

 (19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2013-0000615 (43) 공개일자 2013년01월03일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>C12N 15/70</i> (2006.01) <i>C12N 15/52</i> (2006.01) <i>C12N 15/67</i> (2006.01) <i>C12P 7/64</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2011-0061249 (22) 출원일자 2011년06월23일 심사청구일자 2011년06월23일	(71) 출원인 서강대학교산학협력단 서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교) (72) 발명자 이진원 서울특별시 송파구 양재대로 1218, 올림픽션수 기 자촌아파트 201-1601호 (방이동) 전은영 서울특별시 중구 퇴계로90길 59-8, C동 402호 (신 당동, 동남빌라) (뒷면에 계속) (74) 대리인 양부현

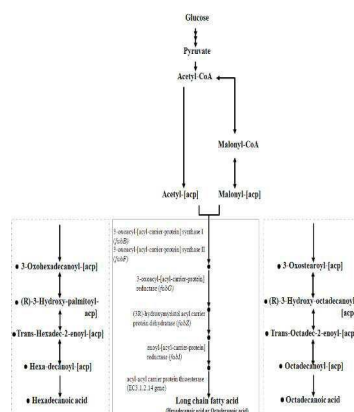
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 지방산 과발현용 형질전환 대장균의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 지방산 과발현용 형질전환 대장균의 제조방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는, (a) *fabB*(3-옥소아실-[아실-전송-단백질] 신타아제 I), *fabG*(3-옥소아실-[아실-전송-단백질] 리덕타아제), *fabZ*(3R-하이드록시미리스톨 아실 전송 단백질 디하이드레타아제) 또는 *fabI*(이노일-[아실-전송-단백질] 리덕타아제)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 뉴클레오타이드 서열을 발현 벡터에 삽입시키는 단계; 및 (b) 상기 *fabB*, *fabG*, *fabZ* 및 *fabI*를 코딩하는 뉴클레오타이드가 삽입된 발현벡터로 대장균을 형질전환 시키는 단계에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 본 발명은 지방산 생합성 경로의 과발현용 형질전환 대장균의 제조방법을 제공할 수 있으며, 글루코오스를 하이드로카본으로 전환시키는 지방산 신장 단계의 재조합 대장균을 제공한다. 또한 본 발명은 하나 이상의 유전자 조합에 따라 미생물의 지방산 생합성 대사산물의 생산을 증대 할 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

이선희

서울특별시 은평구 불광로6길 10-10, 101호 (불광동)

이승한

서울특별시 송파구 올림픽로 135, 248동 2603호 (잠실동, 리센츠)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2010-0029800

부처명 교육과학기술부

연구사업명 글로벌 프론티어연구개발사업(차세대 바이오매스 연구)

연구과제명 대사경로 개선을 통한 지방산 및 지방산 유래 유용물질 생산 균주 개발과 생산공정 최적화

주관기관 서강대학교 산학협력단

연구기간 2010.10.22 ~ 2019.08.21

특허청구의 범위

청구항 1

다음을 포함하는 지방산 과발현용 형질전환 대장균의 제조방법:

(a) *fabB*(3-옥소아실-[아실-전송-단백질] 신타아제 I), *fabG*(3-옥소아실-[아실-전송-단백질] 리덕타아제), *fabZ*(3R-하이드록시미리스톨 아실 전송 단백질 디하이드레타아제) 또는 *fabI*(이노일-[아실-전송-단백질] 리덕타아제)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열로 구성된 균으로부터 선택되는 하나 이상의 뉴클레오타이드 서열을 발현 벡터에 삽입시키는 단계; 및

(b) 상기 *fabB*, *fabG*, *fabZ* 및 *fabI*를 코딩하는 뉴클레오타이드가 삽입된 발현벡터로 대장균을 형질전환 시키는 단계.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 *fabB*를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 형질전환 대장균의 제조방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 *fabG*를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제2서열의 뉴클레오타이드서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 형질전환 대장균의 제조방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 *fabZ*를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제3서열의 뉴클레오타이드서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 형질전환 대장균의 제조방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 *fabI*를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제4서열의 뉴클레오타이드서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 형질전환 대장균의 제조방법.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 발현벡터는 프로모터 서열 및 *fabB* 유전자의 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 형질전환 대장균의 제조방법.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 발현벡터는 프로모터 서열 및 *fabG* 유전자의 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 형질전환 대장균의 제조방법.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 발현벡터는 프로모터 서열 및 *fabZ* 유전자의 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 형질

전환 대장균의 제조방법.

청구항 9

제 1 항에 있어서, 상기 발현백터는 프로모터 서열 및 *fabI* 유전자의 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 형질 전환 대장균의 제조방법.

청구항 10

제 1 항에 있어서, 상기 발현백터는 프로모터 서열, *fabB* 유전자의 서열 및 *fabI* 유전자의 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 형질전환 대장균의 제조방법.

청구항 11

제 1 항에 있어서, 상기 발현백터는 프로모터 서열, *fabB* 유전자의 서열 및 *fabG* 유전자의 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 형질전환 대장균의 제조방법.

청구항 12

제 1 항에 있어서, 상기 발현백터는 프로모터 서열, *fabZ* 유전자의 서열 및 *fabI* 유전자의 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 형질전환 대장균의 제조방법.

청구항 13

제 1 항에 있어서, 상기 발현백터는 프로모터 서열, *fabB* 유전자의 서열, *fabZ* 유전자의 서열 및 *fabG* 유전자의 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 형질전환 대장균의 제조방법.

청구항 14

제 1 항에 있어서, 상기 발현백터는 프로모터 서열, *fabB* 유전자의 서열, *fabZ* 유전자의 서열 및 *fabI* 유전자의 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 형질전환 대장균의 제조방법.

청구항 15

제 1 항에 있어서, 상기 발현백터는 프로모터 서열, *fabB* 유전자의 서열, *fabZ* 유전자의 서열, *fabG* 유전자의 서열 및 *fabI* 유전자의 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 형질전환 대장균의 제조방법.

청구항 16

제 6 항 내지 제 15 항에 있어서, 상기 프로모터는 lac 프로모터임을 특징으로 하는 형질전환된 대장균의 제조 방법.

청구항 17

제 6 항 내지 제 15 항에 있어서, 상기 발현백터는 서열목록 제 5 서열의 최소 서열로 포함하는 백본백터에 도입된 것을 특징으로 하는 형질전환된 대장균의 제조방법.

청구항 18

제 1 항에 있어서, 상기 대장균을 형질전환시키는 단계 (b)는 전기충격 방법으로 수행되는 것을 특징으로 하는 형질전환된 대장균의 제조방법.

청구항 19

상기 제 1 항 내지 제 18 항 중 어느 한 항의 방법으로 제조된 형질전환된 대장균.

명세서**기술분야**

[0001] 본 발명은 지방산 과발현용 형질전환 대장균의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 최근에 세계 각국은 고유가 시대 대비와 온실가스 저감화를 위해 환경 친화적인 바이오에너지 개발에 대한 심혈을 기울이고 있으며, 우리나라에서도 연료용 바이오에너지의 생산 필요성이 증가하는 추세이므로 국내 바이오에너지 산업의 국제 경쟁력 확보 및 산업화를 위해서는 새로운 바이오에너지 형태의 생산 기술력을 위한 연구가 중요하다.

[0003] 세계적 경제 성장에 따른 에너지 사용증가와 지속적인 가격상승을 보이는 화석연료 자원의 한정성으로 인하여 에탄올, 부탄올 및 바이오디젤과 같은 바이오에너지에 대한 관심이 증가하고 있지만, 언급된 종류의 바이오에너지 모두 전력생산이나 수송용 연료로 사용될 수 있으나, 실적용 및 생산 방법의 몇몇 단점으로 인해 새로운 신재생에너지 자원인 하이드로카본(hydrocarbon) 형태의 화합물에 대한 관심이 증가되고 있다. 이에 따라 장쇄(long chain) 지방산(fatty acid)을 대사산물로서 생성할 수 있는 재조합 균주에 대한 관심도 증대되고 있다.

[0004] 본 발명은 단독 미생물 내에서 발효 가능한 탄소 공급원으로부터 하이드로카본을 생물학적으로 생산하는 개선된 방법을 제공하기 위한 연구로서 지방산 생합성(fatty acid biosynthesis: FAS) 경로의 대사 흐름을 향상시키는 방법을 제공한다. 본 발명의 한 측면에서, 글루코오스를 하이드로카본으로 전환시키기 위한 대사의 흐름을 조절할 지방산 신장(elongation) 단계 재조합 방법은 지방산 생합성 경로의 효소들을 과발현 함으로써 신장 루프의 흐름이 활발하도록 돕는 것이다. 이를 실현하기 위해 말로닐-acp(아실-운반-단백질)를 3-옥소헥사데카노일-[acp] 및 3-옥소스티로일-[acp]로 전환하는 효소(3-옥소아실-[acp] 신티아제)를 코딩하는 *fabB* 유전자, 3-옥소헥사데카노일-[acp] 및 3-옥소스티로일-[acp]를 (R)-3-하이드록시-팔미토일-[acp] 및 (R)-3-하이드록시-옥타데카노일-[acp]로 전환하는 효소 (3-옥소아실-[아실-운반-단백질] 리덕타아제)를 코딩하는 *fabG*를 사용하여 형질전환한 대장균(*Escherichia coli*)을 사용하고, 이에 더하여, (R)-3-하이드록시-팔미토일-[acp] 및 (R)-3-하이드록시-옥타데카노일-[acp]를 트랜스-헥사텍-2-이노일-[acp] 및 트랜스-옥타텍-2-이노일-[acp]로 전환하는 효소인 (3R)-하이드록시미리스톨-[acp] 디하이드레이타제를 코딩하는 *fabZ*도 균주내로 도입하며, 마지막으로 트랜스-헥사텍-2-이노일-[acp] 및 트랜스-옥타텍-2-이노일-[acp]를 헥사-디카노일-[acp] 및 옥타데카노일-[acp]으로 전환하는 이노일-[acp] 리덕타아제의 과생산을 위한 *fabI* 유전자를 삽입하여 지방산생산 재조합 균주 개발을 달성한다. 본 형질전환 대장균을 통해 야생종 대장균이 생산하는 말론산 및 지방산 생산량과의 차이를 규명하였다.

[0005] 지방산은 화학 또는 생화학적으로 카복실산을 말한다. 사슬 모양의 포화 혹은 불포화 모노카르복시산을 말하며, 지방을 가수분해하면 글리세롤과 지방산이 분리되어 생기기 때문에 이러한 이름이 붙었다. 가장 단순한 지방산은 부티르산(4탄소)이지만, 자연에 존재하는 지방산은 탄소 수가 8개(카프릴산) 이상이며 모두 짝수의 탄소 수를 갖고 있다.

[0006] 미생물 생체 내에서의 지방산합성은 아세틸-CoA(acetyl-CoA)에서 시작하여, 그 뒤 탄소원자가 한 번에 두 개의 원자씩 탄화수소사슬에 붙어 사슬이 길어지게 된다. 이와작용은 그와 반대방향으로 진행이 된다. 즉, 카복실 그룹에서 시작하여 아세틸-CoA로 끝나며, 탄화수소사슬의 단편과 아세틸-CoA는 대장균(*Escherichia coli*)의

시트르산회로(TCA cycle)에서 산화되어 ATP 형태로 저장되는 에너지를 제공한다.

[0007]

지방산 생합성은 연속적으로 두 개의 탄소단위가 성장 사슬에 덧붙여지며 이루어진다. 말로닐-CoA의 말로닐 그룹에 있는 세 개의 탄소원자 중 두 개가 생합성 반응의 각 단계마다 지방산 사슬에 더해진다. 이 반응은 말로닐-CoA 형성과 마찬가지로 세포질에 있고 막과 결합되어 있지 않는 다효소 복합체가 필요하다. 개별적인 효소들로 구성되어 있는 이 복합체는 지방산 합성효소를 말한다. 이러한 지방산 신티아제 복합체의 일부인 아실 운반 단백질(acyl carrier protein: ACP)은 아세틸-CoA의 아세틸 그룹이 지방산의 탄소 수를 증가시키기 위한 결합에 관여한다.

Step 1. Priming of the system by acetyl-CoA

a. ACP-Acyltransferase reaction



b. Transfer to β -ketoacyl-ACP synthase



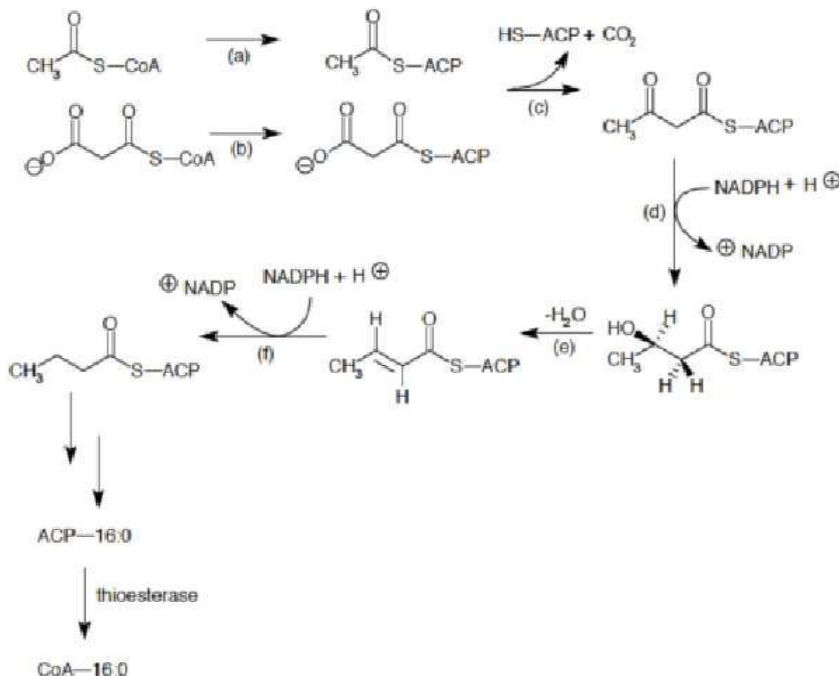
Step 2. ACP-malonyltransferase reaction (malonyl transfer to system)



[0008]

[0009]

ACP는 지방산 생합성에 특별히 사용되는 특별한 형태의 CoA(coenzyme A)에 해당된다. 아세틸 트랜스아실라제(Acetyl transacylase)는 아세틸-ACP를 합성 및 아세틸 이외의 다른 아실기들도 운반하며 말로닐 트랜스아실라제(Malonyl transacylase)는 말로닐-ACP를 합성한다. 아실-말로닐-ACP 축합 효소(Acyl-malonyl-ACP condensing enzyme, β -ketoacyl-ACP synthase)는 아세틸-ACP와 말로닐-ACP가 축합되어 아세토아세틸-ACP가 생성된다. 결과적으로 말로닐-CoA에 첨가된 CO_2 는 이 과정에서 제거된다. 이 반응은 열역학적으로 불리한 반응을 가능케 하는 탈카르복실화 반응에 해당된다.



[0010]

- [0011] β -케토아실-ACP 리덕타아제는 아세토아세틸-ACP를 환원하여 D- β -하이드록시부티릴-ACP를 만든다. NADPH를 환원보조효소로 사용한다는 것과 L형이 아닌 D형이라는 것이 산화과정과 다르다. 3-하이드록시아실-ACP 탈수효소는 탈수반응을 통해 크로토닐-ACP가 합성한다. 이노일-ACP 환원효소는 NADPH를 환원제로 사용하여 부티릴-ACP를 합성한다.
- [0012] 합성된 부티릴-ACP는 전단계로 돌아가 β -케토아실-ACP 합성효소와 결합하여 말로닐-ACP와 합쳐지는 반응이 계속된다. 이러한 순환반응은 탄소사슬 16개가 될 때까지 계속된다. β -케토아실-ACP 합성효소는 이보다 큰 기질은 받아들이지 못하기 때문에 반응은 팔미토일-ACP로 끝나게 된다. 팔미토일-ACP는 가수분해되어 팔미테이트(palmitated)와 ACP로 전환된다. 결과적으로 7분자의 말로일-CoA와 1분자의 아세틸-CoA가 1분자의 팔미테이트를 합성하는데 이용된다. 말로일-CoA의 합성에 1분자의 ATP가 필요하고, 각 회로당 2분자의 NADPH가 사용되므로, 모두 7분자의 ATP와 14분자의 NADPH가 필요하게 된다.
- [0013] 미생물을 사용하여 FAS 경로의 활발한 대사흐름을 꾀한 효소의 과발현 목적에 해당하는 시도와 노력은 끊임없이 있어왔다. 대장균은 효소 생산 시스템으로 타 생물체에 비해 많은 대사정보가 알려져 있고, 유전자에 대한 정보가 거의 다 밝혀져 재조합 단백질 생산에 널리 이용되고 있다.
- [0014] 지방산 생합성의 요점이 되는 유전자와 대사경로의 반응 메커니즘에 대한 정보는 문헌 H. Marrakchi, Y.-M. nWhang and C. O. Rock, Mechanistic diversity and regulation of Type II fatty acid synthesis, Biochemical Society Transactions, Vol.30(6), 1050-1055, 2002.에 언급되어있다. 대장균의 지방산 생합성을 위한 대사 작용에 신장 주기 내부의 개별 유전자의 역할에 대해 문헌 Mechanistic diversity and regulation of Type II fatty acid synthesis, Biochemical Society Transactions, Vol.30(6), 1050-1055, 2002에 언급되어있다. 또한 지방산 생합성 내의 여러 효소에 의한 지방산 합성 대사 네트워크가 진행됨이 참고 문헌에 나타났다(Current understanding of fatty acid biosynthesis and the acyl carrier protein, Biochem. J, 430, 19, 2010).
- [0015] 따라서, 본 발명에서는 지방산 생합성 대사 경로의 여러 유전자 중에 신장 주기 내의 특정 단계 물질들의 세포 내 생산 증대 및 도입을 위해 표적 유전자 및 대사산물을 설정하고, 특정 대사산물을 효율적으로 생산하는 균주를 개발하기 위해서 미생물의 게놈 정보와 대사 네트워크를 이해함과 동시에 야생형 대장균에 적용하여, 표적 유전자의 삽입을 통한 재조합 균주를 개발하여 본 발명이 완성되었다.
- [0016] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0017] 본 발명자들은 안정적이고 효과적으로 지방산 생합성 경로를 과발현시킬 수 있는 형질전환 대장균의 제조방법 개발을 위하여 노력하였고 그 결과 *fabB*(3-옥소아실-[아실-전송-단백질] 신타아제 I), *fabG*(3-옥소아실-[아실-전송-단백질] 리덕타아제), *fabZ*(3R-하이드록시미리스톨 아실 전송 단백질 디하이드레타아제) 또는 *fabI*(이노일-[아실-전송-단백질] 리덕타아제)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열로 구성된 균으로부터 선택되는 하나 이상의 뉴클레오타이드 서열을 하나의 발현 벡터에 삽입시키고 상기 발현벡터로 대장균을 형질전환시키는 방법을 개발해 냄으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0018] 따라서 본 발명의 목적은 지방산 과발현용 형질전환 대장균의 제조방법을 제공하는 데 있다.
- [0019] 본 발명의 다른 목적은 상기 방법으로 제조된 지방산 과발현용 형질전환 대장균을 제공하는 데 있다.
- [0020] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0021] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음을 포함하는 지방산 과발현용 형질전환 대장균의 제조방법을 제공한다:
- [0022] (a) *fabB*(3-옥소아실-[아실-전송-단백질] 신타아제 I), *fabG*(3-옥소아실-[아실-전송-단백질] 리덕타아제), *fabZ*(3R-하이드록시미리스톨 아실 전송 단백질 디하이드레타아제) 또는 *fabI*(이노일-[아실-전송-단백질] 리덕타아제)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열로 구성된 균으로부터 선택되는 하나 이상의 뉴클레오타이드 서열을 발현 벡터에 삽입시키는 단계; 및
- [0023] (b) 상기 *fabB*, *fabG*, *fabZ* 및 *fabI*를 코딩하는 뉴클레오타이드가 삽입된 발현벡터로 대장균을 형질전환 시키는 단계.
- [0024] 본 발명자들은 유전자 조작을 통해 지방산 생합성 대사산물을 안정적이고 효과적으로 생산하는 균주의 개발을 위하여 예의 연구 노력하였고, 그 결과 *fabB*, *fabG*, *fabZ* 및 *fabI* 유전자로 대장균을 형질전환 시키는 경우 기초물질이 두 가지 경로를 통하여 지방산 회로로 유도되게 해주므로 매우 효과적으로 지방산 생합성 경로가 과발현됨을 확인하여, 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0025] 본 발명의 3-옥소아실-[아실-전송-단백질] 신타아제 I (3-Oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase I)는 malonyl-acp(acyl-carrier-protein)를 3-oxohexadecanoyl-[acp] 및 3-oxostearoyl-[acp]로 변환하는 과정에 관여하는 촉매이며, *fabB* 유전자가 이를 암호화하는 유전자이다.
- [0026] 본 발명의 발현벡터에서 발현되는 3-옥소아실-[아실-전송-단백질] 신타아제 I 는 대장균(*Escherichia coli*)으로부터 유래한 것을 사용하는 것이 바람직하다. 보다 바람직하게는 *E. coli* K-12 MG1655의 3-옥소아실-[아실-전송-단백질] 신타아제 I 를 발현하도록 할 수 있으며, 상기 3-옥소아실-[아실-전송-단백질] 신타아제 I 를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 보다 더 바람직하게는 서열목록 제1서열로 표시될 수 있다.
- [0027] 또한, 본 발명의 상기 3-옥소아실-[아실-전송-단백질] 리덕타아제(3-Oxoacyl-[acp] reductase)는 3-oxohexadecanoyl-[acp] 및 3-oxostearoyl-[acp]를 (R)-3-hydroxy-palmitoyl-[acp] 및 (R)-3-hydroxy-octadecanoyl-[acp]로 변환하는 과정에 관여하는 촉매이며, *fabG* 유전자가 이를 암호화하는 유전자이다.
- [0028] 본 발명의 발현벡터에서 발현되는 상기 3-옥소아실-[아실-전송-단백질] 리덕타아제는 대장균(*Escherichia coli*)으로부터 유래한 것을 사용하는 것이 바람직하다. 보다 바람직하게는 *E. coli* K-12 MG1655의 3-옥소아실-[아실-전송-단백질] 리덕타아제를 발현하도록 할 수 있으며, 상기 3-옥소아실-[아실-전송-단백질] 리덕타아제를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 보다 더 바람직하게는 서열목록 제2서열로 표시될 수 있다.
- [0029] 본 발명의 상기 3R-하이드록시미리스톨 아실 전송 단백질 디하이드레타아제(3R-hydroxymyristol acyl carrier protein dehydratase)는 (R)-3-hydroxy-palmitoyl-[acp] 및 (R)-3-hydroxy-octadecanoyl-[acp]를 trans-hexadec-2-enoyl-[acp] 및 trans-octadec-2-enoyl-[acp]로 변환하는 과정에 관여하는 촉매이며, *fabZ* 유전자가 이를 암호화하는 유전자이다.
- [0030] 본 발명의 발현벡터에서 발현되는 상기 3R-하이드록시미리스톨 아실 전송 단백질 디하이드레타아제는 대장균(*Escherichia coli*)으로부터 유래한 것을 사용하는 것이 바람직하다. 보다 바람직하게는 *E. coli* K-12 MG1655의 3R-하이드록시미리스톨 아실 전송 단백질 디하이드레타아제를 발현하도록 할 수 있으며, 상기 3R-하이드록시미리스톨 아실 전송 단백질 디하이드레타아제를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 보다 더 바람직하게는 서열목록 제3서열로 표시될 수 있다.
- [0031] 본 발명의 이노일-[아실-전송-단백질] 리덕타아제(enoyl-[acp] reductase)는 trans-hexadec-2-enoyl-[acp] 및 trans-octadec-2-enoyl-[acp]를 hexa-decanoyl-[acp] 및 octadecanoyl-[acp]로 변환하는 과정에 관여하는 촉매이며, *fabI* 유전자가 이를 암호화하는 유전자이다.
- [0032] 본 발명의 발현벡터에서 발현되는 상기 이노일-[아실-전송-단백질] 리덕타아제는 대장균(*Escherichia coli*)으로부터 유래한 것을 사용하는 것이 바람직하다. 보다 바람직하게는 *E. coli* K-12 MG1655의 이노일-[아실-전송-단백질] 리덕타아제를 발현하도록 할 수 있으며, 상기 이노일-[아실-전송-단백질] 리덕타아제를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 보다 더 바람직하게는 서열목록 제4서열로 표시될 수 있다.
- [0033] 상기에서 기술한, (a) 내지 (b)의 지방산 생합성 과정에 관여하는 효소들을 코딩하는 각각의 뉴클레오타이드 서열들은 발현 조절서열에 작동 가능하게 연결되어 발현 벡터 내에 삽입될 수 있다. 상기에서 '작동 가능하게

연결된다(operably linked to)'는 것은 하나의 핵산 단편이 다른 핵산 단편과 결합되어 그의 기능 또는 발현이 다른 핵산 단편에 의해 영향을 받는 것을 말한다. 또한, '발현 조절 서열(expression control sequence)'이란 특정한 숙주 세포에서 작동 가능하게 연결된 핵산 서열의 발현을 조절하는 DNA 서열을 의미한다. 그러한 조절 서열은 전사를 개시하기 위한 프로모터, 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다.

- [0034] 본 발명에서 제작되는 발현 벡터는 숙주 세포에서 원하는 유전자를 발현할 수 있도록 구축된다. 일반적으로, 발현 벡터는 프로모터-유전자-전사 종결서열의 발현 컨스트럭트를 포함한다.
- [0035] 본 발명에 있어서, 상기 발현벡터에 포함되는 프로모터는 강력한 발현능력을 가지는 것을 사용하는 것이 바람직하다.
- [0036] 바람직하게는, 본 발명의 발현 벡터는 박테리아 용으로 프로모터서열 및 발현 대상 유전자(구조 유전자)의 뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 상기 서열들이 5'-3' 순서대로 연결되는 것이 바람직하다.
- [0037] 상기 발현벡터는 *lacZ* 유전자를 추가적으로 포함한다. *lacZ* 유전자는 β -galactosidase를 암호화 하고 있으며, 이 경우 구조 유전자를 암호화하는 뉴클레오타이드의 발현을 유도하기 위하여, IPTG(Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside)를 사용할 수 있다.
- [0038] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 발현벡터는 *fabB*, *fabG*, *fabZ* 및 *fabI*로 이루어진 군으로부터 선택되는 일 이상의 뉴클레오타이드 서열 전체를 포함할 수도 있다. 그러나, 본 발명의 발현벡터에는 상기 유전자들이 효소의 과발현 기능을 포함하여 최소한의 길이를 가지도록 RBS(ribosomal binding site) 및 효소발현에 꼭 필요한 부분을 포함하는 염기서열만을 서열로 정하여 삽입시키는 것이 숙주세포의 대사부담(metabolic burden)을 줄이는 측면에서 바람직하다. 발명의 실시예에서는 서열목록 제5서열을 최소 서열로 포함하는 발현벡터 pSTV28를 사용하였다.
- [0039] 본 발명에서 사용되는 발현벡터란 구조유전자를 암호화하는 핵산이 삽입될 수 있고, 숙주 세포 내에서 상기 핵산을 발현할 수 있는 당 분야에 공지된 플라스미드, 바이러스 벡터 또는 기타 매개체를 의미하며 바람직하게는 플라스미드 벡터일 수 있다.
- [0040] 상기 플라스미드로는 대장균에서 복제 및 발현이 가능한 운반체라면 당업계에 공지된 그 어떠한 것이라도 사용할 수 있다.
- [0041] 보다 바람직하게는, 상기 발현벡터는 프로모터 서열 및 *fabB* 유전자의 서열을 포함하며, '*E.coli* JES1020' 이라 명명하였다.
- [0042] 보다 바람직하게는, 상기 발현벡터는 프로모터 서열 및 *fabG* 유전자의 서열을 포함하며, '*E.coli* JES1021' 이라 명명하였다.
- [0043] 보다 바람직하게는, 상기 발현벡터는 프로모터 서열 및 *fabZ* 유전자의 서열을 포함하며, '*E.coli* JES1022' 이라 명명하였다.
- [0044] 보다 바람직하게는, 상기 발현벡터는 프로모터 서열 및 *fabI* 유전자의 서열을 포함하며, '*E.coli* JES1023' 이라 명명하였다.
- [0045] 보다 바람직하게는, 상기 발현벡터는 프로모터 서열, *fabB* 유전자의 서열 및 *fabI* 유전자의 서열을 포함하며, '*E.coli* JES1024' 이라 명명하였다.
- [0046] 보다 바람직하게는, 상기 발현벡터는 프로모터 서열, *fabB* 유전자의 서열 및 *fabG* 유전자의 서열을 포함하며, '*E.coli* JES1025' 이라 명명하였다.
- [0047] 보다 바람직하게는, 상기 발현벡터는 프로모터 서열, *fabZ* 유전자의 서열 및 *fabI* 유전자의 서열을 포함하며, '*E.coli* JES1026' 이라 명명하였다.
- [0048] 보다 바람직하게는, 상기 발현벡터는 프로모터 서열, *fabB* 유전자의 서열, *fabZ* 유전자의 서열 및 *fabG* 유전자의 서열을 포함하며, '*E.coli* JES1027' 이라 명명하였다.
- [0049] 보다 바람직하게는, 상기 발현벡터는 프로모터 서열, *fabB* 유전자의 서열, *fabZ* 유전자의 서열 및 *fabI* 유전자의 서열을 포함하며, '*E.coli* JES1028' 이라 명명하였다.
- [0050] 보다 바람직하게는, 상기 발현벡터는 프로모터 서열, *fabB* 유전자의 서열, *fabZ* 유전자의 서열, *fabG* 유전자의

서열 및 *fabI* 유전자의 서열을 포함하며, '*E. coli* JES1029' 이라 명명하였다.

[0051] 바람직하게는, 본 발명에서 제조되는 발현벡터의 프로모터는 lac 프로모터이다.

[0052] 본 발명의 *fabB*, *fabZ*, *fabG* 및 *fabI* 유전자를 포함하는 발현 벡터는 당업계에 공지된 방법, 예를 들어 이에 한정되지는 않으나, CaCl₂ 완충액을 사용한 컴피턴트 세포를 만든 후 열충격(42℃) 방법에 의해 발현벡터를 숙주 세포내로 넣는 방법, 전기 충격에 의한 형질전환 방법, 일시적 형질감염(transient transfection), 미세주사, 세포융합, 칼슘 포스페이트 침전법, 전기침공법(electroporation) 등에 의해 숙주 세포 내로 도입할 수 있다. 형질전환체의 안정적 제조와 효율을 높이기 위해서는 전기 충격에 의한 형질전환 방법을 사용하는 것이 바람직하다.

[0053] 지방산 생합성 경로를 과발현 하도록 형질전환 시킬 숙주세포 대장균으로는 산업 미생물로 적용가능하고 그 기능이 뛰어난 야생종을 선정한다. 박테리아 그람 음성인 대장균(*Escherichia coli*) 속별 특징을 확인 및 비교하여 가장 그 기능이 뛰어난 야생종을 선정할 수 있다. 상기 에세리키아 속 미생물은 박테리아 그람 음성형 대장균인 *Escherichia coli*이며, 예를 들어 MG1655, W3110, DH5α, XL1-Blue 및 BL21이 포함된다. 바람직하게는 대장균 K-12 MG1655이다.

[0054] 본 발명의 헥사테카노산(hexadecanoic acid) 및 옥타테카노산(octadecanoic acid)의 생산 증대를 위한 에세리키아 속 미생물은 내재적으로 지방산 생합성 경로를 가지고 있는 것이나, 지방산(fatty acid)를 생산하기 위한 효소를 코딩하는 유전자 즉 *fabB*, *fabZ*, *fabG* 및/또는 *fabI* 유전자가 추가적으로 도입되고, 상기 지방산(fatty acid)를 생산하기 위한 효소를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열이 증폭, 즉 과발현 되는 균주이다. 이와 관련하여, 용어 '증폭'은 예를 들어 강력한 프로모터를 사용하거나 활성이 높은 적절한 효소를 암호화하는 유전자를 사용하고 임의로 이들 수단을 함께 사용하여 유전자(들)의 카피수를 증가시킴으로써, 적합한 DNA에 의해 암호화되는 하나 이상의 효소의 세포내 활성을 미생물 내에서 증가시키는 것을 기술한다.

[0055] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 본 발명의 방법으로 제조된 형질전환 대장균을 제공한다.

[0056] 상기 형질전환 대장균 내에서 생합성된 지방산을 분리하는 단계는 당업계에 공지된 통상의 분리 또는 정제 방법에 따라 실시될 수 있다(참조: B. Aurousseau et al., *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 57(3):1558-9331(1980); Frank C. Magne et al., *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 34(3):127-129(1957)).

발명의 효과

[0057] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0058] (a) 본 발명은 지방산 생합성 경로의 과발현용 형질전환 대장균의 제조방법을 제공할 수 있다.

[0059] (b) 본 발명은 글루코오스를 하이드로카본으로 전환시키는 지방산 신장 단계의 재조합 대장균을 제공한다.

[0060] (c) 본 발명은 하나 이상의 유전자 조합에 따라 미생물의 지방산 생합성 대사산물의 생산을 증대 할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0061] 도 1은 *Escherichia coli* 생체 내에서 글루코오즈에서부터 지방산 생합성 경로를 보여주는 도식이다.

도 2은 *Escherichia coli*와 같은 박테리아용 발현벡터인 pSTV28에 *fabB* 유전자가 삽입되어있는 구조의 도식화이다. pJE120라 명명한다.

도 3는 *Escherichia coli* 와 같은 박테리아용 발현벡터인 pSTV28에 *fabG* 유전자가 삽입되어있는 구조의 도식화이다. pJE121라 명명한다.

도 4는 *Escherichia coli* 와 같은 박테리아용 발현벡터인 pSTV28에 *fabZ* 유전자가 삽입되어있는 구조의 도식화이다. pJE122라 명명한다.

도 5는 *Escherichia coli* 와 같은 박테리아용 발현벡터인 pSTV28에 *fabI* 유전자가 삽입되어있는 구조의 도식화이다. pJE123라 명명한다.

도 6는 *Escherichia coli* 와 같은 박테리아용 발현벡터인 pSTV28에 *fabB*와 *fabI* 의 유전자가 삽입되어있는 구조의 도식화이다. pJE124라 명명한다.

도 7는 *Escherichia coli* 와 같은 박테리아용 발현벡터인 pSTV28에 *fabB*와 *fabG* 의 유전자가 삽입되어있는 구조의 도식화이다. pJE125라 명명한다.

도 8는 *Escherichia coli* 와 같은 박테리아용 발현벡터인 pSTV28에 *fabZ*와 *fabI* 의 유전자가 삽입되어있는 구조의 도식화이다. pJE126라 명명한다.

도 9는 *Escherichia coli* 와 같은 박테리아용 발현벡터인 pSTV28에 *fabB*, *fabG*와 *fabZ* 의 유전자가 삽입되어있는 구조의 도식화이다. pJE127라 명명한다.

도 10는 *Escherichia coli* 와 같은 박테리아용 발현벡터인 pSTV28에 *fabB*, *fabZ*와 *fabI* 의 유전자가 삽입되어있는 구조의 도식화이다. pJE128라 명명한다.

도 11는 *Escherichia coli* 와 같은 박테리아용 발현벡터인 pSTV28에 *fabB*, *fabG* *fabZ*와 *fabI* 의 유전자가 삽입되어있는 구조의 도식화이다. pJE129라 명명한다.

도 12는 재조합 *Escherichia coli*의 성장곡선을 야생종 *Escherichia coli* 와 비교한 결과를 그린 그래프이다. 범례의 표시는 wtE.coliMG1655는 야생형 *E.coli* MG1655를 의미하며, E.coli.B는 *E.coli* JES1020, E.coli.G는 *E.coli* JES1021, E.coli.Z는 *E.coli* JES1022, E.coli.I는 *E.coli* JES1023, E.coli.BI는 *E.coli* JES1024, E.coli.BG는 *E.coli* JES1025, E.coli.ZI는 *E.coli* JES1026, E.coli.BGZ는 *E.coli* JES1027, E.coli.BZI는 *E.coli* JES1028, E.coli.BGZI는 *E.coli* JES1029를 의미한다.

도 13은 GC-MS로 분석한 야생종 *E. coli*와 재조합 *E. coli*의 세포내부에서 헥사데카노산(C16), 옥타데카노산(C18)의 생산량 차이를 나타낸 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 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.

실시예

각 유전자 조합의 발현을 위한 플라스미드 pJE120, pJE121, pJE122, pJE123, pJE124, pJE125, pJE126, pJE127, pJE128 및 pJE129의 제조

대장균 K-12의 염색체를 주형으로 하여 3-옥소헥사데카노일-[acp], 3-옥소스티로일-[acp], (R)-3-하이드록시-팔미토일-[acp], (R)-3-하이드록시-옥타데카노일-[acp], 트랜스-헥사텍-2-이노일-[acp], 트랜스-옥타텍-2-이노일-[acp], 헥사-데카노일-[acp] 및 옥타데카노일-[acp]의 생산을 위한 효소를 암호화하는 *fabB*, *fabG*, *fabZ*, *fabI*의 유전자서열(genebank, NCBI)을 중합효소연쇄반응(PCR, DaKaRa Korea) 방법을 통해 클로닝 하였다(표 1-2).

표 1

유전자서열 (genebank 히가번호)	유전자	생산 효소
서열목록 제 2 서열 (GeneID: 946799)	<i>fabB</i>	3-옥소아실-[아실-운반-단백질] 신타아제 I
서열목록 제 3 서열 (Gene ID: 945645)	<i>fabG</i>	3-옥소아실-[아실-운반-단백질] 리덕타아제
서열목록 제 4 서열 (Gene ID: 944888)	<i>fabZ</i>	(3R)-하이드록시미리스톨 아실 운반 단백질 디하이드레이타제
서열목록 제 5 서열 (Gene ID: 945870)	<i>fabI</i>	이노일-[아실-운반-단백질] 리덕타아제

표 2

[0067]

유전자	프라이머 서열		제한 효소
<i>fabB</i>	정방향	5 '-GAGCTCCAGAGGTATTGAATGAAACGTGC-3'	Sac I
	역방향	5 '-GGTACCTTAATCTTTCAGCTTGCGCA-3'	Kpn I
<i>fabG</i>	정방향	5 '-CCCGGGAAGAGGAAAATCATGAATTTGAAG-3'	Sma I
	역방향	5 '-GGATCCCAAATCGCGGTCAGACCATGTA-3'	BamH I
<i>fabZ</i>	정방향	5 '-GGATCCAGGAAGAGTATCTTGACTACTAACAATCATAC-3'	BamH I
	역방향	5 '-GTCGACTCAGGCCTCCCGGCTA-3'	Sal I
<i>fabI</i>	정방향	5 '-GTCGACAGGATTAAGCTATGGGTTTCTTT-3'	Sal I
	역방향	5 '-GCATGCTTATTTTCAGTTCGAGTTCGTTC-3'	Sph I

[0068]

표 1의 유전자들을 표 2에 열거된 프라이머를 사용하여 증폭하였다. 증폭된 산물을 표 2에 열거된 제한 효소를 이용하여 pSTV28 벡터(서열목록 제 9 서열, Seon-Won Kim et al., *Biotechnol. Prog.* 2007, 23, 599-605)에 도입하여 pJE120, pJE121, pJE122, pJE123, pJE124, pJE125, pJE126, pJE127, pJE128 및 pJE129를 제조하였다.

[0069]

도 2 내지 도 11은 상기 pJE120, pJE121, pJE122, pJE123, pJE124, pJE125, pJE126, pJE127, pJE128 및 pJE129라 명명된 벡터의 지도를 나타내는 도면이다. 각각의 중합효소연쇄반응은 통상적인 반응조건(10 mM Tris-HCl(pH9.0), 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100, 2 mM MgSO₄, Taq DNA 중합효소(DaKaRa))아래에서 95℃/5분(변성), 60℃/1분(어닐링), 72/1분(증폭)로 1회 수행한 후, 95℃/1분(변성), 60℃/30초(어닐링), 72/1분(증폭)로 30회 반복수행하였다. 마지막 단계로 안정적인 증폭을 위해 95℃/1분(변성), 60℃/1분(어닐링), 72/5분(증폭) 반응시켰다. 중합효소연쇄반응 후 증폭된 DNA는 1% 아가로스 젤 상에서 확인 후 정제하여 제한효소반응에 이용하였다. 제한효소 처리된 각각의 DNA 조각들을 pSTV28벡터의 다중삽입부위(multicloning site)에 도 2, 3, 4 및 5에 개시된 것과 같이 삽입하였다. 각 단계마다 삽입된 유전자의 삽입여부를 확인하기 위해 형질 전환된 대장균(*E. coli* DH5 α 컴피턴트 세포(HIT-DH5 α , 한국)에서 플라스미드를 추출하여 이를 다시 원래 삽입 부위의 제한효소로 처리하여 잘린 DNA 조각의 크기를 1% 아가로스 젤 상에서 전기영동하여 비교하는 방법을 사용하였다.

[0070]

대장균 형질전환체(transformant)의 제조

[0071]

통상적으로 클로닝용으로 많이 쓰이는 대장균의 경우 CaCl₂ 버퍼를 사용한 컴피턴트 세포를 만든 후 열충격(42℃) 방법에 의해 플라스미드를 숙주세포 내로 넣지만, 본 발명에서는 형질전환체의 안정적 제조와 효율을 높이기 위해 전기천공법에 의한 형질전환방법을 사용하였다.

[0072]

상기 전기충격에 의한 형질전환방법을 위해 16시간동안 배양된 200 μ l의 야생종 대장균 배양액을 250 ml 플라스크에 들어있는 50 ml의 LB(10 g/L 트립톤, 10 g/L NaCl, 5 g/L 효모 추출물)배지에 접종하여 배양액의 흡광도(absorbance)가 600 nm파장에서 0.6에 이르렀을 때, 배양액 전체에 해당하는 50 ml의 배양액은 원심분리하여 상등액과 세포를 분리한다. 수득한 세포를 10% 글리세롤 5 ml로 2-3회 반복적으로 세척해준 후, 10% 글리세롤 100-200 μ l로 희석한다. 희석한 세포를 50 μ l씩 분주하고 1-3 μ l의 플라스미드를 넣어준다.

[0073]

상기 플라스미드가 들어있는 분주된 50 μ l의 액체는 전기천공용 큐벳에 담아 전기 충격(1800 v, 25 μ F, 200 Ω)을 가한다. 미리준비해둔 1 ml LB(10 g/L 트립톤, 10 g/L NaCl, 5 g/L 효모 추출물)를 첨가한 뒤 1시간동안 37℃에서 배양한다. 배양된 형질전환체는 선택배지 클로람페니콜 (30 μ g/ml)는 이 첨가된 LB 고체배지)에서 단일균체가 생성될 때까지 배양한다.

[0074]

도 2 내지 도 11의 컨스트럭트를 제조하여 위와 같은 방법으로 발현벡터가 삽입된 재조합 대장균 10종이 개발하였다.

표 3

[0075]

개발균주	유전형
<i>E. coli</i> JES1020	<i>Escherichia coli</i> K12 MG1655::pSTV28::fabB

<i>E. coli</i> JES1021	<i>Escherichia coli</i> K12 MG1655::pSTV28::fabG
<i>E. coli</i> JES1022	<i>Escherichia coli</i> K12 MG1655::pSTV28::fabZ
<i>E. coli</i> JES1023	<i>Escherichia coli</i> K12 MG1655::pSTV28::fabI
<i>E. coli</i> JES1024	<i>Escherichia coli</i> K12 MG1655::pSTV28::fabB::fabI
<i>E. coli</i> JES1025	<i>Escherichia coli</i> K12 MG1655::pSTV28::fabB::fabG
<i>E. coli</i> JES1026	<i>Escherichia coli</i> K12 MG1655::pSTV28::fabZ::fabI
<i>E. coli</i> JES1027	<i>Escherichia coli</i> K12 MG1655::pSTV28::fabB::fabG::fabZ
<i>E. coli</i> JES1028	<i>Escherichia coli</i> K12 MG1655::pSTV28::fabB::fabZ::fabI
<i>E. coli</i> JES1029	<i>Escherichia coli</i> K12 MG1655::pSTV28::fabB::fabG::fabZ::fabI

[0076] 대장균의 배양 및 재조합 균주로부터 단백질의 생산

[0077] 형질 전환의 정확성이 확인된 각각의 균들을 LB배지에 12시간정도 배양시키고 글리세롤 농도가 25%가 되게 보관용 균액으로 만든 다음 -80℃에서 배양실험 시까지 저장하였다. 배양은 전기 보관용 균액 1 ml을 10 ml 튜브에 들어있는 클로람페니콜(50 µg/ml)이 첨가된 3 ml의 LB에 12시간동안 배양한 후, 이를 다시 500 ml 플라스크에 들어있는 클로람페니콜(50 µg/ml)이 첨가된 200 ml의 LB(10 g/L 트립톤, 10 g/L NaCl, 5 g/L 효모 추출물) 배지에 1/200의 전기 배양액을 접종하여 37℃, 170 rpm상태에서 24시간동안 배양하였다(도 12). 단백질 발현을 위해 배양액의 흡광도가 600nm파장에서 0.6에 이르렀을 때 유도물질인 1 mM IPTG(isopropylthio-β-D-galactoside, sigma, 미국)를 첨가하여 재조합 단백질의 발현을 유도하였다.

[0078] 재조합 대장균의 세포내로부터의 지방산 (fatty acid) 측정

[0079] 본 명세서의 실시예 중 ‘대장균의 배양 및 재조합 균주로부터 단백질의 생산’에 언급된 조건으로 배양한 배양액 중 IPTG를 첨가한 후 4시간 후와 24시간 동안 대장균의 양이 충분해 졌을 때 세포 내에 있는 지방산을 측정하기 위해서 지방산 추출을 다음과 같은 방법으로 진행하였다:

[0080] 추출과정은 5 단계로 나누어지며 첫 번째 과정 배양단계로 배양액 5 ml를 원심분리(4500 rpm, 10분)후 대장균은 -80℃에 저장하였다. 두 번째 과정은 비누화 (saponification)단계로 저장된 재조합 대장균들을 용액1(NaOH 45 g, MeOH 150 ml, 증류수 150 ml)을 1 ml 넣고 5-10초간 볼텍스 하였다. 100℃에서 5분 동안 반응해준 후 다시 5-10초 동안 볼텍스 해준 후 다시 100℃, 25분 반응시켜 준 후 열을 식혔다. 세 번째 과정은 메틸화 (methylation)단계로, 용액2(6 N HCl 325 ml, MeOH 275 ml)을 2 ml 넣고 5-10초 동안 볼텍스 해준 뒤 80℃에서 10분 동안 반응하였다. 반응이 끝난 후에는 빨리 열을 식혔다. 네 번째 단계는 추출 (extration)단계로, 용액3(헥산:메틸 테르-부틸 이스터=1:1) 1.25 ml을 첨가하고 10분간 위아래로 흔들어 준 뒤 층이 분리 되면 아래 층은 추출해서 버린다. 다섯 번째 단계는 GC로 분석을 용이하게 하기위해 세척단계로 앞 단계의 남은 상층액에 용액4(NaOH 10.8 g, 증류수 900 ml) 3 ml을 첨가해서 5분 동안 위아래로 흔들어 준 뒤 상층액을 추출하여 GC/MS로 분석하였다.

[0081] 본 발명에서 사용한 GC/MS는 5975 series MSD(휴렛팩커드(HP), 독일) 및 Agilent 7890A(휴렛팩커드(HP), 독일)이며 HP-5 컬럼(30m×0.32 mm, 필름 두께 0.25 µm)을 사용하였다. 분석하기 위한 GC 온도 조건은 40℃/5분, 220℃까지 3℃/분, 250℃까지 3℃/분 및 250℃/5분이었으며 MS 계면온도는 160℃이다.

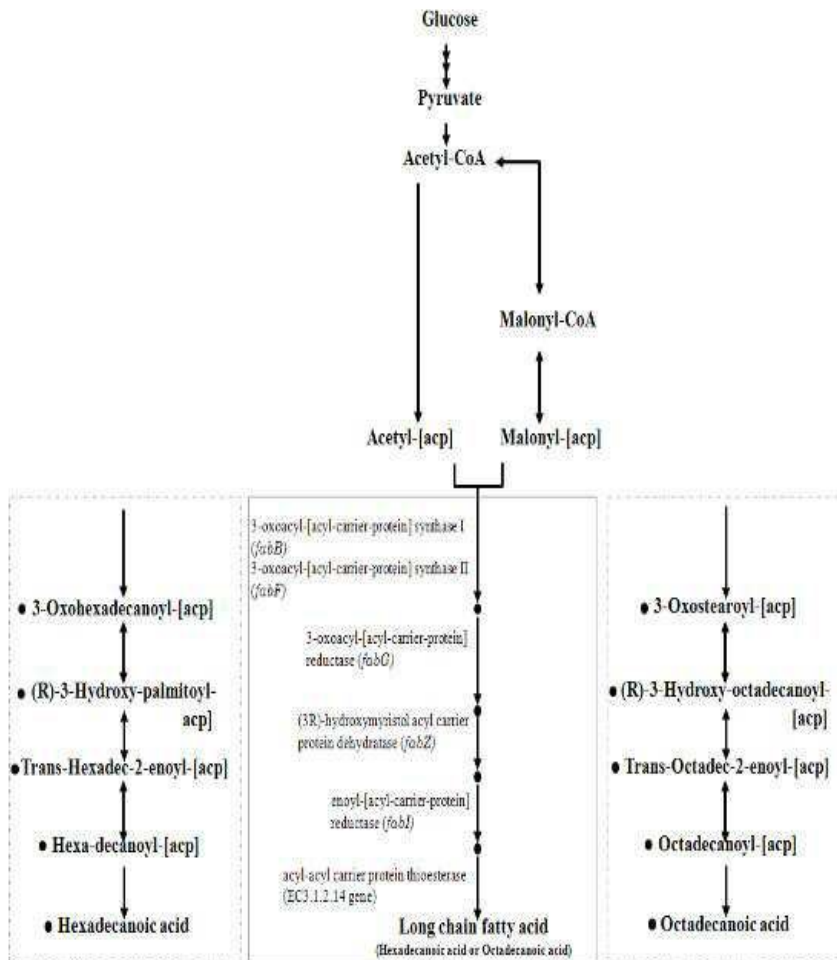
[0082] 이 추출 방법으로 헥사데카노산(C16)과 옥타데카노산(C18)이 추출되고 분석됨을 알 수 있었다. 이 결과, 야생종보다 지방산 합성에 관여하는 신장 주기의 유전자가 과발현 된 재조합 대장균의 지방산, 헥사데카노산(C16)과 옥타데카노산(C18)이 과량 생산 되었다(도 13). 특히, 대장균의 생장물을 고려하면 야생종과 비교했을 시에, 그들의 생장성이 삽입된 유전자에 의해 특별히 저해를 받지 않으면서도, fabB, fabG, fabZ 또는 fabI 유전자들로 구성된 균으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자를 발현 벡터에 삽입하여 형질전환 시킨 균주인 모든 재조합 대장균(*E. coli* JES1020-*E. coli* JES1029)이 야생종에 비해 지방산 생산성이 월등히 향상된 것을 알 수 있다(도 12 및 도 13). 도 13에서 보여지는 결과는 야생종 *E. coli* MG1655에 비해 생산물 지방산의 최고점이 현저히 높게 나타남을 증명하였다. 이 발명을 통해서 지방산 생합성 내부의 신장 단계에 위치한 fabB, fabG, fabZ 및 fabI 유전자가 지방산의 생산 증진에 중요한 역할을 한다는 것을 증명하였다.

[0083]

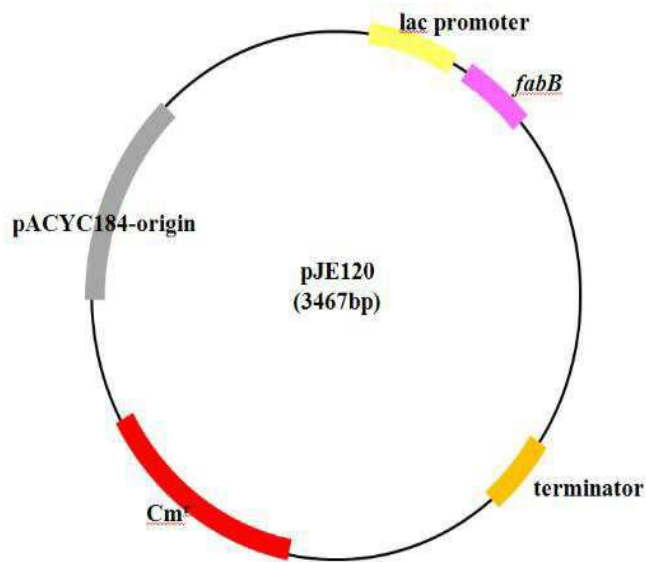
이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

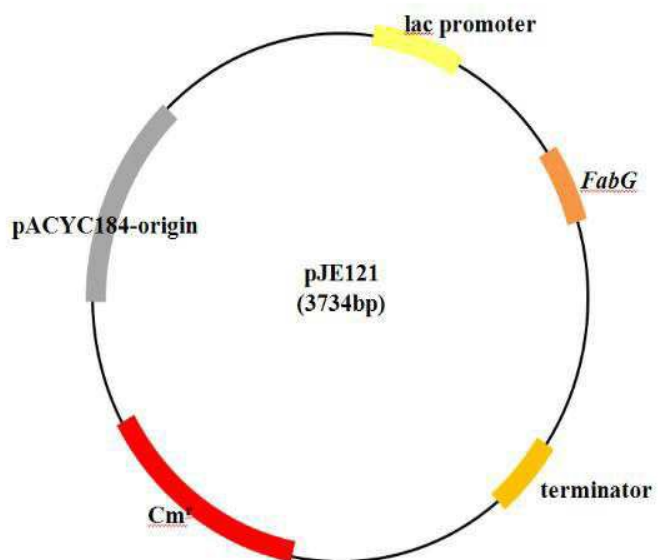
도면1



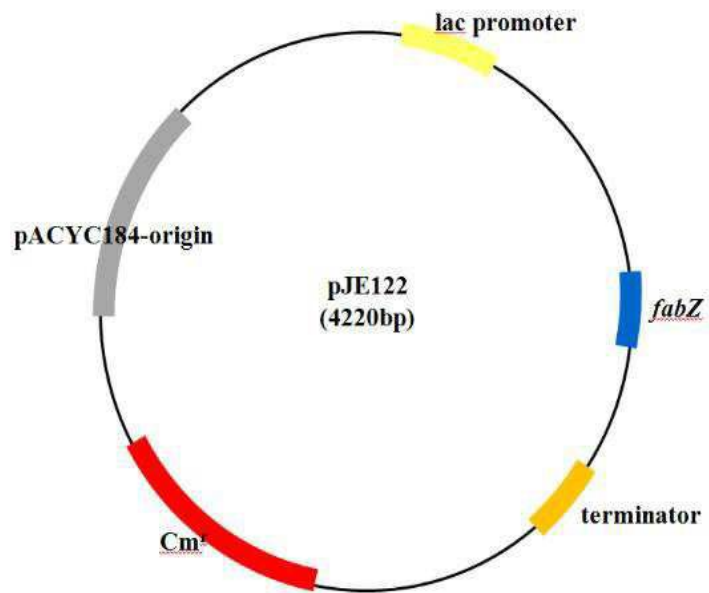
도면2



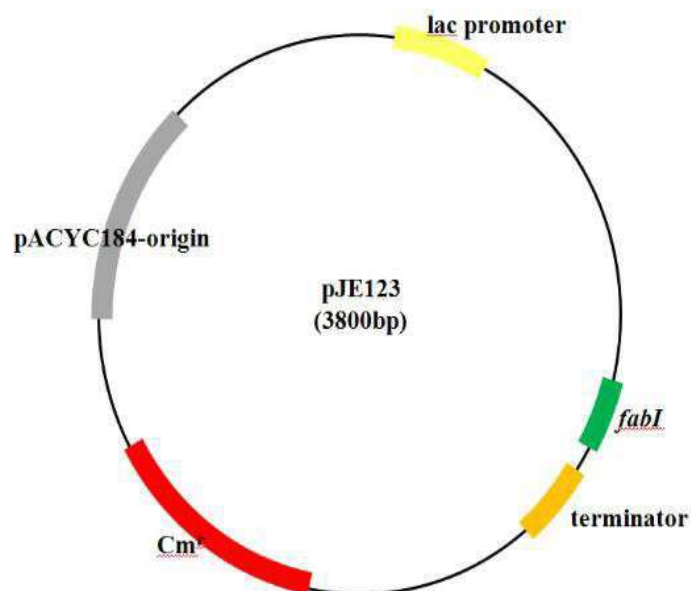
도면3



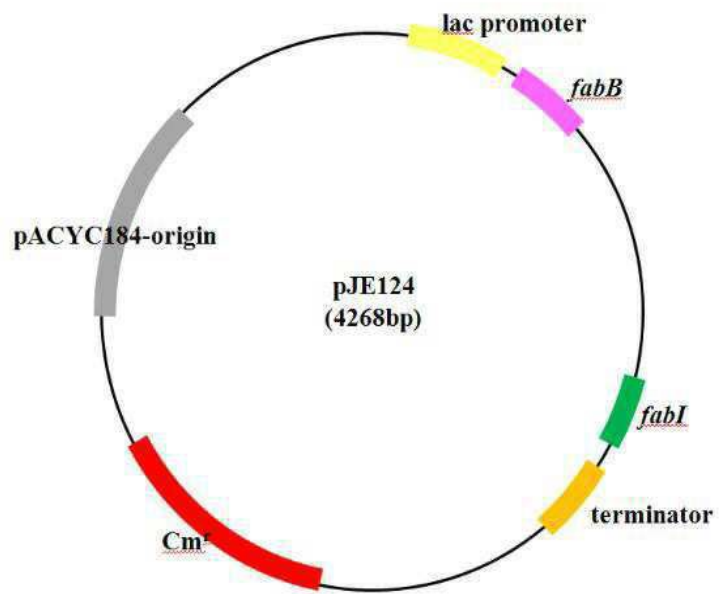
도면4



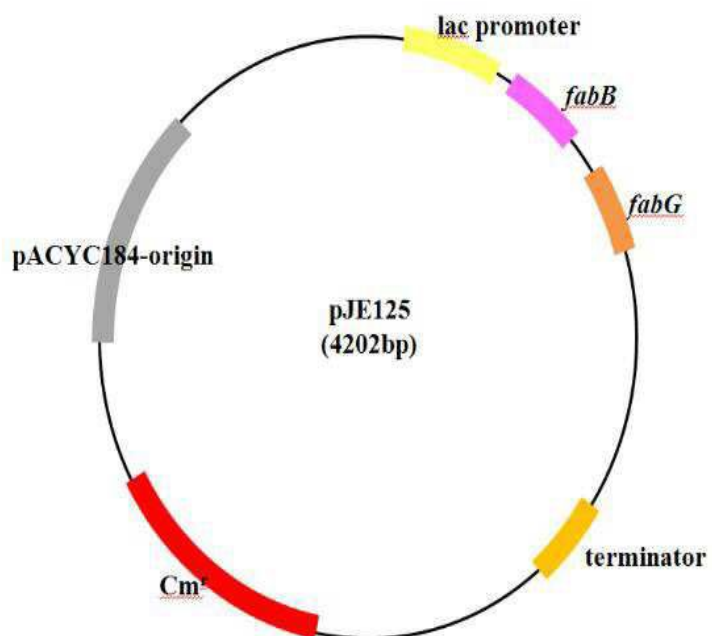
도면5



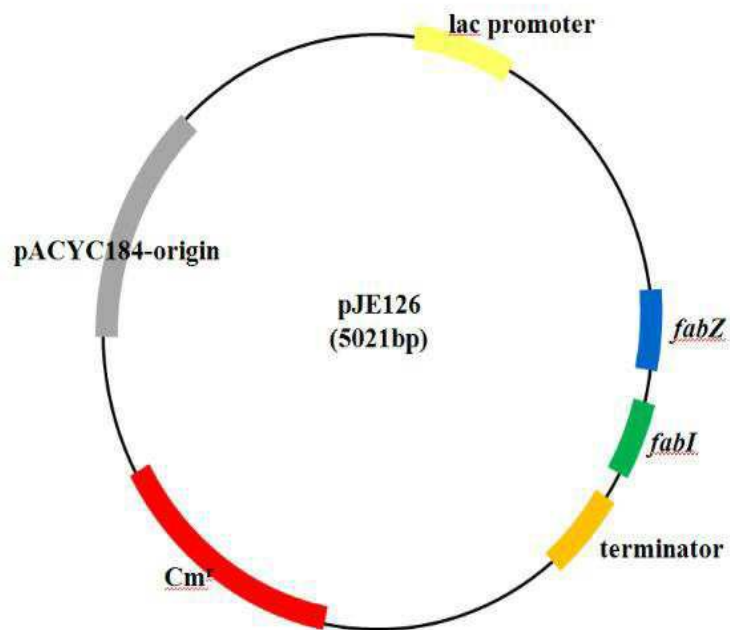
도면6



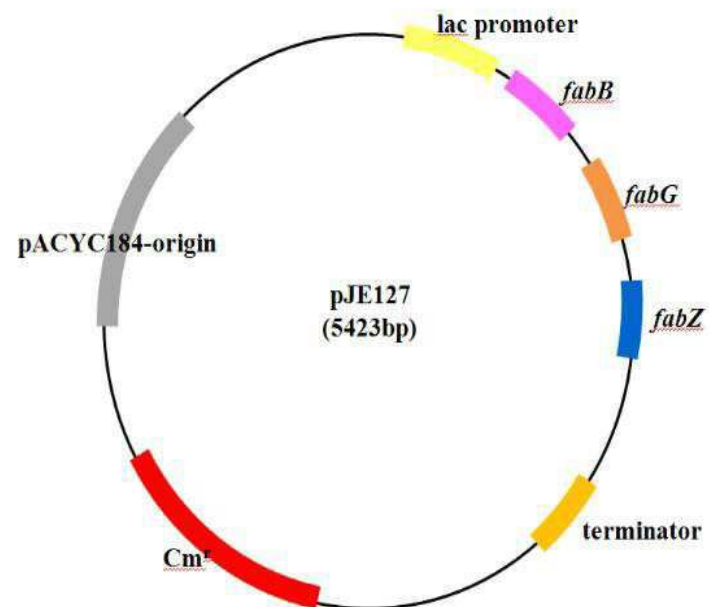
도면7



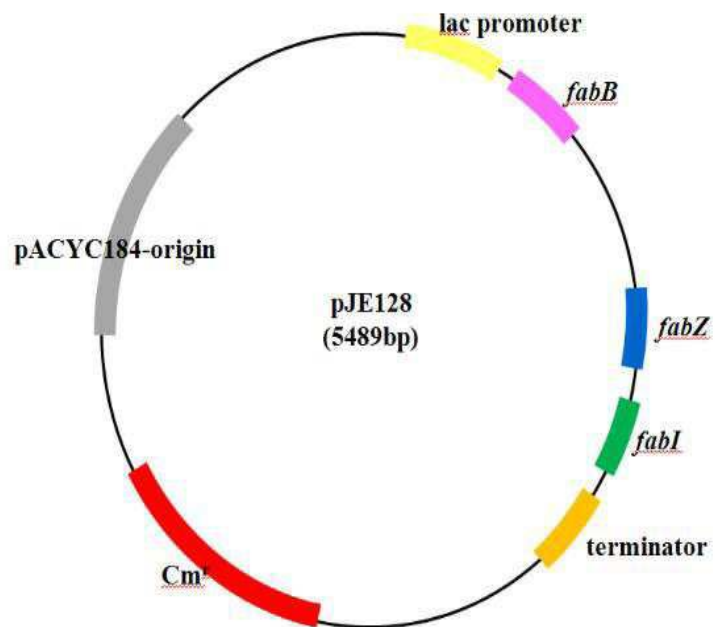
도면8



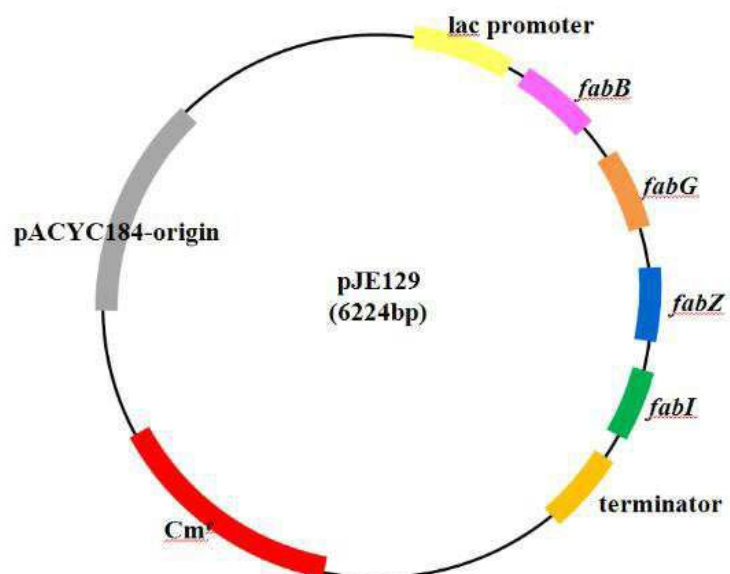
도면9



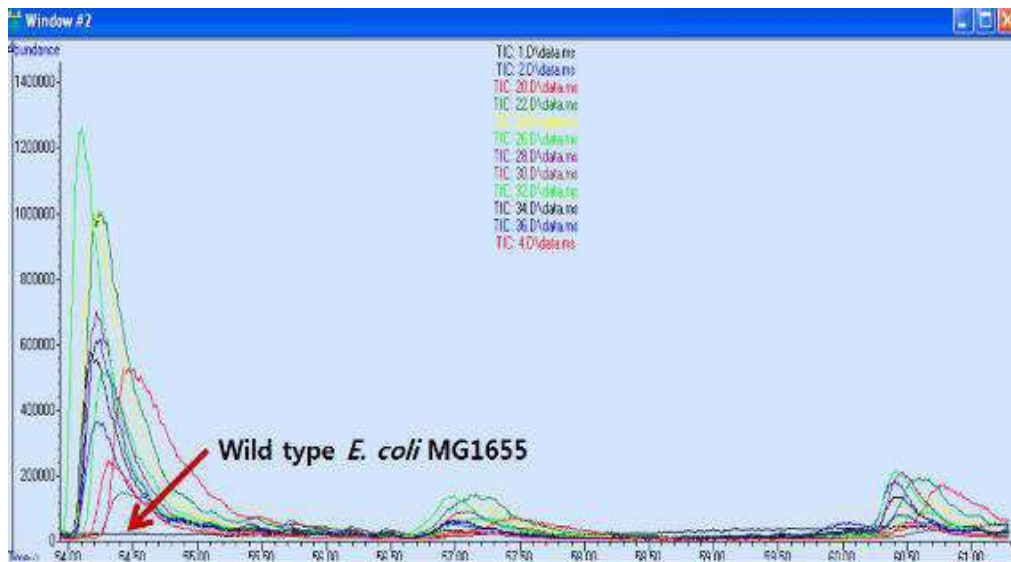
도면10



도면11



도면12



서열 목록

- <110> Industry-University Cooperation Foundation Sogang University
- <120> Method for Preparing Transformed E.coli for Over-expression of Fatty Acid
- <130> PN110343
- <160> 5
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 1221
- <212> DNA
- <213> 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase I
- <400> 1

ttaatctttc agcttgcgca ttaccagcgt ggcgttggtg ccgccgaagc cgaagctgtt	60
agacataacg gtggtcagtt cgcgatcggt cgtttcggtc acgatgttca gacccgcagc	120
ctgctcgtec agctcttcaa tgttgatgct cggggcgata aagccgtgtt ccagcatcag	180
cagagagtag atagcttcct gtacgccagc agcgcgcaga gaggaccgg tcatggcttt	240
ggttgcagaa atcgccgggc tcttatcgcc gaacacttca cggatagctg ccagctcttt	300
cacgtcgcca accggagtcg aagtaccgtg ggagttcagg taatcgattg gggtatcaac	360
gccatgcatc gccatcttca tgcagcgtac tgcgccttcg ccagacggag caaccatgtc	420
tgcaccatca gaggttgctc cgtagccaac gatttcagca tagatgtgag caccacgcgc	480
cagcgcgtgt tccagctctt caaccactac cataccgccg ccgccagcga taacgaaacc	540

gtcacggtga gcgtcgtaag tacgggaggc tttttccggg gtgtcgttgt atttagtaga 600

cagcgacccc attgcgtcga attcgcaagc catttcccag cacagctctt cgccgccgcc 660

agcaaacacg atgtcctgtt tgcccagttg gatctgctct actgcgttac cgatacagtg 720

tgcggaagtc gcacacgcgg agctgatgga gtagttaacg ccatgaattt taaacggggt 780

ggcgaggcag gcagaaacgc cggatgccat cgctttgggtg accacatacg ggccaaccgc 840

tttcaggccg cgcgggccgc gcattgcgtc agcgccgaac acctggaaac gcggggagcc 900

gccgccggaa cctgcaatca ggccaacgcg cgggttattc tggtaagctt ccggagagag 960

gcccgcata gcgattgcct gctccataga aaggaatgca taaatggatg cgtcgtcat 1020

aaagcgcaca accttgcggt caatgaggcc agtggtatcc agttttacgt tgccccagac 1080

gtggctacgc atgccggaat ctttcagctc ctgagagaaa gtgatccctg aacgtccttc 1140

acgcagagat gccaggactt cctgtgggtt attaccgatg ctggaacaa tgcccaggcc 1200

agtaatcact gcacgtttca t 1221

<210> 2

<211> 735

<212> DNA

<213> 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase

<400> 2

atgaattttg aaggaaaaat cgacttggtg accggtgcaa gccgcggaat tggccgcgca 60

attgctgaaa cgctgcgagc ccgtggcgcg aaagtattg gcactgcgac cagtgaaaat 120

ggcgctcagg cgatcagtga ttatttaggt gccaacggca aaggctgat gttgaatgtg 180

accgaccggg catctatcga atctgttctg gaaaaaattc gcgcagaatt tggatgaagt 240

gatatacctg tcaataatgc cggatcact cgtgataacc tgttaatgcg aatgaaagat 300

gaagagtgga acgataattat cgaaaccaac ctttcactctg tttccgtct gtcaaaagcg 360

gtaatgcgcg ctatgatgaa aaagcgtcat ggtcgtatta tctactatcg tctgtgtgtt 420

ggtaccatgg gaaatggcgg tcaggccaac tacgtgcgcg cgaaagcggg cttgatcggc 480

ttcagtaaat cactggcgcg cgaagttgcg tcacgcggtg ttactgtaa cgttgttgct 540

ccgggcttta ttgaaacgga catgacacgt gcgctgagcg atgaccagcg tgcgggtatc 600

ctggcgaggg ttcttgcggg tcgcctcggc ggcgcacagg aaatcgcaa cgcggttgca 660

ttctggcat ccgacgaagc agcttacatc acgggtgaaa ctttgcattg gaacggcggg 720

atgtacatgg tctga 735

<210> 3

<211> 456
 <212> DNA
 <213> (3R)-hydroxymyristol acyl carrier protein dehydratase
 <400> 3

ttgactacta acactcatac tctgcagatt gaagagattt tagaacttct gccgcaccgt 60

ttccccgttct tactggtgga tcgcgtgctg gatattgaag aaggtcgttt tctgcgcgca 120

glaaaaaatg tctctgtcaa tgagccattc ttccagggcc atttccttg aaaaccgatt 180

ttccccgggtg tgctgattct ggaagcaatg gcacaggcaa caggtattct ggcgtttaaa 240

agcgtaggaa aactggaacc gggtagctg tactacttcg ctggtattga cgaagcgcg 300

ttcaagcgcc cggtcgtgcc tggcgatcaa atgatcatgg aagtcacttt cgaaaaaacg 360

cgccgcggcc tgaccgttt taaaggggtt gctctggtcg atggtaaagt agtttgcgaa 420

gcaacgatga tgtgtgctcg tagccgggag gcctga 456

<210> 4
 <211> 789
 <212> DNA
 <213> enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase
 <400> 4

ttatttcagt tcgagttcgt tcattgcagc aatgctgaaa ccgccgtcaa cgtggaccac 60

ttcaccggag ataccggcag agagatcgga gcacaggaat gccgcagagt taccacatc 120

ttcaatagta acggtacggc gaatcggggt aacggcttcg caatgagcca gcattttgcg 180

gaagtctttg ataccggagg ccgccagagt acggatcgga ccagcagaga tggcgtaac 240

acgcacacct tccggacceca tcgcgttcgc catatagcgc acgttcgctt ccagagacgc 300

ttttgccaga ccataacgt tgtagttcgg gatagcgcgc tcagcgccaa ggtaggaaag 360

ggtcagcagg gcagaaccgg gattcagcat ggagcggcaa gcttttgcca ttgcaacgaa 420

gctgtaggag ctgatgtcgt gggcaatttt gaagccttca cgggtaacgg cgtaacata 480

gtcaccatcc agctgatcgc cagggtcaaa accaatagag tgtacgaaac cgtcaaattt 540

cggccaaact ttccccagtt cagcgaacat ggtgtcgatg ctggcatctt ctgcaacatc 600

gcactgcaga acgatgtcag aaccaattg agcggcaaat tcttctacgc ggcctttcag 660

tttgtcgttc tggtagggtga atgccagttc agtccttcg cggatgcacg cctgagcgat 720

accgtaggcg atggatagtt tgctggcaac accggttacc agaatgcgct taccggaaag 780

aaaacccat 789

<210> 5
 <211> 2999
 <212> DNA
 <213> pSTV28
 <400> 5

aaattccgga tgagcattca tcaggcgggc aagaatgtga ataaaggccg gataaaactt 60
 gtgcttattt ttctttacgg tctttaaaaa ggccgtaata tccagctgaa cggctctggtt 120
 ataggtacat tgagcaactg actgaaatgc ctcaaaatgt tctttacgat gccattggga 180
 tatatcaacg gtggtatata cagtgatattt ttctctcatt ttagcttcct tagctcctga 240
 aaatctcgat aactcaaaaa atacgcccgg tagtgatctt atttcattat ggtgaaagtt 300

ggaacctctt acgtgccgat caacgtctca ttttcgcaa aagttggccc agggcttccc 360
 ggtatcaaca gggacaccag gatttattta ttctgcgaag tgatcttccg tcacaggtat 420
 ttattcggcg caaagtgcgt cgggtgatgc tgccaactta ctgatttagt gtatgatggt 480
 gttttgagg tgcctcagtg gcttctgttt ctatcagctg tccctcctgt tcagctactg 540
 acggggtggt gcgtaacggc aaaagcaccg ccggacatca gcgctagcgg agtgtatact 600
 ggcttactat gttggcactg atgaggggtg cagtgaagtg cttcatgtgg caggagaaaa 660
 aaggctgcac cgggtgcgtc gcagaatatg tgatacagga tatattccgc ttcctcgctc 720

actgactcgc tacgtcgggt cgttcgactg cggcgagcgg aaatggctta cgaacggggc 780
 ggagatttcc tggaagatgc caggaagata cttaacaggg aagtgagagg gccgcggcaa 840
 agccgttttt ccataggtc cgccccctg acaagcatca cgaaatctga cgctcaaate 900
 agtggtagcg aaaccgaca ggactataaa gataccaggc gtttcccctg gcggtccct 960
 cgtgcgtct cctgttcctg ctttccggtt taccgggtgc attccgctgt tatggccgcg 1020
 tttgtctcat tccacgctg acactcagtt ccgggtaggc agttcgctcc aagctggact 1080
 gtagtcagca accccccgtt cagtccgacc gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg 1140

agtccaacce ggaaagacat gcaaaagcac cactggcagc agccactggt aattgattta 1200
 gaggagttag tcttgaagtc atgcgccgtt taaggctaaa ctgaaaggac aagttttggt 1260
 gactgcgtc ctccaagcca gttacctcgg ttcaaagagt tggtagctca gagaaccttc 1320
 gaaaaaccgc cctgcaaggc ggttttttcg ttttcagagc aagagattac gcgcagacca 1380
 aaacgatctc aagaagatca tcttattaat cagataaaat atttctagat ttcagtgcaa 1440
 tttatctctt caaatgtage acctgaagtc agccccatac gatataagtt gtaattctca 1500
 tgtttgacag cttatcatcg ataagctcat tcgccattca ggctgcgcaa ctgttgggaa 1560

gggcgatcgg tgcgggcctc ttcgctatta cgccagctgg cgaaaggggg atgtgctgca	1620
aggcgattaa gttgggtaac gccagggttt tcccagtcac gacgttgtaa aacgacggcc	1680
agtgccaagc ttgcatgcct gcaggtcgac tctagaggat ccccggttac cgagctcgaa	1740
ttcgtaatca tggatcatagc tgtttcctgt gtgaaattgt tatccgctca caattccaca	1800
caacatacga gccggaagca taaagtgtaa agcctggggg gcctaagtag tgagctaact	1860
cacattaatt gcgttgcgt cactgccgcg tttccagtcg ggaaacctgt cgtgccagct	1920
gcattaatga atcgccaac gcgcggggag aggcgggttg cgtattggaa cgccatgagc	1980
ggcctcattt cttattctga gttacaacag tccgcaccgc tgtccggtag ctcttccgg	2040
tgggcgcggg gcatgactat cgtcgccgca cttatgactg tcttctttat catgcaactc	2100
gtaggacagg tgccggcagc gcccaacagt ccccgccca cggggcctgc caccataccc	2160
acgccgaaac aagcgccctg caccattatg ttcgggatct gcatcgagg atgctgctgg	2220
ctacctgtg gaacacctac atctgtatta acgaagcgt aaccgttttt atcaggtctt	2280
gggaggcaga ataatgac atacgtcaa ttattacctc cacggggaga gcctgagcaa	2340
actggcctca ggcatttgag aagcacacgg tcacactgct tccggtagtc aataaacgg	2400
taaaccagca atagacataa gcggctattt aacgacctg cctgaaccg acgaccgggt	2460
cgaatttgct ttcgaatttc tgccattcat ccgttatta tcacttattc aggcgtagca	2520
ccaggcgttt aagggcacca ataactgcct taaaaaaatt acgccccgcc ctgccactca	2580
tcgcagtact gttgtaattc attagcatt ctgccgacat ggaagccatc acaaacggca	2640
tgatgaacct gaatgccag cggcatcagc acctgtgcg cttgcgtata atatttgccc	2700
atggtgaaaa cgggggcgaa gaagttgtcc atattggcca cgtttaaatc aaaactggtg	2760
aaactcacc agggattggc tgagacgaaa aacatatctt caataaacc tttagggaaa	2820
taggccaggt ttccaccgta acacgccaca tcttgcaat atatgtgtag aaactgccgg	2880
aaatcgtcgt ggtattcact ccagagcgt gaaaacgttt cagtttgctc atggaaaacg	2940
gtgtaacaag ggtgaacact atcccatatc accagtcac cgtctttcat tgccatacg	2999