



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0077339
(43) 공개일자 2012년07월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/74 (2006.01) *C12N 15/65* (2006.01)

C12N 15/31 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0139266

(22) 출원일자 2010년12월30일

심사청구일자 2010년12월30일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가 1

(72) 발명자

최인걸

서울특별시 동작구 남부순환로263길 34 (사당동)

김경현

경기 성남시 분당구 삼평동 봇들마을 907동 170
4호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인다나

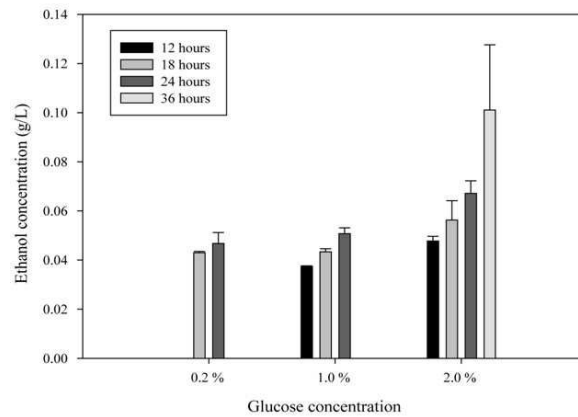
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 사카로파거스 데그라단스 세포 내로 유전자 도입 및 유전자를 발현시키는 방법

(57) 요약

본 발명은 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 세포 내로 유전자를 도입하고, 사카로파거스 데그라단스에서 유전자를 과다 발현시키는 방법 및 그 응용에 관한 것이다.

대표도 - 도10



(72) 발명자

고혁진

서울특별시 성북구 길음로13길 39, 대우푸르지오
아파트 306동 1402호 (길음동)

김소현

경기도 부천시 원미구 중동 계룡리슈빌엔클래스
1113호

특허청구의 범위

청구항 1

사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 세포 내에서 유전자를 발현시키는 방법에 있어서,

- a) 발현하고자 하는 유전자에 조작가능하게 연결된 프로모터를 포함하는 벡터 구조체를 접합에 의하여 세포에 주입하는 단계; 및
- b) 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 세포 내에서 상기 발현하고자 하는 유전자를 과다 발현시키는 단계를 포함하는 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 세포 내에서 유전자를 과다 발현시키는 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 프로모터는 aga16B 프로모터인 것을 특징으로 하는 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 세포 내에서 유전자를 과다 발현시키는 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 벡터 구조체는 복제 오리진을 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 세포 내에서 유전자를 과다 발현시키는 방법.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 복제 오리진은 pBBR1 또는 pMB1 복제 오리진인 것을 특징으로 하는 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 세포 내에서 유전자를 과다 발현시키는 방법.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 벡터 구조체는 재조합 DNA 선택마커를 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 세포 내에서 유전자를 과다 발현시키는 방법.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 재조합 DNA 선택마커는 가나마이신, 젠타마이신 또는 클로람페니콜 저항성 유전자인 것을 특징으로 하는 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 세포 내에서 유전자를 과다 발현시키는 방법.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 접합 단계에서 공여체는 대장균 S 17-1 또는 대장균 BW19851 균주인 것을 특징으로 하는 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 세포 내에서 유전자를 과다 발현시키는 방법.

청구항 8

사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 세포 내에서 유전자를 과다 발현시키는 벡터에 있어서, 발현하고자 하는 유전자에 조작가능하게 연결된 aga16B 프로모터, pBBR1 또는 pMB1 복제 오리진 및 가나마이신, 젠타마이신 또는 클로람페니콜 저항성 유전자를 포함하는 벡터 구조체.

청구항 9

제 8항에 있어서, 상기 벡터 구조체는 도 11에 개시된 벡터 개열지도를 가지는 것을 특징으로 하는 벡터 구조체.

청구항 10

사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 세포 유전자의 분리된 발현 생성물을 제조하는 방법에 있어서,

- a) 제1항 내지 제 3항 중 어느 한 항의 방법에 따라 유전자를 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 세포 내에서 과다 발현시키는 단계, 여기서, 상기 유전자의 발현 산물은 상기 세포 내에서 생성됨; 및
- b) 상기 발현 산물을 상기 세포로부터 분리하는 단계를 포함하는 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 세포 유전자의 분리된 발현 생성물을 제조하는 방법.

청구항 11

사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 세포 내에서 바이오연료 생산 관련 유전자를 과다 발현시키는 방법에 있어서,

- a) 복합 다당류 분해에 관여하는 유전자, 및 사카로파거스 데그라단스 유래 *aga16B* 프로모터를 포함하는 벡터 구조체를 접합에 의하여 세포에 주입하는 단계; 및
- b) 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 세포 내에서 상기 복합 다당류 분해에 관여하는 유전자를 과다 발현시키는 단계를 포함하는 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 세포 내에서 바이오연료 생산 관련 유전자를 과다 발현시키는 방법.

청구항 12

제 11항에 있어서, 상기 복합 다당류는 아가, 알지네이트, 셀룰로오스, 키틴, 베타-글루칸, 라미나린, 펙틴, 녹말, 또는 자일란인 것을 특징으로 하는 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 세포 내에서 바이오연료 생산 관련 유전자를 과다 발현시키는 방법.

청구항 13

- a) 분리된 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 수용체와 분리된 공여체 대장균 균주를 접합시키는 단계, 여기서 대장균 균주는 사카로파거스 데그라단스로 접합에 의하여 유전자를 도입하려는 유전자를 포함하고, 상기 접합은 상기 공여체 대장균 균주로부터 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 수용체로 유전자를 접합에 의한 전달에 적합한 조건 하에서 배양되고;
- b) 상기 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 외부로부터 유래한 유전자를 확인하는 단계를 포함하는 접합에 의한 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 세포 내로 유전자 도입 방법.

청구항 14

제 13항에 있어서, 상기 접합에서 외부 유전자 공여체로 사용되는 대장균 균주는 대장균 S 17-1 또는 대장균 BW19851 균주인 것을 특징으로 하는 접합에 의한 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 세포 내로 유전자 도입 방법.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 세포 내로 유전자를 도입하고, 사카로파거스 데그라단스에서 유전자를 과다 발현시키는 방법 및 그 응용에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 본 발명에서 *Saccharophagus degradans* 2-40('Microbulbifer degradans 2-40'이라고도 함)는 체사피크 만 (Chesapeake Bay) 아래의 해수 코드 클래스 (saltwater cord grass)인 *Spartina alterniflora*를 분해하는 표면으로부터 분리된 간형 호기성 해양 미생물이다(Andrykovich, G., and I. Marx 1988 Appl. Microbiol. Biotechnol. 54: 1061-1062). *S. degradans*는 해양 먹이 그물에서 중요한 역할인 복잡한 다당류들을 분해할 수 있는(Ekborg, N. A., J. M. Gonzalez, M. B. Howard, L. E. Taylor, S. W. Hutcheson, and R. M. Weiner. 2005. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55: 1545-1549; Gonzalez, J. M., and R. M. Weiner. 2000. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50: 831-834) 해양 감마-서브 타입 단백질분해균(proteobacteria) 균이다. *S. degradans* 2-40는 단일 탄소원 및 에너지원으로 아가, 알지네이트, 셀룰로오스, 키틴, 베타-글루칸, 라미나린, 펙틴, 녹말, 자일란과 같은 조류, 고등 식물, 균류 및 동물 기원의 복잡한 다당류를 이용하는 그들의 능력때문에 이들 세균들

중에서 독특하다(Andrykovich, G., and I. Marx. 1988. Appl.Microbiol. Biotechnol. 54: 1061-1062; Ensor, L., S. Stosz, and R. Weiner. 1999 J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 23: 123-126; Howard, M. B., N. A. Ekborg, L. E. Taylor, R. M. Weiner, and S. W. Hutcheson 2003 J. Bacteriol. 185: 3352-33360; NKelly, S. K., V. Coyne, D. Sledjeski, C. Fuqua, and R. Weiner. 1990. FEMS Microbiol. Lett. 67: 275-280). 이 세균이 일반적으로 이들 어려운 기질을 분해하는 기작은 키틴분해에 대한 것이 확립되었다(Howard, M. B., N. A. Ekborg, L. E. Taylor, R. M. Weiner, and S. W. Hutcheson. 2003 J. Bacteriol. 185: 3352-33360).

[0003] 복합 다당류를 분해하는 능력때문에, 이 균주는 바이오매스를 전처리없이 바로 에너지로 전환하거나 저가의 바이오매스로부터 유용한 화합물(chemicals)을 생산하는데 사용할 수 있는 가능성을 가진다. 현재까지 *S. degradans*에서 복합 다당류를 분해하는 많은 효소가 연구되었으나 *S. degradans*의 유전자 조작을 위한 적절한 방법에 대한 개발은 없었다. 따라서 효과적인 바이오매스 전처리 또는 직접 바이오에너지 생산에 *S. degradans*를 채택하기 위해서는 *S. degradans*에 대한 유전 정보를 조작하거나 유전공학적으로 변형가능하게 하는 유전적인 수단이 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명은 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 *S. degradans*에 대한 유전 정보를 조작할 수 있는 유전적인 수단을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0005] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 세포 내에서 유전자를 과다 발현시키는 방법에 있어서,

[0006] a) 발현하고자 하는 유전자에 조작가능하게 연결된 프로모터를 포함하는 벡터 구조체를 접합에 의하여 세포에 주입하는 단계; 및

[0007] b) 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 세포 내에서 상기 발현하고자 하는 유전자를 과다 발현시키는 단계를 포함하는 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 세포 내에서 유전자를 과다 발현시키는 방법을 제공한다.

[0008] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 프로모터는 *aga16B* 프로모터인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0009] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 벡터 구조체는 복제 오리진을 더욱 포함하는 것이 바람직하고, 상기 복제 오리진은 pBBR1 또는 pMB1 복제 오리진인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0010] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 벡터 구조체는 재조합 DNA 선택마커를 더욱 포함하는 것이 바람직하고, 상기 재조합 DNA 선택마커는 가나마이신, 젠타마이신 또는 클로람페니콜 저항성 유전자인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0011] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 접합 단계에서 공여체는 대장균 S 17-1 또는 대장균 BW19851 균주인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0012] 또한 본 발명은 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 세포 내에서 유전자를 과다 발현시키는 벡터에 있어서,

[0013] 발현하고자 하는 유전자에 조작가능하게 연결된 *aga16B* 프로모터, pBBR1 또는 pMB1 복제 오리진 및 가나마이신 또는 클로람페니콜 저항성 유전자를 포함하는 벡터 구조체를 제공한다.

[0014] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 벡터 구조체는 도 11에 개시된 벡터 개열지도를 가지는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0015] 또한 본 발명은 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 세포 유전자의 분리된 발현 생성물을 제조하는 방법에 있어서,

[0016] a) 상기 본 발명의 방법에 따라 유전자를 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 세포 내에서 과다 발현시키는 단계, 여기서, 상기 유전자의 발현 산물은 상기 세포 내에서 생성됨; 및

- [0017] b) 상기 발현 산물을 상기 세포로부터 분리하는 단계를 포함하는 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 세포 유전자의 분리된 발현 생성물을 제조하는 방법을 제공한다.
- [0018] 또한 본 발명은 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 세포 내에서 바이오연료 생산 관련 유전자를 과다 발현시키는 방법에 있어서,
- [0019] a) 복합 다당류 분해에 관여하는 유전자 및 사카로파거스 데그라단스 유래 *aga16B* 프로모터를 포함하는 벡터 구조체를 접합에 의하여 세포에 주입하는 단계; 및
- [0020] b) 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 세포 내에서 상기 복합 다당류 분해에 관여하는 유전자를 과다 발현시키는 단계를 포함하는 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 세포 내에서 바이오연료 생산 관련 유전자를 과다 발현시키는 방법을 제공한다.
- [0021] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 복합 다당류는 아가, 알지네이트, 셀룰로오스, 키틴, 베타-글루칸, 라미나린, 펙틴, 녹말, 또는 자일란 등 사카로파거스 데그라단스가 사용가능한 모든 종류의 바이오매스 및 다당류인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0022] 또한 본 발명은 a) 분리된 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 수용체와 분리된 공여체 대장균 균주를 접합시키는 단계, 여기서 대장균 균주는 사카로파거스 데그라단스로 접합에 의하여 유전자를 도입하려는 유전자를 포함하고, 상기 동시 배양은 상기 공여체 대장균 균주로부터 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 수용체로 유전자를 접합에 의한 전달에 적합한 조건 하에서 배양되고; b) 상기 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 외부로부터 유래한 유전자를 확인하는 단계를 포함하는 접합에 의한 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 세포 내로 유전자 도입 방법을 제공한다.
- [0023] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 접합에서 외부 유전자 공여체로 사용되는 대장균 균주는 대장균 S 17-1 또는 대장균 BW19851 균주인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0024] 본 발명에서 '유전자'란 사카로파거스 데그라단스 세포내로 도입될 수 있는 모든 유전자를 의미한다.
- [0025] 본 발명에서 "벡터"는 뉴클레오타이드를 사카로파거스 데그라단스 세포에 주입하는 일반적인 운반체를 의미하며, 특정한 서열로 제한되는 것은 아니다. 벡터 자체가 유전자를 활성화하는 뉴클레오타이드일 수 있으며 유전자를 활성화하는 서열을 함유하는 것일 수 있다. 따라서, 벡터는 활성화에 필요한 서열을 함유하는 간단한 선형 또는 원형 폴리뉴클레오타이드이거나, 큰 폴리뉴클레오타이드 또는 DNA나 RNA 바이러스 계통, 완전한 비리온(virion), 또는 중요한 뉴클레오타이드 서열을 세포에 주입하는데 사용되는 그 밖의 생물학적 구조체와 같은 다른 구조체 내의 서열일 수 있다.
- [0026] 벡터는 천연 DNA 서열 또는 유전자 조작이나 합성 공정에 의하여 만들어진 DNA 서열을 함유할 수 있다.
- [0027] 본 발명에서 '유전자 과다 발현'이란 상기 본 발명의 유전자 조작이나 도입 방법에 의하여 도입된 유전자가 사카로파거스 데그라단스 세포에서 해당 유전자의 발현이 증가한 경우를 의미한다.
- [0028] 이하 본 발명을 설명한다.
- [0029] *S. degradans*는 아마 높은 제한 장벽 등으로 인하여 화학적 형질전환이나 전기천공 방법으로 유전적으로 조작될 수 없어서 이 문제를 접합에 의하여 해결될 수 있었다. 4 종의 복제 오리진 실험에서, pBBR1 및 pMB1 오리진을 가지는 플라스미드는 *S. degradans* 에 전달될 수 있었으나 p15A 복제 오리진을 포함하는 벡터는 그러하지 못하였다. 그 효율은 작동하는 복제 오리진에 따라 달랐다. 특히 pBBR1이 가장 효과적이었다.
- [0030] *S. degradans*의 경우 접합 효율은 3.88×10^{-3} 에서 3.00×10^{-2} 범위이었다.
- [0031] 유전자 전달의 효율의 개선을 위해, 여러 방법을 사용하였다.
- [0032] 도 9에 나타낸 것과 같이, 접합에 사용된 공여체 균주는 접합에 대한 중요한 부분이고, *uidA* 유전자에서 *pir*의 돌연변이체 의한 *pir* 포함 S17-1 유도체인 BW19851는 다른 공여체 균주보다 더 큰 효율을 가진다. 또 다른 방법은 메이팅 방법의 변화이다. 메이팅은 액체, 고체 상 및 필터를 사용하여 일어날 수 있다. 본 발명에서는 고체 메이팅 방법이 사용되었지만 필터 메이팅이 더 효과적인 것을 나타내는 논문이 있다 (Lampkowska, J., L. Feld, A. Monaghan, N. Toomey, S. Schjorring, B. Jacobsen, H. van der Voet, S. R. Andersen, D. Bolton, H. Aarts, K. A. Krogfelt, A. Wilcks and J. Bardowski (2008). "A standardized conjugation protocol to assess antibiotic resistance transfer between lactococcal species." *Int J Food Microbiol*

127(1-2): 172-175.). 따라서 만약 필터 매개 메티팅 실험이 사용된다면 *S. degradans*의 접합 효율은 증가될 것이다.

- [0033] 본 발명에서는 유도되었을 때, *aga16B* 프로모터가 가장 강한 프로모터이었다. *lac* 프로모터의 경우, *S. degradans*에서 작동하였지만 그 활성은 배지에 IPTG 첨가시에 증가하지 않았다.
- [0034] 본 발명에서 생산된 에탄올 농도는 프로모터에 따라 달랐다. 프로모터 *aga16B*를 *E. coli* 또는 *S. degradans*에서 사용된 경우에 *lac* 프로모터 보다 더 강하였다.
- [0035] *pdC* 및 *adhB* 유전자를 포함하는 벡터를 가지는 *E. coli* 또는 *S. degradans* 성장은 pBBR1MCS2를 가진 것보다 더 늦었다. 이것은 벡터에 코딩된 유전자로부터 생성된 에탄올의 효과에 기인한 것일 수 있다.
- [0036] 본 발명에서, *S. degradans* 는 호기 조건 하에서 배양되었고, 호기 조건에서 cyanobacteria보다 5배 정도 생성된 에탄올의 양이 많았다.
- [0037] 본 발명에 의하여 *S. degradans*는 *degradans*의 대사 경로의 조작을 통한 전처리 단계 없이 바이오매스로부터 바이오에탄올 생산을 위하여 산업적으로 적용될 수 있다는 것을 알았다.

발명의 효과

- [0038] 본 발명을 통해서 알 수 있는 바와 같이, *Saccharophagus degradans* 2-40는 아가, 키틴, 자일란, 녹말, 및 셀룰로스와 같은 여러 복합 다당류를 분해할 수 있는 박테리아로 이러한 분해 활성 때문에 전처리없이 바이오매스를 에너지로 직접 전환할 수 있는 능력을 가진다. 효과적인 바이오매스 전처리 또는 직접 바이오에너지 생산에서 *S. degradans* 를 채택하기 위해서 *S. degradans*의 유전 정보를 조작하는데 필요한 효과적인 유전적 수단이 필요하다.
- [0039] 세 종류의 유전자 전달 방법을 통해서, 접합이 *S. degradans*에서 유전자의 삽입에 사용될 수 있다는 것을 알 수 있었다. *S. degradans* 에서 작동하는 복제의 오리진은 pBBR1, pMB1 및 R6K γ 이었다.
- [0040] *S. degradans*에서 천연 프로모터의 강도를 조사하여 *aga16B* 프로모터가 가장 강력한 것을 밝히고, *lac* 프로모터는 *aga16B* 프로모터에 비해 효과적이지 않다는 것을 확인하였다. 바이오에너지 생산에 적용하기 위해서, 에탄올 생산을 *S. degradans*에서 테스트하였다. pBBR1-*aga*-*pdC*-*adhB* 벡터를 가지는 *S. degradans* 는 탄소원으로 포도당을 가지고 약 0.1 g/L 에탄올을 생성하였다. 이러한 결과는 *S. degradans*에서 바이오에탄올 생성의 잠재성을 나타낸다.

도면의 간단한 설명

- [0041] 도 1은 프로모터 강도 테스트를 위한 플라스미드. pBBR1MCS2 벡터를 골격벡터로 사용하였다. MCS 부위를 프로모터 및 RFP 코딩 유전자로 대체하였다. 벡터 pBBR1-*aga*-RFP, pBBR1-*cel*-RFP 및 pBBR1-*xyn*-RFP는 각각 *aga16B*, *cel5H* 및 *xyn11A* 유전자의 프로모터를 가지는 벡터를 의미한다. 각 프로모터는 RFP 발현을 조절한다. 프로모터 부위는 회색 화살표로 표시.
- 도 2는 벡터 pK19_p15A의 구축. pK19 *mob sacB* 벡터의 복제 오리진은 pACYCDuet-1 유래 p15A로 대체되었다.
- 도 3은 플라스미드 pK19_R6K 고안. R6K γ 복제 오리진은 pKD13로부터 증폭되고 복제 오리진을 제거한 pK19 *mob sacB* 절편과 라이게이션되었다.
- 도 4는 *S. degradans*에서 에탄올 생산용 플라스미드. 회색 *S. degradans*. 유래 프로모터 *aga16B*를 의미한다.
- 도 5는 *Saccharophagus degradans* 2-40의 접합 결과. 접합은 pBBR1MCS2 (A) 및 pECM3 (B) 벡터에서 수행. 세포들을 각각 kanamycin 및 chloramphenicol을 가지는 최소 배지에 스프리딩함. pBBR1MCS2를 사용한 경우에는 접합체가 분리되고 아가 분해활성을 나타내지만, pECM3 벡터의 경우에는 접합체가 나타나지 않음.
- 도 6은 *S. degradans*로부터 플라스미드의 추출에 의한 접합의 확인. 플라스미드를 배양된 *E. coli* 및 *S. degradans*에서 추출하여 0.7% agarose 젤 상에서 런닝하여 염색하였다. Lane 1: 1 kb ladder, 500에서 10,000 bp의 마커; Lane 2: *E. coli* 로부터 추출된 플라스미드 및 Lane 3: *S. degradans*로부터 추출된 플라스미드.
- 도 7은 접합효율에 대한 공여 및 수용체 세포의 OD₆₀₀ 비율의 효과. 실험된수용체 및 공여체 비율은 1:4, 1:2,

1:1, 2:1, 4:1, 9:1, 및 15:1이고, 사용된 공여체 균주는 *E. coli* S17-1, 배양시간은 20 시간으로 고정.

도 8은 배양 시간에 대한 접합 효율. 수용체 및 공여체 세포의 OD 비율은 1:1로 고정하고 *E. coli* S17-1을 사용하였다, 배양 시간은 6, 20, 30, 및 45 시간.

도 9는 공여체 세포에 따른 접합 효율 변화. *E. coli* S17-1, *E. coli* S17-1 λ pir⁺, 및 BW19851의 세 균주를 실험하였다. 혼합 비율은 1:1이고, 배양시간은 20 시간으로 고정.

도 10은 *S. degradans*의 에탄올 생성. 프로모터 aga16B는 *pdh* 및 *adhB* 유전자를 조절. 샘플들은 배양 12, 18, 24 및 36 시간에서 수집. 포도당 농도는 0.2 %부터 2.0 %이었고, 각 샘플은 3회 수집.

도 11은 본 발명의 발현벡터의 개열지도를 나타낸 그림이다. 즉 도 11은 pBBR1 복제 오리진을 가지는 벡터들의 construction을 나타낸 그림으로, pBBR1MCS2 벡터를 기반으로하여 *zymomonas mobilis*로부터 나온 *pdh*와 *adhB* 유전자를 각각 aga16B 프로모터 조절하에 클로닝하여 pBBR1_aga_pdh_adhB 벡터를 만들었고, promoter 세기 비교를 위한 벡터의 경우, 각각의 프로모터에 RFP를 붙여 pBBR1MCS2 벡터를 기반으로 하여 제작하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0042] 이하 비한정적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 의도로 기재된 것으로서 본 발명의 범위는 하기 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석되지 아니한다.

[0043] 실시예 1: 본 발명에 사용된 균주, 플라스미드 및 성장 조건

[0044] 본 발명에서 사용된 균주 및 플라스미드는 표 1에 나타내었다.

[0045] 접합(conjugation)에서, 공여 균주는 *E. coli* S17-1, S17-1 λ pir⁺, 및 BW19851(CGSC, The Coli Genetic Stock Center)이었다. 그 공여 균주들을 37 °C, 200 rpm에서 Luria-Bertani (LB) 배지(Difco)에서 배양하였다. *S. degradans*는 30 °C 및 180 rpm에서 최소배지(MM)에서 배양하였다. MM 제조를 위해서, 2.3 % 해수 염(Sigma), 0.1 % 효모 추출물(Difco) 및 0.05 % 염화암모늄(Shinyo)을 20 mM Tris-cl, pH 7.4에 녹였다. MM는 탄소원으로 0.2 % 포도당(Junsei)를 가지는 MM을 의미한다. 아가 플레이트 제조를 위해서 1.8 % (w/v) 아가(Difco)를 첨가하여 오토크레이브 전에 가열하여 녹인다.

[0046] *S. degradans*의 항생물질 감수성도 조사하였다. 사용된 항생물질은 ampicillin (Duchefa), kanamycin (Duchefa), chloramphenicol (Duchefa), gentamycin (Duchefa), nalidixic acid (Sigma), tetracycline (Duchefa), 및 rifampicin (Sigma)이었다. 각 항생물질의 농도는 각각 100 ug/ml, 50 ug/ml, 25 ug/ml, 10 ug/ml, 50 ug/ml, 12.5 ug/ml 및 50 ug/ml이었다.

표 1

균주	유전자형		
<i>E. coli</i> S17-1	<i>recA, thi, pro, hsdR, M⁺</i> RP4:2-Tc: Mu : Km Tn7 Tp ^R Sm ^R		
<i>E. coli</i> S17-1 λ pir ⁺	Tp ^R Sm ^R <i>recA, thi, pro, hsdR-M⁺</i> RP4:2-Tc:Mu: Km Tn7 λ pir		
<i>E. coli</i> BW19851	F ⁺ , RP4-2(Km::Tn7,Tc::Mu-1), Δ uidA3::pir ⁺ , <i>recA1, endA1, thi-1, hsdR17, creC510</i>		

플라즈미드	복제 오리진	사이즈 (bp)	항생 마커
pBBR1MCS2	pBBR1 (Kovach et al. 1994)	5144	Kanamycin
pBBR1MCS5	pBBR1	4768	Gentamycin
pECM3	P15A and pHM1519	9300	Chrolamphenicol
pMiniHimar	R6K γ	3959	Kanamycin
pK19mobsacB	pMB1	5660	Kanamycin
pBBR1_aga_RFP	pBBR1	4787	Kanamycin
pBBR1_cel_RFP	pBBR1	4789	Kanamycin
pBBR1_xyn_RFP	pBBR1	4767	Kanamycin
pBBR1_lac_RFP	pBBR1	5130	Kanamycin
pK19_R6K	R6K γ	4127	Kanamycin
pK19_p15A	p15A	4565	Kanamycin
pBBR1_aga_pdc_adhB	pBBR1	7166	Kanamycin

[0047]

[0048]

표 1은 본 발명에서 사용된 균주 및 플라즈미드이다.

표 2

pBBR1 벡터에 프로모터 및 RFP의 융합	
이름	서열
pBBR1_F	CGAAGCCCAACCTTTCATAGAA
pBBR1_R	CGACGCAACGCGGGGAG
aga16B_F	ATACCTTGCTGCCTCCCGCGTTGCGTCGACAGCGTGATAGAA CAACCG
aga16B_R	ACGTCTTCGGAGGAAGCCATGGATAGCTCCTTACTCTCCG
cel5H_F	ATACCTTGCTGCCTCCCGCGTTGCGTCGTTTTAGATATAAATTG ATTACCAATACCG
cel5H_R	ACGTCTTCGGAGGAAGCCATAATTAAGATCTCTATTATTGCTTTG TAC
xyn11A_F	ATACCTTGCTGCCTCCCGCGTTGCGTCGGTTAAGCAGCGTTAC CAAATTT
xyn11A_R	ACGTCTTCGGAGGAAGCCATGCTGTACCCCTAATGTAGAAG
lac_F	ATACCTTGCTGCCTCCCGCGTTGCGTCGACCGCCTCTCCCGCG
lac_R	ACGTCTTCGGAGGAAGCCATAGCTGTTCTCTGTGTGAAATTGTT
RFP_aga16B_F	CGGAGAGTAAGGAGCTATCCATGGCTTCCTCCGAAGACGT
RFP_cel5H_F	CAATAATAGAGATCTTAATTATGGCTTCCTCCGAAGACGT
RFP_xyn11A_F	TCTACATTAGGGGTAACAGCATGGCTTCCTCCGAAGACGT
RFP_lac_F	AGAAAGAGGAGAAATACTAGATGGCTTCCTCCGAAGACGT
RFP_R	CTATGAAAGGTGGGCTTCGTTATTAAGCACCGGTGGAGTGA

[0049]

표 3

pK19 mob sacB 벡터 변형	
이름	서열
pK19 (R6K)_F	AGGTGAACTGCGGATCTTGGTCGACTCTAGAGGATCCC
pK19 (R6K)_R	TGACATGGGAATTAGCCATGCGTCAGCCGGGCAGGATA
pK19 (p15A)_F	AGCCAGTATACACTCCGCTAGGTCGACTCTAGAGGATCCC
pK19 (p15A)_R	CAAGAAGATCATCTTATTAACGTCAGCCGGGCAGGATA
R6K_F	CCTATCCTGCCGGCTGACGCATGGCTAATCCCATGTCAGC
R6K_R	GGGATCCTCTAGAGTCGACCAAGATCCGAGTTCAACCTG
p15A_F	CCTATCCTGCCGGCTGACGTTAATAAGATGATCTTCTTGAGATCG
p15A_R	GGGATCCTCTAGAGTCGACCTAGCGGAGTGATATACTGGCTTA
에탄올 생산을 위한 플라즈미드의 구축	
이름	서열
aga1st_F	ATACCTTGCTGCCTCCCGCGTTGCGTCGACAGCGTGATAGAACACCG G
aga1st_R	GTACCGACAGTATAACTCATGGATAGCTCCTTACTCTCCG
aga2nd_F	CTGTAAACAAGCTCCTCTAGACAGCGTTGGATAGAACACCG
aga2nd_R	TAAAAAGTTGAAGAAGCCATGGATAGCTCCTTACTCTCCG
pdc_F	CGGAGAGTAAGGAGCTATCCATGAGTTATACTGTGGTACCTAT
pdc_R	GGTGTCTCTATCCACGCTGTCTAGAGGAGCTTGTTAACAGGC
adh_F	CGGAGAGTAAGGAGCTATCCATGGCTTCTCAACTTTTTATATTCCT
adh_R	CCGCCGCCTTCATGAAAGGTGGGCTTCGTTAGAAAGCGCTCAGGAAG AGT

[0050]

[0051] 표 2와 3은 본 발명에 사용된 프라이머 정보이다.

표 4

항생제	통상적으로 사용된 농도($\mu\text{g/ml}$)	농도 범위($\mu\text{g/ml}$)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)
Ampicillin	100	5 - 100	저항성
Kanamycin	50	3 - 50	25
Chloramphenicol	25	2 - 25	민감
Gentamycin	10	2.5 - 40	10
Nalidixic acid	50	3 - 50	50
Rifampicin	50	6 - 100	50
Tetracycline	10	2 - 25	저항성

[0052]

[0053] 표 4는 항생제 테스트 결과를 나타낸 표로, *S. degradans*의 최소 저해 농도(MIC) 테스트 결과이다. 오버나잇 배양된 *S. degradans*를 여러 농도의 항생제를 포함하는 신선한 배지에 접종하였다.. MIC는 *S. degradans*가 성장할 수 없는 항생제 농도로 결정하였다.

[0054] 실시예 2: *S. degradans*에 DNA 전달

[0055] 화학적 형질전환

[0056] CaCl_2 -수용(competent) *S. degradans* 세포를 제조하기 위하여, 수용 세포 제조방법은 *E. coli* (Mandel, M. and A. Higa (1992). "Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. 1970." *Biotechnology* 24: 198-201)에서 사용한 방법을 사용하였다. 요약하면, *S. degradans*를 OD₆₀₀가 0.6에 도달할 때까지 MM 배지에서 30 °C (180 rpm)에서 배양하였다. 20 ml의 배양물을 10 분(7000 rpm, 4 °C) 동안 원심분리하였다. 그 펠렛을 10 ml 50 mM Tris-Cl, pH7.4에서 재부유하고 10 분(7000 rpm, 4 °C) 동안 원심분리하였다. 그 후 그 세포들을 1.2 ml 100 mM Tris-Cl(400 mM CaCl_2 를 가지는)에 재부유하였다. 200 ul aliquots를 액체질소에서 동결하고 -70 °C에서 저장하였다.

[0057] 20 ug 플라스미드-DNA 및 200 ul polyethylene glycol (PEG) 6000을 200 ul CaCl_2 수용 세포에 첨가하였다. 그 세포들을 혼합하고 1 ml의 MM 배지를 첨가하였고, 30 °C에서 20 분 방치 후, 3 ml의 MM 배지를 첨가하고 그 튜브를 30 °C에서 9 시간 동안 배양하였다. 그 후 1 ml의 세포를 glucose 및 kanamycin을 가지는 MM 아가에 스프리드하였다. 그 아가 플레이트를 30 °C에서 48 시간 동안 배양하였다(Fornari, C. S. and S. Kaplan (1982). "Genetic transformation of *Rhodopseudomonas sphaeroides* by plasmid DNA." *J Bacteriol* 152(1): 89-97)

[0058] 전기천공(Electroporation)

[0059] *S. degradans*를 약 18시간 동안 30 °C, 180 rpm에서 MM 배지에서 배양한 후, 세포들을 4 °C, 6000 rpm에서 15분간 원심분리하여 수집하였다. 그 펠렛을 콜드 10 mM MgCl_2 및 5 mM CaCl_2 로 2회 세척한 후 콜드 10 % glycerol을 첨가하였다. 이들 세포들을 얼음에서 30에서 60분간 배양하였다. 50 ul aliquots를 액체 질소에서 동결하여 -70 °C에서 보관하였다 (Gilchrist, A. and J. Smit (1991). *J Bacteriol* 173(2): 921-925).

[0060] OD₆₀₀이 약 0.5일때까지 세포를 성장시킨 후, 3,200 x g에서 15 분간 원심분리하였다. 그 펠렛을 10 % glycerol로 5회 세척하였다. 50 ul aliquots를 액체 질소에서 동결하여 -70 °C에서 보관하였다 플라스미드

DNA를 2mm pulser cuvette (Bio Rad) 내의 제조된 수용 세포에 첨가하였다. 그 혼합물을 펄드 강도 1.5 ~ 3.0 kV, 저항 200 Ω 및 정전용량 25 Uf를 가지는 Bio Rad gene pulser에서 처리하였다. 전기천공 후 1ml MM 배지를 즉시 첨가하고 30℃에서 밤새 배양하였다. 그 후 세포를 적당한 항생물질을 포함하는 아가 플레이트에 스프리드하고 30 ℃에서 48 시간 동안 배양하였다 (Piekarski, T., 등 (2009). *BMC Microbiology* 9(1): 265)

[0061] 접합

[0062] 접합 형질전환 과정은 *Corynebacterium glutamicum*에 대한 프로토콜을 변형하였다 공여체 *E. coli* strain S17-1을 LB 배지에서 OD₆₀₀ 0.6까지 배양하였다. 수용체 *S. degradans*는 18~20 시간 동안 MM 배지에서 배양하였다. 양 배양물을 수용체/공여체 비율이 1:4, 1:2, 1:1, 2:1, 4:1, 9:1 및 15:1로 OD₆₀₀에 의하여 혼합하였다. 그 세포들을 5000 rpm에서 원심분리하고 200 ul MM 배지에서 재부유하고 MMG 아가 배지 상에 스팟팅하였다. 그 플레이트들을 30 ℃에서 6, 20, 30, 및 48 시간 동안 배양하였다. 그 이후에 그 세포들을 플레이트에서 스크립하고 0.6 ml MM 배지에서 재부유하였다. 일련의 희석을 수행하여 항생물질을 가지는 MM 아가 플레이트에 플레이트하였다. 접합 효율은 접합체 및 사용된 공여 세포들 사이의 비율로서 계산하였다.

[0063] 혼합 비율의 효과에 대한 실험에서, 배양 시간은 20 시간으로 고정하고 사용된 균주는 *E. coli* S17-1이었다. 배양 시간에 대한 테스트 의존성을 위하여, 혼합 비율을 1:1로 고정하고 사용된 균주는 *E. coli* S17-1이었다. 공여체 균주의 비교를 위하여 혼합 비율은 고정된 1:1이고 배양시간은 20 시간이었다.

[0064] *S. degradans* 접합체에서 플라스미드 존재를 확인하기 위해서, 플라스미드를 플라스미드 제조 키트(Cosmo Genetech)로 추출하였다.

[0065] 실시예 3: 플라스미드 구축

[0066] 프로모터 강도 측정용 플라스미드

[0067] 1) 프로모터의 선택

[0068] 본 발명에서는 프로모터 선택의 기준은 유일 탄소원으로 변경될 때 급격하게 증가되는 효소 활성이다. 표준에 기반하여, *aga16B*, *ce15H* 및 *xyn11A* 을 컨트롤하는 프로모터들(이들 프로모터들은 모두 *S. degradans* 고유 gene 들의 프로모터지만, 외부유전자를 도입한 경우에도 잘 작동함을 실험으로 보여준 것, Weiner, R. M., 등 (2008). *PLoS Genet* 4(5): e1000087)이 선택되었다. 프로모터 강도를 비교하기 위한 대조군으로 *lac* 프로모터가 사용되었다.

[0069] 2)플라스미드 "pBBR1_프로모터_RFP"구축

[0070] pBBR1_프로모터_RFP는 pBBR1MCS2 벡터에서 red florescence protein 코딩 유전자와 여러 프로모터를 나타낸다. *S. degradans* 지노믹 DNA로부터 유래한 프로모터 및 pSB3T5 유래한 RFP 코딩 유전자는 삽입 부위의 플랭킹 서열에 상보적인 오버행을 가지는 포워드 및 리버스 유전자 특이적인 프라이머들에 의하여 PCR로 증폭되었다. Sequence and Ligation Independent Cloning (SLIC)에 대한 pBBR1 골격 벡터를 제조하기 위하여 (Li, M. Z. and S. J. Elledge (2007). *Nat Meth* 4(3): 251-256), pBBR1MCS2의 다중 클로닝 사이트(MCS)를 그 삽입체에 상보적인 서열을 가지는 프라이머들에 의하여 PCR을 사용하여 제거하였다. 그 PCR 산물들을 PCR 정제 키트(Cosmo Genetech)를 사용하여 정제하였다. 그 벡터 및 삽입체 PCR 산물들을 0.3 unit의 T4 polymerase (NEB)를 처리하였다. T4 polymerase는 주형-directed 5'에서 3' DNA polymerase 활성 및 3'에서 5' exonuclease 교정 활성 모두를 가진다. T4 polymerase exonuclease 처리는 스티키 말단을 만든다. T4 polymerase를 제거하기 위하여, 클린 업 키트(Qiagen)를 사용하였다. 두 번째 추출 후, 벡터 및 삽입 DNA의 농도를 결정하였다. 그 SLIC-ready 벡터 및 삽입체를 1 시간 동안 상온에서 냉복원하고 그 혼합물을 형질전환에 사용하였다.

[0071] 복제 오리진의 테스트를 위한 플라스미드

[0072] 본 실시예는 모든 플라스미드가 *S. degradans*에서 작동하지는 않는 것을 보여주는 것으로, 특정 복제원점 (replicon; replication origin만이 작동함을 보여준다.

[0073] 벡터들은 골격 벡터로 플라스미드 pK19 *mob sacB* (Sch, A., A. 등(1994). *Gene* 145(1): 69-73.)를 사용하여 구축하였다. Kanamycin 저항성 유전자, *sacB* 유전자 및 *oriT* 는 유지한 반면, pK19 *mob sacB* 벡터의 리프리콘인 pMB1은 삽입체로 대체되었다. 삽입된 복제 오리진은 pKD13로부터 R6K γ, pACYC184로부터 p15A이었다. 새로

구축된 벡터는 각각 pK19_R6K 및 pK19_p15A로 명명하였다(도 2 및 3).

[0074] 에탄올 생성용 플라스미드

[0075] 에탄올은 세포에서 pyruvate decarboxylase (*pdh*) 및 alcohol dehydrogenase (*adhB*) 유전자를 발현시켜서 생성될 수 있다(Dien, B. S., 등(2003). *Applied Microbiology and Biotechnology* 63(3): 258-266). 이 사실에 기초하여, pBBR1_aga_pdc_adhB 벡터(pBBR1MCS2 vector를 기반으로 본 발명의 도 4와 같은 과정을 통해서 제조된 vector)를 구축하였다. pBBR1MCS2 상 MCS 부위를 제거하고 그것을 pBBR1_pdc_adhB의 골격 벡터로 사용하였다. 프로모터 *aga16B* 를 *S. degradans* 지노믹DNA로부터 증폭하고, *pdh* 및 *adhB* 유전자를 *Zymomonas mobilis* 지노믹 DNA로부터 취하였다. 각 유전자는 *aga16B* 프로모터 하에서 조절되었다.

[0076] 실시예 4: 리포터 유전자의 발현 및 정량화

[0077] Red fluorescence protein (RFP)를 프로모터 활성을 비교하기 위한 리포터 유전자로 사용하였다. 인두서는 각각 프로모터 *aga16B*, *cel5H*, *xyn11A*, 및 *lac*에 대해서 low melting agar (BRL), avicel (Sigma), xylan (Sigma), 및 IPTG (Duchefa)이었다. 유도된 샘플과 유도되지 샘플을 비교하기 위하여, 단일 콜로니를 따서 그것을 MMG 브로스에 접종하고 하나는 포도당을 다른 것은 포도당 대신 0.2% 인두서를 가지는 배지에 옮긴다. *lac* 프로모터의 경우, 포도당이 탄소원이고 1 mM IPTG를 첨가하였다.

[0078] *S. degradans*에서 RFP활성을 결정하기 위하여, 세포를 파쇄하여 Multilabel Plate Reader (FL/LU) (Victor3, Perkin Elmer)를 사용하여 형광을 측정하였다. 샘플들을 원심분리하고 그 펠렛을 200 ul의 Bugbuster Protein Extraction Reagent (Novagen)로 처리하였다. 그 상등액을 세포가 녹을때까지 혼합하고 원심분리하여 상청액을 분리하고 RFP 강도를 측정하였다. 그 강도를 조정하기 위하여, 전체 단백질 농도를 Bradford 방법으로 결정하고, RFP 값들을 각 샘플 값에서 표준 값을 제거하여서 계산하였다. pBBR1MCS2 벡터를 가지는 *S. degradans*를 프로모터 강도를 비교하기 위한 표준물질로 사용하였다.

[0079] 실시예 5: 에탄올 농도 검출

[0080] 에탄올 생산을 위하여, pBBR1MCS2 및 pBBR1_pdc_adhB를 가지는 *S. degradans* 를 테스트하였다. 세포를 성장시키기 위해, 단일 탄소원으로 포도당을 첨가하였다. 탄소원의 농도 효과를 인지하기 위하여, 포도당의 농도를 0.2 %, 1 % 및 2 %로 변화시켰다. 샘플을 배양 12시간에서 36시간 동안 수집하였다.

[0081] 에탄올을 검출하기 위해서, 가스 크로마토그래피 조건을 Thermo scientific broacher에 기반하여 변형하였다. 샘플 제조를 위해, NREL 방법(Templeton 1994)에 기초한 전처리 방법을 수행하였다. 샘플을 수집하고 6000 rpm에서 원심분리하고 상청액을 0.45 um 포어 필터에서 여과하였다. 2.16 x 10 mM n-butanol을 내부 표준으로 사용하였다. GC-FID/TCD (Agilent)를 에탄올 검출에 사용하였다. 에탄올 농도는 피크 면적을 사용하여 계산하고 내부 표준 피크에 의하여 보정되었다 상세한 조건은 다음과 같다.

[0082] 컬럼: DB-WAXETR (Agilent)

[0083] 오븐 조건

[0084] 초기 온도: 40 °C, 2min.

[0085] 속도: 20 °C / min.

[0086] 최종 온도: 100 °C, 0 min.

[0087] 입구 온도: 175 °C.

[0088] 검출기 온도: 250 °C.

[0089] 주입 부피: 1 ul.

[0090] 유속: 10 ml/min

[0091] 상기의 실시예의 결과는 다음과 같다.

- [0092] *S. degradans*의 항생물질 감수성
- [0093] 6 종의 항생물질을 테스트하였다; ampicillin, kanamycin, chrolamphenicol, gentamycin, nalixidic acid 및 tetracycline. *S. degradans*의 유전자 서열은 ampicillin 및 tetracycline 저항성을 나타내었다. *S. degradans*는 kanamycin, chrolamphenicol, nalixidic acid 및 gentamycin에 민감하였다. 이들 결과를 통해서 재조합 DNA의 선택마커로 kanamycin 또는 chrolamphenicol을 사용할 수 있다.
- [0094] *S. degradans*로 플라스미드 삽입
- [0095] 화학적 및 전기적 형질전환은 *S. degradans*에 대해서는 작동하지 않았다. 세포 밀도 및 사용된 플라스미드를 변경하여도 콜로니는 나타나지 않았다.
- [0096] *S. degradans*에서 작동하는 복제 오리진
- [0097] pBBR1MCS2, pBBR1MCS5, pK19 *mob sacB*, pMiniHimar, pECM3, pK19_R6K, pK19_p15A의 일곱 개의 벡터를 조사하였다(표 1 참조). pBBR1MCS2, pBBR1MCS5 및 pK19 *mob sacB* 벡터는 *S. degradans*로 삽입되었지만(도 5), pECM3 및 pK19_p15A 벡터는 접합에 의해서 *S. degradans*로 전달되지 않았다. 이들 결과로부터 pBBR1 및 pMB1의 복제 오리진은 *S. degradans*에서 작동할 수 있지만, p15A는 할 수 없다는 것을 나타낸다. R6K γ 복제 오리진을 포함하는 벡터(pMiniHimar 및 pK19_R6K)의 경우, 이들 벡터들은 전달되고 *S. degradans*에서 복제되었지만 그 접합 효율은 pBBR1 복제 오리진을 가진 벡터들에 비하여 약 460배 낮았다. *S. degradans*에서 플라스미드 존재를 확인하기 위하여, 플라스미드 제조 키트(Cosmo Genetech)로 추출하였다. 도 6에서 알 수 있는 바와 같이, 플라스미드는 *S. degradans* 접합체에서 성공적으로 추출되었다.
- [0098] 접합에 대한 최적 조건
- [0099] 혼합 비율, 배양 시간 및 공여체 균주의 관점에서 접합에 대한 최적 조건을 확립하는 실험이 수행되었다.
- [0100] 1) OD 비율의 효과
- [0101] 공여체 및 수용체 세포 혼합 단계에서 OD 비율을 효과를 테스트하였다. 공여체 세포의 OD 값이 1일 때, 수용체 세포 OD 범위는 0.25에서 15이었다(도 7). 최고 접합 효율은 3.88×10^{-3} (1: 2, 공여체에 대한 수용체 비율에서)이었다. 사용된 수용체 세포를 공여체보다 두배 이상인 경우, 접합 효율은 크게 감소되었다.
- [0102] 2) 배양 시간의 효과
- [0103] 실험된 배양시간은 6, 20, 30, 45 시간이었다(도 8). 최대 효율은 30 시간 배양에서 얻었다. 플레이트를 30 시간 배양한 경우, 접합 효율은 20 시간 보다 1.2-배 더 높았다. 도 8에서 알 수 있는 바와 같이, 30 시간 이상 배양은 *S. degradans*의 DNA 섭취 효율을 저해하였다.
- [0104] 3) 공여체 균주의 효과
- [0105] 공여체 균주 기반된 접합 효율은 BW19851 균주가 *S. degradans*에 대하여 최적 균주임을 나타내었다(도 9).
- [0106] S17-1 및 S17-1 λ pir⁺ 균주는 접합 효율에서 유사한 패턴을 나타내었다. 비록 S17-1의 최대 효율은 3.98×10^{-3} 이었지만 BW19851의 접합 효율은 S17-1 균주의 것에 비하여 약 7.6 배 더 높았다.
- [0107] 프로모터 강도의 측정
- [0108] 프로모터 강도는 각 인두서에 기반한 최대 수준에 대한 상대적 숫자로 나타내었다(표 5, 및 6). pBBR1_aga16B_RFP 함유한 *S. degradans*는 포도당, 아가를 탄소원으로 사용한 경우 최고 RFP 값을 보인 반면, pBBR1_ce15H_RFP는 모든 인두서에 최저 양을 나타내었다. pBBR1_aga16B_RFP를 가지는 접합체에 아가를 인두서로 첨가한 경우, RFP 값은 유도되지 않은 세포보다 약 1.5-배 증가하였다. *lac* 프로모터는 *S. degradans*에서 작동하지만 그 강도는 aga16B 프로모터보다 매우 약하였다.

표 5

	Glucose	Agar	Avicel	Xylan	IPTG
pBBR1_aga16B_RFP	1.00	1.00	0.84	0.91	1.00
pBBR1_cel5H_RFP	0.06	0.06	0.41	0.12	0.03
pBBR1_xyn11A_RFP	0.17	0.13	0.35	0.65	0.30
pBBR1_lac_RFP	0.80	0.30	1.00	1.00	0.55

[0109]

[0110]

표 4는 RFP 발현 수준에 의한 프로모터 강도 비교. 기재된 프로모터 하에서 RFP 발현 플라스미드를 가지는 *S. degradans* 접합체를 배양하고 단백질 농도를 정량하고 형광을 마이크로플레이트 리더로 검출하였다. RFP 레벨을 각 최대 수준(굵은 표시)에 대한 값으로 나타내었고 그것은 사용된 프로모터에 따라 얻었다.

표 6

	Glucose	Agar	Avicel	Xylan	IPTG
pBBR1_aga16B_RFP	0.67	1.00	0.29	0.30	0.67
pBBR1_cel5H_RFP	0.28	0.45	1.00	0.27	0.13
pBBR1_xyn11A_RFP	0.54	0.62	0.56	1.00	0.97
pBBR1_lac_RFP	1.00	0.57	0.64	0.62	0.70

[0111]

[0112]

표 6은 인두서에 따른 RFP 발현 수준의 검출에 의한 프로모터 강도의 비교를 나타낸 표이다.

[0113]

에탄올의 생산

[0114]

*E. coli*를 에탄올 생산을 위한 대조 균주로 사용하였다. *lac* 프로모터 및 *aga16B* 프로모터는 *E. coli*에서 작동되고 *aga16B* 프로모터가 *lac* 보다 약 1.8배 더 강하였다.

[0115]

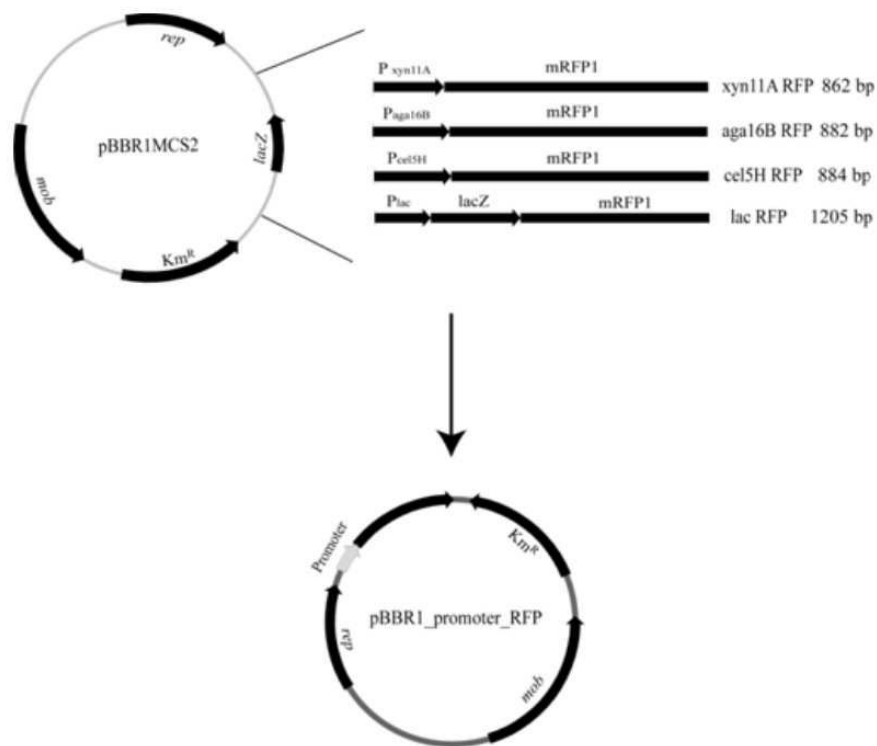
pBBR1_aga_pdc_achB를 가지는 *S. degradans*를 2 % 포도당의 최소 배지에서 배양한 경우, 최대 에탄올 농도는 36시간 배양에서 약 0.1 g/L이었다.

[0116]

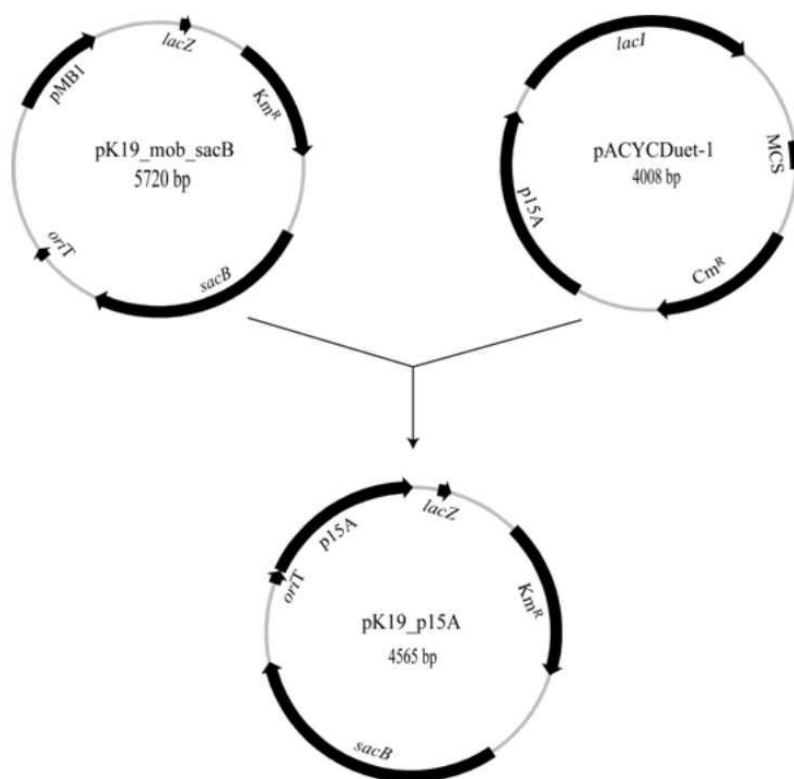
에탄올 생산에 대한 포도당 농도의 효과를 실험하기 위하여, 포도당 농도를 0.2 %에서 2.0 %으로 변경하였다. 그 결과 생성된 에탄올의 양은 탄소원의 퍼센트가 증가함에 따라 증가하였다(도 10).

도면

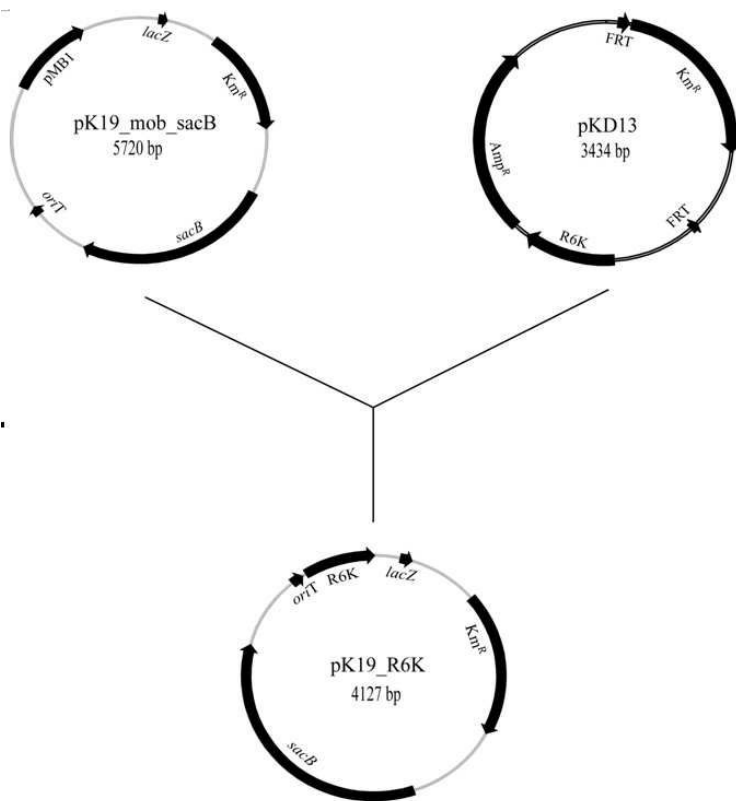
도면1



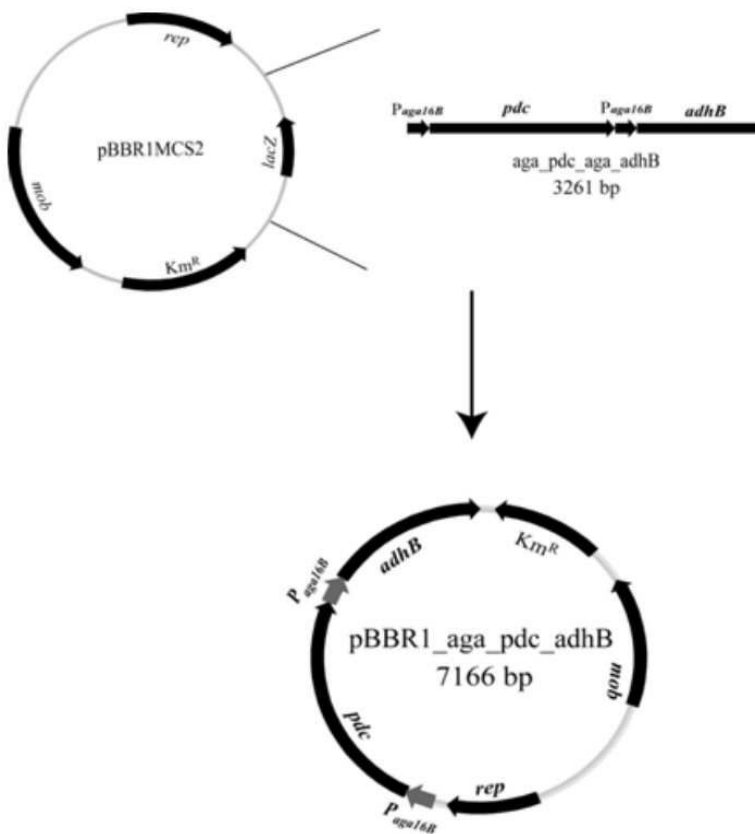
도면2



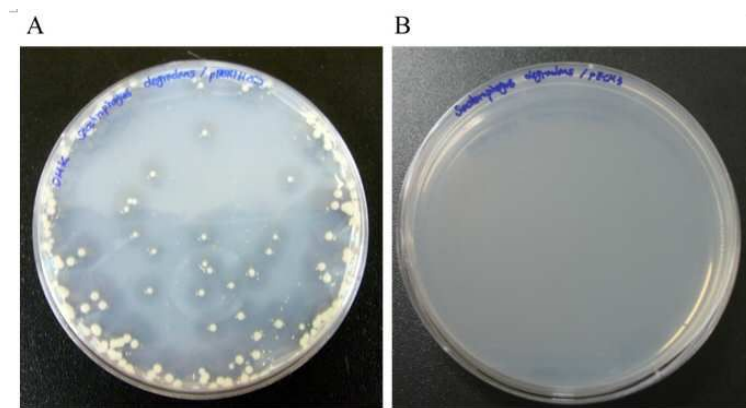
도면3



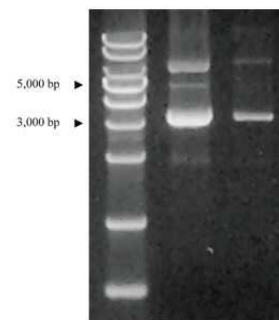
도면4



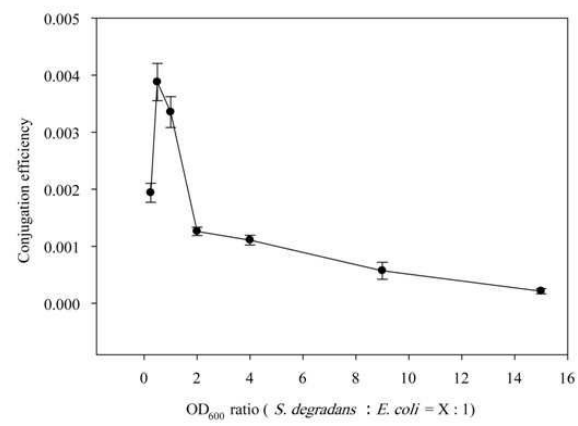
도면5



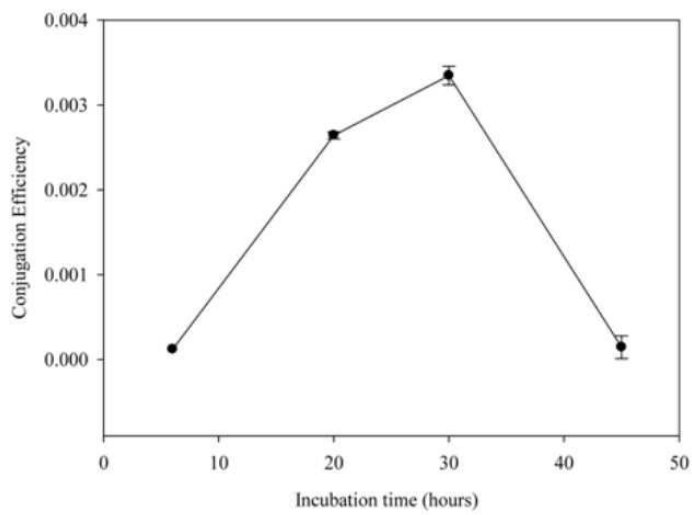
도면6



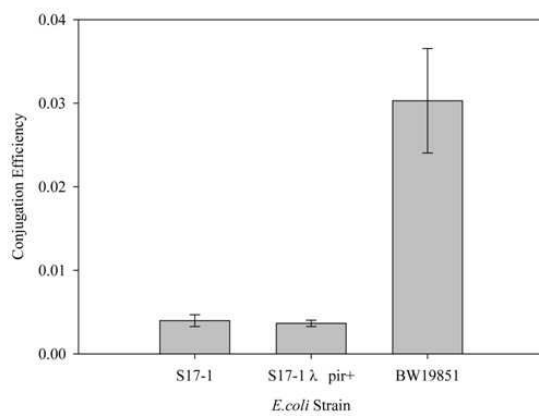
도면7



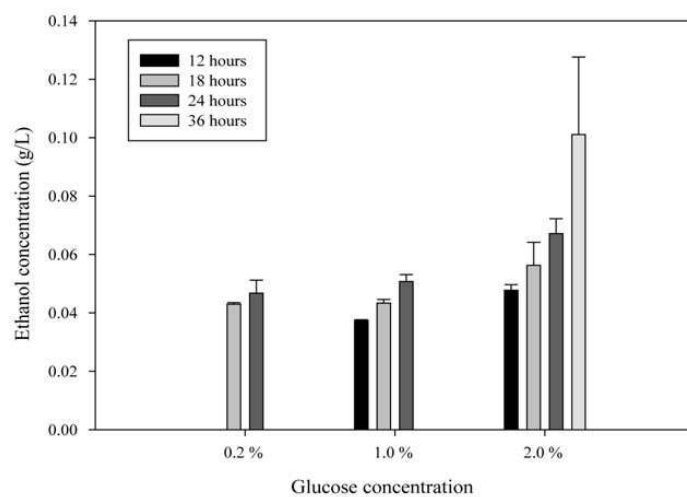
도면8



도면9



도면10



도면11

