



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0044394
(43) 공개일자 2012년05월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 1/21 (2006.01) *C12N 15/31* (2006.01)

C12P 19/04 (2006.01) *C12R 1/38* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0093170

(22) 출원일자 2010년09월27일

심사청구일자 2010년09월27일

(71) 출원인

창원대학교 산학협력단

경상남도 창원시 의창구 사림동 9 창원대학교

(72) 발명자

이경

경상남도 창원시 의창구 용지로 229, 롯데아파트
10동 405호 (용호동)

알리가라 비라나구다

경상남도 창원시 의창구 사림로137번길 12, 202호
(사림동)

(74) 대리인

김순웅

전체 청구항 수 : 총 12 항

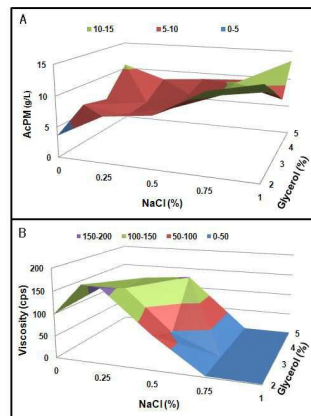
(54) 발명의 명칭 슈도모나스에 의한 폴리만누레이트 및 이의 유도체의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 폴리만누레이트 및 이의 유도체의 제조방법에 관한 것으로, 보다 자세하게는 폴리만누로네이트 또는 이의 유도체를 생산하는 신규한 슈도모나스 속 균주와 이의 돌연변이체 그리고, 이와 같은 슈도모나스 속 균주를 배양하여 폴리만누레이트 또는 이의 유도체를 제조하는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 슈도모나스 속 균주 및 이의 돌연변이체는 다량의 폴리만누로네이트, 아세틸화된 폴리만누로네이트 또는 알긴산을 생산할 수 있으며, 이렇게 제조된 폴리만누로네이트 또는 아세틸화된 폴리만누로네이트는 광범위한 pH 및 온도와, 높은 전해질 농도에서 현저한 유동학적 성질을 보여, 약학 및 의학 분야에서 활용도가 높다.

대표도 - 도7



특허청구의 범위

청구항 1

- (1) MucA(anti-sigma factor)의 활성을 감소시키는 유전적 변형; 및
- (2) AlgG(mannuronan C-5-epimerase)의 활성을 감소시키는 유전적 변형을 포함하는, 아세틸화된 폴리만누로네이트를 생산하는 슈도모나스 속 균주.

청구항 2

제 1항에 있어서,

- (1) MucA의 활성을 감소시키는 유전적 변형은 mucA의 169번째 염기가 T인 것을 특징으로 하는 균주.

청구항 3

제 1항에 있어서,

- (2) AlgG의 활성을 감소시키는 유전적 변형은 422번째 아미노산이 아르기닌인 것을 특징으로 하는 균주.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 균주는 기탁번호 KACC91330P인 것을 특징으로 하는 균주.

청구항 5

제 1항에 있어서,

AlgG를 코딩하는 핵산 분자로 형질전환되어, 알긴산을 생산하는 슈도모나스 속 균주.

청구항 6

제 1항에 있어서,

algI(acetylase) 유전자가 녹아아웃된 유전적 변형을 추가로 포함하고, 폴리만누로네이트를 생산하는 슈도모나스 속 균주.

청구항 7

폴리만누로네이트 또는 이의 유도체를 생산할 수 있는 슈도모나스 속 균주를 배양하고, 이의 배양물로부터 폴리만누로네이트 또는 이의 유도체를 분리하여 상기 폴리머를 제조하는 방법.

청구항 8

제 7항에 있어서,

상기 배양에서 40 ~ 60mM의 인산칼륨 완충액에 15 ~ 25 g/L의 펩톤, 5 ~ 50 g/L의 글리세롤 및 1 ~ 2g/L의 황산마그네슘(또는 이의 수화물)을 첨가하여 이루어지고, pH는 5.5 내지 6.5로 설정된 배지를 이용하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제 7항에 있어서,

상기 배지는 0.01 내지 1% 농도의 염을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 9항에 있어서,

배지의 염 농도를 조절하여 폴리만누로네이트 또는 이의 유도체의 분자량을 조절하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제 10항에 있어서,

염 농도를 낮추어 폴리만누로네이트 또는 이의 유도체의 분자량을 높이는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제 10항에 있어서,

염 농도를 높여 폴리만누로네이트 또는 이의 유도체의 분자량을 낮추는 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 폴리만누레이트 및 이의 유도체의 제조방법에 관한 것으로, 보다 자세하게는 폴리만누로네이트 또는 이의 유도체를 생산하는 신규한 슈도모나스 속 균주와 이의 돌연변이체 그리고, 이와 같은 슈도모나스 속 균주를 배양하여 폴리만누레이트 또는 이의 유도체를 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 폴리-β-D-만누로네이트(Poly-β-D-mannuronate, PM)는 알지네이트(alginate)의 구성성분으로, 많은 의학 및 약학의 적용 분야와 관련이 있다. 예를 들어, PM와 이의 분해 산물은 면역 세포를 활성화시켜, 종양 괴사 인자(tumor necrosis factor) α, 인터루킨-1 및 인터루킨-6과 같은 사이토카인의 분비를 유도하므로 다양한 감염에 대한 면역 보호를 증가시키는데 이용될 수 있다. 황화된(Sulfated) PM은 시험관내 및 생체내 모두에서 HIV-1의 복제를 현저하게 억제할 수 있는 것으로 알려져 있다. 최근 연구는 올리고만누로네이트(oligomannuronate)가 종양의 신생혈관형성(angiogenesis)과 전이를 억제하여, 우수한 암 치료제로 이용 가능성을 입증하였다. (만누론산이 풍부한) 고점착성의 알지네이트로 제조된 매트릭스 정제(tablet) 산성 상태에서 약물 방출 속도를 개선함이 입증되었다. 나노복합체(nanocomposite) 합성에 PM을 도입하여, 새로이 합성된 폴리아닐린-PM 나노복합체는 폴리아닐린 나노복합체에 비해 전도성이 개선됨이 입증되었다. 다양한 약학 및 의학 분야에서 PM의 이용 증가는 이의 수요 증가로 이어질 것이다.

[0003] PM은 β-1,4-글리코시드 결합에 의해 다양한 조성과 순차 구조로 연결된 β-D-만누론산 및 α-L-글루론산(α-L-guluronic acid)으로 구성된 해초 조류의 알지네이트로부터 주로 제공되었다. 그러나, 조류의 알지네이트는 제어되지 않은 환경 인자로 인하여 조성이 쉽게 변화되는 경향이 있어, 생의학 분야에서 해초의 PM을 사용하는 것은 적합하지 않다. 또한, 조류의 알지네이트로부터 PM의 추출은 순도는 낮은 반면 많은 생산 비용이 소요된다. 따라서, 모노머의 조성, 폴리머의쇄 길이 및 아세틸화의 정도와 같은 퀄리티를 조정할 수 있는 박테리아에 의한 PM의 생산이 주목받고 있다. 지금까지 아조토박터(*Azotobacter*) 및 슈도모나스(*Pseudomonas*)와 같은 2속(genera)의 박테리아가 알지네이트의 구성성분으로서 PM을 생산할 수 있는 것으로 확인되었다. 아조토박터 및 갈조류에 의해 생산된 알지네이트는 슈도모나스 보다 높은 비율로 L-글루론산을 함유한다. P. 에루기노사(*P. aeruginosa*)를 포함한 일부 슈도모나스는 글루론산 함량이 적거나 전혀 없는 아세틸화된 PM(AcPM)을 생산할 수 있음에도 불구하고, 박테리아의 숙주에서 PM 및 AcPM을 효과적으로 생산할 수 있는 기술에 대한 연구는 부족한 실정이다. 또한, PM 및 AcPM의 분자 크기에 영향을 미치는 배양 조건도 확립되지 못하고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명은 폴리만누로네이트 또는 이의 유도체를 생산할 수 있는 박테리아를 동정하고, 이 박테리아를 배양하여 폴리만누로네이트 또는 이의 유도체를 고수율로 생산하되, 상기 폴리머의 분자량을 조절할 수 있는 방

법을 제공하고자 한다.

[0005] 본 발명은 슈도모나스 알킬페놀리아(*P. alkylphenolia*)의 천연의(spontaneous) 돌연변이체 중에서 아세틸화된 폴리만누로네이트를 고수율로 생산할 수 있는 균주를 동정하고, 이 균주 또는 이의 돌연변이체를 배양하여 아세틸 폴리만누로네이트, 폴리만누로네이트 또는 알긴산을 생산하되, 배양물의 염 농도를 조절하여 상기 폴리머의 분자량을 조절할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명은, 폴리만누로네이트 또는 이의 유도체를 생산할 수 있는 슈도모나스 속 균주 및 이의 돌연변이체에 관한 것이다.

[0007] 여기서, '유도체'는 폴리만누레이트에 아세틸기가 도입된 아세틸 폴리만누로네이트이거나, 만누론산과 글루론산(만누론산의 에피머화에 의해 형성됨)으로 구성된 알긴산일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0008] 본 발명의 한 관점은,

[0009] (1) MucA(anti-sigma factor)의 활성을 감소시키는 유전적 변형; 및

[0010] (2) AlgG(mannuronan C-5-epimerase) 활성을 감소시키는 유전적 변형을 포함하는, 아세틸화된 폴리만누로네이트를 생산하는 슈도모나스 속 균주에 관한 것이다.

[0011] 유전적 변형을 포함하는 미생물은 목적인 결과(예, 폴리만누레이트 또는 이의 유도체의 고수율 생산)를 달성하기 위해서 정상(즉, 야생형) 형태로부터 변형된(즉, 돌연변이된)형태 및/또는 염색체 유전물질(예, 재조합 핵산 분자)을 발현하도록 변형된 계통을 갖는다. 보다 자세하게는 미생물에 대한 변형은 미생물 계통의 변형(예, 외인성 유전자) 및/또는 미생물로 염색체외에 잔류하거나 숙주 미생물 계통으로 통합될 수 있는 유전 물질(예, 재조합 핵산 분자)을 도입함으로써 달성될 수 있다. 이와 같이 유전적 변형은 미생물의 외인성 또는 재조합으로 도입된 핵산 서열의 발현을 조절하는 조절 서열의 도입 또는 변형, (예, 야생형 또는 변형된 단백질을 암호화하는) 야생형 또는 변형된 재조합 핵산 분자의 도입, 미생물의 내인성 유전자의 변형 또는 단백질 발현 및/또는 생물학적 활성과 관련된 특정 특성을 갖는 미생물로 이어질 수 있는 임의의 다른 변형을 포함할 수 있다. 미생물의 유전적 변형은 전통적인 균주 개발 및/또는 분자 유전학 기술을 사용해서 달성될 수 있다. 그러한 기술은 당업계에 공지되어 있으며 예를 들어, Sambrook et al. 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Labs Press에 미생물과 관련되어 공개되어 있다. 유전적으로 변형된 미생물은 핵산 분자가 삽입, 결실 및/또는 변형(즉, 돌연변이된; 예를 들면 뉴클레오타이드의 삽입, 결실, 치환)되고 그러한 변형은 미생물 내에서 목적인 효과를 제공하는 방식으로 포함할 수 있다.

[0012] 본 발명에서, 유전적 변형은 MucA 및 AlgG 단백질의 활성을 감소시킨다. 그러한 유전적 변형은 임의의 변형 유형을 포함하며 특히 재조합 기술 및/또는 전통적 돌연변이 유발에 의해 이루어진 변형을 포함한다. 본 발명에서 유전자 발현, 유전자의 기능 또는 유전자 생산물(즉, 유전자에 의해 암호화된 단백질)의 기능의 감소로 이어지는 유전적 변형은 유전자의 (완전한 또는 부분적인) 불활성화, 결실, 파괴(interruption), 차단, 억제(silencing) 또는 하향 조절로 정의될 수 있다. 예를 들어, 임의의 유전자에 의해 암호화된 단백질의 기능의 감소로 이어지는 유전자의 유전적 변형은 그 유전자의 완전한 결실(즉, 그 유전자가 존재하지 않아 그 단백질이 존재하지 않는다), 단백질로 불완전하거나 전혀 해독되지 않도록 하는 유전자에서의 돌연변이(예, 단백질이 발현되지 않는다) 또는 단백질의 본래의 기능을 감소시키거나 제거한 유전자에서의 돌연변이(예, 단백질의 활성이 감소되거나 제거된 단백질이 발현된다)의 결과일 수 있다. 보다 자세하게는 본 발명에서 단백질의 활성을 감소시킨다는 것은 단백질의 감소된 발현 및/또는 기능성(생물학적 활성)으로 이어질 수 있는 미생물에서의 임의의 유전적 변형을 의미하고 단백질 발현의 감소 또는 제거 뿐만 아니라 단백질의 감소된 활성(예, 비활성), 단백질의 증가된 억제 또는 분해를 포함한다.

[0013] 본 발명에 있어서, 돌연변이 또는 변형된 단백질의 주어진 활성에서의 감소는 동일한 또는 동등한 조건에서 측정된 또는 알려진 동일한 유기체로부터 유래된(동일한 기원 또는 부모 서열로부터 유래된) 야생형(예, 정상, 변형되지 않은) 단백질의 동일한 특성을 참조하여 판단될 수 있다. 유사하게, 유전적으로 변형된 미생물

의 특성(예, 단백질의 발현 및/또는 생물학적 활성, 또는 생산물의 생산)에서의 감소는 동일하거나 동등한 조건에서 동일한 중, 바람직하게는 동일한 균주의 야생형 미생물의 동일 특성을 참조하여 판단될 수 있다. 그러한 조건은 미생물의 단백질 활성(예, 발현 또는 생물학적 활성) 또는 다른 특성이 측정된 분석 또는 배양 조건(예, 배지 성분, 온도, pH 등) 뿐만 아니라 이용된 분석 유형, 평가된 숙주 미생물 등을 포함한다. 전술된 바와 같이 동등한 조건(예, 배양 조건)은 유사하지만 필수적으로 동일하지 않으며(예, 조건에서의 몇몇 보존적 변화는 허용될 수 있다) 동일한 조건에서의 비교 대상과 비교했을 때 미생물의 성장 또는 단백질의 발현 또는 생물학적 활성에 실질적으로 변화를 일으키지 않는 조건이다.

[0014] 본 발명에서, (1) MucA의 활성을 감소시키는 유전적 변형은 바람직하게는 MucA의 활성을 상실시키는 유전적 변형이다. 한 양태로서, 상기 유전적 변형은 mucA의 169번째 염기(전사가 개시되는 염기를 1번째 염기로 하여 넘버링한 것임)가 T인 것이 바람직하다. 야생형 슈도모나스 알킬페놀리아 KL28의 mucA의 169번째 염기는 C이다(도 6a 참조). mucA의 169번째 염기가 C에서 T로 돌연변이되어, 조기 종료 코돈(stop codon)이 형성됨으로써 짧아진 MucA 단백질이 생성된다. 상기 짧아진 단백질은 그의 본래 기능인 AlgU의 작용을 억제하는 기능을 상실하게 된다.

[0015] 본 발명에서, (2) AlgG의 활성을 감소시키는 유전적 변형은 바람직하게는 AlgG의 에피머화 기능을 상실시키는 유전적 변형이다. 한 양태로서, 상기 유전적 변형은 algG의 1264번째 염기(전사가 개시되는 염기를 1번째 염기로 하여 넘버링한 것임)가 C인 것이 바람직하다. 야생형 슈도모나스 알킬페놀리아 KL28의 algG의 1264번째 염기는 G이다(도 6b 참조). algG의 1264번째 염기가 G에서 C로 돌연변이되어, 422번째 아미노산이 G(글리신)에서 R(아르기닌)로 치환되게 된다. 상기 변형된 단백질은 그의 본래의 기능인 만누로네이트 C-5 에피머화 활성을 상실하여 글루론산을 형성하는 기능을 상실하게 된다.

[0016] 본 발명의 슈도모나스 속 균주는 0-2 및/또는 0-3 위치에서 모노(mono)- 또는 디(di)-아세틸화된 폴리만누레이트를 생산할 수 있다.

[0017] 이상에서 설명된, 아세틸화된 폴리만누레이트를 생산할 수 있는, 본 발명의 슈도모나스 속 균주는 또 다른 유전적 변형을 포함하여, 폴리만누레이트의 변이체(알긴산 또는 폴리만누레이트)를 생산할 수 있다.

[0018] 본 발명의 슈도모나스 속 균주는 AlgG를 코딩하는 핵산 분자로 형질전환되어, 만누론산과 글루론산으로 구성된 알긴산을 생산할 수 있다.

[0019] 한 양태로서, AlgG를 코딩하는 핵산 분자로 형질전환된 슈도모나스 속 균주는 AlgG를 코딩하는 핵산 분자를 이 핵산 분자에 작동가능하게 연결되어 그의 발현을 조절하는 하나 이상의 발현 조절 서열을 포함하는 벡터에 삽입시키고, 이로부터 형성된 재조합 발현 벡터로 숙주를 형질전환시켜, 제조할 수 있다.

[0020] 본 발명의 실시예에서는 상기 재조합 발현 벡터로 도 1e에 나타난 개열 지도를 가지는 pAlgG 플라스미드를 이용하였다.

[0021] 본 발명의 슈도모나스 속 균주는 AlgI 유전자가 녹아웃(knock-out)된 유전적 변형을 추가로 포함하고, 폴리만누로네이트를 생산할 수 있다.

[0022] 본 발명에서, 그러한 유전적 변형은 algI 유전자를 표적화(targeting)하여 달성할 수 있으며, 여기에서는 표적화 벡터를 이용할 수 있다. "표적화 벡터"는 재조합 숙주 세포 내로 특정 핵산 분자를 전달하는데 이용되는 벡터를 의미하는 것으로 상기 핵산 분자는 숙주 세포 또는 미생물 내에서 내인성 유전자를 결실 또는 불활성화시키는데 이용된다(즉, 표적 유전자의 파괴 또는 녹아웃 기술에서 이용되는). 이러한 벡터는 당업계에 또한 "녹-아웃" 벡터로서 알려져 있다. 이러한 양태의 한 측면에서, 벡터의 일부분, 보다 일반적으로는 벡터에 삽입된 핵산 분자(즉, 삽입물)는 숙주 세포내 표적 유전자(즉, 결실 또는 불활성화되도록 표적화된 유전자)의 핵산 서열과 상동성인 핵산 서열을 갖는다. 벡터 삽입물의 핵산 서열은 표적 유전자와 결합하도록 설계되어 표적 유전자와 삽입물간의 상동성 재조합이 일어나서 그에 의하여 (즉, 돌연변이 또는 결실된 내인성 표적 유전자의 적어도 일부분에 의해) 내인성 표적 유전자가 결실, 불활성 또는 약화된다.

[0023] 본 발명의 실시예에서는 algI 유전자를 테트라사이클린 저항성 유전자로 대체함으로써 표적화하였고, 이를 위한 표적화 벡터로 도 1d에 나타난 개열 지도를 가지는 pK18mobsacB-algI-J-Tc2를 이용하였다.

- [0024] 본 발명의 다른 관점은, 폴리만누로네이트 또는 이의 유도체를 생산할 수 있는 슈도모나스 속 균주 또는 이의 돌연변이체를 배양하고, 이의 배양물로부터 폴리만누로네이트 또는 이의 유도체를 분리하여 상기 폴리머(즉, 폴리만누로네이트 또는 이의 유도체)를 제조하는 방법에 관한 것이다.
- [0025] 본 발명의 제조방법에서, 상기 슈도모나스 속 균주 또는 이의 돌연변이체는 바람직하게는 전술된 본 발명에 따른 (1) MucA의 활성을 감소시키는 유전적 변형; 및 (2) AlgG 활성을 감소시키는 유전적 변형을 포함하는 슈도모나스 속 균주 또는 이의 돌연변이체이지만, 본 발명의 제조방법은 폴리만누로네이트 또는 이의 유도체를 생산할 수 있는 모든 슈도모나스 속 균주에 적용 가능하다.
- [0026] 본 발명의 제조방법에서는, 본 발명의 배지를 이용하는 것이 바람직하다. 본 발명의 배지도 폴리만누로네이트 또는 이의 유도체를 생산할 수 있는 모든 슈도모나스 속 균주의 배양에 이용할 수 있다. 본 발명의 배지는 40 ~ 60 mM의 인산칼륨 완충액에 15 ~ 25 g/L의 펩톤, 5 ~ 50 g/L의 글리세롤 및 1 ~ 2g/L의 황산마그네슘(또는 이의 수화물; 예를 들면, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 첨가하여 이루어지고, pH는 5.5 내지 6.5로 설정된 것이다.
- [0027] 본 발명의 제조방법에서, 배양 온도는 20 내지 34°C로 설정하는 것이 바람직하다.
- [0028] 본 발명의 배지는 0.01 내지 2% 농도의 염을 추가로 포함하는 것이 바람직하다. 염의 추가에 의해 산물(즉, 폴리만누로네이트 또는 이의 유도체)의 수율을 높일 수 있기 때문이다. 상기 염으로는, NaCl, KCl, $FeSO_4$, $FeCl_3$, $CaCl_2$, $MnSO_4$ 이 이용될 수 있으나, 특히 바람직한 염은 NaCl이다.
- [0029] 본 발명의 제조방법에서, 배양물의 염 농도를 조절하여 폴리만누레이트 또는 이의 유도체의 분자량을 조절할 수 있다. 상기 염의 바람직한 예는 NaCl이다.
- [0030] 염 농도를 낮추면 폴리만누레이트 또는 이의 유도체의 분자량을 높일 수 있는 반면, 염 농도를 높이면 폴리만누레이트 또는 이의 유도체의 분자량을 낮출 수 있다. 염의 농도가 0.25 ~ 1%일 때 폴리만누레이트 또는 이의 유도체의 정중 분자량은 415 ~ 35 kDa이다.
- [0031] 상기와 같이 배양된 배양물로부터 폴리만누레이트 또는 이의 유도체는 통상의 방법을 통해 분리될 수 있다. 본 발명에서는 이소프로필 알코올 침전을 통해 간편하게 분리할 수 있다.

발명의 효과

- [0032] 본 발명에 따른 신규한 슈도모나스 균주 및 이의 돌연변이체는 천연형 슈도모나스 속 균주에 비해 많은 양의 폴리만누로네이트 또는 이의 유도체를 생산할 수 있다.
- [0033] 본 발명의 제조방법에 의하면, 배지의 염 농도 조절을 통해 폴리만누로네이트 또는 이의 유도체의 분자량을 조절할 수 있으므로 원하는 분자량을 갖는 폴리머를 수득할 수 있다.
- [0034] 본 발명에 따라 제조된 폴리만누로네이트 또는 아세틸화된 폴리만누로네이트는 광범위한 pH 및 온도와, 높은 전해질 농도에서 현저한 유동학적 성질을 보여, 약학 및 의학 분야에서 활용도가 높다.

도면의 간단한 설명

- [0035] 도 1a는 본 발명의 재조합 플라스미드 pRL27DTnp-algP를 나타낸 것이다.
- 도 1b는 본 발명의 재조합 플라스미드 pPROBE-GT-algP를 나타낸 것이다.
- 도 1c는 본 발명의 재조합 플라스미드 p34S-Tc2를 나타낸 것이다.
- 도 1d는 본 발명의 재조합 플라스미드 pK18mobsacB-algI-J-Tc2를 나타낸 것이다.
- 도 1e는 본 발명의 재조합 플라스미드 pAlgG를 나타낸 것이다.
- 도 2는 본 발명의 E1 균주에 의해 생산된 폴리머를 나타낸 것이다.

도 3은 산 가수분해된 폴리머의 산성당 함량에 대한 HPLC 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명의 E1 균주(A) 및 이의 *algI*가 녹다운된 돌연변이체(B)에 의해 생산된 폴리머의 ^1H NMR 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 5는 *P. 알킬페놀리아* KL28의 *alg* 유전자 클러스터의 구성(A) 및 AlgG 아미노산 서열의 일부(B)를 나타낸 것으로, KL28과 동일한 아미노산은 점으로 표시한다(KL28, *P. alkylphenolia*; PA01, *P. aeruginosa* PA01; PSY, *P. syringae*pv. *syringae* B728a; Pf01, *P. fluorescens* Pf01; PEL48, *P. entomophila* L48; PPF1, *P. putida* F1; KT2440, *P. putida* KT2440; 및 E1, spontaneous mutant of KL28).

도 6a는 본 발명의 E1 균주가 *mucA* 유전자에 점 돌연변이(화살표로 표시된 위치)를 보유함을 나타낸 것이다.

도 6b는 본 발명의 E1 균주가 *algG* 유전자에 점 돌연변이(화살표로 표시된 위치)를 보유함을 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명의 E1 균주에 의한 AcPM의 생산(A)과 점성(B)에 대한 글리세롤 및 NaCl의 영향을 나타낸 것이다.

도 8은 고점성(흑색선) 및 저점성(적색선)의 배양물 배지로부터 수득된 AcPM의 분자량 분포를 나타낸 것이다.

도 9는 본 발명의 E1 균주에 의해 생산된 AcPM(열린 기호)와 상업적 알지네이트(닫힌 기호)의 유동성을 나타낸 것으로, 점성에 대한 폴리머 농도의 영향(A), 온도의 영향(B)(고정된 온도에서 측정(세모), 실온에 도달한 후 측정 (네모)), pH의 영향(C), 염의 영향(D)(NaCl (네모), MgCl_2 (세모), 및 CaCl_2 (원))을 각각 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0036] 이하, 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0037] 실시예 1. 재료 및 방법

[0038] 1-1. 박테리아 균주, 배지 및 배양 조건

[0039] *P. 알킬페놀리아* (*P. alkylphenolia*) KL28(KCTC22206)은 *n*-알킬페놀(*n*-alkylphenol) 분해 박테리아로 알려져 있다(Jeong JJ et al. Microbiology 2003;149:3265-3277, Lee K, et al. Environ Microbiol 2009;11:1117-1125). 점액성의 콜로니를 형성하는 균주 KL28의 천연 돌연변이체(E1)가 본 실시예에 이용되었고 LB 배지에서 유지되었다. 재조합 대장균(*Escherichia coli*) 및 슈도모나스 균주는 필요에 따라 종래 개시된 농도의 항생제로 처리되었다(Yun JI et al. FEMS Microbiol Lett 2007;269:97-103). 50 mM 인산칼륨 완충액(pH6.0)에 녹인 20 g/L의 펩톤, 10 g/L의 글리세롤 및 1.5 g/L의 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 로 이루어진 변형된 킹의 B 배지(Modified King's B medium (PG))가 슈도모나스의 AcPM 또는 PM의 생산에 이용되었다.

[0040] AcPM 생산에 대한 pH의 영향을 조사하기 위해, 배지의 pH를 1M NaOH 또는 1M HCl로 조정하였다. 배지를 15 lb에서 20분 동안 고압멸균시켰다. 종 배양물은 PG 플레이트로부터 하룻밤동안 성장시킨 E1 세포를 스크래핑하여 준비하고 이들을 식염수에 현탁하였다. 세포 현탁액의 흡광도는 660nm에서 6.0으로 조정하였다. 그 다음 50 μl 의 세포 현탁액을 50ml의 배지를 포함하는 250ml의 엘렌마이어 플라스크(Erlenmeyer flask)에 넣었다. 이 플라스크를 회전식 진탕기 상(160rpm)에 30℃에서 정치배양하고, 1ml의 시료를 지정된 시간 간격마다 회수하였다. 분광광도계(Model 2130, Sinco Co., Korea)로 660nm에서 세포 현탁액의 흡광도를 측정하여 성장 정도를 확인하였다. 원심분리로 세포를 제거한 후 배양물 상층액을 증류수로 적절히 희석하여 AcPM 생산량을 측정하고, AcPM의 함량을 후술되는 바와 같이 확인하였다.

[0041] 1-2. *alg* 유전자 클러스터(cluster) 및 *mucA* 유전자의 서열 분석

[0042] KL28 균주의 *alg* 유전자 클러스터를 자살 벡터를 이용하는 상동 재조합을 통해 탐침하였다. 접합 플라스미드(junction plasmid)로부터 분리된 *alg* 유전자를 클로닝하고 서열분석하였다. 슈도모나스에서 복제할 수 없는 자살 벡터를 작제하기 위해, pRL27(Larsen RA, et al. Arch Microbiol 2002;178:193-201)을 먼저 *EcoRI*로 소화시키고, 트랜스포존 프리 절편(transposon-free fragment)은 자가 연결되었다. 이렇게 형성된 플라스

미드를 pRL27 Δ Tnp라 명명하였다. 알지네이트 유전자 클러스터의 업스트림 DNA 서열(1,558 bp)과 *algD*의 5'-말단의 약간 부분을 P. 알킬페놀리아 KL28 염색체를 주형으로 하여 PCR로 증폭시켰다. 프라이머 E1-*algD*Pf (5'-CGACGACCTGCTGCTCAACC-3', 서열번호: 1) 및 E1-*algD*Pr (5'-ATCGGTGGCTGGTCGTAA-3', 서열번호: 2)가 이용되었다. 이 프라이머는 슈도모나스 *alg* 유전자 클러스터의 보존된 서열을 기초로 설계되었다. 증폭된 PCR 산물을 정제하여 pGEM[®]-T Easy 벡터에 연결시켜 pT-*algP*를 생산하였다. pT-*algP*내에 온전하게 증폭된 *alg* 서열이 존재함을 DNA 서열분석을 통해 확인하였다. 증폭된 유전자를 포함하는 pT-*algP*로부터 분리된 *EcoRI* 단편을 자살벡터 pRL27 Δ Tnp에 클로닝하였다. 이렇게 형성된 플라스미드를 pRL27 Δ Tnp-*algP*(도 1a)로 명명하고, KL28의 *alg* 클러스터와의 상동성 재조합 반응에 이용하였다. *alg* 유전자의 단일 교차 돌연변이체(single crossover mutant)를 P. 알킬페놀리아 KL28, *E. coli* DH5a(pRL27 Δ Tnp-*algP*) 및 *E. coli* DH5a(pRK2013)(Figurski DH et al. Proc Natl Acad Sci USA 1979;76:1648-1652)의 트리플 메이팅(triple mating)을 통해 생산하였다. 돌연변이체는 암피실린과 가나마이신을 포함하는 LB 아가에서 선별되었고 PCR로 확인되었다. 돌연변이체의 염색체 DNA를 *BamHI*로 소화시키고 자가 연결시켜 전체 *alg* 유전자 클러스터를 포함하는 자살 플라스미드를 회복하였다. 상기 절차로부터 얻어진 22-kb 접합 플라스미드는 SolGent Co. Ltd. (Taejeon, Korea)에서 자동화된 서열분석 장치(ABI PRISM 377, PE Biosystems Inc.)를 이용하여 서열분석되었다. ORFs는 GETORF 프로그램 (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/getorf.html>, Pasteur Institute)을 이용하여 동정되었다. 추정된 아미노산 서열은 BLASTX 알고리즘(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)을 이용하여 단백질 서열 데이터베이스(GenBank)와 비교되었다. *alg* 유전자 클러스터의 뉴클레오타이드 서열은 NCBI 뉴클레오타이드 서열 데이터베이스에 accession number GU597845로 수탁되었다.

[0043]

mucA 유전자는 KL28 및 E1 염색체를 주형으로 하여 프라이머 MucAF (5'-GAGTTTACGACGCGATCATGG-3', 서열번호: 3) 및 MucAR (5'-GCTCACACCAGACACCAAGGCC-3', 서열번호: 4)을 이용하여 PCR 증폭되었다. 증폭된 PCR 산물(1.1kb)을 정제하여 뉴클레오타이드 서열을 분석하였다. *mucA* 및 이의 측면 유전자의 뉴클레오타이드 서열은 NCBI 뉴클레오타이드 서열 데이터베이스에 accession number HM172485로 수탁되었다.

[0044]

1-3. *P_{algD}-gfp* 유전자 발현의 측정

[0045]

pT-*algP* 벡터로부터 증폭된 *EcoRI* 절편을 GFP 리포터 벡터 pPROBE-GT의 동일한 제한효소 자리에 클로닝하여 *alg* 프로모터의 활성을 측정하였다(Miller WG et al. Mol Plant Microbe Interact 2000;13:1243-1250). 이렇게 형성된 올바른 프로모터 방향을 가진 플라스미드를 GT-*algP*(도 1b)라 명명하고 이 플라스미드로 KL28 및 E1 균주에 도입시켰다. *alg* 프로모터(*P_{algD}*)의 활성을 측정하기 위해, pPROBE-GT-*algP*를 포함하는 균주를 전술된 조건 하에서 젠타마이신을 포함하는 PG 액체 배지에서 배양하였다. 특정한 시점에, 1ml의 배양물을 원심 분리로 회수하여 식염수로 2회 세척하고 식염수에 OD₆₆₀ ~0.4로 재현탁하였다. GFP 발현양을 분광형광광도계(spectrofluorophotometer; Model RF-5391PC, Shimadzu Co.)를 이용하여 0.3nm의 파장 스플릿(split)으로 450 및 509의 여기 및 방출 파장으로 측정하였다(Choi EN et al. Microbiology2003;149).

[0046]

1-4. *algI* 무극성 돌연변이의 생성

[0047]

전사 종결자가 없는 테트라사이클린 저항성(tetracycline-resistant, Tc^R) 카세트를 다음과 같이 작제하였다. p34S-Tc(Dennis JJ et al. Appl Environ Microbiol 1998;64:2710-2715)로부터 프라이머 Tc-F1 (5'-CCGAGCTCATGTTTGACAGCTTATC-3', *SacI* 제한효소 자리는 밑줄로 표시함, 서열번호: 5) 및 Tc-R1(5'-TGCCGCCGAGCTCCATTGAGTCG-3, *SacI* 제한효소 자리는 밑줄로 표시함, 서열번호: 6)으로 Tc^R 카세트를 증폭하였다. 증폭된 절편을 테트라사이클린 저항성 *E. coli* DH5a 형질전환체를 선별함으로써 pGEM[®]-T Easy 벡터로 클로닝하였다. 온전한 뉴클레오타이드 서열이 DNA 서열분석에 의해 확인되었다. 이렇게 형성된 벡터 pGEM-Teasy-Tc2로부터 *SacI* 소화시켜 얻은 새로운 Tc^R 카세트(Tc2)를, 본래 Tc^R 유전자가 *SacI* 소화로 인해 제거된, p34S-Tc로 클로닝하였다. 이렇게 형성된 플라스미드를 p34S-Tc2(도 1c)라 명명하였다.

[0048]

무극성 E1 *algI* 녹다운 돌연변이체는 TcR 카세트에 삽입 돌연변이 유발 및 대립유전자 치환을 통해 생성하였다(Schafer A et al. Gene 1994;145:69-73). *algI* 및 *algJ* 유전자의 일부를 포함하는 1.1kb 절편은 P. 알킬페놀리아 KL28 염색체를 주형으로 이용하여 PCR 증폭하였다. 프라이머 AlgIF1 (5'-

CCGACCATTGCTTCGCCCTACAGA-3', 서열번호: 7) 및 AlgJR1 (5'-GCATGCTCGTCGTGAACAGCCACT-3', 서열번호: 8)이 이용되었다. 증폭된 산물을 정제하여 pGEM®-T Easy 벡터에 연결하였고, pT-algI-J라 명명하였다. pT-algI-J내에 온전한 증폭된 유전자의 서열이 존재함을 DNA 서열분석으로 확인하였다. pT-algI-J로부터 분리한 *EcoRI*-*SphI* 절편을 pK18mobsacB(Schafer A et al. Gene 1994;145:69-73)로 클로닝하여 pK18mobsacB-algI-J를 생산하였다. p34S-Tc2로부터 분리한 Tc2 카세트를 pK18mobsacB-algI-J내 *algI*의 유일한 *SacI* 자리로 클로닝하여 상기 유전자를 파괴하였다. 이렇게 형성된 플라스미드를 pK18mobsacB-algI-J-Tc2(도 1d)라 명명하였고, 트리플 메이팅을 통한 E1내 *algI* 유전자의 파괴에 이용하였다. E1(*algI*::Tc2) 돌연변이체는, LB 아가가 테트라사이클린으로 보충되었다는 점 이외에는 공지된 바와 동일하게 선별되었다(Schafer A et al. Gene 1994;145:69-73). E1(*algI*::Tc2)내 *algI*의 파괴는 E1 유래의 주형 DNA와 프라이머 AlgIFa (5'-CGACCTGTGCATCCTCGGCTATTTC-3', 서열번호: 9) 및 TcIR (5'-TGCGACTCCTGCATTAGGAAGC-3', 서열번호: 10)을 이용하여 얻은 PCR 산물의 서열분석을 통해 확인되었다. 상기 두 프라이머는 AlgIF1-결합 서열과 Tc^R 유전자의 업스트림에 각각 결합한다.

[0049]

1-5. *algG* 발현 벡터의 작제 및 E1에서의 보완

[0050]

algG 발현 벡터 pAlgG를 다음과 같이 작제하였다. *algG* 유전자를 KL28 염색체를 주형으로 하여 프라이머 AlgGF (5'-CCGGATCCTTGAGCCAGTCGGTCGA-3', *Bam*HI 자리는 밑줄로 표시함, 서열번호: 11) 및 AlgGR(5'-AAGGCAGAGCTCAGGCCAGCAGTT-3', *SacI* 자리는 밑줄로 표시함, 서열번호: 12)으로 PCR 증폭하였다. 1.8kb의 산물을 정제하여 pGEM®-T Easy(PromegaCo.)에 연결하여 pT-AlgG를 생산하였다. pT-AlgG 내 온전한 *algG* 유전자의 존재를 DNA 서열분석을 통해 확인하였다. pT-AlgG로부터 분리한 *Bam*HI-*SacI* 절편을, 광범위함 숙주 범위를 가지는 pBBR1MCS-5(Kovach ME et al. Gene 1995;166:175-176)의 동일한 자리에 연결하였다. 이렇게 형성된 pAlgG 플라스미드(도 1e)를 tri-parental mating을 통해 균주 E1로 형질전환시켜 E1(pAlgG) 균주를 생산하였다.

[0051]

1-6. 분석을 위한 폴리머의 준비 및 정성분석

[0052]

배양물 상층액 중 AcPM 및 PM 함량은 정제된 AcPM 및 PM을 기준으로 하여 공지된 *m*-하이드록시비페닐 방법(hydroxybiphenyl method)을 통해 측정하였다(Vargas-Garcia MC, et al. J Appl Microbiol 2003;94:388-395). 다량의 AcPM 및 PM을 획득하기 위해, 배양물 브로스(broth)를 12,000rpm으로 1시간 동안 4℃에서 원심분리하였다. 배양물 브로스의 침착성이 높은 경우에는 식염수로 희석하여 원심분리하였다. AcPM 및 PM은 동일 부피의 이소프로필 알코올을 첨가하여 침전시키고 유리 막대(glass rod)로 제거하였다. 침전물을 증류수로 희석하여 3배 부피의 에탄올로 침전시켰다. 이렇게 형성된 PM을 100% 에탄올로 수회 세척하고 80℃에서 일정한 중량에 이를 때까지 건조시켰다.

[0053]

1-7. 폴리머의 당 산 조성 및 분자량을 결정하기 위한 HPLC 분석

[0054]

AcPM 및 PM의 당 산 조성은 Pulsed Amperometric Detection System (Dionex, Sunnyvale, CA, USA)이 구비된 High-Performance Anion-Exchange Chromatography에 의해 CarboPacTM PA-1 컬럼을 이용하여 트리플루오로아세트산 가수분해 산물로 분석하였다(Veeranagouda Y, et al. Microbiology 2009;155:3788-3796). AcPM의 분자량은 PL Aquagel-OH mixed column(Polymer Laboratories Ltd., UK, 8 mm, 7.8 x 300 mm) 및 Waters 515 HPLC pump가 구비된 Waters GPC system에 의해 측정되었다. 컬럼으로부터 용출된 시료를 Waters 2410 differential refractometer로 검출하였다. AcPM 시료를 0.22 μM 밀리포어 멤브레인을 통해 여과하여 마이크로젤을 제거하고, 100 μL 시료(3 mg/mL)를 순차적으로 GPC 시스템에 주입하였다. AcPM은 0.2 M NaNO₃ 및 10mM NaH₂PO₄ (pH7.0)를 이용하여 35℃에서 1ml/분의 유속을 이용하여 용출하였다. 11,800, 22,800, 47,300, 112,000, 212,000, 404,000 and 788,000 Da의 폴루란(Pullulan)이 기준으로 이용되었다. AcPM의 분자량은 상기 기준과 AcPM의 정체 시간(retention time)을 기초로 계산되었다. 이 실시예는 Korea Polymer Testing & Research Institute, Seoul에서 수행되었다.

[0055] 1-8. ^1H -NMR 분석

[0056] 상기 과정에서 얻어진 AcPM과 PM을 폴리머의 점성에 의한 라인의 폭 확장(line broadening)을 방지하기 위해 부분적으로 산 가수분해하였다. AcPM 및 PM을 물에 용해하여 3차 증류수로 48시간 동안 투석하고, PM은 이소프로필 알코올 침전을 통해 회수하였다. 이 시료 약 400mg을 20ml의 증류수에 용해하고 용액의 pH를 1M HCl을 이용하여 3.0으로 조정하였다. 이 용액을 1시간 동안 끓인 후 1M NaOH로 7.0까지 중화시켰다. 이렇게 형성된 용액을 10L의 증류수에 48시간 동안 투석하고 동결건조로 농축하였다. 그 다음, 이 산-가수분해된 폴리머 20mg을 1ml의 D_2O 에 용해하여 스펙트럼을 82°C에서 기록하였다. 모든 NMR 실험은 Bruker 분광계로 ^1H nuclei에 대하여 400.13 M Hz에서 수행되었다. 다음의 획득 파라미터가 이용되었다: number of scans = 32; pulse width = 9.3 msec; number of points in time domain = 32; inter-pulse delay = 1 s; spectral width = 6793 Hz; acquisition time = 2.41 s; line broadening for exponential window function = 0.3 Hz. 참조 피크는 82°C, 4.71ppm에서 DHO이다. AcPM에서 0-아세틸화의 정도((아세틸기 개수/우론산) x 100)는 ^1H NMR 스펙트럼으로부터 아세틸 프로톤 신호(I_a , 2.6-2.8)의 세기와 만누론산 아노머 프로톤 신호(I_b , 5.1-5.9)의 세기를 비교하여 $I_a/(I_b - I_a/3)$ 를 계산하여 추정하였다(Marty N et al. FEMS Microbiol Lett 1992;77:35-44).

[0057] 1-9. PM 점성의 측정

[0058] 배양물 상층액 및 정제된 AcPM 또는 PM의 점성은 a Vibro Viscometer (SV-10, A & D Company, Japan) 으로 25°C에서 30Hz의 진동 주파수로 측정되었다. 0.25%(w/v) 폴리머 용액의 점성에 대한 온도의 영향은 고정된 온도에서 열처리 후에 확인되었다. 점성에 대한 pH의 영향을 조사하기 위해, 폴리머 수용액 (0.25% w/v)의 pH는 1M HCl 또는 1M NaOH로 조정하였다. 점성에 대한 염의 영향은 서로 다른 염의 농도를 가진 폴리머 용액을 준비함으로써 확인하였다. 대조군인 갈조류 유래의 소듐 알지네이트는 Aldrich Chemical Co. (No. 180947)로부터 구입하였다.

[0059] 실시예 2. 결과

[0060] 2-1. E1 균주에 의해 생산된 폴리머의 분리와 동정

[0061] E1이라 명명된, KL28의 자발적 돌연변이체는 PG 배지에서 성장하는 경우 다량의 폴리머를 생산하였으며, 전술된 바와 같이 분리되었다. E1과 연관된 점액성 표현형은 100세대 이상 안정하였다. 이 균주에 의해 생산된 폴리머는 전술된 바와 같이 이소프로필 알코올 침전에 의해 회수되었다(도 2). 화학적 분석 결과, 상기 폴리머는 주로 우론산으로 구성되었다. 야생형 KL28 균주는 점액성이 아니며, 우론산을 검출 가능한 양으로 생산하지 못하였다. 산-가수분해된 E1 폴리머의 HPLC 분석 결과, 산-가수분해된 상업적 알지네이트에 의해 형성되는 두 번째 피크와 유사한 정체 시간을 갖는 단일 피크를 나타내었다(도 3). 알지네이트에 대한 상업적 우론산 표준이 현재 이용 가능하지 않기 때문에 E1 폴리머의 구조는 ^1H -NMR 분광학을 이용하여 확인하였다. 부분적으로 산 가수분해된 E1-폴리머의 ^1H -NMR 스펙트럼을 도 4A에 나타내었다. E1 폴리머의 화학적 변위 배열을 공지된 AcPM의 화학적 변위와 비교하여 수득하였다. 아세틸화 및 H1-H5 프로톤(proton)은 도 4A에 나타난 바와 같이 배열되었다. 글루론산에 대한 스펙트럼에서는 공명이 검출되지 않았다. 아노머 영역의 H2' (5.58 ppm) 및 H3' (5.96 ppm)은 아세틸화된 만누론산 화합물의 각각 H2 및 H3 프로톤에 기인되었다. 이러한 결과로부터 E1 폴리머는 37.4%의 아세틸화 정도로 0-2/0-3 위치에서 단일 아세틸화되거나, 0-2 및 0-3 위치 모두에서 아세틸화됨을 알 수 있었다.

[0062] 이러한 결과는 아세틸라제가 제거된 돌연변이체 E1(*algI::Tc2*)에 의해 생산된 탈아세틸화된 PM으로 확인되었다. 돌연변이체 E1에 의해 생산된 PM은 아세틸기에 대한 화학적 변위는 보이지 않았지만, 그의 화학적 변위는 공지된 PM의 ^1H 화학적 변위와 동일한, 5개의 주요 시그널을 나타내었다(도 4B). 또한, HPLC 분석에서 E1에 의해 생산된 산-가수분해된 폴리머는 알지네이트의 두 번째 피크에 상응하는 단일 피크를 나타내었다(도 3). 그러므로, HPLC 및 ^1H -NMR 분석에 의하면, E1 및 E1(*algI::Tc2*) 균주에 의해 생산된 폴리머는 각각 AcPM 및 PM임을 알 수 있다.

[0063] 본 발명의 P. 알킬페놀리아 E1 변이주는 "Pseudomonas sp. KL28-E1"이라 명명하고, 농업진흥청 농업생명공학연구원 미생물 보존 센터에 기탁하여 기탁번호 "KACC91330P"를 부여받았다.

[0064] 2-2. 균주 KL28 및 E1에서 *alg* 유전자의 뉴클레오타이드 서열 및 발현양

[0065] 알지네이트 생산에 필요한 *alg* 유전자 클러스터를 P. 알킬페놀리아 KL28로부터 분리하여 서열 분석하였다. KL28의 알지네이트 생합성 유전자는 알지네이트를 생산하는 다른 슈도모나스 종과 유사한 방식으로 구성되었다. 서열 상동성을 기초로, 12 ORFs(18,275bp)는 동일한 전사 방향으로 배열되었다(도 5A). 추정된 아미노산 서열의 단백질은 다른 슈도모나스 종의 알지네이트 생합성 단백질과 77 내지 93%의 동일성을 갖는다. *algD*의 프로모터 업스트림의 발현양을 GFP 리포터 분석법으로 확인하였다. 균주 KL28(pPROBE-GT-*algP*) 및 E1(pPROBE-GT-*algP*)에서 확인된 특이적인 GFP 발현은 배양 48시간 이후에 2.5 ± 0.25 와 68 ± 3 이었다. 이러한 결과는 *alg* 클러스터는 E1 균주에서만 강하게 발현되고, 야생형 균주 KL28의 배양물 상층액에서 AcPM이 검출되지 않은 결과와 일치한다.

[0066] *mucA* 유전자 산물은 *algD*의 발현을 유도하는 시그마 인자(sigma factor)인, AlgU의 기능을 억제한다. 많은 경우에, 알지네이트의 과발현은 *mucA*에서 돌연변이와 공존하므로, E1 및 KL28 균주에서 *mucA*의 서열을 확인하였다. 흥미롭게도 E1에서 *mucA* 유전자는 정지 코돈을 유도하는 점 돌연변이(C169T)를 포함하고 있었다(도 6). 이렇게 짧아진 MucA(196 아미노산 잔기 중 56 잔기)는 AlgU를 억제하지 못하고, 그리하여 이 돌연변이가 E1에서 점액성 표현형을 일으킨다.

[0067] 2-3. E1 *algG* 유전자에서 점 돌연변이의 동정

[0068] 균주 E1은 만누로네이트의 C-5를 에피머화하여 AcPM 내 글루론산 잔기를 형성하는 효소를 코딩하는 *algG* 유전자를 포함함에도 불구하고, 글루론산 잔기가 없는 폴리머를 생산하였다(도 3 및 4). P. 애루기노사의 *algG*의 점 돌연변이가 에피머화에 영향을 미쳐, L-글루론산 잔기가 없는 알지네이트를 생산하는 것으로 알려져 있다. 이러한 이유로, E1의 *algG* 뉴클레오타이드 서열과 야생형 균주 KL28을 비교하였다. E1은 슈도모나스 종에서 잘 보존된 AlgG 서열의 아미노산 치환(G422R)으로 이어지는 점 돌연변이(G1264C)를 포함하고 있었다(도 6b). 돌연변이된 아미노산 잔기는 AlgG의 에피머화 기능에 필수적인 것으로 보여진다. 돌연변이된 아미노산 잔기의 예상된 기능을 확인하기 위해, KL28로부터 야생형 KL28 *algG*를 발현하는 pAlgG 벡터를 작제하여 E1에 도입하였다. E1(pAlgG)에 의해 형성된 폴리머를 산 가수분해하고 당 조성 분석을 수행한 결과, L-글루론산 및 D-만누론산이 33 대 67의 비율로 생산되었다(도 3). 폴리머에서 L-글루론산 잔기의 존재는 ¹H-NMR 분석에 의해서도 확인되었다. 이는 AlgG의 에피머화 기능에서 G422 잔기의 역할을 보여준다.

[0069] 2-4. E1에 의한 AcPM의 일차적 생산

[0070] E1 균주에 의한 최대 AcPM 생산을 위한 다양한 배양 파라미터를 조사하였다. 초기 탄소 스크리닝을 위해, 다양한 탄소원 1%(w/v)을 포함하는 King's B 배지(King E0 et al. J Lab Clin Med 1954;44:301-307)가 이용되었다. 배양은 30°C에서 72시간 동안 진행되었고, 배양물 상층액내 AcPM의 함량은 전술된 바와 같이 확인되었다. E1에 의한 AcPM 생산량은 탄소원이 글루코오스, 프룩토오스, 락토오스, 피루베이트, 시트레이트, 아세트이트, 글리세롤 및 숙시네이트인 경우에 각각 0.4, 2.3, 0.2, 0.5, 0.8, 0.4, 3.8 및 0.3 g/L 이었다. 이러한 결과는 AcPM의 최대 생산에 글리세롤이 최고의 탄소원임을 의미한다. AcPM의 생산은 브로스 점성의 증가(1.5에서 42.3 ± 5.6 cps로) 및 배양물 배지의 pH 감소(7에서 5.8로)와 연관이 있다. 배지의 pH 감소는 King's B 배지의 완충 강도를 10에서 50mM 인산칼륨으로 증가시킴으로써 방지되었다. AcPM의 최대 생산을 위해서는 초기 pH가 5, 7 및 8 보다는 pH 6.0이 더 바람직하다. 이러한 결과를 기초로, pH 및 완충 강도가 6.0 및 50mM로 유지되는 새로운 생산 배지를 설계하였다. 이렇게 변형된 King's 배지(PG)에서 E1은 4.5 ± 0.5 g/L의 고점착성 AcPM을 생산하여, 본 실시예에서는 PG 배지가 폴리머 생산에 이용되었다.

[0071] 몰삼투압농도(osmolality)가 알지네이트 생합성에 미치는 영향을 조사하였다. 이에, 다양한 농도의 글리세롤을 포함하는 PG 배지에 삼투 스트레스 유도제로서 NaCl을 투입하여 AcPM의 수율 증감을 확인하였다. 배지내 글리세롤의 농도를 1부터 4%(v/v)로 증가시켰을 때 성장, AcPM 생산 또는 AcPM 점성에 현저한 변화가 없었으나, 5% 글리세롤은 점성을 현저하게 감소시키고 AcPM 생산을 현저하게 증가시켰다. 점성과 AcPM 생산에 큰

영향은 PG 배지에 NaCl을 첨가하면서 나타났다(도 7A 및 7B). PG 배지에 1% NaCl의 첨가는 AcPM 생산을 거의 두 배까지 증가시켰다. 흥미롭게도, 점성은 0.25% NaCl에서 최대이었고, 0.75% 이상에서는 현저하게 감소하여 물과 거의 동일한 점성을 보였다. 이러한 결과는 고농도의 NaCl에서, E1은 저분자량의 AcPM을 높은 수율로 생산함을 보여준다. 최고의 점성 160 cps에서 거의 8g/L의 AcPM이 수득되었다. 또한, 최저의 점성 120 cps에서 거의 14g/L의 AcPM이 수득되었다.

[0072]

2-5. AcPM의 분자량 분석

[0073]

서로 다른 점성에서 생산된 AcPM의 분자량을 젤 투과 크로마토그래피로 확인하였다. 최고의 점성 (160cps)에서 AcPM는 415, 3.4 및 0.95kDa의 정중 분자량을 갖는 넓은 피크를 4:3:3의 비율로 나타내었다(도 8). 이는 고점성의 브로스는 고분자량 AcPM의 생산 때문임을 입증한다. 또한, 최저 점성(1.2cps)에서 생산된 AcPM은 균일한, 35kDa의 정중 분자량을 갖는 더 낮은 분자량의 폴리머인 것으로 확인되었다(도 8).

[0074]

2-6. AcPM의 유동성

[0075]

만누론산은 알지네이트의 구성성분이므로 AcPM의 점성을 상업적 알지네이트와 비교하였다. 폴리머의 함량이 증가함에 따라 AcPM 및 알지네이트의 브로스 점성도 증가하였다(도 9A). 중합체의 농도 1.5%에서 AcPM의 점성은 상업적 알지네이트 보다 3배 높았다. AcPM과 알지네이트 수용액(0.25%, w/v)의 점성을 25 내지 80℃의 서로 다른 온도에서 측정하였다(도 9B). 양 폴리머는 보다 높은 온도에서 점성을 감소시켰으나, 이의 본래 점성이 온도가 실온으로 떨어질 경우에도 유지되었다. AcPM 용액의 점성은 pH를 강염기 또는 약산으로 변화시킬 때 안정하였다(도 9C). pH 1.0에서 AcPM의 점성은 약 50%까지 감소되었다. 반대로, 상업적 알지네이트는 이의 점성을 상실하고 침전되었다. 폴리머 용액의 점성에 대한 대표적인 일가 및 이가 양이온의 영향을 조사하였다(도 9D). 양 폴리머 용액의 점성 값에서의 약간의 감소가 10% (w/v)의 NaCl 및 MgCl₂까지에서 검출되었다. 상업적 알지네이트는 낮은 CaCl₂ 농도에서 젤을 형성하기 때문이 CaCl₂의 존재에서 상업적 알지네이트의 점성은 확인 불가능하였다. 이와는 반대로, AcPM 용액의 점성은 10% CaCl₂의 첨가에도 영향을 받지 않았다. 이러한 차이는 폴리머내 글루론산 잔기의 존재 또는 부재 때문인 것으로 보인다. 실제로, 상업적 알지네이트는 L-글루론산 및 D-만누론산 잔기를 31:69의 비율로 포함하고 있다(도 3).

수탁번호

[0076]

기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC22206BP

수탁일자 : 20100528

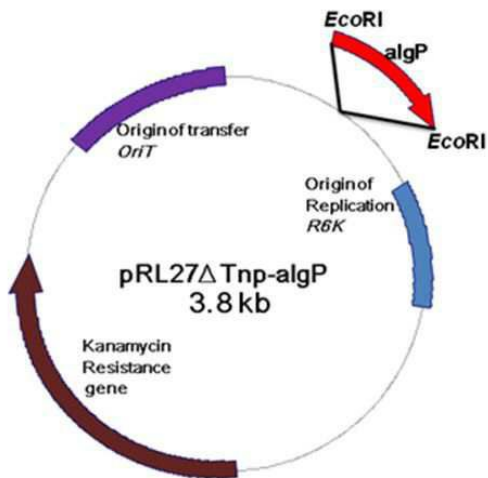
기탁기관명 : 농업생명공학연구원

수탁번호 : KACC91330P

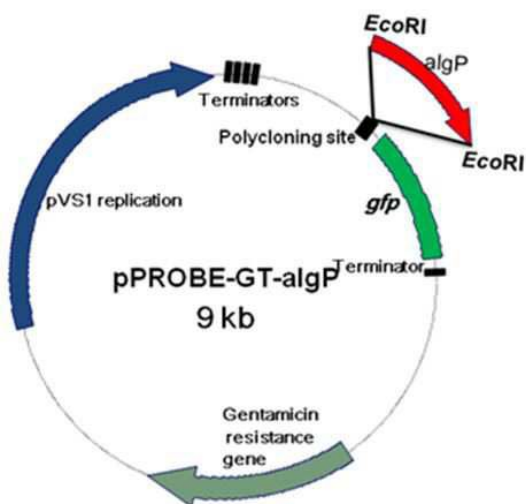
수탁일자 : 20071002

도면

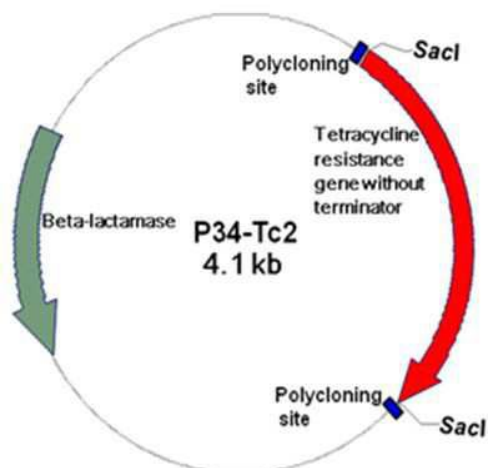
도면1a



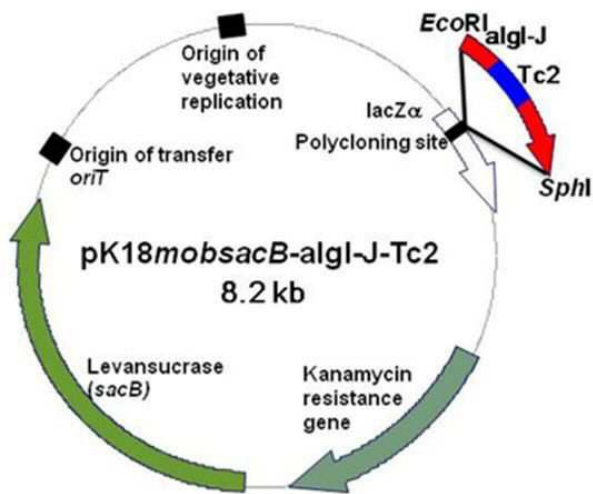
도면1b



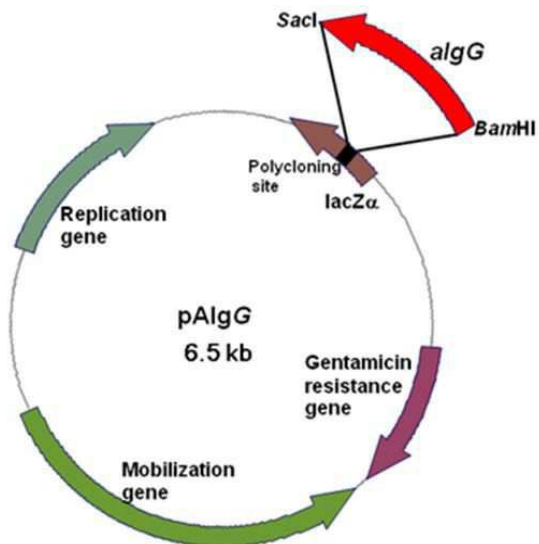
도면1c



도면1d



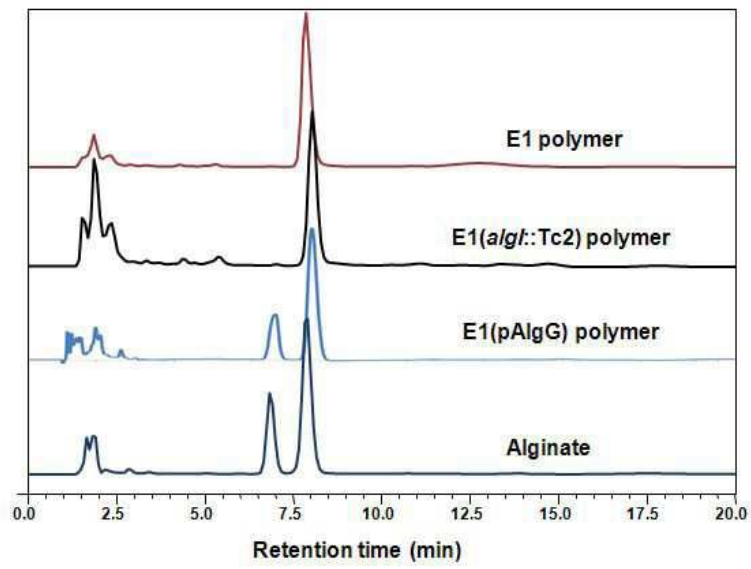
도면1e



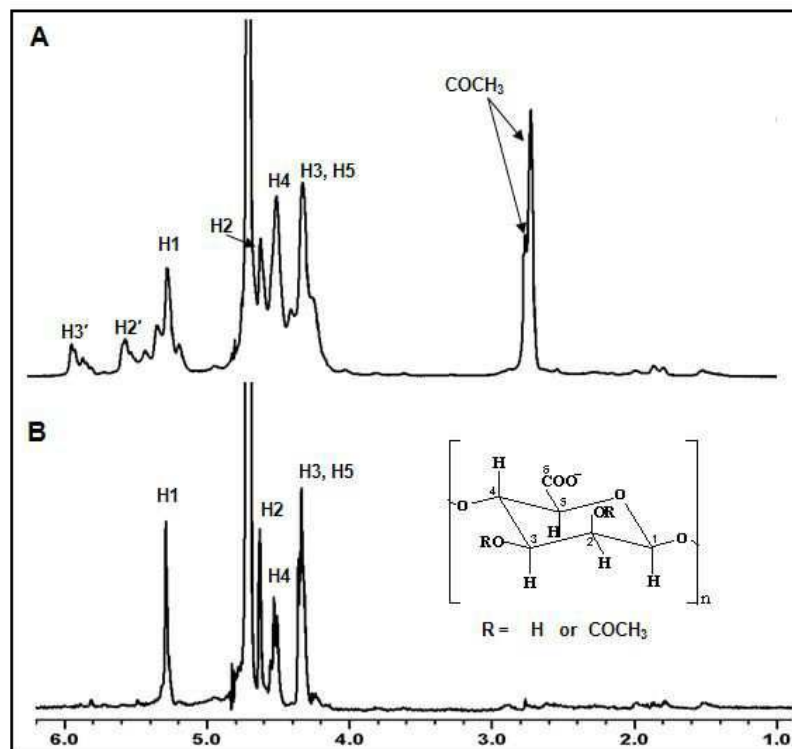
도면2



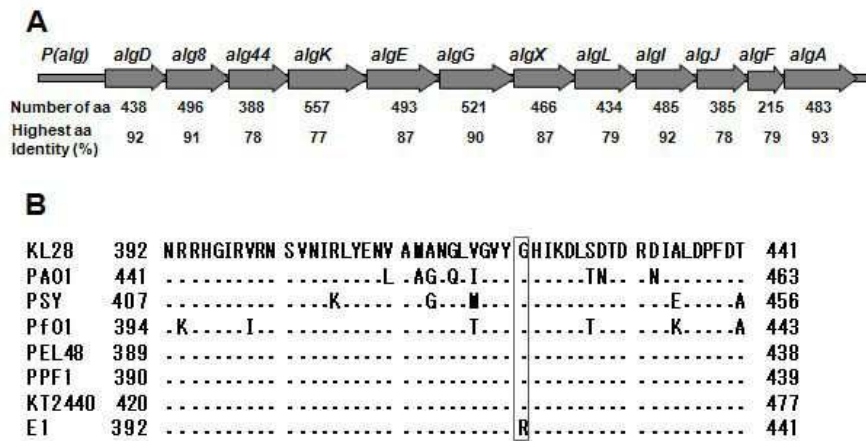
도면3



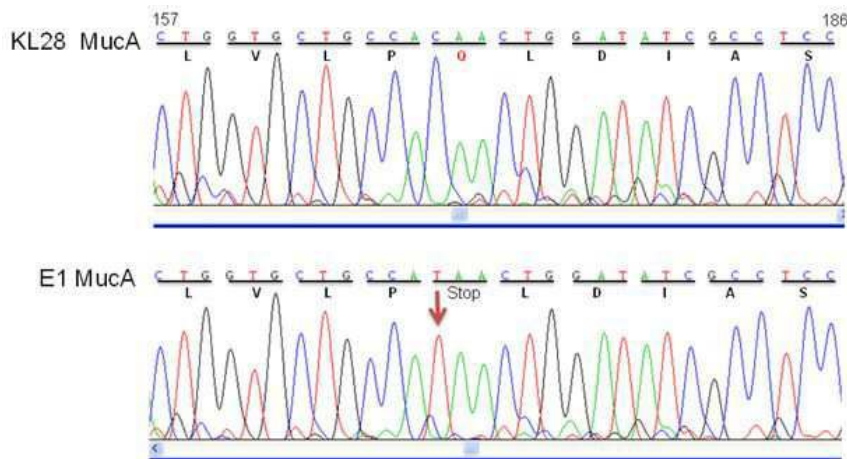
도면4



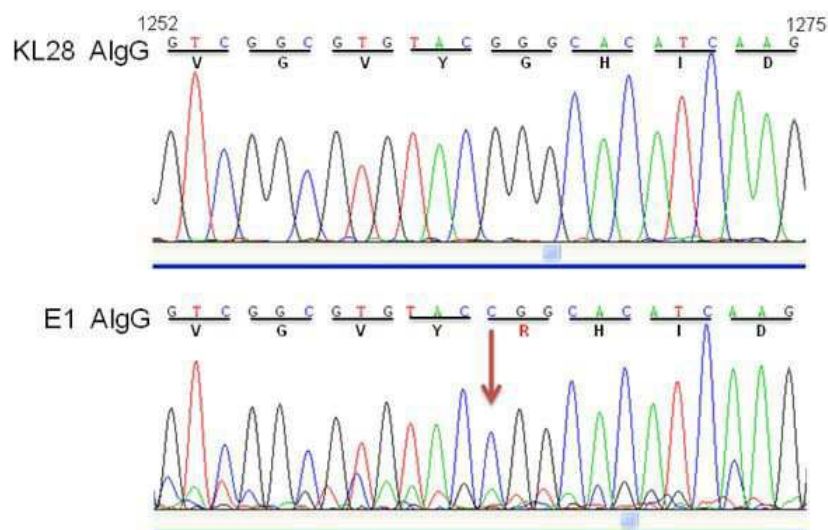
도면5



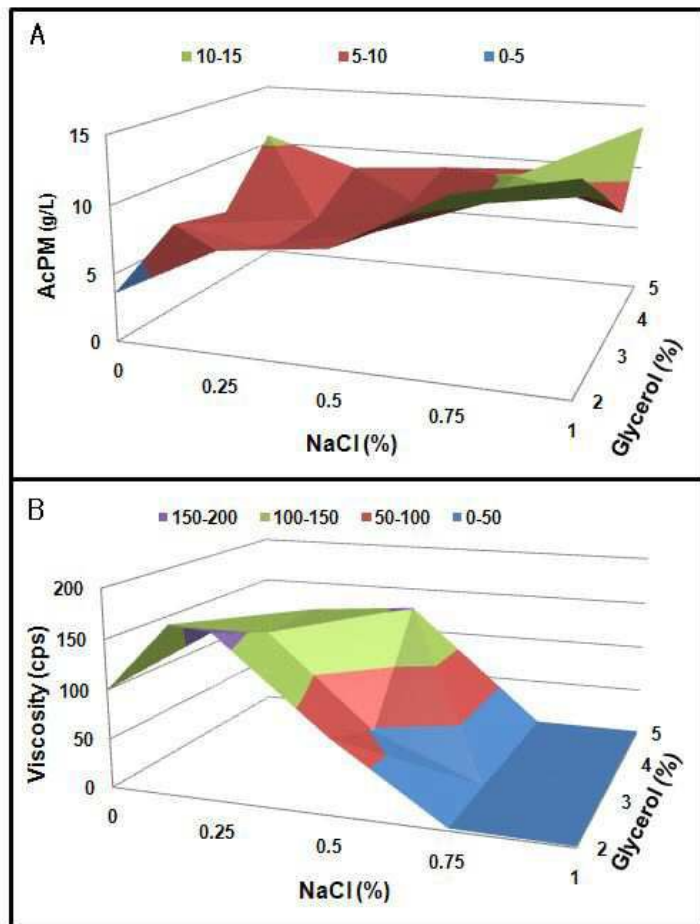
도면6a



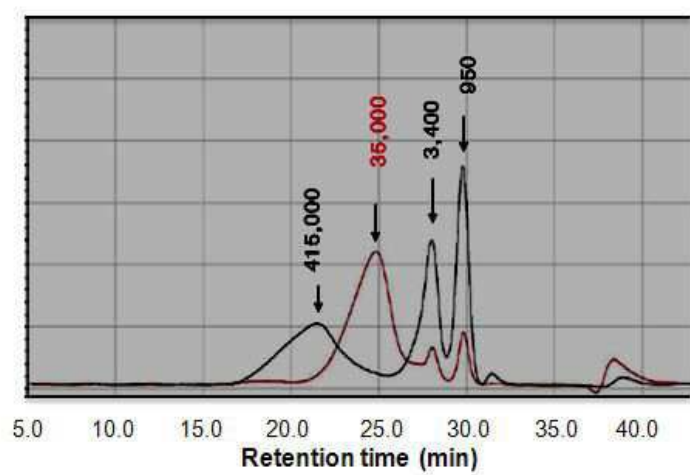
도면6b



도면7



도면8



도면9

