



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0000294
(43) 공개일자 2017년01월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/70 (2006.01) C12P 7/40 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/70 (2013.01)
C12P 7/40 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0089346
(22) 출원일자 2015년06월23일
심사청구일자 2015년06월23일

(71) 출원인
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(72) 발명자
이성국
울산광역시 남구 문수로409번길 23, 202동 601호
(신정동, 문수로아이파크2단지)
함태환
경기도 성남시 분당구 수내로 206, 315동 106호
(수내동, 푸른마을 아파트)
찬드란 사데쉬 프라부
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50, 308동
1706호(울산과학기술대학교 유니스트 기숙사)
(74) 대리인
제일특허법인

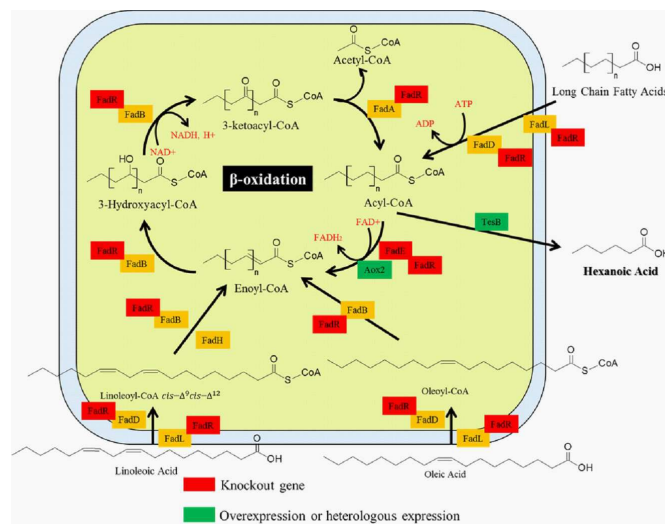
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 변이 대장균에서 베타 산화를 통해 카프로산을 생산하는 방법

(57) 요약

본 발명은 대장균에서 베타 산화를 통해 카프로산을 생산하는 방법, 및 카프로산을 생산하는 변이 대장균에 관한 것으로, 본 발명의 방법에 따르면 폐 식물유와 같은 장쇄 지방산으로부터 카프로산을 우수한 수율로 생산해 낼 수 있으므로 산업 물질 또는 바이오 연료의 제조에 유용하게 적용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12Y 102/03003 (2013.01)

C12Y 301/02002 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1395041389

부처명 농림수산식품부

연구관리전문기관 경상대학교산학협력단

연구사업명 차세대바이오그린21사업

연구과제명 식물 유전자를 이용한 다양한 사슬길이 지방산 합성 대장균 제작 및 응용

기 여 율 1/1

주관기관 국립대학법인 울산과학기술대학교 산학협력단

연구기간 2015.01.15 ~ 2015.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

- (1) 야생형 대장균의 *fadE* 및 *fadR* 유전자를 녹아웃(knock out)시킨 후, *pox2* 및 *tesB* 유전자를 포함하는 발현 벡터로 상기 대장균을 형질 전환시켜 변이 대장균을 제조하는 단계; 및
- (2) 상기 변이 대장균을 배양하고 휴지 단계의 세포를 수확하고, 배지에 C₁₀, C₁₂, C₁₄, C₁₆, C₁₈, C_{18:1} 및 C_{18:2}로 이루어진 군으로부터 선택되는 포화 지방산 또는 불포화 지방산을 첨가하는 단계를 포함하는, 변이 대장균에서 베타 산화를 통해 카프로산을 생산하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 *pox2* 및 *tesB* 유전자가 각각 서열번호 9 및 10로 표시되는 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 발현 벡터가 도 2에 도시된 개열지도를 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

야생형 대장균의 *fadE* 및 *fadR* 유전자가 녹아웃되고, *pox2* 및 *tesB* 유전자를 발현하여 베타 산화를 통해 카프로산을 생산하는 변이 대장균.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 *pox2* 및 *tesB* 유전자가 각각 서열번호 9 및 10로 표시되는 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 변이 대장균.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 변이 대장균에서 베타 산화를 통해 카프로산을 생산하는 방법, 및 카프로산을 생산하는 변이 대장균에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 석유 연료 고갈을 극복하고 이산화탄소 방출을 절감시키기 위하여, 전 세계적으로 석유를 대체할 물질을 개발하기 위한 노력이 지속되고 있다. 연료 또는 석유화학물질을 대체할 수 있는 공급 원료로서 폐 식물유와 같이 재생가능한 물질은 경제적 그리고 환경적인 관점에서 유망한 원료이다. 이에 따라, 동종, 이종 그리고 효소적 촉매 반응을 통한 에스테르 교환 반응을 이용하여 폐유로부터 바이오디젤을 바로 생산하기 위한 연구들이 수행되

고 있다. 특히, 폐 식물유는 탄소원으로서 지방산을 충분히 포함하기 때문에, 미생물을 이용하여 산업물질 또는 바이오연료를 생산할 수 있는 공급 원료로 매우 유용하지만(M.K. Lam, et al., Biotechnology advances, 28 (2010) 500-518), 이에 대한 연구는 아직 미흡한 실정이다.

[0003] 한편, 카프로산(이하, '헥산산'으로도 지칭함)은 6-탄소쇄를 포함하는 카복실산으로서, 이와 같은 단쇄 지방산(short chain fatty acid, SCFA)은 향수,약품, 식품 첨가제, 중합체 백본 및 다양한 산업 물질의 제조에 이용될 수 있다(L.A. Royce, et al., Applied microbiology and biotechnology, 97 (2013) 8317-8327). 카프로산은 아디프산(adipic acid), 헥산(hexane), 헥사놀(hexanol) 등의 6-탄소쇄를 갖는 연료 및 화학 물질의 전구체가 될 수 있다(W. Runguphan, et al., Metabolic engineering, 21 (2014) 103-113; Y.J. Choi, et al., Nature, 502 (2013) 571-574). 바이오디젤의 주요 성분들은 중쇄 지방산(medium chain fatty acid, MCFA)에서 유래되기 때문에, 대장균에서 지방산을 생산하는 것에 관한 수많은 연구들은 중쇄 지방산의 생산 수율 향상에 초점이 맞춰져 왔다(X. Lu, et al., Metabolic engineering, 10 (2008) 333-339; S. Sherkhanov, et al., Metabolic engineering, 25 (2014) 1-7; E.J. Steen, et al., Nature, 463 (2010) 559-562; H. Wu, et al., Metabolic engineering, 25 (2014) 82-91). 미생물로부터 생성된 이러한 중쇄 지방산은 에스테르화 반응 이후에 바이오디젤로서 적용될 수 있다.

[0004] 또한, 헥산산과 같은 단쇄 지방산은 중쇄 지방산에 비해 길이가 짧기 때문에 중합체의 전구체로서 보다 이점을 갖는다(K. Saeed, et al., Journal of applied polymer science, 106 (2007) 3729-3735).

[0005] 이에, 본 발명자들은 미생물로부터 상기 헥산산을 생산해 내기 위하여 새로운 베타 산화 엔지니어링에 관한 연구를 지속하였으며, 그 결과, 대장균에 이중 유전자(heterologous genes)를 도입함으로써 카프로산을 생산하는 방법을 개발함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0006] (비특허문헌 0001) M.K. Lam, et al., Biotechnology advances, 28 (2010) 500-518
(비특허문헌 0002) L.A. Royce, et al., Applied microbiology and biotechnology, 97 (2013) 8317-8327
(비특허문헌 0003) W. Runguphan, et al., Metabolic engineering, 21 (2014) 103-113
(비특허문헌 0004) Y.J. Choi, et al., Nature, 502 (2013) 571-574
(비특허문헌 0005) X. Lu, et al., Metabolic engineering, 10 (2008) 333-339
(비특허문헌 0006) S. Sherkhanov, et al., Metabolic engineering, 25 (2014) 1-7
(비특허문헌 0007) E.J. Steen, et al., Nature, 463 (2010) 559-562
(비특허문헌 0008) H. Wu, et al., Metabolic engineering, 25 (2014) 82-91
(비특허문헌 0009) K. Saeed, et al., Journal of applied polymer science, 106 (2007) 3729-3735

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 따라서, 본 발명의 목적은 변이 대장균으로부터 베타 산화를 통해 카프로산을 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 변이 대장균을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0009] 상기 목적을 달성하기 위해 본 발명은,
- [0010] (1) 야생형 대장균의 *fadE* 및 *fadR* 유전자를 닉 아웃(knock out)시킨 후, *pox2* 및 *tesB* 유전자를 포함하는 발현 벡터로 상기 대장균을 형질 전환시켜 변이 대장균을 제조하는 단계; 및
- [0011] (2) 상기 변이 대장균을 배양하고, 휴지 단계의 세포를 수확하고, 배지에 C₁₀, C₁₂, C₁₄, C₁₆, C₁₈, C_{18:1} 및 C_{18:2}로 이루어진 군으로부터 선택되는 포화 지방산 또는 불포화 지방산을 첨가하는 단계를 포함하는, 변이 대장균에서 베타 산화를 통해 카프로산을 생산하는 방법을 제공한다.
- [0012] 상기 다른 목적을 달성하기 위해 본 발명은, 야생형 대장균의 *fadE* 및 *fadR* 유전자가 닉 아웃되고, *pox2* 및 *tesB* 유전자를 발현하여 베타 산화를 통해 카프로산을 생산하는 변이 대장균을 제공한다.

발명의 효과

- [0013] 본 발명에 따르면, 변이 대장균을 이용하여 상이한 길이의 지방산으로 구성된 다양한 폐 식물유로부터 단쇄 지방산인 카프로산을 생산할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0014] 도 1은 본 발명의 변이 대장균에서 베타 산화를 통해 지방산으로부터 카프로산을 생성하는 과정을 보여주는 개요도이다.
- 도 2는 본 발명의 변이 대장균 제조를 위한 발현 벡터의 개열지도를 나타낸 것이다.
- 도 3은 본 발명의 변이 대장균에서 생산된 카프로산의 양을 그래프로 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0015] 본 발명은 (1) 야생형 대장균의 *fadE* 및 *fadR* 유전자를 닉 아웃(knock out)시킨 후, *pox2* 및 *tesB* 유전자를 포함하는 발현 벡터로 상기 대장균을 형질 전환시켜 변이 대장균을 제조하는 단계; 및 (2) 상기 변이 대장균을 배양하고, 휴지 단계의 세포를 수확하고, 배지에 C₁₀, C₁₂, C₁₄, C₁₆, C₁₈, C_{18:1} 및 C_{18:2}로 이루어진 군으로부터 선택되는 포화 지방산 또는 불포화 지방산을 첨가하는 단계를 포함하는, 변이 대장균에서 베타 산화를 통해 카프로산을 생산하는 방법을 제공한다.
- [0016] 본 발명의 방법에서, 단계 1은 야생형 대장균의 *fadE* 및 *fadR* 유전자를 닉 아웃시킨 후, *pox2* 및 *tesB* 유전자를 포함하는 발현 벡터로 상기 대장균을 형질 전환시켜 변이 대장균을 제조하는 단계이다.
- [0017] 본 발명에서 호스트 세포는 원핵 세포, 바람직하게는 야생형(wild-type) 대장균, 예를 들면 MG1655 (Blattner 등 Science, 277, 5331, 1453-1474 (1997))를 사용할 수 있다.
- [0018] 본 발명에서는 상기 호스트 세포, 즉 대장균의 베타 산화 과정을 불활성시키기 위하여, 상기 대장균에서 아실 CoA 탈수소 효소를 암호화하는 유전자인 *fadE*를 분리한 후 제거한다. 또한, 세포 내부에 다량의 지방 아실 CoA가 존재할 경우 베타 산화와 관련된 유전자의 억제자로 작용하는 *fadR* 유전자의 기능을 억제하기 위하여, 상기 *fadR* 유전자를 닉 아웃시킨다. 따라서, 본 발명에서 사용가능한 바람직한 대장균은 *fadE* 및 *fadR* 유전자가 닉 아웃된 야생형 대장균 MG1655일 수 있다.
- [0019] 본 발명에서 "닉 아웃"은 특정 효소의 활성이 불활성되거나 제거되어 해당 효소의 활성을 나타내지 않는 것을 의미한다.
- [0020] 상기 단계에서, 야생형 대장균에서 *fadE* 및 *fadR* 유전자를 닉 아웃시키는 방법은 당업계에 알려진 유전자 닉 아웃 방법을 사용할 수 있다.
- [0021] 또한, 상기 단계에서 *pox2* 및 *tesB* 유전자를 포함하는 발현 벡터를 제조한다. 상기 발현 벡터의 개열 지도는 도 2에 나타난 바와 같다.

- [0022] 본 발명의 벡터 시스템은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있으며, 이에 대한 구체적인 방법은 문헌[Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press(2001)]에 개시되어 있으며, 이 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.
- [0023] 도 1에는 베타 산화를 통해 지방산으로부터 카프로산을 생산하는 과정이 도시되어 있다.
- [0024] 구체적으로, 상기 베타 산화 과정은 아실 CoA 탈수소 효소를 암호화하는 유전자인 *fadE*를 분리하여 제거하고, 장쇄 지방산의 존재 하에서 베타 산화와 관련된 *fad* 유전자를 억제하는 것으로 알려져 있는 지방산 대사 조절 단백질, 즉 *fadR* 단백질(Y. Xu, et al., Journal of Biological Chemistry, 276 (2001) 17373-17379)을 암호화하는 *fadR* 유전자를 분리하여 제거함으로써 상기 효소를 불활성화시키는 단계를 포함한다. 또한, 아실 CoA 산화 효소를 암호화하는 *pox2* 유전자 및 싸이오에스테라제를 암호화하는 *tesB* 유전자를 발현시키는 단계를 포함한다. 이러한 베타 산화 과정을 수행할 수 있도록 대장균을 변이시킴으로써 다양한 길이의 탄소쇄를 포함하는 폐 식물 유로부터 카프로산과 같은 단쇄 지방산을 대장균으로부터 생산해 낼 수 있다.
- [0025] 상기 *pox2* 유전자는 야로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*) 유래의 아실 CoA 산화효소를 코딩하는 유전자로서, 예를 들어 서열번호 9의 염기 서열로 표시될 수 있다.
- [0026] 사카로마이세스 세레비지애(*saccharomyces cerevisiae*)와 같은 효모는 단쇄 내지는 장쇄 기질 특이성을 갖는 아실 CoA 산화효소를 코딩하는 *pox1* 유전자를 포함한다. 이와 대조적으로, 야로위아 리폴리티카 및 칸디다 속은 상이한 길이의 쇠에 대한 특이성을 갖는 아실 CoA 산화효소를 코딩한다. 야로위아 리폴리티카에서의 베타 산화는 5종의 아실 CoA 산화효소(AOX1 내지 5)를 코딩하는 *pox1* 내지 5 유전자와 연관이 있으며, 특히 AOX2 효소는 장쇄 지방 아실 CoA에 대해 특이성을 나타내는 것으로 알려져 있다(H. Wang, et al., Cell biochemistry and biophysics, 31 (1999) 165-174).
- [0027] 본 발명에서는 상기 *pox2* 유전자를 대장균 내에서 발현시킴으로써 베타산화 순환 과정을 통해 대장균에서 카프로산을 생산할 수 있다. *pox2* 유전자를 발현시킴에 따라 기존의 대장균의 베타산화에서는 긴사슬 지방산을 모두 아세틸코에이로 분해시켜 특정한 길이의 지방산을 만들어 내지 못한다. 하지만, 본 발명에서와 같이 FadE를 녹아웃한 후 AOX2로 대체하는 경우 특정한 길이의 지방산을 만들어낼 수 있다. 예를 들면 C₁₈ 길이의 지방산이 베타산화로 들어가면 6번의 사이클을 거친 후에 6개의 아세틸-CoA와 헥사노일-CoA(C₆)가 만들어지며, 이 헥사노일-CoA는 AOX2에 의한 활성이 매우 작기 때문에 세포 내부에 머물다가 TesB에 의해 헥산산으로 전환되고, 이 헥산산은 세포밖으로 방출된다.
- [0028] 상기 *tesB* 유전자는 대장균에서 유래한 싸이오에스테라제 II를 코딩하는 유전자로서, 예를 들어 서열번호 10의 염기 서열로 표시될 수 있다.
- [0029] 상기 싸이오에스테라제 II는 다른 종류의 싸이오에스테라제에 비해 광범위한 기질 특이성을 나타내는데, 예를 들어, 싸이오에스테라제 I의 경우 C₁₂₋₁₈의 길이의 아실 CoA 에스테르에 기질 특이성을 갖는 반면, 싸이오에스테라제 II는 C₆₋₁₈의 길이의 광범위한 쇠 길이에 대해 기질 특이성을 나타낸다. 따라서, 본 발명에서는 이러한 싸이오에스테라제 II를 코딩하는 *tesB* 유전자를 대장균에서 발현시킴으로써 단쇄 지방산을 대장균에서 생산해 낼 수 있다.
- [0030] 본 발명에서 사용하는 발현 벡터는 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터(예컨대, tac 프로모터, lac 프로모터, lacUV5 프로모터, lpp 프로모터, pLλ 프로모터, pRλ 프로모터, 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.
- [0031] 한편, 본 발명에 이용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드(예: pBbA6C, pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHc79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, pGEX 시리즈, pET 시리즈 및 pUCP19 등), 파지(예: λ-Charon, λΔz1 및 M13 등) 또는 바이러스를 조작하여 제작될 수 있으나, 바람직하게는 디카복실산 생합성에 이용될 특정 유전자를 대장균 내로 운반하여 외부로부터 삽입된 유전자의 발현을 효과적으로 조절할 수 있는 pBbA6C를 사용할 수 있다.
- [0032] 한편, 본 발명의 벡터는 선택표지로서, 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함하며, 예를 들어 암피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게테티신, 네오마이신 및

테트라사이클린에 대한 내성 유전자가 있다.

- [0033] 본 발명의 발현 벡터는 프로모터 서열, 발현 대상 유전자(구조 유전자)의 뉴클레오타이드 서열 및 터미네이터 서열을 포함하며, 상기 서열들이 5'→3' 순서대로 연결되는 것이 바람직하다.
- [0034] 본 발명의 발현벡터에는 RBS(ribosomal binding site) 및 효소발현에 꼭 필요한 부분을 포함하는 염기서열만을 삽입시키는 것이 대장균의 대사부담(metabolic burden)을 줄이는 측면에서 바람직하다.
- [0035] 상기 단계에서, 상기 *pox2* 및 *tesB* 유전자를 포함하는 발현 벡터로 *fadE* 및 *fadR* 유전자가 Nick 아웃된 대장균을 형질전환시켜 변이 대장균을 제조할 수 있다.
- [0036] 본 발명의 벡터를 대장균 내로 운반하는 방법은 당업계에 공지된 방법, 예컨대 CaCl_2 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, 본 발명에서는 형질 전환 균주의 안정적 제조와 효율을 높이기 위해서 전기 천공에 의한 형질전환 방법을 사용하는 것이 바람직하다.
- [0037] 본 발명의 방법에서, 단계 2는 상기 변이 대장균을 배양한 후, 지방산을 첨가하는 단계를 포함한다.
- [0038] 상기 변이 대장균을 배양하기 위한 배지로는 당업계에 공지된 대장균 배양 배지를 사용할 수 있으며, 예컨대, 루리아-버타니(LB) 배지, 또는 M9 배지를 사용할 수 있다. 상기 배양 배지는 카나마이신, 암피실린 또는 클로람페니콜과 같은 적절한 항생제가 보충된 배지일 수 있다.
- [0039] 상기 변이 대장균의 배양은 발현 유도제인 이소프로필 베타-D-티오갈락토피라노사이드(IPTG)의 존재 하에서 실시될 수 있다.
- [0040] 상기 지방산은 탄소수 C_{10} , C_{12} , C_{14} , C_{16} , C_{18} , $\text{C}_{18:1}$ 및 $\text{C}_{18:2}$ 로 이루어진 군으로부터 선택되는 장쇄 지방산으로서, 예를 들어 올레인산, 리놀레인산, 스테아린산, 미리스트산, 팔미트산, 및 라우르산으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다. 상기 지방산은 본 발명의 방법을 거쳐 카프로산으로 전환될 수 있다.
- [0041] 상기 변이 대장균 내에서 생합성된 카프로산을 분리하는 단계는 당업계에 공지된 통상의 분리 또는 정제 방법에 따라 실시될 수 있다(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)).
- [0042] 또한, 본 발명은 야생형 대장균의 *fadE* 및 *fadR* 유전자가 Nick 아웃되고, *pox2* 및 *tesB* 유전자를 발현하여 카프로산을 생산하는 변이 대장균을 제공한다.
- [0043] 본 발명의 대장균의 제조에 이용되는 대장균 및 *pox2* 및 *tesB* 유전자는 상기 제조방법과 관련하여 상술한 바와 같다.
- [0044] 본 발명에 따르면, 대장균에서도 다양한 지방산을 포함하는 폐 식물유 등으로부터 카프로산을 우수한 수율로 제조할 수 있다.
- [0045] [실시예]
- [0046] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.
- [0047] <재료 및 입수처>
- [0048] 모균주로 야생형 대장균 MG1655를 이용하였으며(Blattner 등, Science 277, 5331, 1453-1474 (1997)), 대장균

(DH10B) 균주를 클로닝에 이용하였다.

[0049] 바이오브릭(Biobrick) 플라스미드(pBbA6C 및 pBbE6K; A= p15A 레플리콘; E= colE1 레플리콘; 6= PLlacO 프로모터; C= 클로람페니콜 내성 및 K= 카나마이신 내성)를 랩 스톡(lab stock)에서 추출하여 발현 컨스트럭트 제작에 이용하였다(Lee *et al.*, J Biol Eng, 5:12 (2011)).

[0050] 다른 플라스미드들, 예컨대 λ -Red 재조합 발현 플라스미드용 pSIM5 플라스미드 (Datsenko and Wanner *et al.*, PNAS, 97, 6640-6645 (2000)); cI 억제제(repressor) 및 온도 민감성 레플리케이션에 의해 조절되는 효모 FLP 재조합 유전자용 pCP20 플라스미드(Cherepanov and Wackernagel, Gene, 158(1):9-14 (1995)); 및 유전자 disruption용 주형 플라스미드로 pKD13 (Datsenko and Wanner *et al.*, PNAS, 97, 6640-6645 (2000)), 및 FRT 부위에 의해 플랭킹되는 내성 유전자는 각각의 랩 세포 스톡에서 입수하였다.

[0051] 지방산은 시그마 알드리치사에서 입수하였으며, 제한 효소, 및 DNA 리가아제(New England Biolabs Inc.) 및 Phusion high-Fidelity DNA 폴리머라제(Thermo scientific)를 클로닝 및 플라스미드 컨스트럭션에 이용하였다. 올리고뉴클레오티드는 마크로젠(Korea)에 의뢰하여 합성하였다.

[0052] 또한, 하기 실시예에서 사용된 균주 및 플라스미드를 하기 표 1에 나타내었으며, 발현 벡터의 제조에 사용된 프라이머 및 사용된 유전자의 서열을 각각 표 2 및 표 3에 나타내었다.

표 1

Strains	Genotypes	Ref.
MG1655	F- λ -ilvG- rfb-50 rph-1	Blattner, <i>et al.</i> 1997 ¹⁾
MGR	MG1655 $\Delta fadR::FRT$ with pBbE6k-RFP	실시예에서 제조
MGR A2	MG1655 $\Delta fadR::FRT$ with pBbE6k-Aox2	실시예에서 제조
MGRBA2	MG1655 $\Delta fadR::FRT$ with pBbE6k-TesB/Aox2	실시예에서 제조
MGRE	MG1655 $\Delta fadE::FRT \Delta fadR::FRT$ with pBbE6k-RFP	실시예에서 제조
MGRE A2	MG1655 $\Delta fadE::FRT \Delta fadR::FRT$ with pBbE6k-Aox2	실시예에서 제조
MGREBA2	MG1655 $\Delta fadE::FRT \Delta fadR::FRT$ with pBbE6k-TesB/Aox2	실시예에서 제조
Plasmids	Description	Ref.
pBbE6k-RFP	ColE1 ori, PlacO1 Promoter, Km resistant	Lee, <i>et al.</i> 2011 ²⁾
pBbE6k-Aox2	pBbE6k harbouring <i>pox2</i> gene derived <i>Y. Lipolytica</i>	실시예에서 제조
pBbE6k-TesB/Aox2	pBbE6k harbouring <i>tesB</i> gene with <i>pox2</i> gene	실시예에서 제조

1): F.R. Blattner, *et al.*, science 277 (1997) 1453-1462

2): T.S. Lee, *et al.*, Journal of biological engineering 5 (2011) 1-14

[0053]

표 2

Primer	Sequence	서열번호
fadE_de1_F	CCATATCATCACAGTGGTCAGACCTCCTACAAGTAAGGGGCTTTTCGTTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	1
fadE_de1_R	TTACGCGGCTTCAACTTTCCGCACTTTCTCCGGCAACTTTACCGGCTTCGATTCCGGGGATCCGTCGACC	2
FadR_de1_F	TCTGGTATGATGAGTCCAACCTTTGTTTGTCTGTGTATGGAATCTCACTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	3
FadR_de1_R	AACAACAAAAACCCCTCGTTTGAGGGTTTGCTCTTTAAACGGAAGGGAATTCGGGGATCCGTCGACC	4
Aox2-F	ccgcatatgaacccaacaacactggcacc	5
Aox2-R	ccgtagcggcgcctattctcatcaagctcgcaaat	6
TesB-F	ATCGAgaattctttaagaaggagatatacatATGAGTCAGGCGCTAAAAA	7
TesB-R	TCGggatccTTAATGTGTATTACGCATCA	8

[0054]

표 3

유전자 명칭	서열	서열번호
pox2	atgaaccccaacaacactggcaccattgaaatcaacggtaaggagtacaacaccttca ccgagcccccggtggccatggctcaggagcgagccaagacctcttccccgtgagag agatgacctacttctcgcagcggtggcgagaagaacacctcaaaaacgagcagatcat ggagggagattgagcgagaccctctttcaacaacgacaactactacgatctcaacaagg agcagatccgagagctcaccatggagcgagtcgccaagctgtctctgtttgtgctgat cagccccgaggacgacatcaagaagcgatttgcctcattggatcgcgatatgggaac ctacacccgacttgggtccactacggcctcttcttggcgccgtccgaggtaccggaac tgccgagcagtttggccactggatctccaaggagcgaggagacctgcgaagtctac ggatgtttctccatgaccgagctgggccaatggctccaacctggctggtctcgagaccac cgccatctacgatgaggagaccgacgagttcatcatcaacacccctcacattgccgcca ccaattgggtggatggagagccgccccacacggccacccacactgtctgttgcgccg actcatgtcaagggaaggactacgggtcaagaccttgggtccagctgcgaacat caacgaccacagcctcaaggctcggtatctctattgggtatgcggaagaagatgggccc gagacggtatcgataacggatggatccagttaccaacggtgcgaatcccccgacagaa cctgtcatgaagtacacaaggctgacgcgagagggttaacgtgacccagcctctctgt gctcagcttacctacggttctcttactggttcgagttctccatggccttctgattctacca ggtcggaagcgattcatcaccattgcttgcgatacgcctgcatcgacgacagttctc caccacccccggcagcccgagaccaagatcatcgactacccctaccatcagcgacg acttctgcttcttgcctatgtctatgtcttcaagatgactccgatgaggttggagctc tcttctccgaacctgcttaagatggagacacctcaagcccgacgacaaggccggcct caatgaggttgttccgagctcaaggagctcttctcgtctcgcggctcaaggccttc tccacctgggcttgcgcgagcttgcgaagacccgacaggttgcgggtggccacg gttactctgatacaacggcttgcggcagcctacgcccagctgggttgcagtcgacact gggaggtgacacaacattctcacccttctgcggcggcagctcttaccagttgcg ttgctctgcgaaggcgagccttgggtaacgcccgtttcttacctgaagcgatacaagg atcggccaacgctaagctcaatggccgatctctcaccgaccccaaggctcctgctcag gcctgggaggttgcgcggtaacatcatcaaccgagccaccgaccagctacgagaag ctcatggcgagggtcttaacgccgaccaggccttggaggttctgtctcagcagcgattc cagcgcccaagggtccacacagcagcagacacctcatlccgcttcttctccgaattga caaccgaggtgagcgagccatcaagcagccctgcttaacctggctctgtgttgcgc tgtgtccatcgaaaggagacttggctgttctcctcgagagggcttctcagcgaacg gatalcgacacgctcaccgagctcgtcaacaagctcaccactgtgcgagaggagg tcattggctacaccgatgecttcaacctgtccgactacttcatcaacgctcctatggatg ctacgatggtgacgcttaccgacactacttcagaaggtaacgagcagaacacctgcc cgagacccccgacctcttactacgcttactctcaagccctcttcttccgagaggag gaggatgatgacattgcgagcttgcgaggaatag	9
tesB	atgagtcaggcgctaaaaatttactgacattgttaaacttggaataattgaggaagga cctttcgcggccagagtgaaatttaggtttacgccaaggtgttggcgccaggtcgtg ggtcaggccttctgtctgcaaaagagaccgtccctgaagacggctggtacattcgttt cacagctacttcttgccttggcgatagtaagaagccgattattatgatgtcgaaacgc tgctgacggtaacagcttcagcgcccgccgggttgcgtattcaaaacggcaaac gatttttatgatgactcctcttccaggcaccagaagcggtttcgaacatcaaaaaaca atccgctccgcccagcgccgtgatggcctccttcggaacgcaaatcgcccaatcg tggcgacactgctgcgcgagctgctgaaagataaattcatctcgatcgtccgctggaa gtccgtccgggtggagtttataaccactgaaaggtcacgtcgagaaccacatcgta gggttgatccgcgcaaatggtagcgtgcggatgacctgcgcgttcatcagttatctct cggttacgcttctgacttacttctgcggtagctctacagccgacggcatcggtttt ctgaaccggggattcagattgccaccattgaccattcattgtgttccatcgccggtta attgaaatgaatgctgctgtatagcgtggagagcaccctggcgctccagcgacgtggc ttgtgcgggtgagtttatacccaagacggcgtagtgggtgectcgaccgttcaggaa ggggtgatgcgtaatacaattaa	10

[0055]

[0056]

실시예 1: 베타 산화 변이 대장균 제작

[0057]

하기의 방식에 따라 야생형 대장균에서 베타 산화를 통해 카프로산을 생산하는 변이대장균을 제조하였다.

[0058]

(1-1) *fadE* 및/또는 *fadR* 유전자 녀 아웃

[0059]

MG1655 균주의 베타 산화과정을 불활성화시키기 위하여, 문헌(Datsenko and Wanner et al., PNAS, 97, 6640-6645 (2000))에 개시된 방법에 따라 λ-Red(λ-Red) 및 FLP-매개 부위-특이 재조합 시스템(FLP-mediated site-specific recombination system)을 이용하여 아실 CoA 탈수소 효소를 암호화하는 유전자인 *fadE*를 표 2에 제시된 서열번호 1 및 2의 프라이머를 이용하여 녀 아웃시켰다.

[0060]

또한, 세포 내부에 다량의 지방 아실 CoA가 존재할 경우 베타산화와 관련된 유전자의 억제자로 작용하는 지방산 대사 조절자인 *fadR* 유전자를 서열번호 3 및 4의 프라이머를 이용하여 녀 아웃시켰다.

[0061]

구체적으로, 야생형 MG1655 균주를 λ-레드 리콤비네이즈를 발현할 수 있는 pSim5 플라스미드로 형질전환시킨 다음, 30℃에서 1시간 동안 회복시켰다. 이후, 클로람페니콜 아가 배지에서 30℃에서 밤새 배양된 콜로니를 선택하였다. 한편, 서열번호 1, 2 및 3, 4의 프라이머를 이용하여 pKD13 플라스미드로부터 PCR을 통해 카나마이신 카세트를 증폭시킨 다음, 상기 선택된 세포를 상기 증폭된 카나마이신 카세트에 형질전환시켰다. 이후, 상기 형질전환된 세포를 2시간-3시간 정도 회복시킨 다음, 카나마이신 아가 배지에서 큐어링을 위해 37℃에서 배양된 콜로니를 선택하였다. 상기 선택된 세포를 플립페아제를 발현할 수 있는 PCP20 플라스미드로 형질전환시킨 후, 1시간 30분 정도 회복시켰다. 상기 세포를 암피실린 아가 배지에서 30℃에서 밤새 배양하고, 상기 배양된 콜로

니를 일반 LB 배지에서 42℃에서 교반배양 후 일반 LB 아가 배지에서만 자라는 콜로니를 최종적으로 선택하였다.

[0062] 상기 과정을 거쳐 *fadE* 및 *fadR* 유전자가 제거된 MG1655 대장균을 "MGRE"로 지칭하였으며, 또한, *fadR* 유전자만 제거된 MG1655 대장균을 "MGR"로 지칭하였다.

[0063] (1-2) 베타 산화 유전자가 삽입된 발현 벡터 제작

[0064] 문헌[T.S. Lee, et al., Journal of biological engineering 5 (2011) 1-14; M.R. Green, J. Sambrook, Molecular cloning: a laboratory manual (2012)]에 개시된 BglBrick 벡터로서, pBbE6k을 이용하여 클로닝을 수행하였다.

[0065] 먼저, 야로위아 리폴리티카(한국생명공학연구원(KRIBB)) 유래의 *pox2* 유전자를 증폭시키기 위하여, 서열번호 5 및 6의 Aox2-F/Aox2-R 프라이머를 이용하여 Swift Max Pro(Esco, Singapore)으로 PHUSION polymerase(Thermo Scientific)를 이용하여 95℃에서 2분 후, 95℃에서 40초, 55℃에서 40초 및 72℃에서 40초로 30회 사이클 후, 72℃에서 5분의 조건하에 PCR을 수행하였다. 상기에서 수득한 PCR 산물을 *NdeI* 및 *NotI*로 절단한 후, pBbE6k 벡터의 *NdeI* 및 *NotI* 부위에 라이게이션시켜 pBbE6k-Aox2 플라스미드를 제조하였다.

[0066] 이어, MG1655 균주로부터 서열번호 7 및 8의 TesB-F/TesB-R 프라이머를 이용하여 95℃에서 2분 후, 95℃에서 40초, 55℃에서 40초 및 72℃에서 20초로 30회 사이클 후, 72℃에서 5분의 조건하에 PCR을 수행하여 *tesB* 유전자를 증폭시켰으며, 얻어진 *tesB* 유전자를 *EcoRI* and *BglIII* 제한 효소를 이용하여 상기 pBbE6k-Aox2의 *pox2* 유전자 앞에 삽입하였다. 이때, *tesB* 유전자는 *BglIII* 제한 부위를 포함하기 때문에, 상기 PCR 산물을 *EcoRI* 및 *BamHI*으로 절단하였다.

[0067] 상기에서 얻어진 *tesB* 유전자는 pBbE6k-Aox2 플라스미드에 삽입하여 "pBbE6k-TesB Aox2"를 최종적으로 제조하였다. 상기 제조한 플라스미드의 개열지도를 도 2에 나타내었다.

[0068] (1-3) 오메가 산화를 수행하는 변이 대장균의 제작

[0069] 상기 1-1에서 제조한 *fadR* 유전자가 제거된 MG1655(MGR) 균주, 또는 *fadE* 및 *fadR* 유전자가 제거된 MG1655(MGRE) 균주를, 상기 1-2에서 제조한 pBbE6k-Aox2 및 pBbE6k-TesB/Aox2를 이용하여 전기 천공법으로 형질전환시켰으며, 상기 형질전환된 균주를 각각 "MGREA2" 및 "MGREBA2"로 지칭하였다.

[0070] 실험예 1: 지방산의 카프로산으로의 변환

[0071] (1-1) 휴지기 세포 상태의 대장균 준비

[0072] 상기 실시예에서 제조한 변이 대장균(MGR, MGRE, MGREA2 및 MGREBA2)의 단일 콜로니를 5 ml의 LB 배지에서 37℃ 및 200rpm의 교반 조건에서 하룻밤 동안 배양하였다. 밤새 배양된 500 μL의 변이 균주 배양액을 50 ml의 LB 배지에 접종시키고, O.D. 600에서 0.5-0.6에 이르렀을 때 0.1 mM IPTG를 첨가하여 발현을 유도시켰다. 그 후 30℃ 및 200 rpm의 조건에서 16시간 동안 배양하였다. 이 후, 4℃ 및 3500 rpm 조건에서 20분 동안 원심 분리시켜 세포들을 회수하고, 인산칼륨 완충액(0.1M, pH 7.4)으로 2번 세척하였다.

[0073] (1-2) 변이 대장균에서의 베타 산화를 이용한 카프로산의 생성량 측정

[0074] 상기 1-1에서 얻어진 휴지기 상태의 MGR, MGRE, MGREA2 및 MGREBA2 대장균을 M9배지(1X M9 salts (Bioshop, Canada), 1mM MgSO₄, 1M CaCl₂)에 재현탁시킨 후 1 g/L의 올레산을 넣어 주었다. MGREA2 및 MGREBA2가 현탁된 배지에는 50 μg/mL 카나마이신을 첨가하였다. 또한 지방산의 용해를 위하여 0.5%의 TWEEN80을 넣어 주었다.

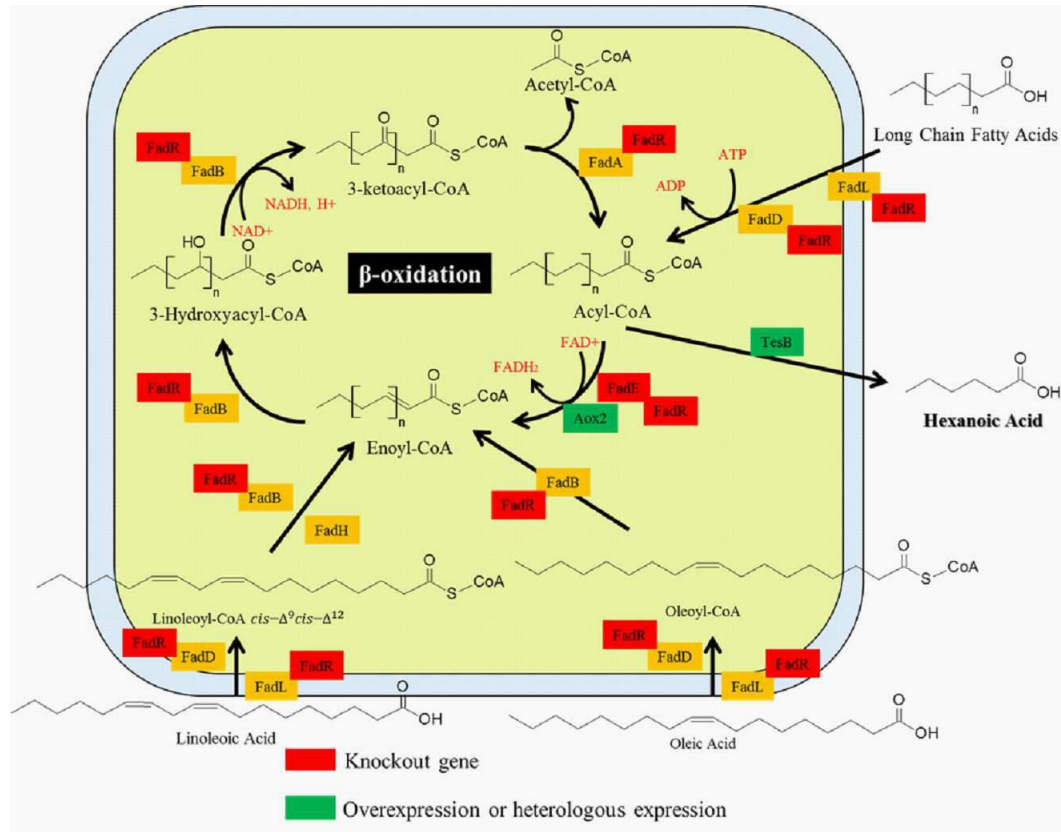
[0075] 상기 혼합 용액을 30℃ 및 200 rpm 조건의 웨이킹 배양기에서 교반 배양시킨 후 가스크로마토그래피(gas chromatography)/불꽃이온화검출기(flame ionization detector)(GC/FID)를 이용하여 디카르복실산의 생성량을

측정하였다.

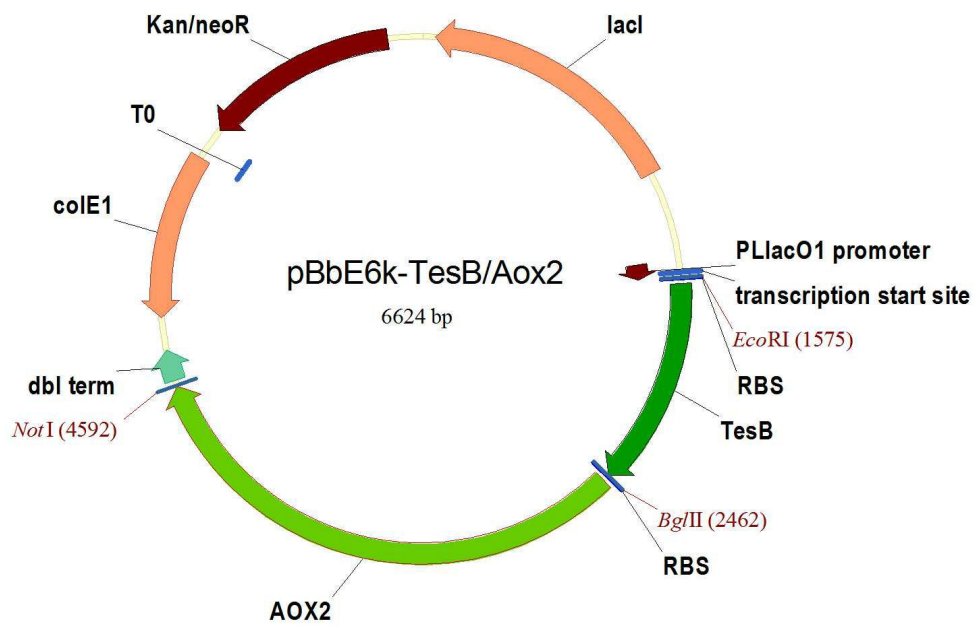
[0076] 지방산 1 g/L에서 생성되는 카프로산의 양을 측정한 결과, 본 발명의 변이 대장균 MGREA2는 올레산을 넣어 주었을 경우 48시간 정도 후에 약 70 mg/L (73.67 mg/L)의 카프로산이 생성됨을 확인하였고, MGREBA2는 올레산을 넣어주었을 경우, 48시간 정도 후에 200 mg/L(204.25 mg/L)의 카프로산이 생성됨을 확인하였다.

도면

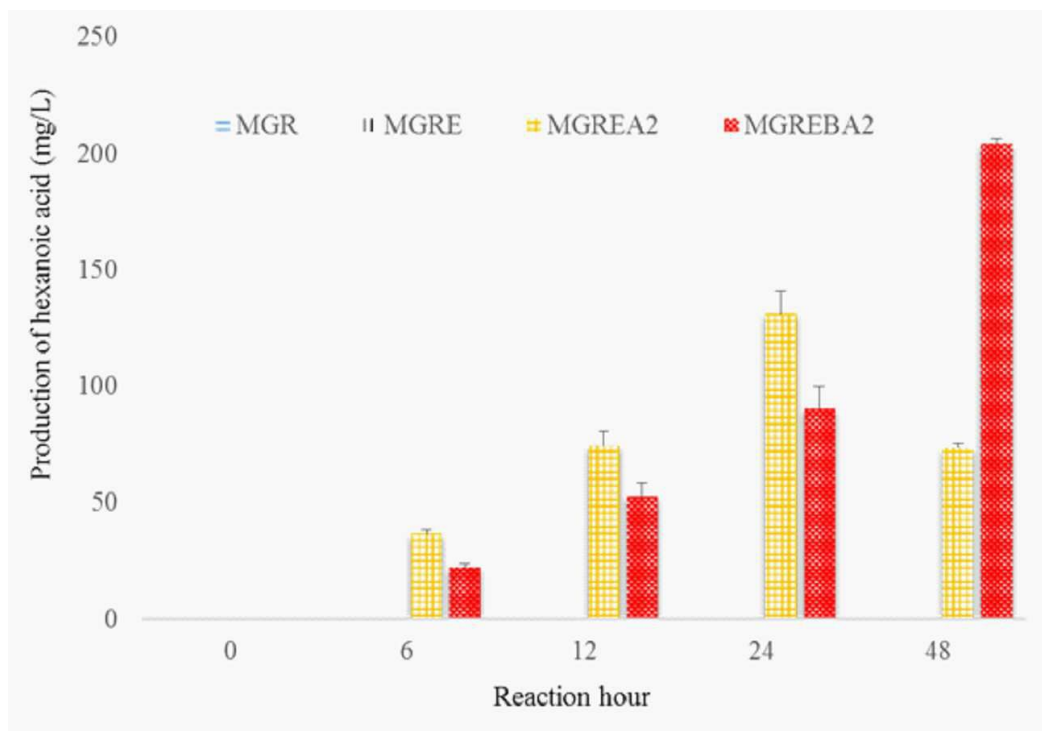
도면1



도면2



도면3



서열 목록

- <110> UNIST ACADEMY-INDUSTRY RESEARCH CORPORATION
- <120> METHOD FOR PRODUCING CAPROIC ACID BY BETA OXIDATION IN MUTANT
ESCHERICHIA COLI
- <130> FPD201505-0148
- <160> 10

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> fadE_del_F

<400> 1

ccatatcatc acaagtggtc agacctccta caagtaaggg gcttttcgtt gtgtaggctg 60

gagctgcttc 70

<210> 2

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> fadE_del_R

<400> 2

ttacgcggct tcaactttcc gcactttctc cggcaacttt accggcttcg attccgggga 60

tccgtcgacc 70

<210> 3

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FadR_del_F

<400> 3

tctggtatga tgagtccaac ttgttttgc tgtgttatgg aaatctcact gtgtaggctg 60

gagctgcttc 70

<210> 4

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FadR_del_R

<400> 4

aacaacaaaa aaccctcgt ttgaggggtt tgctctttaa acggaaggga attccgggga 60

tccgtcgacc 70

<210> 5
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Aox2-F
 <400> 5
 ccgcatatga accccaacaa cactggcacc 30
 <210> 6
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Aox2-R
 <400> 6
 ccgtagcggc cgcctattcc tcatcaagct cgcaaat 37
 <210> 7
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TesB-F
 <400> 7
 atcgagaatt cttaagaag gagatataca tatgagtcag gcgctaaaaa a 51
 <210> 8
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TesB-R
 <400> 8
 tcgggatacct taattgtgat tacgcatca 29
 <210> 9
 <211> 2103
 <212> DNA
 <213> Yarrowia lipolytica
 <400> 9

atgaacccca acaacactgg caccattgaa atcaacggta aggagtacaa caccttcacc	60
gagccccccg tggccatggc tcaggagcga gccaagacct ccttccccgt gcgagagatg	120
acctacttcc tcgacggtgg cgagaagaac accctcaaaa acgagcagat catggaggag	180
attgagcgag accctctttt caacaacgac aactactacg atctcaacaa ggagcagatc	240
cgagagctca ccatggagcg agtcgccaag ctgtctctgt ttgtgcgtga tcagcccag	300
gacgacatca agaagcgatt tgctctcatt ggtatcgccg atatgggaac ctacaccga	360
cttgggtgcc actacggcct cttctttggc gccgtccgag gtaccggaac tgccgagcag	420
tttggccact ggatctccaa gggagccgga gacctgcga agttctacgg atgtttctcc	480
atgaccgagc tgggcatgg ctccaacctg gctggctcgc agaccaccgc catctacgat	540
gaggagaccg acgagttcat catcaacacc cctcacattg ccgccaccaa gtggtggatt	600
ggaggagccg cccacaccgc caccacact gtcgtgttcg ccgactcat tgtcaagggc	660
aaggactacg gtgtcaagac ctttgtgtc cagctgcga acatcaacga ccacagcctc	720
aaggtcggta tctctattgg tgatatcgga aagaagatgg gccgagacgg tatcgataac	780
ggatggatcc agttcaccaa cgtgcgaatc cccgacaga acctgctcat gaagtacaca	840
aaggtcgacc gagagggtaa cgtgaccag cctcctctgg ctacagttac ctacggttct	900
cttatcactg gtcgagtctc catggcctct gattctcacc aggtcgga aa gcgattcatc	960
accattgctc tgcgatacgc ctgcattcga cgacagttct ccaccacccc cggccagccc	1020
gagaccaaga tcatcgacta cccctacat cagcgacgac ttctgcctct tctggcctat	1080
gtctatgctc ttaagatgac tgccgatgag gttggagctc tcttctcccg aacctgctt	1140
aagatggacg acctcaagcc cgacgacaag gccggcctca atgaggttgt ttccgacgtc	1200
aaggagctct tctccgtctc cgccggtctc aaggccttct ccacctgggc ttgtgccgac	1260
gtcattgaca agaccgaca ggcttgccgt gccacgggtt actctggata caacggtttc	1320
ggccaggcct acgccgactg ggttgtccag tgcacctggg agggtagaaa caacattctc	1380
accttttctg cggcgagcgc tcttatccag tctgccgttg ctctgcgaaa gggcgagcct	1440
gttggtaacg ccgtttctta cctgaagcga tacaaggatc tggccaacgc taagctcaat	1500
ggccgatctc tcaccgacc caaggtctc gtcgagcct gggaggttgc tgccgtaac	1560
atcatcaacc gagccaccga ccagtacgag aagctcattg gcgaggtct taacgccgac	1620
caggcctttg aggttctgtc tcagcagcga ttccaggccg ccaaggcca cacacgacga	1680
cacctcattg ccgttttctt ctcccgaatt gacaccgagg ctggcgaggc catcaagcag	1740
ccctgctta acctggtctt gctgtttgcc ctgtgggtcca tcgaagagga ctctggtctg	1800
ttcctgcgag agggcttctt cgagcccaag gatatcgaca ccgtcaccga gctcgtcaac	1860

aagtactgca ccactgtgcg agaggaggtc attggctaca ccgatgcctt caacctgtcc	1920
gactacttca tcaacgctcc tattggatgc tacgatggcg acgcttacgg acactacttc	1980
cagaaggcca acgagcagaa cctgccccga gacccccgac ctccttacta cgcctctact	2040
ctcaagccct tccttttccg agaggaggag gatgatgaca tttgcgagct tgatgaggaa	2100
tag	2103
<210> 10	
<211> 861	
<212> DNA	
<213> Escherichia coli	
<400> 10	
atgagtcagg cgctaaaaaa ttacttgaca ttgttaaata tggaaaaaat tgaggaagga	60
ctctttcgcg gccagagtga agatttaggt ttacgccagg tgtttggcgg ccaggtcgtg	120
ggtcaggcct tgtatgctgc aaaagagacc gtccctgaag agcggctggt acattcgttt	180
cacagctact ttcttcgccc tggcgatagt aagaagccga ttatttatga tgtcgaaacg	240
ctgctgacg gtaacagctt cagcggccgc cgggttgctg ctattcaaaa cggcaaaccg	300
atTTTTtata tgactgcctc ttccaggca ccagaagcgg gtttcgaaca tcaaaaaaca	360
atgccgtccg cgccagcgcc tgatggcctc cttcggaaa cgcaaatcgc ccaatcgctg	420
gcgcacctgc tgccgccagt gctgaaagat aaattcatct gcgatcgcc gctggaagtc	480
cgccgggtgg agtttcataa cccactgaaa ggtcacgtcg cagaaccaca tcgtcaggtg	540
tggatccgcg caaatggtag cgtgccggat gacctgcgcg ttcatcagta tctgctcggt	600
tacgtttctg atcttaactt cctgccggtg gctctacagc cgcacggcat cggttttctc	660
gaaccgggga ttcagattgc caccattgac cattccatgt ggttccatcg cccgtttaat	720
ttgaatgaat ggctgctgta tagcgtggag agcacctcgg cgtccagcgc acgtggcttt	780
gtgcgcggtg agttttatac ccaagacggc gtactggttg cctcgaccgt tcaggaaggg	840
gtgatgcgta atcacaatta a	861