(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0018302
(43) 공개일자 2025년02월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/70 (2006.01) *C07K 14/195* (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01) *C12N 9/00* (2006.01)
C12N 9/04 (2006.01) *C12N 9/10* (2006.01)
C12P 7/625 (2022.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/70 (2013.01)
C07K 14/195 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0098722
(22) 출원일자 2023년07월28일
심사청구일자 2023년07월28일

(71) 출원인
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(72) 발명자
박성훈
울산광역시 울주군 언양읍 반천강변길 51, 106동 901호 (현대아파트)
비벡 쿠마르 가우르
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(74) 대리인
특허법인태백

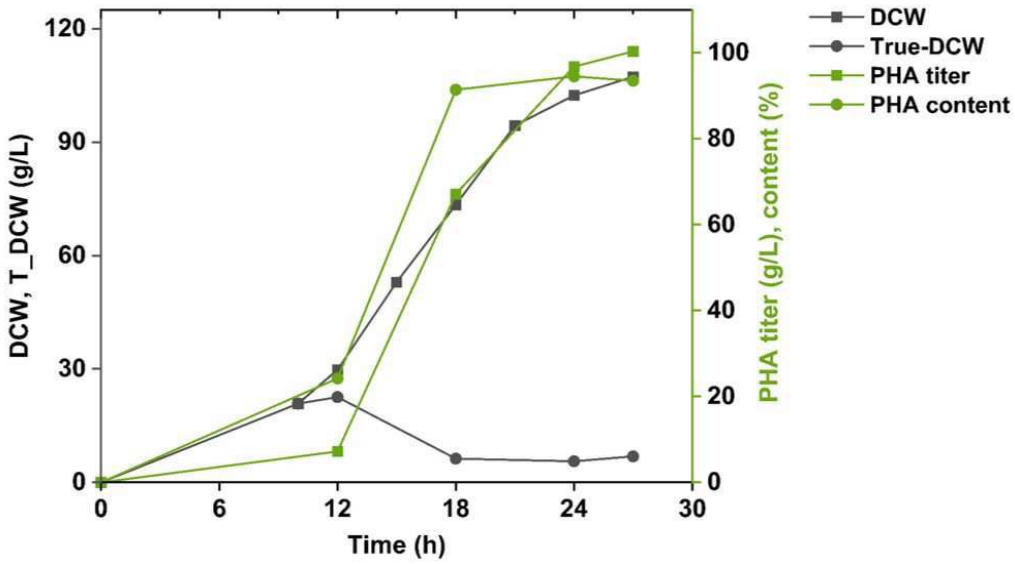
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **P(3HP-co-3HB)를 고효율로 생산하는 재조합 대장균 균주 및 이를 이용한 생분해성 P(3HP-co-3HB) 생산방법**

(57) 요 약

본 발명은 폴리(3-하이드록시프로피오네이트-co-3-하이드록시부티레이트)[poly(3-hydroxypropionate-co-3-hydroxybutyrate); P(3HP-co-3HB)]를 고효율로 생산하는 재조합 대장균 균주 및 이를 이용한 생분해성 P(3HP-co-3HB) 생산방법에 대한 것으로, 본 발명에서는 처음으로 3-HP를 원료로 사용하였고, 그 결과, 세포 내 최대함량 85% 이상으로 P(3HP-co-3HB) 복합고분자를 생산할 수 있었다. 또한, P(3HP-co-3HB) 복합 고분자 내 3-HP 함량을 0-90 mol% 범위로 쉽게 조절할 수 있게 되었다. 더 나아가 유가식 생물반응기 운전을 통해 >100g/L의 P(3HP-co-3HB) 복합중합체를 생산할 수 있었다. 이는 지금까지 알려진 세계 최고의 수준으로, 본 발명의 유전자 재조합 대장균(Escherichia coli) 균주는 포도당과 3-HP를 기질로 이용하여 다양한 몰분율을 갖는 P(3HP-co-3HB) 복합고분자를 높은 농도, 수율, 속도로 생산할 수 있다.

대 표 도 - 도10



(52) CPC특허분류
C12N 15/52 (2013.01)
C12N 9/0006 (2013.01)
C12N 9/1029 (2013.01)
C12N 9/93 (2013.01)
C12P 7/625 (2022.01)
C12Y 101/01036 (2013.01)
C12Y 203/01 (2013.01)
C12Y 203/01009 (2013.01)
C12Y 602/01001 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711189762
과제번호	2020R1A5A1019631
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원
연구과제명	미세플라스틱 대응 화공/바이오 융합 공정 연구센터
기 여 율	1/1
과제수행기관명	울산과학기술원
연구기간	2023.03.01 ~ 2024.02.29

명 세 서

청구범위

청구항 1

폴리하이드록시알카노에이트 합성효소(polyhydroxyalkanoates synthase; *phaC*) 유전자, 아세틸-CoA-아세틸기전이효소(acetyl-CoA acetyltransferase; *phaA*) 유전자, NADPH 의존성 아세토아세틸-CoA 환원효소(NADPH-dependent acetoacetyl-CoA reductase; *phaB*), 삼중기능성 프로피오닐-CoA 합성효소의 아실-CoA 합성효소 도메인(acyl-CoA synthetase domain of trifunctional propionyl-CoA synthase; *acs*) 유전자 및 파신(phasin; *phaP1*) 유전자를 순서대로 포함하는 재조합 발현 벡터.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 *phaC* 유전자는 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어지고, 상기 *phaA* 유전자는 서열번호 2로 표시되는 염기서열로 이루어지고, 상기 *phaB* 유전자는 서열번호 3으로 표시되는 염기서열로 이루어지고, 상기 *acs* 유전자는 서열번호 4로 표시되는 염기서열로 이루어지며, 상기 *phaP1* 유전자는 서열번호 5로 표시되는 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 재조합 발현 벡터.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 *acs* 유전자의 5' 비번역 부위(untranslated region; UTR) 영역은 서열번호 6 내지 서열번호 10으로 표시되는 염기서열 중 어느 하나로 이루어진 것을 특징으로 하는 재조합 발현 벡터.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 재조합 발현 벡터로 형질전환된, 폴리(3-하이드록시프로피오네이트-co-3-하이드록시부티레이트)[poly(3-hydroxypropionate-co-3-hydroxybutyrate); P(3HP-co-3HB)] 생산이 증진된 재조합 대장균 균주.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 재조합 대장균 균주는 피루브산 산화효소(pyruvate oxidase; *poxB*) 유전자, 알코올 탈수소효소(alcohol dehydrogenase; *adhE*) 유전자, 젖산 탈수소효소(D-lactate dehydrogenase; *ldhA*) 유전자, 포스페이트 아세틸트랜스퍼레이즈-아세테이트 키나제(phosphate acetyltransferase-acetate kinase; *pta-ackA*) 유전자, 아실-CoA 티오에스테라제(acyl-CoA thioesterase; *yciA*) 유전자 및 DNA-결합 전사 듀얼 조절자(DNA-binding transcriptional dual regulator; *pdhR*) 유전자로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 유전자가 결실된 대장균 균주를 상기 재조합 발현 벡터로 형질전환시킨 것을 특징으로 하는 P(3HP-co-3HB) 생산이 증진된 재조합 대장균 균주.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 재조합 대장균 균주는 수탁번호 KCTC 15337BP로 기탁된 균주인 것을 특징으로 하는 P(3HP-co-3HB) 생산이 증진된 재조합 대장균 균주.

청구항 7

제4항에 따른 재조합 대장균 균주를 배양하는 단계를 포함하는 P(3HP-co-3HB) 생산 증진 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 배양하는 단계는 포도당 및 3-하이드록시프로피오닌산(3-hydroxypropionic acid; 3-HP)을 기질로 하는 것을 특징으로 하는 P(3HP-co-3HB) 생산 증진 방법.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 방법은 생산된 P(3HP-co-3HB) 내의 3HP 함량이 5 mol% 내지 82 mol%인 것을 특징으로 하

는 P(3HP-co-3HB) 생산 증진 방법.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 방법은 1) 포도당을 이용하여 세포를 농도 30 g/L 이상의 수준으로 성장시키는 단계; 및 2) 3-HP와 포도당을 지속적으로 첨가하여 고농도 P(3HP-co-3HB)가 세포 내에 축적되도록 하는 단계를 포함하는, 2단계 유가식 발효공정인 것을 특징으로 하는 P(3HP-co-3HB) 생산 증진 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 폴리(3-하이드록시프로피오네이트-co-3-하이드록시부티레이트)[poly(3-hydroxypropionate-co-3-hydroxybutyrate); P(3HP-co-3HB)]를 고효율로 생산하는 재조합 대장균 균주 및 이를 이용한 생분해성 P(3HP-co-3HB) 생산방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 전 세계적으로 합성 고분자는 없어서는 안 될 필수품으로 대량 생산, 소비되고 있다. 그들은 주로 화석 연료에서 파생되며 탄소배출과 난분해성으로 인해 심각한 환경 및 인간 건강 문제를 제기한다. 대안으로 생물학적 기원, 낮은 독성 및 높은 생분해성을 가진 바이오 기반 폴리머가 제안되었다. 그러나 세계 바이오플라스틱 시장은 석유계 플라스틱의 0.2% 수준이다. 상용화의 주요 장애물은 값비싼 탄소 원료와 낮은 생산 효율성, 그리고 높은 제조 비용이다. 이 문제를 해결하기 위해 다양한 숙주 미생물과 값싼 탄소 원료를 사용한 대사 공학 접근법이 탐색되었다.

[0003] 바이오 기반 폴리머 중에서 폴리하이드록시알카노에이트(PHA)는 구조적 다양성과 우수한 생분해성으로 인해 많은 주목을 받았다. 이 중에서 가장 생산이 쉽고 많은 연구가 진행된 PHA는 많은 박테리아에 의해 합성되는 폴리(3-하이드록시부티레이트)[poly(3HB)]이다. 안타깝게도, poly(3HB)는 결정성이 높고 부서지기 쉬운 고분자로 Elongation-to-Break factor가 낮아 여러 용도에 사용하는데 부적합하다. 이 때문에 향상된 물리적 및 기계적 특성을 갖는 공중합체를 만드는 연구가 진행되었다. 폴리(3-하이드록시부티레이트-co-3-하이드록시발레레이트)[poly(3HB-co-3HV)], 폴리(3-하이드록시부티레이트-co-4-하이드록시발레레이트) [poly(3HB-co 4HV)], 폴리(3-하이드록시부티레이트-co-4-하이드록시부티레이트) [poly(3HB-co-4HB)] 및 폴리(3-하이드록시부티레이트-co-3-하이드록시프로피오네이트) [poly(3HB-co-3HP)] 등이 중요한 공중합체 고분자들이다.

[0004] 가격면에서 바이오 PHA는 대부분 석유화학 유래 고분자에 비해 열위에 있지만 poly(3HB-co-3HV), poly(3HB-co-4HB), poly(3HB-co-3HH) 등 몇몇 고분자는 상당한 경쟁력을 갖고 상업화되었다. 가장 먼저 poly(3HB-co-3HV)는 Biopol이라는 상품명으로 ICI에 의해 1983년 상업화되었다. 이 공중합체는 Cupriavidus necator에 의해 인산이 고갈된 회분식 배양에서 포도당과 프로피온산을 공급할 때 축적된다. poly(3HB-co-3HV)의 물리적 특성은 폴리에틸렌 및 폴리프로필렌과 유사하다. 최근에는 poly(3HB-co-4HB)가 CJ 제일제당에 의해 PHAT라는 이름으로 상품화되었고 4HB, 3HB 함량을 조절함으로서 다양한 융점 (meting point), crystallinity와 유리전이온도(Tg)를 갖도록 하는 것이 가능하다고 알려진다.

[0005] 3-HP와 3-HB의 공중합체인 poly(3HB-co-3HP)도 우수한 물성으로 인해 많은 주목을 받아왔다. 3HP 분율이 0에서 100 mol%로 증가함에 따라 유리전이온도는 -4℃에서 -19℃로 감소하는 것으로 알려져 있다. 이 효과는 3HB가 다른 하이드록시알카노익산으로 부분적으로 대체된 Poly(3HB-co-3HH) 및 poly(3HB-co-4HB)에서도 유사하게 관찰된다. 융점의 변화는 포물선 모양을 보여준다. Poly(3HB)의 융점은 177℃이다. 3HP 함량을 증가시키면 67 mol%까지는 융점이 44℃까지 감소했다가, 이후 3HP 함량을 추가로 증가시키면 다시 융점이 증가하기 시작하며 100 mol% 3HP에서 77℃까지 상승한다고 알려진다. poly(3HB-co-3HH) 및 poly(3HB-co-4HB)도 유사한 경향을 보인다. 용융 엔탈피도 비슷한 거동을 보인다. 먼저 97 J/g(0 mol% 3HP)에서 2 J/g(43 mol% 3HP)로 감소한 후 74 J/g(100 mol% 3HP)까지 증가한다. poly(3HB-co-3HP)의 열분해도는 분율에 따라 증가한다. 또한, 이전 보고에 의하면 3HP 함량이 42 mol% 미만인 poly(3HB-co-3HP)는 poly(3HB) 유형 결정 구조만 형성하는 반면, 3HP 함량이 56 mol% 이상인 공중합체는 poly(3HP) 유형만 형성한다. 48.8mol%의 3HP 함량에서는 두 유형의 결정이 모두 발생한다.

[0006] 다양하고 우수한 물성에도 불구하고 poly(3HB-co-3HP)는 대량, 고농도로 생산된 적이 없다. 그 이유는 3-HB 단일 고분자인 P-3HB나 3-HB의 혼합 고분자, 즉 poly(3HB-co-3HH) 및 poly(3HB-co-4HB) 등과 비교할 때 생산 효

율이 현저히 떨어지기 때문이다. 대부분의 연구는 플라스크 수준에서 진행되었고 많은 노력에도 불구하고 생산 농도는 10 g/L를 넘지 못하였다. 또한, 3-HB와 3-HP 함량을 자유롭게 조절하는 것도 매우 어렵다는 문제점이 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-2311152호 (2021.10.05 등록)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 P(3HP-co-3HB)를 생합성하는데 필요한 경로의 유전자가 클로닝되고, 추가적으로 P(3HP-co-3HB)의 생합성 효율을 향상시키는데 필요한 phasin 단백질이 과발현된 유전자 재조합 대장균 균주를 제공하고자 한다.

[0009] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 재조합 대장균 균주를 배양하는 단계를 포함하는 P(3HP-co-3HB) 생산 증진 방법을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 폴리하이드록시알카노에이트 합성효소(polyhydroxyalkanoates synthase; *phaC*) 유전자, 아세틸-CoA-아세틸기전이효소(acetyl-CoA acetyltransferase; *phaA*) 유전자, NADPH 의존성 아세토아세틸-CoA 환원효소(NADPH-dependent acetoacetyl-CoA reductase; *phaB*), 삼중기능성 프로피오닐-CoA 합성효소의 아실-CoA 합성효소 도메인(acyl-CoA synthetase domain of trifunctional propionyl-CoA synthase; *acs*) 유전자 및 파신(phasin; *phaP1*) 유전자를 순서대로 포함하는 재조합 발현 벡터를 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 재조합 발현 벡터로 형질전환된, P(3HP-co-3HB) 생산이 증진된 재조합 대장균 균주를 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 재조합 대장균 균주를 배양하는 단계를 포함하는 P(3HP-co-3HB) 생산 증진 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명은 폴리(3-하이드록시프로피오네이트-co-3-하이드록시부티레이트)[poly(3-hydroxypropionate-co-3-hydroxybutyrate); P(3HP-co-3HB)]를 고효율로 생산하는 재조합 대장균 균주 및 이를 이용한 생분해성 P(3HP-co-3HB) 생산방법에 대한 것으로, 본 발명에서는 처음으로 3-HP를 원료로 사용하였고, 그 결과, 세포 내 최대함량 85% 이상으로 P(3HP-co-3HB) 복합고분자를 생산할 수 있었다. 또한, P(3HP-co-3HB) 복합 고분자 내 3-HP 함량을 0-90 mol% 범위로 쉽게 조절할 수 있게 되었다. 더 나아가 유가식 생물반응기 운전을 통해 >100g/L의 P(3HP-co-3HB) 복합중합체를 생산할 수 있었다. 이는 지금까지 알려진 세계 최고의 수준으로, 본 발명의 유전자 재조합 대장균(Escherichia coli) 균주는 포도당과 3-HP를 기질로 이용하여 다양한 몰분율을 갖는 P(3HP-co-3HB) 복합고분자를 높은 농도, 수율, 속도로 생산할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 P(3HP-co-3HB) 복합고분자를 생산하기 위한 대사경로를 나타낸다. Ca_acs는 Chloroflexus aurantiacus 균주에서 유래되었고, trifunctional propionyl-CoA synthase 효소의 acyl-CoA synthetase 도메인을 인코딩하며, Cn_PhaA, Cn_PhaB 및 Cn_phaC는 Cupriavidus necator 균주에서 유래되었고, 각각 acetyl-CoA acetyltransferase, NADPH-의존성 acetoacetyl-CoA 환원효소 및 PHA 합성효소를 인코딩한다.

도 2는 P(3HP-co-3HB) 공중합체 생산을 위해 제작된 유전자 재조합 플라스미드를 나타낸다. C5에는 기본 경로 유전자가, C6에는 기본 경로 유전자 외에 phasin 단백질 생산을 코딩하는 phaP1 유전자가 추가로 클로닝되었다.

C7-C10 플라스미드는 acs 유전자 발현수준을 제어하기 위하여 UTR이 변형된 플라스미드이다.

도 3은 C5 플라스미드를 갖는 기본 균주의 P(3HP-co-3HB) 공중합체 생산 결과를 나타낸다. C5 플라스미드를 갖는 재조합 E. coli 균주는 pQE-80L 플라스미드에서 Cn_PhaC, Cn_PhaA, Cn_PhaB 및 Ca_Acs를 발현하며 수정된 M9 배지에서 30℃에서 배양하였다.

도 4는 P(3HP-co-3HB) 공중합체 생산을 위한 다양한 E. coli 균주의 선별 결과를 나타낸다. C5 플라스미드를 운반하는 재조합 E. coli 균주는 pQE-80L 플라스미드에서 Cn_PhaC, Cn_PhaA, Cn_PhaB 및 Ca_Acs를 발현하며 수정된 M9 배지에서 30℃에서 배양하였다. 오차 막대는 표준 편차(<10%)를 나타낸다.

도 5는 생합성 경로 발현 유도시간이 P(3HP-co-3HB) 공중합체 생산에 미치는 영향을 나타낸다. C5 플라스미드를 가진 재조합 E. coli K12를 수정된 M9 배지를 이용, 30℃에서 배양하되 유도시간을 0 h, 9 h 두 가지로 달리하였다.

도 6은 Cn_PhaP1 발현이 P(3HP-co-3HB) 공중합체 생산에 미치는 영향을 나타낸다. C5 혹은 C6 플라스미드를 가진 재조합 E. coli K12를 수정된 M9 배지를 이용, 30℃에서 배양하였다.

도 7은 3HB-CoA 생산 방향으로 탄소 흐름을 향상시키기 위한 부산물 생성 경로의 순차적인 제거 결과를 나타낸다. 개발된 변이주 K2CP/C6 ~ K8CP/C6 유전자 재조합 균주를 M9 배지를 이용, 30℃에서 배양하였다.

도 8은 P(3HP-co-3HB) 공중합체 생산 중 탄소대사 변이주가 생성하는 부산물을 나타낸다. 3HB-CoA 생산 방향으로 탄소 흐름을 향상시키기 위한 부산물 생성 경로가 제거된 다양한 미생물을 M9 배지를 이용, 30℃에서 배양하였다.

도 9는 P(3HP-co-3HB) 공중합체 생산에서 단량체 조성을 조정하기 위한 Ca_Acs의 UTR 엔지니어링 결과를 나타낸다. 네 개의 UTR이 합성되었으며, 이를 이용하여 새롭게 개발된 C7~C10 플라스미드가 E. coli K8CP에 도입되었다.

도 10은 K8CP/C6 균주의 생물반응기 유가식 고농도 발효 결과를 나타낸다. 세포 농도, 알짜 세포 생물량, P(3HP-co-3HB) 공중합체 농도 및 함량을 시간의 함수로 나타내었다. pH stat 방식으로 포도당(700 g/L)을 공급하였고, DO 농도를 30% 이상으로 유지하기 위하여 공기와 순 산소를 적절한 비율로 공급하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 본 발명의 목적은 상업적으로 의미있는 수준으로 포도당과 3-HP로부터 P(3HP-co-3HB) 공중합체를 생산하기 위한 효율적인 미생물 세포 공장과 공정을 개발하는 것으로, 이를 위해 *C. aurantiacus*의 propionyl-CoA 합성효소의 acs 도메인과 *C. necator*의 *phaABC* 유전자를 *E. coli* K12 MG1655에 도입하였다. 또한 PhaP1(phasin)이 P(3HP-co-3HB) 공중합체 생산에 미치는 영향을 평가하였으며, acetyl-CoA 노드의 경쟁 경로와 3-HB-CoA를 3-HB로 전환하는 thiesterase *yciA* 등의 제거를 통해 3HB-CoA 공급을 증가시켜 기질 사용에 대한 공중합체 생산의 수율을 증가시키고자 하였다. 본 발명에서 개발된 균주는 다양한 조성으로 P(3HP-co-3HB) 공중합체를 생산할 수 있었고, 93.5%의 높은 세포내 함량과 3.70 g/L/h의 생산성을 달성하였고, 최대 100 g/L의 P(3HP-co-3HB) 공중합체를 생산할 수 있었다.

[0017] 본 발명은 폴리하이드록시알카노에이트 합성효소(polyhydroxyalkanoates synthase; *phaC*) 유전자, 아세틸-CoA-아세틸기전이효소(acetyl-CoA acetyltransferase; *phaA*) 유전자, NADPH 의존성 아세토아세틸-CoA 환원효소(NADPH-dependent acetoacetyl-CoA reductase; *phaB*), 삼중기능성 프로피오닐-CoA 합성효소의 아실-CoA 합성효소 도메인(acyl-CoA synthetase domain of trifunctional propionyl-CoA synthase; *acs*) 유전자 및 파신(phasin; *phaP1*) 유전자를 순서대로 포함하는 재조합 발현 벡터를 제공한다.

[0018] 바람직하게는, 상기 *phaC* 유전자는 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어지고, 상기 *phaA* 유전자는 서열번호 2로 표시되는 염기서열로 이루어지고, 상기 *phaB* 유전자는 서열번호 3으로 표시되는 염기서열로 이루어지고, 상기 *acs* 유전자는 서열번호 4로 표시되는 염기서열로 이루어지며, 상기 *phaP1* 유전자는 서열번호 5로 표시되는 염기서열로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0019] 바람직하게는, 상기 *acs* 유전자의 5' 비번역 부위(untranslated region; UTR) 영역은 서열번호 6 내지 서열번호 10으로 표시되는 염기서열 중 어느 하나로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0020] 본 발명에 있어서, "벡터"는 클론유전자(또는 클론 DNA의 다른 조각)를 운반하는데 사용되는 스스로 복제되는 DNA분자를 의미한다.

[0021] 본 발명에서 있어서, "발현 벡터"는 목적한 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동 가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. 발현 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함할 수 있다. 상기 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질 전환된 세포를 비 형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다. 그 예로는 앰피실린(Ampicillin), 카나마이신(Kanamycin), 제네티신(Geneticin; G418), 블레오마이신(Bleomycin), 하이그로마이신(Hygromycin), 클로람페니콜(Chloramphenicol) 과 같은 항생제 내성 유전자가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 당업자에 의해 적절히 선택 가능하다.

[0023] 또한, 본 발명은 상기 재조합 발현 벡터로 형질전환된, P(3HP-co-3HB) 생산이 증진된 재조합 대장균 균주를 제공한다.

[0024] 본 발명에서 사용된 기본 대장균 균주는 K12 MG1655로 여러 대장균 중에서 K-그룹의 대표 균주이며 안전성이 인정된 GRAS (Generally Regarded As Safe) 균주이다.

[0025] 바람직하게는, 상기 재조합 대장균 균주는 피루브산 산화효소(pyruvate oxidase; *poxB*) 유전자, 알코올 탈수소효소(alcohol dehydrogenase; *adhE*) 유전자, 젖산 탈수소효소(D-lactate dehydrogenase; *ldhA*) 유전자, 포스페이트 아세틸트랜스퍼레이즈-아세테이트 키나제(phosphate acetyltransferase-acetate kinase; *pta-ackA*) 유전자, 아실-CoA 티오에스테라제(acyl-CoA thioesterase; *yciA*) 유전자 및 DNA-결합 전사 듀얼 조절자(DNA-binding transcriptional dual regulator; *pdhR*) 유전자로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 유전자가 결실된 대장균 균주를 상기 재조합 발현 벡터로 형질전환시킨 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0026] 보다 더 바람직하게는, 상기 재조합 대장균 균주는 수탁번호 KCTC 15337BP로 기탁된 균주일 수 있으며, 수탁번호 KCTC 15337BP로 기탁된 균주는 본 명세서에서 K8CP/C6 균주로 기재된 균주이다.

[0028] 지금까지 글리세롤을 이용하여 P(3HP-co-3HB) 복합고분자를 생산한 결과 중 가장 높은 역가는 9.8 g/L이다. 또한, 1,3-PDO를 원료로 P(3HP-co-3HB)를 생산한 결과 중 가장 우수한 결과는 세포내 함량 60%, 그리고 반응기 생산 농도 4.2 g/L이었다. 한편 beta-alanine pathway를 통해 3-HP monomer를 공급하고자 하는 연구가 최근에 있었고, 이 경우 0-80 mol%의 3-HP를 복합고분자에 넣어줄 수 있었으나 반응기 생산농도는 3 g/L 이하로 매우 낮았다. 이러한 낮은 성능은 아직 상업화에는 매우 부족한 수준이다.

[0029] 생물학적으로 P(3HP-co-3HB) 복합고분자를 생산할 때 3HB는 보통 포도당과 같은 단당류가, 그리고 3-HP는 글리세롤이나 1,3-propanediol (1,3-PDO)가 원료로 사용된다. 이때 3-HB monomer는 잘 생산되지만 3-HP monomer는 효율적으로 생산이 되지 않는다. 즉, P(3HP-co-3HB) 복합고분자가 지금까지 고농도, 고효율로 생산되지 못한 이유는 3-HP monomer 가 잘 생산되지 않기 때문이다. 여러 이유가 있지만 중요한 이유 중 하나는 글리세롤이나 1,3-propanediol (1,3-PDO)을 원료로 사용하여 3HP monomer 생산하는 과정에서 발생하는 3-HPA (3-hydroxypropionaldehyde)가 높은 독성을 갖기 때문이다. 3-HPA는 반응성이 매우 높아 5mM의 낮은 농도에서도 여러 단백질이나 효소를 불활성화시키며 세포를 사멸시킨다고 보고되었다. 특히 DNA 합성을 위한 데옥시뉴클레오티드 생성에 필수적인 리보뉴클레오타이드 환원효소를 불활성화 시킨다. 즉, 3-HPA가 생성되는 조건에서 3-HP 모노머를 생산한다면 3-HP 모노머 생합성이 쉽지 않기 때문에 P(3HP-co-3HB)의 구성비를 조절하거나 고농도로 폴리머를 생산하는 것이 매우 어렵다는 뜻이다.

[0030] 생물학적으로 3-HP를 생산하는 또다른 방법은 포도당과 같은 당을 이용하는 것이다. 대표적으로 acetyl-CoA로부터 malonyl-CoA를 생산한 후 이를 malonyl-CoA reductase (MCR) 효소를 이용하여 3-HP로 전환하는 방법이 있다. 또 다른 방법으로는 아미노산의 하나인 aspartic acid를 생산한 후 이를 beta-alanine을 거쳐 3-HP로 전환하는 과정이다. 두 가지 방법 모두 약 40 g/L 수준으로 3-HP를 생산할 수 있다는 사실이 증명된 바 있다. 그러나 많은 노력에도 불구하고 그 이상의 생산은 어려웠다. 3-HP 생합성 경로에서 중간대사산물로 생성되는 malonyl-CoA (MCR 경로의 경우)나 malonate semialdehyde (beta-alanine pathway의 경우)는 독성이 있을 뿐 아니라 핵심효소인 MCR이나 malonate semialdehyde dehydrogenase의 활성이 높지 않기 때문이다. 더 나아가 하나의 동일한 원료인 당으로부터 두 가지 모노머, 즉 3-HP와 3-HB를 원하는 속도와 비율로 합성하는 것이 매우 어

렵기 때문이다. 즉 현재의 기술로는 당만을 원료로 이용하여 고효율로 원하는 구성비율을 갖는 P(3HP-co-3HB)를 생산할 수는 없다.

[0031] 현재의 기술 수준에서 생물학적 방법으로 고효율로 원하는 구성비율을 갖는 P(3HP-co-3HB)를 생산할 유일한 방법은 3-HP를 모노머로 외부에서 공급해 주는 것으로 추정된다. 그러나 지금까지 이 모노머는 순수한 형태나 고농도로는 존재하지 않았고 상업적으로 구매할 수 있는 모노머 역시 37% 수용액 상태로 농도가 낮고 가격 역시 매우 높았다. 또한 이 수용액은 여러가지 불순물이 다량 존재하여 발효에 사용하는데 문제가 있었다. 이 때문에 3-HP를 원료로 P(3HP-co-3HB) 혼합고분자를 대규모로 생산하려는 시도는 진행되지 않았다. 그러나 최근 생물학적으로 글리세롤을 원료로 대규모로 3-HP를 생산하는 공정이 확립되어 비교적 순수한 형태의 3-HP salt나 80% 이상의 고농도, 고순도 3-HP 수용액이 원료로 사용할 수 있게 되었다.

[0033] 본 발명에서는 처음으로 3-HP를 원료로 사용하였고 그 결과 세포내 최대 함량 85% 이상으로 P(3HP-co-3HB) 복합고분자를 생산할 수 있었다. 또한 P(3HP-co-3HB) 복합 고분자 내 3-HP 함량을 0-90 mol% 범위로 쉽게 조절할 수 있게 되었다. 더 나아가 유가식 생물반응기 운전을 통해 >100g/L의 P(3HP-co-3HB) 복합중합체를 생산할 수 있었다. 이는 지금까지 알려진 세계 최고의 수준이다.

[0034] 본 발명에서는 E. coli를 숙주세포로 C. necator의 phaCAB 유전자를 도입하여 포도당으로부터 3-HB monomer와 PHB polymer를 생합성하는 경로를 구축하였다. 또한 Chloroflexus aurantiacus 내 propionyl-CoA synthase의 acs 도메인을 도입하여 3-HP로부터 3-HP-CoA로 전환되도록 하고 phaAB로부터 생성되는 3-HB-CoA와 함께 P(3HP-co-3HB) 복합고분자를 생합성하도록 하였다. 따라서 본 발명의 재조합 대장균은 기본적으로 phaCAB, acs 등 4개의 유전자가 도입되어 있다.

[0035] 또한, 본 발명은 3HB-CoA 생산을 촉진하고 3HB 함량을 높이기 위해 adhE, poxB, ldhA, pta-ackA, yciA 및 pdhR 등 일곱 개의 유전자가 하나 이상 제거된 균주를 제공한다. 젖산탈수소 효소(ldhA), 알코올 탈수소 효소 (adhE) 및 피루브산 산화 효소 (poxB)는 전구체인 피루브산과 아세틸-CoA의 손실 방지에 도움이 된다. 또한 아세트산 인산가수분해효소와 인산화효소(pta-ackA), yciA와 같은 티오에스테라제의 제거도 아세틸-CoA의 손실 방지에 도움이 된다. 더 나아가 pdhR의 제거는 피루브산 탈수소복합체의 발현을 촉진하여 피루브산 축적을 줄이고 아세틸-CoA의 생산을 촉진시킨다.

[0036] 또한, 본 발명은 폴리머 독성을 감소시키는 phasin(phaP1)을 함께 과발현시키는 재조합 발현 벡터를 제공한다. P(3HP-co-3HB)는 세포 내 제품으로 생산될 때 세포 형태에 심각한 영향을 미치고, 세포 단백질과 상호작용하여 독성 효과를 나타낸다. phasin으로 불리는 PhaR, PhaP, PhaM 등의 단백질은 폴리머 생합성 조절, 생성된 폴리머의 코팅(표면 대 부피 비율 결정), 세포 내 국소화, 세포분열시 폴리머의 분리 조절 등을 통해 생성된 폴리머의 세포 내 독성을 감소시킨다고 알려져있다.

[0038] 또한, 본 발명은 상기 재조합 대장균 균주를 배양하는 단계를 포함하는 P(3HP-co-3HB) 생산 증진 방법을 제공한다.

[0039] 바람직하게는, 상기 배양하는 단계는 포도당 및 3-하이드록시프로피오닌산(3-hydroxypropionic acid; 3-HP)을 기질로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0040] 바람직하게는, 상기 방법은 생산된 P(3HP-co-3HB) 내의 3HP 함량이 5 mol% 내지 82 mol%일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0041] 바람직하게는, 상기 방법은 1) 포도당을 이용하여 세포를 농도 30 g/L 이상의 수준으로 성장시키는 단계; 및 2) 3-HP와 포도당을 지속적으로 첨가하여 고농도 P(3HP-co-3HB)가 세포 내에 축적되도록 하는 단계를 포함하는, 2단계 유가식 발효공정일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0043] 이하에서는 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0045] **<실험예>**

[0046] 하기의 실험예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.

[0048] **1. 재료**

[0049] 시약은 Sigma-Aldrich (USA)에서 구입하여 사용하였다. 세균 배양을 위한 배지 성분인 트립톤, 이스트 추출물, 아가는 Difco (USA)에서 구입하여 사용하였다. 염색체 DNA 분리, DNA 정제 및 플라스미드 분리를 위한 키트는 Promega(USA), Qiagen(Germany) 및 Cosmo-Genetech(Korea)에서 각각 구입하여 사용하였다. 고성능 DNA 중합효소(pfuX), T4 리가제, 제한효소는 New England Biolabs (USA)에서 구입하여 사용하였다. 유전자 제거 플라스미드인 pKOV는 Church 교수 (Harvard University)로부터 제공받았다. 프라이머 합성 및 생어 염기서열 분석은 Macrogen Co. Ltd(Korea)에서 수행하였다.

[0051] **2. 균주 및 배양조건**

[0052] K-12 MG1655, W3110 (ATCC 27325), XL1-Blue, BW25113, BL21 (DE) 및 DH5α인 다양한 E. coli 균주에 대한 상세 내용은 표 1에 나타내었다. 3-HP 용액은 Noroo Holdings Ltd(Korea)에서 구입하여 사용하였다. 일반적으로 배양(pH 7.0)에 사용하는 수정된 M9 최소 배지는 0.25 g/L $MgSO_47H_2O$, 2 g/L NH_4SO_4, 0.5 g/L 효모 추출물, 100 mM인산 칼륨의 조성으로 구성되었다. 세포 성장과 에너지 생산을 위해 탄소원으로 포도당(3% w/v)를 사용하였다. 세포 성장과 고분자 생성은 특별히 명시되어 있지 않다면 30° C, 250 rpm에서 수행하였다. 유전자 유도를 위해 이소프로필 β-D-1-싸이갈락토피라노사이드(IPTG) 0.25 mM을 사용하였다. 유가식 배양 동안 pH는 6 N NH_4OH와 5 N HCl을 첨가하여 유지하였다.

표 1

[0054]

Strains	Details	Source/Remarks
*E. coli*DH5 alpha		Takara, Korea (Cloning host)
K12	*E. coli MG1655*	KCTC1116
BL21(DE3)	*E. coli BL21(DE3)*	Novagen
W3110	*E. coli W3110*	ATCC 27325
XL-1 Blue	*E. coli XL-1 Blue*	KCCM, Korea
BW25113	*E. coli BW25113*	CGSC
K2CP	*E. coli MG1655 ΔpoxB ΔadhE Δldh*	This study
K3CP	*E. coli MG1655 ΔpoxB ΔadhE Δldh Δpta-acka*	This study
K4CP	*E. coli MG1655 ΔpoxB ΔadhE Δldh Δpta-acka ΔyciA*	This study
K8CP	*E. coli MG1655 ΔpoxB ΔadhE Δldh Δpta-acka ΔyciA ΔpdhR*	This study
Plasmid		
C5	*pQE80L_T5_phaC_phaA_phaB_acs*$_{UTR1}$	P(3HP-co-3HB) production
C6	*pQE80L_T5_phaC_phaA_phaB_acs*$_{UTR1}$*_phaP1*	Introduction of *phasin*
C7	*pQE80L_T5_phaC_phaA_phaB_acs*$_{UTR2}$*_phaP1*	Varying ratio of monomers in P(3HP-co-3HB)
C8	*pQE80L_T5_phaC_phaA_phaB_acs*$_{UTR3}$*_phaP1*	
C9	*pQE80L_T5_phaC_phaA_phaB_acs*$_{UTR4}$*_phaP1*	
C10	*pQE80L_T5_phaC_phaA_phaB_acs*$_{UTR5}$*_phaP1*	

[0056] **3. 플라스미드 및 변이 균주의 제작**

[0057] 본 발명에서 사용한 모든 균주 및 플라스미드는 표 1에 나타내었다. C5 플라스미드를 제작하기 위해 *Cupriavidus necator*와 *Chloroflexus aurantiacus*의 염색체 DNA로부터 아세틸-CoA-아세틸기전이효소(*PhaA*), 아세토아세틸-CoA 환원효소 (*PhaB*), 폴리하이드록시알카노산 합성효소(*phaC*), 삼중활성 프로피오닐 합성효소(*acs*)의 ACS 도메인을 인코딩하는 유전자를 PCR 증폭하였다. 이것으로부터, 겹쳐진 PCR로 단일 조각을 준비하고, 제한 효소를 처리한 후 pQE-80L에서 클로닝하였다. 또한 pha1을 추가로 클로닝하여 C6 플라스미드를, C6 플라스미드 내 acs의 UTR을 조절하여 C7~C10 플라스미드를 제작하였다(도 2).

[0058] Link 등이 1997년에 개발한 무흔적 (scarless) 상동 재조합 방법을 사용하여 E. coli K12 MG1655 변이 균주을 제작하였다. 이 방법에서 대상 유전자의 상류영역과 하류영역 (각각 ~500 bp)을 증폭하여 pKOV 벡터에 연결시켰다. 예를 들어, *ldhA* 제거를 위한 플라스미드는 다음과 같이 제작되었다. 즉, US-*ldhA*-F 및 US-*ldhA*-R 프라이머를 사용하여 *E. coli* K12 염색체 DNA에서 *IdhA* 상류영역 조각을 증폭하였고, DS-*ldhA*-F 및 DS-*ldhA*-R 프라이머를 사용하여 *E. coli* K12의 유전체 DNA에서 *ldhA* 하류영역 조각을 증폭하였다. 이후 US-*ldhA*-F와 DS-*ldhA*-R 프라이머를 사용하여 1000 bp-*ldhA* 조각을 증폭하기 위해 두 조각을 주형으로 사용하였다. 해당 조각을 NotI와 XbaI로 처리하고, 동일한 제한 효소로 자른 pKOV에 ligation 해 주었다. 다른 유전자 제거를 위한 플라스미드 제작도 유사한 방법을 따랐으며, 이 플라스미드를 전기천동법을 통해 *E. coli* K12 또는 해당 변이종에 도입하였다. 제거하고자 하는 유전자는 상동 재조합(이중 교차)을 통해 절단된 유전자로 대체하였다.

[0060] **4. 재조합 균주 제작**

[0061] LB 배지에서 숙주 균주를 37℃, 250 rpm으로 8시간 동안 배양하였다. 얻은 세포를 6,000 × g에서 5분간 원심분리하였고, 10% 글리세롤로 두 번 세척하였다. 세포를 동일한 용액에 재분산하고, 전기 천공법으로 플라스미드를 세포 내에 도입시켰다. 이후, LB 배지를 사용하여 세포를 회수하였으며, 항생제를 포함하는 LB 고체배지에 도말하였다.

[0063] **5. 분석 방법**

[0064] (1) 기질과 대사산물의 분석

[0065] 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC, Agilent 1260 Infinity II, Santa Clara, CA, USA)를 이용하여 배지액 내의 3-HP, 포도당, 다른 대사산물의 농도를 측정하였다. 요약하면, 배양액을 10000 × g로 10분간 원심분리하여 세포가 없는 상층액을 얻었다. 그 다음 상층액을 0.4 μm 멤브레인으로 여과하고, 65℃에서 이동상으로 2.5 mM H_2SO_4를 사용하여 Aminex HPX-87H 컬럼 (300 mm × 7.8 mm; BioRad, Hercules, CA, USA)을 통해 분리하였다.

[0067] (2) PHA 농도의 분석

[0068] 고분자의 양을 측정하기 위해 BD-5MS UI capillary column (60 m × 250 μm × 0.25 μm)과 헬륨을 캐리어 가스로 사용하는 가스 크로마토그래피-질량 분석법(GC-MS)을 사용했다. 간략히 말하면, 동결건조한 박테리아 세포 펠릿은 15% (v/v) H_2SO_4 존재하에 100℃2시간 30분간 메탄올과 반응시켰다. 얻어진 3-HP methyl ester 및 3-HB methyl ester를 GC-MS로 분석하였다. 메틸 벤조산을 내부 표준으로 사용하며, 250℃ 주입 온도, 5 μL 주입량, 0.7 mL/min 유량, 10℃ 램핑 및 총 실행 시간 25 분의 조건으로 분석하였다.

[0070] **6. 고분자 추출 및 열적 성질 측정**

[0071] 이전 문헌에 기술된 방법대로 생산된 고분자의 추출과 정제를 수행했다. 수확한 미생물은 10,000g에서 10분간 원심 분리 후 에탄올과 증류수로 세척하고 동결건조 처리했다. 이어서 건조된 세포 10g에 약 100ml의 클로로포름을 첨가하고 100℃에서 4시간 처리하였다. 이를 통해 얻은 PHA 고분자-클로로포름 용액은 Whatman 필터지를 통해 여과하고 다량의 찬 에탄올에서 침전시켰다. 이어서, 침전된 고분자는 에탄올로 세척하고 진공 건조했다. 고분자의 열적 특성을 조사하기 위해 질소 분위기에서 -80~200℃ 온도 범위에서 Simultaneous thermogravity (TGA) amd Differential scanning calorimetry (DSC) (Q600, TA Instrument, USA)를 사용했으며, 용융 온도 (Tm), 융해 엔탈피 (Δ및 유전 전이 온도 (Tg)를 결정했다. 분자량은 MINIDAWN Multi-Angle static Light

Scattering (MALS) detector(Wyatt Technol., USA)와 Agilent PL칼럼이 장착된 Agilent 1200 (Agilent, USA) Gel permeation chromatography에서 측정하였다.

[0072]

[0073] **<실시예 1> 기본 균주를 통한 복합고분자 생산 가능성 조사**

[0074] 먼저 *E. coli* K12 균주에서 P(3HP-co-3HB) 생산 가능성을 조사하였다. 아세틸-CoA를 3HB-CoA로 전환하는 반응을 촉매하는 유전자인 *Cn_PhaA* (아세틸-CoA-아세틸기전이효소), *Cn_Pha*B (아세토아세틸-CoA 환원효소)와 3-하이드록시프로피오닉 산(3HP)을 3-하이드록시프로피오닉 산-코엔자임A (3HP-CoA)로 전환하는 유전자인 *Ca_acs* (삼중활성 프로피오닐-CoA 합성효소의 아실-CoA 합성효소 도메인), 그리고 3HB-CoA와 3HP-CoA 모노머를 중합하는 클래스 I 폴리하이드록시알카노산 합성효소인 *Cn_phaC*를 pQE-80L 플라스미드에 클로닝시켰으며(도 2), 이 재조합 플라스미드 C5를 *E. coli* K12 MG1655에 도입하였다. 재조합 *E. coli* K12는 30℃, 250 rpm의 조건으로 진탕 플라스크에서 48시간 배양하였다(도 3). M9 배지가 사용되었고 100mM의 3HP 나트륨염과 200mM의 포도당을 첨가하였다. PHA 경로 유전자는 0 시간에 발현되도록 하였다. 재조합 K12/C5 균주는 142 mM의 포도당을 소비하고 4.8 g/L의 DCW [P(3HP-co-3HB) 함량이 30%]와 1.38 g/L의 P(3HP-co-3HB) 중합체를 생성하였다(도 3). 이 결과로부터, PhaC 효소가 *E. coli* K12 내에서 두 가지 단량체, 즉 3HP 및 3-HB로 부터, 보다 정확하게는 HP-CoA와 3HB-CoA 로부터 공중합체의 생합성을 효과적으로 촉매할 수 있음이 확인되었다. 각각의 단량체는 외부에서 첨가한 3-HP와 포도당으로부터 유래한다. 글루코스, 글리세롤, 글루코네이트 및 1,3-PDO을 포함하는 다양한 기질을 사용하여 P(3HP-co-3HB) 생산이 가능하다는 연구를 많이 보고하고 있지만, 본 발명에서처럼 포도당과 외부에서 첨가한 3-HP에서 공중합체 생산이 가능하다는 것을 보여준 결과는 이 결과가 처음이다. 현재의 생산 시스템을 이용하여 P(3HP-co-3HB) 축적을 향상시키기 위해 본격적인 대사 공학 연구를 수행하였다.

[0076] **<실시예 2> 고분자 생산을 위한 호스트 균주의 선택**

[0077] PHA 생합성에서 적절한 호스트의 선택은 매우 중요하다. 다섯 가지의 *E. coli* 균주에 C5 플라스미드를 도입하고, 플라스크 규모에서 P(3HP-co-3HB) 공중합체의 생산을 평가하였다(도 4). 실험을 위해 IPTG 0.25 mM를 사용하여 0시간에 공중합체 생합성 경로의 활성화를 유도하였으며, M9 배지에서 48시간 동안 배양하였다. 평가를 한 균주 중에서 *E. coli* K12 MG1655가 1.46 g/L로 가장 높은 P(3HP-co-3HB) 생산을 보여주었다. *E. coli* BL21(DE3)는 K12 다음으로 1.0 g/L을 생산하였으며, W3110은 평가를 한 균주 중에서 가장 적은 0.21 g/L의 P(3HP-co-3HB)를 생산하였다(도 4). K12 균주에서 생산된 고분자 조성은 27 mol%의 3HP와 4 mol%의 3HB이었다. 현재까지, 재조합 *E. coli*에서 P(3HP-co-3HB) 생산을 보고한 연구는 2-3건에 불과하며, 호스트 균주 스크리닝은 전혀 진행되지 않았다. P(3HP-co-3HB) 생산에서 여러 호스트가 왜 다른 성능을 보이는지에 대한 이유는 명확하지 않다. 성능에 영향을 주는 요소들에는 동일한 프로모터와 플라스미드에서 유전자 발현에 대한 차이, 세포 분열에 관여하는 단백질의 변이(이는 PHA 축적에 영향을 받을 수 있다), PHA의 세포 내 축적에 의해 야기되는 필라멘테이션 정도의 차이 등이 포함된다. 게다가, 기질로 사용하는 3HP의 독성 영향은 *E. coli* 균주 간에도 차이가 있을 수 있다.

[0079] **<실시예 3> P(3HP-co-3HB) 생산 향상을 위한 유도시간 최적화**

[0080] 가장 우수한 성능을 보인 재조합 *E. coli* K12 MG1655(K12/C5)를 사용하여 유도 시간의 영향을 연구하였다(도 5). 유도 시간을 최적화하기 위해, 교반 속도를 250 rpm으로 일정하게 유지하면서, 0.25 mM의 IPTG 를 두 시간대 (0시간, 9시간)에 추가하였다. 유도 시간은 P(3HP-co-3HB) 생산에 큰 영향을 미쳤다. 유도 시간 9시간에는 3.8 g/L의 P(3HP-co-3HB)를 생산하였는데, 이는 0시간 유도에서 1.42 g/L 보다 훨씬 높은 수치였다. P(3HP-co-3HB) 함량의 변화도 유사한 경향을 보였으며, 0시간 유도에서 28%, 9시간 유도에서 51%로 증가하였다. 그러나 두 실험 조건에서 발효 완료시점인 48시간에서의 실제 세포 생물량(T_DCW; 세포의 건조중량에서 P(3HP-co-3HB) 중합체의 중량을 뺀 실제 세포 생물량)은 큰 차이가 없었다. 즉 9시간 유도 조건에서는 3.2 g/L로, 0시간 유도 조건에서는 3.5 g/L이었다. 그러나 고분자 중합 경로가 유도되지 않았을 때, 즉 공중합체 생산이 없는 경우, 균주 K12/C5는 좀더 나은 성장을 보였다. 고분자 중합이 있을 때 알짜 세포농도는 0 시간 유도조건에서 1 g/L에 불과했으나, 고분자 중합이 유도되지 않을 경우 발효 9시간 만에 약 3.6 g/L의 세포 생물량을 얻을 수 있었다. 이는 P(3HP-co-3HB) 생산이 세포 성장을 감소시키며, 생산량이 높아질수록 감소가 더 심해진다는 것을 의미한다. PHA 생산 경로와 PHA 생산 유도는 세포의 열 충격 반응을 유발하고 세포 대사를 변경할 수 있음이 보

고되었다. 세포질 내에 P(3HP-co-3HB)을 축적하는 것은 세포에 내생호흡을 촉진하도록 스트레스를 유발하며, 그 결과 세포 질량이 감소한다. 또한, 많은 세포질 단백질과 주변 단백질이 고농도의 소수성의 PHA 분자와 상호 작용함으로써 손상된다고 알려져 있다.

[0082] **<실시예 4> P(3HP-co-3HB) 생산 개선을 위한 Phasin 도입**

[0083] PHA는 다른 중요한 소수성의 단백질과 상호 작용할 수 있어 세포의 항상성에 영향을 미치는 소수성의 세포 내 과립이다. 안정성을 유지하기 위해 많은 천연 PHA 생산균들은 PHA 결합 단백질인 phasin을 발현한다. Phasin은 소수성의 PHA 표면을 덮으며, 양친성 구조를 가지기 때문에 다른 세포질 단백질과의 상호 작용을 줄이고, 세포 내 독성을 감소시키며, 더 나아가 PHA의 분해를 억제하여 세포 내 PHA의 안정성을 제공한다. 본 발명에서는 *C. necator*의 *phaP1* 유전자를 복제하고 이를 C5 플라스미드에 도입하여 C6 플라스미드를 만들었다(도 2). 도 6은 K12/C5와 K12/C6 균주의 발효결과를 비교해서 보여준다. T_DCW는 각각 3.67 g/L (K12/C5), 3.36 g/L (K12/C6)로 큰 변화가 없었으나 P(3HP-co-3HB) 생산과 세포내 함량은 3.8 g/, 51% 에서 5.6 g/L, 62%로 향상되었다. 그러나 생산된 공중합체 내 3HP와 3HB의 조성은 거의 변화가 없었다. K12/C5 균주는 각각 82 % 3HP, 18 % 3HB의 mol비를 갖는 고분자를 생산하였으며, K12/C6 균주는 각각 81%, 19 %의 몰비를 나타내었다.

[0085] **<실시예 5> 아세틸-CoA 노드에서 경쟁 경로 제거**

[0086] 지금까지의 실험 결과에 따르면 대부분의 균주에서 3HP에 비해 3HB의 비율이 매우 낮았고 또한 부산물로 초산, 피루브산 등이 얻어졌다. 3HB-CoA 생산을 촉진하고 3HB 함량을 높이기 위해 *adhE, poxB, ldhA, pta-ackA, yciA* 및 *pdhR* 등 일곱 개의 유전자를 순차적으로 제거하였다(도 7). 젖산탈수소 효소 (*ldhA*), 알코올 탈수소 효소 (*adhE*) 및 피루브산 산화 효소 (*poxB*)는 전구체인 피루브산과 아세틸-CoA의 손실 방지에 도움이 된다. K2CP/C6 균주(*ΔadhE ΔpoxB Δ ldhA*)에서는 젖산 생산을 제거하였지만, 아세트산은 제거되지 않았다(도 7). 아세트산은 아세트산 인산가수분해효소와 인산화효소(*pta-ackA*), *yciA*와 같은 티오에스테라제, 그리고 *mhpF, aldB, adhP*로 인코딩 된 효소에 의해 알코올/알데하이드 탈수소화 반응을 통해 생성될 수 있다. 아세트산 생성을 줄이기 위해, K3CP/C6 균주에서 *pta-ackA*를 제거하였고 P(3HP-co-3HB) 생산이 10 g/L인 K2CP/C6와 비교하여 12.6 g/L로 향상된 결과를 보였다. 그러나 *pta-ackA* 제거 후에도 아세트산 형성은 줄어들지 않았다. CoA 중간체는 티오에스테라제에 의해 분리될 수 있으며, *E. coli*에는 이러한 종류의 여러 효소가 존재한다. 이 효소들은 아세틸-CoA, 아세토아세틸-CoA 및 3-HB-CoA에 작용하여 1,3-BDO로의 대사흐름을 제한할 수 있다. *yciA* 제거(K4CP/C6)는 아세테이트를 감소시키고, 3-HB 50 mol%인 K3CP/C6와 비교하여 61 mol%의 3-HB를 가진 P(3HP-co-3HB) 농도를 19 g/L로 크게 향상시켰다. K3CP/C6 균주는 22 mM의 피루브산을 생산하였으므로(도 8), 피루브산 축적을 방지하기 위해 피루브산 탈수소효소 복합체 조절유전자(*pdhR*)를 제거하였다. 결과적으로 생성된 K8CP/C6 균주는 피루브산 축적이 없으며 P(3HP-co-3HB) 농도가 22.1 g/L로 향상되었으며 3HB 비율이 65 mol%로 증가하였다(도 8).

[0088] **<실시예 6> P(3HP-co-3HB)에서 3-HP: 3-HB 비율을 임의로 조절하기 위한 UTR Engineering**

[0089] P(3HP-co-3HB)에서 3-HP: 3-HB 비율은 Acs의 활성에 따라 조절이 가능하다. Acs 활성 조절을 위해 C6 플라스미드에 클로닝된 *Ca_acs* 유전자의 ribosome binding site를 포함하는 UTR(Untranslated region)을 4 단계로 변형하였으며 (C7 ~ C10), 이를 통해 *acs*의 발현을 증가 또는 감소시켜 P(3HP-co-3HB)에 포함되는 3HP의 비율에 영향을 줄 수 있도록 하였다(도 2; 표 2). In silico UTR Designer에 기반하여 약 0.2에서 6.5배의 발현 차이가 예상되는 새로운 UTR 서열 4개를 합성하였다. 플라스크 실험에서 이 재조합 균주들을 이용 P(3HP-co-3HB) 생산을 평가하였다. K8CP/C7와 K8CP/C8 균주는 K8CP/C6의 38%에 비해 증가된 68%와 59%의 3HP mol%를 나타내었다(도 9). 또한 K8CP/C9 균주의 경우 3HP: 3HB = 27 mol%: 72 mol% 이었고, K8/C10 균주의 경우 3HP: 3HB = 5 mol%: 95 mol%이었다(도 9, 표 3). 탄소 대사의 변화와 acs UTR 변형을 통해 3HP 함량을 5 mol%~ 82.6 mol%로 다양한 변화를 줄 수 있었고, 3HB 함량 역시 17.4 mol%~95.0 mol%로 변화시킬 수 있었다. 이러한 3HP 및 3HB 비율의 변화는 공중합체의 열적 특성은 물론 생산 농도에도 영향을 미친다. 세포 내 공중합체 함량은 K8CP/C7에서 최대 93% 까지 높게 나타났다. 본 발명에서 얻은 다양한 3HP 및 3HB 비율과 이들의 열적 특성은 표 3에 나타내었다.

표 2

[0090] *Ca_acs* 의 발현과 copolymer 조성을 조절하기 위한 UTR 디자인

Plasmids	Purpose	UTR Sequence	In silico expression level	Fold change by prediction*
acs				
C7 Native UTR of *Ca_acs*	Increased expression	TTAACTTTAAGAAGGAGATATACAA (서열번호 6)	2,183,619	6.51
C8	Increased expression	TTATCTTTAAGAAGGAGATATACAA (서열번호 7)	943682	2.81
C6	Original	TTAACTTTAAGAAGGAATTATACAA (서열번호 8)	335320	0.15
C9	Reduced expression	TTATCTTTAAGATGGAGATATACAA (서열번호 9)	156075	0.46
C10	Reduced expression	TTTTCTTTAAGAAGGTATTATACAA (서열번호 10)	98515	0.29

[0091] *상대적 세기의 변화는 추정치로 새로 디자인된 UTR의 세기를 초기 UTR(UTR3)의 세기로 나는 값이다.

표 3

[0093] 서로 다른 세기의 *Ca_acs*의 발현에 따른 발효 결과

Experimental scale	Strain	Cell density (g_{CDW}/L)	PHA (g/L)	PHA content (%)	Monomer composition (mol%)		Thermal properties*	
					3HP	3HB	T_g(℃)	T_m(℃)
Flask	K12/C5	7.5	3.9	51.2	82.6	17.4	-20.0	74.0
	K12/C6	9.0	5.6	62.6	81.1	19.0	-20.0	74.0
	K8CP/C7	30.3	28.2	93.2	68.0	32.0	-20.0	72.0
	K2CP/C6	14.4	10.6	73.5	60.0	40.0	-20.0	72.0
	K8CP/C8	28.8	26.5	92.2	59.0	41.0	-19.0	68.0
	K3CP/C6	14.7	12.6	86.2	49.2	50.8	-18.0	70.0
	K4CP/C6	22.2	19.6	88.2	38.9	61.1	-16.0	72.0
	K8CP/C6	24.2	22.1	91.4	38.0	62.0	-16.0	72.0
	K8CP/C6	24.2	22.1	91.4	34.8	65.2	-15.0	73.0
	K8CP/C9	23.2	20.6	88.6	27.4	72.6	-4.0	163.0
	K8CP/C10	22.8	20.2	88.5	5.0	95.0	4.0	170.0
Bioreactor	K8CP/C6	143.7	112.0	78.0	56.7	43.3	-19.0	68.0

[0095] **<실시예 7> 고농도 유가식 생물반응기 배양을 통한 고농도 P(3HP-co-3HB) 생산**

[0096] PHA는 세포 내 생성물이므로, PHA 생산을 높이기 위해서는 고농도 세포배양이 중요하다. K8CP/C6 균주를 이용 바이오리액터 실험에서 고농도 유가식 배양을 실시하였다. 순산소 O_2를 공기와 동시에 공급하여 용존산소 (Dissolved Oxygen; DO)를 30% 이상으로 유지하였다. 간헐적 글루코스 공급(700 g/L 저장용액)을 통해 포도당 농도를 50-250 mM 사이로 유지시켰으며, 미량 원소 용액 (1X SL6), 인산암모늄, 효모 추출물과 트립톤 각각 1 그램씩을 주기적으로 첨가하였다. 또한 5 M 3-HP를 주기적으로 공급하여 그 농도를 약 100 mM 수준으로 유지하였다. 고분자 합성경로는 DCW가 약 20 g/L(10th 시간)에 도달했을 때인 늦은 대수성장기에 유도되었다. 이 시점에서는 P(3HP-co-3HB)의 축적이 없으므로 DCW와 T_DCW가 동일하였다. 유도 후 12시간까지 T_DCW가 22.58 g/L로 증가하였으나, 이후 생체량 감소가 관찰되었다(도 10). 12시간 이후 실제 세포 성장의 종료 또는 T_DCW의 감소

가 관찰되었으며 이는 세포분열에 심각한 영향을 미칠 수 있는 높은 PHA 함량(~90%) 때문일 것으로 추정된다. PHA 함량이 약 50%일 때 세포 성장을 심각하게 저해한다는 보고가 있다. 12시간까지 P(3HP-co-3HB) 농도는 7 g/L이었으며, 이후 18시간에는 67 g/L로 크게 향상되었고, 발효 종료시에는 >100 g/L에 이르렀다. 고분자 내 3-HP와 3-HB의 비율은 각각 59.5 mol%와 40.5 mol%였다. P(3HP-co-3HB)는 세포내 축적되는 생산물이므로, 높은 세포 생체량(T_DCW)과 높은 함량을 달성함으로써 높은 반응기 내 농도로 P(3HP-co-3HB) 생산이 이루어졌다.

[0098] 본 발명에서 달성한, >100 g/L의 P(3HP-co-3HB) 공중합체 생산, 93.5%의 생체내 고분자 함량, 3.7 g/L/h의 생산성은 지금까지 보고된 것 중 가장 높은 값으로, 상업적으로도 의미있는 수준이다. 서로 다른 균주와 탄소원으로부터의 P(3HP-co-3HB) 생산 비교는 표 4에도 나와 있듯이 지금까지의 연구 결과와는 비교되지 않는 우수한 결과이다. 본 발명에서 최고의 함량과 생산성을 달성한 이유는 효율적인 균주의 개발, 3HP 기질의 사용, 효과적인 발효기 운전 등과 관련이 있다. 특히 acs UTR engineering은 공중합체 내 단량체 비율을 마음대로 변화시킬 수 있게 하였고, *yciA* 및 *pdhR*의 제거는 포도당의 고분자 전환 및 에너지 생산을 원활하게 하였다.

표 4

[0099]

Name of strain (Reference)	Titer (g/L)	Cellular content (%)	Yield	Productivity (g_{PHA}/L/h)	Composition (mol% of 3HP in 3HP-co-3HB)	Substrate
Alcaligenes eutrophus (Nakamura et al., 1991)	0.51	12	--	--	7.0	3HP
Alcaligenes latus (Wang et al., 1999)	4.2	45.2	--	--	23.0	Sucrose, 3HP
XL1-Blue (Valentin et al., 2000)	--	14	--	--	25.0	3HP, Mannitol
Cupriavidus necator H16 (Fukui et al., 2009)	1.02	57	--	--	1.0	Fructose
Cupriavidus necator JMP134 (Fukui et al., 2009)	0.77	31	--	--	2.1	Fructose
E. coli JM109(DE3) (Wang et al., 2013)	9.8		--	--	48.2	Glycerol
Shimwellia blattae (Sato et al., 2015)	7.12	30.7	0.093	0.148	2.1	Glycerol
Shimwellia blattae (Sato et al., 2015)	0.32	17.2	0.0033	0.006	18.1	Glycerol
Escherichia coli Trans 1-T1 (Meng et al., 2015)	5	42	--	--	84	Glucose
Cupriavidus necator H16 (McGregor et al., 2021)	0.35	17.74	--	--	1.27	Gluconate, β-alanine
Cupriavidus necator H16 (McGregor et al., 2021)	1.49	29.91	--	--	36.72	Gluconate, β-alanine
Cupriavidus necator H16 (McGregor et al., 2021)	2.59	50.76	--	--	7.11	Gluconate, β-alanine
Halomonas bluephagenesis TD27 (Jiang et al., 2021)	4.20	60	--	--	45.0	Glucose, 1,3 PDO

E. coli K12 (This study)	100	93.5	--	3.7	59.5	Glucose, 3HP

[0101] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술한 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[0102] 본 발명의 범위는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

수탁번호

[0104]

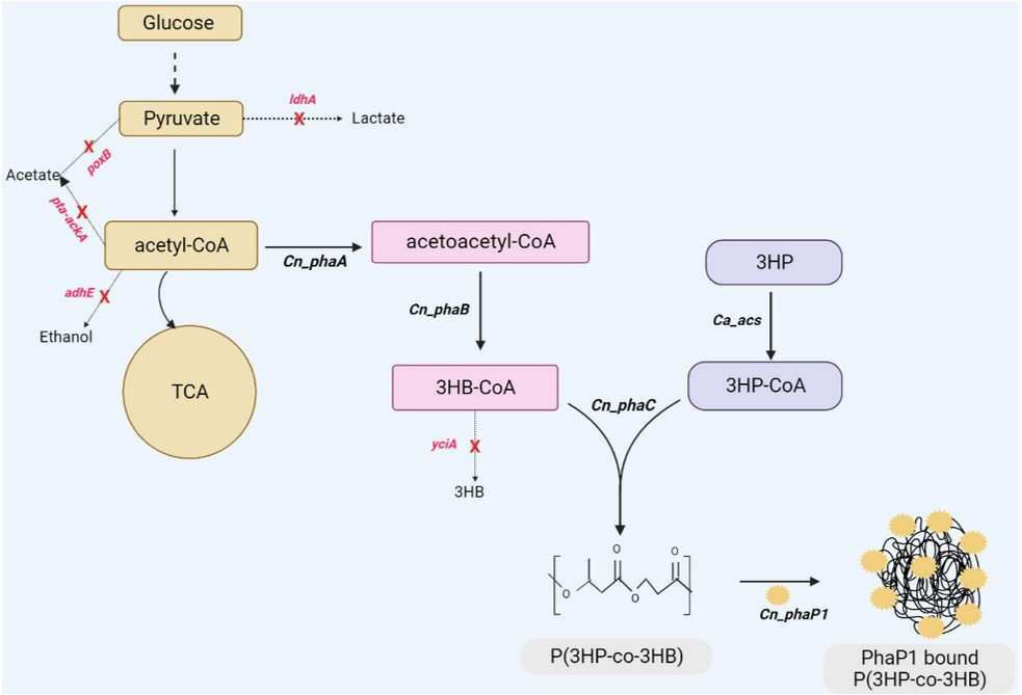
기탁기관명 : 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)

수탁번호 : KCTC15337BP

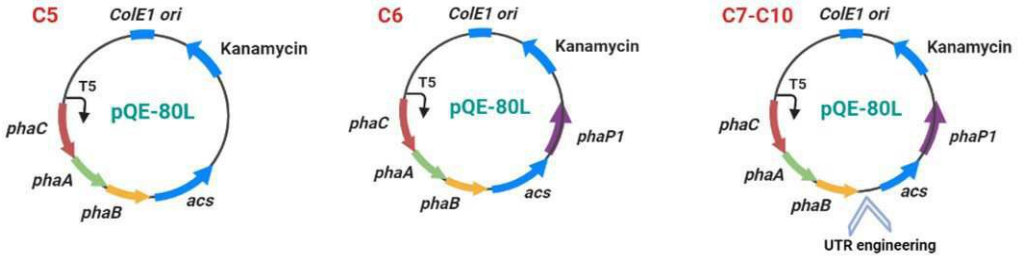
수탁일자 : 20230307

도면

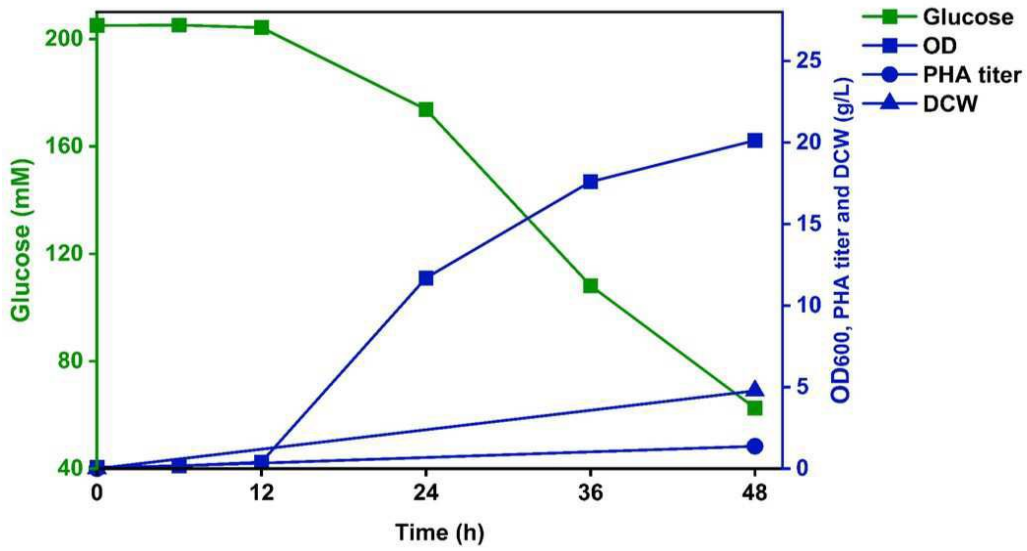
도면1



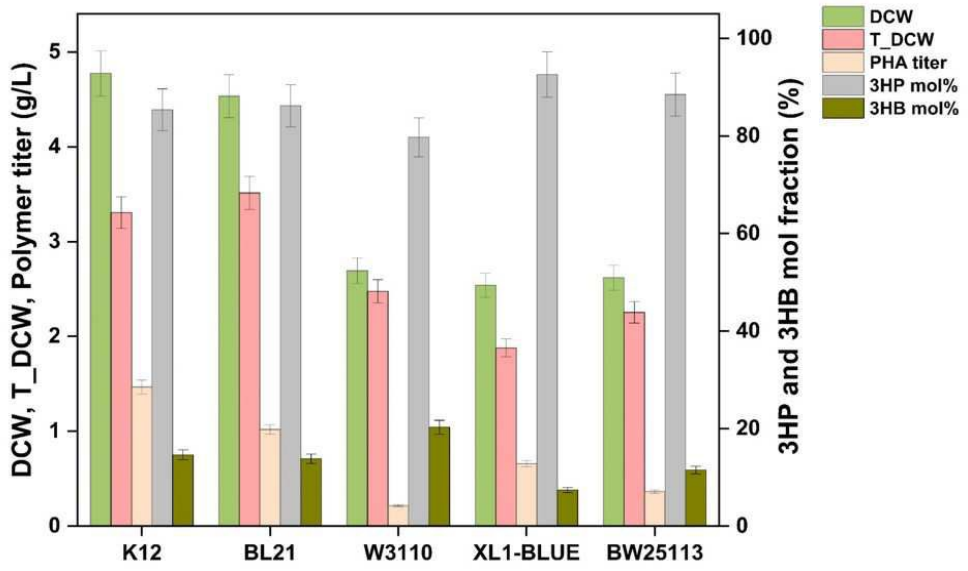
도면2


C5
ColE1 ori
Kanamycin
T5
pQE-80L
phaC
phaA
phaB
acs
C6
ColE1 ori
Kanamycin
T5
pQE-80L
phaC
phaA
phaB
phaP1
acs
C7-C10
ColE1 ori
Kanamycin
T5
pQE-80L
phaC
phaA
phaB
phaP1
acs
UTR engineering

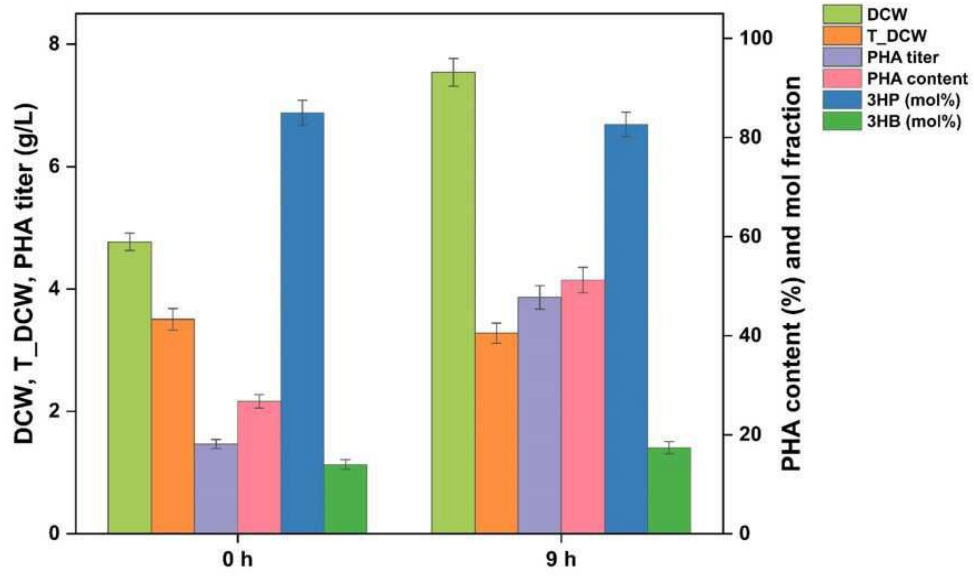
도면3


Glucose
OD
PHA titer
DCW
Glucose (mM)
OD600, PHA titer and DCW (g/L)
Time (h)
200
160
120
80
40
25
20
15
10
5
0
0
12
24
36
48

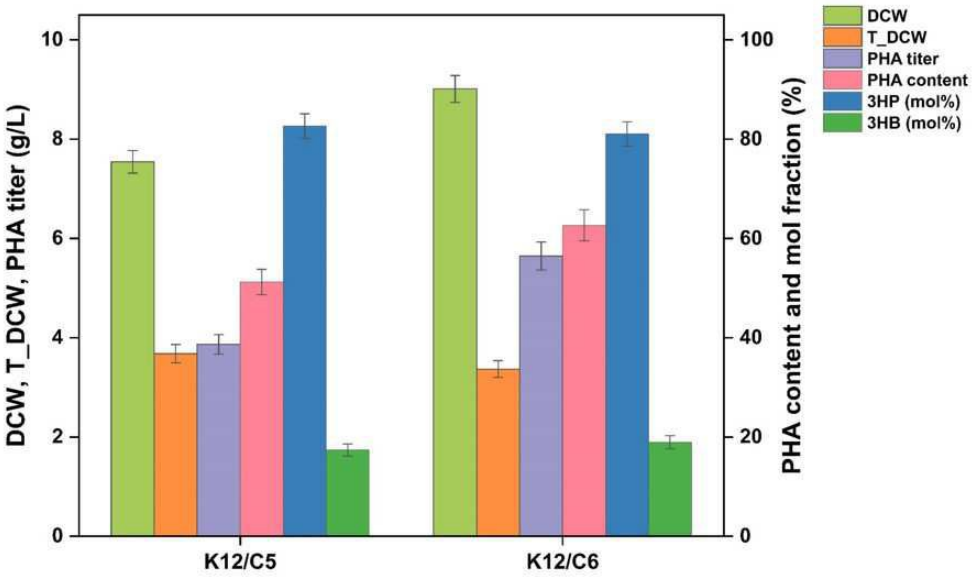
도면4


DCW
T_DCW
PHA titer
3HP mol%
3HB mol%
DCW, T_DCW, Polymer titer (g/L)
3HP and 3HB mol fraction (%)
5
4
3
2
1
0
100
80
60
40
20
0
K12
BL21
W3110
XL1-BLUE
BW25113

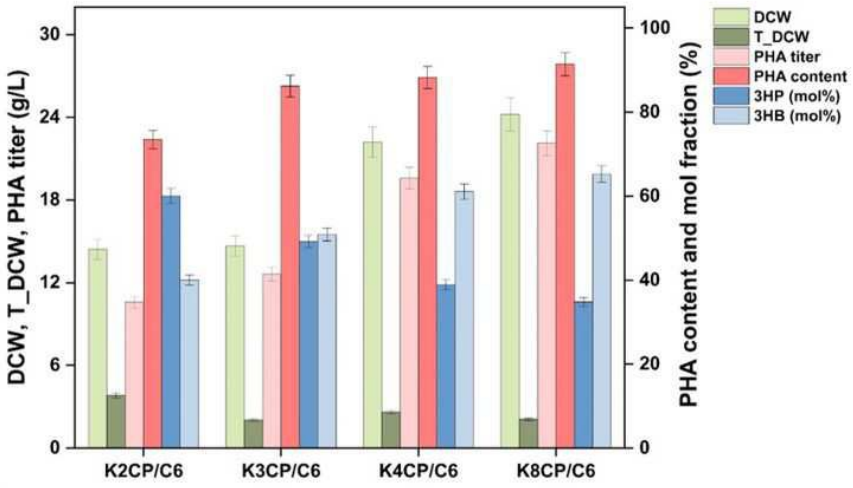
도면5


DCW
T_DCW
PHA titer
PHA content
3HP (mol%)
3HB (mol%)
DCW, T_DCW, PHA titer (g/L)
PHA content (%) and mol fraction
0
2
4
6
8
0
20
40
60
80
100
0 h
9 h

도면6

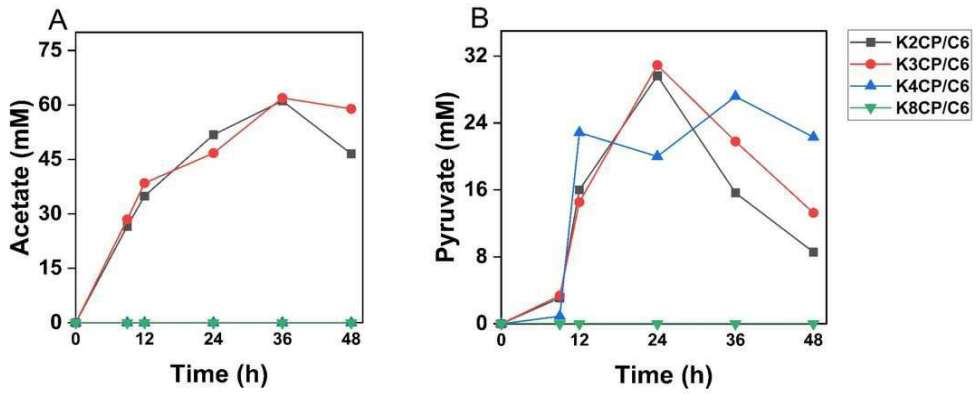

DCW
T_DCW
PHA titer
PHA content
3HP (mol%)
3HB (mol%)
DCW, T_DCW, PHA titer (g/L)
PHA content and mol fraction (%)
0
2
4
6
8
10
0
20
40
60
80
100
K12/C5
K12/C6

도면7

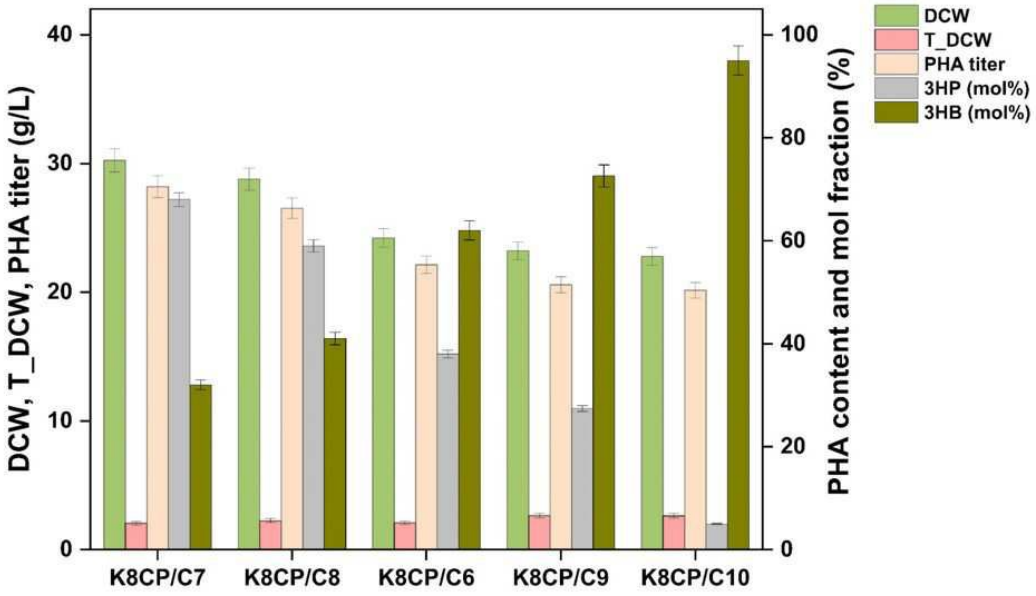


	K2CP/C6	K3CP/C6	K4CP/C6	K8CP/C6
poxB	X	X	X	X
adhE	X	X	X	X
ldh	X	X	X	X
pta-acka		X	X	X
yciA			X	X
pdhR				X

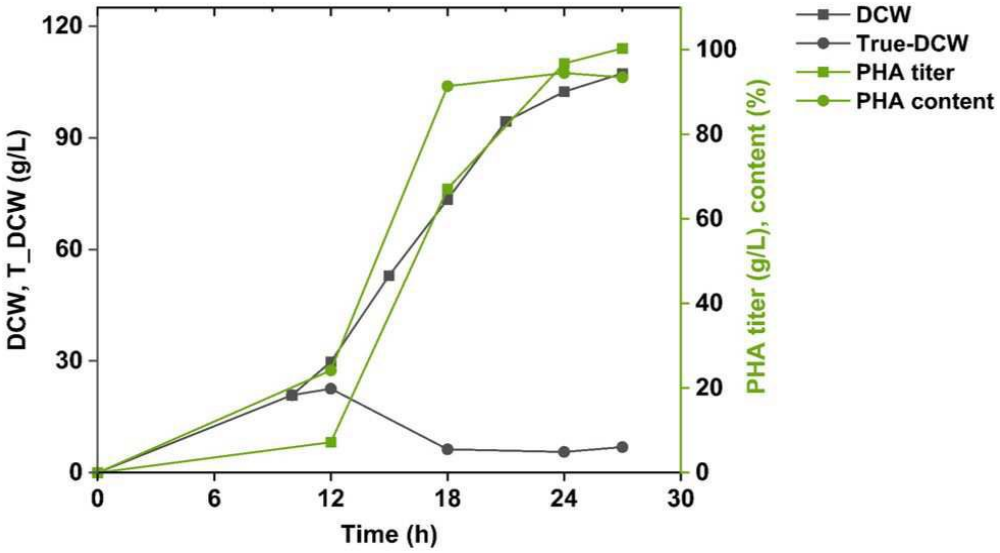
도면8



도면9


DCW
T_DCW
PHA titer
3HP (mol%)
3HB (mol%)
DCW, T_DCW, PHA titer (g/L)
PHA content and mol fraction (%)
0
10
20
30
40
0
20
40
60
80
100
K8CP/C7
K8CP/C8
K8CP/C6
K8CP/C9
K8CP/C10

도면10


DCW
True-DCW
PHA titer
PHA content
DCW, T_DCW (g/L)
PHA titer (g/L), content (%)
0
30
60
90
120
0
20
40
60
80
100
0
6
12
18
24
30
Time (h)

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

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