



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년03월21일
(11) 등록번호 10-1718508
(24) 등록일자 2017년03월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/75 (2006.01) C12N 9/88 (2006.01)
C12N 9/90 (2006.01) C12P 7/26 (2006.01)
C12R 1/125 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/75 (2013.01)
C12N 9/88 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0160808
(22) 출원일자 2015년11월17일
심사청구일자 2015년11월17일
(56) 선행기술조사문헌
KR101019759 B1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암
동5가)
(72) 발명자
박제원
경기도 고양시 일산동구 위시티1로 7, 504동 904
호 (식사동, 위시티블루밍5단지아파트)
(74) 대리인
이처영, 장제환

전체 청구항 수 : 총 6 항

심사관 : 최준호

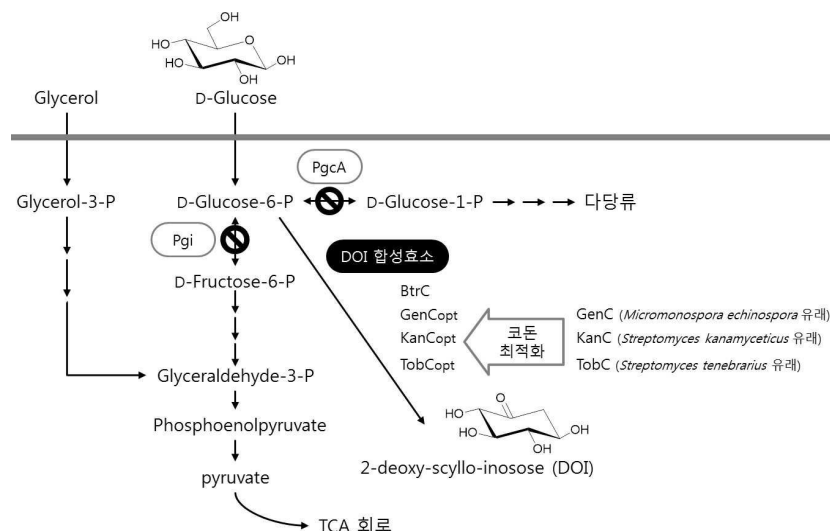
(54) 발명의 명칭 2-데옥시-실로-이노소스 생합성 경로를 가지는 재조합 고초균 및 이를 이용한 2-데옥시-실로-이노소스의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 2-데옥시-실로-이노소스 생합성 경로를 가지는 재조합 고초균 및 이를 이용한 2-데옥시-실로-이노소스의 제조방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 고초균(*Bacillus subtilis*)에, 코돈 최적화된 2-데옥시-실로-이노소스 합성효소를 코딩하는 유전자가 도입되고, 포스포글루코오스 이소머라아제를 코딩하는 유전자 및/또는 포스포글루코뮤타아제를 코딩하는 유전자가 결설되어 있는 것을 특징으로 하는 2-데옥시-실로-이노소스 제조용 재조합 고초균 및 이를 이용한 2-데옥시-실로-이노소스의 제조방법에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 의약품원료나 화학공업자원으로서 광범위하게 응용되는 유용 화합물인 2-데옥시-실로-이노소스(DOI)를 기존의 재조합 대장균을 이용한 2-데옥시-실로-이노소스(DOI) 발효방법보다 고수율로 DOI를 생산할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 9/90 (2013.01)
C12P 7/26 (2013.01)
C12Y 503/01009 (2013.01)
C12Y 504/02002 (2013.01)
C12R 1/125 (2013.01)
C12Y 402/03124 (2015.07)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ011066
 부처명 농촌진흥청
 연구관리전문기관 농촌진흥청
 연구사업명 차세대바이오그린21사업
 연구과제명 생합성 경로공학 기반의 토양 방선균 유전자원 활용 신규 당부가 항생물질 생산
 기 여 율 1/2
 주관기관 고려대학교 산학협력단
 연구기간 2015.03.01 ~ 2017.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015002524
 부처명 미래창조과학부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 (이공)중견연구자지원_핵심연구
 연구과제명 생합성 경로공학화 기반 아미노사이클리톨 신규 항생제 후보물질 디자이너
 기 여 율 1/2
 주관기관 고려대학교 산학협력단
 연구기간 2015.05.01 ~ 2016.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

고초균(*Bacillus subtilis*)에, 서열번호 2의 염기서열로 표시되는 2-데옥시-실로-이노소스 합성효소를 코딩하는 유전자가 도입되고, 포스포글루코오스 이소머라아제를 코딩하는 유전자 또는 포스포글루코뮤타아제를 코딩하는 유전자가 결실되어 있거나, 포스포글루코오스 이소머라아제를 코딩하는 유전자 및 포스포글루코뮤타아제를 코딩하는 유전자가 결실되어 있는 것을 특징으로 하는 2-데옥시-실로-이노소스 제조용 재조합 고초균.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 2-데옥시-실로-이노소스 합성효소는 스트렙토마이세스 카나마이세티커스(*Streptomyces kanamyceticus*), 스트렙토마이세스 테네브라리우스(*Streptomyces tenebrarius*) 및 바실러스 실쿨란스(*Bacillus circulans*)로 구성되는 군에서 선택되는 균주 유래인 것을 특징으로 하는 재조합 고초균.

청구항 3

제1항에 있어서, 서열번호 2의 염기서열로 표시되는 2-데옥시-실로-이노소스 합성효소를 코딩하는 유전자가 도입되고, 포스포글루코오스 이소머라아제를 코딩하는 유전자가 결실되어 있는 것을 특징으로 하는 재조합 고초균.

청구항 4

제1항에 있어서, 서열번호 2의 염기서열로 표시되는 2-데옥시-실로-이노소스 합성효소를 코딩하는 유전자가 도입되고, 포스포글루코오스 이소머라아제를 코딩하는 유전자 및 포스포글루코뮤타아제를 코딩하는 유전자가 결실되어 있는 것을 특징으로 하는 재조합 고초균.

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

다음 단계를 포함하는 2-데옥시-실로-이노소스의 제조방법:

(a) 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 재조합 고초균을 배양하여, 2-데옥시-실로-이노소스를 생성시키는 단계; 및

(b) 생성된 2-데옥시-실로-이노소스를 수득하는 단계.

청구항 10

제9항에 있어서, (a) 단계의 배양은 글리세롤 함유 배지에서 수행하는 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 2-데옥시-실로-이노소스 생합성 경로를 가지는 재조합 고초균 및 이를 이용한 2-데옥시-실로-이노소스의 제조방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 고초균(*Bacillus subtilis*)에, 코돈 최적화된 2-데옥시-실로-이노소스 합성효소를 코딩하는 유전자가 도입되고, 포스포글루코오스 이소머라아제를 코딩하는 유전자 및/또는 포스포글루코뮤타아제를 코딩하는 유전자가 결실되어 있는 것을 특징으로 하는 2-데옥시-실로-이노소스 제조용 재조합 고초균 및 이를 이용한 2-데옥시-실로-이노소스의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 탄소 6원환(pyranose) 화합물은 석유를 원료로 하여 생산되어 왔다. 카테콜(catechol) 등의 방향족 화합물의 대부분은 석유를 원료로 하여 생산되고 있는 실정이지만, 제한된 석유 자원 문제 및 이산화탄소 배출량의 전세계적 규제 등으로 바이오매스를 이용한 환경친화적 신규 제조 프로세스의 개발이 요구되고 있다.

[0003] 2-데옥시-실로-이노소스 합성효소(2-deoxy-scyлло-inosose synthase; 이하, DOI 합성효소)는, 2-데옥시스트렙타민(2-deoxystreptamine)을 주요 아글리콘으로 함유하는 아미노글리코시드(aminoglycoside) 항생물질의 생합성 초기에 관여하는 효소이며, 그 효소 반응물인 DOI는 의약품이나 화학공업자원으로서 광범위하게 응용되는 유용 화합물이다. DOI를 화학적으로 합성하는 방법은, 다단계의 반응과 유해하며 고가인 금속을 사용하는 것에 반하여, DOI 합성효소를 사용하면, 효율적으로 단일 공정에서 DOI를 생산할 수 있다.

[0004] 부티로신(butirosin) 항생제 생산균인 바실러스 실쿨란스(*Bacillus circulans*)에서, 글루코오스-6-인산(glucose-6-phosphate; 이하, Glc-6-P)을 기질로 하여, 탄소 6원환 화합물인 2-데옥시-실로-이노소스(2-deoxy-scyлло-inosose)(이하, DOI)를 합성하는 반응을 촉매하는, DOI 합성효소가 발견되었다(일본국 특개2000-236881호 공보).

[0005] DOI 합성효소를 대장균(*Escherichia coli*)에 발현시킴으로써 얻어지는 재조합 DOI 합성효소를 사용하고 기질로 Glc-6-P를 이용하는 단일 효소반응으로 DOI를 생산하는 방법이 확립되어 있다(일본국 특개2000-236881호 공보). 또한, DOI는 글루코오스(glucose)에 헥소키나아제(hexokinase)와 DOI 합성효소를 작용시키는 2단계의 효소반응이나, 글루코오스-6-인산에 DOI 합성효소를 작용시키는 1단계의 효소반응으로 합성할 수 있는 것이 알려져 있다(일본 특개2000-236881호, K.Kakinuma *et al*, *Tetrahedron Letters*, 41:1935, 2000). 나아가, 효소 반응액을 농축해서 아세트산 용액으로 하여 요오드화 수소를 작용시킴에 따라, DOI를 카테콜(catechol)로까지 변환시킬 수 있는 것도 보고되어 있다(일본특개2000-236881호).

[0006] 한편, DOI 합성효소를 도입한 대장균에 바이오매스 유래의 글루코오스를 원료로 하는 미생물 발효에 의한 DOI의 합성 방법이 근래 보고되어 있다(WO 2006/109479, T. Kogure *et al.*, *J. Biotechnology*, 129:502, 2007). 이에 따르면, DOI 생산 방법에서 원료로서 글루코오스를 사용하고, 균체의 증식/생육을 위해서, 회소하면서 고가인 당 알코올 만니톨(mannitol)이 또한 필요한 것으로 확인되었다. 즉, 야생형의 대장균에 DOI 합성 효소를 발현시킨 것만으로는 DOI의 생산성이 낮았으며, 대장균의 일차 대사경로에 필수적인 3종의 유전자, 포스포글루코오스 이소머라아제(pgi) 및 글루코오스-6-인산-1-디히드로게나아제(zwf) 및 포스포글루코뮤타아제(pgm) 암호화 유전자들을 유전체로부터 동시에 결실시켜 높은 생산성(29.5g/L)을 달성할 수 있었다. 결국 글루코오스가 해당계(glycolysis)에 들어가는 대사 경로가 모두 차단되므로, 대체 가능한 해당계에서 이용될 수 있는 만니톨이 대장균의 생육을 위해서 필요하다는 것을 시사한 바 있다.

[0007] 또한, 글루코오스보다 저가의 당원료라 할 수 있는 슈크로오스(sucrose)를 포함하는 식물유래 원료로부터 DOI를 생산하는 방법이 근래 보고되었다(WO 2010/053052). 즉, 슈크로오스 가수분해 효소(CscA) 암호화 유전자 및 바

실러스 실쿨란스(*Bacillus circulans*) 유래 DOI 합성효소 암호화 유전자를 도입시킨 제조합 대장균을 개발하였고, 이를 통해 폐당밀의 주성분인 슈크로오스로부터 공업화 가능한 저가의 DOI를 생산하는 발효공정이 개발되었다.

[0008] 나아가, 기존 DOI 합성효소와 비교하여 상대적으로 높은 내열성 및 pH 안정성을 나타내는 신규한 DOI 합성효소가 최근 개발된 바 있다(WO 2010/109916). DOI 합성효소는 부티로신 생산균인 바실러스 실쿨란스(*Bacillus circulans*)에 속하는 미생물로부터 1997년에 단리 정제(F. Kudo et al., *J. Antibiotics*, 50:424, 1997)되고, 계속해서, 그 유전자 서열도 공개되어 있다(일본특개2000-236881호). 이 이외에도 스트렙토알로테이커스 힌더스타너스(*Streptoalloteichus hindustanus*) JCM3268주(T. Hirayama et al., *J. Antibiotics*, 59:358, 2006) 유래의 DOI 합성 효소 등이 지금까지 발견되어 있다.

[0009] 또한, DOI 합성효소는 전술한 바와 같이 부티로신 외에도 2-데옥시스트렙타민(2-deoxystreptamine)을 주요 아글리콘으로 함유하는 아미노글리코사이드(aminoglycoside)계열 항생제들의 생합성 초기에 관여하는 효소이므로 관련 항생제인 겐타마이신(gentamicin), 카나마이신(kanamycin), 토브라마이신(tobramycin) 등의 생합성에 필수적인 유전자 집단(gene cluster) 내 존재하고 있다(JW Park et al., *Nature Chemical Biology*, 7:843, 2011, JW Park et al., *Nature Chemical Biology*, 7:843, 2011). 특히 이들 항생제들의 주요 구조인 2-데옥시스트렙타민은 초기물질인 Glc-6-P로부터 DOI 합성효소, 이중 기능형 L-glutamine:DOI 아미노전이효소(aminotransferase), 2-데옥시-실로-이노사민(2-deoxy-scyllo-inosamine) 탈수소효소(dehydrogenase)의 일련의 효소반응을 통하여 생합성되는 바, 개별 항생제 생합성 유전자 집단 내에는 DOI 합성효소를 암호화하는 유전자들이 모두 존재하고 있다. 즉, 마이크로모노스포라 에치노스포라(*Micromonospora echinospora*) 유래의 *genC*, 스트렙토마이세스 카나마이세티커스(*Streptomyces kanamyceticus*) 유래의 *kanC*, 그리고 스트렙토마이세스 테네브라리우스(*Streptomyces tenebrarius*) 유래의 *tobC* 등은 바실러스 실쿨란스(*Bacillus circulans*) 유래 *btrC* 외에도 DOI 합성효소 암호화 유전자들을 알 수 있다(대한민국 특허등록 제10-1272351호, 대한민국 특허등록 제10-1272454호).

[0010] DOI 합성효소 유전자들이 보고되고 있으나, 이들을 이용한 대장균에서의 DOI 생산능이 낮은 편이므로, DOI 생산수율을 높일 수 있는 기술의 개발이 필요한 실정이다.

[0011] 이에, 본 발명자들은 대사공학을 통하여, DOI 생산수율을 높일 수 있는 방법을 개발하고자 예의 노력한 결과, 고초균을 숙주로 하여, *kanC* 및 *tobC* 유전자들을 코돈 최적화시켜 도입하고, 고초균 숙주 내 핵산당 대사 경로를 결실시키는 경우, 높은 DOI 생산능을 나타내는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명의 목적은 2-데옥시-실로-이노소스 생합성 경로를 가지는 제조합 고초균 및 이를 이용한 2-데옥시-실로-이노소스의 제조방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 고초균(*Bacillus subtilis*)에, 코돈 최적화된 서열번호 1~3 중 어느 하나의 염기서열을 가지는 2-데옥시-실로-이노소스 합성효소를 코딩하는 유전자가 도입되고, 포스포글루코오스 이소머라아제를 코딩하는 유전자 및/또는 포스포글루코뮤타아제를 코딩하는 유전자가 결실되어 있는 것을 특징으로 하는 2-데옥시-실로-이노소스 제조용 제조합 고초균을 제공한다.

[0014] 본 발명은 또한, (a) 상기 제조합 고초균을 배양하여, 2-데옥시-실로-이노소스를 생성시키는 단계; 및 (b) 생성된 2-데옥시-실로-이노소스를 수득하는 단계를 포함하는 2-데옥시-실로-이노소스의 제조방법을 제공한다.

[0015]

발명의 효과

[0016] 본 발명에 따르면, 의약품료나 화학공업자원으로서 광범위하게 응용되는 유용 화합물인 2-데옥시-실로-이노소스(DOI)를 기존의 제조합 대장균을 이용한 2-데옥시-실로-이노소스(DOI) 발효방법보다 고수율로 DOI를 생산할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0017] 도 1은 고초균 내 핵산당 대사경로 재설계 방법 및 코돈 최적화 2-데옥시-실로-이노소스(DOI) 합성효소의 도입을 통하여 고초균 재조합 균주로부터 목적물질인 DOI가 생합성되는 것을 나타낸 도식도이다.
- 도 2는 본 발명의 고초균 재조합 균주에서 생산되는 (A) 2-데옥시-실로-이노소스(DOI) 옥심(oxime) 유도체의 질량분석기 내 단편화(fragmentation) 패턴과 (B) 재조합 균주들의 발효액 내 DOI 생산성 확인을 위한 대표적인 UPLC-ESI-MS/MS 크로마토그램을 나타낸 것이다.
- 도 3은 본 발명의 고초균 재조합 균주 중 가장 높은 DOI 생산성을 나타내는 BSDOI-13를 총 60시간 동안 유가배양(fed-batch culture)하는 과정의 균체량, 포도당 및 글리세롤 탄소원들의 소비정도 및 생산되는 DOI 농도의 추이를 정량한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0018] 본 발명에서는 합성 생물학에 기반을 둔 인공 DOI 합성효소 암호화 유전자의 화학합성 및 대사공학학을 통한 핵산당 대사회로 재설계 균주를 개발하여, 고생산성 2-데옥시-실로-이노소스(DOI) 발효방법을 가능케 하였으며, 향후 본 발명의 재조합 균주를 이용하거나 유용 유전자의 추가적인 도입을 통하여 환경 친화적인 다양한 방향족 화합물의 발효 생산 공정이 개발 가능할 것이다.
- [0019] 본 발명에서는 고초균을 숙주세포로 하여, 핵산당 대사 경로에 관여하는 2종의 효소 유전자(*pgi* 및/또는 *pgcA*)를 결손시킨 대사공학화 고초균에 코돈 최적화된 $KanC_{opt}$ 유전자 또는 $TobC_{opt}$ 유전자를 추가적으로 도입하여 재조합 고초균 균주를 제작하였으며, 상기 재조합 고초균이 유가배양을 통하여 50시간 안에 약 38 g/L의 DOI를 생산할 수 있다는 것을 확인하였다.
- [0020] 따라서, 일 관점에서, 본 발명은 고초균(*Bacillus subtilis*)에, 서열번호 1~3의 염기서열을 가지는 2-데옥시-실로-이노소스 합성효소를 코딩하는 유전자가 도입되고, 포스포글루코오스 이소머라아제를 코딩하는 유전자 및/또는 포스포글루코뮤타아제를 코딩하는 유전자가 결실되어 있는 것을 특징으로 하는 2-데옥시-실로-이노소스 제조용 재조합 고초균에 관한 것이다.
- [0021] 본 발명에서 고초균에 도입되는 2-데옥시-실로-이노소스 합성효소를 코딩하는 유전자는 스트렙토마이세스 카나마이세티커스(*Streptomyces kanamyceticus*) 유래의 *kanC* 유전자, 스트렙토마이세스 테네브라리우스(*Streptomyces tenebrarius*) 유래 *tobC* 유전자 또는 바실러스 실쿨란스(*Bacillus circulans*) 유래 *BtrC* 유전자인 것이 바람직하다.
- [0022] 본 발명의 일양태에서는 2-데옥시-실로-이노소스 합성효소를 코딩하는 유전자로 스트렙토마이세스 카나마이세티커스(*Streptomyces kanamyceticus*) 유래의 *kanC* 유전자, 스트렙토마이세스 테네브라리우스(*Streptomyces tenebrarius*) 유래 *tobC* 유전자 및 마이크로모노스포라 에치노스포라(*Micromonospora echinospora*) 유래의 *genC* 유전자를 각각 고초균에 도입한 재조합 균주를 제조하였으며, *kanC* 유전자와 *tobC* 유전자를 도입한 재조합 고초균의 경우 높은 DOI 생성능을 나타내었고, *genC* 유전자가 도입된 재조합 고초균의 경우 DOI 생성능이 낮은 것을 확인하였다.
- [0023] 본 발명의 다른 양태에서는, 60시간의 발효과정을 거친 고초균 재조합 균주들 중에서, 핵산당 대사 경로를 재설계(Δpgi 와 $\Delta pgi \Delta pgcA$)하는 동시에 추가적으로 바실러스 실쿨란스 유래 DOI 합성효소인 *BtrC*를 발현한 재조합 균주들(BSDOI-06과 BSDOI-10)의 DOI 생산성을 대조구인 BSDOI-01 균주의 DOI 생산성과 비교하였으며, BSDOI-06 재조합 균주에선 평균 16.7 g/L로, BSDOI-10 재조합 균주에서는 평균 20.7g/L의 생산성을 확인하여 대사 경로가 재설계 되지 않은 대조구 BSDOI-01의 2.3 g/L에 비하여 각각 7배 이상 및 9배의 DOI 생산성 향상을 확인하였다.
- [0024] 다른 관점에서, 본 발명은 (a) 상기 재조합 고초균을 배양하여, 2-데옥시-실로-이노소스를 생성시키는 단계; 및 (b) 생성된 2-데옥시-실로-이노소스를 수득하는 단계를 포함하는 2-데옥시-실로-이노소스의 제조방법에 관한 것이다.
- [0025] 본 발명의 일양태에서, *pgi* 유전자 단일 결손화 재조합 균주들의 경우, 스트렙토마이세스 유래 코돈 최적화 DOI 합성 효소들($KanC_{opt}$, $TobC_{opt}$)을 추가로 도입한 경우엔 대조구(평균 16.7 g/L)에 비하여 향상된 생산성(평균 22.5와 24.2 g/L)을 나타내었으며, 마찬가지로, *pgi* 유전자 및 *pgcA* 유전자가 모두 결실된 재조합 균주들의 경우

에도 동일한 양상의 DOI 생산성을 확인할 수 있고, 특히 상기 이중 유전자 결손 재조합 균주에 스트렙토마이세스 테네브라리우스 유래 DOI 효소인 TobC를 고초균 숙주에 따라서 코돈 최적화한 인공 효소 TobC_{opt}를 추가로 도입한 경우, 평균 37.2 g/L 의 DOI를 생산할 수 있다.

[0026] 본 발명에서, “벡터 (vector)”는 적합한 숙주 내에서 DNA를 발현시킬 수 있는 적합한 조절 서열에 작동가능하게 연결된 DNA 서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다. 벡터는 플라스미드, 파지 입자, 또는 간단하게 잠재적 계놈 삽입물일 수 있다. 적당한 숙주로 형질전환되면, 벡터는 숙주 계놈과 무관하게 복제하고 기능할 수 있거나, 또는 일부 경우에 계놈 그 자체에 통합될 수 있다. 플라스미드가 현재 벡터의 가장 통상적으로 사용되는 형태이므로, 본 발명의 명세서에서 “플라스미드 (plasmid)” 및 “벡터 (vector)”는 때로 상호 교환적으로 사용된다. 본 발명의 목적상, 플라스미드 벡터를 이용하는게 바람직하다. 이러한 목적에 사용될 수 있는 전형적인 플라스미드 벡터는 (a) 숙주세포당 수백 개의 플라스미드 벡터를 포함하도록 복제가 효율적으로 이루어지도록 하는 복제 개시점, (b) 플라스미드 벡터로 형질전환된 숙주세포가 선발될 수 있도록 하는 항생제 내성 유전자 및 (c) 외래 DNA 절편이 삽입될 수 있는 제한효소 절단부위를 포함하는 구조를 지니고 있다. 적절한 제한효소 절단부위가 존재하지 않을지라도, 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터(oligonucleotide adaptor) 또는 링커(linker)를 사용하면 벡터와 외래 DNA를 용이하게 라이게이션(ligation)할 수 있다.

[0027] 라이게이션 후에, 벡터는 적절한 숙주세포로 형질전환 되어야 한다. 본 발명에 있어서, 선호되는 숙주 세포는 원핵세포이다. 적합한 원핵 숙주세포는 *E. coli* DH5 α , *E. coli* JM101, *E. coli* K12, *E. coli* W3110, *E. coli* X1776, *E. coli* XL-1Blue(Stratagene), *E. coli* B, *E. coli* B21 등을 포함한다. 그러나 FMB101, NM522, NM538 및 NM539와 같은 *E. coli* 균주 및 다른 원핵생물의 종(species) 및 속(genera)등이 또한 사용될 수 있다. 진술한 *E. coli*에 덧붙여, 아그로박테리움 A4와 같은 아그로박테리움 속 균주, 바실루스 섭틸리스(*Bacillus subtilis*)와 같은 바실리(bacilli), 살모넬라 타이피뮤리움(*Salmonella typhimurium*) 또는 세라티아 마르게센스(*Serratia marcescens*)와 같은 또 다른 장내세균 및 다양한 슈도모나스(*Pseudomonas*) 속 균주가 숙주 세포로서 이용될 수 있다.

[0028] 원핵세포의 형질전환은 Sambrook et al., supra의 1.82 섹션에 기술된 칼슘 클로라이드 방법을 사용해서 용이하게 달성될 수 있다. 선택적으로, 전기천공법(electroporation)(Neumann et al., EMBO J., 1:841, 1982) 또한 이러한 세포들의 형질전환에 사용될 수 있다.

[0029] 본 발명에서 “발현 조절 서열 (expression control sequence)”이라는 표현은 특정한 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열의 발현에 필수적인 DNA 서열을 의미한다. 이러한 조절 서열은 전사를 실시하기 위한 프로모터, 그러한 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다. 예를 들면, 원핵생물에 적합한 조절 서열은 프로모터, 임의로 오퍼레이터 서열 및 리보솜 결합 부위를 포함한다. 진핵세포는 프로모터, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서가 이에 포함된다. 플라스미드에서 유전자의 발현 양에 가장 영향을 미치는 인자는 프로모터이다. 고 발현용의 프로모터로서 SR α 프로모터와 사이토메가로바이러스 (cytomegalovirus) 유래 프로모터 등이 바람직하게 사용된다. 본 발명의 DNA 서열을 발현시키기 위하여, 매우 다양한 발현 조절 서열중 어느 것이라도 벡터에 사용될 수 있다. 유용한 발현 조절서열에는, 예를 들어, SV40 또는 아데노바이러스의 초기 및 후기 프로모터들, lac 시스템, trp 시스템, TAC 또는 TRC 시스템, T3 및 T7 프로모터들, 파지 람다의 주요 오퍼레이터 및 프로모터 영역, fd 코드 단백질의 조절 영역, 3-포스포글리세이트 키나제 또는 다른 글리콜분해 효소에 대한 프로모터, 상기 포스포타제의 프로모터들, 예를 들어, Pho5, 효모 알파-교배 시스템의 프로모터 및 원핵세포 또는 진핵 세포 또는 바이러스의 유전자 발현을 조절하는 것으로 알려진 기타 다른 서열 및 이들의 여러 조합이 포함된다. T7 프로모터는 대장균에서 본 발명의 단백질을 발현시키는데 유용하게 사용될 수 있다.

[0030] 핵산은 다른 핵산 서열과 기능적 관계로 배치될 때 “작동가능하게 연결 (operably linked)”된다. 이것은 적절한 분자 (예를 들면, 전사 활성화 단백질)은 조절 서열(들)에 결합될 때 유전자 발현을 가능하게 하는 방식으로 연결된 유전자 및 조절 서열(들)일 수 있다. 예를 들면, 전서열(pre-sequence) 또는 분비 리더 (leader)에 대한 DNA는 폴리펩타이드의 분비에 참여하는 전단백질로서 발현되는 경우 폴리펩타이드에 대한 DNA에 작동가능하게 연결되고; 프로모터 또는 인핸서는 서열의 전사에 영향을 끼치는 경우 코딩서열에 작동가능하게 연결되거나; 또는 리보솜 결합 부위는 서열의 전사에 영향을 끼치는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결되거나; 또는 리보솜 결합 부위는 번역을 용이하게 하도록 배치되는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로, “작동가능하게 연결된”은 연결된 DNA 서열이 접촉하고, 또한 분비 리더의 경우 접촉하고 리딩 프레임 내에 존재하는것을 의미한다. 그러나, 인핸서 (enhancer)는 접촉할 필요가 없다. 이들 서열의 연결은 편리한 제한 효소 부위에

서 라이게이션(연결)에 의해 수행된다. 그러한 부위가 존재하지 않는 경우, 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터 (oligonucleotide adaptor) 또는 링커(linker)를 사용한다.

[0031] 본원 명세서에 사용된 용어 “발현 벡터”는 통상 이종의 DNA의 단편이 삽입된 재조합 캐리어 (recombinant carrier)로서 일반적으로 이중 가닥의 DNA의 단편을 의미한다. 여기서, 이중 DNA는 숙주 세포에서 천연적으로 발견되지 않는 DNA인 이형 DNA를 의미한다. 발현 벡터는 일단 숙주 세포내에 있으면 숙주 염색체 DNA와 무관하게 복제할 수 있으며 벡터의 수 개의 카피 및 그의 삽입된 (이종) DNA가 생성될 수 있다.

[0032] 당업계에 주지된 바와 같이, 숙주세포에서 형질감염 유전자의 발현 수준을 높이기 위해서는, 해당 유전자가, 선택된 발현 숙주 내에서 기능을 발휘하는 전사 및 해독 발현 조절 서열에 작동가능하도록 연결되어야만 한다. 바람직하게는 발현 조절서열 및 해당 유전자는 세균 선택 마커 및 복제 개시점 (replication origin)을 같이 포함하고 있는 하나의 발현 벡터 내에 포함되게 된다.

[0033] 상술한 발현 벡터에 의해 형질전환 또는 형질감염된 숙주 세포는 본 발명의 또 다른 측면을 구성한다. 본원 명세서에 사용된 용어 “형질전환”은 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체의 인자로서 또는 염색체 통합완성에 의해 복제 가능하게 되는 것을 의미한다. 본원 명세서에 사용된 용어 “형질감염”은 임의의 코딩 서열이 실제로 발현되든 아니든 발현 벡터가 숙주 세포에 의해 수용되는 것을 의미한다.

[0034] 이하 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0035] <실시예 1> 균주, 플라스미드 및 고초균 재조합 균주 제작

[0036] 고초균인 *Bacillus subtilis* 168(유전형: *trpC2*, 표현형: Kan^r [카나마이신 내성], ATCC 23857, USA) 균주를 모균주로 사용하였다. 선발 마커(selection marker)가 필요 없는 유전자 결손방법을 이용하여, 고초균 세포내 핵산당 대사경로에서 작동하는 Glc-6-P isomerase를 코딩하는 *pgi* 유전자와 phosphoglucomutase를 코딩하는 *pgcA* 유전자를 각각 결손시키거나, 모두 결손시킨 고초균 재조합 균주들을 제작하였다.

[0037] 삽입 플라스미드(integration plasmid) pCU-pgiFB(표현형: Cm^r [클로람페니콜{chloramphenicol} 내성] *Bacillus* Genetic Stock Center, USA)를 고초균 168 균주 내로 도입한 후, 첫 단일 교차 재조합(single-crossover recombination)으로 고초균 유전체 내 삽입한다. 형질 전환된 재조합 고초균 BS△*pgi*(유전형: *trpC2*△*pgi*, 표현형: Kan^r) 균주는 5 ug/mL 수준의 클로로마이세틴이 부가된 루리아-베르타니(Luria-Bertani) 고체평판 배지에서 선발한 후, 18 시간동안 루리아-베르타니 액체 배지에서 배양하였다. 이후, 5FU 고체 평판 배지에 도말한다. 마찬가지로, 삽입 플라스미드(integration plasmid) pCU-pgcAFB(표현형: Cm^r)를 재조합 고초균 BS△*pgi*(유전형: *trpC2*△*pgi*, 표현형: Kan^r) 균주 내로 도입하여 *pgi* 유전자와 *pgcA* 유전자가 동시에 결실된 재조합 고초균 BS△*pgi*△*pgcA*(유전형: *trpC2*△*pgi*△*pgcA*, 표현형: Kan^r) 균주를 제작하였다.

[0038] 유전자 조작은 표준 기법을 통하여 수행하며, 대장균 및 고초균의 형질전환은 열 충격(heat shock) 형질전환법 및 수용세포(competent cell)법으로 수행한다. 항생제들은 적절한 수준으로 재조합 균주 배지에 첨가하였다(카나마이신 5ug/mL, 암피실린[ampicillin] 100 ug/mL, 클로람페니콜[chloramphenicol] 5 ug/mL).

[0039] 한편, 구성적(constitutive) 유전자 발현 벡터인 pHP13-P43을 다음과 같이 제작한다. 우선, 고초균의 프로모터 중 하나인 P₄₃을 정방향 프라이머 P43-F(5'GGTAAAGCTTGCGGCTTCCTTGTAGAGCTCAG3', 밑줄은 *Hind*III 제한효소 절단부위: 서열번호 4)와 역방향 프라이머 P43-B(5'CTCTCTGCAGCATGTGTACATTCCTCTC3', 밑줄은 *Pst*I 제한효소 절단부위: 서열번호 5) 쌍을 이용하여 PCR로 증폭하였다. PCR 산물을 *Hind*III-*Pst*I로 절단한 후, 동일한 제한효소들로 처리한 고초균 발현 플라스미드 pHP13(표현형: Cm^r, EM^r[에리스로마신 내성]; *Bacillus* Genetic Stock Center, USA)에 클로닝함으로써 pHP13-P43(유전형: P₄₃, 표현형: Cm^r, EM^r)를 제작하였다.

[0040] 삽입 플라스미드인 pCU-pgiFB는 다음과 같이 제작한다. 고초균 유전체 내 *pgi* 유전자의 상부 염기조각인 *pgi*-F와 하부 염기 단편 *pgi*-B를 각각 D-*pgi*-FU/L(5'CTAAACATGAAGTACAATTGAGGAAG3': 서열번호 6)와 D-*pgi*-BU/L(5'GAAGAAATATACAAGGTATCCAAAAGTATATG3': 서열번호 7) 프라이머 쌍을 이용하여 고초균 168 균주의 유전체 주형으로부터 증폭하였다. 이후 두 종의 단편을 융합하여 D-*pgi*-FsnU/L 프라이머로 퓨전 PCR을 실시하였다. 연

여진 PCR 산물을 *SphI-KpnI* 제한효소로 절단한 후 동일한 제한효소들로 처리한 pCU(표현형: Cm^r; Bacillus Genetic Stock Center, USA)에 연결함으로써 pCU-pgiFB(유전형: pgi-FB, 표현형: Cm^r)를 제작하였다.

[0041] 또 다른 삽입 플라스미드(integration plasmid) pCU-pgcAFB(유전형: pgcA-FB, 표현형: Cm^r)도 그 상응하는 프라이머들(D-pgcA-FU/L: 5'TTAAGTTTATCGGTGAAAAGATTAAGGAATAC3': 서열번호 8, D-pgcA-BU/L: 5'AAAACCATATTCGTAAAGAGATTGATGAG3': 서열번호 9)을 이용한 퓨전 PCR과 동일한 제한효소 부위를 이용하여 제작하였다.

[0042] 바실러스 실쿨란스 유래 DOI 합성효소 암호화 유전자인 *btrC*를 고초균 168균주에 도입하기 위한 발현 플라스미드 pHP13-P43-BtrC를 다음과 같이 제작한다. 즉, 바실러스 실쿨란스 NRRL B3312의 유전체를 주형으로 하여 정방향 프라이머 BtrC-F(5'GTGGGTACCGAGGTAAACATGACTAAAC3', 밑줄은 *KpnI* 제한효소 절단부위: 서열번호 10)와 역방향 프라이머 BtrC-B(5'-CTCCTGCAGTTGTTATCGTGGATTAATAATGG3', 밑줄은 *PstI* 제한효소 절단부위: 서열번호 11) 쌍을 이용하여 PCR로 증폭하였다. 얻어진 PCR 산물을 *KpnI-PstI*로 절단한 후, 동일한 제한효소들로 처리한 pHP13-P43(유전형: P₄₃, 표현형: Cm^r, EM^r; Bacillus Genetic Stock Center, USA)에 연결하여 pHP13-P43-BtrC(유전형: P₄₃-*btrC*, 표현형: Cm^r, EM^r)를 제작하였다.

[0043] 바실러스가 아닌 이종 미생물 유래의 DOI 합성효소 암호화 유전자들(*genC*[*Micromonospora echinospora* DSM 43036, GenBank AJ628149], *kanC*[*Streptomyces kanamyceticus* DSM 40500, GenBank AJ628422], *tobC*[*Streptomyces sp.* DSM 40477, GenBank AJ810851])의 고초균 내 발현을 증대시키기 위하여, 원래 유전자의 코돈(codon)을 그 발현 균주인 고초균에 맞추어 디자인한 코돈 최적화된 인공 유전자 단편들(*genC*_{opt}, *kanC*_{opt}, *tobC*_{opt})을 제노텍(대전, 대한민국)에 주문하여 합성하였다. 모든 인공 유전자 조각들은 리보솜 결합 부위의 상부에 *KpnI* 제한 부위를 그리고 종결코돈 아래쪽에 *PstI* 제한부위를 인위적으로 삽입시켰다. 총 3종의 인공 유전자들을 동일한 제한효소들로 처리한 pHP13-P43(유전형: P₄₃, 표현형: Cm^r, EM^r; Bacillus Genetic Stock Center, USA)에 각각 연결하여 pHP13-P43-*GenC*_{opt}(유전형: P₄₃-*genC*_{opt}, 표현형: Cm^r, EM^r), pHP13-P43-*KanC*_{opt}(유전형: P₄₃-*kanC*_{opt}, 표현형: Cm^r, EM^r) 및 pHP13-P43-*TobC*_{opt}(유전형: P₄₃-*tobC*_{opt}, 표현형: Cm^r, EM^r)를 제작하였다.

[0044] 모든 PCR 산물과 인공 합성 유전자들은 염기서열을 분석하여 확인하고, 상기 발현 플라스미드들을 재조합 고초균 BS△*pgi*(유전형: *trpC2*△*pgi*, 표현형: Kan^r)와 *pgi*와 *pgcA* 유전자가 동시에 결실된 재조합 고초균 BS△*pgi*△*pgcA*(유전형: *trpC2*△*pgi*△*pgcA*, 표현형: Kan^r) 균주에 도입함으로써 4종의 상이한 DOI 합성효소를 발현하는 고초균 168 재조합 균주들 및 8종의 핵산당 대사회로가 재설계되며 동시에 상이한 DOI 합성효소를 발현하는 고초균 재조합 균주들을 확보하였다.

[0045] <실시예 2> 고초균 재조합 균주의 발효

[0046] 별도로 기재하지 않는 한, 대장균 및 고초균 재조합 균주들은 37 °C에서 200 rpm으로 루리아-버르타니 배지로 진탕 배양을 실시하였다. 2-데옥시-실로-이노소스(DOI)의 생산성 및 그 재조합 균주의 생장을 비교하기 위하여, 우선 2YTG 액체 배지(1.6% tryptone, 1% yeast extract, 0.5% NaCl, 3% glucose) 20 mL을 엘른마이어 플라스크(Erlenmyer flask) 250 mL에 넣고 재조합 균주들을 각각 접종하여 상기 조건으로 12시간 배양한 것을 발효 접종원으로 사용하였다.

[0047] 핵산당 대사 경로가 재설계된 고초균 재조합 균주들의 경우, 배지 내 탄소원인 포도당(glucose)만으로는 탄소이화 억제(carbon catabolite repression) 현상이 나타날 수 있는 바, 본 발효에서는 포도당 외에 글리세롤(glycerol)이 2%로 부가된 발효배지(1.6% tryptone, 1% yeast extract, 0.5% NaCl, 3% glucose, 2% glycerol)를 이용한다. 상기 발효 접종원을 1 L의 엘른마이어 플라스크 내 본 발효 배지 250 mL에 접종하여 37°C에서 200rpm으로 60시간 배양한다. 한편, 본 발효 30시간 후, 별도로 준비한 포도당 용액(0.5 g/mL) 5 mL를 발효 배지에 추가적으로 주입하여 DOI의 생산성 향상 가능성을 조사하였다.

[0048] <실시예 3> 고초균 재조합 균주의 생장곡선 및 DOI 생산성 분석

[0049] 본 발효 전체 60시간 배양과정 중 10시간 간격으로 발효액 2 mL을 채취하여 다음과 같이 생장곡선을

측정하였다. 흡광도 680nm로 고정된 자외선-가시선 스펙트로포토미터(Shimadzu, 일본)에 순차희석(serial dilution)시킨 발효액 시료 1 mL을 넣고 그 흡광도를 측정하며, 바탕용액은 균체를 접종하지 않은 본 배지액으로 한다. 동일한 시료를 5000 rpm에서 3분간 냉장 원심분리한 후, 상등액을 버리고 동결건조를 수행하였다. 이후 건조된 시료 중량을 측정한 후 흡광도와 건조 균체량과의 상관곡선을 작성함으로써 흡광도 측정을 통한 발효 과정 중 재조합 균주의 건조 균체량을 환산하였다.

[0050] 한편, 발효액 내 DOI의 생산량을 확인하기 위하여, DOI는 다음과 같이 정량하였다. 발효액을 5000 rpm에서 3분간 원심분리한 후, 상등액 100 μ L를 취한다. 준비한 상등액에 메탄올 100 μ L와 200 μ L의 3차 증류수, 40 μ L의 O-(4-nitrobenzyl) hydroxylamine hydrochloride (Sigma, 미국; 35mg/mL 농도)를 섞은 후, 60 °C 수조에서 30분간 반응하여 DOI의 옥심(oxime)을 수득하였다. 반응 후 원심 농축기를 사용하여 반응물 내 용매를 건조시킨 다음 메탄올 100 μ L로 용해시킨 후 이중 25 μ L에 대하여 양이온 모드에서 이온트랩 질량분석기(LCQ ion-trap mass spectrometer, ThermoFinnigan, 미국)가 장착된 UPLC-ESI-MS/MS 기기분석을 실시하였다. UPLC 시스템은 Spectra system P1000XR 펌프(ThermoFinnigan)와 Spectra 시리즈 AS3000 자동시료주입기(ThermoFinnigan, 20 μ L 루프)로 구성된다. 분석 컬럼은 Acquity CSH C18(Waters, 미국) 역상 컬럼을 이용하고, 등용리 용매로 아세트나이트릴/메탄올/물/개미산(1:1.5:8:0.002, v/v/v/v)을 120 μ L/min의 속도로 흐르게 하였다. 발효액 내 DOI의 농도는 진캠(대전, 대한민국)에서 구입한 DOI 표준품의 농도에 대한 크로마토그램 상 검량면적의 검량 직선식을 이용하여 측정하였다. 발효액을 원심분리한 후 상층액을 시료로 하여 상용 분석 키트인 D-glucose HK assay kit(Megazyme, 아일랜드)와 Glycerol determination kit(Sigma-aldrich, 미국)를 활용하며, 발효 중 잔존 포도당과 글리세롤 농도는 측정하였다.

[0051] 고초균 재조합 균주의 성장곡선과 DOI 생산성, 그리고 발효 과정 중 포도당 및 글리세롤 함량의 잔존 정도는 세 번에 걸친 본 배양의 결과를 평균하여 측정하였다.

[0052] (1) DOI 합성효소가 발현되는 고초균 168 재조합 균주들의 DOI 생산성 비교

[0053] 총 60시간의 발효과정을 거친 고초균 재조합 균주들 중에서, 핵산당 대사 경로를 재설계하지 않고 DOI 합성효소들만 발현시킨 재조합 균주의 경우 대조구인 BSDOI-01(DOI 비검출)와 비교 시 DOI 생산성이 확인되었다(표 1). 즉 기존 바실러스 실칼란스 유래 DOI 합성효소인 BtrC를 고초균에 발현(BSDOI-02)시킬 경우 평균 2.3 g/L의 DOI가 생산되었다. 최근의 선행문헌에 따르면 야생형 대장균 내 BtrC 발현을 통하여 1.5 g/L의 DOI 생산을 확인한 바가 있다(T. Kogureet al., J. Biotechnology, 129:502, 2007). 한편, 마이크로모노스포라 에키노스포라 유래의 DOI 합성효소인 GenC를 고초균의 코돈을 기반으로 합성한 인공 효소인 GenC_{opt}가 고초균에 발현(BSDOI-03)되는 경우에는 평균 0.8 g/L의 DOI가 생산되어, 인공 합성효소(GenC_{opt})의 발현을 통한 DOI 생산성 증대를 확인할 수 없었다. 반면, 스트렙토마이세스 유래 KanC_{opt}와 TobC_{opt}의 고초균 내 발현(BSDOI-04와 BSDOI-05)은 모두 3 g/L 이상의 DOI 생산성을 나타내어 기존 선행문헌들에서 통용되고 있는 BtrC 보다 높은 DOI 생산성을 확인하였다.

[0054] 상기 결과로부터, 동일한 반응에 관여하는 이중 균주 유래 동일 DOI 합성효소라도 고초균 내 발현 시에는 상이한 DOI 생산성을 보이는 것을 확인하였으며, 아울러, 재조합 균주의 코돈 선호도를 고려한 합성 생물학 기반의 인공 합성 유전자들의 발현으로 기존 재조합 대장균에서의 DOI 생산능보다 향상된 DOI 생산성이 나타날 수 있다는 것을 확인하였다.

표 1

[0055]

고초균 재조합 균주명	세부사항	DOI (g/L)
BSDOI-01	<i>Bacillus subtilis</i> 168 + pHC13-P43	비검출
BSDOI-02	<i>Bacillus subtilis</i> 168 + pHC13-P43-BtrC	2.3 $\pm$ 0.2
BSDOI-03	<i>Bacillus subtilis</i> 168 + pHC13-P43-GenC _{opt}	0.8 $\pm$ 0.2
BSDOI-04	<i>Bacillus subtilis</i> 168 + pHC13-P43-KanC _{opt}	3.4 $\pm$ 0.3
BSDOI-05	<i>Bacillus subtilis</i> 168 + pHC13-P43-TobC _{opt}	3.6 $\pm$ 0.2
BSDOI-06	BS Δ pgi + pHC13-P43-BtrC	16.7 $\pm$ 0.7
BSDOI-07	BS Δ pgi + pHC13-P43-GenC _{opt}	5.5 $\pm$ 0.7
BSDOI-08	BS Δ pgi + pHC13-P43-KanC _{opt}	22.5 $\pm$ 2.0
BSDOI-09	BS Δ pgi + pHC13-P43-TobC _{opt}	24.2 $\pm$ 1.4

BSDOI-10	BS Δ pgi Δ pgcA + pHCl3-P43-BtrC	20.7 $\pm$ 1.1
BSDOI-11	BS Δ pgi Δ pgcA + pHCl3-P43-GenC _{opt}	6.4 $\pm$ 1.0
BSDOI-12	BS Δ pgi Δ pgcA + pHCl3-P43-KanC _{opt}	29.0 $\pm$ 2.9
BSDOI-13	BS Δ pgi Δ pgcA + pHCl3-P43-TobC _{opt}	37.2 $\pm$ 2.4

(2) 대사 경로 재설계된 BtrC 발현 고초균 재조합 균주들의 DOI 생산성 비교

총 60시간의 발효과정을 거친 고초균 재조합 균주들 중에서, 핵산당 대사 경로를 재설계(Δ pgi 와 Δ pgi Δ pgcA)하는 동시에 추가적으로 바실러스 실칼란스 유래 DOI 합성효소인 BtrC를 발현한 재조합 균주들(BSDOI-06과 BSDOI-10)의 DOI 생산성을 대조구인 BSDOI-01 균주의 DOI 생산성과 비교하였다.

그 결과, 표 1에 나타난 바와 같이, BSDOI-06 재조합 균주에선 평균 16.7 g/L로, BSDOI-10 재조합 균주에서는 평균 20.7 g/L의 생산성을 확인하여 대사 경로가 재설계 되지 않은 대조구 BSDOI-01의 2.3 g/L에 비하여 각각 7 배 이상 및 9배의 DOI 생산성 향상을 확인하였다. 즉, 고초균의 탄수화물 주요 대사경로 중 하나인 핵산당 대사 경로에 관여하면서 Glc-6-P를 기질로 사용하는 2종의 효소인 Glc-6-P isomerase(암호화 유전자: pgi)와 phosphoglucomutase(암호화 유전자: pgcA)를 순차적으로 고초균 내 유전체에서 결손시킬 경우, DOI 합성효소의 기질인 Glc-6-P의 균체 내 축적을 유도하여 BtrC 효소축매를 통한 DOI의 생산성이 향상된 것을 확인할 수 있다. 또한 상기 3종의 고초균 재조합 균주들의 경우 발효 과정 중 균체의 생장에 뚜렷한 차이점이 나타나지 않았다.

(3) 대사경로 재설계되는 동시에 코돈 최적화된 인공 효소를 추가 발현한 고초균 재조합 균주들의 DOI 생산성 비교

총 60시간의 발효과정을 거친 고초균 재조합 균주들 중에서, 핵산당 대사 경로를 재설계(Δ pgi 와 Δ pgi Δ pgcA)하는 동시에 추가적으로 이중 균주 유래 DOI 합성효소들(GenC_{opt}, KanC_{opt}, TobC_{opt})을 발현한 재조합 균주들(BSDOI-07부터 BSDOI-09, BSDOI-11부터 BSDOI-13)의 DOI 생산성을 2종의 BtrC 발현 대조구인 BSDOI-06 및 BSDOI-10 균주의 DOI 생산성과 비교하였다. 우선, pgi 유전자 단일 결손화 재조합 균주들의 경우, 마이크로모노스포라 에치노스포라 유래 GenC를 고초균 숙주에 따라서 코돈 최적화한 인공 효소 GenC_{opt}의 추가 발현은 대조구인 BtrC 발현 BSDOI-06 균주에 비하여 낮은 생산성을 보였다(표 1). 하지만, 나머지 2종의 스트렙토마이세스 유래 코돈 최적화 DOI 합성 효소들(KanC_{opt}, TobC_{opt})의 경우, 대조구(평균 16.7 g/L)에 비하여 향상된 생산성(평균 22.5g/L와 24.2g/L)을 나타내었다. 마찬가지로, pgi 유전자 및 pgcA 유전자를 이중 결실시킨 재조합 균주들의 경우에도 동일한 양상의 DOI 생산성을 확인할 수 있고, 특히 상기 이중 유전자 결손화 재조합 균주에 스트렙토마이세스 테네브라리우스 유래 DOI 효소인 TobC를 고초균 숙주에 따라서 코돈 최적화한 인공 효소 TobC_{opt}의 추가 발현은 DOI를 평균 37.2 g/L 까지 생산하였다(표 1).

총 60시간의 발효 과정 중 포도당은 초기에 1 L 당 30g으로, 30시간 후 첨가된 1 L당 10g을 고려할 경우, 총 40g의 발효 탄소원인 포도당이 37.2g의 DOI로 전환되었으므로 약 93%의 수익율을 얻는다.

본 실시예의 결과는 대사조절 대장균 내 BtrC 추가 발현으로 얻어진 선행문헌(T. Kogure et al., J. Biotechnology, 129:502, 2007)의 DOI 생산성 29.5g/L 보다 높은 생산성(37.2 g/L)을 보이고 있다. 이상의 결과로부터, 핵산당 대사 경로의 재설계는 DOI 합성효소의 기질인 Glc-6-P의 균체 내 축적을 유도하며, 나아가 인공 합성효소의 추가 발현으로 효소반응이나 대장균을 재조합 균주로 사용한 기존 선행문헌들에 비하여 높은 생산성을 나타내는 것을 알 수 있다.

(4) BSDOI-13 고초균 재조합 균주의 발효 과정 중 성장 및 DOI 생산 추이

표 1에 나타난 재조합 고초균 균주의 DOI 생산성은 모두 60시간 배양 후 발효액으로부터 DOI 농도를 분석한 결과인 바, 그 생산성이 가장 높이 나타난 BSDOI-13 재조합 고초균의 발효 과정 중 균체의 안정성과 DOI 생산성 변화를 확인하고자 배양 10시간대 별로 배양액을 분취하여 재조합 균주의 성장 및 포도당의 소비경향 및 DOI 농도의 변화 추이를 정량 분석하였다.

균체의 생장은 전형적인 유가배양(fed-batch culture)의 양상을 보이고 있어 포도당 외 글리세롤이 탄소원으로 사용될 수 있음을 알 수 있다. 또한, 포도당의 농도는 30시간 전후로 포도당 추가에 따른 변동 폭 외에는 뚜렷한 감소 양상을 확인할 수 있었으며, 나아가 DOI 산물의 농도는 50시간에서 약 38g/L로 최고

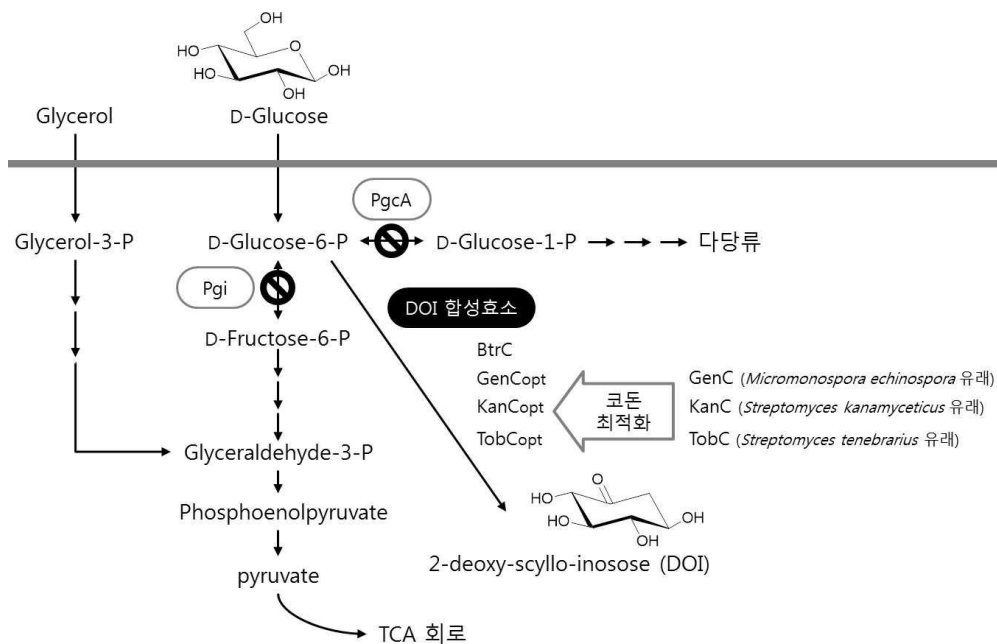
치를 보이며 발효 완료시점인 60시간에서는 다소 감소된 DOI 농도를 나타내어, DOI가 배양시간이 50시간을 넘어 갈 경우 그 안정성에 문제가 있음을 시사한다(도 3).

[0066] 상기 결과로부터, 핵산당 대사 경로에 관여하는 2종의 효소 유전자(*pgi*와 *pgcA*)를 결손화시킨 대사공학화 고초균에 코돈 최적화된 *TobC_{opt}*를 추가적으로 발현한 재조합 균주는 포도당 이외에 글리세롤을 탄소원으로 제공하는 유가배양을 통하여 50시간 안에 약 38 g/L의 DOI를 생산할 수 있다는 것을 확인할 수 있으며, 따라서 대사공학과 합성생물학의 융합을 통하여 유용물질인 DOI를 대량생산할 수 있는 것을 확인하였다.

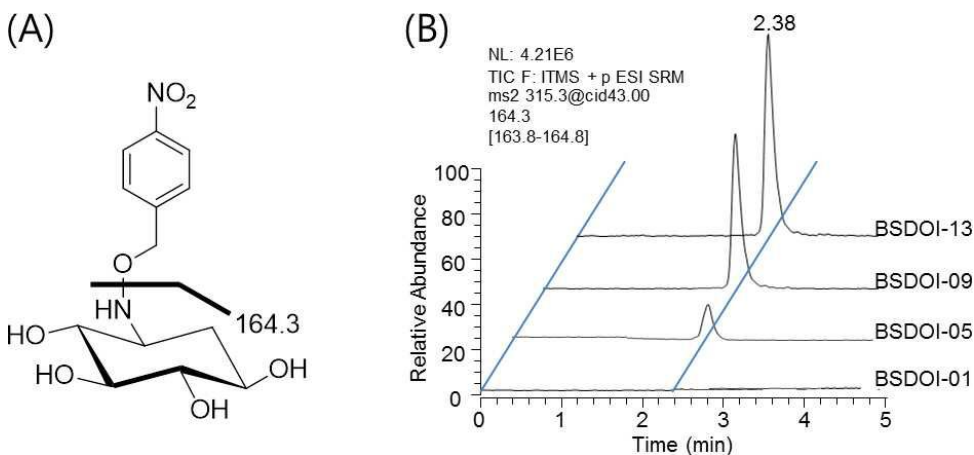
[0067] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시태양일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

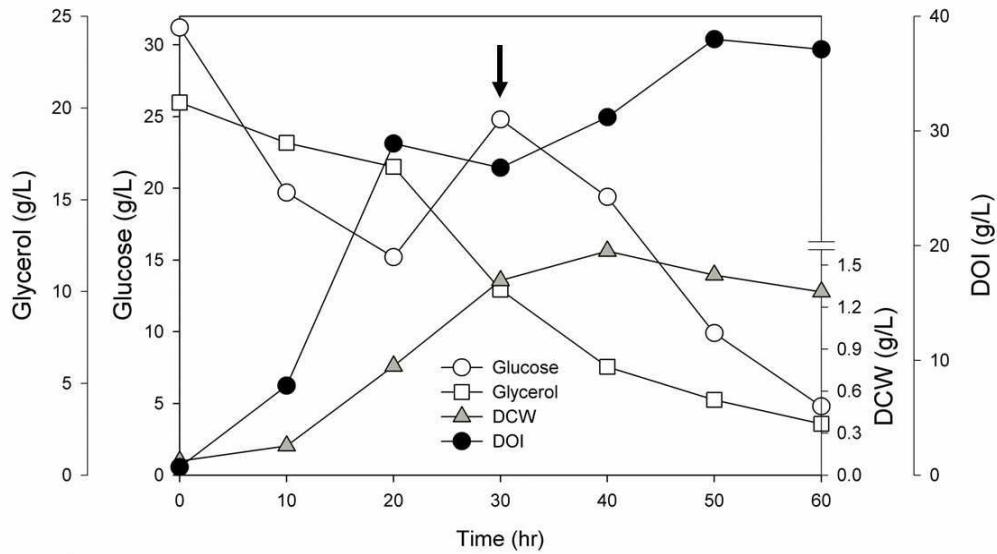
도면1



도면2



도면3



서열 목록

<110> Korea University Research & Business Foundation

<120> Recombinant *Bacillus subtilis* Having Metabolic Engineered Biosynthesis Pathway of 2-Deoxy-scylo-inosose and Method for Preparing 2-Deoxy-scylo-inosose Using Thereof

<130> P15-B255

<160> 11

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 1173

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> KanCopt-artificial 2-deoxy-scylo-inosose synthase encoding gene

<400> 1

```

atgcagggtta ctacgataac gatggatgat gtccaatatc cataccgtct tggtagacac      60

tgcttagacg gcattgtgac acgtctgggt gaattgggcg cgtcaagata ttaattgtc      120
tcagatccgc gattggctga actttacggt caaggattga gagaagact ggcagagcaa      180
gcaggcccg cccagcttat caccatgca tccggcgagc aaaataaggg tctcccggt      240
ctccacgata tggcggagga agcgttacgg cgtggtgctg atcggcaatc cattgtcgta      300
gctctgggtg ggggagtac aggcacata gcaggtttgc ttgcagcatt gctttttcgt      360
ggtataagat tagtacatgt tccgacgaca gttgtggcaa tgcttgactc cgttttatcc      420
    
```

ttgaaacagg ccgtaaacgc aggagtcggt aagaaccttg tcggcacgtt ttaccagcct	480
gtcgaggtgt tagcggatac agccatgctg cgtacccttc cggtcgcga agtgcggtca	540
ggcatgtgcg aagttgttaa aaacagcttg gccatccggc cgtccatgat tgatcaactg	600
tctgcggggc tgcgccaga cggccgttac cctgatgaca ctatgcattg gattatctat	660
gaatcactgg ctgcaaagc acaggttaca gcatatgata aatatgaacg cggcgagggg	720
ctcatcctgg agtatggta cacagttagt catgccgttg aacatagctc acagggtgcg	780
glacctcatg gcgcggccgt ggcgctggga atgattgccg cagcccaggt gtctcataga	840
gccggttggg caagtgcaga gcttctgat ttacatagag aactggtcgc taaaacgggg	900
gttgcacgtc gcatcccatc agacattccg ttgtctgcag tgcgacatcg cttgagcttc	960
gataataaac ggggctatct gccggcaagc gcagacacat atccgatggt gctgctcgag	1020
tcaccgggca aagttttgag atcagaagga actgttctca ccgcggcccc gcgtgatctt	1080
glagatgctg tcgtcgaca acttgacag cctcctcggc cagcggcagc cagaaccgac	1140
gacgctgcca ctgtcttggg cggagcggga taa	1173
<210> 2	
<211> 1173	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> TobCopt-artificial 2-deoxy-scylo-inosose synthase encoding gene	
<400> 2	
tggggagcac aaatgcaaac aacgacaata acgatgggcg acgttcaata tccttaccgt	60
ctgggcacgg gatgtgtga tggcattgtt acacgcctcg gagaacttga agcgtctcat	120
tatcttgtcc tttagcatgc gacagtgtct gaattatatg gacatgactt ggcagcgaga	180
ctgcgtcggc ccgccggacc tgcttctgtg cttaccatc cagcagggga agaacacaag	240
ggattgggca ctctggatac gcttctgat gctgcgttgc atgcaggagt tgacagacgc	300
ggagtgtgtg tcgcactcgg cggtaggtga accggaaata ttgctggcct tctgcagct	360
ctccttttta gaggcacccg cctggtacac gtcccgacga cggtagtagc tatgcttgat	420
tctgtgctgt cattaaaaca agctgtaaac gcgcaagtgg gcaagaacct tgttggtacc	480
ttttatccgc cggtagaggt cttagcggac accgcaatgc tgggcactct ccagttcgg	540
gaaattcgtc ctgggttgtg tgaagtagta aaaaatgctt tagctatccg tccttcaatg	600
attgattttc tcgcagcaga actgcggcca gatggcagat acgcggatga cgtattgaga	660
tggatgatcg acgaatctgt cgctgcaaag gccaagtta cagaacacga taaatatgaa	720

cggcgtgaag ggcttgcct ttagtacggc catacggttg gccacgcact tgaacacgct 780
tcacatggtg cagtcagtc tggagctggt gtaggcgtgg gcatggtagc tgccgcggag 840

gtcgctcgaa gacttggcca ttagacgca gatctggtgg aactgcatag agagtgggtc 900
ggtaaagtag gactggcaac cagcttcct gcagacgtcc cgacagagga aatcacttat 960
cgactgggtt ttgacaataa aagaggatat caacctctcc cggccgatca ttatgcaatg 1020
gtcctcctgg ctgatgtagg acagcctctg taccaagacg gccttcggtt aacgcctgca 1080
cctagagcat tagtggacga agtcgtgcga gacttggcgg acgccccttc aagaattggc 1140
gctagcgttg gaagcgccgg tggcgcttca taa 1173

<210> 3
<211> 1107
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> BtrC: 2-deoxy-scylo-inosose synthase encoding gene

<400> 3

atgacgacta acaaaatttg ttttgcggac cgtgtttta actttgcatt cggcgaacat 60
gttttggaa cgttgaatc ctatattccc cgggatgaat tcgatcaata tatcatgatt 120
tcggactcgg gggtaccgga ctcgattgtt cattatgcgg ccgaataact cggcaaactc 180
gccccgtac atattcttcg ctttcagggc ggagaagaat acaaaacact ttcaaccgtg 240
acaaatttgc aagagcgggc aattgctctg ggagccaacc gaagaaccgc tatcgtagcg 300
gttggcggag ggtaaacgg aaacgttgcc ggagtggcgg ccggcatgat gtttcgcggg 360

attgcgtta ttcacgttcc gaccacgttt ttggcgccct ccgattcggg tctttcgatt 420
aagcaggctg ttaatttaac gagcggaaag aacctggtcg gcttttatta tccgccacgc 480
ttcgtgttcg ccgatacccg aatcttgtcg gactgcgcgc cccgtcaggt gaaagcggga 540
atgtgcgagc tggtaaaaaa tatgtgatt ctggaaaacg acaacaagga atttacagag 600
gatgatttaa attcagccaa tgtgtattct ccgaagcagc tggagacgtt tatcaacttc 660
tgcatatcgg ccaaaatgtc ggtattaagc gaagatattt acgagaaaaa gaagggcctg 720
atctttgagt acggccatc gatcggtcat gcgacgagc ttgccgagca gggagggatc 780

acgcacggag aagccattgc agtgggcatg atttacccg ctaaaatagc gaaccggatg 840
aacctgatgc ccgaacatga cgtgtccgcc cactactggc ttttaataa aatcggggcc 900
ttgcaggata ttccgtcaa atcggaaccg gattcgatct tccattattt aatccacgat 960
aacaagaggg gctacattaa gctggatgag gataatttgg gtatgatattt acttagcgga 1020

gtcggtaaac cggcgatgta taaccaaacg ctgcttacac cggtcagaaa aacgctcata 1080

aaagaagtga tccgggaagg gctgtaa 1107

<210> 4

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 4

ggtaaagctt gcggcttcct tgtagagctc ag 32

<210> 5

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 5

ctctctgcag catgtgtaca ttctcttc 28

<210> 6

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 6

ctaaacatga actgacaatt gaggaag 27

<210> 7

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 7

gaagaaatat acaaggtatc caaaagtata tg 32

<210> 8

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 8

ttaagtttat cggtgaaaag attaaggaat ac 32

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 9

aaaaccatat tcgttaaaga gattgatgag 30

<210> 10

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 10

gtgggtaccg aggttaaaca tgactaaac 29

<210> 11

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 11

ctcctgcagt tggtatcgtg gattaaataa tgg 33