

명세서

발명의 명칭: 야로위아 속 변이체 및 이를 이용한 지방의 제조 방법

기술분야

- [1] 본 출원은 지방 함량 개선을 위한 효모의 개량 및 이의 제조 방법에 관한 것으로, 구체적으로 포스파티딜에탄올아민 N-메틸트랜스퍼라제(phosphatidylethanolamine N-methyltransferase, PEMT) 또는 포스포리피드 메틸트랜스퍼라제(Phospholipid methyltransferase)의 활성이 불활성화되어 지방 함량이 증가된 야로위아 속 변이형 균주, 및 상기 야로위아 속 변이형 균주를 콜린(choline)이 포함된 배지에서 배양하여 균주 내 지방을 증가시키는 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 유리 지방산, 지방 알코올, 지방산 에틸 에스테르, 알칸 등 지방산 유도체들을 생산하는 유질 효모(oleaginous yeast)는 에너지, 화장품, 식품, 사료 등 여러 분야에서 관심을 받고 있고, 관련하여 다양한 연구가 이루어지고 있다. 그 중에서도 지방산 유도체들의 전구체이자 장기 보관이 가능한 지방 형태인 트리아실글리세롤(triacylglycerol; TAG)을 다량으로 합성하려는 연구가 많이 이루어지고 있다.
- [4] 많은 연구자들은 유질 효모 내 TAG 함량을 개선시키는 방법으로 TAG 생합성 경로의 강화(예를 들어, dga1-2, slc1, ac11-2, acc1, sct1, lro1), TAG 분해 억제(예를 들어, tgl1-4, faa1, pxa1-2) 및 베타 산화(beta-oxidation) 억제 전략(예를 들어, pox1-6, mfe1, pex1-32, pot1)을 주로 사용하고 있다(US 2013-0344548 A1).
- [5] 최근에는 다양한 전략으로 효모 내 지방 함량을 개선시키려 노력하고 있으나, 주목할만한 지방함량 증가가 보이지 않는바 효모의 생육 저하를 방지하면서도 지방 생성 정도를 향상시키기 위한 대안이 필요한 실정이다.

[6]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명자들은 포스파티딜에탄올아민 N-메틸트랜스퍼라제 또는 포스포리피드 메틸트랜스퍼라제의 활성이 불활성화된 변이형 균주의 지방 생산량이 증가됨을 확인함으로써, 본 출원을 완성하였다.

[8]

과제 해결 수단

- [9] 본 출원의 하나의 목적은 포스파티딜에탄올아민 N-메틸트랜스퍼라제(phosphatidylethanolamine N-methyltransferase, PEMT) 또는 포스포리피드 메틸트랜스퍼라제(Phospholipid methyltransferase)의 활성이 불활성화된,

야로위아 속 변이형 균주를 제공하는 것이다.

- [10] 본 출원의 다른 하나의 목적은 상기 야로위아 속 변이형 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 추출물, 상기 균주의 건조물, 상기 균주의 파쇄물 및 상기 균주, 배양물, 추출물, 건조물 및 파쇄물 중 적어도 하나로부터 회수된 지방 중 적어도 하나를 포함하는, 화장용 조성물, 식품용 조성물, 사료용 조성물, 또는 의약 조성물을 제공하는 것이다.
- [11] 본 출원의 또 다른 하나의 목적은 상기 야로위아 속 변이형 균주를 배양하는 단계를 포함하는, 균주 내 지방을 증가시키는 방법을 제공하는 것이다.
- [12] 본 출원의 또 다른 하나의 목적은 상기 야로위아 속 변이형 균주를 배양하는 단계를 포함하는, 지방 제조방법을 제공하는 것이다.
- [13] 본 출원의 또 다른 하나의 목적은 상기 야로위아 속 변이형 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 추출물, 상기 균주의 건조물, 상기 균주의 파쇄물, 상기 화장용 조성물, 상기 식품용 조성물, 상기 사료용 조성물, 상기 의약 조성물, 또는 상기 야로위아 속 변이형 균주의 배양물의 지방 제조 용도를 제공하는 것이다.

[14]

발명의 효과

- [15] 본 출원의 야로위아 속 변이형 균주는 포스파티딜에탄올아민 N-메틸트랜스퍼라제 (phosphatidylethanolamine N-methyltransferase, PEMT) 또는 포스포리피드 메틸트랜스퍼라제(Phospholipid methyltransferase)의 활성의 불활성화에 의해 세포 내 지방 생성을 증가시킬 수 있다.
- [16] 본 출원의 균주 내 지방을 증가시키는 방법 및 지방의 제조방법은 상기 균주의 생육 저해를 방지함과 동시에 효과적으로 지방 생산성을 증가시킬 수 있다.
- [17] 본 출원의 화장용 조성물, 식품용 조성물, 사료용 조성물, 및 의약 조성물은 지방 함유량이 증가되어 개선된 기능성을 제공할 수 있다.

[18]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [19] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 출원에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 출원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 출원의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 출원의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.
- [20] 또한, 당해 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 통상의 실험만을 사용하여 본 출원에 기재된 본 출원의 특정 양태에 대한 다수의 등가물을 인지하거나 확인할 수 있다. 또한, 이러한 등가물은 본 출원에 포함되는 것으로 의도된다.
- [21]
- [22] 상기 목적을 달성하기 위한 본 출원의 하나의 양태는 포스파티딜에탄올아민 N-메틸트랜스퍼라제 또는 포스포리피드 메틸트랜스퍼라제의 활성이 불활성화된, 야로위아 속 변이형 균주를 제공한다.

- [23] 본 출원의 "포스파티딜에탄올아민 N-메틸트랜스퍼라제 (phosphatidylethanolamine N-methyltransferase, PEMT)"는 포스파티딜에탄올아민(PE)을 포스파티딜콜린(PC)으로 전환시키는 트랜스퍼라제 효소이다. 상기 PEMT를 통해 제조된 포스파티딜콜린은 콜린의 합성, 막 구조, VLDL 분비에 활용되어 다양한 생리학적 역할을 할 수 있다. 본 출원에서 상기 포스파티딜에탄올아민 N-메틸트랜스퍼라제는 PEMT와 혼용될 수 있다. 본 출원에서 상기 포스파티딜에탄올아민 N-메틸트랜스퍼라제는 *cho2* 유전자에 의해 코딩되는 것일 수 있다.
- [24] 본 출원의 "포스포리피드 메틸트랜스퍼라제(Phospholipid methyltransferase)"는 포스파티딜에탄올아민(PE)의 메틸화 반응을 촉매하는 효소로서, 포스파티딜콜린(PC)을 합성하는 역할을 할 수 있다. 본 출원에서 상기 포스포리피드 메틸트랜스퍼라제는 *opi3* 유전자에 의해 코딩되는 것일 수 있다.
- [25] 본 출원의 포스파티딜에탄올아민 N-메틸트랜스퍼라제 또는 포스포리피드 메틸트랜스퍼라제의 활성의 불활성화는 상기 두 효소의 활성이 각각 불활성화되거나 또는 이들의 조합이 불활성화된 것을 의미한다.
- [26] 본 출원의 목적상 상기 두 효소의 활성이 각각 불활성화되거나 모두 불활성화된 야로위아 속 변이형 균주는 야생형에 비해 균주 내 지방 함량이 증가되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [27]
- [28] 상기 "포스파티딜에탄올아민 N-메틸트랜스퍼라제" 또는 "포스포리피드 메틸트랜스퍼라제"는 공지의 데이터베이스에서 서열을 얻을 수 있으며, 공지의 데이터베이스의 예로 NCBI의 GenBank 등이 있다. 일 예로, 야로위아 속(*Yarrowia* sp.) 유래 포스파티딜에탄올아민 N-메틸트랜스퍼라제 및/또는 포스포리피드 메틸트랜스퍼라제일 수 있으며, 구체적으로 포스파티딜에탄올아민 N-메틸트랜스퍼라제는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하고, 포스포리피드 메틸트랜스퍼라제는 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드는 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 폴리펩티드, 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성되는 폴리펩티드와 혼용하여 사용될 수 있으며, 상기 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드는 서열번호 12의 아미노산 서열을 가지는 폴리펩티드, 서열번호 12의 아미노산 서열로 구성되는 폴리펩티드와 혼용하여 사용될 수 있다. 또한, 상기 아미노산 서열과 동일한 활성을 갖는 폴리펩티드의 서열은 제한없이 포함될 수 있다.
- [29] 또한, 포스파티딜에탄올아민 N-메틸트랜스퍼라제의 서열번호 2의 아미노산 서열 및/또는 포스포리피드 메틸트랜스퍼라제의 서열번호 12의 아미노산 서열 또는 이와 30% 이상의 상동성(homology) 또는 동일성(identity)을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 구체적으로 상기 폴리펩티드는 포스파티딜에탄올아민 N-메틸트랜스퍼라제의 서열번호 2

및/또는 포스포리피드 메틸트랜스퍼라제의 서열번호 12와 적어도 30%, 60%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 가지는 폴리펩티드 아미노산을 포함할 수 있다. 또한, 이러한 상동성 또는 동일성을 가지며 상기 폴리펩티드에 상응하는 효능을 나타내는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드도 본 출원의 범위 내에 포함됨은 자명하다.

- [30] 즉, 본 출원에서 '특정 서열번호로 기재된 아미노산 서열로 이루어진 단백질 또는 폴리펩티드'라고 기재되어 있다 하더라도, 해당 서열번호의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드와 동일 혹은 상응하는 활성을 가지는 경우라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드도 본 출원에서 사용될 수 있음은 자명하다. 예를 들어, '서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드'는, 이와 동일 혹은 상응하는 활성을 가지는 경우라면 '서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드'에 속할 수 있음은 자명하다.
- [31] 본 출원에서 상기 포스파티딜에탄올아민 N-메틸트랜스퍼라제 및 포스포리피드 메틸트랜스퍼라제를 코딩하는 유전자는 각각 *cho2* 및 *opi3* 유전자일 수 있다. 본 출원의 상기 아미노산을 코딩하는 유전자 서열은 포스파티딜에탄올아민 N-메틸트랜스퍼라제 및/또는 포스포리피드 메틸트랜스퍼라제를 코딩하는 서열번호 1 및/또는 서열번호 11의 폴리뉴클레오티드 서열일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한 상기 폴리뉴클레오티드 서열과 동일한 활성을 갖는 서열은 제한없이 포함될 수 있다. 상기 *cho2* 유전자는 서열번호 2의 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열일 수 있으며, 보다 구체적으로는 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 서열일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 서열 및 상기 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1의 염기서열을 가지는 폴리뉴클레오티드, 서열번호 1의 염기서열로 구성되는 폴리뉴클레오티드, 및 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드 서열로 이루어지는 유전자와 혼용하여 사용될 수 있다.
- [32] 상기 *opi3* 유전자는 서열번호 12의 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열일 수 있으며, 보다 구체적으로는 서열번호 11의 염기서열을 포함하는 서열일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 서열번호 11의 염기서열을 포함하는 서열 및 상기 서열번호 11의 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 11의 염기서열을 가지는 폴리뉴클레오티드, 서열번호 11의 염기서열로 구성되는 폴리뉴클레오티드, 및 상기 *opi3* 유전자는 서열번호 11의 폴리뉴클레오티드 서열로 이루어지는 유전자와 혼용하여 사용될 수 있다.
- [33] 본 출원에서 용어 "폴리뉴클레오티드"는 뉴클레오티드 단위체(monomer)가 공유결합에 의해 길게 사슬모양으로 이어진 뉴클레오티드의 중합체(polymer)로, 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).

- [34] 상기 폴리뉴클레오티드는 본 출원의 포스파티딜에탄올아민 N-메틸트랜스퍼라제 및/또는 포스포리피드 메틸트랜스퍼라제 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 본 출원의 포스파티딜에탄올아민 N-메틸트랜스퍼라제 및/또는 포스포리피드 메틸트랜스퍼라제 폴리펩티드와 적어도 30%, 60%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 가지는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 또한, 이러한 상동성 또는 동일성을 가지며 상기 폴리펩티드를 코딩하는 유전자 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 폴리뉴클레오티드 서열도 본 출원의 범위 내에 포함됨은 자명하다.
- [35] 또한, 코돈 축퇴성 (codon degeneracy)에 의해 서열번호 2 및/또는 12 또는 서열번호 2 및/또는 12와 30% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 또는 이와 상동성 또는 동일성을 가지는 폴리펩티드로 번역될 수 있는 폴리뉴클레오티드 역시 포함될 수 있음은 자명하다. 또는 공지의 유전자 서열로부터 조제될 수 있는 프로브, 예를 들면, 상기 폴리뉴클레오티드 서열의 전체 또는 일부에 대한 상보 서열과 엄격한 조건 하에 하이브리드화하여, 서열번호 2의 아미노산 서열과 30% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열이라면 제한없이 포함될 수 있다. 상기 "엄격한 조건"이란 폴리뉴클레오티드 간의 특이적 혼성화를 가능하게 하는 조건을 의미한다. 이러한 조건은 문헌 (예컨대, J. Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, 1989; F.M. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., New York)에 구체적으로 기재되어 있다. 예를 들어, 상동성 또는 동일성이 높은 유전자끼리, 30% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 구체적으로는 85% 이상, 구체적으로는 90% 이상, 보다 구체적으로는 95% 이상, 더욱 구체적으로는 97% 이상, 특히 구체적으로는 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 갖는 유전자끼리 하이브리드화하고, 그보다 상동성 또는 동일성이 낮은 유전자끼리 하이브리드화하지 않는 조건, 또는 통상의 써던 하이브리드화의 세척 조건인 60°C, 1XSSC, 0.1% SDS, 구체적으로는 60°C, 0.1XSSC, 0.1% SDS, 보다 구체적으로는 68°C, 0.1XSSC, 0.1% SDS에 상당하는 염 농도 및 온도에서, 1회, 구체적으로는 2회 내지 3회 세정하는 조건을 열거할 수 있다.
- [36] 혼성화는 비록 혼성화의 엄격도에 따라 염기 간의 미스매치(mismatch)가 가능할지라도, 두 개의 폴리뉴클레오티드가 상보적 서열을 가질 것을 요구한다. 용어, "상보적"은 서로 혼성화가 가능한 뉴클레오티드 염기 간의 관계를

기술하는데 사용된다. 예를 들면, DNA에 관하여, 아데닌은 티민에 상보적이며 시토신은 구아닌에 상보적이다. 따라서, 본 출원은 또한 실질적으로 유사한 폴리뉴클레오티드 서열뿐만 아니라 전체 서열에 상보적인 단리된 폴리뉴클레오티드 단편을 포함할 수 있다.

- [37] 구체적으로, 상동성 또는 동일성을 가지는 폴리뉴클레오티드는 55 °C의 T_m 값에서 혼성화 단계를 포함하는 혼성화 조건을 사용하고 상술한 조건을 사용하여 탐지할 수 있다. 또한, 상기 T_m 값은 60 °C, 63 °C 또는 65 °C일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니고 그 목적에 따라 당업자에 의해 적절히 조절될 수 있다.
- [38] 폴리뉴클레오티드를 혼성화하는 적절한 엄격도는 폴리뉴클레오티드의 길이 및 상보성 정도에 의존하고 변수는 해당기술분야에 잘 알려져 있다(예컨대, J. Sambrook et al., 상동).
- [39]
- [40] 본 출원에서 용어, "상동성(homology)" 또는 "동일성(identity)"은 두 개의 주어진 아미노산 서열 또는 염기 서열과 서로 관련된 정도를 의미하며 백분율로 표시될 수 있다. 용어 상동성 및 동일성은 종종 상호교환적으로 이용될 수 있다.
- [41] 보존된 (conserved) 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 서열 상동성 또는 동일성은 표준 배열 알고리즘에 의해 결정되며, 사용되는 프로그램에 의해 확립된 디폴트 갭 페널티가 함께 이용될 수 있다. 실질적으로, 상동성을 갖거나 (homologous) 또는 동일한 (identical) 서열은 중간 또는 높은 엄격한 조건(stringent conditions)에서 일반적으로 서열 전체 또는 전체-길이의 적어도 약 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90% 이상으로 하이브리드할 수 있다. 하이브리드화는 폴리뉴클레오티드에서 코돈 대신 축퇴 코돈을 함유하는 폴리뉴클레오티드 또한 고려된다.
- [42] 임의의 두 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열이 상동성, 유사성 또는 동일성을 갖는지 여부는 예를 들어, Pearson et al (1988)[Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85]: 2444에서와 같은 디폴트 파라미터를 이용하여 "FASTA" 프로그램과 같은 공지의 컴퓨터 알고리즘을 이용하여 결정될 수 있다. 또는, EMBOSS 패키지의 니들만 프로그램(EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277)(버전 5.0.0 또는 이후 버전)에서 수행되는 바와 같은, 니들만-운치(Needleman-Wunsch) 알고리즘(Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453)이 사용되어 결정될 수 있다. (GCG 프로그램 패키지 (Devereux, J., et al, Nucleic Acids Research 12: 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, [S.] [F.,] [ET AL, J MOLEC BIOL 215]: 403 (1990); Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, [ED.,] Academic Press, San Diego, 1994, 및 [CARILLO ETA/.,](1988) SIAM J Applied Math 48: 1073을 포함한다). 예를 들어, 국립 생물공학 정보 데이터베이스 센터의 BLAST, 또는 ClustalW를 이용하여 상동성, 유사성 또는 동일성을 결정할 수 있다.

- [43] 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 상동성, 유사성 또는 동일성은 예를 들어, Smith and Waterman, Adv. Appl. Math (1981) 2:482에 공지된 대로, 예를 들면, Needleman et al. (1970), J Mol Biol.48: 443과 같은 GAP 컴퓨터 프로그램을 이용하여 서열 정보를 비교함으로써 결정될 수 있다. 요약하면, GAP 프로그램은 두 서열 중 더 짧은 것에서의 기호의 전체 수로, 유사한 배열된 기호(즉, 뉴클레오티드 또는 아미노산)의 수를 나눈 값으로 정의한다. GAP 프로그램을 위한 디폴트 파라미터는 (1) 일진법 비교 매트릭스(동일성을 위해 1 그리고 비-동일성을 위해 0의 값을 함유함) 및 Schwartz and Dayhoff, eds., Atlas Of Protein Sequence And Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358 (1979)에 의해 개시된 대로, Gribskov et al(1986) Nucl. Acids Res. 14: 6745의 가중된 비교 매트릭스 (또는 EDNAFULL(NCBI NUC4.4의 EMBOSS 버전) 치환 매트릭스); (2) 각 갭을 위한 3.0의 페널티 및 각 갭에서 각 기호를 위한 추가의 0.10 페널티 (또는 갭 개방 페널티 10, 갭 연장 페널티 0.5); 및 (3) 말단 갭을 위한 무 페널티를 포함할 수 있다. 따라서, 본원에서 사용된 것으로서, 용어 "상동성" 또는 "동일성"은 서열들간의 관련성(relevance)을 나타낸다.
- [44]
- [45] 본 출원의 폴리펩티드 또는 단백질 활성의 "불활성화"는 상기 폴리펩티드 또는 단백질의 발현이 천연의 야생형 균주, 모균주 또는 해당 폴리펩티드 또는 단백질이 비변형된 균주에 비하여 전혀 발현이 되지 않거나 또는 발현이 되더라도 그 활성이 없거나 감소된 것을 의미한다. 상기 불활성화는 약화, 하향조절(down-regulation), 감소(decrease), 저하(reduce) 등의 용어와 혼용될 수 있다. 이때, 상기 불활성화는 상기 폴리펩티드를 암호화하는 유전자의 변이, 발현조절서열의 변형, 유전자 일부 또는 전체의 결손 등으로 폴리펩티드의 활성이 본래 미생물이 가지고 있는 폴리펩티드의 활성에 비해 감소 또는 제거된 경우와, 이를 암호화하는 유전자의 발현 저해 또는 번역(translation) 저해 등으로 세포 내에서 전체적인 폴리펩티드의 활성 정도가 천연형 균주 또는 변형전의 균주에 비하여 낮은 경우, 상기 유전자의 발현이 전혀 이루어지지 않은 경우, 및 발현이 되더라도 활성이 없는 경우, 및 이들의 조합 역시 포함하는 개념이다.
- [46] 본 출원에 있어서, 상기 불활성화는 이로 제한되는 것은 아니며, 당해 분야에 잘 알려진 다양한 방법의 적용으로 달성될 수 있다(Nakashima N et al., Bacterial cellular engineering by genome editing and gene silencing. Int J Mol Sci. 2014;15(2):2773-2793, Sambrook et al. Molecular Cloning 2012 등). 상기 방법의 예로, 상기 폴리펩티드를 암호화하는 염색체상의 유전자의 전체 또는 일부를 결실시키는 방법; 상기 효소의 활성이 감소되도록 돌연변이된 유전자로, 염색체상의 상기 폴리펩티드를 암호화하는 유전자를 대체하는 방법; 상기 폴리펩티드를 암호화하는 염색체상의 유전자의 발현 조절 서열에 변이를 도입하는 방법; 상기 폴리펩티드를 암호화하는 유전자의 발현 조절 서열을 활성이 약하거나 없는 서열로 교체하는 방법(예컨대, 상기 유전자의 프로모터를

내재적 프로모터보다 약한 프로모터로 교체하는 방법); 상기 폴리펩티드를 암호화하는 염색체상의 유전자의 전체 또는 일부를 결실시키는 방법; 상기 폴리펩티드를 암호화하는 염색체상의 유전자의 전사체에 상보적으로 결합하여 상기 mRNA로부터 단백질 또는 폴리펩티드로의 번역을 저해하는 안티센스 올리고뉴클레오티드(예컨대, 안티센스 RNA)를 도입하는 방법; 상기 폴리펩티드를 암호화하는 유전자의 SD 서열 앞단에 SD 서열과 상보적인 서열을 인위적으로 부가하여 2차 구조물을 형성시켜 리보솜(ribosome)의 부착이 불가능하게 만드는 법; 및 상기 폴리펩티드를 암호화하는 상기 유전자의 폴리뉴클레오티드 서열의 ORF(open reading frame)의 3' 말단에 역전사되도록 프로모터를 부가하는 RTE(Reverse transcription engineering) 방법 등이 있으며, 이들의 조합으로도 달성할 수 있으나, 상기 예에 의해 특별히 제한되는 것은 아니다.

- [47] 구체적으로, 단백질 또는 폴리펩티드를 암호화하는 유전자의 일부 또는 전체를 결실하는 방법은, 미생물 내 염색체 삽입용 벡터를 통해 염색체 내 내재적 목적 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 일부 핵산 서열이 결실된 폴리뉴클레오티드 또는 마커 유전자로 교체함으로써 수행될 수 있다. 이의 일례로 상동재조합에 의하여 유전자를 결실시키는 방법을 사용할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 또한, 상기에서 "일부"란 폴리뉴클레오티드의 종류에 따라서 상이하고, 당업자가 적절히 결정할 수 있으나, 구체적으로는 1 내지 300개, 보다 구체적으로는 1 내지 100개, 보다 더 구체적으로는 1 내지 50개일 수 있다. 그러나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [48] 상기 유전자의 일부 또는 전체를 결손시키는 방법은 자외선과 같은 빛 또는 화학물질을 이용하여 돌연변이를 유발하고, 얻어진 돌연변이체로부터 목적 유전자가 결손된 균주를 선별하여 수행될 수 있다. 상기 유전자 결손 방법에는 DNA 재조합 기술에 의한 방법이 포함된다. 상기 DNA 재조합 기술에는 예를 들면, 목적 유전자와 상동성이 있는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열 또는 벡터를 상기 미생물에 주입하여 상동 재조합(homologous recombination)이 일어나게 함으로써 이루어질 수 있다. 또한, 상기 주입되는 뉴클레오티드 서열 또는 벡터에는 우성 선별 마커를 포함할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [49] 또한, 발현 조절서열을 변형하는 방법은 상기 발현 조절서열의 활성을 더욱 약화하도록 핵산 서열을 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합으로 발현 조절 서열상의 변이를 유도하여 수행하거나, 더욱 약한 활성을 갖는 핵산 서열로 교체함으로써 수행할 수 있다. 상기 발현 조절서열에는 프로모터, 오퍼레이터 서열, 리보솜 결합부위를 코딩하는 서열, 및 전사와 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [50] 아울러, 염색체상의 유전자 서열을 변형하는 방법은 상기 폴리펩티드의 활성을 더욱 약화하도록 유전자 서열을 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는

이들의 조합으로 서열상의 변이를 유도하여 수행하거나, 더욱 약한 활성을 갖도록 개량된 유전자 서열 또는 활성이 없도록 개량된 유전자 서열로 교체함으로써 수행할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [51] 다만 상기와 같은 기재는 한 가지 예에 불과하며, 이에 제한되지 않고, 다양한 공지의 지방 함량을 증가시키는 생합성경로의 효소를 암호화하는 유전자의 발현을 증진시키거나 관련된 경로의 효소를 불활성화시키거나, 지방 생합성 경로상의 중간체, 보조인자, 또는 에너지를 소모하는 경로상의 효소를 불활성화 시킨 미생물일 수 있다. 상기의 지방 함량을 증가시킨 미생물은 공지의 다양한 방법을 적용하여 제조될 수 있다.
- [52] 본 출원의 목적상 본 출원의 미생물은 상기 포스파티딜에탄올아민 N-메틸트랜스퍼라제 (phosphatidylethanolamine N-methyltransferase, PEMT) 또는 포스포리피드 메틸트랜스퍼라제(Phospholipid methyltransferase)의 활성이 불활성화되고, 비변형 미생물 또는 야생형에 비해 증가된 지방함량을 갖는 미생물이라면 모두 가능하다.
- [53] 본 출원에서 "비변형 미생물"은 천연형 균주 자체이거나 포스파티딜에탄올아민 N-메틸트랜스퍼라제 또는 포스포리피드 메틸트랜스퍼라제의 활성이 저하 또는 불활성화되지 않은 미생물을 의미할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 "비변형 미생물"은 "변형 전 균주", "변형 전 미생물", "비변이 균주", "비변형 균주", "비변이 미생물", "비변형 미생물" 또는 "기준 미생물"과 혼용될 수 있다.
- [54]
- [55] 본 출원의 "야생형"은 유전형질에 있어서 돌연변이에 의해 새로운 변이형을 종 내에서 보일 때, 본래 가지고 있던 보편적인 표현형을 의미한다.
- [56] 본 출원의 야생형 균주는 야로위아 속 균주일 수 있다. 상기 "야로위아 속"은 디포다스카세아에(Dipodascaceae) 계통의 진균 속으로, 상기 속은 탄화수소와 같은 비정상적인 탄소원을 사용할 수 있는 효모로서, 단형(monotypic)일 수 있다. 상기 야로위아 속 균주는 구체적으로 야로위아 부풀라(*Yarrowia bubula*), 야로위아 데포르만스(*Yarrowia deformans*), 야로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*), 야로위아 포르시나(*Yarrowia porcina*), 야로위아 야쿠시멘시스(*Yarrowia yakushimensis*)일 수 있고, 보다 구체적으로 야로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [57]
- [58] 본 출원의 "변이형 균주"는 유전형질에 있어 돌연변이에 의해 새로운 변이형을 미생물 균주 내에서 보일 때, 가지는 새로운 표현형을 갖는 균주를 의미한다.
- [59] 본 출원의 "야로위아 속 변이형 균주"는 포스파티딜에탄올아민 N-메틸트랜스퍼라제 활성이 불활성화되거나, 포스포리피드 메틸트랜스퍼라제의 활성이 불활성화되거나, 포스파티딜에탄올아민 N-메틸트랜스퍼라제 및 포스포리피드 메틸트랜스퍼라제의 활성이 불활성화된

야로위아 속 균주일 수 있다.

[60] 또한, 상기 포스파티딜에탄올아민 N-메틸트랜스퍼라제를 코딩하는 *cho2* 유전자, 상기 포스포리피드 메틸트랜스퍼라제를 코딩하는 *opi3* 유전자 또는 이들의 조합이 결손된 야로위아 속 균주일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[61] 구체적으로, 본 출원의 목적상 상기 야로위아 속 변이형 균주는 포스파티딜에탄올아민 N-메틸트랜스퍼라제 또는 포스포리피드 메틸트랜스퍼라제의 활성이 불활성화되어 야생형에 비하여 균주 내 지방 함량이 증가된 것이면 제한되지 않는다.

[62] 본 출원에서 상기 "야생형에 비해 증가된 지방함량을 갖는 미생물"은 "지방을 생산하는 미생물", "지방 생산능을 갖는 미생물", "지방 생산용 미생물", "트리아실글리세롤(TAG)을 생산하는 미생물", "트리아실글리세롤(TAG) 생산능을 갖는 미생물", "트리아실글리세롤(TAG) 생산용 미생물"과 혼용되어 사용될 수 있다.

[63]

[64] 상기 야로위아 속 변이형 균주는 콜린(choline) 요구성이 부여되는 콜린 영양요구주일 수 있다. 상기 "콜린(choline)"은 무색의 강염기성이며, 인지질, 아세틸콜린, 비타민 B군 등의 구성 성분이다. 생물체 내에서 세린, 에탄올아민을 거쳐 콜린의 경로로 합성되며, 트리메틸아민과 에틸렌옥시드로 화학합성되기도 한다.

[65] 본 출원의 목적상 상기 균주는 콜린 요구성 영양요구주로서 콜린이 포함된 배지에서 배양시키는 경우, 균주의 생장 회복이 가능하면서도 동시에 균주 내 지방 함량이 증가될 수 있다.

[66]

[67] 본 출원의 "지방"은 지질의 한 종류로 세 개의 지방산이 하나의 글리세롤과 결합한 에스테르로서, 대표적인 유기물이다. 생물체 내 함유되어 있고, 에너지원으로 사용될 수 있다. 구체적으로, 상기 지방은 트리아실글리세롤(triacylglycerol (TAG))일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[68] 상기 "트리아실글리세롤(TAG)"은 지질의 한 종류로서 글리세린 한 분자에 지방산 3분자가 에스터(ester) 결합을 하는 구조를 가지고 있는 중성지방이다. 상기 TAG 함량을 증가시키기 위해 TAG 생합성 경로의 강화, TAG 분해의 억제 및 베타 산화(beta-oxidation) 억제 전략이 사용될 수 있다. 상기 용어 "지방"은 "TAG", "트리아실글리세롤", 또는 "triacylglycerol"과 혼용되어 사용될 수 있다. 또한, TAG는 지방산 유도체들의 전구체이자 장기 보관이 가능한 지방 형태일 수 있다.

[69]

[70] 본 출원의 다른 하나의 양태는 본 출원의 야로위아 속 변이형 균주; 상기 균주의 배양물; 상기 균주의 추출물; 상기 균주의 건조물; 상기 균주의 파쇄물; 및 상기 균주, 배양물, 추출물, 건조물 및 파쇄물 중 적어도 하나로부터 회수된 지방;

중 적어도 하나를 포함하는 화장용 조성물, 식품용 조성물, 사료용 조성물, 또는 의약 조성물을 제공한다.

- [71] 본 출원의 "야로위아 속", 및 "야로위아 속 변이형 균주"는 상기에서 기재한 바와 같다.
- [72] 본 출원의 목적상 상기 조성물은 포스파티딜에탄올아민 N-메틸트랜스퍼라제 또는 포스포리피드 메틸트랜스퍼라제의 활성이 불활성화된 야생형에 비하여 균주 내 증가된 지방 함량을 갖는 야로위아 속 변이형 균주 자체를 포함할 수도 있으며, 상기 균주의 배양물, 건조물, 추출물 또는 파쇄물을 포함할 수 있다. 뿐만 아니라, 상기 조성물은 본 출원의 균주, 상기 균주의 배양물, 건조물, 추출물, 파쇄물 중 적어도 어느 하나로부터 회수된 지방을 포함할 수 있다. 그러나, 상기 조성물은 본 출원의 목적을 벗어나지 않는 범위 내에서 목적하는 TAG의 함량을 증가시킬 수 있는 한 어떠한 형태로든 제한 없이 포함할 수 있다.
- [73]
- [74] 본 출원의 "화장용 조성물"은 용액, 외용 연고, 크림, 폼, 영양화장수, 유연 화장수, 팩, 유연수, 유액, 메이크업 베이스, 에센스, 비누, 액체 세정료, 입욕제, 선 스크린 크림, 선 오일, 헤팅액, 유탕액, 페이스트, 젤, 로션, 파우더, 비누, 계면 활성제-함유 클렌징, 오일, 분말 파운데이션, 유탕액 파운데이션, 왁스 파운데이션, 패취 및 스프레이로 구성된 군에서 선택되는 제형으로 제조할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [75] 상기 화장용 조성물은 일반 피부 화장료에 배합되는 화장품학적으로 허용 가능한 담체를 1 종 이상 추가로 포함할 수 있으며, 통상의 성분으로 예를 들면 유분, 물, 계면 활성제, 보습제, 저급 알코올, 증점제, 킬레이트제, 색소, 방부제, 향료 등을 적절히 배합할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 출원의 화장용 조성물에 포함되는 화장품학적으로 허용 가능한 담체는 화장료 조성물의 제형에 따라 다양하다.
- [76] 본 출원의 화장용 조성물은 상기 야로위아 속 변이형 균주; 상기 균주의 배양물; 상기 균주의 추출물; 상기 균주의 건조물; 상기 균주의 파쇄물; 및 상기 균주, 배양물, 추출물, 건조물 및 파쇄물 중 적어도 하나로부터 회수된 지방; 중 적어도 하나를 포함하여 증대된 지방함량을 포함할 수 있다.
- [77] 본 출원의 "식품용 조성물"은 기능성 식품(functional food), 영양 보조제(nutritional supplement), 건강 식품(health food) 및 식품 첨가제(food additives)등의 모든 형태를 포함하며, 상기 유형의 식품용 조성물은 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라 다양한 형태로 제조할 수 있다.
- [78] 본 출원의 식품용 조성물은 환제, 분말, 과립, 칩제, 정제, 캡슐 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 본 출원의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 예를 들어, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등이 있다.
- [79] 본 출원의 식품용 조성물에서 포함할 수 있는 성분으로 통상의 식품과 같이 여러가지 생약추출물, 식품 보조 첨가제 또는 천연 탄수화물 등을 추가

성분으로서 함유할 수 있다. 또한, 상기 식품 보조 첨가제는 당업계에 통상적인 식품 보조 첨가제, 예를 들어 향미제, 풍미제, 착색제, 충전제, 안정화제 등을 포함한다.

- [80] 상기 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외에 향미제로서 천연 향미제(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.
- [81] 상기 외에 본 출원의 식품용 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 충전제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 이의 염, 알긴산 및 이의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 천연 과일쥬스 및 과일 쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.
- [82] 본 출원의 식품용 조성물의 제조시에는 당 업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 상기 식품의 제형 또한 식품으로 인정되는 제형이면 제한 없이 제조될 수 있다. 본 출원의 식품 조성물은 다양한 형태의 제형으로 제조될 수 있으며, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나, 본 출원의 식품은 보조제로 섭취가 가능하다.
- [83] 본 출원의 식품용 조성물은 상기 야로위아 속 변이형 균주; 상기 균주의 배양물; 상기 균주의 추출물; 상기 균주의 건조물; 상기 균주의 파쇄물; 및 상기 균주, 배양물, 추출물, 건조물 및 파쇄물 중 적어도 하나로부터 회수된 지방; 중 적어도 하나를 포함하여 증대된 지방함량을 포함할 수 있다.
- [84] 본 출원의 "사료용 조성물"은 동물이 먹고, 섭취하며, 소화시키기 위한 또는 이에 적당한 임의의 천연 또는 인공 규정식, 한끼식 등 또는 상기 한끼식의 성분으로는 당업계의 공지된 다양한 형태의 사료로 제조가능하며, 구체적으로는 농후사료, 조사료 및/또는 특수사료가 포함될 수 있다.
- [85] 상기 사료의 종류는 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 사료를 사용할 수 있다. 상기 사료의 비제한적인 예로는, 곡물류, 근과류, 식품 가공 부산물류, 조류, 섬유질류, 제약 부산물류, 유지류, 전분류, 박 류 또는 곡물 부산물류 등과 같은 식물성 사료; 단백질류, 무기물류, 유지류, 광물성류, 유지류, 단세포 단백질류, 동물성 플랑크톤류 또는 음식물 등과 같은 동물성 사료를 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다.
- [86] 본 출원의 사료용 조성물은 상기 야로위아 속 변이형 균주; 상기 균주의

배양물; 상기 균주의 추출물; 상기 균주의 건조물; 상기 균주의 파쇄물; 및 상기 균주, 배양물, 추출물, 건조물 및 파쇄물 중 적어도 하나로부터 회수된 지방; 중 적어도 하나를 포함하여 증대된 지방함량을 포함할 수 있다.

- [87] 본 출원의 "의약 조성물"은 질병의 예방 또는 치료를 목적으로 제조된 것을 의미하며, 각각 통상의 방법에 따라 다양한 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 예컨대, 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽 등의 경구형 제형으로 제형화할 수 있고, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [88] 또한, 각각의 제형에 따라 약학적으로 허용가능한 담체, 예컨대 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제, 기제, 부형제, 윤활제 등 당업계에 공지된 담체를 추가로 포함하여 제조할 수 있다.
- [89] 한편, 본 출원의 의약 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 출원의 용어 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 건강상태, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.
- [90] 본 출원의 의약 조성물은 상기 야로위아 속 변이형 균주; 상기 균주의 배양물; 상기 균주의 추출물; 상기 균주의 건조물; 상기 균주의 파쇄물; 및 상기 균주, 배양물, 추출물, 건조물 및 파쇄물 중 적어도 하나로부터 회수된 지방; 중 적어도 하나를 포함하여 증대된 지방함량을 포함할 수 있다
- [91] 본 출원의 목적상 균주 내 지방함량의 증가는 TAG가 증가된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [92]
- [93] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 본 출원의 야로위아 속 변이형 균주를 배양하는 단계를 포함하는, 균주 내 지방을 증가시키는 방법을 제공한다.
- [94] 본 출원의 "야로위아 속", "야로위아 속 변이형 균주", 및 "지방"은 상기에서 기재한 바와 같다.
- [95] 본 출원의 "배양"은 상기 야로위아 속 변이형 균주를 적절히 조절된 환경 조건에서 생육시키는 것을 의미한다. 본 출원의 배양 과정은 당업계에 알려진 적절한 배지와 배양조건에 따라 이루어질 수 있다. 이러한 배양 과정은 선택되는 균주에 따라 당업자가 용이하게 조정하여 사용할 수 있다.
- [96] 상기 균주를 배양하는 단계는, 특별히 제한되지 않으나, 공지된 회분식 배양방법, 연속식 배양방법, 유가식 배양방법 등에 의해 수행될 수 있다. 이때, 배양조건은, 특별히 이에 제한되지 않으나, 혐기성 화합물 (예: 수산화나트륨, 수산화칼륨 또는 암모니아) 또는 산성 화합물 (예: 인산 또는 황산)을 사용하여 적정 pH (예컨대, pH 5 내지 9, 구체적으로는 pH 6 내지 8, 가장 구체적으로는 pH

6.8)를 조절할 수 있고, 산소 또는 산소-함유 가스 혼합물을 배양물에 도입시켜 호기성 조건을 유지할 수 있다. 배양온도는 20 내지 45°C 구체적으로는 25 내지 40°C를 유지할 수 있고, 약 10 내지 160 시간 동안 배양할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [97] 본 출원의 "배지"는 상기 야로위아 속 변이형 균주를 배양하기 위해 필요로 하는 영양물질을 주성분으로 혼합한 물질을 포함하는 배양 배지 및/또는 배양한 다음 수득한 산물을 의미한다. 본 출원의 미생물의 배양에 사용되는 배지 및 기타 배양 조건은 통상의 미생물의 배양에 사용되는 배지라면 특별한 제한 없이 어느 것이나 사용할 수 있으나, 본 출원의 미생물을 적당한 탄소원, 질소원, 인원, 무기화합물, 아미노산 및/또는 비타민 등을 함유한 통상의 배지 내에서 호기성 조건 하에서 온도, pH 등을 조절하면서 배양할 수 있다.
- [98] 본 출원에서 사용되는 배양용 배지는 탄소원으로는 당 및 탄수화물(예: 글루코오스, 수크로오스, 락토오스, 프럭토오스, 갈락토오스, 만노오스, 말토오스, 아라비노오스, 자일로오스, 몰라세, 전분 및 셀룰로오스), 유지 및 지방(예: 대두유, 해바라기씨유, 땅콩유 및 코코넛유), 지방산(예: 팔미트산, 스테아르산 및 리놀레산), 알코올(예: 글리세롤 및 에탄올) 및 유기산(예: 아세트산) 등을 개별적으로 사용하거나 또는 혼합하여 사용할 수 있고, 구체적으로, 상기 탄소원은 글루코오스, 프럭토오스, 말토오스, 갈락토오스, 만노오스, 수크로오스, 아라비노오스, 자일로오스 및 글리세롤로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 본 출원에서 사용되는 배양용 배지는 탄소원으로서 10 내지 50 g/L, 10 내지 40 g/L, 20 내지 50 g/L, 20 내지 40 g/L 또는 25 내지 35 g/L 농도의 글루코오스가 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [99] 본 출원에서 사용되는 배양용 배지의 질소원은 유기질소원 또는 무기질소원으로 구별될 수 있으나, 유기질소원 또는 무기질소원을 개별적으로 사용하거나 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 구체적으로 상기 질소원은 효모 추출물, 우육 추출물(beef extract), 펩톤(peptone) 및 트립톤(tryptone)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 유기질소원 또는 암모늄 아세테이트, 암모늄 나이트레이트, 암모늄 클로라이드, 암모늄 설페이트, 소듐 나이트레이트, 우레아 및 MSG(Monosodium glutamate)로 이루어진 군으로부터 선택되는 무기질소원일 수 있다. 또한, 본 출원에서 사용되는 배양용 배지에는 질소원의 일 예로 효모 추출물, 암모늄 설페이트, 소듐 나이트레이트 및 MSG를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [100] 상기 효모 추출물은 배지 내에 0.1 내지 10 g/L, 0.5 내지 10g/L, 0.5 내지 7 g/L, 0.5 내지 5 g/L, 0.5 내지 3 g/L, 0.5 내지 2 g/L 또는 0.5 내지 1.5 g/L 농도로 포함될 수 있고, 상기 암모늄 설페이트는 배지 내에 1 내지 5g/L, 1 내지 4 g/L, 2 내지 5 g/L, 2 내지 4 g/L 농도로 포함될 수 있고, 상기 소듐 나이트레이트는 배지 내에 0.1 내지 10 g/L, 0.5 내지 9 g/L, 1 내지 9 g/L, 2 내지 9 g/L, 3 내지 9 g/L, 5 내지 9

g/L 또는 7 내지 9 g/L 농도로 포함될 수 있으며, 상기 MSG는 배지 내에 0.1 내지 2 g/L, 0.1 내지 1.5 g/L, 0.5 내지 2 g/L, 0.5 내지 1.5 g/L 농도로 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[101]

[102] 본 출원의 야로위아 속 변이형 균주를 배양하는 단계는 콜린(choline)이 포함된 배지에서 배양하는 것일 수 있다. 구체적으로, 본 출원의 콜린이 포함된 배지 내 콜린의 농도는 0.05 내지 5mM, 0.1 내지 5mM, 0.1 내지 3mM, 0.1 내지 2mM, 0.1 내지 1mM의 농도로 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[103] 본 출원의 목적상 상기 균주는 콜린 요구성 영양요구주로서 콜린이 포함된 배지에서 배양시키는 경우, 균주의 성장 회복이 가능하면서도 동시에 균주 내 지방 함량이 증가될 수 있다.

[104] 본 출원의 목적상 상기 배지는 균주 내 지방 함량의 증가를 위해 최적의 C/N ratio를 포함할 수 있다.

[105] 본 출원의 "C/N ratio(탄소 대 질소 비율; 탄질율)"는 배지 내 질소 질량에 대한 탄소 질량의 비율을 의미한다. 상기 비율이 높을수록 배지 내 질소 공급원이 감소할 수 있고, 이에 따라 생육저해로 세포농도가 감소할 수 있다.

[106] 본 출원의 배지 내 C/N ratio가 증가함에 따라 OD 값은 감소할 수 있고, 세포 내 지방함량은 증가할 수 있다. 이에, 지방의 최대 생산성을 위해 배지 내 바람직한 C/N ratio가 중요하다.

[107] 본 출원의 균주 내 지방의 최대 생산성을 나타내는 C/N ratio는 OD * 지방함량값으로 계산할 수 있으며, 상기 배지 내 C/N ratio는 10 내지 120일 수 있고, 구체적으로 30 내지 90일 수 있으며, 보다 구체적으로 40 내지 80일 수 있고, 보다 더 구체적으로 50 내지 70일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[108] 상기 배지 내 바람직한 C/N ratio는 본 출원의 균주의 생육 저해를 방지함과 동시에 지방의 생산성을 효과적으로 증가시킬 수 있다.

[109]

[110] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 포스파티딜에탄올아민 N-메틸트랜스퍼라제(phosphatidylethanolamine N-methyltransferase, PEMT) 또는 포스포리피드 메틸트랜스퍼라제(Phospholipid methyltransferase)의 활성이 불활성화된, 본 출원의 야로위아 속 변이형 균주를 배양하는 단계를 포함하는 지방의 제조 방법을 제공한다.

[111] 본 출원의 "야로위아 속", "야로위아 속 변이형 균주", "배양", 및 "지방"은 상기에서 기재한 바와 같다.

[112] 상기 균주를 배양하는 단계는 콜린이 포함된 배지에서 배양하는 것일 수 있다.

[113] 본 출원의 콜린이 포함된 배지 내 콜린의 농도는 0.05 내지 5mM, 0.1 내지 5mM, 0.1 내지 3mM, 0.1 내지 2mM, 0.1 내지 1mM의 농도로 포함될 수 있다.

[114] 상기 배지 내 C/N ratio는 10 내지 120일 수 있고, 구체적으로 30 내지 90일 수 있으며, 보다 구체적으로 40 내지 80일 수 있고, 보다 더 구체적으로 50 내지 70일

수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [115] 본 출원의 목적상 상기 균주는 콜린 요구성 영양요구주로서 콜린이 포함된 배지에서 배양시키는 경우, 균주의 생장 회복이 가능하면서도 동시에 균주 내 지방 함량이 증가되어 지방 제조에 용이할 수 있다.
- [116] 본 출원의 지방의 제조방법은, 본 출원의 미생물을 준비하는 단계, 상기 균주를 배양하기 위한 배지를 준비하는 단계, 또는 이들의 조합(순서에 무관, in any order)을, 예를 들어, 상기 배양하는 단계 이전에, 추가로 포함할 수 있다.
- [117]
- [118] 본 출원의 지방 제조 방법은 상기 야로위아 속 변이형 균주를 배양한 이후, 상기 균주, 이의 배양물, 이의 추출물, 이의 건조물 또는 이의 파쇄물로부터 지방을 회수하는 단계를 더 포함할 수 있다. 즉, 본 출원의 상기 배양 단계에서 생산된 균주 자체 또는 이의 배양물로부터 지방을 수집할 수 있다. 예를 들어, 원심분리, 여과, 음이온 교환 크로마토그래피, 결정화 및 HPLC 등이 사용될 수 있으며, 당해 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 배양된 상기 균주 또는 이의 배양물, 이의 건조물 또는 이의 파쇄물로부터 목적하는 지방을 회수할 수 있다.
- [119] 또한, 상기 지방을 회수하는 단계는 분리 공정 및/또는 정제 단계를 추가적으로 포함할 수 있으며, 당해 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 수행될 수 있다. 따라서, 상기의 회수되는 지방은 정제된 형태 또는 지방을 함유한 미생물 발효액일 수 있다.
- [120]
- [121] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 포스파티딜에탄올아민 N-메틸트랜스퍼라제 또는 포스포리피드 메틸트랜스퍼라제의 활성이 불활성화된, 야로위아 속 변이형 균주; 또는 상기 균주의 배양물; 상기 균주의 추출물; 상기 균주의 건조물; 상기 균주의 파쇄물; 상기 균주, 배양물, 추출물, 건조물 및 파쇄물 및 상기 균주, 배양물, 추출물, 건조물 및 파쇄물 중 적어도 하나로부터 회수된 지방 중 적어도 하나를 포함하는, 화장용 조성물, 식품용 조성물, 사료용 조성물, 또는 의약 조성물의 지방 제조 용도를 제공한다.
- [122] 본 출원의 "포스파티딜에탄올아민 N-메틸트랜스퍼라제", "포스포리피드 메틸트랜스퍼라제", "야로위아 속", "야로위아 속 변이형 균주", "배양", "지방", "화장용 조성물", "식품용 조성물", "사료용 조성물", 및 "의약 조성물" 등은 상기에서 기재한 바와 같다.

[123]

발명의 실시를 위한 형태

- [124] 이하, 실시예를 통하여 본 출원을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 출원을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 출원의 요지에 따라 본 출원의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

- [125]
- [126] 실시예 1. 야생형 효모 기반 결손주 제작
- [127] 에탄올아민(Ethanolamine) 또는 콜린(choline)에 대한 영양요구주 제작을 위해 야생형 효모인 야로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*) PO1f(ATCC MYA-2613)에서 CHO2 또는 OPI3를 암호화하는 유전자가 결손된 균주를 제작하였다.
- [128]
- [129] 1-1. *cho2* 결손주("CC08-0162") 제작
- [130] 야로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*) 염색체 상에서 *cho2* 유전자를 결손시킬 수 있는 cassette 제작을 위해 KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)에 등록되어 있는 염기서열에 근거하여 *cho2* (YALI0E06061g)의 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드 및 서열번호 2의 아미노산 서열을 확보하였다.
- [131] *Yarrowia lipolytica* PO1f 게놈 DNA를 주형으로 하여 서열번호 3과 4, 서열번호 7과 8, 서열번호 9와 10의 프라이머를 이용하여 각각 PCR을 수행하였다. 그리고 URA3 auxotrophic marker를 주형으로 하여 서열번호 5와 6의 프라이머를 사용해 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 변성 95°C, 1분; 어닐링 55°C, 1분; 및 중합반응 72°C, 1분 30초를 35회 반복 수행하였다.
- [132] 그 결과 1055bp의 5'UTR, 638bp의 5'UTR_RP, 1050bp의 3'UTR 그리고 1569bp의 URA3를 얻었다. PCR로 증폭된 DNA 단편은 overlap extension PCR을 통해 하나의 *cho2* 결손 cassette로 제작되었으며, cassette design은 5'UTR-URA3-5'UTR_RP-3'UTR의 순서로 이루어졌다.
- [133] *cho2* 결손 cassette를 *Yarrowia lipolytica* PO1f에 열충격법(heat-shock)으로 형질전환하고, uracil이 포함되지 않은 고체배지에서 선별하였다. 선별된 1차 균주는 다시 2차 교차를 거쳐 최종적으로 *cho2* 유전자가 결손된 균주를 제작하였다. 이렇게 제작된 결손주를 CC08-0162로 명명하고, 부다페스트 조약 하의 국제기탁기관인 한국미생물보존센터(Korean CultureCenter of Microorganisms, KCCM)에 2020년 2월 20일자로 기탁하여 기탁번호 KCCM12672P를 부여 받았다.
- [134]

[135] [표1]

서열번호	프라이머명	서열(5'-3')
3	CHO2_5'_For	GTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCATCCGCAAA CACAACAC
4	CHO2_5'_Rev	GCAATGACGAGTCAGACAGGGGTGTTTGTGG AAGCTGGTG
5	CHO2_URA_For	CACCAGCTTCCACAAACACCCCTGTCTGACTC GTCATTGC
6	CHO2_URA_Rev	CGCATTCTGCGTACATTTTGCTGGTGGTATTG TGACTGGG
7	CHO2_5'RP_For	CCCAGTCACAATACCACCAGCAAAATGTACG CAGAATGCG
8	CHO2_5'RP_Rev	CAGATATGCTCTCTGCAAACGGTGTTTGTGGA AGCTGGTG
9	CHO2_3'_For	CACCAGCTTCCACAAACACCGTTTGCAGAGA GCATATCTG
10	CHO2_3'_Rev	GCAGGTCGACTCTAGAGAGAGGTCTGTTCAC AACATCGGC

[136]

[137] 1-2. *opi3* 결손주("CC08-0123") 제작

[138] *Yarrowia lipolytica* 염색체 상에서 *opi3* 유전자를 결손시킬 수 있는 cassette 제작을 위해 KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)에 등록되어 있는 염기서열에 근거하여 *opi3* (YALI0E12441g)의 서열번호 11의 폴리뉴클레오티드 및 서열번호 12의 아미노산 서열을 확보하였다.

[139] *Yarrowia lipolytica* PO1f 게놈 DNA를 주형으로 하여 서열번호 13와 14, 서열번호 17과 18, 서열번호 19와 20의 프라이머를 이용하여 각각 PCR을 수행하였다. 그리고 URA3 auxotrophic marker를 주형으로 하여 서열번호 15, 16의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 변성 95°C, 1분; 어닐링 55°C, 1분; 및 중합반응 72°C, 1분 30초를 35회 반복하였다.

[140] 그 결과 980bp의 5'UTR, 730bp의 5'UTR_RP, 1001bp의 3'UTR 그리고 1569bp의 URA3를 얻었다. PCR로 증폭된 DNA 단편은 overlap extension PCR을 통해 하나의 *opi3* 결손 cassette로 제작되었으며, cassette design은 5'UTR-URA3-5'UTR_RP-3'UTR의 순서로 이루어졌다.

[141] *opi3* 결손 cassette를 *Yarrowia lipolytica* PO1f에 열충격법(heat-shock)으로 형질전환하고 uracil이 포함되지 않은 고체배지에서 선별하였다. 선별된 1차

균주는 다시 2차 교차를 거쳐 최종적으로 *opi3* 유전자가 결손된 균주를 제작하였다. 이렇게 제작된 결손주를 CC08-0123으로 명명하고, 부다페스트 조약 하의 국제기탁기관인 한국미생물보존센터(Korean CultureCenter of Microorganisms, KCCM)에 2020년 2월 20일자로 기탁하여 기탁번호 KCCM12673P를 부여 받았다.

[142]

[143] [표2]

서열번호	프라이머명	서열(5'- 3')
13	OPI3_5'_For	GTACCCGGGGATCCTCTAGACACCAACATTG ACATGGAC
14	OPI3_5'_Rev	GCAATGACGAGTCAGACAGGGAGTTTTCCAGA GAGCCAAC
15	OPI3_URA_For	GTTGGCTCTCTGGAAAACTCCCTGTCTGACTCG TCATTGC
16	OPI3_URA_Rev	CAGTCCTTAATCAACGGTGGCTGGTGGTATTGT GACTGGG
17	OPI3_5'RP_For	CCCAGTCACAATACCACCAGCCACCGTTGATT AAGGACTG
18	OPI3_5'RP_Rev	CGTAGGCCGTTTTCTGTTGCGAGTTTTCCAGAG AGCCAAC
19	OPI3_3'_For	GTTGGCTCTCTGGAAAACTCGCAACAGAAAAC GGCCTACG
20	OPI3_3'_Rev	GCAGGTCGACTCTAGAGAGTGCCGTCTCGATT GTCACAGG

[144]

[145] **1-3. *cho2*, *opi3* 동시 결손주("CC08-0183") 제작**

[146] *Yarrowia lipolytica* *PO1f*에서 *cho2*, *opi3* 유전자들의 동시 결손효과를 확인하기 위하여 *cho2*, *opi3* 유전자들이 동시에 결손된 균주를 상기 실시예 1-1, 1-2 와 동일한 방법으로 제작하였으며, 각 유전자를 조합하여 결손시킨 균주를 CC08-0183으로 명명하고, 부다페스트 조약 하의 국제기탁기관인 한국미생물보존센터(Korean CultureCenter of Microorganisms, KCCM)에 2020년 2월 20일자로 기탁하여 기탁번호 KCCM12671P를 부여 받았다.

[147]

[148] **실시예 2. 야생주 기반 결손주의 생육 및 지방 축적 평가**

[149] 실시예 1에서 제작된 결손주 CC08-0162, CC08-0123 및 CC08-0183 의 생육 및

지방 축적 평가를 진행하였다.

[150]

[151] **2-1. 배지에 따른 평가**

[152] 상기 2종의 균주들과 대조균 PO1f를 YPD 혹은 YLMM1(*Yarrowia lipolytica* minimal media 1) 50 ml을 함유하는 250 ml 코너-바플 플라스크에 초기 OD가 0.01이 되도록 접종하고, 30°C에서 72시간 동안, 250 rpm으로 진탕 배양하였다. YLMM1의 경우, 필요에 따라서 0.3 mM choline chloride(CL)가 첨가되었다. 상기 YPD 및 지방배지1(YLMM1)의 조성은 하기와 같다.

[153]

[154] <YPD>

[155] 포도당 20 g/L, 효모 추출물(BD社 제조 Bacto yeast extract, Bacto yeast extract 내 Choline 0.38% 포함) 10 g/L, 우라실(Uracil) 0.5 g/L, 박토 펩톤(Bacto peptone) 20 g/L

[156]

[157] <YLMM1 (pH7.2)>

[158] 포도당 40 g/L, 아미노산 및 암모늄 설페이트가 없는 효모 질소 염기(Yeast nitrogen base without amino acids and ammonium sulfate) 1.7 g/L, 우라실(Uracil) 0.5 g/L, 암모늄 설페이트(Ammonium sulfate) 2.5 g/L를 0.1 M 소듐 포스페이트 완충액(sodium phosphate buffer)(pH 7.2)에 녹인다.

[159]

[160] 배양을 종료한 후, 배양액을 원심분리하여 상등액을 제거하고, 하층부에 남아있는 셀은 60 °C 드라이오븐에서 24시간 건조한 뒤 조지방 추출을 진행하였다. 조지방 추출은 사료표준분석방법에 따라
진행되었으며(사료표준분석방법. 2001. 농촌진흥청 축산기술연구소), 분석된 OD 및 세포 내 조지방 함량을 하기 표 3에 나타내었다. 표 3의 결과는 3회 반복 실험결과값이며, 평균치로 조지방 함량 증가를 평가하였다.

[161]

[162] [표3]

배지	균주	OD ₆₀₀				조지방 함량 [%]			
		배치1	배치2	배치3	평균	배치1	배치2	배치3	평균
YPD	PO1f	60.8	63.2	62.9	62.3	9.7	9.4	9.4	9.5
	CC08-O162	61.5	60.9	62.7	61.7	11.2	10.7	11.4	11.1
	CC08-O123	62.5	62.4	61.4	62.1	11.0	10.7	10.7	10.8
	CC08-O183	61.7	61.5	61.9	61.7	11.1	11.0	11.2	11.1
YIMM 1	PO1f	47.2	46.1	47.7	47.0	10.9	11.5	12.4	11.6
	PO1f(w/ CL)	46.6	47.9	47.2	47.2	11.9	11.1	11.5	11.5
	CC08-O162	10.8	11.9	13.6	12.1	15.0	14.6	15.1	14.9
	CC08-O162 (w/ CL)	44.4	45.0	48.3	45.9	16.4	16.1	16.4	16.3
	CC08-O123	18.0	16.6	17.3	17.3	14.2	14.4	14.9	14.5
	CC08-O123 (w/ CL)	45.7	46.5	46.4	46.2	16.1	15.6	16.3	16.0
	CC08-O183	12.1	12.1	12.4	12.2	14.9	15.0	15.1	15.0
	CC08-O183 (w/ CL)	45.8	46.1	45.9	45.9	16.3	16.5	16.2	16.3

[163]

[164] 표 3에서 나타난 바와 같이, 모균주인 PO1f으로부터 *cho2* 혹은 *opi3* 유전자가 개별 또는 동시 결손된 균주에서 배지에 상관없이 조지방 함량이 증가됨을 확인하였다. 또한, 동일 균주를 YPD에서 배양했을 때보다 YLMM1에서 배양했을 경우 조지방 함량이 증가함을 보였다. 그 증가폭이 YPD 배지에서는 PO1f 대비 *cho2* 결손주가 17%, *opi3* 결손주가 14% 정도였음에 반해,

YLMM1에서는 PO1f 대비 *cho2* 결손주가 28%, *opi3* 결손주가 25%로 YLMM1에서의 지방량 증가폭이 YPD보다 더 큼을 확인하였다. 추가적으로, *cho2*, *opi3* 유전자가 동시 결손된 균주에서는 *cho2* 결손주와 유사한 지방량 증가폭이 확인되었다.

- [165] 그러나, YPD와는 달리 YLMM1 내에는 콜린(choline)이 포함되어 있지 않아, 포스파티딜 에탄올아민으로부터 포스파티딜콜린을 합성하는 경로가 차단되어 콜린(choline) 요구성이 부여된 *cho2* 결손주, *opi3* 결손주 및 *cho2*, *opi3* 동시 결손주는 YLMM1에서 생장 저하를 나타내었다.
- [166] 이에, 생장 회복을 위해 0.3 mM 콜린(choline)을 배지 내 첨가하였으며, 이를 통해 배지 내 콜린(choline)을 첨가해주면 콜린(choline) 요구주의 생장이 대조군 만큼 회복 될 뿐만 아니라 균주 내 조지방 함량도 콜린(choline) 미첨가 대비 약 10% 증가됨을 확인하였다.
- [167] *Yarrowia lipolytica* PO1f 효모 기반으로 제작된 *cho2* 및 *opi3* 결손주의 생육과 지방 축적은 출아 효모인 *Saccharomyces cerevisiae*와 유사한 경향을 보였으나, 콜린(choline)을 첨가 시 생육이 회복될 뿐만 아니라 지방 함량 또한 증가한다는 점은 *Saccharomyces cerevisiae*와 다르며, 이는 유지 효모(oleaginous yeast)인 *Yarrowia lipolytica*만의 특징이다.
- [168]
- [169] **2-2. C/N ratio에 따른 생육 및 지방 축적 평가**
- [170] 실시예 2-1에서 C/N ratio가 1 미만인 YPD 대비 C/N ratio가 30인 YLMM1에서 배양을 진행했을 때, 균주 내 지방 함량이 증가함을 확인하였다. 이에 실시예 1에서 제작된 3종의 균주들과 대조균인 PO1f를 서로 다른 C/N ratio를 갖는 CN 평가배지에서 배양함으로써, C/N ratio에 따른 생육 및 지방 축적 평가를 진행하였다. 서로 다른 농도의 암모늄 설페이트(ammonium sulfate)가 첨가된 CN 평가배지 50 ml을 함유하는 250 ml 코너-바플 플라스크에 초기 OD가 0.01이 되도록 접종하고, 30°C에서 72시간 동안, 250 rpm으로 진탕 배양하였다. 상기 C/N ratio에 따른 CN 평가배지의 조성은 하기와 같다.
- [171]
- [172] <CN 평가배지 (pH7.2)>
- [173] 포도당 40 g/L, 아미노산 및 암모늄 설페이트가 없는 효모 절소 염기 (Yeast nitrogen base without amino acids and ammonium sulfate) 1.7 g/L, 우라실(Uracil) 0.5 g/L, 콜린 클로라이드(Choline chloride) 0.3 mM, 암모늄 설페이트(Ammonium sulfate) 2.5 g/L(C/N ratio 30), 1.25 g/L(C/N ratio 60), 0.83 g/L(C/N ratio 90) 혹은 0.63 g/L(C/N ratio 120)를 0.1 M 소듐 포스페이트 완충액(sodium phosphate buffer)(pH 7.2)에 녹인다.
- [174]
- [175] 배양을 종료한 후, 배양액을 원심분리하여 상등액을 제거하고, 하층부에 남아있는 셀은 60 °C 드라이오븐에서 24시간 건조한 뒤 지방 추출을 진행하였다.

조지방 추출은 사료표준분석방법에 따라 진행되었으며(사료표준분석방법, 2001. 농촌진흥청 축산기술연구소), 분석된 OD 및 세포 내 지방 함량을 하기 표 4에 나타내었다. 표 4의 결과는 3회 반복 실험결과값이며, 평균치로 지방 함량 증가를 평가하였다.

[176]

[177] [표4]

C/N ratio	균주	OD ₆₀₀				조지방 함량 [%]			
		배치1	배치2	배치3	평균	배치1	배치2	배치3	평균
30	PO1f	47.2	46.1	47.7	47.0	10.9	11.5	12.4	11.6
	CC08-O162	44.4	45.0	48.3	45.9	16.4	16.1	16.4	16.3
	CC08-O123	45.7	46.5	46.4	46.2	16.1	15.6	16.3	16.0
	CC08-O183	46.2	45.9	46.0	46.0	16.1	16.3	16.2	16.2
60	PO1f	44.9	45.5	45.5	45.3	12.8	12.9	13.3	13.0
	CC08-O162	44.5	44.0	43.8	44.1	18.9	18.4	19.1	18.8
	CC08-O123	44.9	44.6	45.2	44.9	18.0	18.8	19.3	18.7
	CC08-O183	43.9	44.2	44.1	44.1	19.2	18.5	18.9	18.9
90	PO1f	33.3	34.1	33.1	33.5	15.5	15.1	15.0	15.2
	CC08-O162	32.0	31.7	31.1	31.6	22.2	21.8	22.3	22.1
	CC08-O123	32.6	32.2	32.1	32.3	21.7	21.9	22.4	22.0
	CC08-O183	31.8	32.1	31.5	31.8	21.9	22.5	22.2	22.2
120	PO1f	23.7	23.9	24.4	24.0	16.7	16.4	16.7	16.6
	CC08-O162	23.3	23.2	23.7	23.4	24.1	24.6	24.2	24.3
	CC08-O123	23.8	23.1	23.0	23.3	24.0	24.1	23.6	23.9
	CC08-O183	23.4	23.6	23.1	23.4	24.3	24.0	24.1	24.1

[178]

[179] 표 4에서 나타난 바와 같이, 실시예 2-1에서와 마찬가지로 모균주인 PO1f으로부터 *cho2* 혹은 *opi3* 유전자가 개별 또는 동시 결손된 균주에서 모두 배지의 C/N ratio에 상관없이 지방량이 증가됨이 확인되었다. 또한 그 증가폭은 C/N ratio에 상관없이 약 43% 정도로 비슷함이 확인되었다.

[180] 그러나 배지 내 C/N ratio가 증가함에 따라 질소 공급원이 줄어들면서 OD는 감소하는 경향이 나타났으며, 반대로 세포 내 지방 함량은 증가하는 경향이 나타났다. 최대 생산성을 나타내는 C/N ratio를 구하기 위해 OD * 지방함량값을

계산해 보았으며, 모든 균주에서 C/N ratio 60인 경우에 OD * 지방함량값이 최대로 나타났다. 따라서 C/N ratio가 60인 경우가 최적의 C/N ratio인 것으로 평가되었다.

[181]

[182] 실시예 3. 지방 축적 균주 SCO023 기반 결손주 제작 및 평가

[183]

[184] 3-1. 지방 축적 균주 SCO023 제작

[185] CHO2 또는 OPI3을 암호화하는 유전자의 결손이 지방 축적주에서는 어떠한 영향이 있는지 알아보기 위해 고지방 효모 생산주를 제작하였다.

[186] 고지방 효모 생산주를 제작하기 위해 우선적으로 TAG의 분해 경로를 차단했다. TAG이 분해되는 경로는 다음과 같다. TAG은 TGL3, 4에 의해 fatty acids(FA)로 변화하며, 이 FA는 acyl-CoA binding proteins의 도움으로 peroxisome 내로 유입된다. 이렇게 유입된 FA는 2개의 peroxisomal acyl-CoA Synthases(pxa1, 2)에 의해 acylation되며, acylated FA는 acyl-CoA oxidases(pox1-6)에 의해 vinyl position이 desaturate되게 된다. Desaturated FA-CoA ester는 multi-function enzyme 2(MFE2-C domain, mfe1)에 의해 이중결합 부분이 수화되고, 3-hydroxyacyl-CoA 중간체가 형성된다. 여기에 MFE2 enzyme의 A/B domain이 작용하여 3-hydroxyacyl-CoA 중간체를 3-ketoacyl-CoA 중간체로 산화시키며, 3-ketoacyl-CoA 중간체는 peroxisomal 3-oxyacyl-thiolase(pot1)에 의해 alpha carbon 부분이 잘리면서 acetyl-CoA와 fatty acyl-CoA를 생산해낸다. pox 반응에서부터 pot1에 의한 반응까지의 cycle이 반복되면서 FA 분해가 일어난다(AIMS Bioengineering 2016. 3(4):493-514).

[187] *Yarrowia lipolytica* PO1f에 상기 유전자들 중 pox2(YALI0F10857), mfe1(YALI0E15378) 및 pot1(YALI0E18568)을 결손시켜 각 효소가 발현되지 못하게 하였다. 또한 이러한 beta-oxidation이 일어나는 장소인 퍼옥시좀(peroxisome)의 수를 줄이기 위해 퍼옥시좀(peroxisome) 형성에 관여하는 유전자인 pex10(YALI0C01023)을 결손시켜 효소가 발현되지 못하게 하였다(AIMS Bioengineering 2016. 3(4):493-514). 마지막으로 morphology 관련 유전자인 mhy1(YALI0B21582)을 결손시켰는데, mhy1 유전자를 결손시키면 아미노산 생합성으로의 carbon flux가 줄어들고 지방 생합성으로의 carbon flux가 늘어나면서 세포 내 조지방 함량이 증가된다(Biochim. Biophys. Acta. 2018. 1863(1):81-90).

[188] 각 유전자를 결손시킬 수 있는 cassette 제작을 위해 KEGG에 등록되어 있는 염기서열에 근거하여 pox2의 서열번호 21의 폴리뉴클레오티드 및 서열번호 22의 아미노산 서열, mfe1의 서열번호 23의 폴리뉴클레오티드 및 서열번호 24의 아미노산 서열, pex10의 서열번호 25의 폴리뉴클레오티드 및 서열번호 26의 아미노산 서열, pot1의 서열번호 27의 폴리뉴클레오티드 및 서열번호 28의 아미노산 서열 및 mhy1의 서열번호 29의 폴리뉴클레오티드 및 서열번호 30의

아미노산 서열을 확보하였다.

- [189] 각 유전자의 결손 cassette design은 5'UTR-URA3-5'UTR_RP-3'UTR의 순서로 이루어져있으며, 5'UTR, 5'UTR_RP 및 3'UTR은 *Yarrowia lipolytica* PO1f 게놈 DNA를 주형으로 다음의 프라이머를 이용하여 각각 PCR을 수행하였다; *pox2* 결손 cassette 제작을 위해서는 서열번호 31과 32, 서열번호 35와 36, 서열번호 37과 38의 프라이머를, *mfe1* 결손 cassette 제작을 위해서는 서열번호 39와 40, 서열번호 43과 44, 서열번호 45와 46의 프라이머를, *pex10* 결손 cassette 제작을 위해서는 서열번호 47과 48, 서열번호 51과 52, 서열번호 53과 54의 프라이머를, *pot1* 결손 cassette 제작을 위해서는 서열번호 55와 56, 서열번호 59와 60, 서열번호 61과 62의 프라이머를, *mhy1* 결손 cassette 제작을 위해서는 서열번호 63과 64, 서열번호 67과 68, 서열번호 69와 70의 프라이머를 이용하였다. 그리고 URA3는 URA3 auxotrophic marker를 주형으로 하여 *pox2* 결손 cassette 제작을 위해서는 서열번호 33과 34의 프라이머를, *mfe1* 결손 cassette 제작을 위해서는 서열번호 41과 42의 프라이머를, *pex10* 결손 cassette 제작을 위해서는 서열번호 49와 50의 프라이머를, *pot1* 결손 cassette 제작을 위해서는 서열번호 57과 58의 프라이머를, *mhy1* 결손 cassette 제작을 위해서는 서열번호 65와 66의 프라이머를 사용해 PCR을 수행하였다.
- [190] PCR 조건은 변성 95°C, 1분; 어닐링 55°C, 1분; 및 중합반응 72°C, 1분 30초를 35회 반복 수행하였다. 그 결과 1035bp의 *pox2_5'UTR*, 720bp의 *pox2_5'UTR_RP*, 1010bp의 *pox2_3'UTR*, 1569bp의 *pox2_URA3*, 1003bp의 *mfe1_5'UTR*, 709bp의 *mfe1_5'UTR_RP*, 1036bp의 *mfe1_3'UTR*, 1569bp의 *mfe1_URA3*, 1032bp의 *pex10_5'UTR*, 735bp의 *pex10_5'UTR_RP*, 1033bp의 *pex10_3'UTR*, 1569bp의 *pex10_URA3*, 1036bp의 *pot1_5'UTR*, 735bp의 *pot1_5'UTR_RP*, 1010bp의 *pot1_3'UTR*, 1569bp의 *pot1_URA3*, 921bp의 *mhy1_5'UTR*, 526bp의 *mhy1_5'UTR_RP*, 1029bp의 *mhy1_3'UTR* 및 1569bp의 *mhy1_URA3*를 얻었다. PCR로 증폭된 DNA 단편은 overlap extension PCR을 통해 각각 *pox2*, *mfe1*, *pex10*, *pot1*, *mhy1* 결손 cassette로 제작되었다.
- [191] 첫 번째로 *pox2* 결손 cassette를 *Yarrowia lipolytica* PO1f에 열충격법(heat-shock)으로 형질전환하고 우라실(uracil)이 포함되지 않은 고체배지에서 선별하였다. 선별된 1차 균주는 다시 2차 교차를 거쳐 최종적으로 *pox2* 유전자가 결손된 균주를 제작하였다. 동일한 방법으로 *mfe1*, *pex10*, *pot1*, *mhy1* 결손 cassette를 이용해 *mfe1*, *pex10*, *pot1* 그리고 *mhy1*이 순차적으로 결손된 균주를 제작하였다. 이렇게 제작된 결손주를 "SCO023"이라 명명하였다.
- [192]

[193] [표5]

서열번호	프라이머명	서열(5'- 3')
31	POX2_5'_For	GTACCCGGGGATCCTCTAGAGATTCCGCCAA GTGAGACTG
32	POX2_5'_Rev	GCAATGACGAGTCAGACAGGCGTTGCTTGTG TGATTTTGTG
33	POX2_URA_For	CAAAAATCACACAAGCAACGCCTGTCTGACT CGTCATTGC
34	POX2_URA_Rev	CGCTTGTCCAGTATGAATAGCTGGTGGTATT GTGACTGGG
35	POX2_5'RP_For	CCCAGTCACAATACCACCAGCTATTCATACT GGACAAGCG
36	POX2_5'RP_Rev	CAATAAATACCCGCTTGTCCGTTGCTTGTGTG ATTTTGTG
37	POX2_3'_For	CAAAAATCACACAAGCAACGGACAAGCGGG TATTTATTG
38	POX2_3'_Rev	GCAGGTCGACTCTAGACCAAACAAAGCTGAT GACAC
39	MFE1_5'_For	GTACCCGGGGATCCTCTAGACAAGCCAAAGA GATGTTGAC
40	MFE1_5'_Rev	GCAATGACGAGTCAGACAGGGTTAATAACGT ATCTTCTAC
41	MFE1_URA_For	GTAGAAGATACGTTATTAACCCTGTCTGACT CGTCATTGC
42	MFE1_URA_Rev	CAAATCAGCCGTTGGCCTGCCTGGTGGTATT GTGACTGGG
43	MFE1_5'RP_For	CCCAGTCACAATACCACCAGGCAGGCCAACG GCTGATTTG
44	MFE1_5'RP_Rev	CACTTGGTCAGATAATAGCGTTAATAACGTA TCTTCTAC
45	MFE1_3'_For	GTAGAAGATACGTTATTAACGCTATTATCTG ACCAAGTG
46	MFE1_3'_Rev	GCAGGTCGACTCTAGATGCTTGAAGGCATAT GTGACTG

47	PEX10_5'_For	GTACCCGGGGATCCTCTAGAGTTTTCTGTCTTA GCGTCATG
48	PEX10_5'_Rev	GCAATGACGAGTCAGACAGGGCCGAGGCAG ATTTGGGTTG
49	PEX10_URA_For	CAACCCAAATCTGCCTCGGCCCTGTCTGACT CGTCATTGC
50	PEX10_URA_Rev	GAGTCCAGTAATTCTTTCCGCTGGTGGTATTG TGACTGGG
51	PEX10_5'RP_For	CCCAGTCACAATACCACCAGCGGAAAGAATT ACTGGACTC
52	PEX10_5'RP_Rev	CCTTCCATCCAGACCTCGTCGCCGAGGCAGA TTTGGGTTG
53	PEX10_3'_For	CAACCCAAATCTGCCTCGGCGACGAGGTCTG GATGGAAGG
54	PEX10_3'_Rev	GCAGGTCGACTCTAGAGCTGACCTATACCAG ATCAGACGC
55	POT1_5'_For	GTACCCGGGGATCCTCTAGACACAATACCCC ACAGTGTGC
56	POT1_5'_Rev	GCAATGACGAGTCAGACAGGGTGTGTCTTGG TTGGATGAG
57	POT1_URA_For	CTCATCCAACCAAGACACACCCTGTCTGACT CGTCATTGC
58	POT1_URA_Rev	CAGGCGCTCCCCCATTTGGCGCTGGTGGTATT GTGACTGGG
59	POT1_5'RP_For	CCCAGTCACAATACCACCAGCGCCAATGGGG GAGCGCCTG
60	POT1_5'RP_Rev	GTTTCGATCGCGATTTCATTTCTGTGTCTTGGT TGGATGAG
61	POT1_3'_For	CTCATCCAACCAAGACACACGAAATGAATCG CGATCGAAC
62	POT1_3'_Rev	GCAGGTCGACTCTAGAGAGGAGTGCTAAAAT TAGCCCTGC
63	MHY1_5'_For	GTACCCGGGGATCCTCTAGATGTCAGCGAAA GCTCAAAG

64	MHY1_5'_Rev	GCAATGACGAGTCAGACAGGCAATTCGAGG TCCATTTTGG
65	MHY1_URA_For	CCAAAATGGACCTCGAATTGCCTGTCTGACT CGTCATTGC
66	MHY1_URA_Rev	GTGGTGCTTTTGTACTTGTCTGCTGGTGGTATTG TGACTGGG
67	MHY1_5'RP_For	CCCAGTCACAATACCACCAGGACAAGTACAA AAGCACCAC
68	MHY1_5'RP_Rev	GAAGGCGCTCTACCTCTAGTCCAATTCGAGG TCCATTTTG
69	MHY1_3'_For	CAAAATGGACCTCGAATTGGACTAGAGGTAG AGCGCCTTC
70	MHY1_3'_Rev	GCAGGTCGACTCTAGACTGTGTTTGATTAGC TCTTCTCAG

[194] **3-2. SCO023 기반 *cho2* 결손주("SCO079") 제작**

[195] 상기 실시예 3-1에서 제작된 고지방 효모 생산주 SCO023을 기반으로 *cho2* 유전자 결손주를 제작하였다. 상기 실시예 1-1에서 제작된 *cho2* 결손 cassette를 SCO023에 열충격법(heat-shock)으로 형질전환하고 uracil이 포함되지 않은 고체배지에서 선별하였다. 선별된 1차 균주는 다시 2차 교차를 거쳐 최종적으로 *cho2* 유전자가 결손된 균주를 제작하였다. 이렇게 제작된 결손주를 "SCO079"라 명명하였다.

[196]

[197] **3-3.SCO023 기반 *opi3* 결손주("SCO163") 제작**

[198] 상기 실시예 3-1에서 제작된 고지방 효모 생산주 SCO023을 기반으로 *opi3* 유전자 결손주를 제작하였다. 상기 실시예 1-2에서 제작된 *opi3* 결손 cassette를 SCO023에 열충격법(heat-shock)으로 형질전환하고 우라실(uracil)이 포함되지 않은 고체배지에서 선별하였다. 선별된 1차 균주는 다시 2차 교차를 거쳐 최종적으로 *opi3* 유전자가 결손된 균주를 제작하였다. 이렇게 제작된 결손주를 "SCO163"이라 명명하였다.

[199]

[200] **3-4. 플라스크 평가**

[201] 상기 실시예 3-2, 3-3에서 제작된 균주 SCO079 및 SCO163의 플라스크 테스트를 진행하였다.

[202] 상기 2종의 균주들과 대조균을 다양한 농도의 콜린(choline)을 포함한 YLMM2 50 ml을 함유하는 250 ml 코너-바플 플라스크에 초기 OD가 0.01이 되도록 접종하고, 30 °C에서 72시간 동안, 250 rpm으로 진탕 배양하였다. 상기 YLMM2의

조성은 하기와 같다.

[203] < YLMM2 (pH7.2)>

[204] 포도당 40 g/L, 아미노산 및 암모늄 설페이트가 없는 효모 질소 염기 (Yeast nitrogen base without amino acids and ammonium sulfate) 1.7 g/L, 우라실(Uracil) 0.5 g/L, 암모늄 설페이트(Ammonium sulfate) 1.25 g/L를 0.1 M 소듐 포스페이트 완충액(sodium phosphate buffer)(pH 7.2)에 녹인다.

[205]

[206] 배양을 종료한 후 배양액을 원심분리하여 상등액을 제거하고, 하층부에 남아있는 셀은 60 °C드라이오븐에서 24시간 건조한 뒤 지방 추출을 진행하였다. 조지방 추출은 사료표준분석방법에 따라 진행되었으며(사료표준분석방법, 2001. 농촌진흥청 축산기술연구소), 분석된 OD 및 세포 내 지방 함량을 하기 표 6에 나타내었다. 표 6의 결과는 3회 반복 실험결과값이며, 평균치로 지방 함량 증가를 평가하였다.

[207]

[208] [표6]

균주	Choline 농도[mM]	OD ₆₀₀				조지방 함량 [%]			
		배치1	배치2	배치3	평균	배치1	배치2	배치3	평균
SCO023	0.00	45.5	45.9	46.0	45.8	22.8	23.0	22.6	22.8
	0.05	45.8	46.4	45.8	46.0	22.7	22.3	22.8	22.6
	0.10	46.1	45.5	46.1	45.9	22.8	22.7	23.2	22.9
	0.30	46.3	46.0	46.3	46.2	22.6	22.4	22.8	22.6
	0.50	46.8	47.2	46.7	46.9	22.9	22.5	23.0	22.8
	1.00	47.1	47.0	46.0	46.7	22.4	22.3	22.8	22.5
SCO079	0.00	9.8	9.6	11.2	10.2	25.3	25.2	25.7	25.4
	0.05	31.7	31.4	31.7	31.6	26.5	26.1	26.0	26.2
	0.10	44.0	43.9	43.5	43.8	27.9	26.7	26.7	27.1
	0.30	46.6	44.4	44.9	45.3	27.5	27.7	27.6	27.6
	0.50	45.2	47.1	44.8	45.7	26.8	26.3	26.1	26.4
	1.00	45.4	46.3	46.6	46.1	25.7	26.0	26.3	26.0
SCO163	0.00	11.4	10.5	12.0	11.3	25.9	25.1	24.9	25.3
	0.05	33.5	31.6	31.8	32.3	26.0	26.0	25.7	25.9
	0.10	43.7	44.4	44.5	44.2	26.1	26.4	26.1	26.2
	0.30	44.6	45.8	44.3	44.9	26.9	26.0	27.2	26.7
	0.50	45.5	44.7	45.1	45.1	26.3	25.6	26.4	26.1
	1.00	46.0	45.8	44.7	45.5	26.0	26.1	25.6	25.9

[209]

[210] 표 6에서 나타난 바와 같이, 모균주 SCO023으로부터 *cho2* 혹은 *opi3* 유전자가 결손된 균주 배지 내 콜린(choline) 농도가 0 또는 0.055mM인 경우 모균주 SCO023와 비교 시 지방량은 동등 또는 유사 수준이나 OD가 매우 감소하였다. 배지에 0.1 mM 농도 이상의 콜린(choline)을 배지에 첨가 시 OD가 대조군 수준으로 회복되면서 균주 내 지방 함량 증가 효과도 볼 수 있었다. 배지 내 0.1 ~ 1 mM의 콜린(choline)을 첨가한 경우, SCO023 대비 SCO079는 16 ~ 22%, SCO163은 14 ~ 18%의 조지방 함량 증가를 보였다. 그러나 PEMT pathway가 남아있는 SCO023 균주에서는 배지 내 콜린(choline)의 농도와 관계없이 조지방 함량에 변화가 없었다.

[211] 결과적으로 PEMT pathway 상의 *cho2*나 *opi3* 유전자가 결손된 균주에 적정량의

콜린(choline)을 넣어주면 균주의 생장이 회복되면서 동시에 균주 내 지방 함량이 증가됨을 확인하였다. 그러나 야생형 균주 기반으로 *cho2* 및 *opi3* 유전자를 결손한 경우보다, 지방 축적 균주인 SCO023 기반으로 *cho2* 및 *opi3* 유전자를 결손한 뒤 콜린(choline)을 첨가 배양했을 때 지방 함량 증가폭이 상대적으로 작음이 확인되었다.

[212]

[213] 실시예 4. 지방 축적 균주 SCO028 기반 결손주 제작 및 평가

[214]

[215] 4-1. 지방 축적 균주 SCO028 제작

[216] 실시예 3-1에서 제작된 균주보다 지방 함량이 높은 생산주에서 CHO2 또는 OPI3을 암호화하는 유전자의 결손이 어떤 영향이 있는지 알아보기 위해 또 다른 고지방 효모 생산주를 제작하였다.

[217] *mfe1*과 *pex10*을 결손시킨 균주를 기반으로 지방 생합성 경로의 말단 효소인 acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase isozyme I(DGA1)을 과발현(overexpression)시키면 지방 함량이 증대됨이 알려져 있다(*Nat. Commun.* 2014. 5:3131). 따라서 상기 실시예 3-1에서 제작된 지방 분해 경로가 차단되고 지방 생합성으로의 carbon flux가 늘어난 SCO023 균주를 기반으로 *dga1*(YALI0E32769)의 프로모터를 TEFINT 프로모터로 교체하였다(*METAB ENG* 2015. 29:56-65). 프로모터 교체를 위한 cassette 제작 과정은 다음과 같다.[218] *dga1* 유전자의 프로모터를 교체시킬 수 있는 cassette 제작을 위해 KEGG에 등록되어 있는 염기서열에 근거하여 *dga1*의 서열번호 71의 폴리뉴클레오티드 및 서열번호 72의 아미노산 서열을 확보하였다. *dga1* 프로모터 교체 cassette design은 5'UTR-TEFINT1-URA3-TEFINT2-gene(*dga1*)의 순서로 이루어져있으며, 5'UTR, TEFINT1, TEFINT2 및 gene은 *Yarrowia lipolytica* PO1f 게놈 DNA를 주형으로 하여 서열번호 73과 74, 서열번호 75와 76, 서열번호 79와 80, 서열번호 81과 82의 프라이머를 이용하여 각각 PCR을 수행하였다. 그리고 URA3 auxotrophic marker를 주형으로 하여 서열번호 77과 78의 프라이머를 사용해 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 변성 95°C 1분; 어닐링 55°C 1분; 및 중합반응 72°C 1분 30초를 35회 반복 수행하였다. 그 결과 1539bp의 *dga1_5'UTR*, 573bp의 *dga1_TEFINT1*, 571bp의 *dga1_TEFINT2*, 1539bp의 *dga1_gene* 및 1574bp의 *dga1_URA3*를 얻었다. PCR로 증폭된 DNA 단편은 overlap extension PCR을 통해 *dga1* 프로모터 교체 cassette로 제작되었다.[219] *dga1* 프로모터 교체 cassette를 SCO023에 열충격법(heat-shock)으로 형질전환하고 우라실(uracil)이 포함되지 않은 고체배지에서 선별하였다. 선별된 1차 균주는 다시 2차 교차를 거쳐 최종적으로 *dga1* 프로모터가 TEFINT 프로모터로 교체된 균주를 제작하였다. 이렇게 제작된 결손주를 "SCO028"이라 명명하였다.

[220]

[221] [표7]

서열번호	프라이머명	서열(5'-3')
73	DGA1_5'_For	GTACCCGGGGATCCTCTAGAGACGAGAAACAA ATCATGTG
74	DGA1_5'_Rev	CGCCGCCAACCCGGTCTCTAGCTTTTGT TTTGTGACTTG
75	DGA1_TEF1_For	CAAGTCACACAAAACAAAAGCTAGAGACCGGG TTGGCGGCG
76	DGA1_TEF1_Rev	GACGAGTCAGACAGGAGGCACTGCGGTTAGTA CTGCAAAAAG
77	DGA1_URA_For	CTTTTTCAGTACTAACCGCAGTGCCTCCTGTC TGACTCGTC
78	DGA1_URA_Rev	CGCCGCCAACCCGGTCTCTTGGTGGTATTGTGA CTGGG
79	DGA1_TEF2_For	CCCAGTCACAATACCACCAAGAGACCGGGTTG GCGGCG
80	DGA1_TEF2_Rev	GTAGTATTGTGAGTCGATAGTCTGCGGTTAGTA CTGCAAAAAG
81	DGA1_dga1_For	CTTTTTCAGTACTAACCGCAGACTATCGACTC ACAATACTAC
82	DGA1_dga1_Rev	GCCTGCAGGTCGACTCTAGATTACTCAATCATT CGGAACTC

[222]

[223] **4-2. SCO028 기반 *cho2* 결손주("SCO048") 제작**

[224] 상기 실시예 4-1에서 제작된 고지방 효모 생산주 SCO028을 기반으로 *cho2* 유전자 결손주를 제작하였다. 상기 실시예 1-1에서 제작된 *cho2* 결손 cassette를 SCO028에 열충격법(heat-shock)으로 형질전환하고 우라실(uracil)이 포함되지 않은 고체배지에서 선별하였다. 선별된 1차 균주는 다시 2차 교차를 거쳐 최종적으로 *cho2* 유전자가 결손된 균주를 제작하였다. 이렇게 제작된 결손주를 "SCO048"이라 명명하였다.

[225]

[226] **4-3. SCO028 기반 *opi3* 결손주("SCO067") 제작**

[227] 상기 실시예 4-1에서 제작된 고지방 효모 생산주 SCO028을 기반으로 *opi3* 유전자 결손주를 제작하였다. 상기 실시예 1-2에서 제작된 *opi3* 결손 cassette를 SCO028에 열충격법(heat-shock)으로 형질전환하고 uracil이 포함되지 않은

고체배지에서 선별하였다. 선별된 1차 균주는 다시 2차 교차를 거쳐 최종적으로 *opi3* 유전자가 결손된 균주를 제작하였다. 이렇게 제작된 결손주를 "SCO067"이라 명명하였다.

[228]

[229] **4-4. 플라스크 평가**

[230] 상기 실시예 4-2, 4-3에서 제작된 균주 SCO048 및 SCO067의 플라스크 테스트를 진행하였다.

[231] 상기 2종의 균주들과 SCO028를 콜린을 불포함 또는 0.3 mM 콜린(choline)을 포함한 YLMM2 50 ml을 함유하는 250 ml 코너-바플 플라스크에 초기 OD가 0.01이 되도록 접종하고, 30°C 에서 72시간 동안, 250 rpm으로 진탕 배양하였다. 상기 YLMM2의 조성은 실시예 3-4에 나타난 바와 같다.

[232] 배양을 종료한 후 배양액을 원심분리하여 상등액을 제거하고, 하층부에 남아있는 셀은 60°C 드라이오븐에서 밤새 건조한 뒤 지방 추출을 진행하였다. 조지방 추출은 사료표준분석방법에 따라 진행되었으며(사료표준분석방법, 2001. 농촌진흥청 축산기술연구소), 분석된 OD 및 세포 내 지방 함량을 하기 표 8에 나타내었다. 표 8의 결과는 3회 반복 실험결과값이며, 평균치로 지방 함량 증가를 평가하였다.

[233]

[234] [표8]

균주	OD ₆₀₀				조지방 함량 [%]			
	배치1	배치2	배치3	평균	배치1	배치2	배치3	평균
SCO028	44.8	44.1	43.7	44.2	45.9	45.9	45.6	45.8
SCO028 (w/ CL)	43.9	44.0	44.6	44.2	45.3	45.8	46.0	45.7
SCO048	11.2	11.4	11.3	11.3	47.2	47.1	47.6	47.3
SCO048 (w/ CL)	43.3	43.4	45.0	43.9	52.3	54.4	49.9	52.2
SCO067	11.7	11.9	11.2	11.6	47.1	47.8	46.7	47.2
SCO067 (w/ CL)	44.5	44.1	44.6	44.4	50.3	50.8	50.7	50.6

[235]

[236] 표 8에서 나타난 바와 같이, 모균주 SCO028로부터 *cho2* 혹은 *opi3* 유전자가

결손된 균주 배지 내 콜린이 불포함된 경우 지방량은 동등 또는 유사 수준이나 OD가 매우 감소하였다.

[237] 그러나 0.3 mM의 콜린(choline)을 배지에 첨가 시, 실시예 3-4에서와 마찬가지로 OD가 대조군 수준으로 회복되면서 균주 내 지방 함량 증가 효과가 관찰되었다. 배지 내 0.3 mM의 콜린(choline)을 첨가한 경우, SCO028 대비 SCO048는 14%, SCO067은 10%의 지방 함량 증가를 보였다.

[238] 따라서 *cho2*나 *opi3* 유전자가 결손된 균주에 적정량의 콜린(choline)을 넣어주면 균주의 생장이 회복되면서 동시에 균주 내 지방 함량이 증가됨을 다시 한번 확인하였다. 그리고 실시예 3-4에서 서술한 바와 마찬가지로, 기반 균주 내 지방 함량이 증가할수록 *cho2* 및 *opi3* 유전자를 결손한 경우의 지방 함량 증가폭은 감소함을 알 수 있었다.

[239]

[240] 이상의 설명으로부터, 본 출원이 속하는 기술분야의 당업자는 본 출원이 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 출원의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 출원의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

[241]

[242]

특허출원을 위한 부다페스트 국제 조약 하의 미생물 수탁 증명

국 제 양 식

수신: 씨제이제일제당 주식회사,
대한민국 서울시 중구
동호로 330 CJ 제일제당센터
(우) 100-400

국제기탁기관에 의해 규칙 7.1에
따라 발행된 원기탁에 대한 수탁증

I. 미생물의 표시	
기탁자가 첨부한 미생물 식별에 대한 표시: <i>Yarrowia lipolytica</i> CC08-0183	국제 기탁기관에 부여한 수탁번호: KCCM12671P
II. 과학적 성질의 설명 및/또는 분류학상의 위치	
항목 I에 표시된 미생물에 대하여 다음 사항이 포함되어 있다: ☐ 과학적 성질의 설명 ☐ 제안된 분류학상의 위치 (적용시 x 표시)	
III. 기탁 및 수탁	
본 국제기탁기관은 2020년 2월 20일에 기탁된 항목 I에 표시된 미생물을 수탁하였다.	
IV. 전환 요청의 수령	
상기 항목 I에 표시된 미생물은 에 본 국제기탁기관에 수탁되었고, 원기탁을 부다페스트 조약 하의 기탁으로 전환하기 위한 요청을 에 받았다.	
V. 국제기탁기관	
명칭: 한국미생물보존센터 주소: 대한민국 서울시 서대문구 홍제내 2가길 45 유림빌딩 (우) 03641	국제기탁기관을 대표하는 권한을 가진 자 또는 권한을 부여받은 공무원 서명: 서명일: 2020. 2. 20.

상기 번역은 원문의 내용과 상위 없음을 증명함.

2021년 2월 24일

특허법인 한얼



[243]

특허출원을 위한 부다페스트 국제 조약 하의 미생물 수탁 증명

국 제 양 식

수신: 씨제이제일제당 주식회사,
대한민국 서울시 중구 동호로 330 CJ 제일제당센터
(우) 100-400

국제기탁기관에 의해 규칙 7.1에
따라 발행된 원기탁에 대한 수탁증

I. 미생물의 표시	
기탁자가 첨부한 미생물 식별에 대한 표시: <i>Yarrowia lipolytica</i> CC08-0162	국제 기탁기관에 부여한 수탁번호: KCCM12672P
II. 과학적 성질의 설명 및/또는 분류학상의 위치	
항목 I에 표시된 미생물에 대하여 다음 사항이 포함되어 있다: ☐ 과학적 성질의 설명 ☐ 제안된 분류학상의 위치 (적용시 x 표시)	
III. 기탁 및 수탁	
본 국제기탁기관은 2020년 2월 20일에 기탁된 항목 I에 표시된 미생물을 수탁하였다.	
IV. 전환 요청의 수령	
상기 항목 I에 표시된 미생물은 에 본 국제기탁기관에 수탁되었고, 원기탁을 부다페스트 조약 하의 기탁으로 전환하기 위한 요청을 에 받았다.	
V. 국제기탁기관	
명칭: 한국미생물보존센터 주소: 대한민국 서울시 서대문구 홍제내 2가길 45 유림빌딩 (우) 03641	국제기탁기관을 대표하는 권한을 가진 자 또는 권한을 부여받은 공무원 서명: 서명일: 2020. 2. 20.

상기 번역은 원문의 내용과 상위 없음을 증명함.

2021년 2월 24일

특허법인 한얼



[244]

특허출원을 위한 부다페스트 국제 조약 하의 미생물 수탁 증명

국 제 양 식

수신: 씨제이제일제당 주식회사,
대한민국 서울시 중구 동호로 330 CJ 제일제당센터
(우) 100-400

국제기탁기관에 의해 규칙 7.1에
따라 발행된 원기탁에 대한 수탁증

I. 미생물의 표시	
기탁자가 첨부한 미생물 식별에 대한 표시: <i>Yarrowia lipolytica</i> CC08-0123	국제 기탁기관에 부여한 수탁번호: KCCM12673P
II. 과학적 성질의 설명 및/또는 분류학상의 위치	
항목 I에 표시된 미생물에 대하여 다음 사항이 포함되어 있다: ☐ 과학적 성질의 설명 ☐ 제안된 분류학상의 위치 (적용시 x 표시)	
III. 기탁 및 수탁	
본 국제기탁기관은 2020년 2월 20일에 기탁된 항목 I에 표시된 미생물을 수탁하였다.	
IV. 전환 요청의 수령	
상기 항목 I에 표시된 미생물은 에 본 국제기탁기관에 수탁되었고, 원기탁을 부다페스트 조약 하의 기탁으로 전환하기 위한 요청을 에 받았다.	
V. 국제기탁기관	
명칭: 한국미생물보존센터 주소: 대한민국 서울시 서대문구 홍제내 2가길 45 유림빌딩 (우) 03641	국제기탁기관을 대표하는 권한을 가진 자 또는 권한을 부여받은 공무원 서명: 서명일: 2020. 2. 20.

상기 번역은 원문의 내용과 상위 없음을 증명함.

2021년 2월 26일

특허법인 한얼

