(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0026912
(43) 공개일자 2014년03월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/70 (2006.01) *C12N 15/52* (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01) *C12P 7/64* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0092750
(22) 출원일자 2012년08월24일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
이진원
서울 송파구 양재대로 1218, 201동 1601호 (방이동, 올림픽선수,기자촌아파트)
이선희
서울 은평구 불광로6길 10-10, 101호 (불광동)
정연태
서울특별시 마포구 망원2동 성원아파트 101동 306호
(74) 대리인
양부현

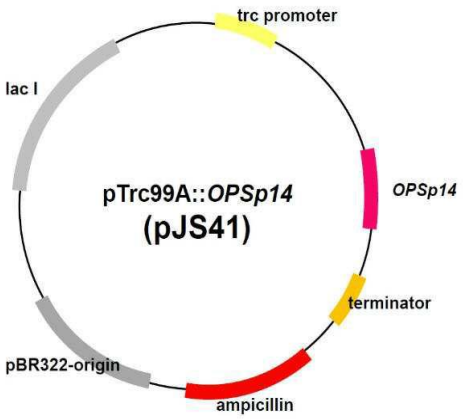
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **유리지방산 함량 개선을 위한 코돈 최적화 균주 및 그의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 (a) 스트렙토코커스 피오제네스(*Streptococcus pyogenes*) 유래의 아실-[아실운반단백질] 티오에스터라제(acyl-[acyl carrier protein] thioesterase)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 대장균(*Escherichia coli*)에서의 발현에 적합하도록 코돈 최적화(codon-optimization)하여 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열을 수득하는 단계; (b) 상기 아실-[아실운반단백질] 티오에스터라제의 코돈 최적화된 뉴클레오타이드 서열을 발현 벡터에 삽입하여 재조합 벡터를 제조하는 단계; 및 (c) 상기 재조합 벡터를 대장균에 형질전환하여 재조합 대장균을 제조하는 단계를 포함하는 아실-[아실운반단백질] 티오에스터라제 발현용 형질전환 대장균의 제조방법을 제공한다. 본 발명은 대장균으로부터 생산되는 지방산 중 C12:0 및 C14:0의 포화지방산 및 C18:1의 불포화지방산의 생산을 야생형과 비교하여 200-400% 증가시키므로, 바이오에너지 생산의 기초가 될 지방산 생산을 대량 생산하고 친환경적임을 물론이고 경제적으로도 큰 경제력을 갖출 수 있을 것으로 기대된다.

대 표 도 - 도5



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2011-0030348
부처명	교육과학기술부
연구사업명	기후변화대응 기초원천기술개발사업
연구과제명	바이오매스를 이용한 지방산계열 대체연료 생산 원천기술 개발
기 여 율	1/1
주관기관	서강대학교 산학협력단
연구기간	2009.09.30 ~ 2015.09.29

특허청구의 범위

청구항 1

다음의 단계를 포함하는 아실-[아실운반단백질] 티오에스터라제 발현용 형질전환 대장균의 제조방법:

(a) 스트렙토코커스 피오제네스(*Streptococcus pyogenes*) 유래의 아실-[아실운반단백질] 티오에스터라제(acyl-[acyl carrier protein] thioesterase)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 대장균(*Escherichia coli*)에서의 발현에 적합하도록 코돈 최적화(codon-optimization)하여 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열을 수득하는 단계;

(b) 상기 아실-[아실운반단백질] 티오에스터라제의 코돈 최적화된 뉴클레오타이드 서열을 발현 벡터에 삽입하여 재조합 벡터를 제조하는 단계; 및

(c) 상기 재조합 벡터를 대장균에 형질전환하여 형질전환 대장균을 제조하는 단계.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (b)의 발현 벡터는 프로모터 서열, 코돈 최적화된 아실-[아실운반단백질] 티오에스터라제를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 및 전사 터미네이터 서열이 작동적으로(operatively) 결합된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 프로모터는 trc 프로모터임을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 2 항에 있어서, 상기 전사 터미네이터는 rrnB 터미네이터인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (c)는 전기천공법으로 실시하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (c)의 대장균은 *E. coli* MG1655인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

상기 제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된 아실-[아실운반단백질] 티오에스터라제 발현용 대장균.

청구항 8

다음의 단계를 포함하는 지방산의 제조방법:

(a) 상기 제 7 항의 아실-[아실운반단백질] 티오에스터라제 발현용 대장균을 배지에서 배양하여 지방산을 생합

성 하는 단계; 및

(b) 상기 생합성된 지방산을 수득하는 단계.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 단계 (a)의 배지는 글루코즈, 소듐 설페이트, 트립톤, 암모늄 클로라이드, 디포타슘 포스페이트, 소듐 포스페이트, $(NH_4)_2$-H-시트레이트, 마그네슘 설페이트 및 티아민을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 8 항에 있어서, 상기 방법은 야생형 대장균과 비교하여 지방산에 대한 수율이 1.5-4.0배 증가된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제 8 항에 있어서, 상기 지방산은 C12:0 및 C14:0의 포화지방산 및 C18:1의 불포화지방산인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

스트렙토코커스 피오제네스(*Streptococcus pyogenes*) 유래의 아실-[아실운반단백질] 티오에스터라제(acyl-[acyl carrier protein] thioesterase)에 대한 대장균(*Escherichia coli*)에서의 코돈 최적화된 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산분자.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 유리지방산 함량 개선을 위한 코돈 최적화 균주 및 그의 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 바이오에너지로 대표되어지는 바이오에탄올, 바이오디젤, 바이오가스 및 부탄올에 대한 관심이 증가하고 있지만, 언급된 종류의 바이오에너지 모두 전력생산이나 수송용 연료로 사용될 수 있으나, 실적용 및 생산 방법의 몇몇 단점으로 인해 새로운 신재생에너지 자원인 탄화수소(hydrocarbon) 형태의 화합물에 대한 관심이 증가되고 있다. 현재 상용화되고 있는 탄화수소 화합물을 이용한 바이오디젤은 화학적 방법에 의해 생산되고 있다. 생물학적 방법에 따라 장쇄 지방산(long chain fatty acid)을 대사산물로서 생성할 수 있는 재조합 균주에 대한 관심도 증대되고 있다.

[0003] 대장균은 증식속도도 빠르고 유전자 조작이 쉬어 바이오화합물을 비롯하여 바이오에너지 생산에 사용되는 중요한 미생물이다. 그러나 대장균에 포함되어진 바이오디젤의 주요원료인 지방산이 매우 적다. 특히 사이토졸에 생산되어지는 유리지방산(free fatty acid)이 거의 생산되어지지 않는다. 최근 유리지방산 생산을 증가시키기 위해 식물의 유전자 도입으로 지방산을 증진시키는 연구는 많이 되어 왔다(Zhang, *Metabolic Engineering* 13 (2011) 713722).

[0004] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허

문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명자들은 안정적이고 효과적으로 지방산 생산성을 증진시키기 위한 재조합 미생물을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 스트렙토코커스 피오제네스(*Streptococcus pyogenes*)의 지방산 생합성 경로 중 마지막 단계에 관여하는 아실-[아실운반단백질] 티오에스터라제(*OPsp14*)를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 대장균 발현에 적합하도록 코돈 최적화(codon-optimization)하여 형질전환시킨 형질전환 대장균의 경우, 지방산 생산이 증가되는 것을 규명함으로써, 본 발명을 완성하였다.

[0006] 따라서, 본 발명의 목적은 아실-[아실운반단백질] 티오에스터라제 발현용 형질전환 대장균의 제조방법을 제공하는 데 있다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 아실-[아실운반단백질] 티오에스터라제 발현용 대장균을 제공하는 데 있다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 지방산의 제조방법을 제공하는 데 있다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산분자를 제공하는 데 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 스트렙토코커스 피오제네스(*Streptococcus pyogenes*) 유래의 아실-[아실운반단백질] 티오에스터라제(acyl-[acyl carrier protein] thioesterase)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 대장균(*Escherichia coli*)에서의 발현에 적합하도록 코돈 최적화(codon-optimization)하여 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열을 수득하는 단계; (b) 상기 아실-[아실운반단백질] 티오에스터라제의 코돈 최적화된 뉴클레오타이드 서열을 발현 벡터에 삽입하여 재조합 벡터를 제조하는 단계; 및 (c) 상기 재조합 벡터를 대장균에 형질전환하여 형질전환 대장균을 제조하는 단계를 포함하는 아실-[아실운반단백질] 티오에스터라제 발현용 형질전환 대장균의 제조방법을 제공한다.

[0012] 본 발명자들은 안정적이고 효과적으로 지방산 생산성을 증진시키기 위한 재조합 미생물을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 스트렙토코커스 피오제네스(*Streptococcus pyogenes*)의 지방산 생합성 경로 중 마지막 단계에 관여하는 아실-[아실운반단백질] 티오에스터라제(*OPsp14*)를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 대장균 발현에 적합하도록 코돈 최적화(codon-optimization)하여 형질전환시킨 형질전환 대장균의 경우, 지방산 생산이 증가되는 것을 규명하였다.

[0013] 본 발명의 대장균 제조방법을 각 단계로 나누어 상세하게 설명한다.

[0014] 단계 (a): 코돈 최적화(codon-optimization) 단계

[0015] 본 발명의 대장균을 제조하기 위해, 스트렙토코커스 피오제네스(*Streptococcus pyogenes*)의 아실-[아실운반단백질] 티오에스터라제(acyl-[acyl carrier protein] thioesterase)를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 대장균(*Escherichia coli*)에서의 발현에 적합하도록 코돈 최적화(codon-optimization)한다.

[0016] 본 발명의 주요한 특징은 본 발명에서 대장균에서 발현하고자하는 아실-[아실운반단백질] 티오에스터라제는 코돈 최적화 된 뉴클레오타이드를 갖는 것이다. 상기 아실-[아실운반단백질] 티오에스터라제는 도 1에 서 확인할 수 있듯이, 지방산 생합성 경로의 마지막 단계에 관여하며, 패티 아실-아실전송단백질(Fatty acyl-Acyl carrier proteins)을 가수분해하는 반응을 촉매한다.

[0017] 본 명세서에서, 용어 '코돈 최적화(codon-optimization)'는 단백질 제조를 증가시키는 방법 중 하나이다. 외래 단백질을 숙주에서 발현하는 경우, 외래 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 숙주가 자주 사용하는 코돈으로 구성되어 있지 않기 때문에, 최대로 발현시키기 위해서는 코돈 최적화하여야 한다. 코돈 최적화는 기본적으로 목적하는 핵산 서열의 발현빈도가 높지 않은 코돈을 숙주의 코돈 발현 빈도를 반영하여 숙주에 유리하게 변환하는 것이다. http://www.kazusa.or.jp/codon/ 는 모든 생물체의 코돈 빈도를 제시하고 있다.

[0018] 바람직하게는, 상기 아실-[아실운반단백질] 티오에스터라제의 코돈 최적화된 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제1서열이다.

[0019] 본 발명에서 이용되는 뉴클레오타이드 서열은 상기 언급된 서열 이외에 상기 뉴클레오타이드 서열에 대하여 실질적인 동일성을 나타내는 뉴클레오타이드 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 본 발명의 뉴클레오타이드 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 80%의 상동성, 보다 바람직하게는 최소 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 최소 95%의 상동성을 나타내는 뉴클레오타이드 서열을 의미한다. 서열비교를 위한 얼라인먼트 방법은 당업계에 공지되어 있다. 얼라인먼트에 대한 다양한 방법 및 알고리즘은 Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482(1981); Needleman and Wunsch, *J. Mol. Bio. 48:443(1970);* Pearson and Lipman, *Methods in Mol. Biol.* 24: 307-31(1988); Higgins and Sharp, *Gene* 73:237-44(1988); Higgins and Sharp, *CABIOS* 5:151-3(1989); Corpet et al., *Nuc. Acids Res.* 16:10881-90(1988); Huang et al., *Comp. Appl. BioSci.* 8:155-65(1992) and Pearson et al., *Meth. Mol. Biol.* 24:307-31(1994)에 개시되어 있다. NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-10(1990))은 NBCI (National Center for Biological Information) 등에서 접근 가능하며, 인터넷 상에서 blastp, blasm, blastx, tblastn and tblastx와 같은 서열 분석 프로그램과 연동되어 이용할 수 있다. BLSAT는 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/에서 접속 가능하다. 이 프로그램을 이용한 서열 상동성 비교 방법은 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_help.html에서 확인할 수 있다.

[0020] 단계 (b): 재조합 벡터의 제조

[0021] 이어, 상기 아실-[아실운반단백질] 티오에스터라제의 코돈 최적화된 뉴클레오타이드 서열을 발현 벡터에 삽입하여 재조합 벡터를 제조한다.

[0022] 본 명세서에 있어서, 용어 "발현 벡터"는 발현 벡터의 전사에 제공되는 추가단편에 작동가능하게 연결된 관심의 폴리펩티드를 암호화하는 단편으로 구성되는 선형 또는 원형의 DNA 분자이다. 그와 같은 추가단편은 프로모터 및 종료암호 서열을 포함한다. 발현 벡터는 하나 이상의 복제 개시점, 하나 이상의 선택마커, 폴리아데닐화 신호 등을 또한 포함한다. 발현 벡터는 일반적으로 플라스미드 또는 바이러스 DNA로부터 유도되거나, 또는 둘 다의 요소를 함유한다.

[0023] 본 발명의 벡터 시스템은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있으며, 이에 대한 구체적인 방법은 Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press(2001)에 개시되어 있으며, 이 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

[0024] 바람직하게는, 본 발명의 단계 (b)의 발현 벡터는 프로모터 서열, 코돈 최적화된 아실-[아실운반단백질] 티오에스터라제를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 및 전사 터미네이터 서열이 작동적으로(operatively) 결합된다. 본 발명의 코돈 최적화된 아실-[아실운반단백질] 티오에스터라제의 뉴클레오타이드 서열을 발현 조절서열에 작동가능하게 연결되어 발현 벡터 내에 삽입될 수 있다. 상기에서 '작동적으로(operatively) 결합된다'는 것은 하나의 핵산 단편이 다른 핵산 단편과 결합되어 그의 기능 또는 발현이 다른 핵산 단편에 의해 영향을 받는 것을 말한다. 또한, '발현 조절 서열(expression control sequence)'이란 특정한 숙주 세포에서 작동 가능하게 연결된 핵산 서열의 발현을 조절하는 DNA 서열을 의미한다. 그러한 조절 서열은 전사를 개시하기 위한 프로모터,

전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보좀 결합 부위를 코딩하는 서열 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다.

[0025] 본 발명의 벡터는 전형적으로 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터(예컨대, trc 프로모터, tac 프로모터, lac 프로모터, lacUV5 프로모터, lpp 프로모터, pL^{λ}프로모터, pR^{λ}프로모터, rac5 프로모터, amp 프로모터, recA 프로모터, SP6 프로모터, trp 프로모터 및 T7 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보좀 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 숙주 세포로서 *E. coli*(예, HB101, BL21, DH5α 등)가 이용되는 경우, *E. coli* 트립토판 생합성 경로의 프로모터 및 오퍼레이터 부위(Yanofsky, C., J. Bacteriol., 158:1018-1024(1984)) 그리고 파아지 λ의 좌향 프로모터(pL^{λ}프로모터, Herskowitz, I. and Hagen, D., Ann. Rev. Genet., 14:399-445(1980))가 조절 부위로서 이용될 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 벡터에 사용되는 프로모터는 trc 프로모터이고, 종결서열은 rrrB 터미네이터이다.

[0026] 숙주 세포 내로 주입된 벡터는 숙주 세포 내에서 발현될 수 있으며, 이러한 경우에는 다량의 아세토인 환원효소를 얻게 된다. 예를 들어, 상기 발현 벡터가 trc 프로모터를 포함하는 경우에는 숙주 세포에 IPTG(Isopropylthio-β-D-Galactoside)를 처리하여 유전자 발현을 유도할 수 있다.

[0027] 한편, 본 발명에 이용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드(예: pTrc99A, pSTV28, pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHC79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, pET22b, pGEX 시리즈, pET 시리즈 및 pUCP19 등), 파지(예: λgt4?λB, λ-Charon, λΔz1 및 M13 등) 또는 바이러스(예: SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있으나, 바람직하게는 pTrc99A를 사용한다.

[0028] 한편, 본 발명의 벡터는 선택표지로서, 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함하며, 예를 들어 엠피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자가 있다. 바람직하게는 엠피실린을 사용한다.

[0029] 본 발명의 발현 벡터는 프로모터서열 및 발현 대상 유전자(구조 유전자)의 뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 상기서열들이 5'-3' 순서대로 연결되는 것이 바람직하다.

[0030] 본 발명의 발현 벡터에는 상기 유전자들이 효소의 과발현 기능을 포함하여 최소한의 길이를 가지도록 RBS(ribosomal bindingsite) 및 효소발현에 꼭 필요한 부분을 포함하는 염기서열만을 서열로 정하여 삽입시키는 것이 숙주세포의 대사부담(metabolic burden)을 줄이는 측면에서 바람직하다.

[0031] 단계 (c): 형질전환 대장균의 제조

[0032] 마지막으로, 상기 재조합 벡터를 대장균에 형질전환하여 형질전환 대장균을 제조한다.

[0033] 상기 단계 (b)의 코돈 최적화된 아실-[아실운반단백질] 티오에스터라제의 뉴클레오타이드 서열이 삽입된 재조합 벡터는 이후 대장균 내부로 도입되는데, 본 발명의 벡터를 대장균 내로 운반하는 방법은 $CaCl_2$ 방법(Cohen, S.N. et al., Proc. Natl. Acac. Sci. USA, 9:2110-2114(1973)), 하나한 방법(Cohen, S.N. et al., Proc. Natl. Acac. Sci. USA, 9:2110-2114(1973); 및 Hanahan, D., J. Mol. Biol., 166:557-580(1983)) 및 전기 천공 방법 (Dower, W.J. et al., Nucleic. Acids Res., 16:6127-6145(1988)) 등에 의해 실시될 수 있으며, 바람직하게는, 본 발명의 단계 (c)는 전기천공법으로 실시한다.

[0034] 본 발명의 벡터를 안정되면서 연속적으로 클로닝 및 발현시킬 수 있는 숙주 세포는 당업계에 공지되어 어떠한 숙주 세포도 이용할 수 있으며, 예컨대, *E. coli* MG1655, *E. coli* W3110, *E. coli* JM109, *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* RR1, *E. coli* LE392, *E. coli* B, *E. coli* X 1776, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 츄린겐시스와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세슨스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등이 있다. 바람직하게는, 본 발명의 숙주세포는 *E. coli* MG1655이다.

[0035] 상기 *E. coli* MG1655의 유전형은 F(Fertility Factor) 및 람다 파지(lambda phage) 음성이고 rph-1[1 염기가 결실되어 직전의 15 코돈 이상이 프레임시프트(frameshift)]인 특징을 갖는다. 상기 *E. coli* MG1655은 최소배지에서 rph 양성 균주와 비교하여 85-90% 감소된 성장률을 가지며, 피리미딘 생합성에 관여하는 오로테이트 포

스포리보실트랜스퍼라제(orotate phosphoribosyltransferase, PyrE)의 발현이 감소된 특징을 갖는다. ATCC(American Type Culture Collection, 미국)을 통해 구매할 수 있다.

[0036] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명의 아실-[아실운반단백질] 티오에스터라제 발현용 대장균의 제조방법에 의해 제조된 아실-[아실운반단백질] 티오에스터라제 발현용 대장균을 제공한다.

[0037] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 지방산의 제조방법을 제공한다:

[0038] (a) 상기 아실-[아실운반단백질] 티오에스터라제 발현용 대장균을 배지에서 배양하여 지방산을 생합성 하는 단계; 및

[0039] (b) 상기 생합성된 지방산을 수득하는 단계.

[0040] 본 발명의 지방산 제조방법에 있어, 상기 단계 (a)의 배지는 LB 배지 또는 최소배지 조건에서 배양할 수 있다.

[0041] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 단계 (a)의 아실-[아실운반단백질] 티오에스터라제 발현용 대장균은 최소배지에서 배양한다. 바람직하게는, 상기 최소배지는 글루코즈, 소듐 설페이트, 트립톤, 암모늄 클로라이드, 디포타슘 포스페이트, 소듐 포스페이트, $(NH_4)_2$-H-시트레이트, 마그네슘 설페이트 및 티아민을 포함한다. 보다 바람직하게는, 상기 단계 (a)의 배지는 1-8 g/L Na_2SO_4, 1-10 g/L 트립톤, 0.1-3 g/L NH_4Cl, 2-13 g/L K_2HPO_4, 0.1-4.0 g/L $NaH_2PO_4H_2O$, 8-16 g/L $(NH_4)_2$-H-시트레이트, 0.05-0.50 g/L $MgSO_4$ 및 0.005-0.100 g/L 티아민을 포함하고, 보다 더 바람직하게는, 2-7 g/L Na_2SO_4, 2-8 g/L 트립톤, 0.4-2.3 g/L NH_4Cl, 4-11 g/L K_2HPO_4, 0.5-3.0 g/L $NaH_2PO_4H_2O$, 10-14 g/L $(NH_4)_2$-H-시트레이트, 0.1-0.4 g/L $MgSO_4$ 및 0.007-0.08 g/L 티아민을 포함하며, 가장 바람직하게는, 3-5 g/L Na_2SO_4, 4-6 g/L 트립톤, 0.7-1.9 g/L NH_4Cl, 6-9 g/L K_2HPO_4, 1.2-2.5 g/L $NaH_2PO_4H_2O$, 11-13 g/L $(NH_4)_2$-H-시트레이트, 0.2-0.3 g/L $MgSO_4$ 및 0.01-0.06 g/L 티아민을 포함한다.

[0042] 본 발명의 지방산 제조방법에 의해 제조된 지방산은 야생형 대장균과 비교하여 지방산에 대한 수율이 1.5-4.0배 증가된다.

[0043] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 지방산 제조방법에 의해 제조된 지방산은 IPTG 첨가 후 8시간 이후에 야생형 균주와 비교하여 2배 이상 증가한 결과를 나타낸다(도 11).

[0044] 바람직하게는, 본 발명의 지방산 제조방법에 의해 제조된 지방산은 C12:0 및 C14:0의 포화지방산 및 C18:1의 불포화지방산이다.

[0045] 본 발명의 지방산 제조방법은 상기 아실-[아실운반단백질] 티오에스터라제 발현용 대장균을 이용하기 때문에, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.

[0046] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 스트렙토코커스 피오제네스(*Streptococcus pyogenes*) 유래의 아실-[아실운반단백질] 티오에스터라제(acyl-[acyl carrier protein] thioesterase)에 대한 대장균(*Escherichia coli*)에서의 코돈 최적화된 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산분자를 제공한다.

발명의 효과

[0047] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0048] (a) 본 발명은 지방산 생합성 경로의 마지막단계에 관련된 티오에스터레이즈를 암호화하는 외래종 박테리아 유전자를 대장균에서의 발현에 적합하도록 코돈 최적화(codon-optimization)하여 과발현함으로써 지방산의 생산을 증진할 수 있는 방법을 제공한다.

[0049] (b) 본 발명은 아실-[아실운반단백질] 티오에스터라제 발현용 형질전환 대장균의 제조방법을 제공한다.

[0050] (c) 본 발명은 대장균으로부터 생산되는 지방산 중 C12:0 및 C14:0의 포화지방산 및 C18:1의 불포화지방산의 생산을 야생형과 비교하여 200-400% 증가시킨다.

[0051] (d) 본 발명은 배지조성의 변화들을 통해 개발 균주들이 효율적으로 지방산의 생산을 증가시키는 방법을 제공한다.

[0052] (e) 본 발명은 바이오에너지 생산의 기초가 될 지방산 생산을 대량 생산하고 친환경적임을 물론이고 경제적으로도 큰 경제력을 갖출 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0053] 도 1은 대장균(*Escherichia coli*) 생체 내에서 글루코즈(glucose)에서 부터 지방산 생합성경로(Fatty Acid biosynthesis pathway; FAS)를 보여주며 아실-[아실운반단백질] 티오에스터라제(acyl-[acyl carrier protein] thioesterase)의 생합성경로 내 위치를 보여주는 도식이다.

도 2는 스트렙토코커스 피오지네스(*Streptococcus pyogenes*)의 아실-[아실운반단백질] 티오에스터라제(acyl-[acyl carrier protein] thioesterase, E.C.3.1.2.14)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열과 대장균에 코돈 최적화(codon-optimization)된 스트렙토코커스 피오제너스의 아실-[아실운반단백질] 티오에스터라제를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열(*OPSp14*)을 얼라인(align)한 결과를 보여준다.

도 3a 내지 도 3e는 PCR 후 아가로즈 젤에 전기영동한 결과를 나타낸다. 도 3a는 대장균에 코돈 최적화(codon-optimization)된 스트렙토코커스 피오지네스의 아실-[아실운반단백질] 티오에스터라제(E.C.3.1.2.14) 유전자(*OPSp14*)가 아가로즈 젤의 753 bp 위치에서 증폭된 결과를 보여준다. 도 3a 의 1열은 사이즈마커(Takara, 일본)이고 2열 및 3열은 유전자(*OPSp14*)가 아가로즈 젤의 753 bp 위치에서 증폭된 결과이다. 도 3b는 아실-[아실운반단백질] 티오에스터라제를 T-벡터에 삽입하고, 제한효소를 처리하여 확인한 결과를 나타낸다. 도 3b의 1열은 사이즈마커이고 2열 내지 5열은 제한효소로 분리되어진 T-벡터와 유전자(*OPSp14*)가 분리되었음을 보여주는 결과이다. 도 3c는 아실-[아실운반단백질] 티오에스터라제를 pTrc99A에 삽입하고 제한효소를 처리하여 확인한 결과를 나타낸다. 도 3c의 1열은 사이즈마커이고 2열 내지 6열은 제한효소로 분리되어진 pTrc99A 벡터와 유전자(*OPSp14*)가 분리되었음을 보여준 결과이다. 도 3d 및 도 3e는 숙주세포인 대장균, *E. coli* MG1655 (도 3d)와 *E. coli* W3110(도 3e)에 형질전환한 후, 아실-[아실운반단백질] 티오에스터라제가 삽입된 pTrc99A가 형질전환 되었음을 확인한 결과를 보여준다. 도 3d의 1열은 사이즈마커이고 2열 내지 4열은 공란(blank)이며 5열 내지 7열은 *E. coli* MG1655에 유전자(*OPSp14*)가 삽입되었음을 PCR을 통해 확인한 것이다. 도 3e의 1열은 marker이고 2열 내지 4열은 공란이며 5열 내지 7열은 *E. coli* W3110에 유전자(*OPSp14*)가 삽입되었음을 보여준다.

도 4는 대장균에 존재하는 아실-[아실운반단백질] 티오에스터라제 (*tesA*) 유전자가 삽입된 대장균(*Escherichia coli*) 발현벡터인 pTrc99A의 벡터 맵(map)을 보여준다. 상기 pTrc99A 벡터의 프로모터는 trc 프로모터이고, 터미네이터는 rrnB 터미네이터이다.

도 5는 대장균에 코돈 최적화(codon-optimization)된 스트렙토코커스 피오제너스의 아실-[아실운반단백질] 티오에스터라제 (E.C.3.1.2.14) 유전자 (*OPSp14*)가 삽입된 대장균 (*Escherichia coli*) 발현벡터인 pTrc99A의 벡터 맵을 보여준다. 상기 pTrc99A 벡터의 프로모터는 trc 프로모터이고, 터미네이터는 rrnB 터미네이터이다.

도 6a 및 도 6b는 글루코즈 10 g/L가 포함된 최소배지(도 6a) 및 LB 배지(도 6b)에서 pTrc99A 공벡터가 포함된 야생종 및 본 발명으로 개발된 형질전환 대장균들의 생장성을 나타낸다.

도 7a 및 도 7b는 글루코즈 10 g/L가 포함된 최소배지(도 7a) 및 LB 배지 (도 7b)에서 pTrc99A 공벡터가 포함된 야생종 및 본 발명으로 개발된 형질전환체들의 글루코즈 소모량을 나타낸다.

도 8a 및 도 8b는 글루코즈 10 g/L가 포함된 최소배지(도 8a) 및 LB 배지(도 8b)에서 pTrc99A 공벡터가 포함된 야생종 및 본 발명으로 개발된 형질전환체들의 유리지방산 생산량을 나타낸다.

도 9a 내지 도 9f는 글루코즈 10 g/L, 및 질소원으로 효모추출물(도 9a, 도 9c 및 도 9e) 및 트립톤(도 9b, 도 9d 및 도 9f)이 포함된 최소배지에서의 개발균주들의 생장성, 글루코즈 소모량 및 아세트산 농축량을 배양시간별로 보여준다. 질소원으로써 효모추출물을 포함한 배지에서의 생장성(도 9a), 글루코즈 소모량 (도 9b) 및 아세트산 농축량(도 9e)을 나타내고, 질소원으로써 트립톤을 포함한 배지에서의 생장성(도 9b), 글루코즈 소모

량(도 9d) 및 아세트산 농축량(도 9e)을 나타낸다.

도 10a 및 도 10b는 질소원으로써 트립톤이 포함된 최소배지에서 pTrc99A 공벡터가 포함된 야생종 및 본 발명의 형질전환 대장균들의 총 유리지방산을 배양시간별로 측정한 결과를 나타낸다. 야생종 *E. coli* MG1655(도 10a) 및 *E. coli* W3110(도 10b)으로 나누어 비교분석하였다. 그래프 세로축의 단위는 FAME(Fatty Acid Methyl Esterase) mg/L이다.

도 11은 글루코즈 10 g/L 및 질소원으로써 트립톤이 포함된 최소배지에서의 pTrc99A 공벡터가 포함된 야생종 및 본 발명으로 형질전환 대장균들의 유리지방산을 배양시간별로 지방산 구성변화를 측정하여 나타낸다. 그래프 세로축의 단위는 FAME mg/L이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0054] 이하, 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.

[0055] **실시예 1: 아실-[아실운반단백질] 티오에스터라제(acyl-[acyl carrier protein] thioesterase, E.C.3.1.2.14)의 코돈 최적화(codon-optimization)**

[0056] 지방산 생합성 마지막 단계에 관여하는 스트렙토코커스 피오제네스(*Streptococcus pyogenes*)의 아실-[아실운반단백질] 티오에스터라제를 코딩하는 유전자(OPsp14)를 대장균에서 발현율을 높이기 위한 코돈 최적화(codon-optimization)를 실시하였다(도 1). 바이오닉스(대한민국)에 의뢰하여 스트렙토코커스 피오제네스의 아실-[아실운반단백질] 티오에스터라제의 뉴클레오타이드 서열을 대장균 발현에 최적화된 뉴클레오타이드 서열로 합성하였다. 상기 코돈 최적화된 스트렙토코커스 피오제네스의 아실-[아실운반단백질] 티오에스터라제(OPsp14)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 PGM-T 이지 벡터(easy vector)에 클로닝하였다(바이오닉스, 대한민국). 대장균에서 고발현 될 수 있게 코돈 최적화된 스트렙토코커스 피오제네스의 아실-[아실운반단백질] 티오에스터라제를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열(서열목록 제1서열) 및 코돈 최적화되지 않은 스트렙토코커스 피오제네스의 아실-[아실운반단백질] 티오에스터라제(서열목록 제2서열)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 얼라인(align)하여 도 2에 나타내었다.

[0057] **실시예 2: 재조합 플라스미드의 제조**

[0058] 상기 실시예 1에서 합성한 코돈 최적화된 스트렙토코커스 피오제네스의 아실-[아실운반단백질] 티오에스터라제가 삽입된 재조합 플라스미드인 pGEM-T:*OPSp14* 및 *E. coli* MG1655를 주형으로 하여 각각 *OPSp14* 및 *tesA*를 표 1에 표시된 프라이머를 이용하여 PCR로 증폭하였다. 유전자들은 RBS(ribosome binding site)를 포함하여 증폭하였다. *OPSp14*의 사이즈는 *753 bp*이고, *tesA*의 사이즈는 627bp이다.

표 1

[0059]

유전자	프라이머 서열		제한 효소
OPSp14	정방향	5 '-GTCGACGGAGAGTATTATGGGCCTGAGT-3'	Sal I
	역방향	5 '-CTGCAGCTCGAGTTAGTCAATCTCGCTTT-3'	Pst I
tesA	정방향	5'-GTCGACACTTCTTAAGATGATGAACTTCAA-3'	Sal I
	역방향	5'-AAGCTTCTCGAGTTATGAGTCATGATTTAC-3'	HindⅢ

[0060] 각각의 PCR 반응은 통상적인 반응조건[10 mM Tris-HCl(pH 9.0), 50 mM KCI, 0.1% Triton X-100, 2 mM $MgSO_4$ 및 Taq DNA 중합효소(DaKaRa)] 하에서 95℃/5분(변성), 60℃/1분(어닐링) 및 72℃/1분(연장) 조건으로 1회 수행한 후, 95℃/1분(변성), 60℃/30초(어닐링) 및 72℃/1분(연장) 조건으로 30회 반복 수행하였다. 마지막 단계로 안정적인 연장을 위해 95℃/1분(변성), 60℃/1분(어닐링) 및 72℃/5분(연장) 반응하였다.

[0061] PCR 산물을 전기영동으로 확인하여 겔에서 추출하였다(도 3a). 이들을 T-벡터에서 안정화를 하였다. 상기 안정화는 추출된 PCR 산물을 T-벡터와 라이게이션 하여 재조합 플라스미드-대장균 컴피턴트 세포(*E. coli* AG1

competent cell, stratagene, 미국)에 형질전환 시킨 후 충분히 복제하여 T-벡터에서 유전자를 안정화시켰다. 다시 pTrc99A[Zhang X, Li M, Argawal A, San K-Y. Efficient free fatty acid production in Escherichia coli using plant acyl-ACP thioesterases. Metabolic Engineering, 13:713-722 (2011)]와 함께 제한효소들로 37℃ 항온수조 (water bath)에서 약 2시간 반응하였다(도 3b). 각각의 DNA 절편들을 절단한 뒤 pTrc99A 벡터의 다중삽입부위(multi cloning site)에 도 2 내지 도 3에 개시된 것과 같이 T4 라이게이즈(Dakara, 일본)를 이용하여, 16℃에서 반응하고 라이게이션을 하여 재조합 플라스미드, pJS40 및 pJS41를 완성하였다(도 3c). 각 단계마다 삽입된 유전자의 삽입여부를 확인하기 위해 대장균 컴피턴트 세포(*E. coli* AG1 competent cell, stratagene, 미국)에 형질전환 시킨 후 재조합 플라스미드를 추출하여 이를 다시 원래 삽입부위의 제한효소로 처리하여 잘린 DNA 조작의 크기를 0.8% 아가로즈 젤 상에서 전기영동을 실시하여 비교하는 방법을 사용하였다.

[0062] 도 4 및 도 5는 상기 pJS40[*tesA*(서열목록 제3서열) 유전자 포함], pJS41(*OPSp14* 유전자 포함)라 명명된 벡터의 맵(map)를 나타내는 도면이다.

[0063] **실시예 3: 대장균 형질전환체 제조**

[0064] 본 발명에서는 대장균 형질전환체의 안정적 제조와 효율을 높이기 위해 전기천공법(electroporation)에 의한 형질전환방법을 사용하였다.

[0065] 상기 전기충격에 의한 형질전환방법을 위해 16시간동안 배양한 30 ㎕ (0.1%)의 두 종류의 야생종 대장균(*E. coli* MG1655 및 *E. coli* W3110) 배양액을 시험관에 들어있는 3 ㎖의 LB(10 g/L tripton, 10 g/L NaCl 및 5 g/L 효모추출물) 배지에 접종하여 배양액의 흡광도(absorbance)가 600 ㎚ 파장에서 0.6에 이르렀을 때, 배양액 전체에 해당하는 3 ㎖의 배양액은 원심 분리(12000 rpm, 1분)하여 상등액과 세포를 분리하였다. 코돈 최적화는 특정대장균을 타겟으로 하는 것이 아니라 대장균이라는 일반적인 종을 타겟으로 하기 때문에 종에 따라서 코돈 최적화의 활성이 달라질수도 있으므로, 두 종류의 대장균에 형질전환 하였다. 수득한 세포는 10% 글리세롤 1 ㎖로 1회 세척해준 후, 다시 원심분리(12000 rpm, 1분)하여 상등액과 세포로 나누어 주었다. 세포를 10% 글리세롤 80 ㎕로 현탁하였다. 현탁된 세포에 1 ㎕의 재조합 플라스미드(pJS40 또는 pJS41)를 첨가하였다.

[0066] 상기의 플라스미드가 들어있는 분주된 80 ㎕의 액체는 전기천공법 (electroporation)용 큐벳(BIO-RAD, Gene pulser cuvette, 미국)에 담아 진 피서 엑스셀(Gene pulser Xcell, BIO-RAD, 미국)로 전기 충격을 가하였다. 미리준비해둔 1 ㎖ LB(10 g/L tripton, 10 g/L NaCl 및 5 g/L 효모추출물)를 첨가한 뒤 1시간동안 200 rpm, 37℃에서 진탕 배양하였다. 배양된 형질전환 대장균은 엠피실린(50 ㎍/㎖)이 첨가된 배지에서 단일균체가 생성될 때까지 배양하였다. 이를 통해 재조합 플라스미드인 pJS40 및 pJS41이 대장균(*E. coli* MG1655)에 형질 전환대장균, *E. coli* SGJS40 및 *E. coli* SGJS41을 제조하였다. 또한 재조합 플라스미드 pJS41이 대장균(*E. coli* W3110) 균주에 형질전환된 *E. coli* SGJS46을 개발하였다(표 2).

[0067] 도 3d 및 도 3e에서는 대장균에 재조합된 플라스미드의 유전자가 안정적으로 발현되고 있는지 확인하기 위해 재조합 균주에서 플라스미드를 취해서 PCR 결과, 안정적으로 유지되고 있음을 보여주고 있다.

표 2

[0068]

개발균주	-
E. coli SGJS40	*Escherichia coli* MG1655::pTrc99A::*tesA*
E. coli SGJS41	*Escherichia coli* MG1655::pTrc99A::*OPSp14*
E. coli SGJS46	*Escherichia coli* W3110::pTrc99A::*OPSp14*

[0069] **실시예 4: 개발된 대장균의 배지특성 조사**

[0070] 대장균에 형질 전환한 재조합 균주들을 LB(엠피실린 50 ㎍/㎖ 포함) 배지에 16시간정도 전 배양시키고 그 배양액을 다시 LB(엠피실린 50 ㎍/㎖ 포함) 배지에 접종하여 흡광도가 600 ㎚에서 0.6-1.0 되었을 때 글리세롤 농도가 25%가 되게 보관용 균액으로 제조한 다음 -80℃에서 배양실험 시까지 저장하였다.

[0071] 상기에서 개발된 재조합 균주의 배양은 보관용 균액 30 ㎕을 10 ㎖ 튜브에 들어있는 엠피실린 50 ㎍/㎖이 첨가된 3 ㎖의 LB에 16시간동안 전 배양한 후, 이를 다시 500 ㎖ 플라스크에 들어있는 50 ㎍/㎖ 엠피실린이 첨가된

200 ㎖의 LB(10 g/L 트립톤, 10 g/L NaCl 및 5 g/L 효모추출물) 배지 및 최소배지에 0.5%의 전 배양액을 접종하여 37℃, 180 rpm 상태에서 30시간동안 배양하였다.

표 3

[0072]

최소 배지(Minimal medium; MM)	
배지 조성	g/L
Na_2SO_4	4
$(NH_4)_2SO_4$	5.4
NH_4Cl	1.0
K_2HPO_4	7.3
$NaH_2PO_4H_2O$	1.8
$(NH_4)_2$-H-Citrate	12
$MgSO_4$	0.25
티아민	0.02

[0073] 본 발명에서 개발한 *E. coli* SGJS40, *E. coli* SGJS41 및 *E. coli* SGJS46는 두 숙주 균주 *E. coli* MG1655 및 *E. coli* W3110에 사용되어진 벡터 pTrc99A 벡터를 형질전환시킨 균주와 비교하였다. 또한 *E. coli* MG1655에 코돈 최적화시킨 외래 유전자(아세틸-CoA 카복실라제, 말로닐-CoA[아실전달단백질] 트랜스아실라제 및 아실-아실전달단백질 티오에스터라제)를 형질전환시킨 균주(*E. coli* JES1017, *Enzyme and Microbial Technology* 49 (2011) 4451)와 같이 비교하여 형질전환 대장균들의 지방산 증산을 비교하였다.

[0074] 단백질 발현을 위해 배양액의 흡광도(absorbance)가 600 nm 파장에서 0.3-0.6에 이르렀을 때 유도물질인 IPTG(isopropylthio-β-D-galactoside, sigma, 미국)를 0.5 mM/㎖ 첨가하여 재조합 단백질의 발현을 유도하였다. 상기 예를 따라 초기 유도체의 발현으로 지방산 함량의 생산증대를 비교하기 위한 종과 본 발명의 목적으로 제조된 대장균과 비교 대장균들의 생장곡선을 확인하였다(도 6).

[0075] 본 발명에서 형질전환 대장균, *E. coli* SGJS40, *E. coli* SGJS41 및 *E. coli* SGJS46은 야생종과 비교하여 생장이 조금 감소된 것을 도 6에서 확인할 수 있다. 차이가 많이 나지 않는 이유는 유전자의 삽입이나 과발현에 의한 독성이나 저해가 크지 않았던 것으로 사료된다. 이는 유전자의 암호화부분은 효소의 과발현 기능을 포함하여 최소한의 길이를 가지도록 RBS(ribosomal binding site) 및 효소발현에 꼭 필요한 부분을 포함하는 염기서열만을 서열로 정하여 유전자의 발현에 의한 숙주세포의 대사부담(metabolic burden)을 줄이고자 하였고 생산경로에 맞춰 두 유전자의 순서가 순서대로 연결된 되게 개발하였기 때문이라고 예상된다.

[0076] 도 6a는 최소배지에서 개발균주의 성장성을 나타내며 도 6b는 LB 배지에서의 성장성을 보여준다.

[0077] **실시예 5: 형질전환 대장균의 글루코즈 소모량 및 아세트산 측정**

[0078] 재조합 균주의 배양액 내의 글루코즈 소모량 및 아세트산 생성 농도를 측정하기 위해 배양 중 일정시간마다 채취한 시료를 원심분리(12000 rpm, 10분) 후 상등액 및 세포를 분리하여 -40℃에서 보관하였다. 상기 배양액으로부터 분리된 상등액을 각각 1 ㎖씩 0.2 ㎛ 필터를 이용하여 정제한 후, 하단의 조건하에서 고속액체크로마토그래피(High-Performance Liquid Chromatography; HPLC) 정량 분석을 실시하였다.

표 4

[0079]

품 목	조 건
HPLC 모델	LC-10AT unit(영린기기, 대한민국)
컬럼	Aminex HPX-87H(BIO-RAD, 미국)
유속	0.6 ㎖/분
주입부피	30 ㎕
이동상	0.01 N 황산

오븐 온도	60℃
작동 시간	30분
검출기	RI 750F 검출기

[0080] 본 발명의 재조합 균주들은 최소배지 및 LB 배지에서 글루코즈 소모량은 성장성과 비례적임을 보여주었다(도 7a 및 도 7b).

[0081] **실시예 6: 형질전환 대장균 세포내로부터의 유리지방산(free fatty acid) 측정**

[0082] 실시예 4의 조건으로 배양한 배양액 중 IPTG를 첨가한 후 배양동안 세포 내에 있는 지방산를 측정하기 위해서 지방산 추출을 다음과 같은 방법으로 진행하였다. 추출과정은 5 단계로 나누어지며 첫 번째 과정 배양단계로 배양액 5 ㎖를 원심분리(4500 rpm, 10분) 후 세포는 -80℃에 저장하였다. 두 번째 과정은 비누화(saponification) 단계로 저장된 재조합 세포를 1 ㎖ 용액1(NaOH 45 g, MeOH 150 ㎖, 증류수 150 ㎖)에 넣고 5-10초 동안 볼텍스 해주었다. 100℃에서 5분 동안 반응해준 후, 다시 5-10초 동안 볼텍스 해주고 다시 100℃에서 25분 동안 반응시켜 준 뒤 열을 식혀주었다. 세 번째 과정은 메틸화(methylation) 단계로, 용액2(6 N HCl 325 ㎖, MeOH 275 ㎖) 2 mL을 넣고 5-10초 동안 볼텍스 해준 뒤 80℃에서 10분 동안 반응시켜주었다. 반응이 끝난 후에는 빨리 열을 식혀주도록 한다. 네 번째 단계는 추출(extraction) 단계로, 용액 3(Haxane/Methyl tert-Butyl Ester=1/1) 1.25 ㎖을 첨가하고 10분간 위아래로 흔들어 준 뒤 층이 분리 되면 아래층은 추출해서 버린다. 다섯 번째 단계는 GC로 분석을 용이하게 하기위해 세척단계로 앞 단계의 남은 상층액에 용액 4(NaOH 10.8 g을 포함하는 증류수 900 ㎖) 3 ㎖을 첨가해서 5분 동안 위아래로 흔들어 준 뒤 상층액을 추출하여 GC/MS로 분석하였다.

[0083] 본 발명에서 사용한 CG/MS는 5975 series MSD 및 Agilent 7890A이며 HP-5 컬럼(30 m × 0.32 ㎜, 필름두께 0.25 ㎛을 사용하였다. 분석하기 위한 GC조건으로, 온도 프로그램은 100℃에서 5분, 220℃까지 5℃/분 가열, 250℃까지 5℃/분 가열 및 250℃ 에서 5분이었으며 MS 인터페이스 온도는 280℃이다.

[0084] 총 지방산 양은 LB 배지에서 높지만 본 발명에서 개발된 대장균들은 최소배지에서 공벡터 pTrc99A가 삽입되어진 야생종보다 더 안정적이고 더 많이 증진되었다 (도 8).

[0085] **실시예 7: 개발된 대장균의 배지특성(질소원) 조사**

[0086] 실시예 6의 지방산 측정결과 재조합균주들이 최소배지에서 유리지방산이 증진되는 것을 확인하였다. 그러나 LB 배지에서 총생산량의 증가가 많이 되었으므로 두 배지의 성분을 비교해본 결과 LB 배지에는 두 종류의 질소원(효모추출물 및 트립톤)이 포함되어있다. 따라서 최소배지에서 LB 배지에 포함된 질소원(효모추출물 또는 트립톤)을 첨가하여 비교 실험하였다. 표 3의 $(NH_4)_2SO_4$ 대신 효모추출물 또는 트립톤 5 g/L를 첨가하여 배양하였다. 배지에 0.5%의 전 배양액을 접종하여 37℃, 180 rpm 상태에서 OD 0.3-0.6이 될 때까지 배양하였다. IPTG 0.5 mM로 첨가 후에는 30℃, 180 rpm에서 형질전환 대장균을 배양하였다.

[0087] 본 발명으로 개발된 형질전환 대장균들의 생장곡선을 도 9에 나타내었다. 질소원으로써 효모추출물이 포함된 최소배지(도 9a)에서 자란 형질전환 대장균들의 생장성은 질소원으로써 트립톤이 포함된 최소배지(도 9b) 자란 형질전환 대장균들의 생장성과 큰 차이는 없었다. 그러나 글루코즈 소모량은 생장성과 반비례하며 트립톤이 포함된 배지에서 생장한 재조합체들이 더 많았다(도 9c 및 도 9d). 형질전환 대장균 내 아세트산은 배양시간에 따라 증가한 것도 확인 할 수 있었다(도 9e 및 도 9f).

[0088] 질소원 트립톤이 포함된 최소배지에서 배양된 형질전환 대장균들을 시간에 따른 유리지방산을 측정하였다. 모든 재조합체들은 배양시간에 따라 지방산이 증가한 것을 확인 할 수 있었으며, 공벡터를 포함한 대장균(*E. coli* MG1655) 보다 개발균주들(*E. coli* SGJS41) 총 유리지방산의 함량이 약 30% 정도 증가하였다(도 9a). *E. coli* W3110은 야생종의 지방산이 많아 형질전환 대장균보다 많이 증가해 보이지 않았다(도 9b).

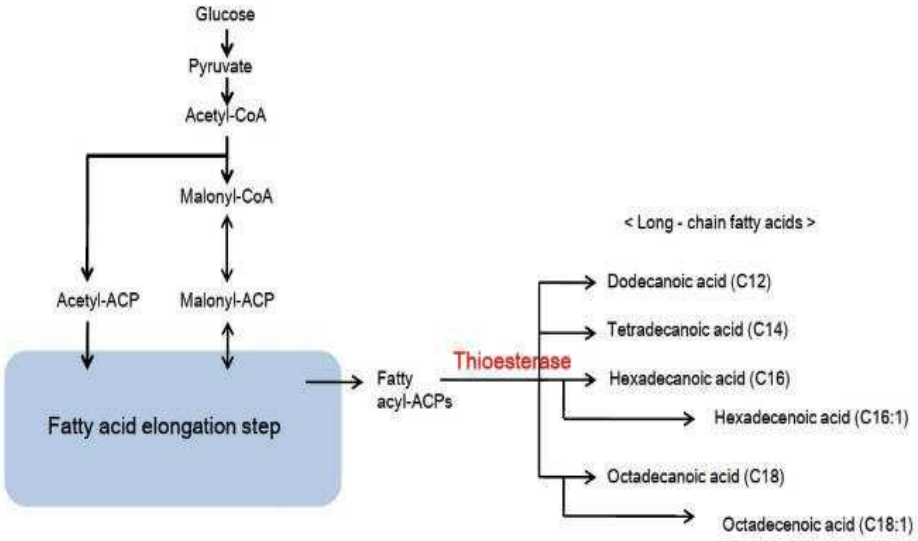
[0089] 시간별로 지방산 구성을 확인하였다(도 11). 본 발명으로 형질전환 된 대장균들은 포화지방산은 C12:0, C14:0, C16:0 및 C18:0까지 측정되었고 불포화지방산은 C16:1, C18:1 및 C18:2가 측정되었다. 본 발명에서 개발한 *E. coli* SGJS41 및 *E. coli* SGJS46은 C12:0과 C14:0이 공벡터가 포함된 대장균보다 최대 300%이상 증가하였고, 불포화지방산인 C18:1도 상당히 증가하였다. 외래종의 티오에스터레이즈를 대장균에 코돈 최적화하여

과발현 함으로써 세포내 지방산의 구성이 변화하였음을 확인하였다.

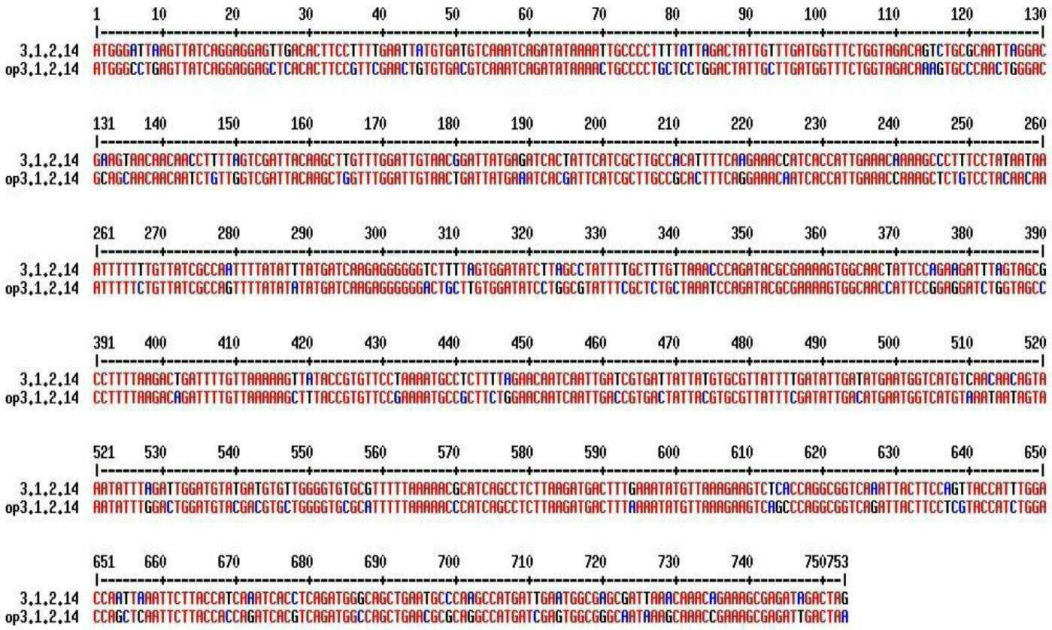
[0090] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

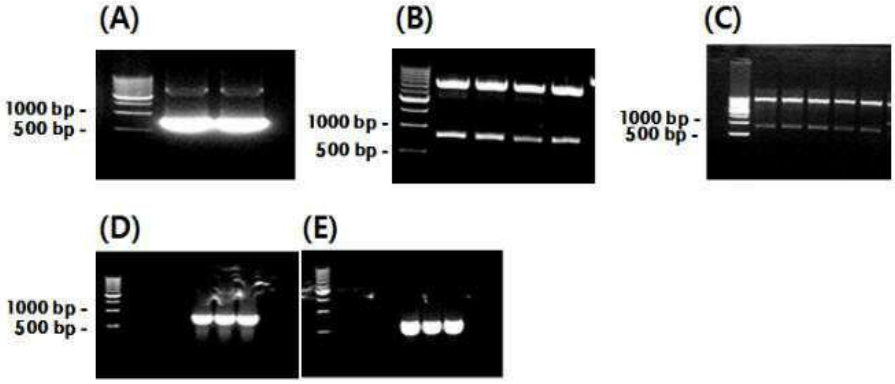
도면1



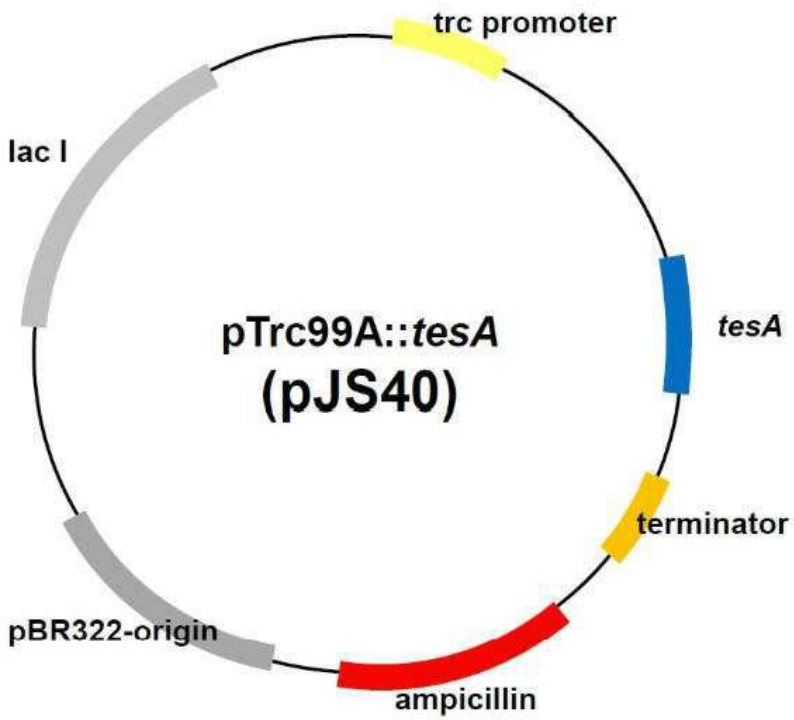
도면2



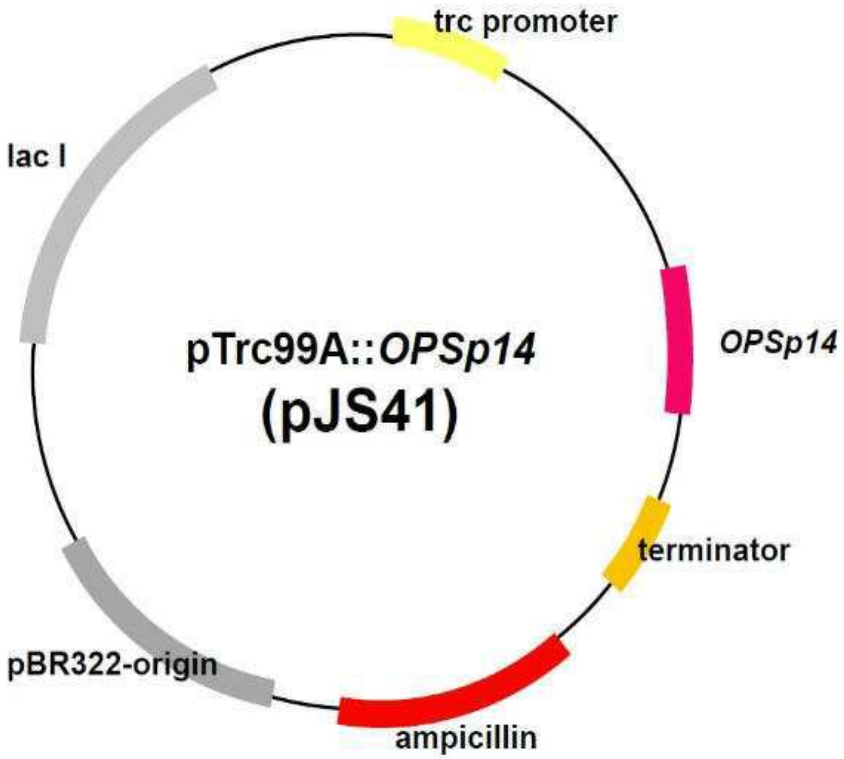
도면3


(A)
(B)
(C)
1000 bp -
500 bp -
1000 bp -
500 bp -
1000 bp -
500 bp -
(D)
(E)
1000 bp -
500 bp -

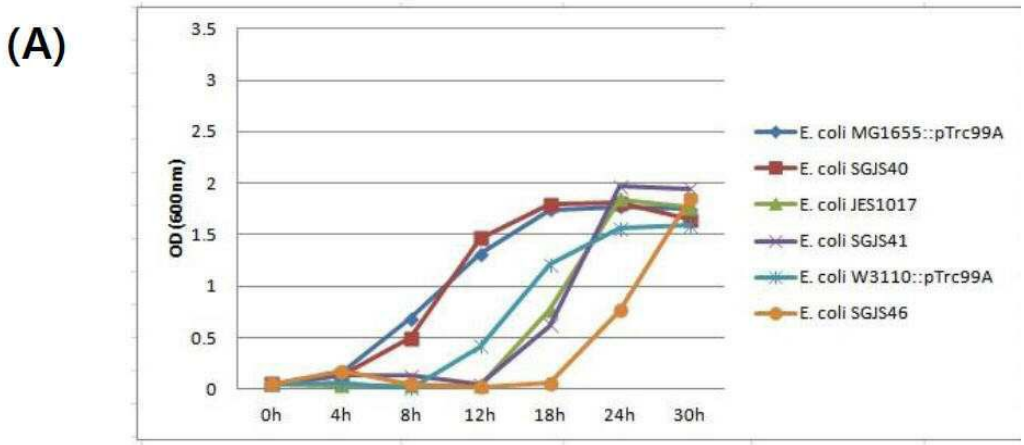
도면4


trc promoter
lac I
pTrc99A::tesA
(pJS40)
tesA
terminator
pBR322-origin
ampicillin

도면5

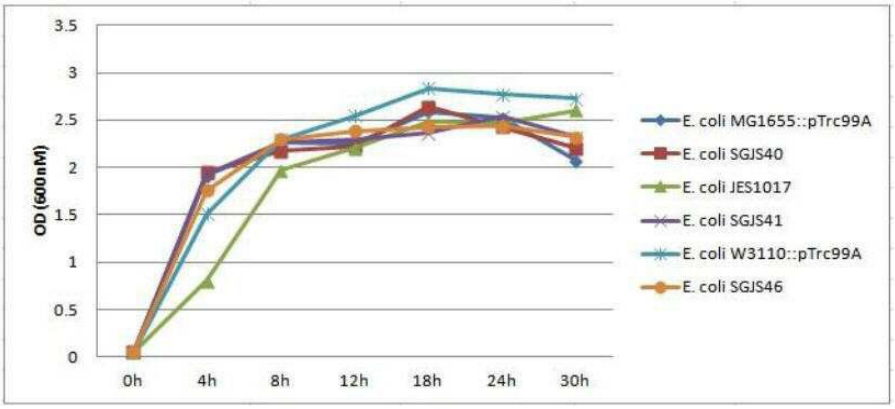

trc promoter
lac I
pTrc99A::OPSp14
(pJS41)
OPSp14
terminator
pBR322-origin
ampicillin

도면6a


(A)
OD (600nm)
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0h
4h
8h
12h
18h
24h
30h
E. coli MG1655::pTrc99A
E. coli SGJS40
E. coli JES1017
E. coli SGJS41
E. coli W3110::pTrc99A
E. coli SGJS46

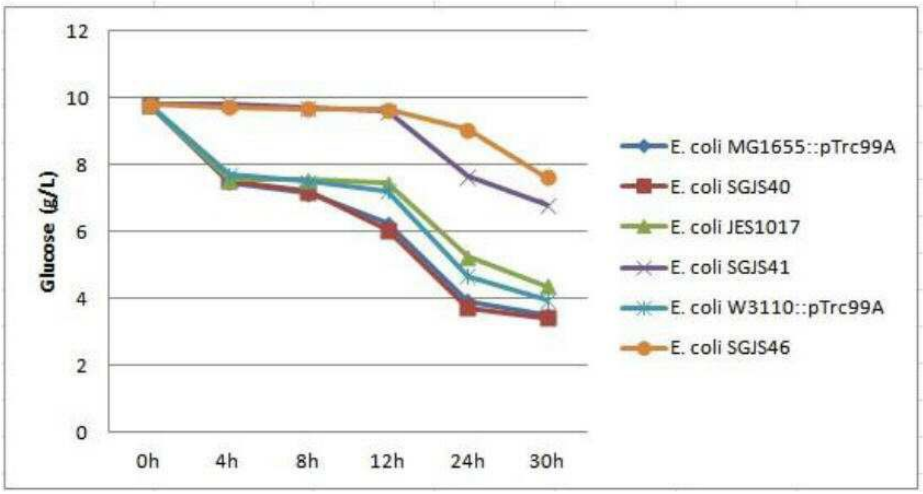
도면6b

(B)



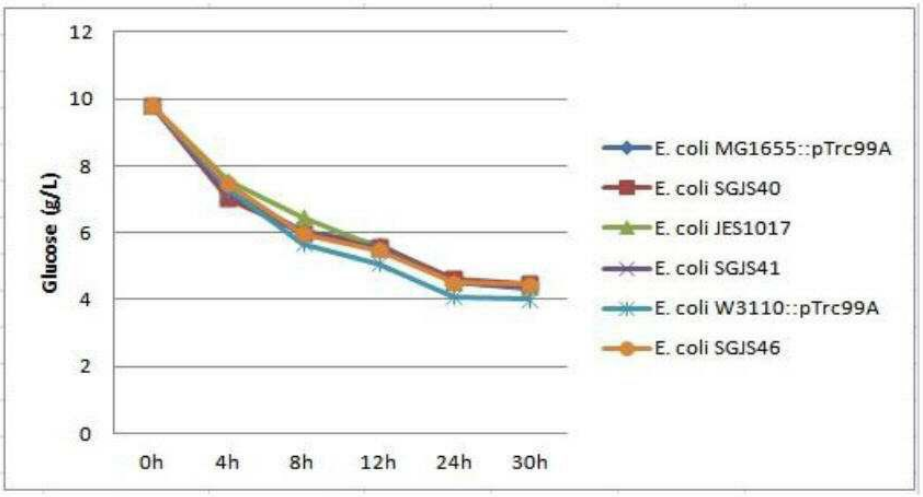
도면7a

(A)

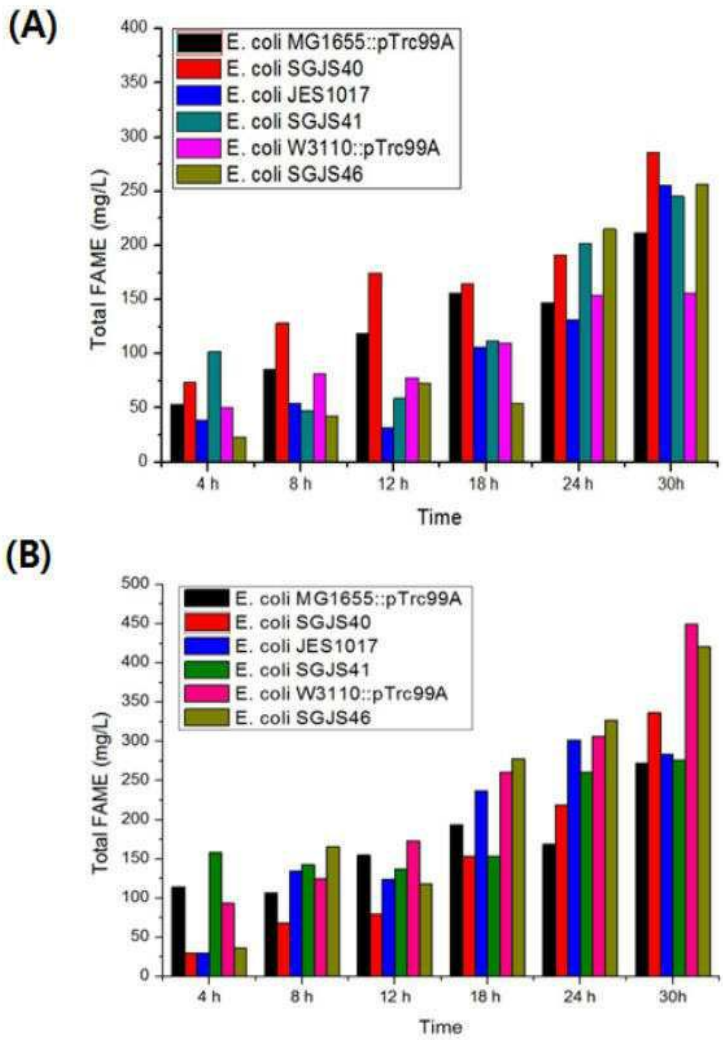


도면7b

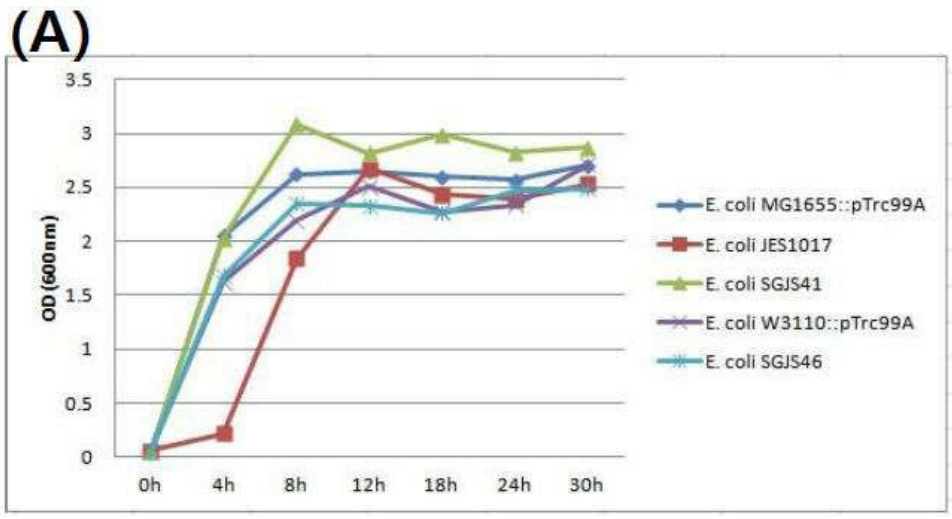
(B)



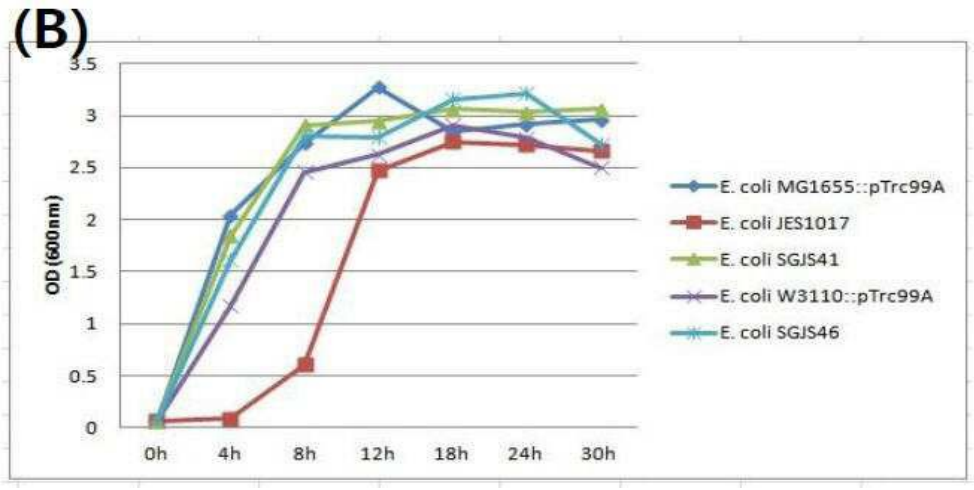
도면8


(A)
E. coli MG1655::pTrc99A
E. coli SGJS40
E. coli JES1017
E. coli SGJS41
E. coli W3110::pTrc99A
E. coli SGJS46
Total FAME (mg/L)
0
50
100
150
200
250
300
350
400
4 h
8 h
12 h
18 h
24 h
30h
Time
(B)
E. coli MG1655::pTrc99A
E. coli SGJS40
E. coli JES1017
E. coli SGJS41
E. coli W3110::pTrc99A
E. coli SGJS46
Total FAME (mg/L)
0
50
100
150
200
250
300
350
400
450
500
4 h
8 h
12 h
18 h
24 h
30h
Time

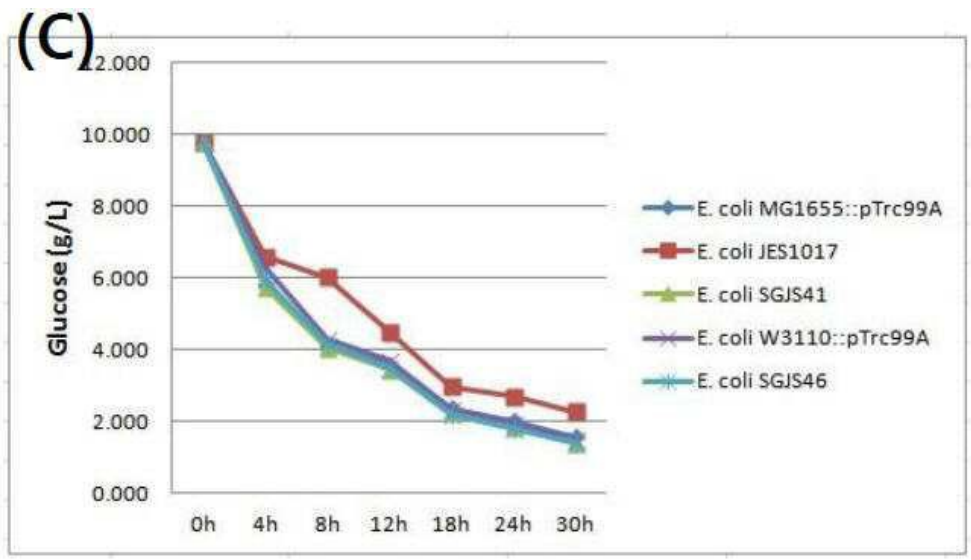
도면9a


(A)
OD (600nm)
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
3.5
0h
4h
8h
12h
18h
24h
30h
E. coli MG1655::pTrc99A
E. coli JES1017
E. coli SGJS41
E. coli W3110::pTrc99A
E. coli SGJS46

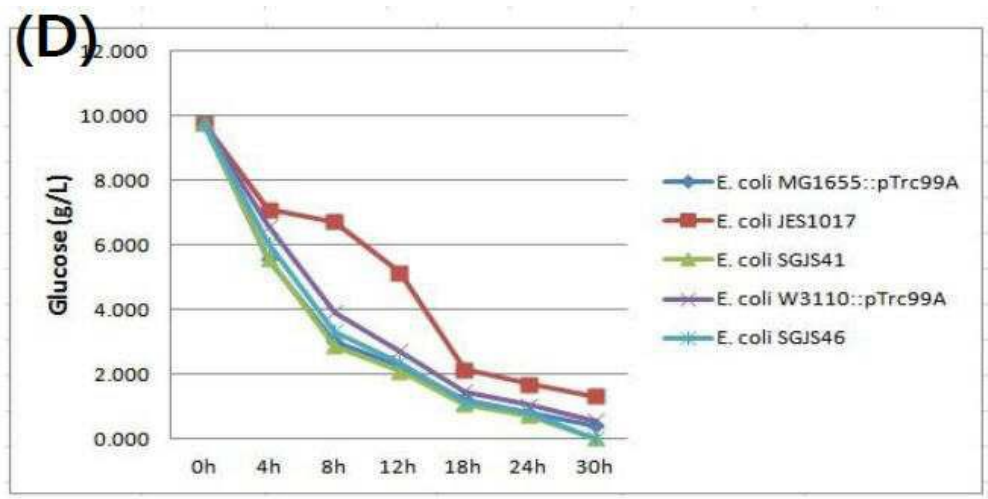
도면9b



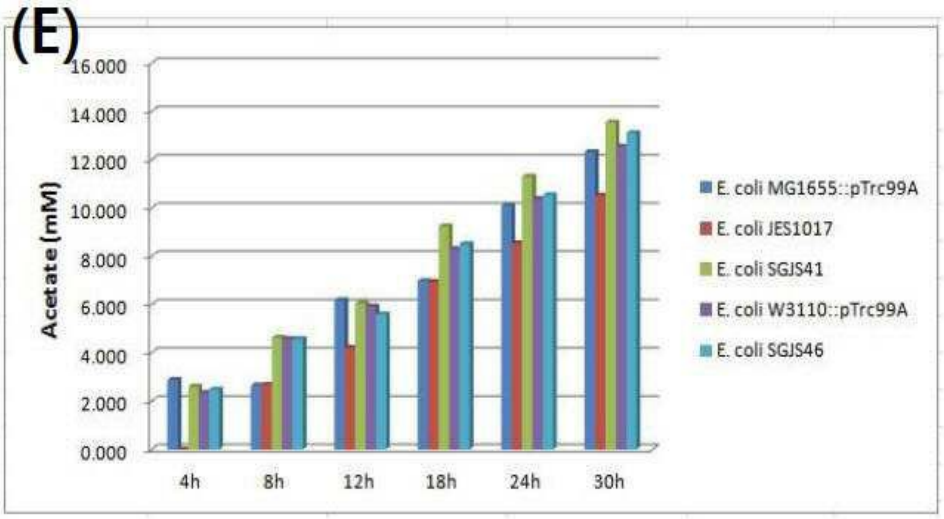
도면9c



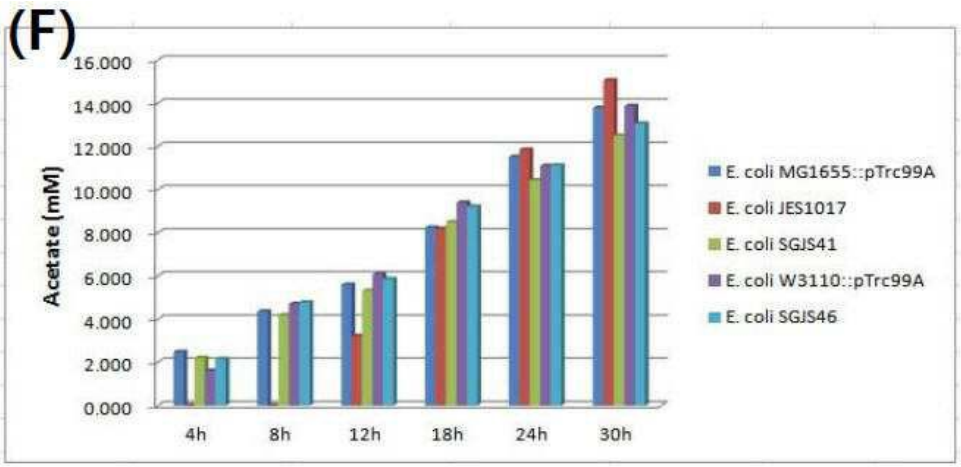
도면9d



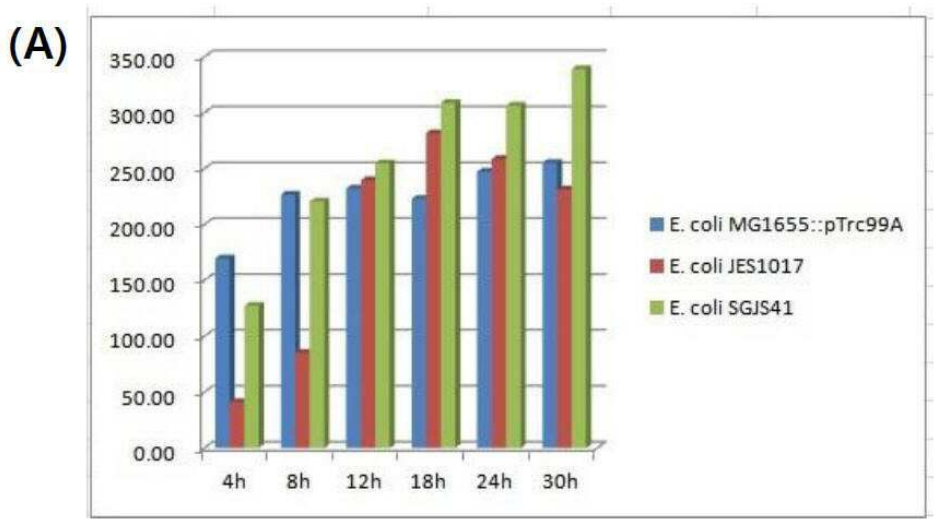
도면9e



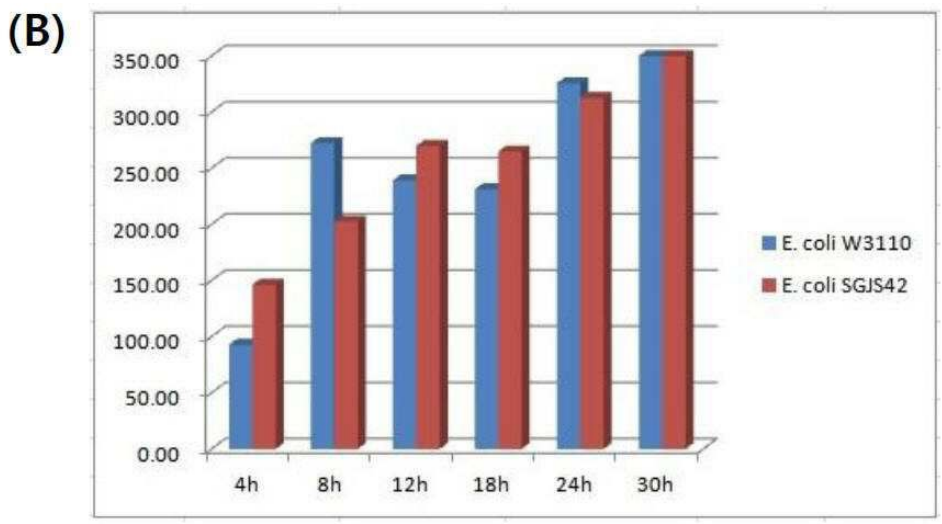
도면9f



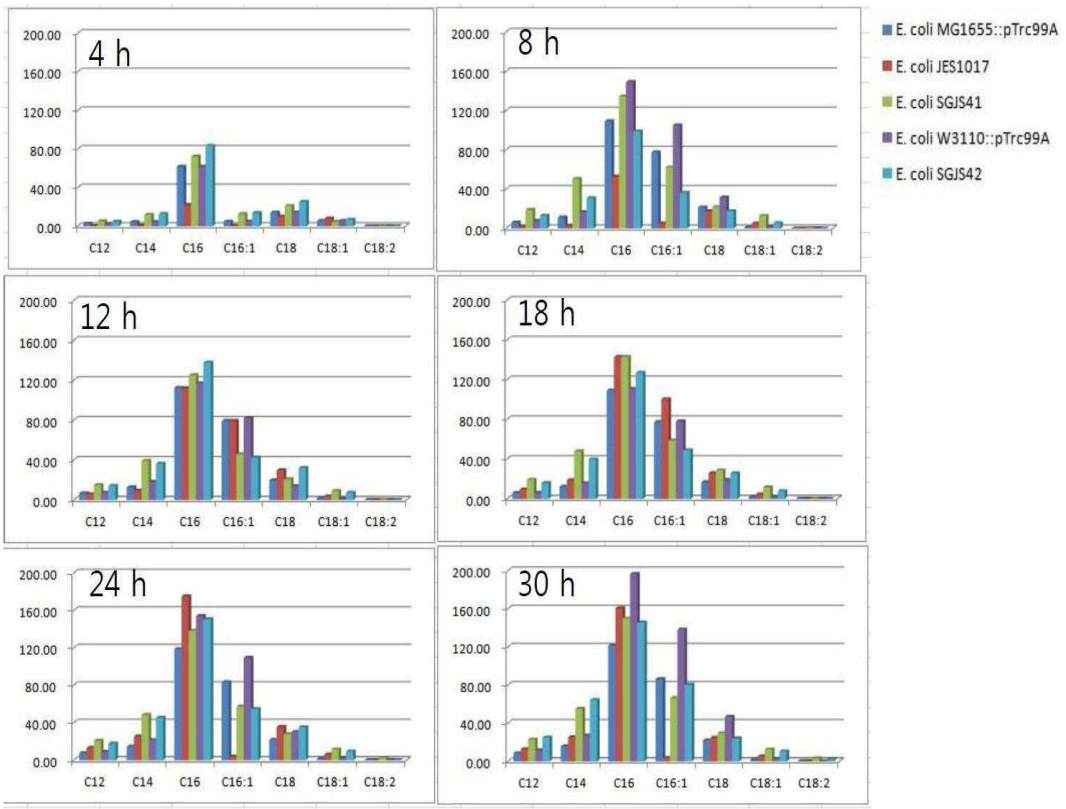
도면10a



도면10b



도면11



서 열 목 록

<110> Industry-University Cooperation Foundation Sogang University

<120> Codon-Optimized Microbes for Improving the Content of Free Fatty Acids and Preparation Method thereof

<130> PN120454

<160> 3

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 753

<212> DNA

<213> Codon -optimiation Streptococcus pyogenes 3.1.2.14

<400> 1

atgggcctga gttatcagga ggagctcaca cttccgttcg aactgtgtga cgtcaaatca 60

gatataaaac tgcccctgct cctggactat tgcttgatgg tttctggtag acaaagtgcc 120

caactgggac gcagcaacaa caatctgttg gtcgattaca agctggtttg gattgtaact 180

gattatgaaa tcacgattca tcgcttgccg cactttcagg aaacaatcac cattgaaacc 240

aaagctctgt cctacaacaa atttttctgt tatcgccagt tttatatata tgatcaagag 300

gggggactgc ttgtggatat cctggcgtat ttcgctctgc taaatccaga tacgcgaaaa 360

gtggcaacca ttccggagga tctggtagcc ccttttaaga cagattttgt taaaaagctt 420

taccgtgttc cgaaaatgcc gcttctggaa caatcaattg accgtgacta ttacgtgcgt 480

tatttcgata ttgacatgaa tggtcatgta aataatagta aatatttgga ctggatgtac 540

gacgtgctgg ggtgcgcatt tttaaaaacc catcagcctc ttaagatgac tttaaaatat 600

gttaaagaag tcagcccagg cggtcagatt acttcctcgt accatctgga ccagctcaat 660

tcttaccacc agatcacgtc agatggccag ctgaacgcgc aggccatgat cgagtggcgg 720

gcaataaagc aaaccgaaag cgagattgac taa 753

<210> 2

<211> 753

<212> DNA

<213> Streptococcus pyogenes 3.1.2.14

<400> 2

atgggattaa gttatcagga ggagttgaca cttccttttg aattatgtga tgtcaaatca 60

gatataaaat tgccccttt attagactat tgtttgatgg tttctggtag acagtctgcg 120

caattaggac gaagtaacaa caacctttta gtcgattaca agcttgtttg gattgtaacg 180

gattatgaga tcactattca tcgcttgcca cattttcaag aaaccatcac cattgaaaca 240

aaagcccttt cctataataa atttttttgt tatcgccaat tttatattta tgatcaagag 300

gggggtcttt tagtggatat cttagcctat tttgctttgt taaacccaga tacgcgaaaa 360

gtggcaacta ttccagaaga tttagtagcg ccttttaaga ctgattttgt taaaaagtta 420

taccgtgttc ctaaaatgcc tcttttagaa caatcaattg atcgtgatta ttatgtgcgt 480

tattttgata ttgatatgaa tggtcatgtc aacaacagta aatatttaga ttggatgtat 540

gatgtgttgg ggtgtgcgtt tttaaaaacg catcagcctc ttaagatgac tttgaaatat 600

gttaaagaag tctcaccagg cggtcaaatt acttccagtt accatttgga ccaattaaat 660

tcttaccatc aaatcacctc agatgggcag ctgaatgccc aagccatgat tgaatggcga 720

gcgattaaac aaacagaaag cgagatagac tag 753

<210> 3

<211> 627

<212> DNA

<213> E. coli MG1655 tesA

<400> 3

atgatgaact tcaacaatgt tttccgctgg catttgccct tcctgttcct ggtcctgtta 60

accttccgtg ccgccgcagc ggacacgtta ttgattctgg gtgatagcct gagcgccggg 120

tatcgaatgt ctgccagcgc ggcctggcct gccttgttga atgataagtg gcagagtaaa 180

acgtcggtag ttaatgccag catcagcggc gacacctcgc aacaaggact ggcgcgcctt 240

ccggctctgc tgaaacagca tcagccgcgt tgggtgctgg ttgaactggg cggcaatgac 300

ggtttgcgtg gttttcagcc acagcaaacc gagcaaacgc tgcgccagat tttgcaggat 360

gtcaaagccg ccaacgctga accattgtta atgcaaatac gtctgcctgc aaactatggt 420

cgccgttata atgaagcctt tagcgccatt taccccaaac tcgccaaaga gtttgatgtt 480

ccgctgctgc ccttttttat ggaagaggtc tacctcaagc cacaatggat gcaggatgac 540

ggtattcatc ccaaccgcga cgcccagccg tttattgccg actggatggc gaagcagttg 600

cagcctttag taaatcatga ctcataa 627