



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년05월22일
(11) 등록번호 10-1738406
(24) 등록일자 2017년05월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/81 (2006.01) C12P 7/16 (2006.01)
C12P 7/18 (2006.01) C12R 1/865 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/81 (2013.01)
C12P 7/16 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0124845
(22) 출원일자 2015년09월03일
심사청구일자 2015년09월03일
(65) 공개번호 10-2017-0028055
(43) 공개일자 2017년03월13일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020150068581 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
서울대학교 산학협력단
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)
(72) 발명자
서진호
서울특별시 서초구 방배로 239, 101동 903호 (방배동, 현대멤피스아파트)
김진우
경기도 군포시 광정로 25-20, 363동 1105호 (금정동, 퇴계아파트)
(74) 대리인
특허법인태동

전체 청구항 수 : 총 9 항

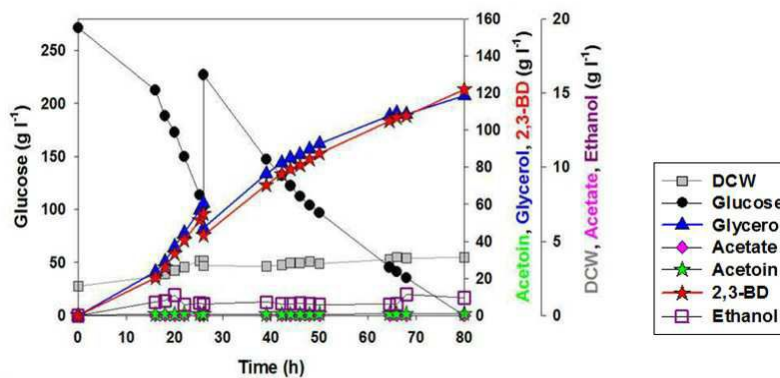
심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 **캔디다 트로피칼리스 유래의 피루베이트 데카르복실라아제가 도입된 2,3-부탄다이올 생산용 재조합 효모 및 이를 이용한 2,3-부탄다이올의 생산방법**

(57) 요약

본 발명은 2,3-부탄다이올 생산용 재조합 효모 및 이를 이용한 2,3-부탄다이올의 생산방법에 관한 것이다. 본 발명은 자체 보유 피루베이트 데카르복실라아제보다 활성이 낮은 캔디다 트로피칼리스 유래의 피루베이트 데카르복실라아제를 균체 내로 도입함으로써, 2,3-부탄다이올의 생산에 부산물로 작용하는 에탄올이 생성 안 되면서도 아세틸-CoA의 합성은 가능해, 균체의 성장속도 및 기질 소모 속도가 증가시킬 수 있었다. 이를 통해, 궁극적으로 2,3-부탄다이올의 생산성을 크게 향상시킬 수 있었다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

- C12P 7/18* (2013.01)
- C12Y 101/01004* (2013.01)
- C12Y 101/05003* (2013.01)
- C12Y 202/01006* (2013.01)
- C12Y 401/01001* (2013.01)
- C12Y 401/01005* (2013.01)
- C12N 2500/02* (2013.01)
- C12N 2500/34* (2013.01)
- C12R 1/865* (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

| | |
|----------|--|
| 과제고유번호 | 0652-20140021 |
| 부처명 | 미래창조과학부 |
| 연구관리전문기관 | 한국연구재단 |
| 연구사업명 | 글로벌 프론티어 |
| 연구과제명 | Saccharomyces cerevisiae 기반 C6/C5 통합형 바이오화학소재 생산 |
| 기 여 율 | 1/1 |
| 주관기관 | 서울대학교 산학협력단 |
| 연구기간 | 2010.10.22 ~ 2019.08.31 |

명세서

청구범위

청구항 1

피루베이트 데카르복실라아제 (pyruvate decarboxylase)의 기능이 소실되도록 형질전환되며,
 캔디다 트로피칼리스 (*Candida tropicalis*) 유래의 피루베이트 데카르복실라아제 (pyruvate decarboxylase)가
 발현되도록 형질전환되고,
 아세토락테이트 신타아제(acetolactate synthase)가 발현되도록 형질전환되며,
 아세토락테이트 데카르복실라아제(acetolactate decarboxylase)가 발현되도록 형질전환되고,
 부탄다이올 데하이드로지나아제(butanediol dehydrogenase)가 발현되도록 형질전환된 것을 특징으로 하는 2,3-
 부탄다이올 생산용 재조합 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*).

청구항 2

제1항에 있어서,
 상기 피루베이트 데카르복실라아제 (pyruvate decarboxylase)의 기능이 소실되도록 형질전환하는 것은,
 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) 균체로부터,
 피루베이트 데카르복실라아제 1 (pyruvate decarboxylase 1)을 암호화하는 *PDC1* 유전자의 일부를 파쇄하거나 전
 체를 제거하고,
 피루베이트 데카르복실라아제 5 (pyruvate decarboxylase 5)를 암호화하는 *PDC5* 유전자의 일부를 파쇄하거나 전
 체를 제거하며,
 피루베이트 데카르복실라아제 6 (pyruvate decarboxylase 6)을 암호화하는 *PDC6* 유전자의 일부를 파쇄하거나 전
 체를 제거함으로써 달성되는 것을 특징으로 하는 2,3-부탄다이올 생산용 재조합 사카로마이세스 세레비지애
 (*Saccharomyces cerevisiae*).

청구항 3

제1항에 있어서,
 캔디다 트로피칼리스 (*Candida tropicalis*) 유래의 피루베이트 데카르복실라아제 (pyruvate decarboxylase)가
 발현되도록 형질전환하는 것은,
 캔디다 트로피칼리스 (*Candida tropicalis*) 유래의 피루베이트 데카르복실라아제 1 (pyruvate decarboxylase
 1)을 암호화하는 *PDC1* 유전자를 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) 균체 내로 도입함으로써
 달성되는 것을 특징으로 하는 2,3-부탄다이올 생산용 재조합 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces
 cerevisiae*).

청구항 4

제3항에 있어서,
 상기 캔디다 트로피칼리스 (*Candida tropicalis*) 유래의 *PDC1* 유전자는,
GPD2 (glyceraldehyde phosphate dehydrogenase 2) 프로모터에 의해 발현이 조절되는 것을 특징으로 하는 2,3-
 부탄다이올 생산용 재조합 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*).

청구항 5

제3항에 있어서,
 상기 캔디다 트로피칼리스 (*Candida tropicalis*) 유래의 *PDC1* 유전자는,
 균체 내로 1 카피(copy) 도입되는 것을 특징으로 하는 2,3-부탄다이올 생산용 재조합 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*).

청구항 6

제1항의 재조합 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)를 배양하는 것을 특징으로 하는 2,3-부탄다이올의 생산방법.

청구항 7

제6항에 있어서,
 상기 배양은,
 글루코스를 함유하는 배지를 이용하여 수행되는 것을 특징으로 하는 2,3-부탄다이올의 생산방법.

청구항 8

제6항에 있어서,
 상기 배양은,
 산소를 공급하면서 수행하는 것을 특징으로 하는 2,3-부탄다이올의 생산방법.

청구항 9

제6항에 있어서,
 상기 배양은,
 글루코스를 지속적으로 공급하는 유가식 배양인 것을 특징으로 하는 2,3-부탄다이올의 생산방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 자체 보유 피루베이트 데카르복실라아제보다 활성이 낮은 캔디다 트로피칼리스 유래의 피루베이트 데카르복실라아제를 균체 내로 도입함으로써, 2,3-부탄다이올의 생산에 부산물로 작용하는 에탄올의 생성은 최소화되나, 생육에 필요한 아세틸-CoA를 생산할 수 있는 2,3-부탄다이올 생산용 재조합 효모 및 이를 이용한 2,3-부탄다이올의 생산방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 2,3-부탄다이올(2,3-butanediol)은 용매, 부동액, 가소제, 의약품, 화장품 등을 구성하는 주요 물질의 합성에 이용되는 화학 물질이며, 액체 연료 첨가제인 MEK(Methyl Ethyl Ketone)의 생산, 자동차 타이어의 원료 물질인 SBR(Stylene-butadiene Rubber)의 합성을 위한 1,3-부타디엔의 전구체로 사용되고 있는 바이오화학소재이다.

[0004] 생물학적 방법을 이용하여 2,3-부탄다이올을 생산하기 위해서는 대사공학적 기술을 응용하여, 2,3-부탄다이올

균주를 개발해야 하고, 최적의 발효 공정을 개발해야 한다. 특히, 2,3-부탄다이올의 대량 생산을 위한 균주의 안전성을 확보하고, 상업화를 위하여 높은 수율과 높은 생산성을 갖는 균주의 개발이 필요하다.

[0005] 한편, 2,3-부탄다이올의 생산을 위해 사용된 기존의 균주로는 클렙시엘라 옥시토키아(*Klebsiella oxytoca*), 폐렴간균(*Klebsiella pneumoniae*), 아에로박터 아에로게네스(*Aerobacter aerogenes*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 페니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*), 세라티아 마르세센스(*Serratia marcescens*) 등이 있었다.

[0006] 그런데, 상기 균주들은 2,3-부탄다이올을 고수율/고생산성으로 생산할 수 있음에도 불구하고, 병원성 미생물로 분류되어 안전 및 산업화에 태생적인 한계가 있었다. 이에 GRAS 미생물로 잘 알려진 효모를 이용하여 2,3-부탄다이올을 생산하는 기술이 종래에 개발되었다. 하지만, 효모는 산업적으로 2,3-부탄다이올 생산 균주로 이용되 기에는 다음의 한계점을 가지고 있었다.

[0007] 기존 기술에서는 2,3-부탄다이올의 주요 전구체인 피루베이트를 에탄올로 전환되는 것을 막기 위하여 핵심 유전자인 PDC (pyruvate decarboxylase) 유전자를 제거한 효모 균주를 이용하였다. 이 효모 균주는 2,3-부탄다이올 생합성 경로를 도입하여 높은 수율의 2,3-부탄다이올을 생산하는 데에는 성공하였지만, PDC 효소의 제거에 따라 세포 성장 및 기질 소모 속도가 현저히 감소하여 2,3-부탄다이올의 생산성이 현저히 낮은 문제가 있었다.

[0008] 따라서, 효모를 이용하여 2,3-부탄다이올을 상업적으로 생산하기 위해서는 기존 균주의 갖는 낮은 세포 성장 속도 및 기질 소모 속도를 해결해야 하는 문제가있었던 것이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) 대한민국 특허공개번호 제10-2015-0068581호 (공개일자 2015. 06. 22)에는, 2,3-부탄다이올 (2,3-Butanediol)의 생합성 경로가 대사공학적으로 조절된 재조합 효모를 이용한 2,3-부탄다이올의 생산방법에 관한 것으로, 피루베이트 데카르복실라아제(pyruvate decarboxylase) 효소 활성이 억제되고, 2,3-부탄다이올 생합성 관련 외래 유전자와 자일로스 대사 관련 외래 유전자가 도입된 재조합 효모를 이용하여 글루코스 또는 자일로스로부터 2,3-부탄다이올을 생산할 수 있는 기술이 기재되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명에서는 기존의 2,3-부탄다이올 생산용 균주가 갖는 낮은 세포 성장 속도 및 기질 소모 속도를 해결하여 고 생산성으로 2,3-부탄다이올을 생산할 수 있는 방법을 개발하여 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명은, 피루베이트 데카르복실라아제 (pyruvate decarboxylase)의 기능이 소실되도록 형질전환되며, 캔디다 트로피칼리스 (*Candida tropicalis*) 유래의 피루베이트 데카르복실라아제 (pyruvate decarboxylase)가 발현되도록 형질전환되고, 아세토락테이트 신타아제(acetolactate synthase)가 발현되도록 형질전환되며, 아세토락테이트 데카르복실라아제(acetolactate decarboxylase)가 발현되도록 형질전환되고, 부탄다이올 데하이드로지나아제(butanediol dehydrogenase)가 발현되도록 형질전환된 것을 특징으로 하는 2,3-부탄다이올 생산용 재조합 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*)를 제공한다. 이때, 캔디다 트로피칼리스 (*Candida tropicalis*) 유래의 피루베이트 데카르복실라아제 (pyruvate decarboxylase)는, 일 예로 서열 번호 2의 아미노산 서열로 구성된 것일 수 있다.

[0014] 본 발명의 2,3-부탄다이올 생산용 효모 균주는 자체 보유 피루베이트 데카르복실라아제 (Pdc)보다 활성이 낮은 캔디다 트로피칼리스 유래의 Pdc를 균체 내로 도입함으로써, 에탄올 생성이 안 되면서도 아세틸-CoA의 합성은 가능해 균체의 성장속도 및 기질 소모 속도가 증가시킬 수 있었고, 궁극적으로 2,3-부탄다이올의 생산성을 크게 향상시킬 수 있었다.

[0015] 한편, 본 발명의 2,3-부탄다이올 생산용 재조합 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*)에 있어서, 상기 피루베이트 데카르복실라아제 (pyruvate decarboxylase)의 기능이 소실되도록 형질전환하는 것은, 일

예로, 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) 균체로부터, 피루베이트 데카르복실라아제 1 (pyruvate decarboxylase 1)을 암호화하는 *PDC1* 유전자의 일부를 파쇄하거나 전체를 제거하고, 피루베이트 데카르복실라아제 5 (pyruvate decarboxylase 5)를 암호화하는 *PDC5* 유전자의 일부를 파쇄하거나 전체를 제거하며, 피루베이트 데카르복실라아제 6 (pyruvate decarboxylase 6)을 암호화하는 *PDC6* 유전자의 일부를 파쇄하거나 전체를 제거함으로써 달성될 수 있다.

[0016] 효소 활성의 소실은 해당 효소를 암호화하는 유전자를 일부 파쇄하거나 전체를 제거함으로써 달성 가능한데, 유전자의 일부 파쇄 (partial disruption) 및 전체 제거 (knock-out)는 유전공학계에 널리 알려진 기술을 이용하여 쉽게 수행 가능하므로, 이에 관한 구체적인 기재는 생략하기로 한다.

[0017] 한편, 본 발명의 2,3-부탄다이올 생산용 재조합 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)에 있어서, 캔디다 트로피칼리스 (*Candida tropicalis*) 유래의 피루베이트 데카르복실라아제 (pyruvate decarboxylase)가 발현되도록 형질전환하는 것은, 일 예로 캔디다 트로피칼리스 (*Candida tropicalis*) 유래의 피루베이트 데카르복실라아제 1 (pyruvate decarboxylase 1)을 암호화하는 *PDC1* 유전자를 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) 균체 내로 도입함으로써 달성될 수 있다. 하기 본 발명의 실험에 의할 경우, 다른 유래의 것들보다 캔디다 트로피칼리스 (*Candida tropicalis*) 유래의 피루베이트 데카르복실라아제 1가 그 활성이 적절히 낮아 에탄올 생성은 하지 않으면서도, 아세틸-CoA는 생합성할 수 있어 세포 성장 및 글루코스 소비속도가 높게 나타났다.

[0018] 한편, 상기 본 발명의 상기 캔디다 트로피칼리스 (*Candida tropicalis*) 유래의 *PDC1* 유전자는, 바람직하게 *GPD2* (glyceraldehyde phosphate dehydrogenase 2) 프로모터에 의해 발현이 조절되는 것이 좋다. *GPD2* 프로모터는 일 예로 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성된 것일 수 있다.

[0019] 또한, 상기 캔디다 트로피칼리스 (*Candida tropicalis*) 유래의 *PDC1* 유전자는, 바람직하게 균체 내로 1 카피 (copy) 도입되는 것이 좋다. 하기 실험에 의할 경우, *GPD2* 프로모터를 이용하고 균체 내로 1 카피 도입하였을 경우, 세포 성장 및 글루코스 소비속도가 높게 나타나고, 에탄올은 생성되지 않았으며, 궁극적으로 2,3-부탄다이올의 생산성이 높게 나타났다.

[0020] 한편, 본 발명은 상기 본 발명의 재조합 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)를 배양하는 것을 특징으로 하는 2,3-부탄다이올의 생산방법을 제공한다. 이때, 상기 배양은 바람직하게 글루코스를 함유하는 배지를 이용하여 수행되는 것이 좋다. 글루코스는 사카로마이세스 세레비지애가 선호하는 탄소원으로써, 이를 탄소원으로 사용할 경우, 균주의 생육이 극대화되어 생산성을 높일 수 있기 때문이다.

[0021] 한편, 본 발명의 2,3-부탄다이올의 생산방법은, 바람직하게 산소를 공급하면서 수행하는 것이 좋은데, 산소 공급을 통해 ATP가 다량 생성됨으로써 미생물의 생육을 촉진시킬 수 있기 때문이다.

[0022] 한편, 본 발명의 2,3-부탄다이올의 생산방법은, 글루코스를 지속적으로 공급하는 유가식 배양으로 수행할 수 있다. 배지를 유가식으로 계속 공급함으로써, 한 배치 (one batch)에서 2,3-부탄다이올을 최대로 생산할 수 있다.

발명의 효과

[0024] 기존의 효모를 이용한 2,3-부탄다이올 생산 기술은 2,3-부탄다이올을 낮은 생산성으로 생산할 수밖에 없었다.

[0025] 하지만, 본 발명의 2,3-부탄다이올 생산용 효모 균주는 자체 보유 피루베이트 데카르복실라아제 (Pdc)보다 활성이 낮은 캔디다 트로피칼리스 유래의 Pdc를 균체 내로 도입함으로써, 에탄올 생성이 안 되면서도 아세틸-CoA의 합성은 가능해 균체의 성장속도 및 기질 소모 속도를 증가시킬 수 있었고, 궁극적으로 2,3-부탄다이올의 생산성을 크게 향상시킬 수 있었다.

[0026] 즉, 종래의 Pdc 결여 균주는, Pdc 결여에 따라, 에탄올 생합성 외에 아세틸-CoA까지 생성되지 않아, 균체가 효율적으로 성장하지 못하였는데, 본 발명에서는 이와 같은 문제를 캔디다 트로피칼리스 유래의 Pdc를 균체 내로 도입함으로써 해결한 것이다. 이를 통해 본 발명에서는 고농도의 2,3-부탄다이올을 높은 생산성으로 생산할 수 있었다.

도면의 간단한 설명

[0028] 도 1(A)는 *PDC*를 발현하지 않는 2,3-부탄다이올 생산 균주(대조군)로 발효한 결과 그래프이다. 도 1(B)는

CtPDC1로 발현한 균주의 발효 결과 그래프이다. 도 1(C)는 KmPDC1로 발현한 균주의 발효 결과 그래프이다.

도 2는 캔디다 트로피칼리스(Candida tropicalis) 유래 피루베이트 데카르복실라아제(pyruvate decarboxylase) 발현 균주의 다양한 발현 조건 (프로모터 종류, 카피 수)에 따른 Pdc 역가 측정 결과이다.

도 3은 다양한 발현 조건을 갖는 PDC 발현 균주의 생산물 (에탄올, 글리세롤, 2,3-부탄다이올)에 대한 수율을 나타내는 그래프이다.

도 4(A)는 대조균의 2,3-부탄다이올 120시간 발효 결과 그래프이다. 도 4(B)는 BD5_G1CtPDC1 균주의 2,3-부탄다이올 120시간 발효 결과 그래프이다.

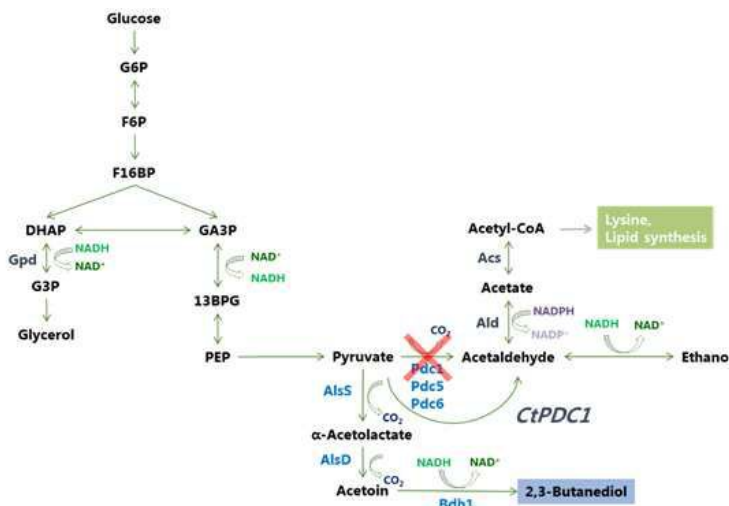
도 5는 유가식 배양을 통해 측정된 BD5_G1CtPDC1 균주의 2,3-부탄다이올 생산 결과 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 본 발명에서는 대사공학적인 기법을 이용하여 2,3-부탄다이올(2,3-Butanediol) 고생산성 재조합 효모를 개발하고, 이를 이용하여 글루코스로부터 2,3-부탄다이올을 고생산성으로 생산하고자 하였다.

[0030] 피루베이트 데카르복실라아제(pyruvate decarboxylase) 효소를 암호화하는 Pdc 활성도의 적절한 조절을 위하여 활성이 낮은 PDC 유전자를 탐색하였는데, 캔디다 트로피칼리스(Candida tropicalis) 유래의 PDC1(CtPDC1) 유전자 서열번호 1의 핵산 서열 및 서열번호 2의 아미노산 서열을 클로닝하여 싱글 카피 (single copy)로 발현해 2,3-부탄다이올을 고수율로 생산하기 위한 균주를 구축하였다 (하기 참고도 1 참조 요망).

[0031] [참고도 1]



[0032] 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.

[0036] [제조예 1: PDC1, PDC5, PDC6 유전자 파쇄 및 2,3-부탄다이올 생합성 경로가 도입된 2,3-부탄다이올 생산 균주의 구축]

[0037] 야생 효모의 경우, 포도당 대사 산물로 생산되는 피루베이트가 피루베이트 데카르복실라아제(pyruvate decarboxylase) 및 알콜 데하이드로지나아제(alcohol dehydrogenase)에 의하여 에탄올로 대부분 전환된다. 따라서, 효모로부터 2,3-부탄다이올을 높은 수율로 생산하기 위해서는 피루베이트가 에탄올로 전환되는 것을 막을 필요가 있다.

[0038] 이에 본 발명에서는, 우선 피루베이트 데카르복실라아제(pyruvate decarboxylase) 유전자인 PDC1, PDC5, PDC6를 파쇄하여 피루베이트 데카르복실라아제(pyruvate decarboxylase) 활성이 완전히 제거된 균주를 구축하였다. 또한, 이 균주에 2,3-부탄다이올 생합성 경로를 도입하기 위하여, 바실러스 서브틸리스(Bacillus subtilis) 유래의 아세톨락테이트 신타아제(acetolactate synthase (alsS))와 아세톨락테이트 디카르복실라아제(acetolactate decarboxylase (alsD))를 사카로미세스 세레비시애(S. cerevisiae)의 TDH3 프로모터와 CYC1 터미네이터를 포함한 플라스미드를 도입하였고, 사카로미세스 세레비시애(S. cerevisiae)의 2,3-부탄다이올 디하이드로제네이즈(2,3-butanediol dehydrogenase (BDH1))을 TDH3 프로모터와 CYC1 터미네이터를 포함한 플라스미드

를 도입하였다 (실험방법 등에 대해서는 본 발명자들이 출원한 대한민국 특허공개공보 제10-2015-0068581호 참조 요망).

[실시예 1: 활성이 낮은 피루베이트 데카르복실라아제(pyruvate decarboxylase, PDC) 유전자의 탐색]

(1) 개요

PDC 유전자를 제거한 효모 균주는 세포 성장 및 기질 소모 속도가 현저히 낮아 2,3-부탄다이올의 생산성이 낮았다.

따라서, 효율적인 2,3-부탄다이올 생산을 위하여 피루베이트 데카르복실라아제의 활성을 적절히 발현되도록 조절하여 2,3-부탄다이올 전구체인 파이루베이트 기질을 확보하고, 동시에 세포 성장에 필수적인 C2 컴파운드의 공급이 가능하도록 하기 위해 활성이 낮은 PDC 유전자를 탐색하고자 하였다.

(2) 재료 및 방법

가. 유전자 및 플라스미드

칸디다 트로피칼리스(*Candida tropicalis*), 클루이베로마이세스 마르시아누스(*Kluyveromyces marxianus*), 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)의 게놈(genomic) DNA를 추출한 후, PCR 방법을 통하여 칸디다 트로피칼리스(*Candida tropicalis*) 유래의 PDC1 (CtPDC1), 클루이베로마이세스 마르시아누스(*Kluyveromyces marxianus*)의 PDC1 (KmPDC1), 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) 유래의 PDC1 (ScPDC1), PDC5 (ScPDC5), PDC6 (ScPDC6) 유전자를 클로닝하였다.

효모용 발현 벡터로는 '2 micron plasmid'의 'origin'과 사카로마이세스 세레비지애(*S. cerevisiae*) 유래의 TDH3 프로모터와 CYC1 터미네이터가 포함되어 있는 p426GPD 플라스미드를 이용하였다.

PCR 방법을 통하여 얻은 상기 PDC 유전자 단편을 상기 p426GPD 플라스미드의 XmaI과 XhoI의 제한효소 자리에 라이게이션하여 재조합 벡터를 구축하였다.

나. 효모 형질 전환

상기에서 구축한 재조합 벡터를 형질전환을 통해 상기 제조예 1의 PDC1, 5, 6 제거 효모 균주에 도입하였다.

(3) 결과

상기 형질전환된 효모 균주의 'in vitro enzyme activity'를 측정하여 다양한 농도의 기질의 활성(activity) 값으로부터 'K_m, V_{max}'의 키네틱 상수(kinetic constant) 값을 산출하였다. 그 값은 하기 표 1에 명시하였다.

표 1

| 균주 | CtPDC1 | KmPDC1 | ScPDC1 | ScpPDC5 | ScPDC6 |
|----------------------------------|--------|--------|--------|---------|--------|
| K _m (mM) | 2.7 | 7.7 | 4.7 | 9.9 | 8.2 |
| V _{max} (mU/mg protein) | 107 | 383 | 541 | 437 | 415 |

실험결과, CtPDC1 균주의 경우 다른 Pdc 균주에 비하여 현저히 활성이 낮았다. 활성이 낮은 CtPDC1 균주를 이용할 경우, 2,3-부탄다이올 생산을 최적화하는데 필요한 Pdc 활성 조절이 가능할 것으로 판단되었다.

[실시예 2: CtPDC1과 KmPDC1을 발현한 균주의 세포 성장, 포도당 소비 속도, 2,3-부탄다이올 생산성 측정]

(1) 개요

실시예 1에서 제조한 Pdc 발현 균주 (CtPDC1, KmPDC1)를 이용하여 세포 성장 및 포도당 소비속도를 측정하고, 2,3-부탄다이올의 생산성을 비교하였다.

(2) 재료 및 방법

가. 균주 및 플라스미드

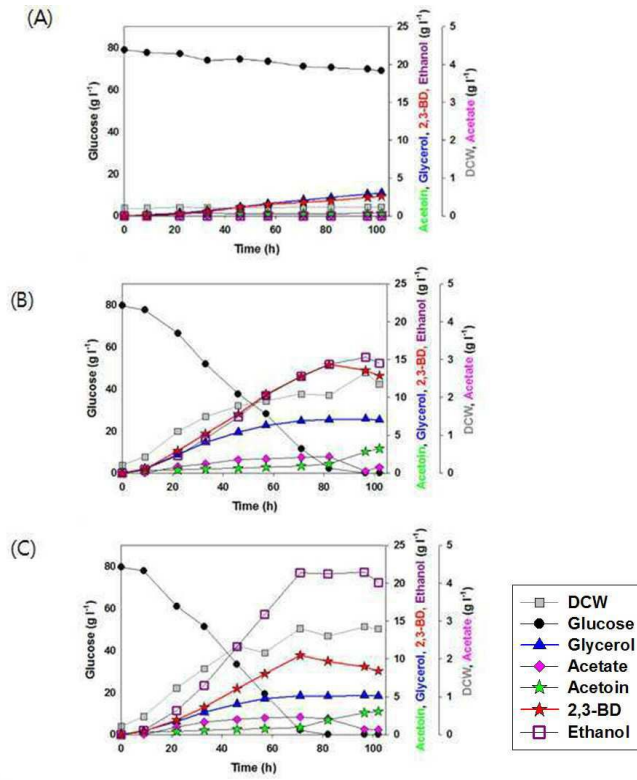
Pdc를 발현하지 않은 2,3-부탄다이올 생산 균주, CtPDC1 발현 균주, KmPDC1 발현 균주를 이용하였다. CtPDC1과 KmPDC1은 *S. cerevisiae*의 TDH3 프로모터 및 CYC1 터미네이터를 이용하여 발현하였다.

- [0066] 나. 배지 및 배양 조건
- [0067] 발효시 'yeast nitrogen base w/o nitrogen base' 6.7 g/L, 'amino acid mixture' 1.4 g/L, 글루코스 (glucose) 80 g/L가 포함된 배지를 사용하였다. 초기 접종 세포 농도는 0.2 g/L이었으며, 발효 온도는 30℃를 유지하였고, 교반 속도는 80 rpm이었다.
- [0069] (3) 결과
- [0070] PDC를 발현하지 않은 대조군의 경우, 시간당 포도당 소모 속도는 0.10 g/L/h 였던 것에 반해, CtPDC1을 발현한 균주는 0.94 g/L/h, KmPDC1을 발현한 균주는 1.09 g/L/h이었다.
- [0071] PDC를 발현하지 않은 균주의 경우의 최대 건조 균체 농도는 0.2 g_{DCW}/L이었으며, CtPDC1을 발현한 균주는 2.7 g_{DCW}/L, KmPDC1을 발현한 균주는 2.8 g_{DCW}/L이었다.
- [0072] PDC를 발현하지 않은 균주의 2,3-부탄다이올과 에탄올 수율은 0.259 g_{2,3-부탄다이올}/g포도당과 0 g_{에탄올}/g포도당이었으며, CtPDC1을 발현한 균주는 0.185 g_{2,3-부탄다이올}/g포도당과 0.185 g_{에탄올}/g포도당, KmPDC1을 발현한 균주는 0.134 g_{2,3-부탄다이올}/g포도당과 0.275 g_{에탄올}/g포도당 이었다.
- [0073] 한편, PDC를 발현하지 않은 균주의 2,3-부탄다이올 생산성은 0.026 g_{2,3-부탄다이올}/L/h 이었으며, CtPDC1을 발현한 균주는 0.175 g_{2,3-부탄다이올}/L/h, KmPDC1을 발현한 균주는 0.147 g_{2,3-부탄다이올}/L/h 이었다.
- [0074] 이상의 실험으로부터 PDC-결여 2,3-부탄다이올 생산 균주에 PDC를 발현시킨 결과 세포 성장 및 포도당 소모 속도가 크게 증가함을 확인할 수 있었고, 생산성이 크게 증가함을 확인할 수 있었다 (도 1). 도 1(A)는 PDC를 발현하지 않는 2,3-부탄다이올 생산 균주(대조군)로 발효한 결과 그래프이고. 도 1(B)는 CtPDC1로 발현한 균주의 발효 결과 그래프이고. 도 1(C)는 KmPDC1로 발현한 균주의 발효 결과 그래프이다.
- [0076] [실시예 3: 캔디다 트로피칼리스(*Candida tropicalis*) 유래 피루베이트 데카르복실라아제(pyruvate decarboxylase)의 다양한 발현 조건을 갖는 균주 구축 및 'in vitro activity assay']
- [0077] (1) 개요
- [0078] PDC의 발현량은 2,3-부탄다이올의 수율 및 생산성에 직접적으로 영향을 미치므로, 최적의 CtPDC1 발현 균주를 선정하기 위하여 다양한 발현 조건을 갖는 CtPDC1 발현 균주를 구축하였다.
- [0080] (2) 재료 및 방법
- [0081] 가. 다양한 프로모터를 갖는 플라스미드 구축
- [0082] 캔디다 트로피칼리스(*C. tropicalis*) 유래의 PDC1 유전자 (CtPDC1)를 증폭하여 각각의 발현 벡터(프로모터로 각각 CYC1 프로모터, GPD2 프로모터-서열번호 3-, TDH3 프로모터 사용 및 터미네이터로 CYC1 터미네이터 공히 사용)에 삽입한 후 형질전환하여 제조함 효모 균주를 제작하였다. 형질전환에 사용할 균주는 YNB 배지에서 2일간 배양 후, OD값이 3이 되는 시점의 균체를 이용하였다.
- [0083] 나. 형질전환
- [0084] 형질전환은 LiAc 방법을 이용하였으며, 형질전환 이후에 YNB leu-his-trp-ura- 평판배지에서 균주를 선별하였다. 그 결과, CYC1 프로모터와 싱글 카피(single copy)로 발현한 균주 (BD5_C1CtPDC1), GPD2 프로모터와 싱글 카피(single copy)로 발현한 균주 (BD5_G1CtPDC1), CYC1 프로모터와 멀티 카피(multi copy)로 발현한 균주 (BD5_C2CtPDC1), TDH3 프로모터와 멀티 카피(multi copy)로 발현한 균주 (BD5_T2CtPDC1)를 구축하였다.
- [0086] (3) 결과
- [0087] 이 균주들의 PDC 발현 정도를 확인하기 위하여 'in vitro Pdc activity assay'를 실시하였다. 그 결과, 대조군에서는 Pdc 역가가 나타나지 않았고, 구축된 균주는 여러 가지 Pdc 발현 수준을 나타내었다(도 2). 도 2는 캔디다 트로피칼리스(*Candida tropicalis*) 유래의 피루베이트 데카르복실라아제(pyruvate decarboxylase) 발현 균주의 Pdc 역가 측정 결과이다.
- [0089] [실시예 4: 캔디다 트로피칼리스(*Candida tropicalis*) 유래 피루베이트 데카르복실라아제(pyruvate decarboxylase)가 발현된 균주를 이용한 2,3-부탄다이올 생산]

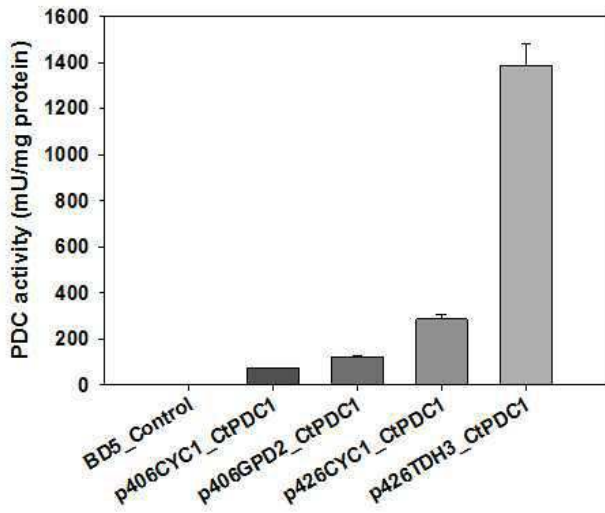
- [0090] (1) 개요
- [0091] 상기 실시예 3에서 구축된 균주들의 2,3-부탄다이올 발효 양상을 확인하기 위하여 초기 90 g/L의 포도당을 함유한 YNB 배지에서 발효 실험을 실시하였다. 대조군으로는 'CtPDC1이 들어있지 않은 p426GPD 공백터'로 형질전환된 균주를 사용하였다.
- [0093] (2) 발효 방법
- [0094] 초기 접종 균체 농도는 0.2 g/L이었으며, 발효 온도는 30℃로 유지하였고, 유리 플라스크에서 80 rpm의 교반속도를 유지하였다.
- [0096] (3) 결과
- [0097] 대조군의 경우, 2,3-부탄다이올 수율은 0.292 g_{2,3-부탄다이올}/g_{포도당} 이었고, 에탄올은 생성되지 않았다.
- [0098] PDC 발현 균주 중 PDC가 멀티 카피(multi copy)로 발현된 BD5_C2CtPDC1과 BD5_T2CtPDC1 균주에서는 다량의 에탄올이 생산되었으며, 이와 함께 2,3-부탄다이올의 수율이 각각 0.245, 0.150 g_{2,3-부탄다이올}/g_{포도당}으로 감소하였다(도 3). 도 3은 대조군 및 PDC 발현 균주의 생산물에 대한 수율을 나타내는 그래프이다. 도 3에서 BD5_C1CtPDC1와 BD5_G1CtPDC1 균주의 2,3-부탄다이올 생산수율은 비슷한 것으로 나타났으나, BD5_C1CtPDC1는 부산물인 글리세롤의 생산 수율이 높게 나타나 바람직하지 않았다. 따라서, 2,3-부탄다이올 생산균주로는 BD5_G1CtPDC1 균주가 더 적합한 것으로 판단되었다.
- [0099] 한편, PDC 발현 균주는 세포 성장 및 포도당 소모 속도가 증가하였는데, 대조군의 단위시간당 포도당 소모 속도가 0.26 g_{포도당}/L/h 인 것에 반해, BD5_G1CtPDC1 균주의 경우 0.62 g_{포도당}/L/h로 확인되었다. BD5_G1CtPDC1 균주의 경우, 대조군과 비교하여 2,3-부탄다이올 생산수율은 비슷하였지만, 2,3-부탄다이올 생산성은 대조군의 0.076 g/L/h에서 0.181 g/L/h로 증가하였다(도 4).
- [0100] 도 4(A)는 대조군의 2,3-부탄다이올 120시간 발효 결과 그래프이고, 도 4(B)는 BD5_G1CtPDC1 균주의 2,3-부탄다이올 120시간 발효 결과 그래프이다.
- [0102] [실시예 5 :유가식 배양을 통한 2,3-부탄다이올 생산]
- [0103] (1) 개요
- [0104] BD5_G1CtPDC1 균주가 2,3-부탄다이올 생산 균주로 적합한지 최종 판단하기 위하여 발효 중간에 포도당을 첨가하는 유가식 배양을 수행하였다.
- [0106] (2) 재료 및 방법
- [0107] 배지는 YP 배지 (Yeast extract 10 g/L, peptone 20 g/L)를 사용하였으며, 초기 포도당 농도는 270 g/L이었고, 발효 중반에 800 g/L의 포도당 용액을 추가하였다. 초기 접종 세포 농도는 2 g/L이었고, 발효 온도는 30℃로 유지하였으며, 0.5 vvm의 공기를 주입하였고, 200 rpm으로 교반 속도를 유지하였다.
- [0109] (3) 결과
- [0110] 80 시간의 배양시간 동안 121.8 g/L의 2,3-부탄다이올을 생산하였다. 이때, 2,3-부탄다이올의 수율은 0.329 g_{2,3-부탄다이올}/g_{포도당} 이었으며, 생산성은 1.61 g/L/h로 높게 나타났다(도 5). 도 5는 BD5_G1CtPDC1 균주를 이용한 유가식 배양을 통해 측정된 2,3-부탄다이올의 생산 결과 그래프이다.
- [0111] 이와 같은 결과로부터, 본 발명의 캔디다 트로피칼리스 (*Candida tropicalis*) 유래의 피루베이트 데카르복실라아제 (pyruvate decarboxylase) 도입 균주는 2,3-부탄다이올 생산을 위해 적합한 것으로 판단할 수 있었다.

도면

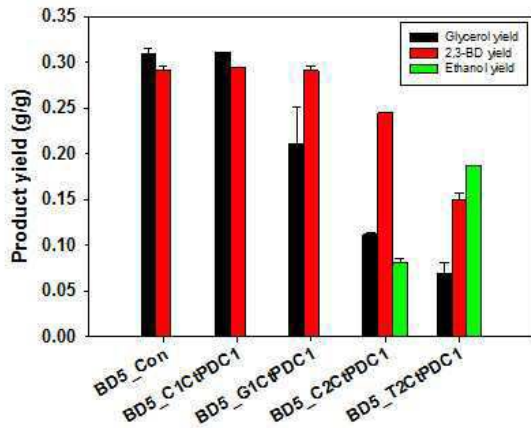
도면1



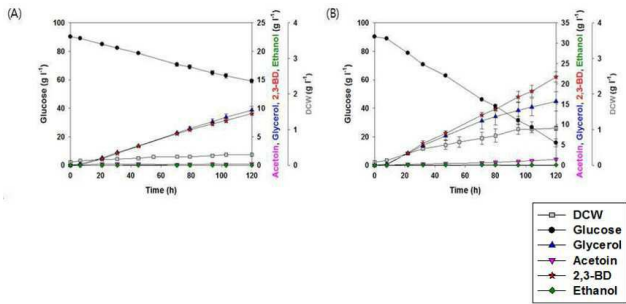
도면2



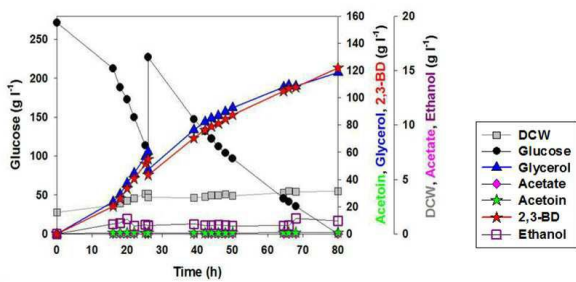
도면3



도면4



도면5



서열 목록

<110> SNU R&D FOUNDATION

<120> Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* for the production of 2,3-butanediol with pyruvate decarboxylase from *Candida tropicalis* and method for the production of 2,3-butanediol therefrom

<130> AP-2015-0146

<160> 3

<170> KopatentIn 2.0
 <210> 1
 <211> 1704
 <212> DNA
 <213> Candida tropicalis
 <400> 1

atgtctgaaa ttactttggg tagattcttc ttgaaagat tgcaccaatt gcaagttgac 60
 accgttttcg gttaccagg tgattttaac ttggctttat tagataaaat ctacgaagtc 120

gatggtatga gatgggctgg taacccaat gaattgaacg ctggttacgc tgctgatggt 180
 tacgccagag ttaatccaaa tggtttggct gctttagtct ccaccttcgg tgttggtgaa 240
 ttgtctttga ctaacgcat tgctggttct tactctgaac acgttggtat cattaacttg 300
 gttggtgttc catcttcttc tgctcaagct aaacaattgt tgttgacca caccttgggt 360
 aacggtgatt tcaactgttt ccacagaatg ttcaagaaca tttctcaaac ttctgctttc 420
 atctccgacc caaacactgc tgcttctgaa attgacagat gtatcagaga tgcttacgtt 480
 taccaaagac cagtttcat tggtttgcca tctaacttgg ttgatgttaa agttccaaaa 540

tctttgttgg acaaaaaaat tgacttgtcc ttgcatccaa atgaaccaga atcccaagct 600
 gaagttgttg aaaccgtga aaaattcatt tctgaagctt ctaaccagt tatcttggtt 660
 gatgcttgtg ctatcagaca caactgtctt aaagaagttg ctgaattgat tgctgaaact 720
 caattccag tcttaccac tccaatgggt aaatcaagtg ttgatgaatc caaccaaga 780
 ttcggtgggt tttacgttgg ttctttgtct tctccagatg ttaagaagc cgttgaaagt 840
 gctgacttgg tcttatctgt tgggtctatg ttgtctgatt tcaaacactgg tgctttctct 900
 tacaactaca agaccagaaa tgttttgaa ttccactctg attacaccaa gatcagacaa 960

gctactttcc caggtgtcca aatgaagaa gctttgcaag ttttgtttaa gactgtcaag 1020
 aaatctgtea atccaaaata cgtccagct ccagttccag ctaccaaagc tattaccact 1080
 ccaggttaaca acgaccagct ctctcaagaa tacttggga gaaaagtffc tgactggttc 1140
 caagaaggtg atgttatcat ttctgaaacc ggtacctctg ctttcggtat tgtccaatct 1200
 aaattcccaa agaatgcat tggatattcc caagtcttgt ggggttctat tggttacgct 1260
 actggtgcta cttgtggcgc tgctatggct gctcaagaaa ttgaccctaa gaagagagtt 1320
 atcttgttca ctggtgatgg ttctttgcaa ttgactgtcc aagaatctc taccatgtgt 1380

aaatgggatt gttacaacac ctatctttac gttttgaaca acgatggtta caccattgaa 1440
 agattgattc acggtgaaaa agctcaatat aacgacattc aacctggaa caactgcaa 1500

cttttgccat tgttcaacgc taagaaatac gaaaccaaga gaatttctac tgttggtgaa 1560
 ttgaacgatt tgttcactaa caaagaattt gctgttccag acagaattag aatgggtgaa 1620
 attatgttgc cagttatgga tgctccagct aacttggttg cccaagctaa acaatctgct 1680
 gctaccaacg ctgctcaaga ataa 1704

<210> 2
 <211> 567
 <212> PRT

<213> *Candida tropicalis*

<400> 2

Met Ser Glu Ile Thr Leu Gly Arg Phe Phe Phe Glu Arg Leu His Gln
 1 5 10 15
 Leu Gln Val Asp Thr Val Phe Gly Leu Pro Gly Asp Phe Asn Leu Ala
 20 25 30
 Leu Leu Asp Lys Ile Tyr Glu Val Asp Gly Met Arg Trp Ala Gly Asn
 35 40 45
 Ala Asn Glu Leu Asn Ala Gly Tyr Ala Ala Asp Gly Tyr Ala Arg Val
 50 55 60

 Asn Pro Asn Gly Leu Ala Ala Leu Val Ser Thr Phe Gly Val Gly Glu
 65 70 75 80
 Leu Ser Leu Thr Asn Ala Ile Ala Gly Ser Tyr Ser Glu His Val Gly
 85 90 95
 Ile Ile Asn Leu Val Gly Val Pro Ser Ser Ser Ala Gln Ala Lys Gln
 100 105 110
 Leu Leu Leu His His Thr Leu Gly Asn Gly Asp Phe Thr Val Phe His
 115 120 125
 Arg Met Phe Lys Asn Ile Ser Gln Thr Ser Ala Phe Ile Ser Asp Pro

 130 135 140
 Asn Thr Ala Ala Ser Glu Ile Asp Arg Cys Ile Arg Asp Ala Tyr Val
 145 150 155 160
 Tyr Gln Arg Pro Val Tyr Ile Gly Leu Pro Ser Asn Leu Val Asp Val
 165 170 175
 Lys Val Pro Lys Ser Leu Leu Asp Lys Lys Ile Asp Leu Ser Leu His

180 185 190
 Pro Asn Glu Pro Glu Ser Gln Ala Glu Val Val Glu Thr Val Glu Lys
 195 200 205

 Phe Ile Ser Glu Ala Ser Asn Pro Val Ile Leu Val Asp Ala Cys Ala
 210 215 220
 Ile Arg His Asn Cys Leu Lys Glu Val Ala Glu Leu Ile Ala Glu Thr
 225 230 235 240
 Gln Phe Pro Val Phe Thr Thr Pro Met Gly Lys Ser Ser Val Asp Glu
 245 250 255
 Ser Asn Pro Arg Phe Gly Gly Val Tyr Val Gly Ser Leu Ser Ser Pro
 260 265 270
 Asp Val Lys Glu Ala Val Glu Ser Ala Asp Leu Val Leu Ser Val Gly

 275 280 285
 Ala Met Leu Ser Asp Phe Asn Thr Gly Ala Phe Ser Tyr Asn Tyr Lys
 290 295 300
 Thr Arg Asn Val Val Glu Phe His Ser Asp Tyr Thr Lys Ile Arg Gln
 305 310 315 320
 Ala Thr Phe Pro Gly Val Gln Met Lys Glu Ala Leu Gln Val Leu Leu
 325 330 335
 Lys Thr Val Lys Lys Ser Val Asn Pro Lys Tyr Val Pro Ala Pro Val
 340 345 350

 Pro Ala Thr Lys Ala Ile Thr Thr Pro Gly Asn Asn Asp Pro Val Ser
 355 360 365
 Gln Glu Tyr Leu Trp Arg Lys Val Ser Asp Trp Phe Gln Glu Gly Asp
 370 375 380
 Val Ile Ile Ser Glu Thr Gly Thr Ser Ala Phe Gly Ile Val Gln Ser
 385 390 395 400
 Lys Phe Pro Lys Asn Ala Ile Gly Ile Ser Gln Val Leu Trp Gly Ser
 405 410 415
 Ile Gly Tyr Ala Thr Gly Ala Thr Cys Gly Ala Ala Met Ala Ala Gln

 420 425 430

Glu Ile Asp Pro Lys Lys Arg Val Ile Leu Phe Thr Gly Asp Gly Ser
 435 440 445
 Leu Gln Leu Thr Val Gln Glu Ile Ser Thr Met Cys Lys Trp Asp Cys
 450 455 460
 Tyr Asn Thr Tyr Leu Tyr Val Leu Asn Asn Asp Gly Tyr Thr Ile Glu
 465 470 475 480
 Arg Leu Ile His Gly Glu Lys Ala Gln Tyr Asn Asp Ile Gln Pro Trp
 485 490 495

Asn Asn Leu Gln Leu Leu Pro Leu Phe Asn Ala Lys Lys Tyr Glu Thr
 500 505 510
 Lys Arg Ile Ser Thr Val Gly Glu Leu Asn Asp Leu Phe Thr Asn Lys
 515 520 525
 Glu Phe Ala Val Pro Asp Arg Ile Arg Met Val Glu Ile Met Leu Pro
 530 535 540
 Val Met Asp Ala Pro Ala Asn Leu Val Ala Gln Ala Lys Gln Ser Ala
 545 550 555 560
 Ala Thr Asn Ala Ala Gln Glu

565

- <210> 3
- <211> 1144
- <212> DNA
- <213> *Saccharomyces cerevisiae*
- <400> 3

caaaaacgac atatctatta tagtggggag agtttcgtgc aaataacaga cgcagcagca 60
 agtaactgtg acgatatcaa ctctttttttt attatgtaat aagcaaacia gcacgaatgg 120
 ggaaagccta tggcaatca ccaaggtcgt cccttttttc ccatttgcta atttagaatt 180
 taaagaaacc aaaagaatga agaaagaaaa caaatactag ccctaaccct gacttcgttt 240
 ctatgataat accctgcttt aatgaacggt atgccctagg gtatatctca ctctgtacgt 300

 taaaaactcc ggttatittta tcggaacatc cgagcaccgg cgccttcctc aaccaggca 360
 ccgccccag gtaaccgtgc gcgatgagct aatcctgagc catcacccac cccaccggtt 420
 gatgacagca attcggggagg gcgaaaaata aaaactggag caaggaatta ccatcaccgt 480
 caccatcacc atcatatcgc cttagcctct agccatagcc atcatgcaag cgtgtatctt 540

| | |
|--|------|
| ctaagattca gtcacatca ttaccgagtt tgttttcctt cacatgatga agaaggtttg | 600 |
| agtatgctcg aaacaataag acgacgatgg cctgccatt gttatattac gcttttgccg | 660 |
| cgaggtgccg atgggttgct gaggggaaga gtgttttagct tacggaccta ttgccattgt | 720 |
| | |
| tattccgatt aatctattgt tcagcagctc ttctctacc tgtcattcta gtattttttt | 780 |
| ttttttttt tggttttact tttttttctt ctgacctttt tttcttgta cttttttct | 840 |
| agttttttt cttccacta agctttttcc ttgatttate cttgggttct tctttctact | 900 |
| cctttagatt tttttttat atattaattt ttaagtttat gtattttggt agattcaatt | 960 |
| ctctttccct ttcctttcc ttcctcccc ttccttatca atgcttgctg tcagaagatt | 1020 |
| aacaagatac acattcctta agcgaacgca tccggtgta tatactcgtc gtgcatataa | 1080 |
| aattttgctt tcaagatcta ctttcctaag aagatcatta ttacaaacac aactgcactc | 1140 |
| | |
| aaag | 1144 |