(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0114090
(43) 공개일자 2015년10월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/52 (2006.01) *C12N 1/19* (2006.01)
C12N 15/81 (2006.01) *C12P 7/52* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0037836
(22) 출원일자 2014년03월31일
심사청구일자 2014년03월31일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
김경헌
서울 서초구 서초중앙로 200, 18동 805호 (서초동, 삼풍아파트)
진용수
미국, 일리노이주 61822 샴페인 샌드힐 레인 3005
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인다나

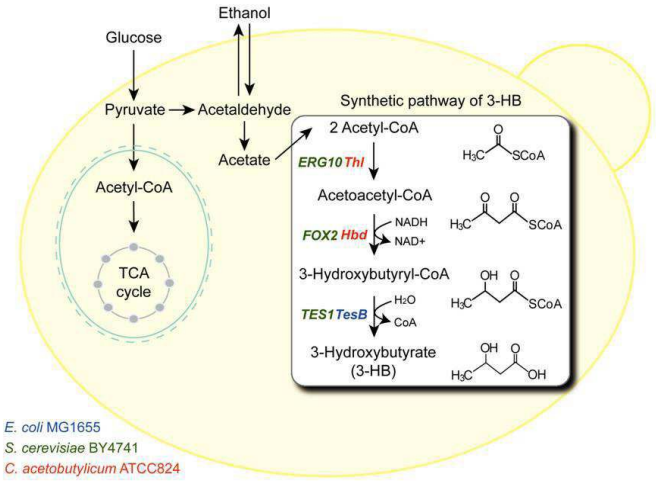
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **3-하이드록시부티르산을 생산하는 재조합 미생물 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 3-하이드록시부티르산을 생산하는 재조합 미생물 및 이의 용도에 관한 것으로, 3-HB 생합성 경로에 관여하는 효소 유전자군을 발현하는 재조합 효모를 이용하여 3-HB를 대량 생산할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

윤은주

서울 금천구 시흥대로 53, 14동 104호 (시흥동, 현대빌라)

김수린

미국, 일리노이주 61874 사보이 패덕 닥터 웨스트 309

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0031353

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 (원천)글로벌프론티어

연구과제명 [공동]화학 및 단백질촉매 융합시스템을 통한 생물친화형 목질계 바이오매스의 탈구조화 기술개발

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2010.10.22 ~ 2011.08.21

명 세 서

청구범위

청구항 1

아세틸 CoA 티올라아제(acetyl-CoA thiolase)를 코딩하는 ERG10 및 thl로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자;

아세토아세틸 CoA 리덕타아제(acetoacetyl-CoA reductase)를 코딩하는 Hbd 및 FOX2로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자; 및

3-하이드록시부티릴 CoA 하이드롤라아제(3-hydroxybutyryl-CoA hydrolase)를 코딩하는 TesB 또는 TES1로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자를 포함하는 3-하이드록시부티르산 제조용 재조합 벡터.

청구항 2

제1항에 있어서,

아세틸 CoA 티올라아제를 코딩하는 ERG10 유전자는 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) BY4741에서 유래하고, thl 유전자는 클로스트리디움 아세토부틸리둠(*Clostridium acetobutylidum*) ATCC824에서 유래한 것인 3-하이드록시부티르산 제조용 재조합 벡터.

청구항 3

제1항에 있어서,

아세틸 CoA 티올라아제를 코딩하는 유전자는 SEQ ID NO: 1 또는 2의 염기서열로 표시되는 3-하이드록시부티르산 제조용 재조합 벡터.

청구항 4

제1항에 있어서,

아세토아세틸 CoA 리덕타아제를 코딩하는 Hbd 유전자는 클로스트리디움 아세토부틸리둠(*Clostridium acetobutylidum*) ATCC824에서 유래하고, FOX2 유전자는 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) BY4741에서 유래한 것인 3-하이드록시부티르산 제조용 재조합 벡터.

청구항 5

제1항에 있어서,

아세토아세틸 CoA 리덕타아제를 코딩하는 유전자는 SEQ ID NO: 3 또는 4의 염기서열로 표시되는 3-하이드록시부티르산 제조용 재조합 벡터.

청구항 6

제1항에 있어서,

3-하이드록시부티릴 CoA 하이드롤라아제를 코딩하는 TesB 유전자는 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*) K12 MG1655에서 유래하고, TES1 유전자는 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) BY4741에서 유래

한 것인 3-하이드록시부티르산 제조용 재조합 벡터.

청구항 7

제1항에 있어서,

3-하이드록시부티릴 CoA 하이드롤라아제를 코딩하는 유전자는 SEQ ID NO: 5 또는 6의 염기서열로 표시되는 3-하이드록시부티르산 제조용 재조합 벡터.

청구항 8

제1항에 있어서,

아세틸 CoA 티올라아제를 코딩하는 ERG10 유전자;

아세토아세틸 CoA 리덕타아제를 코딩하는 Hbd 유전자; 및

3-하이드록시부티릴 CoA 하이드롤라아제를 코딩하는 TesB 유전자를 포함하는 3-하이드록시부티르산 제조용 재조합 벡터.

청구항 9

아세틸 CoA 티올라아제(acetyl-CoA thiolase)를 코딩하는 ERG10 및 thl로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자;

아세토아세틸 CoA 리덕타아제(acetoacetyl-CoA reductase)를 코딩하는 Hbd 및 FOX2로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자; 및

3-하이드록시부티릴 CoA 하이드롤라아제(3-hydroxybutyryl-CoA hydrolase)를 코딩하는 TesB 또는 TES1로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자로 형질전환된 3-하이드록시 부티르산 제조용 재조합 효모.

청구항 10

제9항에 있어서,

아세틸 CoA 티올라아제를 코딩하는 ERG10 및 thl로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자를 포함하는 재조합 벡터;

아세토아세틸 CoA 리덕타아제를 코딩하는 Hbd 및 FOX2로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자를 포함하는 재조합 벡터; 및

3-하이드록시부티릴 CoA 하이드롤라아제를 코딩하는 TesB 또는 TES1로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 3-하이드록시부티르산 제조용 재조합 효모.

청구항 11

제9항에 있어서,

아세틸 CoA 티올라아제를 코딩하는 ERG10 및 thl로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 아세토아세틸 CoA 리덕타아제를 코딩하는 Hbd 및 FOX2로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자 및 3-하이드록시부티릴 CoA 하이드롤라아제를 코딩하는 TesB 또는 TES1로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 3-하이드록시부티르산 제조용 재조합 효모.

청구항 12

제9항에 있어서,

아세틸 CoA 티올라아제를 코딩하는 ERG10 유전자를 포함하는 재조합 벡터;

아세토아세틸 CoA 리덕타아제를 코딩하는 Hbd 유전자를 포함하는 재조합 벡터; 및

3-하이드록시부티릴 CoA 하이드롤라아제를 코딩하는 TesB 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 3-하이드록시부티르산 제조용 재조합 효모.

청구항 13

제9항에 있어서,

아세틸 CoA 티올라아제를 코딩하는 ERG10 유전자, 아세토아세틸 CoA 리덕타아제를 코딩하는 Hbd 유전자 및 3-하이드록시부티릴 CoA 하이드롤라아제를 코딩하는 TesB 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 3-하이드록시부티르산 제조용 재조합 효모.

청구항 14

제9항에 있어서,

효모는 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*), 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 쉬조사카로마세스(*Schizosaccharomyces*), 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*), 야로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*), 클루이베로마세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*), 피치아 안거스타(*Pichia angusta*), 캔디다 보이디니이(*Candida boidinii*) 또는 블라스토보트리스 아데니니포란스(*Blastobotrys adeninivorans*)로부터 선택되는 3-하이드록시부티르산 제조용 재조합 효모.

청구항 15

제9항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 3-하이드록시부티르산 제조용 재조합 효모를 탄소원으로 포도당 및 에탄올을 사용하여 발효시키는 단계를 포함하는 3-하이드록시부티르산의 대량 생산 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 3-하이드록시부티르산을 생산하는 재조합 미생물 및 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 화석원료의 고갈 및 이에 따른 유가 급등에 따른 전 세계적인 에너지 자원 위기로 인하여 기존의 석유자원을 대체할 수 있으며 지속적으로 재생 가능한 자원을 이용하여 연료 또는 화학소재를 생산하는 바이오화학산업이 크게 각광을 받고 있다. 바이오화학산업은 바이오기술과 석유화학산업 등이 보유한 첨단화학 기술의 결합으로 바이오매스를 원료로 사용하거나 혹은 생산 공정 중에서 효소나 미생물을 이용하여 고부가가치의 화학소재를 제조하는 산업이다.

[0003] 화학산업계는 최근 환경오염과 유가상승 등으로 석유기반 화학산업이 한계에 직면하고, 유럽의 신화학물질관리제도(REACH)와 교토의정서 등 세계적인 환경 규제 강화로 인하여 그 대안으로 바이오화학산업의 발전을 모색해 왔다. 바이오화학산업에서 주로 생산하는 화합물로는 에탄올, 부탄올과 같은 바이오연료, 아미노산, 바이오 슈가, 의약품, 향수, 바이오플라스틱 등 전 분야에 걸쳐 다양한 소재를 생산할 수 있다. 이 중 저탄소 화합물인

락트산(C3)와 에틸렌(C2)는 바이오플라스틱인 폴리락테이트(polylactate(PLA))를 합성하는 원료이며 실례로 NatureWorks사는 바이오플라스틱 polylactate 제품을 생산하고 있으며, Novozyme에서는 바이오소재 생산을 위한 다양한 생물학적 효소들을 생산하고 있다.

[0004] 바이오 플라스틱은 포장재에서 전자제품, 자동차 산업에 이르기까지 광범위하게 사용될 수 있는 소재이며, 대한무역투자진흥공사(KOTRA)의 조사에 따르면 바이오플라스틱 소비는 포장재가 34.7%, 건설 23.4%, 자동차 9.9%, 전자 전기 제품이 6.2% 순으로 나타난다. 해외 유명 기업에서도 친환경소재인 바이오플라스틱을 사용하기에 나섰으며, 이에 대한 예로 펩시콜라는 현재 100% 바이오 플라스틱 병(Pepsico Green Bottle)을 사용할 것을 목표로 기존의 석유화학소재로 생산한 플라스틱 병을 바이오플라스틱 병으로 교체하고 있으며 코카콜라 역시 ‘Coca-Cola plant bottle'이라는 이름으로 이와 유사한 프로젝트를 진행 중에 있다.

[0005] 대표적인 바이오플라스틱 소재인 폴리하이드록시알카노익산(polyalkanoate)족의 폴리에스테르는 미생물에 의해서도 합성될 수 있으며, 대표적인 예로 폴리하이드록시부티르산은(polyhydroxybutyrate; PHB)는 랄스토니아 유트로퍼스(*Ralstonia eutrophus*)와 바실러스 메가테리움(*Bacillus megaterium*)과 같은 미생물 또는 이 미생물의 PHB 생합성 경로를 도입한 대장균 또는 효모로부터 생산하는 연구가 진행되어 왔다(Kocharin *et al. AMB Express* 2012, 2:52, Kocharin and Nielsen. *AMB Express* 2013, 3:18). 그러나 대부분의 출발물질이 포도당과 같은 고가의 단당류를 사용하고 있어서 충분한 양의 미생물을 생장시키는데 드는 비용이 매우 비싸다는 단점이 있다. 또한 미생물로부터 중합체 형태인 PHB를 생산할 경우, PHB가 밖으로 배출되지 않고 세포 내에 축적되면서 세포 생장이 저해되고 PHB 회수 시에는 세포 파쇄를 위한 시간과 비용이 든다는 단점이 있다. 그러므로 대량 생산 및 생산물의 회수를 용이하게 하기 위하여 세포 밖으로 배출되기 쉬운 단량체 형태의 바이오 플라스틱 소재를 생산하는 연구를 진행하고 있다(Sang Yup Lee and Young Lee. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003, 69(6):3421, Bo Wang *et al. Metabolic Engineering*. 2013, 16:68-77).

[0006] 3-하이드록시부티르산(3-HB)은 폴리하이드록시알카노익산의 합성소재뿐만 아니라, 항생제, 페로몬, 아미노산의 전구체로 이용될 수 있는 고부가가치 화합물이다. 3-HB를 생합성하기 위해서는 3단계의 효소반응이 필요하다. 먼저 세포 내 아세틸 CoA를 아세토아세틸 CoA로 전환시키는 효소(아세틸 CoA 티올라아제), 아세토아세틸 CoA를 3-하이트록시부티릴 CoA로 환원시키는 효소(아세토아세틸 CoA 리덕타아제), 마지막으로 3-하이드록시부티릴 CoA를 3-하이드록시부티르산(3-HB)로 전환하는 효소(3-하이드록시부티릴 CoA 하이드롤라아제)이다.

[0007] 3-하이드록시부티르산(3-HB)을 대장균 또는 시아노박테리아(cyanobacteria)와 같은 미생물로부터 생산하기 위한 생합성 경로는 알려져 있지만, 현재까지 이 생합성 경로를 사용하여 진핵세포인 효모에서 생산한 연구는 전혀 보고된 바가 없다.

[0008] 본 발명자들은 클로스트리디움 아세토부틸리둠(*Clostridium acetobutylidum*) ATCC 824, 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*) K12 KG1655, 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) BY4741 유래의 효소 유전자들을 효모에 도입하여 3-HB 생산을 위한 최적의 효소 조합을 탐색하고, 3-HB 합성 경로를 도입한 효모를 배양하여 고농도의 3-HB를 최초로 생산함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 미국 공개 특허 제2012-0264179

(특허문헌 0002) 대한민국 등록 특허 제10-1114918호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 3-하이드록시부티르산의 생합성 경로에 관여하는 효소를 재조합 기술을 이용하여 효모에서 3-하이드록시부티르산을 제조하기 위한 것으로, 이를 위한 재조합 벡터, 재조합 효모 및 상기 재조합 효모를 이용한 3-하이드록시부티르산의 대량 생산 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 아세틸 CoA 티올라아제(acetyl-CoA thiolase)를 코딩하는 ERG10 및 thl로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자; 아세토아세틸 CoA 리덕타아제(acetoacetyl-CoA reductase)를 코딩하는 Hbd 및 FOX2로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자; 및 3-하이드록시부티릴 CoA 하이드롤라아제(3-hydroxybutyryl-CoA hydrolase)를 코딩하는 TesB 또는 TES1로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자를 포함하는 3-하이드록시부티르산 제조용 재조합 벡터를 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 아세틸 CoA 티올라아제(acetyl-CoA thiolase)를 코딩하는 ERG10 및 thl로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자; 아세토아세틸 CoA 리덕타아제(acetoacetyl-CoA reductase)를 코딩하는 Hbd 및 FOX2로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자; 및 3-하이드록시부티릴 CoA 하이드롤라아제(3-hydroxybutyryl-CoA hydrolase)를 코딩하는 TesB 또는 TES1로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자로 형질전환된 3-하이드록시부티르산 제조용 재조합 효모를 제공한다.

[0013] 본 발명은 또한 상기 3-하이드록시부티르산 제조용 재조합 효모를 탄소원으로 포도당 및 에탄올을 사용하여 발효시키는 단계를 포함하는 3-하이드록시부티르산의 대량 생산 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명은 3-HB의 생합성 경로에 관여하는 효소를 이용하여 재조합 기술을 통해 효모에서 3-HB를 생산할 수 있는 효과가 있다. 효모의 경우 에탄올, 유기산 및 저해제 내성이 강한 균주로 알려져 있으므로 효모를 이용하여 3-HB를 생산할 경우 고농도의 생산이 가능하다는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 본 발명에 따른 효모에서 3-HB를 생산하는 생합성 경로를 도식화한 것이다.

도 2는 아세틸 CoA 티올라아제 효소활성 측정 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 아세토아세틸 CoA 리덕타아제 효소활성 측정 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 3-하이드록시부티릴 CoA 하이드롤라아제 효소활성 측정 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 3-HB 생합성 경로에 관여하는 효소 유전자군을 발현하는 재조합 효모에서 3-HB의 생산량을 비교한 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 3-HB 생합성 경로에 관여하는 효소 유전자군을 발현하는 재조합 효모에서 Fed-batch fermentation를 실시한 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 3-HB 생합성 경로에 관여하는 효소 유전자군을 발현하는 재조합 효모의 세포독성 측정 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 3-HB 생합성 경로에 관여하는 효소 유전자군을 발현하는 재조합 효모에서 생산된 3-HB의 Mass-spectrum 동정 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 3-하이드록시부티르산(3-HB)을 대장균 또는 시아노박테리아(cyanobacteria)와 같은 미생물로부터 생산하기 위한 생합성 경로는 알려져 있지만, 현재까지 이 생합성 경로를 사용하여 진핵세포인 효모에서 생산한 연구는 전혀 보고된 바가 없다. 효모는 다른 박테리아에 비해서 에탄올, 유기산 및 저해제에 대한 내성이 높은 것으로 알려져 있으며 빵과 와인과 같이 식품에서도 널리 이용되는 안전한 미생물로 알려져 있어 바이오연료 및 화학소재를 생산에 널리 이용되고 있다. 그러나 본 발명에서 도입한 생합성 경로의 출발물질은 아세틸 CoA로 효모와 같은 진핵세포는 피루브산이 미토콘드리아 내에서 아세틸 CoA로 전환되어 TCA 회로를 통해 에너지 대사를 하기 때문에 세포질의 아세틸 CoA의 양은 매우 적다. 이와 같이 세포질의 아세틸 CoA가 잘 만들어지지 않는 조건에서는

도입한 생합성 경로가 활성을 가진다하더라도 생성물을 만들어낼 수 없다.

[0017] 따라서 이러한 문제를 해결하고자 본 발명자들은 세포질의 아세틸 CoA의 양을 높이기 위해서 포도당(글루코스)이나 갈락토스와 같은 당류를 탄소원으로 사용하는 것 외에 에탄올을 탄소원으로 추가 제공함으로써 세포질에서 아세틸 CoA가 생성되도록 유도하였다.

[0018] 또한 3-HB를 생산하기 위한 최적의 효소 유전자 조합을 찾기 위하여 클로스트리디움 아세토부틸리둠(*Clostridium acetobutylidum*) ATCC824, 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*) K12 KG1655, 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) BY4741 유래의 효소 유전자들을 효모에 도입하여, 각각의 유전자 조합 조건에서의 아세틸 CoA 티올라아제, 아세토아세틸 CoA 리덕타아제 그리고 3-하이드록시부티릴 CoA 하이드롤라아제 효소의 활성을 비교하였다. 또한 유전자 조합 조건 별 플라스크 배양을 통하여 생성된 3-HB의 농도를 비교함으로써 최적의 효소 조합을 탐색하였다.

[0019] 위의 실험을 통해 찾은 최적의 효소 유전자 조합 조건에서 고농도의 세포(high cell density) 조건에서 에탄올 fed-batch fermentation을 실시하여 고농도의 3-HB를 생산하였다.

[0020] 따라서, 본 발명은 아세틸 CoA 티올라아제(acetyl-CoA thiolase)를 코딩하는 ERG10 및 thl로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자; 아세토아세틸 CoA 리덕타아제(acetoacetyl-CoA reductase)를 코딩하는 Hbd 및 FOX2로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자; 및 3-하이드록시부티릴 CoA 하이드롤라아제(3-hydroxybutyryl-CoA hydrolase)를 코딩하는 TesB 또는 TES1로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자를 포함하는 3-하이드록시부티르산 제조용 재조합 벡터를 제공한다.

[0021] 본 발명의 3-하이드록시부티르산 제조용 재조합 벡터는 출발물질로 아세틸 CoA를 사용하여 최종산물로 3-하이드록시부티르산을 제조할 수 있는 것을 특징으로 한다. 보다 구체적으로, 상기 재조합 벡터는 아세틸 CoA를 아세토아세틸 CoA로 전환시키는 효소(아세틸 CoA 티올라아제), 아세토아세틸 CoA를 3-하이트록시부티릴 CoA로 환원시키는 효소(아세토아세틸 CoA 리덕타아제), 마지막으로 3-하이드록시부티릴 CoA를 3-하이드록시부티르산(3-HB)로 전환하는 효소(3-하이드록시부티릴 CoA 하이드롤라아제)를 코딩하는 유전자군을 포함하고 있다.

[0022] 상기 아세틸 CoA 티올라아제는 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) BY4741에서 유래하는 ERG10 유전자 또는 클로스트리디움 아세토부틸리둠(*Clostridium acetobutylidum*) ATCC824에서 유래한 thl 유전자로부터 코딩될 수 있고, 예컨대, SEQ ID NO: 1 또는 2의 염기서열로 표시될 수 있다.

[0023] 상기 아세토아세틸 CoA 리덕타아제는 클로스트리디움 아세토부틸리둠(*Clostridium acetobutylidum*) ATCC824에서 유래한 Hbd 유전자 또는 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) BY4741에서 유래한 FOX2 유전자로부터 코딩될 수 있고, 예컨대, SEQ ID NO: 3 또는 4의 염기서열로 표시될 수 있다.

[0024] 상기 3-하이드록시부티릴 CoA 하이드롤라아제는 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*) K12 MG1655에서 유래한 TesB 유전자 또는 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) BY4741에서 유래한 TES1 유전자로부터 코딩될 수 있고, 예컨대, SEQ ID NO: 5 또는 6의 염기서열로 표시될 수 있다.

[0025] 바람직하게는, 본 발명의 3-하이드록시부티르산 제조용 재조합 벡터는 아세틸 CoA 티올라아제를 코딩하는 ERG10 유전자; 아세토아세틸 CoA 리덕타아제를 코딩하는 Hbd 유전자; 및 3-하이드록시부티릴 CoA 하이드롤라아제를 코딩하는 TesB 유전자를 포함할 수 있다.

[0026] 상술한 유전자들은 효소의 물리 화학적 활성을 갖고 하나 이상의 아미노산이 결실, 치환, 삽입 및/또는 부가된 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 예컨대, SEQ ID NOS: 1 내지 6에 기재된 어느 하나의 폴리뉴클레오티드를 포함하고, 효소의 물리 화학적 특성을 갖는 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 엄격한 조건하에서 혼성화하는 폴리뉴클레오티드도 포함한다. '엄격한 조건하에서 혼성화하는 폴리뉴클레오티드' 라 함은, 예컨대 설명서에 기술된 조건하(0.5×SSC를 포함하는 일차 세척 완충액으로 42℃에서 세척)에서 ECL 직접 핵산 표지화 및 검출 시스템(Amersham Pharmacia Biotech)을 이용하여, 효소 단백질로부터 임의적으로 선택된 적어도 20, 바람직하게는 적어도 30의 연속적 잔기(예를 들어, 40, 60 또는 100 연속 잔기)의 서열을 포함하는 하나 이상의 프로브 DNAs에 혼성화하는 폴리뉴클레오티드를 말한다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 분리된 폴리뉴클레오티드를 포함한다. '분리된 폴리뉴클레오티드'라 함은 천연적으로 발생하는 폴리뉴클레오티드에 비해 상이한 형태로 존재하는 폴리뉴클레오티드를 말한다. 예를 들어, 다른 생물체의 게놈에 통합된 벡터 및 폴리뉴클레오티드는 상기 분리된 폴리뉴클레오티드에 포함된다. 또한, 상기 분리된 폴리뉴클레오티드는 cDNA, PCR 산물, 또는 제한 단편으로서 얻어진 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 또한, 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 부분

으로서 사용되는 폴리뉴클레오티드는 '분리된 폴리뉴클레오티드'에 또한 포함된다.

[0027] 상술한 본 발명의 효소들을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 예를 들어, 하기 방법에 의해 분리할 수 있다: SEQ ID NOS: 1 내지 6의 폴리뉴클레오티드 서열에 기초한 각각의 PCR 프라이머를 설계하고, 주형(template)으로서 효소-생산 균주 유래의 염색체 DNA나 cDNA 라이브러리를 이용한 PCR을 수행하여 본 발명의 DNA를 얻는다.

[0028] 또한, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 프로브로서 얻어진 DNA 단편을 이용하여, 콜로니 혼성화, 플라크 혼성화 등으로, (a) 효소-생산 균주에서 유래된 염색체 DNA의 제한효소 단편을 파지나 플라스미드에 도입하고 상기 파지나 벡터로 대장균 세포를 형질전환하여 얻어진 라이브러리, 또는 (b) cDNA 라이브러리에 대한 스크리닝을 수행함으로써 제조할 수 있다.

[0029] 택일적으로, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 PCR로 얻어진 DNA 단편의 뉴클레오티드 서열을 분석; 알려진 DNA 서열의 외부에 가닥(strand)을 신장하기 위해 분석된 서열에 기초한 PCR 프라이머의 설계; 및 적절한 제한효소로 효소-생산 균주의 염색체 DNA의 소화 및 주형으로서 상기 DNA를 이용하는 자가환화 반응(self-cyclizing reaction)에 의한 역-PCR을 수행함으로써 얻어질 수 있다(*Genetics*, 120, 621-623 (1988)). 또한, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 RACE 방법으로 얻어질 수 있다(Rapid Amplification of cDNA End, 'PCR Jikken Manual (Manual for PCR experiments)', 25-33, HBJ Publishing Bureau).

[0030] 상기 방법으로 클로닝된 게놈 DNA 및 cDNA에 더하여, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 합성된 DNAs를 포함한다.

[0031] 본 발명에서 "재조합 벡터"란 적당한 숙주세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있는 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 말한다.

[0032] 상기 벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파아지 벡터 또는 바이러스 벡터 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 적합한 발현벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서 같은 발현 조절 엘리먼트 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 시그널 서열 또는 리더 서열을 포함하며, 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 또한, 발현벡터는 벡터를 함유하는 숙주세포를 선택하기 위한 선택마커를 포함하고, 복제가능한 발현벡터인 경우 복제 기원을 포함한다.

[0033] 본 발명의 재조합 벡터는 바람직하게는 일반적인 대장균 균주 발현용 벡터에 상술한 효소 코딩 핵산을 각각 또는 함께 삽입함으로써 제조될 수 있다. 상기 대장균 균주 발현용 벡터는 일반적으로 사용할 수 있는 모든 대장균주 발현용 벡터가 제한 없이 사용될 수 있다.

[0034] 본 발명은 또한 아세틸 CoA 티올라아제(acetyl-CoA thiolase)를 코딩하는 ERG10 및 thl로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자; 아세토아세틸 CoA 리덕타아제(acetoacetyl-CoA reductase)를 코딩하는 Hbd 및 FOX2로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자; 및 3-하이드록시부티릴 CoA 하이드롤라아제(3-hydroxybutyryl-CoA hydrolase)를 코딩하는 TesB 또는 TES1로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자로 형질전환된 3-하이드록시부티르산 제조용 재조합 효모를 제공한다.

[0035] 상기 형질전환은 핵산을 유기체, 세포, 조직 또는 기관에 도입하는 어떤 방법도 포함되며, 당 분야에서 공지된 바와 같이 숙주세포에 따라 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 이런 방법에는 전기충격유전자전달법(electroporation), 원형질 융합, 인산칼슘($CaPO_4$) 침전, 염화칼슘($CaCl_2$) 침전, 실리콘 카바이드 섬유 이용한 교반, 아그로박테리아 매개된 형질전환, PEG, 덱스트란 설페이트, 리포펙타민 등이 포함되나 이로 제한되지 않는다.

[0036] 또한, 숙주세포로 사용하는 효모는 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*), 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 쉬조사카로마세스(*Schizosaccharomyces*), 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*), 야로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*), 클루이베로마세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*), 피치아 안거스타(*Pichia angusta*), 캔디다 보이디니이(*Candida boidinii*) 또는 블라스토보트리스 아데니니포란스(*Blastobotrys adeninivorans*) 등을 사용할 수 있다.

[0037] 상기 형질전환체는 상기 유전자들을 포함하는 재조합 벡터를 임의의 효모 숙주세포에 도입시킴으로써 용이하게 제조될 수 있다.

[0038] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 효모는 40g/L 미만 농도의 3-하이드록시부티르산에서 세포생장에 영향을 받지 않아 상대적으로 3-HB의 독성에 강하여 고농도의 3-HB 생산에 적합한 숙주세포임을 알 수 있다.

[0039] 본 발명의 재조합 효모는 보다 구체적으로, 아세틸 CoA 티올라아제를 코딩하는 ERG10 및 thl로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자를 포함하는 재조합 벡터; 아세토아세틸 CoA 리덕타아제를 코딩하는 Hbd 및 FOX2로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자를 포함하는 재조합 벡터; 및 3-하이드록시부티릴 CoA 하이드롤라아제를 코딩하는 TesB 또는 TES1로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 것일 수 있다.

[0040] 또한, 본 발명의 재조합 효모는 아세틸 CoA 티올라아제를 코딩하는 ERG10 및 thl로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 아세토아세틸 CoA 리덕타아제를 코딩하는 Hbd 및 FOX2로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자 및 3-하이드록시부티릴 CoA 하이드롤라아제를 코딩하는 TesB 또는 TES1로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 것일 수 있다.

[0041] 본 발명의 재조합 효모는 또한 아세틸 CoA 티올라아제를 코딩하는 ERG10 유전자를 포함하는 재조합 벡터; 아세토아세틸 CoA 리덕타아제를 코딩하는 Hbd 유전자를 포함하는 재조합 벡터; 및 3-하이드록시부티릴 CoA 하이드롤라아제를 코딩하는 TesB 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 것일 수 있다.

[0042] 또는, 본 발명의 재조합 효모는 아세틸 CoA 티올라아제를 코딩하는 ERG10 유전자, 아세토아세틸 CoA 리덕타아제를 코딩하는 Hbd 유전자 및 3-하이드록시부티릴 CoA 하이드롤라아제를 코딩하는 TesB 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 것일 수 있다.

[0043] 본 발명은 또한 상기 3-하이드록시부티르산 제조용 재조합 효모를 탄소원으로 포도당 및 에탄올을 사용하여 발효시키는 단계를 포함하는 3-하이드록시부티르산의 대량 생산 방법을 제공한다.

[0044] 일반적으로 효모와 같은 진핵세포는 탄소원으로 포도당을 사용할 경우 체내에서 피루브산으로 대사되며, 피루브산은 미토콘드리아 내에서 아세틸 CoA로 전환되어 TCA 회로를 통해 에너지 대사를 하기 때문에 세포질의 아세틸 CoA의 양은 매우 적다. 따라서, 세포질의 아세틸 CoA가 잘 만들어지지 않는 조건에서는 도입한 생합성 경로가 활성을 가진다하더라도 생성물을 만들어낼 수 없다. 따라서 본 발명에서는 3-HB를 생산하기 위한 출발물질인 아세틸 CoA를 세포질에 축적되도록 하기 위해서 탄소원으로 포도당 외에 에탄올을 추가로 사용한다. 효모는 에탄올을 탄소원으로 하여 생장할 수가 있는데 이때에 에탄올이 아세트알데히드로 산화되고, 아세트알데히드는 아세트산으로 산화된다. 아세트산은 아세틸-CoA 신세타아제(synthetase)에 의해서 아세틸 CoA로 전환된다. 아세틸 CoA를 출발물질로 하여 세 단계의 효소반응에 의해서 3-HB가 생성이 되며 그 반응은 상술한 바와 같다(도 1 참조).

[0045] 따라서, 본 발명의 3-하이드록시부티르산의 대량 생산 방법은 탄소원으로 포도당 외에 에탄올을 1회 이상 부가하여 발효시킬 수 있다.

[0046] 상기 발효는 호기 조건에서 Fed-batch fermentation 일 수 있다.

[0047] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0048] <실시예 1> 3-하이드록시부티르산(3-HB)의 생합성 경로

[0049] 효모에서 3-HB를 생산하는 생합성 경로를 도 1에 나타내었다. 3-HB를 생산하기 위한 출발물질인 아세틸 CoA를 세포질에 다량 축적되도록 하기 위해서 에탄올을 탄소원으로 사용하였다. 효모는 에탄올을 탄소원으로 생장할 수가 있는데 이때에 에탄올이 아세트알데히드로 산화되고, 아세트알데히드는 아세트산으로 산화가 된다. 아세트산은 아세틸 CoA 신세타아제(Acetyl-CoA synthetase) 효소에 의해서 아세틸 CoA로 전환된다. 아세틸 CoA를 출발물질로 하여 세 단계의 효소반응에 의해서 3-HB가 생성이 되며 그 반응은 다음과 같다.

[0050] 1) 아세틸 CoA 티올라아제(ERG10 또는 thl): 아세틸 CoA를 아세토아세틸 CoA로 전환

[0051] 2) 아세토아세틸 CoA 리덕타아제(FOX2 또는 Hbd): 아세토아세틸 CoA를 3-하이드록시부티릴 CoA로 전환하며 이때 환원반응은 NADH 조효소를 동반

[0052] 3) 3-하이드록시부티릴 CoA 하이드롤라아제(TES1 또는 TesB): 3-하이드록시부티릴 CoA의 CoA를 가수분해하여 3-

HB로 전환

[0053] ERG10, FOX2 및 TES1 유전자는 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) BY4741에서 유래하였으며, thl 및 Hbd는 클로스트리디움 아세토부틸리둠(*Clostridium acetobutylidum*) ATCC824에서 유래하였고, TesB 유전자는 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*) K12 MG1655에서 유래한 것이다.

[0054] <실시예 2> 유전자 클로닝 및 재조합 효모 제조

[0055] 효모로부터 3-HB를 생산하기 위하여 각 단계 효소 유전자들의 클로닝을 실시하였다. ERG10, FOX2, TES1 유전자는 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) BY4741의 게놈 DNA를, thl, Hbd 유전자는 클로스트리디움 아세토부틸리둠(*Clostridium acetobutylidum*) ATCC824의 게놈 DNA를, 마지막으로 TesB 유전자는 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*) K12 MG1655의 게놈 DNA를 주형으로 하여 PCR를 실시하였다. 본 실험에 사용된 균주 및 플라스미드와 프라이머 서열은 표 1과 표 2에서 나타내었다. 증폭한 유전자는 각각의 플라스미드에 라이게이션을 실시하였다. 첫 단계 효소 아세틸 CoA 티올라아제 유전자인 ERG10 또는 thl은 pRS423GPD에, 두 번째 효소인 아세토아세틸 CoA 리덕타아제 유전자인 FOX2 또는 Hbd는 pRS425GPD에, 마지막 효소인 3-하이드록시부티릴 CoA 하이드롤라아제 유전자인 TES1 또는 TesB 유전자는 pRS426GPD에 클로닝하였다. 클로닝 벡터를 이 콜라이(*E. coli*) TOP10에 형질전환을 시행하였다. 플라스미드 선별 마커로 100 ㎍/mL 농도의 암피실린을 고체배지에 첨가해주어 재조합 균주를 선별하였다. 재조합 대장균을 100 ㎍/mL 농도의 암피실린이 함유된 LB 배지에서 배양하여 플라스미드를 추출하였다. 그 후 각 단계 효소유전자들이 클로닝 된 3가지의 플라스미드를 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) D452-2에 형질전환을 실시하였다.

표 1

[0056] 유전자 클로닝 및 재조합 효모 제조 시 사용한 균주와 플라스미드

균주명	설명
사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) D452-2	숙주 균주
사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) BY4741	ERG10, FOX2 및 ES1 유전자
클로스트리디움 아세토부틸리둠(*Clostridium acetobutylidum*)ATCC824	thl 및 Hbd 유전자
에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*) K12 MG1655	TesB 유전자
플라스미드	설명
pRS423GPD	HIS3 영양요구성, GPD 프로모터, CYC1 터미네이터
pRS425GPD	LEU2 영양요구성, GPD 프로모터, CYC1 터미네이터
pRS426GPD	URA3 영양요구성, GPD 프로모터, CYC1 터미네이터
pRS423GPD_thl	thl 유전자가 탑재된 pRS423GPD
pRS423GPD_ERG10	ERG10 유전자가 탑재된 pRS423GPD
pRS425GPD_FOX2	FOX2 유전자가 탑재된 pRS425GPD
pRS425GPD_Hbd	Hbd 유전자가 탑재된 pRS425GPD
pRS426GPD_TES1	TES1 유전자가 탑재된 pRS426GPD
pRS426GPD_TesB	TesB 유전자가 탑재된 pRS426GPD

표 2

[0057] 유전자 클로닝 시 사용한 프라이머 세트

프라이머	5'-3' 서열
thl_F	cgggatccaaaatgagagatgtagtaatagtaagtg
thl_R	ccgctcgagttagtctctttcaactacgagag
ERG10_F	cgggatccaaaatgtctcagaacgtttacattgtat
ERG10_R	ccgctcgagttatcatatcttttcaatgacaatagagg

Hbd_F	cgggatccaaaatgaaaaaggtatgtgttataggtg
Hbd_R	ccgctcgagttattttgaataatcgtagaaaccttttc
FOX2_F	cgcccgggaaaatgcctggaaatttatccttcaaag
FOX2_R	ccgctcgagttattatagtttagattttgcctgcgata
TesB_F	cggaattcaaaatgagtcaggcgctaaaaaattta
TesB_R	ccgctcgagttaattgtgattacgcatcaccc
TES1_F	cgcccgggaaaatgagtgcttccaaaatggcca
TES1_R	ccgctcgagttatcagaacttggctcgaatgtct

[0058] <실시예 3> 재조합 효모의 조효소액의 효소활성 측정

[0059] 상기 실시예 2에서 클로닝하여 제작한 재조합 효모의 조효소액의 효소활성을 비교하여 3-HB 생산을 위한 최적의 효소 조합을 탐색하였다. 효소 활성 측정을 위해 50 ㎍의 조효소 단백질을 사용하였다.

[0060] 1) 아세틸 CoA 티올라아제 효소 활성 측정

[0061] 아세틸 CoA 티올라아제 효소 활성은 0.25 mM의 아세토아세틸 CoA와 1 mM의 아세틸 CoA를 기질로 하여 10 mM의 $MgCl_2$를 100 mM의 Tris-HCl buffer(pH 8.0)를 사용하여 효소반응을 실시하였으며 아세토아세틸 CoA 측정 영역인 303 nm에서 감소하는 흡광도를 모니터링하였다.

[0062] 도 2에 나타난 바와 같이, 두 가지의 효소 유전자 ERG10과 thl 중에서 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) BY4741 유래인 ERG10 효소 활성이 더 높게 나타났다.

[0063] 2) 아세토아세틸 CoA 리덕타아제 효소 활성 측정

[0064] 아세토아세틸 CoA 리덕타아제 효소 활성은 0.4 mM의 아세토아세틸 CoA를 기질로 사용하였으며 0.4 mM의 NADH를 조효소로 첨가하였고 100 mM의 Tris-HCl buffer(pH 7.0)를 사용하여 효소반응을 실시하였다. 효소반응은 NADH 측정 영역인 340 nm에서 감소하는 흡광도를 모니터링하였다.

[0065] 도 3에 나타난 바와 같이, 두 가지의 효소 유전자 FOX2와 Hbd 중에서 클로스트리디움 아세토부틸리둠(*Clostridium acetobutylidum*) ATCC824 유래인 Hbd 효소 활성이 더 높게 나타났다.

[0066] 3) 3-하이드록시부티릴 CoA 하이드롤라아제 효소 활성 측정

[0067] 3-하이드록시부티릴 CoA 하이드롤라아제 효소 활성은 20 nM의 3-하이드록시부티릴 CoA를 기질로 사용하였으며 0.1 mM의 DTNB(5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic Acid)를 발색물질로 사용하여 100 mM Tris-HCl buffer(pH8.0)에서 효소반응을 실시하였으며 412nm 흡광도에서 반응을 모니터링하였다.

[0068] 도 4에 나타난 바와 같이, 두 가지의 효소 유전자 TES1과 TesB 중에서 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*) K12 MG1655 유래인 TesB 효소 활성이 더 높게 나타났다.

[0069] 상기와 같이, 효소활성 측정 결과 1) 아세틸 CoA 티올라아제는 ERG10, 2) 아세토아세틸 CoA 리덕타아제는 Hbd, 3) 3-하이드록시부티릴 CoA 하이드롤라아제는 TesB이 가장 최적의 조합인 것으로 나타났다.

[0070] <실시예 4> 각 효소유전자 조합별 재조합 효모의 배양액에서 3-HB 생산량 비교

[0071] 첫 단계 효소 유전자는 ERG10으로 고정하고 ERG10-FOX2-TES1(FT), ERG10-Hbd-TES1(HT), ERG10-FOX2-TesB(FB), ERG10-Hbd-TesB(HB) 네 가지 효소 유전자 조합 조건에서 재조합 효모 균주를 배양하였다. 이때 배지는 10 g/L의 효모 추출액과 20 g/L의 펩톤이 들어있는 YP에 20 g/L의 에탄올을 탄소원으로 사용하였으며, 15 g/L 농도의 에탄올을 두 번 더 추가하여 첨가하였다.

[0072] 500 mL-플라스크에서 200 mL의 배양액을 30℃, 300 rpm 조건에서 배양한 결과 ERG10-Hbd-TesB(HB) 조건에서만 3-HB가 생산되었다(도 5).

[0073] <실시예 5> Fed-batch fermentation을 통한 고농도의 3-HB의 생산

[0074] ERG10-Hbd-TesB(HB) 조건에서 3-HB가 생성되는 것을 플라스크 배양을 통해 확인한 후에 고농도의 3-HB를 생산하기 위해서 fed-batch fermentation을 실시하였다. Fed batch fermentation을 위한 조건은 다음과 같다. 1L의 배지를 만들기 위하여 15 g의 황산암모늄, 8 g의 인산칼륨, 3 g의 황산마그네슘, 80 g의 포도당, 10 mL의 trace element solution 및 3 mL의 비타민 용액을 넣었고 1N의 NaOH를 이용하여 pH를 6.0으로 맞춰주었다. 배양기 조건은 1000 rpm의 교반, 온도 30℃, pH 6.0, DO (용존산소포화도) 100, 가스 플로우(air) 0.5로 설정하였다.

[0075] 접종을 위하여 재조합 균주가 자란 150 mL의 전배양액을 4000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 세포를 모았으며, 100 mL의 멸균수를 이용해서 한번 재현탁한 후 다시 한번 4000 rpm에서 10분 동안 원심분리하였다. 그 후, 100 mL의 멸균수를 이용하여 재현탁한 후 접종하여 배양하였다. 고농도 세포 배양을 위하여 초기에는 포도당을 탄소원으로 사용하여 배양하였으며, OD_{600}가 70 이상 올라간 후에는 3-HB 생산을 위해 탄소원을 30 g/L의 에탄올로 변경하였다. HPLC를 이용하여 포도당, 에탄올, 3-HB, 글리세롤, 아세트산의 농도 변화를 모니터링 하였다. 탄소원으로 넣어준 에탄올이 없어지면 다시 30 g/L의 에탄올을 넣어주었다.

[0076] 도 6에 나타난 바와 같이, 약 12 g/L의 고농도의 3-HB가 생산되었다.

[0077] <실시예 6> 3-HB의 세포독성 측정

[0078] 효모에 대한 3-HB의 세포독성을 측정하기 위하여, YPD 배지에 0, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40 g/L 농도의 3-HB를 넣고 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) D452-2 균주를 배양하였다.

[0079] 600 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 생장을 모니터링한 결과, 40 g/L 농도의 3-HB를 제외한 모든 농도에서 비성장율(specific growth rate)가 비슷하게 나타났다. 그러므로 20 g/L 농도의 3-HB까지는 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) D452-2 세포 생장에 영향을 미치지 않는다는 것을 알 수 있었다(도 7).

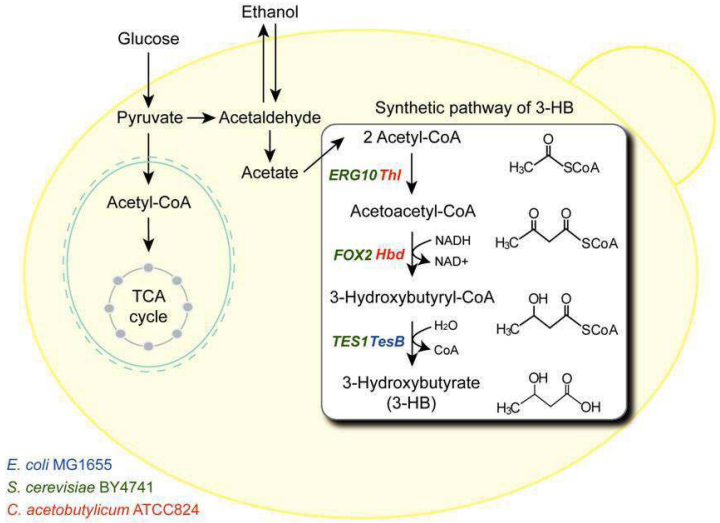
[0080] <실시예 7> HPLC와 GC-MS를 이용한 3-HB의 정성 및 정량 분석

[0081] 플라스크 배양 및 반응기(bioreactor)를 이용한 fed-batch fermentaion을 통해 생성된 3-HB를 분석하기 위하여 HPLC와 GC-MS를 사용하였다. HPLC 조건은 다음과 같다. HPLC(Agilent Technologies 1200 Series) 기기와 refractive index detector를 사용하였으며, 컬럼은 Rezex ROA-Organic Acid H+ (8%) column (Phenomenex, Torrance, CA)이었다. 또한 이동상 용매는 0.005N H_2SO_4 이었으며 flow rate는 0.6 mL/min이었다. 세포배양액을 16,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후에 상등액을 10배 희석하여 26G BD 주사기를 이용하여 주입하였다.

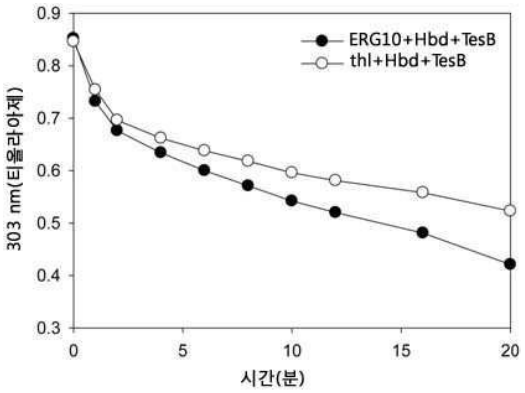
[0082] 또한 GC-MS 조건은 다음과 같다. 세포배양액을 16,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후에 50 ㎕의 상등액을 건조시켰다. 유도체화를 위하여 건조시킨 샘플에 10 ㎕의 4%(w/v)농도의 O-methylhydroxylamine hydrochloride in pyridine을 넣고 30℃에서 90분간 반응을 시킨 후, 45 ㎕의 N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide를 넣고 37℃에서 30분간 반응을 실시한다. GC-MS 분석을 위한 기기 조건은 다음과 같다. 분석 시 사용한 컬럼은 RTX-5Sil MS column (30 m×0.25 mm, 0.25 ㎛ film thickness; Restek, Bellefonte, PA)이며 GC 컬럼 온도 조건은 먼저 50 ℃에서 1분간 유지하고 330 ℃까지 20 ℃/min의 승온 속도로 승온시킨 후 5분간 유지하였다. 1 ㎕의 샘플을 splitless mode로 분석하였다. 3-HB 표준물질의 분석을 위해서 3-HB 표준물질도 위와 같은 방법으로 분석을 실시하였으며 결과는 도 8에 나타내었다. 3-HB 표준물질과 재조합 효모 배양액에서 분석한 3-HB는 GC-MS 상의 mass spectrum을 비교함으로써 동정하였다.

도면

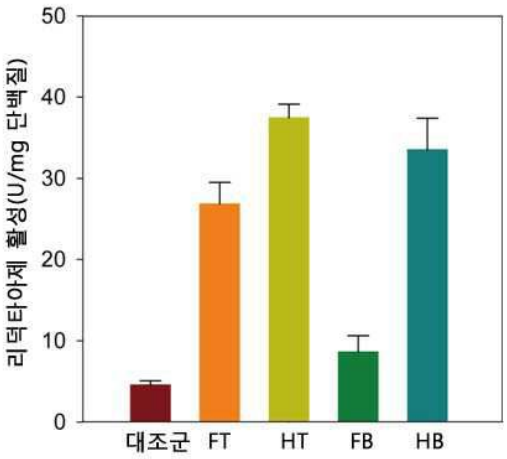
도면1



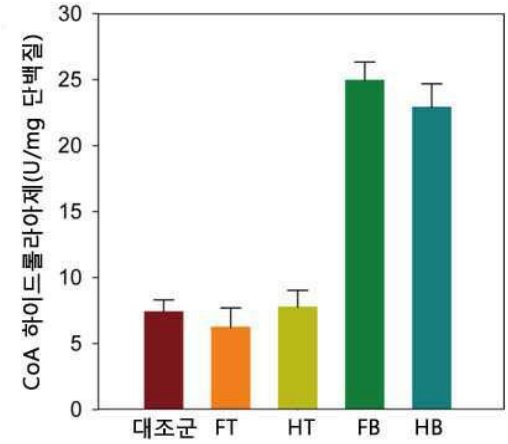
도면2



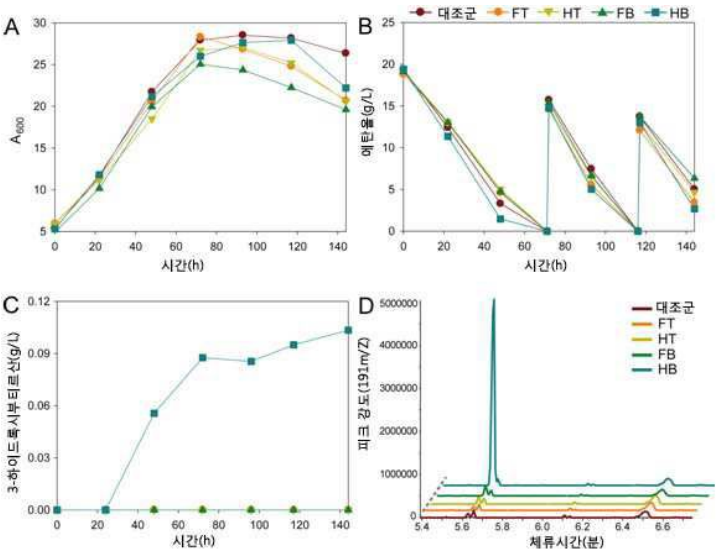
도면3



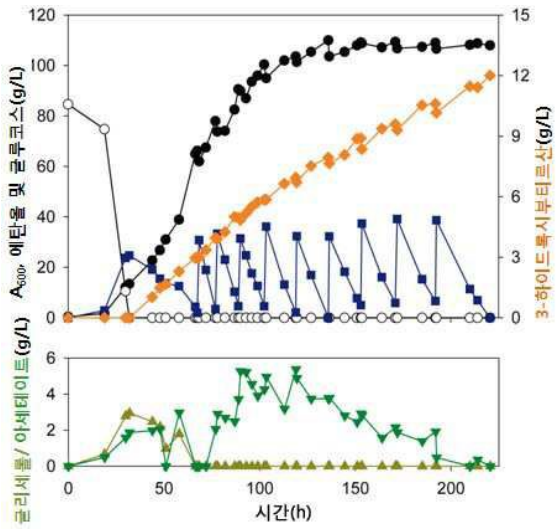
도면4


CoA 하이드롤라아제(U/mg 단백질)
30
25
20
15
10
5
0
대조군
FT
HT
FB
HB

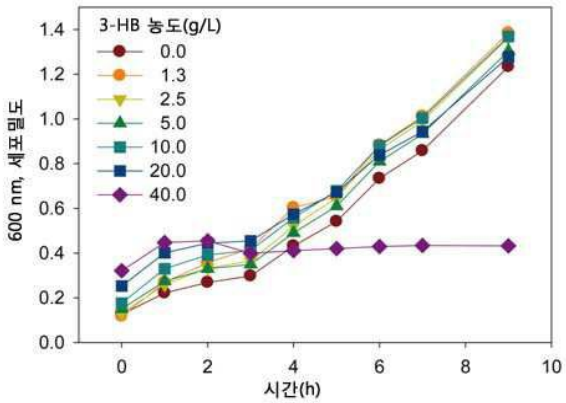
도면5


A
B
C
D
대조군
FT
HT
FB
HB
시간(h)
에탄올(g/L)
3-하이드록시부티르산(g/L)
피크 강도(191m/Z)
체류시간(분)

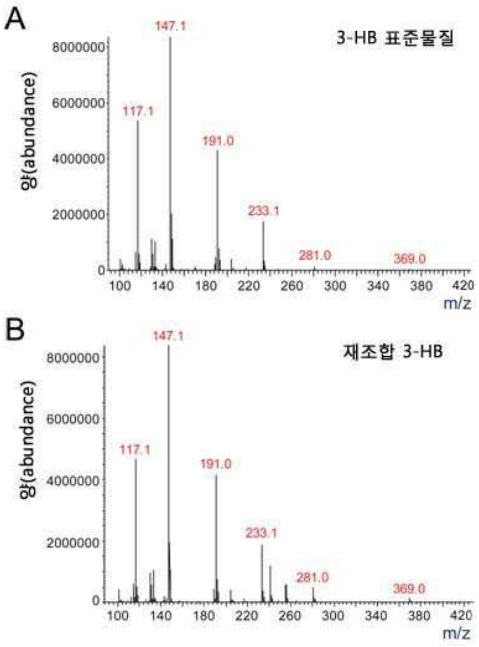
도면6


A600, 에탄올 및 글루코스(g/L)
3-하이드록시부티르산(g/L)
글리세롤/ 아세테이트(g/L)
시간(h)

도면7



도면8



서 열 목 록

<110> Korea University Industrial & Academic Collaboration Foundation

<120> Recombinant microorganism producing 3-hydroxybutyrate and use thereof

<130> P14U13C0103

<160> 18

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 1197

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ERG10

<400> 1

atgtctcaga acgtttacat tgtatcgact gccagaaccc caattggttc attccagggt 60

tctctatcct ccaagacagc agtggaattg ggtgctgttg ctttaaaagg cgccttggct 120

aaggttccag aattggatgc atccaaggat tttgacgaaa ttatttttgg taacgttctt 180

tctgccaatt tgggccaagc tccggccaga caagttgctt tggctgccgg tttgagtaat 240

catatcgttg caagcacagt taacaaggtc tgtgcatccg ctatgaaggc aatcattttg 300

ggtgctcaat ccatcaaatg tggtaatgct gatgttgtcg tagctggtgg ttgtgaatct 360

atgactaacg caccatacta catgccagca gcccgtgcgg gtgccaaatt tggccaaact 420

gttcttgttg atggtgtcga aagagatggg ttgaacgatg cgtacgatgg tctagccatg 480

ggtgtacacg cagaaaagtg tgcccgtgat tgggatatta ctagagaaca acaagacaat 540

tttgccatcg aatcctacca aaaatctcaa aaatctcaaa aggaaggtaa attcgacaat 600

gaaattgtac ctgttaccat taagggattt agaggtaagc ctgatactca agtcacgaag 660

gacgaggaac ctgctagatt acacgttgaa aaattgagat ctgcaaggac tgttttccaa 720

aaagaaaacg gtactgttac tgccgctaac gcttctccaa tcaacgatgg tgctgcagcc 780

gtcatcttgg tttccgaaaa agttttgaag gaaaagaatt tgaagccttt ggctattatc 840

aaaggttggg gtgaggccgc tcatcaacca gctgatttta catgggctcc atctcttgca 900

gttccaaagg ctttgaaaca tgctggcatc gaagacatca attctgttga ttactttgaa 960

ttcaatgaag ccttttcggt tgtcggtttg gtgaacacta agattttgaa gctagaccca 1020

tctaaggtta atgtatatgg tggtgctgtt gctctaggtc acccattggg ttgttctggt 1080

gctagagtgg ttgttacact gctatccatc ttacagcaag aaggaggtaa gatcggtgtt 1140

gccgccattt gtaatggtgg tggtggtgct tcctctattg tcattgaaaa gatatga 1197

<210> 2

<211> 1179

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Thl

<400> 2

atgaaagaag ttgtaatagc tagtgcagta agaacagcga ttggatctta tggaaagtct 60

cttaaggatg taccagcagt agatttagga gctacagcta taaaggaagc agttaaaaaa 120

gcaggaataa aaccagagga tgttaatgaa gtcattttag gaaatgttct tcaagcaggt 180

ttaggacaga atccagcaag acaggcatct tttaaagcag gattaccagt tgaaattcca 240

gctatgacta ttaataaggt ttgtggttca ggacttagaa cagttagctt agcagcacaa 300

attataaaag caggagatgc tgacgtaata atagcaggtg gtatggaaaa tatgtctaga 360

gctccttact tagcgaataa cgctagatgg ggatatagaa tgggaaacgc taaatttgtt 420

gatgaaatga tcactgacgg attgtgggat gcatttaatg attaccacat gggaataaca 480

gcagaaaaca tagctgagag atggaacatt tcaagagaag aacaagatga gtttgctctt 540

gcatcacaaa aaaaagctga agaagctata aaatcaggtc aatttaaaga tgaaatagtt 600

cctgtagtaa ttaaaggcag aaagggagaa actgtagttg atacagatga gcaccctaga 660

tttggatcaa ctatagaagg acttgcaaaa ttaaaacctg ccttcaaaaa agatggaaca 720

gttacagctg gtaatgcatc aggattaaat gactgtgcag cagtacttgt aatcatgagt 780

gcagaaaaag ctaaagagct tggagtaaaa ccacttgcta agatagtttc ttatggttca 840

gcaggagttg acccagcaat aatgggatat ggacctttct atgcaacaaa agcagctatt 900

gaaaaagcag gttggacagt tgatgaatta gatttaatag aatcaaatga agcttttgca 960

gctcaaagtt tagcagtagc aaaagattta aaatttgata tgaataaagt aaatgtaaat 1020

ggaggagcta ttgcccttgg tcatccaatt ggagcatcag gtgcaagaat actcgttact 1080

cttgtacacg caatgcaaaa aagagatgca aaaaaaggct tagcaacttt atgtataggt 1140

ggcggacaag gaacagcaat attgctagaa aagtgctag 1179

<210> 3

<211> 849

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Hbd

<400> 3

atgaaaaagg tatgtgttat aggtgcaggt actatgggtt caggaattgc tcaggcattt 60

gcagctaaag gatttgaagt agtattaaga gatattaaag atgaatttgt tgatagagga 120

ttagatttta tcaataaaaa tctttctaaa ttagttaaaa aaggaaagat agaagaagct 180

actaaagttg aaatcttaac tagaatttcc ggaacagttg accttaatat ggcagctgat 240

tgcgatttag ttatagaagc agctgttgaa agaatggata ttaaaaagca gatttttgct 300

gacttagaca atatatgcaa gccagaaaca attcttgcat caaatacatc atcactttca 360

ataacagaag tggcatcagc aactaaaaga cctgataagg ttataggtat gcatttcttt 420

aatccagctc ctgttatgaa gcttgtagag gtaataagag gaatagctac atcacaagaa 480

acttttgatg cagttaaaga gacatctata gcaataggaa aagatcctgt agaagtagca 540

gaagcaccag gatttgttgt aaatagaata ttaataccaa tgattaatga agcagttggt 600

atattagcag aaggaatagc ttcagtagaa gacatagata aagctatgaa acttggagct 660

aatcacccaa tgggaccatt agaattaggt gattttatag gtcttgatat atgtcttgct 720

ataatggatg ttttatactc agaaactgga gattctaagt atagaccaca tacattactt 780

aagaagtatg taagagcagg atggcttgga agaaaatcag gaaaaggttt ctacgattat 840

tcaaaataa 849

<210> 4

<211> 2703

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FOX2

<400> 4

atgcctggaa atttatcctt caaagataga gttgttgtaa tcacgggcgc tggaggggggc 60

ttaggtaagg tgtatgcact agcttacgca agcagaggtg caaaagtggt cgtcaatgat 120

ctaggtggca ctttgggtgg ttcaggacat aactccaaag ctgcagactt agtggtggat 180

gagataaaaa aagccggagg tatagctgtg gcaaattacg actctgttaa tgaaaatgga 240

gagaaaataa ttgaaacggc tataaaagaa ttcggcaggg ttgatgtact aattaacaac 300

gctggaatat taagggatgt ttcatttgca aagatgacag aacgtgagtt tgcatctgtg 360

gtagatgttc atttgacagg tggctataag ctatcgcgtg ctgcttggcc ttatatgcgc 420

tctcagaaat ttggtagaat cattaacacc gcttcccctg ccggtctatt tggaaatttt 480

ggtcaagcta attattcagc agctaaaatg ggcttagttg gtttggcgga aaccctcgcg 540

aaggagggtg ccaaatacaa cattaatgtt aattcaattg cgccattggc tagatcacgt 600

atgacagaaa acgtgttacc accacatatc ttgaaacagt taggaccgga aaaaattgtt 660

cccttagtac tctatttgac acacgaaagt acgaaagtgt caaactccat ttttgaactc 720

gctgctggat tctttggaca gctcagatgg gagaggtctt ctggacaaat tttcaatcca 780

gaccccaaga catatactcc tgaagcaatt ttaaataagt ggaaggaaat cacagactat 840

agggacaagc catttaacaa aactcagcat ccatatcaac tctcggatta taatgattta 900

atcaccaaag caaaaaaatt acctcccaat gaacaaggct cagtgaaaat caagtcgctt 960

tgcaacaaag tcgtagtagt tacgggtgca ggaggtggtc ttgggaagtc tcatgcaatc 1020

tggtttgcac ggtacggtgc gaaggtagtt gtaaatgaca tcaaggatcc tttttcagtt 1080

gttgaagaaa taaataaact atatggtgaa ggcacagcca ttccagattc ccatgatgtg 1140

gtcaccgaag ctcctctcat tatccaaact gcaataagta agtttcagag agtagacatc 1200

ttggtcaata acgctggtat tttgcgtgac aaatcttttt taaaaatgaa agatgaggaa 1260

tggtttgctg tcctgaaagt ccacctttt tccacatttt cattgtcaaa agcagtatgg 1320

ccaatattta ccaaacaaaa gtctggattt attatcaata ctacttctac ctcaggaatt 1380

tatggtaatt ttggacaggc caattatgcc gctgcaaaag ccgccatttt aggattcagt 1440

aaaactattg cactggaagg tgccaagaga ggaattattg ttaatgttat cgctcctcat 1500

gcagaaacgg ctatgacaaa gactatattc tcggagaagg aattatcaaa ccactttgat 1560

gcatctcaag tctccccact tgttgttttg ttggcatctg aagaactaca aaagtattct 1620

ggaagaaggg ttattggcca attattcgaa gttggcggtg gttggtgtgg gcaaaccaga 1680

tggcaaagaa gttccggtta tgtttctatt aaagagacta ttgaaccgga agaaattaaa 1740

gaaaattgga accacatcac tgatttcagt cgcaacacta tcaacccgag ctccacagag 1800

gagtcttcta tggcaacctt gcaagccgtg caaaaagcgc actcttcaaa ggagttggat 1860

gatggattat tcaagtacac taccaaggat tgtatcttgt acaatttagg acttggatgc 1920

acaagcaaag agcttaagta cacctacgag aatgatccag acttccaagt tttgcccacg 1980

ttcgccgtca ttccatttat gcaagctact gccacactag ctatggacaa tttagtcgat 2040

aacttcaatt atgcaatgtt actgcatgga gaacaatatt ttaagctctg cacgccgaca 2100

atgccaagta atggaactct aaagacactt gctaaacctt tacaagtact tgacaagaat 2160

ggtaaagccg ctttagttgt tggtggcttc gaaacttatg acattaaaac taagaaactc 2220

atagcttata acgaaggatc gttcttcatc aggggcgcac atgtacctcc agaaaaggaa 2280

gtgagggatg ggaaaagagc caagtttgct gtccaaaatt ttgaagtgcc acatggaaag 2340

gtaccagatt ttgaggcgga gatttctacg aataaagatc aagccgcatt gtacaggtta 2400

tctggcgatt tcaatccttt acatatcgat cccacgctag ccaaagcagt taaatttcct 2460

acgccaattc tgcatgggct ttgtacatta ggtattagtg cgaaagcatt gtttgaacat 2520

tatggtccat atgaggagtt gaaagtgaga tttaccaatg ttgttttccc aggtgatact 2580

ctaaaggtta aagcttggaa gcaaggctcg gttgtcgttt ttcaaacaat tgatacgacc 2640

agaaacgtca ttgtattgga taacgccgct gtaaaactat cgcaggcaaa atctaaacta 2700

taa 2703

<210> 5

<211> 861

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TesB

<400> 5

atgagtcagg cgctaaaaaa tttactgaca ttgttaaatc tggaaaaaat tgaggaagga 60

ctctttcgcg gccagagtga agatttaggt ttacgccagg tgtttggcgg ccaggtcgtg 120

ggtcaggcct tgtatgctgc aaaagagacc gtccctgaag agcggctggt acattcgttt 180

cacagctact ttcttcgccc tggcgatagt aagaagccga ttatttatga tgtcgaaacg 240

ctgcgtgacg gtaacagctt cagcgcccgc cgggttgctg ctattcaaaa cggcaaaccg 300

atttttttata tgactgcctc tttccaggca ccagaagcgg gtttcgaaca tcaaaaaaca 360

atgccgtccg cgccagcgcc tgatggcctc ccttcggaaa cgcaaatcgc ccaatcgctg 420

gcgcacctgc tgccgccagt gctgaaagat aaattcatct gcgatcgtcc gctggaagtc 480

cgtccggtgg agtttcataa cccactgaaa ggtcacgtcg cagaaccaca tcgtcaggtg 540

tggatccgcg caaatggtag cgtgccggat gacctgcgcg ttcatcagta tctgctcggt 600

tacgcttctg atcttaactt cctgccggta gctctacagc cgcacggcat cggttttctc 660

gaaccgggga ttcagattgc caccattgac cattccatgt ggttccatcg cccgtttaat 720

ttgaatgaat ggctgctgta tagcgtggag agcacctcgg cgtccagcgc acgtggcttt 780

gtgcgcggtg agttttatac ccaagacggc gtactggttg cctcgaccgt tcaggaaggg 840

gtgatgcgta atcacaatta a 861

<210> 6

<211> 1050

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TES1

<400> 6

atgagtgctt ccaaaatggc catgtccaac ctagagaaaa tattggaact ggttcctctt 60

tcgcctacca gttttgtcac aaagtatctg cctgccgcgc ccgtagggtc taagggcact 120

tttggtggaa cgctggtatc acaatcgctg ctggcgtcat tgcatactgt gccattgaac 180

ttcttcccca catcgctaca ttcgtatttc atcaagggtg gtgatccgcg gaccaagatc 240

acgtaccatg tgcagaatct gagaaacggt agaaatttca tccataagca ggttagtgct 300

tatcagcacg acaagttgat atttacgtcg atgatcttat ttgccgtgca acggtccaag 360

gagcacgact ccttgcagca ctgggagacg attccaggcc tgcaaggtaa gcagccagac 420

cctcatcgtt atgaagaggc cacttcgctt ttccagaaag aagttctgga cccacagaaa 480

ttgagcaggt atgcctcatt gtccgacagg ttccaagacg caacctcgat gagcaagtat 540

gtggatgcgt ttcaatacgg agtcatggag taccaattcc ccaaggacat gttctactcg 600

gcaagacaca ccgacgagct ggattatttc gtcaaagtga gacctcccat cactaccgtg 660

gagcacgcgg gcgacgagtc ttctttacac aagcatcatc cgtacaggat cccgaagagc 720

attactcctg agaacgacgc tcgctacaac tacgtggcct ttgcgtatct gtccgattcc 780

tacctcctac tcacgatccc gtacttccac aacctgcctt tgtactgcca cagtttcagt 840

gtctcgctcg accacacgat ttactttcac cagttgcctc atgtgaacaa ttggatctat 900

cttaagattt cgaatcccag gtcccactgg gacaagcacc tcgtacaggg caagtatttc 960

gacacacagt cgggacgcat catggcaagc gtctctcagg agggctacgt tgtctacggg 1020

tcagaacgag acattcgagc caagttctga 1050

<210> 7

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> thl_F primer

<400> 7

cgggatccaa aatgagagat gtagtaatag taagtg 36

<210> 8

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223

> thl_R primer

<400> 8

ccgctcgagt tagtctcttt caactacgag ag 32

<210> 9

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ERG10_F primer

<400> 9

cgggatccaa aatgtctcag aacgtttaca ttgtat 36

<210> 10

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ERG10_R primer

<400> 10

ccgctcgagt tatcatatct tttcaatgac aatagagg 38

<210> 11

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Hbd_F primer

<400> 11

cgggatccaa aatgaaaaag gtatgtgtta taggtg 36

<210> 12

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Hbd_R primer

<400> 12

ccgctcgagt tattttgaat aatcgtagaa acctttc 38

<210> 13

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FOX2_F primer

<400> 13

cgcccgggaa aatgcctgga aatttatcct tcaaag 36

<210> 14

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FOX2_R primer

<400> 14

ccgctcgagt tattatagtt tagattttgc ctgcgata 38

<210> 15

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TesB_F primer

<400> 15

cggaattcaa aatgagtcag gcgctaaaaa attta 35

<210> 16

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TesB_R primer

<400> 16

ccgctcgagt taattgtgat tacgcatcac cc 32

<210> 17

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TES1_F primer

<400> 17

cgcccgggaa aatgagtgct tccaaaatgg cca 33

<210> 18

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TES1_R primer

<400> 18

ccgctcgagt tatcagaact tggctcgaat gtct 34