(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0122246
(43) 공개일자 2023년08월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/70 (2006.01) *C12N 15/52* (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01) *C12N 9/10* (2006.01)
C12P 23/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/70 (2013.01)
C12N 15/52 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0018664
(22) 출원일자 2022년02월14일
심사청구일자 2022년02월14일

(71) 출원인
인천대학교 산학협력단
인천광역시 연수구 아카데미로 119 (송도동)
(72) 발명자
서명지
인천광역시 연수구 컨벤시아대로252번길 10, 1603동 1902호(송도동, 송도 더샵 파크애비뉴 아파트)
김미방
경상북도 포항시 남구 지곡로 102, 1동 503호(지곡동, 포스빌)
윤덕준
인천광역시 연수구 경원대로467번길 26-1, 둥지주택 205호(선학동)
(74) 대리인
특허법인이룸리온

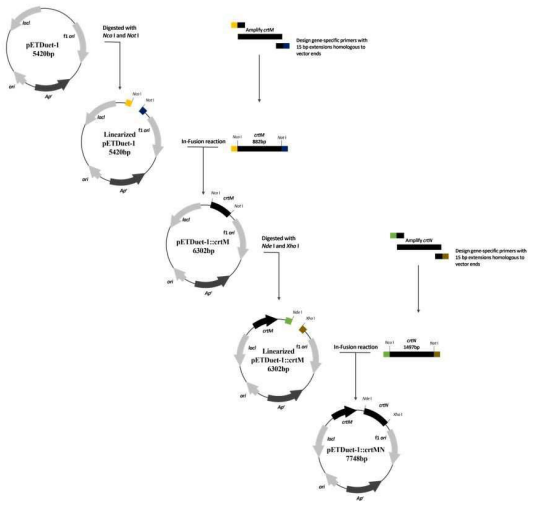
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **카로티노이드 생산용 재조합 대장균 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 유산균 유래 crtM 및 crtN 유전자를 포함하는 벡터로 형질전환된 재조합 대장균 및 상기 재조합 대장균을 이용하여 유산균 유래 카로티노이드를 생산하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 재조합 대장균은 4,4'-디아포뉴로스포렌(4,4'-diaponeuropsorene)을 생산할 수 있으며, 상기 재조합 대장균을 20 ~ 30℃ 온도에서 IPTG를 배제하여 배양하는 경우 카르티노이드 생산량을 유의하게 증가시킬 수 있다.

대 표 도 - 도5



(52) CPC특허분류
C12N 9/001 (2013.01)
C12N 9/1085 (2013.01)
C12P 23/00 (2013.01)
C12Y 103/08002 (2013.01)
C12Y 205/01096 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711131389
과제번호 NRF-2019R1A2C1006038
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 중견연구자지원사업
연구과제명 4,4'-Diaponeurosporene을 생합성하는 기능성 유산균을 활용한 항암 파마바이오틱스 개발
기 여 율 80/100
과제수행기관명 인천대학교 산학협력단
연구기간 2019.03.01 ~ 2022.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345301721
과제번호 NRF-2016R1D1A1B03931582
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 이공학 개인기초연구지원사업
연구과제명 저염 내성 극호염성 고균 유래 카로티노이드 항산화 소재 개발
기 여 율 20/100
과제수행기관명 인천대학교 산학협력단
연구기간 2016.11.01 ~ 2019.10.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

FPP(Farnesyl pyrophosphate) 합성 경로가 내재되어 있는 대장균에 crtM 및 crtN 유전자가 도입되어 있는 4,4'-디아포뉴로스포렌(4,4'-diaponeuropsorene) 생산용 재조합 대장균.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 crtM 및 crtN 유전자는 유산균으로부터 유래한 것을 특징으로 하는, 재조합 대장균.

청구항 3

제 2항에 있어서,

상기 유산균은 *L. plantarum* subsp. *plantarum*인 것을 특징으로 하는, 재조합 대장균.

청구항 4

제1항의 재조합 대장균을 포함하는, 4,4'-디아포뉴로스포렌(4,4'-diaponeuropsorene) 생산용 조성물.

청구항 5

다음 단계를 포함하는 4,4'-디아포뉴로스포렌(4,4'-diaponeuropsorene)를 생산하는 방법:

(a) 제1항 내지 제 6항의 재조합 대장균을 배양하여 4,4'-디아포뉴로스포렌(4,4'-diaponeuropsorene)를 생성시키는 단계; 및

(b) 생성된 4,4'-디아포뉴로스포렌(4,4'-diaponeuropsorene)를 회수하는 단계.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 (a) 단계는 상기 재조합 대장균은 20 ~ 30℃에서 배양하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 (a) 단계는 상기 재조합 대장균은 IPTG 처리하는 단계를 배제하는 것을 특징으로 하는, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 카로티노이드 생산용 재조합 대장균 및 이의 용도에 관한 것으로, 더 상세하게는 crtM 및 crtN 유전자를 포함하는 벡터로 형질전환된 재조합 대장균 및 상기 재조합 대장균을 이용하여 유산균 유래 카로티노이드를 생산하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 카로티노이드(Carotenoid)는 조류, 식물, 일부 균류, 박테리아에 의해 생성되는 테르페노이드 색소(terpenoid pigment)이며, 광합성, 영양 및 광산화 손상에 대한 보호에 중요한 역할을 한다. 카로티노이드는 항산화, 항암, 항비만 등의 효과가 있으며, 산화제에 의해 유발되는 질병 및 노화 관련 증상을 예방하는 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 다만, 인체에서는 카로티노이드를 합성할 수 없기 때문에 섭취를 통하여 보충하여야 한다. 최근에는 카로티노이드를 동물 사료 보조제, 식품 착색제, 화장품 원료, 기능성 식품 및 의약품 등으로 사용하고 있다.

[0004] 유산균(lactic acid bacteria, LAB)은 일반적으로 안전하다고 알려진 그람양성균으로 다양한 발효 식품에 널리 사용되어 왔다. 유산균은 자유 라디칼을 제거하는 카탈라아제(catalase) 발현이 부족하여 미호기성 또는 통성혐기성 성장의 특징을 나타내지만, 초과산화물 불균등화효소 (superoxide dismutase), 티오레독신 환원효소(thioredoxin reductase), 카로티노이드와 같은 다양한 항산화제를 생산한다. 유산균 의해 생산된 카로티노이드는 C_{30} 카로티노이드인 4,4'-디아포뉴로스포렌(4,4'-diaponeurosporene)이다. 카로티노이드 생합성 경로의 유전자를 발현하고 4,4'-디아포뉴로스포렌을 생성한다고 알려진 유산균 *Lactiplantibacillus plantarum*과 *Enterococcus gilvus*는 대부분 외국 발효 식품에서 분리된다.

[0005] 4,4'-디아포뉴로스포렌은 다양한 생물학적 특성을 나타낸다. 4,4'-디아포뉴로스포렌을 생성하는 *Bacillus subtilis*의 경구 투여는 dextran sulfate sodium salt(DSS)에 의해 유도된 마우스에서 대장염(colitis)을 유의하게 개선시켰고, 이는 대장염에 대한 4,4'-디아포뉴로스포렌의 효과를 나타낸다. 또한, 4,4'-디아포뉴로스포렌의 면역 기능은 생쥐의 수지상 세포에서 확인되었고, 이러한 결과를 바탕으로 4,4'-디아포뉴로스포렌이 새끼 돼지의 장 점막 면역에 영향을 미치고 쥐의 *S. typhimurium* 감염에 대한 내성을 증가시킨다는 연구들이 보고된 바 있다.

[0006] 한편, C_{30} 카로티노이드의 생합성에 관여하는 유전자는 dehydrosqualene synthase(crtM) 및 dehydrosqualene desaturase(crtN)이다. C_{30} 카로티노이드 생합성 경로에서 crtM 및 crtN 유전자는 FPP(Farnesyl pyrophosphate)(3개의 이소프렌 단위, 15개의 탄소)를 4,4'-디아포뉴로스포렌(6개의 이소프렌 단위, 30개의 탄소)로 변환시킨다. *L. plantarum*이 생산하는 C_{30} 카로티노이드 생합성이 crtM 및 crtN 유전자에 의해 조절된다고 보고된 바 있으며, 균주의 황색 색소 표현형과 crtM 및 crtN 유전자 사이의 관계를 조사하여 카로티노이드 생산을 분석한 연구가 있다.

[0007] 카로티노이드는 상업적으로 이용하기 위해 화학적 합성, 생물학적 합성, 천연물로부터의 추출 또는 미생물 발효에 의해 유용한 양으로 얻어진다. 그러나 화학적 합성은 부산물 생성 및 유해 폐기물과 관련하여 다양한 환경적인 문제가 발생하며, 카로티노이드 생산 과정에서 가혹한 조건들이 요구된다. 이에 대사공학을 통해 카로티노이드를 저생산 또는 비생산하는 박테리아에서 카로티노이드 생산을 증가시키거나 새로운 카로티노이드 구조를 합성하는 연구에 대한 관심이 높아지고 있다. β-carotene, zeaxantin, lycopene 및 astaxanthin과 같은 카르티노이드는 대장균(*E. coli*)에서 생산되지만, 4,4'-디아포뉴로스포렌의 이종 생산(heterologous production)에 대한 연구는 거의 없는 실정이다.

[0008] *S. aureus*의 경우 대장균에서 crtM과 crtN 유전자의 발현을 진행하여 4,4'-디아포뉴로스포렌을 생산한다는 연구결과가 보고된 바 있다. 다만, *S. aureus* 유래의 crtN과 crtM 유전자를 사용하여 대장균을 재조합 하는 경우 4,4'-디아포뉴로스포렌이 아닌 4,4'-디아포라이코펜(4,4'-diapolycopene)과 디아포토룰렌(Diapotorulene)이 생산된다(Appl Biochem Biotechnol (2010) 162:2333-2344). 높은 이종 발현 수준과 기질의 유효 농도와 같은 특정 조건에서 *S. aureus*의 crtN에 의해 코딩된 불포화 효소(desaturase)는 생산된 총 카로티노이드의 최대 50% 양으로 4,4'-디아포라이코펜(4,4'-diapolycopene)을 생산하거나(International Journal of Food Microbiology 140 (2010) 34-39, JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Dec. 2002, p. 6690-6699), crtN과 crtM만을 재조합한 대장균에서 4,4'-디아포라이코펜(4,4'-diapolycopene)을 90% 가까이 합성된다(Chemistry & Biology, Vol. 10, 453-462, May, 2003). *S. aureus* 유전자를 재조합한 대장균에서 뿐만 아니라 같은 유전자를 재조합한 *B. subtilis*에서도

4,4'-디아포라이코펜(4,4'-diapolycopene)이 생산된다(Biotechnol Lett (2009) 31:1789-1793). 또한, *S. aureus*의 crtN, crtM 유전자를 이용하여 대장균에서 4,4'-디아포뉴로스포렌 단일 물질을 생산하기 위해서는 crtN 유전자에 돌연변이를 주어야만 가능하고, CrtN 구조 데이터의 부족으로 인해 CrtN 돌연변이의 구조 결정도 불가능하다(Scientific Reports volume 6, Article number: 21987 (2016)). 나아가, 현재까지 대장균에서 유산균 유래 crtM 및 crtN 유전자를 이용한 4,4'-디아포뉴로스포렌 생합성에 대한 연구는 아직 보고된 바가 없다.

[0010] 이에, 본 발명은 유산균 유래 C_{30} 카로티노이드인 4,4'-디아포뉴로스포렌 (4,4'-diaponeuropsorene)을 효과적으로 생합성 할 수 있는 재조합 대장균을 제조하기 위해 예의 노력한 결과, *L. plantarum* subsp. *plantarum* 유래 crtN과 crtM 유전자를 포함하는 벡터로 형질전환된 재조합 대장균이 4,4'-디아포뉴로스포렌(4,4'-diaponeuropsorene)을 성공적으로 생산하였으며, 상기 재조합 대장균을 특정 조건에서 배양하는 경우 4,4'-디아포뉴로스포렌(4,4'-diaponeuropsorene)의 생산량이 현저하게 증가한다는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명의 목적은 카로티노이드 생산용 재조합 대장균 및 이의 용도를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 FPP(Farnesyl pyrophosphate) 합성 경로가 내재되어 있는 대장균에 crtM 및 crtN 유전자가 도입되어 있는 4,4'-디아포뉴로스포렌(4,4'-diaponeuropsorene) 생산용 재조합 대장균을 제공한다.

[0015] 본 발명에 있어서, 상기 crtM 및 crtN 유전자는 유산균으로부터 유래한 것을 특징으로 할 수 있다.

[0016] 본 발명에 있어서, 상기 유산균은 *L. plantarum* subsp. *plantarum*인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0018] 본 발명은 또한 상기 재조합 대장균을 포함하는, 4,4'-디아포뉴로스포렌(4,4'-diaponeuropsorene) 생산용 조성물을 제공한다.

[0020] 본 발명은 또한 다음 단계를 포함하는 4,4'-디아포뉴로스포렌(4,4'-diaponeuropsorene)를 생산하는 방법을 제공한다.

[0021] (a) 제1항 내지 제 6항의 재조합 대장균을 배양하여 4,4'-디아포뉴로스포렌(4,4'-diaponeuropsorene)를 생성시키는 단계; 및

[0022] (b) 생성된 4,4'-디아포뉴로스포렌(4,4'-diaponeuropsorene)를 회수하는 단계.

[0023] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계는 상기 재조합 대장균은 20 ~ 30℃에서 배양하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0024] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계는 상기 재조합 대장균은 IPTG 처리하는 단계를 배제하는 것을 특징으로 할 수 있다.

발명의 효과

[0026] 본 발명의 재조합 대장균은 4,4'-디아포뉴로스포렌(4,4'-diaponeuropsorene)을 효과적으로 생산할 수 있으며, 상기 재조합 대장균을 20 ~ 30℃ 온도에서 IPTG를 배제하여 배양하는 경우 카르티노이드 생산량을 10배 이상 증가시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0028] 도 1은 pET28a::crtM 설계 전략에 관한 것이다.

도 2는 C_{30} 카로티노이드 생산 플라스미드 pETDuet-1::crtM (a) 및 pETDuet-1::crtN (b)의 구조에 관한 것이다.

도 3은 pET28a::crtM (a) and pET28a::crtN (b)을 포함하는 재조합 대장균의 SDS-PAGE 분석에 관한 것이다.

도 4는 pET28a::crtN 설계 전략에 관한 것이다.

도 5는 pETDuet-1::crtMN 설계 전략에 관한 것이다.

도 6은 C_{30} 카로티노이드 생산 플라스미드 pETDuet-1::crtMN의 구조에 관한 것이다.

도 7은 pETDuet-1::crtMN 또는 클로닝 벡터인 pETDuet-1을 포함하는 재조합 대장균의 SDS-PAGE 분석에 관한 것이다.

도 8은 pETDuet-1::crtMN 또는 클로닝 벡터인 pETDuet-1을 보유하는 재조합 대장균의 황색 색소 표현형(a), 색소 추출물(b), 카로티노이드 색소 침착 수준(c)을 비교한 것이다. 막대는 평균 ± s.d(Standard Deviation, 표준편차)를 나타낸다. (** $P < 0.01$)

도 9는 pETDuet-1::crtMN을 보유하는 재조합 *E. coli*(a), pETDuet-1을 보유하는 *E. coli*(b) 및 *L. plantarum* subsp. *plantarum* KCCP11226(c)에서 추출한 4,4'-디아포뉴로스포렌(4,4'-diaponeurosporene)의 HPLC 분석 및 UV-VIS 스펙트럼(470nm)에 관한 것이다.

도 10은 pETDuet-1::crtM을 보유하는 재조합 대장균(a) 및 pETDuet-1을 보유하는 대장균(b)에서 추출한 4,4'-디아포파이토엔(4,4'-diapophytoene)의 HPLC 분석 및 UV-VIS 스펙트럼(286mn)에 관한 것이다.

도 11은 pETDuet-1::crtMN을 보유하는 재조합 *E. coli*의 온도에 따른 카로티노이드 생산량에 관한 것이다.

도 12는 pETDuet-1::crtMN을 보유하는 재조합 *E. coli*의 IPTG 농도에 따른 카로티노이드 생산량에 관한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 이하, 발명을 상세하게 설명한다.

[0031] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0033] 카로티노이드는 다양한 미생물 및 식물에 의해 자연적으로 합성되는 이소프레노이드 색소(isoprenoid pigments) 일종으로 식품, 화장품, 의약품 제형의 성분으로 사용된다. 지금까지 많은 종류의 카로티노이드가 보고되었지만, 최근 유산균(lactic acid bacteria, LAB)에 의해 생성되는 카로티노이드에 대한 연구에 대한 관심이 증가하고 있다.

[0034] 본 발명자들은 이전 연구에서 유산균 유래 C_{30} 카로티노이드인 4,4'-디아포뉴로스포렌(4,4'-diaponeuropsorene) 생합성 경로를 밝힌 바 있다. C_{30} 카로티노이드의 생합성에 관여하는 유전자는 dehydrosqualene synthase(crtM) 및 dehydrosqualene desaturase(crtN)이다. 본 발명의 재조합 대장균에서도 crtM 유전자만을 발현하는 대장균에서 4,4'-디아포뉴로스포렌의 기질인 4,4'-디아포파이토엔(4,4'-diapophytoene)이 생성되며, crtM 및 crtN 유전자를 모두 발현하는 재조합 대장균에서 4,4'-디아포뉴로스포렌의 생성된다는 것을 확인하였다.

[0035] 한편, 대사공학을 통해 카로티노이드를 저생산 또는 비생산하는 박테리아에서 카로티노이드 생산을 증가시킬 수 있다. *S. aureus*의 경우 대장균에서 crtM과 crtN 유전자의 발현을 진행하여 4,4'-디아포뉴로스포렌을 생산한다는 연구결과가 보고된 바 있다. 다만, *S. aureus* 유래의 crtN과 crtM 유전자를 사용하여 대장균을 재조합 하는 경우 4,4'-디아포뉴로스포렌이 아닌 4,4'-디아포라이코펜(4,4'-diapolycopene)과 디아포토룰렌(Diapotorulen

e)이 생산된다(Appl Biochem Biotechnol (2010) 162:2333-2344). 높은 이종 발현 수준과 기질의 유효 농도와 같은 특정 조건에서 *S. aureus*의 crtN에 의해 코딩된 불포화 효소(desaturase)는 생산된 총 카로티노이드의 최대 50% 양으로 4,4'-디아포라이코펜(4,4'-diapolycopene)을 생산하거나, crtN과 crtM만을 재조합한 대장균에서 4,4'-디아포라이코펜(4,4'-diapolycopene)을 90% 가까이 합성된다. *S. aureus* 유전자를 재조합한 대장균에서 뿐만 아니라 같은 유전자를 재조합한 *B. subtilis*에서도 4,4'-디아포라이코펜(4,4'-diapolycopene)이 생산된다. 또한, *S. aureus*의 crtN, crtM 유전자를 이용하여 대장균에서 4,4'-디아포뉴로스포렌 단일 물질을 생산하기 위해서는 crtN 유전자에 돌연변이를 주어야만 가능하고, CrtN 구조 데이터의 부족으로 인해 CrtN 돌연변이의 구조 결정도 불가능하다.

[0036] 나아가, *S. aureus*의 crtM 및 crtN 유전자와 *L. plantarum* subsp. *plantarum* 의 crtM 및 crtN 유전자의 상동성은 각각 34.16% 및 45.98%로 상당히 낮다 (표 1 및 2). 현재까지 대장균에서 유산균(예컨대, *L. plantarum* subsp. *plantarum*) 유래 crtM 및 crtN 유전자를 이용한 4,4'-디아포뉴로스포렌 생합성에 대한 연구는 아직 보고된 바가 없다.

표 1

[0037] **다른 균주의 crtM과 *L. plantarum* subsp. *plantarum* crtM의 상동성**

CrtM	Homology (%) (Identity, %)			
	L. plantarum subsp. *plantarum*	*L. plantarum* (WP_072534648)	*E. gilvus* (WP_010780894)	*S. aureus* (WP_075108189)
L. plantarum subsp. *plantarum*	100	100 (99.66)	99 (47.08)	92 (34.16)

표 2

[0038] **다른 균주의 crtN과 *L. plantarum* subsp. *plantarum* crtN의 상동성**

CrtN	Homology (%) (Identity, %)			
	L. plantarum subsp. *plantarum*	*L. plantarum* (WP_074161758)	*E. gilvus* (WP_114524348)	*S. aureus* (NKO05238)
L. plantarum subsp. *plantarum*	100	100 (99.80)	99 (64.44)	98 (45.98)

[0039] 상기 상동성(homology) 및 동일성(identity)은 두 개의 주어진 염기 서열과 관련된 정도를 의미하며 백분율로 표시될 수 있다.

[0041] 이에, 본 발명은 유산균 유래 C_{30} 카로티노이드인 4,4'-디아포뉴로스포렌 (4,4'-diaponeuropsorene)을 효과적으로 생합성 할 수 있는 재조합 대장균을 제조하였으며, 상기 재조합 대장균은 *L. plantarum* subsp. *plantarum* 유래 crtN과 crtM 유전자를 포함하는 벡터로 형질전환된 것으로 4,4'-디아포뉴로스포렌(4,4'-diaponeuropsorene)을 효과적으로 생산하였으며, 상기 재조합 대장균을 특정 조건에서 배양하는 경우 4,4'-디아포뉴로스포렌(4,4'-diaponeuropsorene)의 생산량이 현저하게 증가한다는 것을 확인하였다.

[0043] 따라서, 본 발명은 일관점에서 FPP(Farnesyl pyrophosphate) 합성 경로가 내재되어 있는 대장균에 crtM 및 crtN 유전자가 도입되어 있는 4,4'-디아포뉴로스포렌(4,4'-diaponeuropsorene) 생산용 재조합 대장균에 관한 것이다.

[0044] 본 발명에 있어서, 상기 crtM 및 crtN 유전자는 유산균으로부터 유래한 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0045] 본 발명에 있어서, 상기 crtM은 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0046] 본 발명에 있어서, 상기 crtN은 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0047] 본 발명에 있어서, 상기 유산균은 *L. plantarum* subsp. *plantarum*인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0049] 본 발명은 다른 관점에서 상기 재조합 대장균을 포함하는 4,4'-디아포뉴로스포렌(4,4'-diaponeuropsorene) 생산용 조성물에 관한 것이다.

[0050] 본 발명에서 상기 조성물은 4,4'-디아포뉴로스포렌(4,4'-diaponeuropsorene) 의 제조에 통상 사용되는 임의의 적합한 부형제를 추가로 포함할 수 있으며, 예컨대 보존제, 습윤제, 분산제, 현탁화제, 완충제, 안정화제 및 등장화제 등으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0052] 본 발명은 또다른 관점에서 다음 단계를 포함하는 4,4'-디아포뉴로스포렌(4,4'-diaponeuropsorene)를 생산하는 방법에 관한 것이다.

[0053] (a) 제1항 내지 제 6항의 재조합 대장균을 배양하여 4,4'-디아포뉴로스포렌(4,4'-diaponeuropsorene)를 생성시키는 단계 및

[0054] (b) 생성된 4,4'-디아포뉴로스포렌(4,4'-diaponeuropsorene)를 회수하는 단계.

[0055] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계는 상기 재조합 대장균은 20 ~ 30℃, 바람직하게는 22 ~ 28℃, 더 바람직하게는 24 ~ 26℃에서 배양하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0056] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계는 상기 재조합 대장균은 IPTG 처리하는 단계를 배제하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0057] 상기 IPTG(Isopropyl ß-D-1-thiogalactopyranoside)는 젖당 대사물 (lactose metabolite)로서 락 오페론(lac operon)의 전사를 개시하므로 유전자로부터 단백질 발현을 유도하는데 사용된다. 일반적으로 목적 단백질의 생산 수율을 높이기 위해 100 μM에서 1.0 mM 농도의 IPTG를 첨가한다. 반면, 본 발명의 재조합 대장균을 배양하는 단계에서 IPTG를 첨가하는 경우와 비교하여 IPTG를 첨가하지 않는 경우 4,4'-디아포뉴로스포렌(4,4'-diaponeuropsorene) 발현이 유의하게 증가한다.

[0058] 본 발명에 있어서, 상기 (b) 단계는 생성된 4,4'-디아포뉴로스포렌(4,4'-diaponeuropsorene)을 회수하기 위해서 다양한 방법을 이용할 수 있다. 예컨대, 균체를 원심분리 등에 의해 회수한 다음, 증류, 염석, 에탄올 침전, 한외 여과, 겔 여과 크로마토그래피, 이온교환 칼럼 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 중고압 액체 크로마토그래피, 역상 크로마토그래피, 소수 크로마토그래피 등의 공지된 적절한 방법 또는 이들을 조합함으로써 분리 정제할 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 (b) 단계는 정제 공정을 포함할 수 있으며, 당해 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 수행될 수 있다.

[0059] 본 발명에서 용어 "벡터"는 적합한 숙주 내에서 목적 단백질을 발현시킬 수 있도록 적합한 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 상기 목적 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 염기서열을 함유하는 DNA 생산물을 의미한다. 상기 조절 서열은 전사를 개시할 수 있는 프로모터, 그러한 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보좀 결합 부위를 코딩하는 서열, 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다. 벡터는 적당한 숙주 내로 형질전환된 후 숙주 게놈과 무관하게 복제되거나 기능할 수 있으며, 게놈 그 자체에 통합될 수 있다.

[0060] 본 발명에 있어서, 사용되는 벡터는 숙주 중에서 복제 가능한 것이면 특별히 한정되지 않으며 당업계에 알려진 임의의 벡터를 이용할 수 있다. 통상 사용되는 벡터는 천연 상태이거나 재조합된 상태의 플라스미드, 코스미드, 바이러스 및 박테리오파지으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 예컨대, 파지 벡터 또는 코스미드 벡터로서 pWE15, M13, λMBL3, λMBL4, λIXII, λASHII, λAPII, λt10, λt11, Charon4A, 및 Charon21A 등을 사용할 수 있으며, 플라스미드 벡터로서 pBR계, pUC계, pBluescriptII계, pGEM계, pTZ계, pCL계, pKD계, pT계, pET계 등을 사용할 수 있다. 또한, pACYC177, pACYC184, pCL, pECCG117, pUC19, pBR322, pMW118, pCC1BAC, pKD3, pT7, pKD46, pCP20, GESS(한국등록특허 10-1222056) 벡터 등을 사용할

수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0061] 본 발명에서 용어 "형질전환"은 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 숙주세포에 도입하여 숙주 세포 내에서 상기 폴리뉴클레오티드가 암호화하는 단백질이 발현할 수 있도록 하는 일련의 작업을 의미한다. 상기 숙주세포에 도입되는 폴리뉴클레오티드는 숙주세포 내로 도입되어 발현될 수 있는 모든 형태를 포함한다. 예컨대, 상기 폴리뉴클레오티드는, 자체적으로 발현되는데 필요한 모든 요소(상기 폴리뉴클레오티드에 작동 가능하게 연결되어 있는 프로모터(promoter), 전사 종결 신호, 리보좀 결합부위, 번역 종결 신호 등)를 포함하는 구조체인 발현 카세트(expression cassette)의 형태로 숙주세포에 도입될 수 있고, 상기 발현 카세트는 자체 복제가 가능한 발현 벡터 형태일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0062] 본 발명에서 용어 "작동 가능하게 연결"된다는 것은 본 발명의 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 전사를 개시 및 매개하도록 하는 프로모터 서열과 상기 유전자 서열이 기능적으로 연결되어 있는 것을 의미한다.

[0063] 본 발명에 있어서, 벡터의 도입 방법으로는 인산칼슘법, 염화칼슘/염화루비듐법, 리튬아세테이트법, 일렉트로포레이션법(electroporation), 전기주입법(electroinjection), PEG 등의 화학적 처리 방법, 유전자총(gene gun) 등 당업계에서 널리 사용되는 방법들을 적용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0064] 본 발명에서 용어 "배양"은 상기 대장균을 적당히 조절된 환경 조건에서 생육시키는 것을 의미한다. 상기 배양은 당업계에 알려진 적당한 배지와 배양조건에 따라 이루어질 수 있으며, 당업자가 용이하게 조정하여 사용할 수 있다.

[0066] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다.

[0068] 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0070] [실시예]

실 시 예 1

[0071] **실험 재료 및 방법**

[0072] **(실시예 1-1) 박테리아 균주 및 이의 배양**

[0073] 본 발명에서 사용된 박테리아 균주 및 플라스미드는 표 3과 같다. *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* KCCP11226은 KCCP(Korea Culture Collection of Probiotics)에서 공급받았다. KCCP11226은 de Man Rogosa and Sharpe (MRS; Kisanbio, Korea) 배지에서 30℃로 정적 배양하였다.

표 3

[0074] **본 발명에서 사용된 균주 및 플라스미드**

Strain or plasmids	Characteristics and usages
Strains	
Lactiplantibacillus plantarum subsp. *plantarum* KCCP11226	C30 carotenoid-producing strain
E. coli DH5α	DNA manipulation host. F^-, *end*A1, *hsdR*17(rk2, mk+), *supE*44 *thi*-1 *rec*A1, *pho*A, *gyr*A96, *rel*A1 △(*lacZ*YA-*argF*)U169, *deoR*, Φ80*lacZ*△M15
E. coli BL21 (DE3)	Protein expression host. F^-, *ompT*, *gal* [*E. coli* B, naturally *dcm* and *lon*], $hsdS_B$ with DE3, a λ prophage carrying the T7 RNA polymerase gene and $lacI^Q$
Plasmids	
pET28a(+)	DNA manipulation and expression vector.T7 lac promoter, Km^r

pETDuet-1	DNA manipulation and expression vector.T7 lac promoter, Amp^r
pET28a::crtM	pET28a carrying *crtM*
pET28a::crtN	pET28a carrying *crtN*
pETDuet-1::crtM	pETDuet-1 carrying *crtM*
pETDuet-1::crtN	pETDuet-1 carrying *crtN*
pETDuet-1::crtMN	pETDuet-1 carrying *crtM* and *crtN*

[0075] [a]KCCP, Korean Culture Collection of Probiotics

[0076] *E. coli* DH5α는 접합을 통한 DNA 클로닝 또는 조작을 위한 숙주로 사용하였다. *E. coli* BL21(DE3)은 복제된 유전자의 단백질 과발현을 위한 숙주로 사용하였다. pET28a(+) 및 공동 발현 벡터(pETDuet-1)는 대장균(*E. coli*)에서 C_{30} 카로티노이드 생합성 유전자의 복제 및 이종 발현에 사용하였다. *E. coli* DH5α 및 *E. coli* BL21(DE3)을 Luria-Bertani(LB; BD Difco, USA) 배지에서 37℃로 진탕(220 rpm)하면서 배양하였다. Kanamycin (50 μg/mL; Sigma Aldrich, USA), ampicillin (100 μg/mL; Sigma Aldrich, USA) 또는 streptomycin (50 μg/mL; Sigma Aldrich, USA)는 필요 시 배지에 첨가하였다.

[0078] **(실시예 1-2) C_{30} 카로티노이드 생산 플라스미드(C_{30} carotenoid-producing plasmid)의 제조**

[0079] 본 발명에서 사용된 프라이머는 표 4와 같다. *L. plantarum* subsp. *plantarum* KCCP11226의 게놈 DNA(genomic DNA)는 제조사 권장사항에 따라 Genomic DNA Isolation Kit(COSMO gentech, Korea)를 이용하여 분리 정제한 후, DNA 혼합물(DNA solution)을 사용할 때까지 -20℃에서 보관하였다. 게놈 DNA 추출 및 정제 후 KOD-plus(Toyobo, Japan)를 이용하여 PCR을 수행하였다. 플라스미드 pET28a::crtM을 제조하기 위해, crtM 유전자는 crtM-exp-F 및 crtM-exp-R 프라이머가 있는 *L. plantarum* subsp. *plantarum* KCCP11226의 게놈 DNA로부터 증폭시켰다(표 4). 유사하게, pET28a::crtN은 프라이머 crtN-exp-F 및 crtN-exp-R로 제조하였다(표 4). pETDuet-1::crtMN은 프라이머 crtM-duet-F, crtM-duet-R, crtN-duet-F 및 crtN-Duet-R을 사용하여 제조하였다(표 4). PCR은 5μL KOD 완충액, 5μL dNTP, 2μL MgSO4, 30μL 멸균 증류수, 1μL KOD-plus, 1μL 각 프라이머(10pmol) 및 4μL 게놈 DNA를 포함하여 50μL 부피에서 수행하였다. pET28a::crtM 및 pET28a::crtN의 PCR 조건은 다음과 같다: 2분 동안 94° C에서 예열 후 15초 동안 94° C, 1분 동안 72° C 및 2분 동안 68° C로 30 사이클. pETDuet-1::crtMN의 PCR 조건은 다음과 같다: 2분 동안 94° C에서 예열 후 15초 동안 94° C, 1분 동안 60° C 및 2분 동안 68° C로 30 사이클. PCR 산물(PCR product)은 QIAquick Gel Extraction Kit(QIAGEN, Germany)를 사용하여 정제시켰다.

표 4

[0080] **본 발명에서 사용된 프라이머**

Primer	Sequence of oligonucleotides[a]
crtMN-F	5′ - CGCGGAATTCATGAAGCAAGTATCGATTATTGGC -3′
crtMN-R	5′ - GATCGAATTCTTAAGCCTCCTTAAGGGCTAGTTC -3′
27F	5′ - AGAGTTTGATCMTGGCTCAG -3′
1492R	5′ - TACGGYTACCTTGTTACGACTT -3′
crtM-exp-F	5′ - GTGCCGCGCGGCAGCCATATGACCAAACTAATG -3′
crtM-exp-R	5′ - GTGGTGGTGGTGGTGCTCGAGAGCCTCCTTAAGG -3′
crtN-exp-F	5′ - GTGCCGCGCGGCAGCCATATGAAGCAAGTATCG -3′
crtN-exp-R	5′ - GTGGTGGTGGTGGTGCTCGAGGGCATTAGTTTGG -3′
crtM-duet-F	5′ - TAAGAAGGAGATATACCATGGCCATGACCAAACTAATGCC -3′
crtM-duet-R	5′ - CGACTTAAGCATTATGCGGCCGCTTAAGCCTCCTTAAG -3′
crtN-duet-F	5′ -TAAGAAGGAGATATACATATGAAGCAAGTATCGATTATTGGCGCTGG -3′
crtN-duet-R	5′ - GGTTTCTTTACCAGACTCGAGTTAGGCATTAGTTTG -3′

[0082] 제한효소(restriction enzyme) 처리를 통해 선형 벡터(linear vector)를 만들고 정제된 PCR 산물과 주입효소(infusion enzyme)를 혼합한다. 선형 벡터를 생성하기 위해 pET28a 벡터를 Nde Ⅰ과 Xho Ⅰ로 분해하고, pETDuet-1 벡터를 Nco Ⅰ과 Not Ⅰ로 분해한 후 Nde Ⅰ과 Xho Ⅰ로 분해하였다(Enzynomics, Korea). 주입 클로닝은 2 μL 5X In-Fusion HD exzyme premix (Takara, Japan), 1 μL 선형 벡터, 5 μL 초순수(ultrapure water) 및 2 μL 정제 DNA를 포함하여 10 μL 부피에서 수행하였다. 결찰 반응(ligation reaction)은 50° C에서 15분 동안 진행시켰으며 즉시 얼음에 보관하였다.

[0083] 정제된 분해된 삽입체(purified digested insert) 및 발현 벡터 단편(expression vector fragments)을 주입 효소로 결찰하여 발현 플라스미드 pET28a::crtN, pET28a::crtM 및 pETDuet-1::crtM를 생성한 다음 *E. coli* DH5α로 형질전환시켰다. 플라스미드 pET28a::crtN 및 pET28a::crtM은 QIAprep Spin Miniprep Kit(QIAGEN, Germany)를 이용하여 수득하였다. QIAprep Spin Miniprep Kit로 얻은 플라스미드 pETDuet-1::crtM을 Nde Ⅰ과 Xho Ⅰ(Enzynomics, Korea)로 분해하고 crtN에 클로닝하여 pETDuet-1::crtMN을 생성하였다. 그 다음, 각각의 재조합 플라스미드(recombinant plasmids)를 형질전환시키고, 발현 숙주 *E. coli* BL21(DE3)에서 발현시켰다. pET28a::crtM 또는 pET28a::crtN을 보유하는 *E. coli* BL21(DE3) 세포를 50 mg/mL 카나마이신이 보충된 LB 배지에서 37℃로 배양하였다. 또한, pETDuet-1::crtM 또는 pETDuet-1::crtMN을 포함하는 *E. coli* BL21(DE3) 세포를 100 mg/mL 암피실린이 보충된 LB 배지에서 37℃로 배양하였다. 각 플라스미드의 발현은 0.2mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG; Duchefa Biochemie, Netherlands)를 첨가하여 16℃로 16-18시간 동안 150rpm에서 진탕시켜 OD600의 값이 0.6일때 유도하였다.

[0084] 재조합 효소들(recombinant enzymes)을 소듐 도데실 설페이트-폴리아크릴아미드 겔 전기영동(SDS-PAGE)으로 분석하여 표적 단백질의 분자량을 평가하였다. 배양물을 4℃에서 20분 동안 5000 x g에서 원심분리하여 수득하였다. 세포 펠렛을 5mL 용해 완충액[(50mM Tris-HCl, pH 8.0; 150mM 염화나트륨(Duksan, Korea) 및 1mM 디티오트레이톨(DTT; Thermo Fisher, USA)]에 현탁하고 초음파 처리(sonication)를 통해 4℃에서 용해시켰다. 전극 완충액은 Tris-Glycine-SDS 완충액(DyneBio, Korea)이며, 25mM의 Tris-HCl(pH 8.3), 192mM 글리신 및 0.1%(w/v) SDS로 구성된다. 시료들(samples)을 5X SDS-PAGE loading buffer(DyneBio, Korea)과 혼합하고 5분 동안 가열하였다. 전기영동(PowerPac 300, Bio-Rad Laboratories, USA)을 200V에서 45분간 수행하였다. 전기 영동 후 젤을 Coomassie blue R-250 용액(DyneBio, Korea)으로 30℃로 30분동안 염색하고, 메탄올을 포함하는 탈색 용액(Thermo Fisher, USA): 빙초산(Thermo Fisher, USA): 물(9:1:10, v/v/v)로 실온에서 1시간 동안 탈색시켰다.

[0086] **(실시예 1-3) 카로티노이드 추출**

[0087] 카로티노이드의 생산량을 비교하기 위해 pETDuet-1 벡터 및 재조합 *E. coli* pETDuet-1::crtMN을 원심분리하여 배양하고 수득하였다. 50mL 배양물로부터 수득한 배양 세포를 궤도형 진탕기(orbital shaker)를 사용하여 실온에서 밤새 20mL 아세톤(Showa, Japan)에서 추출하였다. 진탕 후 아세톤 추출물에 헥산(Samchun, Korea) 10mL와 염화나트륨 수용액(10%, w/v) 10mL를 첨가하였다. 상부 상(upper phase)을 무수 $MgSO_4$(Samchun, Korea)로 건조시키고 회전 증발기(R-300, Buchi, Switzerland)에서 증발시켰다. 카로티노이드의 생산량은 UV-VIS 분광광도계(UV-1280, Shimadzu, Japan)를 사용하여 광학 밀도(OD600)를 A_{470}으로 나눈 값으로 표시하였다. 모든 평균은 3개의 독립적인 실험으로부터 계산하였고, 그 결과는 Tukey-Kramer 다중 비교 테스트를 통한 ANOVA 테스트로 분석하였다(** $P < 0.01$).

[0088] 표준 화합물로서 *L. plantarum* subsp. *plantarum* KCCP11226에서 추출된 카로티노이드는 (J Appl Microbiol (2013) 114:1763-1771)에 기재된 내용을 수정한 방법으로 추출하였다. 사전 배양을 준비하기 위해 *L. plantarum* subsp. *plantarum* KCCP11226을 MRS 배지에서 30° C에서 밤새 배양하였다. 사전 배양물을 삼각 플라스크(500mL)를 사용하여 200mL MRS 배지에 접종(1%)하였다. 그 다음 플라스크를 30℃에서 24시간 동안 정치배양 하였다. 박테리아 성장은 600 nm에서 UV-VIS 분광 광도계를 사용하여 측정하였다. 배양 세포를 10,000 x g에서 10분 동안 원심분리하여 수득하고, 궤도형 진탕기를 사용하여 실온에서 밤새 5mL 메탄올에서 추출하였다. 진탕 후 메탄올 추출물에 헥산과 증류수를 첨가하였다. 카로티노이드를 함유한 상층액(supernatant)을 2000 x g에서 10분 동안 원심분리하여 15mL 튜브로 옮겼다. 상층액을 증발시킨 다음 1mL 석유 에테르(Merck, Germany)에 재현탁시켰다. 추출물에 함유된 색소의 양은 UV-VIS 분광광도계를 사용하여 $A_{470\ nm}$에서 측정하였다.

[0090] **(실시예 1-4) UV-VIS 스펙트럼 및 HPLC를 이용한 C_{30} 카로티노이드 확인**

[0091] 실리카 겔 60 플레이트(Merck, Germany)에서 박막 크로마토그래피(TLC)에 의해 황색 색소를 분리한 후, spot 을 석유 에테르로 용리시켰다. 카로티노이드의 흡광도 스펙트럼은 UV-VIS Spectrophotometer로 측정하였다.

[0092] 정제를 위해 추출된 카로티노이드를 궤도형 진탕기로 실온에서 밤새 5N 염화나트륨 용액으로 탈염시켰다. 와류(vortex)를 사용하여 에틸 아세테이트(EtOAc; Showa, Japan)로 재추출한 후, 10,000 x g에서 10분 동안 원심분리한다. 상부 상(upper phase)을 조심스럽게 제거하고 탈수를 위해 황산나트륨 컬럼(무수; Biobasic, Canada)에 적재하였다. 이후 회전 증발기를 이용하여 증발시킨 후, 카로티노이드를 정제하기 위해 EtOAc에 용해시켰다. 용해된 카로티노이드를 실리카겔(Merck, Germany) 컬럼에 적재하였다. 실리카 겔 컬럼은 9:1 헥산/EtOAc 용매 시스템에서 미리 평형화시켜 제조하고, EtOAc의 증가하는 변화도에 따라 카로티노이드를 용리시켰다. 정제된 카로티노이드를 회전 증발기(R-300, Buchi, Switzerland)를 사용하여 건조시키고 아세톤에 용해시켰다. 0.5μM 폴리테트라플루오로에틸렌 필터(PTFE; Pall, USA)로 여과한 후 HPLC 분석에 사용하였다. 정제된 카로티노이드의 부분표본(aliquot)을 C18 역상 컬럼(reversed phase column)(250 × 4.6 mm ID, 입자 크기 5 μm; Syncronis C18, Thermo Fisher, USA)에 적용하고 혼합물 A의 100%에서 혼합물 B의 100%까지 binary gradient elution system에서 1.0 mL/min의 유속으로 용리하였다. 혼합물 A는 메탄올과 HPLC용 물(Samchun, Korea)(60:40; v/v)을 포함하고 혼합물 B는 메탄올, 메틸 tert-부틸-에테르(JTBaker, USA) 및 HPLC용 물(28.5:67.5: 4; v/v/v)을 포함한다. 카로티노이드의 분석은 UV-visible photodiode array detector(YL9100, YoungIn, Korea)가 있는 역상 HPLC 시스템으로 수행하였다. 또한, 4,4'-디아포뉴로스포렌(4,4'-diaponeurosporene) 및 4,4'-디아포파이토엔(4,4'-diapophytoene)의 검출은 각각 470 nm 및 286 nm에서 수행하였다.

실 시 예 2

[0094] **crtM 유전자의 클로닝 및 발현 결과**

[0095] crtM을 인코딩(encoding)하는 유전자는 *L. plantarum* subsp. *plantarum* KCCP11226의 게놈 DNA에서 PCR를 통해 증폭시켰다. PCR 산물은 주입 클로닝(infusion cloning)에 의해 pET28a(+)에 결찰하였다(도 1). *L. plantarum* subsp. *plantarum* KCCP11226 균주 유래의 crtM 유전자의 발현을 조사하기 위해 재조합 *E. coli* 균주를 구축하였다. 그 결과, 6251 bp 플라스미드를 최종적으로 제조하였다(도 2a). 효소의 겉보기 분자량은 SDS-PAGE로 조사하였다. 클론은 36.69kDa의 예상 분자량을 가진 단백질을 인코딩하는 882bp 길이의 삽입체(insert)을 가진다(도 3a).

[0096] *L. plantarum* subsp. *plantarum* KCCP11226의 crtM 유전자를 이용하여 *E.coli* 에서 4,4'-디아포뉴로스포렌(4,4'-diaponeurosporene)의 생산하기 위한 4,4'-디아포뉴로스포렌(4,4'-diaponeurosporene)의 기질인 4,4'-디아포파이토엔(4,4'-diapophytoene)의 발현을 시도하였다. 그 결과, 4,4'-디아포파이토엔(4,4'-diapophytoene)의 발현을 확인하였고, 이는 crtM 유전자의 발현이 4,4'-디아포파이토엔(4,4'-diapophytoene)의 생산과 관련 있으며, *E.coli* 에서 crtM 유전자가 성공적으로 발현되었다는 것을 나타낸다.

실 시 예 3

[0098] **crtN 유전자의 클로닝 및 발현 결과**

[0099] crtN을 인코딩(encoding)하는 유전자는 *L. plantarum* subsp. *plantarum* KCCP11226의 게놈 DNA에서 PCR를 통해 증폭시켰다. PCR 산물은 주입 클로닝에 의해 pET28a(+)에 결찰하였다(도 4). *L. plantarum* subsp. *plantarum* KCCP11226 균주유래의 crtN 유전자의 발현을 조사하기 위해 재조합 *E. coli* 균주를 구축하였다. 그 결과, 6866 bp 플라스미드를 최종적으로 제조하였다(도 2b). 효소의 겉보기 분자량은 SDS-PAGE로 조사하였다. 클론은 59.69kDa의 예상 분자량을 가진 단백질을 인코딩하는 1497bp 길이의 삽입체(insert)을 가진다(도 3b).

실 시 예 4

[0101] **crtM 및 crtN 유전자의 클로닝 및 공동 발현 결과**

[0102] CrtM 및 CrtN을 인코딩(encoding)하는 유전자는 *L. plantarum* subsp. *plantarum* KCCP11226의 게놈 DNA에서 PCR를 통해 증폭시켰다. PCR 산물은 주입 클로닝에 의해 pETDuet-1에 결찰하였다(도 5). C_{30} 카로티노이드 생합성 경로에 따라 crtM 유전자를 먼저 연결한 다음 crtN 유전자를 클로닝하였다. *L. plantarum* subsp. *plantarum* KCCP11226 균주유래의 crtM 및 crtN 유전자의 공동 발현을 조사하기 위해 재조합 *E. coli* 균주를 구축하였다. 2개의 단백질 생성물(4,4'-디아포파이토엔 및 4,4'-디아포뉴로스포렌)은 단일 벡터 pETDuet-1에서 독립적인 T7 프로모터 하 공동 발현되었다. 그 결과, 7748 bp 플라스미드를 최종적으로 제조하였다(도 2). 효소의 겉보기 분자량은 SDS-PAGE로 조사하였다. crtM 및 crtN에 대해 각각 약 33 및 56kDa에 해당하는 단백질 밴드를 나타냈으며, 이는 crtM 및 crtN 효소에 대한 예상 분자 크기 33.46 및 56.46kDa와 일치한다(도 7). 따라서, SDS-PAGE의 결과는 crtM과 crtN 유전자가 *E. coli*에서 성공적으로 동시 발현되었음을 나타낸다.

실 시 예 5

[0104] **재조합 대장균의 카로티노이드 생산 확인 결과**

[0105] 4,4'-디아포뉴로스포렌(4,4'-diaponeurosporene) 생산을 위하여 *E. coli* BL21(DE3) 균주는 *L. plantarum* subsp. *plantarum* 유래의 C_{30} 카로티노이드 생합성 유전자인 crtM 및 crtN으로 설계하였다(도 6). pETDuet-1::crtMN을 포함하는 *E. coli* BL21(DE3) 균주는 황색 색소 표현형을 보인 반면, pETDuet-1(빈 벡터)을 포함하는 *E. coli* BL21(DE3) 균주는 노란색 색소 표현형을 나타내지 않았다(도 8a). 또한, pETDuet-1::crtMN을 포함하는 *E. coli* BL21(DE3) 균주에서 추출한 노란색 색소는 470 nm에서 2.45의 유의한 흡광도를 보인 반면, pETDuet-1을 포함하는 *E. coli* BL21(DE3) 균주에서 추출한 색소는 470 nm에서 흡광도를 관찰할 수 없었다(도 8b, 8c). 한편, 각각의 crtM 또는 crtN 유전자의 발현은 *E. coli*로부터 황색 색소 표현형을 생성하기에 충분하지 않았다. 이러한 결과는 crtM 및 crtN 유전자가 4,4'-디아포뉴로스포렌 생산을 위한 C_{30} 카로티노이드 생합성 경로에서 C_{30} 카로티노이드 형성에 필수적이라는 것을 나타낸다.

[0106] 재조합 대장균(recombinant *E. coli*)에서 생산된 4,4'-디아포뉴로스포렌은 UV-VIS 스펙트럼과 *L. plantarum* subsp. *plantarum* KCCP11226의 HPLC 피크를 비교하여 결정하였다. 그 결과, *E. coli*로부터 추출한 황색 색소에서 *L. plantarum* subsp. *plantarum* KCCP11226의 4,4'-디아포뉴로스포렌과 동일한 유지(retention) 시간(59.2분, 도 9a)에서 주요 피크가 검출되었다. 그러나 빈 벡터를 발현하는 *E. coli*(pETDuet-1)에서는 4,4'-디아포뉴로스포렌이 생성되지 않았다(도 9b). 4,4'-디아포뉴로스포렌은 C_{30} 카로티노이드 생합성에서 2개의 경로 효소를 인코딩하는 *L. plantarum* subsp. *plantarum* 유전자 클러스터(cluster)로 형질전환된 재조합 대장균에서 이종 생산되었다.

[0107] *L. plantarum* subsp. *plantarum* KCCP11226 균주 유래의 crtM 또는 crtN 유전자의 발현을 조사하기 위해 각각의 재조합 *E. coli* 균주를 구축하였다(도 10). 그 결과, 4,4'-디아포뉴로스포렌의 기질인 4,4'-디아포파이토엔이 crtM 유전자만을 발현하는 벡터와 재조합된 대장균으로부터 생산되었다(60.1분; 도 10a). 반면, crtN 유전자만을 발현하는 벡터를 재조합한 대장균에서는 벡터만을 발현하는 대장균과 동일한 결과를 얻었다. 이는 대장균에서 crtM 유전자 없이 crtN 유전자만으로는 4,4'-디아포뉴로스포렌을 생산할 수 없음을 의미한다. 따라서, 본 발명에서 crtM 및 crtN 유전자가 C_{30} 카로티노이드 생합성을 통해 대장균에서 FPP(Farnesyl pyrophosphate의 4,4'-디아포뉴로스포렌으로의 전환을 촉매한다는 것을 확인하였다

[0108] C_{30} 카로티노이드의 생산은 *S. aureus*와 유산균(lactic acid bacteria, LAB)에서만 가능한 것으로 알려져 있다. *S. aureus*는 staphyloxanthin을 C_{30} 카로티노이드로 생산하고, 유산균은 4,4'-디아포뉴로스포렌을 C_{30} 카로티노이드로 생산한다. 따라서 *S. aureus*와 유산균만이 C_{30} 카로티노이드 생산에 필수적인 생합성 유전자를 가지고 있다.

[0109] 대사공학을 통한 4,4'-디아포뉴로스포렌 생성에 대한 기존 연구는 대부분 *S. aureus* 유전자를 이용하여 대장균(*E. coli*)과 고초균(*Bacillus subtilis*)에서 시도하였으며, 유산균 유래 카로티노이드 생합성 유전자를 이용하여 대장균에서 시도한 연구는 알려진 바가 없다. 이는 대사공학을 통해 카로티노이드와 같은 친유성이 높은 화합물을 생산할 때 숙주의 저장용량을 고려할 필요가 있기 때문이다. 그러나, 대장균으로부터 유용물질을 생산할 수 있는 플랫폼이 구축된다면 경제적이고 용이한 대량생산이 가능해 향후 산업적 활용성에 큰 영향을 미칠 수

있다. 또한 일반적으로 안전하다고 인정되는 GRAS 균주인 유산균의 활용은 향후 다양한 연구 분야에서 활용될 수 있을 것이다. 따라서 본 발명은 다양한 활성을 갖는 유용한 물질인 4,4'-디아포뉴로스포렌의 대량 생산을 위해 LAB 유래 카로티노이드 생합성 유전자와 *E. coli*를 사용하였으며, 이를 통해 안전한 LAB 유래 4,4'-디아포뉴로스포렌을 생산할 수 있는 *E. coli* 플랫폼을 완성하였다.

[0110] 본 발명의 카로티노이드 생합성 유전자를 발현하는 재조합 대장균은 4,4'-디아포뉴로스포렌을 성공적으로 생산하였으며, 카로티노이드 생산과 필수적인 생합성 유전자 사이의 인과관계를 입증하였다. 이는 희귀 카로티노이드의 미생물 생산 측면에서 매우 유의미한 결과이며, 본 발명에서 완성된 4,4'-디아포뉴로스포렌 생산을 위한 새로운 *E. coli* 플랫폼은 향후 높은 산업적 수요를 고려할 때 매우 중요하다. 보다 광범위하게, 본 발명에서 개발된 재조합 대장균은 다른 유형의 C30 카로티노이드 생산을 위한 세포 공장의 출발점으로 사용될 수 있다.

실 시 예 6

[0112] **재조합 대장균의 배양 조건에 따른 카로티노이드 생산량 확인 결과**

[0113] 기존 연구는 재조합 대장균을 이용하여 C_{30} 카로티노이드인 4,4' -diaponeurosporene의 생산량을 증가시키는 실험에 대한 결과는 보고된 바가 없다. 따라서, 본 발명에서 유산균 유래의 C_{30} 카로티노이드 필수 생합성 유전자인 crtN과 crtM 유전자를 보유하는 재조합 대장균(*E. coli* BL21)을 이용하여 카로티노이드 생산량을 증가시키기 위한 배양 조건의 최적화 실험을 수행하였다.

[0114] 배양 온도와 관련하여, 재조합 대장균을 37℃에서 200rpm으로 배양하여 OD_{600}을 0.6 전후로 맞추고 0.4mM IPTG induction을 동일하게 진행한 후 5가지 온도(15℃, 20℃, 25℃, 30℃, 37℃) 조건에서 각각 24시간 배양을 수행하였다. 그 결과, 25℃ 조건에서 재조합 대장균을 배양하는 경우 가장 높은 OD(cell density)와 카로티노이드 생산량을 확인하였다(도 11).

[0115] 또한, 재조합 대장균의 IPTG 농도에 따른 카로티노이드 생산에 대한 실험을 수행하였다. 배양 온도 실험과 동일한 방법으로 37℃에서 200rpm으로 배양한 후 IPTG의 농도(0 mM, 0.05 mM, 0.1 mM, 0.2 mM, 0.4 mM)를 달리하여 induction해본 결과 IPTG를 넣어주지 않은 실험군에서 가장 높은 카로티노이드 생산량을 확인하였다(도 12).

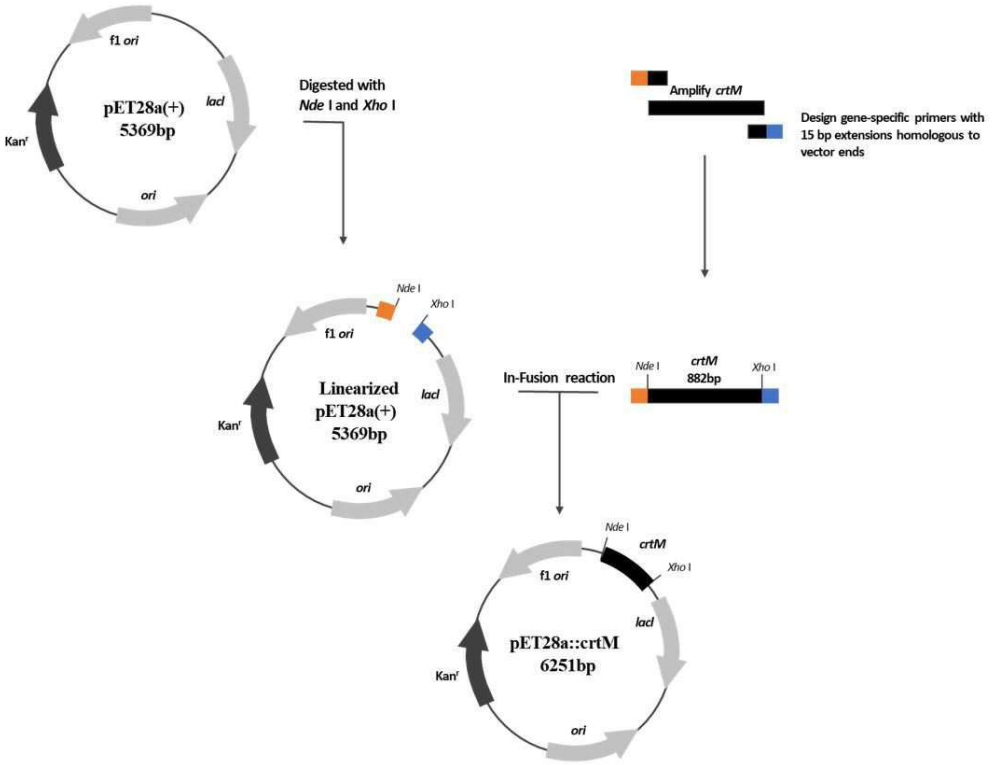
[0116] 재조합 대장균을 제조하기 위해 사용한 petDuet-1 vector는 lac promoter를 가지고 있는 IPTG inducible한 vector이다. 일반적으로 inducible한 vector의 경우 Inducer를 넣어주어 더 많은 단백질을 발현을 유도한다. 예컨대, 한 연구에서 C_{40} 카로티노이드인 beta-carotene을 생산하기 위해 구축된 재조합대장균을 이용하여 IPTG의 농도별 최적화 실험을 진행한 결과, IPTG를 넣어주지 않은 실험군에 비해 IPTG의 농도가 0.05 mM일 때 더 높은 카로티노이드 생산량을 나타낸다는 결과를 보고한 바 있다.

[0117] 또한, 다른 연구는 *E. coli* BL21 균주에서 일반적으로 재조합 단백질을 발현할 때, 재조합 막 단백질을 발현하는 경우 세포질 내부에서 발현된 단백질이 세포질막에 있는 sec-translocon이라는 단백질 복합체의 자리를 대체하여 막 단백질이 발현하게 되고, IPTG를 넣어 세포질 내부의 단백질을 빠르게 발현시키면 막 단백질로 대체될 수 있는 sec-translocon 복합체가 빠르게 포화되어 오히려 막 단백질 발현양이 떨어진다는 점을 보고한 바 있다. 다만, IPTG induction이 세포 수율에 영향을 주지 않고 재조합 플라스미드의 발현에만 영향을 미치는 연구는 알려진 바가 없다. 본 발명에서는 0.2 mM IPTG induction까지 세포 수율이 높게 유지되고 카로티노이드 생산량만 낮아진 것을 확인하였다. 0.4mM보다 낮은 농도의 IPTG를 처리하였을 경우 세포 생장이 감소하지 않는 것은 실험 균주에 따른 차이와 IPTG의 낮은 농도에 의한 것이라고 판단된다.

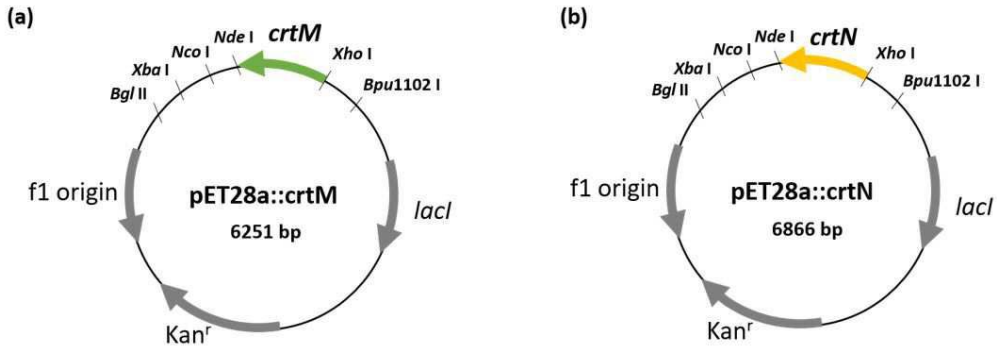
[0118] 본 발명의 재조합 대장균은 배양 온도가 25℃이고, IPTG 농도가 0인 특정 배양 조건에서 카르티노이드 생산량이 10배 이상 증가한 것을 확인하였다(도 11 및 도 12).

도면

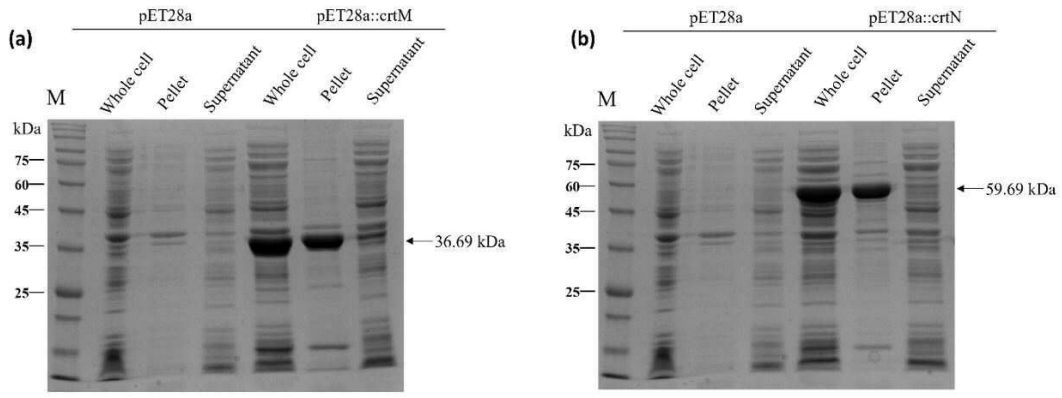
도면1


f1 ori
pET28a(+)
5369bp
lacI
Kanr
ori
Digested with
Nde I and Xho I
Amplify crtM
Design gene-specific primers with
15 bp extensions homologous to
vector ends
Nde I
Xho I
f1 ori
Linearized
pET28a(+)
5369bp
lacI
Kanr
ori
In-Fusion reaction
Nde I
crtM
882bp
Xho I
Nde I
crtM
Xho I
f1 ori
lacI
pET28a::crtM
6251bp
Kanr
ori

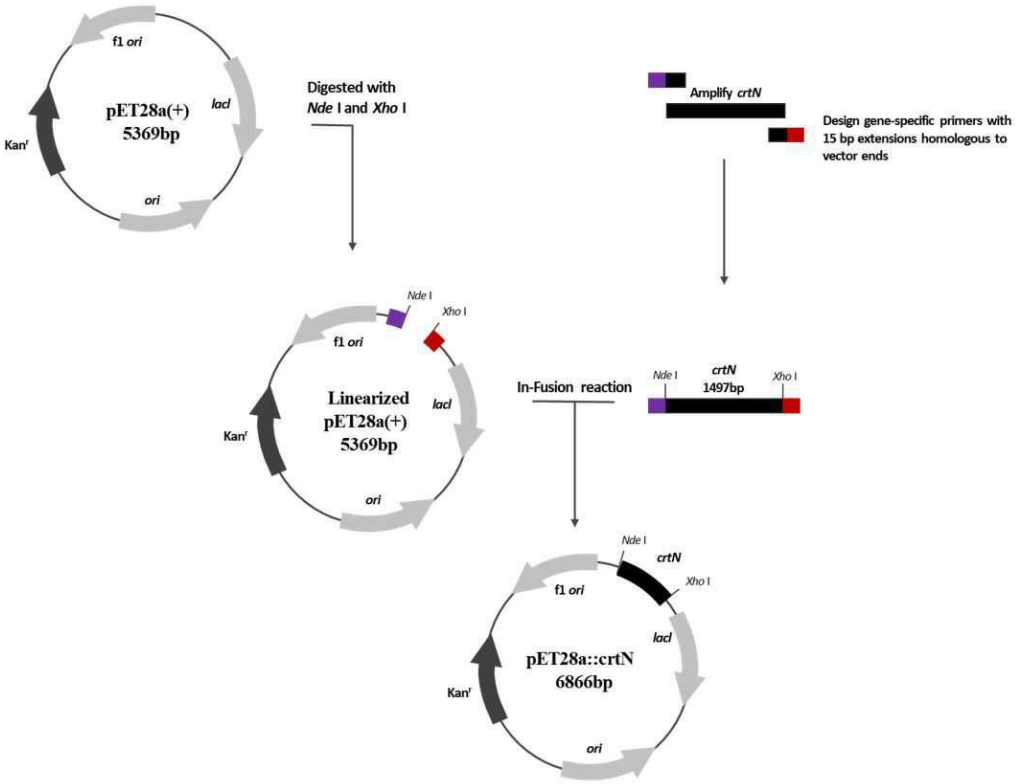
도면2


(a)
Nde I
crtM
Nco I
Xho I
Xba I
Bpu1102 I
Bgl II
f1 origin
pET28a::crtM
6251 bp
lacI
Kanr
(b)
Nde I
crtN
Nco I
Xho I
Xba I
Bpu1102 I
Bgl II
f1 origin
pET28a::crtN
6866 bp
lacI
Kanr

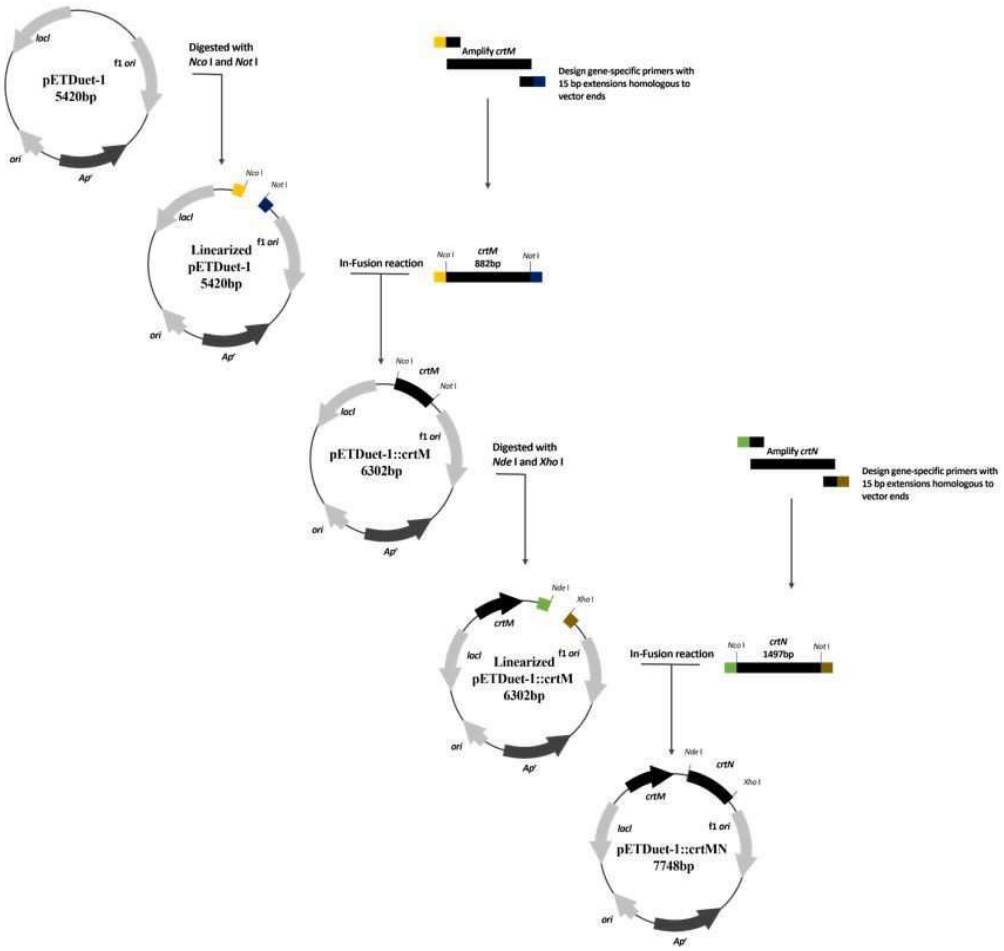
도면3


(a)
pET28a
pET28a::crtM
M
Whole cell
Pellet
Supernatant
Whole cell
Pellet
Supernatant
kDa
75
60
45
35
25
36.69 kDa
(b)
pET28a
pET28a::crtN
M
Whole cell
Pellet
Supernatant
Whole cell
Pellet
Supernatant
kDa
75
60
45
35
25
59.69 kDa

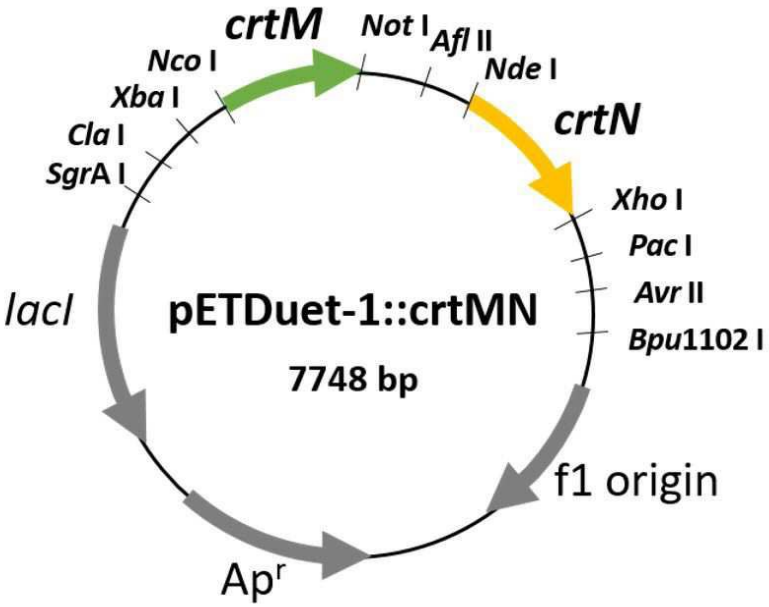
도면4


f1 ori
pET28a(+)
5369bp
lacI
Kan'
ori
Digested with
Nde I and Xho I
Amplify crtN
Design gene-specific primers with
15 bp extensions homologous to
vector ends
Nde I
Xho I
f1 ori
Linearized
pET28a(+)
5369bp
lacI
Kan'
ori
In-Fusion reaction
Nde I
crtN
1497bp
Xho I
Nde I
crtN
Xho I
f1 ori
lacI
pET28a::crtN
6866bp
Kan'
ori

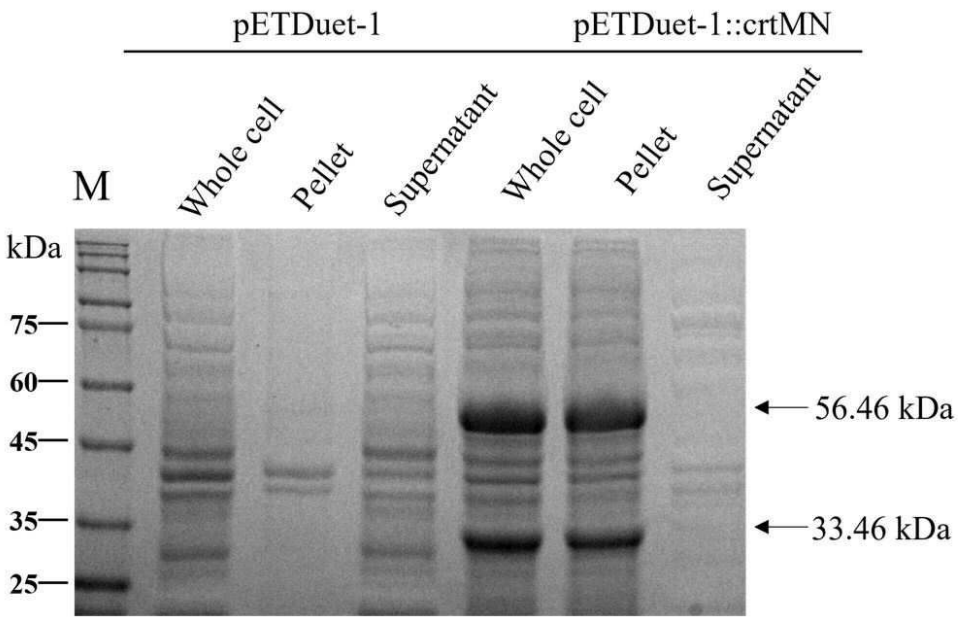
도면5


lacI
f1 ori
pETDuet-1
5420bp
ori
Ap^r
Digested with
Nco I and Not I
Nco I
Not I
Linearized
pETDuet-1
5420bp
Amplify crtM
Design gene-specific primers with
15 bp extensions homologous to
vector ends
In-Fusion reaction
crtM
882bp
pETDuet-1::crtM
6302bp
Digested with
Nde I and Xho I
Nde I
Xho I
Linearized
pETDuet-1::crtM
6302bp
Amplify crtN
Design gene-specific primers with
15 bp extensions homologous to
vector ends
crtN
1497bp
crtN
pETDuet-1::crtMN
7748bp

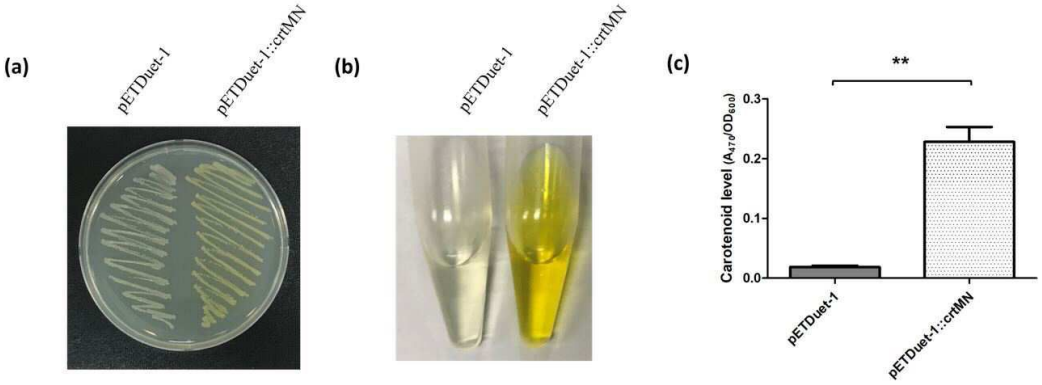
도면6


crtM
Not I
Afl II
Nde I
crtN
Nco I
Xba I
Cla I
SgrA I
Xho I
Pac I
Avr II
Bpu1102 I
lacI
pETDuet-1::crtMN
7748 bp
f1 origin
Ap^r

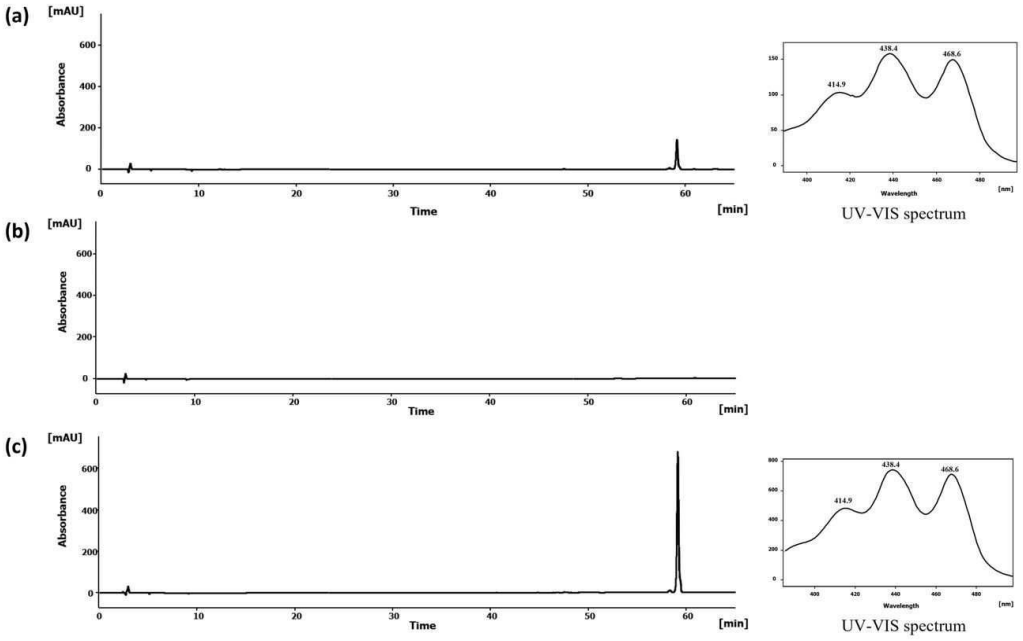
도면7


pETDuet-1
pETDuet-1::crtMN
M
Whole cell
Pellet
Supernatant
Whole cell
Pellet
Supernatant
kDa
75
60
45
35
25
56.46 kDa
33.46 kDa

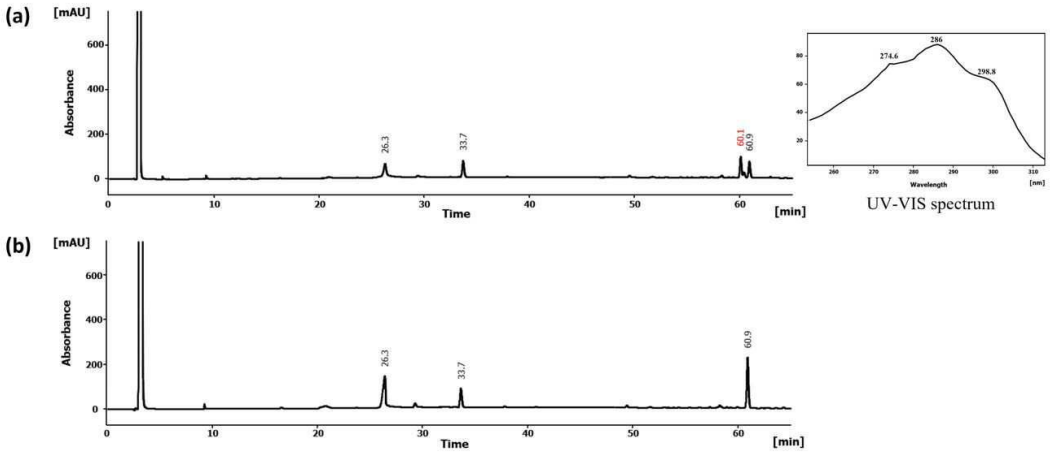
도면8


(a)
pETDuet-1
pETDuet-1::crtMN
(b)
pETDuet-1
pETDuet-1::crtMN
(c)
**
Carotenoid level (A_{470}/OD_{600})
0.3
0.2
0.1
0.0
pETDuet-1
pETDuet-1::crtMN

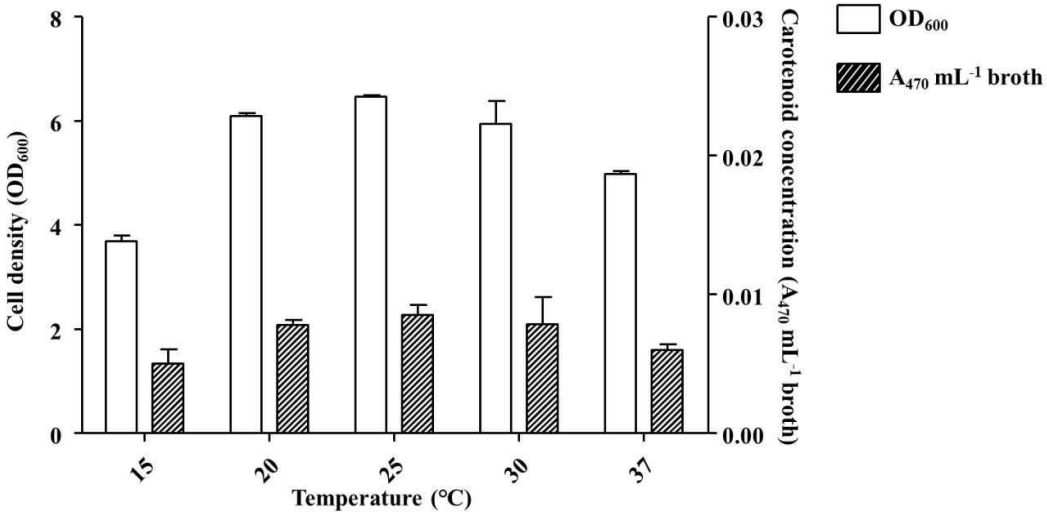
도면9


(a)
[mAU]
Absorbance
600
400
200
0
0
10
20
30
40
50
60
Time
[min]
438.4
468.6
414.9
Wavelength
[nm]
UV-VIS spectrum
(b)
[mAU]
Absorbance
Time
[min]
(c)
[mAU]
Absorbance
Time
[min]
438.4
468.6
414.9
Wavelength
[nm]
UV-VIS spectrum

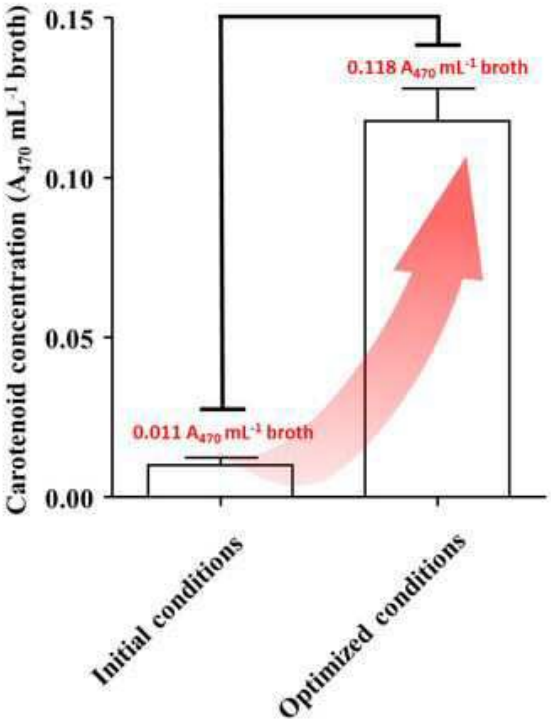
도면10

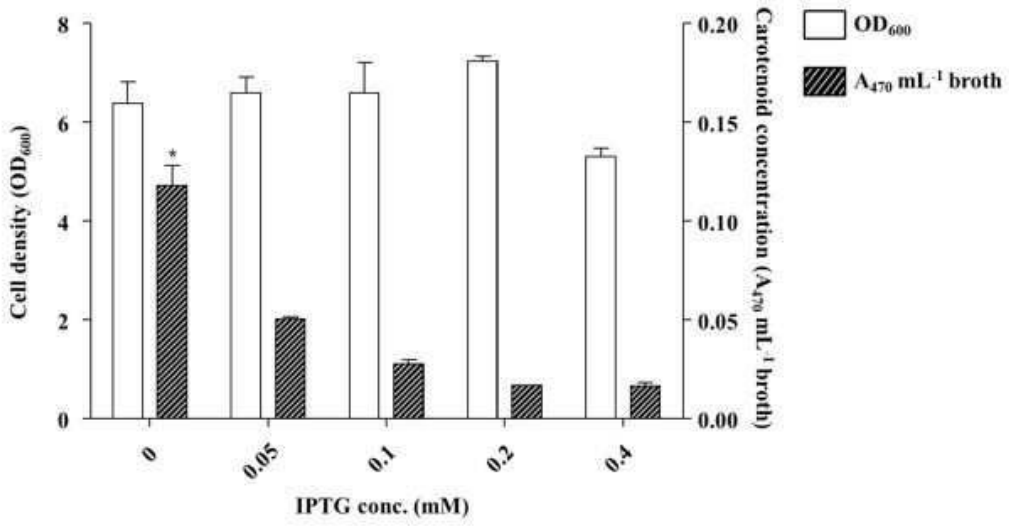

(a)
[mAU]
Absorbance
Time
[min]
26.3
33.7
60.1
60.9
274.6
286
298.8
Wavelength
[nm]
UV-VIS spectrum
(b)
[mAU]
Absorbance
Time
[min]
26.3
33.7
60.9

도면11


Cell density (OD600)
Carotenoid concentration (A470 mL-1 broth)
Temperature (°C)
15
20
25
30
37
OD600
A470 mL-1 broth

도면12





서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> INCHEON NATIONAL UNIVERSITY RESEARCH & BUSINESS FOUNDATION

<120> Recombinant E. coli for carotenoid production and use thereof

<130> 10750573

<160> 14

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 882

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Lactiplantibacillus plantarum subsp. plantarum KCCP11226 crtM

<400> 1

atgaccaaac taatgcctaa attcgaacaa catcgcactg actttgcgta ctgtcaaaca 60

attactaaaa ggtcttctag cgcattctac accgccttct cgcaattacc actagaacgc 120

gcttggagta tttacgccgt ttatgctttt tgtcgaacag ccgacgacct cgttgatgtt 180

gaccatgata ttgatggtct aatggcattg cgccaatcat tgaccacctt tgccaatggt 240

catgtcccag accacccaat gtggcgcgca ctggccgtcg tttttgagac ttatgatatg 300

aatcttgacg tctttttcga tatgctcact ggtcaagaac aagacgcgac ttttaaacaa 360

cctcaaactc agcaagcact tgaagactat tgctattacg tcgccggatc ggttggtctg 420

atgattttgc caatgctagc aactaacccg caatcacttg tcaaaccagc cgtagaatta 480

ggcagcgcca tgcaactcac caatatttta agagatgttg gtgaagacta ccaacgtggc 540

cgaatctacc tgccatcaaa actattggca cactatcagc tcaatccaac tgacttgcat 600

ggccccatcc catctgccaa ttttattcgg ctttgggaac atgaagcaca gattgccatg 660

aacaagtacg aggctgcatt aaccatgatg ccacaaattg atcccgtcgc ccggccatcg 720

ctattagccg ccactttgct ttatcgtgaa ttattgctaa tcgcacgtga acaacactac 780

ccaattttaa gtcagcgcgt ctttttgaca gatgaacgta aaacgcaggt ccttaatcaa 840

gttagcacta aagtgcatga actagcccct aaggaggctt aa 882

<210> 2

<211> 1497

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Lactiplantibacillus plantarum subsp. plantarum KCCP11226 crtN

<400> 2

atgaagcaag tatcgattat tggcgctggt attggtggct taaccgctgc agtacggctt 60

caaaaattag gttataatgt tacgatttat gagcaaaacg cgcaaccggg tggcaaaatg 120

aaccagattg ttagccaagg atttacattt gacgtggggc cgacgatcgt catgatgaaa 180

gacatctacg aagaagtctt tcgcttttgc ggggtcgatc cgcacaacta tttaccattc 240

gaagaagttc aacctttgat gcaccttgtc tttggtgatc aatctagtct agatttgtca 300

cgcgatctcc caacattaat tgccgagatt aaccgcattg cgcctgatga cgtcaatggt 360

atgttaaatt ttttagcgga tatttatcac cggtatacca tcgcgaagcc taatttttta 420

gaacgatcat ttcgtaactg gcgtgacttt tataacctac ccgctctgta tgcaggacta 480

cagttacgca cctttaacaa tgcctacaaa aacattgcaa aatttatcaa gaatgaaaat 540

ctacgtaatt cattagcctt tcagacactg tatattggga tttctcccta ccagggcccg 600

tcgctataca acattattcc gatgattgag ctcttctacg gggtctattt tttaaagggt 660

ggtatgtaca cagttgtcaa tagtctcgtt aagttattca aagaacaggg tggtacgtta 720

aagcttgcca caccagttca agaaattatc atcaaagata aagttgctgt tggcattcgt 780

gtcaataatc atccgatcca cagtgactat gtcctatgta atgctgattt tccaaccgcc 840

atgacgacac tgattccaaa tgagcaaaat cgtggtcagt acacagatca aaaaattgcc 900

aaaatggatt attcatgctc atgtctcgtc ttgtatttag gactagacaa aaaataccca 960

accgaagcat tacacacgat ccactttgca caagatttca gcaaaaacgt cgccgatcta 1020

tttgacaacg gcaagttacc agaagatccc tcgtattatg tctatgttcc atcaaagatg 1080

gatccaagtt tagctcccga aaacagtgag gcactctatg ttttagtacc agttcctgag 1140

ctctcaaagt ttaatgactg gtcaccaaca acactgaaga actatcgtca actaatcatt 1200

aacaaactaa gacaaacggc taccttcagc gatattgaac agcatatcgt tgtcgaaaag 1260

cagtttacac cggttgactt caaagaacag tttggcgcct ataacggagc cactttcggc 1320

ttacgaccga cgttaaaaca aagtaattat tatcgtcccc ataacaagtt cgactatgcc 1380

gaccatcttt atttttgtgg tagtagcacc caccctgggg ccggtgttcc cattgttatg 1440

caaagtgcta aattagccgt tgaggagttg attaaagatg accaaactaa tgcctaa 1497

<210> 3

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> crtMN primer F

<400> 3

cgcggaattc atgaagcaag tatcgattat tggc 34

<210> 4

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> crtMN primer R

<400> 4

gatcgaattc ttaagcctcc ttaagggcta gttc 34

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> 27 primer F

<400> 5

agagtttgat cmtggctcag 20

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> 1492 primer R

<400> 6

tacggytacc ttgttacgac tt 22

<210

> 7

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> crtM exp primer F

<400> 7

gtgccgcgcg gcagccatat gaccaaacta atg 33

<210> 8

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> crtM exp primer R

<400> 8

gtggtggtgg tggtgctcga gagcctcctt aagg 34

<210> 9

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> crtN exp primer F

<400> 9

gtgccgcgcg gcagccatat gaagcaagta tcg 33

<210> 10

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> crtN exp primer R

<400> 10

gtggtggtgg tggtgctcga gggcattagt ttgg 34

<210> 11

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> crtM duet primer F

<400> 11

taagaaggag atataccatg gccatgacca aactaatgcc 40

<210> 12

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> crtM duet primer R

<400> 12

cgacttaagc attatgcggc cgcttaagcc tccttaag 38

<210> 13

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> crtN duet primer F

<400> 13

taagaaggag atatacatat gaagcaagta tcgattattg gcgctgg 47

<210> 14

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> crtN duet primer R

<400> 14

ggtttcttta ccagactcga gttaggcatt agtttg 36