(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0117907
(43) 공개일자 2013년10월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/70 (2006.01) *C12N 1/21* (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01) *C12P 7/46* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0039121
(22) 출원일자 2012년04월16일
심사청구일자 2012년04월16일

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
(72) 발명자
이진원
서울특별시 송파구 방이동 89 올림픽선수,기자촌아파트 201-1601호
백승필
대전시 유성구 하기동 송림마을 6단지 602동 1604호
박수현
경기도 군포시 광정동 을지아파트 624동 1101호
(74) 대리인
양부현

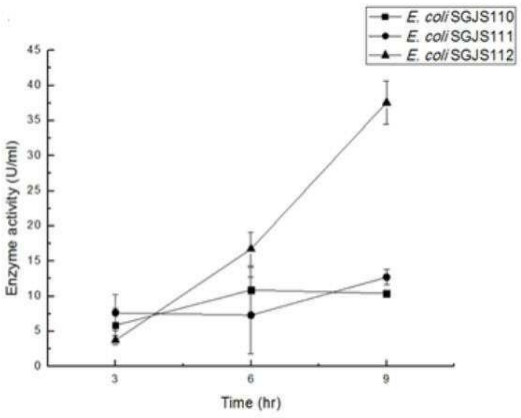
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **포스포에놀피루브산 카르복실화 효소 발현용 형질전환 대장균의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 (a) 글라시에콜라(*Glaciecola*) 종의 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소(Phosphoenolpyruvate Carboxylase) 뉴클레오타이드 서열을 대장균(*Escherichia coli*)에서의 발현에 적합한 코돈 최적화(codon optimization)하여 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열을 수득하는 단계; (b) 상기 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소의 코돈 최적화된 뉴클레오타이드 서열을 발현 벡터에 삽입하여 재조합 벡터를 제조하는 단계; 및 (c) 상기 재조합 벡터를 대장균에 형질전환하여 재조합 대장균을 제조하는 단계를 포함하는 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소 발현용 형질전환 대장균의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 본 발명은 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소를 대량생산, 활성개량, 산업적 유용물질을 얻는데 활용 할 수 있도록 하는 원천기술을 제공한다.

대 표 도 - 도5



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2010-0020501
부처명	교육과학기술부
연구사업명	기후변화대응 기초원천기술개발사업
연구과제명	해양 유래 CA-PEPCase system 기반 생물전환 원천 기술 개발
주관기관	고려대학교 산학협력단
연구기간	2010.06.23 ~ 2015.06.22

특허청구의 범위

청구항 1

다음의 단계를 포함하는 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소 발현용 형질전환 대장균의 제조방법:

(a) 글라시에콜라(*Glaciecola*) 종의 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소(Phosphoenolpyruvate Carboxylase) 뉴클레오타이드 서열을 대장균(*Escherichia coli*)에서의 발현에 적합한 코돈 최적화(codon optimization)하여 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열을 수득하는 단계;

(b) 상기 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소의 코돈 최적화된 뉴클레오타이드 서열을 발현 벡터에 삽입하여 재조합 벡터를 제조하는 단계; 및

(c) 상기 재조합 벡터를 대장균에 도입하여 형질전환 대장균을 제조하는 단계.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (b)의 발현 벡터는 프로모터 서열, 코돈 최적화된 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소 서열 및 전사 터미네이터 서열이 작동적으로(operatively) 결합된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 프로모터는 trc 프로모터임을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 2 항에 있어서, 상기 전사 터미네이터는 rrnB 터미네이터인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 대장균을 형질전환시키는 단계 (c)는 전기천공법으로 실시하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

상기 제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소 발현용 대장균.

청구항 7

다음의 단계를 포함하는 유기산의 제조방법:

(a) 상기 제 6 항의 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소 발현용 대장균을 배양하여 유기산을 생합성 하는 단계; 및

(b) 상기 생합성된 유기산을 수득하는 단계.

청구항 8

제 7 항에 있어서, 상기 유기산은 옥살로아세테이트 및 말산(malic acid)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제 7 항에 있어서, 상기 방법은 야생형 대장균과 비교하여 유기산에 대한 수율이 1.2-20.0배 증가된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

상기 제 7 항의 제조방법에 의해 제조된 유기산.

청구항 11

글라시에콜라(*Glaciecola*) 종의 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소(phosphoenolpyruvate carboxylase)에 대한 대장균(*Escherichia coli*)에서의 코돈 최적화된 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산분자.

명 세 서

기 술 분 야

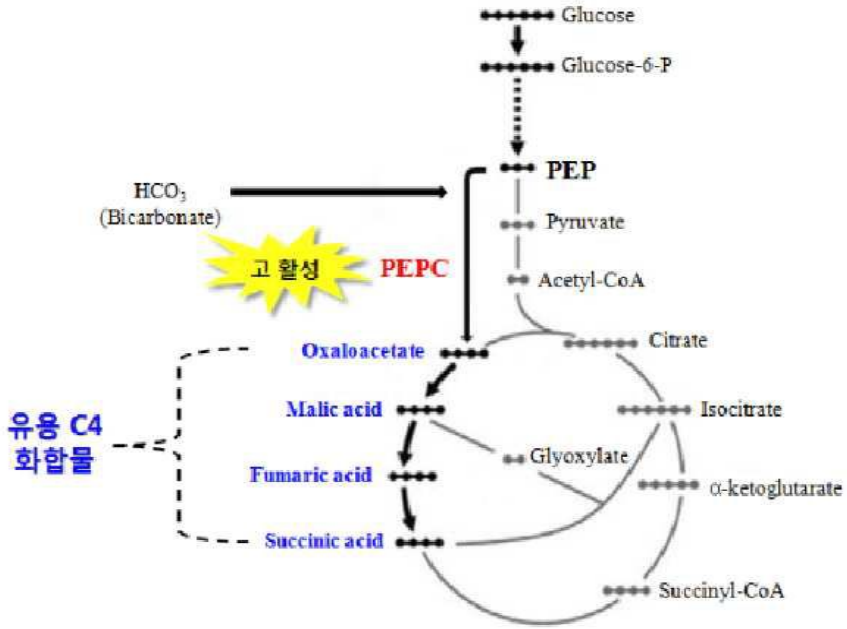
[0001] 본 발명은 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소를 발현용 형질전환 대장균의 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 이산화탄소 양 증가로 인한 지구온난화로 인해 세계적으로 이상기온 현상이 발생하였고, 그로 인해 대기 중 이산화탄소를 줄이는 기술에 대한 연구가 폭넓게 진행 중이다. 그 중 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소(Phosphoenolpyruvate Carboxylase; PEPC)는 C4 대사회로 과정에서 유기산인 숙신산(succinic acid), 말산(malic acid) 및 퓨마르산(fumaric acid) 등으로 전환 될 수 있는 옥살로아세테이트(oxaloacetate)를 제조하는 효소이며, 그 반응 중에 이산화탄소가 용해 시 나오는 바이카보네이트(bicarbonate)를 사용한다. 이러한 과정을 통해 간접적으로 이산화탄소를 흡수 또는 고정화 할 수 있다. 그리고 해당 효소는 식물이나 미생물에는 존재하지만, 동물에는 존재하지 않는 효소이므로 활성 개량이나 대량 생산 시 산업적으로 적용할 수 있는 범위가 넓은 효소이다.

[0003] 포스포에놀피루브산 카르복실화효소는 그 자체만으로도 높은 활용도를 갖는다. 포스포에놀피루브산 카르복실화효소는 산업적으로 시판되는 제품이 시그마알드리치에서 판매되는 옥수수에서 가져온 분말형태의 한 종류밖에 없다. 가격은 100 유니트(Unit)에 625,000원으로 고가에 판매되며 제품 구매시도 재고가 많은 편이 아니라 어렵다. 하지만 미생물인 대장균을 통해 활성이 높은 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소를 활성을 가진 단백질 형태로 발현시킬 수 있으면, 정제시에 보다 낮은 가격으로 활성이 높은 효소를 제공할 수 있을것이라 생각된다. 두번째로는 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소는 대장균 내 TCA 사이클의 시작물질인 옥살로아세트산을 생산할 수 있는 효소이다. 옥살로아세트산은 TCA 사이클 내에서 숙신산, 말산, 푸마르산 등의 동일한 탄소 수(4개)를 가진 다른 유기산으로 전환 될 수 있으므로 다른 유기산의 총 생산량을 높여줄 수 있다. 그러므로 탄소 4개로 이루어진 유기산 생산 공정에 적용 가능할 것이다.

[0004] 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소의 반응은 다음과 같은 모식도로 나타낼 수 있다:



[0005]

[0006] 이종에서 유래한 효소 단백질을 발현시키기에 적합한 종은 대장균(*E. coli*)으로, 널리 연구에 이용되고 있다. 해당 단백질은 대장균 자체가 가지고 있는 단백질이 아니기 때문에 클로닝기술로 일반적인 벡터를 사용해 넣는다고 해서 다 발현이 되지는 않는다. 그래서 원하는 단백질을 대장균에서 발현시키고, 더 많이 얻기 위해 여러 조건들에 대한 연구가 행해지고 있다(G. Hanning et al. 1998). 그 중 한 가지 방법이 코돈최적화(codon optimization) 방법으로서 원하는 단백질을 코딩하는 유전자를 가져올 때, 대장균에서 잘 발현이 될 수 있도록 대장균이 좋아하는 코돈으로 다시 바꿔주는 작업을 의미한다. 코돈 최적화 과정을 거치면 유전자 서열은 염기서열만 바뀔 뿐, 해당 단백질의 아미노산 서열은 바뀌지 않아, 염기서열만 바뀌었을 뿐, 같은 유전자를 의미하게 된다.

[0007] 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

[0008] 본 발명자들은 지구온난화로 인한 이상기온 현상의 발생으로 이산화탄소를 감소시킬 수 있는 방법을 재조합 미생물을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, C4 대사회로 과정에 관여하는 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소(phosphoenolpyruvate carboxylase)가 포스포에놀피루브산을 옥살로아세트산으로 전환하는데 바이카보네이트가 사용되므로 이산화탄소를 흡수하여 유기산을 제조하는 할 수 있는 대장균을 고안하였다. 그 결과, 산업용 균주로 유용한 대장균에 글라시에콜라(*Glaciecola*)의 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소(phosphoenolpyruvate carboxylase) 뉴클레오타이드를 코돈 최적화한 유전자 도입을 통해 우수한 효율을 갖는 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소로부터 효율적으로 유기산을 제조할 수 있음을 규명함으로써, 본 발명을 완성하였다.

[0009] 따라서, 본 발명의 목적은 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소 발현용 형질전환 대장균 및 이의 제조방법을 제공하는 데 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 유기산 및 이의 제조방법을 제공하는 데 있다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 글라시에콜라(*Glaciecola*) 종의 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소에 대한 대장균(*Escherichia coli*)에서의 코돈 최적화된 핵산 서열을 제공하는 데 있다.

[0012] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소 발현용 형질전환 대장균의 제조방법을 제공한다:

[0014] (a) 글라시에콜라(*Glaciecola*) 종의 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소(Phosphoenolpyruvate Carboxylase) 뉴클레오타이드 서열을 대장균(*Escherichia coli*)에서의 발현에 적합한 코돈 최적화(codon optimization)하여 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열을 수득하는 단계;

[0015] (b) 상기 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소의 코돈 최적화된 뉴클레오타이드 서열을 발현 벡터에 삽입하여 재조합 벡터를 제조하는 단계; 및

[0016] (c) 상기 재조합 벡터를 대장균에 형질전환하여 재조합 대장균을 제조하는 단계.

[0017] 본 발명자들은 지구온난화로 인한 이상기온 현상의 발생으로 이산화탄소를 감소시킬 수 있는 재조합 미생물을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, C4 대사회로 과정에 관여하는 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소(phosphoenolpyruvate carboxylase)가 포스포에놀피루브산을 옥살로아세트산으로 전환하는데 바이카보네이트가 사용되어 이산화탄소를 흡수하여 유기산을 제조하는 할 수 있는 대장균을 고안하였다. 그 결과, 산업용 균주로 유용한 대장균에 글라시에콜라(*Glaciecola*)의 포스포에놀피루브산 수산화효소(phosphoenolpyruvate hydroxylase) 뉴클레오타이드를 코돈 최적화한 유전자 도입을 통해 우수한 효율을 갖는 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소로부터 효율적으로 유기산을 제조할 수 있음을 규명하였다.

[0018] 본 발명의 대장균 제조방법을 각 단계로 나누어 상세하게 설명한다.

[0019] 단계 (a): 코돈 최적화(codon optimization) 단계

[0020] 본 발명의 대장균을 제조하기 위해, 글라시에콜라(*Glaciecola*) 종의 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소(Phosphoenolpyruvate Carboxylase) 뉴클레오타이드 서열을 대장균(*Escherichia coli*)에서의 발현에 적합한 코돈 최적화(codon optimization)한다.

[0021] 본 발명에서 대장균에서 발현하고자하는 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소는 카르복실라아제군 중 하나로 바이카르보네이트의 첨가로 포스포에놀피루브산을 C4 화합물 옥살로아세테이트로 전환하는 다음의 반응을 촉매한다:

[0022]

Phosphoenolpyruvate Oxaloacetate Phosphate

[0023] 상기 반응식과 같이, 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소는 한분자의 포스포에놀피루브산, 이산화탄소 및 물을 옥산로아세테이트 및 포스페이트로 전환하는 작용을 촉매한다. 때문에 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소의 작용을 통해, 탄소를 고정화시킴으로서 대기 중의 이산화탄소를 감소시킬 수 있다.

[0024] 본 발명에서는 대장균에서 상기 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소가 보다 고발현될 수 있도록 대장균에 적합한 코돈으로 전환하였다. 코돈 최적화 과정을 거치면 유전자 서열은 염기서열만 전환될 뿐, 아미노산 서열은 전환되지 않는다.

[0025] 바람직하게는 상기 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소의 코돈 최적화된 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제1서열이고, 아미노산 서열은 서열목록 제2서열이다.

[0026] 본 발명에서 이용되는 뉴클레오티드 서열은 상기 언급된 서열 이외에 상기 뉴클레오티드 서열에 대하여 실질적인 동일성을 나타내는 뉴클레오티드 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 본 발명의 뉴클레오티드 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 80%의 상동성, 보다 바람직하게는 최소 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 최소 95%의 상동성을 나타내는 뉴클레오티드 서열을 의미한다. 서열비교를 위한 얼라인먼트 방법은 당업계에 공지되어 있다. 얼라인먼트에 대한 다양한 방법 및 알고리즘은 Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482(1981); Needleman and Wunsch, *J. Mol. Bio. 48:443(1970);* Pearson and Lipman, *Methods in Mol. Biol.* 24: 307-31(1988); Higgins and Sharp, *Gene* 73:237-44(1988); Higgins and Sharp, *CABIOS* 5:151-3(1989); Corpet et al., *Nuc. Acids Res.* 16:10881-90(1988); Huang et al., *Comp. Appl. BioSci.* 8:155-65(1992) and Pearson et al., *Meth. Mol. Biol.* 24:307-31(1994)에 개시되어 있다. NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-10(1990))은 NBCI (National Center for Biological Information) 등에서 접근 가능하며, 인터넷 상에서 blastp, blasm, blastx, tblastn and tblastx와 같은 서열 분석 프로그램과 연동되어 이용할 수 있다. BLSAT는 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/에서 접속 가능하다. 이 프로그램을 이용한 서열 상동성 비교 방법은 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_help.html에서 확인할 수 있다.

[0027] 단계 (b): 재조합 벡터의 제조

[0028] 이어, 상기 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소의 코돈 최적화된 뉴클레오타이드 서열을 발현 벡터에 삽입하여 재조합 벡터를 제조한다.

[0029] 본 명세서에 있어서, 용어 "발현 벡터"는 발현 벡터의 전사에 제공되는 추가단편에 작동가능하게 연결된 관심의 폴리펩티드를 암호화하는 단편으로 구성되는 선형 또는 원형의 DNA 분자이다. 그와 같은 추가단편은 프로모터 및 종료암호 서열을 포함한다. 발현 벡터는 하나 이상의 복제 개시점, 하나 이상의 선택마커, 폴리아데닐화 신호 등을 또한 포함한다. 발현 벡터는 일반적으로 플라스미드 또는 바이러스 DNA로부터 유도되거나, 또는 둘 다의 요소를 함유한다.

[0030] 본 발명의 벡터 시스템은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있으며, 이에 대한 구체적인 방법은 Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press(2001)에 개시되어 있으며, 이 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

[0031] 본 발명의 코돈 최적화된 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소의 뉴클레오타이드 서열을 발현 조절서열에 작동가능하게 연결되어 발현 벡터 내에 삽입될 수 있다. 상기에서 '작동가능하게 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 작동가능하게 연결된 핵산 서열의 발현을 조절하는 DNA 서열을 의미한다. 그러한 조절 서열은 전사를 개시하기 위한 프로모터, 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보좀 결합 부위를 코딩하는 서열 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다.

[0032] 본 발명의 벡터는 전형적으로 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 원핵세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터(예컨대, tac 프로모터, lac 프로모터, lacUV5 프로모터, lpp 프로모터, pL^{λ}프로모터, pR^{λ}프로모터, rac5 프로모터, amp 프로모터, recA 프로모터, SP6 프로모터, trp 프로모터 및 T7 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보좀 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 숙주 세포로서 *E. coli*(예, HB101, BL21, DH5α 등)가 이용되는 경우, *E. coli* 트립토판 생합성 경로의 프로모터 및 오퍼레이터 부위(Yanofsky, C., J. Bacteriol., 158:1018-1024(1984)) 그리고 파아지 λ의 좌향 프로모터 (pL^{λ}프로모터, Herskowitz, I. and Hagen, D., Ann. Rev. Genet., 14:399-445(1980))가 조절 부위로서 이용될 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 벡터에 사용되는 프로모터는 trc 프로모터이고, 종결서열은 rrrB 터미네이터이다.

[0033] 숙주 세포 내로 주입된 벡터는 숙주 세포 내에서 발현될 수 있으며, 이러한 경우에는 다량의 아세토인 환원효소를 얻게 된다. 예를 들어, 상기 발현 벡터가 trc 프로모터를 포함하는 경우에는 숙주 세포에 IPTG(Isopropylthio-β-D-Galactoside)를 처리하여 유전자 발현을 유도할 수 있다.

[0034] 한편, 본 발명에 이용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드(예: pTrc99A, pSTV28, pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHC79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, pET22b, pGEX 시리즈, pET 시리즈 및 pUCP19 등), 파지(예: λgt4?λB, λ-Charon, λΔz1 및 M13 등) 또는 바이러스(예: SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있으나, 바람직하게는 pTrc99A를 사용한다.

[0035] 한편, 본 발명의 벡터는 선택표지로서, 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함하며, 예를 들어 암피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자가 있다.

[0036] 본 발명의 발현 벡터는 프로모터서열 및 발현 대상 유전자(구조 유전자)의 뉴클레오티드 서열을 포함하며, 상기 서열들이 5'-3' 순서대로 연결되는 것이 바람직하다.

[0037] 본 발명의 발현 벡터에는 상기 유전자들이 효소의 과발현 기능을 포함하여 최소한의 길이를 가지도록 RBS(ribosomal bindingsite) 및 효소발현에 꼭 필요한 부분을 포함하는 염기서열만을 서열로 정하여 삽입시키는 것이 숙주세포의 대사부담(metabolic burden)을 줄이는 측면에서 바람직하다.

[0038] 단계 (c): 형질전환 대장균을 제조

[0039] 마지막으로, 상기 재조합 벡터를 대장균에 형질전환 대장균을 제조한다.

[0040] 상기 코돈최적화된 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소의 뉴클레오타이드 서열이 포함된 발현 벡터는 이후 대장균 내부로 도입되는데, 본 발명의 벡터를 대장균 내로 운반하는 방법은 $CaCl_2$ 방법(Cohen, S.N. et al., Proc. Natl. Acac. Sci. USA, 9:2110-2114(1973)), 하나한 방법(Cohen, S.N. et al., Proc. Natl. Acac. Sci. USA, 9:2110-2114(1973); 및 Hanahan, D., J. Mol. Biol., 166:557-580(1983)) 및 전기 천공 방법 (Dower, W.J. et al., Nucleic. Acids Res., 16:6127-6145(1988)) 등에 의해 실시될 수 있으며, 바람직하게는, 본 발명의 단계 (c)는 전기천공법으로 실시한다.

[0041] 본 발명의 벡터를 안정되면서 연속적으로 클로닝 및 발현시킬 수 있는 숙주 세포는 당업계에 공지되어 어떠한 숙주 세포도 이용할 수 있으며, 예컨대, *E. coli* W3110, *E. coli* JM109, *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* RR1, *E. coli* LE392, *E. coli* B, *E. coli* X 1776, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 츄린겐시스와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세슨스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등이 있다.

[0042] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명의 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소 발현용 대장균의 제조방법에 의해 제조된 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소 발현용 대장균을 제공한다.

[0043] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 다음의 단계를 포함하는 유기산의 제조방법을 제공한다:

[0044] (a) 본 발명의 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소 발현용 대장균을 배양하여 유기산을 생합성 하는 단계; 및

[0045] (b) 상기 생합성된 유기산을 수득하는 단계.

[0046] 본 발명의 유기산 제조방법은 상기 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소 발현용 대장균을 이용하기 때문에, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.

[0047] 본 발명의 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소 발현용 대장균을 배양하여 제조된 유기산은 옥살로아세트테이트 및 말산(malic acid)이다.

[0048] 바람직하게는, 야생형 대장균을 이용한 경우와 비교하여 유기산에 대한 수율이 1.2-20.0배 증가된다.

[0049] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소 발현용 대장균은 야생형 대장균과 비교하여 옥살로아세테이트의 수율이 1-3배 증가하였고, 말산의 수율은 배양 시간이 지날수록 감소하는 야생형 대장균과 대조적으로, 야생형 대장균과 비교하여 상당히 증가하여 최대 약 20배 증가하는 경향을 나

타낸다.

[0050] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 제조방법에 의해 제조된 유기산을 제공한다.

[0051] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 글라시에콜라(*Glaciecola*) 종의 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소(phosphoenolpyruvate carboxylase)에 대한 대장균(*Escherichia coli*)에서의 코돈 최적화된 핵산 서열을 제공한다.

발명의 효과

[0052] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0053] (a) 본 발명은 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소 발현용 대장균 및 이의 제조방법을 제공한다.

[0054] (b) 본 발명은 본 발명의 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소 발현용 대장균을 이용한 유기산의 제조방법 및 유기산을 제공한다.

[0055] (c) 본 발명은 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소를 대량생산, 활성개량, 산업적 유용물질을 얻는데 활용 할 수 있도록 하는 원천기술을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0056] 도 1은 OPGS 유전자를 클로닝한 발현 벡터 pTrc99A을 전기영동으로 확인한 그림이다. 1열은 전기영동 사이즈를 알아보는 마커로 500 bp 사이즈이다. 2열은 OPGS 유전자를 클로닝한 발현 벡터 pTrc99A를 샘플로 하여 해당 OPGS 유전자(2634 bp)를 확인할 수 있는 프라이머(표 2)를 사용하여 확인한 콜로니 PCR 수행 결과를 나타낸다.

도 2는 를 pSGJS112(OPGS 유전자를 클로닝한 발현 벡터 pTrc99A)의 지도를 나타내는 도면이다.

도 3는 형질전환 대장균 *E. coli* SGJS112에서 코돈 최적화 된 양 박테리아 글라시에콜라(*Glaciecola*) *sp. HTCC2999*의 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소 단백질이 발현됨을 확인한 SDS-PAGE 사진이다(1열: 사이즈마커, 2열 내지 4열; 컨트롤인 공벡터를 가지는 형질전환 대장균 *E. coli* SGJS110의 3, 6 및 9 시간 때 샘플, 5열 내지 7열; 원래 유전자를 가지는 형질전환 대장균 *E. coli* SGJS111의 3, 6 및 9 시간 때 샘플, 8열 내지 10열; 코돈 최적화 된 유전자를 가지는 형질전환 대장균 *E. coli* SGJS112의 3, 6 및 9 시간 때 샘플, 화살표로 표시한 부분이 코돈 최적화 된 유전자가 발현되었음을 확인할 수 있는 단백질 밴드).

도 4은 *E. coli* SGJS110, *E. coli* SGJS111 및 *E. coli* SGJS112의 성장속도를 나타내는 그래프이다.

도 5은 효소 활성 측정 결과를 나타내는 그래프이다. *E. coli* SGJS112이 코돈 최적화 된 양 박테리아 글라시에콜라(*Glaciecola*) *sp. HTCC2999*의 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소의 유전자를 가진 형질전환 대장균이며, 가장 높은 효소 활성을 나타내는 것을 알 수 있다.

도 6은 형질전환 대장균을 사용해 특정 유기산 생산 분석 결과를 나타내는 표이다. *E. coli SGJS112*에서 특정 유기산인 옥살로아세테이트 및 말산을 다른 균들과 비교하였을 때, 동일한 양의 글루코오즈 사용 시 많은 양을 생산해 낼 수 있음을 확인하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0057] 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.

[0058] **실시예**

[0059] **실시예 1: 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction; PCR)을 이용한 OPGS 유전자를 발현하는 재조합 플라스미드의 제조**

[0060] 해양 미생물인 글라시에콜라(*Glaciecola*) *sp. HTCC2999*의 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소를 암호화 하는 유전자서열(GenBank, NCBI)을 기초로 코돈 최적화하여 제작 된 유전자를 OPGS라 명명하였다(표 1). NCBI(National Center for Biotechnology Information)에서 얻은 글라시에콜라(*Glaciecola*) sp. HTCC2999의 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소를 암호화 하는 아미노산 서열 정보(서열목록 제1서열)를 가지고 대장균에서 최적의 발현 될 수 있게끔, 대장균이 해당 아미노산을 코딩할 때 자주 쓰는 코돈으로 뉴클레오티드서열을 재합성 한다. 대장균이 자주 쓰는 코돈들을 정리해 놓은 것을 코돈사용빈도(codon usage)라고 하며 기본적인 코돈 최적화 과정에선 이에 따라 뉴클레오티드서열이 다시 만들어진다. 코돈 최적화된 뉴클레오티드 서열은 원 서열과 동일하게 같은 아미노산을 암호화 하므로 아미노산 자체의 변화는 없이 대장균 내 해당 유전자의 발현량을 증가 시킬 수 있다.

[0061] 프라이머를 제작해 중합효소연쇄반응(PCR, TaKaRa Korea) 방법을 통해 클로닝 하였다(표 2).

표 1

[0062]

유전자	생산 효소
OPGS	Phosphoenolpyruvate carboxylase

표 2

[0063]

유전자	프라이머 서열		제한 효소
OPGS	F	5'-ACAGACCATGGAATTCATGCCTGATAGTAGCTATATTGATGC-3'	EcoR I
	R	5'-GCAGGTCGACTCTAGAACCAGTATTTCTCATACCAATTGCA-3'	Xba I

[0064] 표 1의 유전자들은 목적 유전자만 특이적으로 증폭하도록 제작된 표 2에 제공된 프라이머를 사용하여 증폭하였다. 이 유전자 OPGS는 2634 bp의 크기로 증폭되었다.

[0065] 중합효소연쇄반응은 통상적인 반응조건(10 mM Tris-HCl(pH 9.0), 50 mM KCI, 0.1% 트리톤 X-100, 2 mM $MgSO_4$, Taq DNA 중합효소(TaKaRa, 일본)) 하에 95℃/5분 (변성), 50℃/1분(어닐링) 및 72℃/1분(신장)로 1회 수행한 후, 95℃/1분 (변성), 50℃/30초(어닐링) 및 72℃/1분(신장)로 30회 반복 수행하였다. 마지막 단계로 안정적인 신장을 위해 95℃/1분(변성), 50℃/1분(어닐링) 및 72℃/5분(신장) 반응하였다. 중합효소연쇄반응 후 증폭된 DNA는 0.8% 아가로즈 젤 상에서 확인 후 정제한 뒤, 인-퓨전 HD 클로닝 키트(Clontech, 미국) 제품을 사용하여 발현 벡터인 pTrc99A에 넣어, 재조합 플라스미드인 pTrc99A::OPGS를 제작하였다. 상기 재조합 플라스미드들은 대장균 (*E. coli* DH5a competent cell, RBS)에서 형질 전환하여 균주를 제조하였다.

[0066] 도 1은 발현 벡터 pTrc99A에 OPGS 유전자가 들어간 것을 전기영동으로 확인한 결과이고, 도 2는 상기 pSGJS112라 명명 된 벡터의 지도를 나타낸다.

[0067] **실시예 2: 이종 대장균 형질전환체 제조**

[0068] 통상적으로 클로닝용으로 많이 쓰이는 균주의 경우 $CaCl_2$ 버퍼를 사용한 컴피턴트 세포를 만든 후 열충격(42℃) 방법에 의해 플라스미드를 숙주세포내로 넣지만, 본 발명에서는 형질전환체의 안정적 제조와 효율을 높이기 위해 전기천공법(electroporation)에 의한 형질전환방법을 사용하였다.

[0069] 상기 전기 충격에 의한 형질전환방법을 위해 16시간동안 전 배양 된 250 ㎕ (0.5 %)의 야생종 *E. coli* W3110 배양액을 시험관에 들어있는 50 ㎖의 LB(10 g/L 트립톤, 10 g/L NaCl 및 5 g/L 효모추출물)배지에 접종하여 배양액의 흡광도 (absorbance)가 600 nm 파장에서 0.6에 이르렀을 때, 배양액 전체에 해당하는 50 ㎖의 배양액은 원심 분리(4000rpm, 10분)하여 상등액과 세포를 분리한다. 수득한 세포는 10% 글리세롤 5 ㎖로 2-3회 세척해준

후, 다시 원심분리(4000 rpm, 10분)하여 상등액과 세포로 나누어 준다. 세포은 10% 글리세롤 200 ㎕로 현탁한다. 현탁 된 세포에 1-3 ㎕의 재조합 플라스미드(pSGJS112)을 첨가시켜준다.

[0070] 상기의 플라스미드가 들어있는 분주된 51-53 ㎕의 액체는 전기천공법용 큐벳 (Gene pulser cuvette, BIO-RAD, 미국)에 담아 Gene pulser Xcell(BIO-RAD, 미국)로 전기 충격 (1800v, 25uF, 200Ω)을 가한다. 미리 준비해 둔 1 ㎖ LB(10 g/L 트립톤, 10 g/L NaCl, 5 g/L 효모추출물)를 첨가한 뒤 1시간 동안 200 rpm, 37℃에서 진탕 배양한다. 배양된 형질전환체는 암피실린(50 ㎍/㎖)이 첨가된 LB 아가(10 g/L 트립톤, 10 g/L NaCl, 5 g/L 효모추출물 및 아가 20 g/L)에서 단일 균체가 생성될 때까지 37℃에서 배양한다. 이를 통해 재조합 플라스미드인 pSGJS112를 *E. coli* W3110 균주에 형질 전환한 *E. coli* SGJS112 재조합 균주를 개발하였다(표 3).

표 3

[0071]

개발균주	-
E. coli SGJS112	*E. coli* W3110::pTrc99A::OPGS

[0072] **실시예 3: 형질전환 대장균에서 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소 (phosphoenolpyruvate carboxylase) 유전자 발현 확인**

[0073] *E. coli* SGJS112 형질전환 균주는 LB(암피실린 50 ㎍/㎖ 포함) 배지에 16시간 정도 전 배양 시키고 그 배양액을 다시 암피실린 50 ㎍/㎖이 포함된 LB 배지에 접종하여 흡광도가 600 nm에서 0.6-1.0 되었을 때 글리세롤 농도가 25%가 되게 보관용 균액으로 만든 다음 -80℃에서 배양실험 시까지 저장하였다.

[0074] 상기에서 개발된 형질전환 균주에 삽입한 벡터에 의해 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소 유전자의 발현 여부를 확인하기 위하여 SDS-PAGE를 수행하였다. 샘플준비과정은 보관용 고체균 하나(single colony)를 10 ㎖ 튜브에 들어있는 암피실린(50 ㎍/㎖)이 첨가된 3 ㎖의 LB에 37℃, 200 rpm 상태에서 16시간동안 배양한 후, 이를 다시 500 ㎖ 플라스크에 들어있는 암피실린(50 ㎍/㎖), IPTG 1 mM 이 첨가된 100 ㎖의 LB(10 g/L 트립톤, 10 g/L NaCl 및 5 g/L 효모추출물) 배지에 2%의 전기 배양액을 접종하여 37℃, 200 rpm 상태에서 9시간동안 배양하였다. 3, 6 및 9 시간 간격으로 샘플을 채취하였다. 배양 후 원심분리(4500 rpm, 5분)를 통해 균만을 수집한 후, 1 ㎖ 용리 버퍼(25 mM Tris-HCl(pH 8.3), 100 mM NaCl, 5 % 글리세롤)로 부유시켜, 초음파발생장치(ULH-700S, Ulsso hi-tech, 대한민국)로 세포를 파쇄하는 작업을 30초 동안 수행하였다. 그 후 원심분리(14000 rpm, 10분)하고 상등액만을 수득하여 SDS-PAGE 샘플로 사용하였다. 동일한 양으로 단백질을 로딩하기 위해 브래드포드법을 사용하여 단백질을 정량하고 20 ㎍씩 SDS-PAGE(12% Tris-HCl)에 로딩하였다. 겔 키트로는 미니 프로틴 3 셀(BIO-RAD, 미국)을 사용하였으며 반응 시간은 70 V에서 1시간 30분, 염색은 코마시 블루(Coomassie Blue) 염색약 G25을 사용하였다. 스태킹 젤 및 러닝 젤은 바이오라드(미국)에서 미리 만들어진 레드 젤을 사용하였다. 다른 실험에 필요한 버퍼들은 당업계에서 일반적으로 조제하는 방법으로 만들어 사용하였다.

[0075] 분석결과 야생종 대장균(*E. coli* SGJS110이라 명명, 도 3의 2열 내지 4열) 및 최적화를 하지 않은 원래의 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소 유전자정보를 갖는 대장균(*E. coli* SGJS111이라 명명, 도 3의 5열 내지 7열)은 SDS-PAGE 상에서 해당 효소 단백질이 발현되지 않음을 확인하였다. 코돈 최적화를 한 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소의 유전자(OPGS)를 갖는 *E. coli* SGJS112는 해양 미생물 글라시에콜라(*Glaciecola*) *sp. HTCC2999*의 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소 단백질 크기에 해당하는 98 kDa의 밴드가 나타났고(도 3의 8열 내지 10열, 화살표로 표기), 이것은 해당 효소 단백질이 대장균에서 발현되었음을 뒷받침하며, 이는 재조합 플라스미드인 상기 pSGJS112를 통해 발현되었음을 확인하였다(도 3의 8열 내지 10열)

[0076] **실시예 4: 형질전환 대장균에서 발현 된 포스포에놀피루브산카르복실화 효소 (phosphoenolpyruvate carboxylase) 활성 측정**

[0077] 개발된 형질전환 균주 *E. coli* SGJS112에서 발현된 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소의 활성을 측정하기 위하여 보관용 고체 균체 하나를 10 ㎖ 튜브에 들어있는 암피실린(50 ㎍/㎖)이 첨가된 3 ㎖ LB에 16시간동안 배양한 후, 이를 다시 500 ㎖ 플라스크에 들어있는 암피실린(50 ㎍/㎖)이 첨가된 100 ㎖ LB(10 g/L 트립톤, 10 g/L NaCl 및 5 g/L 효모추출물) 배지에 2%의 전기 배양액을 접종하여 37℃, 200 rpm 상태에서 9시간 동안 배양하였다. 3, 6 및 9 시간 간격으로 샘플을 채취하였다.

[0078] 단백질 발현을 위해 유도물질인 IPTG(Isopropylthio-β-D-Galactoside, sigma, 미국)를 첨가(최종농도 1 mM)하여 효소 단백질의 발현을 유도하였다. 비교치가 되는 다른 형질전환 균들도 위와 동일한 방법으로 배양하였으며 동일한 조건 구성을 위해 1 mM IPTG를 첨가하였다.

[0079] 효소활성측정방법은 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소를 측정할 수 있도록 고안 된 커플링효소(coupling enzyme)를 사용한 방법으로 1분 동안 소모되는 NADH(Nicotinamide Adenine Dinucleotide의 환원형)의 양을 측정해 활성 값을 구할 수 있었다. 커플링 효소를 통해 활성측정을 하는 방법은 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소에 의해 제조된 옥살로아세테이트를 사용하는 말레이트 디하이드로나아제(malate dehydrogenase)를 사용하여 간접적으로 측정하는 방법이다. 초음파발생장치(ULH-700S, Ulsso hi-tech, 대한민국)를 사용해 초음파분쇄로 균을 30초 동안 파쇄한 후 14000 rpm에서 10분 동안 원심분리를 실시하여 수득한 상등액을 가지고 활성측정 실험에 사용하였다(실시예 3에서 쓰인 샘플과 동일).

[0080] 활성측정 용액은 총 1 ㎖의 부피를 갖는다. 구성은 0.5 M HEPES, 0.1 M $MgCl_2$, 0.05 M PEP, 0.05 M $NaHCO_3$, 0.002 M NADH, MDH(4 units)를 각각 100 ㎕씩 넣어주고 위에 수확 된 샘플도 100 ㎕ 만큼 넣어주며, 나머지 부피는 2차 증류수로 채워주게 된다. 그렇게 만들어진 용액을 30℃, 20분 동안 반응시킨 후 340 ㎚에서 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소에 의해 만들어진 옥살로아세테이트를 사용하여, 말레이트 디하이드로나아제(malate dehydrogenase)가 반응 시 소모한 NADH의 양을 구해 간접적으로 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소의 활성측정을 수행하였다(T. Kodaki *et al*. 1985).

[0081] 그렇게 측정된 활성측정값을 좀 더 정확히 해석하고자, 실험에 사용된 3가지 형질전환 균주(*E. coli* SGJS110(대조군), *E. coli* SGJS111(본래의 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소를 코딩하는 유전자를 갖는 대장균), *E. coli* SGJS112(코돈최적화 된 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소를 코딩하는 유전자를 갖는 대장균))에 시간당 성장속도를 측정하여 그래프로 같이 보여주었다(도 4).

[0082] 측정 된 활성측정값은 도 4에 표기하였으며, 야생종 대장균도 자신의 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소를 가지고 있기 때문에 어느 정도의 활성 값을 보이지만 본 발명을 통해 만들어진 형질전환 대장균인 *E. coli* SGJS112가 가장 큰 활성을 갖는 것으로 보아 발현 벡터에 넣어진 해양 미생물 글라시에콜라(*Glaciecola*) *sp. HTCC2999*의 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소의 단백질을 암호화하는 코돈 최적화 된 유전자가 발현되어 대장균에서 활성을 가짐을 알 수 있었다. 상대적으로 코돈최적화를 하지 않은 원 유전자를 가지는 형질전환 대장균은 SDS-PAGE에서 발현이 확인 되지 않았으므로, 컨트롤과 비슷한 효소 활성을 가지는 것으로 확인되었다(도 5).

[0083] **실시예 5: 세포외로부터 형질전환 대장균의 옥살로아세테이트, 말산, 푸마르산 및 숙신산의 측정**

[0084] 코돈 최적화 된 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소를 가진 개발된 형질전환 균주 *E. coli* SGJS112의 보관용 고체 균체 하나를 10 ㎖ 튜브에 들어있는 암피실린 (50 ㎍/㎖)이 첨가된 3 ㎖ LB에서 16시간 동안 배양한 후, 이를 다시 500 ㎖ 플라스크에 들어있는 암피실린(50 ㎍/㎖)이 첨가된 100 ㎖ LB(10 g/L 트립톤, 10 g/L NaCl 및 5 g/L 효모추출물) 및 10 g/L 글루코오즈(glucose)가 첨가된 배지에 2%의 전기 배양액을 접종하여 37℃, 200 rpm 상태에서 9시간 동안 배양하였다. 3, 6 및 9 시간 간격으로 샘플을 1 ㎖씩 채취하여, 13000 rpm에서 10분 동안 원심분리한 후 수득한 상등액을 0.2 ㎛ 필터를 사용하여 정제한 뒤, 하단 조건에서 고속액체크로마토그래피(High performance liquid chromatography; HPLC) 정량분석을 실시하였다. 3, 6 및 9 시간에 성장속도도 측정하여 첨부하였다(표 5). 표 5의 [a]는 (C4 대사물질의 생산량/글루코오즈의 소모량)의 mM 비를 나타내고, [b]는 검출되지 않음을 나타낸다. 배양 후 3시간에서, *E. coli* SGJS112는 옥살로아세테이트산 및 말산을 각각 약 8.0% 및 약 16.8% 생산하였으며, 이는 *E. coli* SGJS110 및 *E. coli* SGJS111과 비교하여 상당히 높은 증가이다. 배양 후 6 내지 9시간에서, *E. coli* SGJS112는 옥살로아세테이트산 및 말산을 각각 약 3-5% 및 약 20-25% 생산하였으며, 이는 옥살로 아세트산을 1-2% 생산하는 *E. coli* SGJS110 및 거의 생산하지 않는 *E. coli* SGJS111과 비교하여 상당히 높은 증가이다. 특히, *E. coli* SGJS110과 비교하여 말산의 생산 수율은 10배 이상 증가되었다. *E. coli* SGJS112에서는 *E. coli* SGJS110 및 *E. coli* SGJS111과 달리 숙신산이 생성되지 않았는데, 이는 대장균 내 TCA 회로 안에서 옥살로아세트산, 말산 및 숙신산과 같은 유기산이 사이클로 연결되어 전환되기 때문에, TCA사이클 시작물질인 옥살로아세트산의 양이 증가하였고, 또한 코돈 최적화 하여 발현 된 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소 유전자의 영향으로 TCA사이클 상의 유기산 조성도의 변화가 일어난 것으로 보인다. 그러므로 *E. coli* SGJS110 및 *E. coli* SGJS111은 코돈 최적화 한 포스포에놀피루브산 카르복실화 유전자를 가지고

있지 않기 때문에 숙신산이 생성되는 동일한 현상을 보였고, 본 특허에서 개발 한 균주인 *E. coli* SGJS112는 숙신산의 생산량이 줄면서 상대적으로 *E. coli* SGJS110 및 *E. coli* SGJS111이 생산하지 못한 말산을 생산한 것으로 보인다.

표 4

[0085]

품 목	조 건
HPLC 모델	(영린기기, 대한민국), UV730D (영린기기, 대한민국)
컬럼	Aminex HPX-87H(Biorad, 미국)
유속	0.6 mi/분
주입부피	30 ㎕
이동상	0.01 N 황산
오븐 온도	60℃
작동 시간	30분

표 5

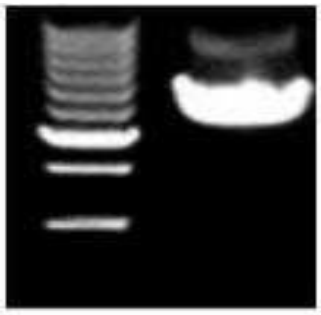
[0086]

균주	시간 (hr)	OD_{600nm}	[a]C4 대사 효율 (%)			
			옥살로아세테이트	말산	푸마르산	숙신산
E.coli SGJS110	3	2.3±0.2	4.8±0.8	14.6±4.8	[b]ND	4.6±1.8
	6	3.0±0.5	2.7±0.5	1.6±0.1	ND	3.7±0.2
	9	3.0±0.4	2.3±0.2	1.7±0.5	ND	ND
E.coli SGJS111	3	2.4±0.3	2.0±1.7	ND	ND	8.7±0.1
	6	4.7±0.6	ND	ND	ND	9.2±1.6
	9	5.4±0.3	ND	ND	ND	ND
E.coli SGJS112	3	1.4±0.4	8.0±1.9	16.8±3.8	ND	ND
	6	2.8±0.5	5.2±2.4	20.1±4.8	ND	ND
	9	3.4±0.4	3.8±0.2	24.0±9.9	ND	ND

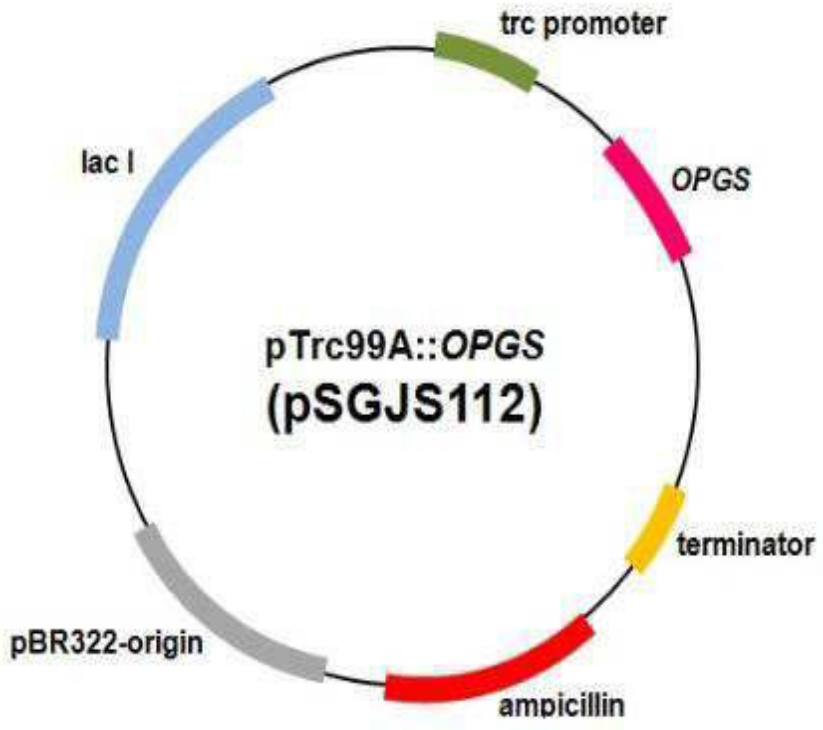
[0087] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

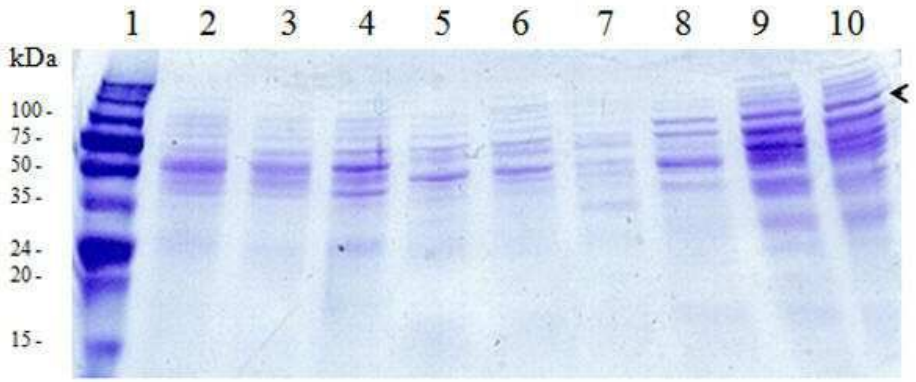
도면1



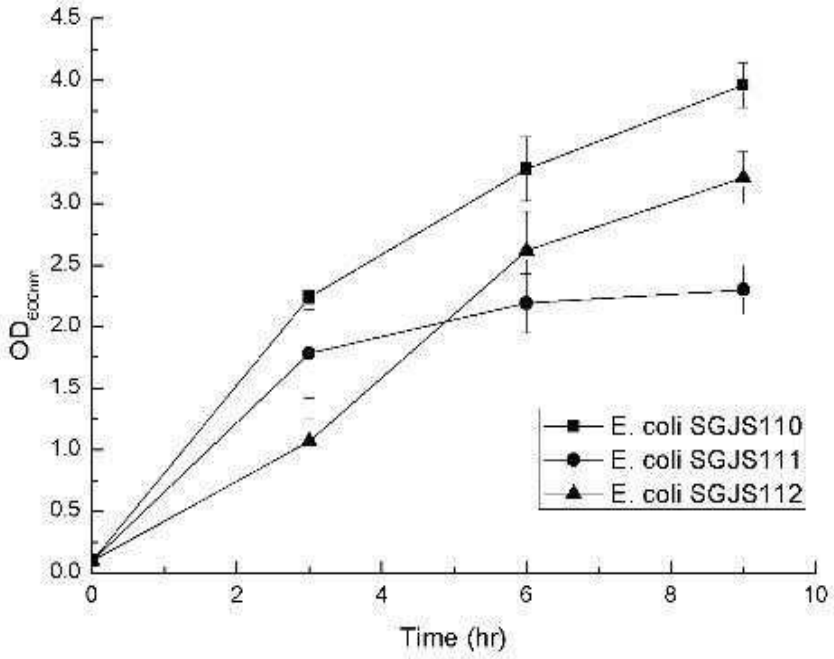
도면2


trc promoter
lac I
OPGS
pTrc99A::OPGS
(pSGJS112)
terminator
pBR322-origin
ampicillin

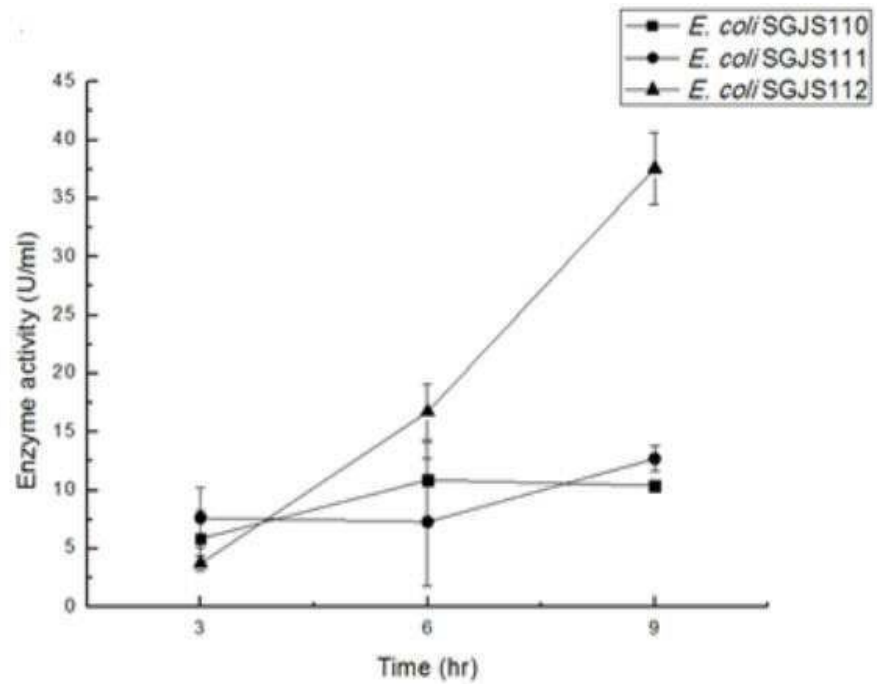
도면3


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
kDa
100-
75-
50-
35-
24-
20-
15-

도면4



도면5



서 열 목 록

<110> Industry-University Cooperation Foundation Sogang University

<120> Methods for Preparing Transformed E.coli for Expression of Phosphoenolpyruvate Carboxylase

<130> PN120181

<160> 2

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 2634

<212> DNA

<213> Codon optimized Phosphoenolpyruvate Carboxylase

<400> 1

atgcctgata gtagctatat tgatgcacag ctgaaacata ccgtccgaga tttgggcgaa 60

ctgctgggta aaactatcaa acatgaactg ggtcaggaat ggctggataa aatagaagcc 120

atccgtctgc agggtcgtgc aggacacacc ggtgattcac aggcaaacat ggcactgcaa 180

agtatattca acgatatgaa caccgattcc ctgcttgttg ttgcacgggc atttgcgcag 240

tttctaaatt tagcgaatat tgctgagcaa gagtttaatt cttcaaaaca actggacgac 300

agcgttgaag ttttgttctc gcatctgcgt aaggcaggtc agagccctga agcaatctac 360

gaagcagtta attctctgaa tattgacctc gtgttaacgg cacacccaac tgaagtaacg 420

cgtagaacaa tgatccataa acatactgcc ctggcagaat gcctgcgtca gcaacataac 480

gatagtcttc accccgcaca aaagctgcag ctggccgaac gtatagctga tttagtggag 540

cagagctggc atacggaaga aattcgtgat cgtcgcccga cgccagtcga cgaagcgaca 600

tggggtttta gcgttatcga aaattcactc tgggatgcaa ttcccgattt tatgcgtgat 660

ctagatctta aactgcaaca agagtatgat attaaactcc cgattgatgc gcaaccggta 720

cagatcagct catggatggg cggggatcgt gatggtaacc cgtttgttac tagcaaggtc 780

acacaaaccg tactgcacct ggcacggcga cgtgcagcaa aattgttcgc aaaagatatt 840

agtgcactgc aggtagaact gtcgatgggc aaatgcgacg ataatgtgcg gcagctcgtc 900

ggagatgccg ctgaaccgta tcgtgcactg ttaaagcctc tggttaaacg tttaagagct 960

acaaaggatg gtattgatga tttgctaaat ggtcgtttat acgatcagag caaatgggtt 1020

aacagccagg aggaactgct gaccccatta atgcagtgtt atagaagcct gttgcatagc 1080

ggtctcgaac agaccgcaaa gggaggtttg cttaatacaa ttcgtagggc gcattgtttt 1140

ggtatttatc tgcttaaact ggacatacgt caggattctg gacggcacgc ggacgccatc 1200

gcggaaattt gtgactattt atctattggc gattaccatt catggaatga ggctgaaaaa 1260

atcgcttttc tgaccaaaga gttaggatcg aagcgcccgc tgctgccgaa cgactggcag 1320

gcagactggc agccgtcaga agacgtccag gaagtactcg atacttgccg tacggtagct 1380

gctaatgatc gggacgcatt tggtatttat attattagta tggcaagtta cgcatccgat 1440

gttttggcag ttcagttact gctgcagcag tgcaaagtta cctggccaat gtcagtcgca 1500

cccctgtttg agacgctgga cgatctgaat cattcccctg tggttataaa acagctgcta 1560

gcaatcgata gctatcgtaa tggattagca gatgggcaac atattatgat aggttattct 1620

gacagcgcca aagatgctgg tgcactggca gcagggtggg cacagtatac cgcacaggaa 1680

gcactggtta gtatttgtaa ccagtacgat accagcttaa ccctgtttca tggtcgtgga 1740

ggaactattg gccggggtgg gctgcccgct catagtgcca tactctctca acctccgggt 1800

tctcttgatg gtggtttccg ggttacggaa cagggtgaaa cgattagata taagttcggg 1860

atgccgaccc tggcgaaacg tagtttaggt atatacgctt ccgcaattat tgaagcaaag 1920

cttttcccgc cgccagcacc gaaatctact tggcgtgacg tattagatga aatggcagca 1980

caaggtcgtg ataactaccg tcacgttgtg agagttgacc cagactttgt tccgtatttt 2040

cgtcaagcaa caccagagca ggaactgggt aagctgccgc ttggtagccg tccggcaaaa 2100

aggaatcccc agggtggtgt tgagagcctt agggcaattc catggatatt cgcatgggca 2160

cagacgcgtt tggtgctgcc cgcatggcta ggagttatgc gtgcaattat gaagacatat 2220

aaaaaagacc cgaataccat tgacgaaatg atagcacaat ggccgttttt ccagtcacga 2280

ctatcaatgt tagatatggt ttttgcaaaa gcagatatta atattgctaa agcatatgat 2340

gatgctctgg ttgaagatga gctgaagcac tttggtgaaa gcctgcgtca tgagcttcaa 2400

caaagccgag cagatttgct ggatatcaca cataaaaata acctgatgca ggatgatcct 2460

caaggactga actcgatgca catacgtgcc gattatctgc agcctctgca ctatctgcaa 2520

atcgaactgt tgaaacgtac acggcagcat ggtgaggata ctgatctgtc ggcaattgag 2580

aaagcaatga tggtaaccat tacaggtatt gcaattggta tgagaaatac tggt 2634

<210> 2

<211> 878

<212> PRT

<213> Codon optimized Phosphoenolpyruvate Carboxylase

<400> 2

Met Pro Asp Ser Ser Tyr Ile Asp Ala Gln Leu Lys His Thr Val Arg
1 5 10 15

Asp Leu Gly Glu Leu Leu Gly Lys Thr Ile Lys His Glu Leu Gly Gln
20 25 30

Glu Trp Leu Asp Lys Ile Glu Ala Ile Arg Leu Gln Gly Arg Ala Gly
35 40 45

His Thr Gly Asp Ser Gln Ala Asn Met Ala Leu Gln Ser Ile Phe Asn

50 55 60

Asp Met Asn Thr Asp Ser Leu Leu Val Val Ala Arg Ala Phe Ala Gln
65 70 75 80
Phe Leu Asn Leu Ala Asn Ile Ala Glu Gln Glu Phe Asn Ser Ser Lys
85 90 95
Gln Leu Asp Asp Ser Val Glu Val Leu Phe Ser His Leu Arg Lys Ala
100 105 110
Gly Gln Ser Pro Glu Ala Ile Tyr Glu Ala Val Asn Ser Leu Asn Ile
115 120 125

Asp Leu Val Leu Thr Ala His Pro Thr Glu Val Thr Arg Arg Thr Met
130 135 140
Ile His Lys His Thr Ala Leu Ala Glu Cys Leu Arg Gln Gln His Asn
145 150 155 160
Asp Ser Leu His Pro Ala Gln Lys Leu Gln Leu Ala Glu Arg Ile Ala
165 170 175
Asp Leu Val Glu Gln Ser Trp His Thr Glu Glu Ile Arg Asp Arg Arg
180 185 190
Pro Thr Pro Val Asp Glu Ala Thr Trp Gly Phe Ser Val Ile Glu Asn

195 200 205
Ser Leu Trp Asp Ala Ile Pro Asp Phe Met Arg Asp Leu Asp Leu Lys
210 215 220
Leu Gln Gln Glu Tyr Asp Ile Lys Leu Pro Ile Asp Ala Gln Pro Val
225 230 235 240
Gln Ile Ser Ser Trp Met Gly Gly Asp Arg Asp Gly Asn Pro Phe Val
245 250 255
Thr Ser Lys Val Thr Gln Thr Val Leu His Leu Ala Arg Arg Arg Ala
260 265 270

Ala Lys Leu Phe Ala Lys Asp Ile Ser Ala Leu Gln Val Glu Leu Ser
275 280 285
Met Gly Lys Cys Asp Asp Asn Val Arg Gln Leu Val Gly Asp Ala Ala

290 295 300

Glu Pro Tyr Arg Ala Leu Leu Lys Pro Leu Val Lys Arg Leu Arg Ala

305 310 315 320

Thr Lys Asp Gly Ile Asp Asp Leu Leu Asn Gly Arg Leu Tyr Asp Gln

325 330 335

Ser Lys Trp Val Asn Ser Gln Glu Glu Leu Leu Thr Pro Leu Met Gln

340 345 350

Cys Tyr Arg Ser Leu Leu His Ser Gly Leu Glu Gln Thr Ala Lys Gly

355 360 365

Gly Leu Leu Asn Thr Ile Arg Arg Ala His Cys Phe Gly Ile Tyr Leu

370 375 380

Leu Lys Leu Asp Ile Arg Gln Asp Ser Gly Arg His Ala Asp Ala Ile

385 390 395 400

Ala Glu Ile Cys Asp Tyr Leu Ser Ile Gly Asp Tyr His Ser Trp Asn

405 410 415

Glu Ala Glu Lys Ile Ala Phe Leu Thr Lys Glu Leu Gly Ser Lys Arg

420 425 430

Pro Leu Leu Pro Asn Asp Trp Gln Ala Asp Trp Gln Pro Ser Glu Asp

435 440 445

Val Gln Glu Val Leu Asp Thr Cys Arg Thr Val Ala Ala Asn Asp Arg

450 455 460

Asp Ala Phe Gly Ile Tyr Ile Ile Ser Met Ala Ser Tyr Ala Ser Asp

465 470 475 480

Val Leu Ala Val Gln Leu Leu Leu Gln Gln Cys Lys Val Thr Trp Pro

485 490 495

Met Ser Val Ala Pro Leu Phe Glu Thr Leu Asp Asp Leu Asn His Ser

500 505 510

Pro Val Val Ile Lys Gln Leu Leu Ala Ile Asp Ser Tyr Arg Asn Gly

515 520 525

Leu Ala Asp Gly Gln His Ile Met Ile Gly Tyr Ser Asp Ser Ala Lys

530 535 540

Asp Ala Gly Ala Leu Ala Ala Gly Trp Ala Gln Tyr Thr Ala Gln Glu

545 550 555 560

Ala Leu Val Ser Ile Cys Asn Gln Tyr Asp Thr Ser Leu Thr Leu Phe
565 570 575
His Gly Arg Gly Gly Thr Ile Gly Arg Gly Gly Leu Pro Ala His Ser
580 585 590
Ala Ile Leu Ser Gln Pro Pro Gly Ser Leu Asp Gly Gly Phe Arg Val
595 600 605
Thr Glu Gln Gly Glu Thr Ile Arg Tyr Lys Phe Gly Met Pro Thr Leu
610 615 620
Ala Lys Arg Ser Leu Gly Ile Tyr Ala Ser Ala Ile Ile Glu Ala Lys

625 630 635 640
Leu Phe Pro Pro Pro Ala Pro Lys Ser Thr Trp Arg Asp Val Leu Asp
645 650 655
Glu Met Ala Ala Gln Gly Arg Asp Asn Tyr Arg His Val Val Arg Val
660 665 670
Asp Pro Asp Phe Val Pro Tyr Phe Arg Gln Ala Thr Pro Glu Gln Glu
675 680 685
Leu Gly Lys Leu Pro Leu Gly Ser Arg Pro Ala Lys Arg Asn Pro Gln
690 695 700

Gly Gly Val Glu Ser Leu Arg Ala Ile Pro Trp Ile Phe Ala Trp Ala
705 710 715 720
Gln Thr Arg Leu Val Leu Pro Ala Trp Leu Gly Val Met Arg Ala Ile
725 730 735
Met Lys Thr Tyr Lys Lys Asp Pro Asn Thr Ile Asp Glu Met Ile Ala
740 745 750
Gln Trp Pro Phe Phe Gln Ser Arg Leu Ser Met Leu Asp Met Val Phe
755 760 765
Ala Lys Ala Asp Ile Asn Ile Ala Lys Ala Tyr Asp Asp Ala Leu Val

770 775 780
Glu Asp Glu Leu Lys His Phe Gly Glu Ser Leu Arg His Glu Leu Gln
785 790 795 800

Gln Ser Arg Ala Asp Leu Leu Asp Ile Thr His Lys Asn Asn Leu Met
805 810 815

Gln Asp Asp Pro Gln Gly Leu Asn Ser Met His Ile Arg Ala Asp Tyr
820 825 830

Leu Gln Pro Leu His Tyr Leu Gln Ile Glu Leu Leu Lys Arg Thr Arg
835 840 845

Gln His Gly Glu Asp Thr Asp Leu Ser Ala Ile Glu Lys Ala Met Met
850 855 860

Val Thr Ile Thr Gly Ile Ala Ile Gly Met Arg Asn Thr Gly
865 870 875