(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0029628
(43) 공개일자 2024년03월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/78 (2006.01) *C12N 1/20* (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01) *C12P 7/52* (2006.01)
C12R 1/40 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/78 (2013.01)
C12N 1/20 (2021.05)
(21) 출원번호 10-2022-0106942
(22) 출원일자 2022년08월25일
심사청구일자 2022년08월25일

(71) 출원인
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(72) 발명자
이성국
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
티와리라메쉬와르
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(74) 대리인
제일특허법인(유)

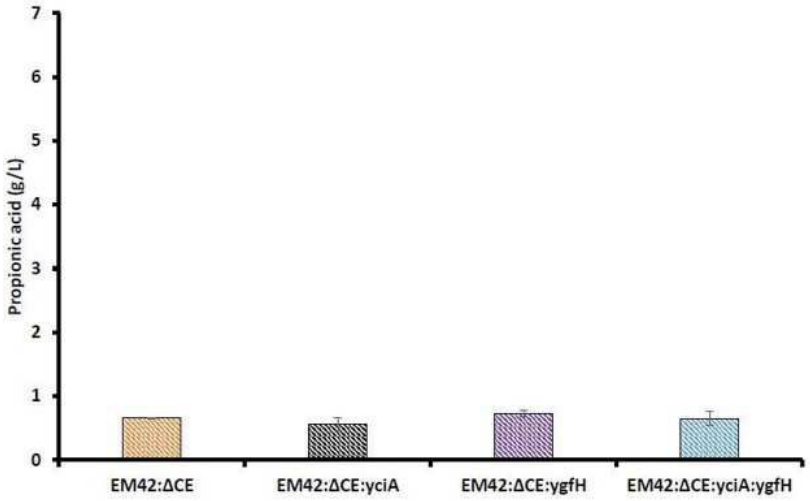
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 **재조합 슈도모나스 푸티다를 이용한 레불린산으로부터 프로피온산 생산**

(57) 요 약

본 발명은 *prpC* 유전자 및 *prpE* 유전자의 기능이 결실되고, 이종(異種) 박테리아 유래의 *yciA* 유전자 및 *ygfH* 유전자를 발현하는 형질전환 슈도모나스 푸티다에 관한 것으로, 상기 형질전환 슈도모나스 푸티다가 레불린산으로부터 프로피온산의 생산을 증대시킬 수 있으므로 이를 프로피온산 생산을 위한 비용-효과적이고 지속가능한 생물공정에서 사용할 수 있다.

대 표 도 - 도4



(52) CPC특허분류
C12N 15/52 (2013.01)
C12P 7/52 (2013.01)
C12R 2001/40 (2021.05)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711166228
과제번호 2020R1A4A1018332
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 집단연구지원
연구과제명 합성곱 신경망 기반 바이오 에너지 생산 기초 연구
기 여 율 1/2
과제수행기관명 울산과학기술원
연구기간 2022.03.01 ~ 2023.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711166498
과제번호 2018H1D3A1A01074745
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 인재활용확산지원
연구과제명 새로운 플랫폼 대장균 균주 개발을 통한 cellodextrin 기반 3-hydroxypropionate 생산
기 여 율 1/2
과제수행기관명 울산과학기술원
연구기간 2022.01.01 ~ 2022.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

i) *prpC* 유전자 및 *prpE* 유전자의 기능이 결실되고,

ii) 이종(異種) 박테리아 유래의 *yciA* 유전자 및 *ygfH* 유전자를 발현하는 형질전환 슈도모나스 푸티다.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 형질전환 슈도모나스 푸티다 제조에 사용되는 슈도모나스 푸티다는 *P. putida* EM42 균주인, 형질전환 슈도모나스 푸티다.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 *prpC* 유전자는 서열번호 1로 표시되는 염기서열인, 형질전환 슈도모나스 푸티다.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 *prpE* 유전자는 서열번호 2로 표시되는 염기서열인, 형질전환 슈도모나스 푸티다.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 *yciA* 유전자는 헤모필루스 인플루엔자(*Haemophilus influenzae*)로부터 유래하는, 형질전환 슈도모나스 푸티다.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 *yciA* 유전자는 서열번호 3으로 표시되는 염기서열인, 형질전환 슈도모나스 푸티다.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 *ygfH* 유전자는 대장균(*Escherichia coli*)으로부터 유래하는, 형질전환 슈도모나스 푸티다.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 *ygfH* 유전자는 서열번호 4로 표시되는 염기서열인, 형질전환 슈도모나스 푸티다.

청구항 9

i) 제1항의 형질전환 슈도모나스 푸티다를 레불린산 존재 하에 배양하는 단계; 및

ii) 상기 형질전환 슈도모나스 푸티다로부터 생산되는 프로피온산을 수득하는 단계를 포함하는, 프로피온산의 생산방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 레불린산은 1g/L 내지 20g/L의 농도로 배양 배지에 포함되는, 프로피온산의 생산 방법.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 형질전환 슈도모나스 푸티다의 배양시 레불린산외에 글리세롤도 추가적으로 존재 하는 것을 특징으로 하는 것인, 프로피온산의 생산 방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 레불린산은 0.1g/L 내지 20g/L의 농도로 그리고 상기 글리세롤은 0.1g/L 내지 10g/L의 농도로 배양 배지에 포함되는, 프로피온산의 생산 방법.

청구항 13

제11항에 있어서,

상기 글리세롤은 배양 시작시 내지 배양 시작 후 20시간까지 기간에 1회 내지 3회 첨가되는 것인, 프로피온산의 생산 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 재조합 슈도모나스 푸티다를 이용한 레불린산으로부터 프로피온산 생산에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 프로피온산은 C3 카복실산이며, 미국 에너지부에 의해 추천되는 유망한 2순위의 구성 요소 후보 그룹이다. 그러나, 프로피온산 생산을 위한 석유화학-기반 공정은 에틸렌, 일산화탄소 및 금속 촉매와 같은 독성 화학물질과 함께 고온 및 고압의 적용을 필요로 한다. 이것은 전체 공정을 재생불가능하고 지속불가능하게 만들어, 많은 환경 오염물을 생성한다. 따라서, 미생물 세포 공장에 의한 바이오매스-기반 기질의 프로피온산으로의 전환이 친환경적 대체 전략으로 부상하였다. 그러나, 바이오리파이너리-기반 생물 공정은 프로피온산 의 대규모 생물 제조를 위해 선택된 미생물 후보에서 생물전환 공정 및 잠재적 경로의 효율과 관련된 기술적 한계를 갖는다.

[0003] 지금까지, 높은 수준의 프로피온산 생산은 프로피오니박테리아(*Propionibacteria*) 속에 속하는 여러 후보들의 우드-워크맨(Wood-Werkman) 주기 및 혐기성 조건하에서 탄소 공급원으로 글루코스 또는 글리세롤을 사용하는 클로스트리듐 프로피오니쿰(*Clostridium propionicum*)의 환원성 아크릴레이트 경로를 통해 달성되었다. 그러나, 프로피오니박테리아 또는 클로스트리듐-기반 프로피온산 생산은 느린 성장 속도, 및 발효시 생성된 다량의 부산물로 인한 고비용의 후속 공정을 포함한 여러 제약들을 갖는다(*Food Technology and Biotechnology*, 2020, 58(2), 115-127).

[0004] 상기 통상적인 미생물 후보 이외에, 대장균과 같은 미생물 세포 공장을 프로피온산 생산하도록 조작하려는 몇몇 시도가 있었다. 대장균에서는 주로, 천연 슬리핑 뷰티 뮤타제(Sbm) 오페론 또는 프로피오니박테리움으로부터의 이종 우드-워크맨 경로의 발현을 조작하여 혐기성 조건하에서 보다 높은 프로피온산 생산을 야기하였다. 그러나, 상기 제조 공정은 낮은 역가 및 높은 부산물 생성에 의해 효율적이지 않다. 더욱이, 발효 공정 전체에 걸쳐 혐기성 조건을 유지하기 위해 고가의 질소 플러싱이 필요하여, 전체 과정이 경제적으로 실행 불가능하다.

[0005] 최근에, 슈도모나스 푸티다에서 L-트레오닌 이화작용을 조작하여 호기성 조건하에서 프로피온산을 생산하였다. 따라서, 호기성 조건하에서의 프로피온산 생산을 위해 상기 경로를 탐구할 수 있다. 또한, 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*)에서 L-트레오닌 이화작용을 조작함으로써 합성 프로피온산 경로가 구축되었으며, 이에 의해 글루코스로부터 프로피온산을 생산할 수 있는 균주가 생성되었다. 그러나, 결과물인 프로피온산 역가(1.05 g/L)는 다른 연구들에서 보고된 것에 비해 매우 낮은 것으로 측정되었다. L-트레오닌은 가축 사료, 의약품 및 화장품에 사용되는 세번째로 많이 판매되는 아미노산이다. L-트레오닌은 주로 발효 생물공정을

통해 생산되기 때문에, 프로피온산을 생산하기 위한 최적의 기질로 간주될 수 없다. 따라서, 프로피온산 생산을 위한 저-비용이면서 지속가능한 기질을 선택하는 것이 현실적으로 필요하다.

[0006] 레불린산은 리그노셀룰로스 바이오매스 기질로부터 수득된 당의 산-촉진된 탈수 및 가수분해에 의해 수득될 수 있는 γ-케토산(C5) 플랫폼 화학물질이다. 레불린산은 고가의 가수분해 효소를 사용하지 않고 생산될 수 있기 때문에, 리그노셀룰로스 바이오매스를 기반으로 하는 생물공정의 총 비용을 감소시킨다. 따라서, 레불린산은 셀룰로스 바이오매스-기반 바이오리파이너리 산업을 재활성화시킬 수 있는 지속가능한 산물로 사용될 수 있다. 뿐만 아니라, 바이오매스로부터 레불린산의 생산 비용은 레불린산 생산 기술의 발달에 의해 감소되었다. 리그노셀룰로스 바이오매스로부터 수득된 복합 당이 미생물 발효에 사용되며, 그 생산 효율은 순차적인 당 적용으로 인해 장기간 공정 작업을 통해 감소된다.

[0007] 레불린산 대사 경로의 사용은 복잡한 대사 조절이 필요 없고 기본 대사 중간체의 생산과 같은 여러 이점을 제공한다. 특히, 레불린산 활용 대사 경로가 슈도모나스 푸티다 KT2440에서 발견되었고, 더 나아가 생물학적으로 다양한 화학물질을 생산하기 위해 레불린산-기반 바이오리파이너리에서 사용되었으나, 재조합 슈도모나스 푸티다를 이용하여 레불린산으로부터 프로피온산 생산 효율을 높이는 것에 대해서는 연구가 더 필요한 실정이다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) Food Technology and Biotechnology, 2020, 58(2), 115-127

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 이에 본 발명자들은 프로피온산을 생산하는 슈도모나스 푸티다 균주의 레불린산 대사 능력을 높이기 위해서, 슈도모나스 푸티다 유전체 내의 *prpC* 유전자 및 *prpE* 유전자의 기능이 결실되고, 생물공정 전반에 걸쳐 다른 화학 유도제의 관여가 필요 없는 기질(레불린산)-기반 유도 프로모터 시스템 하에서 이종 티오에스터라제(YciA) 및 프로피오닐-CoA:숙시네이트-CoA 트랜스퍼라제(YgfH)의 동시-발현이 가능한 슈도모나스 푸티다의 형질전환 균주를 개발하였으며, 대규모 발효 공정에서 역가 및 프로피온산 생산성의 평가를 수행하여 레불린산-기반 프로피온산 생산을 위한 형질전환된 균주의 효율을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명의 일 측면은, i) *prpC* 유전자 및 *prpE* 유전자의 기능이 결실되고, ii) 이종 박테리아 유래의 *yciA* 유전자 및 *ygfH* 유전자를 발현하는 형질전환 슈도모나스 푸티다를 제공한다.

[0011] 본 발명의 다른 측면은, i) 제1항의 형질전환 슈도모나스 푸티다를 레불린산 존재 하에 배양하는 단계; 및 ii) 상기 형질전환 슈도모나스 푸티다로부터 생산되는 프로피온산을 수득하는 단계를 포함하는, 프로피온산의 생산 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명의 형질전환 슈도모나스 푸티다를 이용하여 재생가능한 저비용 기질인 레불린산으로부터 프로피온산 생산을 효과적으로 달성할 수 있으므로, 본 발명의 형질전환 슈도모나스 푸티다를 통한 비용-효과적이고 지속가능한 생물공정에서의 PA 생산이 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 야생형 균주(EM42), 및 *prpC* 및/또는 *prpE*가 결실된 EM42 균주들의 성장 패턴(A), 프로피온산 생산(B), 및 잔류 레불린산의 농도(C)를 나타낸다.

도 2 내지 도 7은 레불린산(LA)(도 2, 도 3), 글리세롤(도 4, 도 5) 및 레불린산+글리세롤(도 6, 도 7)이 배양 배지에 존재하는 경우 성장한, EM42:ΔCE, EM42:ΔCE:*yciA*, EM42:ΔCE:*ygfH*, 및 EM42:ΔCE:*yciA*:*ygfH*를 포함한 선택된 균주들의 프로피온산 생산 및 몰 수율(%)(도 2, 도 4 및 도 6), 및 성장 패턴(도 3, 도 5 및 도 7)을 나

타낸다.

도 8은 슈도모나스 푸티다에서 레불린산으로부터 프로피온산 생산에 관여하는 주요 대사 경로를 나타낸다.

도 9는 레불린산-기반 프로피온산 합성 경로를 나타내는 형질전환 EM42:ΔCE:*yciA*:*ygfH* 균주에 의해 유도된 유가식 발효 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명한다.

[0015] **1. 레불린산으로부터 프로피온산 생산을 위한 형질전환 슈도모나스 푸티다**

[0016] 본 발명의 일 측면은, i) *prpC* 유전자 및 *prpE* 유전자의 기능이 결실되고, ii) 이종 박테리아 유래의 *yciA* 유전자 및 *ygfH* 유전자를 발현하는 형질전환 슈도모나스 푸티다를 제공한다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 형질전환 슈도모나스 푸티다는 EM42:ΔCE:*yciA*:*ygfH* 균주이다.

[0017] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 형질전환 슈도모나스 푸티다 제조에 사용되는 슈도모나스 푸티다는 *P. putida* EM42 균주일 수 있다. *P. putida* EM42 균주는 야생형 *P. putida* KT2440 균주에서 유래한 변이체로서, Martinez-Garcia *et al.*, *Microbial cell factories*, 2014, 13(1), 1-15에 기재된 균주일 수 있다. *P. putida* EM42 균주는 플랫폼 균주 *P. putida* KT2440으로부터 300개 유전자(게놈의 약 4.3%)를 결실시킴으로써 유도된다. *P. putida* EM42 균주는 *P. putida* KT2440 대비 ATP 수준, 산화 스트레스, 성장 속도가 증가되고,

[0018] 상기 형질전환 슈도모나스 푸티다 제조에는 *P. putida* EM42 균주가 적합하며, *P. putida* EM42 균주로 상기 형질전환 슈도모나스 푸티다를 제조하였을 때, 세포 성장이 우수하고 레불린산으로부터 생산되는 프로피온산 생산량도 현저히 높다.

[0019] 슈도모나스 푸티다 균주는, lvaABCDEFG(이하, lva 오페론)로 지정된 다(多)시스트론성 유전자에 의해 코딩되는 단백질의 도움하에 유일한 탄소 공급원으로 레불린산을 사용할 수 있다. lva 오페론은, 레불린산에 의해 유도되는 전사 활성화인자 LvaR에 의해 상향조절된다. 상기 동화 경로에서, 레불린산은 LvaE 및 조효소 A(CoA) 티오에스터, 레불리닐-CoA에 의해 먼저 활성화된다. 이어서, LvaD가 NADH 또는 NADPH에 의한 LA-CoA의 환원을 촉진하여 4-하이드록시발레릴-CoA를 생성한다. 상기 4-하이드록시발레릴-CoA는 이어서 포스포릴화되어 LvaA, LvaB, 및 ATP의 복합 작용에 의해 4-포스포발레릴-CoA를 생성한다. 그 후에, 4-포스포발레릴-CoA가 LvaC에 의해 3-하이드록시발레릴-CoA(3HV-CoA)로 전환되고, 이것은 β-산화를 통해 더 산화되어 아세틸-CoA 및 프로피오닐-CoA를 생성하고, TCA 회로를 통해 완전히 산화된다. 프로피오닐-CoA는 프로피온산 생산에 전구체로 사용될 수 있으며, 아세틸-CoA는 TCA 회로로 유도되어 세포 성장을 촉진할 수 있다. 프로피오닐-CoA는 메틸시트레이트 신타제(PP2335, *prpC*)에 의해 메틸시트레이트 회로를 통해 소비될 수 있다. 또한, 프로피온산은 프로피오닐-CoA 신타제(PP2351, *prpE*)에 의해 프로피오닐-CoA로 분해될 수 있다. 프로피온산의 대량 생산은 그의 전구체인 프로피오닐-CoA의 축적을 요한다(도 8 참조).

[0020] 본 발명의 일 실시예에서는, 프로피온산의 전구체인 프로피오닐-CoA를 축적하기 위해서, *prpC* 유전자 및 *prpE* 유전자의 기능이 결실된 형질전환 슈도모나스 푸티다를 제조하였으며, *P. putida* EM42 균주, *prpC* 유전자의 기능이 결실된 균주 및 *prpE* 유전자의 기능이 결실된 균주에 비해서 *prpC* 유전자 및 *prpE* 유전자의 기능이 모두 결실된 형질전환 슈도모나스 푸티다 균주 배양시 레불린산을 적게 사용하면서도 프로피온산 생산량이 증가됨을 확인하였다.

[0021] 상기 효소 또는 폴리펩티드 등을 암호화하는 유전자의 일부 또는 전체를 결실하는 방법은 예를 들면, Cre/loxP 재조합 시스템을 사용하여 유전자 결손을 위한 카세트를 모균주에 형질전환함으로써 수행될 수 있고, 슈도모나스 푸티다 내 염색체 삽입용 벡터를 통해 염색체 내 내재적 목적 단백질을 암호화하는 유전자를 일부 핵산 서열이 결실된 유전자 또는 마커 유전자로 교체함으로써 수행될 수 있다. 상기 발현조절 서열을 변형하는 방법은 상기 발현조절 서열의 활성을 더욱 약화하도록 핵산 서열을 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합으로 발현조절 서열상의 변이를 유도하여 수행하거나, 더욱 약한 활성을 갖는 핵산 서열로 교체함으로써 수행할 수 있다. 상기 발현조절 서열에는 프로모터, 오퍼레이터 서열, 리보좀 결합 부위를 코딩하는 서열, 및 전사와 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다. 아울러, 상기 효소 또는 폴리펩티드를 암호화하는, 염색체 상의 염기서열을 변형하는 방법은 상기 단백질의 활성을 더욱 약화하도록 염기서열을 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합으로 서열상의 변이를 유도하여 수행하거나, 더욱 약한 활성을 갖도록 개량된 염기서열로 교체함으로써 수행할 수 있다.

[0022] 상기 *prpC* 유전자는 메틸시트레이트 신타제(methylcitrate synthase)를 코딩한다. 메틸시트레이트 신타제는 레불린산으로부터 프로피온산이 생산되는 경로에서 프로피오닐-CoA(propionyl-CoA)를 2-메틸시트레이트(2-methylcitrate)로 전환하는데 관여한다. 메틸시트레이트 신타제가 활성화되면 프로피온산의 전구체인 프로피오닐-CoA가 메틸시트레이트 신타제에 의하여 2-메틸시트레이트로 전환되어 메틸시트레이트 회로로 흘러가게 되므로 결과적으로 프로피온산의 생산량이 감소하게 된다. 상기 *prpC* 유전자는 서열번호 1로 표시되는 염기서열일 수 있다.

[0023] 본 발명에서 사용되는 염기서열은, 서열 목록에 기재된 서열과 실질적인 동일성을 나타내는 서열을 포함하는 것으로 이해된다. 여기서, "실질적인 동일성"은 본 발명의 서열과 임의의 다른 서열로서 70% 이상의 상동성, 구체적으로 80% 이상의 상동성, 보다 더 구체적으로 90% 이상의 상동성을 갖는 서열이며, 이들 상동성 범위에 있는 염기서열도 본 발명의 권리범위에 포함되는 것으로 해석된다.

[0024] 상기 *prpE* 유전자는 프로피오닐-CoA 신타제(propionyl synthase)를 코딩한다. 프로피오닐-CoA 신타제는 레불린산으로부터 프로피온산이 생산되는 경로에서 프로피온산을 프로피오닐-CoA로 전환하는데 관여한다. 프로피오닐-CoA 신타제가 활성화되면, 최종 목적 물질인 프로피온산이 이의 전구체인 프로피오닐-CoA로 전환되므로, 프로피온산의 생산량이 감소하게 된다. 상기 *prpE* 유전자는 서열번호 2로 표시되는 염기서열일 수 있다.

[0025] 상기 *yciA* 유전자는 헤모필루스 인플루엔자(*Haemophilus influenzae*)로부터 유래하는 것일 수 있다. 헤모필루스 인플루엔자 외에도 슈도모나스 푸티다와는 다른 이종 박테리아에서 유래된 *yciA* 유전자이어도 본 발명의 형질전환 슈도모나스 푸티다 균주에 도입되어 레불린산으로부터 프로피온산을 생산에 있어 증가 효과를 나타내는 *yciA* 유전자라면 본 발명에 제한없이 적용될 수 있다.

[0026] 상기 *yciA* 유전자는 티오에스테라제(yciA)를 코딩한다. 티오에스테라제는 프로피오닐-CoA를 프로피온산으로 전환하는데 관여한다. 슈도모나스 푸티다에서도 티오에스테라제가 발현되지만, *prpC* 유전자 및 *prpE* 유전자의 기능을 결실시켜도 프로피온산 생산 수준이 낮았으므로, 이종 박테리아 유래의 *yciA* 유전자를 발현시켜 프로피온산 생산 수준을 높이고자 하였다. 상기 *yciA* 유전자는 서열번호 3으로 표시되는 염기서열일 수 있다.

[0027] 상기 *ygfH* 유전자는 대장균(*Escherichia coli*)으로부터 유래하는 것일 수 있다. 대장균 외에도 슈도모나스 푸티다와는 다른 이종 박테리아에서 유래된 *ygfH* 유전자이어도 본 발명의 형질전환 슈도모나스 푸티다 균주에 도입되어 레불린산으로부터 프로피온산을 생산에 있어 증가 효과를 나타내는 *ygfH* 유전자라면 본 발명에 제한없이 적용될 수 있다. 상기 *ygfH* 유전자는 서열번호 4로 표시되는 염기서열일 수 있다.

[0028] 상기 이종 박테리아 유래의 *yciA* 유전자 및 *ygfH* 유전자는 레불린산-유도성 발현 시스템에 의해 형질전환 슈도모나스 푸티다 내에서 발현될 수 있다. 이러한 레불린산-유도성 발현 시스템(LvaR/P_{lvaA})은 슈도모나스 푸티다 KT2440의 *lva* 오페론으로부터 전사 활성화인자 LvaR 및 그의 동족 *lvaA* 프로모터를 사용할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서, 레불린산-유도성 발현 시스템을 포함하는 발현 벡터(pPROBE_ LvaR/P_{lvaA}_egfp)에 *yciA* 유전자 및 *ygfH* 유전자를 삽입하여 EM42:ΔCE 균주를 형질전환시켜 EM42:ΔCE:*yciA*:*ygfH* 균주를 수득하였으며, 이 균주가 레불린산으로부터 프로피온산 생산을 증가시킬 수 있음을 확인하였다.

[0029] 본 발명의 용어 "전사인자"는 DNA의 특정 부위에 결합하여 유전자의 발현을 촉진하거나 억제하는 단백질을 의미한다. 특히, 전사인자는 DNA-결합 영역(DNA-binding domain, DBD)과 트랜스크립션 조절 영역(transcriptional regulation domain)을 갖는다.

[0030] 본 발명의 용어 "프로모터"는 유전자의 기본 전사 및/또는 조절 전사에 필요한, 일반적으로 코딩 서열 바로 상류의 DNA 서열을 의미한다. 특히, 프로모터는 전사의 개시를 가능하게 하는 정보를 가지며, 일반적으로 전사 개시 시작 부위 및 중합효소 복합체에 대한 결합 부위를 갖는다.

[0031] 본 발명의 용어 "발현 벡터"는 숙주세포에서 목적으로 하는 외래 유전자를 발현할 수 있는 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동 가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 벡터를 의미한다.

[0032] 상기 발현 벡터는 형질전환체에 의해서 발현되는 유전자 및 조절 서열로 구성되는 DNA 벡터로서, 오픈 리딩 프레임, 폴리아데닐화 부위를 포함하는 3' 비번역 영역을 추가로 포함할 수 있다. 또한, 공지의 방법에 의하여 인위적으로 디자인된 재조합 발현 벡터일 수 있다.

[0033] 상기 발현 벡터는 본 기술 분야에 공지된 방법을 통해 세포에 도입될 수 있으며, 예를 들면, 일시적 형질감염(transient transfection), 미세주사, 형질도입(transduction), 세포융합, 칼슘 포스페이트 침전법, 리포좀 매

개된 형질감염(liposome-mediated transfection), DEAE 덱스트란-매개된 형질감염(DEAE Dextran-mediated transfection), 폴리브렌-매개된 형질감염(polybrene-mediated transfection), 전기침공법(electroporation), 유전자 총(gene gun) 또는 세포 내로 핵산을 유입시키기 위한 다른 공지의 방법에 의해 세포 내로 도입할 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 일 실시예에서는, 전기천공법을 사용하였다.

[0034] 상기 발현 벡터는 공지된 다양한 벡터를 사용하여 제조할 수 있으며, 예를 들어, 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파아지 벡터 또는 바이러스 벡터 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는, 상기 발현 벡터로 플라스미드 벡터를 사용하였다.

[0036] **2. 형질전환 슈도모나스 푸티다(EM42:ΔCE:*yciA*:*ygfH* 균주)를 이용한 프로피온산의 생산방법**

[0037] 본 발명의 다른 측면은, i) 제1항의 형질전환 슈도모나스 푸티다를 레불린산 존재 하에 배양하는 단계; 및 ii) 상기 형질전환 슈도모나스 푸티다로부터 생산되는 프로피온산을 수득하는 단계를 포함하는, 프로피온산의 생산방법을 제공한다.

[0038] 상기 프로피온산을 생산하는 방법에 있어서, 상기 형질전환 슈도모나스 푸티다에 대해서는 전술한 형질전환 슈도모나스 푸티다에 대한 설명을 참조한다.

[0039] 본 발명에서 사용하는 용어 "배양"이란, 상기 형질전환 슈도모나스 푸티다로부터 프로피온산을 생산하기 위하여, 상기 슈도모나스 푸티다를 적절히 인공적으로 조절한 환경조건에서 생육시키는 일련의 행위를 의미할 수 있다. 본 발명에서 상기 형질전환 슈도모나스 푸티다를 배양하는 방법은 본 기술분야에 널리 알려져 있는 방법을 이용하여 수행할 수 있다. 배양에 사용되는 배지는 프로피온산으로 대사될 수 있는 하나 이상의 기질을 포함하는 것일 수 있으며, 예를 들면, 적당한 탄소원, 질소원, 아미노산, 비타민 등을 함유한 통상의 배지 내에서 호기성 조건 하에서 온도, pH 등을 조절하면서 적절한 방식으로 특정 균주의 요건을 충족해야 한다. 상기 배양은 레불린산 존재 하에 형질전환 슈도모나스 푸티다를 배양하는 것일 수 있다.

[0040] 사용될 수 있는 탄소원으로는 글루코스를 주탄소원으로 사용하며, 이외에 자일로스, 수크로스, 락토스, 프락토스, 말토스, 전분, 셀룰로스와 같은 당 및 탄수화물, 대두유, 해바라기유, 피마자유, 코코넛유 등과 같은 오일 및 지방, 팔미트산, 스테아린산, 리놀레산과 같은 지방산, 글리세롤, 에탄올과 같은 알코올, 아세트산과 같은 유기산이 포함될 수 있다.

[0041] 사용될 수 있는 질소원으로는 암모니아, 황산암모늄, 염화암모늄, 초산암모늄, 인산암모늄, 탄산안모늄, 및 질산암모늄과 같은 무기질소원; 글루탐산, 메티오닌, 글루타민과 같은 아미노산 및 펩톤, NZ-아민, 육류 추출물, 효모 추출물, 맥아 추출물, 옥수수 침지액, 카세인 가수분해물, 어류 또는 그의 분해생성물, 탈지 대두 케이크 또는 그의 분해생성물 등 유기질소원이 사용될 수 있다. 이들 질소원은 단독 또는 조합되어 사용될 수 있다. 상기 배지에는 인원으로서 인산 제1칼륨, 인산 제2칼륨 및 대응되는 소듐-함유 염이 포함될 수 있다. 사용될 수 있는 인원으로는 인산이수소칼륨 또는 인산수소이칼륨 또는 상응하는 나트륨-함유 염이 포함된다. 또한, 무기화합물로는 염화나트륨, 염화칼슘, 염화철, 황산마그네슘, 황산철, 황산망간 및 탄산칼슘 등이 사용될 수 있다. 마지막으로, 상기 물질에 더하여 아미노산 및 비타민과 같은 필수 성장 물질이 사용될 수 있다.

[0042] 본 발명의 형질전환 슈도모나스 푸티다 배양시 레불린산을 사용하는 경우, 또다른 프로피온산 생산에서 기질로 사용되는 L-트레오닌을 사용한 경우에 비해 세포 성장 및 프로피온산 생산량면에서 우수한 효과를 나타낸다. 아울러, L-트레오닌이 발효 생물 공정을 통해 제조되므로 고비용이고 지속가능하지 않은 기질인 반면에 레불린산은 리그노셀룰로스 바이오매스 기질로부터 고가의 가수분해 효소를 사용하지 않고 생산될 수 있으므로 바이오매스-기반 바이오리파이너리 산업에서 지속가능한 기질로서 적절하다.

[0043] 상기 레불린산은 1g/L 내지 20g/L의 농도로 배양 배지에 포함될 수 있고, 2g/L 내지 19g/L, 3g/L 내지 17g/L, 4g/L 내지 16g/L, 5g/L 내지 15g/L, 6g/L 내지 14g/L, 7g/L 내지 13g/L, 8g/L 내지 12g/L, 9g/L 내지 11g/L, 9g/L 내지 10g/L의 농도로 포함될 수 있고, 9g/L 내지 11g/L, 9g/L 내지 10g/L의 농도로 배양 배지에 포함될 수 있다.

[0044] 상기 형질전환 슈도모나스 푸티다의 배양시 레불린산외에 글리세롤도 추가적으로 배양배지에 포함될 수 있다. 글리세롤을 대신하여 레불린산과 병용하였을 때, 그에 상응하는 프로피온산 생산량을 보이는 글리세롤의 유도체라면 본 발명에 제한없이 적용할 수 있다.

[0045] 상기 레불린산은 0.1g/L 내지 20g/L의 농도로 그리고 상기 글리세롤은 0.1g/L 내지 10g/L의 농도로 배양 배지에

포함될 수 있다.

[0046] 상기 레불린산은 글리세롤과 병용시에 0.5g/L 내지 19g/L, 1g/L 내지 19g/L, 1.5g/L 내지 19g/L, 2g/L 내지 19g/L, 2.5g/L 내지 19g/L, 3g/L 내지 17g/L, 4g/L 내지 16g/L, 5g/L 내지 15g/L, 6g/L 내지 14g/L, 7g/L 내지 13g/L, 8g/L 내지 12g/L, 9g/L 내지 11g/L, 9g/L 내지 10g/L의 농도로 배양 배지에 포함될 수 있고, 9g/L 내지 11g/L, 9g/L 내지 10g/L의 농도로 배양 배지에 포함될 수 있다. 유가식 발효시 레불린산을 글리세롤과 병용할 경우 상기 레불린산은 배양 직후에 0.1g/L 내지 6g/L의 농도로 배양 배지에 포함될 수 있고, 12시간 배양 후에는 5g/L 내지 15g/L의 농도로 배양 배지에 포함될 수 있다.

[0047] 상기 글리세롤은 레불린산과 병용시에 0.1g/L 내지 9.5g/L, 0.5g/L 내지 9g/L, 1g/L 내지 8.5g/L, 1.5g/L 내지 8g/L, 2g/L 내지 7.5g/L, 2.5g/L 내지 7g/L, 3g/L 내지 6.5g/L, 3.5g/L 내지 6g/L, 4g/L 내지 5.5g/L, 4.5g/L 내지 5g/L의 농도로 배양 배지에 포함될 수 있고, 4g/L 내지 5.5g/L, 4.5g/L 내지 5g/L의 농도로 배양 배지에 포함될 수 있다.

[0048] 상기 글리세롤은 배양 시작시 내지 배양 시작 후 20시간까지 기간에 1회 내지 3회 첨가되는 것일 수 있고, 상기 글리세롤은 배양 시작시 내지 배양 시작 후 18시간, 16시간, 14시간, 12시간, 10시간, 8시간, 6시간, 4시간, 2시간, 1시간까지 기간에 1회, 2회 첨가될 수 있고, 배양 시작 후 4시간, 2시간, 1시간까지 기간에 1회 첨가될 수 있다.

[0049] 본 발명의 일 실시예에서는, 상기 형질전환 슈도모나스 푸티다 배양시 5 g/L 글리세롤을 배양 직후에 별도로 첨가한 다음, 레불린산(10 g/L)을 첨가하여 프로피온산 생산량을 평가하였다.

[0050] 상기 형질전환 슈도모나스 푸티다를 통해 생산된 프로피온산은 본 기술분야에 공지된 방법을 사용하여 배양 배지로부터 분리할 수 있다. 이러한 분리 방법은 원심분리, 여과, 이온교환크로마토그래피, 가스크로마토그래피 또는 결정화일 수 있다. 예를 들면, 배양물을 저속 원심분리하여 바이오매스를 제거하고 얻어진 상등액을, 가스크로마토그래피를 통하여 분리할 수 있다.

[0051] 본 발명의 일 실시예에서는, 슈도모나스 푸티다 EM42 균주를, 메틸시트레이트 신타제(*PrpC*) 및 프로피오닐-CoA 신타제(*PrpE*) 유전자를 결실시킴으로써 프로피온산을 생성하도록 조작하였다. 이어서, 레불린산-유도성 발현 시스템을 사용하여 헤모필루스 인플루엔자(*H. influenzae*) 유래 *yciA*(티오에스터라제를 코딩함)를 발현시키고, 대장균(*E. coli*) 유래 *ygfH*(프로피오닐-CoA: 숙시네이트 CoA 트랜스퍼라제를 코딩함)를 발현시켜 프로피온산(PA) 생산을 플라스크 규모 배양에서 10배까지 개선시켰다. 상기 형질전환된 슈도모나스 푸티다 EM42:ΔCE:*yciA*:*ygfH*를 사용하여 생물공정을 최적화시켜 프로피온산 생성 역가를 더 개선시켰다. 나아가, 5 L 발효조에서 최적화된 조건하에서 수행된 유가식 발효는 각각 26.8 g/L, 0.3 g/L/h, 및 83%의 역가, 생산성, 및 프로피온산 생산 몰 수율을 제공함을 확인하였다. 이로부터 레불린산으로부터 프로피온산의 지속적이고 산업적인 생산을 위한 대체 경로로서 신규한 슈도모나스 푸티다의 레불린산 이화 경로가 확인되었다.

[0053] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

[0055] **제조예 1. 슈도모나스 푸티다 EM42 균주를 이용한 레불린산(LA)으로부터 프로피온산(PA) 생산을 위한 형질전환 균주의 제작**

[0056] **제조예 1-1. 균주 및 플라스미드**

[0057] 본 연구에 사용된 균주 및 플라스미드는 표 1에 열거되어 있다. 대장균 DH10B를 모든 실험에 클로닝 숙주로 사용하였다. Centro Nacional de Biotecnologia(CNB-CSIC, 스페인)에서 수득한 슈도모나스 푸티다 EM42 균주를 프로피온산 생산에 필요한 유전자 결실 및 이종 유전자 발현을 위한 모 균주로 사용하였다. 헤모필루스 인플루엔자(DSM 11121)의 게놈 DNA는 독일 미생물 및 세포 배양물 협회(German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH)(DSMZ, 독일)에서 구입하였다. 본 연구에 사용된 프라이머들은 표 2에 나타낸다.

표 1

[0058]

Strain	Description	Source
E. coli DH10B	Cloning host	Lab stock

P. putida EM42	Derivative strain from wild type *P. putida* KT2440	Martinez-Garcia *et al.*, *Microbial cell factories*, 2014, 13(1), 1-15.
EM42:ΔC	EM42 with deleted *prpC*	본 발명에서 제작
EM42:ΔE	EM42 with deleted *prpE*	본 발명에서 제작
EM42:ΔCE	EM42 with deleted *prpC* and *prpE*	본 발명에서 제작
EM42:ΔCE:*yciA*	EM42:Δ*prpC*:Δ*prpE* harboring pPROBE_ LvaR/PlvaA_ *yciA*	본 발명에서 제작
EM42:ΔCE:*ygfH*	EM42:Δ*prpC*:Δ*prpE* harboring pPROBE_-LvaR/P_{lvaA}_*ygfH*	본 발명에서 제작
EM42:ΔCE:*yciA*: *ygfH*	EM42:Δ*prpC*:Δ*prpE* harboring pPROBE_LvaR/P_{lvaA}_*yciA*Δ*ygfH*	본 발명에서 제작
Plasmid	**Description**	**Source**
pPROBE_ LvaR/P_{lvaA}_egfp	pBBR1 origin, carrying *egfp* under the under the control of LvaR/P_{lvaA} levulinic acid inducible promoter from *P. putida* KT2440, Km^R	Sathesh-Prabu et al., *Scientific reports*, 2021, 11(1), 1-8
pPROBE_ LvaR/P_{lvaA}_ *yciA*	pPROBE_LvaR/P_{lvaA} with Δ*egfp*::*yciA* from *Haemophilus influenzae* DSM 11121	본 발명에서 제작
pPROBE_ LvaR/P_{lvaA}_*ygfH*	pPROBE_LvaR/P_{lvaA} with Δ*egfp*::*ygfH* from *E. coli* DH10B	본 발명에서 제작
pPROBE_ LvaR/P_{lvaA}_ *yciA_ygfH*	pPROBE_LvaR/P_{lvaA} with Δ e*GFP*::*yciA*::*ygfH*	본 발명에서 제작
pQSAK	ColE1-*ori*, *sacB*, Km^R and Amp^R	Zhou et al., *Applied microbiology and biotechnology*, 2014, 98(10), 4389-4398
pQSAK-*prpC*	used to delete *prpC* in EM42	본 발명에서 제작
pQSAK-*prpE*	used to delete *prpE* in EM42	본 발명에서 제작

표 2

[0059]

Primers	**Sequences (5'→ 3')**	**서열 번호**	**Purpose**	**Annealing temperature and extension time***
HiYciA_F	ctttataaggaggaaaaacatatg tctgccaattttactg	5	Primers used to amplify and clone *yciA* gene (HI0827) from *H. influenzae* SEQ ID 5 and 6 for constructing pPROBE_ LvaR/P_{lvaA}_ *yciA* plasmid SEQ ID 5 and 7 for constructing pPROBE_ LvaR/P_{lvaA}_*yciA_ygfH* plasmid	For SEQ ID 5 and 6 58 ℃ & 30 sec
HiYciA_R	agtccaagctcagctaattaagct tacaagggttgttctgaaattaag	6		
HiYciA_RBS_ R	atgtatatctccttcttaaagtta caagggttgttctgaaattaag	7		For SEQ ID 5 and 7 67 ℃ & 30 sec
YgfH_F	ctttataaggaggaaaaacatatg gaaactcagtggacaag	8	Primers used to amplify and clone *ygfH* gene from *E. coli* SEQ ID 8 and 10 for constructing pPROBE_ LvaR/P_{lvaA}_*ygfH* plasmid SEQ ID 9 and 10 for constructing pPROBE_ LvaR/P_{lvaA}_*yciA_ygfH* plasmid	For SEQ ID 8 and 10 63 ℃ & 90 sec
YgfH_RBS_F	ctttaagaaggagatatacatatg gaaactcagtggacaag	9		
YgfH_R	agtccaagctcagctaattaagct taacccagcatcgagcc	10		For SEQ ID 9 and 10 63 ℃ & 90 sec

UP_2335_F	cgaaaagtgccacctgacgtcgctcgtgatcatggcgc	11	Primers used to delete *prpC* (PP2335) gene from EM42	For SEQ ID 11 and 12 67 ℃ & 30 sec
UP_2335_R	gctattcagcggccatggtgtttctcctttc	12		
DS_2335_F	caccatggccgctgaatagctataggaggcaaccc	13		For SEQ ID 13 and 14 70 ℃ & 30 sec
DS_2335_R	caaataaatttttttatgatttc*tcgag*caccgggttgacctgggc	14		
PP_2335_F	gcgctgccgccatccata	15		For SEQ ID 15 and 16 72 ℃ & 120 sec
PP_2335_R	gcccggctggatcacgt	16		
UP_2351_F	cgaaaagtgccacctgacgtcatcatcgggttgcccag	17	Primers used to delete *prpE* (PP2351) gene from EM42	For SEQ ID 17 and 18 64 ℃ & 30 sec
UP_2351_R	aaaccatcaactcatgtcgttagaaacccg	18		
DS_2351_F	acgacatgagttgatggtttgacctcgatggccctttcgc	19		For SEQ ID 19 and 20 72 ℃ & 30 sec
DS_2351_R	caaataaatttttttatgatttc*tcgag*cgcagcgccaggcgctg	20		
PP_2351_F	ccatctcgaccttgcgca	21		For SEQ ID 21 and 22 69 ℃ & 150 sec
PP_2351_R	cgtggcgtgtacctgct	22		
pQSAK F	ctgggtgagcaaaaacagga	23	For sequencing of pQSAK_constructs	For SEQ ID 23 and 24 61 ℃ & 60 sec
pQSAK R	ctcaagcgaaaggaaacaat	24		
pPROBE-Seq-F	caggaattggggatcggaag	25	For sequencing of pPROBE_constructs	For SEQ ID 25 and 26 66 ℃ & 120 sec
pPROBE-Seq-R	cgccaagctagcttggattctc	26		

[0061] **제조예 1-2. *prpC* 및 *prpE*이 결실된 슈도모나스 푸티다 EM42 균주의 제작**

[0062] 제한 효소(Thermo Scientific, USA), Q5 고충실도 DNA 폴리머라제(New England Biolabs, USA), 및 e-Taq 폴리머라제(SolGent, 대한민국)를 클로닝 및 플라스미드 제작에 사용하였다. 일렉트로-컴피턴트 세포는 Luo *et al*, *FEMS microbiology letters*, 2016, 363(4)에 기재된 바와 같이 제조하였다. 자살 플라스미드 pQSAK를 사용하여 pQSAK-*prpC* 및 pQSAK-*prpE*를 제작하고. 이들을 *sacB*-음성 카운터-선별 시스템에 기반한 염색체 인-프레임 유전자 결실에 사용하였다(Zhou *et al*, *Applied microbiology and biotechnology*, 2014, 98(10), 4389-4398). *prpC* 유전자(서열번호 1) 및 *prpE* 유전자(서열번호 2)를 결실시키기 위해, 깁슨(Gibson) 어셈블리 클로닝 방법을 이용하여, 각 유전자의 약 500 bp 상류 및 하류 상동 영역을 함유하는 pQSAK 플라스미드를 제작하였다 이어서, 상기 플라스미드 구조물을 슈도모나스 푸티다 EM42에 형질전환시켰다. 이중 상동 재조합 후에, SacB를 사용하여 음성 선별을 위해 슈크로스-카나마이신 플레이트로부터 콜로니들을 골라내었다. PCR 후에 DNA 서열분석에 의해 *prpC* 및 *prpE*의 결실을 확인하였고, *prpC* 및 *prpE*이 각각 결실된 균주를 EM42:ΔC, EM42:ΔE로 명명하였고, *prpC* 및 *prpE*이 모두 결실된 균주를 EEM42:ΔCE로 명명하였다.

[0063] 사용된 *prpC* 유전자(서열번호 1) 및 *prpE* 유전자(서열번호 2)를 표 3에 나타낸다.

표 3

[0064]

유전자	서열번호	서열
prpC	1	ATGGCCGAAGCAAAAGTACTCAGTGGCGCAGGCCTGCGTGGCCAGGTGGCCGGCCAGACTGCACTGTCGACCGTGGGCCAGGCCGG TGCCGGGCTGACCTACCGTGGTTATGATGTGCGTGACCTGGCCGCCGGTGCCGAGTTCGAAGAAGTCGCCTACCTGCTGCTGTACG GCGAGCTGCCAACCCAGGCTGAACTGGCCGACTACAAGCGCAAGCTCAAGGGCCTGCGTGACCTGCCGCAAGCCTTGAAGGAAGTG CTTGAGCGCATCCCGCGCGATGCCCACCCGATGGACGTCATGCGCACCGGTTGCTCGGTACTGGGCACCCTCGAACCAGAACTGAC CTTCGAAGCCCAGCGCGACAAGACCGACCGCCTGCTGGCGCTGTTCCCGGCCGTGATGTGCTACTGGTACCGCTTCACCCACCATG GCGTACGCATCGACTGCACCACTGATGAAGACACCTTGGGTGGCCACTTCCTGCACCTGCTGCACGGCAAGAAGCCGAGCGAGCTG CACGTCAAGGTCATGAACGTGTCGCTGATTCTCTACGCTGAACACGAATTCAACGCCTCGACCTTCACTGCCCGCGTCTGCGCCTC GACCCTGTCTGACTTGTACTCCTGCGTTACCGCAGCCATCGGCTCGCTGCGTGGCCCGCTGCACGGCGGTGCCAACGAGGCTGCGA TGGAACTGATCGAACGCTTCCAGAGCCCGCAGGAAGCCACCGCCGAACTGCTGCGCATGCTCGAGCGCAAAGACAAGATCATGGGC TTTGGCCATGCCATCTACAAAGAGTCCGACCCGCGCAACGAGGTGATCAAGGGCTGGTCGAAGCAGCTGGCTGACGAAGTGGGTGA CAAGGTGCTGTACCCGGTGTCCGAAGCCATCGACAAGACCATGTGGGAGCAGAAGCGCCTGTTCCCCAACGCCGACTTCTACCATG CCTCGGCGTACCACTTCATGGGCATTCCGACCAAGCTGTTCACCCCGATCTTCGTCTGCTCGCGGCTGACCGGCTGGGCGGCGCAC GTCTTCGAGCAGCGCGCCAACAACCGCATCATCCGCCCGAGCGCCGAGTATGTCGGCGTCGAACAGCGCCAGTTCGTGCCGATCGA GCAGCGCTGA
prpE	2	ATGAGCTACCAGCACAGCTACGCCCATTCCATTTCCGACCCTGCCGCTTTCTGGGCGGAACAGGCCGCACACCTGGCCTGGCACCG CAAGCCTGCCCTGACCCTGCAAGATAACGCCGACGGTACCCACCGCTGGTTCGCGGATGGCCGCCTGAACAGCTGTTACCTGGCCC TCGACCACCAGATCGAGCAGGGCCGCGGCGAGCAGTTGGCGCTGATCTACGATTCGCCAGTGACCGGCGTGCAGCAGACCTACACC TACAACCAATTGCGCGACGAGGTGGCACGCCTGGCCGGTTTGCTGCGCCAGCTGGGGGTGAACAAGGGCGATGGCGTGATCATCTA CATGCCCATGGTGCCGCAAGCGGCCATGGCGATGCTGGCCTGCGCGCGGATCGGCGCGGTGCATTCGGTCGTGTTCGGTGGCTTTG CCGCCAACGAGTTGGCCCTGCGCATCGATGACGCCCGGCCCACCTTGTTGCTGACGGCATCGTGCGGGCTGGAGTTCGACCGGGTC ATTGCATACAAACCGCTGGTTGACCGTGCCCTGCAACTGGCCCGGCACCAGCCGCGCAATGTGCTGGTGCTGCAGCGGCCACAGGC ACACGCTGAACTGCTGCCTGGCCGCGACCTGGACTGGCAGGCGGCCTTGGCCGACGCCGAGCCGGTGGCCCCCGTCGAGCTGGATG CCGGCGACCCGCTGTACATCATGTATACCTCAGGCACCACCGGTAAGCCCAAGGGTATCGTCCGGGAAAACGGCGGCAATGCCGTG GCGCTGTGTTACGCCATGCGCCATATCTATGGCATGCAGGCCGGTGATGTGTGGTGGGGCATTTCCGACGTCGGTTGGGTGGTCGG CCACTCACTGATCGTCTACGGGCCGTTGATGAGCGGCTGTACCACGGTGTTCTACGAAGGCAAGCCAATCCGCACCCCGGATGCTT CGGCCTATTGGCGGGTGGTGGAGCAGTACCGGGTCAACGCGCTGTTCTGTGCACCTACGGCCATGCGCGCCATCCGCAAGGAGGAC CCGGAGGGCGACCTGATTCGCAAACATGACCTCAGCTCGCTGCGGCAACTGTTCCTGGCGGGGGAAAAGCTGGATTCCAGCACCCA TGAATGGCTGGAACGGGTGAGTGGCAAGCCGGTGCACGACCACTGGTGGCAGACCGAGACCGGCTGGCCGGTCACCGCGCCTTGCG TCGGGCTGGAGGGCAGTGCGGCGAAGCCAGGATCGAGCAACCGGGCGGTGCCGGGTTACAACGTTCGCGTACTGGATGACGAAGGC CACTTGCTCGGGGCCAACCATCAGGGTTCGATCGTGATTGCCCTGCCATTGCCACCCGGTTGCAGTCAGACGCTGTGGGGGGATCA CGAGCGCTACCTGCAGGCCTACCTGCGCACGTATCCGGGGTACTACCACACGGGCGATGGCGGCTATCTGGACGATGATGGTTTCG TCTACATCATGGGGCGCACCGATGATGTGATCAACGTTTCCGGTCATCGTTTGTCCACCGGTGAAATGGAAGACCTGGTCGCCCGC CACCCGGCGGTAGCGGAGTGTGCTGTGATCGGTGTGCATGACGAGATCAAGGGCCAGGTACCGTTGGCGCTGGTGGTACTCAAGGA TGGCGAGGGCATTGCCGAGGCGCAGTTGCTGGTGGAGCTGGTGGGCAGCGTGCGCGAGGAAATTGGCCCGCTGGCCTGTTTCAACC GGGTACGGCTGGTGAAGCGCCTGCCCAAGACCCGTTCCGGCAAGATTCTGCGGGCGGTGCTGCGCAAGATTGCCGATGGGCAGGAT TATGTGCCGCCGTCGACCCTGGATGACCCGGCAGTGCTGGGGGAGATCGAAGCGGTGCTGGCAGATTTGCCCAGGGCGGGTTGA

[0066] **제조예 1-3. 개선된 프로피온산 생산을 위한 이종 균주 유래의 *yciA* 및 *ygfH* 유전자를 발현하는 슈도모나스 EM42 균주의 제작**

[0067] 슈도모나스 푸티다 KT2440의 *lva* 오페론으로부터 전사 활성화인자 LvaR 및 그의 동족 *lvaA* 프로모터를 사용하여 레불린산-유도성 발현 시스템이 개발된바 있다. 구체적으로, 플라스미드 pPROBE_LvaR/P_{lvaA}_egfp를 제작하였고, 리포터 단백질로서 녹색 형광 단백질을 발현시켜 레불린산-기반 유도를 분석하였다(Sathesh-Prabu *et al*, *Scientific reports*, 2021, 11(1), 1-8). pPROBE_LvaR/P_{lvaA}_*yciA* 및 pPROBE_LvaR/P_{lvaA}_*ygfH* 플라스미드를 제작하기 위해, *yciA* 유전자(서열번호 3) 및 *ygfH* 유전자(서열번호 4)를 표 2에 기재된 프라이머들을 사용하여 헤모필루스 인플루엔자 및 대장균으로부터 각각 증폭시켰다. 이어서, pPROBE_LvaR/P_{lvaA}_egfp를 NdeI/HindIII로 절단하고 *egfp*를 깁슨 어셈블리 클로닝 방법을 이용하여 각각의 유전자로 대체함으로써 상기 증폭된 유전자 산물을 클로닝하였다. RBS 서열에 의해 분리된 두 유전자의 전사 융합을 이용하여 pPROBE_LvaR/P_{lvaA}_*yciA_ygfH* 플라스미드를 제작하였다. 이어서, 상기 제작된 플라스미드들을 제조예 1-2에서 제작된 EM42:ΔCE 균주에 형질전환시켜 EM42:ΔCE:*yciA*, EM42:ΔCE:*ygfH*, 및 EM42:ΔCE:*yciA*:*ygfH* 균주를 수득하였다. 모든 제작된 플라스미드들은 서열분석으로 확인하였다(Macrogen, 대한민국).

[0068] 사용된 *yciA* 유전자(서열번호 3) 및 *ygfH* 유전자(서열번호 4)를 표 4에 나타낸다.

표 4

[0069]

유전자	서열번호	서열
yciA	3	ATGTCTGCCAATTTTACTGATAAAAATGGTCGCCAATCAAAAGGAGTTCTTTTACTACGAACTTTGGCGATGCCTTCTGACACCAA TGCTAACGGAGATATTTTTGGTGGCTGGATTATGTCTCAAATGGATATGGGCGGCGCGATTTTAGCGAAAGAAATCGCACACGGAC GCGTGGTTACTGTCGCCGTTGAAAGTATGAATTTTATCAAACCAATCTCTGTGGGCGATGTGGTTTGTTGCTACGGTCAATGTCTC AAAGTTGGGCGTTCTTCCATTAAAATTAAAGTAGAAGTATGGGTAAAAAAAGTGGCGAGTGAGCCAATTGGCGAACGTTATTGTGT CACCGATGCGGTATTTACTTTTGTTGCAGTTGATAATAATGGTCGCTCTCGCACGATTCCCCGTGAAAATAACCAAGAGTTAGAAA AAGCATTAGCCTTAATTTCAGAACAACCCTTGTAA
ygfH	4	ATGGAAACTCAGTGGACAAGGATGACCGCCAATGAAGCGGCAGAAATTATCCAGCATAACGACATGGTGGCATTTAGCGGCTTTAC CCCGGCGGGTTCGCCGAAAGCCCTACCCACCGCGATTGCCCGCAGAGCTAACGAACAGCATGAGGCCAAAAAGCCGTATCAAATTC GCCTTCTGACGGGTGCGTCAATCAGCGCCGCCGCTGACGATGTACTTTCTGACGCCGATGCTGTTTCCTGGCGTGCGCCATATCAA ACATCGTCCGGTTTACGTAAAAAGATCAATCAGGGCGCGGTGAGTTTCGTTGACCTGCATTTGAGCGAAGTGGCGCAAATGGTCAA TTACGGTTTCTTCGGCGACATTGATGTTGCCGTCATTGAAGCATCGGCACTGGCACCGGATGGTCGAGTCTGGTTAACCAGCGGGA TCGGTAATGCGCCGACCTGGCTGCTGCGGGCGAAGAAAGTGATCATTGAACTCAATCACTATCACGATCCGCGCGTTGCAGAACTG GCGGATATTGTGATTCCTGGCGCGCCACCGCGGCGCAATAGCGTGTCGATCTTCCATGCAATGGATCGCGTCGGTACCCGCTATGT GCAAATCGATCCGAAAAAGATTGTCGCCGTCGTGGAAACCAACTTGCCCGACGCCGGTAATATGCTGGATAAGCAAAATCCCATGT GCCAGCAGATTGCCGATAACGTGGTCACGTTCTTATTGCAGGAAATGGCGCATGGGCGTATTCCGCCGGAATTTCTGCCGCTGCAA AGTGGCGTGGGCAATATCAATAATGCGGTAATGGCGCGTCTGGGGGAAAACCCGGTAATTCCTCCGTTTATGATGTATTCGGAAGT GCTACAGGAATCGGTGGTGCATTTACTGGAAACCGGCAAAATCAGCGGGGCCAGCGCCTCCAGCCTGACAATCTCGGCCGATTCCC TGCGCAAGATTTACGACAATATGGATTACTTTGCCAGCCGCATTGTGTTGCGTCCGCAGGAGATTTCCAATAACCCGGAAATCATC CGTCGTCTGGGCGTCATCGCTCTGAACGTCGGCCTGGAGTTTGATATTTACGGGCATGCCAACTCAACACACGTAGCCGGGGTCGA TCTGATGAACGGCATCGGCGGCAGCGGTGATTTTGAACGCAACGCGTATCTGTCGATCTTTATGGCCCCGTCGATTGCTAAAGAAG GCAAGATCTCAACCGTCGTGCCAATGTGCAGCCATGTTGATCACAGCGAACACAGCGTCAAAGTGATCATCACCGAACAAGGGATC GCCGATCTGCGCGGTCTTTCCCCGCTTCAACGCGCCCGCACTATCATTGATAATTGTGCACATCCTATGTATCGGGATTATCTGCA TCGCTATCTGGAAAATGCGCCTGGCGGACATATTCACCACGATCTTAGCCACGTCTTCGACTTACACCGTAATTTAATTGCAACCG GCTCGATGCTGGGTTAA

[0071] **제조예 1-4. 배지 및 배양 조건**

[0072] 레불린산(이하, LA)(Sigma-Aldrich)을 10 N NaOH로 pH 7.0으로 중화시키고, 사용 전에 오토클레이브로 멸균시켰다. Luria-Bertani(LB) 배지(5 g/L 효모 추출물, 10 g/L 펩톤, 및 10 g/L NaCl) 및 Terrific Broth(TB) 배지(12 g/L 트립톤, 24 g/L 효모 추출물; 9.4 g/L 이염기성 인산칼륨, 및 2.2 g/L 일염기성 인산칼륨)를 사용하여 대장균 및 슈도모나스 푸티다를 각각 37 ℃ 및 30 ℃에서, 200 rpm의 진탕 조건하에서 배양하였다. 플라스미드 구조물을 유지하기 위해, 배지에 50 μg/mL 카나마이신(Km)을 보충하였다.

[0073] 배양을 위해, 세포를 LB 아가 플레이트(필요한 대로, Km 함유 또는 비함유) 상에 스트리킹하고, 규정된 성장 조건하에서 밤새 배양하였다. 이어서, 콜로니들을 5 mL LB 배지에 접종하고, 진탕 조건하에서 16 시간 동안 배양하였다. 이어서, 종균 배양물(0.5 mL)을 레불린산, 글리세롤, 또는 둘 다를 함유하는 20 mL의 TB 배지를 함유하는 250 mL 플라스크에 실험 조건에 따라 접종하였다. 글리세롤은 프로피온산 생산을 위해 레불린산과 공-기질로서 선택하였다. 추가의 분석을 위해 샘플을 주기적으로 수집하였다. 모든 실험은 3중으로 수행하였다. 레불린산의 프로피온산으로의 전환율은 몰 기준으로 계산하고 몰 수율(%)로 나타내었으며, 이때 프로피온산 생산에 수반된 다른 미지의 대사물들을 배제시키기 위해 소비된 레불린산 만을 사용하여 몰 수율을 계산하였다.

[0074] 유가식 발효를 위해, 실험은 1800 mL의 초기 작업량 하에 5 L 생물반응기(MARADO-PDA; CNS, 대한민국 대전)에서 수행하였다. 플라스크 배양에서와 같이, 50 μg/mL 카나마이신으로 보충된 전술한 TB 배지를 사용하였다. 세포를 초기에 유도를 위해 레불린산(3 g/L)를 보충하여 글리세롤 상에서 급속히 성장시켰으며, 이어서, 12 시간 후에 레불린산을 첨가하여 프로피온산 생산을 개시하였다. 온도 및 교반 속도는 각각 30 ℃ 및 700 rpm으로 설정하였다. 또한, 2 vvm의 공기를 유동시켜 용존 산소(DO)를 유지시켰다. pH는 2 M NH_4OH 및 4 M H_3PO_4를 사용하여 7.0으로 유지시켰다. 레불린산 수준은 50% 레불린산을 간헐적으로 공급하여 5 g/L 내지 15 g/L로 유지시켰다. 샘플을 주기적으로 회수하여 세포 성장, 및 글리세롤, 레불린산 및 프로피온산의 농도를 측정하였다.

[0076] **실시예 1. EM42:ΔCE 균주를 이용한 프로피온산 생산**

[0077] 제조예 1-2에서 제조된 균주들을 제조예 1-4의 배지 및 배양 조건을 이용하여 배양시킨 후 균주의 성장을 확인

하였다. 세균 균주의 성장(OD_{600})을 분광광도계(Libra S22; Biochrom, UK)를 사용하여 관찰하였다. 글리세롤, 레불린산 및 프로피온산의 분석을 위해, 수집된 샘플들을 희석하고, 20 μL 분취량을 HPX-87H 컬럼(Bio-Rad)에 0.5 mL/분으로 및 35℃의 컬럼 온도에서 주입하였다. 분석은 굴절률 검출기(Shimadzu) 및 SIL-20A 자동-샘플러(Shimadzu)가 장착된 Shimadzu HPLC 스테이션에서 수행하였다. 나타낸 값은 3회 실험의 평균값이다. 표준 편차는 오차 막대로 나타낸다.

[0078] 그 결과, 성장 곡선 분석에서 알 수 있듯이, EM42:ΔC, EM42:ΔE, 및 EM42:ΔCE 균주에서 탄소 공급원으로 레불린산(10 g/L)를 함유한 TB 배지에서의 세포 생존력이 EM42 균주와 거의 동일하므로, *prpC* 및 *prpE* 유전자 모두의 결실이 세포 생존력에 영향을 미치지 않는다는 것을 확인하였다(도 1의 A). 또한, 48 시간 후 프로피온산 생산에 대한 평가는, EM42 균주는 프로피온산을 생산할 수 없지만, EM42:ΔCE 균주는 9.6% 몰 수율에 달하는 0.31 g/L의 최대 프로피온산 생산을 나타내었음을 보여주었다. 본 발명의 결과는 또한 *prpC* 및 *prpE* 유전자 모두의 결실이 프로피오닐-CoA의 축적을 가능하게 하고, 프로피온산의 프로피오닐-CoA로의 분해를 억제하여, 모든 균주들 중에서 가장 높은 수율의 프로피온산을 달성함을 보여주었다(도 1의 B). 그러나, 레불린산 소비는 배양 48 시간 후에 상기 결실에 의해 영향을 받았으며, EM42는 9.6 g/L 의 레불린산을 소비한 반면, EM42:ΔC 및 EM42:ΔCE 균주는 각각 단지 4.6 및 4.5 g/L의 레불린산 소비를 나타내었다(도 1의 C).

[0079] 따라서, 이는 PrpC 유전자의 결실이 메틸시트레이트 회로를 차단함으로써 프로피오닐-CoA의 축적을 유발하여, 더 낮은 레불린산 소비를 야기하였음을 보여주었다.

[0081] **실시예 2. EM42:ΔCE:*yciA*:*ygfH* 균주를 이용한 프로피온산 생산**

[0082] 실시예 1에서 확인된 바와 같이, 프로피온산 생산 수준에 대한 평가는 녹아웃 균주 EM42:ΔCE가 야생형 EM42에 비해 유의미한 프로피온산 생산을 나타냄을 보여주었지만, 상기 생산 수준은 기대한 수준 보다 낮았다. 따라서, 프로피오닐-CoA의 프로피온산으로의 전환은 티오에스터라제에 의해 촉진되는 제한 단계일 수 있다. 상기 이슈를 해결하기 위해, 헤모필루스 인플루엔자 DSM 11121로부터의 잘 알려진 티오에스테라제(YciA) 유전자를 슈도모나스 푸티다로부터의 레불린산-기반 유도 시스템(LvaR/P_{lvaA})에서 발현시켰다. 상기 기질-기반 유도는 고가의 화학 유도제의 사용 및 세포에 추가의 대사 부담을 해결할 수 있다.

[0083] 그 결과, 생성된 EM42:ΔCE:*yciA* 균주는 48 시간 후에 레불린산을 거의 완전히(9.8 g/L) 사용하였으며, 이러한 경향은 야생형 EM42와 유사하였고 EM42:ΔCE에서 보인 것보다 46% 더 높았다. 추가로, 외인성 티오에스터라제의 발현도 또한 레불린산으로부터 프로피온산의 생산을, 52%의 몰수율 하에 EM42:ΔCE 균주에 의해 확인된 것에 비해 10배만큼 개선하였다(도 2). 따라서, 상기 결과는 슈도모나스 푸티다 고유의 티오에스터라제의 낮은 발현 수준이 낮은 프로피온산 생산의 원인이 되는 것을 확인하였다. 최근에, *PP4975*에 의해 코딩된, 슈도모나스 푸티다 KT2440으로부터의 티오에스터라제가 프로피온산 생산에 수반되었다(Ma et al, 2021). 그러나, 슈도모나스 푸티다 KT2440으로부터의 티오에스터라제의 활성은 EM42:ΔCE:*yciA* 균주에서 매우 낮았다.

[0084] YciA의 성공적인 발현 및 향상된 프로피온산 생산후에도, 역가 및 몰 수율을 개선할 여지가 여전히 존재한다. 따라서, 본 발명자들은 EM42:ΔCE에서 대장균로부터의 프로피오닐-CoA:숙시네이트 CoA 트랜스퍼라제(YgfH) 유전자를 과발현시킴으로써 기본 대사 경로를 프로피오닐-CoA-기반 프로피온산 생산과 연관시키기 위해 시도하였다. YgfH는 프로피오닐-CoA와 숙시네이트-CoA 사이에서 CoA 풀을 순환시킬 뿐 아니라, 프로피온산 생산쪽으로의 탄소 흐름에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.

[0085] 그 결과, 생성된 EM42:ΔCE:*ygfH* 균주는 동일한 배양 조건하에서 2.4 g/L의 프로피온산을 생산하였으며, 이것은 EM42:ΔCE에 의해 생산된 것보다 7배 더 높았다(도 2). EM42:ΔCE:*ygfH* 균주는 레불린산을 완전히 소비하지 않았으며, 배양 48 시간 후에 1.8 g/L의 잔류 레불린산이 여전히 이용가능하였다. 그러나, 이러한 탄소 흐름은 EM42:ΔCE:*yciA*과 동등하지 않았으며, 따라서 더 낮은 프로피온산 생산(25%) 및 몰 수율(11%)을 야기하였다(도 2). 따라서, 이러한 결과들은 YgfH의 발현이 EM42:ΔCE 균주에서 프로피온산 생산을 개선할 수 있음을 보여주었다.

[0086] 또한, 동일한 레불린산-유도성(LvaR/P_{lvaA}) 프로모터 시스템 하에서 *yciA*와 *ygfH*의 전사 융합으로 플라스미드를 제작하였고, 상기 플라스미드를 EM42:ΔCE에 형질전환시켜 EM42:ΔCE:*yciA*:*ygfH* 균주를 수득하고 프로피온산 생산량을 확인하였다.

[0087] 그 결과, 외인성 YciA 및 YgfH의 동시-발현이 프로피온산 생산을 4.6 g/L까지 현저하게 개선시켰음을 보여주었

다(도 2). 또한, EM42:ΔCE:*yciA* 및 EM42:ΔCE:*ygfH*에 비해, EM42:ΔCE에서 상기 두 유전자의 동시-발현은 프로피온산 생산을 각각 30% 및 48% 만큼 증가시켰다. EM42:ΔCE:*yciA*:*ygfH*는 또한 몰 수율을 72%로 개선시켰으며, 이것은 프로피온산 생산쪽으로의 최대 탄소 흐름을 나타낸다.

[0088] 이를 통해서, 슈도모나스 푸티다 EM42 균주에서 *prpC* 및 *prpE* 유전자의 기능적 결실뿐만 아니라, 이종 균주 유래의 *yciA* 및 *ygfH* 유전자의 발현이 프로피온산 생산을 획기적으로 개선시킬 수 있는 것을 확인하였다.

[0090] **실시예 3. EM42:ΔCE:*yciA*:*ygfH* 균주 및 공-기질로서 글리세롤을 사용하는 경우 프로피온산 생산량 확인**

[0091] 실시예 1 및 2의 결과들은, EM42:ΔCE:*yciA*:*ygfH* 균주에 의해 매개된 프로피온산 생산의 경우에 세균 바이오매스에 대한 낮은 탄소 흐름 이용가능성을 나타낸다. 이러한 결과는 EM42:ΔCE:*yciA*, EM42:ΔCE:*ygfH,* 및 EM42:ΔCE 균주들에 비해 EM42:ΔCE:*yciA*:*ygfH*의 감소된 성장으로 더 확인되었다(도 3). EM42:ΔCE:*yciA*:*ygfH* 균주가 더 높은 프로피온산 역가 및 몰 수율을 제공하였지만, 이와 같은 성장면에서의 이슈는 대규모 발효에 적용하기 전에 해결되어야 한다. 상기 이슈를 해결하기 위해, 글리세롤을 공-기질로 사용하였다. 따라서, 5 g/L 글리세롤을 초기에 별도로 첨가한 다음, 레불린산(10 g/L)과 함께 첨가하고, 성장, 기질(들) 소비, 및 프로피온산 생산을 EM42:ΔCE, EM42:ΔCE:*yciA*:*ygfH*, EM42:ΔCE:*ygfH*, 및 EM42:ΔCE:*yciA*:*ygfH*를 포함한 4개 균주 모두에서 평가하였다.

[0092] 그 결과, 글리세롤을 단독으로 함유한 배지가 초기에 상기 4개 균주들 사이에서 성장의 차이를 나타내지 않은 것으로 나타났다(도 5). 그러나, YciA 및/또는 YgfH의 발현은 프로피온산 생산에 유의미한 차이를 나타내지 않았는데, 아마도 글리세롤이 프로피온산 생산을 위한 전구체로서 충분한 프로피오닐-CoA를 제공할 수 없었기 때문인 것으로 추측된다(도 4).

[0093] 이를 통해서, 글리세롤 단독만으로는 충분한 프로피온산 생산이 이루어지지 않으므로, 기질과의 병용이 필요한 것을 확인하였다.

[0094] 이어서, 기질(레불린산) 및 공-기질(글리세롤) 둘 다를 배지에 첨가하고 48 시간 동안 배양하였다.

[0095] 그 결과, 기질 및 공-기질을 함께 첨가한 경우, 성장 결함을 나타내지 않았고 4개 균주 모두 현저하게 유사한 성장 프로필을 나타내었음을 보여주었다(도 7). 또한, 프로피온산 생산은 4개 균주 모두에서 향상되었지만, 최대 프로피온산 생산은 EM42:ΔCE:*yciA*:*ygfH* 균주에 의해 6.5 g/L에서 달성되었다(도 6).

[0096] 이를 통해서, 글리세롤이 성장 결함을 제거하고 프로피온산 생산을 개선하기 위해 필요하므로, 공-기질로서 사용되어야 하는 것을 확인하였다.

[0098] **실시예 4. 유가식 생물반응기 배양에서 프로피온산의 생산: EM42:ΔCE:*yciA*:*ygfH* 균주 및 공-기질로서 글리세롤 사용**

[0099] EM42 균주에서 프로피오닐-CoA의 축적은 메틸시트레이트 회로를 통한 그의 동화를 담당하는 *PrpC* 유전자를 결실시킴으로써 향상되었다. 유사하게, 프로피온산의 프로피오닐-CoA로의 상호전환은 *prpE*의 유전자의 결실에 의해 차단되었다. 이어서, 프로피온산 생산을 촉진하는 *YciA* 및 *YgfH*를 동시-발현시키고, 보다 많은 탄소 흐름을 프로피온산쪽으로 전환시킴으로써 최종 균주 EM42:ΔCE:*yciA*:*ygfH*를 수득하였다(도 8). 이어서, EM42:ΔCE:*yciA*:*ygfH* 균주를 사용하여 5-L 생물반응기에서 유가식 발효를 수행하여 대규모 프로피온산 생산을 실시하였다. 5 g/L 글리세롤 및 3 g/L 레불린산을 유도제로 첨가함으로써 바이오매스 배양을 개시하였다.

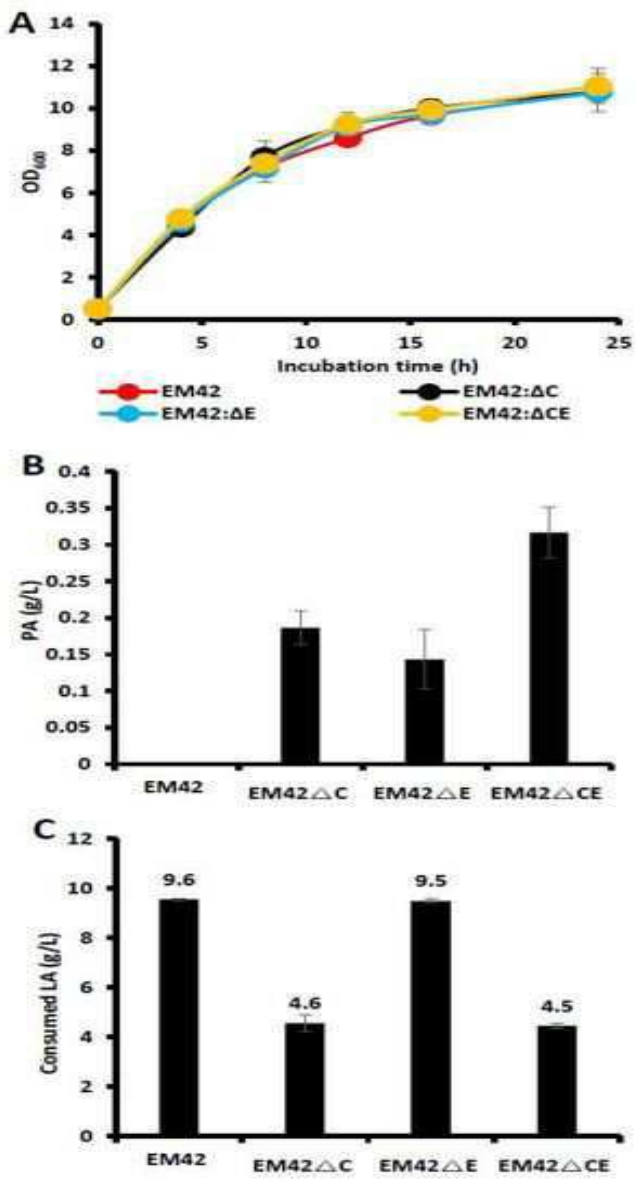
[0100] 그 결과, 성장 곡선 평가에서 알 수 있듯이, 12 시간 배양 후에 OD_{600}이 약 20에 도달하였고, 이어서 10 g/L의 레불린산을 첨가하여 프로피온산 생산이 개시되었음을 확인하였다(도 9). 탄소 공급원으로서 연속 레불린산 공급 후에, 배양물의 최대 OD_{600}은 48 시간 배양후 35.4에 도달하였다. 이어서, 성장이 중지되었지만, 프로피온산 생산은 계속되었다. 추가의 분석에 의해 탄소 공급원으로 49.56 g의 레불린산을 소비한 후 83%의 몰 수율 및 0.3 g/L/h의 생산성 하에 26.8 g/L의 최대 프로피온산 역가가 수득된 것으로 확인되었다(도 9). 숙시네이트 및 아세테이트와 같은 부산물은 전체 생물공정 동안 검출되지 않았다.

[0101] 따라서, 이러한 결과들은 플라스크 규모 실험실 배양 뿐만 아니라 대규모 발효에서도 높은 몰 수율을 시사하는 것이므로, 경제적 관점에서 유의미하다. 프로피온산 바이오리파이너리에서, 원료 물질의 비용은 전체 비용의 약

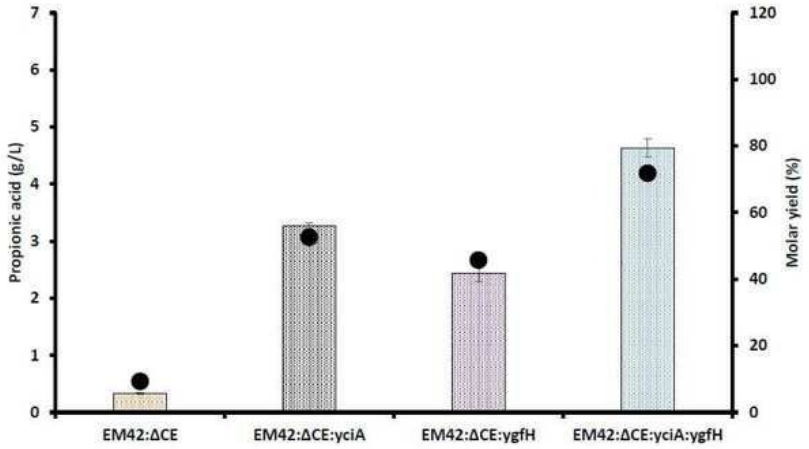
50%이며, 레불린산과 같은 저-비용 기질의 선택 및 높은 몰 수율은 프로피온산의 산업적 생산의 이익률을 향상시킬 수 있다.

도면

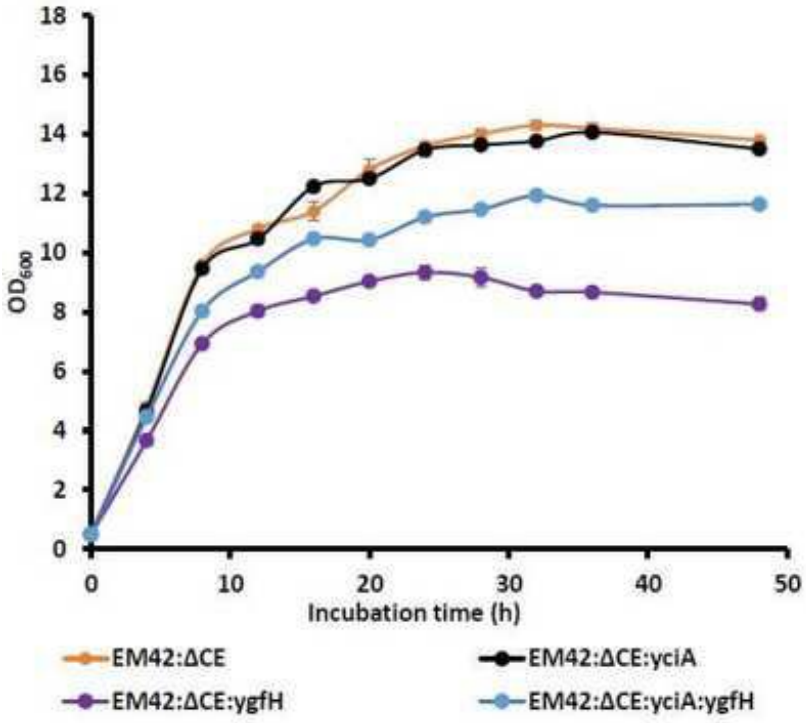
도면1



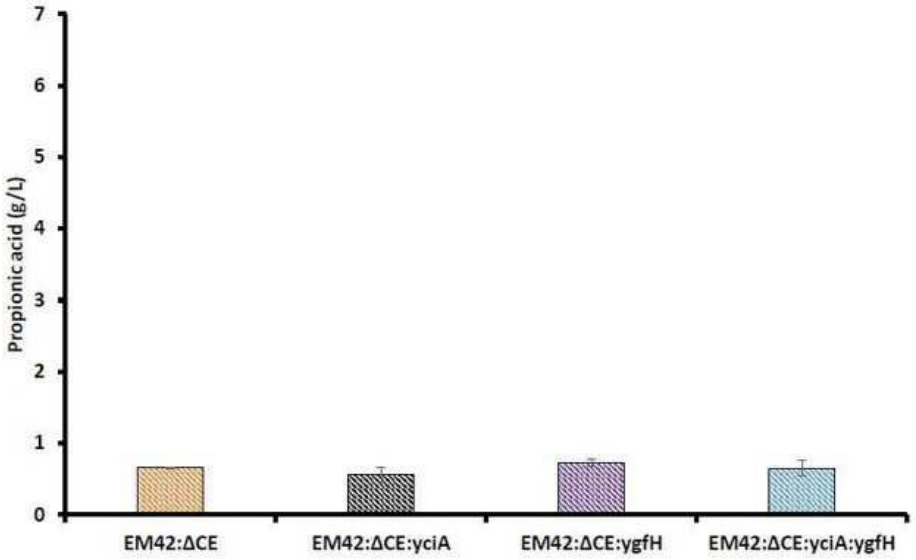
도면2


Propionic acid (g/L)
Molar yield (%)
EM42:ΔCE
EM42:ΔCE:yciA
EM42:ΔCE:ygfH
EM42:ΔCE:yciA:ygfH

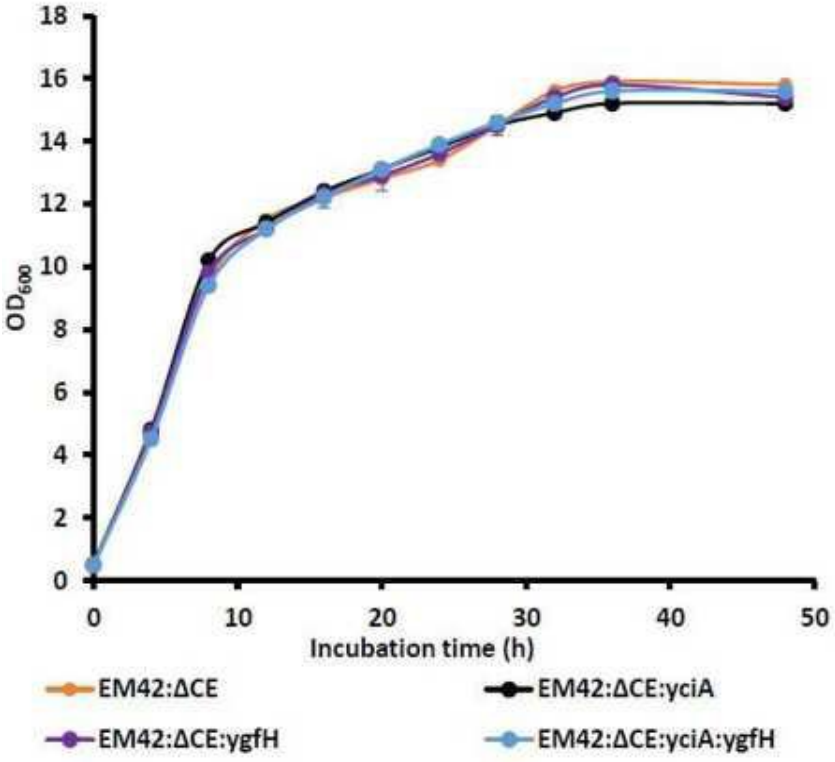
도면3


OD600
Incubation time (h)
EM42:ΔCE
EM42:ΔCE:yciA
EM42:ΔCE:ygfH
EM42:ΔCE:yciA:ygfH

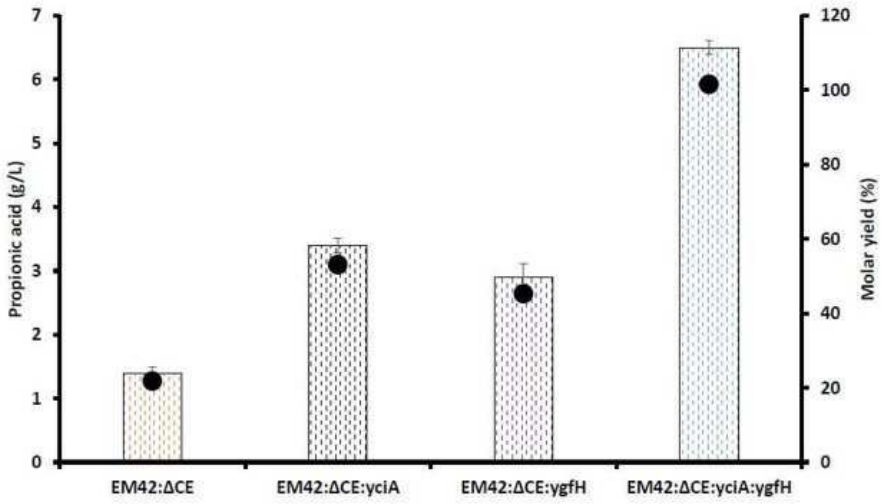
도면4


Propionic acid (g/L)
0
1
2
3
4
5
6
7
EM42:ΔCE
EM42:ΔCE:yciA
EM42:ΔCE:ygfH
EM42:ΔCE:yciA:ygfH

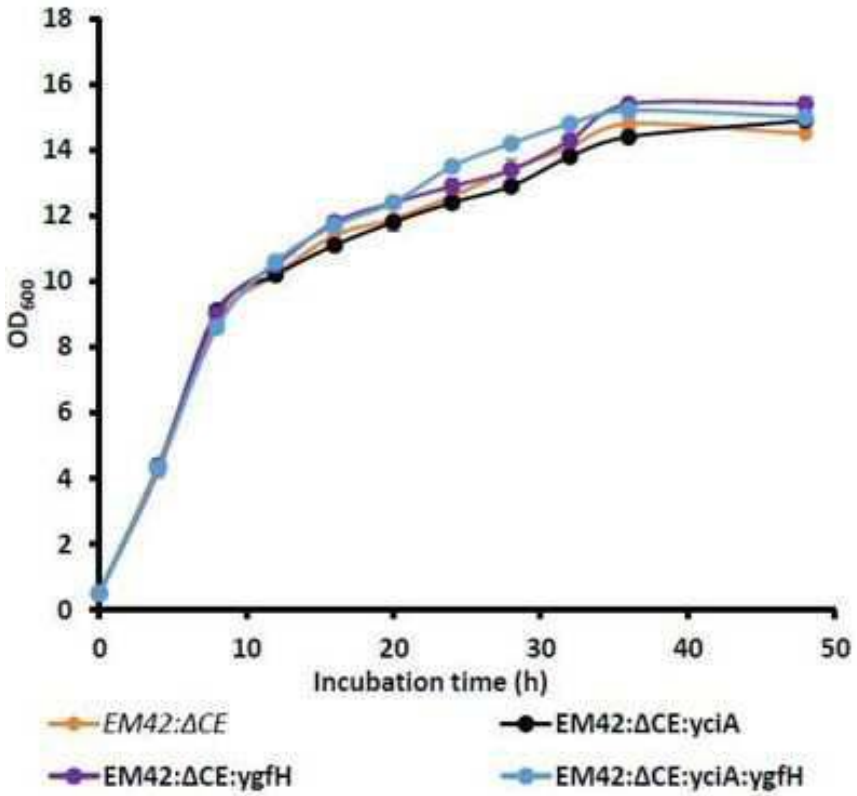
도면5


OD600
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
0
10
20
30
40
50
Incubation time (h)
EM42:ΔCE
EM42:ΔCE:yciA
EM42:ΔCE:ygfH
EM42:ΔCE:yciA:ygfH

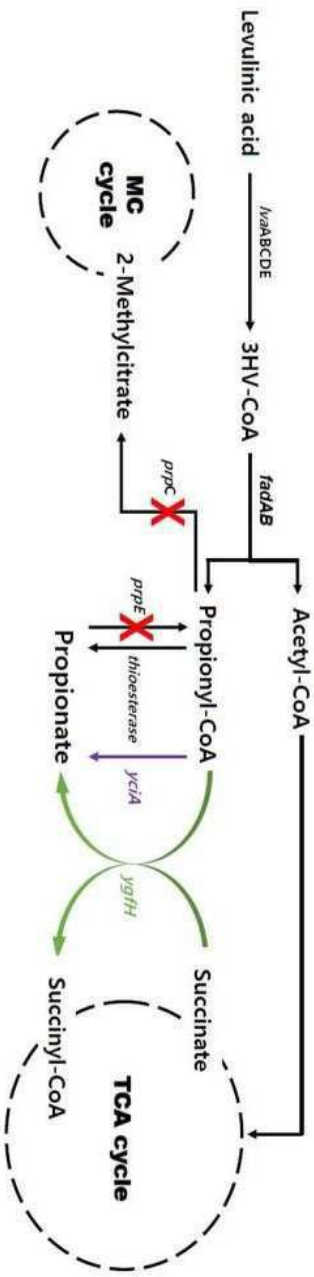
도면6


Propionic acid (g/L)
Molar yield (%)
0
1
2
3
4
5
6
7
0
20
40
60
80
100
120
EM42:ΔCE
EM42:ΔCE:yciA
EM42:ΔCE:ygfH
EM42:ΔCE:yciA:ygfH

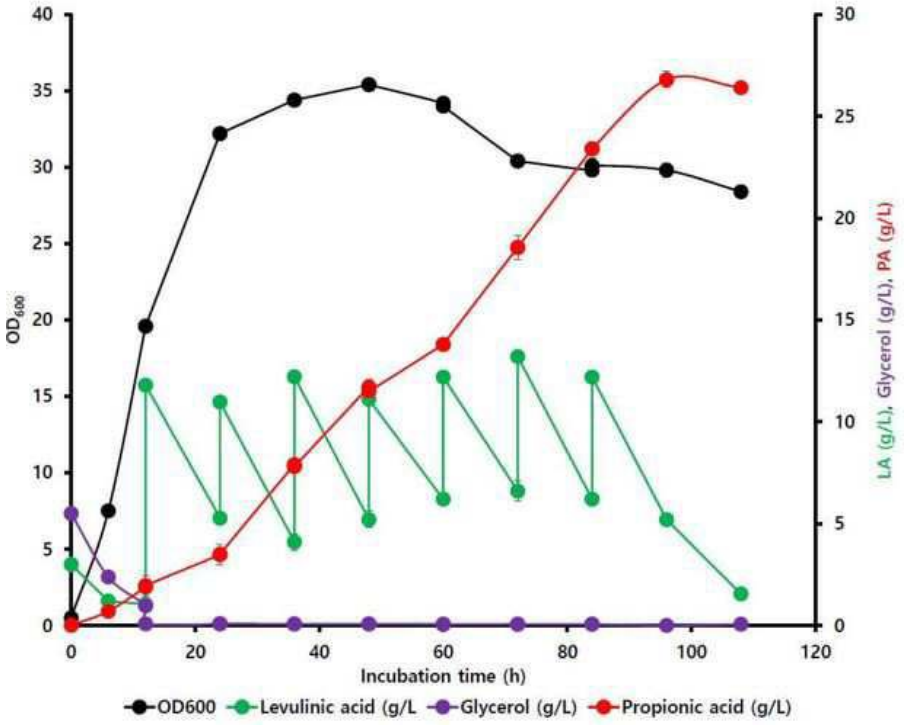
도면7


OD600
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
0
10
20
30
40
50
Incubation time (h)
EM42:ΔCE
EM42:ΔCE:yciA
EM42:ΔCE:ygfH
EM42:ΔCE:yciA:ygfH

도면8


Levulinic acid
lvaABCDE
3HV-CoA
fadAB
Acetyl-CoA
MC cycle
2-Methylcitrate
prpC
prpE
Propionyl-CoA
thioesterase
yciA
Propionate
ygfH
Succinate
Succinyl-CoA
TCA cycle

도면9


OD600
LA (g/L), Glycerol (g/L), PA (g/L)
Incubation time (h)
OD600
Levulinic acid (g/L
Glycerol (g/L)
Propionic acid (g/L)

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

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