(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0156470
(43) 공개일자 2024년10월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/70 (2006.01) *C07K 14/195* (2006.01)
C12N 9/00 (2006.01) *C12N 9/10* (2006.01)
C12P 7/52 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/70 (2013.01)
C07K 14/195 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0051891
(22) 출원일자 2023년04월20일
심사청구일자 2023년04월20일

(71) 출원인
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(72) 발명자
박성훈
울산광역시 울주군 언양읍 반천강변길 51, 106동 901호 (현대아파트)
비벡 쿠마르 가우르
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(74) 대리인
특허법인태백

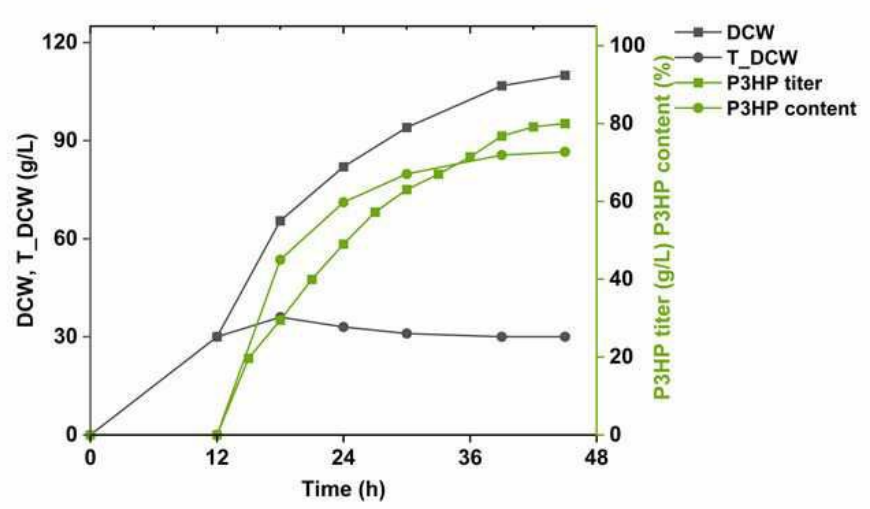
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **폴리(3-하이드록시프로피오네이트)를 고효율로 생산하는 재조합 대장균 균주 및 이를 이용한 생분해성 폴리(3-하이드록시프로피오네이트) 생산방법**

(57) 요 약

본 발명은 폴리(3-하이드록시프로피오네이트)[Poly(3-hydroxypropionate); P3HP]를 고효율로 생산하는 재조합 대장균 균주 및 이를 이용한 생분해성 폴리(3-하이드록시프로피오네이트) 생산방법에 대한 것으로, 3-HP로부터 P3HP를 생산하기 위한 재조합 대장균(Escherichia coli) 균주를 제공한다. 본 발명에서는 처음으로 3-HP를 원료로 사용하였고, 그 결과 세포 내 최대함량 85% 이상으로 P3HP 고분자를 생산할 수 있었다. 더 나아가 유가식 생물반응기 운전을 통해 1.77g/L/h의 생산성으로 >80g/L의 P3HP 단일 중합체를 생산할 수 있었다. 이는 지금까지 알려진 세계 최고의 수준으로, 본 발명의 재조합 대장균 균주는 3-HP로부터 높은 농도, 수율, 속도로 P3HP를 생산할 수 있다.

대 표 도 - 도8



(52) CPC특허분류
C12N 9/1029 (2013.01)
C12N 9/93 (2013.01)
C12P 7/52 (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 2022.03.01 ~ 2023.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

폴리하이드록시알카노에이트 합성효소(polyhydroxyalkanoates synthase; *phaC*) 유전자, 삼중기능성 프로피오닐-CoA 합성효소의 아실-CoA 합성효소 도메인(acyl-CoA synthetase domain of trifunctional propionyl-CoA synthase; *acs*) 유전자 및 파신(phasin; *phaP1*) 유전자를 순서대로 포함하는 재조합 발현 벡터.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 *phaC* 유전자는 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어지고, 상기 *acs* 유전자는 서열번호 2로 표시되는 염기서열로 이루어지며, 상기 *phaP1* 유전자는 서열번호 3으로 표시되는 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 재조합 발현 벡터.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 *acs* 유전자의 5' 비번역 부위(untranslated region; UTR) 영역은 서열번호 4 내지 서열번호 7로 표시되는 염기서열 중 어느 하나로 이루어진 것을 특징으로 하는 재조합 발현 벡터.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 재조합 발현 벡터로 형질전환된, 폴리(3-하이드록시프로피오네이트)[Poly(3-hydroxypropionate); P3HP] 생산이 증진된 재조합 대장균 균주.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 재조합 대장균 균주는 필라멘팅 온도 민감성 돌연변이 Z(filamenting temperature sensitive mutant Z; *ftsZ*) 유전자를 추가적으로 과발현시킨 대장균 균주를 상기 재조합 발현 벡터로 형질전환시킨 것을 특징으로 하는 P3HP 생산이 증진된 재조합 대장균 균주.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 *ftsZ* 유전자는 서열번호 8로 표시되는 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 P3HP 생산이 증진된 재조합 대장균 균주.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 재조합 대장균 균주는 수탁번호 KCTC 15338BP로 기탁된 균주인 것을 특징으로 하는 P3HP 생산이 증진된 재조합 대장균 균주.

청구항 8

제4항에 따른 재조합 대장균 균주를 배양하는 단계를 포함하는 P3HP 생산 증진 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 배양하는 단계는 3-하이드록시프로피오닌산(3-hydroxypropionic acid; 3-HP)을 기질로 하는 것을 특징으로 하는 P3HP 생산 증진 방법.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 방법은 1) 당을 이용하여 세포를 농도 30 g/L 이상의 수준으로 성장시키는 단계; 및 2) 3-하이드록시프로피온산과 당을 지속적으로 첨가하여 고농도 P3HP가 세포 내에 축적되도록 하는 단계를 포함하는, 2단계 유가식 발효공정인 것을 특징으로 하는 P3HP 생산 증진 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 폴리(3-하이드록시프로피오네이트)[Poly(3-hydroxypropionate); P3HP]를 고효율로 생산하는 재조합 대장균 균주 및 이를 이용한 생분해성 폴리(3-하이드록시프로피오네이트) 생산방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 전 세계적으로 합성 고분자는 없어서는 안 될 필수품으로 대량 생산, 소비되고 있다. 그들은 주로 화석 연료에서 파생되며 탄소배출과 난분해성으로 인해 심각한 환경 및 인간 건강 문제를 제기한다. 대안으로 생물학적 기원, 낮은 독성 및 높은 생분해성을 가진 바이오 기반 폴리머가 제안되었다. 그러나 세계 바이오플라스틱 시장은 석유계 플라스틱의 0.2% 수준이다. 상용화의 주요 장애물은 값비싼 탄소 원료와 낮은 생산 효율성, 그리고 높은 제조 비용이다. 이 문제를 해결하기 위해 다양한 숙주 미생물과 값싼 탄소 원료를 사용한 대사 공학 접근법이 탐색되었다.

[0003] 바이오 기반 폴리머 중에서 폴리하이드록시알카노에이트(PHA)는 구조적 다양성과 우수한 생분해성으로 인해 많은 주목을 받았다. 3-하이드록시부티르산(3HB), 4-하이드록시부티르산(4HB), 3-하이드록시발레르산(3HV), 3-하이드록시헥산산(3HH) 등과 같은 많은 하이드록시산이 단독으로 또는 다른 모노머와 조합을 통해 복합적으로 PHA의 단량체로 사용될 수 있다. 여러 PHA 중에서, 폴리(3-하이드록시부티르산[poly(3-hydroxybutyrate); P3HB]이 가장 광범위하게 연구되어 왔는데, P3HB는 Cupriavidus necator, Methylosinus trichosporium OB3b 등 많은 미생물 배양시 탄소원이 잉여로 존재할 때 탄소 및 에너지 저장고로서 자연적으로 생성된다. P3HB 중합체는 재조합 대장균에서 150g/L 이상의 높은 수준으로 생산될 수 있으며, homopolymer 혹은 4HB와의 공중합체 P(3HB-co-4HB) 또는 3HH와의 공중합체 P (3-HB-co-3-HH)로 상용화되었다. C3 하이드록시산인 3-하이드록시프로피오닌산(3-hydroxypropionic acid; 3-HP)의 고분자인 P3HP도 인장 강도, 유연성, 연신율 및 용융 온도를 포함하여 고유한 열화학적 특성을 갖는 흥미로운 폴리머이다. 그러나 3HP는 야생의 미생물 내에서는 높은 수준으로 생산되지 않으며 그 중합체는 미생물에서 생성되지 않는다. 그러나 재조합 대장균을 이용한 P3HP의 합성은 2010년에 처음 보고되었고, P3HP 단독 중합체를 생산하기 위한 여러 연구가 이어진 바 있다. 또한, 3HB와의 copolymer, 즉 [P(3HB-co-3HP)]를 생산하는 연구도 보고되었으나, 대부분 낮은 세포 내 농도와 낮은 반응기 내 농도로 생산되었다. P3HP의 고유한 특성과 상업적 중요성을 고려할때 P3HP 또는 그 공중합체의 상용화를 앞당기는 효율적인 생산 균주와 공정 개발이 절실히 요구된다.

[0004] P3HP의 미생물 합성에서 3-하이드록시프로피오닐-CoA(3HP-CoA)는 가장 중요한 중간체이다. 글리세롤 원료로부터 P3HP의 생성은 글리세롤이 먼저 글리세롤 탈수효소(DhaB)에 의해 3-하이드록시프로피온알데히드(3HPA)로 탈수된 다음 프로피온알데히드 탈수소효소(PduP)에 의해 3HP-CoA로 전환되고 마지막으로 고분자 합성효소(PhaC)에 의해 P3HP로 전환되는 3단계로 진행된다. 지금까지 이 경로에서 보고된 가장 높은 역가는 25.7g/L P3HP이다. 한편 1,3-프로판디올(1,3-PDO)을 기질로 사용할 경우 1,3-PDO 산화환원효소(DhaT)의 작용으로 1,3-PDO를 3HPA로 전환시킨 후 3HPA를 3HP로 전환시키는 알데히드 탈수소효소(AldD), 3HP를 3HP-CoA로 전환시키는 프로피오닐-CoA 합성효소(Acs), 그리고 마지막으로 PhaC에 의한 고분자 합성 등 4단계로 진행된다. 이 경로를 활용한 가장 우수한 결과는 재조합 대장균 S17-1을 통해 보고되었는데, 48시간 내에 세포 내 함량 57%, 그리고 반응기 생산 농도 42.9g/L로 P3HP가 생산되었다. 기존 문헌에 따르면 이것은 지금까지 보고된 가장 훌륭한 P-3HP 단일 중합체 생산 결과이다.

[0005] 지금까지 보고된 P3HP 생산의 세포 내 함량과 반응기 농도는 상업적 수준에 많이 뒤떨어진다. 특히 3-HB 고분자인 P3HB 생산 성능, 즉 세포 내 함량 80% 이상, 반응기내 농도 150 g/L 등과 비교할 때 현저히 떨어진다. 이는 앞서 언급한 대로 글리세롤을 원료로 사용하거나 1,3-PDO를 원료로 사용하는 경우 모두 그러하다. 이의 가장 중요한 이유는 P3HP 고분자 생합성과정에서 중간 대사산물로 생성되고 이용되는 3-HPA (3-hydroxypropionaldehyde)의 독성 때문이다. 3-HPA는 반응성이 매우 높아 5mM의 낮은 농도에서도 여러 단백질이나 효소를 불활성화시키며 세포를 사멸시킨다고 보고되었다. 특히 DNA 합성을 위한 데옥시뉴클레오티드 생성에 필수적인 리보뉴클레오타이드 환원효소를 불활성화시킨다고 알려져 있다. 비활성화 메커니즘과 관련하여 3-HPA가 아크롤레인과 유사하게 시스테인 잔기의 티올기에 강하게 결합하고 트립토판 및 히스티딘 잔기와 약하게 상호작용하기 때문으로 보고한 바 있다. 따라서 만일 3-HPA가 생성되지 않는 조건에서 P3HP polymer를 생합성할 수 있다면 P3HP의 세포내 함량이나 반응기 내 생성 역가를 크게 올릴 수 있을 것이라는 가정이 가능하다. 3-HPA를 거치지 않고 이 폴리머를 생합성하는 방법은 3-HP를 모노머로 외부에서 공급해 주는 방법이 유일하다. 그러나 지금까지 이 모노머는 순수한 형태나 고농도로는 존재하지 않았고 상업적으로 구매할 수 있는 모노머 역시

37% 수용액 상태로 농도가 낮고 가격 역시 매우 높았다. 또한, 이 수용액은 여러가지 불순물이 다량 존재하여 발효에 사용하는데 문제 있었다. 이 때문에 3-HP를 원료로 P3HP 고분자를 생산하려는 연구는 수행되지 않았다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0006] (비특허문헌 0001) Metab Eng. 2011; 13(6):777-85 (2011.10.20 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 3-HP로부터 P3HP를 생합성하는데 필요한 경로의 유전자가 클로닝되고, 추가적으로 P3HP의 생합성 효율을 향상시키는데 필요한 phasin 단백질이나 FtsZ 단백질이 과발현된 유전자 재조합 대장균 균주를 제공하고자 한다.

[0008] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 재조합 대장균 균주를 배양하는 단계를 포함하는 P3HP 생산 증진 방법을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 폴리하이드록시알카노에이트 합성효소(polyhydroxyalkanoates synthase; *phaC*) 유전자, 삼중기능성 프로피오닐-CoA 합성효소의 아실-CoA 합성효소 도메인(acyl-CoA synthetase domain of trifunctional propionyl-CoA synthase; *acs*) 유전자 및 파신(phasin; *phaP1*) 유전자를 순서대로 포함하는 재조합 발현 벡터를 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 재조합 발현 벡터로 형질전환된, P3HP 생산이 증진된 재조합 대장균 균주를 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 재조합 대장균 균주를 배양하는 단계를 포함하는 P3HP 생산 증진 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명은 폴리(3-하이드록시프로피오네이트)[Poly(3-hydroxypropionate); P3HP]를 고효율로 생산하는 재조합 대장균 균주 및 이를 이용한 생분해성 폴리(3-하이드록시프로피오네이트) 생산방법에 대한 것으로, 3-HP로부터 P3HP를 생산하기 위한 재조합 대장균(Escherichia coli) 균주를 제공한다. 본 발명에서는 처음으로 3-HP를 원료로 사용하였고, 그 결과 세포 내 최대함량 85% 이상으로 P3HP 고분자를 생산할 수 있었다. 더 나아가 유가식 생물반응기 운전을 통해 1.77g/L/h의 생산성으로 >80g/L의 P3HP 단일 중합체를 생산할 수 있었다. 이는 지금까지 알려진 세계 최고의 수준으로, 본 발명의 재조합 대장균 균주는 3-HP로부터 높은 농도, 수율, 속도로 P3HP를 생산할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 P3HP 생산을 위한 재조합 플라스미드의 구성을 나타낸다. Ca_acs는 Chloroflexus aurantiacus의 trifunctional propionyl-CoA synthase의 acyl-CoA synthetase 도메인을 인코딩하고, Cn_phaC는 Cupriavidus necator의 PHA synthase를 인코딩하며, phaP1은 C. necator의 phasin 단백질을 인코딩한다. P0-P5는 본 발명에 사용된 플라스미드이다.

도 2는 재조합 E. coli BL21(DE3) 균주를 이용한 P3HP 생산 결과를 나타낸다. pET-30 b(+) 플라스미드(P0)에 Ca_Acs와 Cn_PhaC를 클로닝하였다. 균주는 수정된 M9 배지에서 30℃ 및 200 rpm에서 배양하였다.

도 3은 P3HP 단일중합체 생산 최적 균주 스크리닝 결과를 나타낸다. P1 플라스미드(pQE-80L_T5_phaC_acs)를 갖는 재조합 E. coli 균주의 고분자 생산을 비교하였다. 오차 막대는 표준 편차(<10%)를 나타낸다.

도 4는 플라스크 규모에서 P3HP 생산을 향상시키기 위한 배양 조건의 최적화 결과를 나타낸다. P1 플라스미드(pQE-80L_T5_phaC_acs)를 갖는 재조합 E. coli MG1655이 사용되었다. (A) 경로 유전자의 유도 시간의 효과. (B) 교반 속도의 효과. 오차 막대는 표준 편차(<10%)를 나타낸다.

도 5는 Acs 발현 최적화을 위한 UTR 엔지니어링 결과를 나타낸다. (A) E. coli K12에서 발현된 재조합 Acs와 PhaC의 SDS-PAGE 분석. Ca_Acs의 UTR 강도는 P1에서 P4로 점차 감소하였다. (B) 세포성장을 보여 주는 OD600 프로필. (C) 포도당 소비. (D) 48시간에 결정된 최종 건조 세포 중량(DCW), 실제 건조 세포 중량(T_DCW) 및 P3HP의 제품량과 세포 내 함량.

도 6은 Phasin 발현이 E. coli K12에서 P3HP 생산에 미치는 영향을 나타낸다. (A) OD600과 포도당 소비. (B) 최종 건조세포중량(DCW), 진짜 건조세포중량(T_DCW), 48시간 동안 측정된 P3HP의 양 및 세포 내 함량. P3 (pQE-80L_T5_phaC_RBS2_acs) 혹은 P5 (pQE-80L_T5_phaC_RBS2_acs_phaP1) 플라스미드를 갖는 재조합 균주를 비교하였다.

도 7은 세포분열 링 형성 FtsZ 단백질의 염색체 과발현이 P3HP 생산에 미치는 영향을 나타낸다. ftsZ을 과발현하는 변종 균주 K12Z를 대조 균주인 K12와 비교하였다. P5 플라스미드를 사용하였다. (A) K12. (B) K12Z.

도 8은 K12Z의 고농도 배양 결과를 나타낸다. pH-stat 모드에 따라 포도당(700 g/L)을 공급하고, 공기-O_2 혼합물을 공급하여 DO 수준을 30% 이상 유지하고, 영양소 혼합물(미량 원소, 암모늄 인산염, 이스트 추출물, 트립톤 각각)을 주기적으로 첨가하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 본 발명은 폴리하이드록시알카노에이트 합성효소(polyhydroxyalkanoates synthase; *phaC*) 유전자, 삼중기능성 프로피오닐-CoA 합성효소의 아실-CoA 합성효소 도메인(acyl-CoA synthetase domain of trifunctional propionyl-CoA synthase; *acs*) 유전자 및 파신(phasin; *phaP1*) 유전자를 순서대로 포함하는 재조합 발현 벡터를 제공한다.

[0015] 바람직하게는,상기 *phaC* 유전자는 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어지고, 상기 *acs* 유전자는 서열번호 2로 표시되는 염기서열로 이루어지며, 상기 *phaP1* 유전자는 서열번호 3으로 표시되는 염기서열로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0016] 바람직하게는, 상기 *acs* 유전자의 5' 비번역 부위(untranslated region; UTR) 영역은 서열번호 4 내지 서열번호 7로 표시되는 염기서열 중 어느 하나로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0018] 본 발명에 있어서, "벡터"는 클론유전자(또는 클론 DNA의 다른 조각)를 운반하는데 사용되는 스스로 복제되는 DNA분자를 의미한다.

[0019] 본 발명에서 있어서, "발현 벡터"는 목적한 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동 가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. 발현 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함할 수 있다. 상기 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질 전환된 세포를 비 형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다. 그 예로는 앰피실린(Ampicillin), 카나마이신(Kanamycin), 제네티신(Geneticin; G418), 블레오마이신(Bleomycin), 하이그로마이신(Hygromycin), 클로람페니콜(Chloramphenicol) 과 같은 항생제 내성 유전자가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 당업자에 의해 적절히 선택 가능하다.

[0021] 또한, 본 발명은 상기 재조합 발현 벡터로 형질전환된, P3HP 생산이 증진된 재조합 대장균 균주를 제공한다.

[0022] 본 발명에서 사용된 기본 대장균 균주는 K12 MG1655로 여러 대장균 중에서 K-그룹의 대표 균주이며 안전성이 인정된 GRAS (Generally Regarded As Safe) 균주이다.

[0023] 바람직하게는, 상기 재조합 대장균 균주는 필라멘팅 온도 민감성 돌연변이 Z(filamenting temperature sensitive mutant Z; *ftsZ*) 유전자를 추가적으로 과발현시킨 대장균 균주를 상기 재조합 발현 벡터로 형질전환 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0024] 보다 바람직하게는, 상기 *ftsZ* 유전자는 서열번호 8로 표시되는 염기서열로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0025] 보다 더 바람직하게는, 상기 재조합 대장균 균주는 수탁번호 KCTC 15338BP로 기탁된 균주일 수 있으며, 수탁번

호 KCTC 15338BP로 기탁된 균주는 본 명세서에서 K12Z/P5 균주로 기재된 균주이다.

[0026] 지금까지 글리세롤을 원료로 사용하여 P3HP 생산한 결과 중 가장 높은 역가는 25.7g/L P3HP이다. 또한 1,3-PDO를 원료로 P-3HP를 생산한 결과 중 가장 우수한 결과는 세포 내 함량 57%, 그리고 반응기 생산 농도 42.9g/L 이었다. 이러한 낮은 성능은 아직 상업화에는 매우 부족한 수준이다. 낮은 성능에는 여러 가지 원인이 있으나 가장 중요한 원인은 독성이 매우 높은 3-HPA를 중간 대사산물로 사용하기 때문이며 글리세롤이나 1,3-PDO를 원료로 사용하는 한 3-HPA를 거치지 않는 것은 불가능하다. 3-HPA를 피하는 방법은 3-HP를 원료로 사용하는 것이나 지금까지는 여기에 사용할 3-HP가 존재하지 않았고 최근에 비로소 대량의 3-HP를 얻을 수 있게 되었다. 본 발명에서는 처음으로 3-HP를 원료로 사용하였고, 그 결과 세포 내 최대함량 85% 이상으로 P3HP 고분자를 생산할 수 있었다. 더 나아가 유가식 생물반응기 운전을 통해 1.77g/L/h의 생산성으로 >80g/L의 P3HP 단일 중합체를 생산할 수 있었다. 이는 지금까지 알려진 세계 최고의 수준이다.

[0027] 본 발명은 상업적으로 3-HP로부터 P3HP 단일 중합체를 효율적으로 생산하는 능력을 가진 미생물 세포 공장을 제공한다. E. coli를 숙주세포로 Chloroflexus aurantiacus 내 propionyl-CoA synthase의 acs 도메인과 C. necator의 phaC 유전자를 도입하여 3-HP로부터 P-3HP 고분자를 생합성하는 경로를 구축하였다. 세포 성장과 에너지 공급을 위해 글루코스를 탄소원으로 공급하고 폴리머 합성을 위해 3HP를 공급하였다. 따라서 본 발명의 재조합 대장균은 3-HP로부터 P-3HP를 생합성하는 경로의 효소 2개를 과발현하는 플라스미드를 포함한다. P-3HP 생합성 경로를 구성하는 효소는 다음과 같다: (1) 3HP를 3HP-CoA로 전환시키는 3HP-CoA 합성효소 (Acs), (2) 3HP-CoA를 P-3HP로 전환하는 고분자 중합효소 (PhaC). 이중 Acs는 ATP를 에너지원으로 이용한다.

[0028] 또한, 본 발명은 폴리머 독성을 감소시키는 phasin(phaP1)을 함께 과발현시키는 재조합 발현 벡터를 제공한다. P3HP는 세포 내 제품으로 생산될 때 세포 형태에 심각한 영향을 미치고, 세포 단백질과 상호작용하여 독성 효과를 나타낸다. phasin으로 불리는 PhaR, PhaP, PhaM 등의 단백질은 폴리머 생합성 조절, 생성된 폴리머의 코팅(표면 대 부피 비율 결정), 세포 내 국소화, 세포분열시 폴리머의 분리 조절 등을 통해 생성된 폴리머의 세포 내 독성을 감소시킨다고 알려져있다.

[0029] 또한, 본 발명은 폴리머 독성을 감소시키는 세포 분열을 촉진하는 단백질 ftsZ의 과발현 균주를 제공한다. 최근 연구에 따르면 폴리머 생산 중 세포의 필라멘트화도 PHA의 세포내 축적에 많은 영향을 준다. FtsZ는 세포 분열시 세포 중간 부분에 고리를 형성하여 세포 분열을 촉진하는데 이의 발현을 증가시키거나 억제하여 세포분열이나 세포의 크기를 변화시킬 경우 폴리머 생산이 달라진다고 보고된 바 있다.

[0031] 또한, 본 발명은 상기 재조합 대장균 균주를 배양하는 단계를 포함하는 P3HP 생산 증진 방법을 제공한다.

[0032] 바람직하게는, 상기 배양하는 단계는 3-HP를 기질로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0033] 바람직하게는, 상기 방법은 1) 당을 이용하여 세포를 농도 30 g/L 이상의 수준으로 성장시키는 단계; 및 2) 3-하이드록시프로피온산과 당을 지속적으로 첨가하여 고농도 P3HP가 세포 내에 축적되도록 하는 단계를 포함하는, 2단계 유가식 발효공정일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0035] 이하에서는 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0037] **<실험예>**

[0038] 하기의 실험예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.

[0040] **1. 사용재료**

[0041] 화학물질은 Sigma-Aldrich(미국)에서 구매하였다. 대장균 성장을 위한 배지구성 성분인 tryptone, yeast extract, agar는 Difco(미국)에서 구매하였다. 염색체 DNA 분리, DNA 정제 및 플라스미드 분리용 키트는 각각 Promega(미국), Qiagen(독일) 및 Cosmo-Genetech(한국)에서 구매하였다. 고품질 DNA 폴리머레이즈(pfuX), T4

리게이즈, 제한효소 등 분자생물학 실험에 필요한 시약은 New England Biolabs(미국)에서 구매하였다. 유전자 삭제 플라스미드인 pKOV는 Church 교수님(하버드 대학교)으로부터 제공받았다. 프라이머 합성 및 Sanger 염기서열 분석은 Macrogen Co. Ltd(한국)에서 수행하였다.

[0043] **2. 균주 및 배양조건**

[0044] E. coli 균주인 K-12 MG1655, W3110 (ATCC 27325), XL1-Blue, BW25113, BL21 (DE), 그리고 DH5α의 세부 정보는 표 1에 기재하였다. 3-HP 용액은 노루 홀딩스(한국)에서 제공되었다. 미생물 배양을 위해 M9 최소 배지를 약간 변형시켜 사용하였고, 이 배지는 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25 g/L, NH_4SO_4 2 g/L, yeast extract 0.5 g/L, 그리고 potassium phosphate 100 mM로 구성되었다 (pH는 7.0이었다). 세포 성장과 에너지 생성을 위해 3% 농도의 글루코스가 탄소원으로 사용되었다. 세포 성장 및 고분자 생산은 특별한 언급이 없는 한, 30도에서 250 rpm에서 수행되었다. Fed-batch 발효 중 pH 는 6 N NH_4OH 및 5 N HCl을 첨가하여 유지하였다.

표 1

[0045]

Strains	Details	Source/Remarks
*E. coli*DH5α		Takara, Korea (Cloning host)
K12	*E. coli K12 MG1655*	KCTC1116
BL21(DE3)	*E. coli BL21(DE3)*	Novagen
W3110	*E. coli W3110*	ATCC 27325
XL-1 Blue	*E. coli XL-1 Blue*	KCCM, Korea
BW25113	*E. coli BW25113*	CGSC
K9	*E. coli K12 MG1655 ΔpoxB ΔldhA Δpta-ackA ΔadhE ΔyciA ΔpdhR*	Lab strain
K12Z	*E. coli K12 MG1655 ΔpftsZ::ptrc_ftsZ*	This study
Plasmid		
pK1	*pKOV_Ptrc_ftsZ*	overexpression of *ftsZ*
P0	*pET_T7_phaC_acs*	P3HP production
P1	*pQE-80L_T5_phaC_acs*	P3HP production
P2	*pQE80L_T5_phaC_UTR1_acs*	Pathway balancing
P3	*pQE80L_T5_phaC_UTR2_acs*	
P4	*pQE80L_T5_phaC_UTR3_acs*	
P5	*pQE80L_T5_phaC_UTR2_acs_phaP1*	P3HP production with phasin

[0047] **3. 플라스미드 및 변이균주의 제작**

[0048] 본 발명에서 사용한 모든 균주와 플라스미드는 표 1에 기재되어 있다. P0 플라스미드를 제작하기 위해, polyhydroxyalkanoates synthase 유전자인 phaC와 trifunctional propionyl-CoA synthase의 ACS 도메인인 acs를 각각 Cupriavidus necator와 Chloroflexus aurantiacus의 염색체 DNA에서 phaC-F, phaC-R, acs-F, acs-R 프라이머를 사용하여 PCR 증폭하였다. 이를 오버랩핑 PCR로 단일 조각으로 만들어 제한효소로 절단하고 pET-30b(+)에 클론화하였다. 또한, P1에서 P9까지 플라스미드를 합성하기 위해 벡터를 pQE-80L로 변경하고 프로모터를 T5로 변경하였다.

[0049] 세포 분열에 관여하는 유전자 ftsZ는 동종 재조합법을 사용하여 과발현하였다. 즉, trc 프로모터를 도입할 대상 위치(target location)의 flanking 영역을 증폭하고 trc 프로모터와 하나의 조각으로 만들어 trc 프로모터를 ftsZ 앞에 도입하였다. pK1 플라스미드를 제작하기 위해, 상류 영역(조각 1)은 US-F 및 US-R 프라이머를 사용하여 증폭하였고, Ptrc(조각 2)는 T-F, T-R 프라이머를 사용하여 증폭하였으며, 하류 조각(조각 3)은 DS-F 및 DS-R 프라이머를 사용하여 증폭하였다. 조각 4는 US-F와 DS-R 프라이머를 사용하여 조각 1,2,3을 오버랩핑 PCR하여 제작하였다. 자살 (suicide) 벡터는 조각 4를 선형화된 pKOV와 리게이션하여 제작하였고 이후 대상 호스트에 동종 재조합을 위해 도입하였다.

[0051] **4. 유전자 재조합 균주의 제작**

[0052] 재조합 균주 제작을 위해 호스트 균주를 37도에서 8시간 동안 LB 배지에서 배양하였다. 그 후, 세포는 6,000 × g에서 5분간 원심 분리하고 10% 글리세롤로 2번 세척한 후 같은 용액에 재분산하였다. 그런 다음, electroporation을 통해 플라스미드를 숙주 세포에 도입하였다. 이후, 세포는 LB 배지를 사용하여 회복 배양을 실시하고 항생제가 첨가된 LB 플레이트에 도말하였다.

[0054] **5. 분석 방법**

[0055] (1) 기질과 대사산물의 분석

[0056] 세포배양액의 3-HP, 포도당, 그리고 다른 대사물질의 농도는 고성능 액체크로마토그래피(HPLC, Agilent 1260 Infinity II, Santa Clara, CA, USA)로 측정하였다. 분석을 위해, 배양액을 10,000 × g로 10분간 원심분리하여 무세포 상등액을 얻었다. 상등액은 0.4 μm 필터로 여과하였으며, 65℃에서 이온교환 수지 Aminex HPX-87H 컬럼 (300 mm × 7.8 mm; BioRad, Hercules, CA, USA)을 사용하여 이온간 상호작용을 이용해 2.5 mM H_2SO_4 이동상으로 분리하였다.

[0058] (2) PHA 분석

[0059] 고분자의 양은 고분자를 메틸 에스터 (methyl 3HP ester)로 전환한 후 가스크로마토그래피-질량 분석법 (GC-MS)을 이용하여 측정하였다. 이를 위해 BD-5MS UI 캐피러리 컬럼 (60 m × 250 μm × 0.25 μm)을 이용하고 헬륨을 캐리어 가스로 사용하였다. 메틸에스터를 만드는 고분자의 메탄올 첨가 분해 반응을 위해, 냉동 건조된 세포 펠릿에 15% (부피 비) H_2SO_4가 포함된 메탄올을 넣고 100℃에서 2 시간 30 분 동안 반응시켰다. GC-MS 분석을 위한 내부 표준물질로 메틸 벤조에이트를 사용하였으며, 분석 조건은 다음과 같다: 주입 온도 250℃, 주입 용량 5 μL, 운반기체의 유량 0.7 mL/min, 온도 ramping 10℃/min, 총 런타임 25 분.

[0060]

[0061] **<실시예 1> P3HP 호모폴리머 생산을 위한 생화학 경로의 구성**

[0062] 먼저, E. coli BL21 (DE3) 균주를 이용하여 P3HP 생산 가능성을 조사하였다. P3HP의 생산을 위해서는 경로 유전자 발현이 중요한데 BL21 균주는 유전자 발현이 용이하므로 P3HP 생산 가능성을 조사하는데 적합하다고 판단하여 선정하게 되었다. 3-hydroxypropionic acid (3HP)을 3-hydroxypropionyl-CoA (3HP-CoA)로 전환하는 Ca_acs (trifunctional propionyl-CoA synthase의 acyl-CoA synthetase 도메인)와 3HP-CoA 모노머를 중합하는 Cn_phaC (class I polyhydroxyalkanoates synthase) 두 유전자를 pET-30 b(+) 플라스미드에 클론하였고 (P0 플라스미드로 명명함; 도 1), 이렇게 재조합된 플라스미드는 E. coli BL21 (DE3)에 도입하였다. 재조합 E. coli BL21은 M9 배지에 100 mM 3HP 나트륨 염과 200 mM 글루코스를 첨가하여 30℃ 및 200 rpm에서 진탕 배양하였다(도 2). 48 시간 동안 배양 결과, 재조합 BL21/P0 균주는 130 mM의 글루코스를 소비하고 5.5 g/L DCW (P3HP 함량 55%)을 생산하였는데 이때 3.05 g/L의 P3HP 고분자를 생산했다(도 2). 이 결과는 Ca_acs 및 Cn-phaC에 의해 인코딩된 두 효소가 E. coli BL21 (DE3)에서 잘 기능하고 외부에서 첨가한 3-HP로부터 P3HP를 잘 생산한다는 것을 의미한다. P3HP 생산이 성공적으로 이루어졌으므로 두 효소 시스템을 사용하여 P3HB 생산을 개선하기 위해 추가적인 대사 공학 연구가 수행되었다.

[0064] **<실시예 2> P3HP 생산을 위한 최적의 숙주세포 선정**

[0065] 일반적으로 PHA의 생합성에서 적절한 박테리아 호스트의 선택은 매우 중요하다. 호스트 균주를 스크리닝하기 위해 고복제 ColE1 복제 origin을 가지며, acs와 phaC 두 경로 유전자를 T5 프로모터 하에 발현하는 새로운 플라스미드 P1을 제작하였다. 그 이유는 P0 플라스미드의 T7 프로모터는 BL21에만 존재하는 T7 RNA 폴리머라제에 의해 인식되므로 다른 E. coli 균주에서는 사용할 수 없기 때문이다. 5개의 E. coli 균주에 P1 플라스미드를 도입한 후 P3HP 생산을 조사하였다. P3HP 경로는 배양 초기 즉, 0 h에 0.25 mM isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)를 첨가하여 유도되도록 하였다. 배지는 M9을 사용하였고 배양시간은 48시간이었

다. 조사한 대장균 균주 중에서 E. coli K12 MG1655가 2.11 g/L로 가장 높은 P3HP 생산을 보였으며, 3HP 소모량 (124 mM) 및 글루코스 소모량 (29 mM)도 가장 높았다. 그 다음으로, E. coli BL21(DE3)는 1.61 g/L의 P3HP를 생산하였다. 반면, 여러 균주 중에서 W3110은 가장 적은 양의 P3HP (0.05 g/L)를 생산하였다(도 3). 또한, 균체 내 고분자 함량에서도 K12 균주는 46%로 최대였고, 다음으로 BL21 균주는 36% P3HP 함량을 보였다. 이 결과는 XL1-Blue 균주가 K12, JM109, B 및 W 균주 중에서 가장 좋았다는 이전의 보고와는 다르다. 서로 다른 호스트가 P3HP 생산에서 서로 다른 성능을 보이는 이유는 자세히 연구되지 않았다. 성능에 영향을 미칠 수 있는 요인으로는; 같은 프로모터와 플라스미드를 사용하는 경우에도 균주에 따라 달라지는 유전자 발현의 차이, 세포분열에 관여하는 단백질의 발현 정도 차이 (이들 단백질 발현이 PHA 축적에 영향을 받을 수 있음), 세포 내 P3HP 축적으로 인한 filamentation 의 차이 등이다. 또한, 3HP를 기질로 사용할 때 발생하는 독성 효과도 E. coli 균주 간에 차이가 있을 수 있다. 또 한가지 중요한 사실은 도 2에서 보여진 것처럼 BL21(DE3) 균주가 P0 플라스미드 (BL21/P0)를 사용한 경우 P1 플라스미드를 사용한 경우보다 더 많은 P3HP를 생산했다는 사실이다. 또한, P1 플라스미드를 사용한 어떤 균주(K12 포함)보다 더 많은 P3HP를 생산했다는 것이다. 이는 BL21에서 T7 프로모터 하에서 P3HP 합성 경로의 발현이 T5 프로모터 하에서 발현보다 높았음을 시사한다(도 2).

[0067] **<실시예 3> 배양조건의 최적화**

[0068] P3HP 경로 유전자 발현의 유도 시간과 배양 시 교반 속도의 효과 등 배양조건이 P3HP에 미치는 영향을 K12 MG1655 균주 (K12/P1)를 사용하여 조사하였다. 먼저 유도시간의 영향은 IPTG 첨가시간을 0, 6, 9, 12 h로 변화시키면서 조사하였다 (도 4A). 이 때 IPTG는 0.25 mM로, 그리고 진탕 배양기 교반 속도는 200 rpm으로 일정하게 유지하였다. 유도 시간은 P3HP 생산에 중요한 영향을 미치는 것으로 나타났다. 유도를 6시간과 9시간에 하면, 각각 4.07g/L과 4.63g/L의 P3HP titer를 얻을 수 있었다. 이에 비해, 0시간 유도에서는 2.73g/L의 P3HP만 생산되었다. P3HP 함량도 유도 시간이 증가함에 따라 증가하였는데, 0시간 유도에서 58%였지만 6시간과 9시간 유도에서 각각 75%와 92%까지 증가하였다. 또한, 9시간의 가장 늦은 유도 조건에서는, 실험 종료 시점의 실제 세포 생물량 (T_DCW; 세포 건조 중량에서 P3HP 중량을 빼서 얻은 값)이 0.35g/L로, 0시간 유도에서의 1.98g/L보다 훨씬 낮게 나타났다. 3HP를 첨가하지 않아 P3HP를 생산하지 않을 경우에, K12/P1 균주는 대략 12 시간 내에 ~10 OD600 또는 ~2.8 g/L의 농도로 세포를 성장시킬 수 있었다. 따라서 P3HP 생산이 세포 생물량을 감소시키며, 생산량이 높을수록 그 감소가 심해진다는 것을 알 수 있다. PHA 생산 경로와 PHA 생산의 유도는 세포 내 heat shock protein의 발현을 유발시켜 세포 대사를 변경할 수 있다는 것이 보고되었다. P3HP가 축적되어 세포 내 큰 공간을 차지하면, 내부호흡을 촉진시켜 세포에 스트레스를 유발시키고, 이로 인해 세포질의 손상이 발생할 수 있다. 그러나 9시간의 늦은 유도시간이 0시간 유도보다 높은 P3HP 생산과 낮은 T_DCW를 보이는 이유는 분명하지 않다.

[0069] PHA 생산 중에는 세포 분열이 억제되어 균사성 (filamentous) 성장이 증가하고 이는 배양액의 점성도를 증가시킨다. 따라서, 교반은 PHA 축적에 심각한 영향을 미친다. 고정된 유도 시간 9시간에서 3개의 서로 다른 교반 속도 (150, 200 및 250 rpm)를 테스트했다. 교반 속도가 증가함에 따라 고분자 총량이 향상되어 250 rpm에서 5.5 g/L로 200 rpm에서 5.1 g/L, 150 rpm에서 4.3 g/L에 비해 높은 값을 보였다 (도 4B). 이는 T_DCW가 개선되면서 (200 rpm에서 1.37 g/L에서 250 rpm에서 1.91 g/L로 개선됨) 나타난 결과이다. 그러나, 세포 내 P3HP 함량은 200 rpm의 경우 79%로 가장 높았고, 250 rpm에서는 74%로 다소 감소했다. 높은 세포 농도를 갖는 배양액이 PHA 생산에 유리하다는 연구 결과가 있다. 높은 세포 농도는 높은 산소공급 조건 하에서 얻어진다. 그러나 PHB 생산의 경우 현재 결과와는 대조적으로, 적당히 제한적인 산소 농도에서 고분자 생산이 높아진다는 보고도 있다. 그 이유로는 낮은 교반속도에서 NAD(P)H/NAD(P)+ 비율이 올라가고 아세틸-CoA 노드에서 탄소 흐름이 증가하여 PHB 축적 쪽으로 증가하여 PHB 생산에 긍정적인 영향이 나타난다고 보고된 적이 있다. 즉 세포 농도를 높이면서 동시에 PHB 축적기간에는 PHB 생산쪽으로 탄소흐름을 높게 유지하고 또한 환원력 공급을 좋게 유지하는 것이 좋다는 뜻이다. 그러나, PHB와 달리, P3HP는 아세틸-CoA에서 합성되는 것이 아니라 3HP-CoA에서 합성된다. 따라서, 본 발명의 경우, 공기 공급량이 증가할수록 최종 P3HP의 titer가 증가한다고 해도 전혀 이상한 일이 아니다. 즉, 개선된 세포 성장 및 ATP 생산이 P3HP의 생산을 증가시킬 수 있다는 뜻이다. 특히 ATP는 P3HP 생산 경로에서 필수적인 효소 반응, 즉 Acs 반응에 필수적이다(도 1). 또한, 산소 결핍은 세포의 균사체화를 증가시켜 PHA 생산 및 세포 생존율에 모두 나쁜 영향을 미칠 수 있기 때문이다.

[0071] **<실시예 4> 경로 유전자의 균형 발현을 위한 UTR engineering**

[0072] SDS 단백질 정량 결과 Acs(95 kDa)의 발현량이 PhaC(65 kDa)의 발현량보다 훨씬 높았으며 Acs는 세포질 내 총 단백질의 35%를 차지하였다(도 5). 이러한 발현량은 너무 과도하여 세포에 부담을 줄 뿐 아니라 PhaC 효소활성 과도 균형이 맞지 않을 것으로 예상되었다. 따라서, P1 플라스미드에 클론된 acs 유전자의 UTR을 수정하여 acs 발현량을 감소시키는 실험을 실시하였다. in silico UTR Designer에 기반하여 2-14 배 감소할 것으로 예상되는 3개의 새로운 UTR 서열을 선정하고 이를 포함하는 플라스미드를 제작하였다(표 2). 도 5A에서 볼 수 있듯이, P2, P3, 및 P4를 포함하는 K12 균주에서 acs 유전자의 발현은 각각 P1에서 관찰된 것과 비교하여 86%, 69%, 23% 수준으로 감소하였는데 이는 전체 세포질 내 총 단백질의 30%, 24%, 8%에 해당한다. 이 재조합 균주들을 9시간 IPTG 유도 및 250 rpm 조건에서 플라스크 배양하고 P3HP 생산을 조사하였다. K12/P3 균주는 가장 높은 세포농도 51.8 OD600을 보였다 (K12/P1는 42.4 OD600이었음) (도 5B). 또한, 도 5C와 도 5D에서 나타난 것처럼, Acs의 발현감소는 포도당 소비 및 T_DCW를 개선시켰다. 즉 T_DCW의 경우 K12/P1의 1.5 g/L에서, K12/P3의 3.4 g/L로 개선되었다. 이는, 불필요하게 높은 acs 발현이 세포 성장을 억제하는 것으로 의미한다. 또한, 세포 성장에 힘입어 P3HP titer도 5.6 g/L에서 6.4 g/L로 향상되었다. 다만, 세포 내 함량은 K12/P1의 78%에 비해 K12/P3에서는 71%로 다소 감소되었다. 놀랍게도, K12/P4 균주에서는 P3HP 생산량이 0.4 g/L에 불과했고 이는 Acs의 낮은 발현에 기인한 것으로 판단되었다(도 5D). 이러한 결과를 바탕으로 K12/P3 균주를 최적 균주로 선정하여 추가적인 연구를 진행하였다.

표 2

[0073]

Plasmids	Purpose	Code	UTR Sequence	In silico expression level	Fold change by prediction*
acs					
P1	Original	UTR0	TTAACTTTAAGAAGGAGATATACAA (서열번호 4)	2,183,619	1.00
P2	Reduced expression	UTR1	TTA**T**CTTTAAGAAGGAGATATACAA (서열번호 5)	943682	0.43
P3	Reduced expression	UTR2	TTAACTTTAAGAAGGA**AT**TATACAA (서열번호 6)	335320	0.15
P4	Reduced expression	UTR3	TTA**T**CTTTAAGA**T**GGAGATATACAA (서열번호 7)	156075	0.07

[0075] **<실시예 5> P3HP 생산 향상을 위한 phasin의 도입**

[0076] PHA는 소수성 알갱이로 세포성장에 나쁜 영향을 줄 수 있다. 즉 세포 성장과 유지에 필수적인 소수성 단백질과 상호 작용하여 이들의 역할을 방해할 수 있기 때문이다. 이 때문에 PHA를 자연적으로 생산하는 많은 균주는 이러한 소수성 고분자와 단백질 간의 상호작용을 막아줄 수 있는 PHA 결합 단백질인 phasin을 발현한다. 이전 연구에서는 PhaP1이 amphipathic 구조 (즉, 소수성 및 친수성 도메인을 각각 가짐)를 가지고 있고 소수성 도메인이 PHA 표면에 결합하며 친수성 도메인이 세포질 방향으로 노출되어 PHA와 세포내 소수성 단백질과의 상호작용을 감소시켜 세포의 전체적인 안정성을 향상시킨다고 보고된 바 있다. Phasin 단백질이 소수성인 PHA 표면을 덮는 현상은 PHA 포장(PHA packaging)이라고 표현되기도 한다. 본 발명에서는 phasin의 영향을 조사하기 위해 C. necator 유래의 phaP1 유전자를 클론하고 P3 플라스미드에 도입하여 P5 플라스미드를 제작하였다(도 1). 그리고 P5 플라스미드가 도입된 재조합 균주를 이용, 30℃ 및 250 rpm에서 플라스크 실험을 수행하여 PhaP1이 P3HP 생산에 미치는 영향을 조사하였다. 48 시간 배양 시, 재조합 균주 K12/P5는 K12/P3에 비해 더 높은 OD600 및 포도당 소비를 보였다(도 6A). 특히, 포도당 및 OD600 프로파일은 24시간까지는 유사하지만 이후 배양기간에는 큰 차이가 나타났다. P3HP 함량은 K12/P3의 7.4 g/L에서 K12/P5의 9.4 g/L로 향상되었다. 이 때 T_DCW는 각각 3.6 및 3.3 g/L로 큰 차이가 나타나지 않았다(도 6B). 이는 Phasin의 발현이 P3HP 고분자의 생산을 도왔다는 증거이다. 이전 연구에서 언급된 대로 소수성인 P3HP의 독성이 phasin에 의해 감소된 것으로 추정되었다.

[0078] **<실시예 6> 세포 분열에 필수적인 단백질인 FtsZ의 과발현이 P3HP 생산에 미치는 영향**

[0079] E. coli 내부의 PHA 축적은 세포의 elongation과 균사체 성장을 유도하는데 이러한 원인으로 세포 분열에 필수적인 단백질인 FtsZ가 비활성화 되기 때문이라는 보고가 있다. 세포가 균사체 형으로 성장하게 되면 성장 속도

와 대사 활동이 낮아지며, PHA 축적량도 낮아질 수 있다. 따라서, 균사체 성장을 억제하기 위하여 trc 프로모터를 도입하여 ftsZ 유전자를 K12 균주에서 과발현시키고 이 변이 균주를 K12Z로 명명하였다. P5 플라스미드를 이용하여 FtsZ을 과발현시킨 K12Z/P5 균주를 제작하고 P3HP 생산을 실험하였다. 플라스크 실험 결과, K12Z/P5 균주는 FtsZ를 과발현하지 않는 균주 K12/P5 균주와 큰 차이가 없었다. 그 이유로 플라스크 실험은 기간이 짧고, 배양 중 배지 내 pH 변화가 심하여 FtsZ 과발현 영향이 나타나지 않았을 것으로 추정되었다. 유가식 배양 (fed-batch) 바이오리액터 배양을 통해 ftsZ 과발현이 P3HP 생산에 미치는 영향을 다시 조사하였다(도 7). 생물반응기 배양시 DO는 30% 이상 유지되도록 하였고, pH-stat 모드에서 포도당이 공급되도록 하였다. 즉, pH 상한선이 pH 6.9로 설정되었고, 3-HP 소모가 진행되어 pH가 6.9보다 높아지면 포도당 (70% w/v) 공급이 시작되도록 하였다. pH-stat 방식으로 포도당을 공급할 경우 포도당 농도를 낮게 유지할 수 있어서 발효 중 부산물 축적을 낮추는데 유리하였다. P3HP 생합성을 위한 합성 경로 유전자의 생합성은 충분한 세포 성장이 일어난 후 12시간에 유도되었으며, 이때 두 균주에서 DCW는 모두 약 16 g/L에 도달하였다. 유도 후 24시간까지 T_DCW는 K12/P5에서는 24.0 g/L로 증가하였고 반면 K12Z/P5에서는 30.1 g/L로 증가하였다. 이후, P3HP의 축적이 계속되면서 바이오매스의 감소가 관측되었다(도 7A 및 도 7B).

[0080] 한편, P3HP 생합성 유도 후 세포분열 단백질 FtsZ를 과발현한 K12Z/P5이 K12/P5보다 높은 T_DCW를 유지하는 것이 관찰되었다. 이는 세포 분열 단백질 FtsZ의 과발현이 PHA 생산 중 세포 성장을 향상시키는 데 효과적이었다는 것을 의미한다. 24시간 이후의 알짜 세포 성장이 종료되고 또 T_DCW 감소가 일어나는데 이는 PHA 함량과 밀접한 관계가 있는 것으로 판단된다. 이전의 연구에서도 PHA 함량이 50% 이상이 되면 세포 성장이 심각하게 억제된다는 연구 결과가 있었다. 한 편 pH-stat 모드에서는 적절한 포도당 공급으로 인해 아세트산과 에탄올의 축적이 미미하였다 (<7 mM). 36시간까지 P3HP 생산량은 두 균주 모두 거의 동일했으나 (K12/P5와 K12Z/P5에서 각각 41 및 42 g/L), 발효 종료 (48 h) 시 P3HP 수율은 각각 46 g/L 및 50 g/L로 ftsZ 과발현 균주가 더 나은 결과를 보였다. 특히, 발효 후반 K12/P5와 K12Z/P5에서 P3HP의 비 생산성(specific production rate)은 각각 0.052 g P3HP/g T_DCW/h와 0.085 g P3HP/g T_DCW/h로 ftsZ 과발현 균주가 우수하였다. P3HP는 세포 내에 축적되는 물질이므로, P3HP titer를 얻기 위해서는 P3HP의 세포 내 함량을 높이는 것은 물론 높은 세포 생물량(T_DCW)을 얻는 것이 필수적이다. 이는, P3HP의 함량이 알짜 세포 농도 즉, T_DCW의 증가를 심하게 억제시키는 범위, 즉 세포내 P3HP의 함량이 50%에 도달하기 전에 배양기 내 세포 농도를 적절하게 증가시키는 것이 P3HP의 부피 생산농도를 증가시키는데 중요하다고 판단된다.

[0082] **<실시예 7> 생물반응기 고농도 배양을 통한 P3HP의 생산**

[0083] 상기에서 논의한 대로, PHA 생산을 위해 고분자가 과도하게 축적되기 전에 세포 농도를 높이는 것이 매우 중요하다. 어떤 반응기를 쓰던지 산소 공급의 제한에 의해 세포 성장이 제한된다. 본 발명에서 K12Z/P5 균주의 고농도 배양을 위해 pH-stat으로 글루코스를 적절히 유지하고 동시에 DO를 설정 값 (30%) 이상으로 유지하기 위해 순산소를 공급하였다. 즉 DO가 설정 값 아래로 떨어지면 순산소를 공기와 함께 공급하였다. 이에 더해, 6시간마다 미량 원소 용액이 당초 배지 농도에 포함된 양만큼 첨가하고, 또한 생물량 증가 30 g 당 암모늄 인산염, 효모 추출물 및 트립톤 각각 1 g씩을 첨가하여 세포성장을 촉진하였다.

[0084] 순 산소 보충으로 12시간 후 세포 농도는 30 g/L에 도달하였으며, 이 시점에 IPTG를 첨가하여 P3HP 생산이 시작되도록 하였다. 이후 약 39시간이 되었을 때, 총 세포량(DCW)는 106 g/L까지 도달하였고, 그 이후에는 변화가 거의 없는 수준으로 유지되었다. T_DCW는 18시간에 36.4 g/L까지 증가한 후 45시간에 약간 감소하여 약 30 g/L이 되었다(도 8). 18시간에 P3HP 함량은 약 45%이었으며, 이 P3HP 함량은 T-DCW 감소를 시작하게 하는 농도였다. 문헌에 따르면 PHA 함량이 40% 이상이 되면 세포 농도가 감소하는데, PHA 종류나 균주에 따라 다소 차이가 나겠지만 대략 따라서 생장 저해를 일으키는 PHA 함량은 약 40%에서 50% 범위라 할 수 있다. 한편, P3HP titer는 39시간에 약 77 g/L까지 도달하며, 이후 45시간에 약 80 g/L에 도달하였다 이전 연구에 따르면 PHA 합성 효소의 활성이 발효 후반기에 상당히 감소한다고 알려져 있는데 P3HP 생합성의 중단도 이와 관련이 있을 것으로 추정된다.

[0086] 본 발명의 결과 얻어진 P3HP 80 g/L은 지금까지 알려진 바로는 최고 기록이다. 또한, 세포 내 함량 72%, 부피생산성 1.77 g/L/h도 최고의 결과다(표 3). 이러한 우수한 결과는 3-HP monomer를 기질로 직접 첨가하여 세포 성장이나 P3HP 합성에 방해가 되는 3HPA 같은 독성물질이 생성되지 않도록 한 것이 중요한 원인이라 할 수 있다. 또한, 생합성된 P3HP 고분자의 생체 내 독성을 낮추면서 고분자의 안정성을 높인 phasin의 발현, 그리고 세포

분열을 도와주는 FtsZ의 과발현도 중요한 원인이라 할 수 있다. 마지막으로 세포 성장과 P3HP의 효율적 생산을 위해 세포 성장을 효율적으로 진행하고 영양원과 산소공급을 원활하게 하는 등 발효 조건을 최적화한 것이 중요한 원인이라 할 수 있겠다.

표 3

[0087]

No	*E. coli* strain	Titer (g/L)	Yield (g/g)	Rate (g/L/h)	Content (%)	Time (h)	Substrate /Product	Reference
1	HMS174	1.42	--	--	11.98	92	Glycerol /P3HP	(Andreeßen et al., 2010)
2	JM109	--	--	--	18	48	PDO /P3HP	(Zhou et al., 2011)
3	S17-1 (flask)	1.82 2.98 3.38	--	--	89 80 43	48		
4	S17-1 (fermentor)	22.2 42.9	0.50 0.35	0.14 0.26	92 51.8			
5	Trans5a	0.67 1.20 1.09	--	--	41 67 20			
6	Trans1-T1	0.19 0.09 0.31	--	--	16 4.5 7.7			
7	BL21	--	--	---	0.98	92	Glucose /P3HP	(Wang et al., 2012)
8	JM109	10.1	--	--	46.4	84	Glycerol /P3HP	(Wang et al., 2013)
9	JM109	0.5	--	--	--	48	Glucose and glycerol/ P3HP	(Wang et al., 2014)
10	BL21				40	--	Glucose and glycerol/ P3HP	(Linares-Pasten et al., 2015)

[0089] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술한 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[0090] 본 발명의 범위는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

수탁번호

[0092]

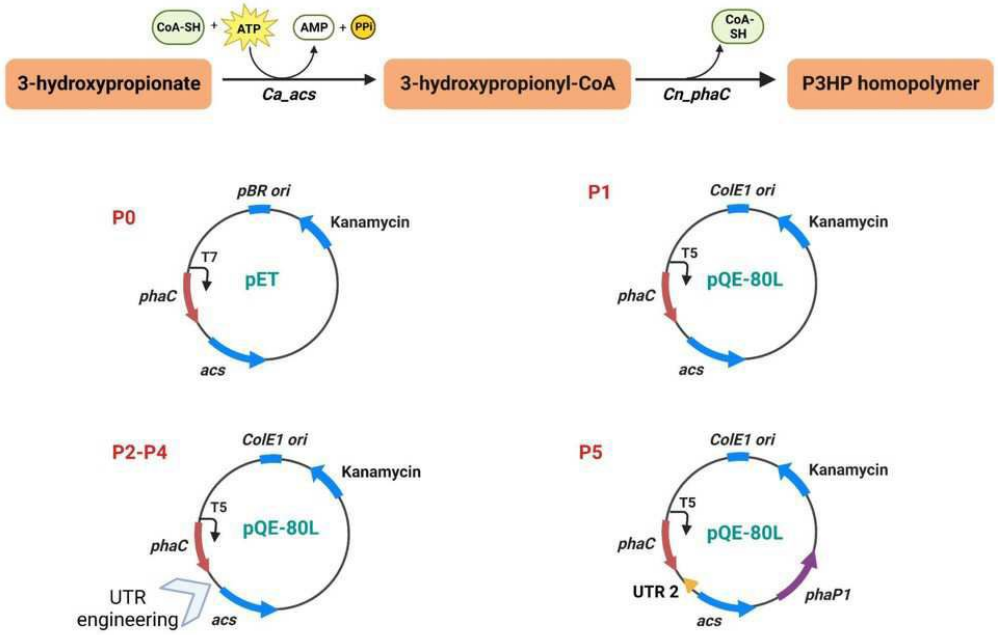
기탁기관명 : 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)

수탁번호 : KCTC15338BP

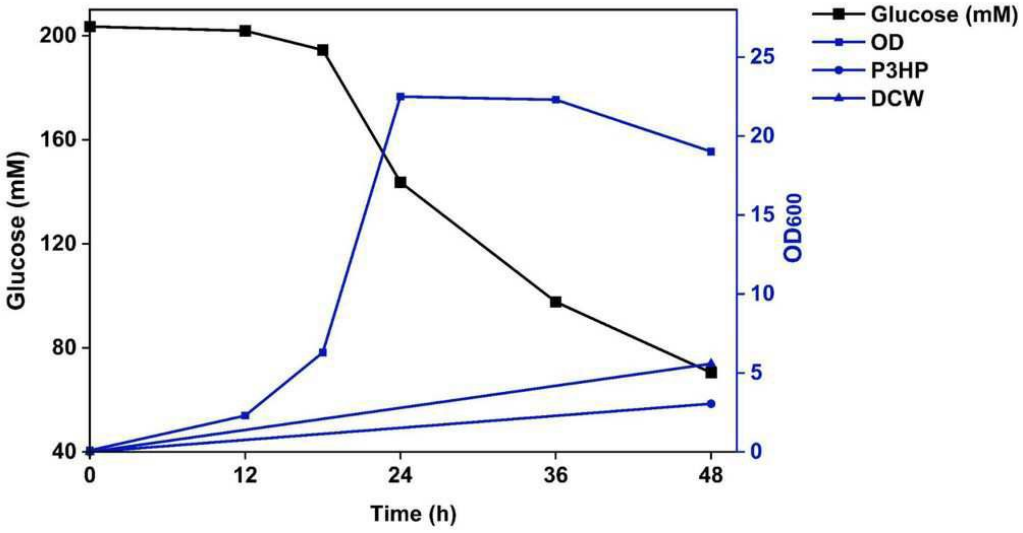
수탁일자 : 20230307

도면

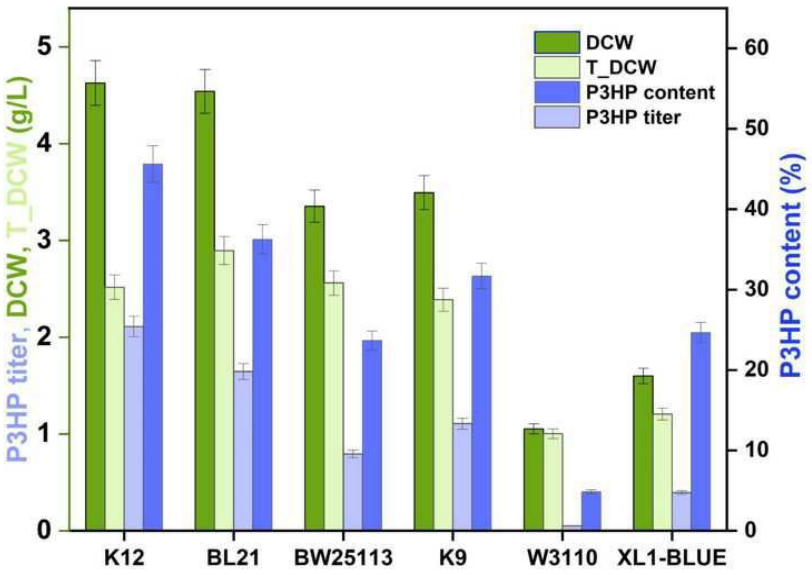
도면1


CoA-SH
ATP
AMP
PPi
3-hydroxypropionate
Ca_acs
3-hydroxypropionyl-CoA
CoA-SH
Cn_phaC
P3HP homopolymer
P0
pBR ori
Kanamycin
T7
pET
phaC
acs
P1
ColE1 ori
Kanamycin
T5
pQE-80L
phaC
acs
P2-P4
ColE1 ori
Kanamycin
T5
pQE-80L
phaC
UTR
engineering
acs
P5
ColE1 ori
Kanamycin
T5
pQE-80L
phaC
UTR 2
phaP1
acs

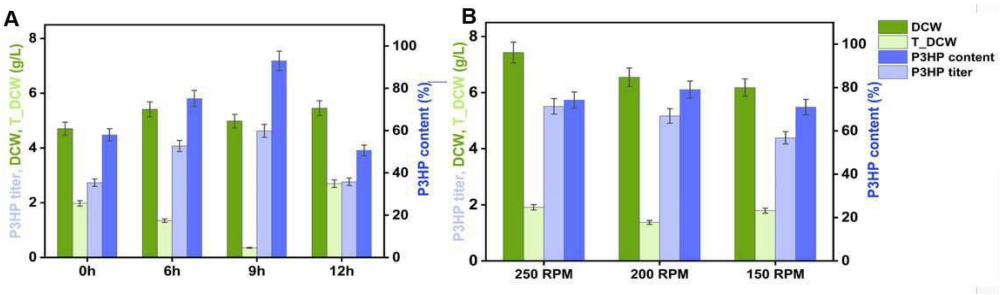
도면2


Glucose (mM)
OD
P3HP
DCW
Glucose (mM)
OD600
Time (h)
200
160
120
80
40
25
20
15
10
5
0
0
12
24
36
48

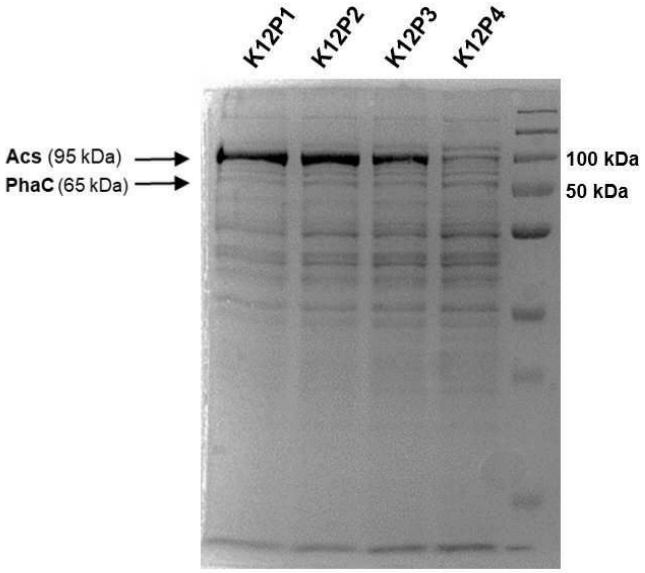
도면3


DCW
T_DCW
P3HP content
P3HP titer
P3HP titer, DCW, T_DCW (g/L)
P3HP content (%)
K12
BL21
BW25113
K9
W3110
XL1-BLUE

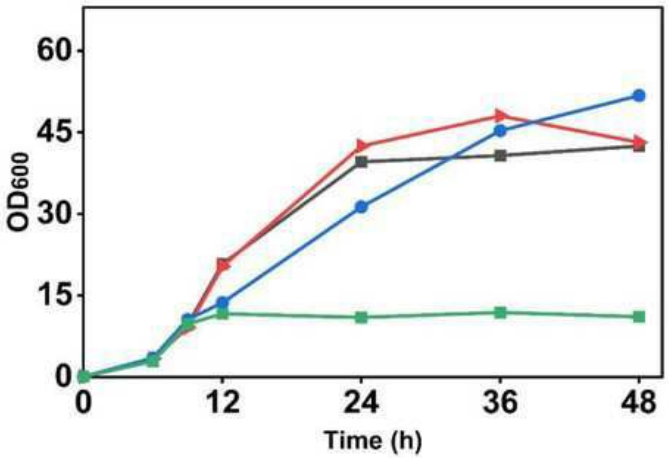
도면4


A
B
DCW
T_DCW
P3HP content
P3HP titer
P3HP titer, DCW, T_DCW (g/L)
P3HP content (%)
0h
6h
9h
12h
250 RPM
200 RPM
150 RPM

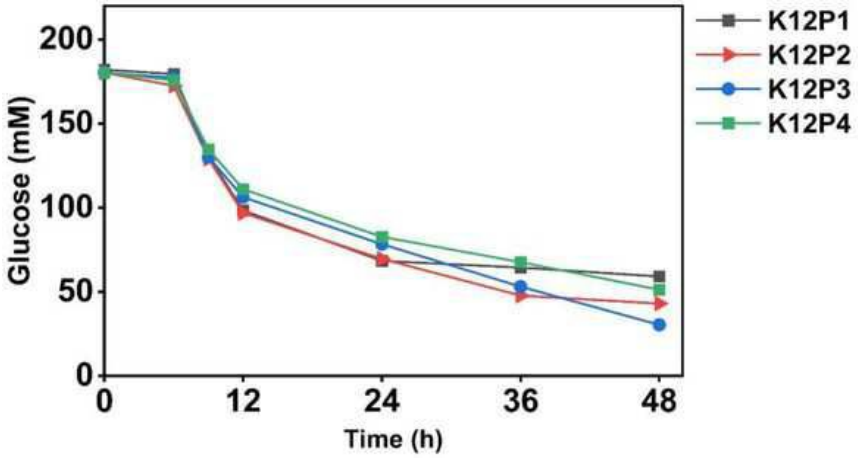
도면5a


K12P1
K12P2
K12P3
K12P4
Acs (95 kDa)
PhaC (65 kDa)
100 kDa
50 kDa

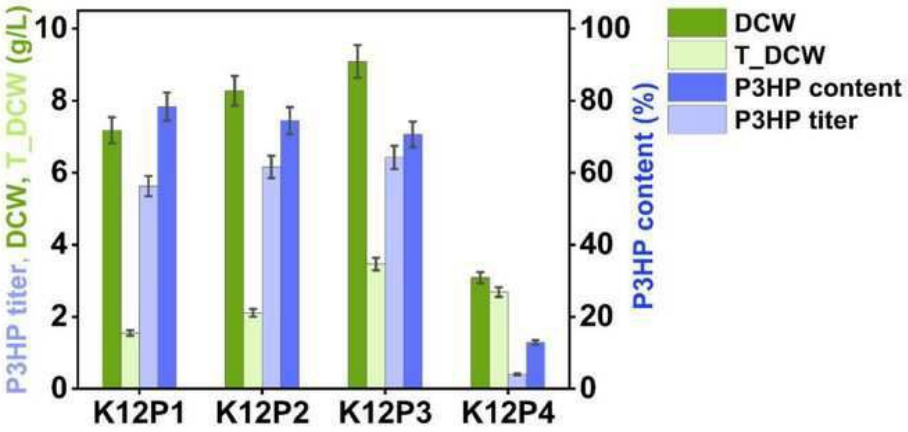
도면5b



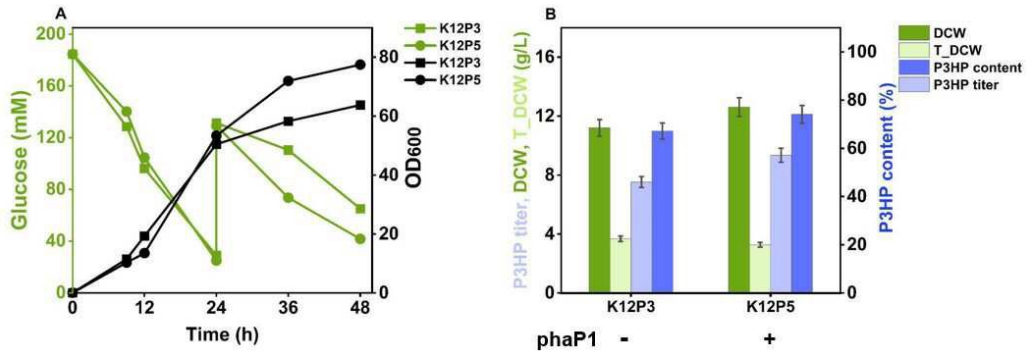
도면5c



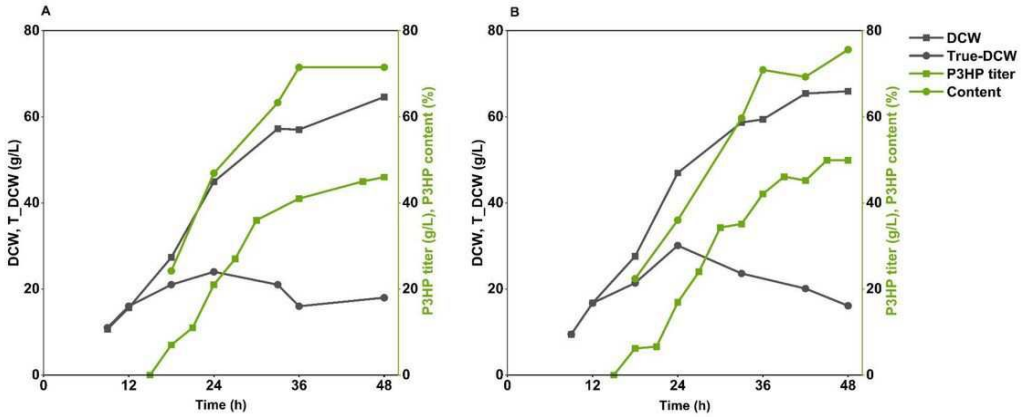
도면5d



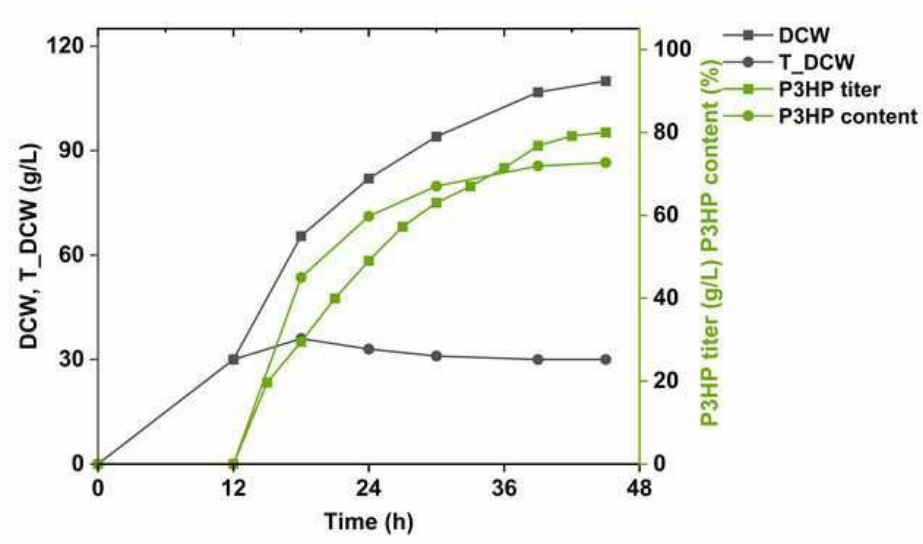
도면6


A
Glucose (mM)
OD600
Time (h)
K12P3
K12P5
K12P3
K12P5
B
P3HP titer, DCW, T_DCW (g/L)
P3HP content (%)
DCW
T_DCW
P3HP content
P3HP titer
K12P3
K12P5
phaP1 -
+

도면7


A
DCW, T_DCW (g/L)
P3HP titer (g/L), P3HP content (%)
Time (h)
B
DCW
True-DCW
P3HP titer
Content

도면8


DCW, T_DCW (g/L)
P3HP titer (g/L) P3HP content (%)
Time (h)
DCW
T_DCW
P3HP titer
P3HP content

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.