

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

정정판

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2013년 2월 7일 (07.02.2013)



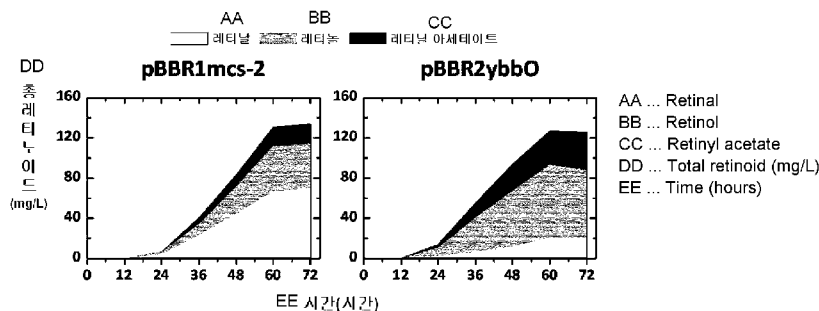
(10) 국제공개번호
WO 2013/019052 A9

- (51) 국제특허분류: C12N 1/21 (2006.01) C12N 15/70 (2006.01)
C12P 1/04 (2006.01) C12N 15/31 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2012/006074
- (22) 국제출원일: 2012년 7월 30일 (30.07.2012)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2011-0075715 2011년 7월 29일 (29.07.2011) KR
10-2012-0083186 2012년 7월 30일 (30.07.2012) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 경상대학교산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIC CO-OPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY) [KR/KR]; 660-701 경상남도 진주시 진주대로 501, Gyeongsangnam-do (KR).
- (72) 발명자: 김
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 김선원 (KIM, Seon Won) [KR/KR]; 660-712 경상남도 진주시 내동면 독산리 휴먼빌아파트 101-1404, Gyeongsangnam-do (KR). 장희정 (JANG, Hui Jeong) [KR/KR]; 660-290 경상남도 진주시 주약동 111-10 305 호, Gyeongsangnam-do (KR). 윤상환 (YOON, Sang Hwal) [KR/KR]; 323-806 충청남도 부여군 부여읍 동남리 268-2 신안빌라 B-202, Chungcheongnam-do (KR). 하보경 (HA, Bo Kyung) [KR/KR]; 660-843 경상남도 진주시 문산읍 삼곡리 고려아파트 504 호, Gyeongsangnam-do (KR).
- (74) 대리인: 이준호 (LEE, Joon Ho) 등; 137-953 서울 서초구 서초중앙로 53 6층 (서초동, 대림빌딩), Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: ESCHERICHIA GENUS MICROORGANISM LACKING OR HAVING AMPLIFIED YBBO GENE AND METHOD FOR PRODUCING RETINOID USING SAME

(54) 발명의 명칭: Y b b O 유전자가 결실 또는 증폭된 에세리키아 속 미생물 및 그를 이용한 레티노이드의 생산 방법



(57) Abstract: The present invention relates to an Escherichia genus microorganism lacking or having an amplified YbbO gene, and to a method for producing retinoid using same, and more specifically, to a method for producing retinoid comprising: the Escherichia genus microorganism lacking or having a diminished or amplified gene for coding a YbbO protein of an Escherichia genus parent strain that is capable of producing retinoid; and separating retinoid from a cultivated product which is obtained by cultivating the microorganism. All of these inventions are based on a confirmation of enzyme activity with respect to retinal and retinoid of the YbbO protein.

(57) 요약서: 본 발명은 YbbO 유전자가 결실 또는 증폭된 에세리키아 속 미생물 및 그를 이용한 레티노이드의 생산방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 레티노이드 생산능을 갖는 에세리키아(Escherichia) 속 모균주의 YbbO 단백질질을 코딩하는 유전자가 감쇄 또는 결실되거나, 증폭된 에세리키아 속 미생물; 이 미생물을 배양시켜 얻어진 배양물로부터 레티노이드를 분리하는 것을 포함하는 레티노이드의 생산 방법에 관한 것이다. 이러한 발명들은 모두 YbbO 단백질질의 레티날과 레티놀에 대한 효소 활성을 확인한 것에 기초한다.

WO 2013/019052 A9



ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

- 명세서와 별도로 규칙 13의 2에 의하여 제출한 기탁된 생물학적 물질에 관한 표시와 함께 (규칙 13의 2.4(d)(i) 및 48.2(a)(viii))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))
- 규칙 91.3(b) 규정에 의한 명백한 잘못의 정정 허가에 관한 정보와 함께 (규칙 48.2(i))

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

(48) 본 정정판 공개일: 2013년 5월 2일

(15) 정정사항에 관한 정보:
2013년 5월 2일 자 공지 참조

명세서

발명의 명칭: Y b b O 유전자가 결실 또는 증폭된 에세리키아 속 미생물 및 그를 이용한 레티노이드의 생산 방법

기술분야

[1] 레티노이드 생산능을 갖는 에세리키아 속 미생물 및 그 미생물을 이용하여 레티노이드를 생산하는 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

[3] 레티노이드는 비타민 A와 화학적으로 관련된 친지질성 이소프레노이드 분자의 클래스이다. 레티노이드는 알코올 (예를 들면, 레티놀), 알데히드 (예를 들면, 레티날), 카르복실산 (예를 들면, 레티노산), 또는 에스테르 (예를 들면, 레티닐 아세테이트) 기능기와 함께, β -이논 고리 및 다불포화(polyunsaturated) 결사슬로 구성된다. 이들은 시력보호, 골 발달 및 재생, 항산화 효과와 더불어 피부 노화 방지와 같은 인체 건강에 있어 필수적인 역할을 하고 특정 암의 위험을 감소시킨다고 알려져 있다.

[4] 레티노이드는 최근 수년간 주름개선 및 피부 질환 치료를 위한 효과적인 화장품 및 의약품 원료로서 큰 관심을 받아 왔다. 레티노이드 시장 규모는 세계적으로 약 160억불 정도로 추정된다. 화학적으로 합성된 레티노이드는 대표적인 상업적 원료이다. 레티놀은 펜타디엔 유도체의 환원에 의해 화학적으로 합성된 레티날의 산성화 또는 가수분해로부터 생산된다. 그러나 이러한 화학적 과정은 복잡한 정제 단계 및 원하지 않는 부산물 형성과 같은 단점을 갖는다. 동물은 과일 및 야채로부터 얻은 카로티노이드로부터 레티노이드를 생산하는 반면, 식물은 레티노이드를 합성할 수 없다. 레티노이드 합성의 전체 경로는 보조기(prosthetic group)로서 레티날을 갖는 박테리오텍신 또는 프로테오텍신을 포함하는 미생물에서만 가능하다. 그러나, 미생물은 레티날의 단백질 결합 형태를 생산하므로 자유 레티노이드의 대량 생산에는 적합하지 않다. 지금까지 생물학적 생산을 위해서 효소를 이용한 일부 제한적인 시도가 있었지만 성공적인 결과는 없었다. 따라서, 대사적으로 형질전환된 미생물을 사용하는, 레티노이드 생산을 위한 생명공학적인 방법의 개발이 필요하다.

[5] 레티노이드는 그의 반응성 있는 콘쥬게이트된 이중 결합으로 인해 화학적으로 매우 불안정하고, 열, 산소 및 빛에 의해 쉽게 산화되고 이성체화된다. 또한 레티노이드는 생물학적으로 레티노산을 통해 쉽게 분해된다. 따라서, 레티노이드를 보다 효율적으로 생산하는 방법이 요구되고 있다.

[6]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 일 양상은 YbbO 단백질을 코딩하는 유전자가 감쇄 또는 결실, 또는 증폭되거나, 상기 유전자의 뉴클레오티드 서열과 80% 이상의 상동성을 갖는 외래 유전자가 도입되어 증폭된 에세리키아 속 미생물을 제공한다.
- [8] 다른 양상은 이 미생물을 이용하여 레티노이드를 생산하는 방법을 제공한다.
- [9] 또 다른 양상은 YbbO 단백질; 또는 YbbO 단백질을 코딩하는 유전자의 뉴클레오티드 서열과 80% 이상의 상동성을 갖는 유전자에 의해 코딩되는 단백질을 포함하는 효소 조성물로 레티놀 생성을 촉진시키는 방법을 제공한다.
- [10]

과제 해결 수단

- [11] 일 양상은 레티노이드 생산능을 갖는 에세리키아(*Escherichia*) 속 모균주의 YbbO 단백질을 코딩하는 유전자가 감쇄 또는 결실, 또는 증폭되거나, 상기 유전자의 뉴클레오티드 서열과 80% 이상의 상동성을 갖는 외래 유전자가 도입되어 증폭된 에세리키아 속 미생물에 관한 것이다.
- [12] 모균주는 레티노이드 생산능을 갖는 야생형 에세리키아 속 미생물 또는 형질전환된 에세리키아 속 미생물일 수 있다. 야생형 에세리키아 속 미생물은 내재적 레티노이드 합성의 경로로서 MEP 경로를 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 형질전환된 에세리키아 속 미생물은 레티노이드 합성의 내재적 MEP 경로에 연관된 유전자, 외래 MVA 경로에 연관된 유전자, 또는 이들의 조합이 도입된 것일 수 있다. MVA 경로 유전자는 아세틸-CoA로부터 IPP를 생산하는데 관여하는 외래 메발로네이트 경로의 효소를 코딩하는 유전자일 수 있다. 또한, 상기 IPP로부터 β -카로틴을 합성하는데 관여하는 효소를 코딩하는 유전자가 도입된 균주일 수 있다. 두 카피 이상의 IPP 이소머라제가 도입되어 IPP로부터 DMAPP로의 전환이 촉진된 것일 수 있다. 따라서, 상기 미생물은 레티노이드를 고농도로 생산할 수 있다. 도 1은 레티날 생합성의 MEP 경로 및 외래의 MVA 경로를 도식적으로 나타낸 도면이다.
- [13] 야생형 에세리키아 속 미생물은 예를 들면, 대장균일 수 있다. 상기 대장균은 DH5 α , MG1655, BL21(DE), S17-1, XL1-Blue, BW25113 또는 이들의 조합일 수 있다.
- [14] 모균주는 예를 들면, 서열번호 1의 엔테로코커스 페칼리스 (*Enterococcus faecalis*) 유래의 아세틸-CoA 아세틸트랜스퍼라제/하이드록시메틸글루타릴 (HMG)-CoA 리덕타제를 코딩하는 유전자, 서열번호 2의 엔테로코커스 페칼리스 유래의 HMG-CoA 신타제를 코딩하는 유전자, 서열번호 3의 스트렙토코커스 뉴모니아 (*Streptococcus pneumoniae*) 유래의 메발로네이트 키나제를 코딩하는 유전자, 서열번호 4의 스트렙토코커스 뉴모니아 유래의 포스포메발로네이트 키나제를 코딩하는 유전자, 서열번호 5의 스트렙토코커스 뉴모니아 유래의 메발로네이트 디포스페이트 데카르복실라제를 코딩하는 유전자, 서열번호 6의

대장균 유래의 이소펜테닐 디포스페이트 (IPP) 이소머라제를 코딩하는 유전자, 서열번호 7의 판토에아 아글루메란스 (*Pantoea agglomerans*) 유래의 제라닐제라닐 피로포스페이트 (GGPP) 신타제를 코딩하는 유전자, 서열번호 8의 판토에아 아글루메란스 유래의 피토엔 신타제를 코딩하는 유전자, 서열번호 9의 판토에아 아글루메란스 유래의 피토엔 데히드로게나제를 코딩하는 유전자, 및 서열번호 10의 판토에아 아나나티스 (*Pantoea ananatis*) 유래의 라이코펜- β -시클라제를 코딩하는 유전자로 형질전환된 것일 수 있다.

- [15] 모균주는 서열번호 1 내지 10의 유전자로 형질전환되고, 또한 서열번호 13의 배양되지 않은 해양 박테리아 (uncultured marine bacterium) 66A03 유래의 β -카로틴 모노옥시게나제를 코딩하는 유전자, 서열번호 14의 생쥐 (*Mus musculus*) 유래의 β -카로틴 15,15'-모노옥시게나제를 코딩하는 유전자, 서열번호 15의 나트로노모나스 파라오니스 (*Natronomonas pharaonis*) ATCC35678 유래의 brp 유사 단백질 2 (brp-like protein 2: brp2)을 코딩하는 유전자, 및 서열번호 16 또는 17의 할로박테리움 살리나룸 (*Halobacterium salinarum*) ATCC700922 유래의 β -카로틴 모노옥시게나제를 코딩하는 유전자로 이루어진 균으로 선택되는 하나 이상의 유전자로 더 형질전환된 것일 수 있다.
- [16] 상기 모균주는 서열번호 12의 헤마토코커스 플루비알리스 (*Haematococcus pluvialis*) 유래의 IPP 이소머라제를 코딩하는 유전자로 더 형질전환된, 레티노이드를 생산하는 것일 수 있다.
- [17] 상기 모균주는 서열번호 11의 대장균 유래 1-데옥시자일롤로즈-5-포스페이트 (DXP) 신타제(dxS)를 코딩하는 유전자로 형질전환된 것일 수 있다. DXP는 내재적 MEP 경로에서 속도 결정 단계에 해당하는 효소이므로 DXP 신타제를 코딩하는 유전자가 추가적으로 도입됨으로써 미생물은 β -카로틴을 고농도로 생산할 수 있게 된다.
- [18] 모균주는 예컨대 기탁번호 KCTC 11254BP의 대장균 DH5 α /pTDHB/pSNA (KOREAN COLLECTION FOR TYPE CULTURE, 2008. 1. 2. 기탁) 또는 기탁번호 KCTC 11255BP의 대장균 DH5 α /pTDHBSR/pSNA (KOREAN COLLECTION FOR TYPE CULTURE, 2008. 1. 2. 기탁)일 수 있다. 특히, 대장균 DH5 α /pTDHBSR/pSNA는 배지 중의 탄소원으로부터 레티노이드를 높은 생산성으로 생산할 수 있다.
- [19] 일 구체예에서, 상기 미생물은 서열번호 1의 엔테로코커스 패칼리스 (*Enterococcus faecalis*) 유래의 아세틸-CoA 아세틸트랜스퍼라제/하이드록시메틸글루타릴 (HMG)-CoA 리덕타제를 코딩하는 유전자, 서열번호 2의 엔테로코커스 패칼리스 유래의 HMG-CoA 신타제를 코딩하는 유전자, 서열번호 3의 스트렙토코커스 뉴모니아 (*Streptococcus pneumoniae*) 유래의 메발로네이트 키나제를 코딩하는 유전자, 서열번호 4의 스트렙토코커스 뉴모니아 유래의 포스포메발로네이트 키나제를 코딩하는 유전자, 서열번호 5의 스트렙토코커스 뉴모니아 유래의 메발로네이트

디포스페이트 데카르복실라제를 코딩하는 유전자, 서열번호 6의 대장균 유래의 이소펜테닐 디포스페이트 (IPP) 이소머라제를 코딩하는 유전자, 서열번호 7의 판토에아 아글루메란스 (*Pantoea agglomerans*) 유래의 제라닐제라닐 피로포스페이트 (GGPP) 신타제를 코딩하는 유전자, 서열번호 8의 판토에아 아글루메란스 유래의 피토엔 신타제를 코딩하는 유전자, 서열번호 9의 판토에아 아글루메란스 유래의 피토엔 데히드로게나제를 코딩하는 유전자, 서열번호 10의 판토에아 아나나티스 (*Pantoea ananatis*) 유래의 라이코펜- β -시클라제를 코딩하는 유전자, 서열번호 11의 대장균 유래 1-데옥시자일롤로즈-5-포스페이트 (DXP) 신타제를 코딩하는 유전자 및 서열번호 12의 헤마토코커스 플루비알리스 (*Haematococcus pluviialis*) 유래의 IPP 이소머라제를 코딩하는 유전자로 형질전환된 에세리키아 속 미생물로서, 서열번호 13의 배양되지 않은 해양 박테리아 (uncultured marine bacterium) 66A03 유래의 β -카로틴 모노옥시게나제를 코딩하는 유전자, 서열번호 14의 생쥐 (*Mus musculus*) 유래의 β -카로틴 15,15'-모노옥시게나제를 코딩하는 유전자, 서열번호 15의 나트로노모나스 파라오니스 (*Natronomonas pharaonis*) ATCC35678 유래의 brp 유사 단백질 2 (brp-like protein 2)을 코딩하는 유전자, 및 서열번호 16 또는 17의 할로박테리움 살리나룸 (*Halobacterium salinarum*) ATCC700922 유래의 β -카로틴 모노옥시게나제를 코딩하는 유전자로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자로 더 형질전환된 에세리키아 속 미생물일 수 있다. 서열번호 13의 배양되지 않은 해양 박테리아 (uncultured marine bacterium) 66A03 유래의 β -카로틴 모노옥시게나제를 코딩하는 유전자는 대장균에서 코돈 사용 최적화된 서열번호 18의 염기서열을 갖는 것일 수 있다.

- [20] 본 명세서에 있어서, 용어 "레티노이드 (retinoids)"는 비타민 A에 화학적으로 관련된 화학물질의 부류를 나타낸다. 레티노이드의 구조는 시클릭 말단기, 폴리엔 측쇄 및 극성 말단기로 구성된다. 상기 폴리엔 측쇄의 C=C 이중결합이 교대로 되어 형성된 공액 시스템 (conjugated system)은 레티노이드의 색 (보통 노란색, 오렌지 또는 적색)을 띠게 한다. 많은 레티노이드는 발색소(chromophore)이다. 측쇄 및 말단기를 변화시킴으로써 다양한 레티노이드가 생성될 수 있다. 상기 레티노이드는 레티날, 레티놀, 레티노산, 레티닐 아세테이트, 또는 이들의 조합일 수 있다. 또한, 상기 레티노이드는 레티날, 레티놀, 레티노산, 레티닐 아세테이트, 또는 이들의 조합의 생체 내 분해 산물일 수 있다.
- [21] 레티노이드는 기본 탄소수가 20인 물질로서, 결합하는 지방산 보조기에 따라 최종 탄소수가 달라질 수 있는데, 예컨대 아세테이트 결합시에는 최종 탄소수가 22이고 올레산 결합시에는 탄소수가 38일 수 있다.
- [22] 본 발명에서 "YbbO 단백질"은 서열번호 23의 아미노산 서열을 갖는 단백질일 수 있고, 이는 서열번호 24의 뉴클레오티드 서열을 갖는 유전자에 의해 코딩될 수 있다.

- [23] 본 발명에서 YbbO 단백질을 코딩하는 유전자의 뉴클레오티드 서열과 80% 이상의 상동성을 갖는 외래 유전자는 서열번호 49 내지 56의 뉴클레오티드 서열을 갖는 것일 수 있다. 외래 유전자는 YbbO 단백질을 코딩하는 유전자와 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 99% 이상의 상동성을 갖는다.
- [24] 서열번호 49는 본원의 YbbO 단백질을 코딩하는 유전자와 상동성 100%인 *Shigella sonnei* Ss046의 GENE ID: 3666309 ybbO 유전자의 뉴클레오티드 서열이다.
- [25] 서열번호 50은 본원의 YbbO 단백질을 코딩하는 유전자와 상동성 92%인 *Citrobacter rodentium* ICC168의 GENE ID: 8710313 ROD_05481인 유전자의 뉴클레오티드 서열이다.
- [26] 서열번호 51은 본원의 YbbO 단백질을 코딩하는 유전자와 상동성 91%인 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium str. LT2의 GENE ID: 1247022 ybbO 유전자의 뉴클레오티드 서열이다.
- [27] 서열번호 52는 본원의 YbbO 단백질을 코딩하는 유전자와 상동성 87%인 *Enterobacter cloacae* EcWSU1의 GENE ID: 11485505 ybbO 유전자의 뉴클레오티드 서열이다.
- [28] 서열번호 53은 본원의 YbbO 단백질을 코딩하는 유전자와 상동성 84%인 *Enterobacter aerogenes* KCTC 2190의 GENE ID: 10792827 EAE_13085 유전자의 뉴클레오티드 서열이다.
- [29] 서열번호 54는 본원의 YbbO 단백질을 코딩하는 유전자와 상동성 83%인 *Klebsiella pneumoniae* 342의 GENE ID: 6935503 KPK_4209 유전자의 뉴클레오티드 서열이다.
- [30] 서열번호 55는 본원의 YbbO 단백질을 코딩하는 유전자와 상동성 83%인 *Klebsiella oxytoca* KCTC 1686의 GENE ID: 11664596 KOX_13160 유전자의 뉴클레오티드 서열이다.
- [31] 서열번호 56은 본원의 YbbO 단백질을 코딩하는 유전자와 상동성 83%인 *Cronobacter sakazakii* ATCC BAA-894의 GENE ID: 5548810 ESA_02773 유전자의 뉴클레오티드 서열이다.
- [32] 서열번호 49 내지 56의 뉴클레오티드 서열을 갖는 유전자는 기재 순으로 각각 서열번호 41 내지 48의 아미노산 서열을 갖는 단백질을 코딩할 수 있다.
- [33] YbbO 유전자의 감쇄 또는 결실에 의하여, 레티날의 생산능 또는 레티노이드 중 레티날의 비율이 증가된 것일 수 있다. YbbO 유전자 또는 이와 80% 이상의 상동성을 갖는 외래 유전자의 증폭에 의하여 레티놀의 생산능 또는 레티노이드 중 레티놀의 비율이 증가된 것일 수 있다.
- [34] 상기 증폭은 외래 레티놀 탈수소효소를 코딩하는 유전자의 도입에 의하여 이루어진 것일 수 있다. 상기 증폭은 일 양상으로 외래 YbbO 유전자의 도입에 의하여 이루어진 것일 수 있다.
- [35] 본 명세서에 있어서, 용어 "감쇄(attenuation)"는 대상 유전자의 발현이 모균주에

- 비하여 감소한 것을 나타낸다. 용어 "결실(deletion)"은 대상 유전자의 발현이 상실된 것을 나타낸다.
- [36] 상기 감쇄 또는 결실은 유전자 서열의 변이, 예를 들면, 치환, 결실, 삽입 또는 그들의 조합에 의하여 발생할 수 있다. 상기 감쇄 또는 결실은 유전자 조절 부의 서열의 변이, 예를 들면, 치환, 결실, 삽입 또는 그들의 조합에 의하여 발생할 수 있다.
- [37] 용어 "증폭(amplification)"은 유전자 카피의 증가 및/또는 유전자의 발현량 증가를 나타낸다. 상기 증폭은 일 양상으로 외래 유전자의 도입 또는 내재적 유전자의 카피 수의 증가에 의하여 이루어질 수 있다. 상기 증폭을 위해 유전자의 발현량을 늘릴 수 있도록 프로모터 또는 RBS(ribosomal binding site)를 대체할 수 있다.
- [38] 에세리키아(*Escherichia*) 속 모균주의 YbbO 단백질을 코딩하는 유전자가 감쇄 또는 결실, 또는 증폭되거나, 상기 유전자의 뉴클레오티드 서열과 80% 이상의 상동성을 갖는 외래 유전자가 도입되어 증폭된 에세리키아 속 미생물은 모균주에 비하여 레티노이드, 즉, 레티날, 레티놀, 레티닐에스테르, 레티노산, 또는 이들의 조합 중 적어도 어느 하나의 생산능이 증가된 것일 수 있다. 또한, 상기 미생물은 모균주에 비하여 레티노이드, 즉, 레티날, 레티놀, 레티닐에스테르, 레티노산, 또는 이들의 조합 중 적어도 어느 하나의 생산능이 감소된 것일 수 있다.
- [39] 모균주는 에탄올아민 이용 단백질 E (Ethanolamine utilization protein E: EutE)를 코딩하는 유전자; 푸트레신 이용 경로 단백질 C (Putrescine utilization pathway protein C: PuuC)를 코딩하는 유전자; 또는 이들의 조합이 추가로 감쇄 또는 결실된 에세리키아 (*Escherichia*) 속 미생물일 수 있다.
- [40] 에탄올아민 이용 단백질 E (EutE)는 서열번호 19의 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있고, 이를 코딩하는 유전자는 서열번호 21의 뉴클레오티드 서열을 갖는 것일 수 있다.
- [41] 푸트레신 이용 경로 단백질 C (PuuC)는 서열번호 20의 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있고, 이를 코딩하는 유전자는 서열번호 22의 뉴클레오티드 서열을 갖는 것일 수 있다.
- [42] 다른 양상은 상기 미생물을 배양하는 단계; 및 배양물로부터 레티노이드를 분리하는 단계;를 포함하는 상기 미생물로부터 레티노이드를 생산하는 방법에 관한 것이다.
- [43] 상기 방법은 상기한 미생물을 배양하는 단계를 포함한다. 여기서 미생물은 위에서 설명한 YbbO 단백질을 코딩하는 유전자가 감쇄 또는 결실되거나, 증폭된 에세리키아 속 미생물일 수 있고, 위에서 설명된 에세리키아 속 미생물에 관한 사항이 본 방법의 미생물에도 모두 적용될 수 있다.
- [44] 상기 배양은 친유성 물질을 포함하는 배지 중에서 배양하는 단계를 포함할 수 있다.

[45] 상기 친유성 물질은 탄소수 8 내지 50의 유기 화합물로서 친유성을 갖는 것일 수 있다.

[46] 상기 친유성 물질은 탄소수 8 내지 50의 알칸 화합물, 하기 화학식 1의 화합물; 하기 화학식 2의 화합물; 또는 이들의 조합일 수 있다:

[47] [화학식 1]

[48] $R_1(CO)OR_2$

[49] (식 중, R_1 및 R_2 는 각각 독립적으로 탄소수 8 내지 50의 알킬을 나타내고, CO는 카르보닐기를 나타냄),

[50] [화학식 2]

[51] $CH_2O(CO)R_3$

$CHO(CO)R_4$

$CH_2O(CO)R_5$

[52] (식 중, R_3 , R_4 및 R_5 는 각각 독립적으로 탄소수 8 내지 50의 알킬을 나타내고, CO는 카르보닐기를 나타냄).

[53] 탄소수 8 내지 50의 알칸 화합물은 직쇄 알칸, 분지 알칸, 시클릭 알칸, 또는 이들의 조합일 수 있다. 알칸 화합물은 예를 들면, 탄소수 8 내지 46, 8 내지 40, 8 내지 36, 8 내지 30, 8 내지 26, 8 내지 20, 8 내지 16, 8 내지 12, 8 내지 10, 10 내지 50, 10 내지 46, 10 내지 40, 10 내지 36, 10 내지 30, 10 내지 26, 10 내지 20, 10 내지 16, 10 내지 12, 10 내지 50, 10 내지 46, 12 내지 50, 12 내지 46, 12 내지 36, 12 내지 30, 12 내지 26, 12 내지 20, 또는 12 내지 16의 알칸 화합물일 수 있다.

[54] 직쇄 알칸은 탄소수 8 (옥탄), 10 (데칸), 12 (도데칸), 14 (테트라데칸), 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50의 알칸, 또는 이들의 조합일 수 있다.

[55] 분지 알칸은 탄소수 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50의 알칸, 또는 이들의 조합일 수 있다. 분지 알칸은 테르펜 화합물의 포화된 유사체(analogue)일 수 있다. 예를 들면, 피토스쿠알란일 수 있다.

[56] 직쇄 알칸, 분지 알칸, 및 시클릭 알칸의 조합은 미네랄 오일일 수 있다. 미네랄 오일은 비식물성 원료 (미네랄) 유래의 탄소 수 15 내지 40의 알칸의 혼합물일 수 있다. 탄소수 15 내지 40의 알칸은 탄소수 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40의 알칸의 2 이상의 혼합물일 수 있다.

[57] 미네랄 오일은 경량 미네랄 오일 또는 중량 미네랄 오일일 수 있다. 경량 미네랄 오일(light mineral oil)은 일반적으로 밀도가 880~920kg/m³이며 20°C에서 비중이 820~860 kg/m³, 40°C에서 유동성 점도가 14~18cst를 가지는 물질이다. 중량 미네랄 오일(heavy mineral oil)은 일반적으로 밀도가 920kg/m³이며 20°C에서

비중이 860~900 kg/m³, 40°C에서 유동성 점도가 65~85cst인 물질이다.

- [58] 화학식 1의 화합물에서 R₁ 및 R₂는 각각 독립적으로 직쇄, 분지쇄 또는 고리형의 탄소수 8 내지 50의 알킬이다. R₁과 R₂는 각각 독립적으로 탄소수 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48 또는 50의 알킬일 수 있다.
- [59] R₁과 R₂는 각각 탄소수 8 내지 50, 예를 들면, 탄소수 8 내지 46, 8 내지 40, 8 내지 36, 8 내지 30, 8 내지 26, 8 내지 20, 8 내지 16, 8 내지 12, 8 내지 10, 10 내지 50, 10 내지 46, 10 내지 40, 10 내지 36, 10 내지 30, 10 내지 26, 10 내지 20, 10 내지 16, 10 내지 12, 10 내지 50, 10 내지 46, 12 내지 50, 12 내지 46, 12 내지 36, 12 내지 30, 12 내지 26, 12 내지 20, 또는 12 내지 16의 알킬일 수 있다. R₁이 탄소수 13의 직쇄 알킬이고 R₂가 이소프로필일 수 있다. 또한, R₁이 에틸펜틸기이고 R₂가 세틸일 수 있다.
- [60] 화학식 2의 화합물에서, R₃, R₄ 및 R₅는 각각 독립적으로 직쇄, 분지쇄 또는 고리형의 탄소수 8 내지 50의 알킬이다.
- [61] R₃, R₄, 및 R₅는 각각 탄소수 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48 또는 50의 알킬일 수 있다. 상기 화합물은 예를 들면, R₃, R₄, 및 R₅가 각각 탄소수 8 내지 50, 예를 들면, 탄소수 8 내지 46, 8 내지 40, 8 내지 36, 8 내지 30, 8 내지 26, 8 내지 20, 8 내지 16, 8 내지 12, 8 내지 10, 10 내지 50, 10 내지 46, 10 내지 40, 10 내지 36, 10 내지 30, 10 내지 26, 10 내지 20, 10 내지 16, 10 내지 12, 10 내지 50, 10 내지 46, 12 내지 50, 12 내지 46, 12 내지 36, 12 내지 30, 12 내지 26, 12 내지 20, 또는 12 내지 16의 알킬일 수 있다.
- [62] 친유성 물질은 옥탄, 데칸, 도데칸, 테트라데칸, 피토스쿠알란, 미네랄 오일, 이소프로필 미리스테이트, 세틸 에틸헥사노에이트, 디옥타노일 데카노일 글리세롤, 스쿠알란, 또는 이들의 조합일 수 있다.
- [63] 친유성 물질은 생산되는 레티노이드를 안정화시키는 것뿐만 아니라, 미생물에 의한 레티노이드의 생산성을 증가시킬 수 있다. 친유성 물질은 미생물의 성장에 영향을 미치지 않거나 적게 영향을 미치는 것일 수 있다.
- [64] 배양은 합성, 반합성, 또는 복합 배양 배지에서 이루어질 수 있다. 배양 배지로는 탄소원, 질소원, 비타민 및 미네랄로 구성된 배지를 사용할 수 있다. 예를 들어, MRS (Man-Rogosa-Sharp) 액체 배지 또는 우유가 첨가된 액체 배지를 사용할 수 있다.
- [65] 배지의 탄소원으로는 전분, 포도당, 자당, 갈락토스, 과당, 글리세롤, 글루코스 또는 이들의 혼합물이 사용될 수 있다. 예를 들면, 글리세롤이 탄소원으로 사용될 수 있다. 질소원으로는 황산암모늄, 질산암모늄, 질산나트륨, 글루탐산, 카사미노산, 효모추출물, 펩톤, 트립톤, 대두박 또는 이들의 혼합물이 사용될 수 있다. 미네랄은 염화나트륨, 인산제이칼륨, 황산마그네슘 또는 이들의 혼합물이 사용될 수 있다.
- [66] 배양이 발효조에서 이루어지는 경우 글루코스를 배지의 탄소원으로 사용하는

것이 좋다. 시험관 배양의 경우에는 글리세롤을 배지의 탄소원으로 사용하는 것이 좋다.

- [67] 미생물 배양 배지 내 상기 탄소원, 질소원 및 미네랄 각각은 예를 들면, 리터당 10 내지 100 g, 5 내지 40 g 및 0.5 내지 4 g 을 이용할 수 있다.
- [68] 상기의 통상의 배양 배지에 첨가되는 비타민은 비타민 A, 비타민 B, 비타민 C, 비타민 D, 비타민 E 또는 이들의 혼합물일 수 있다. 비타민은 통상의 배양 배지에 상기에서 언급된 탄소원, 질소원, 미네랄 등과 함께 첨가되거나, 별균하여 준비된 배지에 별도로 첨가될 수 있다.
- [69] 배양은 통상의 대장균 배양 조건으로 수행될 수 있다. 배양은 예를 들어 약 15-45°C, 예를 들면, 15-44°C, 15-43°C, 15-42°C, 15-41°C, 15-40°C, 15-39°C, 15-38°C, 15-37°C, 15-36°C, 15-35°C, 15-34°C, 15-33°C, 15-32°C, 15-31°C, 15-30°C, 20-45°C, 20-44°C, 20-43°C, 20-42°C, 20-41°C, 20-40°C, 20-39°C, 20-38°C, 20-37°C, 20-36°C, 20-35°C, 20-34°C, 20-33°C, 20-32°C, 20-31°C, 20-30°C, 25-45°C, 25-44°C, 25-43°C, 25-42°C, 25-41°C, 25-40°C, 25-39°C, 25-38°C, 25-37°C, 25-36°C, 25-35°C, 25-34°C, 25-33°C, 25-32°C, 25-31°C, 25-30°C, 27-45°C, 27-44°C, 27-43°C, 27-42°C, 27-41°C, 27-40°C, 27-39°C, 27-38°C, 27-37°C, 27-36°C, 27-35°C, 27-34°C, 27-33°C, 27-32°C, 27-31°C 또는 27-30°C에서 수행될 수 있다.
- [70] 배양액 중의 배양 배지를 제거하고 농축된 균체만을 회수하거나 제거하기 위해 원심분리 또는 여과과정을 거칠 수 있으며 이러한 단계는 당업자의 필요에 따라 수행할 수 있다. 농축된 균체는 통상적인 방법에 따라 냉동하거나 냉동건조하여 그 활성을 잃지 않도록 보존할 수 있다.
- [71] 배양의 일 예에 있어서, 배양은 탄소원으로서 글리세롤을 포함하는 배지에서 이루어지는 것일 수 있다. 글리세롤은 배지 중의 유일한 탄소원일 수 있다. 0.5-5.0%(w/v), 예를 들면, 0.5-4.5%(w/v), 0.5-4.0%(w/v), 0.5-3.5%(w/v), 0.5-3.0%(w/v), 0.5-2.5%(w/v), 0.5-2.0%(w/v), 1-5.0%(w/v), 1-4.5%(w/v), 1-4.0%(w/v), 1-3.5%(w/v), 1-3.0%(w/v) 또는 1-2.5%(w/v)의 글리세롤을 포함하는 배지에서 이루어지는 것일 수 있다. 상기 배지는 글리세롤 및 아라비노스가 첨가된 YT 배지일 수 있다. YT 배지는 1.6중량% 트립톤, 1중량% 효모 추출물 및 0.5 중량% NaCl을 포함할 수 있다.
- [72] 배양은 친유성 물질 존재 하의 배양 배지에서, 예를 들면 배지 표면에 친유성 물질인 도데칸 상(dodecane phase)을 위치시킨 상태로 수행될 수 있다. 배양은 교반되는 상태에서 수행될 수 있다.
- [73] 교반되는 경우, 100 내지 300rpm, 예를 들면, 100 내지 280rpm, 100 내지 260rpm, 100 내지 240rpm, 100 내지 220rpm, 100 내지 200rpm, 100 내지 180rpm, 100 내지 160rpm, 100 내지 140rpm, 100 내지 120rpm, 120 내지 300rpm, 120 내지 280rpm, 120 내지 260rpm, 120 내지 240rpm, 120 내지 220rpm, 120 내지 200rpm, 120 내지 180rpm, 120 내지 160rpm, 120 내지 140rpm, 150 내지 300rpm, 150 내지 280rpm, 150 내지 260rpm, 150 내지 240rpm, 150 내지 220rpm, 150 내지 200rpm, 150 내지

- 180rpm, 140 내지 160rpm, 200 내지 300rpm, 200 내지 280rpm, 200 내지 260rpm, 200 내지 240rpm, 200 내지 220rpm, 또는 150 rpm으로 교반될 수 있다.
- [74] 교반되는 경우, 상기 친유성 물질, 예컨대 도데칸은 배지 중에서 분산되어 세포와 접촉된다. 친유성 물질은 배지 중에 분산됨으로써 미생물과 접촉하는 면적이 넓어져 배양 중 레티노이드를 효율적으로 세포로부터 분리되게 하여 안정화 및/또는 용해시킬 수 있다.
- [75] 친유성 물질, 예컨대 도데칸 상 없이 상기 기술한 레티노이드를 생산하는 미생물을 배양시켰을 때, 레티노이드 생산은 일정 시점에서 최고치를 나타내고 그 이후에 감소할 수 있다. 이는 미생물 성장의 정체 상태 동안 추가적인 레티노이드 합성이 중단되는 반면, 세포 내에서 그의 산화적 분해가 일어나기 때문일 수 있다.
- [76] 친유성 물질, 예컨대 도데칸 상의 존재 하에 배양 배지에서 상기 미생물을 배양시키게 되면 생산된 레티노이드가 세포 내에서 분해되기 전에 친유성 물질, 예컨대 도데칸 상에 흡수되게 되어 레티노이드 생산량을 향상시킬 수 있다.
- [77] 상기 친유성 물질, 예컨대 도데칸 상은 에세리키아 속 미생물의 세포 성장에 영향을 미치지 않고, 소수성 레티노이드의 추출을 위해 소수성이고, 낮은 휘발성을 갖는 것일 수 있다. 도 2는 β -카로틴의 레티날, 레티놀, 레티노산, 및 레티닐 에스테르를 포함하는 레티노이드로의 변환을 나타낸다.
- [78] 배지 대 친유성 물질의 부피비는 특정 범위의 비로 한정되지 않고, 예컨대, 배지 대 친유성 물질의 부피비가 1:0.1-3.0, 1:0.2-3.0, 1:0.5-3.0, 1:1.0-3.0, 1:1.5-3.0, 1:2.0-3.0, 1:2.5-3.0, 1:0.2-2.5, 1:0.2-2.0, 1:0.2-1.5, 1:0.2-1.0, 1:0.2-0.5, 1:0.5-2.5, 1:0.5-2.0, 1:0.5-1.5, 1:0.5-1.0, 1:0.8-2.5, 1:0.8-2.0, 1:0.8-1.5, 1:0.8-1.2, 1:0.8-1.0 등이 가능하다.
- [79] 일 구체예에 따르면 상기 배양하는 단계에서 상기 배지는 약 2.0% 농도의 글리세롤을 포함하고, 상기 에세리키아 속 미생물은 대장균 DH5 α 또는 MG1655이고, 상기 배양하는 단계는 배양액 약 7 ml, 약 29°C에서 배양시키는 것일 수 있다.
- [80] 상기 방법은 또한, 친유성 물질 상으로부터 레티노이드를 분리하는 단계를 포함한다. 상기 레티노이드, 예를 들면, 레티날, 레티놀, 레티닐 에스테르, 또는 이들의 조합을 분리하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들면, 이온교환 크로마토그래피, HPLC 등의 방법에 의하여 분리될 수 있다. 구체적으로, 균체를 회수한 후에 아세톤 등의 용매를 이용한 추출 후에 고순도의 제품을 얻기 위해서는 HPLC 또는 결정화 작업등을 통한 분리정제가 진행될 수 있다.
- [81] 레티노이드는 화장품, 식품 또는 의약품의 소재로 널리 활용된다.
- [82] 다른 양상으로, YbbO 단백질; 또는 상기 YbbO 단백질을 코딩하는 유전자의 아미노산 서열과 80% 이상의 상동성을 갖는 유전자가 코딩하는 단백질을 포함하는 효소 조성물을 첨가함으로써 레티날로부터 레티놀로의 전환을 촉진시킬 수 있다.

- [83] 상기 YbbO 단백질은 앞서 설명한 바와 마찬가지로 서열번호 23의 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있고, 상기 YbbO 단백질을 코딩하는 유전자의 아미노산 서열과 80% 이상의 상동성을 갖는 유전자가 코딩하는 단백질은 서열번호 41 내지 48 중 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다.
- [84] YbbO 단백질을 코딩하는 유전자의 아미노산 서열과 80% 이상의 상동성을 갖는 유전자는 YbbO 단백질을 코딩하는 유전자의 아미노산 서열과 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 99% 이상의 상동성을 가질 수 있다.
- [85] 서열번호 23의 아미노산 서열을 갖는 YbbO 단백질은 서열번호 24의 뉴클레오티드 서열을 갖는 유전자에 의해 코딩될 수 있고, 서열번호 41 내지 48 중 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 단백질은 서열번호 49 내지 56 중 어느 하나의 뉴클레오티드 서열을 갖는 유전자에 의해 코딩될 수 있다.
- [86] YbbO 단백질을 포함하는 효소 조성물은 용매, 안정제, 각종 첨가제 등 통상의 효소 조성물에 포함되는 성분들을 추가 포함할 수 있다. 또한, YbbO 단백질이외의 레티날로부터 레티놀로의 전환을 촉진시키는 성분을 추가 포함할 수 있다.

[87]

발명의 효과

- [88] 일 양상에 따른 에세리키아 속 미생물은 증가된 레티노이드 생산능을 갖는다. 또한, 레티노이드 중 특정 산물을 증가된 비율로 생산할 수 있다.
- [89] 다른 양상에 따른 레티노이드를 생산하는 방법에 의하면, 레티노이드를 효율적으로 생산할 수 있다. 또한, 레티노이드 중 특정 산물을 증가된 비율로 생산할 수 있다.
- [90] 본 발명의 YbbO 단백질을 코딩하는 유전자가 감쇄 또는 결실, 또는 증폭되거나, 상기 YbbO 단백질을 코딩하는 유전자의 아미노산 서열과 80% 이상의 상동성을 갖는 유전자가 도입되어 증폭된 에세리키아 속 미생물을 친유성 물질을 포함하는 배지 중에서 배양시켜 친유성 물질 상으로부터 레티노이드를 분리시키면 보다 효율적으로 레티노이드를 생산할 수 있다.
- [91] 본 발명의 미생물을 이용한 레티노이드 생산 방법을 통해 얻어진 레티노이드는 화장품, 식품, 의약품 등의 소재로 널리 활용될 수 있고, 화장품, 식품, 의약품 등의 제조를 위해 특정 레티노이드의 효과적인 생산이 필요할 경우 본 발명의 레티노이드 생산 방법을 활용하기 적합하다.

[92]

도면의 간단한 설명

- [93] 도 1은 레티날 생합성의 MEP 경로 및 외래의 MVA 경로를 도식적으로 나타낸 도면이다.
- [94] 도 2는 β -카로틴의 레티날, 레티놀, 레티노산, 및 레티닐 에스테르를 포함하는 레티노이드로의 변환을 나타낸 도면이다.

- [95] 도 3은 YbbO 유전자 도입이 레티노이드 생산에 미치는 영향을 나타낸 도면이다.
- [96] 도 4는 YbbO 유전자 결실이 레티노이드 생산에 미치는 영향을 나타낸 도면이다.
- [97] 도 5는 *eutE* 유전자 또는 *puuC* 유전자 결실이 레티노이드 생산에 미치는 영향을 나타낸 도면이다.
- [98] 도 6은 도데칸이 포함된 배지를 사용한 배양에서의 대장균(pT-DHBSR/pS-NA)의 도데칸 부피에 따른 레티노이드 생산 및 세포 성장을 나타낸 도면이다.
- [99] 도 7은 도데칸이 포함된 배지를 사용한 배양에서의 대장균(pT-DHBSR/pS-NA)의 배양 시간 및 도데칸 부피에 따른 레티노이드의 분포가 총 레티노이드에 대한 각 구성성분의 백분율로 나타낸 도면이다.
- [100] 도 8 및 도 9는 다양한 알칸 존재하에서 대장균(pT-DHBSR/pS-NA)의 레티노이드 생산 및 세포성장 결과를 나타낸 도면이다.
- [101] 도 10, 도 11 및 도 12는 다양한 부피의 경량 미네랄 오일 존재 하에서 대장균(pT-DHBSR/pS-NA)의 레티노이드 생산, 세포성장, 균체당 레티노이드 생산량(cell specific retinoids productivity) 결과를 나타낸 도면이다.
- [102] 도 13 및 도 14는 중량 미네랄 오일 존재 하에서 대장균(pT-DHBSR/pS-NA)의 레티노이드 생산 및 세포성장 결과를 나타낸 도면이다.
- [103] 도 15 및 도 16은 중량 미네랄 오일 존재 하에서 시험관을 기울여 배양한 경우 대장균(pT-DHBSR/pS-NA)의 레티노이드 생산 및 세포성장 결과를 나타낸 도면이다.
- [104] 도 17은 피부 친화적 친유성 물질 존재 하에서 대장균(pT-DHBSR/pS-NA)의 세포 성장 및 pH를 나타낸 도면이다.
- [105] 도 18 및 도 19는 피부 친화적 친유성 물질의 다양한 종류와 양에 따른 대장균(pT-DHBSR/pS-NA)의 레티노이드 생산결과를 나타낸 도면이다.
- [106]

발명의 실시를 위한 형태

- [107] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다. 이하의 실시예에서 다음의 실험 재료 및 방법을 사용하였다.
- [108]
- [109] **실시예 1: YbbO 유전자가 증폭 또는 결실된 대장균 및 그를 이용한 레티노이드의 생산**
- [110] 레티노이드 생산능을 갖는 에세리키아 속 미생물인 대장균 DH5 α (pTDHBSR/pSNA) (기탁번호 KCTC 11255BP)에서 YbbO 유전자를 증폭

또는 결실시키고, 그 증폭 또는 결실이 레티노이드 생산에 미치는 영향을 확인하였다.

[111]

[112] (1)YbbO 유전자의 증폭된 대장균의 제조 및 레티노이드 생산

[113] 대장균 YbbO 유전자 (서열번호 24)를 pBBR1MCS2 플라스미드의 KpnI과 XhoI 제한효소 부위에 삽입하여 pBBR1MCS2(YbbO) 플라스미드를 제조하였다. 다음으로, pBBR1MCS2(YbbO) 플라스미드를 대장균 DH5α(pTDHBSR/pSNA)에 형질전환에 의하여 도입하여 대장균 DH5α(pTDHBSR/pSNA/pBBR1MCS2-YbbO)를 얻었다. 이 과정을 상세히 설명하면 다음과 같다.

[114] 표 1

[Table 1]

효소명	유전자	유전자 서열 (Genbank 허가번호)
야생형 대장균(Escherichia coli MG1655; taxid 511145) 유래의 예상 산화환원효소	ybbO	서열번호 24(1786701)

[115] 표 2

[Table 2]

유전자	방향	프라이머 서열	제한효소
ybbO	F	서열번호 25	KpnI
ybbO	R	서열번호 26	

[116] 게놈 DNA 제조, 제한효소 절단, 형질 전환 및 표준 분자 생물학 기술은 문헌에 기재된 대로 수행하였다(Sambrook and Russell 2001). PCR은 그의 표준 프로토콜에 의해 pfu DNA 폴리머라제(Solgent Co., Korea)를 사용하여 수행하였다.

[117] 표 1의 유전자 클로닝에 사용된 프라이머 서열과 제한효소는 표 2에 나타내었다. 표 1의 유전자는 해당 유전자를 포함하고 있는 균주의 염색체 DNA를 주형으로 PCR을 통해 증폭되었다. 증폭된 산물을 표 2에 열거된 제한효소를 이용하여 벡터 pBBR1MCS2 (GenBank 허가번호 U02374)(서열번호 27)에 도입하여, 벡터 pBBR2-ybbO(서열번호 40)를 제조하였다. 그 후, pBBR2-ybbO 플라스미드를 대장균 DH5α(pTDHBSR/pSNA)에 형질전환에 의하여 도입하여 대장균 DH5α(pTDHBSR/pSNA/pBBR2-YbbO)를 얻었다.

[118] 얻은 균주를 2% (w/v) 글리세롤 및 0.2% (w/v) 아라비노오스를 함유한 2YT 배지(리터 당 16g 트립톤, 10g 이스트 추출물, 및 5g NaCl) 5mL와 도데칸 5mL의 혼합 배지 중에서 72 시간 동안 배양하였다.

- [119] 배양은 길이 15 cm, 지름 25 mm의 시험관에 상기 혼합 배지를 넣고 각 균주를 접종한 후, 진탕 배양기 (shaking incubator)에 약 250 rpm으로 교반하면서 약 29°C에서 배양하였다. 대조군으로는 YbbO 유전자가 도입되지 않은 벡터가 도입된 DH5 α (pTDHBSR/pSNA/pBBR1MCS2)를 사용하였다.
- [120] 도 3은 YbbO 유전자 도입이 레티노이드 생산에 미치는 영향을 나타낸 도면이다. 도 3에 나타낸 바와 같이, 대조군 균주(pBBR1MCS-2)에 비하여, YbbO 유전자 도입 균주(pBBR2-ybbO)에서 전체 레티노이드 중 레티놀과 레티닐 아세테이트의 비율이 증가하였다. 전체 레티노이드 생산량은 큰 차이가 없었다. 대조군에서 레티날: 레티놀: 레티닐 아세테이트는 70mg/L: 45 mg/L: 20 mg/L이었으나, YbbO 유전자 균주에서는 21mg/L: 67 mg/L: 39 mg/L이었다.
- [121] YbbO 유전자 도입 균주에 의한 레티노이드 생산시 레티닐 아세테이트 비율 증가는 레티놀 비율의 증가에 의해 야기된 것으로 여겨진다. 반면, YbbO 유전자 도입 균주에 의한 레티노이드 생산시 레티날은 소량 생산되었다.
- [122]
- [123] **(2)YbbO 유전자의 결실된 대장균의 제조 및 레티노이드 생산**
- [124] 대장균 DH5 α Δ ybbO 균주는 Datsenko와 Wanner의 방법(Datsenko KA and Wanner BL., 2000 Proc Natl Acad Sci U.S.A., 97(12):6640-6645)에 따라서 다음과 같이 제조되었다.
- [125] ybbO 유전자를 상동성 재조합에 의하여 선발 마커 유전자인 카나마이신 유전자로 대체하기 위하여, pKD13 플라이스미드(Datsenko KA and Wanner BL., 2000 Proc Natl Acad Sci U.S.A., 97(12):6640-6645)의 카나마이신 유전자에 결합하면서 ybbO 유전자의 상류 말단과 하류 말단의 염기 서열을 갖는 PCR 프라이머를 제조하였다.
- [126] 정방향 프라이머는 ybbO 유전자의 상류 말단의 50bp 염기서열 다음에, 카나마이신 유전자 결합 염기 서열 20bp로 구성되어 있으며, 역방향 프라이머는 ybbO 유전자의 하류 말단의 50bp 염기서열 다음에, 카나마이신 유전자 결합 염기 서열 20bp로 구성되어 있다. 사용한 프라이머는 표 3에 표시하였다. 서열번호 28과 29의 올리고뉴클레오티드를 프라이머로 하고, pKD13을 주형으로 PCR 반응을 수행하였다.
- [127] 상기의 정제된 PCR 반응산물은 pKD46 (Datsenko KA and Wanner BL., 2000 Proc Natl Acad Sci U.S.A., 97(12):6640-6645)을 포함한 DH5 α 콤펙턴트 세포 (competent cell)로 형질전환하였다. 카나마이신 저항성을 가진 평판 배지의 콜로니를 콜로니 PCR을 통하여 카나마이신 유전자가 상동성 재조합에 의해서 ybbO 유전자를 대체했는지를 확인하였다. 콜로니 PCR에 사용된 프라이머는 대장균 DH5 α 염색체 상에서 ybbO 유전자 바로 인접한 영역에 결합하도록 제조하였다.
- [128] 그 결과, ybbO 유전자가 결실된 것을 콜로니 PCR 방법에 의하여 표 3의 서열번호 30과 서열번호 31의 프라이머를 이용해 확인하였다.

[129] 표 3

[Table 3]

명칭	서열번호
KO YbbO-F	28
KO YbbO-R	29
KO YbbOCF-F	30
KO YbbOCF-R	31

- [130] 얻은 균주를 2% (w/v) 글리세롤 및 0.2% (w/v) 아라비노오스를 함유한 2YT 배지(리터 당 16g 트립톤, 10g 이스트 추출물, 및 5g NaCl) 5mL와 도테칸 5mL의 혼합 배지 중에서 60 시간 동안 배양하였다. 배양은 길이 15 cm, 지름 25 mm의 시험관에 상기 혼합 배지를 넣고 각 균주를 접종한 후, 진탕 배양기 (shaking incubator)에 약 250 rpm으로 교반하면서 약 29°C에서 배양하였다. 대조군으로는 YbbO 유전자가 결실되지 않은 DH5α(pTDHBSR/pSNA)를 사용하였다.
- [131] 도 4는 YbbO 유전자 결실이 레티노이드 생산에 미치는 영향을 나타낸 도면이다. 도 4에 나타낸 바와 같이, 대조군 균주(DH5α)에 비하여, YbbO 유전자 결실 균주(DH5αΔybbO)에서 전체 레티노이드 생산량이 높았다.
- [132] 또한, 전체 레티노이드 중 레티날이 레티놀보다 더 많이 생산되었다. 즉, 60시간 대조군에서, 레티날: 레티놀: 레티닐 아세테이트는 43mg/L: 22 mg/L: 9.7 mg/L이었으나, YbbO 유전자 결실 균주에서, 65mg/L: 25 mg/L: 9.5 mg/L이었다. 따라서, 얻어진 균주를 사용하여 레티날 비율이 높은 레티노이드를 생산할 수 있다.
- [133] 또한, 실시예 2에서 확인된 바와 같이, EutE, P_{uu}C, 또는 그 조합을 결실시킴으로써, 레티날 비율이 높은 레티노이드를 생산할 수 있다.
- [134]
- [135] 실시예 2: EutE 유전자와 P_{uu}C 유전자가 결실된 대장균 및 그를 이용한 레티노이드 생산
- [136] 레티노이드 생산능을 갖는 에세리키아 (Escherichia) 속 미생물인 DH5α(pTDHBSR/pSNA) (기탁번호 KCTC 11255BP)에서 EutE 유전자 및 P_{uu}C 유전자를 결실시키고, 그 결실이 레티노이드 생산에 미치는 영향을 확인하였다.
- [137]
- [138] (1) DH5α(pTDHBSR/pSNA)의 eutE 유전자 또는 puuC 유전자 결실
- [139] 결실은 Datsenko와 Wanner의 방법 (Datsenko KA and Wanner BL., 2000 Proc Natl Acad Sci U.S.A., 97(12):6640-6645)에 따라서 다음과 같이 제조하였다.
- [140] EutE 유전자를 상동성 재조합에 의하여 선발 마커 유전자인 카나마이신 유전자로 대체하기 위하여, pKD13 플라이스미드(Datsenko KA and Wanner BL., 2000 Proc Natl Acad Sci U.S.A., 97(12):6640-6645)의 카나마이신 유전자에

결합하면서 EutE 유전자의 상류 말단과 하류 말단의 염기 서열을 갖는 PCR 프라이머를 제조하였다.

- [141] 정방향 프라이머는 EutE 유전자의 상류 말단의 50bp 염기서열 다음에, 카나마이신 유전자 결합 염기 서열 20bp로 구성되어 있으며, 역방향 프라이머는 EutE 유전자의 하류 말단의 50bp 염기서열 다음에, 카나마이신 유전자 결합 염기 서열 20bp로 구성되어 있다. 사용한 프라이머는 하기 표 4에 표시하였다. 서열번호 32와 서열번호 33의 올리고뉴클레오티드를 프라이머로 하고, pKD13을 주형으로 PCR 반응을 수행하였다.
- [142] 상기의 정제된 PCR 반응산물은 pKD46 (Datsenko KA and Wanner BL., 2000 Proc Natl Acad Sci U.S.A., 97(12):6640-6645)을 포함한 DH5 α 콤펙턴트 세포 (competent cell)로 형질전환하였다. 카나마이신 저항성을 가진 평판 배지의 콜로니를 콜로니 PCR을 통하여 카나마이신 유전자가 상동성 재조합에 의해서 EutE 유전자를 대체했는지를 확인하였다. 콜로니 PCR에 사용된 프라이머는 대장균 DH5 α 염색체 상에서 EutE 유전자 바로 인접한 영역에 결합하도록 제조하였다.
- [143] PuuC 유전자를 상동성 재조합에 의하여 선발마커 유전자인 클로람페니콜 유전자로 대체하기 위하여, pKD3 플라이스미드 (Datsenko KA and Wanner BL., 2000 Proc Natl Acad Sci U.S.A., 97(12):6640-6645)의 클로람페니콜 유전자에 결합하면서 PuuC 유전자의 상류 말단과 하류 말단의 염기 서열을 갖는 PCR 프라이머를 제조하였다.
- [144] 정방향 프라이머는 PuuC 유전자의 상류 말단의 50bp 염기서열 다음에, 클로람페니콜 유전자 결합 염기 서열 20bp로 구성되어 있으며, 역방향 프라이머는 PuuC 유전자의 하류 말단의 50bp 염기서열 다음에, 클로람페니콜 유전자 결합 염기 서열 20bp로 구성되어 있다. 사용한 프라이머는 하기 표 4에 표시하였다. 서열번호 36과 서열번호 37의 올리고뉴클레오티드를 프라이머로 하고, pKD3을 주형으로 PCR 반응을 수행하였다.
- [145] 상기의 정제된 PCR 반응산물은 pKD46 (Datsenko KA and Wanner BL., 2000 Proc Natl Acad Sci U.S.A., 97(12):6640-6645)을 포함한 DH5 α 콤펙턴트 세포 (competent cell)로 형질전환하였다. 클로람페니콜 저항성을 가진 평판 배지의 콜로니를 콜로니 PCR을 통하여 클로람페니콜 유전자가 상동성 재조합에 의해서 PuuC 유전자를 대체했는지를 확인하였다. 콜로니 PCR에 사용된 프라이머는 대장균 DH5 α 염색체 상에서 PuuC 유전자 바로 인접한 영역에 결합하도록 제조하였다.
- [146] 그 결과, EutE 유전자 및 PuuC 유전자가 결실된 것을 콜로니 PCR 방법에 의하여 EutE는 하기 표 4의 서열번호 34와 서열번호 35의 프라이머로, PuuC는 하기 표 4의 서열번호 38과 서열번호 39의 프라이머로 확인하였다.
- [147] 표 4

[Table 4]

명칭	서열번호
KO eutE-F	32
KO eutE-R	33
KO eutECF-F	34
KO eutECF-R	35
KO puuC-F	36
KO puuC-R	37
KO puuCCF-F	38
KO puuCCF-R	39

[148]

[149] (2) 레티노이드 생산의 비교

[150] (1)에서 얻은 균주를 2% (w/v) 글리세롤 및 0.2% (w/v) 아라비노오스를 함유한 2YT 배지(리터 당 16g 트립톤, 10g 이스트 추출물, 및 5g NaCl) 5mL와 도데칸 5mL의 혼합 배지 중에서 60 시간 동안 배양하였다.

[151] 배양은 길이 15 cm, 지름 25 mm의 시험관에 상기 혼합 배지를 넣고 각 균주를 접종한 후, 진탕 배양기 (shaking incubator)에 약 250 rpm으로 교반하면서 약 29°C에서 배양하였다. 대조군으로는 상기 유전자가 결실되지 않은 DH5α(pTDHBSR/pSNA)를 사용하였다.

[152] 도 5는 EutE 유전자, 또는 PuuC 유전자 결실이 레티노이드 생산에 미치는 영향을 나타낸 도면이다. 도 5에 나타낸 바와 같이, 대조군 균주에 비하여, 결실 균주에서 전체 레티노이드의 양 (레티날, 레티놀 및 레티닐 아세테이트의 총량) 및 레티날의 비율이 배양 60시간에서 크게 증가하였다. 대조군 균주의 경우 배양 60시간 총 레티노이드 생산량이 75 mg/L, EutE 유전자가 결실된 경우 110.3 mg/L, PuuC 유전자가 결실된 경우 102.2 mg/L를 나타내었다.

[153] 이는 EutE 유전자 및 PuuC 유전자가 레티날을 레티노산으로 산화시키는 옥시다제 활성을 코딩하기 때문인 것으로 여겨진다. 그러나, 특정한 기작에 한정되는 것은 아니다.

[154]

[155] 실시예 3: 도데칸 존재하 대장균 배양과 레티노이드 생산

[156] 도데칸 함유 배지 중에서 대장균(pT-DHBSR/pS-NA)를 배양하여, 도데칸이 레티노이드 생산 및 세포 성장에 미치는 영향을 확인하였다.

[157] 2% (w/v) 글리세롤 및 0.2% (w/v) 아라비노오스를 함유한 2YT 배지(리터 당 16g 트립톤, 10g 이스트 추출물, 및 5g NaCl) 5mL와 도데칸 (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6mL)의 혼합 배지 중에서 72 시간 동안 배양하였다. 배양은 길이 15 cm, 지름 25 mm의

시험관에 상기 혼합 배지를 넣고 각 균주를 접종한 후, 진탕 배양기 (shaking incubator)에 약 250 rpm으로 교반하면서 약 29°C에서 배양하였다.

- [158] 도 6은 도데칸 함유 배지에서 대장균(pT-DHBSR/pS-NA)의 레티노이드 생산 및 세포 성장을 나타낸 도면이다. 레티노이드 생산에서 레티날, 레티놀 및 레티닐 아세테이트를 각각 밝은 회색, 어두운 회색 및 검은색으로 나타내었다. 세포 배양시에 오버레이한 도데칸 부피 0 mL, 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL, 5 mL 및 6 mL를 각각 ■, ●, ▲, □, ○, △ 및 ☆로 나타내었다.
- [159] 도 7은 배양 시간 및 도데칸 부피에 따른 레티노이드의 분포가 총 레티노이드에 대한 각 구성성분의 백분율로 나타낸 도면이다. 레티날, 레티놀 및 레티닐 아세테이트를 각각 밝은 회색, 어두운 회색 및 검은색으로 나타내었다.
- [160] 도면의 레티노이드 함량은 배양액중의 도데칸층만을 원심분리로 분리, 회수하여 HPLC를 통해 측정된 값이다.
- [161] 측정 결과, 레티노이드는 세포 또는 세포 파쇄물 중에는 존재하지 않거나 무시할 수 있는 정도로만 존재하였으며, 세포가 제거된 배양액 즉, 도데칸 층에 존재하였다.
- [162] 도 6 및 도 7에 나타낸 바와 같이, 도데칸이 첨가되지 않은 것에 비하여, 도데칸 첨가에 의하여 레티노이드 생산이 증가하였다.
- [163] 도 6에 나타낸 바와 같이, 레티노이드 생산은 도데칸 부피에 비례하였다. 5 mL 도데칸을 갖는 배양의 72 시간에서 136 mg/L의 가장 높은 레티노이드 생산을 얻었고 이는 1 mL 도데칸으로 할 경우(65 mg/L)보다 약 2 배 높은 수치이다. 5 mL 도데칸으로 72 시간 이상 연장된 배양을 시켰을 때 추가적인 레티노이드 생산의 증가는 없었고 그의 최고치를 분해 없이 유지하였다(데이터는 나타내지 않음). 0, 24, 및 48 시간에서 2 mL의 도데칸을 배양에 추가하는 것에 의해 도데칸 첨가 부피를 6 mL까지 증가시켰다. 6 mL 도데칸 첨가 배양에서 5 mL 도데칸을 갖는 배양에 비교하였을 때 전체 레티노이드 생산의 증가는 없었다. 6 mL 도데칸을 초기에 첨가 배양에서도 레티노이드 생산의 증가는 없었다(데이터는 나타내지 않음). 도데칸을 갖는 모든 배양액에서의 세포 성장은 도데칸이 없을 때보다 약간 높았다(도 6).
- [164] 도 7은 도데칸 첨가 부피에 따라 얻은 레티노이드들의 분포를 나타낸 도면이다. 도데칸 첨가가 있는 경우와 없는 경우 얻은 레티날 및 레티놀 비율에서 현저한 레티노이드 분포 차이가 나타난다. 48 시간에서 레티노이드 중 레티날의 비율은 도데칸 첨가 배양에서 약 51% (w/w)이고 도데칸 첨가가 없는 배양에서 23%인 반면, 레티놀 비율은 도데칸 첨가 배양에서 30% 내지 39%이고 도데칸 첨가 없는 배양에서 59%이다. 따라서, 도데칸 첨가는 레티날의 비율을 높이지만 레티놀의 비율을 감소시킨다. 세포에서 레티날로부터의 레티놀 형성의 반응 순서를 고려하였을 때, 레티날은 도데칸에 의해 그의 레티놀로의 전환 전에 세포로부터 추출되는 것으로 생각된다. 48 시간에서의 레티닐 아세테이트 비율은 도데칸 첨가 있는 배양 및 없는 배양 모두에서 20% 미만이고, 이는 레티날 및 레티놀에

비해 상대적으로 낮은 수치이다. 도데칸 첨가 배양에서 레티닐 아세테이트 비율은 배양 시간이 길어짐에 따라 감소하는데 이는 레티닐 아세테이트 형성을 위한 세포 활동이 배양 동안 감소함을 나타낸다. 결론적으로, 도데칸 첨가는 세포 성장의 정체 상태에서 레티노이드 생산의 감소를 방지하고 레티노이드 생산을 증가시켰다.

[165] 본 발명의 레티노이드의 인-시추 추출에는 세포벽 분해를 위한 리소자임이 필요하지 않다. 레티노이드(C20, 이소프레노이드 분자)는 세포벽의 손실 없이 세포로부터 효과적으로 방출될 수 있다. 레티노이드 생산의 2-상 배양에서, β -카로틴은 레티노이드의 직접적인 전구체이기 때문에 세포 내에 계속 유지되어야 한다. β -카로틴이 도데칸 상에서 추출되는 경우, 이는 시토졸에 위치한 BCD(M)O에 의해 절단될 수 있다.

[166] β -카로틴은 분자 크기 때문에 세포로부터 방출될 수 없어 도데칸에 의해 추출되지 않으므로, β -카로틴의 2-상 배양에서 세포 내에서 계속 유지될 수 있다.

[167]

[168] **실시예 4: 친유성 물질을 포함하는 배지에서 레티노이드의 생산**

[169] 본 실시예에서는 다양한 친유성 물질 함유 배지 중에서 대장균(pT-DHBSR/pS-NA)을 배양하여, 친유성 물질이 레티노이드 생산 및 세포 성장에 미치는 영향을 확인하였다.

[170]

[171] **(1) 알칸을 포함하는 배지에서 레티노이드의 생산**

[172] 위 대장균(pT-DHBSR/pS-NA)을 2% (w/v) 글리세롤 및 0.2% (w/v) 아라비노오스를 함유한 2YT 배지(리터 당 16g 트립톤, 10g 이스트 추출물, 및 5g NaCl) 5mL와 옥탄, 데칸, 도데칸 또는 테트라데칸 5mL의 혼합 배지 중에서 72 시간 동안 배양하였다. 배양은 길이 15 cm, 지름 25 mm의 시험관에 상기 혼합 배지를 넣고 각 균주를 접종한 후, 진탕 배양기 (shaking incubator)에 약 250 rpm으로 교반하면서 약 29°C에서 배양하였다.

[173] 도 8은 알칸 존재하에서 레티노이드 생산 결과를 나타낸 도면이다. 도 9는 알칸 존재하에서 레티노이드 생산 균주의 성장 결과를 나타낸 도면이다.

[174] 도 8에 나타난 바와 같이, 데칸을 사용한 경우에 총 108 mg/L의 레티노이드가 생산되었다. 그 외 균체 증식, pH 및 균체 내 β -카로틴의 양은 알칸에 따라 큰 차이를 보이지 않았다. 그 결과 도데칸에 비해 데칸이 레티노이드 생산에 더 유리한 것으로 여겨진다. 옥탄을 사용한 경우, 레티날 및 레티놀의 생산은 다른 알칸과 유사하였으나, 레티닐 아세테이트는 거의 생산하지 않았다. 테트라데칸은 전체 레티노이드 생산량이 다른 알칸에 비하여 낮았다.

[175]

[176] **(2) 미네랄 오일을 포함 배지에서 레티노이드의 생산**

[177] **(2.1) 경량 미네랄 오일**

[178] 경량 미네랄 오일은 알칸에 비하여 가격이 싸다는 장점이 있다. 2% (w/v)

글리세롤 및 0.2% (w/v) 아라비노오스를 함유한 2YT 배지(리터 당 16g 트립톤, 10g 이스트 추출물, 및 5g NaCl) 5ml와 다른 부피의 경량 미네랄 오일(Sigma, Catalog No.M8410)의 혼합 배지 중에서 72 시간 동안 배양하였다.

[179] 배양은 길이 15 cm, 지름 25 mm의 시험관에 상기 혼합 배지를 넣고 각 균주를 접종한 후, 진탕 배양기 (shaking incubator)에 약 250 rpm으로 교반하면서 약 29°C에서 배양하였다.

[180] 도 10은 경량 미네랄 오일 존재하에서 레티노이드 생산 결과를 나타낸 도면이다. 도 11은 경량 미네랄 오일 존재하에서 균주의 성장 결과를 나타낸 도면이다.

[181] 도 10에 나타낸 바와 같이, 도테칸 5ml에서 136.1mg/L이 생산될 때, 2ml 경량 미네랄 오일에서 158mg/L이 생산되었다. 도 11에 나타낸 바와 같이, pH는 도테칸 이외의 경우 큰 차이를 보이지 않았다. 반면, 균체 성장은 경량 미네랄 오일의 양이 증가할수록 감소하였다. 이는 경량 미네랄 오일의 높은 점도와 비중으로 인하여 배지와 미네랄 오일이 충분히 혼합되지 않았기 때문인 것으로 예상된다. 균체 성장의 감소로 인해 레티노이드 생산도 감소하였다.

[182] 도 12는 균체당 레티노이드 생산량 (cell specific retinoids productivity)을 나타낸 도면이다. 도 12에 나타낸 바와 같이, 미네랄 오일의 양에 상관없이 약 5mg/L/OD_{600nm}의 비생산성을 보였다.

[183]

[184] **(2.2) 중량 미네랄 오일**

[185] 중량 미네랄 오일은 경량 미네랄 오일에 비하여 싸다. 2% (w/v) 글리세롤 및 0.2% (w/v) 아라비노오스를 함유한 2YT 배지(리터 당 16g 트립톤, 10g 이스트 추출물, 및 5g NaCl) 5ml와 중량 미네랄 오일(Daejung, Catalog No.5658-4400) 2ml의 혼합 배지 중에서 96 시간 동안 배양하였다. 배양은 길이 15 cm, 지름 25 mm의 시험관에 상기 혼합 배지를 넣고 각 균주를 접종한 후, 진탕 배양기 (shaking incubator)에 약 250 rpm으로 교반하면서 약 29°C에서 배양하였다.

[186] 도 13은 중량 미네랄 오일 존재하에서 레티노이드 생산 결과를 나타낸 도면이다. 도 14는 중량 미네랄 오일 존재하에서 균주의 성장 결과를 나타낸 도면이다. 도 13 및 도 14에 나타낸 바와 같이, 경량 미네랄 오일, 및 도테칸에 비하여 중량 미네랄 오일의 경우 세포 성장이 적었다. 또한, 레티노이드 96.5mg/L을 생산하였다. 이는 중량 미네랄 오일의 점도에 의하여 배지와 미네랄 오일이 잘 혼합되지 않았기 때문인 것으로 예측된다.

[187] 사용된 시험관 (test tube)를 기울여서 배양기에 배치시키는 것을 제외하고는 위와 동일하게 세포를 배양하였다. 시험관을 기울임으로써 교반의 효과가 더 증대되어 배지와 미네랄 오일이 더 잘 혼합될 수 있었다.

[188] 도 15는 시험관을 기울여 배양한 경우 레티노이드 생산 결과를 나타낸 도면이다. 도 16은 시험관을 기울여 배양한 경우 균주 성장 결과를 나타낸 도면이다. 도 15 및 도 16에 나타낸 바와 같이, 기울여 배양한 경우 세포 성장 및

레티노이드 생산이 증가하였다. 구체적으로, 시험관을 수직으로 한 경우, 96시간에서 88.2mg/L의 레티노이드가 생산되었으나, 시험관을 기울인 경우, 173.9mg/L이 생산되었다.

- [189] 이는 경량 및 중량 미네랄 오일은 높은 점도로 인하여 배지와 혼합이 레티노이드 생산에 중요한 인자라는 것을 나타낸다. 따라서, 배양 중 적절한 교반을 제공함으로써 레티노이드에 사용될 수 있다.
- [190]
- [191] (3) 피부 친화적 친유성 물질을 포함 배지에서 레티노이드의 생산
- [192] 피부 친화적 친유성 물질을 포함하는 배지에서 레티노이드를 생산하였다. 피부 친화적 친유성 물질은 이소프로필 미리스테이트 (IPM), 디옥타노일-테카노일 글리세롤(ODO), 세틸 에틸헥사노에이트 (CEH) 및 피토스쿠알란을 사용하였다.
- [193] DH5 α 에 pT-DHBSR/pSNA가 형질전환된 균주 DH5 α (pT-DHBSR/pSNA)를 사용하고, 5ml 배지에 2ml의 중량 미네랄 오일을 각각 첨가하고, 2% (w/v) 글리세롤 및 0.2% (w/v) 아라비노오스를 함유한 2YT 배지(리터 당 16g 트립톤, 10g 이스트 추출물, 및 5g NaCl) 5ml와 이소프로필 미리스테이트 (IPM, Sigma, Catalog No.172472), 디옥타노일-테카노일 글리세롤(ODO), 세틸 에틸헥사노에이트 (CEH), 또는 피토스쿠알란((PHYTOSQUALAN®, Sophim; 분자식 C₃₀H₆₂; hydrogenated form of squalane; extracted from Olive) 2mL 또는 5mL의 혼합 배지 중에서 72 시간 동안 배양하였다.
- [194] 배양은 길이 15 cm, 지름 25 mm의 시험관에 상기 혼합 배지를 넣고 각 균주를 접종한 후, 진탕 배양기 (shaking incubator)에 약 250 rpm으로 교반하면서 약 29°C에서 배양하였다.
- [195] 도 17은 피부 친화적 친유성 물질 존재하에서 세포 성장 및 pH를 나타낸 도면이다. 도 18 및 도 19는 피부 친화적 친유성 물질의 양에 따른 레티노이드 생산결과를 나타낸 도면이다.
- [196] 도 18 및 도 19에 나타난 바와 같이, 도데칸을 제외한 친유성 물질에서 5mL에 비하여 2mL에서 레티노이드 생산량이 많았다. 즉, 경량 미네랄 오일, IPM, ODO, CEH, 및 피토스쿠알란의 배지 5mL에 대하여 약 2mL을 사용한 경우, 레티노이드 생산량이 많았다. IPM, ODO, CEH 및 피토스쿠알란 중 IPM에서 가장 많은 레티노이드가 생산되었다. 특히, IPM 2mL를 첨가한 경우, 180mg/L의 레티노이드가 생산되었다. IPM의 경우, 균체 성장이 비슷한 것을 고려하면, 균체당 비생산성이 높은 것으로 예측된다.
- [197]
- [198]
- [199]
- [200]
- [201]
- [202]

[203]
[204]
[205]
[206]

특허 출원을 위한 미생물 기탁의
국제적 승인에 대한 부다페스트 조약

규칙 7.1에 의거 발행된

원기탁의 수탁증

「To. 김 선원
대한민국 경상남도 진주시 가
좌동 900 경상대학교 응용생명과학부 660-701」

I. 미생물의 표시	
기탁자에 의해 주어진 참조 표시: 대장균 DH5a/pTDHB/pSNA	국제 기탁 기관에 의해 주어진 수탁번호: KCTC 11254BP
II. 과학적 설명 및/또는 제안된 분류학적 명명	
상기 I에서 확인된 미생물에 대하여 다음이 수반된다: [x] 과학적 설명 [] 제안된 분류학적 명명 (해당란에 x 표시함).	
III. 수탁 및 수령	
본 국제 기탁 기관은 상기 I 에 확인된 미생물을 2008년 1월 2일 수령하였다.	
IV. 전환신청의 수령	
상기 I에 확인된 미생물은 본 국제기탁기관에 ----에 수탁되었으며, 원기탁을 부다페스트 조약하의 기탁으로 전환신청을 ... 에 수령하였다.	
국제 기탁 기관	
명칭: 유전자 은행(KCTC) 주소: 대한민국 대전시 유성구 어은동 52번 지 305-333. 한국생명공학연구원 (KRIBB) 생물자원센터 (BRC)	국제 기탁 기관의 대표자의 사인 오 회 목 이사 일자: 2008. 1. 7.

양식 BP/4 (KCTC 양식 17)

이 번역문은 원문 내용과 상위 없음을 확인함.

2012 년 7월 30일

두호국제특허법률사무소

변리사 이 준 호



특허 출원을 위한 미생물 기탁의
국제적 승인에 대한 부다페스트 조약
규칙 7.1에 의거 발행된
원기탁의 수탁증

「To. 김 선원
대한민국 경상남도 진주시 가
좌동 900 경상대학교 응용생명과학부 660-701」

I. 미생물의 표시	
기탁자에 의해 주어진 참조 표시: 대장균 DH5α/pTDHBSR/pSNA	국제 기탁 기관에 의해 주어진 수탁번호: KCTC 11255BP
II. 과학적 설명 및/또는 제안된 분류학적 명명	
상기 I에서 확인된 미생물에 대하여 다음이 수반된다: [x] 과학적 설명 [] 제안된 분류학적 명명 (해당란에 x 표시함)	
III. 수탁 및 수령	
본 국제 기탁 기관은 상기 I 에 확인된 미생물을 2008년 1월 2일 수령하였다.	
IV. 전환신청의 수령	
상기 I에 확인된 미생물은 본 국제기탁기관에 ----에 수탁되었으며, 원기탁을 부다페스트 조약하의 기탁으로 전환신청을 에 수령하였다.	
국제 기탁 기관	
명칭: 유전자 은행(KCTC) 주소: 대한민국 대전시 유성구 어은동 52번 지 305-333. 한국생명공학연구원 (KRIBB) 생물자원센터 (BRC)	국제 기탁 기관의 대표자의 사인 오 회 복 이사 일자: 2008. 1. 7.

양식 BP/4 (KCTC 양식 17)

이 번역문은 원문 내용과 상위 없음을 확인함.

2012 년 7월 30일

두호국제특허법률사무소

변리사 이 준 호



청구범위

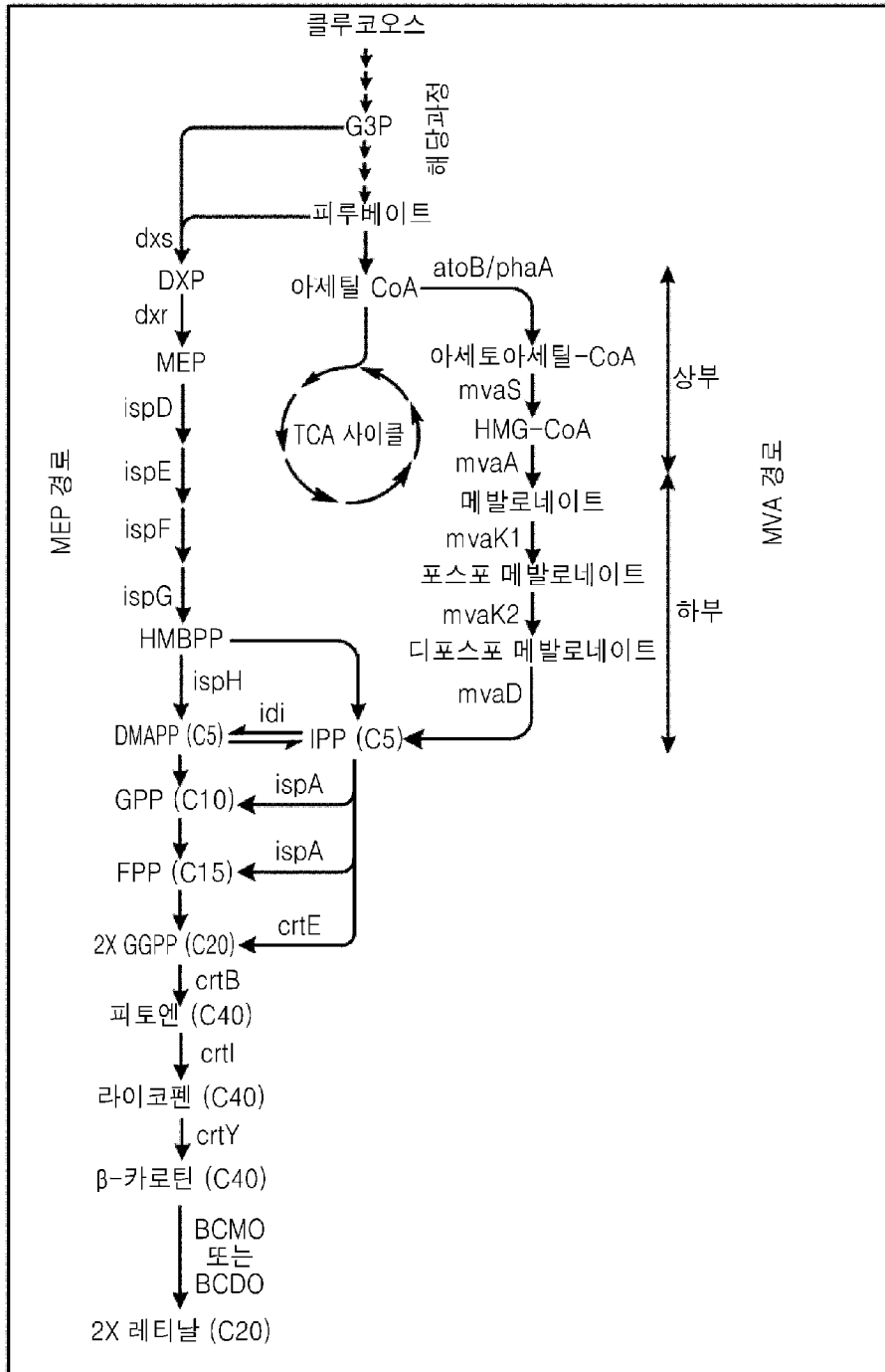
- [청구항 1] 레티노이드 생산능을 갖는 에세리키아(*Escherichia*) 속 모균주의 YbbO 단백질을 코딩하는 유전자가 감쇄 또는 결실, 또는 증폭되거나, 상기 유전자의 뉴클레오티드 서열과 80% 이상의 상동성을 갖는 외래 유전자가 도입되어 증폭된 에세리키아 속 미생물.
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서, 상기 YbbO 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 24의 뉴클레오티드 서열을 갖는 것인, 미생물.
- [청구항 3] 청구항 1에 있어서, 상기 외래 유전자는 서열번호 49 내지 56 중 어느 하나의 뉴클레오티드 서열을 갖는 것인, 미생물.
- [청구항 4] 청구항 1에 있어서, 상기 YbbO 단백질은 서열번호 23의 아미노산 서열을 갖는 것인, 미생물.
- [청구항 5] 청구항 3에 있어서, 상기 외래 유전자는 서열번호 41 내지 48 중 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 단백질을 코딩하는 것인, 미생물.
- [청구항 6] 청구항 1에 있어서, 상기 미생물은 대장균인 미생물.
- [청구항 7] 청구항 6에 있어서, 상기 대장균은 DH5 α , MG1655, BL21(DE), S17-1, XL1-Blue, BW25113 또는 이들의 조합인, 미생물.
- [청구항 8] 청구항 1에 있어서, 상기 YbbO 단백질을 코딩하는 유전자의 감쇄 또는 결실에 의해 상기 모균주에 비해 레티날의 생산능이 향상된, 미생물.
- [청구항 9] 청구항 1에 있어서, 상기 YbbO 단백질을 코딩하는 유전자 또는 상기 유전자의 뉴클레오티드 서열과 80% 이상의 상동성을 갖는 외래 유전자의 증폭에 의해 상기 모균주에 비해 레티놀의 생산능이 향상된, 미생물.
- [청구항 10] 청구항 1에 있어서, 상기 모균주의 에탄올아민 이용 단백질 E (Ethanolamine utilization protein E: EutE)를 코딩하는 유전자; 푸트레신 이용 경로 단백질 C (Putrescine utilization pathway protein C: PucC)를 코딩하는 유전자; 또는 이들의 조합이 추가로 감쇄 또는 결실된, 미생물.
- [청구항 11] 청구항 10에 있어서, 상기 에탄올아민 이용 단백질 E (EutE)는 서열번호 19의 아미노산 서열을 갖는 것인, 미생물.
- [청구항 12] 청구항 10에 있어서, 상기 푸트레신 이용 경로 단백질 C (PucC)는 서열번호 20의 아미노산 서열을 갖는 것인, 미생물.
- [청구항 13] 청구항 10에 있어서, 상기 에탄올아민 이용 단백질 E (EutE)를 코딩하는 유전자는 서열번호 21의 뉴클레오티드 서열을 갖는 것인, 미생물.

- [청구항 14] 청구항 10에 있어서, 상기 푸트레신 이용 경로 단백질 C (PuuC)를 코딩하는 유전자는 서열번호 22의 뉴클레오티드 서열을 갖는 것인, 미생물.
- [청구항 15] 청구항 1에 있어서, 상기 레티노이드는 레티날, 레티놀, 레티닐에스테르 및 레티노산으로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나인, 미생물.
- [청구항 16] 청구항 1에 있어서, 상기 모균주는 서열번호 1의 엔테로코커스 패칼리스 (*Enterococcus faecalis*) 유래의 아세틸-CoA 아세틸트랜스퍼라제/하이드록시메틸글루타릴 (HMG)-CoA 리덕타제를 코딩하는 유전자; 서열번호 2의 엔테로코커스 패칼리스 유래의 HMG-CoA 신타제를 코딩하는 유전자; 서열번호 3의 스트렙토코커스 뉴모니아 (*Streptococcus pneumoniae*) 유래의 메발로네이트 키나제를 코딩하는 유전자; 서열번호 4의 스트렙토코커스 뉴모니아 유래의 포스포메발로네이트 키나제를 코딩하는 유전자; 서열번호 5의 스트렙토코커스 뉴모니아 유래의 메발로네이트 디포스페이트 데카르복실라제를 코딩하는 유전자; 서열번호 6의 대장균 유래의 이소펜테닐 디포스페이트 (IPP) 이소머라제를 코딩하는 유전자; 서열번호 7의 판토에아 아글루메란스 (*Pantoea agglomerans*) 유래의 제라닐제라닐 피로포스페이트 (GGPP) 신타제를 코딩하는 유전자; 서열번호 8의 판토에아 아글루메란스 유래의 피토엔 신타제를 코딩하는 유전자; 서열번호 9의 판토에아 아글루메란스 유래의 피토엔 데히드로게나제를 코딩하는 유전자; 및 서열번호 10의 판토에아 아나나티스 (*Pantoea ananatis*) 유래의 라이코펜- β -시클라제를 코딩하는 유전자로 형질전환된 것인, 미생물.
- [청구항 17] 청구항 16에 있어서, 상기 모균주는 서열번호 13의 배양되지 않은 해양 박테리아 (*uncultured marine bacterium*) 66A03 유래의 β -카로틴 모노옥시게나제를 코딩하는 유전자; 서열번호 14의 생쥐 (*Mus musculus*) 유래의 β -카로틴 15,15'-모노옥시게나제를 코딩하는 유전자; 서열번호 15의 나트로노모나스 파라오니스 (*Natronomonas pharaonis*) ATCC35678 유래의 brp 유사 단백질 2 (brp-like protein 2)를 코딩하는 유전자; 및 서열번호 16 또는 17의 할로박테리움 살리나룸 (*Halobacterium salinarum*) ATCC700922 유래의 β -카로틴 모노옥시게나제를 코딩하는 유전자로 이루어진 군으로 선택되는 하나 이상의 유전자로 더 형질전환된 것인, 미생물.
- [청구항 18] 청구항 16에 있어서, 상기 모균주는 대장균에서 코돈 사용 최적화된 서열번호 18의 염기서열을 갖는 유전자로 더 형질전환된

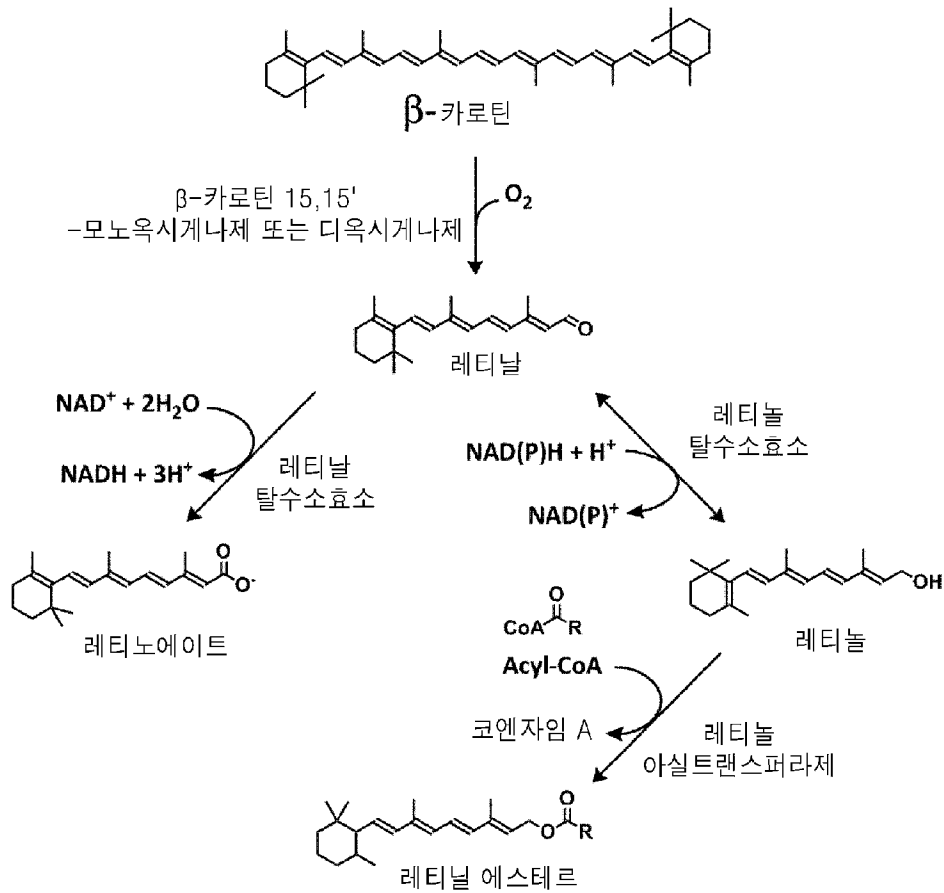
- 것인, 미생물.
- [청구항 19] 청구항 1에 있어서, 상기 모균주는 서열번호 11의 대장균 유래 1-데옥시자일롤로즈-5-포스페이트 (DXP) 신타제를 코딩하는 유전자로 형질전환된 것인, 미생물.
- [청구항 20] 청구항 1에 있어서, 상기 모균주는 서열번호 12의 헤마토코커스 플루비알리스 (Haematococcus pluvialis) 유래의 IPP 이소머라제를 코딩하는 유전자로 형질전환된 것인, 미생물.
- [청구항 21] 청구항 1에 있어서, 상기 모균주는 기탁번호 KCTC 11254BP의 대장균 DH5 α /pTDHB/pSNA 또는 기탁번호 KCTC 11255BP의 대장균 DH5 α /pTDHBSR/pSNA인, 미생물.
- [청구항 22] 청구항 1 내지 21 중 어느 항의 미생물을 배양하는 단계; 및 배양물로부터 레티노이드를 분리하는 단계;를 포함하는, 미생물로부터 레티노이드를 생산하는 방법.
- [청구항 23] 청구항 22에 있어서, 상기 배양은 친유성 물질을 포함하는 배지 중에서 수행되는 것인, 방법.
- [청구항 24] 청구항 22에 있어서, 상기 분리는 친유성 물질 상으로부터 되는 것인, 방법.
- [청구항 25] 청구항 23 또는 24에 있어서, 상기 친유성 물질은 탄소수 8 내지 50의 알칸 화합물; 하기 화학식 1의 화합물; 하기 화학식 2의 화합물; 또는 이들의 조합인, 방법:
- [화학식 1]
- $$R_1(CO)OR_2$$
- (식 중, R₁ 및 R₂는 각각 독립적으로 탄소수 8 내지 50의 알킬을 나타내고, CO는 카르보닐기를 나타냄),
- [화학식 2]
- $$\begin{array}{c} CH_2O(CO)R_3 \\ | \\ CHO(CO)R_4 \\ | \\ CH_2O(CO)R_5 \end{array}$$
- (식 중, R₃, R₄ 및 R₅는 각각 독립적으로 탄소수 8 내지 50의 알킬을 나타내고, CO는 카르보닐기를 나타냄).
- [청구항 26] 청구항 23 또는 24에 있어서, 상기 친유성 물질은 옥탄, 데칸, 도데칸, 테트라데칸, 피토스쿠알란, 미네랄 오일, 이소프로필 미리스테이트, 세틸 에틸헥사노에이트, 디옥타노일 데카노일 글리세롤, 스쿠알란, 또는 이들의 조합인, 방법.
- [청구항 27] 청구항 22에 있어서, 상기 레티노이드는 레티날, 레티놀, 레티닐에스테르 및 레티노산으로 이루어진 군에서 선택되는

- 적어도 하나인, 방법.
- [청구항 28] 청구항 22에 있어서, 상기 레티노이드는 화장품, 식품 또는 의약품의 소재인, 방법.
- [청구항 29] YbbO 단백질; 또는 상기 YbbO 단백질을 코딩하는 유전자의 아미노산 서열과 80% 이상의 상동성을 갖는 유전자가 코딩하는 단백질을 포함하는 효소 조성물을 첨가함으로써 레티날로부터 레티놀로의 전환을 촉진시키는 방법.
- [청구항 30] 청구항 29에 있어서, 상기 YbbO 단백질은 서열번호 23의 아미노산 서열을 갖는 것인, 방법.
- [청구항 31] 청구항 29에 있어서, 상기 YbbO 단백질을 코딩하는 유전자의 아미노산 서열과 80% 이상의 상동성을 갖는 유전자가 코딩하는 단백질은 서열번호 41 내지 48 중 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 것인, 방법.
- [청구항 32] 청구항 29에 있어서, 상기 YbbO 단백질은 서열번호 24의 뉴클레오티드 서열을 갖는 유전자로 코딩되는 것인, 방법.
- [청구항 33] 청구항 29에 있어서, 상기 YbbO 단백질을 코딩하는 유전자의 아미노산 서열과 80% 이상의 상동성을 갖는 유전자가 코딩하는 단백질은 서열번호 49 내지 56 중 어느 하나의 뉴클레오티드 서열을 갖는 유전자로 코딩되는 것인, 방법.

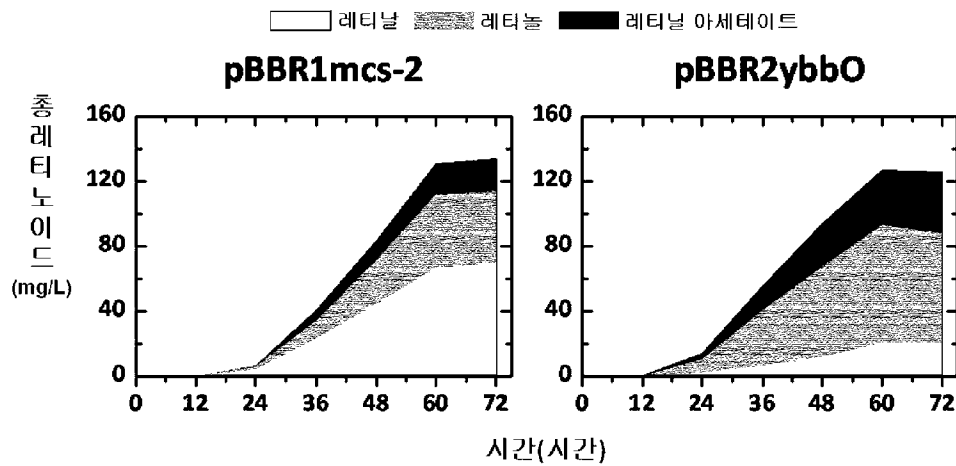
[Fig. 1]



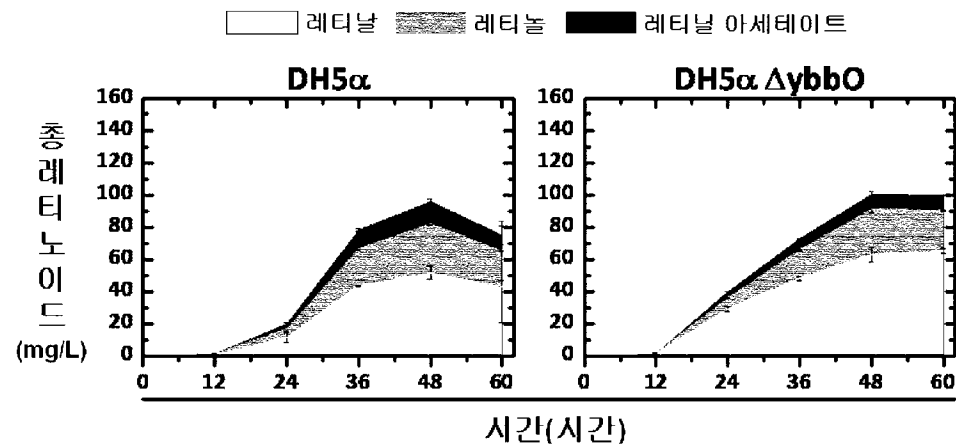
[Fig. 2]



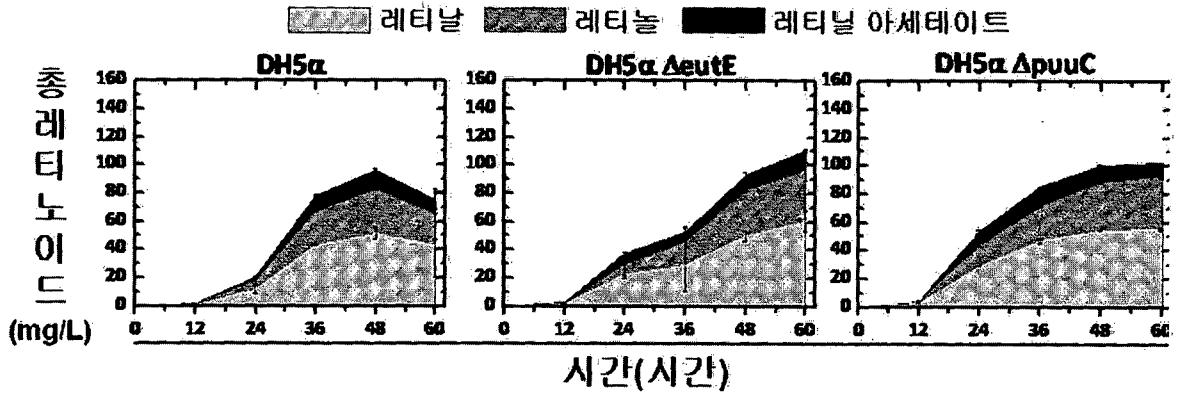
[Fig. 3]



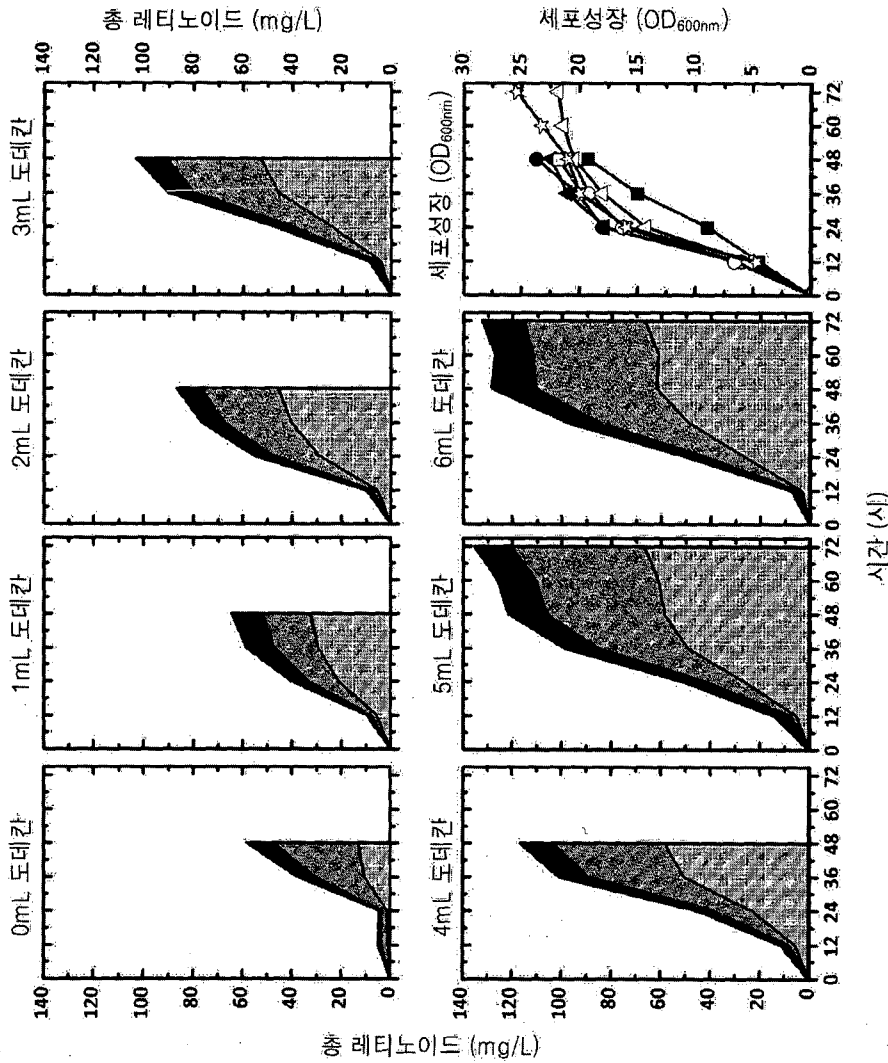
[Fig. 4]



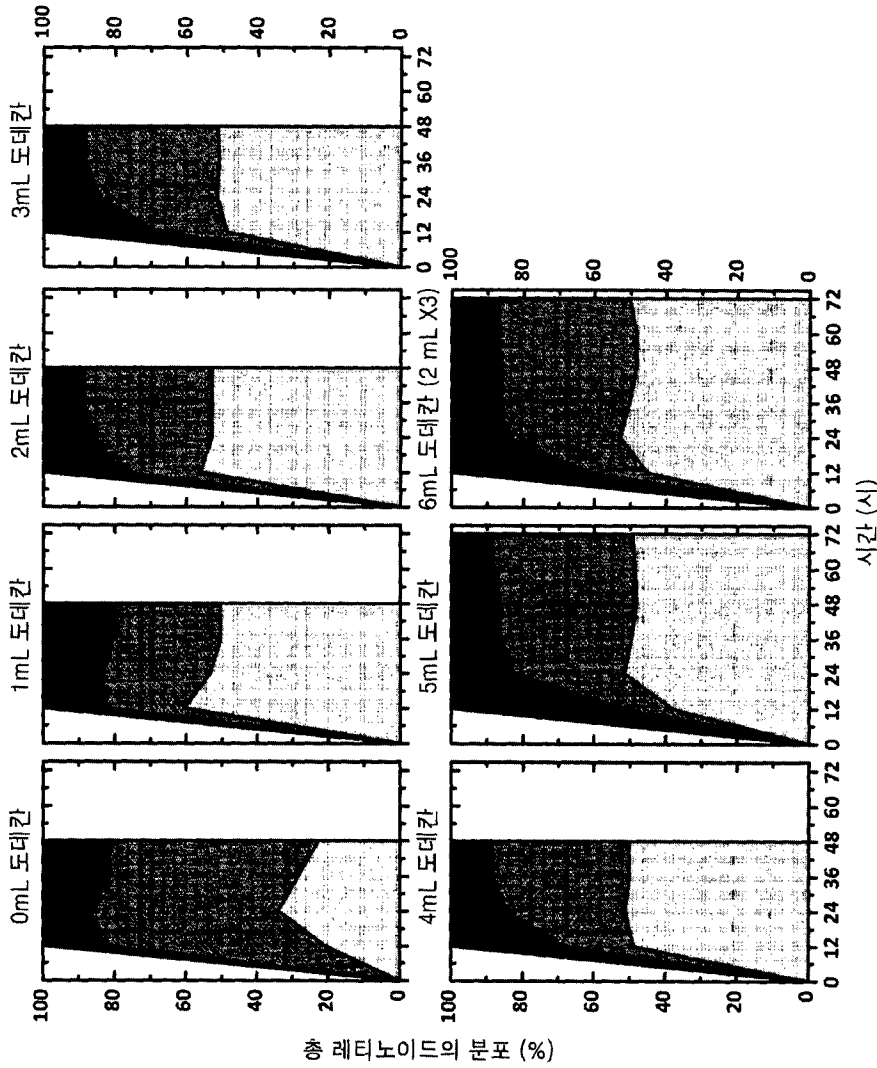
[Fig. 5]



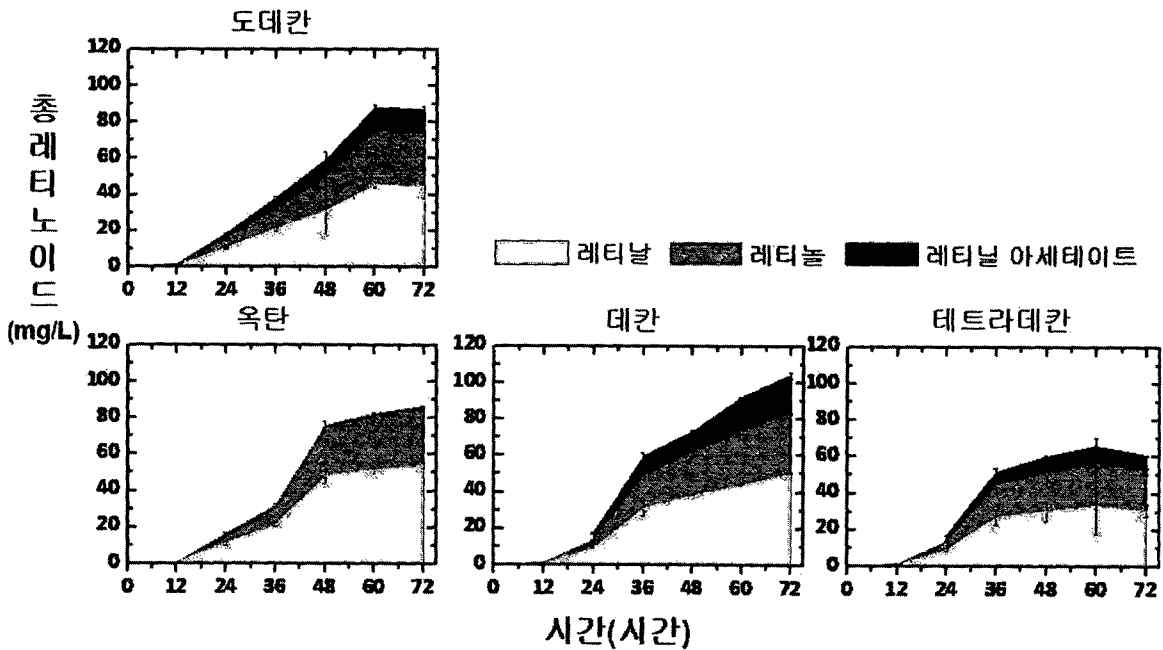
[Fig. 6]



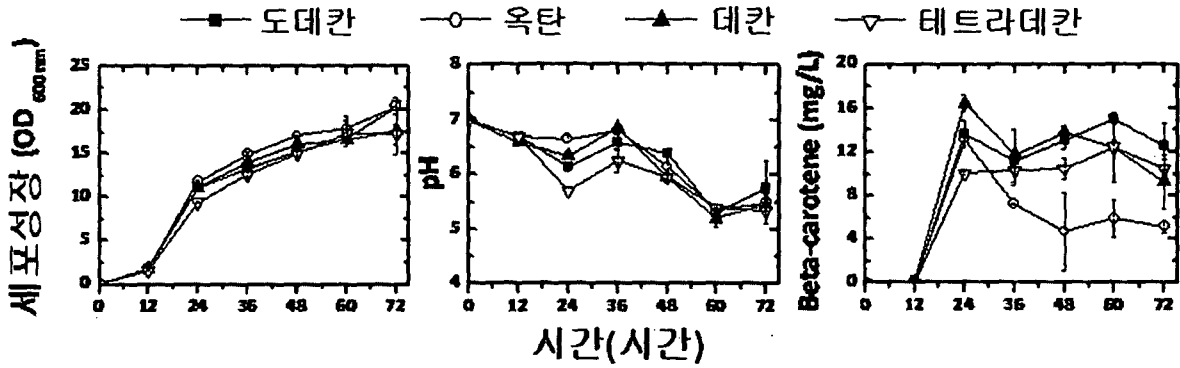
[Fig. 7]



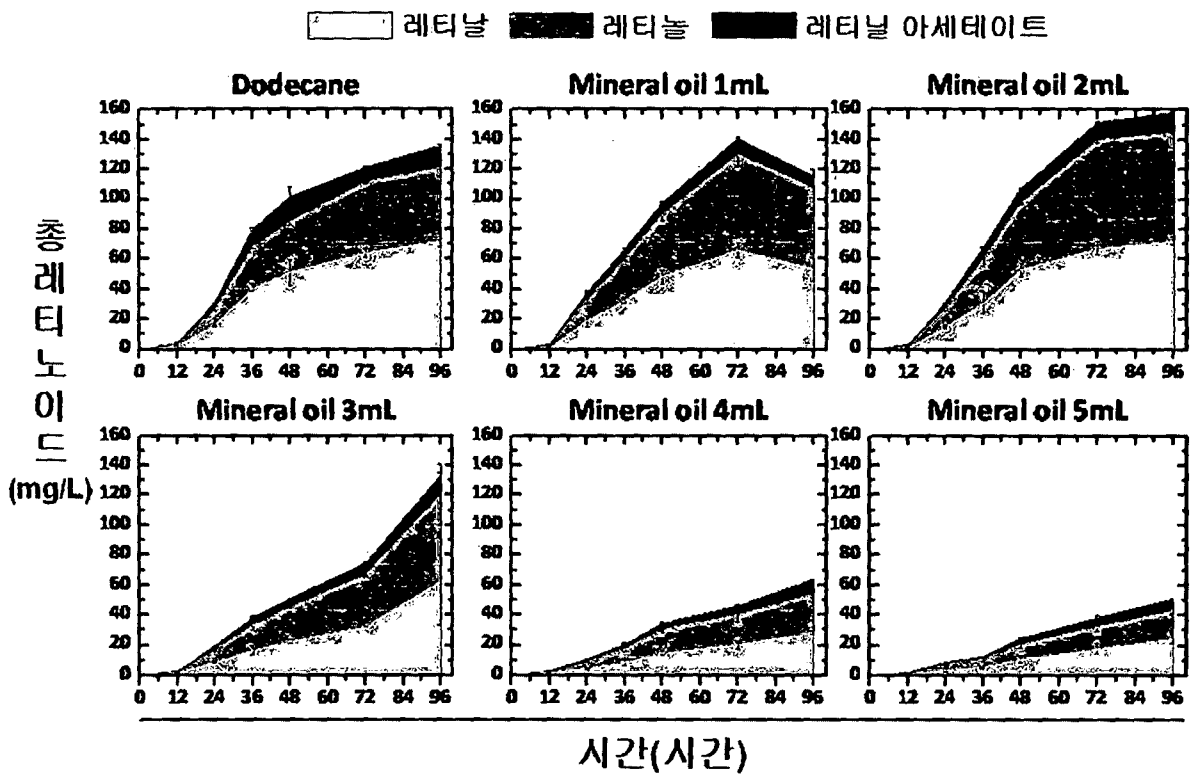
[Fig. 8]



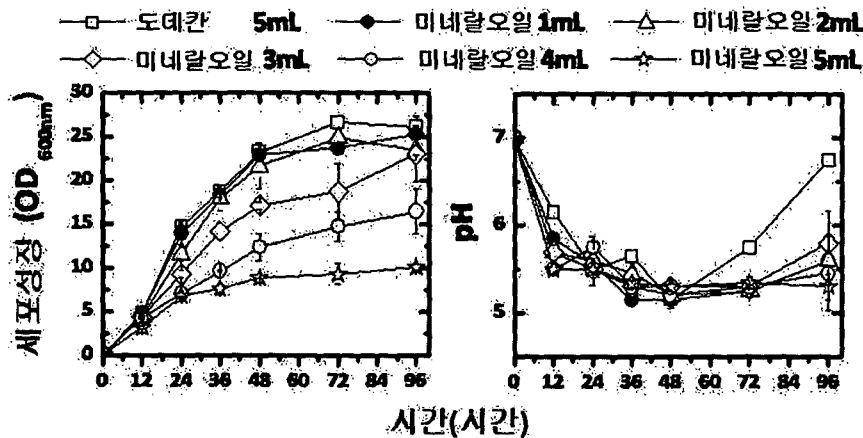
[Fig. 9]



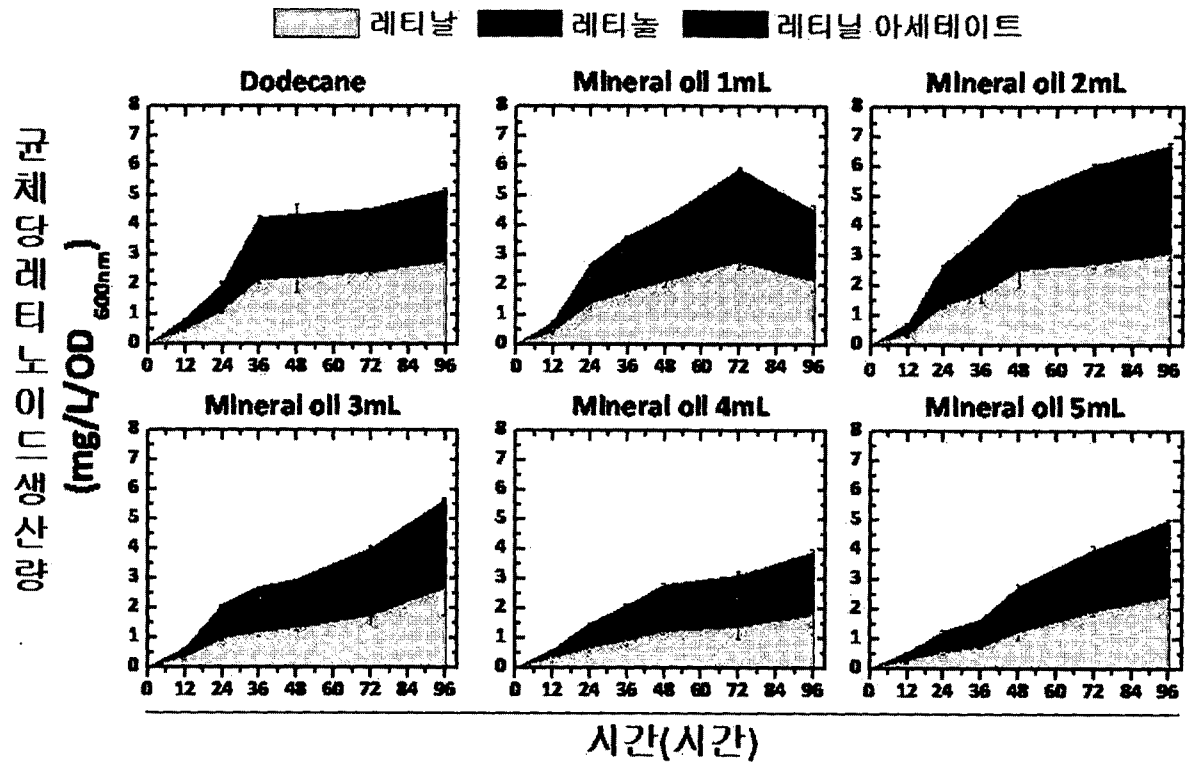
[Fig. 10]



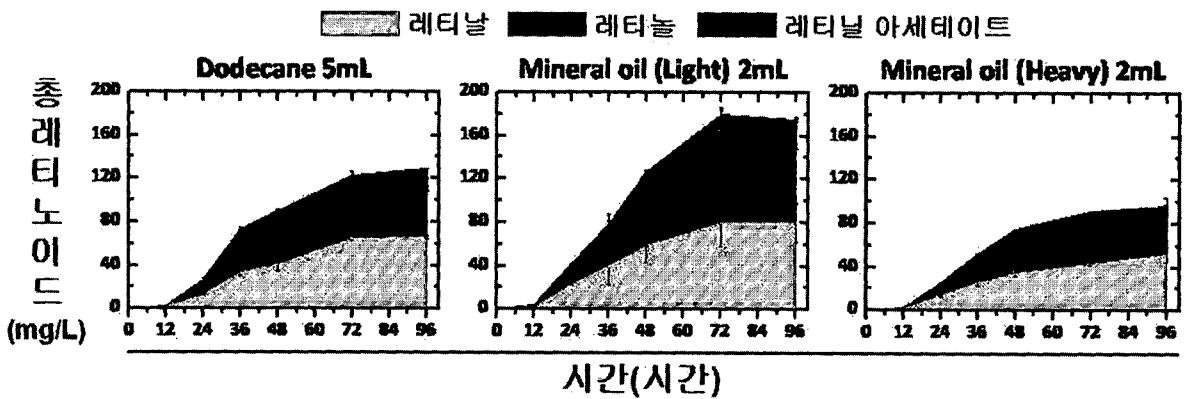
[Fig. 11]



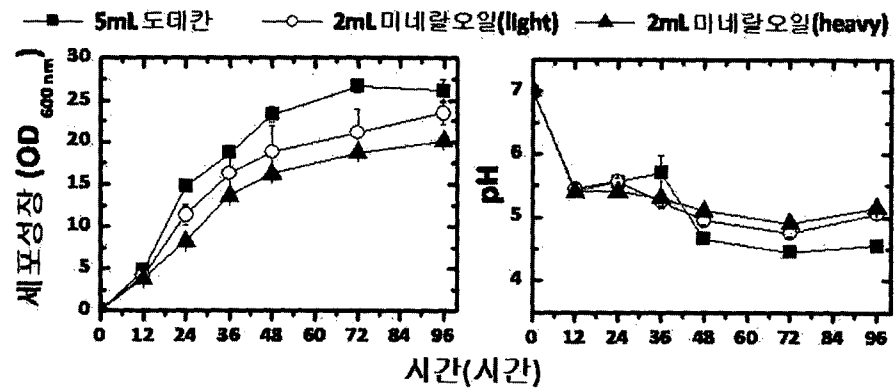
[Fig. 12]



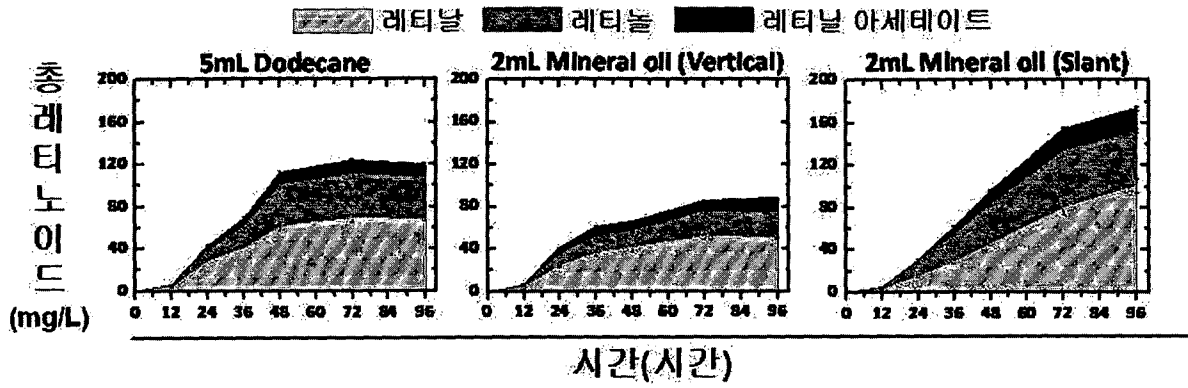
[Fig. 13]



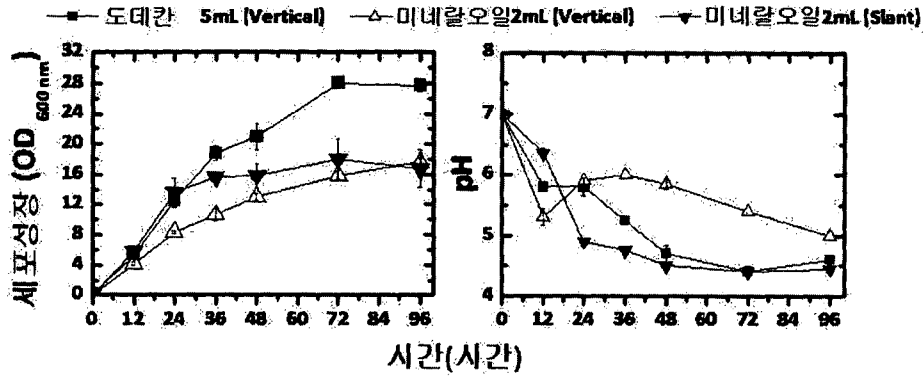
[Fig. 14]



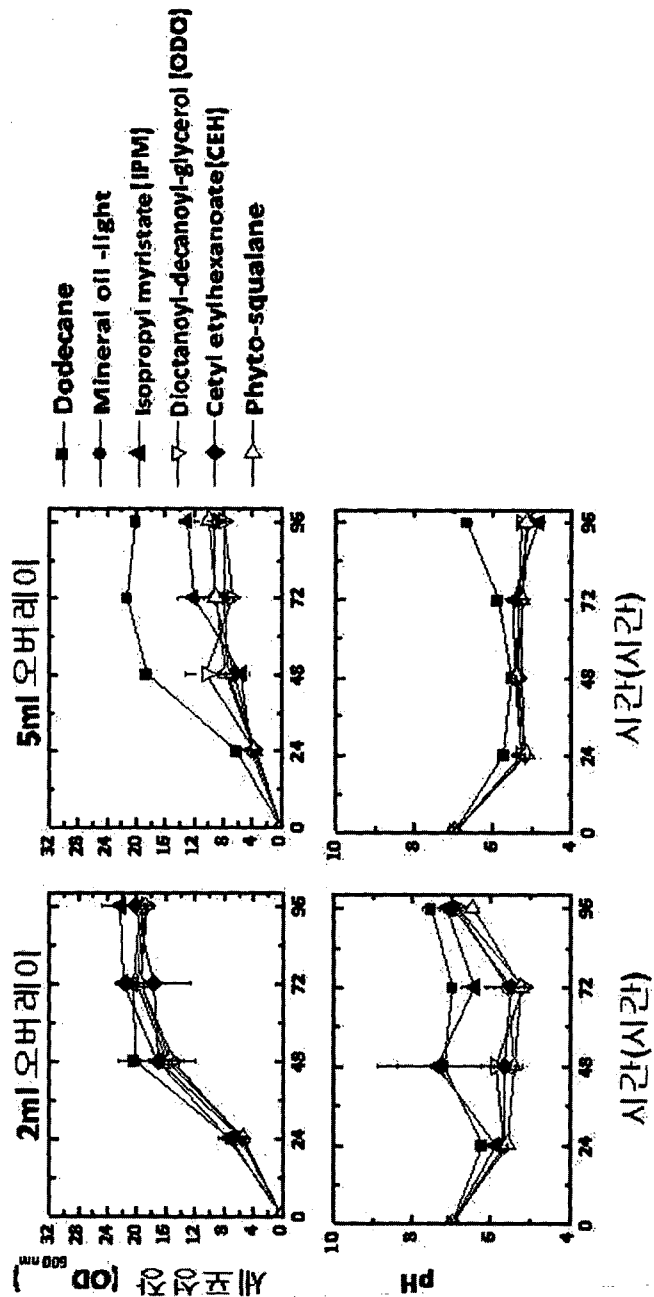
[Fig. 15]



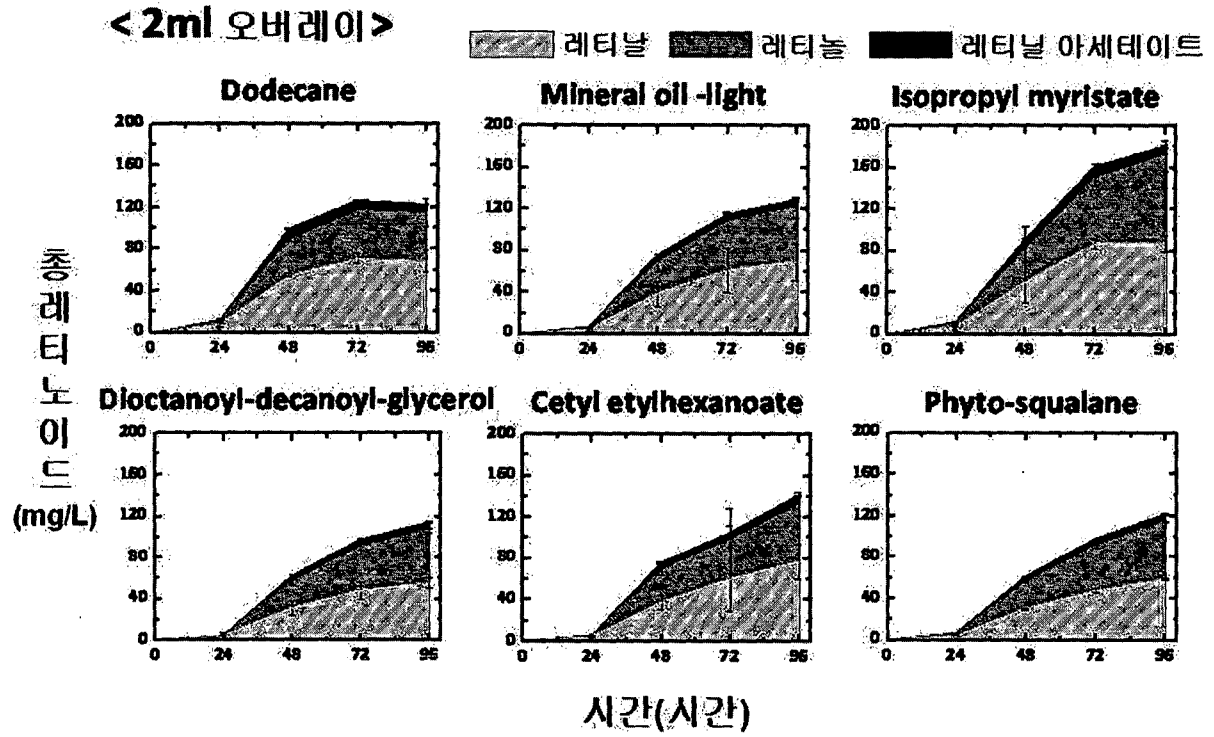
[Fig. 16]



[Fig. 17]



[Fig. 18]



[Fig. 19]

