

|                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  <b>(19) 대한민국특허청(KR)</b><br><b>(12) 공개특허공보(A)</b>                                                                                                                | <b>(11) 공개번호</b> 10-2012-0104765<br><b>(43) 공개일자</b> 2012년09월24일                                                                                                                                                                                                                                          |
| <b>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)</b><br><i>C12N 1/21</i> (2006.01) <i>C12N 15/74</i> (2006.01)<br><i>C12N 15/31</i> (2006.01) <i>C12P 7/16</i> (2006.01)<br><b>(21) 출원번호</b> 10-2011-0022372<br><b>(22) 출원일자</b> 2011년03월14일<br><b>심사청구일자</b> 2011년03월14일 | <b>(71) 출원인</b><br><b>서강대학교산학협력단</b><br>서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)<br><b>고려대학교 산학협력단</b><br>서울 성북구 안암동5가 1<br><b>(72) 발명자</b><br><b>이진원</b><br>서울특별시 송파구 양재대로 1218, 올림픽선수 기<br>자촌아파트 201-1601호 (방이동)<br><b>오민규</b><br>서울특별시 강남구 압구정동 신현대APT 104동 60<br>5호<br>(뒷면에 계속)<br><b>(74) 대리인</b><br><b>양부현</b> |

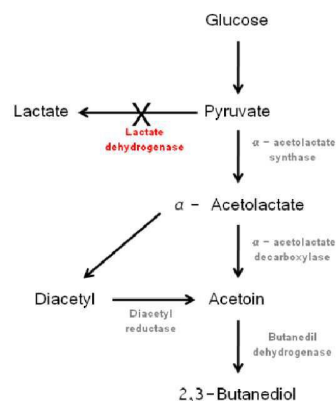
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 2, 3-부탄다이올 생산량 향상을 위한 락테이트 디하이드로젠에이즈가 제거 된 돌연변이 엔테로박터 에어로진스

### (57) 요약

본 발명은 2,3-부탄다이올 생성능이 향상된 락테이트 디하이드로젠에이즈 유전자가 제거된 엔테로박터 에어로진스(*enterobacter aerogenes*) 균주를 제공한다. 본 발명의 균주는 야생형 엔테로박터 에어로진스에 비해서 현저히 높은 2,3-부탄다이올을 생산할 수 있는 장점을 제공한다. 따라서 본 발명의 균주를 이용할 경우, 화석연료로부터 생산되어지는 2,3-부탄다이올에 비해 친환경적이고 경제적인 대체에너지 수단으로써 사용될 수 있음이 기대된다.

### 대표도 - 도1



(72) 발명자

**정무영**

서울특별시 성북구 개운사길 75-6, 백산빌라 201호  
(안암동5가)

**황천유**

서울특별시 동대문구 무학로44길 47-9, TF (제기동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 10035578

부처명 지식경제부

연구사업명 산업원천기술개발사업

연구과제명 2,3-부탄다이올 생산용 균주 발굴 및 대사회로 최적화 기술 개발

주관기관 서강대학교 산학협력단

연구기간 2010.04.01 ~ 2011.03.31

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

2,3-부탄다이올 생성능이 향상된 락테이트 디하이드로겐에이즈 유전자가 제거된 *엔테로박터 에어로진스* (*enterobacter aerogenes*) 균주.

### 청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 *엔테로박터 에어로진스*는 기탁번호 KCTC 2190인 것을 특징으로 하는 균주.

### 청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 *엔테로박터 에어로진스*는 배지조성 pH 5에서 2,3-부탄다이올 생성능이 10-15 g/l인 것을 특징으로 하는 균주.

### 청구항 4

(a) *엔테로박터 에어로진스*의 락테이트 디하이드로겐에이즈 유전자의 플랭킹 서열(flanking sequence); 및 (b) FRT-카나마이신-FRT 카세트를 포함하는 유전자 제거용 벡터.

### 청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 유전자 제거용 벡터는 *엔테로박터 에어로진스* 스트레인에 적용되는 것을 특징으로 하는 유전자 제거용 벡터.

### 청구항 6

제 4 항에 있어서, 상기 유전자 제거용 벡터는 *엔테로박터 에어로진스*의 락테이트 디하이드로겐에이즈 유전자 단편의 플랭킹 서열(flanking sequence)과 상동적인 서열과 염색체 상의 상기 *엔테로박터 에어로진스*의 락테이트 디하이드로겐에이즈 유전자 단편 간의 상동재조합(homologous recombination)을 통해 유전자를 제거하는 것을 특징으로 하는 유전자 제거용 벡터.

### 청구항 7

다음의 단계를 포함하는 2,3-부탄다이올 생성능이 향상된 *엔테로박터 에어로진스*(*enterobacter aerogenes*) 균주의 제조방법:

(a) 상기 제 4 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항의 유전자 제거용 벡터를 *엔테로박터 에어로진스*에 형질전환하여 락테이트 디하이드로겐에이즈 유전자를 제거하는 단계; 및

(b) 상기 단계 (a)의 락테이트 디하이드로겐에이즈 유전자가 제거된 *엔테로박터 에어로진스*를 선별하는 단계.

### 청구항 8

제 7 항에 있어서, 상기 형질전환은 전기천공법을 이용하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 9

제 7 항에 있어서, 상기 단계 (b)의 락테이트 디하이드로겐에이즈 유전자가 제거된 *엔테로박터 에어로진스*를 선별하는 마커는 카르베니실린, 클로로암페니콜 및 카나마이신으로 구성된 군으로부터 선택된 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 10

상기 제 7 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항의 방법으로 제조된 *엔테로박터 에어로진스* 균주.

#### 청구항 11

마그네슘 설페이트( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )를 0.1-0.5 g/L 포함하는 *엔테로박터 에어로진스* 균주 배양 배지.

#### 청구항 12

상기 제 11 항의 배지를 이용하여 *엔테로박터 에어로진스* 균주를 배양하는 방법.

#### 청구항 13

제 12 항에 있어서, 상기 *엔테로박터 에어로진스*는 야생형(wild type) 균주 또는 *엔테로박터 에어로진스*(KCTC 2190) 균주인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 14

제 12 항에 있어서, 상기 배양시 최적 pH는 상기 야생형 균주의 경우 4-6인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 15

제 12 항에 있어서, 상기 배양시 최적 pH는 상기 *엔테로박터 에어로진스*(KCTC 2190) 균주의 경우 6-8인 것을 특징으로 하는 방법.

### 명세서

#### 기술분야

[0001] 본 발명은 2, 3-부탄다이올 생산이 가능한 돌연변이 *엔테로박터 에어로진스*에 관한 것이다.

#### 배경기술

[0002] 2,3-부탄다이올은 대량 화학물질(bulk chemical)의 한 종류로써 다양한 바이오 공정을 통해 얻어진다. 또한 탈수소화 반응, 에스테르화 반응 등의 화학적 전환을 통해 1,3-부타디엔, 다이아세틸, 메틸 에틸 케톤과 같은 물질로 전환이 되며, 이 물질들은 고무의 재료, 연료 첨가제, 부동액, 화장품과 의약품까지 그 응용 범위가 매우 넓은 고부가 물질로 전환되어 질 수 있다.

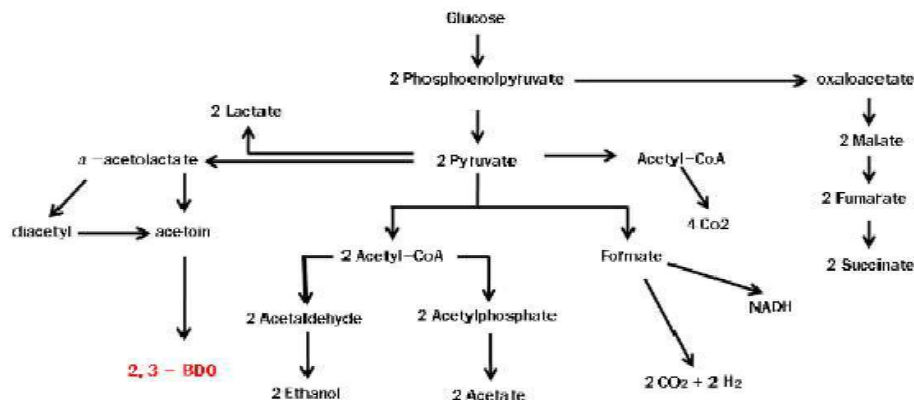
[0003] 바이오 공정에 의한 2,3-부탄다이올의 생산에 관한 연구는 반세기 전까지만 하더라도 활발히 이루어 졌으나, 석유를 이용한 전환이 가능해지면서 그 연구가 중단되었다. 하지만 현재 화석연료 사용에 따른 지구 온난화 가

스 배출 및 폐기물 대량 생산에 따른 환경오염이 인류에 심각한 위기를 초래하고 있다. 또한 석유의 고갈의 시점이 가까워지고 있으며 이에 따라 그 가격이 매우 높아지면서 다시 바이오 공정을 통한 2,3-부탄다이올 생산에 관한 연구에 많은 관심과 노력이 집중되고 있다.

[0004] 자연계에는 대사 과정을 통해 2,3-부탄다이올을 생성하는 여러 미생물이 존재한다. 대표적인 미생물로는 클렙시엘라 뉴모니에(*klebsiella pneumoniae*), 클렙시엘라 옥시토카(*klebsiella oxytoca*), 엔테로박터 에어로진스(*enterobacter aerogenes*) 등이다. 이러한 미생물들 중 본 발명에서 실험을 수행한 엔테로박터 에어로진스는 현재 수소 생성을 위한 미생물로 더 많은 관심을 받고 있으며, 2,3-부탄다이올 생산을 위한 연구는 미흡하다. 엔테로박터 에어로진스는 그람음성 막대균으로 호흡기나 피부, 조직에 감염을 일으키는 병원균이다. 비록 야생종의 엔테로박터 에어로진스의 경우 클렙시엘라 종에 비해 2,3-부탄다이올 생성은 낮지만 다른 장점을 지닌다. 첫째, 성장 속도가 빠르고 높은 성장을 보인다. 이러한 특성은 산업적으로 이용될 경우 빠른 대사 과정에 따른 빠른 대사 산물을 회득할 수 있는 장점을 지닌다. 둘째, 탄소원의 다양화가 가능하다. 현재 미생물을 이용한 2,3-부탄다이올 생성에는 탄소원으로 주로 글루코스(*glucose*)를 사용하고 있다. 하지만 엔테로박터 에어로진스의 경우 말토스(*maltose*), 자이로스(*zylose*), 글리세롤(*glycerol*) 등의 탄소원에서도 활발한 대사 과정을 유지하는 것으로 보고되었고, 특히 글리세롤의 이용이 매우 뛰어나다. 이러한 탄소원의 다양화는 바이오 공정에 있어 경제적인 부담을 줄일 수 있으므로 산업적으로 매우 적합한 미생물이라 할 수 있다.

[0005] 엔테로박터 에어로진스는 조건 혐기성 생물(*facultative anaerobe*)로써 산소의 존재 여부와 상관없이 생존할 수 있으며, 환경에 따라 다른 대사 과정을 사용하며 에너지를 생성한다. 따라서 산소의 접근성 여부에 따라 2,3-부탄다이올을 비롯한 대사산물의 생산은 변하게 된다. 이러한 산소의 접근성 외에도 온도와 pH 같은 배양 조건의 영향 역시 대사산물 생산에 큰 영향을 미친다. 또한 균의 대사 과정을 돕고 목표 대사산물의 생산량 향상을 위해 배지의 최적화 역시 반드시 필요한 과정이다. 미생물을 이용한 바이오 공정으로 대사산물을 생산하는 연구에는 이와 같은 접근이 활발히 이루어지고 있으며, 본 연구에서도 역시 pH 조절과 배지의 최적화를 통해 2,3-부탄다이올의 생산량을 향상시킬 수 있었다.

[0006] 대사공학적인 관점에서 미생물의 대사 경로와 역할을 이해하고 목표하는 대사산물의 향상을 위한 유전자 과 발현과 유전자 제거 방법은 이 분야에서 가장 중요하고 근본적인 접근이라 할 수 있다. 엔테로박터 에어로진스는 2,3-부탄다이올 뿐만 아니라 락테이트(*lactate*), 아세테이트(*acetate*), 숙신에이트(*succinate*) 등의 산과 에탄올, 수소 등을 대사 과정을 통해 생산한다. 2,3-부탄다이올 생산을 위해서는 보조 인자인 NADH와 pH의 변동, 그리고 미세호기성 조건이 주로 필요하다. 미세호기성 조건에서 엔테로박터 에어로진스를 배양시 2,3-부탄다이올 다음으로 락테이트가 주요 대사산물이며, 이것의 생산을 위해서 역시 NADH가 소모되고 생산된 락테이트는 배지를 산화시켜 균의 성장과, 2,3-부탄다이올 생산에 저해하는 역할을 한다. 따라서 본 연구에서는 2,3-부탄다이올 생산성 향상을 위해 레드 람다 재조합(*Red lambda recombination*) 방법을 적용시켜 엔테로박터 에어로진스의 락테이트 디하이드로젠에이즈 유전자 제거를 달성했으며, 앞서 설명한 pH의 조절과 배지의 최적화를 통해 야생종보다 뛰어난 2,3-부탄다이올 생산용 엔테로박터 에어로진스 균주(EJL)를 완성하였다.



[0007]

[0008] 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

- [0009] 본 발명자들은 2,3-부탄다이올 생성능이 향상된 균주를 개발하기 위해서 예의 연구 노력하였다. 그 결과 2,3-부탄다이올 생성 균주로 *엔테로박터 에어로진스(enterobacter aerogenes)*를 이용하고, 또한 상기 *엔테로박터 에어로진스* 균주에서 락테이트 디하이드로겐에이즈 유전자를 제거할 경우 2,3-부탄다이올 생성능이 현저히 향상된다는 사실을 발견하여 본 발명을 완성하였다.
- [0010] 따라서, 본 발명은 2,3-부탄다이올 생성능이 향상된 *엔테로박터 에어로진스(enterobacter aerogenes)* 균주를 제공한다.
- [0011] 또한, 본 발명은 상기 균주를 제조하는데 필요한 벡터를 제공한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 상기 균주의 제조방법을 제공한다.
- [0013] 또한, 본 발명은 상기 균주를 배양하는 배지를 제공한다.
- [0014] 마지막으로, 본 발명은 상기 균주를 배양하는 배지를 이용하여 상기 균주를 배양하는 방법을 제공한다.

### 과제의 해결 수단

- [0015] 본 발명자들은 2,3-부탄다이올 생성능이 향상된 균주를 개발하기 위해서 예의 연구 노력하였다. 그 결과 2,3-부탄다이올 생성 균주로 *엔테로박터 에어로진스(enterobacter aerogenes)*를 이용하고, 또한 상기 *엔테로박터 에어로진스* 균주에서 락테이트 디하이드로겐에이즈 유전자를 제거할 경우 2,3-부탄다이올 생성능이 현저히 향상된다는 사실을 확인하였다.
- [0016] 본 발명은 2,3-부탄다이올 생성능이 향상된 *엔테로박터 에어로진스(enterobacter aerogenes)* 균주를 제공한다.
- [0017] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 2,3-부탄다이올 생성능이 향상된 락테이트 디하이드로겐에이즈 유전자가 제거된 *엔테로박터 에어로진스(enterobacter aerogenes)* 균주를 제공한다.
- [0018] 본 명세서에서 용어 “2,3-부탄다이올”은 대량 화학물질(bulk chemical)의 한 종류로써 다양한 바이오 공정을 통해 얻어지며, 또한 탈수소화 반응, 에스테르화 반응 등의 화학적 전환을 통해 1,3-부타디엔, 다이아세틸, 메틸 에틸 케톤과 같은 물질로 전환이 되며, 이 물질들은 고무의 재료, 연료 첨가제, 부동액, 화장품과 의약품까지 그 응용 범위가 매우 넓은 고부가 물질로 전환되어 질 수 있는 물질을 말한다.
- [0019] 본 명세서에서의 용어 “락테이트 디하이드로겐에이즈”는 트리오스 포스페이트 아이소머레이즈(triose-phosphate isomerase)서, 해당과정에서 파이루베이트(pyruvate)를 NADH로 환원하여 락테이트(lactate)로 변환하는 효소를 말하며, 이용된 NADH는 NAD<sup>+</sup>를 생성한다.
- [0020] 본 명세서에서의 용어 “락테이트 디하이드로겐에이즈 유전자”는 상기 락테이트 디하이드로겐에이즈 효소를 인코딩하는 핵산 분자를 말한다.
- [0021] 본 명세서에서 용어 “핵산 분자”는 DNA (gDNA 및 cDNA) 그리고 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 가지며, 핵산 분자에서 기본 구성 단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체 (analogue)도 포함한다(Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, Chemical Reviews, 90:543-584(1990)).
- [0022] 상기 뉴클레오타이드의 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. Biol.* 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.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_help.html)에서 확인할 수 있다.

[0023] 본 발명의 바람직한 양태에 따르면, 상기 *엔테로박터 에어로진스*는 바람직하게는 기탁번호 KCTC 2190인 것을 특징으로 하는 균주이다. 상기 기탁번호 KCTC 2190 균주는 pH 5 배지조성에서 2,3-부탄다이올 생성능이 10-15 g/l를 나타내어, 기존의 야생형 *엔테로박터 에어로진스*에 비해 탁월한 2,3-부탄다이올 생산능을 보여준다.

[0024] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) *엔테로박터 에어로진스*의 락테이트 디하이드로겐에이즈 유전자의 플랭킹 서열(flanking sequence); 및 (b) FRT-카나마이신-FRT 카세트를 포함하는 유전자 제거용 벡터를 제공한다. 본 발명의 상기 *엔테로박터 에어로진스*(KCTC 2190)를 개발하기 위해서는 필연적으로 *엔테로박터 에어로진스*의 락테이트 디하이드로겐에이즈 유전자를 제거할 필요가 있는데, 본 발명의 상기 벡터를 이용하여 상기 유전자를 제거할 수 있다는 점에서 본 발명의 벡터는 중요하다.

[0025] 본 발명에 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.

[0026] 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.

[0027] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 벡터는 바람직하게는 *엔테로박터 에어로진스* 스트레인에 적용될 수 있다.

[0028] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 벡터는 *엔테로박터 에어로진스*의 락테이트 디하이드로겐에이즈 유전자 단편의 플랭킹 서열(flanking sequence)과 상동적인 서열과 염색체 상의 상기 *엔테로박터 에어로진스*의 락테이트 디하이드로겐에이즈 유전자 단편 간의 상동재조합(homologous recombination)을 통해 유전자를 제거한다.

[0029] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 락테이트 디하이드로겐에이즈 유전자와 상기 FRT-카나마이신-FRT 카세트의 상동재조합이 발생된 것이 확인된 *엔테로박터 에어로진스*에서 다른 유전자 제거를 위해 FRT 사이트 사이의 항 의약(anti drug)을 제거한다. 상기 항 의약의 제거시 pCP20 벡터를 이용하는데, pCP20 벡터는 FLP라는 효소를 발현하고, 이 효소는 FRT 사이트를 인식하여 FRT 사이트 사이의 항 의약(anti drug)을 제거하는 역할을 한다.

[0030] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 상기 유전자 제거용 벡터를 *엔테로박터 에어로진스*에 형질전환하여 락테이트 디하이드로겐에이즈 유전자를 제거하는 단계; 및 (b) 상기 단계 (a)의 락테이트 디하이드로겐에이즈 유전자가 제거된 *엔테로박터 에어로진스*를 선별하는 단계를 포함하는 2,3-부탄다이올 생성능이 향상된 *엔테로박터 에어로진스*(*enterobacter aerogenes*) 균주의 제조방법 및 상기 방법에 의해 제조된 균주를 제공한다.

[0031] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 벡터를 *엔테로박터 에어로진스*(*enterobacter aerogenes*) 균주 내로 운반하는 방법은, 바람직하게는 CaCl<sub>2</sub> 방법(Cohen, S.N. et al., Proc. Natl. Acac. Sci. USA, 9:2110-2114(1973)), 하나한 방법(Cohen, S.N. et al., Proc. Natl. Acac. Sci. USA, 9:2110-2114(1973); 및 Hanahan, D., J. Mol. Biol., 166:557-580(1983)) 및 전기천공방법(Dower, W.J. et al., Nucleic. Acids Res., 16:6127-6145(1988)) 등에 의해 실시될 수 있고, 보다 바람직하게는 하나한 방법 및 전기천공방법에 의해 실시될 수 있으며, 가장 바람직하게는 전기천공방법에 의해 실시될 수 있다. 상기 전기천공방법에 의한 형질전환시 1800-2200 v의 전압을 사용하는 것이 가장 바람직하다.

[0032] 본 발명의 *엔테로박터 에어로진스*(KCTC 2190) 균주는 상기 방법에 의해 유래된 것이기 때문에, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.



- [0033] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 마그네슘 설페이트( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )를 0.1-0.5 g/L 포함하는 *엔테로박터 에어로진스* 균주 배양 배지 및 상기 배지를 이용하여 *엔테로박터 에어로진스* 균주를 배양하는 방법을 제공한다.
- [0034] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 *엔테로박터 에어로진스* 균주는 바람직하게는 야생형(wild type) 균주 또는 *엔테로박터 에어로진스*(KCTC 2190) 균주에 이용될 수 있다.
- [0035] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 야생형(wild type) 균주 배양시 최적 pH는 바람직하게는 6-8이고 가장 바람직하게는 7이다.
- [0036] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 *엔테로박터 에어로진스*(KCTC 2190) 균주 배양시 최적 pH는 바람직하게는 4-6이고 가장 바람직하게는 5이다.
- [0037] 상기 범위의 pH에서 야생형 균주 및 *테로박터 에어로진스*(KCTC 2190) 균주는 가장 높은 2,3-부탄다이올 생성능을 나타냈다.

### 발명의 효과

- [0038] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0039] (a) 본 발명은 2,3-부탄다이올 생성능이 향상된 락테이트 디하이드로젠에이즈 유전자가 제거된 *엔테로박터 에어로진스*(*enterobacter aerogenes*) 균주를 제공한다.
- [0040] (b) 본 발명의 균주는 야생형 *엔테로박터 에어로진스*에 비해서 현저히 높은 2,3-부탄다이올을 생산할 수 있는 장점을 제공한다.
- [0041] (c) 본 발명의 균주를 배양하는 배지를 이용할 경우 기존의 배지에서 상기 균주를 배양하는 것에 비해 현저히 높은 2,3-부탄다이올을 생산할 수 있는 장점을 제공한다.
- [0042] (d) 본 발명의 균주를 이용할 경우, 화석연료로부터 생산되어지는 2,3-부탄다이올에 비해 친환경적이고 경제적인 대체에너지 수단으로써 사용될 수 있음이 기대된다.

### 도면의 간단한 설명

- [0043] 도 1은 *엔테로박터 에어로진스* 생체 내에서 포도당에서부터 2,3-부탄다이올과 락테이트까지의 대사 과정을 보여주는 도식이다.
- 도 2는 배지의 최적화가 *엔테로박터 에어로진스*의 성장과 2,3-부탄다이올 생산에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.
- 도 3는 최적화된 배지에서 pH의 변화 (pH5, 6, 7, 8)에 따른 야생종 *엔테로박터 에어로진스*의 성장과 2,3-부탄다이올을 비롯한 대사산물의 변화를 나타낸 그래프이다.
- 도 4는 최적화된 배지에서 pH의 변화 (pH5, 6, 7, 8)에 따른 돌연변이 *엔테로박터 에어로진스*의 성장과 2,3-부탄다이올을 비롯한 대사산물의 변화를 나타낸 그래프이다.
- 도 5는 세포내 형질전환을 위해 사용된 전기천공법을 사용하여 형질전환된 pQE-80L 벡터의 전기영동 사진이다. 레인 1: 사이즈마커, 레인2 : 1500v에서 형질전환, 레인 3 : 1800v에서 형질전환, 레인 4 : 2100v에서 형질전환.
- 도 6는 2100v의 전기천공법으로 형질전환된 pACYCDuet 벡터가 *엔테로박터 에어로진스*에서 anti drug 저항성을 가지는지 확인한 고체배지 사진이다. 좌 : pACYCDuet이 형질전환된 *엔테로박터 에어로진스*를 클로로암페니콜이 첨가된 LB고체배지에서 배양시킨 사진, 우 : 야생종의 *엔테로박터 에어로진스*를 클로로암페니콜이 첨가된 LB고체배지에서 배양시킨 사진.
- 도 7는 녹색형광 단백질을 pQE-80L, pET-28a, pACYCDuet-1 벡터에 삽입한 후 RFPC로 파장을 확인하고, 대장균과 *엔테로박터 에어로진스*의 발현정도를 비교한 그래프이다.
- 도 8는 락테이트 디하이드로젠에이즈 제거를 위해 사용된 재조합 효소 발현 벡터 pKM208의 도식화이다.
- 도 9는 락테이트 디하이드로젠에이즈 제거를 위해 선형 유전자 주형으로 사용되며 FRT site와 anti drug 를 가



지고 있는 pKD4의 도식화이다.

도 10는 야생종과 락테이트 디하이드로겐에이즈 유전자가 제거된 엔테로박터 에어로진스를 확인한 전기영동 사진이다. 락테이트 디하이드로겐에이즈 유전자가 제거된 엔테로박터 에어로진스는 EJL이라 명명한다. 레인 1, 7, 13 : 사이즈마커, 레인 2, 8 : 야생종 확인을 위한 A와 B 프라이머로 콜로니 중합효소 연쇄 반응을 한 결과, 레인 3, 9 : 야생종 확인을 위한 C와 D 라이머로 콜로니 중합효소 연쇄 반응을 한 결과, 레인 4, 10 : 락테이트 디하이드로겐에이즈가 제거된 돌연변이 확인을 위한 A와 BK 라이머로 콜로니 중합효소 연쇄 반응을 한 결과, 레인 5, 11번 : 락테이트 디하이드로겐에이즈가 제거된 돌연변이 확인을 위한 CK와 D 라이머로 콜로니 중합효소 연쇄 반응을 한 결과, 레인 6, 12 : 공란.

도 11은 FRT-Kanmycin-FRT cassette이 제거된 배지 사진. 상 : 카나마이신이 12.5 mg/ml 포함된 LB 고체 배지에서 배양된 EJL, 중 : 항생제가 첨가되지 않은 LB 고체 배지에서 배양된 EJL, 하 : 카르베니실린이 400mg/ml 포함된 LB 고체 배지에서 배양된 EJL.

도 12는 엔테로박터 에어로진스의 대사 과정을 통해 생산되는 락테이트, 폴메이트, 숙신에이트, 아세테이트, 그리고 탄소 영양분인 글루코스 분석을 위한 HPLC 그래프이다.

도 13은 엔테로박터 에어로진스의 대사 과정을 통해 생산되는 1,2-프로판다이올, 1,3- 프로판다이올, 2,3-부탄다이올, 아세토인 분석을 위한 GC 그래프 이다.

도 14은 야생종과 락테이트 디하이드로겐에이즈가 제거된 돌연변이 엔테로박터 에어로진스가 배양 12시에서 추출한 대사산물 분석 그래프이다.(pH5)

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0044] 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.

### [0045] 실시예

#### [0046] 실시예 1: 배지 최적화가 엔테로박터 에어로진스에서 2,3-부탄다이올 생산에 미치는 영향 확인

[0047] 야생종의 엔테로박터 에어로진스(미생물자원센터, KCTC)를 37℃에서 글루코스가 20 g/l가 첨가된 50 mL의 LB(10 g/L tripton, 10 g/L NaCl, 5 g/L yeast extract)배지에서 키웠을 경우 OD<sub>600</sub> 4.5, 2,3-부탄다이올은 4.5 g/l의 생산량을 보였다. 먼저 2,3-부탄다이올의 생성이 약산성의 환경에서 생성되므로 포타슘 포스페이트와 소디움 포스페이트 버퍼를 사용하여 pH를 6.5로 유지하고 엔테로박터 에어로진스를 배양한 결과 최대 OD<sub>600</sub> 7까지 약 1.5배의 균 성장과 2,3-부탄다이올 생산 증가를 보였다. 그 다음으로 효소의 활성을 도와주는 미네랄과 미네랄의 분해와 섭취를 도와주는 물질을 첨가한 최적화 배지(5 g/L yeast extract, 2.9 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 11.3 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6.6 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.25 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.05 g/L FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.01 g/L ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.0014 g/L MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.001 g/L CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 36 g/L glucose)에서 OD<sub>600</sub> 10.5, 2,3-부탄다이올 7 g/l의 생산량을 보였다.

특히 미네랄인 마그네슘 설페이트(MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O)가 균의 성장과 2,3-부탄다이올 생산량 향상에 큰 역할을 하는 것으로 고려된다. 이로써 엔테로박터 에어로진스의 성장과 2,3-부탄다이올 생성에 최적화된 배지를 선정하였다(도 2).

#### [0048] 실시예 2: pH의 변화가 엔테로박터 에어로진스에서 2,3-부탄다이올을 비롯한 대사산물 생산에 미치는 영향 확인

[0049] 엔테로박터 에어로진스는 배양 pH에 따라 생산하는 대사산물이 변하게 된다. 따라서 2,3-부탄다이올 생성에 최적화된 pH 조건을 찾기 위해 야생종과 락테이트 디하이드로겐에이즈 유전자가 제거된 돌연변이 엔테로박터 에어로진스를 pH 5, 6, 7, 8의 최적화 배지에서 배양시켜 대사산물을 확인하고 비교하였다. pH는 0.1 M의 포타슘 포스페이트 버퍼를 이용하여 초기값을 설정해주었다. 그 결과 야생종의 경우 초기 pH 7에서 배양시킨 배지

에서 최대 11.23 g/l 의 2,3-부탄다이올을 생성했으며(도 3), 돌연변이의 경우 초기 pH 5에서 배양했을 경우 최대 13.2 g/l의 2,3-부탄다이올을 생성했다.(도 4)

[0050] **실시예 3: 엔테로박터 에어로진스 내에서 유전자 제거 기술을 적용시키기 위해 균 선별을 위한 항생제 종류와 농도, 형질전환 방법 탐색 및 확인.**

[0051] 엔테로박터 에어로진스 내에서 유전자 제거 기술을 적용시키기 위해 먼저 균 선별을 위한 항생제 종류의 농도를 확인했다. 문헌에 나와있던 앰피실린을 사용하였고, 선별이 안되었기 때문에 고농도에서 배양시켰지만 자연적인 저항성이 있었기 때문에 선별이 되지 않았다. 따라서 엔테로박터 에어로진스에 적용시킬 수 있는 다른 항생제를 탐색했다. 그 결과 앰피실린과 같은 역할을 하지만 보다 안정성이 높은 카르베니실린(Sigma-Aldrich, 400 mg/ml) 에서 선별이 되며, 그 외에 클로로암페니콜(Sigma-Aldrich, 50 mg/ml), 카나마이신(ICN biomedical Inc., 50 mg/ml) 에서 선별이 됨을 확인하였다(도 5). 또한 세포의 형질전환 위해 화학적인 방법과 전기천공법을 이용하기 위한 컴피턴트 세포를 준비하여 형질전환을 수행하였다. 그 결과 전기천공법 2100 v에서 형질전환이 수행되는 것을 확인하였다(도 6).

[0052]

[0053] **실시예 4: 엔테로박터 에어로진스 내에서 발현이 가능한 벡터 탐색.**

[0054] 유전자 제거 기술을 적용시키기 위해 엔테로박터 에어로진스 내에서 발현 가능한 벡터를 탐색하는 수행했다. 먼저 대장균에서 발현가능한 벡터 pQE-80L(Pusan Univ.), pJF118EH(KIST), pET-28a(Novagen), pACYCDuet-1(Novagen)에 녹색형광단백질(KIST)을 삽입하여 재조합 벡터를 완성했다. 실시예 4에서 확인된 것을 토대로 엔테로박터 에어로진스를 형질전환 시킨 후 카르베니실린(400 mg/ml), 클로로암페니콜(50 mg/ml), 카나마이신(50 mg/ml)이 첨가된 LB배지 50 ml에 37℃에서 배양시켰다. 배양 2시간 후 OD<sub>600</sub>이 0.6정도 되었을 때 1 mM이 되게 IPTG(Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) 50 μl를 첨가시켜 벡터의 발현을 유도하였다. 그 후 생성된 단백질의 안정화를 위하여 26℃에서 3시간 배양 후 원심분리를 통해 상층액을 얻었다. 상층액을 1000 배 희석 시킨 후 RFPC를 통해 과장을 확인하였다. 그 결과 pQE-80L, pJF118EH 벡터의 경우 엔테로박터 에어로진스 내에서 발현됨을 확인하였다. 또한 tac 프로모터와 T5 프로모터가 균주 내에서 작동함을 확인하였다(도 7).

## 표 1

[0055] pQE-80L 벡터에 녹색형광단백질을 삽입하기 위해 사용된 프라이머

| 프라이머 명           | 프라이머 서열                                         |
|------------------|-------------------------------------------------|
| GFP F EcoR I RBS | AGAGGAATTCAGAGGAGAAATACTATGAGTAAAGGAGAAGAAGCTTT |
| GFP Re Pst I     | AAACTGCAGTTATTGTAGAGCTCATCCATGC                 |

[0056] **실시예 5: 엔테로박터 에어로진스에서 락테이트 디하이드로젠에이즈 유전자 제거**

[0057] 엔테로박터 에어로진스의 락테이트 디하이드로젠에이즈 유전자를 제거하기 위해 레드 람다 재조합(Red lambda recombination)방법을 사용했다. 우선 세포 내부로 유입된 선형 유전자의 분해를 방지하고 상동재조합(homologous recombination)의 효율을 높이기 위한 효소 엑소, 감마, 베타의 발현 벡터를 컴피턴트 세포로 준비된 엔테로박터 에어로진스에 형질전환 시켰다. 여러 종류의 재조합 효소 발현 벡터가 있는데 실시예 4에서 확인한 tac 프로모터를 가지고 앰피실린 저항성이 있는 pKM208 벡터(도 8)를 본 발명에 사용하였고, 형질전환을 확인하였다. 다음으로 상동재조합을 위한 선형 유전자를 제작하였다. FRT-카나마이신-FRT 카세트(도 9)를 주형으로 사용하였다. 상동재조합이 발생하는 위치인 엔테로박터 에어로진스의 락테이트 디하이드로젠에이즈 유전자 양 옆의 상동한 50개의 염기쌍과 주형으로 쓰는 pKD4의 FRT-카나마이신-FRT 카세트를 중합하기 위한 20개의 염기쌍, 총 70개의 염기쌍을 프라이머로 제작하였고 중합효소 연쇄 반응(polymerase chain reaction)을 이용하여 락테이트 디하이드로젠에이즈 유전자를 제거하기 위한 선형 유전자를 제작하였다(표 2). 카나마이신은 상동재조합이 성공적으로 이루어졌는지 확인하기 위한 항 의약(anti drug)이고, FRT 사이트는 목표 유전자가 제거 된 후 다른 유전자의 제거를 위해 항 의약을 제거해 주는 역할을 한다.

## 표 2

[0058]

락테이트 디하이드로겐에이즈 유전자 제거를 위한 선형유전자 제작에 사용된 프라이머

| 프라이머 명       | 프라이머 서열                                                                    |
|--------------|----------------------------------------------------------------------------|
| △ldh For FKF | ATTATTTTAATTATGCTACCGTGACGGTATTATCACTAGAGGAAAGCCTTGTGTAGGCTGGAGCTGC<br>TTC |
| △ldh Rev FKF | TTGTCTGAATGTGCCCCCGTTAGCGGGGAGCACAAAAGGGGAAAGAAGCTCCTCCTTAGTTCCTAT<br>TCC  |

[0059]

다음 단계로 pKM208 벡터가 형질전환 된 것이 확인된 엔테로박터 에어로진스를 30℃에서 배양했다. pKM208 벡터는 온도에 민감한 벡터로써 37℃이상이 되면 그 활성을 잃기 때문에 30℃에서 배양했다. 또한 배양 1시간 후 OD<sub>600</sub>이 0.1 정도 되었을 때 1 mM의 IPTG로 재조합 효소 발현 유도를 시켜주었다. 1시간 더 배양시켜 OD<sub>600</sub>이 0.6정도가 되었을 때 전기천공법을 위한 컴피턴트 세포로 만든 후 제작한 선형유전자를 형질전환 시켰다. LB 배지에 37℃에서 1시간 배양 후 카나마이신이 12.5 mg/ml 첨가된 LB 고체배지에 스프레딩하고 12시간 배양 시켰다. 상동재조합의 성공 여부를 확인하기 위해 총 6가지의 프라이머가 제작되었다. 락테이트 디하이드로겐에이즈 양옆의 상동한 20~24개의 염기쌍을 A와 D로 명칭하였다. 야생종과 돌연변이 일 경우 중합효소 연쇄 반응이 일어날 수 있는 A와 D 사이의 프라이머를 20개의 염기쌍으로 각각 2개씩 제작하였다. 야생종일 경우 B와 C로 명칭하였고, 돌연변이 일 경우 Bk와 Ck로 명칭하였다(표 3).

### 표 3

[0060]

상동재조합이 성공적으로 이루어 졌는지 확인하기 위한 프라이머

| 프라이머 명 | 프라이머 서열                  |
|--------|--------------------------|
| A      | GTATTATCACTAGAGGAAAGCCTT |
| D      | GCACAAAAGGGGAAAGAAGC     |
| B      | CATATTCAACGCCGAGATCC     |
| C      | CGGTGCTGGAAGAGCTAAAA     |
| Bk     | CTCGTCCTGCAGTTCATTCA     |
| Ck     | GGATGATCTGGACGAAGAGC     |

[0061]

카나마이신이 12.5 mg/ml 첨가된 LB 고체배지에 12시간 후 자란 콜로니를(표 3)의 6가지 프라이머 사용과 콜로니 중합효소 연쇄 반응을 통해 상동재조합이 성공적으로 이루어 진 것을 확인하였다(도 10).

[0062]

**실시예 6: FRT-카나마이신-FRT 카세트 제거된 돌연변이 제작.**

[0063]

락테이트 디하이드로겐에이즈 유전자와 FRT-카나마이신-FRT 카세트의 상동재조합이 발생된 것이 확인된 엔테로박터 에어로진스에서 다른 유전자 제거를 위해 FRT 사이트 사이의 항 의약(anti drug)을 제거하는 실험은 필수적이다. 먼저 상동재조합이 일어난 균주를 컴피턴트 세포로 만든 후 pCP20 벡터를 형질전환 시키고 카르베니실린이 400 mg/ml이 첨가된 LB 고체배지에 스프레딩 후 30℃에서 12시간 배양 시켰다. pCP20 벡터는 FLP라는 효소를 발현하고, 이 효소는 FRT 사이트를 인식하여 FRT 사이트 사이의 항 의약(anti drug)을 제거하는 역할을 한다. 12시간 배양 후 자란 콜로니를 30℃ LB 액체배지에서 1시간 배양하여 세포의 양을 확보한 뒤, 42℃에서 12시간 더 배양했다. pCP20 벡터는 온도에 민감한 벡터로써 37℃ 이상이 되어야 발현이 되며, 42℃ 이상이 되면 활성을 잃는다. 12시간 배양 후 같은 튜브에서 자란 균을 카나마이신이 12.5 mg/ml 첨가된 LB 고체배지와 카르베니실린이 400 mg/ml 첨가된 LB 고체배지, 항생제가 첨가되지 않은 LB 고체배지에 스프레딩 한 후 37℃에서 12시간 배양시켰다. FRT-카나마이신-FRT 카세트가 제거되었으면 카나마이신이 첨가된 배지에서 자랄 수 없고, pCP20 벡터의 활성을 잃었다면 카르베니실린에서 자랄 수 없다. 따라서 항생제가 첨가 안 된 LB 고체배지에서만 자라야한다(도 11). 따라서 항생제가 첨가 안 된 LB 고체배지에서만 자란 엔테로박터 에어로진스를 마지막으로 실시예 5에서 이용했던 상동재조합 확인을 위한 프라이머를 이용해 중합효소 연쇄 반응을 한 결과 FRT-카나마이신-FRT 카세트가 제거된 것을 확인하였다.

[0064]

**실시예 7 : 2,3-부탄다이올을 비롯한 엔테로박터 에어로진스 대사산물의 측정**

[0065]

대사과정을 통하여 엔테로박터 에어로진스는 2, 3-부탄다이올을 비롯한 다양한 대사 산물을 생산한다. 대사의

흐름과 목표 대사산물의 측정을 위하여 대사 과정에서 생산되는 모든 대사 산물을 HPLC를 이용하여 분석하였다. 대사산물 중 락테이트, 아세테이트, 폴메이트, 숙신에이트, 글루코스는 분석이 되었으나(표 4), 2,3-부탄다이올과 아세트인은 분석 그래프가 겹쳐서 확인되었다(도 12). 따라서 두 물질에 대해서는 정량 분석을 할 수 없었고, 2,3-부탄다이올, 아세트인, 1,2-프로판다이올, 1,3-프로판다이올은 GC를 이용하여 분석할 수 있었다(도 13)(표 5).

**표 4**

[0066]

락테이트, 아세테이트, 폴메이트, 숙신에이트, 글루코스 분석을 위한 HPLC 조건

| 품 목     | 조 건                                 |
|---------|-------------------------------------|
| HPLC 모델 | (영린기기, Korea), RI750F (영린기기, Korea) |
| 컬럼      | Aminex HPX-87H(Biorad, USA)         |
| 유속      | 0.8 ml/min                          |
| 주입부피    | 20ul                                |
| 이동상     | 10mM 황산                             |
| 오븐 온도   | 60℃                                 |
| 작동 시간   | 20분                                 |

**표 5**

[0067]

2,3-부탄다이올, 1,2-프로판다이올, 1,3-프로판다이올, 아세트인, 에탄올 분석을 위한 GC 조건

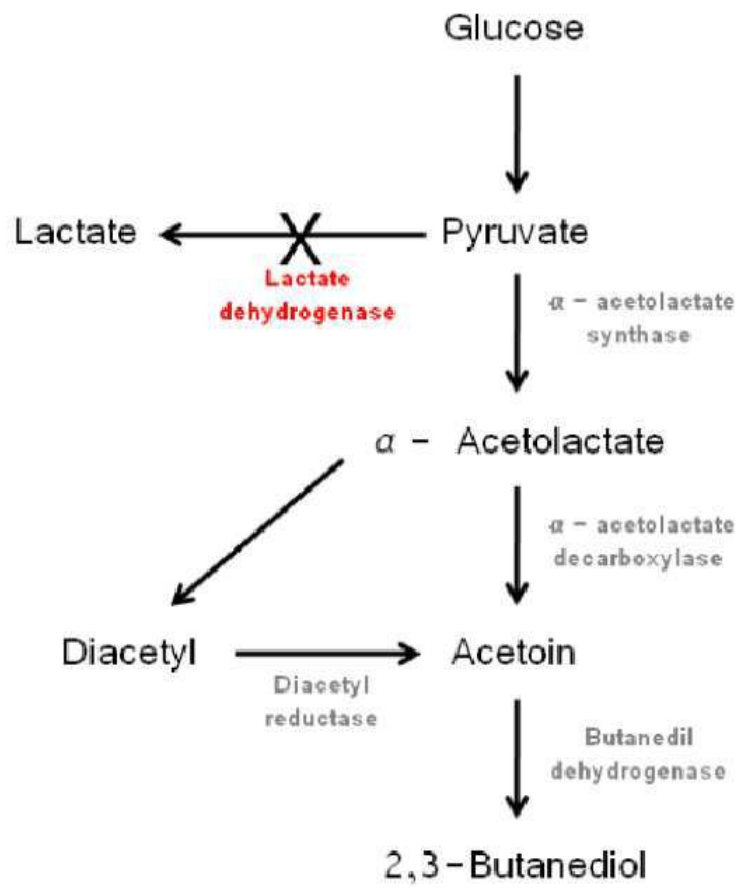
| 품 목               | 조 건                  |
|-------------------|----------------------|
| CG 모델             | 7890A (agilent, USA) |
| 컬럼                | HP-INNOWAX           |
| 인렛(inlet) 온도      | 240℃                 |
| 디텍터(detector)/ 온도 | FID 디텍터 / 250℃       |
| 오븐 온도             | 50℃                  |
| 온도상               | 50 ~240℃ / 16℃/min   |
| 주입부피              | 1ul                  |
| split ratio       | 10 : 1               |

[0068]

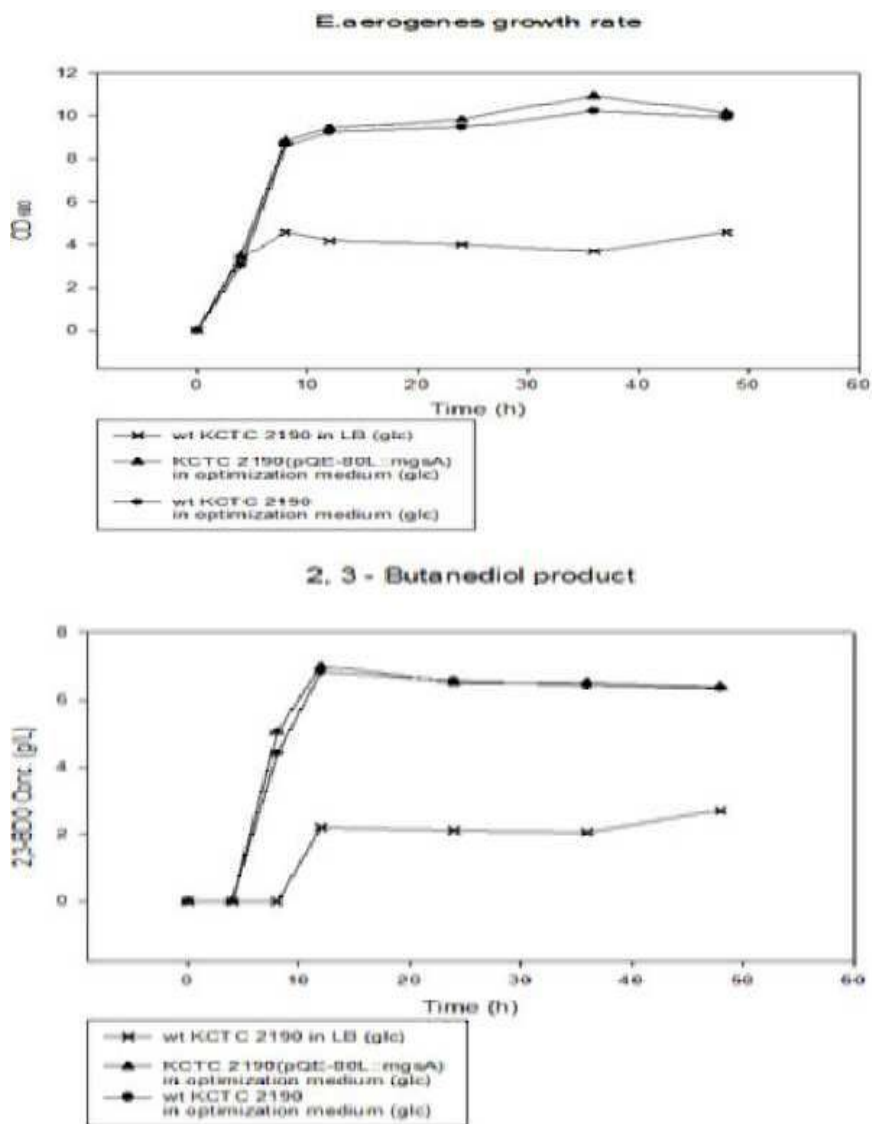
모든 대사산물을 분석할 수 있는 조건을 확보한 후 야생종과 락테이트 디하이드로젠에이즈 유전자가 제거된 유전자 엔테로박터 에어로진스를 최적화한 배지와 pH에서 배양했을 때 야생종은 pH 7에서 최대 11.23 g/l, 돌연변이는 pH 5에서 최대 13.2 g/l를 생산했고, 같은 환경에서 배양했을 경우 락테이트 디하이드로젠에이즈 유전자가 제거된 돌연변이가 2,3-부탄다이올 생산이 야생종에 비해 높은 것이 확인되었다(도 14).

도면

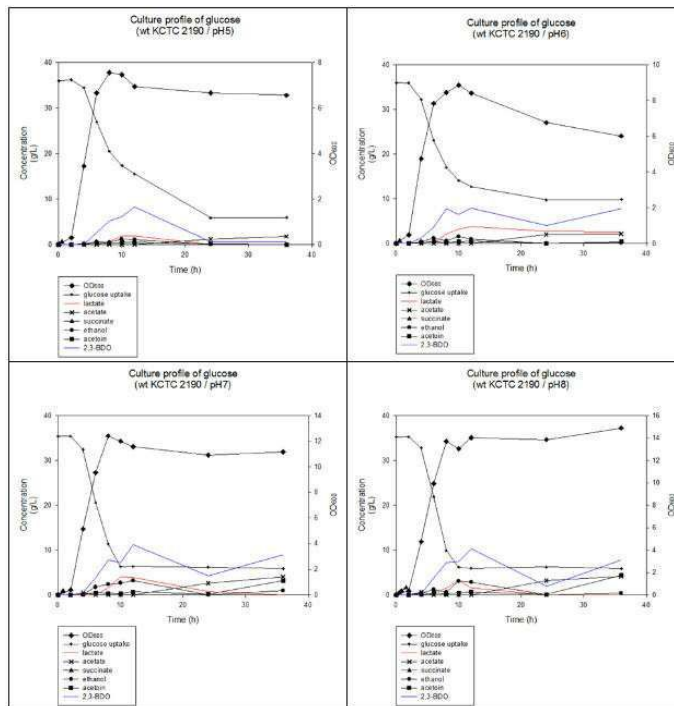
도면1



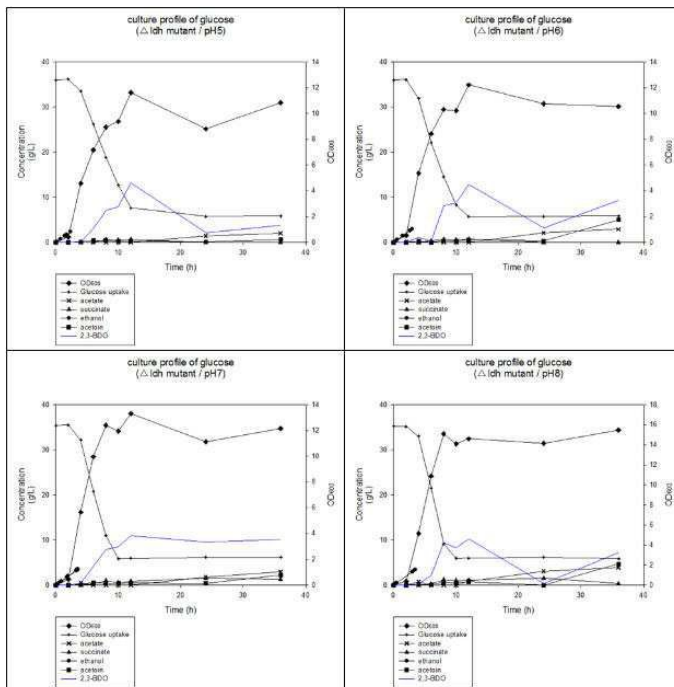
도면2



도면3

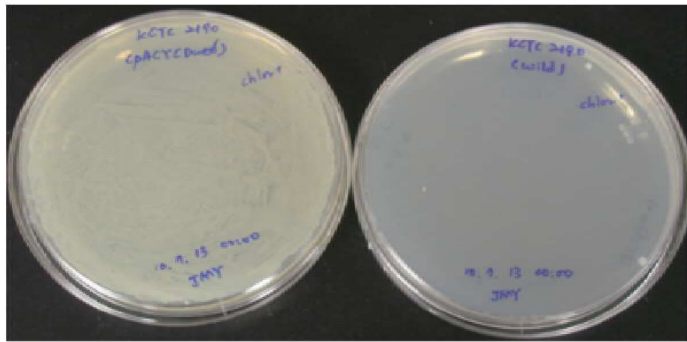


도면4

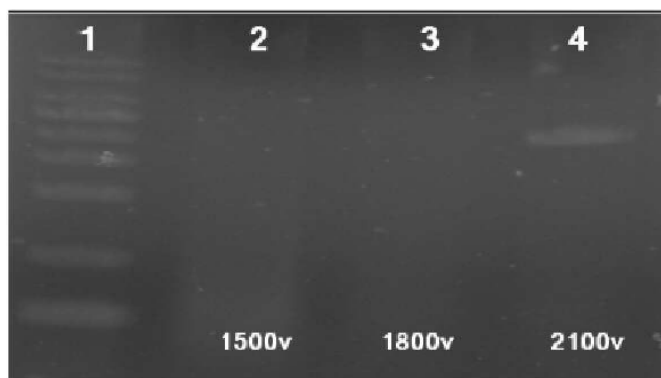




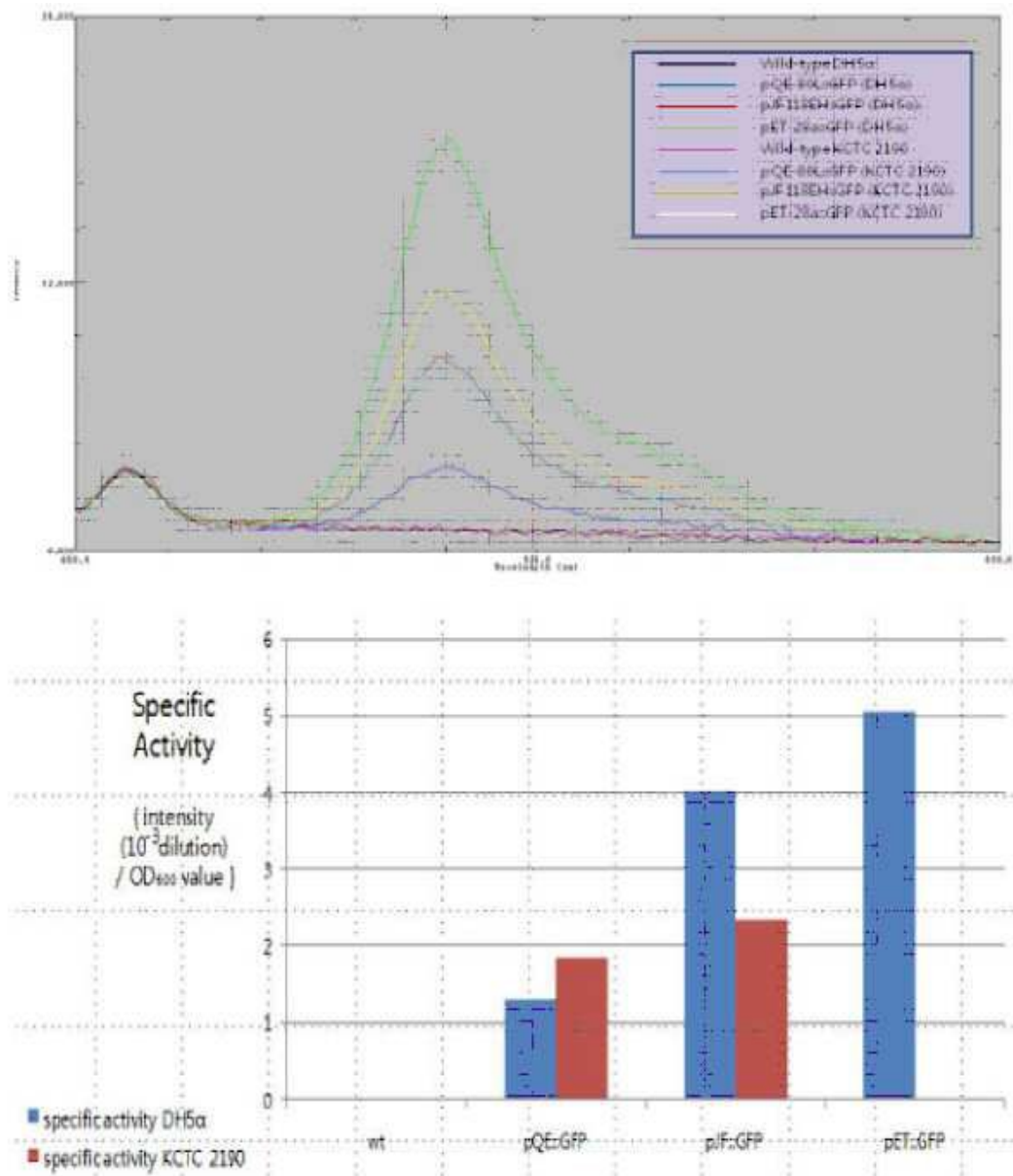
도면5



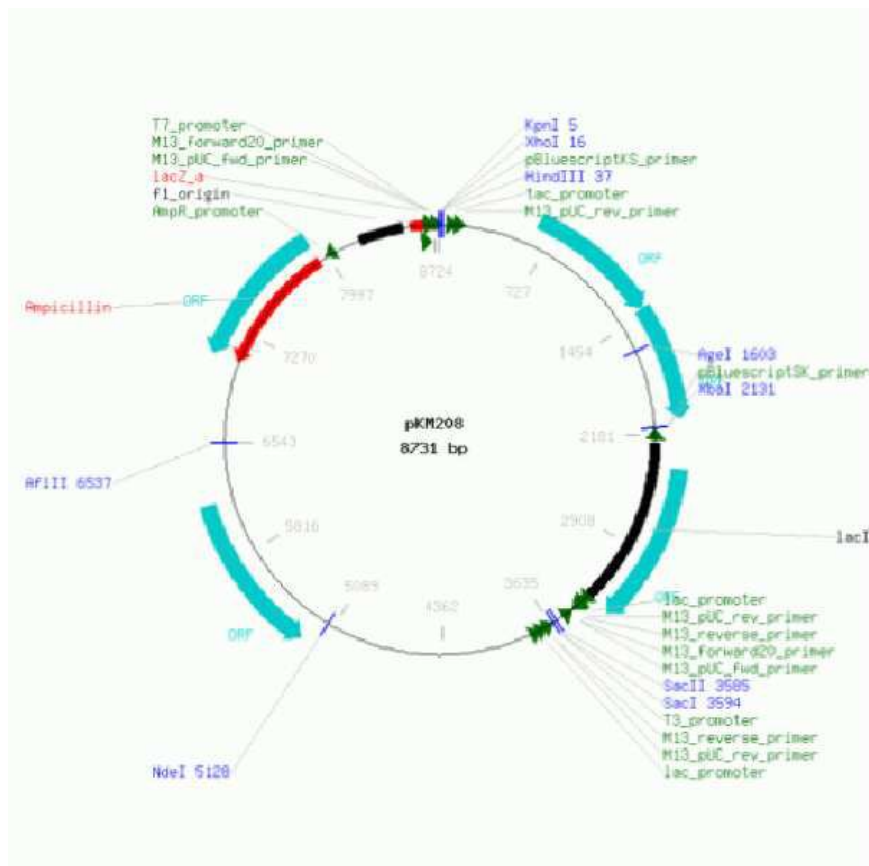
도면6



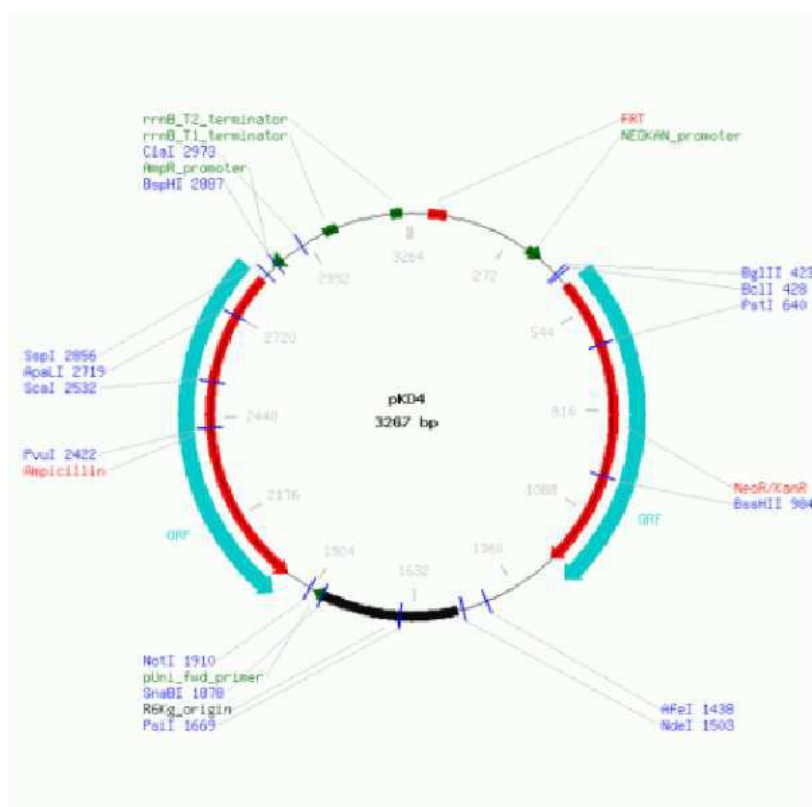
도면7



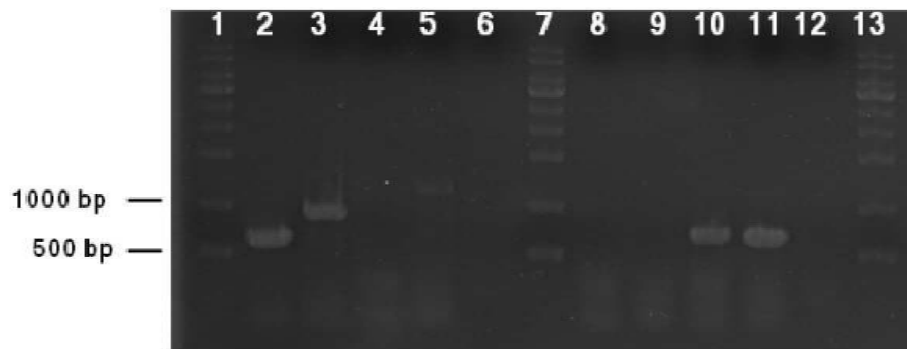
도면8



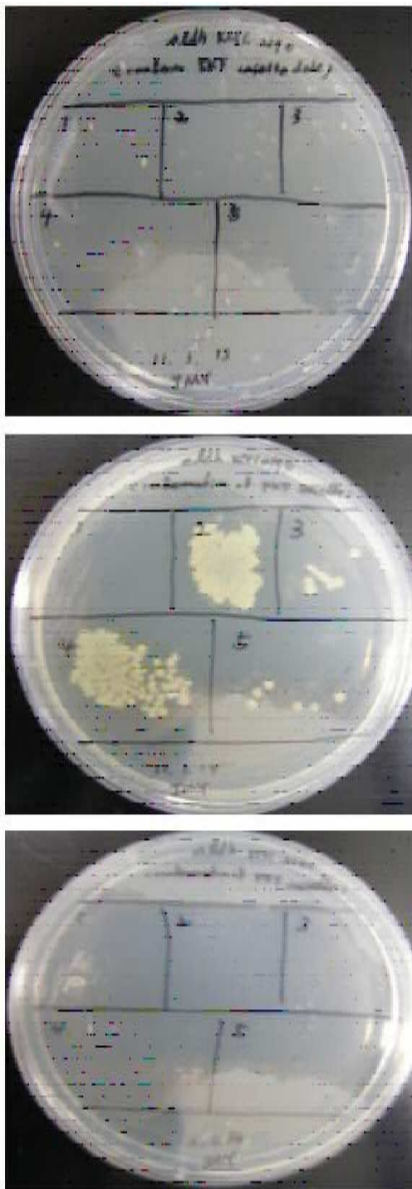
도면9



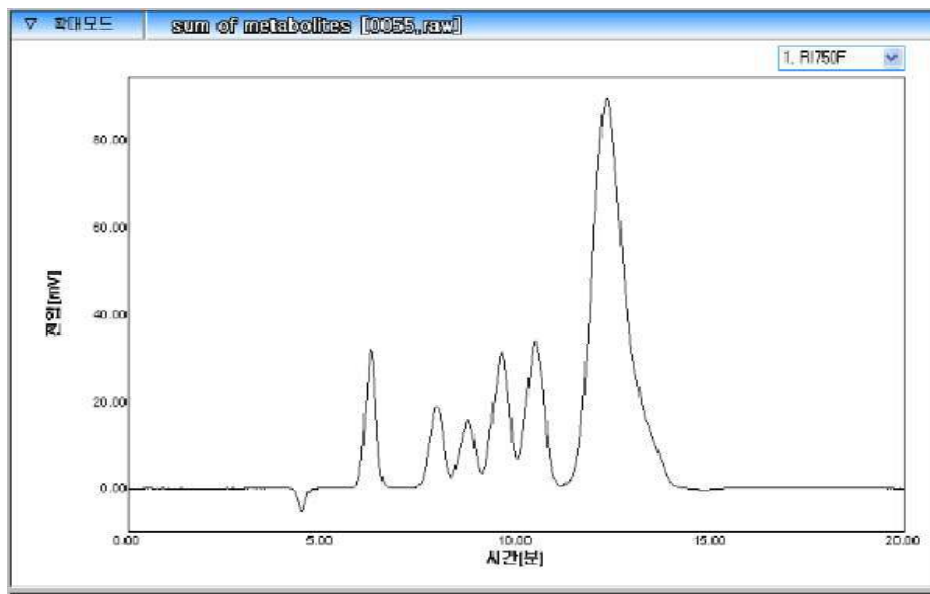
도면10



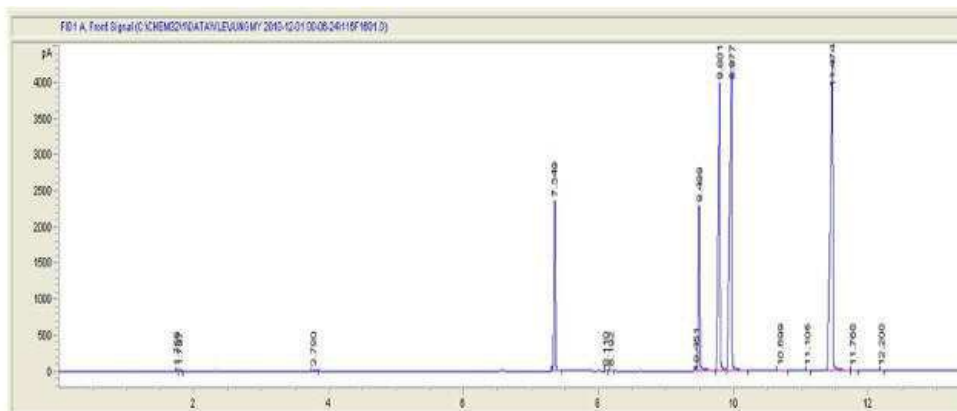
도면11



도면12



도면13



도면14

