



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0082079
(43) 공개일자 2018년07월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/63 (2006.01) C12N 9/02 (2006.01)
C12N 9/04 (2006.01) C12N 9/88 (2006.01)
C12P 7/18 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/63 (2013.01)
C12N 9/0006 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0003301
(22) 출원일자 2017년01월10일
심사청구일자 2018년02월21일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
이은열
서울특별시 강남구 광평로34길 55 수서동 강남테시앙포레아파트 104동 802호
황인엽
경기도 용인시 기흥구 서현동 덕영대로 1732, 경희대학교 국제캠퍼스 공과대학 공학실험동 103호 나노바이오공학 연구실
오소현
경기도 수원시 권선구 금곡로 73번길 71 404동 601호
(74) 대리인
손민

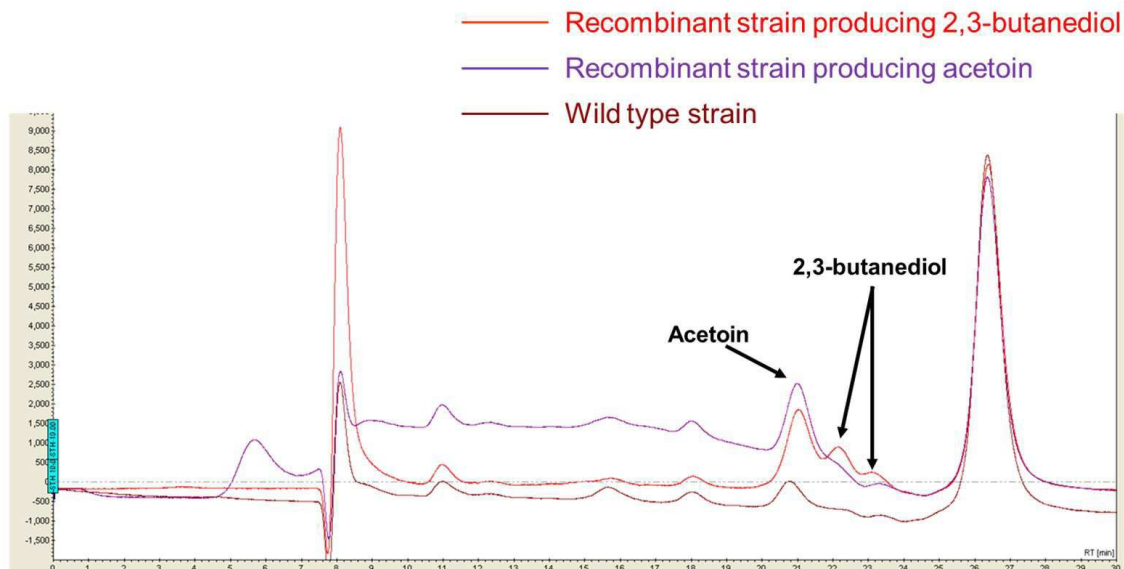
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 형질전환 미생물을 이용한 2,3-부탄디올 생산방법

(57) 요약

본 발명은 메탄올탈수소효소를 코딩하는 유전자, 알데하이드 라이에이즈를 코딩하는 유전자 및 아세트인 환원효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 2,3-부탄디올 생산용 재조합 벡터, 상기 각 유전자가 도입된 2,3-부탄디올 생산용 형질전환 미생물, 상기 재조합 벡터 또는 형질전환 미생물을 포함하는 2,3-부탄디올 생산용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 2,3-부탄디올 생산용 키트 및 상기 형질전환 미생물을 배양하는 단계를 포함하는 2,3-부탄디올 생산방법에 관한 것이다. 본 발명의 형질전환 미생물을 이용하면, 연속된 효소반응에 의하여, 별도의 부산물을 생성하지 않으면서도 에탄올로부터 2,3-부탄디올을 생성할 수 있으므로, 2,3-부탄디올의 경제적인 생산에 널리 활용될 수 있을 것이다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

C12N 9/0071 (2013.01)

C12N 9/88 (2013.01)

C12P 7/18 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20160440

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 C1가스리파이너리사업

연구과제명 메탄-메탄올 전환 플랫폼 균주 개발

기 여 율 1/1

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2016.03.01 ~ 2017.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

메탄올탈수소효소(methanol dehydrogenase, MDH)를 코딩하는 유전자, 알데하이드 라이에이즈(aldehyde lyase)를 코딩하는 유전자 및 아세토인 환원효소(acetoin reductase)를 코딩하는 유전자를 포함하는, 2,3-부탄디올 생산용 재조합 벡터.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 메탄올탈수소효소는 에탄올을 아세트알데히드로 전환시키는 것인, 2,3-부탄디올 생산용 재조합 벡터.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 메탄올탈수소효소는 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드로부터 발현되는 것인, 2,3-부탄디올 생산용 재조합 벡터.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 알데하이드 라이에이즈는 아세트알데히드를 아세토인으로 전환시키는 것인, 2,3-부탄디올 생산용 재조합 벡터.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 알데하이드 라이에이즈는 포몰라제(formolase, FLS)인 것인, 2,3-부탄디올 생산용 재조합 벡터.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 포몰라제는 서열번호 2의 폴리뉴클레오티드로부터 발현되는 것인, 2,3-부탄디올 생산용 재조합 벡터.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 아세토인 환원효소는 아세토인을 2,3-부탄디올로 전환시키는 것인, 2,3-부탄디올 생산용 재조합 벡터.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 아세토인 환원효소는 2,3-부탄디올 탈수소효소(2,3-butanediol dehydrogenase, BDH1)인 것인, 2,3-부탄디올 생산용 재조합 벡터.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 재조합 벡터는 메탄산화효소(methane monooxygenase, MMO)를 코딩하는 유전자를 추가로 포함하는 것인, 2,3-부탄디올 생산용 재조합 벡터.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 메탄산화효소는 대기중의 에탄을 에탄올로 전환시키는 것인, 2,3-부탄디올 생산용 재조합 벡터.

청구항 11

메탄올탈수소효소(methanol dehydrogenase, MDH)를 코딩하는 유전자, 알데하이드 라이에이즈(aldehyde lyase)를 코딩하는 유전자 및 아세토인 환원효소(acetoin reductase)를 코딩하는 유전자가 도입된, 2,3-부탄디올 생산용 형질전환 미생물.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 형질전환 미생물은 메탄산화효소(methane monooxygenase, MMO)를 코딩하는 유전자가 추가로 도입된 것인, 2,3-부탄디올 생산용 형질전환 미생물.

청구항 13

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 재조합 벡터, 제11항 또는 제12항의 형질전환 미생물 또는 상기 형질전환 미생물의 배양산물을 포함하는, 2,3-부탄디올 생산용 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 배양산물은 상기 형질전환 미생물의 배양물, 배양상등액, 과쇄물 및 이들의 분획물로 구성된 군으로부터 선택되는 것인, 2,3-부탄디올 생산용 조성물.

청구항 15

제13항의 2,3-부탄디올 생산용 조성물을 포함하는, 2,3-부탄디올 생산용 키트.

청구항 16

제11항 또는 제12항의 형질전환 미생물을 에탄올을 포함하는 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, 에탄올로부터 2,3-부탄디올을 생산하는 방법.

청구항 17

제16항에 있어서,

상기 배지내 에탄올의 농도는 0.01 내지 6%(v/v)인 것인, 방법.

청구항 18

제16항에 있어서,

상기 배양을 통해 수득한 배양물로부터 2,3-부탄디올을 회수하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 형질전환 미생물을 이용한 2,3-부탄디올 생산방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로 본 발명은 메탄올 탈수소효소를 코딩하는 유전자, 알데하이드 라이에이즈를 코딩하는 유전자 및 아세토인 환원효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 2,3-부탄디올 생산용 재조합 벡터, 상기 각 유전자가 도입된 2,3-부탄디올 생산용 형질전환 미생물, 상기 재조합 벡터 또는 형질전환 미생물을 포함하는 2,3-부탄디올 생산용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 2,3-부탄디올 생산용 키트 및 상기 형질전환 미생물을 배양하는 단계를 포함하는 2,3-부탄디올 생산방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

세계적으로 지구온난화에 대한 관심이 높아지고 있으며 주요 원인은 이산화탄소와 메탄 등의 온실효과로 알려져 있다. 이를 해결하기 위하여 이산화탄소를 사용하는 미생물을 활용하여 이산화탄소로부터 고부가가치 산물을 생산하는 연구가 활발히 수행되고 있으며, 최근 이산화탄소를 전환하기 위하여 컴퓨터로 계산하여 설계한 합성 생촉매를 만들고 이를 활용한 대사 경로를 재구축하는 연구가 수행되었다.

[0003]

메탄의 주요 발생원은 혐기성소화의 산물인 바이오가스와 자연적으로 생성된 천연가스이다. 바이오가스의 주요 성분은 메탄과 이산화탄소이고, 천연가스의 70~90%는 메탄이며 나머지는 에탄과 소량의 프로판으로 구성되어 있다. 최근, 셰일층에서 생산되는 천연가스인 셰일가스의 생산량이 급증하여 메탄 및 에탄의 사용에 대한 관심이 높은 상황이다. 그에 따라 메탄을 활용할 수 있는 능력을 가진 미생물인 메탄자화균에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있으며, 메탄자화균이 보유한 메탄산화효소(methane monooxygenase, MMO)는 넓은 범위의 기질을 사용할 수 있어 메탄 뿐만 아니라 에탄과 같은 보다 긴 알칸(alkane)을 산화시킬 수 있는 능력을 보유하고 있으며, 메탄올 탈수소효소(methanol dehydrogenase, MDH) 역시 보다 넓은 범위의 기질을 사용할 수 있어, 다중 탄소 알콜도 산화시킬 수 있다고 알려져 있다.

[0004]

한편, 2,3-부탄디올은 광범위하게 산업적으로 이용되고 있는데, 프린트 잉크, 화장품, 합성수지를 합성을 위한 용매제 등 다양한 제조 산업에서 이용되고 있다. 또한 생물학적으로 생산된 2,3-부탄디올은 탈수과정을 통해 메틸에틸케톤(용매제)과 1,3-부타디엔(합성고무 생산에 사용) 등 유용한 물질로 변환이 가능하다는 장점이 있다. 이같은 2,3-부탄디올은 에어로박터 에어로제네스(*Aerobacter aerogenes*), 크렙시엘라 유모니아(*Klebsiella pneumonia*), 크렙시엘라 옥시티카(*Klebsiella oxytoca*), 바실러스 폴리믹사(*Bacillus polymyxa*) 등과 같은 미생물로부터 글루코스를 원료로 하여 생산되고 있다. 그러나, 상기 미생물을 이용할 경우에는, 2,3-부탄디올 뿐만 아니라, 부산물로 아세트인, 에탄올, 락테이트, 아세테이트 등이 함께 생산되고 있어, 2,3-부탄디올의 생산수율이 낮다는 단점이 있었다. 이러한 단점을 극복하고자, 다양한 연구가 수행되고 있다. 예를 들어, 한국등록특허 제1562866호에는 재조합 크렙시엘라 옥시토키나 M1 균주를 사용하여, 아세트인과 같은 부산물의 함량을 감소시키고, 2,3-부탄디올의 수율을 증가시키는 방법이 개시되어 있다.

[0005] 이러한 배경하에서, 본 발명자들은 형질전환된 미생물을 이용하여 보다 효과적으로 2,3-부탄디올을 생산하는 방법을 개발하기 위하여, 예의 연구노력한 결과, 메탄올탈수소효소, 알데하이드 라이에이즈 및 아세토인 환원효소를 함께 발현시키도록 형질전환된 형질전환 미생물을 사용할 경우, 에탄올로부터 2,3-부탄디올을 생산할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 하나의 목적은 메탄올탈수소효소를 코딩하는 유전자, 알데하이드 라이에이즈를 코딩하는 유전자 및 아세토인 환원효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 2,3-부탄디올 생산용 재조합 벡터를 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 상기 각 유전자가 도입된 2,3-부탄디올 생산용 형질전환 미생물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 재조합 벡터 또는 형질전환 미생물을 포함하는 2,3-부탄디올 생산용 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 포함하는 2,3-부탄디올 생산용 키트를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 형질전환 미생물을 배양하는 단계를 포함하는 2,3-부탄디올 생산방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명자들은 형질전환된 미생물을 이용하여 보다 효과적으로 2,3-부탄디올을 생산하는 방법을 개발하기 위하여 다양한 연구를 수행한 결과, 에탄올을 아세트알데히드로 전환시키고, 전환된 아세트알데히드를 아세토인으로 전환시킨 다음, 전환된 아세토인으로 2,3-부탄디올을 생산하는 공정을 형질전환 미생물을 통해 구현시키는 방법을 개발하였다. 즉, 미생물에서 발현되는 메탄올탈수소효소는 메탄올을 포름알데히드로 전환시키는 활성 이외에도 에탄올을 아세트알데히드로 전환시킬 수 있고, 알데하이드 라이에이즈는 포름알데히드 또는 아세트알데히드와 같은 알데히드류 화합물을 연결시켜서 DHA, 아세토인 등의 화합물을 생성할 수 있으며, 아세토인 환원효소는 상기 아세토인을 2,3-부탄디올로 전환시킬 수 있음을 확인하고, 상기 3종의 효소를 모두 발현시킬 수 있는 형질전환 미생물을 이용할 경우, 에탄올로부터 2,3-부탄디올을 생산할 수 있음을 확인하였다. 특히, 상기 효소의 연쇄반응을 수행할 경우에는, 아세트알데히드 또는 아세토인과 같은 주반응산물이 생성될 뿐, 부가적인 부산물이 생성되지 않으므로, 최종산물의 생성수율이 높은 수준을 나타낸다는 장점이 있다. 아울러, 통상적인 메탄산화균에서 발현되는 메탄산화수소를 추가로 발현시킬 경우, 대기중의 에탄올 에탄올로 전환시킴으로써, 대기중의 에탄올로부터 2,3-부탄디올을 생산할 수 있어, 2,3-부탄디올의 생산성을 현저히 향상시킬 수 있음을 확인하였다.

[0012] 이처럼, 메탄올탈수소효소, 알데하이드 라이에이즈 및 아세토인 환원효소를 함께 발현시킬 수 있는 형질전환 미생물을 통해 에탄올로부터 2,3-부탄디올을 생산하는 방법은 지금까지 전혀 알려져 있지 않고, 본 발명자에 의하여 최초로 개발되었다.

[0013] 상술한 목적을 달성하기 위한 일 실시양태로서, 본 발명은 메탄올탈수소효소를 코딩하는 유전자, 알데하이드 라이에이즈를 코딩하는 유전자 및 아세토인 환원효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 2,3-부탄디올 생산용 재조합 벡터를 제공한다.

[0014] 본 발명의 용어 "메탄올탈수소효소(methanol dehydrogenase, MDH)"란, 메탄올을 포름알데히드로 전환시키는 반응을 촉매하는 효소를 의미하는데, 이러한 효소반응을 수행하기 위한 에너지로서 NAD^+ 를 이용하는 것으로 알려져 있다. 상기 메탄올탈수소효소의 종류로는 당업계에 알려진 모든 종류의 효소를 사용할 수 있는데, 일 예로서, 3-히드록시아실-CoA 탈수소효소(3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase), 3-히드록시부틸릴-CoA 탈수소효소(3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase), 알코올 탈수소효소(Alcohol dehydrogenase), 알도-케토 환원효소(Aldo-keto reductase) 등이 될 수 있다. 예시적으로, 본 발명에서는 대장균에서 발현하기 위해 최적화된 서열번호 1의 메탄올탈수소효소 유전자를 이용하여 형질전환 미생물을 제작하였다.

[0015] 본 발명의 용어 "알데하이드 라이에이즈(aldehyde lyase)"란, 화합물에서 알데히드 그룹을 제거하는 활성을 나타내는 효소를 의미한다. 예를 들어, 포름알데히드 3분자를 반응시켜서 DHA를 생성하거나 또는 아세트알데히드 2분자를 반응시켜서 아세토인을 생성할 수 있다. 상기 알데하이드 라이에이즈의 종류로는 당업계에 알려진 모든 종류의 효소를 사용할 수 있는데, 일 예로서, 포몰라제(formolase, FLS), 알돌라제(aldolase), 벤즈알데하이드

라이에이즈(benzaldehyde lyase), 프로피오인 합성효소(propionin synthase) 등이 될 수 있다. 예시적으로, 본 발명에서는 대장균에서 발현하기 위해 최적화된 서열번호 2의 포몰라제 유전자를 이용하여 형질전환 미생물을 제작하였다.

[0016] 본 발명의 용어 "아세트인 환원효소(acetoin reductase)"란, 아세트인은 2,3-부탄디올로 전환시키는 반응을 촉매하는 효소를 의미한다. 상기 아세트인 환원효소로는 일 예로서, 알코올 탈수소효소(alcohol dehydrogenase) 등이 될 수 있고, 다른 예로서, 2,3-부탄디올 탈수소효소(2,3-butanediol dehydrogenase) 등이 될 수 있다. 예시적으로, 본 발명에서는 상기 2,3-부탄디올 탈수소효소를 코딩하는 budABC 유전자를 이용하여 형질전환 미생물을 제작하였다.

[0017] 아울러, 상기 각 효소는 본 발명에서 사용되는 각각의 활성을 나타내는 한, 각 효소를 구성하는 아미노산 서열의 하나 이상의 위치에서의 1개 또는 다수개(단백질의 아미노산 잔기의 입체 구조에 있어서의 위치나 종류에 따라서 상이하지만, 구체적으로는 2 내지 20개, 바람직하게는 2 내지 10개, 보다 바람직하게는 2 내지 5개)의 아미노산이 치환, 결실, 삽입, 첨가 또는 역위된 아미노산 서열을 포함할 수 있는데, 상기 각 효소의 활성을 유지 또는 강화시킬 수 있는 한, 상기 각 효소의 아미노산 서열에 대하여, 80% 이상, 구체적으로는 90% 이상, 보다 구체적으로는 95% 이상, 보다 더욱 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 가지는 단백질로서, 실질적으로 각 효소와 동일하거나 상응하는 생물학적 활성을 가지는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가되는 아미노산 서열을 갖는 경우도 본 발명의 범주에 포함하며, 이는 당업자에게 자명하다.

[0018] 본 발명의 용어 "상동성"이란, 두 개의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩타이드 모이티 사이의 동일성의 퍼센트를 말한다. 하나의 모이티로부터 다른 하나의 모이티까지의 서열 간 상동성은 알려진 당해 기술에 의해 결정될 수 있다. 예를 들면, 상동성을 서열정보를 정렬하고 용이하게 입수 가능한 컴퓨터 프로그램을 이용하여 두 개의 폴리뉴클레오티드 분자 또는 두 개의 폴리펩타이드 분자 간의 서열 정보를 직접 정렬하여 결정될 수 있다. 상기 컴퓨터 프로그램은 BLAST(NCBI), CLC Main Workbench(CLC bio), MegAlign™(DNASTAR Inc) 등일 수 있다. 또한, 폴리뉴클레오티드 간 상동성은 상동 영역 간의 안정된 이중가닥을 이루는 조건 하에서 폴리뉴클레오티드의 혼성화한 후, 단일-가닥-특이적 뉴클레아제로 분해시켜 분해된 단편의 크기를 결정함으로써 결정할 수 있다.

[0019] 다른 실시양태로서, 본 발명은 메탄올탈수소효소를 코딩하는 유전자, 알데하이드 라이에이즈를 코딩하는 유전자 및 아세트인 환원효소를 코딩하는 유전자가 도입된 2,3-부탄디올 생산용 형질전환 미생물을 제공한다.

[0020] 상기 메탄올탈수소효소, 알데하이드 라이에이즈 및 아세트인 환원효소에 대하여는 상술한 바와 동일하다.

[0021] 본 발명의 용어 "형질전환 미생물"이란, 형질전환체라고도 호칭되며, 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 벡터를 이용하여 숙주의 내부로 도입된 후, 상기 목적 단백질을 발현시키도록 변이된 세포 또는 미생물을 의미한다. 이때, 상기 숙주세포에 도입되는 폴리뉴클레오티드는 숙주세포 내로 도입되어 발현될 수 있는 한, 어떠한 형태라도 무방하다.

[0022] 본 발명에서 제공하는 상기 형질전환 미생물은 상기 각 효소를 코딩하는 각각의 폴리뉴클레오티드 서열이 도입된 발현벡터를 숙주세포에 도입하여 제작할 수 있다. 이때, 사용될 수 있는 숙주세포로는 본 발명의 각 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열이 도입되어 각 효소를 발현시킬 수 있는 숙주세포라면 특별히 제한되지는 않으나, 바람직하게는 생물전환공정에 적용하기에 적합한 배양가능한 단세포성 원핵생물 또는 진핵생물의 세포를 사용할 수 있고, 보다 바람직하게는 대장균, 효모 등을 사용할 수 있으며, 가장 바람직하게는 대장균 BL21(DE3) 세포를 사용할 수 있다.

[0023] 본 발명의 형질전환 미생물은 그로부터 발현되는 효소의 연속반응에 의해 배지에 포함된 에탄올로부터 2,3-부탄디올을 생산할 수 있다. 즉, 메탄올탈수소효소는 배지내의 에탄올을 아세트알데히드로 전환시키고, 상기 아세트알데히드는 알데하이드 라이에이즈에 의해 아세트인으로 전환되며, 상기 아세트인은 아세트인 환원효소에 의해 2,3-부탄디올로 전환된다. 이처럼, 상기 효소의 연쇄반응을 수행할 경우에는, 아세트알데히드 또는 아세트인과 같은 주반응산물이 생성될 뿐, 부가적인 부산물이 생성되지 않으므로, 최종산물의 생성수율이 높은 수준을 나타낸다는 장점이 있다.

[0024] 한편, 이같은 방법에 의해 생산된 2,3-부탄디올의 생산성을 향상시키기 위하여, 본 발명의 형질전환 미생물은 메탄산화효소를 코딩하는 유전자가 추가로 도입된 것이 될 수 있다.

[0025] 본 발명의 용어 "메탄산화효소(methane monooxygenase, MMO)"란, 메탄을 산화하여 메탄올을 생성하는 산화반응을 촉매할 수 있는 효소를 의미한다. 상기 메탄산화효소는 메탄으로부터 메탄올을 생산하는 반응을 촉매하는 활성을 나타내는 한, 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서 슈도모나스 속(*Pseudomonas* sp.), 로도코커스 속

(*Rhodococcus* sp.). 브레비박테리움 속(*Brevibacterium* sp.), 코마노나스 속(*Comamonas* sp.), 아시네토박터 속(*Acinetobacter* sp.), 아르트로박터 속(*Arthrobacter* sp.), 브라키모나스 속(*Brachymonas* sp.), 또는 메틸로시너스 속(*Methylosinus* sp.) 등의 미생물로 부터 유래된 메탄산화효소가 될 수 있다.

- [0026] 본 발명에 있어서, 상기 메탄산화효소는 대기중의 에탄올 흡수하여 에탄올로 전환시킬 수 있으므로, 에탄올보다도 저렴한 에탄올을 원료로 사용함으로써, 2,3-부탄디올의 생산성을 향상시키는데 사용될 수 있다.
- [0027] 또 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 재조합 벡터, 형질전환된 미생물 또는 상기 미생물의 배양산물을 포함하는 2,3-부탄디올 생산용 조성물을 제공한다.
- [0028] 상술한 바와 같이, 상기 3종의 효소를 코딩하는 유전자가 도입된 형질전환 미생물에서는 상기 3종의 효소의 연쇄반응에 의하여 에탄올로부터 2,3-부탄디올을 생산할 수 있으므로, 상기 형질전환 미생물 또는 이의 배양물을 이용하면 에탄올로부터 2,3-부탄디올을 높은 수율로 생산할 수 있다.
- [0029] 뿐만 아니라, 상기 3종의 효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터 역시 2,3-부탄디올 생산용 조성물의 유효성분으로 사용될 수 있다.
- [0030] 본 발명에 있어서, 상기 형질전환 미생물의 배양산물은 2,3-부탄디올을 높은 수율로 생산하는데 사용될 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서, 상기 형질전환 미생물의 배양물, 배양상등액, 과채물, 이들의 분획물 등이 될 수 있고, 다른 예로서, 형질전환 미생물의 배양물을 원심분리하여 수득한 배양상등액, 형질전환 미생물을 물리적으로 또는 초음파처리하여 수득한 과채물, 상기 배양물, 배양상등액, 과채물 등을 원심분리, 크로마토그래피 등의 방법에 적용하여 수득한 분획물 등이 될 수 있다.
- [0031] 또 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 2,3-부탄디올 생산용 조성물을 포함하는 2,3-부탄디올 생산용 키트를 제공한다.
- [0032] 본 발명의 2,3-부탄디올 생산용 키트는 상기 2,3-부탄디올 생산용 조성물을 포함하여 2,3-부탄디올을 생산하는데 사용될 수 있는데, 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 반응에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치가 포함될 수 있고, 구체적인 예로 상기 2,3-부탄디올 생산에 사용되는 완충액, 상기 2,3-부탄디올 생산을 수행하기 위한 반응용기, 상기 2,3-부탄디올 생산을 수행하기 위한 진탕배양기, 상기 2,3-부탄디올 생산 반응을 수행하기 위한 타이머 등을 포함할 수 있다.
- [0033] 또 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 형질전환 미생물을 에탄올을 포함하는 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, 에탄올로부터 2,3-부탄디올을 생산하는 방법을 제공한다.
- [0034] 이때, 상기 형질전환 미생물에 대하여는 앞서 설명한 바와 동일하다.
- [0035] 또한, 상기 배지에 포함된 에탄올의 농도는 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서 0.01 내지 6%(v/v)가 될 수 있고, 다른 예로서, 0.1 내지 2%(v/v)가 될 수 있으며, 또 다른 예로서, 1.7%(v/v)가 될 수 있다.
- [0036] 또한, 상기 배양을 통해 수득한 배양물로부터 2,3-부탄디올을 회수하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0037] 본 발명의 용어 "배양"이란, 미생물을 적당히 인공적으로 조절한 환경조건에서 생육시키는 방법을 의미한다.
- [0038] 본 발명에 있어서, 상기 형질전환 미생물을 배양하는 방법은 당업계에 널리 알려져 있는 방법을 이용하여 수행할 수 있다. 구체적으로 상기 배양은 상기 형질전환 미생물로부터 2,3-부탄디올을 생산할 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 배치 공정 또는 주입 배치 또는 반복 주입 배치 공정(fed batch or repeated fed batch process)에서 연속식으로 배양할 수 있다.
- [0039] 배양에 사용되는 배지는 적당한 탄소원, 질소원, 아미노산, 비타민 등을 함유한 통상의 배지 내에서 호기성 조건 하에서 온도, pH 등을 조절하면서 적절한 방식으로 특정 균주의 요건을 충족해야 한다. 사용될 수 있는 탄소원으로는 글루코즈, 자일로즈, 수크로즈, 락토즈, 프락토즈, 말토즈, 전분, 셀룰로즈와 같은 당 및 탄수화물, 대두유, 해바라기유, 피마자유, 코코넛유 등과 같은 오일 및 지방, 팔미트산, 스테아린산, 리놀레산과 같은 지방산, 글리세롤, 에탄올과 같은 알코올, 아세트산과 같은 유기산 등을 부가적으로 사용할 수 있는데, 이들 물질은 개별적으로 또는 혼합물로서 사용될 수 있다. 사용될 수 있는 질소원으로는 암모니아, 황산암모늄, 염화암모늄, 초산암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄, 및 질산 암모늄과 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 대응되

는 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.

[0040] 또한, 배양 배지에 적절한 전구체들이 사용될 수 있다. 상기된 원료들은 배양과정에서 배양물에 적절한 방식에 의해 회분식, 유가식 또는 연속식으로 첨가될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다. 수산화나트륨, 수산화칼륨, 암모니아와 같은 기초 화합물 또는 인산 또는 황산과 같은 산 화합물을 적절한 방식으로 사용하여 배양물의 pH를 조절할 수 있다.

[0041] 또한, 지방산 폴리글리콜 에스테르와 같은 소포제를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다. 호기 상태를 유지하기 위해 배양물 내로 산소 또는 산소-함유 기체(예, 공기)를 주입한다. 배양물의 온도는 보통 27℃ 내지 37℃, 바람직하게는 30℃ 내지 35℃이다. 배양은 상기 펩타이드의 생성량이 최대로 얻어질 때까지 계속한다. 이러한 목적으로 보통 10 내지 100 시간에서 달성된다.

[0042] 아울러, 반응액으로부터 2,3-부탄디올을 회수하는 단계는 투석, 원심분리, 여과, 용매추출, 크로마토그래피, 결정화 등의 당업계에 공지된 방법에 의해 수행될 수 있다. 예를 들면, 상기 반응액을 원심분리하여 형질전환 미생물을 제거하고 얻어진 상등액을, 용매추출법에 적용하여 목적하는 2,3-부탄디올을 회수하는 방법을 사용할 수 있고, 이외에도 상기 목적하는 2,3-부탄디올의 특성에 맞추어 공지된 실험방법을 조합하여 상기 2,3-부탄디올을 회수할 수 있는 방법이라면 특별히 제한되지 않고 사용될 수 있다.

발명의 효과

[0043] 본 발명의 형질전환 미생물을 이용하면, 연속된 효소반응에 의하여, 별도의 부산물을 생성하지 않으면서도 에탄올로부터 2,3-부탄디올을 생성할 수 있으므로, 2,3-부탄디올의 경제적인 생산에 널리 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0044] 도 1은 형질전환 대장균에서 발현된 포몰라제의 활성을 분석한 결과를 나타내는 그래프로서, (○)는 기질인 아세트알데히드의 수준을 나타내고, (●)는 반응산물인 아세트오인의 수준을 나타낸다.

도 2는 에탄올 및 글루코스를 단독으로 또는 함께 포함하는 배지조건에서 형질전환 대장균 BL21-pMDHFLS2로부터 생산된 아세트오인의 수준을 정량분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 3은 에탄올을 포함하는 배지에서 배양된 MDH 및 FLS를 발현시키는 형질전환 대장균(Recombinant strain producing acetoin)과 MDH, FLS 및 bdh1를 발현시키는 형질전환 대장균(Recombinant strain producing 2,3-butanediol)의 배양산물에 포함된 성분을 HPLC를 통해 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0045] 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.

[0046] 실시예 1: 형질전환 대장균의 제작

[0047] 대장균에 메탄올탈수소효소의 유전자와 알데하이드 라이에이즈의 일종인 포몰라제(formolase, FLS) 유전자를 도입하여, 에탄올로부터 2,3-부탄디올을 생합성할 수 있는 형질전환 대장균을 제작하였다.

[0048] 실시예 1-1: 재조합 벡터의 수득

[0049] 첫 째, 바실러스 균주(Bacillus methanolicus MGA3)에서 유래된 메탄올탈수소효소(NAD^+ -dependent methanol dehydrogenase)를 코딩하는 mdh 유전자를 대장균에서 발현하기 위해 최적화된 서열로 변경하여 합성하고(서열번호 1), 합성된 mdh 유전자를 pACYCDuetTM-1 벡터(Novagen)에 클로닝하여, 재조합 벡터 pMDH를 수득하였다.

[0050] 둘 째, 알데하이드 라이에이즈의 일종인 포몰라제(formolase, FLS) 유전자(서열번호 2)를 합성하고, 합성된 FLS 유전자를 pACYCDuetTM-1 벡터(Novagen)에 클로닝하여, 재조합 벡터 pFLS를 수득하였다.

[0051] 셋 째, 상기 합성된 FLS 유전자를 pET21b(+) 벡터(Novagen)에 클로닝하여, 재조합 벡터 pFLS_2를 수득하였다.

[0052] 넷 째, 상기 합성된 mdh 유전자와 FLS 유전자를 pACYCDuetTM-1 벡터(Novagen)에 클로닝하여, 재조합 벡터

pMDHFLS를 수득하였다.

[0053] 다섯째, 아세트인 환원효소의 일종인 2,3-부탄디올 탈수소효소(2,3-butanediol dehydrogenase, bdh1)를 코딩하는 budABC 유전자를 합성하고, 합성된 budABC 유전자를 pAWP89 벡터(Addgene)에 클로닝하여, 재조합 벡터 pBUD를 수득하였다.

[0054] **실시예 1-2: 형질전환 대장균의 제작**

[0055] 상기 실시예 1-1에서 합성된 4가지 재조합 벡터를 대장균(E. coli BL21(DE3))에 도입하여, 각각의 형질전환 대장균을 제작하였다.

[0056] 구체적으로, 재조합 벡터 pMDH를 대장균에 도입하여, 형질전환 대장균 BL21-pMDH를 제작하였고; 재조합 벡터 pFLS를 대장균에 도입하여, 형질전환 대장균 BL21-pFLS를 제작하였으며; 재조합 벡터 pMDHFLS를 대장균에 도입하여, 형질전환 대장균 BL21-pMDHFLS를 제작하였고; 재조합 벡터 pMDH 및 pFLS_2를 함께 대장균에 도입하여, 형질전환 대장균 BL21-pMDHFLS2를 제작하였으며; 재조합 벡터 pMDH, pFLS_2 및 pBUD를 함께 대장균에 도입하여, 형질전환 대장균 BL21-pMDHFLSBUD를 제작하였다.

[0057] 상기 제작된 각 형질전환 대장균을 10mL의 LB배지에서 하룻밤 동안 전 배양하고, 상기 전 배양한 배양액을 LB배지에 접종하여 OD600기준 0.5 내지 0.6까지 배양한 후 0.1mM의 이소프로필 β-D-1-티오갈락토피라노시드(IPTG)를 첨가하여 유전자의 전사를 유도하였으며, IPTG를 첨가한 후에 37℃에서 4.5시간 또는 15℃에서 24시간동안 단백질을 발현하였다.

[0058] **실시예 2: 형질전환 대장균을 이용한 2,3-부탄디올의 생산**

[0059] **실시예 2-1: 포몰라제의 활성 분석**

[0060] 상기 실시예 1-2에서 제작된 형질전환 대장균 BL21-pFLS에서 포몰라제를 생산한 다음, 원심분리하여 균체를 수득하고, 반응완충액(0.082% Monosodium phosphate monohydrate, 1.32% Potassium phosphate 및 100 mM NaPO₄, pH 8.0)에 현탁시켰다.

[0061] 이어, 상기 현탁액에 PMSF와 리소자임을 가한 후, 초음파 파쇄기에 적용하여, 균체를 파쇄하였으며, 파쇄된 균체를 원심분리하여 포몰라제를 포함하는 상층액을 수득하였다.

[0062] 상기 수득한 상층액에 100 mM NaPO₄(pH 8.0), 2 mM MgSO₄, 134 mM 아세트알데히드 및 0.1 mM TPP를 가하고, 상온에서 24시간 동안 반응시킨 후, 일정 시간마다 생성된 아세트인의 수준을 정량분석하여 상기 포몰라제의 활성을 검증하였다(도 1).

[0063] 도 1은 형질전환 대장균에서 발현된 포몰라제의 활성을 분석한 결과를 나타내는 그래프로서, (○)는 기질인 아세트알데히드의 수준을 나타내고, (●)는 반응산물인 아세트인의 수준을 나타낸다. 도 1에서 보듯이, 본 발명의 형질전환 대장균에서 발현된 포몰라제는 2시간이 경과된 시점부터 일정한 수준의 효소활성을 나타냄을 확인하였다.

[0064] **실시예 2-2: 형질전환 대장균을 이용한 아세트인의 생산**

[0065] 상기 실시예 1-2에서 제작된 형질전환 대장균 중에서 BL21-pMDHFLS2를 배양하고, 도입된 2종의 유전자를 발현시킨 다음, 에탄올 또는 글루코스를 포함하는 LB 배지 또는 M9 배지에서 반응시킨 후, 반응산물로서 생산된 아세트인의 정량분석을 수행하였다(도 2).

[0066] 도 2는 에탄올 및 글루코스를 단독으로 또는 함께 포함하는 배지조건에서 형질전환 대장균 BL21-pMDHFLS2로부터 생산된 아세트인의 수준을 정량분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

[0067] 도 2에서 보듯이, 에탄올이 포함된 LB 배지를 사용할 경우에만, BL21-pMDHFLS2로부터 아세트인을 높은 수율로 생산할 수 있음을 확인하였다.

[0068] **실시예 2-3: 형질전환 대장균을 이용한 2,3-부탄디올의 생산**

[0069] 상기 실시예 1-2에서 제작된 형질전환 대장균 중에서, 형질전환 대장균 BL21-pMDHFLS2 및 상기 형질전환 대장균 BL21-pMDHFLS2에 재조합 벡터 pBUD가 추가된 형질전환 대장균 BL21-pMDHFLSBUD를 1.7%(v/v) 에탄올이 첨가된 LB 배양액에서 배양한 다음, 배양액 내의 반응산물을 HPLC를 통해 분석하였다(도 3). 이때, 대조군으로는 야생형 대장균을 사용하였다.

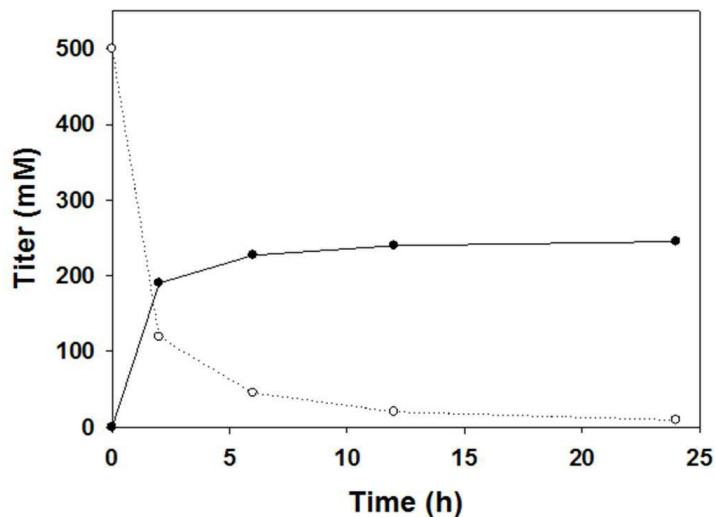
[0070] 도 3은 에탄올을 포함하는 배지에서 배양된 MDH 및 FLS를 발현시키는 형질전환 대장균(Recombinant strain producing acetoin)과 MDH, FLS 및 bdh1를 발현시키는 형질전환 대장균(Recombinant strain producing 2,3-butanediol)의 배양산물에 포함된 성분을 HPLC를 통해 분석한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 3에서 보듯이, MDH 및 FLS를 발현시키는 형질전환 대장균은 에탄올을 이용하여 아세트인만을 생산할 수 있었으나, FLS 및 bdh1를 발현시키는 형질전환 대장균은 에탄올을 이용하여 아세트인 뿐만 아니라, 2,3-부탄디올을 생산할 수 있음을 확인하였다.

[0071] 상기 결과에서 보듯이, 메탄올탈수소효소(methanol dehydrogenase, MDH), 알데하이드 라이에이즈(aldehyde lyase)의 일종인 포몰라제(FLS) 및 아세트인 환원효소(acetoin reductase)의 일종인 2,3-부탄디올 탈수소효소(2,3-butanediol dehydrogenase, bdh1)를 발현시킬 수 있는 형질전환 대장균은 상기 발현된 효소의 연쇄반응을 통해, 에탄올로부터 2,3-부탄디올을 생산할 수 있음을 확인하였다.

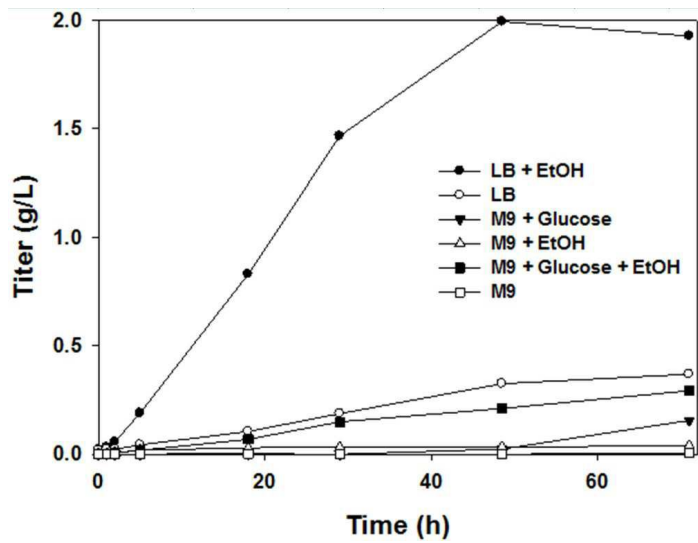
[0072] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

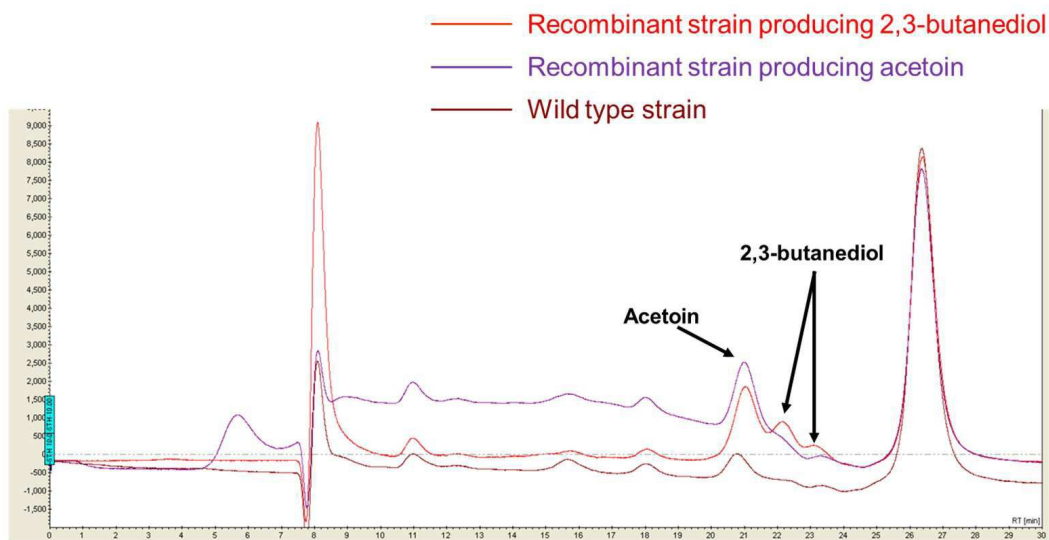
도면1



도면2



도면3



서열 목록

- <110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
- <120> Process for preparing 2,3-butanediol using transformant
- <130> KPA161710-KR
- <160> 2
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 1164
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

<220><223> recombinant methanol dehydrogenase

<400> 1

atggaaatga cgaacactca gtcagccttc tttatgccta gcgtaaattt gttcggcgcg 60
ggtagcgtga atgaggtcgg taccgccttg gcagatttag gtgtgaaaa agcgcctgctg 120
gttaccgatg cgggtctgca cggcttggga ctgtcggaaa aaattagtag cattatccgt 180

gccgcggggg tcgaagtgtc gatttttctt aaagcggagc cgaatcctac agataagaat 240
gtggccgaag gcttgggaag gtacaacgcg gaaaactgcg atagcattgt gactttgggc 300
ggcggtagca gccatgatgc cggcaaagca atcgcttgg tggcagcgaa cggcggcaaa 360
attcacgact atgaaggcgt cgatgtgagt aaagaaccta tgggccact tattgccatt 420
aataccaccg caggtacggg tagcgagctg accaagtcca ctattatcac tgacaccgaa 480
cgtaaagtga agatggcaat cgtggataag catgtgactc cgaccctgag tattaatgac 540
ccagagttag tggtaggtat gccgcctagc ctgaccgcgg cgactgggct tgatgcgttg 600

actcatgca tcgaagcata tgtctcaacc ggtgccaccc cgatcaccga tgcgcttgcg 660
attcaagcga tcaaatcat cagcaaatat ctgccgcg cggtggccaa tggcaaagat 720
attgaagccc gtgaacaaat ggcgtttgca cagagcttag cgggtatggc ctttaataac 780
gcccggattag gctatgtgca tgccatcgca catcaactgg gcggttttta taactttcct 840
catggcgctt gtaatgccgt gctgttacct tacgtttgtc gttttaattt aattagcaaa 900
gtggaacgct acgccgaaat cgcggcgctt ttaggcgaaa atgtggatgg cctgagcacg 960
tatgacgcgg cggaaaaagc gattaaagcc attgaacgca tggcgaaaga cctgaacatt 1020

cctaaaggtt ttaaggagtt aggcgcgaaa gaagaggata tcgaaaccct ggcaaagaat 1080
gcgatgaaag acgcgtgcgc gttgactaac cctcgcaagc cgaagctgga ggaggtcatt 1140
caaatcatta aaaatgcgat gtaa 1164

<210> 2

<211> 1725

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> recombinant formolase

<400> 2

atggctatga ttactggtgg tgaactggtt gttcgtaccc tgattaaagc tggcgtagaa 60
catctgtttg gcctgcatgg cattcatatt gacaccattt ttcaggcttg cctggaccac 120

gacgtcccaa tcattgatac tcgccacgaa gcggcggcag gccacgctgc ggaaggttat 180

gcccgcgcgg gcgctaaact ggggtgtgcc ctggtgaccg ctggcgggtgg ctttaccat	240
gccgttacgc cgatcgcgaa cgctcggacc gatcgactc cggttctgtt cctgaccggt	300
tctggtgctc ttctgatga cgaaaccaac accctgcagg ccggtattga tcaggtggcc	360
atggcggccc cgatcacgaa atgggctcat cgtgttatgg caactgaaca catcccgcgt	420
ctggttatgc aggccattcg tgccgctctg agcgccccac gtggcccggt gctgctggat	480
ctgccatggg acatcctgat gaaccaaac gatgaagatt ccgttatcat cccagacctg	540
gtgctgtctg ctacgggtgc ccatccagac ccggtgacc tggaccaggc tctggcactg	600
ctgcgtaag ccgaacgccc agttatcgta ctgggctccg aggcgtcccg caccgcacgc	660
aagaccgcac tgagcgcatc cgtagcggcg accggtgtac cggttttcgc tgactatgaa	720
ggcctgtcca tgctgagcgg cctgccggac gctatgcgtg gcggcctggt gcagaacctg	780
tactcctttg caaaagctga tgcagctccg gacctggtac tgatgctggg tgctcgtttc	840
ggcttgaaca ccggtcatgg ttccggtcaa ctgatccgc attctgtca ggtgatccag	900
gtggatccag acgcgtgtga actgggtcgc ctgcaaggca tcgcgctggg tatcgtggct	960
gatgtagggtg gcaccattga agcgctggct caggcgaccg cacaggacgc cgcgtggcgg	1020
gaccgcggcg actggtgcgc caagtaact gacctggccc aggagcgta cgcttccatc	1080
gcggctaaat ccagctctga acatgcgtg caccggttc acgcttctca ggttatcgcg	1140
aaacacgtgg acgcaggcgt gaccgtcgtt gcggatggtg gcctgactta tctgtggctg	1200
tccgaagtta tgctcgtgt caaaccaggc ggcttctgt gccacggcta tctgaacagc	1260
atgggtgtag gcttcggtac tgccctgggt gcgcaggttg cggatctgga ggcaggtcgt	1320
cgtaccatcc tggtagccgg cgacggctct gttaggttatt ccattggcga attcgacacc	1380
ctggtacgca aacagctgcc gctgattgta attatcatga acaaccagtc ttggggctgg	1440
accctgact ttcagcagct ggccgttggt cctaaccgtg tcaccggcac ccgcctggaa	1500
aatggttctt atcacggcgt tgctgcggca ttcggtgctg atggttacca cgtcgactct	1560
gtcgagagct tcagcgccg tctggctcag gactggcac acaaccgccc ggcatgcatc	1620
aacgttgctg tggccctgga cccgatcccg ccggaggaa tgatcctgat tggcatggac	1680
ccgtttgcgg gctccacgga gaatctgtat ttccaatccg gcgcg	1725