

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0103187 (43) 공개일자 2012년09월19일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 15/75 (2006.01) C12N 15/31 (2006.01) C12P 21/02 (2006.01) C12R 1/125 (2006.01)	(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울 성북구 안암동5가 1	
(21) 출원번호 10-2011-0021304	(72) 발명자 한성욱 서울특별시 성북구 길음로 119, 대우푸르지오아파트 210동 201호 (길음동)	
(22) 출원일자 2011년03월10일 심사청구일자 2011년03월10일	정주 서울특별시 양천구 신목로16길 30, 103동 1108호 (신정동, 목동현대아파트) 유경옥 서울특별시 강서구 양천로 391 (가양동)	
	(74) 대리인 이처영	

전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **바이오 서펙틴 생산능 향상을 위한 유전자가 도입된 형질전환체 및 그 균주를 이용한 서펙틴 생성방법**

(57) 요약

본 발명은 서펙틴의 생산능이 향상된 재조합백터, 형질전환체 및 그 전환체를 이용한 서펙틴 생산방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)속 미생물 유래의 comX유전자가 도입된 재조합백터 그리고 상기 백터로 형질 전환된 효모 형질 전환체 및/또는 이들을 이용한 서펙틴 생산 증대 방법에 대한 것이다. 본 발명의 바실러스 서브틸리스 속 미생물로부터 유래한 comX는 quorum response와 관련된 몇몇 genes의 발현을 activation시키기 위한 autoinducer로써 작용한다. 따라서 본 연구에서는 comX의 발현을 통하여 SrfA에게 자극을 주어 서펙틴의 생산량이 증대될 수 있도록 제작되어진 형질전환체를 바이오 서펙틴 생산능이 있는 바실러스 서브틸리스에 형질전환 시켜 기존의 야생형과 비교시 서펙틴 생산능이 증가된 재조합체를 제작하였으며 이를 이용한 서펙틴 생산 증대에 관한 것이다.

대표도 - 도5



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2010-0029799

부처명 교육과학기술부

연구사업명 글로벌 프론티어연구개발사업(차세대 바이오매스 연구)

연구과제명 핵심3-바이오매스 전환 기술 개발/세부3-1-바이오연료 전환 플랫폼기술 개발/협동2-바이오매스의 바이오디젤 및 고부가가치 화학물질 생산을 위한 전환기술 개발

주관기관 탄소순환형 바이오매스 생산/전환 기술연구단

연구기간 2010.10.22 ~ 2012.08.21

특허청구의 범위

청구항 1

바실러스 서브틸리스의 comX 유전자를 포함하는 서펙틴의 생산량 증대를 위한 재조합 벡터.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 comX는 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 가지는 단백질을 코딩하는 것을 특징으로 하는 재조합벡터.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 comX는 서열번호 2에 기재된 염기 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 재조합벡터.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 재조합 벡터는 도 2에 기재된 개열지도를 가지는 것을 특징으로 하는 재조합벡터.

청구항 5

제 1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 재조합 벡터를 포함하는 형질전환체.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 형질전환체는 *B. subtilis* pHT43-ComX KCCM11163P인 형질전환체.

청구항 7

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 재조합된 벡터를 바실러스 서브틸리스에 형질전환시키는 단계를 포함하는 서펙틴 생산능이 증대된 형질전환체 제조방법.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 형질전환체는 *B. subtilis* pHT43-ComX인 서펙틴 생산능이 증대된 형질전환체 제조방법.

청구항 9

제 5항 또는 제6항의 형질전환체를 배양하여 그 배양액으로부터 서펙틴을 분리하는 것을 포함하는 서펙틴 생산 방법.

청구항 10

제 5항 또는 제6항의 형질전환체를 유효성분으로 포함하는 서펙틴 생산용 조성물.

명세서

기술 분야

[0001]

본 발명은 서펙틴의 생산능이 향상된 재조합벡터, 형질전환체 및 그 전환체를 이용한 서펙틴 생산방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)속 미생물 유래의 comX유전자가 도입된 재조합 벡터 그리고 상기 벡터로 형질 전환된 효모 형질 전환체 및/또는 이들을 이용한 서펙틴 생산 증대 방법에 대한 것이다. 본 발명의 바실러스 서브틸리스 속 미생물로부터 유래한 comX는 quorum response와 관련된 몇몇 유전자들의 발현을 활성화시키기 위한 autoinducer로써 작용한다. 따라서 본 발명에서는 comX의 발현을 통하여 SrfA에게 자극을 주어 서펙틴의 생산량이 증대될 수 있도록 제작되어진 형질전환체를 바이오 서펙틴 생산능이 있는 바실러스 서브틸리스에 형질전환시켜 기존의 야생형과 비교시 서펙틴 생산능이 증가된 재조합체를 제작하였으며 이를 이용한 서펙틴 생산 증대에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 많은 바실러스 균주는 생명 공학과 약학에서 응용할 수 있는 높은 잠재력을 가진 생활성 펩타이드의 풍부한 원천이다. 이러한 화합물 중 리포펩타이드 서펙틴, 펜지신, 이투린 화합물(이투린, 마이코셉틸린, 바실로마이신)이 잘 알려져 있으며, 이들은 양쪽성 막활성 생계면활성제이고 강한 항균활성이 있는 펩타이드이다. 서펙틴과 이투린 화합물은 β -하이드록시 지방산과 β -아미노 지방산을 포함하고 있는 사이클릭 리포펩타이드이다. 펜지신은 측면 사슬에 β -하이드록시 지방산을 포함하고 있는 리포데카펩타이드이다.
- [0003] 리포펩타이드란 친수성인 펩타이드와 소수성인 지방산으로 구성 되어있는 양쪽성 화합물로 공기/물, 물/오일 사이의 경계면의 표면장력을 감소시키는 생물 유화제의 한 종류로 다양한 종류가 알려져 있다. 이들은 화학적 구조의 특성에 따라 항균력에 변화를 야기한다.
- [0004] 서펙틴은 L-Glu, L-Asp, L-Val, 그리고 두 개의 L-Leu, D-Leu을 친수성 도메인으로, 13~15개의 탄소원자를 소수성 도메인으로 가지는 베타 하이드록시 지방산으로 구성되어져 있다. 서펙틴은 이러한 친수성 구조로 인하여 표면장력을 나타내게 됨으로써 강력한 생물계면활성제로서 사용이 가능하다. (Ishigami et al., 1995, Biointerfaces 4:341-348)
- [0005] 생물계면활성제는 효모, 곰팡이, 박테리아 등 미생물에 의해 생산되는 생분해성 계면활성제를 말하며, 균주에 따라 세포외 또는 세포내에 생성이 된다. 생물계면활성제가 화학합성 계면활성제에 비해 무독성이며 생분해가 용이하기 때문에 이를 사용 시 이차오염원이 되지 않고, 기존의 방법으로는 합성하기 어려운 복잡한 화학구조로 인해서 특수한 목적으로 사용될 수 있는 장점이 있다. 또한, 표면장력 저하능력, 온도, pH에 대한 안정성 등의 계면활성제의 물리, 화학적 성능면에서 기존의 화학합성 계면활성제와 거의 대등한 결과를 보이므로 생물 계면활성제가 매우 유용하게 사용될 수 있는 것이다. 전 세계 계면활성제 시장은 해마다 증가하는 추세에 있지만 이들 대부분은 자체적으로 생분해가 안 되어 환경오염의 원인이 되고 있다.
- [0006] 따라서, 이러한 문제점을 무독성이며 생분해가 용이한 환경친화적인 미생물 계면활성제로 대체함으로써 환경오염을 감소시킬 수 있고, 더 나아가 생물 계면활성제는 화장품, 의약품, 식품, 세제, 펄프 및 제지, 원유의 2차 회수, 환경정화 등의 각 분야에서 광범위하게 응용될 수 있다.
- [0007] 이러한 서펙틴은 산업적으로 이용하기에는 생산성이 낮기 때문에 많은 발명자들이 생산성을 개선시키고자 노력하여 왔다. 카레라(Carrera) 등은 바실러스 서브틸리스 ATCC 21332의 돌연변이 균주로서 바실러스 서브틸리스 ATCC 55033이 2.0 내지 4.0 g/L 농도의 서펙틴을 생산하는 능력을 갖는 것을 개시하고 있다 (일본국 특허 제 3030789호 및 미국 특허 제5227294호). 김(Kim) 등은 탄소원으로서 글루코스를 사용하고, 질소원으로서 NH_4HCO_3 를 사용하여 산소 제한 조건 하에 바실러스 서브틸리스 C9를 배양하면 7.0 g/L농도의 서펙틴을 생산할 수 있음을 개시하고 있다. (Kim et al., 1997, J Ferment Bioeng 84:41-46).
- [0008] 그러나, 이와 같은 개선들은 서펙틴을 산업적으로 이용하도록 제공하는 데 충분하지 못하다. 또한 생산조건의 변화를 통한 방법이나 유전자를 조절하여 서펙틴 생산능을 향상시키는 연구는 미비하다.
- [0009] 서펙틴의 생합성은 서펙틴 합성효소(surfactin synthetase)라고 불리는 거대 효소 복합체에 의하여 생산되는데 이는 subunit-SrfA, SrfB와 SrfC 효소로 구성 되어져 있다.
- [0010] 본 발명에서는 ComX의 발현을 통하여 SrfA에게 자극을 주어 서펙틴의 생산량이 증대될 수 있도록 제작되어진 형질전환체를 이용하였으며 서펙틴 생산량 증대를 이루었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명은 상기의 문제점을 해결하고, 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 바이오서펙틴 생산량이 증대될 수 있도록 개량 되어진 균주를 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 다른 목적은 상기 형질전환체를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 형질전환체를 이용한 서펙틴 생산방법을 제공하는 것이다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 형질전환체를 포함하는 서펙틴 생성용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0015] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 바실러스 서브틸리스의 comX 유전자를 포함하는 서펙틴의 생산량 증대를 위한 재조합 벡터 pHT43-ComX를 제공한다.
- [0016] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 comX는 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 가지는 것이 바람직하나, 서열번호 1에 기재된 단백질에 하나 이상의 치환, 결손, 부가 등의 돌연변이가 유발된 comX 활성을 가진 돌연변이체도 본 발명의 comX에 포함된다.
- [0017] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 comX는 서열번호 2에 기재된 염기 서열을 가지는 것이 바람직하나, 유전자 코드의 디제너러시를 고려하여 상기 서열번호 2에 기재된 염기서열과 80%의 상동성, 바람직하게는 85%의 상동성, 더욱 바람직하게는 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 95%의 상동성을 가지는 유전자도 본 발명의 comX 유전자에 포함된다.
- [0018] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 재조합 벡터는 도 2에 기재된 개열지도를 가지는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0019] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 comX는 바람직하게는 바실러스, 더욱 바람직하게는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 속 미생물 유래인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0020] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 재조합 벡터를 포함하는 형질전환체를 제공한다.
- [0021] 본 발명의 형질전환체는 바실러스, 바람직하게는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 속 미생물 유래인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0022] 본 발명의 바람직한 구체예에 있어서, 상기 형질전환체는 균주 기탁번호가 KCCM11163P인 바실러스 서브틸리스 *B. subtilis* pHT43-ComX인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0023] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 재조합된 벡터 pHT43-ComX를 바실러스 서브틸리스에 형질전환시키는 단계를 포함하는 서펙틴 생산능이 증대된 형질전환체 제조방법을 제공한다.
- [0024] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 형질전환체를 배양하여 그 배양액으로부터 서펙틴을 분리하는 것을 포함하는 서펙틴 생산 방법을 제공한다.
- [0025] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 형질전환체를 유효성분으로 포함하는 서펙틴 생산용 조성물을 제공한다.
- [0026] 본 발명의 서펙틴 생성물 조성물은 예를 들어 상기 형질전환체를 배양하여 서펙틴을 생성하는데 적합한 폴리펩타이드, 브로쓰, 세포 용해물, 정제 또는 정제되지 않은 효소 추출물 또는 폴리펩타이드 등을 포함한다.
- [0027] 또, 재조합벡터에는, 발현의 억제 또는 증폭, 또는 유도를 위한 각종의 기능을 가진 발현억제용의 단편이나, 형질전환체의 선택을 위한 마커나 항생물질에 대한 내성유전자, 또는, 균체밖으로의 분비를 목적으로 한 시그널을 코딩하는 유전자 등을 또 가진 것도 가능하다.
- [0028] 본 발명의 형질전환체를 배양하는 방법은, 숙주의 배양에 사용되는 통상의 방법을 사용하면 된다.
- [0029] 또 배양방법은, 배치(batch)식, 유동배치식, 연속배양, 리액터형식 등, 통상의 미생물의 배양에 사용하는 어떠한 방법도 사용할 수 있다. 대장균 등의 세균을 숙주로 해서 얻게 된 형질전환체를 배양하는 배치로서는, 완전배지 또는 합성배지, 예를 들면 LB배지, NB배지 등을 들 수 있다. 또, 배양온도는 상기 언급한 적온의 범위에서 배양함으로써 comX를 균체 내에 축적시키고, 회수한다.
- [0030] 탄소원은 미생물의 증식에 필요하고, 예를 들면 글루코스, 프럭토스, 슈크로스, 말토스, 갈락토스, 전분 등의 당류; 에탄올, 프로판올, 부탄올 등의 저급알콜류; 글리세롤 등의 다가알콜류; 아세트산, 시트르산, 숙신산, 타르타르산, 락트산, 글루콘산 등의 유기산; 프로피온산, 부탄산, 펜탄산, 헥산산, 헵탄산, 옥탄산, 노난산, 데칸산, 운데칸산, 도데칸산 등의 지방산 등을 이용할 수 있다.
- [0031] 질소원으로서, 예를 들면 암모니아, 염화암모늄, 황산암모늄, 인산암모늄 등의 암모늄염 외에, 펩톤, 고기즙, 효모엑기스, 맥아엑기스, 카제인분해물, 옥수수 침지액 등의 천연물유래의 것을 들 수 있다. 또, 무기물로서는, 예를 들면 인산제 1칼륨, 인산제 2칼륨, 인산마그네슘, 황산마그네슘, 염화나트륨 등을 들 수 있다. 배양액에, 카나마이신, 암피실린, 테트라사이클린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신 등의 항생물질을 첨가해도 된다.
- [0032] 또, 프로모터가 유도성의 발현벡터를 사용해서 형질전환한 미생물을 배양하는 경우는, 프로모터의 종류에 적합

한 유도물질을 배지에 첨가하면 된다. 예를 들면, 이소프로필--D-티오갈락토피라노시드(IPTG), 테트라사이클린, 인돌아크릴산(IAA) 등을 유도물질로서 들 수 있다.

[0033] ComX의 취득은, 얻게 되는 배양물 중으로부터, 균체 또는 상청액을 원심 회수하여, 균체파쇄, 추출, 친화성크로마토그래피, 양이온 또는 음이온교환크로마토그래피, 겔여과 등을 단독으로 또는 적당히 조합함으로써 행할 수 있다.

[0034] 얻게 된 정제물질이 목적의 효소인 것의 확인은, 통상의 방법, 예를 들면 SDS-폴리아크릴아미드겔 전기영동, 웨스턴블로팅등에 의해 행할 수 있다.

[0035] 이하, 본 발명을 설명한다.

[0036] 본 발명은 서펙틴의 생산능이 향상된 재조합백터, 형질전환체 및 그 전환체를 이용한 서펙틴 생산방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)속 미생물 유래의 comX유전자가 도입된 재조합 백터 그리고 상기 백터로 형질 전환된 효모 형질 전환체 및/또는 이들을 이용한 서펙틴 생산 증대 방법에 대한 것이다. 본 발명의 바실러스 서브틸리스 속 미생물로부터 유래한 comX는 quorum response와 관련된 몇몇 genes의 발현을 activation시키기 위한 autoinducer로써 작용한다. 따라서 본 발명에서는 comX의 발현을 통하여 SrfA에게 자극을 주어 서펙틴의 생산량이 증대될 수 있도록 제작되어진 형질전환체를 바이오 서펙틴 생산능이 있는 바실러스 서브틸리스에 형질전환시켜 기존의 야생형과 비교시 서펙틴 생산능이 증가된 재조합체를 제작하였으며 이를 이용한 서펙틴 생산 증대에 관한 것이다.

[0037] 본 발명의 바실러스 서브틸리스 속 미생물로부터 유래한 autoinducer comX의 과발현을 통한 서펙틴의 생산능을 증대함으로써 기존의 야생형의 균주와 비교시 서펙틴 생산능이 증가됨을 확인하였다. 또한, 본 발명에 따라 서펙틴의 생산량이 증대되도록 제작되어진 바실러스 서브틸리스 속 미생물로부터 생산되어지는 서펙틴은 기존의 화학합성계면활성제와 비교시 보다 무독하며 생분해가 용이한 환경친화적인 미생물계면활성제로 이용함으로써 화장품, 의약품, 식품등의 각분야에서 유용하게 사용될 수 있다. 바실러스 서브틸리스의 autoinducer인 comX의 발현결과 기존의 야생형보다 많은 양의 서펙틴을 생성하였다.

[0038] 이하 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0039] 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)속 미생물 유래의 comX유전자가 도입된 재조합 백터 그리고 상기 백터로 형질 전환된 효모 형질 전환체 및/또는 이들을 이용한 서펙틴 생산 증대 방법에 대한 것이다. 본 발명의 바실러스 서브틸리스 속 미생물로부터 유래한 comX는 quorum response와 관련된 몇몇 genes의 발현을 activation시키기 위한 autoinducer로써 작용한다. 따라서 본 발명에서는 comX의 발현을 통하여 SrfA에게 자극을 주어 서펙틴의 생산량이 증대될 수 있도록 제작되어진 형질전환체를 바이오 서펙틴 생산능이 있는 바실러스 서브틸리스에 형질전환 시켜 기존의 야생형과 비교시 서펙틴 생산능이 증가된 재조합체를 제작하였으며 이를 이용한 서펙틴 생산 증대에 관한 것이다.

[0040] 본 발명의 실시예에서는 바실러스 서브틸리스를 주형으로 한 PCR반응을 통하여 comX 168bp의 PCR product를 얻었고, 얻어진 PCR product를 pHT43 백터에 클로닝하여 바실러스 서브틸리스에 형질전환 함으로써 야생형의 균주보다 서펙틴 생산능이 증대된 균주를 제작하였다. 상기 유전자로부터 발현되는 autoinducer의 작용에 의한 서펙틴 생산을 조사하였다.

[0041] 이로써, 본 발명에 따라 재조합되고 형질 전환된 *B. subtilis* pHT43-ComX에 의하여 서펙틴 생산이 증가되는 것을 확인할 수 있었다.

[0042] 따라서 대표적인 서펙틴 생산균주인 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)에서의 서펙틴 생산량 증대를 위하여 본 발명자는 바실러스 서브틸리스로부터 유래한 autoinducer인 comX를 과발현 하였으며 이를 바실러스 서브틸리스 균주에의 형질전환을 통하여 바실러스 형질전환체를 개발하여 이를 대한민국 서울시 서대문구 홍제1동 유림빌딩 소재 한국미생물보존센터(KCCM)에 2011년 1월 7일 기탁번호 KCCM11163P로 기탁하였다. 뿐만 아니라 상기 바실러스 형질 전환체가 과발현됨으로써 서펙틴 생산이 효율적으로 증가한다는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 효과

[0043] 이상 살펴본 바와 같이, 본 발명에서는 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) 속 comX를 과발현하기 위한 유전자가 도입된 재조합백터를 바실러스 서브틸리스 균주에 도입하였다. 이후, 상기 형질전환되어진 바실러스

서브틸리스는 기존의 야생형에 비하여 서펙틴 생산수율이 높아진 것을 확인하였다. 본 발명에 따라 서펙틴을 다량 생산하도록 조작되어진 균주를 이용하여 많은 양의 서펙틴을 생산할 수 있어 매우 유용한 발명인 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0044] 도 1은 본 발명에서 아가로스 겔 전기영동을 수행하여 comX를 인코딩하는 유전자를 확인한 그림이고, Lane 1, 1kb DNA 마커; Lane 2, comX 유전자를 확인한 그림을 나타낸다.
- 도 2는 본 발명에서 제시된 comX 유전자가 삽입된 재조합 벡터 pHT43-ComX의 유전자 삽입하는 재조합 과정을 나타낸 모식도를 나타낸다.
- 도 3은 본 발명에서 제시된 comX의 과발현을 SDS-PAGE를 통하여 확인한 그림이다.
- 도 4는 본 발명에서 comX의 과발현에 의하여 생산되어진 서펙틴의 생산 확인을 위한 그림으로, Lane 1, pHT43 Lane 2, pHT43-ComX
- 4a는 TLC를 이용한 서펙틴의 확인
- 4b는 blood agar를 이용한 생산되어진 서펙틴을 확인한 그림이다.
- 도 5는 본 발명에 의하여 생산되어진 서펙틴을 이용하여 식물탄저균 (Colletotrichum gloeosporioides)에서의 저해능을 확인한 그림이다. Lane 1, pHT43 Lane 2, pHT43-ComX

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0045] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0046] 실시예 1: 바실러스 서브틸리스의 comX를 코딩하는 유전자의 형질전환
- [0047] 실시예 1-1: 바실러스 서브틸리스의 comX 유전자의 증폭
- [0048] 서펙틴 생산을 위한 autoinducer인 ComX pheromone의 과발현을 위하여 comX의 과발현을 sufA를 자극하였으며 이를 통한 서펙틴 생산의 증대를 위하여 유전자를 클로닝하기 위하여 바실러스 서브틸리스의 지노믹디엔에이로부터 펩타이드 부분의 염기서열을 참고로 하여 comX의 클로닝을 위하여 *BamH-F*(5-ggatccatgc aagacctaataacta)(서열번호 3), *BamH-R* (5-ggatccttaa tcacccatt gacg)(서열번호 4)로 각각의 인식서열이 삽입되도록 프라이머를 디자인하여 합성하였다. 이후 상기 합성된 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과 각각 168bp의 PCR 밴드를 확인할 수 있었고 도면 1에 각각 도시하였다.
- [0049] 실시예 1-2: 효모의 comX의 유전자의 클로닝
- [0050] 상기 실시예 1에서 얻은 증폭산물을 0.8% 아가로스 겔 상에서 전기영동하였고 아가로스 겔 상의 DNA 절편은 Biospin gel extraction kit (Bioflux)를 사용하여 회수하였다.
- [0051] 그 후, comX를 *BamH*로 절단한 후 각각의 제한효소로 절단한 후 바실러스 발현벡터인 pHT43에 라이게이션 (ligation)시켜 바실러스 서브틸리스(*B. subtilis*)에 형질전환을 하였다. 이어 형질 전환체로부터 라이게이션 (ligation)된 재조합 플라스미드 DNA를 분리하였다. 상기 재조합 벡터를 pHT43-ComX이라 명명하였으며 이를 그림2에 도식화 하였다.
- [0052] pHT43-ComX의 단백질 발현되는 바실러스의 제조하기 위해서는 Ito And Nagane(Ito M, Nagane M. 2001. Biosci BiotechnolBiochem. 65:2773-2775)의 방법에 따라 일렉트로 바실러스 서브틸리스(Electrocompetent *Bacillus subtilis*)에 제조하였다. pHT43-ComX의 DNA를 2ug을 형질전환용 일렉트로 바실러스 서브틸리스(Electrocompetent *Bacillus subtilis*) 100ul에 첨가하고 Gene-Pulser cuvette에 옮기고, Gene-Pulser(Bio-Rad)를 이용하여 형질전환하였다. LB에 클로람페니콜(5ug/ml)이 첨가된 다량의 고체배지에 도말하여 형질 전환체를 선별하였으며, 이를 *B. subtilis* pHT43-ComX라 명명하였다.

[0053] 실시예 2: 바실러스 형질 전환체를 이용한 서팩틴 생산 확인

[0054] *B. subtilis* pH43-ComX를 LA배지에서 24시간 전배양 후 IPTG에 의하여 유도되어지는 LA배지에 1% 접종하여 30℃, 180rpm에서 배양하며 24시간 배양 후 배양액을 채취하여 TLC와 Blood agar를 이용하여 서팩틴의 생산을 측정하였다. 본 발명을 통하여 유전자 과발현되어진 균주 *B. subtilis* pH43-ComX에서의 서팩틴 생산수율이 *B. subtilis*(pH43)보다 높게 측정이 되었다. 이 결과를 도면 4에 도시하였다.

수탁번호

[0055]

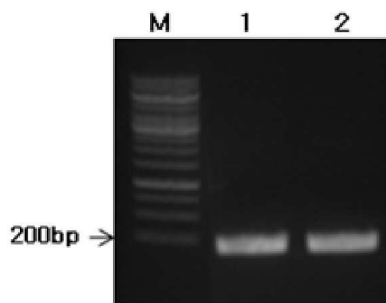
기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

수탁번호 : KCCM11163P

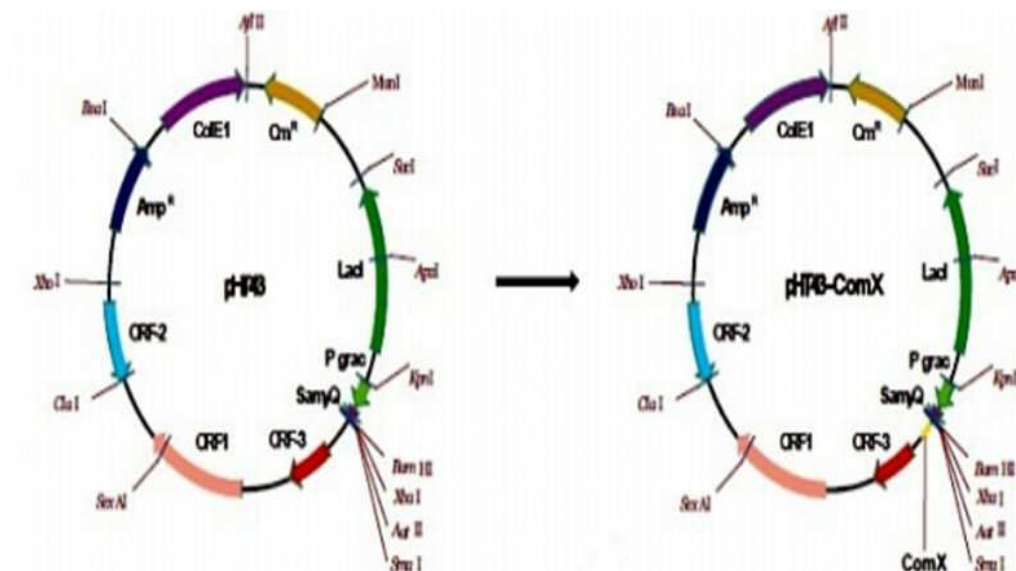
수탁일자 : 20110107

도면

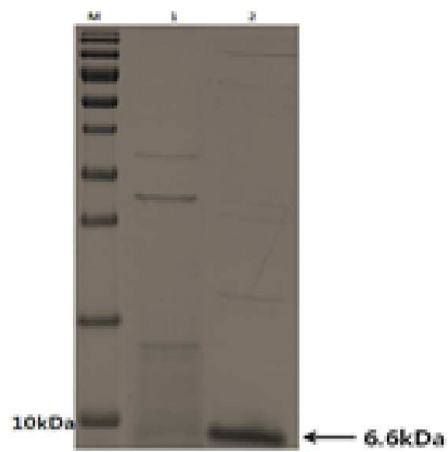
도면1



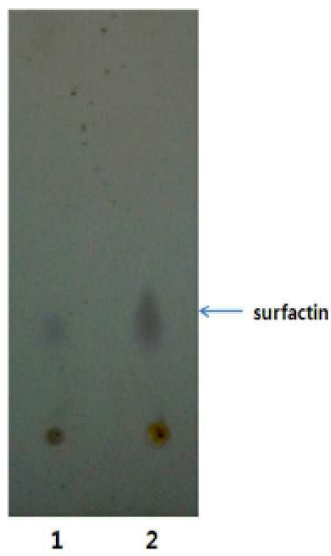
도면2



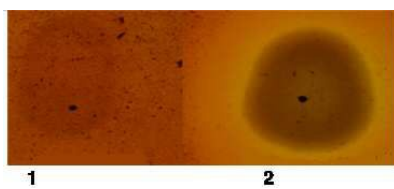
도면3



도면4a



도면4b



도면5



서 열 목 록

<110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION
 <120> Transformant for improving productivity of biosurfactin and
 Method for producing surfactin using the same
 <160> 4
 <170> KopatentIn 1.71
 <210> 1
 <211> 55
 <212> PRT
 <213> Bacillus subtilis
 <400> 1

Met Gln Asp Leu Ile Asn Tyr Phe Leu Asn Tyr Pro Glu Ala Leu Lys

1 5 10 15

Lys Leu Lys Asn Lys Glu Ala Cys Leu Ile Gly Phe Asp Val Gln Glu

20 25 30

Thr Glu Thr Ile Ile Lys Ala Tyr Asn Asp Tyr Tyr Leu Ala Asp Pro

35 40 45

Ile Thr Arg Gln Trp Gly Asp

50 55

<210> 2

<211> 165

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<400> 2

atgcaagacc taattaacta ctttttaaata tatectgagg ctttaaaaaa attgaaaaat 60

aaagaagcct gccttatagg ttttgatgtg caagaaactg aaacaataat taaagcttat 120

aatgattatt atctggctga tccaataacc cgtcaatggg gtgat 165

<210> 3

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 3

ggatccatgc aagacctaat taacta

26

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 4

ggatccttaa tcacccatt gacg

24