



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0155401  
(43) 공개일자 2024년10월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 15/74 (2006.01) C12P 7/18 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
C12N 15/746 (2013.01)  
C12P 7/18 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2023-0051181  
(22) 출원일자 2023년04월19일  
심사청구일자 2023년04월19일

(71) 출원인  
울산과학기술원  
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50  
(72) 발명자  
박성훈  
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50  
칼파나 성  
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50  
(74) 대리인  
특허법인리체

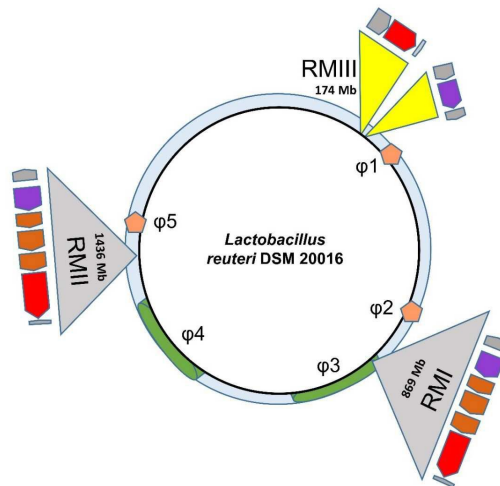
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 락토바실러스 류테리 형질전환체 및 이의 제조 방법

(57) 요약

본 발명은 락토바실러스 류테리의 형질전환체를 제공한다. 보다 상세하게는, 본 발명은 락토바실러스 류테리에서 완전한 바이러스 입자를 생성하는 프로파아지가 결실된 형질전환체를 통해 이를 이용한 1,3-프로판다이올 생산에 있어서 세포 용해를 효과적으로 감소시킬 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

**C12Y 101/01001** (2013.01)

**C12Y 101/01202** (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

|             |                             |
|-------------|-----------------------------|
| 과제고유번호      | 1711158021                  |
| 과제번호        | 2020R1A5A1019631            |
| 부처명         | 과학기술정보통신부                   |
| 과제관리(전문)기관명 | 한국연구재단                      |
| 연구사업명       | 집단연구지원                      |
| 연구과제명       | 미세플라스틱 대응 화공/바이오 융합 공정 연구센터 |
| 기 여 율       | 1/1                         |
| 과제수행기관명     | 울산과학기술원                     |
| 연구기간        | 2021.01.01 ~ 2022.12.31     |

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

서열번호 1의 서열로 이루어진 프로파아지  $\Phi 3$ 을 코딩하는 유전자가 결실된, 락토바실러스 류테리 (*Lactobacillus reuteri*) 형질전환체.

#### 청구항 2

청구항 1에 있어서, 서열번호 2의 서열로 이루어진 프로파아지  $\Phi 4$ 를 코딩하는 유전자의 적어도 일부가 추가로 결실된, 락토바실러스 류테리 형질전환체.

#### 청구항 3

청구항 1에 있어서, adh(alcohol dehydrogenase) 2 또는 6을 코딩하는 유전자가 추가로 결실된, 락토바실러스 류테리 형질전환체.

#### 청구항 4

청구항 1에 있어서, PduQ(1,3-propanediol oxidoreductase)를 코딩하는 유전자와 작동 가능하게 연결된 제조용 프로모터  $P_{\text{dhL}}$ 을 포함하는, 락토바실러스 류테리 형질전환체.

#### 청구항 5

청구항 1 내지 4 중 어느 한 항의 락토바실러스 류테리 형질전환체를 포함하는, 1,3-프로판다이올 생산용 조성물.

#### 청구항 6

락토바실러스 류테리 (*Lactobacillus reuteri*)에서 서열번호 3의 서열로 이루어진 RM(Restriction-Modification) 시스템 I을 코딩하는 유전자를 제거하는 단계; 및

이후 서열번호 2의 서열로 이루어진 프로파아지  $\Phi 4$ 를 코딩하는 유전자의 적어도 일부를 제거하는 단계를 포함하는, 락토바실러스 류테리 형질전환체 제조 방법.

#### 청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 RM 시스템 I을 코딩하는 유전자의 제거는, 이를 포함하는 서열번호 1의 서열로 이루어진 프로파아지  $\Phi 3$ 을 코딩하는 유전자를 제거하는 것인, 락토바실러스 류테리 형질전환체 제조 방법.

## 발명의 설명

## 기술 분야

[0001] 본 발명은 락토바실러스 류테리의 형질전환체에 관한 것으로, 1,3-프로판다이올 생산 분야에서 활용될 수 있다.

## 배경 기술

[0002] 락토바실러스 류테리(*Lactobacillus reuteri*)는 인간의 위장관을 포함한 다양한 자연 환경에서 발견되는 유산균(lactic Acid Bacteria: LAB)이다. LAB은 GRAS (Generally Regarded As Safe) 미생물로, 음식 첨가제나 사료 첨가제로 사용 가능한 유익한 미생물(probiotic)이다.

[0003] 락토바실러스 류테리는 젖산, 류테린, 3-하이드록시프로피오산(3-HP) 및 1,3-프로판다이올(1,3-PDO)과 같은 대사산물 생산에 적합하지만, 세포 성장 또는 스트레스 상황에서 이러한 대사산물을 생산하는 동안 균주 불안정성, 즉 세포 용해로 인해 그 사용이 제한되고 있는 실정이다. 예를 들어, 1,3-프로판다이올 생산 중 락토바실러스 류테리는 발효 후반에 심각한 세포 용해를 나타낸다. 특히 1,3-프로판다이올 생산을 향상시키기 위하여 에탄올 생성을 촉진하는 2개의 알코올 디하이드로제나제 유전자(adh2 및 adh6)를 제거한 경우 세포 용해가 더욱 심각해진다. 이러한 균주 불안정성은 락토바실러스 류테리 균주 및 이를 사용하는 발효 공정의 개발에 심각한 걸림 사유로 작용하고 있다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) 한국 공개특허 제2022-0144624호

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 1,3-프로판다이올 생산능이 향상된 락토바실러스 류테리 형질전환체 및 이의 제조 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0006] 본 발명은 락토바실러스 류테리 형질전환체를 포함하는 1,3-프로판다이올 생산용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

### 과제의 해결 수단

[0007] 1. 서열번호 1의 서열로 이루어진 프로파아지 Φ3을 코딩하는 유전자가 결실된, 락토바실러스 류테리(*Lactobacillus reuteri*) 형질전환체.

[0008] 2. 위 1에 있어서, 서열번호 2의 서열로 이루어진 프로파아지 Φ4를 코딩하는 유전자의 적어도 일부가 추가로 결실된, 락토바실러스 류테리 형질전환체.

[0009] 3. 위 1에 있어서, adh(alcohol dehydrogenase) 2 또는 6을 코딩하는 유전자가 추가로 결실된, 락토바실러스 류테리 형질전환체.

[0010] 4. 위 1에 있어서, PduQ(1,3-propanediol oxidoreductase)를 코딩하는 유전자와 작동 가능하게 연결된 제조합 프로모터 P<sub>ldhL</sub>을 포함하는, 락토바실러스 류테리 형질전환체.

[0011] 5. 위 1 내지 4 중 어느 한 항의 락토바실러스 류테리 형질전환체를 포함하는, 1,3-프로판다이올 생산용 조성물.

[0012] 6. 락토바실러스 류테리(*Lactobacillus reuteri*)에서 서열번호 3의 서열로 이루어진 RM(Restriction-Modification) 시스템 I을 코딩하는 유전자를 제거하는 단계; 및 이후 서열번호 2의 서열로 이루어진 프로파아지 Φ4를 코딩하는 유전자의 적어도 일부를 제거하는 단계를 포함하는, 락토바실러스 류테리 형질전환체 제조 방법.

[0013] 7. 위 6에 있어서, 상기 RM 시스템 I을 코딩하는 유전자의 제거는, 이를 포함하는 서열번호 1의 서열로 이루어진 프로파아지 Φ3을 코딩하는 유전자를 제거하는 것인, 락토바실러스 류테리 형질전환체 제조 방법.

## 발명의 효과

- [0014] 본 발명 형질전환체는 기존 락토바실러스 류테리를 이용한 1,3-프로판다이올 생산에 있어 균주의 불안정성으로 인한 문제를 해결한다. 구체적으로, 본 발명 형질전환체는 세포 용해현상이 억제되고, 세포 생장이 증대되어 높은 1,3-프로판다이올 생산 효율을 달성할 수 있다.
- [0015] 본 발명은 상기 형질전환체를 제조 방법을 제공하며, 이를 통해 높은 전환 효율로 락토바실러스 류테리 형질전환체를 제조할 수 있다.

## 도면의 간단한 설명

- [0016] 도 1은 *L. reuteri* DSM 20016의 게놈 분석 결과를 도식화한 것이다. 기능적으로 완전한 프로파아지 ( $\Phi 3$  및  $\Phi 4$ : 초록색) 및 불완전 프로파아지 ( $\Phi 1$ ,  $\Phi 2$  및  $\Phi 5$ : 주황색 마름모), RM-시스템과 그들의 유전자 배열을 나타내었다. 파란색: DNA 메틸화효소/메틸 전달효소; 주황색: 특이성 도메인을 가지는 단백질; 빨간색: 추정 제한효소; 회색: 기능이 미분류된 유전자.
- 도 2는 adh 제거에 대한 실험 결과이다. (A) 플라스크 규모에서의 세포 성장 프로파일. (B) 플라크 형성 단위 (plaque forming unit; Pfu) (Pfu/ml)로 정량화한 바이러스 생산.
- 도 3은 파지 용해물로 재감염된 *L. reuteri* 균주(LR1)의 성장을 실험한 결과이다. (a) 글리세롤 미포함. (b) 글리세롤 포함. 대조군: 용해물 미첨가. 0.3~0.4 OD600의 LR1 배양(글리세롤 첨가 또는 미첨가)에 0.5%(v/v) LR2/LR3의 파지 용해물을 보충했다.
- 도 4는 포도당-글리세롤 발효의 다양한 부산물에 의한 LR1 균주에서의 프로파지의 활성화를 실험한 결과이다.
- 도 5는 프로파아지가 제거된 *L. reuteri* 균주의 특성을 조사한 결과이다. (A, B) LR2 (빨간색 원), LR8 (초록색 삼각형) 및 LR9 (연보라색 사각형)의 성장 프로파일. 미토마이신 C (0.5 ug/mL)의 부재 (A)와 존재 조건 (B)에서 세포성장을 조사하였다. (C) LR2, LR8 및 LR9의 파아지 생산. (D, E) LR3 (초록색 원), LR10 (갈색 삼각형) 및 LR11 (연보라색 사각형)의 성장 프로파일. 미토마이신 C (0.5 ug/mL)의 부재 (D)와 존재 조건 (E)에서 세포성장을 조사하였다. (F) LR2, LR8 및 LR9의 파지 생산. (C, F)에서 파지 생산은 미토마이신 C 포함 배지에서 성장한 세포 상등액의 Pfu/ml을 측정하였다.
- 도 6은 PduQ 발현 증대를 위한 프로모터 실험 결과이다. (A)  $P_{gly}$ ,  $P_{nisin}$  또는  $P_{ldhL}$  프로모터 하에서 발현된 PduQ의 crude-cell 효소 활성. pNZ8148은 빈 벡터로서 대조군으로 사용되었다. (B) PduQ 발현이 세포 성장 및 대사 생성물에 미치는 영향. 플라스크 실험 (10시간 후) 종료 시점에서 측정하였다.
- 도 7은 프로파아지 제거와 PduQ++ 과발현이 유가식 생물반응기 실험에서 1,3-PDO 생산에 미치는 영향을 실험한 결과이다. (A,B) LR2, (C,D) LR9. 두 균주 모두  $P_{ldhL}$  프로모터에 의해 PduQ가 과발현되었다.
- 도 8은 프로파아지 제거 및 PduQ++ 과발현이 유가식 배양 생물반응기 실험에서 1,3-PDO 생산에 미치는 영향을 실험한 결과이다. (A,B) LR3. (C,D) LR11. 양 균주 모두 PduQ는  $P_{ldhL}$  프로모터에 의해 과발현되었다.
- 도 9는 프로파아지 및 제한-수정(RM) 시스템 제거에 따른 외래유전자 도입 효율 변화를 실험한 결과이다. (A) 고 복제수(pNZ8148) 및 중 복제수(pSIP411) 플라스미드를 사용하여 다양한 LR-균주에서 효율 비교 (B) 전기 충격에 따른 세포 생존율의 비교.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0019] 본 발명은 서열번호 1의 서열로 이루어진 프로파아지  $\Phi 3$ 을 코딩하는 유전자가 결실된, 락토바실러스 류테리 (*Lactobacillus reuteri*) 형질전환체에 관한 것이다.
- [0020] 상기 형질전환체는 서열번호 2의 서열로 이루어진 프로파아지  $\Phi 4$ 를 코딩하는 유전자의 적어도 일부가 추가로 결실될 수 있다. 즉 상기 프로파아지  $\Phi 4$ 의 전체 또는 일부가 결실될 수 있고, 예를 들면 상기 서열번호 2의 서열의 연속 또는 불연속하는 서열 50%, 60% 또는 70% 이상이 결실된 것일 수 있고, 이의 상한은 60%, 70%, 80%,

90% 또는 100% 이하로 표시될 수 있다.

- [0021] 상기 락토바실러스 류테리(*Lactobacillus reuteri*)는 글리세롤로부터 1,3-프로판다이올 생성에 이용되는 미생물이다. 예컨대 글리세롤 및 포도당 존재 하에 상기 미생물을 배양하여, 대사산물로 1,3-프로판다이올을 수득할 수 있다.
- [0022] 상기 프로파아지  $\Phi 3$  및 4는, 본원 도 1에서 도식한 바와 같이, 락토바실러스 류테리 게놈이 포함하는 다섯 종류의 프로파아지의 일부이다. 나머지  $\Phi 1$ , 2 및 5와 달리,  $\Phi 3$  및 4는 완전한 형태로서 활성화 될 경우 완전한 파아지 입자를 생성할 수 있다. 본 발명 형질전환체는, 상기 프로파아지  $\Phi 3$ , 4를 코딩하는 유전자가 결실됨으로써, 락토바실러스 류테리로부터의 파아지 생성을 감소 또는 제거시킬 수 있다.
- [0023] 이를 통해 본 발명 형질전환체는, 1,3-프로판다이올 생산과 같은 스트레스 환경에서의 세포 용해(cell lysis)가 효과적으로 감소한다.
- [0024] 상기 스트레스 환경은 예를들면 산성 pH나, 단쇄지방산(SCFAs)의 존재, 예를 들면 아세트산, 프로피온산, 부티르산 또는 3-HP(hydroxypropionic acid)에 의한 것일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0025] 상기 형질전환체는, adh(alcohol dehydrogenase) 2 또는 6을 코딩하는 유전자가 추가로 결실된 것일 수 있다.
- [0026] 상기 adh 2 또는 6은 알코올 탈수소효소로 에탄올 생성을 촉진한다. 에탄올 생산은 1,3-프로판다이올 생산에 사용될 수 있는 NADH를 소비하기 때문에, 상기 효소를 코딩하는 유전자가 결실됨으로써 1,3-프로판다이올 생산능을 더욱 높이는 효과를 가진다.
- [0027] 상기 adh 2 또는 6의 결실은 세포 내 NADH 농도를 높이므로써 균주의 세포 용해가 촉진되는 단점이 있으나, 본 발명 형질전환체에서는 상기 프로파아지가 결실됨으로써 이러한 문제가 해결되므로 이들 조합을 통해 더욱 높은 1,3-프로판다이올 생산 효율을 달성할 수 있다.
- [0028] 예컨대 본 발명의 일 실시예에서, adh2, adh6,  $\Phi 3$ ,  $\Phi 4$ 가 결실된 락토바실러스 류테리 균주는("LR11 pduQ++"), 에탄올 생산에 사용되던 NADH가 1,3-PDO 생산으로 완전히 사용되어 이상적인 수율을 보인다(실시예 1의 5. 참조).
- [0029] 상기 형질전환체는, PduQ(1,3-propanediol oxidoreductase)를 코딩하는 유전자와 작동 가능하게 연결된 재조합 프로모터  $P_{\text{ldhL}}$ 을 포함하는 것일 수 있다.
- [0030] 상기  $P_{\text{ldhL}}$  프로모터는 락토바실러스 아시도필루스(*Lactobacillus acidophilus*)에서 유래한 것일 수 있다. 이는 *L. acidophilus* 표면층 단백질 유전자(slp)나 enterococcal rRNA 아테닌 N6-메틸트랜스퍼아제 유전자(ermB)와 같은 프로모터보다 높은 eGFP 발현을 보이는 강한 프로모터 중 하나이다. 상기  $P_{\text{ldhL}}$ 의 도입을 통해, 이와 연결된 PduQ의 발현을 증대시킬 수 있다.
- [0031] 구체적으로, PduQ는 1,3-PDO 산화환원효소로 1,3-PDO 생산을 위해 NADH를 소비하므로, 이 효소의 발현을 증대시킴으로써 포도당-글리세롤 혼합 발효에서 세포 내 NADH 농도를 감소시키고, 결과적으로 세포 성장을 촉진할 수 있다.
- [0032] 이는 전술한 adh 2 또는 6 효소의 결실이 NADH를 축적시켜 세포 성장을 저해하는 문제를 해결하므로, 이들 조합을 통해 더욱 높은 1,3-프로판다이올 생산 효율을 달성할 수 있다.
- [0033] 예컨대 본 발명의 일 실시예에서,  $P_{\text{ldhL}}$ 을 갖는 균주는  $P_{\text{nisin}}$ 을 갖는 균주와 비교하여 1,3-PDO 생산량이 21% 증가하고, 세포 농도는 44% 증가한다(실시예 1의 4. 참조)
- [0034] 또한, 본 발명은 상기 락토바실러스 류테리 형질전환체를 포함하는, 1,3-프로판다이올 생산용 조성물을 포함한다.
- [0035] 상기 조성물에서의 형질전환체에 대한 구체적인 설명 및 이를 이용한 1,3-프로판다이올 생산의 원리, 효과에 대한 설명은 전술한 바와 같으므로 중복을 피하기 위해 생략한다. 상기 조성물은 필요에 따라 1,3-프로판다이올 생산을 위한 다른 물질을 당업자에 의해 추가적으로 포함하는 것일 수 있다.
- [0037] 또한 본 발명은 락토바실러스 류테리(*Lactobacillus reuteri*)에서 서열번호 3의 서열로 이루어진 RM(Restriction-Modification) 시스템 I을 코딩하는 유전자를 제거하는 단계; 및 이후 서열번호 2의 서열로 이

루어진 프로파아지  $\Phi 4$ 를 코딩하는 유전자의 적어도 일부를 제거하는 단계를 포함하는, 락토바실러스 류테리 형질전환체 제조 방법에 관한 것을 포함한다.

[0038] 상기 RM 시스템은 박테리아 및 원핵 생물에서 발견되는 외부 DNA에 대한 방어를 제공하는 시스템을 의미한다. 본원 도 1에 도식화된 것과 같이, 락토바실러스 류테리 균주에서 RM 시스템 I, II, III가 발견되며 이 중 RM 시스템 I은 프로파아지  $\Phi 3$ 내에 존재한다.

[0039] 상기 유전자의 제거는, 공지의 형질전환 방법을 이용하여 당업자에 의해 선택될 수 있으며 특별히 제한되지 않는다. 상기 형질전환은 제조된 재조합 DNA를 숙주세포 내 도입하여 숙주세포 내에서 해당 폴리뉴클레오티드가 코딩하는 단백질이 발현될 수 있도록 하는 것을 의미한다. 이러한 도입의 형태는 제한되지 않으며, 예를들면 전기천공법(electroporation)을 통해 도입될 수 있다.

[0040] 상기 방법은, 락토바실러스 류테리에서 RM 시스템 I을 먼저 제거함으로써, 이후 프로파아지  $\Phi 4$  유전자 제거를 위한 외래 유전자 도입 효율을 높일 수 있다. 이를 통해, 높은 효율로 상기 프로파아지가 제거된 1,3-프로판다이올 생성능이 증대된 락토바실러스 류테리 형질전환체를 제조할 수 있다.

[0041] 상기 RM 시스템 I은 전술한 바와 같이 프로파아지  $\Phi 3$ 에 포함되는 것이므로, 이를 포함하는 서열번호 1의 서열로 이루어진 프로파아지  $\Phi 3$ 을 코딩하는 유전자의 제거를 통해 달성되는 것일 수 있다.

[0042] 예컨대 본 발명의 일 실시예에서, adh2, adh6 및  $\Phi 3$ 이 제거된 형질전환체 균주("LR10")은 외래 유전자 도입 효율이 약 200배 증가한다(실시예 1의 6. 참조).

[0043] 상기 방법으로 제조된 형질전환체는 스트레스 환경에서의 세포 용해가 감소하는 효과를 가진다.

[0044] 또한, 상기 방법은 adh(alcohol dehydrogenase) 2 또는 6을 코딩하는 유전자를 결실시킨 것일 수 있다. 이를 통해 NADH를 소비하는 에탄올 생성을 감소시켜 1,2-프로판다이올의 생산을 높일 수 있다.

[0045] 또한, 상기 방법은 PduQ(1,3-propanediol oxidoreductase)의 발현을 증대시키는 단계를 포함할 수 있다. 이는 세포 성장을 촉진시킬 수 할 수 있으며, 구체적으로 상기 adh 2 또는 6의 제거로 인해 감소된 세포 성장을 촉진시키는 것일 수 있다. 일 실시예에서, 상기 PduQ 발현 증대는  $P_{\text{ldh}}$ 과 같은 강력한 프로모터의 도입을 통해 이루어질 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0046] 상기 형질전환체에 대한 구체적인 설명 및 이를 이용한 1,3-프로판다이올 생산의 원리, 효과에 대한 설명은 전술한 바와 같으므로 중복을 피하기 위해 생략한다.

[0048] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것으로, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

#### [0050] 실시예 1

[0051] 본원 실시예에서 사용된 균주 및 플라스미드를 정리하면 하기 표 1 및 2와 같다. 본원 실시예의 구체적인 실험 방법은 실시예 2에서 후술하였으며, 하기 표 1에서 "Δ"는 해당 유전자의 결실, "RM"은 Restriction modification system을 의미한다.

[0052] [표 1]

| 균주                  | 설명                                                   | 출처                 |
|---------------------|------------------------------------------------------|--------------------|
| LR1                 | 야생형 <i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 20016           | KCTC               |
| LR2                 | <i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 20016 Δ adh2        | Singh et al, 2021* |
| LR3                 | <i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 20016 Δ adh2 Δ adh6 | Singh et al, 2021* |
| LR8                 | LR2 Δ $\Phi 3$ (Δ RM1)                               | 본 발명               |
| LR9                 | LR8 Δ $\Phi 4$                                       | 본 발명               |
| LR10                | LR3 Δ $\Phi 3$ (Δ RM1)                               | 본 발명               |
| LR11                | LR10 Δ $\Phi 4$                                      | 본 발명               |
| LR12                | LR11 Δ RM2                                           | 본 발명               |
| LR13                | LR12 Δ RM3                                           | 본 발명               |
| <i>E. coli</i> 1000 | pVPL3002의 클로닝 호스트                                    | ATCC               |

[0053]

[0054] \*Singh K, Ainala SK, Park S. Metabolic engineering of *Lactobacillus reuteri* DSM 20,016 for improved 1, 3-propanediol production from glycerol. *Bioresource technology*. 2021 Oct 1;338:125590.

[0055] [표 2]

| 플라스미드                      | 설명                                                         |
|----------------------------|------------------------------------------------------------|
| pVPL3002                   | <i>L. reuteri</i> 유래 ddIF258Y를 보유한 EmR, pORI19             |
| pSIP411                    | EmR, pSIP401(SH71rep 포함)                                   |
| pN28148                    | CmR, 니친 기반 발현 벡터                                           |
| pN28148 Pnisin <i>pduQ</i> | Pnisin 프로모터 하에서 <i>pduQ</i> 발현                             |
| pN28148 Pgly <i>pduQ</i>   | <i>L. reuteri</i> 유래 Pgly 프로모터 하에서 <i>pduQ</i> 발현          |
| pN28148 PldhL <i>pduQ</i>  | <i>L. acidophilus</i> 에서 유래한 PldhL 프로모터 하에서 <i>pduQ</i> 발현 |

[0056]

[0057] 1. *adh* 변이주의 프로파아지 활성 조사

[0058] (1) *adh* 변이주의 바이러스 생산 및 세포 성장

[0059] 야생형 균주(LR1), *adh2* 단일 제거 변이체(LR2) 및 *adh2 adh6* 이중 제거 변이체(LR3)에서 세포 성장 및 바이러스 생산을 비교하였다(도 2). *adh* 제거 변이체는 야생형 균주에 비해 세포 성장이 감소하고 바이러스 생산이 증가하였다. 이때, 바이러스 생산은 plaque assay로 plaque forming unit (Pfu)를 측정하여 분석하였다. 이중 제거 변이체(LR3)는 8시간 후에 유의한 세포 밀도 감소와 LR1 대비 >150배 더 높은 Pfu 수를 나타내었다. 또한, 미토마이신 C가 배양액에 첨가될 경우 바이러스 생산 및 세포 용해가 크게 증가하였다.

[0060] 만일 프로파아지가 활성화된다면 배양상등액, 특히 LR2와 LR3에서 배양 상등액에 활성 바이러스 입자가 다량 포함되어 있을 것이라는 추측이 가능하다. 이 경우 이 상등액을 신선한 배지에 첨가하고 균주를 접종하면 이들 바이러스가 균주를 감염시켜 세포 성장을 억제하게 될 것이다. 이 가능성을 조사하기 위해 바이러스가 포함되어 있을 것으로 추정되는 상등액을 LR1의 배양 배지에 첨가하여 LR1 균주의 성장에 미치는 영향을 조사하였다(도 3).

[0061] 도 3의 A는 전자 수용체로서의 글리세롤이 없는 경우로, 세포 성장은 다음 순서대로 감소했다: 대조군(LR1의 상등액) > LR2 > LR3.

[0062] 도 3의 B는 글리세롤이 존재하는 경우로, LR3 배양 상등액에 의해만 LR1 세포 성장 억제가 나타났다. 이러한 결과는 특히 LR3와 같은 *adh* 변이체가 더 많은 활성 바이러스 입자를 생산할 수 있으며 이러한 입자가 *L. reuteri* 숙주 세포를 감염시켜 세포를 죽일 수 있다는 가정을 지지해준다.

[0064] (2) 프로파아지 활성 물질

[0065] 단쇄지방산(SCFAs) 및 본 발명에서 생산되는 알코올에 의한 프로파아지의 활성화 유도 효과를 아세트산, 락테이트, 에탄올, 1,3-PDO 및 3-HP를 사용하여 확인하였다(도 4). 각 대사산물이 다양한 농도로 첨가된 MRS 배지에서 야생형 LR1 균주를 24 시간 동안 배양하였다. 다양한 양의 부산물이 보충된 배양 상등액에서 Pfu에 의해 파지 생성을 정량화했다.

[0066] 아세트산 또는 3-HP의 농도가 증가함에 따라 Pfu는 지수 함수적으로 증가하여 이들 유기산이 농도 의존적으로 프로파아지 활성화를 자극한다는 것을 알 수 있었다. 그러나 락테이트, 에탄올 또는 1,3-PDO에서는 이러한 유도가 관찰되지 않았으며, 이들 대사산물에 대해 60 mM까지 ~10 Pfu/mL의 일정한 수준의 타이터를 보여 주었다. 3-HP가 자신의 구조 이성질체인 락테이트와 전혀 다른 효과를 나타낸다는 것이 매우 놀랍다. 또한 이 결과는 포도당-글리세롤 공동 발효로 생성되는 아세트산 및 3-HP가 프로파아지 활성화를 유도하며 이에 따른 세포 사멸로 인해 1,3-PDO의 생산이 저해될 수 있음을 나타낸다.

[0068] 2. 프로파아지 결실 균주의 제작 및 특성 규명

[0069] 전통적인 상동유전자 서열 재결합 방법과 벤코마이신 기반의 역선택 방법을 사용하였다(자세한 내용은 실시예 2. 참조). LR2 및 LR3 균주로부터 두 가지 프로파아지를 순차적으로 제거하여 LR8 (LR2ΔΦ3), LR9 (LR2ΔΦ3ΔΦ4), LR10 (LR3ΔΦ3), LR11 (LR3ΔΦ3ΔΦ4) 균주를 확보하였다. 프로파아지 ΔΦ3(Lreu\_07960876, 총 58.3 kb)은 완전히 제거되었으며, 프로파아지 ΔΦ4 (Lreu\_11481089, 총 48.5 kb)는 Lreu\_1107와 Lreu\_1148 사이의 유전자 중 일부가 파괴되었으며, 총 29.8 kb이었다. LR9 또는 LR11에서 제거된 프로파아지 유전자의 총 길이는

*L. reuteri*의 게놈의 4.8%인 88.1 kb이었다. 이러한 변종 균주에서 각 프로파아지가 제거될 때 적어도 하나의 att-site가 제거되었다. 따라서 이 변이주 *L. reuteri* 균주의 경우  $\Delta\Phi3$  혹은  $\Delta\Phi4$ 가 재감염 할 경우 염색체 내 att site 로 들어가는 것이 불가능하다.

### [0071] 3. 프로파아지 결실 균주의 성장과 파아지 생성 분석

[0072] 프로파아지가 제거된 변이 균주의 성장과 파아지 생성과, 미토마이신 C의 이들 세포의 성장에 미치는 영향을 평가하였다(도 5). 미토마이신 C가 없는 상황에서는 프로파아지가 있는 경우와 없는 경우 모두 LR2 계열 균주(LR2, LR8, LR9)와 LR3 계열 균주(LR3, LR10, LR11)는 유사한 성장을 보였다(도 5의 A 및 D). 반면에, 미토마이신 C를 첨가하면 세포 성장에 급격한 변화가 관찰되었다. 파아지  $\Delta\Phi3$  와  $\Delta\Phi4$ 의 제거는 미토마이신 C에 대한 민감성을 크게 감소시켰다(도 5의 B 및 E).

[0073] 특히, 두 파아지가 모두 제거되면 미토마이신 C가 존재하는 조건에서도 유의한 세포 사멸이 없었다. 파아지 생성 정도를 미토마이신 C 존재 하에 성장한 세포 상등액에서 측정하였다(도 5의 C 및 F).  $\Delta\Phi3$ 의 제거(LR8 및 LR10)는 파아지 생성을 약 67% 감소시켰으며,  $\Delta\Phi3$  및  $\Delta\Phi4$ 의 동시 제거는 파아지 생성을 완전히 제거했다. 이 결과는 미토마이신 C의 존재 하에서 세포 사멸이 프로파아지  $\Delta\Phi3$  및  $\Delta\Phi4$ 의 유도에 의해 발생하는 것을 명확하게 보여준다. 또한, 스트레스 조건에서 파아지가 없는 *L. reuteri*가 더 안정된 호스트일 수 있음을 시사한다.

[0074] 미토마이신 C가 없는 경우, 모든 파아지가 제거되면 균주의 유전체 크기가 감소하므로 세포 생장이 약간 증가하는 것으로 나타났다. 이는 후술하는 실시예 1의 5.의 유가식 생물 반응기 실험에서 더 분명해졌다.

### [0076] 4. PduQ 발현 중대를 위한 프로모터 재조합

[0077] PduQ인 1,3-PDO 산화환원효소는 1,3-PDO 생산을 위해 NADH를 소비하며, 이 효소의 활성이 올라가면 포도당-글리세롤 혼합 발효에서 세포 내 NADH 농도를 감소시키고 세포 성장을 촉진할 것으로 기대된다. 지금까지는 PduQ의 발현을 위해 플라스미드와 nisin 유도 프로모터( $P_{\text{nisin}}$ )가 사용되었으며, PduQ 발현을 개선하기 위해 다른 프로모터의 도입을 시험하였다. 하나는 글리세롤 및 1,2-PDO에 의해 유도되는 프로모터( $P_{\text{gly}}$ )이고, 다른 하나는 *L. acidophilus*의 젖산 탈수소효소 프로모터( $P_{\text{ldhL}}$ )이었다. 야생형 *L. reuteri*에서  $P_{\text{gly}}$  프로모터는 1,3-PDO operon을 발현함에도 불구하고, 상당량의 1,3-PDO가 생산되는 것으로 나타났기 때문에 세기가 강한 프로모터로 알려져 있다. 또한  $P_{\text{ldhL}}$  프로모터는 *L. acidophilus* 표면층 단백질 유전자(slp)나 enterococcal rRNA 아데닌 N6-메틸트랜스퍼아제 유전자(ermB)와 같은 프로모터보다 높은 eGFP 발현을 보이는 강한 프로모터이다.

[0078] 프로모터 강도를 비교하기 위하여 이들 서로 다른 프로모터로 재조합된 PduQ 활성도를 LR11 변이주에서 비교하였다(도 6). 그리고 빈 pNZ8148 플라스미드를 대조군으로 사용했다. 세포는 MRS 배지에서 배양했고 중간 지수 상태(~6 시간)에서 수확하였다.  $P_{\text{ldhL}}$ 은 최고의 PduQ 활성(2.15 U/mg 단백질을)을 보였고, 지금까지 사용해온 nisin 유도 프로모터에 비해 3배가량 높은 우수한 활성이었다.

[0079] 반면  $P_{\text{gly}}$ (0.6 U/mg 단백질)는  $P_{\text{nisin}}$ (0.75 U/mg 단백질)보다 낮은 활성을 보였다. 대조군으로 사용한 빈 pNZ8148 플라스미드는 0.55 U/mg 활성을 보였다. 이는  $P_{\text{nisin}}$  또는  $P_{\text{gly}}$ 를 이용하여 발현된 PduQ 활성에 비해 큰 차이가 없는 것으로, 많은 복제수를 갖는 플라스미드를 이용함에도 불구하고 PduQ 활성이 거의 향상되지 않았음을 의미한다.

[0080] 도 6의 B에서 세포 성장과 1,3-프로판다이올(1,3-PDO) 생산도를 조사하여 나타내었다.  $P_{\text{ldhL}}$ 을 갖는 균주는  $P_{\text{nisin}}$ 을 갖는 균주와 비교하여 1,3-PDO 생산량이 21% 증가하고, 세포 농도는 44% 증가했다.

### [0082] 5. 프로파아지 결실 균주의 성능 평가

[0083] 프로파아지가 없는 재조합 LR9( $\Delta adh2$ ) 및 LR11( $\Delta adh2 \Delta adh6$ ) 균주들의 성능을 배양조 생물 반응기 실험을 통해 조사하였다. 이 균주들은 PduQ를  $P_{\text{ldhL}}$  프로모터 하에 과발현하였다. 대조군으로는 프로파아지를 포함하는 균주 LR2( $\Delta adh2$ ) 및 LR3( $\Delta adh2 \Delta adh6$ )를 사용하였다(도 7 및 8). 글루코스-글리세롤 혼합물을 1:2 몰 비율로

공급하였으며, 이들의 공급은 발효 개시 약 5시간 후에 시작되었다. 프로파아지가 없는 LR9 pduQ++ 균주의 경우 대조균주 LR2 pduQ++ ( $\mu_{\max} = 0.32 \text{ h}^{-1}$ ; 최종 OD600 = 18.6)와 비교하여 더 빠른 성장 ( $\mu_{\max} = 0.47 \text{ h}^{-1}$ )과 높은 최종 세포 농도를 보여주었다(OD600 = 23.3)(도 7). LR9 pduQ++에서의 세포 성장 개선은 프로파아지 제거로 인한 세포 용해 작용 감소 및 염색체 크기 감소에 기인한 것으로 추정된다.

[0084] 한편  $\Delta adh2\Delta adh6$  이중 제거 균주의 경우, 프로파아지 제거의 영향이 더욱 크게 나타났다. 프로파아지를 함유하는 LR3 pduQ++ 균주는 10 시간 후부터 세포농도가 감소하며, 최종적으로 10.5 OD600 ( $\mu_{\max} = 0.38 \text{ h}^{-1}$ )에 도달하였다. 반면, 프로파아지가 없는 LR11 pduQ++ 균주는 발효 과정 내내 안정적인 세포증식을 보여 48 시간에는 최대 18.0 OD600에 이르렀으며,  $\mu_{\max}$ 는  $0.55 \text{ h}^{-1}$ 이었다 (도 8). 그러나 LR11 pduQ++ 균주의 최종 세포농도는 LR9 pduQ++ 균주보다 낮았는데, 이는 adh2와 adh6가 동시에 제거된 경우 에탄올 생산이 완전히 억제되고 PduQ의 과발현에도 불구하고 NADH 축적이 높아진 것에 기인할 수 있다. 48 시간 발효 후, 가장 높은 1,3-PDO 함량은 LR9 pduQ++ 균주에서 관측되었으며, 878.5 mM (66.8 g/L)이었다. 이는 LR11 pduQ++ (825 mM 또는 62.8 g/L) 또는 LR2 pduQ++ (745.0 mM 또는 56.6 g/L)보다 높은 값이다.

[0085] LR9 pduQ++ 균주가 생산한 878.5 mM (66.8 g/L)의 PDO는 기존에 보고된 최대 1,3-프로판다이올 (1,3-PDO) 함량인 *L. diolivorans*의 92 g/L(Lindlbauer KA, Marx H, Sauer M. Effect of carbon pulsing on the redox household of Lactobacillus diolivorans in order to enhance 1, 3-propanediol production. New biotechnology. 2017 Jan 25;34:32-9.), *L. reuteri* JH83의 93 g/L (Ju JH, Heo SY, Choi SW, Kim YM, Kim MS, Kim CH, Oh BR. Effective bioconversion of 1, 3-propanediol from biodiesel-derived crude glycerol using organic acid resistance enhanced Lactobacillus reuteri JH83. Bioresource Technology. 2021 Oct 1;337:125361) 보다 낮았다.

[0086] 그러나 LR9 pduQ++ 균주가 보인 1.39 g/L/h 생산성은 *L. diolivorans* (0.49 g/L/h) 또는 *L. reuteri* JH83 (1.29 g/L/h)보다 상당히 높았다. Lactobacillus에서 PDO의 생산은 젖산에 의해 저해 받는다고 알려져 있으며 젖산 400 mM 이상에서는 그 저해가 심각하여 PDO 생산이 거의 멈춘다고 알려져 있다. *L. diolivorans*의 경우 포도당 제한 조건에서 아주 낮은 속도이기는 하지만 젖산을 피루브산으로 전환하고 피루브산 탈수소효소 (PDH)를 통해 이를 아세테이트로 전환할 수 있어서 고농도 PDO를 얻는 것이 가능하다고 알려져 있다. 다만 젖산의 소모 속도가 매우 느리기 때문에 부피 생산성은 매우 낮으며, 92 g/L를 얻는데 거의 190 시간이 소요되었다고 보고되었다. 이에 비해 *L. reuteri*는 PDH를 발현하지 않으며 따라서 1,3-PDO 생산에 젖산의 저해 효과를 피할 수 없다고 알려져 있다. 그럼에도 불구하고 *L. reuteri* JH83는 비교적 높은 부피 생산성으로 93 g/L의 높은 PDO를 생산한 것으로 보고되어 있는데 그 이유에 대해서는 심도 있는 분석이 필요하다. 젖산에 의해 PDO 생산 저해가 나타나지 않는 조건에서만 이러한 결과가 가능할 것이다.

[0088] 상기 재조합 균주들의 발효 결과를 포도당 수율, 산화환원 균형 및 글리세롤 수율 측면에서 정량적으로 분석하여 하기 표 3 내지 6에 나타내었다.

[0089] [표 3]

| LR2 pNZ P <sub>lac</sub> pduQ |        |        |      |                |                |
|-------------------------------|--------|--------|------|----------------|----------------|
| 기질, 대사산물                      | 탄소 밸런스 |        |      | 산화환원 밸런스       |                |
|                               | 양 (mM) | C mmol | % C  | NADH 생성 (mmol) | NADH 소비 (mmol) |
| 포도당                           | 507    | 3042   | 100  | 1521           | 0              |
| 락테이트                          | 511    | 1533   | 48.5 | 0              | 511            |
| 아세테이트                         | 467    | 934    | 29.5 | 0              | 0              |
| 에탄올                           | 67.7   | 135.4  | 3.6  | 0              | 135.4          |
| CO <sub>2</sub>               | 262.3  | 262.3  | 8.3  | 0              | 0              |
| 합계                            |        | 2864.7 |      |                |                |
| C-회수율(%)                      |        |        | 94.2 |                |                |
| 글리세롤                          | 842    | 2526   | 100  | 0              | 0              |
| 1,3-PDO                       | 745    | 2235   | 88.5 | 0              | 745            |
| 3-HP                          | 73     | 219    | 8.7  | 73             | 0              |
| 합계                            |        | 2454   |      | 1594           | 1391.4         |
| C-회수율(%)                      |        |        | 97.1 |                |                |

[0090]

[0091] [표 4]

| LR9 pNZ P <sub>lac</sub> pduQ |        |        |      |              |              |
|-------------------------------|--------|--------|------|--------------|--------------|
| 기질, 대사산물                      | 탄소 밸런스 |        |      | 산화환원 밸런스     |              |
|                               | 양 (mM) | C mM   | % C  | NADH 형성 (mM) | NADH 소비 (mM) |
| 포도당                           | 539    | 3234   | 100  | 1617         | 0            |
| 락테이트                          | 514.7  | 1544.1 | 47.7 | 0            | 514.7        |
| 아세트테이트                        | 433.3  | 866.6  | 26.8 | 0            | 0            |
| 에탄올                           | 98.8   | 197.6  | 6.1  | 0            | 197.6        |
| CO <sub>2</sub>               | 266.1  | 266.1  | 8.2  | 0            | 0            |
| 합계                            |        | 2874.6 |      |              |              |
| C-회수율 (%)                     |        |        | 88.8 |              |              |
| 글리세롤                          | 969.9  | 2909   | 100  | 0            | 0            |
| 1,3-PDO                       | 878    | 2634   | 91.9 | 0            | 878          |
| 3-HP                          | 81.7   | 245.1  | 8.5  | 81.7         | 0            |
| 합계                            |        | 2879.1 |      | 1698.7       | 1590.3       |
| C-회수율 (%)                     |        |        | 99   |              |              |

[0092]

[0093] [표 5]

| LR3 pNZ P <sub>lac</sub> pduQ |        |        |      |              |              |
|-------------------------------|--------|--------|------|--------------|--------------|
| 기질, 대사산물                      | 탄소 밸런스 |        |      | 산화환원 밸런스     |              |
|                               | 양 (mM) | C mM   | % C  | NADH 형성 (mM) | NADH 소비 (mM) |
| 포도당                           | 216    | 1296   | 100  | 648          | 0            |
| 락테이트                          | 202    | 606    | 46.8 | 0            | 202          |
| 아세트테이트                        | 192    | 384    | 29.6 | 0            | 0            |
| 에탄올                           | 0      | 0      | 0    | 0            | 0            |
| CO <sub>2</sub>               | 96     | 96     | 7.4  | 0            | 0            |
| 합계                            |        | 1086   |      |              |              |
| C-회수율 (%)                     |        |        | 83.8 |              |              |
| 글리세롤                          | 467.5  | 1402.5 | 100  | 0            | 0            |
| 1,3-PDO                       | 410.6  | 1231.8 | 87.9 | 0            | 410.6        |
| 3-HP                          | 7.35   | 22.05  | 1.57 | 7.35         | 0            |
| 합계                            |        | 1253.8 |      | 655.3        | 612.6        |
| C-회수율 (%)                     |        |        | 89.5 |              |              |

[0094]

[0095] [표 6]

| LR11 pNZ P <sub>lac</sub> pduQ |        |        |      |              |              |
|--------------------------------|--------|--------|------|--------------|--------------|
| 기질, 대사산물                       | 탄소 밸런스 |        |      | 산화환원 밸런스     |              |
|                                | 양 (mM) | C mM   | % C  | NADH 형성 (mM) | NADH 소비 (mM) |
| 포도당                            | 409.8  | 2458.8 | 100  | 1229.4       | 0            |
| 락테이트                           | 378.9  | 1136.7 | 46.2 | 0            | 378.9        |
| 아세트테이트                         | 387.6  | 774.4  | 31.5 | 0            | 0            |
| 에탄올                            | 0      | 0      | 0    | 0            | 0            |
| CO <sub>2</sub>                | 193.8  | 193.8  | 7.1  | 0            | 0            |
| 합계                             |        | 2104.9 |      |              |              |
| C-회수율 (%)                      |        |        | 85.6 |              |              |
| 글리세롤                           | 930.9  | 2793   | 100  | 0            | 0            |
| 1,3-PDO                        | 825.8  | 2477.4 | 88.7 | 0            | 825.8        |
| 3-HP                           | 76.9   | 230.7  | 8.3  | 76.9         | 0            |
| 합계                             |        | 2708.1 |      | 1306.3       | 1204.7       |
| C-회수율 (%)                      |        |        | 96.9 |              |              |

[0096]

[0097] \* 48 시간 발효결과에 따른 분석이다.

[0098] \*\* CO<sub>2</sub> 생산량은 (에탄올 + 아세트테이트)/2 로 추정하였다.

[0099] LR3 pduQ++를 제외하고는, 1,3-PDO와 3-HP로서의 글리세롤 회수율은 96% 이상이고, 젖산 및 아세트산 (또는 아세트산 + 에탄올)과의 비율은 거의 1:1에 가까워 실험 데이터가 신뢰성이 있다는 것을 알 수 있었다. 특히, LR11 pduQ++ 균주에서의 1,3-PDO 수율은 이론적인 최대치인 약 2.0 mol 1,3-PDO/mol glucose로 나타났다. 반면 LR9 pduQ++ 균주에서는 에탄올 생산으로 인해 그 수율이 약 1.63 mol 1,3-PDO/mol glucose이었다. 다시 말해, LR9 pduQ++에서 에탄올 생산에 사용되던 NADH가 LR11 pduQ++에서는 1,3-PDO 생산으로 완전히 사용되었다는 뜻이

다. 이러한 이론치에 도달한 수율을 보인 것은 LR11 균주가 처음이다.

## 6. RM 시스템의 전환 효율에 대한 영향 분석

본 발명에서  $\Phi 3$ 의 제거 후 전환 효율성이 크게 증가하는 것이 발견되었다. 이 효과를 정량화하기 위해, LR1(야생형), LR3( $\Delta adh2 \Delta adh6$ ), LR10( $\Delta adh2 \Delta adh6 \Delta \Phi 3$ ) 및 LR11( $\Delta adh2 \Delta adh6 \Delta \Phi 3 \Delta \Phi 4$ )의 다양한 호스트 균주에서 높은 복제 수의 pNZ8148 플라스미드와 중간 복제 수의 pSIP411 플라스미드를 사용하여 유전자 도입 효율성을 측정하였다. 모든 균주에서 고복제 수 pNZ8148 플라스미드가 중간 복제 수 pSIP411 플라스미드보다 높은 전환 효율성을 보였다. LR3 < LR1 << LR10 = LR11의 순서로 전환 효율성이 증가되었다. LR3 균주의 전환 효율은 야생형(LR1 균주)에 비해 2-3배 감소했다. 이 원인은 명확하지 않지만, 에탄올 생산의 억제와/또는 adh2/6 유전자로부터 인코딩되는 효소들의 생리적 역할, 혹은 이들 유전자 제거 후 야기되는 높은 NADH 축적에 원인으로 추정된다. 에탄올 변환효소(adhE)는 두가지 이상의 생리적 활성을 가지며 이 효소가 제거될 경우 변이 균주는 편모 및 type III 분비 시스템(T3SS)의 전사에 변화를 보이며, 독성, 이동성 및 콜로니 생성 능력이 감소한다고 알려져 있다. 특히, LR10에서  $\Phi 3$ 의 제거는 외래 유전자 도입 효율이 약 200배 급증시키는 결과를 가져왔다(도 9의 A).

이러한 유전자 도입효율의 급격한 증가는 프로파아지 자체 보다는  $\Phi 3$ 에 존재하는 RM 시스템 I (RMI)이 이 가장 중요한 원인인 것으로 추정되었으며(도 1 참조), 이는 추가적으로  $\Phi 4$ 가 제거된 LR11에서 전환 효율에 변화가 없었기 때문에 더욱 확실해졌다. 나아가 프로파아지 제거 후 전환 과정 중 세포 회복율이 향상되었을 가능성을 배제하기 위해(프로파아지 제거 후 바이러스 생산이 줄어들어 전환 효율 증가된 것처럼 결과가 나타날 수 있다), 플라스미드 없이 전기충격을 가한 후 CFU를 측정해 보았다. LR1, LR3, LR10 및 LR11의 CFU가 전기충격 전후로 거의 변하지 않았으므로(도 9의 9B), 이는 전기충격이 프로파아지의 활성화를 유발하지 않으며 따라서 전기충격에 의한 세포 사멸 차이는 무시될 수 있음을 의미한다. 따라서,  $\Phi 3$ 에 존재하는 RMI의 제거가 개선된 전환 효율의 주요 원인임을 확인하였다.

한편 *L. reuteri* DSM 20016 유전체 분석에 따르면, 이 균주는 2개의 추가적인 RM 시스템 (II 및 III)을 보유하고 있으며, 도 1에서 RMI로 명명된 RM 시스템은 Type I에 속하며, RM 시스템 II 및 III는 Type II에 속한다. 이러한 RM 시스템의 제거가 전환 효율성에 미치는 영향을 조사하기 위해, LR11 균주에서 RMII 및 RMIII 내 제한 효소를 인코딩하는 유전자를 순차적으로 제거하여 LR12( $\Delta RMI \Delta RMII$ ) 및 LR13( $\Delta RMI \Delta RMII \Delta RMIII$ ) 균주를 제작하였다. LR12의 경우 RMII가 추가적으로 제거되었을 때, RMI만 제거된 LR11과 비교하여 pNZ8148 및 pSIP411 플라스미드 도입 효율이 각각 1.5배씩 개선되었다. 그러나 추가적으로 RMIII를 제거한 경우 더 이상의 개선은 관찰되지 않았다.

## 실시예 2

### 1. 시약 및 효소

고성능 DNA 폴리머아제 (pfuX)는 New England Biolabs (미국 매사추세츠주 베버리)에서 구입하였다. 플라스미드 구축을 위해 사용된 제한효소와 T4 DNA 리가제 역시 New England Biolabs에서 구입하였다. 유전체 DNA 분리 키트는 Promega (미국 위스콘신주 매디슨)에서 획득하였다. 미니 플라스미드 분리 키트와 DNA 겔 추출 키트는 코스모텍 (한국 서울)에서 구입하였다. 올리고뉴클레오타이드 합성과 DNA 시퀀싱은 마크로젠 (한국 서울)이 담당하였다. MRS(De Man, Rogosa, Sharpe) 배지는 BD Difco (미국 뉴저지주 프랭클린 레이크스)에서 구입하였다. D-(+)-글루코스, 글리세롤, 나트륨-(DL)-락테이트, 나트륨 아세테이트, 에탄올 (99.8%), 프로페이지 유도를 위한 미토마이신 C 및 그 외 모든 화학 물질(특별한 언급이 없는 경우)은 Sigma-Aldrich (미국 미주리주 세인트루이스)에서 구입하였다.

### 2. 배양조건

*L. reuteri* 균주는 MRS 또는 수정된 MRS 배지에서 37 °C에서 배양하였다. 바이러스 정량을 위한 plaque assays는 96 well block에서 수행하였다. 대장균 1000 (EC1000) 균주는 Luria-Bertani (LB) 배지에서 배양하였다. *L. reuteri*의 배양 시 배지내 Erythromycin과 chloramphenicol 농도는 각각 5 µg/ml이며, EC1000 배양시 배지내 Erythromycin과 chloramphenicol 농도는 각각 300 µg/ml과 25 µg/ml이었다. *L. reuteri* 배지 내 Vancomycin

농도는 350  $\mu\text{g/ml}$ 이었다.

[0113] **3. 미토마이신 C를 이용한 파아지 활성화**

[0114] *L. reuteri*의 전 배양(preculture)를 위해 agar 플레이트에서 colony를 채취하여 10 ml의 MRS 배지에 접종하고 교반이 없는 정적 조건에서 37 °C에서 배양하였다. 밤새 배양한 배양물을 미리 따뜻하게 온도를 맞춘 MRS 배지에 0.1 OD600 농도가 되도록 희석하였다. 이 후 0.2-0.3 OD600까지 배양한 후 미토마이신 C(0.5  $\mu\text{g/ml}$ )를 첨가하였고, 세포 성장(OD600)은 최대 8시간 동안 매시간 모니터링하였다. 그 다음, 바이러스를 포함하는 것으로 예상되는 박테리아 상등액을 원심분리(5000 rpm, 1분)를 통하여 획득하였다. 상등액을 0.22  $\mu\text{m}$  필터로 여과한 후, 추가 분석을 위해 4 °C에서 보관하였다.

[0116] **4. 파아지 분석을 위한 Plaque Assay**

[0117] 플라크 분석은 간략히 설명하면, 배양 상등액을 0.22  $\mu\text{m}$ , Millipore필터로 여과하고, 파아지 희석용액 (8.0 mM  $\text{MgSO}_4$  및 10.0 mM Tris-HCl, pH 7.5)을 이용하여 연속적으로 희석하였다. 호스트 균주는 밤새 배양한 후 파아지 희석용액으로 한 번 세척하고, OD600 가 2.0이 되도록 조절하였다. 희석된 상등액 (200  $\mu\text{L}$ )을 호스트 세포 용액 (200  $\mu\text{L}$ )과 합치고 1 M  $\text{CaCl}_2$  용액 4  $\mu\text{L}$ 을 혼합한 후, 37 °C에서 1시간 동안 정체배양 하였다. 이후, 50 °C로 가열한 soft-agar 용액 3 mL (10 mM  $\text{CaCl}_2$  을 포함)을 세포-파아지 혼합물에 부드럽게 첨가하여 섞은 후 이 soft-agar 용액을 MRS-아가로스 플레이트 (10 mM  $\text{CaCl}_2$  포함)에 천천히 부어 주었다. 이 후 이 플레이트를 37 °C에서 하룻밤 배양하였다.

[0119] **5. 프로파아지 결실 변이주 제작**

[0120] *L. reuteri*의 프로파아지를 제거하기 위해, pVPL3002 플라스미드를 사용한 벤코마이신 기반 카운터-선택 방법을 사용하였다. 전통적인 클로닝 기술을 사용하여 각 프로파아지의 상-하위 flanking 영역을 pVPL3002에 클로닝하였다. 이 때 ApaI 및 XbaI 제한 효소 부위를 사용하였고 이렇게 얻어진 재조합 플라스미드를 pVPL3002\_ENG\_Φ3/Φ4 로 명명하였다 (올리고뉴클레오타이드 서열은 하기 표 7 참조).

[0121] [표 7]

| 서열번호    | Oligo's   | 설명                                                                                                    |
|---------|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 서열번호 4  | oSHP-LR01 | pVPL3002 구조 스크리닝용 oSHP-LR02 페어 올리고뉴클레오타이드                                                             |
| 서열번호 5  | oSHP-LR02 | pVPL3002 구조 스크리닝용 oSHP-LR01 페어 올리고뉴클레오타이드                                                             |
| 서열번호 6  | oSHP-LR03 | curing/ALE/counter selection에 의한 $\Phi$ 3 경화 스크리닝용 oSHP-LR04 페어 올리고뉴클레오타이드                            |
| 서열번호 7  | oSHP-LR04 | curing/ALE/counter selection에 의한 $\Phi$ 3 경화 스크리닝용 oSHP-LR03 페어 올리고뉴클레오타이드                            |
| 서열번호 8  | oSHP-LR05 | curing/ALE/counter selection에 의한 $\Phi$ 4 경화 스크리닝용 oSHP-LR06 페어 올리고뉴클레오타이드                            |
| 서열번호 9  | oSHP-LR06 | curing/ALE/counter selection에 의한 $\Phi$ 4 경화 스크리닝용 oSHP-LR05 페어 올리고뉴클레오타이드                            |
| 서열번호 10 | oSHP-LR07 | curing/ALE/counter selection에 의한 부분 $\Phi$ 4 경화 스크리닝용 oSHP-LR05 페어 올리고뉴클레오타이드                         |
| 서열번호 11 | oSHP-LR08 | ApaI 제한 부위를 포함하는 $\Phi$ 3 결손에 대한 상류 단편 증폭용 oSHP-LR09/11 페어 올리고뉴클레오타이드                                 |
| 서열번호 12 | oSHP-LR09 | $\Phi$ 3 결손을 위한 상류 단편 증폭용 oSHP-LR08 페어 브릿지 올리고뉴클레오타이드                                                 |
| 서열번호 13 | oSHP-LR10 | $\Phi$ 3 결손을 위한 다운스트림 단편의 증폭용 oSHP-LR09 페어 브릿지 올리고뉴클레오타이드                                             |
| 서열번호 14 | oSHP-LR11 | XbaI 제한 부위에서 $\Phi$ 3 결손을 위한 다운스트림 단편 증폭용 oSHP-LR08/10 페어 올리고뉴클레오타이드                                  |
| 서열번호 15 | oSHP-LR12 | ApaI 제한 부위를 포함하는 부분적인 $\Phi$ 4 결손에 대한 상류 단편 증폭용 oSHP-LR13 페어 올리고뉴클레오타이드                               |
| 서열번호 16 | oSHP-LR13 | 부분적인 $\Phi$ 4 결손을 위한 상류 단편 증폭용 oSHP-LR12와 페어 브릿지 올리고뉴클레오타이드                                           |
| 서열번호 17 | oSHP-LR14 | 부분적인 $\Phi$ 4 결손을 위한 다운스트림 단편 증폭용 oSHP-LR15와 페어 브릿지 올리고뉴클레오타이드                                        |
| 서열번호 18 | oSHP-LR15 | XbaI 제한 부위에서 부분적인 $\Phi$ 4 결손을 위한 다운스트림 단편 증폭용 oSHP-LR14 페어 올리고뉴클레오타이드                                |
| 서열번호 19 | oSHP-LR16 | pNZ8148 플라스미드에 PstI 제한 부위를 포함하는 <i>L. acidophilus</i> 의 $P_{lac}$ 프로모터 증폭용 oSHP-LR17/19 페어 올리고뉴클레오타이드 |
| 서열번호 20 | oSHP-LR17 | pNZ8148 플라스미드에서 <i>L. acidophilus</i> 의 $P_{lac}$ 프로모터 증폭용 oSHP-LR16 페어 브릿지 올리고뉴클레오타이드                |

[0122]

|         |           |                                                                                                       |
|---------|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 서열번호 21 | oSHP-LR18 | pNZ8148 플라스미드에서 <i>L. reuteri</i> DSM 20016의 pduQ 유전자 증폭용 oSHP-LR19 페어 브릿지 올리고뉴클레오타이드                 |
| 서열번호 22 | oSHP-LR19 | pNZ8148 플라스미드에서 XbaI 제한 부위를 가진 <i>L. reuteri</i> DSM 20016의 pduQ 유전자 증폭용 oSHP-LR18/16 페어 올리고뉴클레오타이드   |
| 서열번호 23 | oSHP-LR20 | pNZ8148 플라스미드에 PstI 제한 부위를 포함하는 Pnisin 프로모터 아래에서 pduQ 유전자 클로닝용 oSHP-LR21 페어 올리고뉴클레오타이드                |
| 서열번호 24 | oSHP-LR21 | pNZ8148 플라스미드에서 xbaI 제한 부위를 포함하는 Pnisin 프로모터 아래에서 pduQ 유전자 복제용 oSHP-LR20 페어 올리고뉴클레오타이드                |
| 서열번호 25 | oSHP-LR22 | pNZ8148 플라스미드에 kpnI 제한 부위를 포함하는 <i>L. reuteri</i> DSM 20016의 Pgly 프로모터 증폭용 oSHP-LR23/25 페어 올리고뉴클레오타이드 |
| 서열번호 26 | oSHP-LR23 | pNZ8148 플라스미드에서 <i>L. reuteri</i> DSM 20016의 Pgly 프로모터 증폭용 oSHP-LR22 페어 브릿지 올리고뉴클레오타이드                |
| 서열번호 27 | oSHP-LR24 | pNZ8148 플라스미드에서 <i>L. reuteri</i> DSM 20016의 pduQ 유전자 증폭용 oSHP-LR25 페어 브릿지 올리고뉴클레오타이드                 |
| 서열번호 28 | oSHP-LR25 | pNZ8148 플라스미드에서 XbaI 제한 부위를 가진 <i>L. reuteri</i> DSM 20016의 pduQ 유전자 증폭용 oSHP-LR22/24 페어 올리고뉴클레오타이드   |
| 서열번호 29 | oSHP-LR26 | pNZ8148 구조 스크리닝용 oSHP-LR27 페어 올리고뉴클레오타이드                                                              |
| 서열번호 30 | oSHP-LR27 | pNZ8148 구조 스크리닝용 oSHP-LR26 페어 올리고뉴클레오타이드                                                              |

[0123]

[0125]

5  $\mu$ g의 pVPL3002\_ENG\_ $\Phi$ 3/ $\Phi$ 4 플라스미드를 제거하고자 하는 균주 (LR2, LR3 균주 등)에 전기천공을 통해 도입하고, 전기천공된 균주를 MRS액체 배지에서 회복배양한 후, 5  $\mu$ g/mL 에리스로마이신이 포함된 MRS 아가(agar) 배지 상에 도말하였다. 에리스로마이신 내성(EmR)을 가지고 아가 배지에서 성장하는 콜로니에 대해 단일 교차 상동 재결합(single cross-over homologous recombination)을 확인하기 위하여 colony PCR을 실시하였다. 단일 교차 상동 재결합이 확인된 colony에 대하여, 10세대 동안 MRS 액체 배지에서 배양하였다. 이후, 두 번째 상동 재결합(second homologous recombination)을 위해 배양된 균주를 350  $\mu$ g/mL 밴코마이신이 포함된 MRS 아가 배지에 도말하고 배양하였다.

[0127] **6. 전환 효율 조사 방법**

[0128] 밤새 배양한 균주 배양액을 사전에 온도를 맞춘 40 ml의 MRS 배지에 접종하고 0.55-0.65 OD600까지 성장시켰다. 이후 세포를 획득하여 얼음으로 냉각한 버퍼(0.5 M sucrose 및 10% glycerol)로 2회 세척 후 1 µg 플라스미드 DNA를 사용하여 전기천공법을 실시하였다. 이후 전기천공된 세포를 2-2.5 시간(정지 상태, 37℃) 동안 1 ml MRS 배지에서 재생 배양하였고, 적절한 항생제가 포함된 MRS 아가 고체배지에 도포하였다. 전환 효율은 CFU/µg DNA로 나타내었다.

[0130] **7. 1,3-PDOR(PduQ) 효소활성 측정**

[0131] 1,3-PDOR 활성은 환원 활성(정 반응)으로 측정하였다. 50mM Tris-HCl 버퍼 (pH 7.0)와 crude 세포 추출물을 포함하는 반응 혼합물을 최적 온도인 37 °C에서 2분간 반응시켰다. 반응은 0.1mM의 NADH와 20mM의 3-HPA를 첨가하여 개시하였다. 단위시간당 NADH의 산화를 측정하였고 NADH의 molar extinction coefficient계수로는  $6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 을 사용하였다.

[0133] **8. 플라스크 및 반응기 배양 실험**

[0134] 재조합 *L. reuteri* 균주를 150 mM 글리세롤과 2.5 mM 코발트 염화물(cobalt chloride)이 첨가된 수정 MRS 배지(BD Difco, DF0881-17-5)를 이용하여 37 °C에서 배양하였다. MRS 배지의 조성은 다음과 같았다 (배지 1리터 당 다음 성분을 포함한다): 펩톤 10 g, beef extract 10 g, yeast extract 5 g, polysorbate 80.1 g, ammonium citrate 2 g, sodium acetate 5 g, magnesium sulfate 0.1 g, manganese sulfate, 0.05 g; dipotassium phosphate, 2 g; glucose, 20 g. 필요한 경우 chloramphenicol (5 µg/ml)을 첨가하였다. 접종균은 15 mL 파이콘 튜브를 이용하여 37℃, 무산소조건으로 MRS 배지에서 교반 없이 정체배양하였다. 배양액 부피는 10 mL이었다. 플라스크 수준의 본 배양은 MRS 배지를 이용, 165 mL크기의 유리병을 사용하여 무산소 상태에서 진행하였고 이때 배양액 부피는 50 mL이었다. 재조합 pduQ의 발현이 필요할 때는 1.0 OD600에서 25 ng/ml의 니신(Sigma-Aldrich: N5764)을 첨가해 주었다.

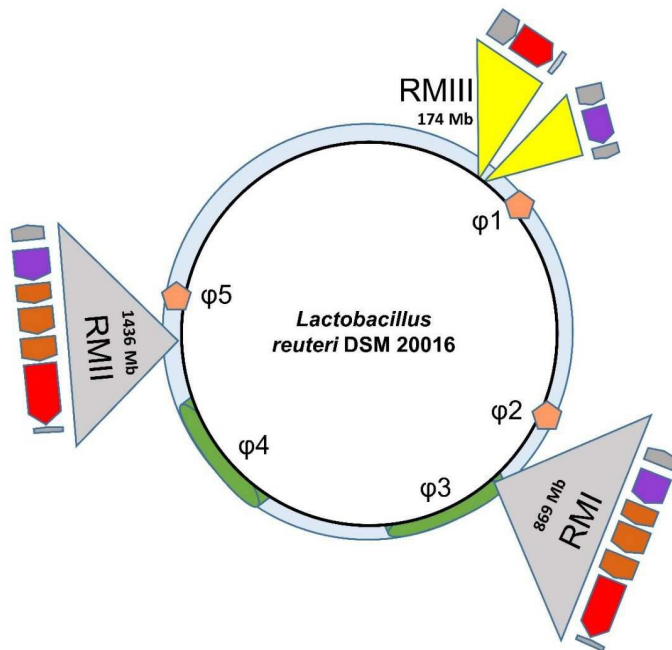
[0135] 생물반응기 실험은 2.5 L Eppendorf 생물반응기(Hamburg, Germany)를 사용하여 초기 반응액 부피 1 L로 수행하였다. 배지는 200 mM 글리세롤과 2.5 mM 코발트 염을 포함하는 수정된 MRS였다. 실험은 37 °C 및 pH 5.5에서 300 rpm의 회전 속도로 fed-batch 모드로 진행하였다. 배양 시작전 산소를 제거하기 위해 질소 가스를 bubbling해 주었다. pH는 20% NH3를 주입하여 유지했다. BactoPeptone, beef extract 및 yeast extract로 이루어진 feeding 용액은 별도 살균 후 12시간마다 1 g/L 농도가 되도록 첨가해 주었다. 세포 성장(OD600) 과 대사산물은 매 2시간마다 모니터링 하였다.

[0137] **9. 농도 분석 방법**

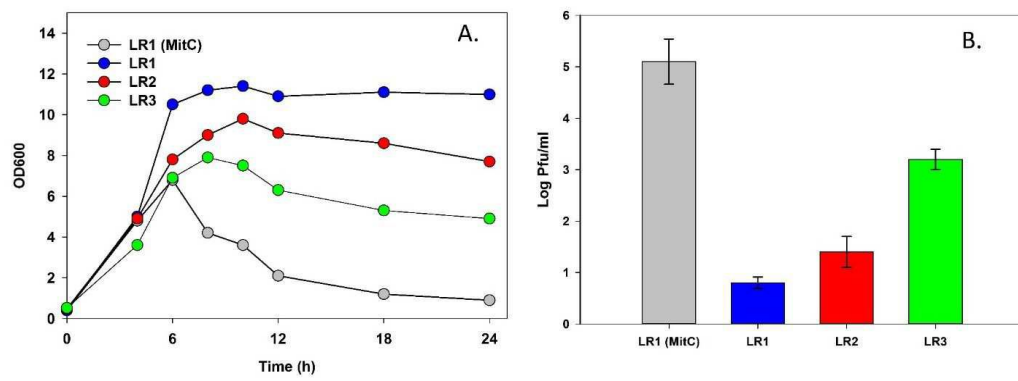
[0138] 세포 농도는 이중 광선 분광광도계 (Lambda 20, Perkin Elmer; Norwalk, CT, USA)와 10 mm 패스 길이 큐벳을 사용하여 600 nm (OD600)에서 측정하였다. 글리세롤, 포도당, 3-HP, 1,3-PDO 및 기타 대사산물의 농도는 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC, Agilent 1260 Infinity II, Santa Clara, CA, USA)를 사용하여 측정하였다. 300mm × 7.8mm Aminex HPX-87H 컬럼 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 사용하였고 2.5mmol/L H2SO4를 모바일 상으로 이용하였다. HPLC 분석 온도는 65 °C였다. 생성 또는 소비된 NADH 및 ATP 양은 기질 전환과 생성물의 반응 화학식에 기초하여 계산하였다.

도면

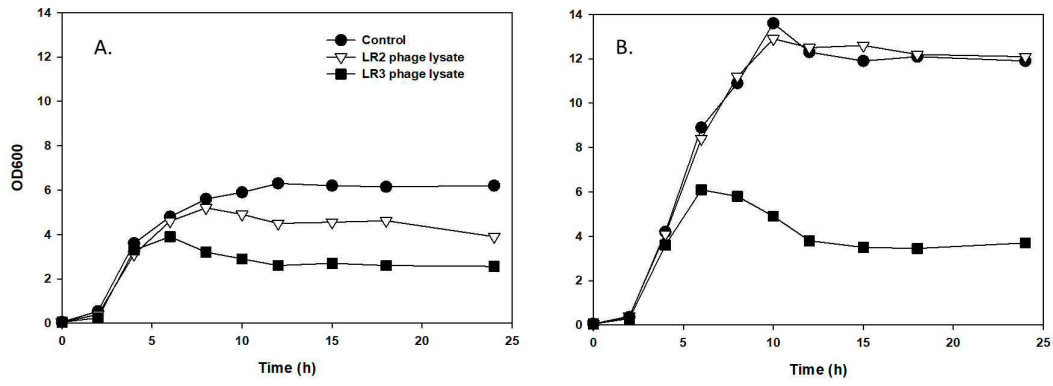
도면1



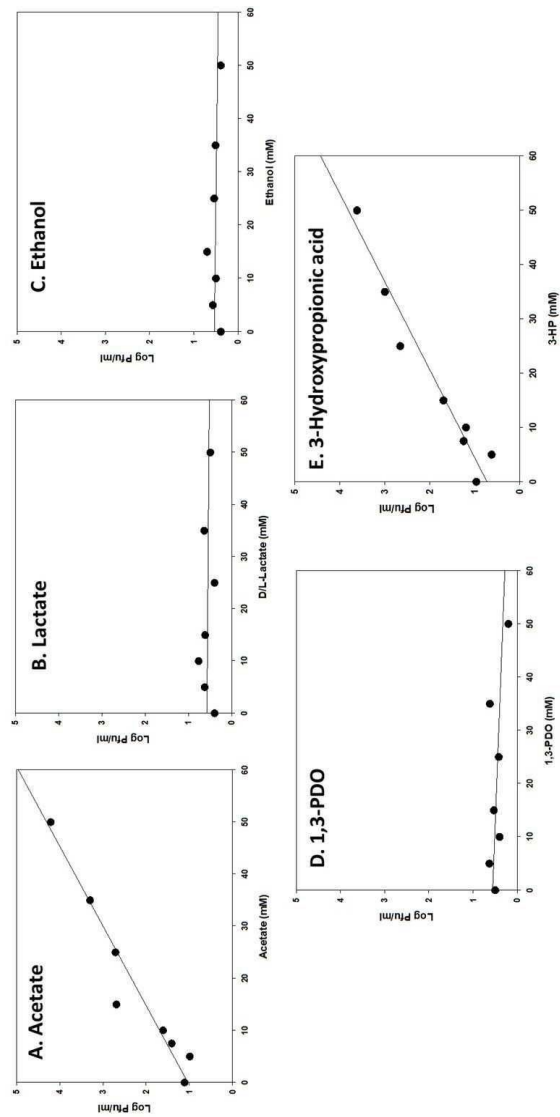
도면2



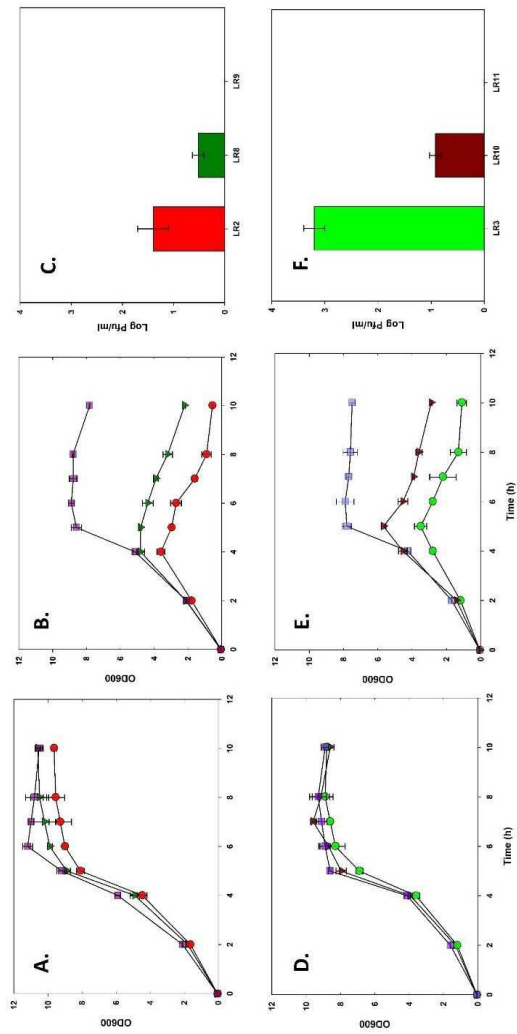
도면3



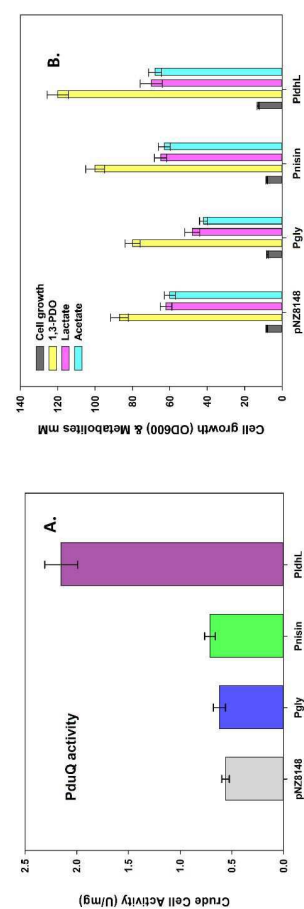
도면4



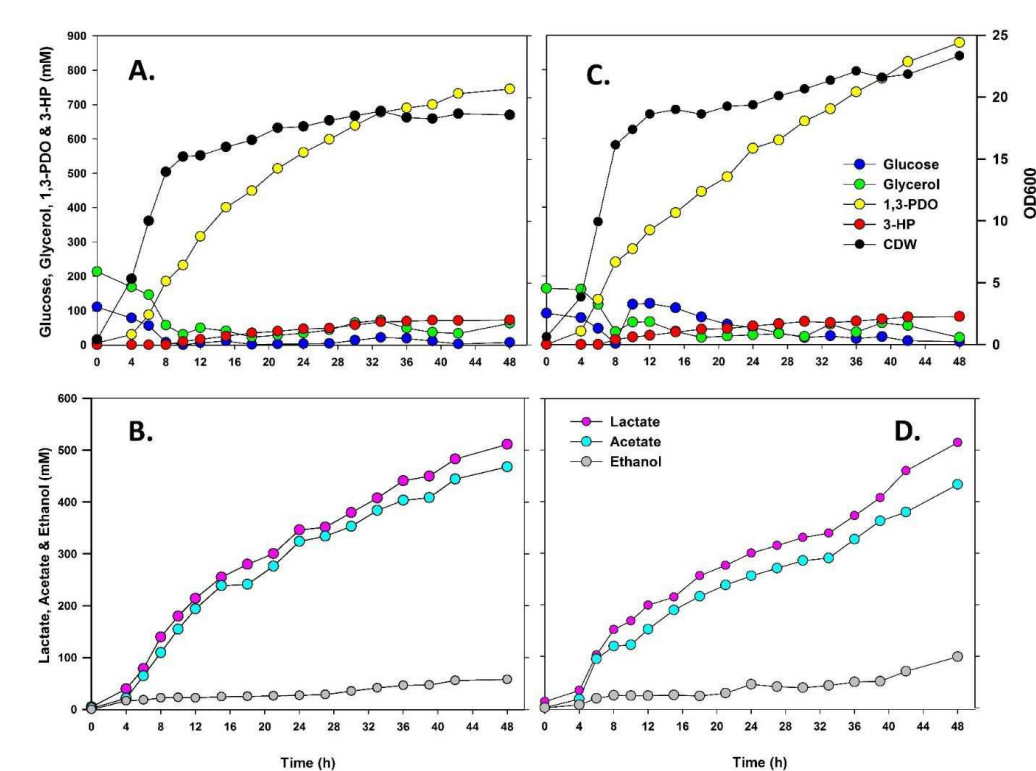
도면5



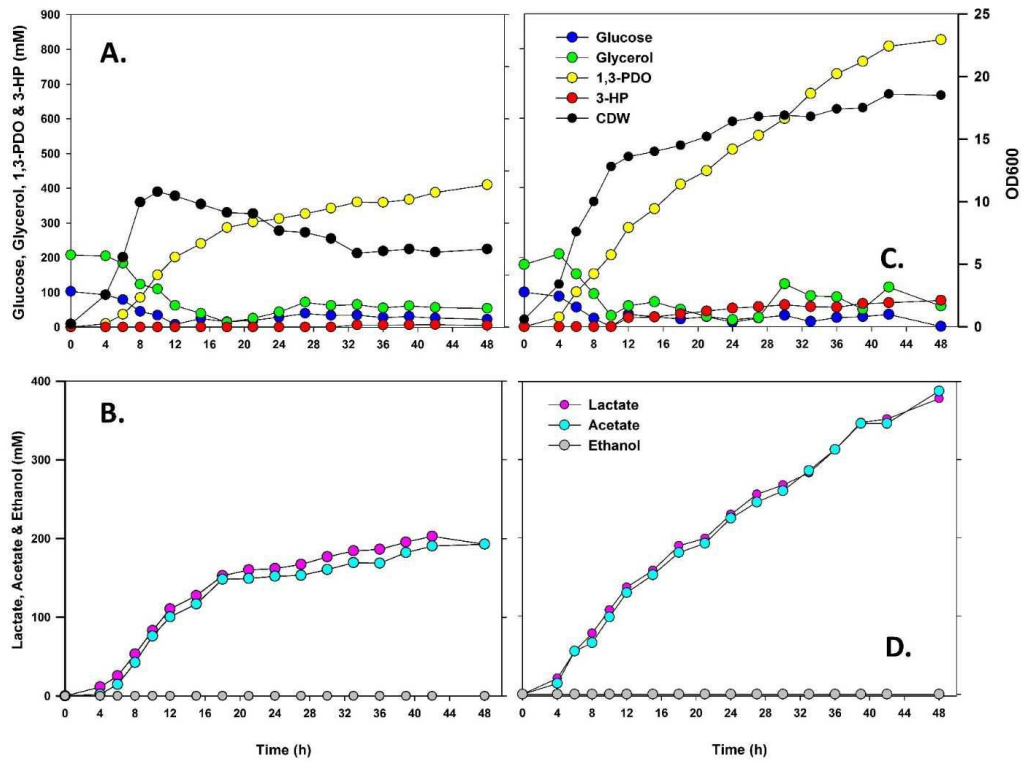
도면6



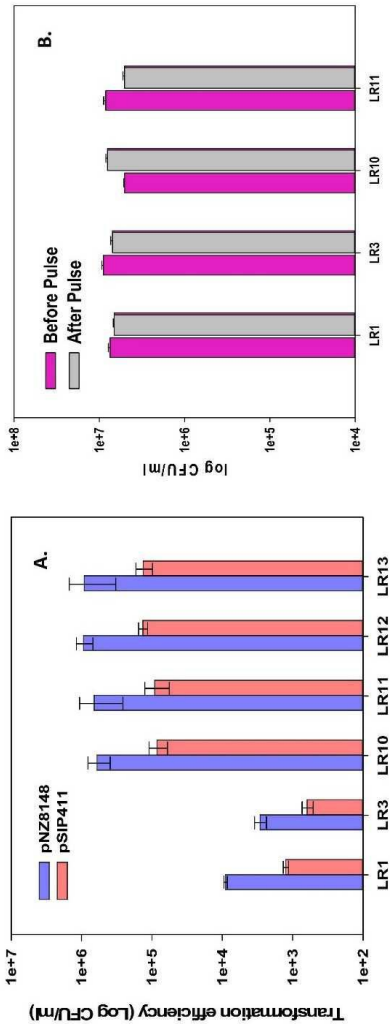
도면7



도면8



도면9



## 서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.