



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0099819
(43) 공개일자 2024년07월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/70 (2006.01) *C12P 13/00* (2006.01)

C12P 7/40 (2006.01) *C12R 1/19* (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 15/70 (2013.01)

C12P 13/001 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-0181671

(22) 출원일자 2022년12월22일

심사청구일자 2022년12월22일

(71) 출원인

인하대학교 산학협력단

인천광역시 미추홀구 인하로 100(용현동, 인하대학교)

(72) 발명자

김웅수

서울특별시 강남구 언주로30길 26, G동 5006호(도곡동, 타워팰리스)

김혜진

인천광역시 연수구 청량로 210, 103동 1604호(옥련동, 쌍용아파트)

최시선

인천광역시 중구 하늘별빛로 86, 923동 1302호(중산동, 인천 영종하늘도시 한라비발디아파트)

(74) 대리인

특허법인태백

전체 청구항 수 : 총 5 항

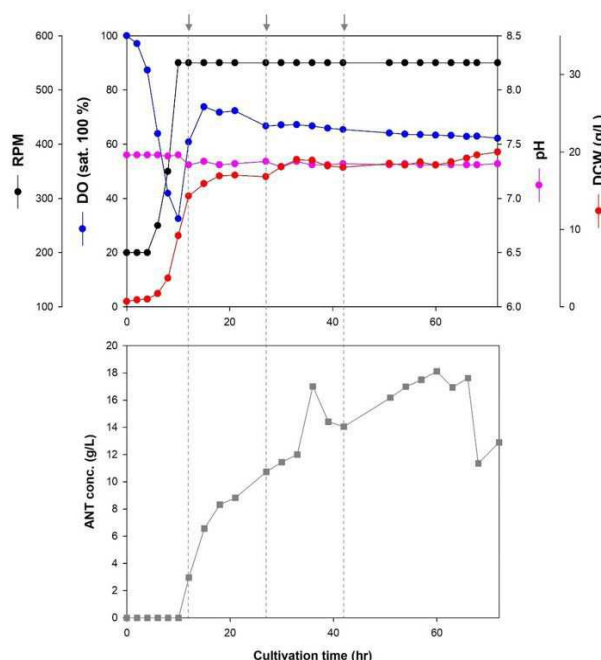
(54) 발명의 명칭 안트라닐레이트 고생산 재조합 대장균 균주 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 안트라닐레이트(anthranilate) 고생산 재조합 대장균 균주 및 이의 용도에 대한 것으로, 본 발명에서는 선행연구를 통해 기확보된 시키메이트(shikimate) 고생산 *E. coli* 재조합 균주를 기반으로, 제거된 두 개의 shikimate kinase 유전자 (*aroL* 및 *aroK*)를 보상하고 안트라닐레이트에 phosphoribosyl group을 전이하는 *trpD*

(뒷면에 계속)

대표도 - 도3



유전자를 제거함으로써 안트라닐레이트가 축적되도록 하였다. 또한 안트라닐레이트 생합성 과정에서 기질로 사용되는 chorismate의 대사경로를 억제함으로써 시키메이트의 과축적을 유도하였고, *trpR* 유전자의 제거 및 dehydroshikimate로부터 시키메이트로의 생전환에 관여하는 shikimate dehydrogenase (*aroE* gene)의 안정적인 발현, 그리고 transketolase의 과발현을 통해 시키메이트 경로 및 탄소 대사 경로 최적화를 시도하였다. 이렇게 구축된 안트라닐레이트 고생산 균주의 7 L 유가식 배양(fed-batch fermentation)을 통해 약 18.1 g/L의 안트라닐레이트가 생산되는 것을 확인할 수 있었으며, 이는 현재까지 보고된 미생물 기반의 안트라닐레이트 생산 수율 중 가장 높은 수치로 확인되었다. 본 발명을 통해 구축한 rational cell factory design 전략은 안트라닐레이트 뿐만 아니라 유용 시키메이트 경로 대사체들의 고생산 균주 개발을 위한 기반 기술로 활용될 수 있을 것으로 기대한다.

(52) CPC특허분류

C12P 7/40 (2022.01)

C12R 2001/19 (2021.05)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395074494
과제번호	PJ015639012022
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	바이오그린연계농생명혁신기술개발
연구과제명	유전체 재설계된 미생물 기반의 시킵산 경로 대사체 대량생산 및 실용화 기술
개발(1주관)	
기 여 율	1/1
과제수행기관명	인하대학교산학협력단
연구기간	2022.01.01 ~ 2022.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

시키페이트(shikimate) 고생산 균주에 *aroL* 및 *aroK* 유전자를 과발현시키고, *trpD*, *pheA*, *tyrA*, *pabA*, *entC* 및 *ubiC* 유전자를 결실시킨, 안트라닐레이트(anthranilate) 고생산 재조합 대장균 균주.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 시키페이트(shikimate) 고생산 균주는 *E. coli* AB2834 균주에 *aroB*, *aroD*, *aroF*, *aroG*, *galP*, *ppsA*, *aroE* 및 *tktA* 유전자를 과발현시키고, *tyrR*, *ptsG*, *pykA*, *aroL*, *aroK* 및 *shiA* 유전자를 결실시킨 것을 특징으로 하는 안트라닐레이트(anthranilate) 고생산 재조합 대장균 균주.

청구항 3

제1항에 따른 균주의 유전체(chromosome)에 *aroE* 유전자를 삽입하고, *trpR* 유전자를 결실시키고, *tktA* 유전자는 J23119 프로모터의 조절 하에서 과발현시키고, *aroL* 및 *aroK* 유전자는 종결코돈과 개시코돈이 결합된 형태로 치환시킨, 안트라닐레이트(anthranilate) 고생산 재조합 대장균 균주.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 재조합 대장균 균주는 수탁번호 KCTC19060P로 기탁된 균주인 것을 특징으로 하는 안트라닐레이트(anthranilate) 고생산 재조합 대장균 균주.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 재조합 대장균 균주를 배양하는 단계를 포함하는 안트라닐레이트(anthranilate) 생산 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 안트라닐레이트(anthranilate) 고생산 재조합 대장균 균주 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 시키페이트(shikimate) 생합성 경로는 박테리아, 곰팡이, 식물에서 다양한 aromatic molecule을 생산하기 위한 전구물질 생산에 기여한다. 식물에서는 시키페이트 경로를 통해 생산되는 L-phenylalanine (L-Phe), L-tyrosine (L-Tyr) 및 L-tryptophan (L-Trp)이 식물 성장에 중요한 다양한 이차 대사산물 생산을 위한 전구물질로 활용되나, 미생물에서는 단백질 생합성을 위한 building block으로 활용된다. 시키페이트 경로는 glycolytic 경로를 거쳐 생성된 phosphoenolpyruvate (PEP)와 pentose phosphate 경로를 거쳐 생성된 erythrose-4-phosphate (E4P)의 축합반응을 시작으로 순차적인 효소 반응을 거쳐 chorismate를 생합성한다. *E. coli* 내에서 chorismate는 다섯 가지의 효소반응에 의해 prephenate, anthranilate, aminodeoxychorismate, isochorismate 및 p-hydroxybenzoate로 생전환되고, 이들은 aromatic amino acid를 포함한 다양한 종류의 aromatic compound 생산에 활용된다(도 1).

[0003] 한편, 안트라닐레이트는 식재료, 염료, 향수, 작물 보호제, 약물, 플라스틱 생산을 위해 플랫폼 화합물로 사용되는 aromatic acid로 알려져 있다. 뿐만 아니라 안트라닐레이트가 광범위한 박테리아의 바이오필름 형성을 억제한다는 연구결과 역시 보고된 바 있어 안트라닐레이트의 산업적 활용도가 더욱 넓어질 전망이다. 현재 안트라닐레이트의 생산방법은 벤젠과 같은 석유 유래 전구물질을 이용한 화학합성을 기반으로 하며, 이는 에너지 집약적인 공정이며 독성 부산물이 생산된다는 한계점이 있다. 따라서, 환경친화적인 방법으로 재생가능한 자원으로부터 안트라닐레이트를 생산하고자 하는 시도가 이루어지고 있으며, 미생물을 기반으로 한 안트라닐레이트 생산이 대안으로 제시되고 있다.

[0004] 선행연구에 따르면, 재조합 *Escherichia coli* 균주의 유가식 배양(fed-batch fermentation)을 통해 최대 14 g/L의 안트라닐레이트 생산이 보고된 바 있으며, *Pseudomonas putida* 균주를 기반으로 각각 3.8 mM, 1.5 g/L (11.23 mM)의 안트라닐레이트 생산이 시도된 바 있다. 또한, anthranilic acid methyltransferase (AAMT1) 효소를 추가로 발현함으로써 안트라닐레이트로부터 메틸 안트라닐레이트를 생산하고자 한 선행연구에서 *E. coli* 기반으로는 2.3 g/L의 안트라닐레이트와 4.5 g/L의 메틸 안트라닐레이트가, *C. glutamicum* 기반으로는 7.9 g/L의 안트라닐레이트와 5.74 g/L의 메틸 안트라닐레이트가 생산되는 것이 보고된 바 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-2223521호 (2021.02.26. 등록)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 시키메이트(shikimate) 고생산 균주로부터 대사 경로 최적화를 통한 안트라닐레이트(anthranilate) 고생산 재조합 대장균 균주를 제공하는 데에 있다.

[0007] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 재조합 대장균 균주를 배양하는 단계를 포함하는 안트라닐레이트 생산 방법을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 시키메이트(shikimate) 고생산 균주에 *aroL* 및 *aroK* 유전자를 과발현시키고, *trpD*, *pheA*, *tyrA*, *pabA*, *entC* 및 *ubiC* 유전자를 결실시킨, 안트라닐레이트 고생산 재조합 대장균 균주를 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 안트라닐레이트 고생산 재조합 대장균 균주의 유전체(chromosome)에 *aroE* 유전자를 삽입하고, *trpR* 유전자를 결실시키고, *tktA* 유전자는 J23119 프로모터의 조절 하에서 과발현시키고, *aroL* 및 *aroK* 유전자는 종결코돈과 개시코돈이 결합된 형태로 치환시킨, 안트라닐레이트 고생산 재조합 대장균 균주를 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 재조합 대장균 균주를 배양하는 단계를 포함하는 안트라닐레이트 생산 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명은 안트라닐레이트(anthranilate) 고생산 재조합 대장균 균주 및 이의 용도에 대한 것으로, 본 발명에서는 선행연구를 통해 기 확보된 시키메이트(shikimate) 고생산 *E. coli* 재조합 균주를 기반으로, 제거된 두 개의 shikimate kinase 유전자 (*aroL* 및 *aroK*)를 보상하고 안트라닐레이트에 phosphoribosyl group을 전이하는 *trpD* 유전자를 제거함으로써 안트라닐레이트가 축적되도록 하였다. 또한 안트라닐레이트 생합성 과정에서 기질로 사용되는 chorismate의 대사경로를 억제함으로써 chorismate의 과축적을 유도하였고, *trpR* 유전자의 제거 및 dehydroshikimate로부터 시키메이트로의 생전환에 관여하는 shikimate dehydrogenase (*aroE* gene)의 안정적인 발현, 그리고 transketolase의 과발현을 통해 시키메이트 경로 및 탄소 대사 경로 최적화를 시도하였다. 이렇게 구축된 안트라닐레이트 고생산 균주의 7 L 유가식 배양(fed-batch fermentation)을 통해 약 18.1 g/L의 안트라닐레이트가 생산되는 것을 확인할 수 있었으며, 이는 현재까지 보고된 미생물 기반의 안트라닐레이트 생산 수율 중 가장 높은 수치로 확인되었다. 본 발명을 통해 구축한 rational cell factory design 전략은 안트라닐레이트 뿐만 아니라 유용 시키메이트 경로 대사체들의 고생산 균주 개발을 위한 기반 기술로 활용될 수 있을 것으로 기대한다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 대장균에서 안트라닐레이트 생산을 위한 경로 엔지니어링 모식도를 나타낸다. 빨간색 X 표는 파괴된 유전자를 나타내고, 굵은 파란색 화살표는 표적 유전자 과발현을 통해 향상된 단계를 나타낸다. 점선 화살표는 2

이상의 단계를 나타낸다. G6P; glucose-6-phosphate, F6P; fructose-6-phosphate, G3P; glyceraldehyde-3-phosphate, PEP; phosphoenolpyruvate, PYR; pyruvate, ACoA; acetyl-CoA, X5P; xylulose-5-phosphate, R5P; ribose-5-phosphate, S7P; sedoheptulose-7-phosphate, E4P; erythrose-4-phosphate, F6P; fructose-6-phosphate, DAHP; 3-deoxy-D-arabinoheptulosanate-7-phosphate.

도 2는 재조합 대장균 균주(Inha254 및 Inha256)에서 세포 성장 및 안트라닐레이트 생산 수율의 비교 결과를 나타낸다. (A) OD600에서 측정된 세포 성장, (B) 안트라닐레이트 생산 수율의 정량 분석.

도 3은 7L 바이오리액터에서 안트라닐레이트 생산을 위한 유가식 배양(Fed-batch fermentation) 결과를 나타낸다. RPM의 시간 경과, DO 농도, pH, DCW 및 안트라닐레이트 생산 수율을 각각 나타냈다. 공급은 15 hr에 0.1701 ml/min으로 시작하여 27 hr 및 42 hr에 각각 0.1323과 0.1701 ml/min으로 변경하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 본 발명은 시키메이트(shikimate) 고생산 균주에 *aroL* 및 *aroK* 유전자를 과발현시키고, *trpD*, *pheA*, *tyrA*, *pabA*, *entC* 및 *ubiC* 유전자를 결실시킨, 안트라닐레이트 고생산 재조합 대장균 균주를 제공한다.

[0014] 바람직하게는, 상기 시키메이트(shikimate) 고생산 균주는 *E. coli* AB2834 균주에 *aroB*, *aroD*, *aroF*, *aroG*, *galP*, *ppsA*, *aroE* 및 *tktA* 유전자를 과발현시키고, *tyrR*, *ptsG*, *pykA*, *aroL*, *aroK* 및 *shiA* 유전자를 결실시킨 균주일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0016] 본 발명은 상기 안트라닐레이트 고생산 재조합 대장균 균주의 유전체(chromosome)에 *aroE* 유전자를 삽입하고, *trpR* 유전자를 결실시키고, *tktA* 유전자는 J23119 프로모터의 조절 하에서 과발현시키고, *aroL* 및 *aroK* 유전자는 종결코돈과 개시코돈이 결합된 형태로 치환시킨, 안트라닐레이트 고생산 재조합 대장균 균주를 제공한다.

[0017] 바람직하게는, 상기 재조합 대장균 균주는 수탁번호 KCTC19060P로 기탁된 균주일 수 있으며, 수탁번호 KCTC19060P로 기탁된 균주는 본 명세서에서 Inha256 균주로 기재된 균주이다.

[0019] 또한, 본 발명은 상기 재조합 대장균 균주를 배양하는 단계를 포함하는 안트라닐레이트 생산 방법을 제공한다.

[0021] 이하에서는 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

<실험예>

[0024] 하기의 실험예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.

1. 박테리아 균주 및 배양조건

[0027] 대장균 *E. coli* DH5 α 를 재조합 플라스미드 제조를 위한 호스트로 사용하였으며, 대장균 *E. coli* AB2834를 안트라닐레이트 생산을 위한 호스트로 사용하였다. 재조합 플라스미드 제조를 위한 세포 증식, 접종 준비 및 결손 플라스미드 제조를 위하여 모든 대장균 균주들은 LB(Luria-Bertani) 액체 배지 또는 고체배지에서 성장시켰다. 상기 LB 배지는 1 L 기준 트립톤 10 g, 효모추출물 5 g, NaCl 5 g을 포함하며 필요에 따라 100 ug/mL의 암피실린 (ampicillin), 50 ug/mL의 스펙티노마이신 (spectinomycin) 혹은 카나마이신 (kanamycin)이 포함된 LB 배지에서 30 $^{\circ}$ C 혹은 37 $^{\circ}$ C에서 배양한 후 콜로니를 선택하였다. 본 실험에서 사용되거나 제조된 모든 균주들은 하기 표 1에 나열하였다.

표 1

미생물	관련 특성	Ref.
<i>E. coli</i> DH5 α		TaKaRa

<i>E. coli</i> Inha215	AB2834△ <i>tyrR</i> △ <i>ptsG</i> △ <i>pykA</i> △ <i>lacI</i> :: <i>Plac_aroB_aroD_Plac_aroG_aroF_Plac_ppsA_galP</i> △ <i>aroL</i> △ <i>aroK</i> △ <i>shiA</i> / <i>pPoppA-aroE-tktA</i>	Lee et al., 2021
<i>E. coli</i> Inha254	Inha215△ <i>aroL</i> :: <i>ParoL-ParoK-aroK</i> △ <i>trpD</i> △ <i>pheA</i> & <i>tyrA</i> △ <i>pabA</i> △ <i>ubiC</i> △ <i>entC</i>	This study
<i>E. coli</i> Inha256	Inha254△ <i>aroL</i> :: <i>PJ23119_aroL&aroK</i> △ <i>trpR</i> △ <i>aroE</i> _{AB2834} :: <i>PoppA_aroE</i> _{K-12} △ <i>tktA</i> :: <i>PJ23119_tktA</i>	This study

[0030] 안트라닐레이트 생산을 위한 Small-scale 배양과, 유가식(fed-batch) 발효는 선행 연구와 같이 수행되었다(J Ind Microbiol Biotechnol. 2021; 48(9-10), kuab043). 24-well 배양판에서 Small-scale 배양을 위해 단일 콜로니를 30 °C에서 15시간 동안 1.3 mL LB 배지에 접종하고 배양액 중 1 % (v/v) 접종하여 30 °C에서 15시간 동안 배양하였다. 1.3 mL 대장균 생산 배지(EPM)에 30 °C에서 4일간 2차 배양배지를 접종하였다. 미니어처 배양은 습도 80%와 200rpm으로 설정된 humid 챔버를 사용하여 수행하였다. 유가식(fed-batch) 발효를 위해 단일 콜로니를 5 mL LBG 배지에 30 °C, 200 rpm으로 12시간 동안 접종하였다. 동일 배지 20 mL에 1 % (v/v)를 30 °C에서 6시간 동안 접종하였다. 이어서 2차 배양액을 7 L 발효기에 1 % (v/v) 접종하였다. pH는 7.0에서 10 N NaOH 또는 3 M HCL로 조절하였으며, RPM, 통기 및 공급 속도를 조절하여 DO 수준을 30% 이상으로 유지하였다.

[0032] 2. 제조합 플라스미드 구축

[0033] 플라스미드 pCas9(구입처: Addgene)과 pTargetF(구입처: Addgene)를 유전자 결손을 위한 CRISPR/Cas9 시스템으로 사용하였다. 플라스미드 pTargetF는 타겟 유전자의 결손(deletion)을 위한 벡터로 사용하였으며, 제한효소 SpeI & HindIII로 절단하여 제조합 하였다. 타겟 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 20 개의 염기서열 (N20)이 포함된 single-guide RNA (sgRNA)를 증폭한 단편과 결손하고자 하는 유전자의 위쪽 유전자 단편인 up region(up stream, left region, forward region) 및 유전자 아래쪽 단편인 down region(down stream, right region)을 플라스미드 pTargetF에 제조합 하였다. 제조된 플라스미드는 제한효소분석 및 시퀀싱에 의해 확인하였다. 본 발명에서 사용되거나 제조된 모든 플라스미드 및 프라이머들은 하기 표 2 및 3에 나열하였다.

[0034] 본 실험에서 표준 프로토콜이 플라스미드 추출, DNA 정제를 위해 사용되었다. TransStart®DNA 중합효소(TransGen Biotech Co., LTD, China)와 SapphireAmp®Master Mix(TaKaRa, Japan)가 제조합 플라스미드 제조를 위한 단편 증폭 및 콜로니 선별을 위한 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)에 사용되었으며, In-Fusion® HD Cloning Kit(TaKaRa, Japan)는 플라스미드 pTargetF에 단편들을 제조합하기 위한 Gibson 어셈블리(Gibson assembly) 반응을 위해 사용되었다.

표 2

플라스미드(벡터)	관련 특성	Ref.
pCas	<i>repA101</i> (Ts) <i>kan Pcas-cas9 ParaB-Red lacIq</i> <i>Ptrc-sgRNA-pMB1</i>	Addgene (Jiang et al., 2015)
pTargetF	<i>pMB1 aadA sgRNA-cadA</i>	Addgene (Jiang et al., 2015)
pTarget- <i>ParoL-ParoK</i>	sgRNA, <i>aroL</i> UP & DOWN, 자체 프로모터를 포함한 <i>aroL</i> 및 <i>aroK</i> 함유 pTargetF	This study
pTarget- <i>PJ23119_aroL-aroK</i>	sgRNA, <i>aroL</i> UP & DOWN, <i>J23119</i> 프로모터 및 결합된 <i>aroL</i> 과 <i>aroK</i> 함유 pTargetF	This study
pTarget- <i>trpR</i>	sgRNA, <i>trpR</i> UP & DOWN 함유 pTargetF	This study
pTarget- <i>PoppA_aroE</i>	sgRNA, <i>aroE</i> UP & DOWN, <i>oppA</i> 프로모터 및 야생형 <i>aroE</i> 함유 pTargetF	This study
pTarget- <i>PJ23119_tktA</i>	sgRNA, <i>tktA</i> UP & <i>tktA</i> 일부 및 <i>J23119</i> 프로모터 함유 pTargetF	This study
pTarget- <i>trpD</i>	sgRNA, <i>trpD</i> UP & DOWN 함유 pTargetF	This study
pTarget- <i>pheA-tyrA</i>	sgRNA, <i>pheA</i> UP & <i>tyrA</i> DOWN 함유 pTargetF	This study
pTarget- <i>pabA</i>	sgRNA, <i>pabA</i> UP & DOWN 함유 pTargetF	This study

pTarget- <i>entC</i>	sgRNA, <i>entC</i> UP & DOWN 함유 pTargetF	This study
pTarget- <i>ubiC</i>	sgRNA, <i>ubiC</i> UP & DOWN 함유 pTargetF	This study

표 3

[0037]

용도	서열 (5'→3')
<i>aroL</i> 및 <i>aroK</i> 보 상	sgRNA 증폭 5'-agt cct aggt ata ata act agt gct ta acc gtg a acc cag ccg ttt tag agct aga aat ag caa g-3'
	5'-aag ctt ctg cag gt c gact-3'
	<i>aroL</i> Upstream & <i>aroL</i> 증폭 5'-gac ctg cag aag ct t gac gcg t g t c c a a t g t a a t-3'
	5'-cg ctt t t t a c g g c t g t t c a a c a a t t g a t c g t c t g t g c c-3'
	<i>aroK</i> 증폭 5'-ac ag c c g t a a a a g c g g t a a t g-3'
	5'-t t a g t t g c t t t c c a g c a t g t g-3'
<i>trpD</i> 결 손	Downstream 증폭 5'-ct g g a a g c a a c t a a c g t g a a a t a a g g a a g a a c g a t g-3'
	5'-c a g g g t a a t a g a t c t a a g c t t g t t c a t c c a c t t a c t t t t-3'
	sgRNA 증폭 5'-gt c c t a g g t a t a a t a g a a t t c t g t c a g g c c a a a g t c t t c t g g t t t t a g a g c t a g a a a t a g c a a-3'
	5'-a a g c t t c t g c a g g t c g a c t-3'
	<i>trpD</i> Upstream 증폭 5'-a g g g t a a t a g a t c t a a a g c t t c t c c a c g g t a a a g c c t c c-3'
	5'-a a c g g t t t g c a t c a t t t a c a g a a t c g g t t g c a g c g-3'
<i>pheA</i> 및 <i>tyrA</i> 결 손	<i>trpD</i> Downstream 증폭 5'-a t g a t g c a a a c c g t t t t a g c-3'
	5'-g a g t c g a c c t g c a g a a a g c t t t g a c g a t g g g g a g g a a t t a-3'
	sgRNA 증폭 5'-a g t c c t a g g t a t a a t a c t a g t t c c g c a c c t g a t a a c c c a g g t t t t a g a g c t a g a a a t a g c-3'
	5'-a a g c t t c t g c a g g t c g a c t-3'
	<i>pheA</i> Upstream 증폭 5'-a g a g t c g a c c t g c a g a a g c t t a a c a t g t c g c a g a c c g t c t-3'
	5'-g a t t t g g g a g g c c t t a t t g t t c-3'
<i>pabA</i> 결 손	<i>tyrA</i> Downstream 증폭 5'-a a g g c c t c c c a a t c a a t a a c c t c t t a a g c c a c g c g-3'
	5'-c a g g g t a a t a g a t c t a a g c t t g c a a c a g c a a t t a a c g c t a t g c-3'
	sgRNA 증폭 5'-a g t c c t a g g t a t a a t a c t a g t c a g c g a a t g g t a g c g t g t c a g t t t t a g a g c t a g a a a t a g c-3'
	5'-a a g c t t c t g c a g g t c g a c t-3'
	<i>pabA</i> Upstream 증폭 5'-a g a g t c g a c c t g c a g a a g c t t a t t t g c g a a c t a t c c a t c g c c-3'
	5'-a a t g g c a a t c a g a a a t t a c t c a g a t t c c c c g g c t t-3'
<i>entC</i> 결 손	<i>pabA</i> Downstream 증폭 5'-t t t c t g a t t g c a t t t a g t g a t t t t t a-3'
	5'-c a g g g t a a t a g a t c t a a g c t t t a a c a g c g a g c g a c c a t g a-3'
	sgRNA 증폭 5'-a g t c c t a g g t a t a a t a c t a g t t g a g g a a g t a c a g c a g a c c a g t t t t a g a g c t a g a a a t a g c-3'
	5'-a a g c t t c t g c a g g t c g a c t-3'
	<i>entC</i> Upstream 증폭 5'-a g a g t c g a c c t g c a g a a g c t t c a c g g c t g t c a g t a a t c t g a-3'
	5'-g a a t g c t c a t c c t c g c c t c c a c a a a a t g a t a a a g g c t t-3'
<i>ubiC</i> 결 손	<i>entC</i> Downstream 증폭 5'-c g a g g a t g a g c a t t c c a t t c-3'
	5'-c a g g g t a a t a g a t c t a a g c t t g a a t g g a g g a a t g t t c t g t g a c-3'
	sgRNA 증폭 5'-a g t c c t a g g t a t a a t a c t a g t g c g t g a c g a t g a t c c g c g a a g t t t t a g a g c t a g a a a t a g c-3'
	5'-a a g c t t c t g c a g g t c g a c t-3'
	<i>ubiC</i> Upstream 증폭 5'-a g a g t c g a c c t g c a g a a g c t t c a g c g c t t a c a t g a t a t g t t g a a-3'
	5'-c a t g c c g a a c t c t c c g t t a c-3'
<i>ubiC</i> 결 손	<i>ubiC</i> Downstream 증폭 5'-g a g t g g a g t c t g a c g c a g a a-3'
	5'-c a g g g t a a t a g a t c t a a g c t t a g c c a t t g g a a t c g a c c a g c-3'

<i>trpR</i> 결손	sgRNA 증폭	5'-gtcctaggtataataactagtgatggcagaacacgcgtcaccgttttagagctagaaatagc-3'
		5'-aagcttctgcaggtcgact-3'
	<i>trpR</i> Upstream 증폭	5'-gagtcgacctgcagaagctttacaccagcggaaggagat-3'
		5'-tcagtaacgacgtccccatt-3'
	<i>trpR</i> Downstream 증폭	5'-ggacgtcgttactgattttgtaggcctgataagacgt-3'
		5'-agggtaatagatctaagcttacgaaatcgggtagccaatg-3'
<i>aroE</i> 치환	sgRNA 증폭	5'-agtctaggtataataactagtcaggggtaacataatgaatcgtttttagagctagaaatagc-3'
		5'-aagcttctgcaggtcgact-3'
	<i>aroE</i> Upstream 증폭	5'-agagtcgacctgcagaagcttagtgatgacgactgttgagat-3'
		5'-ctgtcgagacacattttaccctgtcgaaacag-3'
	<i>oppA</i> promoter 증폭	5'-aatgtgtctcgacaggggag-3'
		5'-agcataggtttccattgttttttgactccctca-3'
	야생형 <i>aroE</i> 증폭	5'-atggaacctatgctgtttttgg-3'
<i>tktA</i> 프로모터 치환	sgRNA 증폭	5'-gtcctaggtataataactagtaggacattttgactccagatgttttagagctagaaatagc-3'
		5'-aagcttctgcaggtcgact-3'
	<i>tktA</i> Upstream 증폭	5'-gagtcgacctgcagaagcttcttagcgcatgtggcaatagt
		5'-tgagctagctgtcaaccttaacgacttgacgacag-3'
	<i>J23119</i> 프로모터 및 <i>tktA</i> 증폭	5'- ttgacagctagctcagtcctaggtataatgctagcaaaggagagaaatactagatgtcctcacgtaagagctt- 3' 5'-agggtaatagatctaagcttaacttcgtgggagatgcctt-3'
결합된 <i>aroL</i> 과 <i>aroK</i> 보상	sgRNA 증폭	5'-gtcctaggtataataactagtggtgtattgacgtgaaatagtttagagctagaaatagcaag-3'
		5'-aagcttctgcaggtcgact-3'
	<i>aroL</i> Upstream 증폭	5'-gacctgcagaagcttgacgcgtgtccaatgtaat-3'
		5'-ggactgagctagctgtcaatcaatacacccttactatacc-3'
	<i>J23119</i> 프로모터 및 <i>aroL</i> 증폭	5'- ttgacagctagctcagtcctaggtataatgctagcaaaggagagaaatactagatgacacaacctcttttctgat c-3' 5'-gcgtttctctgccatcaacaattgatcgctctgtgcc-3'
		5'-atggcagagaaacgcaatatctt-3'
	<i>aroK</i> 증폭	5'-ttagtgtcttccagcatgtg-3'
		5'-ctggaagcaactaacgtgaaataaggaagaacgatg-3'
	<i>aroL</i> Downstream 증폭	5'-cagggtaatagatctaagcttgttcatccaccttactttt-3'

- [0039] 상기 실험에서 상기 수용 균주에 pTargetF 벡터를 삽입하여 타겟 유전자를 결손 혹은 보상시키는 방법은 하기와 같다.
- [0040] -결손 벡터(플라스미드) 제작단계: 결손하고자 하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 20개의 염기서열이 포함된 sgRNA 단편, up region, down region을 pTargetF에 재조합하고, 상기 유전자를 플라스미드 추출 방법을 이용하여 3차 증류수에 녹인 순수한 DNA로 준비한다.
- [0041] -보상 벡터(플라스미드) 제작단계: 결손하고자 하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 20개의 염기서열이 포함된 sgRNA 단편, up region, down region 및 삽입하고자 하는 유전자 단편을 pTargetF에 재조합하고, 상기 유전자를 플라스미드 추출 방법을 이용하여 3차 증류수에 녹인 순수한 DNA로 준비한다.
- [0042] -형질전환 단계: 준비한 결손 및 보상 벡터를 원하는 균주에 도입하기 위해 10 mM arabinose가 포함된 LB 배지에서 OD₆₀₀ 0.6에서 0.8 사이로 성장한 균주를 취하여 10 % 글리세롤을 이용하여 세포를 세척한다. 10 % 글리세롤에 현탁한 세포 50 μL에 준비한 벡터 2 μL를 섞어서 2 mm 간격의 큐벳(cuvette)과 BioRad Micro Pulsar를 이용해 전기천공법을 수행한다. 상기 세포에 LB 배지를 1 mL 첨가한 후 30 °C에서 한 시간 배양하고, 이를 적절

한 항생제가 포함된 LB 고체배지에 도말한 후 24 시간 배양한 후 형질전환체를 선별한다. 형질전환체는 콜로니 PCR 및 시퀀싱을 통해 확인한다.

[0043] -벡터 제거단계: 형질전환체로부터 pTargetF 벡터를 제거하기 위해 카나마이신(kanamycin)과 0.5 mM의 isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside(IPTG)가 포함된 3 mL의 LB 배지에서 8 혹은 16 시간 배양한다. 배양액은 적절하게 희석하여 카나마이신이 포함된 LB 고체배지에 도말하고 스펙티노마이신(spectinomycin) 민감성 콜로니를 선별한다. 이후 상기 세포를 pCas 벡터 제거를 위해 37 °C에서 16 혹은 24 시간 배양한다.

[0045] 3. 소량 배양(miniature culture) 조건

[0046] 재조합 균주들을 적절한 항생제들이 포함된 LB 고체 배지에 도말한 후 37 °C에서 배양하였다. 1차 성장 배양은 단일 콜로니를 1.3 mL의 LB 배지를 포함한 24-well 배양판에서 30 °C에서 200 rpm으로 15 시간 동안 배양함으로써 이루어졌다. 2차 성장 배양은 1.3 μ L의 1차 성장 배양액을 1.3 mL의 LB 배지를 포함한 24-well 배양판에서 30 °C에서 200 rpm으로 6 시간 동안 배양함으로써 이루어졌다. 이후 본배양은 1.3 mL의 대장균 생산배지를 포함한 24-well 배양판에서 30 °C에서 200 rpm으로 3 일 동안 배양함으로써 이루어졌다. 소량 배양은 80 % 습도로 설정된 항온항습기를 이용하여 수행하였다.

[0048] 4. 유가식 배양(fed-batch fermentation) 조건

[0049] 1차 성장 배양을 위해 적절한 항생제가 포함된 LB 고체 배지에 도말하여 배양한 재조합 균주의 단일 콜로니를 5 mL LB 배지에 접종하여 30 °C, 200 rpm으로 회전진탕기에서 15 시간 배양하였다. 상기 1차 성장배양액 1 %를 50 mL의 LB 배지가 포함된 250 mL 플라스크에 접종하고 30 °C, 200 rpm에서 6 시간 진탕배양시켜 2차 성장배양을 실시하였다. 안트라닐산 생산을 위한 5 L 발효기에서의 본배양을 위해 생산배지 2 L를 준비하여 발효기에 첨가하고 상기 2차 성장 배양액을 1 % 접종하여 250~550 rpm, 1 vvm, 30 °C, pH 7.0에서 재조합 대장균을 배양하여 안트라닐산을 생산하였다. 초기 생산배지에 첨가된 글루코스의 농도가 5 g/L 이하로 떨어지는 시점에서 피딩(feeding) 배지를 유입 펌프를 이용하여 지속적으로 공급하였다.

[0051] 5. 안트라닐산 정량 분석

[0052] 재조합 대장균을 배양한 후 배양액을 15,000 rpm에서 10 분간 원심분리 한 후 상등액을 0.22 μ m syringe-filter(Rainbow PVDF membrane filter)를 사용하여 여과하였다. 안트라닐산의 농도는 Zorbax SB-Aq 컬럼(4.6 x 250 mm, Agilent, USA)을 사용하여 HPLC로 측정하였다. 이동상은 0.1%의 trifluoroacetic acid (TFA)가 포함된 40% MeOH을 사용하였으며 0.5 ml/min의 유량으로 등용매 용출방식을 사용하였다. 안트라닐산은 330nm에서 검출하였다.

[0054] 6. 안트라닐레이트 및 시키메이트 경로 대사물 분석

[0055] 배양액을 15,000 RPM에서 5분간 원심분리한 후 상등액은 0.22 μ m syringe-filter(Rainbow PVDF membrane filter)를 사용하여 여과하고 -20 °C에서 저장하였다. 안트라닐레이트 및 시키메이트 경로 대사물의 농도는 Zorbax SB-Aq 컬럼(4.6 x 250 mm, 미국 Agilent)을 사용하여 HPLC로 측정하였다. 이동상은 30% MeOH에서 trifluoroacetic acid (TFA) 0.1%, 유량은 0.5ml/min이었다. 안트라닐레이트 및 시키메이트 경로 대사물은 각각 330nm와 214nm에서 검출되었다.

[0057] <실시예 1> 안트라닐레이트 생산 균주 개발

[0058] 본 발명에서 사용한 시키메이트(shikimate) 고생산 균주 (Inha215 균주)는 시키메이트 생합성에 부정적인 영향을 끼치는 *tyrR*, *ptsG*, *pykA* 유전자가 제거되고 시키메이트 생합성 유전자들인 *aroB*, *aroD*, *aroF*, *aroG*가 과발현되었다. 또한 glucose uptake를 최대화하고 시키메이트 경로의 시작 물질 중 하나인 phosphoenolpyruvate (PEP)의 고생산을 위해 *galP*, *ppsA* 유전자가 각각 과발현되었고, 시키메이트의 수송(transport)에 관여하는 *shiA* 유전자, 시키메이트로부터 shikimate-3-phosphate로의 생전환에 관여하는 *aroL*, *aroK* 유전자를 제거함으로써

써 시키메이트가 과축적 되도록 설계되었다. 뿐만 아니라 Inha215 균주는 chromosome 상에서 shikimate dehydrogenase (encoded by *aroE* gene)가 비활성화 되어 있는 상태이므로 high-copy plasmid 기반으로 야생형 (wild-type)의 functional AroE와 transketolase (TktA)가 과발현되도록 함으로써 시키메이트 경로가 원활히 작동하도록 하였다(J Ind Microbiol Biotechnol. 2021; 48(9-10), kuab043)(표 1). 따라서 안트라닐레이트 축적 균주를 구축하기 위해, 제일 먼저 시키메이트 고생산 균주 (Inha215)에 두 개의 shikimate kinase 유전자 (*aroL* 및 *aroK*)를 보상함으로써 시키메이트 경로를 활성화시키고자 하였다.

[0059] 안트라닐레이트는 시키메이트 경로를 거쳐 생산된 chorismate가 anthranilate synthase에 의해 생전환되어 생성 되는 물질로, 이 단계에서 2 개의 TrpE와 2 개의 TrpG가 heterotetrameric complex를 이루어 anthranilate synthase로 작용하며 이후 TrpD에 의해 안트라닐레이트에 phosphoribosyl group이 transfer되어 L-tryptophan 생합성 경로의 전구물질인 N-phosphoribosylanthranilate로 전환된다. 따라서 anthranilate phosphoribosyltransferase인 TrpD를 제거함으로써 안트라닐레이트가 대사되지 않고 축적되도록 하였다.

[0060] 또한, 안트라닐레이트의 고생산을 위해서는 전구물질인 chorismate가 과축적 되어야한다. *E. coli* 내에서 chorismate는 prephenate (phenylalanine, tyrosine biosynthesis), anthranilate (tryptophan biosynthesis), p-aminobenzoate (folic acid biosynthesis), isochorismate (menaquinone and enterobactin biosynthesis), p-hydroxybenzoate (ubiquinone biosynthesis)로 대사되는 branching point 물질이며, *E. coli* 내에서 각각의 과정에 관여하는 효소는 bifunctional chorismate mutase/prephenate dehydratase (encoded by *pheA* and *tyrA*), anthranilate synthase (encoded by *trpEG*), p-aminobenzoate synthase (encoded by *pabAB*), isochorismate synthase (encoded by *menF* and *entC*), chorismate lyase (encoded by *ubiC*)로 밝혀져 있다. 따라서 안트라닐레이트 생합성 경로를 제외한 chorismate 대사경로를 제거함으로써 안트라닐레이트의 전구물질인 chorismate가 축적되도록 하였다. 두 개의 shikimate kinase 유전자가 보상되고 anthranilate phosphoribosyltransferase 유전자가 제거된 Inha215 균주를 기반으로 *pheA&tyrA*, *pabA*, *entC*, *ubiC* 유전자가 모두 제거된 Inha254 균주를 개발하였으며, Inha254 균주에서 약 18.7 mg/L의 anthranilate가 생산되는 것을 확인할 수 있었다(도 2). 따라서 Inha254 균주를 향후 안트라닐레이트 고생산 균주 개발을 위한 기본 균주로 활용하였다.

[0062] <실시예 2> 안트라닐레이트 생산 향상을 위한 시키메이트 경로 유전자들의 재설계

[0063] 표적 대사물의 생산성 증대를 위해 전구체 합성의 최적화는 중요한 전략이 될 수 있으며, 본 발명에서는 chorismate 대사경로가 차단된 Inha254 균주를 기반으로 하여 추가적인 안트라닐레이트 고생산을 위한 전구체 합성 최적화를 진행하였다.

[0064] 선행연구 결과를 토대로 *E. coli* 시키메이트 경로의 transcription regulator로 작용하는 TrpR을 제거함으로써 시키메이트 경로의 발현을 강화하고자 하였으며, 또한, 현재까지 개발된 안트라닐레이트 생산 균주들은 shikimate dehydrogenase인 AroE가 비활성화 되어 있어 플라스미드 형태로 AroE의 발현을 시도하였으나, 보다 안정적인 시키메이트의 생산을 위해 strong promoter인 oppA promoter 조절 하에 functional AroE를 chromosome에 도입, 발현을 시도하였다. 다른 선행 연구들과 유사하게 시키메이트 경로의 필수적인 전구체 중 하나인 erythrose-4-phosphate (E4P) pool을 증대시키고자 pentose phosphate (PP) pathway에 관여하는 transketolase (encoded by *tktA* gene)를 strong promoter인 J23119 promoter 조절 하에 과발현을 시도하였다. 뿐만 아니라 shikimate kinase인 AroL와 AroK의 발현을 최적화하기 위해 보상된 두 유전자를 종결코돈과 개시코돈이 결합된 형태의 coupled AroL 및 AroK로 치환하였고 이를 strong promoter인 J23119 promoter의 조절 하에 발현되도록 하여 시키메이트의 대사를 극대화하고자 하였다. 이렇게 4 종의 유전자 (*trpR*, *aroE*, *tktA* 및 *aroL&aroK* genes)가 최적화된 균주를 Inha256으로 명명하였고, 해당 균주에서 56.8 mg/L의 안트라닐레이트가 생산되는 것을 확인하였다(도 2).

[0066] <실시예 3> 유가식 배양(Fed-batch fermentation)

[0067] Inha256 균주의 7-L fed-batch fermentation을 수행하였고, 세포 성장의 경우 배양 8 시간 이후 급격히 증가하다 배양 18 시간 이후 stationary phase에 도달한 것으로 보였다(도 3). 이후 feeding rate를 낮춘 배양 27 시간 이후 세포 성장이 약간 증가하였으나, 배양이 종료되는 72 시간까지 일정한 세포 성장을 보였다. Inha256 균주에서의 안트라닐레이트의 생산량은 배양 10 시간 이후부터 점차 증가하여 배양 60 시간 후에는 안트라닐레이

트의 생산성이 최대로 증가하여 약 18.1 g/L의 가 생산되는 것을 확인할 수 있었으며, 이는 현재까지 보고된 재조합 *E. coli* 뿐만 아니라 다른 미생물로부터 생산된 안트라닐레이트의 수율 중 가장 높은 수치로 확인된다(도 3).

[0069]

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

수탁번호

[0071]

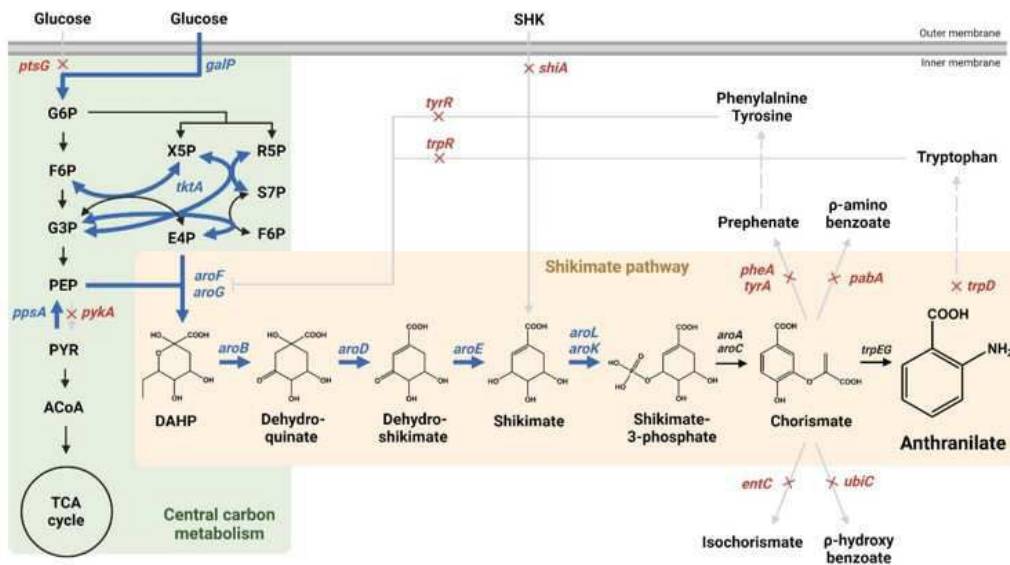
기탁기관명 : 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)

수탁번호 : KCTC19060P

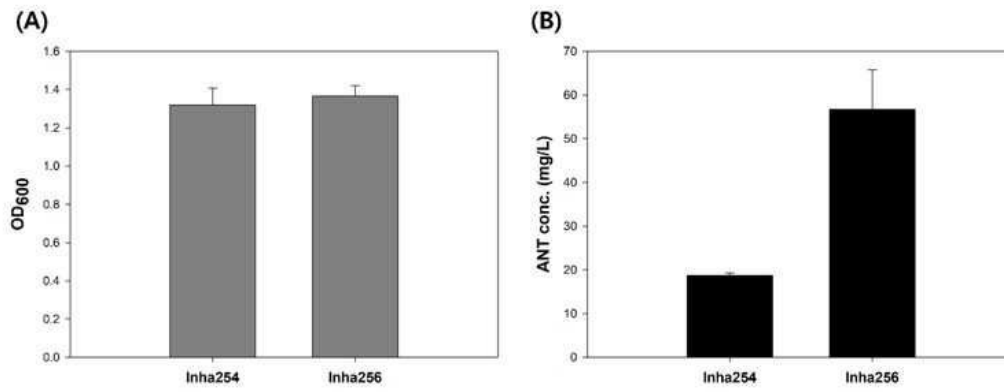
수탁일자 : 20221207

도면

도면1



도면2



도면3

