



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0142518
(43) 공개일자 2014년12월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/21 (2006.01) C12N 15/11 (2006.01)
C12N 15/74 (2006.01) C12P 7/16 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0064033
(22) 출원일자 2013년06월04일
심사청구일자 2013년06월04일

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
이진원
서울 송파구 양재대로 1218, 201동 1601호 (방이동, 올림픽선수,기자촌아파트)
이수진
서울 마포구 백범로25길 63, 105동 1504호 (염리동, 염리삼성래미안)
김보림
서울 금천구 금하로23라길 31, 507호 (시흥동, 현대아파트)
(74) 대리인
양부현

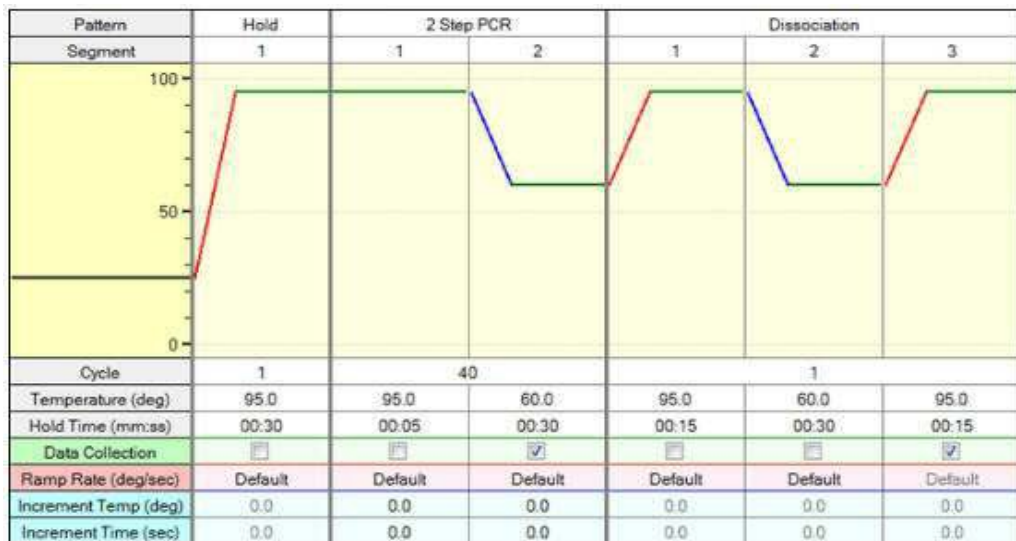
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 (a) *wabG* 유전자가 불활성화 되어 있고 (b) *budR* 유전자가 과발현된 2,3-부탄다이올 생산용 재조합 균주

(57) 요약

본 발명은 (a) *wabG* 유전자가 불활성화(inactivation) 되어 있고; (b) *budR* 유전자가 과발현된 2,3-부탄다이올 생산용 크렙시엘라(*Klebsiella*) 재조합 균주에 관한 것으로, 본 발명의 2,3-부탄다이올 생산용 크렙시엘라(*Klebsiella*) 중 재조합 균주는 비병원성으로 안전하게 2,3-부탄다이올을 생성할 수 있으며, 증가된 2,3-부탄다이올 생성능을 갖는 재조합 균주를 제공한다.

대표도 - 도3



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 10035578

부처명 지식경제부

연구관리전문기관 한국산업기술평가관리원

연구사업명 산업기술개발사업

연구과제명 2,3-부탄타이올 생산용균주 발굴 및 대사회로 최적화 기술개발

기 여 율 1/1

주관기관 서강대학교 산학협력단

연구기간 2010.04.01 ~ 2015.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

(a) *wabG* 유전자가 불활성화(inactivation) 되어 있고; (b) *budR* 유전자가 과발현된 2,3-부탄다이올 생산용 크렙시엘라(*Klebsiella*) 종 재조합 균주.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 불활성화는 *wabG* 유전자를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열에서 결실, 치환 또는 부가 변이가 발생된 것을 특징으로 하는 2,3-부탄다이올 생산용 재조합 균주.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 크렙시엘라 종은 크렙시엘라 뉴모니에(*Klebsiella pneumoniae*), 크렙시엘라 옥시토카(*Klebsiella oxytoca*), 크렙시엘라 그라눌로마티스(*Klebsiella granulomatis*) 또는 크렙시엘라 테리제나(*Klebsiella terrigena*)인 것을 특징으로 하는 재조합 균주.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 *budR* 유전자는 서열목록 제2서열의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 균주.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 재조합 균주는 최소배지에서 성장하는 것을 특징으로 하는 재조합 균주.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 재조합 균주는 *wabG* 유전자 및 *budR* 유전자가 불활성화(inactivation)된 균주와 비교하여 2,3-부탄다이올 생산이 3.5-4.0배 증가한 것을 특징으로 하는 재조합 균주.

청구항 7

상기 제 1 항 및 제 6 항 중 어느 한 항의 재조합 균주를 배양 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 2,3-부탄다이올 제조 방법.

청구항 8

제 7 항에 있어서, 상기 배양 배지는 최소배지인 것을 특징으로 하는 2,3-부탄다이올 제조 방법.

청구항 9

상기 제 7 항 또는 제 8 항의 2,3-부탄다이올 제조 방법에 의해 제조된 2,3-부탄다이올.

명세서

기술 분야

- [0001] 본 발명은 (a) *wabG* 유전자가 불활성화 되어 있고 (b) *budR* 유전자가 과발현된 2,3-부탄다이올 생산용 재조합 균주에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 일반적으로 미생물은 발효성 성장 동안 혼합된 산(acid) 생산물을 동반하고, 배양 조건 산성화에 대한 대응 시스템(counteracting system)을 갖는다. 배양배지의 산성화에 대한 가장 잘 알려진 대응 시스템은 대장균의 FHL(Formate Hydrogen Lyase) 시스템의 유도이다. 그러나, 2,3-부탄다이올(2,3-butanediol, 2,3-BDO)을 생산하는 미생물은 배양 환경의 산성화를 조절하기 위해 새로운 시스템을 갖는다. 알려진 바와 같이, 2,3-부탄다이올을 생산하는 미생물인 크렙시엘라(*Klebsiella*) 종, 엔테로박터(*Enterobacter*) 종, 락토바실러스(*Lactobacillus*) 종은 피루브산 흐름을 조절하기 위해 락테이트, 아세트산 또는 포름산과 같은 산성물질보다 비-산성 산물인 2,3-부탄다이올 생합성에 대한 2,3-부탄다이올 오페론을 유도하는 것으로 생각되어진다.
- [0003] 2,3-부탄다이올 생산 미생물과 관련된 이전의 연구에 따르면, 2,3-부탄다이올 오페론은 *budR* 유전자 유래의 추정(putative) LysR-패밀리 전사 조절자 단백질에 의해 유도되는 것으로 알려져 있다. *budR* 효소는 2,3-부탄다이올 오페론의 상부 영역(upper region)의 DNA에 결합하고, 2,3-부탄다이올 생합성에 대하여 2,3-부탄다이올 오페론을 향상시키는 것으로 알려져 있다. 또한, *budR*의 유전자 전사는 낮은 중성 pH(예컨대, pH 5 내지 pH 6)의 경우에 아세트산에 의해 유도되는 것으로 보고되었다. 2,3-부탄다이올 생합성의 조절은 유전자 전사 단계에서 발생하나, 2,3-부탄다이올의 조절 기작에 대한 대부분이 밝혀져 있지 않다.
- [0004] 2,3-부탄다이올은 높은 끓는점(177 °C) 및 낮은 어는점(-60 °C)으로 인해, 인조 고무 합성을 위한 글리콜성 화합물질로 매우 중요하며, 이는 액상 연료의 첨가제로 쓰이는 MEK(methylethyl ketone)로 전환시킬 수 있다. 현실적인 산업적 적용 및 유망한 시장 잠재능으로 미생물을 이용한 2,3-부탄다이올 생합성이 주목받고 있다.
- [0005] 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.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명자들은 크렙시엘라 뉴모니아 균주의 병원성을 제거하고 2,3-부탄다이올 생합성을 증가시켜 안정적으로 2,3-부탄다이올을 생산할 수 있는 재조합 균주를 개발하고자 노력하였다. 그 결과, *wabG* 유전자가 불활성화(inactivation) 되어 있고 *budR* 유전자가 과발현된 2,3-부탄다이올 생산용 크렙시엘라 재조합 균주를 개발하여 최소배지에서 배양하는 경우에 우수한 2,3-부탄다이올 생성 효율을 나타내는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.
- [0007] 따라서, 본 발명의 목적은 2,3-부탄다이올 생산용 크렙시엘라(*Klebsiella*) 종 재조합 균주를 제공하는 데 있다.
- [0008] 본 발명의 다른 목적은 2,3-부탄다이올 제조 방법을 제공하는 데 있다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 목적은 2,3-부탄다이올을 제공하는 데 있다.
- [0010] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0011] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 (a) *wabG* 유전자가 불활성화(inactivation) 되어 있고; (b) *budR* 유전자가 과발현된 2,3-부탄다이올 생산용 크렙시엘라(*Klebsiella*) 중 재조합 균주를 제공한다.
- [0012] 본 발명자들은 크렙시엘라 뉴모니아 균주의 병원성을 제거하고 2,3-부탄다이올 생합성을 증가시켜 안정적으로 2,3-부탄다이올을 생산할 수 있는 재조합 균주를 개발하고자 노력하였다. 그 결과, *wabG* 유전자가 불활성화 되어 있고 *budR* 유전자가 과발현된 2,3-부탄다이올 생산용 크렙시엘라 재조합 균주를 개발하여 최소배지에서 배양하는 경우에 우수한 2,3-부탄다이올 생성 효율을 나타내는 것을 확인하였다.
- [0013] 본 발명의 기본적인 전략은 (a) *wabG* 유전자가 불활성화 되어 있고; (b) *budR* 유전자가 과발현된 2,3-부탄다이올 생산용 크렙시엘라(*Klebsiella*) 중 재조합 균주를 제조하는 것이다.
- [0014] 상기 *wabG*는 크렙시엘라의 외막을 구성하는 성분 중 하나인 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide)의 코어(core) 생합성에 관련된다. 불활성화 대상이 되는 *wabG*는 다양한 크렙시엘라에서 발견되고 동정되었다. 하기의 실시예에서는 서열목록 제1서열의 크렙시엘라 뉴모니아의 *wabG*가 예시되어 있으나, 이외에도 다양한 *wabG*가 본 발명에 포함된다. 예를 들어, GenBank 접근번호 JN377744 (*Klebsiella pneumoniae*), 접근번호 NC_012731(*Klebsiella pneumoniae*), 접근번호 NC_009648(*Klebsiella pneumoniae*), 접근번호 COP000647(*Klebsiella pneumoniae*) 및 접근번호 AP006725(*Klebsiella pneumoniae*)에 개시된 *wabG*가 본 발명에서 불활성화 대상이 될 수 있다.
- [0015] 본 명세서에서 *wabG*를 언급하면서 사용되는 용어, “불활성화(inactivation)”란 유전자의 전사 또는 해독, 유전자 산물의 활성의 손상(impairment)을 초래하는 *wabG*의 지놈 열상에서의 변형(modifications)을 의미한다. 이런 유전자 변형은 *wabG* 코딩 서열의 불활성화뿐만 아니라 이의 프로모터의 불활성화도 포함될 수 있다. 효모 지놈 상에서 목적인 유전자만의 특이적 불활성화는 코딩하는 유전자의 전체 또는 하나 이상의 부분 영역에서 치환, 삽입, 결실 또는 이들의 조합을 통하여 돌연변이시킴으로서 가능하다. 예를 들어, 유전자의 결실 및 유전자로의 이형 서열(heterogenous sequence)의 삽입은 유전자의 절단(truncation), 넌센스 돌연변이(nonsense mutation), 프레임쉬프트 돌연변이(frameshift mutation), 미스센스 돌연변이(missense mutation) 등을 초래할 수 있다. 이러한 유전자의 특이적 불활성화는 당 분야에서 확립된 방법을 통하여 수행할 수 있다.
- [0016] 본 명세서에서 *wabG*를 언급하면서 사용되는 용어, “결실(deletion)”은 *wabG*의 기능을 상실케 하는 모든 결실 변이를 포함하는 의미를 갖는다. 예를 들어, *wabG* 유전자의 결실은 *wabG* 코딩 서열의 부분 결실 또는 전체 결실을 모두 포함한다.
- [0017] 이러한 *wabG* 코딩 서열의 결실은 당업계에 공지된 다양한 변이유발(mutagenesis) 방법을 통하여 실시할 수 있다. 예컨대, *wabG* 코딩 서열의 결실은 당업계에 공지된 다양한 변이유발(mutagenesis) 방법을 통하여 실시할 수 있다. 예를 들어, PCR 돌연변이 유발법, 카세트 돌연변이 유발법(Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)), λ Red 재조합 방법(Jung et al., 2012; Datsenko and Wanner, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97: 6640-6645, 2000), Rac phage RecE/RecT system (Zhang et al., Nature Biotechnol., 18:1314-1317, 2000), FLP-FRT 재조합 방법(Zhu XD, Sadowski PD (1995) "Cleavage-dependent Ligation by the FLP Recombinase". Journal of Biological Chemistry 270 (39): 2304454), 부위-특이 재조합 방법(Sauer, Brian; Henderson, Nancy (1988). "Site-Specific DNA Recombination in Mammalian Cells by the Cre Recombinase of Bacteriophage P1". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 85 (14): 516670), Cre-Lox 재조합 방법(Turan, S.; Galla, M.; Ernst, E.; Qiao, J.; Voelkel, C.; Schiedlmeier, B.; Zehe, C.; Bode, J. (2011). "Recombinase-mediated cassette exchange (RMCE): traditional concepts and current challenges". J. Mol. Biol. 407 (2): 193-221), 염색체 교차법(Creighton H, McClintock B (1931). "A Correlation of Cytological and Genetical Crossing-Over in Zea Mays". Proc Natl Acad Sci USA 17 (8): 4927) 및 트랜스포존(US 20090305369)을 통하여, *wabG*를 불활성화 시키는 변이를 유발시킬 수 있다.
- [0018] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 재조합 균주는 *wabG*를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열에서 결실 변이가 발생된 것이다.

- [0019] 본 발명의 2,3-부탄다이올 생산용 재조합 균주에서 과발현하고자 하는 *budR* 유전자를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제3서열이고, 아미노산 서열은 서열목록 제2서열이다.
- [0020] 상기 *budR* 유전자를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현 벡터를 크렙시엘라 뉴모니아 균주에 형질전환하여 재조합 균주를 제조할 수 있다.
- [0021] 본 발명에서 이용되는 뉴클레오타이드 서열은 상기 언급된 서열 이외에 상기 뉴클레오타이드 서열에 대하여 실질적인 동일성을 나타내는 뉴클레오타이드 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 본 발명의 뉴클레오타이드 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 80%의 상동성, 보다 바람직하게는 최소 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 최소 95%의 상동성을 나타내는 뉴클레오타이드 서열을 의미한다. 서열비교를 위한 얼라인먼트 방법은 당업계에 공지되어 있다. 얼라인먼트에 대한 다양한 방법 및 알고리즘은 Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482(1981); Needleman and Wunsch, *J. Mol. Bio.* 48:443(1970); Pearson and Lipman, *Methods in Mol. Biol.* 24: 307-31(1988); Higgins and Sharp, *Gene* 73:237-44(1988); Higgins and Sharp, *CABIOS* 5:151-3(1989); Corpet et al., *Nuc. Acids Res.* 16:10881-90(1988); Huang et al., *Comp. Appl. BioSci.* 8:155-65(1992) and Pearson et al., *Meth. Mol. Biol.* 24:307-31(1994)에 개시되어 있다. NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-10(1990))은 NCBI (National Center for Biological Information) 등에서 접근 가능하며, 인터넷 상에서 blastp, blastm, 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.
- [0022] 상기 유전자들은 발현 벡터 내부에 도입되어 대장균에서 발현되게 된다. 본 명세서에 있어서, 용어 "발현 벡터"는 발현 벡터의 전사에 제공되는 추가단편에 작동가능하게 연결된 관심의 폴리펩티드를 암호화하는 단편으로 구성되는 선형 또는 원형의 DNA 분자이다. 그와 같은 추가단편은 프로모터 및 종료암호 서열을 포함한다. 발현 벡터는 하나 이상의 복제 개시점, 하나 이상의 선택마커, 폴리아데닐화 신호 등을 또한 포함한다. 발현 벡터는 일반적으로 플라스미드 또는 바이러스 DNA로부터 유도되거나, 또는 둘 다의 요소를 함유한다.
- [0023] 본 발명의 벡터 시스템은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있으며, 이에 대한 구체적인 방법은 Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press(2001)에 개시되어 있으며, 이 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.
- [0024] 본 발명의 2,3-부탄다이올의 제조에 관여하는 효소들을 코딩하는 각각의 뉴클레오타이드 서열들은 발현 조절서열에 작동가능하게 연결되어 발현 벡터 내에 삽입될 수 있다. 상기에서 '작동가능하게 연결된다(operably linked to)'는 것은 하나의 핵산 단편이 다른 핵산 단편과 결합되어 그의 기능 또는 발현이 다른 핵산 단편에 의해 영향을 받는 것을 말한다. 또한, '발현 조절 서열(expression control sequence)'이란 특정한 숙주 세포에서 작동 가능하게 연결된 핵산 서열의 발현을 조절하는 DNA 서열을 의미한다. 그러한 조절 서열은 전사를 개시하기 위한 프로모터, 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다.
- [0025] 본 발명의 벡터는 전형적으로 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터(예컨대, *lac* 프로모터, *tac* 프로모터, *lacUV5* 프로모터, *lpp* 프로모터, pL^{λ} 프로모터, pR^{λ} 프로모터, *rac5* 프로모터, *amp* 프로모터, *recA* 프로모터, *SP6* 프로모터, *trp* 프로모터 및 *T7* 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 숙주 세포로서 *E. coli*(예, HB101, BL21, DH5 α 등)가 이용되는 경우, *E. coli* 트립토판 생합성 경로의 프로모터 및 오퍼레이터 부위(Yanofsky, C., *J. Bacteriol.*, 158:1018-1024(1984)) 그리고 파아지 λ 의 좌향 프로모터(pL^{λ} 프로모터, Herskowitz, I. and Hagen, D., *Ann. Rev. Genet.*, 14:399-445(1980))가 조절 부위로서 이용될 수 있다.
- [0026] 숙주 세포 내로 주입된 벡터는 숙주 세포 내에서 발현될 수 있으며, 이러한 경우에는 다량의 아세트산 환원효소를 얻게 된다. 예를 들어, 상기 발현 벡터가 *trc* 프로모터를 포함하는 경우에는 숙주 세포에 IPTG(Isopropylthio- β -D-Galactoside)를 처리하여 유전자 발현을 유도할 수 있다.
- [0027] 한편, 본 발명에 이용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드(예: pUC18, pTrc99A, pSTV28, pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHc79, pIJ61, pLAFR1,

pHV14, pET22b, pGEX 시리즈, pET 시리즈 및 pUCP19 등), 파지(예: λ gt4 λ B, λ -Charon, λ Δ z1 및 M13 등) 또는 바이러스(예: SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있으나, 바람직하게는 pUC18를 사용한다.

- [0028] 본 발명의 발현 벡터는 프로모터서열 및 발현 대상 유전자(구조 유전자)의 뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 상기 서열들이 5'-3' 순서대로 연결되는 것이 바람직하다.
- [0029] 바람직하게는, 상기 발현 벡터는 *lac* 프로모터 서열, *budR*을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열이 작동적으로 (operatively) 결합된다.
- [0030] 본 발명의 벡터를 숙주 세포 내로 운반하는 방법은, CaCl_2 방법(Cohen, S.N. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 9:2110-2114(1973)), 하나한 방법(Cohen, S.N. et al., *Proc. Natl. Acad. 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 있다.
- [0031] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 재조합 균주는 전기 천공방법을 이용하여 형질전환한다.
- [0032] 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.
- [0033] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명은 pET-28a로부터 카나마이신 내성 유전자를 도입한 pUC18 벡터를 이용하여, 이를 pUC18K라고 명명한다(표 1).
- [0034] 본 발명의 (a) *wabG* 유전자가 불활성화(inactivation) 되어 있고; (b) *budR* 유전자가 과발현된 2,3-부탄다이올 생산용 크렙시엘라(*Klebsiella*) 종 재조합 균주는 다양한 크렙시엘라 종에 적용될 수 있다.
- [0035] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 크렙시엘라 종은 크렙시엘라 뉴모니에(*Klebsiella pneumoniae*), 크렙시엘라 옥시토카(*Klebsiella oxytoca*), 크렙시엘라 그라눌로마티스(*Klebsiella granulomatis*) 또는 크렙시엘라 테리제나(*Klebsiella terrigena*)이다.
- [0036] 본 발명의 재조합 균주는 탄소원을 포함하는 최소배지에서 배양한다.
- [0037] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 재조합 균주는 최소배지에서 성장한다. 상기 최소배지는 황산나트륨, 황산암모늄, 염화암모늄, 인산이칼륨, 인산이수소일나트륨일수화물, 구연산암모늄, 황산마그네슘, 티아민 및 탄소원을 포함한다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 최소배지는 1 L 탈이온수에 2-6 g 황산나트륨, 4-7 g 황산암모늄, 2-4 g 염화암모늄, 6-9 g 인산이칼륨, 1-4 g 인산이수소일나트륨일수화물, 1-4 g 구연산암모늄, 3-5 g 황산마그네슘, 0.005-0.03 g 티아민 및 2-6 % 탄소원을 포함하는 pH 7.2의 배지이다.
- [0038] 본 발명의 재조합 균주는 우수한 2,3-부탄다이올 생성능을 갖는다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 재조합 균주는 *wabG* 유전자 및 *budR* 유전자가 불활성화된 균주와 비교하여 2,3-부탄다이올 생산이 3.5-4.0배 증가한다.
- [0039] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 재조합 균주를 배양 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 2,3-부탄다이올 제조 방법을 제공한다.
- [0040] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 배양 배지는 최소배지이다.
- [0041] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 2,3-부탄다이올 제조 방법에 의해 제조된 2,3-부탄다이올을 제공한다.

발명의 효과

- [0042] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0043] (a) 본 발명은 2,3-부탄다이올 생산용 크렙시엘라(*Klebsiella*) 종 재조합 균주를 제공한다.

- [0044] (b) 본 발명의 2,3-부탄다이올 생산용 크렙시엘라(*Klebsiella*) 종 재조합 균주는 비병원성으로 안전하게 2,3-부탄다이올을 생성할 수 있다.
- [0045] (c) 본 발명은 크렙시엘라 뉴모니아의 *budR* 유전자의 기능을 규명하여, 이를 과발현함으로써, 증가된 2,3-부탄다이올 생성능을 갖는 재조합 균주를 제공한다.

도면의 간단한 설명

- [0046] 도 1은 크렙시엘라 뉴모니아의 글루코즈로부터 *bud* 오페론에 의한 2,3-부탄이올 생성을 도식화하여 보여준다.
- 도 2는 *budR*을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 삽입한 발현벡터의 지도를 보여준다.
- 도 3은 실시간 PCR 조건을 나타낸다.
- 도 4a 내지 도 4c는 SGSB100(도 4a), SBSG101(도 4b) 및 SBSG102(도 4c)의 배양 4시간, 8시간 및 24시간에서 2,3-부탄다이올, 에탄올, 락테이트, 아세테이트의 생산량을 그래프로 나타낸다.
- 도 5는 SGSB100, SGSB101 및 SGSB102의 글루코즈로부터 숙신산, 락테이트, 에탄올, 아세트산 및 2,3-부탄다이올로의 합성비를 보여준다.
- 도 6은 SGSB100, SGSB101 및 SGSB102에서 *budR*, *budB*, *budA*, *budC*, *ldhA* 및 *ack*의 배양 4시간, 8시간 및 24시간에서의 실시간 PCR 결과를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0047] 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.

[0048] 실시예

[0049] 실험방법 및 실험재료

[0050] 균주 및 플라스미드

- [0051] 본 발명에서 이용한 균주, 플라스미드 및 프라이머를 표 1에 나타내었다. 표 1의 PR1 및 PR2의 밑줄 서열은 제한효소 인식 서열을 나타낸다.

표 1

균주, 플라스미드 또는 프라이머	유전자형, 특징 또는 서열	출처
균주		
<i>K. pneumoniae</i> KCTC2242	Ap ^r , <i>trpR</i>	KCTC
<i>K. pneumoniae</i> $\Delta wabG$	<i>K. pneumoniae</i> KCTC2242 deleted <i>wabG</i> gene	
<i>E. coli</i> HIT-DH5 α	F ⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK ⁻ mK ⁺), λ	RBC
플라스미드		
pUC18	Ap ^r	Takara
pET-28a	Kan ^r	Takara
pUC18K	Ap ^r , pUC18 containing Kan ^r from pET-28a	본 발명
pRedET	Tet ^r , containing <i>gam</i> , <i>exo</i> and <i>bet</i> genes	Gene Bridges

pUC18K-budR	Ap ^r , Kan ^r , pUC18K containing <i>budR</i> gene	본 발명 (도 2)
프라이머		
PR1	5'-GGATCCATGGAACCTTCGTTATCTTCGCT-3' (BamHI)	본 발명
PR2	5'-GTCGACTCAGAACATCGCCAGAAACG-3' (SalI)	본 발명
PDR1	5'-ATGGAACCTTCGTTATCTTCGCTATTTTGTGCGCGTCGCCAGGACGCGGCAAAATTAACCCCTCACTAAAGGGCG-3'	본 발명
PDR2	5'-TCAGAACATCGCCAGAAAGCGTTTACCGTACGCGAGCGCTCGAAGCGCCTAATACGACTCACTATAGGGCTCGA-3'	본 발명

[0053] 추정 LysR-패밀리 전사 조절자(*budR*)를 코딩하는 유전자는 크렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*) KCTC2242 유래이다. 플라스미드 제작 및 유전자 클로닝을 위해 대장균 DH5 α [F-(80d lacZ M15)(lacZYA-rhF)U1691 hsd17(m+)recA1 endA1 relA1 deoR; 동인 바이오테크, 대한민국)를 이용하였다. 벡터의 발현 및 *budR* 유전자를 클로닝하는데 *lacZ* 프로모터를 포함하는 pUC18 플라스미드(타카라, 일본)를 이용하였다. 또한, 카나마이신(kanamycin) 내성 유전자를 pUC18 벡터로 클로닝하는데 pET28a 플라스미드(타카라, 일본)를 이용하였다.

[0054] 효소 및 화학물질

[0055] 크렙시엘라 뉴모니아 KCTC2242로부터 지놈 DNA를 분리하기 위해 DNeasy 티슈 키트(Qiagen, 미국)를 사용하였다. 제한 효소 및 T4 DNA 라이가제는 타카라로부터 구매하였다. AxyPrep™ 키트(Axygen, 미국)를 이용하여 박테리아 플라스미드 DNA를 분리하였다. 플라스미드 DNA를 겔에서 분리하기 위해 겔 추출 키트(타카라, 일본)를 이용하였다.

[0056] 플라스미드 제조 및 유전자 결실

[0057] 크렙시엘라 뉴모니아 KCTC2242의 LysR-패밀리 전사 조절자(*budR*)를 코딩하는 유전자의 서열정보를 마크로젠으로부터 제공받았다. *budR* 유전자를 클로닝하기 위해 PR1 및 PR2 프라이머를 65.0°C Tm(melting temperature)값으로 사용하였다. pUC18K 벡터를 BamHI 및 SalI으로 처리하여 *budR* 유전자 프래그먼트를 삽입하였다. 플라스미드를 전기천공법(Gene Pulser, Bio-Rad, 미국)을 이용하여 크렙시엘라 뉴모니아 KCTC2242 컴피턴트 세포에 형질전환하였다. 상기 전기천공법은 1 μl 플라스미드 및 50 μl 컴피턴트 세포를 0.2 cm-갭(gap) 큐벳에 첨가하고 2.48 kV, 25 μF 및 200 Ω 조건에서 실시하였다. pRedET(Gene Bridge, 독일) 및 707-FLPe(Gene Bridge, 독일) 플라스미드를 상동 재조합(homologous recombination)에 이용하였다. 표 1에 이탤릭체로 표시된 카나마이신 유전자의 엑스트리미티(extremities)에 상동하는 20 뉴클레오타이드를 나타낸다. 95°C 5분 한 후에, 95°C 30초, 66°C 55초 및 72°C 60초를 25 주기 실시하는 조건으로 PCR(Polymerase Chain Reaction) 반응을 수행하였다. 본 발명에서, FLP 발현 플라스미드를 갖는 형질전환 세포에 의한 *wabG* 제거 후에 염색체로부터 클로람페니콜 선별 마커를 제거하는 카세트로 FRT(Flippase Recognition Target)를 도입하였다(*wabG* 제거된 크렙시엘라 뉴모니아 균주는 SGSB100; *wabG* 및 *budR* 제거된 크렙시엘라 뉴모니아 균주는 SGSB101; *wabG* 제거 및 *budR* 과발현 크렙시엘라 뉴모니아 균주는 SGSB102). PCR 산물(FRT-플랭크 카나마이신-내성 유전자, FCF)을 T-벡터(Enzymonics, 대한민국)에 라이게이션(ligation) 하였다. 두번째 단계에서, *wabG* 유전자의 양쪽 말단에 상응하는 5' 엑스트리미티(extremity)의 50-bp 상동 암(arms)을 포함하는 프라이머 쌍을 이용하여 FCF를 주형으로 PCR 반응하였다. 프라이머 쌍의 서열은 다음과 같다: *budR*/정방향 (5'-ATGGAACCTTCGTTATCTTCGCTATTTTGTGCGCGTCGCCAGGACGCGGCAAAATTAACCCCTCACTAAAGGGCG-3') 및 *budR*/역방향 (5'-TCAGAACATCGCCAGAAAGCGTTTACCGTACGCGAGCGCTCGAAGCGCCTAATACGACTCACTATAGGGCTCGA-3'). 상동 암은 이탤릭체로 표시하였다. 최종 PCR 산물은 *budR* 유전자의 양쪽 말단에 상동하는 50-bp 암에 의해 플랭크된 카나마이신-내성 카세트를 포함한다(RFKRF; *budR* homologous region(arm)-FRT-Kanamycin resistance gene-FRT-*budR* homologous region(arm)). PCR 반응은 95°C 5분 한 후에, 95°C 30초, 65°C 60초 및 72°C 60초를 25 주기 실시하였다. 플라스미드 DNA 및 PCR 산물의 정제는 Qiagen 플라스미드 키트(Qiagen, 미국) 및 PCR 정제 키트(Qiagen, 미국)를 이용하여 실시하였다. 모든 PCR 반응은 0.6 U Taq 폴리머라제(타카라, 일본)를 이용하였다.

[0058] 배양 조건

[0059] SGSB100, SGSB101 및 SGSB102를 LB 배양배지[10 g 트립톤(Difco, 미국), 5 g 효모 추출물(Difco), 10 g NaCl 및 1 g 글루코즈(상기 첨가물의 질량은 1 L 탈이온수에 해당하는 양이며, pH 7.2를 갖는다), 별도의 언급이 없는 한, 본 명세서에서 'LB 배양배지'는 상기 조성을 갖는다]에서 배양하였다. 상기 배지에 20 g 아가(agar)를 첨가하고 고형화하여 아가배지를 제조하였다. 항생제 내성 균주의 선별을 위해, 암피실린(50 µg/ml) 및 카나마이신(50 µg/ml)을 필요시 첨가하였다. 비연속(batch) 배양을 위해, 종 배양물(seed culture)을 2.5 L 발효기의 1 L 배양배지에 10%로 접종하였다. SGSB101 및 SGSB102를 최소배지[4 g 황산나트륨, 5.36 g 황산암모늄, 1.0 g 염화암모늄, 7.3 g 인산이칼륨, 1.8 g 인산이수소일나트륨일수화물, 1.2 g 구연산암모늄, 4.0 g 황산마그네슘, 0.02 g 티아민 및 3% 탄소원(상기 첨가물의 질량은 1 L 탈이온수에 해당하는 양이며, pH 7.2를 갖는다), 별도의 언급이 없는 한, 본 명세서에서 '최소배지'는 상기 조성을 갖는다]에서 배양하였다. 항생제 내성 균주의 선별을 위해, 암피실린(50 µg/ml) 및 카나마이신(50 µg/ml)을 필요시 첨가하였다. 용해 산소는 1.5 L/분의 유속으로 여과 공기를 주입하여 제공하였고, 교반 속도는 200 rpm으로 유지하였다. pH는 5 N 수산화나트륨 및 5 N 염산을 첨가하여 pH 6.8로 유지하였다. 모든 비연속배양은 3회 반복하였다.

[0060] 샘플을 일정시간마다 수집하여 4,500 rpm으로 10분 동안 원심분리를 실시하였다. RNAiso Plus(다카라, 일본)을 이용하여 RNA를 각각 분리하였다. 각 RNA의 cDNA를 합성하기 위해 PrimeScript reverse Transcriptase(다카라, 일본)을 이용한 방법을 통해 역전사 하였다. 각 cDNA의 상대적인 양을 측정하기 위해 실-시간 PCR(다카라, 일본)을 이용하여 $\Delta\Delta ct$ 방법을 이용하였다.

[0061] 분석방법

[0062] 샘플을 일정시간마다 수집하여 4,500 rpm으로 10분 동안 원심분리를 실시하였다. 침전물 내 탄소원, 2,3-부탄다이올 및 유기산의 양을 RI2414 검출기가 장착된 HPLC(Waters Co., 미국) 및 Aminex HPX-87H 유기산 컬럼(300 mm × 7.8 mm; Bio-Rad)로 측정하였다. 황산(0.01 M)을 0.6 ml/분 유속으로 60℃에서 이동상으로 사용하였다. 모든 용액은 사용하기 전에 0.2 µm 막을 통해 여과하였다.

[0063] 실시간 PCR

[0064] 샘플을 일정시간마다 수집하여 4,500 rpm으로 2분 동안 원심분리를 실시한 후, 침전물에 RNAiso Plus(TAKARA)을 일정량 넣어주고 5분간 상온에 방치하였다. 그 다음 클로로포름(chloroform)을 0.2 배 첨가하고 상온에 5분 동안 방치한 후, 4,500 rpm으로 15분 동안 원심분리하고 상등액만 수득하여 동일한 양의 이소프로판올과 혼합 후 상온에 10분 동안 방치한 후 4,500 rpm으로 10분 동안 원심분리하였다. 침전물에 차가운 75% 에탄올을 섞어 4,500 rpm으로 5분 동안 원심분리하고 상등액을 제거하였다. 침전물을 RNase-프리 워터에 용해하였다. 수득한 샘플에 Oligo dT 프라이머, dNTP 및 RNase-프리 워터를 넣어 65℃에서 5분 동안 반응시킨 후, PrimeScript reverse Transcriptase(TAKARA), 5×PrimeScript 완충액 및 RNase 억제제를 첨가하여 42℃에서 60분 동안 반응시켰다. 그 다음 70℃에서 15분 동안 방치한 후 얼음에서 식혔다. 마지막으로 얻은 반응액을 아래 표에 있는 프라이머와 PrimeScript RT Master Mix(TAKARA), RNase-프리 워터를 넣어 섞어준 후 도 3과 같은 조건으로 Real-time PCR (TAKARA)을 시행하였다.

표 2

[0065]

프라이머	서열
budR-FW	GGTATTTCACAGCCTCCGTT
budR-Rev	AGAAAGACTCTCCCGCTTCC
budB-FW	TCTACCGATAACTTTGGCA
budB-Rev	GCCAGGTAGTACCAGAAGCC
budA-FW	GACCGACGTACTCGACGAT
budA-Rev	TTGCGGTCATCGGTAATAAA
budC-FW	ACAACATCAACGTCAAAGGG
budC-Rev	GGAACAGGCGTTGATGATTT
ldhA-FW	TTGCGAAGCGGTATGTATCT
ldhA-Rev	AGGTCGACGTTGTTAAACCC
ack-FW	GGTGGTTCTGTTCCGCTAT

ack-Rev	GTGCAGATGGAAGATGATGG
16srRNA-FW	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG
16srRNA -Rev	GGTTACCTTGTACGACTT

[0066] **결과 및 토론**

[0067] 크랩시엘라 뉴모니아 KCTC2242 *budR* 유전자의 확인

[0068] 이전 연구에서, 발명자들은 2,3-부탄다이올 생산으로 잘 알려진 몇몇 미생물 종을 특히, 크랩시엘라 종, 엔테로 박터 종 및 락토바실러스 종을 스크리닝하였다. 균주의 견고성 및 2,3-부탄다이올 생산성으로 크랩시엘라 뉴모니아 KCTC2242를 선택하였다. 그러나, 크랩시엘라 뉴모니아 KCTC2242의 게놈 서열이 보고되어 있지 않아, 마크로젠에 전체 게놈 시퀀싱을 의뢰하였다. 크랩시엘라 뉴모니아 KCTC2242의 전체 게놈 서열을 수득한 후 Lys-패밀리 전사 조절자인 *budR*을 규명하였다. 게놈 시퀀싱 데이터에 근거하여, 아미노산 서열을 수득하였다. 공지된 크랩시엘라 뉴모니아 아종인 크랩시엘라 뉴모니아 MGH 78578 서열의 아미노산 서열을 어닐링하여 단백질의 COG(Cluster of Orthologous Groups)를 수득하였다. 결과적으로 전사후 조작, 단백질 전환, 샤페론 그룹에서 Lys-패밀리 전사 조절자인 *budR*의 유전자 서열을 발견하였다. 상기 *budR* 유전자는 873 뉴클레오타이드 염기 쌍을 갖으며, *budA* 유전자의 상부에 위치하는 것을 발견하였다.

[0069] 유전자 과발현 또는 결실에 의한 *budR* 돌연변이 균주의 제조

[0070] *budR* 유전자의 과발현이 2,3-부탄다이올 생합성과 관련된 유전자의 발현정도에 영향을 주는지 알아보기 위해, pUC18K::*budR* 벡터를 갖는 SGSB101을 제조하였다. *budR* 유전자의 과발현에 의해 2,3-부탄다이올의 생산성 (g/L, DCW)을 SGSB100과 비교하여 54%까지 증가시킬 수 있었다.

[0071] 발명자들은 *budR*-결실 돌연변이(SGSB102)를 제조하여, 2,3-부탄다이올 오페론이 *budR*의 비활성화로 인해 비활성화되는지 조사하였다. 또한, *budR* 유전자의 발현정도와 2,3-부탄다이올 생산 정도의 상관관계를 조사하였다.

[0072] pH 5.5 고정 발효

[0073] 공지된 연구에 따르면, *budR* 유전자 전사 정도는 자체적인 조절 기작에 의해 조절되는 것으로 보고되나, 아세테이트, 배지의 낮은 pH 및 혐기성 조건과 같은 외적 자극에 의해 주로 조절 또는 증대된다. *budR* 유전자 전사 자극으로서의 아세테이트 작용 사이의 관계에 대하여 명백하게 밝혀지진 않았지만, 2,3-부탄다이올 생합성의 조절에 아세테이트가 중요한 역할을 한다는 것은 분명하다. 또한, 산성 배지 조건에서 산성 환경에 따른 아세테이트 구조의 변화로 아세테이트의 영향이 증가된다.

[0074] 이러한 사실에 기초하여, SGSB100, *budR*-과발현 균주(SGSB101) 및 *budR*-결실 균주(SGSB102)를 통일된 조건하에 발효를 실시하였다. 작동 부피는 1 L, 3% 글루코즈, 37°C, pH 5.5, 200 rpm, 공기 1 vvm(1 분 동안 1 L의 배지에 1 L의 공기 통과). 배양배지는 최소배지를 이용하였고, SGSB100을 배양 배지에는 암피실린(50 µg/ml)을, SGSB101 및 SGSB102의 배양 배지에는 암피실린(50 µg/ml) 및 카나마이신(50 µg/ml)을 첨가하였다.

[0075] 발효는 각 균주[SGSB100, *budR*-과발현 균주(SGSB101) 및 *budR*-결실 균주(SGSB102)]에 대하여 24시간동안, 유도기(4시간), 로그기(8시간) 및 안정기(12시간)에 각각 샘플을 수득하였다. 상기 3 균주의 탄소 흐름 변화를 HPLC로 각각 비교하였다. 결과적으로, 탄소 흐름은 모든 균주에서 유사하게 나타났다[SGSB100: 28.5/SGSB101: 25.1/SGSB102: 28.6 (mol수)]. 이는 *budR* 유전자 조작이 세포 성장에 최소한의 영향을 나타냄을 의미한다. 그러나 피루브산 흐름으로부터 유래한 기질 흐름(알코올성 물질: 2,3-부탄다이올; 에탄올/산성 물질: 아세테이트, 락테이트)은 각 균주에서 다르게 나타났다. SGSB101 균주에서 SGSB100과 비교하여 피루브산으로부터 2,3-부탄다이올 및 아세테이트로의 흐름은 최대 31% 및 19% 증가하였고, 에탄올 및 락테이트로의 흐름은 51% 및 74% 각각 감소하였다. 대조적으로, SGSB102 균주는 SGSB100과 비교하여 피루브산으로부터 2,3-부탄다이올로의 흐름은 69% 감소되었고, 아세테이트는 검출되지 않았으며, 락테이트로의 흐름은 8% 증가되었다. 산성(아세테이트 및 락테이트) 또는 알코올성(에탄올 및 2,3-부탄다이올) 물질로의 흐름은 *budR* 조절기작에 의해 조절됨을 관찰하였다. 각 균주들의 발효 부산물의 생성량을 상대적으로 비교하기 위해서 세포 1개 당 생성한 부산물의 양을 각각 계산하였다. 세포 1개 당 생성한 부산물의 양을 계산하기 위해서 부산물들의 생산량인 g/L를 건조세포중량으로 나누었다. 결과적으로, 야생형 균주 1 세포 당 ‘산성 물질의 양 : 알코올성 물질의

양'은 유도기 및 로그기에서 크게 차이하지 않았다(유도기 = 0.86:0.90; 로그기 = 1.15:2.11). 반면, SGSB101 균주의 산성물질의 양:알코올성 물질의 양의 비율은 로그기에서 큰 차이를 나타냈다(로그기= 0.55:3.99). 이러한 결과는 *budR* 유전자의 과발현이 산성 물질:알코올성 물질의 비에 영향을 주는 것을 의미한다. 그러나, SGSB102 균주의 산성 물질의 양:알코올성 물질의 양은 로그기에서 크게 차이를 나타내지 않았고(로그기 = 0.31:1.13), 기질 생산은 다른 두 균주와 비교하여 상대적으로 낮았다(도 4a 내지 도 5).

[0076] *budR* 및 다른 2,3-부탄다이올 생합성 관련 유전자의 RT-PCR 분석

[0077] 2,3-부탄다이올 생합성에 있어서 *budR* 조절 기작을 조사하기 위해, 역전사 및 실시간-PCR 실험을 실시하여 유전자 전사 정도의 조절 기작을 조사하였다. 각 균주를 24시간동안 배양하여 유도기(4시간), 로그기(8시간) 및 안정기(24시간)에 각각 샘플을 수득하였다.

[0078] 2,3-부탄다이올 생합성 관련 4 유전자(*budR*, *budB*, *budA* 및 *budC*) 및 산성 물질 생합성 관련 2 유전자(*ldhA* 및 *ack*)를 조사하였다. 이전 연구에 따르면, 크렙시엘라 중에서 혼합산 발효로 인한 배양배지의 산성화를 최소화하기 위해 세포 성장의 정지기에 2,3-부탄다이올 생산을 증대시켰다. 락테이트, 포름산 및 아세테이트와 같은 산성 물질로 향하는 피루브산 흐름이 감소시키기 위해 2,3-부탄다이올 및 에탄올의 생합성 조절 기작을 조절하는 것이 알려져 있다. *budR* 유전자의 과발현 또는 결실에 의한 유전자 발현 정도의 변화를 조사하기 위해, 2,3-부탄다이올 생합성 및 혼합산 발효와 관련된 6 유전자를 선별하였다(*budR*, *budB*, *budA*, *budC*, *ldhA* 및 *ack*).

[0079] 실시간 PCR 결과를 단일세포에서 유전자 발현을 비교하기 위해, $\Delta\Delta Ct$ 방법으로 보정하였다. 크렙시엘라 뉴모니아 KCTC2242의 하우스키핑 유전자인 16s rRNA를 기준 유전자로 하였다. 결과적으로, 야생형 균주는 2,3-부탄다이올 생합성 관련 유전자(*budR*, *budB*, *budA* 및 *budC*)는 로그기 및 정지기에 증가하였고, 상대적으로 낮은 pH(pH 5.5)로 인해 산성 물질 생합성의 유전자(*ldhA* 및 *ack*) 전사 정도는 낮았다(표 3 및 도 6).

표 3

[0080]

-	<i>budR</i>	<i>budB</i>	<i>budA</i>	<i>budC</i>	<i>ldhA</i>	<i>ack</i>
유도기	2650E-003	3.705E-005	6.992E-003	1.584E-002	1.452E-004	1.184E-002
로그기	1.609E-003	2.731E-005	7.705E-003	6.346E-003	6.146E-005	7.340E-003
정지기	2.259E-003	1.958E-005	5.727E-004	7.769E-004	4.499E-005	6.003E-003

[0081] 그러나, SGSB101 균주의 2,3-부탄다이올 생합성 관련 유전자 및 산성 물질 생합성과 관련된 유전자의 전사 정도는 유전자 발현 정도가 상이한 양상을 나타내었다. SGSB101 균주에서 이러한 변화는 HPLC 분석 결과와 상응하며, 이는 *budR*의 과발현으로 인한 관련 유전자 전사 정도가 변화된 것으로 생각된다(표 4 및 도 6).

표 4

[0082]

-	<i>budR</i>	<i>budB</i>	<i>budA</i>	<i>budC</i>	<i>ldhA</i>	<i>ack</i>
유도기	2.120E-002	1.169E-003	8.212E-004	7.759E-003	4.192E-004	1.321E-001
로그기	4.743E-003	8.924E-004	5.456E-004	4.843E-003	2.310E-004	6.792E-002
정지기	1.470E-003	1.307E-003	2.342E-004	4.518E-003	4.251E-004	6.792E-002

[0083] 마지막으로, SGSB102 균주에서 2,3-부탄다이올 생합성 관련 유전자 및 산성 물질 생합성 관련 유전자는 상대적으로 낮은 발현 정도를 나타내었다(표 5 및 도 6).

표 5

[0084]

-	<i>budR</i>	<i>budB</i>	<i>budA</i>	<i>budC</i>	<i>ldhA</i>	<i>ack</i>
유도기	0	1.863E-004	1.280E-003	1.575E-003	2.294E-004	5.493E-004
로그기	0	1.800E-004	3.726E-004	2.441E-004	1.153E-004	1.048E-004
정지기	0	1.025E-003	6.533E-004	9.449E-004	7.556E-004	1.567E-004

[0085] *budR* 유전자는 *budBAC* 오페론의 활성을 조절해주는 단백질을 생성하는 유전자이므로, 클렙시엘라 균주에서 이러

한 2,3-부탄다이올 생합성 관련 메커니즘이 있는 이유는 크랩시엘라 균주가 혼합산 발효를 하기 때문이라고 기존의 문헌들에서 추측하고 있다. 이는 크랩시엘라가 글루코즈와 같이 탄소원을 소비하였을 때 발효 부산물로 산성이 강한 락테이트, 포르메이트, 숙시네이트 같은 부산물들을 생성하는데, 이러한 산성이 강한 부산물들은 세포의 성장을 저해하고 세포가 살기 어려운 환경을 조성한다. 따라서 산성이 강한 부산물들이 분비되기 시작하면 크랩시엘라는 산성이 강한 부산물들 생성을 억제하기 위해서 2,3-부탄다이올 또는 에탄올을 생성하기 시작한다. 이러한 상황에서 *budR* 유전자의 전사가 활성화되고 단백질이 발현되어 *budBAC* 오페론을 활성화시켜서 2,3-부탄다이올을 생합성할 수 있게 된다. 본 발명은 이러한 크랩시엘라의 특성을 이용하여서 산업적으로 유용한 물질인 2,3-부탄다이올을 최대한 빠르고 많이 생성할 수 있는 균주를 개발하고 발효 조건을 찾는데 그 목적이 있다. 그리하여 *budR* 유전자를 과발현하여서 기존의 크랩시엘라보다 *budBAC* 오페론의 활성을 발효 초기부터 유도하려는데 그 목적이 있다. 또한 SGSB100, SGSB101 및 SGSB102에서의 *budR* 과발현 및 제거가 6개의 유전자(*budB*, *budA*, *budC*, *budR*, *ldhA* 및 *ack*) 전사에 미치는 영향을 비교하여서 그 특성을 파악하고자하였다.

[0086] 그 결과 SGSB100은 기존 문헌들의 예측과 같이, *budR*의 전사가 시작되었고, *budR*의 전사가 *budBAC*의 전사를 촉진시키면서 상대적으로 *ldhA*와 *ack*의 전사가 줄어드는 것을 관찰할 수 있었다. SGSB102에서는 *budR* 과발현 시 *budR*의 전사가 세포 성장단계 초기부터 증가하는 것을 볼 수 있었고 크랩시엘라 균주의 산성 부산물 생성에 대한 완충 작용이 보다 잘 되어 산성을 띄는 부산물들의 생합성 관련 유전자들의 전사체 양이 다른 두 균주에 비해 비교적 늘어난 것을 볼 수 있었다. 그에 비해서 SGSB101은 *budR* 제거에도 불구하고 *budBAC* 오페론이 어느 정도 활성화되는 것을 볼 수 있었으나, 크랩시엘라 균주의 산성 부산물 생성에 대한 완충 작용이 위축되어서 부산물들의 생합성 관련 유전자들의 전사체 양이 다른 두 균주에 비해 비교적 감소한 것을 관찰할 수 있었다(도 6).

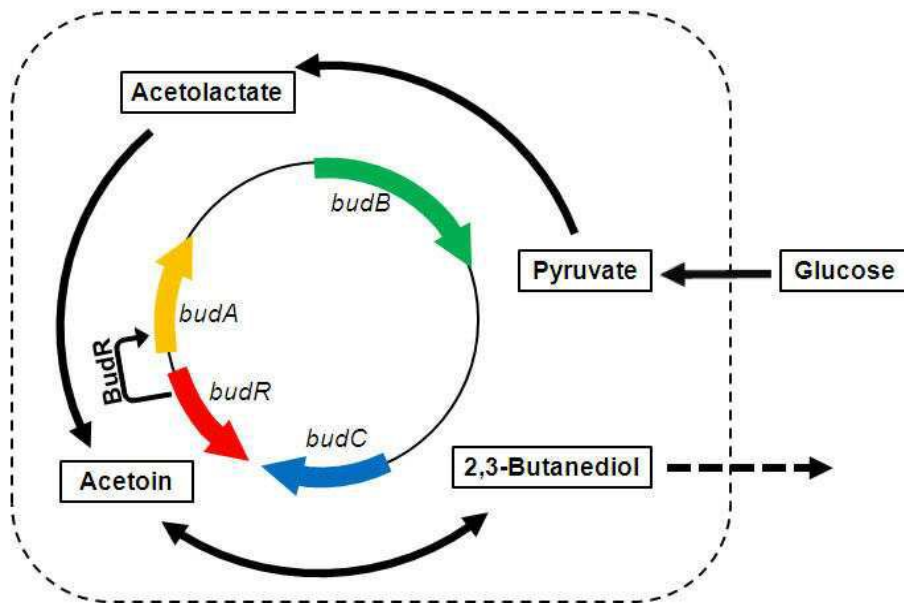
[0087] 결론

[0088] 본 발명에서, 발명자들은 크랩시엘라 뉴모니아 KCTC2242의 Lys-패밀리 전사 조절자인 *budR*을 규명하고 특징을 조사하였다. 또한, *budR* 과발현 균주(SGSB101) 및 *budR* 결실 균주(SGSB102)를 제조하여, 2,3-부탄다이올 생합성의 조절기작을 DNA 전사 수준에서 분석하였다. 결과적으로, *budR* 전사 정도는 2,3-부탄다이올 오페론 유전자의 전사 정도에 직접적으로 영향을 주는 것을 확인하였다.

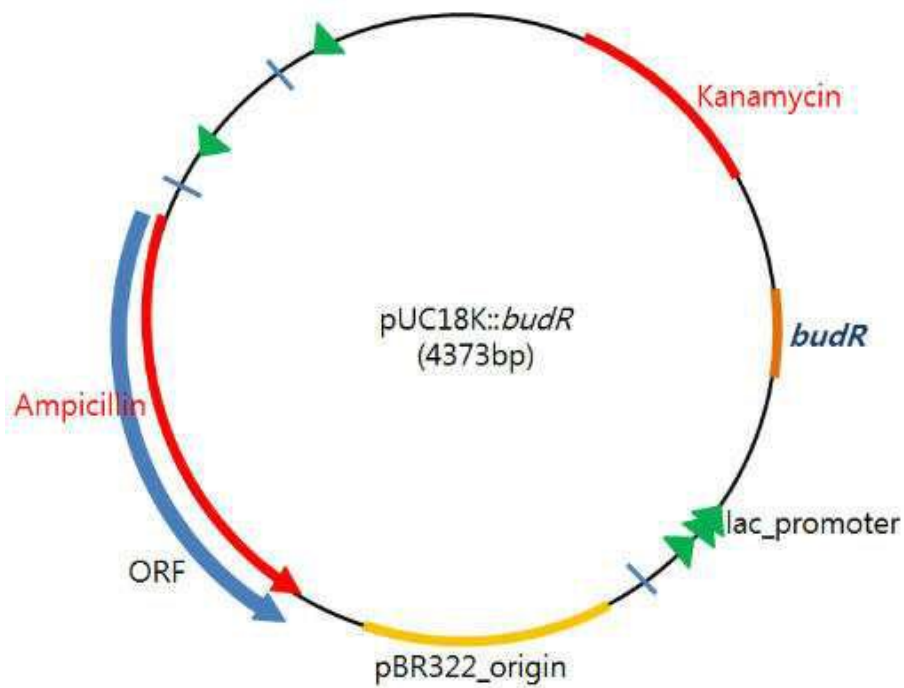
[0089] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

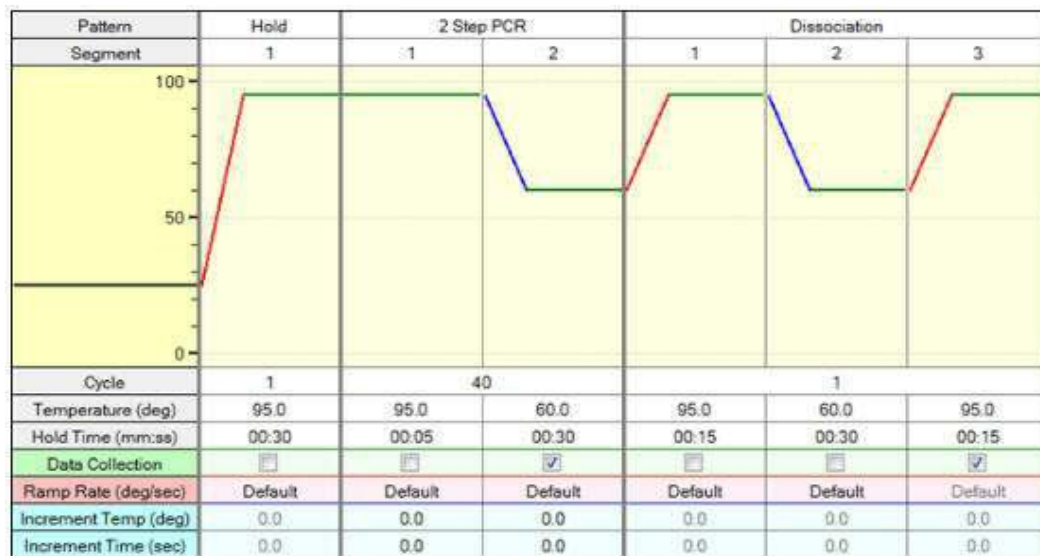
도면1



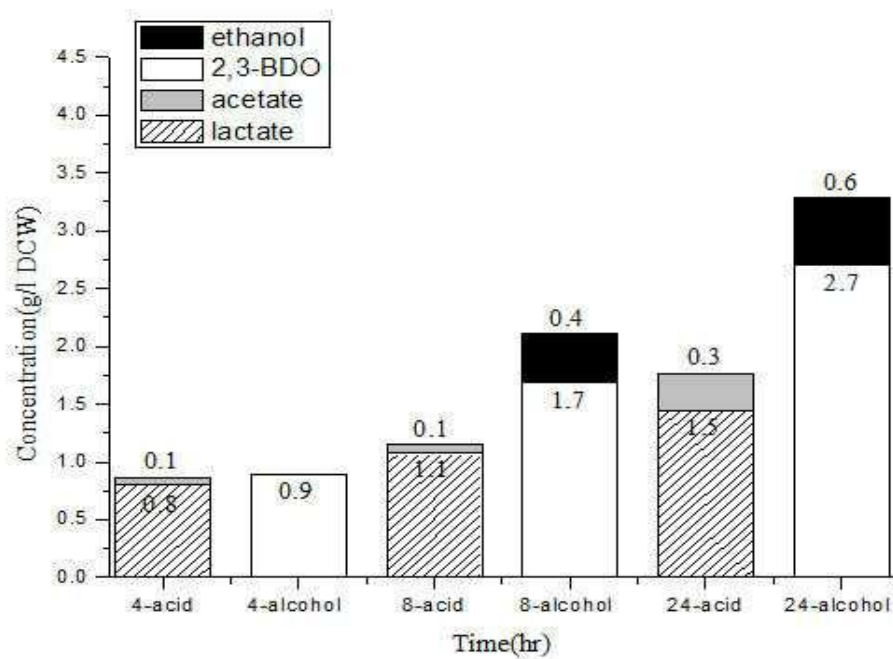
도면2



도면3

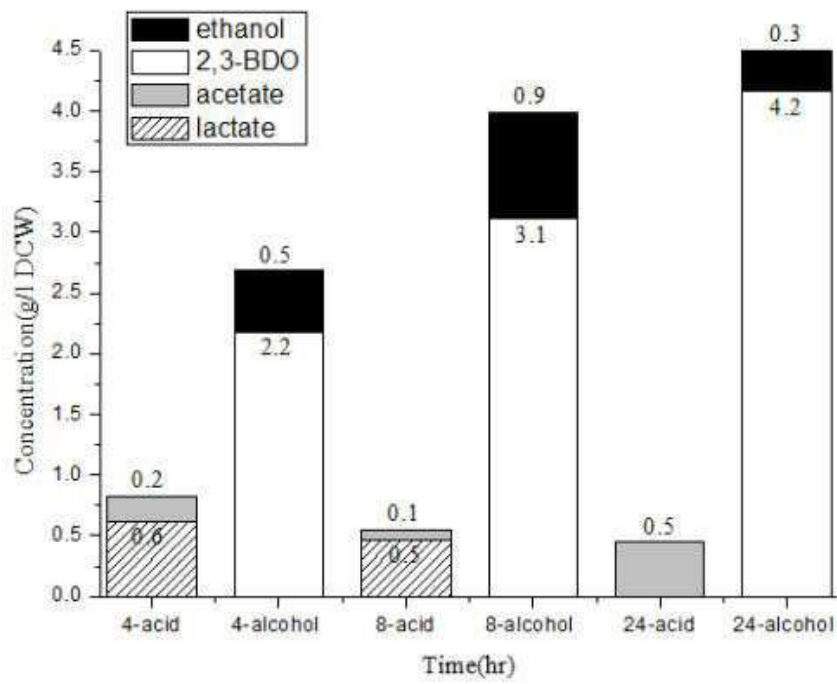


도면4a



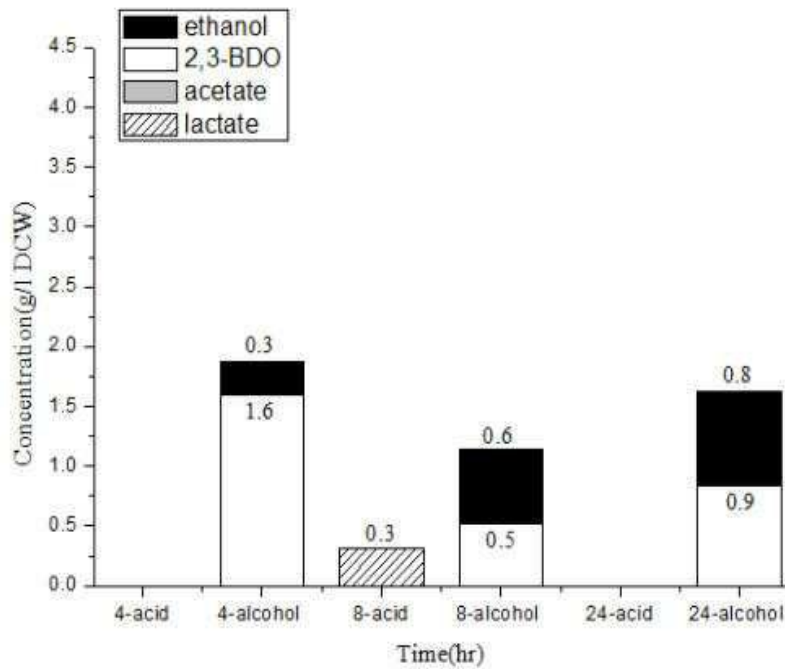
SGSB100

도면4b



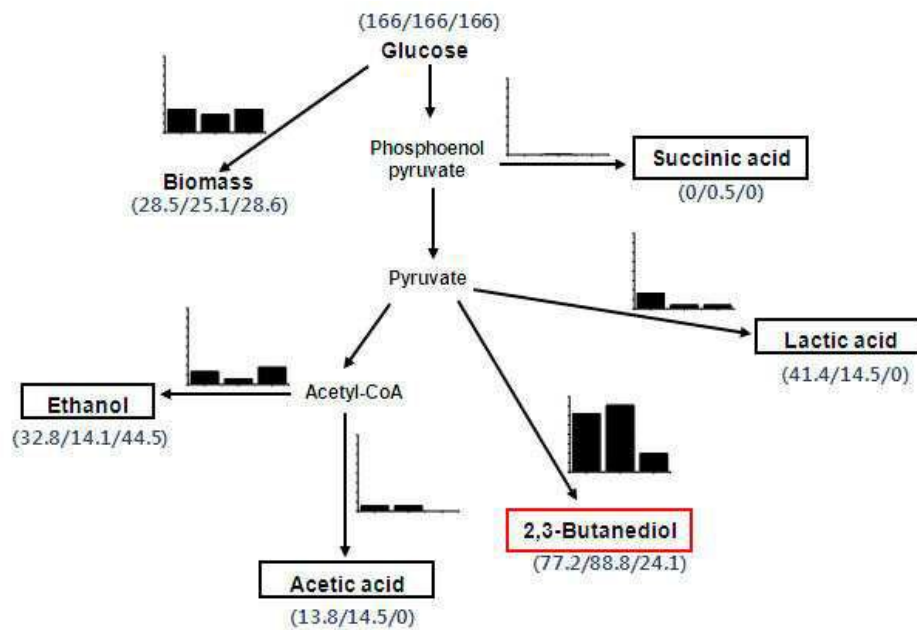
SGSB101

도면4c



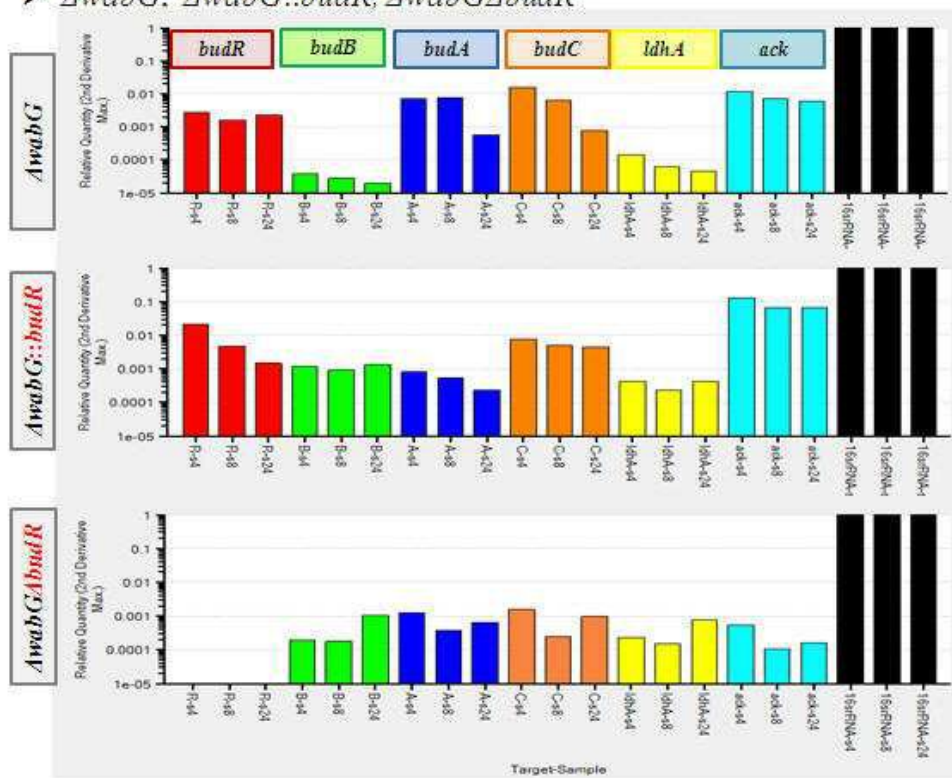
SGSB102

도면5



도면6

➤ $\Delta wabG, \Delta wabG::budR, \Delta wabG\Delta budR$



서 열 목 록

- | | |
|-------|---|
| <110> | SOGANG UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION |
| <120> | Recombinant Strain for Manufacturing 2,3-Butanediol comprising
Inactivated wabG and Overexpressed budR |

<130> PN130207

<160> 3

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 1128

<212> DNA

<213> Klebsiella pneumoniae KCTC 2242, wabG

<400> 1

atgagtaa at tcaggctggc tctggtgcgg cagaagtacc gcccgacgg cggcgcagaa 60

cggtttgtct cccgcgcgct ggaagccctc gacagcagtc atctgcaact gaacgtcatc 120

acccgcgaat ggcagggggc ggtgaaaccg gactggcaga tccatattctg taaccacgt 180

aatgggggc gcatcagccg cgagcgcggc ttgccaacg ccgcgcgcgc gctctggcag 240

cgcgagtcct tcgacctggt gcagagccat gaacgtattc ccggtgcga tctctaccgc 300

gctggcgatg gcgttcatcg ccgctggctg cagcagcgcct cgcgcatctt accggcctgg 360

aaaagccgcc tgctgttcgc cgaccgttac caccgctacg tcatgcaggc ggagcgcgag 420

atgtatgaag actcacacct gcgcgggggtg atctgcaacg ccgagatgat caagcgcgag 480

atcatcgaag actttggcct gccggcggag aagatccacg ttatttataa cgccattgat 540

aaccagcgt tcttgccgcc ggacgaagag acctttgccg ctttacgcgc caaatggcag 600

ctaccgtgc aggcgacctg cctgatctac gtcggctccg gctttgagcg caaggggctg 660

gcggcggcga tccgcgccat cgctcccacc gatcgctacc tgctggtggt cggcaaagat 720

aaggatcagc ctgcgtatca ggcgctggcg aagagcctga actgtgaagc gcgggtgcgc 780

ttcttcggca tgcagtcgga gacattgcc ttctatcaaa tggccgatgg tctgttgctg 840

ccgacctct acgatccgtt ccccaacgtc atcctcgagg caatggcctg cggcttgccc 900

gtgatcacca ctaccggctg gcgcggggcg gattttatcg tcgacggcca caacggttac 960

gtctgcgacg ctctggatat cccggcgcta cagcaggcgg taatggccct gcccgcgcg 1020

gcgctgggct ccgcgcaagg cggtcacgcc cgcgagcgca ttatggcctg caccagcgag 1080

cgactctcaa ccagctgct ttctctttat caggatctgg tgaattaa 1128

<210> 2

<211> 290

<212> PRT

<213> putative Lys-family transcriptional regulator, budR

<400> 2

Met Glu Leu Arg Tyr Leu Arg Tyr Phe Val Ala Val Ala Arg Thr Arg
1 5 10 15
His Phe Thr Gln Ala Ala Lys Glu Leu Gly Ile Ser Gln Pro Pro Leu
20 25 30
Ser Gln Gln Ile Gln Arg Leu Glu Arg Glu Val Gly Thr Pro Leu Phe
35 40 45
Arg Arg Leu Thr Arg Gly Val Glu Leu Thr Glu Ala Gly Glu Ser Phe
50 55 60
Tyr Glu Asp Ala Arg Gln Ile Leu Ala Met Ser Asp Ala Ala Leu Glu
65 70 75 80
Lys Ala Lys Gly Ile Ala Arg Gly Met Asn Gly Ser Leu Ser Leu Gly
85 90 95
Ile Thr Ser Ser Asp Ala Phe His Pro Gln Ile Phe Thr Leu Leu His
100 105 110
Arg Phe Gln Leu Asp His Pro Gly Val Thr Leu His Gln Met Glu Asp
115 120 125
Asn Met Ala Asn Leu Met Thr Ala Leu Ser Glu Ala Glu Leu Asp Ile
130 135 140
Ala Phe Val Arg Leu Pro Cys Glu Ser Ser Lys Ala Phe Asn Leu Arg
145 150 155 160
Ile Ile Asp Glu Glu Pro Met Val Ile Ala Leu Pro Arg Asp Asn Pro
165 170 175
Leu Ala Thr Gln Pro Thr Leu Ala Leu Glu Gln Leu Arg Asp Val Ala
180 185 190
Pro Ile Leu Phe Pro Arg Glu Val Ala Pro Gly Leu Tyr Glu Leu Val
195 200 205
Tyr Asn Ser Cys Leu Arg Ala Gly Ile Asp Met Glu Arg Ala Trp Gln
210 215 220
Ser Ser Gln Ile Ser Ser Ser Leu Ser Met Val Asn Ala Gly Phe Gly
225 230 235 240
Phe Ala Leu Val Pro Gln Ser Met Thr Cys Ile Gln Gln Pro Asn Val

245	250	255	
Ser Tyr His Pro Leu Ser Gly Ala Pro Leu Lys Thr Asp Ile Ala Ile			
260	265	270	
Ala Trp Arg Arg Phe Glu Arg Ser Arg Thr Val Lys Arg Phe Leu Ala			
275	280	285	
Met Phe			
290			
<210>	3		
<211>	873		
<212>	DNA		
<213>	putative Lys-family transcriptional regulator, budR		
<400>	3		
atggaacttc gttatcttcg ctattttgtc gccgtcgcca ggacgcggca cttcacccag			60
gccgccaagg agctgggtat ttcacagcct ccgttaagtc agcaaattca gcggcttgag			120
cgcgaggtag ggaccccgct gttccggcgt ttaaccgcg gggtaggagct gacggaagcg			180
ggagagtctt tctatgagga tgcccgccag atcctcgcca tgagcgatgc ggcgctggag			240
aaggccaagg gcattgcgcg cgggatgaac ggagcctgt cgctaggcat taccagtctt			300
gatgctttcc atccgcaaat cttcacgctg ctgcaccgtt ttcagctcga ccacccggg			360
gtgacctgc accagatgga agacaatatg gccaatctga tgaccgcct gagcgaggcc			420
gagctggata tcgccttcgt ccgcctgccg tgcgagagca gtaaagcctt taatctgcgg			480
attatcgatg aggagccgat ggttatcgcg ctgccgcgcg ataaccgct ggcgacgcag			540
ccgacctgg cctggagca gctgcgcgac gtggcgccga tctctttccc gcgggaggtg			600
gccccgggc tgiatgagct ggtgtacaac agctgtctgc gcgccgggat cgatatggag			660
cgcgcttggc agtcgtcgca aatttcgtcg tcgctgagca tggatcaatgc tggcttcggc			720
ttcgcgtgg ttccgcagtc gatgacctgc atccagcagc cgaacgtcag ctatcacccg			780
cttagcgggg cgccgtgaa gaccgatac gccatgcct ggcggcgctt cgagcgctcg			840
cgtacggtga aacgctttct ggcgatgttc tga			873