해, 100 μ l 배양액을 수거하고 이것을 동일한 양의 배지로 한번 세척하였다. 각각의 투브에, 5 μ l의 세척된 세포 및 200 μ l의 18M 황산을 첨가하였다. 투브를 90°C에서 수조 중에서 30분 동안 인큐베이션하고 1ml의 인산-바닐린 시약을 투브에 첨가하고 37°C에서 15분 동안 인큐베이션하였다. 인산-바닐린 시약을 제조하기 위해서, 0.12g의 바닐린을 20ml의 물에 첨가하고, 85% 인산을 사용하여 부피를 100ml로 조정하였다. 530nm에서의 광 밀도를, 샘플로 5 μ l 물을 함유하는 대조 투브에 대해 유리 큐벳 중에서 판독하였다. 결과가 도 3에 표시되어 있다.

[0546] 실시예 5

균주 및 배지: 클로렐라 프로토테코이드 #2 (균주 264), 및 클로렐라 캐슬러리 #1 (균주 398)를 텍사스 대학(미국 텍사스 오스틴)의 더 컬쳐 컬렉션 오브 앤게로부터 입수하였다. 스톡 배양액을 개질된 프로테오스 배지 상에 유지시켰다(실시예 2 참조).

실험 설계 및 성장 측정: 각각의 균주에 대해서, 하기 상이한 배지 1ml를 24웰 플레이트 중에서 제조하였다:

1. 프로테오스 + 1% 순수 글리세롤 + 1% 글루코오스

2. 프로테오스 + 1% 비-산성화된 글리세롤

3. 프로테오스 + 1% 순수 글리세롤 + 1% 글루코오스 (72시간 후에 첨가함)

4. 프로테오스 + 1% 비-산성화된 글리세롤 + 1% 글루코오스 (72시간 후에 첨가함)

각각의 균주를 상이한 글리세롤(순수하거나 비-산성화된)을 함유하는 배지에 5×10^5 세포/ml 농도로 접종하였다. 배양액을 암실에 두고 랩네트(영국 버크셔) 제품인 오비탈 진탕기로 430rpm에서 진탕시켰다. 최초 성장 72시간 후에, 1% 글루코오스를 샘플 #3 및 #4에 첨가하고 추가 24시간 동안 배양하였다. 지질 내용물을 모든 샘플에서 측정하였다(실시예 4 참고). 비특이적인 흡광도를 체크하기 위해서 600nm에서의 광 밀도를 또한 측정하고, 지질의 양을 계산하기 위해 이것을 O.D. 530nm에서 감하였다. 대조 커브는 1 내지 10 μ g의 범위 내의 클로로포름에 용해시킨 트리올레인으로 구성되었다. 그 결과가 도 4에 표시되어 있다.

[0554] 실시예 6

균주 및 배지: 클로렐라 프로토테코이드 #3 (균주 249), 및 클로렐라 캐슬러리 #2 (균주 397)를 텍사스 대학(미국 텍사스 오스틴)의 더 컬쳐 컬렉션 오브 앤게로부터 입수하였다. 스톡 배양액을 개질된 프로테오스 배지 상에 유지시켰다(실시예 2 참조).

실험 설계 및 성장 측정: 각각의 균주에 대해서, 하기 상이한 배지 1ml를 24웰 플레이트 중에서 제조하였다:

1. 프로테오스 + 1% 순수 글리세롤 + 1% 글루코오스 (72시간 후에 첨가함)

2. 프로테오스 + 1% 산성화된 글리세롤 + 1% 글루코오스 (72시간 후에 첨가함)

3. 프로테오스 + 1% 비-산성화된 글리세롤 + 1% 글루코오스 (72시간 후에 첨가함)

[0560] 각각의 균주를 상이한 글리세롤(순수하거나 산성화시키거나 비-산성화된)을 함유하는 배지에 5×10^5 세포/ml 농도로 접종하였다. 배양액을 암실에 두고 랩네트(영국 버크셔) 제품인 오비탈 진탕기로 430rpm에서 진탕시켰다. 최초 성장 72시간 후에, 1% 글루코오스를 첨가하고 추가 24시간 동안 배양하였다. 건조시킨 세포 중량 및 지질 내용물을 모든 샘플에서 측정하였다(실시예 2 및 5 참고). 지질 백분율을 건조시킨 세포 중량으로 나눈 전체 지질 양으로부터 계산하였다. 결과가 도 5에 표시되어 있다.

[0561] 실시예 7

[0562] 균주 및 배지: 클로렐라 프로토테코이드 #2 (균주 264), 및 클로렐라 캐슬러리 #1 (균주 398)를 텍사스 대학(미국 텍사스 오스틴)의 더 컬쳐 컬렉션 오브 앤게로부터 입수하였다. 스톡 배양액을 개질된 프로테오스 배지 상에 유지시켰다(실시예 2 참조).

[0563] 실험 설계 및 성장 측정: 각각의 균주에 대해서, 하기 상이한 배지 1ml를 24웰 플레이트 중에서 제조하였다:

[0564] 1. 프로테오스 + 1% 순수 글리세롤 + 1% 글루코오스 (72시간 후에 첨가함)

[0565] 2. 프로테오스 + 1% 비-산성화된 글리세롤 + 1% 글루코오스 (72시간 후에 첨가함)

[0566] 각각의 균주를 1% 순수 또는 1% 비-산성화된 글리세롤을 함유하는 배지에 5×10^5 세포/ml 농도로 접종하였다. 배양액을 암실에 두고 랩네트(영국 버크셔) 제품인 오비탈 진탕기로 430rpm에서 진탕시켰다. 최초 성장 72시간 후에, 1% 글루코오스를 첨가하고 추가 24시간 동안 배양하였다. 건조시킨 세포 중량 및 지질 내용물을 모든 샘플에서 측정하였다(실시예 1 및 4 참고). 지질 백분율을 건조시킨 세포 중량으로 나눈 전체 지질 양으로부터 계산하였다. 결과가 도 6에 표시되어 있다.

[0567] 실시예 8

[0568] 균주 및 배지: 클로렐라 프로토테코이드 #1 (균주 250), #4 (균주 31), 및 클로렐라 캐슬러리 #2 (균주 397)를 텍사스 대학(미국 텍사스 오스틴)의 더 컬쳐 컬렉션 오브 앤게로부터 입수하였다. 스톡 배양액을 개질된 프로테오스 배지 상에 유지시켰다(실시예 2 참조).

[0569] 실험 설계 및 성장 측정: 각각의 균주에 대해서, 하기 상이한 배지 1ml를 24웰 플레이트 중에서 제조하였다:

[0570] 1. 프로테오스 + 2% 글루코오스

[0571] 2. 프로테오스 + 1% 글리세롤 + 1% 글루코오스

[0572] 각각의 균주를 상이한 배지에 5×10^5 세포/ml 농도로 접종하였다. 배양액을 암실에 두고 랩네트(영국 버크셔) 제품인 오비탈 진탕기로 430rpm에서 진탕시켰다. 최초 성장 96시간 후에, 지질 내용물을 측정하였다(실시예 5 참고). 결과가 도 7에 표시되어 있다.

[0573] 실시예 9

[0574] 균주 및 배지: 클로렐라 프로토테코이드 #3 (균주 249), #4 (균주 31), 및 클로렐라 캐슬러리 #1 (균주 398)를 텍사스 대학(미국 텍사스 오스틴)의 더 컬쳐 컬렉션 오브 앤게로부터 입수하였다. 스톡 배양액을 개질된 프로테오스 배지 상에 유지시켰다(실시예 2 참조).

[0575] 실험 설계 및 성장 측정: 각각의 균주에 대해서, 하기 상이한 배지 1ml를 24웰 플레이트 중에서 제조하였다:

[0576] 1. 프로테오스 + 2% 글리세롤

[0577] 2. 프로테오스 + 1% 글리세롤 + 1% 글루코오스

[0578] 3. 프로테오스 + 1% 글리세롤 + 1% 글루코오스 (72시간 후에 첨가함)

[0579] 각각의 균주를 상이한 배지에 5×10^5 세포/ml 농도로 접종하였다. 배양액을 암실에 두고 랩네트(영국 버크셔) 제품인 오비탈 진탕기로 430rpm에서 진탕시켰다. 최초 성장 72시간 후에, 1% (w/v) 글루코오스를 #3 배지에 첨가하고 추가 24시간 동안 배양하였다. 건조시킨 세포 중량 및 지질 내용물을 모든 샘플에서 측정하였다(실시예 2 및 5 참고). 지질 백분율을 건조시킨 세포 중량으로 나눈 전체 지질 양으로부터 계산하였다. 결과가 도 8에 표시되어 있다.

[0580] **실시예 10**

균주 및 배지: 클로렐라 프로토테코이드 #1 (균주 250), #3 (균주 249), 및 클로렐라 캐슬러리 #2 (균주 397)를 텍사스 대학(미국 텍사스 오스틴)의 더 컬쳐 컬렉션 오브 앤게로부터 입수하였다. 스톡 배양액을 개질된 프로테오스 배지 상에 유지시켰다(실시예 2 참조).

실험 설계 및 성장 측정: 각각의 균주에 대해서, 하기 상이한 배지 1ml를 24웰 플레이트 중에서 제조하였다:

1. 프로테오스 + 1% 순수 글리세롤 + 1% 글루코오스

2. 프로테오스 + 1% 순수 글리세롤 + 1% 글루코오스 (72시간 후에 첨가함)

3. 프로테오스 + 1% 산성화된 글리세롤 + 1% 글루코오스

4. 프로테오스 + 1% 산성화된 글리세롤 + 1% 글루코오스 (72시간 후에 첨가함)

5. 프로테오스 + 1% 비-산성화된 글리세롤 + 1% 글루코오스

6. 프로테오스 + 1% 비-산성화된 글리세롤 + 1% 글루코오스 (72시간 후에 첨가함)

각각의 균주를 상이한 배지에 5×10^5 세포/ml 농도로 접종하였다. 배양액을 암실에 두고 랩네트(영국 베크셔) 제품인 오비탈 진탕기로 430rpm에서 진탕시켰다. 최초 성장 72시간 후에, 1% (w/v) 글루코오스를 #2, #4 및 #6 배지에 첨가하고 추가 24시간 동안 배양하였다. 지질 내용물을 모든 샘플에서 측정하였다(실시예 4 참고). 결과가 도 9에 표시되어 있다.

[0589] **실시예 11**

균주 및 배지: 클로렐라 프로토테코이드 #1 (균주 250), #3 (균주 249), #4 (균주 31) 및 클로렐라 캐슬러리 #2 (균주 397)를 텍사스 대학(미국 텍사스 오스틴)의 더 컬쳐 컬렉션 오브 앤게로부터 입수하였다. 스톡 배양액을 개질된 프로테오스 배지 상에 유지시켰다(실시예 2 참조).

실험 설계 및 성장 측정: 각각의 균주에 대해서, 하기 상이한 배지 1ml를 24웰 플레이트 중에서 제조하였다:

1. 프로테오스 + 1% 순수 글리세롤 + 1% 글루코오스

2. 프로테오스 + 1% 순수 글리세롤 + 1% 글루코오스 (72시간 후에 첨가함)

3. 프로테오스 + 1% 산성화된 글리세롤 + 1% 글루코오스

4. 프로테오스 + 1% 산성화된 글리세롤 + 1% 글루코오스 (72시간 후에 첨가함)

5. 프로테오스 + 1% 비-산성화된 글리세롤 + 1% 글루코오스

6. 프로테오스 + 1% 비-산성화된 글리세롤 + 1% 글루코오스 (72시간 후에 첨가함)

각각의 균주를 상이한 배지에 5×10^5 세포/ml 농도로 접종하였다. 배양액을 암실에 두고 랩네트(영국 베크셔) 제품인 오비탈 진탕기로 430rpm에서 진탕시켰다. 최초 성장 72시간 후에, 1% (w/v) 글루코오스를 #2, #4 및 #6 배지에 첨가하고 추가 24시간 동안 배양하였다. 건조시킨 세포 중량을 모든 샘플에서 측정하였다(실시예 2 참고). 결과가 도 10에 표시되어 있다.

[0590] **실시예 12**벡터 작제

CMV 프로모터, 히그로마이신 내성 cDNA 및 CMV 3' UTR (서열번호 5, 오스트레일리아 캔버라에 소재한 캠비아로부터의 pCAMBIA 1380 벡터의 서열)을 함유하는 BamHI-SacII 단편을 pBluescript의 BamHI 및 SacII 부위 내로 클로닝하였는데, 이것을 본원에서 pHyg라 칭한다.

클로렐라의 바이오리스틱 형질전환

씨쉘 테크놀로지(Seashell Technology)로부터의 S550d 골드 캐리어를 제조업자로부터의 프로토콜에 따라 제조하였다. 선형화된 pHyg 플라스미드 ($20\mu\text{g}$)를 $50\mu\text{l}$ 결합 완충액 및 $60\mu\text{l}$ (30mg)의 S550d 골드 캐리어와 혼합하고, 이것을 1분 동안 얼음 중에서 인큐베이션하였다. 침전 완충액 ($100\mu\text{l}$)을 첨가하고, 혼합물을 추가 1분 동안 얼음 중에서 인큐베이션하였다. 교반 후에, DNA 코팅된 입자를 에펜도르프 5415C 원심분리기에서 10,000rpm에서

10초 동안 회전시킴으로써 펠렛화하였다. 상기 골드 펠렛을 $500\mu\text{l}$ 의 차가운 100% 에탄올로 1회 세척하고, 원심 분리기에서 간단히 회전시켜 펠렛화시키고, 이것을 $50\mu\text{l}$ 얼음 냉각시킨 에탄올과 함께 재현탁시켰다. 간단하게 (1 내지 2초) 초음파 처리한 후에, $10\mu\text{l}$ 의 DNA-코팅된 입자를 캐리어 막으로 즉각 옮겼다.

[0605] 클로렐라 프로토테코이드 배양액(텍사스 대학 컬쳐 컬렉션 250)을, 이것이 2×10^6 세포/ mL 의 세포 밀도에 도달할 때까지, $75\mu\text{mol}$ 광자 $\text{m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ 의 연속적인 빛 아래에서 회전식 진탕기 상에서 프로테오스 배지(2g/L 효모 추출물, 2.94mM NaNO_3 , 0.17mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.3mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.4mM K_2HPO_4 , 1.28mM KH_2PO_4 , 0.43mM NaCl) 중에서 성장시켰다. 세포를 수확하고, 멸균 증류수로 1회 세척하고, $50\mu\text{l}$ 의 배지에 재현탁시켰다. 1×10^7 세포가 비선택적인 프로테오스 배지 플레이트의 중심의 1/3에서 스프레딩되었다. 세포에 PDS-1000/He 바이오리스틱 입자 전달 시스템(바이오-라드)을 사용하여 충격을 가하였다. 럽쳐 디스크(rupture disk)(1100 및 1350 psi)를 사용하였고, 플레이트를 스크린/매크로캐리어 조립체의 9cm 및 12cm 아래에 위치시켰다. 세포를 25°C 에서 12 내지 24시간 동안 회수하게 하였다. 회수 후에, 세포를 고무 주걱을 이용하여 플레이트로부터 긁어 내고, $100\mu\text{l}$ 배지와 혼합하고, 히그로마이신 함유된 플레이트($200\mu\text{g/mL}$) 상에서 스프레딩시켰다. 25°C 에서 7 내지 10일 동안 인큐베이션시킨 후에, 형질전환된 세포를 나타내는 콜로니가 1100 내지 1350psi 럽쳐 디스크로부터 9cm 및 12cm 거리에서 플레이트 상에서 확인되었다. 콜로니를 채집하고 제 2 라운드의 선택을 위해 선택적인 아가 플레이트 상에 스풋팅하였다.

전기천공에 의한 클로렐라의 형질전환

[0607] 클로렐라 프로토테코이드 배양액을, 이것이 2×10^6 세포/ mL 의 세포 밀도에 도달할 때까지, $75\mu\text{mol}$ 광자 $\text{m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ 의 연속적인 빛 아래에서 회전식 진탕기 상에서 프로테오스 배지 중에서 성장시켰다. 세포를 수확하고, 멸균 증류수로 1회 세척하고, 50mM 수크로오스를 함유하는 트리스-포스페이트 완충액(20mM 트리스-HCl, $\text{pH } 7.0$; 1mM 인산칼륨) 중에서 4×10^8 세포/ mL 의 밀도로 재현탁시켰다. 약 $250\mu\text{l}$ 의 세포 혼탁액(1×10^8 세포)을 4mm 틈이 있는 일회용 전기천공 큐벳에 위치시켰다. 상기 세포 혼탁액에 $5\mu\text{g}$ 의 선형화된 pHyg 플라스미드 DNA 및 $200\mu\text{g}$ 의 캐리어 DNA(전단된 염어 정자 DNA)를 첨가하였다. 이후, 상기 전기천공 큐벳을 수조 중의 16°C 에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 전기 펄스(1100V/cm)를 이후 진 펄서(Gene Pulser) II (캘리포니아 허큘스 바이오-라드 랩스) 전기천공 장치를 이용하여 $25\mu\text{F}$ 의 커페시턴스(전기천공을 위해 션트 저항체(shut resistor)를 사용하지 않았다)에서 상기 큐벳에 가하였다. 큐벳을 이후 실온에서 5분 동안 인큐베이션시킨 다음, 세포 혼탁액을 50mL 프로테오스 배지로 옮기고 회전식 진탕기 상에서 2일 동안 진탕시켰다. 회수 후에, 세포를 저속에서 원심 분리시켜 수확하고, 이것을 프로테오스 배지에 재현탁시키고, $200\mu\text{g/mL}$ 히그로마이신이 공급된 플레이트 상에서 저밀도로 플레이팅하였다. 플레이트를 $75\mu\text{mol}$ 광자 $\text{m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ 의 연속적인 빛 아래에서 인큐베이션하였다. 1 내지 2주 내에 형질변환체가 콜로니로 나타났다. 콜로니를 채집하고 제 2 라운드의 선택을 위해 선택적인 아가 플레이트 상에 스풋팅하였다.

유전자형 결정(genotyping)

[0608] 제 2 라운드의 선택에서 생존한 콜로니 서브셋을 소 용량으로 배양시키고 수확하였다. 대략 5 내지 $10\mu\text{l}$ 부피의 펠렛을 교반에 의해 10mM NaEDTA $50\mu\text{l}$ 에 재현탁시킨 다음, 100°C 에서 10초 동안 인큐베이션하였다. 그런 다음, 튜브를 간단하게 교반시키고 10초 동안 초음파처리한 다음, $12,000 \times g$ 에서 1분 동안 원심분리하였다. 주형으로서 $2\mu\text{l}$ 의 상청을 $50\mu\text{l}$ PCR 반응에 사용하였다. 제노타이핑에 사용된 프라이머는 서열번호 6 및 서열번호 7이었다. PCR 조건은 다음과 같았다: 95°C 5분 \times 1 주기; 95°C 30초 - 58°C 30초 - 72°C 1분 30초 \times 35주기; 72°C 10분 \times 1주기. 예상된 992bp 단편이 바이오리스틱 방법 및 단일 전기천공 콜로니로부터의 10개의 콜로니 중 6개에서 확인되었다. 더 작은 크기의 비특이적 밴드가 모든 레인에 존재하였다. 결과가 도 16에 표시되어 있다. 증폭된 992bp 단편의 밀도를 확인하기 위해서, 2개의 바이오리스틱 밴드 및 전기천공 밴드를 젤로부터 잘라내어 개별적으로 서열화하였다. 3개의 모든 밴드의 서열은 예상된 992bp 단편에 상응하였다(DNA 래더: 바이오넥서스(Bionexus)[®] 올 퍼포스 Hi-Lo[®] DNA 래더 카탈로그 #BN2050).

실시예 13

[0611] 균주 및 배지: (a) 스피룰리나 플라텐시스 (UTEX 2340) 및 (b) 나비쿨라 폐리쿨로사 (UTEX 667)을 텍사스 대학 (미국 텍사스 오스틴)의 더 컬쳐 컬렉션 오브 알게로부터 입수하였다. 스피룰리나의 스톡 배양액을 스피룰리나 배지 중에 유지시키고, 나비쿨라는 토양 추출물 배지 (SEM) 중에서 유지시켰다. 스피룰리나 배지는 162mM

NaHCO₃, 38mM Na₂CO₃, 1.9mM K₂HPO₄, 29mM NaNO₃, 5.75mM K₂SO₄, 17.1mM NaCl, 0.8mM MgSO₄ · 7H₂O, 0.25mM CaCl₂ · 2H₂O, 2mM Na₂EDTA, 0.36mM FeCl₃ · 6H₂O, 0.21mM MnCl₂ · 4H₂O, 0.037mM ZnCl₂, 0.0085mM CoCl₂ · 6H₂O, 0.017mM NaMoO₄ · 2H₂O, 0.78 μM CuSO₄ · 5H₂O, 0.15 μM ZnSO₄ · 7H₂O, 10 μM H₃BO₃, 및 0.001mM 비타민 B₁₂로 구성되었다. 토양 추출물 배지는 2.94mM NaNO₃, 0.17mM CaCl₂ · 2H₂O, 0.3mM MgSO₄ · 7H₂O, 0.43mM K₂HPO₄, 1.29mM KH₂PO₄, 0.43mM NaCl 및 토양 추출물로 구성되었다. 바이오디젤 생산으로부터의 글리세롤 폐물(산성화된 글리세롤(AG) 및 비-산성화된 글리세롤 (NAG))을 임페리얼 웨스턴 프로덕츠(미국 캘리포니아 셀마)로부터 입수하였다.

[0612] 실험 설계 및 성장 측정: 각각의 균주에 대해서, 하기 상이한 배지 1ml를 24웰 플레이트 중에서 제조하였다:

[0613] (a)

[0614] 7. 스피룰리나 배지 + 2% 글루코오스

[0615] 8. 스피룰리나 배지 + 2% 시약 등급 글리세롤

[0616] 9. 스피룰리나 배지 + 2% 비-산성화된 글리세롤

[0617] 10. 스피룰리나 배지 + 1% 비-산성화된 글리세롤 + 1% 글루코오스

[0618] (b)

[0619] 1. SEM + 2% 글루코오스

[0620] 2. SEM + 2% 시약 등급 글리세롤

[0621] 3. SEM + 1% 시약 등급 글리세롤 + 1% 글루코오스

[0622] 4. SEM + 2% 산성화된 글리세롤

[0623] 5. SEM + 1% 산성화된 글리세롤 + 1% 글루코오스

[0624] 6. SEM + 2% 비-산성화된 글리세롤

[0625] 7. SEM + 1% 비-산성화된 글리세롤 + 1% 글루코오스

[0626] 각각의 균주를 상이한 배지에 5×10^5 세포/ml 농도로 접종하였다. 배양액을 암실에 유지시키고, 랩네트(영국 버크셔) 제품인 오비탈 진탕기로 430rpm에서 진탕시켰다. 96시간 후에, 지질 내용물을 측정하였다. 세포 중의 지질 내용물의 양을 측정하기 위해서, 100μl 배양액을 수집하고 이것을 동일한 부피의 배지로 1회 세척하였다. 각각의 튜브에, 5μl의 세척된 세포 및 200μl의 18M 황산을 첨가하였다. 튜브를 90°C의 수조에서 30분 동안 인큐베이션시키고, 1ml의 인산-바닐린 시약을 튜브에 첨가하고 37°C에서 15분 동안 인큐베이션하였다. 인산-바닐린 시약을 제조하기 위해서, 0.12g의 바닐린을 20ml의 물에 첨가하고, 85% 인산을 사용하여 부피를 100ml로 조절하였다. 530nm에서의 광 밀도를, 샘플로 5μl 물을 함유하는 대조 튜브에 대해 유리 큐벳에서 판독하였다. 대조 곡선은 1 내지 10μg 범위의 클로로포름 중에 용해된 트리올레인으로 구성되었다.

[0627] 건조 세포 중량을 측정하기 위해, 각 배양액 0.5ml를 5분 동안 5,000rpm에서 원심분리로 펠렛화하였다. 상청을 제거한 후에, 세포 펠렛을 -80°C에서 동결시키고 냉동 건조 시스템(미국 미주리 웹콩코)에서 밤새 건조시켰다. 지질 백분율을 건조된 세포 중량으로 나눈 전체 지질 양으로부터 계산하였다. 결과가 도 11에 표시되어 있다.

실시예 14

[0629] 균주 및 배지: 썬테스무스 아르마투스 (UTEX 2552)를 텍사스 대학(미국 텍사스 오스틴)의 더 컬쳐 컬렉션 오브 알게로부터 입수하였다. 스톡 배양액을 개질된 프로테오스 배지 상에 유지시켰다. 개질된 프로테오스 배지는 리터 당 0.25g NaNO₃, 0.09g K₂HPO₄, 0.175g KH₂PO₄, 0.025g CaCl₂ · 2H₂O, 0.075g MgSO₄ · 7H₂O, 및 2g의 효모 추출물로 구성되었다(g/L).

[0630] 실험 설계 및 성장 및 지질 측정: 각각의 성장 조건에 대해서, 하기 상이한 배지 1ml를 24웰 플레이트 중에서 제조하였다:

[0631] (a), (b)

[0632] 1. 프로테오스 + 2% 글루코오스

[0633] 2. 프로테오스 + 2% 글리세롤

[0634] 3. 프로테오스 + 2% 산성화된 글리세롤

[0635] 4. 프로테오스 + 2% 비-산성화된 글리세롤

[0636] 5. 프로테오스 + 1% 비-산성화된 글리세롤 + 1% 글루코오스

[0637] 씬데스무스 아르마투스 (UTEX 2552)를 상이한 배지에 5×10^5 세포/ml 농도로 접종하였다. 배양액을 암실에 유지시키고 랙네트(영국 베크셔) 제품인 오비탈 진탕기로 430rpm에서 진탕시켰다. 96시간 후에, 세포 성장을 건조 세포 중량으로 측정하고, 지질 내용물을 인-바닐린 검정으로 측정하였다 (실시예 13 참고). 지질 백분율을 건조시킨 세포 중량으로 나눈 전체 지질 양으로부터 계산하였다. 결과가 도 12에 표시되어 있다.

실시예 15

[0639] 균주 및 배지: 나비쿨라 페리쿨로사 (UTEX 667)를 텍사스 대학(미국 텍사스 오스틴)의 더 컬처 컬렉션 오브 알게로부터 입수하였다. 스톡 배양액을 토양 추출물 배지 상에 유지시켰다 (실시예 13 참고).

[0640] 실험 설계 및 성장 측정: 각각의 성장 조건에 대해서, 하기 상이한 배지 1ml를 24웰 플레이트 중에서 제조하였다:

[0641] 1. SEM + 2% 글루코오스

[0642] 2. SEM + 2% 글리세롤

[0643] 3. SEM + 2% 산성화된 글리세롤

[0644] 4. SEM + 1% 산성화된 글리세롤 + 1% 글루코오스

[0645] 5. SEM + 2% 비-산성화된 글리세롤

[0646] 6. SEM + 1% 비-산성화된 글리세롤 + 1% 글루코오스

[0647] 나비쿨라 페리쿨로사 (UTEX 667)를 글루코오스 또는 상이한 글리세롤(순수, 산성화되거나 비-산성화된)을 함유하는 배지에 5×10^5 세포/ml 농도로 접종하였다. 배양액을 암실에 유지시키고 랙네트(영국 베크셔) 제품인 오비탈 진탕기로 430rpm에서 진탕시켰다. 96시간 후에, 세포 성장을 건조 세포 중량으로 측정하였다 (실시예 13 참고). 결과가 도 13에 표시되어 있다.

실시예 16

[0649] 균주 및 배지: 씬데스무스 아르마투스 (UTEX 2552) 및 나비쿨라 페리쿨로사를 텍사스 대학(미국 텍사스 오스틴)의 더 컬처 컬렉션 오브 알게로부터 입수하였다. 스톡 배양액을 씬데스무스 아르마투스에 대해서는 개질된 프로테오스 배지 상에서 그리고 나비쿨라 페리쿨로사에 대해서는 토양 추출물 배지 상에서 유지시켰다 (실시예 1 참고).

[0650] 실험 설계 및 성장 측정: 각각의 성장 조건에 대해서, 하기 상이한 배지 1ml를 24웰 플레이트 중에서 제조하였다:

[0651] 씬데스무스 아르마투스

[0652] 5. 프로테오스 + 1% 산성화된 글리세롤 + 1% 글루코오스

[0653] 6. 프로테오스 + 1% 산성화된 글리세롤 + 1% 글리세롤 (72시간 후에 첨가됨)

[0654] 나비쿨라 페리쿨로사

[0655] 1. SEM + 1% 산성화된 글리세롤 + 1% 글루코오스

[0656] 2. SEM + 1% 산성화된 글리세롤 + 1% 글리세롤 (72시간 후에 첨가됨)

[0657] 각각의 균주를 배지에 5×10^5 세포/ml 농도로 접종하였다. 배양액을 암실에 유지시키고 랙네트(영국 베크셔) 제품인 오비탈 진탕기로 430rpm에서 진탕시켰다. 최초 성장 72시간 후에, 1% 글루코오스를 샘플 #2에 첨가하고 추가 24시간 동안 배양시켰다. 세포 성장을 건조 세포 중량으로 측정하였다 (실시예 13 참고). 결과가 도 14

에 표시되어 있다.

실시예 17

균주 및 배지: 클로렐라 프로토테코이드 (UTEX 31)를 텍사스 대학(미국 텍사스 오스틴)의 더 컬처 컬렉션 오브 알제로부터 입수하였다. 스톡 배양액을 개질된 프로테오스 배지 상에 유지시켰다 (실시예 1 참고).

실험 설계: 각각의 조건에 대해서, 하기 상이한 배지 1ml를 24웰 플레이트 중에서 제조하였다:

4. 프로테오스

5. 프로테오스 + 0.5% 글루코오스

6. 프로테오스 + 0.5% 자일로스

7. 프로테오스 + 0.25% 글루코오스 + 0.25% 자일로스

클로렐라 프로토테코이드 #4 (UTEX 31)를 상이한 당 (글루코오스 또는 자일로스)을 함유하는 배지에 3×10^5 세포/ml 농도로 접종하였다. 배양액을 암실에 유지시키고 랩네트(영국 버크셔) 제품인 오비탈 진탕기로 430rpm에서 진탕시켰다. 성장 72시간 후에, 세포 성장을 각 배양액의 세포 수를 계수하여 측정하였다. 결과가 도 15에 표시되어 있다.

실시예 18

클로렐라 프로토테코이드 균주 #1, #3, 및 #4를 텍사스 대학(미국 텍사스 오스틴)의 더 컬처 컬렉션 오브 알제로부터 입수하였다. 스톡 배양액을 개질된 프로테오스 배지 상에 유지시켰다 (실시예 1 참고). 각각의 조건에 대해서, 하기 상이한 배지 1ml를 24웰 플레이트 중에서 제조하였다:

1. 프로테오스

2. 프로테오스 + 1% 글루코오스

3. 프로테오스 + 1% 프럭토스

각각의 균주를 상이한 당 (글루코오스 또는 프럭토스)을 함유하는 배지에 1×10^6 세포/ml 농도로 접종하였다. 배양액을 암실에 유지시키고 랩네트(영국 버크셔) 제품인 오비탈 진탕기로 430rpm에서 진탕시켰다. 성장 96시간 후에, 세포 밀도를 각 배양액의 세포 수를 계수하여 측정하였다. 결과가 도 20에 표시되어 있다.

실시예 19

수크로오스 상에서의 클로렐라

물질 및 방법: 클로렐라 프로토테코이드 (UTEX 249)를 1% 수크로오스를 함유하는 프로테오스 배지 (2.94mM NaNO₃, 0.428mM K₂HPO₄, 1.28mM KH₂PO₄, 0.427mM NaCl, 0.17mM CaCl₂ · 2H₂O, 0.3M MgSO₄ · 7H₂O, 프로테오스 웨튼 1g/L)의 3개의 50ml 플라스크 내로 ml 당 4×10^5 세포의 최종 세포 밀도로 접종하였다. 전화효소 (시그마 #I4504)를 0.01U/ml 및 0.05U/ml의 2개의 배양액에 첨가하였다. 3개의 모든 배양액을 150rpm에서 진탕시키면서 약 60시간 동안 암실에서 성장시켰다.

결과: 최종 세포 계수를, 암실에서 약 60시간 동안 진탕시킨 후의 3개의 모든 배양액에 대해 실시하였다. 대조 플라스크는 ml 당 4.4×10^5 세포에 도달한 반면, 0.01U/ml 및 0.05U/ml 플라스크에서는 각각 1×10^8 및 3×10^8 의 세포 밀도에 도달하였다. 각각의 플라스크를 현미경 분석에 의해 실험 마지막에 오염에 대해 체크하였으나, 모두가 깨끗하였다.

실시예 20

수크로오스 상에서 성장하는 클로렐라 균주

클로렐라 캐슬러리 ((a) UTEX 397 및 (b) UTEX 398) 및 클로렐라 푸스카 ((a) UTEX 251 및 (b) UTEX 1801)의 배양액을 자가영양 액체 배양액으로부터 50ml 플라스크 중의 프로테오스 + 1% 수크로오스 배지 10ml 내로 1×10^6 세포/ml에서 접종하였다. 대조 배양액을 또한 단지 프로테오스 배지만을 사용하여 동일한 밀도에서 접종하

였다. 배양액을 7일 동안 250rpm에서 진탕시키면서 암실 중의 28°C에서 성장시키고, 그 시점에서 세포 밀도를 혈구계로 측정하였다. 도 21 내지 22에 표시된 바대로, 초기 세포 밀도 및 프로테오스 만을 함유하는 대조와 비교하여 4개의 모든 균주가 수크로오스 상에서 성장하였다.

[0679] 실시예 21

[0680] 수크로오스 전화효소를 함유하는 당밀 상에서의 클로렐라 프로토테코이드 성장

[0681] 접종을 위한 클로렐라 세포의 제조: 고체 프로테오스 플레이트로부터 접종편을 취하여 클로렐라의 10ml의 액체 배양을 개시하였다. 배양액을 대략 2일 동안 26°C에서 빛 아래서 성장시켰다. 750nm에서 광 밀도계 (OD)를 사용하여 그리고 건조 세포 중량을 측정함으로써 성장을 측정하였다.

[0682] 당밀 및 당 스톡 용액의 제조: 하기 표 13에 표시된 바와 같은, 사탕수수의 당으로의 상업적 가공으로부터 얻어진 글루코오스, 수크로오스 및 3개의 상이한 당밀 샘플(표지된 BS1, BS2 및 HTM)을 사용하여 5% 스톡 용액을 제조하였다. 모든 스톡의 pH는 6 내지 6.6의 범위 내에 있는 것으로 확인되었고, 이후 스톡을 오토클레이브하였다.

[0683] 표 13. 당밀 및 당 용액

당밀	% 당	100ml로 희석된 5% 당
		그램 또는 ml
HTM	78.72	6.4
BS1 (FL)	44.25	11.3
BS2 (AU)	51.55	9.7
수크로오스	100	5
글루코오스	100	5

[0685] 전화효소 용액의 제조: 전화효소 40 단위/ml 스톡 용액을 1mg의 400 단위/mg 전화효소 (시그마)를 10 밀리리터의 중류수 중에서 재구성함으로써 제조하였다.

[0686] 실험 조건 및 셋업: 각각 베이스 프로테아제 배지 중의 1% 최종 당밀/당 농도, 0.05 단위/ml 전화효소, 및 ml 당 1.0×10^6 세포의 클로렐라 프로토테코이드로 구성되는 10ml 배양액을 제조하였다. 상기 배양액을 다음과 같이 번호매겼다: (1) 배지만을 함유하는 대조; (2) 1% HTM; (3) 1% BS1; (4) 1% BS2; (5) 1% 글루코오스; 및 (6) 1% 수크로오스. 유사 대조 셋을 또한 전화효소를 첨가하지 않고 제조하였다. 배양액을 28°C에서 250rpm에서 진탕시키면서 5일 동안 암실에서 성장시켰다.

[0687] 결과: 클로렐라 프로토테코이드 세포의 성장은, 암실 중에서 각각의 공급원료 상에서 5일 동안 인큐베이션한 후에 평가하였다. 도 23 내지 24에 표시된 바대로, 세포들은 순수 시약 등급의 글루코오스 상에서의 성장에 필적하는 수율로, 수크로오스 전화효소의 존재하에서 당밀 상에서 성장할 수 있다.

[0688] 실시예 22

[0689] 외인성 수크로오스 전화효소를 발현시키기 위한 클로렐라 프로토테코이드(*Chlorella protothecoides*)의 유전적 공학처리

[0690] 균주 및 배지: 클로렐라 프로토테코이드(*Chlorella protothecoides*) (UTEX 250)를 텍사스 유니버시티의 (Austin, TX, USA)의 컬쳐 콜렉션 오브 앤게로부터 수득하였다. 스톡 배양액을 변형된 프로테오스 배지 상에 유지하였다. 변형된 프로테오스 배지는 리터 당 0.25 g의 NaNO_3 , 0.09 g의 K_2HPO_4 , 0.175 g의 KH_2PO_4 0.025 g, 0.025 g의 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.075 g의 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 및 2 g의 효모 추출물로 구성된다 (g/L).

[0691] 플라스미드 구성: 클로렐라 프로토테코이드(*Chlorella protothecoides*)에서 분비된 형태의 전화효소를 발현시키기 위해, 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) SUC2 유전자를 세 상이한 프로모터인 콜리플라원 모자이크 바이러스 35S 프로모터 (CMV), 클로렐라 바이러스 프로모터 (NC-1A), 및 클로렐라 HUP1 프로모터의 조절하에 두었다. C. 프로토테코이드(*C. protothecoides*)에 대해 최적화된 코돈 사용을 수용하도록 효모 SUC2 유전자를 합성하였고 이는 전화효소의 세포외 분비를 유도하는데 요구되는 시그널 서열을 포함한다. 각 구성물

을 pBluescript KS+에 구성하고, EcoRI/AscI, AscI/XbaI, 및 XbaI/BamHI 부위를 각 프로모터, 전화효소 유전자 및 CMV 3'UTR에, 특이적 프라이머를 이용한 PCR 증폭에 의해 각각 도입하였다. 정제된 PCR 생성물을 연속하여 클로닝시켰다. 최종 구성물의 예가 도 25에 도시되어 있다.

[0692] 클로렐라 프로토테코이드(*Chlorella protothecoides*)의 형질전환: 클로렐라 프로토테코이드(*Chlorella protothecoides*) 배양액을 회전식 진탕기 상의 변형된 프로테오스 배지에서 $75 \mu\text{mol}$ 광자 $\text{m}^{-2} \text{ 초}^{-1}$ 의 연속적인 광 하에, 이것이 6×10^6 개 세포/ ml 의 세포 밀도에 도달할 때까지 성장시켰다.

[0693] 바이오리스틱(biostatic) 형질전환을 위해, 씨셀 테크놀로지로부터의 S550d 금 담체를 제조자의 프로토콜에 따라 제조하였다. 간단히 말해, BsaI에 의해 선형화된 구성물 ($20 \mu\text{g}$)을 $50 \mu\text{l}$ 의 결합 완충제 및 $60 \mu\text{l}$ (3 mg)의 S550d 금 담체와 혼합시키고 얼음에서 1분 동안 인큐베이션하였다. 침전 완충제 ($100 \mu\text{l}$)를 첨가하고, 혼합물을 얼음에서 1분 더 인큐베이션하였다. 가볍게 와동시킨 후, DNA-코팅된 입자를 에펜도르프 마이크로퓨즈에서 10,000 rpm으로 10초 동안 스피닝시킴에 의해 펠렛을 형성하였다. 금 펠렛을 $500 \mu\text{l}$ 의 찬 100% 에탄올로 1회 세척하고, 마이크로퓨즈에서의 짧은 스피닝에 의해 펠렛을 형성하고, $50 \mu\text{l}$ 의 빙-냉 에탄올로 재현탁시켰다. 짧은 (1-2초) 초음파처리 후, 즉시 $10 \mu\text{l}$ 의 DNA-코팅된 입자를 담체 막으로 옮겼다. 세포를 수확하고, 살균 증류수로 1회 세척하고, $50 \mu\text{l}$ 의 배지에 재현탁시키고 (1×10^7 개 세포), 비선택적인 프로테오스 플레이트의 센터 서드(centre third)에 스프레딩하였다. PDS-1000/He 바이오리스틱 입자 전달 시스템 (Bio-Rad)으로 세포에 충격을 주었다. 파열 디스크 (1100 및 1350 psi)를 이용하였고, 플레이트를 스크린/매크로캐리어 어셈블리의 9-12 cm 아래에 두었다. 세포가 25°C 에서 12-24시간 동안 회수되게 하였다. 회수할 때, 세포를 고무 주걱을 이용하여 플레이트로부터 긁어 모으고, $100 \mu\text{l}$ 의 배지와 혼합시키고, 1% 수크로오스를 지니는 변형된 프로테오스 플레이트 상에 스프레딩하였다. 암실에서 25°C 로 7-10일 인큐베이션시킨 후, 형질전환된 세포를 나타내는 콜로니가 플레이트 위에 보였다.

[0694] 일렉트로포레이션으로 형질전환하기 위해, 세포를 수확하고, 살균 증류수로 1회 세척하고, 50 mM 수크로오스를 함유하는 트리스-포스페이트 완충액 (20mM Tris-HCl, pH 7.0; 1 mM 인산칼륨)에 4×10^8 개 세포/ ml 의 밀도로 재현탁시켰다. 약 $250 \mu\text{l}$ 의 세포 혼탁액 (1×10^8 개 세포)을 4 mm 캡의 일회용 일렉트로포레이션 큐벳에 정위시켰다. 세포 혼탁액에 $5 \mu\text{g}$ 의 선형화된 플라스미드 DNA 및 $200 \mu\text{g}$ 의 담체 DNA (전단처리된(sheared) 연어 정액 DNA)를 첨가하였다. 이후 일렉트로포레이션 큐벳을 빙수조에서 16°C 로 10분 동안 인큐베이션하였다. 그 다음 큐벳에 전기 펄스 (1100 V/cm)를 $25 \mu\text{F}$ 의 용량으로 (일렉트로포레이션을 위해 갈래 저항기를 이용하였다) Gene Pulser II (Bio-Rad Labs, Hercules, CA) 일렉트로포레이션 장치를 이용하여 적용시켰다. 이후 큐벳을 실온에서 5분 동안 인큐베이션하고, 세포 혼탁액을 50 ml 의 변형된 프로테오스 배지로 옮기고, 회전식 진탕기 상에서 2일 동안 진탕시켰다. 회수 이후, 세포를 저속 (4000 rpm)으로 수확하고, 변형된 프로테오스 배지에 재현탁하고, 1% 수크로오스를 지니는 변형된 프로테오스 플레이트 상에 저 밀도로 플레이팅하였다. 암실에서 25°C 로 7-10일 인큐베이션 후, 형질전환된 세포를 나타내는 콜로니가 플레이트 상에 보였다.

[0695] 형질전환체 스크리닝 및 유전자형 결정: 콜로니를 1% 수크로오스를 지니는 암실에서 성장한-변형된 프로테오스 플레이트로부터 취하고, 대략 동일한 양의 세포를 1% 수크로오스와 함께 1 ml 의 변형된 프로테오스 액체 배지를 함유하는 24 웰-플레이트로 옮겼다. 배양액을 암실에서 유지하고 랩넷(Labnet) (Berkshire, UK)으로부터의 오비탈 진탕기에 의해 430 rpm 에서 5일 동안 교반하였다.

[0696] 클로렐라 형질전환체에 도입된 전화효소 유전자의 존재를 입증하기 위해, 각 형질전환체의 DNA를 단리시키고 한 세트의 유전자-특이적 프라이머 (CMV 구성물: 순방향 프라이머 (CAACCACGTCTCAAAGCAA) (서열번호 6)/역방향 프라이머 (TCCGGTGTGTTGTAAGTCCA) (서열번호 9), CV 구성물: 순방향 프라이머 (TTGTGGAATGTCATATCAA) (서열번호 10)/역방향 프라이머 (TCCGGTGTGTTGTAAGTCCA) (서열번호 11), 및 HUP1 구성물: 순방향 프라이머 (AACGCCCTTGTACAACGTGCA) (서열번호 12)/역방향 프라이머 (TCCGGTGTGTTGTAAGTCCA) (서열번호 13))로 증폭시켰다. 신속한 DNA 단리를 위해, 세포량 (대략 $5-10 \mu\text{l}$ 의 부피)을 $50 \mu\text{l}$ 의 10 mM Na-EDTA에 재현탁시켰다. 세포 혼탁액을 100°C 에서 10분 동안 인큐베이션하고 10초 동안 초음파처리하였다. 12000g에서 1분 동안 원심분리 후, $3 \mu\text{l}$ 의 상청액을 PCR 반응에 이용하였다. PCR 증폭을 DNA 열적 사이클러 (Perkin-Elmer GeneAmp 9600)에서 수행하였다. 반응 혼합물은 ($50 \mu\text{l}$) $3 \mu\text{l}$ 의 추출된 DNA, 각각 100 pmol 의 상기 개시된 개별 프라이머, 200 \muM dNTP, 0.5 \muM 의 Taq DNA 중합효소 (NEB), 및 제조자의 지시에 따른 Taq DNA 중합효소 완충제를 함유하였다. DNA의 변성을 95°C 에서 5분 동안 제1 사이클로 수행하였고, 이후 30초 동안 수행하였다. 프라이머 어닐링 및 연장 반응을 58°C 에서 30초 동안 및 72°C 에서 1분 동안 각각 수행하였다. 이후 PCR 생성물

을 에티디움 브로마이드로 염색된 1% 아가로오스 젤 상에서 가시화하였다. 도 26은 상기 동정된 유전자-특이적 프라이머를 이용한 *C. protothecoides* (*C. protothecoides*) 형질전환체의 PCR 유전자형 결과를 도시한다. 화살표는 PCR 생성물의 예상 크기를 나타내고, 별표는 예상 크기와 매칭되는 PCR 생성물을 나타내는 각 형질전환체로부터의 DNA 샘플을 나타낸다 (V: 벡터만, WT: 야생형).

[0697] 액체 배양액에서의 성장: 암실에서 5일 성장 후, 유전자형-포지티브 형질전환체가 암실에서의 최소 액체 프로토오스 배지 + 1% 수크로오스 상에서 성장을 나타낸 반면, 야생형 세포는 암실에서의 동일한 배지에서 성장하지 않았다.

실시예 23

S. 세레비지애(*S. cerevisiae*)로부터 유래된 분비 전화효소로 조류 균주의 형질전환

[0700] 분비 전화효소: 분비 수크로오스 전화효소를 엔코딩하는 유전자 (젠뱅크 수탁 번호 사카로마이세스 세레비지애 (*Saccharomyces cerevisiae*)로부터의 NP_012104)를 1599 bp Asc I-Xho 단편으로서 새로이 합성하고 후속하여 EcoR I/Asc I 및 Xho/Sac I 카세트로서 각각 콜리플라워 모자이크 바이러스 35s 프로모터 및 3' UTR을 소유하는 pUC19 유도체로 서브클로닝하였다.

[0701] 조류 세포의 성장: 본 실험에 사용된 배지는 1%의 최종 농도로 수크로오스 또는 글루코오스 형태의 (지정된 대로) 고정된 탄소를 함유하는 액체 염기 배지 (실시예 1 참조) 및 고체 염기 배지 (+ 1.5% 아가로오스)였다. 본 실험에 사용된 균주는 추가의 고정된 탄소원의 부재하에 암실에서 염기 배지 상에서 성장하지 않았다. 종들을 플레이트로 스트라이킹(struck)하고 암실에서 28°C로 성장시켰다. 1% 글루코오스를 함유하는 500 ml의 액체 염기 배지를 접종하기 위해 단일 콜로니를 취하여 이용하였으며 중간-로그기에 도달할 때까지 암실에서 성장하도록 하여 매일 세포 수를 측정하였다. 하기 균주 각각을 유일한 탄소원인 수크로오스 상에서 암실에서의 성장에 대해 사전에 검사하였고 이는 성장을 나타내지 않았으며, 따라서 분비 전화효소로의 형질전환을 위해 선택하였다: (1) 클로렐라 프로토테코이드(*Chlorella protothecoides*) (UTEX 31); (2) 클로렐라 미누티시마(*Chlorella minutissima*) (UTEX 2341); 및 (3) 클로렐라 에메르소니이(*Chlorella emersonii*) (CCAP 211/15).

[0702] 입자 충격을 통한 조류 세포의 형질전환: 충분한 배양액을 원심분리시켜 대략 $1-5 \times 10^8$ 개의 총 세포를 제공하였다. 생성된 펠렛을 고정된 탄소원이 첨가되지 않은 염기 배지로 세척하였다. 세포를 재원심분리하고 펠렛을 5×10^7 내지 2×10^8 개 세포/ml를 제공하기에 충분한 부피의 염기 배지에 재현탁시켰다. 이후 250-1000 μl 의 세포를 1% 수크로오스가 보충된 고체 염기 배지 상에 플레이팅하고 살균 후드에서 플레이트 위로 건조되게 하였다. 플라스미드 DNA를 제조자의 추천에 따라 금 입자 위로 침전시켰다 (Seashell Technology, La Jolla, CA). BioRad PDS He-1000 입자 전달 시스템을 이용하고 파열 디스크 홀더로부터 9 cm에 세팅된 매크로캐리어 어셈블리를 지니는 1350 psi 파열 디스크를 이용하여 형질전환을 수행하였다. 형질전환 후, 플레이트를 암실에서 28°C로 인큐베이션하였다. 모든 균주가 다수의 형질전환체 콜로니를 생성하였다. 전화효소 삽입 없이 형질전환되고 다른 모든 점에서는 동일한 양상으로 제조된 대조 플레이트는 콜로니를 함유하지 않았다.

[0703] 클로렐라 프로토테코이드(*Chlorella protothecoides*) 형질전환체의 분석: 계놈 DNA를 하기와 같이 클로렐라 프로토테코이드(*Chlorella protothecoides*) 야생형 세포 및 형질전환체 콜로니로부터 추출하였다: 세포를 100 μl 의 추출 완충제 (87.5 mM Tris Cl, pH 8.0, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 8.0, 0.25% SDS)에 재현탁하고, 뒤집음에 의해 때로 혼합시키며, 30분 동안 60°C에서 인큐베이션하였다. PCR을 위해, 샘플을 20 mM Tris Cl, pH 8.0에서 1:100으로 희석하였다.

[0704] 유전자형 결정은 WT, 형질전환체 및 플라스미드 DNA로부터 추출된 계놈 DNA 상에서 수행되었다. 샘플을 마커 유전자에 대해 유전자형 결정하였다. 프라이머 2383 (5' CTGACCCGACCTATGGGAGCGCTCTGGC 3') (서열번호 20) 및 2279 (5' CTTGACTCCCTCACCTGGAATTGTGCG 3') (서열번호 21)을 이러한 유전자형 결정 PCR에 이용하였다. 사용된 PCR 프로필은 하기와 같았다: 94°C에서 5분 동안 변성: 94°C -30초, 60°C -30초, 72°C -3분의 35회 사이클; 72°C -5분. 동일한 크기의 밴드를 도 27에 도시된 대로 포지티브 대조군 (플라스미드) 및 클로렐라 프로토테코이드(*Chlorella protothecoides*) (UTEX 31)의 두 형질전환체로부터 증폭시켰다.

[0705] 클로렐라 미누티시마(*Chlorella minutissima*) 및 클로렐라 에메르소니이(*Chlorella emersonii*) 형질전환체의 분석: 계놈 DNA를 다음과 같이 클로렐라 WT 및 형질전환체로부터 추출하였다: 세포를 100 μl 의 추출 완충제 (87.5 mM Tris Cl, pH 8.0, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 8.0, 0.25% SDS)에 재현탁하고, 뒤집음에 의해 때로 혼합시키며, 30분 동안 60°C에서 인큐베이션하였다. PCR을 위해, 샘플을 20 mM Tris Cl, pH 8.0에서 1:100으로

희석하였다. 유전자형 결정은 WT, 형질전환체 및 플라스미드 DNA로부터 추출된 개놈 DNA 상에서 수행되었다. 샘플을 마커 유전자에 대해 유전자형 결정하였다. 프라이머 2336 (5' GTGGCCATATGGACTTACAA 3') (서열번호 22) 및 2279 (5' CTTGACTTCCCTCACCTGGAATTGTCG 3') (서열번호 21)를 프라이머 세트 2 (1215 bp 예상 생성물)로 지정하는 한편, 프라이머 2465 (5' CAAGGGCTGGATGAATGACCCCAATGGACTGTGGTACGACG 3') (서열번호 23) 및 2470 (5' CACCCGTCGTACGAGCCCAGTGC 3') (서열번호 24)을 프라이머 세트 4 (1442 bp 예상 생성물)로 지정하였다. 사용된 PCR 프로토콜은 하기와 같았다: 94°C에서 2분 동안 변성: 94°C -30초, 60°C -30초, 72°C -1분의 29회 사이클; 72°C -5분. 분비 전화효소를 함유하는 플라스미드 대조군을 PCR 대조군으로서 이용하였다. 도 28은 분비 전화효소를 엔코딩하는 유전자를 이용한 미세조류의 클로렐라 미누티시마(*Chlorella minutissima*) (UTEX 2341) 및 클로렐라 에머슨니아(*Chlorella emersonii*) (CCAP 211/15) 종의 형질전환을 도시한다.

[0706] 전화효소 구성물의 서열은 서열번호 25에 상응한다.

실시예 24

[0708] 셀루클라스트(Cel lulast)로 제조된 셀룰로직 공급원료 상에서 *S. cerevisiae*과 비교한 조류 균주의 성장

[0709] 균주 및 배양 조건: 본 연구에 사용된 조류 균주가 하기 표 14에 나열되어 있고, 이들을 외부에서 제공된 셀룰로직 물질 및 일부 경우에 글루코오스 형태의 추가의 고정된 탄소를 지니는 프로테오스 배지에서 성장시켰다. 본 연구에는 클로렐라(*Chlorella*)의 11개 상이한 종, 파라클로렐라(*Parachlorella*)와 프로토테카(*Prototheca*)의 2개 종, 및 브락테오코코스(*Bracteococcus*)와 슈도클로렐라(*Pseudochlorella*)의 각 1개 종을 포함하는 5개의 상이한 속을 포함하는, 24개의 조류 균주를 이용하였다. 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) (균주 PJ-69-4A)를 YPD 배지 (리터 당, 10g 박토-효모 추출물, 20g 박토 웨튼 및 20g 글루코오스)에서 성장시켰다. 조류 및 효모 둘 모두를 암실에서 28°C로 성장시켰다. 이러한 균주들은 암실의 프로테오스 배지 상에서 셀룰로직 물질 또는 다른 추가의 고정된 탄소의 부재하에 성장하지 않거나 극히 최소로 성장하였다.

[0710] 효소적 탈중합 처리를 통한 셀룰로직 물질로부터 글루코오스의 유리: 옥수수대를 1.4% 황산 용액에서 요리하고 생성된 슬리리를 탈수시킴에 의해 젖은 파열된 옥수수대 물질을 내셔널 리뉴얼 에너지 래버리토리 (Golden, CO)에 의해 제조하였다. 메틀러 톨레도 모이스처(Mettler Toledo Moisture) 분석기를 이용하여, 젖은 옥수수대의 건조 고형물이 24%인 것으로 결정되었다. 100 g의 젖은 샘플을 420 ml의 최종 부피로 탈이온수에 재현탁하고 10 N NaOH를 이용하여 pH를 4.8로 조정하였다. 셀루클라스트(Cel lulast™) (Novozymes) (셀룰라아제)를 4%의 최종 농도로 첨가하고 생성된 슬리리를 50°C에서 72시간 동안 진탕시키며 인큐베이션하였다. 이 물질의 pH를 NaOH를 이용하여 7.5로 조정하고 (무시해도 좋은 부피 변화), 0.22 μm 필터를 통해 여과 살균하고, -20°C에서 저장하였다. 하기 개시된 대로 Sigma로부터의 헥소키나아제 기재 키트를 이용한 글루코오스 농도의 결정을 위해 샘플을 저장하였다.

[0711] 젖은 옥수수대의 셀루클라스트 처리에 의해 유리된 글루코오스 농도의 결정: 글루코오스 농도를 Sigma 글루코오스 검정 시약 #G3293을 이용하여 결정하였다. 상기 개요된 대로 처리된 샘플을 400배 희석시키고 40 μl를 반응물에 첨가하였다. 옥수수대 셀룰로직 제조물은 약 23 g/L의 글루코오스를 함유하는 것으로 결정되었다.

[0712] 표 14. 셀룰로직 공급원료 상에서 성장한 조류 균주

속 / 종	공급원 / 지정
<i>Bracteococcus minor</i>	UTEX 66
<i>Chlorella ellipsoidea</i>	SAG 2141
<i>Chlorella kessleri</i>	UTEX 1808
<i>Chlorella kessleri</i>	UTEX 397
<i>Chlorella emersonii</i>	CCAP 211/15
<i>Chlorella luteoviridis</i>	SAG 2133
<i>Chlorella luteoviridis</i>	SAG 2198
<i>Chlorella luteoviridis</i>	SAG 2214
<i>Chlorella luteoviridis</i>	UTEX 22
<i>Bracteococcus medionucleatus</i>	UTEX 1244
<i>Chlorella minutissima</i>	CCALA 20024
<i>Chlorella minutissima</i>	UTEX 2341
<i>Chlorella ovalis</i>	CCAP 211/21A
<i>Chlorella protothecoides</i>	CCAP 211/8d
<i>Chlorella protothecoides</i>	UTEX 250
<i>Chlorella saccharophila</i>	UTEX 2911
<i>Chlorella sorokiniana</i>	UTEX 1230
<i>Chlorella sp.</i>	SAG 241.80
<i>Chlorella vulgaris</i>	CCAP 211/11C
<i>Parachlorella kessleri</i>	SAG 12.80
<i>Parachlorella kessleri</i>	SAG 27.87
<i>Prototheca moriformis</i>	UTEX 1441
<i>Prototheca moriformis</i>	UTEX 1434
<i>Pseudochlorella aquatica</i>	SAG 2149

[0713]

[0714] 표 14 및 본원에 사용된 대로, UTEX는 텍사스 유니버시티 (Austin, Texas, USA)의 컬쳐 컬렉션 오브 앤게를 언급하고, SAG는 괴팅겐 유니버시티 (Gottingen, Germany)의 컬쳐 컬렉션 오브 앤게를 언급하며, CCAP는 스코티시 어소시에이션 포 머린 사이언스 (Scotland, United Kingdom)에 의해 관리되는 조류 및 원생동물의 컬쳐 컬렉션을 나타내며, CCALA는 인스티튜트 오브 바터니의 조류 실험실의 컬쳐 컬렉션을 나타낸다 (Trebon, Czech Republic).

[0715] 셀룰로직 물질 상에서 성장의 결정: 셀룰로오스에서 글루코오스, 크실로오스, 및 기타 단당류로의 효소적 처리 및 당화 이후, 상기 제조된 물질을 프로테오스 배지 또는 YPD 배지 각각에서의 24개 조류 균주 또는 *S. 세레비지애* (*S. cerevisiae*)의 성장을 위한 공급원료로서 평가하였다. 다양한 양의 순수한 글루코오스 및/또는 탈중합된 셀룰로직 물질을 첨가함에 의해 *S. 세레비지애* (*S. cerevisiae*)의 성장을 위한 YPD를 구성했듯이, 프로테오스 배지를 23 g/L의 최종 글루코오스 농도로 구성하였다 (옥수수대의 셀룰로라이티c (cellulolytic) 처리를 통해 생성된 글루코오스의 최종 농도). 0, 12.5, 25, 50 및 100%의 23 g/L의 글루코오스를 각 배지에서 제공하는, 다양한 농도의 셀룰로직 물질을 포함시켰고, 이의 성분들은 하기 표 15에 제시되어 있다. 1 ml의 적합한 배지를 24 웰 플레이트의 웰에 첨가하였다. 종속영향에 의해 28°C에서 YPD에서 성장한 *S. 세레비지애* (*S. cerevisiae*) 가 효모 웰에 대한 접종물 (20 μ l)로서 기능하였다. 24개 조류 균주에 대한 20 μ l의 접종물을 20 g/L의 글루코오스를 함유하는 프로테오스 배지에서 혼합영양에 의해 성장한 조류 세포에 의해 공급받았다.

[0716]

표 15. 셀룰로직 공급원료 제조물

YPD의 부피 23.1 g/L 글루코오스 (ml)	프로테오스 배지 의 부피 23.1 g/L 글루코오스 (ml)	프로테오스 배지로 제조된 100% 셀룰로직의 부피 (ml)	YPD로 제조된 100% 셀룰로직의 부피 (ml)	최종 부피 (ml)	퍼센트 셀룰로직
0	1	0	0	1	0
0	0.875	0.125	0	1	12.5
0	0.75	0.25	0	1	25
0	0.5	0.5	0	1	50
0	0	1	0	1	100
1	0	0	0	1	0
0.875	0	0	0.125	1	12.5
0.75	0	0	0.25	1	25
0.5	0	0	0.5	1	50
0	0	0	1	1	100

[0717]

[0718] 표 15는 지시된 비율의 셀룰로직을 함유하는 배지를 생성하기 위해 각각 프로테오스 또는 YPD 배지에 첨가된 프로테오스 또는 YPD 배지를 함유하도록 변형된 탈중합된 옥수수대의 부피를 도시한다. 배지는 모든 경우에 23 g/L의 최종 글루코오스 농도를 수득하기 위해 제조되었다. 20 μ l의 중간-로그기 성장된 효모 또는 조류 세포를 첨가하기 전에 배지의 부피는 1 ml였다. 세포를 다양한 농도의 셀룰로직 공급원료 상에서 28°C에서 전탕시키며

(300 rpm) 암실에서 2일 동안 인큐베이션하였다. UV 분광광도계로 750 nm에서 흡광도를 측정함에 의해 성장을 평가하였다. 놀랍게도, 모든 균주는 발효될 수 있는 당의 100%가 셀룰로직-유래된 것인 배지 조건을 포함하는, 셀루클라스트로 제조된 셀룰로직 물질 상에서 성장하였다.

[0719] 실시예 25

악셀레라아제(Accellerase) 1000™ 및 셀루클라스트™로 제조된 다양한 셀룰로직 공급원료 상에서 24개 조류 균주 및 *S. 세레비지애(S. cerevisiae)*의 성장

균주 및 배양 조건: 실시예에 사용된 조류 균주가 표 14(상기)에 열거되어 있고 이들을 프로테오스 배지 및 탈중합된 셀룰로직 물질 및/또는 순수한 글루코오스 형태의 추가의 고정된 탄소에서 성장시켰다. 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) (균주 pJ69-4a)를 YPD 배지 및 탈중합된 셀룰로직 물질 및/또는 순수한 글루코오스 형태의 추가의 고정된 탄소에서 성장시켰다. 조류 및 효모 둘 모두를 암실에서 28°C로 성장시켰다.

효소적 탈중합 처리를 통한 셀룰로직 물질로부터 글루코오스의 유리: 옥수수대를 1.4% 황산 용액에서 요리하고 생성된 슬러리를 탈수시킴에 의해 젖은 파열된 옥수수대 물질을 내셔널 리뉴어블 에너지 래버리토리 (Golden, CO)에 의해 제조하였다. 스위치그래스도 옥수수대와 동일한 방법을 이용하여 내셔널 리뉴어블 에너지 래버리토리 (Golden, CO)에 의해 제조하였다. 페티나아제 처리를 통해 생성된 사탕무 펄프를 아틀란틱 바이오매스, 인크(Atlantic Biomass, Inc. of Frederick, MD)로부터 공급받았다. 메틀러 틀레도 모이스쳐 분석기를 이용하여, 젖은 옥수수대의 건조 고형물은 24%, 스위치그래스의 건조 고형물은 26% 및 사탕무 펄프의 건조 고형물은 3.5%였다. 옥수수대 또는 스위치그래스의 100 g의 젖은 샘플을 420 mL의 최종 부피로 탈이온수에 재현탁하고 10 N NaOH를 이용하여 pH를 4.8로 조정하였다. 사탕무의 경우, 8.8 그램의 건조 고형물을 탈이온수로 350 mL로 만들고 10 N NaOH를 이용하여 pH를 4.8로 조정하였다. 모든 공급원료에 대하여, 악셀레라아제 1000™ (Genencor) (셀룰라아세 효소 복합체)을 건조 바이오매스 그램 당 0.25 mL 효소의 비율로 이용하였다. 샘플을 50°C에서 72시간 동안 진탕시키며 (110 rpm) 인큐베이션하였다. 이 물질의 pH를 NaOH를 이용하여 7.5로 조정하고 (무시해도 좋은 부피 변화), 0.22 μm 필터를 통해 여과 살균하고, 하기 개요된 대로 성장 실험에 이용하였다. 하기 개시된 대로 Sigma로부터의 헥소키나아제 기재 키트를 이용한 글루코오스 농도의 결정을 위해 샘플을 저장하였다. 동일한 세트의 셀룰로직 공급원료도 이전 실시예에 개시된 대로 셀루클라스트™ (Novozymes) (셀룰라아제)를 이용하여 제조하였다.

악셀레라아제 1000으로 처리된 다양한 셀룰로직 공급원료 중 글루코오스 농도의 결정: 글루코오스 농도를 Sigma 글루코오스 검정 시약 #G3293을 이용하여 결정하였다. 상기 개요된 대로 처리된 샘플을 400배 희석시키고 40 μL를 반응물에 첨가하였다. 옥수수대, 스위치그래스 및 사탕무 펄프로부터의 셀룰로직 제조물은 약 23.6, 17.1 및 13.7 g/L의 글루코오스를 각각 함유하는 것으로 결정되었다.

셀룰로직 물질 상에서 성장의 결정: 셀룰로오스에서 글루코오스, 크실로오스, 및 기타 단당류로의 효소적 탈중합 이후, 상기 제조된 물질을 프로테오스 또는 YPD 배지 각각에서의 표 14에 나열된 24개 조류 균주 및 *S. 세레비지애(S. cerevisiae)*의 성장을 위한 공급원료로서 평가하였다. 배지는 일관된 농도의 글루코오스를 함유하는 한편 옥수수대, 스위치그래스 또는 사탕무 펄프로부터 유래된 셀룰로직 물질의 양은 변화하도록 설계되었다. 첫 번째 세트의 프로테오스 및 YPD 배지는 23.6 g/L의 순수한 글루코오스를 함유하였고, 두 번째 세트의 배지는 각각 23.6 g/L의 글루코오스를 함유하는 탈중합된 옥수수대, 스위치그래스 및 사탕무 펄프를 함유하였다. 스위치그래스 및 사탕무 펄프 배지에 6.5 및 9.9 g/L의 순수한 글루코오스를 보충하여 셀룰로직 배지 중 글루코오스를 23.6 g/L로 표준화하였다. 1 mL의 적합한 배지를 24 웰 플레이트의 웰에 첨가하였다. 종속영향에 의해 28 °C에서 YPD에서 성장한 *S. 세레비지애(S. cerevisiae)*가 효모 웰에 대한 접종물 (20 μL)로서 기능하였다. 24개 조류 균주에 대한 20 μL의 접종물을 20 g/L의 글루코오스를 함유하는 프로테오스 배지에서 혼합영양에 의해 성장한 조류 세포에 의해 공급받았다. 모든 세포를 다양한 농도의 셀룰로직 공급원료 상에서 28°C에서 진탕시키며 (300 rpm) 암실에서 2일 동안 인큐베이션하였다. UV 분광광도계로 750 nm에서 흡광도를 측정함에 의해 성장을 평가하였다. 놀랍게도, 모든 균주는 발효될 수 있는 당의 100%가 셀룰로직-유래된 것인 배지 조건을 포함하는, 악셀레라아제 1000™ 또는 셀루클라스트™로 제조된 옥수수대, 스위치그래스 및 사탕무 펄프 물질 상에서 성장하였다. 셀룰로직 공급원료와 탈중합이 조합되지 않은 경우, 효소는 당량의 순수한 글루코오스 상에서 *S. 세레비지애(S. cerevisiae)*의 보다 우수한 성장을 달성하였는데, 이는 셀룰로직 물질에서의 효모 성장의 억제제가 발효의 생산성에 주요한 영향을 미침을 나타낸다. 100% 순수한 글루코오스 보다 성능이 우수한 100% 셀룰로직-유래된 단당류를 지니는 공급원료, 탈중합 효소 및 조류 균주의 조합이 표 16에 제시된다.

표 16. 조류, 효소 및 공급원료의 조합

공급원료 및 탈종합 효소	속/종	공급원/지정
corn stover/cellulase TM	<i>Bracteococcus minor</i>	UTEX 66
beet pulp/accelerase TM	<i>Chlorella ellipsoidea</i>	SAG 2141
switchgrass/accelerase TM	<i>Chlorella kessleri</i>	UTEX 252
beet pulp/accelerase TM	<i>Chlorella kessleri</i>	UTEX 397
switchgrass/accelerase TM	<i>Chlorella luteoviridis</i>	SAG 2133
beet pulp/accelerase TM	<i>Chlorella luteoviridis</i>	SAG 2133
switchgrass/accelerase TM	<i>Chlorella luteoviridis</i>	UTEX 22
beet pulp/accelerase TM	<i>Chlorella luteoviridis</i>	UTEX 22
corn stover/accelerase TM	<i>Chlorella luteoviridis</i>	UTEX 22
beet pulp/accelerase TM	<i>Chlorella protothecoides</i>	UTEX 250
beet pulp/accelerase TM	<i>Chlorella sp.</i>	SAG 241.80
beet pulp/accelerase TM	<i>Parachlorella kessleri</i>	SAG 12.80
switchgrass/accelerase TM	<i>Prototheca moriformis</i>	UTEX 1441

beet pulp/accelerase TM	<i>Prototheca moriformis</i>	UTEX 1441
corn stover/accelerase TM	<i>Prototheca moriformis</i>	UTEX 1441
corn stover/cellulase TM	<i>Prototheca moriformis</i>	UTEX 1441
corn stover/accelerase TM	<i>Prototheca moriformis</i>	UTEX 1434
beet pulp/accelerase TM	<i>Pseudochlorella aquatica</i>	SAG 2149

[0727]

실시예 26

탄소 이용 스크린

균주 및 배양 조건: 24 웨л 플레이트에서 1 ml의 액체 배양액으로서 하기 동정된 미세조류의 다양한 균주의 시드 배양을 시작하였고 독립영양에 의해 꽝 하에서 48시간 동안 ~350 rpm으로 교반시키며 성장시켰다. 플레이트를 1%의 글루코오스, 글리세롤, 크실로오스, 수크로오스, 프리토오스, 아라비노오스, 만노오스, 갈락토오스, 또는 아세테이트를 유일한 고정된 탄소원으로서 함유하는 1.5% 아가로오스-기체 고형 프로테오스 배지로 구성하였다. 각 균주에 대해, 독립영양적 24 웨л 플레이트로부터의 5 μ l의 배양액을 고체 배지 위로 스풋팅하였다. 플레이트를 암실에서 28°C로 7일 동안 인큐베이션하고 추가의 고정된 탄소를 함유하지 않는 대조군 플레이트와 비교하여 성장에 대해 조사하였다. 성장은 하기 표 17에 제시된 대로 각 개별적인 공급원료로 시험된 종들 각각에 대해 관찰되었다. 프로테오스 배지 상에서 암실에서 추가의 고정된 탄소의 부재하에 이러한 균주의 성장은 일어나지 않거나 극히 최소로 일어났다.

표 17. 다양한 고정된-탄소 공급원료 상에서 성장한 조류 종

고정된 탄소원	속/종	공급원/지정
글루코오스	<i>Chlorella protothecoides</i>	UTEX 250
글루코오스	<i>Chlorella kessleri</i>	UTEX 397
글루코오스	<i>Chlorella sorokiniana</i>	UTEX 2805
글루코오스	<i>Parachlorella kessleri</i>	SAG 12.80
글루코오스	<i>Pseudochlorella aquatica</i>	SAG 2149
글루코오스	<i>Chlorella reisiglpii</i>	CCAP 11/8
글루코오스	<i>Bracteococcus medionucleatus</i>	UTEX 1244
글루코오스	<i>Prototheca stagnora</i>	UTEX 1442
글루코오스	<i>Prototheca moriformis</i>	UTEX 1434
글루코오스	<i>Prototheca moriformis</i>	UTEX 1435
글루코오스	<i>Scenedesmus rubescens</i>	CCAP 232/1
글리세롤	<i>Parachlorella kessleri</i>	SAG 12.80
글리세롤	<i>Chlorella protothecoides</i>	CCAP 211/8d
글리세롤	<i>Bracteococcus medionucleatus</i>	UTEX 1244
글리세롤	<i>Prototheca moriformis</i>	UTEX 288
글리세롤	<i>Prototheca moriformis</i>	UTEX 1435
글리세롤	<i>Chlorella minutissima</i>	UTEX 2341
글리세롤	<i>Chlorella sp.</i>	CCAP 211/61
글리세롤	<i>Chlorella sorokiniana</i>	UTEX 1663

[0732]

크실로오스	<i>Chlorella luteoviridis</i>	SAG 2133
크실로오스	<i>Chlorella ellipsoidea</i>	SAG 2141
크실로오스	<i>Pseudochlorella aquatica</i>	SAG 2149
크실로오스	<i>Chlorella sp.</i>	CCAP 211/75
크실로오스	<i>Prototheca moriformis</i>	UTEX 1441
크실로오스	<i>Prototheca moriformis</i>	UTEX 1435
수크로오스	<i>Chlorella saccharophila</i>	UTEX 2469
수크로오스	<i>Chlorella luteoviridis</i>	UTEX 22
수크로오스	<i>Chlorella sp.</i>	UTEX EE102
수크로오스	<i>Chlorella luteoviridis</i>	SAG 2198
수크로오스	<i>Bracteococcus medionucleatus</i>	UTEX 1244
수크로오스	<i>Chlorella minutissima</i>	CCALA 20024
프력토오스	<i>Chlorella kessleri</i>	UTEX 398
프력토오스	<i>Chlorella trebouxoides</i>	SAG 3.95
프력토오스	<i>Parachlorella kessleri</i>	SAG 27.87
프력토오스	<i>Chlorella luteoviridis</i>	SAG 2214
프력토오스	<i>Chlorella protothecoides</i>	UTEX 31
프력토오스	<i>Chlorella protothecoides</i>	UTEX 250
프력토오스	<i>Chlorella reisiglii</i>	CCAP 11/8
프력토오스	<i>Chlorella protothecoides</i>	CCAP 211/8d
프력토오스	<i>Prototheca moriformis</i>	UTEX 1435
프력토오스	<i>Scenedesmus rubescens</i>	CCAP 232/1
아라비노오스	<i>Chlorella sp.</i>	CCAP 211/75
만노오스	<i>Chlorella kessleri</i>	UTEX 263
만노오스	<i>Chlorella saccharophila</i>	UTEX 2911
만노오스	<i>Parachlorella kessleri</i>	SAG 12.80
만노오스	<i>Chlorella sp.</i>	SAG 241.80
만노오스	<i>Chlorella angustoellipsoidea</i>	SAG 265
만노오스	<i>Chlorella ellipsoidea</i>	SAG 2141
만노오스	<i>Chlorella protothecoides</i>	UTEX 250
만노오스	<i>Chlorella emersonii</i>	CCAP 211/15
만노오스	<i>Bracteococcus minor</i>	UTEX 66
만노오스	<i>Prototheca stagnora</i>	UTEX 1442
만노오스	<i>Prototheca moriformis</i>	UTEX 1439
만노오스	<i>Chlorella cf. minutissima</i>	CCALA 20024
만노오스	<i>Scenedesmus rubescens</i>	CCAP 232/1
갈락토오스	<i>Bracteococcus minor</i>	UTEX 66
갈락토오스	<i>Parachlorella kessleri</i>	SAG 14.82
갈락토오스	<i>Parachlorella beijerinckii</i>	SAG 2046
갈락토오스	<i>Chlorella protothecoides</i>	UTEX 25
갈락토오스	<i>Chlorella sorokiniana</i>	UTEX 1602
갈락토오스	<i>Parachlorella kessleri</i>	SAG 12.80
갈락토오스	<i>Pseudochlorella aquatica</i>	SAG 2149
갈락토오스	<i>Chlorella luteoviridis</i>	SAG 2214
갈락토오스	<i>Chlorella ellipsoidea</i>	CCAP 211/42
갈락토오스	<i>Chlorella ellipsoidea</i>	CCAP 211/50
갈락토오스	<i>Chlorella protothecoides</i>	UTEX 250
갈락토오스	<i>Chlorella protothecoides</i>	UTEX 264

[0733]

갈락토오스	<i>Bracteococcus medionucleatus</i>	UTEX 1244
갈락토오스	<i>Prototheca moriformis</i>	UTEX 1439
갈락토오스	<i>Prototheca moriformis</i>	UTEX 1441
갈락토오스	<i>Chlorella kessleri</i>	CCALA 252
아세테이트	<i>Chlorella sorokiniana</i>	UTEX 1230
아세테이트	<i>Chlorella sorokiniana</i>	UTEX 1810
아세테이트	<i>Chlorella luteoviridis</i>	UTEX 22
아세테이트	<i>Parachlorella kessleri</i>	SAG 12.80
아세테이트	<i>Parachlorella kessleri</i>	SAG 27.87
아세테이트	<i>Chlorella sp.</i>	SAG 241.80
아세테이트	<i>Chlorella luteoviridis</i>	SAG 2214
아세테이트	<i>Chlorella protothecoides</i>	UTEX 31
아세테이트	<i>Chlorella protothecoides</i>	UTEX 411
아세테이트	<i>Chlorella ellipsoidea</i>	CCAP 211/42
아세테이트	<i>Chlorella ovalis</i>	CCAP 211/21A
아세테이트	<i>Chlorella protothecoides</i>	CCAP 211/8d
아세테이트	<i>Prototheca stagnora</i>	UTEX 1442
아세테이트	<i>Chlorella protothecoides</i>	UTEX 250
아세테이트	<i>Chlorella sorokiniana</i>	CCALA 260
아세테이트	<i>Chlorella vulgaris</i>	CCAP 211/79
아세테이트	<i>Parachlorella kessleri</i>	SAG 14.82

[0734]

실시예 27

[0735]

재생가능한 디젤의 생성

[0737]

세포 생성: 클로렐라 프로토테코이드(*Chlorella protothecoides*) (UTEX 250)의 F-탱크 배치를 이용하여 (약 1,200 갤런) 추출 공정을 위한 바이오매스를 생성하였다. 배치 (#ZA07126)가 100시간 동안 가동되게 하는 한편, 글루코오스 수준을 16 g/L로 조절하였고, 이 시간 이후 옥수수 시럽 공급을 종료하였다. 잔류하는 글루코오스 수준은 2시간 후 <0 g/L까지 떨어졌다. 이것은 102시간의 최종 에이지(age)를 초래하였다. 최종 액체 배지 부피는 1,120 갤런이었다. 인-프로세스(in-process) 오염도 조사 및 최종 액체배지 샘플의 철저한 분석 둘 모두가 어떠한 오염물의 기미도 찾아내지 못했다. 발효 액체배지를 원심분리하고 드럼(drum) 건조시켰다. 드럼 건조된 세포를 헥산에 재현탁하고 약 1000 바아로 균질화시켰다. 이후 표준 방법을 이용하여 헥산 추출을 수행하였고, 생성된 조류의 트리글리세라이드 오일에는 잔류하는 헥산이 없는 것으로 결정되었다.

[0738]

재생가능한 디젤의 생성: 조류의 트리글리세라이드 오일은 약 3% C18:0, 71% C18:1, 15% C18:2, 1% C18:3, 8% C16:0, 및 2% 기타 성분의 지질 프로필을 지녔다. 오일을 먼저 수소화분해(hydrocracking)시켜 물 및 가스로의 대략 20% 수율 손실을 초래하였다. 이후 수소화이성질화(hydroisomerization)을 수행하여, 가스로의 대략 10%의 수율 손실을 초래하였다. 이후 첫 번째 증류를 수행하여 요망되는 생성물을 남기며, 나프타 분획을 제거하였다. 물질의 대략 20%가 첫 번째 증류에서 나프타로 손실되었다. 이후 두 번째 증류를 충분한 온도에서 수행하여 ASTM D975 명세를 충족하는데 필요한 분획을 제거하고 D975 증류를 위한 90% 포인트를 충족하지 못한 바닥 분획을 남겼다. 물질의 대략 30%가 두 번째 증류에서 바닥 분획에 남아 있었다. 이후 생성된 물질을 모든 ASTM D975 명세에 대해 시험하였다.

[0739]

도 29 및 30은 본 발명의 방법에 의해 생성된 최종 재생가능한 디젤 생성물의 가스 크로마토그래피 및 비등점 분포 플롯을 각각 도시한다. 표 18은 생성된 재생가능한 디젤 생성물의 비등점 분포를 나타내고, 표 19는 ASTM D975 명세를 준수하는 최종 생성물의 분석 결과를 도시한다.

[0740]

표 18. 재생가능한 디젤 생성물의 비등점 분포

회수된 질량 %	BP °C						
IBP	150.4	26.0	261.8	52.0	303.8	78.0	315.8
1.0	163.6	27.0	264.6	53.0	304.4	79.0	316.4
2.0	173.4	28.0	266.2	54.0	304.8	80.0	317.0
3.0	175.2	29.0	268.2	55.0	305.2	81.0	317.6
4.0	188.0	30.0	271.0	56.0	305.6	82.0	318.4
5.0	194.8	31.0	272.4	57.0	306.0	83.0	319.0
6.0	196.6	32.0	273.4	58.0	306.4	84.0	319.6
7.0	197.8	33.0	276.2	59.0	306.6	85.0	320.2
8.0	207.4	34.0	280.0	60.0	307.0	86.0	320.8
9.0	210.0	35.0	282.4	61.0	307.4	87.0	321.2
10.0	214.4	36.0	285.2	62.0	307.6	88.0	321.8
11.0	216.6	37.0	287.8	63.0	308.0	89.0	322.2
12.0	217.6	38.0	289.6	64.0	308.4	90.0	322.4
13.0	221.4	39.0	291.8	65.0	308.8	91.0	322.8
14.0	227.6	40.0	294.2	66.0	309.2	92.0	323.2
15.0	229.8	41.0	295.8	67.0	309.6	93.0	324.4
16.0	233.2	42.0	296.8	68.0	310.2	94.0	326.8
17.0	235.8	43.0	297.6	69.0	310.6	95.0	329.4
18.0	236.8	44.0	298.4	70.0	311.2	96.0	333.6
19.0	240.2	45.0	299.2	71.0	311.6	97.0	339.4
20.0	245.6	46.0	299.8	72.0	312.2	98.0	346.2
21.0	248.0	47.0	300.6	73.0	313.0	99.0	362.8
22.0	250.2	48.0	301.2	74.0	313.6	FBP	401.4
23.0	253.6	49.0	302.0	75.0	314.2		
24.0	255.2	50.0	302.6	76.0	314.8		
25.0	256.8	51.0	303.2	77.0	315.4		

[0741]

[0742] 표 19. D975 명세를 이용한 재생가능한 디젤 생성물에 대한 분석 보고서

방법 번호	시험 설명	결과	단위
D93A	인화점 (PMCC)	70	°C
D2709	물 및 침전물	0	Vol %
D86	증류 90% (회수율)	301.0 / 573.9	°C / °F
D445	동점도 @ 40.0°C (104.0°F)	2 868	mm ² /sec
D482	재	< 0.001	Wt %
D5453	황	2.4	ppm
D130	구리 부식 3시간 @ 50°C	1b	
D613	세탄 수 **	>65	
D976	계산된 세탄 지수	71.2	
D2500	흐름점	-3	°C
D524	Ramsbottom 10% 탄소 잔기	0.02	Wt %
D97	유동점	-3	°C
D2274	총 불용성물 (산화 안정성) 40시간 시험 ***	4.0	mg/100mL
D4052	밀도 @ 15.0°C (59.0°F)	793.8	kg/m ³
D4176-1	기시적 검사에 의한 외형 (Lab)	투명하고 밝음- 패스	시각
D4176-1	기시적 검사에 의한 외형 (Lab)	유리수- 패스	시각
D4176-1	기시적 검사에 의한 외형 (Lab)	미립자- 패스	시각
D1500	ASTM 색	L 0.5	
D664	산성도 수	< 0.10	mg KOH/g
D6079	윤활성 (마모 자국)	405	μm

[0743]

[0744] 서열

[0745] 서열번호 1

[0746] 클로렐라로부터의 HUP 프로모터 (젠햄크 수탁 번호 X55349의 부분서열):

gatcagacggccgtacactgcggagataatcaagtgcgttaggcaaccaactcagcagctgtgggtggctgcaggatagtgtt
 gcagggcccaaggacagcaggaaacttacacctgtccccgacccagtttatggagtgcattgcctcaagagcctagccggagc
 gtaggcctacacttgccgaccggatggggatagttactcgcactgcgtcttagtgagatggcggcgtgcgtccataaac
 aactggctgcagccattttggccggaccatttgcggggccagcaatgcctacttgcggtagggtagaaactgaacaaagac
 tacaaaacagaattttcccttggggatggtaaggcgccggccgcgtccatggcgtccatggcgtccatggcgtccatggc
 aaggcgcaaacatggccggactttgtcagacttccatggccatacaaggcatgtcgagatttagtgctgagtaagacactatca
 ccccatgtcgatgaaggcgacttcgtccatggccggccgtccatggcgtccatggcgtccatggcgtccatggcgtccatggc
 ctgtctttgcacaaaacaactgggtacccgcgtcaaggctgcgtccatggccggccgtccatggcgtccatggcgtccatggc
 gggccggcccttgcggtagggtagggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatgg
 cctaaaccaagacggcacccataataatagggtggggactaacaaggccatatgcgaacttgggtgcctatcttgatgg
 ttggagtggtgtgtacggcgtccatggccggacttgcgtccatggccggccgtccatggccggccgtccatggccggccgt
 gttgtgtttcagttatgtatgtatgtatgtatgtatgtatgtatgtatgtatgtatgtatgtatgtatgtatgtatgt
 gcctcaccatctaaggctgtacacgcgtactcaaaacgccttgcgtccatggccggccgtccatggccggccgtccatgg
 gcacatagcactcccttacatcaccaggcgtacaaca

[0747]

[0748] 서열번호 2

pCambia로부터의 CMV-Hyg-CMV BamHI-SacII 카세트:

서열번호 6

caaccacgtcttcaaagcaa

aaaaatggatgt

서울한국

TCTATGACGAACGAAACCTCGGATAGACCACTTGTGCACTTACACCAAACAAG
GGCTGGATGAATGACCCAAATGGACTGTGGTACGACGAAAAAGATGCCAGTGG
CATCTGTACTTCAATACAACCCGAACGATACTGTCTGGGGGACGCCATTGTTT
GGGGCCACGCCACGTCCGACGACCTGACCAATTGGGAGGACCAACCAATAGCTA
TCGCTCCGAAGAGGAACGACTCCGGAGCATTCTCGGGTTCCATGGTGGTTGACTA
CAACAATACTCCGGCTTTCAACGATACCATTGACCCGAGACAACGCTGCGTG

GCCATATGGACTTACAACACACCGGAGTCCGAGGAGCAGTACATCTCGTATAGC
 CTGGACGGTGGATACACTTACAGAGTATCAGAAGAACCTGTGCTGCTGCAA
 ATTGACTCAGTCCGAGATCCGAAGGTCTTGGTACGAGCCCTCGCAGAAGTG
 GATCATGACAGCGCAAAGTCACAGGACTACAAGATCGAAATTTACTCGTCTGA
 CGACCTTAAATCCTGGAAGCTCGAATCCGCGTTCGCAAACGAGGGCTTCTCGGC
 TACCAATACGAATGCCAGGCCTGATAGAGGTCCAACAGAGCAAGATCCCAGC
 AAGTCCTACTGGGTGATGTTTATTCCATTAATCCAGGAGCACCGCAGGAGGT
 CTTTAATCAGTACTTCGCGGAAGCTTAACCGAACTCATTGAGGCACTTGAT
 AACCAATCAAGAGTAGTTGATTTGGAAAGGACTACTATGCCCTGCAGACTTTCT
 TCAAACTGACCCGACCTATGGGAGCGCTTGGCATTGCGTGGCTTCTAACTG
 GGAGTATTCCGATTGTTCTACAAACCCCTGGAGGTCTCCATGCGCTCGTG
 AGGAAATTCTCTCAACACTGAGTACCAAGGCCAACCGAAACCGAACTCATA
 AACCTGAAAGCGAACCGATCCTGAACATTAGCAACCGTGGCCCTGGAGCCGG
 TTTGCAACCAACACCACGTTGACGAAAGCCAACAGTACAACGTCGATTTGCA
 ATAGCACCGGTACACTGAATTGAACTGGTGTATGCCGTCATAACCAACCCAAAC
 GATCTCGAAGTCGGTGTGCGGACCTCTCCCTCTGGTTAAAGGCTGGAAGAC
 CCCGAGGAGTACCTCAGAATGGGTTCGAGGTTCTGCGTCCTCCTTCTGGA
 TCGCGGAACAGCAAAGTAAAATTGTTAAGGAGAACCCATATTACCAACAG
 GATGAGCGTTAACACCAACCATTCAAGAGCGAAAACGACCTGCGTACTACAA
 AGTGTATGGTTGCTGATCAAATATCCTGAACTCTACTCAACGATGGTGAT
 GTCGTGTCACCAACACATACTTCATGACAACCGGAAACGCACTGGCTCCGTGA
 ACATGACGACGGGTGTGGATAACCTGTTACATGACAAATTCCAGGTGAGGG
 AAGTCAAGTGA

[0767]

서열번호 9

TCCGGTGTGTTGTAAGTCCA

[0769]

서열번호 10

TTGTCGGAATGTCATATCAA

[0771]

서열번호 11

TCCGGTGTGTTGTAAGTCCA

[0774]

서열번호 12

AACGCCTTGTACAACGTCA

[0776]

서열번호 13

TCCGGTGTGTTGTAAGTCCA

[0777]

[0778] 서열번호 14

MTNETSDRPLVHFTPKNKGWMNDPGLWYDEKDAKWHLYFQYNPNDTVWGTLF
WGHATSDDLTNWEDQPIAIAPKRNDSGAFGSMVVDYNNTSGFFNDTIDPRQRCV
WTYNTPESEEQYISYSLDGGYTFTEYQKNPVLAAANSTQFRDPKVFWYEPSQKWIM
AAKSQDYKIEIYSSDDLKSWKLESAFANEGFLGYQYECPGLIEVPTEQDPSKSYW
FISINPGAPAGGSFNQYFVGSFNGTHFEAFDNQSRVVDFGKDYYALQTFFNDPTYGS
ALGIAWASNWEYSAFVPTNPWRSSMSLVRKFSLNTEYQANPETELINLKAEPILN
AGPWSRFATNTTLTKANSYNVDLSNSTGTLEFELVYAVNTTQTIKSVFADLSLW
GLEDPPEYLRMGFEVSASSFLDRGNSKVFKVKENPYFTNRMSVNNQPFKSENDLS
YKVGLLDQNILELYFNDGTVVSTNTYFMTTGNALGSVNMTGVDNLFYIDKFQVR
EVK

[0779]

[0780] 서열번호 15

MLLQAFLFLLAGFAAKISAS

[0781]

[0782] 서열번호 16

MANKSLLLLLLGSLASG

[0783]

[0784] 서열번호 17

MARLPLAALG

[0785]

[0786] 서열번호 18

MANKLLLLLLLLPLAASG

[0787]

[0788] 서열번호 19

MLLQAFLFLLAGFAAKISASMTNETSDRPLVHFTPKNKGWMNDPGLWYDEKDAKWHLYF
QYNPNDTVWGTLFWGHATSDDLTNWEDQPIAIAPKRNDSGAFGSMVVDYNNTSGFFND
TIDPRQRCVIAWTYNTPESEEQYISYSLDGGYTFTEYQKNPVLAAANSTQFRDPKVFWYEPSQ
KWIMTAAKSQDYKIEIYSSDDLKSWKLESAFANEGFLGYQYECPGLIEVPTEQDPSKSYW
MFISINPGAPAGGSFNQYFVGSFNGTHFEAFDNQSRVVDFGKDYYALQTFFNDPTYGSALG
IAWASNWEYSAFVPTNPWRSSMSLVRKFSLNTEYQANPETELINLKAEPILNISNAGPWSRF
ATNTTLTKANSYNVDLSNSTGTLEFELVYAVNTTQTIKSVFADLSLWFKGLEDPPEYLRMG
FEVSASSFLDRGNSKVFKVKENPYFTNRMSVNNQPFKSENDLSYYKVGLLDQNILELYFN
DGDVVSTNTYFMTTGNALGSVNMTGVDNLFYIDKFQVREVK

[0789]

[0790] 서열번호 20

CTGACCCGACCTATGGGAGCGCTCTTGGC

[0791]

[0792] 서열번호 21

CTTGACTTCCCTCACCTGGAATTGTCG

[0793]

[0794] 서열번호 22

GTGGCCATATGGACTTACAA

[0795]

[0796] 서열번호 23

CAAGGGCTGGATGAATGACCCCAATGGACTGTGGTACGACG

[0797]

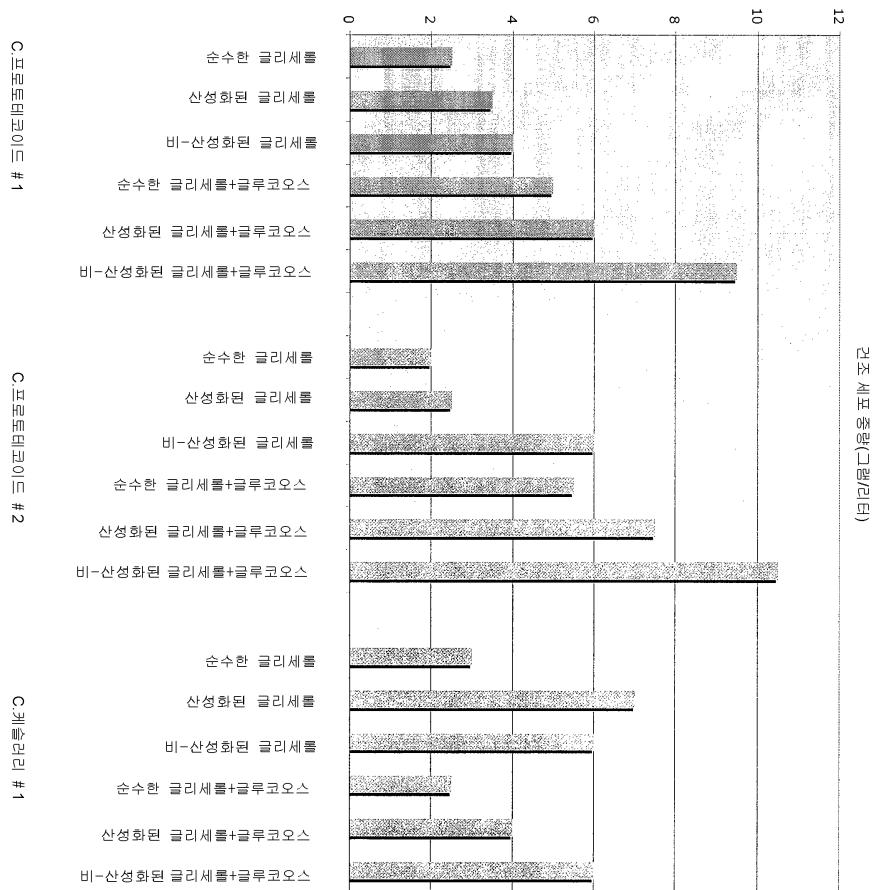
서열번호 24

CACCCGTCGTCATGTTCACGGAGCCCAGTGCG

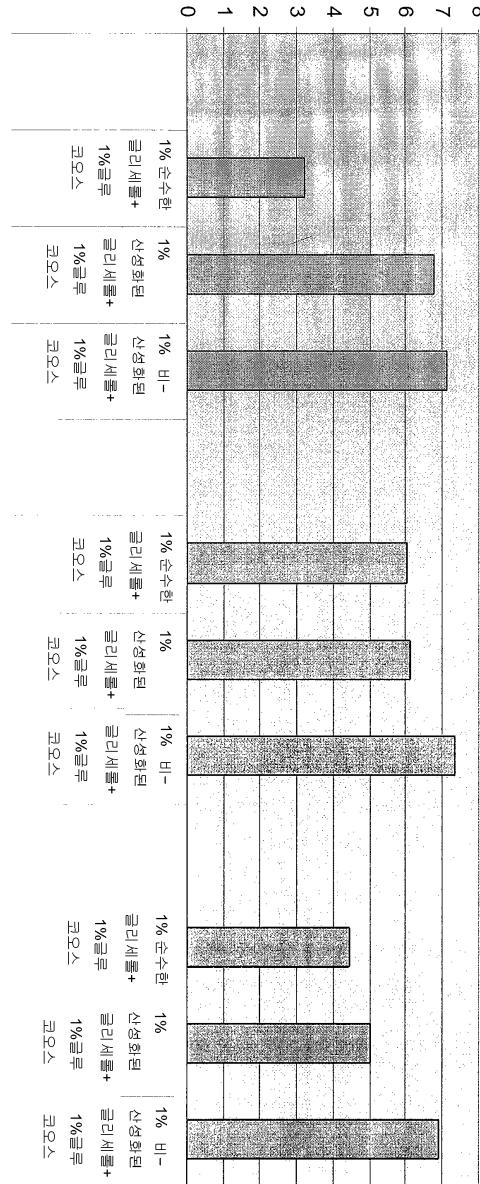
서연버흐 25

도면

도면1



도면2



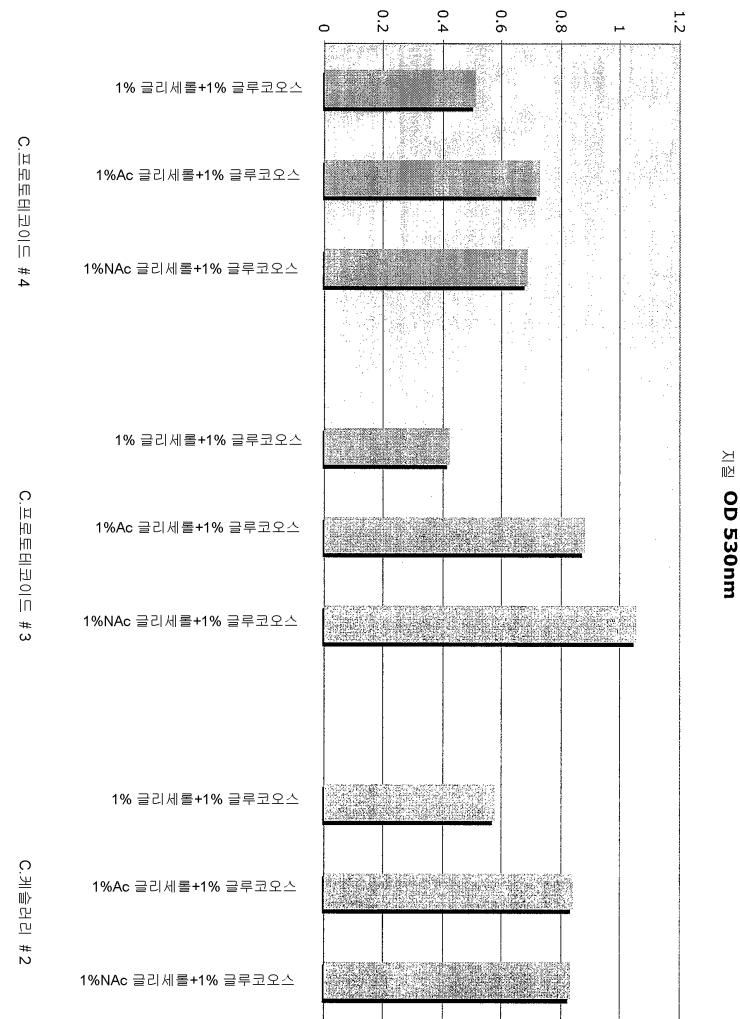
전조 세포 중량(그램/리터)

C.프로토테코이드 #3

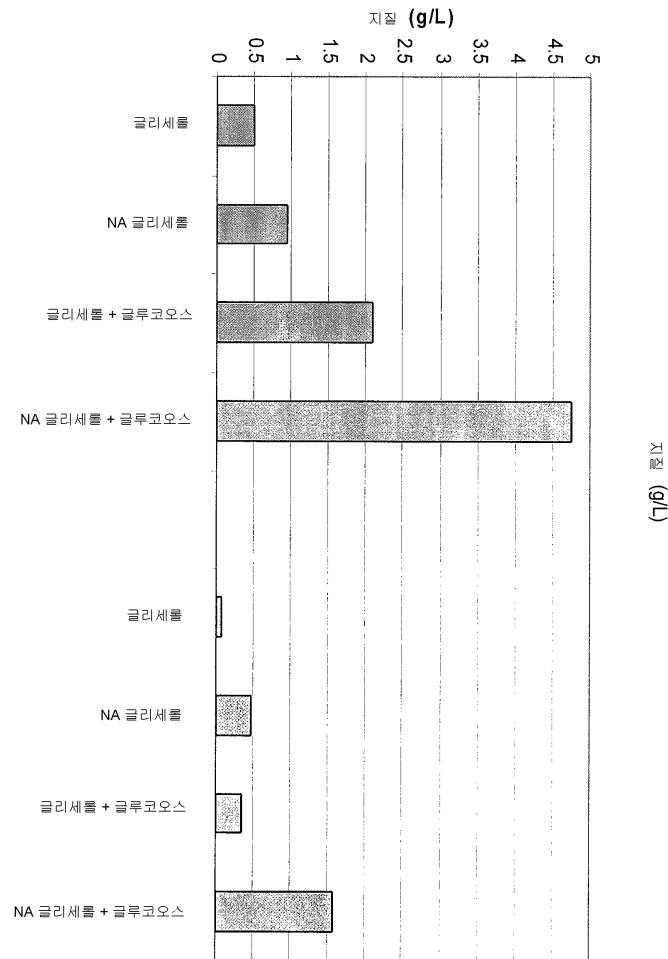
C.프로토테코이드 #2

C.캐슬러리 #2

도면3



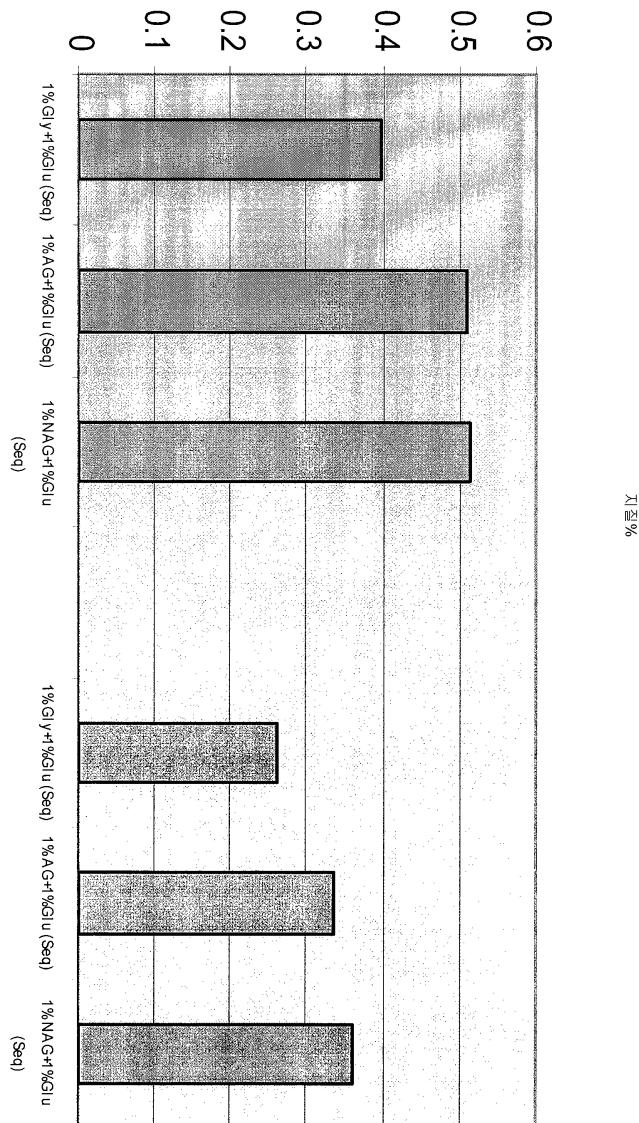
도면4



C.프로토콜코드 #2

C.캐슬리 #1

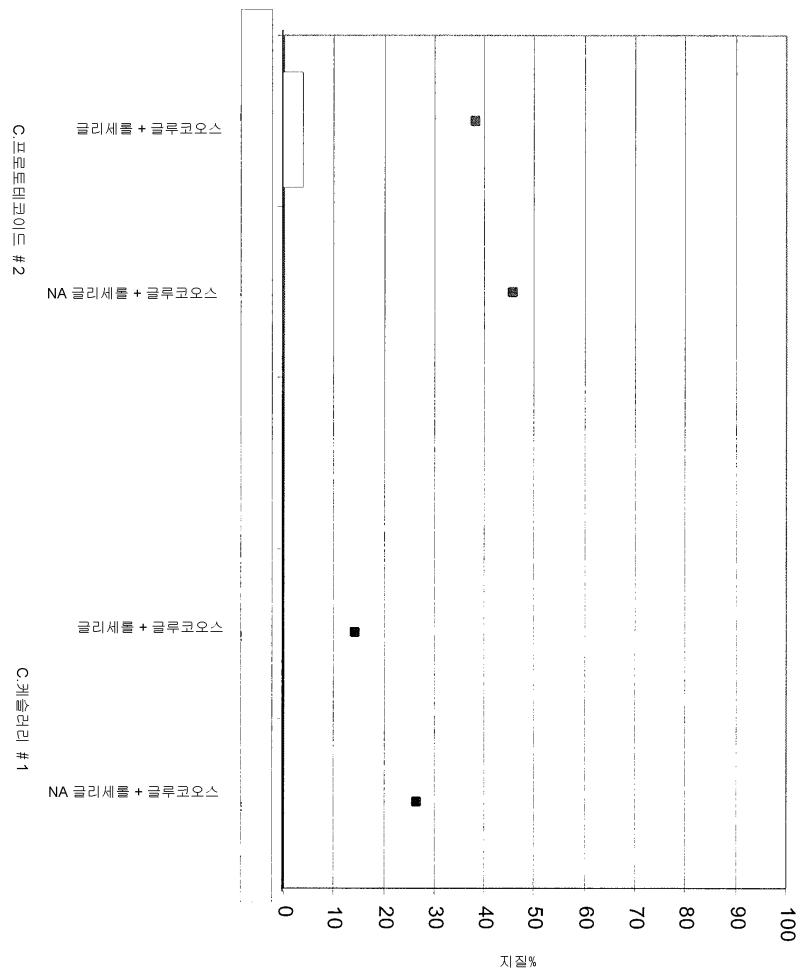
도면5



c.프로토코일 #3

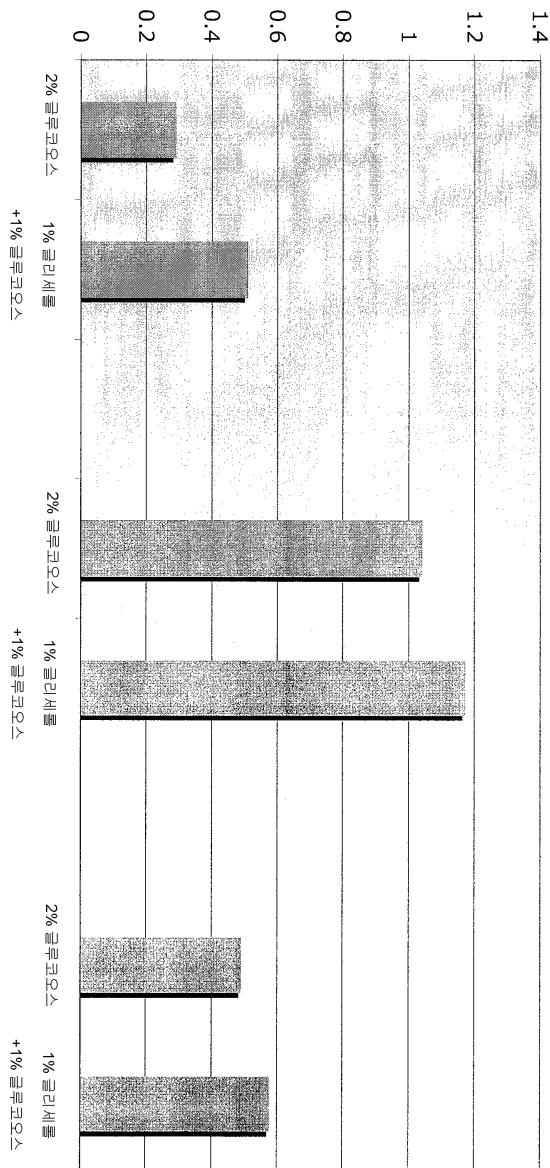
c.캐슬리 #2

도면6



도면7

지침 OD 530nm

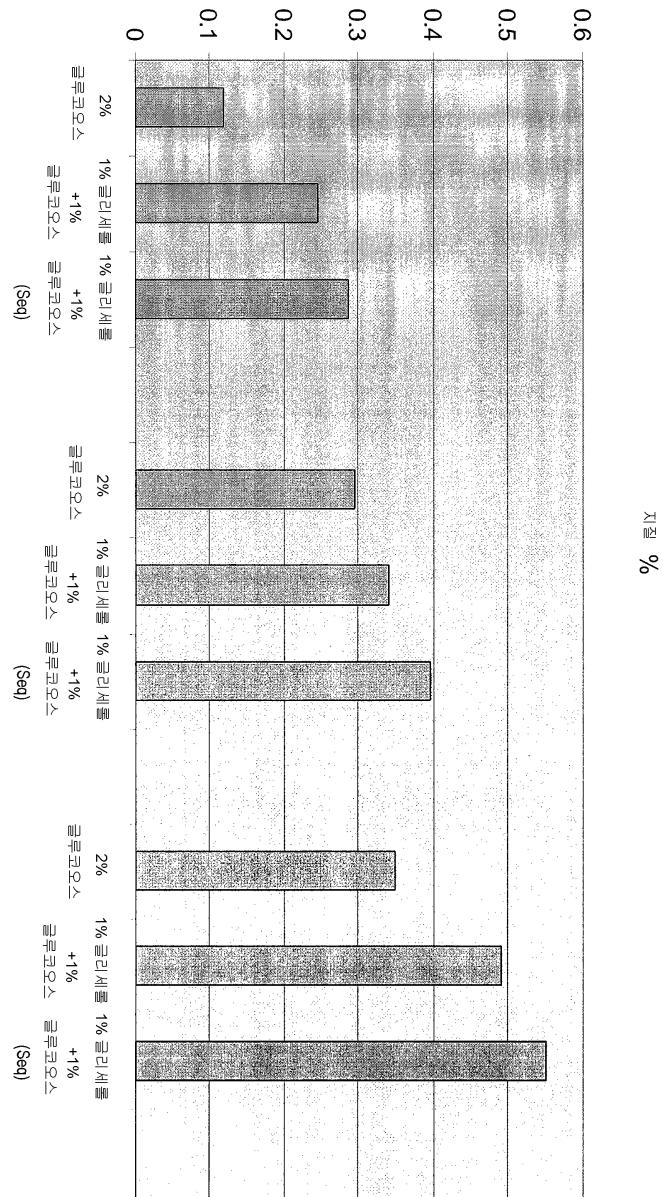


C.프로토타이코드 #4

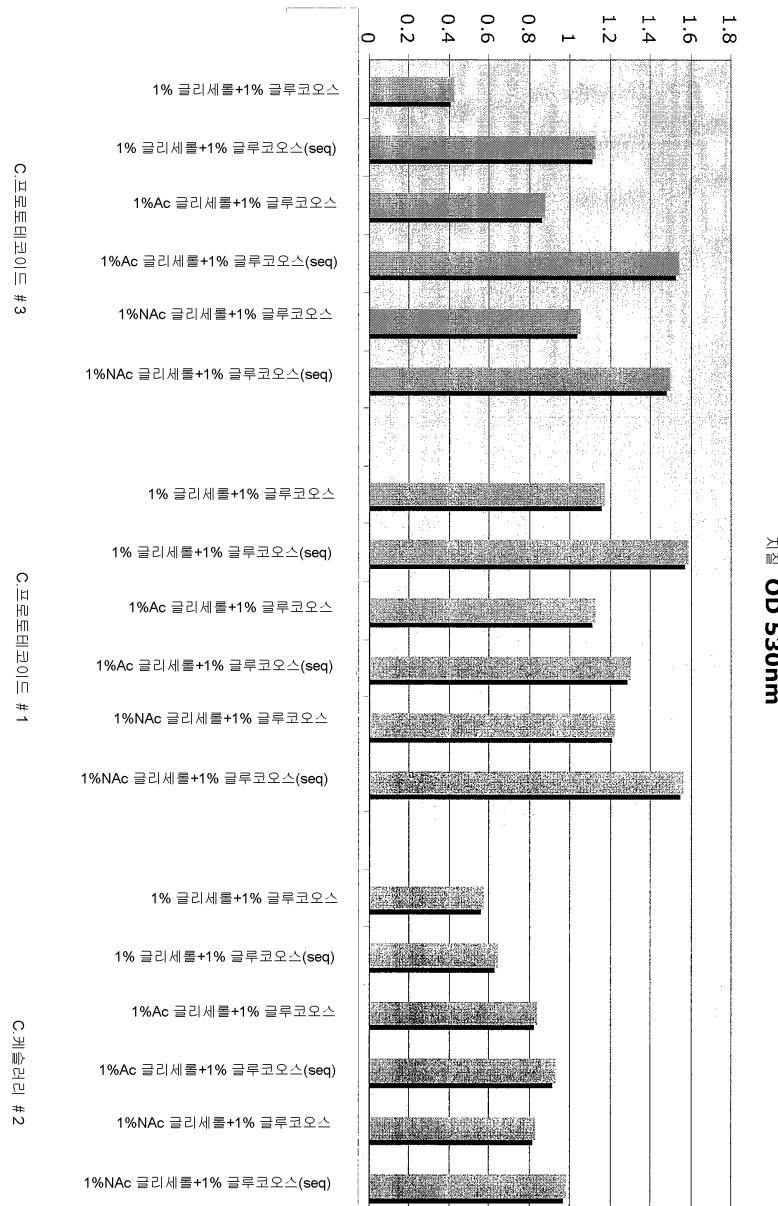
C.프로토타이코드 #1

C.캐슬러리 #2

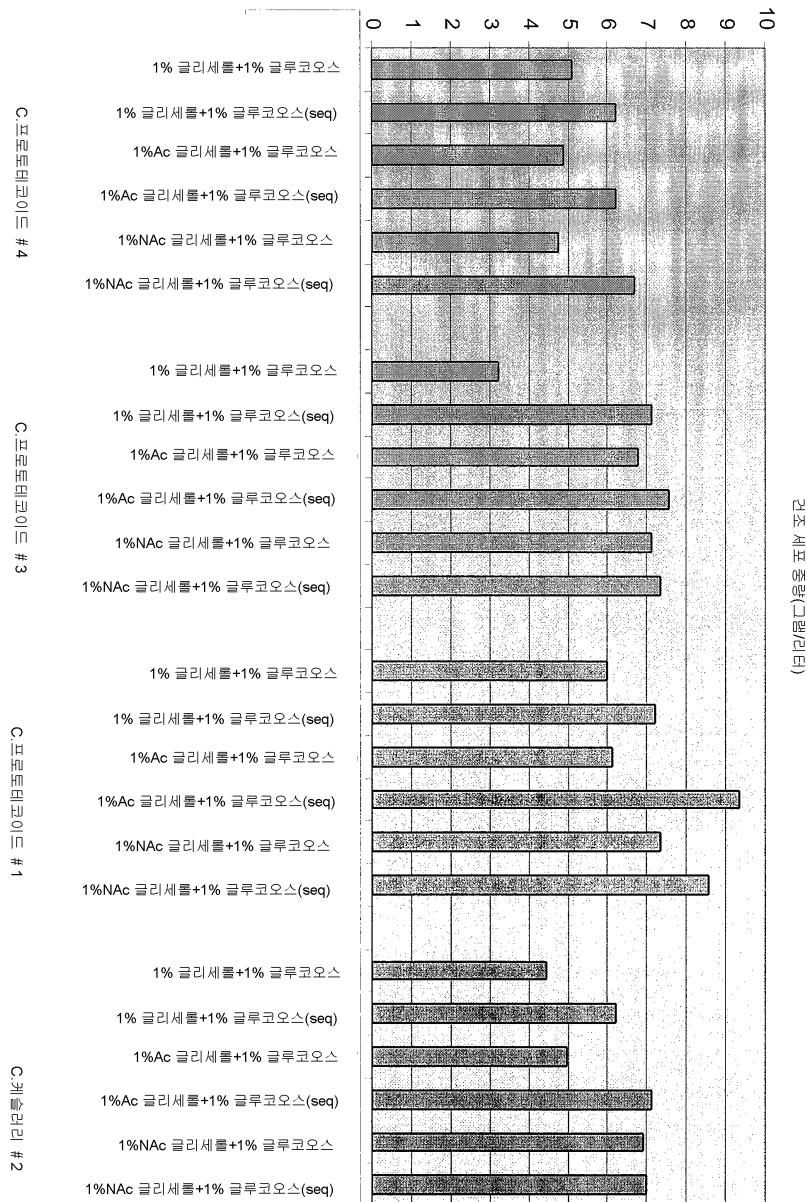
도면8



도면9

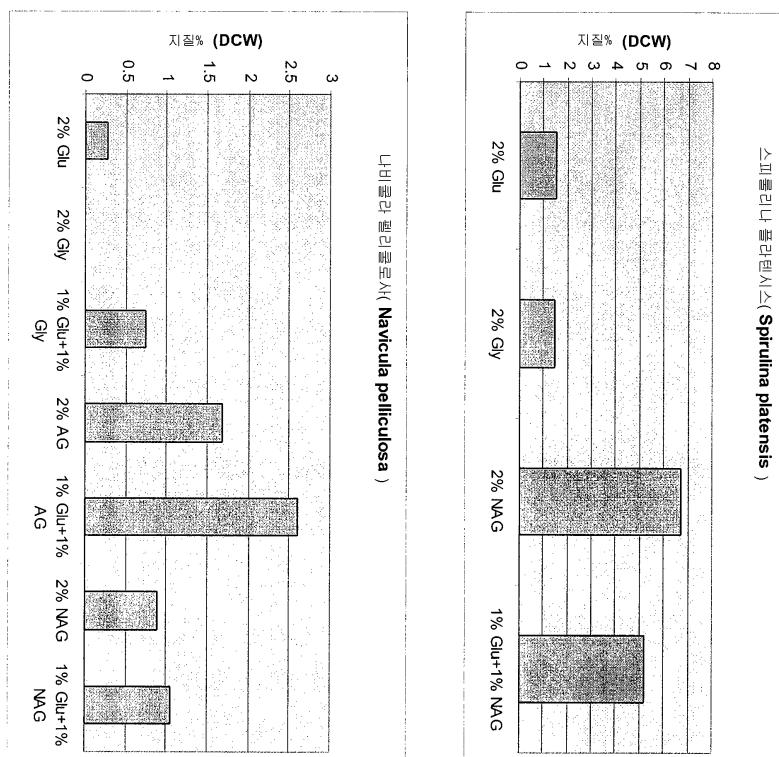


도면10

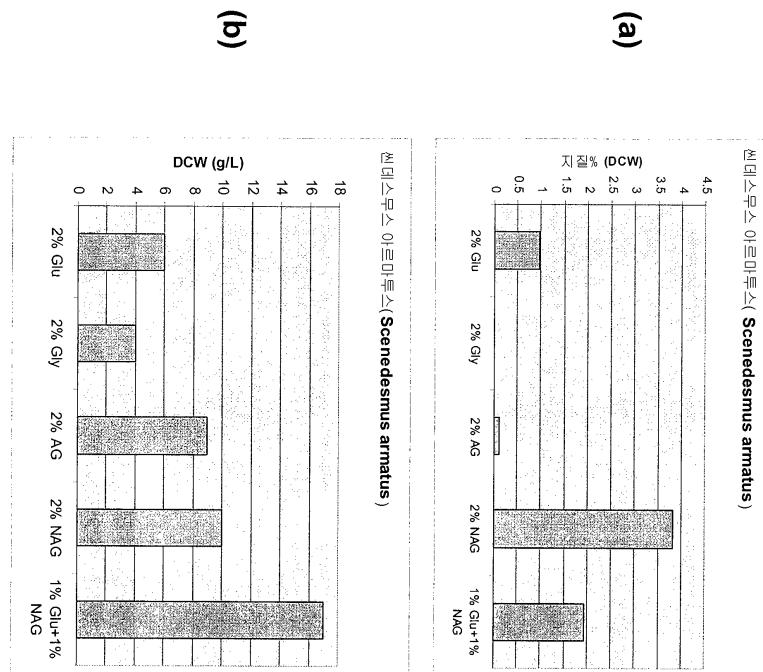


도면11

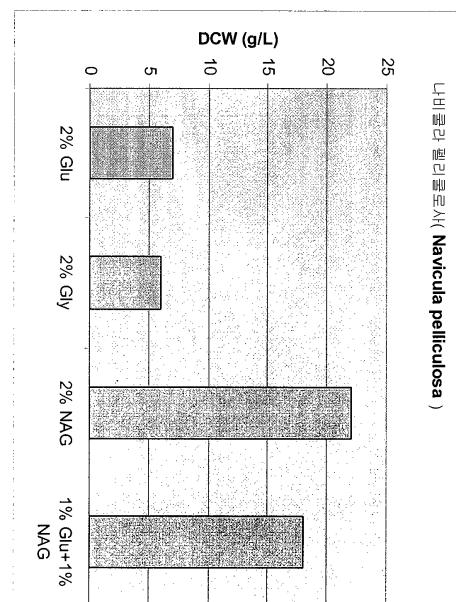
(b)



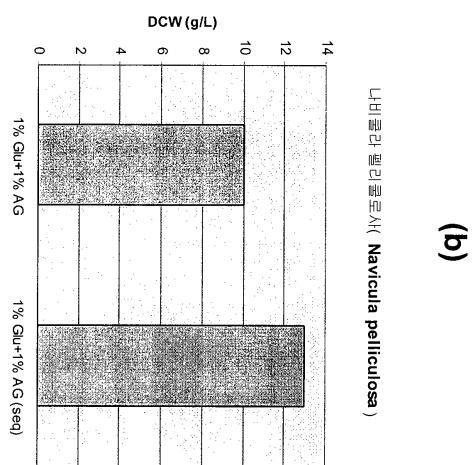
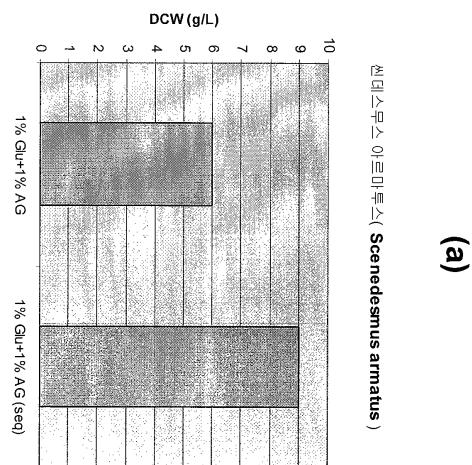
도면12



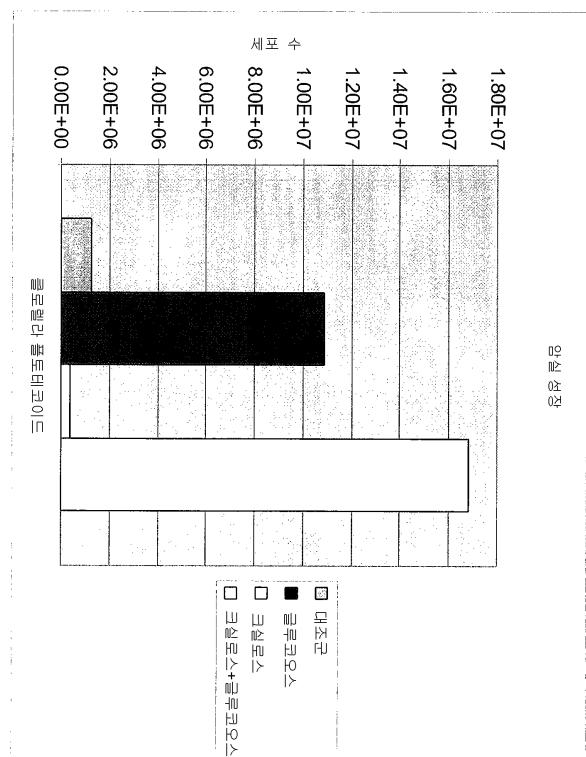
도면13



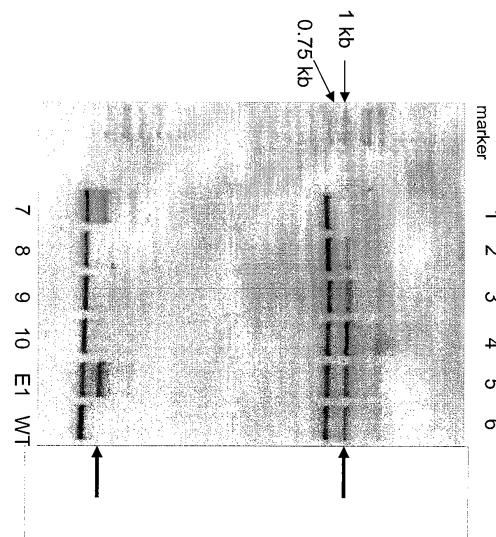
도면14



도면15



도면16



래인 1-10: 바이오리스틱 혈질전환제
래인 E1: 은렉트로포레이션 혈질전환제
래인 : WT 개별 DNA

클로렐라 프로토테코아이드 코돈 사용표

Phe	UUU	39	(0.82)	Ser	UCU	50	(1.04)
	UUC	56	(1.18)		UCC	60	(1.25)
Leu	UUA	10	(0.20)		UCA	46	(0.96)
	UUG	46	(0.91)		UCG	43	(0.89)
Tyr	UAU	15	(0.59)	Cys	UGU	46	(0.77)
	UAC	36	(1.41)		UGC	73	(1.23)
ter	UAA	9	(0.00)	ter	UGA	43	(0.00)
	UAG	15	(0.00)	Ter	UGG	69	(1.00)
Leu	CUU	49	(0.97)	Pro	CCU	80	(0.98)
	CUC	73	(1.45)		CCC	88	(1.08)
	CUA	22	(0.44)		CCA	93	(1.14)
	CUG	103	(2.04)		CCG	65	(0.80)
His	CAU	50	(0.88)	Arg	CGU	39	(0.76)
	CAC	63	(1.12)		CGC	63	(1.23)
Gln	CAA	59	(0.84)		CCA	46	(0.90)
	CAG	82	(1.16)		CGG	47	(0.92)
Ile	AUU	24	(0.69)	Thr	ACU	32	(0.67)
	AUC	61	(1.76)		ACC	76	(1.60)
	AUA	19	(0.55)		ACA	41	(0.86)
Met	AUG	42	(1.00)		ACG	41	(0.86)
Asn	AAU	26	(0.75)	Ser	AGU	23	(0.48)
	AAC	43	(1.25)		AGC	67	(1.39)
Lys	AAA	32	(0.54)	Arg	AGA	51	(1.00)
	AAG	86	(1.46)		AGG	61	(1.19)
Val	GUU	36	(0.75)	Ala	GCU	57	(0.79)
	GUC	54	(1.13)		GCC	97	(1.34)
	GUA	30	(0.63)		GCA	89	(1.23)
	GUG	71	(1.49)		GCG	47	(0.65)
Asp	GAU	60	(0.95)	Gly	GUU	35	(0.60)
	GAC	66	(1.05)		GUC	78	(1.33)
Glu	GAA	41	(0.68)		GCA	54	(0.92)
	GAG	80	(1.32)		GCG	67	(1.15)

도면18

A. 두널리얼라 슬리나 가장 바람직한 코드

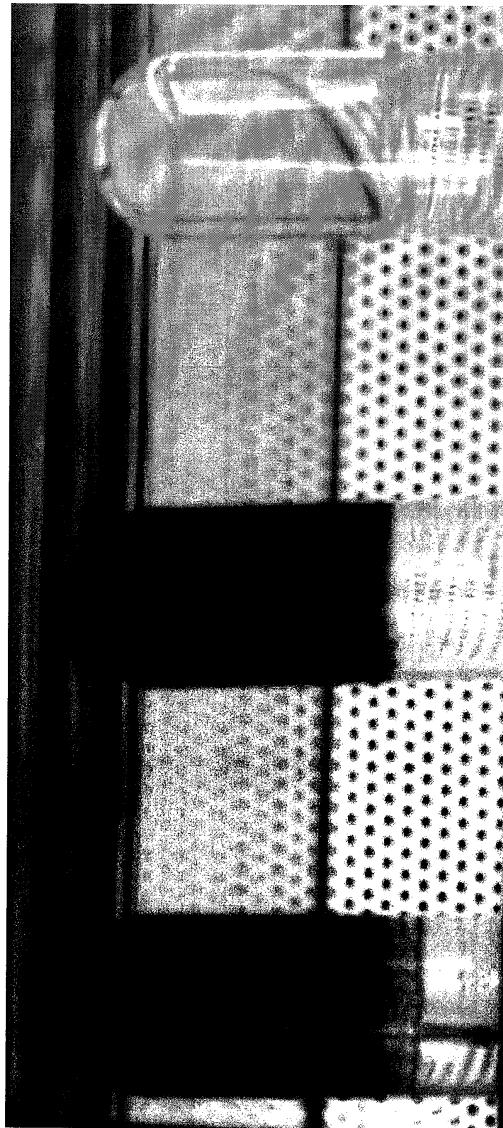
TTC (Phe)
TAC (Tyr)
TGC (Cys)
TAA (Stop)
TGG (Trp)
CCC (Pro)
CAC (His)
CGC (Arg)
CTG (Leu)
CAG (Gln)
ATC (Ile)
ACC (Thr)
AAC (Asn)
AGC (Ser)
ATG (Met)
AAG (Lys)
GCC (Ala)
GAC (Asp)
GGC (Gly)
GTG (Val)
GAG (Glu)

B. 클로렐라 피레노이도사 가장 바람직한 코드

TTC (Phe)
TAC (Tyr)
TGC (Cys)
TGA (Stop)
TGG (Trp)
CCC (Pro)
CAC (His)
CGC (Arg)
CTG (Leu)
CAG (Gln)
ATC (Ile)
ACC (Thr)
GAC (Asp)
TCC (Ser)
ATG (Met)
AAG (Lys)
GCC (Ala)
AAC (Asn)
GGC (Gly)
GTG (Val)
GAG (Glu)

도면19

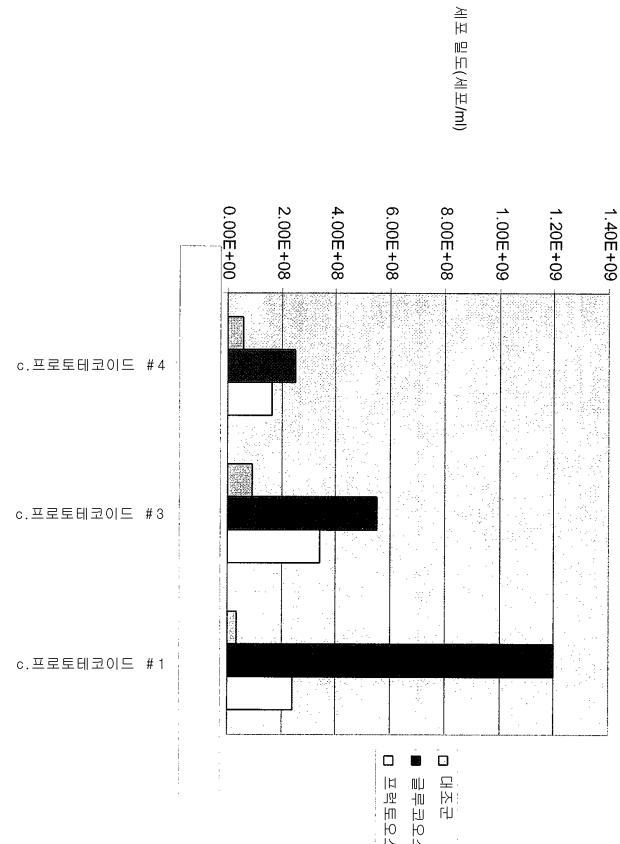
(a)



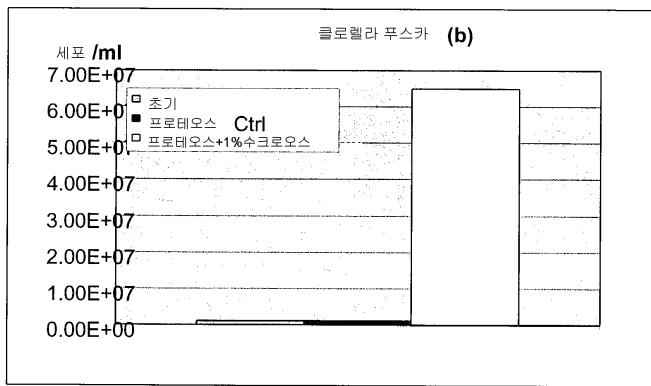
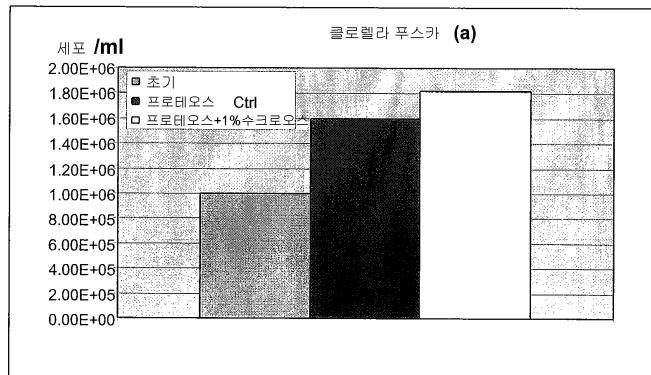
(b)

(c)

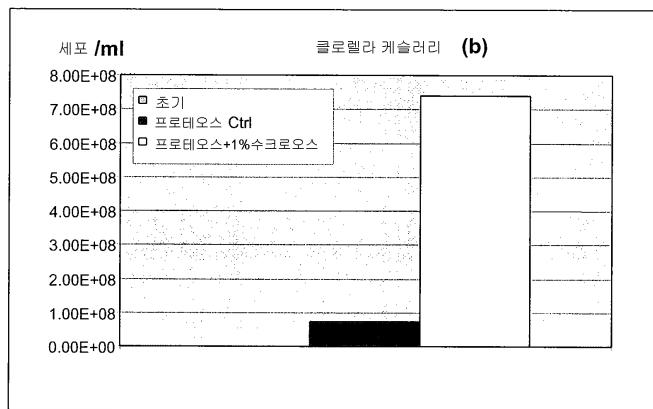
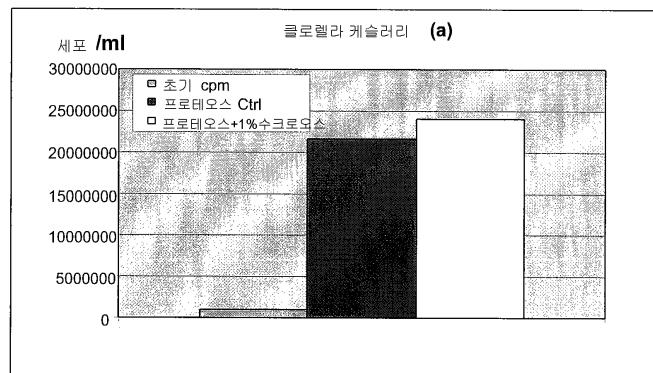
도면20



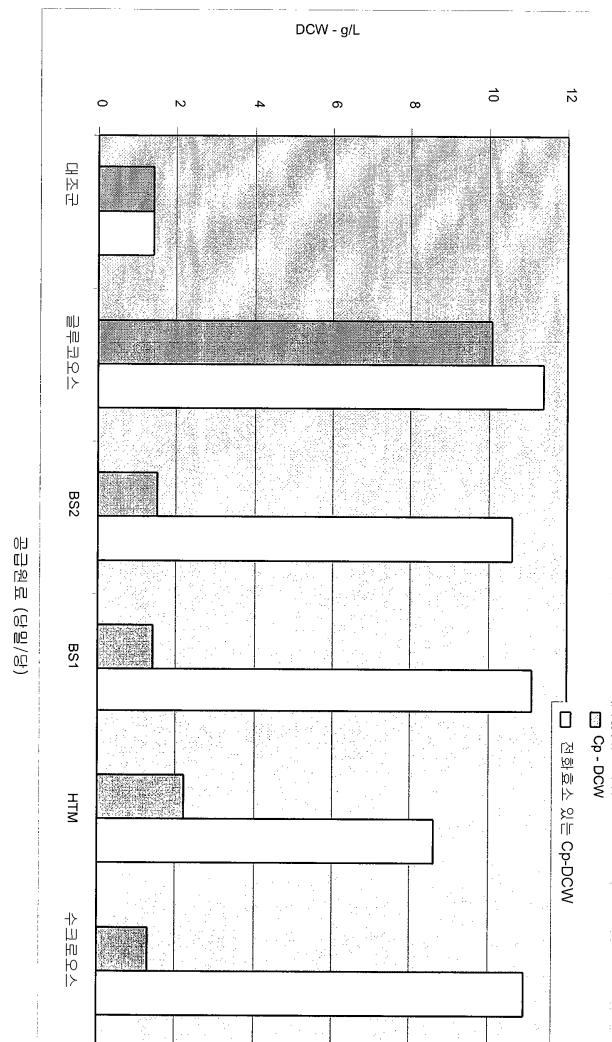
도면21



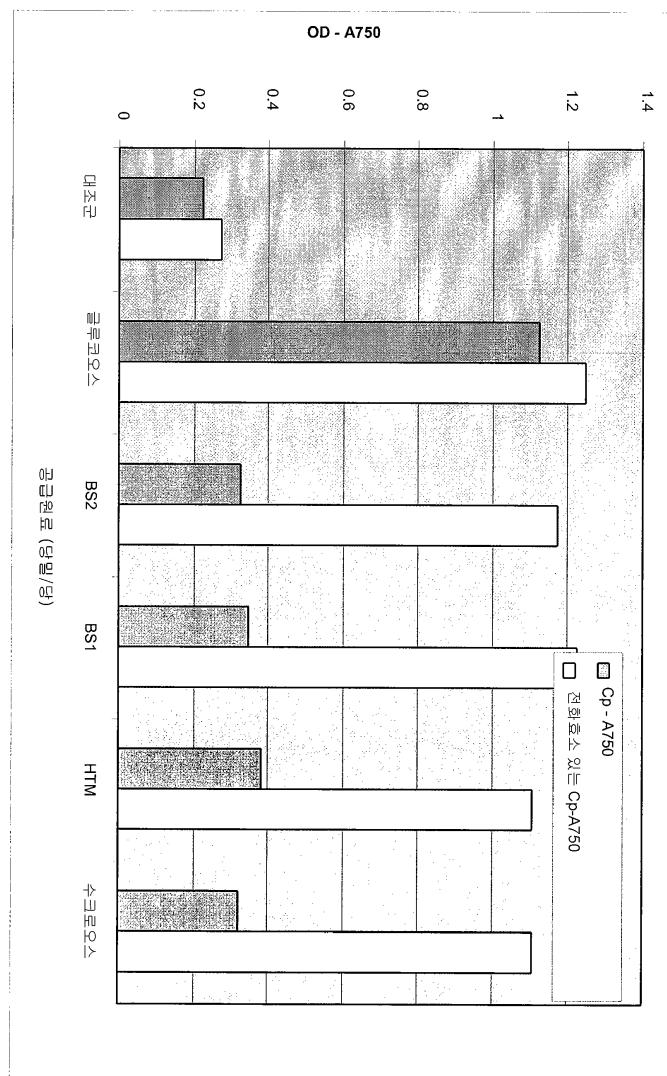
도면22



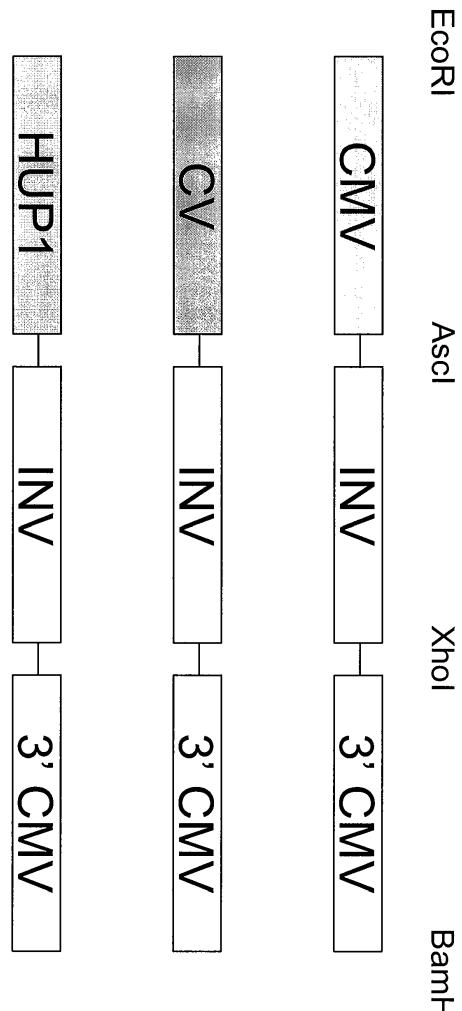
도면23



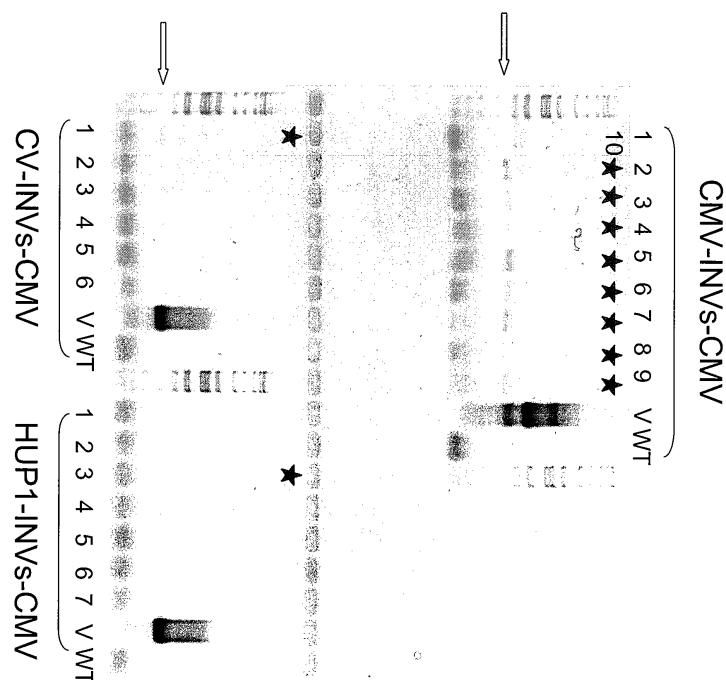
도면24



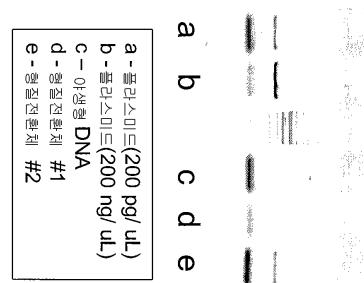
도면25



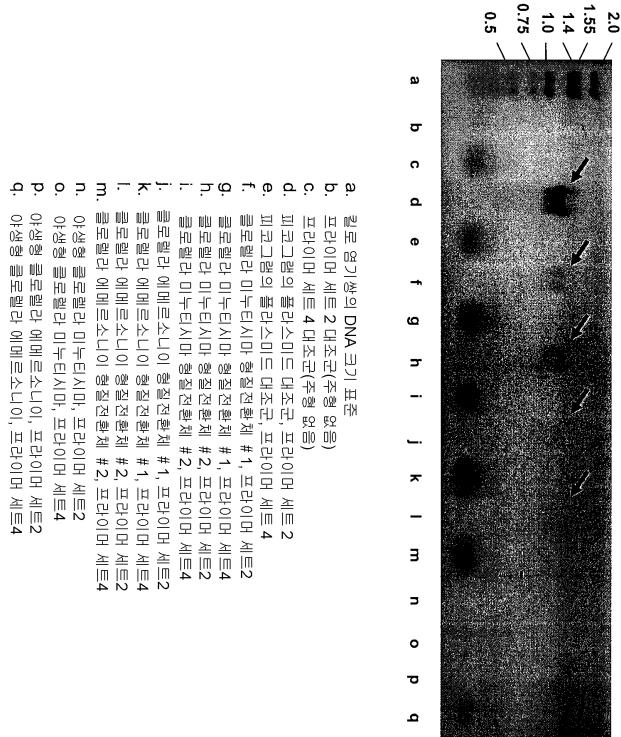
도면26



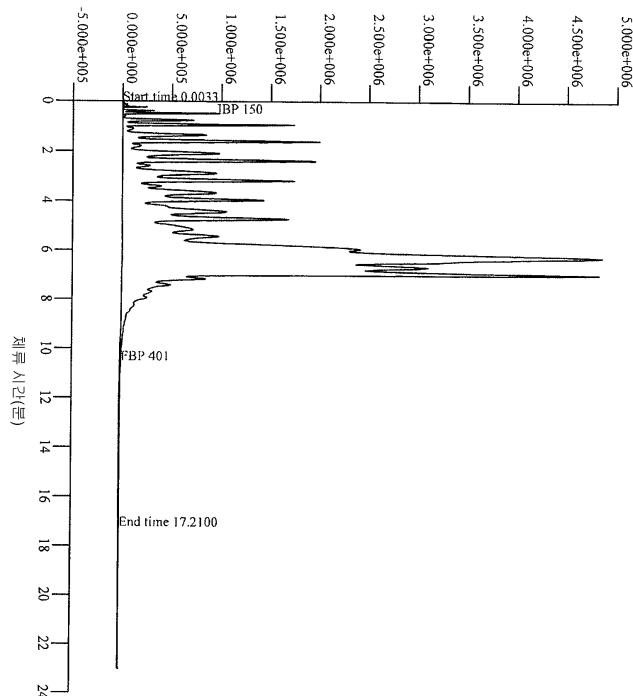
도면27



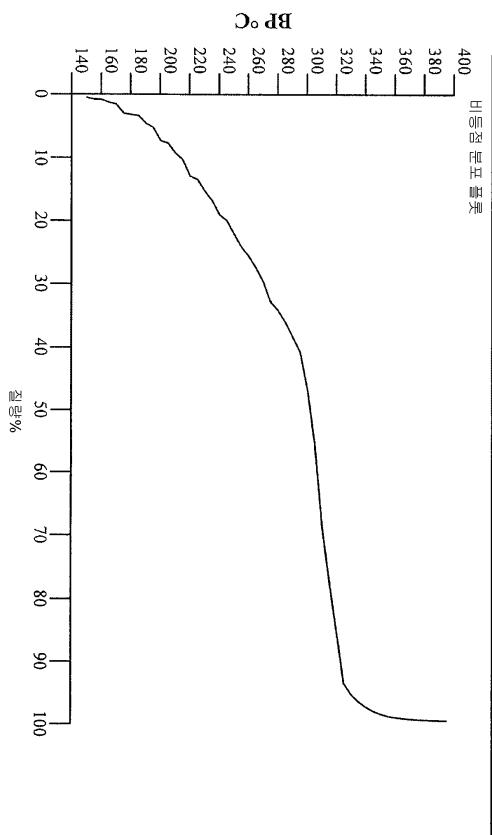
도면28



도면29



도면30



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> SOLAZYME, INC.

<120> PRODUCTION OF OIL IN MICROORGANISMS

<130> 026172-002430KR

<140>

<141>

<150> PCT/US2008/065563

<151> 2008-06-02

<150> 61/024,069

<151> 2008-01-28

<150> 60/968,291
 <151> 2007-08-27

<150> 60/959,174
 <151> 2007-07-10

<150> 60/941,581
 <151> 2007-06-01

<160> 26

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 1187
 <212> DNA
 <213> Chlorella kessleri

<400> 1	
gatcagacgg gcctgacctg cgagataatc aagtgcgtt agccaaccaa ctcagcagct	60
gcttgggttt gggctctgcag gatagtgttg cagggcccca aggacagcag ggaaacttac	120
accttgcctcc cgacccagtt ttatggagtg cattgcctca agagccttagc cggagcgcta	180
ggctacatac ttgccgcacc ggtatgaggg gatatagtac tcgcactgctc ctgtctagtg	240
agatggcag tgctgccat aaacaactgg ctgctcagcc atttggcggc ggaccattct	300
ggggggccca gcaatgcctg actttcggtt agggtgaaaa ctgaacaaag actacaaaa	360
cagaatttct tcctccttgg aggttaagcgc aggccggccc gcctgcgcac acatggcgt	420
ccgaacacct ccatagctgt aaggcgca acatggccgg actgttgtca gcactttc	480
atggccatac aaggtcatgt cgagatgtt gctgagtaag acactatcac cccatgttc	540
attgaagccg tgacttcatg ccaacctgcc cctggcgta gcagacgtat gcccattat	600

ccactagccg acatgcgctg tctttgcca ccaaacaac tggcacaccg ctcgaagtgc	660
tgccgcacac ctccgggagt gagtccggcg actccccc ggcggccgc ggcctacct	720
ggtagggtc gccatacgcc cacgaccaaa cgacgcagga ggggattggg gtaggaaatc	780
ccaaccagcc taaccaagac ggcacctata ataataggtg ggggactaa cagccctata	840
tcgcaagctt tgggtgccta tcttgagaag cacgagttgg agtggtgtg tacggtcgac	900
cctaagggtgg gtgtgccca gcctgaaaca aagcgcttag cagctgttc tataatgtgt	960
cagccgttgt gttcagtttattgtatgc tatttttgt tcgtgttagg gtggcgcagg	1020
cccacctact gtggcgggcc attgggtggt gcttgaattt cctaccatc taaggctgtga	1080
acgctcactc aaacgcctt gtacaactgc agaactttcc ttggcgctgc aactacagt	1140
tgcaaaccag cacatagcac tcccttacat cacccagcag tacaaca	1187
<210> 2	
<211> 1414	
<212> DNA	
<213> Chlorella ellipsoidea	
<400> 2	
cgctgcgcac cagggccgcc agctcgctga tgtcgctcca aatcggtcc cccgattttt	60
tgttcttcat cttctccacc ttgggtggct tcttgccag ggccttcagc tgcatgcga	120
cagaccgttg agctcctgtat cagcatcctc aggaggccct ttgacaagca agccctgtg	180
caagccatt cacgggttac cagttgtgtc gaggttagatg gtttgaaaa ggattgtcg	240
gtcgattgtc gtcatggaa ttggcatgtc catgcattt cacaatatgc caccaggctt	300
tggagcaaga gagcatgaat gccttcaggc aggttggaaat ttccctgggg tgaaggaggca	360
ggccgagga ttggaggagg aaagcatcaa gtctcgctc atgtcatgt ttctcgtcag	420

agtttgc当地 gctcacagga gcagagacaa gactggctgc tcaggtgttgc catcggtgt 480
 gtggtgaaaa ggggggggtt aatacggtac gaaatgcact tgaaattccc acctcatgcc 540
 agcggaccca catgcttgc ttcgaggcct gtgggttag aatgctcac tctgcctcg 600
 ttgctgaggt acttcaggcc gctgagctca aagtcgatgc cctgctcgat tatcagggcc 660
 tgcacccctcg ggctgaccgg ctcaaggctcc ttgcgggca tggagtaggc gccggcagcg 720
 ttcatgtccg ggcccgaggc agcggtggtg ccataaatgt cggtgtatggg ggggaggggg 780
 gccgtcgcca caccattgcc gttgctggct gacgcattca catgtggcct ggctggcacc 840
 ggcagcactg gtctccagcc agccagcaag tggctgttca ggaaagcggc catgttttg 900
 gtccctgcgc atgttaattcc ccagatcaaa ggagggaaaca gcttggattt gatgtatgc 960
 ccaaccggac tgaatgtcg atggcagggtc ctttgagtc tcccaattt ctagcaggc 1020
 actgtgaccc aacgcagcat gccaaccgca aaaaaatgt tgacagaaaa tgaagcggtg 1080
 tgtcaatatt tgctgttattt attcgttta atcagcaacc aagttcgaaa cgcaactatc 1140
 gtggtgatca agtgaaccc atcagactta cctcggtcg caagggaaacg gaggcacaa 1200
 attccaattt gatattatcg ctggccaaggc tagagctgtat ctttggaaa ccaactgcca 1260
 gacagtggac tgtgtggag tgcccgagt ggtggagcct cttcgattcg gttatgtt 1320
 actaacgtga accctcagtg aagggacccat cagaccagaa agaccagatc tcctcctcg 1380
 caccgagaga gtgttgccgc agtaggacga caag 1414

<210> 3
 <211> 1113
 <212> DNA
 <213> Botryococcus braunii

<400> 3
aattggaaac cccgcgaag accgggttgt ttggccgcct gaccggaaag ggggggcctg 60

tcccgaaagg ggtctatctc ttggggatgc tcggcgccg aaagtgcgt tgatggacc 120

tcttcgtcgaa ccatgtcgcc gtcgaggcca agagccgcgt ccattcgcc gagttcatga 180

tggaggtgaa tgaccgcac gccaccgaac ggcacaagaa gcggcgacc gatcgcccc 240

gtcgctgcag cccttgccga ggaagtcgg ctgctggcgt tcgacgagat gatggtgacg 300

aacagcccg acgcgtatgt cctgtcgccg ctgttcaccg cgctgatcga ggcgggggtg 360

acgatcgta ccacctccaa cggccgccc agggatctt ataagaacgg gctcaaccgc 420

gagcatttcc tgcccttcat cgcgctgatc gaggcgccgc tggacgtgct ggcgtgaac 480

ggcccgaccg actatcgccg cgaccggctg gggcgctgg acacgtggtt ggtgccaaat 540

ggcccaagg cgacgattac ctgtcgccg gcgttcttcc gcctgaccga ctatccggtc 600

gaggatgccc cgcatgtgcc ctctgaggac ctgaaggtgg gcggcgccgt gctgaatgtc 660

cccaaggcgc tgaagggcgt cgcggtcttc tcgttcaagc ggttgtgcgg cgaagcgcgg 720

ggggcgccgg actatctggc ggtcgccgcg ggcttccaca ccgtcatcct ggtcggaatc 780

cccaagctgg gggcgagaa ccgcaacgag gcggggcgt tcgtccagct gatcgacgcg 840

ctctacgaac ataaggtcaa gctgctcgcc gcagccgtat ccagccgcgaaactctatg 900

aaaccggcga cggccggttc gagttgagc gcagatcagc cggttggaaag agatgcgtc 960

cgaggattat ctggccaaag gccatggcgc ggagggcct tgatcaggcc ttaatgcact 1020

tcgcaaccat tatcgttaa aatcttaac tctgtggaat aacggttccc cgacggcgca 1080

atacacgtac gtccactacg gagtaggatt gga 1113

<210> 4
<211> 253
<212> DNA
<213> Chlamydomonas sp.

<400> 4
cgcttagaag attcgataa ggccgcagaa ggagcgcagc caaaccagga tggatgttga 60

tgggttattt gagcacttgc aacccttatac cgaaagcccc ctggcccaca aaggctaggc 120

gccaatgcaa gcagttcgca tgcagccctt ggagcggtgc cctcctgata aaccggccag 180

ggggcctatg ttctttactt tttacaaga gaagtcaactc aacatcttaa acggctttaa 240

gaagtctatac cg 253

<210> 5
<211> 2435
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<400> 5
ggatccccgg gaattcggcg cgccggcccc aacatggtgg agcacgacac tctcgctac 60

tccaagaata tcaaagatac agtctcagaa gaccaaagg ctattgagac tttcaacaa 120

aggtaataat cggaaacct cctcgattc cattgcccag ctatctgtca cttcatcaaa 180

aggacagtag aaaagggagg tggcacctac aaatgccatc attgcgataa aggaaaggct 240

atcggtcaag atgcctctgc cgacagtgg cccaaagatg gaccccccacc cacgaggagc 300

atcggtggaaa aagaagacgt tccaaccacg tcttcaaagc aagtggattg atgtgataac 360

atggtggagc acgacactct cgtctactcc aagaatatca aagatacagt ctcagaagac	420
caaagggcta ttgagacttt tcaacaaagg gtaatatcgaa gaaacctctt cgattccat	480
tgcctcgtt tctgtcactt catcaaaagg acagtagaaa aggaagggtgg cacctacaaa	540
tgcctcgtt tctgtcactt catcaaaagg acagtagaaa aggaagggtgg cacctacaaa	540
tgccatcatt gcgataaagg aaaggctatc gttcaagatg cctctgccga cagtggccc	600
aaagatggac ccccacccac gaggagcatc gtggaaaaag aagacgttcc aaccacgtct	660
tcaagcaag tggatttgc tgatatctcc actgacgtaa gggatgacgc acaatccac	720
tatccttcgc aagaccccttcc tctatataag gaagttcatt tcattggag aggacacgct	780
gaaatcacca gtctctctt acaaatttatc ctcttcgag ctttcgaga tccgggggg	840
caatgagata taaaaagcc tgaactcacc gcgacgtctg tcgagaagtt tctgatcgaa	900
aagttcgaca gcgtctccga cctgatgcag ctctcgagg gcgaagaatc tcgtgtttc	960
agcttcgtat taggagggcg tggatatgtc ctgcggtaa atagctgcgc cgatggttc	1020
tacaaagatc gttatgtta tcggactttt gcatcgcccg cgctcccgat tccgaaatgt	1080
cttgcattt gggatgttgcg acctattgc tctccgcgc tgacacagggt	1140
gtcacgttgc aagacctgcc tggaaaccgaa ctgcggctg ttctacaacc ggtcgccgg	1200
gctatggatc cgatcgctgc ggccgatctt agccagacga gcgggttcgg cccattcgga	1260
ccgcaaggaa tcggtaata cactacatgg cgtatttca taigcgcgtat tgctgtatccc	1320
catgtgtatc actggcaac tggatggac gacaccgtca gtgcgtccgt cgccaggct	1380
ctcgatgagc tggatgttttgcg ggcggaggac tgcccgaaatccggcacct cgtgcacgcg	1440
gatttcggctt ccaacaatgtt cctgacggac aatggccgca taacagcggtt cattgactgg	1500

agcgaggcga tggcgggaa ttccaaatac gaggtcgcca acatcttctt ctggaggccg	1560
tggttggctt gtatggagca gcagacgcgc tacttcgagc ggagggatcc ggagcttgca	1620
ggatcgccac gactccgggc gtatatgctc cgcatggtc ttgaccaact ctatcagagc	1680
ttggttgacg gcaatttcga tggatgcagct tggcgcagg gtcgatgcga cgcaatcgctc	1740
cgcgtccggag cggggactgt cggcgtaaca caaatcgccc gcagaagcgc gcccgtctgg	1800
accgatggct gtgtagaagt actcgccat agtgaaacc gacgccccag cactcgccg	1860
aggcacaaga aatagatgtatgcgaccg gatctgtcga tcgacaagct cgagtttctc	1920
cataataatgtgtgagtagt tcccgataaa gggaaattagg gttcctatag gtttcgctc	1980
atgtgttgag catataagaa acccttagta tggatgttta tttgtaaaat acttctatca	2040
ataaaaatttc taattcctaa aacccaaatc cagtaaaaaatccatcccccgaattaa	2100
ttcggcgtta attcagtaca ttaaaaacgt ccgcaatgtt ttatataagtt gtctaaacgt	2160
caattttttt acaccacaat atatcctgcc accagccagc caacagctcc ccgaccggca	2220
gctcggcaca aaatcaccac tcgatacagg cagccatca gtcggggacg gctcagcgg	2280
gagagccgtt gtaaggcggc agactttgtt catgttaccg atgttattcg gaagaacggc	2340
aactaagctg ccgggtttga aacacggatg atctcgccga gggtagcatg ttgattgtaa	2400
cgcgtccggag cgcgtccggag cgcgtccggag cgcgtccggag	2435

<210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 6
caaccacgtc ttcaaagcaa 20

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 7
agcaatcgcg catatgaaat 20

<210> 8
<211> 1599
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 8
atgcttttc aggcctttct tttcttctt gctggtttg ctgccaagat cagcgcctct 60

atgacgaacg aaacctcgga tagaccactt gtgcacttta caccaaacaa gggctggatg 120

aatgacccca atggactgtg gtacgacgaa aaagatgcca agtggcatct gtacttcaa 180

tacaacccga acgatactgt ctggggacg ccattgtttt gggccacgc cacgtccgac 240

gacctgacca attgggagga ccaaccaata gctatcgctc cgaagaggaa cgactccgga 300

gcattctcggttccatgggttggactacaacaataacttccggcttttcaacgataacc 360

attgaccgaa gacaacgctg cgtggccata tggacttaca acacaccgga gtccgaggag	420
cagtagatct cgtatagcct ggacggtgga tacacttta cagagtatca gaagaaccct	480
tgcttgctg caaattcgac tcagttcga gatccgaagg tccttggtt cgagccctcg	540
cagaagtggaa tcatgacagc ggcaaagtca caggactaca agatgaaat ttactcgct	600
gacgaccta aatcctggaa gctcgaatcc gcgttcgaa acgagggtt tctcgctac	660
caatacgaat gcccaggcct gatagaggc ccaacagagc aagatcccag caagtctac	720
tgggtgtatgt ttatttccat taatccagga gcacccggcag gaggttcttt taatcagtagc	780
ttcgtcgaa gcttaacgg aactcattc gaggcattt gataccaatc aagagtagtt	840
gattttggaa aggactacta tgccctgcag actttttca atactgaccc gacctatggg	900
agcgctttg gcattgcgtg ggcttctaact tggagttt ccgcattcgt tcctacaac	960
ccttggaggt cctccatgtc gctcgtgagg aaattctctc tcaacactga gtaccaggcc	1020
aacccggaaa ccgaactcat aaacctgaaa gccgaaccga tcctgaacat tagcaacgct	1080
ggcccccgttggaa gcccgtttgc aaccaacacc acgttgacga aagccaacag ctacaacgct	1140
gatctttcga atagcaccgg tacacttcaa tttaactgg tttatgccgt caataaccacc	1200
caaacgatct cgaagtcggt gttcgccgac ctctccctt ggttaaagg cctggaagac	1260
cccgaggagt acctcagaat gggtttcgag gtttctgcgt cctccttctt ctttgatcgc	1320
gggaacagca aagtaaaatt tttaaggag aaccatatt ttaccaacag gatgagcggt	1380
aacaaccaac cattcaagag cggaaacgac ctgtcgact acaaagtgtt tggttgctt	1440
gatcaaaata tcctggact ctacttcaac gatggtgatg tcgtgtccac caacacatac	1500
ttcatgacaa cggggacgc actgggtcc gtgaacatga cgacgggtgt ggataacctg	1560

ttctacatcg acaaattcca ggtgaggaa gtcaagtga 1599

<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 9
tccgggtgtgt tgtaagtcca 20

<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 10
ttgtcgaaat gtcataatcaa 20

<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 11
tccgggtgtgt tgtaagtcca 20

<210> 12
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 12
 aacgccttg tacaactgca 20

<210> 13
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 13
 tccggtgtgt tgtaagtcca 20

<210> 14
 <211> 512
 <212> PRT
 <213> Unknown

<220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Unknown: Sucrose invertase sequence"

<400> 14
 Met Thr Asn Glu Thr Ser Asp Arg Pro Leu Val His Phe Thr Pro Asn
 1 5 10 15

Lys Gly Trp Met Asn Asp Pro Asn Gly Leu Trp Tyr Asp Glu Lys Asp
 20 25 30

Ala Lys Trp His Leu Tyr Phe Gln Tyr Asn Pro Asn Asp Thr Val Trp
 35 40 45

Gly Thr Pro Leu Phe Trp Gly His Ala Thr Ser Asp Asp Leu Thr Asn
 50 55 60

Trp Glu Asp Gln Pro Ile Ala Ile Ala Pro Lys Arg Asn Asp Ser Gly
 65 70 75 80

Ala Phe Ser Gly Ser Met Val Val Asp Tyr Asn Asn Thr Ser Gly Phe
 85 90 95

Phe Asn Asp Thr Ile Asp Pro Arg Gln Arg Cys Val Ala Ile Trp Thr
 100 105 110

Tyr Asn Thr Pro Glu Ser Glu Glu Gln Tyr Ile Ser Tyr Ser Leu Asp
 115 120 125

Gly Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Gln Lys Asn Pro Val Leu Ala Ala
 130 135 140

Asn Ser Thr Gln Phe Arg Asp Pro Lys Val Phe Trp Tyr Glu Pro Ser
 145 150 155 160

Gln Lys Trp Ile Met Thr Ala Ala Lys Ser Gln Asp Tyr Lys Ile Glu
 165 170 175

Ile Tyr Ser Ser Asp Asp Leu Lys Ser Trp Lys Leu Glu Ser Ala Phe
 180 185 190

Ala Asn Glu Gly Phe Leu Gly Tyr Gln Tyr Glu Cys Pro Gly Leu Ile
 195 200 205

Glu Val Pro Thr Glu Gln Asp Pro Ser Lys Ser Tyr Trp Val Met Phe

210 215 220

Ile Ser Ile Asn Pro Gly Ala Pro Ala Gly Gly Ser Phe Asn Gln Tyr
 225 230 235 240

Phe Val Gly Ser Phe Asn Gly Thr His Phe Glu Ala Phe Asp Asn Gln
 245 250 255

Ser Arg Val Val Asp Phe Gly Lys Asp Tyr Tyr Ala Leu Gln Thr Phe
 260 265 270

Phe Asn Thr Asp Pro Thr Tyr Gly Ser Ala Leu Gly Ile Ala Trp Ala
 275 280 285

Ser Asn Trp Glu Tyr Ser Ala Phe Val Pro Thr Asn Pro Trp Arg Ser
 290 295 300

Ser Met Ser Leu Val Arg Lys Phe Ser Leu Asn Thr Glu Tyr Gln Ala
 305 310 315 320

Asn Pro Glu Thr Glu Leu Ile Asn Leu Lys Ala Glu Pro Ile Leu Asn
 325 330 335

Ile Ser Asn Ala Gly Pro Trp Ser Arg Phe Ala Thr Asn Thr Thr Leu
 340 345 350

Thr Lys Ala Asn Ser Tyr Asn Val Asp Leu Ser Asn Ser Thr Gly Thr
 355 360 365

Leu Glu Phe Glu Leu Val Tyr Ala Val Asn Thr Thr Gln Thr Ile Ser
 370 375 380

Lys Ser Val Phe Ala Asp Leu Ser Leu Trp Phe Lys Gly Leu Glu Asp
 385 390 395 400

Pro Glu Glu Tyr Leu Arg Met Gly Phe Glu Val Ser Ala Ser Ser Phe
 405 410 415

Phe Leu Asp Arg Gly Asn Ser Lys Val Lys Phe Val Lys Glu Asn Pro
 420 425 430

Tyr Phe Thr Asn Arg Met Ser Val Asn Asn Gln Pro Phe Lys Ser Glu
 435 440 445

Asn Asp Leu Ser Tyr Tyr Lys Val Tyr Gly Leu Leu Asp Gln Asn Ile
 450 455 460

Leu Glu Leu Tyr Phe Asn Asp Gly Asp Val Val Ser Thr Asn Thr Tyr
 465 470 475 480

Phe Met Thr Thr Gly Asn Ala Leu Gly Ser Val Asn Met Thr Thr Gly
 485 490 495

Val Asp Asn Leu Phe Tyr Ile Asp Lys Phe Gln Val Arg Glu Val Lys
 500 505 510

<210> 15

<211> 20

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Unknown: Unknown yeast sequence"

<400> 15

Met Leu Leu Gln Ala Phe Leu Phe Leu Leu Ala Gly Phe Ala Ala Lys
 1 5 10 15

Ile Ser Ala Ser
 20

<210> 16

<211> 18

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Unknown: Secretion signal sequence"

<400> 16

Met Ala Asn Lys Ser Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Ser Leu Ala
1 5 10 15

Ser Gly

<210> 17

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 17

Met Ala Arg Leu Pro Leu Ala Ala Leu Gly
1 5 10

<210> 18

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 18

Met Ala Asn Lys Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu
1 5 10 15

Ala Ala Ser Gly

<210> 19
 <211> 532
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 19
 Met Leu Leu Gln Ala Phe Leu Phe Leu Ala Gly Phe Ala Ala Lys
 1 5 10 15

Ile Ser Ala Ser Met Thr Asn Glu Thr Ser Asp Arg Pro Leu Val His
 20 25 30

Phe Thr Pro Asn Lys Gly Trp Met Asn Asp Pro Asn Gly Leu Trp Tyr
 35 40 45

Asp Glu Lys Asp Ala Lys Trp His Leu Tyr Phe Gln Tyr Asn Pro Asn
 50 55 60

Asp Thr Val Trp Gly Thr Pro Leu Phe Trp Gly His Ala Thr Ser Asp
 65 70 75 80

Asp Leu Thr Asn Trp Glu Asp Gln Pro Ile Ala Ile Ala Pro Lys Arg
 85 90 95

Asn Asp Ser Gly Ala Phe Ser Gly Ser Met Val Val Asp Tyr Asn Asn
 100 105 110

Thr Ser Gly Phe Phe Asn Asp Thr Ile Asp Pro Arg Gln Arg Cys Val
 115 120 125

Ala Ile Trp Thr Tyr Asn Thr Pro Glu Ser Glu Glu Gln Tyr Ile Ser

130 135 140

Tyr Ser Leu Asp Gly Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Gln Lys Asn Pro
 145 150 155 160

Val Leu Ala Ala Asn Ser Thr Gln Phe Arg Asp Pro Lys Val Phe Trp
 165 170 175

Tyr Glu Pro Ser Gln Lys Trp Ile Met Thr Ala Ala Lys Ser Gln Asp
 180 185 190

Tyr Lys Ile Glu Ile Tyr Ser Ser Asp Asp Leu Lys Ser Trp Lys Leu
 195 200 205

Glu Ser Ala Phe Ala Asn Glu Gly Phe Leu Gly Tyr Gln Tyr Glu Cys
 210 215 220

Pro Gly Leu Ile Glu Val Pro Thr Glu Gln Asp Pro Ser Lys Ser Tyr
 225 230 235 240

Trp Val Met Phe Ile Ser Ile Asn Pro Gly Ala Pro Ala Gly Ser
 245 250 255

Phe Asn Gln Tyr Phe Val Gly Ser Phe Asn Gly Thr His Phe Glu Ala
 260 265 270

Phe Asp Asn Gln Ser Arg Val Val Asp Phe Gly Lys Asp Tyr Tyr Ala
 275 280 285

Leu Gln Thr Phe Phe Asn Thr Asp Pro Thr Tyr Gly Ser Ala Leu Gly
 290 295 300

Ile Ala Trp Ala Ser Asn Trp Glu Tyr Ser Ala Phe Val Pro Thr Asn
 305 310 315 320

Pro Trp Arg Ser Ser Met Ser Leu Val Arg Lys Phe Ser Leu Asn Thr
 325 330 335

Glu Tyr Gln Ala Asn Pro Glu Thr Glu Leu Ile Asn Leu Lys Ala Glu
 340 345 350

Pro Ile Leu Asn Ile Ser Asn Ala Gly Pro Trp Ser Arg Phe Ala Thr
 355 360 365

Asn Thr Thr Leu Thr Lys Ala Asn Ser Tyr Asn Val Asp Leu Ser Asn
 370 375 380

Ser Thr Gly Thr Leu Glu Phe Glu Leu Val Tyr Ala Val Asn Thr Thr
 385 390 395 400

Gln Thr Ile Ser Lys Ser Val Phe Ala Asp Leu Ser Leu Trp Phe Lys
 405 410 415

Gly Leu Glu Asp Pro Glu Glu Tyr Leu Arg Met Gly Phe Glu Val Ser
 420 425 430

Ala Ser Ser Phe Phe Leu Asp Arg Gly Asn Ser Lys Val Lys Phe Val
 435 440 445

Lys Glu Asn Pro Tyr Phe Thr Asn Arg Met Ser Val Asn Asn Gln Pro
 450 455 460

Phe Lys Ser Glu Asn Asp Leu Ser Tyr Tyr Lys Val Tyr Gly Leu Leu
 465 470 475 480

Asp Gln Asn Ile Leu Glu Leu Tyr Phe Asn Asp Gly Asp Val Val Ser
 485 490 495

Thr Asn Thr Tyr Phe Met Thr Thr Gly Asn Ala Leu Gly Ser Val Asn
 500 505 510

Met Thr Thr Gly Val Asp Asn Leu Phe Tyr Ile Asp Lys Phe Gln Val
 515 520 525

Arg Glu Val Lys
530

<210> 20
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 20
ctgaccgcac ctagggaggc gctcttggc 29

<210> 21
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 21
cttgacttcc ctcacctgga atttgtcg 28

<210> 22
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 22
gtggccatat ggacttacaa 20

<210> 23
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 23
 caaggctgg atgaatgacc ccaatggact gtggtacgac g 41

<210> 24
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 24
 caccgcgtcgt catgttcacg gagcccagtg cg 32

<210> 25
 <211> 2615
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 25
 gaattccccca acatggtgga gcacgacact ctctgtact ccaagaatat caaagataca 60

gtctcagaag accaaaggc tattgagact tttcaacaaa ggtaatac gggaaacctc 120

ctggattcc attgccagc tatctgtac ttcatcaaaa ggacagtaga aaaggaaggt 180
 ggcacctaca aatgccatca ttgcgataaa ggaaaggcta tcgttcaaga tgcctctgcc 240
 gacagtggtc ccaaagatgg acccccaccc acgaggagca tcgtggaaaa agaagacgtt 300
 ccaaccacgt cttcaagca agtggattga tgtgaacatg gtggagcacg acactctcg 360
 ctactccaag aatatcaaag atacagtctc agaagaccaa agggctattg agactttca 420
 acaaaggta atatcgaa acctcctcg attccattgc ccagctatct gtcacttcat 480
 caaaaggaca gtagaaaagg aaggtggcac ctacaatgc catcattgcg ataaaggaaa 540
 ggctatcggtt caagatgcct ctggcgacag tggcccaaa gatggacccc cacccacgag 600
 gagcatcgta gaaaaagaag acgttccaac cacgtttca aagaagtgg attgatgtga 660
 tatctccact gacgtaaggg atgacgcaca atccactat cttcgcaag accttcctc 720
 tatataagga agttcatttc attggagag gacacgctga aataccagt ctctctctac 780
 aaatctatct ctggcgccat atataatgc ttcttcaggc cttttttt ctcttgctg 840
 gttttgtgc caagatcagc gcctctatga cgaacgaaac ctggataga ccacttgtgc 900
 actttacacc aaacaaggc tggatgaatg accccaatgg actgtggta gacgaaaaag 960
 atgccaagtgc gcatctgtac ttcaataca acccgAACGA tactgtctgg gggacgccat 1020
 tgtttgggg ccacgcccacg tccgacgacc tgaccaattt ggaggaccaa ccaatagcta 1080
 tcgctccgaa gaggaacgac tccggagcat tctcggttc catgggttt gactacaaca 1140
 atacttccgg cttttcaac gataccattt acccgagaca acgctgcgtg gccatatgga 1200
 cttaacaacac accggagatcc gaggagcagt acatctcgta tagcctggac ggtggataca 1260
 cttttacaga gtatcagaag aaccctgtgc ttgctgcaaa ttgcactcag ttccgagatc 1320

cgaaggctt ttggtagcag ccctcgaga agtggatcat gacagggca aagtcacagg	1380
actacaagat cgaatattac tcgtctgacg accttaaatc ctggaaagctc gaatccgcgt	1440
tcgcaaacga gggcttctc ggctaccaat acgaatgccc aggcctgata gaggtcccaa	1500
cagagcaaga tcccagcaag tcctactggg ttagtttat ttccattaaat ccaggagcac	1560
cggcaggagg ttcttttaat cagtaatcgc tcgaaagctt taacggact catttcgagg	1620
catttgataa ccaatcaaga gtagttgatt ttggaaagga ctactatgcc ctgcagactt	1680
tcttcaatac tgacccgacc tatggagcg ctcttggcat tgctggct tctaactgg	1740
agtattccgc attcgttcct acaaaccctt ggaggtcctc catgtcgctc gtgaggaat	1800
tctctctcaa cactgagtagc caggccaaacc cggaaaccga actcataaac ctgaaagccg	1860
aaccgatcct gaacatttagc aacgctggcc cctggagccg gtttcaacc aacaccacgt	1920
tgacgaaagc caacagctac aacgtcgatc tttcaatag caccgtaca ctgttttg	1980
aactggtgta tgccgtcaat accacccaaa cgatctgaa gtcgggttgc gccgacctct	2040
ccctctggtt taaaggcctg gaagaccccg aggagtagct cagaatgggt ttggatgttt	2100
ctgcgtcctc cttttccctt gatgcggga acagcaaagt aaaattgtt aaggagaacc	2160
catatttac caacaggatg agcgtaaca accaaccatt caagagcgaa aacgacgtt	2220
cgtactacaa agtgtatggt ttgttgatc aaaatatcct ggaactctac ttcaacgttg	2280
gtgatgtcgt gtccaccaac acataactca tgacaacccgg gaacgcactg ggctccgtga	2340
acatgacgac ggggtgtggat aacctgttct acatcgacaa attccaggtg agggaaatca	2400
agtgagatct gtcgatcgac aagctcgagt ttctccataa taatgtgtga gtagttccca	2460

gataaggaa ttagggttcc tataagggtt cgctcatgtg ttgagcataat aagaaccct 2520

tagtatgtat ttgtatgtt aaaatacttc tatcaataaa atttctaatt cctaaaacca 2580

aaatccagta ctaaaatcca gatccccga attaa 2615

<210> 26

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 26

Lys Asp Glu Leu

1