



- (51) 국제특허분류:
C12N 1/21 (2006.01) C12N 15/60 (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01) C12P 7/16 (2006.01)
C12N 15/53 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2012/000436
- (22) 국제출원일: 2012년 1월 18일 (18.01.2012)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2011-0022359 2011년 3월 14일 (14.03.2011) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): **서강대학교 산학협력단 (INDUSTRY-UNIVERSITY CO-OPERATION FOUNDATION SOGANG UNIVERSITY)** [KR/KR]; 서울특별시 마포구 신수동 1번지 서강대학교 데이아르관 306호, 121-742 Seoul (KR).
- (72) 발명자: **김**
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): **이진원 (LEE, Jin Won)** [KR/KR]; 서울특별시 송파구 방이동 89 올림픽선수기자촌아파트 201동 1601호, 138-050 Seoul (KR). **이수진 (LEE, Soo Jin)** [KR/KR]; 서울특별시 마포구 염리동 삼성래미안아파트 105동 1504호, 121-090 Seoul (KR). **김보림 (KIM, Bo-Rim)** [KR/KR]; 서울특별시 금천구 시흥동 209번지 현대아파트 507호, 153-030 Seoul

(KR). **최우주 (CHOI, Woo Joo)** [KR/KR]; 서울특별시 성동구 옥수동 한남하이츠아파트 3동 105호, 133-100 Seoul (KR).

(74) 대리인: **양부현 (YANG, Boo-Hyun)**; 서울특별시 관악구 인현동 1659-2 청동빌딩 301호, 151-832 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, 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, QA, RO, RS, RU, RW, 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.

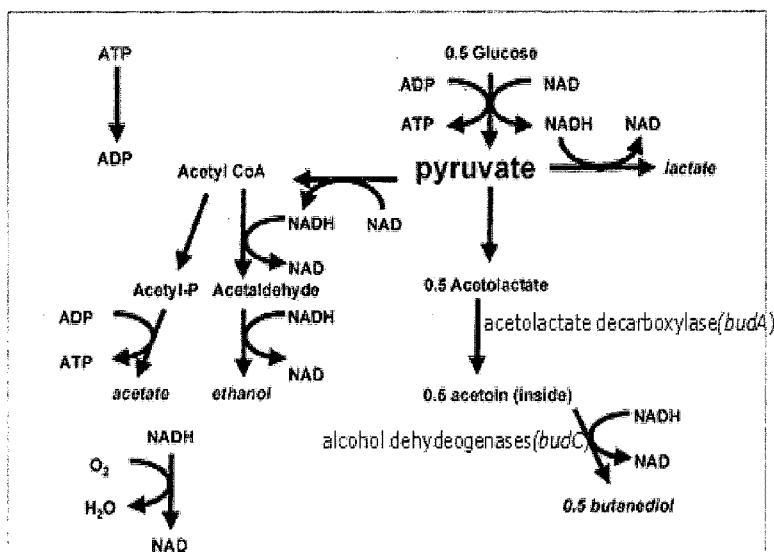
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[다음 쪽 계속]

(54) Title: METHOD FOR PREPARING MESO-2,3-BUTANEDIOL

(54) 발명의 명칭 : meso-2,3-부탄다이올의 제조방법

Fig. 1



(57) Abstract: The present invention relates to a method for preparing meso-2,3-butanediol. More particularly, the present invention relates to colon bacillus for overexpressing meso-2,3-butanediol, which is co-transformed to an expression vector including at least one nucleotide SEQ ID selected from the group consisting of the following nucleotide SEQ IDs: (a) nucleotide-coding acetoin reductase having an amino acid sequence described in SEQ ID 5 of a sequence listing; (b) nucleotide-coding acetolactate decarboxylase; and (c) nucleotide-coding alcohol dehydrogenase. The co-transformed colon bacillus of the present invention can produce 2,3-butanediol, which could not be obtained from wild species. Therefore, it is possible to biosynthesize a large amount of meso-2,3-butanediol through the biosynthesis path expression of meso-2,3-butanediol from glucose, and through metabolic flux change by means of the insertion of the genes of other species.

(57) 요약서: 본 발명은 meso-2,3-부탄다이올

[다음 쪽 계속]

**공개:**

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를
별도 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

제조방법에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 다음의 뉴클레오티드 서열로 구성된 균으로부터 선택되는 최소 1 종의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현벡터로 형질전환된(cotransformed) meso-2,3-부탄다이올 과발현용 대장균을 제공한다: (a) 서열목록 제 5 서열에 기재된 아미노산 서열을 가지는 아세토인 환원효소 (acetoin reductase)를 코딩하는 뉴클레오티드; (b) 아세토락테이트 디카복실레이즈(acetolactate decarboxylase)를 코딩하는 뉴클레오티드; 및 (c) 알코올 디하이드로지네이스(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는 뉴클레오티드. 본 발명의 형질전환 대장균은 야생종에서는 생산하지 못하는 2,3-부탄다이올을 생산할 수 있다. 따라서 당으로부터 meso-2,3-부탄다이올 생합성 경로 발현과 다른 종의 유전자 삽입에 의한 대사 흐름 변경을 통해 대량의 meso-2,3-부탄다이올 생합성이 가능하다.

【명세서】

【발명의 명칭】

meso-2,3-부탄다이올의 제조방법

5 【기술분야】

본 발명은 *meso*-2,3-부탄다이올의 제조방법에 관한 것이다.

【배경기술】

화석연료들의 사용은 지구온난화 가스 및 폐기물을 대량생산하여
 10 인류에게 심각한 환경적인 위기를 초래하고 있다. 화석연료로부터
 생산되어지는 화학공업을 대체할 수 있는, 즉 인류에게 유해한 폐기물의
 생산 및 에너지 소비를 최소화할 수 있는 바이오매스를 원료로 사용하는
 환경 친화적인 새로운 생물 공정의 개발이 필요하다. 바이오에너지로
 대표되어지는 바이오에탄올, 바이오디젤, 바이오가스, 부탄올에 대한
 15 관심이 증가하고 있지만, 언급된 종류의 바이오에너지 모두 전력생산이나
 수송용 연료로 사용될 수 있으나, 실적용 및 생산 방법의 몇몇 단점으로
 인해 새로운 신재생에너지 자원인 hydrocarbon (탄화수소) 형태의 화합물에
 대한 관심이 증가되고 있다. 이에 따라 다양한 산업적 가치를 지닌
 플랫폼용 화합물인 *meso*-2,3-부탄다이올을 대사산물로서 생성할 수 있는
 20 재조합 균주에 대한 관심도 증대되고 있다.

크렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*)는 폐렴간균으로
 그람음성이며 운동성이 없고 유당 발효를 하는 조건적 혐기성 균주이다.
 뉴모니아는 장내세균과(*Enterobacteriaceae*)의 *크렙시엘라*(*Klebsiella*)
 속으로 *크렙시엘라 옥시토카*와 유사하지만, 인돌음성(indole-negative)과
 25 멜레치토스(melezitose), 3-하이드록시부티레이트 (hydroxybutyrate)
 배지에서 성장할 수 있다는 특성으로 구분된다. 주로 흙에서 발견되며
 30% 정도는 혐기 조건에서 질소 고정 능력을 갖고 있다. *크렙시엘라*
*뉴모니아*는 폐렴을 유발한다.

크렙시엘라 옥시토카(*Klebsiella oxytoca*)는 폐렴간균으로
 30 그람음성이며 운동성이 없고 유당 발효를 하는 조건적 혐기성 균주이다.
*옥시토카*는 장내세균 과(*Enterobacteriaceae*)의 *크렙시엘라*(*Klebsiella*)

속으로 크렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumonia*)와 유사하지만, 인돌음성(indole-negative), 멜레치토스(melezitose) 및 3-하이드록시부티레이트(hydroxybutyrate)배지에서 성장할 수 없다는 특성으로 구분된다. 주로 흙에서 발견되며 30% 정도는 혐기 조건에서

5 질소 고정 능력을 갖고 있다. 크렙시엘라 옥시토카는 질병을 유발한다.

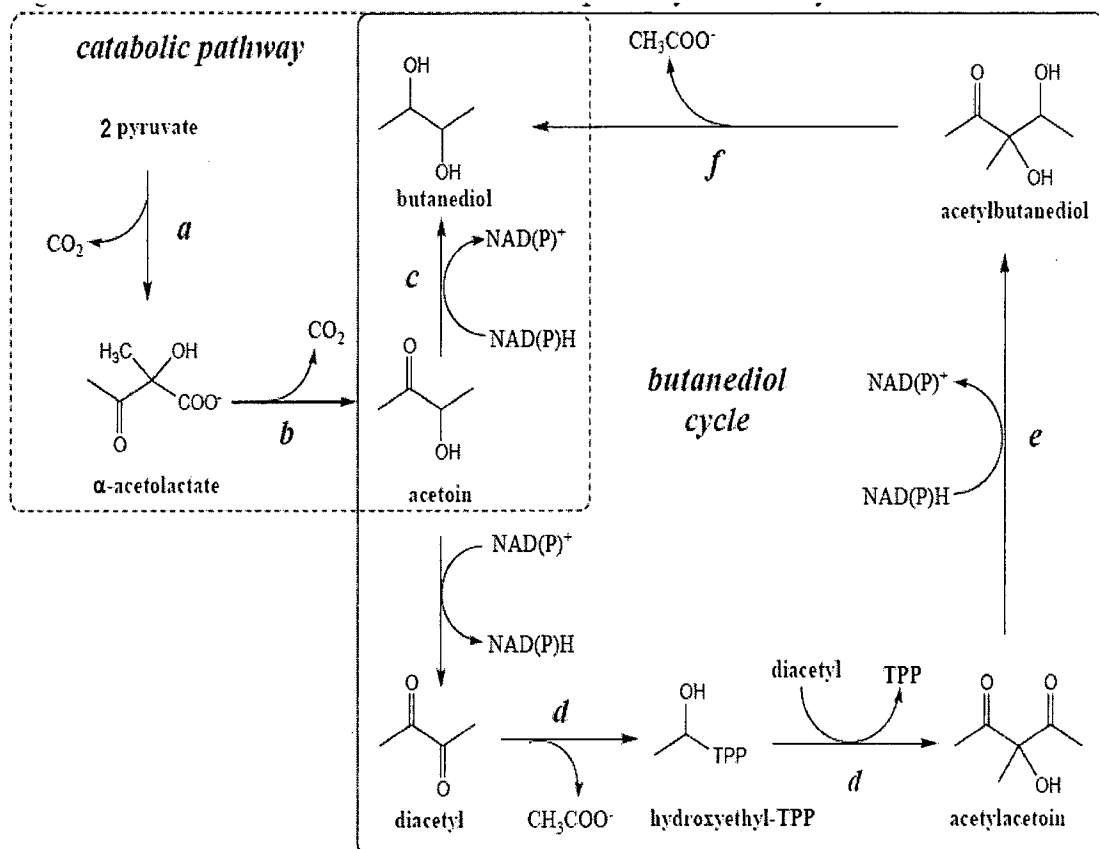
또한, 일반적으로 크렙시엘라 옥시토카 (*Klebsiella oxytoca*)는 단당류로부터 *meso*-2,3-부탄다이올의 세가지 이성질체들의 혼합물을 생합성한다. *meso*-2,3-부탄다이올의 이성질체로는 (*R,R*)-, *meso*-, 및 (*S,S*)- 형태의 세가지 이성질체가 존재한다. 이러한 이성질체의 생합성

10 비율은 균주와 유전자, 그리고 균주의 배양 환경 등에 의해서 매우 급격하게 변화되는 것을 볼 수 있다.

meso-2,3-부탄다이올은 용매, 부동액(anti-freeze solution), 가소제(plasticizer)의 합성에 이용되는 화학물질이다. 화학적인 전환을 통해 합성고무 제조에 사용되는 부타디엔(1,3-butadiene), 액체연료 첨가제(liquid fuel additive)인 MEK(methyl ethyl ketone), 식품 첨가제 향료로써 사용되는 아세토인(acetoin), 디아세틸(diacetyl) 및 폴리우레탄의 전구체 등의 생산이 가능하다.

meso-2,3-부탄다이올은 생물학적 방법으로 생산이 가능하며, 2 차 세계대전 당시 상업적 규모로 개발되어졌다가, 최근 산업바이오 기술 개발과 함께 다시 관심을 받고 있다. *meso*-2,3-부탄다이올은 혼합산 발효(mixed acid fermentation) 대사경로를 통해 생산되며 균주와 탄소원에 따라서 다양한 생산 양산을 보여준다. 글루코스를 탄소원으로 이용하는 경우, 파이루빈산염(pyruvate) 및 아세토인(acetoin)을 거쳐 *meso*-2,3-부탄다이올이 생산되거나 디아세틸(diacetyl)을 거치는 부탄다이올 순환(butanediol cycle)을 통해 *meso*-2,3-부탄다이올이 생산되는 선택적

25 경로를 갖고 있다.



a: α-acetolactate synthase; b: α-acetolactate decarboxylase; c: AC reductase; d: acetylacetoin synthase; e: acetylacetoin reductase; f: acetylbutanediol hydrolase

미생물의 *meso*-2,3-부탄다이올 생산을 위한 균주의 발굴, 재조합 균주의 개량 및 효율적인 전환기술에 해당하는 시도와 노력은 끊임없이 있어왔다. 특히, 크렙시엘라 종은 *meso*-2,3-부탄다이올 생산량이 높다고 알려져 있는 균주로 많은 연구가 진행되고 있다.

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 상세한 설명】

【기술적 과제】

본 발명자들은 유해한 폐기물의 생산 및 에너지 소비를 최소화할 수 있는 신재생에너지 자원인 탄화수소 형태의 화합물을 제조하기 위해 *meso*-

2,3-부탄다이올을 제조할 수 있는 재조합 미생물을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 산업용 균주로 유용한 대장균에 크렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*) 및 크렙시엘라 옥시토카(*Klebsiella oxytoca*)의 2,3-부탄다이올 생합성 경로 관련 유전자 도입을 통해 *meso*-2,3-부탄다이올을

5 생산할 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

본 발명의 목적은 *meso*-2,3-부탄다이올 과발현용 대장균을 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 *meso*-2,3-부탄다이올 생합성 방법을 제공하는데 있다.

10 본 발명의 또 다른 목적은 아세토인 환원효소를 제공하는데 있다.

본 발명의 다른 목적은 아세토인 환원효소(*acetoin reductase*)를 코딩하는 핵산 분자를 제공하는데 있다.

본 발명의 또 다른 목적은 아세토인 환원효소(*acetoin reductase*)를 코딩하는 벡터를 제공하는데 있다.

15

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

【기술적 해결방법】

20 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 뉴클레오티드 서열로 구성된 균으로부터 선택되는 최소 1 종의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현벡터로 형질전환된(*cotransformed*) *meso*-2,3-부탄다이올 과발현용 대장균을 제공한다:

(a) 서열목록 제 5 서열에 기재된 아미노산 서열을 가지는 아세토인 환원효소(*acetoin reductase*)을 코딩하는 뉴클레오티드;

25

(b) 아세토락테이트 디카복실레이즈(*acetolactate decarboxylase*)를 코딩하는 뉴클레오티드; 및

(c) 알코올 디하이드로지네이즈(*alcohol dehydrogenase*)를 코딩하는 뉴클레오티드.

30

본 발명자들은 유해한 폐기물의 생산 및 에너지 소비를 최소화할 수 있는 신재생에너지 자원인 탄화수소 형태의 화합물을 제조하기 위해 *meso*-2,3-부탄다이올을 제조할 수 있는 재조합 미생물을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 산업용 균주로 유용한 대장균에 크렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumonia*)의 아세토락테이트 디카복실레이즈(*acetolactate decarboxylase*) 및 알코올 디하이드로지네이즈(*alcohol dehydrogenase*)와 크렙시엘라 옥시토카(*Klebsiella oxytoca*)의 아세토인 환원효소(*acetoin reductase*)의 유전자 도입을 통해 *meso*-2,3-부탄다이올을 생산할 수 있음을 확인하였다.

본 명세서에서의 용어 '*meso*-2,3-부탄다이올'은 용매, 부동액(*anti-freeze solution*) 및 가소제(*plasticizer*)의 합성에 이용되는 화합물질이다. 화학적인 전환을 통해 합성고무 제조에 사용되는 부타디엔(*1,3-butadiene*), 액체연료 첨가제(*liquid fuel additive*)인 MEK(*methyl ethyl ketone*), 식품 첨가제 향료로써 사용되는 아세토인(*acetoin*)과 디아세틸(*diacetyl*) 및 폴리우레탄의 전구체 등의 생산이 가능하다.

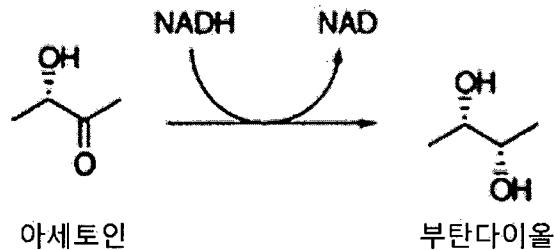
본 명세서에서의 용어 '크렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*)'는 폐렴간균으로 그람음성이며 운동성이 없고 유당 발효를 하는 조건적 혐기성 균주이다. 뉴모니아는 장내세균과(*Enterobacteriaceae*)의 크렙시엘라(*Klebsiella*) 속으로 크렙시엘라 옥시토카와 유사하지만, 인돌음성(*indole-negative*)과 멜레치토스(*melezitose*), 3-하이드록시부티레이트(*hydroxybutyrate*)배지에서 성장할 수 있다는 특성으로 구분된다. 주로 흙에서 발견되며 30% 정도는 혐기 조건에서 질소 고정 능력을 갖고 있다. 크렙시엘라 뉴모니아는 폐렴(*Klebsiella pneumonia*) 질병을 일으킨다.

본 명세서에서의 용어 '크렙시엘라 옥시토카(*Klebsiella oxytoca*)'는 폐렴간균으로 그람음성이며 운동성이 없고 유당 발효를 하는 조건적 혐기성 균주이다. 옥시토카는 장내세균 과(*Enterobacteriaceae*)의 크렙시엘라(*Klebsiella*) 속으로 크렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumonia*)와 유사하지만, 인돌음성(*indole-negative*), 멜레치토스(*melezitose*) 및 3-하이드록시부티레이트(*hydroxybutyrate*)배지에서 성장할 수 없다는 특성으로 구분된다. 주로

흡에서 발견되며 30% 정도는 혐기 조건에서 질소 고정 능력을 갖고 있다. 크렙시엘라 옥시토카는 질병을 유발한다.

본 명세서에서 용어 ‘아세트인 환원효소’는 다음의 반응식을 통해 아세트인(acetoin)을 부탄다이올로 합성하는 효소를 말한다:

[반응식]



바람직하게는, 서열목록 제 5 서열에 기재된 아미노산 서열을 가지는 아세트인 환원효소(acetoin reductase)를 코딩하는 핵산 분자이고, 보다 바람직하게는, 상기 핵산 분자는 서열목록 제 6 서열에 기재된 뉴클레오타이드 서열을 갖는다.

본 명세서에서, 용어 ‘아세토락테이트 디카복실실레이즈(acetolactate decarboxylase)’는 *meso*-2,3-부탄다이올의 전구체인 아세토인을 생산하는 효소로서, *budA* 유전자가 이를 코딩하는 유전자이다.

본 발명의 발현벡터에서 발현되는 상기 아세토락테이트 디카복실실레이즈는 크렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*)으로부터 유래한 것을 사용하는 것이 바람직하다. 더욱 바람직하게는 서열목록 제 1 서열로 표시되는 아세토락테이트 디카복실실레이즈를 발현하도록 할 수 있으며, 상기 아세토락테이트 디카복실실레이즈를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 바람직하게는 서열목록 제 3 서열로 표시될 수 있다.

본 명세서에서의 용어 ‘알코올 디하이드로지네이즈’는 부탄다이올을 생산하는 효소로서 *budC* 유전자가 이를 코딩하는 유전자이다.

본 발명의 발현벡터에서 발현되는 상기 알코올 디하이드로지네이즈는 크렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*)으로부터 유래한 것을 사용하는 것이 바람직하다. 더욱 바람직하게는 서열목록 제 2 서열로 표시되는 알코올 디하이드로지네이즈를 발현하도록 할 수 있으며, 상기

알코올 디하이드로지네이즈를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 바람직하게는 서열목록 제 4 서열로 표시될 수 있다.

본 명세서에서 용어 “핵산 분자”는 DNA(gDNA 및 cDNA) 그리고 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 갖으며, 핵산 분자에서 기본 구성 단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체 (analogue)도 포함한다(Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, Chemical Reviews, 90:543-584(1990)).

뉴클레오타이드에서의 변이는 단백질에서 변화를 가져오지 않는 것도 있다. 이러한 핵산은 기능적으로 균등한 코돈 또는 동일한 아미노산을 코딩하는 코돈(예를 들어, 코돈의 축퇴성에 의해, 아르기닌 또는 세린에 대한 코돈은 여섯 개이다), 또는 생물학적으로 균등한 아미노산을 코딩하는 코돈을 포함하는 핵산분자를 포함한다.

또한, 뉴클레오타이드에서의 변이가 아세트인 환원효소, 아세토락테이트 디카복실레이즈 또는 알코올 디하이드로지네이즈(alcohol dehydrogenase) 자체에 변화를 가져올 수도 있다. 아세트인 환원효소, 아세토락테이트 디카복실레이즈 또는 알코올 디하이드로지네이즈(alcohol dehydrogenase)의 아미노산에 변화를 가져오는 변이인 경우에도 본 발명의 아세트인 환원효소, 아세토락테이트 디카복실레이즈 또는 알코올 디하이드로지네이즈(alcohol dehydrogenase)와 거의 동일한 활성을 나타내는 것이 얻어질 수 있다.

본 발명의 아세트인 환원효소, 아세토락테이트 디카복실레이즈 또는 알코올 디하이드로지네이즈(alcohol dehydrogenase)에 포함될 수 있는 생물학적 기능 균등물은 본 발명의 아세트인 환원효소와 균등한 생물학적 활성을 발휘하는 아미노산 서열의 변이에 한정될 것이라는 것은 당업자에게 명확하다.

이러한 아미노산 변이는 아미노산 결사슬 치환체의 상대적 유사성, 예컨대, 소수성, 친수성, 전하, 크기 등에 기초하여 이루어진다. 아미노산 결사슬 치환체의 크기, 모양 및 종류에 대한 분석에 의하여, 아르기닌, 라이신과 히스티딘은 모두 양전하를 띤 잔기이고; 알라닌, 글라이신과 세린은 유사한 크기를 갖으며; 페닐알라닌, 트립토판과 타이로신은 유사한

모양을 갖는다는 것을 알 수 있다. 따라서, 이러한 고려 사항에 기초하여, 아르기닌, 라이신과 히스티딘; 알라닌, 글라이신과 세린; 그리고 페닐알라닌, 트립토판과 타이로신은 생물학적으로 기능 균등물이라 할 수 있다.

5 변이를 도입하는 데 있어서, 아미노산의 소수성 인덱스(hydrophobic index)가 고려될 수 있다. 각각의 아미노산은 소수성과 전하에 따라 소수성 인덱스가 부여되어 있다: 아이소루이신(+4.5); 발린(+4.2); 루이신(+3.8); 페닐알라닌(+2.8); 시스테인/시스타인(+2.5); 메티오닌(+1.9); 알라닌(+1.8); 글라이신(-0.4); 쓰레오닌(-0.7); 세린(-0.8); 트립토판(-0.9); 타이로신(-1.3); 프롤린(-1.6); 히스티딘(-3.2); 글루타메이트(-3.5); 글루타민(-3.5); 아스파르테이트(-3.5); 아스파라긴(-3.5); 라이신(-3.9); 및 아르기닌(-4.5).

단백질의 상호적인 생물학적 기능(interactive biological function)을 부여하는 데 있어서 소수성 아미노산 인덱스는 매우 중요하다. 유사한 소수성 인덱스를 가지는 아미노산으로 치환하여야 유사한 생물학적 활성을 보유할 수 있다는 것은 공지된 사실이다. 소수성 인덱스를 참조하여 변이를 도입시키는 경우, 바람직하게는 ± 2 이내, 보다 바람직하게는 ± 1 이내, 보다 더 바람직하게는 ± 0.5 이내의 소수성 인덱스 차이를 나타내는 아미노산 사이에 치환을 한다.

20 한편, 유사한 친수성 값(hydrophilicity value)을 가지는 아미노산 사이의 치환이 균등한 생물학적 활성을 갖는 단백질을 초래한다는 것도 잘 알려져 있다. 미국 특허 제 4,554,101 호에 개시된 바와 같이, 다음의 친수성 값이 각각의 아미노산 잔기에 부여되어 있다: 아르기닌(+3.0); 라이신(+3.0); 아스파테이트(+3.0 ± 1); 글루타메이트(+3.0 ± 1); 세린(+0.3); 아스파라긴(+0.2); 글루타민(+0.2); 글라이신(0); 쓰레오닌(-0.4); 프롤린(-0.5 ± 1); 알라닌(-0.5); 히스티딘(-0.5); 시스테인(-1.0); 메티오닌(-1.3); 발린(-1.5); 루이신(-1.8); 아이소루이신(-1.8); 타이로신(-2.3); 페닐알라닌(-2.5); 트립토판(-3.4).

30 친수성 값을 참조하여 변이를 도입시키는 경우, 바람직하게는 ± 2 이내, 보다 바람직하게는 ± 1 이내, 보다 더 바람직하게는 ± 0.5 이내의 친수성 값 차이를 나타내는 아미노산 사이에 치환을 한다.

분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다(H. Neurath, R.L.Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979). 가장 통상적으로 일어나는 교환은 아미노산 잔기 Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly 간의 교환이다.

상술한 생물학적 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, 본 발명의 아세트인 환원효소 또는 이를 코딩하는 핵산 분자는 서열목록에 기재된 서열과 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기한 본 발명의 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 예컨대 최소 99%의 상동성을 나타내는 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. Biol. 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 및 tblastx 와 같은 서열 분석 프로그램과 연동되어 이용할 수 있다. BLSAT 는 <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.

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 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. Biol. 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 tblastx 와 같은 서열 분석 프로그램과 연동되어 이용할 수 있다. BLSAT 는 <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.html 에서 확인할 수 있다.

상기 유전자들은 발현벡터 내부에 도입되어 대장균에서 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 DNA 로부터 유도되거나, 또는 둘 다의 요소를 함유한다.

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.

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
5 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 해독을 조절하게 된다.

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, *tac* 프로모터, *lac* 프로모터, *lacUV5* 프로모터, *lpp* 프로모터, *pLλ* 프로모터, *pRλ* 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, DH5α 등)가 이용되는 경우, *E. coli* 트립토판 생합성 경로의
10 프로모터 및 오퍼레이터 부위(Yanofsky, C., J. Bacteriol., 158:1018-1024(1984)) 그리고 파아지 λ의 좌향 프로모터 (*pLλ* 프로모터, Herskowitz, I. and Hagen, D., Ann. Rev. Genet., 14:399-445(1980))가 조절 부위로서 이용될 수 있다.

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 및 pUC18K 등), 파지(예: λgt4?λB, λ-Charon, λΔz1 및 M13 등) 또는 바이러스(예: SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있으나, 바람직하게는 *meso*-2,3-부탄다이올 생합성에 이용될 박테리아인
20 대장균을 위한 특정 유전자를 미생물 생체 내로 운반하여 외부로부터 삽입된 유전자의 발현을 효과적으로 조절할 수 있는 pUC18K를 사용한다.

pUC18K 벡터는 pET28a의 카나마이신 저항성 유전자를 pUC18의 NDE1 제한효소 부위에 삽입하여서 pUC18K를 제작한 것으로서, 크렙시엘라 종이 앰피실린에 대한 내성을 가지고 있어서 카나마이신이라는 새로운 항생제
30 내성 유전자를 벡터에 도입함으로써 유전자 조작을 가능하게 하기 위함이다.

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

5 본 발명의 발현 벡터는 프로모터서열, 발현 대상 유전자(구조 유전자)의 뉴클레오티드 서열 및 터미네이터 서열을 포함하며, 상기서열들이 5'-3' 순서대로 연결되는 것이 바람직하다. 본 발명에서는 *budA* 와 *budC* 로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 서열이 5'-3' 순서대로 연결되어 제공되었다.

10 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.

15 상기 유전자가 포함된 발현벡터는 이후 대장균 내부로 도입되는데, 본 발명의 벡터를 대장균 내로 운반하는 방법은 CaCl₂ 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.

25 바람직한 구현예에 따르면, 상기 *meso*-2,3-부탄다이올 과발현 대장균은 아세토락테이트 디카복실레이즈(acetolactate decarboxylase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현벡터로 형질전환된 것을 특징으로 하는 2,3-부탄다이올 과발현용 대장균이다.

30 바람직한 구현예에 따르면, 상기 *meso*-2,3-부탄다이올 과발현 대장균은 알코올 디하이드로지네이즈(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현벡터로 형질전환된 것을 특징으로 하는 2,3-부탄다이올 과발현용 대장균이다.

바람직하게는, 상기 *meso*-2,3-부탄다이올 과발현 대장균은 (a) 아세토락테이트 디카복실실레이즈(acetolactate decarboxylase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열; 및 (b) 알코올 디하이드로지네이즈(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현벡터로 공동
5 형질전환된 것을 특징으로 하는 *meso*-2,3-부탄다이올 과발현용 대장균이다.

본 발명의 벡터를 안정되면서 연속적으로 클로닝 및 발현시킬 수 있는 숙주 세포는 당업계에 공지되어 어떠한 숙주 세포도 이용할 수 있으며, 예컨대, *E. coli* JM109, *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* RR1, *E. coli* LE392, *E. coli* B, *E. coli* X 1776, *E. coli* W3110, 바실러스 서브틸리스,
10 바실러스 추린겐시스와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세센스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등이 있다.

본 발명의 벡터를 숙주 세포 내로 운반하는 방법은, CaCl₂ 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.
15

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명은 전기천공방법을 이용하여 형질전환 미생물을 제조하였다.
20

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 *meso*-2,3-부탄다이올 생합성 방법을 제공한다:

(a) 제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항의 대장균을 배양하여 *meso*-2,3-부탄다이올을 생합성하는 단계; 및
25

(b) 상기 단계 (a)의 생합성된 *meso*-2,3-부탄다이올을 수득하는 단계.

바람직하게는, 상기 대장균은 상기 서열목록 제 5 서열에 기재된 아미노산 서열을 가지는 아세토인 환원효소(acetoin reductase)을 코딩하는 뉴클레오티드에 형질전환된 대장균이며 상기 형질전환 대장균은 *meso*-2,3-부탄다이올 거울상이성질체 선택적(enantioselective) 과발현을 한다.
30

본 명세서에서, 용어 ‘거울상이성질체 선택적’은 거울상 이성질체 중 특정 거울상 이성질체를 선택적으로 발현하는 것을 말한다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 형질전환된 미생물은 *meso*-2,3-부탄다이올 이성질체를 생산한다.

5 바람직하게는, 상기 형질전환 대장균은 pH 5 내지 pH 7 조건에서 2,3-부탄다이올의 최적 수율을 나타낸다.

바람직하게는, 상기 형질전환 대장균은 35℃ 내지 45℃ 조건에서 2,3-부탄다이올의 최적 수율을 나타낸다.

10 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열목록 제 5 서열에 기재된 아미노산 서열을 가지는 아세토인 환원효소(acetoin reductase)를 제공한다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열목록 제 5 서열에
15 기재된 아미노산 서열을 가지는 아세토인 환원효소(acetoin reductase)를 코딩하는 핵산 분자를 제공한다.

바람직하게는, 상기 핵산 분자는 서열목록 제 6 서열에 기재된 뉴클레오타이드 서열을 가진다.

20 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 서열목록 제 5 서열에 기재된 아미노산 서열을 가지는 아세토인 환원효소(acetoin reductase)를 코딩하는 핵산 분자 또는 서열목록 제 6 서열에 기재된 뉴클레오타이드 서열의 핵산 분자를 포함하는 벡터를 제공한다.

25 【유리한 효과】

(a) 본 발명은 다음의 뉴클레오타이드 서열로 구성된 균으로부터 선택되는 최소 1 종의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현벡터로 형질전환된(cotransformed) *meso*-2,3-부탄다이올 과발현용 대장균을 제공한다: (i) 서열목록 제 5 서열에 기재된 아미노산 서열을 가지는
30 아세토인 환원효소(acetoin reductase)을 코딩하는 뉴클레오타이드; (ii) 아세토락테이트 디카복실레이즈(acetolactate decarboxylase)를 코딩하는

뉴클레오티드; 및 (iii) 알코올 디하이드로지네이즈(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는 뉴클레오티드.

(b) 본 발명의 형질전환 대장균은 야생종 크렙시엘라와 비교하였을 때, 포도당의 소모량에 따른 *meso*-2,3-부탄다이올의 생산량이 증가하였다.

5 (c) 본 발명의 형질전환 대장균은 야생종에서는 생산하지 못하는 2,3-부탄다이올을 생산할 수 있다. 따라서 당으로부터 2,3-부탄다이올 생합성 경로 발현과 다른 종의 유전자 삽입에 의한 대사 흐름 변경을 통해 대량의 *meso*-2,3-부탄다이올 생합성이 가능하다. 화학공업에 유용한
10 기초가 될 플랫폼용 화합물인 *meso*-2,3-부탄다이올을 비병원성 균주에서 대량 생산하는 것은 친환경적이며 경제적으로도 큰 강점을 갖출 수 있을 것으로 기대된다.

【도면의 간단한 설명】

도 1은 크렙시엘라 뉴모니아 생체 내에서 포도당에서부터 2,3-
15 부탄다이올까지의 2,3-부탄다이올 생합성 경로를 보여주는 도식이다.

도 2는 크렙시엘라 뉴모니아 유전자를 도입한 이중 대장균 생체 내에서 포도당에서부터 *meso*-2,3-부탄다이올까지의 *meso*-2,3-부탄다이올 생합성 경로를 보여주는 도식이다.

도 3는 발현 벡터인 pUC18을 에스케리치아 콜라이-크렙시엘라 셔틀
20 벡터(*Escherichia coli*-*Klebsiella* settle vector)로 사용하기 위해 카나마이신 저항성(Kanamycin resistance) 유전자를 삽입한 구조의 도식화이다. 이를 pUC18K라 명명하였다.

도 4은 에스케리치아 콜라이-크렙시엘라 셔틀 벡터인 pUC18K에
25 크렙시엘라 뉴모니아의 *budA* 유전자가 삽입되어있는 구조의 도식화이다. 이를 pSB1라 명명하였다.

도 5는 에스케리치아 콜라이-크렙시엘라 셔틀 벡터인 pUC18K에
크렙시엘라 뉴모니아의 *budC* 유전자가 삽입되어있는 구조의 도식화이다. 이를 pSB2라 명명하였다.

도 6은 에스케리치아 콜라이-크렙시엘라 셔틀 벡터인 pUC18K에
30 크렙시엘라 뉴모니아의 *budA* 및 *budC* 유전자가 삽입되어있는 구조의 도식화이다. 이를 pSB3라 명명하였다.

도 7은 크렙시엘라 뉴모니아 염색체를 주형으로 하여 *budA*, *budC* 각각의 유전자를 삽입한 도4, 도5와 *budA*, *budC* 두 개의 유전자를 삽입한 도 6의 재조합 플라스미스를 제한효소를 이용하여 확인한 전기영동 사진이다. 레인 1: 사이즈마커, 레인 2: *E. coli*에서 EcoR I 과 BamH I 로 절단한 *budA* ::pUC18K::*budA*, 레인 3: *E. coli*에서 BamH I 과 Xba I 로 절단한 *budC* ::pUC18K::*budC*, 레인 4: *E. coli*에서 EcoR I 과 BamH I 로 절단한 *budA* ::pUC18K::*budA*::*budC*, 레인 5: *E. coli*에서 BamH I 과 Xba I 로 절단한 *budC* ::pUC18K::*budA*::*budC*.

도 8은 대장균 야생종과 재조합체의 시간에 따른 생장(OD)를 나타낸 그래프이다.

도 9는 본 발명의 *E. coli* ::pSB1 재조합 균주가 글루코즈를 소모함에 따라 생성한 아세트인의 양을 나타낸 그래프이다.

도 10는 본 발명의 *E. coli* ::pSB2 재조합 균주가 배지에 넣어준 아세트인을 소모함에 따라 생성한 *meso*-2,3-부탄다이올의 양을 나타낸 그래프이다.

도 11은 본 발명의 *E. coli* ::pSB3 재조합 균주가 글루코즈를 소모함에 따라 생성한 *meso*-2,3-부탄다이올 및 생산물의 양을 나타낸 그래프이다.

도 12는 야생종 크렙시엘라 뉴모니아가 글루코즈를 소모함에 따라 생성한 *meso*-2,3-부탄다이올 및 생산물의 양을 나타낸 그래프이다.

도 13은 본 발명의 *E. coli* ::pSB3 재조합 균주와 야생종 크렙시엘라 뉴모니아의 *meso*-2,3-부탄다이올 생산량 및 수율을 비교한 표이다.

도 14 은 대장균에 박테리아 그람 음성균인 크렙시엘라 옥시토카의 글루코즈를 *meso*-2,3-부탄다이올(*meso*-2,3-butanediol)로 전환하는 대사에 관여하는 효소를 암호화하는 유전자를 도입한 경우, 중간산물 및 *meso*-2,3-부탄다이올(*meso*-2,3-butanediol)의 생합성 경로를 보여주는 도식을 보여준다.

도 15 는 발현 벡터인 pUC18K 의 구조를 보여준다. pUC18K 는 *Klebsiella* 및 *E. coli* 서를 벡터인 pUC18 벡터에 카나마이신 내성 유전자를 삽입한 구조이다. 화살표 머리(▶)는 유전자 서열의 5' 에서 3'

의 방향성을 의미하는 것이고, 가로 마디(□)는 제한효소 부위가 있는 부분을 나타낸다.

도 16 는 셔틀 벡터인 pUC18K 에 *크렙시엘라 옥시토카*의 *budC* 유전자를 삽입한 구조의 도식화이다. 이를 pSB3 이라 명명하였다. 화살표 머리(▶)는 유전자 서열의 5' 에서 3' 의 방향성을 의미하는 것이고, 가로 마디(□)는 제한효소 부위가 있는 부분을 나타낸다.

도 17 는 *크렙시엘라 옥시토카* 염색체를 주형으로 한 아세트인 환원효소 (acetoin reductase, *budC*) 유전자를 삽입한 pSB3 에 제한효소를 이용하여 유전자의 삽입 여부를 확인한 전기영동 사진을 보여준다. 1 열은 10 사이즈마커이고, 2 열은 pSB3 에 BamH I 및 Xba I 를 제한효소 처리한 결과이다. 사이즈마커(Takara, 일본)는 500 bp DNA 래더(ladder)를 사용하였으며, 제일 아래에 표시된 마커로부터 역행해서 올라오면 각각의 크기가 500 bp, 1000 bp, 1500 bp 및 2000 bp 의 순이다.

도 18 는 pSB3 를 대장균에 도입하여 배양하는 경우, IPTG 0.1 mM 에 15 의해 과발현을 유도하였을 때, 단백질의 발현 여부를 확인한 SDS-PAGE 겔 영동 사진을 보여준다. 1 열은 사이즈마커(size marker)이고, 2 열은 야생형 대장균이며, 3 열은 pSB3 을 도입한 대장균의 *budC* 단백질의 발현 결과를 보여준다.

도 19 은 본 발명의 *E. coli* ::pSB3 재조합 균주가 아세트인을 20 첨가한 배지에서 시간에 따른 *meso*-2,3-부탄다이올 생산량을 나타낸 그래프이다.

도 7 는 본 발명의 *E. coli* ::pSB3 재조합 균주의 pH 에 따른 아세트인 첨가 배지에서의 *meso*-2,3-부탄다이올 생산 수율을 나타낸 그래프이다.

25 도 20 는 본 발명의 *E. coli* ::pSB3 재조합 균주의 온도에 따른 아세트인 첨가 배지에서의 *meso*-2,3-부탄다이올 생산 수율을 나타낸 그래프이다.

【발명의 실시를 위한 형태】

30 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.

실시예

5

실시예 1: 크렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*)

크렙시엘라 뉴모니아의 *budA* 및 *budC* 유전자를 발현하는 재조합 플라스미드의 제조

10 크렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*) KCTC 2242 의 염색체를 주형으로 하여 2,3-부탄다이올 생산을 위한 효소를 암호화하는 *budA* 및 *budC* 의 유전자서열(Genbank, NCBI)의 프라이머(primer)를 제작하여 중합효소연쇄반응(PCR, 다카라 코리아) 방법을 통해 클로닝 하였다.

【표 1】

유전자	생산 효소
크렙시엘라 뉴모니아 <i>budA</i>	acetolactate decarboxylase
크렙시엘라 뉴모니아 <i>budC</i>	alcohol dehydrogenase

15

【표 2】

유전자	프라이머 서열		제한 효소
<i>budA</i>	F	5'-GAA TTC ATG AAC CAT TCT GTT GAA TGC TC-3'	EcoR I
	R	5'-GGA TCC TTA GTT TTC GAC TGA GCG AAT G-3'	BamH I
<i>budC</i>	F	5'-GGA TCC ATG AAA AAA GTC GCA CTT GTT ACC-3'	BamH I
	R	5'-TCT AGA TTA GTT AAA CAC CAT GCC GC-3'	Xba I

표 1 의 유전자들만 특이적으로 증폭하도록 제작된 표 2 의 프라이머(primer)를 사용하여 증폭하였다. 크렙시엘라 뉴모니아의 *budA* 는 20 780 bp(base pair), 크렙시엘라 뉴모니아의 *budC* 는 771 bp 의 크기로 증폭되었다. 각각의 중합효소연쇄반응은 통상적인 반응조건(10 mM Tris-HCl (pH9.0), 50 mM KCl(potassium chloride), 0.1% 트리톤 X-100, 2 mM

MgSO₄, Taq DNA 중합효소(다카라)) 아래에서 95℃/5 분(변성), 66℃/1 분(어닐링) 및 72℃/1 분(신장)로 1 회 수행한 후, 95℃/1 분(변성), 66℃/30 초(어닐링) 및 72℃/1 분(신장) 주기로 30 회 반복 수행하였다. 마지막 단계로 안정적인 신장을 위해 95℃/1 분(변성), 66℃/1 분(어닐링) 및 72℃/5 분(신장) 반응하였다. 중합효소연쇄반응 후 증폭된 DNA 는 0.8% 아가로스 젤 상에서 확인 후 정제하여 T-벡터 클로닝에 이용하였다. pGEM-T 이지 벡터(DaKaRa)에 라이게이션을 수행하여 재조합 플라스미드인 pGEM-T::*budA*, pGEM-T::*budC* 및 pGEM-T::*budA*::*budC* 를 제작하였다. 상기 재조합 플라스미드들은 대장균(*E. coli* DH5a 컴피턴트 세포, RBS)에서 형질 전환하여 균주를 제조하였다.

재조합 플라스미드 *pSB1*, *pSB2* 및 *pSB3*의 제조

상기 재조합 플라스미드인 pGEM-T::*budA*, pGEM-T::*budC* 및 pGEM-T::*budA*::*budC*를 대장균과 크렙시엘라의 셔틀 벡터인 pUC18K(도 3)를 표 2에 열거된 제한효소 들로 37℃ 항온수조(water bath)에서 약 2시간 동안 반응하였다. 여기서 사용한 pUC18K는 기존의 pET28a 벡터에 카나마이신에 저항성을 갖는 유전자를 클로닝한 후 이를 pUC18 벡터에 삽입하여 제작하였다. 보다 상세하게 pUC18 벡터는 다카라 (Takara Shuzo Co. Ltd., Kyoto)에서 구입하였고, pET28a(Takara Shuzo Co. Ltd., Kyoto)의 카나마이신 저항성 유전자를 pUC18의 NDE1 제한효소 사이트에 삽입하여 pUC18K를 제작하였다. 이것은 크렙시엘라 종이 앰피실린에 대한 내성을 가지고 있어서 카나마이신이라는 새로운 항생제 내성 유전자를 벡터에 도입함으로써 유전자 조작을 가능하게 하기 위함이다. 상기 열거한 제한효소들로 각각의 DNA 절편들을 절단한 뒤 pUC18K 벡터의 다중삽입부위(multicloning site)에 도 4, 5 및 6에 개시된 것과 같이 T4 라이게이즈(Dakara)를 이용하여 재조합 플라스미드를 완성하였다. 각 단계마다 삽입된 유전자의 삽입여부를 확인하기 위해 대장균(*E. coli* DH5a 컴피턴트 세포, RBS)에 형질 전환 시킨 후 재조합 플라스미드를 추출하여 이를 다시 원래 삽입부위의 제한효소로 처리하여 잘린 DNA 조작의 크기를 0.8% 아가로스 젤 상에서 전기영동하여 비교하는 방법을 사용하였다. 도 7에서는 재조합 된 플라스미드가 제한효소에 의해 절단된 결과를

보여주었다. 증폭된 산물을 표 2에 열거된 제한효소들을 이용하여 pUC18K 벡터에 도입하여 pSB1, pSB2 및 pSB3를 제조하였다. 도 4, 5 및 6은 상기 pSB1(크렙시엘라 뉴모니아의 *budA*를 암호화하는 유전자 포함), pSB2(크렙시엘라 뉴모니아의 *budC*를 암호화하는 유전자 포함) 및
 5 pSB3(크렙시엘라 뉴모니아의 *budA* 및 *budC*를 암호화하는 유전자 포함)라 명명된 벡터의 지도(map)를 나타내는 도면이다.

이중 대장균 형질전환체 제조

통상적으로 클로닝용으로 많이 쓰이는 대장균의 경우 CaCl_2 버퍼를
 10 사용한 컴피턴트 세포를 만든 후 열 충격(42°C) 방법에 의해 플라스미드를 숙주세포 내로 도입하지만, 본 발명에서는 형질전환체의 안정적 제조와 효율을 높이기 위해 전기천공법(electroporation)에 의한 형질전환방법을 사용하였다. 상기 전기 충격에 의한 형질전환방법을 위해 16시간 동안 전
 배양 된 $30\ \mu\text{l}$ (0.1 %)의 야생종 *에스케리키아 콜라이*(*Escherichia coli*)
 15 DH5 α 배양액을 시험관에 들어있는 3 ml의 LB(10 g/L tripton, 10 g/L NaCl, 5 g/L 효모 추출물)배지에 접종하여 배양액의 흡광도(absorbance)가 600 nm 파장에서 0.6에 이르렀을 때, 배양액 전체에 해당하는 3 ml의 배양액은 원심 분리(12000 rpm, 1분)하여 상등액 및 세포를 분리하였다. 모아진
 세포는 10% 글리세롤 1 ml로 1회 세척해준 후, 다시 원심분리(12000 rpm,
 20 1분)하여 상등액과 세포로 나누어 주었다. 세포는 10% 글리세롤 $80\ \mu\text{l}$ 로 현탁하였다. 현탁 된 세포에 1-3 μl 의 재조합 플라스미드(pJS01, pJS02, pJS03, pJS04 및 pJS07)를 첨가하였다. 상기 플라스미드가 들어있는
 세포가 분주된 $80\ \mu\text{l}$ 의 액체를 전기천공법(electroporation)용 큐벳(BIO-
 RAD, Gene pulser cuvette)에 담아 진 펄서 엑스셀(Gene pulser Xcell,
 25 BIO-RAD, 미국)로 전기 충격(1800 v, 25 μF , 200 Ω)을 가하였다. 미리
 준비해둔 1 ml LB(10 g/L 트리톤, 10 g/L NaCl, 5 g/L 효모추출물)를
 첨가한 뒤 1시간 동안 200 rpm, 37°C 에서 진탕 배양하였다. 배양된
 형질전환체는 암피실린($50\ \mu\text{g/ml}$)과 카나마이신($50\ \mu\text{g/ml}$)이 첨가된 LB
 아가(10 g/L 트리톤, 10 g/L NaCl, 5 g/L 효모추출물, 아가 20 g/L)에서
 30 단일 균체가 생성될 때까지 37°C 에서 배양하였다. 이를 통해 재조합
 플라스미드인 pSB1, pSB2 및 pSB3를 *E. coli* DH5 α 균주에 형질 전환한 *E.*

coli SGSB1, *E. coli* SGSB2 및 *E. coli* SGSB3 재조합 균주를 개발하였다(표 3).

【표 3】

개발균주	-
<i>E. coli</i> SGSB1	<i>E. coli</i> DH5a::pUC18K:: <i>budA</i>
<i>E. coli</i> SGSB2	<i>E. coli</i> DH5a::pUC18K:: <i>budC</i>
<i>E. coli</i> SGSB3	<i>E. coli</i> DH5a::pUC18K:: <i>budA</i> :: <i>budC</i>

5 이종 대장균의 배양 및 재조합 균주로부터 단백질의 생산

E. coli DH5a 균주에 형질 전환한 재조합 균주들을 LB(엠포실린 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 카나마이신 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 포함) 배지에 16시간 정도 전배양 시키고 그 배양액을 다시 엠포실린 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 카나마이신 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 포함된 LB 배지에 접종하여 흡광도가 600 nm에서 0.6-1.0 되었을 때 글리세롤 농도가 25%가 되게 보관용 균액으로 만든 다음 -80°C에서 배양실험 시까지 저장하였다. 상기에서 개발된 재조합 균주의 배양은 보관용 균액 30 μl 을 10 ml 튜브(bottom tube)에 들어있는 엠포실린(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)과 카나마이신(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 첨가된 3 ml의 LB에 16시간 동안 배양한 후, 이를 다시 500 ml 플라스크에 들어있는 엠포실린(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)과 카나마이신(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 첨가된 200 ml의 LB(10 g/L 트리톤, 10 g/L NaCl, 5 g/L 효모추출물) 배지에 0.5 %의 전기 배양액을 접종하여 37°C, 170 rpm 상태에서 24시간 동안 배양하였다. 재조합 균주와 비교하기 위한 크렙시엘라 뉴모니아 KCTC 2242 야생종은 엠포실린만을 포함하는 LB에서 재조합 균주와 동일한 조건으로 실험을 실시하였다. 단백질 발현을 위해 배양액의 흡광도(absorbance)가 600 nm 파장에서 0.6에 이르렀을 때 유도물질인 IPTG (isopropylthio- β -D-galactoside, sigma, USA)를 첨가 (최종농도 1 mM/ml)하여 재조합 단백질의 발현을 유도하였다. 또한 알코올 디하이드로지네이즈(alcohol dehydrogenase)의 확인 실험에서는 위와 동일한 배지조성에 아세트인 15 mM을 첨가해주었고, 나머지 배양조건은 동일하였다. 본 발명에서 개발된 이종 대장균 재조합 균주들은 생장곡선에서 야생종 대장균과 비교하였을 때, *E. coli* SGSB1은 약간 더

높은 OD값을 보였고, 다른 두 재조합체는 야생종에 비해 약간 저해되는 현상을 보였다(도 8). 이는 다른 종의 유전자의 삽입에 의한 독성이나 저해가 약간은 있었던 것으로 사료된다. 그러나 크렙시엘라와 대장균에 모두 발현이 가능한 안정적인 벡터를 사용하였기 때문에 반복적으로 배양한다면, 성장능력을 높일 수 있을 것이라 판단된다.

아세트인(acetoin) 및 2,3-부탄다이올(2,3-butanediol)의 측정

재조합 균주의 배양액 내의 2,3-부탄다이올 중간물질이면서 2,3-부탄다이올 생산의 유도체 물질인 아세트인과 2,3-부탄다이올의 농도를 측정하기 위해 배양 중 일정시간마다 채취한 시료를 원심분리(12000 rpm, 10분)후 상등액과 세포를 분리하여 -40℃에서 보관하였다. 상기 배양액으로부터 분리된 상등액은 각각 1 ml씩 0.2 μm 필터를 이용하여 정제한 후, 표 4의 조건하에서 고속액체크로마토그래피(HPLC) 정량 분석을 실시하였다.

【표 4】

품 목	조 건
HPLC 모델	(영린기기, Korea), UV730D (영린기기, Korea)
컬럼	Aminex HPX-87H(Biorad, USA)
유속	0.8 ml/min
주입부피	30ul
이동상	0.001N 황산
오븐 온도	60℃
작동 시간	20 분

본 발명에서 측정한 아세트인은 2,3-부탄다이올 생합성 과정의 중간체이면서 유도체이다. 따라서 이와 관련된 유전자를 포함하고 있는 *E. coli* SGSB1 및 *E. coli* SGSB3 재조합 균주와 야생종 대장균의 생산량 변화를 관찰하였다. 야생종의 경우에는 이와 관련된 유전자가 존재하지 않으므로 아세트인이 생산되지 않으며, *E. coli* SGSB2 는 아세트인을 2,3-부탄다이올로 전환시키는 효소에 관련된 유전자를 삽입하였기 때문에

배지에 아세트인을 첨가해주어서 그 변화량을 관찰하였다. 재조합 대장균들은 세포외(extracellular)에서 분석되어지는 아세트인과 2,3-부탄다이올의 생산량 경향에 차이를 보였다. 배양이 시작된 후 *budA* 유전자의 삽입으로 발현된 *E. coli* SGSB1 은 야생종이 생산할 수 없는 아세트인을 생산하는 것을 확인하였다(도 9). *budC* 유전자가 삽입된 *E. coli* SGSB2 는 배지에 넣어준 아세트인이 줄어들면서 2,3-부탄다이올을 생산하는 것을 확인하였다(도 10). 마지막으로 *E. coli* SGSB3 는 *budA*, *budC* 두 개 유전자의 삽입으로 아세트인과 2,3-부탄다이올이 둘 다 생산되는 것을 확인하였으며, 아세트인은 2,3-부탄다이올로 전환되기 때문에 아세트인의 양은 배양 후기에 일정한 값을 유지하였다(도 11). 대조군인 야생종 *크렙시엘라 뉴모니아*도 *E. coli* SGSB3 와 비슷한 경향성을 보였다(도 12). 이는 *budA* 유전자가 발현되면서 생성된 아세트락테이트 디카복실실레이즈(acetolactate decarboxylase) 효소가 야생종 *E. coli* 에서도 생산되는 아세트락테이트를 아세트인으로 전환시켰고, *budC* 유전자가 발현되면서 생성된 알코올 디하이드로지네이즈(alcohol dehydrogenase) 효소가 아세트인을 2,3-부탄다이올로 전환시켰다. 이 결과로, 야생종 *E. coli* 에서는 생산하지 못하는 2,3-부탄다이올을 재조합 *E. coli* 를 통해 생산하였다. 야생종 *크렙시엘라 뉴모니아* KCTC 2242 와 비교하였을 때, OD 값으로 비교한 성장정도는 더 낮지만, 포도당의 소모량에 따른 2,3-부탄다이올의 생산량인 수율의 측면에서는 20%정도 더 높았다(도 13)

실시예 2: *크렙시엘라 옥시토카*(*Klebsiella oxytoca*)

*크렙시엘라 옥시토카*의 *budC* 발현 재조합 플라스미드의 제조

크렙시엘라 옥시토카(*Klebsiella oxytoca*) ATCC 43863 의 염색체를 주형으로 하여, *meso*-2,3-부탄다이올 생산을 위한 효소를 암호화하는 *budC* 의 유전자서열(Genbank 미등록 서열, 전체 지놈 서열 분석(마크로젠, 대한민국)을 참조하여 제작된 프라이머(primer)를 이용한 중합효소연쇄반응(PCR, TAKARA, 일본) 방법을 통해 클로닝 하였다. 표 5 는 *크렙시엘라 옥시토카*의 *budC* 유전자를 나타내며, 표 6 는 *크렙시엘라 옥시토카*의 *budC* 유전자의 증폭을 위한 프라이머 및 제한효소를 나타낸다.

【표 5】

유전자	생산 효소
크렙시엘라 옥시토카 <i>budC</i>	아세트인 환원효소(acetoin reductase)

【표 6】

유전자	프라이머 서열		제한 효소
<i>budC</i>	정방향	5'-GGA TCC ATG AAA AAA GTC GCA CTT GTT ACC-3'	BamH I
	역방향	5'-TCT AGA TTA GTT AAA CAC CAT GCC GC-3'	Xba I

5

크렙시엘라 옥시토카의 *budC* 유전자를 증폭하기 위해 크렙시엘라 옥시토카의 *budC* 유전자 특이적으로 디자인한 프라이머(primer)를 사용하여 증폭하였다(표 6). 이 *budC* 유전자는 780 bp 의 크기로 증폭되었다.

중합효소연쇄반응은 통상적인 반응조건(10 mM pH 9.0 Tris-HCl, 50 mM KCl, 0.1% 트립톤 X-100, 2 mM MgSO₄ 및 Taq DNA 중합효소(TAKARA, 일본)) 하에서 95℃/5 분(변성), 66℃/1 분(어닐링) 및 72℃/1 분(신장)으로 1 회 수행한 후, 95℃/1 분(변성), 66℃/30 초(어닐링) 및 72℃/1 분(신장)의 조건으로 30 회 반복 수행하였다. 마지막 단계로 안정적인 신장을 위해 95℃/1 분(변성), 66℃/1 분(어닐링) 및 72℃/5 분(신장) 반응하였다.

중합효소연쇄반응 후 증폭된 DNA 는 0.8% 아가로스 젤 상에서 확인 후 정제하여 T-벡터 클로닝에 이용하였다. pGEM-T 이지(easy) 벡터(TAKARA, 일본)에 라이게이션(ligation)을 수행하여 재조합 플라스미드인 pGEM-T::*budC* 를 제작하였다. 상기 재조합 플라스미드를 대장균(E. coli DH5 α 컴프턴트 세포, RBS bioscience)에서 형질 전환하여 균주를 제조하였다.

20

재조합 플라스미드 pSB3 의 제조

상기 실시예 1 의 재조합 플라스미드인 pGEM-T::*budC* 를 대장균과 크렙시엘라의 셔틀 벡터인 pUC18K(도 15)를 표 6 에 열거된 제한효소로 37℃ 항온수조(water bath)에서 약 2 시간 반응하였다. 여기서 사용한

pUC18K 는 pUC18 벡터의 NdeI 제한효소 부위에 기존의 pET28a 벡터에 카나마이신 저항성을 갖는 유전자(814 bp)를 클로닝한 후 pUC18 벡터(Takara, 일본)에 삽입하여 제작하였다. 위의 열거한 제한효소들로 각각의 DNA 절편들을 절단한 뒤 pUC18K 벡터의 다중삽입부위(multi cloning site)에 도 15 에 개시된 것과 같이 T4 라이게이즈(ligase, TAKARA)를 이용하여 16℃에서 라이게이션 하여 재조합 플라스미드를 완성하였다. 각 단계마다 삽입된 유전자의 삽입여부를 확인하기 위해 대장균(E. coli DH5 α 컴프턴트 세포, RBS)에 형질 전환 시킨 후 재조합 플라스미드를 추출하여 이를 다시 원래 삽입부위의 제한효소로 처리하여 잘린 DNA 조각의 크기를 10 0.8% 아가로즈 젤 상에서 전기영동하여 비교하는 방법을 사용하였다. 도 17 에서는 재조합된 플라스미드가 제한효소에 의해 절단된 결과를 보여주었다.

증폭된 산물을 표 6 에 열거된 제한효소들을 이용하여 pUC18K 벡터에 도입하여 pSB3 를 제조하였다. 도 16 은 상기 pSB3(*크렙시엘라 옥시토카*의 *budC* 를 암호화하는 유전자 포함)라 명명된 벡터의 지도(map)를 나타내는 도면이다.

이종 대장균 형질전환체 제조

통상적으로 클로닝용으로 많이 쓰이는 균주의 경우 CaCl_2 버퍼를 사용하여 컴프턴트 세포를 만든 후 열 충격(42°C) 방법에 의해 플라스미드를 숙주세포 내로 도입하지만, 본 발명에서는 형질전환체의 안정적 제조와 효율을 높이기 위해 전기천공법(electroporation)에 의한 형질전환방법을 사용하였다.

상기 전기 충격에 의한 형질전환방법을 위해 16 시간 동안 전 배양된 30 μl 0.1 % 야생형 대장균(E. coli DH5 α) 배양액을 시험관에 들어있는 3 ml의 LB(10 g/L 트립톤, 10 g/L NaCl 및 5 g/L 효모 추출물)배지에 접종하여 배양액의 흡광도 (absorbance) 600 nm 파장에서 0.6 에 이르렀을 때, 배양액 전체에 해당하는 3 ml의 배양액은 12000 rpm 로 1 분 동안 원심 분리하여 상등액과 세포를 분리하였다. 수득한 세포를 10% 글리세롤 1 30 ml로 1 회 세척하고, 다시 12000 rpm 로 1 분 동안 원심분리하여 상등액과

세포로 분리하였다. 세포를 10% 글리세롤 80 μ l로 현탁하고, 현탁한 세포에 1-3 μ l의 pSB3를 첨가하였다.

상기 플라스미드를 첨가한 80 μ l의 세포를 전기천공법 (electroporation)용 큐벳(BIO-RAD, Gene pulser cuvette)에 담아, 진 펄서 엑스셀(Gene pulser Xcell, BIO-RAD, 미국)로 전기 충격(1800 v, 25 μ F, 200 Ω)을 가하였다. 미리 준비해둔 1 ml LB(10 g/L 트립톤, 10 g/L NaCl 및 5 g/L 효모 추출물)를 첨가한 뒤 200 rpm에서 1 시간 동안 37°C 진탕 배양하였다. 배양한 형질전환체는 LB 아가(50 μ g/ml 앰피실린, 50 μ g/ml 카나마이신, 10 g/L 트립톤, 10 g/L NaCl, 5 g/L 효모 추출물 및 아가 20 g/L)에서 단일 균체가 생성될 때까지 37°C에서 배양하였다. 이를 통해 재조합 플라스미드인 pSB3을 *E. coli* DH5 α 균주에 형질 전환한 *E. coli* SGJSB03 재조합 균주를 개발하였다(표 7).

【표 7】

개발균주	-
<i>E. coli</i> SGJSB03	<i>K. oxytoca</i> ATCC43863::pUC18K:: <i>budC</i>

재조합 대장균에서 아세트인 환원효소(*acetoin reductase, budC*) 유전자 발현 확인 및 단백질 생산

E. coli SGJSB03 재조합 균주를 50 μ g/ml 앰피실린(Ampicillin) 및 50 μ g/ml 카나마이신(Kanamycin)을 포함하는 LB 배지에서 16 시간 정도 전 배양 시키고 그 배양액을 다시 50 μ g/ml 앰피실린 및 50 μ g/ml 카나마이신이 포함된 LB 배지에 접종하여 흡광도가 600 nm에서 0.6-1.0 되었을 때 글리세롤 농도가 25%가 되게 보관용 균액을 만든 다음 -80°C에서 배양실험 시까지 저장하였다.

상기에서 개발된 재조합 균주에 삽입한 벡터에 의해 크랩시엘라 옥시토카의 *budC* 유전자의 발현 여부를 확인하기 위해 (주)프로테옴텍에 SDS-PAGE(Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)를 의뢰하였다. 실험과정은 샘플 준비 과정과 SDS 과정으로 나뉘지며, 샘플준비 과정은 30 μ l 보관용 균액을 10 ml 튜브에 들어있는 50 μ g/ml 앰피실린 및 50 μ g/ml 카나마이신이 첨가된 3 ml LB에 16 시간동안 배양한

후, 이를 다시 500 ml 플라스크에 1 mM IPTG(Iisopropylthio- β -D-galactoside, sigma, 미국)이 첨가된 200 ml의 LB(50 μ g/ml 앰피실린, 50 μ g/ml 카나마이신, 10 g/L 트립톤, 10 g/L NaCl 및 5 g/L 효모추출물) 배지에 0.5%의 전기 배양액을 접종하여 37°C, 170 rpm 상태에서 12 시간 동안 배양하였다. 배양 후 원심분리를 통해 균을 분리한 후 PBS(Phosphate Buffered Saline) 버퍼로 세척하고, 이를 세포 용해액과 1:1 의 부피로 혼합한 후 음파처리하였다. 그 후 원심분리 하여 상등액 채취 후 프로테아제 억제인자(protease inhibition factor)를 넣어주고 브래드포드(Bradford)법으로 단백질을 정량하여 20 μ l씩 SDS 겔에 전기영동 하였다. 겔 키트는 미니 PROTEAN 3 셀(BIO-RAD, 미국)을 사용하였으며 이동상은 10% SDS 버퍼이고 반응 시간은 50 볼트에서 30-40 분, 염색은 쿠마시 블루(Coomassie Blue) 염색약 G25 을 사용하였다. 유리판을 비누 및 물로 세척한 후 에탄올을 사용하여 2 중 세척하고 스페이서(spacer)와 반응하여 러닝겔 반응물(증류수 4.295 ml, 40% 비스/아크릴아마이드 3 ml, 0.5 M pH 6.8 트리스 2.5 ml, 10% SDS 0.1 ml, APS(ammonium persulfate) 0.1 ml 및 TEMED(Tetramethylethylenediamine) 0.005 ml로, 최종 부피는 10 ml)들을 넣어주어 30 분 동안 중합하였다. 콤브(comb)를 직각으로 삽입한 후 소량의 스택킹겔(stack gel)을 콤브 양 끝에 부어서 겔을 밀봉하여 10-20 분 동안 중합반응 후 콤브를 빼 겔 유리 받침대와 챔버(chamber)들을 배치하였다. SDS 이동상을 챔버의 위 및 아래에 채운 후 겔에 전극을 걸어주어 샘플을 분리하였다. 분석결과 *budC* 는 27 KDa 의 단백질이 재조합플라스미드를 통해 발현되었음을 확인하였다(도 18).

개발된 재조합 균주의 배양은 보관용 균액 30 μ l을 10 ml 튜브에 들어있는 50 μ g/ml 앰피실린 및 50 μ g/ml 카나마이신이 첨가된 3 ml의 LB 에 16 시간 동안 배양하고, 이를 다시 500 ml 플라스크의 200 ml LB(50 μ g/ml 앰피실린, 50 μ g/ml 카나마이신, 10 g/L 트립톤, 10 g/L NaCl 및 5 g/L 효모추출물) 배지에 15 mM 아세트인을 첨가하고 0.5%의 전 배양액을 접종하여 37°C, 170 rpm 상태에서 54 시간 동안 배양하였다. 단백질 발현을 위해 배양액의 흡광도(absorbance)가 600 nm 파장에서 0.6 에 이르렀을 때 유도물질인 IPTG(isopropylthio- β -D-galactoside, sigma,

미국)를 최종농도가 0.1 mM/ml이 되게 첨가하여 재조합 단백질의 발현을 유도하였다.

재조합 균주의 배양액 내의 *meso*-2,3-부탄다이올의 농도를 측정하기 위해 배양 중 일정시간마다 채취한 시료를 12000 rpm 로 10 분 동안 원심분리 후 상등액과 세포를 분리하여 -40℃에서 보관하였다. 상기 배양액로부터 분리된 상등액을 각각 1 ml씩 0.2 μ m 필터를 이용하여 정제한 후, 하단의 조건하에서 고속액체크로마토그래피(HPLC) 정량 분석을 실시하였다. 표 8 는 *meso*-2,3-부탄다이올 분석을 위한 HPLC 조건을 나타낸다.

【표 8】

품 목	조 건
HPLC 모델	LC-10AT unit(영린기기, 대한민국), UV730D (210 nm, 영린기기, 대한민국)
컬럼	Aminex HPX-87H(Biorad, 미국)
유속	0.8 ml/min
주입부피	30 μ l
이동상	0.001 N 황산
오븐 온도	60℃
작동 시간	20 분

본 발명에서 개발된 재조합 균주는 아세트인이 첨가된 배지에서 *meso*-2,3-부탄다이올을 생산하였으며, 이는 53% 이상의 전환율로 재조합 대장균에서 아세트인 환원효소 단백질이 생산 가능함을 확인하였다(도 19).

재조합 대장균에서 발현된 아세트인 환원효소(*acetoin reductase, budC*)의 효소 활성 및 전환률 측정

개발된 재조합 균주에서 발현된 아세트인 환원효소의 효소 활성을 측정하기 위해 30 μ l 보관용 균액을 10 ml 튜브에 들어있는 3 ml의 LB(50 μ g/ml 앰피실린 및 50 μ g/ml 카나마이신)에서 16 시간 동안 배양한 후, 이를 다시 500 ml 플라스크에 들어있는 200 ml의 LB(50 μ g/ml 앰피실린, 50 μ g/ml 카나마이신, 10 g/L 트립톤, 10 g/L NaCl 및 5 g/L 효모추출물)

배지에 0.5%의 전기 배양액을 접종하여 37℃, 170 rpm 상태에서 24 시간 동안 배양하였다. 단백질 발현을 위해 배양액의 흡광도(absorbance)가 600 nm 파장에서 0.6 에 이르렀을 때 유도물질인 IPTG(isopropylthio-β-D-galactoside, sigma, 미국)를 첨가하여 최종농도 1 mM/ml에서 재조합 단백질의 발현을 유도하였다. 야생형 대장균의 경우는 항생제가 첨가되지 않은 LB 배지에 위와 동일한 방법으로 배양하였으며 IPTG 는 첨가하지 않았다.

효소 활성 측정을 위해 배양액을 4000 rpm 에서 10 분간 원심분리 후 PBS 버퍼로 세척하는 과정을 두 번 반복한 뒤 5 ml의 PBS 버퍼에 균액을 현탁한 후 3 분 동안 음파처리를 통해 세포를 파쇄하였다. 그 후 원심분리 하여 상등액 0.7 ml에 0.1 ml의 1 mM NADH 및 0.1 ml의 50 mM 아세트인을 첨가하였다. 이 용액을 60 분 동안 반응시킨 후 UV(340 nm)로 측정하여 NADH(Nicotinamide Adenine Dinucleotide Hydrogenase)/NAD(Nicotinamide Adenine Dinucleotide) 전환율을 계산하였다. pH 에 따른 효소 활성의 변화를 측정하기 위하여 PBS 버퍼의 pH 를 pH 5, pH 6 및 pH 7 의 세가지 조건으로 제조하여 첨가해준 후 마지막 단계엔 25℃에서 60 분 동안 반응하였다. 이와 반대로 온도에 따른 효소 활성의 변화를 측정하기 위하여 pH 7 PBS 버퍼를 사용하여 배양세포를 세척한 후 마지막 단계에 25℃, 30℃, 37℃ 및 42℃사이에 온도로 60 분 동안 반응하였다. 이를 통해 온도 및 pH 에 따른 아세트인 환원효소의 활성을 측정하였다. 또한 비색정량법을 이용하여 단백질의 양을 측정하였고, 계산을 통하여 단백질 당 효소 활성정도를 산출하였다. 그 결과 야생형 대장균에서는 아세트인 환원효소가 없기 때문에 NADH 의 소모가 없어 효소 활성이 측정되지 않았으며, 재조합체에서는 pH 6 과 온도 37℃ 및 42℃에서 높은 효소 활성을 보였다(표 9 및 표 10). 이는 세포내의 아세트인 환원효소의 pH 및 온도에 따른 효소 활성을 의미한다. 표 9 는 본 발명의 *E. coli* ::pSB3 재조합 균주에서 과발현된 아세트인 환원효소(acetoin reductase, *budC*)의 온도에 따른 효소 활성 측정값을 나타낸 표이고, 표 10 은 *E. coli* ::pSB3 재조합 균주에서 과발현된 아세트인 환원효소(acetoin reductase, *크렙시엘라 옥시토카*의 *budC*)의 pH 에 따른 효소 활성 측정값을 나타낸 표이다.

【표 9】

균주	온도 (°C)	특이 효소 활성 ($\mu\text{M}/\text{분}/\text{mg}$ 단백질)
야생형 대장균	25	ND
	30	ND
	37	ND
	42	ND
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha::\text{pUC18K}::\text{K.oxy43863budC}$	25	27.20 ± 0.001
	30	37.12 ± 0.003
	37	55.42 ± 0.003
	42	63.93 ± 0.004

【표 10】

균주	pH	특이 효소 활성 ($\mu\text{M}/\text{분}/\text{mg}$ 단백질)
야생형 대장균	5	ND
	6	ND
	7	ND
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha::\text{pUC18K}::\text{K.oxy43863budC}$	5	ND
	6	28.51 ± 0.002
	7	37.12 ± 0.003

개발된 재조합 균주의 아세트인 환원효소의 세포외의 활성을
 5 측정하기 위하여 위와 동일한 조건의 배지에서 15 mM 아세트인을 첨가해준
 후 pH 5, pH 6 및 pH 7 또는 온도 25°C, 30°C, 37°C 및 42°C의 조건에서
 각각 24 시간 동안 배양한 후 HPLC 로 *meso*-2,3-부탄다이올을 측정하였다.
 측정된 부탄다이올의 양을 넣어준 아세트인 양으로 나눠 수율을 g/g 의
 10 단위로 계산하였다. 그 결과 pH 6 과 42°C 온도 조건에서 세포외 효소의
 활성이 높은 것으로 나타났다(도 20 및 도 21).

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

5 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

【청구의 범위】

【청구항 1】

다음의 뉴클레오티드 서열로 구성된 균으로부터 선택되는 최소
 5 1 종의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현벡터로 형질전환된
 (cotransformed) *meso*-2,3-부탄다이올 과발현용 대장균:

(a) 서열목록 제 5 서열에 기재된 아미노산 서열을 가지는 아세트인
 환원효소(acetoin reductase)를 코딩하는 뉴클레오티드;

(b) 아세토락테이트 디카복실레이즈(acetolactate decarboxylase)를
 10 코딩하는 뉴클레오티드; 및

(c) 알코올 디하이드로지네이즈(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는
 뉴클레오티드.

【청구항 2】

15 제 1 항에 있어서, 상기 *meso*-2,3-부탄다이올 과발현 대장균은 (a)
 아세토락테이트 디카복실레이즈(acetolactate decarboxylase)를 코딩하는
 뉴클레오티드 서열; 및 (b) 알코올 디하이드로지네이즈(alcohol
 dehydrogenase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현벡터로 공동
 형질전환된 것을 특징으로 하는 *meso*-2,3-부탄다이올 과발현용 대장균.

20

【청구항 3】

제 1 항에 있어서, 상기 아세토락테이트 디카복실레이즈
 (acetolactate decarboxylase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 알코올
 디하이드로지네이즈(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는 뉴클레오티드
 25 서열은 *크렙시엘라 뉴모니아*(*Klebsiella pneumoniae*)로부터 유래한 것을
 특징으로 하는 *meso*-2,3-부탄다이올 과발현용 대장균.

【청구항 4】

제 1 항에 있어서, 상기 아세토락테이트 디카복실레이즈
 30 (acetolactate decarboxylase)는 서열목록 제 1 서열의 아미노산 서열을
 포함하고, 상기 알코올 디하이드로지네이즈(alcohol dehydrogenase)는

서열목록 제 2 서열의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 *meso*-2,3-부탄다이올 과발현용 대장균.

【청구항 5】

5 제 1 항에 있어서, 상기 아세토락테이트 디카복실레이즈 (acetolactate decarboxylase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열목록 제 3 서열의 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 상기 알코올 디하이드로지네이즈(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열목록 제 4 서열의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것을 특징으로
10 하는 *meso*-2,3-부탄다이올 과발현용 대장균.

【청구항 6】

다음 단계를 포함하는 *meso*-2,3-부탄다이올 생합성 방법:

- (a) 제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항의 대장균을 배양하여 *meso*-
15 2,3-부탄다이올을 생합성하는 단계; 및
(b) 상기 단계 (a)의 생합성된 *meso*-2,3-부탄다이올을 수득하는 단계.

【청구항 7】

제 6 항에 있어서, 상기 대장균은 상기 서열목록 제 5 서열에 기재된
20 아미노산 서열을 가지는 아세토인 환원효소(acetoin reductase)을 코딩하는 뉴클레오티드에 형질전환된 대장균이며 상기 형질전환 대장균은 *meso*-2,3-부탄다이올 거울상이성질체 선택적(enantioselective) 과발현을 하는 것을 특징으로 하는 방법.

25 【청구항 8】

제 7 항에 있어서, 상기 형질전환 대장균은 pH 5 내지 pH 7 조건에서 2,3-부탄다이올의 최적 수율을 나타내는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 9】

30 제 7 항에 있어서, 상기 형질전환 대장균은 35℃ 내지 45℃ 조건에서 *meso*-2,3-부탄다이올의 최적 수율을 나타내는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 10】

서열목록 제 5 서열에 기재된 아미노산 서열을 가지는 아세트인 환원효소(acetoin reductase).

5 **【청구항 11】**

서열목록 제 5 서열에 기재된 아미노산 서열을 가지는 아세트인 환원효소(acetoin reductase)를 코딩하는 핵산 분자.

【청구항 12】

10 제 11 항에 있어서, 상기 핵산 분자는 서열목록 제 6 서열에 기재된 뉴클레오타이드 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 핵산 분자.

【청구항 13】

상기 제 11 항 또는 제 12 항의 핵산분자를 포함하는 벡터.

1/16

Fig. 1

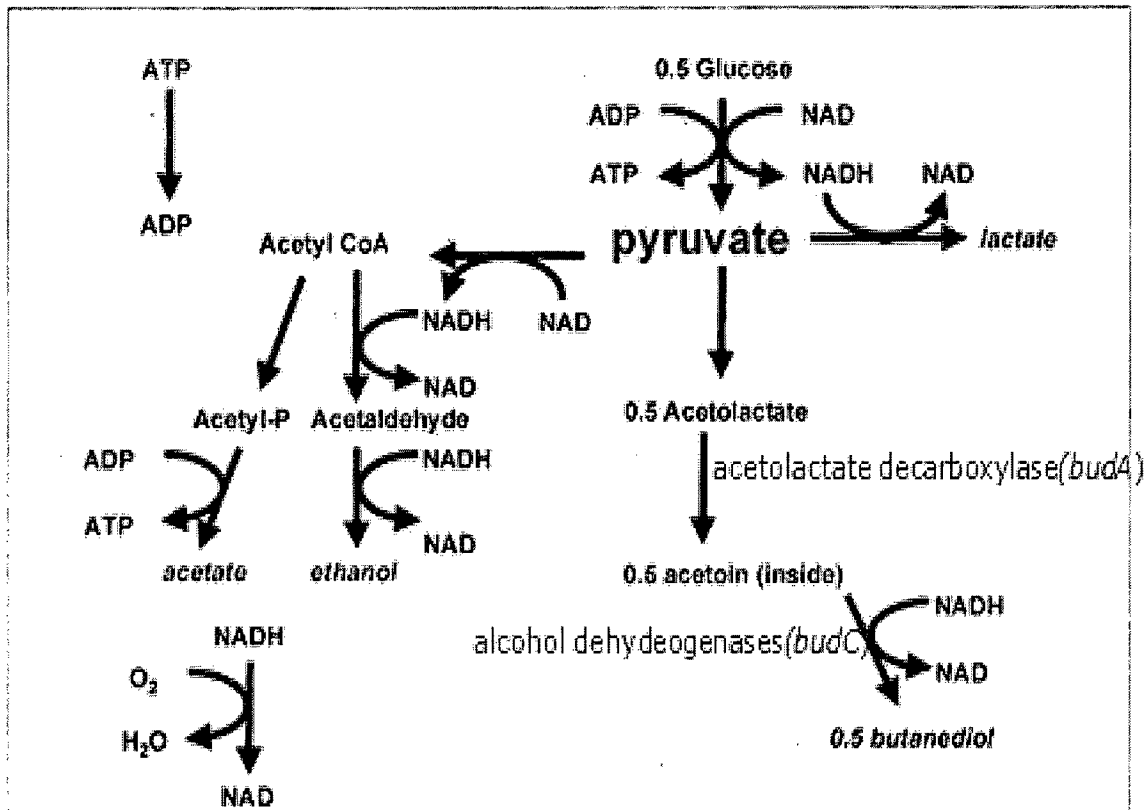
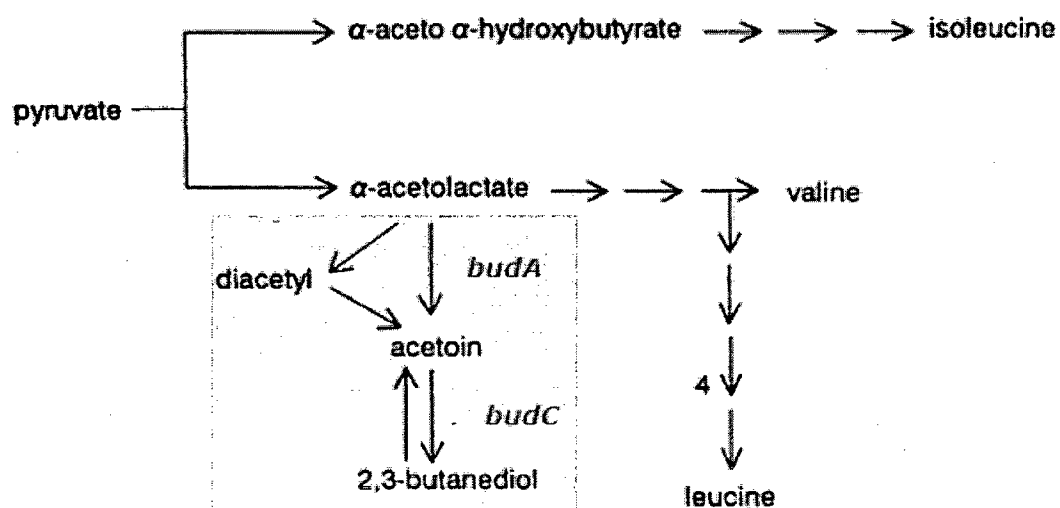


Fig. 2



2/16

Fig. 3

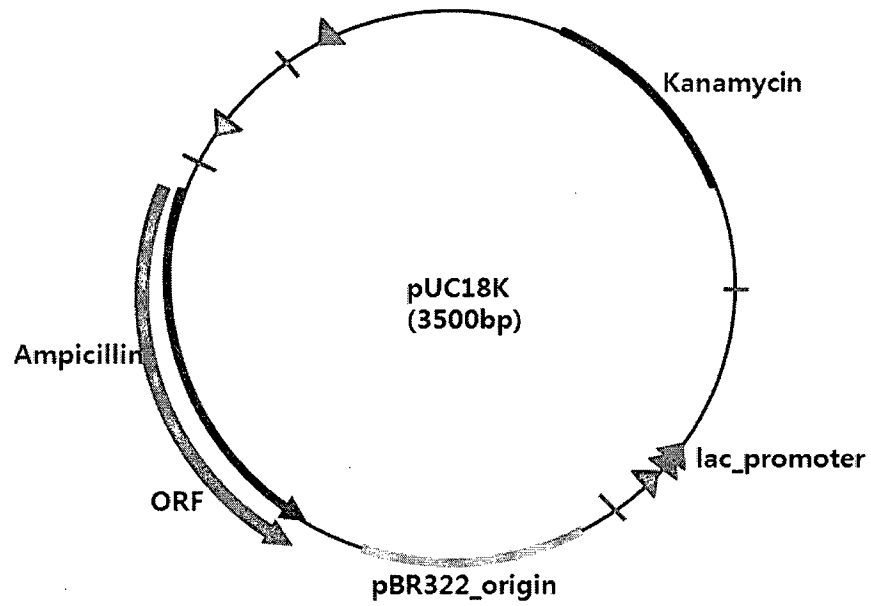
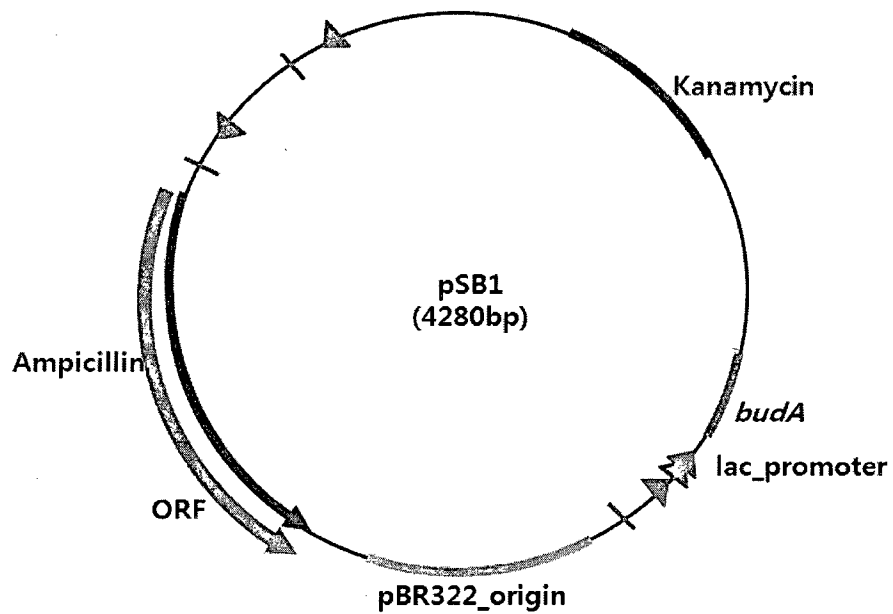


Fig. 4



3/16

Fig. 5

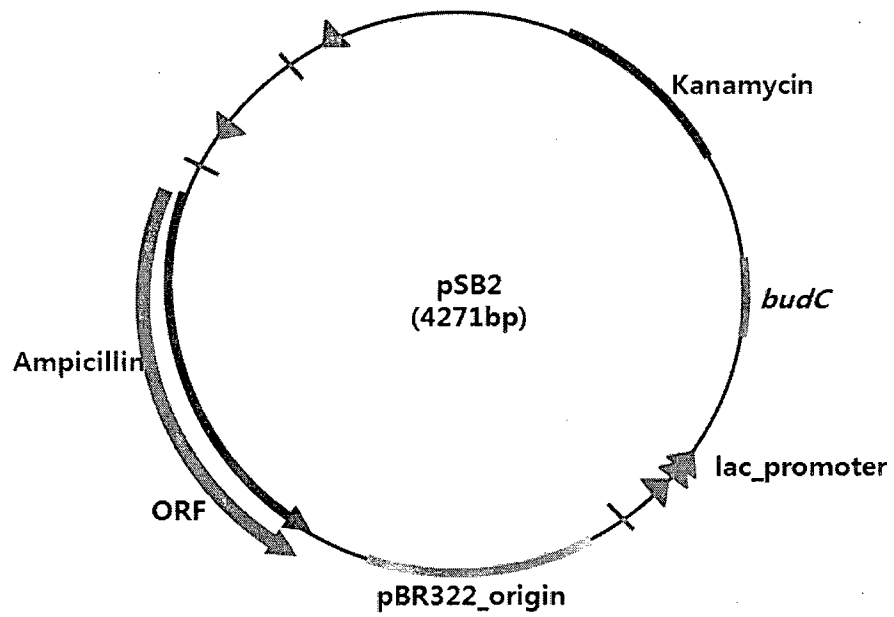


Fig. 6

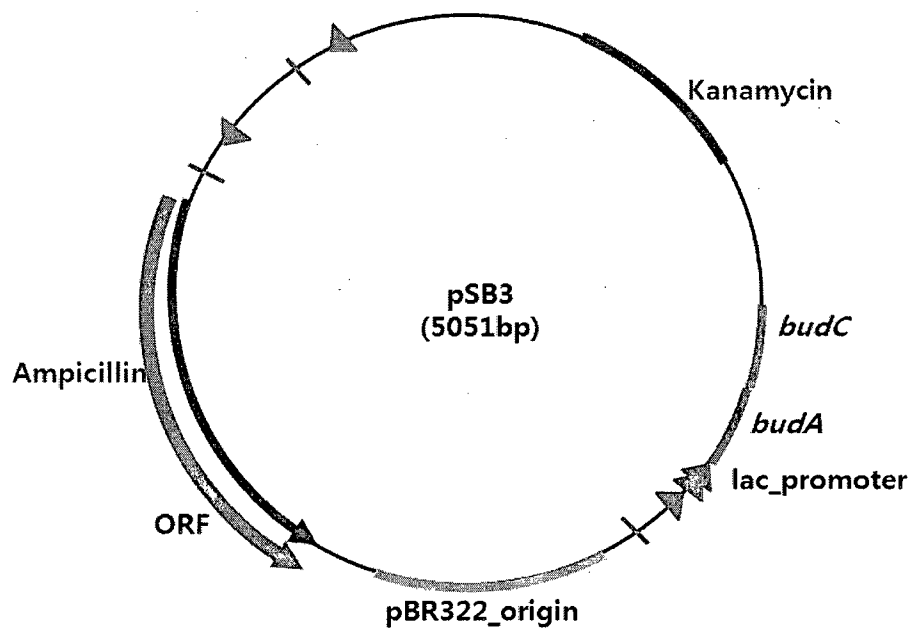


Fig. 7

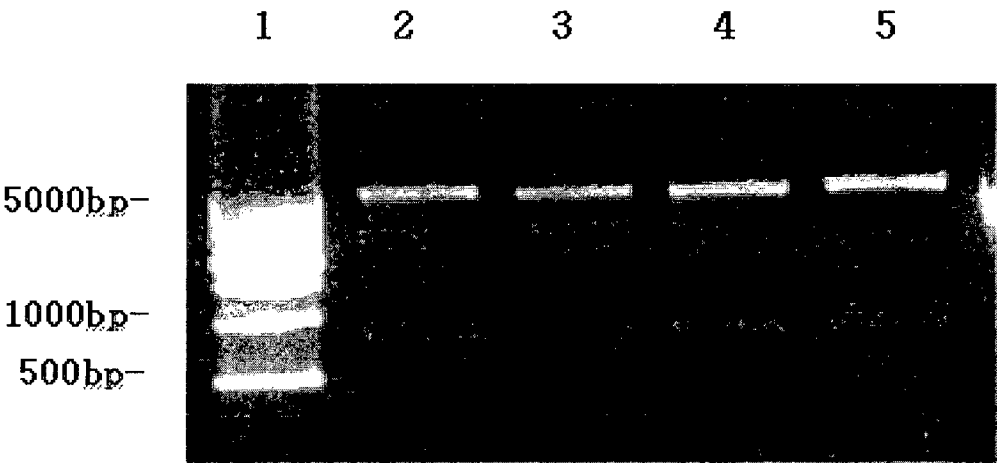


Fig. 8

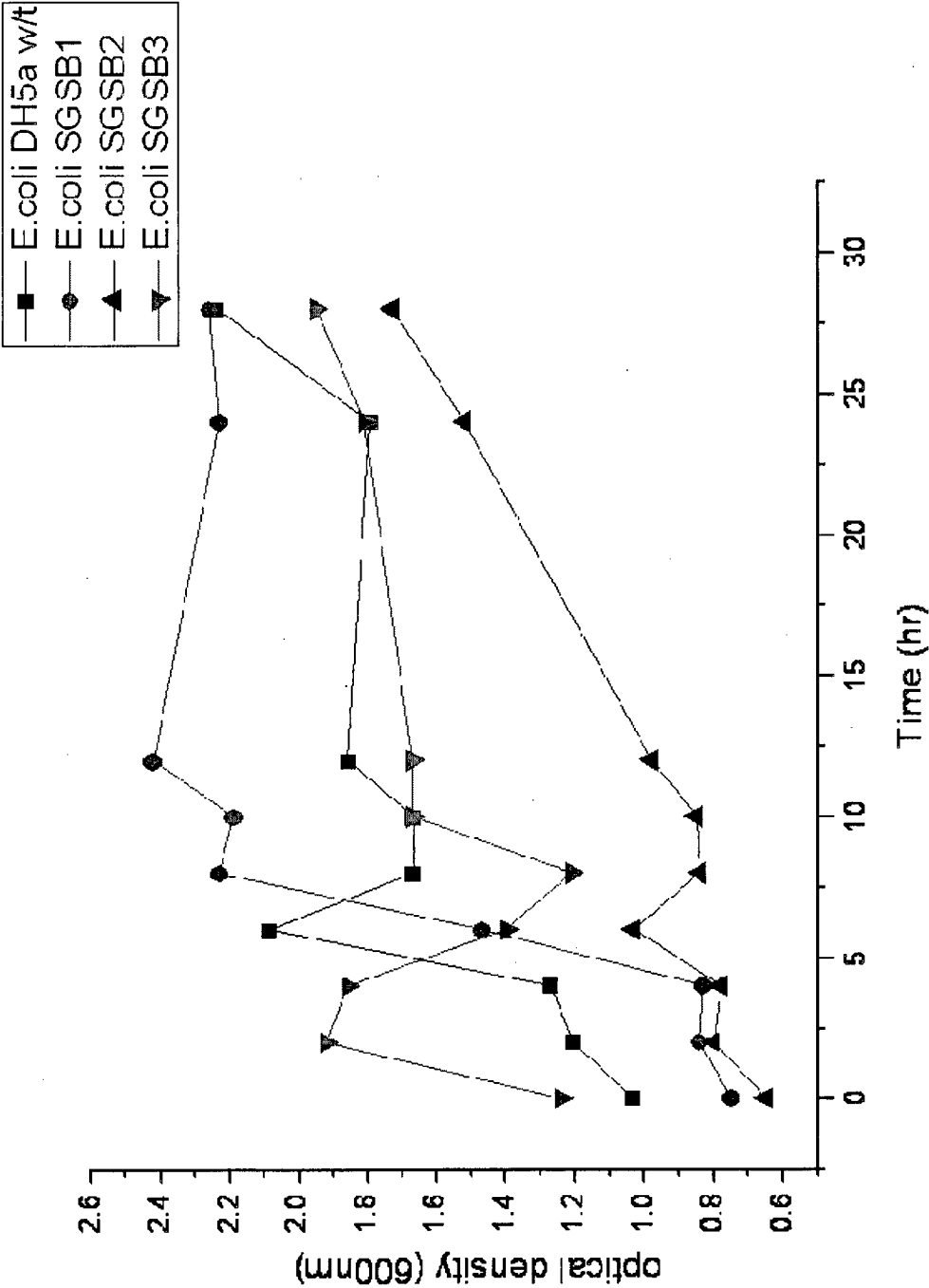


Fig. 9

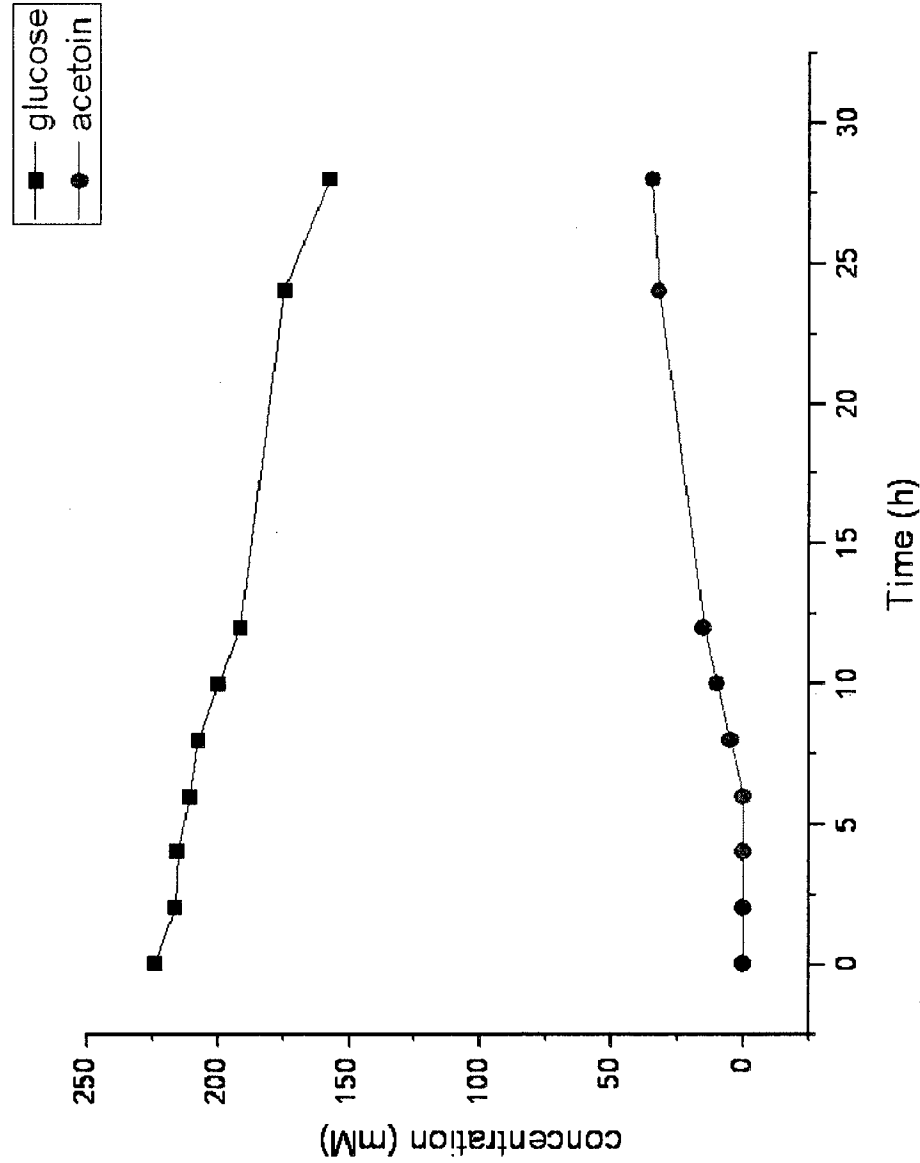


Fig. 10

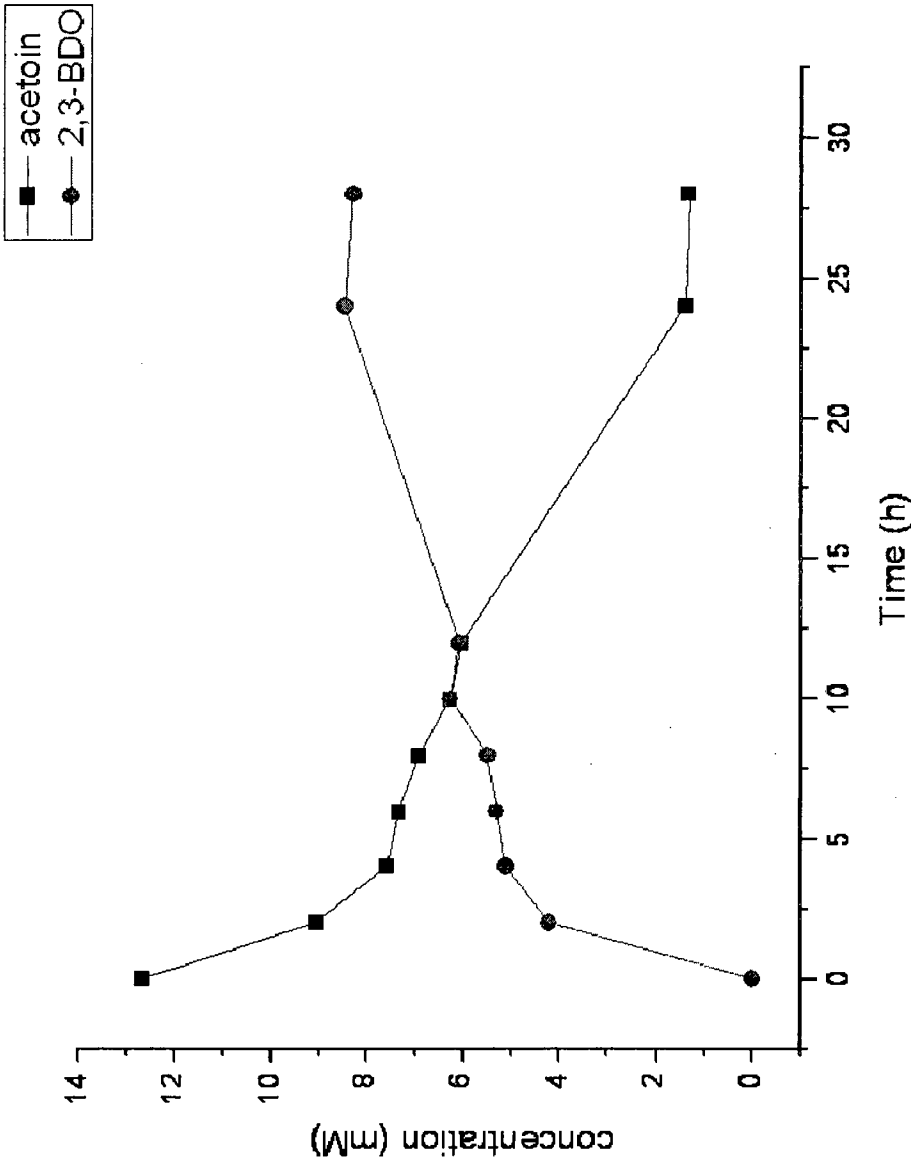


Fig. 11

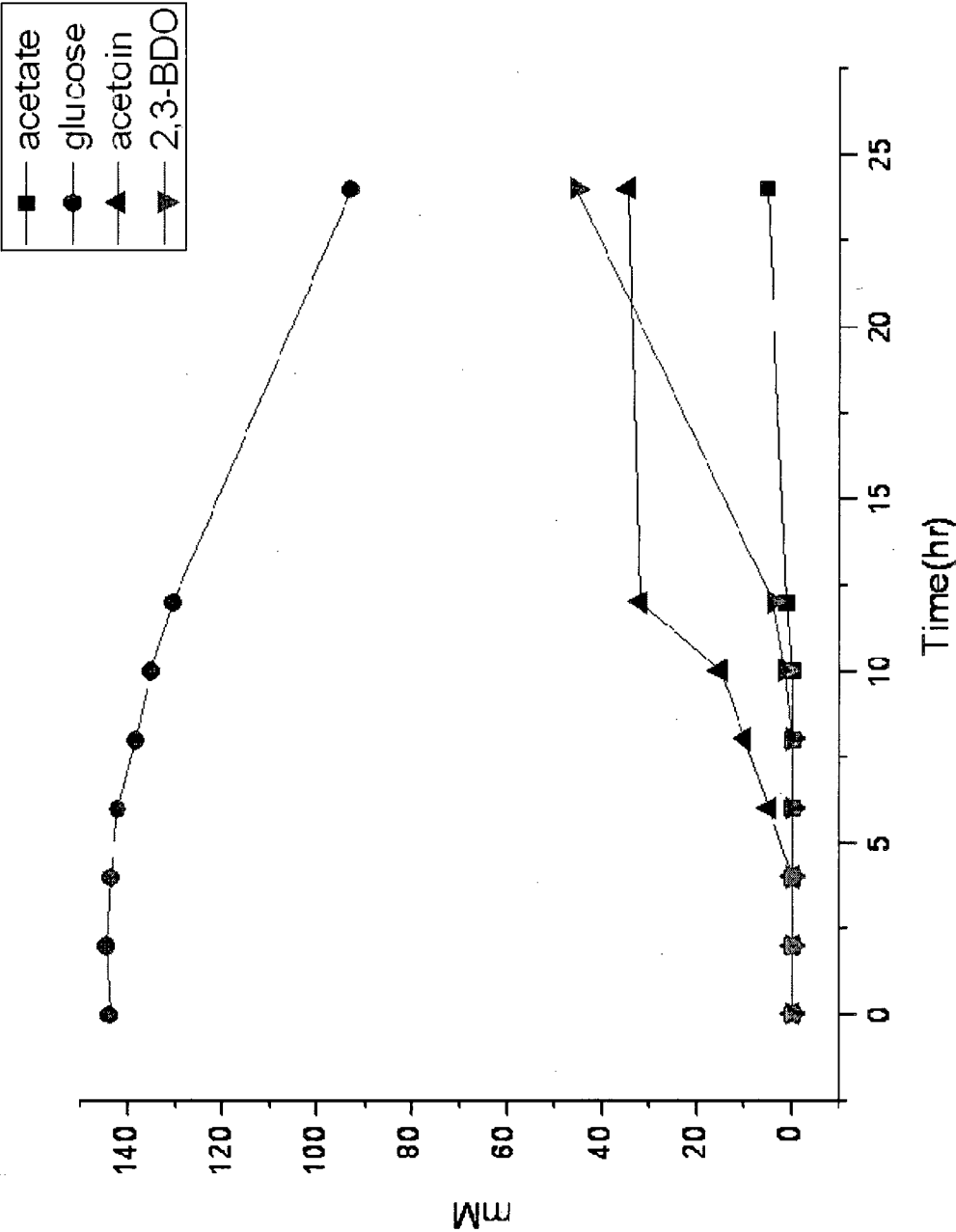
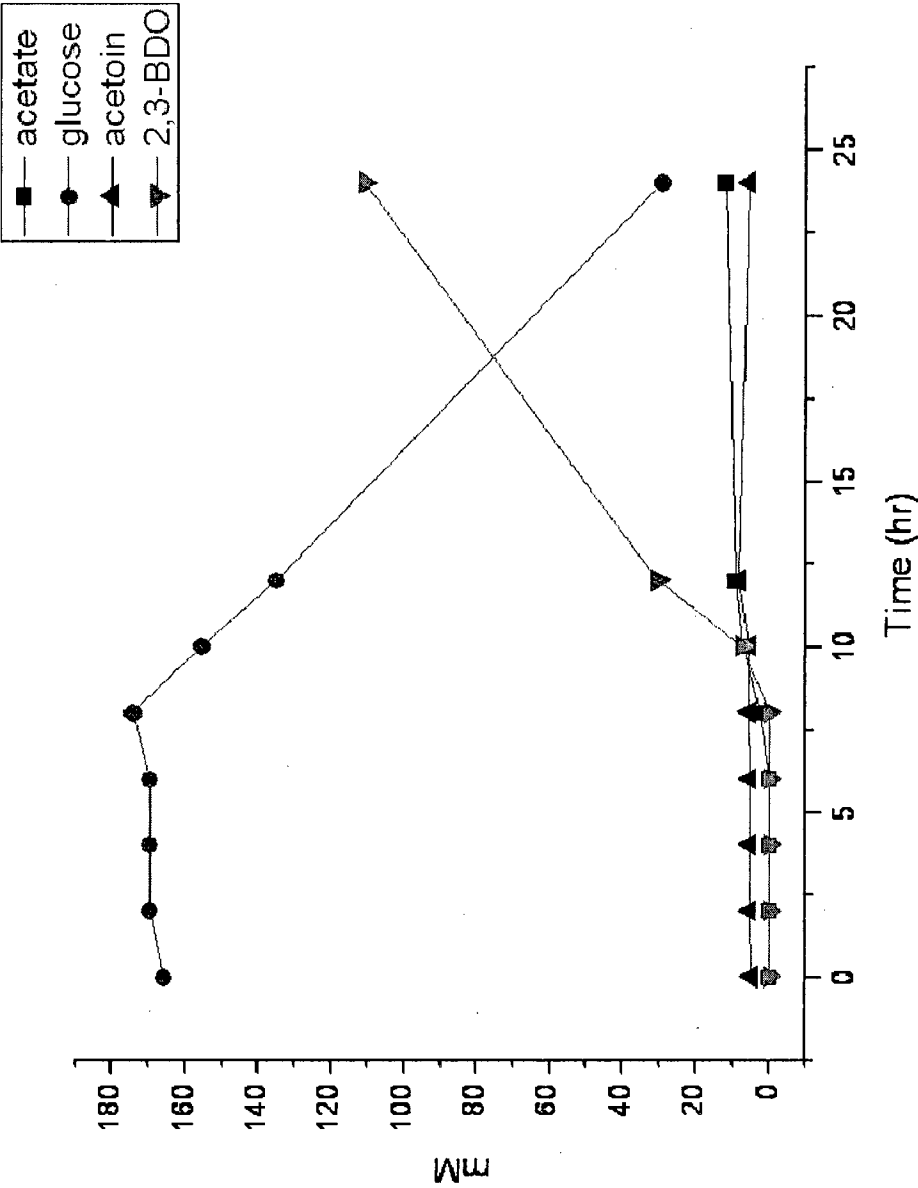


Fig. 12



10/16

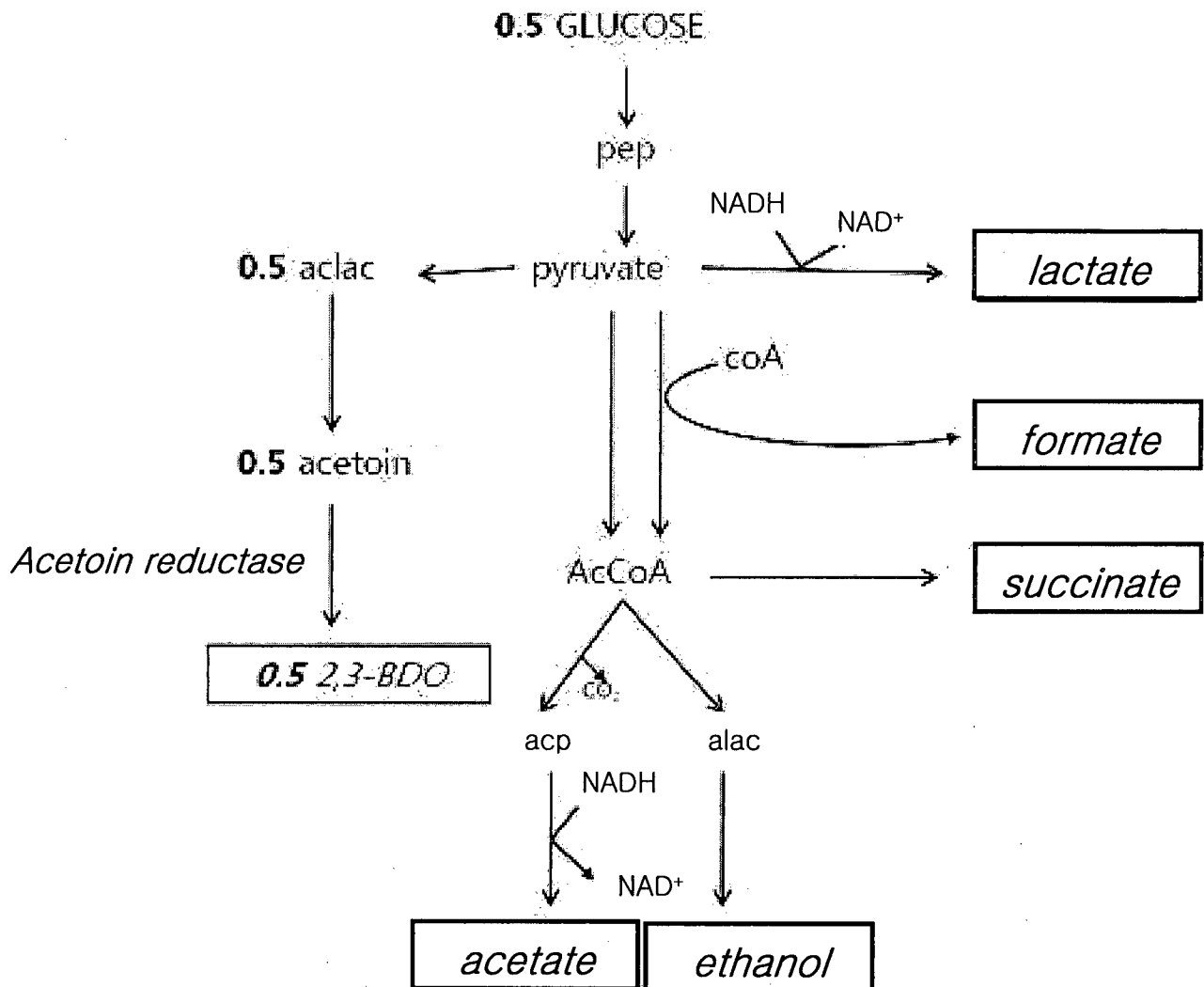
Fig. 13

	<i>E.coli</i> DH5a::pUC18K::budAC	<i>K.pneumoniae</i> 2242 w/t
OD max	1.81	6.27
μ max	0.22	0.30
Production (g/L)	4.09	12.28
Volumetric productivity (g/L/h)	0.31	2.51
Volumetric productivity (mM/h)	3.44	27.86
Specific productivity (g/g DCW/h)	0.15	0.47
Specific productivity (mM/g DCW/h)	1.66	5.22
Yield (g/g Glu.)	0.45	0.37
Yield (mM/mM Glu.)	0.90	0.74

2,3-BDO

11/16

Fig. 14



12/16

Fig. 15

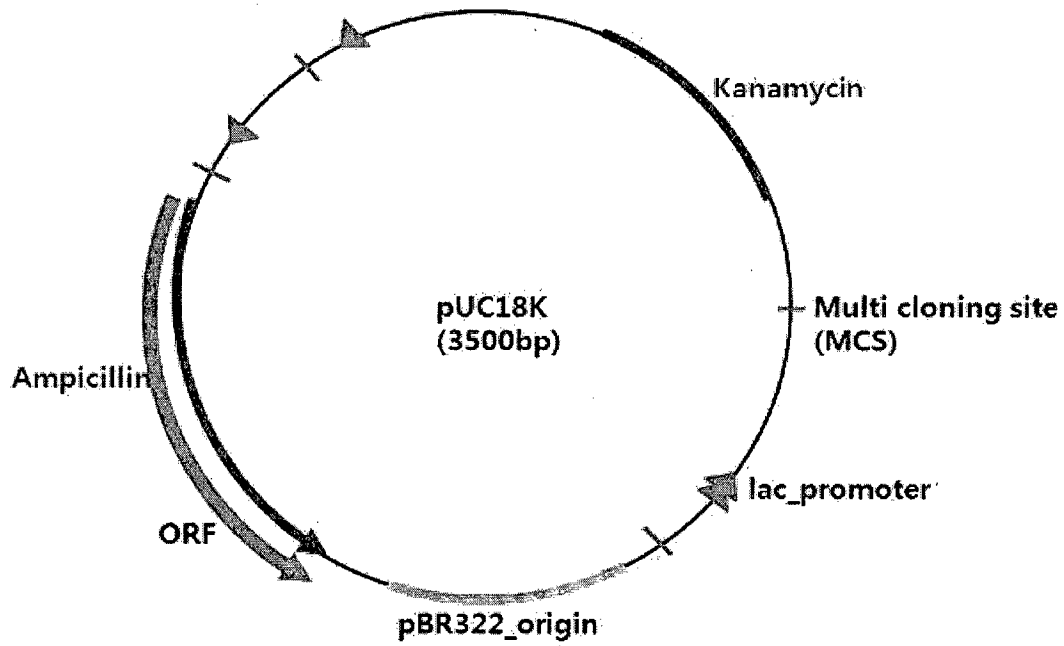


Fig. 16

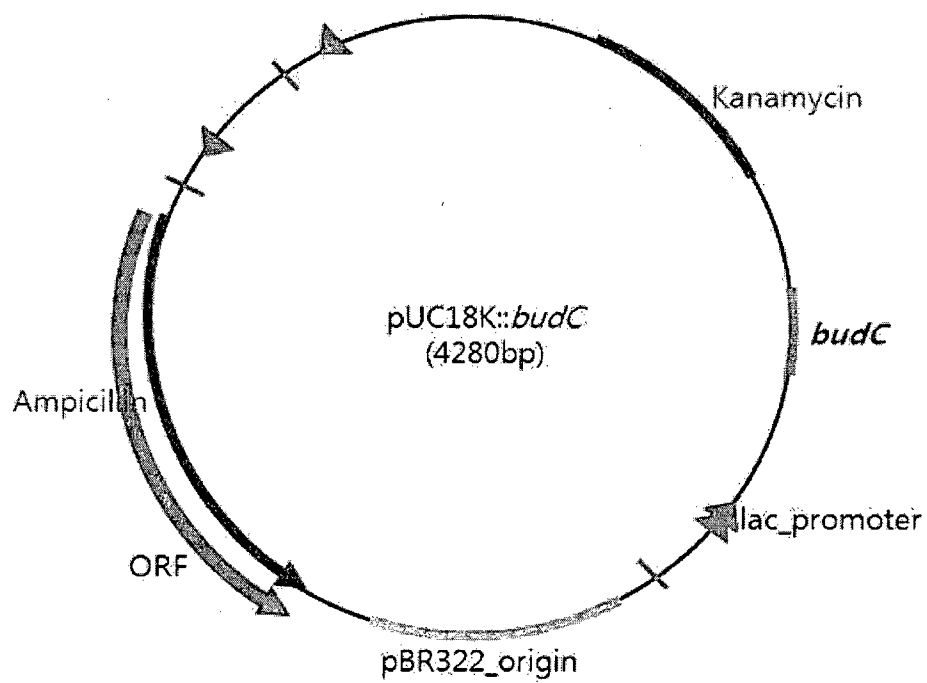


Fig. 17

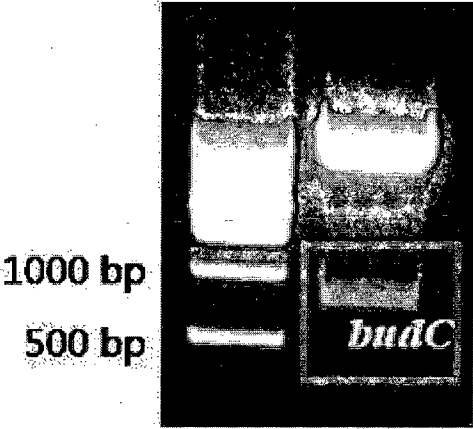


Fig. 18

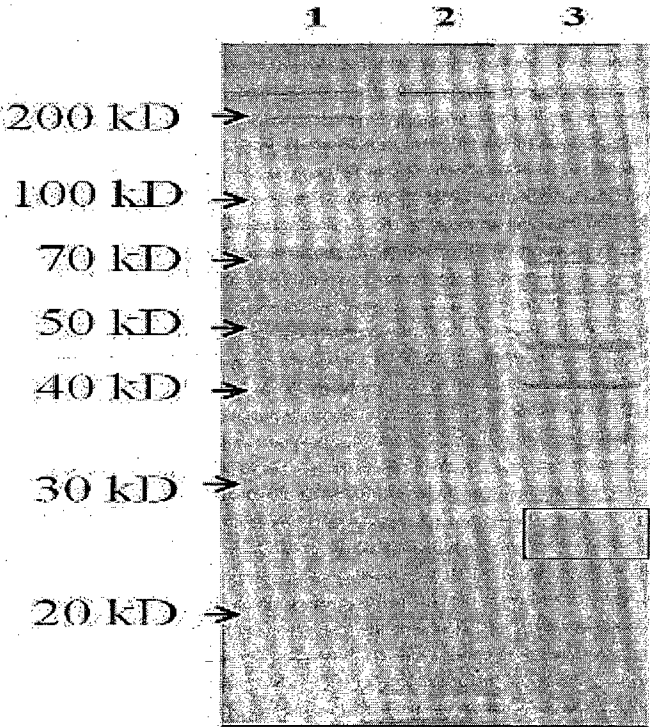


Fig. 19

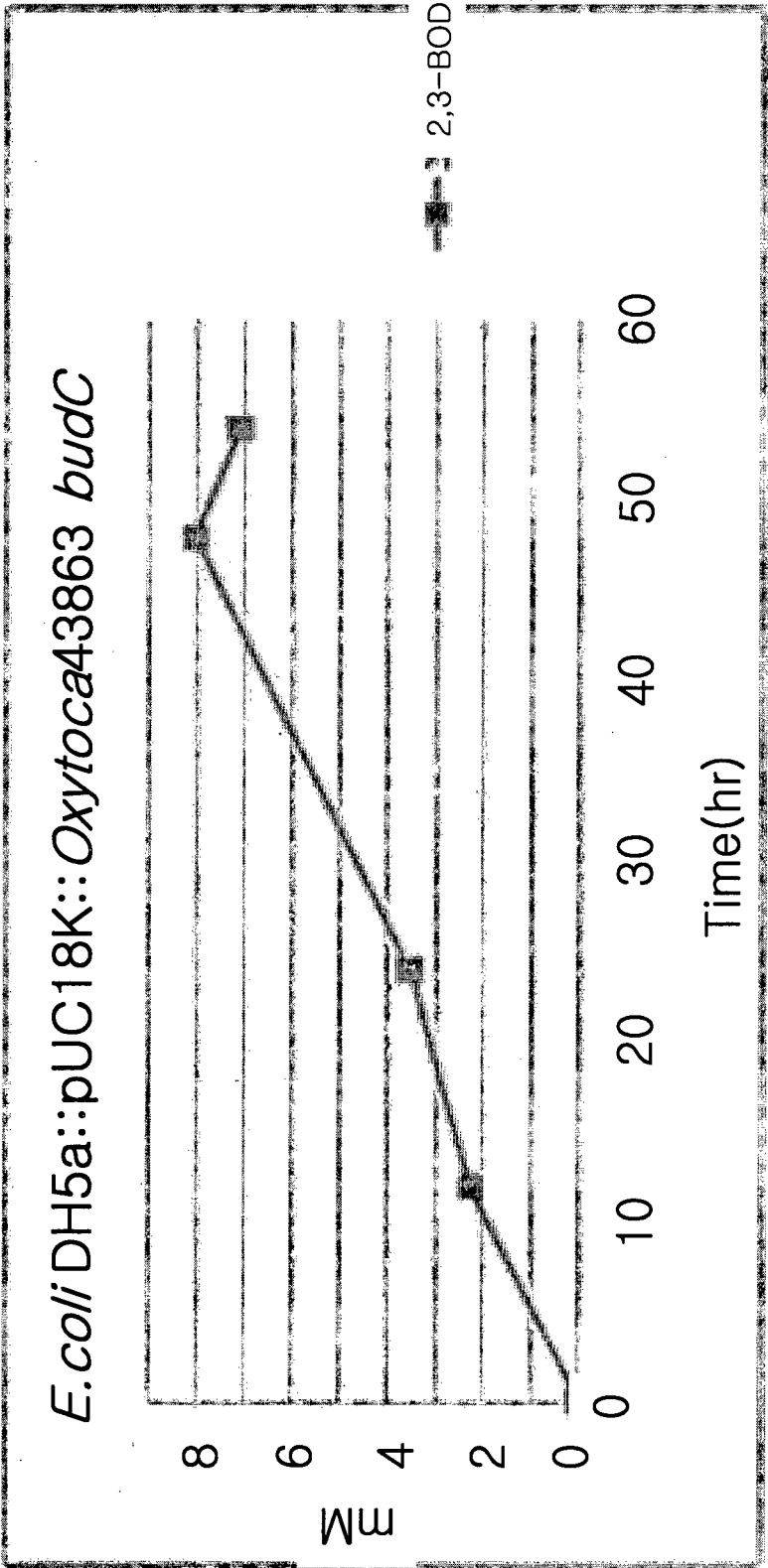


Fig. 20

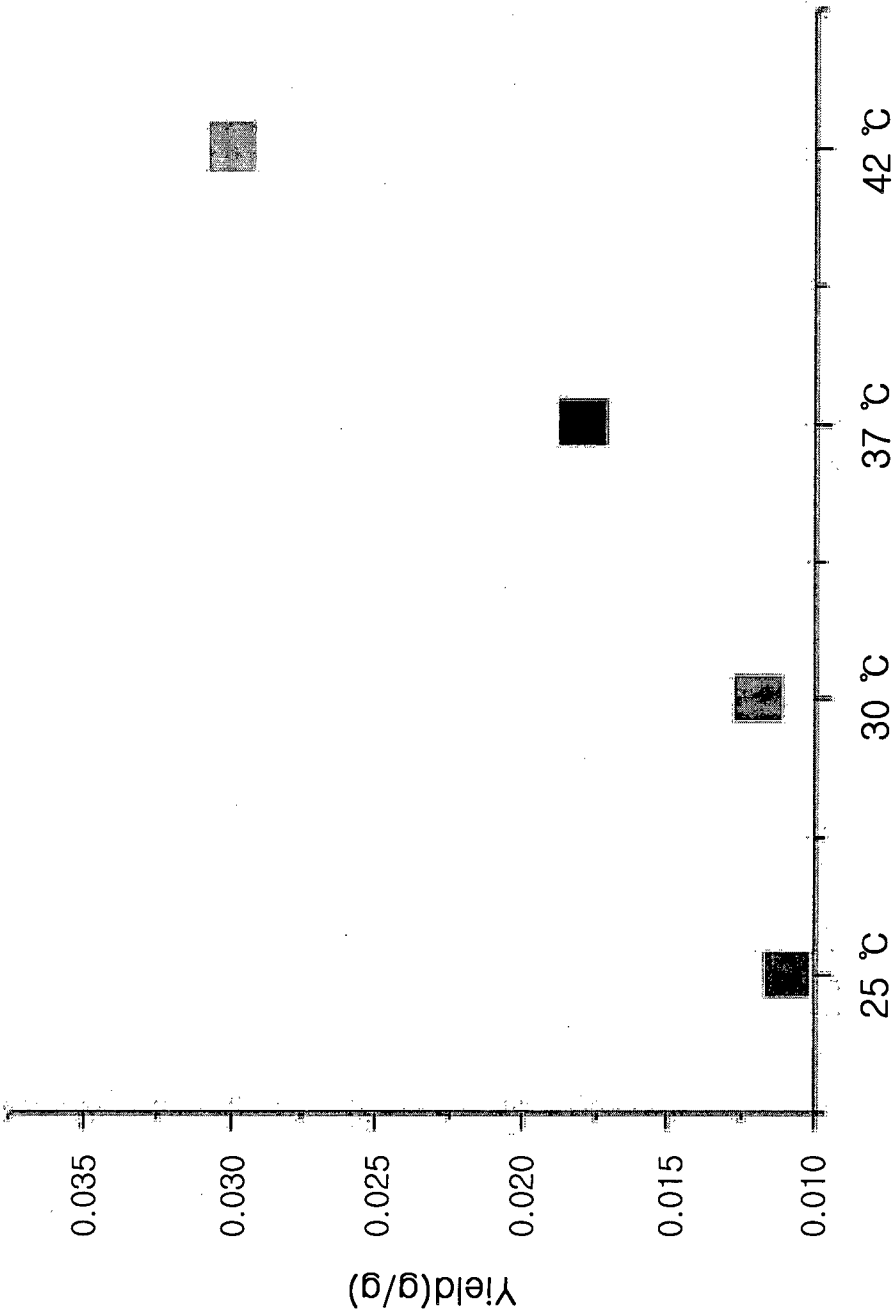


Fig. 21

