

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0018787 (43) 공개일자 2014년02월13일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 1/21 (2006.01) C12N 1/38 (2006.01) C12N 15/70 (2006.01) C12N 15/03 (2006.01)	(71) 출원인 이화여자대학교 산학협력단 서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)	
(21) 출원번호 10-2013-0074010	(72) 발명자 김옥빈 경기도 고양시 일산동구 백석로 109 301동 702호(백석동, 백송마을3단지아파트)	
(22) 출원일자 2013년06월26일 심사청구일자 2013년06월26일	이상엽 대전광역시 유성구 엑스포로 448 212동 702호(전민동, 엑스포아파트) (뒷면에 계속)	
(30) 우선권주장 1020120068835 2012년06월26일 대한민국(KR)	(74) 대리인 손민	

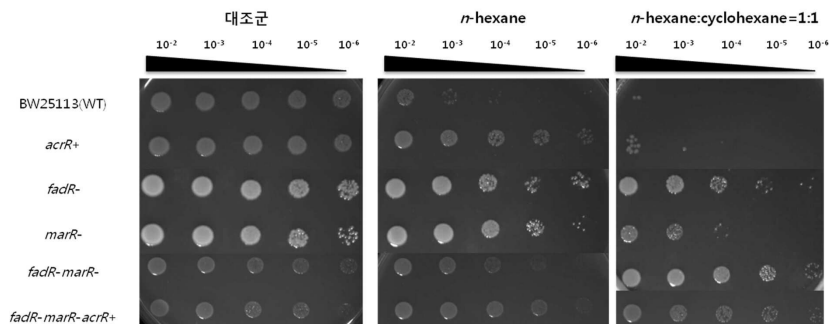
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 유기용매에 대한 저항성이 향상된 균주 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 유기용매에 대한 저항성이 증가된 균주에 관한 것으로, 보다 상세하게는 *fadR* 유전자 및 *marR* 유전자가 불활성된 균주, 이에 추가로 *acrR* 유전자의 활성이 강화된 균주, 상기 균주를 제조하는 방법, 상기 균주를 배양하는 단계를 포함하는 유기용매의 존재 하에서 균주의 성장을 증진시키는 방법 및 바이오 연료를 생산하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 균주는 유기용매에 대한 저항성이 향상되어, 바이오연료를 생산하는 데에 있어서 생산율을 높여 대량으로 생산할 수 있는 장점이 있다. 이에 따라, 대체 에너지 생산율의 증가를 가져올 수 있다.

대표도 - 도6



(72) 발명자

오혜윤

서울특별시 강동구 양재대로122가길 30, SDA아파트
(길동)

이재욱

인천광역시 서구 용두산로13번길 12 101동 403호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2010-0025404

부처명 교육과학기술부

연구사업명 일반연구자지원사업

연구과제명 Actinobacillus succinogenes의 C4-디카르복실산 대사의 수송시스템

기 여 율 1/1

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2011.09.01 ~ 2013.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

fadR 유전자 및 marR 유전자가 불활성화되어, 유기용매에 대한 저항성이 증가된 균주.

청구항 2

제1항에 있어서, 추가로 acrR 유전자의 활성이 강화된 것인 균주.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 균주는 에스케리치아(Escherichia) 속 균주인 것인 균주.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 에스케리치아 속 균주는 대장균인 것인 균주.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 유기용매는 n-헥산, 사이클로헥산 및 이들의 조합으로 구성된 군에서 선택된 것인 균주.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 fadR 유전자 및 marR 유전자의 불활성화는 fadR 유전자 및 marR 유전자의 결손에 의한 것인 균주.

청구항 7

제2항에 있어서, 상기 acrR 유전자의 활성 강화는 acrR 유전자의 추가 도입에 의한 것인 균주.

청구항 8

균주로부터 fadR 유전자 및 marR 유전자를 결손시키는 단계를 포함하는, 제1항의 균주를 제조하는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, acrR 유전자를 도입하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 10

제1항 또는 제2항의 균주를 배양하는 단계를 포함하는, 유기용매의 존재 하에서 균주의 성장을 증진시키는 방법.

청구항 11

바이오매스로부터 바이오연료를 생산하는 방법에 있어서, 제1항 또는 제2항의 균주를 배양하는 단계를 포함하는, 바이오연료를 생산하는 방법.

명세서

기술 분야

- [0001] 본 발명은 유기용매에 대한 저항성이 증가된 균주에 관한 것으로, 보다 상세하게는 fadR 유전자 및 marR 유전자가 불활성된 균주, 이에 추가로 acrR 유전자의 활성이 강화된 균주, 상기 균주를 제조하는 방법, 상기 균주를 배양하는 단계를 포함하는 유기용매의 존재 하에서 균주의 성장을 증진시키는 방법 및 바이오 연료를 생산하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 가솔린 및 디젤과 같은 화석 연료를 대체하기 위한 바이오연료의 생산에 대한 연구가 전세계적으로 진행되고 있다. 지금까지, 미생물 발효에 의해 가장 성공적으로 생산된 바이오연료는 바이오에탄올로서, 그 생산량은 2011년 기준 전세계적으로 약 846억 리터에 이르렀다.
- [0003] 바이오에탄올 이외에도 다양한 바이오연료의 후보물질들이 있다. 예컨대, 탄화수소 기반의 바이오연료는 다양한 가능성과 이점이 있어 대체 연료로서 각광받고 있다. 탄화수소를 연료로 사용하고자 하는 경우에는, 기관(engine)이나 유통 시스템과 같은 기반 시설의 변경이 불필요하다는 장점이 있다. 또한, 탄화수소는 포화되고 긴 탄소 사슬을 포함하는 경우 에탄올이나 부탄올보다도 높은 에너지를 낼 수 있고, 미생물 발효에 의해서 자체적으로 생산이 가능하여, 비용이나 시간적 측면에서 다양한 장점이 있다. 그에 따라, 미생물을 이용한 발효에 의하여 생산될 수 있는 '바이오-탄화수소'는 차세대 바이오연료의 하나로서 자리잡고 있는 실정이다.
- [0004] 그러나, 탄화수소 역시 다른 다양한 연료와 마찬가지로 미생물 및 세포에 대한 독성을 가진다. 따라서, 미생물에 의해서 일반적으로 생성되는 바이오 연료로 공지된 수많은 알코올과 탄화수소가 종종 그 자체로 독성이 있다는 문제점이 있다. 또한, 탄화수소와 같은 유기용매의 축적은 세포막을 파괴시키고, 투과성을 증가시키며, 막전위의 소실로 에너지 형질도입을 손상시키고, 수송이나 신호에 관계하는 막 단백질의 장애를 유발하여 최종적으로 세포 사멸에까지 이르게 한다. 즉, 바이오 연료인 유기 용매가 세포에 독성이 있어서 바이오 연료를 생산할수록 균주가 사멸하거나 자라지 못하게 되어 생산성이 없어지는 문제점이 있는 것이다. 따라서 이러한 역설적 상황을 해결하기 위하여, 박테리아의 다수의 메커니즘이 최근 연구들에서 시험되었다.
- [0005] 그람음성 박테리아의 유기용매 저항성(Organic Solvent Tolerance)은 세포막, 다중약물 방출 시스템(multidrug efflux system), 세포 외피(cell envelope), 삼투 억제제(osmoprotectant), 펩티도글리칸 및 스트레스 반응 메커니즘 등과 깊이 연관되어 있다. 그러나, 상기와 같은 다양한 메커니즘에서 타겟이 되는 유전자 또는 단백질의 변형이 유기용매 저항성에 대한 일관적인 결과를 도출해내지 못하고 모순되는 결과들이 보고되고 있다.
- [0006] 이러한 배경 하에서, 본 발명자들은 다양한 타겟 유전자들의 변형을 통해 유기용매에 대한 저항성을 증가시킨 균주를 개발하여, 탄화수소와 같은 바이오연료를 효율적으로 생산할 수 있도록 생산율을 높이기 위한 방법을 찾고자 예의 노력한 결과, fadR 유전자 및 marR 유전자를 결손시키거나, acrR 유전자를 도입시키는 경우, 균주의 유기용매 저항성이 현저하게 증가되는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명의 하나의 목적은 유기용매에 대한 저항성이 증가된 균주를 제공하는 것이다.
- [0008] 본 발명의 다른 하나의 목적은 상기 균주를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 균주를 배양하는 단계를 포함하는, 유기용매의 존재 하에서 균주의 생장을 증진시키는 방법을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 균주를 이용하여 바이오 연료를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 fadR 유전자 및 marR 유전자가 불활성화되어, 유기용매에 대한 저항성이 증가된 균주를 제공한다. 본 발명은 상기 균주에 추가로 acrR 유전자의 활성이 강화된 균주 역시 제공할 수 있다.
- [0012] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 균주로부터 fadR 유전자 및 marR 유전자를 결손시키는 단계를 포함하는, 유기용매에 대한 저항성이 증가된 균주를 제조하는 방법을 제공한다. 본 발명의 상기 방법은 acrR 유전자를 도입하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0013] 본 발명은 유기용매에 대한 저항성을 증가시키기 위하여, fadR 유전자 및 marR 유전자의 불활성화, 예컨대 fadR 유전자 및 marR 유전자의 결손을 일으켜 제조된 균주를 제공하는 데에 특징이 있다. 또한, 본 발명은 상기 fadR 유전자 및 marR 유전자의 불활성화에 더하여 acrR 유전자의 활성을 강화시킴으로써, 유기용매에 대한 저항성을 더욱 증가시킬 수 있다. 상기 제조된 균주를 이용하여 궁극적으로는 바이오연료를 생산하는 데에 있어서, 보다 높은 생산율을 달성할 수 있다.
- [0014] 본 발명에서 용어 "fadR 유전자"는 지방산 대사 조절 단백질을 코딩하는 유전자로서, 세균의 전사인자 중 하나를 의미한다. 이와 같은 유전자의 서열은 공지의 데이터베이스, 예컨대 NCBI의 GenBank 등에서 얻을 수 있으나, 이에 제한되지는 않으며, 바람직하게는 NCBI gene ID No. 948652의 서열인 서열번호 1로 표시되는 염기서열일 수 있다. 상기 fadR 유전자는 지방산 분해 관련 오페론(fad operon)과 글리옥실레이트 우회(bypass) 오페론(aceBAK operon)의 발현 조절인자로 알려져 있으며, 지방산 대사 및 분해와 관련된 역할에 대해서는 잘 알려져 있으나, 유기용매에 대한 저항성에 대해서는 직접적으로 알려진 바가 없었다.
- [0015] 본 발명에서 용어 "marR 유전자"는 다중 항생제 저항성 억제제(multiple antibiotic resistance repressor)를 코딩하는 유전자로서, DNA-결합 전사 억제제(DNA-binding transcriptional repressor)의 하나를 의미한다. 이와 같은 유전자의 서열은 공지의 데이터베이스, 예컨대 NCBI의 GenBank 등에서 얻을 수 있으나, 이에 제한되지는 않으며, 바람직하게는 NCBI gene ID No. 945825의 서열인 서열번호 2로 표시되는 염기서열일 수 있다. 상기 marR 유전자는 다중약물내성(multidrug resistance)을 위한 조절인자인 marA를 억제하는 것으로 알려져 있고, 다중 항생제 저항성 오페론(mar operon)의 발현 조절인자로 잘 알려져 있으나, 유기용매에 대한 저항성에 대해서는 직접적으로 알려진 바가 없었다.
- [0016] 본 발명에서는, 상기 fadR 유전자 및 marR 유전자를 불활성화시켜 유기용매 저항성을 증가시키고자 하였다. 본 발명에서 용어 "불활성화"는 유전자가 본래 가지고 있는 기능을 없애는 작용을 총칭하는 의미로서, 유전자의 감쇠 또는 결손을 통하여 활성을 약화시키거나 비활성화시키는 모든 작용을 포함한다. 바람직하게는 상기 유전자의 불활성화는 유전자의 결손에 의하여 달성될 수 있으며, 상기 유전자의 "결손"은 유전자를 절단하거나, 염색체 상에 특정 유전자 서열을 삽입하여 서열을 변형시킴으로써 수행될 수 있다. 상기 "감쇠" 또는 "약화"는 미생물 균주에서 상응하는 DNA에 의해 코딩되는 하나 이상의 효소에 대한 세포 내 활성을 제거하거나 감소시키는 것을 의미하는데, 그 예로 유전자의 프로모터 부위 및 5'-UTR 부위의 염기서열을 변형시킴으로써 단백질의 발현을 약화시키거나 해당 유전자의 ORF 부위에 돌연변이를 도입함으로써 단백질의 활성을 약화시킬 수 있다.
- [0017] 또한, 적절한 배양에 의해, 유전자 발현의 신호구조의 변형에 의해, 또는 안티센스(antisense)-RNA 기술에 의해 유전자 발현을 감소시킬 수 있다. 예를 들어, 유전자 발현의 신호 구조는, 예를 들어 억제(repressor) 유전자, 활성화(activator) 유전자, 작동자(operator), 프로모터, 감쇠자(attenuator), 리보솜 결합 자리, 시작 코돈

(codon) 그리고 종료자(terminator) 들이다. 이러한 유전자의 변형 방법은 당업계에 잘 알려져 있다.

- [0018] 본 발명의 일실시예에서는 P1_{kc} 형질도입에 의해 해당 유전자들을 녹아웃시키는 방법을 이용하여 유전자를 결손시킨 후, 유기용매 저항성과 관련되어 있을 것으로 추정되는 다양한 후보 유전자 중에서 fadR 유전자 및 marR 유전자를 결손시키는 경우 유기용매 저항성이 현저하게 증가하는 것을 확인하였다. 그에 따라, fadR 유전자 및 marR 유전자 전체를 결손시켜 본 발명의 균주를 제조하였다.
- [0019] 본 발명에서 용어 "acrR 유전자"는 상기 marR 유전자와 함께 DNA-결합 전사 억제제(DNA-binding transcriptional repressor)의 하나로 알려져 있으며, acrAB 펌프 발현의 억제자로서 기능하는 유전자를 의미한다. 이와 같은 유전자의 서열은 공지의 데이터베이스, 예컨대 NCBI의 GenBank 등에서 얻을 수 있으나, 이에 제한되지는 않으며, 바람직하게는 NCBI gene ID No. 945516의 서열인 서열번호 3으로 표시되는 염기서열일 수 있다. 상기 acrR 유전자는 아크리딘(acridine)의 전사 조절인자로 알려져 있으나, 이의 과발현이 유기용매에 대한 저항성과 연관되어 있음은 직접적으로 알려진 바가 없었다.
- [0020] 본 발명에서는, 상기에서 fadR 유전자 및 marR 유전자가 불활성화된 균주에 추가로 acrR 유전자의 활성이 강화된 균주가 보다 증가된 유기용매 저항성을 가짐으로써, 배양시 생장이 잘 일어나는 것을 확인하였다.
- [0021] 본 발명에서 용어 "활성 강화"는 균주의 내재적 활성과 비교하여 활성이 더 향상된 것을 의미하는 것으로서 유전자를 과발현시키는 것을 의미한다. 상기 내재적 활성이란 본래 미생물이 천연의 상태에서 가지고 있는 유전자의 활성을 의미하며, 바람직하게는 야생형 균주의 유전자의 활성을 의미할 수 있다. 상기 유전자의 활성 강화는 당업계에 공지된 다양한 방법을 이용하여 달성될 수 있다. 바람직하게는 유전자 카피 수의 증가, 유전자의 도입, 프로모터 교체 또는 변형 및 돌연변이에 의한 유전자 활성의 증가 등 유전자를 과발현시킬 수 있는 모든 당업계에 알려진 방법을 이용할 수 있으며, 보다 바람직하게는 유전자의 도입을 통한 과발현에 의해 달성될 수 있다. 상기 유전자 카피 수의 증가는, 외래 유전자의 도입에 의한 카피 수의 증가 뿐만 아니라, 내재적 유전자의 증폭에 의한 것도 포함된다.
- [0022] 본 발명에서 용어 "유기용매 저항성"은 "유기용매 내성"이라고도 하며, 그 자체로 균주에 대한 독성을 가질 수 있는 유기용매 존재 하에서도 균주가 견딜 수 있는 힘을 의미한다. 본 발명의 목적상, 바이오 연료를 생산할 수 있는 균주는 역설적으로 그 균주가 생산하는 유기용매에 의하여 스트레스를 받아 균주가 사멸하거나 자라지 못하는 등의 현상이 일어나는데, 이러한 유기용매에 대하여 저항할 수 있는 성질을 유기용매 저항성이라고 한다.
- [0023] 본 발명의 일실시예에서는, 다양한 유전자 중에서 fadR 및/또는 marR 유전자를 결손시킨 균주가 유기용매에 의해서도 죽지 않고 잘 자라는 것을 확인하였으며(도 1 및 표 2), 추가로 다양한 유전자 중에서 acrR 유전자를 도입시킨 경우 더욱 잘 자라는 것을 확인함으로써(도 5 및 도 6), 유기용매 저항성을 갖는 균주를 개발할 수 있었다. 또한, 본 발명의 돌연변이 균주를 배양한 후에는 상기 유기용매의 축적량이 감소된 것을 확인함으로써(표 5 및 도 8), 이러한 사실을 다시 한번 확인할 수 있었다.
- [0024] 상기 유기용매는 유기물질로 이루어진, 다른 물질을 녹일 수 있는 액체 유기 화합물을 의미하는 것으로서, 본 발명의 목적상 균주의 생장에 영향을 줄 수 있는 스트레스를 유발할 수 있는 물질을 의미할 수 있다. 상기 유기용매는 당업계에 알려진 모든 유기용매를 포함하며, 대표적으로 탄화수소나 알코올 등이 있을 수 있으며, 이에 제한되지는 않으나, n-헥산, 사이클로헥산, 옥탄, 도데칸, 클로로포름, 에테르, 벤젠 등이 있으며, 바람직하게는 n-헥산 및/또는 사이클로헥산일 수 있다.
- [0025] 본 발명에서 상기 균주는 유기용매에 대한 저항성이 증가되도록 변형이 가능한 당업계에 알려진 모든 균주일 수 있다. 본 발명의 목적상, 상기 균주는 유기용매에 대한 저항성이 증가됨으로써, 발효를 통한 바이오연료의 생산에서 그 생산율을 증가시킬 수 있는 균주를 의미할 수 있다. 본 발명의 균주는 발효가 가능한 박테리아 균주일 수 있으며, 이에 제한되지는 않으나, 바람직하게는 에스케리치아(Escherichia) 속, 자이모모나스(Zymomonas) 속, 슈도모나스(Pseudomonas) 속, 클로스트리디움(Clostridium) 속 균주일 수 있으며, 보다 바람직하게는 에스케리치아 속의 대장균(E. coli), 자이모모나스 모빌리스(Zymomonas mobilis), 슈도모나스 푸티다(Pseudomonas putida), 클로스트리디움 아세트부틸리쿰(Clostridium acetobutylicum)일 수 있으며, 보다 더 바람직하게는 대장균(E. coli)일 수 있다. 상기 균주들은 바이오부탄올, 바이오디젤, 유기용매 등의 바이오연료의 생산이 가능한

균주이다.

- [0026] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 유기용매에 대한 저항성이 증가된 균주를 배양하는 단계를 포함하는, 유기용매의 존재 하에서 균주의 성장을 증진시키는 방법을 제공한다.
- [0027] 또한, 또 다른 하나의 양태로서, 바이오매스로부터 바이오연료를 생산하는 방법에 있어서, 상기 유기용매에 대한 저항성이 증가된 균주를 배양하는 단계를 포함하는 바이오연료의 생산 방법을 제공한다.
- [0028] 전술한 바와 같이, 상기 균주는 그의 배양에 의해서 생성될 수 있는 유기용매에 대한 저항성을 가짐으로써, 세포 독성이 있는 유기용매의 존재 하에서도 균주의 생장이 잘 이루어지도록 할 수 있을 뿐 아니라, 바이오매스로부터 바이오연료를 생산하는 과정에서 유기용매에 대한 저항성을 가져 그 생산율을 증가시킬 수 있는 장점이 있다. 상기 유기용매에 대한 저항성이 증가된 균주 및 그의 성장 증진에 대해서는 전술한 바와 같다.
- [0029] 본 발명에서 용어 "바이오연료(biofuel)"는 바이오매스(biomass)에서 얻는 연료를 총칭하는 의미로서, 살아있는 유기체뿐 아니라 동물의 배설물 등 대사활동에 의한 부산물을 모두 포함하는 개념이다. 본 발명의 목적상, 상기 바이오연료는 상기 균주, 즉 미생물의 발효 과정에 의해 생산될 수 있는 바이오연료를 의미할 수 있으며, 보다 구체적으로는 생산과정에서 균주에 독성을 유발할 수 있는 탄화수소 계열의 바이오연료일 수 있다.
- [0030] 상기 바이오연료는 주로 혐기발효를 통한 공정을 통하여 최종적으로 필요한 산물을 분리하여 사용한다. 상기 바이오연료에는 바이오솔벤트(Biosolvent) 기반의 바이오연료로서 바이오부탄올, 바이오메탄올, 바이오에탄올, 바이오등유(biokerosene), 디메틸푸란(dimethylfuran) 등이 포함되며, 상기 바이오솔벤트 중에서 산업적으로 사용되는 것으로서 자일렌(폴리에스테르 필름, 섬유 생산), 사이클로헥산(나일론 생산), 모노에틸렌글리콜(폴리에스테르 섬유, 동결 방지제), 스티렌 단량체(폴리스티렌, 합성고무) 등이 있어, 바이오연료 생산 과정에서 유기용매에 저항성을 가짐으로써, 바이오연료의 대량 생산을 꾀할 수 있게 되는 것이다.
- [0031] 본 발명의 기술적 특징은 유기용매에 저항성을 갖는 균주를 제공하는 데에 있기 때문에, 당업계에 공지된 바이오연료 생산 방법을 이용하여 공지의 바이오연료 생산 과정 중에서 *fadR* 유전자 및 *marR* 유전자가 불활성화되고, *acrR* 유전자의 활성이 강화된 균주를 이용하여, 배양 및 발효 등의 과정을 거침으로써, 바이오연료의 생산성을 극대화시킬 수 있다.
- [0032] 또한, 본 발명의 균주를 이용하면 상기와 같은 바이오연료의 생산뿐만 아니라, 1차 대사산물(primary metabolite)이나 2차 대사산물(secondary metabolite)을 생산하도록 함으로써, 의약품의 성분, 플라스틱을 비롯한 생활용품의 성분, 식품의 보조 성분 등에 바이오 유래물질로 공급될 수 있다.

발명의 효과

- [0033] 본 발명의 균주는 유기용매에 대한 저항성이 향상되어, 바이오연료를 생산하는 데에 있어서 생산율을 높여 대량으로 생산할 수 있는 장점이 있다. 이에 따라, 대체 에너지 생산율의 증가를 가져올 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0034] 도 1은 n-헥산 또는 헥산:사이클로헥산 혼합액이 포함되거나 포함되지 않은 배지에서 야생형 균주(BW25113) 및 돌연변이체의 스팟 어세이 결과를 나타낸다. 세포 배양액은 10^{-2} 에서 10^{-6} 농도까지 스팟팅하였다. (A)는 유기용매가 없을 때, (B)는 n-헥산, (C)는 헥산:사이클로헥산 혼합액 존재시의 스팟팅 결과이다.
- 도 2는 PCR 생성물의 전기영동결과를 나타낸다. (A)의 (a)는 유기용매가 없을 때, (b)는 n-헥산, (c)는 n-헥산:사이클로헥산 혼합액 존재시의 결과이며, 각각 홀수 번째 세대의 PCR 생성물을 나타낸다. (B)에서 밴드의 사이즈를 대조군으로 나타내었다.
- 도 3은 n-헥산 존재시의 (A) 생장곡선 및 (B) 생존능력을 나타낸다. 각각 야생형 균주(BW25113, ○), $\Delta fadR$ (JW1176, □), $\Delta marR$ (JW5248, △) 및 $\Delta fadR \Delta marR$ (LMB015, ◇) 균주의 생장곡선 및 생존능을 나타낸다.

도 4는 n-헥산:사이클로헥산 혼합액 존재시의 (A) 생장곡선 및 (B) 생존능력을 나타낸다. 각각 야생형 균주(BW25113, ○), $\Delta fadR$ (JW1176, □), $\Delta marR$ (JW5248, △) 및 $\Delta fadR \Delta marR$ (LMB015, ◇) 균주의 생장곡선 및 생존능을 나타낸다.

도 5는 n-헥산 또는 헥산:사이클로헥산 혼합액이 포함되거나 포함되지 않은 배지에서 야생형 균주(BW25113) 및 유전자 과발현 돌연변이체의 스팟 어세이 결과를 나타낸다. 세포 배양액은 10^{-2} 에서 10^{-6} 농도까지 스팟팅하였다. 총 11개의 유전자를 각각 과발현시킨 균주에 대하여, 유기용매가 없을 때, n-헥산 존재시, n-헥산:사이클로헥산 존재시의 각각의 스팟팅 결과이다.

도 6은 n-헥산 또는 헥산:사이클로헥산 혼합액이 포함되거나 포함되지 않은 배지에서 야생형 균주(BW25113) 및 돌연변이체의 스팟 어세이 결과를 나타낸다. 세포 배양액은 10^{-2} 에서 10^{-6} 농도까지 스팟팅하였다. 유기용매가 없을 때, n-헥산 존재시, n-헥산:사이클로헥산 존재시의 각각의 스팟팅 결과이다.

도 7은 n-헥산 또는 n-헥산:사이클로헥산 혼합액 존재시의 생장곡선을 나타낸다. 각각 야생형 균주(BW25113, △), $acrR^-$ (□), $acrR^+$ (◆), $acrR^-acrR^+$ (▲), $fadR-marR^-$ (■) 및 $fadR-marR^-acrR^+$ (●) 균주의 생장곡선을 나타낸다.

도 8은 야생형 균주(BW25113) 및 각각의 돌연변이체에 대하여, n-헥산 존재하에서 배양한 후 세포 내에 남아있는 n-헥산의 양을 나타낸다.

도 9는 야생형 균주, $acrR^-$ 균주 및 $acrR^+$ 균주에 대하여, 유기용매 저항성과 관련된 다양한 유전자의 발현 수준을 분석한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] 이하, 하기 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0036] 실시예 1: 배지, 유기용매 및 배양 조건

[0037] 모든 균주는 변이 LB 배지에서 배양하였다: LBGM 배지(Aono R. *Extremophiles*. 1998;2(3):239-248) (박토 펩톤(Difco) 8, 효모 추출액(Difco) 4, NaCl(Junsei) 8, D-글루코스(Dae-jung) 및 $MgSO_4 \cdot 12H_2O$ (Dae-jung) 0.428 g/L). 아가 배지는 1.5 % (w/v) 아가로스(Difco)와 함께 굳혔다. 성장 테스트를 위한 모든 배양물은 진탕 배양기에서 37°C, 180 rpm에서 자라게 했다. n-헥산(Junsei), n-옥탄(Kanto chemical), n-도데칸(Kanto chemical) 및 사이클로헥산(Sigma-aldrich)을 저항성 테스트를 위한 유기 용매로 사용하였다.

[0038] 실시예 2: 균주들, 플라스미드 및 균주 제작

[0039] 1차적으로 유기용매에 대한 저항성을 갖는 균주를 개발하기 위하여 사용한 대장균 균주 및 플라스미드는 표 1에 나타내었다. 모든 단일 유전자 녹아웃 변이체는, LMB003을 제외하고, NBRP(Japan)로부터 획득하였다. P_{1kc} 형질 도입을 $fadR$, $marR$ 이중 유전자 파괴 변이체의 제작을 위해 사용하였다. 이 단계에서, pCP20 플라스미드를 사용하여 JW1176로부터 카나마이신 저항성 카세트를 제거하였다. LMB014($\Delta fadR$)를 수용체 균주로서 사용하고 JW5248($\Delta marR::kanR$) 균주를 공여 균주로 사용하여 P_{1kc} 형질도입에 이용하였다.

표 1

Strain or Plasmid		Genotype and/or description	Source; reference
Strains			
BW25113	wildtype		NBRP
JW0453	BW25113, but $\Delta acrR::kan^R$		NBRP
JW0305	BW25113, but $\Delta betI::kan^R$		NBRP
JW4093	BW25113, but $\Delta cadB::kan^R$		NBRP
JW4094	BW25113, but $\Delta cadC::kan^R$		NBRP
JW2779	BW25113, but $\Delta gcvA::kan^R$		NBRP
JW3935	BW25113, but $\Delta fabR::kan^R$		NBRP
JW1176	BW25113, but $\Delta fadR::kan^R$		NBRP
JW5248	BW25113, but $\Delta marR::kan^R$		NBRP
JW5249	BW25113, but $\Delta marA::kan^R$		NBRP
JW4355	BW25113, but $\Delta slt::kan^R$		NBRP
JW5670	BW25113, but $\Delta yhiD::kan^R$		NBRP
LMB003	MG1655, but $\Delta fabB::kan^R$		This study
LMB014	BW25113, but $\Delta fadR$		This study
LMB015	BW25113, but $\Delta fadRmarR::kan^R$		This study
Plasmids			
pCP20	FLP ⁺ $\lambda cI857 \lambda p_{\Delta Rep^2}$ cat bla		G. Unden
pKD46	oriR101 repA101(ts) ara Bp-gam-bet-exo bl		G. Unden
pKD3	oriR γ cat bla $\Delta(phoB-phoR)580$ galU95 $\Delta uidA3::pir^+$ $\Delta endA::FRT$		G. Unden
Phage			
P1 _{kc}			G. Unden

[0040]

[0041] 실시예 3: 유기용매 저항성을 증가시키기 위한 타겟 유전자의 선별: $\Delta marR$ 및 $\Delta fadR$

[0042] 박테리아의 유기용매 저항성은 복잡한 세포 메커니즘에 의해 영향을 받기 때문에, 어떠한 유전자의 녹아웃이 유기용매 저항성을 갖게 할 수 있는지를 확인하기 위하여, 각각의 유전자를 녹아웃시킨 균주의 유기용매 저항성을 확인하였다.

[0043] 먼저, 유기용매 저항성에 영향을 미칠 수 있을 것으로 예상되는 12개의 타겟 유전자를 선별하였다. 구체적으로, MDR (Multi drug resistance)의 조절과 연관이 있는 *acrR*, *marA* 및 *marR* 유전자, 세포 오스모프로텍턴트 (osmoprotectants)와 연관이 있는 *betI* 및 *gcvA* 유전자, 펩티도글리칸 생합성에 관여하는 유전자인 *slt* 유전자, 지방산 생합성을 조절하는 데에 연관되어 있는 *fabR*, *fadR* 및 *fabB* 유전자, 알코올 저항성과 관련있으며, 산 스트레스 유전자인 *cadB*, *cadC* 및 *yhiD* 유전자 등 총 12개의 유전자를 선별하였다.

[0044] 상기 각각의 유전자들의 녹아웃 돌연변이체를 후기 대수기(exponential phase)까지 50 μ g/ml의 카나마이신을 포함한 LBGM 배지에서 자라게 하였다. 모든 배양물은 0.5의 OD₆₀₀ 값에서 재현탁시키고 10⁻⁶ 농도까지 10 배 연속적으로 희석시켰다. 각각의 희석된 현탁액은 LBGM 아가 배지(약 20 ml 배지를 페트리 접시에 균게함) 상에 5 μ l씩 스팟팅하고 n-헥산(4ml) 및 n-헥산:사이클로헥산 혼합액(1:1, v/v)(2ml)를 덮어씌웠다. 유기용매 저항성은 30℃에서 20시간 배양 후 관찰하였다.

[0045] 그 결과, n-헥산 또는 n-헥산:사이클로헥산 혼합액(1:1, v/v)에서 $\Delta marR$ -돌연변이체(JW5248) 및 $\Delta fadR$ -돌연변이체(JW1176)가 유의미하게 증가된 저항성을 보임을 확인하였다(표 2 및 도 1). 구체적으로, 야생형 균주(BW25113)의 경우 유기용매 첨가시에 잘 자라지 않았으며, $\Delta marR$ 및 $\Delta fadR$ 를 제외한 나머지 10개의 단일 돌연변이체는 상기 야생형 균주(BW25113)와 비교하여 비슷하거나 덜 자랐음을 확인하였다. 반면, $\Delta marR$ - 및 $\Delta fadR$ -돌연변이체는 희석된 세포가 각각 10⁻⁴ 및 10⁻⁶까지 스팟팅되었을 때에도 콜로니를 형성하는 것을 확인함으로써(도 1), 유기용매 저항성이 증가됨을 알 수 있었다.

표 2

Biofuel tolerances mechanism	Genes	Tolerances [*]
Cell membrane fatty acid synthesis	<i>fabR</i>	-
	<i>fadR</i>	++
	<i>fabB</i>	-
Multi drug resistance	<i>acrR</i>	-
	<i>marA</i>	-
	<i>marR</i>	++
Cellular osmoprotectant	<i>betI</i>	-
	<i>gcvA</i>	-
Peptidoglycan production	<i>slt</i>	+
Acid stress response	<i>cadB</i>	+
	<i>cadC</i>	+
	<i>yhiD</i>	+

[0046]

[0047]

또한, 추가로 상기에서 각각 단일로도 유기용매 저항성을 증가시킬 수 있다고 확인된 두 유전자를 동시에 결손시킨 $\Delta fadR \Delta marR$ -이중 돌연변이체(LMB015)에 대해서도 실험을 실시하였다. 그 결과, $\Delta fadR \Delta marR$ -이중 돌연변이체(LMB015)는 n-헥산 및 사이클로헥산의 존재하에 각각의 $\Delta fadR$ - 또는 $\Delta marR$ -단일 돌연변이체에 비해 저항성이 보다 향상되었으며, 거의 유기용매에 저항을 받지 않고 정상적으로 자람을 확인할 수 있었다(도 1).

[0048]

실시예 4: PCR을 이용한 유전자 결손 돌연변이체의 배양 확인

[0049]

11개의 단일 유전자(*acrR*, *betI*, *cadB*, *cadC*, *gcvA*, *fabR*, *fadR*, *marR*, *marA*, *slt* 및 *yhiD*) 돌연변이체를 후기 대수기($OD_{600}=1.5 \sim 2.0$)까지 LBGM 배지에서 자라게 하였다. 모든 배양물은 원심분리를 사용하여 수집하고(Hanil; Combi 541R, 4000rpm, 10분, 4°C) OD_{600} 값 0.5의 LBGM 배지와 함께 재현탁시켰다. 각각의 현탁액의 동일 부피를 가지도록 하여 '폴드 배양물(pooled culture)'이라고 명명하고(Dunlop MJ, Dossani ZY, Szmidt HL, et al. *Molecular systems biology*. 2011;7(1):1-7), 폴드 배양물을 유기용매와 함께 또는 유기용매 없이 30ml LBGM 배지에서 연속적으로 9번 배양하였다. 폴드 배양물을 용매 스트레스로서 10% (v/v) n-헥산 및 2%(v/v) n-헥산 : 사이클로헥산(1:1, v/v 혼합액)과 함께 자라게 하였다. 시험 후에 전체 게놈 DNA를 게놈 DNA 준비 키트(Solgent Co., Korea)를 사용해 정제하고 각각의 프라이머 및 REDTaq®ReadyMix™(Sigma-Aldrich)를 사용해 PCR을 수행하였다. 나머지 돌연변이체의 경우 모두 3번째 배양시부터 밴드가 사라진 것을 확인할 수 있었으며, 최종적으로 변화가 일어난 4개의 돌연변이체(*acrR*, *fabR*, *fadR*, *marR*)에 대한 프라이머 세트는 표 3과 같다.

표 3

프라이머	방향	염기서열	서열목록
kan2	정방향(forward)	5'-CGG TGC CCT GAA TGA ACT GC-3'	서열번호 4
$\Delta acrR_pooled_rev$	역방향(reverse)	5'-GCG TTC GGG CTG CGT CTG TA-3'	서열번호 5
$\Delta fabR_pooled_rev$	역방향(reverse)	5'-CGG TTA CGC ATC TTC GCG CC-3'	서열번호 6
$\Delta fadR_pooled_rev$	역방향(reverse)	5'-CCG GTT CCG ACT GGC TGG AA-3'	서열번호 7
$\Delta marR_pooled_rev$	역방향(reverse)	5'-GGT TTG TTC CGC AAC GCC CT-3'	서열번호 8

[0051]

각각의 돌연변이체의 세포 숫자의 변화를 PCR로 측정한 결과, 유기용매가 없을 때는(도 2의 A의 (a)열), 각각의 돌연변이체의 양이 연속적인 배양을 통해서도 유지되었으나, n-헥산(도 2의 A의 (b)열)과 함께 배양할 경우, Δ

acrR- 및 Δ fabR-돌연변이체의 양은 용매가 없는 조건과 비교할 때 점차적으로 감소하였고, 돌연변이체는 7번째 배양시 사라졌다. 반면, 3번째 및 5번째 배양에서 Δ fadR- 및 Δ marR-돌연변이체의 생장은 분명하게 증가하였으며, 특히 Δ marR-돌연변이체의 경우 7번째 및 9번째 배양시에도 여전히 잘 자라는 것을 확인할 수 있었다.

[0052] 한편, n-헥산:사이클로헥산 혼합액과 함께 배양한 경우(도 2의 A의 (c)열)에도, 단지 Δ marR-돌연변이체만이 또한 9번째 배양시까지 자라는 것을 확인할 수 있었다.

[0053] 이러한 결과를 통하여, Δ fadR- 및 Δ marR-돌연변이체의 경우 유기용매에 저항성을 가짐으로써, 유기용매 하에서도 생장이 유지됨을 알 수 있었으며, 특히 Δ marR-돌연변이체는 유기용매에 거의 영향을 받지 않는다는 것을 확인할 수 있었다.

[0054] 실시예 5: Δ fadR Δ marR-돌연변이체의 세포 성장 및 세포 생존능 측정

[0055] 추가적으로, 세포의 성장 및 세포 생존능을 정량적으로 측정하기 위하여, BW25113, JW1176, JW5248 및 LMB015 균주를 밤새 50 μ g/ml 카나마이신을 포함하는 5ml LB 배지, 37°C에서 배양하였다. 배양물을 새로운 LBGM 배지에 1% (v/v) 접종하였다. 성장 테스트를 위하여, 광학밀도(OD₆₀₀)를 매시간 분광광도계(Human corporation; X-ma 1200, Korea)를 사용해 측정하였다. 미생물 세포 성장능력 분석을 위하여, Microbial Viability Assay Kit-WST(Dojindo, , Japan)를 사용하였고, 흡광도는 매시간 450nm에서 마이크로플레이트 리더(BioTek, U.S.A.)를 사용해 측정하였다. 접종 후 한 시간째에, 유기용매는 초기 대수기에 첨가하였다.

[0056] 그 결과, n-헥산 스트레스 하에서, 단일 돌연변이체인 JW1176 (Δ fadR) 및 JW5248 (Δ marR)는 야생형 균주보다 훨씬 더 유의미하게 성장하였다(도 3). 또한, Δ fadR Δ marR-이중 돌연변이체의 저항성은 각각의 단일 돌연변이체의 것보다 훨씬 더 향상되었다. n-헥산 추가 후 3-5 시간 후에, 이중 돌연변이체의 세포 숫자 및 성장능력은 단일 돌연변이체보다 두배 가량 증가하였다.

[0057] 돌연변이체 사이의 저항성의 차이는 n-헥산:사이클로헥산 혼합액과 함께 성장한 경우에 더욱 변화가 큼을 보였다(도 4). 용매 첨가 후 6시간이 될 때까지, 단지 이중 돌연변이체 LMB015만이 자랐고 3 보다 큰 OD 값에 다다랐다. fadR 및 marR의 이중 결손은 용매 저항성을 더욱 더 향상시켰다.

[0058] 요컨대, n-헥산 또는 n-헥산:사이클로헥산 혼합액을 유기용매로 사용한 모든 경우에 있어서, fadR 및 marR 유전자를 결손한 경우에 유기용매 저항성이 증가하여 세포 성장 및 세포 생존능 모두에 있어서 높은 수준을 보이며, 특히 fadR 및 marR 유전자를 모두 결손한 경우에는 세포 성장 및 세포 생존능 모두에 있어서 야생형 균주 및 단일 결손 돌연변이체에 비해 현저하게 높은 수준을 보인다는 것을 확인할 수 있었다.

[0059] 실시예 6: 세포 지방산 조성 분석

[0060] 유기용매 저항성 균주가 어떠한 이유로 유기용매에 대한 저항성을 갖는지 유추하기 위하여, 세포 내 지방산 조성 분석을 실시하였다. 일반적으로, 미생물 세포 지방산은 9 내지 20 탄소 길이로 구성되며, 그들 가운데 팔미트산(C₁₆) 및 스티아릭산(C₁₈)이 주요 구성요소이다. 본 발명자들은 용매 스트레스 동안에 균주와 그들의 변화 사이에 저항성에 관하여 세포 지방산 조성의 차이에 대하여 알아내고자 하였다.

[0061] 이를 위하여, BW25113, JW1176, JW5248 및 LMB015 균주를 10% n-헥산과 함께 또는 10% n-헥산 없이 연속적으로 10번 배양하였다. 10번째 배양물을 원심분리기를 사용해 수집하고(4000 rpm, 10분, 25°C), 새로운 LBGM 배지와 함께 위상하였다. 원심분리기를 사용하여 세포를 수집한 후(4000 rpm, 10 분, 25°C), 세포 펠렛은 KCCM (Seoul, Korea)에서 분석된 MIS였다. 10번의 연속적인 용매 시험 이후, 전체 세포 지방산을 크로마토그래피를 이용해 분석하였다(표 4).

표 4

Strains (genotype)		BW25113 (wild type)		JW1176 ($\Delta fadR::kan$)		JW5248 ($\Delta marR::kan$)		LMB015 ($\Delta fadR\Delta marR::kan$)	
		<i>n</i> -hexane							
Fatty acids		-	+	-	+	-	+	-	+
SFA	12:0	5.5	3.5	4.7	4.6	5.2	4.1	5.1	5.3
	14:0	6.9	7.2	7.2	9.4	7.1	6.7	11.4	13.0
	16:0	23.7	32.8	39.6	44.5	24.0	29.8	39.7	40.6
	17:0 cyclo	14.7	10.2	15.2	16.6	12.9	15.5	15.0	15.7
	18:0	0.4	0.5	0.4	0.5	0.4	0.6	0.3	0.5
	19:0 cyclo	4.1	2.3	1.3	1.6	3.5	5.0	1.2	1.2
	Others	0.3	0.5	0.3	0.4	0.3	0.5	0.3	1.2
UFA	16:1	0.4	0.2	0.1	nd	0.6	0.5	nd	nd
	18:1	22.2	20.3	8.1	4.9	23.9	21.0	5.5	4.8
	Others	nd	nd	nd	nd	nd	0.1	nd	0.1
Unknown FA		22.1	22.5	23.3	17.5	22.3	16.7	21.5	17.9
Total		100.3	100.0	100.2	100.0	100.2	100.5	100.0	100.3
Total SFA		55.6	57.0	68.7	77.6	53.4	62.2	73.0	77.5
Total UFA		22.6	20.5	8.2	4.8	24.5	21.6	5.5	4.9
ratio SFA/UFA		2.5	2.8	8.4	16.2	2.2	2.9	13.3	15.8

[0062]

[0063]

균주 간의 지방산 조성물 사이의 차이는 팔미트산(palmitic acid, C_{16:0}) 및 박센산(vaccenic acid, C_{18:1})의 비율에서 그 힌트를 얻을 수 있다. *n*-헥산 스트레스가 없을 경우, JW1176($\Delta fadR$)(44.5%) 및 LMB015($\Delta fadR \Delta marR$)(40.6%)에서, 팔미트산 비는 BW25113(wt)(32.8%)에서 보다 12% 및 8% 더 높았다. 반면, 돌연변이체 둘 다 (4.9% 및 4.8%)에서 박센산의 양은 BW25113(20.3%)에서 보다 15% 더 낮았다. BW25113(wt) 및 JW5248($\Delta marR$)사에서는 세포 지방산 조성에 어떠한 유의미한 변화도 없었다. *fad*(지방산 분해) 유전자의 억제자의 결실은 불포화 지방산 박센산의 생합성을 억제하였고, 이에 따라 포화 지방산 팔미트산이 증가하였다.

[0064]

한편, 연속적인 *n*-헥산 스트레스 동안에, 세포 지방산 조성은 크게 변하지 않았다. *n*-헥산 스트레스 후에, 균주 BW25113(wt), JW1176($\Delta fadR$) 및 JW5248($\Delta marR$)의 팔미트산 양은 약 5-9 % 감소하였다. 균주의 박센산 양은 약 2-3% 정도로 다소 증가하였다. 반면, 가장 저항성인 균주 LMB015 ($\Delta fadR \Delta marR$)에서 지방산 양은 헥산 시험 전 및 후에 변화가 없었다. 이러한 결과를 토대로, 유기용매 저항성은 막에서의 지방산 조성 안정성으로부터 기인하는 것으로 유추할 수 있었다.

[0065]

실시예 7: 세포 내 *n*-헥산 축적의 측정

[0066]

유기용매 스트레스 이후 세포 내에 남아있는 *n*-헥산의 양은 용매 저항성의 기준이 된다. 세포 내에 존재하는 유기용매가 적당히, 내부로 유입이 적거나 외부로 배출하는 시스템이 강화된 것을 알 수 있다. 이에, 본 발명자들은 남아있는 *n*-헥산의 축적량을 측정하였다.

[0067]

구체적으로, BW25113, JW1176, JW5248 및 LMB015를 37℃, 180rpm에서 밤새 카나마이신(50 μg/ml)과 함께 3ml LB 배지에서 서브배양하고, 10ml LBGm 배지에서 주 배양물 1%(v/v)로서 접종하였다. 상기 주 배양물을 OD₆₀₀ 값이 1.5 내지 2.0에 이를때까지 37℃, 180 rpm에서 배양하였다.

[0068]

이후, 10%(V/V) 부피 *n*-헥산 배양물을 첨가하였다. 한 시간 배양 후에, 대장균 세포에서 세포 내 *n*-헥산을 공지된 변형방법으로 추출하였다. 8ml 양의 현탁액을 15ml 팔콘 튜브로 옮기고, 10분간 4℃, 4000rpm에서 원심분리하였다. 용매층을 배지층으로부터 제거하고, 배지를 버렸다. 세포 펠렛을 재생하고 0.9% NaCl-10mM MgSO₄ 2ml에서 재현탁시켰다. 2ml 세포 재현탁물을 동일 부피의 CHCl₃와 함께 30초간 볼텍싱시킴으로써 추출하고, 20℃에서 10분 동안 진탕배양하였다. 그 후 30초 동안 다시 볼텍싱시킴으로써 혼합하였다. 4℃, 4000rpm에서 15분 동안 원심분리한 후, 하부 CHCl₃ 층을 Eppendorf 튜브로 옮겼다.

[0069] CHCl_3 추출물 내의 n-헥산의 양은 왁스컬럼($30\text{m} \times 0.32\text{mm} \times 0.25\text{ }\mu\text{m}$; Supelco, Bellefonte, USA)을 사용해 가스 크로마토그래피 분석을 사용해 측정하였다(GC6850N; Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA). $1\text{ }\mu\text{l}$ 의 추출물을 주입하였고, 컬럼을 35ml/분 의 유속에서 N_2 가스를 사용해 용출하였다. 주입구 온도는 230°C 로 하였고, 오븐은 다음과 같이 프로그램하였다: 5분 동안 100°C 그 후 320°C 까지 매 분마다 5°C 씩 올림. 용매는 플레임 이온화 디텍터를 사용해 검출하였다. GC 분석 후에, 결과는 대장균의 일반적인 건조 세포 질량을 사용해 계산하였다($\text{OD}_{600} = 1.0$ 일 때, $280\text{ }\mu\text{g/ml}$). 결과는 각 배양물의 OD_{600} 을 사용해 조정하였다.

[0070] 상기와 같이 n-헥산의 축적량을 측정한 결과, 돌연변이체의 세포내 n-헥산 농도는 야생형보다 현저히 낮은 것을 확인할 수 있었다(표 5). JW1176(ΔfadR), JW5248(ΔmarR) 및 LMB015($\Delta\text{fadR } \Delta\text{marR}$)에서 세포 질량 당 양은 1224, 1234 및 1254 (세포 질량의 ng/mg)으로서, 각각은 야생형과 비교할 때 77%(ΔfadR), 78%(ΔmarR) 및 79%($\Delta\text{fadR } \Delta\text{marR}$)였다. 이러한 결과를 통해, 돌연변이체들의 유기용매 저항성을 다시 한번 확인할 수 있었다.

표 5

Strain	Intracellular amount of n-hexane (ng/mg of cell mass)
BW25113 (Wildtype)	1582
JW1176 (ΔfadR)	1224
JW5248 (ΔmarR)	1234
LMB015 ($\Delta\text{fadR } \Delta\text{marR}$)	1254

[0071]

[0072] 실시예 8: 유기용매 저항성을 증가시키기 위한 추가 도입 및 과발현 유전자 확인: *acrR*

[0073] 상기 실시예들을 통하여 *marR* 및 *fadR* 유전자를 결손시킨 균주가 유기용매에 대한 저항성을 갖는 것을 확인하였는바, 추가로 특정 유전자를 도입 및 과발현시켰을 경우 유기용매에 대한 저항성이 보다 증가할 수 있는지를 알아보고자 하였다.

[0074] 먼저, *acrA*, *acrB*, *acrR*, *cadB*, *cadC*, *tolC*, *betI*, *murB*, *yhiD*, *fabA* 및 *fadR* 유전자, 총 11개의 유전자를 각각 과발현시킨 균주를 이용하여(NBRP, JAPAN), 실시예 3에서와 동일한 방법으로 스팟 어세이를 진행하였다.

[0075] 각각의 세포 배양액을 10^{-2} 에서 10^{-6} 농도까지에서 스팟팅하여 균주의 성장을 확인한 결과, n-헥산을 첨가한 균에서는 다양한 유전자의 과발현 균주가 저항성을 갖는 것을 확인할 수 있었으며, n-헥산:사이클로헥산 혼합액을 첨가한 균에서는 오로지 *acrR* 유전자를 과발현시킨 균주가 높은 저항성을 가져 낮은 농도에서까지 잘 자라는 것을 확인할 수 있었다.

[0076] 실시예 9: *acrR* 유전자 추가 과발현 균주의 제작 및 유기용매 저항성 확인

[0077] 상기 실시예 8에서 선택된 *acrR* 유전자를 추가적으로 과발현시킨 균주를 제작하기 위하여, *fadR* 및 *marR* 유전자가 모두 결손된 돌연변이 균주에 *acrR* 유전자의 과발현 플라스미드를 조합하여 새로운 균주인 *fadR⁻ marR⁻ acrR⁺* ($\Delta\text{fadR } \Delta\text{marR } \text{acrR}^+$)를 제작하였다. 구체적으로, IPTG에 의해 *acrR* 유전자의 발현이 유도되는 플라스미드를 *fadR⁻ marR⁻* 균주에 도입하였다. 계대배양(subculture)한 배양액을 항생제와 함께 1% 접종하여 37°C , 180rpm 으로 배양하여 OD_{600} 값이 약 0.3이 되었을 때, IPTG $200\text{ }\mu\text{M}$ 을 넣어준 후 30~45분 후에 유기용매(n-헥산 10%, n-헥산:사이클로헥산 혼합액 (1:1) 2%)를 넣고 균주의 성장을 관찰하였다.

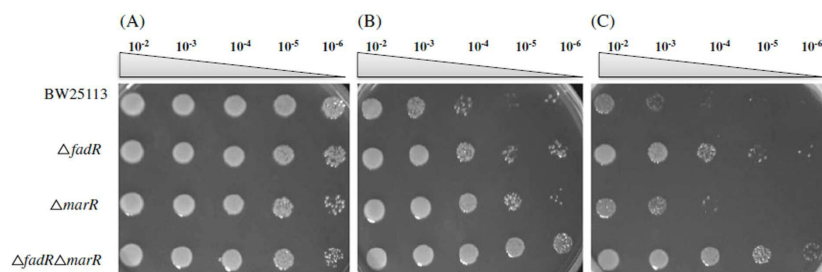
[0078] 야생형 균주(BW25113), *acrR⁺* 균주, *fadR⁻* 균주, *marR⁻* 균주, *fadR⁻ marR⁻* 균주 및 *fadR⁻ marR⁻ acrR⁺* 균주를 대상으로, 실시예 3에서와 동일한 방법으로 스팟 어세이를 진행하였다.

[0079] 각각의 세포 배양액을 10^{-2} 에서 10^{-6} 농도까지에서 스팟팅하여 균주의 성장을 확인한 결과, 기존에 제작한 *fadR⁻ marR⁻* 균주와 유사한 수준으로 유기용매에 대한 저항성을 가져 잘 자라는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 n-헥산에 대해서는 보다 우수한 저항성을 갖는 것을 확인할 수 있었다(도 6).

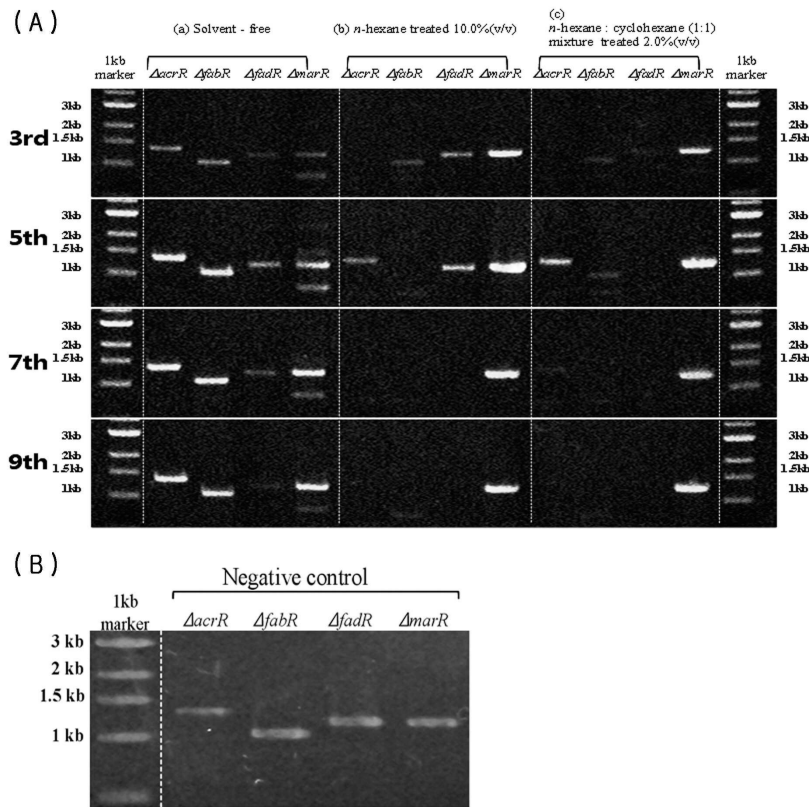
- [0080] 추가로, 실시예 5에서와 동일한 방법으로 세포의 생장을 정량적으로 측정하였다.
- [0081] 그 결과, *fadR*⁻ *marR*⁻ *acrR*⁺ 균주의 경우, *n*-헥산 존재시 및 *n*-헥산:사이클로헥산 존재시 모두에서, *fadR* 및 *marR* 유전자를 모두 결손한 경우보다도 더 높은 수준의 세포 생장을 보임을 확인할 수 있었다(도 7).
- [0082] 이러한 결과를 통하여, *fadR* 및 *marR* 유전자의 결손과 함께 *acrR* 유전자를 도입 및 과발현시키는 경우 유기용매 저항성이 더욱 향상되는 것을 알 수 있었다.
- [0083] **실시예 10: 세포 내 *n*-헥산 축적의 측정**
- [0084] 다음으로, 상기 실시예 9에서 제작된 *fadR*⁻ *marR*⁻ *acrR*⁺ 균주에 대해서도, 세포 내에 축적된 *n*-헥산의 축적량을 측정하였다.
- [0085] 실시예 7에서와 동일한 방법으로 *n*-헥산의 축적량을 측정한 결과, *acrR*⁺ 균주에서는 세포 내 *n*-헥산의 양이 야생형 균주에 비하여 약 60% 감소하여 가장 적은 것을 확인할 수 있었으며, 이와 반대로 *acrR*⁻ 균주에서는 *n*-헥산의 양이 오히려 야생형 균주보다 20% 많아진 것을 확인하였다. 또한, *fadR*⁻ 또는 *marR*⁻ 균주의 세포 내 *n*-헥산의 양은 약 40~50% 감소한 것을 확인할 수 있었다(도 8).
- [0086] **실시예 11: *acrR* 유전자의 조절에 따른 유전자 발현 분석**
- [0087] *acrR* 유전자의 과발현이 어떠한 경로를 통하여 유기용매 저항성을 증가시키는지 유추하기 위하여, *acrR* 유전자가 과발현된 균주가 유기용매에 대한 저항성이 향상된다는 실험결과를 토대로, *acrR* 유전자를 결손시킨 돌연변이체와 과발현시킨 돌연변이체 사이에 유기용매 저항성과 관련된 유전자의 발현을 realtime PCR을 통해 분석하였다.
- [0088] 지금까지 보고된 논문 데이터 결과에 의하면 *acrR*이 대장균의 펌프(pump)를 구성하는 유전자인 *acrA*, *acrB*, *tolC*의 억제제(repressor)로 작용하는 것으로 알려져 있다. 그러나, 유전자 발현 분석 결과, *acrR* 유전자는 *acrA*, *acrB*, *tolC*의 발현에는 영향을 미치지 않는 것으로 분석되었다(도 9). 한편, *acrR* 결손 균주에서는 MDR(multi drug resistance)의 전반적인 조절자(global regulator)인 *marA*의 발현이 매우 증가되었다.

도면

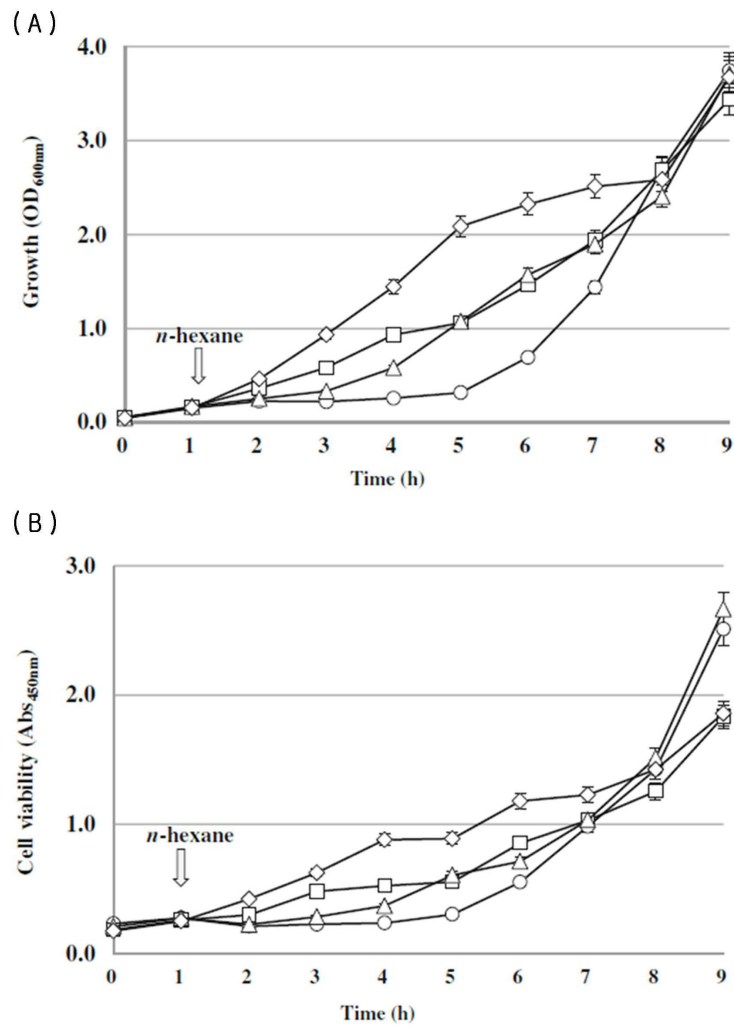
도면1



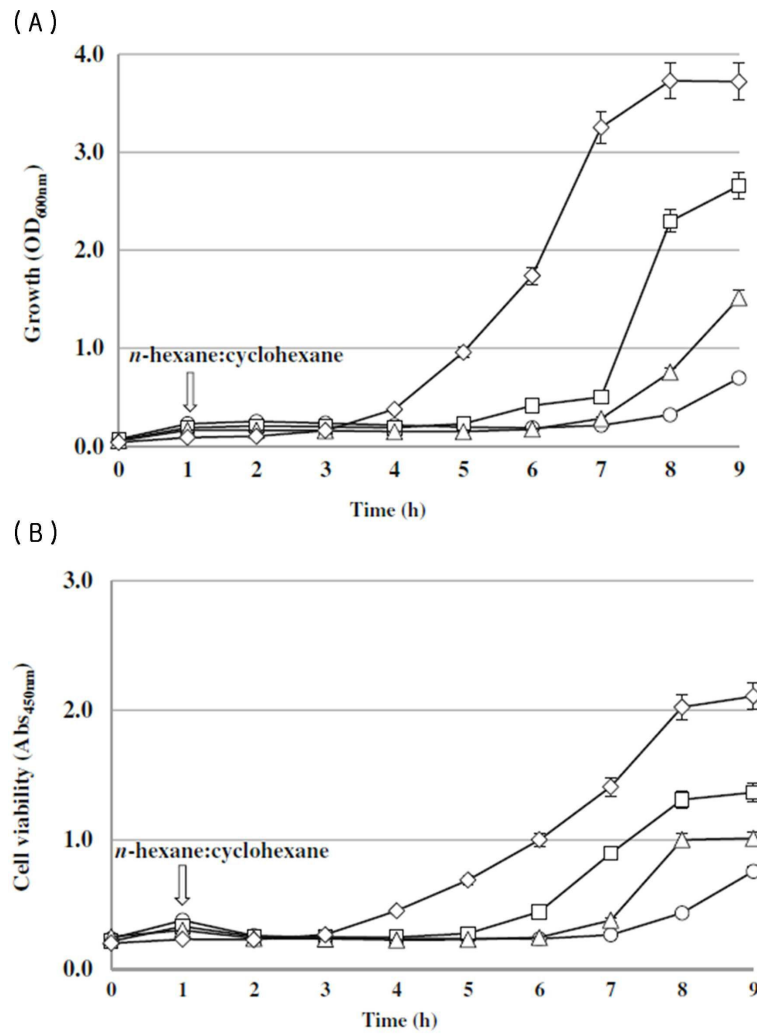
도면2



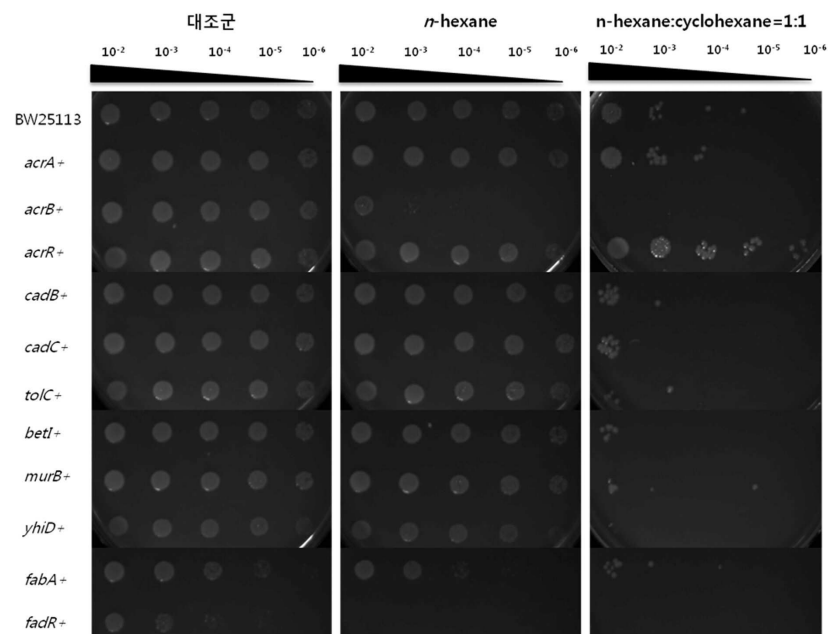
도면3



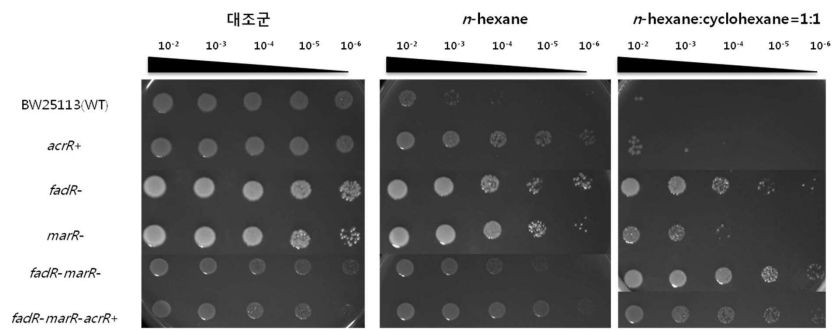
도면4



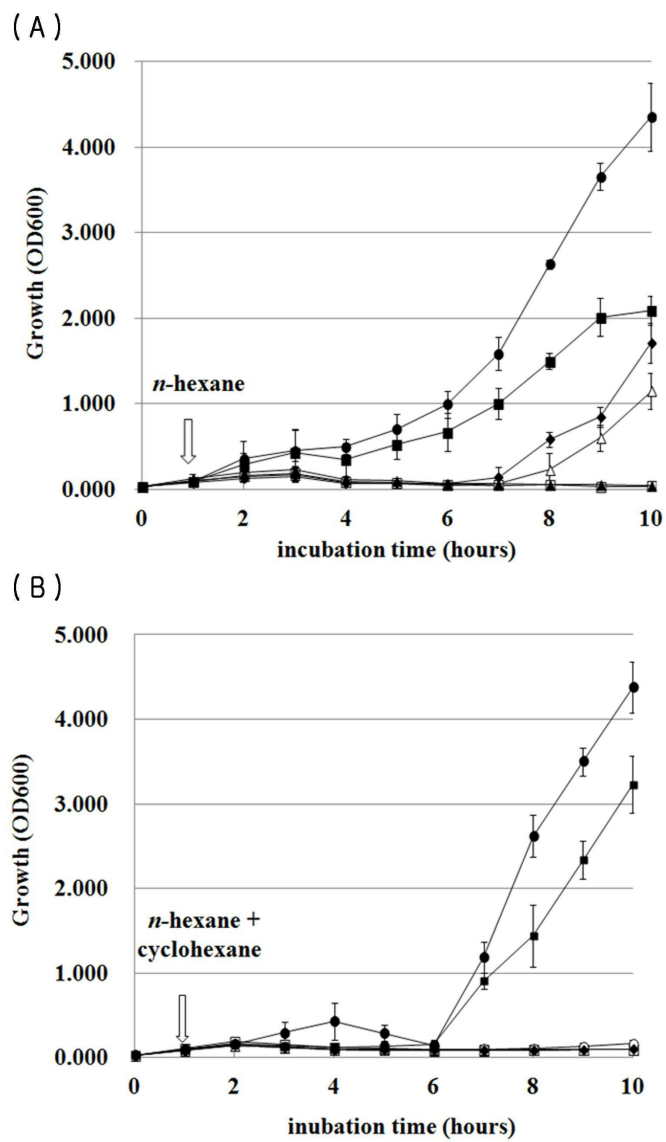
도면5



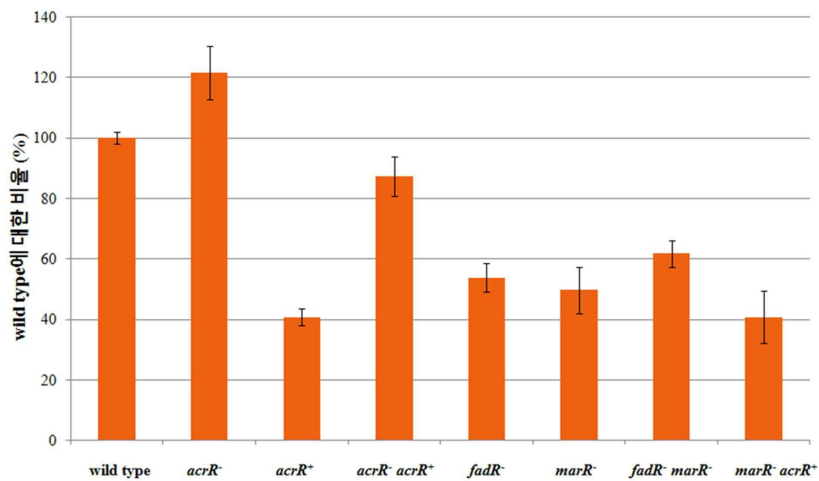
도면6



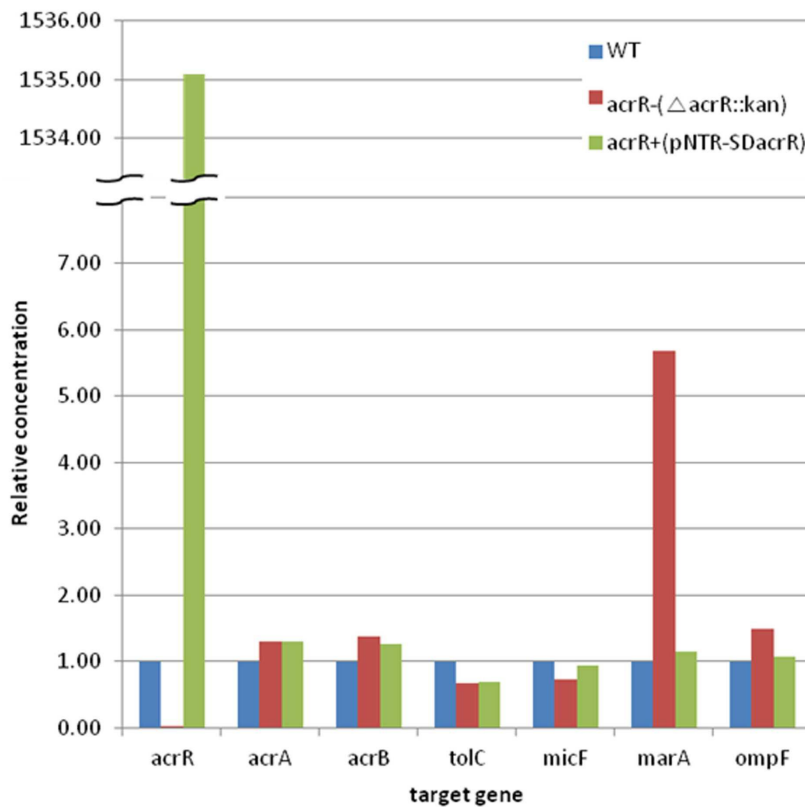
도면7



도면8



도면9



서열 목록

- <110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation
- <120> Bacterial strain having improved organic solvent tolerance and use thereof
- <130> PA130586/KR
- <150> 10-2012-0068835
- <151> 2012-06-26

<160> 8

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 720

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 1

atggtcatta aggcgcaaag cccggcgggt ttcgcggaag agtacattat tgaaagtatc 60

tggaataacc gcttccctcc cgggactatt ttgcccgcag aacgtgaact ttcagaatta 120

attggcgtaa cgcgtactac gttacgtgaa gtgttacagc gtctggcacg agatggctgg 180

ttgaccattc aacatggcaa gccgacgaag gtgaataatt tctgggaaac ttccggttta 240

aatatccttg aaacactggc gcgactggat cacgaaagtg tgccgcagct tattgataat 300

ttgctgtcgg tgcgtaccaa tatttccact atttttattc gcaccgcgtt tcgtcagcat 360

cccgataaag cgcaggaagt gctggctacc gctaataaag tggccgatca ccccgatgcc 420

tttgccgagc tggattacaa catattccgc ggcttggcgt ttgcttccgg caaccgatt 480

tacggtctga ttcttaacgg gatgaaaggg ctgtatacgc gtattggtcg tcactatttc 540

gccaatccgg aagcgcgcag tctggcgcig ggcttctacc acaaactgtc ggcgttgtgc 600

agtgaaggcg cgcacgatca ggtgtacgaa acagtgcgtc gctatgggca tgagagtggc 660

gagatttggc accggatgca gaaaaatctg ccgggtgatt tagccattca ggggcgataa 720

720

<210> 2

<211> 435

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 2

gtgaaaagta ccagcgatct gttcaatgaa attattccat tgggtcgcctt aatccatatg 60

gttaatcaga agaaagatcg cctgcttaac gattatctgt ctccgctgga tattaccgcg 120

gcacagttta aggtgctctg ctctatccgc tgcgcggcgt gtattactcc ggttgaactg 180

aaaaaggtat tgtcggtcga cctgggagca ctgaccgta tgctggatcg cctggtctgt 240

aaaggctggg tggaaggtt gccgaaccg aatgacaagc gcggcgtact ggtaaaactt 300

accaccggcg gcgcggcaat atgtgaacaa tgccatcaat tagttggcca ggacctgcac 360

caagaattaa caaaaaacct gacggcggac gaagtggcaa cacttgagta ttgcttaag 420

aaagtcctgc cgtaa 435

<210> 3

<211> 648

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 3

atggcacgaa aaaccaaaca agaagcgcaa gaaacgcgcc aacacatcct cgatgtggct 60

ctacgtcttt tctcacagca gggggtatca tccacctcgc tgggcgagat tgcaaaagca 120

gtggcggtta cgcgcggcgc aatctactgg catTTTaaag acaagtcgga ttgttcagt 180

gagatctggg aactgtcaga atccaatatt ggtgaactag agcttgagta tcaggcaaaa 240

ttccctggcg atccactctc agtattaaga gagatattaa ttcatgttct tgaatccacg 300

gtgacagaag aacggcgtcg attattgatg gagattatat tccacaaatg cgaatttgc 360

ggagaaatgg ctgttgtgca acaggcaciaa cgtaatctct gtctggaaaag ttatgaccgt 420

atagaacaaa cgTTaaaaca ttgtattgaa gcgaaaatgt tgctgcgga tttaatgacg 480

cgtcgcgcag caattattat gcgcggctat atttccggcc tgatggaaaa ctggctcttt 540

gccccgcaat cttttgatct taaaaaagaa gcccgcgatt acgttgccat cttactggag 600

atgtatctcc tgtgccccac gcttcgtaat cctgccacta acgaataa 648

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> kan2 forward primer

<400> 4

cggtgccctg aatgaactgc 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> marR_pooled_ rev. primer

<400> 5

gcgttcgggc tgcgtctgta 20

<210> 6

<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	marR_pooled_ rev. primer	
<400>	6	
	cggttacgca tcttcgcgcc	20
<210>	7	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	marR_pooled_ rev. primer	
<400>	7	
	ccggttccga ctggctggaa	20
<210>	8	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	marR_pooled_ rev. primer	
<400>	8	
	ggtttgttcc gcaacgcct	20