

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0010474 (43) 공개일자 2014년01월27일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 15/53 (2006.01) C12N 15/70 (2006.01) C12P 7/64 (2006.01)	(71) 출원인 서강대학교산학협력단 서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)	
(21) 출원번호 10-2012-0073418	(72) 발명자 이진원 서울특별시 송파구 양재대로 1218, 201동 1601호 (방이동, 올림픽선수기자촌아파트)	
(22) 출원일자 2012년07월05일 심사청구일자 2012년07월05일	이선희 서울특별시 은평구 불광로6길 10-10, 101호 (불광동) 이승한 서울특별시 송파구 올림픽로 135 (잠실동, 리센즈) 248동 2603호	
	(74) 대리인 양부현	

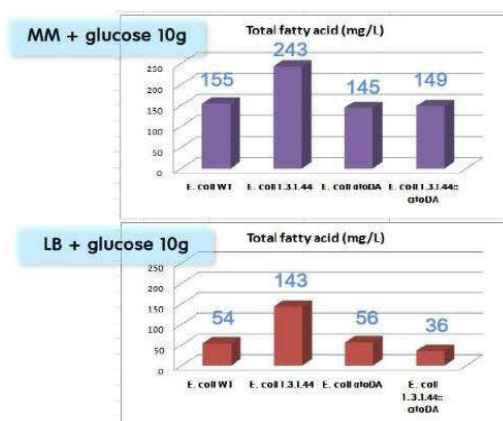
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 트랜스-2-에노일-CoA 리덕타아제를 도입한 형질전환 대장균을 이용한 지방산 제조방법

(57) 요약

본 발명은 형질전환 대장균을 이용한 지방산의 제조방법에 관한 것으로, (a) 슈도모나스(*Pseudomonas*) 종의 트랜스-2-에노일-CoA 리덕타아제(trans-2-enoyl-CoA reductase)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 발현 벡터에 삽입하여 재조합 벡터를 제조하는 단계; (b) 상기 재조합 벡터를 대장균에 형질전환하여 형질전환 대장균을 제조하는 단계; (c) 상기 형질전환 대장균을 배양하여 지방산을 제조하는 단계; 및 (d) 상기 지방산을 수득하는 단계를 포함하는 형질전환 대장균을 이용한 지방산의 제조방법을 제공한다. 본 발명에 따르면, 본 발명의 형질전환 대장균은 야생형 대장균과 비교하여 2-4배 증가된 지방산 생산능을 나타낸다. 본 발명의 지방산 제조방법은 환경 친화적인 생물 공정을 통해 지방산을 제조하므로 유해한 폐기물 및 에너지 소비를 절감할 수 있다.

대표도 - 도6



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0031364

부처명 교육과학기술부

연구사업명 글로벌 프론티어 연구개발사업

연구과제명 대사경로 개선을 통한 지방산 및 지방산 유래 유용물질 생산 균주 개발과 생산공정 최적화

기 여 율 1/1

주관기관 서강대학교 산학협력단

연구기간 2011.08.22 ~ 2012.08.21

특허청구의 범위

청구항 1

다음의 단계를 포함하는 형질전환 대장균을 이용한 지방산의 제조방법:

- (a) 슈도모나스(*Pseudomonas*) 종의 트랜스-2-에노일-CoA 리덕타아제(trans-2-enoyl-CoA reductase)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 발현 벡터에 삽입하여 재조합 벡터를 제조하는 단계;
- (b) 상기 재조합 벡터를 대장균에 형질전환하여 형질전환 대장균을 제조하는 단계;
- (c) 상기 형질전환 대장균을 배양하여 지방산을 제조하는 단계; 및
- (d) 상기 지방산을 수득하는 단계.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 슈도모나스 종은 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*), 슈도모나스 크레모리콜로라타(*Pseudomonas cremoricolorata*), 슈도모나스 풀바(*Pseudomonas fulva*), 슈도모나스 몬테일리(*Pseudomonas monteilii*), 슈도모나스 오리지하비탄스(*Pseudomonas oryzihabitans*), 슈도모나스 파라풀바(*Pseudomonas parafulva*) 또는 슈도모나스 플리코글로시시다(*Pseudomonas plecoglossicida*)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 트랜스-2-에노일-CoA 리덕타아제를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제1서열인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 재조합 벡터는 lac 프로모터 서열을 포함하며 상기 lac 프로모터 서열은 상기 트랜스-2-에노일-CoA 리덕타아제를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동적으로(operatively) 결합된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 형질전환은 전기천공법을 이용하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 형질전환 대장균은 야생형 대장균과 비교하여 2-4배 증가된 지방산 생산능을 나타내는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

상기 제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된 지방산.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 트랜스-2-에노일-CoA 리덕타아제를 도입한 형질전환 대장균을 이용한 지방산 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 화석연료로부터 생산되어지는 화학공업을 대체할 수 있는, 즉 인류에게 유해한 폐기물의 생산 및 에너지 소비를 최소화할 수 있는 바이오매스를 원료로 사용하는 환경 친화적인 새로운 생물 공정의 개발이 필요하다. 바이오 에너지로 대표되어지는 바이오에탄올, 바이오디젤, 바이오가스 및 부탄올에 대한 관심이 증가하고 있지만, 언급된 종류의 바이오에너지 모두 전력생산이나 수송용 연료로 사용될 수 있으나, 실적용 및 생산 방법의 몇몇 단점으로 인해 새로운 신재생에너지 자원인 탄화수소(hydrocarbon) 형태의 화합물에 대한 관심이 증가되고 있다. 이에 따라 지방산(fatty acid)를 대사산물로서 생성할 수 있는 재조합 균주에 대한 관심도 증대되고 있다.

[0003] 미생물의 지방산 경로 대사흐름에서 지방산 생산의 과발현 목적에 해당하는 시도와 노력은 끊임없이 있어왔다. 특히, 대장균은 효소 생산 시스템은 타 생물체에 비해 많은 대사정보가 알려져 있고, 유전자에 대한 정보가 거의 다 밝혀져 재조합 단백질 생산에 널리 이용되고 있다. 대장균은 다루기 쉬운 미생물로 성장력이 좋으며 경로 조절이 쉬운 것으로 알려져 있다.

[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 화학공업을 대체할 수 있는 신재생에너지 자원인 탄화수소(hydrocarbon) 형태의 화합물을 제조하고자 노력하였다. 그 결과, 슈도모나스(*Pseudomonas*) 종의 트랜스-2-에노일-CoA 리덕타아제(trans-2-enoyl-CoA reductase)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 발현 벡터에 삽입하고 이를 대장균에 도입하여 지방산을 제조하는 방법을 개발함으로써 본 발명을 완성하였다.

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

[0007] 본 발명의 다른 목적은 지방산을 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 다음의 단계를 포함하는 형질전환 대장균을 이용한 지방산의 제조방법을 제공한다:

[0010] (a) 슈도모나스(*Pseudomonas*) 종의 트랜스-2-에노일-CoA 리덕타아제(trans-2-enoyl-CoA reductase)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 발현 벡터에 삽입하여 재조합 벡터를 제조하는 단계;

[0011] (b) 상기 재조합 벡터를 대장균에 형질전환하여 형질전환 대장균을 제조하는 단계;

[0012] (c) 상기 형질전환 대장균을 배양하여 지방산을 제조하는 단계; 및

[0013] (d) 상기 지방산을 수득하는 단계.

[0014] 본 발명자들은 화학공업을 대체할 수 있는 신재생에너지 자원인 탄화수소(hydrocarbon) 형태의 화합물을 제조하고자 노력하였다. 그 결과, 슈도모나스(*Pseudomonas*) 종의 트랜스-2-에노일-CoA 리덕타아제(trans-2-enoyl-CoA reductase)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 발현 벡터에 삽입하고 이를 대장균에 도입하여 지방산을 제조하는 방법을 개발하였다.

[0015] 본 발명의 지방산 제조방법을 각각의 단계로 나누어 상세하게 설명하면 다음과 같다:

[0016] 단계 (a): 재조합 벡터의 제조

[0017] 본 발명의 지방산(fatty acid)을 제조하기 위한 첫 번째 단계로, 슈도모나스(*Pseudomonas*) 종의 트랜스-2-에노일-CoA 리덕타아제(trans-2-enoyl-CoA reductase)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 발현 벡터에 삽입하여 재조합 벡터를 제조한다.

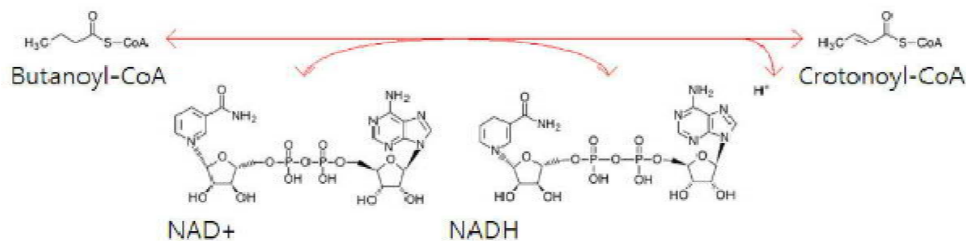
[0018] 본 발명에서 지방산을 제조하기 위해 이용한 미생물은 슈도모나스 종이고, 바람직하게는, 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*), 슈도모나스 크레모리콜로라타(*Pseudomonas cremoricolorata*), 슈도모나스 풀바(*Pseudomonas fulva*), 슈도모나스 몬테일리(*Pseudomonas monteilii*), 슈도모나스 오리지하비탄스(*Pseudomonas oryzihabitans*), 슈도모나스 파라풀바(*Pseudomonas parafulva*) 또는 슈도모나스 플리코글로시사(*Pseudomonas plecoglossicida*)이다.

[0019] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에서 지방산을 제조하기 위해 슈도모나스 푸티다 F1의 염색체를 주형으로 하여 트랜스-2-에노일-CoA 리덕타아제를 코딩하는 뉴클레오타이드를 증폭한다.

[0020] 바람직하게는, 상기 트랜스-2-에노일-CoA 리덕타아제를 코딩하는 뉴클레오타이드는 서열목록 제1서열이다.

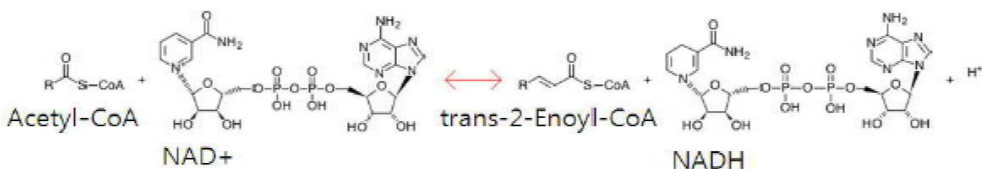
[0021] 본 발명에서 대장균에 도입하고자 하는 효소는 트랜스-2-에노일-CoA 리덕타아제이다. 상기 트랜스-2-에노일-CoA 리덕타아제는 다음의 반응을 촉매하는 활성을 갖는다:

[0022] [반응식 1]



[0023]

[0024] [반응식 2]



[0025]

[0026] 본 발명에서 이용되는 트랜스-2-에노일-CoA 리덕타아제의 뉴클레오타이드 서열은 상기 언급된 서열 이외에 상기 뉴클레오타이드 서열에 대하여 실질적인 동일성을 나타내는 뉴클레오타이드 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 본 발명의 뉴클레오타이드 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 열라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 열라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 80%의 상동성, 보다 바람직하게는 최소 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 최소 95%의 상동성을 나타내는 뉴클레오타이드 서열을 의미한다. 서열비교를 위한 열라인먼트 방법은 당업계에 공지되어 있다. 열라인먼트에 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 NCBI (National Center for Biological Information) 등에서 접근 가능하며, 인터넷 상에서 blastp, blastn, blastx, tblastn and tblastx와 같은 서열 분석 프로그램과 연동되어 이용할 수 있다. BLAST는 <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.

- [0027] 상기 유전자들은 발현 벡터 내부에 도입되어 대장균에서 발현되게 된다. 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.
- [0028] 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.
- [0029] 본 발명의 지방산 제조에 관여하는 효소들을 코딩하는 각각의 뉴클레오타이드 서열들은 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 작동가능하게 연결된 핵산 서열의 발현을 조절하는 DNA 서열을 의미한다. 그러한 조절 서열은 전사를 개시하기 위한 프로모터, 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다.
- [0030] 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, lac 프로모터, tac 프로모터, lacUV5 프로모터, lpp 프로모터, pL^λ프로모터, pR^λ프로모터, rac5 프로모터, amp 프로모터, recA 프로모터, SP6 프로모터, trp 프로모터 및 T7 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보솜 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^λ프로모터, Herskowitz, I. and Hagen, D., *Ann. Rev. Genet.*, 14:399-445(1980))가 조절 부위로서 이용될 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 벡터에 사용되는 프로모터는 lac 프로모터이다.
- [0031] 숙주 세포 내로 주입된 벡터는 숙주 세포 내에서 발현될 수 있으며, 이러한 경우에는 다량의 아세트산 환원효소를 얻게 된다. 예를 들어, 상기 발현 벡터가 lac 프로모터를 포함하는 경우에는 숙주 세포에 IPTG(Isopropylthio-β-D-Galactoside)를 처리하여 유전자 발현을 유도할 수 있다.
- [0032] 한편, 본 발명에 이용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드(예: pUCP19, pUC18, pTrc99A, pSTV28, pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHC79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, pET22b, pGEX 시리즈 및 pET 시리즈 등), 파지(예: λgt4?λB, λ-Charon, λΔz1 및 M13 등) 또는 바이러스(예: SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있으나, 바람직하게는 pUCP19를 사용한다.
- [0033] 본 발명의 발현 벡터는 프로모터서열 및 발현 대상 유전자(구조 유전자)의 뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 상기 서열들이 5'-3' 순서대로 연결되는 것이 바람직하다.
- [0034] 바람직하게는, 상기 발현 벡터는 lac 프로모터 서열을 포함하며 상기 lac 프로모터 서열은 상기 트랜스-2-에노일-CoA 리덕타아제를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동적으로(operatively) 결합된다.
- [0035] 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.
- [0036] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에서 사용된 선택표지는 암피실린이다.
- [0037] 본 발명의 벡터는 트랜스-2-에노일-CoA 리덕타아제 유전자가 효소 과발현 기능을 포함하여 최소한의 길이를 가

지도록 RBS(Ribosomal binding site) 및 효소발현에 꼭 필요한 부분을 포함하는 염기서열만을 서열로 정하여 삽입시키는 것이 숙주세포의 대사부담(metabolic burden)을 줄이는 측면에서 바람직하다.

[0038] 단계 (b): 형질전환 대장균의 제조

[0039] 이어, 상기 단계 (a)의 재조합 벡터를 대장균에 형질전환하여 형질전환 대장균을 제조한다.

[0040] 본 발명의 벡터를 안정되면서 연속적으로 클로닝 및 발현시킬 수 있는 숙주 세포는 당업계에서 공지되어 어떠한 숙주 세포도 이용할 수 있으며, 예컨대, *E. coli* MG1655, *E. coli* JM109, *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* RR1, *E. coli* LE392, *E. coli* B, *E. coli* X 1776, *E. coli* W3110, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 쉼린젠시스와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세센스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등이 있다.

[0041] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에서 지방산을 제조하기 위해 이용되는 숙주 세포는 대장균(*E. coli*)이고, 보다 바람직하게는 *E. coli* MG1655이다.

[0042] 본 발명의 벡터를 숙주 세포 내로 운반하는 방법은, CaCl_2 방법(Cohen, S.N. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 9:2110-2114(1973)), 하나한 방법(Cohen, S.N. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 9:2110-2114(1973); 및 Hanahan, D., *J. Mol. Biol.*, 166:557-580(1983)) 및 전기 천공 방법(Dower, W.J. et al., *Nucleic. Acids Res.*, 16:6127-6145(1988)) 등에 의해 실시될 수 있다.

[0043] 바람직하게는, 본 발명의 재조합 벡터를 숙주세포 내에 도입하기 위해 전기천공법을 이용한다.

[0044] 단계 (c): 지방산의 제조

[0045] 이어, 상기 단계 (b)의 형질전환 대장균을 배양하여 지방산을 제조한다.

[0046] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 탄소원(예컨대, 글루코오스)을 포함하는 배양배지(예컨대, LB 배지 또는 최소 배지)에서 야생형 대장균과 거의 유사한 성장성을 보여준다(도 5).

[0047] 단계 (d): 지방산의 수득

[0048] 마지막으로, 상기 단계 (c)의 지방산을 수득한다.

[0049] 바람직하게는, 본 발명의 형질전환 대장균은 야생형 대장균과 비교하여 2-4배 증가된 지방산 생산능을 나타낸다(도 6).

[0050] 본 발명의 형질전환 대장균은 야생형 대장균과 거의 유사한 성장성을 갖으며, 우수한 지방산 생성능을 나타낸다.

[0051] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명의 지방산 제조방법에 따라 제조된 지방산을 제공한다.

[0052] 본 발명의 지방산은 생물 공정을 통해 제조한 탄화수소 형태의 화합물로 석유, 천연가스 및 석탄과 같은 에너지로 이용될 수 있다.

발명의 효과

[0053] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0054] (a) 본 발명은 형질전환 대장균을 이용한 지방산 제조방법을 제공한다.

[0055] (b) 본 발명의 형질전환 대장균은 야생형 대장균과 비교하여 2-4배 증가된 지방산 생산능을 나타낸다.

[0056] (c) 본 발명의 지방산 제조방법은 환경 친화적인 생물 공정을 통해 지방산을 제조하므로 유해한 폐기물 및 에너

지 소비를 절감할 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 대장균 생체 내에서 글루코오스(glucose)로부터 부타노에이트(Butanoate) 대사를 보여주는 도식이다.

도 2는 대장균(*Escherichia coli*)-슈도모나스(*Pseudomonas*) 셔틀 벡터인 pUCP9에 트랜스-2-에노일-CoA 리덕타아제(trans-2-enoyl-CoA reductase, E.C 1.3.1.44)를 암호화하는 유전자가 삽입되어있는 플라스미드의 도식화이다.

도 3은 pUCP9에 *atoDA*(acetyl-CoA:acetoacetyl-CoA transferase, alpha subunit 및 beta subunit을 암호화하는 유전자)가 삽입되어있는 플라스미드의 도식화이다.

도 4는 pUCP9에 트랜스-2-에노일-CoA 리덕타아제(trans-2-enoyl-CoA reductase, E.C 1.3.1.44)를 암호화하는 유전자 및 *atoDA* (acetyl-CoA:acetoacetyl-CoA transferase, alpha subunit 및 beta subunit)을 암호화하는 유전자가 삽입되어있는 플라스미드의 도식화이다.

도 5는 본 발명의 형질전환 대장균 및 야생형 대장균의 성장곡선을 배지별로 나타낸 것이다. (A)는 최소배지(minimal medium), (B)는 글루코오스 10 g/L을 포함하는 최소배지, (C)는 LB 배지, (D)는 글루코오스 10 g/L을 포함하는 LB 배지이다.

도 6은 본 발명의 형질전환 대장균 및 야생형 대장균을 도 5의 (B) 글루코오스 10 g/L을 포함하는 최소배지 및 (D) 글루코오스 10 g/L을 포함하는 LB 배지에서 총 지방산을 IPTG 첨가 후 24시에서 추출하여 정량한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

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.

실시예

실시예 1: 재조합 플라스미드의 제조

대장균(*E. coli* MG1655)의 염색체를 주형으로 하고, 아세틸-CoA:아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라아제 알파 서브유닛(acetyl-CoA:acetoacetyl-CoA transferase, alpha subunit) 및 아세틸-CoA:아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라아제 베타 서브유닛(acetyl-CoA:acetoacetyl-CoA transferase, beta subunit) 효소를 암호화하는 *atoD* 및 *atoA*의 유전자서열(Genbank, NCBI)에 대한 프라이머(primer)를 이용하여(표 2), 중합효소연쇄반응(PCR, DaKaRa Korea) 방법을 통해 클로닝 하였다.

슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*) F1의 염색체를 주형으로 하여 대장균과 슈도모나스 에어루지노사(*Pseudomonas Aeruginosa*)의 지방산 합성 과정에 포함되지 않은 트랜스-2-에노일-CoA 리덕타아제(trans-2-enoyl-CoA reductase, E.C 1.3.1.44)를 암호화하는 유전자에 대해 특이적인 프라이머를 제작하여 클로닝 하였다(표 1 및 표 2).

표 1

유전자	생산 효소
<i>atoD</i>	아세틸-CoA:아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라아제 알파 서브유닛(acetyl-CoA:acetoacetyl-CoA transferase, alpha subunit)
<i>atoA</i>	아세틸-CoA:아세토아세틸-CoA 트랜스퍼라아제 베타 서브유닛(acetyl-CoA:acetoacetyl-CoA transferase, beta subunit)
1.3.1.44	트랜스-2-에노일-CoA 리덕타아제(trans-2-enoyl-CoA reductase)

표 2

유전자	프라이머 서열		제한 효소
	정방향	역방향	
<i>atoDA</i>	5'-CTGCAGTAAAAAATGAAAACAAAATTGATGAC-3'	5'-AAGCTTTCATAAATCACCCCGTTGCGTAT-3'	Pst I
			HindIII
1.3.1.44	5'-CCCGGGACGAGGTACAGACATTGGCCAT-3'	5'-GGATCCTTACAGCTCGACGAGTCGAAC-3'	Sma I
			BamHI

표 1의 유전자들을 특이적으로 증폭하도록 제작된 표 2의 프라이머를 사용하여 증폭하였다. *atoDA* 및 1.3.1.44 유전자의 각각의 RBS(ribosome binding site)를 포함하여 증폭하였다.

각각의 중합효소연쇄반응은 통상적인 반응조건(10 mM Tris-HCl(pH 9.0), 50 mM KCl, 0.1% 트리톤 X-100, 2 mM MgSO₄, Taq DNA 중합효소(DaKaRa)) 하에 95℃/5분(변성), 62℃/1분(어닐링) 및 72℃/1분(신장)동안 1회 수행한 후, 95℃/1분(변성), 62℃/30초(어닐링) 및 72℃/1분(신장)의 조건으로 30회 반복 수행하였다. 마지막 단계로 안정적인 신장을 위해 95℃/1분(변성), 60℃/1분(어닐링) 및 72℃/5분(신장) 반응하였다. 중합효소연쇄반응 후 증폭된 DNA는 0.8% 아가로스 젤 상에서 확인 후 정제하여 T-vector 클로닝에 이용하였다. pGEM-T easy 벡터(DaKaRa)에 라이게이션(ligation)을 수행하여 재조합 플라스미드인 pGEM::*atoDA* 및 pGEM::1.3.1.44를 제작하였다. 상기 재조합 플라스미드들은 대장균에서 형질전환을 실시하여 형질전환 대장균을 제조하였다.

실시예 2: 재조합 플라스미드의 확인

상기 실시예 1의 재조합 플라스미드인 pGEM-T::1.3.1.44와 pGEM-T::*atoAD* 및 대장균과 슈도모나스의 서틀 벡터인 pUCP19(Schweizer H.P., *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19, *Gene*, (1991) 97:109-121)를 표 2에 열거된 제한효소로 37℃ 항온수조(water bath)에서 약 2시간동안 반응하였다. 각각의 DNA 절편들을 절단한 뒤 pUCP19 벡터의 다중삽입부위(multicloning site)에 도 2 및 도 3에 개시된 것과 같이 T4 라이게이즈(Dakara, 일본)를 이용하여 16℃에서 라이게이션 반응을 통해 재조합 플라스미드를 완성하였다. 각 단계마다 삽입된 유전자의 삽입여부를 확인하기 위해 대장균에 형질 전환 시킨 후 재조합 플라스미드를 추출하여 이를 다시 원래 삽입부위의 제한효소로 처리하여 잘린 DNA 조각의 크기를 0.8% 아가로스 젤 상에서 전기영동을 실시하여 비교하는 방법을 사용하였다.

결과적으로, PCR 산물을 pUCP19 벡터에 도입하여 pJS31, pJS32 및 pJS33을 제조하였다. 도 2, 3 및 4는 상기 pJS31(1.3.1.44를 암호화하는 유전자 포함), pJS32(*atoDA* 유전자 포함) 및 pJS33(*atoDA* 및 1.3.1.44를 암호화하는 유전자 포함)라 명명된 벡터의 지도(map)를 나타내는 도면이다.

실시예 3: 형질전환 대장균의 제조

본 발명에서는 형질전환 대장균의 안정적 제조 및 효율을 높이기 위해 전기천공법(electroporation)에 의한 형질전환법을 사용하였다.

상기 전기충격에 의한 형질전환법을 위해 16시간 동안 배양된 30 μ l (0.1%)의 야생형 대장균(*E. coli* MG1655) 배양액을 시험관에 들어있는 3 ml의 LB (10 g/L 트립톤, 10 g/L NaCl 및 5 g/L 효모추출물)배지에 접종하여 배양액의 흡광도(absorbance)가 600 nm 파장에서 0.6에 이르렀을 때, 배양액 전체에 해당하는 3 ml의 배양액을 원심 분리(12000 rpm, 1분)하여 상등액과 세포를 분리하였다. 수확한 세포를 10% 글리세롤 1 ml로 1회 세척해준 후, 다시 원심분리(12000 rpm, 1분)를 실시하여 상등액과 세포로 분리하였다. 상등액을 제거하고 세포에 10% 글리세롤 80 μ l를 첨가하여 현탁하였다. 현탁한 세포에 1 μ l의 재조합 플라스미드(pJS31, pJS32 또는 pJS33)를 첨가하였다.

상기의 플라스미드가 들어있는 분주된 80 μ l의 액체는 전기천공법(electroporation)용 큐벳(Gene pulser cuvette, BIO-RAD, 미국)에 담아 진 퍼서 X셀(Gene pulser Xcell, BIO-RAD, 미국)로 전기 충격(2500 v, 25 μ F, 200 Ω)을 가하였다. 사전에 준비해둔 1 ml LB(10 g/L 트립톤, 10 g/L NaCl 및 5 g/L 효모추출물)를 첨가한 후에 1시간 동안 200 rpm, 37℃에서 진탕 배양하였다. 배양한 형질전환 대장균을 엠포실린(50 μ g/ml)이 첨가된 배지에서 단일균체가 생성될 때까지 배양하였다. 이를 통해 재조합 플라스미드인 pJS31, pJS32 또는

pJS33을 대장균(*E. coli* MG1655)에 형질 전환한 형질전환 대장균인 *E. coli* SGJS31, *E. coli* SGJS32 및 *E. coli* SGJS33을 제조하였다. 또한 야생형 대장균에 공백터를 형질전환하여 같은 벡터를 이용하였을 때 지방산 생산 차이를 보고자 하였다(표 3).

표 3

형질전환 대장균	특징
<i>E. coli</i> SGJS30	<i>Escherichia coli</i> ::pUCP19
<i>E. coli</i> SGJS31	<i>Escherichia coli</i> ::pUCP19::1.3.1.44
<i>E. coli</i> SGJS32	<i>Escherichia coli</i> ::pUCP19::atoDA
<i>E. coli</i> SGJS33	<i>Escherichia coli</i> ::pUCP19::1.3.1.44::atoDA

실시예 4: 형질전환 대장균의 특성 조사

대장균에 형질 전환한 형질전환 대장균들을 LB(엠펜실린 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 포함)배지에 약 16시간동안 전-배양하고 그 배양액을 다시 LB(엠펜실린 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 포함)배지에 접종하여 흡광도가 600 nm에서 0.6-1.0 되었을 때 글리세롤 농도가 25%가 되게 보관용 균액으로 만든 다음 -80°C에서 배양실험 시까지 저장하였다.

상기에서 개발된 형질전환 대장균의 배양은 보관용 균액 30 μl 을 엠펜실린 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 첨가된 3 ml의 LB에 16시간동안 전-배양한 후, 이를 다시 500 ml 플라스크에 들어있는 엠펜실린 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 첨가된 200 ml의 LB(10 g/L 트립톤, 10 g/L NaCl 및 5 g/L 효모 추출물) 배지에 0.5%의 전 배양액을 접종하여 37°C, 170 rpm 상태에서 24 시간 동안 배양하였다. 형질전환 대장균과 비교하기 위한 야생형 대장균은 엠펜실린을 포함하지 않는 LB에서 형질전환 대장균과 동일한 조건으로 실험을 실시하였다. 단백질 발현을 위해 배양액의 흡광도(absorbance)가 600 nm 파장에서 0.6에 이르렀을 때 유도물질인 IPTG(isopropylthio- β -D-galactoside, sigma, 미국)를 첨가 (0.5 mM/ml)하여 재조합 단백질의 발현을 유도하였다. 상기 예를 따라 초기 유도체의 발현으로 지방산 함량의 생산증대를 비교하기 위한 종과 본 발명의 목적으로 개발된 형질전환 대장균과 야생형 대장균의 성장곡선은 도면 5에서 보여주고 있다.

본 발명에서 형질전환 대장균들을 최소배지(minimal medium; MM)와 LB배지에서 성장성을 확인하였다. 최소배지의 배지 조성성분은 표 4에 나타내었다.

표 4

Minimal medium(MM)	
성분	g/L
Na ₂ SO ₄	4
(NH ₄) ₂ SO ₄	5.4
NH ₄ Cl	1.0
K ₂ HPO ₄	7.3
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	1.8
(NH ₄) ₂ -H-시트레이트	12
MgSO ₄	0.25
티아민	0.02

당이 포함되어있지 않은 최소배지에서는 모든 형질전환 대장균들이 잘 성장하지 못하였고 글루코오스(glucose 10 g/L)이 포함된 배지에서는 포함되지 않은 배지에서보다 매우 많이 성장한 것을 확인할 수 있었다. LB 배지에서는 당이 포함되어 있는 배지에서 초기배양은 매우 빠르나 소비 후에는 포함되지 않았을 때보다 많이 성장하지 못한 것을 도 5에서 볼 수 있다.

형질전환 대장균이 대조군(공백터가 형질전환된 형질전환 대장균)과 차이가 많이 나지 않는 이유는 유전자의 삽입이나 과발현에 의한 독성이나 저해가 크지 않았던 것으로 사료된다. 이는 유전자의 암호화부분은 효소의 과발현 기능을 포함하여 최소한의 길이를 가지도록 RBS(ribosomal binding site) 및 효소발현에 꼭 필요한 부분을 포함하는 염기서열만을 서열로 정하여 유전자의 발현에 의한 숙주세포의 대사부담 (metabolic burden)을 줄이고

자 하였고 생산 경로에 맞춰 두 유전자의 순서가 순서대로 연결되게 개발하였기 때문이라고 예상된다.

[0082] 실시예 5: 지방산(fatty acid) 측정

[0083] 실시예 4의 조건으로 배양한 배양액 중 IPTG를 첨가한 후 24시간 동안 세포양이 충분해 졌을 때 형질전환 대장균 내에 있는 지방산(fatty acid)을 측정하기 위해서 지방산 추출을 다음과 같은 방법으로 진행하였다. 추출 과정은 5 단계로 나누어지며 첫 번째 과정 배양단계로 배양액 5 ml를 원심분리(4500 rpm, 10분) 후 형질전환 대장균을 -80℃에 저장하였다. 두 번째 과정은 비누화(saponification) 단계로 저장된 형질전환 대장균들을 제1용액(NaOH 45 g, MeOH 150 ml, 탈염증류수 150 ml)을 1 ml을 넣고 5-10초 동안 볼텍스 해주었다. 100℃에서 5분 동안 반응해준 뒤 다시 5-10초 동안 볼텍스 해준 후 다시 100℃, 25분 반응시켜 준 뒤 열을 식혀주었다. 세 번째 과정은 메틸화(methylation) 단계로, 제2용액(6 N HCl 325 ml, MeOH 275 ml) 2 ml을 첨가하고 5-10초 동안 볼텍스 해준 뒤 80℃에서 10분 동안 반응시켜주었다. 반응이 끝난 후에는 빨리 열을 식혀주었다. 네 번째 단계는 추출(extraction) 단계로, 제3용액(헥산(Hexane)/메틸 테르트-부틸 이스터(Methyl tert-Butyl Ester)=1/1) 1.25 ml을 첨가하고 10분 동안 위아래로 흔들어 준 후에 층이 분리되면 아래층은 추출하여 제거하였다. 다섯 번째 단계는 GC로 분석을 용이하게 하기 위해 세척단계로 앞 단계의 남은 상층액에 제4용액(NaOH 10.8 g, 탈염증류수 900 ml) 3 ml을 첨가해서 5분 동안 위아래로 흔들어 준 뒤 상층액을 추출하여 GC/MS로 분석하였다.

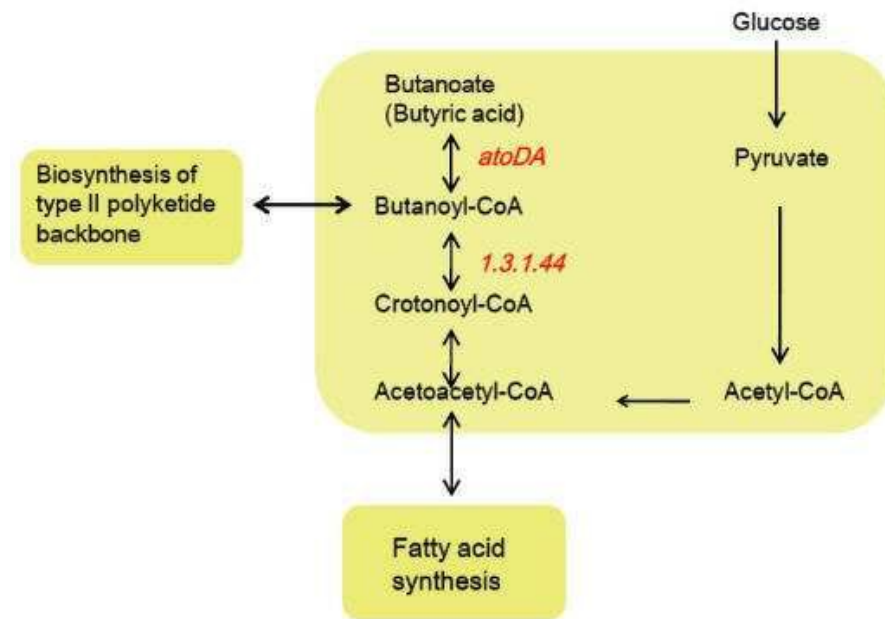
[0084] 본 발명에서 사용한 GC/MS는 5975 시리즈 MSD 및 아질런트(Agilent) 7890A이며 HP-5 컬럼 (30 m × 0.32 mm, 필름 두께 0.25 μ)을 사용하였다. 5분 동안 100℃, 5℃/분으로 220℃ 및 5분 동안 250℃ 조건 하에 GC 분석하였다.

[0085] 상기 예를 따라 지방산 함량 증진을 위해 형질전환 대장균 및 야생형 대장균의 지방산 추출 분석결과를 도 6에서 보여주고 있다. 슈도모나스 푸티다의 외래 유전자인 트랜스-2-에노일-CoA 리덕타아제(trans-2-enoyl-CoA reductase) 유전자가 도입된 형질전환 대장균 SGJS31이 LB 배지에서 야생형 대장균보다 최대 2.6배 이상 증가한 것을 확인 할 수 있었다. 이는 도 1에서 보여준 것과 같이 유전자의 도입으로 지방산 생합성 경로에도 영향을 주어 지방산이 증진된 것으로 확인되었다. 한편, *atoDA* 유전자 및 트랜스-2-에노일-CoA 리덕타아제 유전자로 형질전환된 대장균의 경우, 트랜스-2-에노일-CoA 리덕타아제 유전자 단독으로 형질전환된 대장균보다 지방산 생산능이 감소하였다. 이와 같은 결과는, 트랜스-2-에노일-CoA 리덕타아제 유전자에 의한 형질전환에서, 내재성 유전자(endogenous gene)인 *atoDA* 유전자의 과발현이 트랜스-2-에노일-CoA 리덕타아제 유전자에 의한 지방산 생산능을 오히려 감소시킬 수 있음을 보여주는 매우 흥미로운 결과이며, 이러한 결과는 형질전환 대장균을 이용한 지방산 대량 생산에 있어서 조절 단계에 대한 중요한 단서를 제공한다.

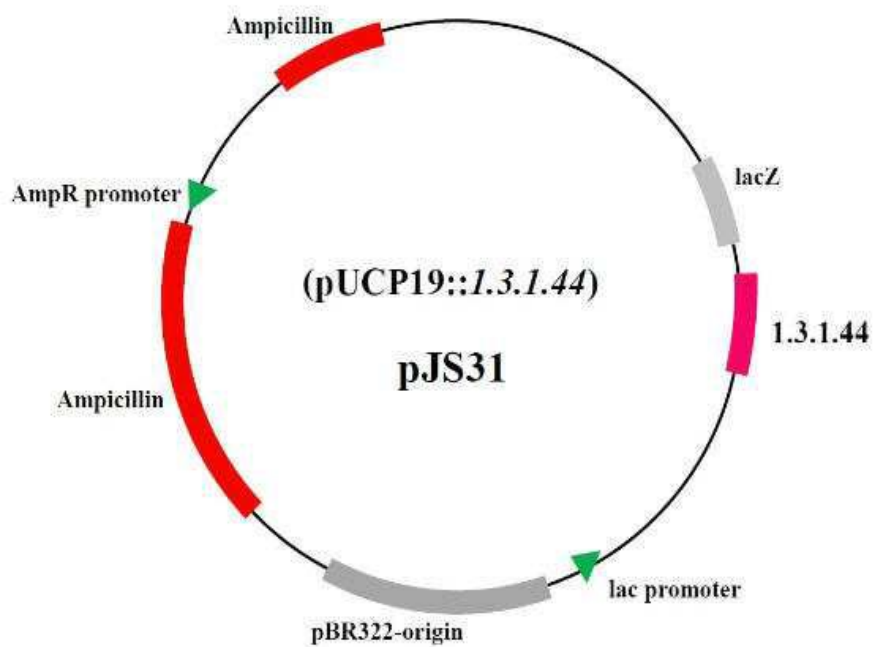
[0086] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

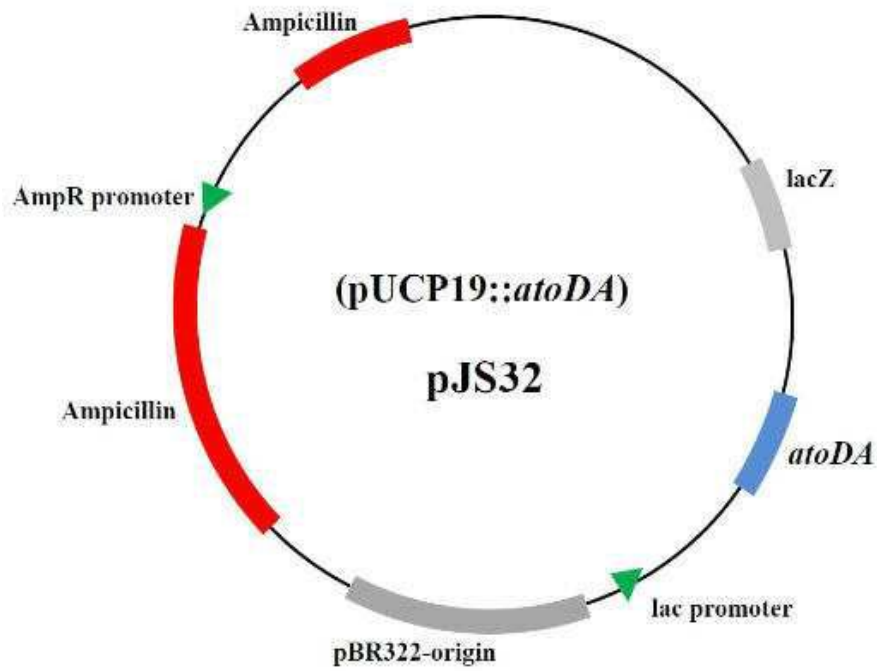
도면1



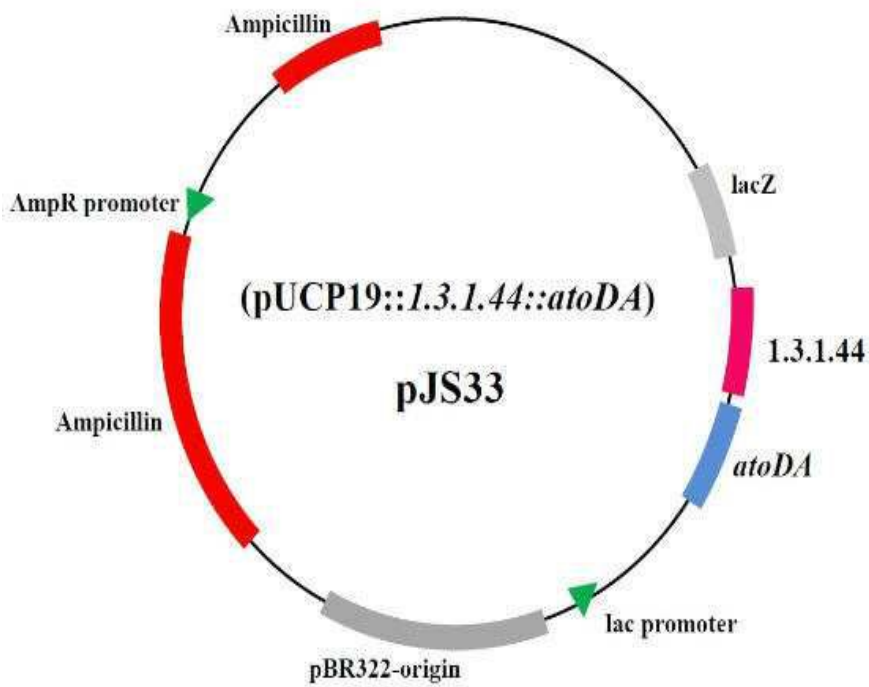
도면2



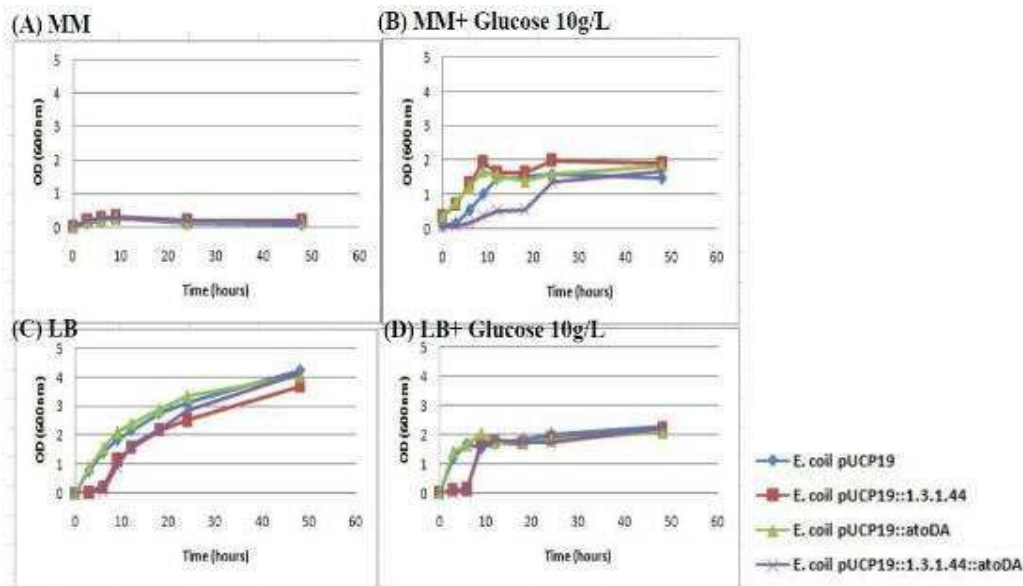
도면3



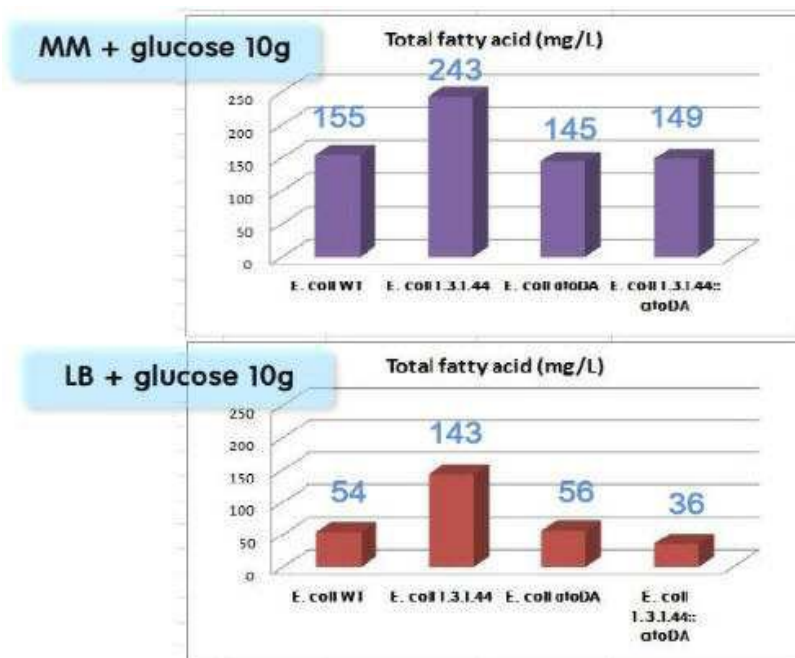
도면4



도면5



도면6



서열 목록

- <110> Industry-University Cooperation Foundation Sogang University
- <120> Method for Preparing Fatty acid using Transformed *E. coli* introducing Trans-2-enoyl-CoA reductase
- <130> PN120326
- <160> 3
- <170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 663

<212> DNA

<213> atoD

<400> 1

atgaaaacaa aattgatgac attacaagac gccaccggct tctttcgtga cggcatgacc 60

atcatggtgg gcggatttat ggggattggc actccatccc gcctggttga agcattactg 120

gaatctggtg ttcgcgacct gacattgata gccaatgata ccgcgtttgt tgataccggc 180

atcggtcgcg tcatcgtaaa tggctcagtc cgcaaagtga ttgcttcaca tatcggcacc 240

aaccgggaaa caggctggcg catgatatct ggtgagatgg acgtcgttct ggtgccgcaa 300

ggtacgctaa tcgagcaaat tcgctgtggt ggagctggac ttggtggttt tctcacccca 360

acgggtgtcg gcaccgtcgt agaggaaggc aaacagacac tgacactcga cggtaaaacc 420

tggctgctcg aacgccact gcgcgccgac ctggcgctaa ttcgcgctca tcgttgcgac 480

acacttgga acctgaccta tcaacttagc gcccgcaact ttaacccct gatagccctt 540

gcggctgata tcacgtggt agagccagat gaactggtcg aaaccggcga gctgcaacct 600

gaccatattg tcacccctgg tgccgttacc gaccacatca tcgtttcaca ggagagcaaa 660

taa 663

<210> 2

<211> 650

<212> DNA

<213> atoA

<400> 2

tggatgcgaa acaacgtatt gcgcgccgtg tggcgcaaga gcttcgtgat ggtgacatcg 60

ttaacttagg gatcggttta cccacaatgg tcgccaatta ttaccggag ggtattcata 120

tcactctgca atcggaaaac ggcttcctcg gtttaggccc ggtcacgaca gcgcaccag 180

atctggtgaa cgtcggcggg caacctgctg gtgttttacc cgggtcagcc atgtttgata 240

gcgcatgctc atttgcgcta atccgtggcg gtcataatga tgctgcgtg ctcggcggtt 300

tgcaagtaga cgaagaagca aacctcgcga actgggtagt gcctgggaaa atggtgccc 360

gtatgggtgg cgcgatggat ctggtgaccg ggtcgcgcaa agtgatcatc gccatggaac 420

attgcgcaa agatggttca gcaaaaattt tgcgccgtg caccatgcca ctcaactgcgc 480

aacatgcggt gcatatgctg gttactgaac tggtgtctt tcgttttatt gacggcaaaa 540

tgtggctcac cgaaattgcc gacgggtgtg atttagccac cgtgcgtgcc aaaacagaag 600

ctcggtttga agtcgccgcc gatctgaata cgcaacgggg tgatttatga 650

<210> 3

<211> 1212

<212> DNA

<213> 1.3.1.44

<400> 3

ttggccatca ttcatcctaa ggttcgcggt ttcatctgca ccacgactca cccgaagggc 60

tgcgagctca acgtccgtga ccagatcgaa gccaccgcga agctgggcgt acgcgaggat 120

ggcccgaaga aggtcctggt catcggtgct tccagcggct acggcctggc tgcccgcatac 180

acggcggcct tcggcttcaa ggctgacacc ctgggcgtgt tcttcgaaaa accaggcacc 240

gagaccaagg ccggcactgc tggctggtac aacgtgccg ccttcgacaa gttcgccaag 300

gccgagggcc tgiacagcaa gtcgatcaac ggtgacgcct tctctgacga agcccgcgcc 360

aaggtcatcg agctgatcaa gaacgaaatg ggtggcaagg tcgacctggt catctactcg 420

ctggcttcgc ccgtgcgcaa gctgccgcag accggtgaag tcattcgctc ggcaactcaag 480

ccgatcggcc agccatacaa gtcgaccgcc atcgacacca acaaggacac catcatcgag 540

gccagcatcg agccggccac cgagcaggaa attgccgata ccgtcacctg catgggtggc 600

caggactggc agctgtggat cgatgcgctg gctggcgcca atgtactggc cgaaggcgt 660

cgcaccgtgg ccttcagcta tateggcagc gatatacct ggccgatcta ctggcacggt 720

gcactgggcc aggccaagca ggacctggac gaaactgccc tgcgtctgaa ccagaagctg 780

gccggtgaag tgaaaggcgg cgccaatgtg gcggtgctca agtcggtggt taccagggcc 840

agctcgcca tcccgtgat gccactgtac ctgtcgatgg tcttcaagat catgcaggag 900

aaaggtgttc acgaaggcac ccaggaccag ctgcaccgca tgtaccgca ccgtatgtac 960

cgcaccgacg gtgcgccggc agaggtcgac gagaaggggc gcctgcgcct ggacgactgg 1020

gaactgcgtg acgactgca aaacgcctgc aaggccctgt ggccacaggt gaccaccgag 1080

aacctgttcg agctgaccga ctacgccgt tacaagaagc agttcctcaa cctgttcggc 1140

ttcgagcgcg ctgacgtcaa ctacgacgaa gacgtggcca ccgatgtgaa gttcgactgc 1200

gtcgagctgt aa 1212