

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0055022

(43) 공개일자 2023년04월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/74 (2006.01) C12N 9/02 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01) C12P 7/16 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 15/74 (2013.01)

C12N 9/0008 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0138241

(22) 출원일자 2021년10월18일

심사청구일자 2021년10월18일

(71) 출원인

경상국립대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

한국과학기술원

대전광역시 유성구 대학로 291(구성동)

(72) 발명자

장유신

경상남도 진주시 가좌길29번길 63, 453동 302호
(가좌동, 경상대학교)

성현정

경상남도 진주시 진성면 진성로276번길 279-23 (구천리)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이처영, 장제환

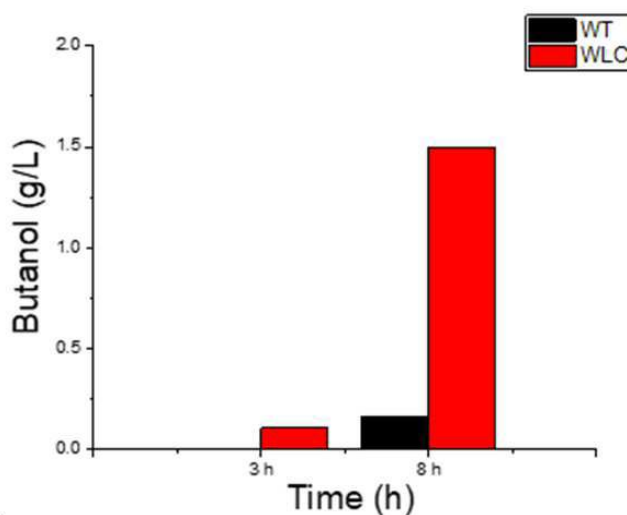
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 로그기에서 부탄올을 생산하는 클로스트리듐 균주

(57) 요약

본 발명은 로그기(log phase)에서 부탄올을 생산하는 재조합 미생물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 기존에 정 체기(stationary phase)에서 시작되었던 부탄올 생성 시기를 로그기로 앞당김으로써, 높은 부탄올 생산성을 나타 내는 재조합 미생물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 균주는 야생형 균주에 비해 바이오부탄올을 빨리 생산하는 재조합 균주로 미생물을 활용한 바이오연료 생산의 경쟁력을 높일 수 있는 효과가 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 9/0051 (2013.01)
C12N 9/1007 (2013.01)
C12P 7/16 (2013.01)
C12Y 102/07004 (2013.01)
C12Y 108/01004 (2013.01)
C12Y 201/01086 (2013.01)

(72) 발명자

이행림

경상남도 창원시 의창구 명지로94번길 8-4 (명서동)

윤예린

경상남도 창원시 진해구 해원로 5, 105동 406호 (이동, 남홍아파트)

이상엽

대전광역시 유성구 대학로 291 (구성동, 한국과학기술원)

임정애

대전광역시 유성구 대학로 291 (구성동, 한국과학기술원)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711134019
과제번호	2019R1A4A1029125
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원(R&D)
연구과제명	바이오리파이너리 시스템화 연구실
기 여 율	95/100
과제수행기관명	경상국립대학교
연구기간	2021.03.01 ~ 2022.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395067280
과제번호	PJ014926012021
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	미생물활용농업환경문제개선기술개발(R&D)
연구과제명	시스템대사공학 기반 미생물 효소를 이용한 농업용 폴리에틸렌 분해 기술 개발(1주

관)

기 여 율	5/100
과제수행기관명	경상국립대학교
연구기간	2021.01.01 ~ 2021.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

부탄올 생성 미생물에서,

이포아미드 리덕테이즈(ipoamide reductase), 추정 일산화탄소 탈수소효소 액세서리 단백질(putative carbon monoxide dehydrogenase accessory protein), C/Fe-SP 작은 서브유닛(C/Fe-SP small subunit), CODH/ACS 복합체 서브유닛 감마(CODH/ACS complex subunit gamma), 테트라하이드로메타노프로틴 S-메틸트랜스퍼레이즈 서브유닛(tetrahydromethanopterin S-methyltransferase subunit), 혐기성 일산화탄소 탈수소효소(anaerobic carbon-monoxide dehydrogenase) 및 리포산 함유 단백질(lipoic acid-containing protein)로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 단백질을 코딩하는 유전자가 도입되어 있는 재조합 미생물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 부탄올 생성 미생물은 클로스트리듐 속 균주인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 부탄올 생성 미생물은 클로스트리듐 아세토부틸리쿰인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 4

제1항에 있어서, 로그기(log phase)에도 부탄올 생성능을 가지는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 5

제1항에 있어서, 클로스트리듐 아세토부틸리쿰 WLC-K (*Clostridium acetobutylicum* WLC-K(KCTC18916P)) 인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 6

다음 단계를 포함하는 바이오 부탄올의 제조방법:

- (a) 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 재조합 미생물을 배양하여, 부탄올을 생성시키는 단계; 및
- (b) 상기 생성된 부탄올을 수득하는 단계.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 로그기(log phase)에서 부탄올을 생산하는 재조합 미생물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 기존에 정체기(stationary phase)에서 시작되었던 부탄올 생성 시기를 로그기로 앞당김으로써, 높은 부탄올 생산성을 나타내는 재조합 미생물에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0003] 바이오부탄올은 폐목재, 볏짚, 해조류 등에서 추출한 포도당과 박테리아로 만드는 알코올 연료다. 기존 석유나 석탄 등 화석연료에 포함된 탄소가 아니라 대기 중에 있는 이산화탄소를 바이오매스가 흡수해 생산하는 탄소원을 이용하기 때문에 이산화탄소 배출량 감소 효과가 큰 기술로 평가받고 있다.
- [0004] 부탄올은 탄소 4개로 구성된 알코올로 화학적 공정 또는 생화학적 공정을 이용하여 생산할 수 있다. 생화학적 공정으로는 클로스트리듐 아세토부틸리쿰(*Clostridium acetobutylicum*)과 같은 미생물 발효 공정을 통하여 생산될 수 있다.
- [0005] 부탄올은 Clostridial 균주의 혐기적 ABE (Acetone-Butanol-Ethanol) fermentation에 의해 생물학적 방법으로 생산될 수 있는데 (Jones, D.T. and Woods, D.R., Microbiol. Rev., 50:484, 1986; Rogers, P., Adv. Appl. Microbiol., 31:1, 1986; Lesnik, E.A. et al., Nucleic Acids Research, 29: 3583, 2001), 이러한 방법이 1950년대 까지만 해도 40년 이상에 걸쳐 부탄올과 아세톤의 주요 공급원이었다. Clostridial 균주는 성장 조건이 까다롭고 분자생물학적 tool 및 omics technology 등이 완전히 갖추어져 있지 않아서 추가 균주 개량에 어려움이 있다.
- [0006] 바이오부탄올 생산 미생물은 글루코오스와 같은 당분을 이용하여 산을 생산하는 산생성(acidogenesis) 과정과 생산된 산을 바이오알코올로 전환시키는 용매생성(solventogenesis) 과정을 거쳐 ABE 발효공정을 수행하게 된다. 상기 산 생성 과정은 로그기(log phase)에서 발생되며, 용매생성(solventogenesis) 과정은 정체기(stationary phase)에서 발생된다.
- [0007] 산생성 없이 바이오부탄올 생산하기 위한 수많은 대사공학적 시도가 있었음에도 불구하고, 클로스트리듐 균주가 발견되고 지금까지 log phase에서 부탄올을 생산이 보고된 바 없었다.
- [0008] 이에, 본 발명자들은 향상된 바이오부탄올 생성능을 가지는 미생물 균주를 개발하고자 예의 노력한 결과, 대사공학적 방법으로 로그기(log phase)에서도 부탄올을 생산할 수 있는 재조합 클로스트리듐 균주를 제작하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0009] (비특허문헌 0001) Jones, D.T. and Woods, D.R., Microbiol. Rev., 50:484, 1986
- (비특허문헌 0002) Rogers, P., Adv. Appl. Microbiol., 31:1, 1986;
- (비특허문헌 0003) Lesnik, E.A. et al., Nucleic Acids Research, 29: 3583, 2001

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명은 로그기(log phase)에서 부탄올을 생산하는 재조합 미생물을 제공하는데 있다.
- [0011] 본 발명의 다른 목적은 상기 재조합 미생물을 이용한 부탄올의 제조방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 부탄올 생성 미생물에서, 이포아미드 리덕테이즈(ipoamide reductase), 추정 일산화탄소 탈수소효소 액세스리 단백질(putative carbon monoxide dehydrogenase accessory protein), C/Fe-SP 작은 서브유닛(C/Fe-SP small subunit), CODH/ACS 복합체 서브유닛 감마(CODH/ACS complex subunit gamma), 테트라하이드로메타노프루틴 S-메틸트랜스퍼레이즈 서브유닛(tetrahydromethanopterin S-methyltransferase subunit), 혐기성 일산화탄소 탈수소효소(anaerobic carbon-monoxide dehydrogenase) 및 리

포산 함유 단백질(lipoic acid-containing protein)로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 단백질을 코딩하는 유전자가 도입되어 있는 재조합 미생물을 제공한다.

[0014] 본 발명은 또한, 다음 단계를 포함하는 바이오 부탄올의 제조방법을 제공한다:

[0015] (a) 상기 재조합 미생물을 배양하여, 부탄올을 생성시키는 단계; 및

[0016] (b) 상기 생성된 부탄올을 수득하는 단계.

발명의 효과

[0018] 본 발명에 따른 재조합 미생물은 야생형 균주에 비해 바이오부탄올을 생산하는 시기를 당김으로서 부탄올 생산성을 획기적으로 향상시켜 바이오연료 생산의 경쟁력을 높일 수 있는 효과가 있다. 또한, 바이오 부탄올 생산을 위한 그린화학(green chemistry) 구축의 핵심기술로 활용이 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 *Clostridium* 야생형 균주 (WT), *Clostridium* 재조합 균주 (WLC-K)를 각각 80g/L 글루코오스를 함유하는 CGM 배지에서 배양하며 부탄올 첫 생산 시기에 따른 부탄올 생산량 결과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0023] 본 발명에서는 부탄올 생성 균주에서 부탄올의 첫 생성시기를 기존의 정체기(stationary phase) 로그기(log phase)로 당긴 재조합 미생물을 제작하여, 바이오부탄올의 생산성을 향상시키고자 하였다.

[0024] 따라서, 본 발명에서는 클로스트리듐에서 이포아미드 리덕테이즈(ipoamide reductase), 추정 일산화탄소 탈수소 효소 액세스리 단백질(putative carbon monoxide dehydrogenase accessory protein), C/Fe-SP 작은 서브유닛(C/Fe-SP small subunit), CODH/ACS 복합체 서브유닛 감마(CODH/ACS complex subunit gamma), 테트라하이드로 메타노프로틴 S-메틸트랜스퍼레이즈 서브유닛(tetrahydromethanopterin S-methyltransferase subunit), 혐기성 일산화탄소 탈수소효소(anaerobic carbon-monoxide dehydrogenase) 및 리포산 함유 단백질(lipoic acid-containing protein)로 구성된 군에서 선택되는 단백질을 코딩하는 유전자를 도입한 재조합 클로스트리듐 균주를 제작하고, 상기 재조합 균주를 글루코오스를 탄소원으로 하여 발효시킨 결과, 로그기(log phase)에서 부탄올을 생산하는 것을 확인하였다.

[0025] 본 발명의 재조합 클로스트리듐 균주는 최초로 로그기에서 용매 생산이 가능한 균주이다.

[0026] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, 부탄올 생성 미생물에서, 이포아미드 리덕테이즈(ipoamide reductase), 추정 일산화탄소 탈수소효소 액세스리 단백질(putative carbon monoxide dehydrogenase accessory protein), C/Fe-SP 작은 서브유닛(C/Fe-SP small subunit), CODH/ACS 복합체 서브유닛 감마(CODH/ACS complex subunit gamma), 테트라하이드로 메타노프로틴 S-메틸트랜스퍼레이즈 서브유닛(tetrahydromethanopterin S-methyltransferase subunit), 혐기성 일산화탄소 탈수소효소(anaerobic carbon-monoxide dehydrogenase) 및 리포산 함유 단백질(lipoic acid-containing protein)로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 단백질을 코딩하는 유전자가 도입되어 있는 재조합 미생물에 관한 것이다.

[0027] 본 발명에 있어서, 상기 부탄올 생성 미생물은 클로스트리듐 속 균주인 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 클로스트리듐 아세토부틸리쿰인 것이 바람직하다.

[0028] 본 발명에 있어서, 상기 재조합 미생물은 로그기(log phase)에도 부탄올 생성능을 가지는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0029] 본 발명에 있어서, 상기 재조합 미생물은 클로스트리듐 아세토부틸리쿰 K (*Clostridium acetobutylicum* WLC-

K(KCTC18916P) 인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0030] 본 발명은 다른 관점에서, 다음 단계를 포함하는 바이오 부탄올의 제조방법에 관한 것이다:

[0031] (a) 상기 재조합 미생물을 배양하여, 부탄올을 생성시키는 단계; 및

[0032] (b) 상기 생성된 부탄올을 수득하는 단계.

[0034] 본 발명에 있어서, 용어 "벡터 (vector)"는 적합한 숙주 내에서 DNA를 발현시킬 수 있는 적합한 조절 서열에 작동가능하게 연결된 DNA 서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다. 벡터는 플라스미드, 파지 입자, 또는 간단하게 잠재적 게놈 삽입물일 수 있다. 적당한 숙주로 형질전환되면, 벡터는 숙주 게놈과 무관하게 복제하고 기능할 수 있거나, 또는 일부 경우에 게놈 그 자체에 통합될 수 있다. 플라스미드가 현재 벡터의 가장 통상적으로 사용되는 형태이므로, 본 발명의 명세서에서 "플라스미드 (plasmid)" 및 "벡터 (vector)"는 때로 상호 교환적으로 사용된다. 그러나, 본 발명은 당업계에 알려진 또는 알려지게 되는 바와 동등한 기능을 갖는 벡터의 다른 형태를 포함한다. 포유동물 세포 배양물 발현을 위한 전형적인 발현 벡터는 예를 들면 pRK5 (EP 307,247호), pSV16B (WO 91/08291호) 및 pVL1392 (Pharmingen)을 기초로 한다.

[0035] "발현 조절 서열 (expression control sequence)"이라는 표현은 특정한 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열의 발현에 필수적인 DNA 서열을 의미한다. 그러한 조절 서열은 전사를 실시하기 위한 프로모터, 그러한 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다. 예를 들면, 원핵생물에 적합한 조절 서열은 프로모터, 임의로 오퍼레이터 서열 및 리보솜 결합 부위를 포함한다. 진핵세포는 프로모터, 폴리아데닐화 시그널 및 인헨서가 이에 포함된다. 플라스미드에서 유전자의 발현 양에 가장 영향을 미치는 인자는 프로모터이다. 고 발현용의 프로모터로서 SR α 프로모터와 사이토메가로바이러스 (cytomegalovirus) 유래 프로모터 등이 바람직하게 사용된다.

[0036] 본 발명의 DNA 서열을 발현시키기 위하여, 매우 다양한 발현 조절 서열중 어느 것이더라도 벡터에 사용될 수 있다. 유용한 발현 조절서열의 예에는, 예를 들어, SV40 또는 아데노바이러스의 초기 및 후기 프로모터들, lac 시스템, trp 시스템, TAC 또는 TRC 시스템, T3 및 T7 프로모터들, 파지 램다의 주요 오퍼레이터 및 프로모터 영역, fd 코드 단백질의 조절 영역, 3-포스포글리세레이트 키나제 또는 다른 글리콜분해 효소에 대한 프로모터, 상기 포스포타제의 프로모터들, 예를 들어 Pho5, 효모 알파-교배 시스템의 프로모터 및 원핵세포 또는 진핵 세포 또는 이들의 바이러스의 유전자의 발현을 조절하는 것으로 알려진 구성과 유도의 기타 다른 서열 및 이들의 여러 조합이 포함된다. T7 RNA 폴리메라아제 프로모터 Φ 10은 이. 콜라이에서 단백질을 발현시키는데 유용하게 사용될 수 있다.

[0037] 핵산은 다른 핵산 서열과 기능적 관계로 배치될 때 "작동가능하게 연결 (operably linked)"된다. 이것은 적절한 분자 (예를 들면, 전사 활성화 단백질)은 조절 서열(들)에 결합될 때 유전자 발현을 가능하게 하는 방식으로 연결된 유전자 및 조절 서열(들)일 수 있다. 예를 들면, 전서열(pre-sequence) 또는 분비 리더 (leader)에 대한 DNA는 폴리펩타이드의 분비에 참여하는 전단백질로서 발현되는 경우 폴리펩타이드에 대한 DNA에 작동가능하게 연결되고; 프로모터 또는 인헨서는 서열의 전사에 영향을 끼치는 경우 코딩서열에 작동가능하게 연결되거나; 또는 리보솜 결합 부위는 서열의 전사에 영향을 끼치는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결되거나; 또는 리보솜 결합 부위는 번역을 용이하게 하도록 배치되는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로, "작동가능하게 연결된"은 연결된 DNA 서열이 접촉하고, 또한 분비 리더의 경우 접촉하고 리딩 프레임 내에 존재하는것을 의미한다. 그러나, 인헨서 (enhancer)는 접촉할 필요가 없다. 이들 서열의 연결은 편리한 제한 효소 부위에서 라이게이션(연결)에 의해 수행된다. 그러한 부위가 존재하지 않는 경우, 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터 (oligonucleotide adaptor) 또는 링커(linker)를 사용한다.

[0038] 본원 명세서에 사용된 용어 "발현 벡터"는 통상 이중의 DNA의 단편이 삽입된 재조합 캐리어 (recombinant carrier)로서 일반적으로 이중 가닥의 DNA의 단편을 의미한다. 여기서, 이중 DNA는 숙주 세포에서 천연적으로 발견되지 않는 DNA인 이형 DNA를 의미한다. 발현 벡터는 일단 숙주 세포내에 있으면 숙주 염색체 DNA와 무관하게 복제할 수 있으며 벡터의 수 개의 카피 및 그의 삽입된 (이중) DNA가 생성될 수 있다.

[0039] 당업계에 주지된 바와 같이, 숙주세포에서 형질감염 유전자의 발현 수준을 높이기 위해서는, 해당 유전자가, 선택된 발현 숙주 내에서 기능을 발휘하는 전사 및 해독 발현 조절 서열에 작동가능하도록 연결되어야만 한다. 바람직하게는 발현 조절서열 및 해당 유전자는 세균 선택 마커 및 복제 개시점 (replication origin)을 같이 포함하고 있는 하나의 발현 벡터 내에 포함되게 된다. 발현 숙주가 진핵세포인 경우에는, 발현 벡터는 진핵 발현

숙주 내에서 유용한 발현 마커를 더 포함하여야만 한다.

[0040] 본 발명의 목적 단백질의 DNA 서열을 발현시키기 위해 매우 다양한 발현 숙주/벡터 조합이 이용될 수 있다. 진핵 숙주에 적합한 발현 벡터에는, 예를 들어 SV40, 소 유두종바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스(adeno-associated virus), 시토크로마 바이러스 및 레트로바이러스로부터 유래된 발현 조절 서열을 포함한다. 세균 숙주에 사용할 수 있는 발현 벡터에는 pBluescript, pGEX2T, pUC벡터, col E1, pCR1, pBR322, pMB9 및 이들의 유도체와 같이 E. coli에서 얻는 것을 예시할 수 있는 세균성 플라스미드, RP4와 같이 보다 넓은 숙주 범위를 갖는 플라스미드, ϕ _{gt10}과 ϕ _{gt11}, NM989와 같은 매우 다양한 파지 람다(phage lambda) 유도체로 예시될 수 있는 파지 DNA, 및 M13과 필라멘트성 단일가닥의 DNA 파지와 같은 기타 다른 DNA 파지가 포함된다. 효모 세포에 유용한 발현 벡터는 2 μ 플라스미드 및 그의 유도체이다. 곤충 세포에 유용한 벡터는 pVL 941이다.

[0041] 상술한 발현 벡터에 의해 형질전환 또는 형질감염된 숙주 세포는 본 발명의 또 다른 측면을 구성한다. 본원 명세서에 사용된 용어 "형질전환"은 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체의 인자로서 또는 염색체 통합완성에 의해 복제가능하게 되는 것을 의미한다. 본원 명세서에 사용된 용어 "형질감염"은 임의의 코딩 서열이 실제로 발현되는 아니든 발현 벡터가 숙주 세포에 의해 수용되는 것을 의미한다.

[0042] 발명의 숙주 세포는 원핵 또는 진핵생물 세포일 수 있다. 또한, DNA의 도입효율이 높고, 도입된 DNA의 발현효율이 높은 숙주가 통상 사용된다. 이. 콜라이, 슈도모나스, 바실러스, 스트렙토마이세스, 진균, 효모와 같은 주지의 진핵 및 원핵 숙주들, 스포도프테라 프루기페르다(SF9)와 같은 곤충 세포, CHO 및 생쥐 세포같은 동물 세포, COS 1, COS 7, BSC 1, BSC 40 및 BMT 10과 같은 아프리카 그린 원숭이 세포, 및 조직배양된 인간 세포는 사용될 수 있는 숙주 세포의 예이다. 본 발명의 단백질을 코딩하는 cDNA를 클로닝할 때에는 동물세포를 숙주로 하는 것이 바람직하다. 본 발명에서는 어류 기원의 CHSE-214, FHM, RTG-2 및 EPC를 예시하였으나 물론 이에 제한되는 것은 아니다. COS 세포를 이용하는 경우에는 COS 세포에서 SV40 라지 T안티겐(large T antigen)이 발현하고 있으므로 SV40의 복제개시점을 갖는 플라스미드는 세포중에서 다수 카피(copy)의 에피솜(episome)으로 존재하도록 되고 통상보다 고 발현이 기대될 수 있다. 도입된 DNA 서열은 숙주 세포와 동일한 종으로부터 얻을 수 있거나, 숙주 세포와 다른 종의 것일 수 있거나, 또는 그것은 어떠한 이종 또는 상동성 DNA를 포함하는 하이브리드 DNA 서열일 수 있다.

[0043] 물론 모든 벡터와 발현 조절 서열이 본 발명의 DNA 서열을 발현하는데 모두 동등하게 기능을 발휘하지는 않는다는 것을 이해하여야만 한다. 마찬가지로 모든 숙주가 동일한 발현 시스템에 대해 동일하게 기능을 발휘하지는 않는다. 그러나, 당업자라면 과도한 실험적 부담없이 본 발명의 범위를 벗어나지 않는 채로 여러 벡터, 발현 조절 서열 및 숙주 중에서 적절한 선택을 할 수 있다. 예를 들어, 벡터를 선택함에 있어서는 숙주를 고려하여야 하는데, 이는 벡터가 그 안에서 복제되어야만 하기 때문이다. 벡터의 복제 수, 복제 수를 조절할 수 있는 능력 및 당해 벡터에 의해 코딩되는 다른 단백질, 예를 들어 항생제 마커의 발현도 또한 고려되어야만 한다. 발현 조절 서열을 선정함에 있어서는, 여러 가지 인자들을 고려하여야만 한다. 예를 들어, 서열의 상대적 강도, 조절가능성 및 본 발명의 DNA 서열과의 상용성 등, 특히 가능성있는 이차 구조와 관련하여 고려하여야 한다. 단세포 숙주는 선정된 벡터, 본 발명의 DNA 서열에 의해 코딩되는 산물의 독성, 분비 특성, 단백질을 정확하게 폴딩시킬 수 있는 능력, 배양 및 발효 요건들, 본 발명 DNA 서열에 의해 코딩되는 산물을 숙주로부터 정제하는 것의 용이성 등의 인자를 고려하여 선정되어야만 한다. 이들 변수의 범위내에서, 당업자는 본 발명의 DNA 서열을 발효 또는 대규모 동물 배양에서 발현시킬 수 있는 각종 벡터/발현 조절 서열/숙주 조합을 선정할 수 있다. 발현 클로닝에 의해 단백질의 cDNA를 클로닝 하려고 할 때의 스크리닝법으로서 바인딩법(binding법), 페닝법(panning법), 필름에멀션법(film emulsion 법)등이 적용될 수 있다.

[0044] 본 발명에서 상기 유전자를 숙주세포의 염색체상에 삽입하는 방법으로는 통상적으로 알려진 유전자조작방법을 사용할 수 있으며, 비바이러스 전달 방법은 전지천공법, 리포펙션, 미세주사, 탄도법, 비로솜, 리포솜, 면역리포솜, 다가 양이온 또는 지질:핵산 접합체, 네이키드 DNA, 인공 바이론 및 화학물질 촉진 DNA 유입을 포함한다. 소소노포레이션, 예를 들어 Sonitron 2000 시스템(Rich-Mar)을 이용한 방법도 핵산의 전달에 사용할 수 있으며, 다른 대표적인 핵산 전달 시스템은 Amaxa Biosystems(Cologne, Germany), Maxcyte, Inc.(Rockville, Maryland) 및 BTX Molecular Syetem(Holliston, MA)의 방법을 포함한다. 리포펙션 방법은 미국특허 제5,049,386호, 미국특허 제4,946,787호 및 미국특허 제4,897,355호에 명시되어 있으며 리포펙션 시약은 상업적으로 시판되고 있으며, 예를 들어, TransfectamTM 및 LipofectinTM 이 있다. 폴리뉴클레오타이드의 효과적인 리셉터-인식 리포펙션에 적당한 양이온 또는 중성 지질은 Felgner의 지질을 포함하며 (W091/17424 및 W091/16024), 생체 외 도입을 통해 세포로, 생체 내 도입을 통해 표적 조직으로 전달할 수 있다. 면역지질 복합체 등 표적 리포솜을 포함하는

지질:핵산 복합체의 제조 방법은 당해 업계에 잘 알려져 있다 (Crystal, Science., 270:404-410, 1995; Blaese et al., Cancer Gene Ther., 2:291-297, 1995; Behr et al., Bioconjugate Chem., 5:382389, 1994; Remy et al., Bioconjugate Chem., 5:647-654, 1994; Gao et al., Gene Therapy., 2:710-722, 1995; Ahmad et al., Cancer Res., 52:4817-4820, 1992; 미국특허 제4,186,183호; 미국특허 제4,217,344호; 미국특허 제4,235,871호; 미국특허 제4,261,975호; 미국특허 제4,485,054호; 미국특허 제4,501,728호; 미국특허 제4,774,085호; 미국특허 제4,837,028호; 미국특허 제4,946,787호).

[0045] 레트로바이러스의 친화성은 외부 외피 단백질과 일체화함으로써 변할 수 있어 표적 세포의 종류를 확대시킬 수 있다. 렌티바이러스 벡터는 비분열 세포를 형질도입 또는 감염시켜서 고바이러스 역가를 생성하는 레트로바이러스 벡터이다. 표적 조직에 따라 레트로바이러스 유전자 전달 시스템이 결정된다. 레트로바이러스 벡터는 6-10kb 외부 서열을 포함할 수 있는 시스 액팅 긴 말단 반복을 포함한다. 벡터의 복제와 포장을 위해 충분한 최소의 시스 액팅 LTR은 영구적인 트랜스젠 발현을 위해 치료 유전자가 표적 세포로 통합되도록 사용할 수 있다. 널리 사용되는 레트로바이러스 벡터는 쥐 백혈병 바이러스(MuLV), 긴팔원숭이 백혈병 바이러스(GaLV), 원숭이 면역결핍 바이러스(SIV), 인간 면역결핍 바이러스(HIV), 및 그들의 조합 바이러스를 포함한다 (Buchscher et al., J. Virol., 66:2731-2739, 1992; Johann et al., J. Virol., 66:1635-1640 1992; Sommerfelt et al., Virol., 176:58-59, 1990; Wilson et al., J. Virol., 63:2374-2378, 1989; Miller et al., J. Virol., 65:2220-2224, 1991; PCT/US94/05700).

[0046] 수크로오스 포스포틸라아제 단백질을 일시적으로 발현하는 경우에는 아데노바이러스 기반 시스템을 더욱 많이 이용하며, 아데노바이러스 벡터는 많은 세포들에서 고효율로 형질도입을 일으키지만 세포 분열을 필요로 하지 않는다. 상기 벡터를 이용하면 높은 역가와 높은 수준의 발현을 얻을 수 있고, 간단한 시스템에서 대량으로 생산될 수 있다. 또한 아데노 부속 바이러스(AAV) 벡터는 표적 핵산을 가진 세포로 형질도입하는데 이용되는데, 예를 들면 생체 외 상에서 핵산과 펩티드의 생산 및 생체 내 및 생체 외 상에서 유전자 치료에 이용되며 (West et al., Virology., 160:38-47, 1987; 미국특허 제4,797,368호; WO93/24641; Kotin, Human Gene Therapy., 5:793-801, 1994; Muzyczka, J. Clin. Invest., 94:1351, 1994), 재조합 AAV 벡터의 구성은 이미 알려져 있다 (미국특허 제 5,173,414호; Tratschin et al., Mol. Cell. Biol., 5:3251-3260, 1985; Tratschin, et al., Mol. Cell. Biol., 4:20722081, 1984; Hermonat & Muzyczka, PNAS., 81:6466-6470, 1984; Samulski et al., J Virol., 63:038223828, 1989). 임상 실험에서는 적어도 6개의 바이러스 벡터를 이용한 유전자 전달 방법이 이용되고 있는데 형질도입제를 생성하는 도움 세포 라인에 유전자를 삽입함으로써 결합이 있는 벡터를 보완하는 접근법이다. pLASN과 MFG-S는 임상 실험에서 사용되고 있는 레트로바이러스의 예이고 (Dunbar et al., Blood., 85:3048-305, 1995; Kohn et al., Nat. Med., 1:1017-102, 1995; Malech et al., PNAS., 94:(22)12133-12138, 1997), PA317/pLASN는 유전자 치료에 사용된 최초의 치료 벡터로 (Blaese et al., Science., 270:475-480, 1995) MFG-S 포장 벡터의 형질도입 효율은 50% 또는 그 이상을 보였다 (Ellem et al., Immunol Immunother., 44(1):10-20, 1997; Dranoff et al., Hum. Gene Ther., 1:111-2, 1997).

[0047] 재조합 아데노 연관 바이러스 벡터(rAAV)는 결합 있고 비병원성인 제2형 파르보바이러스 아데노 연관 바이러스를 기반으로 하는 유망한 대체 유전자 전달 시스템이다. 모든 벡터는 트랜스젠 발현 카세트 측면에 위치하는 AAV 145 bp 역위 말단 반복을 보유한 플라스미드로부터 유래한다. 형질도입된 세포의 게놈으로 통합에 기인하는 효율적인 유전자 전달 및 안정한 트랜스젠 전달은 상기 벡터 시스템의 큰 장점이다 (Wagner et al., Lancet., 351:9117-17023, 1998; Kearns et al., Gene Ther., 9:748-55, 1996).

[0049] [실시예]

[0050] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0052] 실시예 1. 부탄올 생성능이 향상된 재조합 클로스트리듐 개량 균주의 제조

[0053] 본 실시예에서는 클로스트리듐 아세토부틸리쿰 ATCC824를 모균주로 하여 로그기에서도 부탄올을 생성할 수 있도록 대사공학적인 방법을 이용하여, 재조합 균주를 제작하였다.

[0054] 클로스트리듐 디피실리 유전자 (NCBI ID_ 31352282 ~ 3152288를 주형으로 하여, 서열번호 1, 서열번호 2의 올리

고뉴클레오티드를 프라이머로 제작하고, 이를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 변성 95℃, 30초; 어닐링 55℃, 30초; 및 중합반응 72℃, 5분을 30회 반복하였다. 그 후, 얻어진 유전자를 이용하여 제한효소 NcoI 과 PstI이 처리된 pTHL20 벡터에 김슨어셈블리를 수행하여 클로닝된 pTHL20-WLC 재조합 벡터를 얻었다. 제작된 pTHL20-WLC 벡터를 클로스트리듐 아세토부틸리쿰 ATCC824 균주에 형질전환시켰다.

서열 번호 1: TTA GTT AGA CCA TGG ATG AAG ATA GTA GTA GTA GGT GGT GG

서열 번호 2: AAT AAT ATC TTA ATC TTT AAT TAT TCT AAT CCA GCC TCG TAT TCT TT

그 결과, 이포아미드 리덕테이즈(ipoamide reductase), 추정 일산화탄소 탈수소효소 액세스리 단백질(putative carbon monoxide dehydrogenase accessory protein), C/Fe-SP 작은 서브유닛(C/Fe-SP small subunit), CODH/ACS 복합체 서브유닛 감마(CODH/ACS complex subunit gamma), 테트라하이드로메타노프루틴 S-메틸트랜스퍼레이즈 서브유닛(tetrahydromethanopterin S-methyltransferase subunit), 혐기성 일산화탄소 탈수소효소(anaerobic carbon-monoxide dehydrogenase) 및 리포산 함유 단백질(lipoic acid-containing protein)을 코딩하는 유전자가 도입된 재조합 클로스트리듐 아세토부틸리쿰 WLC-K(*Clostridium acetobutylicum* WLC-K) 균주를 제작하였다.

실시예 2. 클로스트리듐 개량 균주 배양용 배지 제조

실시예 1에서 제작된 클로스트리듐 아세토부틸리쿰 WLC-K 균주를 다음 표 1의 배지성분 및 함량을 이용하여 종배양과 본 배양을 실시하였다.

표 1

클로스트리듐 생산 배지 (CGM)

성분	조성 (g/L)
K ₂ HPO ₄	0.75
KH ₂ PO ₄	0.75
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.7
MnSO ₄ · 5H ₂ O	0.017
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.01
(NH ₄) ₂ SO ₄	2
NaCl	1
Asparagine	2
p-aminobenzoic acid	0.004
Yeast extract	5

실시예 3. 클로스트리듐 개량 균주 배양 및 부탄올 생성능 확인

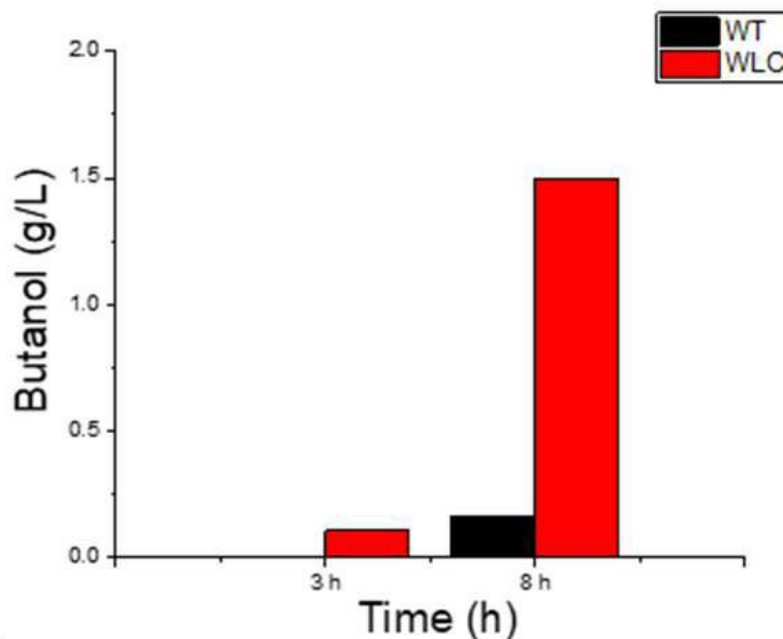
클로스트리듐 아세토부틸리쿰 WLC-K 균주와 클로스트리듐 아세토부틸리쿰 ATCC824를 배양하여 부탄올 생산시기와 생성능을 확인하였다.

배양배지로 사용한 CGM 배지(표 1)는 121℃에서 15분간 멸균하여 37℃의 혐기 챔버에 보관하여 24시간 이상 기화하였다. 종자 배양(seed culture)을 준비하기 위해 80 g/L 글루코오가 보충된 CGM 배지 10 mL에 클로스트리듐 아세토부틸리쿰 K를 접종하여 37℃의 혐기 챔버에서 배양하였다. 배양액의 OD(Optical Density)가 1 이상 자랐을 때 5% 부피로 CGM 배지 200 mL가 담겨 있는 플라스크에 접종하였다. 이후, 배양액의 OD가 1 이상 자랐을 때 5% 부피로 CGM 배지 1.8 L가 담겨 있는 발효기에 접종하였다. 혐기성 조건을 유지하기 위해 초기 3시간 동안 이산화탄소를 0.5 L/min-1의 유량으로 퍼지(purge)한 후 공급을 중단하였다. 배양 pH는 28% 암모니아 용액을 첨가하여 자동으로 5.0 이상으로 조정하였으며, 교반 속도는 200 rpm으로 수행하였다.

- [0069] OD를 제외한 모든 분석방법을 수행하기 이전에 12,000 RPM에서 7분간 원심분리한 후 상등액을 분석에 사용하였다. 배양액내 존재하는 글루코오스는 high performance liquid chromatography (HPLC; Waters 1515/2414/2707, Waters, Milford, MA, USA) 를 이용하여 분석하였다. 배양액내 존재하는 부탄올의 농도는 Gas chromatography (GC; Agilent 7890N, Agilent Technologies, CA, USA)를 이용하여 분석하였다.
- [0070] 상기 배지에서 생산된 바이오부탄올 생산 시기를 확인한 결과, 클로스트리듐 아세트부틸리쿰 WLC-K 균주의 경우 로그기에 해당하는 3 시간 배양액에서 부탄올이 0.106 g/L 생산된 반면, 야생형 균주(ATCC824)는 부탄올이 생산되지 않았다. 또한, 야생형 균주에서 부탄올 최초 생산 시기는 정체기(stationary phase)인 8 시간에서 0.164 g/L가 생산된 반면, 클로스트리듐 아세트부틸리쿰 WLC-K 균주는 1.5 g/L 부탄올이 생산되어 생산량이 10배 가량 증가함을 확인하였다(도 1).
- [0071] 클로스트리듐 아세트부틸리쿰 WLC-K (*Clostridium acetobutylicum* WLC-K)는 한국생명공학연구원에 2021년 8월 25일자로 기탁 신청하고, 2021년 8월 27일자 수탁번호 KCTC18916P의 기탁번호(KCTC18916P)를 부여받았다.
- [0072] 기탁기관명 : 한국생명공학연구원
- [0073] 수탁번호 : KCTC18916P
- [0074] 수탁일자 : 20210827

도면

도면1



서열목록

- <110> Gyeongsang National University
- <120> Novel *Clostridium* strain capable of production butanol at log phase
- <130> P21-B180
- <160> 2

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 1

ttagttagac catggatgaa gatagtagta gtaggtggtg g 41

<210> 2

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 2

aataatatct taatctttaa ttattctaatt ccagcctcgt attcttt 47