



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0038377
(43) 공개일자 2020년04월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 1/20 (2006.01) *C12N 1/36* (2006.01)

C12P 7/46 (2006.01) *C12R 1/19* (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 1/20 (2013.01)

C12N 1/36 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0117634

(22) 출원일자 2018년10월02일

심사청구일자 2018년10월02일

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

(72) 발명자

김옥빈

경기도 고양시 일산동구 강송로125번길 52 610동 306호 (백석동, 흰돌마을6단지아파트)

김남연

서울특별시 서초구 매향로 16길 40

김유섭

서울특별시 서초구 서초중앙로 200 3동 102호 (서초동, 삼풍아파트)

(74) 대리인

특허법인한얼

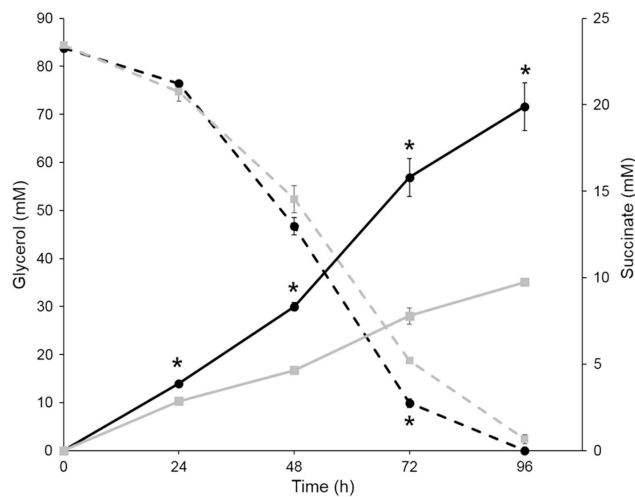
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 메탄균과의 공동배양을 통해 적응 진화된 대장균 및 이를 이용하여 폐글리세롤로부터 숙신산을 제조하는 방법

(57) 요약

본 발명은 메탄생성균과의 공동배양에 의해 적응진화되어, 숙신산 생산능이 향상된 대장균(*E.coli*) 균주, 상기 균주의 제조방법 및 상기 균주를 이용한 숙신산 제조 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

C12P 7/46 (2013.01)

C12R 1/19 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015R1A4A1041997

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기초연구실지원사업

연구과제명 적응진화 유전체 분석 연구실

기 여 율 1/1

주관기관 이화여자대학교

연구기간 2015.09.01 ~ 2020.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

메탄생성균과의 공동배양에 의해 적응진화되어, 숙신산 생산능이 향상된 대장균(*E.coli*) 균주.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 대장균은 포름산 생산능이 감소된 것인, 대장균 균주.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 숙신산은 글리세롤 발효에 의해 글리세롤을 소모하여 생산되는 것인, 대장균 균주.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 공동배양은 계대배양에 의한 것인, 대장균 균주.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 공동배양은 266일 내지 280일간 수행된 것인, 대장균 균주.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 메탄생성균은 메타노박테리움 포미시쿰(*Methanobacterium formicicum*) 인 것인, 대장균 균주.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 대장균은 수탁번호 KCTC 13592BP로 기탁된 것인, 대장균 균주.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 대장균 균주를 배양하는 단계를 포함하는, 숙신산 제조방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 대장균 균주는 메탄생성균과 공동배양되는 것인, 숙신산 제조방법.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 메탄생성균은 메타노박테리움 포미시쿰(*Methanobacterium formicicum*) 인 것인, 숙신산 제조방법.

청구항 11

야생형 대장균 및 메탄생성균을 계대배양을 통해 공동배양하는 단계를 포함하는, 숙신산 생성능이 향상되도록 대장균을 적응진화시키는 방법.

청구항 12

야생형 대장균 및 메탄생성균을 계대배양을 통해 공동배양하여 대장균을 적응진화시키는 단계를 포함하는, 숙신산 생성능이 향상된 대장균의 제조 방법.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 계대배양은 일주일 단위로 수행되는 것인, 대장균을 적응진화시키는 방법.

청구항 14

제11항에 있어서, 상기 공동배양은 266일 내지 280일간 수행되는 것인, 대장균을 적응진화시키는 방법.

청구항 15

제11항에 있어서, 상기 적응진화된 대장균은 수탁번호 KCTC 13592BP로 기탁된 것인, 대장균을 적응진화시키는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 메탄생성균과의 공동배양에 의해 적응진화되어, 숙신산 생산능이 향상된 대장균(*E.coli*) 균주, 상기 균주의 제조방법 및 상기 균주를 이용한 숙신산 제조 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 21세기 들어서 중국, 인도 등과 같은 거대 신흥공업국가들의 출현과 세계경제의 지속적 팽창으로 인하여 화석연료 사용량이 해마다 증가하고 있으며, 화석연료의 사용과정에서 발생하는 이산화탄소는 주요 온실가스로서 지구 온난화에 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 이러한 화석연료의 대체연료로 개발된 바이오디젤은 제조과정이 간단하고 기존 경유와 혼합 이용이 가능하나, 바이오디젤 생산 시 부산물로서 발생하는 폐글리세롤은 바이오디젤 생산량의 약 10%를 차지하는바, 이의 처리가 문제되고 있다.

[0004] 숙신산은 TCA 회로의 중간 대사 산물로, 가장 단순한 이카르복실 유기산이다. 숙신산을 이용하여 여러가지 폴리에스테르 화합물을 제조할 수 있기 때문에, 숙신산은 식료품, 의류, 의약, 플라스틱 등 산업적인 유도체로 여러 방면에 활용되며 석유화학 기술의 한 축을 담당할 정도로 그 용도가 다양하다 (Willke et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., 66:131, 2004). 숙신산의 세계시장은 현재 약 20조 원 규모로 형성되어 있고, 지금까지 생산 플랫폼의 대부분은 화학합성을 통한 생산이었으나, 생물 공정을 통한 숙신산 생산의 비중이 상당히 높아지고 있으며, 이에 생물공학적인 방법을 통하여 숙신산을 대량생산하는 플랫폼은 재생 가능한 에너지 자원의 활용 및 환경오염의 방지 등 여러 가지 이유로 그 중요성이 점점 대두되고 있다.

[0005] 현재까지 숙신산을 생산하기 위한 방법으로는, 변이 균주를 이용하여 숙신산 생산 수율을 높인 것이 대부분이나

(한국공개특허 2012-0113146, 한국공개특허 2011-000457 등), 유전자 조작으로 변이된 균주로 숙신산을 생산하는 경우, 사회적으로 안정성에 문제가 있는 것으로 인식되는 문제점이 있다.

[0006] 한편, 배양 배지의 성분을 다르게 함으로써 숙신산을 생산하는 방법으로, 유청을 이용한 숙신산의 생산방법(한국등록특허 10-0301960호)이 있는데, 낙농 산업에서 나오는 폐기물인 유청을 전처리 과정 없이 바로 배양원료로 이용하였기 때문에 배양 효율이 떨어지며, 질소원으로는 값비싼 효모 추출물을 사용한 결과 경제성 배지를 완전히 달성하지 못하는 문제점이 있다.

[0008] 이에, 본 발명자들은 대장균의 숙신산 생산능을 강화하기 위해, 메탄생성균인 메타노박테리움 포미시쿰(*Methanobacterium formicicum*)을 대장균과 공동배양하여 대장균을 적응진화시킴으로써 숙신산 생산능이 향상된 대장균 균주를 제조하였으며, 이를 배양하여 글리세롤로부터 숙신산을 생산하는 능력이 개선된 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명의 목적은 메탄생성균과의 공동배양에 의해 적응진화되어, 숙신산 생산능이 향상된 대장균(*E.coli*) 균주를 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 다른 목적은 상기 대장균 균주의 제조 방법을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 대장균 균주를 배양하는 단계를 포함하는, 숙신산 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0014] 이하, 본 발명을 더욱 상세히 설명한다. 그러나, 본 발명에 개시한 일 실시 양태의 설명 및 실시예는 공통된 사항에 대하여 다른 실시 양태의 설명 및 실시예에서도 적용될 수 있다. 또한, 본 발명의 상세한 설명에 개시된 다양한 요소들의 모든 조합은 본 발명의 권리범위에 속하는 것은 물론이다. 그뿐만 아니라, 하기 기술된 구체적인 설명에 의하여 본 발명출원의 권리범위가 제한되는 것이 아니다.
- [0015] 또한, 당해 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 통상의 실험만을 사용하여 본 발명에 기재된 본 발명의 특정 양태에 대한 다수의 등가물을 인지하거나 확인할 수 있다. 또한, 이러한 등가물은 본 발명에 포함되는 것으로 의도된다.
- [0017] 야생형 대장균(*Escherichia coli*)은 혐기성 조건에서 발효 복합산물을 생산한다. 이러한 발효 복합산물은 초산, 젖산, 포름산, 숙신산, 알코올이 포함되어 있는 혼합산 발효형태(mixed acid-fermentation type)이다. 그러나 혐기성 조건에서 야생형 대장균의 글리세롤 발효는 잘 일어나지 않는다.
- [0018] 구체적으로, 혐기성 조건에서 글리세롤을 발효하기 위해서는, 글리세롤이 대장균 내부로 수송되어 산화되는 단계가 필요하다(도 1). 이 단계에서 1ATP가 소모되고 MQH₂, NADH₂가 생성된다.
- [0019] 포름산의 형태로 전환된 환원 등가물은 CO₂ 및 H₂로 전환될 수 있다. 그러나 포름산을 CO₂ 및 H₂로 전환시키는 효소인 FDH(Formate hydrogenlyase)의 포름산에 대한 친화도가 낮으며, 이러한 전환은 발효가 충분히 진행된 후 외부 pH가 낮은 상태에서만 포름산이 다시 대장균 내로 유입되어야만 일어나고, 포름산이 전환된다고 하더라도 세포외로 방출된 H₂가 대장균 생장을 저해한다는 문제가 있다.
- [0020] 따라서, 글리세롤 발효를 위해서는 포름산 및 H₂가 제거되는 것이 숙신산 생산에 유리하다.
- [0021] 본 발명자들은 대장균과 메탄생성균을 공동배양하여 숙신산 생산 시 발생하는 포름산을 메탄의 형태로 전환시킴으로써 반응 평형을 숙신산 발효 쪽으로 조정하고 배양 환경을 유리하게 할 수 있음을 밝혀내었으며, 이와 같은 결과를 토대로 공동배양을 장기간 수행하여 대장균을 적응진화시킴으로써 숙신산 생산능이 강화된 신규한 대장

균을 수득할 수 있다는 것을 밝혀내어 본 발명을 완성시켰다.

- [0023] 본 발명의 목적을 달성하기 위한 하나의 양태는, 메탄생성균과의 공동배양에 의해 적응진화되어, 숙신산 생산능이 향상된 대장균(*E.coli*) 균주를 제공한다.
- [0024] 본 발명의 다른 하나의 양태는 상기 대장균 균주를 제조하는 방법을 제공한다.
- [0026] 본 발명에서 용어, "적응 진화(adaptive evolution)"란 일련의 목적하는 작용을 달성하도록 가해진 광범위한 변이를 나타내며, 적응하는 성질, 즉 생존이나 번식 등을 향상시키는 성질의 획득이나 개선되는 방향으로의 진화를 의미할 수 있다.
- [0027] 상기 적응 진화는 여러 세대에 걸쳐 광범위하게 축적된 변이 결과일 수 있으며, 이러한 결과를 인공적으로 도입하는 변이 역시 본 발명의 범위에 포함될 수 있다. 또한 상기 적응 진화는 본 발명의 목적상, 대장균이 숙신산 생산능이 증가하고 포름산이 적게 생성되는 방향으로 적응 진화되는 것일 수 있다.
- [0028] 상기 적응 진화는 관심 특성을 갖는 변이체의 성장을 선호하는 선택압이 작용하도록 하는 것일 수 있다. 이러한 선택압은 상이한 배양 조건에 의해 작용할 수 있으며, 구체적으로는 배지의 조성을 변화시키거나, 다른 미생물과 공동배양하여 작용하는 것일 수 있다. 상기 미생물은 메탄생성균일 수 있다.
- [0029] 본 발명의 적응 진화는, 특정 기질을 이용하는 데 있어서 대사 경로에 관여하는 단백질을 코딩하는 유전자의 변이가 축적되는 것일 수 있다. 상기 변이는 변이가 일어나기 전의 개체와 비교하여 대사 산물의 생성량을 변화시키는 것일 수 있다.
- [0030] 대장균에 있어서, 상기 특정 기질은 글리세롤일 수 있고, 상기 대사 산물은 PEP를 대사경로를 거쳐 생산되는 것일 수 있으며, 구체적으로는 포름산 또는 숙신산일 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 변이는 변이가 일어나기 전의 개체에 비해 숙신산 생산량을 증가시키는 변이일 수 있으며, 추가적으로 포름산 생성량은 감소되는 변이일 수 있다.
- [0031] 또한 메탄생성균에 있어서 상기 특정 기질은 포름산 또는 수소일 수 있고, 상기 대사 산물은 메탄일 수 있다. 구체적으로, 상기 변이는 포름산 또는 수소 및 이산화탄소를 기질로 하는 메탄 생산량이 증가되는 변이일 수 있다.
- [0033] 상기 적응진화에 의해, 변화된 특성을 갖는 균주를 수득할 수 있다. 상기 변화된 특성은 적응진화가 일어나기 전의 개체와 비교하여 대사 산물의 생성량이 변화하는 것일 수 있으며, 구체적으로는 대장균의 숙신산 생산량이 증가하고 포름산 생산능은 감소하는 변화일 수 있다.
- [0034] 즉, 본 발명의 "균주를 적응진화시키는 방법"은 "균주의 제조 방법"의 하나의 양태를 의미하는 것으로서 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명의 목적을 달성하기 위한 다른 하나의 양태는, 야생형 대장균 및 메탄생성균을 계대배양을 통해 공동배양하는 단계를 포함하는, 숙신산 생성능이 향상되도록 대장균을 적응진화시키는 방법을 제공한다. 본 발명의 일 구현예에서는 적응진화를 통해 숙신산 생산능이 증가하고 포름산 생산능이 감소한 대장균 균주를 수득하였다.
- [0036] 상기 메탄생성균은 포름산을 소모하는 메탄생성균일 수 있다. 구체적으로, 메타노마이크로바이아세아에(*Methanomicrobiaceae*), 메타노코카세아에(*Methanococcaceae*), 메타노코푸스쿨라세아에(*Methanocorpusculaceae*), 메타노스피릴라세아에(*Methanospirillaceae*), 메타노박테리아세아에(*Methanobacteriaceae*) 과에 속하는 메탄생성균 등일 수 있으며, 보다 구체적으로는 메타노박테리움(*Methanobacterium*)속에 속하는 메탄생성균일 수 있고, 보다 더 구체적으로는 메타노박테리움 포미시쿰(*Methanobacterium formicum*)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0038] 상기 공동배양은 계대배양에 의한 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 계대배양은 이전 단계의 공동배양체의 전부 또는 일부를 새 배지에 접종함으로써 이루어질 수 있다. 구체적으로 이전 단계의 공동배양체의 5%, 10%, 15%,

20%, 25%, 30% 또는 35%를 새 배지에 접종하는 것일 수 있으나 이에 제한되지는 않는다. 또한, 상기 계대배양에는 이전 단계의 공동배양체 전부 또는 일부에 더하여, 공동배양에 사용된 어느 미생물 한 종을 다른 배지에서 배양한 것을 추가적으로 접종하는 단계를 포함할 수 있다. 구체적으로, 이전 단계의 공동배양체의 일부에 더하여, 다른 배지에서 배양한 메탄생성균을 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30% 또는 35% 접종하는 단계를 더 포함할 수 있다. 본 발명의 일 구현예에서는 이전 단계의 공동배양체의 20%에 더하여 *M.formicicum*을 20% 추가적으로 접종하여 계대배양을 수행하였다.

[0039] 상기 공동배양의 총 기간은 숙신산 생산능이 증가하는 방향으로 대장균이 적응진화될 수 있는 기간이라면 본 발명의 범위에 포함된다. 구체적으로는 7일 이상 이루어진 것일 수 있으며, 보다 구체적으로는 200일 이상, 보다 구체적으로는 266일 내지 280일간, 보다 더 구체적으로는 270일 내지 276일간, 보다 더 구체적으로는 273일간 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0041] 상기 공동배양에 사용되는 대장균은 숙신산 생산이 가능한 것이면 어느 것이든 본 발명의 조성물과 사용될 수 있으며, 구체적으로는 숙신산 생산 경로에 관여하는 유전자 또는 효소가 변형되지 않은 것일 수 있고, 보다 구체적으로는 야생형 대장균일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0042] 본 발명의 일 구현예에서는 야생형 대장균과 *M.formicicum*을 계대배양하면서 273일간 공동배양하여 *E.coli* 균주를 제조하였고, 이를 한국생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures)에 기탁하여 수탁번호 KCTC13592BP를 부여받았다.

[0044] 상기 글리세롤은 순수 글리세롤 또는 바이오디젤 생산 공정으로부터 발생한 폐글리세롤일 수 있다. 상기 폐글리세롤은 두유, 폐식용유 등을 사용한 바이오디젤 생산 공정(알칼리 촉매와 메탄올 또는 에탄올 사용)에서 발생한 것일 수 있다. 또한, 상기 폐글리세롤은 정제 과정 없이 멸균하여 배양액에 직접 글리세롤 농도로 묻혀 사용할 수 있다. 또는, 폐글리세롤에 HCl과 같은 산을 첨가하여 생성되는 검은 불순물 층을 제거한 전처리된 폐글리세롤일 수 있다.

[0046] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 적응진화시킨 대장균 균주를 배양하는 단계를 포함하는, 숙신산 제조방법을 제공하는 것이다.

[0048] 상기 대장균 균주는 적응진화에 의해 숙신산 생산능이 증가한 특성을 갖는 것으로, 추가로 포름산 생산능이 감소한 것일 수 있고, 구체적으로는 KCTC13592BP 균주일 수 있다. 적응진화에 대해서는 전술한 바와 같다.

[0050] 상기 배양단계는 배양 배지에 숙신산 생산능이 증가한 균주를 외부 전자 수용체와 함께 배양하는 것일 수 있다.

[0051] 상기 외부 전자수용체는 유기체 또는 무기체일 수 있다. 상기 유기체는 박테리아, 고세균, 원생동물 등을 포함하는 광의의 개념으로, 포름산을 기질로 이용할 수 있는 유기체일 수 있으며, 구체적으로는 메탄생성균일 수 있고, 보다 구체적으로는 메타노박테리움 포미시쿰일 수 있다. 메탄생성균에 대해서는 전술한 바와 같다.

[0052] 상기 무기체는 환원 균형을 맞추기 위한 물질로서 전자수용체로 이용될 수 있는 것이면 어느 물질이든 포함할 수 있으며, 구체적으로는 미생물의 혐기성 생장에 이용되는 전자 수용체일 수 있고, 보다 구체적으로는 DMSO(Dimethyl sulfoxide), 아황산염(sulfite), 티오황산염(thiosulfate), 황(elemental sulfur), 메티오닌 설펍사이드(methionine sulfoxide), 테트라메틸렌 설펍사이드(tetramethylene sulfoxide), 질산염(nitrate)일 수 있으며, 보다 구체적으로 DMSO일 수 있다. 본 발명의 일 구현예에서는 적응진화를 통해 제조한 숙신산 생산능이 증가한 대장균 균주를 메탄생성균 없이 DMSO를 첨가하여 배양한 결과, 숙신산 생산능이 야생형에 비해 증가하였음을 확인하였다.

발명의 효과

[0054] 본 발명의 대장균은 바이오디젤 부산물인 폐글리세롤로부터 숙신산을 생산할 수 있으며, 메탄균과 공동배양 시 에너지원료가 되는 메탄 또한 수득할 수 있으므로 유용산물 생산에 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0056] 도 1은 대장균의 글리세롤 대사 경로를 나타낸 것이다.

도 2는 대장균(*Escherichia coli*)과 메타노박테리움 포미시쿰(*Methanobacterium formicum*)의 공동배양 동안 폐글리세롤 발효로부터 생성된 숙신산의 양을 나타낸 것이다. 실선은 숙신산 생산량을 나타내며, 점선은 글리세롤 소모량을 나타낸 것이고, 검은 점은 적응 진화된 대장균에서, 회색 사각형은 적응되지 않은 대장균에서 측정된 값을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0057] 이하 본 발명을 실시예 및 실험예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.

[0059] 실시예 1: 적응진화에 사용할 *E.coli*의 type 결정

[0060] 숙신산 생산능을 향상시키기 위한 적응진화에 사용할 *E.coli* 균주를 선택하기 위해, 야생형 및 유전자 조작된 대장균을 메탄생성균과 공동배양하였다.

[0061] 구체적으로, 숙신산 생산과 경쟁적인 경로에 있는 특정 유전자(*pflB*, *adhE*, *pta*, 또는 *ackA*)가 각각 삭제된 돌연변이 *E.coli* 및 야생형 *E.coli*를 다른 외부 전자 수용체 없이 *M.formicum*과 함께 배양하였다. *pta*(phosphate acetyltransferase) 및 *ackA*(acetate kinase) 돌연변이는 포름산 및 아세트산을 모두 생산하지 않고 숙신산을 생산하도록 돌연변이를 일으킨 것이다. 숙신산 생산 이외의 모든 경로가 차단된 *pflB*(pyruvate formate lyase) 돌연변이를 음성 대조균으로 사용하였다. 야생형으로 *E.coli* K-12 strain MG1655가 사용되었고, *E.coli* K-12 BW25113 유전자 녹아웃 돌연변이는 National BioResource Project(National Institute of Genetics, Japan)로부터 구입하였다. *M.formicum* JF-1은 Leibniz Institute German Type Culture Collection (DSMZ, Germany)로부터 구입하였다.

[0062] *E.coli* 세포들은 Luria Broth(Affymetrix inc., USA)에서 37℃에서 혐기성으로 배양하였고, 돌연변이 *E.coli* 균주에 대해 카나마이신(kanamycin) 30 µg/mL을 첨가하였다. *M.formicum*는 DSMZ 119 배지에서 37℃에서 혐기성으로 배양하였다. *E.coli*와 *M.formicum*을 각각 OD₆₀₀이 1.20 및 0.27이 될 때까지 배양한 후 단독배양 또는 공동배양을 통해 글리세롤을 발효시키도록 하였다.

[0063] 7일간의 단독배양 또는 공동배양 동안 산물 및 세포 성장을 측정하여 하기 표 1과 같은 결과를 얻었다.

표 1

E.coli와 M.formicicum의 단독 또는 공동배양 시 글리세롤 발효

E. coli Strains	Culture condition	(mM)		(mM)		Ethanol	Cell number (T ₀)	Cell number (T ₇)	Cell number (T ₀)	Cell number (T ₇)
		Glycerol	Succinate	Formate	Acetate		(mL ⁻¹)	(mL ⁻¹)	(mL ⁻¹)	(mL ⁻¹)
wild type	Single	4.6±1.6	1.0±0.1	10.7±3.5	1.7±0.9	9.6±2.0	5.0x10 ⁸ ±1.6x10 ⁸	3.4x10 ⁸ ±0.4x10 ⁸	ND	ND
	Co-culture	53±12.8	8.0±0.7	0	7.3±1.0	47.2±16.1	5.0x10 ⁸ ±2.1x10 ⁸	1.1x10 ⁹ ±0.2x10 ⁹	4.7x10 ⁷ ±2.1x10 ⁷	2.1x10 ⁸ ±1.2x10 ⁸
ΔpflB	Single	0.7±0.6	0.8±0.1	0	0.6±0.1	0	3.9x10 ⁸ ±0.9x10 ⁸	1.6x10 ⁸ ±0.5x10 ⁸	ND	ND
	Co-culture	1.9±2.3	1.8±0.2	0	0.2±0.4	6.4±0.6	4.5x10 ⁸ ±1.6x10 ⁸	2.4x10 ⁸ ±0.2x10 ⁸	3.8x10 ⁷ ±0.9x10 ⁷	6.7x10 ⁷ ±2.1x10 ⁷
ΔadhE	Single	0.8±0.2	0.4±0.1	2.6±0.6	1.8±0.5	0	3.9x10 ⁸ ±0.6x10 ⁸	6.8x10 ⁷ ±3.6x10 ⁷	ND	ND
	Co-culture	1.0±1.1	0.5±0.2	0	2.3±0.6	0	3.5x10 ⁸ ±1.2x10 ⁸	1.4x10 ⁸ ±0.6x10 ⁸	3.2x10 ⁷ ±0	5.6x10 ⁷ ±2.8x10 ⁷
Δpta	Single	5.7±0.7	1.3±0.2	8.5±1.8	0	12.5±2.1	4.0x10 ⁸ ±1.2x10 ⁸	2.0x10 ⁸ ±0.7x10 ⁸	ND	ND
	Co-culture	18.7±5.1	3.4±0.4	0	2.4±1.2	23.0±6.7	1.8x10 ⁸ ±0.9x10 ⁸	4.8x10 ⁸ ±3.2x10 ⁸	2.5x10 ⁷ ±1.1x10 ⁷	1.3x10 ⁸ ±0.7x10 ⁸
ΔackA	Single	7.8±1.2	0.8±0	13.3±1.8	1.6±0.4	13.3±1.9	2.0x10 ⁸ ±0.9x10 ⁸	2.9x10 ⁸ ±1.3x10 ⁸	ND	ND
	Co-culture	28.5±2.3	1.9±0.1	0	5.2±0.9	35.8±3.6	2.3x10 ⁸ ±0.8x10 ⁸	7.3x10 ⁸ ±1.1x10 ⁸	2.8x10 ⁷ ±1.7x10 ⁷	1.6x10 ⁸ ±0.2x10 ⁸

Values report means ± standard deviations for 3 replicates.

Wild type MG1655; ΔpflB, pflB knockout MG1655; ΔadhE, adhE knockout MG1655; Δpta, pta knockout MG1655; ΔackA, ackA knockout MG1655

[0065]

[0067]

야생형 *E.coli*와 *M.formicicum*을 공동배양한 경우, 글리세롤 소모량은 12배, 숙신산 생산량은 8배 증가한 것을 확인하였다. 구체적으로 7일간의 공동 배양동안, *E.coli*는 53mM의 글리세롤을 발효했고 8mM의 숙신산을 생산하였으며, 그 외의 발효 산물의 생산량도 증가하였으나, 포름산은 전부 *M.formicicum*에 의해 소모되었다.

[0068]

adhE(alcohol dehydrogenase) 돌연변이는 단독 또는 공동배양 모두에서 자라지 못했으며, 이는 *E.coli* 생장에 있어서 에탄올 생성이 불가피한 것임을 나타낸다. pta 또는 ackA 돌연변이 *E.coli*는 *M.formicicum*과의 공동배양에서 어느 정도 성장했으나, 글리세롤 소모량이 적었고 숙신산 생산량 또한 야생형 *E.coli*의 절반을 넘지 못했다.

[0069]

종합하면, *E.coli* 야생형과 *M.formicicum*을 공동배양한 경우에 비하여, *E.coli* 돌연변이와 *M.formicicum*의 공동배양은 숙신산 생산을 비교적 크게 증가시키지 못했다.

[0070]

이를 통해, 숙신산 생산을 위해서는 *E.coli* 균주 중 야생형이 *M.formicicum*과 공동배양하기에 가장 적합함을 알 수 있었다. 이러한 이유로, 야생형 *E.coli*를 장기간 적응진화에 사용하였다.

[0072]

실시예 2: M.formicicum과 E.coli의 공동배양 및 E.coli의 적응진화

[0074]

2-1: 배지 제조 및 분석 장치

[0075]

적응 배지(adaption media)는 3 mM KH₂PO₄, 1 mM K₂HPO₄, 4 mM NH₄Cl, 5 mM KCl, 6 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 21 mM HCO₃Na, 5 mM CO₃Na₂, 0.2 mM 아스코르브산 나트륨(sodium ascorbate), 5.1 mM CaCl₂, 10 mL NB 미량 무기질(trace mineral) 용액, 1.0mL 아셀렌산염-텅스텐산염(selenite-tungstate) 용액(13mM NaOH, 17 μM Na₂SeO₃, 및 12 μM Na₂WO₄), 및 10mL 비타민 용액(DSMZ, media 141), 0.1%(w/v) 효모 추출물, 1 mM 시스테인, 및 2 μM 레사주린(resazurin)을 포함하였다. pH값은 7.0으로 조정하였다.

[0076]

페글리세롤 발효 배지는 1.5 mM KH₂PO₄, 2.3 mM K₂HPO₄, 9.4 mM NH₄Cl, 2 mM MgSO₄, 2 mM CaCl₂, 38.8 mM NaCl, 0.01 mM FeSO₄, 20 mM HCO₃Na, 미량 무기질 용액 SL-10 (DSMZ, media 320), 10mL 비타민 용액(DSMZ, media 141), 0.1%(w/v) 효모 추출물, 0.2%(w/v) 카지톤(casitone), 1.7 mM 시스테인, 1.3 mM Na₂S, 및 2 μM 레사주린을 포함하였다.

- [0077] 각 산물 분석에 사용한 장치 및 분석 방법은 다음과 같다.
- [0079] HPLC
- [0080] HPLC Hitachi LaChrom Elite system (Hitachi High Technologies, Japan)을 이용하여 배양물 1mL의 상청액의 기질 및 생산물을 분석하였다.
- [0081] 주입한 샘플 10 μ L는 Aminex HPX-87H 이온배제컬럼(300 mm X 7.8 mm i.d., Bio-Rad, USA)을 통해 분리되었다. 이동상은 4 mM H₂SO₄이고 0.55 mL/min의 이동물로 펌핑되었다. L-2490 시차 굴절 검출기 및 L-2400 UV 검출기 (210 nm)를 이용하여 정량 분석을 수행하였다.
- [0083] GC
- [0084] 6500GC 시스템(YL Instruments, Korea)을 이용하여 배양체의 기체 공간 샘플 1mL를 분석하였다. Carboxen 1006 PLOT 컬럼(30 m X 0.53 mm i.d., Sigma-Aldrich Co.LLC., USA)에 가스 샘플을 주입하여 분리하였다. Flame ionization detector(YL Instruments, Korea)를 사용하여 메탄을 정량적으로 분석하였다.
- [0086] 세포성장분석
- [0087] *M.formicicum*과 *E.coli* 혼합물의 세포 밀도는 UV/VIS spectrophotometer(X-mal200, Human Corporation, Korea)를 이용하여 600nm 파장으로 측정하였다. *M.formicicum* 및 *E.coli* 세포의 증식은 하기의 프라이머를 이용한 qRT-PCR을 통해 측정하였다.
- [0088] *M.formicicum* 프라이머 F : 5' - CGWAG GGAAG CTGTT AAGT-3'
- [0089] *M.formicicum* 프라이머 R : 5' - TACCG TCGTC CACTC CTT-3'
- [0090] *E.coli* K-12 프라이머 F : 5' - ACTCC TACGG GAGGC AG-3'
- [0091] *E.coli* K-12 프라이머 R : 5' - GACTA CCAGG GTATC TAATC C-3'
- [0092] 각 산물 크기는 343 및 468 bp였다.
- [0093] *M.formicicum* 및 *E.coli*의 qRT-PCR 표준 곡선에서 16S rRNA 유전자 카피수는 각각 2.6×10^9 내지 2.6×10^2 , 2.6×10^9 내지 2.6×10^2 였다.
- [0094] 각각의 16S rRNA 유전자양의 로그값을 CT(threshold cycle) 값에 대해 플롯팅했다. 표준 곡선의 선형 범위는 기울기 R²값을 기반으로 선택하였으며 각각 *M.formicicum* 및 *E.coli*에 대해 0.9964 및 0.9945였다. 평균 기울기 및 절편을 계산하여 세운 식을 이용하여 샘플 내의 16S rRNA 양을 확인하였다. 각 샘플의 CT값을 표준 곡선의 각 값에 비교하였다. DNA를 NucleoSpin Microbial DNA 키트(Macherey-Nagel, Germany)를 이용하여 추출하고 qRT-PCR 주형 가닥으로 사용하였다. 전체 반응 부피는 20 μ L이었고 각 프라이머를 400nM 씩 포함하였다. qRT-PCR 분석은 95℃에서 10초간 변성, 60℃에서 20초간 어닐링, 72℃에서 20초간 신장을 40사이클 반복하여 수행하였다.
- [0096] **2-2: *E.coli*의 적응진화**
- [0097] *E.coli*를 글리세롤을 이용한 숙신산 생산에 적응진화시키기 위해, *E.coli*와 *M.formicicum*를 39라운드까지 공동으로 계대배양하였고, 각 공동배양을 7일 유지하였다.
- [0098] 구체적으로, 각 라운드마다 250mL 고무마개된 주입 병 내에 70mM 글리세롤을 포함한 100 mL 적응 배지에서 멸균된 80% H₂ + 20% CO₂ 가스 혼합물 하에 37℃에서 4일간 혐기성으로 공동배양을 수행하였다. 다음 라운드로 진행 시 이전 단계의 공동배양체의 20%를 새 배지에 접종하였고, 여기에 DSMZ 119 배지에서 배양한 20% *formicicum*(v/v)을 추가로 접종하였다.

[0099] 계대배양 39라운드에서 수득한, 메탄균과의 공동배양에 적응 진화된 *E. coli* 균주를 생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures)에 기탁하여 수탁번호 KCTC13592BP를 부여받았다.

[0101] 2-3: 적응진화된 *E. coli*와 *M. formicicum*의 생산능 증가

[0102] 실시예 2-2 에서 적응진화시킨 *E. coli*와 *M. formicicum*을 공동배양하여, 산물 생산량 및 기질 소모량 변화를 측정하였다.

[0103] 구체적으로, 24시간 간격으로 숙신산 생산능 및 페글리세롤 소모량을 측정하였으며, 그 밖의 부산물인 포름산, 아세트산, 에탄올 생산량 및 pH 변화와 세포수, OD를 측정하여 하기 표 2-4에 나타내었다.

표 2

숙신산 생산능		
Time (h)	39 th <i>E. coli</i> <i>M. formicicum</i>	1 st <i>E. coli</i> <i>M. formicicum</i>
0	0	0
24	3.9±0.1	2.9±0.1
48	8.3±0.2	4.7±0.1
72	15.8±1.1	7.8±0.5
96	19.9±1.4	9.7±0.2

페글리세롤 소모량		
Time (h)	39 th <i>E. coli</i> <i>M. formicicum</i>	1 st <i>E. coli</i> <i>M. formicicum</i>
0	0	0
24	7.4±0.2	9.7±2.0
48	37.1±1.8	32.0±2.8
72	73.9±0.9	65.6±0.4
96	83.8±0.8	82.0±1.0

[0105]

표 3

포름산	Time (h)	39 th <i>E. coli</i> <i>M. formicicum</i>	1 st <i>E. coli</i> <i>M. formicicum</i>
	0	0	0
	24	0	1.9±0.7
	48	0	0
	72	3.4±0.2	0
	96	0	0
아세트산	Time (h)	39 th <i>E. coli</i> <i>M. formicicum</i>	1 st <i>E. coli</i> <i>M. formicicum</i>
	0	0	0
	24	2.1±0.3	1.7±0.2
	48	3.6±0.6	2.2±0.3
	72	5.4±1.3	3.5±0.5
	96	6.1±1.8	5.3±0.8
에탄올	Time (h)	39 th <i>E. coli</i> <i>M. formicicum</i>	1 st <i>E. coli</i> <i>M. formicicum</i>
	0	0	0
	24	20.1±2.9	25.3±2.9
	48	28.4±4.1	39.2±2.8
	72	54.3±2.1	65.3±2.3
	96	56.9±3.5	74.8±3.0

[0107]

표 4

pH 변화

Time (h)	39 th <i>E. coli</i> <i>M. formicicum</i>	1 st <i>E. coli</i> <i>M. formicicum</i>
0	7.13	7.14
24	7.16	7.18
48	6.77	7.05
72	5.79	6.62
96	6.19	6.92

OD

Time (h)	39 th <i>E. coli</i> <i>M. formicicum</i>	1 st <i>E. coli</i> <i>M. formicicum</i>
0	0.36±0.01	0.37±0.01
24	0.67±0.02	0.73±0.02
48	1.08±0.01	1.06±0.01
72	1.32±0.04	1.25±0.02
96	1.33±0.03	1.31±0.02

세포수

Time (h)		39 th <i>E. coli</i> <i>M. formicicum</i>	1 st <i>E. coli</i> <i>M. formicicum</i>
0	<i>E. coli</i>	$2.8 \times 10^8 \pm 7.2 \times 10^7$	$3.5 \times 10^8 \pm 1.5 \times 10^7$
	MF	$4.3 \times 10^7 \pm 1.3 \times 10^7$	$4.4 \times 10^7 \pm 1.0 \times 10^7$
96	<i>E. coli</i>	$8.9 \times 10^8 \pm 7.2 \times 10^7$	$8.5 \times 10^8 \pm 1.5 \times 10^8$
	MF	$7.8 \times 10^7 \pm 1.3 \times 10^7$	$1.1 \times 10^8 \pm 1.7 \times 10^7$

[0109]

[0111] 96일간의 측정 결과를 요약하여, 하기 표 5 및 도 2에 표시하였다.

표 5

			39 th <i>E. coli</i> <i>M. formicicum</i>	1 st <i>E. coli</i> <i>M. formicicum</i>
발효	소모량 (mM)	Glycerol	83.8±0.8	82.0±1.0
		Succinate	19.9±1.4	9.7±0.2
	생산량 (mM)	Acetate	6.1±1.8	5.3±0.8
		Ethanol	56.9±3.5	74.8±3.0
		Formate	0	0
		Methane (ppm)	206977.7± 72056.8	127552.0± 11659.79
생장	Cell density (OD ₆₀₀)		1.33±0.03	1.31±0.02
	<i>E. coli</i> cell number (mL ⁻¹)		8.9x10 ⁸ ± 7.2x10 ⁷	8.5x10 ⁸ ± 1.5x10 ⁸
	<i>M. formicicum</i> cell number (mL ⁻¹)		7.8x10 ⁷ ± 1.3x10 ⁷	1.1x10 ⁸ ± 1.7x10 ⁷

[0113]

[0115] 96시간(4일)동안의 글리세롤 발효 결과, 적응되지 않은 *E. coli*는 9.7mM의 숙신산을 생산한 반면, 글리세롤 발효에 적응된 *E. coli*는 그 2배 이상인 19.9mM의 숙신산을 생산했다(도 2).

[0116] 또한, 적응되지 않은 *E. coli* 공동배양에서 82mM 글리세롤로부터 생산된 PEP의 12%만이 숙신산으로 전환된 반면, 공동배양 적응된 *E. coli*에서 83.8mM 글리세롤로부터 생산된 PEP의 24%가 숙신산으로 전환되었다(도 2).

[0117] 메탄 생산은 적응진화가 일어나지 않은 공동배양에서 127552ppm, 적응진화 후 공동배양에서 206978ppm으로 적응된 공동배양에서 더 높았다. 메탄 생산은 1차탄소원 소비자의 개선된 성장 또는 기질 소모 속도에 수반되었으며 메탄은 발효과정동안 에너지로 사용되기 위해 쉽게 수집될 수 있었다.

[0118] 종합하면, *M. formicicum*과 *E. coli*를 공동배양에 적응시킨 결과, *E. coli*의 숙신산 생산능이 증가한 것을 확인할 수 있었다. 또한 *M. formicicum*의 메탄생산능도 증가했음을 알 수 있다.

[0120] 2-4: 적응 진화된 *E. coli* 단독배양 시 숙신산 생산능 증가

[0121] 2-2에서 적응진화시킨 대장균을 메탄생성균과 공동 배양하지 않아도 야생형 *E. coli*에 비해 숙신산 생산능이 증가하는 효과가 있는지 알아보기 위한 실험을 수행하였다.

[0122] 구체적으로, 숙신산 생산경로의 외부 전자수용체로서 DMSO를 사용하도록 처리하여 숙신산 생산능을 비교하였다. 10퍼센트의 *E. coli*(v/v) 및 30%의 *M. formicicum*(v/v)을 80 mM 페글리세롤(AEKYUNG PETROCHEMICAL CO. LTD.,

Korea)을 포함한 배지에 접종하여 멸균된 80% N₂ + 20% CO₂ 가스 혼합물 하에 37℃에서 4일간 혐기성으로 배양하였다. 구체적인 폐글리세롤 배지 조성은 하기 표 6과 같다.

표 6

폐글리세롤의 조성

Purity, %	80min
Moisture, %	15 max
Ash, %	5 max
MONG, %	1.5 max
pH	4.5-6.0

[0124]

[0126]

폐글리세롤에서 야생형 *E. coli* 또는 적응 진화된 *E. coli*에 DMSO를 처리하여 24시간 간격으로 숙신산 생산능 및 폐글리세롤 소모량을 측정하였으며, 그 밖의 부산물인 포름산, 아세트산, 에탄올 생산량 및 pH 변화와 세포수, OD를 측정하여 하기 표 7 내지 9에 나타내었다.

표 7

숙신산 생산능

Time (h)	39 th <i>E. coli</i> DMSO	1 st <i>E. coli</i> DMSO	39 th <i>E. coli</i> <i>M. formicicum</i> DMSO	1 st <i>E. coli</i> <i>M. formicicum</i> DMSO
0	0	0	0	0
24	4.4±0.1	2.7±0.2	4.9±0	3.5±0.3
48	8.7±0.2	5.1±0.1	10.2±0.1	6.6±0.4
72	12.2±0.1	6.4±0.1	16.2±0.2	10.7±0.4
96	14.0±0.2	7.2±0	19.8±0.5	12.6±0.4

폐글리세롤 소모량

Time (h)	39 th <i>E. coli</i> DMSO	1 st <i>E. coli</i> DMSO	39 th <i>E. coli</i> <i>M. formicicum</i> DMSO	1 st <i>E. coli</i> <i>M. formicicum</i> DMSO
0	0	0	0	0
24	7.4±0.6	8.3±0.6	17.4±1.1	17.9±4.6
48	23.1±2.7	25.6±0.8	40.4±1.4	45.2±1.8
72	40.5±1.3	45.3±3.2	70.0±2.2	72.1±1.0
96	46.3±1.1	54.1±1.1	78.5±1.2	81.0±1.4

[0128]

표 8

포름산

Time (h)	39 th <i>E. coli</i> DMSO	1 st <i>E. coli</i> DMSO	39 th <i>E. coli</i> <i>M. formicicum</i> DMSO	1 st <i>E. coli</i> <i>M. formicicum</i> DMSO
0	0	0	0	0
24	3.7±0.2	5.6±0.4	0	2.8±0.7
48	6.8±0.4	10.5±1.0	0	4.2±1.1
72	8.0±0.5	14.1±1.7	1.2±1.1	3.0±2.3
96	7.6±0.3	14.4±1.2	0	0

아세트산

Time (h)	39 th <i>E. coli</i> DMSO	1 st <i>E. coli</i> DMSO	39 th <i>E. coli</i> <i>M. formicicum</i> DMSO	1 st <i>E. coli</i> <i>M. formicicum</i> DMSO
0	0	0	0	0
24	2.2±0.2	1.9±0.2	2.8±0.1	2.4±0.1
48	2.2±0.1	1.5±0.1	4.4±0.2	3.1±0.1
72	2.4±0	1.3±0.1	5.9±0.2	3.6±0.9
96	2.7±0	1.5±0.1	7.0±0.4	4.6±1.4

에탄올

Time (h)	39 th <i>E. coli</i> DMSO	1 st <i>E. coli</i> DMSO	39 th <i>E. coli</i> <i>M. formicicum</i> DMSO	1 st <i>E. coli</i> <i>M. formicicum</i> DMSO
0	0	0	0	0
24	14.3±4.7	18.3±5.5	19.0±0.8	21.7±4.3
48	18.6±1.5	29.2±1.3	24.3±1.5	37.6±1.3
72	26.9±0.2	46.3±1.8	44.6±1.0	63.0±1.9
96	30.8±0.1	52.2±1.6	47.3±2.0	67.5±5.7

[0130]

표 9

pH

Time (h)	39 th <i>E. coli</i>	1 st <i>E. coli</i>	39 th <i>E. coli</i>	1 st <i>E. coli</i>
	DMSO	DMSO	<i>M. formicicum</i> DMSO	<i>M. formicicum</i> DMSO
0	7.14	7.15	7.2	7.17
24	7.07	6.95	7.09	7.03
48	6.59	6.52	6.67	6.77
72	5.91	5.84	5.83	6.35
96	6.1	6.14	5.95	6.84

OD

Time (h)	39 th <i>E. coli</i>	1 st <i>E. coli</i>	39 th <i>E. coli</i>	1 st <i>E. coli</i>
	DMSO	DMSO	<i>M. formicicum</i> DMSO	<i>M. formicicum</i> DMSO
0	0.27±0.01	0.28±0.01	0.35±0.02	0.36±0.02
24	0.77±0.02	0.87±0.01	0.85±0.01	0.98±0.03
48	0.98±0.02	1.09±0.01	1.16±0.02	1.28±0.02
72	1.01±0.01	1.12±0.01	1.31±0.02	1.39±0.02
96	1.01±0.01	1.10±0	1.32±0.02	1.41±0.03

세포수

Time (h)		39 th <i>E. coli</i>	1 st <i>E. coli</i>	39 th <i>E. coli</i>	1 st <i>E. coli</i>
		DMSO	DMSO	<i>M. formicicum</i> DMSO	<i>M. formicicum</i> DMSO
0	<i>E. coli</i>	1.3x10 ⁸ ±6.8x10 ⁷	2.2x10 ⁸ ±1.2x10 ⁷	2.2x10 ⁸ ±4.2x10 ⁷	2.9x10 ⁸ ±5.5x10 ⁷
	MF	0	0	3.5x10 ⁷ ±8.1x10 ⁶	4.1x10 ⁷ ±8.1x10 ⁶
96	<i>E. coli</i>	6.3x10 ⁸ ±7.0x10 ⁷	7.8x10 ⁸ ±5.5x10 ⁷	8.6x10 ⁸ ±4.0x10 ⁷	9.5x10 ⁸ ±5.5x10 ⁷
	MF	0	0	6.3x10 ⁷ ±4.1x10 ⁶	5.6x10 ⁷ ±1.2x10 ⁷

[0132]

[0134]

96시간 동안의 배양 결과를 표 10에 요약하였다.

표 10

			39 th <i>E. coli</i> DMSO	1 st <i>E. coli</i> DMSO	39 th <i>E. coli</i> <i>M. formicicum</i> DMSO	1 st <i>E. coli</i> <i>M. formicicum</i> DMSO
발효	소모량 (mM)	Glycerol	46.3±1.1	54.1±1.1	78.5±1.2	81.0±1.4
		Succinate	14.0±0.2	7.2±0	19.8±0.5	12.6±0.4
		Acetate	2.7±0	1.5±0.1	7.0±0.4	4.6±1.4
	생산량 (mM)	Ethanol	30.8±0.1	52.2±1.6	47.3±2.0	67.5±5.7
		Formate	7.6±0.3	14.4±1.2	0	0
		Methane (ppm)	105.7±81.5	528.0±454.5	122956.7± 84541.3	62341.3± 3672.3
생장	Cell density (OD ₆₀₀)		1.01±0.01	1.10±0	1.32±0.02	1.41±0.03
	<i>E. coli</i> cell number (mL ⁻¹)		6.3x10 ⁸ ± 7.0x10 ⁷	7.8x10 ⁸ ± 5.5x10 ⁷	8.6x10 ⁸ ± 4.0x10 ⁷	9.5x10 ⁸ ± 5.5x10 ⁷
	<i>M. formicicum</i> cell number (mL ⁻¹)		ND	ND	6.3x10 ⁷ ± 4.1x10 ⁶	5.6x10 ⁷ ± 1.2x10 ⁷

[0136]

[0138]

DMSO (50mM) 처리시 적응진화되지 않은 *E. coli*의 경우 7.2mM의 숙신산을 생산한 반면 적응진화된 *E. coli*는 14.0mM의 숙신산을 생산했다. 이와 같은 생산량은 공동배양(19.9mM)한 경우보다는 적은 것이지만, 공동배양에 적응되지 않은 경우에 비해 숙신산 생산능이 현저하게 개선된 것임을 나타낸다.

[0139]

또한 DMSO와 배양했을 때보다 *M. formicicum* 과 공동배양한 경우, *E. coli*에 의한 페글리세롤 소모량이 증가했다. 이를 통해, 살아있는 전자수용체인 *M. formicicum*에 의한 포름산 소모가 전자수용체 DMSO 처리 시에 비해 더 유리하다는 것을 알 수 있다.

[0141]

이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

수탁번호

[0143]

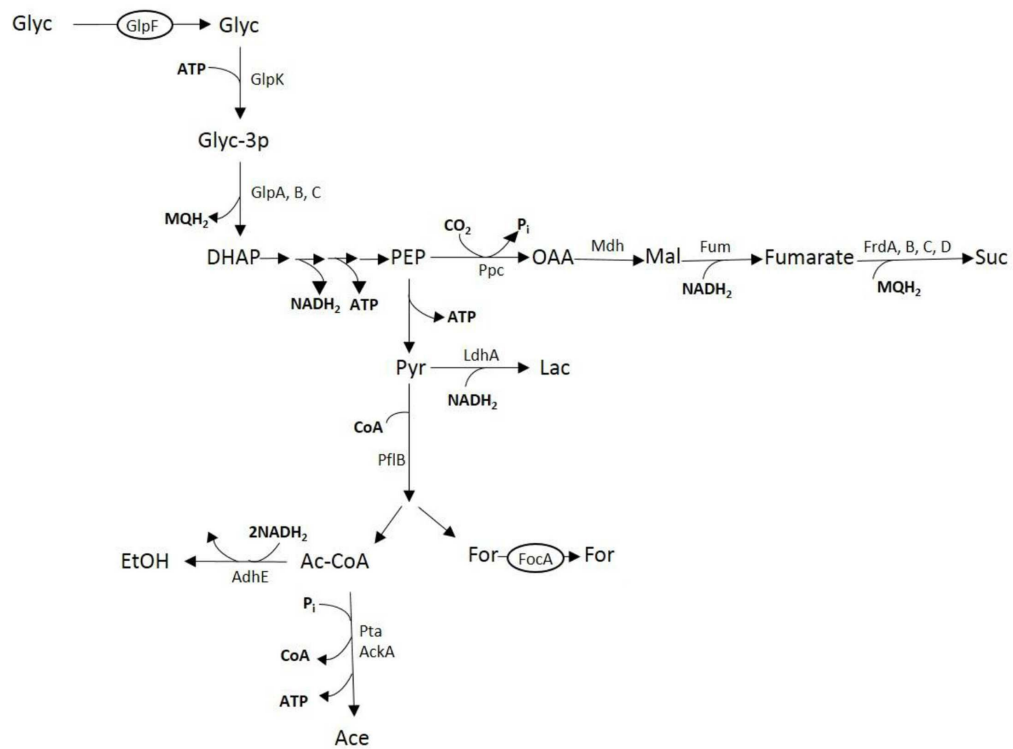
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC13592BP

수탁일자 : 20180718

도면

도면1



도면2

