



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0099261
(43) 공개일자 2021년08월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/63 (2006.01) C07K 14/245 (2006.01)
C12P 19/04 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/63 (2013.01)
C07K 14/245 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0012889
(22) 출원일자 2020년02월04일
심사청구일자 2020년02월04일

(71) 출원인
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
장유신
경상남도 사천시 서포면 중촌안길 128 (자혜리)
우지은
경상남도 사천시 숲피길 11, 102동 1403호 (동금동, 가양라프빌5차아파트)
성현정
경상남도 진주시 진성면 진성로276번길 279-23 (구천리)
(74) 대리인
이처영, 장제환

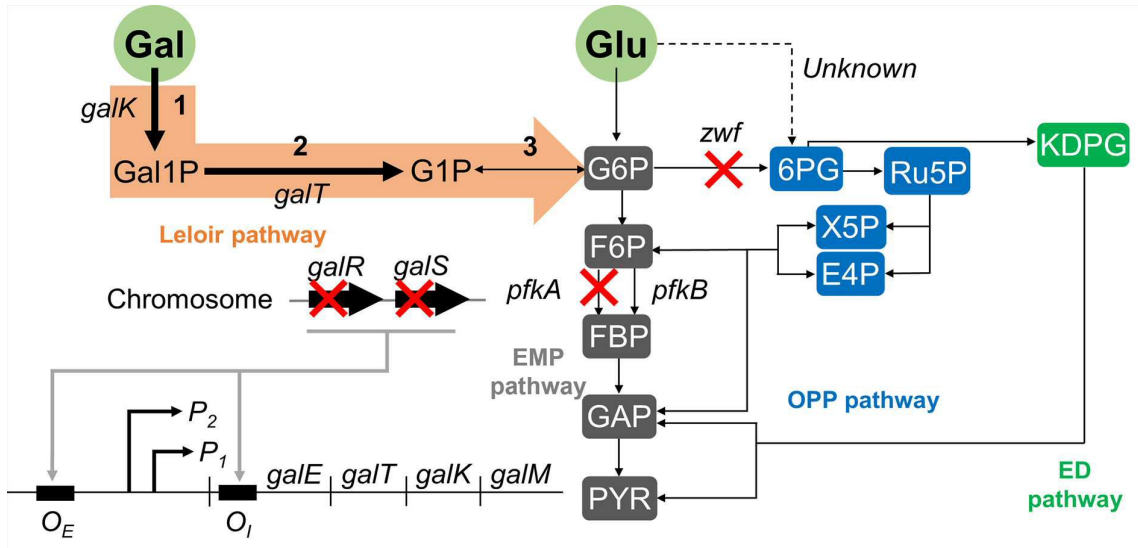
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 갈락토오스 소비효율 제어용 변이 미생물

(57) 요약

본 발명은 글루코오스와 갈락토오스를 탄소원으로 이용가능한 미생물에서, 갈락토오스 오페론 리프레서를 코딩하는 유전자가 녹아웃되어 있는 글루코오스와 갈락토오스 공 발효조건에서 갈락토오스의 소비율을 증가시킨 변이 미생물 및 상기 변이 미생물을 이용한 글루코오스와 갈락토오스 공발효 시에, 갈락토오스 소비를 조절하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12P 19/04 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711099347
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원(R&D)
연구과제명	바이오리파이너리 시스템화 연구실
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경상대학교
연구기간	2019.09.01 ~ 2020.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

글루코오스와 갈락토오스를 탄소원으로 이용가능한 미생물에서, 갈락토오스 오페론 리프레서를 코딩하는 유전자가 녹아웃되어 있는 글루코오스와 갈락토오스 공 발효조건에서 갈락토오스의 소비율을 증가시킨 변이 미생물.

청구항 2

제1항에 있어서, 6-포스포프락토키나아제를 코딩하는 유전자가 추가적으로 녹아웃되어 있는 변이 미생물.

청구항 3

제1항에 있어서, 글루코오스-6-포스페이트 탈수소효소를 코딩하는 유전자가 추가적으로 녹아웃되어 있는 변이 미생물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 변이 미생물은 대장균 속(*Escherichia* sp.), 코리넨박테리움 속(*Corynebacterium* sp.), 바실러스 속(*Bacillus* sp.), 슈도모나스 속(*Pseudomonas* sp.) 및 사카로마이세스 속(*Saccharomyces* sp.)으로 구성되는 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 변이 미생물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 갈락토오스 오페론 리프레서를 코딩하는 유전자는 *galR* 유전자 및 *galS* 유전자인 것을 특징으로 하는 변이 미생물.

청구항 6

제2항에 있어서, 상기 글루코오스-6-포스페이트 탈수소효소를 코딩하는 유전자는 *pfkA* 유전자인 것을 특징으로 하는 변이 미생물.

청구항 7

제3항에 있어서, 상기 글루코오스-6-포스페이트 탈수소효소를 코딩하는 유전자는 *zwf* 유전자인 것을 특징으로 하는 변이 미생물.

청구항 8

글루코오스와 갈락토오스를 함유하는 배지에서 제1항 내지 제7항 중 어느 한항의 변이 미생물을 배양하는 것을 특징으로 하는 글루코오스와 갈락토오스 공발효에서 갈락토오스의 소비율을 조절하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 글루코오스와 갈락토오스를 탄소원으로 이용가능한 미생물에서, 갈락토오스 오페론 리프레서를 코딩하는 유전자가 녹아웃되어 있는 글루코오스와 갈락토오스 공 발효조건에서 갈락토오스의 소비율을 증가시킨 변이 미생물 및 상기 변이 미생물을 이용한 글루코오스와 갈락토오스 공발효 시에, 갈락토오스 소비를 조절하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 과도한 화석연료의 사용으로 발생한 지구온난화는 현재 인류가 직면한 가장 큰 문제 중 하나이다. 이를 극복하기 위하여, 최근 바이오 기반 연료와 화합물이 화석 연료의 대안으로 주목을 받고 있다(Banerjee *et al. Biotechnol Bioproc Eng*:1-21, 2019). 일부 바이오 기반 연료 및 화합물은 목재 및 해조와 같은 지속 가능한 바이오매스를 이용한 미생물 발효를 통해 생산할 수 있다(Dang and Lee, *Biotechnol Bioproc Eng* 23:405, 2018).
- [0004] 기존에 알려진 셀룰로오스 바이오매스 외에, 단위 면적당 높은 바이오매스 수율, 높은 이산화탄소 고정률을 가지면서 자연에 풍부한 해양 바이오매스는 유망한 재생 가능한 자원으로 제안되고 있다(Noreen *et al. Int J Biol Macromol* 86:937-949, 2016), 해양 거대조류(macroalgae)에는 글루코오스 및 갈락토오스와 같은 발효 가능한 당이 함유되어 있다. 해양 거대조류 바이오매스로부터 바이오 기반 연료 및 화학 물질의 생산하기 위해서는 거대조류에 포함된 갈락토오스를 적절하게 이용하는 것이 중요하다. 또한, 갈락토오스가 글루코오스보다 10 배나 더 비싸기 때문에, 글루코오스와 갈락토오스의 공발효(co-fermentation)에서 갈락토오스 소비율의 적절한 조절은 매우 중요하다.
- [0005] 대부분의 미생물은 글루코오스와 갈락토오스의 공발효에서 글루코오스를 주요 공급원으로 사용한다. 탄소 이화 작용 억제(carbon catabolite repression, CCR)를 통해 발생하는 글루코오스의 우선적인 소비는 미생물이 글루코오스와 갈락토오스를 동시에 사용하기 어렵게 만든다. 최근 연구에서, 갈락토오스 리프레서(galR)가 녹아웃되고, 갈락토오스 오페론 (galP, galE, galT, galK 및 galM)과 포스포글루코뮤타아제(*pgm*)가 과발현된 재조합 대장균을 사용하여, 글루코오스와 갈락토오스가 공발효될 때, CCR 경로는 완전히 조절되지 않는 것으로 확인되었다(Lim *et al. Bioresour Technol* 135:564, 2013). 상기 재조합 균주는 갈락토오스와 글루코오스의 공발효(co-fermentation) 시에 두 당을 동시에 사용하였다. 그러나, 글루코오스와 갈락토오스의 공발효(co-fermentation) 동안 갈락토오스 소비율을 정밀하게 제어하는 방법이 보고된 연구는 없었다.
- [0006] 본 발명에서는 갈락토오스와 글루코오스를 공발효하는 동안 갈락토오스-글루코오스 소비 비율을 미세하게 제어할 수 있는 방법을 개발하고자 예의 노력한 결과, 대장균에서 *galRS*, *galRS-pfkA* 및 *galRS-pfkA-zwf* 유전자를 각각 녹아웃시킨 3 개의 재조합 대장균 균주를 제작하고, 상기 재조합 대장균을 글루코오스와 갈락토오스가 동시에 존재하는 환경에서 배양하는 동안 각기 다른 소비율로 갈락토오스를 이용할 수 있으며, 당 특이 소비율을 조절할 수 있다는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명의 목적은 글루코오스와 갈락토오스가 동시에 존재하는 환경에서 갈락토오스 소비효율을 증가시킬 수 있는 변이 미생물을 제공하는데 있다.
- [0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 변이 미생물을 이용한 글루코오스와 갈락토오스 공발효에서 갈락토오스의 소비율을 조절하는 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 글루코오스와 갈락토오스를 탄소원으로 이용가능한 미생물에서, 갈락토오스 오페론 리프레서를 코딩하는 유전자가 녹아웃되어 있는 글루코오스와 갈락토오스 공 발효조건에서 갈락

토오스의 소비율을 증가시킨 변이 미생물을 제공한다.

[0012] 본 발명은 또한, 글루코오스와 갈락토오스를 함유하는 배지에서 상기 변이 미생물을 배양하는 것을 특징으로 하는 글루코오스와 갈락토오스 공발효에서 갈락토오스의 소비율을 조절하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명에 따른 변이 미생물을 이용하면 해양 바이오매스와 같이 갈락토오스가 풍부한 바이오매스를 탄소원으로 이용한 발효에서 갈락토오스의 소비율을 제어할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 재조합 대장균을 이용한 갈락토오스와 글루코오스의 공발효에서 갈락토오스-포도당 소비 비율의 제어를 나타낸 것으로, 'X'는 녹아아웃된 유전자를 나타낸다. 관련 유전자 및 이들의 암호화된 효소는 다음과 같다; *galR*: DNA-결합 전사 억제자; *galS*: DNA-결합 전사 이소프레서; *galK*: 갈락토키나제; *galT*: 갈락토오스-1-포스페이트 우리딜틸트랜스퍼라제; *pfkA*: 6-포스포프락토키나제 I; *pfkB*: 6-포스포프락토키나제 II; *zwf*: 글루코오스-6-포스페이트 탈수소효소. 약어; *Gal1P*: 갈락토오스-1-포스페이트; *G1P*: 글루코오스-1-포스페이트; *G6P*: 글루코오스-6-포스페이트; *F6P*: 프락토오스-6-포스페이트; *FBP*: 프락토오스-1,6-포스페이트; *PYR*: 피루베이트; *6PG*: 6-포스페이트-글루코네이트; *Ru5P*: 리불로스-5-포스페이트; *X5P*: 자일룰로스-5-포스페이트; *E4P*: 에리쓰로스-4-포스페이트; *KDPG*: 2-케토-3-데옥시-포스포글루코네이트.

도 2는 글루코오스(3g/L) 및 갈락토오스(3g/L)를 함유하는 R/2 배지에서 배양된 대장균 균주(a) GR2 및 (b) W3110에 대한 다양한 파라미터의 시간 프로파일을 나타낸 것이다(세포 성장 (▲), 포도당 (■), 갈락토스 (□)).

도 3은 글루코오스(3g/L) 및 갈락토오스(3g/L)를 함유하는 R/2 배지에서 배양된 대장균 균주 GR2P에 대한 다양한 파라미터의 시간 프로파일을 나타낸 것이다(세포 성장 (▲), 포도당 (■), 갈락토스 (□)).

도 4는 글루코오스(3g/L) 및 갈락토오스(3g/L)를 함유하는 R/2 배지에서 배양된 대장균 균주 GR2PZ에 대한 다양한 파라미터의 시간 프로파일을 나타낸 것이다(세포 성장 (▲), 포도당 (■), 갈락토스 (□)).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0018] 이산화탄소를 고정할 수 있는 해양 바이오 매스는 화석자원을 대신하여 연료 및 화합물 생산을 위한 자원으로 주목받고 있다. 해양 바이오 매스를 이용한 글루코오스 및 갈락토오스와 같은 발효 가능한 당의 단순 공발효는 보고된 바 있지만, 갈락토오스-글루코오스 소비 비율을 정밀히 제어하는 발효에 대하여는 보고된 바 없다. 본 발명에서는 유전자 조작된 대장균 균주를 사용하여 당의 공발효(co-fermentation)에서 갈락토오스 대비 글루코오스 소비 비율을 정밀하게 제어하기 위하여, 대장균(W3110)에서 *galRS*, *galRS-pfkA* 및 *galRS-pfkA-zwf* 유전자를 각각 녹아아웃시켜, 대장균 균주 GR2, GR2P 및 GR2PZ를 각각 제작하였다. 각각의 대장균 균주 W3110, GR2, GR2P 및 GR2PZ는 갈락토오스와 글루코오스를 모두 포함하는 배지에서 공발효(co-fermentation) 동안 각각 0.03, 0.09, 0.12 및 0.17의 갈락토오스-글루코오스 소비 비율(글루코오스 특이 소비율 당 갈락토오스 특이 소비율)을 나타내는 것을 확인하였다.

[0019] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, 글루코오스와 갈락토오스를 탄소원으로 이용가능한 미생물에서, 갈락토오스 오페론 리프레서를 코딩하는 유전자가 녹아아웃되어 있는 글루코오스와 갈락토오스 공 발효조건에서 갈락토오스의 소비율을 증가시킨 변이 미생물에 관한 것이다.

[0020] 본 발명의 변이 미생물은 6-포스포프락토키나아제를 코딩하는 유전자가 추가적으로 녹아아웃되어 있는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0021] 본 발명의 변이 미생물은 글루코오스-6-포스페이트 탈수소효소를 코딩하는 유전자가 추가적으로 녹아아웃되어 있

는 것을 특징으로 할 수 있다.

- [0022] 본 발명의 변이 미생물은 6-포스포프락토키나아제를 코딩하는 유전자 및 글루코오스-6-포스페이트 탈수소효소를 코딩하는 유전자가 추가적으로 녹아아웃되어 있는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0023] 본 발명에 있어서, 상기 변이 미생물은 대장균 속(*Escherichia* sp.), 코리네박테리움 속(*Corynebacterium* sp.), 바실러스 속(*Bacillus* sp.), 슈도모나스 속(*Pseudomonas* sp.) 및 사카로마이세스 속(*Saccharomyces* sp.)으로 구성되는 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0024] 본 발명에 있어서, 상기 갈락토오스 오페론 리프레서를 코딩하는 유전자는 *galR* 유전자 및 *galS* 유전자인 것을 특징으로 할 수 있으며, 상기 글루코오스-6-포스페이트 탈수소효소를 코딩하는 유전자는 *pfkA* 유전자인 것을 특징으로 할 수 있으며, 상기 글루코오스-6-포스페이트 탈수소효소를 코딩하는 유전자는 *zwf* 유전자인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0025] 다른 관점에서, 본 발명은 글루코오스와 갈락토오스를 함유하는 배지에서 상기 변이 미생물을 배양하는 것을 특징으로 하는 글루코오스와 갈락토오스 공발효에서 갈락토오스의 소비율을 조절하는 방법에 관한 것이다.
- [0026] 해양 바이오매스에 의해 생성된 갈락토오스는 바이오 연료 및 생화학 물질의 생산을 위한 유망한 발효성당이다. 최근에는 글루코오스와 같은 속도로 갈락토오스를 섭취할 수 있는 재조합 대장균 균주가 보고된 바 있으나(Lim HG *et al.*, *Bioresour Technol*, 135:564, 2013), 글루코오스와 갈락토오스의 공발효 동안 대장균에 의하여 갈락토오스 소비를 미세조정하는 것에 대한 보고는 없었다.
- [0027] 본 발명에서는 재조합 대장균 변이 균주와 모균주인 야생형 W3110 균주를 비교하여 글루코오스와 갈락토오스의 공발효 동안 갈락토오스 소비율을 미세하게 조절할 수 있다는 것을 확인하였다. 본 발명에서 모균주 W3110 균주와 변이균주 GR2, GR2P 및 GR2PZ는 글루코오스와 갈락토오스의 공발효 동안 각각 0.03, 0.09, 0.12 및 0.17의 갈락토오스 대 글루코오스 소비율($R_{gal/glu}$) 값을 나타내었다.
- [0028] 본 발명에서는 대장균 균주의 갈락토오스 대 글루코오스 소비율을 *galRS* 유전자에 의해 인코딩되는 갈락토오스 오페론 리프레서를 제거하여 조절할 수 있으며, 추가적으로 중심 대사경로를 조절하여 조절할 수 있다는 것을 밝혀내었다.
- [0029] 본 발명에서 제작된 *galRS* 유전자 변이 대장균 균주 GR2는 갈락토오스 대 글루코오스 소비율($R_{gal/glu}$)이 0.09인 반면, 모균주인 W3110는 0.03이었다. *galRS* 유전자의 생성물은 갈락토오스 오페론의 업스트림에 결합하여 갈락토오스 대사를 음성적으로 조절하는 것으로 알려져 있다(Geanacopoulos and Adhya, *J Bacteriol*, 179:228, 1997). 따라서, 갈락토오스 오페론 리프레서의 불활성화는 이론적으로 대장균에서 갈락토오스 특이 소비율을 증가시키는 반면, 글루코오스 특이 소비율을 변화시키지 않을 것으로 판단되며, 실제로, 글루코오스와 갈락토오스의 공발효 시에, 변이 균주인 GR2 균주와 모균주인 W3110의 갈락토오스 특이 소비율은 각각 0.1262g/gDCW/h와 0.0373g/gDCW/h를 나타내어, *galRS* 유전자가 녹아아웃된 GR2 균주에서 갈락토오스 소비율이 높아졌으며, 글루코오스 특이 소비율은 각각 1.3629g/gDCW/h 및 1.3706g/gDCW/h로 두 균주 사이에 큰 차이가 없었다(도 2, 표 2).
- [0030] *pfkA* 및 *pfkA-zwf* 유전자의 녹아아웃에 의해 중심 대사 경로가 추가로 변형된 균주 GR2P 균주 및 GR2PZ 균주를 사용한 글루코오스 및 갈락토오스의 공발효에서, GR2P 균주 및 GR2PZ 균주는 각각 0.12 및 0.17의 갈락토오스 대 글루코오스 소비율($R_{gal/glu}$)을 나타내었다. GR2P 균주 및 GR2PZ 균주의 경우, 두 종류 당의 총 소비비는 GR2 균주에 비해 감소하였다. 글루코오스 소비는 중심 대사 경로의 조절에 대하여, 갈락토오스 소비보다 더 민감하였다: 글루코오스 특이 소비율은 GR2 균주가 1.3629g/gDCW/h인 반면, GR2P 균주는 0.4714g/gDCW/h로 GR2 균주에 비하여 65% 감소하였으며, GR2PZ 균주는 0.4419g/gDCW/h로 GR2 균주에 비하여 68% 감소하였다.
- [0031] 갈락토오스 특이 소비율은 GR2 균주가 0.1262g/gDCW/h인 반면, GR2P 균주는 0.0552g/gDCW/h로 56% 감소하였으며, GR2PZ 균주는 0.0737g/gDCW/h로 41% 감소하였다. 글루코오스 및 갈락토오스의 공발효에서, GR2P 균주 및 GR2PZ 균주의 갈락토오스 대 글루코오스 소비율($R_{gal/glu}$)은 각각 0.12 및 0.17이었다(도 4, 표 2).
- [0032] 결론적으로, 본 발명자들은 이들 글루코오스 및 갈락토오스의 공발효에 대장균 균주 W3110, GR2, GR2P 및 GR2PZ를 각각 사용하여 글루코오스 및 갈락토오스의 공발효에서 갈락토오스 대 글루코오스 소비율($R_{gal/glu}$)이 각각 0.03, 0.09, 0.12 및 0.17임을 확인하였다. 재조합 대장균 균주에서, 갈락토오스 대 글루코오스 소비율은 갈락토오스 오페론의 활성화 및 두 당의 동시 발효에서 중심 대사 경로 (EMPP 및 OPPP)의 조절에 의해 변경될 수 있다. 본 발명에서 보고된 전략은 갈락토오스가 풍부한 바이오매스로부터의 두 당의 동시 발효에서 갈락토오스

대 글루코오스 소비 비율을 조절하는데 도움을 줄 수 있다.

[0034] [실시예]

[0035] 이하 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 이에 의해 본 발명의 기술적 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0037] **실시예 1: 글루코오스-갈락토오스 소비 미세조절을 위한 변이체 제작**

[0038] 본 발명의 실시예에서 사용한 미생물 균주 및 플라스미드에 대한 세부 사항은 표 1에 나타내었다. 대장균에서의 유전자 녹아웃에는 람다 레드 재조합 효소 및 Cre-리코비나아제를 코딩하는 유전자를 포함하는 플라스미드 pCW611를 사용하였다(Song and Lee, *Biotechnol J* 8:776, 2013). *lox66-cat-lox77* 카세트를 함유한 플라스미드 pMtrc9를 타겟 유전자 녹아웃을 위한 DNA 단편의 PCR 주형으로 사용하였다 (Kim *et al. FEMS Microbiol Lett* 278:78, 2008).

표 1

[0039] 본 발명에서 사용한 균주와 플라스미드

명칭	유전형(Genotype)	비고
<i>E. coli</i> strains		
W3110	Coli genetic stock center strain no.4474	CGSC ^a
GR	<i>E. coli</i> K12 W3110, $\Delta galR$	본 발명
GR2	<i>E. coli</i> K12 W3110, $\Delta galR$, $\Delta galS$	본 발명
GR2P	<i>E. coli</i> K12 W3110, $\Delta galR$, $\Delta galS$, $\Delta pfkA$	본 발명
GR2PZ	<i>E. coli</i> K12 W3110, $\Delta galR$, $\Delta galS$, $\Delta pfkA$, Δzwf	본 발명
Plasmids		
pCW611	Ap ^R , λ Red recombinase under arabinose-inducible <i>BAD</i> promoter, Cre-recombinase under IPTG-inducible <i>lacUV5</i> promoter, temperature sensitive origin	Song and Lee, <i>Biotechnol J</i> 8:776, 2013
pMtrc9	<i>trc</i> promoter downstream of <i>lox66-cat-lox71</i> cassette	Kim <i>et al. FEMS Microbiol Lett</i> 278:78, 2008

[0040] ^aCGSC, Coli Genetic Stock Center (New Haven, CT, USA)

[0042] 배양배지와 배양조건

[0043] 대장균은 지시된 탄소원을 포함하는 R/2 배지에서 배양하였다. R/2 배지 (pH 6.8)는 2 g (NH₄)₂HPO₄, 6.75 g KH₂PO₄, 0.7 g MgSO₄ · 7H₂O, 0.85 g 구연산 및 5ml 미량금속 용액/L를 포함한다.

[0044] 미량금속용액(/L): 0.1M HCl, 10 g FeSO₄ · 7H₂O, 2.25 g ZnSO₄ · 7H₂O, 0.58 g MnSO₄ · 5H₂O, 1 g CuSO₄ · 5H₂O, 0.1 g (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4H₂O, 0.02 g Na₂B₄O₇ · 10H₂O, and 2 g CaCl₂ · 2H₂O

[0045] 종균배양을 위해, LB 한천 플레이트에서 성장한 콜로니를 5 ml R/2 배지가 포함된 25ml 테스트튜브에 접종하였다. 테스트튜브를 37°C 진탕배양기(IST-4075, JEIOTECH, Korea)에서 200rpm으로 배양하였다. 다음날, 2.2 ml의 종균 배양액을 220ml R/2 배지를 함유하는 각각의 500ml 플라스크로 옮겼다. 공-발효 실험을 위해, 배지에 3g/L 글루코오스 및 3g/L 갈락토오스를 탄소원으로 보충하였다.

[0047] 녹아아웃 변이체의 구축

[0048] 야생형 대장균 균주 K-12 W3110 균주를 변이체 구축의 모균주로 사용하였다. 4개 유전자를 녹아아웃시킨 변이체인 GR2PZ(예시)는 변형된 원-스텝 불활성화 방법(Song and Lee, *Biotechnol J* 8:776, 2013)을 사용하여 galR, galS, pfkA 및 zwf 유전자를 녹아아웃시켰다. 표적 유전자 서열과 lox66-cat-lox71 카세트를 함유하는 라스미드 pMtrc9 유래 서열로부터 디자인된 프라이머 서열을 표 2에 나타내었다.

[0049] galR, galS, pfkA 및 zwf 유전자의 녹아아웃을 위한 선형 DNA 단편을 구축하기 위해, 프라이머 쌍 galR-KO-F1 및 galR-KO-R1 쌍, galS-KO-F1 및 galS-KO-R1 쌍, pfkA-KO-F1 및 pfkA-KO-R1 쌍과 zwf-KO-F1 및 zwf-KO-R1 쌍을 사용하였다. 생성된 DNA 단편을 상응하는 프라이머 쌍인 galR-KO-F2 및 galR-KO-R2, galS-KO-F2 및 galS-KO-R2, pfkA-KO-F1 및 pfkA-KO-R1과 zwf-KO-F2 및 zwf-KO-R2를 사용하여 개별적으로 PCR 증폭시켰다. 최종 단편을 BTX ECM 630 전기천공기 (BTX, 미국; 1.8 kV, 25 μ F, 200 Ω , 1-mm 전기 천공 큐벳)를 사용하여 pCW611 헬퍼 플라스미드를 보유하는 대장균 세포 내로 개별적으로 전기천공시켰다. 람다 레드 재조합효소 및 Cre 재조합효소를 모두 함유하는 pCW611을 사용하여, 대장균에서의 표적 유전자 녹아아웃을 수행하였다(Song and Lee, *Biotechnol J* 8:776, 2013). 표적 유전자 galR, galS, pfkA 및 zwf의 변이는 각각 프라이머 쌍 galR-KO-F1 및 galR-KO-R1, galS-KO-F1 및 galS-KO-R1, pfkA-KO-F1 및 pfkA-KO-R1과 zwf-KO-F1 및 zwgal-KO-R1를 사용하여 콜로니 PCR로 검증하였다. 마지막으로, 변이체 대장균을 42°C에서 배양하여, 플라스미드 pCW611를 대장균 세포로부터 제거하였다. 2중 및 3중 유전자 녹아아웃 변이체인 대장균 GR2 및 대장균 GR2P도 상기와 동일한 방식으로 상응하는 유전자의 녹아아웃 조합에 의해 구축하였다.

표 2

[0050]

명칭	염기서열(5'→ 3')
Oligonucleotides	
galR-KO-F1 (서열번호 1)	ATGTAAGCGTTTACCCACTAAGGTATTTTCGACACTATAGAACGCGGCCG
galR-KO-R1 (서열번호 2)	TTACTGGCGCTGGAATTGCTTTAACTGCGGCCGCATAGGCCACTAGTGGA
galR-KO-F2 (서열번호 3)	AAAACACGCCACCCCTTGAACCAACGGCGTTTTCCGTAACACTGAAAGAATGTAAGCGTTTACCCACTA
galR-KO-R2 (서열번호 4)	TTGATAATGGTCAGGCGCGTTTGATTCGCCGTCGCCAGACCATCGAAGAATTACTGGCGCTGGAATTGCT
galS-KO-F1 (서열번호 5)	ACTGTGAAATCACTCACAGATTGAAAGCGGGACACTATAGAACGCGGCCG
galS-KO-R1 (서열번호 6)	CAGTCATTTACTGCAATCTCATAACAGGTACCGCATAGGCCACTAGTGGA
galS-KO-F2 (서열번호 7)	CGGGTTACAACGTTAAACGGTGCAATCATAGCTATCACATTGTTAAGATACTGTGAAATCACTCACAGA
galS-KO-R2 (서열번호 8)	TCGATTACGAAGTCCTGTATTCACTGCTGACAAAATAGCCGCCAGCAAGCAGTCATTTACTGCAATCTC
zwf-KO-F1 (서열번호 9)	TAAATAAACCATAAAGGATAAGCGCAGATAGACACTATAGAACGCGGCCG
zwf-KO-R1 (서열번호 10)	TACCGGGTTAGTTAACTTAAGGAGAATGACCCGCATAGGCCACTAGTGGA
zwf-KO-F2 (서열번호 11)	CCTGAAAGTGTAATAATTGTTCTACAATCTGCACAAGATCATGTTACCGGTAAATAACCATAAAGGATA
zwf-KO-R2 (서열번호 12)	AAAGCAGTACAGTGCACCGTAAGAAAATTACAAGTATACCTGGCTTAAGTACCGGGTTAGTTAACTTAA
pfkA-KO-F1 (서열번호 13)	GGTAAAGGAATCTGCCTTTTTCCGAAATCAGACACTATAGAACGCGGCCG
pfkA-KO-R1 (서열번호 14)	TACTATTTGCACATTCGTTGGATCACTTCGCCGCATAGGCCACTAGTGGA
pfkA-KO-F2 (서열번호 15)	CCTGATAAGCGAAGCGCATCAGGCATTTTGTCTCTGTCATCGGTTTCAGGGTAAAGGAATCTGCCTTTT
pfkA-KO-R2 (서열번호 16)	ATACCGCCATTTGGCCTGACCTGAATCAATTCAGCAGGAAGTGATTGTTATACTATTTGCACATTCGTTG

[0052] 갈락토오스-글루코오스 소비율 분석

[0053] 본 발명의 균주들이 글루코오스를 소비하는 동안, 갈락토오스 대 글루코오스 소비율을 확인하기 위하여, 대장균을 37℃ 및 200rpm에서 3g/L 글루코오스 및 3g/L 갈락토오스가 함유된 R/2 배지를 함유하는 500mL 플라스크에서 배양하였다. 배양액 1 mL를 각각 배양 0시간, 3시간, 6시간, 9시간, 12시간, 16시간, 24시간, 28시간, 32시간, 36시간 및 48시간에 샘플링하여 잔류 글루코오스 및 갈락토오스 농도를 확인하였다(분석 방법은 하기 참조). 추가로 1 mL의 배양액을 동시에 취해 건조 세포중량을 결정하는데 사용하였다. 상기 분석으로부터, 글루코오스 특이 소비속도(R_{glu})를 확인하고, 갈락토오스 특이 소비속도(R_{gal})는 글루코오스 소비 동안 확인하였다. 모든 플라스크 발효를 독립적으로 3 회 수행하였다.

[0055] 분석 방법

[0056] 세포 성장은 600nm에서의 배양액의 흡광도를 분광광도계(HIACHI, JP / U-1900, Japan)를 사용하여 측정하여 모니터링하였다. 글루코오스 및 갈락토오스 농도를 결정하기 위해, 배양액을 원심분리하여 상청액을 수득한 다음, 0.22 μ m 시린지필터를 사용하여 여과하여 샘플을 제조하였다. 굴절률 검출기(RID; RI-101, Shodex, Klokkefalde, Denmark)가 장착된 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC; 1100 시리즈, Agilent Technologies, CA, CA, USA)에 샘플을 적용하였다. MetaCarb 87H 컬럼(Agilent Technologies)을 25℃에서 이동상으로서 0.01N H₂SO₄와 함께 0.5mL/분의 유속으로 사용하였다.

[0058] **실시예 2: 글루코오스 소비 동안 갈락토오스 오페론 억제제가 결여된 대장균 GR2의 갈락토오스 대 글루코오스 소비 비율**

[0059] 대장균을 사용하여, 글루코오스와 갈락토오스의 공발효(co-fermentation)에서 갈락토오스의 소비 속도를 미세하게 제어하기 위해, 먼저 *galRS* 유전자로부터 암호화된 갈락토오스 오페론 리프레서를 생산하지 못하는 *galRS* 유전자 변이체인 대장균 GR2를 제작하였다(도 1).

[0060] 상기 대장균 GR2는 글루코오스와 갈락토오스의 공발효에서 모균주보다 더 높은 비율로 갈락토오스를 소비할 것이지만 이 비율은 여전히 상당히 낮을 것으로 예상되었다. *galRS* 변이체인 GR2의 갈락토오스 소비율을 확인하기 위해, 3g/L 글루코오스와 3g/L 갈락토오스가 추가된 R/2 배지에서 GR2 균주를 배양하였으며, 모균주인 W3110을 대조군으로하여 동일한 조건에서 배양하였다. 글루코오스와 갈락토오스의 공발효에서, 대장균 균주 GR2는 배양 12시간에 글루코오스를 완전히 소비하여 1.3629g/gDCW/h의 글루코오스 특이 소비율을 나타내었으며(도 2a 및 표 2), 0.16g/gDCW/h의 특이 소비 속도로 0.36 g / L의 갈락토오스를 소비하였다. 동일한 조건에서 모균주 W3110은 비슷한 수준의 글루코오스 소비를 보였지만(도 2b) 0.0373g/gDCW/h에서 낮은 갈락토오스 특이 소비율을 나타내었다(표 2). GR2 균주는 갈락토오스 대 글루코오스 소비 비율이 $R_{gal/glu}=0.09$ 이었고, 모균주 W3110은 $R_{gal / glu} = 0.03$ 이었다(표 3).

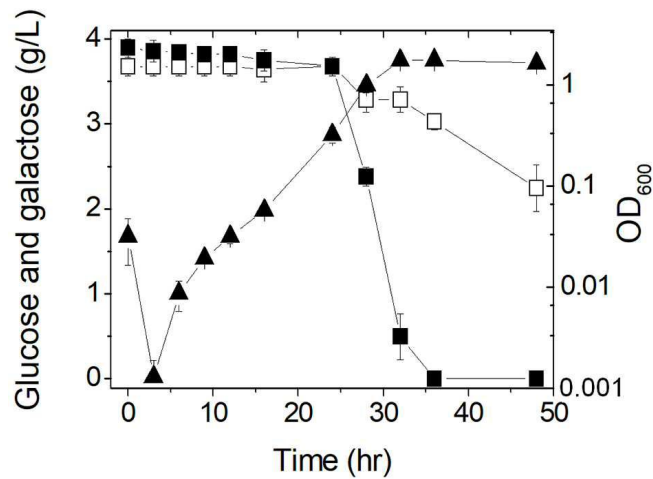
표 3

[0061] 글루코오스와 갈락토오스를 함유하는 배지에서의 변이 균주의 발효 파라미터

균주명	최대 특이 성장율 (μ_{max} ; /h)	당 특이 소비율(g/gDCW/h)		$R_{gal/glu}$
		글루코오스	갈락토오스	
W3110	0.5653 $\pm$ 0.01	1.3706 $\pm$ 0.04	0.0373 $\pm$ 0.00	0.03
GR2	0.4469 $\pm$ 0.02	1.3629 $\pm$ 0.23	0.1262 $\pm$ 0.02	0.09
GR2P	0.2993 $\pm$ 0.02	0.4714 $\pm$ 0.04	0.0552 $\pm$ 0.00	0.12
GR2PZ	0.2076 $\pm$ 0.01	0.4419 $\pm$ 0.02	0.0737 $\pm$ 0.00	0.17

- [0062] (3g/L 글루코오스와 3g/L 갈락토오스가 추가된 R/2 배지 사용)
- [0064] **실시예 3: 갈락토오스 오페론 리프레서 및 6-포스포프락토키나아제가 결여된 GR2P 균주의 글루코오스 소비 동안 갈락토오스-글루코오스 소비 비율**
- [0065] 갈락토오스 오페론 리프레서가 없는 변이체 대장균에서 갈락토오스 오페론을 과발현함으로써 $R_{gal/glu}$ 가 거의 1.0에 달성하였다는 보고가 있었다(Lim HG *et al.*, *Bioresour Technol*, 135:564, 2013).
- [0066] 본 발명에서는 갈락토오스 오페론을 과발현시키는 대신에, $R_{gal/glu}$ 를 추가로 조절하기 위해, GR2 균주에서 ATP-의존적 6-포스포프락토키나제(6-phosphofructokinase)를 암호화하는 *pfkA* 유전자를 녹아웃시켰다. 6-포스포프락토키나제가 Embden-Meyerhof-Parnas 경로 (EMPP)의 핵심효소이므로, 글루코오스와 갈락토오스 공발효 조건에서, GR2P는 6-포스포프락토키나제의 결여에 의해 글루코오스 특이 소비율이 부정적인 영향을 받을 것으로 예상하였다. 플라스크 배양에서 GR2P의 성장은 짧은 lag기를 가지면서, 0.2993/h의 최대 비성장률 (μ_{max})을 보였으며 이는 각각 W3110과 GR2의 배양에서 얻은 0.5653/h 및 0.4469/h보다 다소 낮았다(도 3 및 표 2). 이는 *pfkA* 유전자의 추가 녹아웃이 세포 성장에 부정적인 영향을 미쳤음을 나타낸다. 대장균 GR2P는 배양 24시간에 글루코오스를 완전히 소비하여 0.4714 g/gDCW/h의 글루코오스 특이 소비 속도를 나타내었다(도 3 및 표 2). 한편, 갈락토오스 특이 소비율은 0.0552g/gDCW/h이었으며, 갈락토오스 대 글루코오스 소비비율($R_{gal/glu}$)은 0.12로 이었다(표 2). 따라서, 상기 결과는 글루코오스 특이 소비율이 재조합 대장균에서 EMPP의 조절에 의해 부정적인 영향을 받는 반면, 갈락토오스 특이 소비율은은 조작에 덜 민감하다는 것을 나타낸다.
- [0068] **실시예 4: 오페론 리프레서, 6-포스포프락토키나제 및 글루코오스-6-포스페이트 탈수소 효소가 결여된 GR2PZ 균주에서, 글루코오스 소비 동안 갈락토오스-글루코오스 소비 비율**
- [0069] 글루코오스-6-포스페이트 탈수소 효소가 결여된 *zwf*-변이 대장균 균주가 OPPP(oxidative pentose phosphate pathway)를 통한 탄소 흐름을 보여주었다는 보고가 있었다(Hollinshead WD *et al.*, *Biotechnol Biofuels*, 9:212, 2016).
- [0070] 본 발명에서는 변이 균주의 글루코오스 소비 속도를 추가로 조절하기 위해, GR2P 균주에서 *zwf* 유전자를 추가로 녹아웃시켰다. 글루코오스-6-포스페이트 탈수소 효소가 OPPP에서 글루코오스-6-포스페이트를 6-포스포글루코네이트로 전환시키는데 관여하기 때문에, GR2P 균주에 비해 결과 GR2PZ 균주에서 글루코오스 소비 속도가 추가로 감소될 것으로 예상하였다. 글루코오스와 갈락토오스의 공발효에서 GR2PZ의 성장은 lag 기를 가지면서 0.2076/h의 최대 비성장률을 보였으며, 본 발명에서 제작된 균주 중에서 가장 낮은 μ_{max} 를 나타내었다(도 4 및 표 2). GR2PZ는 배양 36시간에 글루코오스를 완전히 소비하여 0.4419g/gDCW/h의 글루코오스 특이 소비 속도를 나타내었으며(도 4 및 표 2). 갈락토오스 대 글루코오스 소비비율($R_{gal/glu}$)은 0.17 이었고, 갈락토오스 특이 소비율은 0.0737g/gDCW/h이었다.
- [0072] 이상으로 본 발명의 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다. 본 발명의 단순한 변형 내지 변경은 이 분야의 통상의 지식을 가진 자에 의하여 용이하게 이용될 수 있으며, 이러한 변형이나 변경은 모두 본 발명의 영역에 포함되는 것으로 볼 수 있다.

도면4



서열 목록

<110> Gyeongsang National University Office of Academy and Industry Collaboration

<120> Variant Microorganism Controlling Galactose Consumption
Efficiency

<130> P20-B013

<160> 16

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 1

atgtaagcgt ttaccacta aggtatatttc gacactatag aacgcggcgg 50

<210> 2

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 2

ttactggcgc tggaattgct ttaactgcgg ccgcatagga cactagtggg 50

<210> 3

<211> 70

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 3
 aaaacacgcc accccttgaa ccaacgggcg ttttcgtaa cactgaaaga atgtaagcgt 60
 ttaccacta 70
 <210> 4
 <211> 70
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 4
 ttgataatgg tcaggcgcgg ttgattcgcc gtcgccagac catcgaagaa ttactggcgc 60
 tggaattgct 70
 <210> 5
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 5
 actgtgaaat cactcacaga ttgaaagcgg gacactatag aacgcggcgc 50
 <210> 6
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 6
 cagtcattta ctgcaatctc ataacaggta ccgcataggc cactagtgga 50
 <210> 7
 <211> 70
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer

<400> 7
cgggttacaa cgtaaaacg gtgcaatcat agctatcaca ttgttaagat actgtgaaat 60
cactcacaga 70
<210> 8
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer
<400> 8
tcgattcacg aagtcctgta ttcagtgcgtg acaaaatagc cgccagcaag cagtcattta 60
ctgcaatctc 70
<210> 9
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer
<400> 9
taaaataacc ataaaggata agcgcagata gacactatag aacgcggccg 50
<210> 10
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer
<400> 10
taccgggtta gttacttaa ggagaatgac ccgcataggc cactagtgga 50
<210> 11
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer
<400> 11
cctgaaagtg taaaaattgt tctacaatct gcgcaagatc atgttaccgg taaaataacc 60
ataaaggata 70

<210> 12
 <211> 70
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 12
 aaagcagtac agtgcaccgt aagaaaatta caagtatacc ctggcttaag taccgggtta 60
 gttactta 70
 <210> 13
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 13
 ggtaaaggaa tctgcctttt tccgaaatca gacactatag aacgcggcgcg 50
 <210> 14
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 14
 tactatttgc acattcgttg gatcacttcg ccgcataggc cactagtgga 50
 <210> 15
 <211> 70
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 15
 cctgataagc gaagcgcatac aggcatTTTT gcttctgtca tcggtttcag ggtaaaggaa 60
 tctgcctttt 70
 <210> 16
 <211> 70
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 16

ataccgccat ttggcctgac ctgaatcaat tcagcaggaa gtgattgtta tactatttgc 60

acattcgttg 70