



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0136947
(43) 공개일자 2022년10월11일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/12 (2006.01) C12N 15/79 (2006.01)
C12N 9/14 (2006.01) C12R 1/89 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/12 (2019.02)
C12N 15/79 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0040865
(22) 출원일자 2022년04월01일
심사청구일자 2022년04월01일
(30) 우선권주장
1020210042862 2021년04월01일 대한민국(KR)

- (71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
심상준
서울특별시 영등포구 의사당대로 127, 102동 1401호
황성원
서울특별시 서초구 서초중앙로2길 48, 501호
최홍일
서울특별시 종로구 종로66길 28, 204호
(74) 대리인
정은열, 김태훈

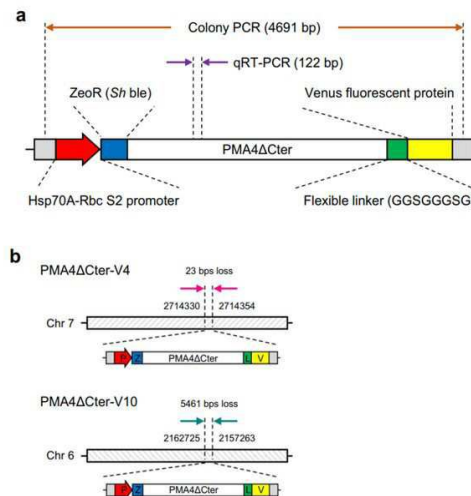
전체 청구항 수 : 총 31 항

(54) 발명의 명칭 **고농도 CO2 및/또는 산성에 대한 내성이 증진된 재조합 미세조류**

(57) 요약

본 발명은 클라미도모나스 레인하티 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 유래의 유전자 변이 미세조류 균주 *Chlamydomonas reinhardtii* PMA4ΔCter-V4 및 이의 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

C12N 9/14 (2013.01)

C12Y 306/03006 (2013.01)

C12R 2001/89 (2021.05)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711121279
과제번호	2020M3H7A1098295
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	유용물질 생산을 위한 CarbontoX 기술개발(R&D)
연구과제명	연소가스 내 CO ₂ 직접 광생물 전환을 위한 고효율 공정 원천 기술
기 여 율	1/1
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2021.01.27 ~ 2022.01.26

명세서

청구범위

청구항 1

PMA 단백질을 코딩하는 유전자가 도입된 재조합 미세조류.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 PMA 단백질은 PMA 단백질의 자가억제 부위를 암호화하는 C-말단의 서열 일부가 제거된 기능적 단편인 것인, 재조합 미세조류.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 서열 일부는 서열번호 1의 아미노산 서열의 C-말단으로부터 100개의 아미노산인 것인, 재조합 미세조류.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 기능적 단편은 서열번호 4를 포함하는 폴리뉴클레오티드인 것인, 재조합 미세조류.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 미세조류는 클라미도모나스(*Chlamydomonas*) 속인 것인, 재조합 미세조류.

청구항 6

제5항에 있어서,

클라미도모나스 레인하티(*Chlamydomonas reinhardtii*)인 것인, 재조합 미세조류.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 재조합 미세조류는 수탁번호 KCTC14511BP로 기탁된 것인, 재조합 미세조류.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 미세조류를 배양하는 단계를 포함하는 바이오매스 또는 바이오연료 생산방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 바이오연료는 바이오디젤인 것인, 생산방법.

청구항 10

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 미세조류를 배양하는 단계를 포함하는 바이오매스 또는 바이오연료 생산성 증진방법.

청구항 11

PMA 단백질의 활성이 강화된 고농도 CO₂ 또는 산성에 대한 내성이 증진된 재조합 미세조류.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 미세조류는 PMA 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열이거나 이의 기능적 단편인 것인, 재조합 미세조류.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 기능적 단편은 서열번호 1의 아미노산 서열의 C-말단으로부터 자가복제 도메인이 제거된 것인, 재조합 미세조류.

청구항 14

제12항에 있어서,

상기 기능적 단편은 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 것인, 재조합 미세조류.

청구항 15

제11항에 있어서,

상기 재조합 미세조류는 PMA 단백질의 활성이 강화되지 않은 모균주에 비하여 고농도 CO₂ 또는 산성에 대한 내성이 증진된 것인, 재조합 미세조류.

청구항 16

제11항에 있어서,

상기 미세조류는 클라미도모나스(*Chlamydomonas*) 속인 것인, 재조합 미세조류.

청구항 17

제16항에 있어서,

클라미도모나스 레인하티(*Chlamydomonas reinhardtii*)인 것인, 재조합 미세조류.

청구항 18

제11항에 있어서,

상기 재조합 미세조류는 수탁번호 KCTC14511BP로 기탁된 것인, 재조합 미세조류.

청구항 19

제11항 내지 제18항 중 어느 한 항의 미세조류를 배양하는 단계를 포함하는 바이오매스 또는 바이오연료 생산방법.

청구항 20

PMA 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에서 자가억제 부위를 암호화하는 C-말단의 서열 일부가 제거된 폴리뉴클레오티드의 단편; 및

상기 단편에 링커로 작동가능하게 연결된 형광단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는, PMA 단백질 과 발현용 발현 카세트.

청구항 21

제20항에 있어서,

상기 PMA 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 단편은 서열번호 4를 포함하는 것인, 발현 카세트.

청구항 22

제20항에 있어서,
상기 링커는 GGSGGGSG인 것인, 발현 카세트.

청구항 23

제20항에 있어서,
상기 형광단백질은 VENUS인 것인, 발현 카세트.

청구항 24

제20항 내지 제23항 중 어느 한 항의 발현 카세트를 포함하는 발현 벡터.

청구항 25

제24항의 발현 벡터가 숙주세포가 도입된 형질전환체.

청구항 26

제25항에 있어서,
상기 숙주세포는 미세조류인 것인, 형질전환체.

청구항 27

제26항에 있어서,
상기 미세조류는 클라미도모나스(*Chlamydomonas*) 속인 것인, 형질전환체.

청구항 28

제27항에 있어서,
클라미도모나스 레인하티(*Chlamydomonas reinhardtii*)인 것인, 형질전환체.

청구항 29

제25항에 있어서,
상기 형질전환체는 수탁번호 KCTC14511BP로 기탁된 것인, 형질전환체.

청구항 30

제25항 내지 제29항 중 어느 한 항의 형질전환체를 배양하는 단계를 포함하는 바이오매스 또는 바이오연료 생산 방법.

청구항 31

제30항에 있어서,
상기 배양은 광독립 배양인 것인, 생산방법.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 고농도 CO₂ 및/또는 낮은 pH (산성) 환경에 대한 내성이 향상된 신규 재조합 미세조류 균주에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 클라미도모나스 레인하티 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 유래의 유전자 변이 미세조류 균주 클라미도모나스 레인하티 PMA4ΔCter-V4과 -V10 및 이의 용도에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0003] 산업 혁명 이후 끊임없이 증가하는 인류발생적 CO₂로 인해 지구온난화 및 해양산성화 등 여러 가지 환경 문제가 발생하고 있다. 이를 해결하기 위해 지난 수십 년간 수많은 CO₂ 포집, 활용 및 저장 기술 (CO₂ capture, utilization, and storage; CCUS)이 개발, 제안되어 왔다. 여러 CCUS 기술 가운데 최근 들어 CO₂ 활용 (CO₂ utilization) 기술이 크게 주목을 받고 있는데, 이는 해당 기술을 활용할 경우 CO₂ 전환을 통해 다양한 유용 물질을 생산할 수 있어 CO₂ 감축에 직접적인 기여하면서도 여타 CO₂ 포집 및 저장 (CO₂ capture and storage; CCS) 기술, 즉 단순히 산업 활동에 의해 발생하는 CO₂를 포집하고 거대한 저장소에 격리하는 기술의 가장 큰 문제점인 부족한 기술 경제성을 극복할 수 있는 장점을 가지기 때문이다. CO₂ 전환 기술은 사용 플랫폼에 따라 크게 화학적 전환, 생물학적 전환 기술로 분류할 수 있는데, 이 중 생물학적 전환 기술이 화학적 전환 방식에 비해 보다 안정적이고 지속 가능성이 높아 각광을 받고 있다. 그 이유는, 생물학적 CO₂ 전환의 대표 메커니즘인 광합성은 상온, 상압 상의 조건에서 외부 에너지 투입 없이 무제한 공급이 가능한 태양광을 활용하여 구동이 가능하기 때문에, 이에 따라 높은 경제성 및 전주기적 관점에서 월등한 CO₂ 저감 효과의 증대를 기대할 수 있기 때문이다.
- [0004] 생물학적 전환 기술의 기반이 되는 여러 종의 생물체 가운데, 미세조류 (광합성 미생물)는 타 생물학적 CO₂ 전환 플랫폼 생물체에 비해 높은 성장성, 이에 따른 높은 CO₂ 고정 능력으로 빠른 시일 내에 생물학적 CO₂ 전환 기술을 현실화하게 할 생물종으로 많은 관심을 얻고 있다. 뿐만 아니라 미세조류는 내재적으로 바이오 연료부터 소재, 고부가 영양보조물질 및 약리물질 등 인류가 필요로 하는 대부분의 유용 물질을 생산할 수 있는 능력이 있어 그 가치를 더욱 인정받고 있다. 또한 미세조류 배양 공정은 습식 생물공정으로 산업 CO₂ 배출원에 직접 연결하여 구동함으로써 배출되는 대량의 CO₂에 집약적으로 대응 가능하여 그 활용성이 유망한 것으로 평가되고 있다.
- [0005] 그러나 앞서 언급한 여러 장점에도 불구하고, 미세조류가 실질적으로 활용되기에 생물학적 특징에 기인한 낮은 환경 내성, 그 중에서도 낮은 CO₂ 내성이 미세조류의 CO₂ 저감 산업의 중추적 생물학 플랫폼으로 본격적으로 활용하고자 하는 시도에 있어 가장 큰 걸림돌이 되고 있다. 다시 말해 CO₂는 미세조류의 광독립 배양 과정에서 단독 탄소원으로 이용되는 중요한 물질이지만, 역설적이게도 일정 농도 이상의 CO₂ (약 5% 이상)가 지속적으로 공급될 경우 세포 내부의 과도한 산성화가 유발되어 세포의 활성에 큰 악영향을 미침으로써 CO₂ 전환능을 저하시키고 결국 세포의 사멸에 이르게 한다. 문제는 일반 산업 공정에서 발생하는 배기가스의 경우 LNG 연소 등 소수의 낮은 CO₂ 농도를 배출하는 배출원을 제외하면, 대부분이 10% 이상의 고농도 CO₂를 함유하고 있어 이를 미세조류 광독립 배양 공정에 적용할 경우, 위의 언급과 같이 많은 경우 세포 활성 저하 및 사멸에 이르는 결과를 얻게 되고, 이 경우 더 이상 CO₂를 전환할 주체가 CO₂ 전환 시스템 상에서 제거되는 효과를 가져오기 때문에, 미세조류를 활용한 CO₂의 안정적 전환, 이에 기반한 해당 생물학적 유용 물질 생산 공정의 성공적인 운영을 위해 미세조류의 고농도 CO₂에 대한 내성 확보는 극복해야 할 가장 중요한 문제 중 하나이다.
- [0006] 진술한 기술적 필요성에 의해, 미세조류의 CO₂에 대한 불내성 (intolerance)과 관련한 생물학적 메커니즘 분석을 통해 미세조류가 고농도 CO₂에 대해 낮은 내성을 보이는 원인을 분석하였고, 그 결과 원형질막 상의 양성자 펌프 (proton pump), 즉 원형질막 양성자-ATP 분해효소 (plasma membrane H⁺-ATPase; PMA)의 이상 저발현이 고농도 CO₂ 공급 시 미세조류 세포 내 과도한 산성화를 유발하는 핵심 원인으로 판단하였으며, 이를 극복하고자 외래 PMA 유전자를 도입한 결과 CO₂ 내성뿐만 아니라 일반 산성 환경 (낮은 pH)에서도 생존율이 획기적으로 증대됨을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명의 하나의 목적은 PMA 단백질을 코딩하는 유전자가 도입된 재조합 미세조류를 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 다른 하나의 목적은 PMA 단백질의 활성이 강화된 고농도 CO₂ 또는 산성에 대한 내성이 증진된 재조합 미세조류를 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 재조합 미세조류를 배양하는 단계를 포함하는 바이오매스 또는 바이오연료 생산방법을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 재조합 미세조류를 배양하는 단계를 포함하는 바이오매스 또는 바이오연료 생산성 증진방법을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 PMA 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에서 자가억제 부위를 암호화하는 C-말단의 서열 일부가 제거된 폴리뉴클레오티드의 단편; 및 상기 단편에 링커로 작동가능하게 연결된 형광단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는, PMA 단백질 과발현용 발현 카세트를 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 발현 카세트를 포함하는 발현 벡터를 제공하는 것이다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 발현 벡터가 도입된 형질전환체를 제공하는 것이다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 형질전환체를 배양하는 단계를 포함하는 바이오매스 또는 바이오연료 생산방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0017] 본원에서 개시되는 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술되는 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 할 수 없다.
- [0018] 또한, 당해 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 통상의 실험만을 사용하여 본 출원에 기재된 본 발명의 특정 양태에 대한 다수의 등가물을 인지하거나 확인할 수 있다. 또한, 이러한 등가물은 본 발명에 포함되는 것으로 의도된다.
- [0019] 아울러, 본원의 명세서 전체에 있어서, 어떤 부분이 어떤 구성 요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성 요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.
- [0021] 본 발명은 고농도 CO₂ 및/또는 낮은 pH (산성) 환경에 대한 내성이 향상된 신규 재조합 미세조류 균주로서, 클라미도모나스 레인하티 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 유래의 유전자 변이 미세조류 균주 *Chlamydomonas reinhardtii* PMA4 ΔCter-V4, 및 이를 활용하여 CO₂를 바이오매스 및 바이오 연료로 전환하는 방법에 관한 것이다.
- [0022] 본 발명은 종래 기술의 문제점을 해결하기 위한 방안으로서, 미세조류의 CO₂에 대한 불내성 (intolerance)과 관련한 생물학적 메커니즘 분석을 통해 미세조류가 고농도 CO₂에 대해 낮은 내성을 보이는 원인을 분석하였고, 그 결과 원형질 막상의 양성자 펌프 (proton pump), 즉 원형질막 양성자-ATP 분해효소 (plasma membrane H⁺-ATPase; PMA)의 이상 저발현이 고농도 CO₂ 공급 시 미세조류 세포 내 과도한 산성화를 유발하는 핵심 원인으로 판단하였으며, 이를 극복하고자 외래 PMA 유전자를 도입한 결과, CO₂ 내성뿐만 아니라 일반 산성 환경 (낮은 pH)에서도 생존율이 획기적으로 증대됨을 확인함으로써 완성되었다.
- [0024] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 바람직한 실시형태를 상세히 설명하기로 한다.
- [0026] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 일 양태로 PMA 단백질을 코딩하는 유전자가 도입된 재조합 미세조류를

제공할 수 있다.

- [0027] 또한, 다른 양태로 PMA 단백질의 활성이 강화된 고농도 CO₂ 또는 산성에 대한 내성이 증진된 재조합 미세조류를 제공할 수 있다.
- [0029] 본 발명에서 용어, “미세조류”는 광합성 작용을 하는 수중에 존재하는 식물 플랑크톤을 말한다. 50여만 종으로 해양 또는 담수에 존재하고, 온천, 심해 등의 열악한 환경에서도 생명력을 가지며, 바이오 연료 및 기능성 단백질로서 활용도가 높다고 보고된다.
- [0030] 본 발명의 미세조류는 미세조류에서 특정 단백질을 발현하도록 변형된 재조합 미세조류일 수 있다.
- [0031] 구체적으로, 상기 “재조합 미세조류”는 PMA 단백질을 발현하도록 변형된 미세조류일 수 있으며, 구체적으로는 PMA 단백질이 발현되지 않은 모균주에 비하여 고농도 CO₂ 및/또는 산성에 대한 내성이 증진된 것일 수 있다.
- [0032] 본 발명에서 용어, “PMA 단백질”은 원형질막 양성자-ATP 분해효소 (plasma membrane H⁺-ATPase; PMA)로 원형질막 양성자 펌프라고도 불린다. 원형질막 양성자 운반 ATP 분해효소는 주로 곰팡이 또는 식물의 원형질막에서 발견되는 일종의 가수분해효소(hydrolase)이자 기전성 펌프(electrogenic pump)로서, ATP 가수분해를 이용하여 원형질막을 가로질러 양성자(H⁺)의 능동수송(active transport)을 일으킨다. 원형질막 양성자 운반 ATP 분해효소의 활성은 세포막을 가로질러 전기화학적 기울기(electrochemical gradients)를 형성하기 때문에 다른 대사산물들과 이온들의 2차 수송(secondary transport)을 일으키게 되며, 이에 따라 다양한 대사산물들의 세포 내 수송과 환경에 따른 식물의 반응 등을 포함하여 다양한 대사 과정이 촉진된다.
- [0033] 상기 PMA 단백질은 니코티아나 플럼배지니폴리아 (Nicotiana plumbaginifolia) 유래 PMA4 단백질일 수 있다. 상기 PMA4 단백질은 종의 장벽 없이 발현 가능하다.
- [0034] 상기 PMA4 단백질은 공지된 데이터 베이스인 NCBI Genbank에서 확인할 수 있다. 또한 이에 상응하는 활성을 가지면서 다른 유래의 단백질이라면 제한없이 포함될 수 있다. 구체적으로는, 상기 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 단백질일 수 있으며, 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되는 단백질, 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 단백질, 또는 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 단백질과 혼용되어 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0035] 상기 단백질은 서열번호 1 및/또는 상기 서열번호 1과 적어도 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 상동성(homology) 또는 동일성(identity)을 가지는 아미노산 서열일 수 있다. 또한, 이러한 상동성 또는 동일성을 가지며 상기 단백질에 상응하는 효능을 나타내는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질도 본 출원의 범위 내에 포함됨은 자명하다.
- [0036] 더불어, 공지의 유전자 서열로부터 조제될 수 있는 프로브, 예를 들면, 상기 폴리펩티드를 암호화하는 염기서열의 전체 또는 일부에 대한 상보 서열과 엄격한 조건 하에 하이브리드화되는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 폴리펩티드로서, PMA 활성을 갖는 폴리펩티드도 제한 없이 포함될 수 있다.
- [0037] 상기 PMA4 단백질은 서열번호 2의 폴리뉴클레오티드 서열로 코딩되는 것일 수 있다.
- [0039] 상기 PMA4 단백질은 상기 단백질과 서열은 다르나 기능이 동일한 기능적인 단편을 포함할 수 있다.
- [0040] 본 발명에서 용어, “기능적인 단편”은 상기 단백질에 상응하는 효능을 나타내는 아미노산 서열을 의미하는 것으로서, 상기 단백질의 아미노산 서열의 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 단백질도 상기 단백질과 상응하는 활성을 갖는다면, 본 출원의 범위 내에 포함됨은 자명하며, 이는 본 출원의 목적상 기능적 단편이라고 할 수 있다.
- [0041] 구체적으로는 상기 기능적인 단편은 상기 PMA4 단백질에서 일부 서열이 결실된 아미노산 서열일 수 있으며, 보다 구체적으로는, 상기 PMA4 단백질의 자가억제 부위를 암호화하는 C-말단의 서열 일부가 제거된 단편인 것일 수 있고, 보다 더 구체적으로 PMA4 전장 단백질의 C-말단에서 단백질의 자가억제 도메인인 100개의 아미노산 서열이 제거된 것일 수 있다.
- [0042] 상기 PMA4 전장 단백질의 C-말단에서 단백질의 자가억제 도메인인 100개의 아미노산 서열이 제거된 서열은 서열

번호 3의 아미노산 서열일 수 있으며, 상기 서열번호 3의 아미노산 서열은 서열번호 4의 폴리뉴클레오티드 서열로 코딩된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0043] 상기 용어, “자가억제 도메인”은 PMA4 단백질 스스로가 발현을 억제할 수 있는 도메인을 의미한다.

[0045] 상기 단백질의 기능적 단편은 서열번호 3 및/또는 상기 서열번호 3과 적어도 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 상동성(homology) 또는 동일성(identity)을 가지는 아미노산 서열일 수 있다. 또한, 이러한 상동성 또는 동일성을 가지며 상기 단백질에 상응하는 효능을 나타내는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질도 본 출원의 범위 내에 포함됨은 자명하다.

[0046] 또한, 본 발명은 상기 유전 서열을 모균주의 코돈 출현 빈도에 기반하여 코돈 최적화한 서열도 포함할 수 있음이 자명하다.

[0048] 본 발명에서 용어 “폴리뉴클레오티드”는 DNA 또는 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 가지며, 폴리뉴클레오티드에서 기본 구성 단위인 뉴클레오티드는 천연 뉴클레오티드 뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체도 포함할 수 있다(Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, Chemical Reviews, 90:543-584(1990) 참조).

[0049] 상기 서열번호 1 또는 3의 아미노산 서열을 포함하는 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 PMA4 단백질 또는 이의 기능적 단편의 활성을 갖는 단백질을 코딩할 수 있는 서열이라면 제한 없이 포함될 수 있다.

[0051] 본 출원에서 용어, 단백질이 “발현되도록/되는”은 목적 단백질이 미생물 내에 도입되거나, 미생물내 존재하는 단백질인 경우 내재적 또는 변형전에 비하여 그 활성이 강화된 상태를 의미한다.

[0052] 구체적으로, “단백질의 도입”은, 미생물이 본래 가지고 있지 않았던 특정 단백질의 활성을 나타나게 되는 것 또는 해당 단백질의 내재적 활성 또는 변형 전 활성에 비하여 향상된 활성을 나타나게 되는 것을 의미한다. 예를 들어, 특정 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 미생물 내 염색체로 도입되거나, 특정 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 단편 또는 벡터가 미생물 내로 도입되어 이의 활성이 나타나는 것일 수 있다. “내재적 활성”은 자연적, 또는 인위적 요인에 의한 유전적 변이로 미생물의 형질이 변화하는 경우, 형질 변화 전 모균주가 본래 가지고 있던 특정 단백질의 활성을 말한다.

[0054] 상기 특정 단백질 및/또는 유전자의 활성을 도입, 강화, 불활성화 하는 방법 은 미생물이 가진 특징에 따라 당해 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 수행될 수 있다.

[0055] 본 출원에서 용어, 단백질의 활성의 “강화”는 상기 단백질의 활성이 도입되거나, 또는 내재적 활성에 비하여 증가되는 것을 의미한다. 상기 활성의 “도입”은, 자연적 혹은 인위적으로 미생물이 본래 가지고 있지 않았던 특정 폴리펩타이드의 활성이 나타나게 되는 것을 의미한다.

[0056] 본 출원에서 용어, 단백질의 활성이 내재적 활성에 비하여 “증가”한다는 것 은, 미생물이 가진 단백질의 내재적 활성 또는 변형 전 활성에 비하여 활성이 향상된 것을 의미한다. 상기 “내재적 활성”은, 자연적 또는 인위적 요인에 의한 유전적 변이로 미생물의 형질이 변화하는 경우, 형질 변화 전 모균주 또는 비변형 미생물 이 본래 가지고 있던 특정 단백질의 활성을 말한다. 변형 전 활성으로 혼용되어 사용될 수 있다. 상기 활성 증가는, 외래의 단백질을 도입하는 것과, 내재적인 단백질의 활성 강화를 모두 포함할 수 있다. 상기 단백질의 활성 증가/강화는, 유전자의 발현 증가/강화에 의해 달성될 수 있다.

[0057] 구체적으로, 본 출원에서 활성 증가는,

[0058] 1) 상기 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 카피수 증가,

[0059] 2) 상기 폴리뉴클레오티드의 발현이 증가하도록 발현조절 서열의 변형,

[0060] 3) 상기 단백질의 활성이 강화되도록 염색체 상의 폴리뉴클레오티드 서열의 변형,

- [0061] 4) 상기 단백질의 활성을 나타내는 외래 폴리뉴클레오티드 또는 상기 폴리뉴클레오티드의 코돈 최적화된 변이형 폴리뉴클레오티드의 도입, 또는
- [0062] 5) 이의 조합에 의해 강화되도록 변형하는 방법 등에 의하여 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0064] 상기 1) 폴리뉴클레오티드의 카피수 증가는, 특별히 이에 제한되지 않으나, 벡터에 작동 가능하게 연결된 형태로 수행되거나, 숙주세포 내의 염색체 내로 삽입됨으로써 수행될 수 있다. 구체적으로, 숙주와 무관하게 복제되고 기능할 수 있는 벡터에 본원의 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 작동 가능하게 연결되어 숙주세포 내에 도입됨으로써 수행될 수 있거나, 숙주세포 내의 염색체 내로 상기 폴리뉴클레오티드를 삽입시킬 수 있는 벡터에 상기 폴리뉴클레오티드가 작동 가능하게 연결되어 숙주세포 내에 도입됨으로써 상기 숙주세포의 염색체 내 상기 폴리뉴클레오티드의 카피수를 증가하는 방법으로 수행될 수 있다.
- [0065] 다음으로, 2) 폴리뉴클레오티드의 발현이 증가하도록 발현조절 서열의 변형은, 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 발현조절 서열의 활성을 더욱 강화하도록 핵산 서열을 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합으로 서열상의 변이를 유도하여 수행하거나, 더욱 강한 활성을 가지는 핵산 서열로 교체함에 의하여 수행될 수 있다. 상기 발현조절 서열은, 특별히 이에 제한되지 않으나 프로 모터, 오퍼레이터 서열, 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열, 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열 등을 포함할 수 있다.
- [0066] 상기 폴리뉴클레오티드 발현 단위의 상부에는 본래의 프로모터 대신 강력한 이중 프로모터가 연결될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 아울러, 3) 염색체 상의 폴리뉴클레오티드 서열의 변형은, 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 폴리뉴클레오티드 서열의 활성을 더욱 강화하도록 핵산 서열을 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합으로 발현조절 서열상의 변이를 유도하여 수행하거나, 더욱 강한 활성을 갖도록 개량된 폴리뉴클레오티드 서열로 교체함에 의하여 수행될 수 있다.
- [0067] 또한, 4) 외래 폴리뉴클레오티드 서열의 도입은, 상기 단백질과 동일/유사한 활성을 나타내는 단백질을 암호화하는 외래 폴리뉴클레오티드, 또는 이의 코돈 최적화된 변이형 폴리뉴클레오티드를 숙주세포 내로 도입하여 수행될 수 있다. 상기 외래 폴리뉴클레오티드는 상기 단백질과 동일/유사한 활성을 나타내는 한 그 유래나 서열에 제한 없이 사용될 수 있다. 또한 도입된 상기 외래 폴리뉴클레오티드가 숙주세포 내에서 최적화된 전사, 번역이 이루어지도록 이의 코돈을 최적화하여 숙주세포 내로 도입할 수 있다. 상기 도입은 공지된 형질전환 방법을 당업자가 적절히 선택하여 수행될 수 있으며, 숙주 세포 내에서 상기 도입된 폴리뉴클레오티드가 발현됨으로써 단백질이 생성되어 그 활성이 증가될 수 있다.
- [0069] 마지막으로, 5) 상기 1) 내지 4)의 조합에 의해 강화되도록 변형하는 방법은, 상기 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 카피수 증가, 이의 발현이 증가하도록 발현조절 서열의 변형, 염색체 상의 상기 폴리뉴클레오티드 서열의 변형 및 상기 단백질의 활성을 나타내는 외래 폴리뉴클레오티드 또는 이의 코돈 최적화된 변이형 폴리뉴클레오티드의 변형 중 하나 이상의 방법을 함께 적용하여 수행될 수 있다.
- [0071] 본 발명에서 사용되는 용어 "CO₂ 내성 및/또는 산성에 대한 내성이 강화된 재조합 미세조류"란, 종래 CO₂ 불내성을 가지거나 약한 내성을 가지는 미세조류와 달리, PMA4 단백질의 활성이 강화 또는 발현되도록 변형됨으로써, CO₂ 내성 및/또는 산성에 대한 내성이 강화된 재조합 미세조류를 의미할 수 있다.
- [0072] 또한, 상기 "CO₂ 내성 및/또는 산성에 대한 내성이 강화된 재조합 미세조류"는 야생형 미세조류이나 자연적 또는 인위적으로 유전적 변형이 일어난 미세조류를 모두 포함하며, 외부 유전자가 삽입되거나 내재적 유전자의 활성이 강화되거나 불활성화되는 등의 원인으로 인해서 특정 기작이 약화되거나 강화된 미생물로서, 목적하는 CO₂ 내성 및/또는 산성에 대한 내성 강화를 위하여 유전적 변형이 일어나거나 활성을 강화시킨 미세조류 일 수 있다.
- [0073] 구체적으로 상기 미세조류는 그 종류가 특별히 제한되지 않으나, 구체적으로는 클라미도모나스(*Chlamydomonas*) 속일 수 있으며, 보다 구체적으로는 클라미도모나스 레인하티(*Chlamydomonas reinhardtii*)일 수 있다.
- [0074] 상기 "클라미도모나스 레인하티"는 두 개의 편모와 함께 헤엄치는 직경 약 10마이크로미터의 단세포

녹조류로, 하이드록시프롤린이 풍부한 당단백질로 이루어진 세포벽, 커다란 컵 모양의 엽록체, 커다란 피레노이드, 빛을 감지하는 안점을 가지고 있다.

- [0075] 클라미도모나스 속 미세조류는 토양과 담수에 전 세계적으로 널리 분포되어 있는데, 그 중 클라미도모나스 레인하티는 연구가 많이 된 생물학적 모델 유기체이며, 부분적으로는 배양이 용이하고 유전학을 조작할 수 있는 능력이 있다. 클라미도모나스 레인하티는 조명이 있을 시 광독립영양적으로 자랄 수 있으나 유기 탄소가 공급되면 어둠 속에서도 자랄 수 있다. 상업적으로 클라미도모나스 레인하티는 바이오 의약품 및 바이오 연료 생산에 관심이 있을 뿐만 아니라 수소를 만드는 데 유용한 연구 도구로 알려져 있다.
- [0076] 상기 클라미도모나스 레인하티는 클라미도모나스 라인하르티와 혼용되어 사용될 수 있다.
- [0077] 본 발명자들은 이산화탄소 및/또는 산성에 내성이 있는 신균주를 한국생명공학연구원 미생물자원센터에 기탁하여 기탁번호 KCTC14511BP를 부여받았다.
- [0079] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 PMA 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에서 자가억제 부위를 암호화하는 C-말단의 서열 일부가 제거된 폴리뉴클레오티드의 단편; 및 상기 단편에 링커로 작동가능하게 연결된 형광단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는, PMA 단백질 과발현용 발현 카세트를 제공하는 것이다.
- [0080] 상기 용어, “PMA 단백질” 및 “PMA 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에서 자가억제 부위를 암호화하는 C-말단의 서열 일부가 제거된 폴리뉴클레오티드의 단편”은 상기에서 설명한 바와 같다.
- [0081] 본 발명에서 용어, “발현카세트”는 PMA4 단백질 또는 이의 기능적 단편이 발현되도록 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열, 링커 및 형광단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 플랫폼을 의미할 수 있다.
- [0082] 또한, 상기 발현카세트는 프로모터 및 선택적으로 인핸서(enhancer) 서열이나 종결서열과 같은 자체의 발현을 조절하는 서열을 포함할 수 있다.
- [0083] 상기 용어, “링커”는 PMA4 단백질 또는 이의 기능적 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열과 형광단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 연결하는 것을 의미하는 것으로서, 발현카세트가 작동가능하도록 연결하는 것이라면 제한없이 포함될 수 있으며, 구체적으로는 GGSGGGSG일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0084] 상기 용어 “형광단백질”은 스스로가 가진 폴리펩타이드(polypeptide) 서열(sequence) 내 3개의 아미노산(amino acid)이 발색단(chromophore)을 자체적으로 형성해 가시광 영역의 형광(fluorescence)을 나타내는 단백질을 말한다. 이처럼 독특한 형광 특성을 공유하며 구조적으로 유사한 단백질 군을 모두 형광 단백질로 정의할 수 있으며, 구체적으로는 GFP, mVenus일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0086] 본 발명은 또 다른 양태로 상기 발현 카세트를 포함하는 발현 벡터 및 상기 발현 벡터가 도입된 형질전환체를 제공할 수 있다.
- [0087] 본 발명에서 용어, 벡터란 연결되어 있는 다른 핵산을 운반할 수 있는 핵산분자를 의미한다. 벡터의 하나의 유형인 플라스미드는 그 안에 추가적으로 DNA조각을 연결시킬 수 있는 환형의 이중가닥 DNA 루프를 의미한다.
- [0088] 본 발명의 벡터는 작동 가능하도록 연결된 목적 단백질을 코딩하는 유전자의 발현을 지시할 수 있는데, 이러한 벡터를 발현 벡터라고 한다. 일반적으로, 재조합 DNA 기술의 사용에 있어서 발현 벡터는 플라스미드 형태이다.
- [0089] 상기 발현벡터는 숙주세포에 따라, 사용가능한 발현벡터의 종류가 결정될 수 있는데, 미세조류를 숙주로서 사용하는 경우는 발현 벡터로서, 예를 들면 pChlamy_4 벡터를 이용할 수 있으며, 프로모터로서 Hsp70A-Rbc S2를 이용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0090] 미세조류로의 DNA의 도입방법으로서, 예를 들면 일렉트로포레이션법(Method Enzymol., 194, 182-187(1990)), 스페로플라스트법(Proc. Natl. Acad. Sci.USA, 84, 1929-1933(1978)), 아세트산리튬법(J. Bacteriol., 153, 163-168(1983)) 등이 이용가능하다.
- [0091] 아울러, 상기 발현벡터에는, 목적 유전자의 발현의 억제 또는 증폭, 또는 유도를 위한 각종의 기능을 가진 발현 억제용의 단편이나, 형질전환체의 선택을 위한 마커나 항생물질에 대한 내성유전자, 균체 밖으로의 분비를 목적

으로 한 시그널을 코딩하는 유전자, 난발현성 단백질에 적합한 맞춤형 융합인자 등을 추가로 포함할 수도 있다.

- [0093] 본 발명에서 용어, "형질전환"은 DNA를 숙주세포로 도입하여 DNA가 염색체 외 인자로서 또는 염색체 통합완성에 의해 복제가능하게 되는 것을 의미한다.
- [0094] 본 발명에 따른 형질전환에 사용되는 숙주 세포는 당업계에 널리 알려져 있는 숙주세포는 어떤 것이나 사용할 수 있으나, 본 발명의 PMA4를 코딩하는 유전자의 도입효율과 발현효율이 높은 숙주를 사용할 수 있는데, 예를 들면 미세조류, 박테리아, 곰팡이, 효모, 식물 또는 동물(예컨대, 포유동물 또는 곤충) 세포를 포함할 수 있다. 바람직하게, 상기 숙주세포는 미세조류일 수 있다.
- [0095] 상기 미세조류는 상기에서 설명한 바와 같다.
- [0097] 본 발명은 또 다른 양태로 상기 본 발명의 재조합 미세조류를 배양하는 단계를 포함하는 바이오매스 또는 바이오연료 생산방법을 제공할 수 있다.
- [0098] 또한, 또 다른 양태로 상기 재조합 미세조류를 배양하는 단계를 포함하는 바이오매스 또는 바이오연료 생산성 증진방법을 제공할 수 있다.
- [0099] 또한, 또 다른 양태로 본 발명의 형질전환체를 배양하는 단계를 포함하는 바이오매스 또는 바이오연료 생산방법을 제공할 수 있다.
- [0100] 상기 용어, "재조합 미세조류"는 상기에서 설명한 바와 같다.
- [0101] 상기 용어, "배양"은 상기 재조합 미세조류가 성장할 수 있도록 하는 것으로서, 본 발명의 형질전환체를 배양하기 위한 배지 및 배양조건은 숙주 세포에 따라 적절히 선택 이용할 수 있다. 영양배지는 숙주세포의 생육에 필요한 탄소원 무기질소원 또는 유기질소원을 포함하고 있는 것이 바람직하다. 탄소원으로는 글루코오스, 텍스트란, 가용성 전분, 수크로오스, 및 메탄올 등이 예시된다. 무기질소원 또는 유기 질소원으로는 암모늄염류, 질산염류, 아미노산, 콘스텝 리퀴(corn steep liquer), 펄톤, 카제인, 소 추출물, 대두백, 및 감자추출물 등이 예시된다. 필요에 따라 다른 영양소, 예를 들어 염화나트륨, 염화칼슘, 인산이수소나트륨, 염화마그네슘 같은 무기염, 비타민류, 및 항생물질(테트라사이클린, 네오마신, 암피실린, 및 카나마이 신)등을 포함할 수 있다. 배양시는 세포의 생육과 단백질의 대량 생산에 적합하도록 온도, 배지의 pH 및 배양 시간 등의 조건들을 적절하게 조절할 수 있다.
- [0102] 보다 구체적으로, 본 발명에서의 상기 배양은 고농도 CO₂를 포함하는 산업 배기가스를 활용한 광독립 배양일 수 있다.
- [0103] 상기 용어, "광독립 배양"은 광 조건 하에서 독립 배양을 하는 것을 의미할 수 있다.
- [0104] 상기 고농도 CO₂ 배양은 20% CO₂를 배양 상부 공간 (head space)에 지속적으로 공급하면서 23 °C의 온도 조건 하에서 수행될 수 있다. 또한, 상기 고농도 CO₂ 배양은 50 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 광조건에서 수행될 수 있다.
- [0105] 본 발명에 따르면, 산업 배기가스 내 포함된 고농도 CO₂를 단독 탄소원으로 활용하여 미세조류 바이오매스 및 해당 생물 유래 바이오연료 (바이오디젤)를 생성할 수 있다. 여기서, 산업 배기가스 내 포함된 고농도 CO₂를 단독 탄소원으로 활용하여 미세조류 바이오매스 및 해당 생물 유래 바이오연료 (바이오디젤)를 생성할 수 있다. 상기 실제 산업 배기가스를 활용한 바이오매스 및 바이오연료 생산은 광생물반응기에서 수행되며 고농도 CO₂ (CO₂ 약 13%, 질소 산화물 약 20 ppm, 황 산화물 약 32 ppm)가 포함된 산업 배기가스를 해당 광생물반응기에 0.1 vvm으로 주입하여 수행될 수 있다.
- [0106] 또한, 상기 실제 산업 배기가스를 활용한 바이오매스 및 바이오 연료 생산은 유동적인 광도 조사 및 가변적인 온도 조건이 나타나는 옥외조건에서 수행될 수 있다.
- [0108] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 미세조류의 CO₂에 대한 낮은 내성이 결국 산성 기체인 CO₂에 의한 심각한

세포 내부 산성화에 기인하고 있음을 문헌 분석을 통해 인지한 후, 산성 및 고농도 CO₂ 환경 하 모균주 *Chlamydomonas reinhardtii* CC125 내에서 기존 연구를 통해 알려진 미세조류의 CO₂ 내성과 관련 있는 유전자에 대한 발현 정도 (전사체) 분석을 수행하였다. 이를 통해 해당 균주의 CO₂ 불내성의 원인이 세포 내 pH 유지, 즉 pH 항상성을 관장하는 가장 중요하다고 알려진 PMA가 산성 및 고농도 CO₂ 환경, 즉 내부 산성화가 쉽게 일어나는 환경에서 오히려 저발현되는 현상을 관찰하였다.

[0109] 이에 따라, 본 발명에서는 미세조류의 CO₂ 불내성의 핵심 원인을 낮은 pH 및 고농도 CO₂ 조건, 즉 내부 산성화 촉진 환경에서의 낮은 PMA 발현 정도로 규정하였고, 선행 연구들에 의해 종의 장벽 없이 발현 가능하다고 알려진 니코티아 나 플럼배지니폴리아 (*Nicotiana plumbaginifolia*) 유래 PMA4 단백질의 유전 서열을 모균주의 코돈 출현 빈도에 기반하여 코돈 최적화하였다.

[0110] 특히, PMA4 단백질의 자가억제 부위 (autoinhibitory domain)를 암호화하고 있는 C-말단 쪽 100개의 아미노산 서열(300bp)이 삭제될 경우 (PMA4ΔCter), 해당 단백질의 양성자 (proton; H⁺) 배출 능력이 향상됨에 착안하여 관련 부위를 제거하였다. 추가로, 차후 세포 내에서 발현된 단백질의 용이한 동정을 위해 글리신-리치 (glycine-rich) 연결체 시퀀스 (linker sequence)를 매개로 하여 형광 단백질 중 하나인 Venus를 C-말단이 제거된 PMA4 단백질에 부착하였다 (PMA4ΔCter-V). 이후, 해당 유전자를 전기천공법을 통해 삽입하여 *Chlamydomonas reinhardtii* CC125 야생형 균주 내에서의 성공적인 발현을 통해 미세조류 세포의 양성자 배출 능력을 향상시킴으로써, 산성 환경 및 고농도 CO₂ 공급 환경에 대한 높은 내성을 부여하여, 상기 세포 내부 산성화 조건들 아래에서도 세포 내부 pH 유지 능력이 향상되어 원활한 광합성을 가능하게 하였고, 결국 바이오매스 생산성 및 CO₂ 고정 속도가 현저하게 향상된 클라미도모나스 레인하티 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 유래의 변이 미세조류 균주, *Chlamydomonas reinhardtii* PMA4ΔCter-V4 및 -V10을 확인하였다.

[0112] 또한, 본 발명의 구체적인 일 실시예에 따르면, 산성 조건 및 고농도 CO₂ 환경에 대한 고내성을 가지는 미세조류 균주 *Chlamydomonas reinhardtii* PMA4ΔCter-V4는 그 유래가 되는 야생형 균주 *Chlamydomonas reinhardtii* CC125에 비해 월등한 고농도 CO₂ (20% CO₂) 환경 하에서 고성장성 (최대 성장 기준 3.2배 이상) 및 낮은 pH 환경 (아세트이트가 공급된 혼합 영양 배양 환경 하 pH 5.5)에서의 생존성을 가진다.

[0113] 또한, 실제 고농도 CO₂ 뿐만 아니라 다양한 생물 유해성 산성 가스 (질소 산화물 및 황 산화물)을 함유하고 있는 석탄 연소 배기가스에 직접 균주를 적용, 배양한 결과, 모균주에 비해 2.28배 이상의 광독립 성장성 및 2.22배 이상의 CO₂ 전환 속도가 향상되는 것을 확인하였다.

[0114] 또한, 미세조류 바이오매스를 생산하는 동시에 광합성을 통해 세포 내에서 생합성하는 여러 유용 물질 중, 대표적인 바이오디젤 (Fatty acid methyl ester; 지방산 메틸 에스터) 생산성 또한 4.99배 이상까지 증대되는 것을 확인하였다.

[0115] 이를 통해 본 발명에서 제작된 변이 균주는 산업 배기가스 유래 CO₂를 전환함으로써 산업 탄소 배출 저감에 기여하는 동시에 탄소 중립적 유용 물질을 실질적으로 생산할 수 있는 플랫폼 균주로 활용하는데 매우 적합하다.

[0116] 또한, 본 발명에 따른 균주의 경우 유전적 변이가 용이하지만 낮은 고농도 CO₂ 내성으로 인해 재활용성이 떨어지는 것으로 평가받던 *Chlamydomonas reinhardtii* 균주를 기반으로 하고 있기 때문에, 이 균주를 모균주로 한 차후 추가 유전적 변이를 통해 CO₂로부터 바이오 연료뿐만 아니라 더욱 다양한 물질을 직접 생산할 수 있는 능력을 부여함으로써, 미세조류 기반의 지속 가능한 사회를 앞당기는데 기여할 것으로 기대된다.

발명의 효과

[0118] 본 발명에 따른 낮은 pH (산성 조건) 및 고농도 CO₂ 환경에 대한 고 내성을 가지는 미세조류 균주 *Chlamydomonas reinhardtii* PMA4ΔCter-V4와 -V10은 그 유래가 되는 야생형 균주 *Chlamydomonas reinhardtii* CC125에 비해 월등한 고농도 CO₂ (20% CO₂) 환경 하 성장성 (최대 성장 기준 3.2배 이상) 및 낮은 pH 환경 (아

세테이트가 공급된 혼합 영양 배양 환경 하 pH 5.5)에서의 생존성을 보임을 확인하였다. 또한 실제 고농도 CO₂ 뿐만 아니라 다양한 생물 유해성 산성 가스 (질소 산화물 및 황 산화물)을 함유하고 있는 석탄 연소 배기가스에 직접 균주를 적용, 배양한 결과 모균주에 비해 2.28배 이상의 광독립 성장성 및 2.22배 이상의 CO₂ 전환 속도 향상이 가능함 또한 입증하였다. 또한 미세조류 바이오매스를 생산하는 동시에 광합성을 통해 세포 내에서 생합성 하는 여러 유용 물질 중 대표적인 바이오디젤 (Fatty acid methyl ester; 지방산 메틸 에스터) 생산성 또한 4.99배 이상까지 증대됨을 실험적으로 검증하였다. 이를 통해 본 발명에서 제작된 변이 균주는 산업 배기가스 유래 CO₂를 전환함으로써 산업 탄소 배출 저감에 기여하는 동시에 탄소 중립적 유용 물질을 실질적으로 생산할 수 있는 플랫폼 균주로 활용하는데 매우 적합하다. 또한, 본 균주의 경우 유전적 변이가 용이하지만 낮은 고농도 CO₂ 내성으로 인해 제 활용성이 떨어지는 것으로 평가받던 *Chlamydomonas reinhardtii* 균주를 기반으로 하고 있기 때문에 이 균주를 모균주로 한 차후 추가 유전적 변이를 통해 CO₂로부터 바이오연료 뿐만 아니라 더욱 다양한 물질을 직접 생산할 수 있는 능력을 부여함으로써 미세조류 기반의 지속 가능한 사회를 앞당기는데 기여할 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0120]

도 1은 모델 미세조류이자 본 발명을 위한 모균주 *Chlamydomonas reinhardtii* CC125의 CO₂ 불내성 원인 규명을 위한 전사체 분석에 사용하기 위한 조건 수립 과정에서 도출된 미세조류 성장성 그래프이다.

도 2는 미세조류의 세포 내부 산성화를 유발하는 고농도 CO₂ 환경 (CO₂ 20%) 및 낮은 pH (산성, pH 5.0)에서 모균주 클라미도모나스 레인하티 (*Chlamydomonas reinhardtii*)의 전사체 분석 결과이다.

도 3은 전사체 및 번역 수준에서 유전자 발현 결과의 재현성을 각각 qRT-PCR 및 번역 블로팅에 의해 확인한 결과이다.

도 4는 *Chlamydomonas reinhardtii* CC125에 고농도 CO₂ 및 산성 환경에 대한 내성을 향상시키기 위해 삽입된 유전자의 모식도이다.

도 5는 PMA4ΔCter-V4 유전자의 미세조류 균주 내로의 안정적 삽입 확인을 위한 야생형 *Chlamydomonas reinhardtii* CC125와 변이 균주 *Chlamydomonas reinhardtii* PMA4ΔCter-V4와 -V10의 PCR 이미지이다. 도 4에서 A는 actin 단백질을 암호화하고 있는 유전서열로 내인성 대조군 (endogenous control)로 사용되었으며 P는 관심 서열, 즉 PMA4ΔCter-V4와 PMA4ΔCter-V10에 대한 PCR 증폭 결과이다.

도 6은 야생형 *Chlamydomonas reinhardtii* CC125와 변이 균주 *Chlamydomonas reinhardtii* PMA4ΔCter-V4와 -V10의 전사체 수준에서 PMA4ΔCter-V 유전자의 상대적 발현량을 나타내는 그래프이다.

도 7은 야생형 *Chlamydomonas reinhardtii* CC125와 변이 균주 *Chlamydomonas reinhardtii* PMA4ΔCter-V4와 -V10의 단백질 수준에서 PMA4ΔCter-V 유전자의 상대적 발현량을 나타내는 웨스턴 블랏 (Western blot) 이미지이다.

도 8은 야생형 *Chlamydomonas reinhardtii* CC125와 변이 균주 *Chlamydomonas reinhardtii* PMA4ΔCter-V4와 -V10의 산성 (pH 5.5, 혼합 영양 배양 배지) 내성을 비교한 고체 배지 배양 결과이다.

도 9는 야생형 *Chlamydomonas reinhardtii* CC125와 변이 균주 *Chlamydomonas reinhardtii* PMA4ΔCter-V4와 -V10의 산성 (pH 5.5, 혼합 영양 배양 배지) 내성을 비교한 액체 배지 배양 결과이다.

도 10은 야생형 *Chlamydomonas reinhardtii* CC125와 변이 균주 *Chlamydomonas reinhardtii* PMA4ΔCter-V4와 -V10의 고농도 CO₂ 내성을 확인하기 위해 20% CO₂ 공급 조건에서 액체 독립 영양 배지 배양을 통해 도출된 성장성 평가 결과를 나타내는 그래프이다.

도 11은 광독립영양 바이오매스 생산(상단 도면)과 CO₂ 고정율(RCO₂, 하단 도면)의 경우 매우 높은 CO₂ 조건(20% CO₂)에서 개선되는 것도 확인한 그래프이다.

도 12는 야생형 *Chlamydomonas reinhardtii* CC125와 변이 균주 *Chlamydomonas reinhardtii* PMA4ΔCter-V4와 -V10의 일반 중성 대기 조건 및 고농도 CO₂ 환경 하에서 광합성 유래 산소 생산 속도를 비교한 결과에 대한 그

래프이다.

도 13은 야생형 *Chlamydomonas reinhardtii* CC125와 변이 균주 *Chlamydomonas reinhardtii* PMA4 Δ Cter-V4와 -V10의 고농도 CO₂ 환경하에 노출된 시간에 따른 세포 내부 pH (pHi)에 대한 모니터링 결과를 나타내는 그래프이다.

도 14는 야생형 *Chlamydomonas reinhardtii* CC125와 변이 균주 *Chlamydomonas reinhardtii* PMA4 Δ Cter-V4과 -V10로부터 각각 분리해낸 원형질막 샘플로부터 측정된 PMA 활성을 나타낸 그래프이다.

도 15는 pH 지시약인 브로모크레졸 퍼플 (bromocresol purple)을 활용하여 야생형 *Chlamydomonas reinhardtii* CC125와 변이 균주 *Chlamydomonas reinhardtii* PMA4 Δ Cter-V4와 -V10의 세포의 양성자 배출 능력을 고체 배지 상에서 시각화한 결과이다.

도 16은 실제 산업 배기가스를 탄소원으로 적용한 야생형 *Chlamydomonas reinhardtii* CC125와 변이 균주 *Chlamydomonas reinhardtii* PMA4 Δ Cter-V4의 10 L 규모 광생물반응기 내에서 옥외 배양한 이미지이다.

도 17은 실제 산업 배기가스를 탄소원으로 적용한 야생형 *Chlamydomonas reinhardtii* CC125와 변이 균주 *Chlamydomonas reinhardtii* PMA4 Δ Cter-V4의 10 L 규모 광생물반응기 내에서 옥외 배양한 균주들의 성장성 (biomass productivity), CO₂ 고정 속도 (CO₂ fixation rate), 열량 생산성 (calorific productivity), 바이오디젤 생산성 (biodiesel productivity), 및 총지질 생산성 (lipid productivity)을 비교하는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0121] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0123] 실험예 1: 미세조류 균주, 배지 제형 및 배양 조건

[0124] *C. reinhardtii* WT(wild-type) 균주 CC-125는 미네소타 대학의 *Chlamydomonas* Resource Center에서 입수하였으며, 본 발명에 사용된 모든 조작된 세포주는 상기 균주에서 구성되었다.

[0125] 미세조류의 실험실 규모에서의 배양은 변형된 Tris-acetate-phosphate(TAP; 이하 MTAP) 및 Tris-phosphate(TP; 이하 MTP) 배지로 수행하고, 배지의 완충 용량은 배양의 산도를 엄격하게 유지하기 위한 추가 완충 물질인 MES를 사용하였다. 이는, 암모늄 섭취로 인해 pH가 매우 낮아져 CO₂ 내성을 정확하게 평가할 수 없기 때문이다.

[0126] 중성 pH의 혼합영양 MTAP 배지는 10 mM MES, 17.4 mM acetic acid, 7 mM NH₄Cl, 0.83 mM MgSO₄ · 7H₂O, 0.45 mM CaCl₂ · 2H₂O, 1.65 mM K₂HPO₄, 1.05 mM KH₂PO₄, 0.134 mM Na₂EDTA · 2H₂O, 0.136 mM ZnSO₄ · 7H₂O, 0.184 mM H₃BO₃, 40 μ M MnCl₂ · 4H₂O, 32.9 μ M FeSO₄ · 7H₂O, 12.3 μ M CoCl₂ · 6H₂O, 10 μ M CuSO₄ · 5H₂O, and 4.44 μ M (NH₄)₆MoO₃로 구성되며, pH는 25mM Tris 염기로 조정하였다. 참고로, 이러한 모든 물질은 Sigma-Aldrich(미국)에서 구입하였다.

[0127] 아세트산 대신 0.35% HCl을 첨가하고, 그 외 MTAP 제제와 동일한 방법으로 독립영양 MTP 배지(pH 7.0)를 제조하였다.

[0129] 세포는 연속 광 조명(50 μ E m⁻² s⁻¹) 하에 120 rpm의 회전 속도로 23 ° C의 인큐베이터에서 진탕 배양하였다. 헤드스페이스에는 각 실험의 목적에 따라 공기와 20% CO₂ 농축 공기를 제공하였고, 800 nm에서 UV-1800 UV 분광광도계(Shimadzu, Japan)를 사용하여 세포 성장을 매일 모니터링하였다.

[0131] 미세조류의 비성장률(μ ; d⁻¹)은 다음 식 1에 따라 평가하였다.

[0133] [식 1]

$$\mu = (\ln OD_{800,F} - \ln OD_{800,I}) / (t_F - t_I)$$

[0134]

[0135] 여기에서, $OD_{800,F}$ 및 $OD_{800,I}$ 는 2개의 특정 시점, 즉 t_F 및 t_I 에서 측정된 800nm에서의 최종 및 초기 광학 밀도이다.

[0137] 실험예 2: RNA 준비 및 RNA-seq 분석

[0138] 높은 CO₂ 및 낮은 pH 민감성 유전자를 식별하기 위하여, 미세조류 성장 속도를 50% 억제한 특정 CO₂(20% CO₂) 조건 및 pH(pH 5.0) 조건에서 성장한 *C. reinhardtii*의 RNA 샘플 (대기 pH 7.0)(성장을 감소로 유발한 유효 농도, EC50)를 분리하였다(도 1). 배양 전에 CO₂ 및 pH의 EC50 값은 미리 결정하였다.

[0140] 세포 성장 1일 후, 노출 시간을 스트레스 자극이 목표 수준에서 스트레스 유발 성장 억제를 유발하는 짧은 기간으로 결정하고, 세포가 시간적 적응 단계의 중앙에 진입하기 전(3일에서 4일 사이), 미세조류 세포를 원심분리(1373 × g, 5분)에 의해 수득 후 액체 질소를 사용하여 즉시 동결시켰다.

[0141] 또한, 단백질 수준에서 조건 의존적 PMA 발현 패턴을 조사하기 위하여, 이와 동일한 세포 샘플을 면역블롯팅 분석에 사용했다. 이후, PureHelix™ Total RNA Purification Kit(Nanohelix, Korea)를 이용하여 RNA 추출을 수행하고, RNA-seq 기반 전사체 분석을 각 조건에서 6개의 생물학적 복제물을 사용하여 수행하였다.

[0142] RNA 시료의 양과 질을 확인하기 위하여, NanoDrop™ 분광광도계 장치(Thermo Fisher Scientific, USA)와 Agilent 2100 Bioanalyzer(Agilent Technologies, USA)를 사용하였다. 라이브러리 준비를 위해, 약 6.0의 RNA 무결성 번호(RIN)를 나타내는 RNA 샘플을 TruSeq RNA 라이브러리 준비 키트(Illumina, USA)를 사용하여 선택하고, 그런 다음 Illumina NovaSeq™ 6000 시퀀싱 시스템을 사용하여 RNA-seq를 수행 후 150bp paired-end 읽기를 생성하였다. 또한, 결과 데이터는 기본 매개변수가 있는 Bowtie2 소프트웨어를 사용하여 *C. reinhardtii*(Chlamydomonas reinhardtii v5.6, JGI)의 참조 게놈에 매핑하였다.

[0143] Bioconductor R 소프트웨어 패키지 edgeR을 사용하여 각 유전자의 RPKM(백만 매핑된 읽기당 킬로베이스당 읽기) 단위를 계산하고 DEG를 식별한 후, 유의미한 DEG 유전자 세트를 사용하여 R 패키지 topGO를 사용하여 GO 농축 분석을 수행하고 Fisher의 정확한 테스트 방법을 사용하여 통계적 유의성을 결정하였다(p < 0.05).

[0144] GO 용어를 할당하기 위해 관련 유전자를 KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 데이터베이스를 사용하여 이중 그룹 클러스터(COG) 범주에 주석을 달고, CO₂ 내성과 관련된 개별 유전자(도 2)를 Chlamydomonas reinhardtii v5.6 데이터베이스에 제공된 유전자 주석을 기반으로 선택 및 분석하였다. 그런 다음, 그들의 발현 패턴을 프로파일링하여 높은 CO₂ 조건이 전사체 수준에서 세포에 미치는 영향을 종합적으로 평가하였다.

[0146] 실험예 3: PMA 과발현 발현벡터 제조 및 이를 이용한 형질전환

[0147] PMA 과발현 발현벡터를 제조하기 위하여, *N. plumbaginifolia* 유래 PMA인 PMA4를 선택하였으며, 이의 코딩 서열을 National Center for Biotechnology Information(NCBI, USA) 데이터베이스에서 얻었다.

[0148] 미세조류 균주에 개선된 H⁺ 압출 능력을 부여하기 위하여 H⁺ 유출을 감소시킬 수 있는 원래 서열(100개 아미노산, 300bp) 내의 C-말단 자가억제 도메인의 코딩 영역을 제거하였다.

[0149] 또한, 외인성 단백질의 국소화 및 최종 발현 표적인 PMA4 ΔCter-V의 서열을 확인하기 위하여, Gly-rich GGSGGSG Flexible linker에 의해 녹색 형광 단백질(GFP)의 유도체인 mVenus를 PMA4 ΔCter에 부착하였다.

[0150] 그런 다음, 키메라 단백질 코딩 서열을 *C. reinhardtii* 핵의 코돈 사용 선호도를 고려하여 GeneArt™ GeneOptimizer™ 소프트웨어(Thermo Fisher Scientific, USA)를 사용하여 코돈 최적화하고 GeneArt를 사용하여 합성하였다. 이어서, 상기 유전자 카세트에 EcoRI 및 BglII로 분해하고 구성적 프로모터(Hsp70A-Rbc S2) 및 제오신 내성 유전자(Sh Ble)를 함유하는 pChlamy_4 단백질 발현 벡터(Thermo Fisher Scientific, USA)에 클로닝

하였다. PMA4ΔCter-V-보유 플라스미드는 형질전환 전에 ScaI에 의해 선형화되었다. 클로닝 단계에 사용된 모든 제한 효소 및 T4 DNA 리가제는 Thermo Fisher Scientific(USA)에서 구입하였다.

[0152] mVenus 코딩 삽입물을 제작하기 위하여, 해당 서열(즉, PMA4ΔCter 및 링커 서열이 없는 PMA4ΔCter-V)을 동일한 발현 벡터 백본에 클로닝하고, 이후 전기천공법으로 미세조류에 형질전환하였다.

[0153] 세포 농도가 $\sim 1.5 \times 10^6$ 세포 mL⁻¹에 도달할 때까지 씨드(seed)를 200mL의 기존 혼합 영양(TAP) 배지에서 신선하게 유지하고 성장시켰으며, 이후 1373 x g에서 5분 동안 부드럽게 원심분리하여 수집하고 10 mL의 MAX Efficiency™ Transformation Reagent for Algae(Thermo Fisher Scientific, USA)에 재현탁한 후, 2회 세척하였다.

[0154] 전기 투과화 후, 세포를 15분 동안 인큐베이션하고 40mM 자당이 보충된 10mL의 TAP 배지로 옮겼다. 암실에서 16시간 동안 배양한 후, 세포를 수집하여 TAP 배지, 1.5%(w/v) 식물 한천(Duchefa Biochemie, The Netherlands) 및 5 μg mL⁻¹ Zeocin(Thermo Fisher Scientific, 미국)으로 구성된 고체 배지에 두었다. 플레이트의 세포를 저조도 조건($50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$)에서 23°C에서 7일 동안 성장시켰다.

[0156] 실험예 3: 이뮤노블로팅

[0157] 1차 항체로는 Agrisera의 H+ ATPase(1:1,000; AS07 260) 및 AtpB(1:10,000; AS05 085)를 사용하였으며, 2차 항체로는 Agrisera의 HRP-접합 염소 항-토끼 IgG(조건 의존적 PMA 발현의 정량화를 위한 1:100,000 및 외인성 PMA 단백질 검출을 위한 1:1500; AS09 602)를 사용하였다. 2차 항체의 희석 비율은 개발 시약의 제조사 프로토콜에 따라 조정하고 단백질 발현 수준의 정량적 분석에서 밴드 강도는 ImageJ 소프트웨어를 사용하여 측정하였다.

[0159] 실험예 4: 프라이머

[0160] 이 연구에서 이름과 서열을 포함하여 사용된 모든 프라이머의 전체 목록은 하기 표 1과 같다.

[0162] [표 1]

Set	Amplifying target	Primer sequence	Amplicon size (bp)	Reference
Colony PCR	IDA5 (coding an actin protein; as an endogenous control)	Forward: 5'-TCGTCACCTTATCCTCATCGC-3' Reverse: 5'-CTGCAAGCTATCCACGTATGC-3'	501	5
	PMA4ΔCter-V	Forward: 5'-AGCTACAGGACTGATTGGC-3' Reverse: 5'-GAGCAGTATCTCCATCCAC-3'	4691	This study
qRT-PCR	IDA5 (coding an actin protein; as an endogenous control)	Forward: 5'-GACATGGAGAAGATCTGGCA-3' Reverse: 5'-GTCTCGAACATGATCTGGGT-3'	137	5
	PMA2	Forward: 5'-CAACACCTTCTTCGGCAGGG-3' Reverse: 5'-AGCTCAATCACCACCCAGAC-3'	129	This study
	PMA3	Forward: 5'-GTCGAGTTCACCGCAAGAA-3' Reverse: 5'-GAATGAACGAGGTGACGACC-3'	133	This study
	PMA4ΔCter-V	Forward: 5'-CAACATGTACCCCTCCGCTT-3' Reverse: 5'-AGCCGTCAGCCTTCTCAATC-3'	95	This study
PCR verification of gene insertion site	PMA4ΔCter-V4	Forward: 5'-GGAAGGGCGTGGAGATTGAC-3' Reverse: 5'-TCCGAGGTATTATTAGTCGGGC-3'	199 (When no gene is inserted)	This study
	PMA4ΔCter-V10 D1	Forward: 5'-TCAATGCACCTCCCTCCAC-3' Reverse: 5'-TGATGCTCCACACCATAC-3'	1198 (When no deletion occurred)	This study
	PMA4ΔCter-V10 D2	Forward: 5'-CACGACGACACCACATGTTA-3' Reverse: 5'-ATGGCTCTTCTGTCCAGC-3'	1136 (When no deletion occurred)	This study

[0165] 실험예 5: 유세포분석

[0166] BD Accuri™ C6 Plus 소프트웨어(BD Biosciences, USA) 및 Flowjo 소프트웨어(BD Biosciences, USA)가 있는 유세포 분석기(BD Accuri™ C6 Plus 유세포 분석기; BD Biosciences, USA)를 사용하여 각 세포주의 정량적 형광

을 추정하였다. 488 nm 레이저로 여기되고 방출은 533/30 nm 대역통과 필터(FITC-A)를 사용하여 감지하였다.

[0168] **실험예 6: 세포 내성 확인**

[0169] 낮은 pH 내성 테스트에 사용된 산성 매질의 pH 값을 HCl(MTAP 및 MTP 매질 모두)로 조정하였다. 스폿 플레이트 배양의 경우, 오토클레이브 후 식물 한천(1.5% w/v)을 사용하여 다양한 pH 값(즉, pH 7.0 및 pH 5.5)의 액체 배지를 고형화하여 사용하였다. 5×10^5 세포 mL^{-1} 에서 시작하여 4회의 연속 10배 희석을 수행한 다음, 각 희석액의 20 μL 분취량을 pH 조정된 플레이트에 스포팅하였다. 또한, CO_2 내성 테스트를 극도로 높은 CO_2 조건(농축 공기 20%)에서 독립영양 배지(즉, 초기 pH 값이 7.0인 MTP)로만 수행하여 유기 탄소원(즉, 아세트산)에 의해 유발되는 추가 산성화 효과를 분리하였다.

[0170] 또한 적응 효과를 배제하기 위해, 세포를 주변 조건에서 높은 CO_2 조건으로 갑자기 옮겼다. 세포 현탁액의 광학 밀도(OD800)는 각 균주에 대해 플롯된 관련 보정 함수를 사용하여 바이오매스 농도(g L^{-1})로 변환하였다.

[0171] 선형 회귀 곡선은 세포 배양 건조 세포 중량(DCW)과 탁도 간의 상관 관계를 기반으로 도출하였다. DCW는 Whatman GF/C glass microfiber filter(GE Healthcare, USA)를 사용하여 필터 기반 중량법으로 측정하였다. 세포 샘플은 각 세포주의 독립 영양 배양(대기 pH 7.0 조건에서) 과정에 걸쳐 수득하였으며, 이는 상관 관계를 확립하기 위해 별도로 수행하였다. 각 배양액에서 100 μL 및 5mL의 분취량을 샘플링하여 탁도 및 DW를 각각 측정했다. 그런 다음, 다음 식 2를 사용하여 바이오매스 생산성(P ; $\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$)을 계산하였다.

[0172] [식 2]

$$P = (X_F - X_I)/(t_F - t_I)$$

[0173]

[0174] 여기에서, $X_F(\text{g L}^{-1})$ 및 $X_I(\text{g L}^{-1})$ 은 각각 t_F 및 t_I 의 두 특정 시점에서 측정된 최종 및 초기 DCW를 나타낸다.

[0176] 독립영양 조건에서 탄소 균형이 주어졌을 때 CO_2 고정률(R_{CO_2} ; $\text{g CO}_2 \text{ L}^{-1} \text{d}^{-1}$)은 다음 식 3을 사용하여 평가하였다.

[0177] [식 3]

$$\text{CO}_2 \text{ fixation rate } (R_{\text{CO}_2}) = \frac{C}{100} \times \left(\frac{M_{\text{CO}_2}}{M_C} \right) \times P$$

[0178]

[0179] 여기서 C , M_{CO_2} 및 M_C 는 각각 탄소 함량(% w/w), CO_2 의 분자량(44.01 g mol^{-1}) 및 탄소의 원자 질량(12.01 g mol^{-1})을 나타낸다.

[0180] 실험실 규모의 내성 시험에서 각 세포주의 탄소 함량은 50%로 가정하였으며, 야외 배양에서 조류 세포의 실질적인 탄소 고정 능력을 정확하게 추정하기 위해 미세 조류의 탄소 함량 펠릿은 실제로 5E-CHN2200 원소 분석기(Changsha Kaiyuan Instruments, 중국)를 사용하여 결정하였다.

[0182] **실험예 7: 석탄 연소 연도 가스 주입으로 야외(옥상) 재배**

[0183] 제작된 본 발명의 돌연변이체(PMA4 $\Delta\text{Cter-V4}$)의 배양을 위하여, 미세조류 CO_2 전환 공장을 한국 정부의 허가(허가 번호: LML 19-912) 하에 건설 및 운영하였다. 실증 공장(도 16)에서 10L(작업 부피) 기포 기둥 PBR과 실외 미세조류 재배에 최적화된 독립영양 배지를 사용하여 개념 증명 실외 재배를 수행하였다. 미세조류 세포를 접종하기 전에 PBR과 공업용수 10L를 포함한 배양 시스템을 고알칼리성($\sim\text{pH } 12$, 10mM KOH 보충)으로 소독하고, 이웃

석탄 연소 보일러에서 배출되는 연도 가스 흐름을 제거했다. 이후 0.1 vvm의 폭기 속도로 수상에 지속적으로 살포하였다.

[0184] 배기 가스는 80.57% N₂, 13.18% CO₂, 7.46% O₂, 20.27ppm NOX 및 32.04ppm SOX로 구성되었다. 연도 가스의 산성 성분(예: CO₂, NOX 및 SOX)의 KOH와 산성 성분의 상호 작용으로 인해 가스 주입으로 인해 수상(~pH 7.11)이 중화되는 동시에, 대규모 작업에 적합한 중탄산염 완충 시스템이 자동으로 형성된다. 그 다음, 배양 배지로 7mM NH₄Cl, 0.83mM MgSO₄ · 7H₂O, 0.45mM CaCl₂ · 2H₂O, 1.65mM K₂HPO₄, 1.05mM KH₂PO₄, 0.134mM Na₂EDTA · 2H₂O, 0.136 mM ZnSO₄ · 7H₂O, 0.184 mM H₃BO₃, 40 μM MnCl₂ · 4H₂O, 32.9 μM FeSO₄ · 7H₂O, 12.3 μM CoCl₂ · 6H₂O, 10 μM CuSO₄ · 5H₂O, 및 4.44 μM (NH₄)₆MoO₃를 첨가하여 제조하였다. 독립영양 배양액을 기준으로 신선하고 대기에서 자란 조류 종자 50 mg L⁻¹을 접종하여 배양을 시작하고 2주(14일) 동안 계속하였다. 조류 배양물의 pH는 작업 내내 ~6.56으로 유지하였다. 생성된 바이오매스를 연속 흐름 원심분리기(21,000 × g)로 수득 후 추가 분석을 위해 동결건조(1kPa의 압력 및 -55° C의 온도에서)하였다.

[0186] 실험예 8: 분석 방법(총 지질 함량, 총 FAME 함량 및 발열량)

[0187] 야외 재배에서 수확한 바이오매스를 사용하여 각각의 지질 생산성(mg lipid L⁻¹ d⁻¹), 바이오디젤 생산성(mg FAME L⁻¹ d⁻¹) 및 발열량(kJ L⁻¹ d⁻¹) 변형률은 다음 식 4를 사용하여 계산하였다.

[0188] [식 4]

$$Lipid\ productivity = Total\ lipid\ content \times P$$

$$Biodiesel\ productivity = Total\ FAME\ content \times P$$

$$Calorific\ productivity = LHV \times P$$

[0189] 여기서 P와 LHV는 바이오매스 생산성(mg 바이오매스 L⁻¹ d⁻¹) 및 낮은 발열량(순 발열량이라고도 함)이다. 다양한 매트릭(matrices)을 계산하기 위해 P(mg 바이오매스 L⁻¹ d⁻¹), 총 지질 함량(% w/w), 총 FAME 함량(% w/w) 및 LHV(kJ g⁻¹) 값을 결정하였다. P는 상기 식 2를 사용하여 계산하였다.

[0192] 바이오매스의 총 지질 함량을 측정하기 위해 수정된 BlighDyer 방법에 따라 건조된 바이오매스의 총 지질 분획을 추출하고 중량 분석을 사용하여 함량을 결정하였다. 바이오디젤 함량 분석을 위해 나머지 총 지질 분획으로부터 FAME(일반적으로 바이오디젤 분획이라고 함)를 준비하고 DB-23 GC 컬럼이 장착된 Agilent 7890 A 가스 크로마토그래피(GC) 시스템(Agilent Technology, USA) 및 화염 이온화 검출기(FID)를 사용하여 분석하였다. 추출된 지질 시료에 10 mg의 pentadecanoic acid(C15:0)를 내부 표준물질로 첨가한 후, 3% 메탄올성 황산을 이용한 에스테르 교환 반응을 통해 FAME로 전환시켰다. 그 다음, 생성된 전환된 지질을 GC로 정량화하였다. Supelco[®] 37 성분 FAME 믹스, F.A.M.E. RM-3과 F.A.M.E.를 혼합하고 Mix RM-5(모두 미국 Sigma-Aldrich에서 구입)를 FAME 참조 표준으로 채택하였다.

[0193] FID의 운반 가스와 연료 가스로 각각 헬륨과 수소와 고순도 공기의 혼합물을 사용하였다.

[0194] GC 작동 조건은 다음과 같다: 주입 부피, 1 μL; 분할 비율, 1:50; 입구 온도, 250℃; 검출기 온도, 280 ℃; 및 오븐 온도, 50℃에서 1분간 유지, 25℃ min⁻¹의 속도로 175℃로 증가, 4℃ min⁻¹의 속도로 230℃로 증가, 230℃에서 5분간 유지.

[0195] 바이오매스의 발열량(LHV) 평가는 5E-C5500 자동 폭탄 열량계(Changsha Kaiyuan Instruments, China)를 사용하여 수행하였다.

[0197] **실험예 9: 통계 및 재현성**

[0198] 모든 실험은 해당 그림에 표시하였다. 결과는 평균(평균 $\pm$ SD)의 표준 편차를 보여주는 평균 값과 오차 막대로 표시하였다. 필요한 경우 양측 스튜던트 t-검정을 수행하여 두 그룹의 평균 값 사이에 통계적으로 유의한 차이가 있는지 확인하였다.

[0199] RNA-seq 데이터 분석에서 $|\log_2FC| > 1$ 및 $p < 0.05$ 인 유전자는 DEG로 간주하였다. 통계적으로 유의한 차이는 일반화 선형 모델(GLM) 우도비(LR) 테스트에 의해 결정하였다. GO 용어는 Fisher의 정확한 테스트 방법을 사용하여 $p < 0.05$ 의 컷오프 값을 기반으로 결정하였다. 제작된 군주 및 WT 대조군 군주의 pH_i 값을 상자 및 위스커 플롯과 비교하여 중앙값, 최대 및 최소 지점, 사분위수 범위를 입증하였다. PCR 및 면역블롯팅 결과를 포함한 겔 및 블롯 이미지는 단일 복제에서 획득하였다. 단백질 발현 수준의 정량 분석에서 단백질 샘플 간의 비교는 동일한 겔 내에서 수행하였다. 공초점 이미지는 생물학적으로 독립적인 3개의 샘플에서 획득하였다.

[0201] **실시예 1: 모균주 *Chlamydomonas reinhardtii* CC125의 전사체 분석**

[0202] 상기 실험예 2에 따라 모균주 *Chlamydomonas reinhardtii* CC125의 전사체를 분석하여 그 결과는 도 1과 도 2에 나타내었다.

[0203] 도 1은 모델 미세조류이자 본 발명을 위한 모균주 *Chlamydomonas reinhardtii* CC125의 CO₂ 불내성 원인 규명을 위한 전사체 분석에 사용하기 위한 조건 수립 과정에서 도출된 미세조류 성장성 그래프로, 화살표는 RNA-seq(n = 3)에 대한 바이오매스 샘플링 시점을 나타낸다.

[0204] 도 1에서 확인할 수 있는 바와 같이 각 조건은 해당 조건에 노출 후 1일간 바이오매스 성장성이 일단 중성 대기(ambient) 조건에서 배양 시에 비해 세포 내부 산성화 등의 원인으로 인해 성장성이 약 50% 감소하는 조건이며 이는 이후 전사체 분석을 위한 조건으로 되었다.

[0205] 다음으로, 도 2는 미세조류의 세포 내부 산성화를 유발하는 고농도 CO₂ 환경(CO₂ 20%) 및 낮은 pH(산성, pH 5.0)에서 모균주 클라미도모나스 레인하티(*Chlamydomonas reinhardtii*)의 전사체 분석 결과이다.

[0206] 미세조류는 고농도 CO₂ 환경에 대응하여 크게 다섯 가지의 세포 반응을 보이는데, 이는 첫 번째 양성자 펌프의 과발현, 두 번째 탄소 집중 기작(Carbon concentrating mechanism)의 저발현, 세 번째 세포막 성분의 변화, 네 번째 단백질 회복 기작의 활성화, 다섯 번째 ATP 합성 기작의 활성화 등이다.

[0207] 도 2에서 볼 수 있듯이, 기존 알려진 전사체 발현 예상 거동과는 달리 세포 내부 pH 유지에 가장 주된 역할을 한다고 알려진 양성자 펌프를 암호화하고 있는 PMA2와 PMA3 유전자가 오히려 내부 산성화를 일으키는 조건에서 이상 저발현이 나타났음을 확인할 수 있었다.

[0209] 또한, 이러한 결과는 도 3을 통해서도 확인할 수 있다.

[0210] 도 3에서 볼 수 있듯이, PMA2(Cre10.g459200; 약간 하향 조절됨) 및 PMA3(Cre03.g164600; 통계적으로 유의하게 하향 조절됨)과 같은 PMA의 발현 감소를 높은 CO₂ 조건에서 확인할 수 있었으며, 이는 PMA가 다양한 산성 조건에 노출되는 동안 생명 유지에 중요한 역할을 하는 것을 시사하는 것이다. 높은 CO₂ 조건 하에서 전사체 및 번역 수준에서 유전자 발현 결과의 재현성이 각각 qRT-PCR 및 면역 블로팅에 의해 확인되며, 이는 mRNA와 단백질의 발현 일치를 의미하고, 동시에 하향 조절이 선천적인 낮은 내성에 직접적인 영향을 주는 것임을 시사한다.

[0211] 이에 따라, 고농도 CO₂ 취약 균주인 *Chlamydomonas reinhardtii*의 불내성 주원인이 PMA 유전자의 이상 저발현으로 규정하였다.

[0213] **실시예 2: 높은 CO₂ 내성을 갖는 미세조류 균주의 구축**

[0214] 상기 실험예 3에 따라 모균주(야생형) *Chlamydomonas reinhardtii* CC125에 PMA 단백질을 과발현 할 수 있는 발현카세트를 제조하고 이를 포함하는 발현백터를 제조하였으며, 상기 발현백터를 미세조류에 형질전환하여 높은 CO₂ 내성을 가지는 미세조류 균주를 제조하였다.

- [0215] 구체적으로, 상기 실시예 1에 따르면 *C. reinhardtii*의 CO₂ 내성을 증가시키기 위한 과발현 표적은 전형적인 PMA, 즉 *Nicotiana plumbaginifolia*의 원형질막 H⁺-ATPase isoform 4(이하 PMA4라고 함)로, 이는 다른 식물 및 효모와 같은 다양한 바이오 플랫폼에서 잘 특성화되고 성공적으로 발현되기 때문이다.
- [0216] 이러한 PMA4의 과발현을 통하여 미세조류 시스템에서 활성화된다면, PMA4의 발현은 숙주와 무관하다는 특성 때문에 정제된 H⁺ 압출과 그에 따른 CO₂ 불내성으로 고통받는 다양한 미세조류 중에 대한 다목적 접근법이 될 수 있다.
- [0217] 이를 위하여 미세조류 세포에 매우 큰 산에 대한 내성을 부여하기 위하여, PMA4 단백질을 코딩하는 유전자 서열에서 C-말단에 존재하는 자가억제 도메인을 결실시킨 후 이렇게 잘린 형태의 PMA4를 PMA4Cter라고 명명하였다.
- [0218] 그 후, 발현된 산-분비 나노머신의 세포내 국소화를 조사하기 위한 리포터를 라벨링하기 위하여, 링커(GSGGGSG)를 이용하여 PMA4Cter 코딩 유전자 3'-코딩 말단에 Venus 형광 단백질(mVenus) 코딩 유전자를 연결하고, 이를 PMA4Cter-V라고 명명하였다. 아울러, 강력한 프로모터인 Hsp70A-Rbc S2를 연결하였다.
- [0219] 그 후, 코돈최적화된 삽입 카세트를 전기천공법(electroporation)에 의해 미세조류 세포로 형질전환한 후, 상기 실험예 4의 스크리닝 프라이머 세트를 이용하여 콜로니 PCR로 Zeocin을 포함하는 선택적 배지 플레이트에서 시간이 지남에 따라 유전 및 표현형 안정성이 유지되는 2 개의 독립적인 재조합 미세조류를 스크리닝하였다. 이를, 각각 PMA4Cter-V4, PMA4Cter-V10으로 명명하였다(도 4 및 도 5).
- [0220] 도 4는 *Chlamydomonas reinhardtii* PMA4ΔCter-V4 또는 PMA4ΔCter-V10 균주의 유전체 DNA (genomic DNA) 상 유전자 삽입 위치 확인을 위한 차세대 염기서열 분석(next generation sequencing) 결과 밝혀진 유전자 삽입 위치에 대한 모식도로, PMA4ΔCter-V4는 염색체 7번(Chromosome 7; Chr 7)의 2714330 위치에 23 bp를 탈락시킨 후 삽입된 것을 확인한 것이며, PMA4ΔCter-V10은 염색체 6번의 2162725 위치에 5461 bp를 탈락시킨 후 삽입된 것을 확인한 것이다. 참고로, P, Z, L, V의 경우 각각 프로모터(promotor), 지오신 항생제 내성 유전자(Zeocin antibiotic resistance gene), 연결체 서열(linker sequence)와 Venus 형광단백질을 의미한다.
- [0221] 그 결과, 도 4 및 도 5에서 확인할 수 있듯이, 본 발명에서 제조한 발현카세트를 포함하는 발현백터를 이용하여 형질전환시킨 균주가 각각 PMA4ΔCter-V4와 PMA4ΔCter-V10 유전자를 미세조류 균주 내에 안정적으로 삽입되었음을 확인할 수 있었다. 이와 달리, 모균주인 야생형(WT) 균주에서는 PMA4ΔCter-V의 발현이 확인되지 않았다.
- [0223] **실시예 3: *Chlamydomonas reinhardtii* CC125, 및 *Chlamydomonas reinhardtii* PMA4ΔCter-V4의 PMA4ΔCter-V 유전자의 상대적 발현량 평가**
- [0224] *Chlamydomonas reinhardtii* CC125, 및 *Chlamydomonas reinhardtii* PMA4ΔCter-V4의 PMA4ΔCter-V 유전자의 상대적 발현량을 qRT-PCR과 웨스턴 블랏을 이용하여 유전자와 단백질 수준에서 각각 확인하였다.
- [0225] 그 결과, 도 6 및 도 7에서 확인할 수 있듯이, 야생형에서는 PMA4ΔCter-V 유전자가 전혀 발현되지 않았으나, 본 발명에서 제작한 변이 균주 2종에서는 모두 PMA4ΔCter-V 유전자가 상대적으로 높게 발현되는 것을 확인할 수 있었고, 특히, PMA4ΔCter-V4에서 더 높게 발현되는 것을 확인할 수 있었다.
- [0227] **실시예 4: *Chlamydomonas reinhardtii* CC125, 및 *Chlamydomonas reinhardtii* PMA4ΔCter-V4과 PMA4ΔCter-V10의 산성 및 고농도 CO₂ 내성 평가**
- [0228] 본 발명의 형질전환 세포의 특성을 확인하기 위하여, 낮은 pH에서 성장한 세포주의 생산성을 먼저 평가하였다.
- [0229] 구체적으로, 조류 세포의 pH 내성 평가는 혼합 영양 및 독립 영양 조건의 두 가지 독립적인 배양 모드에서 수행하였고, 독립영양과 혼합영양 배양을 위해 아세트산을 유기탄소원으로 사용하였다.
- [0230] 그 결과, 도 8과 도 9에서 확인할 수 있듯이, 고체배지를 이용한 배양과 액체배지를 이용한 배양 모두에서 5.5의 pH 값에서 형질전환된 세포주는 WT 세포와 비교하여 성장 성능에서 분명한 차이를 보였다. 특히, pH 5.5의 혼합영양배양에서 WT 세포의 증식속도는 현저히 저하된 것과 달리, 본 발명의 형질전환 균주의 생산성은 높아 재조합 미세조류의 내산성이 성공적으로 증대되었음을 알 수 있었다.
- [0231] 또한, 도 10에서 확인할 수 있듯이, 낮은 pH에서 본 발명의 형질전환 균주 성장은 중성 pH에서의 성장과 비슷한 것으로 확인되었다. 이를 통해, 본 발명과 같은 PMA 과발현 전략이 세포에 부정적인 영향을 미치지 않는 것으로

알 수 있었으며, 광독립 영양 산성 배양에서 외인성 PMA 발현 돌연변이체도 동일한 산도 (pH 5.5)에서 상대적으로 향상된 성장성을 나타내었으나 이는 혼합 영양 배양에서 얻은 결과와 비교할 때 극적인 성장 차이를 보이지는 않는 것으로 확인할 수 있었다.

[0233] 한편, 도 11에서 확인할 수 있듯이, 광독립영양 바이오매스 생산(상단 도면)과 CO₂ 고정율(RCO₂, 하단 도면)의 경우 매우 높은 CO₂ 조건(20% CO₂)에서 개선되는 것도 확인할 수 있었다. 이와 같은 두 그래프는 동일한 시간 척도를 나타내며, 화살표는 세포주가 최대 농도에 도달한 시점(색상으로 구분)을 나타낸다. 중복 세포 배양의 데이터가 표시되며, 하단 도면에 표시된 각 점은 두 개의 생물학적 복제를 나타낸다. 배양 결과에 따르면, 결국 WT는 주변 CO₂ 조건(17일까지)에 비해 높은 CO₂ 조건(6일까지)에서 생산성이 1.09배 증가한 반면, 최대 바이오매스 생산은 0.66배 감소한 것으로 확인되었다.

[0234] 이와 달리, 본 발명의 재조합 미세조류에서의 최대 바이오매스 생산능은 동일한 CO₂ 조건에서 WT 균주에서 발견된 것보다 현저히 높았고, PMA4ΔCter-V4 및 PMA4ΔCter-V10 각각 3.22배 및 3.03배 개선되는 것을 알 수 있었다(도 11의 상단). 또한, 형질전환 균주의 누적 생산 및 비율도 높은 CO₂ 조건(7일째까지) 하에서 주변 CO₂ 조건(즉, 독립영양 pH 7.0)(17일까지) 보다 훨씬 더 높았다. 구체적으로, 누적 바이오매스 생산은 PMA4ΔCter-V4 및 PMA4ΔCter-V10에서 각각 1.12배 및 1.09배 개선되었고, 생산성이 각각 2.77배 및 2.62배 개선되었다. 이는 PMA 발현 돌연변이가 세포내 산성화 효과를 약화시키면서 과량의 CO₂를 유리하게 활용할 수 있음을 시사하는 것이다.

[0235] 이러한 성장 개선은 또한 배양 기간 동안 각 돌연변이체로 얻은 CO₂ 고정 양이 높은 CO₂ 제공 조건(도 11의 하단)에서 WT에서 발견된 것과 비교하여 상당히 개선되었음을 나타낸다. CO₂ 고정 속도 측면에서, PMA4ΔCter-V4와 PMA4ΔCter-V10은 효과적인 CO₂ 고정이 발생하는 기하급수적 성장 단계(2일과 6일 사이)에서 WT 균주와 비교할 때 각각 3.23배 및 2.99배 증가된 RCO₂ 값을 보여주었다.

[0236] 종합하면, 이러한 내성 개선 전략은 높은 CO₂ 공급 조건에서 짧은 배양 기간 동안 돌연변이체의 최대 바이오매스 농도를 높이고, CO₂ 제거율 및 효율성을 향상시키는 것을 시사한다.

[0238] 실시예 5: Chlamydomonas reinhardtii CC125, 및 Chlamydomonas reinhardtii PMA4ΔCter-V4와 -V10의 고농도 CO₂ 환경에서의 특성 평가

[0239] Chlamydomonas reinhardtii CC125와 Chlamydomonas reinhardtii PMA4ΔCter-V4 또는 -V10에 대하여 고농도 CO₂ 환경에서의 특성을 평가하여, 그 결과를 도 12 및 도 13에 나타내었다.

[0240] 먼저, 도 12는 야생형 Chlamydomonas reinhardtii CC125와 변이 균주 Chlamydomonas reinhardtii PMA4ΔCter-V4와 -V10의 일반 중성 대기 조건 및 고농도 CO₂ 환경 하에서 광합성 유래 산소 생산 속도를 비교한 결과에 대한 그래프로, CO₂로 성장한 WT 균주는 주변 조건에서 배양된 WT 균주보다 총 광합성 속도(즉, O₂ 발생 + 암호흡)가 더 낮았으며(약 50.4% 감소), 이는 높은 CO₂ 조건에 의해 미세조류 광합성 장치가 심하게 손상되는 것을 나타낸다. 그러나, 이와는 대조적으로, 높은 CO₂ 조건에서 성장한 PMA4ΔCter-V4 및 PMA4ΔCter-V10 균주는 대기 조건에서 성장하는 동안 발견된 것과 비교하여 증가된 광합성 O₂ 발생 속도를 보여주었다(각각 약 58.6% 및 37.3% 증가)(도 12).

[0241] 또한, 도 13은 야생형 Chlamydomonas reinhardtii CC125와 변이 균주 Chlamydomonas reinhardtii PMA4ΔCter-V4와 -V10의 고농도 CO₂ 환경하에 노출된 시간에 따른 세포 내부 pH (pHi)에 대한 모니터링 결과를 나타내는 그래프로, WT 균주는 높은 CO₂에 노출된 2시간 동안 pHi가 급격히 감소한 반면(pH 중앙값 6.56), 본 발명의 재조합 미세조류는 산성 조건에서 거의 중성에 가까운 pH를 강력하게 유지하는 더 나은 능력을 보여주었다. 구체적으로, PMA4ΔCter-V4 및 PMA4ΔCter-V10에 대해 각각 6.65 및 6.78의 중간 pH 값을 확인할 수 있었다(도 13).

[0242] 이는 높은 CO₂ 조건이 세포질 pH를 낮추어 미세 조류의 생존율에 크게 영향을 미치고, CO₂ 유래 세포내 산성화에

대한 긍정적인 반응을 가짐을 나타내는 것이다. 결국, 광합성 CO₂ 고정 시스템과 O₂ 진화 시스템이 세포질 및 subcellular pH뿐만 아니라 주변의 pH 및 CO₂ 조건에 매우 민감하다는 점을 감안할 때, 높은 CO₂ 조건에서 pH를 유지하는 세포 능력의 차이가 WT와 본 발명의 형질전환 균주 사이의 내성 격차의 근본적인 원인임을 시사하는 것이다.

[0244] **실시예 6: *Chlamydomonas reinhardtii* CC125, 및 *Chlamydomonas reinhardtii* PMA4ΔCter-V4와 -V10의 PMA 활성 및 세포의 양성자 배출 능력 평가**

[0245] *Chlamydomonas reinhardtii* CC125, 및 *Chlamydomonas reinhardtii* PMA4ΔCter-V4와 -V10의 PMA 활성 및 세포의 양성자 배출 능력을 평가하여 그 결과를 도 14와 도 15에 나타내었다. 참고로, 이러한 평가는 시험관 내와 생체 내에서 종합적으로 ATPase 활성을 확인하는 것으로 평가하였다.

[0246] 도 14는 야생형 *Chlamydomonas reinhardtii* CC125와 변이 균주 *Chlamydomonas reinhardtii* PMA4ΔCter-V4와 -V10으로부터 각각 분리해낸 원형질막 샘플로부터 측정된 PMA 활성을 나타낸 그래프이다. 앞서 설명한 결과와 유사하게, PMA4ΔCter-V4 및 PMA4ΔCter-V10이 WT 균주보다 각각 약 2.5배 및 2.6배 더 높은 ATPase 매개 ATP 가수분해 성능을 나타내는 것을 확인하였다. 이는 본 발명의 형질전환 균주가 실질적으로 더 높은 H⁺를 갖는다는 것을 입증하는 것이다.

[0247] 도 15는 pH 지시약인 브로모크레졸 퍼플 (bromocresol purple)을 활용하여 야생형 *Chlamydomonas reinhardtii* CC125와 변이 균주 *Chlamydomonas reinhardtii* PMA4ΔCter-V4와 -V10의 세포의 양성자 배출 능력을 고체 배지 상에서 시각화 한 결과이다. 원형 세포 군집 외곽의 밝은 노란색이 세포로부터 배출된 양성자에 의해 상대적 산성화된 지역을 보여준다. 배출된 H⁺ 및 수반되는 세포의 산성화로 인한 세포 주변의 색상 변화에서 추론할 수 있는 바와 같이, 본 발명의 PMA 발현 돌연변이체에서 H⁺ 플럭스가 눈에 띄게 개선되었음을 시각적으로 확인할 수 있었다.

[0249] **실시예 7: *Chlamydomonas reinhardtii* CC125, 및 *Chlamydomonas reinhardtii* PMA4ΔCter-V4와 -V10의 옥외 배양 평가**

[0250] *Chlamydomonas reinhardtii* CC125, 및 *Chlamydomonas reinhardtii* PMA4ΔCter-V4와 -V10의 옥외 배양을 평가하였다.

[0251] 도 16은 실제 산업 배기가스를 탄소원으로 적용한 야생형 *Chlamydomonas reinhardtii* CC125와 변이 균주 *Chlamydomonas reinhardtii* PMA4ΔCter-V4의 10 L 규모 광생물반응기 내에서 옥외 배양한 이미지이다.

[0252] 도 17은 실제 산업 배기가스를 탄소원으로 적용한 야생형 *Chlamydomonas reinhardtii* CC125와 변이 균주 *Chlamydomonas reinhardtii* PMA4ΔCter-V4의 10 L 규모 광생물반응기 내에서 옥외 배양한 균주들의 성장성 (biomass productivity), CO₂ 고정 속도 (CO₂ fixation rate), 열량 생산성 (calorific productivity), 바이오디젤 생산성 (biodiesel productivity), 및 총지질 생산성 (lipid productivity)을 비교하는 그래프이다.

[0253] 2주간의 세포 배양 후 다양한 계산식을 사용하여 균주의 다양한 성능 지수를 전체적으로 평가하였다. 그 결과, 도 16과 도 17에서 확인할 수 있듯이, PMA4ΔCter-V4가 WT 균주보다 현저하게 개선된 광영양성 성장 속도(2.28배 높음)를 나타내고, 유해 가스 스트림에 포함된 고농도 CO₂를 유리하게 전환시키는 것을 관찰할 수 있었다. 나아가, 본 발명의 형질전환 조류 균주에서 바이오매스 생산성 증가는 미세조류 CO₂ 고정률(2.23배), 총 지질 생산성(2.21배), 총 지방산 메틸 에스테르(FAME) 생산성(4.68배) 및 발열량 (2.20배)을 포함한 기타 필수 매개변수의 향상으로 이어지는 것을 알 수 있었다. CO₂ 격리, FAME 축적 및 발열량 생산의 가속화는 다양한 유형의 바이오 연료(즉, 직접 연소를 위한 바이오디젤 및 고체 연료)를 생산하기 위한 생물학적 플랫폼으로, 본 발명의 제조함 미세조류 균주를 사용하는 동시에 산업적 CO₂ 배출량을 줄이는 실용성을 나타내는 것이다.

[0255] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서

기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

수탁번호

[0257]

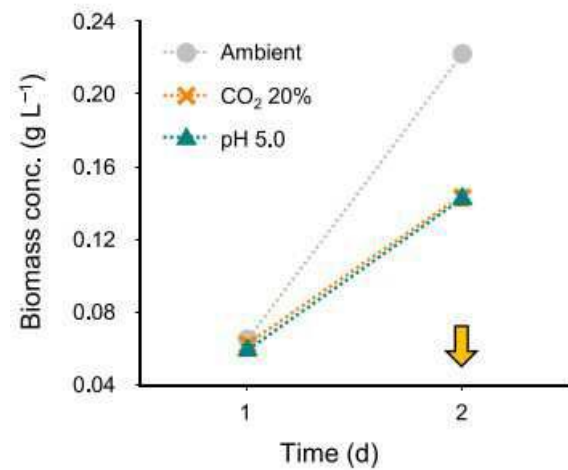
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC14511BP

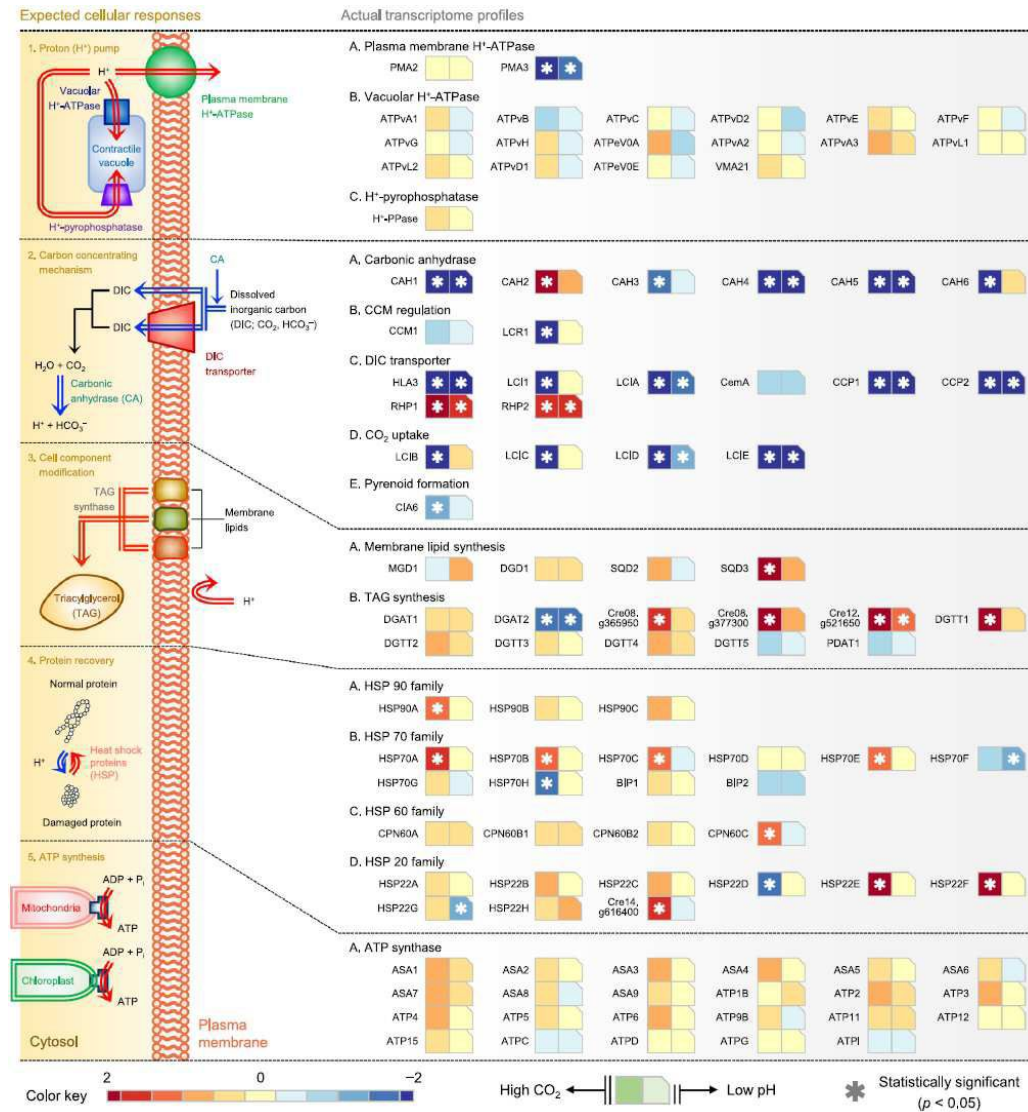
수탁일자 : 20210325

도면

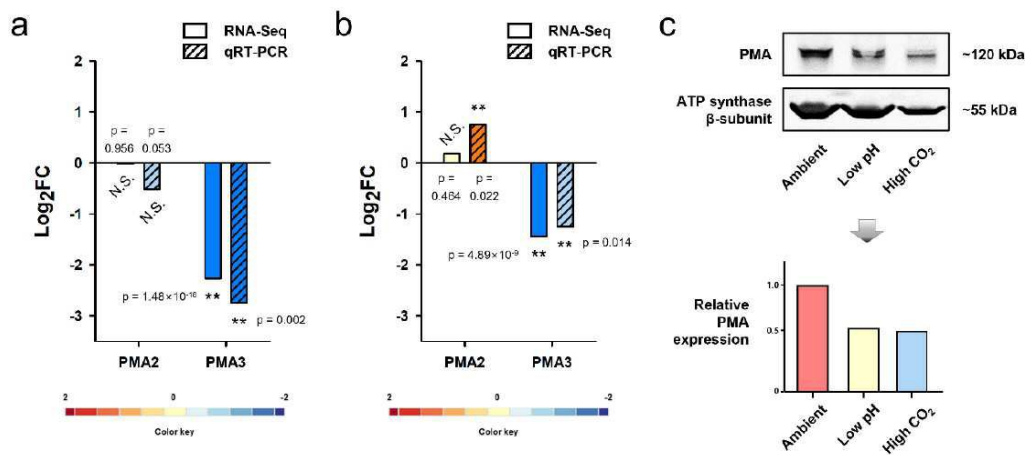
도면1



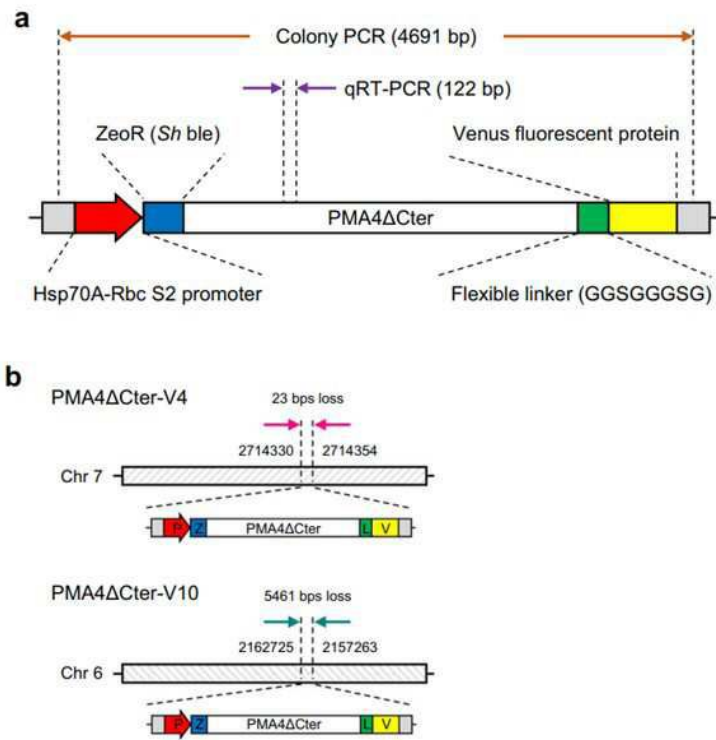
도면2



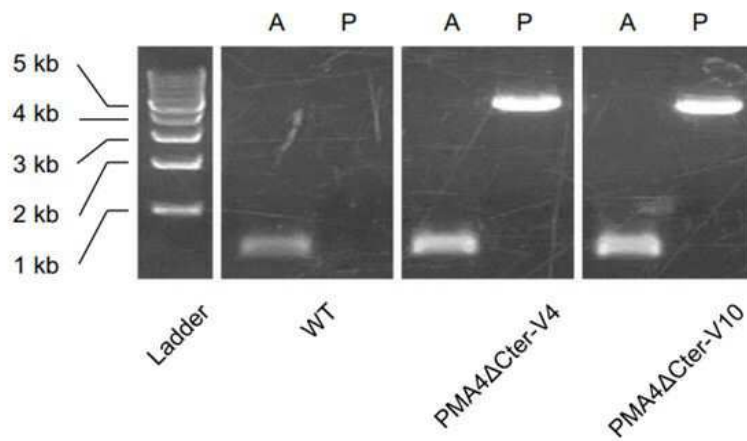
도면3



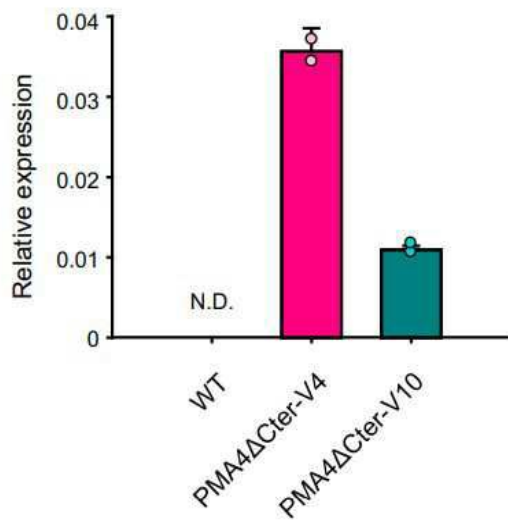
도면4



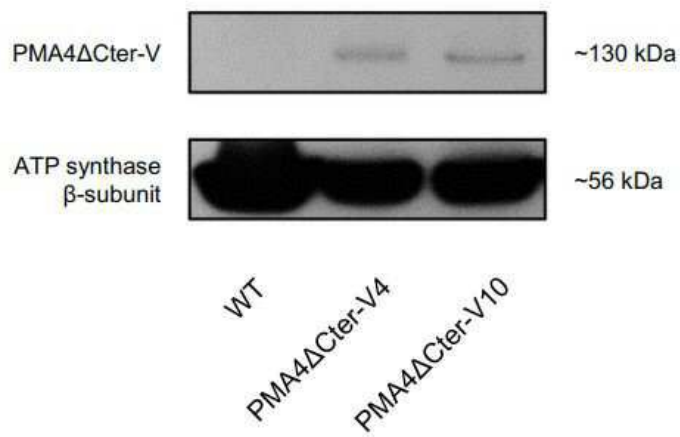
도면5



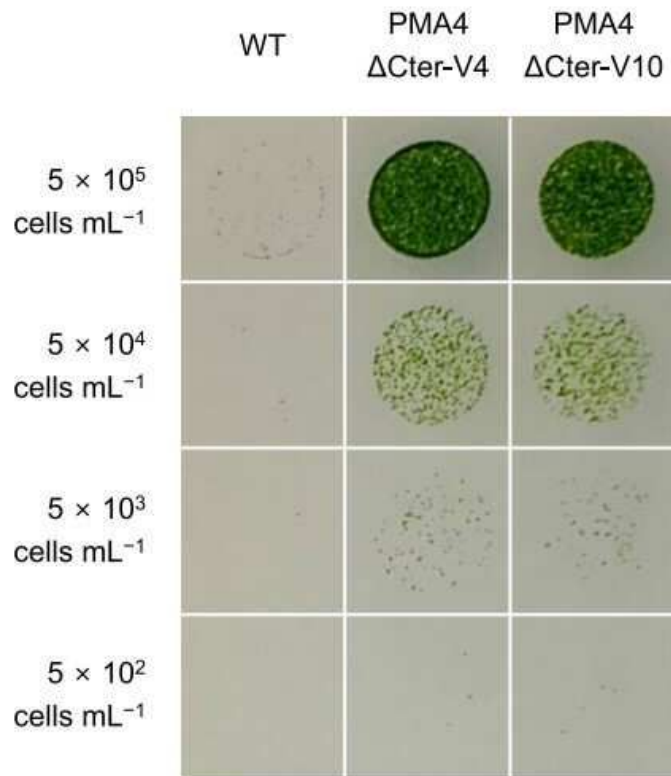
도면6



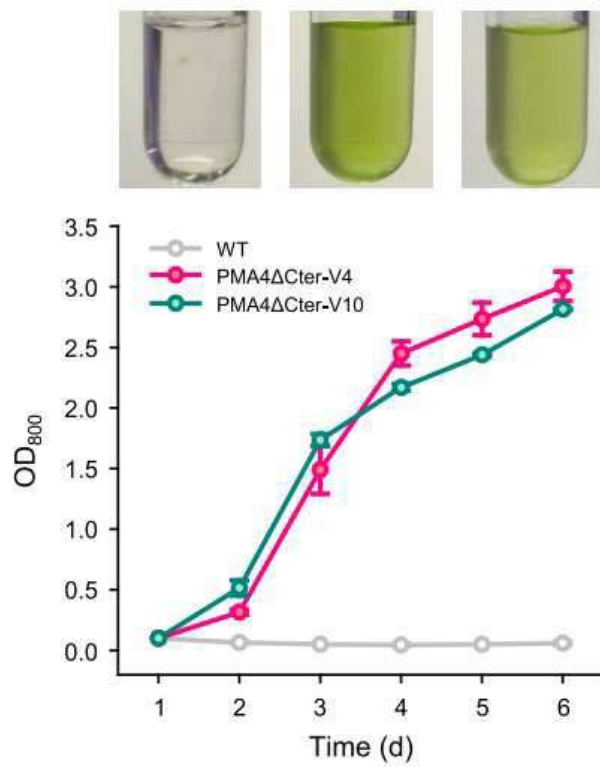
도면7



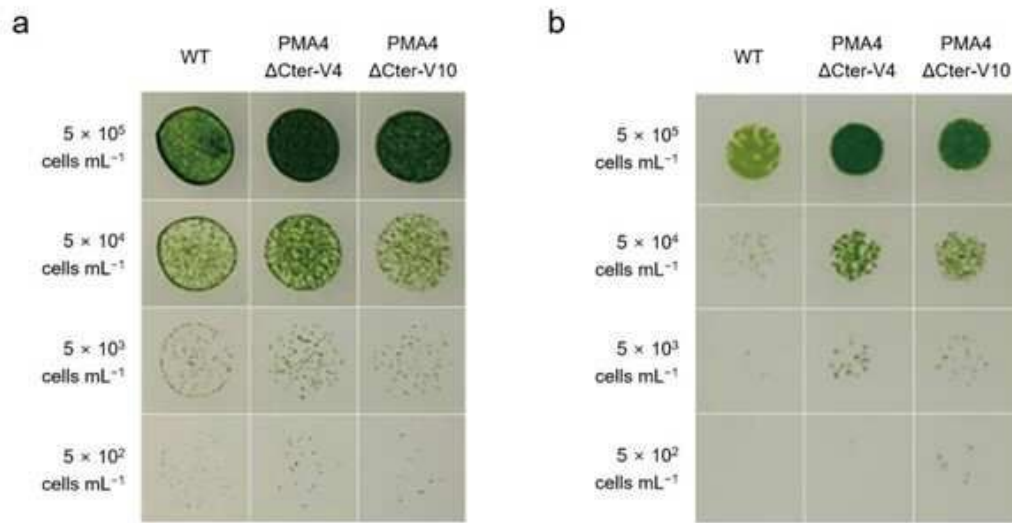
도면8



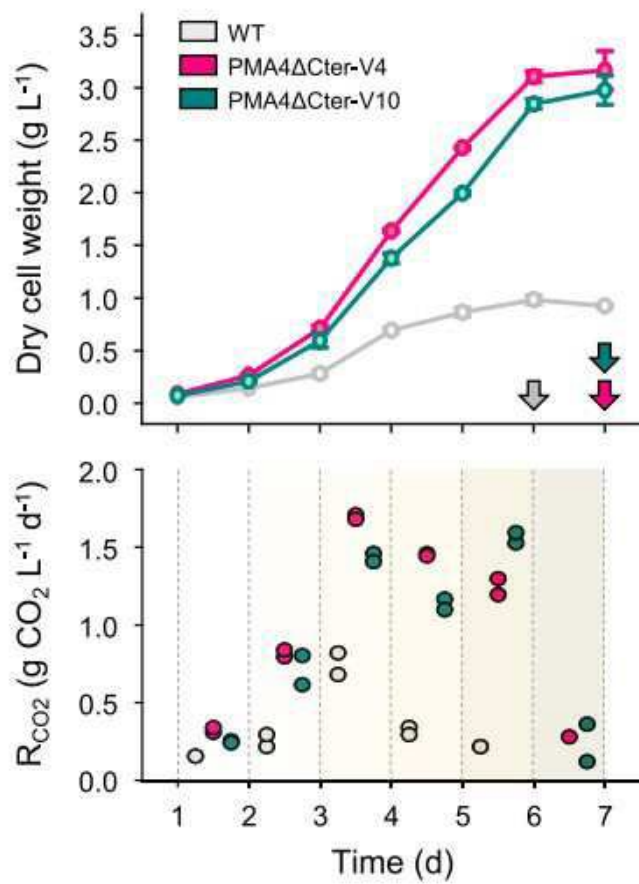
도면9



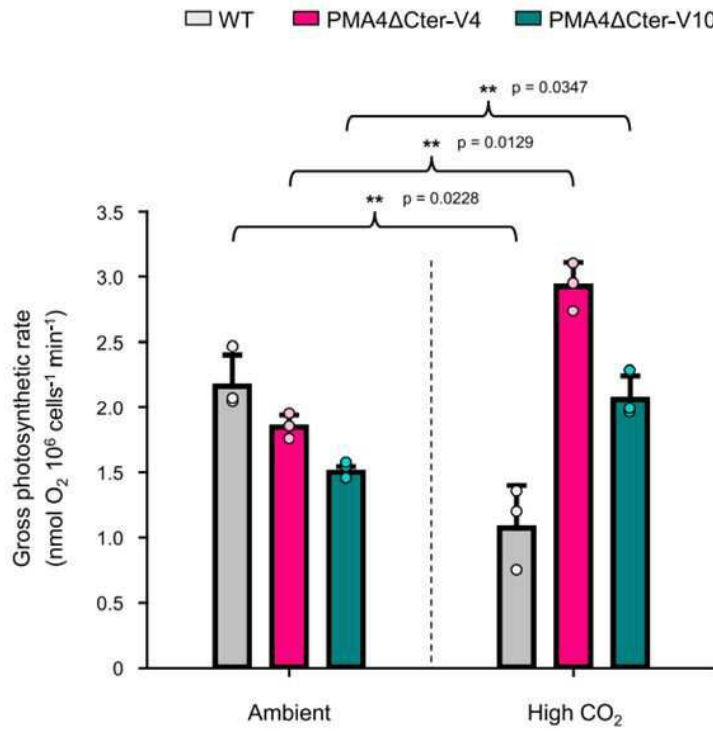
도면10



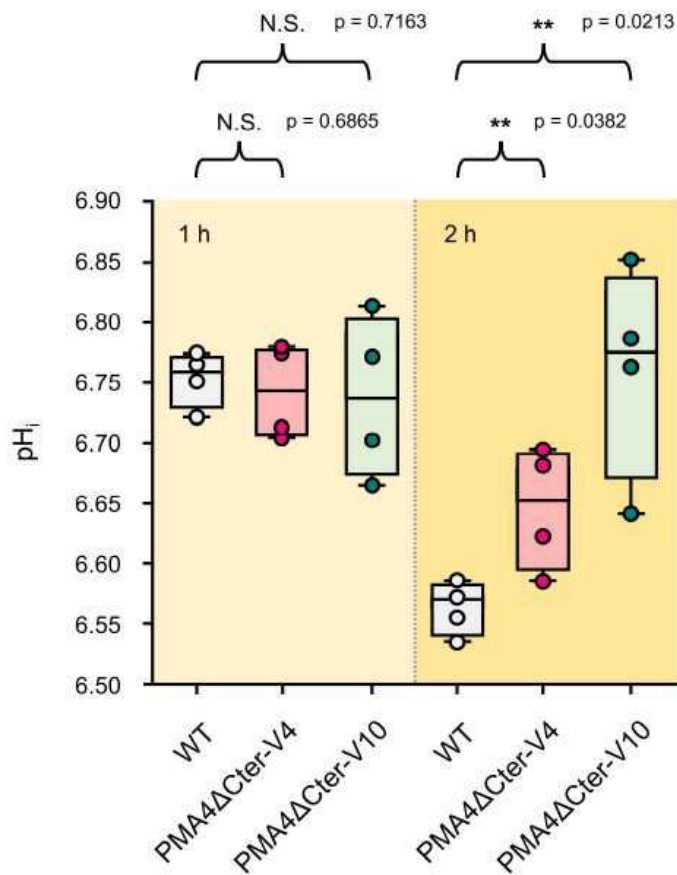
도면11



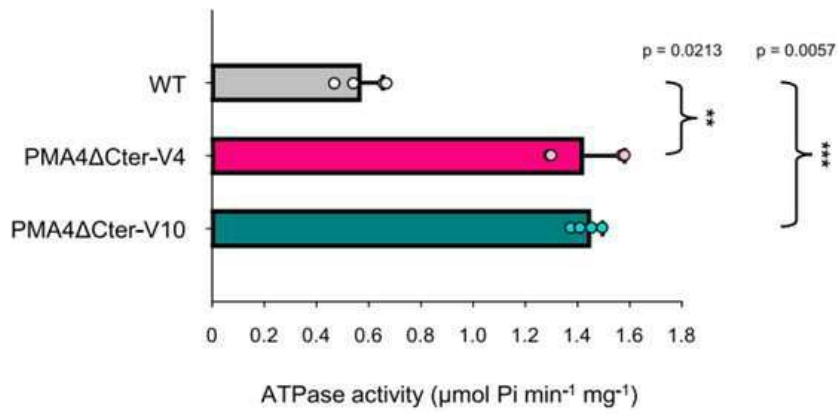
도면12



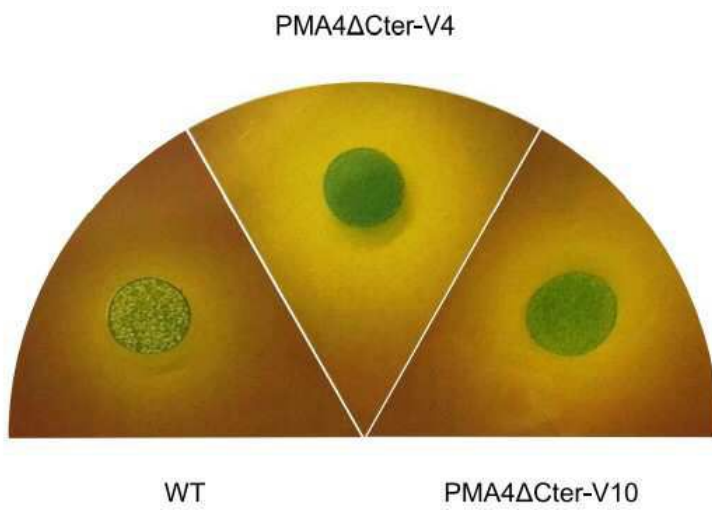
도면13



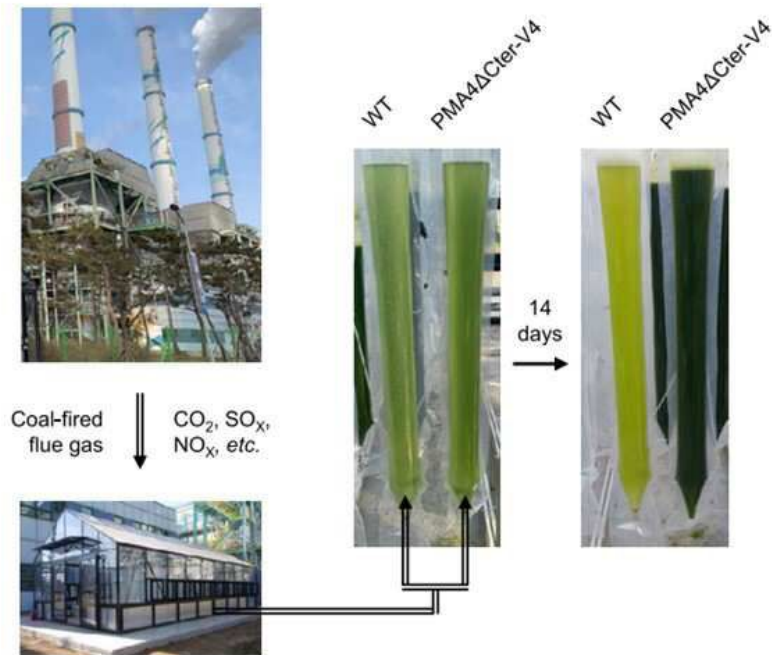
도면14



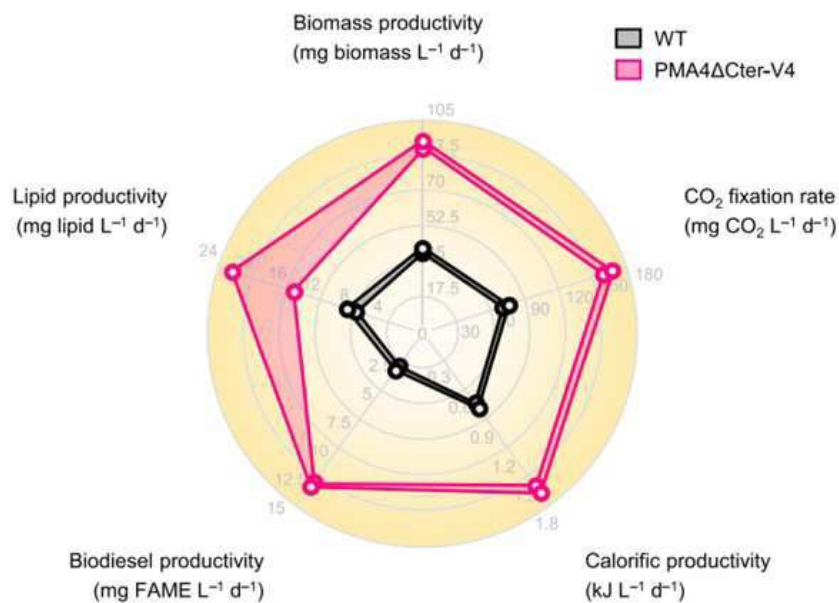
도면15



도면16



도면17



서열 목록

- <110> Korea University Research and Business Foundation
- <120> Recombinant microalga with highly improved tolerances towards high CO₂ and/or low pH conditions
- <130> JKP1641R1
- <150> KR 10-2021-0042862

<151> 2021-04-01

<160> 4

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 952

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of PMA4

<400> 1

Met Ala Lys Ala Ile Ser Leu Glu Glu Ile Lys Asn Glu Thr Val Asp

1 5 10 15

Leu Glu Lys Ile Pro Ile Glu Glu Val Phe Glu Gln Leu Lys Cys Thr

20 25 30

Arg Glu Gly Leu Ser Ala Asp Glu Gly Ala Ser Arg Leu Gln Ile Phe

35 40 45

Gly Pro Asn Lys Leu Glu Glu Lys Asn Glu Ser Lys Ile Leu Lys Phe

50 55 60

Leu Gly Phe Met Trp Asn Pro Leu Ser Trp Val Met Glu Ala Ala Ala

65 70 75 80

Val Met Ala Ile Ala Leu Ala Asn Gly Asp Gly Lys Pro Pro Asp Trp

85 90 95

Gln Asp Phe Ile Gly Ile Ile Cys Leu Leu Val Ile Asn Ser Thr Ile

100 105 110

Ser Phe Ile Glu Glu Asn Asn Ala Gly Asn Ala Ala Ala Ala Leu Met

115 120 125

Ala Gly Leu Ala Pro Lys Thr Lys Val Leu Arg Asp Gly Arg Trp Ser

130 135 140

Glu Gln Glu Ala Ala Ile Leu Val Pro Gly Asp Ile Ile Ser Val Lys

145 150 155 160

Leu Gly Asp Ile Ile Pro Ala Asp Ala Arg Leu Leu Glu Gly Asp Pro

165 170 175

Leu Lys Ile Asp Gln Ser Ala Leu Thr Gly Glu Ser Leu Pro Val Thr

180 185 190
 Lys Asn Pro Gly Asp Glu Val Phe Ser Gly Ser Thr Cys Lys Gln Gly
 195 200 205
 Glu Leu Glu Ala Val Val Ile Ala Thr Gly Val His Thr Phe Phe Gly
 210 215 220
 Lys Ala Ala His Leu Val Asp Ser Thr Asn Asn Val Gly His Phe Gln

 225 230 235 240
 Lys Val Leu Thr Ala Ile Gly Asn Phe Cys Ile Cys Ser Ile Ala Ile
 245 250 255
 Gly Met Leu Val Glu Ile Ile Val Met Tyr Pro Ile Gln His Arg Lys
 260 265 270
 Tyr Arg Asp Gly Ile Asp Asn Leu Leu Val Leu Leu Ile Gly Gly Ile
 275 280 285
 Pro Ile Ala Met Pro Thr Val Leu Ser Val Thr Met Ala Ile Gly Ser
 290 295 300

 His Arg Leu Ser Gln Gln Gly Ala Ile Thr Lys Arg Met Thr Ala Ile
 305 310 315 320
 Glu Glu Met Ala Gly Met Asp Val Leu Cys Ser Asp Lys Thr Gly Thr
 325 330 335
 Leu Thr Leu Asn Lys Leu Ser Val Asp Arg Asn Leu Val Glu Val Phe
 340 345 350
 Ala Lys Gly Val Asp Lys Glu Tyr Val Leu Leu Leu Ala Ala Arg Ala
 355 360 365
 Ser Arg Val Glu Asn Gln Asp Ala Ile Asp Ala Cys Met Val Gly Met

 370 375 380
 Leu Ala Asp Pro Lys Glu Ala Arg Ala Gly Ile Arg Glu Val His Phe
 385 390 395 400
 Leu Pro Phe Asn Pro Val Asp Lys Arg Thr Ala Leu Thr Tyr Ile Asp
 405 410 415
 Asn Asn Asn Asn Trp His Arg Ala Ser Lys Gly Ala Pro Glu Gln Ile
 420 425 430
 Leu Asp Leu Cys Asn Ala Lys Glu Asp Val Arg Arg Lys Val His Ser

435 440 445
 Met Met Asp Lys Tyr Ala Glu Arg Gly Leu Arg Ser Leu Ala Val Ala
 450 455 460
 Arg Arg Thr Val Pro Glu Lys Ser Lys Glu Ser Pro Gly Gly Arg Trp
 465 470 475 480
 Glu Phe Val Gly Leu Leu Pro Leu Phe Asp Pro Pro Arg His Asp Ser
 485 490 495
 Ala Glu Thr Ile Arg Arg Ala Leu Asn Leu Gly Val Asn Val Lys Met
 500 505 510
 Ile Thr Gly Asp Gln Leu Ala Ile Ala Lys Glu Thr Gly Arg Arg Leu
 515 520 525
 Gly Met Gly Thr Asn Met Tyr Pro Ser Ala Ser Leu Leu Gly Gln Asp
 530 535 540
 Lys Asp Ser Ala Ile Ala Ser Leu Pro Ile Glu Glu Leu Ile Glu Lys
 545 550 555 560
 Ala Asp Gly Phe Ala Gly Val Phe Pro Glu His Lys Tyr Glu Ile Val
 565 570 575
 Lys Lys Leu Gln Glu Arg Lys His Ile Val Gly Met Thr Gly Asp Gly
 580 585 590
 Val Asn Asp Ala Pro Ala Leu Lys Lys Ala Asp Ile Gly Ile Ala Val
 595 600 605
 Ala Asp Ala Thr Asp Ala Ala Arg Gly Ala Ser Asp Ile Val Leu Thr
 610 615 620
 Glu Pro Gly Leu Ser Val Ile Ile Ser Ala Val Leu Thr Ser Arg Ala
 625 630 635 640
 Ile Phe Gln Arg Met Lys Asn Tyr Thr Ile Tyr Ala Val Ser Ile Thr
 645 650 655
 Ile Arg Ile Val Phe Gly Phe Met Phe Ile Ala Leu Ile Trp Lys Tyr
 660 665 670
 Asp Phe Ser Ala Phe Met Val Leu Ile Ile Ala Ile Leu Asn Asp Gly
 675 680 685

Thr Ile Met Thr Ile Ser Lys Asp Arg Val Lys Pro Ser Pro Met Pro
690 695 700

Asp Ser Trp Lys Leu Lys Glu Ile Phe Ala Thr Gly Val Val Leu Gly
705 710 715 720

Gly Tyr Gln Ala Leu Met Thr Val Val Phe Phe Trp Ala Met His Asp
725 730 735

Thr Asp Phe Phe Ser Asp Lys Phe Gly Val Lys Ser Leu Arg Asn Ser
740 745 750

Asp Glu Glu Met Met Ser Ala Leu Tyr Leu Gln Val Ser Ile Ile Ser
755 760 765

Gln Ala Leu Ile Phe Val Thr Arg Ser Arg Ser Trp Ser Phe Leu Glu
770 775 780

Arg Pro Gly Met Leu Leu Val Ile Ala Phe Met Ile Ala Gln Leu Val
785 790 795 800

Ala Thr Leu Ile Ala Val Tyr Ala Asn Trp Ala Phe Ala Arg Val Lys
805 810 815

Gly Cys Gly Trp Gly Trp Ala Gly Val Ile Trp Leu Tyr Ser Ile Ile
820 825 830

Phe Tyr Leu Pro Leu Asp Ile Met Lys Phe Ala Ile Arg Tyr Ile Leu
835 840 845

Ser Gly Lys Ala Trp Asn Asn Leu Leu Asp Asn Lys Thr Ala Phe Thr
850 855 860

Thr Lys Lys Asp Tyr Gly Lys Glu Glu Arg Glu Ala Gln Trp Ala Leu
865 870 875 880

Ala Gln Arg Thr Leu His Gly Leu Gln Pro Pro Glu Ala Thr Asn Leu
885 890 895

Phe Asn Glu Lys Asn Ser Tyr Arg Glu Leu Ser Glu Ile Ala Glu Gln
900 905 910

Ala Lys Arg Arg Ala Glu Met Ala Arg Leu Arg Glu Leu His Thr Leu
915 920 925

Lys Gly His Val Glu Ser Val Val Lys Leu Lys Gly Leu Asp Ile Glu
930 935 940

Thr Ile Gln Gln His Tyr Thr Val

945	950	
<210>	2	
<211>	2856	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	polynucleotide sequence of PMA4	
<400>	2	
atggccaagg ccatcagcct ggaggagatc aagaacgaga ccgtggacct ggagaagatc		60
cccatcgagg aggtgttcga gcagctgaag tgcaccgcg agggcctgag cgctgacgag		120
ggcgctagcc gcctgcagat tttcggcccc aacaagctgg aggagaagaa cgagagcaag		180
atcctgaagt tcctgggctt catgtggaac ccgctgagct gggtcatgga ggctgctgcc		240
gtgatggcta tcgctctggc taacggcgac ggcaagccgc cggactggca ggacttcac		300
ggcatcattt gcctgctggt catcaacagc accatcagct tcattgagga gaacaacgcc		360
ggcaacgccg ctgccgctct gatggctggc ctggctccca agaccaaggt gctgcgcgac		420
ggccggtgga gcgagcagga ggccgctatt ctggccccg gcgacatcat tagcgtgaag		480
ctgggcgaca ttatccccgc tgacgtcgc ctgctggagg gcgaccgct gaagattgac		540
cagtcgctc tgaccggcga gtcgtgccc gtgacgaaga acccggcgca cgaggtgttc		600
agcggctcga cctgcaagca gggcgagctg gaggctgtgg tcattgctac cggcgtgcac		660
accttcttcg gcaaggctgc tcacctggtg gacagcacca acaacgtggg ccacttcag		720
aaggigtgta ccgcgattgg caacttctgc atctgctcga tcgccatcgg catgctggtc		780
gagatcatcg tgatgtacct catccagcac cgcaagtacc gcgacggcat tgacaacctg		840
ctggtgctgc tgattggcgg catccccatt gctatgccca ccgtgctgag cgtgaccatg		900
gctattggca gccaccgcct gagccagcag ggcgctatta ccaagcgcat gaccgctatc		960
gaggagatgg ccggcatgga cgtgctgtgc agcgacaaga ccggcacgct gacctgaac		1020
aagctgtccg tggaccgcaa cctggctcag gtgttcgcta agggcgctga caaggagtac		1080
gtcctgctgc tggtgctcgc cgcttccgc gtcgagaacc aggacgctat tgacgcttgc		1140
atggtcggca tgctggctga cccaaggag gctcgcgctg gcattcgcga ggtccacttc		1200
ctgccgttca accccgtgga caagcgacg gctctgacct acatcgaca caacaacaac		1260
tggcaccgcg ccagcaaggg cgctcccag cagattctgg acctgtgcaa cgctaaggag		1320
gacgtccgcc gcaagggtgca cagcatgatg gacaagtacg ctgagcgcg cctgcgcagc		1380

ctggctgtgg ctgcccgcac ggtgcccag aagtccaagg agagccccgg cggccgctgg	1440
gagttcgtgg gcctgctgcc gctgttcgac ccgccgcgcc acgacagcgc tgagaccatt	1500
cgccgcgctc tgaacctggg cgtgaacgtg aagatgatca ccggcgacca gctggcgatt	1560
gctaaggaga ccggccggcg cctgggcatg ggcaccaaca tgtaccctc cgcttcgctg	1620
ctgggccagg acaaggacag cgctattgct agcctgccga tcgaggagct gattgagaag	1680
gctgacggct tcgctggcgt gttccccgag cacaagtacg agatcgtgaa gaagctgcag	1740
gagcgcaagc acatcgtcgg catgaccggc gacggcgtga acgacgtcc ggctctgaag	1800
aaggccgaca ttggcattgc tgtggccgac gctaccgacg ccgctcgcgg cgctagcgac	1860
attgtcctga ccgagccggg cctgtccgtg attattagcg ctgtgctgac ctgcgcgcc	1920
atcttcacg gcatgaagaa ctacaccatc tacgccgtgt ccatcaccat ccgcatcgtg	1980
ttcggttca tgttcattgc cctgatctgg aagtacgact tcagcgctt catggtgctg	2040
atcattgcc tctgaacga cggcaccatc atgaccatca gcaaggaccg cgtgaagccc	2100
tcgccgatgc cggacagctg gaagctgaag gagattttcg ccaccggcgt ggtgctgggc	2160
ggctaccagg ctctgatgac cgtggtgttc ttctgggcca tgcacgacac cgacttttc	2220
agcgacaagt tcggcgtgaa gtccctgcgc aacagcgacg aggagatgat gagcgcgctg	2280
tacctgcagg tgtgatcat ctgcaggcg ctgattttcg tgaccgcag ccgcagctgg	2340
tccttcctgg agcgcccggg catgctgctg gtcattgcct tcatgattgc ccagctggtg	2400
gcgacctga tcgccgtga cgttaactgg gctttcgtc gcgtgaaggg ctgcgctgg	2460
ggctgggctg gcgtgatctg gctgtactcc atcatcttct acctgccgt ggacatcatg	2520
aagttcgcca tccgtacat cctgagcggc aaggcttga acaacctgct ggacaacaag	2580
accgccttca ccaccaagaa ggactacggc aaggaggagc gcgaggctca gtgggctctg	2640
gctcagcgca cctgcacgg cctgcagccg ccggaggcta ccaacctgtt caacgagaag	2700
aacagctacc gcgagctgag cgagatgcc gagcaggcta agcgccgcgc tgagatggct	2760
cggctgcgcg agctgcacac cctgaagggc cacgtcgaga gcgtggtcaa gctgaagggc	2820
ctggacatcg agaccatcca gcagcactac accgtg	2856
<210> 3	
<211> 852	
<212> PRT	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> amino acid sequence of PMA4 Cter	
<400> 3	

Met Ala Lys Ala Ile Ser Leu Glu Glu Ile Lys Asn Glu Thr Val Asp
1 5 10 15
Leu Glu Lys Ile Pro Ile Glu Glu Val Phe Glu Gln Leu Lys Cys Thr
20 25 30
Arg Glu Gly Leu Ser Ala Asp Glu Gly Ala Ser Arg Leu Gln Ile Phe
35 40 45
Gly Pro Asn Lys Leu Glu Glu Lys Asn Glu Ser Lys Ile Leu Lys Phe
50 55 60
Leu Gly Phe Met Trp Asn Pro Leu Ser Trp Val Met Glu Ala Ala Ala
65 70 75 80
Val Met Ala Ile Ala Leu Ala Asn Gly Asp Gly Lys Pro Pro Asp Trp
85 90 95
Gln Asp Phe Ile Gly Ile Ile Cys Leu Leu Val Ile Asn Ser Thr Ile
100 105 110
Ser Phe Ile Glu Glu Asn Asn Ala Gly Asn Ala Ala Ala Ala Leu Met
115 120 125
Ala Gly Leu Ala Pro Lys Thr Lys Val Leu Arg Asp Gly Arg Trp Ser
130 135 140
Glu Gln Glu Ala Ala Ile Leu Val Pro Gly Asp Ile Ile Ser Val Lys
145 150 155 160
Leu Gly Asp Ile Ile Pro Ala Asp Ala Arg Leu Leu Glu Gly Asp Pro
165 170 175
Leu Lys Ile Asp Gln Ser Ala Leu Thr Gly Glu Ser Leu Pro Val Thr
180 185 190
Lys Asn Pro Gly Asp Glu Val Phe Ser Gly Ser Thr Cys Lys Gln Gly
195 200 205
Glu Leu Glu Ala Val Val Ile Ala Thr Gly Val His Thr Phe Phe Gly
210 215 220
Lys Ala Ala His Leu Val Asp Ser Thr Asn Asn Val Gly His Phe Gln
225 230 235 240
Lys Val Leu Thr Ala Ile Gly Asn Phe Cys Ile Cys Ser Ile Ala Ile

				245				250				255			
Gly	Met	Leu	Val	Glu	Ile	Ile	Val	Met	Tyr	Pro	Ile	Gln	His	Arg	Lys
260				265				270							
Tyr	Arg	Asp	Gly	Ile	Asp	Asn	Leu	Leu	Val	Leu	Leu	Ile	Gly	Gly	Ile
275				280				285							
Pro	Ile	Ala	Met	Pro	Thr	Val	Leu	Ser	Val	Thr	Met	Ala	Ile	Gly	Ser
290				295				300							
His	Arg	Leu	Ser	Gln	Gln	Gly	Ala	Ile	Thr	Lys	Arg	Met	Thr	Ala	Ile
305				310				315				320			
Glu	Glu	Met	Ala	Gly	Met	Asp	Val	Leu	Cys	Ser	Asp	Lys	Thr	Gly	Thr
325				330				335							
Leu	Thr	Leu	Asn	Lys	Leu	Ser	Val	Asp	Arg	Asn	Leu	Val	Glu	Val	Phe
340				345				350							
Ala	Lys	Gly	Val	Asp	Lys	Glu	Tyr	Val	Leu	Leu	Leu	Ala	Ala	Arg	Ala
355				360				365							
Ser	Arg	Val	Glu	Asn	Gln	Asp	Ala	Ile	Asp	Ala	Cys	Met	Val	Gly	Met
370				375				380							
Leu	Ala	Asp	Pro	Lys	Glu	Ala	Arg	Ala	Gly	Ile	Arg	Glu	Val	His	Phe
385				390				395				400			
Leu	Pro	Phe	Asn	Pro	Val	Asp	Lys	Arg	Thr	Ala	Leu	Thr	Tyr	Ile	Asp
405				410				415							
Asn	Asn	Asn	Asn	Trp	His	Arg	Ala	Ser	Lys	Gly	Ala	Pro	Glu	Gln	Ile
420				425				430							
Leu	Asp	Leu	Cys	Asn	Ala	Lys	Glu	Asp	Val	Arg	Arg	Lys	Val	His	Ser
435				440				445							
Met	Met	Asp	Lys	Tyr	Ala	Glu	Arg	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Ala	Val	Ala
450				455				460							
Arg	Arg	Thr	Val	Pro	Glu	Lys	Ser	Lys	Glu	Ser	Pro	Gly	Gly	Arg	Trp
465				470				475				480			
Glu	Phe	Val	Gly	Leu	Leu	Pro	Leu	Phe	Asp	Pro	Pro	Arg	His	Asp	Ser
485				490				495							

Ala Glu Thr Ile Arg Arg Ala Leu Asn Leu Gly Val Asn Val Lys Met
500 505 510

Ile Thr Gly Asp Gln Leu Ala Ile Ala Lys Glu Thr Gly Arg Arg Leu
515 520 525

Gly Met Gly Thr Asn Met Tyr Pro Ser Ala Ser Leu Leu Gly Gln Asp
530 535 540

Lys Asp Ser Ala Ile Ala Ser Leu Pro Ile Glu Glu Leu Ile Glu Lys
545 550 555 560

Ala Asp Gly Phe Ala Gly Val Phe Pro Glu His Lys Tyr Glu Ile Val
565 570 575

Lys Lys Leu Gln Glu Arg Lys His Ile Val Gly Met Thr Gly Asp Gly
580 585 590

Val Asn Asp Ala Pro Ala Leu Lys Lys Ala Asp Ile Gly Ile Ala Val
595 600 605

Ala Asp Ala Thr Asp Ala Ala Arg Gly Ala Ser Asp Ile Val Leu Thr
610 615 620

Glu Pro Gly Leu Ser Val Ile Ile Ser Ala Val Leu Thr Ser Arg Ala
625 630 635 640

Ile Phe Gln Arg Met Lys Asn Tyr Thr Ile Tyr Ala Val Ser Ile Thr
645 650 655

Ile Arg Ile Val Phe Gly Phe Met Phe Ile Ala Leu Ile Trp Lys Tyr
660 665 670

Asp Phe Ser Ala Phe Met Val Leu Ile Ile Ala Ile Leu Asn Asp Gly
675 680 685

Thr Ile Met Thr Ile Ser Lys Asp Arg Val Lys Pro Ser Pro Met Pro
690 695 700

Asp Ser Trp Lys Leu Lys Glu Ile Phe Ala Thr Gly Val Val Leu Gly
705 710 715 720

Gly Tyr Gln Ala Leu Met Thr Val Val Phe Phe Trp Ala Met His Asp
725 730 735

Thr Asp Phe Phe Ser Asp Lys Phe Gly Val Lys Ser Leu Arg Asn Ser
740 745 750

Asp Glu Glu Met Met Ser Ala Leu Tyr Leu Gln Val Ser Ile Ile Ser

755 760 765
Gln Ala Leu Ile Phe Val Thr Arg Ser Arg Ser Trp Ser Phe Leu Glu
770 775 780
Arg Pro Gly Met Leu Leu Val Ile Ala Phe Met Ile Ala Gln Leu Val
785 790 795 800
Ala Thr Leu Ile Ala Val Tyr Ala Asn Trp Ala Phe Ala Arg Val Lys
805 810 815
Gly Cys Gly Trp Gly Trp Ala Gly Val Ile Trp Leu Tyr Ser Ile Ile
820 825 830

Phe Tyr Leu Pro Leu Asp Ile Met Lys Phe Ala Ile Arg Tyr Ile Leu
835 840 845
Ser Gly Lys Ala
850

<210> 4

<211> 2556

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> polynucleotide sequence of PMA4 Cter

<400> 4

atggccaagg ccatcagcct ggaggagatc aagaacgaga ccgtggacct ggagaagatc 60
cccatcgagg aggtgttcga gcagctgaag tgcacccgcg agggcctgag cgctgacgag 120
ggcgctagcc gcctgcagat ttctggcccc aacaagctgg aggagaagaa cgagagcaag 180

atcctgaagt tcttgggctt catgtggaac ccgctgagct gggtcatgga ggctgctgcc 240
gtgatggcta tcgctctggc taacggcgac ggcaagccgc cggactggca ggacttcac 300
ggcatcattt gcctgctggt catcaacagc accatcagct tcattgagga gaacaacgcc 360
ggcaacgccg ctgccgtct gatggtggc ctggctccca agaccaaggt gctgcgcgac 420
ggccggtgga gcgagcagga ggccgctatt ctgggtcccg gcgacatcat tagcgtgaag 480
ctgggcgaca ttatccccgc tgacgtcgc ctgctggagg gcgacccgct gaagattgac 540
cagtcgctc tgaccggcga gtcgtgccc gtgacgaaga acccgggcga cgaggtgttc 600

agcggctcga cctgcaagca gggcgagctg gaggtgtgg tcattgtac cggcgtgcac 660

acctttctcg gcaaggctgc tcacctgggtg gacagcacca acaacgtggg ccacttccag	720
aaggtgctga ccgcgattgg caacttctgc atctgctcga tcgccatcgg catgctggtc	780
gagatcatcg tgatgtaccc catccagcac cgcaagtacc gcgacggcat tgacaacctg	840
ctggtgctgc tgattggcgg catccccatt gctatgccca ccgtgctgag cgtgaccatg	900
gctattggca gccaccgcct gagccagcag ggcgctatta ccaagcgcac gaccgctatc	960
gaggagatgg ccggcatgga cgtgctgtgc agcgacaaga ccggcacgct gaccctgaac	1020
aagctgtccg tggaccgcaa cctggctcag gtgttcgcta agggcgtcga caaggagtac	1080
gtcctgctgc ttgctgctcg cgcttcccgc gtcgagaacc aggacgctat tgacgcttgc	1140
atggtcggca tgctggctga cccaaggag gctcgcgctg gcattcgca ggtccacttc	1200
ctgccgttca accccgtgga caagcgcacg gctctgacct acatcgaca caacaacaac	1260
tggcaccgcg ccagcaaggg cgctcccag cagattcttg acctgtgcaa cgctaaggag	1320
gacgtccgcc gcaagggtga cagcatgatg gacaagtacg ctgagcgcgg cctgcgcagc	1380
ctggctgtgg ctgcgccac ggtgcccag aagtccaagg agagccccgg cggccgctgg	1440
gagttcgtgg gctgctgcc gctgttcgac ccgccgcgc acgacagcgc tgagaccatt	1500
cgccgcgctc tgaacctggg cgtgaacgtg aagatgatca ccggcgacca gctggcgatt	1560
gctaaggaga ccggccggcg cctgggcatg ggcaccaaca tgtaccctc cgcttcgctg	1620
ctgggccagg acaaggacag cgctattgct agcctgccga tcgaggagct gattgagaag	1680
gctgacggct tcgtggcgt gtccccgag cacaagtacg agatcgtgaa gaagctgacg	1740
gagcgcaagc acatcgtcgg catgaccggc gacggcgtga acgacgctcc ggctctgaag	1800
aaggccgaca ttggcattgc tgtggccgac gctaccgacg ccgctcgcgg cgctagcgac	1860
attgtcctga ccgagccggg cctgtccgtg attattagcg ctgtgctgac ctgcgcgcgc	1920
atcttccagc gcatgaagaa ctacaccatc tacgccgtgt ccatcaccat ccgcacgtg	1980
ttcggcttca tgttcattgc cctgatctgg aagtacgact tcagcgctt catggtgctg	2040
atcattgcca tctgaacga cggcaccatc atgacatca gcaaggaccg cgtgaagccc	2100
tcgccgatgc cggacagctg gaagctgaag gagattttcg ccaccggcgt ggtgctgggc	2160
ggctaccagg ctctgatgac cgtggtgttc ttctgggcca tgcacgacac cgacttcttc	2220
agcgacaagt tcggcgtgaa gtccctgcgc aacagcgacg aggagatgat gagcgcgctg	2280
tacctgcagg tgtcgatcat ctgcgaggcg ctgattttcg tgaccgcag ccgcagctgg	2340
tccttcttgg agcgcccggt catgctgctg gtcatcgct tcatgattgc ccagctgggtg	2400
gcgacctga tcgccgtga cgctaactgg gctttcgctc gcgtgaagggt ctgcggctgg	2460
ggctgggctg gcgtgatctg gctgtactcc atcatcttct acctgccgct ggacatcatg	2520

aagttcgcca tccgctacat cctgagcggc aaggct

2556