



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0095608
(43) 공개일자 2014년08월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/21 (2006.01) C12N 15/52 (2006.01)
C12P 7/52 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0007670
(22) 출원일자 2013년01월23일
심사청구일자 2013년01월23일

(71) 출원인
부산대학교 산학협력단
부산광역시 금정구 부산대학교로63번길 2 (장전동, 부산대학교)
(72) 발명자
박성훈
부산 금정구 금강로565번길 54, 307동 1302호 (구 서동, 선경3차아파트)
리탐사카
부산광역시 금정구 장전동 산30 제7공학관 7201-A호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태백

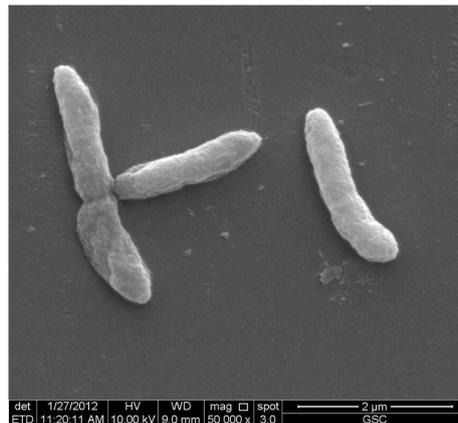
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 신규 슈도모나스 SP2 균주 및 이를 이용한 3-하이드록시프로피온산의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 호기 조건에서 비타민 B₁₂ 생성능을 갖는 신규 슈도모나스 균주 및 이를 이용한 3-하이드록시프로피온산의 제조방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 기탁번호 KACC91720P의 슈도모나스 SP2 균주 및 이를 이용하여 현재 화학공정으로 생산하기 어려운 3-하이드록시프로피온산을 저가의 탄소원을 통해 우수한 효율 및 환경친화적인 생물공정으로 생산하는 방법에 관한 것이다

대표도 - 도3



(72) 발명자

발란아라수

부산광역시 금정구 장전동 산30 제7공학관 7201-A
호

고연주

부산 동래구 안남로 9, 102동 808호 (낙민동, 우성
아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20110031361

부처명 교육과학기술부

연구사업명 글로벌프론티어사업

연구과제명 첨단 바이오연료 생산을 위한 탈카보닐 효소 및 탈수효소의 개발

기여율 1/1

주관기관 부산대학교 산학협력단

연구기간 2011.08.22 ~ 2012.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

호기 조건에서 비타민 B₁₂를 생산하는 기탁번호 KACC91720P의 슈도모나스 SP2 균주.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 균주는 글리세롤(glycerol), 글루코오스(glucose), 프룩토오스(fructose), 말토오스(maltose), 락토오스(lactose), 수크로오스(sucrose) 또는 갈락토오스(galactose)를 탄소원으로 사용하는 것인 슈도모나스 SP2 균주.

청구항 3

제1항의 슈도모나스 SP2 균주를 탄소원이 포함된 배지에서 호기 조건으로 배양하는 단계; 및

상기 배양액으로부터 비타민 B₁₂를 수득하는 단계를 포함하는 비타민 B₁₂의 제조방법.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 따른 슈도모나스 SP2 균주에 글리세롤 디하이드라타제(glycerol dehydratase) 유전자(DhaB) 및 글리세롤 디하이드라타제 재활성화인자(glycerol dehydratase reactivase) 유전자(GdrAB)가 형질도입된 재조합 균주.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 글리세롤 디하이드라타제(glycerol dehydratase) 유전자(DhaB) 및 글리세롤 디하이드라타제 재활성화인자(glycerol dehydratase reactivase) 유전자(GdrAB)는 클렙시엘라 뉴모니에(*Klebsiella pneumoniae*) DSM2026의 게놈 DNA로부터 유래된 것인 재조합 균주.

청구항 6

제4항의 재조합 균주를 탄소원이 포함된 배지에서 배양하는 단계; 및

상기 배양액으로부터 3-하이드록시프로피온산을 수득하는 단계를 포함하는 3-하이드록시프로피온산의 제조방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 배양하는 단계는 호기 조건에서 수행되는 것인 3-하이드록시프로피온산의 제조방법.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 탄소원은 글리세롤 및 글루코오스인 것인 3-하이드록시프로피온산의 제조방법.

명세서

기술분야

본 발명은 호기 조건에서 비타민 B₁₂ 생성능을 갖는 신규 슈도모나스 균주 및 이를 이용한 3-하이드록시프로피온산의 제조방법에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 비타민 B₁₂(vitamin B₁₂)는 1926년 Ninot과 Murphy에 의해 간추출물에서 발견된 비폴리머 생물학적 분자들 중 하나로 디메틸벤질이미다졸(DMB) 뉴틀레오티드, 아미노프로판올 작용기, 중심부에 코발트가 있는 코오린 고리 등 크게 세 부분이 결합된 구조를 가진다. 이 코발트에 시안기가 결합한 것을 시아노-코발라민이라고 하며 생체 내에서는 이 시안기가 아데노실이나 메틸 그룹으로 교체되어 아데노실-코발라민(adenosyl-cobalamin) 또는 메틸-코발라민(methyl-cobalamin)으로 존재하면서 세포의 대사과정에 필수적인 조효소 역할을 하게된다.
- [0003] 비타민 B₁₂의 화학적 구조가 밝혀졌음에도 불구하고 이 구조의 복잡한 특징 때문에 비타민 B₁₂의 상업적인 생산은 생물학적 발효에 의해서만 수행되어 왔다. 비타민 B₁₂의 상업적인 생산을 위해 사용되는 균주는 네 가지 정도로 알려져 있으며, 비타민 B₁₂ 생합성 유전자의 산소 요구여부 따라 호기성 경로를 이용하는 균주와 혐기성 경로를 이용하는 균주로 분류할 수 있다. 비타민 B₁₂를 호기성에서 생성할 수 있는 균주로는 슈도모나스 디나이트리피칸스(*Pseudomonas denitrificans*) 등이 있으며, 혐기성 조건에서 생성할 수 있는 균주로는 살모넬라 타이피무리움(*Salmonella typhimurium*), 프로피오니박테리움 프레우덴레이키이 아종 세르마니이(*Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*) 및 바실러스 메가테리움(*Bacillus megaterium*) 등이 있다. 본 균주들은 비타민 B₁₂의 합성을 위해 약 30개 이상의 유전자와 이와 비슷한 수의 효소 반응 단계가 필요한 것으로 보고되고 있다.
- [0004] 이와 같이 비타민 B₁₂를 합성할 수 있는 균주들은 중요한 대사산물들의 생산을 위한 호스트 균주로써 개발될 수 있어 관련 분야 연구자들의 주목을 받고 있다. 그 중 호기성 조건에서 비타민 B₁₂를 생성할 수 있는 슈도모나스 디나이트리피칸스는 특히 글리세롤로부터 3-하이드록시프로피온산(3-hydroxypropionic acid, 3-HP)을 효과적으로 생산할 수 있는 장점을 가지고 있다(한국 특허 출원번호 10-2010-0083654호).
- [0005] 글리세롤로부터 3-HP의 생산은 비타민 B₁₂를 요구하는 글리세롤 디하이드라테이즈(DhaB)에 의해 글리세롤이 3-하이드록시프로피온알데히드(3-HPA)로 전환되는 단계와 이 3-HPA가 NAD⁺를 조효소로 이용하는 알데하이드 디하이드로지네이즈(AldH)에 의해 3-HP로 산화되는 과정을 통해 이루어진다. 이렇게 생산된 3-HP는 고분자 코팅제의 가교제, 금속의 윤활유, 섬유용의 정전기 방지제 등으로 사용될 수 있을 뿐만 아니라 아크릴산, 1,3-프로판디올, 아크릴아마이드, 말로닉산, 프로피온락톤, 아크로니트릴 등의 합성원료로 사용될 수 있다.
- [0006] 현재 비타민 B₁₂의 생산이 자체적으로 가능하고 글리세롤에 대한 대사경로가 가장 잘 연구된 크렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumonia*) 균주를 3-HP 생산에 이용하기 위한 연구가 진행되었으나, 혐기 조건을 요구하는 비타민 B₁₂의 생성 조건이 NAD⁺의 재생을 어렵게 하여 3-HP의 생산량을 일정 수준이상 향상시키지 못하는 것으로 조사되었다. 따라서 호기 조건에서 높은 비타민 B₁₂의 생산성을 가지고 있으며, 빠른 세포성장을 보이는 새로운 균주의 개발이 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 따라서 본 발명은 호기 조건에서 비타민 B₁₂ 생산능을 가지는 새로운 슈도모나스 균주 및 이를 이용하여 3-하이드록시프로피온산을 제조하는 방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0008] 상기 과제의 해결을 위하여, 본 발명은 호기 조건에서 비타민 B₁₂를 생산하는 기탁번호 KACC91720P의 슈도모나스 SP2 균주 및 이를 이용한 비타민 B₁₂의 제조방법을 제공한다.
- [0009] 또한 본 발명은 상기 슈도모나스 SP2 균주에 글리세롤 디하이드라타제(glycerol dehydratase) 유전자(DhaB) 및 글리세롤 디하이드라타제 재활성화인자(glycerol dehydratase reactivase) 유전자(GdrAB)가 형질도입된 재조합 균주 및 이를 이용한 3-하이드록시프로피온산의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명에 따른 기탁번호 KACC91720P의 슈도모나스 SP2 균주는 호기 조건에서 높은 효율로 비타민 B₁₂의 생산이 가능하므로, 알데하이드 디하이드로지네이즈 등과 같은 효소의 조효소로 사용되는 NAD⁺ 재생 문제를 최소화할 수 있다. 따라서 상기 균주를 글리세롤 디하이드라테이즈 및 알데하이드 디하이드로지네이즈 등의 효소로 합성되는 3-하이드록시피로피온산 생산에 적용되는 경제적이고 유용한 호스트 균주로 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도1은 본 발명의 SP2 균주의 계통도이다.
 도 2는 본 발명의 SP2 균주에 대한 호기 및 미호기 배양 결과이다.
 도 3은 본 발명의 SP2 균주에 대한 SEM 사진이다.
 도4는 본 발명의 SP2 균주에 글리세롤 디하이드라테이즈와 글리세롤 디하이드라테이즈의 재활성을 위한 유전자를 과발현한 후 3-HP생산 수율을 조사한 결과 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 본 발명은 호기 조건에서 비타민 B₁₂를 생산하는 기탁번호 KACC91720P의 슈도모나스 SP2 균주를 제공한다.

[0013] 본 발명의 발명자들은 호기 조건에서 비타민 B₁₂를 생산하는 균주를 분리하기 위해 연구하던 중, 혐기성 소화조로부터 신규 분리균 슈도모나스 속 SP2 균주를 확보하였으며, 성장 특성, 대사산물들의 생산량, 지방산 구성 성분, 비타민 B₁₂ 생산 능력 등을 조사하였으며, 신규 분리균 슈도모나스 중 SP2가 비타민 B₁₂를 조효소로 요구하는 생체분자들의 생산을 위한 호스트 균주로서의 가능성이 있음을 확인하고 이를 2012년 5월 15일자로 국립농업과학원에 기탁번호 KACC91720P로 기탁하고 본 발명을 완성하게 되었다.

[0014] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 슈도모나스 SP2 균주는 글리세롤(glycerol), 글루코오스(glucose), 프룩토오스(fructose), 말토오스(maltose), 락토오스(lactose), 수크로오스(sucrose) 또는 갈락토오스(galactose)를 탄소원으로 사용하는 것일 수 있으며, 상기 물질을 탄소원으로 함유하는 배지에서 호기조건으로 배양시 비타민 B₁₂를 합성한다.

[0015] 따라서 본 발명은 상기 슈도모나스 SP2 균주를 탄소원이 포함된 배지에서 호기 조건으로 배양하는 단계; 및 상기 배양액으로부터 비타민 B₁₂를 수득하는 단계를 포함하는 비타민 B₁₂의 제조방법을 제공한다.

[0016] 본 발명의 슈도모나스 SP2 균주는 호기성 조건에서 높은 효율로 비타민 B₁₂의 생산이 가능하므로, 알데하이드 디하이드로지네이즈 등과 같은 효소의 조효소로 사용되는 NAD⁺ 재생 문제를 최소화할 수 있다. 따라서 상기 균주에 글리세롤 디하이드라테이즈 등의 효소를 형질도입하여 재조합 균주를 생성하고, 이를 3-하이드록시피로피온산 생산에 적용하여 경제적이고 유용한 호스트 균주로 사용할 수 있다.

[0017] 따라서 본 발명은 슈도모나스 SP2 균주에 글리세롤 디하이드라타제(glycerol dehydratase) 유전자(DhaB) 및 글리세롤 디하이드라타제 재활성화인자(glycerol dehydratase reactivase) 유전자(GdrAB)가 형질도입된 재조합 균주 및 이를 이용한 3-하이드록시피로피온산의 제조방법을 제공한다.

[0018] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 글리세롤 디하이드라타제(glycerol dehydratase) 유전자(DhaB) 및 글리세롤 디하이드라타제 재활성화인자(glycerol dehydratase reactivase) 유전자(GdrAB)는 클렙시엘라 뉴모니에(*Klebsiella pneumoniae*) DSM2026 의 게놈 DNA로부터 유래된 것일 수 있다.

[0019] 상기 글리세롤 디하이드라타제는 클렙시엘라 뉴모니에(*Klebsiella pneumoniae*)에서 유래한 효소로, 글리세롤을 3-HPA로 전환하며, *dhaB1* 유전자(KPN_03489)가 코딩하는 단백질인 대단위체(Large subunit 또는 α subunit라 불림), *dhaB2* 유전자(KPN_03488)가 코딩하는 단백질인 중단위체(Medium subunit 또는 β subunit라 불림), *dhaB3* 유전자(KPN_03487)가 코딩하는 단백질인 소단위체(Small subunit 또는 γ subunit라 불림) 등 세 가지 단백질로 구성되어 있다.

[0020] 또한, 글리세롤 디하이드라타제 재활성화인자는 클렙시엘라 뉴모니에(*Klebsiella pneumoniae*)에서 유래한 단백질

질로, 글리세롤 디하이드라테이즈의 촉매 반응 시 상기 촉매의 활성을 유지시키는 작용을 하며, *gdrA* 유전자 (KPN_03486)가 코딩하는 *GdrA* 단백질 및 *gdrB* 유전자(potein ID; AAA 74261)가 코딩하는 *GdrB* 단백질로 구성되어 있다.

[0021] 상기 글리세롤 디하이드라타제(glycerol dehydratase) 유전자(DhaB) 및 글리세롤 디하이드라타제 재활성화인자(glycerol dehydratase reactivase) 유전자(GdrAB)의 형질도입은 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터 및 전기천공법을 통한 상기 벡터의 세포내 도입을 통해 수행될 수 있다.

[0022] 상기 3-하이드록시프로피온산의 제조방법은 상기 슈도모나스 SP2 균주에 글리세롤 디하이드라타제(glycerol dehydratase) 유전자(DhaB) 및 글리세롤 디하이드라타제 재활성화인자(glycerol dehydratase reactivase) 유전자(GdrAB)가 형질도입된 재조합 균주를 탄소원이 포함된 배지에서 배양하는 단계; 및 상기 배양액으로부터 3-하이드록시프로피온산(3-HP)을 수득하는 단계를 포함할 수 있다.

[0023] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 배양하는 단계는 호기 조건에서 수행될 수 있으며, 상기 배양시 탄소원으로는 글리세롤(glycerol) 및 글루코오스(glucose)를 사용할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0024] 본 발명의 이하의 실시예에서, 상기 재조합 균주를 글리세롤 및 글루코오스를 포함하는 배지에서 배양한 결과, 비타민 B₁₂의 첨가없이 29시간 동안 최대 16.24 mmol/L의 3-HP를 생산하는 것을 확인할 수 있었다. 사용된 글리세롤 대비 생산된 3-HP의 비는 약 0.32 (수율 32%)로 나타났다.

[0025] 따라서 본 발명의 슈도모나스 종 SP2 균주는 호기 조건에서 비타민 B₁₂를 생산할 수 있고, 이러한 특성을 통해 조효소로 비타민 B₁₂를 요구하는 글리세롤 디하이드라테이즈(DhaB)를 이용하는 3-하이드록시프로피온산(3-HP)의 생산을 위한 호스트 균주로 유용하게 사용될 수 있는 바, 우수한 특성을 보유하는 균주에 해당한다.

[0026] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0027] <실시예 1> 슈도모나스 종 SP2의 분리 및 동정

[0028] 1-1. 슈도모나스 종 SP2의 분리

[0029] 신규 균주를 분리하기 위하여 혐기성 소화조로부터 시료를 채취하였다. 채취한 시료는 8000rpm에서 10분 동안 원심분리하여 무거운 입자를 제거하였으며, 상등액은 멸균된 물을 이용하여 연속적으로 희석시킨 후 5g/L의 글루코즈, 50 µg/ml의 엠피실린 및 세트리미드 0.3g/L가 첨가된 슈도모나스 분리용 배지에 도말하였다. 균을 도말한 평판배지는 37℃에서 24시간 동안 배양되었으며, 슈도모나스와 비슷한 형태를 가지면서 우수한 성장 특성을 보이는 슈도모나스 종 SP2 (SP2)를 선별하였다. SP2 균주는 호기성으로 LB 한천 배지에 배양하였을 때 콜로니가 밝은 크림색을 나타내는 것으로 확인하였다. 상기 SP2균주는 국립농업과학원 농업유전자원센터에 2012년 5월 15일 기탁 (기탁번호: KACC91720P) 보존하였다.

[0030] 1-2. 16S rDNA 증폭에 의한 슈도모나스 종 SP2의 확인

[0031] 신규 분리균인 슈도모나스 종 SP2로부터 게놈 DNA는 이하의 표 1에 보여진 프라이머를 사용해 PCR(중합효소연쇄반응)을 수행하여 1575bp의 16S 리보솜 DNA를 얻었다. PCR 산물은 One-Step Isothermal DNA Assembly 방법을 사용하여 pCDFduet-1 벡터에 접합하였으며, 증폭을 위한 PCR 조건 (35 cycle)은, 초기변성과정 96℃ 10분, 변성과정 96℃ 1분, 어닐링과정 65℃(insert), 47℃(vector) 30초, 연장(중합)과정 68℃ 2분(insert), 5분(vector), 최종 연장 과정 72℃ 20분으로 하였다.

표 1

[0032]

Primer	Sequence
16S rDNA 및 vitamin B₁₂ 유전자 클로닝 프라이머	
pCDF-PD 16S INS IAFP	TTA ACT TTA ATA AGG AGA TAT AAT TGA ACG CTG GCG GCA GGC C
pCDF-PD 16S INS IARP	GTA CAA TAC GAT TAC TTT CTG TTC GAA TCG TCT AAC CAG TGA ATC AAG
pCDF-PD 16S VEC IARP	TAT ATC TCC TTA TTA AAG TTA A

pCDF-PD 16S VEC IAFP	TCG AAC AGA AAG TAA TCG TAT TGT AC
pCDF-PD CobB INS IAFP1	ATT TTG TTT AAC TTT AAT AAG GAG ATA TAA TGC CTT CAA GGC CGG GAT CAA GGC GCA GA
pCDF-PD CobB VEC IARP2	TAT ATC TCC TTA TTA AAG TTA AAC AAA AT
pCDF-PD CobB VEC IAFP2	AAT TTT GTT TAA CTT TAA TAA GGA GAT ATA
pCDF-PD CobB INS IARP1	GGC CGT GTA CAA TAC GAT TAC TTT CTG TTC GAT CAT GGT CGA AAC AGG GCC ACC GCG GCG TCC G
pCDF-PD CobQ INS IAFP	TTA ACT TTA ATA AGG AGA TAT AAT GAC CTC GCC GAC GGG GCA GGC CGA
pCDF-PD CobQ INS IARP	TGT ACA ATA CGA TTA CTT TCT GTT CGA CTA CAG CCC GCA TAG TGC TTT CAA TCG
시퀀싱 프라이머	
pCDF-PD 16S SEQ FP1	AGC GGA TAA CAA TTC CCC TGT A
pCDF-PD 16S SEQ RP2	TAT ATC TCC TTC TTA TAC TTA ACT
pCDF-CobB SEQ729FP	CTG GCC GAC CTC GAC GCC CGC CTG
pCDF-CobB SEQ783RP	GCT GGC GGC CAG GGC ATC GGC GGC G
pCDF-CobQ SEQ819FP	CAC CTG GAA GCC GAG GAC GCC ATC
pCDF-CobQ SEQ869RP	GCC GCT CTT GGC GGT CTG GCG GAG

[0033] Cosmotech Co. Ltd. (Seoul, Korea) 에서 유전자 염기 서열을 밝혔고, 유전자 염기서열 분석 결과는 NCBI BLAST를 사용하여 게놈 데이터베이스 은행 (genomic database bank) 에 등록된 박테리아의 reference species 로 유사성을 비교하였다. 그 결과 SP2의 시퀀스 데이터가 슈도모나스 니트로리듀센스(*Pseudomonas nitroreducens*)의 시퀀스와 99% 이상의 상동성을 가짐을 확인하였다. 이상의 16S rDNA 분석 결과로부터 분리된 SP2 균주는 슈도모나스 종으로 분류되었고, 상기 균주와 달리 분리균은 호기성 조건에서 비타민 B₁₂를 생성하는 신균주임으로 확인된 바 슈도모나스 중 SP2라 명명하였다. SP2의 16S rDNA 유전자 시퀀스는 NCBI nucleotide sequence database에 등록번호 JX298094로 기탁하였다.

[0034] **1-3. 비타민 B₁₂ 합성 유전자 증폭에 의한 슈도모나스 속 SP2의 확인**

[0035] 슈도모나스 디나이트리피칸스(*Pseudomonas denitrificans*)가 호기성에서 비타민 B₁₂ 합성시 필요한 유전자로 알려진 *cobB*와 *cobQ* 유전자 영역을 증폭하여 그 서열을 분석하고 SP2를 동정하였다. *cobB*와 *cobQ* 단편은 상기 표 1에 나타난 프라이머들을 사용하여 분리균의 게놈 DNA로부터 증폭하여 각각 1300bp, 1500bp의 유전자 단편을 획득하였다. PCR 산물은 One-Step Isothermal DNA Assembly 방법을 사용하여 pCDFduet-1 벡터에 접합하였으며, 증폭을 위한 PCR 조건 (35 cycle)은, 초기변성과정 96℃ 10분, 변성과정 95℃ 1분, 어닐링과정 67℃(insert), 62℃(vector) 1분, 연장(중합)과정 68℃ 2분(insert), 5분(vector), 최종 연장 과정 72℃ 20분으로 하였다.

[0036] Cosmotech Co. Ltd. (Seoul, Korea) 에서 유전자 염기 서열을 밝혔고, 유전자 염기서열 분석 결과는 NCBI BLAST를 사용하여 게놈 데이터베이스 은행 (genomic database bank) 에 등록된 박테리아의 reference species 로 유사성을 비교하였다. 그 결과 SP2의 *cob* 유전자 시퀀스 데이터가 아조토박터 비넬란디(*Azotobacter vinelandii*)의 *cob* 유전자 시퀀스 데이터와 83% 이상의 상동성을 가짐을 확인하였다. 신규 분리균인 SP2와 슈도모나스 디나이트리피칸스 (*Pseudomonas denitrificans*) ATCC13867 균주의 비타민 B₁₂ 합성 유전자인 *cobB*와 *cobQ*의 유전자 서열분석시 상당한 차이를 가지고 있는 것으로 확인된 바 분리균 SP2는 호기성 조건에서 비타민 B₁₂를 합성할 수 있는 신균주로 분류되었다. 상기 결과를 바탕으로 신규 분리균과 기존에 기술된 균주간의 유연 관계를 알아보기 위해 계통분석을 수행한 결과, 도 1에 나타난 바와 같이 신균주 SP2는 슈도모나스 (*Pseudomonas*) 종에 포함되는 독립적인 계통임이 확인되었다.

[0037] **1-4. 슈도모나스 속 SP2의 생화학적 분석**

[0038] SP2 균주에 대한 생화학적 분석은 API 20E 마이크로 테스트 키트(Himedia, Mumbai, India)를 사용하여 수행되었다. 결과를 표 2에 나타내었다.

[0039] 표 2를 참조하면, SP2 균주는 만니톨(mannitol), 자일로오스(xylose), 만노오스(mannose), 셀로비오스(cellobiose), 람노오스(rahmnose), 자일리토(xylito), 아라비노스(arabinose), 이노시톨(inositol), 소르비톨(sorbitol) 등과 같은 배지에서는 성장하지 못하지만 글리세롤(glycerol), 글루코오스(glucose), 프룩토오스(fructose), 말토오스(maltose), 락토오스(lactose), 수크로오스(sucrose), 갈락토오스(galactose)에서는 자랄

수 있는 것으로 확인되었다. 또한 아질산염을 감소하는 능력을 가진 반면 수소황화물을 생산하는 능력은 없는 것으로 확인되었다.

표 2

[0040]

Test	SP2	Test	SP2
Lactose	+	α-Methyl-D-Glucoside	-
Xylose	-	Rhamnose	-
Maltose	+	Cellobiose	-
Fructose	+	Melezitose	-
Dextrose	+	α-Methyl-D-Mannoside	-
Galactose	+	Xylitol	-
Raffinose	-	ONPG	-
Trehalose	-	Esculin hydrolysis	-
Melibiose	-	D-Arabinose	-
Sucrose	+	Citrate utilization	+
L-Arabinose	-	Malonate utilization	-
Mannose	-	Sorbose	-
Inulin	-	Indol	-
Sodium Gluconate	-	Methyl red	-
Glycerol	+	Voges Proskauer' s	-
Salicin	-	Citrate utilization	+
Dulcitol	-	Lysine utilization	-
Inositol	-	Ornithine	-
Sorbitol	-	Urease	-
Mannitol	-	Phenylalanine Deaminase	-
Adonitol	-	Nitrate reduction	+
Arabitol	-	H ₂ S Production	-
Erytritol	-		

[0041]

+ : Positive (90% 이상), - : Negative (90% 이상)

[0042]

상기 결과에서 본 발명의 신균주 SP2가 글리세롤을 탄소원으로 이용할 수 있다는 점을 바탕으로, SP2 균주가 글리세롤로부터 3-HP를 합성하는 유용한 균주로 개발될 수 있음을 알 수 있었다.

[0043]

<실시예 2> SP2 균주를 이용한 플라스크 실험

[0044]

본 발명의 신균주 SP2에 대해 호기 및 미호기 조건에서 세포의 성장과 대사산물의 양을 조사하였다. 상기 SP2 균주는 LB배지를 포함하는 250mL 삼각플라스크를 사용하여 진탕배양기에서 온도 37℃, 교반속도 200rpm으로 배양되었다. 호기 조건과 미호기 조건을 위해서 LB배지의 양을 각각 50mL, 150mL로 달리하여 플라스크 상부공극에 존재하는 산소의 양을 조절하는 방법을 사용하였다. 샘플은 주기적으로 채취하여 OD와 대사물질들을 분석하였으며, 최대 비성장 속도(μ_{max})는 2시간에서 4시간 사이에 OD₆₀₀으로 측정되었다. 성장 곡선 그래프를 도 2에 나타내었다(Symbol: ● - SP2 호기성, ○ - SP2 미호기성).

[0045]

2-1. 호기성 배양

[0046]

SP2 균주를 호기 조건에서 배양하였을 때 최대 비성장 속도(μ_{max})는 $0.91 \pm 0.5h^{-1}$ 였으며, 8시간 후에 OD₆₀₀는 3.23로 나타났다. 주요 대사산물로는 포르메이트와 거의 비슷한 양의 피루베이트가 생성되었다. 이 결과는 SP2가 균주개발을 통해 다양한 분야의 상업적 균주로 사용될 수 있음을 나타낸다.

[0047]

2-2. SP2와 미호기성 배양

[0048]

SP2를 미호기 조건에서 배양하였을 때 8시간째에 각각 0.56의 OD₆₀₀값을 나타내었다. 8시간까지 낮은 성장률을 보이며 더 이상 성장하지 못하는 것으로 관찰되었으며, 대사산물 또한 생산되지 않았다. 이 결과는 SP2균주가 활발한 성장을 위해 산소를 요구하는 호기성 균주임을 말해주며, 또한 미호기 조건에서는 비타민 B₁₂를 거의 생

산하지 못하는 균주임을 의미한다.

[0049] <실시예 3> SP2 균주의 형태학적 관찰

[0050] SP2 균주의 형태학적 관찰을 위하여 주사전자현미경(SEM)을 사용하였다. 균주는 LB배지에서 호기 상태로 배양하였으며, 세포 펠렛은 4℃에서 10분간 원심분리하여 수집하였다. 상기 회수한 세포 펠렛은, 0.1M 나트륨카코딜산염(pH7.2)에 글루타르알데히드(2.5%), 파라포름알데히드(2.0%)을 포함시킨 고정액을 이용하여 채부유시킨 다음, 폴리-L-라이신으로 코팅된 슬라이드 위에 부착시켰다. 2차 고정은 0.1M 나트륨 카코딜산염(pH7.2)에 페리시안화칼륨(1.5%), 사산화 오스뮴(1.0%)가 포함된 용액을 사용하여 고정시켰다. 1차 고정 및 2차 고정 과정은 4℃에서 3시간 동안 수행되었다. 2차 고정을 마친 시료는 에탄올의 함량을 50, 60, 70, 80, 90, 95%로 달리하여 건조시킨 후, 헥사메틸 디실라잔을 이용하여 2회 재건조시켰다. 마지막으로 건조된 세포는 150초 동안 30mM에서 금으로 스퍼터링 코팅되었고, 코팅을 마친 세포는 주사전자현미경(Quantana™ 250FEG, FEI Company, Hillsboro, OR)을 이용하여 12kV에서 미세구조가 관찰되었다. 그 결과 사진을 도 3에 나타내었다. 도 3을 참조하면, 본 발명의 SP2 균주는 타원형이고 세포 표면이 약간 거칠고 길게 늘어진 모양을 하고 있는 것을 알 수 있었다.

[0051] <실시예 4> 항생제에 대한 감수성 평가

[0052] 항생제 테스트는 머레이에 의해 제안된 디스크 확산법을 사용하여 수행되었다. 균주는 그람 네거티브 미생물들을 위해 디자인된 Mueller-Hinton 한천 배지(Difco)와 HiMedia Icosa-G-I-Minus를 사용하여 37℃에서 하룻밤 동안 배양되었으며, 각 항생물질에 대한 억제영역은 NCCLS에서 정한 기준에 따라 sensitive, intermediate, resistant로 구분하여 판정하였고, 결과를 이하의 표 3에 나타내었다.

표 3

[0053]

항생제 그룹	항생제 (µg)	억제 영역 직경 (mm)	
		SP2	분류
Aminoglycoside	Amikacin (30)	20	S
	Gentamicin (10)	22	S
	Kanamycin (30)	28	S
	Streptomycin (30)	20	R
	Tobramycin (10)	26	S
Carboxypenicillin	Carbenicillin (50)	0	R
	Ampicillin (50)	0	R
	Augmentin (30)	25	NA
β-lactamase inhibitors	Imipenem (10)	27	S
	Ticarcillin (75)	27	S
	Ciprofloxacin (5)	35	S
	Gatifloxacin (5)	28	S
	Levofloxacin (5)	31	S
Fluoroquinolone	Moxifloxacin (5)	26	NA
	Nalidixic acid (30)	18	I
	Norfloxacin (10)	29	S
	Ofloxacin (5)	30	S
	Sparfloxacin (5)	26	I
Cephalosporin	Cefpodoxime (10)	0	R
	Cetriaxone (30)	32	S
Lipopeptides	Colistin (10)	7	R
Sulphonamide	Co-Trimoxazole (25)	21	NA

[0054] S: Sensitive, I: Intermediate, R: Resistant

[0055] 상기 제시된 방법으로 SP2의 항생제에 대한 감수성을 평가한 결과 스트렙토마이신(streptomycin), 이미페넴(imipenem), 세프포독심(cefepodoxime)을 제외한 대부분의 아미노글리코사이드(aminoglycoside) 항생제에 저항

성을 가지고 있는 것으로 확인되었다. 슈도모나스 균주 중 몇몇 균주는 엑소폴리사카라이드 알지네이트(exopolysaccharide alginate)를 분비하거나 세포밖으로 알지네이트 글리코칼릭스(alginate glycoalyx)를 형성함으로써 병원성을 나타내는 것으로 보고되어 왔다. 상기 두 분비물은 아미노글리코사이드 항생제에 대항하는 이온 장애물질로써 스트렙토마이신, 이미페넴, 세프트독심을 제외한 나머지 아미노글리코사이드 항생제의 침투를 방해하는 것으로 알려져 있다. 따라서 위 결과는 SP2 균주는 어느 정도의 병원성을 가지고 있음을 말해준다. 또한 콜리스틴(Colistin)에 대해 SP2는 저항성을 가지고 있었고, 날리딕스산(Nalidixic acid), 플루오로퀴놀론(Fluoroquinolone)에 대해서는 중간정도의 감수성을 가지고 있는 것으로 확인되었다.

[0056] <실시예 5> 지방산 분석

[0057] 지방산 분석을 위해 SP2 균주는 MIDI 시스템 프로토콜에 따라 TSB(Tryptic Soy Broth) 배지에 접종된 후, 37℃, 200rpm에서 24시간동안 배양되었다. 다음 배양된 세포의 세포벽에 존재하는 지질을 검화(saponification)하기 위해 NaOH-메탄올로 30분동안 100℃에서 열을 가하였으며, 그 후 추출된 지질은 HCl-메탄올로 80℃에서 10동안 열을 가하여 에스테르화하였다. 상기와 같이 처리된 지방산은 가스크로마토그래피로 그 성분이 분석되었다. 성분 분석 결과를 이하의 표 4에 나타내었다.

표 4

[0058]

	SP2
총 지질 (% lipids)	50%
지방산 조성 (% 총 지질중량)	
C10:0 30H	2.23
C12:0	3.53
C12:0 20H	5.33
C12:0 30H	4.05
C14:0	3.44
C16:1 ω7c/15 iso 20H	9.03
C16:0	39.18
C17:0 cyclo	8.70
C18:1 ω7c/ω9t/ω12t	23.01
19:0 cyclo ω8c	1.49

[0059] 상기 표 4를 참조하면, SP2 균주에 포함된 지질량은 각각 50%이었으며, 10종류의 지방산을 함유하고 있는 것을 확인할 수 있었다.

[0060] <실시예 6> 비타민 B₁₂의 추출

[0061] 비타민 B₁₂는 Zhang *et al.*에 의해 서술된 방법을 사용하여 추출되었다. SP2 세포는 LB배지에서 호기조건으로 하룻밤 동안 배양되었고, 세포 펠렛은 원심분리에 의해 획득하였다. 획득한 세포펠렛은 100mM MES 용액 (pH 6.0)에 0.1% KCN 20mL을 넣어 재부유시키고 121℃에서 10분간 멸균한 뒤 상온에서 식혔다. 다음 상기 샘플에 존재하는 고체를 제거하기 위해 10분 동안 25℃에서 10,000rpm으로 원심분리시켰으며, 분리된 상등액에 Na₂SO₄ 1g을 넣고 잘 혼합한 뒤 다시 원심분리 시켰다. 다음은 비타민 B₁₂를 추출하기위한 본격적인 단계로 원심분리 후 형성된 상등액 10mL을 50mL 튜브에 모으고 1g Na₂SO₄와 10mL 벤질알코올을 상등액에 넣었다. 이와 같은 과정을 5mL 벤질알코올로 두 번 더 반복한 뒤, 벤질알코올과 반응된 추출물을 모두 모아 10mL 클로로폼과 2.0mL 물로 완전히 혼합하였다. 이 용액은 10,000rpm, 25℃에서 10분간 원심분리 되었으며, 수용액상의 비타민 B₁₂의 흡광도는 물을 기준으로 하여 582nm에서 측정되었다. 또한 시중에 판매되고 있는 비타민 B₁₂(Sigma-Aldrich, MO, USA)를 멸균된 물과 함께 1.0에서 100uM 농도범위로 용해시킨 다음 표준 곡선을 작성하고 이에 기초하여 비타민 B₁₂의 농도를 계산하였다.

[0062] 그 결과 SP2균주는 11.1±0.5 μg/mL의 비타민 B₁₂를 생산하는 것으로 관찰되었다. 이는 지금까지 보고된 다른 슈

도모나스 종들의 비타민 B₁₂의 생산량과 비교될 만한 수준으로 비타민 B₁₂생산에 있어 SP2 균주가 유용한 균주가 될 수 있음을 보여준다.

[0063] <실시예 7> SP2가 생산하는 비타민 B₁₂의 조효소로서의 성능분석

[0064] 실시예 6에서 추출된 비타민 B₁₂의 조효소로서의 기능은 비타민 B₁₂ 요구성 효소인 DhaB의 활성측정을 통해 평가되었다. DhaB 활성은 Raj *et al.*에서 기술된 방법으로 실시되었다. DhaB를 과발현한 크렙시엘라 뉴모니에 (*Klebsiella pneumoniae*) 재조합 균주로부터 획득한 적당한 양의 세포 추출물을 35mM의 인산화 칼륨 용액 (pH8.0)과 50mM의 염화칼륨이 포함된 용액에 넣고 37°C에서 5분동안 미리 배양 한 다음, 50mM 글리세롤과 15 μM 비타민 B₁₂를 전배양 된 용액에 넣고 1분간 반응을 진행하였다. 마지막으로 총 반응 부피와 같은 양(0.5mL)의 100mM 구연산을 더한 뒤 1분 후 반응을 종료하였다. DhaB 활성의 단위는 분당 글리세롤에서 1 μM의 3-HPA를 생산하는데 필요한 효소의 양으로 정의하였다.

[0065] 상기에서 방법으로 추출한 비타민 B₁₂을 사용하여 DhaB 효소 활성을 측정한 결과 0.040 U/mg의 효소 활성을 나타 내었다. Sigma-Aldrich 사에 구입한 비타민 B₁₂을 사용하였을 때도 SP2 균주에서 추출한 비타민 B₁₂와 동일한 활 성을 보여주었다. 이것은 새로 분리된 SP2 균주에서 생성되는 비타민 B₁₂가 DhaB의 조효소로서의 역할을 제대로 수행한다는 것을 의미한다. 따라서 상기 결과는 SP2가 비타민 B₁₂ 요구성 DhaB를 이용하여 글리세롤로부터 3-HP와 같은 플랫폼 화학물질들의 생산을 위한 호스트 균주로 개발될 수 있음을 시사한다.

[0066] <실시예 8> DhaB 및 GdrAB 효소가 클로닝된 유전자 재조합 SP2를 이용한 3-HP의 생산

[0067] 신규 분리균 SP2의 3-HP 생산 가능성을 평가하기 위해 글리세롤 디하이드라테이즈 및 글리세롤 디하이드라테이즈 재활성화 효소를 코딩하는 각각의 유전자가 클로닝된 유전자 재조합 SP2를 제작하였다. 또한 이 재조합 균주 를 이용하여 플라스크 규모에서 3-HP 생산을 조사하였다.

[0068] **8-1. *dhaB*와 *gdrAB*를 과발현한 유전자 재조합 SP2 균주의 제작**

[0069] pUCP19 벡터로부터 *bla* 프로모터 유전자를 증폭하기 위해 정방향 프라이머 (서열번호 1: G GCG AAG CTT CTA AAT ACA TTC AAA TAT) 역방향 프라이머 (서열번호 2: GAC GAG CTC TCT AGA GGT ACC ACT CTT CCT TTT TCA ATA) 를 사용하여 PCR를 수행하였으며, 증폭된 PCR단편은 제한효소 *HindIII* 와 *Sac I*으로 절단하였다.

[0070] 글리세롤 디하이드라타제 (DhaB) 유전자는 클렙시엘라 뉴모니에(*Klebsiella pneumoniae*) DSM2026 균주의 게놈 DNA로부터 정방향 프라이머(서열번호 3: AGT GGT ACC ATG AAA AGA TCA AAA CGA TTT GC)와 역방향 프라이머(서 열번호 4: AT CTT AAG CCT GAT TAA TTC GCC TGA CCG GCC AGT)를 사용하여 PCR을 수행하였다. 증폭된 PCR 단편 *dhaB1*, *dhaB2*, *dhaB3* 및 *dhaB4* (*gdrA*)들은 제한효소 *Kpn I* 과 *Afl II*로 절단하였다. *dhaB* 유전자를 증폭하기 위 한 내부 프라이머로는 *kp_dhaB_Int_FP1*(서열번호 5: CTG GCG CTG TTG GTC GGT TCG), *kp_dhaB_Int_FP2*(서열번호 6: TTT CTC CGG CTA CAG CGC GGT), *kp_dhaB_Int_FP3*(서열번호 7: TAG CTT CTG CCG ATG AAC GCG), *kp_dhaB_Int_FP4*(서열번호 8: CGC ATT CTG GCT ATC TAT AAC), *kp_dhaB_Int_FP5*(서열번호 9: CTC TCG CAT CTA TCT TAA CG), *kp_dhaB_Int_FP6*(서열번호 10: TGG ATA CGT TTA TTC CGC GCA), 및 *kp_dhaB_Int_FP7*(서열번호 11: CGA TAA AAA A AT ACC CGC TGG) 등이 사용되었다.

[0071] *gdrB* 유전자의 증폭 또한 클렙시엘라 뉴모니에 DSM2026으로부터 정방향 프라이머(서열번호 12: GTG CAG CTT AAG AAA ATG TCG CTT TCA CCG CCA GGC GTA)와 역방향 프라이머(서열번호 13: A TTA GAG CTC TCA GTT TCT CTC ACT TAA CGG)를 사용하여 PCR을 수행하였다. 증폭된 PCR 단편은 제한효소 *Afl II*와 *Sac I*으로 절단하였다.

[0072] 상기 증폭한 *bla* 프로모터와 *dhaB* (*dhaB1*, *dhaB2*, *dhaB3* 및 *dhaB4* (*gdrA*)) 및 *gdrB*의 PCR 단편을 발현벡터인 pUC19 벡터에 클로닝하여 재조합 플라스미드 pPBG1을 얻었다. 제작된 플라스미드는 전기천공법을 수행하여 신규 분리균 SP2에 도입되었으며, pPBG1이 도입된 SP2 재조합 균주는 슈도모나스 SP2/pPBG1으로 명명하였다.

[0073] **8-2. 슈도모나스 SP2/pPBG1 재조합 균주를 이용한 3-HP생산**

[0074] 상기 재조합 균주 슈도모나스 SP2/pPBG1을 yeast extract 2g/L를 포함한 M9 액체배지 (pH 7.0)에 37°C에서 12 시간 예비배양한 뒤, 충분히 자란 배양액을 글루코스 20mM과 yeast extract 2g/L가 첨가된 M9 액체배지(pH 7.

0)에 0.1 OD₆₀₀가 되도록 넣고 본 배양을 하였다. 이 때 배양액의 pH를 유지시키기 위하여 100mM의 인산화 칼륨 완충 용액(pH7.0)이 사용되었다. 또한 세포는 50mL의 M9 배지를 포함하는 250mL 삼각플라스크를 사용하여 온도가 37°C로 유지된 진탕배양기에서 배양되었으며, 호기조건이 되도록 교반속도는 200rpm으로 하였다. 이 후 OD₆₀₀가 1.0에 이르렀을 때 글루코즈 6.5mM, 글리세롤 50mM을 첨가하였다. 결과 그래프를 도 4에 나타내었다(Symbol: ▲ - Glycerol, △ - Glucose, ● - 3-HP, ○ - 세포성장).

[0075] 도 4를 참조하면, 비타민 B₁₂의 첨가없이 29시간 동안 최대 16.24 mmol/L의 3-HP를 생산할 수 있는 것으로 관찰되었다. 이 때 미생물의 농도는 1.3mg/1였으며, 사용된 글리세롤 대비 생산된 3-HP의 비는 약 0.32(수율 32%)였다. 반면, 동일한 방법으로 슈도모나스 SP2 wild type (WT)를 배양하였을 때는 3-HP의 생산이 전혀 관찰되지 않았다.

[0076] 따라서 신규 분리균 SP2를 이용한 유전자 재조합 균주 슈도모나스 SP2/pPBG1이 보여준 3-HP 생산능력은 플라스미드로 도입된 글리세롤 디하이드라테이즈와 글리세롤 디하이드라테이즈 재활성화 효소 작용에 의한 것임을 알 수 있었다.

[0077] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

수탁번호

[0078]

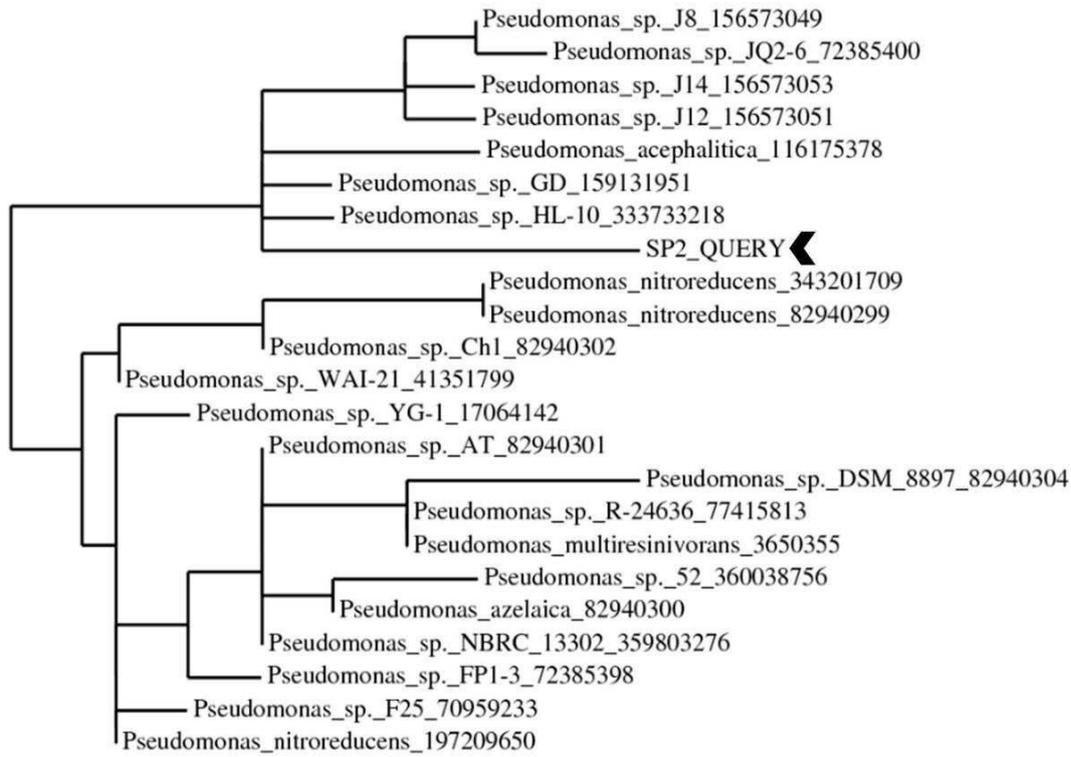
기탁기관명 : 국립농업과학원

수탁번호 : KACC91720

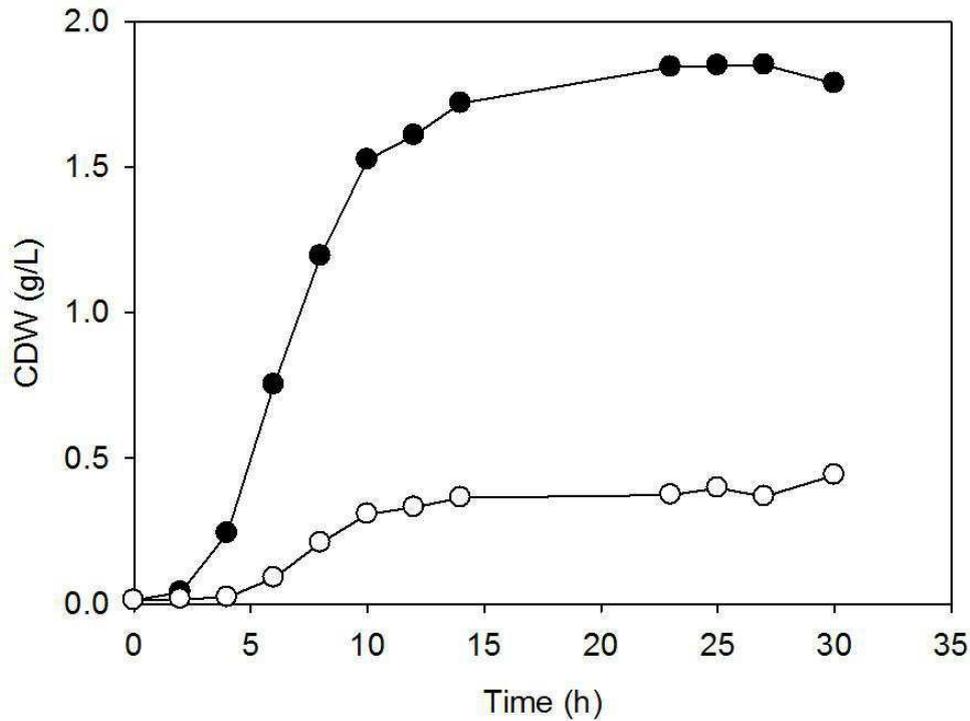
수탁일자 : 20120716

도면

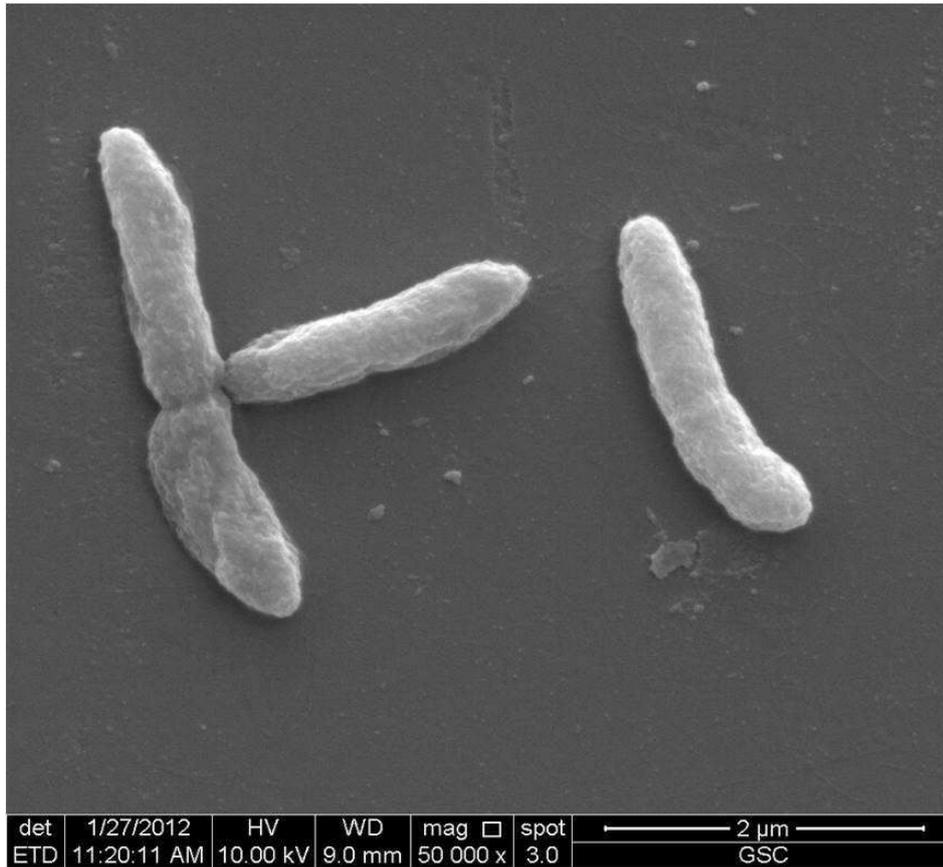
도면1



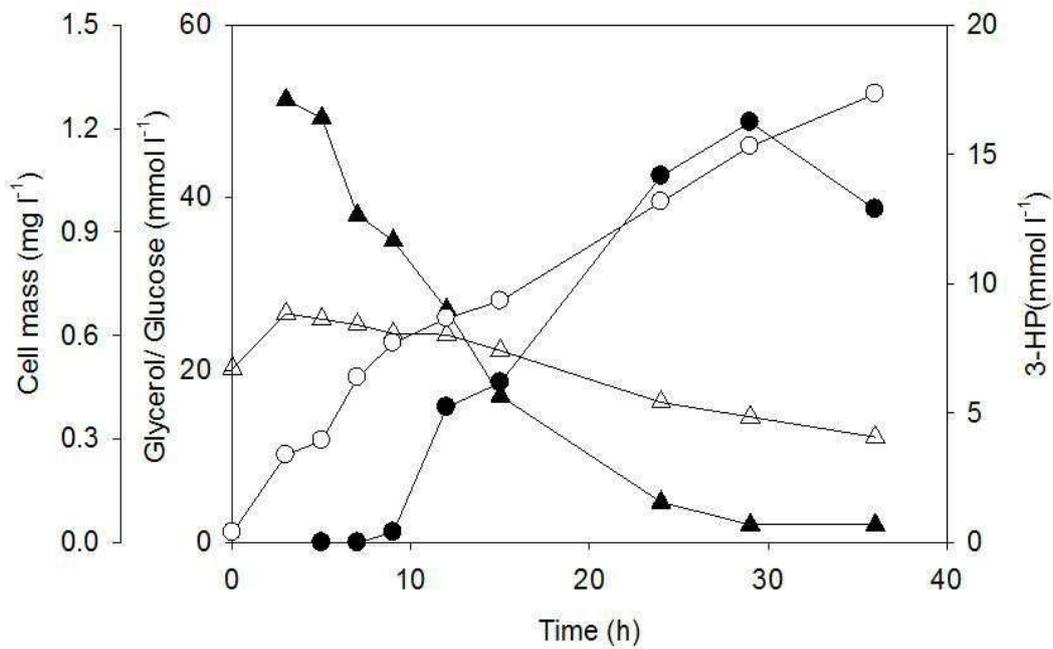
도면2



도면3



도면4



서열목록

<110> Institute for research and industry cooperation, PNU
 <120> Novel Pseudomonas SP2 and Preparation Method of 3-Hydroxypropionic acid Therewith
 <130> DP-2012-0598
 <160> 13
 <170> KopatentIn 1.71
 <210> 1
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Forward primer for bla promoter gene
 <400> 1
 ggccaagctt ctaaatacat tcaaatat 28
 <210> 2
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse primer for bla promoter gene
 <400> 2
 gacgagctct ctagaggtac cactcttctct ttttcaata 39
 <210> 3
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Forward primer for dhaB gene
 <400> 3
 agtggtagca tgaagagatc aaaacgattt gc 32
 <210> 4
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse primer for dhaB gene
 <400> 4
 atcttaagcc tgattaattc gcctgaccgg ccagt 35

<210> 5
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Internal primer for dhaB gene
 <400> 5
 ctggcgctgt tggtcggttc g 21
 <210> 6
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Internal primer for dhaB gene
 <400> 6
 tttctccggc tacagcgcg t 21
 <210> 7
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Internal primer for dhaB gene
 <400> 7
 tagcttctgc cgatgaacgc g 21
 <210> 8
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Internal primer for dhaB gene
 <400> 8
 cgcattctgg ctatctataa c 21
 <210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Internal primer for dhaB gene
 <400> 9

ctctcgcatac tatcttaacg 20

<210> 10
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Internal primer for dhaB gene
 <400> 10
 tggatacgtt tattccgcgc a 21

<210> 11
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Internal primer for dhaB gene
 <400> 11
 cgataaaaa ataccgctg g 21

<210> 12
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Forward primer for gdrB gene
 <400> 12
 gtcagctta agaaaatgtc gctttcaccg ccaggcgta 39

<210> 13
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse primer for gdrB gene
 <400> 13
 attagagctc tcagtttctc tcaactaacg g 31