(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0131073
(43) 공개일자 2009년12월28일

(51) Int. Cl.
C12P 1/02 (2006.01) *C12N 1/20* (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-0056856
(22) 출원일자 2008년06월17일
심사청구일자 2008년06월17일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교내
(72) 발명자
박진병
경기 고양시 덕양구 화정동 870 은빛마을 527-802
두은희
서울특별시 서대문구 대현동 45-29 201호
서진호
서울 서초구 방배동 774-19 현대멤피스아파트 101동 903호
(74) 대리인
오용주

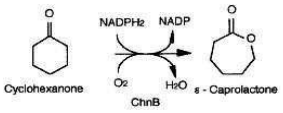
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 코리네박테리움 속의 균을 이용한 산화물의 제조방법

(57) 요 약

본 발명은 기질에 산소를 첨가하는 산화 반응을 유도하여 산화물을 제조하는 방법에 있어서, 기질에 산소를 첨가할 수 있는 산화 효소를 암호화하는 유전자로 형질전환된 코리네박테리움 속 균주를 이용하는 것을 특징으로 하는 산화물의 제조방법에 관한 것으로, 기존의 대장균을 이용하는 방법에 비해 산화물의 생산성이 월등히 증대되는 효과를 발휘한다.

대 표 도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

기질에 산소를 첨가하는 산화 반응을 유도하여 산화물을 제조하는 방법에 있어서,

기질에 산소를 첨가할 수 있는 산화 효소를 암호화하는 유전자로 형질전환된 코리네박테리움 속 균주를 이용하는 것을 특징으로 하는 산화물의 제조방법

청구항 2

제1항에 있어서,

코리네박테리움속 균은,

코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*), 코리네박테리움 암모니아게네스(*Corynebacterium ammoniagenes*)인 것을 특징으로 하는 산화물의 제조방법

청구항 3

제1항에 있어서,

산화 효소는,

베이어-빌리걸 산화효소인 것을 특징으로 하는 산화물의 제조방법

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 베이어-빌리걸 산화효소는,

시클로헥사논 모노옥시게나제인 것을 특징으로 하는 산화물의 제조방법

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 기질은,

시클로헥사논인 것을 특징으로 하는 산화물의 제조방법

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 산화물의 제조방법은,

시클로헥사논 모노옥시게나제로 형질전환된 코리네박테리움 속 균주를 포도당 제한 유가식 배양으로 배양하는 것을 특징으로 하는 산화물의 제조방법

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

<1> 본 발명은 기질에 산소를 첨가하는 산화 반응을 유도하여 산화물을 제조하는 방법에 관한 것으로, 산화 효소를 암호화하는 유전자로 형질전환된 코리네박테리움 속 균주를 이용하여 산화물을 제조하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

<2> 산화화합물은 화학촉매를 사용하는 화학적인 방법과 효소나 미생물과 같은 생물촉매를 사용하는 생물학적인 방법에 의해 제조될 수 있는데, 보통 화학적인 방법은 고온, 고압 하에서 이루어지고 독성이 강한 유기용매나 중

금속 이온들이 요구되지만, 생물학적인 방법은 산화효소(oxygenase)나 산화효소를 생산하는 미생물을 촉매로 이용하여 상온, 상압 하에서 이루어진다. 또한, 반응 중 기질을 제외한 유기용매나 중금속 이온들을 필요로 하지 않으면서도, 반응선택성이 우수하여 부산물의 생성량이 적다.

<3> 한편, 생물촉매를 이용하여 산화화합물을 제조할 때, 보통 NAD(P)H와 같은 보효소가 요구된다. 따라서 보효소 재생효율이 높은 미생물 촉매가 효소 촉매에 비해 널리 이용되고 있는데, 미생물 촉매로 널리 이용되는 것으로 산화효소를 생산하는 재조합 대장균이나 슈도모나스 속 균이 있다.

<4> 재조합 대장균은 유전자 조작과 대사 분석 및 조절, 대량배양이 용이하나, 산화반응에 필수적인 보효소의 재생 효율이 높지 않고 유기화합물에 대한 내성이 낮으며, 반응 중 초산을 생산하여 대사활성이 빠르게 저하되는 경향이 있다.

<5> 재조합 슈도모나스 속의 균은 유기화합물의 독성에 대한 내성이 높고 반응 중 초산을 생산하지 않으나 대사 분석과 조절이 어려워 재조합 대장균에 비해 생산성이 낮은 수준에 머물러 있다.

<6> 따라서, 유전자 조작과 대사 조절이 용이하고 유기화합물의 독성에 내성이 높으며 초산과 같은 대사활성 저해 물질을 적게 생산하는 미생물을 생촉매로 개발하여 산화물 제조에 사용하려는 연구가 많이 요구되고 있다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<7> 이에 본 발명은 유기화합물의 독성에 내성이 높으며 초산과 같은 대사활성 저해 물질을 적게 생산하는 미생물을 생촉매로 사용한 산화물의 제조방법을 개발하여 제공하는데 그 목적이 있다.

과제 해결수단

<8> 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 기질에 산소를 첨가하는 산화 반응을 유도하여 산화물을 제조하는 방법에 있어서, 기질에 산소를 첨가할 수 있는 산화 효소를 암호화하는 유전자로 형질전환된 코리네박테리움 속 균주를 이용하는 것을 특징으로 하는 산화물의 제조방법을 제공한다.

<9> 이하 본 발명의 과제 해결 수단에 대해 상세히 설명하고자 한다.

<10> 기질에 산소를 첨가하는 산화 반응을 유도하여 산화물을 제조하는 방법은 첨가된 기질보다 부가가치가 높은 물질을 생성할 수 있는데, 본 발명은 기질에 산화 효소를 직접 반응시켜 산화물을 제조하는 것이 아니라, 기질에 산소를 첨가할 수 있는 산화 효소를 암호화하는 유전자로 형질전환된 코리네박테리움 속 균주를 사용하여 산화물을 제조함에 특징이 있다.

<11> 미생물을 사용하는 산화물의 제조 방법은 반응 중 기질을 제외한 유기 용매나 중금속 이온들이 필요하지 않으면서도, 반응 선택성이 우수하여 부산물의 생성량이 적은 장점이 있으며, 정제 효소를 사용하는 것에 비해서는 비용적인 면에서 우수하다.

<12> 산화효소(oxygenase)는 산소첨가효소라고도 불리우며, 분자상 산소를 활성화함으로써 산화를 진행하는 산화환원 효소이다. 2개의 산소원자가 동시에 생산물 속에 포함되는데, 분자상 산소의 1원자 만이 생산물에 들어가고 다른 하나는 NAPH(DPNH) 또는 NADPH(TPNH)로부터 수소를 얻어 물을 생성한다.

<13> 본 발명은 코리네박테리움 속 균주가 산화효소를 발현 또는 과발현하도록 형질전환시키는데, 실시예 1, 실시예 2 및 비교예 1로부터 코리네박테리움 속 균주를 사용함으로써 대장균보다 산화 반응속도가 높게 나타났고, 코리네박테리움 속 균주를 이용한 산화물 제조시 비생산속도(specific product formation rate)와 부피생산성(volumetric productivity) 및 생산 수율이 대장균을 이용한 것보다 높게 나타났다.

<14> 코리네박테리움 속 균주가 대장균보다 산화 반응속도가 빠른 이유로는 3가지 정도를 추론할 수 있다.

<15> 첫째, 코리네박테리움 속 균은 NADPH의 재생속도가 높기 때문에 산화 반응속도가 대장균보다 높다. 미생물에서는 NADPH가 펜토스 포스페이트 경로(pentose phosphate pathway)와 TCA 회로의 이소사이트레이트 탈수소효소(isocitrate dehydrogenase) 및 말릭효소(malic enzyme)에 의해 재생된다. 포도당이 탄소원으로 이용될 때, 대장균의 경우 약 25%의 포도당이 펜토스 포스페이트 경로(pentose phosphate pathway)를 통해 대사 되나(J. Bacteriol. (1999) 181 (21):6679-6688), 코리네박테리움 속 균에서는 약 44%의 포도당이 펜토스 포스페이트

경로를 통해 대사 되어(J. Microbiol. Biotechnol. (2006) 16(8): 1174-1179) NADPH 재생속도가 높다.

<16> 둘째, 코리네박테리움 속 균은 산화반응 중 생물 촉매의 활성을 저하시킬 수 있는 독성 대사산물(toxic metabolite)의 생산량이 낮기 때문에 산화 반응속도가 대장균 보다 높다. 예를 들어 시클로헥사논(Cyclohexanone)을 산화시킬 경우, 대장균은 초산을 0.05g/g dry cells/h의 속도로 생산하지만(Appl. Microbiol. Biotechnol. (2007) 76:329-338) 코리네박테리움은 0.03g/g dry cells/h의 속도로 생산한다(실시예 2).

<17> 셋째, 코리네박테리움 속 균은 대장균에 비해 유기화합물의 독성에 대한 내성이 높기 때문에 산화 반응속도가 높게 유지된다. 코리네박테리움 속 균은 세포벽이 mycomembrane과 S-layer로 구성되어 있어 세포벽이 lipopolysaccharide로 구성된 대장균에 비해 유기화합물에 대한 세포벽 투과성(permeability)이 매우 낮다 (J. Biotechnol. (2003) 104:55-67).

<18> 한편, 본 발명에서 사용한 코리네박테리움 속 균은, 특정의 종류에 한정되는 것은 아니나, 바람직하게는 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*), 코리네박테리움 암모니아게네스(*Corynebacterium ammoniagenes*)인 것이 좋다.

<19> 한편, 산화 효소는 특정의 효소에 한정되는 것은 아니나, 바람직하게는 베이어-빌리걸(Baeyer-Villiger)산화효소인 것이 좋은데, 베이어-빌리걸(Baeyer-Villiger)산화효소를 이용한 산화반응은, 케톤류(ketone)의 산화반응으로서 알데하이드(aldehyde)와 달리 비교적 안정하다고 알려진 케톤 및 케톤 유도체들을 그 산화물인 에스터(ester) 및 락톤(lactone)으로 변환시키는 반응이다.

<20> 상기 베이어-빌리걸(Baeyer-Villiger)산화효소는 가장 바람직하게 시클로헥사논 모노옥시게나제(cyclohexanone monooxygenase)인 것이 좋으며, 이때 기질은 가장 바람직하게 시클로헥사논(cyclohexanone)인 것이 좋고, 기질이 시클로헥사논(cyclohexanone)일 때 산화물의 제조방법은 가장 바람직하게 시클로헥사논 모노옥시게나제로 형질전환된 코리네박테리움 속 균주를 포도당 제한 유가식 배양으로 배양하는 것이 좋다.

<21> 그리고 유가식 배양을 통한 산화물의 제조시, 가장 바람직하게 기질인 시클로헥사논은 포도당이 전부 소모되고 난 후, 공급되는 것이 좋은데 시클로헥사논이 세포의 생장을 억제하기 때문이다.

효 과

<22> 상기에서 살펴본 바와 같이 본 발명은 산화효소를 생성하도록 형질전환된 코리네박테리움 속 균주를 생물 촉매로 사용함으로써 기존의 대장균을 이용하는 방법에 비해 산화물의 생산성이 월등히 증대되는 효과를 발휘한다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<23> 이하, 본 발명의 구성 및 작용에 대해 하기 실시예에서 더욱 상세히 설명하지만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에만 한정되는 것은 아니고, 이와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 포함한다

<24> **실시예 1: ε-카프로락톤(ε-Caprolactone)의 제조**

<25> 본 실시예 1은 기질에 산소를 첨가하는 산화 반응을 유도하여 제조되는 산화물 중 ε-카프로락톤(ε-Caprolactone)을 생산하기 위해 아시네토박터(*Acinetobacter*) 유래의 시클로헥사논 모노옥시게나제(cyclohexanone monooxygenase) 유전자를 이용하여 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)을 형질전환을 시켰으며, 기질은 시클로헥사논(cyclohexanone)을 사용하였다. 기질인 시클로헥사논(cyclohexanone)으로부터 ε-카프로락톤(ε-Caprolactone)이 생산되는 반응은 도 1과 같다.

<26> **1. 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) 제조**

<27> 야생균주인 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) ATCC13032가 아시네토박터(*Acinetobacter*) 유래의 시클로헥사논 모노옥시게나제(cyclohexanone monooxygenase)를 생산하도록 재조합 플라스미드를 구축하였다. 재조합 플라스미드는 코리네박테리움 발현 벡터인 pEKEX-2(Gene (1991) 102:9398)에 아시네토박터(*Acinetobacter*) 유래의 시클로헥사논 모노옥시게나제(cyclohexanone monooxygenase) 유전자(Biotechnol. Prog. (2002) 18:262-268)를 삽입하여 만들었다.

<28> 재조합 플라스미드로 형질전환된 균을 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) pEKEx2-*chnB*로

명명하였다.

<29> **2. 상기에 제조한 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)을 이용한 ε-카프로락톤 생산**

<30> **(1) 종균 배양**

<31> 카나마이신(Kanamycin)을 함유한 'Brain heart infusion (BHI)' 한천배지에서 자란 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) 콜로니를 카나마이신(kanamycin)을 함유한 BHI 배지에서 적당시간 동안 배양을 한 후, 종균으로 사용하였다. 배양 조건은 온도는 30℃, 교반속도는 200rpm 이었다.

<32> **(2) ε-카프로락톤 생산**

<33> 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) 배양액 100 ml를 900 ml의 비오틴(biotin)이 첨가된 리젠버그 배지(Riesenberg medium)에 접종한 후 30℃에서 600rpm으로 교반하면서 배양하였다. 초기에 넣어 준 탄소원 포도당이 고갈되었을 때 포도당을 주입하는 유가식 배양을 시작하였고, 균체 농도가 5.8 g dry cells/l에 도달했을 때 'Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside(IPTG)'를 1.0 mM로 배양액에 첨가하여 시클로헥사논 모노옥시게타제(cyclhexanone monooxygenase)의 발현을 유도하였다. 이 후, 균체 농도가 7.0 g dry cells/l에 도달했을 때, 시클로헥사논(cyclohexanone)을 6.0 g/l로 첨가하여 산화반응을 시작하였다.

<34> 산화반응을 개시한 후, 5시간이 지났을 때, ε-카프로락톤(ε-caprolactone)이 5.9 g/l로 생산되었다(도 2). 산화반응 중 반응 산물의 비생산속도는 0.15 g/g dry cells/h이었고 부피생산성은 1.2 g/l/h이었으며, 생산수율은 97% 이상이었다.

<35> **실시예 2: ε-카프로락톤(ε-Caprolactone)의 제조**

<36> 상기 실시예 1과 같은 방법으로 제조된 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) 종균배양액 100 ml를 900 ml의 비오틴(biotin)이 첨가된 리젠버그 배지(Riesenberg medium)에 접종한 후, 30℃에서 1000rpm으로 교반하며 배양하였다.

<37> 탄소원이 고갈되었을 때 포도당을 이용한 유가식 배양을 시작하였고, 균체 농도가 15.0 g dry cells/l에 도달했을 때 IPTG를 1.0 mM로 배양액에 첨가하여 시클로헥사논 모노옥시게나제(cyclohexanone monooxygenase)의 발현을 유도하였으며, 균체 농도가 20.0 g dry cells/l에 도달했을 때 시클로헥사논(cyclohexanone)을 6.0 g/l로 첨가하여 산화반응을 시작하였다.

<38> 반응 중 기질 농도가 3.0 g/l 이하로 떨어지면 시클로헥사논을 추가로 첨가하였다. 산화반응 개시한 후, 7시간이 지났을 때 ε-카프로락톤(ε-caprolactone)이 16.0 g/l로 생산되었다(도 3). 반응 중 반응산물의 비생산속도는 0.12 g/g dry cells/h 었고 부피생산성은 2.3 g/l/h였으며 생산수율은 97% 이상이었다.

<39> **비교예 1: 대장균을 이용한 ε-카프로락톤의 제조**

<40> 상기 실시예 1과 같은 방법으로 아시네토박터(*Acinetobacter*) 유래의 시클로헥사논 모노옥시게나제(cyclohexanone monooxygenase) 유전자로 대장균을 형질전환을 시켰으며, 기질도 시클로헥사논(cyclohexanone)을 사용하였다.

<41> 실시예 2와 유사한 반응조건에서 실험한 결과, 반응물의 비생산 속도가 0.02 g/g dry cells/h이었고 부피생산성은 0.82 g/l/h로 나타났다(Appl. Microbiol. Biotechnol. (2007) 76:329-338).

<42> 이상의 실시예 1, 2 및 비교예 1을 종합하면, 상기 실시예 1 및 실시예 2의 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)을 이용한 ε-카프로락톤의 제조가 비교예 1의 대장균을 이용하여 ε-카프로락톤의 제조하는 것에 비해 비생산 속도(specific productivity)는 5배 이상, 부피생산성(volumetric productivity)은 2.7배 이상 높으며, 최종 반응 산물 농도는 45% 이상 높게 나타났다.

<43> 상기의 결과로부터 코리네박테리움 속 균주를 생물 촉매로 이용한 본 발명은 기존의 대장균을 이용하는 방법보다 산화물의 생산성을 월등히 증대시킬 수 있다는 사실을 확인할 수 있었다.

도면의 간단한 설명

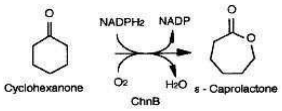
<44> 도 1은 시클로헥사논(cyclohexanone)으로부터 ε-카프로락톤(ε-Caprolactone)의 생산 과정을 나타낸다.

<45> 도 2는 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)의 성장 곡선과 초산 및 ε-카프로락톤(ε-caprolactone)의 생산 곡선을 나타낸다. 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)을 비오틴(biotin)이 첨가된 리젠버그 배지(Riesenberg medium)에 배양한 후 탄소원이 고갈되었을 때 포도당을 이용한 유가식 배양을 시작하였고, 균체 농도가 5.8 g dry cells/l에 도달했을 때 IPTG를 1.0 mM로 첨가하여 시클로헥산 모노옥시게나제(cyclohexanone monooxygenase) 생산을 유도하였으며, 균체 농도가 8.0 g dry cells/l에 도달했을 때 시클로헥산(cyclohexanone)을 6.0 g/l로 첨가하여 락톤 생산 반응을 개시하였다. 배양 온도는 30℃, 공기공급속도는 1.0 vvm, 교반속도는 600rpm, pH는 6.8로 조절되었다.

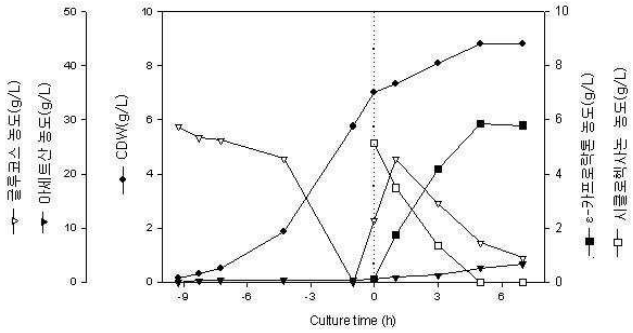
<46> 도 3은 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)의 성장 곡선과 초산 및 ε-카프로락톤(ε-caprolactone) 생산 곡선을 나타낸 도이다. 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰을 비오틴(biotin)이 첨가된 리젠버그 배지(Riesenberg medium)에 배양한 후 탄소원이 고갈되었을 때 포도당을 이용한 유가식 배양을 시작하였고, 균체 농도가 15.0 g dry cells/l에 도달했을 때 IPTG를 1.0 mM로 첨가하여 시클로헥사논 모노옥시게나제(cyclohexanone monooxygenase)의 발현을 유도하였으며, 균체 농도가 20.0 g dry cells/l에 도달했을 때 시클로헥사논(cyclohexanone)을 6.0 g/l로 첨가하여 산화반응을 개시하였다. 반응 중 기질 농도가 3.0 g/l 이하로 떨어졌을 때 시클로헥사논(cyclohexanone)을 추가로 첨가하였다. 배양 온도는 30℃, 공기공급속도는 1.0 vvm, 교반속도는 1000rpm, pH는 6.8로 조절되었다.

도면

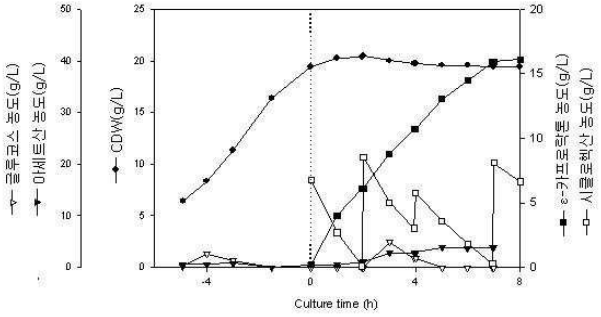
도면1



도면2



도면3


글루코스 농도(g/L)
아세트산 농도(g/L)
CDW(g/L)
ε-카프로락톤 농도(g/L)
시클로헥산 농도(g/L)
Culture time (h)