(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0098103
(43) 공개일자 2025년07월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/77 (2006.01) *C12N 9/12* (2006.01)
C12P 7/18 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/77 (2013.01)
C12N 9/1288 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0188981
(22) 출원일자 2023년12월21일
심사청구일자 2023년12월21일

(71) 출원인
대상 주식회사
서울특별시 종로구 창경궁로 120 (인의동, 종로플레이스)
(72) 발명자
김경진
서울특별시 강서구 마곡중앙로 178 DAESANG InnoPark
김성민
서울특별시 강서구 마곡중앙로 178 DAESANG InnoPark
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
박혁

전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **1,4-부탄디올 생산능이 향상된 변이 미생물 및 이를 이용한 1,4-부탄디올의 생산 방법**

(57) 요 약

본 발명은 1,4-부탄디올 생산능이 향상된 변이 미생물 및 이를 이용한 1,4-부탄디올의 생산 방법에 관한 것으로, 상기 변이 미생물은 마이코박테로이데스 압세수스 subsp. 마실리엔세(*Mycobacteroides abscessus* subsp. *Massiliense*), 마이코박테리움 카나리아센세(*Mycobacterium canariasense*) 및 마이코박테리움 콘셉티오넨세(*Mycobacterium conceptione*nse)에서 유래하여 카르복실산 환원효소와의 반응성이 우수한 포스포판테테이닐 전이효소를 발현함으로써 효율적으로 1,4-부탄디올을 생산할 수 있다.

(52) CPC특허분류
C12P 7/18 (2013.01)
C12Y 207/08 (2013.01)
(72) 발명자
이승환
서울특별시 강서구 마곡중앙로 178 DAESANG InnoPark
이동훈
서울특별시 강서구 마곡중앙로 178 DAESANG InnoPark
김문정
서울특별시 강서구 마곡중앙로 178 DAESANG InnoPark
유지인
서울특별시 강서구 마곡중앙로 178 DAESANG InnoPark
이재헌
서울특별시 강서구 마곡중앙로 178 DAESANG InnoPark
양영렬
서울특별시 강서구 마곡중앙로 178 DAESANG InnoPark

명 세 서

청구범위

청구항 1

마이코박테로이데스 압세수스 subsp. 마실리엔세(*Mycobacteroides abscessus* subsp. *Massiliense*), 마이코박테리움 카나리아센세(*Mycobacterium canariasense*) 및 마이코박테리움 콘셉티오넨세(*Mycobacterium conceptionense*)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상에서 유래한 포스포판테테이닐 전이효소를 발현하는, 1,4-부탄디올 생산능이 향상된 변이 미생물.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 포스포판테테이닐 전이효소는 서열번호 2, 4 및 6의 아미노산 서열로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상으로 구성된 것인 변이 미생물.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 변이 미생물은 코리네박테리움(*Corynebacterium*) 속인 것인 변이 미생물.

청구항 4

마이코박테로이데스 압세수스 subsp. 마실리엔세(*Mycobacteroides abscessus* subsp. *Massiliense*), 마이코박테리움 카나리아센세(*Mycobacterium canariasense*) 및 마이코박테리움 콘셉티오넨세(*Mycobacterium conceptionense*)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상에서 유래한 포스포판테테이닐 전이효소를 암호화하는 유전자를 도입하는 단계를 포함하는, 청구항 1의 변이 미생물의 제조 방법.

청구항 5

청구항 4에 있어서,

상기 포스포판테테이닐 전이효소를 암호화하는 유전자는 서열번호 1, 3 및 5의 염기서열로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 것인 변이 미생물의 제조 방법.

청구항 6

청구항 1의 변이 미생물을 배지에서 배양하는 단계; 및

상기 변이 미생물 또는 변이 미생물이 배양된 배지로부터 1,4-부탄디올을 회수하는 단계를 포함하는 1,4-부탄디올의 생산 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 1,4-부탄디올 생산능이 향상된 변이 미생물 및 이를 이용한 1,4-부탄디올의 생산 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 1,4-부탄디올(1,4-Butanediol)은 용매, 중합체 중간체, 정밀화학 중간물질 등으로 화학산업 전반에 걸쳐 사용되고 있다. 1,4-부탄디올은 주로 아세틸렌과 포름알데히드를 반응시킨 후 수소를 첨가하는 공정을 통해 생산되며, 이외에도 말레산 무수물, 프로필렌 옥사이드로부터 생산될 수 있으나, 화석 원료의 사용에 따른 지구 온난화 가스 및 폐기물 발생과 더불어 불안정한 국제 유가로 인해 원료 수급 차질, 생산비용 증가 등의 문제점이 있다.

[0003] 이러한 화학 생산공정을 보완하고자 최근에는 바이오매스를 원료로 하여 1,4-부탄디올을 생물학적으로 생산하는 저비용 및 친환경적인 공정이 개발되고 있다. 일반적으로는 미생물의 대사과정에서 α-케토글루타레이트 또는 숙시닐-CoA를 거쳐 1,4-부탄디올이 생산된다. 하지만 미생물을 이용한 1,4-부탄디올의 생산 공정에서는 미생물의 대사과정에서 1,4-부탄디올뿐만 아니라 불필요한 부산물도 생성되며, 상대적으로 낮은 생산 수율을 나타내는 등 한계가 존재한다. 따라서 이러한 한계를 극복하기 위해 유전공학적 기술을 이용하여 1,4-부탄디올을 고수율로 생산할 수 있는 미생물을 개발하기 위한 노력이 지속적으로 시도되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) 유럽 등록특허 제3050970호

(특허문헌 0002) 유럽 등록특허 제2782893호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 1,4-부탄디올 생산능이 향상된 변이 미생물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0006] 또한, 본 발명은 상기 변이 미생물의 제조 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0007] 또한, 본 발명은 상기 변이 미생물을 이용한 1,4-부탄디올의 생산 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명의 일 양상은 마이코박테로이데스 압세수스 subsp. 마실리엔세(*Mycobacteroides abscessus* subsp. *Massiliense*), 마이코박테리움 카나리아센세(*Mycobacterium canariasense*) 및 마이코박테리움 콘셉티오넨세(*Mycobacterium conceptione*nse)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상에서 유래한 포스포판테테이닐 전이효소를 발현하는, 1,4-부탄디올 생산능이 향상된 변이 미생물을 제공한다.

[0009] 종래 알려진 미생물에서의 1,4-부탄디올 생산 경로는 해당과정에서 글루코스(glucose)로부터 생산된 피루베이트(pyruvate)가 아세틸-CoA(acetyl-CoA)로 산화되고 TCA 회로 내에서 α-케토글루타레이트(α-ketoglutarate) 및 숙시닐-CoA(succinyl-CoA)로 합성되는데, 여기서 α-케토글루타레이트의 탈탄산 반응 또는 숙시닐-CoA의 환원반응을 거쳐 4-하이드록시뷰티르산(4-hydroxybutyricacid)이 만들어지며, 카르복실산 환원효소(carboxylic acid reductase, CAR)에 의해 4-하이드록시뷰티르산으로부터 최종적으로 1,4-부탄디올이 생산된다.

[0010] 본 발명에서 사용된 “포스포판테테이닐 전이효소(phosphopantetheinyl transferase, PPTase)”는 카르복실산 환원효소를 활성화시키는데 작용하는 효소로, 포스포판테테이닐 전이효소의 반응이 선행되어야 그 반응물이 카르복실산 환원효소에 결합하여 4-하이드록시뷰티르산의 카르복실기 환원을 통해 1,4-부탄디올을 생산할 수 있다. 상기 포스포판테테이닐 전이효소는 pptase 유전자에 의해 암호화되어 포스포판테테이닐 전이효소 활성을 가지는 폴리펩티드일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0011] 일반적인 포스포판테테이닐 전이효소는 카르복실산 환원효소와의 반응성이 낮지만 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)에서 유래되어 sfp 유전자로 암호화된 포스포판테테이닐 전이효소의 경우 상대적으로 그 반응성이 좋은 것으로 알려져 있어, 본 발명에서는 생물정보학(bioinformatics)을 활용하여 포스포판테테이닐 전이효소를 분류하고 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 유래 포스포판테테이닐 전이효소와 비교하여 카르복실산 환원효소에 대해 더 높은 활성을 가지는 새로운 포스포판테테이닐 전이효소를 발굴하였다.

[0012] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 포스포판테테이닐 전이효소는 서열번호 2, 4 및 6의 아미노산 서열로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상으로 구성된 것일 수 있다.

[0013] 구체적으로는, 상기 포스포판테테이닐 전이효소는 마이코박테로이데스 압세수스 subsp. 마실리엔세(*Mycobacteroides abscessus* subsp. *Massiliense*)에서 유래한 경우 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성된 것일 수 있고, 마이코박테리움 카나리아센세(*Mycobacterium canariasense*)에서 유래한 경우 서열번호 4의 아미노산 서열로 구성된 것일 수 있고, 마이코박테리움 콘셉티오넨세(*Mycobacterium conceptione*nse)에서 유래한 경우 서

열번호 6의 아미노산 서열로 구성된 것일 수 있다.

[0014] 본 발명에 따른 포스포판테테이닐 전이효소의 아미노산 서열은 서열번호 2, 4 및 6의 각 아미노산 서열과 비교하여 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 상동성 또는 동일성을 가지는 서열로 이루어지거나 이를 필수적으로 포함할 수 있으며, 본래의 기능을 가지는 것일 수 있다. 여기서 "상동성" 또는 "동일성"이란 기준이 되는 아미노산 서열과 임의의 다른 아미노산 서열을 최대한 대응되도록 정렬하여 분석하였을 때 두 서열 간의 일치율(%)을 의미한다.

[0015] 본 발명의 마이코박테로이데스 압세수스 subsp. 마실리엔세(*Mycobacteroides abscessus* subsp. *Massiliense*), 마이코박테리움 카나리아센세(*Mycobacterium canariasense*) 및 마이코박테리움 콘셉티오넨세(*Mycobacterium conceptione*nse) 유래 포스포판테테이닐 전이효소는 종래 알려진 포스포판테테이닐 전이효소 (예컨대, *Bacillus subtilis* 유래)에 비해 카르복실산 전이효소에 대해 높은 반응성을 가진다.

[0016] 본 발명에서는 포스포판테테이닐 전이효소를 본래 가지고 있지 않는 미생물에 다른 종의 미생물에서 유래한 외래 포스포판테테이닐 전이효소를 발현시키거나, 또는 미생물이 본래 가지고 있는 내재 포스포판테테이닐 전이효소에 비해 카르복실산 환원효소에 대한 반응성이 높은 외래 포스포판테테이닐 전이효소를 발현시켜 1,4-부탄디올 생산능을 향상시킬 수 있다.

[0017] 또한 본 발명에서는 내재 포스포판테테이닐 전이효소 또는 외래 포스포판테테이닐 전이효소의 활성을 강화하거나 발현량을 증대시킬 수 있는데, 구체적으로는 포스포판테테이닐 전이효소를 암호화하는 유전자의 뉴클레오티드 치환, 삽입, 결실 또는 이들의 조합을 통하여 단백질 자체의 활성을 본래 단백질의 활성에 비해 증가시키는 경우, 포스포판테테이닐 전이효소를 암호화하는 유전자의 복제수(copy number)를 증가시키는 경우, 포스포판테테이닐 전이효소를 암호화하는 유전자의 발현을 조절하는 조절 인자의 변형 (예컨대, 프로모터 서열 변이, 강한 프로모터로의 교체)을 통하여 유전자의 발현량을 증가시키는 경우, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다.

[0018] 본 발명에서 사용된 "1,4-부탄디올 생산능이 향상된"은 변이 전 미생물 (모균주)에 비해 1,4-부탄디올의 생산성이 증가된 것을 의미한다. 상기 모균주는 변이의 대상이 되는 야생형 또는 변이 미생물을 의미하며, 직접 변이의 대상이 되거나 재조합된 벡터 등으로 형질전환되는 대상을 포함한다. 본 발명에 있어서, 모균주는 1,4-부탄디올 생산능이 없거나 1,4-부탄디올 생산능을 가지며, 예를 들면 야생형 코리네박테리움(*Corynebacterium*) 속이거나 야생형으로부터 변이된 코리네박테리움(*Corynebacterium*) 속의 미생물 또는 균주일 수 있다.

[0019] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 변이 미생물은 코리네박테리움(*Corynebacterium*) 속인 것일 수 있다.

[0020] 구체적으로, 상기 변이 미생물은 코리네박테리움(*Corynebacterium*) 속으로, 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*), 코리네박테리움 크루디락티스(*Corynebacterium crudilactis*), 코리네박테리움 데저티(*Corynebacterium deserti*), 코리네박테리움 칼루나에(*Corynebacterium callunae*), 코리네박테리움 수라나래에(*Corynebacterium suranareeae*), 코리네박테리움 루브리칸티스(*Corynebacterium lubricantis*), 코리네박테리움 두사넨세(*Corynebacterium doosanense*), 코리네박테리움 이피시엔스(*Corynebacterium efficiens*), 코리네박테리움 우테레키(*Corynebacterium uterequi*), 코리네박테리움 스테셔니스(*Corynebacterium stationis*), 코리네박테리움 파캔세(*Corynebacterium pacaense*), 코리네박테리움 싱귤라레(*Corynebacterium singulare*), 코리네박테리움 휴미레듀센스(*Corynebacterium humireducens*), 코리네박테리움 마리눔(*Corynebacterium marinum*), 코리네박테리움 할로톨레란스(*Corynebacterium halotolerans*), 코리네박테리움 스페니스코룸(*Corynebacterium spheniscorum*), 코리네박테리움 프레이부르겐세(*Corynebacterium freiburgense*), 코리네박테리움 스트리아툼(*Corynebacterium striatum*), 코리네박테리움 카니스(*Corynebacterium canis*), 코리네박테리움 암모니아게네스(*Corynebacterium ammoniagenes*), 코리네박테리움 레날레(*Corynebacterium renale*), 코리네박테리움 폴루티솔리(*Corynebacterium pollutisoli*), 코리네박테리움 이미탄스(*Corynebacterium imitans*), 코리네박테리움 카스피움(*Corynebacterium caspium*), 코리네박테리움 테스투디노리스(*Corynebacterium testudinoris*), 코리네박테리움 슈도펠라지(*Corynebacaterium pseudopelargi*) 및 코리네박테리움 플라베스센스(*Corynebacterium flavescens*)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0021] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 변이 미생물은 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)인 것일 수 있다.

[0022] 본 발명에 따른 1,4-부탄디올 생산능이 향상된 변이 미생물은 변이 전 미생물 (모균주)에 비해 증가된 1,4-부탄디올 생산능을 나타내며, 특히 모균주에 비해 1,4-부탄디올 생산량이 적어도 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100% 증가하거나, 또는

1.1배, 1.5배, 2배, 2.5배, 3배, 3.5배, 4배, 4.5배, 5배, 5.5배, 6배, 6.5배, 7배, 7.5배, 8배, 8.5배, 9배, 9.5배 또는 10배 증가된 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 일례로, 상기 포스포판테테이닐 전이효소를 발현하는 변이 미생물은 모균주에 비해 1,4-부탄디올 생산량이 0.5배 이상, 구체적으로는 0.5 내지 20배 (바람직하게는 1 내지 10배) 증가된 것일 수 있다.

[0023] 본 발명에 따른 변이 미생물을 포함하는 조성물은 1,4-부탄디올 생산용 조성물로서 이용될 수 있다.

[0025] 본 발명의 다른 일 양상은 마이코박테로이데스 압세수스 subsp. 마실리엔세(*Mycobacteroides abscessus* subsp. *Massiliense*), 마이코박테리움 카나리아센세(*Mycobacterium canariasense*) 및 마이코박테리움 콘셉티오넨세(*Mycobacterium conceptione*nse)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상에서 유래한 포스포판테테이닐 전이효소를 암호화하는 유전자를 도입하는 단계를 포함하는, 상기 변이 미생물의 제조 방법을 제공한다.

[0026] 상기 단계는 포스포판테테이닐 전이효소를 암호화하는 유전자의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 모균주에 형질전환시키는 과정이다.

[0027] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 포스포판테테이닐 전이효소를 암호화하는 유전자는 서열번호 1, 3 및 5의 염기서열로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 것일 수 있다.

[0028] 구체적으로는, 상기 포스포판테테이닐 전이효소를 암호화하는 유전자는 마이코박테로이데스 압세수스 subsp. 마실리엔세(*Mycobacteroides abscessus* subsp. *Massiliense*)에서 유래한 경우 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 것일 수 있고, 마이코박테리움 카나리아센세(*Mycobacterium canariasense*)에서 유래한 경우 서열번호 3의 염기서열을 포함하는 것일 수 있고, 마이코박테리움 콘셉티오넨세(*Mycobacterium conceptione*nse)에서 유래한 경우 서열번호 5의 염기서열을 포함하는 것일 수 있다.

[0029] 본 발명에서 사용된 "벡터(vector)"는 변이 대상 미생물 (숙주세포)에 목적 유전자, 즉 포스포판테테이닐 전이효소를 암호화하는 유전자를 전달하여 발현시키기 위한 수단으로 사용되는 모든 유형의 핵산 서열 운반 구조체를 의미한다. 상기 벡터는 특별한 언급이 없는 한, 담지된 핵산 서열이 숙주세포 유전체 내 삽입되어 발현되도록 하는 것 및/또는 독자적으로 발현되도록 하는 것을 의미할 수 있다. 이러한 벡터는 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 서열을 포함하며, "작동가능하게 연결된(operably linked)"이란 목적 유전자와 이의 조절 서열이 서로 기능적으로 결합되어 유전자 발현을 가능케 하는 방식으로 연결된 것을 의미하고, "조절 서열"은 전사를 수행하기 위한 프로모터 서열, 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보좀 결합 부위를 암호화하는 서열, 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다.

[0030] 본 발명에서 사용되는 벡터는 숙주세포 내에서 복제 가능한 것이라면 특별히 한정되지 않으며, 당업계에 알려진 임의의 벡터를 이용할 수 있다. 상기 벡터의 일례로는 천연 상태이거나 재조합된 상태의 플라스미드, 코스미드, 바이러스 및 박테리오파지를 들 수 있다. 예를 들면, 파지 벡터 또는 코스미드 벡터로는 pWE15, M13, λMBL3, λMBL4, λIXII, λASHII, λAPII, λt10, λt11, Charon4A, Charon21A 등이 있으며, 플라스미드 벡터로는 pBR계, pUC계, pBluescriptII계, pGEM계, pTZ계, pCL계 및 pET계 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 않는다.

[0031] 상기 벡터는 전형적으로 클로닝을 위한 벡터 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 발현을 위한 벡터는 당업계에서 식물, 동물 또는 미생물에서 외래의 유전자 또는 단백질을 발현하는데 사용되는 통상의 것을 사용할 수 있으며, 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있다.

[0032] 본 발명에서 사용된 "재조합 벡터"는 원핵세포 또는 진핵세포를 숙주로 하여 구축될 수 있으며, 숙주세포의 게놈과 무관하게 복제 가능하거나 게놈 그 자체에 봉합될 수 있다. 상기 숙주세포는 벡터가 복제 가능한 것으로, 복제가 개시되는 특정 염기서열인 복제 원점을 포함할 수 있다. 예를 들어, 사용되는 벡터가 발현 벡터이고 원핵세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터 (예컨대, pLλ 프로모터, CMV 프로모터, trp 프로모터, lac 프로모터, tac 프로모터, T7 프로모터), 해독의 개시를 위한 라이보좀 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 진핵세포를 숙주로 하는 경우에는, 벡터에 포함되는 진핵세포에서 작동하는 복제원점은 f1 복제원점, SV40 복제원점, pMB1 복제원점, 아데노 복제원점, AAV 복제원점 및 BBV 복제원점 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 포유동물 세포의 게놈으로부터 유래된 프로모터 (예컨대, 메탈로 티오닌 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터 (예컨대, 아데노 바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, 사이토 메갈로 바이러스 프로모터, HSV의 tk 프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 일반적으로 가진다.

[0033] 상기 재조합 벡터는 선택 마커(selection marker)를 포함할 수 있는데, 상기 선택 마커는 벡터로 형질전환된 형질전환체 (숙주세포)를 선별하기 위한 것으로 상기 선택 마커가 처리된 배지에서 선택 마커를 발현하는 세포만 생존할 수 있기 때문에, 형질전환된 세포의 선별이 가능하다. 상기 선택 마커는 대표적인 예로 암피실린, 카나마이신, 스트렙토마이신, 클로람페니콜 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0034] 상기 재조합 벡터를 숙주세포에 삽입함으로써 형질전환체를 만들 수 있으며, 상기 형질전환체는 재조합 벡터를 적절한 숙주세포에 도입시킴으로써 얻어진 것일 수 있다. 숙주세포는 상기 발현벡터를 안정되면서 연속적으로 클로닝 또는 발현시킬 수 있는 세포로서 당업계에 공지된 어떠한 숙주세포도 이용할 수 있다.

[0035] 재조합 미생물을 제작하기 위하여 원핵세포에 형질전환시키는 경우에는 숙주세포로서 *E. coli* DH5α, *E. coli* JM109, *E. coli* BL21, *E. coli* RR1, *E. coli* LE392, *E. coli* B, *E. coli* X 1776, *E. coli* W3110, *E. coli* XL1-Blue와 같은 대장균 속 균주, 코리네박테리움 속 균주, 바실루스 서브틸리스, 바실루스 츄린겐시스와 같은 바실루스 속 균주, 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세슨스 및 슈도모나스 종과 같은 다양한 장내균과 균주 등이 이용되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0036] 재조합 미생물을 제작하기 위하여 진핵세포에 형질전환을 하는 경우에는 숙주세포로서 효모 (예컨대, 사카로마이세스 세레비지에), 곤충 세포, 식물 세포 및 동물 세포, 예를 들어, Sp2/0, CHO K1, CHO DG44, PER.C6, W138, BHK, COS7, 293, HepG2, Huh7, 3T3, RIN, MDCK 세포주 등이 이용될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0037] 본 발명에서 사용된 “형질전환(transformation)”은 외부 DNA를 숙주세포 내로 도입하여 인위적으로 유전적인 변화를 일으키는 현상을 의미하며, “형질전환체(transformant)”는 외부 DNA가 도입되어 목적 유전자의 발현을 안정적으로 유지하는 숙주세포를 의미한다.

[0038] 상기 형질전환은 숙주세포에 따라 적합한 벡터 도입 기술이 선택되어 목적 유전자 또는 이를 포함하는 재조합 벡터를 숙주세포 내에서 발현시킬 수 있다. 예를 들면, 벡터 도입은 전기천공법(electroporation), 열 충격(heat-shock), 인산칼슘($CaPO_4$) 침전, 염화칼슘($CaCl_2$) 침전, 미세주입법(microinjection), 폴리에틸렌글리콜(PEG)법, DEAE-덱스트란법, 양이온 리포좀법, 초산 리튬-DMSO법, 또는 이들의 조합에 의해 수행될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 형질전환된 유전자는 숙주세포 내에서 발현될 수 있으면 숙주세포의 염색체 내 삽입 또는 염색체 외에 위치하고 있는 것이든 제한하지 않고 포함될 수 있다.

[0039] 상기 형질전환체는 생체내 또는 시험관내에서 본 발명에 따른 재조합 벡터로 형질감염, 형질전환, 또는 감염된 세포를 포함하며, 재조합 숙주세포, 재조합 세포 또는 재조합 미생물과 동일한 용어로 사용될 수 있다.

[0040] 본 발명의 형질전환용 재조합 벡터 내에 삽입된 유전자들은 상동 재조합 교차로 인하여 코리네박테리움 속 미생물과 같은 숙주세포 내로 치환될 수 있다.

[0041] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 숙주세포는 코리네박테리움 속 미생물인 것일 수 있으며, 예를 들면 코리네박테리움 속 미생물은 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)일 수 있다.

[0043] 또한, 본 발명의 다른 일 양상은 상기 변이 미생물을 배지에서 배양하는 단계; 및 상기 변이 미생물 또는 변이 미생물이 배양된 배지로부터 1,4-부탄디올을 회수하는 단계를 포함하는 1,4-부탄디올의 생산 방법을 제공한다.

[0044] 상기 배양은 당업계에 알려진 적절한 배지와 배양 조건에 따라 이루어질 수 있으며, 통상의 기술자라면 배지 및 배양 조건을 용이하게 조정하여 사용할 수 있다. 구체적으로, 상기 배지는 액체 배지일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 배양 방법은 예를 들면, 회분식 배양(batch culture), 연속식 배양(continuous culture), 유가식 배양(fed-batch culture) 또는 이들의 조합 배양을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0045] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 배지는 적절한 방식으로 특정 균주의 요건을 충족해야 하며, 통상의 기술자에 의해 적절하게 변형될 수 있다. 코리네박테리움 속 미생물에 대한 배양 배지는 공지된 문헌 (Manual of Methods for General Bacteriology. American Society for Bacteriology. Washington D.C., USA, 1981)을 참조할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0046] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 배지에 다양한 탄소원, 질소원 및 미량원소 성분을 포함할 수 있다. 사용될 수 있는 탄소원으로는 글루코스, 수크로스, 락토스, 프락토스, 말토스, 전분, 셀룰로스와 같은 당 및 탄수화물, 대두유, 해바라기유, 피마자유, 코코넛유 등과 같은 오일 및 지방, 팔미트산, 스테아린산, 리놀레산과 같은 지방

산, 글리세롤, 에탄올과 같은 알코올, 아세트산과 같은 유기산이 포함된다. 이들 물질은 개별적으로 또는 혼합물로서 사용될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 사용될 수 있는 질소원으로는 펩톤, 효모 추출물, 육즙, 맥아 추출물, 옥수수 침지액, 대두밀 및 요소 또는 무기 화합물, 예를 들면 황산 암모늄, 염화암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄 및 질산암모늄이 포함될 수 있다. 질소원 또한 개별적으로 또는 혼합물로서 사용할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 사용될 수 있는 인의 공급원으로는 인산이수소칼륨 또는 인산수소이칼륨 또는 상응하는 나트륨-함유 염이 포함될 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 배양 배지는 성장에 필요한 황산마그네슘 또는 황산철과 같은 금속염을 함유할 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다. 그 외에, 아미노산 및 비타민과 같은 필수 성장 물질이 포함될 수 있다. 또한 배양 배지에 적절한 전구체들이 사용될 수 있다. 상기 배지 또는 개별 성분은 배양과정에서 배양액에 적절한 방식에 의해 회분식으로 또는 연속식으로 첨가될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0047] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 배양 중에 수산화암모늄, 수산화칼륨, 암모니아, 인산 및 황산과 같은 화합물을 미생물 배양액에 적절한 방식으로 첨가하여 배양액의 pH를 조정할 수 있다. 또한, 배양 중에 지방산 폴리글리콜 에스테르와 같은 소포제를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다. 추가적으로, 배양액의 호기 상태를 유지하기 위하여, 배양액 내로 산소 또는 산소-함유 기체 (예, 공기)를 주입할 수 있다. 배양액의 온도는 통상 20 내지 45℃, 예를 들면 25 내지 40℃일 수 있다. 배양기간은 유용물질이 원하는 생산량으로 수득될 때까지 계속될 수 있으며, 예를 들면 10 내지 160시간일 수 있다.

[0048] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 배양된 변이 미생물 또는 이를 포함하는 배양 배지에서 1,4-부탄디올을 회수하는 단계는 배양 방법에 따라 당해 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 배지로부터 생산된 1,4-부탄디올을 수집 또는 회수할 수 있다. 예를 들면 원심분리, 여과, 추출, 분무, 건조, 증발, 침전, 결정화, 전기영동, 분별용해 (예를 들면, 암모늄 설페이트 침전), 크로마토그래피 (예를 들면, 이온 교환, 친화성, 소수성 및 크기 배제) 등의 방법을 사용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 않는다.

[0049] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 1,4-부탄디올을 회수하는 단계는 배양 배지를 저속 원심분리하여 바이오매스를 제거하고 얻어진 상등액을 이온교환 크로마토그래피를 통하여 분리할 수 있다.

[0050] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 1,4-부탄디올을 회수하는 단계는 1,4-부탄디올을 정제하는 공정을 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0051] 본 발명에 따른 변이 미생물은 마이코박테로이데스 압세수스 subsp. 마실리엔세(*Mycobacteroides abscessus* subsp. *Massiliense*), 마이코박테리움 카나리아센세(*Mycobacterium canariasense*) 및 마이코박테리움 콘셉티오넨세(*Mycobacterium conceptione*nse)에서 유래하여 카르복실산 환원효소와의 반응성이 우수한 포스포판테테이닐 전이효소를 발현함으로써 효율적으로 1,4-부탄디올을 생산할 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0052] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이러한 설명은 본 발명의 이해를 돕기 위하여 예시적으로 제시된 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이러한 예시적인 설명에 의하여 제한되는 것은 아니다.

[0054] **실시예 1. 포스포판테테이닐 전이효소(PPTase)의 과발현 및 효소 활성 평가**

[0055] **1-1. sfp 또는 pptase 유전자 과발현 벡터 제작**

[0056] 포스포판테테이닐 전이효소를 암호화하는 sfp 유전자를 포함하는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) strain 168의 염색체 DNA를 주형으로 프라이머 1 및 2를 이용하여 PCR로 증폭하였다. 이를 통해 얻은 PCR 산물을 pET30a 벡터 (Merck Millipore, Novagen 69909)의 제한효소 NdeI 및 XhoI 위치에 삽입하였다. 이 벡터를 pET21b-BsPPTase로 명명하였다.

[0057] 마이코박테로이데스 압세수스 subsp. 마실리엔세(*Mycobacteroides abscessus* subsp. *Massiliense*)의 염색체 DNA를 주형으로 프라이머 3 및 4를 이용하여 PCR로 증폭하였다. 이를 통해 얻은 PCR 산물을 pET21b 벡터 (Merck Millipore,Novagen 69741)의 제한효소 NdeI 및 XhoI 위치에 삽입하였다. 이 벡터를 pET21b-MaPPTase로 명명하였다.

[0058] 마이코박테리움 카나리아센세(*Mycobacterium canariasense*)의 염색체 DNA를 주형으로 프라이머 5 및 6을 이용하여 PCR로 증폭하였다. 이를 통해 얻은 PCR 산물을 pET21b 벡터의 제한효소 NdeI 및 XhoI 위치에 삽입하였다. 이 벡터를 pET21b-McaPPTase로 명명하였다.

[0059] 마이코박테리움 콘셉티오넨세(*Mycobacterium conceptionense*)의 염색체 DNA를 주형으로 프라이머 7 및 8을 이용하여 PCR로 증폭하였다. 이를 통해 얻은 PCR 산물을 pET21b 벡터의 제한효소 NdeI 및 XhoI 위치에 삽입하였다. 이 벡터를 pET21b-McoPPTase로 명명하였다.

[0060] 포스포판테테이닐 전이효소에 의해 효소 활성이 활성화되는 카르복실산 환원효소(CAR)의 과발현을 위해, 이를 암호화하는 car 유전자를 포함하는 마이코박테리움 압세수스(*Mycobacterium abscessus*) ATCC 19977의 염색체 DNA를 주형으로 프라이머 9 및 10을 이용하여 PCR로 증폭하였다. 이를 통해 얻은 PCR 산물을 pET30a 벡터의 제한효소 NdeI 및 HindIII 위치에 삽입하였다. 이 벡터를 pET30a-MabCAR로 명명하였다.

[0061] 여기서 각 균으로부터 염색체 DNA를 추출하기 위해 Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, 미국)를 사용하였고, 증폭된 sfp/pptase 유전자 및 car 유전자의 염기서열은 하기 표 1에 나타내었고, PCR을 위해 사용된 프라이머는 하기 표 2에 나타내었다. PCR은 Thermocycler (TP600, TAKARA BIO Inc., 일본)를 이용하여 각각의 데옥시뉴클레오티드 트리포스페이트 (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 100 μM가 첨가된 반응액에 올리고뉴클레오티드 1 pM 및 주형 DNA 10 ng을 첨가하고 PrimeSTAR Max DNA Polymerase (Takara, 일본) 1 유닛의 존재 하에서 실시하였다.

[0062] PrimeSTAR MAX Polymerase (Takara, Japan) 및 NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix (NEB, USA)와 제한효소 NdeI (NEB, USA), HindIII (NEB, USA) 및 XhoI (NEB, USA)를 사용하여 pET21b-BsPPTase, pET21a-MaPPTase, pET21a-McaPPTase, pET21a-McoPPTase 및 pET30a-MabCAR 벡터를 제작하였고, 각 벡터를 각각 *E. coli* DH5a (HIT Competent cells™, Cat No. RH618)에 형질전환시키고, 50 ㎍/㎖의 카나마이신과 100 ㎍/㎖의 암피실린을 함유하는 LB-한천 플레이트 상에 각각 도말하여, 37℃에서 24시간 배양하였다. 최종 형성되는 콜로니를 분리하여 삽입물(insert)이 정확히 벡터에 존재하는지 확인한 후 DokDo-Prep Plasmid Mini-Prep Kit (ELPIS-biotech, 한국)를 이용하여 벡터를 분리하였다.

표 1

[0063]

서열번호	유전자 및 염기서열 (5'-3')
1	*Mycobacteroides abscessus* subsp. *Massiliense* 유래, pptase 유전자
	TTGATCGCTTCGGTAGTTCCCGAGCTGTTGTCGTCGGCCGAGTTGTATGACGACCCACCCGGTCTGGAGCCGCTGCCCGAAGAG GAACCGTTGATCGCCAAGTCGGTGGCCAAGCGGCGCAACGAATTCATCACCGTGCGGTACTGCGCCCGGCAGGCGCTATCCGTG CTTGGCGTTCCAGAGGCGCCGATCCTCAAGGGAGACAAGGGGCAACCGCTGTGGCCCGATGGGATCGTGGGCAGCATGACGCAT ACCGAGGGCTTCCGGGGGGCCGTGGTGGGGCGGACGGGCGAGGTGCGTTCGGTGGGCATCGACGCCGAACCGCACGATGTGTTG CCCAATGGCGTGCTCAAGTCGATTGCCCTGCCCGTCGAGCGTGACGAGCTGGACGCGTTGCCTGCTGGCACCCACTGGGACAGA TTGTTGTTCTGTGCCAAGGAAACCACGTACAAGGCATGGTTTCCGTTGACTGCCCGCTGGCTTGGTTTCGAGGACGCTCACATC ACGATCGACCCGGATGGAACGTTTACTTCGCGAATCTTGGTTGACGGCAGGGCCAACGATGGCACCGTGTTATCGGCCTTTGAC GGCCGATGGATCATCGACAAGGGTTTGATCTTGACCGCGATTGTGGTGCCGTGA
3	*Mycobacterium canariasense* 유래, pptase 유전자
	GTGGCCCTGTTGCGTGCCCTGGTGCCCGAGGTCGTGGTGTCGGCCGAGACCTACGACGACCCGCCCGGTCTGGCGCCGCTGCCG GAGGAGGAACCGCTGGTGGCGCGTTCGGTGGCCAAGCGGCGCAACGAGTTCGTCACCGTTCGGTACTGCGCCCGGCAGGCGCTC GGTGAGCTGGGTGTGCCGCCGGCACCGATCCTCAAGGGCGACAAGGGCGAACCGTGCTGGCCCGACGGTGTCGTCGGCAGCCTG ACGCACTGCGACGGTTTCCGCGGTGCGGTGGTGGGGCGCAGCTCCGATGTCCGCTCGCTGGGCATCGACGCCGAACCGCACGAT GTGCTGCCCAAGGGGGTGCTCGACGCGATCAGCCTGCCCGCCGAACGGGCACACCTGTCCGGCCTGCCGGGTGGCCTGCACTGG GACCGAATCCTGTTCTGCGCCAAAGAGGCCACTTACAAGGCCTGGTTCCCGCTGACGCACCGGTGGCTCGGCTTCGAGGATGCC CACATCACGTTCACCCCCGACTCGTCAGGTGCGGCAGGGACGTTCGAGTCCCGGATCCTGATCGACCCGGCCGCCGAGTCCGGT CCGCCGCTGACCGCGCTGGCCGGGCGCTGGTCGGTGGCCGACGGAATCGCGCTGACGGCGATCACGCTGTGA
5	*Mycobacterium conceptione*nse 유래, pptase 유전자
	ATGAACGACACGTTGCTGGGGCAGGTGCTGCCCGACCTGCCGGGCAAGCTGGCCGCGGCGGAGATGTACGACGACCCGCCGGGC TTGCCAACGCTGCCCGAGGAGGAAGCGCTCGTGGCTCGCGCGGTGGCCAAGCGGCGCAACGAGTTCACCACTGTGCGCTACTGC GCCCGCCAGGCGTTGAGTGAGCTGGGCGTGAGTCCGGTGCCGATTCTCAAGGGGGACAAGGGCGAACCGTGCTGGCCGGACGGG ATCGTCGGCAGCCTGACGCACACCCAGGGGTTTCGCGGCGCGGTGGTGGGCCGGGCCGGCGGGGTGCGCTCGGTCGGCATCGAC GCCGAACCGCACGACGTGCTGCCCGACGGGGTTCTGGGTGCCATCTCGCTACCGTTGGAGCGCTCCGAAATCGGCGCTTTGCCC GACGGCCTGCATTGGGATCGAATCCTGTTCTGCGCCAAGGAGGCCACCTACAAGGTCTGGTATCCGCTGACGCACCGCTGGCTC GGGTTCGAGGATGCCCACATCACCTTCGGGGTGGATGCGTCCGGTGCCGCCGGAACCTTCCGGTCCCAGATCCTCATCGACCCC GCCGCCGAACACGGCCCACCGTTGACCGCGCTGGACGGCCGCTGGTCGGTCCGTGACGGTGTGACGCTGACGGCGATCGTGCTG TGA

7	*Bacillus subtilis* 유래, sfp 유전자
	ATGAAGATTTACGGAATTTATATGGACCGCCCGCTTTCACAGGAAGAAAATGAACGGTTCATGTCTTTCATATCACCTGAAAAA CGGGAGAAATGCCGGAGATTTTATCATAAAGAAGATGCTCACCGCACCCTGCTGGGAGATGTGCTCGTTCGCTCAGTCATAAGC AGGCAGTATCAGTTGGACAAATCCGATATCCGCTTTAGCACACAGGAATACGGGAAGCCGTGCATCCCTGATCTTCCCGACGCT CATTTCAACATTTCTCACTCCGGCCGCTGGGTCATTGGTGCGTTTGATTCACAGCCGATCGGCATAGATATCGAAAAAACGAAA CCGATCAGTCTTGAGATCGCCAAGCGCTTCTTTTCAAAAACAGAGTACAGCGACCTTTTAGCAAAAGACAAGGACGAGCAGACA GACTATTTTTATCATCTATGGTCAATGAAAGAAAGTTTTATCAAACAGGAAGGCAAAGGCTTATCGCTTCCGCTTGATTCCTTT TCAGTGCGCCTGCATCAGGACGGACAAGTATCCATTGAGCTTCCGGACAGCCATTCCCCATGCTATATCAAAACGTATGAGGTC GATCCCGGCTACAAAATGGCTGTATGCGCCGCACACCCTGATTTCCCCGAGGATATCACAATAGTCTCGTACGAAGAGCTTTTA TAA
9	*Mycobacterium abscessus* 유래, car 유전자
	ttgactgaaacgatctccacagcggctgtccccactacggatctcgaagagcaggtgaagcgacgcatcgagcaggtcgtgtcc aacgatccgcagctggcggcgcttctcccggaagattcggtcaccgaggcggtcaacgagcccgatctaccgctggtcgaggtg atcaggcgactgctggagggctacggtgaccgcccggcactcggccagcgcgccttcgagttcgtcaccggggacgacggtgcg accgtgatcgcgctgaagcccgaatacaccaccgtctcctaccgcgagttgtgggaacgtgccgaggctatcgctgccgcgtgg cacgagcagggcatccgtgacggcgacttcgtcgctcagttgggtttcaccagcacggacttcgcgtcgctcgacgtcgcggga ttgcgtctgggcaccgtctcggtgcccctgcagacgggcgcgtcgctgcagcagcgcaacgcgattctcgaagagacccggccc gcagtctttgccgcgagtatcgaatacctttgatgccgccgtcgattcggtgcttgcgacccccctcggtgcgactcctctcggtt ttcgactatcacgcggaggtcgacagccagcgcgaagcgctggaggctgtgcgggcccggcttgagagtgccggccggacgatc gtcgtcgaggccctggcggaggctctcgcgcgggggcgggacctgcccgccgcgccgctgcccagtgcagatcccgatgccttg cgtctgctcatctacacctccggcagcaccggtacccccaagggcgccatgtatccgcaatggctggtcgccaacttgtggcag aagaagtggctcaccgacgatgtgattccgtccataggcgtgaacttcatgcccatgagccacctggcgggtcgcctcactctc atgggcacccttccggtggcggaaccgcctactacatcgcttcgagcgatctttcgactttcttcgaggacatcgcgctcatc cgcccctccgaagtgctcttcgtgccgcgtgtggtggagatggtgttccagcgttttcaggcagaattggaccggtcccttgcc ccgggtgagagcaactccgagatcgcggagcgaatcaaggtccgcatccgggaacaggacttcggcgggcgtgtgctcagtgct ggctccgggtcggccccgttgtctcctgagatgacggagttcatggagtcgctgctgcaggtgccgttgcgcgacgggtatggg tccaccgaggccggtggtgtgtggcgtgacggagtcctgcagcgtccgcccgtcaccgactacaagctggttgacgttccggaa ctcggatacttcaccacagattcgccgcatccccgtggcgagctgcggttgaagtcggagacgatgttccccggctactacaag cgcccggagaccactgccgatgtcttcgatgacgaggggtactacaagaccggtgacgtggtcgccgagctcgggccggatcac ctcaagtacctcgaccgcgtcaagaacgtcctcaagctcgcgcagggagagtttgtcgcggtgtcaaagctggaggccgcttac accggcagcccgctggtccggcagatctttgtgtacgggaacagtgaacgctcgttcctgctggctgtcgtggtcccgacaccc gaagtccttgagcggtacgcagattcgccagatgcgctcaagcccttgatccaggattcgctgcagcaggtcgccaaggacgcg gagctgcaatcctatgagataccgcgcgacttcatcgttgagacggtgccgttcaccgtcgagtccggattgctatcggacgcg cgaaagctgctgcgccccaagctgaaggatcactacggagaggctggaggcgctgtacgccgaactggcggaaagccagaat gagcggctgcgccagttggccagggaggcagccacgcgcccggtcctggagacggtgaccgatgcggccgccgcgctgctgggc gcatcgtcctcggatctggctcctgatgtgcgattcatcgacctcggtggcgactcactgtcggcgctgtcgtactccgagctg ctgcgcgacatctttgaggtggacgttccggtgggcgtcatcaacagcgtcgccaacgaccttgccgcgatcgcccggcacatc gaggcgcagcggaccggcgccgctacgcagccgacctttgcgtcggtccacggcaaggacgcgacggtcatcaccgccggtgaa ctcaccctcgacaagttcttggacgagtcactgttgaaagcggccaaggacgttcagccggcaacggccgatgtcaagaccgtt ctagtgaccggcggcaacggctggttgggtcgttggctggtgctcgattggctggagcggttggcacccaatggtggcaaggtc tacgccctcattcgtggcgccgatgccgaagcagcccgggcacggttggacgccgtgtacgaatcgggtgatcccaagctgtcc gcgcattatcgtcagctggcgcaacagagtctggaagttatcgccggcgatttcggcgaccaggatctcggtctatcccaggaa gtttggcagaagctggccaaggacgtggacctgatcgtgcactccggtgccttggtgaaccacgtgctgccgtacagccagttg ttcggtccgaatgtggcgggtaccgccgagatcatcaagctggcaatttcggagcggctcaagccggtcacctacctgtcgacg gtgggcatcgccgaccagattccggtgacggagttcgaggaagactccgatgttcgtgtgatgtcggccgagcgccagatcaat gacggctacgcgaacggatacggcaactcaaaatgggccggcgaggtgctgttgcgggaggctcatgacctagcggggctgccg gtgcgtgtgttccgctccgacatgatcctggcgcacagtgactaccacggacagctcaacgtcaccgacgtgttcacccggagc atccagagtctgctgctcaccggtgttgcaccggccagcttctatgaattggatgccgacggcaatcggcagcgcgctcactat gacggtgtgcccggcgatttcaccgccgcatcgatcaccgccatcggcggtgtgaacgtggtagacggttaccgcagcttcgac gtgttcaacccgcaccatgacggtgtctcgatggatacttcgtcgactggctgatcgacgcaggctacaagatcgcgcggatc gacgattacgaccagtggctcgcccggttcgagctggccctcaagggattgcccgagcagcagcggcaacagtcggtgttgcca cttctcaagatgtacgagaagccgcaaccggcgatcgacggaagtgcacttccgaccgcagaattcagtcgcgccgtgcacgag gcgaaggtcggagacagcggtgagataccgcacgtcaccaaggagctgatcctcaagtacgccagcgatattcagctgttgggc ctggtgtag

[0064]

표 2

서열번호	프라이머	프라이머 서열 (5'-3')
10	프라이머1	CGCGCATATGAAGATTTACGGAATTTATATGGAC
11	프라이머2	TATACTCGAGTTATAAAAGCTCTTCGTACGAGAC
12	프라이머3	GCGCCATATGTTGATCGCTTCGGTAGTTCCCGAG
13	프라이머4	GCGCCTCGAGTCACGGCACCACAATCGC
14	프라이머5	GCGCCATATGGTGGCCCTGTTGCGTGCCC
15	프라이머6	GCGCCTCGAGTCACAGCGTGATCGCCGTCAGC
16	프라이머7	GCGCCATATGAACGACACGTTGCTGGGGCAGG
17	프라이머8	GCGCCTCGAGTCACAGCACGATCGCCGTCAGC

18	프라이머9	GCGCCATATGACTGAAACGATCTCCACAGC
19	프라이머10	ATATAAGCTTCACCAGGCCCAACAGCTGA

[0066] **1-2. PPTase의 과발현 및 효소 활성 평가**

[0067] pET30a-MabCAR 벡터와 pET21b-BsPPTase 벡터, pET30a-MabCAR 벡터와 pET21b-MaPPTase 벡터, pET30a-MabCAR 벡터와 pET21b-McaPPTase 벡터, 그리고 pET30a-MabCAR 벡터와 pET21b-McoPPTase 벡터를 각각 *E. coli* BL21(DE3) (HIT Competent cells™, Cat No. RH217)에 형질전환시키고, 50 ㎍/㎖의 카나마이신과 100 ㎍/㎖의 암피실린을 함유하는 LB-한천 플레이트 상에 도말하여, 37℃에서 24시간 배양하였다. 최종 형성된 각 균주는 종배양액을 위해 10 ㎖ LB 배지에 접종하여 37℃, 18시간 동안 1차 배양을 하였으며, 이후 1 ℓ LB배지에 종배양액을 10 ㎖ 접종하여 본배양을 하였다. 본배양은 37℃, 120 rpm으로 2 ~ 2.5시간 배양하여 OD_{600} 값이 0.5 ~ 0.6이 되었을 때 0.5 mM의 IPTG를 첨가하였으며, 이후 18℃, 120 rpm으로 18시간 동안 배양하였다. 배양액은 4℃, 4000 rpm으로 10분간 원심분리한 뒤 상등액을 버리고 침전된 균주를 40 mM Tris-HCl 완충용액 30 ㎖ 에 현탁하였으며, 현탁액은 초음파 파쇄기를 이용하여 세포를 파쇄한 후, 4℃, 13500 rpm으로 30분간 원심분리하였다. 상등액은 친화크로마토그래피 (affininy chromatography) 과정을 통해 단백질을 분리 및 정제하였으며, SDS-PAGE로 과발현을 확인하였다.

[0068] 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) strain 168 유래 포스포판테테이닐 전이효소 (BsPPTase)는 마이코박테로이데스 압세수스 subsp. 마실리엔세(*Mycobacteroides abscessus* subsp. *Massiliense*), 마이코박테리움 카나리아센세(*Mycobacterium canariasense*) 및 마이코박테리움 콘셉티오넨세(*Mycobacterium conceptionense*) 유래 포스포판테테이닐 전이효소 (MaPPTase, McaPPTase 및 McoPPTase)의 대조군으로 사용했으며, PPTase에 의해 효소 활성이 활성화되는 CAR의 활성을 측정하여 PPTase의 활성을 비교하였다. 효소 활성은 UV/Vis 분광광도계 (Shimadzu, UV-1800)를 이용하여 분석하였으며, CAR의 활성은 숙신산(succinic acid)를 기질로 사용하여 반응이 일어날 때 NADPH의 감소량을 측정하였다. 반응 용액은 500 ㎕ 이며, 반응 용액의 조성은 100 mM 인산염 완충용액(phosphate, pH 7.0), 10 mM 염화마그네슘 ($MgCl_2$), 2.5 mM ATP, 0.2 mM NADPH, 200 mM 숙신산(succinic acid)에 CAR 1 uM을 첨가하였다. 효소 반응은 상온 (25℃)에서 진행했으며, 파장 340 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과는 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

[0069]

효소	효소 활성 (uM/min)
MabCAR+BsPPTase	56.6
MabCAR+MaPPTase	123.4
MabCAR+McaPPTase	96.0
MabCAR+McoPPTase	104.6

[0071] 상기 표 3에 나타낸 바와 같이, 마이코박테로이데스 압세수스 subsp. 마실리엔세(*Mycobacteroides abscessus* subsp. *Massiliense*), 마이코박테리움 카나리아센세(*Mycobacterium canariasense*) 및 마이코박테리움 콘셉티오넨세(*Mycobacterium conceptionense*) 유래 카르복실산 환원효소 (MaPPTase, McaPPTase 및 McoPPTase)의 활성은 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 유래 포스포판테테이닐 전이효소 (BsPPTase)의 활성과 비교하여 각각 약 2.2배, 1.7배 및 1.8배 증가하였다.

[0073] **실시예 2. 1,4-BDO 생산 경로가 구축된 변이 코리네박테리움 글루타미쿰 제작**

[0074] **2-1. gadB, gabT, yqhD, car 및 sfp 유전자 도입 벡터 제작**

[0075] 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) ATCC13032에 gadB, gabT, yqhD, car 및 sfp 유전자를 도입하여 글루탐산으로부터 1,4-부탄디올을 생합성하는 경로를 구축하였다. 글루탐산-1,4-부탄디올 경로는 글루탐산(glutamic acid)을 4-아미노뷰티르산(4-aminobutyric acid)으로 전환하는 효소 반응 (gadB 유전자), 4-아

미노뷰티르산을 숙시네이트 세미알데히드(succinate semialdehyde)로 전환하는 효소 반응 (gabT 유전자), 숙시네이트 세미알데히드를 4-하이드록시뷰티르산으로 전환하는 효소 반응 (yqhD 유전자) 및 4-하이드록시뷰티르산을 1,4-부탄디올로 전환하는 효소 반응 (car/yqhD 유전자)을 단계적으로 거친다.

[0076] 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032의 염색체 DNA를 주형으로 프라이머 1 및 2, 프라이머 3 및 4, 프라이머 7 및 8, 프라이머 41 및 42, 프라이머 43 및 44, 그리고 프라이머 45 및 8을 이용하여 각각 PCR로 증폭하였다. gadB 유전자를 포함하는 pCES208H36EcGADmut (ACS Omega. 2022 Aug 23; 7(33): 29106-29115.) DNA를 주형으로 프라이머 5 및 6을 이용하여 PCR로 증폭하였다. 이를 통해 얻은 PCR 산물들을 크로스오버(crossover) PCR로 증폭한 후, pK19mobSacB 벡터 (ATCC, 87098)의 제한효소 HindIII 및 XbaI 위치에 삽입하였다. 이 벡터를 pk19mobsacB-gadB(E89Q,△452-466)gabT로 명명하였다.

[0077] 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032의 염색체 DNA를 주형으로 프라이머 9 및 10, 프라이머 11 및 12, 그리고 프라이머 15 및 16을 이용하여 각각 PCR로 증폭하였다. yqhD 유전자 (*Escherichia coli* 유래)를 포함하는 대장균(*Escherichia coli*) K-12 MG1655의 염색체 DNA를 주형으로 프라이머 13 및 14를 이용하여 PCR로 증폭하였다. 이를 통해 얻은 PCR 산물들을 크로스오버 PCR로 증폭한 후, pK19mobSacB 벡터의 제한효소 HindIII 및 XbaI 위치에 삽입하였다. 이 벡터를 pk19mobsacB-yqhD로 명명하였다.

[0078] 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032의 염색체 DNA를 주형으로 프라이머 17 및 18, 프라이머 19 및 20, 그리고 프라이머 23 및 24를 이용하여 각각 PCR로 증폭하였다. car 유전자 (*Mycobacterium abscessus* 유래)를 포함하는 대장균 발현 벡터 pKE112CAR3pptase (Polymers (Basel). 2019 11(7):1184)를 주형으로 프라이머 21 및 22를 이용하여 PCR로 증폭하였다. 이를 통해 얻은 PCR 산물들을 크로스오버 PCR로 증폭한 후, pK19mobSacB 벡터의 제한효소 HindIII 및 XbaI 위치에 삽입하였다. 이 벡터를 pk19mobsacB-car로 명명하였다.

[0079] car 유전자의 효소 활성을 활성화하는데 필요한 sfp 유전자를 삽입하기 위해, 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032의 염색체 DNA를 주형으로 프라이머 25 및 26, 프라이머 27 및 28, 그리고 프라이머 31 및 32를 이용하여 각각 PCR로 증폭하였다. sfp 유전자 (*Bacillus subtilis* 유래)를 포함하는 대장균 발현 벡터 pKE112CAR3pptase (Polymers (Basel). 2019 11(7):1184)를 주형으로 프라이머 29 및 30를 이용하여 PCR로 증폭하였다. 이를 통해 얻은 PCR 산물들을 크로스오버 PCR로 증폭한 후, pK19mobSacB 벡터의 제한효소 HindIII 및 XbaI 위치에 삽입하였다. 이 벡터를 pk19mobsacB-sfp로 명명하였다.

[0080] 여기서 각 균으로부터 염색체 DNA를 추출하기 위해 Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, 미국)를 사용하였다. 증폭된 gadB, gabT, yqhD, car 및 sfp 유전자의 염기서열은 하기 표 4에 나타내었고, PCR을 위해 사용된 프라이머는 하기 표 5에 나타내었다. PCR은 Thermocycler (TP600, TAKARA BIO Inc., 일본)를 이용하여 각각의 데옥시뉴클레오티드 트리포스페이트 (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 100 μM가 첨가된 반응액에 올리고뉴클레오티드 1 pM 및 주형 DNA 10 ng을 첨가하고 PrimeSTAR Max DNA Polymerase (Takara, 일본) 1 유닛의 존재 하에서 실시하였다.

[0081] NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix (NEB, USA)와 제한효소 HindIII (NEB, USA) 및 XbaI (NEB, USA)를 사용하여 제작된 pk19mobsacB-gadB(E89Q,△452-466)gabT, pk19mobsacB-yqhD, pk19mobsacB-car 및 pk19mobsacB-sfp 벡터를 각각 *E. coli* DH5a (HIT Competent cells™, Cat No. RH618)에 형질전환시키고, 50 ㎍/㎖의 카나마이신을 함유하는 LB-한천 플레이트 상에 도말하여, 37℃에서 24시간 배양하였다. 최종 형성되는 콜로니를 분리하여 삽입물(insert)이 정확히 벡터에 존재하는지 확인한 후, 이 벡터를 분리하여 글루탐산-1,4-부탄디올 경로가 도입된 코리네박테리움 글루타미쿰 변이 균주를 제조하는데 사용하였다.

표 4

[0082]

서열번호	유전자 및 염기서열 (5'-3')
20	*Escherichia coli* 유래, gadB 유전자
	ATGGATAAGAAGCAAGTAACGGATTTAAGGTCGGAACTACTCGATTCACGTTTTGGTGCGAAGTCTATTTCCACTATCGCAGAA TCAAAACGTTTTCCGCTGCACGAAATGCGCGACGATGTCGCATTCCAGATTATCAATGACGAATTATATCTTGATGGCAACGCT CGTCAGAACCTGGCCACTTTCTGCCAGACCTGGGACGACGAAAATGTCCACAAATTGATGGATTTATCCATTAACAAAAACTGG ATCGACAAAGAAcAgTATCCGCAATCCGCAGCCATCGACCTGCGTTGCGTAAATATGGTTGCCGATCTGTGGCATGCGCCTGCG CCGAAAAATGGTCAGGCCGTTGGCACCAACACCATTGGTTCTTCCGAGGCCTGTATGCTCGGCGGGATGGCGATGAAATGGCGT TGGCGCAAGCGTATGGAAGCTGCAGGCAAACCAACGGATAAACCAAACCTGGTGTGCGGTCCGGTACAAATCTGCTGGCATAAA TTCGCCCGCTACTGGGATGTGGAGCTGCGTGAGATCCCTATGCGCCCCGGTCAGTTGTTTATGGACCCGAAACGCATGATTGAA GCCTGTGACGAAAACACCATCGGCGTGGTGCCGACTTTCGGCGTGACCTACACTGGTAACTATGAGTTCCCACAACCGCTGCAC GATGCGCTGGATAAATTCCAGGCCGATACCGGTATCGACATCGACATGCACATCGACGCTGCCAGCGGTGGCTTCCTGGCACCG TTCGTCGCCCCGGATATCGTCTGGGACTTCCGCCTGCCGCGTGTGAAATCGATCAGTGCTTCAGGCCATAAATTCGGTCTGGCT CCGCTGGGCTGCGGCTGGGTTATCTGGCGTGACGAAGAAGCGCTGCCGCAGGAACTGGTGTTCAACGTTGACTACCTGGGTGGT CAAATTGGTACTTTTGCCATCAACTTCTCCCGCCCGGCGGGTCAGGTAATTGCACAGTACTATGAATTCCTGCGCCTCGGTCGT GAAGGCTATACCAAAGTACAGAACGCCTCTTACCAGGTTGCCGCTTATCTGGCGGATGAAATCGCCAAACTGGGGCCGTATGAG TTCATCTGTACGGGTCGCCCGGACGAAGGCATCCCGGCGGTTTGCTTCAAACTGAAAGATGGTGAAGATCCGGGATACACCCTG TATGACCTCTCTGAACGTCTGCGTCTGCGCGGCTGGCAGGTTCCGGCCTTCACTCTCGGCGGTGAAGCCACCGACATCGTGGTG ATGCGCATTATGTGTCGTCGCGGCTTCGAAATGGACTTTGCTGAACTGTTGCTGGAAGACTACAAAGCCTCCCTGAAATATCTC AGCGATCACTGA
21	*Corynebacterium glutamicum* 유래, gabT 유전자
	GTGGAAGATCTCTCATACCGCATCCCGCAGTCGCGCACCGTGGCCGAGCAGGTGCCAGGGCCGAAGTCGAAAGCGCTGGATGAG CGTCGACAAGCAGCAGTAGCACGAGCACTTGCACCGGGTCTGCCTGGATACGTGGTGGACGCAGACGGTGGCATCTTGGCTGAC GCGGACGGCAACCGTTTCATCGACCTGGCCTCCGGCATCGCCGTGACCACGGTCGGCGGATCCAACGCGGCCGTCGCGAAAGCC GTCGGCGCCGCAGCTGCCCGCTTCACCCACACCTGCTTCATGGTCTCACCTTATGAAACTTACGTGGCCATGGCGGAGAGACTC AACGCCTTGACTCCAGGCGATCACGACAAGAAGAGCGCGCTGTTTAACTCTGGCGCCGAAGCCGTGGAAAACGCCGTCAAGGTG GCACGCGCCTACACCGGCAAGGGCGCGGTCGTGGTGTTCGACAACGCGTACCACGGACGGACCAACCTCACCATGGCGATGACC GCGAAGAACCGCCCATACAAGTCCGGATTCGGACCACTAGCCGCAGACGTCTACCGTGCACCAATGTCTTACCCACTGCGCGAC GGACTGTCCGGCCCGGAAGCCGCAGAGCGCGCGATCTCCGTGATCGAATCCCAGGTCGGAGCCGAAAACCTCGCCTGCGTGGTC ATTGAACCGATCCAGGGCGAAGGCGGATTCATCGTCCCCGCACCAGGATTCCTCGCAGCCATTTCCACCTGGTGCCGCGAGAAC GACGTGGTGTTCATCGCCGATGAAATCCAATCTGGCTTCCTGCGCACCGGCGACTGGTTCGCCAGCGACGCAGAAGGTGTGATC CCCGACGTCATCACCACCGCAAAAGGCATCGCCGGCGGCATGCCACTATCCGCAGTGACCGGCCGCGCAGAAATCATGGACGCA CCCGGCCCCGGCGCGCTCGGCGGAACCTACGGCGGAAACCCCGTTGCTTGCGCCGCGGCACTTGCAGCCATTGAAGTGATGGAA CAAGCCGACCTTAAGACCCGCGCGCAAGAAATCGAGACCATCATCCGCGATGAATTCGCGCAGCTGAGTGCCTTCCCGGAGGTC GCCGAAATCCGCGGCCGCGGAGCAATGATGGCCATTGAGCTTATCGACGCTACCGGCCGCCCGAACGCAGCTTTAACCGCCGCA GTGGCTGCGCGCGCAAAAGCTGAAGGTGTGCTGCTGCTGACTTGCGGCACCGATGGCAACGTCATCCGCCTGCTGCCACCACTG GTCATTGCAGAGGACACTCTCCGTGATGGTCTTCAGGTGTTAGTCGCAGCCCTAGAGCGCGAAACCGCGCACCAGAAGGTGGGC TAA
22	*Escherichia coli* 유래, yqhD 유전자
	atgAACAACTTTAATCTGCACACCCCAACCCGCATTCTGTTTGGTAAAGGCGCAATCGCTGGTTTACGCGAACAAATTCCTCAC GATGCTCGCGTATTGATTACCTACGGCGGCGGCAGCGTGAAAAAAACCGGCGTTCTCGATCAAGTTCTGGATGCCCTGAAAGGC ATGGACGTGCTGGAATTTGGCGGTATTGAGCCAAACCCGGCTTATGAAACGCTGATGAACGCCGTGAAACTGGTTCGCGAACAG AAAGTGACTTTCCTGCTGGCGGTTGGCGGCGGTTCTGTACTGGACGGCACCAAATTTATCGCCGCAGCGGCTAACTATCCGGAA AATATCGATCCGTGGCACATTCTGCAAACGGGCGGTAAAGAGATTAAAAGCGCCATCCCGATGGGCTGTGTGCTGACGCTGCCA GCAACCGGTTCAGAATCCAACGCAGGCGCGGTGATCTCCCGTAAAACCACAGGCGACAAGCAGGCGTTCCATTCTGCCCATGTT CAGCCGGTATTTGCCGTGCTCGATCCGGTTTATACCTACACCCTGCCGCCGCGTCAGGTGGCTAACGGCGTAGTGGACGCCTTT GTACACACCGTGGAACAGTATGTTACCAAACCGGTTGATGCCAAAATTCAGGACCGTTTCGCAGAAGGCATTTTGCTGACGCTA ATCGAAGATGGTCCGAAAGCCCTGAAAGAGCCAGAAAACTACGATGTGCGCGCCAACGTCATGTGGGCGGCGACTCAGGCGCTG AACGGTTTGATTGGCGCTGGCGTACCGCAGGACTGGGCAACGCATATGCTGGGCCACGAACTGACTGCGATGCACGGTCTGGAT CACGCGCAAACACTGGCTATCGTCCTGCCTGCACTGTGGAATGAAAAACGCGATACCAAGCGCGCTAAGCTGCTGCAATATGCT GAACGCGTCTGGAACATCACTGAAGGTTCCGATGATGAGCGTATTGACGCCGCGATTGCCGCAACCCGCAATTTCTTTGAGCAA TTAGGCGTGCCGACCCACCTCTCCGACTACGGTCTGGACGGCAGCTCCATCCCGGCTTTGCTGAAAAAACTGGAAGAGCACGGC ATGACCCAACTGGGCGAAAATCATGACATTACGTTGGATGTCAGCCGCCGTATATACGAAGCCGCCCGCtaa

표 5

[0083]

서열번호	프라이머	프라이머 서열 (5'-3')
23	프라이머 1	aacagctatgaccatgattacgccaCAAGGATTACGAGCTCGTTGGTGAG
24	프라이머2	CTTCGGATCTAAACGATCTGGGCTTTTACCTTCGTTTCGC
25	프라이머3	CGAAGGTAAAAGCCCAGATCGTTTAGATCCGAAGGAAAAC
26	프라이머4	ACTTGCTTCTTATCCATTGTATGTCCTCCTGGACTTCGTG
27	프라이머5	AGTCCAGGAGGACATACAATGGATAAGAAGCAAGTAACGG
28	프라이머6	gcagctaagtagggtTCAGTGATCGCTGAGATATTTCAGG
29	프라이머7	CTCAGCGATCACTGACAAAAAGCCGGACCCTTGCTTTAAG

30	프라이머8	ggtacccggggatcctctagTGCTCATGCAGTACCTGC
31	프라이머9	TGATTACGCCAAGCTGGGCGATGGCGGCGAATCCG
32	프라이머10	CCTTCGGATCTAAACGATCTTTCCTTAAGTGCTGATTCGC
33	프라이머11	GCGAATCAGCACTTAAGGAAAGATCGTTTAGATCCGAAGG
34	프라이머12	CAGATTAAAGTTGTTcatTGTATGTCCTCCTGGACTTCG
35	프라이머13	GTCCAGGAGGACATACAatgAACAACTTTAATCTGCACAC
36	프라이머14	TCAGAACCTGTAGGTCttaGCGGGCGGCTTCGTATATACG
37	프라이머15	CGAAGCCGCCCGCtaaGACCTACAGGTTCTGACAATTTAAATCTC
38	프라이머16	CCGGGGATCCTCTAGCTGGGACTTCAGCAACATCG
39	프라이머17	aacagctatgaccatgattacgccaTCCGACCTGGCCGGTGATGG
40	프라이머18	agctaagtagggtGAGCCAAGATTAGCGCTGAAAAGTAGC
41	프라이머19	GCGCTAATCTTGGCTCaccctacttagctgccaattattc
42	프라이머20	ggagatcgtttcagtcatgggtaaaaaatcctttcgtagg
43	프라이머21	aaggatttttacccatgactgaaacgatctccacagcgg
44	프라이머22	GTCTGTAATCAGCGTCCTActacaccaggcccaacagctg
45	프라이머23	ttgggcctggtgtagTAGGACGCTGATTACAGACGTGTCC
46	프라이머24	ggtacccggggatcctctagTCTGCTCTAAAGAGCGGCGGGTGG
47	프라이머25	gaccaTGATTACGCCAAGCTCGACGCAGAAGGTGTGATCC
48	프라이머26	aattggcagctaagtagggtTTAGCCCACCTTCTGGTGCG
49	프라이머27	CAGAAGGTGGGCTAAaccctacttagctgccaattattcc
50	프라이머28	TAAATTCCGTAAATCTTCATgggtaaaaaatcctttcgta
51	프라이머29	aaggatttttacccATGAAGATTTACGGAATTTATATGG
52	프라이머30	TCACGGCAAAGCGAGGTACTTATAAAAGCTCTTCGTACG
53	프라이머31	CGTACGAAGAGCTTTTATAAGTACCTCGCTTTGCCGTGAC
54	프라이머32	ggtacCCGGGGATCCTCTAGCGAAGCTTGCCGTGTGCAGG
55	프라이머33	GGTTGGGCAGGAGTATATTGggatccATGAAGATTTACGGAATTTATATG
56	프라이머34	atatggacgggcctgcaggtTTATAAAAGCTCTTCGTACG
57	프라이머35	GTTGGGCAGGAGTATATTGggatccTTGATCGCTTCGGTAGTTCCCGAGC
58	프라이머36	ggtccatatggacgggcctgcaggtTCACGGCACCACAATCGCGGTCAAG
59	프라이머37	GTTGGGCAGGAGTATATTGggatccGTGGCCCTGTTGCGTGCCCTGGTGC
60	프라이머38	ggtccatatggacgggcctgcaggtTCACAGCGTGATCGCCGTCAGCGCG
61	프라이머 39	GTTGGGCAGGAGTATATTGggatccATGAACGACACGTTGCTGGGGCAGG
62	프라이머 40	ggtccatatggacgggcctgcaggtTCACAGCACGATCGCCGTCAGCGTC
63	프라이머 41	TCTCAGCGATCACTGAaccctacttagctgccaattattc
64	프라이머 42	GTATGAGAGATCTTCCACgggtaaaaaatcctttcgtagg
65	프라이머 43	aaggatttttacccGTGGAAGATCTCTCATACCGCATCC
66	프라이머 44	CAAGGGTCCGGCTTTTTGTTAGCCCACCTTCTGGTGCGCG
67	프라이머 45	CAGAAGGTGGGCTAACAAAAAGCCGGACCCTTGCTTTAAG

[0085] **2-2. 1,4-BDO 생산 경로가 구축된 변이 균주 제작**

[0086] 전기천공기(Electrophorator) (BIO-RAD, 미국)를 사용하여 상기 실시예 2-1에서 제작된 pk19mobsacB-gadB(E89Q,△452-466)gabT 벡터를 컴피턴트 셀로 만들어진 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032 균주에 전기충격요법(electroporation)으로 도입 후, 2YT KM AGAR 배지 (2YT AGAR 및 카나마이신 30 mg/L 함유)에 도말하고 30℃ 배양기에서 2일간 배양하여 콜로니를 얻었다. 1차 상동재조합이 유도된 콜로니 중 PCR로 확인된 콜로니를 2YT 액체배지 (트립토판 16 g/L, 효모 추출물 10 g/L 및 NaCl 5 g/L 함유)에서 12시간 배양 후 2YT Sucrose AGAR 배지 (2YT AGAR 및 수크로스 100 g/L 함유)에 도말하여 2차 상동재조합을 통해 항생제 마커를 제거하였다. 선별된 콜로니는 PCR과 서열분석을 통해 gadB 및 gabT 유전자가 의도대로 도입되었는지 최종 확인하였다.

[0087] 이후, 상기 실시예 2-1에서 제작된 pk19mobsacB-yqhD, pk19mobsacB-car 및 pk19mobsacB-sfp 벡터를 사용하여 상기 과정을 순차적으로 진행하여 gadB, gabT, yqhD, car 및 sfp 유전자가 도입되어 글루탐산으로부터 1,4-부탄디올을 생산하는 경로가 구축된 코리네박테리움 글루타미쿰 변이 균주를 제작하였고, 이를 WB04-P001로 명명하였다.

[0089] **실시예 3. BsPPTase, MaPPTase, McaPPTase 또는 McoPPTase를 발현하는 변이 코리네박테리움 글루타미쿰 제작**

[0090] **3-1. BsPPTase, MaPPTase, McaPPTase 또는 McoPPTase 발현 벡터 제작**

[0091] pET21b-BsPPTase 벡터를 주형으로 프라이머 33 및 34를 이용하여 PCR하였다. 제한효소 BamHI 및 XbaI로 처리한 pCES208H30 벡터 (Microbial Cell Factories volume 15, Article number: 174 (2016))에 상기에서 수득한 PCR 산물을 연결하였으며, 여기서 얻은 플라스미드를 pCES208H30-BsPPTase이라 명명하였다.

[0092] pET21b-MaPPTase 벡터를 주형으로 프라이머 35 및 36을 이용하여 PCR하였다. 제한효소 BamHI 및 XbaI로 처리한 pCES208H30 벡터에 상기에서 수득한 PCR 산물을 연결하였으며, 여기서 얻은 플라스미드를 pCES208H30-MaPPTase이라 명명하였다.

[0093] pET21b-McaPPTase 벡터를 주형으로 프라이머 37 및 38을 이용하여 PCR하였다. 제한효소 BamHI 및 XbaI로 처리한 pCES208H30 벡터에 상기에서 수득한 PCR 산물을 연결하였으며, 여기서 얻은 플라스미드를 pCES208H30-McaPPTase이라 명명하였다.

[0094] pET21b-McoPPTase 벡터를 주형으로 프라이머 39 및 40을 이용하여 PCR하였다. 제한효소 BamHI 및 XbaI로 처리한 pCES208H30 벡터에 상기에서 수득한 PCR 산물을 연결하였으며, 여기서 얻은 플라스미드를 pCES208H30-McoPPTase이라 명명하였다.

[0095] 여기서 각 벡터로부터 DNA를 추출하기 위해 Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, 미국)를 사용하였다. PCR에 사용된 프라이머는 상기 표 5와 같다. PCR은 Thermocycler (TP600, TAKARA BIO Inc., 일본)를 이용하여 각각의 데옥시뉴클레오티드 트리포스페이트 (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 100 μM가 첨가된 반응액에 올리고뉴클레오티드 1 pM 및 주형 DNA 10 ng을 첨가하고 PrimeSTAR Max DNA Polymerase (Takara, 일본) 1 유닛의 존재 하에서 실시하였다. NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix (NEB, USA)와 제한효소 HindIII (NEB, USA) 및 XbaI (NEB, USA)를 사용하여 각 플라스미드를 제작하였다.

[0097] **3-2. BsPPTase, MaPPTase, McaPPTase 또는 McoPPTase 발현 벡터 도입**

[0098] 상기 실시예 3-1에서 제작된 4개의 플라스미드를 각각 도입하기 위한 모균주로, 상기 실시예 2에서 제작된 코리네박테리움 글루타미쿰 기반 1,4-부탄디올 생산 균주 WB04-P001을 사용하였다. WB04-P001 균주의 형질전환을 위한 방법으로 van der Rest 등의 방법을 기본으로 수식한 일렉트로컴피턴트 셀(electro-competent cell) 제조법을 사용하였다. 먼저, 배지 (Beef Extract 10 g/ℓ, Brain Heart infusion 40 g/ℓ 및 소비톨 30 g/ℓ 함유) 10 mℓ에서 WB04-P001 균주를 1차 배양하여 종배양액을 준비하였다. 이후, 배지 100 mℓ (Beef Extract 10 g/ℓ, Brain Heart infusion 40 g/ℓ 및 소비톨 30 g/ℓ, 글리신 2.5 g/L, Isoniazid 400 mg/L, Tween80 100 μℓ/L 함유)에 OD_{610} 값이 0.3이 되도록 종배양액을 접종한 후, 30℃, 200 rpm으로 1.5 ~ 2시간 배양하여 OD_{610} 값이 0.5 ~ 0.6이 되도록 하였다. 배양액을 얼음에서 30 분간 방치한 후, 4℃, 3500 rpm으로 5분간 원심분리하였다. 그 뒤 상등액을 버리고 침전된 균주를 10% 글리세롤 용액으로 3회 세척하고, 최종적으로 10% 글리세롤 용액 0.5 mℓ에 재현탁하여 컴피턴트 셀(competent cell)을 준비하였다. 전기천공(Electroporation)은 바이오-라드(Bio-Rad)사의 전기천공기(electroporator)를 사용하였다. 전기천공 큐벳 (0.2 mm)에 준비된 컴피턴트 셀에 플라스미드를 첨가한 후, 2.5 kV, 200 Ω 및 12.5 μF의 조건으로 전기충격을 가하였다. 전기 충격이 끝난 즉시 재생(regeneration) 배지 (Beef Extract 10 g/ℓ, Brain Heart infusion 40 g/ℓ 및 소비톨 30 g/ℓ 함유) 1 mℓ을 첨가하고 46℃에서 6분간 열처리하였다. 그 후 튜브를 얼음에 박아 식힌 뒤, 30℃에서 2시간 배양하고 선별 배지 (Beef Extract 10 g/ℓ, Brain Heart infusion 40 g/ℓ 및 소비톨 30 g/ℓ, 아가(agar) 20 g/ℓ 및 카나마이신(kanamycine) 30 μg/ℓ 함유)에 도말하였다. 30℃ 배양기에서 2일간 배양하여 콜로니를 얻었다. 최종적으로 pCES208H30-BsPPTase가 도입된 균주를 WB04-P003, pCES208H30-MaPPTase가 도입된 균주를 WB04-P010, pCES208H30-McaPPTase가 도입된 균주를 WB04-P011, 그리고 pCES208H30-McoPPTase가 도입된 균주를 WB04-P012로 명명하였다.

[0100] **실시예 4. BsPPTase, MaPPTase, McaPPTase 또는 McoPPTase 발현 벡터가 도입된 1,4-부탄디올 생산 균주의 생산성 평가**

[0101] BsPPTase MabCAR 발현 벡터 도입 균주 (WB04-P003)와 MaPPTase, McaPPTase 또는 McoPPTase 발현 벡터 도입 균

주 (WB04-P010, WB04-P011 또는 WB04-P012)의 1,4-부탄디올 생산성을 비교하였다.

[0102] 각 균주를 플라스크 배지 (포도당 10%, $MgSO_4$ 0.25%, 효모 추출물 2.5%, KH_2PO_4 0.25%, $(NH_4)_2SO_4$ 2.5%, $FeSO_4$ 100 ppm, 펩톤 2.5%, 비오틴 100 ㎍/L, 니코틴아미드 25 ppm 및 CPN 25 ppm 함유)에 접종하여 30℃에서 48시간 배양하였다. 배양 종료 후 배양액을 0.45 μm 필터로 여과한 다음 컬럼 (Avantor HPLC Column Apollo C18)이 장착된 고성능 액체크로마토그래피(HPLC) (Agilent, 1260 infinity II)를 이용하여 배양액 내 1,4-부탄디올 함량을 분석하였다. 이동상으로 0.1M 인산완충액(phosphate buffer)을 사용하였고, 온도 40℃, 유량 0.8 mL/min로 15분간 RI 검출기를 이용하여 분석하였다. 그 결과는 하기 표 6에 나타내었다.

표 6

[0103]

균주	1,4-부탄디올 (g/L)
WB04-P003	0.6
WB04-P010	1.65
WB04-P011	0.85
WB04-P012	1.6

[0105] 상기 표 6에 나타낸 바와 같이, 마이코박테로이데스 압세수스 subsp. 마실리엔세(*Mycobacteroides abscessus* subsp. *Massiliense*), 마이코박테리움 카나리아센세(*Mycobacterium canariasense*) 및 마이코박테리움 콘셉티오넨세(*Mycobacterium conceptione*nse) 유래 포스포판테테이닐 전이효소 (MaPPTase, McaPPTase 및 McoPPTase)를 발현하는 변이 미생물은 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 유래 카르복실산 환원효소 (BsPPTase)를 발현하는 경우와 비교하여 CAR에 대한 포스포판테테이닐 전이효소의 높은 반응성에 의해 1,4-부탄디올 생산량이 각각 약 2.8배, 1.4배 및 2.7배 증가되었다.

[0107] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

서 열 목 록 (첨부)

아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.