(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0092556
(43) 공개일자 2016년08월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/77 (2006.01) *C12N 9/04* (2006.01)
C12P 7/64 (2006.01) *C12R 1/15* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/77 (2013.01)
C12N 9/0006 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0012670
(22) 출원일자 2015년01월27일
심사청구일자 2015년01월27일

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
이진원
서울특별시 송파구 양재대로 1218 (방이동, 올림픽선수기자촌아파트) 201동 1601호
이병훈
서울특별시 영등포구 양평로12가길 2 509호 (당산동6가)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양부현

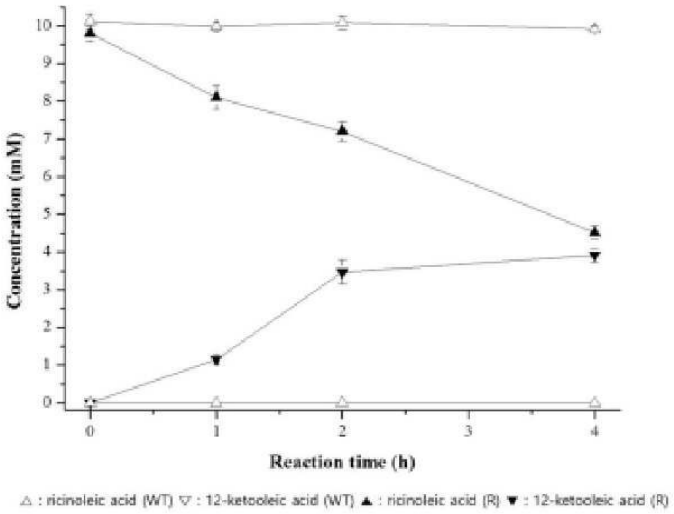
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **12-케토올레 산의 생산능이 우수한 코리네박테리움 글루타미컴 균주 및 이의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 알코올 디하이드로게네이즈(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현벡터로 형질전환된 12-케토올레 산(12-ketooleic acid) 생산용 코리네박테리움 글루타미컴(*Corynebacterium glutamicum*) 균주에 관한 것이다. 야생종 코리네박테리움 글루타미컴 균주가 12-케토올레 산의 생산이 전혀 이루어지지 않는데 반해, 유전자 조작을 통해 재조합된 본 발명의 코리네박테리움 글루타미컴(*Corynebacterium glutamicum*) 균주는 우수한 12-케토올레 산 생성능을 가지며, 12-케토올레 산을 탄소원으로 사용하지 않아 지속적으로 12-케토올레 산을 생산할 수 있다.

대 표 도 - 도5



(52) CPC특허분류
C12P 7/6409 (2013.01)
C12R 1/15 (2013.01)
(72) 발명자
이새봄
대전광역시 대덕구 동춘당로114번길 47 (송촌동, 선비마을2단지아파트) 206동 201호
김현수
서울특별시 강남구 학동로 609 12동 907호 (청담동,삼익아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 10044604
부처명 산업통상자원부
연구관리전문기관 한국산업기술평가관리원
연구사업명 산업핵심기술개발사업
연구과제명 지방/지방산으로부터 장쇄디카르복실산의 생물/화학적 전환 기술 개발
기 여 율 1/1
주관기관 (주)에이피테크놀로지
연구기간 2014.06.01 ~ 2015.05.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

알코올 디하이드로게네이즈(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현벡터로 형질전환된 12-케토올레 산(12-ketooleic acid) 생산용 코리네박테리움 글루타미컴(*Corynebacterium glutamicum*) 균주.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 알코올 디하이드로게네이즈를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 마이크로코쿠스 루테우스(*Micrococcus luteus*)로부터 유래한 것을 특징으로 하는 코리네박테리움 글루타미컴 균주.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 알코올 디하이드로게네이즈는 서열목록 제 1 서열의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 코리네박테리움 글루타미컴 균주.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 알코올 디하이드로게네이즈를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열목록 제 2 서열의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 코리네박테리움 글루타미컴 균주.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 발현벡터는 도 3의 유전자 지도를 갖는 pCES-L10이고, 상기 뉴클레오티드 서열은 pCES-L10의 MCS(multiple cloning site)에 삽입되는 것을 특징으로 하는 코리네박테리움 글루타미컴 균주.

청구항 6

다음 단계를 포함하는 12-케토올레 산(12-ketooleic acid) 생산용 코리네박테리움 글루타미컴(*Corynebacterium glutamicum*) 균주의 제조방법:

(a) 알코올 디하이드로게네이즈(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현벡터에 삽입시키는 단계; 및

(b) 상기 뉴클레오티드 서열이 삽입된 발현벡터로 코리네박테리움 글루타미컴 균주를 형질전환시키는 단계.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 상기 코리네박테리움 글루타미컴 균주를 발현시키는 단계 (b)는 전기충격 방법으로 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

다음 단계를 포함하는 12-케토올레 산(12-ketooleic acid) 생합성 방법:

(a) 제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항의 코리네박테리움 글루타미컴 균주를 배양하여 12-케토올레 산을 생합성하는 단계; 및

(b) 상기 단계 (a)의 생합성된 12-케토올레 산을 수득하는 단계.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 12-케토올레 산(12-ketooleic acid) 생산용 코리네박테리움 글루타미컴(*Corynebacterium glutamicum*) 균주, 이의 제조방법 및 상기 균주를 이용한 12-케토올레 산 생합성 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 코리네박테리움 글루타미컴(*Corynebacterium glutamicum*)은 그람-양성 토양박테리아로서, 비병원성이며 빠른 균생장과 주변 환경 적응에 강한 성질로 인해 현재 산업용 균주로 많이 사용되고 있다. 특히 현재 글루타메이트와 라이신 등의 아미노산 생산용 균주로써 산업현장에서 널리 사용 되고 있는 균주이다(도 1).

[0003] 한편, 재조합 균주를 이용하여 친환경적으로 케토 지방산 중에 하나인 10-케토스테아린 산(10-ketostearic acid)을 생산하는 연구가 가장 많이 진행되어 왔으나, 아직 12-케토올레 산(12-ketooleic acid)를 생산하는 재조합 균주는 연구가 진행되어지지 않았다. 일반적인 12-케토올레 산의 생산 경로는 도 2와 같다.

[0004] 현재 지방산을 이용한 전환반응 연구로써 활발하게 진행되고 있는 균주는 대장균(*Escherichia coli*)이다. 하지만, 대장균 같은 경우는 12-케토올레 산을 탄소원으로 사용하기 때문에 12-케토올레 산을 지속적으로 생산하기란 쉽지 않다.

[0005] 그리하여, 본 발명자들은 12-케토올레 산을 탄소원으로 사용하지 않고, 지속적으로 생산 가능하도록, 적응력이 강한 코리네박테리움 글루타미컴(*Corynebacterium glutamicum*)을 이용하여 12-케토올레 산을 생산하고자 하였다.

[0006] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허공보 제10-2014-0015086호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명자들은 우수한 12-케토올레 산(12-ketooleic acid) 생산능을 가지며, 유전자 조작을 통해 12-케토올레 산 생합성 대사산물을 안정적이고, 효과적으로 생산하는 균주의 개발을 위하여 예의 연구 노력하였고, 그 결과 마이크로코쿠스 루테우스(*micrococcus luteus*) 유래 *ADH* 유전자를 코리네박테리움 글루타미컴(*Corynebacterium glutamicum*) 균주를 형질전환 시킨 결과, 효과적으로 12-케토올레 산 생합성 경로가 과발현되고, 12-케토올레 산을 탄소원으로 사용하지 않아 지속적으로 12-케토올레 산을 생산 가능함을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

[0009] 따라서, 본 발명의 목적은 12-케토올레 산(12-ketooleic acid) 생산용 코리네박테리움 글루타미컴

(*Corynebacterium glutamicum*) 균주를 제공하는 데 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 상술한 본 발명의 12-케토올레 산 생산용 코리네박테리움 글루타미컴(*Corynebacterium glutamicum*) 균주의 제조방법을 제공하는 데 있다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상술한 본 발명의 코리네박테리움 글루타미컴(*Corynebacterium glutamicum*) 균주를 이용하여 12-케토올레 산 생합성 방법을 제공하는 데 있다.

[0012] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 알코올 디하이드로게네이즈(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현벡터로 형질전환된 12-케토올레 산(12-ketooleic acid) 생산용 코리네박테리움 글루타미컴(*Corynebacterium glutamicum*) 균주를 제공한다.

[0014] 본 발명자들은 우수한 12-케토올레 산(12-ketooleic acid) 생산능을 가지며, 유전자 조작을 통해 12-케토올레 산 생합성 대사산물을 안정적이고, 효과적으로 생산하는 균주의 개발을 위하여 예의 연구 노력하였고, 그 결과 마이크로코쿠스 루테우스(*micrococcus luteus*) 유래 *ADH* 유전자를 코리네박테리움 글루타미컴(*Corynebacterium glutamicum*) 균주에 형질전환 시킨 결과, 효과적으로 12-케토올레 산 생합성 경로가 과발현되고, 12-케토올레 산을 탄소원으로 사용하지 않아 지속적으로 12-케토올레 산을 생산 가능함을 확인하였다.

[0015] 본 명세서에서, "알코올 디하이드로게네이즈(alcohol dehydrogenase)"는 리시놀레 산(ricinoleic acid)으로부터 12-케토올레 산(12-ketooleic acid)을 생산하는 효소로서, *ADH* 유전자가 이를 코딩하는 유전자이다.

[0016] 본 발명의 발현벡터에서 발현되는 상기 알코올 디하이드로게네이즈는 마이크로코쿠스 루테우스(*micrococcus luteus*)로부터 유래한 것을 사용하는 것이 바람직하다. 보다 바람직하게는 서열목록 제1서열로 표시되는 알코올 디하이드로게네이즈를 발현하도록 할 수 있으며, 상기 알코올 디하이드로게네이즈를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 바람직하게는 서열목록 제2서열로 표시될 수 있다.

[0017] 본 발명에서 이용되는 뉴클레오티드 서열은 상기 언급된 서열 이외에 상기 뉴클레오티드 서열에 대하여 실질적인 동일성을 나타내는 뉴클레오티드 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 본 발명의 뉴클레오티드 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 뉴클레오티드 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.

[0018] 상기 유전자들은 발현벡터 내부에 도입되어 코리네박테리움 글루타미컴(*Corynebacterium glutamicum*)에서 발현되게 된다. 본 명세서에 있어서, 용어 "발현벡터"는 발현벡터의 전사에 제공되는 추가단편에 작동가능하게 연결된 관심의 폴리펩티드를 암호화하는 단편으로 구성되는 선형 또는 원형의 DNA 분자이다. 그와 같은 추가단편은 프로모터 및 종료암호 서열을 포함한다. 발현벡터는 하나 이상의 복제 개시점, 하나 이상의 선택마커, 폴리아데닐화 신호 등을 또한 포함한다. 발현벡터는 일반적으로 플라스미드 또는 바이러스 DNA로부터 유도되

거나, 또는 둘 다의 요소를 함유한다.

[0019] 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.

[0020] 본 발명의 상기 유전자를 인코딩하는 핵산 분자는 원핵세포에서 작동하는 프로모터에 작동적으로 연결(operatively linked)된다. 본 명세서에서, 용어 "작동적으로 결합된"은 핵산 발현 조절 서열(예: 프로모터, 시그널 서열, 또는 전사조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 해독을 조절하게 된다.

[0021] 본 발명의 벡터는 전형적으로 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 원핵세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터(예컨대, tac 프로모터, lac 프로모터, lacUV5 프로모터, lpp 프로모터, pL^{λ}프로모터, pR^{λ}프로모터, rac5 프로모터, amp 프로모터, recA 프로모터, SP6 프로머터, trp 프로모터 및 T7 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보좀 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다.

[0022] 한편, 본 발명에 이용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드(예: pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHC79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, pET28a, pGEX 시리즈, pET 시리즈, pUC18K, pEKEx2 및 pCES-L10 등), 파지(예: λgt4λB, λ-Charon, λΔz1 및 M13 등) 또는 바이러스(예: SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있으나, 바람직하게는 12-케토올레 산 생합성에 이용될 코리네박테리움 글루타미컴(*Corynebacterium glutamicum*)을 위한 특정 유전자를 미생물 생체 내로 운반하여 외부로부터 삽입된 유전자의 발현을 효과적으로 조절할 수 있도록 상기 발현벡터는 도 3의 유전자 지도를 갖는 pCES-L10이고, 상기 뉴클레오티드 서열은 pCES-L10의 MCS(multiple cloning site)에 삽입된다.

[0023] 한편, 본 발명의 벡터는 선택표지로서, 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함하며, 예를 들어 암피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자가 있다.

[0024] 본 발명의 발현 벡터는 프로모터서열, 발현 대상 유전자(구조 유전자)의 뉴클레오티드 서열 및 터미네이터 서열을 포함하며, 상기 서열들이 5'-3' 순서대로 연결되는 것이 바람직하다. 본 발명에서는 *ADH* 의 유전자 서열이 5'-3' 순서대로 연결되어 제공되었다.

[0025] 본 발명의 발현벡터에는 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.

[0026] 상기 유전자가 포함된 발현벡터는 이후 코리네박테리움 글루타미컴(*Corynebacterium glutamicum*) 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 있으나, 형질전환체의 안정적 제조와 효율을 높이기 위해서는 전기 충격에 의한 형질전환 방법을 사용하는 것이 바람직하다.

[0027] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 12-케토올레 산(12-ketooleic acid) 생산용 코리네박테리움 글루타미컴(*Corynebacterium glutamicum*) 균주의 제조방법을 제공한다: (a) 알코올 디하이드로게네이즈(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현벡터에 삽입시키는 단계; 및 (b) 상기 뉴클레오티드 서열이 삽입된 발현벡터로 코리네박테리움 글루타미컴 균주를 형질전환시키는 단계.

[0028] 본 발명의 12-케토올레 산(12-ketooleic acid) 생산용 형질전환 코리네박테리움 글루타미컴(*Corynebacterium glutamicum*) 균주의 제조방법은 상술한 본 발명의 코리네박테리움 글루타미컴 균주를 제조하는 것이므로 상술한 내용과 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.

[0029] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 코리네박테리움 글루타미컴 균주를 발현시키는 단계 (b)는 전기충격 방법으로 수행된다.

[0030] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 12-케토올레 산(12-ketooleic acid) 생합성 방법을 제공한다: (a) 상술한 본 발명의 코리네박테리움 글루타미컴 균주를 배양하여 12-케토올레 산을 생합성하는 단계; 및 (b) 상기 단계 (a)의 생합성된 12-케토올레 산을 수득하는 단계.

[0031] 상기 형질전환 코리네박테리움 글루타미컴(*Corynebacterium glutamicum*) 균주 내에서 생합성된 12-케토올레 산을 분리하는 단계는 당업계에 공지된 통상의 분리 또는 정제 방법에 따라 실시될 수 있다(참조: B. Aurousseau et al., *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 57(3):1558-9331(1980); Frank C. Magne et al., *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 34(3):127-129(1957)).

발명의 효과

[0032] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0033] (ⅰ) 본 발명은 알코올 디하이드로게네이즈(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현벡터로 형질전환된 12-케토올레 산(12-ketooleic acid) 생산용 코리네박테리움 글루타미컴(*Corynebacterium glutamicum*) 균주를 제공한다.

[0034] (ⅱ) 야생종 코리네박테리움 글루타미컴 균주가 12-케토올레 산의 생산이 전혀 이루어지지 않는데 반해, 유전자 조작을 통해 재조합된 본 발명의 코리네박테리움 글루타미컴(*Corynebacterium glutamicum*) 균주는 우수한 12-케토올레 산 생성능을 가지며, 12-케토올레 산을 탄소원으로 사용하지 않아 지속적으로 12-케토올레 산을 생산할 수 있다.

[0035] (ⅲ) 또한, 본 발명의 코리네박테리움 글루타미컴 균주는 12-케토올레 산 대사경로에 필수적인 유전자를 과발현시키는 과정을 통해 12-케토올레 산의 생산량이 증가하였다.

도면의 간단한 설명

[0036] 도 1은 코리네박테리움 글루타미컴(*Corynebacterium glutamicum*)을 보여주는 사진이다.

도 2는 12-케토올레 산(12-ketooleic acid)의 생산경로를 보여준다.

도 3은 발현벡터인 pCES-L10을 보여주는 도식화이다.

도 4는 야생종 코리네박테리움 글루타미컴 ACTC13032 및 본 발명의 일 실시예에 따른 재조합 균주인 코리네박테리움 글루타미컴 ATCC13032-pCESL10::*ADH* 의 플라스크 배양(flask fermentation)의 GC/MS 분석 결과를 보여준다.

도 5는 야생종 코리네박테리움 글루타미컴 ACTC13032 및 본 발명의 일 실시예에 따른 재조합 균주인 코리네박테리움 글루타미컴 ATCC13032-pCESL10::*ADH* 의 회분식 배양(batch fermentation)의 GC/MS 분석 결과를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0037] 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.

[0038] **실시예**

[0039] 코리네박테리움 글루타미컴(*Corynebacterium glutamicum*)의 경우, 지방산으로부터 12-케토올레 산(12-ketooleic acid)을 생산하는데 필요한 효소인 알코올 디하이드로게네이즈(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는 *ADH* 유전자를 가지고 있지 않다.

[0040] 따라서, 코리네박테리움 글루타미컴이 가지고 있지 않은 마이크로코쿠스 루테우스(*Micrococcus luteus*) NCTC2665 유래 *ADH* 유전자를 발현 벡터(expression vector)인 pCES-L10를 이용하여 삽입하여 재조합 코리네박테리움 글루타미컴(*Corynebacterium glutamicum*) 균주 (*Corynebacterium glutamicum* ATCC13032::pCES-L10::*ADH*)를 제작하였다.

[0041] **실시예 1: 중합효소 연쇄 반응(Polymerase Chain Reaction; PCR)을 이용한 *ADH* 유전자를 발현하는 재조합 플라**

스미드의 제조

[0042] 표 1

유전자	생산 효소
ADH	Alcohol dehydrogenase

[0043] 상기 표 1의 *ADH* 유전자를 증폭하기 위한 프라이머는 Forward - GGATCCATGTCCGAGTTCACCCGTTTCG Tm=67.55(28mer)(서열목록 제3서열) 및 Reverse CATATGTCAGCCGAGCGGGGTGTC Tm=68.34(24mer)(서열목록 제4서열)를 이용하였고, 제한효소는 *Bam*HI 및 *Nde*I을 이용하였다.

[0044] 상기 프라이머(primer)를 사용하여 증폭한 결과, *ADH*는 933 bp의 크기로 증폭되었다. 각각의 중합효소연쇄반응은 통상적인 반응조건(10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 50 mM KCI, 0.1% Triton X-100, 2 mM MgSO4, Taq DNA 중합효소(DaKaRa)) 아래에서 95℃/5분(denaturation), 67℃/1분(annealing), 72℃/1분(extension)로 1회 수행한 후, 95℃/20초(denaturation), 67℃/30초(annealing), 72℃/1분 20초(extension)로 27회 반복 수행하였다. 마지막 단계로 안정적인 신장(extension)을 위해 95℃/1분(denaturation), 67℃/1분(annealing), 72℃/10분(extension) 반응하였다.

[0045] 중합효소 연쇄 반응 후 증폭된 DNA는 0.8% 아가로즈 젤 상에서 확인 후 정제하여 T-벡터 클로닝에 이용하였다. pGEM-T easy 벡터(DaKaRa)에 라이게이션(ligation)을 수행하여 재조합 플라스미드인 pGEM-T::*ADH*를 제작하였다. 상기 재조합 플라스미드들은 대장균(*E. coli* DH5a competent cell, RBS)에서 형질 전환하여 균주를 제조하였다.

[0046] **실시예 2: 재조합 플라스미드의 제조**

[0047] 상기 실시예 1의 재조합 플라스미드인 pGEM-T::*ADH*를 위의 제한효소들과 37℃ 항온수조(water bath)에서 약 1시간 30분 반응하였다. 각각의 DNA 절편들을 절단한 뒤 발현 벡터(expression vector)인 pCES-L10(도 3)의 다중삽입부위(multicloning site)에 T4 라이게이즈(Dakara)를 이용, 16℃에서 라이게이션 반응하여 재조합 플라스미드를 완성하였다. 각 단계마다 삽입된 유전자의 삽입여부를 확인하기 위해 대장균(*E. coli* DH5a competent cell, RBS)에 형질 전환 시킨 후 재조합 플라스미드를 추출하여 이를 다시 원래 삽입부위의 제한효소로 처리하여 잘린 DNA 조작의 크기를 0.8% 아가로즈 젤 상에서 전기영동하여 비교하는 방법을 사용하였다.

[0048] **실시예 3 : 이종 코리네박테리움 글루타미컴 형질전환체 제조**

[0049] 통상적으로 클로닝용으로 많이 쓰이는 균주의 경우 $CaCl_2$ 버퍼를 사용한 컴피턴트 세포를 만든 후 열충격(42℃) 방법에 의해 플라스미드를 숙주세포내로 넣지만, 본 발명에서는 형질전환체의 안정적 제조와 효율을 높이기 위해 전기천공법 (electroporation)에 의한 형질전환방법을 사용하였다. 상기 전기 충격에 의한 형질전환방법을 위해 16시간동안 전 배양 된 500 uL(0.1 %)의 야생종 코리네박테리움 글루타미컴(*Corynebacterium glutamicum* ATCC13032) 배양액을 41.5 mL의 BHI(5 g/L beef heart, 12.5 g/L calf brains, 2.5 g/L disodium hydrogen phosphate, 2 g/L D(+)-glucose, 10 g/L peptone, 5 g/L sodium chloride)에 100 mg/mL의 이소니코틴산(isonicotinic acid) 2 mL, 200 mg/mL의 글라이신 6.25 mL, 20%(v/v) 트윈80 0.25 mL를 첨가한 배지에 접종하여 배양액의 흡광도(absorbance)가 600 nm 파장에서 0.6에 이르렀을 때, 배양액 전체에 해당하는 50 mL의 배양액을 원심 분리(12000 rpm, 10분)하여 상등액과 세포를 분리하였다. 모아진 세포는 10% 글리세롤 50 mL로 3회 세척해준 후, 다시 원심분리(12000 rpm, 1분)하여 상등액과 세포로 나누어 주었다. 세포는 10% 글리세롤 0.25 mL로 현탁하였다. 현탁된 세포 50 uL에 재조합 플라스미드 1.5 uL를 첨가시켜주었다. 상기 플라스미드가 들어있는 분주된 51.5 uL의 액체는 전기천공법(electroporation)용 큐벳(BIO-RAD, Gene pulser cuvette)에 담아 BIO-RAD, Gene pulser Xcell로 전기 충격(2500v, 25uF, 200Ω)을 가하였다. 미리 준비해둔 1 mL BHI(5 g/L beef heart, 12.5 g/L calf brains, 2.5 g/L disodium hydrogen phosphate, 2 g/L D(+)-glucose, 10 g/L peptone, 5 g/L sodium chloride)를 첨가한 뒤 1시간 동안 200 rpm, 30℃에서 진탕 배양하였다. 배양된 형질전환체는 카나마이신(50 ug/mL)이 첨가된 BHI 아가(5 g/L beef heart, 12.5 g/L calf brains, 2.5 g/L disodium hydrogen phosphate, 2 g/L D(+)-glucose, 10 g/L peptone, 5 g/L sodium chloride, agar 20 g/L)에서 단일 균체가 생성될 때까지 30℃에서 배양하였다. 이를 통해 재조합 플라스미드를 코리네박테리움 글루타

미컴(*Corynebacterium glutamicum* ATCC13032) 균주에 형질 전환한 코리네박테리움 글루타미컴 ATCC13032::*ADH* 재조합 균주를 개발하였다.

[0050] **실험예 1: Tris-HCl 버퍼 용액을 이용한 전세포 생물전환(Whole cell bioconversion)**

[0051] *C. glutamicum* ACTC13032::pCES-L10::*ADH* 균주가 리시놀레 산(ricinoleic acid)으로부터 12-케토올레 산의 생산 가능성을 확인하기 위해 플라스크 배양을 진행하였고, 대조군으로는 야생형(wild type) *C. glutamicum* ACTC13032을 선정하였다. 100 ml 플라스크 배양 및 25 ml 생물전환 조건 그리고, 배지 조성은 다음 표 2와 같으며, 플라스크 배양(flask fermentation) 실험은 500 ml 삼각 플라스크를 이용해 100 ml 부피로 진행하였고, 생물전환 실험은 250 ml 배플(baffle) 삼각 플라스크를 이용해 25 ml 부피로 진행하였다.

표 2

[0052]

Strains	
C. glutamicum	Wild type
	::ADH
Culture conditions	
Agitation	200rpm
Temperature	30℃
Initial pH	6.1
Bioconversion conditions	
Agitation	200rpm
Temperature	35℃
pH	8.0
Ricinoleic acid	5mM
Tween 80	0.05 g/l

BHI Medium	
Calf Brains	7.7 g/l
Beef Heart	9.8 g/l
Proteose peptone	10.0 g/l
Dextrose	2.0 g/l
Sodium Chloride	5.0 g/l
Disodium Phosphate	2.5 g/l
Buffer solution	
Tris-HCl (pH8.0)	50mM

[0053] 12시간의 배양하여 정체 성장기(stationary growth phase)까지 세포를 키운 후에 Tris-HCl(pH 8.0) 버퍼로 풀어준 후에 기질인 리시놀레 산 5 mM를 넣어서 생물 전환 반응을 진행하였다. 실험 결과, 도 4에서 확인할 수 있듯이, 최대 전환수율 72%, 최대 생산성 1.1 g/l/h의 12-케토올레 산이 생산되었고, 대조군인 야생형의 경우 12-케토올레 산 생산이 전혀 이루어지지 않았다. 또한, 1시간 이후에 12-케토올레 산이 감소하지 않고 그대로 유지되는 점에 있어서 *C. glutamicum* ACTC13032::pCES-L10::*ADH*가 12-케토올레 산을 생산하는 균주로서 산업적 가능성이 있다고 판단된다.

[0054] **실험예 2: 최소 배지 용액을 이용한 전세포 생물전환(Whole cell bioconversion)**

[0055] 최종적으로 산업적으로 쓰이기 위해서는 버퍼 조건이 아닌 최소 배지조건으로 생물 전환이 일어나야 하므로 플라스크 배양 및 생물전환 결과를 바탕으로 2.5 L 회분식 배양기(Batch Reactor)에서 1 L 워킹 부피(working volume)로 최소배지인 CGXⅡ를 이용하여 세포를 성장시킨 후에 기질인 리시놀레 산 10 mM를 넣어서 생물 전환 반응을 진행하였다. 그리고, 플라스크 배양과 동일한 배지조성에서 회분식 배양(batch fermentation)을 수행하였다. 한편, 1 L 회분식 배양 및 생물전환 조건 그리고 및 배지 조성은 아래 표 3에 정리 하였다:

표 3

Strains	
C. glutamicum	Wild type
	□ADH
Culture conditions	
Agitation	200rpm
Temperature	30℃
pH control	7.0
Bioconversion conditions	
Agitation	200rpm
Temperature	35℃
pH	8.0
Ricinoleic acid	10mM

CGXII Medium		
Stock 1	$(NH_4)_2SO_4$	20 g/l
	KH_2PO_4	16.68 g/l
	K_2HPO_4	13.48 g/l
	urea	5 g/l
Stock 2	$MgSO_4$	0.25 g/l
Stock 3	$FeSO_4$	0.01 g/l
	$MnSO_4$	0.01 g/l
	$CaCl_2$	0.01 g/l
	$ZnSO_4$	0.001 g/l
	$CuSO_4$	200 μg/l
	$NiCl_2$	20 μg/l
Stock 4	Protocatechuic acid	0.03 g/l
Stock 5	biotin	200 μg/l

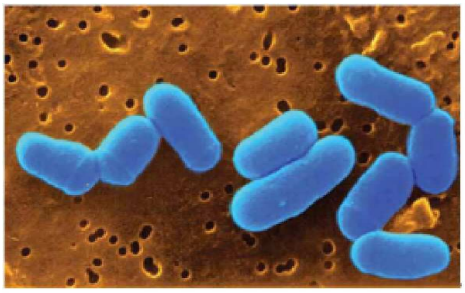
[0056]

[0057] 실험 결과, 도 5에서 볼 수 있듯이, 최대 전환수율 74%, 최대 생산성 0.69 g/l/h의 12-케토올레 산이 생산 되었고, 대조군인 야생형의 경우 12-케토올레 산의 생산이 전혀 이루어지지 않았다. Tris-HCl 버퍼 용액으로 전환 반응을 진행하였을 때 보다 생산성은 떨어졌으나 전환수율은 비슷한 점을 감안하였을 때, 이 균주가 12-케토올레 산 생산을 위한 균주로서 산업적 가능성이 있음을 다시 확인할 수 있었다.

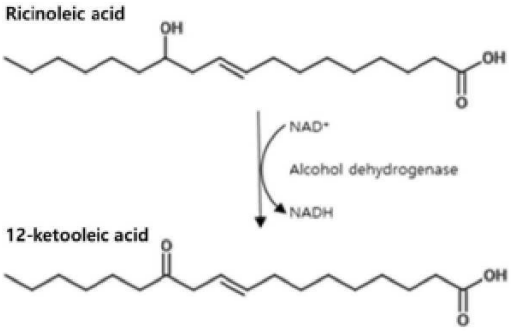
[0058] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

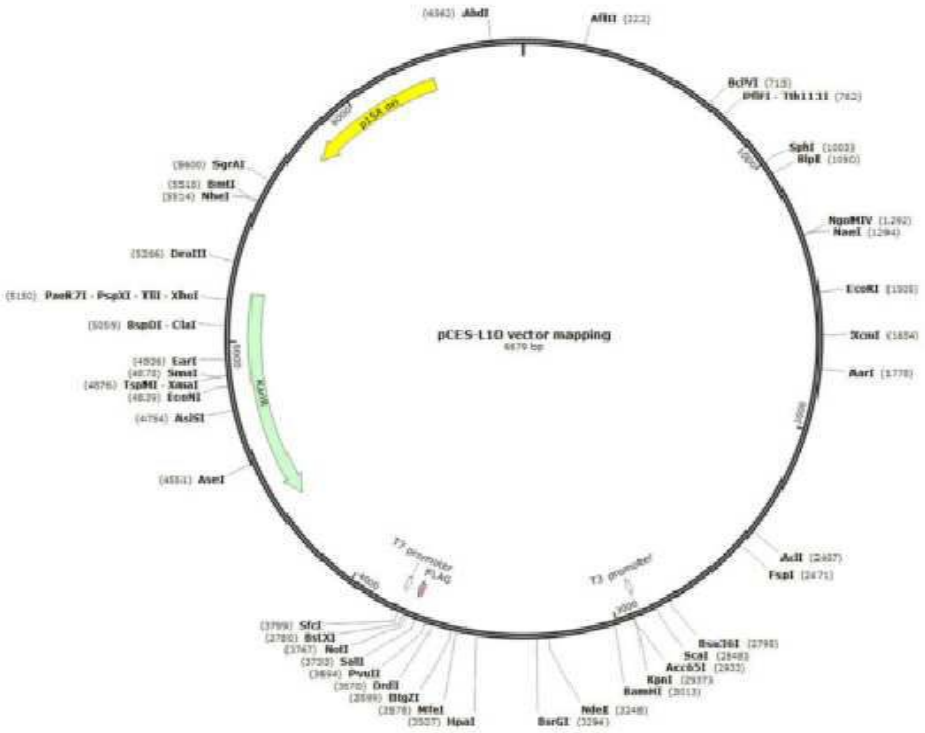
도면1



도면2

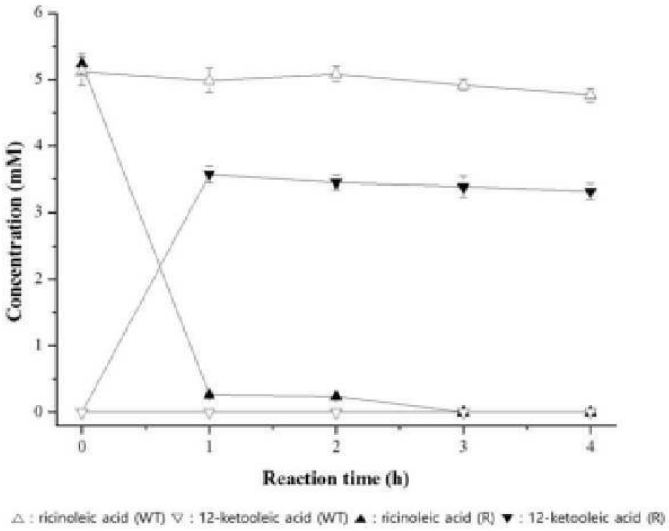


도면3

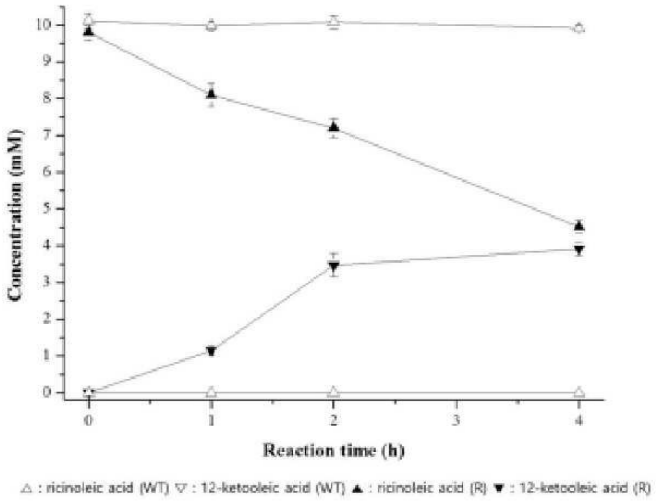


< pCES-L10 vector Mapping - kan^{R}, a fully synthetic promoter >

도면4



도면5



서 열 목 록

<110> Sogang University

<120> Corynebacterium glutamicum Strains Having Excellent Production Potential of 12-ketooleic acid and Method for Preparing Thereof

<130> PN150006

<160> 4

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 933

<212> PRT

<213> Alcohol dehydrogenase from Micrococcus luteus NCTC2665

<400> 1

Ala Thr Gly Thr Cys Cys Gly Ala Gly Thr Thr Cys Ala Cys Cys Cys
1 5 10 15

Gly Thr Thr Thr Cys Gly Ala Gly Cys Ala Gly Gly Thr Cys Gly Cys

20 25 30

Cys Gly Thr Gly Cys Thr Gly Gly Gly Cys Ala Cys Cys Gly Gly Cys
35 40 45

Gly Thr Gly Cys Thr Gly Gly Gly Thr Thr Cys Gly Cys Ala Gly Ala
50 55 60

Thr Cys Ala Thr Cys Ala Thr Gly Cys Ala Gly Gly Cys Gly Gly Cys
65 70 75 80

Gly Thr Ala Cys Cys Ala Cys Gly Gly Cys Ala Ala Gly Ala Ala Gly
85 90 95

Gly Thr Gly Ala Thr Gly Gly Cys Cys Thr Ala Cys Gly Ala Cys Gly
100 105 110

Cys Cys Gly Thr Cys Cys Cys Cys Gly Cys Cys Gly Cys Cys Cys Thr
115 120 125

Cys Gly Ala Gly Gly Gly Gly Ala Thr Cys Gly Ala Gly Cys Gly Cys
130 135 140

Cys Gly Cys Thr Gly Gly Gly Cys Gly Thr Gly Gly Ala Thr Cys Cys
145 150 155 160

Gly Cys Cys Ala Ala Gly Gly Cys Thr Ala Cys Gly Ala Ala Gly Cys

165 170 175

Ala Gly Ala Cys Cys Thr Cys Gly Gly Gly Gly Ala Gly Gly Gly Cys
180 185 190

Thr Ala Cys Gly Ala Cys Cys Cys Gly Cys Ala Gly Cys Gly Cys Thr
195 200 205

Thr Cys Gly Ala Cys Gly Ala Gly Gly Cys Cys Ala Thr Cys Gly Cys
210 215 220

Cys Cys Gly Cys Ala Thr Cys Ala Cys Gly Cys Cys Gly Ala Cys Cys

225 230 235 240

Thr Cys Cys Gly Ala Cys Cys Thr Cys Gly Gly Cys Gly Ala Gly Gly
245 250 255
Cys Cys Cys Thr Gly Gly Cys Gly Gly Ala Thr Gly Cys Gly Gly Ala
260 265 270
Cys Ala Thr Cys Gly Thr Gly Ala Thr Cys Gly Ala Gly Gly Cys Cys
275 280 285
Gly Thr Cys Cys Cys Gly Gly Ala Gly Ala Ala Cys Cys Thr Gly Gly
290 295 300
Ala Gly Cys Thr Cys Ala Ala Gly Cys Gly Cys Ala Ala Gly Gly Thr

305 310 315 320
Gly Thr Gly Gly Gly Cys Cys Cys Ala Gly Gly Thr Gly Gly Gly Cys
325 330 335
Gly Ala Gly Cys Thr Cys Gly Cys Cys Cys Cys Cys Gly Cys Cys Ala
340 345 350
Cys Gly Ala Cys Cys Cys Thr Gly Thr Thr Cys Gly Cys Cys Ala Cys
355 360 365
Gly Ala Ala Cys Ala Cys Cys Thr Cys Cys Thr Cys Cys Cys Thr Gly
370 375 380

Cys Thr Gly Cys Cys Cys Thr Cys Gly Gly Ala Cys Thr Thr Cys Gly
385 390 395 400
Cys Cys Gly Ala Cys Gly Cys Cys Ala Gly Cys Gly Gly Cys Cys Ala
405 410 415
Thr Cys Cys Gly Gly Ala Gly Cys Gly Cys Thr Thr Cys Cys Thr Gly
420 425 430
Gly Cys Cys Cys Thr Gly Cys Ala Cys Thr Ala Cys Gly Cys Cys Ala
435 440 445
Ala Cys Cys Gly Cys Ala Thr Cys Thr Gly Gly Gly Cys Gly Cys Ala

450 455 460
Gly Ala Ala Cys Ala Cys Cys Gly Cys Cys Gly Ala Gly Gly Thr Cys
465 470 475 480

Ala Thr Gly Gly Gly Cys Ala Cys Cys Gly Cys Cys Gly Cys Cys Ala
485 490 495
Cys Cys Thr Cys Gly Cys Cys Gly Gly Ala Gly Gly Cys Cys Gly Thr
500 505 510
Cys Gly Cys Gly Gly Gly Ala Gly Cys Cys Cys Thr Gly Cys Ala Gly
515 520 525

Thr Thr Cys Gly Cys Cys Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Cys Cys Gly
530 535 540
Gly Cys Ala Thr Gly Gly Thr Cys Cys Cys Cys Gly Thr Gly Cys Ala
545 550 555 560
Cys Gly Thr Gly Cys Gly Cys Ala Ala Gly Gly Ala Gly Ala Thr Cys
565 570 575
Cys Cys Gly Gly Gly Cys Thr Ala Cys Thr Thr Cys Cys Thr Cys Ala
580 585 590
Ala Cys Thr Cys Cys Cys Thr Gly Cys Thr Cys Ala Thr Cys Cys Cys

595 600 605
Gly Thr Gly Gly Cys Thr Gly Cys Ala Gly Gly Cys Cys Gly Gly Cys
610 615 620
Thr Cys Cys Ala Ala Gly Cys Thr Gly Thr Ala Cys Ala Thr Gly Cys
625 630 635 640
Ala Cys Gly Gly Ala Gly Thr Gly Gly Gly Cys Ala Ala Cys Cys Cys
645 650 655
Gly Gly Cys Gly Gly Ala Cys Ala Thr Cys Gly Ala Cys Cys Gly Cys
660 665 670

Ala Cys Cys Thr Gly Gly Cys Gly Cys Gly Thr Gly Gly Cys Cys Ala
675 680 685
Cys Cys Gly Gly Cys Ala Ala Cys Gly Ala Gly Cys Gly Cys Gly Gly
690 695 700
Cys Cys Cys Gly Thr Thr Cys Cys Ala Gly Ala Cys Cys Thr Ala Cys
705 710 715 720
Gly Ala Cys Ala Thr Cys Gly Thr Gly Gly Gly Cys Thr Thr Cys Cys
725 730 735

Ala Cys Gly Thr Gly Gly Cys Cys Gly Cys Cys Ala Ala Cys Gly Thr

740 745 750

Cys Thr Cys Cys Cys Gly Cys Ala Ala Cys Ala Cys Gly Gly Gly Cys

755 760 765

Gly Thr Cys Gly Ala Cys Thr Gly Gly Cys Ala Gly Cys Thr Cys Gly

770 775 780

Gly Cys Thr Thr Cys Gly Cys Thr Gly Ala Gly Cys Thr Gly Cys Thr

785 790 795 800

Cys Gly Ala Gly Ala Ala Gly Ala Gly Cys Ala Thr Cys Gly Cys Cys

805 810 815

Gly Ala Gly Gly Gly Cys Cys Ala Cys Ala Gly Cys Gly Gly Cys Gly

820 825 830

Thr Gly Gly Cys Thr Gly Ala Cys Gly Gly Cys Cys Ala Gly Gly Gly

835 840 845

Cys Thr Thr Cys Thr Ala Cys Cys Gly Cys Thr Ala Cys Gly Gly Gly

850 855 860

Cys Cys Gly Gly Ala Cys Gly Gly Gly Gly Ala Gly Ala Ala Cys Cys

865 870 875 880

Thr Cys Gly Gly Cys Cys Cys Gly Gly Thr Gly Gly Ala Gly Gly Ala

885 890 895

Cys Thr Gly Gly Ala Ala Cys Cys Thr Gly Gly Gly Cys Gly Ala Cys

900 905 910

Ala Ala Gly Gly Ala Cys Ala Cys Cys Cys Cys Gly Cys Thr Cys Gly

915 920 925

Gly Cys Thr Gly Ala

930

<210> 2

<211> 933

<212> DNA

<213> ADH sequence coding Alcohol dehydrogenase from Micrococcus luteus NCTC2665

<400> 2

atgtccgagt tcacccgttt cgagcaggtc gccgtgctgg gcaccggcgt gctgggttcg 60

cagatcatca tgcaggcggc gtaccacggc aagaaggtga tggcctacga cgccgtcccc 120

gccgccctcg aggggatcga gcgccgctgg gcgtggatcc gccaaggcta cgaagcagac 180

ctcggggagg gctacgaccc gcagcgcttc gacgaggcca tcgcccgcat cacgccgacc 240

tccgacctcg gcgaggccct ggcggatgcg gacatcgtga tcgaggccgt cccggagaac 300

ctggagctca agcgcaaggt gtgggcccag gtgggcgagc tcgcccccgc cacgaccctg 360

ttcgccacga acacctcctc cctgctgccc tcggacttcg ccgacgccag cggccatccg 420

gagcgcttcc tggccctgca ctacgccaac cgcatctggg cgcagaacac cgccgaggtc 480

atgggcaccg ccgccacctc gccggaggcc gtcgcgggag ccctgcagtt cgccgaggag 540

accggcatgg tccccgtgca cgtgcgcaag gagatcccgg gctacttcct caactccctg 600

ctcatcccgt ggctgcaggc cggctccaag ctgtacatgc acggagtggg caacccggcg 660

gacatcgacc gcacctggcg cgtggccacc ggcaacgagc gcggcccgtt ccagacctac 720

gacatcgtgg gcttccacgt ggccgccaac gtctcccgca acacgggcgt cgactggcag 780

ctcggcttcg ctgagctgct cgagaagagc atcgccgagg gccacagcgg cgtggctgac 840

ggccagggct tctaccgcta cgggccggac ggggagaacc tcggcccggt ggaggactgg 900

aacctgggcg acaaggacac cccgctcggc tga 933

<210> 3

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer for amplifying ADH gene

<400> 3

ggatccatgt ccgagttcac ccgtttcg 28

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer for amplifying ADH gene

<400> 4

catatgtcag ccgagcgggg tgtc 24