(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0085422
(43) 공개일자 2015년07월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/70 (2006.01) *C12N 1/21* (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01) *C12P 7/64* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0005278
(22) 출원일자 2014년01월15일
심사청구일자 2014년01월15일

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
이진원
서울 송파구 양재대로 1218, 201동 1601호 (방이동, 올림픽선수기자촌아파트)
이선희
서울 은평구 불광로6길 10-10, 101호 (불광동)
박수현
경기 군포시 산본천로 12, 624동 1101호 (산본동, 을지아파트)
(74) 대리인
양부현

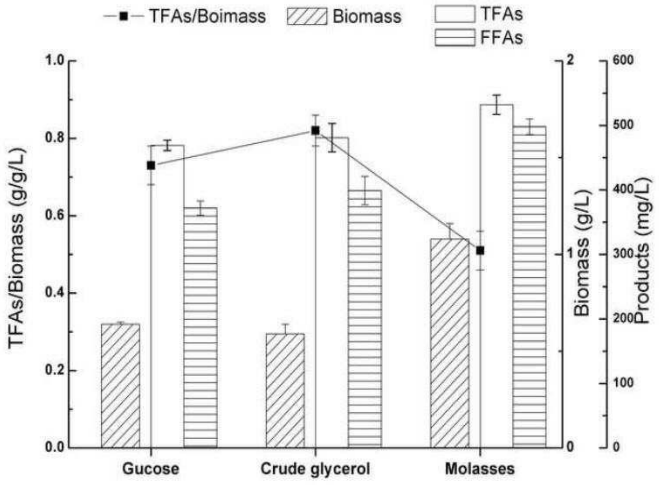
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **이종 박테리아 유래 아실-아실 운반 단백질 티오에스터라제를 포함하는 대장균을 이용한 지방산 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 (a) 락토코커스 종(*lactococcus* sp.) 유래 아실-아실 운반 단백질 티오에스터라제(acyl-acyl carrier protein thioesterase)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열의 코돈-최적화(codon-optimization)된 서열을 발현벡터에 삽입하는 단계; (b) 상기 발현벡터로 대장균을 형질전환시켜 형질전환 대장균을 제조하는 단계; 및 (c) 상기 형질전환 대장균을 배양하여 지방산을 제조하는 단계를 포함하는 이종 박테리아 유래 아실-아실 운반 단백질 티오에스터라제를 포함하는 대장균을 이용한 지방산 제조방법에 관한 것이다. 본 발명은 산업용 탄소원을 사용함으로써 저비용 지방산 생산을 가능하게 한다.

대 표 도 - 도5a



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 201232038
부처명 교육과학기술부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 기후변화대응 기초원천기술개발사업
연구과제명 바이오매스를 이용한 지방산계열 대체연료 생산 원천기술 개발
기 여 율 1/1
주관기관 서강대학교 산학협력단
연구기간 2012.09.30 ~ 2013.09.29

명 세 서

청구범위

청구항 1

다음의 단계를 포함하는 지방산의 제조방법:

(a) 락토코커스(lactococcus) 속 유래 아실-아실 운반 단백질 티오에스터라제(acyl-acyl carrier protein thioesterase)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열의 코돈-최적화(codon-optimization)된 서열을 발현벡터에 삽입하는 단계;

(b) 상기 발현벡터로 대장균을 형질전환시켜 형질전환 대장균을 제조하는 단계; 및

(c) 상기 형질전환 대장균을 배양하여 지방산을 제조하는 단계.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 락토코커스 속은 락토코커스 락티스(*L. lactis*), 락토코커스 중앙젠시스(*L. chungangensis*), 락토코커스 푸지엔시스(*L. fujiensis*), 락토코커스 가르비애(*L. garvieae*), 락토코커스 피시움(*L. piscium*), 락토코커스 플란타럼(*L. plantarum*) 또는 락토코커스 라피노락티스(*L. raffinolactis*)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 코돈 최적화된 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제1서열인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 형질전환 대장균은 추가적으로 *fadE*(acyl-CoA synthetase) 유전자가 불활성화 되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (c)의 배양은 탄소원으로서 글리세롤을 포함하는 배양 배지를 사용하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 지방산은 단쇄(short-chain) 지방산, 중쇄(middle-chain) 지방산 또는 불포화지방산인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 지방산은 옥타노익산(octanoic acid, C8:0), 데카노익산(decanoic acid, C10:0) 및 9-헥사데세노익산(9-hexadecenoic acid, C16:1)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 지방산인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

락토코커스 종(lactococcus sp.) 유래 아실-아실 운반 단백질 티오에스터라제(acyl-acyl carrier protein thioesterase)를 코딩하는 코돈-최적화된(codon-optimized) 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 이종 박테리아 유래 아실-아실 운반 단백질 티오에스터라제를 포함하는 대장균을 이용한 지방산 제조 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 최근, 화석연료의 광범위한 사용은 극심한 환경오염을 증가시켰다. 이 문제를 해결하기 위해, 에너지 위기 및 환경 저하의 문제를 완화할 수 있는 자연-친화적이고 재생 가능 에너지를 이용한 복합적인 해결책이 모색되어왔다. 전세계 연구자들에게 바이오매스를 원료로 한 바이오디젤과 같은 바이오연료에 대한 관심이 증가되고 있다[5, 16, 28, 31]. 바이오디젤 생산을 위해 환경적 및 경제적으로 유익한 미생물이 사용되어 왔다. 바이오디젤은 기존의 수송 차량과 호환할 수 있고, 현재 적합한 연로로서 연소 시스템이 사용 중이므로, 바이로디젤의 의무적인 사용을 지지하는 정책으로 인해 미래에는 바이오디젤의 소비가 증가될 것으로 기대된다[16, 18, 19, 32].

[0003] 대장균(*Escherichia coli*) 내 지방산 생합성(fatty acid synthesis; FAS)의 신장 주기(elongation cycle) 후 종결단계에서 지방 acyl-ACP(acyl carrier protein) 티오에스터라제(thioesterases; TEs)는 지방 acyl-ACPs로부터 ACP를 제거하고 유리 지방산(free fatty acids; FFAs)을 생성한다(도 1)[2, 26]. 대장균 내 지방산 생성 및 구성은 발현되는 acyl-ACP TE 종류에 의해 결정된다. 그러나, 초기 연구는 식물 acyl-ACP TEs(*Cinnamomum camphorum*, *Umbellularia californica*, *Ricinus communis* 및 *Jatropha curcus* 유래)에 중점을 두었고, 소수의 박테리아성 acyl-ACP TEs를 FFAs의 과발현에 적용하였었다[2, 21, 31]. 박테리아의 acyl-ACP TEs(*Streptococcus pyogenes* 및 *Lactobacillus* sp. 유래)는 식물 acyl-ACP TEs만큼의 다양한 길이 및 넓은 기질 특이성의 지방산을 생산할 수 있다[7, 8, 10]. 또한, 박테리아의 acyl-ACP TEs는 식물 acyl-ACP TEs와 비교하여 우수한 지방산(FFA 포함) 생산하게 할 수 있다. 이는 박테리아의 acyl-ACP TE 단백질이 식물 단백질보다 대장균에 최적으로 발현할 수 있음을 의미한다[7, 9].

[0004] 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

[0005] 본 발명자들은 산업용 탄소원을 이용하여 경제적으로 지방산을 제조할 수 있는 방법을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 산업용 탄소원인 글리세롤 원액(Crud glycerol)을 배양 배지에 첨가하고 이종 박테리아의 아실-아실 운반 단백질 티오에스터라제(acyl-acyl carrier protein thioesterase)를 코돈 최적화(codon-optimization)하여, 야생형 대장균과 비교하여 현저한 지방산 생산 효율을 확인함으로써 본 발명을 완성하였습니다.

[0006] 따라서, 본 발명의 목적은 지방산의 제조방법을 제공하는 데 있다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드를 제공하는 데 있다.

[0008] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 락토코커스 종(lactococcus sp.) 유래 아실-아실 운반 단백질 티오에스터라제(acyl-acyl carrier protein thioesterase)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열의 코돈-최적화(codon-optimization)된 서열을 발현벡터에 삽입하는 단계; (b) 상기 발현벡터로 대장균을 형질전환시켜 형질전환 대장균을 제조하는 단계; 및 (c) 상기 형질전환 대장균을 배양하여 지방산을 제조하는 단계를 포함하는 포함하는 지방산의 제조방법을 제공한다.

[0010] 본 발명자들은 산업용 탄소원을 이용하여 경제적으로 지방산을 제조할 수 있는 방법을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 산업용 탄소원인 글리세롤 원액(Crude glycerol)을 배양 배지에 첨가하고 이종 박테리아의 아실-아실 운반 단백질 티오에스터라제를 코돈 최적화하여, 야생형 대장균과 비교하여 현저한 지방산 생산 효율을 확인하였다.

[0011] 본 발명의 지방산 제조방법을 단계별로 정리한다.

[0012] 단계 (a): 코돈 최적화된 서열을 포함하는 발현벡터의 제조

[0013] 먼저, 락토코커스 종(*lactococcus* sp.) 유래 아실-아실 운반 단백질 티오에스터라제(acyl-acyl carrier protein thioesterase)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열의 코돈-최적화(codon-optimization)된 서열을 발현벡터에 삽입한다.

[0014] 본 발명의 상기 아실-아실 운반 단백질 티오에스터라제는 락토코커스 종 유래이다. 본 발명의 상기 락토코커스 종은 락토코커스 락티스(*L. lactis*), 락토코커스 중앙젠시스(*L. chungangensis*), 락토코커스 푸지엔시스(*L. fujiensis*), 락토코커스 가르비애(*L. garvieae*), 락토코커스 피시움(*L. piscium*), 락토코커스 플란타럼(*L. plantarum*) 또는 락토코커스 라피노락티스(*L. raffinolactis*)이다.

[0015] 본 발명의 대장균을 제조하기 위해, 락토코커스 종 유래 아실-아실 운반 단백질 티오에스터라제의 뉴클레오타이드 서열을 대장균(*Escherichia coli*)에서의 발현에 적합한 코돈 최적화(codon optimization)한다. 상기 락토코커스 종 유래 아실-아실 운반 단백질 티오에스터라제가 대장균에서 고발현 될 수 있도록, 대장균에 적합한 코돈으로 전환하였다. 코돈 최적화 과정을 거치면 유전자 서열은 염기서열만 전환될 뿐, 아미노산 서열은 전환되지 않는다.

[0016] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 락토코커스 종 유래 아실-아실 운반 단백질 티오에스터라제를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열의 코돈-최적화된 서열은 서열목록 제1서열이고, 아미노산 서열은 서열목록 제2서열이다.

[0017] 본 발명에서 이용되는 뉴클레오티드 서열은 상기 언급된 서열 이외에 상기 뉴클레오티드 서열에 대하여 실질적인 동일성을 나타내는 뉴클레오티드 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 본 발명의 뉴클레오티드 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인(align)하고, 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. 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 및 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.

[0018] 이어, 상기 락토코커스 종 유래 아실-아실 운반 단백질 티오에스터라제를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열의 코돈-최적화된 서열을 발현 벡터에 삽입한다.

[0019] 본 명세서에 있어서, 용어 "발현 벡터"는 발현 벡터의 전사에 제공되는 추가단편에 작동가능하게 연결된 관심의 폴리펩티드를 암호화하는 단편으로 구성되는 선형 또는 원형의 DNA 분자이다. 그와 같은 추가단편은 프로모터 및 종료암호 서열을 포함한다. 발현 벡터는 하나 이상의 복제 개시점, 하나 이상의 선택마커, 폴리아데닐화 신호 등을 또한 포함한다. 발현 벡터는 일반적으로 플라스미드 또는 바이러스 DNA로부터 유도되거나, 또는 둘 다의 요소를 함유한다.

[0020] 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.

[0021] 본 발명의 코돈 최적화된 아실-아실 전송 단백질 티오에스터라제의 뉴클레오타이드 서열을 발현 조절서열에 작동가능하게 연결되어 발현 벡터 내에 삽입될 수 있다. 상기에서 '작동가능하게 연결된다(operably linked to)'는 것은 하나의 핵산 단편이 다른 핵산 단편과 결합되어 그의 기능 또는 발현이 다른 핵산 단편에 의해 영향을 받는 것을 말한다. 또한, '발현 조절 서열(expression control sequence)'이란 특정한 숙주 세포에서 작동 가능하게 연결된 핵산 서열의 발현을 조절하는 DNA 서열을 의미한다. 그러한 조절 서열은 전사를 개시하기 위한 프로모터, 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보좀 결합 부위를 코딩하는 서열 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다.

[0022] 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, trc 프로모터, lac 프로모터, lacUV5 프로모터, lpp 프로모터, pLλ 프로모터, pRλ프로모터, rac5 프로모터, amp 프로모터, recA 프로모터, SP6 프로모터, trp 프로모터 및 T7 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보좀 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 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. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 벡터에 사용되는 프로모터는 trc 프로모터이고, 종결서열은 rrrB 터미네이터이다.

[0023] 숙주 세포 내로 주입된 벡터는 숙주 세포 내에서 발현될 수 있으며, 이러한 경우에는 다량의 아실-아실 전송 단백질 티오에스터라제를 얻게 된다. 예를 들어, 상기 발현 벡터가 trc 프로모터를 포함하는 경우에는 숙주 세포에 IPTG(Isopropylthio-β-D-Galactoside)를 처리하여 유전자 발현을 유도할 수 있다.

[0024] 한편, 본 발명에 이용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드(예: pTrc99A, pSTV28, pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHC79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, pET22b, pGEX 시리즈, pET 시리즈 및 pUCP19 등), 파지(예: λgt4?λB, λ-Charon, λΔz1 및 M13 등) 또는 바이러스(예: SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있으나, 본 발명의 일 구현예에 따르면, pTrc99A를 사용한다.

[0025] 한편, 본 발명의 벡터는 선택표지로서, 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함하며, 예를 들어 암피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자가 있다.

[0026] 본 발명의 발현 벡터는 프로모터서열 및 발현 대상 유전자(구조 유전자)의 뉴클레오티드 서열을 포함하며, 상기 서열들이 5'-3' 순서대로 연결되는 것이 바람직하다.

[0027] 단계 (b): 형질전환 대장균의 제조

[0028] 다음, 상기 발현벡터로 대장균을 형질전환시켜 형질전환 대장균을 제조한다.

[0029] 상기 코돈 최적화된 아실-아실 전송 단백질 티오에스터라제의 뉴클레오타이드 서열이 포함된 발현 벡터는 이후

대장균 내부로 도입되는데, 본 발명의 벡터를 대장균 내로 운반하는 방법은 $CaCl_2$ 방법(Cohen, S.N. et al., Proc. Natl. Acac. Sci. USA, 9:2110-2114(1973)), 하나한 방법(Cohen, S.N. et al., Proc. Natl. 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 있으며, 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 단계 (b)는 전기천공법으로 실시한다.

[0030] 본 발명의 벡터를 안정되면서 연속적으로 클로닝 및 발현시킬 수 있는 숙주 세포는 당업계에 공지되어 어떠한 숙주 세포도 이용할 수 있으며, 예컨대, *E. coli* W3110, *E. coli* JM109, *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* RR1, *E. coli* LE392, *E. coli* B, *E. coli* X 1776, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 츄린겐시스와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세슨스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등이 있으며, 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 숙주 세포는 *E. coli* W3110이다.

[0031] 본 발명의 상기 형질전환 대장균은 추가적으로 *fadE*(acyl-CoA synthetase) 유전자가 불활성화 된다.

[0032] 본 명세서에서 *fadE*를 언급하면서 사용되는 용어, "불활성화(inactivation)"란 유전자의 전사 또는 해독, 유전자 산물의 활성의 손상(impairment)을 초래하는 *fadE*의 지놈 열상에서의 변형(modifications)을 의미한다.

[0033] 이런 유전자 변형은 *fadE* 코딩 서열의 불활성화뿐만 아니라 이의 프로모터의 불활성화도 포함될 수 있다. 대장균 지놈 상에서 목적한 유전자만의 특이적 불활성화는 코딩하는 유전자의 전체 또는 하나 이상의 부분 영역에서 치환, 삽입, 결실 또는 이들의 조합을 통하여 돌연변이시킴으로서 가능하다. 예들 들어, 유전자의 결실 및 유전자로의 이형 서열(heterogenous sequence)의 삽입은 유전자의 절단(truncation), 넌센스 돌연변이(nonsense mutation), 프레임쉬프트 돌연변이(frameshift mutation), 미스센스 돌연변이(missense mutation) 등을 초래할 수 있다. 이러한 유전자의 특이적 불활성화는 당 분야에서 확립된 방법을 통하여 수행할 수 있다.

[0034] 본 명세서에서 *fadE*를 언급하면서 사용되는 용어, "결실(deletion)"은 *fadE*의 기능을 상실케 하는 모든 결실 변이를 포함하는 의미를 갖는다. 예를 들어, *fadE* 유전자의 결실은 *fadE* 코딩 서열의 부분 결실 또는 전체 결실을 모두 포함한다.

[0035] 이러한 *fadE* 코딩 서열의 결실은 당업계에 공지된 다양한 변이유발(mutagenesis) 방법을 통하여 실시할 수 있다. 예컨대, *fadE* 코딩 서열의 결실은 PCR 돌연변이 유발법 및 카세트 돌연변이 유발법으로 실시할 수 있다(Sambrook, J. et al., Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)).

[0036] 본 발명의 도 4에서 확인할 수 있듯이, 상기 *fabE* 유전자의 불활성화는 TFA보다 FFA가 더 잘 생성되게 한다.

[0037] 본 명세서에서 용어 'TFA(또는 TFAs)'는 '총 지방산(total fatty acids)'으로, 상기 형질전환 대장균에 의해 생성된 단쇄 지방산, 중쇄 지방산 및 장쇄 지방산, 또한 포화 지방산 및 불포화 지방산을 모두 포함한다.

[0038] 본 명세서에서 용어 'FFA(또는 FFAs)'는 '유리 지방산(free fatty acids)으로, 비-에스테르화(non-esterified)된 지방산을 통칭한다.

[0039] 단계 (c): 지방산의 제조

[0040] 마지막으로, 상기 형질전환 대장균을 배양하여 지방산을 제조한다.

[0041] 본 발명은 산업용 탄소원을 이용하여 경제적으로 지방산을 제조하고자 고안된 것으로, 상기 형질전환 대장균을 배양하는 배양배지는 탄소원으로서 글리세롤을 포함한다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 글리세롤은 글리세롤 원액(Crude glycerol)으로, 95%, 99% 또는 99.9%이상의 글리세롤을 포함한다.

[0042] 본 발명의 지방산 제조방법에 의해 제조되는 지방산은 단쇄(short-chain) 지방산, 중쇄(middle-chain) 지방산 또는 불포화지방산이다.

[0043] 본 발명에 따르면, 상기 형질전환 대장균은 야생형 대장균과 비교하여 단쇄 및 중쇄 지방산을 2 내지 21 배 생산한다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 단쇄 및 중쇄 지방산은 옥타노익산(octanoic acid, C8:0), 데카노익산(decanoic acid, C10:0) 및 도데카노익산(dodecanoic acid. C12:0)을 포함한다.

[0044] 본 발명에 따르면, 상기 형질전환 대장균은 야생형 대장균과 비교하여 불포화지방산을 15-18배 생산한다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 불포화 지방산은 9-헥사데세노익산(9-hexadecenoic acid, C16:1)이다.

[0045] 본 발명의 형질전환 대장균은 탄소원으로서 글리세롤을 포함하는 경우에, 탄소원으로서 글루코오스를 포함하는 경우와 비교하여, 우수한 TFA 효율 및 FFA 효율을 갖는다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 형질전환 대장균은 탄소원으로서 글리세롤을 포함하는 경우에, 탄소원으로서 글루코오스를 포함하는 경우와 비교하여, 2.5-3.0배의 TFA 및 FFA 효율을 갖는다.

[0046] 또한, 본 발명의 형질전환 대장균은 탄소원으로서 글루코오스를 포함하는 경우에도 우수한 지방산 생성을 나타낸다. 도 3c에서 확인할 수 있듯이, 배양 24시간 이후에, 야생형 균주와 비교하여 2.5-3.5배의 TFA 생산을 나타낸다.

[0047] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 락토코커스 종 유래 아실-아실 운반 단백질 티오에스터라제를 코딩하는 코돈-최적화된 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드를 제공한다.

발명의 효과

[0048] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0049] (a) 본 발명은 이종 박테리아 유래 아실-아실 운반 단백질 티오에스터라제(acyl-acyl carrier protein thioesterase)를 포함하는 대장균을 이용한 지방산 제조방법을 제공한다.

[0050] (b) 본 발명은 산업용 탄소원을 사용함으로써 저비용 지방산 생산을 가능하게 한다.

[0051] (c) 본 발명은 야생형 균주와 비교하여 15-20 배의 단쇄 지방산을 생산한다.

도면의 간단한 설명

[0052] 도 1은 *E. coli* K-12 W3110의 지방산 생합성의 대사경로를 보여준다. ACC는 acetyl-CoA carboxylase, fadD는 malonyl-CoA:ACP transacylase, fabH, fabF, fabB는 β-ketoacyl-ACP synthase, fabG는 β-ketoacyl-ACP reductase, fabA, fabZ는 β-hydroxyacyl-ACP dehydrase, fabO는 β-enoyl-ACP reductase, TE는 fatty acyl-ACP thioesterase 및 fadD, fadE는 acyl-CoA synthetase를 의미한다.

도 2는 *E. coli*의 아미노산 서열(*EsTE*) 및 *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecalis* 및 *Burkholderia cepacia*의 fatty acyl-acyl carrier protein(ACP) thioesterase를 코딩하는 유전자의 코돈-최적화된 아미노산 서열(*OPL1TE*, *OPEfTE* 및 *OPBcTE*)을 얼라인(alignment)하여 보여준다.

도 3a 내지 도 3c은 야생형 균주 *E. coli* W3110 및 형질전환 균주(*E. coli* SGJS47, SGJS49 및 SGJS0)의 세포 생장(3a), 글루코오스 소비(3b) 및 TFA 생산(3c)을 보여준다. 1% 글루코오스를 포함하는 30℃의 최소 배지에서 IPTG 유도 후 30시간동안 균주를 배양하였다. 4, 8, 12, 24 및 30 시간에 시료를 채취하여 TFA 함량을 조사하였다.

도 4는 바이오매스 및 야생형 균주 및 형질전환 균주(*E. coli* SGJS47 및 SGJS52)의 글루코즈 활용, TFA 및 FFA 산물, TFA 내 FFA의 비율을 나타낸다. 1% 글루코오스를 포함하는 30℃의 최소 배지에서 IPTG 유도 후 30시간동안 균주를 배양하였다.

도 5a는 야생형 균주 및 *E. coli* SGJS47의 탄소원(글루코오스, 글리세롤 원액 및 당밀)에 대한 TFA 및 FFA 산물, 바이오매스 및 바이오매스 내 FFA의 함량에 대한 영향을 나타낸다. 1% 탄소원을 포함하는 30℃의 최소 배지에서 IPTG 유도 후 30시간동안 균주를 배양하였다. 도 5b는 *E. coli* SGJS47의 탄소원인 글리세롤 원액에 대한 TFA 및 FFA 산물, TFA 내 FFA 비율, 바이오매스 및 글리세롤 원액 소비를 나타낸다. 6, 12 및 24시간에 시료를 채취하여 분석하였다.

도 6a 내지 도 6d는 박테리아의 코돈-최적화된 acyl-ACP TE 유전자(*OPL1TE*, *OPEfTE* 및 *OPBcTE*)의 과발현의 TFA 및 FFA 함량에 대한 영향을 보여둔다. 도 6a 및 도 6b는 야생형 균주 미치 *E. coli* SGJS47의 단쇄 및 중쇄 지방산(6a, TFAs 및 6b, FFAs)의 비율 및 주요 사슬변화(6c, C16:0 및 6d, C16:1)을 보여준다.

도 7a 내지 도 7c는 본 발명에 이용된 플라스미드 컨스트럭트를 나타낸다. 도 7a는 *OPL1TE*를 삽입한 발현벡터

이고, 도 7b는 *OPEfTE*를 삽입한 발현벡터이며, 도 7c는 *OPBcTE*를 삽입한 발현벡터이다.

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**

[0055] **실험 재료 및 실험 방법**

[0056] *실험 재료*

[0057] *E. coli* K-12 W3110 균주를 TFAs(total fatty acids) 및 FFAs(free fatty acids)의 생산을 위한 숙주로 이용하였다. 상기 균주는 ATCC(American Type Culture Collection, USA)에서 구매하였다[15, 22]. 재조합 플라스미드를 컨스트럭트하고 안정화하는데 컴프턴트 *E. coli* DH5α(Donginbiotech, Korea)를 사용하였다. 숙주의 acyl-CoA 디하이드로제나제 유전자(fadE 유전자)를 결실하기 위해 Quick & Easy *E. coli* 유전자 결실 키트(Gene Bridges, Germany)를 사용하였다. 본 발명에 사용된 균주를 표 1에 정리하였다. 제한 효소는 Takara(일본)으로부터 구매하였다. 글루코오스는 sigma chemicals company로부터 구매하였고, 글리세롤 원액 및 당밀은 GS-Caltex(Korea)로부터 수득하였다.

표 1

	Description	Soure /restriction site
Strains		
E. coli DH5α	F' (80d lacZ M15) (lacZYA-rgF)U169 hsdR17(r_k^-) recA1 endA1 relA1 deoR	Donginbiotechnol
E. coli W3110	Wild-type *E. coli* K-12 strain	ATCC
SGJS47	W3110 harboring pTrc99A :: codon-optimized (*L. lactis* acyl-acyl (ACP) thioesterase) gene	This study
SGJS49	W3110 harboring pTrc99A :: codon-optimized (*E. faecalis* acyl-acyl (ACP) thioesterase) gene	This study
SGJS50	W3110 harboring pTrc99A :: codon-optimized (*B. cepacia* acyl-acyl (ACP) thioesterase) gene	This study
SGJS52	W3110 (*fadE*⁻) harboring pTrc99A :: codon-optimized (*L. lactis* acyl-acyl (ACP) thioesterase) gene	This study
Plasmids		
pGEM-T	T-easy vector	Promega
pTrc99A	Expression vector, Ap^r	Takara
Primers[a]		
OPLlTE-F	5'-GTCGACATGGGTATAAAGTATCAA-3'	SalI
OPLlTE-R	5'-AAGCTTTTAGTAAATTTTGCCCCA-3'	Hind III
OPEfTE-F	5'-GTCGACGTAGGTAAGAAACATACA-3'	SalI
OPEfTE-R	5'-AAGCTTTTAGTTGGTCCAATCGAT-3'	Hind III
OPBcIE-F	5'-TCTAGAATGCCGACTCATCGTCAT-3'	XbaI
OPBcIE-R	5'-AAGCTTTTATGCCTGCAGTGCGGA-3'	Hind III

[a] The underlined letters denote the restriction sites.

[0058]

[0059] *플라스미드 컨스트럭션 및 형질전환*

[0060] *E. coli*에서, 목적하는 이종 박테리아의 acyl-ACP TE 유전자의 발현을 증가시키기 위해, 원래의 서열을 *E. coli* 코돈 사용(codon usage)에 따라 변환하였다. 코돈 최적화 및 유전자 합성은 Bioneer(Korea)에 의뢰하였다. 코돈-최적화된 상태의 각 유전자를 합성하기 위해, 웹사이트를 이용하여 복합적 얼라인(alignment)을 실시하였다[6, 14, 22]. DNA를 표 1에 기재된 제한효소로 처리한 후, pTrc99A 발현 벡터에 코돈-최적화된 유전자를 라이게이션(ligation) 하였다[7](도 7a 내지 7c)도 벡터의 조작 및 박테리아의 형질전환은 표준 방법대로 하였다[25]. Gene Pulser Xcell 전기천공기(Bio-Rad, USA)를 이용하여 플라스미드 컨스트럭트로 *E. coli*를 형질전환하였다.

[0061] *배양 배지 및 배양 조건*

[0062] *E. coli* W3110을 재조합 플라스미드로 전기천공하고 암피실린(50 ㎍/㎖) 또는 카나마이신(50 ㎍/㎖)을 포함하는 LB 아가에서 18시간 동안 37℃ 배양하였다. TFAs 및 FFAs를 분석하기 위해, 200 ㎖ 최소배지(4.0 g/L Na_2SO_4; 5.0 g/L $(NH_4)_2SO_4$; 1.0 g/L NH_4Cl; 7.3 g/L K_2HPO_4; 1.8 g/L NaH_2PO_4; 12 g/L $(NH_4)_2$-H-citrate; 0.25 g/L MgSO4; 0.02 g/L thiamine)를 포함하는 500-㎖ 삼각 플라스크에 1 ㎖(0.5%) 종 배양물을 접종하고 30℃에서 180 rpm으로 배양하였다. 탄소원(글루코오스, 글리세롤 원액(Crude glycerol) 및 당밀) 및 질소원(트립톤)을 각각 10 g/L(1%) 및 5 g/L(0.5%) 농도로 첨가하였다. 흡광도(λ=600 ㎚)가 0.3 내지 0.6일 때, 0.5 mM IPTG(isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside)를 첨가하여 유도하였다.

[0063] *분석기법*

[0064] *E. coli*의 성장을 UV 7300 분광광도계(Staffs, UK)로 600 ㎚에서 측정하였다. 탄소원의 소비를 HPLC(high performance liquid chromatography, Younglin, Korea)로 측정하였다. LC-10AT 유닛(Younglin, Korea), RI 750F 검출기 및 HPX-87-H 유기산 컬럼(Bio-Rad, USA)를 장착한 HPLC 기구를 이용하여 시료를 측정하였다. 황산(Sulfuric acid, 0.01M)을 이동상으로 이용하였다(유속 0.6 ㎖/분; 컬럼 온도 60℃).

[0065] *TFA 및 FFA 추출*

[0066] 5 ㎖ 배양물로부터 TFAs 및 FFAs을 추출하였다. 배양물로부터 TFAs를 직접적으로 메틸에스테르로 전환하였고, 지질로부터 FFAs를 메틸 에스테를 전환하였다. Bligh 및 Dyer[1]의 방법을 수정하여 지질을 추출하였다. 지질을 추출하기 위해, 5 ㎖ 배양물에 클로로포름-메탄올(v/v. 2:1)을 첨가하고 15초 동안 볼텍싱 한 후, 20분 동안 200 rpm으로 쉐이킹하였다. 유기층을 분리하고 상기 추출을 반복하여 2차 추출을 실시하여 건조하였다. 14% BF_3-메탄올(Sigma, USA)을 이용하여 TFAs 및 FFAs를 메틸 에스테르로 전환시켰다[24]. 먼저, 14% BF_3-메탄올을 시료에 첨가하고 100℃에서 30분 동안 반응시킨 후, 상온에서 식혔다. 다음, 혼합물에 1 ㎖ 헥산(Sigma, USA)을 첨가하였다. 시료를 10분 동안 인버팅을 반복하였다.

[0067] *지방산 검출*

[0068] Agilent model 5975 시리즈 MS 및 7890A GC(30 m× 0.32 m× 0.25 ㎛의 필름 두께를 갖는 HP-5 컬럼 장착)을 포함하는 GC/MS(gas chromatography/mass spectrometry) 시스템을 이용하여 지방산(TFAs, FFAs)를 분석하였다. 헬륨을 이동체로 사용하였다. 시료를 1:5의 분할비(split ratio)로 주입하였다. 다음, GC 프로그램을 적용하였다. 80℃의 초기온도에서 5분, 150℃까지 분당 10℃씩 상승, 200℃까지 분당 3℃ 상승, 및 200℃에서 5분 동안 유지시켰다. 피크는 MSD(mass spectral database, MSD ChemStation software)와 비교하여 식별하였다[7, 10]. 지방산 메틸 표준(Sigma, USA) 칼리브레이션 곡선과 비교하여 정량하였다.

[0069] **결과 및 토론**

[0070] 유전자 결실 및 코돈-최적화

[0071] *fadE* 녹아웃(△*fadE*)을 통해 β-산화를 제거하고 지방산 생합성 경로를 증진시켜 지방산 생성을 증가시키기 위해, 본 발명자들은 *E. coli*에 코돈 최적화된 TE 유전자(*OPTE* 유전자)를 도입하였다(도 1). 이종 박테리아의 acyl-ACP-TE 유전자는 *L. lactis*, *E. faecalis* 및 *B. cepacia*로 선택하였고, Codon Analysis Tool을 이용하여 상기 유전자가 *E. coli*에서 발현되도록 하였다[6,21].

[0072] Acyl-ACP TEs를 제조하기 위해, 상기 유전자의 원래 코돈을 *E. coli* 선호 코돈으로 치환하여 합성하였다(*OPL1TE*, *OPEfTE* 및 *OPBcTE*). *L. lactis*의 원래의 *L1TE* 서열(614 bp)과 *OPL1TE* 서열(733 bp)의 뉴클레오타이드 상동성은 84%이다. *E. faecalis*의 원래의 *EfTE* 서열(639 bp)과 *OPEfTE* 서열(726 bp)의 뉴클레오타이드 상동성은 88%이고, *B. cepacia*의 원래의 *BcTE* 서열(715 bp)과 *OPBcTE* 서열(844 bp)의 뉴클레오타이드 상동성은

85%이다. *E. coli*의 대조군 및 코돈-최적화된 *OPL1TE*, *OPBfTE* 및 *OPBcTE*의 다중 아미노산 서열의 얼라인을 도 2에서 보여준다[4]. 공통적으로 *E. coli*에서 가장 선호하는 코돈으로 바꾸어 주었지만 *OPTE*의 타입에 따라 아미노산 서열을 다르게 나타났다.

[0073] 이러한 *OPL1TE*, *OPEfTE* 및 *OPBcTE* 유전자를 발현벡터, pTrc99A에 클로닝하고, 재조합 플라스미드를 *E. coli* W3110 숙주에 형질전환 하였다. 본 발명자들의 이전 연구에 따르면, pTrc99A 벡터는 강력한 *trc* 프로모터로 지방산 생산을 증가시키는데 효과적이다[7, 8, 11]. *E. coli* W3110의 형질전환 후, 이를 각각 *E. coli* SGJS47(*OPL1TE* 유전자 포함), *E. coli* SGJS49(*OPEfTE* 유전자 포함) 및 *E. coli* SGJS50(*OPBcTE* 유전자 포함)이라고 명명하였다. *OPL1TE* 유전자를 *E. coli* W3110(△*fabE*) 균주에 삽입하였고, 이 재조합 *E. coli* 균주를 *E. coli* SGJS52라고 명명하였다.

[0074] *재조합 균주의 TFAs 분석*

[0075] 재조합 *E. coli* 균주(*E. coli* SGJS47, SGJS49 및 SGJS50)를 1% 글루코오스를 포함하는 최소 배지에서 배양하고 IPTG(0.25 mM)를 첨가하여 유도하였다[10,12]. 유전적으로 조작된 박테리아 균주의 TFA 함량을 결정하였고, 모든 TFAs를 이의 메틸 에스테르(FAMEs) 형태로 측정하였다[26, 27]. 균주 성장, 글루코오스 소비 및 TFA 생산을 측정하였고, 배양기간 동안 모든 균주가 증가함을 확인하였다(도 3a 및 3c). 형질전환 *E. coli* 균주의 긴 유도기로 인해 초기 4-12시간의 성장은 더뎠고, 비교적으로, 글루코오스의 소비는 야생형 균주보다 적었다(도 3a 및 3b). 12시간 이후에, 재조합 균주의 성장은 TFA 함량에 상응하게 증가하였다. *E. coli* SGJS49(*OPEfTE* 유전자 과발현)는 최저 성장 및 최저 TFA 생산을 나타내었다. *E. coli* SGJS50(*OPBcTE* 유전자 과발현)에서는, 30시간에 야생형 균주와 유사한 성장에도 TFA 함량은 야생형 균주(165 mg/L)보다 1.6배(257 mg/L)로 높았다. TFA 함량은 *E. coli* SGJS47(*OPL1TE* 유전자 과발현)에서 30시간에 가장 높았고(530 mg/L), 이는 야생형 균주(165 mg/L) 및 다른 재조합 균주(185-257 mg/L)보다 2.1-3.2배의 높은 수치이다(도 3c). 이러한 결과는 TFA 생산이 *E. coli*에 도입된 코돈-최적화된 박테리아 acyl-ACP TE 유전자에 의해 증가됨을 확인하였다. 또한, TFA 생산은 종-의존적으로 이종 코돈-최적화된 acyl-ACP TE 유전자에 따라 다르게 나타났다.

[0076] 최근, 막 통과 지방산 확산의 추진력(driving force)을 증가시켜 지방산 생산을 개선하는 최적화 과정이 적용되었다. 본 발명자들은 acyl-ACP TE가 발현되거나 *fad* 유전자 패밀리가 결실된 재조합 *E. coli*의 지방산 생산을 개선하였다. 이는 세포에서 지방산을 수송하는데 acyl-ACP TE 유전자 및 *fad* 유전자 패밀리(*fadD* 및 *fadE* 유전자 포함)가 관련 있음을 의미한다. 그리고 fad 유전자들은 생산되어진 FFAs 지방산을 다시 acyl-CoA로 순환되어지게 분해하는 역할을 한다 [3, 21, 26, 30]. 최근 연구는 FFAs 생산에 초점이 맞춰져 있다[31]. FFAs는 글리세롤 백본에 붙지 않기 때문에, 이러한 분자는 바이오 디젤, 지방알코올 및 알칸과 같은 지방산-기반 바이오연료를 생산하기 위해 추가적으로 조작할 수 있다. 이러한 주제를 조사하기 위해, 본 발명에서는 *fadE* 유전자를 결실하고 *OPL1TE* 유전자를 도입하여 TFA 및 FFA 생산에 가장 효율적인 균주를 제조하였다. Keasling의 연구에 따르면, *fadE* 유전자의 결실은 *fadD* 유전자보다 많은 FFA 함량을 생산하게 한다[26]. 본 발명에서 이러한 접근으로 TFA 및 FFA 함량의 증가를 기대하였으나, 본 발명에서 *fadE* 유전자 결실은 TFA 함량의 증가를 나타내지 않았다(도 4). TFA 함량은 30시간에 *E. coli* SGJS47(*OPL1TE* 유전자 포함)이 가장 높았고(734 mg/L), 이는 야생형 균주(240 mg/L) 및 *E. coli* SGJS52(△*fadE*, *OPL1TE* 과발현, 375 mg/L) 보다 2.0-3.1배 높았다. 그러나, *E. coli* SGJS52는 TFA 내 FFA의 함량이 87.8%로 가장 높았고, *E. coli* SGJS47에서 TFA 내 FFA 함량은 야생형 균주(67.1%)보다 높은 79.5%였다. 이러한 결과는 *E. coli*에서 코돈-최적화된 acyl-ACP TE 유전자의 과발현으로 TFA 및 FFA 생산이 증가됨을 보여준다. 특히, *fadE* 유전자 결실과 동시에 코돈-최적화 유전자가 발현되는 경우에 TFA보다 FFA가 더 잘 생성된다.

[0077] *TFA 및 FFA 생산에 대한 산업용 탄소원의 영향*

[0078] 산업 규모의 미생물 사용에 적합하기 위해서는, 바이오디젤의 생산을 위해 적용되는 탄소원은 저비용이어야 한다. 저비용 탄소원으로 부산물로 생성되는 글리세롤 원액 및 당밀을 공급받을 수 있다. 본 발명은 재조합 *E. coli* 균주에서 지방산 생산 및 소비하는데 산업용 탄소원의 영향을 조사하고자 하였다. 본 발명자들은 IPTG 유도 후 24시간에 TFAs 및 FFAs 농도를 조사하였다. TFA 생산은 1%(10 g/L) 글루코오스 배지에서 성장한 *E. coli* SGJS47에서 가장 높았다(도 4). 글리세롤 원액 및 당밀을 최소배지에 1% 로 참가하여 비교하였다.

[0079] 도 5a에서 확인할 수 있듯이, 바이오매스는 의존적인 탄소원의 종류가 달랐다. 당밀은 탄소 뿐 아니라 다른

미네랄 및 질소함유원을 포함하기 때문에, 바이오매스는 글루코오스 및 글리세롤 원액을 첨가한 배지에서 보다 당밀을 첨가한 배지에서 두드러지게 높았다. 이전 연구에 따르면, 세포 성장 및 지방산 함량은 동시에 증가한다[7, 10, 12]. 그러나 본 발명에서, GS-Caltex로부터 얻은 30.%(글루코오스 6.1%, 수크로즈 24.7% 및 프럭토오스 8.0%)의 탄소를 갖는 당밀 배지에서 높은 균주 성장에도 불구하고 TFAs/바이오매스(0.59 g/g/L)는 가장 낮았다. 그러므로, TFAs/바이오매스는 정제 글루코오스 및 글리세롤 원액(> 글리세롤 99.9%) 배지와 비교하여 낮았다. *E. coli* SGJS47에서, 글리세롤 원액을 포함하는 배지의 지방산(TFA 및 FFA) 농도는 글루코오스를 포함하는 배지와 유사하였다(도 5a); 또한, TFAs/바이오매스는 같은 조건 하에 최고치를 나타내었다. 지방산 생산을 위해 탄소원으로서 글리세롤 원액을 사용하는 것은 당밀보다 경제적으로 적합하다. 본 발명자들의 이전 연구에서 글리세롤 원액을 사용하여 효율적으로 지방산을 생산함을 보여주었다[12, 15].

[0080] 지방산 생산 및 바이오매스는 글리세롤 원액을 포함하는 배지에서 배양 시간을 증가시킬수록 증가하였다(도 5b). *E. coli* SGJS47은 배양 6시간에 낮은 초기 성장 및 지방산 축적을 보여주었다(TFAs 124 mg/L 및 FFAs 93 mg/L). 6시간 후에, 지방산 생산은 TFAs 449 mg/L 및 FFAs 402 mg/L로 향상되었다. 특히, FFA 함량이 두드러지게 증가하였고, TFA 내 FFA의 함량이 75.0%에서 89.6%로 14.6% 향상되었다. 이는 FFA 생산이 지수기(exponential phase) 동안 증가함을 말해준다. 탄소원으로 글리세롤 원액을 사용한 경우의 FFA 함량은 글루코오스를 사용한 경우보다 높았다. 또한, *E. coli* SGJS47에서 24시간에 TFAs/바이오매스 및 FFAs/바이오매스가 높았다(표 2).

표 2

	Items	Glucose	Crude glycerol
SGJS47	Biomass (g/L)[a]	0.64 ± 0.08	0.59 ± 0.08
	TFAs (mg/L)	469 ± 28	481 ± 33
	FFAs (mg/L)	372 ± 24	399 ± 26
	FFAs of TFAs (%)	79.5	83.0
	TFAs/ Biomass (mg/g/L)	734	821
	FFAs/ Biomass (mg/g/L)	584	681
	Utilized reducing Sugar (g/L)	4.2 ± 0.48	1.73 ± 0.22
	TFA yield (mg/g)[b]	110	278
	FFA yield (mg/g)[c]	88	231

[a] Biomass is DCW (dry cell weight), it was measured 24 h after plasmid induction by IPTG.
[b] TFA yield (mg TFAs /g consumed sugar).
[c] FFA yield (mg FFAs /g consumed sugar).

[0081]

[0082] *E. coli* SGJS47에서 탄소원으로서 글리세롤 원액을 사용한 경우의 TFA 효율은 글루코오스를 사용한 경우보다 약 2.8배 높았고(278 mg/g vs. 110 mg/g), FFA 효율은 글루코오스를 사용한 경우보다 글리세롤 원액을 사용한 경우에 2.7배 높았다(231 mg/g vs. 88 mg/g). 식물의 acyl-ACP TE 유전자가 형질전환된 *E. coli* 균주는 높은 농도의 FFAs를 생산(0.38-2.5 g/L)하지만, OD(예컨대, 바이오매스) 값은 풍부 배양 배지에서 매우 높았다. 또한, 다수의 논문에 보고된 OD(바이오매스)가 정확하지 않아 FFA 생산성을 비교할 수 없다(표 3)[26, 27].

표 3

Base strains	Modifications	Acyl-ACP thioesterase	Titer (g/L)	OD	Titer/OD (g/L/OD)	Media	Time (h)	Culture type	Refs
BL21(DE3)	+fadD, ACC+	TesA'+CcTE	0.38	-	-	LB/none	> 18	Batch	[20]
BL21(DE3)	+fadD, ACC+	TesA'+CcTE	2.50	~40	0.06	M9/glycerol	22	Fed-batch	[20]
BL21(DE3)	+fadE	TesA'+CcTE	0.45	-	-	LB	> 18	Batch	[27]
BL21(DE3)	+fadE+FabGZ]	TesA'+CcTE	0.65	-	-	LB	> 18	Batch	[27]
DH1	+fadD	TesA'	0.70	-	-	M9/2% glucose	N/A	Batch	[26]
DH1	+fadE	TesA'	0.12	-	-	M9/2% glucose	N/A	Batch	[26]
MG1655	+fadD	BTE	0.77	4.2	0.18	LB/0.4% glycerol	24	Batch	[16]
MG1655	+fadD	RcTE	1.50	12	0.13	LB/1.5% glucose	36	Batch	[31]
MG1655	+fadD	JcTE	2.00	10	0.20	LB/1.5% glucose	36	Batch	[32]
MG1655	ACC+,FabD+	SpTE	0.16	3.3	0.05	LB/none	24	Batch	[7]
MG1655	ACC+,FabD+	SpTE	0.24	2.0	0.11	LB/2% glycerol	24	Batch	[10]
W3110	-	OPLITE	0.37	1.3	0.28	Minimal/1% glucose	30	Batch	This study
W3110	-	OPLITE	0.40	1.1	0.36	Minimal/1% crude glycerol	24	Batch	This study
W3110	+fadE	OPLITE	0.40	3.5	1.15	Minimal/1% crude glycerol	24	Batch	This study

Abbreviations: TesA' , cytosolic form of *E. coli* thioesterase; CcTE, acyl-ACP TE from *Cinnamomum camphorum*; BTE, acyl-ACP TE from *Umbellularia californica*; SpTE, oleoyl-ACP TE from *Streptococcus pyogenes*; RcTE, acyl-ACP TE from *Ricinus communis*; JcTE, acyl-ACP TE from *Jatropha curcas*; OPSpTE, codon-opunized oleoyl-ACP TE from *Streptococcus pyogenes*; OPLITE, codon-opunized oleoyl-ACP TE from *Lactococcus lacti*

[0083]

[0084] 글리세롤이 첨가된 유가배양(fed-batch)의 M9 최소 배지에서 TesA' 및 CcTE를 발현하는 △*fadD* 균주를 이용한 조작된 *E. coli* 균주를 이용하여 FFAs를 약 2.5 g/L까지 생산하였다. 이러한 조건에서 OD 값이 약 40로 까지 생장성이 높아서, 세포단위당 FFAs 생산성은 최하(0.06 g/L/OD)였다[20]. 최근 연구는 재조합 *E. coli*에서 *JcTE*를 과발현하고 *fadD* 유전자를 결실하여 높은 농도(2.0 g/L)의 FFAs를 보고하였다. OD 값은 대략 10이고, FFA 생산은 0.20 g/L/OD로, 0.03-0.18 g/L/OD의 다른 식물 acyl-ACP TE 과발현보다 높았다(표 3). c 그러나, 상기 균주는 1.5% 글루코오스가 첨가된 LB(풍부 배지)에서 배양되기 때문에 산업 규모의 매스 생산은 비경제적이다. 운영비는 산업적 실현가능성의 관점에서 고려되어야 한다[14, 28]. 본 발명에서, *fad* 패밀리 유전자 결실되지 않은 균주 중 하나의 코돈-최적화된 박테리아 acyl-ACP TE(*OPLITE*)만이 증가된 FFAs를 나타내었다. 또한, *E. coil* SGJS47는 매우 고농도(0.36 g/L/OD)의 FFAs를 생산하였다. *OPLITE*의 FFA 생산성은 산업용 탄소원인 글리세롤 원액을 사용한 경우의 *JeTE*보다 6배 높았다(0.36 g/l/OD vs. 0.06 g/L/OD). 본 발명은 코돈-최적화된 *LITE* 유전자(*OPLITE*)가 FFA 발현 정도를 증가시키고 이는 산업용 탄소원을 이용하여 경제적으로 달성할 수 있음을 보여주었다.

[0085] *TFAs 및 FFAs의 구성*

[0086] 안정적인 바이오디젤은 고급 연료로 사용될 수 있고, 이의 개선된 품질은 생산성을 향상시키는 것만큼 중요하다. 고품질의 바이오연료는 저가(low-price) 및 알맞은 산업용 탄소원을 이용하면서 적절한 포화 지방산(saturated fatty acid; SFA)과 불포화지방산(unsaturated fatty acid; UFA)의 비에 의해 생산될 수 있다[2, 5, 19, 29]. 본 발명에서, *E. coli* SGJS47에 의해 생산된 지방산의 구성에 대한 코돈-최적화의 영향을 확인하기 위해, 글리세롤 원액을 첨가한 최소 배지에서 W3110 야생형 균주와 비교하였다. 상기 균주의 지방산(TFAs, FFAs) 구성을 표 4 및 도 6에 나타내었다.

표 4

[0087]

Fatty acid	Common name	Control W3110		SGJS47	
		TFAs (%)	FFAs (%)	TFAs (%)	FFAs (%)
Octanoic acid	C8:0	0.04 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.24 ± 0.02	3.56 ± 0.55
Decanoic acid	C10:0	0.07 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.37 ± 0.03	1.65 ± 0.21
Dodecanoic acid	C12:0	3.68 ± 0.18	1.12 ± 0.01	3.04 ± 0.23	2.29 ± 0.30
Tetradecanoic acid	C14:0	7.10 ± 0.51	3.96 ± 0.32	6.71 ± 0.40	4.59 ± 0.55
Hexadecanoic acid	C16:0	59.30 ± 4.60	62.65 ± 3.98	48.88 ± 5.33	50.62 ± 2.75
9-Hexadecenoic acid	C16:1	0.49 ± 0.08	0.41 ± 0.07	9.05 ± 0.12	6.53 ± 0.20
Octadecanoic acid	C18:0	18.92 ± 1.22	23.86 ± 1.25	23.00 ± 1.5	25.39 ± 2.20
9-Octadecenoic acid	C18:1	8.96 ± 0.88	6.67 ± 0.75	7.23 ± 0.66	4.45 ± 0.43
9,12-Octadecenoic acid	C18:2	1.44 ± 0.10	1.07 ± 0.11	1.48 ± 0.20	0.92 ± 0.06
Short-chain fatty acid (C8-C14)		10.89	5.34	10.35	12.10
UFAs		10.89	8.15	17.77	11.89

[0088] 단쇄 지방산(short-chain fatty acids, C8-C10)의 비율은 TFAs와 비교하여 FFAs가 크게 변화하였다(도 6a 및 6b). 실제로, *E. coli* SGJS47에서 야생형 균주와 비교하여 FFAs의 분획에서의 단쇄 지방산 및 중쇄(middle-chain) 지방산의 비율은 약 2.3배(12.10% vs. 5.34%) 증가하였다. 특히, 야생형 균주에서 C8 및 C10 지방산은 매우 적은 양이 생산되었지만, *E. coli* SGJS47에서는 상당히 증가하였다(도 6b). FFAs의 경우에, 형질전환 *E. coli* 대(versus) 야생형 균주의 C8:0(옥탄익산) 및 C10:0(데카노익산)의 비율은 각각 약 21배(3.56% vs. 0.17%) 및 16배(1.65% vs. 0.10%) 증가하였다. 대조적으로, 형질전환 대장균에서 중쇄 지방산(C12-C14)의 비율은 감소하였다(도 6a 및 6b). 24시간에, 야생형 균주와 *E. coli* SGJS47 사이의 가장 큰 구성의 차이는 C16의 변화이다. TFAs 및 FFAs 모두, C16:0(hexadecanoic acid; 헥사데카노익산)의 비율은 W3110 야생형 균주보다 *E. coli* SGJS47에서 더 낮았다. 대조적으로, C16:1(cis-9-hexadecenoic acid; cis-9-헥사데센산)은 *E. coli* SGJS47에서 두드러지게 증가되었다. 야생형 균주와 비교하여, *E. coli* SGJS47의 TFA(C16:0)는 10.42% 감소(59.30% vs. 48.88%)되었고, TFA(C16:1)은 8.56% 증가(0.49% vs. 9.05%)되었다. TFA(C16:1)의 비율은 18배까지 향상되었다. 또한, FFA(16:0)는 12.03% 감소(62.65% vs. 50.62%)하였고, FFA(C16:1)은 6.12% 증가(0.41% vs. 6.53%)하였다. 박테리아의 코돈-최적화 acyl-ACP TE(*OPLITE*)이 C16 지방산뿐만 아니라 다른 지방산도 생산함을 확인하였다(도 6c 및 6d). *E. coli* SGJS47에서 UFAs(C16:1, C18:1 및 C18:2)의 비율은 TFA C16:1의 증가와 함께 개선되었다. 탄소원으로서 글리세롤 원액을 포함하는 최소 배지에서 배양된 *E. coli* SGJS47로부터 생산된 지방산(SFAs 및 UFAs)의 구성은 글루코오스를 포함하는 배지에서와 유사하였고, 이는 지방산 구성이 조절될 수 있음을 의미한다. Zhang의 연구에 따르면, *JcTE*(*R. communis* 유래의 acyl-ACP TE) 과발현 및 *fadD* 유전자가 결실된 형질전환 *E. coli*로부터 생산된 FFAs는 C14 및 C16:1 함량이 증가되었다[31]. 최근 연구는 넓은 기질 특이성을 갖는 *L. latis* acyl-ACP TEs를 포함하는 박테리아 acyl-ACP TEs는 다양한 길이의 지방산을 생산할 수 있고 식물 acyl-ACP TEs는 특이적 및 우선적으로 C14 및 C16 지방산을 생산함을 보여준다[9]. 본 발명에서 코돈-최적화된 *LITE*(*OPLITE*) 유전자가 *E. coli* 내 지방산 구성을 개선시키는 것을 확인하였다.

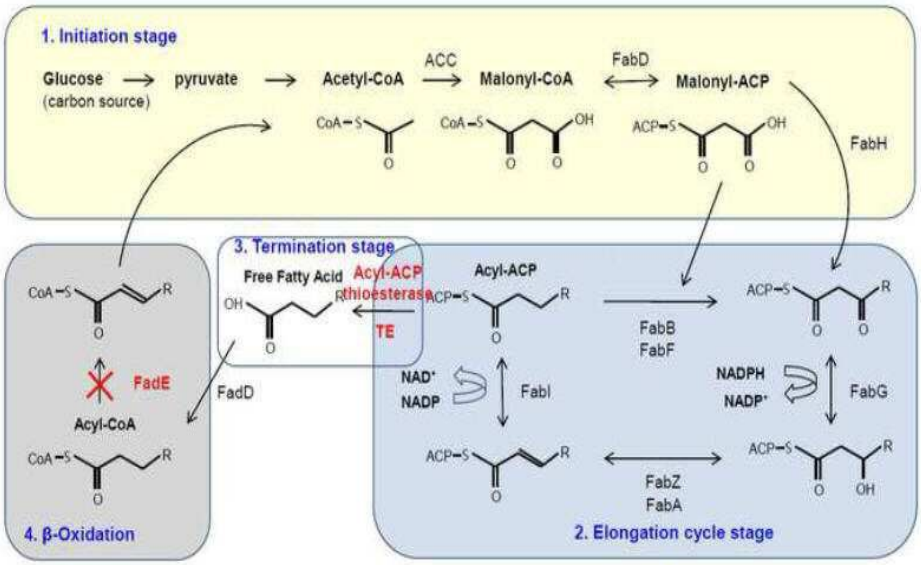
[0089] **결론**

[0090] 본 발명은 *E. coli*에서 박테리아의 acyl-ACP TE(*OPLITE*, *OPEfTE* 및 *OPBcTE*)의 코돈-최적화된 유전자가 FFAs의 생산을 개선시킴을 확인하였다. 특히, *E. coli* SGJS47(*OPLITE*)는 탄소원으로서 글리세롤 원액을 사용하는 경우에 다른 균주와 비교하여 C8, C10 및 C16:1 FFAs 생산이 증가되었다. 그러므로, *OPLITE*는 산업용 부산물(예컨대, 글리세롤 원액)을 탄소원으로 사용하여 FFA의 생산 및 조성을 최적화하는데 유용한 효소이다. 상기 효소의 과발현은 야생형 균주와 비교하여, C8 및 C10 FFA를 각각 16- 및 21배 증가시켰고, C16:1 FFA비율을 18배 증가시켰다. 이러한 결과는, 코돈-최적화된 박테리아 acyl-ACP TE 유전자를 갖는 형질전환 균주가 바이오디젤의 구성 및 생산을 유의하게 개선시킬 수 있음을 보여준다.

[0091] 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

```
OPL1TE          ------------METGIKYQQNYQVPFYESDAFKKMETRISSLLAVALQISGEQSTALGR 48
OPEfTE          --------------VGKKHTSSYEVAYYDGDFTGAMETKIPALLAVVIKVSEEQTELLGR 46
OPBcTE          SRMETPTHRHGNNDWNLNGEKRRTREFPQRDLPRAGSKRAARVPARMETRLICFPYAGGS 60
EsTE            --------------MTHKATEILTGKVMQKSVLITGCSSGIGLESALELKRQGFHVLAGC 46
                                :  .      : .     .   : :           *

OPL1TE          ---SDVWVFERYGLFWAVIEYELTIHRLPEFNEKITIETEA--TSYNKFFCYRN------ 97
OPEfTE          ---DAAYVAQ-FGLGWVITNYEIEIHRLPKVGEKVAITTQAMETSYNKYFCYRN------ 96
OPBcTE          ---AAVYRALQALLPGIEVCRHELAGRGSRLSEPAARDMETS-TLIDALLCDLDNCFDRP 116
EsTE            RKPDDVERMNSMGFTGVLIDLDSPESVDRAADEVIALTDNCLYGIFNNAG---------- 96
                     .      :       .        .*  :   :      :

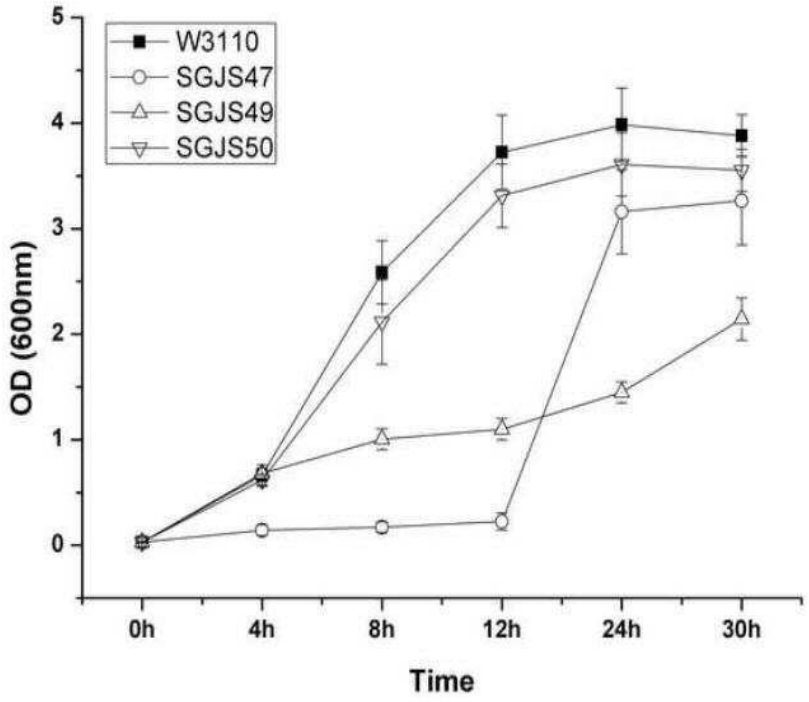
OPL1TE          FSFLDENGEVLVEIRSTWVLMETDKATRKIDRVLDEIVDPYESEK--------------- 142
OPEfTE          FWVHDEEGKECVFVKSTFVLMETDQKNRKISSVLPEIIAPFDSEK--------------- 141
OPBcTE          FALLGHSMETGAAIAVELALRLPARARPNLRHLFVSGRAAPGRERPVRQMETQALDDRAF 176
EsTE            FGMYG-PLSTISRAQMEQQFSANFFGAHQLTMRLLPAMLPHGEGR--------------- 140
                * . .   .          :        ::   :     .    :

OPL1TE          ---VSKISRPHKFRKIDEFSDAQKIVYFVRFSALDMETNG-HVNNAKYYDWAADMETVDF 198
OPEfTE          ---ITKIYR---HEKIEKVTEGNFLPYRVRF--FDIDGNQ-HVNNAIYFNWLLD--VLGY 190
OPBcTE          VDALHEMETGGTPKPVLDNSELMETALLMETPALRADFTL-IENYRPVPGRRLAVDITAF 235
EsTE            -IVMTSSVMGLISTPGRGAYAASKYALEAWSDALRMELRHSGIKVSLIEPGPIRTRFTDN 199
                   : .                          :  :      :

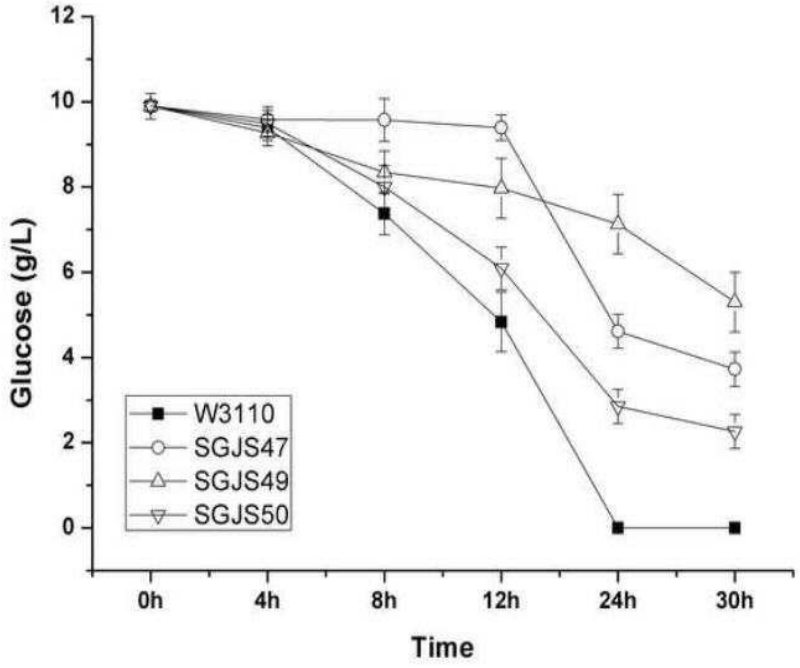
OPL1TE          EFRK-SHQPKHVFIKYNHEVLYG---EEIN---ALMETSWEDEVSHHNFN---DGST--Q 246
OPEfTE          DFLT-THQPKKILVKFDKEVEYG---QEVESHYEIVEQENQLKTRHEIRI---DGQTYCE 243
OPBcTE          AGRADEHAPVDAVAGWGAETTGHFDFHVIEGDHFFMETRSEMETRTMETAGIIAARLRRT 295
EsTE            VNQTQSDKPVEN-PGIAARFTLGPEAVVDKVRHAFISEKPKMRYPVTLVTWAVMVLKRLL 258
                      . * .       .          :    ::.   : .

OPL1TE          IEIHWGKIY----- 255
OPEfTE          ANIDWINSTOP--- 254
OPBcTE          EHVAWSALQASTOP 309
EsTE            PGRVMDKILQG--- 269
```

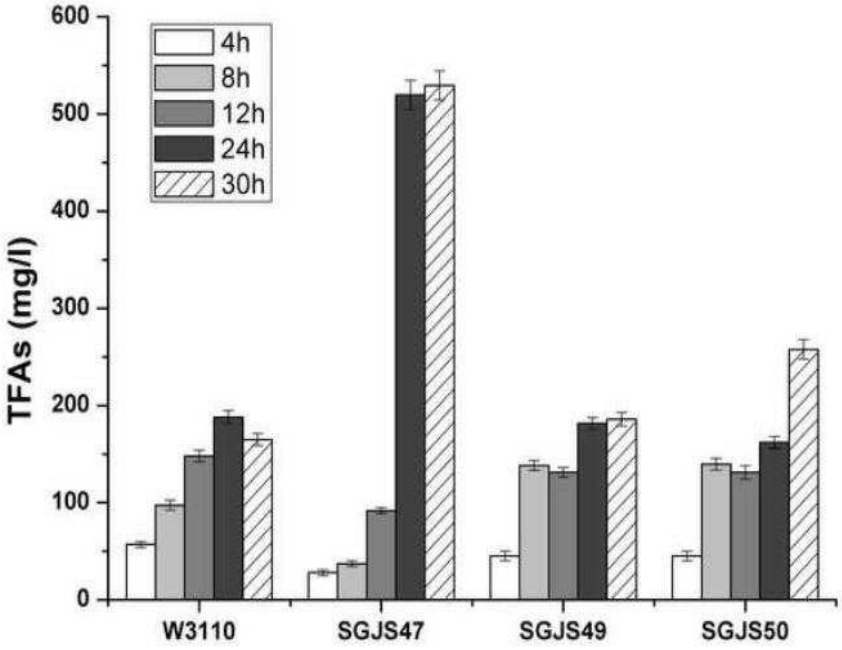
도면3a



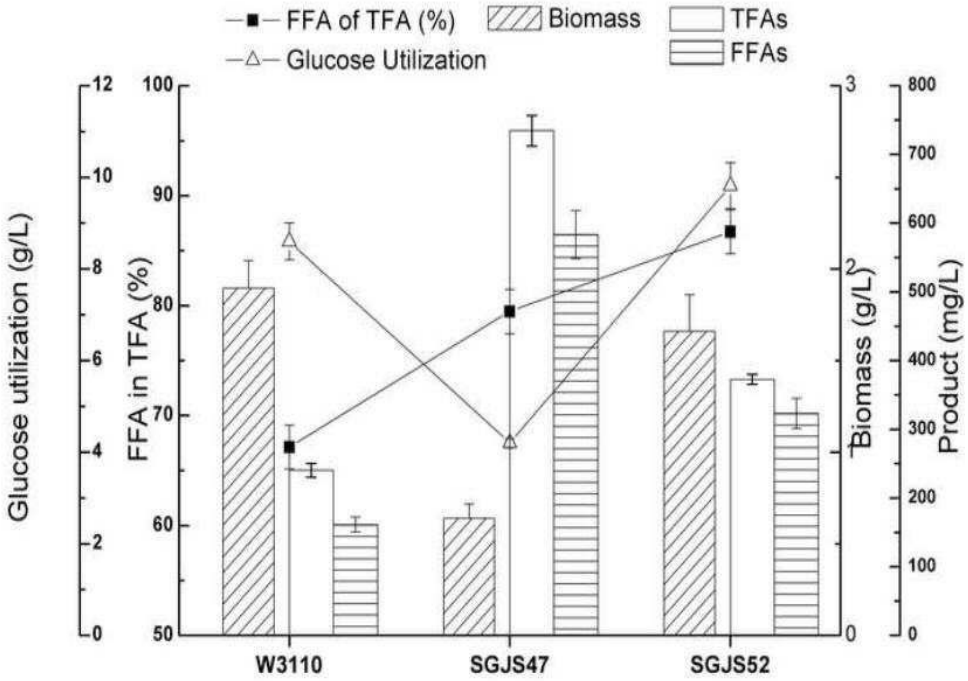
도면3b


Glucose (g/L)
12
10
8
6
4
2
0
W3110
SGJS47
SGJS49
SGJS50
0h
4h
8h
12h
24h
30h
Time

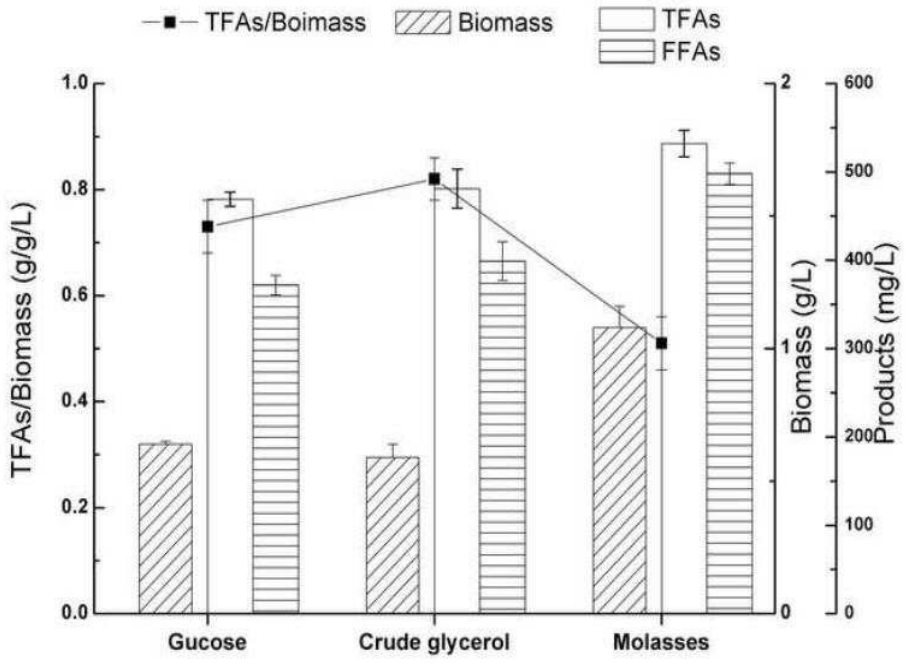
도면3c


TFAs (mg/l)
600
500
400
300
200
100
0
4h
8h
12h
24h
30h
W3110
SGJS47
SGJS49
SGJS50

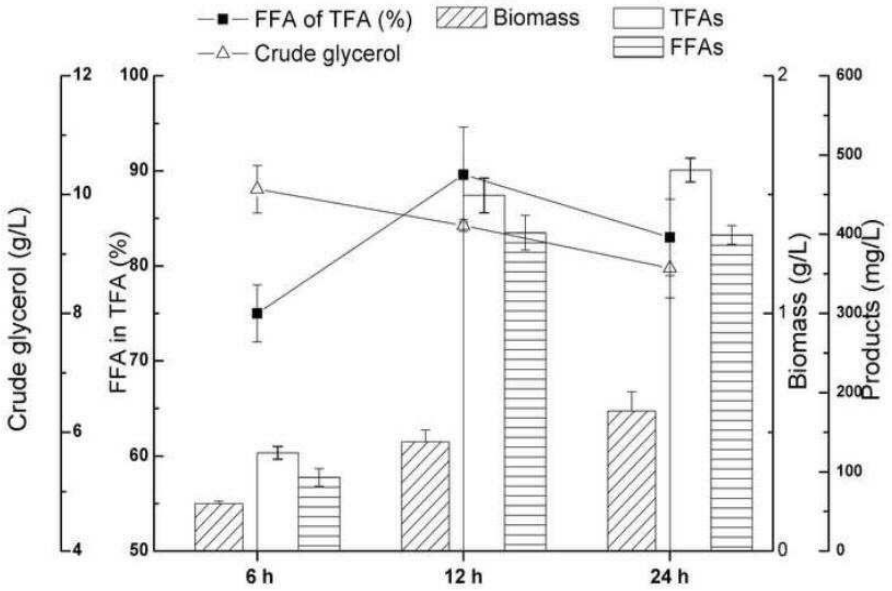
도면4


FFA of TFA (%)
Biomass
TFAs
FFAs
Glucose Utilization
Glucose utilization (g/L)
FFA in TFA (%)
Biomass (g/L)
Product (mg/L)
W3110
SGJS47
SGJS52

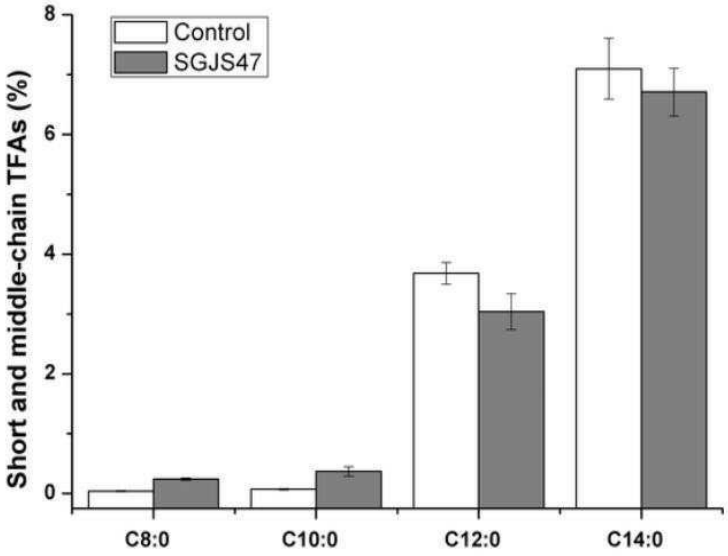
도면5a


TFAs/Boimass
Biomass
TFAs
FFAs
TFAs/Biomass (g/g/L)
Biomass (g/L)
Products (mg/L)
Gucose
Crude glycerol
Molasses

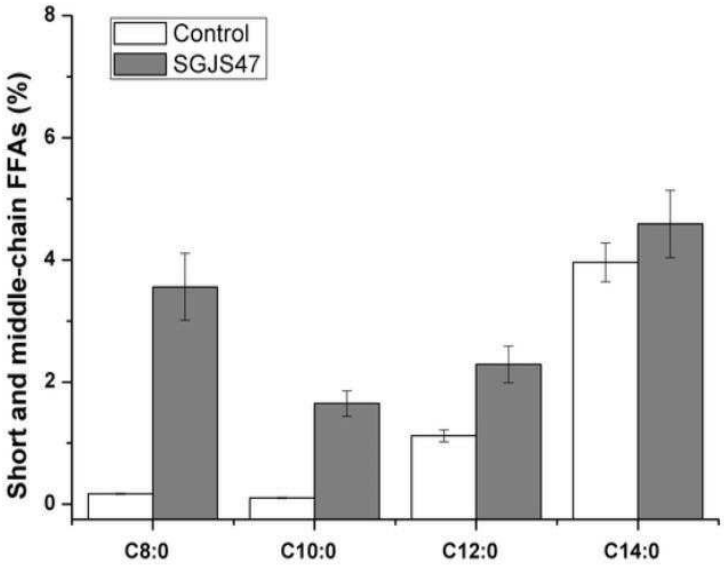
도면5b


FFA of TFA (%)
Crude glycerol
Biomass
TFAs
FFAs
Crude glycerol (g/L)
FFA in TFA (%)
Biomass (g/L)
Products (mg/L)
6 h
12 h
24 h

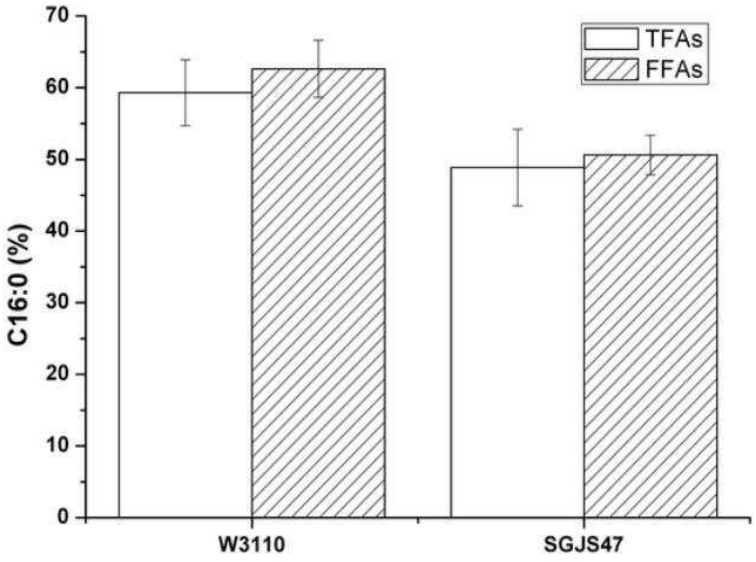
도면6a


Control
SGJS47
Short and middle-chain TFAs (%)
C8:0
C10:0
C12:0
C14:0

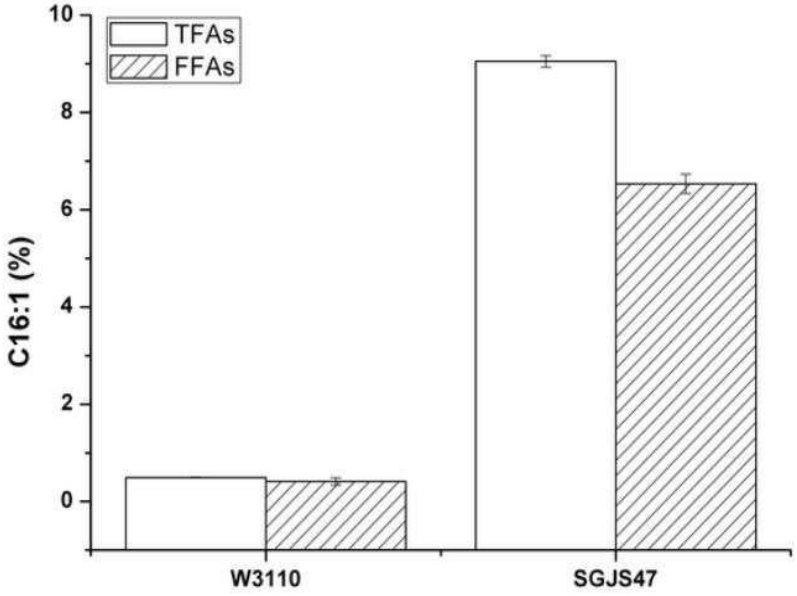
도면6b


Control
SGJS47
Short and middle-chain FFAs (%)
0
2
4
6
8
C8:0
C10:0
C12:0
C14:0

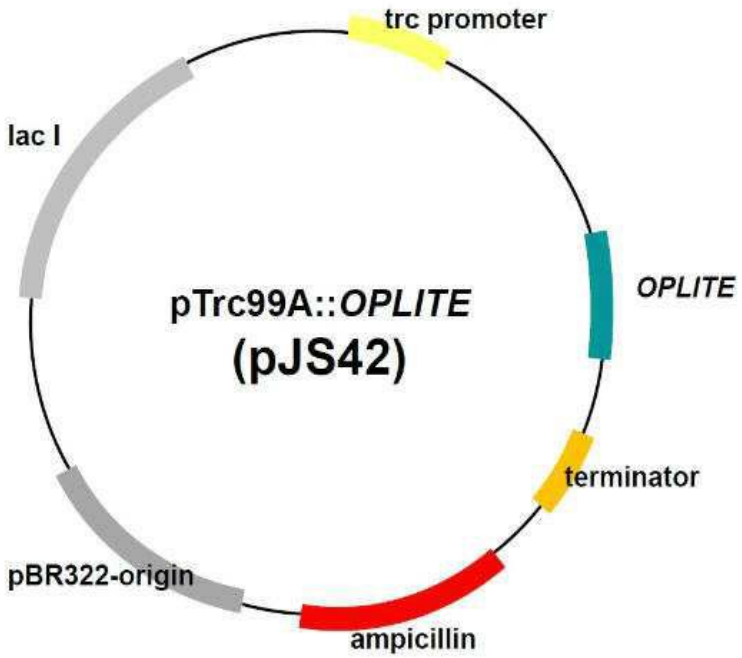
도면6c


TFAs
FFAs
C16:0 (%)
0
10
20
30
40
50
60
70
W3110
SGJS47

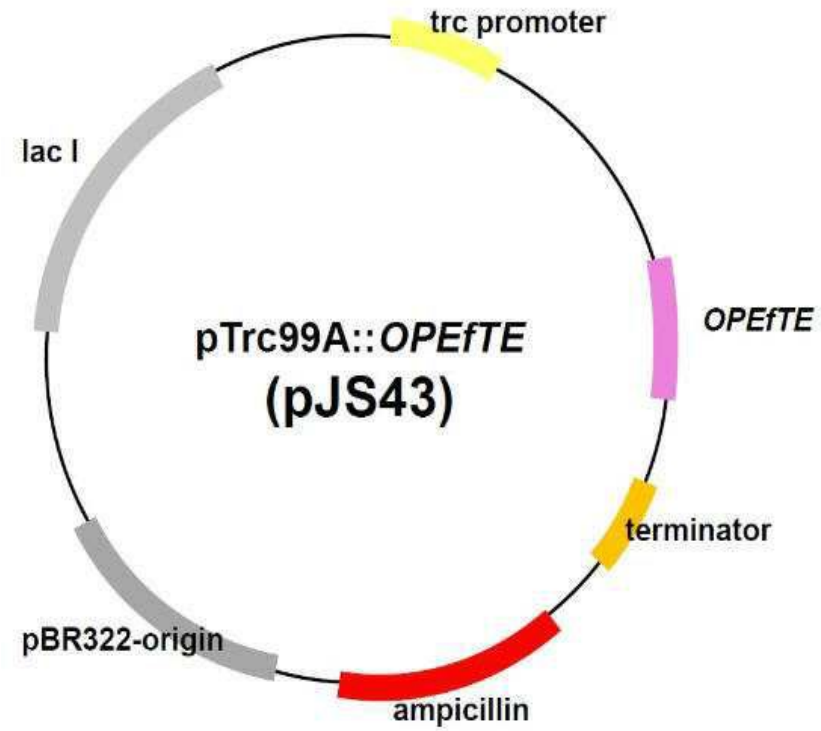
도면6d


TFAs
FFAs
C16:1 (%)
10
8
6
4
2
0
W3110
SGJS47

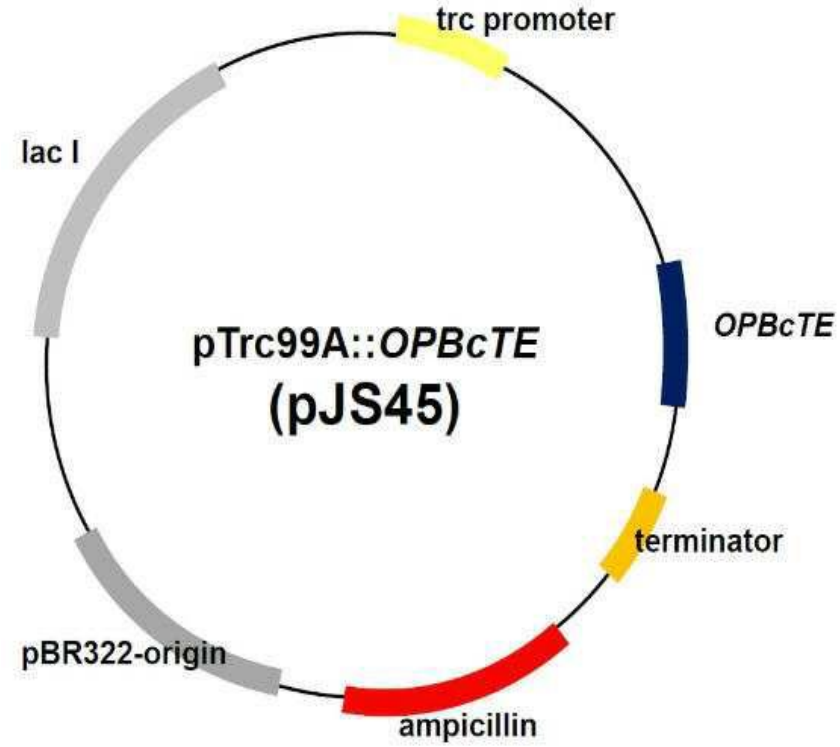
도면7a


trc promoter
lac I
pTrc99A::OPLITE
(pJS42)
OPLITE
terminator
pBR322-origin
ampicillin

도면7b



도면7c



서 열 목 록

<110> SOGANG UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION

<120> Method for Preparing Fatty acid Using Escherichia coli Comprising Acyl-acyl carrier protein Thioesterase from Heterologous Bacteria

<130> PN130730

<160> 2

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 732

<212> DNA

<213> OPLITE

<400> 1

atgggtataa agtatcaaca gaattatcag gtcccgttct atgagagcga tgcctttaaa 60

aaaatgcgaa tttcgagcct gctggctgtc gccctgcaga tttctgggga acagagcacg 120

gcactgggcc gctccgacgt atgggtattc gagcgctatg gactcttctg ggccgttatt 180

gagtatgaac tgaccattca tcgtctgcca gagtttaacg aaaaaataac aatcgagact 240

gaagcaacaa gttataacaa attttttgc taccgtaact tctcattcct ggatgagaat 300

ggtgaggttc tggttgagat ccggtccacc tgggttttga tggacaaggc cacgcgcaag 360

attgacaggg tattggatga gatagttgac ccttacgagt ctgaaaaagt gtcaaaaatc 420

agcagaccgc acaaattccg gaaaatcgac gaatttagtg atgcgcaaaa gatagtttat 480

ccggtccgtt tttcagcgct ggatatgaac ggccatgtga acaatgcgaa atattacgat 540

tgggcagctg atatggtgga ttttgagttt cgtaaatcgc accagcccaa acatgtgttt 600

atcaagtata atcatgaagt cctgtacggt gaggagatta atgctctgat gtcttgggaa 660

gacgaggtga gtcatcacaa ttttaatgat ggaagcaccc agattgaaat ccattggggc 720

aaaatttact aa 732

<210> 2

<211> 243

<212> PRT

<213> OPLITE

<400> 2

Met Gly Ile Lys Tyr Gln Gln Asn Tyr Gln Val Pro Phe Tyr Glu Ser
1 5 10 15

Asp Ala Phe Lys Lys Met Arg Ile Ser Ser Leu Leu Ala Val Ala Leu

20 25 30

Gln Ile Ser Gly Glu Gln Ser Thr Ala Leu Gly Arg Ser Asp Val Trp
35 40 45
Val Phe Glu Arg Tyr Gly Leu Phe Trp Ala Val Ile Glu Tyr Glu Leu
50 55 60
Thr Ile His Arg Leu Pro Glu Phe Asn Glu Lys Ile Thr Ile Glu Thr
65 70 75 80
Glu Ala Thr Ser Tyr Asn Lys Phe Phe Cys Tyr Arg Asn Phe Ser Phe
85 90 95
Leu Asp Glu Asn Gly Glu Val Leu Val Glu Ile Arg Ser Thr Trp Val

100 105 110
Leu Met Asp Lys Ala Thr Arg Lys Ile Asp Arg Val Leu Asp Glu Ile
115 120 125
Val Asp Pro Tyr Glu Ser Glu Lys Val Ser Lys Ile Ser Arg Pro His
130 135 140
Lys Phe Arg Lys Ile Asp Glu Phe Ser Asp Ala Gln Lys Ile Val Tyr
145 150 155 160
Pro Val Arg Phe Ser Ala Leu Asp Met Asn Gly His Val Asn Asn Ala
165 170 175

Lys Tyr Tyr Asp Trp Ala Ala Asp Met Val Asp Phe Glu Phe Arg Lys
180 185 190
Ser His Gln Pro Lys His Val Phe Ile Lys Tyr Asn His Glu Val Leu
195 200 205
Tyr Gly Glu Glu Ile Asn Ala Leu Met Ser Trp Glu Asp Glu Val Ser
210 215 220
His His Asn Phe Asn Asp Gly Ser Thr Gln Ile Glu Ile His Trp Gly
225 230 235 240
Lys Ile Tyr