



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0090132
(43) 공개일자 2012년08월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 1/21 (2006.01) *C12N 15/52* (2006.01)

C12P 7/64 (2006.01) *C12R 1/19* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-0002246

(22) 출원일자 2011년01월10일

심사청구일자 2011년01월10일

(71) 출원인

서강대학교산학협력단

서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)

(72) 발명자

이진원

서울특별시 송파구 양재대로 1218, 올림픽선수
기자촌아파트 201-1601호 (방이동)

이선희

서울특별시 은평구 불광로6길 10-10, 101호 (불
광동)

전은영

서울특별시 중구 퇴계로90길 59-8, C동 402호 (신
당동, 동남빌라)

(74) 대리인

양부현

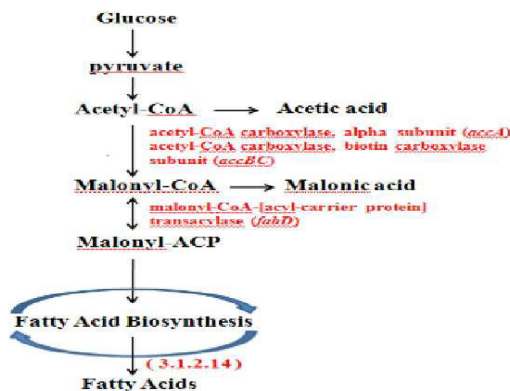
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 지방산 생합성 경로를 이용한 지방산 함량 개선을 위한 이중 대장균 및 제조방법

(57) 요약

본 발명은 지방산 생합성 경로에 관여하는 효소들을 암호화하는 유전자로 형질전환된 지방산 과발현용 대장균 및 그 제조방법에 관한 것이다. 본 발명의 지방산 과발현용 대장균은 유전적 안정성이 높을 뿐만 아니라 기초물질이 두 가지 경로를 통하여 지방산 회로로 유도되게 해주므로 지방산 과발현 효과가 매우 뛰어나다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2008-N-BI08-P-03

부처명 지식경제부

연구사업명 신재생에너지 기술개발사업

연구과제명 당화 바이오매스를 이용한 탄화수소계 바이오에너지 생산 균주 및 공정 최적화 원천기술 개발

주관기관 서강대학교 산학협력단

연구기간 2008.10.01 ~ 2011.07.31

특허청구의 범위

청구항 1

다음의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현벡터로 형질전환된(cotransformed) 지방산 과발현용 대장균: (a) 슈도모나스 에오루지노사의 아세틸-CoA 카복실라제 카복실트랜스퍼라제 서브유닛 알파 (acetyl-CoA carboxylase carboxytransferase subunit alpha)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열, (b) 슈도모나스 에오루지노사의 말로닐-CoA-[아실운반단백질]트랜스아실라제 (malonyl-CoA-[acyl-carrierprotein] transacylase)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열, 및 (c) 스트렙토코커스 피오제네스의 아실-아실 운반단백질 티오에스터라제 (acyl-acyl carrier protein thioesterase)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 최소 1종의 뉴클레오타이드 서열.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 지방산 과발현용 대장균은 (a) 슈도모나스 에오루지노사의 아세틸-CoA 카복실라제 카복실트랜스퍼라제 서브유닛 알파 (acetyl-CoA carboxylase carboxytransferase subunit alpha)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 및 (b) 슈도모나스 에오루지노사의 말로닐-CoA-[아실운반단백질]트랜스아실라제 (malonyl-CoA-[acyl-carrierprotein] transacylase)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현벡터로 공동 형질전환된 것을 특징으로 하는 지방산 과발현용 대장균.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 지방산 과발현용 대장균은 스트렙토코커스 피오제네스의 아실-아실 운반단백질 티오에스터라제(acyl-acyl carrier protein thioesterase)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현벡터로 공동 형질전환된 것을 특징으로 하는 지방산 과발현용 대장균.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 지방산 과발현용 대장균은 (a) 슈도모나스 에오루지노사의 아세틸-CoA 카복실라제 카복실트랜스퍼라제 서브유닛 알파 (acetyl-CoA carboxylase carboxytransferase subunit alpha)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열, (b) 슈도모나스 에오루지노사의 말로닐-CoA-[아실운반단백질]트랜스아실라제 (malonyl-CoA-[acyl-carrierprotein] transacylase)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열, 및 (c) 스트렙토코커스 피오제네스의 아실-아실 운반단백질 티오에스터라제(acyl-acyl carrier protein thioesterase)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현벡터로 공동 형질전환된 것을 특징으로 하는 지방산 과발현용 대장균.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 발현벡터는 도 2의 유전자 지도를 갖는 대장균-슈도모나스 서플벡터 pUCP19이고, 상기 뉴클레오타이드 서열은 pUCP19의 MCS(multiple cloning site)에 삽입되는 것을 특징으로 하는 지방산 과발현용 대장균.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 아세틸-CoA 카복실라제 카복실트랜스퍼라제 서브유닛 알파는 서열목록 제 1 서열의 아미노산 서열을 포함하고, 상기 말로닐-CoA-[아실운반단백질]트랜스아실라제는 서열목록 제 3 서열의 아미노산 서열을 포함하며, 상기 아실-아실 운반단백질 티오에스터라제는 서열목록 제 5 서열의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 지방산 과발현용 대장균.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 상기 아세틸-CoA 카복실라제 카복실트랜스퍼라제 서브유닛 알파를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제 2 서열로 표시되고, 상기 말로닐-CoA-[아실운반단백질]트랜스아실라제를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제 4 서열로 표시되며, 상기 아실-아실 운반단백질 티오에스터라제를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제 6 서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 지방산 과발현용 대장균.

청구항 8

다음 단계를 포함하는 지방산 과발현용 형질전환 대장균의 제조방법:

(a) (i) 슈도모나스 에어루지노사의 아세틸-CoA 카복실라제 카복실트랜스퍼라제 서브유닛 알파 (acetyl-CoA carboxylase carboxytransferase subunit alpha)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열, (ii) 슈도모나스 에어루지노사의 말로닐-CoA-[아실운반단백질]트랜스아실라제 (malonyl-CoA-[acyl-carrierprotein] transacylase)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열, 및 (iii) 스트렙토코커스 피오제네스의 아실-아실 운반단백질 티오에스터라제 (acyl-acyl carrier protein thioesterase)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 뉴클레오타이드 서열을 발현벡터에 삽입시키는 단계; 및

(b) 상기 뉴클레오타이드 서열이 삽입된 발현벡터로 대장균을 형질전환시키는 단계.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 대장균을 발현시키는 단계 (b)는 전기충격 방법으로 수행되는 것을 특징으로 하는 지방산 과발현용 형질전환 대장균의 제조방법.

청구항 10

다음 단계를 포함하는 지방산 생합성 방법.

(a) 제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항의 대장균을 배양하여 지방산을 생합성하는 단계; 및

(b) 상기 단계 (a)의 생합성된 지방산을 수득하는 단계.

명세서

기술분야

본 발명은 지방산 생합성 경로의 과발현용 형질전환 대장균의 제조방법 및 상기 제조방법으로 제조된 형질전환 대장균에 관한 것이다.

배경기술

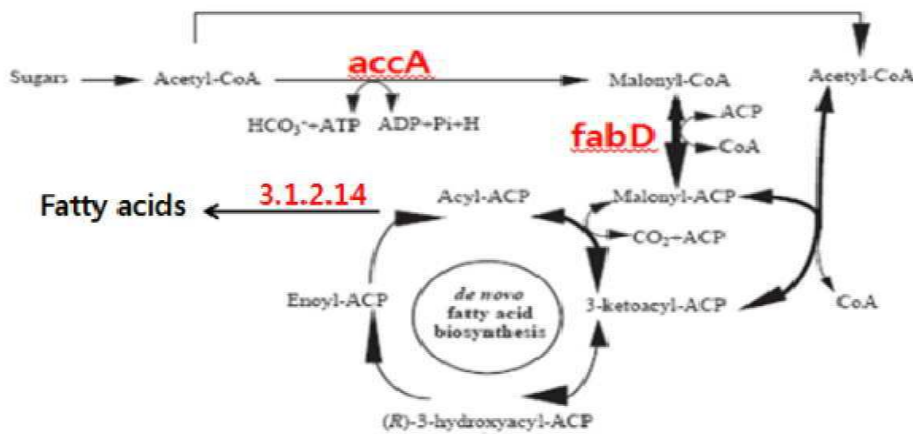
화석연료들의 사용은 지구온난화 가스 및 폐기물을 대량생산하여 인류에게 심각한 환경적인 위기를 초래하고 있다. 화석연료로부터 생산되어지는 화학공업을 대체할 수 있는, 즉 인류에게 유해한 폐기물의 생산 및 에너지 소비를 최소화할 수 있는 바이오매스를 원료로 사용하는 환경 친화적인 새로운 생물 공정의 개발이 필요하다. 바이오에너지로 대표되어지는 바이오에탄올, 바이오디젤, 바이오가스, 부탄올에 대한 관심이 증가하고 있지만, 언급된 종류의 바이오에너지 모두 전력생산이나 수송용 연료로 사용될 수 있으나, 실 적용 및 생산 방법의 몇몇 단점으로 인해 새로운 신재생에너지 자원인 탄화수소(hydrocarbon) 형태의 화합물에 대한 관심이 증가되고 있다. 이에 따라 긴 사슬 지방산(long chain fatty acid)를 대사산물로서 생성할 수 있는 재조합 균주에 대한 관심도 증대되고 있다.

슈도모나스 에어루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*)는 녹농균으로 1882년 게샤드(Gessard)에 의해 녹색의 농즙

에서 발견되었으며, 녹색을 형성하는 관계로 녹농균이라 하였다. 녹농균은 자연계에 널리 분포되어 있으며, 농, 객담, 분변, 소변, 담즙, 자궁분비물, 혈액, 척수액등에서 자주 분리 되고 있다. 슈도모나스 에어루지노사 녹농균의 형태는 그람음성 막대균으로 배양시 협막과 유사한 세포외성의 다당질인 점질층이 형성된다. 협막과 유사한 세포외성의 다당질인 점질층이 형성된다. 자연계에 적응력이 매우 강한 미생물이다. 이 균은 성장을 위한 영양요구가 매우 단순하다. 스트렙토코커스 피오지네스(*Streptococcus pyogenes*)는 화농성 연쇄상구균으로 폐렴, 인후염, 급성신장염, 독성쇼크증후군 등의 질병을 일으킨다.

[0004] 지방산(fatty acid)은 1개의 카복시기(-COOH)를 가지는 탄화수소 사슬의 카복실산으로 사슬 모양의 1개의 카복실산을 말한다. 지방을 가수분해하면 생기기 때문에 이러한 이름이 붙었다. 지방산 분자는 탄화수소 사슬로 이루어져 있는데, 탄화수소는 탄소의 기본 골격에 곁가지로 수소가 연결되어 있고 한쪽 끝에 카복시기가 붙어 있다. 생체 내에서 지방산은 지방산회로에 의해서 분해되거나 합성되거나 한다. 이 회로는 탄소 2개씩의 단위로 지방산을 합성하거나 분해하므로, 자연계에 존재하는 지방산은 거의 대부분이 짝수인 탄소수로 되어 있다.

[0005] 미생물 생체 내에서의 당으로부터 지방산 생합성의 첫 단계는 아세틸-CoA (acetyl-CoA)에서 시작하여, 그 뒤 탄소원자가 한 번에 두 개의 원자씩 탄화수소사슬에 붙어 사슬이 길어지게 된다. 세포질에서 아세틸-CoA는 카복실화 되어서, 지방산 생합성에 있어 중요한 중간체가 되는 말로닐-CoA(malonyl-CoA)를 생산한다. 이 반응은 아세틸-CoA 카복실라아제 복합체에 의해 촉매되는데, 이 복합체는 세 개의 효소로 구성되어 있고, 효소 활성을 위해 ATP뿐만 아니라 Mn^{2+} 과 바이오틴을 요구한다. 말로닐-CoA의 말로닐 그룹에 있는 세 개의 탄소원자 중 두 개가 생합성 반응의 각 단계마다 지방산 사슬에 더해진다. 이 반응은 말로닐-CoA 형성과 마찬가지로 세포질에 있고 막과 결합되어 있지 않는 다효소 복합체가 필요하다. 개별적인 효소들로 구성되어 있는 이 복합체는 지방산 합성효소를 말한다. 이러한 지방산 합성 효소 복합체의 일부인 아실 운반 단백질(acyl carrier protein: ACP)은 지방산(fatty acid)의 탄소 수를 증가시키기 위한 결합에 관여한다.



[0006]

[0007] 미생물의 지방산 경로 대사흐름에서 지방산 생산의 과발현 목적에 해당하는 시도와 노력은 끊임없이 있어왔다. 특히, 대장균은 효소 생산 시스템은 타 생물체에 비해 많은 대사정보가 알려져 있고, 유전자에 대한 정보가 거의 다 밝혀져 재조합 단백질 생산에 널리 이용되고 있다. 그러나 다른 종들의 유전자들이 대장균에서 함께 공동발현 되었을 때 미치는 영향에 대해서는 연구가 조금 미흡하다.

[0008] 식물의 유전자 도입으로 지방산을 증진시키는 연구는 많이 되어져 왔으나 본 발명에서처럼 다른 미생물의 유전자 도입으로 지방산을 생산을 개선시키는 연구가 미흡하다.

[0009] 대장균은 다루기 쉬운 미생물로 성장력이 좋으며 경로 조절이 쉬운 것으로 알려져 있고 슈도모나스 에어로지노사는 대장균보다 지질의 함량이 2배 가까이 많은 것으로 알려져 있다. 따라서 지방산을 포함한 지질의 함량이 높은 슈도모나스의 유전자도입과 대장균과 슈도모나스에 존재하지 않는 유전자를 그람양성균에서 도입으로 지방산 함량을 증진하고자 하였다.

[0010] 본 발명에서는 대장균의 지방산 생합성 대사 경로(fatty acid biosynthesis pathway)의 초기단계에서 지방산 함량 증대, 특정 대사산물을 효율적으로 생산하는 균주를 개발하기 위해서 생물학적 대사 네트워크를 이해와

유전자 삽입의 유전자 조작을 통해 제조할 균주를 개발하여 본 발명이 완성되었다.

[0011] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명자들은 유전자 조작을 통해 지방산 생합성 대사산물을 안정적이고, 효과적으로 생산하는 균주의 개발을 위하여 예의 연구 노력하였고, 그 결과 슈도모나스 에어루지노사의 *accA* 유전자, *fabD* 유전자 및 스트렙토코커스 피오제네스의 3.1.2.14 유전자군으로부터 선택된 1종 이상의 유전자와 함께 대장균을 공동형질전환시키는 경우 효과적으로 지방산 생합성 경로가 과발현됨을 확인하여, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0013] 따라서 본 발명의 목적은 지방산 생합성 경로의 과발현용 형질전환 대장균을 제공하는 데 있다.

[0014] 본 발명의 다른 목적은 상기 형질전환 대장균의 제조방법을 제공하는 데 있다.

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 형질전환 대장균을 이용하여 지방산을 생합성하는 방법을 제공하는 데 있다.

[0016] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0017] 본 발명자들은 유전자 조작을 통해 지방산 생합성 대사산물을 안정적이고, 효과적으로 생산하는 균주의 개발을 위하여 예의 연구 노력하였고, 그 결과 슈도모나스 에어루지노사의 *accA* 유전자, *fabD* 유전자 및 스트렙토코커스 피오제네스의 3.1.2.14 유전자군으로부터 선택된 1종 이상의 유전자와 함께 대장균을 공동형질전환시키는 경우 효과적으로 지방산 생합성 경로가 과발현됨을 확인하여, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0018] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음을 포함하는 발현벡터로 공동형질전환된(cotransformed) 지방산 과발현용 대장균을 제공한다: 아세틸-CoA 카복실라제 카복실트랜스퍼라제 서브유닛 알파 (acetyl-CoA carboxylase carboxytransferase subunit alpha)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열, 말로닐-CoA-[아실운반단백질]트랜스아실라제 (malonyl-CoA- [acyl-carrierprotein] transacylase)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 및 아실-아실 운반단백질 티오에스터라제(acyl-acyl carrier protein thioesterase)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 뉴클레오타이드 서열.

[0019] 본 명세서에서 용어 ‘아세틸-CoA 카복실라제 카복실트랜스퍼라제(acetyl-CoA carboxylase carboxytransferase)’는 아세틸-CoA를 말로닐-CoA로 변환하는 과정에 관여하는 촉매이며, 두 개의 알파 서브유닛과 두 개의 베타 서브유닛으로 구성된 테트라머이다. 본 발명의 아세틸-CoA 카복실라제 카복실트랜스퍼라제 서브유닛 알파는 상기 서브유닛 중 하나이며, *accA* 유전자가 이를 코딩하는 유전자이다.

[0020] 본 발명의 발현벡터에서 발현되는 상기 아세틸-CoA 카복실라제 카복실트랜스퍼라제 서브유닛 알파는 슈도모나스 에어루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*)으로부터 유래한 것을 사용하는 것이 바람직하다. 더욱 바람직하게는 서열목록 제1서열로 표시되는 아세틸-CoA 카복실라제 카복실트랜스퍼라제 서브유닛 알파를 발현하도록 할 수 있으며, 상기 아세틸-CoA 카복실라제 카복실트랜스퍼라제 서브유닛 알파를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 바람직하게는 서열목록 제2서열로 표시될 수 있다.

[0021] 본 명세서에서 용어 ‘말로닐-CoA-[아실운반단백질]트랜스아실라제 (malonyl-CoA- [acyl-carrierprotein] transacylase)’는 말로닐-CoA를 말로닐-ACP로 변환하는 과정에 관여하는 촉매이며, *fabD* 유전자가 이를 코딩하는 유전자이다.

- [0022] 본 발명의 발현벡터에서 발현되는 상기 말로닐-CoA-[아실-운반단백질]트랜스아실라제는 슈도모나스 에어루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*)로부터 유래한 것을 사용하는 것이 바람직하다. 더욱 바람직하게는 서열목록 제3서열로 표시되는 말로닐-CoA-[아실-운반단백질]트랜스아실라제를 발현하도록 할 수 있으며, 상기 말로닐-CoA-[아실-운반단백질]트랜스아실라제를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 바람직하게는 서열목록 제4서열로 표시될 수 있다.
- [0023] 본 명세서에서 용어 ‘아실-아실 운반단백질 티오에스터라제(acyl-acyl carrier protein thioesterase)’는 지방산 생합성 경로 상에서 장쇄 지방산들의 생물학적 생산을 위해 필수적인 촉매로서 말로닐-acp에서 여러 전구체를 거쳐 긴 사슬 지방산을 얻기 위한 효소이지만 야생종 대장균이 생산하지 못하는 효소이며, 3.1.2.14 유전자가 이를 코딩하는 유전자이다.
- [0024] 본 발명의 발현벡터에서 발현되는 아실-아실 운반단백질 티오에스터라제는 특히 제한되지는 않으나 스트렙토코커스(*Streptococcus*)로부터 유래한 것을 사용하는 것이 바람직하다. 더욱 바람직하게는 서열목록 제5서열로 표시되는 스트렙토코커스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*)의 아실-아실 운반단백질 티오에스터라제를 발현하도록 할 수 있으며, 상기 아실-아실 운반단백질 티오에스터라제를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 바람직하게는 서열목록 제6서열로 표시될 수 있다.
- [0025] 본 발명에서 이용되는 뉴클레오타이드 서열은 상기 언급된 서열 이외에 상기 뉴클레오타이드 서열에 대하여 실질적인 동일성을 나타내는 뉴클레오타이드 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 본 발명의 뉴클레오타이드 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 열라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 열라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 80%의 상동성, 보다 바람직하게는 최소 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 최소 95%의 상동성을 나타내는 뉴클레오타이드 서열을 의미한다. 서열비교를 위한 열라인먼트 방법은 당업계에 공지되어 있다. 열라인먼트에 대한 다양한 방법 및 알고리즘은 Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482(1981); Needleman and Wunsch, *J. Mol. Bio.* 48:443(1970); Pearson and Lipman, *Methods in Mol. Biol.* 24: 307-31(1988); Higgins and Sharp, *Gene* 73:237-44(1988); Higgins and Sharp, *CABIOS* 5:151-3(1989); Corpet et al., *Nuc. Acids Res.* 16:10881-90(1988); Huang et al., *Comp. Appl. BioSci.* 8:155-65(1992) and Pearson et al., *Meth. Mol. Biol.* 24:307-31(1994)에 개시되어 있다. NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-10(1990))은 NCBI (National Center for Biological Information) 등에서 접근 가능하며, 인터넷 상에서 blastp, blastn, blastx, tblastn and tblastx와 같은 서열 분석 프로그램과 연동되어 이용할 수 있다. BLSAT는 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>에서 접속 가능하다. 이 프로그램을 이용한 서열 상동성 비교 방법은 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_help.html에서 확인할 수 있다.
- [0026] 상기 각 유전자의 반응 메카니즘을 간단히 요약하면 다음과 같다.
- [0027] *accA* 유전자; $ATP + \text{아세틸-CoA} + HCO_3^- \rightleftharpoons ADP + \text{오쏘포스페이트} + \text{말로닐-CoA}$,
- [0028] *fabD* 유전자; $\text{말로닐-CoA} + \text{아실-운반단백질} \rightleftharpoons CoA + \text{말로닐[아실-운반단백질]}$,
- [0029] E.3.1.2.14 유전자; $\text{올레오일-[아실-운반단백질]} + H_2O \rightleftharpoons [\text{아실-운반단백질}] + \text{올레이트}$.
- [0030] 상기 유전자들은 발현벡터 내부에 도입되어 대장균에서 발현되게 된다. 본 명세서에 있어서, 용어 "발현벡터"는 발현벡터의 전사에 제공되는 추가단편에 작동가능하게 연결된 관심의 폴리펩티드를 암호화하는 단편으로 구성되는 선형 또는 원형의 DNA 분자이다. 그와 같은 추가단편은 프로모터 및 종료암호 서열을 포함한다. 발현벡터는 하나 이상의 복제 개시점, 하나 이상의 선택마커, 폴리아데닐화 신호 등을 또한 포함한다. 발현벡터는 일반적으로 플라스미드 또는 바이러스 DNA로부터 유도되거나, 또는 둘 다의 요소를 함유한다.
- [0031] 본 발명의 벡터 시스템은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있으며, 이에 대한 구체적인 방법은 Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press(2001)에 개시되어 있으며, 이 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.
- [0032] 본 발명의 상기 유전자를 인코딩하는 핵산 분자는 원핵세포에서 작동하는 프로모터에 작동적으로 연결(operatively linked)된다. 본 명세서에서, 용어 “작동적으로 결합된”은 핵산 발현 조절 서열(예: 프로모터, 시그널 서열, 또는 전사조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 해독을 조절하게 된다.

- [0033] 본 발명의 벡터는 전형적으로 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터(예컨대, tac 프로모터, lac 프로모터, lacUV5 프로모터, lpp 프로모터, pL^λ프로모터, pR^λ프로모터, rac5 프로모터, amp 프로모터, recA 프로모터, SP6 프로모터, trp 프로모터 및 T7 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 숙주 세포로서 *E. coli*(예, HB101, BL21, DH5α 등)가 이용되는 경우, *E. coli* 트립토판 생합성 경로의 프로모터 및 오퍼레이터 부위(Yanofsky, C., J. Bacteriol., 158:1018-1024(1984)) 그리고 파아지 λ의 좌향 프로모터 (pL^λ프로모터, Herskowitz, I. and Hagen, D., Ann. Rev. Genet., 14:399-445(1980))가 조절 부위로서 이용될 수 있다.
- [0034] 한편, 본 발명에 이용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드(예: pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHc79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, pGEX 시리즈, pET 시리즈 및 pUCP19 등), 파지(예: λgt4?λB, λ-Charon, λΔz1 및 M13 등) 또는 바이러스(예: SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있으나, 바람직하게는 지방산 생합성에 이용될 박테리아인 대장균을 위한 특정 유전자를 미생물 생체 내로 운반하여 외부로부터 삽입된 유전자의 발현을 효과적으로 조절할 수 있는 pUCP19를 사용한다.
- [0035] 한편, 본 발명의 벡터는 선택표지로서, 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함하며, 예를 들어 암피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자가 있다.
- [0036] 본 발명의 발현 벡터는 프로모터서열, 발현 대상 유전자(구조 유전자)의 뉴클레오타이드 서열 및 터미네이터 서열을 포함하며, 상기서열들이 5'-3' 순서대로 연결되는 것이 바람직하다. 본 발명에서는 *accA*와 *fabD*로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 서열, E3.1.2.14효소의 유전자의 서열이 5'-3' 순서대로 연결되어 제공되었다.
- [0037] 본 발명의 발현벡터에는 상기 유전자들이 효소의 과발현 기능을 포함하여 최소한의 길이를 가지도록 RBS(ribosomal bindingsite) 및 효소발현에 꼭 필요한 부분을 포함하는 염기서열만을 서열로 정하여 삽입시키는 것이 숙주세포의 대사부담(metabolic burden)을 줄이는 측면에서 바람직하다.
- [0038] 상기 유전자가 포함된 발현벡터는 이후 대장균 내부로 도입되는데, 본 발명의 벡터를 대장균 내로 운반하는 방법은 CaCl₂ 방법(Cohen, S.N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 9:2110-2114(1973)), 하나한 방법(Cohen, S.N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 9:2110-2114(1973); 및 Hanahan, D., J. Mol. Biol., 166:557-580(1983)) 및 전기 천공 방법(Dower, W.J. et al., Nucleic. Acids Res., 16:6127-6145(1988)) 등에 의해 실시될 수 있으나, 형질전환체의 안정적 제조와 효율을 높이기 위해서는 전기 충격에 의한 형질전환 방법을 사용하는 것이 바람직하다.
- [0039] 본 발명의 다른 양태에 따르면 본 발명은 다음 단계를 포함하는 지방산 과발현용 형질전환 대장균의 제조방법을 제공한다: (a) 아세틸-CoA 카복실라제 카복실트랜스퍼라제 서브유닛 알파 (acetyl-CoA carboxylase carboxytransferase subunit alpha)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열, 말로닐-CoA-[아실운반단백질]트랜스아실라제 (malonyl-CoA- [acyl-carrierprotein] transacylase)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 및 아실-아실 운반단백질 티오에스터라제(acyl-acyl carrier protein thioesterase)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열로 구성된 균으로부터 선택되는 하나 이상의 뉴클레오타이드 서열을 발현벡터에 삽입시키는 단계; 및 (b) 상기 뉴클레오타이드 서열이 삽입된 발현벡터로 대장균을 형질전환시키는 단계.
- [0040] 본 발명의 지방산 생합성 경로의 과발현용 형질전환 대장균의 제조방법은 상술한 형질전환 대장균을 생산하는 방법에 관한 것이므로 상술한 내용과 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.
- [0041] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 상기에서 상술한 형질전환 대장균을 배양하여 지방산을 생합성 하는 단계; 및 (b) 상기 생합성된 지방산을 수득하는 단계를 포함하는 지방산 생합성 방법을 제공한다.
- [0042] 본 발명의 지방산 과발현용 형질전환 대장균의 배양은 당업계에 공지된 통상의 대장균 배양 방법에 의해 배양될 수 있다.

[0043] 바람직하게는, 단계 (a)는 발현 유도제인 IPTG의 존재 하에서 실시된다.

[0044] 상기 형질전환 대장균 내에서 생합성된 지방산을 분리하는 단계는 당업계에 공지된 통상의 분리 또는 정제 방법에 따라 실시될 수 있다(참조: B. Aurousseau et al., *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 57(3):1558-9331(1980); Frank C. Magne et al., *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 34(3):127-129(1957)).

발명의 효과

[0045] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0046] (a) 본 발명은 다음을 포함하는 발현벡터로 공동형질전환된(cotransformed) 지방산 과발현용 대장균을 제공한다: 아세틸-CoA 카복실라제 카복실트랜스퍼라제 서브유닛 알파 (acetyl-CoA carboxylase carboxytransferase subunit alpha)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열, 말로닐-CoA-[아실운반단백질]트랜스아실라제 (malonyl-CoA-[acyl-carrierprotein] transacylase)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 및 아실-아실 운반단백질 티오에스터 라제(acyl-acyl carrier protein thioesterase)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 뉴클레오타이드 서열.

[0047] (b) 본 발명은 제조합 이중 대장균에 의하여 지방산 생합성 경로의 초입단계 물질인 말로닐산을 세포내외의 생산을 증진할 수 있을 뿐만 아니라 지방산 자체의 함량을 증진할 수 있는 효과를 제공한다.

[0048] (c) 본 발명은 당으로부터 지방산 생합성 경로에의 과발현과 다른 종의 유전자 삽입에 의한 대사 흐름 변경을 통해 지방산 생합성을 대량 생산 해 내는 효과를 제공한다.

[0049] (d) 본 발명은 바이오에너지 생산의 기초가 될 지방산 생산을 대량 생산하고 친환경적임을 물론이고 경제적으로도 큰 경제력을 갖출 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0050] 도 1은 대장균 생체 내에서 포도당에서부터 지방산까지의 지방산 생합성 경로를 나타낸다.

도 2는 에스케리키아 콜라이-슈도모나스 기반 벡터(*Escherichia coli*-*Pseudomonas* settle vector)인 pUCP19 구조를 나타낸다.

도 3은 에스케리키아 콜라이-슈도모나스 기반 벡터인 pUCP19에 3.1.2.14 유전자가 삽입되어있는 구조를 나타내며, 이를 pJS04라 명명하였다.

도 4는 에스케리키아 콜라이-슈도모나스 기반 벡터인 pUCP19에 *accA*, *fabD* 그리고 3.1.2.14 유전자가 삽입되어 있는 구조를 나타내며, 이를 pJS07라 명명하였다.

도 5는 슈도모나스 에어루지노사와 스트렙토코커스 피오지네스 염색체를 주형으로 하여 *accA*, *fabD* 유전자 3.1.2.14 효소를 암호화하는 유전자를 삽입한 도 3과 도 4의 제조합 플라스미드를 제한효소를 이용하여 확인한 전기영동 사진을 나타낸다. 레인 1: 사이즈마커, 레인 2-4: *E. coli* SGJS14에서 Sac I 과 E.coRI 으로 3.1.2.14를 처리, 레인 5: 공란, 레인 6,7: *E. coli* SGJS17에서 Sac I 과 E.coRI 으로 3.1.2.14를 처리, 레인 8: *E. coli* SGJS17에서 Xba I 과 BamHI 으로 3.1.2.14를 처리, 레인 9: *E. coli* SGJS17에서 Kpn I 과 Sac I 으로 *fabD*를 처리.

도 6은 본 발명의 *E. coli* SGJS04, *E. coli* SGJS05, *E. coli* SGJS06, *E. coli* SGJS14 및 *E. coli* SGJS17 제조합 균주들의 생장곡선과 야생종(wild type) 대장균과 비교한 결과를 그린 그래프를 나타낸다.

도 7은 본 발명의 제조합 대장균들의 세포외에서 분석된 아세트산과 말론산의 양을 야생종 대장균(wild type)과 비교한 결과를 나타낸다.

도 8은 24시간 배양 후 본 발명의 제조합 대장균들과 야생종 대장균의 세포내에서 지질 (lipid) 추출 실험 결과를 나타낸다.

도 9는 본 발명의 제조합 대장균의 지방산에서 추출한 헥사데카노산, 9-헥사데카노산, 7-헥사데카노산, 헵타

테카노산, 9-옥타데카노산, 옥타데카노산의 GC 그래프를 나타낸다.

도 10은 탄소수 16개를 가진 헥사테카노산의 GC/MS 분석한 결과이다.

도 11은 탄소수 18개를 가진 옥타데카노산의 GC/MS 분석한 결과이다.

도 12는 본 발명의 제조합 대장균들과 야생종 대장균에서 헥사테카노산과 옥타데카노산을 IPTG 첨가 후 6시간과 배양 24시에서 추출하여 정량한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명 하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

실시예

실시예 1: 중합효소연쇄반응 (Polymerase Chain Reaction, PCR)을 이용한 *accA*와 *fabD* 유전자를 발현하는 제조합 플라스미드와 3.1.2.14를 암호화하는 유전자가 삽입된 플라스미드의 제조

슈도모나스 에어루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*) PA01(KCCM)의 염색체를 주형으로 하여 말로닐-CoA와 말로닐-CoA:ACP의 생산을 효소를 암호화하는 *accA*와 *fabD*의 유전자서열(genebank, NCBI)을 프라이머(primer)를 제작하여 중합효소연쇄반응(PCR, DaKaRa Korea) 방법을 통해 클로닝 하였다. 스트렙토코커스 피오지네스(*Streptococcus pyogenes*) MGAS10270(ATCC)의 염색체를 주형으로 하여 대장균과 슈도모나스 에어루지노사의 지방산 합성 과정에 포함되어 있지 않은 아실(아실운반단백질) 티오에스터라제(E.C 3.1.2.14)를 암호화하는 유전자 서열(GenBank, NCBI) 또한 프라이머를 제작하여 클로닝 하였다(표 1, 2).

표 1

유전자	생산 효소
<i>accA</i>	아세틸-CoA 카복실라제 카복시트랜스퍼라제 서브유닛 알파 (acetyl-CoA carboxylase, carboxytransferase, alpha subunit)
<i>fabD</i>	말로닐-CoA[아실운반단백질]트랜스아실라제 (malonyl-CoA-[acyl-carrier-protein]transacylase)
E.C 3.1.2.14	아실-아실 운반단백질 티오에스터라제 acyl-(acyl carrier protein) thioesterase

표 2

표 1의 유전자를 증폭하기 위한 프라이머 및 제한효소

유전자	프라이머 서열	제한 효소
<i>accA</i>	F 5 '-TCTAGACGACGGAAGCCTATGAACCCG-3'	XbaI
	R 5 '-GGATCCTTACGGCGCGCCGTAGCTCAT-3'	BamHI
<i>fabD</i>	F 5 '-GGTACCCAAGGGACCTATTCAATGTCTGC-3'	KpnI
	R 5 '-GAGCTCTTCTCTCTTTCTCTCTCAGG-3'	SacI
E.C 3.1.2.14	F 5'-GAGCTCGGAGAGTATTATGGGATTAAGTTA-3'	SacI
	R 5'-GAATTCCTAGTCTATCTCGCTTCTGTTT-3'	EcoRI

표 1의 유전자들은 타겟 유전자들만 특이적으로 증폭하도록 제작된 표 2에 제공된 프라이머(primer)를 사용하여 증폭하였다. 이 유전자들은 rbs(ribosome binding site)를 포함하여 *accA*는 972 bp, *fabD*는 963 bp 그리고 아실(아실운반단백질) 티오에스터라제를 암호화하는 유전자는 763 bp에서 증폭되었다. 각각의 중합효소 연쇄반응은 통상적인 반응조건(10 mM Tris-HCl (pH9.0), 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100, 2 mM MgSO₄, Taq DNA 중합효소(DaKaRa)) 아래에서 95℃/5분(denaturation), 66℃/1분(annealing), 72℃/1분(extension)로 1회 수행

한 후, 95℃/1분(denaturation), 66℃/30초(annealing), 72℃/1분(extension)로 30회 반복 수행하였다. 마지막 단계로 안정적인 신장(extension)을 위해 95℃/1분(denaturation), 66℃/1분(annealing), 72℃/5분(extension) 반응하였다. 증합효소연쇄반응 후 증폭된 DNA는 0.8% 아가로스 젤 상에서 확인 후 정제하여 T-벡터 클로닝에 이용하였다. pGEM-T easy 벡터(DaKaRa)에 라이게이션을 수행하여 재조합 플라스미드인 pGEM-T:accA, pGEM-T:fabD 그리고 pGEM-T::3.1.2.14를 제작하였다. 상기 재조합 플라스미드들은 대장균(*E. coli* AG1 competent cell, Stratagene)에서 형질 전환하여 균주를 제조하였다.

[0058] 실시예 2: 재조합 플라스미드 pJS04와 pJS07의 제조

[0059] 상기 실시예 1의 재조합 플라스미드인 pGEM-T::3.1.2.14와 pGEM-T:accA, pGEM-T:fabD를 대장균과 슈도모나스의 셔틀 벡터인 pUCP19(ATCC, 도 2)를 표 2에 열거된 제한효소들로 37℃ 항온수조(water bath)에서 약 2시간 반응하였다. 각각의 DNA 절편들을 절단한 뒤 pUCP19 벡터의 다중삽입부위(multicloning site)에 도 3 및 4에 개시된 것과 같이 T4 라이게이즈(Dakara)를 이용, 16℃에서 반응, 라이게이션을 하여 재조합 플라스미드를 완성하였다. 각 단계마다 삽입된 유전자의 삽입여부를 확인하기 위해 대장균(*E. coli* AG1 competent cell, Stratagene)에 형질 전환 시킨 후 재조합 플라스미드를 추출하여 이를 다시 원래 삽입부위의 제한효소로 처리하여 잘린 DNA 조각의 크기를 0.8% 아가로스 젤 상에서 전기영동하여 비교하는 방법을 사용하였다. 도 5에서는 재조합된 플라스미드가 제한효소에 의해 절단된 결과를 보여주었다. 증폭된 산물을 표 2에 열거된 제한효소들을 이용하여 pUCP19 벡터에 도입하여 pJS01, pJS02, pJS03, pJS04와 pJS07을 제조하였다. 도 3, 4는 상기 pJS04(3.1.2.14를 암호화하는 유전자 포함), pJS07(accA, fabD 및 3.1.2.14를 암호화하는 유전자 포함)라 명명된 벡터의 지도(map)를 나타내는 도면이다.

[0060] 실시예 3: 이중 대장균 형질전환체 제조

[0061] 통상적으로 클로닝용으로 많이 쓰이는 대장균의 경우 CaCl₂ 버퍼를 사용한 컴피턴트 세포를 만든 후 열 충격(42℃) 방법에 의해 플라스미드를 숙주세포내로 넣지만, 본 발명에서는 형질전환체의 안정적 제조와 효율을 높이기 위해 전기천공법(electroporation)에 의한 형질전환방법을 사용하였다. 상기 전기 충격에 의한 형질전환방법을 위해 16시간동안 전 배양 된 30 μl(0.1 %)의 야생종 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) K-12 MG1655(ATCC, USA) 배양액을 시험관에 들어있는 3 mL의 LB(10 g/L tripton, 10 g/L NaCl, 5 g/L yeast extract)배지에 접종하여 배양액의 흡광도(absorbance)가 600nm 파장에서 0.6에 이르렀을 때, 배양액 전체에 해당하는 3 mL의 배양액은 원심 분리(12000 rpm, 1분)하여 상등액과 세포를 분리하였다. 모아진 세포는 10% 글리세롤 1 mL로 1회 세척해준 후, 다시 원심분리 (12000 rpm, 1분)하여 상등액과 세포로 나누어 주었다. 세포는 10% 글리세롤 80 μl로 현탁하였다. 현탁된 세포에 1-3 μL의 재조합 플라스미드(pJS01, pJS02, pJS03, pJS04와 pJS07)를 첨가시켰다. 상기의 플라스미드가 들어있는 분주된 80 μl의 액체는 전기천공법(electroporation)용 큐벳(BIO-RAD, Gene pulser cuvette)에 담아 BIO-RAD, Gene pulser Xcell로 전기 충격(1800v, 25μF, 200Ω)을 가하였다. 미리 준비해둔 1 mL LB(10 g/L tripton, 10 g/L NaCl, 5 g/L yeast extract)를 첨가한 뒤 1시간 동안 200 rpm, 37℃에서 진탕 배양하였다. 배양된 형질전환체는 엠펬실린(50 μg/mL)이 첨가된 LB 아가(10 g/L tripton, 10 g/L NaCl, 5 g/L yeast extract, agar 20 g/L)에서 단일 균체가 생성될 때까지 37℃에서 배양하였다. 이를 통해 재조합 플라스미드인 pJS01, pJS02, pJS03, pJS04와 pJS07를 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) K-12 MG1655 균주에 형질 전환한 *E. coli* SGJS04, *E. coli* SGJS05, *E. coli* SGJS06, *E. coli* SGJS14와 *E. coli* SGJS17 재조합 균주를 개발하였다(표 3).

표 3

개발균주	유전형
<i>E. coli</i> SGJS04	<i>E. coli</i> K-12 MG1655::pUCP19::accA
<i>E. coli</i> SGJS05	<i>E. coli</i> K-12 MG1655::pUCP19::fabD
<i>E. coli</i> SGJS06	<i>E. coli</i> K-12 MG1655::pUCP19::accA::fabD
<i>E. coli</i> SGJS14	<i>E. coli</i> K-12 MG1655::pUCP19::3.1.2.14
<i>E. coli</i> SGJS17	<i>E. coli</i> K-12 MG1655::pUCP19::accA::fabD::3.1.2.14

[0063] 재조합 균주

[0064] 실시예 4: 이중 대장균의 배양 및 재조합 균주로부터 단백질의 생산

[0065] 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) K-12 MG1655 균주에 형질 전환한 재조합 균주들을 LB(암페실린 50 μ g/mL 포함) 배지에 16시간 정도 전 배양 시키고 그 배양액을 다시 암페실린 50 μ g/mL이 포함된 LB 배지에 접종하여 흡광도가 600 nm에서 0.6-1.0 되었을 때 글리세롤 농도가 25%가 되게 보관용 균액으로 만든 다음 -80℃에서 배양실험 시까지 저장하였다. 상기 개발된 재조합 균주의 배양은 보관용 균액 30 μ L을 10 mL 저면 튜브(bottom tube)에 들어있는 암페실린(50 μ g/mL)이 첨가된 3 mL의 LB에 16시간동안 배양한 후, 이를 다시 500 mL 플라스크에 들어있는 암페실린(50 μ g/mL)이 첨가된 200 mL의 LB(10 g/L tripton, 10 g/L NaCl, 5 g/L yeast extract) 배지에 0.5 %의 전기 배양액을 접종하여 37℃, 170 rpm 상태에서 24시간동안 배양하였다. 재조합 균주와 비교하기 위한 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) K-12 MG1655 야생종은 암페실린이 들어 있지 않은 LB에서 재조합 균주와 동일한 조건으로 실험을 실시하였다. 단백질 발현을 위해 배양액의 흡광도(absorbance)가 600 nm 파장에서 0.6에 이르렀을 때 유도물질인 IPTG (isopropylthio- β -D-galactoside, sigma, USA)를 첨가(최종농도 1 mM/mL)하여 재조합 단백질의 발현을 유도하였다. 상기 예를 따라 초기 유도체의 발현으로 지방산 함량의 생산증대를 비교하기 위한 종과 본 발명의 목적으로 재조합 대장균과 야생종의 성장곡선은 도 6에서 보여주고 있다.

[0066] 본 발명에서 개발된 이중 대장균 재조합 균주들은 성장곡선에서 야생종 대장균과 비교하여 큰 차이가 없었다. 다른 종의 유전자의 삽입이나 과발현에 의한 독성이나 피해는 없었던 것으로 사료된다. 이는 슈도모나스와 대장균에 모두 발현이 가능한 안정적인 벡터를 사용하였고 삽입된 모든 유전자가 발현이 되도록 유전자 마다 RBS(Ribosomal Binding Site)를 첨가해 주었기 때문이라고 생각된다. 유전자의 암호화부분은 효소의 과발현 기능을 포함하여 최소한의 길이를 가지도록 RBS(Ribosomal Binding Site) 및 효소발현에 꼭 필요한 부분을 포함하는 염기서열만을 서열로 정하여 유전자의 발현에 의한 숙주세포의 대사부담(metabolic burden)을 줄이고자 하였고 생산 경로에 맞춰 두 유전자의 순서가 순서대로 연결된 되게 개발하였기 때문이라고 예상된다.

[0067] 실시예 5: 세포외로부터 재조합 대장균의 아세트산(acetic acid) 및 말론산(malonic acid)의 측정

[0068] 재조합 균주의 배양액 내의 지방산 중간물질이면서 지방산 생산의 유도체 물질인 아세트산과 말론산의 농도를 측정하기 위해 배양 중 일정시간마다 채취한 시료를 원심분리(12000 rpm, 10분)후 상등액과 세포를 분리하여 -40℃에서 보관하였다. 상기 배양액로부터 분리된 상등액은 각각 1 mL씩 0.2 μ m 필터를 이용하여 정제한 후, 하단의 조건하에서 고속액체크로마토그래피(HPLC) 정량 분석을 실시하였다.

표 4

[0069] 아세트산과 말론산 분석을 위한 HPLC 조건

품 목	조 건
HPLC 모델	(영린기기, Korea), UV730D (영린기기, Korea)
컬럼	Aminex HPX-87H(Biorad, USA)
유속	0.6 ml/min
주입부피	30ul
이동상	0.005N 황산
오븐 온도	50℃
작동 시간	30분
UV 검출과장	210nm

[0070]

[0071] 본 발명에서 측정한 아세트산과 말론산은 지방산 생합성 과정의 중간체이면서 유도체로 생합성의 초기도입부에서 발생한다. 따라서 이와 관련된 유전자를 포함하고 있는 *E. coli* SGJS04, *E. coli* SGJS05와 *E. coli* SGJS06의 세 재조합 균주와 야생종 대장균과 생산량의 변화를 관찰하였다. 재조합 대장균들은 야생종 대장균과 엑스트라셀룰라(extracellular)에서 분석되어지는 아세트산(acetic acid)과 말론산(malonic acid)의 생산량 경향에 차이를 보였다. 배양이 시작된 후 *accA* 유전자의 삽입으로 과발현된 *E. coli* SGJS04은 야생종과 다른 지방산 유도를 유도하는 유전자가 삽입된 균주들과 비교하였을 때 말론산(malonic acid)이 많이 증가

된 것을 확인하였다. *fabD* 유전자가 삽입된 *E. coli* SGJS05와 *E. coli* SGJS06는 *accA* 유전자의 삽입으로 과발현된 *E. coli* SGJS04 보다 좀 적게 생산된 것을 확인 할 수 있었다.

[0072] 이는 아세틸-CoA 카르복실레이즈를 암호화하는 *accA* 유전자는 이 유전자가 과발현되면서 아세틸-CoA는 말로닐-CoA로 형성되어 말로닐-CoA는 말론산으로 전환되어져 다른 재조합 균주보다 *E. coli* SGJS04에서 많이 생산되어지는 결과를 볼 수 있었다. *E. coli* SGJS05와 *E. coli* SGJS06의 *fabD* 유전자 과발현은 말로닐-CoA[아실운반단백질] 트랜스아실레이즈 활성을 가지게 해주어서 말론산이 생성되기 전에 말로닐-CoA에서 말로닐-아실운반단백질로 빠르게 흐르게 해주어서 지방산 생합성의 신장(elongation) 단계로 진입하게 해주어서 *E. coli* SGJS04보다 적게 생산 되어진 것이라 알 수 있었다. 지방산 생합성 경로의 초기단계의 필수적인 효소를 과발현하여 지방산의 생산의 중간체인 말론산(malonic acid)이 증진되었고 이로 인해 지방산 함량증진을 가져올 것이라 예상할 수 있다.

[0073] 실시예 6: 야생종 대장균과 재조합 대장균들의 세포내로부터의 지질 (lipid) 함량 측정

[0074] 지질은 Bligh-Dyer(1959)의 방법을 변형하여 추출하였다. 실시예 4의 조건으로 IPTG를 첨가하여 24 시간 배양한 배양액을 50 mL 튜브에 50 mL 넣어 원심분리 하여 배양된 세포를 모았다(4500 rpm for 10 min). 인산염 버퍼, PBS(Phosphate-buffer saline, 50mM, pH7.4)에 한번 세척해준 뒤 다시 원심분리를 하였다. 모아진 재조합 균주들과 야생종 대장균에 메탄올 (MeOH) 2 mL을 첨가하여 볼텍싱 해주고 클로로포름(CHCl₃) 1 mL을 첨가하여 다시 볼텍싱 해주었다. 이후 멸균 증류수 0.8 mL을 첨가하여 볼텍싱 하였다. 충분한 볼텍싱 후에 다시 클로로포름 1 mL을 첨가해서 볼텍싱 해주었다. 볼텍싱 후에 원심분리(1000 rpm for 20 min)을 해준 이후 상층액을 분리하여서 다른 튜브에 옮겨주고 이를 말려 세포 안에 포함된 지질의 양을 측정해주었다.

[0075] 본 발명에서 개발한 모든 재조합 대장균 균주들은 야생종 대장균보다 지질함량이 모두 증가 한 것을 도면 8에서 확인 할 수 있었다. 지질은 지방산을 포함하기 때문에 지방산 함량 증진이 지질함량을 증가 시킨 것으로 사료된다. 지방산 생합성 경로의 도입부분에 관련된 유전자들이 삽입되어 과발현된 *E. coli* SGJS04, *E. coli* SGJS05와 *E. coli* SGJS06에서는 슈도모나스 에어루지노사의 *accA* 유전자가 포함되어 있는 *E. coli* SGJS04와 *E. coli* SGJS06에서 많이 증가된 것을 볼 수 있었고 *fabD* 유전자가 포함되어 있는 *E. coli* SGJS05에서 조금 덜 생산되어진 것이 확인되었다. 슈도모나스 에어루지노사의 *fabD* 유전자는 지방산을 생산하는데 있어 *accA*의 유전자보다 조금 저해를 받는 것으로 생각되었다. 본 발명에서 스트렙토코커스 피오지네스의 3.1.2.14를 암호화하는 유전자가 포함되어 있는 *E. coli* SGJS14의 지질이 가장 많이 증가 된 것을 확인 할 수 있었다. 따라서 본 발명에서 지방산이 합성되어지는데 3.1.2.14를 암호화하는 유전자가 매우 중요한 역할을 한다는 것을 확인하였다. 슈도모나스 에어루지노사의 유전자들과 스트렙토코커스 피오지네스의 유전자가 함께 발현되어지고 있는 *E. coli* SGJS17이 스트렙토코커스 피오지네스의 유전자 혼자 발현되었을 때 보다 지질 함량이 조금 적어지는 것을 확인 할 수 있었는데 이는 대장균에 다른 두 종의 유전자가 함께 발현되었기 때문 이라고 사료되어진다.

[0076] 실시예 7: 야생종 대장균과 재조합 대장균들의 세포내로부터의 지방산(fatty acid) 측정

[0077] 실시예 4의 조건으로 배양한 배양액 중 IPTG를 첨가한 후 6시간 후와 24시간 동안 세포양이 충분해 졌을 때 세포 내에 있는 지방산(fatty acid)을 측정하기 위해서 지방산 추출을 다음과 같은 방법으로 진행하였다. 추출과정은 5 단계로 나누어지며 첫 번째 과정 배양단계로 배양액 5 mL를 원심분리(4500 rpm, 10분)후 세포는 -80℃에 저장하였다. 두 번째 과정은 비누화(saponification) 단계로 저장된 재조합 세포들을 용액 1(NaOH 45g, MeOH 150 mL, deionized distilled water 150 mL) 1 mL을 넣고 5-10초간 볼텍싱 해주었다. 100℃에서 5분 동안 반응해준 뒤 다시 5-10초 동안 볼텍싱 해준 후 다시 100℃, 25분 반응시켜 준 뒤 열을 식혀주었다. 세 번째 과정은 메틸화(methylation)단계로, 용액 2(6N HCl 325 mL, MeOH 275 mL) 2 mL을 넣고 5-10초 동안 볼텍싱 해준 뒤 80℃에서 10분 동안 반응시켜주었다. 반응이 끝난 후에는 빨리 열을 식혀주었다. 네 번째 단계는 추출(extraction) 단계로, 용액 3(Hexane/Methyl tert-Butyl Ester=1/1) 1.25 mL을 첨가하고 10분간 위아래로 흔들어 준 뒤 층이 분리 되면 아래층은 추출해서 버렸다. 다섯 번째 단계는 GC로 분석을 용이하게 하기위해 세척단계로 앞 단계의 남은 상층액에 용액 4(NaOH 10.8 g, ddW 900 mL) 3 mL을 첨가해서 5분 동안 위아래로 흔들어 준 뒤 상층액을 추출하여 GC/MS로 분석하였다.

[0078] 본 발명에서 사용한 가스크로마토그래피 GC/MS는 5975 시리즈 MSD 및 아질런트 7890A이며 HP-5 칼럼(30m X

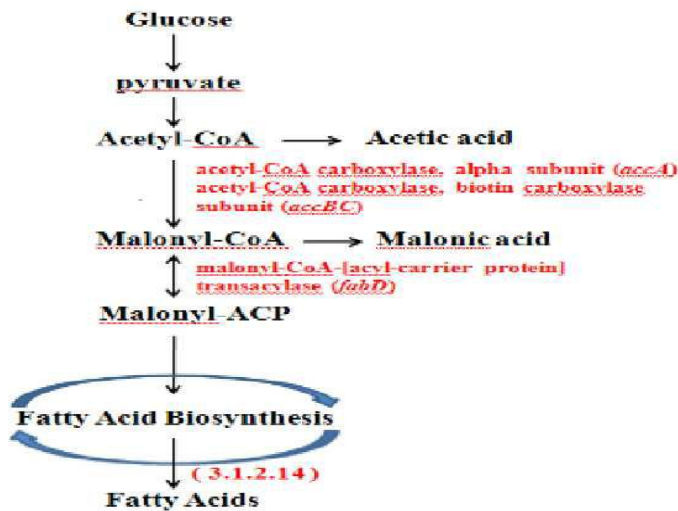
0.32 mm, film thickness 0.25)을 사용하였다. 이동상 가스는 헬륨(helium)을 사용하였다. 정량을 위해 지방산 메틸 에스테르 표준(fatty acid methyl ester standard)(F.A.M.E Mix, C8-C24, Sigma)을 사용하였다. 분석하기 위한 GC조건은 온도 프로그램 : 40℃ 5분, 분당 3℃로 220℃까지, 분당 3℃로 250℃까지, 그리고 250℃ 5분이었으며 MS 내부온도 160℃이었다.

[0079] 상기 예를 따라 지방산 함량 증진을 위해 형질전환 된 재조합 대장균 2종과 야생종 대장균의 지방산 추출 분석결과를 도 9, 도9 (a), 도9 (b) 그리고 도 10에서 보여주고 있다. 도 9, 에서는 지방산 추출 방법으로 추출된 여러 지방산 종류를 확인할 수 있었는데 (A) 헥사데카노산(도 9 (a)), (B) 옥타데카노산(도 9 (b)) 뿐만 아니라 9-헥사데카노산, 7-헥사데카노산, 헵타데카노산 그리고 9-옥타데카노산이 확인 되었다. 그러나 이들 중 가장 많이 생산 되어진 (A) 헥사데카노산, (B) 옥타데카노산은 표준 물질을 이용하여 정량되어 도 10에 나타내었다. 헥사데카노산은 탄소수 16개를 가졌고 옥타데카노산은 18개의 탄소수를 가진 지방산이다. 도 10은 IPTG 유도 6시간 후와 배양 24시간 결과 후의 지방산 추출 결과이다.

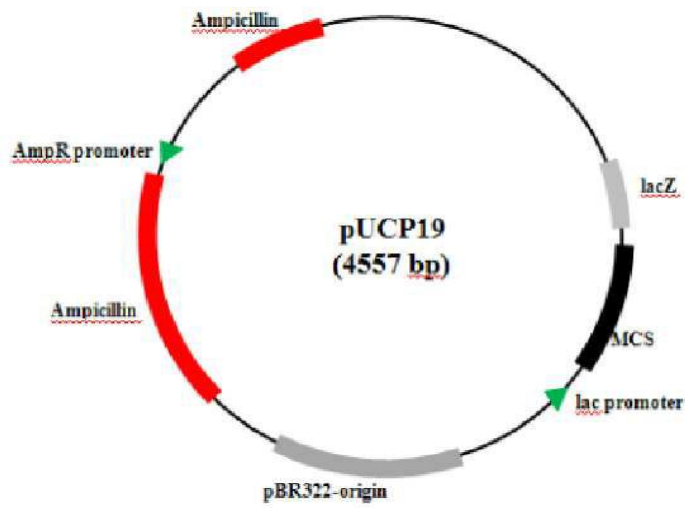
[0080] 그 결과, 개선되어진 재조합 이중 대장균들은 야생종보다 헥사데카노산과 옥타데카노산이 더 많이 생산 되는 것을 알 수 있었다. 대장균 지방산 생합성 경로에서 초기단계에 관여하는 슈도모나스 에어루지노사의 유전자가 삽입되어진 *E. coli* SGJS04, *E. coli* SGJS05, *E. coli* SGJS06에서는 IPTG가 유도되어진 후 6시간 후에는 야생종 대장균과 거의 비슷하게 지방산을 생산하였지만 스트렙토코커스 피오지네스의 아실(아실운반단백질)티오에스테라제를 인코딩하는 유전자가 삽입되어진 *E. coli* SGJS14와 *E. coli* SGJS17에서 헥사데카노산과 옥타데카노산이 모두 증가된 것을 확인 할 수 있었다. 배양시간이 오래 지속 되어졌을 때, 24시간 배양 하였을 때는 *E. coli* SGJS14와 *E. coli* SGJS17도 많이 증가됨과 동시에 *E. coli* SGJS06의 지방산이 가장 많이 증가된 것을 확인 할 수 있었다.

도면

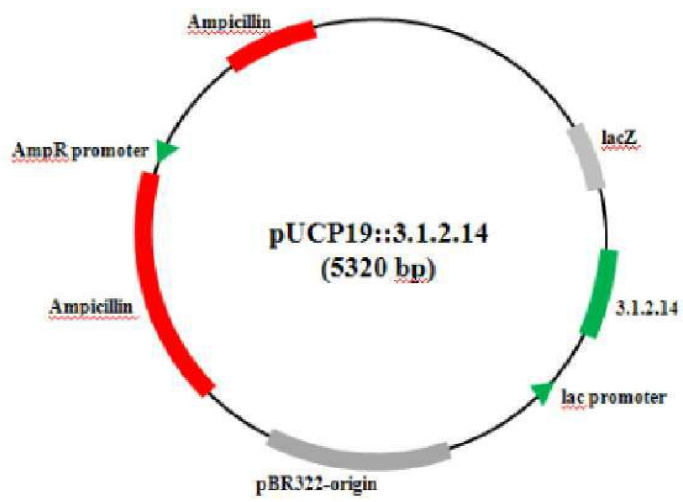
도면1



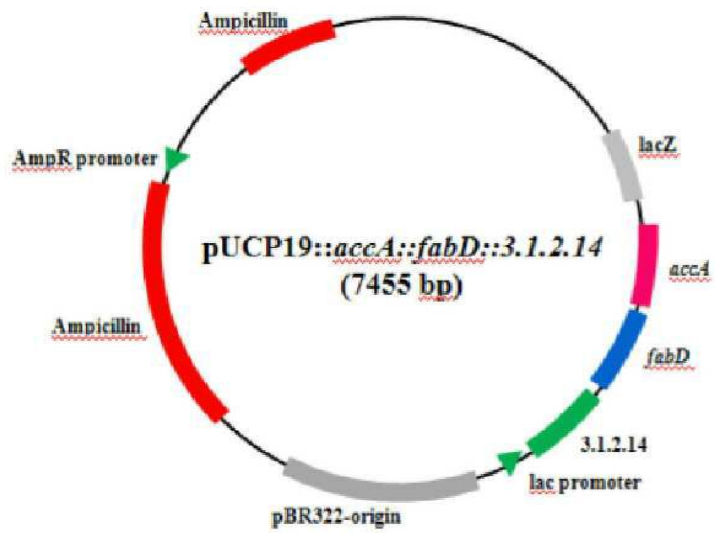
도면2



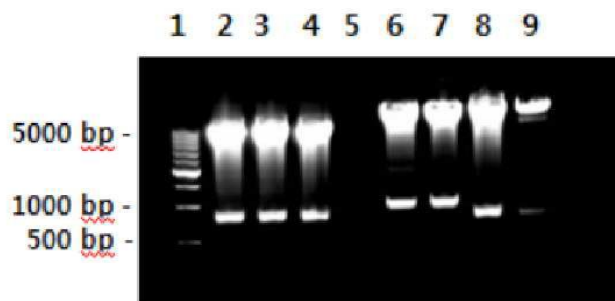
도면3



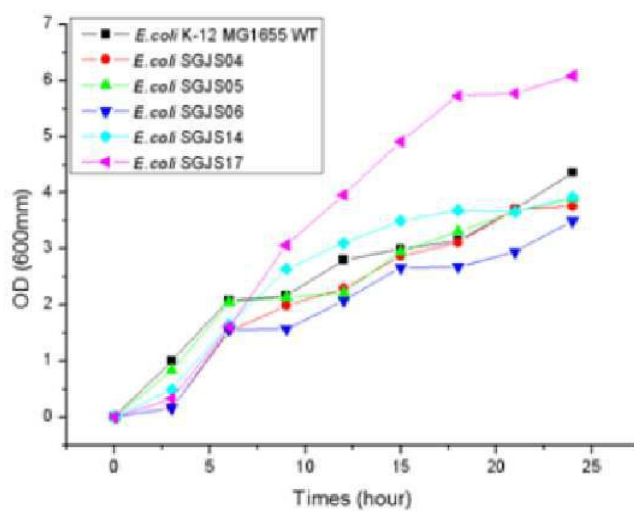
도면4



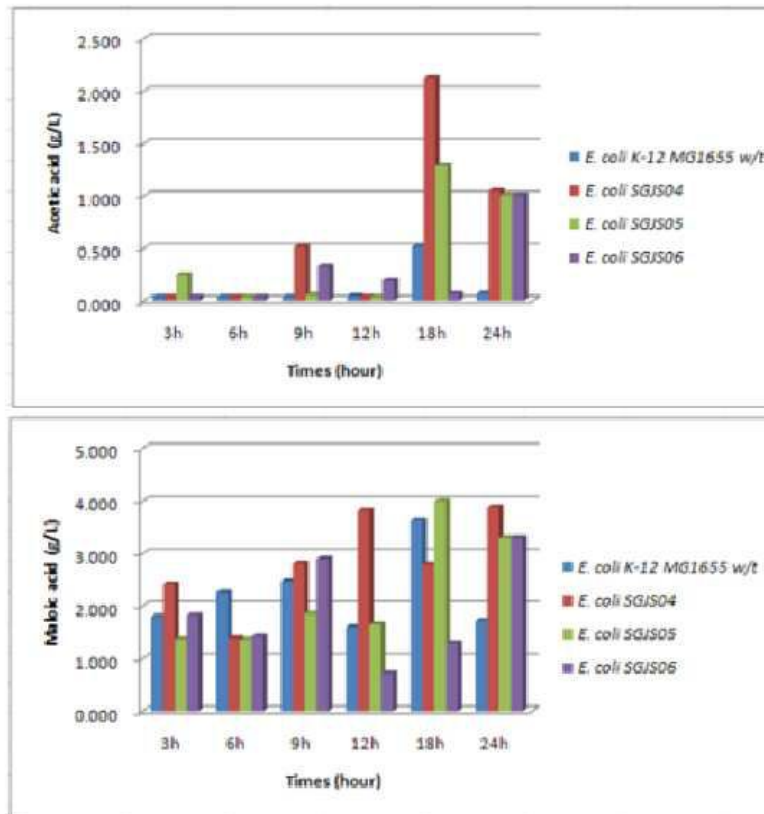
도면5



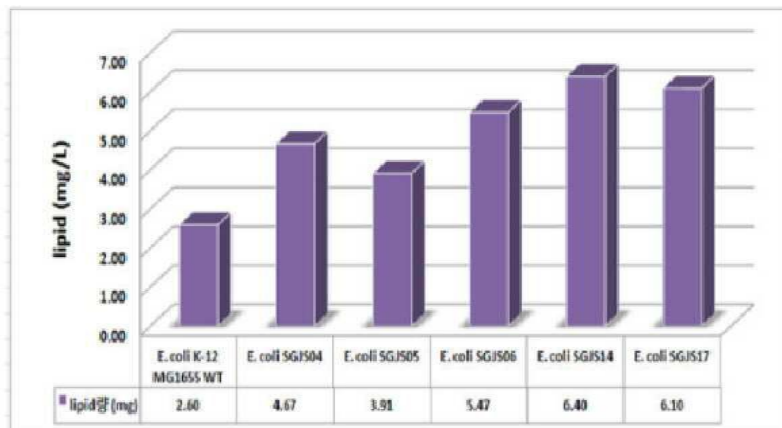
도면6



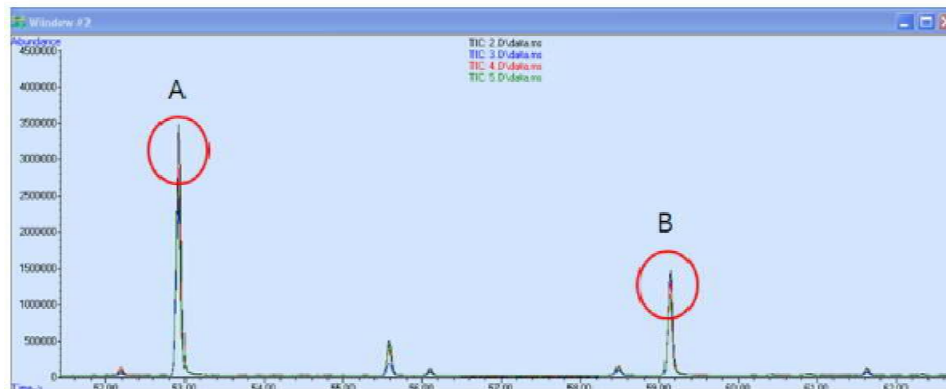
도면7



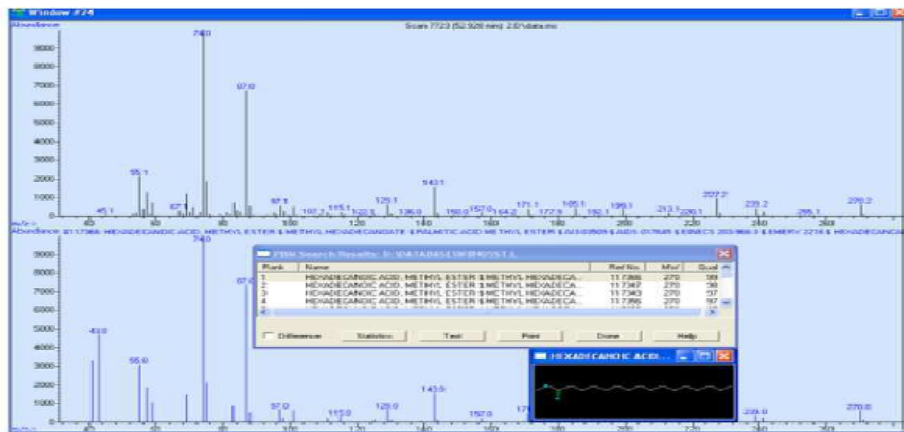
도면8



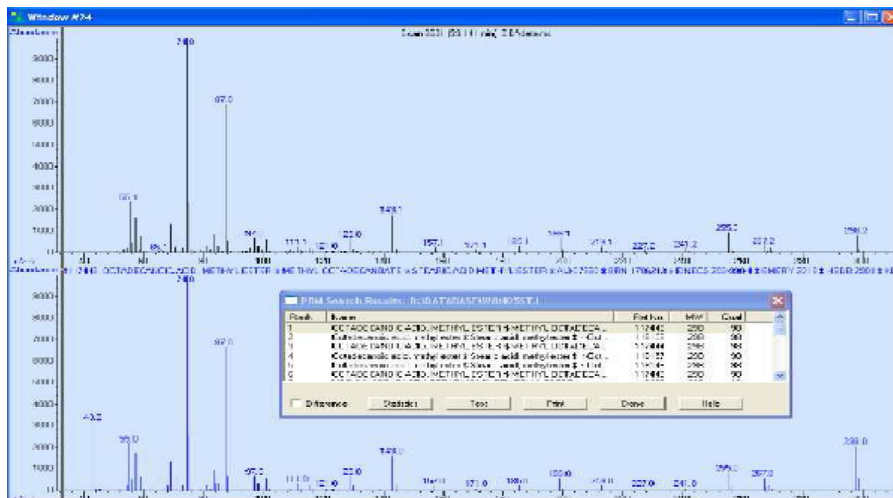
도면9



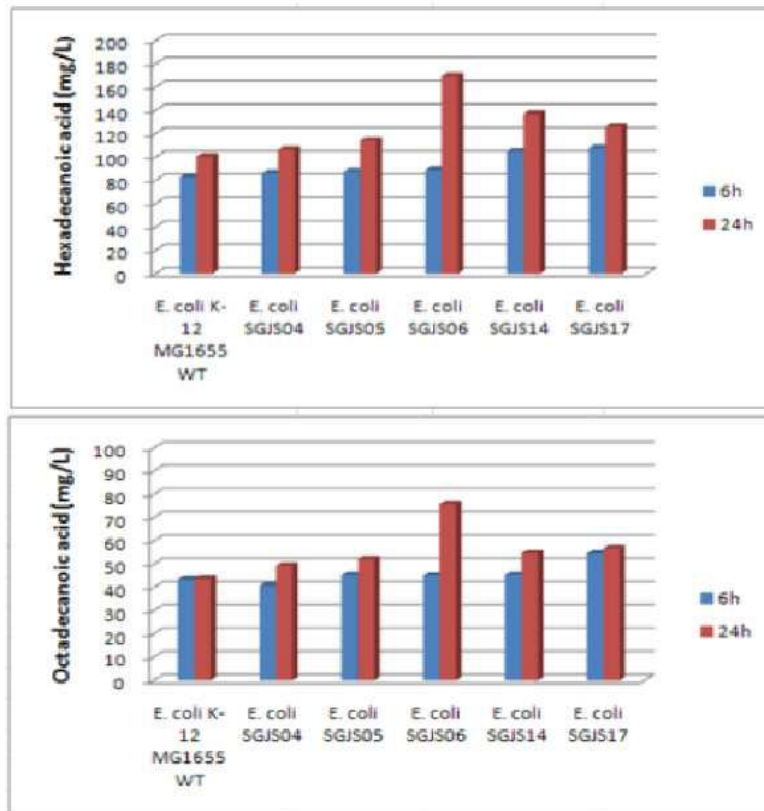
도면10



도면11



도면12



서열목록

- <110> Sogang University
- <120> Heterologous Escherichia coli strains for improving the content of fatty acids using fatty acid biosynthesis pathway and manufacturing method
- <160> 6
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
- <211> 316
- <212> PRT
- <213> Pseudomonas aeruginosa
- <400> 1

Met Asn Pro Asn Phe Leu Asp Phe Glu Gln Pro Ile Ala Asp Leu Gln

1 5 10 15

Ala Lys Ile Glu Glu Leu Arg Leu Val Gly Asn Asp Asn Ala Leu Asn

20 25 30

Ile Ser Asp Glu Ile Ser Arg Leu Gln Asp Lys Ser Lys Ala Leu Thr

35 40 45
 Glu Asn Ile Phe Gly Asn Leu Ser Ser Trp Gln Ile Ala Gln Leu Ala
 50 55 60
 Arg His Pro Lys Arg Pro Tyr Thr Leu Asp Tyr Ile Gly Tyr Leu Phe
 65 70 75 80
 Ser Asp Phe Glu Glu Leu His Gly Asp Arg His Phe Ala Asp Asp Pro
 85 90 95

 Ala Ile Val Gly Gly Val Ala Arg Leu Asp Gly Ser Pro Val Met Val
 100 105 110
 Ile Gly His Gln Lys Gly Arg Glu Val Arg Glu Lys Val Arg Arg Asn
 115 120 125
 Phe Gly Met Pro Arg Pro Glu Gly Tyr Arg Lys Ala Cys Arg Leu Met
 130 135 140
 Glu Met Ala Glu Arg Phe Lys Met Pro Ile Leu Thr Phe Ile Asp Thr
 145 150 155 160
 Pro Gly Ala Tyr Pro Gly Ile Asp Ala Glu Glu Arg Gly Gln Ser Glu

 165 170 175
 Ala Ile Ala Trp Asn Leu Arg Val Met Ala Arg Leu Lys Thr Pro Ile
 180 185 190
 Ile Ala Thr Val Ile Gly Glu Gly Gly Ser Gly Gly Ala Leu Ala Ile
 195 200 205
 Gly Val Cys Asp Gln Leu Asn Met Leu Gln Tyr Ser Thr Tyr Ser Val
 210 215 220
 Ile Ser Pro Glu Gly Cys Ala Ser Ile Leu Trp Lys Thr Ala Glu Lys
 225 230 235 240

 Ala Pro Glu Ala Ala Glu Ala Met Gly Ile Thr Ala Glu Arg Leu Lys
 245 250 255
 Gly Leu Gly Ile Val Asp Lys Val Ile Asp Glu Pro Leu Gly Gly Ala
 260 265 270
 His Arg Asp Pro Ala Ser Met Ala Glu Ser Ile Arg Gly Glu Leu Leu
 275 280 285
 Ala Gln Leu Lys Met Leu Gln Gly Leu Glu Met Gly Glu Leu Leu Glu

290	295	300	
Arg Arg Tyr Asp Arg Leu Met Ser Tyr Gly Ala Pro			
305	310	315	
<210>	2		
<211>	951		
<212>	DNA		
<213>	Pseudomonas aeruginosa		
<400>	2		
atgaaccgca acatttcttga ttctgaacag ccgatcgccg acctgcaagc caagatcgaa		60	
gagctgcgcc tgggtgggcaa cgacaatgcg ctgaacatca gcgacgaaat ctgcgctctg		120	
caggacaaga gcaaggcgct caccgaaaac atcttcggca atctgtccag ttggcagatc		180	
gcccagctcg cgcgccatcc caagcgctcc tataccctcg actacatcgg ctacctgttc		240	
agcgatttcg aggaactgca cggcgaccgg catctcgccg acgacccggc gatcgtcggc		300	
ggcgttgccc gcctcgacgg ttccccggtg atggtcatcg gccaccagaa gggccgcgaa		360	
gtccgtgaga aggtccggcg caacttcggc atgccgcgtc cggaaggcta tcgcaaggcc		420	
tgccgcctga tggaatggc cgaacgcttc aagatgccga tccitacctt catcgacacg		480	
cccggcgctt acccggggat cgatgccgag gaacgcggcc agagcgaggc gatcgcttgg		540	
aacctgcggg tgatggcgcg actgaagacg ccgatcatcg ccaccgtgat cggcgagggc		600	
ggttcggcgg gcgcgctggc catcggtgtc tgcgaccagt tgaacatgct gcaatactcc		660	
acctattcgg tgatctcgcc ggaaggctgc gcctccatcc tctggaagac cgccgagaag		720	
gcgccggaag ccgccgaggc catgggcatc accgccgagc gccigaaagg cctgggcatc		780	
gtcgacaagg tcatcgacga accgttgggc ggcgcccatc gcgatccggc gagcatggcc		840	
gaatcgatcc gtggcgaact gctggcgcaa ctgaagatgc tccagggcct ggaaatgggt		900	
gagttgctgg agcgtcgta cgaccgcctg atgagctacg gcgcgccgta a		951	
<210>	3		
<211>	312		
<212>	PRT		
<213>	Pseudomonas aeruginosa		
<400>	3		
Met Ser Ala Ser Leu Ala Phe Val Phe Pro Gly Gln Gly Ser Gln Ser			
1	5	10	15

Leu Gly Met Leu Ala Glu Leu Gly Ala Gln Gln Ala Leu Val Arg Asp
 20 25 30
 Thr Phe Ala Glu Ala Ser Glu Ala Leu Gly Tyr Asp Leu Trp Ala Leu
 35 40 45
 Val Gln Asn Gly Pro Glu Glu Arg Leu Asn Gln Thr Asp Lys Thr Gln
 50 55 60
 Pro Ala Ile Leu Thr Val Ser Ile Ala Leu Trp Arg Leu Trp Leu Ala
 65 70 75 80
 Glu Gly Gly Ala Arg Pro Ala Phe Val Ala Gly His Ser Leu Gly Glu
 85 90 95
 Tyr Ser Ala Leu Val Ala Ala Glu Ser Leu Ala Phe Ala Asp Ala Val
 100 105 110
 Lys Leu Val Glu Arg Arg Gly Gln Leu Met Gln Gln Ala Val Pro Ala
 115 120 125
 Gly Gln Gly Gly Met Ala Ala Ile Leu Gly Leu Glu Asp Ala Asp Val
 130 135 140
 Leu Ala Ala Cys Ala Glu Ala Ala Gln Gly Glu Val Val Ser Ala Val
 145 150 155 160
 Asn Phe Asn Ala Pro Gly Gln Val Val Ile Ala Gly Ala Ala Ala Ala
 165 170 175
 Val Glu Arg Ala Ile Glu Ala Cys Lys Ala Arg Gly Ala Lys Arg Ala
 180 185 190
 Val Ala Leu Pro Val Ser Val Pro Ser His Cys Glu Leu Met Arg Pro
 195 200 205
 Ala Ala Glu Gln Phe Ala Ala Ser Val Glu Ser Leu Gln Trp Gln Ala
 210 215 220
 Pro Lys Ile Ser Leu Val Gln Asn Val Ser Ala Ala Val Pro Ala Asp
 225 230 235 240
 Leu Asp Thr Leu Arg Arg Asp Leu Leu Ala Gln Leu Tyr Ser Pro Val
 245 250 255
 Arg Trp Val Glu Ser Ile Gln Leu Leu Ala Glu Lys Gly Val Thr Glu
 260 265 270

Leu Val Glu Cys Gly Pro Gly Lys Val Leu Ala Gly Leu Asn Arg Arg

275 280 285

Cys Ala Lys Gly Ile Asn Thr His Gly Leu Asp Gly Val Glu Ala Phe

290 295 300

Ala Ala Thr Arg Ala Ala Leu Ala

305 310

<210> 4

<211> 939

<212> DNA

<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 4

atgtctgcat cctcgcatt cgtcttcct ggccagggtt cgcaatcct cggcatgctg 60
gccgagctgg gcgcccagca ggcgctggtg cgcgatacct tcgccgaggc ctccgaggcg 120
ctcggttacg acctttgggc gctggtccag aatggtcctg aagagcgcct gaaccagacc 180
gacaagacc agccggccat ccttacggtt tcgatcgcgc tctggcgctt ctggctggcc 240
gagggcggtg cgcgcccggc gttcgtcgcc gggcacagcc tgggcgaata ttccgcgctg 300

gtcgcggccg aaagcctggc gttcgccgat gcggtcaagc tggtcgagcg taggggccaa 360
ctgatgcagc agcggttcc ggcggggcag ggcgcatgg ccgcgacatc tggcctggaa 420
gacgccgatg tattggcggc ctgtgccgag gcggcccagg gcgaggtggt cagcgcggtc 480
aacttcaacg cgccggggca ggtagtgatc gccggtgccg cggctgccgt tgagcgtgcc 540
atcgaggcat gcaaggcacg cggcgccaag cgcgcggtgg cgttgccagt cagcgtgccg 600
tcgcattgca aactgatgca tccggccgcc gagcagttcg ccgcctcggt cgaaagcctg 660
cagtggcagg cgccgaagat ttcgtggtg cagaacgtca gcgcgccgt gccggtgat 720

ctcgatacgc tcgcccgcga cctgtggca cagctgtaca gcccgttcg ctgggtggag 780
agcatccagc tctggcgga aaagggcgtc accgagctgg tcgagtgcgg gccgggcaag 840
gtcctggcag gcctcaacag gcgctgcgcg aaggcatca ataccatgg cctggatggc 900
gtcgaggcgt tcgccccac gcgcgccgc ctggcctga 939

<210> 5

<211> 254

<212> PRT

<213> Streptococcus pyogenes

<400> 5

Met Pro Tyr Lys Gly Tyr Leu Ile Asp Leu Asp Gly Thr Ile Tyr Gln
1 5 10 15

Gly Lys Asn Arg Ile Pro Ala Gly Glu Arg Phe Ile Lys Arg Leu Gln
20 25 30

Glu Lys Gly Ile Pro Tyr Leu Leu Val Thr Asn Asn Thr Thr Arg Thr
35 40 45

Pro Ala Met Val Gln Ser Met Leu Ala Asn Gln Phe Asn Val Glu Thr
50 55 60

Gly Ile Glu Thr Ile Tyr Thr Ala Thr Met Ala Thr Val Asp Tyr Met
65 70 75 80

Asn Asp Met Asn Arg Gly Lys Thr Ala Tyr Val Ile Gly Glu Thr Gly
85 90 95

Leu Lys Ser Ala Ile Ala Ala Ala Gly Tyr Val Glu Glu Leu Glu Asn
100 105 110

Pro Ala Tyr Val Val Val Gly Leu Asp Ser Gln Val Thr Tyr Glu Met
115 120 125

Leu Ala Ile Ala Thr Leu Ala Ile Gln Lys Gly Ala Leu Phe Ile Gly
130 135 140

Thr Asn Pro Asp Leu Asn Ile Pro Thr Glu Arg Gly Leu Met Pro Gly
145 150 155 160

Ala Gly Ala Leu Asn Ala Leu Leu Glu Ala Ala Thr Arg Val Lys Pro
165 170 175

Val Phe Ile Gly Lys Pro Asn Ala Ile Ile Met Asn Lys Ser Leu Glu
180 185 190

Val Leu Gly Ile Gln Arg Ser Glu Ala Val Met Val Gly Asp Asn Tyr
195 200 205

Leu Thr Asp Ile Met Ala Gly Ile Gln Asn Asp Ile Ala Thr Ile Leu
210 215 220

Val Thr Thr Gly Phe Thr Arg Pro Glu Glu Val Pro Thr Leu Pro Ile
225 230 235 240

Gln Pro Asp His Val Leu Ser Ser Leu Asp Glu Trp Arg Leu

	245	250	
<210>	6		
<211>	753		
<212>	DNA		
<213>	Streptococcus pyogenes		
<400>	6		
atgggattaa gttatcagga ggagttgaca cttccttttg aattatgtga tgtcaaatca		60	
gataataaat tgccccctttt attagactat tgtttgatgg tttctggttag acagtctgcg		120	
caattaggac gaagtaacaa caacctttta gtcgattaca agcttgtttg gattgtaacg		180	
gattatgaga tcactattca tcgcttgcca cattttcaag aaaccatcac cattgaaaca		240	
aaagcccttt cciataataa atttttttgt tatcgccaat tttatattta tgatcaagag		300	
gggggtcttt tagtggatat cttagectat ttgctttgt taaaccaga tacgcgaaaa		360	
gtggcaacta ttccagaaga tttagtagcg ccttttaaga ctgattttgt taaaaagtta		420	
taccgtgttc ctaaaatgcc tcttttagaa caatcaattg atcgtgatta ttatgtgcgt		480	
tattttgata ttgatatgaa tggatcatgtc aacaacagta aatatttaga ttggatgtat		540	
gatgtgttgg ggtgtgcgtt tttaaaaacg catcagcctc ttaagatgac ttigaaatat		600	
gttaaagaag tctcaccagg cgggtcaaatt acttccagtt accatttgga ccaattaaat		660	
tcttaccatc aaatcacctc agatgggcag ctgaatgccc aagccatgat tgaatggcga		720	
gcgattaaac aaacagaaag cgagatagac tag		753	