

특허증

CERTIFICATE OF PATENT



특허

Patent Number

제 10-1483012 호

출원번호

Application Number

제 10-2013-0007108 호

출원일

Filing Date

2013년 01월 22일

등록일

Registration Date

2015년 01월 09일

발명의 명칭 Title of the Invention

제조합 대장균을 이용하여 3-히드록시프로피온산을 고수율로 생산하는 방법

특허권자 Patentee

등록사항란에 기재

발명자 Inventor

등록사항란에 기재

위의 발명은 「특허법」에 따라 특허등록원부에 등록되었음을 증명합니다.

This is to certify that, in accordance with the Patent Act, a patent for the invention has been registered at the Korean Intellectual Property Office.



2015년 01월 09일

특허청장

COMMISSIONER,

KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

김영민

등 록 사 항

특 허

Patent Number

등록 제 10-1483012 호

특허권자 Patentees

서울대학교산학협력단(114371-0***)**

서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)

국민대학교산학협력단(114471-0***)**

서울특별시 성북구 정릉로 77 (정릉동, 국민대학교)

발명자 Inventors

서진호(531224-1***)**

서울특별시 관악구 관악로 1 서울대학교 식품생명공학과

박용철(700119-1***)**

서울특별시 성북구 정릉로 77 국민대학교 발효융합과

김광욱(820206-1***)**

경기도 용인시 기흥구 삼성2로 삼성석유화학 중앙연구소 바이오 2팀

이종원(860111-1***)**

부산광역시 부산진구 가야공원로 41 가야반도보라아파트 105동 905호

정인영(890315-1***)**

경기도 안양시 동안구 학의로 20 관악동성아파트 115동 1503호



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년01월19일

(11) 등록번호 10-1483012

(24) 등록일자 2015년01월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/52 (2006.01) *C12N 15/70* (2006.01)

C12P 7/52 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0007108

(22) 출원일자 2013년01월22일

심사청구일자 2013년01월22일

(65) 공개번호 10-2014-0094364

(43) 공개일자 2014년07월30일

(56) 선행기술조사문헌

US20110144377 A1*

KR101048485 B1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

서울대학교산학협력단

서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)

국민대학교산학협력단

서울특별시 성북구 정릉로 77 (정릉동, 국민대학교)

(72) 발명자

서진호

서울특별시 관악구 관악로 1 서울대학교 식품생명
공학과

박용철

서울특별시 성북구 정릉로 77 국민대학교 발효음
합과

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 태동

전체 청구항 수 : 총 5 항

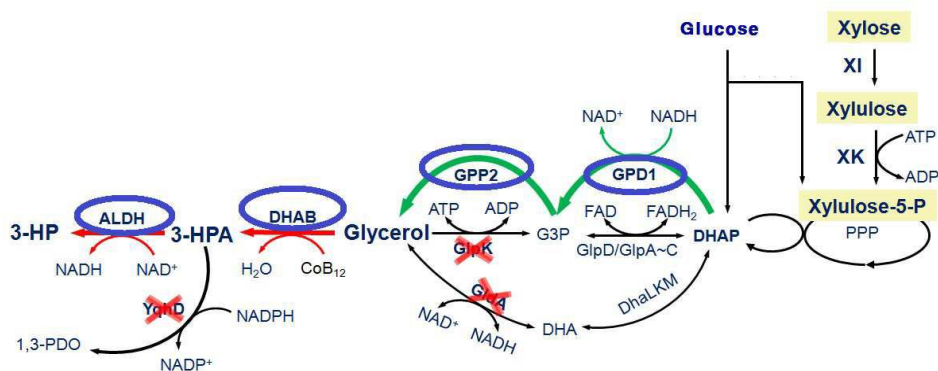
심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 **재조합 대장균을 이용하여 3-히드록시프로피온산을 고수율로 생산하는 방법**

(57) 요약

본 발명은 3-HP 생합성에 관여하는 관련 효소를 실험 또는 과발현시킨 재조합 대장균을 호스트로 이용하고, 글리세롤, 자일로스 또는 포도당을 기질로 사용하여 3-히드록시프로피온산을 고수율로 생산하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

김광욱

경기도 용인시 기흥구 삼성2로 삼성석유화학 중앙
연구소 바이오 2팀

이종원

부산광역시 부산진구 가야공원로 41 가야반도보라
아파트 105동 905호

정인영

경기도 안양시 동안구 학의로 20 관악동성아파트
115동 1503호

특허청구의 범위

청구항 1

삭제

청구항 2

글리세롤을 3-히드록시프로피온산(3-hydroxypropionic acid)의 전구체가 되는 3-히드록시프로피온알데히드(3-hydroxypropionaldehyde; 3-HPA)로 전환시키는 글리세롤 데히드라타제(glycerol dehydratase; DHAB)가 발현되도록 형질전환되고;

3-히드록시프로피온알데히드를 3-히드록시프로피온산으로 전환시키는 알데하이드 데하이드로지나아제(aldehyde dehydrogenase)가 발현되도록 형질전환되며;

글리세롤 키나아제(glycerol kinase)가 활성을 나타내지 못하도록 또는 글리세롤 키나아제(glycerol kinase)와 글리세롤 데하이드로지나아제(glycerol dehydrogenase) 모두가 활성을 나타내지 못하도록, 이들을 각각 암호화하는 유전자가 그 기능이 소실되도록 유전자 일부가 파쇄되거나, 유전자 전부가 제거되도록 형질전환되고;

디하이드록시아세톤 포스페이트(dihydroxyacetone phosphate)를 글리세롤로 전환하는 글리세롤-3-포스파타아제(glycerol-3-phosphatase)와 글리세롤-3-포스페이트 데하이드로지나아제(glycerol-3-phosphate dehydrogenase)가 발현되도록 형질전환된;

재조합 대장균을 자일로스가 첨가된 배지에서 배양하는 것을 특징으로 하는 3-히드록시프로피온산의 생산 방법.

청구항 3

삭제

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 재조합 대장균은,

3-HPA를 3-HP로 전환시키는 역할을 하는 자체 보유의 알데하이드 데하이드로지나아제(aldehyde dehydrogenase) 암호화 유전자가 제거되고, 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 유래의 알데하이드 데하이드로지나아제 유전자가 도입된 것을 특징으로 하는 3-히드록시프로피온산의 생산 방법.

청구항 5

제2항에 있어서,

상기 대장균은,

1,3-프로판다이올 데하이드로지나아제(1,3-propanediol dehydrogenase, *yqhD*)가 활성을 나타내지 못하도록 이를 암호화하는 유전자가 그 기능이 소실되도록 유전자 일부가 파쇄되거나, 유전자 전부가 제거되도록 추가로 형질전환된 것을 특징으로 하는 3-히드록시프로피온산의 생산 방법.

청구항 6

제2항에 있어서,

상기 배지는,

보효소 B₁₂가 첨가된 것을 특징으로 하는 3-히드록시프로피온산의 생산 방법.

청구항 7

제2항에 있어서,

상기 대장균은,

글리세롤 데히드라타제 리액티바제(glycerol dehydratase reactivase)가 발현되도록 추가적으로 형질전환된 것을 특징으로 하는 3-히드록시프로피온산의 생산 방법.

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 재조합 대장균을 이용하여 3-히드록시프로피온산을 고수율로 생산하는 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 3-HP 생합성에 관여하는 관련 효소를 실험 또는 과발현시킨 재조합 대장균을 호스트로 이용하고, 글리세롤, 자일로스 또는 포도당을 기질로 사용하여 3-히드록시프로피온산을 고수율로 생산하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

3-히드록시프로피온산(3-hydroxypropionic acid, 3-HP) 또는 그 염은 고분자 코팅제의 가교 결합제, 금속 윤활제 및 직물에 대한 정전기 방지제로 주로 사용하고 있고, 유기합성에서 중요한 빌딩 블록(building block)으로 쓰일 수 있다. 3-HP를 전구체로 하여 합성되는 핵심 화합물로는 1,3-프로판디올, 아크릴릭 에시스(acrylic acid), 메틸 아크릴레이트(methyl acrylate), 아크릴아미드(acrylamide), 에틸 3-HP, 말로닉 에시스(malonic acid), 프로피로락톤(propiolactone) 및 아크릴로니트릴(acrylonitrile) 등이 있다.

[0003]

3-HP는 상기와 같이 다양한 물질의 합성을 위한 전구체로 활용되고 있고, 다양한 응용분야를 갖는데, 세계 시장의 규모가 연간 3.63 백만 톤 정도이다. 3-HP는 현재 US DOE 리스트에 올라 있는 재생 바이오 매스 생산물 관련 12가지 플랫폼 화합물 중 세 번째 위치를 차지할 정도로 중요하다.

[0004]

그런데, 상기와 같은 중요하고 유용한 역할을 하는 3-HP의 생합성 경로에 대해서는 연구가 많이 되어 있지 않고, 그나마 연구된 것들 중 대부분의 것들은 글리세롤을 기질로 하여 3-HP를 합성한 것들이다. 하지만, 글리세롤 외에 포도당이나 자일로스로부터 3-HP를 생합성하는 기술에 대한 연구는 거의 이루어지지 않고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005]

(특허문헌 0001) 본 발명자들이 등록받은 대한민국 등록특허 10-1048151호(등록일자 2011년 07월 04일)에는, "글리세롤을 3-히드록시프로피온산(3-hydroxypropionic acid)의 전구체가 되는 3-히드록시프로피온알데히드(3-hydroxypropionaldehyde; 3-HPA)로 전환시키기 위하여, 락토바실러스 브레비스(Lactobacillus brevis) 유래의 글리세롤 데히드라타제를 구성하는 서브 유닛 DHAB1, DHAB2 및 DHAB3 중 DHAB1 및 DHAB2를 각각 암호화하는 오픈리딩프레임의 개시코돈 TTG 및 GTG가 ATG로 각각 변이된 락토바실러스 브레비스 유래의 글리세롤 데히드라타제(glycerol dehydratase; DHAB) 및, 락토바실러스 브레비스 유래의 글리세롤 데히드라타제 리액티바제(glycerol dehydratase reactivase)가 발현되게 형질전환되고; 3-히드록시프로피온알데히드를 3-히드록시프로피온산으로 전환시키는 효소가 발현되도록 형질전환된; 재조합 대장균을 글리세롤이 첨가되고, 포도당이 배양 중 고갈되지 않도록 충분히 존재하는 배지에서 배양하는 것을 특징으로 하는 글리세롤로부터 3-히드록시프로피온산을 생산하는 방법"이 기재되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006]

본 발명에서는 글리세롤, 자일로스 또는 포도당을 기질로 사용하여 고수율로 3-HP를 생산할 수 있는 방법을 개발하여 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0007]

본 발명은 제1형태로, 글리세롤을 3-히드록시프로피온산(3-hydroxypropionic acid)의 전구체가 되는 3-히드록시프로피온알데히드(3-hydroxypropionaldehyde; 3-HPA)로 전환시키는 글리세롤 데히드라타제(glycerol dehydratase; DHAB)가 발현되도록 형질전환되고; 3-히드록시프로피온알데히드를 3-히드록시프로피온산으로 전환시키는 알데하이드 데하이드로지나아제(aldehyde dehydrogenase)가 발현되도록 형질전환되며; 글리세롤 키나아제(glycerol kinase)와 글리세롤 데하이드로지나아제(glycerol dehydrogenase) 중 어느 하나 또는 이 둘 모두가 활성을 나타내지 못하도록 이들을 각각 암호화하는 유전자가 그 기능이 소실되도록 유전자 일부가 파쇄되거나, 유전자 전부가 제거되도록 형질전환된; 재조합 대장균을 글리세롤이 첨가된 배지에서 배양하는 것을 특징으로 하는 3-히드록시프로피온산의 생산 방법을 제공한다.

[0008]

본 발명은 제2형태로, 글리세롤을 3-히드록시프로피온산(3-hydroxypropionic acid)의 전구체가 되는 3-히드록시프로피온알데히드(3-hydroxypropionaldehyde; 3-HPA)로 전환시키는 글리세롤 데히드라타제(glycerol dehydratase; DHAB)가 발현되도록 형질전환되고; 3-히드록시프로피온알데히드를 3-히드록시프로피온산으로 전환시키는 알데하이드 데하이드로지나아제(aldehyde dehydrogenase)가 발현되도록 형질전환되며; 글리세롤 키나아제(glycerol kinase)와 글리세롤 데하이드로지나아제(glycerol dehydrogenase) 중 어느 하나 또는 이 둘 모두가 활성을 나타내지 못하도록 이들을 각각 암호화하는 유전자가 그 기능이 소실되도록 유전자 일부가 파쇄되거나, 유전자 전부가 제거되도록 형질전환되고; 디하이드록시아세톤 포스페이트(dihydroxyacetone phosphate)를 글리세롤로 전환하는 글리세롤-3-포스파타아제(glycerol-3-phosphatase)와 글리세롤-3-포스페이트 데하이드로지나아제(glycerol-3-phosphate dehydrogenase)가 발현되도록 형질전환된; 재조합 대장균을 자일로스가 첨가된 배지에서 배양하는 것을 특징으로 하는 3-히드록시프로피온산의 생산 방법을 제공한다.

[0009]

본 발명은 제3형태로, 글리세롤을 3-히드록시프로피온산(3-hydroxypropionic acid)의 전구체가 되는 3-히드록시프로피온알데히드(3-hydroxypropionaldehyde; 3-HPA)로 전환시키는 글리세롤 데히드라타제(glycerol dehydratase; DHAB)가 발현되도록 형질전환되고; 3-히드록시프로피온알데히드를 3-히드록시프로피온산으로 전환시키는 알데하이드 데하이드로지나아제(aldehyde dehydrogenase)가 발현되도록 형질전환되며; 글리세롤 키나아제(glycerol kinase)와 글리세롤 데하이드로지나아제(glycerol dehydrogenase) 중 어느 하나 또는 이 둘 모두가 활성을 나타내지 못하도록 이들을 각각 암호화하는 유전자가 그 기능이 소실되도록 유전자 일부가 파쇄되거나, 유전자 전부가 제거되도록 형질전환되고; 디하이드록시아세톤 포스페이트(dihydroxyacetone phosphate)를 글리세롤로 전환하는 글리세롤-3-포스파타아제(glycerol-3-phosphatase)와 글리세롤-3-포스페이트 데하이드로지나아제(glycerol-3-phosphate dehydrogenase)가 발현되도록 형질전환된; 재조합 대장균을 글루코스가 첨가된 배지에서 배양하는 것을 특징으로 하는 3-히드록시프로피온산의 생산 방법을 제공한다.

[0010]

한편, 본 발명의 제1형태 또는 제2형태 또는 제3형태에 있어서, 상기 대장균은 바람직하게 1,3-프로판다이올 데하이드로지나아제(1,3-propanediol dehydrogenase, *yqhD*)가 활성을 나타내지 못하도록 이를 암호화하는 유전자가 그 기능이 소실되도록 유전자 일부가 파쇄되거나, 유전자 전부가 제거되도록 추가로 형질전환된 것이 좋다.

[0011]

한편, 본 발명의 제1형태 또는 제2형태 또는 제3형태에 있어서, 상기 재조합 대장균은, 바람직하게 3-HPA를 3-HP로 전환시키는 역할을 하는 자체 보유의 알데하이드 데하이드로지나아제(aldehyde dehydrogenase) 암호화 유전자가 제거되고, 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 유래의 알데하이드 데하이드로지나아제 유전자가 도입된 것이 바람직하다.

[0012]

한편, 본 발명의 제1형태 또는 제2형태 또는 제3형태에 있어서, 상기 배지는 바람직하게 보효소 B₁₂가 첨가된 것이 좋다. 글리세롤 데히드라타제는 글리세롤을 3-히드록시프로피온알데히드로 전환하는 효소로서, 본 발명에서는 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) 유래의 것을 사용한다. 글리세롤 데히드라타제는 B₁₂-

의존성으로서, 반응을 위해 반드시 B₁₂가 필요하기 때문이다.

[0013] 한편, 본 발명의 제1형태 또는 제2형태 또는 제3형태에 있어서, 상기 대장균은, 글리세롤 데히드라타제 리액티바제(glycerol dehydratase reactivase)가 발현되도록 추가적으로 형질전환된 것이 좋은데, 발현된 글리세롤 데히드라타제(glycerol dehydratase; DHAB)의 활성을 지속적으로 유지시켜 줄 수 있기 때문이다.

[0014] 본 발명에서는 글리세롤로부터 고농도의 3-HP를 얻기 위해 글리세롤 대사에 관여하는 글리세롤 키나아제(glycerol kinase, *glpK*), 글리세롤 데하이드로지나아제(glycerol dehydrogenase, *glcA*) 유전자를 람다 레드 리컴비나아제(λ red recombinase) 방법을 이용하여 과쇄하였다. 또한, 3-HP의 전구체인 3-히드록시프로피온알데히드(3-hydroxypropionaldehyde; 3-HPA)에서 생산될 수 있는 또 다른 대사산물인 1,3-PDO(propanediol) 생산을 억제하기 위해 1,3-프로판다이올 데하이드로지나아제(1,3-propanediol dehydrogenase, *yqhD*) 유전자를 같은 방법으로 과쇄하였다. 이를 통해 구축된 여러 균주 중 BL21 star (DE3) $\Delta glpK \Delta yqhD$ /pELDRR/pCEa 균주와 BL21 star (DE3) $\Delta glpK \Delta glcA$ /pELDRR /pCEa 균주는 기존 균주에 비해 3-HP의 수율이 각각 3.6배, 5.2배 증가하였다.

[0015] 한편, 기존 균주의 경우, 3-HPA를 3-HP로 전환시키는 역할을 하는 알데하이드 데하이드로지나아제(aldehyde dehydrogenase) 유전자의 역가가 글리세롤 데하이드라타아제(glycerol dehydratase)의 역가에 비해 현저히 낮아서 독성이 있는 대사체인 3-HPA가 균주 내에 축적되는 문제점이 있었다. 본 발명에서는 기존에 사용하던 대장균(*E. coli*) 유래의 알데하이드 데하이드로지나아제(aldehyde dehydrogenase)보다 역가가 높은 슈도모나스 애루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*)유래의 알데하이드 데하이드로지나아제 유전자를 도입시킴으로써 수율을 1.27배 더 증가시켰다.

[0016] 이후, 자일로스를 기질로 하여 3-HP를 생산하기 위하여 추가적으로 디하이드록시아세톤 포스페이트(dihydroxyacetone phosphate)를 글리세롤로 전환하는 글리세롤-3-포스파타아제(glycerol-3-phosphatase)와 글리세롤-3-포스페이트 데하이드로지나아제(glycerol-3-phosphate dehydrogenase) 유전자를 pCDFduet-1 벡터에 클로닝하여 형질전환 하였다. 이를 통해 구축된 균주 중 BL21 star (DE3) $\Delta glpK \Delta yqhD$ /pELDRR/pCaGPDGPP 균주와 BL21 star (DE3) $\Delta glpK \Delta glcA$ /pELDRR/pCaGPDGPP 균주는 자일로스로부터 3-HP를 각각 13.2 g/L와 22.2 g/L로 생산하였다.

[0017] 한편, 도 1은 3-HP 생산을 위한 본 발명 재조합 대장균 내 대사경로를 보여준다. 도 1에서, "X"가 표시된 유전자는 해당 유전자가 전부 또는 일부 과쇄되어 그 활성이 발휘되지 못함을 의미하고, 파란색 타원으로 표시된 유전자는 해당 유전자가 신규로 발현되거나 또는 과발현된 것이다.

[0018] 한편, 본 발명에서는, 글리세롤을 3-히드록시프로피온산(3-hydroxypropionic acid)의 전구체가 되는 3-히드록시프로피온알데히드(3-hydroxypropionaldehyde; 3-HPA)로 전환시키기 위하여, 글리세롤 데히드라타제(glycerol dehydratase; DHAB)를 발현시키는데, 대장균에는 이 효소가 존재하지 않기 때문에 다른 미생물 유래의 것을 클로닝해서 사용해야 한다. 다양한 미생물 유래 글리세롤 데히드라타제의 클로닝 및 대장균 내 발현은 미국등록특허 US 7067300를 참조하여 당업계의 상식으로부터 수행할 수 있다(Suryang Kwak, Yong-Cheol Park, Jin-Ho Seo : Biosynthesis of 3-hydroxypropionic acid from glycerol in recombinant Escherichia coli expressing Lactobacillus brevis dhaB and dhaR gene clusters and E. coli K-12 aldH, 2012 online published), (Subramanian Mohan Raj, Sunghoon Park : Production of 3-hydroxypropionic acid from glycerol by a novel recombinant Escherichia coli BL21 strain, Process Biochemistry , 2008, 1440-1446). 일 예로는 본 발명자들이 등록받은 대한민국 등록특허 10-1048151호(등록일자 2011년 07월 04일)에서 사용한 바와 같이 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) 유래의 것을 사용할 수 있다. 다만, 다른 미생물 유래의 효소를 대장균에서 발현시킬 경우, 해당 효소의 개시코돈을 대장균에서 개시 가능한 개시코돈(ATG)으로 바꿔줄 필요도 있는데, 이에 관한 지식 및 기술은 유전공학에 관한 당업계의 상식으로부터 자명하게 수득 및 수행할 수 있는 바이므로 구체적인 기재는 생략하기로 한다.

[0019] 한편, 본 발명에서는 디하이드록시아세톤 포스페이트(DHAP, dihydroxyacetone phosphate)로부터 글리세롤을 생산하기 위해 글리세롤-3-포스파타아제(glycerol-3-phosphatase)와 글리세롤-3-포스페이트 데하이드로지나아제(glycerol-3-phosphate dehydrogenase)를 발현시키는데, 대장균에는 이 효소가 존재하지 않기 때문에 다른 미생물 유래의 것을 클로닝해서 발현시켜야 한다(M. Hartlep, A.-P. Zeng : Study of two-stage processes for the microbial production of 1,3-propanediol from glucose, Appl Microbiol Biotechnol, 2002, 60:60-66). 일 예로는 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)의 것을 사용할 수 있다. 유전자의 클로닝 및 대장균 내 발현은 상기에서 설명한 바와 같이 당업계의 상식 및 기술로부터 용이하게 수행

할 수 있으므로, 이에 관한 기재는 생략하기로 한다.

[0020] 한편, 본 발명에서 사용한 형질전환의 방법은 유전공학계에 알려진 공지의 방법을 통해 수행할 수 있으므로, 이에 대한 구체적인 기재도 생략하기로 한다.

발명의 효과

[0021] 상기 본 발명의 제1형태, 제2형태, 제3형태에 의한 경우, 산업적으로 유용한 3-히드록시프로피온산(3-HP)을 글리세롤, 자일로스, 글루코스로부터 각각 고수율로 생산할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 3-HP 생산을 위한 본 발명 재조합 대장균 내 대사경로를 보여준다.

도 2는 람다 레드 리컴비나아제(λ red recombinase) 방법을 이용한 유전자 파쇄 모식도이다.

도 3은 본 발명에서 구축한 벡터 pCPa72의 벡터맵이다.

도 4는 본 발명에서 구축한 벡터 pCaGPDGPP의 벡터맵이다.

도 5는 본 발명에서 구축한 네 가지 균주의 유가식 배양결과(도 5a, 도 5a, 도 5c, 도 5d)이다. 5a: BL21 star (DE3) /pELDRR/pCEa, 5b: BL21 star (DE3) $\Delta glpK$ /pELDRR/pCEa, 5c: BL21 star (DE3) $\Delta glpK \Delta gldA$ /pELDRR/pCEa, 5d: BL21 star (DE3) $\Delta glpK \Delta yqhD$ /pELDRR/pCEa.

도 6은 이 콜라이(*E. coli*) 유래의 알데하이드 탈하이드로지나아제와 슈도모나스 애틀지노사 유래의 알데하이드 탈하이드로지나아제의 비효소역가를 비교한 결과이다.

도 7은 슈도모나스 애틀지노사 유래의 알데하이드 탈하이드로지나아제를 도입한 BL21 star (DE3) $\Delta glpK \Delta yqhD$ /pELDRR/pCPa72 균주의 유가식 배양 결과이다.

도 8은 BL21 star (DE3) $\Delta glpK$ /pCaGPDGPP 균주의 회분식 배양 결과이다.

도 9는 BL21 star (DE3) $\Delta glpK \Delta gldA$ /pELDRR/pCaGPDGPP 균주의 유가식 배양 결과이다.

도 10은 BL21 star (DE3) $\Delta glpK \Delta yqhD$ /pELDRR/pCaGPDGPP 균주의 유가식 배양 결과이다.

도 11은 포도당 배지에서 BL21 star (DE3) $\Delta glpK \Delta yqhD$ /pELDRR/pCa72 균주(도 11a), BL21 star (DE3) $\Delta glpK \Delta gldA$ /pELDRR/pCa72 균주(도 11b), BL21 star (DE3) $\Delta glpK \Delta yqhD$ /pELDRR/pCaGPDGPP 균주(도 11c), BL21 star (DE3) $\Delta glpK \Delta gldA$ /pELDRR/pCaGPDGPP 균주(도 11d)의 회분식 배양결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 이하, 본 발명의 내용을 하기 실시예를 통해 더욱 상세히 설명하고자 한다. 다만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에만 한정되는 것은 아니고, 그와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 포함한다.

[0024] [실시예 1: 재조합 대장균의 제조]

[0025] 1) 글리세롤 키나아제(glycerol kinase), 글리세롤 탈하이드로지나아제(glycerol dehydrogenase), 1,3-프로판다이올 탈하이드로지나아제(1,3-propanediol dehydrogenase) 유전자의 파쇄

[0026] 모균주인 BL21 star(DE3)의 글리세롤 키나아제(glycerol kinase, *glpK*), 글리세롤 탈하이드로지나아제(glycerol dehydrogenase, *gldA*), 1,3-프로판다이올 탈하이드로지나아제(1,3-propanediol dehydrogenase, *yqhD*) 유전자의 파쇄를 위해 람다 레드 리컴비나아제(λ red recombinase) 방법(Kirill A. Datsenko, Barry L. Wanner_and Wanner : One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products, PNAS, 2000, 12:6640-6645)을 사용하였다. 도 2는 람다 레드 리컴비나아제(λ red recombinase) 방법을 이용한 유전자 파쇄 모식도이다.

[0027] 먼저, 카나마이신 저항성 카세트(kanamycin resistance cassettes)를 얻기 위해 하기 표 1에 나열된

프라이머들을 이용하여 pKD13 (Kirill A. Datsenko, Barry L. Wanner and Wanner : One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products, PNAS, 2000, 12:6640-6645)을 주형으로 PCR (polymerase chain reaction)을 수행하였다. 이렇게 얻어진 카나마이신 저항성 카세트를 pKD46 (Kirill A. Datsenko, Barry L. Wanner and Wanner : One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products, PNAS, 2000, 12:6640-6645)이 도입된 대장균 BL21 star (DE3)에 형질전환하여 유전자들(*glpK*, *gldA*, *yqhD*)을 파쇄하였다. 표 1에 나열된 프라이머들을 이용하여 콜로니 PCR을 통해 타겟 유전자가 파쇄된 것으로 확인한 균주에 pCP20(Kirill A. Datsenko, Barry L. Wanner and Wanner : One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products, PNAS, 2000, 12:6640-6645)을 도입하여 카나마이신 저항성 카세트를 제거하였다(도 2).

[표 1]

글리세롤 키나아제, 글리세롤 데하이드로지나아제, 1,3-프로판다이올 데하이드로지나아제 유전자의 파쇄를 위해 사용한 균주, 프라이머, 벡터

Strains and plasmids	Sequences or Characteristics	Reference
Strains		
<i>E. coli</i> BL21 star (DE3)	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdSB</i> (r _B -m _B ⁻), <i>gal</i> , <i>dcm</i> <i>rne131</i> (DE3)	Invitrogen
Primers		
5'-D1 <i>glpK</i>	CCGGATGCGGCATAAACGCTTCATTCGGCATTACAGTGAGGCTGGAGCTGCTTC	
3'-D4 <i>glpK</i>	TGGTGAATTGCTGTTTGGTACGGTTGATACGTGGCTTATCCGGGGATCCGTCGACC	
5'-D1 <i>gldA</i>	TTCAAACCTCCCGACAAGCCGGGAGTTGGAGTAGGTTAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	
3'-D4 <i>gldA</i>	CCGATTTGGCACTACTCATCTCTAAAGGAGCAATTATGATCCGGGGATCCGTCGACC	
5'-D1 <i>yqhD</i>	TTCTCTGCCCTCATATTGGCCAGCAAGGGAGCAAGTAGTGTAGGCTGGAGTGCTTC	
3'-D4 <i>yqhD</i>	CGAAATGCCGAAACGAAAGTTTGAGGGTAAAAAGCATTCCGGGGATCCGTCGACC	
5'-Δ <i>glpK</i> chek	CGGGGTTGCCCGCACG	
3'-Δ <i>glpK</i> chek	AAGGCTCTCGCGAGCGTGC	
5'-Δ <i>gldA</i> chek	AAGCGTAGCGCATCAGGC	
3'-Δ <i>gldA</i> chek	AGAAAGTTCCGAACACGACTGG	
5'-Δ <i>yqhD</i> chek	CGCTGGCGATCACAATGA	
Plasmids		
pKD46	Phage λ red recombinase, Temperature sensitive replicon	
pKD13	Amp ^R , Kan ^R , oriR6K	Datsenko and Wanner 1999
pCP20	Amp ^R , Chi ^R , Yeast Flp recombinase, temperature sensitive replicon	

실험 결과, BL21 star (DE3) Δ*glpK*, BL21 star (DE3) Δ*glpK*Δ*gldA*, BL21 star (DE3) Δ*glpK*Δ*yqhD* 균주가 구축되었다.

2) 슈도모나스 애루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 유래의 알데하이드 데하이드로지나아제(aldehyde dehydrogenase) 유전자 클로닝

슈도모나스 애루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 유래의 알데하이드 데하이드로지나아제(aldehyde dehydrogenase)를 암호화하는 *PSPA_3072* 유전자를 PCR을 통해 증폭한 뒤 pCDFDuet-1 벡터에 도입하였다. 그 결과, pCDFDuet-1-*PSPA_3072* (pCPa72) 벡터가 구축되었다(표 2)(도 3). 도 3은 구축된 벡터 pCPa72의 벡터맵이다.

[표 2]

[0035] 알데하이드 데하이드로지나아제 유전자 도입에 사용한 균주, 프라이머, 벡터

Strains and plasmids	Sequences or Characteristics	Reference
Strains		
<i>Pseudomonas aureginosa</i>	Type species of the genus <i>Pseudomonas</i> containing putative aldehyde dehydrogenase gene	ATCC10145
Primers		
F-BamH I -PSPA3072	CGGGATCCCATGACAGCCATCCTCGGACACAACT	
R-Hind III -PSPA3072	CCCAAGCTTTCAGCAACG CCGCCGCGTC	
Plasmid		
pCDFDuet-1	3.8 kb, Streptomycin ^R , T ₇ promoter	Novagen

[0036]

[0037] *밑줄 친 서열은 제한효소 자리이다.

[0038] 3) 글리세롤-3-포스파타아제(glycerol-3-phosphatase)와 글리세롤-3-포스페이트 데하이드로지나아제(glycerol-3-phosphate dehydrogenase) 유전자의 클로닝

[0039] 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) D-452-2 유래의 글리세롤-3-포스파타아제(glycerol-3-phosphatase)와 글리세롤-3-포스페이트 데하이드로지나아제(glycerol-3-phosphate dehydrogenase)를 각각 암호화하는 *GPP2*와 *GPD1* 유전자를 PCR을 통해 증폭한 뒤, 위 실시예 1의 2)에서 구축된 pCPa72 벡터의 MCS2 (Multi Cloning Site 2)에 클로닝하였다. 그 결과, pCPa72-GPD1-GPP2 (pCaGPDGPP)벡터가 구축되었다(표 3, 도 4). 도 4는 구축된 벡터 pCaGPDGPP의 벡터맵이다.

[0040] [표 3]

[0041] 글리세롤-3-포스파타아제와 글리세롤-3-포스페이트 데하이드로지나아제 유전자의 도입에 사용한 균주, 프라이머, 벡터

Strains and plasmids	Sequences or Characteristics	Reference
Strains		
<i>S. cerevisiae</i> D425-2	Containing glycerol-3-phosphate dehydrogenase1(<i>GPD1</i>) and glycerol-3-Phosphate2(<i>GPP2</i>), <i>Mat a</i> , <i>leu2</i> , <i>his3</i> , <i>ura3</i> , <i>can1</i>	Kurtzman (1994)
Primers		
F- <i>GPD1</i> -NdeI	GGAATTCATATGATGCTGCTGCTGATAGATATAA	
R- <i>GPD1</i> -XhoI	CCGCTCGAGCTAATCTCATGTAGATCTAATCTTCAATC	
F- <i>GPP2</i> -XhoI	CCGCTCGAGAGGAGGAAATAAATGGGATTGACTACTAACTCTATCT	
R- <i>GPP2</i> -PacI	CCCTAATTAATTACCATTTCACAGATCGTCCTTAG	
Plasmid		
pCPa72	pCDFDuet carrying <i>aldH</i> gene from <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; Sm ^r	

[0042]

[0043] *밑줄 친 서열은 제한효소 자리이다.

[0044] 4) 형질전환을 통한 재조합 대장균 구축

[0045] 상기 실시예 1의 2), 3)에서 구축한 벡터를 이전 특허에서 구축한 pET29-dhaB-dhaR (pELDRR) (대한민국 등록특허 10-1048151 중 참고도 7 참조 요망) 벡터와 함께 상기 실시예 1의 1)에서 구축된 균주들에 형질전환하여 재조합 대장균을 구축하였다. 이때, 사용한 균주와 플라스미드는 다음과 같다(표 4, 표 5).

[0046] [표 4]

[0047]

형질전환에 사용된 균주

Strains	Characteristics	Reference
<i>E. coli</i> BL21 star (DE3)	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdSB</i> (r _S -m _S ⁻), <i>gal</i> , <i>dcm</i> <i>rne131</i> (DE3)	Invitrogen
<i>E. coli</i> BL21 star (DE3) Δ <i>glpK</i>	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdSB</i> (r _S -m _S ⁻), <i>gal</i> , <i>dcm</i> <i>rne131</i> (DE3), Δ <i>glpK</i> ::FRT	
<i>E. coli</i> BL21 star (DE3) Δ <i>glpK</i> Δ <i>gldA</i>	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdSB</i> (r _S -m _S ⁻), <i>gal</i> , <i>dcm</i> <i>rne131</i> (DE3), Δ <i>glpK</i> ::FRT, Δ <i>gldA</i> ::FRT	
<i>E. coli</i> BL21 star (DE3) Δ <i>glpK</i> Δ <i>yqhD</i>	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdSB</i> (r _S -m _S ⁻), <i>gal</i> , <i>dcm</i> <i>rne131</i> (DE3), Δ <i>glpK</i> ::FRT, Δ <i>yqhD</i> ::FRT	

[0048]

[0049]

[표 5]

[0050]

형질전환에 사용된 플라스미드

Plasmids	Characteristics	Reference
pCEa	pCDFDuet carrying <i>aldH</i> gene from <i>E. coli</i> K-12; Sm ^r	대한민국 등록특허 10-1048151
pELDRR	pET29b carrying <i>dhaB1</i> , <i>dhaB2</i> , <i>dhaB3</i> , <i>dhaR1</i> , <i>dhaR2</i> gene from <i>Lactobacillus brevis</i> ; Kan ^r	
pCPa72	pCDFDuet carrying <i>aldH</i> gene from <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; Sm ^r	
pCaGPDGPP	pCPa72 carrying <i>GPD1</i> and <i>GPP2</i> gene from <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ; Sm ^r	

[0051]

[0052]

* Kan^r : Kanamycin 저항성 유전자, Sm^r : Streptomycin/Spectinomycin 저항성 유전자

[0053]

[실시예 2: 유전자 파쇄 효과를 확인하기 위한 재조합 대장균의 유가식 배양-기질로 글리세롤 사용-]

[0054]

상기 실시예 1의 1)에서 시행한 유전자 파쇄 효과를 알아보기 위해 a: BL21 star (DE3) /pELDRR/pCEa, b: BL21 star (DE3) Δ *glpK* /pELDRR/pCEa, c: BL21 star (DE3) Δ *glpK* Δ *gldA* /pELDRR/pCEa, d: BL21 star (DE3) Δ *glpK* Δ *yqhD* /pELDRR/pCEa 의 네 가지 균주에 대해 pH-stat 유가식 배양을 실시하였다. 이때, 상기 네 가지 균주에 도입된 pCEa 벡터는 본 발명자들이 등록을 받은 대한민국 등록특허 10-1048151호의 참고도 7에 기재된 벡터로서, 이 콜라이(*E. coli*) K12 유래의 알데하이드 데하이드로지나아제 유전자가 클로닝되어 삽입된 것이다.

[0055]

발효는 2.5 L jar 발효기에서 1 L 부피로 수행하였다. 배지는 포도당 20 g/L 첨가된 리젠버그(Riesenberg medium) 배지를 사용하였으며, 항생제는 카나마이신(kanamycin) 50 mg/L, 스트렙토마이신(streptomycin) 50 mg/L가 사용되었다. 배양 중 공기는 1 vvm의 속도로 공급하였고, 교반은 12,000~13,000 rpm으로 수행하였으며, 배양온도는 발현 유도 전 37℃, 발현 유도 후 25℃로 하였다. pH는 28% 암모니아 워터(Ammonia water)를 공급하여 6.8이 되도록 조절하였다.

[0056]

배지 내에 당이 고갈된 시점부터 800 g/L 포도당과 14 g/L MgSO₄ · 7H₂O로 구성된 용액(Feeding solution)을 공급하였다. O.D₆₀₀ 값이 100~120이 되었을 때 IPTG (Isopropyl-β-D-thio-galactoside) 0.2mM와 coenzyme B₁₂ (glycerol dehydratase의 cofactor) 20 μM을 첨가하여 발현유도를 하였고, 발현유도 후에는 coenzyme B₁₂의 분해를 막기 위해 불빛을 차단하여 주었다. 또한, 발현 유도시에 3-HP의 기질인 글리세롤 60 g/L를 덤핑하였다.

[0057]

배양 결과는 도 5와 같았다. BL21 star (DE3) Δ *glpK* /pELDRR/pCEa 균주는 glpK가 파쇄됨으로써 글리세롤이 세포성장에 이용되는 것이 억제되어, 기존 BL21 star (DE3) pELDRR/pCEa 균주에 비해 3-HP 생산량 약 2배 증가하였으며, BL21 star (DE3) Δ *glpK* /pELDRR/pCEa 균주에서 추가적으로 yqhD 유전자를 파쇄시킨 Δ *glpK* Δ *yqhD* /pELDRR/pCEa 균주는 1,3-프로판다이올(propanediol)의 생산량이 감소하여 3-HP 생산량이 약 50% 증가하였다. 도 5의 a 내지 d는 상기 네 가지 균주의 유가식 배양 결과(a, b, c, d)이다.

[0058]

[실시예 3: 슈도모나스 애루지노사 유래의 알데하이드 데하이드로지나아제 유전

자 도입 효과 확인-기질로 글리세롤 사용-

- [0059] 상기 실시예 1의 2)에서 실시한 슈도모나스 애루지노사 유래의 알데하이드 데하이드로지나아제 유전자 도입 효과를 확인하기 위하여 유가식 배양을 실시하였고, 알데하이드 데하이드로지나아제의 역가를 측정하였다.
- [0060] 역가 측정은 베르그마이어 방법(Bergmeyer and Gawehn 1974)을 약간 변형한 방식으로 이루어졌다. 50 mM 포타슘 포스페이트 버퍼(pH 7.0), 0.4 mM NAD^+ , 5 mM MgCl_2 , 0.4 mM DTT, 50 mM 3-HPA 조성으로 이루어진 200 μL 의 시료를 마이크로플레이트 리더(microplate reader, Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, USA)로 분석하였으며, 30°C, 340 nm에서 환원되는 NAD^+ 양을 측정하였다. 1 unit 의 ALDH 역가는 1분에 1마이크로몰의 NAD^+ 을 NADH로 환원시키는데 필요한 효소의 양으로 정의하였으며 비효소역가(Specific enzyme activity, U/ mg protein)값은 ALDH 역가를 세포 단백질 농도로 나뉘준 값으로 정의하였다.
- [0061] 유가식 배양의 배양 조건은 상기 실시예 2에서 명시한 유가식 배양 조건과 동일하게 하였다.
- [0062] 역가 측정과 유가식 배양의 결과는 도 6, 도 7과 같았다. 도 6은 이 콜라이(*E. coli*) 유래의 알데하이드 데하이드로지나아제와 슈도모나스 애루지노사 유래의 알데하이드 데하이드로지나아제의 비효소역가를 비교한 결과이다. 도 7은 슈도모나스 애루지노사 유래의 알데하이드 데하이드로지나아제를 도입한 BL21 star (DE3) $\Delta glpK \Delta yqhD/pELDRR/pCPa72$ 균주의 유가식 배양 결과이다.
- [0063] 슈도모나스 애루지노사 유래의 알데하이드 데하이드로지나아제는 이. 콜라이(*E. coli*) 유래의 알데하이드 데하이드로지나아제와 비교하여 약 1.42배 높은 역가를 보였다. 슈도모나스 애루지노사 유래의 알데하이드 데하이드로지나아제를 도입한 균주를 유가식 배양한 결과, 이 콜라이(*E. coli*) 유래의 알데하이드 데하이드로지나아제를 도입한 균주에 비해 3-HP 생산량이 57.38 g/L약 30% 증가하였으며, 수율(M 3-HP/M glycerol) 또한 0.93으로 약 27% 증가하였다.
- [0064] **[실시예 4: 글리세롤-3-포스파타아제(glycerol-3-phosphatase)와 글리세롤-3-포스페이트 데하이드로지나아제(glycerol-3-phosphate dehydrogenase) 유전자 도입 효과 확인-기질로 자일로스 사용-]**
- [0065] 상기 실시예 1의 3)에서 실시한 글리세롤-3-포스파타아제와 글리세롤-3-포스페이트 데하이드로지나아제 유전자 *GPD1*, *GPP2*의 도입 효과를 확인하기 위하여 회분식 배양과 유가식 배양을 실시하였다.
- [0066] 회분식 배양은 100 mL 부피로 수행하였다. 배지는 자일로스 10 g/L와 함께 이스트 엑스트랙트 5g/L가 첨가된 리젠버그 배지(Riesenberg medium)를 사용하였다. 항생제는 스트렙토마이신 50 mg/L가 사용되었다. 도입 효소의 발현 유도(induction)는 $0.D_{600}$ 값이 0.8~1이 되었을 때 IPTG 0.2 mM을 첨가하여 수행했다. 발현유도 전까지는 37°C, 발현 후에는 25°C에서 배양하였으며, 산소 교환을 위해 250 rpm에서 배양을 수행하였다.
- [0067] 한편, 유가식 배양은 2.5 L jar 발효기에서 1 L 부피로 수행하였다. 배지는 자일로스 20 g/L와 함께 이스트 엑스트랙트가 5g/L가 첨가된 리젠버그 배지를 사용하였으며, 항생제는 카나마이신 50 mg/L, 스트렙토마이신 50 mg/L가 사용되었다. 전배양은 회분식 배양조건과 동일하되, 카나마이신 50 mg/L, 스트렙토마이신 50 mg/L을 첨가하였고, 발현 유도를 하지 않은 상태에서 12시간 배양하였다. 배양 중 공기는 1 vvm의 속도로 공급하였고, 교반은 12,000~13,000 rpm으로 수행하였으며, 배양온도는 발현 유도 전은 37°C, 발현 유도 후에는 25°C로 하였다. pH는 28% 암모니아 워터(Ammonia water)를 공급하여 6.74~6.82가 되도록 조절하였다.
- [0068] 배지 내에 당이 고갈된 시점부터 600 g/L 자일로스와 14 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 로 구성된 피딩용액(Feeding solution)을 0.75 g/L · h 속도로 컨스턴트 피딩(Constant feeding) 해주었다. 그리고 $0.D_{600}$ 값이 3.0~8.0이 되었을 때 IPTG 0.2 mM와 coenzyme B_{12} (glycerol dehydratase의 cofactor) 20 μM 을 첨가하여 발현유도를 하였고, 발현유도 후에는 coenzyme B_{12} 의 분해를 막기 위해 불빛을 차단하여 주었다.
- [0069] 자일로스 배지에서 실시한 BL21 star (DE3) $\Delta glpK/pCaGPDGPP$ 균주의 회분식 배양 결과는 도 8과 같았는데, *GPD1*, *GPP2* 도입 전과 달리 글리세롤이 생산되어 축적되는 양상을 보였다. 도 8은 BL21 star (DE3) $\Delta glpK/pCaGPDGPP$ 균주의 회분식 배양 결과이다.
- [0070] 이에 따라 pCaGPDGPP 플라스미드를 BL21 star (DE3) $\Delta glpK \Delta gldA/pELDRR$ 와 BL21 star (DE3) $\Delta glpK \Delta yqhD/pELDRR$ 에 도입하여 유가식 배양을 실시하였다. 그 결과는 도 9, 도 10과 같았는데 *glpK*, *yqhD* 결핍 돌연변

이 재조합 대장균은 120시간 동안 13.2 g/L의 3-HP를 생산하였으며, *glpK*, *gldA* 결핍 돌연변이 재조합 대장균은 223시간 동안 22.2 g/L의 3-HP를 생산하였다. 도 9는 BL21 star (DE3) $\Delta glpK \Delta gldA$ /pELDRR/pCaGPDGPP 균주의 유가식 배양 결과이다. 도 10은 BL21 star (DE3) $\Delta glpK \Delta yqhD$ /pELDRR/pCaGPDGPP 균주의 유가식 배양 결과이다.

[실시예 5: 기질로 포도당을 사용하여 3-HP 생산]

포도당으로부터 3-HP를 생산하기 위하여 회분식 배양을 실시하였다. 회분식 배양은 100 mL 부피로 수행하였다. 배지는 포도당 10 g/L와 함께 이스트 엑스트랙트 5 g/L가 첨가된 리젠버그 배지(Riesenberg medium)를 사용하였다. 항생제는 스트렙토마이신 50 mg/L가 사용되었다. 도입 효소의 발현 유도(induction)는 O.D₆₀₀ 값이 0.8~1이 되었을 때 IPTG 0.2 mM을 첨가하여 수행했다. 발현유도 전까지는 37℃, 발현 후에는 25℃에서 배양하였으며, 산소 교환을 위해 250 rpm에서 배양을 수행하였다.

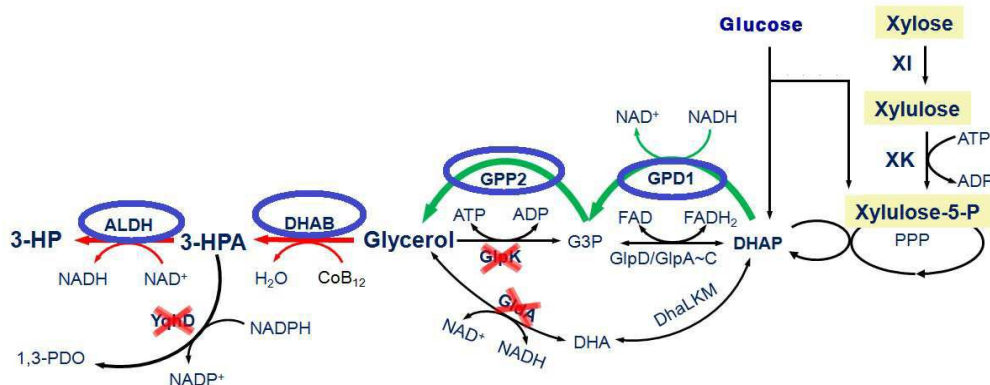
포도당 배지에서 실시한 BL21 star (DE3) $\Delta glpK \Delta yqh$ pELDRR/pCa72, BL21 star (DE3) $\Delta glpK \Delta gldA$ /pELDRR/pCa72, BL21 star (DE3) $\Delta glpK \Delta yqhD$ /pELDRR/pCaGPDGPP, BL21 star (DE3) $\Delta glpK \Delta gldA$ /pELDRR/pCaGPDGPP 균주의 회분식 배양결과는 도 11의 a~d와 같았다. 도 11a는 포도당 배지에서 BL21 star (DE3) $\Delta glpK \Delta yqhD$ /pELDRR/pCa72 균주의 회분식 배양 결과이다. 도 11b는 포도당 배지에서 BL21 star (DE3) $\Delta glpK \Delta gldA$ /pELDRR/pCa72 균주의 회분식 배양결과이다. 도 11c는 포도당 배지에서 BL21 star (DE3) $\Delta glpK \Delta yqhD$ /pELDRR/pCaGPDGPP 균주의 회분식 배양결과이다. 도 11d는 포도당 배지에서 BL21 star (DE3) $\Delta glpK \Delta gldA$ /pELDRR/pCaGPDGPP 균주의 회분식 배양결과이다.

실험 결과, GPD와 GPP가 도입된 BL21 star (DE3) $\Delta glpK \Delta yqhD$ /pELDRR/pCaGPDGPP와 BL21 star (DE3) $\Delta glpK \Delta gldA$ /pELDRR/pCaGPDGPP 균주에서만 3-HP가 생산되었고, BL21 star (DE3) $\Delta glpK \Delta yqhD$ /pELDRR/pCa72, BL21 star (DE3) $\Delta glpK \Delta gldA$ /pELDRR/pCa72 균주는 글리세롤을 만드는 경로가 없기 때문에 3-HP를 생산하지 못하였다.

한편, BL21 star (DE3) $\Delta glpK \Delta yqhD$ /pELDRR/pCaGPDGPP와 BL21 star (DE3) $\Delta glpK \Delta gldA$ /pELDRR/pCaGPDGPP 균주는 10 g/L의 포도당으로부터 3-HP를 각각 0.7 g/L, 0.6 g/L 생산하였다.

도면

도면1

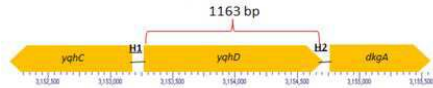


도면2

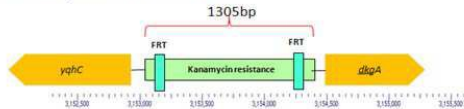
1. PCR amplification of FRT-flanked *kanamycin* resistance gene



2. Transformation *E.coli* BL21 star (DE3) expressing λ Red recombinase



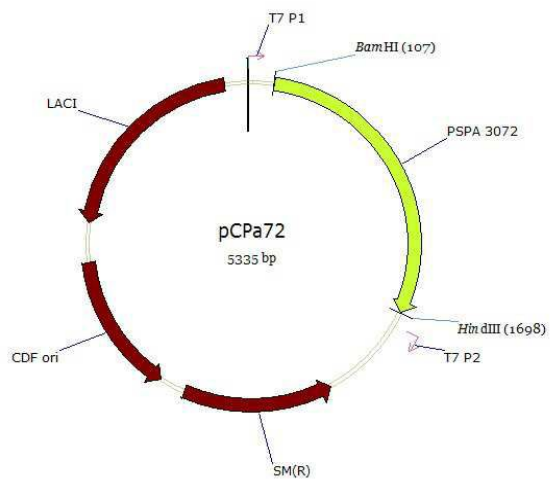
3. Selection of kanamycin resistant transformants



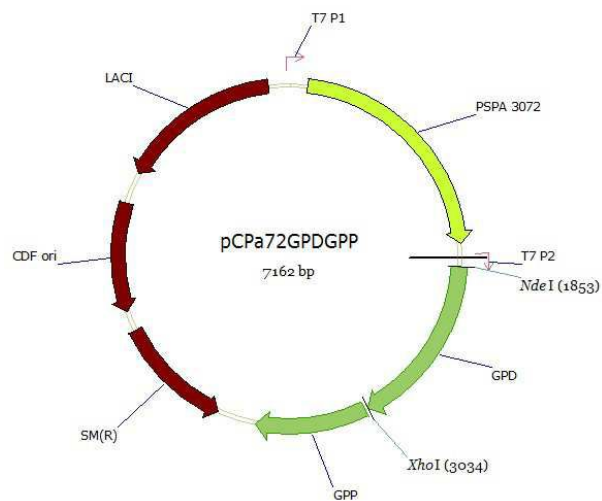
4. Elimination of kanamycin resistance cassette using a FLP expression plasmid, pCP 20



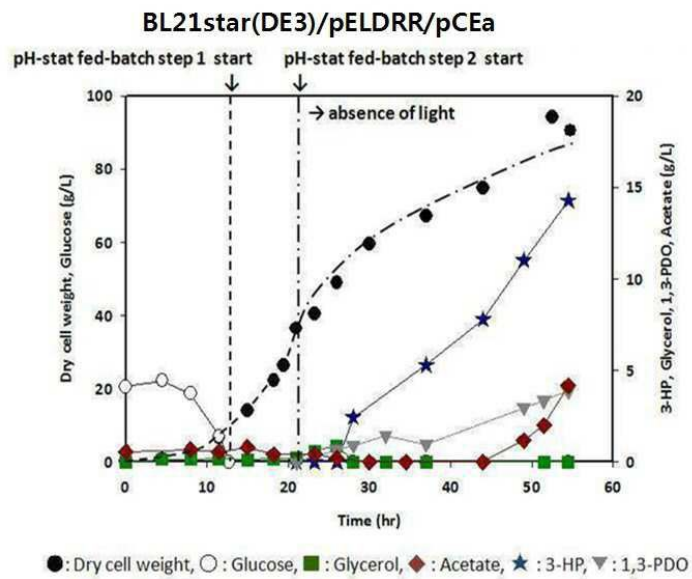
도면3



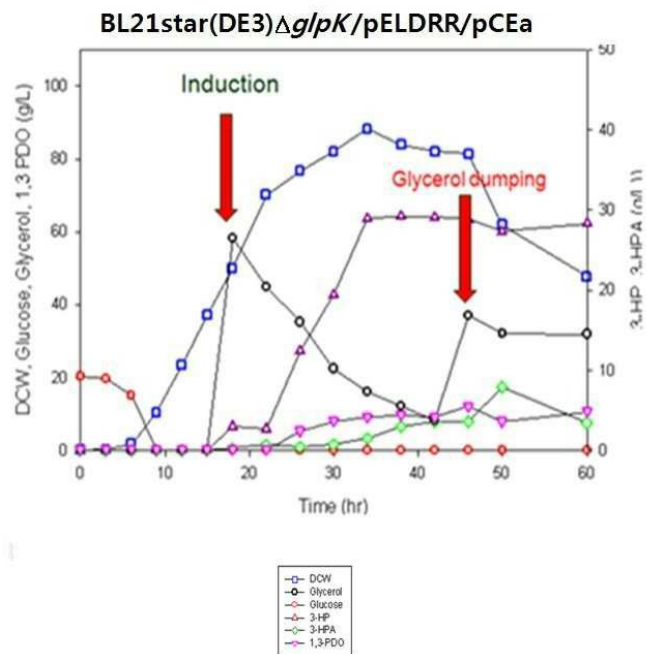
도면4



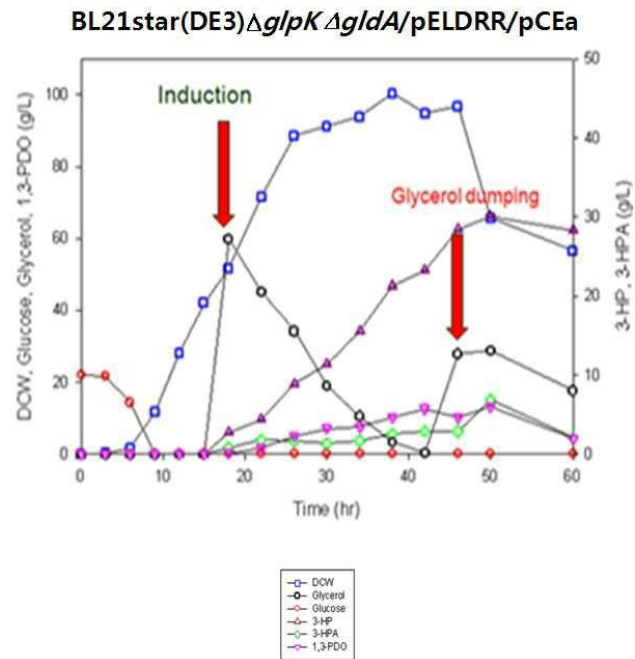
도면5a



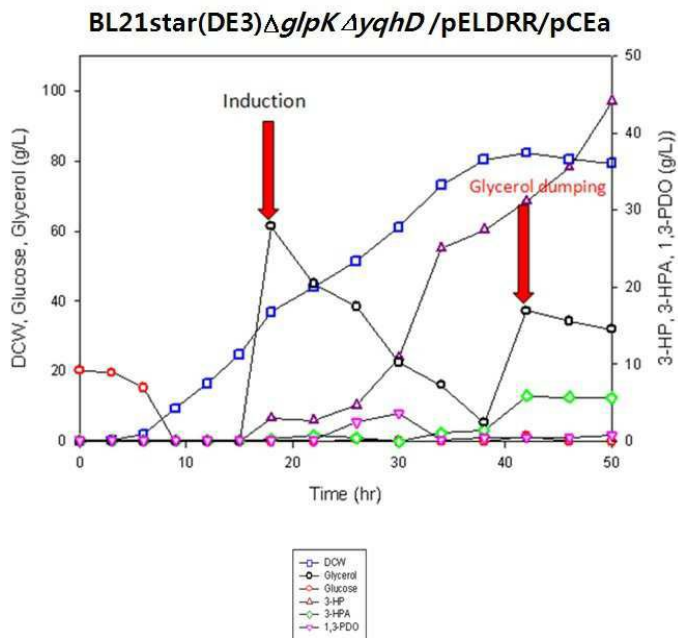
도면5b



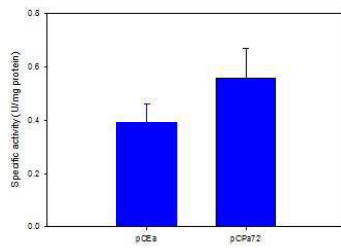
도면5c



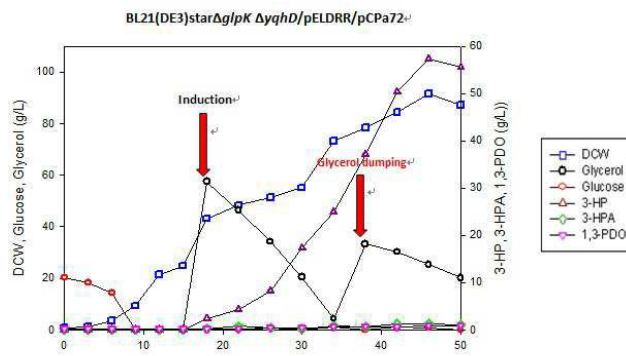
도면5d



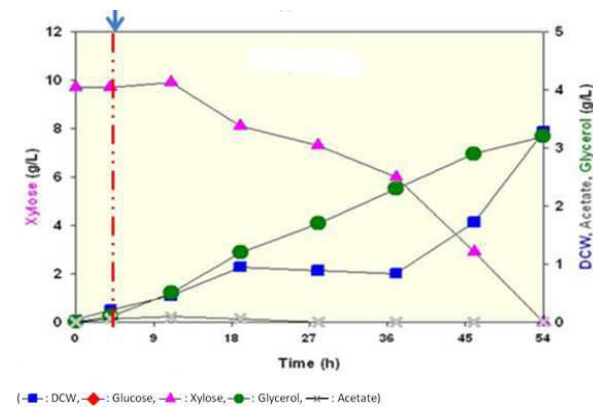
도면6



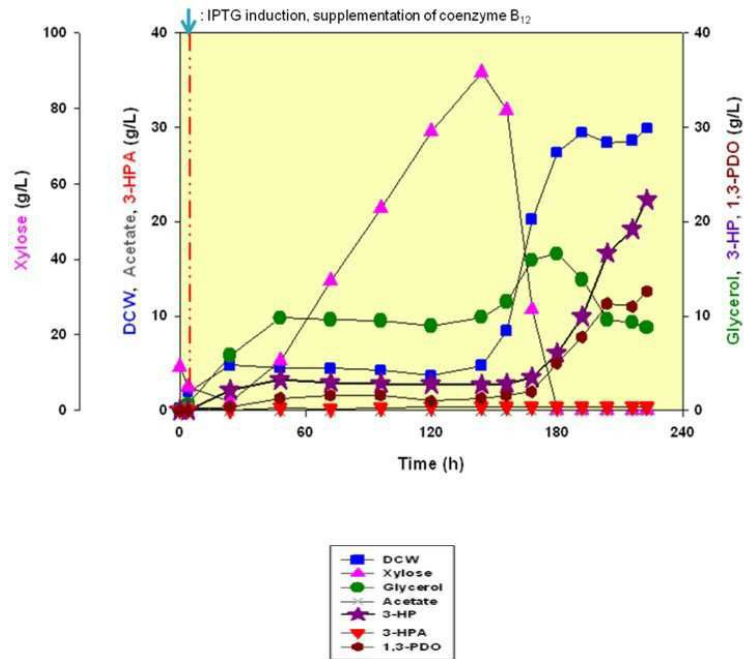
도면7



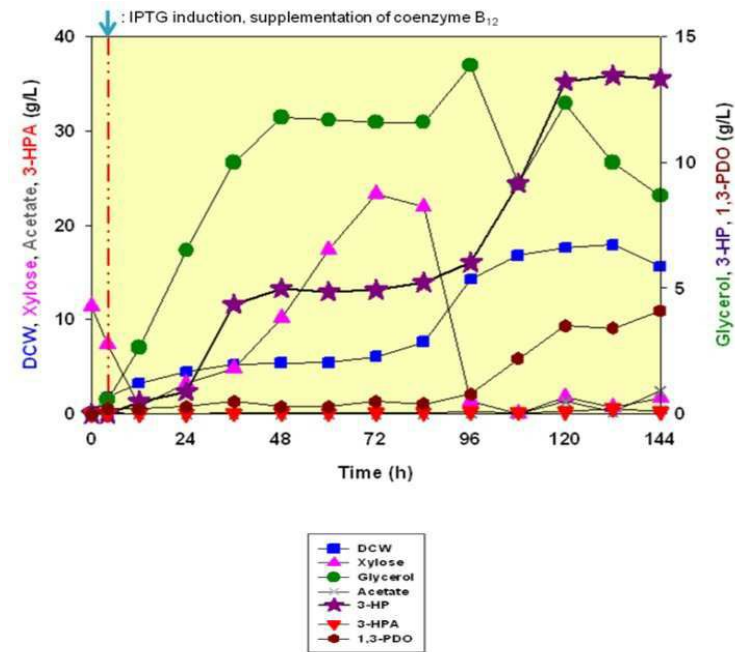
도면8



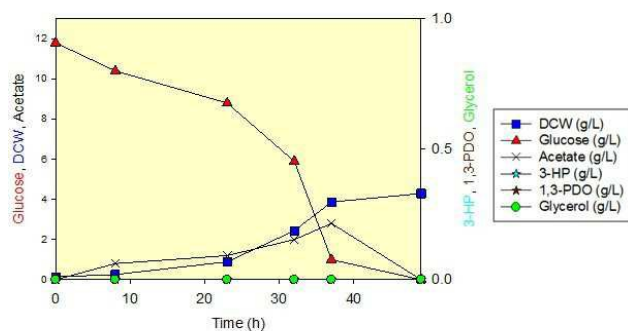
도면9



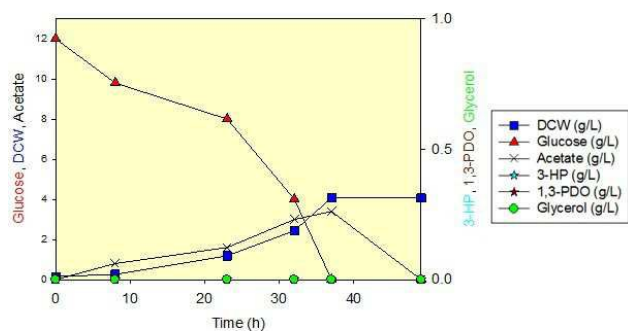
도면10



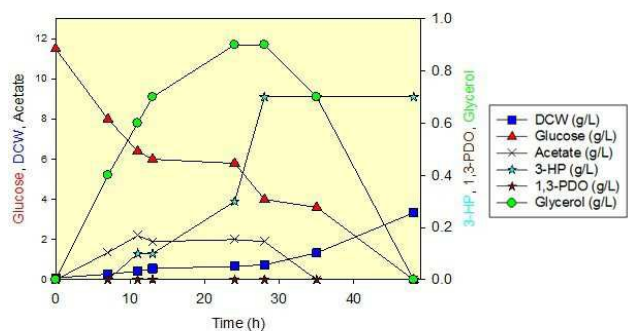
도면11a



도면11b



도면11c



도면11d

