(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0067790
(43) 공개일자 2022년05월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/70 (2006.01) *C08J 11/10* (2006.01)
C12N 9/04 (2006.01) *C12N 9/12* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/70 (2013.01)
C08J 11/10 (2021.05)
(21) 출원번호 10-2020-0154431
(22) 출원일자 2020년11월18일
심사청구일자 2021년11월17일

(71) 출원인
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
장유신
경상남도 진주시 가좌길29번길 63, 453동 302호 (가좌동, 경상대학교)
성현정
경상남도 진주시 진성면 진성로276번길 279-23 (구천리)
우지은
경상남도 사천시 숲뫼길 11, 102동 1403호 (동금동, 가양라끄빌5차아파트)
(74) 대리인
이처영, 장제환

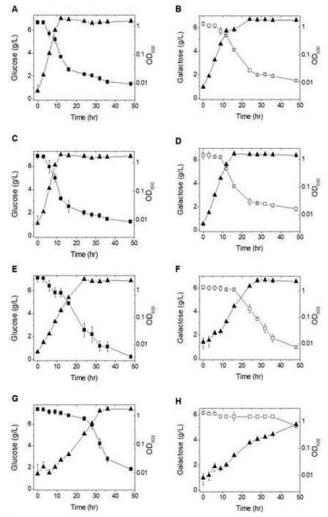
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 **플라스틱 분해 균주 개발용 샤시 플랫폼**

(57) 요 약

본 발명은 DNA-결합 전사 리프레서(DNA-binding transcriptional repressor), DNA-결합 전사 이소리프레서(DNA-binding transcriptional isorepressor), ATP-의존 6-인산프룩토키나아제 이소자임 1(ATP-dependent 6-phosphofructokinase isozyme 1) 및 포도당-6-인산 탈수소효소(glucose-6-phosphate dehydrogenase)로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 효소의 기능이 억제되어 있는, 플라스틱 분해용 재조합 균주에 관한 것으로, 본 발명에 따른 균주는 야생형 균주에 비해 탄소원으로 글루코오스 및 갈락토오스와 같은 탄수화물 섭취를 감소시키고, 플라스틱 분해 산물을 주요 탄소원으로 활용하기 위한 플라스틱 분해 재조합 균주 개발용 샤시 플랫폼으로 효과적으로 사용할 수 있는 효과가 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12N 9/0006 (2013.01)
C12N 9/12 (2013.01)
C12Y 101/01049 (2013.01)
C12Y 207/01011 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711109676
과제번호 2019R1A4A1029125
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 집단연구지원(R&D)
연구과제명 바이오리파이너리 시스템화 연구실
기 여 율 1/2
과제수행기관명 경상대학교
연구기간 2020.03.01 ~ 2021.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1395066019
과제번호 PJ014926012020
부처명 농촌진흥청
과제관리(전문)기관명 농촌진흥청
연구사업명 미생물활용농업환경문제개선기술개발(R&D)
연구과제명 시스템대사공학 기반 미생물 효소를 이용한 농업용 폴리에틸렌 분해 기술 개발
기 여 율 1/2
과제수행기관명 경상대학교
연구기간 2020.01.01 ~ 2020.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

DNA-결합 전사 리프레서(DNA-binding transcriptional repressor), DNA-결합 전사 이소리프레서 (DNA-binding transcriptional isorepressor), ATP-의존 6-인산프룩토키나아제 이소자임 1(ATP-dependent 6-phosphofructokinase isozyme 1) 및 포도당-6-인산 탈수소효소(glucose-6-phosphate dehydrogenase)로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 효소를 인코딩하는 유전자의 발현이 억제되어 있거나, 상기 하나 이상의 효소의 기능이 억제되어 있는, 탄소 대사가 조절된 재조합 균주.

청구항 2

제1항의 재조합 균주에 플라스틱 분해 효소를 인코딩하는 유전자가 추가로 도입 또는 증폭되어 있는, 플라스틱 분해용 재조합 균주.

청구항 3

제2항의 재조합 균주를 이용한 플라스틱의 분해방법.

청구항 4

제2항의 재조합 균주를 플라스틱을 함유하는 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, 플라스틱으로부터 유용물질의 제조방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 플라스틱 분해 재조합 균주 개발용 샤시 플랫폼에 관한 것으로, 더 상세하게는 야생형 균주에 비해 주요 탄소원으로 사용하는 글루코오스 및 갈락토오스 등과 같은 탄수화물(carbohydrate) 섭취를 감소시켜, 플라스틱 분해 산물을 주요 탄소원으로 활용하기 위한 플라스틱 (폴리에틸렌, 폴리에틸렌테레프탈레이트 등) 분해 재조합 균주 개발용 샤시 플랫폼에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 플라스틱 소재의 포장지 및 용기류는 우수한 기능과 저렴한 가격으로 생활의 편리성을 가져오고 산업 전반에 걸쳐 산업발달에 큰 공헌을 하지만, 플라스틱 폐기물은 환경오염의 가장 큰 오염원 중 하나로 인식되고 있다.

[0004] 플라스틱 소재로 대표적인 폴리에틸렌은 일반적으로 식품 위생성이 우수하고, 신율이 우수하여 가공성이 우수하고, 가격이 저렴한 등의 이유에 의하여 다양한 식품 용기의 내부에 코팅되어 방수 등의 목적으로 사용되고 있으나 이를 사용한 코팅용기 포장재는 사용 및 폐기과정에서 플라스틱에 첨가된 가소제 등에 의한 환경 호르몬방출 등의 사회적·환경적 문제를 야기한다. 또한, 폴리에틸렌 코팅 용기 포장재는 사용 후 재활용을 위해 해리하는 과정에서 물에 해리되지 않는 폴리에틸렌은 선별 과정을 거쳐야 하기 때문에 재활용 비용이 증가하는 단점이 있다.

[0005] 또한, 대량으로 발생하는 각종 폐비닐, 스티로폼, 플라스틱 용기 등의 소각이나 매립에 다른 환경 호르몬 누출,

맹독성의 다이옥신 검출 폐기물의 불완전 연소에 의한 대기오염 발생 등과 같은 심각한 환경오염의 원인으로 대두하고 있으며, 이러한 난분해성 플라스틱으로 인하여 전 세계적으로 환경문제가 대두함에 따라 자연 부하를 최소화할 수 있는 소재의 개발이 중요시되고 있으며 자연 순환계로 돌아가 환경오염을 일으키지 않는 폴리에틸렌 분해 방법에 대한 요구가 있다.

[0006] 폴리에틸렌의 친환경적 분해 기술의 일환으로 재조합 미생물을 이용하여 폴리에틸렌을 분해할 수 있는 기술에 대한 연구가 있는데, 예를 들어 대한민국 등록특허 10-2018-0154759에서는 플라스틱을 분해할 수 있는 재조합 PETase 및 재조합 MHETase 생산 균주를 개시하고 있으나, 아직까지 플라스틱 분해 산물을 주요 탄소원으로 활용하기 위한 플라스틱 분해 재조합 균주 개발용 샤시 플랫폼 개발 시도는 없었다.

[0007] 이에, 본 발명자들은 균주의 종래 탄소원인 글루코오스나 갈락토오스와 같은 탄수화물을 이용하지 않고 폴리에틸렌과 같은 플라스틱을 분해시켜 균주를 생장시킬 수 있는 방법을 모색하던 중, 균주의 일부 유전자 변형을 통하여 플라스틱 분해 산물을 주요 탄소원으로 활용하기 위한 플라스틱 분해 재조합 균주 개발용 샤시 플랫폼을 개발함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 10-2018-0154759

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 플라스틱 분해 균주 개발용 샤시 플랫폼으로 활용할 수 있는 신규한 재조합 균주를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 DNA-결합 전사 리프레서(DNA-binding transcriptional repressor), DNA-결합 전사 이소리프레서 (DNA-binding transcriptional isorepressor), ATP-의존 6-인산프룩토키나아제 이소자임 1(ATP-dependent 6-phosphofructokinase isozyme 1) 및 포도당-6-인산 탈수소효소(glucose-6-phosphate dehydrogenase)로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 효소를 인코딩하는 유전자의 발현이 억제되어 있거나, 상기 하나 이상의 효소의 기능이 억제되어 있는, 탄소 대사가 조절된 재조합 균주를 제공한다.

[0012] 본 발명은 또한, 상기 탄소 대사가 조절된 재조합 균주에 폴리에틸렌 분해 효소를 인코딩하는 유전자가 추가로 도입 또는 증폭되어 있는, 폴리에틸렌 분해용 재조합 균주를 제공한다.

[0013] 본 발명은 또한, 상기 재조합 균주를 이용한 폴리에틸렌의 분해방법을 제공한다.

[0014] 본 발명은 또한, 상기 재조합 균주를 폴리에틸렌을 함유하는 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, 폴리에틸으로부터 유용물질의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명에 따른 재조합 균주는 생존에 필요한 탄소 공급원으로 종래 글루코오스나 갈락토오스와 같은 탄수화물을 대체하여 폴리에틸렌과 같은 플라스틱을 분해하여 사용하는 균주 개발의 샤시 플랫폼으로써, 환경 오염의 주범인 폴리에틸렌과 같은 폐플라스틱 분해에 기여하는 동시에 재조합 균주를 이용한 다양한 기술분야에 이용이 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 *E. coli* 균주 (A, B) W3110, (C, D) GR2 (E, F) GR2P and (G, H) GR2PZ 를 각각 6 g/L 글루코오스 (A, C, E, G) 또는 6 g/L 갈락토오스 (B, D, F, H)를 함유하는 R/2 배지에서 배양하며 세포 성장 (▲글루코오스 (■

갈락토오스 (□함량 변화를 확인한 결과이다.

(A, B) : *E. coli* w3110

(C, D) : GR2 : *E. coli* 균주에서 galR, galS가 넉아웃 된 균주

(E, F) : GR2P : *E. coli* 균주에서 galRS, zwf가 넉아웃 된 균주

(G, H) : GR2PZ : *E. coli* 균주에서 galRS, zwf, pfkA가 넉아웃 된 균주

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0020] 본 발명에서는 대장균에서 DNA-결합 전사 리프레서(DNA-binding transcriptional repressor, galR)와 DNA-결합 전사 이소리프레서 (DNA-binding transcriptional isorepressor, galS), ATP-의존 6-인산프룩토키나아제 이소자임 1(ATP-dependent 6-phosphofructokinase isozyme 1, pfkA) 및 포도당-6-인산탈수소효소(glucose-6-phosphate dehydrogenase, zwf)를 인코딩하는 유전자를 순차적으로 넉아웃시키고 글루코오스 또는 갈락토오스를 탄소원으로 발효시킨 결과, 이들 탄소원의 섭취가 감소되는 것을 확인하였다.

[0021] 이러한 경우 미생물은 생존을 위해 부족한 탄소를 공급할 수 있는 다른 대체적인 탄소원을 모색하게 되는데, 폴리에틸렌은 폴리머 형태의 알케인 구조이므로, 미생물이 폴리에틸렌을 탄소원으로 이용하는 경우 폴리에틸렌은 지방산으로 분해되고 아세틸-CoA로 변환되어, 글루코오스 또는 갈락토오스를 대체할 수 있는 탄소원으로의 사용이 가능할 것이다.

[0023] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, DNA-결합 전사 리프레서(DNA-binding transcriptional repressor), DNA-결합 전사 이소리프레서 (DNA-binding transcriptional isorepressor), ATP-의존 6-인산프룩토키나아제 이소자임 1(ATP-dependent 6-phosphofructokinase isozyme 1) 및 포도당-6-인산 탈수소효소(glucose-6-phosphate dehydrogenase)로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 효소의 기능이 억제되어 있는, 탄소 대사가 조절된 재조합 균주에 관한 것이다.

[0024] 본 발명은 다른 관점에서, 폴리에틸렌 분해 효소를 인코딩하는 유전자가 추가로 도입 또는 증폭되어 있는 폴리에틸렌 분해용 재조합 균주에 관한 것이다.

[0025] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 재조합 균주를 이용한 폴리에틸렌의 분해방법에 관한 것이다.

[0026] 본 발명에 있어서, 상기 플라스틱은 폴리에틸렌, 폴리에틸렌테레프탈레이트, 폴리프로필렌, 폴리프탈아마이드, 폴리스티렌, 폴리테트라프루오로에틸렌, 폴리비닐아코올, 폴리염화비닐, 폴리비닐 아세테이트, 폴리우레탄, 스티렌 부다디엔 고무, 염화비닐, 폴리아마이드, 다환 방향족 탄화수소, 폴리카보네이트, 폴리아크릴로니트릴, 폴리부티레이트, 폴리숙시네이트, 폴리부틸렌 테레프탈레이트, 폴리염화비페닐, 폴리카프로락톤, 폴리에틸렌 퓨나노에이트, 폴리에틸렌글리콜, 폴리에틸렌 숙시네이트, 폴리글라이콜산, 폴리하이드록시알카노에이트, 폴리하이드록시부티레이트, 폴리락트산, 메타크릴수지로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[0028] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 재조합 균주를 폴리에틸렌을 함유하는 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, 폴리에틸으로부터 유용물질의 제조방법에 관한 것이다

[0029] 본 발명에 있어서, 상기 유용물질은 부탄올, 이소부탄올, 헥산올, 헵탄올, 옥탄올, 노난올, 데칸올, tert-부탄올, 1-펜탄올, 2-펜탄올, 3-펜탄올, 2-메틸-1-부탄올, 3-메틸-1-부탄올, 2-메틸-2-부탄올이소부탄올, 퓨트레신, L-오르니틴, 아르기닌, 다핵방향족 탄화수소(PHA), 폴리락테이트, 폴리락테이트-co-글라이콜레이트, 폴리아이소발러레이트, 폴리하이드록시부티레이트(PHB), 4-하이드록시부티레이트, 바이오디젤, 가솔린, 올레핀, 5-아미노발러릭산, 감마이미노부티릭산, 3-하이드록스피로피오닉산, 3-아미노프로피오닉산, 아크릴산, 1,3-디아미노프로

판, 카프로락탐, 쓰레오닌, 발린, 이소류신, 푸마르산, 말릭산, 숙신산, 세라마이드, 아스타잔틴, 실리빈, 라이코펜, 루테인, 레티놀 및 히알루론산으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[0030] 본 발명에 있어서, 상기 균주는 에스처리키아 (Escherichia) 속, 코리네박테리움 (Corynebacterium) 속, 락토바시러스 (Lactobacillus) 속, 싸카로마이세스 (Saccharomyces) 속, 맨하이미하 (Mannheimia) 속, 로도박터 (Rhodobacter) 속 및 메틸로박테리엄 (Methylobacterium) 속으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[0031] 본 발명에서, "효소의 기능의 억제"란 상기 효소를 코딩하는 유전자의 전부 또는 일부가 결실되어 있거나, 유전자의 기능이 억제되어 상기 유전자에 의해 생성되는 효소가 숙주 미생물에서 제거하는 것뿐만 아니라, 상기 유전자에 의해 생성되는 효소의 내재적 활성 또는 기능에 비하여 약화되도록 변형된 것을 포함한다.

[0032] 본 발명에서 "내재적 활성 또는 기능에 비하여 약화되도록 변형"되었다는 것은, 활성 또는 기능을 나타내는 유전자의 결실이나 유전자의 불활성화(예를 들어, 돌연변이 유전자로의 치환), 유전자 발현의 약화(예를 들어, 약한 프로모터로의 치환, siRNA, gRNA, sRNA 등의 도입, 시작 코돈을 ATG에서 GTG 등으로의 치환), 유전자에 의해 발현된 효소의 기능 억제(예를 들어, 비경쟁적 억제자 또는 경쟁적 억제자 첨가) 등과 같은 조작이 이루어지기 전의 미생물이 가지는 기능에 비하여 조작이 이루어진 이후의 미생물이 가지고 있는 기능이 감소된 상태를 의미한다.

[0033] 본 발명에서 유전자가 도입 또는 증폭되어 있다는 것은, 상기 유전자에 의해 생성되는 효소나 단백질이 숙주 미생물에 없는 경우 이를 인위적으로 숙주 미생물에서 발현하도록 하여 효소나 단백질의 활성 또는 기능을 갖도록 하는 것뿐만 아니라, 상기 유전자에 의해 생성되는 효소나 단백질의 활성 또는 기능이 내재적 활성 또는 기능에 비하여 강화되도록 변형된 것을 포함한다.

[0034] 본 발명에서 사용되는 용어 "내재적 활성 또는 기능"이란, 본래 미생물이 변형되지 않은 상태에서 가지고 있는 효소, 단백질 등이 보유하는 활성 또는 기능을 의미하고, "내재적 활성 또는 기능에 비해 강화되도록 변형"된다는 의미는 변형 전 상태의 펩타이드 등의 활성 또는 기능과 비교할 때 당해 활성 또는 기능이 신규로 도입되거나 더 향상된 것을 의미하며, "내재적 활성 또는 기능에 비해 약화되도록 변형"된다는 의미는 변형 전 상태의 펩타이드 등의 활성 또는 기능과 비교할 때 당해 활성 또는 기능이 사라지거나 더 감소된 것을 의미한다.

[0035] 본 발명에서 "결실"이란 해당유전자의 일부 또는 전체염기를 변이, 치환 또는 삭제시키는 방법을 통해 해당유전자가 발현되지 않도록 하거나 발현되더라도 활성 또는 기능을 나타내지 못하도록 하는 것을 포괄하는 개념이다.

[0036] 본 발명에서 " 기능의 강화"란, 펩타이드 자체의 기능이 새로 도입되거나 증대되어 본래 기능 이상의 효과를 도출하는 것을 포함할 뿐만 아니라, 내재적 유전자 기능의 증가, 내부 또는 외부 요인으로부터 내재적 유전자 증폭, 상기 유전자 발현의 억제 조절 인자의 결실, 유전자 카피수 증가, 외부로부터의 유전자 도입, 발현조절 서열의 변형, 특히 프로모터 교체 또는 변형 및 유전자내 돌연변이에 의한 펩타이드 기능의 증가 등에 의해 그 기능이 증대되는 것을 포함한다.

[0037] 본 발명에서 "과발현"이란 보통상태에서 세포내 해당유전자가 발현되는 수준보다 높은 수준의 발현을 일컫는 것으로써, 유전체 상에 존재하는 유전자의 프로모터를 강력한 프로모터로 치환하거나, 발현벡터에 해당유전자를 클로닝하여 세포에 형질전환시키는 방법을 통해 발현량을 증가시키는 것 등을 포함하는 개념이다.

[0038] 본 발명에서 "벡터(vector)"는 적합한 숙주 내에서 DNA를 발현시킬 수 있는 적합한 조절 서열에 작동가능하게 연결된 DNA 서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다. 벡터는 플라스미드, 파지 입자 또는 간단하게 잠재적 게놈 삽입물일 수 있다. 적당한 숙주로 형질전환되면, 벡터는 숙주 게놈과 무관하게 복제하고 기능할 수 있거나, 또는 일부 경우에 게놈 그 자체에 통합될 수 있다. 플라스미드가 현재 벡터의 가장 통상적으로 사용되는 형태이므로, 본 발명의 명세서에서 "플라스미드(plasmid)" 및 "벡터(vector)"는 때로 상호 교환적으로 사용된다. 본 발명의 목적상, 플라스미드 벡터를 이용하는 게 바람직하다. 이러한 목적에 사용될 수 있는 전형적인 플라스미드 벡터는 (a) 숙주세포당 수 개에서 수백 개의 플라스미드 벡터를 포함하도록 복제가 효율적으로 이루어지도록 하는 복제 개시점, (b) 플라스미드 벡터로 형질전환된 숙주세포가 선발될 수 있도록 하는 항생제 내성 유전자 및 (c) 외래 DNA 절편이 삽입될 수 있는 제한효소 절단부위를 포함하는 구조를 지니고 있다. 적절한 제한효소 절단부위가 존재하지 않을지라도, 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터(oligonucleotide adaptor) 또는 링커(linker)를 사용하면 벡터와 외래 DNA를 용이하게 라이게이션(ligation)할 수 있다. 라이게이션 후에, 벡터는 적절한 숙주세포로 형질전환되어야 한다. 형질전환은 칼슘 클로라이드 방법 또는 전기천공법

(electroporation) (Neumann, et al., EMBO J., 1:841, 1982) 등을 사용해서 용이하게 달성될 수 있다.

[0039] 상기 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있으며, 본 발명의 효과를 위해 추가적으로 변형될 수 있다. 또한 발현벡터는 벡터를 함유하는 숙주 세포를 선택하기 위한 선택성 마커를 포함하고, 복제 가능한 발현벡터인 경우 복제 기원(Ori)을 포함한다. 벡터는 자가 복제하거나 숙주 게놈 DNA에 통합될 수 있다. 바람직하게는 벡터 내로 삽입되어 전달된 유전자가 숙주세포의 게놈 내로 비가역적으로 융합되어 세포 내에서 유전자 발현이 장기간 안정적으로 지속되도록 하는 것이 바람직하다.

[0040] 염기서열은 다른 핵산 서열과 기능적 관계로 배치될 때 "작동가능하게 연결(operably linked)" 된다. 이것은 적절한 분자(예를 들면, 전사 활성화 단백질)가 조절 서열(들)에 결합될 때 유전자 발현을 가능하게 하는 방식으로 연결된 유전자 및 조절 서열(들)일 수 있다. 예를 들면, 전서열(pre-sequence) 또는 분비 리더 (leader)에 대한 DNA는 폴리펩타이드의 분비에 참여하는 전단백질로서 발현되는 경우 폴리펩타이드에 대한 DNA에 작동가능하게 연결되고; 프로모터 또는 인핸서는 서열의 전사에 영향을 끼치는 경우 코딩서열에 작동가능하게 연결되거나; 또는 리보좀 결합 부위는 서열의 전사에 영향을 끼치는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결되거나; 또는 리보좀 결합 부위는 번역을 용이하게 하도록 배치되는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로, "작동가능하게 연결된"은 연결된 DNA 서열이 접촉하고, 또한 분비 리더의 경우 접촉하고 리딩 프레임 내에 존재하는 것을 의미한다. 그러나, 인핸서(enhancer)는 접촉할 필요가 없다. 이들 서열의 연결은 편리한 제한 효소 부위에서 라이게이션(연결)에 의해 수행된다. 그러한 부위가 존재하지 않는 경우, 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오티드 어댑터(oligonucleotide adaptor) 또는 링커(linker)를 사용한다.

[0041] 당업계에 주지된 바와 같이, 숙주세포에서 형질전환 유전자의 발현 수준을 높이기 위해서는, 해당 유전자가 선택된 발현 숙주 내에서 기능을 발휘하는 전사 및/또는 해독 발현 조절 서열에 작동가능하도록 연결되어야만 한다. 바람직하게는 발현 조절서열 및/또는 해당 유전자는 세균 선택 마커 및 복제 개시점(replication origin)을 같이 포함하고 있는 하나의 재조합벡터 내에 포함되게 된다. 숙주세포가 진핵세포인 경우에는, 재조합벡터는 진핵 발현숙주 내에서 유용한 발현 마커를 더 포함하여야만 한다.

[0042] 상술한 재조합 벡터에 의해 형질전환된 숙주 세포는 본 발명의 또 다른 측면을 구성한다. 본원 명세서에 사용된 용어 "형질전환"은 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체 외 인자로서 또는 염색체 통합완성에 의해 복제 가능하게 되는 것을 의미한다.

[0043] 물론 모든 벡터가 본 발명의 DNA 서열을 발현하는데 모두 동등하게 기능을 발휘하지는 않는다는 것을 이해하여야만 한다. 마찬가지로 모든 숙주가 동일한 발현 시스템에 대해 동일하게 기능을 발휘하지는 않는다. 그러나, 당업자라면 과도한 실험적 부담없이 본 발명의 범위를 벗어나지 않는 채로 여러 벡터, 발현 조절 서열 및 숙주 중에서 적절한 선택을 할 수 있다. 예를 들어, 벡터를 선택함에 있어서는 숙주를 고려하여야 하는데, 이는 벡터가 그 안에서 복제되어야만 하기 때문이다. 벡터의 복제 수, 복제 수를 조절할 수 있는 능력 및 당해 벡터에 의해 코딩되는 다른 단백질, 예를 들어 항생제 마커의 발현도 또한 고려되어야만 한다.

[0044] 아울러, 본 발명에서 도입된 유전자는 숙주세포의 게놈에 도입되어 염색체 상 인자로서 존재하는 것을 특징으로 할 수 있다. 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자에게 있어 상기 유전자를 숙주세포의 게놈 염색체에 삽입하여서도 상기와 같이 재조합 벡터를 숙주세포에 도입한 경우와 동일한 효과를 가질 것은 자명하다 할 것이다.

[0046] 이하 본 발명을 실시예 및 실험예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.

[0048] **실시예 1. 변이 균주의 제작**

[0049] 본 발명에서는 야생형 *E. coli* strain K-12 W3110 균주 (CGSC, Coli Genetic Stock Center, New Haven, CT, USA) 를 이용하여 변이형 균주를 제작하였다. GR2PZ 변이형 제작을 위해서 변형된 원-스텝 불활성화 방법으로 *galR* (AYG18180.1), *galS* (AYG18825.1), *pfkA* (AYG21290.1), 및 *zwf* (AYG19095.1) 유전자를 넉아웃하였다. 이를 위하여, 각각 표1에 기재된 galR-KO-F1과 galR-KO-R1, galS-KO-F1과 galS-KO-R1, pfkA-KO-F1과 pfkA-KO-R1, 및 zwf-KO-F1과 zwf-KO-R1 프라이머를 사용하였다. 한편, DNA 단편 산물을 개별적으로 다음의 상응하는 프라이머 쌍을 이용하여 PCR 증폭하였다: galR-KO-F2와 galR-KO-R2, galS-KO-F2와 galS-KO-R2, pfkA-KO-F2과 pfkA-KO-R2, 및 zwf-KO-F2와 zwf-KO-R2. 최종 단편을 BTX ECM 630 전기 천공기 (BTX, San Diego, CA, USA; 1.8kV,

25μF, 200Ω, 1-mm 전기 천공 큐벳)를 사용하여 pCW611 헬퍼 플라스미드 (Song and Lee, Biotechnol J 8:776, 2013)를 포함하는 *E. coli* 세포로 개별적으로 전기 천공하였다. Lambda red recombinase와 Cre recombinase를 모두 포함하는 pCW611을 사용하여 *E. coli*에서 표적 유전자 넉아웃 하였다. 표적 유전자 *galR, galS, pfkA* 및 *zwf*의 돌연변이는 프라이머 쌍 galR-KO-F1과 galR-KO-R1, galS-KO-F1과 galS-KO-R1, pfkA-KO-F1과 pfkA-KO-R1, zwf-KO-F1과 zwf-KO-R1를 사용하여 콜로니 PCR에 의해 검증하였다. 마지막으로 42℃에서 배양하여 재조합 *E. coli* 세포에서 플라스미드 pCW611을 제거 하였다.

[0050] 이와 같은 방법으로 제조된 균주는 각각 다음과 같은 재조합 균주로 명명하였다.

[0051] w3110 : *E. coli* w3110 야생형 균주

[0052] GR2 : *E. coli* 균주에서 galR, galS가 넉아웃 된 균주

[0053] GR2P : *E. coli* 균주에서 galRS, zwf가 넉아웃 된 균주

[0054] GR2PZ : *E. coli* 균주에서 galRS, zwf, pfkA가 넉아웃 된 균주

표 1

[0056] 프라이머 서열

Name	Sequences (5' *?* 3')
galR-KO-F1	ATGTAAGCGTTTACCCACTAAGGTATTTTCGACACTATAGAACGCGGCCG
galR-KO-R1	TTACTGGCGCTGGAATTGCTTTAACTGCGGCCGCATAGGCCACTAGTGGA
galR-KO-F2	AAAACACGCCACCCCTTGAACCAACGGGCGTTTTCCGTAACACTGAAAGAATGTAAGCGTTTACCCACTA
galR-KO-R2	TTGATAATGGTCAGGCGCGGTTGATTCGCCGTCGCCAGACCATCGAAGAATTACTGGCGCTGGAATTGCT
galS-KO-F1	ACTGTGAAATCACTCACAGATTGAAAGCGGGACACTATAGAACGCGGCCG
galS-KO-R1	CAGTCATTTACTGCAATCTCATAACAGGTACCGCATAGGCCACTAGTGGA
galS-KO-F2	CGGGTTACAACGTTAAAACGGTGCAATCATAGCTATCACATTGTTAAGATACTGTGAAATCACTCACAGA
galS-KO-R2	TCGATTCACGAAGTCCTGTATTCAGTGCTGACAAAATAGCCGCCAGCAAGCAGTCATTTACTGCAATCTC
zwf-KO-F1	TAAAATAACCATAAAGGATAAGCGCAGATAGACACTATAGAACGCGGCCG
zwf-KO-R1	TACCGGGTTAGTTAACTTAAGGAGAATGACCCGCATAGGCCACTAGTGGA
zwf-KO-F2	CCTGAAAGTGTAAAAATTGTTCTACAATCTGCGCAAGATCATGTTACCGGTAAAATAACCATAAAGGATA
zwf-KO-R2	AAAGCAGTACAGTGCACCGTAAGAAAATTACAAGTATACCCTGGCTTAAGTACCGGGTTAGTTAACTTAA
pfkA-KO-F1	GGTAAAGGAATCTGCCTTTTTCCGAAATCAGACACTATAGAACGCGGCCG
pfkA-KO-R1	TACTATTTGCACATTCGTTGGATCACTTCGCCGCATAGGCCACTAGTGGA
pfkA-KO-F2	CCTGATAAGCGAAGCGCATCAGGCATTTTTGCTTCTGTCATCGGTTTCAGGGTAAAGGAATCTGCCTTTT
pfkA-KO-R2	ATACCGCCATTTGGCCTGACCTGAATCAATTCAGCAGGAAGTGATTGTTATACTATTTGCACATTCGTTG

[0058] **실시예 2. 변이 균주의 배양**

[0059] E. coli 균주는 글루코오스 또는 갈락토오스 탄소 공급원이 보충된 R/2 배지에서 배양하였다. R/2 배지 (pH 6.8)에는 l 당 2 g $(NH_4)_2HPO_4$, 6.75 g KH_2PO_4, 0.7 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.85 g citric acid, 및 5 ml trace metal solution을 포함하고, trace metal solution은 리터 당 0.1M HCl, 10 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 2.25 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.58 g $MnSO_4 \cdot 5H_2O$, 1 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0.1 g $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$, 0.02 g $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$, 및 2 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$를 포함한다. 종자 배양(seed culture)을 준비하기 위해 LB 한천 플레이트에서 성장한 콜로니를 5ml R / 2 배지가 포함된 25ml 시험관에 접종하였다. 시험관은 진탕 배양기 (IST-4075, JEIOTECH, Korea)에서 37 ℃, 200rpm으로 배양하였다. 다음날, 2.2ml의 종자 배양물을 220ml R/2 배지를 포함하는 각 500ml 플라스크로 옮기고, 발효 실험을 위해 3g/L 글루코오스 또는 3g/L 갈락토스를 탄소원으로 배지에 보충하였다.

[0060] 그 결과, 변이 균주는 야생형 균주에 비해 기존에 사용하는 탄소원인 글루코오스 및 갈락토오스 섭취가 감소되는 것을 확인할 수 있었다 (표 2, 도 1).

표 2

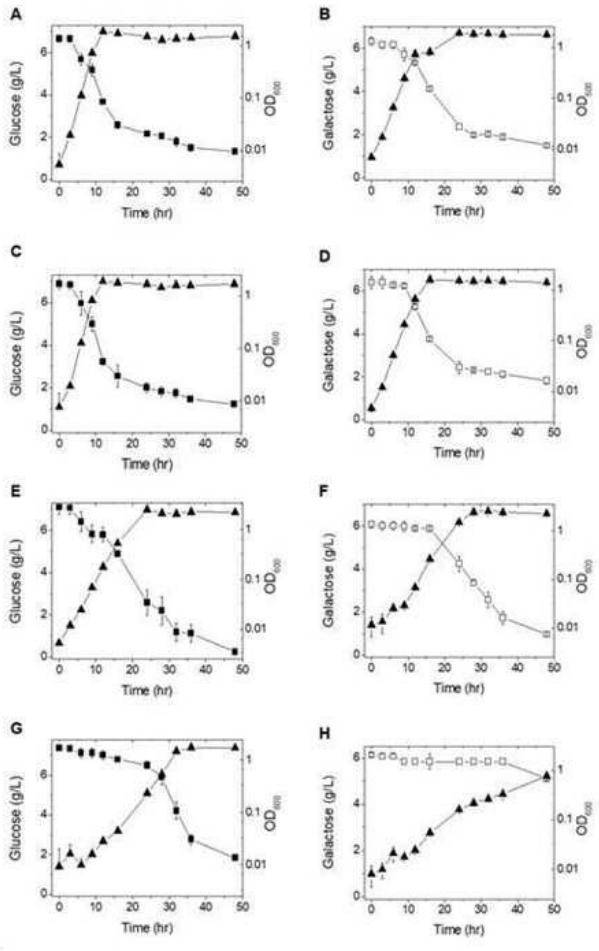
[0062] 유일한 탄소원을 포함하는 R/2 배지에서 *E. coli* 균주 W3110, GR2, GR2P 및 GR2PZ의 배양물에서 얻은 발효 매개변수

Strain	Specific growth rate (μ_{max}; /h)		Overall specific sugar consumption rate (g/gDCW/h)	
	Glucose	Galactose	Glucose	Galactose
W3110	0.4888 ± 0.05	0.3470 ± 0.00	0.9793 ± 0.08	0.7127 ± 0.04
GR2	0.5098 ± 0.01	0.3643 ± 0.01	1.1777 ± 0.11	0.8644 ± 0.07
GR2P	0.2989 ± 0.00	0.3057 ± 0.01	0.5434 ± 0.07	0.3110 ± 0.02
GR2PZ	0.2196 ± 0.01	0.1649 ± 0.01	0.4905 ± 0.06	0.2167 ± 0.04

[0064] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

도면1



서 열 목 록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY

<120> Chassis Platform for Development of Plastic-Decomposing Microorganism

<130> P20-B235

<160> 16

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 1

atgtaagcgt ttacccacta aggtattttc gacactatag aacgcggccg 50

<210> 2

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 2

ttactggcgc tggaattgct ttaactgcgg ccgcataggc cactagtgga 50

<210> 3

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 3

aaaacacgcc acccttgaa ccaacgggcg ttttccgtaa cactgaaaga atgtaagcgt 60

ttacccacta 70

<210> 4

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 4

ttgataatgg tcaggcgcgg ttgattcgcc gtcgccagac catcgaagaa ttactggcgc 60

tggaattgct 70

<210> 5

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 5

actgtgaaat cactcacaga ttgaaagcgg gacactatag aacgcggccg 50

<210> 6

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 6

cagtcattta ctgcaatctc ataacaggta ccgcataggc cactagtgga 50

<210> 7

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 7

cgggttacaa cgttaaaacg gtgcaatcat agctatcaca ttgttaagat actgtgaaat 60

cactcacaga 70

<210> 8

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 8

tcgattcacg aagtcctgta ttcagtgctg acaaaatagc cgccagcaag cagtcattta 60

ctgcaatctc 70

<210> 9

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 9

taaaataacc ataaaggata agcgcagata gacactatag aacgcggccg 50

<210> 10

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 10

taccgggtta gttaacttaa ggagaatgac ccgcataggc cactagtgga 50

<210> 11

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 11

cctgaaagtg taaaaattgt tctacaatct gcgcaagatc atgttaccgg taaaataacc 60

ataaaggata 70

<210> 12

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 12

aaagcagtac agtgcaccgt aagaaaatta caagtatacc ctggcttaag taccgggtta 60

gttaacttaa 70

<210> 13

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 13

ggtaaaggaa tctgcctttt tccgaaatca gacactatag aacgcggccg 50

<210> 14

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 14

tactatttgc acattcgttg gatcacttcg ccgcataggc cactagtgga 50

<210> 15

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 15

cctgataagc gaagcgcatc aggcattttt gcttctgtca tcggtttcag ggtaaaggaa 60

tctgcctttt 70

<210> 16

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 16

ataccgccat ttggcctgac ctgaatcaat tcagcaggaa gtgattgtta tactatttgc 60

acattcgttg 70