(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0094788
(43) 공개일자 2012년08월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/21 (2006.01) *C12N 15/52* (2006.01)
C12P 7/64 (2006.01) *C12R 1/385* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0014270
(22) 출원일자 2011년02월17일
심사청구일자 2011년02월17일

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
이진원
서울특별시 송파구 양재대로 1218, 올림픽선수기자촌아파트 201-1601호 (방이동)
이선희
서울특별시 은평구 불광로6길 10-10, 101호 (불광동)
전은영
서울특별시 중구 퇴계로90길 59-8, 동남하이츠빌라C동 402호 (신당동)
(74) 대리인
노경규

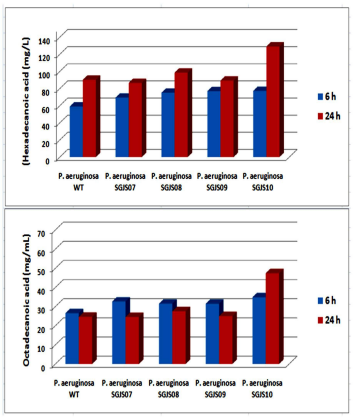
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **지방산 함량 개선을 위해 개발된 슈도모나스 에어루지노사 균주 및 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 지방산 함량 개선을 위해 개발된 슈도모나스 에어루지노사 균주 및 제조방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 슈도모나스 에어루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*)의 아세틸-CoA 카복실라제 카복실트랜스퍼라제 서브유닛 알파를 코딩하는 뉴클레오타이드 및/또는 말로닐-CoA-[아실운반단백질]트랜스아실라제트랜스아실라제를 코딩하는 뉴클레오타이드, 및/또는 스트렙토코커스 피오제네스(*Streptococcus pyogenes*)의 아실(아실운반단백질)티오에스터라제를 코딩하는 뉴클레오타이드를 포함하는 발현벡터로 형질전환된 슈도모나스 에어루지노사 및 그의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 형질전환된 슈도모나스 에어루지노사는 유전적 안정성이 높고 지질 또는 지방산 함량이 매우 높으므로, 지방산 생산을 대량 생산하는데 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도13



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2008-N-BI08-P-03

부처명 지식경제부

연구사업명 신재생에너지 기술개발사업

연구과제명 당화 바이오매스를 이용한 탄화수소계 바이오에너지 생산 균주 및 공정 최적화 원천기술 개발

주관기관 서강대학교 산학협력단

연구기간 2008.10.01 ~ 2011.07.31

특허청구의 범위

청구항 1

스트렙토코커스 피오제네스(*Streptococcus pyogenes*)로부터 유래한 아실(아실운반단백질)티오에스터라제(acyl-acyl carrier protein thioesterase)를 코딩하는 뉴클레오타이드를 포함하는 발현벡터로 형질전환된, 지방산 과발현용 슈도모나스 에어루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*).

청구항 2

슈도모나스 에어루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*)의 아세틸-CoA 카복실라제 카복실트랜스퍼라제 서브유닛 알파(acetyl-CoA carboxylase carboxytransferase subunit alpha)를 코딩하는 뉴클레오타이드와 스트렙토코커스 피오제네스(*Streptococcus pyogenes*)의 아실(아실운반단백질)티오에스터라제를 코딩하는 뉴클레오타이드를 포함하는 발현벡터로 형질전환된, 지방산 과발현용 슈도모나스 에어루지노사.

청구항 3

슈도모나스 에어루지노사의 말로닐-CoA-[아실운반단백질]트랜스아실라제(malonyl-CoA-[acyl-carrierprotein] transacylase)를 코딩하는 뉴클레오타이드와 스트렙토코커스 피오제네스의 아실(아실운반단백질)티오에스터라제를 코딩하는 뉴클레오타이드를 포함하는 발현벡터로 형질전환된, 지방산 과발현용 슈도모나스 에어루지노사.

청구항 4

슈도모나스 에어루지노사의 아세틸-CoA 카복실라제 카복실트랜스퍼라제 서브유닛 알파를 코딩하는 뉴클레오타이드 및 말로닐-CoA-[아실운반단백질]트랜스아실라제를 코딩하는 뉴클레오타이드를 포함하고, 스트렙토코커스 피오제네스의 아실(아실운반단백질)티오에스터라제를 코딩하는 뉴클레오타이드를 포함하는 발현벡터로 형질전환된, 지방산 과발현용 슈도모나스 에어루지노사.

청구항 5

제 1 항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 발현벡터는 도 2에 기재된 유전자 지도를 갖는 대장균-슈도모나스 셔틀벡터 pUCP19인 것을 특징으로 하는 지방산 과발현용 슈도모나스 에어루지노사.

청구항 6

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 아실-아실 운반단백질 티오에스터라제를 코딩하는 뉴클레오티드는 서열번호: 6으로 기재되는 염기 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 지방산 과발현용 슈도모나스 에어루지노사.

청구항 7

제 2항 또는 제 4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 아세틸-CoA 카복실라제 카복실트랜스퍼라제 서브유닛 알파를 코딩하는 뉴클레오티드는 서열번호: 2로 기재되는 염기 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 지방산 과발현용 슈도모나스 에어루지노사.

청구항 8

제 3항 또는 제 4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 말로닐-CoA-[아실운반단백질]트랜스아실라제를 코딩하는 뉴클레오티드는 서열번호: 4로 기재되는 염기 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 지방산 과발현용 슈도모나스 에어루지노사.

청구항 9

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 슈도모나스 에어루지노사는 슈도모나스 에어루지노사 PA14인 것을 특징으로 하는 지방산 과발현용 슈도모나스 에어루지노사.

청구항 10

하기의 단계를 포함하는 지방산 과발현용 슈도모나스 에어루지노사의 제조방법:

i) 스트렙토코커스 피오제네스의 아실(아실운반단백질)티오에스터라제를 코딩하는 뉴클레오타이드를 발현벡터에 삽입시키는 단계; 및

ii) 상기 단계 i)의 발현벡터로 슈도모나스 에어루지노사를 형질전환시키는 단계.

청구항 11

하기의 단계를 포함하는 지방산 과발현용 슈도모나스 에어루지노사의 제조방법:

i) 아세틸-CoA 카복실라제 카복실트랜스퍼라제 서브유닛 알파를 코딩하는 뉴클레오타이드 또는 말로닐-CoA-[아실운반단백질]트랜스아실라제를 코딩하는 뉴클레오타이드 중 하나 또는 둘 모두, 및 스트렙토코커스 피오제네스의 아실(아실운반단백질)티오에스터라제를 코딩하는 뉴클레오타이드를 발현벡터에 삽입시키는 단계; 및

ii) 상기 단계 i)의 발현벡터로 슈도모나스 에어루지노사를 형질전환시키는 단계.

청구항 12

하기의 단계를 포함하는 지방산 생산 방법:

i) 제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항의 슈도모나스 에어루지노사를 배양하여 지방산을 생합성하는 단계; 및

ii) 상기 단계 i)에서 생합성된 지방산을 수득하는 단계.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 형질전환된 재조합 슈도모나스 에어루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 및 그의 제조방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 지방산 생합성과 관련된 유전자들로 형질전환된 지방산 과발현용 슈도모나스 에어루지노사 및 그의 제조방법에 관한 것이다.

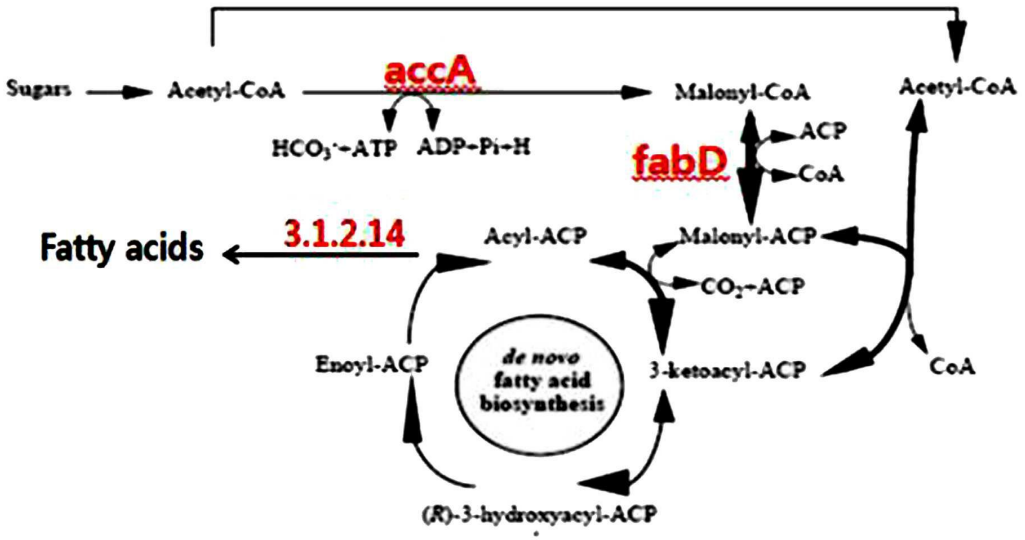
배 경 기 술

[0002] 화석연료들의 사용은 지구온난화 가스 및 폐기물을 대량생산하여 인류에게 심각한 환경적인 위기를 초래하고 있다. 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. 바이오에너지로 대표되어지는 바이오에탄올, 바이오디젤, 바이오가스, 부탄올에 대한 관심이 증가하고 있지만, 언급된 종류의 바이오에너지 모두 전력생산이나 수송용 연료로 사용될 수 있으나, 실적용 및 생산 방

법의 몇몇 단점으로 인해 새로운 신재생에너지 자원인 탄화수소(hydrocarbon) 형태의 화합물에 대한 관심이 증가되고 있다. 이에 따라 긴 사슬 지방산(long chain fatty acid)를 대사산물로서 생성할 수 있는 재조합 균주에 대한 관심도 증대되고 있다.

[0003] 슈도모나스 에어루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*)는 녹농균으로 1882년 게샤드(Gessard)에 의해 녹색의 농즙에서 발견되었으며, 녹색을 형성하는 관계로 녹농균이라 하였다. 녹농균은 자연계에 널리 분포되어 있으며, 농, 객담, 분변, 소변, 담즙, 자궁분비물, 혈액, 척수액 등에서 자주 분리되고 있다. 슈도모나스 에어루지노사 녹농균의 형태는 그람음성 막대균으로 배양시 협막과 유사한 세포 외성의 다당질인 점질층이 형성된다. 협막과 유사한 세포 외성의 다당질인 점질층이 형성된다. 자연계에 적응력이 매우 강한 미생물이다. 이 균은 성장을 위한 영양요구가 매우 단순하다. 스트렙토코커스 피오지네스(*Streptococcus pyogenes*)는 화농성 연쇄상구균으로 폐렴, 인후염, 급성신장염, 독성쇼크증후군 등의 질병을 일으킨다.

[0004] 지방산(fatty acid)은 1개의 카복시기(-COOH)를 가지는 탄화수소 사슬의 카복실산으로 사슬 모양의 1가의 카복실산을 말한다. 지방을 가수분해하면 생기기 때문에 이러한 이름이 붙었다. 지방산 분자는 탄화수소 사슬로 이루어져 있는데, 탄화수소는 탄소의 기본 골격에 곁가지로 수소가 연결되어 있고 한쪽 끝에 카복시기가 붙어 있다. 생체 내에서 지방산은 지방산회로에 의해서 분해되거나 합성되거나 한다. 이 회로는 탄소 2개씩의 단위로 지방산을 합성하거나 분해하므로, 자연계에 존재하는 지방산은 거의 대부분이 짝수인 탄소수로 되어 있다.



[0005]

[0006] 미생물 생체 내에서의 당으로부터 지방산 생합성의 첫 단계는 아세틸-CoA (acetyl-CoA)에서 시작하여, 그 뒤 탄소원자가 한 번에 두 개의 원자씩 탄화수소사슬에 붙어 사슬이 길어지게 된다. 세포질에서 아세틸-CoA는 카복실화 되어서, 지방산 생합성에 있어 중요한 중간체가 되는 말로닐-CoA(malonyl-CoA)를 생산한다. 이 반응은 아세틸-CoA 카복실라아제 복합체에 의해 촉매되는데, 이 복합체는 세 개의 효소로 구성되어 있고, 효소 활성을 위해 ATP뿐만 아니라 Mn^{2+}과 바이오틴을 요구한다. 말로닐-CoA의 말로닐 그룹에 있는 세 개의 탄소원자 중 두 개가 생합성 반응의 각 단계마다 지방산 사슬에 더해진다. 이 반응은 말로닐-CoA 형성과 마찬가지로 세포질에 있고 막과 결합되어 있지 않는 다효소 복합체가 필요하다. 개별적인 효소들로 구성되어 있는 이 복합체는 지방산 합성효소를 말한다. 이러한 지방산 합성 효소 복합체의 일부인 아실 운반 단백질(acyl carrier protein: ACP)은 지방산(fatty acid)의 탄소 수를 증가시키기 위한 결합에 관여한다.

[0007] 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. 그러나 슈도모나스 에어루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*)와 다른 종들의 유전자들이 함께 공동발현 되었을 때 미치는 영향에 대해서는 연구

가 미흡하다.

[0008] 식물의 유전자 도입으로 지방산을 증진시키는 연구는 많이 되어져 왔으나 본 발명에서처럼 다른 미생물의 유전자 도입으로 지방산을 생산을 개선시키는 연구가 미흡하다.

[0009] 따라서 지방산을 포함한 지질의 함량이 높은 슈도모나스의 유전자 도입과 슈도모나스에 존재하지 않는 유전자를 그람양성균으로부터 도입으로 지방산 함량을 증진하고자하였다.

[0010] 본 발명자들은 슈도모나스 에어루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*)의 지방산 생합성 대사 경로(fatty acid biosynthesis pathway)의 초기단계에서 지방산 함량 증대, 특정 대사산물을 효율적으로 생산하는 균주를 개발하기 위해서 생물학적 대사 네트워크를 이해와 유전자 삽입의 유전자 조작을 통해 재조합 균주를 개발하여 본 발명을 완성하였다.

[0011] 구체적으로, 본 발명자들은 안정적이고 효과적으로 지방산 생합성 경로를 통해 슈도모나스 에어루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*)에서 과발현시킬 수 있는 형질전환 박테리아를 개발하기 위하여 예의 노력한 결과, 슈도모나스 에어루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*)의 아세틸-CoA 카복실라제 카복실트랜스퍼라제 서브유닛 알파알파(acetyl-CoA carboxylase carboxytransferase subunit alpha)를 코딩하는 뉴클레오타이드 및/또는 말로닐-CoA-[아실운반단백질]트랜스아실라제트랜스아실라제(malonyl-CoA-[acyl-carrier-protein] transacylase)를 코딩하는 뉴클레오타이드와 스트렙토코커스 피오제네스(*Streptococcus pyogenes*)의 아실(아실운반단백질)티오에스터라제(acyl-acyl carrier protein thioesterase)를 코딩하는 뉴클레오타이드를 발현벡터에 삽입시키고, 상기 발현벡터로 슈도모나스 에어루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*)를 형질전환시키는 경우 효과적으로 지방산 생합성 경로가 과발현됨을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명의 목적은 지방산 생합성 경로와 관련된 유전자인 슈도모나스 에어루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*)의 아세틸-CoA 카복실라제 카복실트랜스퍼라제 서브유닛 알파를 코딩하는 뉴클레오타이드 및/또는 말로닐-CoA-[아실운반단백질]트랜스아실라제트랜스아실라제를 코딩하는 뉴클레오타이드 및/또는 스트렙토코커스 피오제네스(*Streptococcus pyogenes*)의 아실(아실운반단백질)티오에스터라제를 코딩하는 뉴클레오타이드를 포함하는 발현벡터로 형질전환시킴으로써, 지방산 생합성 경로를 증진시킨, 형질전환된 슈도모나스 에어루지노사를 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 다른 목적은 상기 형질전환된 슈도모나스 에어루지노사를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 형질전환된 슈도모나스 에어루지노사를 이용하여 지질 또는 지방산을 대량 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 스트렙토코커스 피오제네스로부터 유래한 아실(아실운반단백질)티오에스터라제를 코딩하는 뉴클레오타이드를 포함하는 발현벡터로 형질전환된, 지방산 과발현용 슈도모나스 에어루지노사를 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 슈도모나스 에어루지노사의 아세틸-CoA 카복실라제 카복실트랜스퍼라제 서브유닛 알파를 코딩하는 뉴클레오타이드 및 스트렙토코커스 피오제네스의 아실(아실운반단백질)티오에스터라제를 코딩하는 뉴클레오타이드를 포함하는 발현벡터로 형질전환된, 지방산 과발현용 슈도모나스 에어루지노사를 제공한다.

[0017] 또한, 본 발명은 슈도모나스 에어루지노사의 말로닐-CoA-[아실운반단백질]트랜스아실라제를 코딩하는 뉴클레오타이드와 스트렙토코커스 피오제네스의 아실(아실운반단백질)티오에스터라제를 코딩하는 뉴클레오타이드를 포함하는 발현벡터로 형질전환된, 지방산 과발현용 슈도모나스 에어루지노사를 제공한다.

[0018] 또한, 본 발명은 슈도모나스 에어루지노사의 아세틸-CoA 카복실라제 카복실트랜스퍼라제 서브유닛 알파를 코딩하는 뉴클레오타이드 및 말로닐-CoA-[아실운반단백질]트랜스아실라제를 코딩하는 뉴클레오타이드를 포함하고, 스트렙토코커스 피오제네스의 아실(아실운반단백질)티오에스터라제를 코딩하는 뉴클레오타이드를 포함하는 발현벡터로 형질전환된, 지방산 과발현용 슈도모나스 에어루지노사를 제공한다.

[0019] 또한, 본 발명은

[0020] i) 스트렙토코커스 피오제네스의 아실(아실운반단백질)티오에스터라제를 코딩하는 뉴클레오타이드를 발현벡터에 삽입시키는 단계; 및

[0021] ii) 상기 단계 i)의 발현벡터로 슈도모나스 에어루지노사를 형질전환시키는 단계를 포함하는, 지방산 과발현용 슈도모나스 에어루지노사의 제조방법을 제공한다.

[0022] 또한, 본 발명은

[0023] i) 아세틸-CoA 카복실라제 카복실트랜스퍼라제 서브유닛 알파를 코딩하는 뉴클레오타이드 또는 말로닐-CoA-[아실운반단백질]트랜스아실라제를 코딩하는 뉴클레오타이드 중 하나 또는 둘 모두, 및 스트렙토코커스 피오제네스의 아실(아실운반단백질)티오에스터라제를 코딩하는 뉴클레오타이드를 발현벡터에 삽입시키는 단계; 및

[0024] ii) 상기 단계 i)의 발현벡터로 슈도모나스 에어루지노사를 형질전환시키는 단계를 포함하는, 지방산 과발현용 슈도모나스 에어루지노사의 제조방법을 제공한다.

[0025] 아울러, 본 발명은

[0026] i) 본 발명에 따른 지방산 과발현용 슈도모나스 에어루지노사를 배양하여 지방산을 생합성하는 단계; 및

[0027] ii) 상기 단계 i)에서 생합성된 지방산을 수득하는 단계를 포함하는, 지방산 생산 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0028] 본 발명은 지방산 생합성 경로에 관여하는 유전자들을 포함하는 발현벡터로 형질전환시킨 슈도모나스 에어루지노사를 제조함으로써, 지방산 생합성 경로의 초입 단계를 과발현하여 지질의 생산을 증진할 수 있을 뿐만 아니라 지방산 자체의 함량을 증진할 수 있다. 즉, 본 발명은 당으로부터 지방산 생합성 경로에의 과발현과 다른 종의 유전자 삽입에 의한 대사 흐름 변경을 통해 지방산 생합성을 대량 생산해 내는데 효과적이다. 따라서, 본 발명은 바이오에너지 생산의 기초가 될 지방산 생산을 대량 생산하고 친환경적임을 물론이고 경제적으로도 큰 경제력을 갖출 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1은 슈도모나스 에어루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 생체 내에서 글루코즈(Glucose)에서부터 지방산까지의 지방산 생합성경로(fatty acid biosynthesis (FAS) pathway)를 보여주는 그림이다.

도 2는 대장균-슈도노마스 기반 벡터(*Escherichia coli- Pseudomonas* settle vector)인 pUCP9 구조를 보여주는 그림이다.

도 3은 대장균-슈도노마스 기반 벡터인 pUCP9에 아실-(아실운반단백질) 티오에스터라제 유전자(E.C.3.1.2.14)가 삽입되어있는 구조를 보여주는 그림이다(본 발명에서 pJS04로 명명된 벡터의 지도(map)을 나타낸다).

도 4는 대장균-슈도노마스 기반 벡터인 pUCP9에 *accA* 유전자 및 아실-(아실운반단백질) 티오에스터라제 유전자(E.C.3.1.2.14)가 삽입되어있는 구조를 보여주는 그림이다(본 발명에서 pJS05로 명명된 벡터의 지도(map)을 나타낸다).

도 5는 대장균-슈도노마스 기반 벡터인 pUCP9에 *fabD* 유전자 및 아실-(아실운반단백질) 티오에스터라제 유전자(E.C.3.1.2.14)가 삽입되어있는 구조를 보여주는 그림이다(본 발명에서 pJS06로 명명된 벡터의 지도(map)을 나타낸다).

도 6은 대장균-슈도노마스 기반 벡터인 pUCP9에 *accA* 유전자, *fabD* 유전자 및 아실-(아실운반단백질) 티오에스터라제 유전자(E.C.3.1.2.14)가 삽입되어있는 구조를 보여주는 그림이다(본 발명에서 pJS07로 명명된 벡터

의 지도(map)을 나타낸다).

도 7은 도 4 및 도 5에서 각각 만들어진 재조합 벡터가 슈도모나스 에어루지노사에서 안정적으로 형질전환되었는지 PCR로 확인한 결과를 보여주는 그림이다:

(A)는 도 3의 재조합 벡터에서 유전자들을 확인한 결과(레인 1: 사이즈마커, 레인 2: *accA*, 레인 3: 3.1.2.14); 및

(B)는 도 4의 재조합 유전자에서 유전자들을 확인 결과(레인 1: 사이즈마커, 레인 2: *fabD*, 레인 3: 3.1.2.14, 레인 4: *fabD*, 레인 5: 3.1.2.14).

도 8은 본 발명의 재조합 슈도모나스 에어루지노사들의 생장곡선을 야생종(wild type) 슈도모나스 에어루지노사와 비교한 결과를 보여주는 그래프이다.

도 9는 슈도모나스 에어루지노사를 배양한 배양액으로부터 지질을 추출하는 방법을 보여주는 그림이다.

도 10은 본 발명의 재조합 슈도모나스 에어루지노사들과 야생종 슈도모나스 에어루지노사를 각각 24시간 배양한 후 세포 내(intracellular)에서 지질(lipid)을 추출한 결과를 보여주는 그래프이다.

도 11은 본 발명의 재조합 슈도모나스 에어루지노사를 24시간 배양한 후 세포 내(intracellular)에서 추출된 지방산(fatty acid)의 함량을 GC(Gas chromatography)를 이용하여 분석한 결과를 보여주는 그림이다.

도 12는 재조합 슈도모나스 에어루지노사의 성분을 GC/MS(Gas chromatography-mass spectrometry)를 이용하여 분석한 결과를 보여주는 그림이다:

도 12a는 탄소수 16개를 가진 헥사노데카노인산(Hexadecanoic acid)을 GC/MS 분석한 결과;

도 12b는 탄소수 18개를 가진 옥타데칸산(Octadecanoic acid)을 GC/MS 분석한 결과; 및

도 12c는 탄소수 18개를 가진 9-옥타디센산(9-Octadecenoic acid)을 GC/MS 분석한 결과.

도 13은 본 발명의 재조합 슈도모나스 에어루지노사들과 야생종 슈도모나스 에어루지노사에서 헥사노데카노인산과 옥타데칸산을 IPTG 첨가 후 6시간과 배양 24시에서 각각 추출하여 정량한 결과를 보여주는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0031] 본 발명은 당으로부터 지방산 생합성 경로에 관련된 단백질을 과발현시키거나 다른 종의 유전자 삽입에 의한 대사 흐름 변경을 통해 지방산 생합성 생산을 증진시킨 형질전환 슈도모나스 에어루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*)를 제공한다.

[0032] 구체적으로, 본 발명은 스트렙토코커스 피오제네스(*Streptococcus pyogenes*)로부터 유래한 아실(아실운반단백질)티오에스터라제(acyl-acyl carrier protein thioesterase)를 코딩하는 뉴클레오타이드를 포함하는 발현벡터로 형질전환된, 지방산 과발현용 슈도모나스 에어루지노사를 제공한다.

[0033] 또한, 본 발명은 슈도모나스 에어루지노사의 아세틸-CoA 카복실라제 카복실트랜스퍼라제 서브유닛 알파(acetyl-CoA carboxylase carboxytransferase subunit alpha)를 코딩하는 뉴클레오타이드와 스트렙토코커스 피오제네스(*Streptococcus pyogenes*)의 아실(아실운반단백질)티오에스터라제를 코딩하는 뉴클레오타이드를 포함하는 발현벡터로 형질전환된, 지방산 과발현용 슈도모나스 에어루지노사를 제공한다.

[0034] 또한, 본 발명은 슈도모나스 에어루지노사의 말로닐-CoA-[아실운반단백질]트랜스아실라제(malonyl-CoA-[acyl-carrierprotein] transacylase)를 코딩하는 뉴클레오타이드와 스트렙토코커스 피오제네스의 아실(아실운반단백질)티오에스터라제를 코딩하는 뉴클레오타이드를 포함하는 발현벡터로 형질전환된, 지방산 과발현용 슈도모나스 에어루지노사를 제공한다.

[0035] 또한, 본 발명은 슈도모나스 에어루지노사의 아세틸-CoA 카복실라제 카복실트랜스퍼라제 서브유닛 알파를 코딩하는 뉴클레오타이드 및 말로닐-CoA-[아실운반단백질]트랜스아실라제를 코딩하는 뉴클레오타이드를 포함하고, 스트렙토코커스 피오제네스의 아실(아실운반단백질)티오에스터라제를 코딩하는 뉴클레오타이드를 포함하는 발현벡터로 형질전환된, 지방산 과발현용 슈도모나스 에어루지노사를 제공한다.

[0036] 본 발명의 실시예에서는 스트렙토코커스 피오제네스(*Streptococcus pyogenes*)로부터 유래한 아실(아실운반단백질)티오에스터라제를 코딩하는 뉴클레오타이드를 포함하는 발현벡터로 슈도모나스 에어루지노사를 형질전환시켜 재조합 슈도모나스 에어루지노사를 제조하였다. 또한, 본 발명의 실시예에서는 슈도모나스 에어루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*)로부터 유래한 아세틸-CoA 카복실라제 카복실트랜스퍼라제 서브유닛 알파알파를 코딩하는 뉴클레오타이드 및/또는 말로닐-CoA-[아실운반단백질]트랜스아실라제트랜스아실라제를 코딩하는 뉴클레오타이드와 스트렙토코커스 피오제네스로부터 유래한 아실(아실운반단백질)티오에스터라제를 코딩하는 뉴클레오타이드를 포함하는 발현벡터로 슈도모나스 에어루지노사를 형질전환시켜 재조합 슈도모나스 에어루지노사를 제조하였다.

[0037] 또한, 본 발명의 실시예에서는 본 발명에 따라 제조된 재조합 슈도모나스 에어루지노사들의 지질 함량이 증진되었는지 알아보기 위해 상기 균주를 배양한 후 세포로부터 지질을 추출하여 정량 분석하였다. 그 결과, 본 발명에서 개발한 모든 재조합 슈도모나스 에어루지노사 균주들은 야생종 슈도모나스 에어루지노사 보다 지질 함량이 모두 증가한 것을 확인할 수 있었다(도 10 참조).

[0038] 또한, 본 발명의 실시예에서는 본 발명에 따라 제조된 재조합 슈도모나스 에어루지노사들의 세포내 지방산 함량이 증진되었는지 알아보기 위해 상기 균주를 배양한 후 세포로부터 지방산을 추출하여 정량 분석하였다. 그 결과, 본 발명에서 개발한 모든 재조합 슈도모나스 에어루지노사 균주들은 야생종 슈도모나스 에어루지노사 보다 증가하였으며, 특히 헥사노데카노인산(Hexadecanoic acid), 옥타데칸산(Octadecanoic acid) 및 9-옥타디센산(9-Octadecenoic acid)이 다량으로 생산되어지는 것을 확인할 수 있었다(도 11 내지 도 13 참조).

[0039] 따라서, 상기 실시예들을 통해 본 발명에 따른 지방산 생합성 경로에 관여하는 유전자들을 포함하는 발현벡터로 형질전환시킨 슈도모나스 에어루지노사는, 지질의 생산을 증진할 수 있을 뿐만 아니라 지방산 자체의 함량을 증진할 수 있으므로, 지방산 대량 생산을 위해 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있다.

[0040] 본 발명에 있어서, 아세틸-CoA 카복실라제 카복실트랜스퍼라제(acetyl-CoA carboxylase carboxytransferase)는 아세틸-CoA를 말로닐-CoA로 변환하는 과정에 관여하는 촉매이며, 두 개의 알파 서브유닛과 두 개의 베타 서브유닛으로 구성된 테트라머이다. 본 발명에서 사용되는 아세틸-CoA 카복실라제 카복실트랜스퍼라제 서브유닛 알파는 상기 서브유닛 중 하나로서 *accA* 유전자가 이를 코딩하는 유전자인 것이 바람직하다.

[0041] 본 발명에 있어서, 아세틸-CoA 카복실라제 카복실트랜스퍼라제 서브유닛 알파는 슈도모나스 에어루지노사로부터 유래한 것을 사용하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 아세틸-CoA 카복실라제 카복실트랜스퍼라제 서브유닛 알파는 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 가지며, 상기 아세틸-CoA 카복실라제 카복실트랜스퍼라제 서브유닛 알파를 코딩하는 뉴클레오타이드는 서열번호 2로 기재되는 염기서열을 가지는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0042] 본 발명에 있어서, 말로닐-CoA-[아실운반단백질]트랜스아실라제 (malonyl-CoA-[acyl-carrierprotein] transacylase)는 말로닐-CoA를 말로닐-ACP로 변환하는 과정에 관여하는 촉매이며, *fabD* 유전자가 이를 코딩하는 유전자인 것이 바람직하다.

[0043] 본 발명에 있어서, 말로닐-CoA-[아실운반단백질]트랜스아실라제는 슈도모나스 에어루지노사로부터 유래한 것을 사용하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 말로닐-CoA-[아실운반단백질]트랜스아실라제는 서열번호 3으로 기재되는 아미노산 서열을 가지며, 상기 말로닐-CoA-[아실운반단백질]트랜스아실라제를 코딩하는 뉴클레오타이드는 서열번호 4로 기재되는 염기서열을 가지는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0044] 본 발명에 있어서, 아실-아실 운반단백질 티오에스터라제(acyl-acyl carrier protein thioesterase)는 지방산 생합성 경로 상에서 장쇄 지방산들의 생물학적 생산을 위해 필수적인 촉매로서 말로닐-acp에서 여러 전구체를 거쳐 긴 사슬 지방산을 얻기 위한 효소이지만 야생종 대장균이 생산하지 못하는 효소이며, 3.1.2.14 유전자가 이를 코딩하는 유전자인 것이 바람직하다.

[0045] 본 발명에 있어서, 아실-아실 운반단백질 티오에스터라제는 스트렙토코커스(*Streptococcus*)로부터 유래한 것을 사용하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 아실-아실 운반단백질 티오에스터라제는 서열번호 5로 기재되는 아미노산 서열을 가지며, 상기 아실-아실 운반단백질 티오에스터라제를 코딩하는 뉴클레오타이드는 서열번호 6으로 기재되는 염기서열을 가지는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0046] 본 발명에 있어서, 사용되는 뉴클레오타이드는 상기 언급된 서열번호의 염기서열 이외에 상기 뉴클레오타이드에 대하여 실질적인 동일성을 나타내는 염기서열을 포함할 수 있다. 상기 실질적인 동일성은, 본 발명의 뉴클레오타이드의 염기서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 배열(alignment)하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 배열된 염기서열을 분석한 경우, 바람직하게는 적어도 80% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열, 더욱 바람직하게는 적어도 90% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열, 가장 바람직하게는 적어도 95% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열을 갖는 것을 의미한다. 염기서열 비교를 위한 배열 방법은 당업계에 공지되어 있다. 서열의 배열(sequence alignment)에 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. 또한, NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)(Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-10(1990))를 통해 이용가능하며, 인터넷 상에서 blastp, blasm, blastx, tblastn and tblastx와 같은 서열 분석 프로그램과 연동되어 이용할 수 있다. BLSAT는 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/을 통해 이용할 수 있다.

[0047] 본 발명에 있어서, 발현벡터는 발현벡터의 전사에 제공되는 추가단편에 작동가능하게 연결된 관심의 폴리펩티드를 암호화하는 단편으로 구성되는 선형 또는 원형의 DNA 분자인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 이와 같은 추가단편은 프로모터 및 종료암호 서열을 포함한다. 상기 발현벡터는 하나 또는 그 이상의 복제개시점, 하나 또는 그 이상의 선택마커 및 폴리아데닐화 신호 등을 포함할 수 있다. 상기 발현벡터는 일반적으로 플라스미드 또는 바이러스 DNA로부터 유도되거나, 또는 둘 다의 요소를 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 본 발명에 있어서, 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.

[0048] 본 발명에 있어서, 발현벡터는 아세틸-CoA 카복실라제 카복실트랜스퍼라제 서브유닛 알파를 코딩하는 뉴클레오타이드 및/또는 말로닐-CoA-[아실운반단백질]트랜스아실라제를 코딩하는 뉴클레오타이드 및/또는 스트렙토코커스 피오제네스로부터 유래한 아실(아실운반단백질)티오에스터라제를 코딩하는 뉴클레오타이드는 발현 조절 서열에 작동가능하게 연결되어 상기 발현벡터 내에 삽입될 수 있다. 여기서, 상기 '작동 가능하게 연결되는(operably linked to)'은 하나의 핵산 단편이 다른 핵산 단편과 결합되어 그의 기능 또는 발현이 다른 핵산 단편에 의해 영향을 받는 것을 의미한다. 또한, 여기서, '발현 조절 서열(expression control sequence)'은 특정한 숙주 세포에서 작동 가능하게 연된 핵산 서열의 발현을 조절하는 DNA 서열을 의미한다. 이런 발현 조절 서열은 전사를 개시하기 위한 프로모터, 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보좀 결합 부위를 코딩하는 서열 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함할 수 있다.

[0049] 본 발명에 있어서, 발현벡터는 *accA* 유전자 서열 전체 및/또는 *fabD* 유전자 서열 전체 및/또는 3.1.2.14 유전자 서열 전체를 포함할 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 그러나, 본 발명의 발현벡터에는 *accA*, *fabD* 또는 3.1.2.14 유전자가 효소의 과발현 기능을 포함하여 최소한의 길이를 가지도록 꼭 필요한 부분을 포함하는 염기서열만을 서열로 정하여 삽입시키는 것이 숙주세포의 대사부담(metabolic burden)을 줄이는 측면에서 바람직하다.

[0050] 본 발명에 있어서, 발현 벡터는 *lac*I 유전자를 추가적으로 포함할 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 상기 *lac*I 유전자는 숙주 세포가 Lac 억제제를 코딩하는 유전자를 포함하고 있는지 불문하고, 프로모터를 조절할 수 있다. 이 경우 상기 *accA*, *fabD* 또는 3.1.2.14 유전자의 발현을 유도하기 위하여, IPTG(Isopropyl-β-Dthiogalactopyranoside)를 사용할 수 있다.

[0051] 본 발명에 있어서, 발현벡터는 구조유전자를 암호화하는 핵산이 삽입될 수 있고, 숙주 세포 내에서 상기 핵산을 발현할 수 있는 당 분야에 공지된 플라스미드, 바이러스 벡터 또는 기타 매개체를 의미하며 바람직하게는 플라스미드 벡터일 수 있다. 상기 플라스미드로는 슈도모나스 에어루지노사에서 복제 및 발현이 가능한 운반체라면 당업계에 공지된 그 어떠한 것이라도 사용할 수 있으며, 바람직하게는 대장균-슈도모나스 셔틀벡터 pUCP19(ATCC 87110; Schweizer, 1991)를 사용할 수 있다. 대장균-슈도모나스 셔틀벡터 pUCP19는, pUC19 벡터로부터 유래된 것으로서 두가지 호스트-범위 플라스미드 벡터이다(Schweizer H.P., Escherichia-Pseudomonas shuttle vectors derived from pUC18/19, Gene, 97(1):109-121(1991) 참조).

[0052] 본 발명에 있어서, 형질전환은 $CaCl_2$ 방법(Cohen, S.N. et al., Proc. Natl. Acac. Sci. USA, 9:2110-

2114(1973)), 하나한 방법(Cohen, S.N. et al., Proc. Natl. Acac. 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 수행되는 것이 바람직하며, 형질전환체의 안정적 제조와 효율을 높이기 위해서 전기 충격에 의한 형질전환 방법을 사용하는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0053] 본 발명에 있어서, 숙주세포로서 슈도모나스 에어루지노사는 내재적으로 지방산 생합성 경로를 가지고 있는 미생물로서, 이를 지방산 생합성 경로를 과발현하도록 형질전환 시키는 경우 안정적이고 효과적으로 상기 경로가 과발현될 수 있다. 이런 슈도모나스 에어루지노사로는 산업 미생물로 적용가능하고 그 기능이 뛰어난 야생종을 선정하는 것이 바람직하며, 슈도모나스 에어루지노사 PA14를 사용하는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0054] 또한, 본 발명은 상기 본 발명에 따른 지방산 과발현용 슈도모나스 에어루지노사를 제조하는 방법을 제공한다.

[0055] 구체적으로, 본 발명은

[0056] i) 스트렙토코커스 피오제네스의 아실(아실운반단백질)티오에스터라제를 코딩하는 뉴클레오타이드를 발현벡터에 삽입시키는 단계; 및

[0057] ii) 상기 단계 i)의 발현벡터로 슈도모나스 에어루지노사를 형질전환시키는 단계를 포함하는 제조방법을 제공한다.

[0058] 또한, 본 발명은

[0059] i) 아세틸-CoA 카복실라제 카복실트랜스퍼라제 서브유닛 알파를 코딩하는 뉴클레오타이드 또는 말로닐-CoA-[아실운반단백질]트랜스아실라제를 코딩하는 뉴클레오타이드 중 하나 또는 둘 모두, 및 스트렙토코커스 피오제네스의 아실(아실운반단백질)티오에스터라제를 코딩하는 뉴클레오타이드를 발현벡터에 삽입시키는 단계; 및

[0060] ii) 상기 단계 i)의 발현벡터로 슈도모나스 에어루지노사를 형질전환시키는 단계를 포함하는 제조방법을 제공한다.

[0061] 상기 본 발명에 따른 방법들에 있어서, 발현벡터는 구조유전자를 암호화하는 핵산이 삽입될 수 있고, 숙주 세포 내에서 상기 핵산을 발현할 수 있는 당 분야에 공지된 플라스미드, 바이러스 벡터 또는 기타 매개체를 의미하며 바람직하게는 플라스미드 벡터를 모두 사용할 수 있으며, 대장균-슈도모나스 셔틀벡터 pUCP19(ATCC 87110; Schweizer, 1991)를 사용하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0062] 상기 본 발명에 따른 방법들에 있어서, 형질전환은 $CaCl_2$ 방법(Cohen, S.N. et al., Proc. Natl. Acac. Sci. USA, 9:2110-2114(1973)), 하나한 방법(Cohen, S.N. et al., Proc. Natl. Acac. 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 있으나, 전기 충격을 사용하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0063] 또한, 본 발명은 상기 본 발명에 따른 지방산 과발현용 슈도모나스 에어루지노사를 이용하여 지방산을 대량으로 생산하는 방법을 제공한다:

[0064] 구체적으로, 본 발명은

[0065] i) 본 발명에 따른 재조합 슈도모나스 에어루지노사를 배양하여 지방산을 생합성하는 단계; 및

[0066] ii) 상기 단계 i)에서 생합성된 지방산을 수득하는 단계를 포함하는 지방산을 생산하는 방법을 제공한다.

[0067] 상기 본 발명에 따른 방법에 있어서, 형질전환된 슈도모나스 에어루지노사의 배양은 당업계에 공지된 통상의 슈도모나스 에어루지노사 배양 방법에 의해 배양될 수 있으며, LB 배지에서 37℃에서 배양하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 또한, 상기 배양은 발현 유도제인 IPTG의 존재 하에서 실시할 수 있다.

[0068] 상기 본 발명에 따른 방법에 있어서, 형질전환된 슈도모나스 에어루지노사 내에서 생합성된 지방산을 분리하는 방법은 당업계에 공지된 통상의 분리 또는 정제 방법에 따라 실시될 수 있다(참조: B. Aurousseau et al., Journal of the American Oil Chemists' Society, 57(3):1558-9331(1980); Frank C. Magne et al., Journal of the American Oil Chemists' Society, 34(3):127-129(1957)). 따라서, 상기 기술한 방법을 사용하여 형질전환된 슈도모나스 에어루지노사를 배양하는 경우 지방산 생합성 경로를 과발현하므로, 유익한 에너지원으로 사용할 수 있는 지방산을 용이하게 얻을 수 있다.

[0069] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다.

[0070] 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

실 시 예 1

[0071] **중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)을 이용한 *accA*와 *fabD* 유전자를 발현하는 재조합 플라스미드와 3.1.2.14를 암호화하는 유전자가 삽입된 플라스미드의 제조**

[0072] 슈도모나스 에어루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*) PAO1(KCCM)의 염색체를 주형으로 하여 말로닐-CoA와 말로닐-CoA:ACP을 생산하는 효소를 암호화하는 *accA*와 *fabD*의 유전자 서열(genebank, NCBI)을 증폭시키는 프라이머(primer)를 제작하여 중합효소연쇄반응(PCR, DaKaRa Korea) 방법을 통해 클로닝하였다. 또한, 스트렙토코커스 피오지네스(*Streptococcus pyogenes*) MGAS10270(ATCC)의 염색체를 주형으로 하여 슈도모나스 에어루지노사의 지방산 합성 과정에 포함되어 있지 않은 아실(아실운반단백질) 티오에스터라제(E.C 3.1.2.14)를 암호화하는 유전자 서열(GenBank, NCBI)을 증폭시키는 프라이머를 제작하여 클로닝하였다(표 1 및 2).

표 1

[0073]

유전자	생산 효소
accA	아세틸-CoA 카복실라제 카복시트랜스퍼라제 서브유닛 알파 (acetyl-CoA carboxylase, carboxytransferase, alpha subunit)
fabD	말로닐-CoA[아실운반단백질]트랜스아실라제 (malonyl-CoA-[acyl-carrier-protein]transacylase)
3.1.2.14	아실-아실 운반단백질 티오에스터라제 acyl-(acyl carrier protein) thioesterase

표 2

[0074]

유전자		프라이머 서열	서열번호	제한 효소
accA	F	5'-TCTAGACGACGGAAGCCTATGAACCCG-3'	8	XbaI
	R	5'-GGATCCTTACGGCGCGCCGTAGCTCAT-3'	9	amHI
fabD	F	5'-GGTACCCAAGGGACCTATTCAATGTCTGC-3'	10	pnI
	R	5'-GAGCTCTTCTCTCCTTTCTCTCTCTCAGG-3'	11	acI
3.1.2.14	F	5'-GAGCTCGGAGAGTATTATGGGATTAAGTTA-3'	12	acI
	R	5'-GAATTCCTAGTCTATCTCGCTTTCTGTTT-3'	13	coRI

[0075] 상기 [표 1]의 유전자들은 표적(target) 유전자들만 특이적으로 증폭하도록 제작된 [표 2]에 제공된 프라이머(primer)를 사용하여 증폭하였다. 이런 유전자들은 rbs(ribosome binding site)를 포함하여 *accA*는 972 bp, *fabD*는 963 bp 그리고 아실(아실운반단백질) 티오에스터라제를 암호화하는 유전자는 763 bp에서 증폭되었다. 각각의 중합효소연쇄반응은 통상적인 반응조건(10 mM Tris-HCl (pH9.0), 50 mM KCI, 0.1% Triton X-100, 2 mM $MgSO_4$, Taq DNA 중합효소(DaKaRa)) 아래에서 95℃/5분(denaturation), 66℃/1분(annealing), 72℃/1분

(extension)로 1회 수행한 후, 95℃/1분(denaturation), 66℃/30초(annealing), 72℃/1분(extension)로 30회 반복 수행하였다. 마지막 단계로 안정적인 신장(extension)을 위해 95℃/1분(denaturation), 66℃/1분(annealing), 72℃/5분(extension) 반응하였다. 중합효소연쇄반응 후 증폭된 DNA는 0.8% 아가로즈 젤 상에서 확인 후 정제하여 T-벡터 클로닝에 이용하였다. pGEM-T easy 벡터(DaKaRa)에 라이게이션을 수행하여 재조합 플라스미드인 pGEM-T:*accA*, pGEM-T:*fabD* 및 pGEM-T::3.1.2.14를 제작하였다. 상기 재조합 플라스미드들은 대장균(*E. coli* AG1 competent cell, Stratagene)에서 형질 전환하여 균주를 제조하였다.

실 시 예 2

[0076] **재조합 플라스미드 pJS05와 pJS06의 제조**

[0077] 상기 실시예 1의 재조합 플라스미드인 pGEM-T::3.1.2.14와 pGEM-T:*accA*, pGEM-T:*fabD*를 대장균과 슈도모나스의 셔틀 벡터인 pUCP19(ATCC, 도 2)를 상기 [표 2]에 열거된 제한효소 들로 37℃ 항온수조(water bath)에서 약 2시간 반응하였다. 각각의 DNA 절편들을 절단한 뒤 pUCP19 벡터의 다중삽입부위(multicloning site)에 도 3, 4 및 5에 개시된 것과 같이 T4 라이게이즈(Dakara)를 이용, 16℃에서 반응, 라이게이션을 하여 재조합 플라스미드를 완성하였다. 각 단계마다 삽입된 유전자의 삽입여부를 확인하기 위해 대장균(*E. coli* AG1 competentcell, stratagene)에 형질전환시킨 후 재조합 플라즈미드를 추출하여 이를 다시 원래 삽입부위의 제한효소로 처리하여 잘린 DNA 조작의 크기를 0.8% 아가로즈 젤 상에서 전기영동하여 비교하는 방법을 사용하였다.

[0078] 그 결과, 증폭된 산물을 [표 2]에 열거된 제한효소들을 이용하여 pUCP19 벡터에 도입하여 pJS04(3.1.2.14를 암호화하는 유전자 포함)(도 3), pJS05(*accA* 및 3.1.2.14를 암호화하는 유전자 포함)(도 4), pJS06(*fabD* 및 3.1.2.14를 암호화하는 유전자 포함) 및 pJS07(*accA*, *fabD* 및 3.1.2.14를 암호화하는 유전자 포함)(도 5)을 각각 제조하였다.

실 시 예 3

[0079] **슈도모나스 에어루지노사 형질전환체 제조**

[0080] 본 발명에서는 슈도모나스 에어루지노사 형질전환체의 안정적 제조와 효율을 높이기 위해 전기천공법(electroporation)에 의한 형질전환방법을 사용하였다.

[0081] 구체적으로, 전기충격에 의한 형질전환방법을 위해 16시간 동안 배양된 30 uL(0.1%)의 야생종 슈도모나스 에어루지노사 PA14(*Pseudomonas aeruginosa*) PA14PA14(ATCC, GenBank NC_008463, Julia M. Plotnikova, et al., Plant Physiol, December 2000, Vol. 124, pp. 1766-1774; Nicole T. Liberati et al., PNAS 103(8):2833-2838(2006)) 배양액을 시험관에 들어있는 3 mL의 LB(10 g/L tripton, 10 g/L NaCl, 5 g/L yeast extract)배지에 접종하여 배양액의 흡광도(absorbance)가 600 nm 파장에서 0.6에 이르렀을 때, 배양액 전체에 해당하는 3 mL의 배양액은 원심 분리(12000 rpm, 1분)하여 상등액과 세포를 분리하였다. 모아진 세포는 10% 글리세롤(glycerol) 1 mL로 1회 세척해준 후, 다시 원심분리(12000 rpm, 1분)하여 상등액과 세포로 나누어 주었다. 세포를 10% 글리세롤 80 uL로 현탁하였다. 현탁된 세포에 1 uL의 재조합 플라스미드(pJS04, pJS05, pJS06 및 pJS07)를 첨가시켰다. 상기 플라즈미드가 들어있는 분주된 80 uL의 액체는 전기천공법(electroporation)용 큐벳(BIO-RAD, Gene pulser cuvette)에 담아 BIO-RAD, Gene pulser Xcell로 전기 충격 (2500v, 25uF, 200Ω)을 가하였다. 미리 준비해둔 1 mL LB(10 g/L tripton, 10 g/L NaCl, 5 g/L yeast extract)를 첨가한 뒤 1시간 동안 200 rpm, 37℃에서 진탕 배양하였다. 배양된 형질전환체는 슈도모나스 선택 배지, 카베니실린(200 ug/mL)이 첨가된 세트리미드 아가 베이스(cetrimide agar base)(Difco)에서 단일균체가 생성될 때까지 배양하였다.

[0082] 이를 통해, 재조합 플라스미드인 pJS04, pJS05, pJS06 및 pJS07를 슈도모나스 에어루지노사 PA14 균주에 형질전환한 재조합 균주인, 슈도모나스 에어루지노사(*P.aeruginosa*) SGJS07, 슈도모나스 에어루지노사 SGJS08, 슈도모나스 에어루지노사 SGJS09와 슈도모나스 에어루지노사 SGJS10를 각각 개발하였다(표 3).

[0083] 상기 슈도모나스 에어루지노사 PA14에서 재조합된 플라즈미드의 유전자가 안정적으로 발현되고 있는지 확인하기 위해, 각각의 제조된 재조합 균주에서 플라스미드를 취해서 제한효소에 의해 절단한 결과 안정적으로 유지

되고 있음을 확인하였다(도 7).

표 3

[0084] 재조합 균주

개발균주	
슈도모나스 에어루지노사 SGJS07	슈도모나스 에어루지노사 PA14::pUCP19::3.1.2.14
슈도모나스 에어루지노사 SGJS08	슈도모나스 에어루지노사 PA14::pUCP19::accA::3.1.2.14
슈도모나스 에어루지노사 SGJS09	슈도모나스 에어루지노사 PA14::pUCP19::fabD::3.1.2.14
슈도모나스 에어루지노사 SGJS10	슈도모나스 에어루지노사 PA14::pUCP19::accA::fabD::3.1.2.14

실 시 예 4

[0085] **슈도모나스 에어루지노사의 배양 및 재조합 균주로부터 단백질의 생산**

[0086] 슈도모나스 에어루지노사 PA14 균주(GenBank NC_008463)에 형질 전환한 재조합 균주들을 LB(카베니실린 200 ㎍/㎖ 포함) 배지에 16시간정도 배양시키고 그 배양액을 다시 LB(카베니실린 200 ㎍/㎖ 포함) 배지에 접종하여 흡광도가 600 nm에서 0.6-1.0 되었을 때 글리세롤 농도가 25%가 되게 보관용 균액으로 만든 다음 -80℃에서 배양실험 시까지 저장하였다.

[0087] 상기에서 개발된 재조합 균주의 배양은 보관용 균액 30 uL을 10 mL 버텀 트튜브(bottom tube)에 들어있는 카베니실린(200 ug/mL)이 첨가된 3 mL의 LB에 16시간 동안 전 배양한 후, 이를 다시 500 mL 플라스크에 들어있는 카베니실린(200 ug/mL)이 첨가된 200 mL의 LB(10 g/L tripton, 10 g/L NaCl, 5 g/L yeast extract)배지에 0.5%의 전 배양액을 접종하여 37℃, 170 rpm 상태에서 24시간동안 배양하였다. 재조합 균주와 비교하기 위한 야생종 슈도모나스 에어루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*) PA14는 카베니실린이 들어있지 않은 LB에서 재조합 균주와 동일한 조건으로 실험을 실시하였다. 단백질 발현을 위해 배양액의 흡광도(absorbance)가 600 nm파장에서 0.6에 이르렀을 때 유도물질인 IPTG(isopropylthio -β-D-galactoside, sigma, USA)를 첨가(1 mM/mL)하여 재조합 단백질의 발현을 유도하였다. 상기 실시예를 따라 초기 유도체의 발현으로 지방산 함량의 생산증대를 비교하기 위한 종과 본 발명의 목적으로 개발된 슈도모나스 에어루지노사와 야생종의 생장곡선은 도 8에 나타내었다.

[0088] 그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이, 본 발명에서 재조합 균주, 슈도모나스 에어루지노사 SGJS07, 슈도모나스 에어루지노사 SGJS08, 슈도모나스 에어루지노사 SGJS09 및 슈도모나스 에어루지노사 SGJS10에서 야생종과 비교하여 생장이 조금 적은 것을 알 수 있었다(도 8).

[0089] 이런 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 줄이고자 하였고 생산 경로에 맞춰 두 유전자의 순서가 순서대로 연결된 되게 개발하였기 때문이라고 예상된다.

실 시 예 5

[0090] **야생종 슈도모나스 에어루지노사와 재조합 슈도모나스 에어루지노사의 세포내로부터의 지질(lipid) 함량 측정**

[0091] 지질은 Bligh-Dyer(1959)의 방법을 변형하여 추출하였다. 상기 실시예 4의 조건으로 IPTG를 첨가하여 24시간 배양한 배양액을 50 mL 튜브에 50 mL 넣어 원심분리 하여 배양된 세포, 세포를 모았다(4500 rpm for 10 min). 인산염 버퍼(Phosphate-buffer saline)(PBS, 50mM, pH7.4)에 한번 세척해준 뒤 다시 원심분리를 수행하였다. 모아진 재조합 균주들과 야생종 대장균에 메탄올 (MeOH) 2 mL을 첨가하여 볼텍싱 해주고 클로로포름($CHCl_3$) 1 mL을 첨가하여 다시 볼텍싱 해주었다. 그 다음 멸균 증류수 0.8 mL을 첨가하여 볼텍싱 해주었다. 충분한 볼텍싱 후에 다시 클로로포름 1 mL을 첨가해서 볼텍싱 해주었다. 볼텍싱 후에 원심분리 (4000 rpm for 20 mi

n)을 해준 뒤 상층액을 분리하여서 다른 튜브에 옮겨주고 이를 건조시켜서 세포 안에 포함된 지질의 양을 측정하였다. 이런 실험방법은 도 9에 나타내었다.

[0092] 그 결과, 도 10에 나타난 바와 같이, 본 발명에서 개발한 모든 재조합 슈도모나스 에어루지노사 균주들은 야생종 슈도모나스 에어루지노사 보다 지질함량이 모두 증가한 것을 확인할 수 있었다. 지질은 지방산을 포함하기 때문에 지방산 경로의 과발현을 통해 지방산 함량 증진이 지질함량을 증가시킨 것으로 사료된다.

[0093] 또한, 본 발명에서 스트렙토코커스 피오지네스의 3.1.2.14를 암호화하는 유전자가 포함되어 있는 슈도모나스 에어루지노사 SGJS07의 지질이 가장 많이 증가된 것을 확인할 수 있었다. 따라서 본 발명에서 지방산이 합성되어지는데 3.1.2.14를 암호화하는 유전자가 매우 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있었다. 지방산 생합성 경로의 도입부분에 관련된 유전자들과 3.1.2.14를 암호화하는 유전자가 같이 삽입되어 과발현된 슈도모나스 에어루지노사 SGJS08, 슈도모나스 에어루지노사 SGJS09와 슈도모나스 에어루지노사 SGJS10에서는 슈도모나스 에어루지노사의 *accA* 유전자가 포함되어 있는 슈도모나스 에어루지노사 SGJS08와 슈도모나스 에어루지노사 SGJS10에서 많이 증가된 것을 볼 수 있었고, *fabD* 유전자가 포함되어 있는 슈도모나스 에어루지노사 SGJS09에서 조금 덜 생산되어진 것이 확인되었다. 슈도모나스 에어루지노사의 *fabD* 유전자는 지방산을 생산하는데 있어 *accA*의 유전자보다 조금 저해를 받는 것으로 생각되었다.

[0094] 슈도모나스 에어루지노사의 유전자들과 스트렙토코커스 피오지네스의 유전자가 함께 발현되어지고 있는 슈도모나스 에어루지노사 SGJS08, 슈도모나스 에어루지노사 SGJS09와 슈도모나스 에어루지노사 SGJS10에서는 스트렙토코커스 피오지네스의 유전자 혼자 발현되었을 때보다 지질함량이 조금 적어지는 것을 확인할 수 있었는데 이는 다른 두 종의 유전자가 함께 과발현되었기 때문이라고 사료되어진다.

실 시 예 6

[0095] **재조합 슈도모나스 에어루지노사 세포내로부터의 지방산(fatty acid) 측정**

[0096] 상기 실시예 4의 조건으로 배양한 배양액 중 IPTG를 첨가한 후 6시간 후와 24시간 동안 세포양이 충분해 졌을 때, 세포 내에 있는 지방산(fatty acid)를 측정하기 위해서 지방산 추출을 다음과 같은 방법으로 진행하였다.

[0097] 구체적으로, 추출과정은 5 단계로 나누어지며 첫 번째 과정 배양단계로 배양액 5 mL를 원심분리(4500 rpm, 10분) 후 세포를 -80℃에 저장하였다. 두 번째 과정은 비누화(saponification) 단계로 저장된 재조합 세포들을 용액 1(NaOH 45g, MeOH 150 mL, deionized distilled water 150 mL) 1 mL을 넣고 5-10초간 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, 용액 2(6N HCl 325 mL, MeOH 275 mL) 2 mL을 넣고 5-10초 동안 볼텍스 해준 뒤 80℃에서 10분 동안 반응시켜주었다. 반응이 끝난 후에는 빨리 열을 식혀주었다. 네 번째 단계는 추출(extration) 단계로, 용액 3(Haxane/Methyl tert-Butyl Ester=1/1) 1.25 mL을 첨가하고 10분간 위아래로 흔들어 준 뒤 층이 분리 되면 아래층은 추출해서 버렸다. 다섯 번째 단계는 GC로 분석을 용이하게 하기위해 세척단계로 앞 단계의 남은 상층액에 용액 4(NaOH 10.8 g, ddW 900 mL) 3 mL을 첨가해서 5분 동안 위아래로 흔들어 준 뒤 상층액을 추출하여 GC/MS로 분석하였다. 본 발명에서 사용한 CG/MS는 5975 시리즈 MSD 및 아질런트(Agilent) 7890A이며 HP-5 컬럼(column)(30m X 0.32 mm, film thickness 0.25)을 사용하였다. 분석하기 위한 GC조건은 온도 프로그램: 440℃ 5분, 분당 3℃로 220℃까지, 분당 3℃로 250℃까지, 그리고 250℃ 5분이었으며, 이때 MS 내부온도는 160℃이었다. 상기 실시예를 따라 지방산 함량 증진을 위해 형질전환된 재조합 슈도모나스 에어루지노사와 야생종 슈도모나스 에어루지노사의 지방산 추출 분석결과를 도 11, 12 및 도 13에 나타내었다.

[0098] 그 결과, 도 11에 나타난 바와 같이, 슈도모나스 에어루지노사의 지방산 추출 분석 결과, 1. 헥사노데카노인산(Hexadecanoic acid), 2. 옥타데칸산(Octadecanoic acid) 뿐만 아니라 그 사이에 3. 9-옥타디센산(9-Octadecenoic acid)이 확인되었다. 슈도모나스 에어루지노사는 2. 옥타데칸산, 즉 탄소수 18개를 가진 지방산이 3. 9-옥타디센산이 더 많이 생산되어지는 것을 확인할 수 있었다(도 11).

[0099] 또한, 이들 중 가장 많이 생산되어진 1. 헥사노데카노인산(C16), 2. 옥타데칸산(도 8)은 표준(standard) 물질을 이용하여 정량하여 도 12에 나타내었다(도 12). 헥사노데카노인산은 탄소수 16개를 가졌고 옥타데칸산은 18개의 탄소수를 가진 지방산이다. 또한, 실시예 4의 조건으로 배양되어지고 IPTG 유도 6시간 후와 배양 24시간 결과 후의 지방산 추출 결과를 도 13에 나타내었다(도 13).

[0100] 추출 결과, 도 13에 나타난 바와 같이, 헥사노데카노인산 및 옥타데칸산은 야생종 슈도모나스 에어루지노사보다 개발된 재조합 슈도모나스 에어루지노사에서 더 많이 생산되어진 것이 확인되었다. 스트렙토코커스 피오지네스의 아실(아실운반단백질)티오에스터라제를 인코딩하는 유전자의 삽입으로 지방산 함량이 증가된 것을 확인할 수 있었다. 슈도모나스 에어루지노사의 지방산 생합성 경로에서 초기단계에 관여하는 필수적 효소들을 암호화하는 유전자가 삽입되어진 슈도모나스 에어루지노사 SGJS07, 슈도모나스 에어루지노사 SGJS08 및 슈도모나스 에어루지노사 SGJS09는 야생종보다는 지방산 함량이 증가했지만 서로 차이가 많이 나지 않고 비슷하게 증가한 것을 확인할 수 있었다. 배양시간이 오래 지속 되어졌을 때, 즉 24시간 배양하였을 때 슈도모나스 에어루지노사 SGJS10의 헥사노데카노인산 및 옥타데칸산이 가장 많이 증가했음을 확인할 수 있었다. 야생종과 재조합 슈도모나스는 시간이 지남에 따라 헥사노데카노인산이 증가하고 시간이 지남에 옥타데칸산이 감소하는 경향을 보였으나, 슈도모나스 에어루지노사 SGJS10는 오랜 배양에서도 모두가 증가한 것을 확인할 수 있었다.

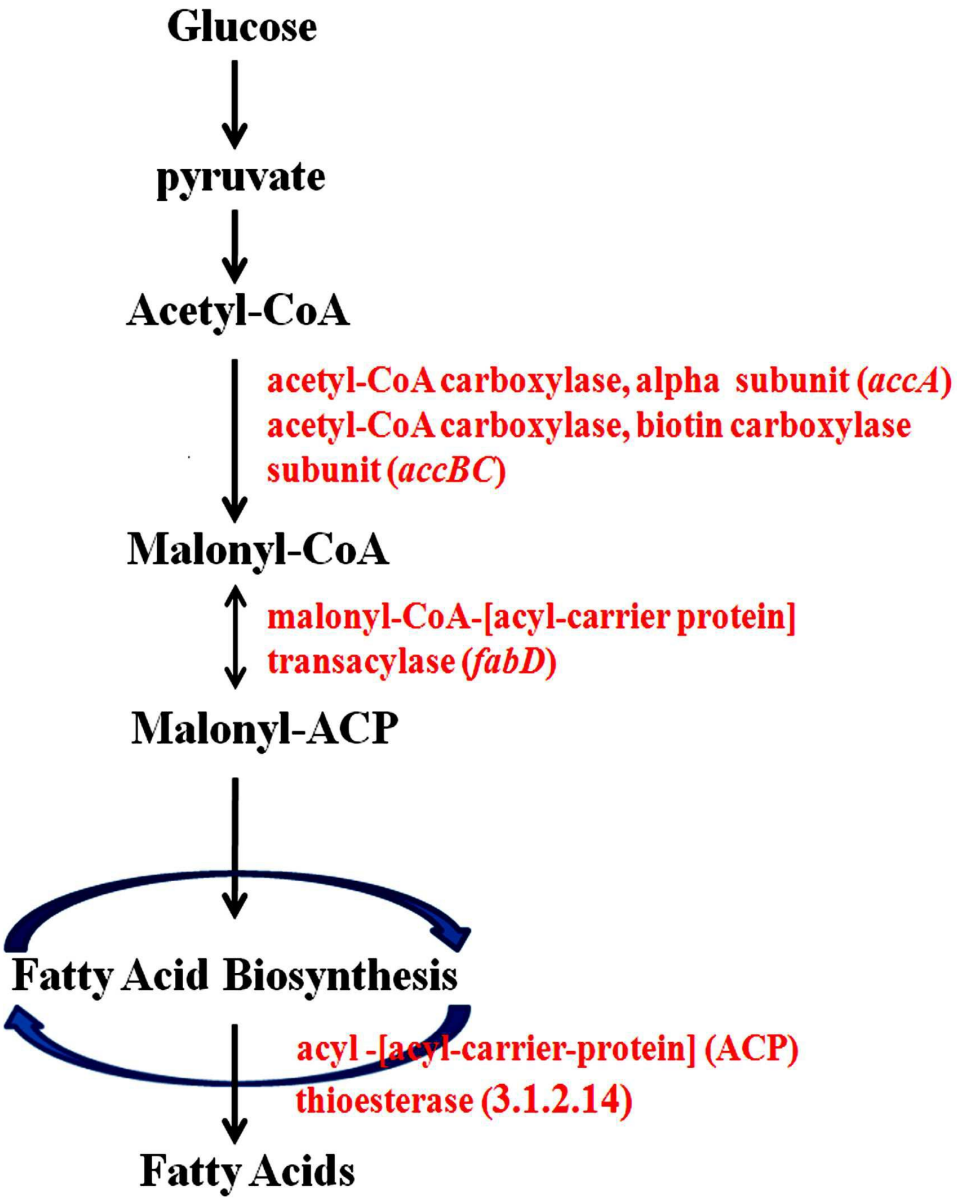
[0101] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 범위는 본 명세서에 기재된 발명뿐만 아니라 그와 동일한 사상 및 범위를 모두 포함하는 것은 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 자명할 것이다.

산업상 이용가능성

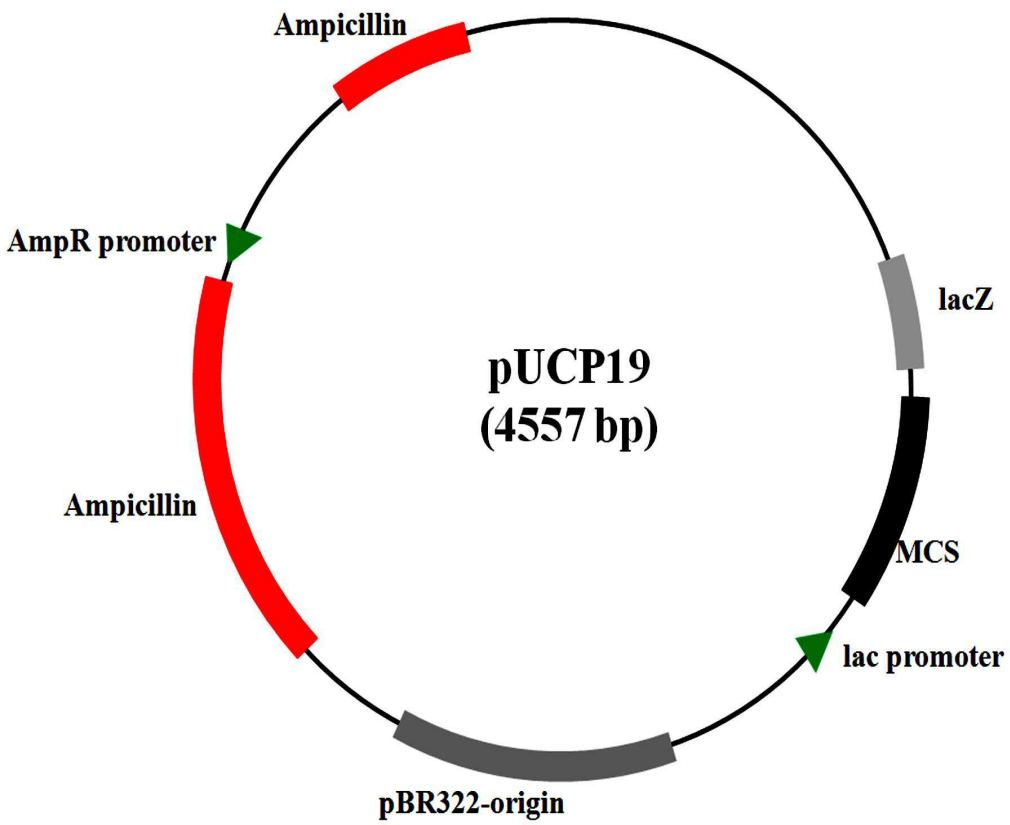
[0102] 상기에서 보는 바와 같이, 본 발명은 포도당으로부터 지방산까지의 지방산 생합성 경로에 관여하는 효소의 과발현과 다른 종의 유전자 삽입에 의한 대사 흐름 변경을 통해, 지방산을 대량 생산할 수 있다. 따라서, 본 발명은 바이오에너지 생산의 기초가 될 지방산 생산을 대량 생산하고 친환경적임을 물론이고 경제적으로도 큰 경제력을 갖출 수 있을 것으로 기대된다.

도면

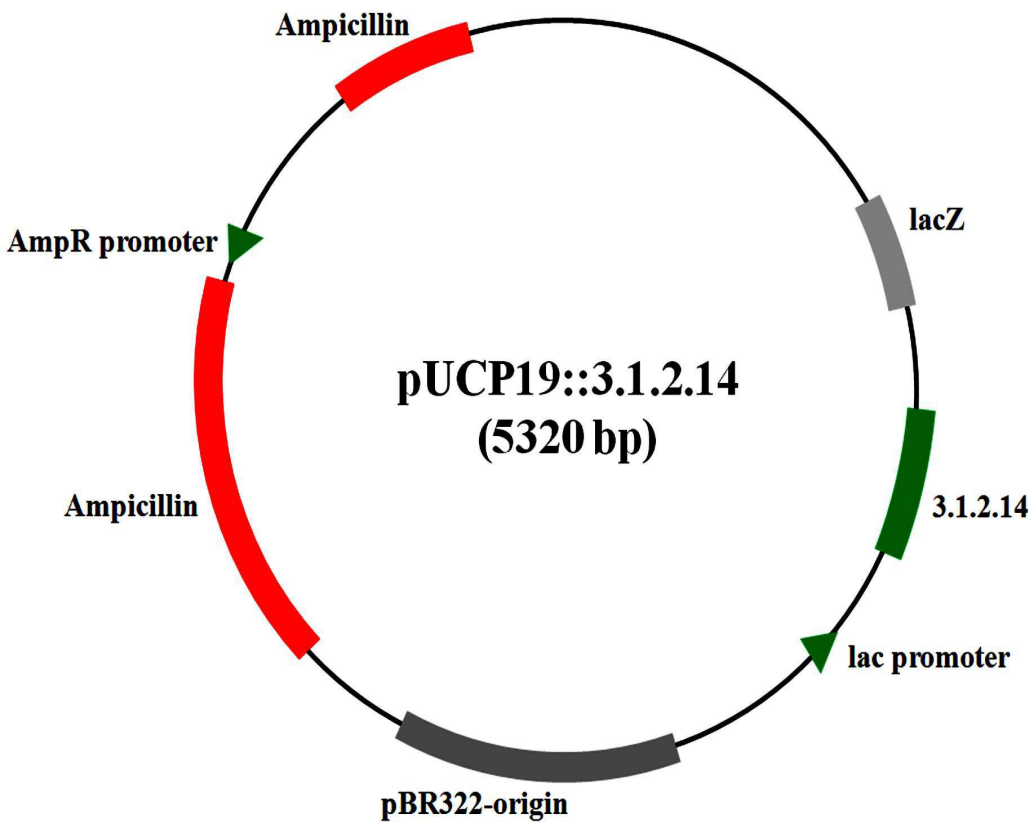
도면1


Glucose
pyruvate
Acetyl-CoA
acetyl-CoA carboxylase, alpha subunit (accA)
acetyl-CoA carboxylase, biotin carboxylase subunit (accBC)
Malonyl-CoA
malonyl-CoA-[acyl-carrier protein] transacylase (fabD)
Malonyl-ACP
Fatty Acid Biosynthesis
acyl -[acyl-carrier-protein] (ACP) thioesterase (3.1.2.14)
Fatty Acids

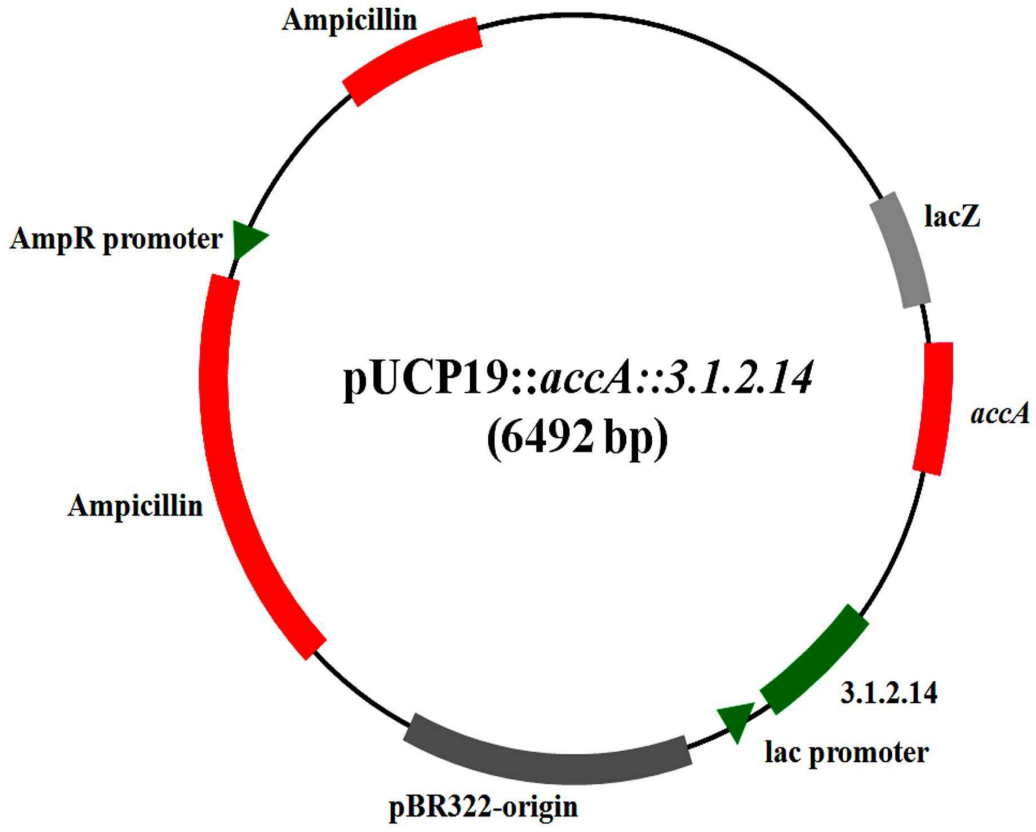
도면2


Ampicillin
AmpR promoter
lacZ
pUCP19
(4557 bp)
Ampicillin
MCS
lac promoter
pBR322-origin

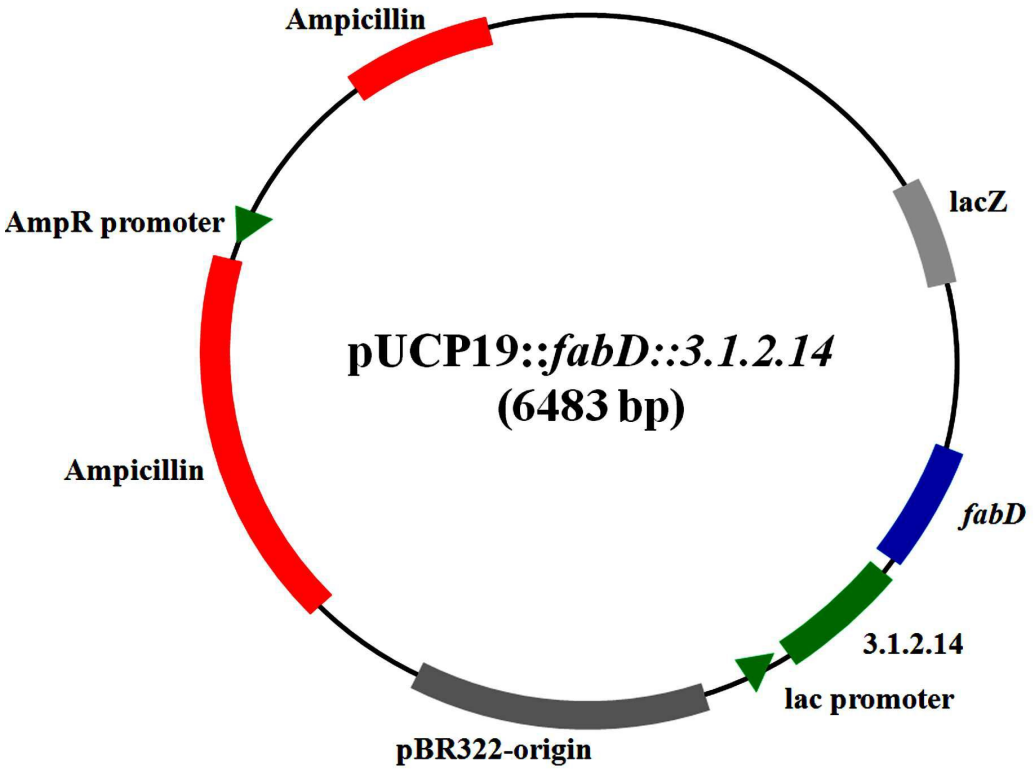
도면3


Ampicillin
AmpR promoter
lacZ
pUCP19::3.1.2.14
(5320 bp)
Ampicillin
3.1.2.14
lac promoter
pBR322-origin

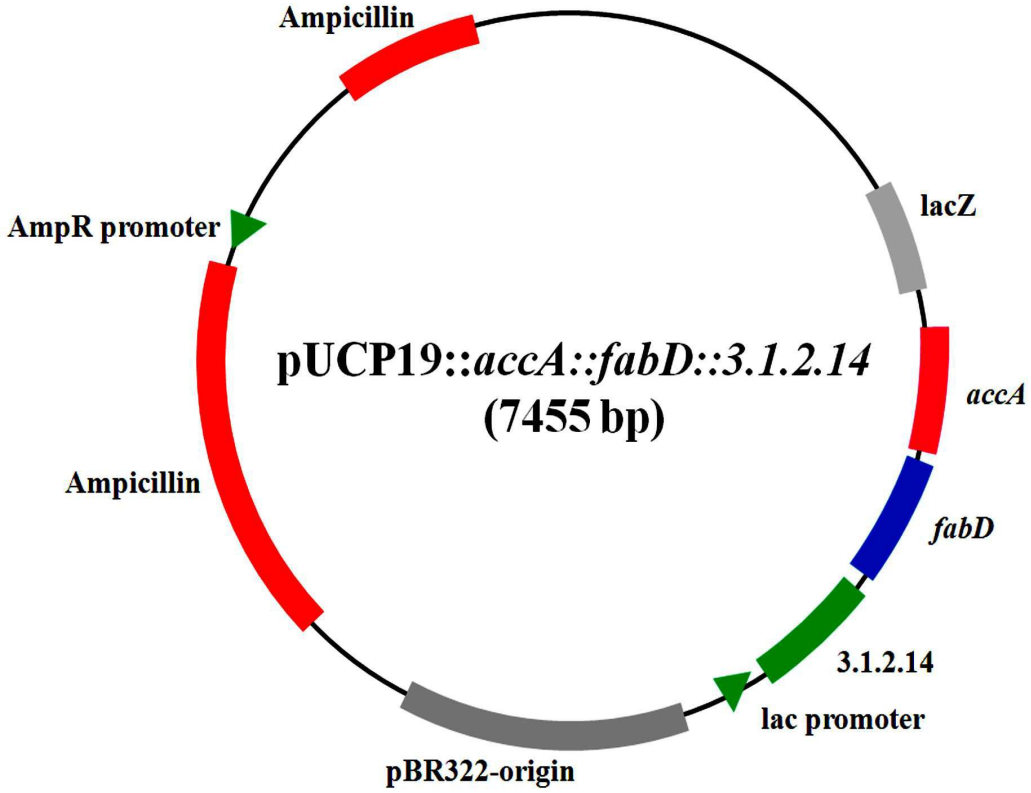
도면4


Ampicillin
AmpR promoter
lacZ
pUCP19::accA::3.1.2.14
(6492 bp)
accA
Ampicillin
3.1.2.14
lac promoter
pBR322-origin

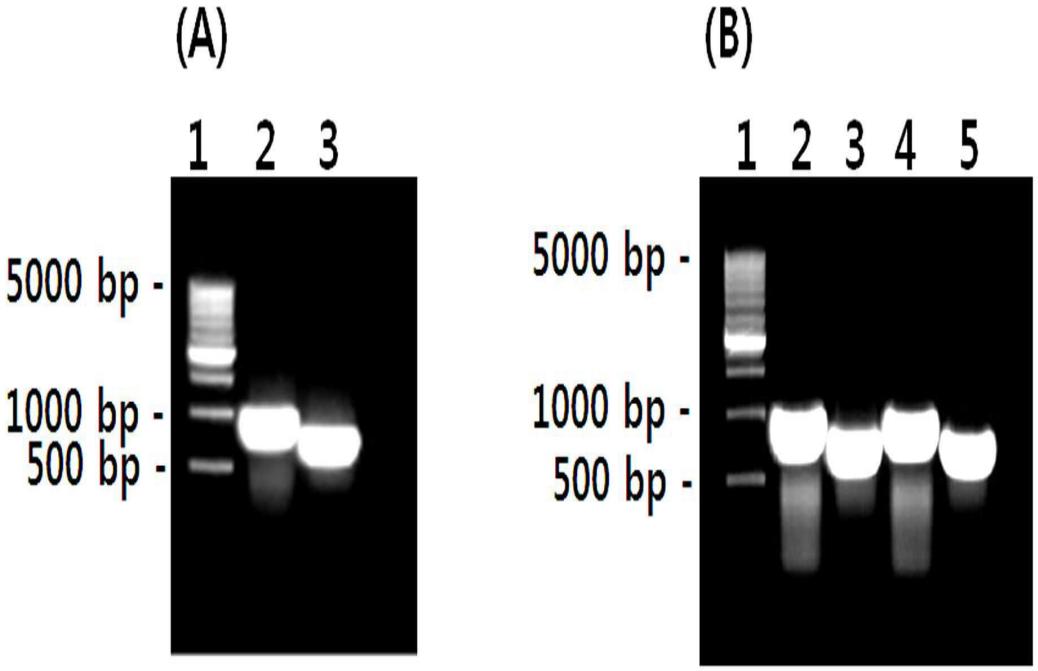
도면5


Ampicillin
AmpR promoter
lacZ
pUCP19::fabD::3.1.2.14
(6483 bp)
Ampicillin
fabD
3.1.2.14
lac promoter
pBR322-origin

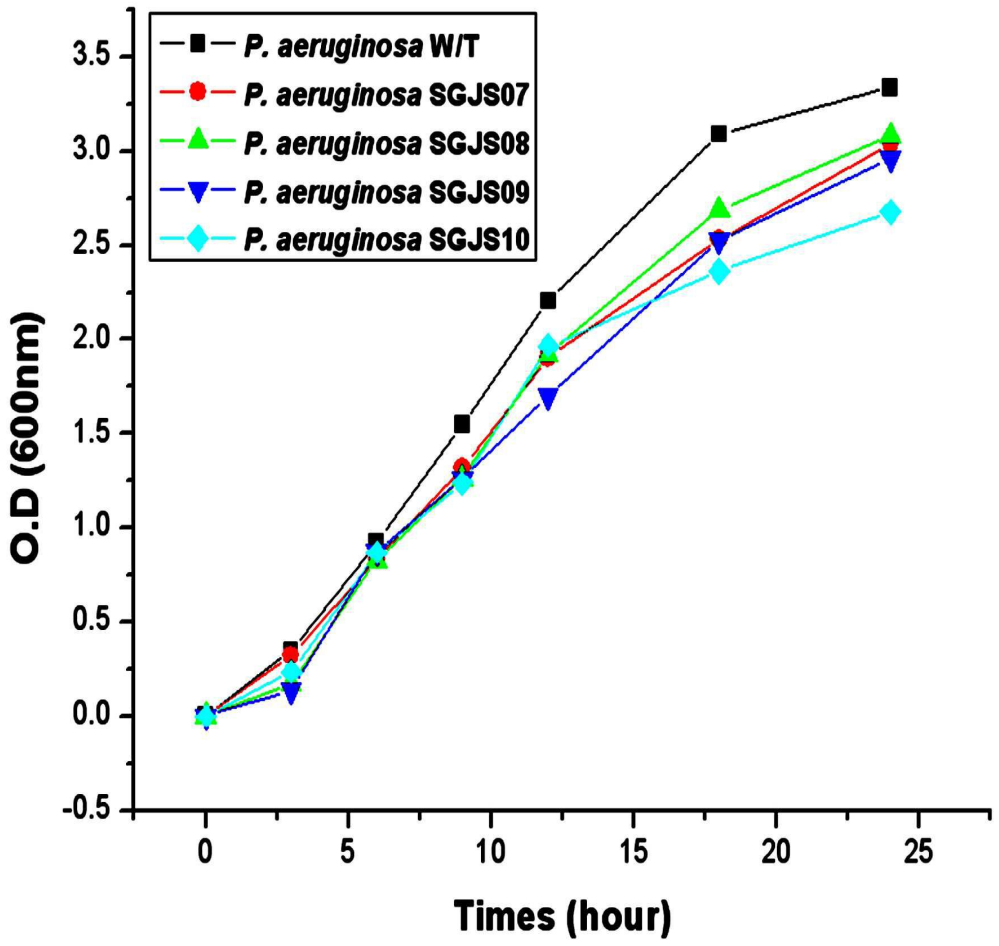
도면6


Ampicillin
AmpR promoter
lacZ
pUCP19::accA::fabD::3.1.2.14
(7455 bp)
accA
Ampicillin
fabD
3.1.2.14
lac promoter
pBR322-origin

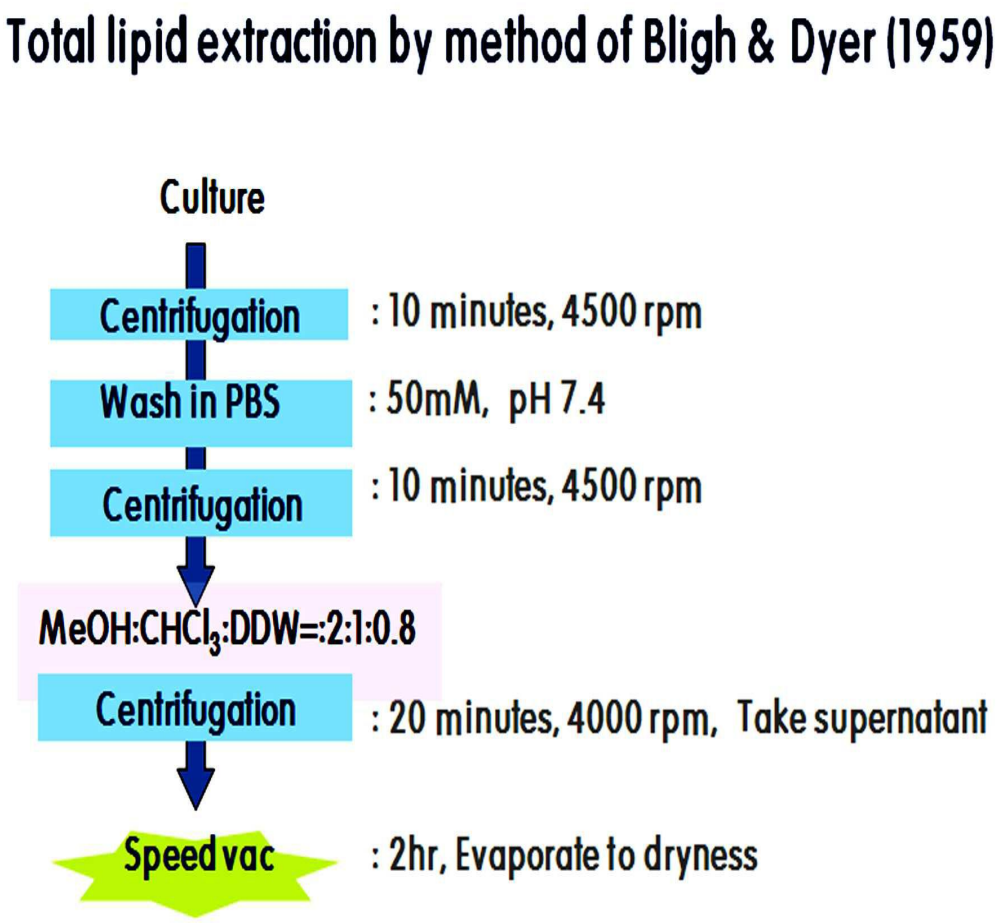
도면7


(A)
1 2 3
5000 bp -
1000 bp -
500 bp -
(B)
1 2 3 4 5
5000 bp -
1000 bp -
500 bp -

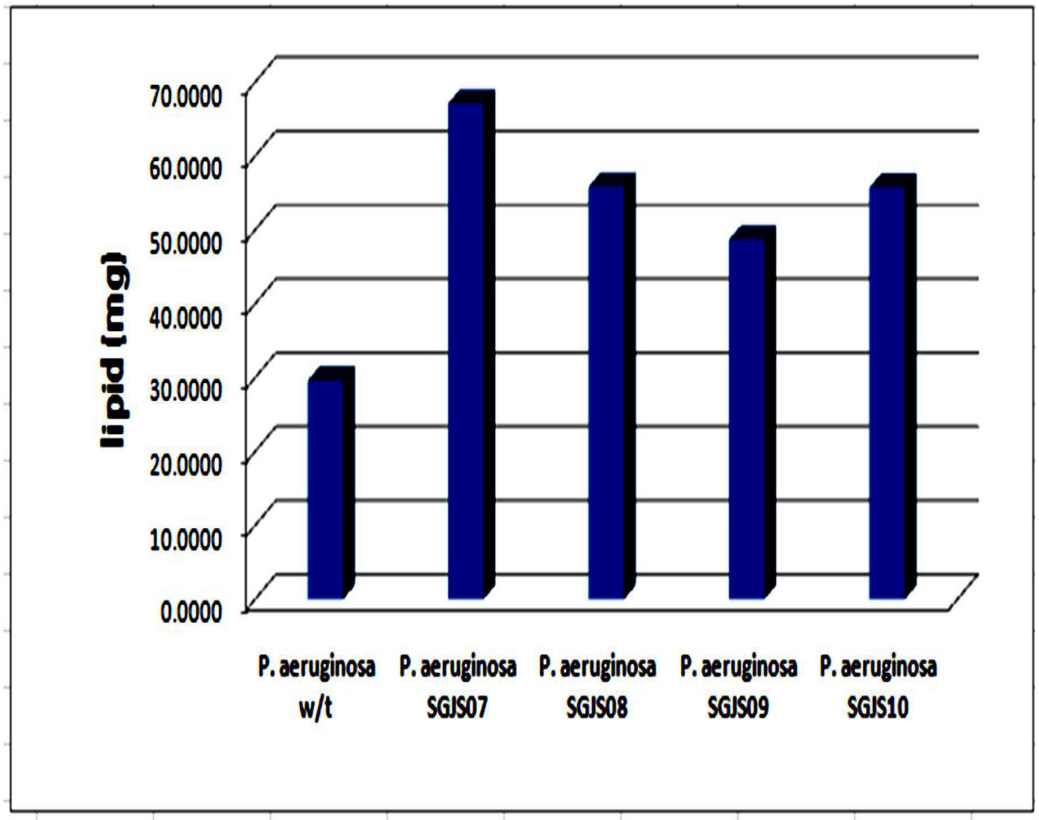
도면8


P. aeruginosa W/T
P. aeruginosa SGJS07
P. aeruginosa SGJS08
P. aeruginosa SGJS09
P. aeruginosa SGJS10
O.D (600nm)
Times (hour)
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
0
5
10
15
20
25

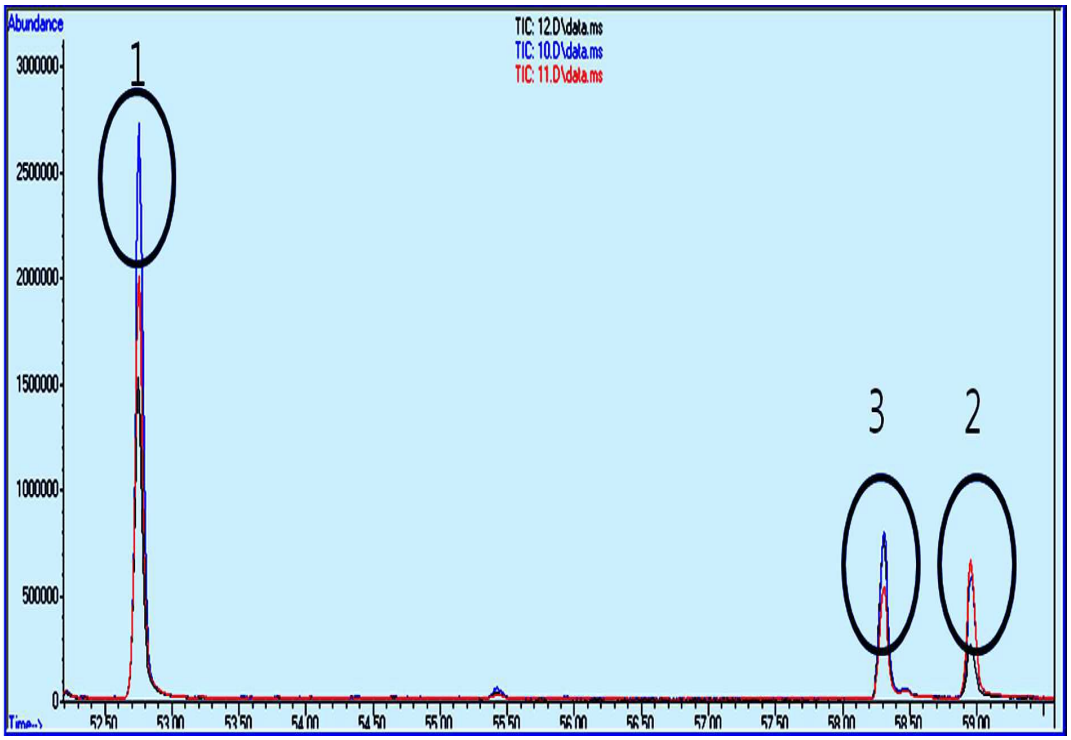
도면9


Total lipid extraction by method of Bligh & Dyer (1959)
Culture
Centrifugation
: 10 minutes, 4500 rpm
Wash in PBS
: 50mM, pH 7.4
Centrifugation
: 10 minutes, 4500 rpm
MeOH:CHCl3:DDW=:2:1:0.8
Centrifugation
: 20 minutes, 4000 rpm, Take supernatant
Speed vac
: 2hr, Evaporate to dryness

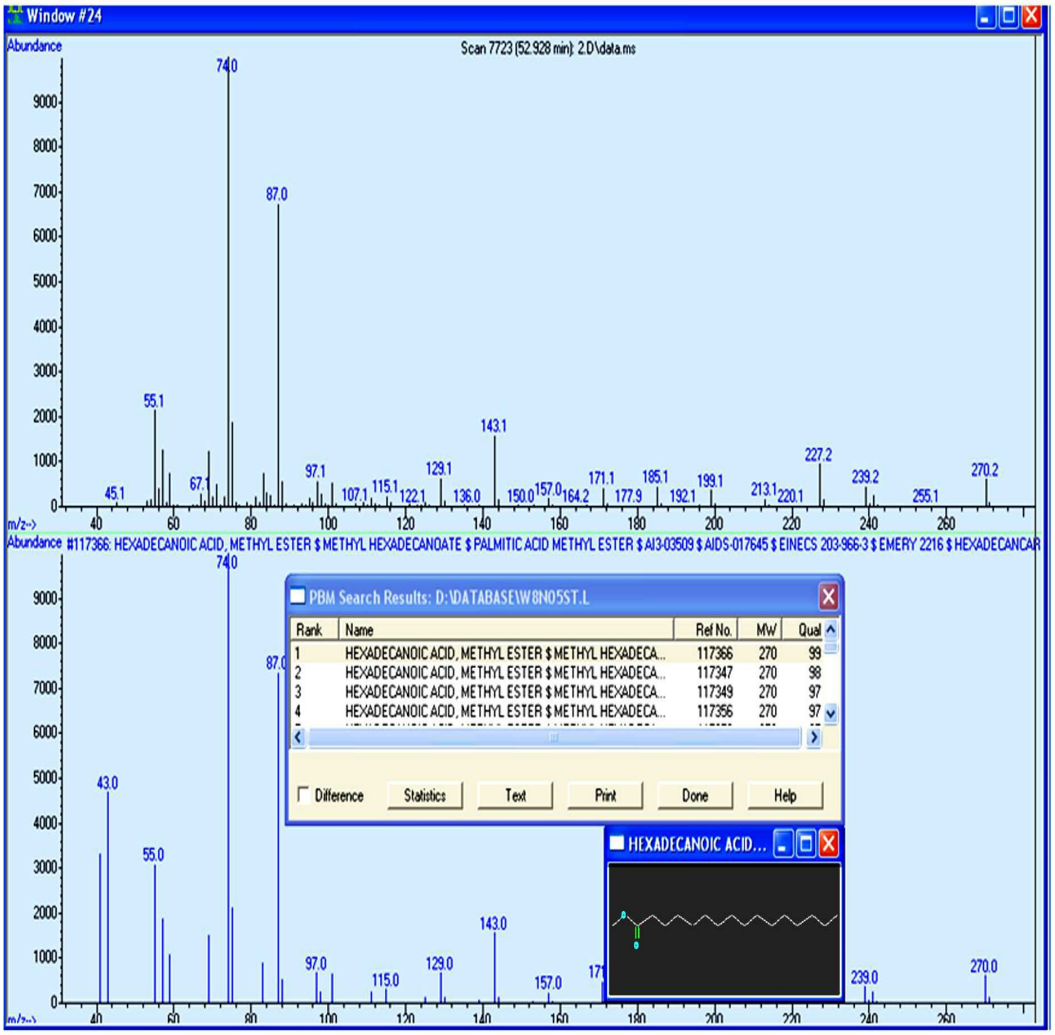
도면10


lipid (mg)
70.0000
60.0000
50.0000
40.0000
30.0000
20.0000
10.0000
0.0000
P. aeruginosa w/t
P. aeruginosa SGJS07
P. aeruginosa SGJS08
P. aeruginosa SGJS09
P. aeruginosa SGJS10

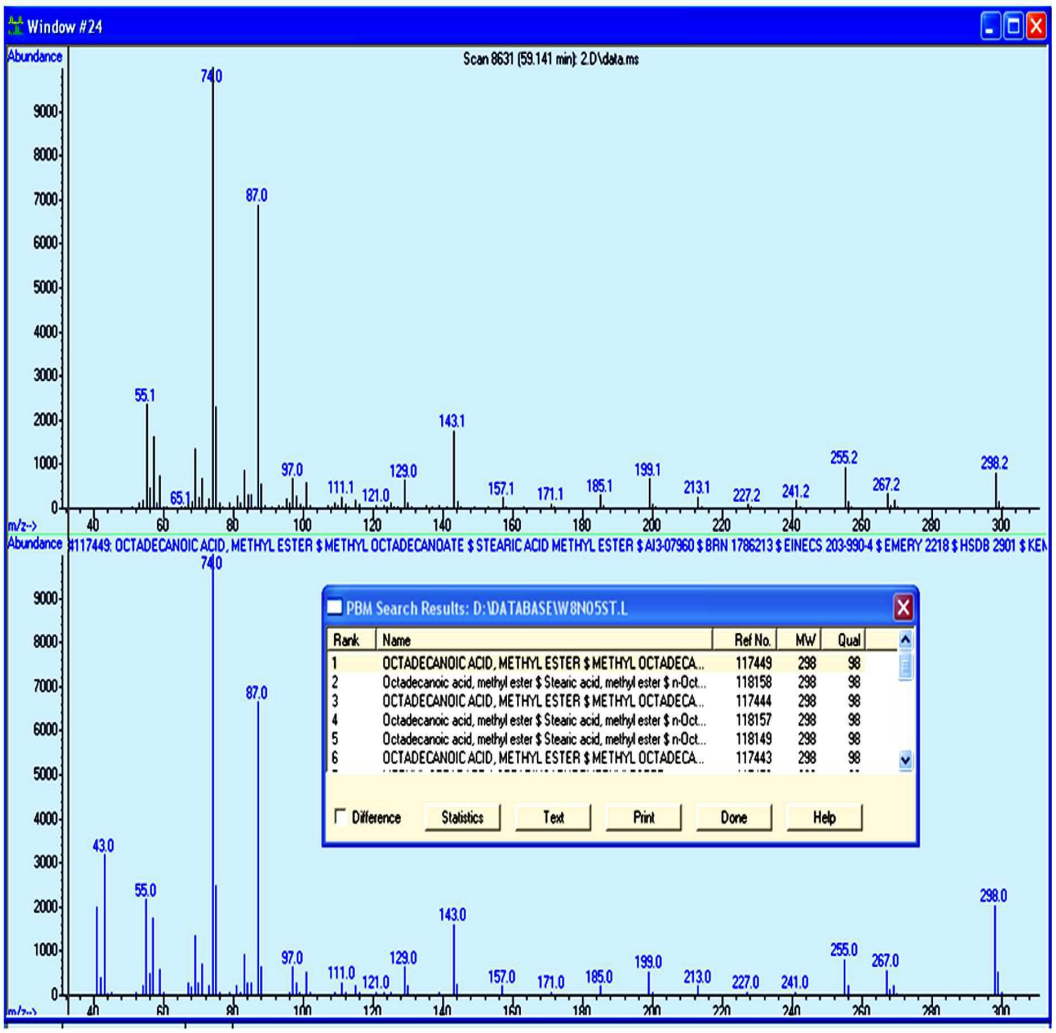
도면11


Abundance
TIC: 12.D\data.ms
TIC: 10.D\data.ms
TIC: 11.D\data.ms
1
2
3
3000000
2500000
2000000
1500000
1000000
500000
0

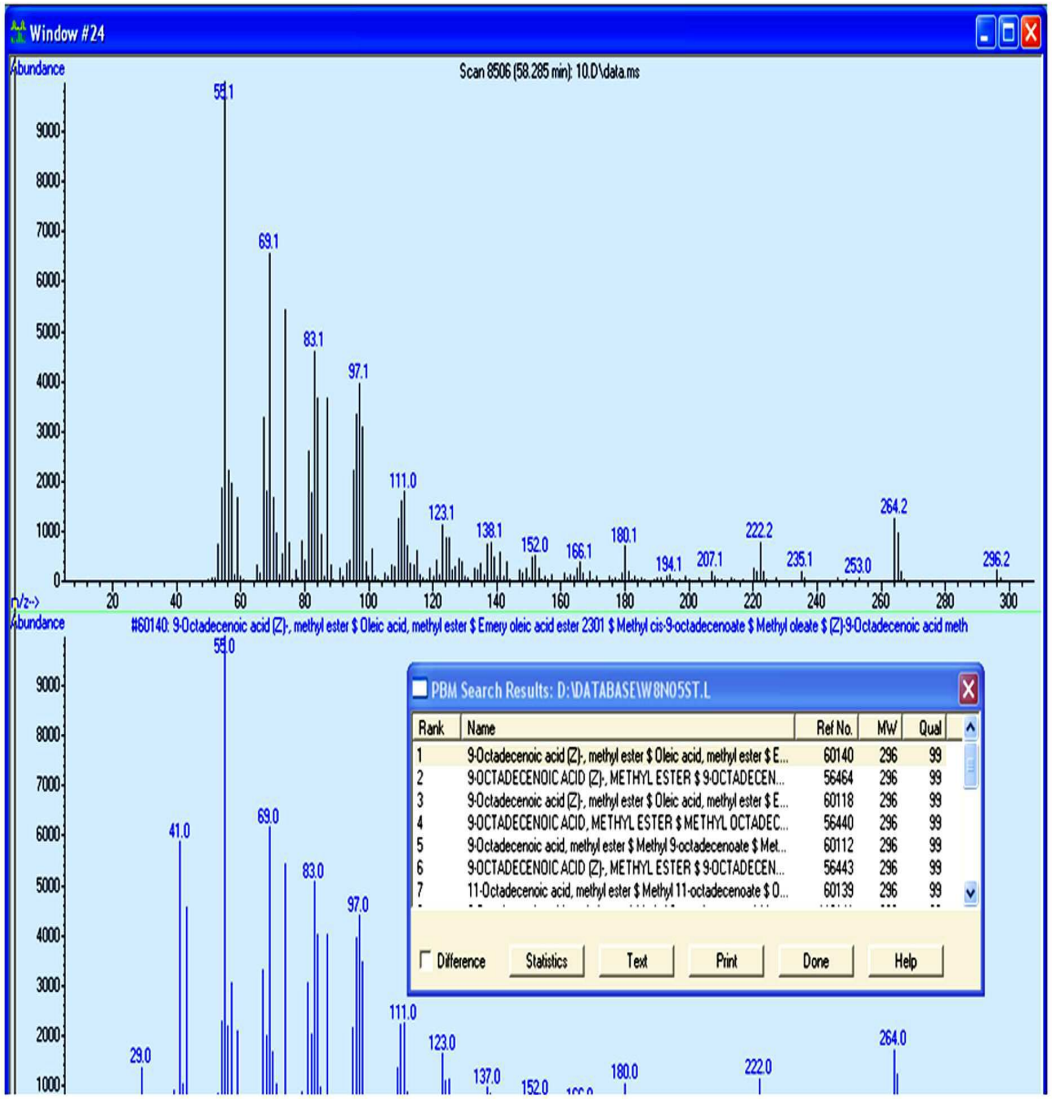
도면12a


Window #24
Abundance
Scan 7723 (52.928 min): 2.D\data.ms
74.0
87.0
55.1
143.1
97.1
129.1
227.2
239.2
270.2
m/z-->
Abundance #117366: HEXADECANOIC ACID, METHYL ESTER $ METHYL HEXADECANOATE $ PALMITIC ACID METHYL ESTER $ AI3-03509 $ AIDS-017645 $ EINECS 203-966-3 $ EMERY 2216 $ HEXADECANCAR
PBM Search Results: D:\DATABASE\W8N05ST.L
Rank
Name
Ref No.
MW
Qual
1 HEXADECANOIC ACID, METHYL ESTER $ METHYL HEXADECA... 117366 270 99
2 HEXADECANOIC ACID, METHYL ESTER $ METHYL HEXADECA... 117347 270 98
3 HEXADECANOIC ACID, METHYL ESTER $ METHYL HEXADECA... 117349 270 97
4 HEXADECANOIC ACID, METHYL ESTER $ METHYL HEXADECA... 117356 270 97
Difference
Statistics
Text
Print
Done
Help
HEXADECANOIC ACID...
43.0
55.0
143.0
97.0
115.0
129.0
157.0
239.0
270.0

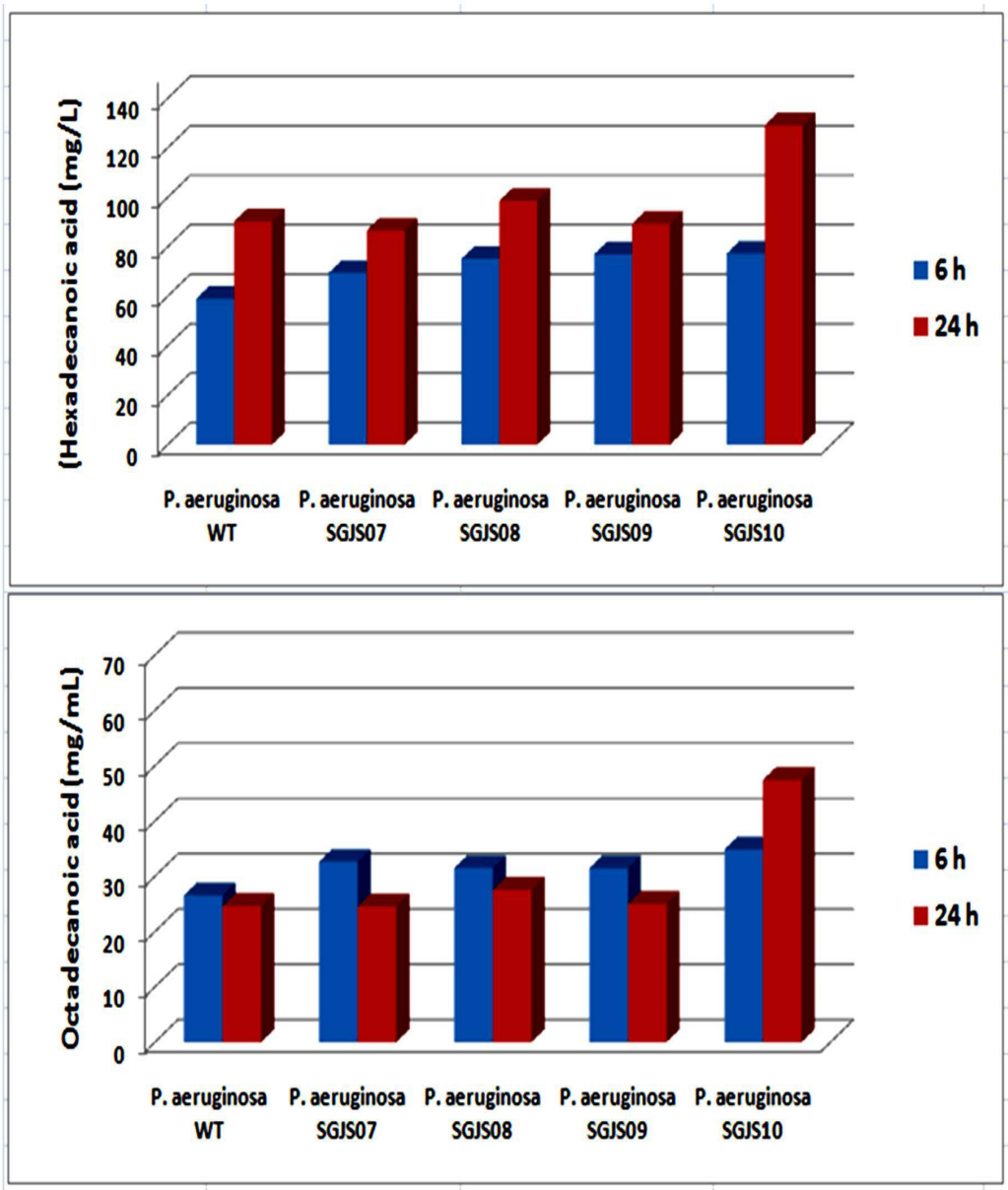
도면12b


Window #24
Abundance
Scan 8631 (59.141 min): 2.D\data.ms
m/z-->
#117449: OCTADECANOIC ACID, METHYL ESTER $ METHYL OCTADECANOATE $ STEARIC ACID METHYL ESTER $ AI3-07960 $ BRN 1786213 $ EINECS 203-990-4 $ EMERY 2218 $ HSDB 2901 $ KEA
PBM Search Results: D:\DATABASE\W8N05ST.L
Rank | Name | Ref No. | MW | Qual
1 OCTADECANOIC ACID, METHYL ESTER $ METHYL OCTADECA... 117449 298 98
2 Octadecanoic acid, methyl ester $ Stearic acid, methyl ester $ n-Oct... 118158 298 98
3 OCTADECANOIC ACID, METHYL ESTER $ METHYL OCTADECA... 117444 298 98
4 Octadecanoic acid, methyl ester $ Stearic acid, methyl ester $ n-Oct... 118157 298 98
5 Octadecanoic acid, methyl ester $ Stearic acid, methyl ester $ n-Oct... 118149 298 98
6 OCTADECANOIC ACID, METHYL ESTER $ METHYL OCTADECA... 117443 298 98
Difference
Statistics
Text
Print
Done
Help

도면12c


Window #24
Abundance
Scan 8506 (58.285 min): 10.D\data.ms
55.1
69.1
83.1
97.1
111.0
123.1
138.1
152.0
166.1
180.1
194.1
207.1
222.2
235.1
253.0
264.2
296.2
m/z-->
Abundance
#60140: 9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester $ Oleic acid, methyl ester $ Emery oleic acid ester 2301 $ Methyl cis-9-octadecenoate $ Methyl oleate $ (Z)-9-Octadecenoic acid meth
PBM Search Results: D:\DATABASE\W8N05ST.L
Rank | Name | Ref No. | MW | Qual
1 | 9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester $ Oleic acid, methyl ester $ E... | 60140 | 296 | 99
2 | 9-OCTADECENOIC ACID (Z)-, METHYL ESTER $ 9-OCTADECEN... | 56464 | 296 | 99
3 | 9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester $ Oleic acid, methyl ester $ E... | 60118 | 296 | 99
4 | 9-OCTADECENOIC ACID, METHYL ESTER $ METHYL OCTADEC... | 56440 | 296 | 99
5 | 9-Octadecenoic acid, methyl ester $ Methyl 9-octadecenoate $ Met... | 60112 | 296 | 99
6 | 9-OCTADECENOIC ACID (Z)-, METHYL ESTER $ 9-OCTADECEN... | 56443 | 296 | 99
7 | 11-Octadecenoic acid, methyl ester $ Methyl 11-octadecenoate $ O... | 60139 | 296 | 99
Difference
Statistics
Text
Print
Done
Help
55.0
41.0
69.0
83.0
97.0
111.0
123.0
137.0
152.0
180.0
222.0
264.0
29.0

도면13



서 열 목 록

<110> Industry-University Cooperation Foundation Sogang University

<120> The developed Pseudomonas aeruginosa strains for improving the content of fatty acids and manufacturing method

<130> DP110217KR

<160> 13

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 316

<212> PRT

<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 1

Met Asn Pro Asn Phe Leu Asp Phe Glu Gln Pro Ile Ala Asp Leu Gln
1 5 10 15

Ala Lys Ile Glu Glu Leu Arg Leu Val Gly Asn Asp Asn Ala Leu Asn
20 25 30

Ile Ser Asp Glu Ile Ser Arg Leu Gln Asp Lys Ser Lys Ala Leu Thr
35 40 45

Glu Asn Ile Phe Gly Asn Leu Ser Ser Trp Gln Ile Ala Gln Leu Ala
50 55 60

Arg His Pro Lys Arg Pro Tyr Thr Leu Asp Tyr Ile Gly Tyr Leu Phe
65 70 75 80

Ser Asp Phe Glu Glu Leu His Gly Asp Arg His Phe Ala Asp Asp Pro
85 90 95

Ala Ile Val Gly Gly Val Ala Arg Leu Asp Gly Ser Pro Val Met Val
100 105 110

Ile Gly His Gln Lys Gly Arg Glu Val Arg Glu Lys Val Arg Arg Asn
115 120 125

Phe Gly Met Pro Arg Pro Glu Gly Tyr Arg Lys Ala Cys Arg Leu Met
130 135 140

Glu Met Ala Glu Arg Phe Lys Met Pro Ile Leu Thr Phe Ile Asp Thr
145 150 155 160

Pro Gly Ala Tyr Pro Gly Ile Asp Ala Glu Glu Arg Gly Gln Ser Glu
165 170 175

Ala Ile Ala Trp Asn Leu Arg Val Met Ala Arg Leu Lys Thr Pro Ile
180 185 190

Ile Ala Thr Val Ile Gly Glu Gly Gly Ser Gly Gly Ala Leu Ala Ile
195 200 205

Gly Val Cys Asp Gln Leu Asn Met Leu Gln Tyr Ser Thr Tyr Ser Val
210 215 220

Ile Ser Pro Glu Gly Cys Ala Ser Ile Leu Trp Lys Thr Ala Glu Lys

225 230 235 240

Ala Pro Glu Ala Ala Glu Ala Met Gly Ile Thr Ala Glu Arg Leu Lys
245 250 255
Gly Leu Gly Ile Val Asp Lys Val Ile Asp Glu Pro Leu Gly Gly Ala
260 265 270
His Arg Asp Pro Ala Ser Met Ala Glu Ser Ile Arg Gly Glu Leu Leu
275 280 285
Ala Gln Leu Lys Met Leu Gln Gly Leu Glu Met Gly Glu Leu Leu Glu
290 295 300
Arg Arg Tyr Asp Arg Leu Met Ser Tyr Gly Ala Pro

305 310 315

<210> 2

<211> 951

<212> DNA

<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 2

atgaacccga actttcttga tttcgaacag ccgatcgccg acctgcaagc caagatcgaa 60

gagctgcgcc tggtgggcaa cgacaatgcg ctgaacatca gcgacgaaat ctcgcgtctg 120

caggacaaga gcaaggcgct caccgaaaac atcttcggca atctgtccag ttggcagatc 180

gcccagctcg cgcgccatcc caagcgtccc tataccctcg actacatcgg ctacctgttc 240

agcgatttcg aggaactgca cggcgaccgg catttcgccg acgacccggc gatcgtcggc 300

ggcgttgccc gcctcgacgg ttccccggtg atggtcatcg gccaccagaa gggccgcgaa 360

gtccgtgaga aggtccggcg caacttcggc atgccgcgtc cggaaggcta tcgcaaggcc 420

tgccgcctga tggaaatggc cgaacgcttc aagatgccga tcctcacctt catcgacacg 480

cccggcgcct acccggggat cgatgccgag gaacgcggcc agagcgaggc gatcgcctgg 540

aacctgcggg tgatggcgcg actgaagacg ccgatcatcg ccaccgtgat cggcgagggc 600

ggttccggcg gcgcgctggc catcggtgtc tgcgaccagt tgaacatgct gcaatactcc 660

acctattcgg tgatctcgcc ggaaggctgc gcctccatcc tctggaagac cgccgagaag 720

gcgccggaag ccgccgaggc catgggcatc accgccgagc gcctgaaagg cctgggcatc 780

gtcgacaagg tcatcgacga accgctgggc ggcgcccatc gcgatccggc gagcatggcc 840

gaatcgatcc gtggcgaact gctggcgcaa ctgaagatgc tccagggcct ggaaatgggt 900

gagttgctgg agcgtcgtta cgaccgcctg atgagctacg gcgcgccgta a 951

<210> 3

<211> 312

<212> PRT

<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 3

Met Ser Ala Ser Leu Ala Phe Val Phe Pro Gly Gln Gly Ser Gln Ser
1 5 10 15

Leu Gly Met Leu Ala Glu Leu Gly Ala Gln Gln Ala Leu Val Arg Asp
20 25 30

Thr Phe Ala Glu Ala Ser Glu Ala Leu Gly Tyr Asp Leu Trp Ala Leu
35 40 45

Val Gln Asn Gly Pro Glu Glu Arg Leu Asn Gln Thr Asp Lys Thr Gln
50 55 60

Pro Ala Ile Leu Thr Val Ser Ile Ala Leu Trp Arg Leu Trp Leu Ala
65 70 75 80

Glu Gly Gly Ala Arg Pro Ala Phe Val Ala Gly His Ser Leu Gly Glu
85 90 95

Tyr Ser Ala Leu Val Ala Ala Glu Ser Leu Ala Phe Ala Asp Ala Val
100 105 110

Lys Leu Val Glu Arg Arg Gly Gln Leu Met Gln Gln Ala Val Pro Ala
115 120 125

Gly Gln Gly Gly Met Ala Ala Ile Leu Gly Leu Glu Asp Ala Asp Val
130 135 140

Leu Ala Ala Cys Ala Glu Ala Ala Gln Gly Glu Val Val Ser Ala Val
145 150 155 160

Asn Phe Asn Ala Pro Gly Gln Val Val Ile Ala Gly Ala Ala Ala Ala
165 170 175

Val Glu Arg Ala Ile Glu Ala Cys Lys Ala Arg Gly Ala Lys Arg Ala
180 185 190

Val Ala Leu Pro Val Ser Val Pro Ser His Cys Glu Leu Met Arg Pro
195 200 205

Ala Ala Glu Gln Phe Ala Ala Ser Val Glu Ser Leu Gln Trp Gln Ala
210 215 220
Pro Lys Ile Ser Leu Val Gln Asn Val Ser Ala Ala Val Pro Ala Asp

225 230 235 240
Leu Asp Thr Leu Arg Arg Asp Leu Leu Ala Gln Leu Tyr Ser Pro Val
245 250 255
Arg Trp Val Glu Ser Ile Gln Leu Leu Ala Glu Lys Gly Val Thr Glu
260 265 270
Leu Val Glu Cys Gly Pro Gly Lys Val Leu Ala Gly Leu Asn Arg Arg
275 280 285
Cys Ala Lys Gly Ile Asn Thr His Gly Leu Asp Gly Val Glu Ala Phe
290 295 300

Ala Ala Thr Arg Ala Ala Leu Ala
305 310

<210> 4
<211> 939
<212> DNA
<213> Pseudomonas aeruginosa
<400> 4

atgtctgcat ccctcgcatt cgtcttccct ggccagggtt cgcaatccct cggcatgctg 60
gccgagctgg gcgcccagca ggcgctggtg cgcgatacct tcgccgaggc ctccgaggcg 120
ctcggttacg acctttgggc gctggtccag aatggtcctg aagagcgcct gaaccagacc 180
gacaagaccc agccggccat ccttacggtt tcgatcgcgc tctggcgcct ctggctggcc 240
gagggcggtg cgcgcccggc gttcgtcgcc gggcacagcc tgggcgaata ttccgcgctg 300

gtcgcggccg aaagcctggc gttcgccgat gcggtcaagc tggtcgagcg taggggccaa 360
ctgatgcagc aggcggttcc ggcggggcag ggcggcatgg ccgcgatcct tggcctggaa 420
gacgccgatg tattggcggc ctgtgccgag gcggcccagg gcgaggtggt cagcgcggtc 480
aacttcaacg cgccggggca ggtagtgatc gccggtgccg cggctgccgt tgagcgtgcc 540
atcgaggcat gcaaggcacg cggcgccaag cgcgcggtgg cgttgccagt cagcgtgccg 600
tcgcattgcg aactgatgcg tccggccgcc gagcagttcg ccgcctcggt cgaaagcctg 660
cagtggcagg cgccgaagat ttcgctggtg cagaacgtca gcgccgccgt gccggctgat 720

ctcgatacgc tgcgccgcga cctgctggca cagctgtaca gcccggttcg ctgggtggag 780

agcatccagc tgctggcgga aaagggcgtc accgagctgg tcgagtgcgg gccgggcaag 840

gtcctggcag gcctcaacag gcgctgcgcg aagggcatca atacccatgg cctggatggc 900

gtcgaggcgt tcgccgccac gcgcgccgcc ctggcctga 939

<210> 5

<211> 250

<212> PRT

<213> Streptococcus pyogenes

<400> 5

Met Gly Leu Ser Tyr Gln Glu Glu Leu Thr Leu Pro Phe Glu Leu Cys
1 5 10 15

Asp Val Lys Ser Asp Ile Lys Leu Pro Leu Leu Leu Asp Tyr Cys Leu
20 25 30

Met Val Ser Gly Arg Gln Ser Ala Gln Leu Gly Arg Ser Asn Asn Asn
35 40 45

Leu Leu Val Asp Tyr Lys Leu Val Trp Ile Val Thr Asp Tyr Glu Ile
50 55 60

Thr Ile His Arg Leu Pro His Phe Gln Glu Thr Ile Thr Ile Glu Thr
65 70 75 80

Lys Ala Leu Ser Tyr Asn Lys Phe Phe Cys Tyr Arg Gln Phe Tyr Ile

85 90 95

Tyr Asp Gln Glu Gly Gly Leu Leu Val Asp Ile Leu Ala Tyr Phe Ala
100 105 110

Leu Leu Asn Pro Asp Thr Arg Lys Val Ala Thr Ile Pro Glu Asp Leu
115 120 125

Val Ala Pro Phe Lys Thr Asp Phe Val Lys Lys Leu Tyr Arg Val Pro
130 135 140

Lys Met Pro Leu Leu Glu Gln Ser Ile Asp Arg Asp Tyr Tyr Val Arg
145 150 155 160

Tyr Phe Asp Ile Asp Met Asn Gly His Val Asn Asn Ser Lys Tyr Leu

165 170 175

Asp Trp Met Tyr Asp Val Leu Gly Cys Ala Phe Leu Lys Thr His Gln

180 185 190

Pro Leu Lys Met Thr Leu Lys Tyr Val Lys Glu Val Ser Pro Gly Gly

195 200 205

Gln Ile Thr Ser Ser Tyr His Leu Asp Gln Leu Asn Ser Tyr His Gln

210 215 220

Ile Thr Ser Asp Gly Gln Leu Asn Ala Gln Ala Met Ile Glu Trp Arg

225 230 235 240

Ala Ile Lys Gln Thr Glu Ser Glu Ile Asp

245 250

<210> 6

<211> 753

<212> DNA

<213> Streptococcus pyogenes

<400> 6

atgggattaa gttatcagga ggagttgaca cttccttttg aattatgtga tgtcaaatca 60

gatataaaat tgccccttt attagactat tgtttgatgg tttctggtag acagtctgcg 120

caattaggac gaagtaacaa caacctttta gtcgattaca agcttgtttg gattgtaacg 180

gattatgaga tcactattca tcgcttgcca cattttcaag aaaccatcac cattgaaaca 240

aaagcccttt cctataataa atttttttgt tatcgccaat tttatattta tgatcaagag 300

gggggtcttt tagtggatat cttagcctat tttgctttgt taaacccaga tacgcgaaaa 360

gtggcaacta ttccagaaga tttagtagcg ccttttaaga ctgattttgt taaaaagtta 420

taccgtgttc ctaaaatgcc tcttttagaa caatcaattg atcgtgatta ttatgtgcgt 480

tattttgata ttgatatgaa tggtcatgtc aacaacagta aatatttaga ttggatgtat 540

gatgtgttgg ggtgtgcgtt tttaaaaacg catcagcctc ttaagatgac tttgaaatat 600

gttaaagaag tctcaccagg cggtcaaatt acttccagtt accatttgga ccaattaaat 660

tcttaccatc aaatcacctc agatgggcag ctgaatgccc aagccatgat tgaatggcga 720

gcgattaaac aaacagaaag cgagatagac tag 753

<210> 7

<211> 4557

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pUCP19 Full Sequence

<400> 7

aattacacgc cactggctgt gcttgctggg gtgacggtgg caacggtggc ggccttgctg 60

ggctatcgcg ttggaaagaa acgagggaaa ggggactgat aaaccggtct tagcccctcc 120

ccttggtgtc caaccgctct gtaggcctct caggcgccgc tggtgccgct ggttggacgc 180

caagggtgaa tccgcctcga taccctgatt actcgcttcc tgcgccctct caggcggcga 240

taggggactg gtaaaacggg gattgcccag acgcctcccc cgccccttca ggggcacaaa 300

tgcggcccca acggggccac gtagtggtgc gttttttgcg tttccaccct tttcttcctt 360

ttccctttta aacctttag gacgtctaca ggccacgtaa tccgtggcct gtagagttta 420

aaaagggacg gatttgttgc cattaaggga cggatttgtt gttaagaagg gacggatttg 480

ttgttgtaaa gggacggatt tgttgtattg tgggacgcag atacagtgtc cccttataca 540

caaggaatgt cgaacgtggc ctcacccca atggtttaca aaagcaatgc cctggtcgag 600

gccgcgtatc gcctcagtgt tcaggaacag cggatcgttc tggcctgtat tagccaggtg 660

aagaggagcg agcctgtcac cgatgaagtg atgtattcag tgacggcgga ggacatagcg 720

acgatggcgg gtgtccctat cgaatcttcc tacaaccagc tcaaagaagc ggccctgcgc 780

ctgaaacggc gggaagtccg gttaacccaa gagcccaatg gcaaggggaa aagaccgagt 840

gtgatgatta ccggctgggt gcaaacaatc atctaccggg agggtgaggg ccgtgtagaa 900

ctcaggttca ccaaagacat gctgccgtac ctgacggaac tcaccaaaca gttcaccaaa 960

tacgccttgg ctgacgtggc caagatggac agcacccacg cgatcaggct ttacgagctg 1020

ctcatgcaat gggacagcat cggccagcgc gaaatagaaa ttgaccagct gcgaaagtgg 1080

tttcaactgg aaggccggta tccctcgatc aaggacttca agttgcgagt gcttgatcca 1140

gccgtgacgc agatcaacga gcacagcccg ctacaggtgg agtgggcgca gcgaaagacc 1200

gggcgcaagg tcacacatct gttgttcagt tttggaccga agaagcccgc caaggcggtg 1260

ggtaaggccc cagcgaagcg caaggccggg aagatttcag atgctgagat cgcgaaacag 1320

gctcgccctg gtgagacatg ggaagcggcc cgcgctcgac taacccagat gccgctggat 1380

ctggcctaga ggccgtggcc accacggccc ggcctgcctt tcaggctgcg caactgttgg 1440

gaagggcgat cggtgcgggc ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg gggatgtgct 1500

gcaaggcgat taagttgggt aacgccaggg ttttcccagt cacgacgttg taaaacgacg 1560

gccagtgaat tcgagctcgg tacccgggga tcctctagag tcgacctgca ggcatgcaag 1620

cttggcgtaa tcatggtcat agctgtttcc tgtgtgaaat tgttatccgc tcacaattcc 1680

acacaacata cgagccggaa gcataaagtg taaagcctgg ggtgcctaat gagtgagcta 1740

actcacatta attgcgttgc gctcactgcc cgctttccag tcgggaaacc tgtcgtgcca 1800

gctgcattaa tgaatcggcc aacgcgcggg gagaggcggt ttgcgtattg ggcgctcttc 1860

cgcttcctcg ctcactgact cgctgcgctc ggtcgttcgg ctgcggcgag cggtatcagc 1920
tcactcaaag gcggtaatac ggttatccac agaatcaggg gataacgcag gaaagaacat 1980
gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgttttt 2040
ccataggctc cgccccccctg acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc agaggtggcg 2100
aaacccgaca ggactataaa gataccaggc gtttcccccct ggaagctccc tcgtgcgctc 2160
tcctgttccg accctgccgc ttaccggata cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt 2220
ggcgctttct catagctcac gctgtaggta tctcagttcg gtgtaggtcg ttcgctccaa 2280

gctgggctgt gtgcacgaac cccccgttca gcccgaccgc tgcgccttat ccggtaacta 2340
tcgtcttgag tccaacccgg taagacacga cttatcgcca ctggcagcag ccactggtaa 2400
caggattagc agagcgaggt atgtaggcgg tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa 2460
ctacggctac actagaagaa cagtatttgg tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt 2520
cggaaaaaga gttggtagct cttgatccgg caaacaaacc accgctggta gcggtggttt 2580
ttttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaaagga tctcaagaag atcctttgat 2640
cttttctacg gggtctgacg ctcagtggaa cgaaaactca cgttaaggga ttttggtcat 2700

gagattatca aaaaggatct tcacctagat ccttttaaat taaaaatgaa gttttaaatc 2760
aatctaaagt atatatgagt aaacttggtc tgacagttac caatgcttaa tcagtgaggc 2820
acctatctca gcgatctgtc tatttcgttc atccatagtt gcctgactcc ccgtcgtgta 2880
gataactacg atacgggagg gcttaccatc tggccccagt gctgcaatga taccgcgaga 2940
cccacgctca ccggctccag atttatcagc aataaaccag ccagccggaa gggccgagcg 3000
cagaagtggt cctgcaactt tatccgcctc catccagtct attaattgtt gccgggaagc 3060
tagagtaagt agttcgccag ttaatagttt gcgcaacgtt gttgccattg ctacaggcat 3120

cgtggtgtca cgctcgtcgt ttggtatggc ttcattcagc tccggttccc aacgatcaag 3180
gcgagttaca tgatccccca tgttgtgcaa aaaagcggtt agctccttcg gtcctccgat 3240
cgttgtcaga agtaagttgg ccgcagtgtt atcactcatg gttatggcag cactgcataa 3300
ttctcttact gtcatgccat ccgtaagatg cttttctgtg actggtgagt actcaaccaa 3360
gtcattctga gaatagtgta tgcggcgacc gagttgctct tgcccggcgt caatacggga 3420
taataccgcg ccacatagca gaactttaaa agtgctcatc attggaaaac gttcttcggg 3480
gcgaaaactc tcaaggatct taccgctgtt gagatccagt tcgatgtaac ccactcgtgc 3540

acccaactga tcttcagcat cttttacttt caccagcgtt tctgggtgag caaaaacagg 3600

aaggcaaaat gccgcaaaaa agggaataag ggcgacacgg aaatgttgaa tactcatact 3660

cttccttttt caatattatt gaagcattta tcagggttat tgtctcatga gcggatacat 3720

atttgaatgt atttagaaaa ataaacaaat aggggttccg cgcacatttc cccgaaaagt 3780

gccacctgac gtctaagaaa ccattattat catgacatta acctataaaa ataggcgtat 3840

cacgaggccc tttcgtctcg cgcgtttcgg tgatgacggt gaaaacctct gacacatgca 3900

gctcccggag acggtcacag cttgtctgta agcggatgcc gggagcagac aagcccgtca 3960

gggcgcgtca gcgggtgttg gcgggtgtcg gggctggctt aactatgcgg catcagagca 4020

gattgtactg agagtgcacc atatgcggtg tgaaataccg cacagatgcg taaggagaaa 4080

ataccgcatc aggcggcaat ggcaacaacg ttgcgcaaac tattaactgg cgaactactt 4140

actctagctt cccggcaaca attaatagac tggatggagg cggataaagt tgcaggacca 4200

cttctgcgct cggcccttcc ggctggctgg tttattgctg ataaatctgg agccggtgag 4260

cgtggatctc gcggtatcat tgcagcactg gggccagatg gtaagccctc ccgtatcgta 4320

gttatctaca cgacggggag tcaggcaact atggatgaac gaaatagaca gatcgctgag 4380

ataggtgcct cactgattaa gcattggtaa ctgtcagacc aagtttactc atatatactt 4440

tagattgatt taaaacttca tttttaattt aaaaggatct aggtgaagat ccttttttgat 4500

aatctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag ttttcgttcc actgagcgtc agacccc 4557

<210> 8

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> accA forward primer

<400> 8

tctagacgac ggaagcctat gaacccg 27

<210> 9

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220

><223> accA reverse primer

<400> 9

ggatccttac ggcgcgccgt agctcat 27

<210> 10

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> fabD forward primer

<400> 10

ggtacccaag ggacctattc aatgtctgc 29

<210> 11

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> fabD reverse primer

<400> 11

gagctcttct ctcctttctc tctctcagg 29

<210> 12

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3.1.2.14 forward primer

<400> 12

gagctcggag agtattatgg gattaagtta 30

<210> 13

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3.1.2.14 reverse primer

<400> 13

gaattcctag tctatctcgc tttctgttt 29