

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호
WO 2011/162447 A1

PCT

(43) 국제공개일
2011년 12월 29일 (29.12.2011)

- (51) 국제특허분류:
C12N 1/21 (2006.01) *C12P 23/00* (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2010/007053
- (22) 국제출원일: 2010년 10월 14일 (14.10.2010)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2010-0059316 2010년 6월 22일 (22.06.2010) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 경상대학교산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIC CO-OPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY) [KR/KR]; 경상남도 진주시 가좌동 900, 660-701 Gyeongsangnam-do (KR).
- (72) 발명자: 겸
- (71) 출원인 : 김유근 (KIM, You Geun) [KR/KR]; 경상남도 진주시 문산읍 이곡리 1158, 660-841 Gyeongsangnam-do (KR).

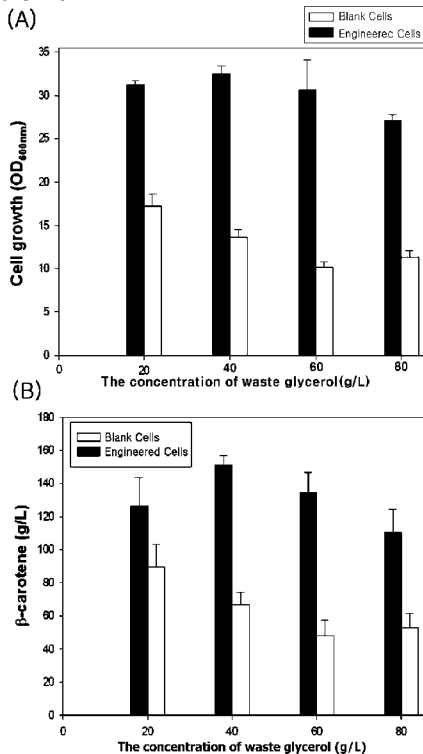
- (72) 발명자: 겸
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 김창준 (KIM, Chang Joon) [KR/KR]; 경상남도 진주시 평거동 들말대경아파트 104 동 103 호, 660-774 Gyeongsangnam-do (KR). 장용근 (CHANG, Young Keun) [KR/KR]; 대전 유성구 신성동 한울아파트 103 동 301 호, 305-707 Daejeon (KR). 김선원 (KIM, Seon Won) [KR/KR]; 경상남도 사천시 사남면 월성리 대우푸르지오아파트 102 동 102 호, 664-712 Gyeongsangnam-do (KR). 느구엣트쿠앙 (NGUYEN DO, Quynh Anh) [VN/KR]; 경상남도 진주시 가좌동 900 경상대학교, 660-701 Jinju-si Gyeongsangnam-do (KR).
- (74) 대리인: 손민 (SON, Min); 서울 강남구 삼성동 159-9 도심공향타워 6층 한얼국제특허사무소, 135-973 Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: MICROORGANISM ABLE TO GROW AND PRODUCE USEFUL SUBSTANCE IN WASTE GLYCEROL CONDITION

(54) 발명의 명칭 : 폐글리세롤 환경 하에서 생장 및 유용물질의 생산이 가능한 미생물

[Fig. 14]



(57) Abstract: The present invention relates to a microorganism with increased growth in the presence of waste glycerol, and more particularly, to a microorganism having overexpressed *otsBA* genes with increased growth even in the presence of waste glycerol, a method for promoting the growth of the microorganism, a microorganism that can produce a carotenoid or useful substances using waste glycerol as a matrix, and to a method for producing carotenoid including a step for cultivating the microorganism and recovering the carotenoid.

(57) 요약서: 본 발명은 폐글리세롤 존재 하에서 생장이 증진된 미생물에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 *otsBA* 유전자가 과발현된, 폐글리세롤의 존재 하에서도 생장이 증진된 미생물, 상기 미생물의 생장을 증진시키는 방법, 폐글리세롤을 기질로 이용하여 카로티노이드 또는 유용물질의 생산이 가능한 미생물, 및 상기 미생물을 배양하여 카로티노이드를 회수하는 단계를 포함하는 카로티노이드를 생산하는 방법에 관한 것이다.

WO 2011/162447 A1



LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- (84) **지정국** (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서와 별도로 규칙 13 의 2 에 의하여 제출한 기탁된 생물학적 물질에 관한 표시와 함께 (규칙 13 의 2.4(d)(i) 및 48.2(a)(viii))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 폐글리세롤 환경 하에서 생장 및 유용물질의 생산이 가능한 미생물

기술분야

- [1] 본 발명은 폐글리세롤 존재 하에서 생장이 증진된 미생물에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 *otsBA* 유전자가 과발현된, 폐글리세롤의 존재 하에서도 생장이 증진된 미생물, 상기 미생물의 생장을 증진시키는 방법, 폐글리세롤을 기질로 이용하여 카로티노이드 또는 유용물질의 생산이 가능한 미생물, 및 상기 미생물을 배양하여 카로티노이드를 회수하는 단계를 포함하는 카로티노이드를 생산하는 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 전 세계적으로 유가 급등, 화석연료 고갈, 화석연료의 사용에 따른 이산화탄소 배출로 인한 국제환경 규제로 친환경 청정 대체 에너지 개발에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 친환경 청정 대체 에너지 중 바이오 디젤은 국내외에서 생산량이 꾸준히 늘고 있으며, 세계 최대 바이오 디젤 생산 국가인 미국의 바이오디젤 생산량은 2000년 2백만 갤런에서 2006년 2억 3천만 갤런으로 급격히 상승하였고, 향후에도 지속적으로 증가할 것으로 예측되고 있는 실정이다. 국내에서도 바이오 디젤을 보급하기 위한 정부의 노력이 이루어지고 있는데, 2002년부터 2006년까지 국내에서 판매된 바이오 디젤량은 미국 생산량의 약 3.3%이며, 해마다 생산량은 증가하고 있는 실정이다.
- [4] 이러한 바이오 디젤은 오일(대부분 식용유), 메탄올, 염기 촉매(KOH 또는 NaOH)가 반응기로 유입되어 트랜스에스테르화 반응에 의해서 지방산의 메틸에스터인 바이오 디젤이 생성되게 된다. 한편 지방은 지방산과 글리세롤이 결합된 형태인데, 에스테르화 반응에 의해 지방산과 글리세롤로 쪼개지게 되어 글리세롤이 부산물로 생성되게 된다. 게다가 생산된 지방산의 일부가 염기 촉매와 반응하여 지방산염(비누)로 전환된다는 부반응이 일어난다. 또한 고온반응이므로 불포화지방산 유래 퍼록사이드(peroxide)가 생성될 수 있다. 따라서 현재 바이오 디젤 생산공정에서 주로 사용하는 염기 촉매로 인해 공정 중에 발생하는 폐글리세롤은 높은 농도의 미반응 지방산염과 분리공정에서 제거되지 않은 메탄올, 염, 퍼록사이드, 바이오 디젤 성분(MONG, matter of organic non glycerol) 등이 포함되어 있다.
- [5] 글리세롤은 화장품, 음식제조, 석유화학 유도체의 원료로 사용될 수 있으나, 폐글리세롤을 이러한 제품군에 활용하기 위해서는 순도를 매우 높게 하는 분리 및 정제공정이 필수적이다. 바이오 디젤로부터 고순도 글리세롤을 분리하기 위하여 증류법, 흡착법, 추출법 등의 정제방법이 사용될 수 있으나,

정제과정으로 분리회수율을 높이는데 한계가 있어 염, 지방산 등의 불순물 제거를 위한 전처리 공정이 추가적으로 필요하다. 따라서 폐글리세롤을 정제하여 사용하기 위해서는 정제과정에 소요되는 비용이 너무 크기 때문에 이를 정제하여 판매하는 것에 대한 경제적인 효과는 매우 낮다고 할 수 있다.

- [6] 생성되는 바이오 디젤 100 kg당 약 10 kg의 폐글리세롤이 부산물로 생성되는데, 바이오 디젤 생산량이 증가함에 따라 폐글리세롤의 발생량도 동시에 증가하기 때문에 폐글리세롤의 생산단가도 지속적으로 하락하고 있는 실정이다. 이러한 이유로 인해 폐글리세롤을 활용하기 위한 연구가 전 세계적으로 진행되고 있으나, 아직까지 명확한 해결방안이 제시되지 않고 있어 새로운 환경오염 유발원으로 부각되고 있으며, 미국을 포함한 전 세계가 폐글리세롤의 처리방안에 대해서 다양한 연구를 진행하고 있으나, 뚜렷한 해결책이 제시되지는 않고 있는 실정이다.
- [7] 따라서 정제공정을 거치지 않은 폐글리세롤을 그대로 사용할 수 있는 방법을 개발한다면, 폐자원의 효율적 이용을 통한 경제적 이익과 환경오염의 최소화라는 관점에서 여러 가지 잇점이 있을 것으로 예측된다.
- [8] 최근 폐글리세롤을 기질로 활용하여 고가의 화합물[1,3-프로판디올(1,3-propanediol) 등] 또는 바이오 에너지(바이오 알코올 등)를 생산하는 발효공정 개발을 위한 연구가 시도되고 있으나, 다량으로 존재하는 지방산염(비누)등의 불순물과 펄록사이드 등이 미생물의 성장을 저해하는 독성물질로 작용하여 생물학적 공정에 이를 산업적으로 직접 이용할 수 없는 문제점들이 보고되고 있다.
- [9] 생물학적 공정을 이용한 1,3-프로판디올(1,3-propandiol)과 1,2-프로판디올(1,2-propandiol)을 생산하는 공정은 현재 미국의 듀퐁(Dupont)사를 비롯한 국내외에서 유전자 조작 및 공정개발을 시도하고 있으나, 생산량은 극히 낮아 이를 극복하기 위한 대사공학적 접근 방법을 통한 고효율 균주개발이 필요한 실정이다.
- [10] 게다가 국내에서는 폐글리세롤로부터 수송용 바이오 연료를 생산하기 위한 주된 연구분야는 혐기성 균주인 클로스트리디움 속(*Clostridium sp.*)을 이용하여 바이오 부탄올을 생산하는 공정에 보다 많은 연구가 수행되고 있다. 이러한 바이오 부탄올 생산을 위한 미생물 내 대사 경로를 살펴보면, 아세틸조효소(acetyl-CoA), 부티릴조효소(butyryl-CoA)와 부틸알데히드(butyraldehyde)를 거쳐 부탄올이 생성된다. 그러나 이 공정에서는 아세톤, 부틸레이트 등의 부산물의 생성을 저해하고 바이오 부탄올의 생산성을 높이기 위해 높은 가격의 환원제를 넣어 주어야 하며, *Clostridium sp.*의 높은 산소민감도에 의해 높은 공정비용이 필요하다는 단점이 있다.

[11]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [12] 본 발명자들은 기존에 보고된 다양한 문제점들을 해결하여 고부가가치 화합물을 생산하는 생물공정을 개발하고자 예의 노력한 결과, 트레할로스 생합성 유전자(*otsBA*)가 과발현되어 폐글리세롤 중에 고농도로 존재하는 불순물인 지방산염과 퍼록사이드 [하이드로젠 퍼록사이드(H_2O_2) 또는 유기 퍼록사이드]에 저항력이 강한 균주를 개발하여 폐글리세롤로부터 고부가가치 화합물인 베타-카로틴을 생산할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[13]

과제 해결 수단

- [14] 본 발명의 하나의 목적은 트레할로스 생합성 유전자인 *otsBA*가 과발현된, 폐글리세롤의 존재 하에서도 생장이 증진된 미생물을 제공하는 것이다.
- [15] 본 발명의 또 하나의 목적은 상기 미생물을 배양하는 단계를 포함하는, 폐글리세롤의 존재 하에서 미생물의 생장을 증진시키는 방법을 제공하는 것이다.
- [16] 본 발명의 또 하나의 목적은 *otsBA* 유전자 및 글리세롤 대사 유전자가 도입된, 폐글리세롤을 기질로 이용할 수 있는 미생물을 제공하는 것이다.
- [17] 본 발명의 또 하나의 목적은 *otsBA* 유전자 및 카로티노이드 생합성 유전자가 도입된 폐글리세롤의 존재 하에서 카로티노이드를 생산할 수 있는 미생물을 제공하는 것이다.
- [18] 본 발명의 또 하나의 목적은 상기 카로티노이드를 생산할 수 있는 균주를 배양하여, 상기 균주의 배양액으로부터 카로티노이드를 회수하는 단계를 포함하는 카로티노이드 생산방법을 제공하는 것이다.

[19]

발명의 효과

- [20] 상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명은 미생물에 독성이 있는 불순물이 많은 폐글리세롤이 존재하는 열악한 환경에서 생존 및 생장이 가능하며, 폐글리세롤을 기질로 활용하여 베타-카로틴을 포함한 카로티노이드와 바이오 연료를 생산할 수 있는, *otsBA* 유전자가 도입된 형질전환 미생물에 관한 것으로, 바이오 연료의 부산물로 발생하며, 환경오염의 주범이 되고 있는 폐글리세롤을 친환경적으로 처리 및 이를 이용하여 유용물질을 생산할 수 있어 환경산업에의 응용에 대한 가능성을 가진다.

[21]

도면의 간단한 설명

- [22] 도 1은 폐글리세롤, 전처리에 의해 지방산이 제거된 폐글리세롤(이하, 전처리 폐글리세롤이라 함, 왼쪽) 및 폐글리세롤로부터 회수된 지방산(오른쪽)을 나타낸다.
- [23] 도 2는 순수 글리세롤(왼쪽), 전처리 폐글리세롤(가운데),

- 폐글리세롤(오른쪽)이 첨가된 배지를 나타낸다.
- [24] 도 3은 트레할로스 생합성 유전자(*otsBA*)의 합성 및 재조합 대장균의 개발에 대한 모식도를 나타낸다.
- [25] 도 4는 베타-카로틴을 생산하기 위한 대사과정 및 이에 관여하는 유전자들을 나타낸다.
- [26] 도 5는 순수 글리세롤(20 g/l)이 첨가된 배지에서 *otsBA* 유전자가 도되지 않은 blank 균주의 생장 및 베타-카로틴 생산 특성에 대한 결과를 나타낸다.
- [27] 도 6은 순수 글리세롤(20 g/l)이 첨가된 배지에서 *otsBA* 유전자가 도입되어 형질전환된 재조합 균주의 생장 및 베타-카로틴 생산 특성에 대한 결과를 나타낸다.
- [28] 도 7A는 순수글리세롤(20 g/l)과 폐글리세롤 유래 지방산염(비누)이 첨가된 배지에서 86시간 배양 후에 나타나는 blank 균주와 재조합 균주의 생장 특성을 나타내고, 도 7B는 순수글리세롤(20 g/l)과 폐글리세롤 유래 지방산염(비누)이 첨가된 배지에서 86시간 배양 후에 나타나는 blank 균주와 재조합 균주의 베타-카로틴 생산량에 대한 결과를 나타낸다.
- [29] 도 8A는 첨가되는 메탄올의 농도에 따른 재조합 균주와 blank 균주의 생장에 미치는 영향을 나타내고, 도 8B는 첨가되는 메탄올의 농도에 따른 재조합 균주와 blank 균주의 베타-카로틴 생산에 미치는 영향을 나타낸다.
- [30] 도 9A는 첨가되는 순수 글리세롤의 농도에 따른 재조합 균주와 blank 균주의 생장에 미치는 영향을 나타내고, 도 9B는 첨가되는 순수 글리세롤의 농도에 따른 재조합 균주와 blank 균주의 베타-카로틴 생산에 미치는 영향을 나타낸다.
- [31] 도 10A는 첨가되는 KCl의 농도가 재조합 균주와 blank 균주의 생장에 미치는 영향을 나타내고, 도 10B는 첨가되는 KCl의 농도가 재조합 균주와 blank 균주의 베타-카로틴 생산에 미치는 영향을 나타낸다.
- [32] 도 11A는 전처리 폐글리세롤이 첨가된 배지(글리세롤, 20 g/l)에서 blank 균주의 생장 및 베타-카로틴의 생합성 결과를 나타내고, 도 11B는 전처리 폐글리세롤이 첨가된 배지(글리세롤, 20 g/l)에서 재조합 균주의 생장 및 베타-카로틴의 생합성 결과를 나타낸다.
- [33] 도 12A는 폐글리세롤이 첨가된 배지(글리세롤, 20 g/l)에서 blank 균주의 생장 및 베타-카로틴의 생합성 결과를 나타내고, 도 12B는 폐글리세롤이 첨가된 배지(글리세롤, 20 g/l)에서 재조합 균주의 생장 및 베타-카로틴의 생합성 결과를 나타낸다.
- [34] 도 13은 폐글리세롤이 첨가된 배지에서 5일간 배양된 재조합 균주의 배양액을 나타낸다.
- [35] 도 14A는 폐글리세롤이 첨가된 배지에서 폐글리세롤의 농도에 따른 blank 균주와 재조합 균주의 생장 결과를 나타내고, 도 14B는 폐글리세롤이 첨가된 배지에서 폐글리세롤의 농도에 따라 blank 균주와 재조합 균주의 베타-카로틴의 생산량을 비교한 결과를 나타낸다.

- [36] 도 15A는 전처리 폐글리세롤의 농도변화에 따라 blank 균주와 재조합 균주의 생장을 비교한 결과를 나타내고, 도 15B는 전처리 폐글리세롤의 농도변화에 따라 blank 균주와 재조합 균주의 베타-카로틴 생산을 비교한 결과를 나타낸다.
- [37] 도 16은 생물반응기에서 재조합 균주를 회분식(batch)으로 배양하였을 때, 시간이 지남에 따른 베타-카로틴, 잔여 글리세롤, 아세트산, NH_4 의 농도변화를 나타낸다.
- [38] 도 17은 재조합 균주를 유가식(bioreactor)으로 배양하였을 때, 시간이 지남에 따른 베타-카로틴, 잔여 글리세롤, 아세트산, NH_4 의 농도변화를 나타낸다.

[39]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [40] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여 하나의 양태로서, 본 발명은 *otsBA* 유전자가 과발현된, 폐글리세롤의 존재 하에서 생장이 증진된 미생물에 관한 것이다.
- [41] 본 발명에서 용어, "폐글리세롤"이란 바이오 연료 또는 바람직하게는 바이오 디젤의 생산 시 부산물로 형성되는 것을 의미하며, 생산되는 바이오디젤 100 kg당 약 10 kg의 폐글리세롤이 부산물로 생성된다. 상기 폐글리세롤은 글리세롤 외에 불순물로는 지방산염(비누), 피록사이드를 비롯한 다양한 염류(K 또는 Na, Cl) 및 메탄올 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 바람직하게는 특히 지방산염(비누)가 15%이상인 것으로, 가장 바람직하게는 15~25% 함유된 폐글리세롤을 말한다. 본 발명의 일 구현예에 따르면 본 발명의 폐글리세롤 내에는 17.4% 함량의 지방산 염이 존재할 수 있다.
- [42] 본 발명에서 용어, "*otsBA*" 유전자는 트레할로스 생합성 오페론으로서, 트레할로스-6-포스페이트 신타제를 코딩하는 *otsA*, 및 트레할로스-6-포스페이트 포스파타제를 코딩하는 *otsB* 유전자로 이루어진 것으로, 공지 데이터베이스로부터 당업자가 용이하게 서열 정보를 얻을 수 있으며, 그 예로 NCBI GenBank Accession No.NC000913일 수 있다. *otsBA*가 박테리아 등에서 과발현될 경우, 폐글리세롤과 같은 고농도의 지방산 염 및 피록사이드가 존재하는 물질의 존재 하에서 미생물의 생장을 증진시킬 수 있는 결과가 개시된 바 없다. 본 발명에서 사용할 수 있는 *otsBA* 유전자로는 트레할로스를 생합성할 수 있는 활성을 가진 유전자는 제한 없이 포함될 수 있으며, 트레할로스를 생합성할 수 있는 활성을 유지하는 한 *otsBA* 유전자와 70%, 바람직하게는 80%, 더욱 바람직하게는 90%의 상동성을 가지는 유전자를 포함할 수 있다.
- [43] 본 발명에서 용어 "과발현"이란 상응하는 DNA에 의해 코딩되는 효소의 세포 내 활성의 증가를 의미한다. 목적 유전자의 과발현은 상기 유전자의 프로모터 부위 및 5'-UTR 지역의 염기서열을 변형시킴으로써 단백질 발현을 증진시킬 수 있으며, 목적 유전자를 염색체상에 추가 도입함으로써 발현을 강화시킬 수 있으며, 목적 유전자를 벡터 상에 자가 프로모터 또는 강화된 별개의 프로모터와

함께 도입하여 균주에 형질전환시킴으로써 단백질의 발현량을 강화시킬 수 있다. 또한, 목적 유전자의 ORF (open reading frame) 지역에 돌연변이를 도입함으로써 이루어질 수 있다.

[44] 상기 미생물 내로 *otsBA* 유전자를 도입하여 과발현되게 하는 방법은 해당 분야에서 공지된 방법의 적용이 가능하다. 본 발명의 구체적인 구현예에서는 *otsBA* 유전자를 벡터에 도입하고, 그 재조합 벡터를 이용하여 미생물을 형질전환하였다.

[45] 또한, 본 발명에서 *otsBA* 유전자는 전사되어 트레할로스 생합성 효소가 발현되게 되는데, 형질전환된 미생물 내에서 조절될 수 있는 프로모터에 의한 발현의 증가, mRNA의 안정성을 증가시킴으로써 유전자 번역을 조절하여 발현을 증가시킬 수 있다. 또한, 특정부위 재조합 DNA 기술에 의하여 유전자의 일부 또는 전부를 결실하거나, 돌연변이된 단편의 교환에 의해서 트레할로스 생합성 효소가 과발현되는 것을 특징으로 한다. 그러나 이러한 방법 외에도 당해 분야에 공지된 다양한 방법을 이용하여 유전자가 과발현되도록 할 수 있음은 당업자에게 자명할 것이다.

[46] 또한, 본 발명에서는, *otsBA* 유전자를 PCR과 같은 공지의 방법을 이용하여 합성한 후, 제한효소로 절단하여 벡터에 연결하고, 상기 벡터를 이용하여 형질전환체를 제조하고, 이를 선별하며, 최종적으로 폐글리세롤에서도 생장이 증진된 미생물을 배양하는 것이다. 바람직하게, 상기 미생물은 기탁번호 KCCM11106P일 수 있다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, *otsBA* 유전자를 과발현시킨 균주를 *Escherichia coli* DH5 α -KBCJ01로 명명하고, KCCM(Korean Culture Center of Microorganism, 대한민국, 서울시 서대문구 홍제1동 유림 빌딩 361-221)에 2010년 10월 02일자로 기탁번호 KCCM11106P로 기탁하였다.

[47] 본 발명의 일 구현예에 따르면, *E. coli* K12의 세포의 크로모솜 DNA를 주형(template)으로 이용하고, *otsBA* 오페론의 측면에 대한 2개의 프라이머 (서열번호 1 및 2)에 의해서 PCR을 수행하였다.

[48] 본 발명에 있어서, *otsBA* 유전자의 과발현으로 인해 미생물이 트레할로스를 생합성하여 고농도의 지방산 염, 또는 퍼록사이드에 저항할 수 있는 능력을 가지게 되는 것이며, 이러한 능력은 폐글리세롤에 존재하는 이들 불순물에 의한 독성에도 견딜 수 있는 특성을 가지게 하여, 미생물의 성장이 증가하는 결과를 나타냈다.

[49] 본 발명의 일 구현예에 따르면 *otsBA* 유전자가 형질전환된 재조합 균주의 경우, *otsBA* 유전자로 형질전환 되지 않은 blank 균주보다 폐글리세롤의 농도의 증가에 상관없이 생장이 증진되는 결과를 나타내는 것을 확인하였다 (도 14A).

[50] 본 발명에 있어서, "형질전환"이란 유전자 그 자체 및 그 형질전환 카세트에 의하여 형질전환된 것을 포함한다. 상기 "형질전환 카세트"란 외래유전자를 가지고 있으며 외래 유전자 외에 특정 숙주세포의 형질전환을 용이하게 하는 인자를 갖는 벡터를 말한다. 여기서 벡터란 자가복제서열, 계놈삽입서열, 파지

또는 뉴클레오티드 서열, 선형 또는 원형, 단일 또는 이중가닥의 DNA 혹은 RNA이다. 일반적으로 벡터에는 적당한 유전자의 전사 및 번역을 지시하는 서열, 선택마커, 및 자가복제 또는 염색체 삽입을 허용하는 서열이 포함된다. 벡터의 구체적인 예로는, 플라스미드 벡터(pSE계, pBR계, pUC계, pBluescriptII계, pGEM계, pTZ계, pET계)와 파지 또는 코스미드 벡터(pWE15, M13, EMBL3, EMBL4, FIX II, DASH II, ZAP II, gt11, Charon4A, Charon21A) 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [51] 또한, 본 발명에서 사용되는 상기 제한효소로는 공지의 제한효소를 사용할 수 있으며, 바람직하게는 *EcoRI*과 *XbaI*이 사용될 수 있으며, 상기 벡터로는 pBluescrip SK(+), pTrc99A, pBBR1MCS-2, pT-DHB, pS-NA가 사용될 수 있다. 또한 형질전환에 사용할 수 있는 미생물로는 *otsBA* 유전자를 도입시켜서 폐글리세롤을 기질로 이용할 수 있는 모든 미생물일 수 있으며, 천연 미생물뿐만 아니라, 카로티노이드를 생산할 수 있는 변이 미생물도 포함될 수 있다. 바람직하게는 대장균(*Escherichia coli*)이며, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [52] 또한, 본 발명에서 형질전환체의 선별은 항생제 저항성 유전자를 가진 벡터(플라스미드)를 이용할 수 있으며, 바람직하게는 엮피실린(ampicillin), 클로람페니콜(chloramphenicol), 카나마이신(kanamycin) 저항성 유전자를 가진 벡터(플라스미드)를 이용할 수 있으며, 바람직하게는 pTrc99A, pBBR1MCS-2, pT-DHB, pS-NA를 사용할 수 있다.
- [53]
- [54] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 미생물을 배양하는 단계를 포함하는, 폐글리세롤의 존재 하에서 미생물의 성장을 증진시키는 방법에 관한 것이다.
- [55] 상기에서 설명한 바와 같이, 본 발명의 미생물을 사용할 경우, 지방산염의 함량이 높은 폐글리세롤의 존재 하에서도 미생물의 성장을 증진시킬 수 있다.
- [56]
- [57] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 *otsBA* 유전자 및 글리세롤 대사 유전자가 도입되어 폐글리세롤을 기질로 이용하여 유용물질을 생산할 수 있는 미생물에 관한 것이다.
- [58] 본 발명에서 용어, "글리세롤 대사 유전자"란, 폐글리세롤 내에 존재하는 글리세롤을 이용하여 유용한 물질을 생산할 수 있는 대사 관련 유전자를 의미하며, 이에 제한되지는 않으나, *gldA*(글리세롤 탈수소효소 유전자), *glpD*(글리세롤 3-포스페이트 산화효소, glycerol 3-phosphate oxidase)를 예시할 수 있으며, 글리세롤 대사 유전자가 도입된 미생물은 상기 유전자의 발현으로 인해 폐글리세롤 내에 함유된 글리세롤을 기질로 이용할 수 있으며, 이를 통하여 유용물질을 생산할 수 있다.
- [59] 바람직하게, 상기 유용물질로는 카로티노이드, 바이오 에탄올, 바이오 부탄올, 1,3-프로판디올(1,3-propanediol) 또는 3-하이드록시프로피온산(3-hydroxypropionic acid)일 수 있으나, 이에 제한되지는

않는다.

[60]

[61] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 *otsBA* 유전자 및 카로티노이드 생합성 유전자가 도입된 폐글리세롤의 존재 하에서 카로티노이드를 생산하는 미생물에 관한 것이다.

[62] 상기 카로티노이드를 생산하는 미생물은 폐글리세롤의 존재 하에서 성장할 수 있는 능력을 가지기 위하여 *otsBA* 유전자를 형질전환하였고, 또한 카로티노이드를 생산하기 위한 대사과정에 필요한 유전자를 도입하여 제조할 수 있다.

[63] 본 발명에서 용어, "카로티노이드"는 카로틴과 유사한 색소군으로 라이코펜(lycopene), 베타-카로틴, 아스타잔틴(astaxanthin), 지아잔틴(zeaxanthin) 또는 크산토폰(xanthophyl) 등을 의미하며, 바람직하게는 베타-카로틴이다.

[64] 본 발명에서 용어, "베타-카로틴"이란, 지용성인 비타민 A의 전구체로서, 항산화 특성을 가지고 있으며, 기능성 식품, 음료 및 기능성 화장품의 첨가제로 사용할 수 있다.

[65] 상기 카로티노이드를 생산하기 위한 대사과정에 필요한 유전자(카로티노이드 생합성 유전자)로는, *crtE*, *crtB*, *crtI*, *ipiHP1*, *crtY*, *dxs*, *mvaE*, *mvaS*, *mvaK1*, *mvaK2*, *mvaD* 또는 *idi* 유전자가 포함될 수 있으며, 카로티노이드 종류에 따라 카로티노이드의 생합성과 관련된 공지의 유전자들이 추가로 포함될 수 있다. 상기 유전자에 의한 카로티노이드 생합성 경로는 도 4에 나타난 바와 같다.

[66] 상기 카로티노이드 생합성에 필요한 대사이전자들의 유래는 카로티노이드류를 생산할 수 있는데 필요한 유전자를 가진 공지의 미생물이 유래가 될 수 있으며, 바람직하게는 판토에아 아그로머렌스(*Pantoea agglomerans*), 헤마토코코스 플라우비아리스(*Haematococcus plautialis*), 판토에아 아나나티스(*P. ananatis*), 엔트로코코스 파에칼리스(*Enterococcus faecalis*), 스트렙토코코스 페누모니아(*Streptococcus penumoniae*)일 수 있으며, *idi* 유전자의 경우에는 추가적으로 *E. coli*의 유래로 사용할 수 있다.

[67] 바람직하게, 상기 카로티노이드의 계열인 지아잔틴(zeaxanthin)의 생합성을 위해서는 *crtZ* [베타-카로틴 하이드로시라제(β -carotene hydroxylase)] 유전자가 추가적으로 포함될 수 있다.

[68] 상기 유전자들은 공지의 벡터를 이용하여 미생물에 도입될 수 있는데, 바람직하게는 pS-NA, pT-DHB, *ipiHP1*, pTrc99A가 사용될 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기의 카로티노이드 생합성 유전자들을 유전자의 클로닝 또는 발현에 일반적으로 사용되는 공지의 벡터를 이용하여 미생물에 도입할 수도 있다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 도 4에 나타난 MVA 경로에 사용되는 *crtE*, *crtB*, *crtI*, *ipiHP1*, *crtY*, *dxs*, *mvaE*, *mvaS*, *mvaK1*, *mvaK2*, *mvaD* 및 *idi* 유전자를 *otsBA* 유전자가 도입된 균주에 추가로 도입하여 과발현 시킴으로 폐글리세롤 존재 하에서 생장이 증진되며, 베타-카로틴의 생합성도 유지하는

결과를 확인하였다(도 12 및 14).

[69]

[70] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 *otsBA*가 도입되어, 폐글리세롤을 기질로 사용하며, 카로티노이드를 생산할 수 있는 형질전환 미생물을 배양하고, 상기 배양액으로부터 카로티노이드를 회수하는 방법이다.

[71] 본 발명의 구체적인 예에서 형질전환된 미생물의 배양과정은 당업계에 알려진 적당한 배지와 배양조건에 따라 이루어질 수 있다. 배지의 종류로는 배양에 사용되는 배지는 특정한 균주의 요구조건을 적절하게 만족시켜야 한다. 상기 배지는 다양한 탄소원, 질소원 및 미량원소 성분을 포함한다. 사용될 수 있는 탄소원의 예에는, 포도당(glucose), 과당(fructose), 자당(sucrose), 유당(lactose), 맥아당(maltose), 전분(starch) 및 셀룰로스(cellulose)와 같은 탄수화물(carbohydrate), 대두유(soybean oil), 해바라기유(regular sunflower oil), 피마자유(castor oil), 코코넛유(coconut oil)와 같은 지방, 팔미트산(palmitic acid), 스테아린산(stearic acid) 및 리놀레산(linoleic acid)과 같은 지방산, 글리세롤(glycerol) 및 에탄올과 같은 알코올, 아세트산과 같은 유기산(organic acids) 등이 포함된다. 이들 탄소원은 단독 또는 조합되어 사용될 수 있다.

[72] 또한, 사용될 수 있는 질소원의 예에는, 펩톤, 효모 추출물, 육즙, 맥아 추출물, 옥수수 침지액(CSL: corn steep liquor) 및 대두밀과 같은 유기 질소원 및 요소(urea, $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$), 황산암모늄(ammonium sulfate, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), 염화암모늄(ammonium chloride, NH_4Cl), 인산암모늄(ammonium phosphate, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$), 탄산암모늄(ammonium carbonate, $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$) 및 질산암모늄(ammonium nitrate, NH_4NO_3)과 같은 무기 질소원이 포함된다. 이들 질소원은 단독 또는 조합되어 사용될 수 있다. 상기 배지에는 인원(phosphorus source)으로서, 산이수소칼륨(KH_2PO_4), 인산수소이칼륨(K_2HPO_4), 및 대응되는 나트륨(Na)-함유 염(salt)이 포함될 수 있다. 또한, 황산마그네슘(magnesium sulfate, MgSO_4) 또는 황산철(iron sulfate)과 같은 금속염을 포함할 수 있다. 그 외에, 아미노산, 비타민, 및 적절한 전구체 등이 포함될 수 있다. 배양 중에 수산화암모늄, 수산화칼륨, 암모니아, 인산 및 황산과 같은 화합물을 배양물에 적절한 방식으로 첨가하여, 배양물의 pH를 조정할 수 있다. 또한, 배양 중에는 지방산 폴리글리콜 에스테르와 같은 소포제를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다. 또한, 배양물의 호기상태(aerobic condition)를 유지하기 위하여, 배양물 내로 산소 또는 산소-함유 기체(예, 공기)를 주입할 수 있다.

[73] 이러한 배양과정은 당업자라면 선택되는 미생물의 종류에 따라 용이하게 조정하여 사용될 수 있다. 상기 배양방법의 예에는, 회분식 배양(batch culture), 연속식 배양(continuous culture) 또는 유가식 배양(fed-batch culture)이 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니며, 바람직하게는 유가식 배양 또는 연속식 배양이 포함된다.

[74] 이들 공지된 배양방법은 예를 들면, "Biochemical Engineering"(James M. Lee,

Prentice-Hall Interantional Editions, pp.138~176)에 개시되어 있다. 게다가 미생물의 배양은 널리 공지된 방법에 따라서 수행될 수 있고, 배양온도, 배양시간 및 배지의 pH 등의 조건은 절절하게 조절될 수 있다. 상기의 배지에는 2~20%의 폐글리세롤이 첨가되어 배양할 수 있으며, 바람직하게는 2~8% 이다.

[75] 배양액으로부터 카로티노이드를 회수하는 방법으로는 공지의 회수방법이 적용될 수 있으며, 공지의 방법으로는 유기용매추출 및 결정화 방법, TLC(thin layer chromatography), 가스 크로마토그래피(gas chromatography), 고성능 액체 크로마토그래피(high-performance liquid chromatography ; HPLC), 겔투과 크로마토그래피(Gel-Permeation Chromatography), 관 크로마토그래피(column chromatograph) 등이 사용될 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[76] 바람직하게, 상기 카로티노이드는 베타-카로틴일 수 있다. 바람직한 일 구현예에 따르면 회분식 배양 및 유가식 배양에 의해 베타-카로틴을 각각 130 mg/ml 및 175 mg/ml을 생산하는 것을 확인하였다 (도 16 및 17).

[77]

발명의 실시를 위한 형태

[78] 이하, 하기 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는다.

[79]

[80] 실시예 1 : 폐글리세롤의 조성

[81] 폐글리세롤은 국내의 바이오 디젤 생산업체인 M 에너지(평택, 한국)에서 입수하였다. 폐글리세롤(waste glycerol), 이로부터 분리된 지방산, 전처리에 의해 지방산이 제거된 시료(pretreated waste glycerol)를 도 1에 나타내었다. 폐글리세롤 중의 K, Na, Cl 농도는 한국기초과학지원연구원에 의뢰하여 측정하였고, 지방산염 및 메탄올(methanol)의 함량은 본 발명자에 의해서 측정하였다.

[82] 본 실시예에 사용한 폐글리세롤의 조성을 하기 [표 1]에 나타내었다. 시료의 pH는 강한 염기인 11이며, 이는 바이오디젤 생산공정에서 알칼리 촉매인 KOH를 사용하였기 때문인 것으로 예상된다. 이는 폐글리세롤 질량당 1.1%의 칼륨이온(K⁺)이 존재하는 것으로도 알 수 있다. 특히 주목할만한 사항으로는 지방산염이 다량(17.4%)으로 존재한다. 폐글리세롤이 짙은 색을 띠는 것은 지방산염(비누)에 의한 것으로 여겨진다. 이러한 지방산염을 제거한 전처리 글리세롤은 투명한 갈색을 띤다(도 1).

[83] 한편, 하기 [표 2]에 폐글리세로부터 회수된 지방산의 조성을 나타내었다. 탄소수 18의 불포화 지방산인 올레산(oleic acid), 리놀렌산(linoleic acid) 및 리놀레닉산(linolenic acid)가 약 74%로 전체 성분의 대부분을 차지하고 포화지방산인 팔미트산(palmitic acid), 스테아릭산(stearic acid)도 약 22%를 차지한다. 또한 탄소수가 15 이하인 지방산도 존재함을 알 수 있다.

[84]

[85] 표 1

페리세롤의 주요 성분

항목	함량
글리세롤 함량(%)	80.0
pH	11.0
K (%)	1.1
Na (%)	0.03
Cl (%)	0.02
Methanol (%)	14.2
지방산염(비누)	17.4

[86]

[87] 표 2

폐글리세롤로부터 회수된 지방산 조성

지방산 탄소수 및 불포화도	조성(%)
C8:0	0.03±0.02
C10:0	0.02±0.00
C12:0	0.10±0.00
C14:0	0.45±0.01
C14:1	0.04±0.00
C15:0	0.04±0.00
C15:1	0.03±0.00
C16:0	17.30±0.07
C16:1	0.59±0.01
C17:0	0.13±0.00
C17:1	0.10±0.00
C18:0	4.65±0.11
C18:1	30.89±0.18
C18:2	37.95±0.78
C18:3	4.85±0.12
C20:0	0.36±0.02
C20:1	0.40±0.00
C22:0	0.32±0.05

[88]

[89] 실시예 2 : 배지 및 배양조건

[90] M 에너지(평택, 한국)로부터 입수한 폐글리세롤은 실험조건에 따라, 지방산염(비누)을 배양 배지에서 제거하거나, 잔류하게 했다. 염산(HCl)을 이용하여 폐글리세롤 원액의 pH를 3으로 조정하고, 용액으로부터 침전된 자유 지방산은 원심분리로 분리하여서, 지방산염(비누)이 제거된 배지를 공지의 방법에 따라 제조하였다. 지방산염이 함유된 배지는 원래 폐글리세롤로부터 회수된 지방산염(비누)을 원하는 양만큼을 배양 배지에 첨가하였다.

[91] 전배양은 50 ml LB broth(5 g/l 효모 추출물, 10 g/l 트립톤(tryptone), 100 mg/l NaCl)에 항생제(100 mg/l 앰피실린(ampicillin), 50 mg/l 클로람페니콜(chloramphenicol), 50 mg/l 카나마이신(kanamycin))을 보충하여 실시하였다. 모든 플라스크 배양(flask culture)을 500 ml 엘렌마이어 플라스크(Erlenmeyer flask)에서 37°C, 190 rpm으로 실시하였다. 600 nm (OD_{600nm})

)에서 배양액의 OD값이 0.6에 도달할 때, 종균배양(seed culture)을 순수 글리세롤, 전처리 또는 가공하지 않은 폐글리세롤이 다른 농도로 첨가된 50 ml의 주요 배양 R 배지로 옮겼다. 접종원(inoculum)의 크기는 10%이고, R 배지의 구성은 하기 [표 3]과 [표 4]에 나타내었다. 주요 배양은 25°C, 180 rpm에서 배양하였고, OD_{600 nm}가 5일 때, IPTG 0.5 mM을 첨가하여 과량발현을 유도하였다.

- [92] 3.4 l 상부구동식(top-driven) 발효기(코바이오텍, 인천, 한국)에서 모든 발효를 수행하였다. 100 ml 종균배양을 플라스크 배양으로 제조하였고, 60 g/l의 폐글리세롤 및 항생제(100 mg/l 엠피실린, 50 mg/l 클로람페니콜, 50 mg/l 카나마이신)를 포함하는 1 l의 R 배지가 있는 반응기에 접종하였다. pH는 2N H₂SO₄와 25% NH₄OH를 사용하여 6.8~7.0으로 유지했다. 용존산소의 수치는 공기관 그리고/또는 수동으로 교반속도를 조절하면서 순수한 산소를 첨가하여 공기 포화도를 30%이상으로 유지했다. 발효온도는 25°C에서 수행하였다.

- [93] 표 3
R 배지의 구성

구성	함량
K ₂ HPO ₄	13.5 g/l
(NH ₄) ₂ HPO ₄	4 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.4 g/l
Citric acid	1.7 g/l
Thiamin	300 mg/l
Trace metal solution	10 mg/l

[94]

- [95] 표 4
미량원소 용액(trace metal solution)의 구성

구성	조성
FeSO ₄ ·7H ₂ O	10.0 g/l
CaCl ₂	2.0 g/l
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2.2 g/l
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0.5 g/l
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1.0 g/l
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0.1 g/l
Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O	0.02 g/l

[96]

- [97] 실시예 3 : *E. coli* *otsBA* 오페론(operon)의 발현용 플라스미드(plasmid)의 제작
- [98] DNA 분리, 제한효소 처리, 알카라인 포스포타아제 처리(alkaline phosphatase treatment), DNA 라이게이션 등의 DNA 조작에 대한 유전자 조작과정은 공지的方法으로 수행하였다.
- [99] *E. coli* K12의 세포의 크로모솜 DNA를 주형(template)으로 이용하고, *otsBA* 오페론의 측면에 대한 2개의 프라이머(서열번호 1 및 2)로 PCR을 수행하였다(N-말단부위 GAA TTC GTG ACA GAA CCG TTA ACC GAA AC [서열번호 1]와 C-말단부위 TCT AGA CGC AAG CTT TGG AAA GGT AT [서열번호 2]). PCR 반응물의 조성은 하기 [표 5]에 나타내었다. PCR은 94°C에서 2분 동안 전변성하고, 94°C에서 40초간 변성, 55°C에서 40초간 어닐링 후, 72°C에서 4분간 연장하며, 30 주기를 수행하였다.
- [100] PCR 산물을 37°C에서 1시간 동안 제한효소(*EcoRI*과 *XbaI*)로 절단하고, 3M의 아세트산염(sodium acetate) 10 μ l 와 100%의 에탄올 200 μ l를 사용한 침전에 의해서 정제하였다. PCR 산물은 pBluescript SK(+) 벡터의 *EcoRI*과 *XbaI* 부위로 도입하였다. 라이게이션을 위한 반응물의 조성은 하기 [표 6]에 기재하였다. 라이게이션을 PCR 기계 챔버에서 12시간 동안 16°C에서 수행하였다(도 3).

[101]

[102] 표 5

PCR을 위한 반응 혼합물의 조성

구성물	용량(μ l)
10 Pfu buffer	5.0
10 mM dNTP mix	1.0
Primer 1 (10 pmole/l)	2.0
Primer 2 (10 pmole/l)	2.0
DNA template (<i>E. coli</i> Chromosome)	1.0
5×Band Doctor	5.0
Pfu (2.5 U/ μ l)	0.5
Add D.W. to	50.0

[103]

[104] 표 6

연결을 위한 반응물의 조성

구성물	용량(μl)
T4-ligase	1.0
T4.buffer	1.0
소화된 PCR 산물	7.0
소화된 pBluescript SK(+) vector	1.0
Total	10

- [105] 1 μl 의 정제된 라이게이션 혼합물(purified ligation mixture)을 50 μl 의 *E. coli* DH5 α 컴피턴트(competant)세포와 얼음 위에서 혼합하였다. 상기 혼합물을 즉시 전자큐벳(electrocuvette)으로 이동하고, 단일 전자펄스를 적용하였다. 전기영동 세포 부유물을 즉시 1 ml의 LB 배지로 희석했고, 37°C, 200 rpm에서 50분간 배양했다. 그리고 1 ml의 배양액은 엠포실린(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 첨가된 고체 LB 배지에서 배양하여 스크리닝했다. 37°C에서 18시간 배양 후에 나타나는 백색 콜로니를 선택하였고, 엠포실린(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 함유된 3 ml LB broth가 담긴 테스트 튜브에 접종하였다. 이 배양액을 37°C에서 200 rpm으로 하룻밤 배양한 후, 세포를 분리하고 이로부터 플라스미드를 회수한 후 정제하였다. 스크리닝된 플라스미드 DNA들 중에서 원하는 플라스미드를 1차 선별하기 위하여 *Hind*III와 *Bgl*III 효소를 사용하여 회수된 플라스미드를 이중 절단하고 아가로스 젤 상에서 전개한 후 표준 마커와의 비교를 통해 크기를 확인하였다. 그리고 선별된 플라스미드의 최종 확인을 위하여 솔젠트사(대전, 한국)에 의뢰하여 정제된 플라스미드 DNA의 서열분석을 수행하였다.
- [106] *otsBA*(서열번호 3)가 삽입된 pBluescript SK(+) 플라스미드를 *Eco*RI와 *Xba*I 효소로 이중절단 후, 얻어진 *otsBA* 단편을 Qiagen gel extraction kit(QIAGEN, Germany)를 사용하여 정제하였다. 그리고 상기 단편을 pTrc99A 벡터의 *Eco*RI와 *Xba*I 절단 클리닝 부위에 도입하였다. 라이게이션은 PCR 기계의 챔버 내에서 16°C에서 12시간 동안 수행하였다. 재조합 DNA를 상기 플라스미드 pBluescript SK(+)와 동일한 과정인 전기천공법(electroporation)으로 *E. coli* DH5 α 컴피턴트 세포에 도입하였다. 형질전환 과정 후의 형질전환체를 400 μl 배양액 및 400 μl 의 50% 글리세롤이 포함된 글리세롤 스톡(glycerol stock)에 저장하였고, -70°C의 냉동고에 보관했다. 상기 균주를 *Escherichia coli* DH5 α -KBCJ01로 명명하고, KCCM(Korean Culture Center of Microorganism, 대한민국, 서울시 서대문구 홍제1동 유림 빌딩 361-221)에 2010년 10 월 02 일자로 기탁번호 KCCM11106P로 기탁하였다.
- [107] 베타-카로틴을 생산할 수 있는 *E. coli* 균주를 *otsBA* 유전자로 형질전환하는 경우, *otsBA* 단편을 *Eco*RI와 *Xba*I을 사용하여 플라스미드 pTrc99A로부터 분리하고, 플라스미드 pBBR1MCS-2의 동일효소의 절단부위에 삽입되었다. 상기

백터는 카나마이신(kanamycin) 저항성 유전자 단편을 포함하고 있다. 이 형질전환과정은 위에서 기술한 것과 동일하게 수행하였다(도 3).

[108]

[109] 실시예 4 : 베타-카로틴을 생산할 수 있는 재조합 균주의 제작

[110] 베타-카로틴을 생산할 수 있는 *E. coli* DH5 α 균주로서 베타-카로틴 생합성에 대한 유전자를 가진 플라스미드 pT-DHB와 전체 MVA 대사경로의 효소를 코딩하는 유전자를 가진 플라스미드 pS-NA를 포함하고 있는 균주를 blank 균주로 정의하였다. pT-DHB는 판토에아 아그로머렌스(*Pantoea agglomerans*)의 *crtE*, *crtB* 및 *crtI*; 헤마토코코스 플라우비아리스(*Haematococcus pluvialis*)의 *ipiHP1*; 판토에아 아나나티스(*P. ananatis*)의 *crtY*; *E. coli*의 *dxs*를 pTrc99A(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)에 클로닝하여 제작하였다. pS-NA는 엔트로코코스 파에칼리스 ATCC14508(*Enterococcus faecalis* ATCC14508)의 *mvaE*와 *mvaS*; 스트렙토코코스 폐누모니에(*Streptococcus penumoniae*)의 *mvaK1*, *mvaK2*, *mvaK3*, *mvaD*; *E. coli*의 *idi*를 pSTV28(TaKaRa Bio, Shiga, Japan)에 클로닝하여 제작하였다. 반면에 재조합 균주는 플라스미드 pT-DHB, pS-NA뿐 아니라, 트레할로스 생합성 유전자인 *otsBA*를 포함하는 플라스미드 pBBR1MCS-2를 추가적으로 가지고 있다(도 4).

[111]

[112] 실시예 5 : 베타-카로틴의 농도 결정

[113] 세포 내 베타-카로틴 농도를 결정하기 위해서 *E. coli* 배양액 1 ml를 원심분리하여(10,000 rpm, 10분) 세포를 수득하고 이를 물로 1번 세척하였다. 세포 펠렛을 1 ml의 아세톤으로 현탁한 후, 암실에서 55°C, 15분간 배양하였다. 현탁액을 12,000 rpm, 10분간 원심분리하였고, 베타-카로틴이 함유된 상등액을 454 nm에서 분광광도계로 흡광도를 측정한 후, 표준 베타-카로틴(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)을 지표로 사용하여 농도를 결정하였다.

[114]

[115] 실시예 6 : 지방산 분석

[116] Folch et al.에 의해 개발된 프로토콜에 따라 페글리세롤에 존재하는 지방산을 분석하였다. 3~5 g의 페글리세롤 용액을 취하여 클로로포름과 메탄올 혼합용매(2:1) 20 ml를 첨가하여 교반 후 2시간을 방치하였다. 혼합액을 필터(현대 No. 51, 한국)에 통과시켜 존재할 수 있는 고형성분을 제거하였다. 여과액에 0.88%(w/v) 염화나트륨 용액을 첨가하여 2,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후, 지방산을 포함하는 하부의 유기용매층을 취하였다. 이를 60°C 건조기에서 30분간 또는 상온에서 질소가스를 흘리면서 건조시킴으로써 지방산을 회수하였다.

[117]

회수된 지방산에 염화메틸렌 1 ml와 0.5 N 수산화나트륨을 첨가하고 90°C 항온조에서 10분간 가열하였다. 이를 냉각시킨 후 메탄올에 용해시킨 14%(w/v) BF₃ 용액을 첨가하여 90°C 항온조에서 10분간 반응시키면 메틸화 반응에 의해 지방산 메틸에스테르(Fatty acid methyl esters, FAME)가 된다. 이를 헥산으로

추출한 후 GC 분석에 사용하였다.

- [118] Agilent technologies 6890N network 가스 크로마토그래피를 FAME 분석을 위해서 사용하였다. 가스 크로마토그래피는 불꽃이온화검출기(Flameionization Detector, FID) 및 실리카 모세관(silica capillary column, 60 mm×0.32 mm×0.25mm)이 융합된 Supelcowax-10으로 수행하였다. 질소는 수송기체이다. 주입기는 250°C로 유지하고, 주입모드(비율 10:1)에 의해 1 μ l의 주입량을 가진다. 검출온도는 180°C에서 6분 동안 유지하고, 분당 5씩 250°C까지 증가시켰다. 오븐 온도의 일람은 다음과 같다; 220°C에서 2분 동안, 240°C까지 분당 2씩 상승시키고 20분간 유지하였다. 지방산은 지표 지방산(Supelco 37 component FAME Mix)과 보유시간을 비교하여 확인하였고, 내부지표(C17:0)에 대한 최고값 면적(peak area)을 비교하는 것에 의해서 정량화하였다.

[119]

[120] 실시예 7: 메탄올 분석

- [121] 효소화학적 분석(enzyme-chemical assay)을 이용하여 멸균 후, 페글리세롤 용액과 전처리된 페글리세롤을 첨가한 배지에서 메탄올 농도를 측정하였다. 0.2 ml 시료를 1.8 ml 반응시약(0.05% 3-methyl-2-benzothiazoline hydrazone (MBTH-HCl), 25 mM MOPS-K⁺ 버퍼, 0.5 U/ml 알코올 산화효소)과 혼합한 후 37°C에서 15분간 반응시켰다. 이 과정에서, 시료에 존재하는 메탄올은 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*) 유래의 알코올 산화효소(alcohol oxidase, AO)에 의해 포름산(formic acid)으로 전환되고, 이는 MBTH(3-methyl-2-benzothiazolione hydrazone)와 복합체를 형성한다. 여기에 2 ml의 발색제(30 mM HCl에 용해된 0.1% FeCl₃ 용액)를 첨가하면 이 복합체와의 화학반응에 의해 진한 파란 색깔을 띠게 된다. 최종 색소 혼합물에 대한 광학밀도를 분광광도계(spectrophotometer)를 이용하여 670 nm에서 측정하였다. 이를 농도별로 제조된 고순도 메탄올 용액을 표준으로 정량화하였다.

[122]

[123] 실시예 8: 기본 분석 및 암모늄이온 분석

- [124] 순수한 페글리세롤과 전처리된 페글리세롤의 기본 구성은 유도결합 플라즈마 분광분석기(inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy, ICP-AES)를 사용하여 한국기초과학지원연구원(Korea Basic Science Institute)에서 결정하였다.
- [125] 암모늄 이온의 농도를 Solorzano 등에 따른 페놀법(phenol method)을 사용하여 결정하였다. 간략히 설명하자면, 배양 broth를 원심분리한 후의 1 ml의 상층액을 1 ml(0.8%)의 페놀용액(에탄올에 용해), 1 ml의 0.0075% 니트로프루시드나트륨(sodium nitroprusside), 2 ml의 산화 용액(1.5% tri-sodium citrate, 0.08% sodium hydroxide, 0.2% sodium hypochloride)과 혼합하였다. 혼합물을 실온에서 4시간 동안 배양하고, 광학밀도를 640 nm에서 측정하였다.

[126]

[127] 실시예 9 : 퍼록사이드 분석

[128] 시그마사(미국)에서 구입한 PeroxiDetect™ 키트를 이용하여 멸균 후 페글리세롤 용액, 전처리된 페글리세롤, 또는 지방산(crude fatty acid)을 첨가한 배지에서 하이드로젠 퍼록사이드(H_2O_2) 또는 유기 퍼록사이드를 정량하였다. 발색시약을 제조하기 위하여 시그마사에서 공급된 25 mM 황산제일철 암모니움(ferrous ammonium sulfate) 용액과 자일레놀 오렌지 용액을 1:100의 부피 비율로 혼합하였다. 0.1 ml 시료에 1 ml의 발색시약을 첨가하여, 혼합한 후, 상온에 30분 방치하였다. 이 과정에서 시료에 존재하는 퍼록사이드는 산성조건에서 2가 철 이온(Fe^{2+})을 3가 철 이온(Fe^{3+})으로 산화시키는 데, 생성된 3가철이온(Fe^{3+})은 자일레놀 오렌지 (xylenol orange)와 복합체를 형성하여 적자색을 띄게 된다. 이를 분광광도계 (spectrophotometer)를 이용하여 560 nm에서 측정하였다. 시그마사에서 구입한 30% 하이드로젠 퍼록사이드(H_2O_2) 수용액과 70% tert-butyl hydroperoxide(t-BuOOH) 용액을 표준용액으로 하여 측정된 흡광도를 정량값으로 환산하였다.

[129]

[130] 실험예 1. *otsBA* 가 도입된 재조합 균주의 특성조사

[131]

[132] 1-1. 생장 및 아세트산 생산 특성

[133] 정제된 글리세롤(순도 98%이상) 20 g/l가 첨가된 합성 배지인 R-배지상에서 상기 실시예 4에서 제작한 기존 베타-카로틴 생산균주인 blank 균주와 *otsBA*가 도입되어 형질전환된 베타-카로틴 생산균주인 재조합 균주의 특성을 비교하였다. 500 ml baffled 플라스크에 배지 50 ml 을 넣고 25°C에서 180 rpm으로 배양하였다. 균체농도가 $OD_{600\text{ nm}}$ 5에 도달하였을 때, IPTG를 첨가하였다

[134] 그 결과, blank 균주는 67시간 만에 $OD\ 17\pm0.5$ 에 도달한 후 생장이 멈추었고, 이와 동시에 베타-카로틴 생산량도 최대치인 $122\pm17\text{ mg/l}$ 에 도달하였다. 생장이 멈춘 후에도 글리세롤은 지속적으로 감소하여 잔류글리세롤 양은 115시간째에 약 $1.3\pm0.1\text{ g/l}$ 에 도달하였다. 최대 아세트산 생산량은 $0.3\pm0.04\text{ g/l}$ 로 매우 낮았다(도 5).

[135] *otsBA*가 도입되어 형질전환된 베타-카로틴 생산균주인 재조합 균주는 배양 67시간에 $OD\ 23\pm2.0$ 에 도달한 후, 지속적으로 성장하여 90시간에는 최대치인 28 ± 1.6 에 달하였다. 베타-카로틴 최대 생산량도 blank 균주보다 높은 $147\pm3.4\text{ mg/l}$ 이었다. 글리세롤도 계속 사용되어 배양 115시간째에 거의 고갈되었다. 아세트산 생성량도 매우 적어 최대치가 0.02 g/l 이었다(도 6).

[136]

[137] 1-2. 페글리세롤 유래지방산이 균주의 생장 및 베타-카로틴 생산에 미치는 영향

[138] 페글리세롤로부터 지방산을 회수하여 20 g/l의 순수한 글리세롤이 첨가된 합성배지인 R-배지상에 단계적으로 지방산을 첨가하여 상기 실시예 4에서 제작한 균주의 생장에 미치는 영향을 비교하였다.

- [139] 분리된 지방산을 습중량(wet weight) 기준으로 0.7 wet-g, 1.4 wet-g, 2.1 wet-g, 2.8 wet-g을 첨가하였는데, 이양은 각각 글리세롤 기준으로 폐글리세롤 용액을 20 g/l, 40 g/l, 60 g/l, 80 g/l가 되도록 첨가한 배지에 포함된 지방산의 양에 해당한다. 86시간 배양 후, blank 균주와 재조합 균주를 비교하였다.
- [140] Blank 균주는 지방산을 첨가하지 않은 경우와 비교시, 0.7 wet-g의 지방산을 첨가하였을 경우, 세포 생장이 거의 절반 수준으로 감소하였으며, 베타-카로틴 생산량도 약 1/6수준으로 감소하였다(도 7A 및 7B).
- [141] 재조합 균주는 1.4 wet-g의 지방산을 첨가할 때까지도 세포 농도가 증가하였고, 2.8 wet-g를 첨가하였을 경우에도 세포 농도가 첨가하지 않은 경우보다는 약간 감소하였으나, 큰 차이를 보이지는 않았다. 베타카로틴 생산량도 2.1 wet-g의 지방산을 첨가할 때까지 큰 차이를 보이지 않았으며, 2.8 wet-g를 첨가하였을 때, 생산량이 약간 감소하는 경향을 보였다(도 7A 및 7B).
- [142] 한편 지방산을 첨가하고 살균(autoclave) 후, 제조된 배지에서 90~105 μM 의 하이드로젠 퍼록사이드(H_2O_2)와 109~116 μM 의 유기 퍼록사이드가 검출되었다.
- [143] 이와 같은 결과는 지방산이 blank 균주의 세포 성장 및 베타-카로틴 생합성을 저해하는 것을 나타낸다. 세포 성장에 대한 지방산의 저해효과는 지방산에 의한 직접적인 저해와 하이드로젠 퍼록사이드(H_2O_2) 또는 유기 퍼록사이드 생성으로 인한 간접적인 저해의 복합영향으로 나타난다. 대장균은 작은 또는 중간 크기의 사슬을 갖는 지방산(C_6 - C_{12} 지방산)을 대사할 수 없고 이의 존재로 생장이 저해된다는 보고가 있었다(Journal of Bacteriology, 1973년, vol. 115, No 3, p. 869-875; Journal of general microbiology, 1975년, vol. 91, p. 233-240). 탄소수 18과 같은 긴사슬 지방산은 대장균에 저해효과를 나타내지는 않지만 고온의 열을 받을 경우 쉽게 산화되어 하이드로젠 퍼록사이드(H_2O_2)가 생성될 수 있다. 이렇게 생성된 하이드로젠 퍼록사이드(H_2O_2)는 다시 연쇄적으로 불포화 지방산과 반응하여 유기 퍼록사이드를 형성한다. 이렇게 형성된 하이드로젠 퍼록사이드(H_2O_2) 또는 유기 퍼록사이드는 낮은 농도에서도 세포 내의 호흡사슬에 관여하는 효소들의 활성 저하, 세포막 구성 지방산 공격을 통해 세포막 구성 단백질들의 응집 형성을 통한 단백질들의 구조 파괴, 또는 세포막 파괴 등을 통한 세포막의 붕괴 유도, 세포내 DNA 합성 시 수선 시스템의 교란을 등을 통해 세포에 치명적인 사멸을 초래하거나 성장을 억제한다는 보고가 있다(Journal of Bacteriology, 1986년, vol. 166, No 2, p. 519-527; Journal of Biological Chemistry, 1989년, vol. 264, No. 3, p. 1729-1734; Biochimica et Biophysica Acta, 1990년, 510-516; J. Agric. Food. Chem., 1991년, vol. 39, p. 439-442; Genetics and Molecular Biology, 2004년, vol. 27. No.2, p. 291-303).
- [144] 이에 본 발명의 재조합 균주가 지방산의 존재에도 성장 및 베타-카로틴 생합성에 거의 영향을 받지 않는 것은 본 발명자가 최초로 규명한 트레할로스 생합성 유전자 발현에 의해 세포 내에 축적된 트레할로스가 하이드로젠 퍼록사이드(H_2O_2) 및 유기 퍼록사이드로부터 세포를 보호해주기 때문인 것을

시사하는 결과이다.

[145]

[146] **1-3. 메탄올이 균주의 성장 및 베타-카로틴 생산에 미치는 영향**

[147] 20 g/l의 순수한 글리세롤이 첨가된 R-배지에 메탄올을 추가로 첨가하여 균주의 성장에 미치는 영향을 비교하였다. 메탄올은 휘발성이 강하여 멸균 과정에서 증발될 가능성이 높기 때문에 정확한 농도 영향을 조사하기 위하여 필터살균(세공크기 0.2 μm) 후 첨가하였다. 배양 5일 후, blank 균주와 재조합 균주를 비교하였다.

[148] 메탄올을 첨가하지 않은 경우와 비교시, 7.5 g/l의 메탄올 첨가할 때까지 blank 균주는 세포생장이 큰 차이를 보이지 않은 반면, 재조합 균주의 세포 생장은 약간 감소하였다. 한편 5 g/l의 메탄올 첨가 시, 두 균주의 베타-카로틴 생산량은 약간 증가하였다(도 8A 및 8B).

[149] 본 결과는 두 균주 모두 메탄올에 대한 저항성이 비슷하여 7.5 g/l의 메탄올이 존재함에도 불구하고 세포생장이 거의 저해를 받지 않음을 나타낸다. 5 g/l의 메탄올 첨가는 오히려 베타-카로틴 생합성을 촉진시켜주는 것을 보여준다. 기존연구에 따르면, 대장균은 알코올을 첨가시, 일정시간의 지연기(lag phase)를 갖게되는데, 이 기간 동안 세포는 자신의 세포막의 주성분인 지방산의 조성을 변화시킴으로써 일정농도의 알코올에 저항할 수 있는 능력을 갖게 된다. 탄소수가 작은 알코올일수록 세포가 알코올에 저항할 수 있는 최대농도는 높다(Journal of Bacteriology, 1976년, vol. 125, No.2, p. 670-678).

[150]

[151] **1-4. 순수 글리세롤 농도에 따른 균주의 성장 및 베타-카로틴 생산**

[152] R-배지에 순수글리세롤을 20 g/l, 40 g/l, 60 g/l, 80 g/l가 되도록 첨가한 후 각 농도에서 5일간 배양 후, blank 균주와 재조합 균주의 성장 및 베타-카로틴 생합성을 비교하였다.

[153] 20 g/l의 글리세롤을 첨가한 경우와 비교시, 60 g/l의 글리세롤을 첨가할 때까지 blank 균주는 세포생장이 큰 차이를 보이지 않은 반면, 재조합 균주의 세포 생장은 약간씩 감소하였다. 베타-카로틴 생합성은 blank 균주의 경우 40 g/l의 글리세롤을 첨가한 경우 최대를 보인 반면, 재조합 균주는 글리세롤 농도 증가와 함께 약간 감소하였다. (도 9A 및 9B). 본 결과는 두 균주 모두 글리세롤 농도 저항성이 비슷하지만 blank 균주가 약간 우수하다는 것을 보여준다.

[154]

[155] **1-5. KCl 농도가 재조합 균주의 성장에 미치는 영향 분석**

[156] 상기 실시예 4에서 제작한 blank 균주 및 재조합 균주를 순수 글리세롤(20 g/l)가 첨가된 배지에 0~300 mM의 범위로 KCl 농도를 변화시키며 첨가하여 그 영향을 조사하였고, 배양 5일 후의 세포 생장을 비교하였다(도 10A 및 10B). 기본배지에 K_2HPO_4 의 형태로 K^+ 이온(154 mM)이 존재하므로 KCl 형태로 공급되는 K^+ 이온은 여기에 추가되는 농도이다. 즉, 100 mM의 KCl을 첨가 시

배지에는 254 mM의 K⁺가 존재하게 된다.

[157] Blank 균주는 KCl 첨가시, 200 mM까지는 세포생장 및 베타-카로틴 생산이 저해를 받지 않는 것으로 측정되었고, 100 mM KCl 첨가 시, 세포생장과 베타-카로틴 생산이 오히려 증가하는 것으로 측정되었다.

[158] 반면, 재조합 균주는 KCl 첨가 시, 세포 생장 및 베타-카로틴 생산이 둔화되는 것을 볼 수 있었으며, 결론적으로 재조합 균주는 blank 균주에 비하여 KCl 내성이 낮은 것으로 측정되었다(도 10A 및 10B).

[159]

[160] 실험예 2. *otsBA* 가 도입된 재조합 균주가 폐글리세롤을 기질로 사용할 가능성 확인

[161]

[162] 2-1. 전처리된 폐글리세롤 및 폐글리세롤 상에서 생장 및 베타-카로틴 생산 특성 비교

[163] 상기 실시예 4에서 제작한 blank 균주의 생장 및 베타-카로틴 생산 특성을 조사하였다. 위에서 언급하였듯이 순수한 글리세롤을 첨가한 경우, 균주는 18시간의 lag time을 보인 후 성장을 개시하였고, 배양 67시간에 최고 세포농도인 OD 17±0.5에 도달하였다. 이 시간에 베타-카로틴 생산량도 최대치인 122±17 mg/l이었다(도 5).

[164] 반면, 전처리 글리세롤을 첨가한 배지에서는 blank 균주가 48시간의 lag time을 보인 후, 성장을 개시하였고, 114시간째에 OD 18±0.0에 도달하였다. 이때의 베타-카로틴 생합성량은 74±12 mg/l이었다. 이는 순수글리세롤 첨가배지에서의 생산성(1.82 mg/l·h)의 약 1/3 수준인 0.65 mg/l·h에 해당한다(도 11A 및 11B).

[165] 폐글리세롤을 첨가한 배지에서 blank 균주의 lag time은 전처리 글리세롤이 첨가된 배지에서와 비슷한 48시간을 나타내었고, 114시간째에 OD 20±0.5에 도달하였다. 이 시점에 베타-카로틴 생산은 최대값인 78±6.8 mg/l에 도달하였다(도 12A 및 12B).

[166] 이와 같은 결과로부터 전처리 글리세롤 또는 폐글리세롤이 blank 균주의 세포 생장과 베타-카로틴 생합성을 심각하게 저해한다는 것을 알 수 있다.

[167] 또한, 위에서 언급했듯이, 순수 글리세롤을 첨가한 배지에서 재조합 균주는 배양 67시간 만에 OD 23±2.0에 도달 후, 지속적으로 성장하여 90시간에는 최대치인 28±1.6에 도달하였다. 베타-카로틴 최대치도 147±3.4 mg/l이었다(도 6).

[168] 반면, 전처리된 폐글리세롤을 첨가한 배지에서는 재조합 균주는 lag time 없이 성장을 개시하였고, 114시간째에 OD 30±2.1에 도달하였다. 이때의 베타-카로틴 생합성량은 118±1.1 mg/l이었다. 이는 순수글리세롤 첨가배지에서의 생산성(1.6 mg/l·h)의 63% 수준인 1.04 mg/l·h의 생산성에 해당한다(도 11A 및 11B).

[169] 한편, 폐글리세롤이 첨가된 배지에서도 재조합 균주는 lag time 없이 성장을 개시하였고, 114시간째에 OD 27±0.0에 도달하였다. 베타-카로틴 생합성량은 66.5 시간에 89±0.1 mg/l에 도달한 후 더 이상의 증가하지 않았다. 이는

순수글리세롤 첨가배지에서의 생산농도의 61% 수준이지만, 생산성은 1.3 mg/l·h로 순수글리세롤에서의 생산성의 81% 수준에 해당한다. 폐글리세롤이 첨가된 배지에서 배양된 blank 균주와 비교시, 제조합 균주는 blank 균주보다 약 2배 높은 생산성을 나타내었다(도 12A 및 12B).

[170] 도 13은 폐글리세롤이 첨가된 배지에서 제조합 균주를 5일간 배양한 후의 배양액을 나타낸다.

[171] 이와 같은 결과는, 본 발명의 *otsBA* 유전자가 과발현된 제조합 균주가 폐글리세롤에서 생장이 증가할 뿐만 아니라, 베타-카로틴의 생산량도 증가시킨다는 것을 의미한다.

[172]

[173] **2-2. 폐글리세롤의 농도가 세포의 성장 및 성장에 미치는 영향**

[174] 검토된 폐글리세롤의 농도 범위는 20~80 g/l이고, 배양 5일 후의 상기 실시예 4에서 제작한 균주의 성장 및 베타-카로틴 생산의 결과를 비교하였다.

[175] Blank 균주는 폐글리세롤의 농도가 증가함에 따라 세포 생장이 감소하였다. 즉, 20 g/l의 폐글리세롤 배지에서 OD가 17±1.5에서 폐글리세롤의 농도를 60 g/l로 증가 시 59% 수준인 OD 10±0.6을 나타내었다(도 14A). 베타카로틴 생산량도 90±13.5 mg/l에서 이의 54% 수준인 48±9.1 mg/l로 감소하였다(도 14B).

[176] 제조합 균주는 60 g/l의 폐글리세롤이 존재함에도 불구하고, 세포농도가 감소하지 않았다. 80 g/l의 폐글리세롤을 첨가시, 세포농도가 약 12% 감소하였다(도 14A). 베타-카로틴 생산량은 40 g/l의 폐글리세롤을 첨가한 경우에 최대값인 151±6.2 mg/l이었고, 80 g/l 첨가시, 110±13.8 mg/l로 감소하였다(도 14B).

[177]

[178] **2-3. 전처리 폐글리세롤의 농도가 세포의 성장 및 성장에 미치는 영향**

[179] 배지에 전처리 폐글리세롤의 함유량을 20 g/l, 40 g/l, 60 g/l, 80 g/l로 조절하여 첨가하여, 전처리 폐글리세롤의 농도 변화에 따른 blank 균주와 제조합 균주의 성장 및 베타-카로틴 생산에 대한 변화를 알아보았다.

[180] Blank 균주는 전처리 폐글리세롤의 농도를 40 g/l까지 증가시켰을 경우, 세포 생장은 감소하였으나, 베타-카로틴 생산량의 변화는 거의 없었다(도 15A 및 15B).

[181] 제조합 균주는 전처리 폐글리세롤의 농도가 60 g/l까지 증가시켰을 경우, 세포생장은 감소하였으나, 베타-카로틴의 생산량은 증가하였다(도 15A 및 15B).

[182]

[183] **2-4. 전처리 및 폐글리세롤이 농도별로 첨가된 배지 내에 존재하는 염, 지방산염, 펩톡사이드 함량 및 이의 영향**

[184] 전처리 및 폐글리세롤이 농도별로 첨가된 배지 내에 존재하는 염, 지방산염, 펩톡사이드 함량 및 이의 영향에 대한 결과를 [표 7]에 나타내었다. 전처리 폐글리세롤이 동일 농도의 폐글리세롤보다 칼륨 이온 함량이 높았다. 이는

폐글리세롤로부터 지방산을 제거하기 위하여 HCl을 첨가하게 되는데, 이 과정에서 지방산염이 지방산 형태로 침전하면서 칼륨이온을 배출하기 때문인 것으로 여겨진다.

- [185] 80 g/l의 폐글리세롤 또는 전처리 폐글리세롤 첨가 시 배지 중의 칼륨 농도는 179 mM과 236 mM인데, 이는 blank 균주가 내성을 나타내는 농도(250 mM)보다 낮은 칼륨 농도이다(도 10A 및 10B). 60 g/l의 폐글리세롤 또는 전처리 폐글리세롤이 첨가된 배지에는 약 8 g/l의 메탄올이 존재하는데, 이 농도는 blank 균주가 내성을 보이는 농도이다(도 8A 및 8B). 뿐만 아니라, blank 균주는 고농도(60 g/l)의 순수글리세롤이 첨가된 배지에서도 세포생장 및 베타-카로틴 생합성이 저해를 나타내지 않았다(도 9A 및 9B). 그러나 낮은 농도(20 g/l)의 폐글리세롤이 첨가된 배지에서 세포 생장 및 베타-카로틴 생합성 저해를 나타내는 것은 이에 존재하는 지방산염, 하이드로젠 퍼옥사이드(H_2O_2) 및 유기 퍼옥사이드의 독성 때문에 기인한 것으로 여겨진다. 한편, 지방산이 거의 제거된 전처리 폐글리세롤을 저농도(20 g/l)로 첨가한 배지에서도 blank 균주의 세포생장 및 베타-카로틴 생합성이 저해되었다. 이는 존재하는 퍼옥사이드의 독성으로 인한 세포성장이 저해된다는 사실을 명확히 보여주는 결과이다. 그러나 폐글리세롤을 첨가한 경우에 비하여 농도의 영향을 덜 받았는데, 이는 지방산이 거의 존재하지 않아 이의 독성의 영향을 덜 받은 것으로 여겨진다.

- [186] *otsBA*가 과량발현된 제조합 균주는 고농도(60 g/l) 폐글리세롤이 첨가된 배지에서도 세포생장 및 베타-카로틴 생합성이 저해를 받지 않았다. 이는 제조합 균주가 고농도의 지방산과 퍼옥사이드의 독성에 내성이 생겼음을 나타낸다. 그러나 전처리 폐글리세롤이 첨가된 배지에서의 세포생장량과 베타-카로틴 생합성량이 동일농도의 폐글리세롤이 첨가된 배지에서의 값보다 낮았는데, 이는 폐글리세롤보다 전처리 폐글리세롤에 존재하는 칼륨이온의 양이 더 많아 이에 영향을 받는 것으로 여겨진다.

- [187] 일반적으로 *otsBA*가 과량발현된 제조합 균주는 트레할로스를 축적하게 되는데, 이는 균주가 나트륨 또는 칼륨 이온에 의해 유발되는 고 삼투압에 저항할 수 있도록 해준다는 기존의 보고가 있었으나(Applied Microbiology & Biotechnology, 2005년, vol. 71, No. 7, p.3761-3769), 본 발명의 균주는 칼륨염에 저해를 받는 상반되는 결과를 보였다. 그러나 검토된 농도 범위의 폐글리세롤 중에 존재하는 칼륨염의 양은 많지 않아 제조합 균주의 성능에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 여겨진다. 본 발명자들은 폐글리세롤을 미생물 배양용 기질로 이용하는데 해결해야 할 가장 큰 장애요소가 이에 존재하는 지방산과 퍼옥사이드에 의한 독성이라는 것을 처음으로 지적하였다. 본 발명자들이 개발한 *otsBA*가 과량발현된 제조합 균주는 이에 대한 독성에 내성을 가짐으로서 폐글리세롤을 효과적으로 사용할 수 있음을 상기 결과들은 시사하고 있다.

[188]

[189] 표 7

전처리 폐글리세롤이 농도별로 첨가된 배지에 존재하는 염, 지방산염 및 퍼록사이드

	폐글리세롤이 첨가된 배지				전처리 폐글리세롤이 첨가된 배지			
	글리세롤 농도(g/l)				글리세롤 농도 (g/l)			
	20	40	60	80	20	40	60	80
${}^1\text{K}^+$ (mM)	160±0.0	167±0.0	173±0.0	179±0.0	174±0.0	194±0.0	213±0.0	236±0.0
지방산 염 (g/l)	${}^2_{14}$	${}^2_{28}$	${}^2_{43}$	${}^2_{57}$	${}^3_{0.2}$	${}^3_{0.4}$	${}^3_{0.6}$	${}^3_{0.8}$
메탄올 (g/l)	2.8±0.1	5.7±0.3	8.6±0.4	11.4±0.6	2.6±0.1	5.1±0.2	7.7±0.3	10.3±0.3
하드로 젠 퍼록 사이드 (uM)	8.1±2.6	16.2±5.2	24.3±7.8	32.4±10.4	1.2±0.5	2.4±1.0	3.6±1.4	4.8±1.9
유기 퍼록사 이드 (uM)	18.8±1.4	37.6±2.4	56.4±4.1	75.2±5.5	4.4±1.0	8.8±2.1	13.1±3.1	17.5±4.2

¹배지성분에 KH_2PO_4 형태로 K^+ 이온 154 mM 존재

²산성(pH 4) 조건에서 침전된 지방산을 회수하여 정량

³유기용매(클로로포름:메탄올=2:1)로 지방산을 추출하여 정량

[190]

[191] **실험예 3. 생물반응기를 이용한 회분식 배양**

[192] 공기가 공급되고 온도 및 pH가 제어되는 3.4 l 교반식 발효조((주)코바이오텍)에 폐글리세롤 60 g/l가 첨가된 배지를 충전한 후 상기 실시예 4에서 제작한 재조합 균주를 배양하였다(도 16). 온도는 25°C로 유지하였고, 2N 황산과 암모니아 수를 이용하여 pH를 중성으로 조절하였다. 액체의 부피는 1.5 l이었다.

[193]

도 17은 배양 시간에 따른 세포 농도, 베타-카로틴 생산을 나타낸다. 건조세포중량을 측정하여 세포의 성장거동을 알아보았다. 배양 67시간 이후부터 세포농도는 급격히 증가하여 약 177시간에 18 g/l에 도달하였다. 이는 $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ 가 73에 해당하는 값이다. 베타-카로틴은 20시간 이후부터 생산하였고, 90시간 이후부터 그 생산속도가 급격히 증가하여 165시간에 128 mg/l에 도달하였다. 부산물로 생성된 아세트산의 양은 세포생장이 시작되는 57시간대에 최대값인 0.1 g/l에 도달한 후 세포에 의해 재사용되었다. 질소원으로 사용되는 암모늄이온의 농도가 감소하다 78시간 이후부터 증가하기 시작하였다. 이는 pH제어를 위하여 암모니아를 사용하였는데, 57시간 이후 아세트산 생성으로 인해 배양액의 pH가 하락하였고 이를 중성으로 조절하기 위하여 암모니아가 투입되었기 때문이다(도 16). 따라서 본 배양 조건은 질소원이 충분히 공급된 조건이다. 탄소원으로 사용된 폐글리세롤 중의 글리세롤은 세포생장이 시작되는 57시간 이후부터 급격히 그 농도가 감소하여 세포생장이 거의 끝나는 시점인 102시간에 고갈되었다. 그러나 이 시간 이후에도 느린 세포생장과 베타-카로틴 생합성이 이루어지는 데, 이는 균주가 폐글리세롤 중에 존재하는 지방산, 특히 올레익산과 같은 긴 사슬의 불포화 지방산을 탄소원으로 사용하기 때문인 것으로 추측된다.

[194]

[195] **실험예 4. 생물반응기를 이용한 유가식 배양**

[196] 초기 페글리세롤 20 g/l로 회분식 모드로 상기 실시예 4에서 제작한 제조합 균주의 배양을 시작하였고, 글리세롤이 고갈된 후, pH-stat로 페글리세롤을 공급하였다.

[197] 도 17은 유가식 배양 시간에 따른 세포 농도, 베타-카로틴 생산을 나타낸다. 정확한 세포생장을 알아보기 위하여 OD 외에 건조세포 중량도 동시에 측정하였다. 최대 세포농도는 36 g/l이었으며, 최대 베타카로틴 생산량은 175 mg/l이었다(도 17).

[198]

[199] **실험예 5. 베타-카로틴 추출 및 정제**

[200] 제조합 균주의 회분식 배양액 1.5 l로부터 wet cell cake을 회수하였고, 이로부터 베타-카로틴을 회수하였다. 이를 증류수로 두 번 세척한 후, 85% 2-프로판올 용액으로 세포를 탈수하였다. 여기에 1.6 l의 IBA를 첨가하여, 탈수세포로부터 베타-카로틴을 추출하였다. 추출액을 감압 하에 160 ml로 농축한 후, 2-프로판올 640 ml를 첨가하였다. 이를 4~12시간 방치함으로써 베타-카로틴 결정을 얻어냈다.

[201] 또한, 회수된 베타-카로틴 결정을 50 ml 에탄올로 세척하여 고순도 베타-카로틴 결정을 얻었으며, 베타-카로틴 순도를 확인하기 위하여 UV-분광광도계 분석과 HPLC 분석을 수행하였다.

[202]

국 제 양 식

특허출원을 위한 부다페스트 국제 조약 하의 미생물 수탁 증명

국제기탁기관에 의해 규칙 7.1에 따라 발행된 원기탁에 대한 수탁증

수신: 김유근,
대한민국 진주시 무산읍 이국리 1158 KB 코스메틱
(우편번호 660-841);
김장준,
대한민국 진주시 경상국립대학교 생명화학공학과
(우편번호 660-841)

I. 미생물의 표시	
기탁자가 첨부한 미생물 식별에 대한 표시: <i>Escherichia coli</i> DH5a-KBCJ01	국제 기탁기관이 부여한 수탁번호: KCCM11106P
II. 과학적 성질의 설명 및/또는 분류학상의 위치	
항목 I에 표시된 미생물에 대하여 다음 사항이 포함되어 있다: ☐ 과학적 성질의 설명 ☐ 제안된 분류학상의 위치 (적용시 ☒ 표시)	
III. 기탁 및 수탁	
본 국제기탁기관은 2010년 10월 2일에 기탁된 항목 I에 표시된 미생물을 수탁하였다.	
IV. 국제기탁기관	
명칭: 한국미생물보존센터 주소: 대한민국 서울시 시내문구 홍제1동 361-221 유림빌딩 (우편번호 120-091)	국제기탁기관을 대표하는 권한을 가진 자 또는 권한을 부여받은 공무원 서명: 서명일: 2010. 10. 02.

상기 번역은 원문의 내용과 상위 없음을 증명함.

2010 년 10 월 12 일

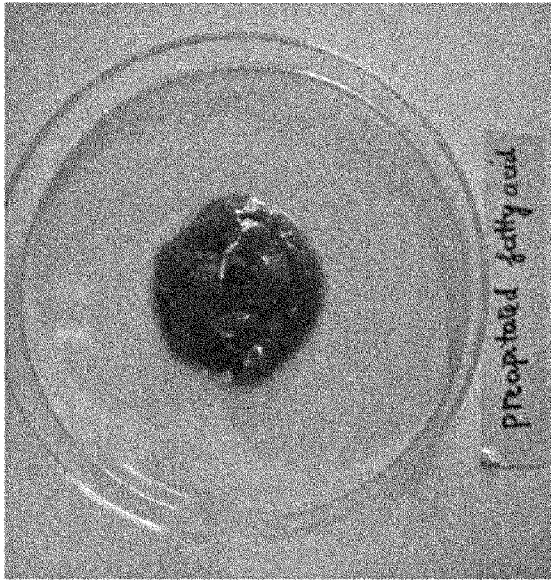
변리사 손 민



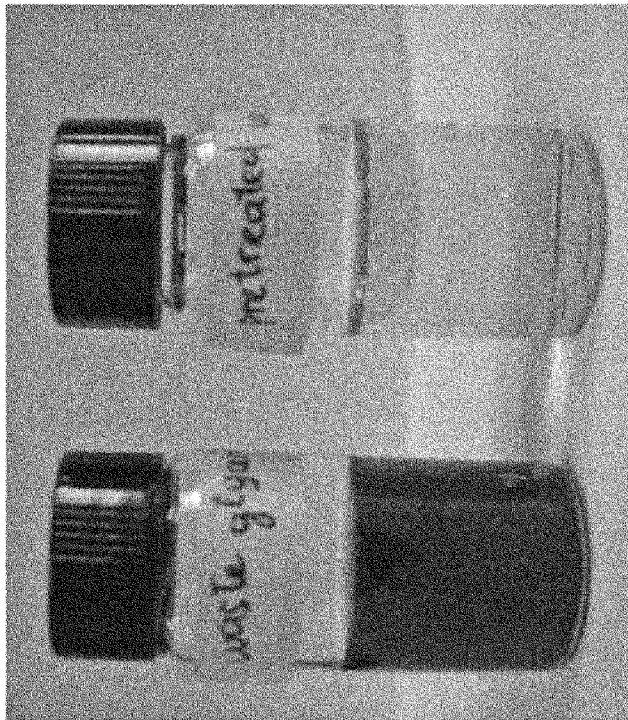
청구범위

- [청구항 1] *otsBA* 유전자가 과발현된, 폐글리세롤의 존재 하에서 생장이 증진된 미생물.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서, 상기 폐글리세롤은 지방산염을 15% 이상 포함하는 것인, 폐글리세롤의 존재하에서 생장이 증진된 미생물.
- [청구항 3] 제 1항에 있어서 상기 미생물은 대장균인 미생물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 미생물은 대장균(*Escherichia coli*) DH5 α -KBCJ01(기탁번호 KCCM111106P)인 미생물.
- [청구항 5] 제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항의 미생물을 배양하는 단계를 포함하는, 폐글리세롤의 존재 하에서 미생물의 생장을 증진시키는 방법.
- [청구항 6] *otsBA* 유전자 및 글리세롤 대사 유전자가 도입된, 폐글리세롤을 기질로 이용하는 미생물.
- [청구항 7] 제 6항에 있어서, 상기 미생물은 카로티노이드, 바이오에탄올, 바이오부탄올, 1,3-프로판디올 (1,3-propanediol) 또는 3-하이드록시프로피온산(3-hydroxypropionic acid)을 생산하는 폐글리세롤을 기질로 이용하는 미생물.
- [청구항 8] *otsBA* 유전자 및 카로티노이드 생합성 유전자가 도입된, 폐글리세롤의 존재 하에서 카로티노이드를 생산하는 미생물.
- [청구항 9] 제 8항에 있어서, 상기 카로티노이드는 라이코펜, 베타-카로틴, 아스타잔틴, 지아잔틴, 크산토페로 이루어진 군에서 선택된 카로티노이드를 생산하는 미생물.
- [청구항 10] 제 9항에 있어서, 상기 미생물은 베타-카로틴을 생산하는 것인 미생물.
- [청구항 11] 제 10항에 있어서, 상기 미생물은 *crtE*, *crtB*, *crtI*, *ipiHP1*, *crtY*, *dxs*, *mvaE*, *mvaS*, *mvaK1*, *mvaK2*, *mvaD* 및 *idi* 유전자를 포함하는 벡터로 형질전환된 것인 미생물.
- [청구항 12] 제 8항에 있어서, 상기 미생물은 대장균인 미생물.
- [청구항 13] 제 8항에 있어서, 상기 폐글리세롤은 지방산염을 15% 이상 포함하는 것인, 카로티노이드를 생산하는 미생물.
- [청구항 14] (a) 제8항 내지 제 13항 중 어느 한 항의 균주를 배양하는 단계; 및 (b) 상기 (a) 단계의 배양액으로부터 베타-카로틴을 회수하는 단계를 포함하는 카로티노이드를 생산하는 방법.
- [청구항 15] 제 14항에 있어서, 상기 (a) 단계의 배양은 회분식 또는 유가식인 방법.

[Fig. 1]



Precipitated fatty acid



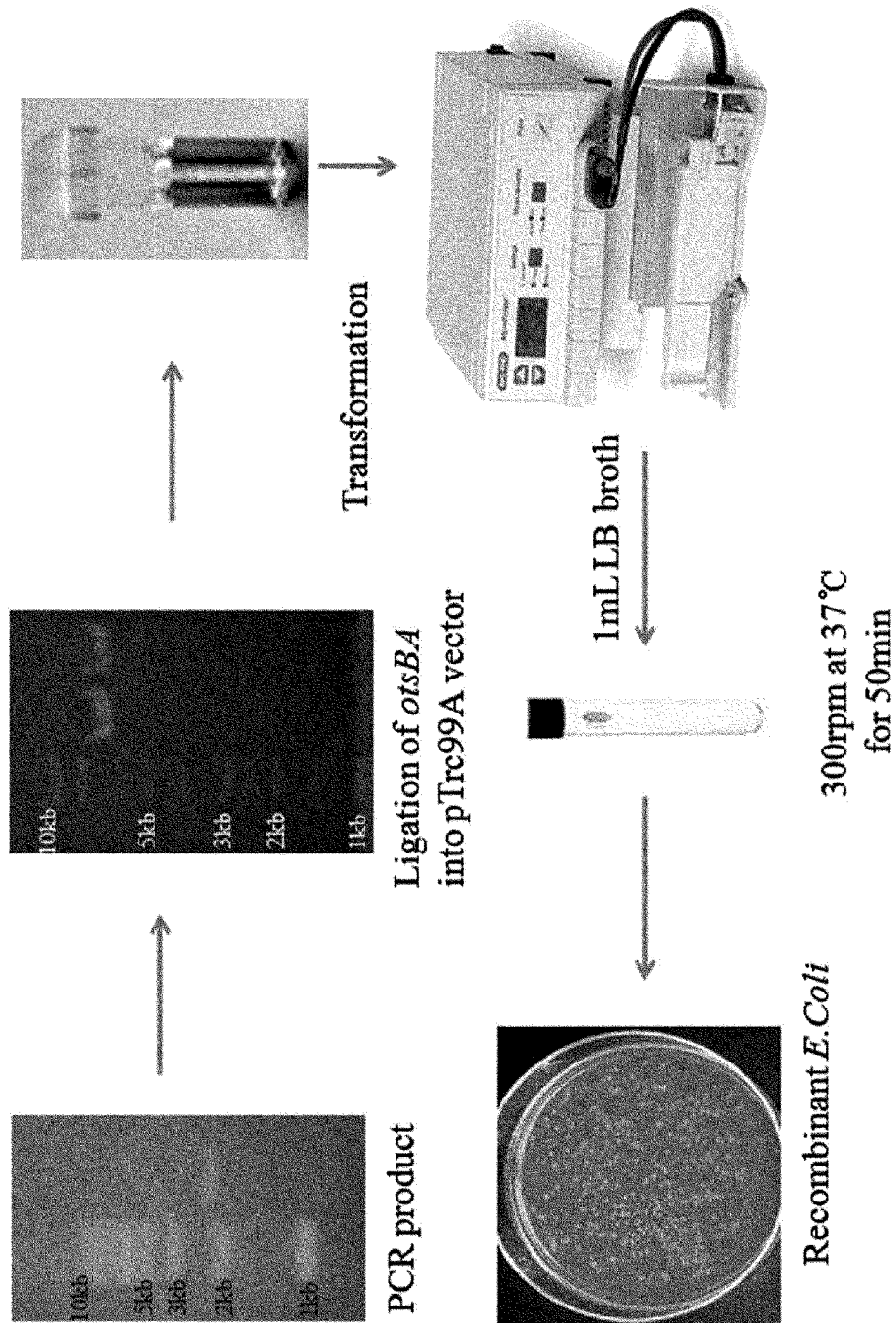
Waste Glycerol Pretreated waste glycerol

[Fig. 2]

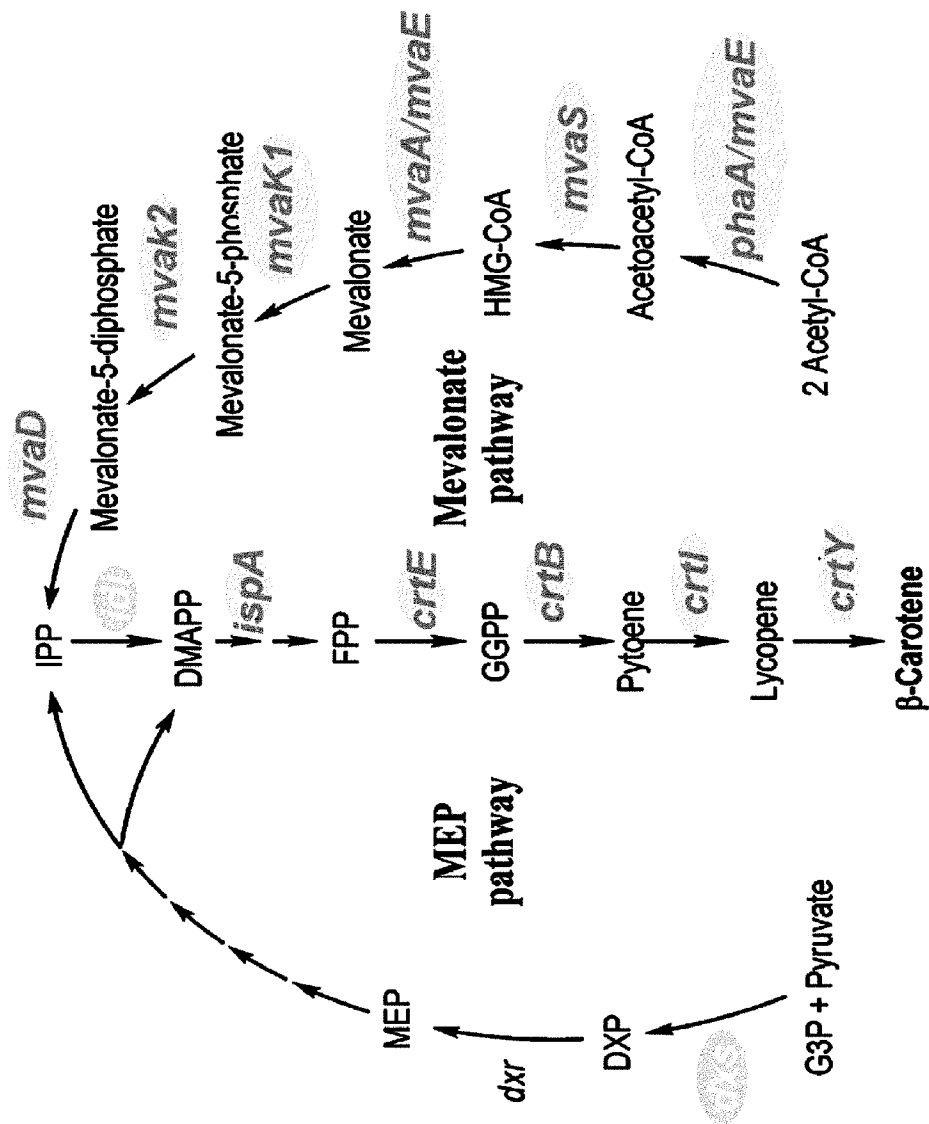


좌로부터 순수글리세롤, 전처리 페글리세롤, 폐글리세롤이 첨가된 배지

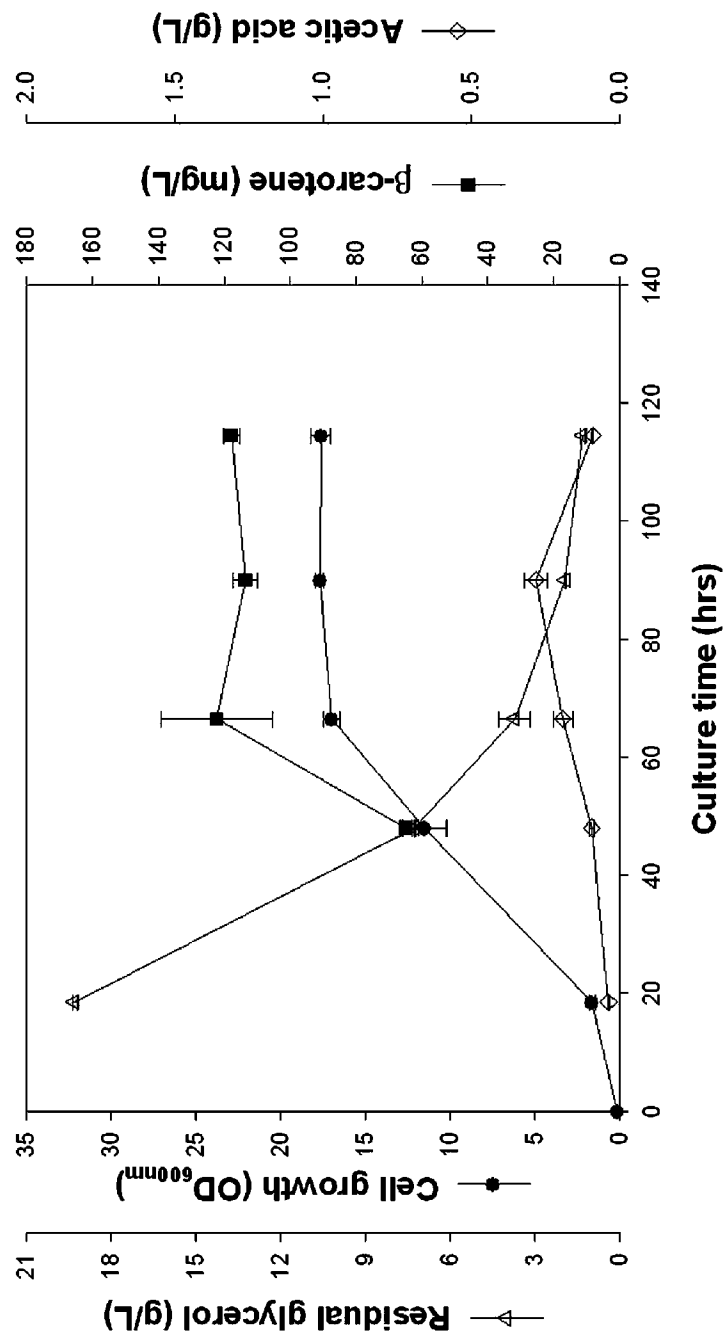
[Fig. 3]



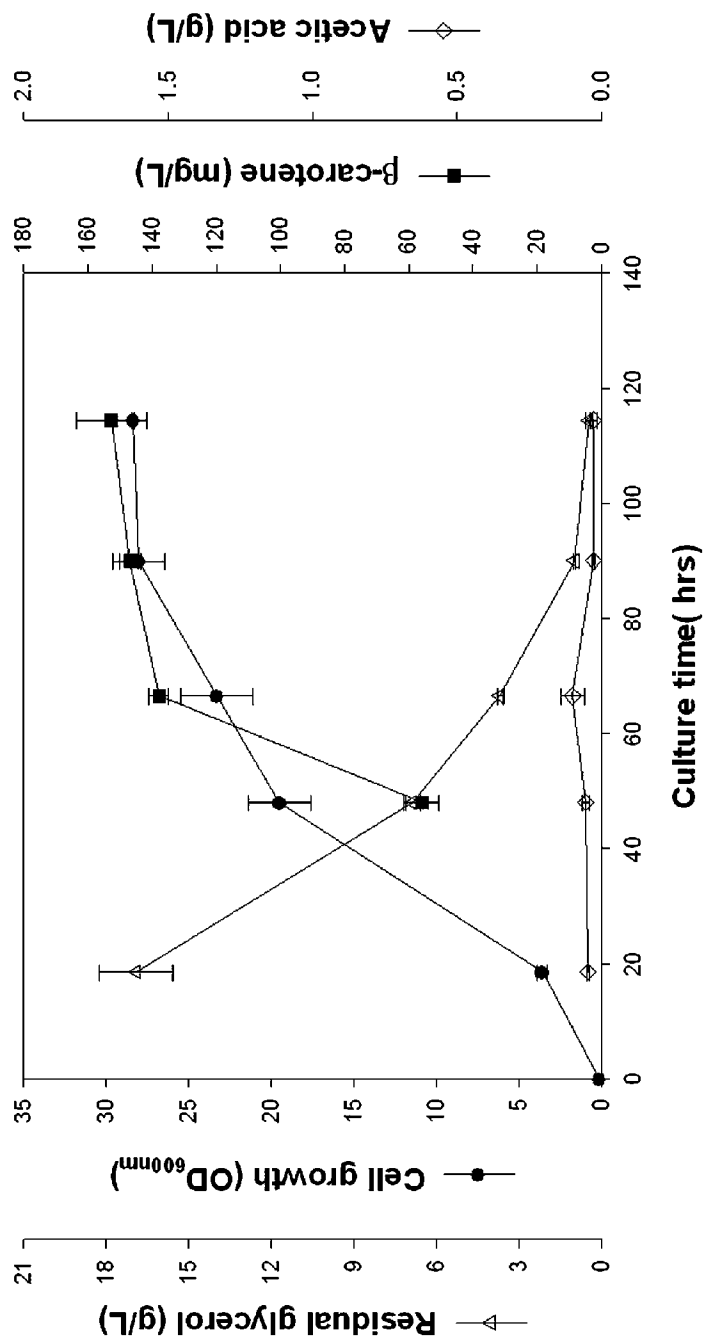
[Fig. 4]



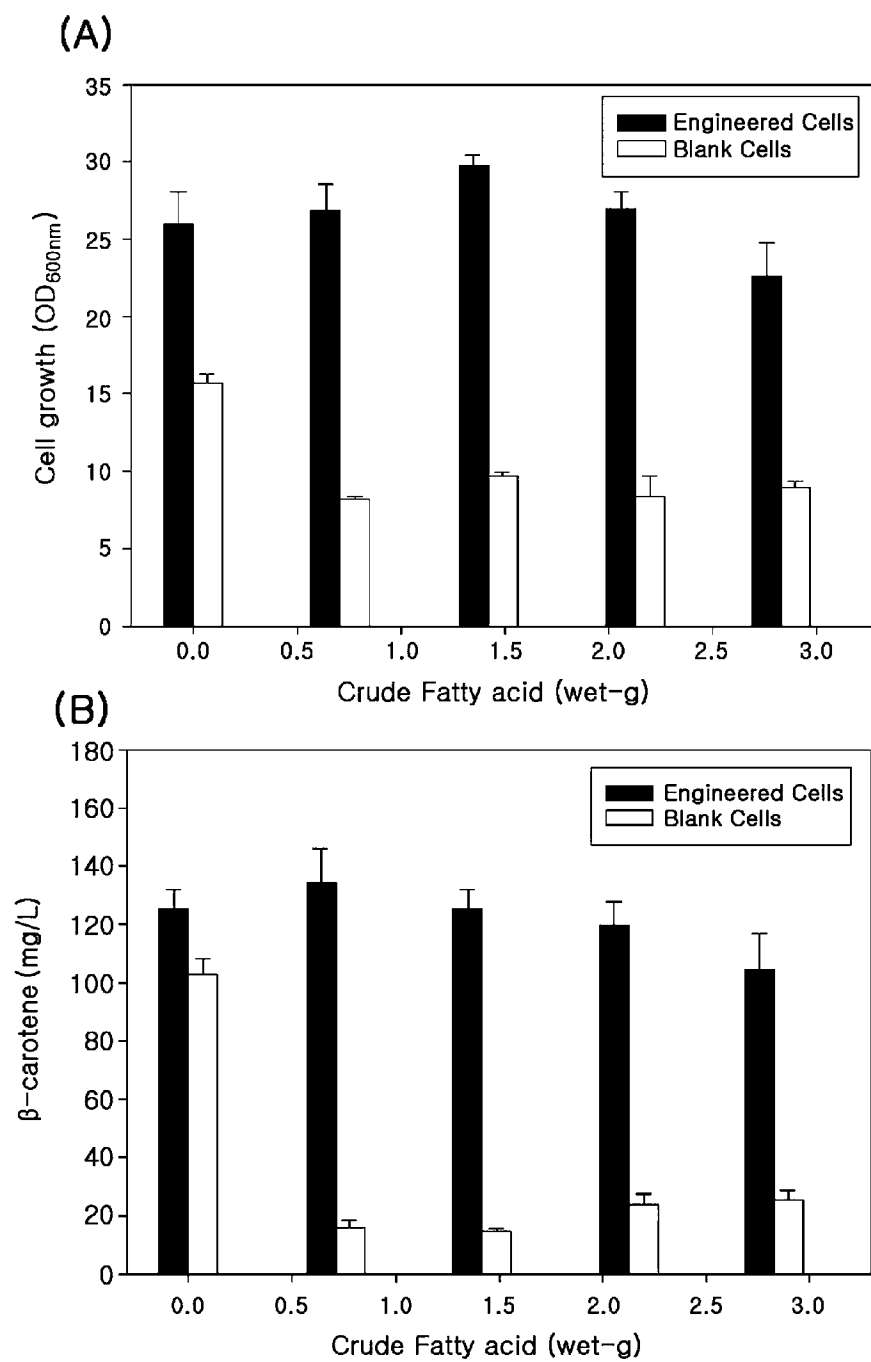
[Fig. 5]



[Fig. 6]

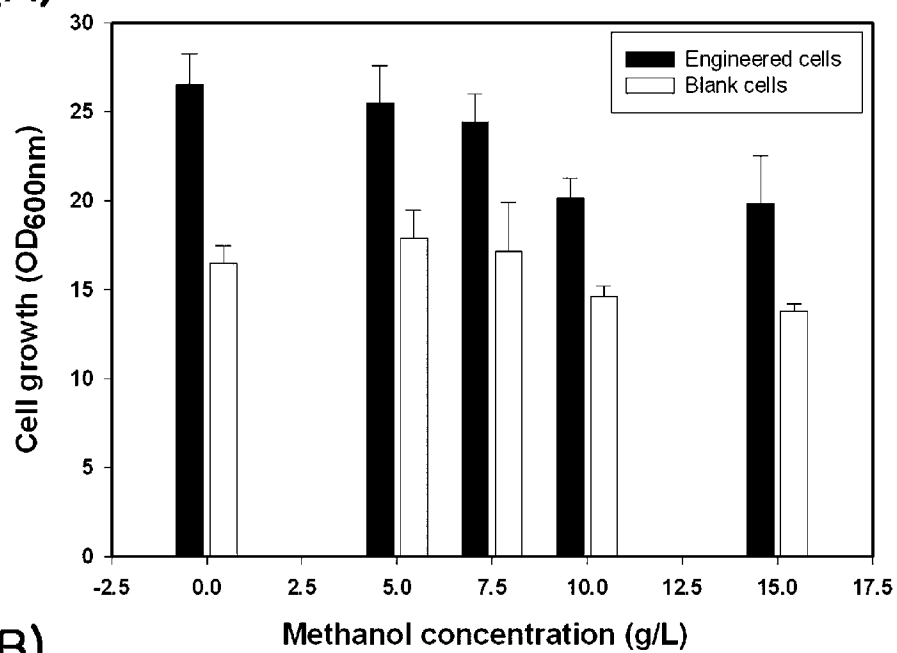


[Fig. 7]

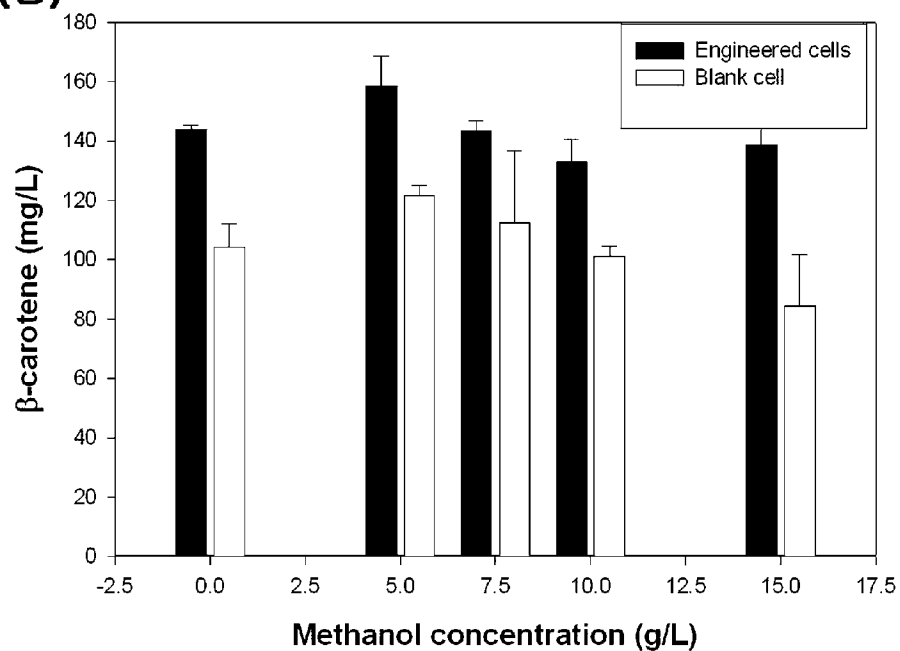


[Fig. 8]

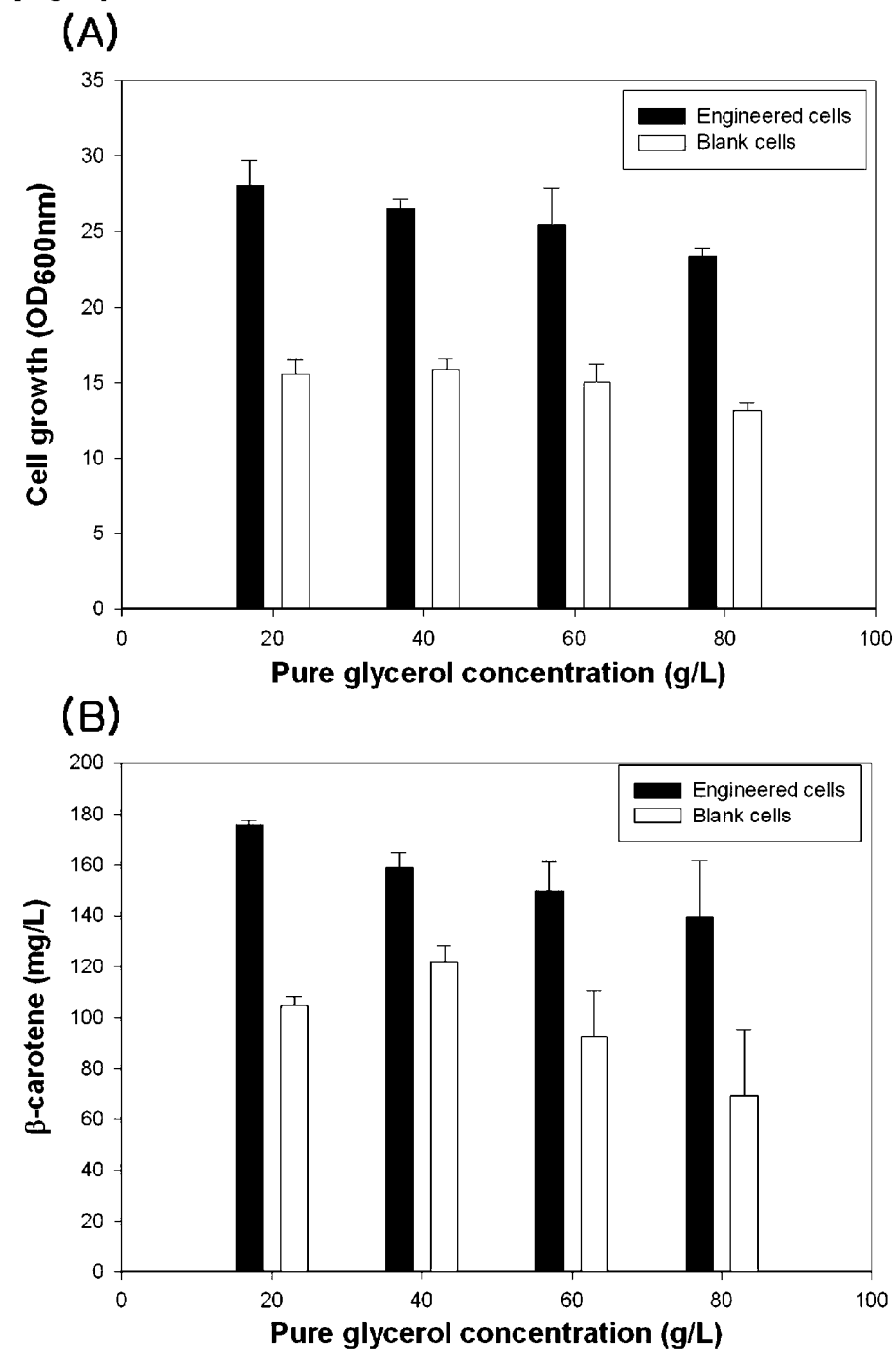
(A)



(B)

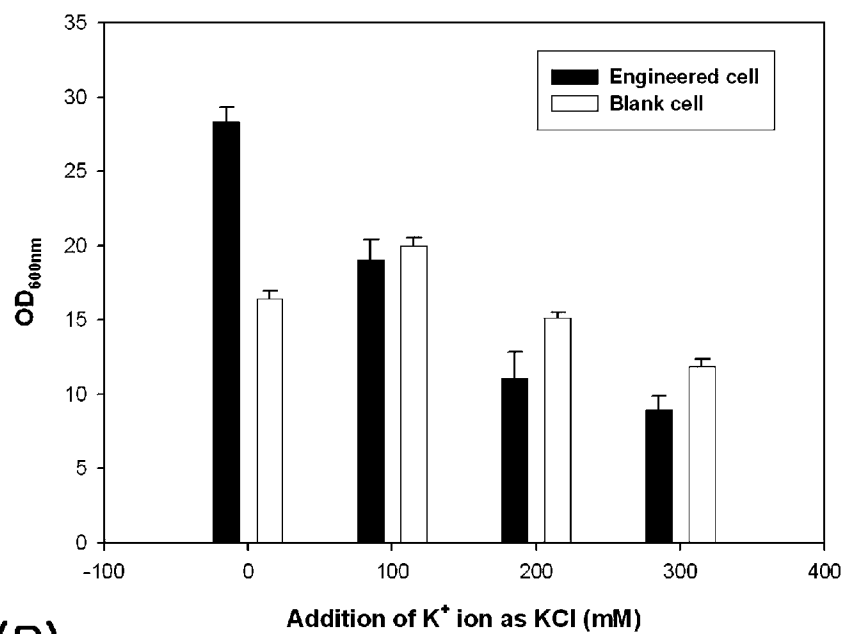


[Fig. 9]

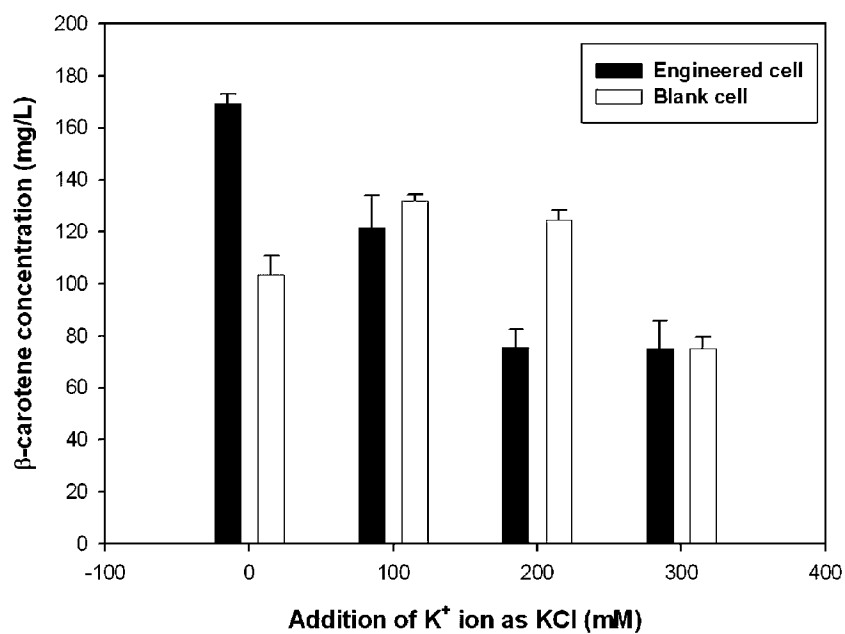


[Fig. 10]

(A)

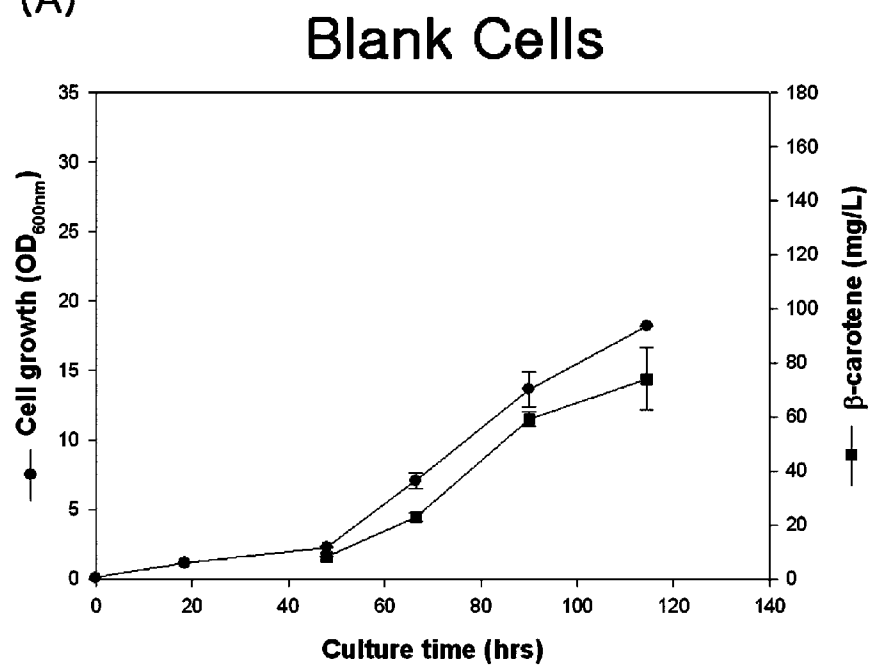


(B)

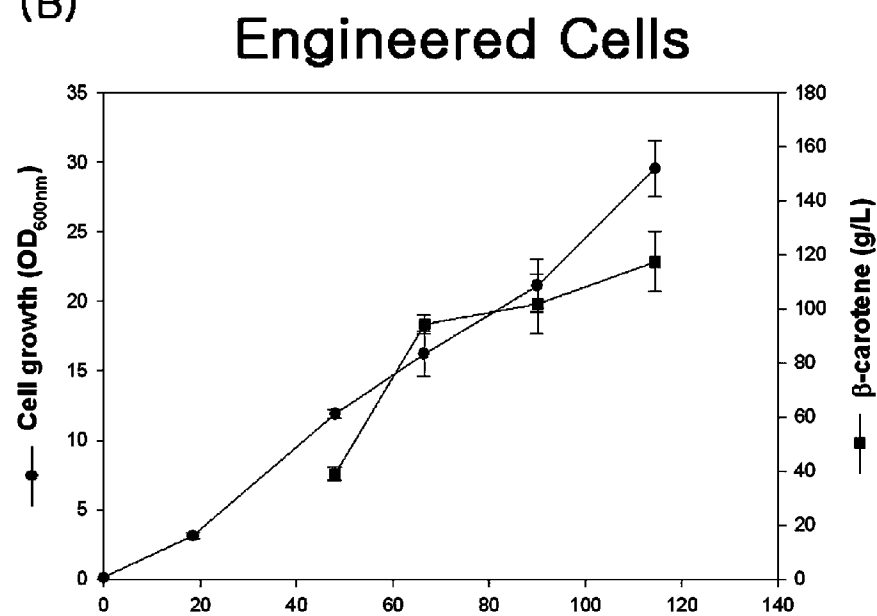


[Fig. 11]

(A)



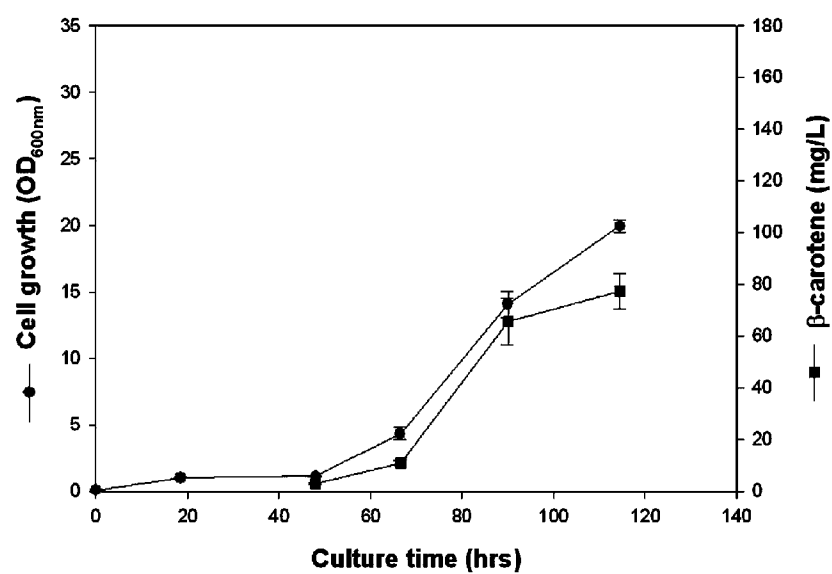
(B)



[Fig. 12]

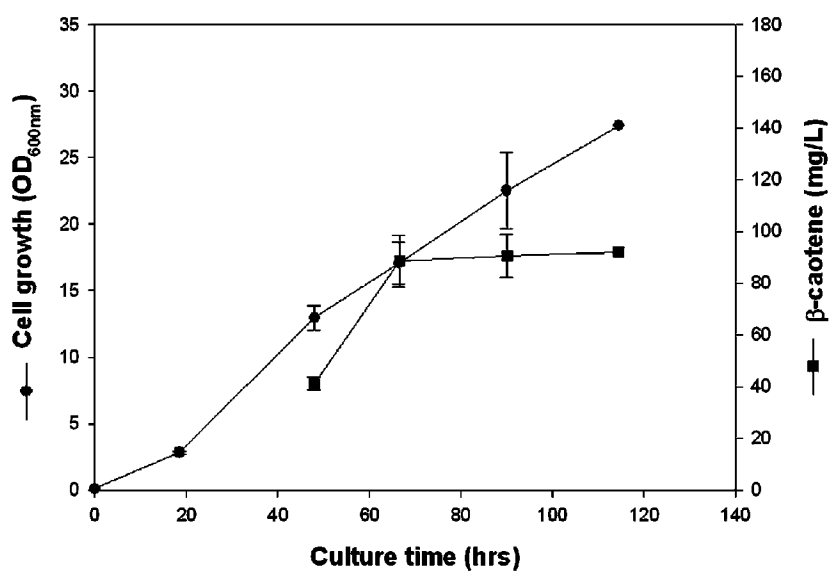
(A)

Blank Cells



(B)

Engineered Cells

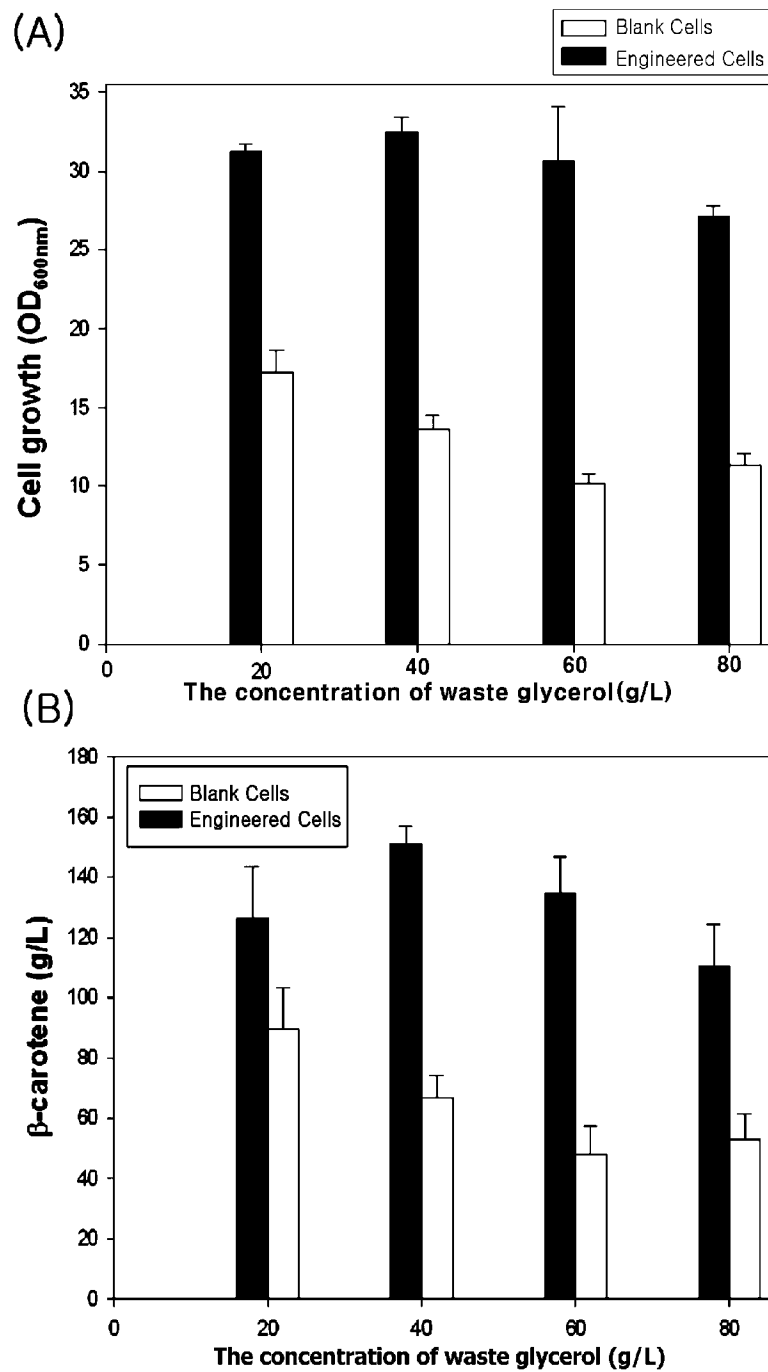


[Fig. 13]



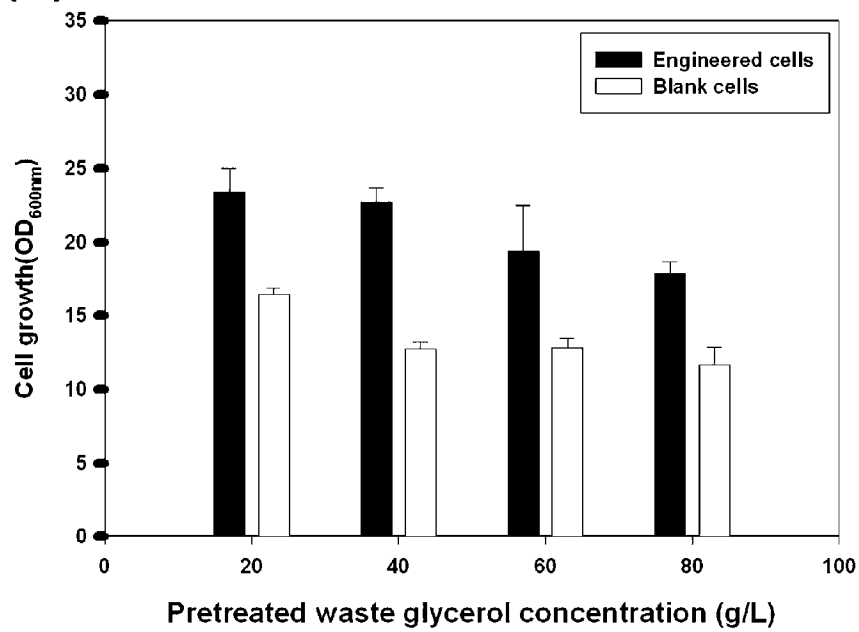
폐글리세롤이 첨가된 배지에서 5일간 배양된 Engineered cells의 배양액

[Fig. 14]

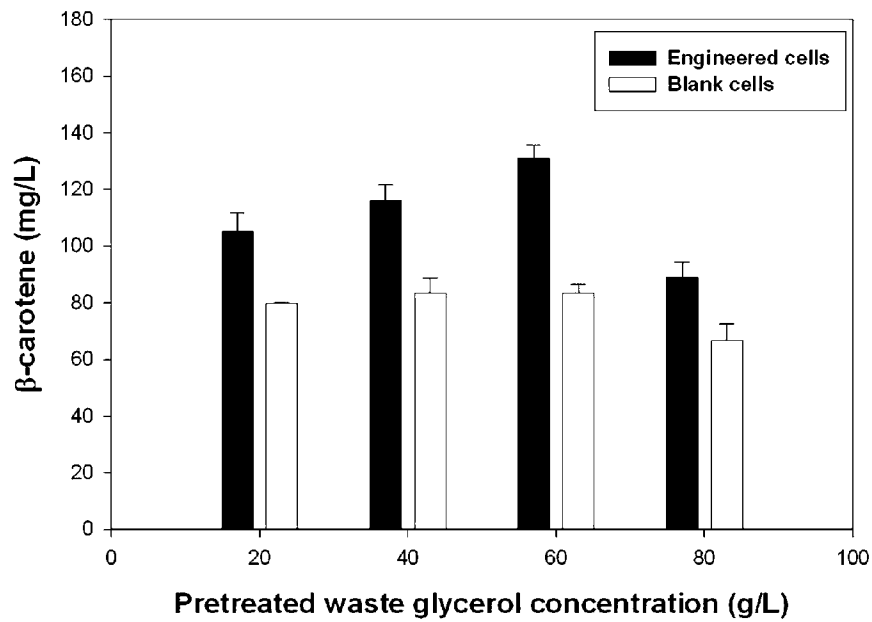


[Fig. 15]

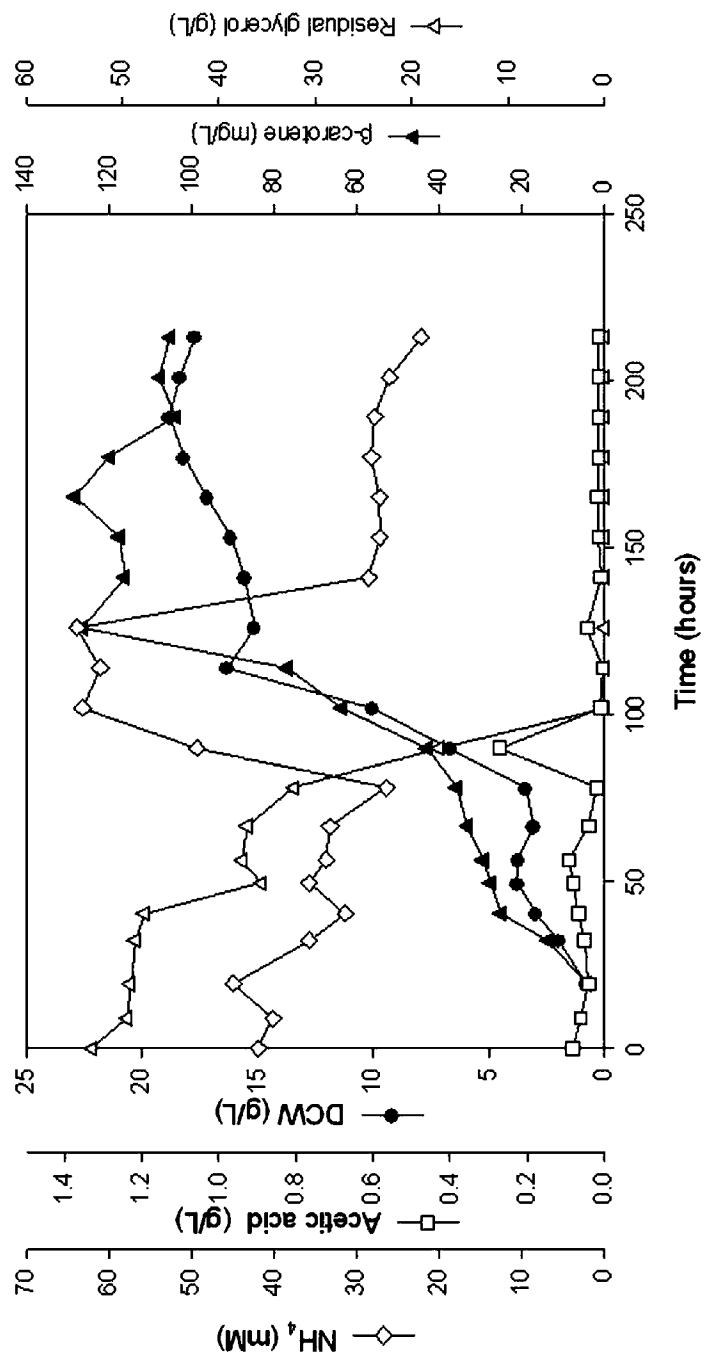
(A)



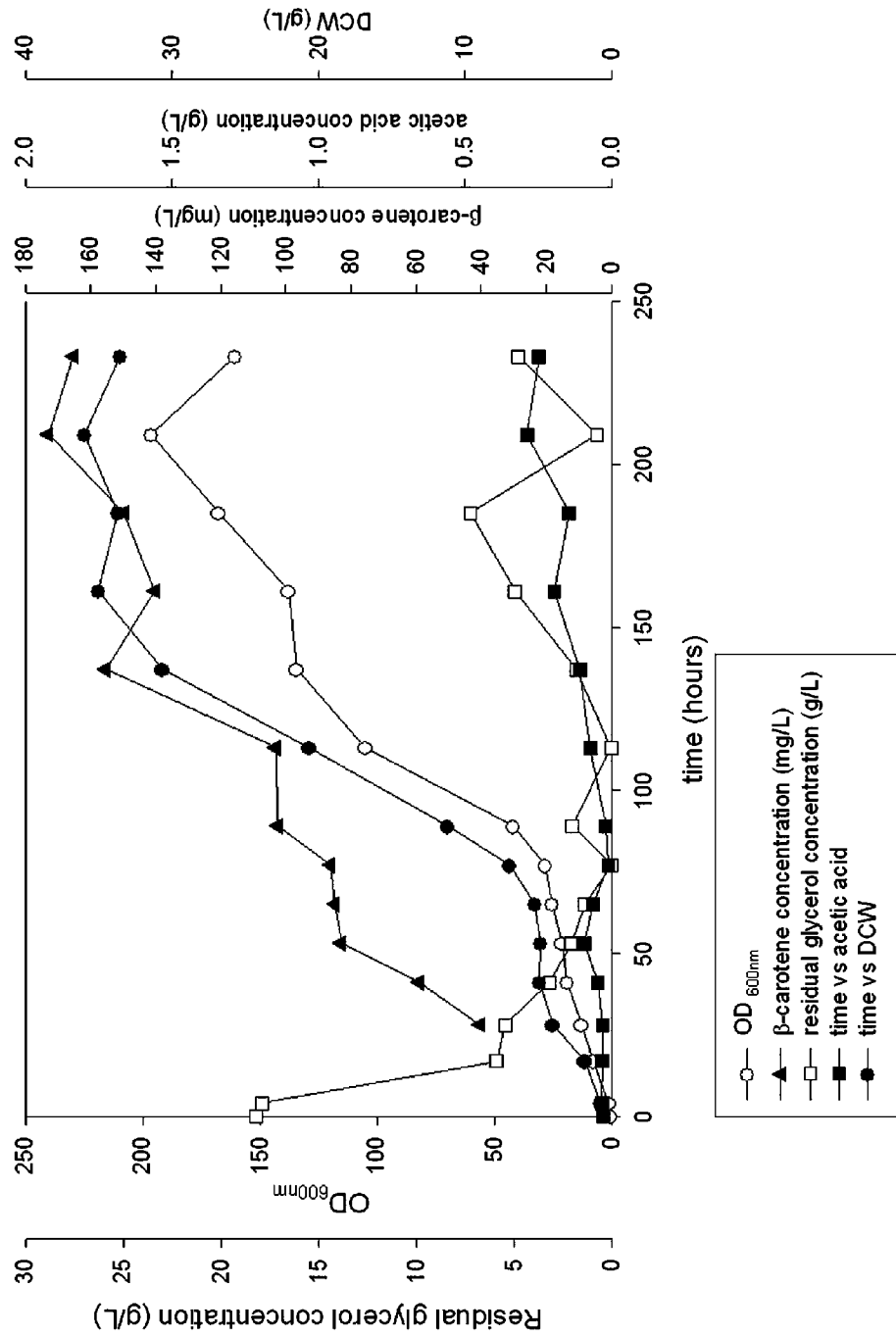
(B)



[Fig. 16]



[Fig. 17]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2010/007053**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C12N 1/21(2006.01)i, C12N 15/52(2006.01)i, C12P 23/00(2006.01)i***

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 1/21; C12N 1/20

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal), Pubmed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MILLER, E. et al. "Sucrose and overexpression of trehalose biosynthetic genes (otsBA) increase desiccation tolerance of recombinant Escherichia coli" Biotechnology Letters. Vol. 30(3), pp. 503-508 (31 October 2007)	1-4
A	See abstract.	5-15
A	KONG, X. et al. "Directed evolution of operon of trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase from Escherichia coli" Biochemical and Biophysical Research communications. Vol. 280(1), pp. 396-400 (12 January 2001)	5-15
	See abstract.	
A	KAASEN, I. et al. "Molecular cloning and physical mapping of the otsBA genes, which encode the osmoregulatory trehalose pathway of Escherichia coli: evidence that transcription is activated by katF (AppR)" Journal of Bacteriology. Vol. 174(3), pp. 889-898 (February 1992)	5-15
	See abstract.	
A	KR 10-2004-0048620 A (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY et al.) 10 June 2004	5-15
	See abstract.	



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 JULY 2011 (28.07.2011)

Date of mailing of the international search report

01 AUGUST 2011 (01.08.2011)

Name and mailing address of the ISA/KR



Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2010/007053

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2004-0048620 A	10.06.2004	NONE	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) <i>C12N 1/21(2006.01)i, C12N 15/52(2006.01)i, C12P 23/00(2006.01)i</i>		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 1/21; C12N 1/20 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템), Pubmed		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	MILLER, E. et al. `Sucrose and overexpression of trehalose biosynthetic genes (otsBA) increase desiccation tolerance of recombinant Escherichia coli` Biotechnology Letters. Vol. 30(3), pp. 503-508 (31 October 2007)	1-4
A	초록 참조.	5-15
A	KONG, X. et al. 'Directed evolution of operon of trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase from Escherichia coli` Biochemical and Biophysical Research communications. Vol. 280(1), pp. 396-400 (12 January 2001) 초록 참조.	5-15
A	KAASEN, I. et al. 'Molecular cloning and physical mapping of the otsBA genes, which encode the osmoregulatory trehalose pathway of Escherichia coli: evidence that transcription is activated by katF (AppR)` Journal of Bacteriology. Vol. 174(3), pp. 889-898 (February 1992) 초록 참조.	5-15
A	KR 10-2004-0048620 A (한국생명공학연구원 외 1명) 2004.06.10 초록 참조.	5-15
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2011년 07월 28일 (28.07.2011)		국제조사보고서 발송일 2011년 08월 01일 (01.08.2011)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 정부대전청사 팩스 번호 82-42-472-7140		심사관 김지윤 전화번호 82-42-481-8288

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

KR 10-2004-0048620 A

2004.06.10

없음