



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0044192
(43) 공개일자 2012년05월07일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 7/42 (2006.01) *C12N 15/78* (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01) *C12R 1/385* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0105625
(22) 출원일자 2010년10월27일
심사청구일자 2010년10월27일

- (71) 출원인
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
- (72) 발명자
윤성철
경상남도 진주시 진주대로879번길 19, A동 305호
(주약동, 현대성우 트리펠리스)
- 최문환
경상남도 진주시 석갑로142번길 18-2 (신안동)
- (74) 대리인
김순웅

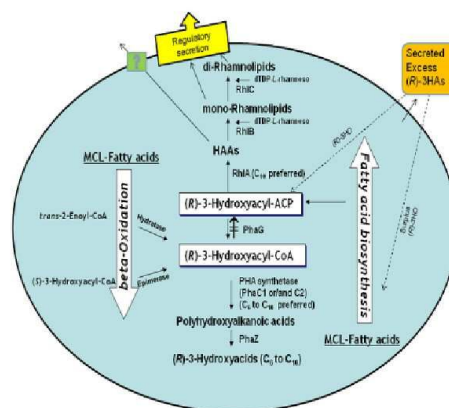
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 *Pseudomonas aeruginosa* rhlB 유전자 변이 균주를 이용한 HAAs [(R) - 3 ((R) - 3 - hydroxyalkanoxyloxy) alkanolic acids] 의 생산을 증가시키는 방법

(57) 요약

본 발명은 바이오 계면활성제뿐만 아니라 의약품 전구체로서 활용이 가능한 HAAs의 생산을 증가시키는 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로 *Pseudomonas aeruginosa*의 *rhIB* 유전자 변이 균주를 이용하여 medium-chain-length 지방산을 탄소원으로 M1 제한 배지에서 배양함으로써 (*R*)-3-((*R*)-3-hydroxyalkanoxyloxy)alkanoic acids(HAAs)의 생산을 증가시키는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도5



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20090091 489

부처명 교육과학기술부

연구사업명 기초연구사업 (국가핵심연구센터)

연구과제명 예방차원의 친환경 생물소재 개발

주관기관 경상대학교 환경생명과학 국가핵심연구센터

연구기간 2003.12.01 ~ 2010.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

(i) 슈도모나스 속 균주의 람노리피드 유전자를 제거하여 슈도모나스 속 균주 변이체를 제조하는 단계; (ii) 상기 슈도모나스 속 변이체를 중쇄 지방산을 포함하는 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 HAAs ((R)-3-((R)-3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids)의 생산을 증가시키는 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 중쇄 지방산은 탄소수가 6 내지 14인 지방산인 것을 특징으로 하는 HAAs의 생산을 증가시키는 방법.

청구항 3

제 2항에 있어서,

상기 중쇄 지방산의 함량은 20~100 mM인 것을 특징으로 하는 HAAs의 생산을 증가시키는 방법.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 슈도모나스 속 균주는 슈도모나스 아에루기노사 (*Pseudomonas aeruginosa*)인 것을 특징으로 하는 HAAs의 생산을 증가시키는 방법.

청구항 5

제 4항에 있어서,

상기 슈도모나스 아에루기노사는 슈도모나스 아에루기노사 PA14 또는 PA01인 것을 특징으로 하는 HAAs의 생산을 증가시키는 방법.

청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 슈도모나스 속 균주의 변이체는 *Pseudomonas aeruginosa rhIB* 변이체인 것을 특징으로 하는 HAAs의 생산을 증가시키는 방법.

명세서

기술 분야

[0001]

본 발명은 바이오 계면활성제뿐만 아니라 의약품 전구체로서 활용이 가능한 HAAs의 생산을 증가시키는 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로 *Pseudomonas aeruginosa*의 *rhIB* 유전자 변이 균주를 이용하여 medium-chain-length 지방산을 탄소원으로 M1 제한 배지에서 배양함으로써 (R)-3-((R)-3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids(HAAs)의 생산을 증가시키는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

통상적으로, 슈도모나스 아에루기노사 (*Pseudomonas aeruginosa*) 균주에 관한 연구는 토양으로부터 균을 분리하여, 항균활성에 관한 연구가 최초로 보고 되었으며, 1949년 F. J. Jarvis등에 의하여 당지질을 생산함이 확인된 이래로 많은 연구자들에 의해, 슈도모나스 아에루기노사와 그 변종 그리고 이들이 생산하는 당지질 생물유화제(람노리피드)의 종류에 대한 많은 연구가 이루어졌다. 슈도모나스 아에루기노사는 녹농균으로 알려져 있고, 주

로 폐수처리와 토양 유류오염지역의 생물학적 정화에 주로 이용되고 있다.

- [0003] 슈도모나스 아에루기노사 (*Pseudomonas aeruginosa*)가 생산하는 생물유화제는 많은 연구자들에 의해 주성분이 당지질이며, 당은 람노즈(rhamnose)로 지질은 베타-하이드록시데카노익에시드 (β -hydroxydecanoic acid)로 구성되어 있음이 밝혀졌으며, 환경 등의 조건에 따라 일부 변이종이 나타나 생물유화제의 형태도 달라지는 것으로 보고되고 있다.
- [0004]
- [0005] 생물유화제 (Bio-surfactant, BS)란 생물에 의해 세포표면에 생성되거나 세포 외로 분비되는 화합물로서 친수성인 부분과 소수성인 부분을 동시에 가지는 양친매성 물질로, 유화안정성이 매우 우수하다 (Gerson and Zajic, 1979).
- [0006] 생물유화제에는 그들이 생산하는 미생물 종과 생화학적 성질에 기초하여 분류되며, 생물유화제의 종류에는 크게 당지질 (glycolipids), 인지질과 지방산 (phospholipids and fatty acids), 지질단백질 (lipopeptides and lipoproteins), 고분자 생물유화제 (polymeric surfactants)로 분류할 수 있다 (Desai and Desai, 1993).
- [0007] 이러한 당지질 생물유화제인 람노리피드는 람노리피드-1 (RL-1), 람노리피드-2 (RL-2), 람노리피드-3 (RL-3), 람노리피드-4 (RL-4)의 4종류의 주요형태가 알려져 있다. 람노리피드의 4가지 주요형태 가운데에서 가장 많이 발견되는 형태는 RL-1과 RL-3으로서 Hisatsuka 등 (1971)과 Itoh 등 (1972)에 의하여 각각 발견되었으며, RL-2와 RL-4는 오직 휴지기 세포에서만 합성되는 것으로 Syltatk (1985) 등이 보고하고 있다.
- [0008] 그리고, 생산되는 람노리피드의 형태는 미생물 종과 배양조건에 영향을 받는 것으로 보고되고 있으며, RL의 구성 당은 예외 없이 람노즈 (rhamnose)이다. 지방산은 지방산 생합성 경로(fatty acid *de novo* biosynthesis pathway)의 중간물질로 생성되는 것으로, 이 과정에서 람노리피드의 변종을 이루는 여러 종류의 지방산이 유래되는 것으로 알려져 있다.
- [0009] 람노리피드의 대량생산에 관한 연구는 슈도모나스 종 디에스엠 2874 (*Pseudomonas* sp. DSM 2874)균주를 칼슘 알지네이트 지지체를 이용하여 고정화한 후 유동층 반응기에서 연속 배양하여 생산하는 방법 (Siemann and Wagner, 1993)과 발효기를 이용하여 연속 배양한 후 한외 여과법으로 생물유화제를 회수하여 동결 농축하는 방법 등으로 생물유화제를 생산하고 있다 (Mulligan and Gibbs, 1993).
- [0010]
- [0011] 그러나 람노리피드의 전구체인 HAAs [(R)-3-((R)-3-hydroxyalkanoyloxy) alkanolic acids]의 대량생산에 관해서는 알려진 바가 없다. HAAs 전구체는 바이오 계면활성제로서 뿐만 아니라, 의약품 전구체로서 활용할 수 있어 대체소재로 시장성이 매우 클 것으로 전망이 되고 있다.
- [0012] 이에 본 발명자는 *Pseudomonas aeruginosa*의 *rhIB* 변이 균주를 이용하여, (R)-3-((R)-3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids(HAAs)를 대량 생산하는 방법을 고안하기에 이르렀다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0013] 본 발명은 HAAs의 생산을 증가시키는 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로 *Pseudomonas aeruginosa*의 *rhIB* 유전자 변이 균주를 이용하여, medium-chain-length 지방산을 탄소원으로 M1 제한 배지에서 배양함으로써, 많은 양의 HAAs((R)-3-((R)-3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids)의 생산을 증가시키는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0014] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 HAAs의 생산을 증가시키는 방법을 제공한다.
- [0015] 보다 구체적으로, 본 발명은
- [0016] (i) 슈도모나스 속 균주의 람노리피드 유전자를 제거하여 슈도모나스 속 균주 변이체를 제조하는 단계; (ii) 상기 슈도모나스 속 변이체를 중쇄 지방산을 포함하는 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 HAAs ((R)-3-((R)-3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids)의 생산을 증가시키는 방법을 제공한다.

- [0017] 상기 중쇄 지방산은 탄소수가 6 내지 14인 지방산인 것이 바람직하다.
- [0018] 상기 중쇄 지방산의 함량은 20~100 mM인 것이 바람직하다.
- [0019] 상기 슈모도나스 속 균주는 슈모도나스 아에루기노사 (*Pseudomonas aeruginosa*)인 것을 더 포함할 수 있다.
- [0020] 상기 슈모도나스 아에루기노사는 슈모도나스 아에루기노사 PA14 또는 PA01인 것이 바람직하다.
- [0021] 상기 슈모도나스 속 균주의 변이체는 *Pseudomonas aeruginosa rhIB* 변이체인 것이 바람직하다.

발명의 효과

- [0022] *rhIB* mutant를 이용함으로써 응용성이 높은 HAAs 전구체를 대량 생산할 수 있음으로써 난 분해 계면활성제를 대체할 수 있다. 또한, HAAs는 바이오 계면활성제로서 뿐만 아니라, 의약품 전구체로 활용할 수 있어 대체소재로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0023] 도 1은 30℃, 120 시간 동안 70 mM 과당에서 자란 *Pseudomonas aeruginosa* PA14 및 PA01 변이체에서 PHA와 람노리피드의 생산에 관한 도식도이다.
- 도 2는 30℃, 60 시간동안 30 mM 옥탄산에서 자란 *Pseudomonas aeruginosa* PA14 및 PA01 변이체에서 PHA와 람노리피드의 생산에 관한 도식도이다.
- 도 3은 PHA와 배양 상등액의 클로로포름 추출액에 대한 ¹³C-NMR 분광학 스펙트럼에 관한 도식이다. PHA의 스펙트라는 CDCl₃에서 결정되었고 람노리피드의 스펙트라는 CD₃OD에서 결정되었다. 도 3a는 30℃, 72 시간동안 70 mM octanoic-*I*-¹³C acid에서 자란 *Pseudomonas aeruginosa* 야생형, *phaZ* 변이주, 그리고 *phaG* 변이주들에서 합성된 PHA의 ¹³C-NMR 스펙트라. 도 3b는 30℃, 72 시간동안 70 mM octanoic-*I*-¹³C acid에서 자란 *Pseudomonas aeruginosa* 야생형, *phaZ* 변이주, 그리고 *phaG* 변이주들에서 얻어진 상등액의 클로로포름 추출액의 PHA의 ¹³C-NMR 스펙트라. 도 3c는 HAAs와 람노즈 환에서 카복실 카본과 메틴 카본 영역에 대한 확장 스펙트라: a), 60 시간동안 70 mM octanoic-*I*-¹³C acid에서 자란 PA14 야생형; b), 84 시간동안 70 mM octanoic-*I*-¹³C acid에서 자란 PA14 야생형; c), 72 시간동안 60 mM 옥탄산에서 자란 PA14 *rhIB* 변이주; d), 60 시간동안 60 mM 옥탄산에서 자란 PA14 야생형; e), 120 시간동안 70 mM 과당에서 자란 *P. aeruginosa* BM114. 도 3d는 60 mM 옥탄산에서 자란 PA14 *rhIB* 변이주에서 배양시간에 따른 ¹³C-NMR 흡수 프로파일: a), 48 h; b), 60 h; c), 72 h. 도 3e는 60 mM 옥탄산에서 자란 PA14 야생형에서 배양시간에 따른 ¹³C-NMR 흡수 프로파일: a), 48 h; b), 60 h; c), 72 h.
- 도 4는 60 mM 옥탄산에서 자란 PA14 야생형 세포에서 배양시간에 따른 프로파일에 관한 도식도이다.
- 도 5는 MCL-fatty acids로부터의 HAAs 과 생산에 관한 경로의 도식도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0024] 본 발명은 HAAs의 생산을 증가시키는 방법을 제공한다.
- [0025] 보다 구체적으로, 본 발명은
- [0026] (i) 슈모도나스 속 균주의 람노리피드 유전자를 제거하여 슈도모나스 속 균주 변이체를 제조하는 단계; (ii) 상기 슈모도나스 속 변이체를 중쇄 지방산을 포함하는 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 HAAs ((R)-3-((R)-3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids)의 생산을 증가시키는 방법을 제공한다.
- [0027] 상기 중쇄 (medium-chain-length)란 탄소수가 6 내지 14인 것을 의미하며, 지방산 (脂肪酸, Fatty acid)이란 화학 또는 생화학적으로 카복실산으로서 사슬 모양의 포화 혹은 불포화 모노카복시산을 의미한다.

- [0028] 상기 중쇄 지방산은 상기 슈모도나스 속 균주의 생육을 위한 탄소원으로서 사용이 될 수 있다.
- [0029] 본 발명의 일실시예에서는 탄소수가 8개인 옥탄산 (octanoic acid)과 10개인 데칸산 (decanoic acid)인 것이 바람직하다. 상기 옥탄산 및 데칸산의 함량은 각각 60 mM과 30 mM인 것이 HAAs의 다량생산에 유리하다.
- [0030] 상기 배지는 슈모도나스 속 균주의 생육에 적합한 것이라면 어느 것을 사용하여도 무방하나, 바람직하게는 M1 미네랄염 배지 (1.0g (NH₄)₂SO₄, 2.3g KH₂PO₄, 7.3g Na₂HPO₄·12H₂O, 0.25g MgSO₄·7H₂O, 0.3g NaHCO₃, 0.1g CaCl₂·2H₂O, 0.03g 구연산 철 암모늄 (ferric ammonium citrate) 및 2 ml 미량원소 용액 (microelement solution))이 바람직하다. 상기 미량원소 용액은 200 ml의 0.5N 염산에 0.556g FeSO₄·7H₂O, 0.396g MnCl₂·4H₂O, 0.034g CuCl₂·2H₂O, 0.06g H₃BO₃, 0.006g NaMoO₄·2H₂O, 0.562g CoSO₄·7H₂O, 0.058g ZnSO₄·7H₂O, 및 0.004g NiCl₂·6H₂O가 첨가된 용액이다.
- [0031] 배양 조건으로는 균주가 최대성장(maximal growth)에 이를 때까지 20 내지 37℃, 바람직하게는 30℃로 배양할 수 있으며, 배양 시간은 48 내지 120시간이 바람직하다.
- [0032] 상기 슈모도나스 속 균주는 슈모도나스 아에루기노사 (*Pseudomonas aeruginosa*)인 것이 바람직하다. 슈도모나스 아에루기노사는 녹농균으로 주로 폐수처리와 토양 유류 오염지역의 생물학적정화에 주로 이용되고 있다. 슈도모나스 아에루기노사가 생산하는 생물유화제는 많은 연구자들에 의해 주성분이 당지질이며, 당은 람노즈 (rhamnose)로 지질은 베타-하이드록시데카노익에시드 (β-hydroxydecanoic acid)로 구성되어 있다.
- [0033]
- [0034] 상기 슈모도나스 아에루기노사는 슈모도나스 아에루기노사 PA14 또는PA01 인 것을 포함할 수 있다.
- [0035] 상기 슈모도나스 속 균주의 변이체는 슈모도나스 속 균주의 람노리피드 유전자를 제거 한 *Pseudomonas aeruginosa* *rhIB* 변이체인 것이 바람직하다.
- [0036] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 상세히 설명하도록 한다. 하기 실시예는 본 발명을 설명하기 위한 일 예에 지나지 않으며, 이에 의하여 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.
- [0037]
- [0038] **<실시예 1. 실험 방법>**
- [0039] **박테리아 균주 및 배양배지**
- [0040] 하기 [표 1]과 같이 본 발명의 실시예에서 사용된 박테리아 균주 *P. aeruginosa* PA14 및 PA01 야생형 균주 및 이의 변이체들은 PA14 (Liberati et al. 2006) Mutant Library 및 PA01 (Jacobs et al. 2003) Mutant Library (University of Washington Transposon Mutant Collection)에서 각각 구입하였다. 1% 효모 추출물, 1.5% 뉴트리언트 브로쓰 (nutrient broth) 및 0.2% 황산암모늄을 포함하는 영양소가 풍부한 (NR) 배지를 *P. aeruginosa*의 세포의 종배양(seed culture), 유지 및 보관에 사용하였다.
- [0041] HAAs 합성 배지로는 M1 미네랄염 배지 (1.0g (NH₄)₂SO₄, 2.3g KH₂PO₄, 7.3g Na₂HPO₄·12H₂O, 0.25g MgSO₄·7H₂O, 0.3g NaHCO₃, 0.1g CaCl₂·2H₂O, 0.03g 구연산 철 암모늄 (ferric ammonium citrate) 및 2 ml 미량원소 용액 (microelement solution))를 사용하였다. 상기 미량원소 용액은 200 ml의 0.5N 염산에 0.556g FeSO₄·7H₂O, 0.396g MnCl₂·4H₂O, 0.034g CuCl₂·2H₂O, 0.06g H₃BO₃, 0.006g NaMoO₄·2H₂O, 0.562g CoSO₄·7H₂O, 0.058g ZnSO₄·7H₂O, 및 0.004g NiCl₂·6H₂O가 첨가된 용액이다. 변이체들의 종배양을 위한 배지에는 항생제 (60 μg/ml 테트라시클린 및 30 μg/ml 겐타마이신)를 첨가하였다.
- [0042] **세포의 성장 모니터링**
- [0043] 미생물 균주 (microbial strains)를 12시간 동안 180rpm으로 30℃에서 5 ml의 NR 배지를 사용하여 접종하였고, 본 배양 (main culture)을 위해 70 mM 과당 또는 30 mM 데칸산 및 1.0 g/liter의 황산암모늄으로 보충된 500 ml의 M1 배지가 들어있는 2리터 플라스크로 옮겼다. 호기성에서 정상상태의 성장 (steady state growth)에 도달

할 때까지 배양하였다. 세포성장은 건조세포중량의 측정으로 결정하였다. 세포는 배양액을 원심분리 (10000×g, 10 min)하여 분리하였고, 메탄올로 세척하고 실온에서 24시간 동안 진공상태에서 건조시켰다. 잔류 암모늄 이온은 Nessler 시약을 사용하여 측정하였다. 잔류 과당은 3,5-디니트로살리실산(3,5-Dinitrosalicylic acid, DNS) 방법을 이용하여 측정하였다. 잔류 데칸 산의 농도를 측정하기 위해서 세포가 없는 상등액을 클로로포름으로 추출하였고 기체 크로마토그래피로 측정하였다.

[0044]

[0045] **세포 내의 PHA의 양적 분석**

[0046] 세포 내의 PHA의 분석을 위해서, 20 mg의 건조된 세포를 1 ml의 클로로포름, 0.85 ml의 메탄올 및 0.15 ml의 conc. 황산의 혼합물로 반응시켰다. Screw capped tube 안에서 반응물을 100℃에서 3시간 동안 반응시켰고, 반응물을 함유한 유기층을 분리, MgSO₄로 건조, GC (gas chromatography)로 분석하였다. 샘플을 비분산모드 (splitless mode)로 주입하였다. 정량적 NMR 분석에 의해 조성이 확인된 정제된 PHA를 황산 메탄올가수분해 (methanolysis)시켜 얻은 3-하이드록시 메틸에스터들의 GC 피크와 비교하여 시료의 GC 피크를 표준화하였다. 가스 크로마토그램을 HP-1 컬럼 및 불꽃이온화 검출기 (Flame Ionization Detector, FID)가 장착된 Hewlett Packard 5890A GC에 의해 얻었다. 컬럼은 80에서 250℃까지 8℃/min에서 가열되었고 주입기 및 검출기의 온도는 각각 230 및 280℃였다(Choi et al., 2009).

[0047]

[0048] **람노리피드의 분석**

[0049] M1 미네랄염배지에서 배양되는 동안 분비된 람노리피드 내에 람노즈의 양을 측정하기 위해 오르시놀 (orcinol) 분석을 사용하였다. 배양 상등액의 300 μl 샘플은 600 μl 디에틸 에테르로 2번 추출하였다. 에테르 분획물이 응집하였고, 건조를 위해 증발시킨 후 100 μl 물을 첨가하였다. 1.71% 오르시놀 용액의 100 μl 및 60% (v/v) 황산 800 μl에 각 샘플 100μl가 첨가되었다. 80℃에서 30분간 가열한 후, 상온에서 15분간 식혔고 421nm에서 흡광도를 측정하였다. 0~50 mg/ml 사이의 람노즈 표준물의 오르시놀 반응으로부터 얻은 표준곡선과 비교하여 람노리피드 내의 람노즈의 농도를 측정하였다. 그리고 나서, 균주의 타입 및 ¹³C-NMR 신호의 피크를 비교함으로써 모노 및 다이람노리피드의 비율을 기초로 탄소원에 따른 람노리피드의 함량(g/L)을 계산하였다. 람노리피드의 아실 그룹의 구성은 GC 방법으로 분석했다. 배양 상등액을 pH 2로 산성화한 후에 클로로포름으로 밤새 추출하였다. 여과된 클로로포름 추출액을 증발기 (Eyela N-11 1000, Tokyo Rikakikai Co., LTD, Tokyo, Japan)로 농축하였다. 농축된 클로로포름 추출액을 황산 메탄올가수분해시켜 세포내 PHA의 GC 분석에 사용된 같은 조건하에서 GC로 분석하였다.

[0050]

[0051] **PHA 및 람노리피드의 분리**

[0052] 옥탄산으로부터 람노리피드의 합성의 대사경로를 조사하기 위해 PA14 야생형, PA14 *phaZ* 변이체 및 PA14 *phaG* 변이체를 C-1 위치에 99% 동위체 C-13이 풍부한 옥탄산을 사용하여 배양하였다. Pyrex Soxhlet apparatus 에서 8 시간동안 (Choi et al., 1994) 뜨거운 클로로포름을 이용하여 건조된 세포로부터 PHA를 추출하였다. 농축된 용매 추출물을 차가운 메탄올로 빠르게 교반하여 침전시켰다. 분리된 PHA는 재침전에 의해서 정제되었고 50℃ 진공에서 밤새 건조되었다.

[0053]

람노리피드를 클로로포름 추출에 의해 세포가 없는 배양 상등액으로부터 분리하였다. 수집된 배양 상등액을 먼저 6 N 염산으로 pH 2로 산성화하였고, 상온에서 클로로포름으로 밤새 추출하였다. 클로로포름 층만 분리하여 증발에 의해 농축했으며, 점성 있는 람노리피드 생성물을 수득하였다. 분리된 람노리피드를 NMR 분광학으로 분석하였다.

[0054]

[0055] **¹³C-NMR 분석**

[0056] 25℃에서 PHA (~30mg/ml)의 CDCl₃ 용액 또는 람노리피드의 CD₃OD 용액을 125MHz ¹³C-NMR(DRX-500Bruker, Rheinstetten4, Germany)로 측정하였다. ¹³C-NMR스펙트럼에 대한 데이터 수집은 zgig 30 프로그램을

이용하였고, 게이티드 디커플링 모드 (gated decoupling mode) 하에서 10 μ s 펄스 폭, 30-s 펄스 반복, 30000Hz 스펙트라 폭, 64K 데이터 포인트 및 400 어큐물레이션 (accumulations)의 조건으로 수행하였다. 화학적 이동은 PHA와 람노리피드에 대해 문헌에 보고된 값에 따라 지정되었다.

[0057]

[0058] <실시예 2. 실험결과>

[0059] phaC1, phaC2, phaZ, 및 phaG 변이체에서 PHA 및 람노리피드의 합성

[0060] GC 분석을 통한 PHA 모노머 유닛의 정량분석은 과당으로부터 합성된 폴리에스터가 주성분으로서 3-하이드록시데카노에이트(3HD) 및 부성분으로서 3-하이드록시옥타노에이트(3HO) 및 3-하이드록시헥사노에이트(3HH)로 구성되어 있음을 보여주었다 (표 2 및 3).

[0061] 반면에, 데칸산으로부터 축적된 PHA는 기질보다 1개의 에틸렌 유닛이 더 짧은 체인을 가진 3HO가 주 모노머 유닛이었다. (표 4 및 5).

[0062] 각각의 탄소원에 따라 정량적 13 C-NMR 분석에 의해 결정된 모노 및 다이 람노리피드의 몰비율을 고려하여 오르시놀 방법에 의해 결정된 람노즈의 양을 이용하여 람노리피드의 함량을 계산하였다. GC 분석에 의하면, 람노리피드의 아실 체인은 주 성분으로서 3HD (85 mol% 이상)에 이어 3HO 뿐만 아니라 적은 양의 3-하이드록시도데세노에이트(3HDDe) 및 3-하이드록시도데카노에이트(3HDD) 유닛을 포함하고 있다 (표 2 내지 5).

[0063] PA14 및 PA01에 의해 합성된 람노리피드 내의 아실 체인의 몰 비율은 탄소원의 종류에 무관하게 매우 비슷하였다. 다양한 *P. aeruginosa* 야생형 균주에서 (Rha-Rha-C₁₀-C₁₀)가 주 (70% 이상) 람노리피드인 것으로 보고되었다 (D18 et al. 1999; Monteiro et al. 2007). 표 2-5를 보듯이 람노리피드 내의 HAAs-유닛에서 3HD와 다른 중쇄 3-하이드록시알칸산 (3HAs)의 합의 9:1 평균적 몰 비율은 람노리피드 함량의 계산에 사용된다. 과당 배지로부터의 상등액에 있어서 GC에 의해 측정된 3HAs의 총체적인 양은 람노리피드 (PA 14 균주에 있어 [모노람노리피드: 다이람노리피드]는 [28: 72]; PA01 균주에 있어 [모노람노리피드: 다이람노리피드]는 [0:~100]) 내의 람노즈의 양과 일치하였다 (표 2 및 3). 그러나, 중쇄 지방산 배지에 있어서, GC 분석과 오르시놀 분석에 의한 정량이 서로 일치하지 않았고, 이것은 유리 3HAs 또는 유리 HAAs가 과당으로 상등액에 존재하는 것을 의미하였다 (표 4 및 5).

[0064] PHA 축적과 관련된 유전자에 결점이 있는 4개의 *pha* 변이체 균주들은 PHA 합성 유전자들 (*phaC1* 및 *phaC2*), PHA 분해효소 유전자 (depolymerase gene, *phaZ*) 및 transacylase 유전자 (*phaG*)를 포함한다 (표 1). 과당에서 배양 시 도 1에서 보듯이 *P. aeruginosa* PA14 및 PA01 *phaC1* 변이체는 약하게 감소된 PHA 축적을 보였다. 반면에, 데칸산에서 배양 시 (도 2) 야생형과 비교해 보면 PHA 축적이 많이 감소하였다. 그러나 *phaC2* 변이체의 경우 과당 및 데카노에이트 모두에서 배양 시 PHA 축적이 많이 감소하였다. 이런 결과는 과당에서는 PhaC2가 주로 PHA 합성에 활성을 나타내고 반면에 데칸산에서는 PhaC1 및 PhaC2 모두 활성을 나타냄을 의미한다. 탄소원에 따른 PhaC1 및 PhaC2의 활성의 차이는 PHA 합성에 있어서 기질 특이성의 상이함으로 해석될 수 있다.

[0065] 하기 표 1은 본 실시예에서 사용된 박테리아 균주를 나타낸다. 또한, 표 2는 30℃에서 120 시간 one-step 배양 조건 하에서 70 mM 과당에서 배양된 *P. aeruginosa* PA14 균주 내의 PHA 및 람노리피드 합성에 관한 것이고, 표 3은 30℃에서 120시간 one-step 배양조건 하에서 70 mM 과당에서 배양된 *P. aeruginosa* PA01 균주 내의 PHA 및 람노리피드 합성에 관한 것이다.

표 1

Strains	Relevant characteristics	Reference
<i>P.aeruginosa</i> PA14 strains		
wild type		
<i>phaC1</i> mutant	poly(3-hydroxyalkanoic acid) synthase 1:: MrT7	Liberati et al. 2006
<i>phaC2</i> mutant	poly(3-hydroxyalkanoic acid) synthase 2:: MrT7	
<i>phaZ</i> mutant	poly(3-hydroxyalkanoic acid) depolymerase:: MrT7	
<i>phaG</i> mutant	putative transferase:: MrT7	
<i>rpoS</i> mutant	Sigma factor RpoS::MrT7	
<i>rhlA</i> mutant	rhamnosyltransferase chain A::MrT7	
<i>rhlB</i> mutant	rhamnosyltransferase chain B::MrT7	
<i>rhlR</i> mutant	acylhomoserine lactone dependent transcriptional regulator::MrT7	
<i>rhlI</i> mutant	autoinducer synthesis protein RhlI::MrT7	
<i>P.aeruginosa</i> PAO1 strains		
wild type		
<i>phaC1</i> mutant	poly(3-hydroxyalkanoic acid) synthase 1:: ISlacZ/hah	Jacobs et al. 2003
<i>phaC2</i> mutant	poly(3-hydroxyalkanoic acid) synthase 2:: ISphoA/hah	
<i>phaZ</i> mutant	poly(3-hydroxyalkanoic acid) depolymerase:: ISphoA/hah	
<i>phaG</i> mutant	probable transferase:: ISlacZ/hah	
<i>rpoS</i> mutant	Sigma factor RpoS:: ISlacZ/hah	
<i>rhlA</i> mutant	rhamnosyltransferase chain A:: ISphoA/hah	
<i>rhlB</i> mutant	rhamnosyltransferase chain B:: ISlacZ/hah	
<i>rhlR</i> mutant	acylhomoserine lactone dependent transcriptional regulator:: ISlacZ/hah	
<i>rhlI</i> mutant	autoinducer synthesis protein RhlI:: ISphoA/hah	

[0066]

표 2

Strain	Dry cell weight (g/L)	PHA content (g/L)	Monomer-unit composition of PHA (mol%)			Rhamnolipid ^b (g/L)	Free HAAAs ^c secreted (g/L)	Acyl chain composition of rhamnolipid (mol%)			
			3HC ^d	3HO	3HD			3HO ^e	3HD	3HDD ^e	3HDD ^e
Wild-type	3.83±0.10	0.289±0.013	4.5±0.2	27.3±0.5	68.2±0.7	1.34±0.033	0	19.3±0.3	86.4±0.3	1.4±0.1	1.7±0.1
<i>phaC1</i> mutant	3.55±0.03	0.235±0.011	9.0±0.5	28.5±0.2	66.7±0.2	1.135±0.025	0	19.2±0.1	88.0±0.3	0.7±0.1	1.1±0.1
<i>phaC2</i> mutant	3.35±0.11	0.019±0.003	0	28.6±1.1	71.4±1.3	1.06±0.011	0	19.0±0.2	87.6±0.4	1.2±0.1	1.2±0.1
<i>phaZ</i> mutant	3.73±0.11	0.315±0.027	3.1±0.1	26.7±0.6	69.9±0.5	1.058±0.017	0	19.3±0.5	87.1±0.2	1.1±0.1	1.2±0.2
<i>phaG</i> mutant	3.45±0.20	0.019±0.005	0	31.5±0.8	67.5±0.8	1.025±0.026	0	9.7±0.8	88.5±0.6	0.9±0.1	0.9±0.1
<i>rpoS</i> mutant	3.40±0.05	0.014±0.001	0	27.6±1.5	77.4±1.5	0.50±0.014	0	8.7±0.8	89.5±0.6	0.8±0.1	1.5±0.1
<i>rhlA</i> mutant	3.45±0.15	0.228±0.021	3.7±0.5	26.1±0.1	70.2±0.4	0.91±0.031	0	9.3±0.5	88.6±0.2	0.9±0.2	1.4±0.1
<i>rhlB</i> mutant	3.10±0.22	0.804±0.022	4.3±0.1	31.5±0.3	64.5±0.4	0	0.058±0.003 ^f	19.1±0.2	88.4±0.4	0.7±0.1	0.8±0.1
<i>rhlR</i> mutant	2.45±0.17	0.798±0.010	3.3±0.1	24.4±0.5	72.3±0.6	0	0 ^g	0	0	0	0
<i>rhlI</i> mutant	3.43±0.05	0.228±0.007	3.8±0.3	27.7±0.1	68.5±0.2	0.909±0.027	0	9.5±0.2	88.1±0.6	1.0±0.2	1.4±0.2

^a The production of PHA and rhamnolipid showed maximum peak values at 120 h of cultivation time and 85% or more carbon source was consumed for all strains under consideration.

^b 3HC, 3-hydroxyoctanoate; 3HO, 3-hydroxyoctanoate; 3HD, 3-hydroxydecanoate; 3HDD, 3-hydroxydodecanoate; 3HDD, 3-hydroxydodecanoate.

^c The amount of rhamnolipids was calculated from the amount of rhamnose determined by the orcinol method, assuming a 28:77 mole-ratio of mono- and di-rhamnolipids which was determined by their ¹³C NMR signal ratio.

^d HAAAs, (R)-3-((R)-3-hydroxyalkanoate)oxyalkanoic acids.

^e Not determined.

^f Estimated from the total amounts of 3HAs in the supernatant which was determined by GC.

[0067]

[0068]

표 3

Strain	Dry cell weight (g/L)	PHA content (%)	Monomer unit composition of PHA				Rhamnolipid ^d (g/L)	Free HAAs ^e secreted (g/L)	Acyl chain composition of rhamnolipid (mol%)			
			3HC ^f	3HO	3HD	3HDD			3HO ^g	3HD	3HDD	3HDD
Wild-type	1.87±0.15	0.233±0.011	0.3±0.2	36.6±0.5	57.1±0.3	1.816±0.017	NA	0	9.7±0.3	37.2±0.6	1.4±0.1	1.7±0.2
<i>phaC1</i> mutant	1.77±0.21	0.171±0.016	7.3±0.2	42.2±0.8	50.5±0.6	1.770±0.023	NA	0	9.8±0.2	37.5±0.4	1.6±0.1	1.8±0.1
<i>phaC2</i> mutant	1.53±0.13	0.025±0.003	0	40.2±0.7	59.7±0.7	1.861±0.015	NA	0	10.0±0.2	37.5±0.5	1.2±0.1	1.3±0.1
<i>phaG</i> mutant	2.32±0.14	0.336±0.022	3.9±0.1	40.5±0.4	53.6±0.7	1.488±0.010	NA	0	9.5±0.3	38.2±0.1	1.0±0.1	1.6±0.1
<i>phaG</i> mutant	1.66±0.23	0.089±0.010	4.8±0.8	58.5±0.6	66.7±0.2	1.567±0.006	NA	0	9.5±0.5	37.1±0.1	1.6±0.1	1.8±0.2
<i>zphS</i> mutant	1.57±0.06	0.018±0.004	0	30.7±0.5	69.3±0.5	0.690±0.016	NA	0	10.1±0.1	37.8±0.5	1.1±0.2	1.2±0.2
<i>rhIA</i> mutant	1.93±0.20	0.308±0.015	0.6±0.3	37.3±0.4	56.1±0.7	0	0 ^h	0	0	0	0	0
<i>rhIB</i> mutant	2.10±0.11	0.365±0.015	6.7±0.3	37.0±0.2	56.3±0.1	0	0.087±0.007 ⁱ	0	9.9±0.7	38.5±0.5	0.8±0.1	0.8±0.1
<i>rhI</i> mutant	2.10±0.17	0.372±0.017	7.2±1.5	37.8±1.9	65.0±0.3	0	0 ^h	0	0	0	0	0
<i>rhI</i> mutant	2.13±0.25	0.360±0.020	8.4±0.7	29.1±0.6	66.2±0.1	0	0 ^h	0	0	0	0	0

^a The production of PHA and rhamnolipid showed maximum peak values at 120 h of cultivation time and 95% or more carbon source was consumed for all strains under consideration.

^b 3HC, 3-hydroxyoctanoate; 3HO, 3-hydroxyoctanoate; 3HD, 3-hydroxydecanoate; 3HDD, 3-hydroxydodecanoate.

^c 3HDD, 3-hydroxydodecanoate.

^d The amount of rhamnolipids was calculated from the amount of rhamnose determined by the orcinol method, assuming ~100% rhamnolipids which was determined by their ¹³C-NMR signal ratio.

^e HAAs, (R)-3-((R)-3-hydroxyalkanoxyloxy)alkanoic acids.

^f Not determined.

^g Estimated from the total amounts of HAAs in the supernatant which was determined by GC.

[0069]

[0070]

[0071]

P. aeruginosa PA14 및 PA01의 *phaC1* 및 *phaC2* 변이체 모두에 있어 과당(도 1)이나 데칸산(도 2)에서 배양된 야생형과 비교하여 람노리피드의 생산은 약간 감소되었거나 비슷하였다. 3-하이드록시 지방산은 PHA 및 람노리피드 합성 경로 모두에 있어서 공통적인 전구체로서 사용이 된다.

[0072]

따라서, PHA 합성이 람노리피드의 합성과 무관하다는 것은 람노리피드의 생산은 다른 세포의 조절에 의해 통제될 수 있음을 의미한다. 이전에 보고된 것처럼 *P. aeruginosa* 내의 람노리피드의 생산은 전사단계에서 quorum-sensing 반응 및 환경조건에 의해 잘 조절이 된다 (Pearson et al. 1997; Chen et al. 2004; Soberet al. 2005).

[0073]

세포 내 PHA 분해효소 (PhaZ)의 생화학적 특성은 PHA granule 표면에 위치하면서 특이적으로 중쇄-PHA를 가수분해하는 것으로 보고되었다 (de Eugenio et al. 2007). 놀랍게도 PA14 *phaZ* 변이체는 세포가 30 mM 데칸산에서 (도 2) 배양되었을 때 PA14 야생형 균주보다 ~300% 더 PHA를 축적했다. 유사하게, *P. putida* KT2442 (Cai et al. 2009) 및 *P. fluorescens* BM07 (Choi et al. 2010) 균주 내의 *phaZ* 유전자의 불활성은 PHA의 증가된 축적을 이끌었다. 과당 (도 1) 및 데칸산 (도 2)에서 배양된 PA01 *phaZ* 변이체도 야생형과 비교하여 PHA를 훨씬 많이 축적하였다. 그러나, *phaC1* 및 *phaC2* 변이체와 유사하게 PA14과 PA01 2개의 *phaZ* 변이체의 람노리피드 생산은 2 탄소원에 대해 야생형의 람노리피드 생산과 비교하면 영향을 많이 받지 않는다.

[0074]

과당에서 배양된 (도 1) 2개의 *phaG* 변이체는 PHA 축적이 상당히 감소되었고 람노리피드의 생산은 야생형과 비교해 보면 약간 감소했다. 반면에 데칸산에서 배양되었을 때 거의 동일한 양의 PHA 및 람노리피드가 합성되었다. 최근의 연구에서 *phaG*는 PHA 및 람노리피드의 합성을 위한 공통의 지방산 전구체를 위해 RhIA와 경쟁하는 것으로 보고되었다. 따라서, *phaG* 변이체에서 증가된 람노리피드의 생산이 예상되었으나, 탄소원으로서 데칸산이나 과당에서 배양되었을 때 람노리피드 생산이 증가되지 않았다. 이는 람노리피드의 생산은 PHA 축적과 독립된 것이고 세포 대 세포의 신호된 quorum-sensing 반응에 의해 잘 조절되는 것을 의미한다 (Pearson et al. 1997; Chen et al. 2004; Soberon-Chavez et al. 2005).

[0075]

rhIA, rhIB, rhIR, 및 rhII 변이체에서 PHA 및 람노리피드의 합성

[0076]

rhIA 및 rhIB 유전자는 quorum-sensing (QS) 반응 (Maier and Sober2000)을 통해 람노리피드 합성의 전사 조절에 관여하는 단백질을 암호화하는 rhIR (전자 활성화체 유전자) 및 rhII (N-부틸호모세린 락톤 자가유도인자 합성 유전자)와 더불어 오페론 (operon) 형태로 배열되어 있다. 따라서, 람노리피드 및 PHA 합성의 상관성을 확인하기 위해 *P. aeruginosa* PA14 및 PA01의 4개의 *rhl* (*rhIA*, *rhIB*, *rhIR*, and *rhII*) 변이체 균주에서 과당 또는 데칸산으로부터 PHA 및 람노리피드의 생산을 조사하였다.

[0077]

3-하이드록시아실-ACP에 대한 RhIA 및 PhaG의 경쟁적인 특성으로부터 예상된 것처럼, 람노리피드가 생산되지 못

하는 PA14 및 PA01 *rhI* 변이체 균주는 과당 (도 1) 또는 데칸산 (도 2)에서 배양될 때 증가된 PHA 축적을 보였다. 70 mM 과당 배지에서 배양 시, PA14 *rhIB* 및 *rhIR* 변이체는 PA14 야생형 균주보다 약 280% PHA가 더 축적되었다. 이것은 지방산 합성이 HAA를 위한 근원임이 됨을 암시하였다. 이는 람노리피드의 HAA 내의 (R)-3-하이드록시 산은 지방산 생합성에서의 중간체와 일치하기 때문이다. 이와 대조적으로 지방산 β -산화 (Zhu et al. 12 2008)에 있어서 중간체와는 일치하지 않는다. 따라서, 람노리피드가 생산되지 못하는 변이체 균주 내에서, 람노리피드의 HAAs를 위해 생산된 (R)-3-하이드록시 산 전구체는 PhaG를 통해 PHA 합성을 위해 쉽게 유입될 수 있다.

[0078] 그러나, PA14 *rhIA* 및 *rhII* 변이체 내에서 PHA 및 람노리피드의 합성은 야생형과 비교해 다르지 않았다. 이는 이 변이체 균주들의 leaky property에 기인하는 것일지도 모른다.

[0079] 만니톨 (mannitol)에서 배양된 *Pseudomonas aeruginosa* PG201은 전체적인 지질양 (29 mg/L 유리된 HAAs) 내에서 유리 HAAs는 2%보다 적게 생산되고 *rhIB* 변이체는 유리 HAAs의 722 μ M (calculated as 256 mg/L)을 생산 (Deiel et al., 2003) 한다고 보고되었다. 그러나, 흥미롭게도 PA14 및 PA01 균주가 데칸산에서 배양되면, 유리된 3-하이드록시알칸 산 (3HAs)이 야생형 및 HAAs의 적은 양을 가진 *pha* 변이체에 의해 과하게 분비되었으나, *rhIB* 변이체에서는 유리 HAAs가 600 ~ 700 mg/L까지 생산되었다 (표 4 및 5). 중쇄 지방산 배지에서 배양된 *rhIB* 변이체에서 유리 HAAs의 대량 생산은 중쇄 지방산의 대사 (metabolism) 동안 (R)-3-하이드록시 지방산 전구체의 고농도 때문 일 수 있다. HAAs는 표면 장력을 낮추는 역할을 가지고 있다고 알려져 있다 (Deziel et al. 2003). 따라서, 중쇄 지방산으로부터 변이체에서 유리 HAAs의 높은 생산은 생명공학에 있어서 중요할 수 있다.

[0080] 하기 표 4는 30°C에서 60 시간 one-step 배양조건 하에서 30 mM 데칸산에서 배양된 *P. aeruginosa* PA14 균주 내의 PHA 및 람노리피드 합성에 관한 것이고, 표 5는 30°C에서 60 시간 one-step 배양조건 하에서 30 mM 데칸산에서 배양된 *P. aeruginosa* PA01 균주 내의 PHA 및 람노리피드 합성에 관한 것이다.

표 4

Strain	Dry-cell weight (g/L)	PHA content (g/L)	Monomer unit composition of PHA (mol%)				Rhamnolipid ^a calculated (g/L)	Surplus 3HAs ^b calculated (g/L)	Overall compositional ratio of 3HAs in supernatant (mol%)			
			3HC ^c	3HO ^c	3HD ^c	3HDD ^c			3HC ^d	3HO ^d	3HDD ^d	3HDD ^d
Wild-type	3.10±0.31	0.341±0.019	8.7±0.3	35.0±0.1	38.8±0.3	0.57±0.051	0.391±0.040 ^e	0.0±0.1	90.0±0.4	1.0±0.1	2.1±0.3	2.1±0.3
<i>phaC1</i> mutant	1.85±0.15	0.032±0.009	7.6±0.1	32.8±0.5	39.6±0.4	0.62±0.053	0.292±0.019 ^e	4.1±0.5	93.3±0.3	1.8±0.1	1.3±0.1	1.3±0.1
<i>phaC2</i> mutant	1.85±0.22	0.129±0.013	12.1±0.4	61.5±0.3	26.4±0.7	0.589±0.062	0.346±0.044 ^e	3.3±0.5	93.5±0.3	1.6±0.1	1.6±0.1	1.6±0.1
<i>phaC2</i> mutant	3.10±0.09	1.00±0.022	7.5±0.1	51.3±0.3	38.2±0.4	0.470±0.028	0.231±0.011 ^e	6.7±0.1	89.3±0.2	2.3±0.2	2.7±0.1	2.7±0.1
<i>phaG</i> mutant	3.10±0.30	0.543±0.031	7.8±0.5	54.3±0.3	37.4±0.3	0.602±0.039	0.340±0.019 ^e	7.0±0.1	90.5±0.5	1.1±0.3	1.4±0.3	1.4±0.3
<i>phbA</i> mutant	1.45±0.75	0.003±0.001	8.0±0.8	35.3±0.5	38.5±0.5	0.629±0.057	0.339±0.019 ^e	8.1±0.5	90.8±0.3	1.6±0.1	1.2±0.2	1.2±0.2
<i>phbA</i> mutant	2.10±0.13	0.371±0.011	7.6±0.1	57.3±0.5	35.1±0.4	0.553±0.011	0.251±0.022 ^e	6.2±0.3	90.0±0.2	1.8±0.1	2.0±0.1	2.0±0.1
<i>phbD</i> mutant	2.15±0.13	0.532±0.005	7.5±0.3	36.6±0.2	35.5±0.2	0	0.457±0.023 ^e	6.0±0.1	90.5±0.1	2.7±0.1	1.8±0.2	1.8±0.2
<i>phbD</i> mutant	2.15±0.33	0.401±0.015	8.0±0.3	35.0±0.3	37.0±0.3	0	0	0	0	0	0	0
<i>phb</i> mutant	2.15±0.21	0.356±0.013	8.0±0.1	57.5±0.1	34.5±0.2	0.488±0.053	0.263±0.010 ^e	7.0±0.6	89.7±0.3	1.6±0.2	1.3±0.1	1.3±0.1

^a The production of PHA and rhamnolipid showed maximum peak values at 60 h of cultivation time and 95% or more carbon source was consumed

for all strains under consideration

^b The amount of rhamnolipids was calculated from the amount of rhamnose determined by the orcinol method, assuming a 1:1 mole-ratio of mono- and di-rhamnolipids which was determined by their ¹³C-NMR signal ratio

^c 3HAs, 3-hydroxyalkanoic acids (sum of the content of four free acids 3HO, 3HD, 3HDD, and 3HDD acid). The surplus 3HAs is defined by [the content of 3HAs in supernatant] - [the content of 3HAs equivalent to HAAs-unit in rhamnolipid]

^d The surplus 3HAs was mostly in the form of free 3HAs, which was identified by ¹³C-NMR analysis

^e The surplus 3HAs was mostly in the form of free HAAs, which was identified by ¹³C-NMR analysis

^f 3HC, 3-hydroxycaproate, 3HO, 3-hydroxyoctanoate, 3HD, 3-hydroxydecanoate, 3HDD, 3-hydroxydodecanoate,

3HDD, 3-hydroxydodecanoate

[0081]

[0082]

표 5

Strain	Dry cell weight (g/L)	PHA content (g/L)	Monomeric unit composition of PHA (mol%)				Rhamnolipid ^a (g/L)	Surplus HLAs ^b calculated (g/L)	Overall compositional ratio of HLAs in supernatant (mol%)			
			3HC ^c	3HO ^c	3HD ^c	3HDD ^c			3HD ^c	3HDd ^c	3HDDe ^c	3HDD ^c
Wild-type	1.93±0.11	0.18±0.005	10.3±0.1	58.7±0.5	35.0±0.4	0.63±0.045	0.413±0.007 ^d	7.3±0.5	89.3±0.7	1.6±0.3	1.3±0.1	
<i>phaC1</i> mutant	1.10±0.07	0.09±0.005	7.1±0.8	51.8±0.5	41.1±0.3	0.751±0.071	0.393±0.051 ^e	4.9±0.7	90.9±0.5	2.1±0.1	2.1±0.1	
<i>phaC2</i> mutant	1.79±0.13	0.23±0.009	13.2±0.1	62.8±0.3	29.0±0.4	0.775±0.066	0.455±0.036 ^e	7.6±0.4	88.7±0.6	2.8±0.1	1.9±0.1	
<i>phaZ</i> mutant	2.33±0.28	1.119±0.051	8.0±0.8	55.1±0.5	36.9±0.2	0.582±0.019	0.512±0.032 ^e	13.3±0.1	83.9±0.1	2.3±0.2	1.5±0.1	
<i>phaG</i> mutant	1.30±0.20	0.73±0.085	8.7±0.7	58.0±0.5	35.3±0.4	0.759±0.018	0.374±0.018 ^e	7.1±0.5	89.7±0.3	1.8±0.2	1.9±0.1	
<i>rpoS</i> mutant	1.90±0.09	0.18±0.011	11.8±0.3	61.0±0.1	25.1±0.1	0.397±0.025	0.382±0.030 ^e	7.9±0.4	89.4±0.2	1.3±0.1	1.4±0.1	
<i>rhIAB</i> mutant	2.05±0.13	0.858±0.017	9.7±0.1	60.0±0.2	30.3±0.5	0	0	0	0	0	0	
<i>rhIAB</i> mutant	2.25±0.17	0.899±0.015	10.5±0.1	59.9±0.1	29.5±0.2	0	0.621±0.022 ^e	8.3±0.4	90.6±0.6	1.5±0.1	1.5±0.1	
<i>rhIAB</i> mutant	1.90±0.07	0.687±0.011	9.6±0.4	58.8±0.3	35.6±0.1	0	0	0	0	0	0	
<i>rhIAB</i> mutant	2.30±0.22	1.123±0.025	10.2±0.2	61.2±0.1	26.8±0.1	0	0	0	0	0	0	

^a The production of PHA and rhamnolipid showed maximum peak values at 60 h of cultivation time and 95% or more carbon source was consumed.

for all strains under consideration.

^b The amount of rhamnolipids was calculated from the amount of rhamnose determined by the orcinol method, assuming a 27.73 mole ratio of mono- and di-rhamnolipids, which was determined by their ¹³C-NMR signal ratio.

^c HLAs, 3-hydroxyacylamic acids (sum of the content of four free acids: 3HO, 3HD, 3HDDe, and 3HDD acid). The surplus HLAs is defined by [(the content of 3OC detected) - overall HLAs in supernatant] - [the content of HLAs equivalent to HLAs unit in rhamnolipid].

^d The surplus HLAs was mostly in the form of free HLAs, which was identified by ¹³C-NMR analysis.

^e The surplus HLAs was mostly in the form of free HLAs, which was identified by ¹³C-NMR analysis.

^f 3HC, 3-hydroxyoctanoate; 3HO, 3-hydroxyoctanoate; 3HD, 3-hydroxydecanoate; 3HDDe, 3-hydroxydodecanoate;

3HDD, 3-hydroxydodecanoate.

PHA 및 람노리피드의 합성에 있어서 rpoS 유전자의 역할

*E. coli*에서 sigma factor S (*rpoS*)는 성장의 정지기 (stationary phase) 동안 *rhIAB* 발현에 직접적 혹은 간접적으로 관여한다. PA14 및 PA01의 *rpoS* 변이체 균주가 70 mM 과당에서 배양될 때 PHA 및 람노리피드의 생산은 야생형과 비교하면 각각 10% 및 40% 보다 적게 감소하였다 (도 1). 이런 결과는 *rpoS* 변이체에서 감소된 PHA 생산은 *phaC2*의 감소된 발현에 의해서 영향을 받을 수 있다는 것을 의미한다.

유사하게, 과당에서 배양된 감소된 람노리피드는 *RhIAB*의 낮은 발현에 기인한 것으로 보인다. PA14 *rpoS* 변이체는 30 mM 데칸산으로부터 PHA를 축적시키지 않았다 (도 2). 반면에 PA01 *rpoS* 변이체는 야생형과 유사한 PHA의 양을 축적시켰다 (도 2). 이런 차이는 RpoS sigma factor에 있어 두 개의 균주의 전사 의존도의 차이에 의한 것일지도 모른다. 그러나 두 개의 변이체 균주는 데칸산으로부터 람노리피드의 생산에 있어서 명확한 차이를 보이지는 않았다 (도 2).

중쇄 지방산으로부터 PHA 및 람노리피드 합성을 위한 대사경로

중쇄 지방산으로부터 PHA 및 람노리피드 합성을 위한 대사경로는 C-1 위치에 99% 동위체 C-13이 풍부한 옥탄산 (70 mM)을 사용함으로써 조사했다. PHA의 NMR 스펙트라는 테스트한 모든 세 개의 균주 (PA14 야생형, PA14 *phaZ*, 및 *phaG* 변이체)에 있어서 모노머-유닛 3HO 내의 카르보닐 탄소 (~170ppm 영역)가 풍부한 것으로 나타났다 (도 3a). 따라서 모노머-유닛 3HO는 어떤 탄소 골격의 재배치 없이 옥탄산 기질 분자로부터 직접적으로 유도되고 PHA로 합성된다는 것으로 나타났다.

그러나 ~175 및 ~75 ppm의 두 개의 강한 C-13 NMR 이동 영역이 주 구성물로서 람노리피드를 함유하고 있는 배양 상등액의 클로로포름 추출로부터 관찰되었다 (도 3b). PA14 야생형 및 PA14 *phaG*의 스펙트라 사이의 유사성은 중쇄 지방산으로부터 람노리피드 합성에 있어서 *phaG* 유전자의 무관성으로 제안된다. 가장 유용한 정보를 주기 때문에 카르보닐 탄소 및 O-bound 메틴 탄소를 위한 흡수를 상세하게 분석하였다. 확장된 카르보닐 영역은 흡수, 176.9, 175.0, 173.4, 172.1, 171.54 및 171.84ppm (도 3c)를 보였다. 문헌에 보고된 화학 이동값 및 표준 물질들 (과당에서 배양된 BM114 균주에서 합성된 3HO acid, 3HD acid 및 다이람노리피드)로부터 얻어진 화학 이동값에 따라 피크들은 다음과 같이 지정되었다: 옥탄산(OA)의 카르보닐 탄소(C-1), 176.9ppm; 3HO acid 및 3HD acid의 C-1, 175ppm; A1, A'1 및 A''1, 173.4ppm; B'1, 172.1ppm; B'1, 171.54ppm; B1, 171.48ppm. 지정된 난프라임 (non-primed), 프라임 (primed) 및 더블 프라임 (double primed)은 다이람노리피드, 모노람노리피드 및 유리된 HAAs와 각각 일치하고 다이람노리피드 Rha-Rha-C10-C10의 탄소 골격 (A, B, C 및 D)의 넘버링 시스템 (numbering system)은 도 3b에서 나타났다. ~75ppm 영역은 람노즈 환 (ring) 내의 -CH(OH)- 및 HAAs 내의 -CH(R)-O- 또는 3-하이드록시알칸산(3HA) (도 3c)을 포함하는, 한 개 산소 원자에 바인딩된 메틴 카본과 연관

이 있다. 74.5 및 74.3ppm에서의 피크들은 각각 다이람노리피드 및 모노람노리피드 내의 람노즈 환의 산화물-결합(oxide-linkage)에서부터 아노머 탄소(anomeric carbon)까지 연속된 3HD-유닛 내의 B' 3 및 B3 β-카본과 연관되어있다. 71.4ppm에서 강한 흡수는 다이람노리피드 및 모노람노리피드 내의 유리된 카르복실 그룹(A3 및 A' 3)을 가진 3HD-유닛 내의 β-카본과 연관이 있다. 추가의 강한 흡수는 아직 문헌으로 보고되지 않은 68.4ppm에서 또한 발견된다. 68.4ppm에서의 흡수는 3HO 및 3HD 산 내의 β-카본의 흡수와 일치하는 것으로 발견되었다. PA14 *rhIB* 변이체에 있어서, 단지 71.3 및 68.4ppm 두 개의 주요 신호는 0-바인딩 된 메틴 카본 영역 내에서 발견되었다. 변이체는 유리된 HAA 만 생산했다. 따라서, 71.3 및 68.4ppm 두 개의 피크는 HAAs의 메틴 카본(B' 3)에 부착된 β-카본(A' 3) 및 수산기(hydroxyl group)에 연계된 에스테르로 지정될 수 있다. HAAs와 연관된 71.3ppm 피크는 람노리피드 내의 A3 및 A' 3과 약간 겹쳐졌다(도 3c).

[0091] 도 3c는 기질 OA, 중간체(3HO 산, 3HD 산, 및 유리된 HAAs) 및 람노리피드를 포함한 클로로포름 추출물로 나타났다. 거의 동등한 비율의 두 쌍의 피크들(B1 및 B' 1) 및 (B3 및 B' 3)은 무관 탄소원 배지(도 3c)에서보다 중쇄 지방산 배지에서 모노람노리피드의 생산이 훨씬 많다는 것을 나타낸다. 도 3c에서 보듯이, 람노리피드 내의 풍부한 카르복실 카본 피크들(A1 및 B1 시리즈) 및 HAAs-유닛의 β-카본 피크들(A3 및 B3 시리즈)은 람노리피드의 아실 체인 내의 3HD 유닛이 C-1위치에서 한 개의 에틸렌 유닛에 의한 측색신장(chain elongation) 이후에 옥탄산-1-¹³C산 기질로부터 직접적으로 전환이 된다는 것을 의미한다. 람노즈 환의 6개의 카본 중에 단지 카본 3 및 4는 도 3c에서 보듯이 증대된 흡수를 보여준다. 다른 람노즈 카본 1(~100ppm), 2, 5 및 6은 약하고 거의 측정할 수 없는 신호들(도 3b 및 3c)을 나타낸다. 이것은 모노 및 다이람노리피드의 람노즈 일부의 카본 3 및 4가 옥탄산 내의 카본 1로부터 거의 유래되었다는 것을 의미한다. 따라서 dTDP-L-람노즈 생합성 경로(Soberet al. 2005)에서 사용된 글루코스는 글루코스 합성 경로를 통해서 옥탄산-1-¹³C산의 재배열을 통해서 유래 되었을 지도 모른다.

[0092] OA, 중간체(유리 산: 3HO, 3HD 및 HAAs), 및 람노리피드 사이의 대사의 이동 상호관계를 이해하기 위해서 60 mM 옥탄산에서 배양된 PA14 야생형에 있어 배양 시간에 따른 프로파일(profiles)을 조사하였다(도 4). 게다가, 60 mM 옥탄산에서 배양된 PA14 *rhIB* 변이체 및 PA14 야생형의 배양 상등액은 ¹³C-NMR 스펙트럼으로 48, 60 및 72 시간의 3번의 간격으로 분석하였다(도 3d, e). 그러나 최대 람노리피드의 생산은 70 시간에서 발생했다. 상등액에서 람노리피드의 양의 계산을 위해 모노 및 다이람노리피드의 1:1 혼합물을 사용했다(도 3e). 3HO, 3HD, 3HDD 및 3HDD와 같은 GC-측정된 3HAs 중에서 주요 구성인 3HO 및 3HD 산은 도 4에 나타났다. 유리된 산 3HO는 55시간까지 다량으로 분리되었고 3HD로 전환된 이후에 람노리피드로 통합되기 위해 이후 다시 택해졌다. 그러나, 상등액에서 측정된 3HAs는 도 3e에서와 같이 유리된(R)-3HAs(175.0ppm 신호와 연관된)에 상당히 기인되었다. HAAs 화합물(172.1 ppm과 연관된 신호, B' 1)의 분획 내의 점차적 증가는 상등액에서 발견되었다: 48, 60 및 72 시간에서 전체 3HAs양 내의 13, 27, 및 42 mol%(도 3e의 피크 영역 몰 비율의 관점에서 재계산된). 게다가, PA14 배양 상등액(색소가 없는 최적의 조건 하에서 준비된)을 위한 세 개의 클로로포름 추출물의 광회전은 55, 65 및 75시간에서 -8.5, -25.1 및 -13.8°로 결정되었다. 여기서 각각의 상등액은 0.15 3HO 및 0.01 3HD(g/L); 0.43 및 0.05(g/L); 0.35 및 0.15(g/L)로 구성되어있다. 광회전의 음의 수치는 유리된 산 3HAs가(R)-form임을 나타내었다. 이는(R)-3-하이드록시부틸 산은 [α]_D = -17.5o (0.31 g/L in chloroform)를 가지고 있기 때문이다. 그러나, PA14 *rhIB* 변이체에서, 점진적 변형 OA → 3HAs → HAAs은 배양 시간에 따라 더욱 명확하게 보여질 수 있다. 3HAs 대 HAA의 몰 비율(카르복실 탄소 피크들 175.0 및 173.4 또는 172.1ppm의 영역 비율로부터 계산된)은 72시간에서 15:85였다. 따라서 PA14 *rhIB* 변이체는 과당에서 배양된 야생형 세포에 비해 많은 양의 HAAs를 효과적으로 생산하였다.

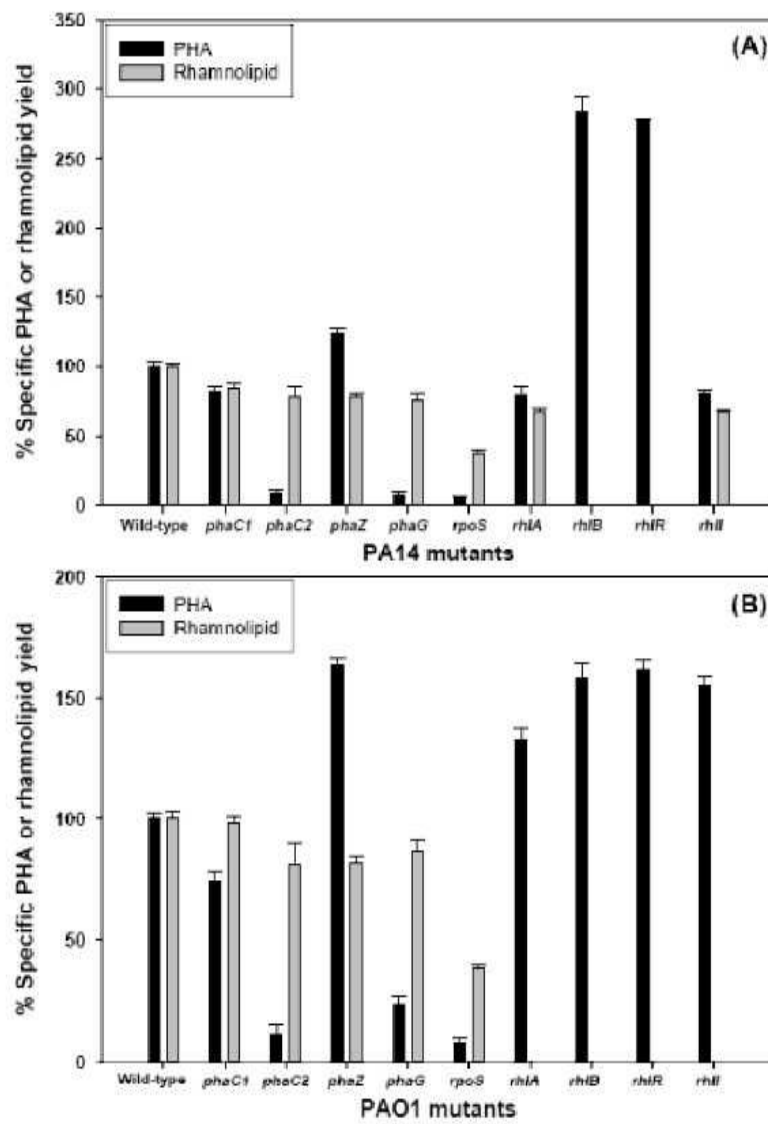
[0093]

[0094] 이상 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시예들을 설명하였지만, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 그 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

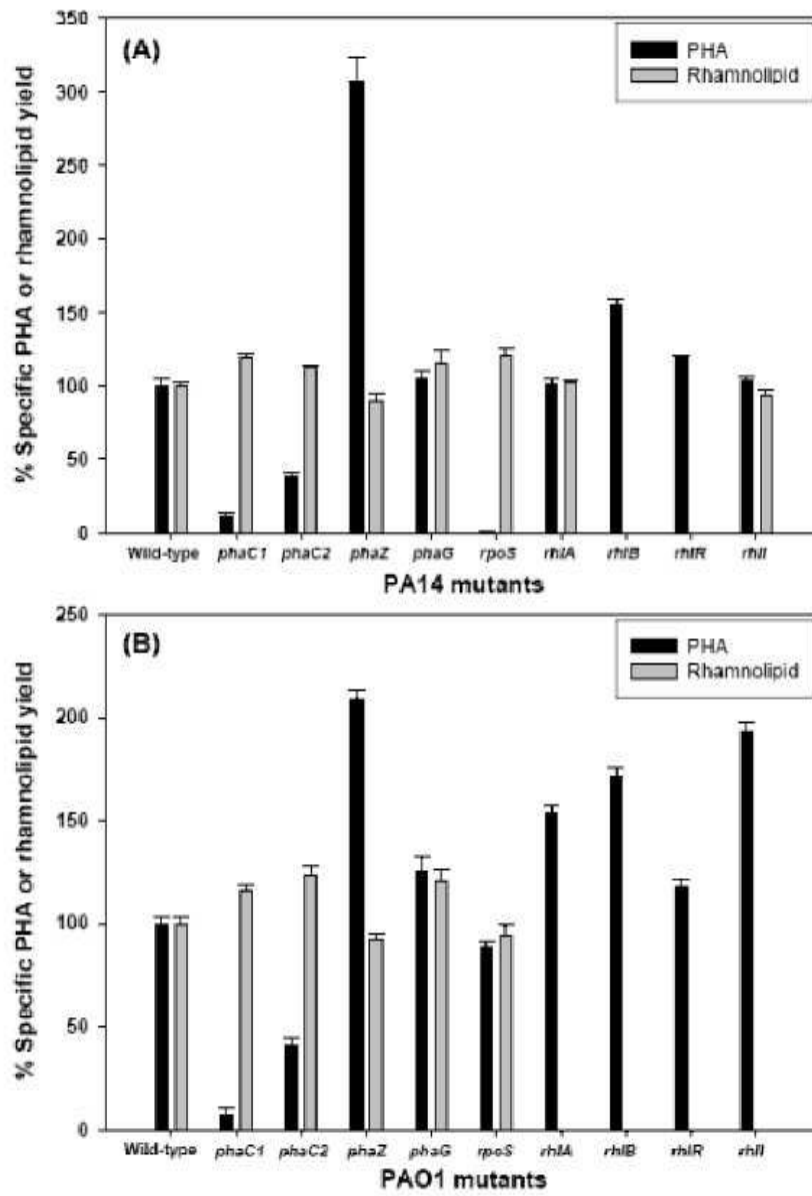
[0095]

도면

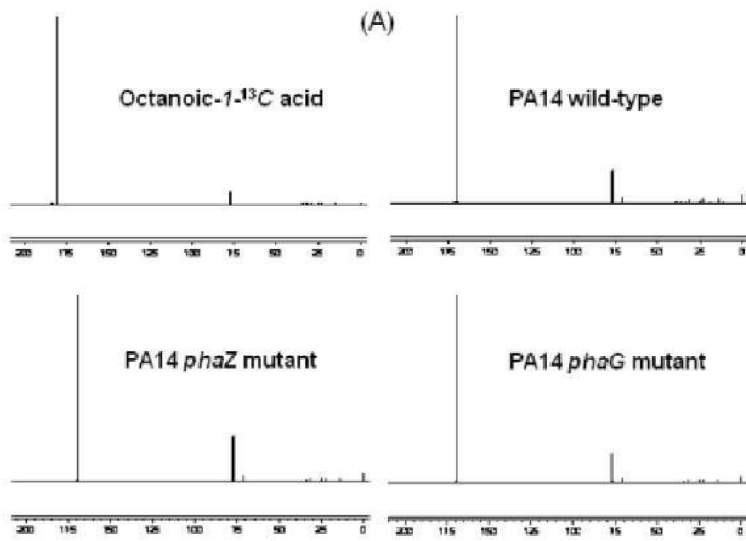
도면1



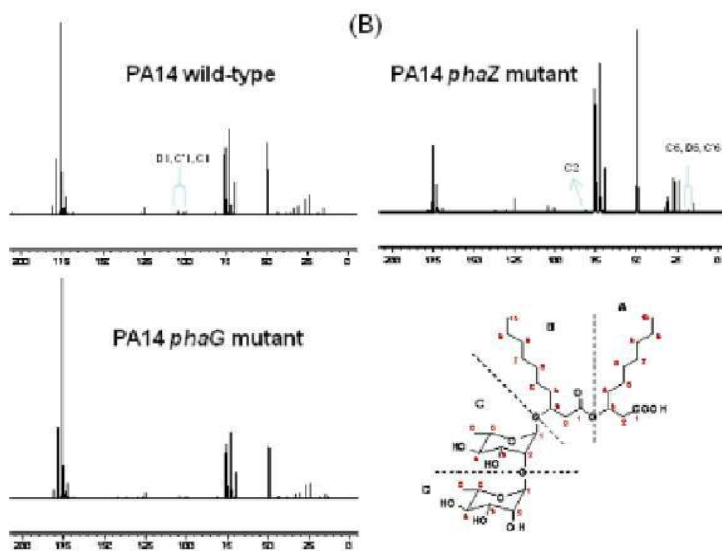
도면2



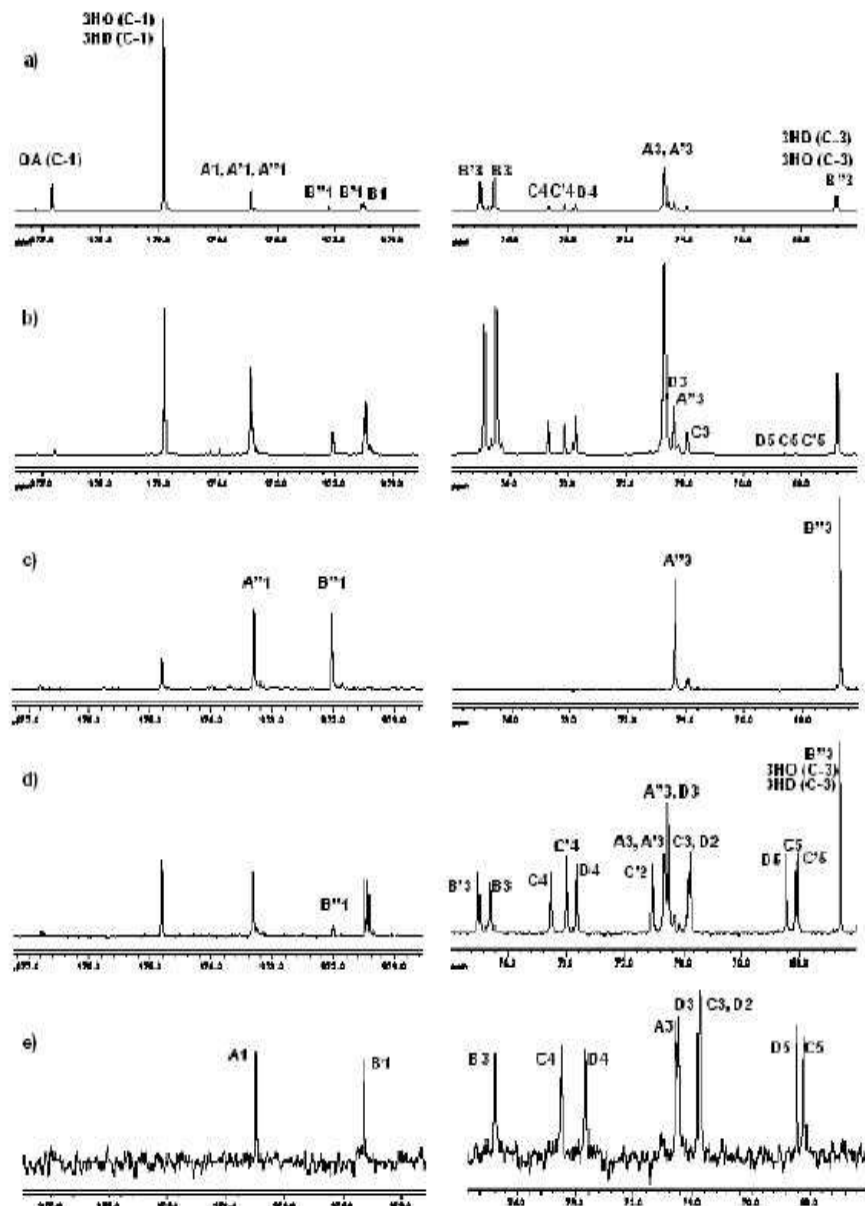
도면3a



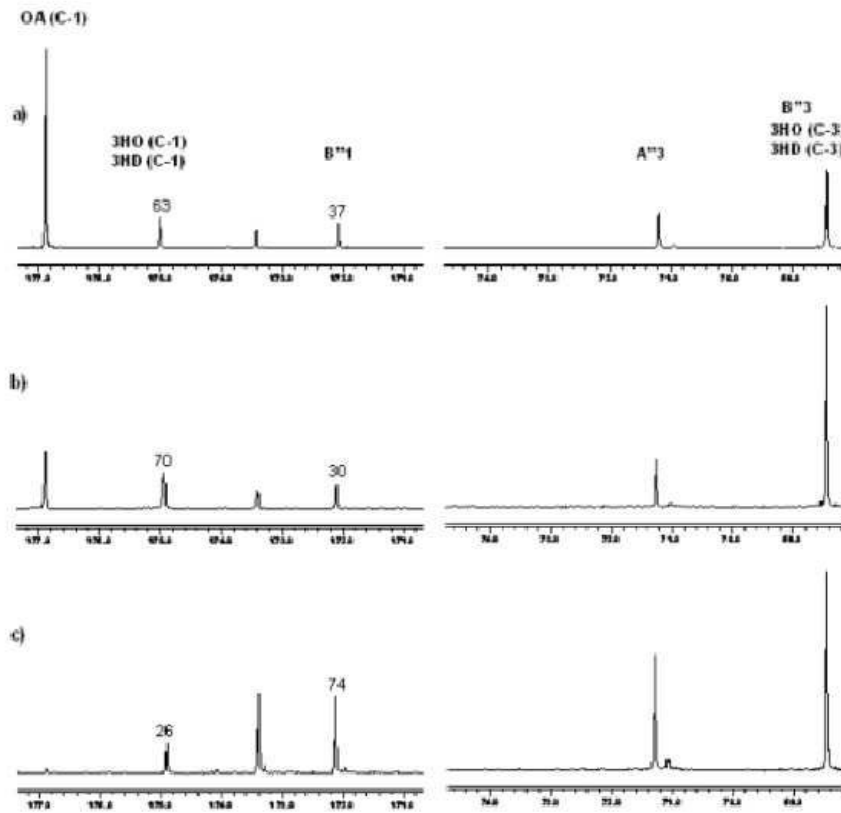
도면3b



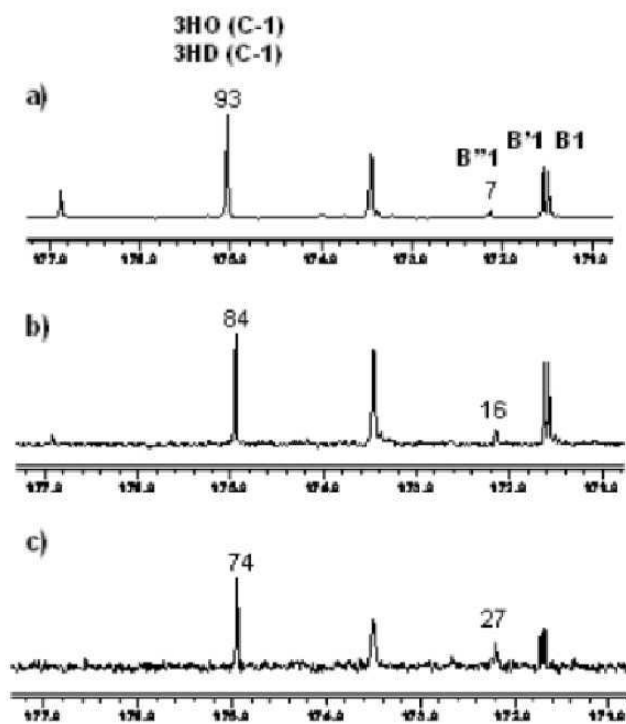
도면3c



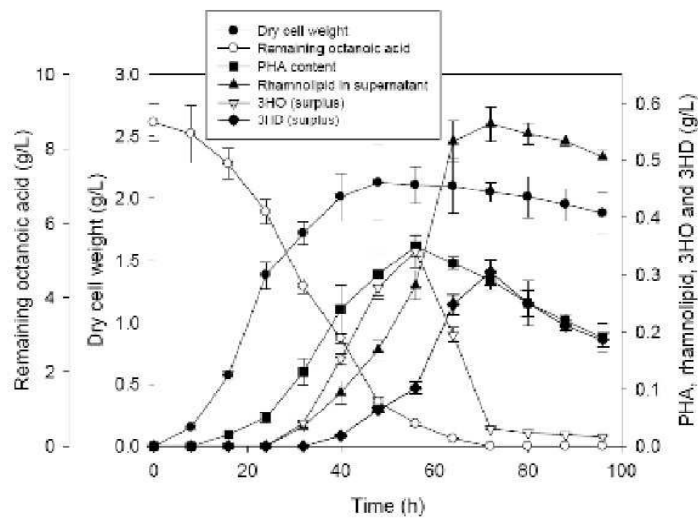
도면3d



도면3e



도면4



도면5

