(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0052156
(43) 공개일자 2014년05월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/19 (2006.01) *C12N 15/52* (2006.01)
C12N 15/81 (2006.01) *C12P 7/64* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0116959
(22) 출원일자 2012년10월19일
심사청구일자 2012년10월19일

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
이진원
서울 송파구 양재대로 1218, 201동 1601호 (방이동, 올림픽선수,기자촌아파트)
정연태
서울특별시 마포구 망원2동 성원아파트 101동 306호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양부현

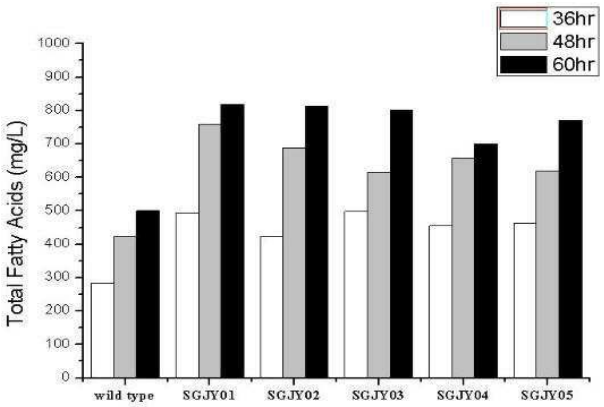
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **지방산 함량 개선을 위한 형질전환 효모 및 그의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 지방산 함량 개선을 위한 형질전환 효모 및 그의 제조방법에 관한 것으로, (ⅰ) 사카로미세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) 유래의 옥소아실 운반 단백질 합성효소Ⅱ(*fabF*)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열; (ⅱ) 스트렙토코커스 피오지네스(*Streptococcus pyogenes*) 유래의 옥소아실 운반단백질 환원효소(*fabG*)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열; (ⅲ) 스트렙토코커스 피오지네스 유래의 하이드록시미리스토일 운반단백질 탈수효소(*fabZ*)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열; (ⅳ)스트렙토코커스 피오지네스 유래의 이노일 운반단백질 환원효소 Ⅱ(*fabK*)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열; 또는 (ⅴ) 스트렙토코커스 피오지네스 유래의 올레일 운반단백질 가수분해효소(EC 3.1.2.14)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 지방산 생산용 형질전환 효모를 제공한다. 본 발명은 *사카로미세스 세레비시아*에 의하여 지방산 생합성 경로의 신장단계를 과발현하여 지방산 자체의 함량을 증진할 수 있어, 글루코스로부터 지방산 생합성 경로에의 과발현과 다른 종의 유전자 삽입에 의한 대사 흐름 변경을 통해 지방산 생합성을 대량 생산해 내는데 효과적이다.

대 표 도 - 도11c



(72) 발명자

박창훈

경기 용인시 수지구 죽전로 267, 803동 1301호 (죽전동, 내대지마을건영캐스빌)

이선희

서울 은평구 불광로6길 10-10, 101호 (불광동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345142202
부처명	교육과학기술부
연구사업명	Cellulose-based Biofuel 생산효율 향상 기술개발
연구과제명	Fatty acid elongation mechanism 개선을 통한 고성능바이오연료 생산균주 개발
기 여 율	1/1
주관기관	한국생명공학연구원
연구기간	2010.12.15 ~ 2013.12.14

특허청구의 범위

청구항 1

(ⅰ) 사카로미세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) 유래의 옥소아실 운반 단백질 합성효소Ⅱ(*fabF*)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열; (ⅱ) 스트렙토코커스 피오지네스(*Streptococcus pyogenes*) 유래의 옥소아실 운반 단백질 환원효소(*fabG*)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열; (ⅲ) 스트렙토코커스 피오지네스 유래의 하이드록시미리스토일 운반단백질 탈수효소(*fabZ*)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열; (ⅳ)스트렙토코커스 피오지네스 유래의 이노일 운반단백질 환원효소 Ⅱ(*fabK*)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열; 또는 (ⅴ) 스트렙토코커스 피오지네스 유래의 올레일 운반단백질 가수분해효소(EC 3.1.2.14)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 지방산 생산용 형질전환 효모.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 사카로미세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) 유래의 옥소아실 운반단백질 환원효소(*fabG*)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제1서열인 것을 특징으로 하는 효모.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 스트렙토코커스 피오지네스(*Streptococcus pyogenes*) 유래의 옥소아실 운반 단백질 합성효소Ⅱ(*fabF*)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제2서열인 것을 특징으로 하는 효모.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 스트렙토코커스 피오지네스 유래의 하이드록시미리스토일 운반단백질 탈수효소(*fabZ*)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제3서열인 것을 특징으로 하는 효모.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 스트렙토코커스 피오지네스 유래의 이노일 운반단백질 환원효소 Ⅱ(*fabK*)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제4서열인 것을 특징으로 하는 효모.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 스트렙토코커스 피오지네스 유래의 올레일 운반단백질 가수분해효소(EC 3.1.2.14)을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제5서열인 것을 특징으로 하는 효모.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 재조합 벡터는 GAL10 프로모터 또는 GAL1 프로모터임를 포함하는 것을 특징으로 하는 효모.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 재조합 벡터는 ADH1 터미네이터 또는 CYC1 터미네이터를 포함하는 것을 특징으로 하는 효모.

청구항 9

다음의 단계를 포함하는 지방산 생산용 형질전환 효모의 제조방법:

(a) (ⅰ) 사카로미세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) 유래의 옥소아실 운반 단백질 합성효소Ⅱ(*fabF*)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열; (ⅱ) 스트렙토코커스 피오지네스(*Streptococcus pyogenes*) 유래의 옥소아실 운반단백질 환원효소(*fabG*)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열; (ⅲ) 스트렙토코커스 피오지네스 유래의 하이드록시미리스토일 운반단백질 탈수효소(*fabZ*)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열; (ⅳ)스트렙토코커스 피오지네스 유래의 이노일 운반단백질 환원효소 Ⅱ(*fabK*)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열; 또는 (ⅴ) 스트렙토코커스 피오지네스 유래의 올레일 운반단백질 가수분해효소(EC 3.1.2.14)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 발현 벡터에 삽입하여 재조합 벡터를 제조하는 단계; 및

(b) 상기 재조합 벡터를 효모에 형질전환하여 형질전환 효모을 제조하는 단계.

청구항 10

다음의 단계를 포함하는 지방산의 제조방법:

(a) 상기 제 1 항 내지 제9항 중 어느 한 항의 지방산 생산용 효모를 배지에서 배양하여 지방산을 생합성 하는 단계; 및

(b) 상기 생합성된 지방산을 수득하는 단계.

청구항 11

제 10 항에 있어서, 상기 단계 (b)의 지방산은 헥사데카노익산(hexadecanoic acid) 또는 옥타데카노익산(octadecanoic acid)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제 10 항에 있어서, 상기 방법은 야생형 *사카로미세스 세레비시아*와 지방산에 대한 수율이 1.0 내지 2.0배 증가된 것을 특징으로 하는 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 지방산 함량 개선을 위한 형질전환 효모 및 그의 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 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 및 부탄올에 대한 관심이 증가하고 있지만, 언급된 종류의 바이오에너지 모두 전력생산이나 수송용 연료로 사용될 수 있으나, 실적용 및 생산 방법의 몇몇 단점으로 인해 새로운 신재생에너지 자원인 탄화수소(hydrocarbon) 형태의 화합물에 대한 관심이 증가되고 있다. 이에 따라 장쇄 지방산(long chain fatty acid)을 대사산물로서 생성할 수 있는 재조합 균주에 대한 관심도 증대되고 있다.

[0003] *사카로미세스 세레비시아*(*Saccharomyces cerevisiae*)는 1683년 Leeuwenhoek에 의해 발견되었으며, 자낭균류에 속하는 대표적인 효모이다. 효모균은 효모 자체가 값싼 지방 및 단백질원으로 사료에 사용된다. 비타민 B군

을 풍부하게 함유하고, 또 비타민 D를 함유하는 것도 있으며, 의약품 공업에도 사용되고 있다. 효모를 처음으로 관찰한 것은 현미경의 발명자 레벤후크(Anton van Leeuwenhoek)이며, 1680년 맥주효모를 발견하였다. 그러나 효모 발효의 생물학적 의의가 알려진 것은 1861년이었으며, 파스퇴르(Louis Pasteur)는 포도주 발효가 효모에 의해 일어난다는 것을 처음으로 밝혔다. 자연계에 적응력이 매우 강한 미생물이다. 이 균은 성장을 위한 영양요구가 매우 단순하다.

[0004] *스트렙토코커스 피오지네스*(*Streptococcus pyogenes*)는 화농성 연쇄상구균으로 폐렴, 인후염, 급성신장염, 독성 쇼크증후군 등의 질병을 일으킨다.

[0005] 지방산(fatty acid)은 1개의 카복시기(-COOH)를 가지는 탄화수소 사슬의 카복실산으로 사슬 모양의 1가의 카복실산을 말한다. 지방을 가수분해하면 생기기 때문에 이러한 이름이 명명되었다. 지방산 분자는 탄화수소 사슬로 이루어져 있는데, 탄화수소는 탄소의 기본 골격에 곁가지로 수소가 연결되어 있고 한쪽 끝에 카복실기가 결합되어 있다. 생체 내에서 지방산은 지방산회로에 의해서 분해되거나 합성되거나 한다. 이 회로는 탄소 2개씩의 단위로 지방산을 합성하거나 분해하므로, 자연계에 존재하는 지방산은 거의 대부분이 짝수인 탄소수로 되어 있다.

[0006] 미생물 생체 내에서 글루코즈로부터의 지방산합성은 아세틸-CoA (acetyl-CoA)에서 시작하여, 그 뒤 탄소원자가 한 번에 두 개의 원자씩 탄화수소사슬에 붙어 사슬이 길어지게 된다. 세포질에서 아세틸-CoA는 카복실화 되어서, 지방산 생합성에 있어 중요한 중간체가 되는 말로닐-CoA(malonyl-CoA)를 생산한다. 이 반응은 아세틸-CoA 카복실라아제 복합체에 의해 촉매되는데, 이 복합체는 세 개의 효소로 구성되어 있고, 효소 활성을 위해 ATP 뿐만 아니라 Mn^{2+} 및 바이오틴을 요구한다. 말로닐-CoA의 말로닐 그룹에 있는 세 개의 탄소원자 중 두 개가 생합성 반응의 각 단계마다 지방산 사슬에 더해진다. 이 반응은 말로닐-CoA 형성과 마찬가지로 세포질에 있고 막과 결합되어 있지 않는 다효소 복합체가 필요하다. 개별적인 효소들로 구성되어 있는 이 복합체는 지방산 합성효소를 말한다. 이러한 지방산 합성 효소 복합체의 일부인 아실 운반 단백질(acyl carrier protein; ACP)은 지방산의 탄소 수를 증가시키기 위한 결합에 관여한다.

[0007] 미생물의 지방산 경로 대사흐름에서 지방산 생산의 과발현 목적에 해당하는 시도와 노력은 끊임없이 있어왔다. 특히, 대장균은 효소 생산 시스템은 타 생물체에 비해 많은 대사정보가 알려져 있고, 유전자에 대한 정보가 거의 다 밝혀져 재조합 단백질 생산에 널리 이용되고 있다. 그러나 *사카로미세스 세레비시아* (*Saccharomyces cerevisiae*)와 다른 종들의 유전자들이 함께 공동발현 되었을 때 미치는 영향에 대해서는 연구가 조금 미흡하다.

[0008] 식물의 유전자 도입으로 지방산을 증진시키는 연구는 많이 되어져 왔으나 본 발명에서처럼 다른 미생물의 유전자 도입으로 지방산을 생산을 개선시키는 연구가 미흡하다.

[0009] 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

[0010] 본 발명자들은 안정적이고 효과적으로 지방산 생산성을 증진시키기 위한 재조합 효모를 개발하고자 노력하였다. 그 결과, *사카로미세스 세레비시아*(*Saccharomyces cerevisiae*) 또는 *스트렙토코커스 피오제네스*(*Streptococcus pyogenes*)의 지방산 생합성 경로에 관여하는 옥소아실 운반 단백질 합성효소Ⅱ(*fabF*), 옥소아실 운반단백질 환원효소(*fabG*), 하이드록시미리스토일 운반단백질 탈수효소(*fabZ*), 이노일 운반단백질 환원효소 Ⅱ(*fabK*) 및 올레일 운반단백질 가수분해효소(EC 3.1.2.14)를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 형질전환시킨 형질전환 효모의 경우, 지방산 생산이 증가되고, 지방산 함량이 개선되는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

[0011] 따라서, 본 발명의 목적은 지방산 생산용 형질전환 효모를 제공하는 데 있다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 지방산 생산용 형질전환 효모의 제조방법을 제공하는 데 있다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 지방산의 제조방법을 제공하는 데 있다.

[0014] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0015] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은, ⅰ) 사카로미세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) 유래의 옥소아실 운반 단백질 합성효소Ⅱ(*fabF*)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열; (ⅱ) 스트렙토코커스 피오지네스(*Streptococcus pyogenes*) 유래의 옥소아실 운반단백질 환원효소(*fabG*)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열; (ⅲ) 스트렙토코커스 피오지네스 유래의 하이드록시미리스토일 운반단백질 탈수효소(*fabZ*)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열; (ⅳ)스트렙토코커스 피오지네스 유래의 이노일 운반단백질 환원효소 Ⅱ(*fabK*)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열; 또는 (ⅴ) 스트렙토코커스 피오지네스 유래의 올레일 운반단백질 가수분해효소(EC 3.1.2.14)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 지방산 생산용 형질전환 효모를 제공한다.

[0016] 본 발명자들은 안정적이고 효과적으로 지방산 생산성을 증진시키기 위한 재조합 미생물을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, *사카로미세스 세레비시아*(*Saccharomyces cerevisiae*) 및 *스트렙토코커스 피오제네스*(*Streptococcus pyogenes*)의 지방산 생합성 경로에 관여하는 옥소아실 운반 단백질 합성효소Ⅱ(*fabF*), 옥소아실 운반단백질 환원효소(*fabG*), 하이드록시미리스토일 운반단백질 탈수효소(*fabZ*), 이노일 운반단백질 환원효소 Ⅱ(*fabK*) 또는 올레일 운반단백질 가수분해효소(EC 3.1.2.14)를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 형질전환시킨 형질전환 효모의 경우, 지방산 생산이 증가되고, 지방산 함량이 개선되는 것을 확인하였다.

[0017] 상기 용어 "효모"는 *사카로마이세스*(*Saccharomyces*), *스키조사카로마이세스*(*Schizosaccharomyces*), *스포로보로마이세스*(*Sporobolomyces*), *토루로프시스*(*Torulopsis*), *트리코스포론*(*Trichosporon*), *윅커하미아*(*Wickerhamia*), *아쉬바이아*(*Ashbya*), *블라스토마이세스*(*Blastomyces*), *캔디다*(*Candida*), *사이테로마이세스*(*Citeromyces*), *크레브로테슘*(*Crebrothecium*), *크립토코커스*(*Cryptococcus*), *드바리오마이세스*(*Debaryomyces*), *에노마이코프시스*(*Endomycopsis*), *지오트리컴*(*Geotrichum*), *한세눌라*(*Hansenula*), *클로엑케라*(*Kloeckera*), *리포마이세스*(*Lipomyces*), *피키아*(*Pichia*), *로도스포리듐*(*Rhodosporidium*) 또는 *로도토룰라*(*Rhodotorula*) 속(genus)에 속하는 효모이고, 보다 바람직하게는 *사카로마이세스 및 스키조사카로마이세스*에 속하는 효모이고, 가장 바람직하게는 *사카로마이세스 세레비시애* 이다.

[0018] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 지방산 생산용 형질전환 효모의 제조방법을 제공한다.

[0019] 본 발명의 형질전환 효모의 제조방법을 단계별로 정리한다.

[0020] 단계 (a) : <u>재조합 벡터의 제조</u>

[0021] 본 발명의 지방산 생산용 형질전환 효모를 제조하기 위해, (ⅰ)사카로미세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) 유래의 옥소아실 운반 단백질 합성효소Ⅱ(*fabF*)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열; (ⅱ) 스트렙토코커스 피오지네스(*Streptococcus pyogenes*) 유래의 옥소아실 운반단백질 환원효소(*fabG*)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열; (ⅲ) 스트렙토코커스 피오지네스 유래의 하이드록시미리스토일 운반단백질 탈수효소(*fabZ*)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열; (ⅳ)스트렙토코커스 피오지네스 유래의 이노일 운반단백질 환원효소 Ⅱ(*fabK*)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열; 또는 (ⅴ) 스트렙토코커스 피오지네스 유래의 올레일 운반단백질 가수분해효소(EC 3.1.2.14)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 발현 벡터에 삽입하여 재조합 벡터를 제조한다.

[0022] 상기 벡터는 플라스미드, 파아지 또는 코스미드와 같은 레플리콘으로서, 이에 또 다른 DNA 절편이 부착되어 부

착된 절편의 복제를 초래한다. 용어 '레플리콘'은 생체 내에서 DNA 복제의 자가 단위로서 작용하는 모든 유전적 인자(예를 들면, 플라스미드, 염색체 및 바이러스 등)를 의미한다.

[0023] 본 발명에 사용되는 '발현 벡터'는 숙주 세포에서 발현되는 유전자를 포함하는 DNA 분자를 가리킨다. 전형적으로, 유전자의 발현은 프로모터 및/또는 인핸서를 포함한 특정 조절 요소의 조절 하에 위치하게 된다. 발현하고자 하는 유전자는 조절 요소에 작동적으로(operatively) 연결된다.

[0024] 본 발명에서 발현하고자 하는 유전자는 (ⅰ)*사카로미세스 세레비시아*(*Saccharomyces cerevisiae*) 유래의 옥소아실 운반 단백질 합성효소Ⅱ(*fabF*)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열; (ⅱ) *스트렙토코커스 피오지네스*(*Streptococcus pyogenes*) 유래의 옥소아실 운반단백질 환원효소(*fabG*)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열; (ⅲ) *스트렙토코커스 피오지네스* 유래의 하이드록시미리스토일 운반단백질 탈수효소(*fabZ*)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열; (ⅳ)*스트렙토코커스 피오지네스* 유래의 이노일 운반단백질 환원효소 Ⅱ(*fabK*)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열; 및 (ⅴ) *스트렙토코커스 피오지네스* 유래의 올레일 운반단백질 가수분해효소(EC 3.1.2.14)이다.

[0025] 바람직하게는, 상기 *사카로미세스 세레비시아*(*Saccharomyces cerevisiae*) 유래의 옥소아실 운반단백질 환원효소(*fabG*)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제1서열이다.

[0026] 바람직하게는, 상기 *스트렙토코커스 피오지네스*(*Streptococcus pyogenes*) 유래의 옥소아실 운반 단백질 합성효소Ⅱ(*fabF*)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제2서열이다.

[0027] 바람직하게는, 상기 *스트렙토코커스 피오지네스* 유래의 하이드록시미리스토일 운반단백질 탈수효소(*fabZ*)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제3서열이다.

[0028] 바람직하게는, 상기 *스트렙토코커스 피오지네스* 유래의 이노일 운반단백질 환원효소 Ⅱ(*fabK*)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제4서열이다.

[0029] 바람직하게는, 상기 *스트렙토코커스 피오지네스* 유래의 올레일 운반단백질 가수분해효소(EC 3.1.2.14)을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제5서열이다.

[0030] 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 NBCI (National Center for Biological Information) 등에서 접근 가능하며, 인터넷 상에서 blastp, blasm, blastx, tblastn and tblastx와 같은 서열 분석 프로그램과 연동되어 이용할 수 있다. BLSAT는 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/에서 접속 가능하다. 이 프로그램을 이용한 서열 상동성 비교 방법은 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_help.html에서 확인할 수 있다.

[0031] 본 발명에서 제작되는 발현 벡터는 숙주 세포에서 원하는 유전자를 발현할 수 있도록 구축된다. 일반적으로, 발현 벡터는 프로모터-유전자-전사 종결서열의 발현 컨스트럭트를 포함한다.

[0032] 본 발명의 발현벡터로 이용 가능한 벡터는 pESC-HIS, pESC-LEU, pESC-TRP, pESC-URA, Gateway pYES-DEST52, pAO815, pGAPZ A, pGAPZ B, pGAPZ C, pGAPα A, pGAPα B, pGAPα C, pPIC3.5K, pPIC6 A, pPIC6 B, pPIC6 C, pPIC6α A, pPIC6α B, pPIC6α C, pPIC9K, pYC2/CT, pYD1 Yeast Display Vector, pYES2, pYES2/CT, pYES2/NT A, pYES2/NT B, pYES2/NT C, pYES2/CT, pYES2.1, pYES-DEST52, pTEF1/Zeo, pFLD1, PichiaPink™, p427-TEF, p417-CYC, pGAL-MF, p427-TEF, p417-CYC, PTEF-MF, pBY011, pSGP47, pSGP46, pSGP36, pSGP40, ZM552, pAG303GAL-ccdB, pAG414GAL-ccdB, pAS404, pBridge, pGAD-GH, pGAD T7, pGBK T7, pHIS-2, pOBD2, pRS408, pRS410, pRS418, pRS420, pRS428, yeast micron A form, pRS403, pRS404, pRS405, pRS406, pYJ403, pYJ404,

pYJ405 및 pYJ406를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0033] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 발현벤터는 pESC-HIS, pESC-LEU 또는 pESC-TRP이다.

[0034] 예를 들어, 숙주 세포가 효모인 경우, 상기 발현 컨스트럭트에서 이용가능한 프로모터는 GAL10 프로모터, GAL1 프로모터, ADH1 프로모터, ADH2 프로모터, PHO5 프로모터, GAL1-10 프로모터, TDH3 프로모터, TDH2 프로모터, TDH1 프로모터, PGK 프로모터, PYK 프로모터, ENO 프로모터 및 TPI 프로모터를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0035] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 프로모터는 GAL10 프로모터 또는 GAL1 프로모터이다.

[0036] 상기 발현 컨스트럭트에서 이용가능한 전사 종결서열은 ADH1 터미네이터, CYC1 터미네이터, GAL10 터미네이터, PGK 터미네이터, PHO5 터미네이터, ENO 터미네이터 및 TPI 터미네이터를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0037] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 전사 터미네이터는 ADH1 터미네이터 또는 CYC1 터미네이터이다.

[0038] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 발현 컨스트럭트는 프로모터 서열, (ⅰ)사카로미세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) 유래의 옥소아실 운반 단백질 합성효소Ⅱ(*fabF*)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열; (ⅱ) 스트렙토코커스 피오지네스(*Streptococcus pyogenes*) 유래의 옥소아실 운반단백질 환원효소(*fabG*)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열; (ⅲ) 스트렙토코커스 피오지네스 유래의 하이드록시미리스토일 운반단백질 탈수효소(*fabZ*)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열; (ⅳ)스트렙토코커스 피오지네스 유래의 이노일 운반단백질 환원효소Ⅱ(*fabK*)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열; 또는 (ⅴ) 스트렙토코커스 피오지네스 유래의 올레일 운반단백질 가수분해효소(EC 3.1.2.14)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열, 및 전사 터미네이터 서열이 작동적으로(operatively) 결합된다. 상기에서 '작동적으로(operatively) 결합된다'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 리보좀 결합 부위를 코딩하는 서열 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다.

[0039] 본 발명에서 제작되는 발현 벡터는 선별 작업을 용이하게 하기 위하여, 선택마커를 포함할 수 있다. 예를 들어, 숙주 세포가 효모인 경우, 상기 선택 마커는 UAR3, LEU2, HIS3, TRP1, ADE2 및 LYS2 같은 영양요구성(auxotrophic) 선택마커 또는 CAN1 및 CYH2과 같은 약물 저항성 선택마커를 포함한다.

[0040] 단계 (b): <u>형질전환 효모의 제조</u>

[0041] 상기 재조합 벡터를 효모에 형질전환하여 형질전환 효모를 제조한다.

[0042] 상기 용어 "형질전환"은 상기 제작된 벡터를 미생물 내로 운반하는 방법을 의미하며, 형질전환 하고자 하는 세포가 원핵세포인 경우에는, $CaCl_2$ 방법(Cohen, S.N. et al., Proc. Natl. Acac. Sci. USA, 9:2110-2114(1973)), 하나한 방법(Cohen, S.N. et al., Proc. Natl. 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. 형질전환 하고자 하는 세포가 진핵세포인 경우에는, 미세 주입법(Capecchi, M.R., Cell, 22:479(1980)), 칼슘 포스페이트 침전법(Graham, F.L. et al., Virology, 52:456(1973)), 전기 천공법(Neumann, E. et al., EMBO J., 1:841(1982)), 리포좀-매개 형질감염법(Wong, T.K. et al., Gene, 10:87(1980)), DEAE-덱스트란 처리법(Gopal, Mol. Cell. Biol., 5:1188-1190(1985)), 및 유전자 밤바드먼트(Yang et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 87:9568-9572(1990))등을 이용하여 실시할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 효모와 같은 진균의 형질전환의 경우에는, 일반적으로 리튬 아세테이트(Lithium acetate, R.D. Gietz, Yeast 11, 355360(1995)) 및 열 충격(Keisuke Matsuura, Journal of Bioscience and Bioengineering, Vol. 100, 5;538-544(2005))을 이용한 형질전환법과 전기천공법(Nina SkoluckaAsian, Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 94-98(2011))에 의해 실시될 수 있다.

[0043] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 형질전환 효모는 리튬 아세테이트 방법으로 실시한다.

[0044] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 지방산의 제조방법을 제공한다.

[0045] 본 발명의 지방산 생산용 효모 및 지방산의 제조방법은 상기 제조방법에 의해 제조된 지방산 생산용 효모 및 이를 이용한 지방산의 제조방법이므로, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.

[0046] 바람직하게는, 상기 지방산은 헥사데카노익산(hexadecanoic acid) 또는 옥타데카노익산(octadecanoic acid)이다.

[0047] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, *사카로미세스 세레비시아*의 지방산 생합성 경로에서 신장단계에 관여하는 필수적 효소들을 암호화하는 유전자가 삽입되어진 *사카로미세스 세레비시아* SGJY01, *사카로미세스 세레비시아* SGJY02 및 *사카로미세스 세레비시아* SGJY03은 헥사데카노익산의 생산된 양은 야생종과 비교하여 1.57-1.7배 증가하였고, 옥타데카노익산의 경우에는 1.16-1.50배 더 증가하였다. 나머지 *사카로미세스 세레비시아* SGJY04 및 *사카로미세스 세레비시아* SGJY05도 야생종 *사카로미세스 세레비시아*보다 헥사데카노익산은 1.3-1.5배, 옥타데카노익산은 1.05-1.2배 생산량이 증가하였고, 총 지방산의 양을 비교해 보았을 때 야생종에 비해 최대 1.64배 및 최소 1.36배 생산량의 증가를 나타내었다.

발명의 효과

[0048] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0049] (a) 본 발명은 지방산 생산용 형질전환 효모를 제공한다.

[0050] (b) 본 발명은 *사카로미세스 세레비시아*에 의하여 지방산 생합성 경로의 신장단계를 과발현하여 지방산 자체의 함량을 증진할 수 있어, 글루코스로부터 지방산 생합성 경로에의 과발현과 다른 종의 유전자 삽입에 의한 대사흐름 변경을 통해 지방산 생합성을 대량 생산 해 내는데 효과적이다.

[0051] (c) 본 발명은 바이오에너지 생산의 기초가 될 지방산 생산을 대량 생산하고 친환경적임을 물론이고 경제적으로도 큰 경제력을 갖출 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0052] 도 1은 *사카로미세스 세레비시아*(*Saccharomyces cerevisiae*) 생체 내에서 글루코스로부터 지방산 생합성경로(fatty acid biosynthesis pathway)의 도식을 나타낸다.

도 2는 *사카로미세스 세레비시아*와 같은 박테리아용 발현벡터, *이스케리치아 콜라이-사카로미세스 세레비시아* 셔틀 벡터인 pESC-HIS에 *fabK* 유전자가 삽입된 벡터지도를 나타낸다.

도 3은 *사카로미세스 세레비시아*와 같은 박테리아용 발현벡터, *이스케리치아 콜라이-사카로미세스 세레비시아* 셔틀 벡터인 pESC-HIS에 *fabZ* 유전자가 삽입된 벡터지도를 나타낸다.

도 4는 *사카로미세스 세레비시아*와 같은 박테리아용 발현벡터, *이스케리치아 콜라이-사카로미세스 세레비시아* 셔틀 벡터인 pESC-LEU에 *fabG* 유전자가 삽입된 벡터지도를 나타낸다.

도 5는 *사카로미세스 세레비시아*와 같은 박테리아용 발현벡터, *이스케리치아 콜라이-사카로미세스 세레비시아* 셔틀 벡터인 pESC-LEU에 E.C.3.1.2.14 유전자가 삽입된 벡터지도를 나타낸다.

도 6은 *사카로미세스 세레비시아*와 같은 박테리아용 발현벡터, *이스케리치아 콜라이-사카로미세스 세레비시아* 셔틀 벡터인 pESC-TRP에 *fabF* 유전자가 삽입된 벡터지도를 나타낸다.

도 7은 pJY01, pJY02, pJY03, pJY04 및 pJY05가 *사카로미세스 세레비시아*에서 안정적으로 형질전환 되었는지 PCR로 확인한 것이다. 1열은 사이즈마커, 2열은 *fabF*, 3열은 *fabK*, 4열은 *fabZ*, 5열은 *fabG*, 6열은 3.1.2.14을 나타낸다.

도 8는 본 발명의 재조합 *사카로미세스 세레비시아*의 생장곡선을 야생종(wild type) *사카로미세스 세레비시아*와 비교한 결과를 나타낸다.

도 9은 재조합 사카로미세스 세레비시아 (*Saccharomyces cerevisiae*)의 intracellular에서 추출된 지방산(fatty acid)의 GC 그래프이다.

도 10는 재조합 사카로미세스 세레비시아 (*Saccharomyces cerevisiae*)의 성분분석 결과를 나타낸다. 도 10a는 탄소수 12개를 가진 도데카노익산(Dodecanoic acid)을 GC/MS 분석한 결과이고, 도 10b는 탄소수 14개를 가진 테트라데카노익산(Tetradecanoic acid)을 GC/MS 분석한 결과이며, 도 10c는 탄소수 16개를 가진 헥사데카노익산(Hexadecanoic acid)의 GC/MS 분석한 결과이고, 도 10d는 탄소수 16개를 가진 9-헥사데카노익산(9-Hexadecanoic acid)의 GC/MS 분석한 결과이며, 도 10e는 탄소수 18개를 가진 옥타데카노익산(Octadecanoic acid)의 GC/MS 분석한 결과이고, 도 10f는 탄소수 18개를 가진 9-옥타데세노익산(9-Octadecenoic acid)의 GC/MS 분석한 결과이다 .

도 11은 본 발명의 재조합 *사카로미세스 세레비시아*들과 야생종 *사카로미세스 세레비시아*에서 헥사데카노익산, 옥타데카노익산 및 총 지방산을 갈락토스 첨가 후 36시간(도 11a), 48시간(도 11b) 및 60시간(도 11c)에서 추출하여 정량한 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0053] 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.

[0054] **실시예 1: 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction; PCR)을 이용한 *fabF, fabG, fabZ, fabK* 및 3.1.2.14 유전자를 발현하는 재조합 플라스미드의 제조**

[0055] *사카로미세스 세레비시아*(*Saccharomyces cerevisiae*) YPH500의 염색체를 주형으로 하여 옥소아실 운반단백질 합성효소 II(*fabF*)의 뉴클레오타이드 서열(Genbank, NCBI)을 프라이머를 이용하여 중합효소연쇄반응(PCR, DaKaRa Korea) 방법을 통해 클로닝 하였다.

[0056] *스트렙토코커스 피오지네스*(*Streptococcus pyogenes*) MGAS10270의 염색체를 주형으로 하여 옥소아실 운반단백질 환원효소(*fabG*), 하이드록시미리스토일 운반단백질 탈수소효소(*fabZ*), 이노일 운반단백질 환원효소 II(*fabK*) 및 올레일 운반단백질 탈수소효소(3.1.2.14)의 뉴클레오타이드 서열(Genbank, NCBI)을 프라이머를 이용하여 중합효소연쇄반응(PCR, DaKaRa Korea) 방법을 통해 클로닝 하였다(표 1 및 표 2).

표 1

[0057]

유전자	생산 효소
fabF	3-oxoacyl-acyl carrier protein synthase II beta-ketoacyl-ACP synthase II
fabG	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase beta-ketoacyl-[acyl-carrier protein](ACP) reductase
fabZ	(3R)-hydroxyacyl-dehydratase
fabK	Enoyl-reductase
3.1.2.14	oleoyl-[acyl-carrier-protein] hydrolase acyl-[acyl-carrier-protein] hydrolase

표 2

[0058]

유전자		프라이머 서열	제한 효소
fabF	F	5'-GTC GAC ACG TAG TGA AAT GAC ATT TAA AAG A-3'	*Sal*I
	R	5'-CTC GAG AAT ATT CAA CCT ACT CCT CCC AAC A-3'	*Xho*I
fabG	F	5'-GCG GCC GCG AGG ACA TTC ATG GAA AT-3''	*Not*I
	R	5'-GAA TTC CTA CGT CTC CTT ATT GCA-3'	*EcoR*I
fabZ	F	5'-GGG CCC TGC GGA TCA AAT GAT GGA TAT TAG-3'	*Sal*I
	R	5'-GTC GAC CCA CTT GCT GCT AGC TTG CCA T-3'	*Xho*I
fabK	F	5'-GCG GCC GCG AAA GTT ATT ATG AAA ACA CGT ATT-3'	*Not*I

	R	5'-GAA TTC ATG TGT TTA TCT ACT TTT CTA TTG A-3'	*Eco*RI
3.1.2.14	F	5'-GTC GAC GGA GAG TAT TAT GGG ATT AAG TTA-3'	*Sal*I
	R	5'-CTC GAG TTA TAA GGC ACT AGT CTA TCT CG-3'	*Xho*I

[0059] 표 1의 유전자를 표적 유전자들만 특이적으로 증폭하도록 제작된 표 2의 프라이머를 사용하여 증폭하였다. 이 유전자들은 RBS(Ribosome Binding Site)를 포함하여 *fabF*는 1253 bp, *fabG*는 755 bp, *fabZ*는 383 bp, *fabK*는 992 bp 및 3.1.2.14는 773 bp에서 증폭되었다.

[0060] 각각의 중합효소연쇄반응은 통상적인 반응조건[10 mM Tris-HCl(pH 9.0), 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100, 2 mM $MgSO_4$ 및 Taq DNA 중합효소(DaKaRa)] 하에서 95℃/5분(변성), 60℃/1분(어닐링) 및 72℃/1분(신장)의 조건으로 1회 수행한 후, 95℃/1분(변성), 60℃/30초(어닐링) 및 72℃/1분(신장)의 조건으로 30회 반복 수행하였다. 마지막 단계로 안정적인 신장을 위해 95℃/1분(변성), 60℃/1분(어닐링) 및 72℃/5분(신장) 반응하였다. 중합효소연쇄반응 후 증폭된 DNA는 0.8% 아가로즈 젤 상에서 확인 후 정제하여 T-벡터 클로닝에 이용하였다. pGEM-T 이지 벡터 (DaKaRa)에 라이게이션을 수행하여 재조합 플라스미드인 pGEM::*fabF*, pGEM::*fabG*, pGEM::*fabZ*, pGEM::*fabK* 및 pGEM::3.1.2.14를 제작하였다. 상기 재조합 플라스미드들은 대장균(*E. coli* AG1 컴피턴트 세포, Stratagene)에 형질전환하여 형질전환 균주를 제조하였다.

[0061] **실시예 2: 재조합 플라스미드 pJY01, pJY02, pJY03, pJY04와 pJY05 제조**

[0062] 상기 실시예 1의 재조합 플라스미드인 pGEM::*fabF*, pGEM::*fabG*, pGEM::*fabZ*, pGEM::*fabK* 및 pGEM::3.1.2.14와 효모의 셔틀 벡터인 pESC-TRP, pESC-LEU 및 pESC-HIS를 표 2에 열거된 제한효소로 37℃ 항온수조(water bath)에서 약 2시간 반응하였다. 각각의 DNA 절편들을 절단한 뒤 pESC-TRP, pESC-LEU, pESC-HIS 벡터의 다중삽입부위(multicloning site)에 도 2, 도 3 및 도 4에 개시된 것과 같이 T4 라이게이즈(Dakara)를 이용하여, 16℃에서 반응시켜 라이게이션을 하여 재조합 플라스미드를 완성하였다. 각 단계마다 삽입된 유전자의 삽입여부를 확인하기 위해 대장균(*E. coli* AG1 컴피턴트 세포, stratagene)에 형질 전환 시킨 후 재조합 플라스미드를 추출하여 이를 다시 원래 삽입부위의 제한효소로 처리하여 잘린 DNA 조작의 크기를 0.8% 아가로즈 젤 상에서 전기영동하여 비교하는 방법을 사용하였다.

[0063] 도 2, 도 3 및 도 4는 상기 pJY01(*fabF*를 암호화하는 유전자 포함), pJY02(*fabG*를 암호화하는 유전자 포함), pJY03(*fabZ*를 암호화하는 유전자 포함), pJY04(*fabK*를 암호화하는 유전자 포함) 및 pJY05(3.1.2.14를 암호화하는 유전자 포함)의 지도(map)를 나타낸다.

[0064] **실시예 3: *사카로미세스 세레비시아*(*Saccharomyces cerevisiae*) 형질전환체의 제조**

[0065] 본 발명에서는 *사카로미세스 세레비시아* 형질전환체의 안정적 제조와 효율을 높이기 위해 리튬 아세테이트 방법(lithium acetate method)에 의한 형질전환방법을 사용하였다.

[0066] 상기 리튬 아세테이트에 의한 형질전환방법을 위해 3 ㎖의 YPD(0.0075% l-아데닌 헤미설페이트 염, 1% 효모 추출물, 2% 펩톤 및 2% 덱스트로스) 배지에서 16시간동안 전배양된 30 ㎕(0.1%)의 야생종 *사카로미세스 세레비시아*(*Saccharomyces cerevisiae*)를 100 ㎖의 YPD 배지에 접종하여 배양액의 흡광도(absorbance)가 600 nm 파장에서 1.0에 이르렀을 때, 배양액 전체에 해당하는 100 ㎖ 배양액을 원심분리(12000 rpm, 1분)하여 상등액과 세포를 분리하였다. 수득한 세포를 9 ㎖ TE Buffer(10mM Tris-HCl pH7.5, 1mM EDTA)로 1회 현탁하였다. 다시 원심분리(12000 rpm, 1분)를 실시하여 상등액과 세포로 분리하였다. 5 ㎖ LTE Buffer(0.1M LiOAc, 10mM Tris-HCl pH7.5, 1mM EDTA)으로 현탁한 후 30분 동안 200 rpm, 30℃에서 배양하였다. 다시 원심분리(12000 rpm, 1분)를 실시하여 상등액과 세포로 분리하였다. 1 ㎖ TE Buffer(10mM Tris-HCl pH7.5, 1mM EDTA)로 현탁한 후 100 ㎕ 현탁된 세포에 10 ㎕의 재조합 플라스미드(pJY01, pJY02, pJY03, pJY04 또는 pJY05)와 5 ㎕ 캐리어 DNA(MP Biomedicals, United States) 및 5 ㎕ 히스타민 용액(MP Biomedicals, United States)을 첨가하였다. 상온에서 30분 동안 반응시킨 후 0.8 ㎖ PEG와 0.2 ㎖ TE/양이온 혼합물(40% polyethylene glycol 3350, 0.1M LiOAc, 10mM Tris-HCl pH7.5, 1mM EDTA)을 각각의 튜브에 첨가한 후 30℃ 항온기에서 1시간 동안 반응하였다. 그 후 42℃ 항온기에서 20분 동안 열 충격을 준 후 30℃에서 감열하였다. 형질전환된 *사카로미세스 세레비시아*는 *사카로미세스 세레비시아* 선택배지인 필수아미노산인 히스타민, 류신 또는 트립토판이

각각 결핍된 아가 평판배지에서 단일 균제가 생성될 때가지 24-48시간까지 배양하였다. 이를 통해 재조합 플라스미드인 pJY01, pJY02, pJY03, pJY04 또는 pJY05를 포함하는 재조합 균주 *S. cerevisiae* SGJY01, *S. cerevisiae* SGJY02, *S. cerevisiae* SGJY03, *S. cerevisiae* SGJY04 및 *S. cerevisiae* SGJY05를 개발하였다(표 3).

표 3

[0067]

개발균주	특징
S. cerevisiae SGJY01	*Saccharomyces cerevisiae* YPH500::pESC-TRP::*fabF*
S. cerevisiae SGJY02	*Saccharomyces cerevisiae* YPH500::pESC-LEU::*fabG*
S. cerevisiae SGJY03	*Saccharomyces cerevisiae* YPH500::pESC-HIS::*fabZ*
S. cerevisiae SGJY04	*Saccharomyces cerevisiae* YPH500::pESC-HIS::*fabK*
S. cerevisiae SGJY05	*Saccharomyces cerevisiae* YPH500::pESC-LEU::3.1.2.14

[0068] **실시예 4: 개발된 *사카로미세스 세레비시아*의 배양 및 재조합 균주로부터 단백질의 생산**

[0069] *사카로미세스 세레비시아* YPH500에 형질전환한 재조합 균주들을 SD-HIS(히스타민 결핍 배지), SD-LEU(류신 결핍 배지) 및 SD-TRP(트립토판 결핍 배지) 배지에 16시간정도 전배양시키고 그 배양액을 다시 SD-HIS, SD-LEU 및 SD-TRP배지에 접종하여 흡광도가 600 nm에서 0.8-1.0 되었을 때 글리세롤 농도가 25%가 되게 보관용 균액으로 만든 다음 -80℃에서 배양실험 시까지 저장하였다.

[0070] 상기에서 개발된 재조합 균주의 배양은 보관용 균액 30 ㎕을 10 ㎖ 튜브에 들어있는 3 ㎖의 SD-HIS(히스타민 결핍 배지), SD-LEU (류신 결핍 배지) 및 SD-TRP (트립토판 결핍 배지)배지에 16시간동안 전배양한 후, 이를 다시 500 ㎖ 플라스크에 들어있는 SD-HIS, SD-LEU 및 SD-TRP 배지에 200 ㎖의 SD-HIS, SD-LEU 및 SD-TRP배지에 1%의 전 배양액을 접종하여 30℃, 200 rpm 상태에서 72시간동안 배양하였다. 재조합 균주와 비교하기 위한 야생종 *사카로미세스 세레비시아* YPH500는 YPD 배지에서 재조합 균주와 동일한 조건으로 실험을 실시하였다. 단백질 발현을 위해 배양액의 흡광도(absorbance)가 600 nm파장에서 1.0에 이르렀을 때 유도물질인 갈락토스를 15 g/L 첨가하여 재조합 단백질의 발현을 유도하였다. 상기 예를 따라 초기 유도체의 발현으로 지방산 함량의 생산증대를 비교하기 위한 종과 본 발명의 목적으로 개발된 *사카로미세스 세레비시아*와 야생종의 생장곡선을 도 5에 나타내었다.

[0071] 본 발명에서 재조합 균주, *사카로미세스 세레비시아* SGJY01, *사카로미세스 세레비시아* SGJY02, *사카로미세스 세레비시아* SGJY03, *사카로미세스 세레비시아* SGJY04 및 *사카로미세스 세레비시아* SGJY05는 야생종과 비교하여 생장이 거의 차이가 나지 않는 것을 도 5에서 볼 수 있다. 차이가 많이 나지 않는 이유는 유전자의 삽입이나 과발현에 의한 독성이나 저해가 크지 않았던 것으로 사료된다. 이는 유전자의 암호화부분은 효소의 과발현 기능을 포함하여 최소한의 길이를 가지도록 RBS(ribosomal binding site) 및 효소발현에 꼭 필요한 부분을 포함하는 염기서열만을 서열로 정하여 유전자의 발현에 의한 숙주세포의 대사부담(metabolic burden)을 줄이고자 하였고 생산 경로에 맞춰 두 유전자의 순서가 순서대로 연결된 되게 개발하였기 때문이라고 예상된다.

[0072] **실시예 5: 재조합 *사카로미세스 세레비시아* 내 지방산 측정**

[0073] 실시예 4의 조건으로 배양한 배양액 중 갈락토스를 첨가한 후 36시간, 48시간 및 60시간 동안 세포 양이 충분해졌을 때 세포 내에 있는 지방산을 측정하기 위해서 지방산 추출을 다음과 같은 방법으로 진행하였다:

[0074] 추출과정은 5 단계로 나누어지며 첫 번째 과정 배양단계로 배양액 5 ㎖를 원심분리(4500 rpm, 10분)한 후 세포는 -80℃에 저장하였다. 두 번째 과정은 비누화(saponification) 단계로 저장된 재조합 균주들을 용액 1(NaOH 45 g, MeOH 150 ㎖ 및 증류수 150 ㎖) 1 ㎖ 첨가하고 5-10초동안 볼텍스 해주었다. 100℃에서 5분 동안 반응해준 뒤 다시 5-10초 동안 볼텍스 해준 후 다시 100℃, 25분 반응시켜 준 뒤 열을 식혀주었다. 세 번째 과정은 메틸화(methylation) 단계로, 용액 2 (6N HCl 325 ㎖ 및 MeOH 275 ㎖) 2 ㎖을 첨가하고 5-10초 동안 볼텍스 해준 뒤 80℃에서 10분 동안 반응시켜주었다. 반응이 끝난 후에는 빨리 열을 식혀주도록 해야한다. 네 번째 단계는 추출(extraction) 단계로, 용액 3(헥산:메틸 테르트-부틸 에스터=1:1) 1.25 ㎖을 첨가하고 10분 동안 위아래로 흔들어 준 뒤 층이 분리 되면 아래층은 추출해서 제거하였다. 다섯 번째 단계는 GC(Gas Chromatography)로 분석을 용이하게 하기위해 세척단계로 앞 단계의 남은 상층액에 용액 4(NaOH 10.8 g 및 증류

수 900 ㎖) 3 ㎖을 첨가해서 5분 동안 위아래로 흔들어 준 뒤 상층액을 추출하여 GC/MS로 분석하였다.

[0075] 본 발명에서 사용한 CG/MS는 5975 series MSD 및 Agilent 7890A이며 HP-5 컬럼(30 m × 0.32 ㎜, 필름두께 0.25 ㎛)을 사용하였다. 분석하기 위한 GC조건은 125℃에서 3분, 245℃까지 분당 5℃ 가열하고 32분 유지하였다.

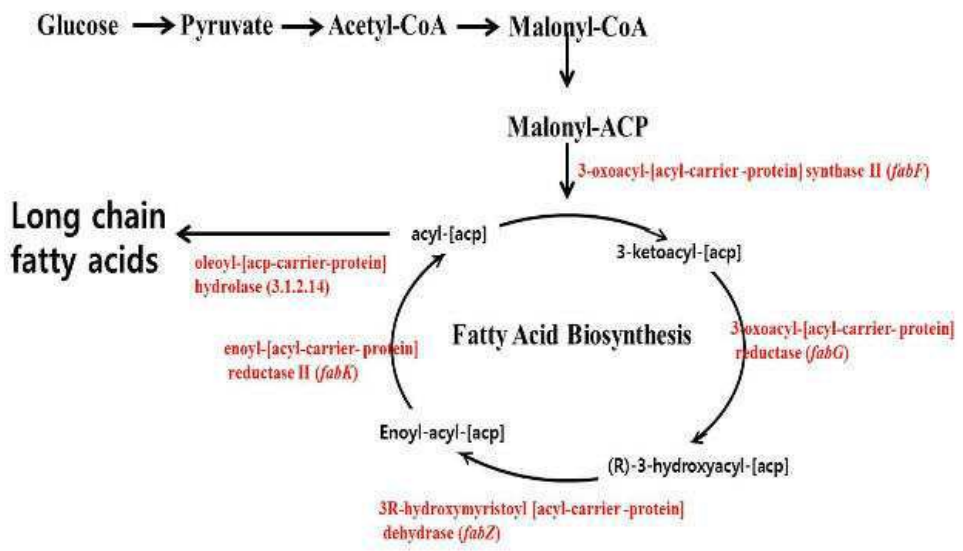
[0076] 상기 예를 따라 지방산 함량 증진을 위해 형질전환된 재조합 *사카로미세스 세레비시아*와 야생종 *사카로미세스 세레비시아*의 지방산 추출 분석결과를 도 7, 도 8 및 도 9에서 보여주고 있다. 도 7 은 효모의 지방산 추출 방법으로 추출된 것으로 6-20분 사이에서 여러 지방산 종류를 확인할 수 있었다. 헥사노데카노익산(Hexadecanoic acid) 및 옥타데카노익산(Octadecanoic acid) 뿐만 아니라 그 사이에 도데카노익산(dodecanoic acid), 테트라데카노익산(tetradecanoic acid), 9-헥사데세노익산(9-hexadecenoic acid) 및 9-옥타데세노익산(9-Octadecenoic acid)이 확인되었다.

[0077] 이 들 중 가장 많이 생산 되어진 헥사데카노익산(C16) 및 옥타데카노익산는 표준 물질을 이용하여 정량되어 도 8에 나타내었다. 헥사데카노익산는 탄소수 16개를 가졌고, 옥타데카노익산은 18개의 탄소수를 가진 지방산이다. 도 9은 실시예 4의 조건으로 배양되어지고 갈락토스 유도 36시간, 48시간 그리고 60시간 후의 지방산 추출 결과이다. 추출결과, 헥사데카노익산 및 옥타데카노익산은 야생종 *사카로미세스 세레비시아*보다 개발된 재조합 *사카로미세스 세레비시아*에서 더 많이 생산되어진 것이 확인 되었다. *사카로미세스 세레비시아*의 지방산 생합성 경로에서 신장단계에 관여하는 필수적 효소들을 암호화하는 유전자가 삽입되어진 *사카로미세스 세레비시아* SGJY01, *사카로미세스 세레비시아* SGJY02 및 *사카로미세스 세레비시아* SGJY03은 헥사데카노익산의 생산된 양은 야생종과 비교하여 1.57배-1.7배 더 많이 생산하는 것을 확인할 수 있었으며 옥타데카노익산의 경우에는 1.16배-1.5배 더 증가하는 것을 보여준다. 나머지 *사카로미세스 세레비시아* SGJY04, *사카로미세스 세레비시아* SGJY05도 야생종 *사카로미세스 세레비시아*보다 헥사데카노익산은 1.3배-1.5배, 옥타데카노익산은 1.05-1.2배 더 많이 생산하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 총 지방산의 양을 비교해 보았을 때 야생종에 비해 최대 1.64배 및 최소 1.36배 생산량이 증가된 것을 확인할 수 있었다.

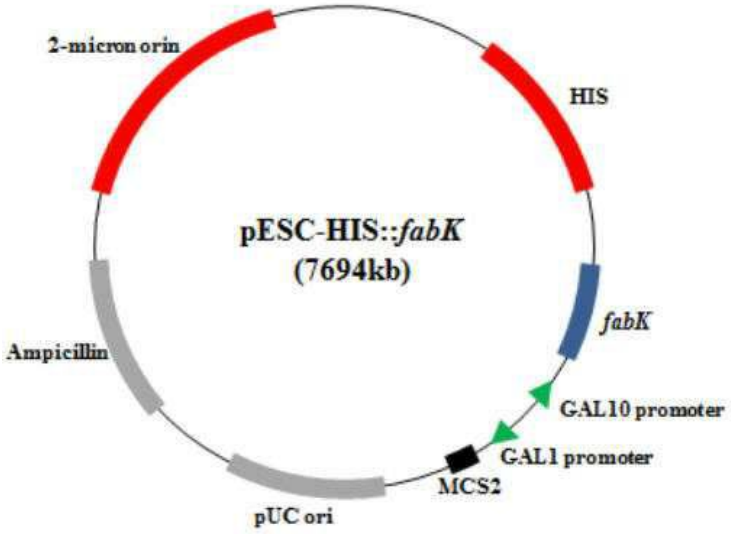
[0078] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

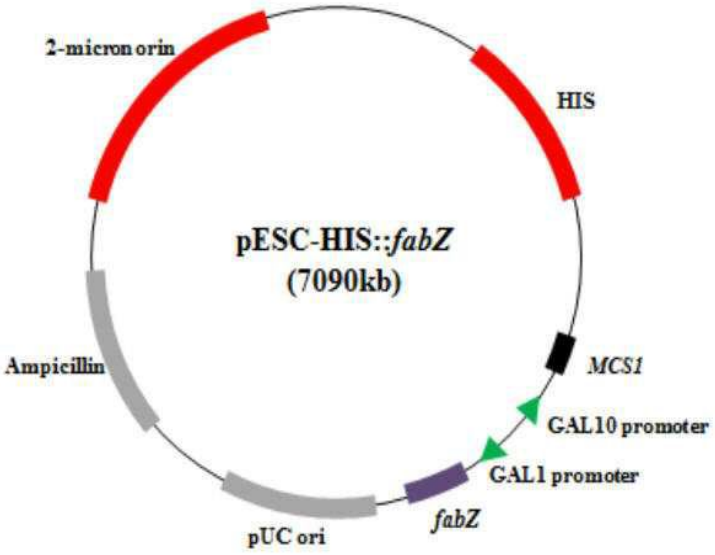
도면1



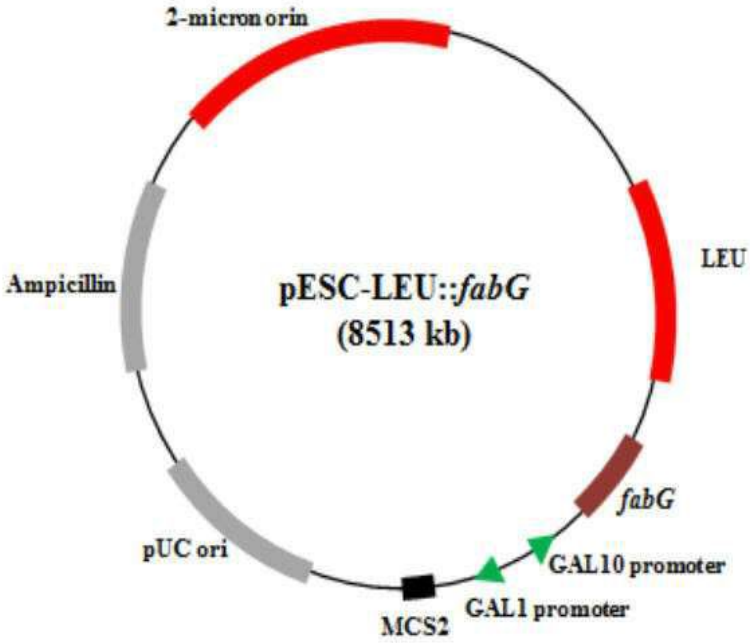
도면2


2-micron orin
HIS
pESC-HIS::fabK
(7694kb)
fabK
Ampicillin
GAL10 promoter
GAL1 promoter
MCS2
pUC ori

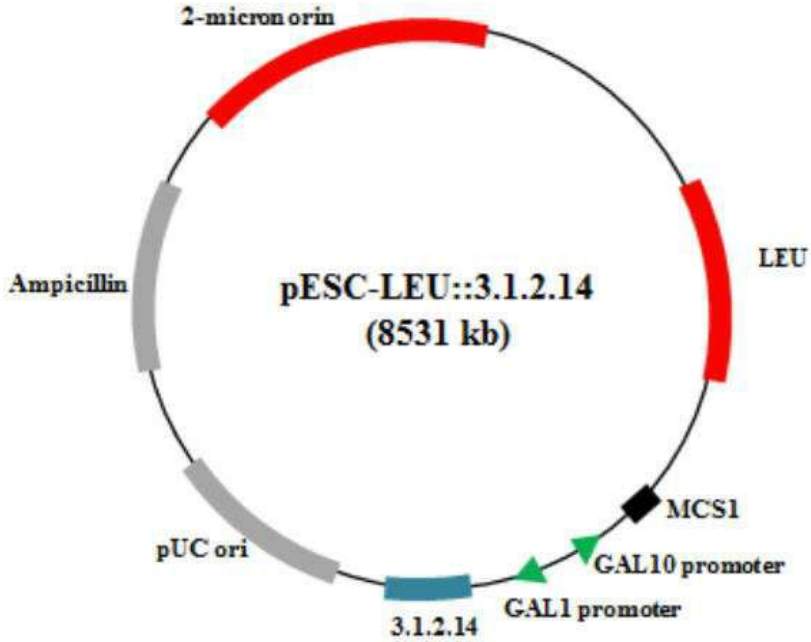
도면3


2-micron orin
HIS
pESC-HIS::fabZ
(7090kb)
MCS1
Ampicillin
GAL10 promoter
GAL1 promoter
fabZ
pUC ori

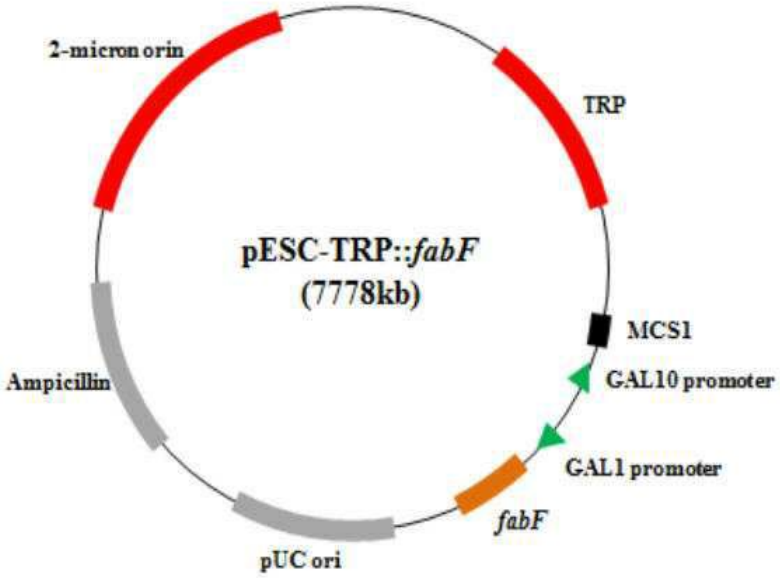
도면4


2-micron orin
LEU
Ampicillin
pESC-LEU::fabG
(8513 kb)
fabG
pUC ori
GAL10 promoter
MCS2
GAL1 promoter

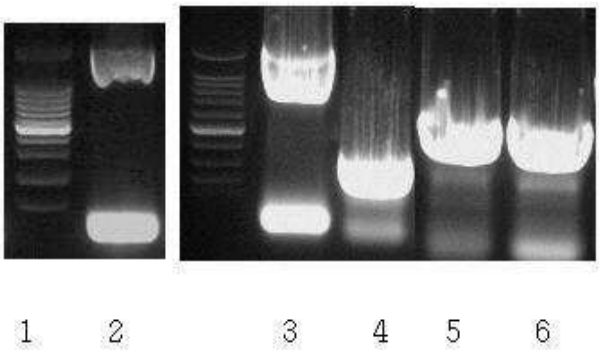
도면5


2-micron orin
LEU
Ampicillin
pESC-LEU::3.1.2.14
(8531 kb)
MCS1
pUC ori
GAL10 promoter
3.1.2.14
GAL1 promoter

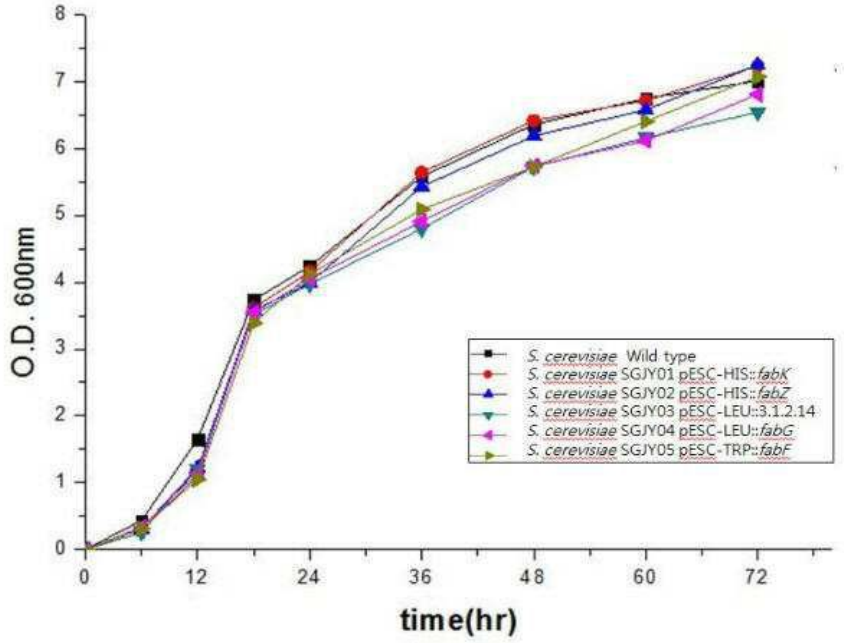
도면6


2-micron orin
TRP
pESC-TRP::fabF
(7778kb)
MCS1
GAL10 promoter
Ampicillin
GAL1 promoter
fabF
pUC ori

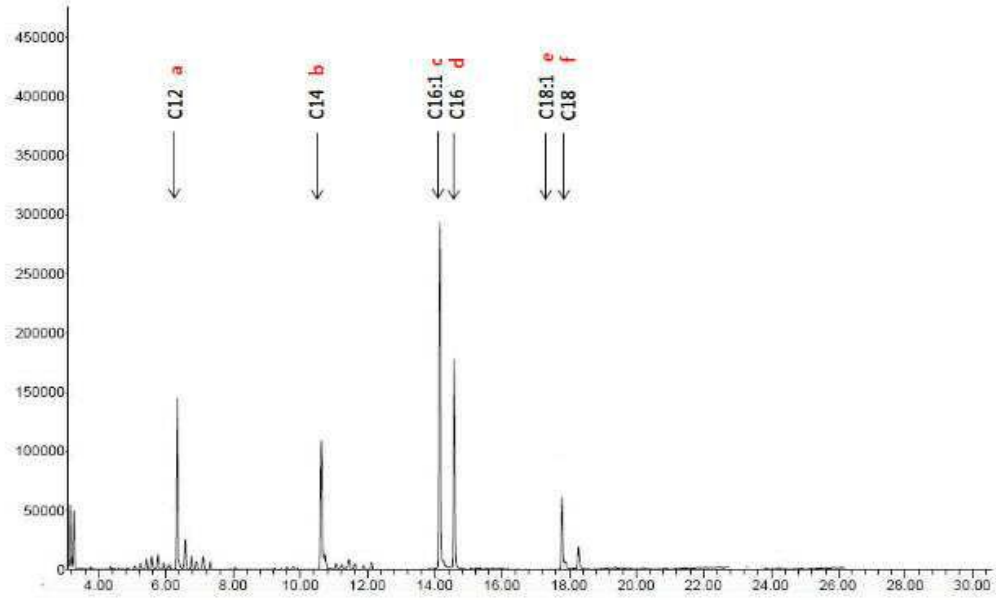
도면7


1
2
3
4
5
6

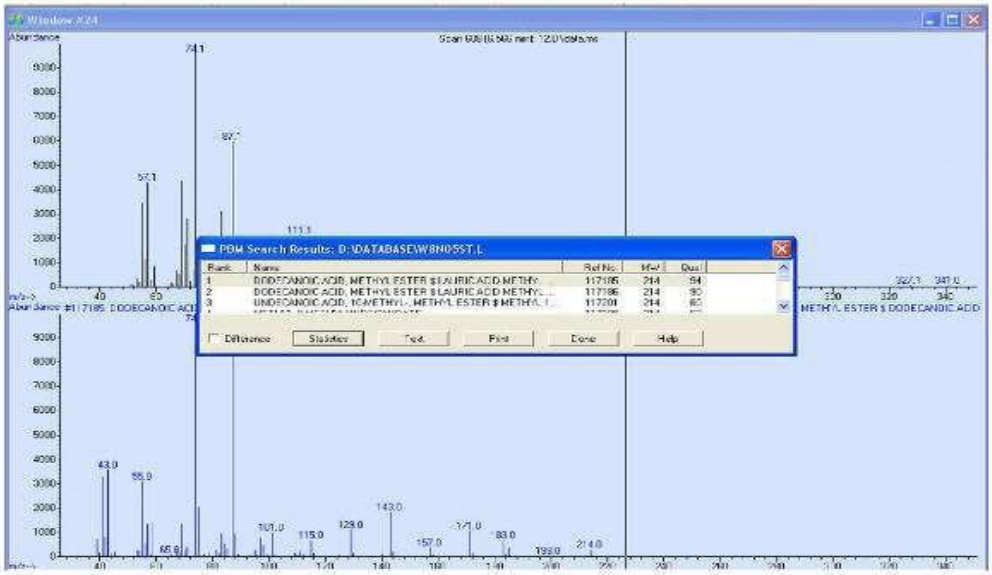
도면8


O.D. 600nm
time(hr)
S. cerevisiae Wild type
S. cerevisiae SGJY01 pESC-HIS::fabK
S. cerevisiae SGJY02 pESC-HIS::fabZ
S. cerevisiae SGJY03 pESC-LEU::3.1.2.14
S. cerevisiae SGJY04 pESC-LEU::fabG
S. cerevisiae SGJY05 pESC-TRP::fabF

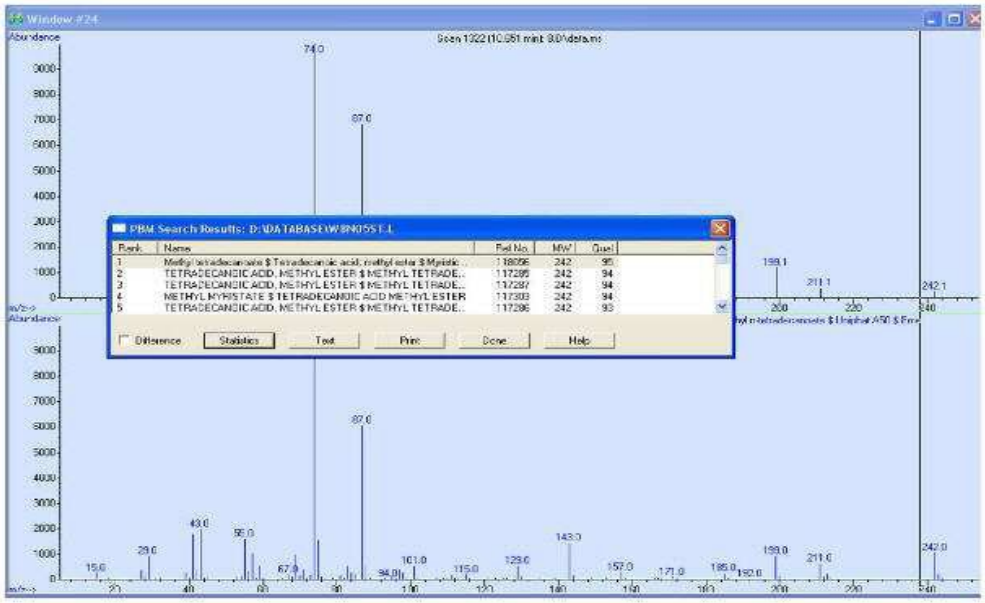
도면9


C12 a
C14 b
C16:1 c
C16 d
C18:1 e
C18 f

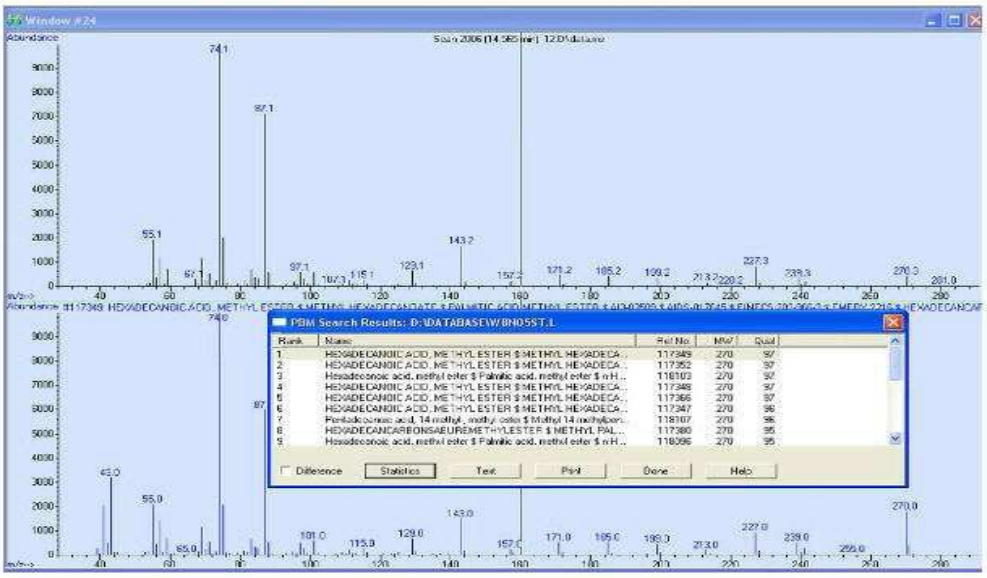
도면10a


Window #24
Abundance
74.1
87.1
57.1
111.1
PBM Search Results: D:\DATABASE\W8N05ST.L
Rank
Name
Ref No.
MW
Qual
1
DODECANOIC ACID, METHYL ESTER $LAURIC ACID METHY...
117185
214
94
2
DODECANOIC ACID, METHYL ESTER $LAURIC ACID METHYL...
117186
214
90
3
UNDECANOIC ACID, 10-METHYL-, METHYL ESTER $METHYL 1...
117201
214
60
Difference
Statistics
Text
Print
Done
Help
METHYL ESTER $ DODECANOIC ACID
43.0
55.0
101.0
115.0
129.0
143.0
157.0
171.0
183.0
199.0
214.0

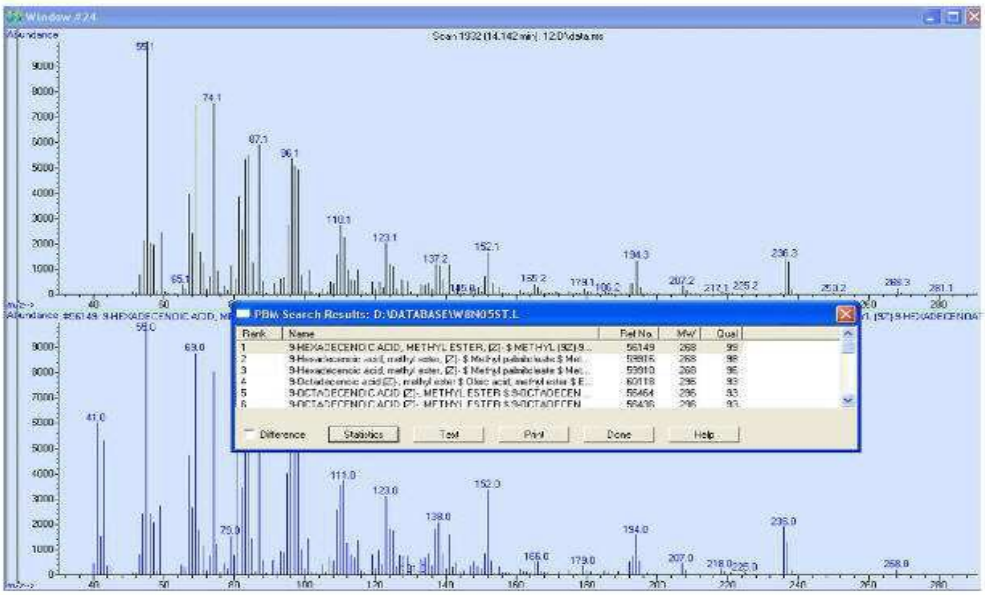
도면10b


Window #24
Abundance
74.0
87.0
PBM Search Results: D:\DATABASE\W8N05ST.L
Rank
Name
Ref No.
MW
Qual
1
Methyl tetradecanoate $ Tetradecanoic acid, methyl ester $ Myristic...
118056
242
95
2
TETRADECANOIC ACID, METHYL ESTER $ METHYL TETRADE...
117289
242
94
3
TETRADECANOIC ACID, METHYL ESTER $ METHYL TETRADE...
117287
242
94
4
METHYL MYRISTATE $ TETRADECANOIC ACID METHYL ESTER
117303
242
94
5
TETRADECANOIC ACID, METHYL ESTER $ METHYL TETRADE...
117286
242
93
Difference
Statistics
Text
Print
Done
Help
199.1
211.1
242.1
43.0
55.0
101.0
115.0
129.0
143.0
157.0
171.0
185.0
199.0
211.0
242.0

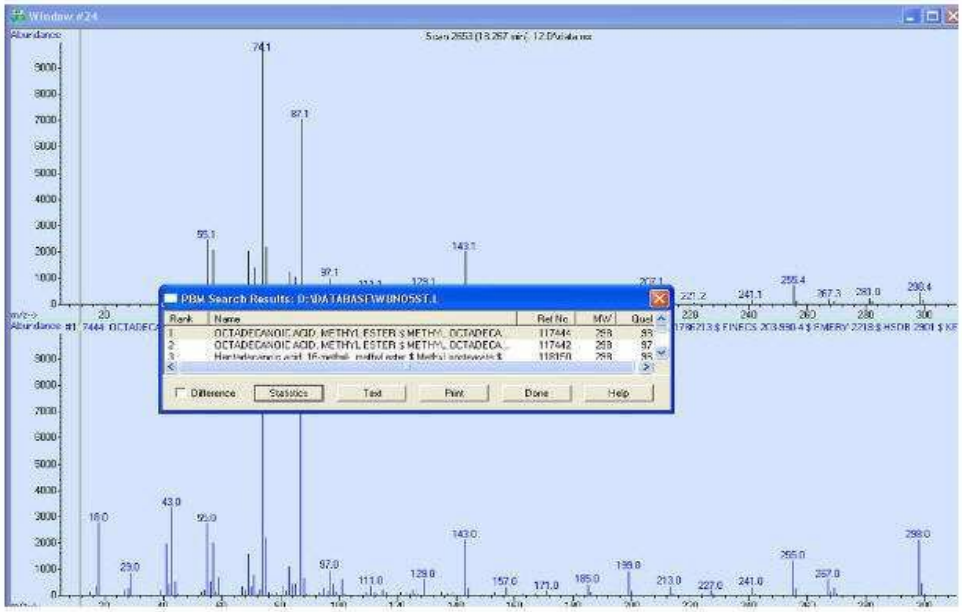
도면10c


Window #24
Abundance
Scan 2006 (14.565 min): 12.D\data.ms
74.1
87.1
55.1
143.2
227.3
270.3
PBM Search Results: D:\DATABASE\WBN05ST.L
Rank
Name
Ref No.
MW
Qual
HEXADECANOIC ACID, METHYL ESTER $ METHYL HEXADECA...
Hexadecenoic acid, methyl ester $ Palmitic acid, methyl ester $ n-H...
Difference
Statistics
Text
Print
Done
Help

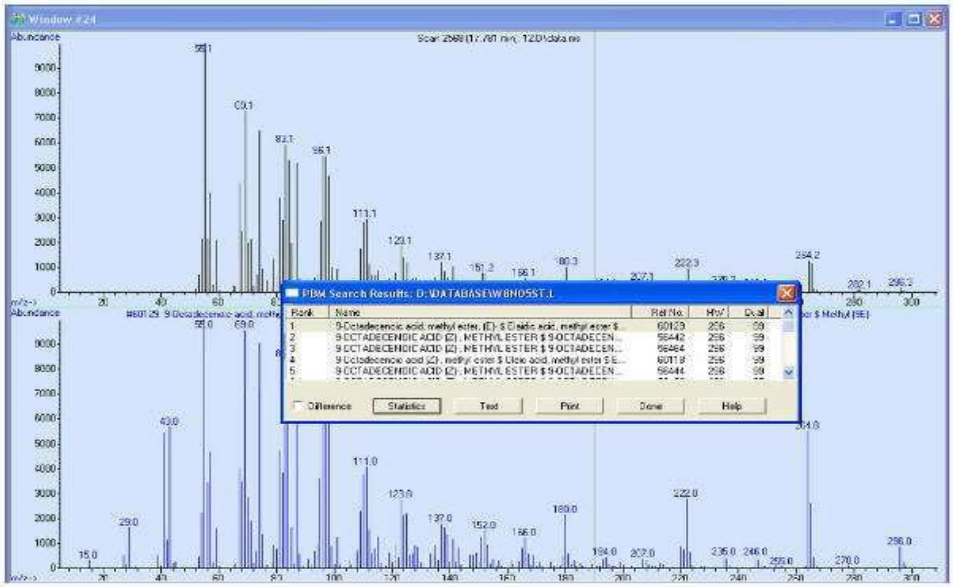
도면10d


Window #24
Abundance
Scan 1932 (14.142 min): 12.D\data.ms
55.1
74.1
87.1
96.1
110.1
123.1
137.2
152.1
194.3
236.3
PBM Search Results: D:\DATABASE\WBN05ST.L
Rank
Name
Ref No.
MW
Qual
9-HEXADECENOIC ACID, METHYL ESTER, (Z)- $ METHYL (92) 9...
9-OCTADECENOIC ACID (Z)-, METHYL ESTER $ 9-OCTADECEN...
Difference
Statistics
Text
Print
Done
Help

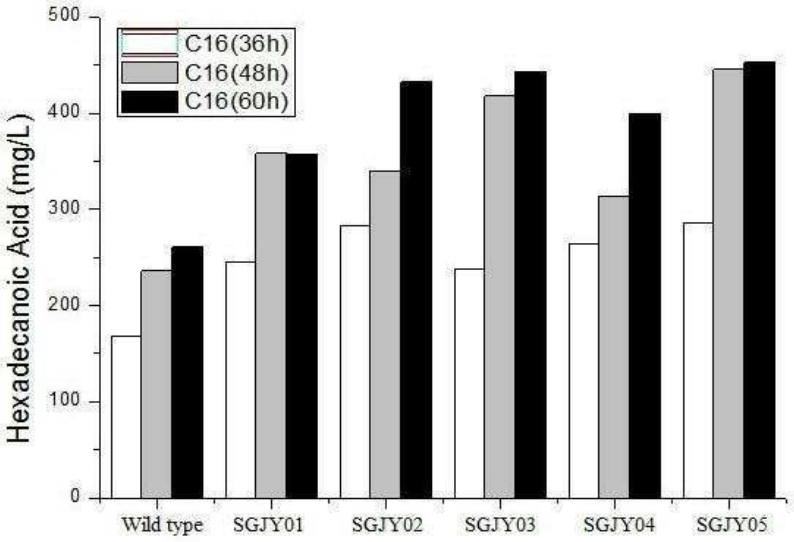
도면10e


Window #24
Abundance
74.1
87.1
55.1
143.1
PBM Search Results: D:\DATABASE\WBNO5ST.L
Rank
Name
Ref No
MW
Qual
OCTADECANOIC ACID, METHYL ESTER $ METHYL OCTADECA...
OCTADECANOIC ACID, METHYL ESTER $ METHYL OCTADECA...
Difference
Statistics
Text
Print
Done
Help

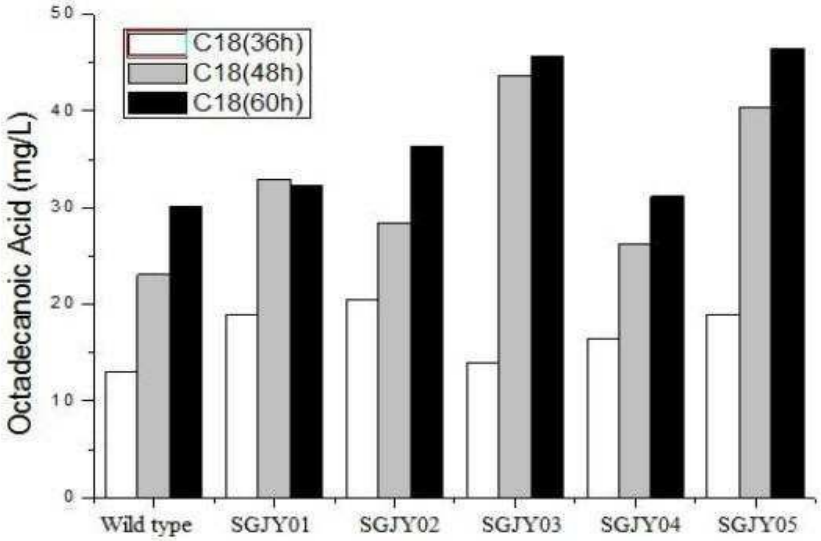
도면10f


Window #24
Abundance
55.1
69.1
83.1
97.1
111.1
123.1
PBM Search Results: D:\DATABASE\WBNO5ST.L
Rank
Name
Ref No
MW
Qual
Difference
Statistics
Text
Print
Done
Help

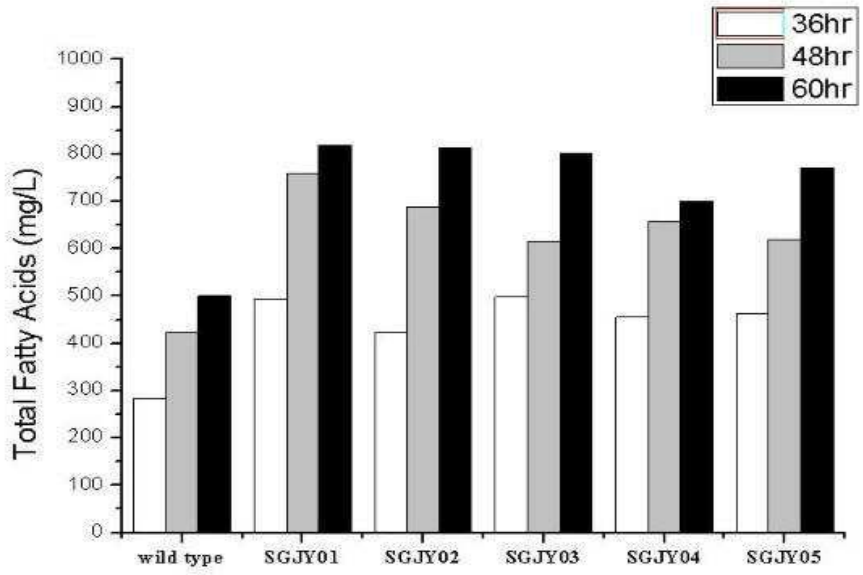
도면11a


500
400
300
200
100
0
Hexadecanoic Acid (mg/L)
C16(36h)
C16(48h)
C16(60h)
Wild type
SGJY01
SGJY02
SGJY03
SGJY04
SGJY05

도면11b


50
40
30
20
10
0
Octadecanoic Acid (mg/L)
C18(36h)
C18(48h)
C18(60h)
Wild type
SGJY01
SGJY02
SGJY03
SGJY04
SGJY05

도면11c



서 열 목 록

<110> Industry-University Cooperation Foundation Sogang University

<120> Transformed Saccharomyces cerevisiae for Improving the Content of Fatty Acids and Preparation Method thereof

<130> PN120562

<160> 5

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 1253

<212> DNA

<213> Saccharomyces cerevisiae fabF

<400> 1

acgtagtgaa atgacattta aaagagtagt ggtaacaggt tatggtctaa catctccaat 60

cgggcatgat cctgaaacgt tttggaacaa tctgaaagct ggccaaattg gtattggccc 120

tattactaaa tttgacacga ctgattatgc ggtcaagaat gctgctgaaa ttcaggattt 180

tccatttgac aaatactttg tgaaaaaaga tttgaaccgt ttcgatagat attctcttta 240

tgctctttac gcagcgaaag aggctattaa tcatgctgat ttaaatattg agatggttga 300

ttccgatcga tttggcgtta ttgttgcttc aggtattggt ggaattgcgg agattgaaga 360

gcaagtgatt cgcttacatg aaaaagggcc aaaacgtgtg aagccaatga cgttgccaaa 420

agcgctacca aatatggctg caggaaatgt cgccatgtct ttaaaagctc aaggagtatg 480

taaatcaatt aatactgcct gcgcttcttc aaatgatgcg attggggatg cctttcgtgc 540

cattaaattt gggactcaag atgtgatgat agttggtggg tcagaggcgg ccataaccaa 600

gtttgccatt gctggcttcc aaagtttaac agctctctca acaactgaag atccaagcag 660

aagctctatt ccatttgata aagaccgaaa tggttttatc atgggagaag gatcaggaat 720

gcttgtttta gaaagcctag aacatgcgca agaacgcggg gcgacaatct tagcagaaat 780

tgtgggttat ggaaatacct gcgatgccta ccatatgaca tctccaaatc ctgagggatt 840

aggagctcgt aaagccatcc acttagcctt acaagaagct ggtattgaag ccagtgctat 900

taattatgtc aatgcgcacg gaacttcaac cccagctaat gaaaaaggag agagtcaagc 960

aattgtagcc gttcttggta aggatgttcc ggtgtcttca acaaaatcgt ttacgggtca 1020

ccttcttgga gcagcaggcg ctattgaagc tattgccact atcgaggcta tgcgtcataa 1080

ctatgttccg atgacggctg ggacacaagc tttatcagag gatatcgaag caaatgtcat 1140

ctttggagaa ggaaaagaaa cagctatcaa ctatgccatt tcaaatactt ttggatttgg 1200

tggtcataat gctgtattag cttttaaatg ttgggaggag taggttgaat att 1253

<210> 2

<211> 755

<212> DNA

<213> Streptococcus pyogenes fabG

<400> 2

gaggacattc atggaaatta aaggaaaaaa tatatttatc acaggctcaa cgagaggtat 60

cggtttagca atggctcatc aattcgccag tttaggagct aatattgtct taaatggtcg 120

ttctgctatc tctgaggagc ttattgctag ttttactgac tacggcgtta cagttgttac 180

catctctggg gatgtttcag aagcatcaga agctaaacgt atggttaatg aagctatcga 240

aagtttaggt tcgattgatg ttttagttaa caatgctggc attactaatg ataaattgat 300

gcttaaaatg acggaagagg attttgagcg cgtcttgaaa atcaatttga ccggtgcttt 360

taacatgact caatcagtgt taaaaccaat gatcaaggcc cgccaaggag caattattaa 420

tgtctctagt gtggttggtt taacaggcaa tattgggcaa gcaaactatg ctgcttctaa 480

ggcaggaatg attggtttta ccaagtctgt tgcccgtgaa gttgctgctc gtaacatttg 540

cgtgaatgct attgctccag gatttatcga gtccgacatg acaggtgtcc ttcctgaaaa 600

aatgcaagag caaatcttaa gtcaaatccc aatgaaacgt attggaaaag ctcaagaagt 660

tgctcactta gcaagcttct tggtggaaca agattatatt acgggacaag ttatcgctat 720

tgatggcggt atgacaatgc aataaggaga cgtag 755

<210> 3

<211> 404

<212> DNA

<213> Streptococcus pyogenes fabZ

<400> 3

tgcggatcaa atgatggata ttagagaaat tcaagcagct ttgcctcatc gctacccaat 60

gttattggtt gatcgtgtgt tagaagtgtc agacgaccat atcgttgcca ttaaaaatgt 120

gactattaat gaacctttct ttaacgggca ttttcctcac tatcctgtga tgccaggtgt 180

tctgattatg gaagctttgg ctcaaacagc tggtgtctta gaattgtcaa aagaagaaaa 240

taaaggcaag ttggtctttt acgctggaat ggataaagtg aagttcaaaa aacaagtcgt 300

ccctggtgat caacttgtga tgacagcaac ctttatcaag cgtcgcggta ccattgctgt 360

cgttgaagcc aggcagaagt tgatggcaag ctagcagcaa gtgg 404

<210> 4

<211> 992

<212> DNA

<213> Streptococcus pyogenes fabK

<400> 4

gaaagttatt atgaaaacac gtattacaga attacttaat attgattacc ccatttttca 60

aggaggaatg gcttgggttg ctgatggtga tttagcaggt gcagtttcta atgctggtgg 120

tttaggcatt ataggtggtg gcaatgctcc caaagaagtc gttaaagcta atattgatcg 180

tgtcaaagct attactgata gaccttttgg ggttaatatc atgcttttat ctccttttgc 240

tgatgatatc gttgatttgg tcattgaaga aggtgttaaa gtagtaacaa caggcgcagg 300

aaatccagga aagtatatgg aaagactgca ccaggcgggt ataatcgttg ttcctgttgt 360

cccaagcgtt gcgctagcca aacgtatgga aaagcttggg gtagatgctg ttattgctga 420

gggtatggaa gctggaggac atattggcaa gttaacgact atgtctttag taagacaagt 480

tgttgaagcg gtttcgattc ctgtcattgc ggcaggtggt atagctgatg gtcatggtgc 540

agcagcagca tttatgttag gagcagaggc tgttcaaatt ggaactcgct ttgttgttgc 600

taaagaatcc aatgcccacc aaaattttaa agataaaatc ttagtagcaa aagatattga 660

tacggtgatt tctgcgcagg ttgtgggcca ccctgtccgt tctattaaaa ataaattgac 720

ctcagcttac gctaaagcag aaaaagcatt tttaattggt caaaaaacag ctactgatat 780

tgaagaaatg ggagcaggat cgcttcgaca tgctgttatt gaaggcgatg tagtcaatgg 840

atctgttatg gctggccaaa ttgcagggct tgtgagaaaa gaagaaagct gtgaaacgat 900

tttaaaagat atttattatg gtgcagctcg tgttattcaa aatgaagcta agcgctggca 960

atctgtttca atagaaaagt agataaacac at 992

<210> 5

<211> 773

<212> DNA

<213> Streptococcus pyogenes EC 3.1.2.14

<400> 5

ggagagtatt atgggattaa gttatcagga ggagttgaca cttccttttg aattatgtga 60

tgtcaaatca gatataaaat tgcccctttt attagactat tgtttgatgg tttctggtag 120

acagtctgcg caattaggac gaagtaacaa caacctttta gtcgattaca agcttgtttg 180

gattgtaacg gattatgaga tcactattca tcgcttgcca cattttcaag aaaccatcac 240

cattgaaaca aaagcccttt cctataataa attttttgt tatcgccaat tttatattta 300

tgatcaagag gggggtcttt tagtggatat cttagcctat tttgctttgt taaacccaga 360

tacgcgaaaa gtggcaacta ttccagaaga tttagtagcg ccttttaaga ctgattttgt 420

taaaaagtta taccgtgttc ctaaaatgcc tcttttagaa caatcaattg atcgtgatta 480

ttatgtgcgt tattttgata ttgatatgaa tggtcatgtc aacaacagta aatatttaga 540

ttggatgtat gatgtgttgg ggtgtgcgtt tttaaaaacg catcagcctc ttaagatgac 600

tttgaaatat gttaaagaag tctcaccagg cggtcaaatt acttccagtt accatttgga 660

ccaattaaat tcttaccatc aaatcacctc agatgggcag ctgaatgccc aagccatgat 720

tgaatggcga gcgattaaac aaacagaaag cgagatagac tagtgcctta taa 773