

명세서

발명의 명칭: 퓨트레신을 생산하는 미생물 및 이를 이용한 퓨트레신 생산 방법

기술분야

- [1] 본원은 퓨트레신을 생산하는 미생물 및 이를 이용하여 퓨트레신을 생산하는 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 퓨트레신은 폴리아미드의 원료 물질 중 하나로 알려져 있다. 퓨트레신은 현재까지 석유화합물을 원료물질로 하는 화학적 방법으로 생산되며, 유전자 조작 기술 및 발효 기술을 이용한 퓨트레신 발효 생산 기술이 연구되고 있다.
- [4] 예를 들어, 코리네박테리움 속 균주의 대사 경로를 조작한 퓨트레신 생산이 가능한 균주가 기공지 되어 있다 (대한민국 공개특허 제2014-0115244호, 국제공개 WO2014-148743호).
- [5] 한편, 포름산 탈수소효소는 포름산의 산화를 촉매시켜 두 번째 기질인 NAD⁺를 환원시키고 결과물로 NADH와 CO₂를 생성하는 효소이다. NADH는 균주의 대사 전반에 걸친 중요한 물질로 알려져 있다. NADH 증가를 통해 균주 내 환원력을 증가시킬 수 있어서 목적 물질 생산에 유리할 수 있기 때문이다.
- [6] 포름산 탈수소효소를 이용하여 NADH를 강화시켜, 혐기 조건에서 숙신산 및 바이오 알코올을 생산하는 방법이 공지되어 있다. 숙신산은 혐기 발효 조건에서 환원성 TCA (reverse TCA) 경로를 이용하여 생산이 가능하다. 환원성 TCA 경로에서 NADH 양은 숙신산 생산과 직접적인 관련성을 가지고 있으며, 옥살로아세트산 (oxaloacetate)으로부터 숙신산 경로까지 2 몰의 NADH가 소모된다. 실제로 포도당으로부터 숙신산을 혐기 조건에서 생산할 때 FDH를 강화시키면 20 % 이상의 수율이 증가되는 것으로 보고된 바 있다 (Appl Environ Microbiol., 2012, 78(9): 3325-3337). 그러나, 숙신산과는 달리 퓨트레신 생합성 경로에서는 NADH가 직접적인 기질로 사용되지 않으며, 포름산 탈수소효소와 퓨트레신 생산과의 관련성에 대해서는 보고된 바 없다.

[7]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [8] 본 발명자들은 퓨트레신 생산 균주에서 퓨트레신의 생산을 증가시키기 위해 예의 노력한 결과, 포름산 탈수소효소를 과발현시켜 균주 내 NADH 및 ATP 수준을 증가시키고, 이를 통해 퓨트레신 생산이 증가하는 것을 확인함으로써 본원을 완성하였다.

[9]

과제 해결 수단

- [10] 본원의 하나의 목적은 포름산 탈수소효소 (formate dehydrogenase, Fdh)의 활성이 증가된, 퓨트레신을 생산하는 코리네박테리움 속 미생물을 제공하는 것이다.
- [11] 본원의 다른 목적은 상기 미생물을 이용하여 퓨트레신을 생산하는 방법을 제공하는 것이다.
- [12]

발명의 효과

- [13] 본원의 퓨트레신 생산능이 향상된 코리네박테리움 속 미생물은 포름산 탈수소효소의 활성이 증가되도록 변형되어 NADH 및 ATP 생성이 증가되며, 이를 통해 퓨트레신 생산을 증가시킬 수 있어 퓨트레신의 대량 생산에 효과적으로 활용될 수 있다.
- [14]

도면의 간단한 설명

- [15] 도 1은 대장균 숙주를 이용하여 CbFdh를 과발현시킨 결과를 보여주는 SDS-PAGE 겔 사진이다. 1 열은 대장균 BL21 DE3를 이용하여 18 °C 조건에서 24 시간 발현시킨 세포 분쇄액상의 단백질 결과이다. 2 열은 대장균 BL21 DE3를 이용하여 18 °C 조건에서 24 시간 발현시킨 가용성 단백질 결과이다. 3 열은 대장균 BL21 DE3를 이용하여 30 °C 조건에서 8 시간 발현시킨 세포 분쇄액상의 단백질 결과이다. 4 열은 대장균 BL21 DE3를 이용하여 30 °C 조건에서 8 시간 발현시킨 가용성 단백질 결과이다. 5 열은 대장균 Rosetta DE3를 이용하여 18 °C 조건에서 24 시간 발현시킨 세포 분쇄액상의 단백질 결과이다. 6 열은 대장균 Rosetta DE3를 이용하여 18 °C 조건에서 24 시간 발현시킨 가용성 단백질 결과이다. 7 열은 대장균 Rosetta DE3를 이용하여 30 °C 조건에서 8 시간 발현시킨 세포 분쇄액상의 단백질 결과이다. 8 열은 대장균 Rosetta DE3를 이용하여 30 °C 조건에서 8 시간 발현시킨 가용성 단백질 결과이다.
- [16] 도 2는 시간에 따른 NADH의 생성량을 표시한 그래프이다. 완충액은 100mM 인산 완충액 (pH 7.2)을 사용하였으며, 대조군은 가용성 단백질을 제외한 반응 샘플이다. CbFdh는 대장균 BL21 DE3를 이용하여 30 °C에서 포름산 탈수소효소를 과발현시킨 가용성 단백질 10 % 첨가 반응 샘플이다. CbFdh의 경우 시간이 지날수록 CbFdh의 반응물인 NADH가 지속적으로 증가되는 것을 확인할 수 있었다.
- [17] 도 3은 시간에 따른 포름산 농도를 표시한 그래프이다. 대조군은 코리네박테리움 글루타미쿰 균주에 pSCEC_CJ7 벡터가 삽입된 균주이다. CbFdh는 *C. boidinii* 유래 포름산 탈수소효소 유전자의 발현이 가능한 pSCEC_CJ7_CbFdh 플라스미드가 삽입된 균주이다. 배양액에 0, 2, 및 10 g/l의 포름산을 넣고 대조군과 CbFdh의 포름산 농도 변화를 관찰하였다.

- [18] **발명의 실시를 위한 최선의 형태**
- [19] 상기의 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본원은 포름산 탈수소효소 (formate dehydrogenase, Fdh)의 활성이 증가된, 퓨트레신을 생산하는 코리네박테리움 속 미생물을 제공한다.
- [20] 본원에서 용어, “포름산 탈수소효소 (formate dehydrogenase, 이하 “Fdh”로 기재)”는 포름산을 기질로 하여, 산화반응을 촉매시켜 NAD⁺를 환원시키고 NADH 및 CO₂를 생성하는 효소를 통칭한다.
- [21] 상기 포름산 탈수소효소는 미생물의 종 또는 균주에 따라 활성을 나타내는 단백질의 아미노산 서열에 차이가 존재하는 경우가 있기 때문에, 그 유래나 서열에 한정되지 않는다.
- [22] 구체적으로 상기 Fdh는 세리포리옵시스 서브베르미스포라 (*Ceriporiopsis subvermispora*), 메틸로박테리움 엑스토르쿠엔스 (*Methylobacterium extorquens*), 메틸로시너스 트리코스포리움 (*Methylosinus trichosporium*), 큐프리아비두스 옥살라티쿠스 (*Cupriavidus oxalaticus*), 캔디다 메틸리카 (*Candida methylica*), 메틸로트로픽 박테리움 (*methyilotrophic bacterium*), 안실로박터 아쿠아티쿠스 (*Ancylobacter aquaticus*), 코마가타엘라 파스토리스 (*Komagataella pastoris*), 마이코박테리움 바씨애 (*Mycobacterium vaccae*), 아라비돕시스 탈리아나 (*Arabidopsis thaliana*) 등의 유래일 수 있으며, 최근 공지된 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Microbiology* (2012), 158, 2428-2439) 유래일 수 있다. 구체적으로는 캔디다 보이디니 (*Candida boidinii*) 유래일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [23] 또한, 본원에서 Fdh는 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 단백질, 또는 상기 서열과 70 % 이상, 구체적으로는 80 % 이상, 더욱 구체적으로는 90 % 이상, 보다 더욱 구체적으로는 95 % 이상, 가장 구체적으로는 99 % 이상의 상동성을 나타내는 아미노산 서열로서, 실질적으로 포름산 탈수소효소로서의 활성을 가지는 단백질이라면 제한 없이 포함될 수 있다.
- [24] 상기 서열과 상동성을 가지는 서열로서 실질적으로 서열번호 10의 단백질과 동일하거나 상응하는 생물학적 활성을 가지는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 가지는 경우도 역시 본원의 범주에 포함됨은 자명하다.
- [25] 본원의 Fdh를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 상기 Fdh 단백질과 유사한 활성을 가지는 한, 서열번호 10의 아미노산 서열 또는 상기 서열과 70 % 이상, 구체적으로는 80 % 이상, 더욱 구체적으로는 90 % 이상, 보다 더욱 구체적으로는 95 % 이상, 가장 구체적으로는 99 % 이상의 상동성을 나타내는 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 예를 들어, 서열번호 9의 염기서열을 포함할 수 있다.
- [26] 또한, 본원의 Fdh를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 9의 염기서열

또는 상기 염기서열로부터 유래된 프로브 (probe)와 엄격한 조건 (stringent conditions)에서 혼성화될 수 있고, 정상적으로 기능하는 Fdh를 코딩하는 변이형일 수 있다.

- [27] 상기에서 용어 "상동성"은 주어진 아미노산 서열 또는 염기 서열과 일치하는 정도를 의미하며 백분율로 표시될 수 있다. 본 명세서에서, 주어진 아미노산 서열 또는 염기 서열과 동일하거나 유사한 활성을 가지는 그의 상동성 서열이 "% 상동성"으로 표시된다. 예를 들면, 점수(score), 동일성(identity) 및 유사도(similarity) 등의 매개 변수(parameter)들을 계산하는 표준 소프트웨어, 구체적으로 BLAST 2.0을 이용하거나, 정의된 엄격한 조건하에서 써던 혼성화 실험에 의해 서열을 비교함으로써 확인할 수 있으며, 정의되는 적절한 혼성화 조건은 해당 기술 범위 내이고, 당업자에게 잘 알려진 방법(예컨대, J. Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, 1989; F.M. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., New York)으로 결정될 수 있다. 상기에서 용어 "엄격한 조건"이란 폴리뉴클레오티드 간의 특이적 혼성화를 가능하게 하는 조건을 의미한다. 예를 들어, 이러한 조건은 문헌(예컨대, J. Sambrook et al., 상동)에 구체적으로 기재되어 있다.
- [28]
- [29] 본원에서 용어, "활성의 증가"는 미생물이 가진 내재적 활성 또는 변형 전 활성에 비하여 활성이 향상된 것을 의미한다. 상기 활성 증가는 외래의 Fdh를 도입하는 것과, 내재적 Fdh의 활성을 강화하는 것을 모두 포함할 수 있다. 구체적으로는 포름산 탈수소효소의 활성이 증가되어 푸트레신 생산능이 증가되는 것을 의미할 수 있다.
- [30] 구체적으로, 본원에서 활성 증가는,
- [31] 1) 상기 효소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 카피수 증가,
- [32] 2) 상기 폴리뉴클레오티드의 발현이 증가하도록 발현조절 서열의 변형,
- [33] 3) 상기 효소의 활성이 강화되도록 염색체 상의 폴리뉴클레오티드 서열의 변형, 또는
- [34] 4) 이의 조합에 의해 강화되도록 변형하는 방법 등에 의하여 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [35]
- [36] 상기 1) 폴리뉴클레오티드의 카피수 증가는, 특별히 이에 제한되지 않으나, 벡터에 작동 가능하게 연결된 형태로 수행되거나, 숙주세포 내의 염색체 내로 삽입됨으로써 수행될 수 있다. 구체적으로, 본원의 효소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 작동 가능하게 연결된, 숙주와 무관하게 복제되고 기능할 수 있는 벡터가 숙주세포 내에 도입됨으로써 수행될 수 있다. 또는 상기 폴리뉴클레오티드가 작동 가능하게 연결된, 숙주세포 내의 염색체 내로 상기 폴리뉴클레오티드를 삽입시킬 수 있는 벡터가 숙주세포 내에 도입됨으로써

상기 숙주세포의 염색체 내 상기 폴리뉴클레오티드의 카피수를 증가하는 방법으로 수행될 수 있다.

- [37] 또한 카피수 증가의 한 양태로, 효소의 활성을 나타내는 외래 폴리뉴클레오티드 또는 상기 폴리뉴클레오티드의 코돈 최적화된 변이형 폴리뉴클레오티드의 도입함으로써 수행될 수 있다. 외래 폴리뉴클레오티드 서열의 도입은, 상기 효소와 동일/유사한 활성을 나타내는 효소를 암호화하는 외래 폴리뉴클레오티드를 숙주세포 내로 도입하여 수행될 수 있다. 상기 외래 폴리뉴클레오티드는 상기 효소와 동일/유사한 활성을 나타내는 한 그 유래나 서열에 제한 없이 사용될 수 있다. 또한 상기 외래 폴리뉴클레오티드가 숙주세포 내에서 최적화된 전사, 번역이 이루어지도록 이의 코돈을 최적화하여 숙주세포 내로 도입할 수 있다. 상기 도입은 공지된 형질전환 방법을 당업자가 적절히 선택하여 수행될 수 있으며, 숙주 세포 내에서 상기 도입된 폴리뉴클레오티드가 발현됨으로써 효소가 생성되어 그 활성이 증가될 수 있다.
- [38] 다음으로, 2) 폴리뉴클레오티드의 발현이 증가하도록 발현조절 서열의 변형은, 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 발현조절 서열의 활성을 더욱 강화하도록 핵산 서열을 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합으로 서열상의 변이를 유도하여 수행하거나, 더욱 강한 활성을 가지는 핵산 서열로 교체함에 의하여 수행될 수 있다. 상기 발현조절 서열은, 특별히 이에 제한되지 않으나 프로모터, 오퍼레이터 서열, 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열, 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열 등을 포함할 수 있다.
- [39] 구체적으로, 폴리뉴클레오티드 발현 단위의 상부에는 본래의 프로모터 대신 강력한 이중 프로모터가 연결될 수 있는데, 상기 강력한 프로모터의 예로는 CJ7 프로모터, lysCP1 프로모터, EF-Tu 프로모터, groEL 프로모터, aceA 혹은 aceB 프로모터 등이 있다. 더욱 구체적으로는 코리네박테리움 속 유래 프로모터인 lysCP1 프로모터 (WO2009/096689) 혹은 CJ7 프로모터(대한민국 등록특허 제0620092호 및 WO2006/065095)와 작동 가능하게 연결되어 상기 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 발현율을 향상시킬 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [40] 아울러, 3) 염색체 상의 폴리뉴클레오티드 서열의 변형은, 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 폴리뉴클레오티드 서열의 활성을 더욱 강화하도록 핵산 서열을 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합으로 발현조절 서열상의 변이를 유도하여 수행하거나, 더욱 강한 활성을 갖도록 개량된 폴리뉴클레오티드 서열로 교체함에 의하여 수행될 수 있다.
- [41] 마지막으로, 4) 상기 1) 내지 3)의 조합에 의해 강화되도록 변형하는 방법은, 상기 효소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 카피수 증가, 이의 발현이 증가하도록 발현조절 서열의 변형, 염색체 상의 상기 폴리뉴클레오티드 서열의 변형 및 상기 효소의 활성을 나타내는 외래 폴리뉴클레오티드 또는 이의 코돈 최적화된 변이형 폴리뉴클레오티드의 변형 중 1 이상의 방법을 함께 적용하여

수행될 수 있다.

- [42] 본원에서 사용된 용어 "백터"는 적합한 숙주 내에서 목적 단백질을 발현시킬 수 있도록 적합한 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 상기 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 염기서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다. 상기 조절 서열은 전사를 개시할 수 있는 프로모터, 그러한 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합부위를 코딩하는 서열, 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함할 수 있다. 백터는 적당한 숙주세포 내로 형질전환된 후, 숙주 게놈과 무관하게 복제되거나 기능할 수 있으며, 게놈 그 자체에 통합될 수 있다.
- [43] 본원에서 사용되는 백터는 숙주세포 내에서 복제 가능한 것이면 특별히 한정되지 않으며, 당업계에 알려진 임의의 백터를 이용할 수 있다. 통상 사용되는 백터의 예로는 천연 상태이거나 재조합된 상태의 플라스미드, 코스미드, 바이러스 및 박테리오파지를 들 수 있다. 예를 들어, 파지 백터 또는 코스미드 백터로서 pWE15, M13, MBL3, MBL4, IXII, ASHII, APII, t10, t11, Charon4A, 및 Charon21A 등을 사용할 수 있으며, 플라스미드 백터로서 pBR계, pUC계, pBluescriptII계, pGEM계, pTZ계, pCL계 및 pET계 등을 사용할 수 있다. 구체적으로는 pDZ, pACYC177, pACYC184, pCL, pECCG117, pUC19, pBR322, pMW118, pCC1BAC 백터 등을 사용할 수 있다.
- [44] 일례로 세포 내 염색체 삽입용 백터를 통해 염색체 내에 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 변이된 폴리뉴클레오티드로 교체시킬 수 있다. 상기 폴리뉴클레오티드의 염색체 내로의 삽입은 당업계에 알려진 임의의 방법, 예를 들면, 상동재조합에 의하여 이루어질 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [45] 본원에서 용어 "형질전환"은 표적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 백터를 숙주세포 내에 도입하여 숙주세포 내에서 상기 폴리뉴클레오티드가 코딩하는 단백질이 발현할 수 있도록 하는 것을 의미한다. 형질전환된 폴리뉴클레오티드는 숙주세포 내에서 발현될 수 있지만 한다면, 숙주세포의 염색체 내에 삽입되어 위치하거나 염색체 외에 위치하거나 상관없이 이들 모두를 포함할 수 있다. 또한, 상기 폴리뉴클레오티드는 표적 단백질을 코딩하는 DNA 및 RNA를 포함한다. 상기 폴리뉴클레오티드는 숙주세포 내로 도입되어 발현될 수 있는 것이면, 어떠한 형태로 도입되는 것이든 상관없다. 예를 들면, 상기 폴리뉴클레오티드는 자체적으로 발현되는데 필요한 모든 요소를 포함하는 유전자 구조체인 발현 카세트 (expression cassette)의 형태로 숙주세포에 도입될 수 있다. 상기 발현 카세트는 통상 상기 폴리뉴클레오티드에 작동 가능하게 연결되어 있는 프로모터 (promoter), 전사 종결신호, 리보솜 결합부위 및 번역 종결신호를 포함할 수 있다. 상기 발현 카세트는 자체 복제가 가능한 발현 백터 형태일 수 있다. 또한, 상기 폴리뉴클레오티드는 그 자체의 형태로 숙주세포에 도입되어 숙주세포에서 발현에 필요한 서열과 작동 가능하게 연결되어 있는 것일 수도 있으며, 이에

한정되지 않는다.

- [46] 또한, 상기에서 용어 "작동 가능하게 연결"된 것이란 본원의 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 전사를 개시 및 매개하도록 하는 프로모터 서열과 상기 유전자 서열이 기능적으로 연결되어 있는 것을 의미한다.
- [47]
- [48] 본원에서 사용되는 용어 "퓨트레신을 생산하는 미생물" 또는 "퓨트레신 생산능을 가지는 미생물"이란, 자연적으로 퓨트레신 생산능을 가지고 있는 미생물 또는 퓨트레신의 생산능이 없는 모균주에 퓨트레신의 생산능이 부여된 미생물을 의미한다.
- [49] 상기 퓨트레신을 생산하는 미생물은, 특별히 이에 제한되지 않으나, 예를 들어 글루타메이트에서 오르니틴까지의 생합성 경로를 강화하기 위해 글루타메이트를 아세틸글루타메이트 (N-acetylglutamate)로 전환하는 아세틸글루타메이트 신타아제 또는 아세틸오르니틴을 오르니틴으로 전환하는 오르니틴 아세틸트랜스퍼라아제 (ArgJ), 아세틸글루타메이트를 아세틸글루타밀 포스페이트 (N-acetylglutamyl phosphate)로 전환하는 아세틸글루타메이트 키나아제 (ArgB), 아세틸글루타밀 포스페이트를 아세틸글루타메이트 세미알데히드 (N-acetylglutamate semialdehyde)로 전환하는 아세틸 감마 글루타밀 포스페이트 리덕타아제 (ArgC), 아세틸글루타메이트 세미알데히드를 아세틸오르니틴 (N-acetylornithine)으로 전환하는 아세틸오르니틴 아미노트랜스퍼라아제 (ArgD)의 활성을 내재적 활성에 비하여 증가시키도록 변형되어 퓨트레신의 생합성 원료로서 사용되는 오르니틴의 생산성이 향상된 것일 수 있다.
- [50] 또한, 상기 미생물은 오르니틴에서 아르기닌 합성에 관여하는 오르니틴 카르바모일 트랜스퍼라아제 (ornithine carbamoyltransferase, ArgF), 글루타메이트 엑스포터 (glutamate exporter) 활성을 나타내는 단백질, 및/또는 퓨트레신을 아세틸화시키는 아세틸트랜스퍼라아제의 활성을 내재적 활성이 불활성화되도록 변이되고/되거나, 오르니틴 디카르복실라아제 (ornithine decarboxylase, ODC)의 활성을 도입하도록 변형된 것일 수 있다.
- [51] 이때, 상기 오르니틴 카르바모일 트랜스퍼라아제 (ArgF), 글루타메이트 엑스포터 (glutamate exporter) 활성을 나타내는 단백질, 오르니틴 디카르복실라아제 (ODC), 오르니틴 아세틸트랜스퍼라아제 (ArgJ), 아세틸글루타메이트 키나아제 (ArgB), 아세틸 감마 글루타밀 포스페이트 리덕타아제 (ArgC), 및 아세틸오르니틴 아미노트랜스퍼라아제 (ArgD)는, 특별히 이에 제한되지 않으나, 구체적으로는 각각 서열번호: 11, 12, 13, 14, 15, 16 및 17로 기재되는 아미노산 서열 또는 이와 70 % 이상, 구체적으로는 80 % 이상, 더욱 구체적으로는 90 % 이상, 보다 더욱 구체적으로는 95 % 이상, 가장 구체적으로는 99 % 이상의 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [52] 또한, 퓨트레신을 아세틸화시키는 아세틸트랜스퍼라아제는, 특별히 이에

제한되지 않으나, 구체적으로는 서열번호: 18 또는 19로 기재되는 아미노산 서열 또는 이와 70 % 이상, 구체적으로는 80 % 이상, 더욱 구체적으로는 90 % 이상, 보다 더욱 구체적으로는 95 % 이상, 가장 구체적으로는 99 % 이상의 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

- [53] 또한, 퓨트레신 배출 활성을 나타내는 단백질의 활성이 내재적 활성에 비해 증가된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 퓨트레신 배출 활성을 나타내는 단백질은, 특별히 이에 제한되지 않으나, 구체적으로는 서열번호: 20 또는 21로 기재되는 아미노산 서열 또는 이와 70 % 이상, 구체적으로는 80 % 이상, 더욱 구체적으로는 90 % 이상, 보다 더욱 구체적으로는 95 % 이상, 가장 구체적으로는 99 % 이상의 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [54] 한편, 본원의 미생물은 퓨트레신 생산능을 가지는 미생물로서, 상기 Fdh 단백질이 발현되는 원핵 미생물을 포함할 수 있으며, 이의 예로는 에스케리키아 속 (*Escherichia* sp.), 시겔라 속 (*Shigella* sp.), 시트로박터 속 (*Citrobacter* sp.), 살모넬라 속 (*Salmonella* sp.), 엔테로박터 속 (*Enterobacter* sp.) 여시니아 속 (*Yersinia* sp.), 크렙시엘라 속 (*Klebsiella* sp.), 어위니아 속 (*Erwinia* sp.), 코리네박테리움 속 (*Corynebacterium* sp.), 브레비박테리움 속 (*Brevibacterium* sp.), 락토바실러스 속 (*Lactobacillus* sp.), 셀레노모나스 속 (*Selenomonas* sp.), 비브리오 속 (*Vibrio* sp.), 슈도모나스 속 (*Pseudomonas* sp.), 스트렙토마이시스 속 (*Streptomyces* sp.), 아카노박테리아 속 (*Arcanobacterium* sp.), 알칼리젠 속 (*Alcaligenes* sp.) 등에 속하는 미생물일 수 있다. 구체적으로 본원의 미생물은 코리네박테리움 속 또는 에스케리키아 속에 속하는 미생물일 수 있으며, 더욱 구체적으로는 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*)일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [55] 다른 하나의 양태로서 본원은, 퓨트레신을 생산하기 위한, 상기 코리네박테리움 미생물의 용도를 제공한다. 상기 미생물은 포름산 탈수소효소(formate dehydrogenase, Fdh)의 활성이 변형 전 활성에 비하여 증가된 미생물이고, 상기 용도는 퓨트레신을 생산하기 위한 것 일 수 있다.
- [56]
- [57] 다른 하나의 양태로서 본원은, (a) 포름산 탈수소효소 (formate dehydrogenase, Fdh)의 활성이 증가된 퓨트레신을 생산하는 코리네박테리움 속 미생물을 배지에서 배양하는 단계; 및 (b) 상기 단계에서 수득되는 미생물 또는 배지로부터 퓨트레신을 회수하는 단계를 포함하는 퓨트레신 생산 방법을 제공한다.
- [58] 포름산 탈수소효소 및 퓨트레신 생산능이 향상된 미생물에 대해서는 상기 설명한 바와 같다.
- [59] 상기 방법에 있어서, 상기 미생물을 배양하는 단계는, 특별히 이에 제한되지 않으나, 공지된 회분식 배양방법, 연속식 배양방법, 유가식 배양방법 등에 의해 수행될 수 있다. 이때, 배양조건은, 특별히 이에 제한되지 않으나, 혐기성 화합물 (예: 수산화나트륨, 수산화칼륨 또는 암모니아) 또는 산성 화합물 (예: 인산 또는

황산)을 사용하여 적정 pH (예컨대, pH 5 내지 9, 구체적으로는 pH 6 내지 8, 가장 구체적으로는 pH 6.8)를 조절할 수 있고, 산소 또는 산소-함유 가스 혼합물을 배양물에 도입시켜 호기성 조건을 유지할 수 있다. 배양온도는 20 내지 45 °C, 구체적으로는 25 내지 40 °C를 유지할 수 있고, 약 10 내지 160 시간 동안 배양할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 배양에 의하여 생산된 퓨트레신은 배지 중으로 분비되거나 세포 내에 잔류할 수 있다.

- [60] 아울러, 사용되는 배양용 배지는 탄소 공급원으로는 당 및 탄수화물 (예: 글루코오스, 슈크로오스, 락토오스, 프럭토오스, 말토오스, 몰라세, 전분 및 셀룰로오스), 유지 및 지방 (예: 대두유, 해바라기씨유, 땅콩유 및 코코넛유), 지방산 (예: 팔미트산, 스테아르산 및 리놀레산), 알코올 (예: 글리세롤 및 에탄올) 및 유기산 (예: 아세트산) 등을 개별적으로 사용하거나 또는 혼합하여 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 질소 공급원으로는 질소-함유 유기 화합물 (예: 펩톤, 효모 추출액, 육즙, 맥아 추출액, 옥수수 침지액, 대두 박분 및 우레아), 또는 무기 화합물 (예: 황산암모늄, 염화암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄 및 질산암모늄) 등을 개별적으로 사용하거나 또는 혼합하여 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 인 공급원으로 인산 이수소칼륨, 인산수소이칼륨, 이에 상응하는 나트륨 함유 염 등을 개별적으로 사용하거나 또는 혼합하여 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 배지에는 기타 금속염 (예: 황산마그네슘 또는 황산철), 아미노산 및 비타민과 같은 필수성장-촉진 물질을 포함할 수 있다.
- [61] 본원의 상기 배양 단계에서 생산된 퓨트레신을 회수하는 방법은 배양방법에 따라 당해 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 배양액으로부터 목적하는 아미노산을 수집할 수 있다. 예를 들어, 원심분리, 여과, 음이온 교환 크로마토그래피, 결정화 및 HPLC 등이 사용될 수 있으며, 당해 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 배지 또는 미생물로부터 목적하는 퓨트레신을 회수 할 수 있다.

[62]

발명의 실시를 위한 형태

- [63] 이하 본원을 실시예에 의해 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본원을 예시적으로 설명하기 위한 것으로, 본원의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[64]

[65] 실시예 1: CbFdh의 대장균 발현 및 반응성 평가

[66]

[67] 1) CbFdh 유전자의 대장균 발현

- [68] CbFdh (*Candida boidinii* formate dehydrogenase)를 대장균에 과발현시키기 위하여 캔디다 보이디니 (*Candida boidinii*) KCTC17776 균주를 배양하여 유전체 DNA 를 획득하였다. 서열번호 1 및 2의 프라이머를 이용하여 pET28a 벡터에

포름산 탈수소효소 유전자 (CbFdh) (서열번호 9)를 삽입하였다.

- [69] 구체적으로, PCR 조건은 변성 (denaturation) 95 °C 30 초, 어닐링 (annealing) 55 °C 30 초, 신장 (extension) 72 °C 1 분을 30 회 반복 수행하였다. 이 PCR 결과물로부터 1.0 % 아가로스 겔에서 전기 영동한 후 1.1 kb 크기의 밴드를 용리하여 정제하였다. 상기 정제된 PCR 산물과 pET28a 벡터 용액 샘플에 NcoI과 XhoI을 넣고 37 °C, 4 시간 반응으로 제한효소 처리하고 1.5 % 아가로스 겔을 이용하여 전기영동 후 CbFdh와 벡터 사이즈의 핵산 단편을 잘라낸 후 Gel prep kit (GeneAll, 서울)를 이용하여 정제된 핵산 단편들을 수득하였다. 상기 수득한 각 1 mg의 CbFdh 단편과 pET28a 벡터 단편을 T4 연결효소 (ligase)를 이용하여 연결시킨 후 *E. coli* DH5 α 균주에 2500 V로 일렉트로포레이션 (electrophoration)하였다. 상기 일렉트로포레이션 후, 회수된 균주를 50 μ g/l 스펙티노마이신 (spectinomycin)을 포함한 LB 평판배지에 도말하여 37 °C에서 1 일 배양한 후 스펙티노마이신에 내성을 보이는 균주를 선별하였다. 회수된 균주를 50 μ g/l 카나마이신 (kanamycin)을 포함한 LB 평판배지에 도말하여 37 °C에서 1 일 배양한 후 내성을 보이는 균주를 선별하였다. 선별된 균주는 T7 프로모터와 터미네이터 (terminator) 서열의 서열번호 3 및 4의 프라이머를 이용하여 위 조건으로 PCR 한 후, 1.0 % 아가로스 겔 상에서 유전자의 크기가 1.3 kb로 관찰되는 것을 확인함으로써 CbFdh 삽입을 확인하였다.

- [70] 상기 CbFdh의 삽입이 확인된 균주를 3 ml의 LB 용액 배지에 50 mg/ml 농도의 앰피실린을 넣고 37 °C에서 12 시간 배양하였다. 배양된 균주를 항생제를 포함한 50 ml LB에 넣고 37 °C에서 배양하여 광학광도 (600 nm 파장)가 0.8이 되면, 0.2 mM IPTG를 첨가하여 다양한 온도/시간 조건에서 발현을 유도하였다. 배양된 균주를 세척하고 소니케이터 (sonicator)를 이용하여 세포를 분쇄하였다. 분쇄 후 SDS-PAGE 겔 결과를 통해서 CbFdh (41kDa, 서열번호 10)가 과발현되었음을 확인하였다 (도 1).

[71]

[72] **2) 발현된 CbFdh 유전자의 활성 평가**

- [73] CbFdh의 활성을 평가하기 위하여, 100 mM 인산 완충액 (pH 7.2)을 반응 완충용액으로 사용하였다. 상기 완충용액에 10 mM의 NAD⁺와 0.1 % 소듐 포메이트 (sodium formate)를 넣어준 용액을 대조군으로 사용하였다. 한편, 대조군에 상기 실시예 1-1)에서 확인한 CbFdh 과발현 세포 분쇄액을 10 % 비율로 넣어주고 CbFdh의 활성을 평가하였다. 반응액은 96 웰 플레이트 리더기를 사용하여 339 nm 파장에서 수치 변화를 확인하였다. 340 nm 파장의 빛은 NADH에 선택적으로 흡수되는 것으로 알려져 있다.

- [74] 그 결과, 수분 동안 NADH가 지속적으로 생성되는 것을 확인할 수 있었다 (도 2). 본 실시예를 통하여 CbFdh가 대장균에서 과발현될 수 있으며, 발현된 단백질은 고유한 활성을 가지는 것으로 평가되었다.

[75]

- [76] 실시예 2: CbFdh 발현 코리네박테리움 속 미생물 제작
- [77]
- [78] 다음으로, 퓨트레신을 생산하는 코리네박테리움 속 균주에 CbFdh의 기능을 강화하여 퓨트레신 생산능 향상 여부를 확인하고자 하였다. 코리네박테리움 속 균주에서 CbFdh를 발현시키고 이의 활성을 확인하기 위하여 CbFdh의 유전자 개시코돈 앞에 CJ7 프로모터 (KCCM10617, 대한민국 등록특허 제10-0620092호)를 도입하였다.
- [79] 우선 CJ7 프로모터 서열을 포함하는 유전자를 얻기 위하여 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032의 게놈 DNA를 주형으로 서열번호 5 및 6의 프라이머 쌍을 이용한 PCR을 수행하였다. PCR 반응은 변성 95 °C 30 초, 어닐링 55 °C 30 초 및 신장 72 °C 30 초의 과정을 30 회 반복하여 수행하였다. 1.5 % 아가로스 겔을 이용하여 전기영동 후 400 bp (base pair)의 크기를 가지는 PCR 핵산 결과물을 확인하였다. 얻어진 PCR 결과물로부터 PCR prep kit (GeneAll, 서울)를 이용하여 정제된 CJ7 프로모터 핵산 단편을 확보하였다. 정제된 CJ7 핵산 단편과 pSCEC 벡터 용액 샘플에 BamHI과 XbaI을 넣고 37 °C, 4 시간 반응으로 제한효소 처리하였다. 그 다음 1.5 % 아가로스 겔을 이용하여 전기영동 후 400 bp의 크기를 가지는 CJ7 프로모터와 pSCEC 벡터 크기의 핵산 단편들을 잘라내고, Gel prep kit (GeneAll, 서울)를 이용하여 CJ7 프로모터 단편과 pSCEC 벡터의 핵산 단편들을 수득하였다. 상기 각 1 mg의 CJ7 프로모터 단편과 pSCEC 벡터를 T4 연결효소를 이용하여 연결한 후 *E. coli* DH5 α 균주에 2500 V로 일렉트로포레이션 (electrophoration)하였다. 일렉트로포레이션 후 회수된 균주를 50 μ g/l 스펙티노마이신 (spectinomycin)을 포함한 LB 평판배지에 도말하여 37 °C에서 1 일 배양한 후 스펙티노마이신에 내성을 보이는 균주를 18 종 선별하였다. 상기 선별된 18 개의 균주를 서열번호 5 및 6의 프라이머를 이용하여 콜로니 PCR 후 400 bp의 크기를 가지는 PCR 결과물을 확인할 수 있었다. 콜로니 PCR 결과물로부터 CJ7 프로모터를 가지는 pSCEC_CJ7의 제작을 확인하였다.
- [80] 상기 실시예 1에서 얻어진 CbFdh PCR 결과물 획득 조건과 동일하게 서열번호 7 및 8의 프라이머를 이용하여 pSCEC_CJ7에 삽입할 수 있는 CbFdh PCR 결과물을 획득하였다. 제한 효소 XbaI과 SalI으로 처리된 pSCEC_CJ7와 CbFdh PCR 결과물을 연결하여 *E. coli* DH5 α 균주에 삽입 하였다. 선별된 균주로부터 pSCEC_CJ7_CbFdh를 수득하고 퓨트레신 생산 균주인 코리네박테리움 속 미생물 KCCM11240P (대한민국 공개특허 제2013-0082478호)과 KCCM11401P (대한민국 공개특허 제2014-0017243호)에 2500 V로 일렉트로포레이션 (electrophoration)하였다.
- [81] 상기 일렉트로포레이션하여 수득한 균주를 50 μ g/l 스펙티노마이신 (spectinomycin)을 포함한 BHIS 평판 배지 (Braine heart infusion 37 g/l, 소르비톨 91 g/l, 한천 2 %)에 도말하여 배양함으로써 콜로니를 형성시켰다. 상기 선별된 균주는 50 μ g/l 스펙티노마이신 (spectinomycin)을 포함한 CM 배지 (glucose 10

g/l, polypeptone 10 g/l, yeast extract 5 g/l, beef extract 5 g/l, NaCl 2.5 g/l, Urea 2 g/l, pH 6.8)에서 진탕 배양하여 최종 선별하였다. pSCEC_CJ7_CbFdh가 삽입된 KCCM11240P 균주를 KCCM11240P/pSCEC_CJ7_CbFdh (CC04-0081)로 명명하고 pSCEC_CJ7가 삽입된 KCCM11240P 균주를 KCCM11240P/pSCEC_CJ7로 명명하였다. 마찬가지로 pSCEC_CJ7_CbFdh가 삽입된 KCCM11401P 균주를 KCCM11401P/pSCEC_CJ7_CbFdh로 명명하고 pSCEC_CJ7가 삽입된 KCCM11401P 균주를 KCCM11401P/pSCEC_CJ7로 명명하였다.

- [82] 이 중, CC04-0081 균주를 2016 년 1 월 8 일자로 부다페스트조약하의 국제기탁기관인 한국미생물보존센터 (Korea Culture center of Microorganisms, KCCM)에 수탁번호 KCCM11798P로 기탁하였다.

[83]

- [84] 실시예 3: 코리네박테리움 속 미생물에서의 CbFdh의 활성 평가

[85]

- [86] CbFdh가 삽입된 코리네박테리움 속 균주의 포름산 탈탄산효소 활성을 확인하기 위하여 포름산 (formic acid)를 첨가한 배지에서 포름산 농도 변화를 분석하였다 (도 3). CbFdh가 강화된 균주와 공백터가 삽입된 균주의 배양액에 0 g/l, 2 g/l, 10 g/l 농도의 포름산을 배양액에 첨가하였다. 강화 균주와 공백터 삽입 균주는 KCCM11240P/pSCEC_CJ7_CbFdh와 KCCM11240P/pSCEC_CJ7를 사용하였다.

- [87] 배양 결과 공백터가 포함된 균주의 경우, 2 g/l 및 10 g/l 포름산이 첨가되었을 때 포름산이 배양액에 그대로 남아 있는 것을 확인할 수 있었다. 반면 CbFdh가 강화된 균주는 2 g/l 의 포름산을 24 시간 안에 모두 분해하는 것을 확인할 수 있었다. 그리고 10 g/l 의 포름산이 첨가된 경우에는 32 시간 내에 모두 분해하지 못하였지만, 지속적으로 포름산이 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 반응 32 시간째에 대조군 균주와 비교해 볼 때 80 % 정도의 포름산이 전환되었음을 확인할 수 있었다.

- [88] CbFdh 강화 균주 및 대조군 균주 배양을 통한 포름산 변화량 분석을 통하여 CbFdh 강화 균주는 포름산을 분해하는 것으로 확인되었다. 이 결과를 통하여 코리네박테리움 속 균주에 도입된 CbFdh가 정상적으로 발현하여 기능을 유지하고 있음을 확인하였다.

[89]

- [90] 실시예 4: CbFdh 강화 퓨트레신 균주의 생산능 평가

[91]

- [92] CbFdh 강화 퓨트레신 균주의 생산능을 평가하기 위하여 제작된 4 종의 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주 (KCCM11240P/pSCEC_CJ7_CbFdh, KCCM11240P/pSCEC_CJ7, KCCM11401P/pSCEC_CJ7_CbFdh, KCCM11401P/pSCEC_CJ7)를 각각 1 mM 아르기닌 함유 CM 평판 배지 (glucose 1 %, polypeptone 1 %, yeast extract 0.5 %, beef extract 0.5 %, NaCl 0.25 %, urea 0.2 %, 1

50 % NaOH 100 μ l, 50 μ g 스펙티노마이신, agar 2 %, pH 6.8, 1 ℓ 기준)에 도달하여 30 °C에서 24 시간 동안 배양하였다. 이로부터 배양된 각 균주를 25 ml의 역가 배지 (Glucose 8 %, 대두단백질 0.25 %, 옥수수고형 0.50 %, (NH₄)₂SO₄ 4 %, KH₂PO₄ 0.1 %, MgSO₄·7H₂O 0.05 %, urea 0.15 %, 바이오틴 100 μ g, 티아민 염산염 3 mg, 칼슘-판토텐산 3 mg, 니코틴아미드 3 mg, CaCO₃ 5 %, 50 μ g 스펙티노마이신, 1 ℓ 기준)에 한 백금이 정도로 접종한 후 이를 30 °C에서 200 rpm으로, KCCM11240P/pSCEC_CJ7_CbFdh 및 KCCM11240P/pSCEC_CJ7 균주의 경우 98 시간, KCCM11401P/pSCEC_CJ7_CbFdh 및 KCCM11401P/pSCEC_CJ7 균주의 경우 104 시간 동안 진탕 배양하였다.

[93] 각 배양물로부터 생산된 푸트레신 농도를 측정하고 그 결과를 하기 표 1에 나타내었다.

[94]

[95] [표1]

균주명	포름산 첨가량 (g/l)	푸트레신(g/l)
KCCM11240P/pSCEC_CJ7	0	12.2
KCCM11240P/pSCEC_CJ7	5	12.3
KCCM11240P/pSCEC_CJ7_CbFdh	0	13.4
KCCM11240P/pSCEC_CJ7_CbFdh	5	13.1
KCCM11401P/pSCEC_CJ7	0	11.4
KCCM11401P/pSCEC_CJ7	5	10.7
KCCM11401P/pSCEC_CJ7_CbFdh	0	12.0
KCCM11401P/pSCEC_CJ7_CbFdh	5	12.0

[96]

[97] 배양액에 존재하는 푸트레신 농도는 HPLC를 이용하여 분석하였다. 상기 표 1에 나타난 바와 같이, KCCM11240P/pSCEC_CJ7 균주의 경우 5 g/l 포름산의 유무에 따라서 푸트레신 생성량이 크게 변화되지 않았다. 반면 KCCM11240P/pSCEC_CJ7_CbFdh 가 도입된 균주는 5g/l 포름산 유무와 상관없이 KCCM11240P/pSCEC_CJ7 균주 대비 생산량이 7 % 이상 증가되는 것을 확인하였다. 포름산의 유무와 상관없이 Fdh 강화 균주의 푸트레신 생산량이 증가되는 것을 확인하였다.

[98] 또한, 포름산 첨가 없이 동일 배지에서 평가된 KCCM11401P/pSCEC_CJ7

균주의 경우 11.4 g/l의 푸트레신이 생산되었으며, 5 g/l의 포름산이 첨가된 배지에서 배양된 균주는 6 % 정도 수율이 감소 (10.7 g/l)되는 것을 확인하였다. 반면에 CbFdh가 강화된 균주인 KCCM11401P/pSCEC_CJ7_CbFdh의 경우 포름산의 유무와 상관 없이 동일량의 푸트레신이 생성 (12.0 g/l)되는 것을 확인하였다. KCCM11401P/pSCEC_CJ7_CbFdh 균주와 KCCM11401P/pSCEC_CJ7 균주로부터 생산된 푸트레신을 분석하였을 때, CbFdh가 강화된 균주는 KCCM11401P/pSCEC_CJ7 보다 5 %이상 푸트레신 생산량이 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 포름산의 유무와 무관하게 CbFdh 강화 균주가 푸트레신 생산능이 향상된 것을 확인하였다.

[99]

[100] 상기 결과를 종합하면, 푸트레신 생산 균주에 포름산 탈수소효소 (CbFdh)가 도입된 형질전환 균주는 푸트레신 생산량이 더욱 증가하는 것을 확인하였으며, 이는 포름산의 첨가 여부와는 무관하게 나타나는 효과이다. 이에, 본원을 통해 푸트레신을 효율적으로 대량 생산할 수 있을 것으로 기대된다.

[101]

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

[103]

[104]

국 제 양 식

특허출원을 위한 부디페스트 국제 조약 하의 미생물 수탁 증명

국제기탁기관에 의해 규칙 7.1에 따라 발행된 원기탁에 대한 수탁증

수신: 씨제이제일제당 주식회사,
서울시 중구 동호로 330 CJ 제일제당센터

I. 미생물의 표시	
기탁자가 첨부한 미생물 식별에 대한 표시: <i>Corynebacterium glutamicum</i> CC04-0081	국제 기탁기관이 부여한 수탁번호: KCCM11798P
II. 과학적 성질의 설명 및/또는 분류학상의 위치	
항목 I에 표시된 미생물에 대하여 다음 사항이 포함되어 있다: ☐ 과학적 성질의 설명 ☐ 제안된 분류학상의 위치 (적용시 ☒ 표시)	
III. 기탁 및 수탁	
본 국제기탁기관은 2016년 1월 8일에 기탁된 항목 I에 표시된 미생물을 수탁하였다.	
IV. 국제기탁기관	
명칭: 한국미생물보존센터 주소: 대한민국 서울시 서대문구 홍제대 2가길 45 유림빌딩 (우편번호 120-861)	국제기탁기관을 대표하는 권한을 가진 자 또는 권한을 부여받은 공무원 서명: 서명일: 2016. 01. 08.

상기 번역은 원문의 내용과 상위 없음을 증명함.

2016 년 3 월 14 일

변리사 손 민

