(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0128776
(43) 공개일자 2012년11월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/21 (2006.01) *C12N 15/74* (2006.01)
C12P 7/18 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0046626
(22) 출원일자 2011년05월18일
심사청구일자 2011년05월18일

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
이진원
서울특별시 송파구 양재대로 1218, 올림픽선수 기자촌아파트 201-1601호 (방이동)
엄영순
서울특별시 성북구 화랑로14길 5, 사택 B-301 (하월곡동, 한국과학기술연구원)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양부현

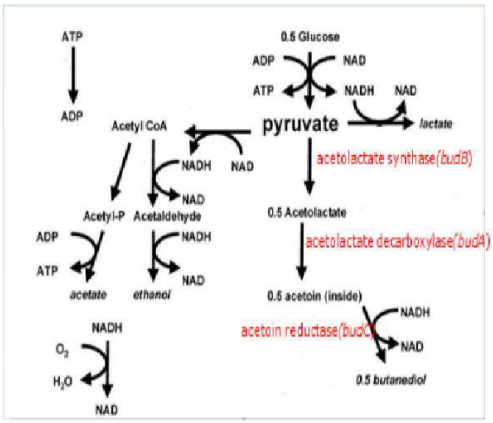
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **2,3-부탄다이올 생산을 위한 크렙시엘라 뉴모니아 균주 및 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 다음의 뉴클레오티드 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 최소 1종의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현벡터로 형질전환 또는 공동 형질전환된(cotransformed) 2,3-부탄다이올 과발현용 *크렙시엘라 뉴모니아* (*Klebsiella pneumoniae*) 균주를 제공한다: (a) 아세토락테이트 디카복실실레이즈(acetolactate decarboxylase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열; (b) 아세토락테이트 신타제(acetolactate synthase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열; 및 (c) 아세토인 리덕타제(acetoin reductase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열. 본 발명의 *크렙시엘라 뉴모니아* 균주는 야생종 크렙시엘라 뉴모니아 2와 비교하였을 때, 2,3-부탄다이올 대사경로에 필수적인 일부 유전자를 과발현 시키는 과정을 통해 포도당의 소모량에 따른 2,3-부탄다이올의 생산량이 20% 증가하였다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

이수진

서울특별시 마포구 백범로25길 63, 삼성래미안아파트 105동 1504호 (염리동)

김보림

서울특별시 금천구 금하로23라길 31, 507호 (시흥동, 현대아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	10035578
부처명	지식경제부
연구사업명	산업원천기술개발사업
연구과제명	2,3-부탄다이올 생산용 균주 발굴 및 대사회로 최적화 기술 개발
주관기관	서강대학교 산학협력단
연구기간	2010.04.01 ~ 2011.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

다음의 뉴클레오티드 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 최소 1종의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현벡터로 형질전환 또는 공동 형질전환된(cotransformed) 2,3-부탄다이올 과발현용 *크렙시엘라 뉴모니아*(*Klebsiella pneumoniae*) 균주:

(a) 아세토락테이트 디카복실실레이즈(acetolactate decarboxylase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열;

(b) 아세토락테이트 신타제(acetolactate synthase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열; 및

(c) 아세토인 리덕타제(acetoin reductase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 2,3-부탄다이올 과발현용 *크렙시엘라 뉴모니아*(*Klebsiella pneumoniae*) 균주는 아세토락테이트 디카복실실레이즈를 코딩하는 뉴클레오티드 서열, 아세토락테이트 신타제를 코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 아세토인 리덕타제를 코딩하는 뉴클레오티드 서열로 공동 형질전환된 것을 특징으로 하는 2,3-부탄다이올 과발현용 *크렙시엘라 뉴모니아*(*Klebsiella pneumoniae*) 균주.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 아세토락테이트 디카복실실레이즈를 코딩하는 뉴클레오티드 서열, 아세토락테이트 신타제를 코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 아세토인 리덕타제를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 *크렙시엘라 뉴모니아*(*Klebsiella pneumoniae*)로부터 유래한 것을 특징으로 하는 2,3-부탄다이올 과발현용 *크렙시엘라 뉴모니아*(*Klebsiella pneumoniae*) 균주.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 아세토락테이트 디카복실실레이즈는 서열목록 제 1 서열의 아미노산 서열을 포함하고, 상기 아세토락테이트 신타제는 서열목록 제 2 서열의 아미노산 서열을 포함하며, 상기 아세토인 리덕타제는 서열목록 제 3 서열의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 2,3-부탄다이올 과발현용 *크렙시엘라 뉴모니아*(*Klebsiella pneumoniae*) 균주.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 아세토락테이트 디카복실실레이즈를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열목록 제 4 서열의 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 상기 아세토락테이트 신타제를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열목록 제 5 서열의 뉴클레오티드 서열을 포함하며, 상기 아세토인 리덕타제를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열목록 제 6 서열의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 2,3-부탄다이올 과발현용 *크렙시엘라 뉴모니아*(*Klebsiella pneumoniae*) 균주.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 발현벡터는 도 2의 유전자 지도를 갖는 대장균-크렙시엘라 셔틀벡터 pUC18K이고, 상기 뉴클레오티드 서열은 pUC18K의 MCS(multiple cloning site)에 삽입되는 것을 특징으로 하는 2,3-부탄다이올 과발현용 *크렙시엘라 뉴모니아*(*Klebsiella pneumoniae*) 균주.

청구항 7

다음 단계를 포함하는 2,3-부탄다이올 과발현용 *크렙시엘라 뉴모니아*(*Klebsiella pneumoniae*) 균주의 제조방법:

(a) (i) 아세토락테이트 디카복실실레이즈를 코딩하는 뉴클레오티드 서열; (ii) 아세토락테이트 신타제를 코딩하는 뉴클레오티드 서열; 및 (iii) 아세토인 리덕타제를 코딩하는 뉴클레오티드 서열서열을 발현벡터에 삽입시키는 단계; 및

(b) 상기 뉴클레오티드 서열이 삽입된 발현벡터로 *크렙시엘라 뉴모니아* 균주를 형질전환시키는 단계.

청구항 8

제 7 항에 있어서, 상기 *크렙시엘라 뉴모니아* 균주를 발현시키는 단계 (b)는 전기충격 방법으로 수행되는 것을 특징으로 하는 2,3-부탄다이올 과발현용 *크렙시엘라 뉴모니아*(*Klebsiella pneumoniae*) 균주의 제조방법.

청구항 9

다음 단계를 포함하는 2,3-부탄다이올 생합성 방법:

(a) 제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항의 *크렙시엘라 뉴모니아* 균주를 배양하여 2,3-부탄다이올을 생합성하는 단계; 및

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

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 2,3-부탄다이올 생산을 위한 *크렙시엘라 뉴모니아 균주* 및 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

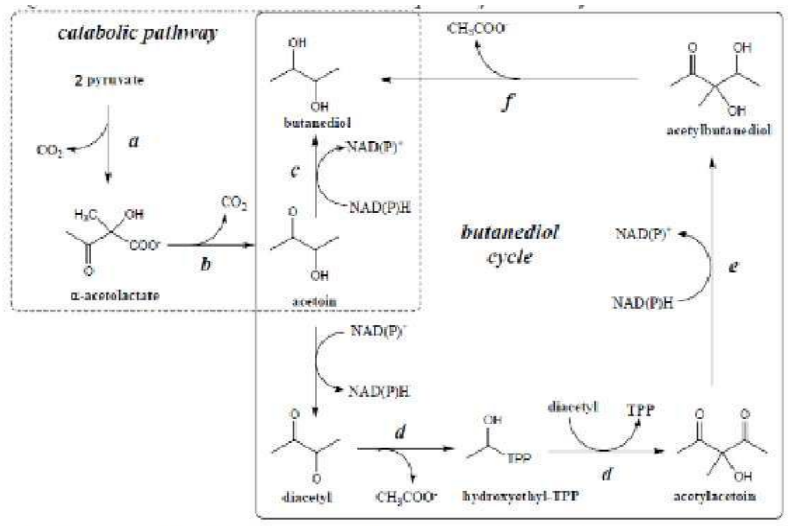
[0002] 화석연료들의 사용은 지구온난화 가스 및 폐기물을 대량생산하여 인류에게 심각한 환경적인 위기를 초래하고 있다. 화석연료로부터 생산되어지는 화학공업을 대체할 수 있는, 즉 인류에게 유해한 폐기물의 생산 및 에너지 소비를 최소화할 수 있는 바이오매스를 원료로 사용하는 환경 친화적인 새로운 생물 공정의 개발이 필요하다. 바이오에너지로 대표되어지는 바이오에탄올, 바이오디젤, 바이오가스, 부탄올에 대한 관심이 증가하고 있지만, 언급된 종류의 바이오에너지 모두 전력생산이나 수송용 연료로 사용될 수 있으나, 실적용 및 생산 방법의 몇몇 단점으로 인해 새로운 신재생에너지 자원인 탄화수소(hydrocarbon) 형태의 화합물에 대한 관심이 증가되고 있다. 이에 따라 다양한 산업적 가치를 지닌 플랫폼용 화합물인 2,3-부탄다이올을 대사산물로서 생성할 수 있는 재조합 균주에 대한 관심도 증대되고 있다.

[0003] *크렙시엘라 뉴모니아*(*Klebsiella pneumoniae*)는 폐렴간균으로 그람음성이며 운동성이 없고 유당 발효를 하는 조건적 혐기성 균주이다. 뉴모니아는 장내세균과(Enterobacteriaceae)의 크렙시엘라(Klebsiella) 속으로 크렙시엘라 옥시토카와 유사하지만, 인돌음성(indole-negative)과 멜레치토스(melezitose), 3-하이드록시부티레이트(hydroxybutyrate)배지에서 생장할 수 있다는 특성으로 구분된다. 주로 흙에서 발견되며 30% 정도는 혐기 조건에서 질소 고정 능력을 갖고 있다. 크렙시엘라 뉴모니아는 폐렴(Klebsiella pneumonia) 질병을 일으킨다.

[0004] 2,3-부탄다이올은 용매, 부동액(anti-freeze solution), 가소제(plasticizer)의 합성에 이용되는 화학물질이다. 화학적인 전환을 통해 합성고무 제조에 사용되는 부타디엔(1,3-butadiene), 액체연료 첨가제(liquid fuel additive)인 MEK(methyl ethyl ketone), 식품 첨가제 향료로써 사용되는 아세토인(acetoin)과 디아세틸(diacetyl), 폴리우레탄의 전구체 등의 생산이 가능하다.

[0005] 2,3-부탄다이올은 생물학적 방법으로 생산이 가능하며, 2차 세계대전 당시 상업적 규모로 개발되어졌다가, 최근 산업바이오 기술 개발과 함께 다시 관심을 받고 있다. 2,3-부탄다이올은 혼합산 발효(mixed acid

fermentation) 대사경로를 통해 생산되며 균주와 탄소원에 따라서 다양한 생산 양산을 보여준다. 글루코스를 탄소원으로 이용하는 경우, 피루베이트(pyruvate)와 아세토인(acetoin)을 거쳐 2,3-부탄다이올이 생산되거나 디아세틸(diacetyl)을 거치는 부탄다이올 사이클을 통해 2,3-부탄다이올이 생산되는 선택적 경로를 갖고 있다.



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

[0006]

[0007] 미생물의 2,3-부탄다이올 생산을 위한 균주의 발굴, 재조한 균주의 개량, 효율적인 전환기술에 해당하는 시도와 노력은 끊임없이 있어왔다. 특히, 크렙시엘라 뉴모니아는 2,3-부탄다이올 생산량이 높다고 알려져있는 균주로 많은 연구가 진행되고 있다. 본 발명에서는 기존에 유전자 염기서열이 알려지지 않은 뉴모니아 균주(KTCT2242)를 선택하여, 2,3-부탄다이올 생산에 관여하는 효소 및 이를 코딩하는 유전자를 규명하고 이를 과발현시키고자 하였다.

[0008] 본 발명에서는 2,3-부탄다이올 생산 능력이 증진된 재조합 균을 개발하기 위해서 생물학적 대사 네트워크의 이해와 유전자 삽입의 유전자 조작을 통해 재조합 균주를 개발하여 본 발명이 완성되었다.

[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 유전자 조작을 통해 2,3-부탄다이올 생합성 대사산물을 안정적이고, 효과적으로 생산하는 균주의 개발을 위하여 예의 연구 노력하였고, 그 결과 *크렙시엘라 뉴모니아*의 *budA*,*budB* 및 *budC* 유전자군으로부터 선택된 1종 이상의 유전자와 함께 *크렙시엘라 뉴모니아* 균주를 형질전환 또는 공동형질전환시키는 경우 효과적으로 2,3-부탄다이올 생합성 경로가 과발현됨을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0011] 따라서, 본 발명은 2,3-부탄다이올 생성능이 우수한 *크렙시엘라 뉴모니아*균주를 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 2,3-부탄다이올 생성능이 우수한 *크렙시엘라 뉴모니아*균주의 제조 방법을 제공한다.

[0013] 마지막으로, 본 발명은 상기 2,3-부탄다이올 생성능이 우수한 *크렙시엘라 뉴모니아*균주를 이용하여 2,3-부탄다이올을 생산하는 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0014] 본 발명자들은 유전자 조작을 통해 2,3-부탄다이올 생합성 대사산물을 안정적이고, 효과적으로 생산하는 균주의 개발을 위하여 예의 연구 노력하였고, 그 결과 *크렙시엘라 뉴모니아*의 *budA*,*budB* 및 *budC* 유전자군으로부터 선

택된 1종 이상의 유전자와 함께 *크렙시엘라 뉴모니아* 균주를 형질전환 또는 공동형질전환시키는 경우 효과적으로 2,3-부탄다이올 생합성 경로가 과발현됨을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0015] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 뉴클레오티드 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 최소 1종의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현벡터로 형질전환 또는 공동 형질전환된(cotransformed) 2,3-부탄다이올 과발현용 *크렙시엘라 뉴모니아*(*Klebsiella pneumoniae*) 균주를 제공한다: (a) 아세토락테이트 디카복실실레이즈(acetolactate decarboxylase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열; (b) 아세토락테이트 신타제(acetolactate synthase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열; 및 (c) 아세토인 리덕타제(acetoin reductase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열.

[0016] 본 명세서에서의 용어 '*크렙시엘라 뉴모니아*(*Klebsiella pneumoniae*)'는 폐렴간균으로 그람음성이며 운동성이 없고 유당 발효를 하는 조건적 혐기성 균주이다. 뉴모니아는 장내세균과(Enterobacteriaceae)의 크렙시엘라(Klebsiella) 속으로 크렙시엘라 옥시토카와 유사하지만, 인돌음성(indole-negative)과 멜레치토스(melezitose), 3-하이드록시부티레이트 (hydroxybutyrate)배지에서 생장할 수 있다는 특성으로 구분된다. 주로 흙에서 발견되며 30% 정도는 혐기 조건에서 질소 고정 능력을 갖고 있다. 크렙시엘라 뉴모니아는 폐렴(Klebsiella pneumonia) 질병을 일으킨다.

[0017] 본 명세서에서의 용어 '아세토락테이트 디카복실실레이즈(acetolactate decarboxylase)'는 2,3-부탄다이올의 전구체인 아세토인을 생산하는 효소로서, *budA* 유전자가 이를 코딩하는 유전자이다.

[0018] 본 발명의 발현벡터에서 발현되는 상기 아세토락테이트 디카복실실레이즈는 *크렙시엘라 뉴모니아*(*Klebsiella pneumoniae*)으로부터 유래한 것을 사용하는 것이 바람직하다. 더욱 바람직하게는 서열목록 제1서열로 표시되는 아세토락테이트 디카복실실레이즈를 발현하도록 할 수 있으며, 상기 아세토락테이트 디카복실실레이즈를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 바람직하게는 서열목록 제4서열로 표시될 수 있다.

[0019] 본 명세서에서의 용어 '아세토락테이트 신타제(acetolactate synthase)'는 아세토락테이트를 합성하는 효소로서, *budB* 유전자가 이를 코딩하는 유전자이다.

[0020] 본 발명의 발현벡터에서 발현되는 상기 아세토락테이트 신타제는 *크렙시엘라 뉴모니아*(*Klebsiella pneumoniae*)으로부터 유래한 것을 사용하는 것이 바람직하다. 더욱 바람직하게는 서열목록 제2서열로 표시되는 아세토락테이트 신타제를 발현하도록 할 수 있으며, 상기 아세토락테이트 신타제를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 바람직하게는 서열목록 제5서열로 표시될 수 있다.

[0021] 본 명세서에서의 용어 '아세토인 리덕타제(acetoin reductase)'는 아세토인을 환원시키는 효소로서, *budC* 유전자가 이를 코딩하는 유전자이다.

[0022] 본 발명의 발현벡터에서 발현되는 상기 아세토인 리덕타제는 *크렙시엘라 뉴모니아*(*Klebsiella pneumoniae*)으로부터 유래한 것을 사용하는 것이 바람직하다. 더욱 바람직하게는 서열목록 제3서열로 표시되는 아세토인 리덕타제를 발현하도록 할 수 있으며, 상기 아세토인 리덕타제를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 바람직하게는 서열목록 제6서열로 표시될 수 있다.

[0023] 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 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 80%의 상동성, 보다 바람직하게는 최소 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 최소 95%의 상동성을 나타내는 뉴클레오티드 서열을 의미한다. 서열비교를 위한 얼라인먼트 방법은 당업계에 공지되어 있다. 얼라인먼트에 대한 다양한 방법 및 알고리즘은 Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482(1981); Needleman and Wunsch, *J. Mol. 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.

[0024] 상기 유전자들은 발현벡터 내부에 도입되어 *크렙시엘라 뉴모니아*에서 발현되게 된다. 본 명세서에 있어서, 용어 "발현벡터"는 발현벡터의 전사에 제공되는 추가단편에 작동가능하게 연결된 관심의 폴리펩티드를 암호화하는 단편으로 구성되는 선형 또는 원형의 DNA 분자이다. 그와 같은 추가단편은 프로모터 및 종료암호 서열을 포함한다. 발현벡터는 하나 이상의 복제 개시점, 하나 이상의 선택마커, 폴리아데닐화 신호 등을 또한 포함한다. 발현벡터는 일반적으로 플라스미드 또는 바이러스 DNA로부터 유도되거나, 또는 둘 다의 요소를 함유한다.

[0025] 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.

[0026] 본 발명의 상기 유전자를 인코딩하는 핵산 분자는 원핵세포에서 작동하는 프로모터에 작동적으로 연결(operatively linked)된다. 본 명세서에서, 용어 "작동적으로 결합된"은 핵산 발현 조절 서열(예: 프로모터, 시그널 서열, 또는 전사조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 해독을 조절하게 된다.

[0027] 본 발명의 벡터는 전형적으로 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 원핵세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터(예컨대, tac 프로모터, lac 프로모터, lacUV5 프로모터, lpp 프로모터, pL^{λ}프로모터, pR^{λ}프로모터, rac5 프로모터, amp 프로모터, recA 프로모터, SP6 프로머터, 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 (pL^{λ}프로모터, Herskowitz, I. and Hagen, D., Ann. Rev. Genet., 14:399-445(1980))가 조절 부위로서 이용될 수 있다.

[0028] 한편, 본 발명에 이용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드(예: pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHC79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, pET28a, pGEX 시리즈, pET 시리즈 및 pUC18K 등), 파지(예: λgt4?λB, λ-Charon, λΔz1 및 M13 등) 또는 바이러스(예: SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있으나, 바람직하게는 2,3-부탄다이올 생합성에 이용될 *크렙시엘라 뉴모니아*를 위한 특정 유전자를 미생물 생체 내로 운반하여 외부로부터 삽입된 유전자의 발현을 효과적으로 조절할 수 있는 pUC18K를 사용한다.

[0029] pUC18K 벡터는 pET28a의 카나마이신 저항성 유전자를 pUC18의 NDE1 제한효소 site에 삽입하여서 pUC18K를 제작한 것으로서, 크렙시엘라 종이 엠피실린에 대한 내성을 가지고 있어서 카나마이신이라는 새로운 항생제 내성 유전자를 벡터에 도입함으로써 유전자 조작을 가능하게 하기 위함이다.

[0030] 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.

[0031] 본 발명의 발현 벡터는 프로모터서열, 발현 대상 유전자(구조 유전자)의 뉴클레오티드 서열 및 터미네이터 서열을 포함하며, 상기서열들이 5'-3' 순서대로 연결되는 것이 바람직하다. 본 발명에서는 *budA, budB* 및 *budC*로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 서열이 5'-3' 순서대로 연결되어 제공되었다.

[0032] 본 발명의 발현벡터에는 상기 유전자들이 효소의 과발현 기능을 포함하여 최소한의 길이를 가지도록 RBS(ribosomal bindingsite) 및 효소발현에 꼭 필요한 부분을 포함하는 염기서열만을 서열로 정하여 삽입시키는 것이 숙주세포의 대사부담(metabolic burden)을 줄이는 측면에서 바람직하다.

[0033] 상기 유전자가 포함된 발현벡터는 이후 *크렙시엘라 뉴모니아* 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 있으나, 형질전환체의 안정적 제조와 효율을 높이기 위해서는 전기 충격에 의한 형질전환 방법을 사용하는 것이 바람직하다.

[0034] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 2,3-부탄다이올 과발현용 *크렙시엘라 뉴모니아* (*Klebsiella pneumoniae*) 균주의 제조방법을 제공한다: (a) (i) 아세토락테이트 디카복실실레이즈를 코딩하는 뉴클레오티드 서열; (ii) 아세토락테이트 신타제를 코딩하는 뉴클레오티드 서열; 및 (iii) 아세토인 리덕타제를 코딩하는 뉴클레오티드 서열서열을 발현벡터에 삽입시키는 단계; 및 (b) 상기 뉴클레오티드 서열이 삽입된 발현벡터로 *크렙시엘라 뉴모니아* 균주를 형질전환시키는 단계.

[0035] 본 발명의 2,3-부탄다이올 생합성 경로의 과발현용 형질전환 *크렙시엘라 뉴모니아* 균주의 제조방법은 상술한 *크렙시엘라 뉴모니아* 균주를 생산하는 방법에 관한 것이므로 상술한 내용과 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.

[0036] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 2,3-부탄다이올 생합성 방법을 제공한다: (a) 제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항의 *크렙시엘라 뉴모니아* 균주를 배양하여 2,3-부탄다이올을 생합성하는 단계; 및 (b) 상기 단계 (a)의 생합성된 2,3-부탄다이올을 수득하는 단계.

[0037] 본 발명의 2,3-부탄다이올 과발현용 형질전환 *크렙시엘라 뉴모니아* 균주의 배양은 당업계에 공지된 통상의 균주 배양 방법에 의해 배양될 수 있다.

[0038] 바람직하게는, 단계 (a)는 발현 유도제인 IPTG의 존재 하에서 실시된다.

[0039] 상기 형질전환 *크렙시엘라 뉴모니아* 균주 내에서 생합성된 2,3-부탄다이올을 분리하는 단계는 당업계에 공지된 통상의 분리 또는 정제 방법에 따라 실시될 수 있다(참조: B. Aurousseau et al., *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 57(3):1558-9331(1980); Frank C. Magne et al., *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 34(3):127-129(1957)).

발명의 효과

[0040] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0041] (a) 본 발명은 다음의 뉴클레오티드 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 최소 1종의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현벡터로 형질전환 또는 공동 형질전환된(cotransformed) 2,3-부탄다이올 과발현용 *크렙시엘라 뉴모니아* (*Klebsiella pneumoniae*) 균주를 제공한다: (a) 아세토락테이트 디카복실실레이즈(acetolactate decarboxylase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열; (b) 아세토락테이트 신타제(acetolactate synthase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열; 및 (c) 아세토인 리덕타제(acetoin reductase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열.

[0042] (b) 본 발명의 *크렙시엘라 뉴모니아* 균주는 야생종 크렙시엘라 뉴모니아 2와 비교하였을 때, 2,3-부탄다이올 대사경로에 필수적인 일부 유전자를 과발현 시키는 과정을 통해 포도당의 소모량에 따른 2,3-부탄다이올의 생산량이 20% 증가하였다.

도면의 간단한 설명

[0043] 도 1은 *크렙시엘라 뉴모니아* 생체 내에서 포도당에서부터 2,3-부탄다이올까지의 부탄다이올 생합성 경로를 보여주는 도식이다.

도 2는 발현벡터인 pUC18을 크렙시엘라 셔틀 벡터로 사용하기 위해 카나마이신 저항성(Kanamycin resistance) 유전자를 삽입한 구조의 도식화이다. 이를 pUC18K라 명명하였다.

도 3은 셔틀벡터인 pUC18K에 *budA* 유전자가 삽입되어있는 구조의 도식화이다. 이를 pSB1이라 명명하였다.

도 4는 셔틀벡터인 pUC18K에 *budB* 유전자가 삽입되어있는 구조의 도식화이다. 이를 pSB2라 명명하였다.

도 5는 셔틀벡터인 pUC18K에 *budB* 유전자가 삽입되어있는 구조의 도식화이다. 이를 pSB3이라 명명하였다.

도 6은 셔틀벡터인 pUC18K에 *budA*와 *budB* 유전자가 삽입되어있는 구조의 도식화이다. 이를 pSB4라 명명하였다.

도 7은 셔틀벡터인 pUC18K에 *budA*와 *budC* 유전자가 삽입되어있는 구조의 도식화이다. 이를 pSB5라 명명하였다.

도 8은 셔틀벡터인 pUC18K에 *budB*와 *budC* 유전자가 삽입되어있는 구조의 도식화이다. 이를 pSB6이라 명명하였다.

도 9는 셔틀벡터인 pUC18K에 *budA*, *budB*와 *budC* 유전자가 삽입되어있는 구조의 도식화이다. 이를 pSB7이라 명명하였다.

도 10은 *크렙시엘라 뉴모니아*의 염색체를 주형으로 하여 *budA*, *budB*, *budC* 각각의 효소를 암호화하는 유전자를 한 개,두 개 또는 세 개를 삽입한 도3,4,5,6,7,8,9의 재조합 플라스미드를 제한효소를 이용하여 확인한 전기영동 사진이다.

도 11은 *크렙시엘라 뉴모니아* 염색체를 주형으로 하여 *budA*, *budB*, *budC* 각각의 유전자를 삽입한 도3, 도4, 도5를 대장균 야생종에 삽입한 후 SDS-PAGE를 실시한 전기영동 사진이다. 레인 1: 사이즈마커, 레인 2: 크렙시엘라 뉴모니아 야생종, 레인 3: 대장균 야생종, 레인 4: E. coli ::pSB1, 레인 5: E. coli ::pSB2, 레인 6: E. coli ::pSB3

도 12는 대장균 야생종과 재조합체의 시간에 따른 생장(OD)를 나타낸 그래프이다.

도 13는 야생종 *크렙시엘라 뉴모니아*와 본 발명의 재조합 균주들이 배양시간에 따라 생성한 2,3-부탄다이올의 양을 나타낸 그래프이다.

도 14는 야생종 *크렙시엘라 뉴모니아*와 본 발명의 재조합 균주들이 12시간 배양 후에 생산한 2,3-부탄다이올의 양을 나타낸 그래프이다.

도 15는 야생종 *크렙시엘라 뉴모니아*와 본 발명의 재조합 균주들의 2,3-부탄다이올 생산량 및 수율을 나태난 표이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0044] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명 하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0045] **실시예**

[0046] **실시예 1 : 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)을 이용한 *budA*, *budB* 및 *budC* 유전자를 발현하는 재조합 플라스미드의 제조**

[0047] *크렙시엘라 뉴모니아*(*Klebsiella pneumoniae*) KTCT 2242의 염색체를 주형으로 하여 2,3-부탄다이올 생산을 위한 효소를 암호화하는 *budA*, *budB*와 *budC*의 유전자서열(genebank, NCBI)을 프라이머(primer)를 제작하여 중합효소연쇄반응(PCR, DaKaRa Korea) 방법을 통해 클로닝 하였다.

표 1

[0048]

유전자	생산 효소
budA	acetolactate decarboxylase
budB	acetolactate synthase
budC	acetoin reductase

표 2

[0049] 표 1의 유전자를 증폭하기 위한 프라이머 및 제한효소

유전자	프라이머 서열		제한 효소
budA	F	5'-GAA TTC ATG AAC CAT TCT GTT GAA TGC TC-3'	EcoR I
	R	5'-GGA TCC TTA GTT TTC GAC TGA GCG AAT G-3'	BamHI

budB	F	5'-TCT AGA ATG AAA ACA CGA AAA ATT GCA CT-3'	Xba I
	R	5'-AAG CTT TTA TCG GCT ATA TGT CGA ATT-3'	HindIII
budC	F	5'-GGA TCC ATG AAA AAA GTC GCA CTT GTT ACC-3'	BamH I
	R	5'-TCT AGA TTA GTT AAA CAC CAT GCC GC-3'	Xba I

[0050] 표 1의 유전자들은 타켓 유전자들만 특이적으로 증폭하도록 제작된 표 2에 제공된 프라이머(primer)를 사용하여 증폭하였다. 이 유전자들은 *budA*는 780 bp, *budB*는 1584 bp, *budC*는 771 bp의 크기로 증폭되었다. 각각의 중합효소연쇄반응은 통상적인 반응조건(10 mM Tris-HCl(pH9.0), 50 mM KCI, 0.1% Triton X-100, 2 mM MgSO4, Taq DNA 중합효소(DaKaRa)) 아래에서 95℃/5분(denaturation), 66℃/1분(annealing), 72℃/1분(extension)로 1회 수행한 후, 95℃/1분(denaturation), 66℃/30초(annealing), 72℃/1분(extension)로 30회 반복 수행하였다. 마지막 단계로 안정적인 신장(extension)을 위해 95℃/1분(denaturation), 66℃/1분(annealing), 72℃/5분(extension) 반응하였다. 중합효소연쇄반응 후 증폭된 DNA는 0.8% 아가로즈 젤 상에서 확인 후 정제하여 T-벡터 클로닝에 이용하였다. pGEM-T easy 벡터(DaKaRa)에 라이게이션(ligation)을 수행하여 재조합 플라스미드인 pGEM-T::*budA*, pGEM-T::*budB*, pGEM-T::*budC*, pGEM-T::*budA*::*budB*, pGEM-T::*budA*::*budC*, pGEM-T::*budB*::*budC*와 pGEM-T::*budA*::*budB*::*budC*를 제작하였다. 상기 재조합 플라스미드들은 대장균(E. coli DH5a competent cell, RBS)에서 형질 전환하여 균주를 제조하였다.

[0051] **실시예 2: 재조합 플라스미드 pSB1,pSB2,pSB3, pSB4, pSB5, pSB6, pSB7의 제조**

[0052] 상기 실시예 1의 재조합 플라스미드인 pGEM-T::*budA*, pGEM-T::*budB*, pGEM-T::*budC*, pGEM-T::*budA*::*budB*, pGEM-T::*budA*::*budC*, pGEM-T::*budB*::*budC*와 pGEM-T::*budA*::*budB*::*budC*를 대장균과 크렙시엘라의 셔틀 벡터인 pUC18K(도 2)를 표 2에 열거된 제한효소 들로 37℃ 항온수조(water bath)에서 약 2시간 반응하였다. 여기서 사용한 pUC18K는 기존의 pET28a벡터에 카나마이신에 저항성을 갖는 유전자를 클로닝한 후 pUC18벡터에 삽입하여 제작하였다. 위의 열거한 제한효소들로 각각의 DNA 절편들을 절단한 뒤 pUC18K 벡터의 다중삽입부위(multicloning site)에 도 3,4,5,6,7,8,9에 개시된 것과 같이 T4 라이게이즈 (Dakara)를 이용, 16℃에서 반응, 라이게이션을 하여 재조합 플라스미드를 완성하였다. 각 단계마다 삽입된 유전자의 삽입여부를 확인하기 위해 대장균(E. coli DH5a competentcell, RBS)에 형질 전환 시킨 후 재조합 플라즈미드를 추출하여 이를 다시 원래 삽입부위의 제한효소로 처리하여 잘린 DNA 조작의 크기를 0.8% 아가로즈 젤 상에서 전기영동하여 비교하는 방법을 사용하였다. 도 10에서는 재조합된 플라즈미드가 제한효소에 의해 절단된 결과를 보여주었다. 또한 도 11에서는 (주)프로테옴텍에 재조합된 플라스미드(pSB1,pSB2,pSB3)의 SDS-PAGE를 의뢰하여 각 플라스미드안에 삽입된 유전자의 발현여부를 단백질 분석을 통해 확인하였다. 분석결과 *budA*는 29KDa, *budB*는 60KDa, *budC*는 27KDa 의 단백질이 재조합플라스미드를 통해 발현되었다. 증폭된 산물을 표 2에 열거된 제한효소들을 이용하여 pUC18K 벡터에 도입하여 pSB1, pSB2, pSB3, pSB4, pSB5, pSB6, pSB7, pSB8, pSB9를 제조하였다. 도 3,4,5,6,7,8,9는은 상기 pSB1(*budA*를 암호화하는 유전자 포함), pSB2(*budB*를 암호화하는 유전자 포함), pSB3(*budC* 를 암호화하는 유전자 포함), pSB4(*budA,budB*를 암호화하는 유전자 포함), pSB5(*budA,budC*를 암호화하는 유전자 포함), pSB6(*budB,budC*를 암호화하는 유전자 포함), pSB7(*budA,budB,budC*를 암호화하는 유전자 포함)라 명명된 벡터의 지도(map)를 나타내는 도면이다.

[0053] **실시예 3 : 이종 크렙시엘라 뉴모니아 형질전환체 제조**

[0054] 통상적으로 클로닝용으로 많이 쓰이는 균주의 경우 $CaCl_2$ 버퍼를 사용한 컴피턴트 세포를 만든 후 열충격(42℃) 방법에 의해 플라즈미드를 숙주세포내로 넣지만, 본 발명에서는 형질전환체의 안정적 제조와 효율을 높이기 위해 전기천공법 (electroporation)에 의한 형질전환방법을 사용하였다. 상기 전기 충격에 의한 형질전환방법을 위해 16시간동안 전 배양 된 30 ul(0.1 %)의 야생종 *크렙시엘라 뉴모니아(Klebsiella pneumoniae)* KTCT2242 배양액을 엠피실린(50 ug/mL)이 포함된 시험관에 들어있는 3 mL의 LB(10 g/L tripton, 10 g/L NaCl, 5 g/L yeast extract)배지에 접종하여 배양액의 흡광도(absorbance)가 600nm 파장에서 0.6에 이르렀을 때, 배양액 전체에 해당하는 3 mL의 배양액은 원심 분리 (12000 rpm, 1분)하여 상등액과 세포를 분리하였다. 모아진 세포는 10% 글리세롤 1 mL로 1회 세척해준 후, 다시 원심분리(12000 rpm, 1분)하여 상등액과 세포로 나누어 주었다. 세포는 10% 글리세롤 80 ul로 현탁하였다. 현탁 된 세포에 1-3 uL의 재조합 플라즈미드 (pSB1, pSB2, pSB3, pSB4, pSB5, pSB6, pSB7)를 첨가시켜주었다. 상기 플라즈미드가 들어있는 분주된 80 ul의 액체는 전기

천공법(electroporation)용 큐벳 (BIO-RAD, Gene pulser cuvette)에 담아 BIO-RAD, Gene pulser Xcell로 전기충격 (1800v, 25uF, 200Ω)을 가하였다. 미리 준비해둔 1 mL LB(10 g/L tripton, 10 g/L NaCl, 5 g/L yeast extract)를 첨가한 뒤 1시간 동안 200 rpm, 37℃에서 진탕 배양하였다. 배양된 형질전환체는 엠피실린 (50 ug/mL)과 카나마이신(50 ug/mL)이 첨가된 LB 아가(10 g/L tripton, 10 g/L NaCl, 5 g/L yeast extract, agar 20 g/L)에서 단일 균체가 생성될 때까지 37℃에서 배양하였다. 이를 통해 재조합 플라스미드인 pSB1, pSB2, pSB3, pSB4, pSB5, pSB6, pSB7을 *크렙시엘라 뉴모니아*(*Klebsiella pneumoniae*) KTCT2242 균주에 형질 전환한 K. pneumoniae SGJSB01, K. pneumoniae SGJSB02, K. pneumoniae SGJSB03, K. pneumoniae SGJSB04, K. pneumoniae SGJSB05, K. pneumoniae SGJSB06, K. pneumoniae SGJSB07 재조합 균주를 개발하였다(표 3).

표 3

[0055]

개발균주	
K. pneumoniae SGJSB01	*K. pneumoniae* KTCT2242::pUC18K::*budA*
K. pneumoniae SGJSB02	*K. pneumoniae* KTCT2242::pUC18K::*budB*
K. pneumoniae SGJSB03	*K. pneumoniae* KTCT2242::pUC18K::*budC*
K. pneumoniae SGJSB04	*K. pneumoniae* KTCT2242::pUC18K::*budA*::*budB*
K. pneumoniae SGJSB05	*K. pneumoniae* KTCT2242::pUC18K::*budA*::*budC*
K. pneumoniae SGJSB06	*K. pneumoniae* KTCT2242::pUC18K::*budB*::*budC*
K. pneumoniae SGJSB07	*K. pneumoniae* KTCT2242::pUC18K::*budA*::*budB*::*budC*

[0056] 재조합 균주

[0057] **실시예 4: 이종 *크렙시엘라 뉴모니아*의 배양 및 재조합 균주로부터 단백질의 생산**

[0058] *크렙시엘라 뉴모니아*(*Klebsiella pneumoniae*) KTCT2242 균주에 형질 전환한 재조합 균주들을 LB(암페실린 50 ug/mL와 카나마이신 50 ug/mL 포함) 배지에 16시간 정도 전 배양 시키고, 그 배양액을 다시 암피실린 50 ug/mL과 카나마이신 50 ug/mL이 포함된 LB 배지에 접종하여 흡광도가 600 nm에서 0.6-1.0 되었을 때 글리세롤 농도가 25%가 되게 보관용 균액으로 만든 다음 -80℃에서 배양실험 시까지 저장하였다. 상기에서 개발된 재조합 균주의 배양은 보관용 균액 30 uL을 10 mL 바톰 튜브에 들어있는 암페실린(50 ug/mL)과 카나마이신(50 ug/mL)이 첨가된 3 mL의 LB에 16시간동안 배양한 후, 이를 다시 500 mL 플라스크에 들어있는 암페실린(50 ug/mL)과 카나마이신(50 ug/mL)이 첨가된 200 mL의 LB (10 g/L tripton, 10 g/L NaCl, 5 g/L yeast extract) 배지에 0.5 %의 전기 배양액을 접종하여 37℃, 170 rpm 상태에서 24시간동안 배양하였다. 재조합 균주와 비교하기 위한 *크렙시엘라 뉴모니아* KTCT 2242야생종은 엠피실린은 들어있고, 카나마이신은 들어있지 않은 LB에서 재조합 균주와 동일한 조건으로 실험을 실시하였다. 단백질 발현을 위해 배양액의 흡광도(absorbance)가 600nm 파장에서 0.6에 이르렀을 때 유도물질인 IPTG (isopropylthio-β-D-galactoside, sigma, USA)를 첨가 (최종농도 1 mM/mL)하여 재조합 단백질의 발현을 유도하였다. 본 발명에서 개발된 이종 크렙시엘라 뉴모니아 재조합 균주들은 생장곡선에서 야생종 크렙시엘라 뉴모니아와 비교하였을 때, K. pneumoniae SGJSB04는 약간 높은 OD값을 보였고, 다른 재조합체들은 야생종에 비해 약간 저해되는 현상을 보였다(도12). 이는 다른 종의 유전자의 삽입에 의한 독성이나 저해가 약간은 있었던 것으로 사료된다. 그러나 크렙시엘라와 대장균에 모두 발현이 가능한 안정적인 벡터를 사용하였기 때문에 반복적으로 배양한다면, 성장능력을 높일 수 있을 것이라 판단된다.

[0059] **실시예 5 : 세포외로부터 재조합 대장균의 2,3-부탄다이올(2,3-butanediol)의 측정**

[0060] 재조합 균주의 배양액 내의 2,3-부탄다이올의 농도를 측정하기 위해 배양 중 일정시간마다 채취한 시료를 원심분리(12000 rpm, 10분)후 상등액과 세포를 분리하여 -40℃에서 보관하였다. 상기 배양액로부터 분리된 상등액은 각각 1 mL씩 0.2 um 필터를 이용하여 정제한 후, 하단의 조건하에서 고속액체크로마토그래피 (HPLC) 정량 분석을 실시하였다.

표 4

[0061] 아세트산과 말론산 분석을 위한 HPLC 조건

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

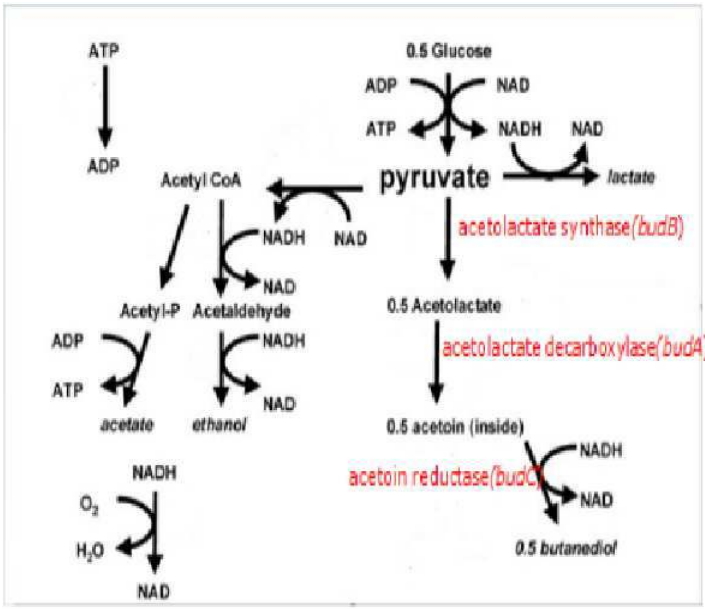
[0062] 본 발명에서 일곱개의 재조합 균주와 야생종 *크렙시엘라 뉴모니아*의 2,3-부탄다이올 생산량의 변화를 관찰하였다. 야생종은 2,3-부탄다이올 생산에 관련된 유전자가 존재하고 있으므로 2,3-부탄다이올이 생산되며, 재조합체들의 경우에는 글루코즈로부터 2,3-부탄다이올로 전환하는데 영향을 미치는 효소들을 코딩하는 유전자를 한 개 , 두 개 또는 세 개 과발현시켜 2,3-부탄다이올 생산량의 변화를 관찰하였다. 야생종과 재조합 *크렙시엘라 뉴모니아*들은 배양 시간에 따라 엑스트라셀룰라(extracellular)에서 분석되어지는 2,3-부탄다이올의 생산량 경향성은 비슷하였다(도13). 그러나 배양 후 12시간을 기준으로 생산량을 비교해 보면 K. pneumoniae SGJSB06, K. pneumoniae SGJSB07 균주가 야생종 크렙시엘라 뉴모니아보다 많은 양의 2,3-부탄다이올을 생산하였다(도14). 그 중에서도 유전자 세 개를 재조합하여 세 개의 효소를 과발현시킨 K. pneumoniae SGJSB07균주가 가장 높은 생산성을 보였다. 이는 *budB* 유전자가 발현되면서 생성된 아세토락테이트 합성효소(acetolactate synthase) 가 글루코즈를 아세토락테이트로 전환하는 효율을 높였고, *budA* 유전자가 발현되면서 생성된 아세토락테이트 탈카복실화효소(acetolactate decarboxylase)가 야생종에서도 생산되는 아세토락테이트를 아세토인으로 전환시킬 때의 효율을 높였고, 마지막단계에서 아세토인 환원효소(acetoin reductase)가 아세토인을 2,3-부탄다이올로 전환시키는 효율을 높였다고 판단된다. 이 결과로, 재조합 *크렙시엘라 뉴모니아*를 통해 2,3-부탄다이올의 생산량을 높였다. 야생종 *크렙시엘라 뉴모니아* KTCT 2242와 비교하였을 때, OD값으로 비교한 생장정도는 대체로 더 낮지만, 포도당의 소모량에 따른 2,3-부탄다이올의 생산량인 수율의 측면에서는 20.5%정도 더 높았다(도15).

[0063] **본 발명의 재조합 *크렙시엘라 뉴모니아*의 효과**

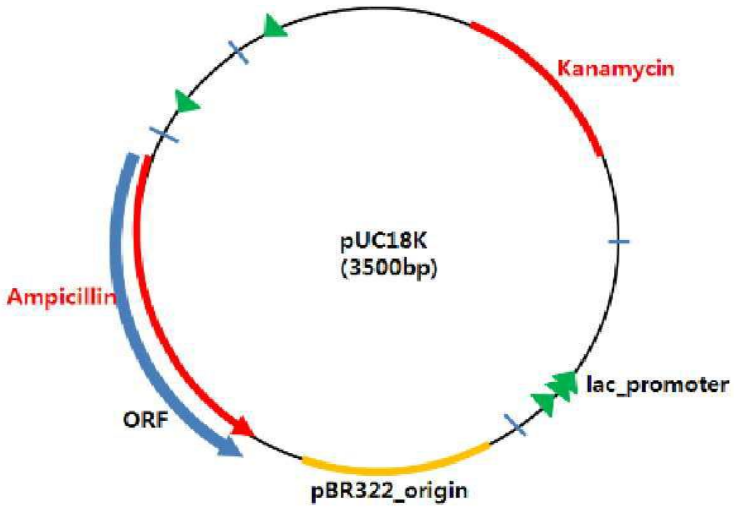
[0064] 본 발명은 재조합 *크렙시엘라 뉴모니아*에 의하여 야생종에서 생산하는 2,3-부탄다이올의 생산을 증진시켰다. 따라서, 당으로부터 2,3-부탄다이올 생합성 경로에의 과발현과 유전자 삽입에 의한 대사 흐름 변경을 통해 대량의 2,3-부탄다이올 생합성이 가능하다. 화학공업에 유용한 기초가 될 플랫폼용 화합물인 2,3-부탄다이올을 대량 생산하는 것은 친환경적이며 경제적으로도 큰 강점을 갖출 수 있을 것으로 기대된다.

도면

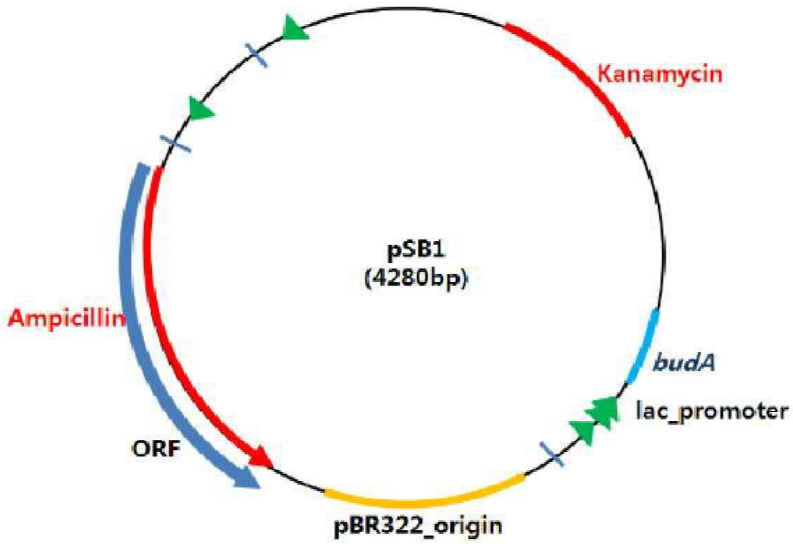
도면1


ATP
ADP
0.5 Glucose
ADP
ATP
NAD
NADH
NAD
pyruvate
lactate
Acetyl CoA
NADH
NAD
acetolactate synthase(budB)
NAD
Acetyl-P
Acetaldehyde
0.5 Acetolactate
ADP
ATP
NADH
NAD
acetolactate decarboxylase(budA)
acetate
ethanol
0.5 acetoin (inside)
NADH
acetoin reductase(budC)
NAD
NADH
O2
H2O
0.5 butanediol
NAD

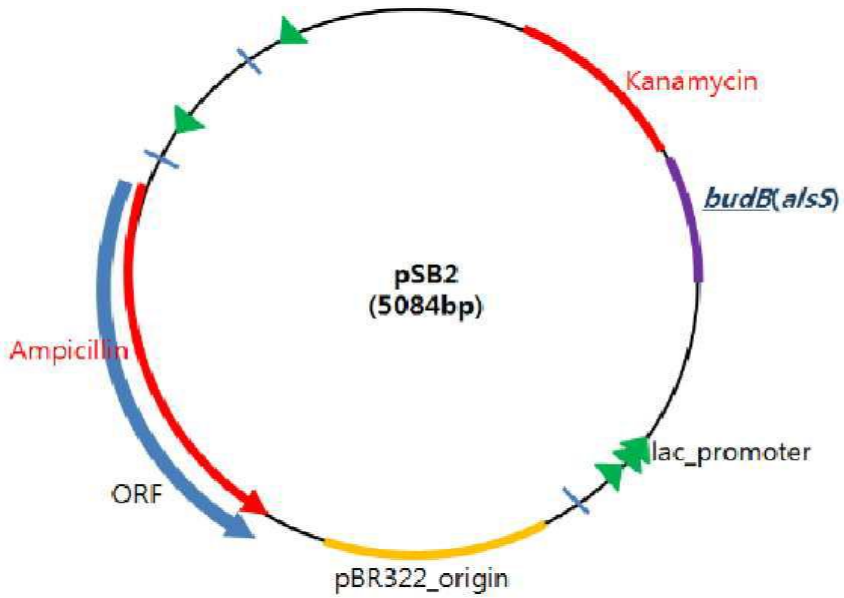
도면2


Kanamycin
pUC18K
(3500bp)
Ampicillin
lac_promoter
ORF
pBR322_origin

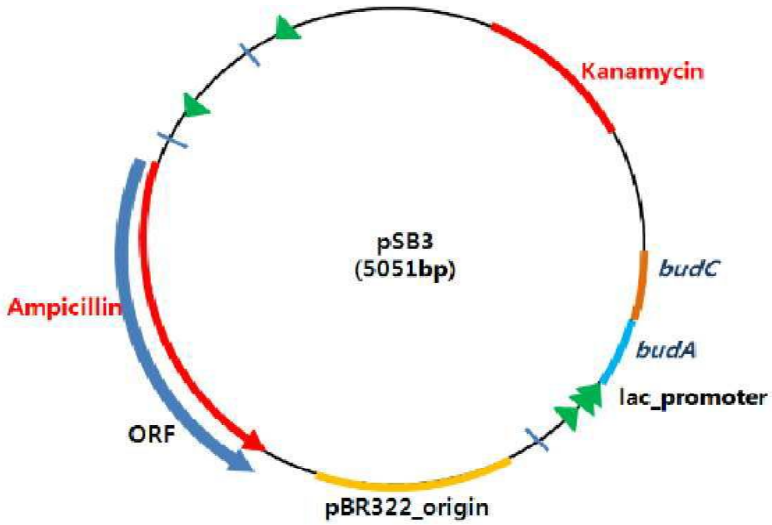
도면3


Kanamycin
pSB1
(4280bp)
Ampicillin
budA
lac_promoter
ORF
pBR322_origin

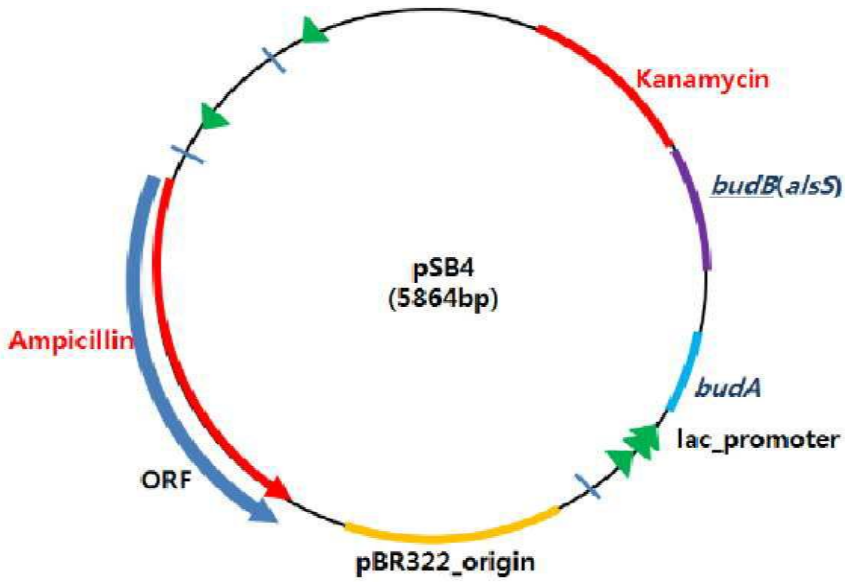
도면4


Kanamycin
budB(alsS)
pSB2
(5084bp)
Ampicillin
lac_promoter
ORF
pBR322_origin

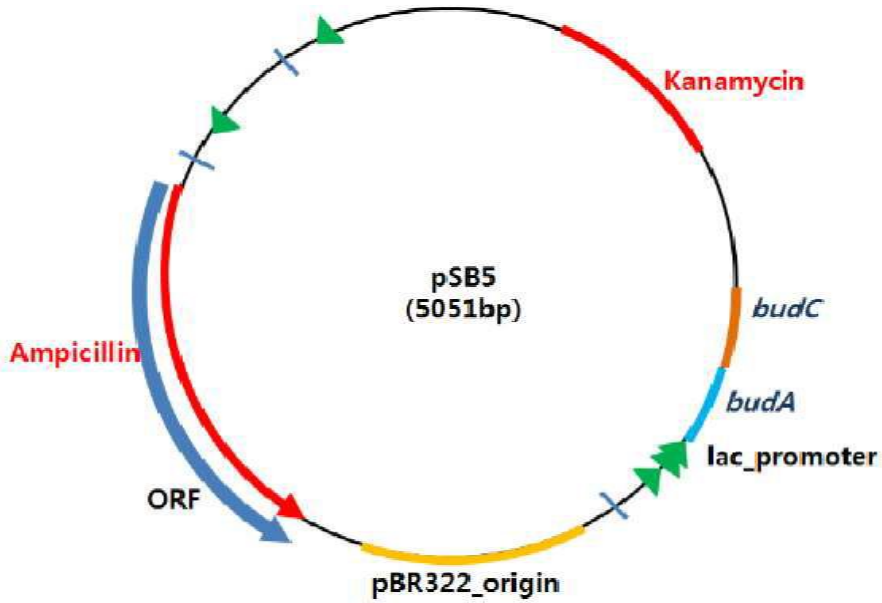
도면5


Kanamycin
pSB3
(5051bp)
budC
Ampicillin
budA
lac_promoter
ORF
pBR322_origin

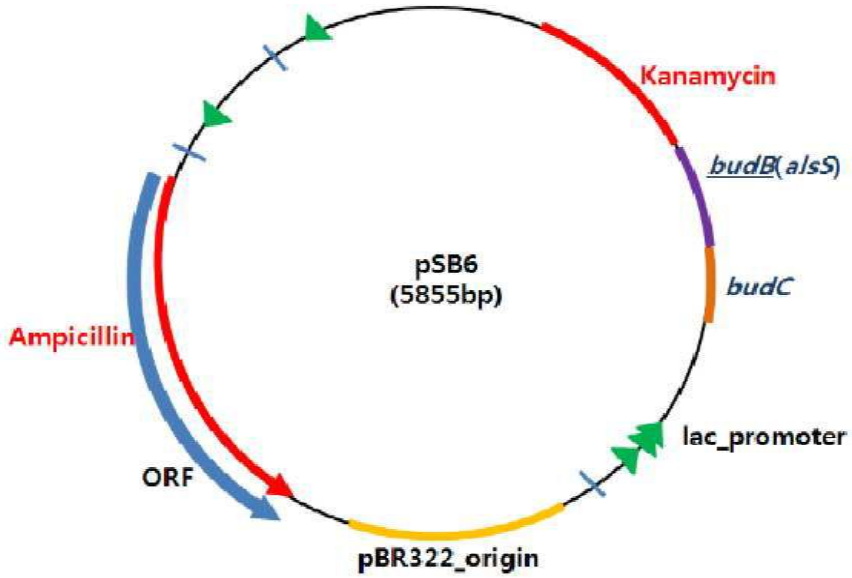
도면6


Kanamycin
budB(alsS)
pSB4
(5864bp)
Ampicillin
budA
lac_promoter
ORF
pBR322_origin

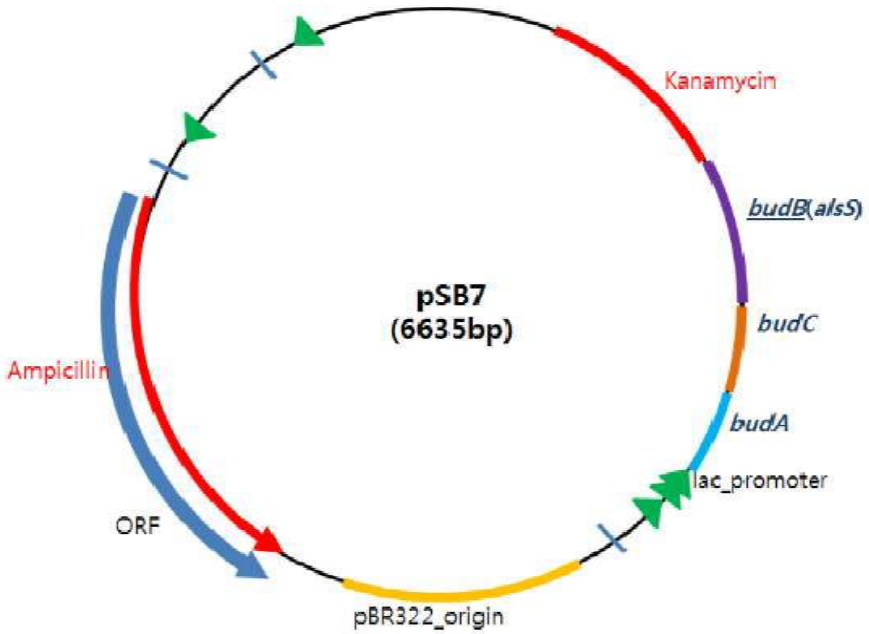
도면7


Kanamycin
pSB5
(5051bp)
budC
budA
lac_promoter
Ampicillin
ORF
pBR322_origin

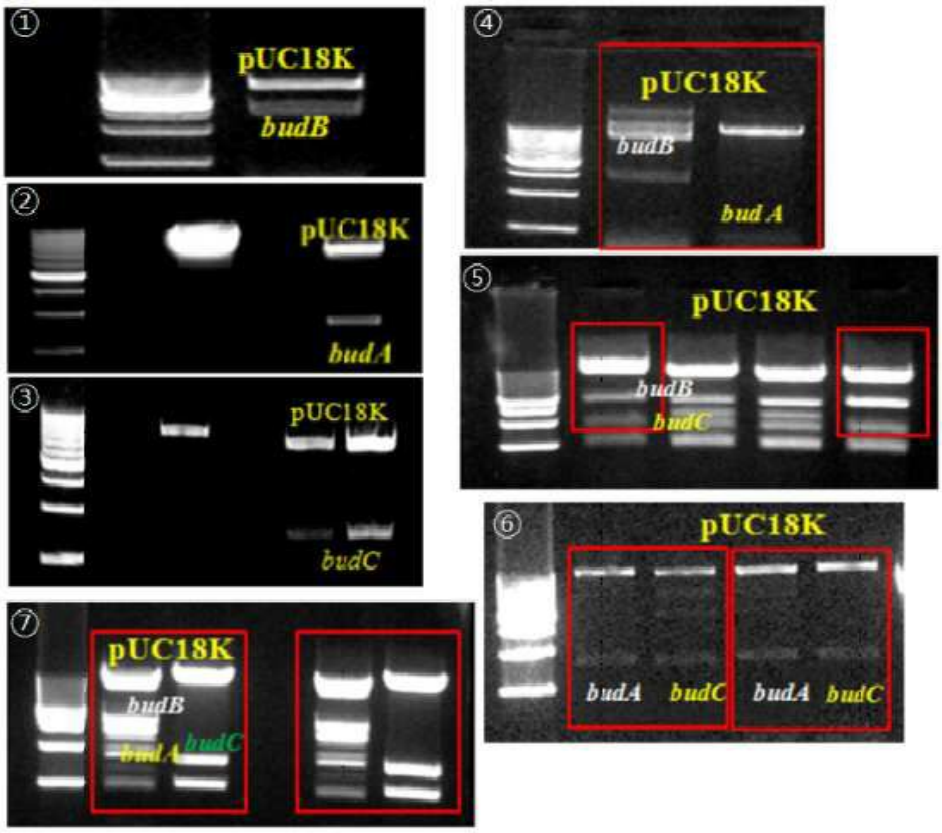
도면8


Kanamycin
budB(alsS)
pSB6
(5855bp)
budC
Ampicillin
lac_promoter
ORF
pBR322_origin

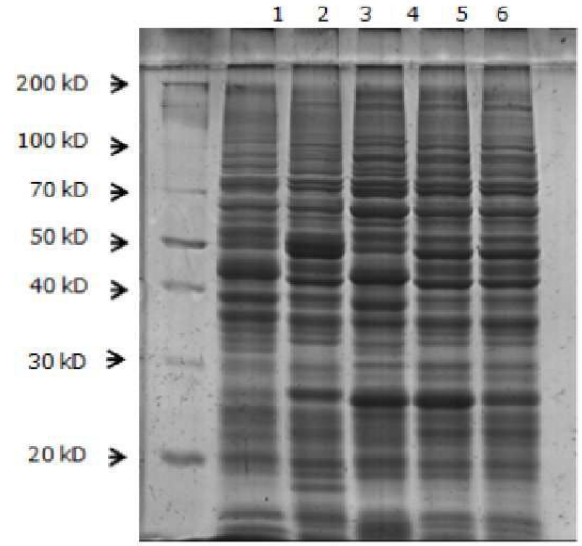
도면9


Kanamycin
budB(alsS)
budC
budA
lac_promoter
pBR322_origin
ORF
Ampicillin
pSB7
(6635bp)

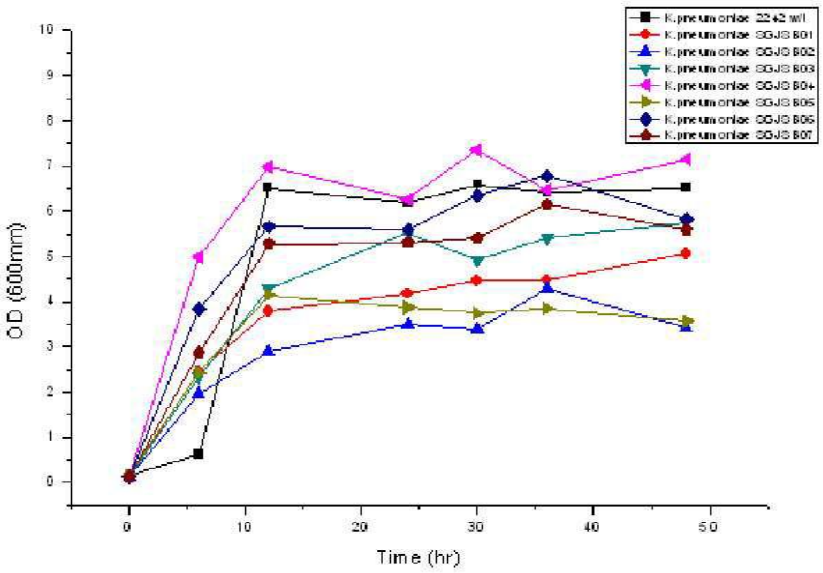
도면10


①
pUC18K
budB
②
pUC18K
budA
③
pUC18K
budC
④
pUC18K
budB
budA
⑤
pUC18K
budB
budC
⑥
pUC18K
budA
budC
budA
budC
⑦
pUC18K
budB
budA
budC

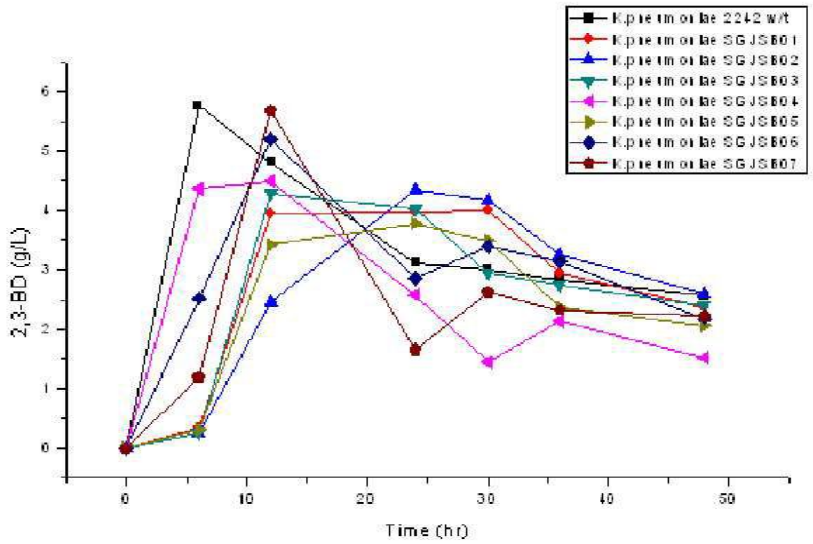
도면11


1 2 3 4 5 6
200 kD
100 kD
70 kD
50 kD
40 kD
30 kD
20 kD

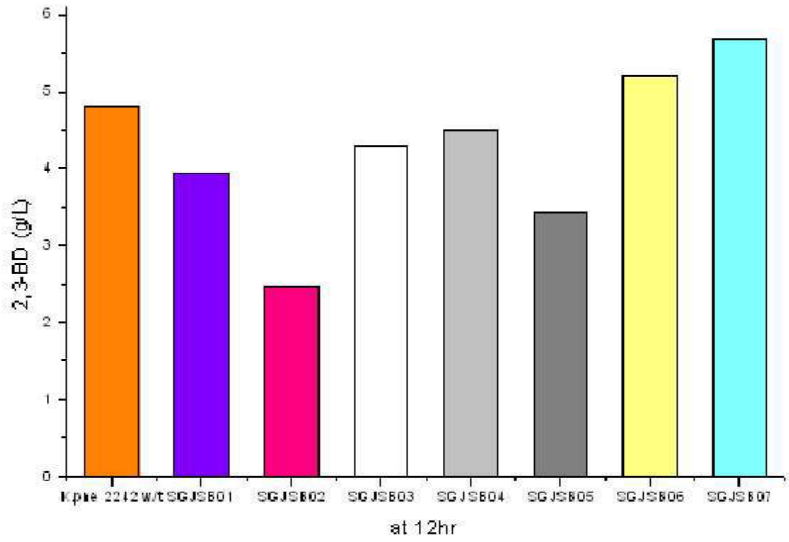
도면12


OD (600nm)
Time (hr)
0
10
20
30
40
50

도면13



도면14



도면15

		K.pneumoniae 2242 w/t	SGJSB01	SGJSB02	SGJSB03	SGJSB04	SGJSB05	SGJSB06	SGJSB07
	OD max	6.51	5.05	4.29	6.78	7.34	4.16	6.78	5.60
	μ max	0.39	0.48	0.45	0.47	0.60	0.46	0.55	0.52
2,3 BD	Maximum Production (g/L)	5.77	4.01	4.35	5.21	4.49	3.77	5.21	5.67
	Volumetric productivity (g/L/h)	0.40	0.33	0.21	0.36	0.37	0.29	0.43	0.47
	Volumetric productivity (mM/h)	4.44	3.66	2.33	3.99	4.11	3.22	4.77	5.22
	Specific productivity (g/g DCW/h)	0.07	0.07	0.04	0.07	0.06	0.06	0.08	0.09
	Specific productivity (mM/g DCW/h)	0.78	0.78	0.44	0.78	0.67	0.67	0.89	1.00
	Yield (g/g Glu.)	0.39	0.48	0.34	0.42	0.43	0.39	0.46	0.49
	Yield (mM/mM Glu.)	0.78	0.96	0.68	0.84	0.86	0.78	0.92	0.98

서 열 목 록

<110> Sogang univirsity

<120> Heterologous Klebsiella pneumoniae strains for producing 2,3-butanediol and manufacturing method

<160> 6

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 259

<212> PRT

<213> Klebsiella pneumoniae

<400> 1

Met Asn His Ser Ala Glu Cys Thr Cys Glu Glu Ser Leu Cys Glu Thr
1 5 10 15

Leu Arg Ala Phe Ser Ala Gln His Pro Glu Ser Val Leu Tyr Gln Thr
20 25 30

Ser Leu Met Ser Ala Leu Leu Ser Gly Val Tyr Glu Gly Ser Thr Thr
35 40 45

Ile Ala Asp Leu Leu Lys His Gly Asp Phe Gly Leu Gly Thr Phe Asn
50 55 60

Glu Leu Asp Gly Glu Leu Ile Ala Phe Ser Ser Gln Val Tyr Gln Leu
65 70 75 80

Arg Ala Asp Gly Ser Ala Arg Lys Ala Gln Pro Glu Gln Lys Thr Pro
85 90 95

Phe Ala Val Met Thr Trp Phe Gln Pro Gln Tyr Arg Lys Thr Phe Asp
100 105 110

His Pro Val Ser Arg Gln Gln Leu His Glu Val Ile Asp Gln Gln Ile
115 120 125

Pro Ser Asp Asn Leu Phe Cys Ala Leu Arg Ile Asp Gly His Phe Arg
130 135 140

His Ala His Thr Arg Thr Val Pro Arg Gln Thr Pro Pro Tyr Arg Ala
145 150 155 160

Met Thr Asp Val Leu Asp Asp Gln Pro Val Phe Arg Phe Asn Gln Arg

165 170 175

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

245 250 255
Val Glu Ser

<210> 2
<211> 527
<212> PRT
<213> Klebsiella pneumoniae
<400> 2
Met Lys Thr Arg Lys Ile Gly Leu Ala Asn Tyr Leu Ala Tyr Gly Ala
1 5 10 15
Gly Asp Phe Leu Gly Ala Gly Thr Thr Ala Leu Thr Ala Ala Trp Leu
20 25 30
Leu Tyr Phe Tyr Thr Thr Phe Cys Gly Leu Thr Pro Ile Glu Ala Thr
35 40 45

Leu Ile Phe Ala Ala Ala Arg Val Leu Asp Ala Val Val Ser Pro Leu
50 55 60
Met Gly Phe Leu Thr Asp Asn Phe Gly Thr Thr Trp Leu Gly Lys Arg
65 70 75 80
Phe Gly Arg Arg Lys Phe Phe Ile Leu Leu Gly Ile Pro Cys Val Phe
85 90 95
Ser Tyr Ser Ala Met Trp Val Gly Glu Met Gly Phe Trp Tyr Tyr Leu
100 105 110

Ala Thr Tyr Leu Leu Phe Asp Met Val Tyr Thr Met Ile Leu Val Pro

115 120 125

Tyr Glu Thr Leu Val Pro Glu Met Thr Asp Asp Phe Lys Gln Lys Thr

130 135 140

Lys Phe Ser Gly Ala Arg Ile Ser Met Ala Gln Met Ser Ala Ile Leu

145 150 155 160

Ala Ser Phe Leu Pro Gly Ile Leu Leu Ser Trp Leu Gly Lys Asp Asn

165 170 175

Ala Ser Ser Phe Phe Tyr Ala Ser Leu Val Phe Ser Val Leu Cys Ala

180 185 190

Val Met Leu Thr Leu Val Trp Cys Phe Thr Trp Glu Arg Pro Arg Glu

195 200 205

Ala Trp Ser Glu Ala Ala Leu Arg Ala Glu Ala Glu Lys Gln Asn Leu

210 215 220

Thr Leu Ala Gln Ser Leu Asn Arg Leu Val Ile Glu Leu Ser Ser Thr

225 230 235 240

Leu Arg Ile Lys Ile Phe Arg Gln His Leu Gly Met Tyr Leu Gly Gly

245 250 255

Tyr Ile Ala Gln Asp Val Phe Asn Ala Val Phe Thr Tyr Tyr Val Val

260 265 270

Phe Val Leu Met Gln Glu Ala Ala Val Ala Ser Asn Leu Leu Gly Thr

275 280 285

Met Ala Ile Phe Gln Phe Ile Ala Val Ile Ala Met Ile Pro Leu Cys

290 295 300

Ile Arg Phe Gly Pro Ala Pro Ser Tyr Arg Met Val Val Val Leu Phe

305 310 315 320

Gly Leu Ser Ser Leu Ser Tyr Ala Leu Leu Tyr Tyr Ala Gly Leu Ser

325 330 335

Asp Val Tyr Ser Leu Leu Leu Leu Ile Ser Ala Val Ala Gly Leu Gly

340 345 350

Arg Gly Gly Ile Asn Tyr Val Pro Trp Asn Thr Tyr Thr Tyr Ile Ala

355 360 365

Asp Val Asp Glu Ala Ile Thr Gly Gln Arg Arg Glu Gly Ile Phe Ala

370 375 380

Gly Ile Met Thr Leu Thr Arg Lys Ala Ser Gln Ala Gly Ala Val Met

385 390 395 400

Leu Val Gly Ile Ile Met Gln Leu Ser Gly Phe Val Ser Gly Gln Lys

405 410 415

Ile Gln Pro Glu Gly Val Ser His Thr Ile Leu Leu Ile Leu Ser Val

420 425 430

Gly Thr Leu Val Val Leu Ala Cys Gly Phe Leu Val Ser Leu Arg Phe

435 440 445

Lys Leu Asn Leu His Thr His Ser Val Leu Arg Ser Glu Thr Leu Arg

450 455 460

Met Arg Glu Leu Gly Tyr Ala Gln Ser Glu Gln Thr Ser Ala Glu His

465 470 475 480

Arg Ala Val Val Glu Leu Leu Ala Gly Met Pro Tyr Asp Cys Leu Trp

485 490 495

Gly Asn Asn Asn Ile Gly Tyr Leu Asn Arg His Lys Pro Ala Ala Pro

500 505 510

Ala Leu Ile Lys Gly Gly Ala Leu Asn Ser Thr Tyr Thr Arg Gly

515 520 525

<210> 3

<211> 256

<212> PRT

<213> Klebsiella pneumoniae

<400> 3

Met Lys Lys Val Ala Leu Val Thr Gly Ala Gly Gln Gly Ile Gly Lys

1 5 10 15

Ala Ile Ala Leu Arg Leu Val Lys Asp Gly Phe Ala Val Ala Ile Ala

20 25 30

Asp Tyr Asn Asp Ala Thr Ala Lys Ala Val Ala Ser Glu Ile Asn Gln

35 40 45

Ala Gly Gly Arg Ala Met Ala Val Lys Val Asp Val Ser Asp Arg Asp
50 55 60
Gln Val Phe Ala Ala Val Glu Gln Ala Arg Lys Thr Leu Gly Gly Phe
65 70 75 80

Asp Val Ile Val Asn Asn Ala Gly Val Ala Pro Ser Thr Pro Ile Glu
85 90 95
Ser Ile Thr Pro Glu Ile Val Asp Lys Val Tyr Asn Ile Asn Val Lys
100 105 110
Gly Val Ile Trp Gly Ile Gln Ala Ala Val Glu Ala Phe Lys Lys Glu
115 120 125
Gly His Gly Gly Lys Ile Ile Asn Ala Cys Ser Gln Ala Gly His Val
130 135 140
Gly Asn Pro Glu Leu Ala Val Tyr Ser Ser Ser Lys Phe Ala Val Arg

145 150 155 160
Gly Leu Thr Gln Thr Ala Ala Arg Asp Leu Ala Pro Leu Gly Ile Thr
165 170 175
Val Asn Gly Tyr Cys Pro Gly Ile Val Lys Thr Pro Met Trp Ala Glu
180 185 190
Ile Asp Arg Gln Val Ser Glu Ala Ala Gly Lys Pro Leu Gly Tyr Gly
195 200 205
Thr Ala Glu Phe Ala Lys Arg Ile Thr Leu Gly Arg Leu Ser Glu Pro
210 215 220

Glu Asp Val Ala Ala Cys Val Ser Tyr Leu Ala Ser Pro Asp Ser Asp
225 230 235 240
Tyr Met Thr Gly Gln Ser Leu Leu Ile Asp Gly Gly Met Val Phe Asn
245 250 255

<210> 4
<211> 780
<212> DNA
<213> Klebsiella pneumoniae
<400> 4
atgaatcatt ctgctgaatg cacctgcgaa gagagtctat gcgaaaccct gcgggcgttt 60

tccgcgcagc atcccgagag cgtgctctat cagacatcgc tcatgagcgc cctgctgagc 120

ggggtttacg aaggcagcac caccatcgcc gacctgctga aacacggcga tttcggcctc 180

ggcaccttta atgagctgga cggggagctg atcgccttca gcagtcaggt ctatcagctg 240

cgcgccgacg gcagcgcgcg caaagcccag ccggagcaga aaacgccgtt cgcggtgatg 300

acctggttcc agccgcagta ccggaaaacc tttgaccatc cggtgagccg ccagcagctg 360

cacgaggtga tcgaccagca aatcccctct gacaacctgt tctgcgccct gcgcatcgac 420

ggccatttcc gccatgccca tacccgcacc gtgccgcgcc agacgccgcc gtaccgggcg 480

atgaccgacg tactcgacga tcagccggtg ttccgcttta accagcgcga aggggtgctg 540

gtcggcttcc ggaccccgca gcatatgcag gggatcaacg tcgccgggta tcacgagcat 600

tttattaccg atgaccgcaa aggcggcggt cacctgctgg attaccagct cgaccacggg 660

gtgctgacct tcggcgaaat tcacaagctg atgatcgacc tgcccgccga cagcgcgttc 720

ctgcaggcta atctgcatcc cgataatctc gatgccgcca tccgttccgt agaaagttaa 780

780

<210> 5

<211> 1584

<212> DNA

<213> Klebsiella pneumoniae

<400> 5

atgaaaacac gaaaaattgg actggctaac tatctggcct acggcgcggg cgattttctc 60

ggcgccggca cgacggcgtt aaccgccgca tggctgctct acttttacac gacctttgc 120

ggactgaccc cgattgaggc cacgcttatt tttgctgccg cccgcgtgct ggacgcggtg 180

gtaagcccgc tgatgggctt tctcaccgat aactttggca ccacctggct tggtaagcgc 240

ttcggccgca gaaaattctt tattctgctc ggcatcccct gcgtattcag ctattcagcg 300

atgtgggtcg gcgagatggg cttctggtac tacctggcga cctatctgct gtttgatatg 360

gtctatacca tgattctggt gccctatgag acgctggtgc cggagatgac cgatgacttt 420

aaacagaaaa ccaaattctc cggcgcgcgc atttcgatgg cgcagatgtc ggcgatttta 480

gcctccttcc tgccggggat ccttctctcc tggctcggca aagataatgc cagctcgttc 540

ttctatgcca gtctggtgtt ctcggtgctg tgcgcggtga tgctgactct ggtctggtgt 600

ttcacctggg aacgaccgcg ggaggcgtgg tcggaagcgg ccctgcgggc ggaagcggaa 660

aaacaaaact taacccttgc tcagagcctc aatcgcctgg tgattgagct gagttctacg 720

ctgcggataa aaattttccg ccagcacctc ggcatgtatc tgggggggcta tatcgcccag 780

gacgtcttca atgccgtgtt tacctattac gtggtctttg ttctgatgca ggaagccgcc 840

gtcgcctcga acctgctggg gacgatggcc atcttccagt ttattgcggt aatcgccatg 900

atcccgctgt gcattcgttt tggccccgcg ccgtcgtacc gcatggtggt ggtcctgttt 960

ggcctgagct cactctccta cgcgctgctc tattacgccg gactgagcga cgtctattcc 1020

ttattgctgc tcatctctgc tgtcgccgga ctgggacgcg gcgggataaa ttacgtaccg 1080

tggaatacct acacctatat tgccgacgtc gacgaagcga tcaccggcca gcgccgggag 1140

gggatttttg ccggcatcat gactctgacc cgcaaagcct cgcaggcggg ggcggtgatg 1200

ctggtgggga tcattatgca gttgtcgggg tttgtttccg ggcaaaaaat acagcctgaa 1260

ggggtcagcc ataccattct gctgatcctc agcgtcggca ctctggtggt gttagcctgc 1320

ggcttcctcg tctcgctgcg cttcaaactc aacctgcaca cccacagcgt cctgcgcagc 1380

gagaccctca gaatgcgcga gctcggctac gctcagtcgg aacagaccag tgcggaacac 1440

cgtgcggtgg tcgagctgct ggcggggatg ccttacgact gtctgtgggg caataacaat 1500

attggctatc tgaatcgtca taaacctgct gccccggcgc tcattaaggg cggcgctttg 1560

aattcgacat atacccgagg ttaa 1584

<210> 6

<211> 771

<212> DNA

<213> Klebsiella pneumoniae

<400> 6

atgaaaaaag tcgcacttgt taccggcgcc ggccagggga ttggtaaagc tatcgccctt 60

cgtctggtga aggatggatt tgccgtggcc attgccgatt ataacgacgc caccgccaaa 120

gcggtcgcct ccgaaatcaa ccaggccggc ggccgcgcca tggcggtgaa agtggatgtt 180

tctgaccgcg accaggtatt tgccgccgtc gaacaggcgc gcaaaacgct gggcggcttc 240

gacgtcatcg tcaacaacgc cggcgtggcg ccatccacgc cgatcgagtc cattaccccg 300

gagattgtcg acaaagtcta caacatcaac gtcaaagggg tgatctgggg catccaggca 360

gcggtcgagg cctttaagaa agagggtcac ggcgggaaaa tcatcaacgc ctgttcccag 420

gccggccacg tcggcaaccc ggagctggcg gtatatagct cgagtaaatt cgcggtacgc 480

ggcttaaccc agaccgccgc tcgcgacctc gcgccgctgg gcatcacggt caacggctac 540

tgcccgggga ttgtcaaaac gccgatgtgg gccgaaattg accgccaggt gtccgaagcc 600

gccggtaaac cgctgggcta cggtaccgcc gagttcgcca aacgcatcac cctcggccgc 660

ctgtccgagc cggaagatgt cgccgcctgc gtctcctatc ttgccagccc ggattctgat 720

tatatgaccg gtcagtcatt gctgatcgac ggcggcatgg tgtttaacta a 771