

명세서

발명의 명칭: 제라닐제라닐 피로포스페이트 신타아제 변이체 및 이를 이용한 테트라테르펜, 이의 전구체, 및 테트라테르펜을 전구체로 하는 물질의 생산방법

기술분야

- [1] 본 출원은 제라닐제라닐 피로포스페이트 신타아제(Geranylgeranyl pyrophosphate synthase) 변이체; 상기 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터; 상기 변이체, 폴리뉴클레오티드, 및 벡터 중 어느 하나 이상을 포함하는 미생물; 이를 이용한 테트라테르펜, 이의 전구체, 및 테트라테르펜을 전구체로 하는 물질의 생산방법; 테트라테르펜, 이의 전구체, 및 테트라테르펜을 전구체로 하는 물질 생산용 조성물; 및 상기 변이체, 폴리뉴클레오티드, 및 벡터 중 어느 하나 이상을 포함하는 미생물의 테트라테르펜, 이의 전구체, 및 테트라테르펜을 전구체로 하는 물질 생산 용도에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 테르페노이드(terpenoid)는 카로티노이드(carotenoid)를 포함하는 개념으로서, 식물 및 동물에서 다양한 기능을 발휘함에 따라, 식품, 사료 등 다방면의 산업 분야에서 이용되고 있다. 테르페노이드는 식물의 약효를 내는 대표적인 물질로 알려져 있으며, 카로티노이드(carotenoid)와 같이 테르펜(terpene)류이다. 그 중에서도 베타카로틴과 같은 카로티노이드는 자유라디칼 제거, 동물에서 비타민 A의 모체, 척추동물의 면역시스템 증강, 및 폐암 위험성 감소와 같은 기능이 보고된 물질이다.
- [4] 그러나, 이러한 장점에도 불구하고, 카로티노이드, 예를 들어, 베타카로틴은 동물의 체내에서 합성되지 않거나 합성량이 부족하다. 또한, 변이된 미생물을 이용하여 산업적 생산을 도모하더라도(미국등록특허 제7745170호), 여전히 부산물로 인해 베타카로틴을 고순도로 생산하는 것이 어려운 실정이다.
- [5] 부산물과 관련하여, 카로티노이드 또는 테르페노이드 생산을 위한 핵심 전구물질인 제라닐제라닐 피로포스페이트(geranylgeranyl pyrophosphate; GGPP, C20)는 아이소프레노이드(isoprenoid) 생합성 경로에서 제라닐제라닐 피로포스페이트 신타아제(geranylgeranyl pyrophosphate synthase) 효소에 의해 파네실 피로포스페이트(farnesyl pyrophosphate; FPP, C15)와 이소펜테닐 피로포스페이트(isopentenyl pyrophosphate; IPP, C5)가 결합되어 생산된다. 다만, 스쿠알렌 신타아제(squalene synthase; ERG9)에 의해 파네실 피로포스페이트(FPP, C15)로부터 스쿠알렌(C30)이 부산물로 함께 생산될 수 있다. 이에, 카로티노이드 또는 테르페노이드 생합성을 위한 핵심 전구물질인

GGPP 생성량 증대 및 경쟁경로인 스쿠알렌 생산 감소를 위한 방법의 개발할 필요성이 대두되고 있다.

[6]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[7] 본 출원의 해결하고자 하는 과제는 제라닐제라닐 피로포스페이트 신타아제 변이체 및 이를 이용한 테트라테르펜, 이의 전구체, 및 테트라테르펜을 전구체로 하는 물질 생산 방법을 제공하는 것이다.

[8]

과제 해결 수단

[9] 본 출원의 하나의 목적은 서열번호 1의 아미노산 서열의 N-말단으로부터 29번, 43번, 90번, 103번, 122번, 및 141번 위치에 상응하는 아미노산 중 어느 하나 이상의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 제라닐제라닐 피로포스페이트 신타아제(Geranylgeranyl pyrophosphate synthase) 변이체를 제공하는 것이다.

[10] 본 출원의 다른 하나의 목적은 상기 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공하는 것이다.

[11] 본 출원의 또 다른 하나의 목적은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공하는 것이다.

[12] 본 출원의 또 다른 목적은 상기 변이체, 폴리뉴클레오티드, 및 벡터 중 어느 하나 이상을 포함하는 미생물을 제공하는 것이다.

[13] 본 출원의 또 다른 하나의 목적은 상기 미생물을 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 테트라테르펜(tetraterpene), 이의 전구체, 및 테트라테르펜을 전구체로 하는 물질 생산 방법을 제공하는 것이다.

[14] 본 출원의 또 다른 하나의 목적은 상기 변이체, 벡터, 미생물 또는 상기 미생물의 배양물을 포함하는, 테트라테르펜, 이의 전구체, 및 테트라테르펜을 전구체로 하는 물질 생산용 조성물을 제공하는 것이다.

[15] 본 출원의 또 다른 하나의 목적은 상기 변이체, 폴리뉴클레오티드, 벡터, 및 미생물 중 어느 하나 이상의 테트라테르펜, 이의 전구체, 및 테트라테르펜을 전구체로 하는 물질 생산 용도를 제공하는 것이다.

[16]

발명의 효과

[17] 본 출원의 제라닐제라닐 피로포스페이트 신타아제 변이체를 발현하는 미생물은 이를 발현하지 않는 균주에 비해 테트라테르펜, 테트라테르펜의 전구체, 또는 테트라테르펜을 전구체로 하는 물질을 효과적으로 생산할 수 있다.

[18]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[19] 이하, 본 출원 내용에 대하여 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본

출원에서 개시한 일 양태의 설명 및 실시형태는 공통된 사항에 대하여 다른 양태의 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 또한, 본 출원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 출원의 범주에 속한다. 더불어, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 출원의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[20]

[21] 본 출원의 일 양태는 서열번호 1의 아미노산 서열의 N-말단으로부터 29번, 43번, 90번, 103번, 122번, 및 141번 위치에 상응하는 아미노산 중 어느 하나 이상의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 제라닐제라닐 피로포스페이트 신타아제(Geranylgeranyl pyrophosphate synthase) 변이체를 제공한다.

[22] 상기 제라닐제라닐 피로포스페이트 신타아제 변이체는, 제라닐제라닐 피로포스페이트 신타아제 활성을 갖는 폴리펩티드 또는 제라닐제라닐 피로포스페이트 신타아제에서 서열번호 1의 N-말단으로부터 29번, 43번, 90번, 103번, 122번, 및 141번 위치에 상응하는 아미노산 중 어느 하나 이상의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 변이체를 의미한다.

[23]

[24] 본 출원에서 "제라닐제라닐 피로포스페이트 신타아제(Geranylgeranyl pyrophosphate synthase; GGS1)"는 파네실피로인산(Farnesylpyrophosphate; FPP)로부터 제라닐제라닐 피로포스페이트(Geranylgeranyl pyrophosphate synthase; GGPP)의 합성을 촉매할 수 있는 효소이다.

[25] 본 출원의 제라닐제라닐 피로포스페이트 신타아제는 본 출원에서 제공하는 제라닐제라닐 피로포스페이트 신타아제 변이체를 제조하기 위해 변형이 가해지는 제라닐제라닐 피로포스페이트 신타아제 또는 제라닐제라닐 피로포스페이트 신타아제 활성을 갖는 폴리펩티드일 수 있다. 구체적으로, 자연적으로 발생하는 폴리펩티드 또는 야생형 폴리펩티드일 수 있고, 이의 성숙 폴리펩티드일 수 있으며, 이의 변이체 또는 기능적 단편을 포함할 수 있으나 본 출원의 제라닐제라닐 피로포스페이트 신타아제 변이체의 모체(parent)가 될 수 있는 한 제한 없이 포함된다.

[26] 본 출원에서 상기 제라닐제라닐 피로포스페이트 신타아제는 이에 제한되지는 않으나, 서열번호 1의 폴리펩티드일 수 있다. 또한, 서열번호 1의 폴리펩티드와 약 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드일 수 있으며, 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드와 동일 혹은 상응하는 활성을 가지는 경우라면 제한 없이 제라닐제라닐 피로포스페이트 신타아제 범위에 포함된다.

[27] 본 출원의 제라닐제라닐 피로포스페이트 신타아제는 공지의 데이터 베이스인 NCBI의 GenBank 등에서 그 서열을 얻을 수 있다. 구체적으로 *ggs1* 유전자에 의해 코딩되는 폴리펩티드일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[28]

[29] 본 출원에서, "변이체"는 하나 이상의 아미노산이 보존적 치환(conservative

substitution) 및/또는 변형(modification)되어 상기 변이체의 변이 전 아미노산 서열과 상이하나 기능(functions) 또는 특성(properties)이 유지되는 폴리펩티드를 지칭한다. 이러한 변이체는 일반적으로 상기 폴리펩티드의 아미노산 서열 중 하나 이상의 아미노산을 변형하고, 상기 변형된 폴리펩티드의 특성을 평가하여 동정(identify)될 수 있다. 즉, 변이체의 능력은 변이 전 폴리펩티드에 비하여 증가되거나, 변하지 않거나, 또는 감소될 수 있다. 또한, 일부 변이체는 N-말단 리더 서열 또는 막전이 도메인(transmembrane domain)과 같은 하나 이상의 부분이 제거된 변형을 포함할 수 있다. 다른 변이체는 성숙 단백질(mature protein)의 N- 및/또는 C-말단으로부터 일부분이 제거된 변형을 포함할 수 있다. 상기 용어 "변이체"는 변이형, 변형, 변이형 폴리펩티드, 변이된 단백질, 변이 변이체 등의 용어(영문 표현으로는 modification, modified polypeptide, modified protein, mutant, mutein, divergent 등)가 혼용되어 사용될 수 있으며, 변이된 의미로 사용되는 용어라면 이에 제한되지 않는다.

[30] 또한, 변이체는 폴리펩티드의 특성과 2차 구조에 최소한의 영향을 갖는 아미노산들의 결실 또는 부가를 포함할 수 있다. 예를 들면 변이체의 N-말단에는 번역-동시에(co-translationally) 또는 번역-후에(post-translationally) 단백질의 이동(translocation)에 관여하는 시그널(또는 리더) 서열이 컨주게이트 될 수 있다. 또한 상기 변이체는 확인, 정제, 또는 합성할 수 있도록 다른 서열 또는 링커와 컨주게이트 될 수 있다.

[31]

[32] 본 출원의 변이체는 서열번호 1의 아미노산 서열의 N-말단으로부터 29번, 43번, 90번, 103번, 122번, 및 141번 위치에 상응하는 아미노산 중 어느 하나 이상의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 제라닐제라닐 피로포스페이트 신타아제 변이체일 수 있다. 구체적으로, 상기 29번, 43번, 90번, 103번, 122번, 및 141번 위치 중 1 이상, 2 이상, 3 이상, 4이상, 5 이상, 또는 6 이상의 위치의 아미노산이 치환된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[33] 상기 변이체의 모체가 되는 제라닐제라닐 피로포스페이트 신타아제 활성을 갖는 폴리펩티드 또는 제라닐제라닐 피로포스페이트 신타아제에 있어서, 서열번호 1의 아미노산 서열의 N-말단으로부터 29번 위치에 상응하는 아미노산은 아스파라긴; 43번 위치에 상응하는 아미노산은 페닐알라닌; 90번 위치에 상응하는 아미노산은 류신; 103번 위치에 상응하는 아미노산은 메티오닌; 122번 위치에 상응하는 아미노산은 이소류신; 및/또는 141번 위치에 상응하는 아미노산은 아르기닌일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[34] 일 구현예로 상기 변이체는, 상기 서열번호 1의 아미노산 서열의 N-말단으로부터 29번 위치에 상응하는 아미노산이 아스파라긴 외의 아미노산으로 치환; 43번 아미노산에 상응하는 아미노산이 페닐알라닌 외의 아미노산으로 치환; 90번 아미노산에 상응하는 아미노산이 류신 외의 아미노산으로 치환; 103번 아미노산에 상응하는 아미노산이 메티오닌 외의

아미노산으로 치환; 122번 아미노산에 상응하는 아미노산이 이소류신 외의 아미노산으로 치환; 및 141번 아미노산에 상응하는 아미노산이 아르기닌 외의 아미노산으로 치환 중 하나 이상의 치환을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [35] 상기 "다른 아미노산"은 치환 전 아미노산과 치환 전의 아미노산과 다른 아미노산이면 제한되지 않는다. 한편, 본 출원에서 '특정 아미노산이 치환되었다'고 표현하는 경우, 다른 아미노산으로 치환되었다고 별도로 표기하지 않더라도 치환 전의 아미노산과 다른 아미노산으로 치환되는 것임은 자명하다.
- [36] 상기 다른 아미노산으로의 치환은 비극성(nonpolar) 아미노산, 극성(polar) 아미노산, 또는 양으로 하전된(염기성) 아미노산으로의 치환일 수 있다. 구체적으로, 상기 비극성(nonpolar) 아미노산은 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 메티오닌, 및 프롤린으로 이루어지는 군에서 선택되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 극성(polar) 아미노산은 친수성(hydrophilic) 아미노산과 혼용될 수 있으며, 세린, 트레오닌, 시스테인, 티로신, 아스파라긴 및 글루타민으로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있고, 상기 양으로 하전된(염기성) 아미노산은 아르기닌, 라이신, 및 히스티딘으로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [37] 구체적으로, 본 출원의 변이체는 참조(reference) 단백질인 서열번호 1의 아미노산 서열의 29번, 43번, 90번, 103번, 122번, 및 141번 위치에 상응하는 아미노산 중 어느 하나 이상의 아미노산이 비극성 아미노산, 극성 아미노산, 또는 양으로 하전된(염기성) 아미노산 중 치환 전 아미노산과 다른 아미노산으로 치환된 변이체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 비극성 아미노산은 이소류신(Ile) 또는 발린(Val)일 수 있고, 상기 극성 아미노산은 트레오닌(Thr)일 수 있으며, 상기 양으로 하전된 아미노산은 아르기닌(Arg) 또는 라이신(Lys)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [38] 또한, 상기 다른 아미노산은 트레오닌, 이소류신, 아르기닌, 발린, 및 라이신으로 구성되는 군에서 선택되는 어느 하나인 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [39] 일 구현예로, 본 출원의 변이체는 서열번호 1의 아미노산 서열의 29번, 43번, 90번, 103번, 122번, 및 141번 위치에 상응하는 아미노산 중 어느 하나 이상의 아미노산이 트레오닌, 이소류신, 아르기닌, 발린, 및 라이신으로 구성되는 군에서 선택되는 어느 하나로 치환된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [40] 일 구현예로, 본 출원의 변이체는 서열번호 1의 아미노산 서열의 29번 위치에 상응하는 아미노산이 트레오닌으로 치환; 43번 위치에 상응하는 아미노산이 이소류신으로 치환; 90번 위치에 상응하는 아미노산이 아르기닌으로 치환; 103번 위치에 상응하는 아미노산이 이소류신으로 치환; 122번 위치에 상응하는 아미노산이 발린으로 치환; 141번 위치에 상응하는 아미노산이 라이신으로

치환; 및 이들의 조합으로 구성되는 군에서 선택되어 치환된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[41]

[42] 본 출원에서, 용어 "상응하는(corresponding to)"은, 폴리펩티드에서 열거되는 위치의 아미노산 잔기이거나, 또는 폴리펩티드에서 열거되는 잔기와 유사하거나 동일하거나 상동한 아미노산 잔기를 지칭한다. 상응하는 위치의 아미노산을 확인하는 것은 특정 서열을 참조하는 서열의 특정 아미노산을 결정하는 것일 수 있다. 본 출원에 사용된 "상응 영역"은 일반적으로 관련 단백질 또는 참조(reference) 단백질에서의 유사하거나 대응되는 위치를 지칭한다.

[43] 예를 들어, 임의의 아미노산 서열을 서열번호 1과 정렬(align)하고, 이를 토대로 상기 아미노산 서열의 각 아미노산 잔기는 서열번호 1의 아미노산 잔기와 상응하는 아미노산 잔기의 숫자 위치를 참조하여 넘버링 할 수 있다. 예를 들어, 본 출원에 기재된 것과 같은 서열 정렬 알고리즘은, 쿼리 시퀀스("참조 서열"이라고도 함)와 비교하여 아미노산의 위치, 또는 치환, 삽입 또는 결실 등의 변형이 발생하는 위치를 확인할 수 있다.

[44] 이러한 정렬에는 예를 들어 Needleman-Wunsch 알고리즘 (Needleman 및 Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453), EMBOSS 패키지의 Needle 프로그램 (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000), Trends Genet. 16: 276-277) 등을 이용할 수 있으나, 이에 제한되지 않고 당업계에 알려진 서열 정렬 프로그램, 쌍 서열(pairwise sequence) 비교 알고리즘 등을 적절히 사용할 수 있다.

[45]

[46] 일 구현예로, 본 출원의 변이체는 서열번호 1의 폴리펩티드와 약 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 가지면서, 서열번호 1의 29번, 43번, 90번, 103번, 122번, 및 141번 위치에 상응하는 아미노산 중 어느 하나 이상의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 것일 수 있다.

[47] 일 구현예로, 본 출원의 변이체는 서열번호 3, 서열번호 5, 서열번호 7, 서열번호 9, 서열번호 11, 서열번호 13, 서열번호 15 또는 서열번호 17로 기재된 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.7% 또는 99.9% 이상의 상동성 또는 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[48] 구체적으로, 본 출원의 변이체는 서열번호 3, 서열번호 5, 서열번호 7, 서열번호 9, 서열번호 11, 서열번호 13, 서열번호 15 또는 서열번호 17로 기재된 아미노산 서열을 가지거나(having), 포함하거나(comprising), 이루어지거나(consisting of), 상기 아미노산 서열로 필수적으로 이루어질(essentially consisting of) 수 있다.

[49] 일 구현예로, 본 출원의 변이체는 서열번호 1의 아미노산 서열을 기준으로 29번, 43번, 90번, 103번, 122번, 및 141번 위치에 상응하는 아미노산 중 어느 하나 이상의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환되고, 상기 서열번호 3, 서열번호 5, 서열번호 7, 서열번호 9, 서열번호 11, 서열번호 13, 서열번호 15, 또는 서열번호

17로 기재된 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.7% 또는 99.9% 이상의 상동성 또는 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

- [50] 일 구현예로, 본 출원의 변이체는 서열번호 1의 아미노산 서열의 103번째 위치에 상응하는 아미노산인 메티오닌이 이소류신으로 치환된, 서열번호 3으로 기재된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드; 서열번호 1의 아미노산 서열의 43번째 위치에 상응하는 아미노산인 페닐알라닌이 이소류신으로 치환된, 서열번호 5로 기재된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드; 서열번호 1의 아미노산 서열의 29번째 위치에 상응하는 아미노산인 아스파라긴이 트레오닌으로 치환 및 90번째 위치에 상응하는 아미노산인 류신이 아르기닌으로 치환된, 서열번호 7로 기재된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드; 서열번호 1의 아미노산 서열의 29번째 위치에 상응하는 아미노산인 아스파라긴이 트레오닌으로 치환된, 서열번호 9로 기재된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드; 서열번호 1의 아미노산 서열의 90번째 위치에 상응하는 아미노산인 류신이 아르기닌으로 치환된, 서열번호 11로 기재된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드; 서열번호 1의 아미노산 서열의 122번째 위치에 상응하는 아미노산인 이소류신이 발린으로 치환 및 141번째 위치에 상응하는 아미노산인 아르기닌이 라이신으로 치환된, 서열번호 13으로 기재된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드; 서열번호 1의 아미노산 서열의 122번째 위치에 상응하는 아미노산인 이소류신이 발린으로 치환된, 서열번호 15으로 기재된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드; 및 서열번호 1의 아미노산 서열의 141번째 위치에 상응하는 아미노산인 아르기닌이 라이신으로 치환된, 서열번호 17로 기재된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[51]

[52]

- [53] *또한, 이러한 상동성 또는 동일성을 가지며 본 출원의 변이체에 상응하는 효능을 나타내는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환, 보존적 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 변이체도 본 출원의 범위 내에 포함됨은 자명하다.

- [54] 예를 들어, 상기 아미노산 서열 N-말단, C-말단 그리고/또는 내부에 본 출원의 변이체의 기능을 변경하지 않는 서열 추가 또는 결실, 자연적으로 발생할 수 있는 돌연변이, 잠재성 돌연변이 (silent mutation) 또는 보존적 치환을 가지는 경우이다.

- [55] 상기 "보존적 치환(conservative substitution)"은 한 아미노산을 유사한 구조적 및/또는 화학적 성질을 갖는 또 다른 아미노산으로 치환시키는 것을 의미한다. 이러한 아미노산 치환은 일반적으로 잔기의 극성, 전하, 용해도, 소수성, 친수성 및/또는 양친매성(amphipathic nature)에서의 유사성에 근거하여 발생할 수 있다.

통상적으로, 보존적 치환은 단백질 또는 폴리펩티드의 활성화에 거의 영향을 미치지 않거나 또는 영향을 미치지 않을 수 있다.

[56]

[57] 본 출원에서 용어, '상동성 (homology)' 또는 '동일성 (identity)'은 두 개의 주어진 아미노산 서열 또는 염기 서열 상호간 유사한 정도를 의미하며 백분율로 표시될 수 있다. 용어 상동성 및 동일성은 종종 상호교환적으로 이용될 수 있다.

[58] 보존된(conserved) 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 서열 상동성 또는 동일성은 표준 배열 알고리즘에 의해 결정되며, 사용되는 프로그램에 의해 확립된 디폴트 갭 페널티가 함께 이용될 수 있다. 실질적으로, 상동성을 갖거나(homologous) 또는 동일한(identical) 서열은 일반적으로 서열 전체 또는 일부분과 중간 또는 높은 엄격한 조건(stringent conditions)에서 하이브리드할 수 있다. 하이브리드화는 폴리뉴클레오티드에서 일반 코돈 또는 코돈 축퇴성을 고려한 코돈을 함유하는 폴리뉴클레오티드와의 하이브리드화 역시 포함됨이 자명하다.

[59] 임의의 두 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열이 상동성, 유사성 또는 동일성을 갖는지 여부는, 예를 들어, Pearson et al (1988) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85]: 2444에서와 같은 디폴트 파라미터를 이용하여 "FASTA" 프로그램과 같은 공지의 컴퓨터 알고리즘을 이용하여 결정될 수 있다. 또는, EMBOSS 패키지의 니들만 프로그램(EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277)(버전 5.0.0 또는 이후 버전)에서 수행되는 바와 같은, 니들만-운치(Needleman-Wunsch) 알고리즘(Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453)이 사용되어 결정될 수 있다(GCG 프로그램 패키지 (Devereux, J., et al, Nucleic Acids Research 12: 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, [S.] [F.,] [ET AL, J MOLEC BIOL 215]: 403 (1990); Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, [ED.,] Academic Press, San Diego, 1994, 및 [CARILLO ETA/.](1988) SIAM J Applied Math 48: 1073을 포함한다). 예를 들어, 국립 생물공학 정보 데이터베이스 센터의 BLAST, 또는 ClustalW를 이용하여 상동성, 유사성 또는 동일성을 결정할 수 있다.

[60] 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 상동성, 유사성 또는 동일성은, 예를 들어, Smith and Waterman, Adv. Appl. Math (1981) 2:482 에 공지된 대로, 예를 들면, Needleman et al. (1970), J Mol Biol. 48:443과 같은 GAP 컴퓨터 프로그램을 이용하여 서열 정보를 비교함으로써 결정될 수 있다. 요약하면, GAP 프로그램은 두 서열 중 더 짧은 것에서의 기호의 전체 수로, 유사한 배열된 기호(즉, 뉴클레오티드 또는 아미노산)의 수를 나눈 값으로 정의할 수 있다. GAP 프로그램을 위한 디폴트 파라미터는 (1) 이진법 비교 매트릭스(동일성을 위해 1 그리고 비-동일성을 위해 0의 값을 함유함) 및 Schwartz and Dayhoff, eds., Atlas Of Protein Sequence And Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358 (1979)에 의해 개시된 대로, Gribskov et al(1986) Nucl. Acids Res. 14:

6745의 가중된 비교 매트릭스 (또는 EDNAFULL (NCBI NUC4.4의 EMBOSS 버전) 치환 매트릭스); (2) 각 갭을 위한 3.0의 페널티 및 각 갭에서 각 기호를 위한 추가의 0.10 페널티 (또는 갭 개방 페널티 10, 갭 연장 페널티 0.5); 및 (3) 말단 갭을 위한 무 페널티를 포함할 수 있다.

[61]

[62] 일 구현예로, 본 출원의 변이체는 제라닐제라닐 피로포스페이트 신타아제 활성을 가질 수 있다. 일 구현예로, 본 출원의 변이체는 야생형 혹은 비변이 제라닐제라닐 피로포스페이트 신타아제에 비해, 테트라테르펜, 테트라테르펜의 전구체 또는 테트라테르펜을 전구체로 하는 물질 생산능이 증가하도록 하는 활성을 가질 수 있다. 일 구현예로, 본 출원의 변이체는 야생형 혹은 제라닐제라닐 피로포스페이트 신타아제에 비해, 테트라테르펜, 테트라테르펜의 전구체 또는 테트라테르펜을 전구체로 하는 물질 생산경로의 부산물 생산수준이 감소하도록 하는 활성을 가질 수 있다. 일 구현예로, 본 출원의 변이체는 야생형 혹은 제라닐제라닐 피로포스페이트 신타아제에 비해, 스쿠알렌 생산수준이 감소하도록 하는 활성을 가질 수 있다. 일 구현예로, 본 출원의 변이체는 야생형 혹은 비변이 제라닐제라닐 피로포스페이트 신타아제에 비해, 강화된 활성을 가지는 것일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[63]

[64] 본 출원의 다른 하나의 양태는 본 출원의 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[65] 본 출원에서 용어, "폴리뉴클레오티드"는 뉴클레오티드 단위체(monomer)가 공유결합에 의해 길게 사슬모양으로 이어진 뉴클레오티드의 중합체(polymer)로 일정한 길이 이상의 DNA 또는 RNA 가닥으로서, 보다 구체적으로는 제라닐제라닐 피로포스페이트 활성을 갖는 상기 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 단편을 의미한다.

[66] 본 출원의 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 3, 서열번호 5, 서열번호 7, 서열번호 9, 서열번호 11, 서열번호 13, 서열번호 15, 또는 서열번호 17로 기재된 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열을 포함할 수 있다. 일 구현예로, 본 출원의 폴리뉴클레오티드는 서열번호 4, 서열번호 6, 서열번호 8, 서열번호 10, 서열번호 12, 서열번호 14, 서열번호 16 또는 서열번호 18의 서열을 가지거나 포함할 수 있다. 또한, 본 출원의 폴리뉴클레오티드는 서열번호 4, 서열번호 6, 서열번호 8, 서열번호 10, 서열번호 12, 서열번호 14, 서열번호 16 또는 서열번호 18의 서열로 이루어지거나, 필수적으로 구성될 수 있다.

[67] 본 출원의 폴리뉴클레오티드는 코돈의 축퇴성(degeneracy) 또는 본 출원의 변이체를 발현시키고자 하는 생물에서 선호되는 코돈을 고려하여, 본 출원의 변이체의 아미노산 서열을 변화시키지 않는 범위 내에서 코딩 영역에 다양한 변형이 이루어질 수 있다. 구체적으로, 본 출원의 폴리뉴클레오티드는 서열번호 4, 서열번호 6, 서열번호 8, 서열번호 10, 서열번호 12, 서열번호 14, 서열번호 16

또는 서열번호 18의 서열과 상동성 또는 동일성이 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 및 100% 미만인 염기서열을 가지거나 포함하거나, 또는 서열번호 4, 서열번호 6, 서열번호 8, 서열번호 10, 서열번호 12, 서열번호 14, 서열번호 16 또는 서열번호 18의 서열과 상동성 또는 동일성이 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 및 100% 미만인 염기서열로 이루어지거나 필수적으로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [68] 이때, 상기 상동성 또는 동일성을 갖는 서열의, 서열번호 4, 서열번호 6, 서열번호 8, 서열번호 10, 서열번호 12, 서열번호 14, 서열번호 16 또는 서열번호 18의 29번, 43번, 90번, 103번, 122번, 및 141번 위치에 상응하는 아미노산을 코딩하는 코돈은, 트레오닌, 이소류신, 아르기닌, 발린, 또는 라이신을 코딩하는 코돈 중 하나일 수 있다.
- [69] 또한, 본 출원의 폴리뉴클레오티드는 공지의 유전자 서열로부터 제조될 수 있는 프로브, 예를 들면, 본 출원의 폴리뉴클레오티드 서열의 전체 또는 일부에 대한 상보 서열과 엄격한 조건 하에 하이브리드화할 수 있는 서열이라면 제한 없이 포함될 수 있다. 상기 "엄격한 조건(stringent condition)"이란 폴리뉴클레오티드 간의 특이적 혼성화를 가능하게 하는 조건을 의미한다. 이러한 조건은 문헌(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, 9.50-9.51, 11.7-11.8 참조)에 구체적으로 기재되어 있다. 예를 들어, 상동성 또는 동일성이 높은 폴리뉴클레오티드끼리, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 갖는 폴리뉴클레오티드끼리 하이브리드화하고, 그보다 상동성 또는 동일성이 낮은 폴리뉴클레오티드끼리 하이브리드화하지 않는 조건, 또는 통상의 써던 하이브리드화(southern hybridization)의 세척 조건인 60°C, 1XSSC, 0.1% SDS, 구체적으로 60°C, 0.1XSSC, 0.1% SDS, 보다 구체적으로 68°C, 0.1XSSC, 0.1% SDS에 상당하는 염 농도 및 온도에서, 1회, 구체적으로 2회 내지 3회 세정하는 조건을 열거할 수 있다.
- [70] 혼성화는 비록 혼성화의 엄격도에 따라 염기 간의 미스매치(mismatch)가 가능할지라도, 두 개의 핵산이 상보적 서열을 가질 것을 요구한다. 용어, "상보적"은 서로 혼성화가 가능한 뉴클레오티드 염기 간의 관계를 기술하는데 사용된다. 예를 들면, DNA에 관하여, 아데닌은 티민에 상보적이며 시토신은 구아닌에 상보적이다. 따라서, 본 출원의 폴리뉴클레오티드는 또한 실질적으로 유사한 핵산 서열뿐만 아니라 전체 서열에 상보적인 단리된 핵산 단편을 포함할 수 있다.
- [71] 구체적으로, 본 출원의 폴리뉴클레오티드와 상동성 또는 동일성을 가지는 폴리뉴클레오티드는 55 °C의 T_m 값에서 혼성화 단계를 포함하는 혼성화 조건을

사용하고 상술한 조건을 사용하여 탐지할 수 있다. 또한, 상기 T_m 값은 60 °C, 63 °C, 또는 65 °C일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니고 그 목적에 따라 당업자에 의해 적절히 조절될 수 있다.

- [72] 상기 폴리뉴클레오티드를 혼성화하는 적절한 엄격도는 폴리뉴클레오티드의 길이 및 상보성 정도에 의존하고 변수는 해당기술분야에 잘 알려져 있다(예컨대, J. Sambrook et al., 상동).
- [73]
- [74] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 본 출원의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공한다. 상기 벡터는 상기 폴리뉴클레오티드를 숙주세포에서 발현시키기 위한 발현 벡터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [75] 본 출원의 벡터는 적합한 숙주 내에서 목적 폴리펩티드를 발현시킬 수 있도록 적합한 발현조절영역(또는 발현조절서열)에 작동 가능하게 연결된 상기 목적 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 염기서열을 포함하는 DNA 제조물을 포함할 수 있다. 상기 발현조절영역은 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. 벡터는 적당한 숙주세포 내로 형질전환된 후, 숙주 게놈과 무관하게 복제되거나 기능할 수 있으며, 게놈 그 자체에 통합될 수 있다.
- [76] 본 출원에서 사용되는 벡터는 특별히 한정되지 않으며, 당업계에 알려진 임의의 벡터를 이용할 수 있다. 통상 사용되는 벡터의 예로는 천연 상태이거나 재조합된 상태의 플라스미드, 코스미드, 바이러스 및 박테리오파지를 들 수 있다. 예를 들어, 파지 벡터 또는 코스미드 벡터로서 pWE15, M13, MBL3, MBL4, IXII, ASHII, APII, t10, t11, Charon4A, 및 Charon21A 등을 사용할 수 있으며, 플라스미드 벡터로서 pDC계, pBR계, pUC계, pBluescriptII계, pGEM계, pTZ계, pCL계 및 pET계 등을 사용할 수 있다. 구체적으로는 pDC, pDCM2(대한민국 공개특허공보 제10-2020-0136813호), pACYC177, pACYC184, pCL, pECCG117, pUC19, pBR322, pMW118, pCC1BAC, pIMR53 벡터 등을 사용할 수 있다.
- [77] 일례로 세포 내 염색체 삽입용 벡터를 통해 목적 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 염색체 내로 삽입할 수 있다. 상기 폴리뉴클레오티드의 염색체 내로의 삽입은 당업계에 알려진 임의의 방법, 예를 들면, 상동재조합(homologous recombination)에 의하여 이루어질 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다. 상기 염색체 삽입 여부를 확인하기 위한 선별 마커(selection marker)를 추가로 포함할 수 있다. 상기 선별 마커는 벡터로 형질전환된 세포를 선별, 즉 목적 핵산 분자의 삽입 여부를 확인하기 위한 것으로, 약물 내성, 영양 요구성, 세포 독성제에 대한 내성 또는 표면 폴리펩티드의 발현과 같은 선택가능 표현형을 부여하는 마커들이 사용될 수 있다. 선택제(selective agent)가 처리된 환경에서는 선별 마커를 발현하는 세포만 생존하거나 다른 표현 형질을 나타내므로, 형질전환된 세포를 선별할 수 있다.

- [78] 본 출원에서 용어 "형질전환"은 표적 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 숙주세포 혹은 미생물 내에 도입하여 숙주세포 내에서 상기 폴리뉴클레오티드가 코딩하는 폴리펩티드가 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 목적 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 및/또는 RNA를 포함한다. 상기 폴리뉴클레오티드는 숙주세포 내로 도입되어 발현될 수 있는 것이면, 어떠한 형태로도 도입될 수 있다. 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 벡터 형태일 수 있다. 또한, 상기 폴리뉴클레오티드는 그 자체의 형태로 숙주세포에 도입되어 숙주세포에서 발현에 필요한 서열과 작동 가능하게 연결되어 있는 것일 수도 있으며, 이에 제한되지 않는다.
- [79] 또한, 상기에서 용어 "작동 가능하게 연결"된 것이란 본 출원의 목적 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 전사를 개시 및 매개하도록 하는 프로모터 서열과 상기 폴리뉴클레오티드 서열이 기능적으로 연결되어 있는 것을 의미한다.
- [80]
- [81] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 본 출원의 변이체; 상기 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 및 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 중 어느 하나 이상을 포함하는, 미생물을 제공한다.
- [82] 본 출원에서 용어, "미생물" 또는 "균주"는 야생형 미생물이나 자연적 또는 인위적으로 유전적 변형이 일어난 미생물을 모두 포함하며, 외부 유전자가 삽입되거나 내재적 유전자의 활성이 강화되거나 불활성화되는 등의 원인으로 인해서 특정 기작이 약화되거나 강화된 미생물로서, 목적하는 폴리펩티드, 단백질 또는 산물의 생산을 위하여 유전적 변형(modification)을 포함하는 미생물일 수 있다.
- [83] 본 출원의 미생물은 본 출원의 변이체, 본 출원의 폴리뉴클레오티드 및 본 출원의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 중 어느 하나 이상을 포함하는 미생물; 본 출원의 변이체 또는 본 출원의 폴리뉴클레오티드를 발현하도록 변형된 미생물; 본 출원의 변이체, 또는 본 출원의 폴리뉴클레오티드를 발현하는 미생물; 또는 본 출원의 변이체 활성을 갖는 미생물 (예컨대, 재조합 미생물)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 미생물은 라이코펜 사이클라제/파이토엔 신타아제(lycopene cyclase/phytoene synthase, crtYB) 및 파이토엔

디새튜라아제(phytoene desaturase, crtI) 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 더 포함하도록 변형되어, 이들 단백질 활성을 나타내는 미생물 또는 이들 단백질 활성이 강화된 미생물일 수 있다. 상기 라이코펜 사이클라제/파이토엔 신타아제 또는 파이토엔 디새튜라아제는 크산토피로마이세스 텐드로하우스(*Xanthophyllomyces dendrorhous*) 유래의 단백질일 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 일 구체예로 상기 라이코펜 사이클라제/파이토엔 신타아제 또는 파이토엔 디새튜라아제를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 각각 서열번호 27 또는 서열번호 28의 서열을 가지거나 포함하는 것일 수 있다. 상기 폴리뉴클레오티드는 코돈의 축퇴성(degeneracy) 또는 본 출원의 변이체를 발현시키고자 하는 미생물에서 선호되는 코돈을 고려하여, 아미노산 서열을 변화시키지 않는 범위 내에서 코딩 영역에 다양한 변형이 이루어질 수 있다. 구체적으로, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 27 또는 서열번호 28의 서열과 상동성 또는 동일성이 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 및 100% 미만인 염기서열을 가지거나 포함하거나, 또는 서열번호 27 또는 서열번호 28의 서열과 상동성 또는 동일성이 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 및 100% 미만인 염기서열로 이루어지거나 필수적으로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[84]

[85] 본 출원의 미생물은 테트라테르펜, 테트라테르펜의 전구체 또는 테트라테르펜을 전구체로 하는 물질을 생산하는 것일 수 있으며, 테트라테르펜 생산 경로에서 생성되는 부산물 생산이 감소된 것일 수 있고, 스쿠알렌 생산이 감소된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[86]

[87] 본 출원에서 "테트라테르펜(tetraterpene)"은 테르펜(terpene) 중에서 이소프렌(isoprene)이 8개가 중합된 폴리머(C40)를 의미하며, 테트라테르펜계 물질을 포함할 수 있다. 상기 테르펜은 이소프렌 단위의 중합체이고, 두 개의 이소프렌(C5) 단위가 중합된 테르펜은 모노테르펜(monoterpene, C10), 및 세 개의 이소프렌 단위가 중합된 테르펜은 세스퀴테르펜(Sesquiterpene, C15)이며, 이와 같이 테르펜은 중합된 이소프렌 단위 개수에 따라 구분될 수 있다.

[88] 구체적으로, 상기 테트라테르펜은 카로티노이드(carotenoid)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[89] 본 출원에서 테트라테르펜의 전구체는 제라닐제라닐

피로포스페이트(Geranylgeranyl Pyrophosphate; GGPP)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[90] 본 출원에서 테트라테르펜을 전구체로 하는 물질은 레티날(retinal) 및 레티놀(retinol)로 구성되는 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [91] 본 출원에서 "테트라테르페노이드(tetraterpenoid)"는 변형된 테트라테르펜이다. 상기 테트라테르페노이드는 작용기가 결합된 테트라테르펜일 수 있다.
- [92] 본 출원에서 "카로티노이드(carotenoid)"는 과일 및 야채에서 노란색 등의 색을 내게 하는 테트라테르펜 또는 이의 유도체로서, 상기 테트라테르펜 및 테트라테르페노이드와 혼용될 수 있다.
- [93] 구체적으로, 상기 카로티노이드는 크산토틸(xanthophyll), 카로틴(carotene), 알파카로틴(alpha-carotene), 베타카로틴(beta-carotene), 감마카로틴(gamma-carotene), 루테인(lutein), 라이코펜(lycopene), 제아잔틴(Zeaxanthin), 캡산틴(Capsanthin), 칸타잔틴(Canthaxanthin), 및 아스타잔틴(Astaxanthin)으로 구성되는 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [94] 본 출원에서 카로티노이드의 전구체는 제라닐제라닐 피로포스페이트(Geranylgeranyl Pyrophosphate; GGPP)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [95] 본 출원에서 카로티노이드를 전구체로 하는 물질은 레티날(retinal) 및 레티놀(retinol)로 구성되는 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [96] 본 출원에서 "베타카로틴"은 카로티노이드계 물질 중 하나로서, 카로틴 중에서 분자 양쪽 끝 단에 베타 고리를 갖는다.
- [97] 본 출원에서 베타카로틴의 전구체는 피토엔(phytoene), 피토플루엔(phytofluene), 라이코펜(lycopene), 및 감마카로틴(gamma-carotene)으로 구성되는 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [98] 본 출원에서 베타카로틴을 전구체로 하는 물질은 레티날(retinal), 레티놀(retinol), 및 비타민 A으로 구성되는 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [99] 상기 테트라테르펜, 테트라테르펜의 전구체 또는 테트라테르펜을 전구체로 하는 물질은 카로티노이드, 카로티노이드의 전구체 또는 카로티노이드를 전구체로 하는 물질일 수 있고, 베타카로틴, 베타카로틴의 전구체, 또는 베타카로틴을 전구체로 하는 물질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [100] 본 출원에서 상기 변이체, 폴리뉴클레오티드, 벡터, 및 미생물 중 어느 하나 이상은 테트라테르펜 생산을 위한 것일 수 있으며, 상기 미생물은 테트라테르펜을 생산하는 것일 수 있고, 테트라테르펜의 전구체를 생산하거나 테트라테르펜을 전구체로 하는 물질을 생산하는 것일 수 있다.
- [101] 본 출원에서 상기 변이체, 폴리뉴클레오티드, 벡터, 및 미생물 중 어느 하나 이상은 카로티노이드 생산을 위한 것일 수 있으며, 상기 미생물은 카로티노이드를 생산하는 것일 수 있고, 카로티노이드의 전구체를 생산하거나

카로티노이드를 전구체로 하는 물질을 생산하는 것일 수 있다.

- [102] 본 출원에서 상기 변이체, 폴리뉴클레오티드, 벡터, 및 미생물 중 어느 하나 이상은 베타카로틴 생산을 위한 것일 수 있으며, 상기 미생물은 베타카로틴을 생산하는 것일 수 있고, 베타카로틴의 전구체를 생산하거나 베타카로틴을 전구체로 하는 물질을 생산하는 것일 수 있다.
- [103] 일 구현예로, 제라닐제라닐 피로포스페이트(geranylgeranyl pyrophosphate; GGPP)는 이소프레노이드(isoprenoid) 생합성 경로에서 제라닐제라닐 피로포스페이트 신타아제에 의해 생산되므로, 상기 미생물은 제라닐제라닐 피로포스페이트도 생산하는 것일 수 있다.
- [104]
- [105] *본 출원에서 테트라테르펜 생산 경로에서 생성되는 부산물은, 테트라테르펜, 테트라테르펜의 전구체, 및 테트라테르펜을 전구체로 하는 물질 이외의 물질을 의미하며, 구체적으로는 스쿠알렌(squalene)일 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 베타카로틴은 카로티노이드(Carotenoid) 또는 이소프레노이드 생산 경로에서 생산될 수 있는 것으로서, 그 과정에서 스쿠알렌 신타아제(squalene synthase; ERG9)에 의해 파네실 피로포스페이트(FPP, C15) 2분자를 소모하여 스쿠알렌(C30)이 부산물로 함께 생산될 수 있다.
- [106] 본 출원에서 "스쿠알렌"은 불포화 탄화수소($C_{30}H_{50}$)로서, 스테로이드 호르몬, 비타민 D 등의 생합성에도 이용되는 물질이다. 본 출원의 미생물은 테트라테르펜 생산 경로에서 생성되는 부산물을 감소시킨 것일 수 있으며, 구체적으로 스쿠알렌 생산을 감소시킨 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [107]
- [108] 본 출원의 미생물 또는 균주는 자연적으로 제라닐제라닐 피로포스페이트 신타아제 또는 테트라테르펜 생산능을 가지고 있는 미생물, 또는 제라닐제라닐 피로포스페이트 신타아제 또는 테트라테르펜 생산능이 없는 모균주에 본 출원의 변이체 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 (또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터)가 도입되거나 및/또는 테트라테르펜, 테트라테르펜의 전구체 또는 테트라테르펜을 전구체로 하는 물질의 생산능이 부여된 미생물일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [109] 일 예로, 본 출원의 미생물 또는 균주는 본 출원의 폴리뉴클레오티드 또는 본 출원의 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터로 형질 전환되어, 본 출원의 변이체를 발현하는 세포 또는 미생물로서, 본 출원의 목적상 본 출원의 미생물 또는 균주는 본 출원의 변이체를 포함하여 테트라테르펜, 테트라테르펜의 전구체 또는 테트라테르펜을 전구체로 하는 물질을 생산할 수 있는 미생물을 모두 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 출원의 미생물 또는 균주는 천연의 야생형 미생물 또는 테트라테르펜을 생산하는 미생물에 본 출원의 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 도입됨으로써 제라닐제라닐 피로포스페이트 신타아제 변이체가 발현되어, 테트라테르펜,

테트라테르펜의 전구체 또는 테트라테르펜을 전구체로 하는 물질의 생산능이 증가된 제조합 균주일 수 있다. 상기 제조합 균주는, 천연의 야생형 미생물 또는 제라닐제라닐 피로포스페이트 신타아제 비변형 미생물 (즉, 야생형 제라닐제라닐 피로포스페이트 신타아제를 발현하는 미생물)에 비하여 테트라테르펜, 테트라테르펜의 전구체 또는 테트라테르펜을 전구체로 하는 물질의 생산능이 증가된 미생물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[110]

[111] 일 예로, 상기 제조합 균주는 변이 전 모균주 또는 비변형 미생물의 테트라테르펜, 테트라테르펜의 전구체 또는 테트라테르펜을 전구체로 하는 물질의 생산능에 비하여 약 1% 이상, 구체적으로는 약 3%, 약 5% 이상 높아진 것일 수 있으나, 변이 전 모균주 또는 비변형 미생물의 생산능에 비해 +값의 증가량을 갖는 한, 이에 제한되지 않는다.

[112] 다른 예로, 상기 제조합 균주는 변이 전 모균주 또는 비변형 미생물에 비하여 테트라테르펜 생산 경로에서 생성되는 부산물의 생산량이 약 85% 이하, 약 80% 이하, 약 75% 이하, 약 70% 이하, 약 65% 이하, 약 60% 이하, 약 55% 이하, 약 50% 이하, 약 30% 이하, 또는 약 10% 이하로 낮아진 것일 수 있고, 또는 부산물이 생산되지 않는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[113] 상기 용어 "약(about)"은 ± 0.5 , ± 0.4 , ± 0.3 , ± 0.2 , ± 0.1 등을 모두 포함하는 범위로, 약 이란 용어 뒤에 나오는 수치와 동등하거나 유사한 범위의 수치를 모두 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[114]

[115] 본 출원에서 용어, "비변형 미생물"은 미생물에 자연적으로 발생할 수 있는 돌연변이를 포함하는 균주를 제외하는 것이 아니며, 야생형 균주 또는 천연형 균주 자체이거나, 자연적 또는 인위적 요인에 의한 유전적 변이로 형질이 변화되기 전 균주를 의미할 수 있다. 예를 들어, 상기 비변형 미생물은 본 출원의 제라닐제라닐 피로포스페이트 신타아제 변이체가 도입되지 않거나 도입되기 전의 균주를 의미할 수 있다. 상기 "비변형 미생물"은 "변형 전 균주", "변형 전 미생물", "비변이 균주", "비변형 균주", "비변이 미생물" 또는 "기준 미생물"과 혼용될 수 있다.

[116] 일 구현예로, 본 출원의 미생물은 야로위아(*Yarrowia sp.*) 속 미생물일 수 있고, 구체적으로 야로위아 리폴리티카 (*Yarrowia lipolytica*)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[117]

[118] 본 출원에서 용어, 폴리펩티드 활성의 "강화"는, 폴리펩티드의 활성이 내재적 활성에 비하여 증가되는 것을 의미한다. 상기 강화는 활성화(activation), 상향조절(up-regulation), 과발현(overexpression), 증가(increase) 등의 용어와 혼용될 수 있다. 여기서 활성화, 강화, 상향조절, 과발현, 증가는 본래 가지고 있지 않았던 활성을 나타내게 되는 것, 또는 내재적 활성 또는 변형 전 활성에

비하여 향상된 활성을 나타내게 되는 것을 모두 포함할 수 있다. 상기 "내재적 활성"은 자연적 또는 인위적 요인에 의한 유전적 변이로 형질이 변화하는 경우, 형질 변화 전 모균주 또는 비변형 미생물이 본래 가지고 있던 특정 폴리펩티드의 활성을 의미한다. 이는 "변형 전 활성"과 혼용되어 사용될 수 있다. 폴리펩티드의 활성이 내재적 활성에 비하여 "강화", "상향조절", "과발현" 또는 "증가"한다는 것은, 형질 변화 전 모균주 또는 비변형 미생물이 본래 가지고 있던 특정 폴리펩티드의 활성 및/또는 농도(발현량)에 비하여 향상된 것을 의미한다.

- [119] 상기 강화는 외래의 폴리펩티드를 도입하거나, 내재적인 폴리펩티드의 활성 강화 및/또는 농도(발현량)를 통해 달성할 수 있다. 상기 폴리펩티드의 활성의 강화 여부는 해당 폴리펩티드의 활성 정도, 발현량 또는 해당 폴리펩티드로부터 배출되는 산물의 양의 증가로부터 확인할 수 있다.
- [120] 상기 폴리펩티드의 활성의 강화는 당해 분야에 잘 알려진 다양한 방법의 적용이 가능하며, 목적 폴리펩티드의 활성을 변형전 미생물보다 강화시킬 수 있는 한, 제한되지 않는다. 구체적으로, 분자생물학의 일상적 방법인 당업계의 통상의 기술자에게 잘 알려진 유전자 공학 및/또는 단백질 공학을 이용한 것일 수 있으나, 이로 제한되지 않는다(예컨대, Sitnicka et al. *Functional Analysis of Genes*. *Advances in Cell Biology*. 2010, Vol. 2. 1-16, Sambrook et al. *Molecular Cloning* 2012 등).
- [121] 구체적으로, 본 출원의 폴리펩티드의 강화는
- [122] 1) 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 세포 내 카피수 증가;
- [123] 2) 폴리펩티드를 코딩하는 염색체상의 유전자 발현조절영역을 활성이 강력한 서열로 교체;
- [124] 3) 폴리펩티드를 코딩하는 유전자 전사체의 개시코돈 또는 5'-UTR 지역을 코딩하는 염기서열의 변형;
- [125] 4) 폴리펩티드 활성이 강화되도록 상기 폴리펩티드의 아미노산 서열의 변형;
- [126] 5) 폴리펩티드 활성이 강화되도록 상기 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열의 변형 (예를 들어, 폴리펩티드의 활성이 강화되도록 변형된 폴리펩티드를 코딩하도록 상기 폴리펩티드 유전자의 폴리뉴클레오티드 서열의 변형);
- [127] 6) 폴리펩티드의 활성을 나타내는 외래 폴리펩티드 또는 이를 코딩하는 외래 폴리뉴클레오티드의 도입;
- [128] 7) 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 코돈 최적화;
- [129] 8) 폴리펩티드의 삼차구조를 분석하여 노출 부위를 선택하여 변형하거나 화학적으로 수식; 또는
- [130] 9) 상기 1) 내지 8) 중 선택된 2 이상의 조합일 수 있으나, 이에, 특별히 제한되는 것은 아니다.
- [131] 보다 구체적으로,
- [132] 상기 1) 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 세포 내 카피수 증가는,

해당 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 작동가능하게 연결된, 숙주와 무관하게 복제되고 기능할 수 있는 벡터의 숙주세포 내로의 도입에 의해 달성되는 것일 수 있다. 또는, 해당 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 숙주세포 내의 염색체 내에 1 카피 또는 2 카피 이상 도입에 의해 달성되는 것일 수 있다. 상기 염색체 내에 도입은 숙주세포 내의 염색체 내로 상기 폴리뉴클레오티드를 삽입시킬 수 있는 벡터가 숙주세포 내에 도입됨으로써 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 벡터는 전술한 바와 같다.

- [133] 상기 2) 폴리펩티드를 코딩하는 염색체상의 유전자 발현조절영역(또는 발현조절서열)을 활성이 강력한 서열로 교체는, 예를 들면, 상기 발현조절영역의 활성을 더욱 강화하도록 결실, 삽입, 비보존적 또는 보존적 치환 또는 이들의 조합으로 서열상의 변이 발생, 또는 더욱 강한 활성을 가지는 서열로의 교체일 수 있다. 상기 발현조절영역은, 특별히 이에 제한되지 않으나 프로모터, 오퍼레이터 서열, 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열, 그리고 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열 등을 포함할 수 있다. 일 예로, 본래의 프로모터를 강력한 프로모터로 교체시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [134] 공지된 강력한 프로모터의 예에는 *cj1* 내지 *cj7* 프로모터(미국등록특허 US 7662943 B2), *lac* 프로모터, *trp* 프로모터, *trc* 프로모터, *tac* 프로모터, 람다 파아지 PR 프로모터, PL 프로모터, *tet* 프로모터, *gapA* 프로모터, SPL7 프로모터, SPL13(sm3) 프로모터(미국등록특허 US 10584338 B2), O2 프로모터(미국등록특허 US 10273491 B2), *tkl* 프로모터, *yccA* 프로모터 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [135] 상기 3) 폴리펩티드를 코딩하는 유전자 전사체의 개시코돈 또는 5'-UTR 지역을 코딩하는 염기서열 변형은, 예를 들면, 내재적 개시코돈에 비해 폴리펩티드 발현율이 더 높은 다른 개시코돈을 코딩하는 염기 서열로 치환하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [136] 상기 4) 및 5)의 아미노산 서열 또는 폴리뉴클레오티드 서열의 변형은, 폴리펩티드의 활성을 강화하도록 상기 폴리펩티드의 아미노산 서열 또는 상기 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 결실, 삽입, 비보존적 또는 보존적 치환 또는 이들의 조합으로 서열상의 변이 발생, 또는 더욱 강한 활성을 갖도록 개량된 아미노산 서열 또는 폴리뉴클레오티드 서열 또는 활성이 증가하도록 개량된 아미노산 서열 또는 폴리뉴클레오티드 서열로의 교체일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 교체는 구체적으로 상동재조합에 의하여 폴리뉴클레오티드를 염색체내로 삽입함으로써 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 이때 사용되는 벡터는 염색체 삽입 여부를 확인하기 위한 선별 마커 (selection marker)를 추가로 포함할 수 있다. 상기 선별 마커는 전술한 바와 같다.
- [137] 상기 6) 폴리펩티드의 활성을 나타내는 외래 폴리뉴클레오티드의 도입은, 상기 폴리펩티드와 동일/유사한 활성을 나타내는 폴리펩티드를 코딩하는 외래

폴리뉴클레오티드의 숙주세포 내 도입될 수 있다. 상기 외래 폴리뉴클레오티드는 상기 폴리펩티드와 동일/유사한 활성을 나타내는 한 그 유래나 서열에 제한이 없다. 상기 도입에 이용되는 방법은 공지된 형질전환 방법을 당업자가 적절히 선택하여 수행될 수 있으며, 숙주 세포 내에서 상기 도입된 폴리뉴클레오티드가 발현됨으로써 폴리펩티드가 생성되어 그 활성이 증가될 수 있다.

- [138] 상기 7) 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 코돈 최적화는, 내재 폴리뉴클레오티드가 숙주세포 내에서 전사 또는 번역이 증가하도록 코돈 최적화한 것이거나, 또는 외래 폴리뉴클레오티드가 숙주세포 내에서 최적화된 전사, 번역이 이루어지도록 이의 코돈을 최적화한 것일 수 있다.
- [139] 상기 8) 폴리펩티드의 삼차구조를 분석하여 노출 부위를 선택하여 변형하거나 화학적으로 수식하는 것은, 예를 들어 분석하고자 하는 폴리펩티드의 서열정보를 기지 단백질들의 서열정보가 저장된 데이터베이스와 비교함으로써 서열의 유사성 정도에 따라 주형 단백질 후보를 결정하고 이를 토대로 구조를 확인하여, 변형하거나 화학적으로 수식할 노출 부위를 선택하여 변형 또는 수식하는 것일 수 있다.
- [140] 이와 같은 폴리펩티드 활성의 강화는, 상응하는 폴리펩티드의 활성 또는 농도 발현량이 야생형이나 변형 전 미생물 균주에서 발현된 폴리펩티드의 활성 또는 농도를 기준으로 하여 증가되거나, 해당 폴리펩티드로부터 생산되는 산물의 양의 증가되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [141] 본 출원의 미생물에서 폴리뉴클레오티드의 일부 또는 전체의 변형은 (a) 미생물 내 염색체 삽입용 벡터를 이용한 상동 재조합 또는 유전자가위 (engineered nuclease, e.g., CRISPR-Cas9)을 이용한 유전체 교정 및/또는 (b) 자외선 및 방사선 등과 같은 빛 및/또는 화학물질 처리에 의해 유도될 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 상기 유전자 일부 또는 전체의 변형 방법에는 DNA 재조합 기술에 의한 방법이 포함될 수 있다. 예를 들면, 목적 유전자와 상동성이 있는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열 또는 벡터를 상기 미생물에 주입하여 상동 재조합(homologous recombination)이 일어나게 함으로써 유전자 일부 또는 전체의 결손이 이루어질 수 있다. 상기 주입되는 뉴클레오티드 서열 또는 벡터는 우성 선별 마커를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [142]
- [143] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 본 출원의 변이체; 상기 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 및 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 중 어느 하나 이상을 포함하는, 미생물을 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, 테트라테르펜, 테트라테르펜의 전구체, 또는 테트라테르펜을 전구체로 하는 물질 생산 방법을 제공한다. 상기 테트라테르펜, 테트라테르펜의 전구체, 또는 테트라테르펜을 전구체로 하는 물질 생산 방법은 스쿠알렌 생산을 감소시키는 방법일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [144] 본 출원에서, 용어 "배양"은 본 출원의 미생물을 적당히 조절된 환경 조건에서 생육시키는 것을 의미한다. 본 출원의 배양과정은 당업계에 알려진 적당한 배지와 배양조건에 따라 이루어질 수 있다. 이러한 배양 과정은 선택되는 균주에 따라 당업자가 용이하게 조정하여 사용할 수 있다. 구체적으로 상기 배양은 회분식, 연속식 및/또는 유가식일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [145] 본 출원에서 용어, "배지"는 본 출원의 미생물을 배양하기 위해 필요로 하는 영양물질을 주성분으로 혼합한 물질을 의미하며, 생존 및 발육에 불가결한 물을 비롯하여 영양물질 및 발육인자 등을 공급한다. 구체적으로, 본 출원의 미생물의 배양에 사용되는 배지 및 기타 배양 조건은 통상의 미생물의 배양에 사용되는 배지라면 특별한 제한 없이 어느 것이나 사용할 수 있으나, 본 출원의 미생물을 적당한 탄소원, 질소원, 인원, 무기화합물, 아미노산 및/또는 비타민 등을 함유한 통상의 배지 내에서 호기성 조건 하에서 온도, pH 등을 조절하면서 배양할 수 있다.
- [146] 본 출원에서 상기 탄소원으로는 글루코오스, 사카로오스, 락토오스, 프룩토오스, 수크로오스, 말토오스 등과 같은 탄수화물; 만니톨, 소르비톨 등과 같은 당 알코올, 피루브산, 락트산, 시트르산 등과 같은 유기산; 글루탐산, 메티오닌, 리신 등과 같은 아미노산 등이 포함될 수 있다. 또한, 전분 가수분해물, 당밀, 블랙스트랩 당밀, 쌀겨울, 카사버, 사탕수수 찌꺼기 및 옥수수 침지액 같은 천연의 유기 영양원을 사용할 수 있으며, 구체적으로는 글루코오스 및 살균된 전처리 당밀(즉, 환원당으로 전환된 당밀) 등과 같은 탄수화물이 사용될 수 있으며, 그 외의 적정량의 탄소원을 제한 없이 다양하게 이용할 수 있다. 이들 탄소원은 단독으로 사용되거나 2 종 이상이 조합되어 사용될 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [147] 상기 질소원으로는 암모니아, 황산암모늄, 염화암모늄, 초산암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄, 질산암모늄 등과 같은 무기질소원; 글루탐산, 메티오닌, 글루타민 등과 같은 아미노산, 펩톤, NZ-아민, 육류 추출물, 효모 추출물, 맥아 추출물, 옥수수 침지액, 카세인 가수분해물, 어류 또는 그의 분해생성물, 탈지 대두 케이크 또는 그의 분해 생성물 등과 같은 유기 질소원이 사용될 수 있다. 이들 질소원은 단독으로 사용되거나 2 종 이상이 조합되어 사용될 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [148] 상기 인원으로는 인산 제1칼륨, 인산 제2칼륨, 또는 이에 대응되는 소듐-함유 염 등이 포함될 수 있다. 무기화합물로는 염화나트륨, 염화칼슘, 염화철, 황산마그네슘, 황산철, 황산망간, 탄산칼슘 등이 사용될 수 있으며, 그 외에 아미노산, 비타민 및/또는 적절한 전구체 등이 포함될 수 있다. 이들 구성성분 또는 전구체는 배지에 회분식 또는 연속식으로 첨가될 수 있다. 그러나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [149] 또한, 본 출원의 미생물의 배양 중에 수산화암모늄, 수산화칼륨, 암모니아, 인산, 황산 등과 같은 화합물을 배지에 적절한 방식으로 첨가하여, 배지의 pH를

조정할 수 있다. 또한, 배양 중에는 지방산 폴리글리콜 에스테르와 같은 소포체를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다. 또한, 배지의 호기 상태를 유지하기 위하여, 배지 내로 산소 또는 산소 함유 기체를 주입하거나 혐기 및 미호기 상태를 유지하기 위해 기체의 주입 없이 혹은 질소, 수소 또는 이산화탄소 가스를 주입할 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.

[150] 본 출원의 배양에서 배양온도는 20 내지 45°C 구체적으로는 25 내지 40°C, 20 내지 35°C, 또는 25 내지 35°C를 유지할 수 있고, 약 10 내지 160 시간 동안 배양할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[151] 본 출원의 배양에 의하여 생산된 테트라테르펜, 테트라테르펜의 전구체 또는 테트라테르펜을 전구체로 하는 물질은 배지 중으로 분비되거나 세포 내에 잔류할 수 있다.

[152]

[153] 본 출원의 테트라테르펜, 테트라테르펜의 전구체 또는 테트라테르펜을 전구체로 하는 물질 생산방법은, 본 출원의 미생물을 준비하는 단계, 상기 균주를 배양하기 위한 배지를 준비하는 단계, 또는 이들의 조합(순서에 무관, in any order)을, 예를 들어, 상기 배양하는 단계 이전에, 추가로 포함할 수 있다.

[154] 본 출원의 테트라테르펜, 테트라테르펜의 전구체 또는 테트라테르펜을 전구체로 하는 물질 생산방법은, 상기 배양에 따른 배지(배양이 수행된 배지) 또는 본 출원의 미생물로부터 테트라테르펜, 테트라테르펜의 전구체 또는 테트라테르펜을 전구체로 하는 물질을 회수하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 회수하는 단계는 상기 배양하는 단계 이후에 추가로 포함될 수 있다.

[155] 상기 회수는 본 출원의 미생물의 배양 방법, 예를 들어 회분식, 연속식 또는 유가식 배양 방법 등에 따라 당해 기술 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 목적하는 테트라테르펜, 테트라테르펜의 전구체 또는 테트라테르펜을 전구체로 하는 물질을 수집(collect)하는 것일 수 있다. 예를 들어, 원심분리, 여과, 결정화 단백질 침전제에 의한 처리(염석법), 추출, 세포 파쇄, 초음파 파쇄, 한외여과, 투석법, 분자체 크로마토그래피(겔여과), 흡착크로마토그래피, 이온교환 크로마토그래피, 친화도 크로마토그래피 등의 각종 크로마토그래피, HPLC 또는 이들의 방법을 조합하여 사용될 수 있으며, 당해 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 배지 또는 미생물로부터 목적하는 테트라테르펜, 테트라테르펜의 전구체 또는 테트라테르펜을 전구체로 하는 물질을 회수할 수 있다.

[156] 또한, 본 출원의 테트라테르펜, 테트라테르펜의 전구체 또는 테트라테르펜을 전구체로 하는 물질 생산방법은, 추가적으로 정제 단계를 포함할 수 있다. 상기 정제는 당해 기술분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여, 수행할 수 있다. 일 예에서, 본 출원의 테트라테르펜, 테트라테르펜의 전구체 또는 테트라테르펜을 전구체로 하는 물질 생산방법이 회수 단계와 정제 단계를 모두 포함하는 경우, 상기 회수 단계와 정제 단계는 순서에 상관없이 이시적(또는 연속적)으로 수행되거나, 동시에 또는 하나의 단계로 통합되어 수행될 수 있으나, 이에

제한되는 것은 아니다.

- [157] 본 출원의 테트라테르펜을 전구체로 하는 물질의 생산방법은 테트라테르펜을 테트라테르펜을 전구체로 하는 물질로 전환하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 본 출원의 테트라테르펜을 전구체로 하는 물질의 생산방법에 있어서, 상기 전환하는 단계는 상기 배양하는 단계 또는 상기 회수하는 단계 이후에 추가로 포함될 수 있다. 상기 전환하는 단계는 당해 기술분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 수행할 수 있다. 예컨대, 상기 전환은 베타-카로틴 15,15'-옥시게네이스 또는 레티놀 탈수소효소(retinol dehydrogenase)를 이용하여 수행할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [158] 상기 변이체, 폴리뉴클레오티드, 벡터, 미생물, 테트라테르펜, 테트라테르펜의 전구체 및 테트라테르펜을 전구체로 하는 물질 등은 전술한 바와 같다.
- [159]
- [160] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 본 출원의 변이체; 본 출원의 벡터; 본 출원의 변이체, 상기 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터 또는 본 출원의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 미생물; 이를 배양한 배지; 또는 이들 중 2 이상의 조합을 포함하는 테트라테르펜, 테트라테르펜의 전구체 및 테트라테르펜을 전구체로 하는 물질 생산용 조성물을 제공하는 것이다.
- [161] 본 출원의 조성물은 테트라테르펜, 테트라테르펜의 전구체 및 테트라테르펜을 전구체로 하는 물질 생산용 조성물에 통상 사용되는 임의의 적합한 부형제를 추가로 포함할 수 있으며, 이러한 부형제는, 예를 들어 보존제, 습윤제, 분산제, 현탁화제, 완충제, 안정화제 또는 등장화제 등일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [162] 상기 변이체, 폴리뉴클레오티드, 벡터, 미생물, 배지, 테트라테르펜, 테트라테르펜의 전구체, 및 테트라테르펜을 전구체로 하는 물질 등은 전술한 바와 같다.
- [163]
- [164] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 본 출원의 변이체, 폴리뉴클레오티드, 벡터, 및 미생물 중 어느 하나 이상의 테트라테르펜, 테트라테르펜의 전구체 및 테트라테르펜을 전구체로 하는 물질 생산 용도를 제공한다.
- [165] 상기 변이체, 폴리뉴클레오티드, 벡터, 미생물, 테트라테르펜, 테트라테르펜의 전구체 및 테트라테르펜을 전구체로 하는 물질 등은 전술한 바와 같다.
- [166]

발명의 실시를 위한 형태

- [167] 이하 본 출원을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예 및 실험예는 본 출원을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 출원의 범위가 이들 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.

[168]

[169] 실시예 1. GGS1 변이 벡터 라이브러리 구축

[170] 야로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*) 염색체 상에서 제라닐제라닐 피로포스페이트 신타아제를 코딩하는 *GGS1* 유전자를 증폭하기 위해, KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)에 등록되어 있는 염기서열에 근거하여 *GGS1*(YALI0D17050)의 서열번호 1의 아미노산 및 서열번호 2의 폴리뉴클레오티드 서열을 확보하였다. Error-prone PCR(ep-PCR)을 통해 임의의(random) 변이를 유도하기 위해서 diversify PCR random mutagenesis kit(Takara 社)를 사용하였다. PCR 조건 및 방법은 최적화를 통해 사용자 매뉴얼(user manual)의 buffer 조건 1 및 buffer 조건 2로 각각 진행하였다. 구체적인 Error-prone PCR 조건은 하기 표 1에 나타내었다.

[171]

[172] [표1]

	Buffer 조건 1	Buffer 조건 2
PCR grade water	40 μ l	39 μ l
10X Titanium Taq buffer	5 μ l	5 μ l
MnSO ₄	0 μ l	1 μ l
dGTP	1 μ l	1 μ l
50X Diversify dNTP Mix	1 μ l	1 μ l
Primer mix	1 μ l	1 μ l
Template DNA	1 μ l	1 μ l
Titanium Taq polymerase	1 μ l	1 μ l

[173] 야로위아 리폴리티카 (*Yarrowia lipolytica*) PO1f 게놈 DNA를 주형으로 하고 서열번호 19와 서열번호 20의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 조건으로, 변성 95°C, 1분; 어닐링 55°C, 1분; 및 중합반응 68°C, 1분을 32회 반복 수행하였다. PCR로 증폭된 2 가지 조건의 *GGS1* PCR 산물을 혼합하여 pIMR53-EXP1p-CYC1t 벡터 기반 *GGS1* 변이체 발현 벡터 라이브러리를 제작하였다.

[174] pIMR53-EXP1p-CYC1t 벡터는 하기와 같은 방법으로 제작되었다. EXP1p를 증폭하기 위해 야로위아 리폴리티카 (*Yarrowia lipolytica*) PO1f 게놈 DNA를 주형으로 하고 서열번호 21와 서열번호 22의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였고, CYC1t 터미네이터를 증폭하기 위해 사카로마이세스 세레비지에 (*Saccharomyce cerevisiae*) 게놈 DNA를 주형으로 하고 서열번호 23과 서열번호 24의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 조건으로, 변성 95°C, 1분; 어닐링 55°C, 1분; 및 중합반응 68°C, 1분을 32회 반복 수행하였다. 추가적으로

pIMR53 벡터를 주형으로 하고 서열번호 25와 서열번호 26의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 조건으로, 변성 95°C, 1분; 어닐링 55°C, 1분; 및 중합반응 68°C, 5분을 32회 반복 수행하였다.

- [175] 그 결과 6,774bp의 linearized pIMR53, 1,050bp의 EXP1p, 그리고 289bp의 CYC1t을 얻었다. PCR로 증폭된 상기 EXP1p 및 CYC1t DNA 단편은 Infusion 클로닝 키트(Invitrogen)를 사용하여 pIMR53 벡터에 접합한 후 대장균 DH5α에 형질전환하고, 30 mg/L의 앰피실린이 포함된 LB 고체배지에 도말하였다. PCR을 통해 목적인 EXP1p 프로모터와 CYC1t 터미네이터가 삽입된 플라스미드로 형질전환된 콜로니를 선별한 후, 통상적으로 알려진 플라스미드 추출법을 이용하여 플라스미드를 획득하였고, 이 플라스미드를 pIMR53-EXP1p-CYC1t이라 명명하였다.

[176]

[177] 실시예 2. 베타카로틴 생산용 *Yarrowia lipolytica* 플랫폼 균주 제작

[178] 실시예 2-1. *X. dendrorhous* 유래 crtYB-crtI 삽입주 제작

- [179] 베타카로틴 생산을 위한 플랫폼 균주 제작을 위해 고지방 효모인 *Yarrowia lipolytica* CC08-0125(기탁번호 KCCM12972P) 균주의 게놈에 *Xanthophyllomyces dendrorhous* 유래 lycopene cyclase/phytoene synthase (crtYB)와 phytoene desaturase(crtI) 유전자를 삽입하였다. crtYB는 NCBI(National Center for Biotechnology Information Search database)에 등록되어 있는 염기서열(GenBank: AY177204.1)에 근거하여 서열번호 27의 폴리뉴클레오티드를 확보하였고, crtI는 NCBI에 등록되어 있는 염기서열(GenBank: AY177424.1)에 근거하여 서열번호 28의 폴리뉴클레오티드를 확보하였다. crtYB와 crtI의 폴리뉴클레오티드 서열은 마크로젠사를 통해 TEFINtp-crtYB-CYC1t(서열번호 29), TEFINtp-crtI-CYC1t(서열번호 30)의 형태로 유전자를 합성하였으며, 선별 마커로는 *Y. lipolytica*의 URA3 유전자(서열번호 31)를 이용하여 MHY1(YALI0B21582g) 유전자 위치에 삽입되는 카세트를 디자인 하였다. 합성된 crtYB, crtI 유전자 및 KCCM12972P 게놈 DNA를 주형으로 하고 서열번호 32 및 서열번호 33, 서열번호 34 및 서열번호 35, 서열번호 36 및 서열번호 37, 서열번호 38 및 서열번호 39, 서열번호 40 및 서열번호 41, 서열번호 42 및 서열번호 43의 프라이머를 이용하여 각각의 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 변성 95°C, 1분; 어닐링 55°C, 1분; 및 중합반응 72°C, 3분 30초를 35회 반복 수행하였다. 그 결과로 얻어진 5개의 DNA 단편은 overlap extension PCR을 통해 하나의 카세트로 제작되었다.

- [180] 이렇게 제작된 카세트를 열충격법 (*D.-C. Chen et al., Appl Microbiol Biotechnol*, 1997)으로 KCCM12972P 균주에 도입한 후, uracil이 포함되지 않은 고체배지(YLMM1)에서 형성된 콜로니를 획득하였다. 서열번호 44 및 서열번호 45의 프라이머를 이용하여 게놈 내에 카세트 삽입이 확인된 콜로니들을 5-FOA 고체배지에 spotting하여 30°C에서 3일간 배양하였고, 5-FOA 고체 배지에서 자란

콜로니를 획득함으로써 URA3 마커를 회수하였다.

[181]

[182] **실시예 2-2. HMGR 강화주 제작**

[183] 앞서 실시예 2-1에서 제작된 crtYB, crtI 유전자가 삽입된 균주의 하이드록시메틸글루타릴 리덕테이스(3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, HMGR)유전자의 native 프로모터(서열번호 46) 부위를 TEFINt 프로모터로 교체하기 위한 카세트를 디자인하였고, KCCM12972P 게놈 DNA를 주형으로 하고 서열번호 47 및 서열번호 48, 서열번호 49 및 서열번호 50, 서열번호 51 및 서열번호 52, 서열번호 53 및 서열번호 54, 서열번호 55 및 서열번호 56의 프라이머를 이용하여 각각의 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 변성 95°C, 1분; 어닐링 55°C, 1분; 및 중합반응 72°C, 1분 30초를 35회 반복 수행하였다. 그 결과로 얻어진 5개의 DNA 단편은 overlap extension PCR을 통해 하나의 카세트로 제작되었다.

[184] 이렇게 제작된 카세트를 열충격법으로 실시예 2-1에서 제작한 균주에 도입한 후, uracil이 포함되지 않은 고체배지(YLMM1)에서 형성된 콜로니를 획득하였다. 서열번호 57 및 서열번호 58의 프라이머를 이용하여 카세트 삽입이 확인된 콜로니들을 5-FOA 고체배지에 spotting하여 30°C에서 3일간 배양하였고, 5-FOA 고체 배지에서 자란 콜로니를 획득함으로써 URA3 마커를 회수하였다. 최종적으로 제작된 베타카로틴 생산 플랫폼 균주를 CC08-1023으로 명명하였다.

[185]

[186] <Yarrowia lipolytica minimal media1 (YLMM1)>

[187] 포도당 20 g/L, 아미노산을 포함하지 않는 효모 질소 염기(Yeast nitrogen base without amino acids) 6.7 g/L, 우라실을 포함하지 않는 효모 합성 드롭 아웃 배지 보충물 (Yeast Synthetic Drop-out Medium Supplements without uracil) 2 g/L, 한천(agar) 15 g/L

[188]

[189] <5-Fluoroorotic Acid (5-FOA)>

[190] 포도당 20 g/L, 아미노산을 포함하지 않는 효모 질소 염기(Yeast nitrogen base without amino acids) 6.7 g/L, 우라실을 포함하지 않는 효모 합성 드롭 아웃 배지 보충물 (Yeast Synthetic Drop-out Medium Supplements without uracil) 2 g/L, 우라실(Uracil) 50 µg/mL, 5-플루오로 오로틴산(5-Fluoroorotic acid; 5-FOA) 1 g/L, 한천(agar) 15 g/L

[191]

[192] **실시예 3. GGS1 활성 강화주 1차 선별**

[193] GGS1 활성 강화주의 1차 선별을 위해, 색깔 기반 1차 선별을 진행하였다.

[194] 우선, 베타카로틴을 소량 생산하는 Yarrowia lipolytica CC08-1023 균주에, pIMR53(negative control; NC), pIMR53-EXP1p-GGS1(야생형, 서열번호 2)-CYC1t 벡터(positive control; PC), 및 실시예 1에서 구축된 GGS1 random 변이체 발현

박터 라이브러리를 열 충격법(heat-shock)으로 형질 전환하였다. 이후, 우라실(uracil)이 포함되지 않은 고체배지에서 형성된 콜로니를 획득하였다.

- [195] 96 deep-well plate 25 판에 우라실이 포함되지 않은 YLMM2 (Yarrowia lipolytica minimal media 2) 액체배지를 350 μ l 씩 분주하고, 획득한 콜로니들을 접종하여 30°C에서 48시간 동안 배양하였다. 이후, 우라실이 포함되지 않은 YLMM1 고체배지에 접종하여 30°C에서 3일간 배양하였으며, 배양 종료 후에 총 2,400 종의 균주 중에서 positive control (CC08-1023/pIMR53-EXP1p-GGS1-CYC1t) 박터로 형질전환된 균주 대비 색깔이 짙은 주황색 균주 36 종을 1차 선별하였다. 전술한 YLMM2의 제조방법 및 조성은 하기와 같다.

[196]

[197] <YLMM2 (pH 7.2)>

- [198] 포도당 40 g/L, 아미노산 및 암모늄 설페이트가 없는 효모 질소 염기(Yeast nitrogen base without amino acids and ammonium sulfate) 1.7 g/L, 우라실(Uracil) 0.5 g/L, 암모늄 설페이트(Ammonium sulfate) 2.5 g/L를 0.1 M 포스페이트 완충액(sodium phosphate buffer)(pH 7.2)에 용해.

[199]

[200] 실시예 4. GGS1 활성 강화주 2차 선별

- [201] GGS1 활성 강화주의 2차 선별을 위해, 실시예 3에서 1차로 선별된 36종에 대한 플라스크 평가를 진행하였다.

- [202] 우라실이 포함되지 않은 YLMM2(Yarrowia lipolytica minimal media 2) 50 ml를 함유하는 250 ml 코너-바플 플라스크에, 상기 36종의 균주 및 PC(positive control) 박터로 형질 전환된 균주를 초기 OD가 1이 되도록 각각 접종하고, 30°C에서 48시간 동안 250 rpm에서 진탕 배양하였다.

- [203] 배양 종료 후, 배양액 1 ml을 원심 분리하여 상등액을 제거하였다. 다음으로, DMSO(Dimethyl sulfoxide, sigma 社) 0.5 ml을 첨가하고, 55°C에서 10분동안 2000rpm에서 진탕하여 셀을 파쇄하였다. 추가적으로, 아세톤(sigma 社) 0.5 ml를 첨가하고 45°C에서 15분동안 2000rpm에서 진탕하여 베타카로틴과 스쿠알렌을 추출하였다. 추출된 물질은 HPLC 설비로 농도를 분석하였다. 선별주의 플라스크 평가 결과, OD, 베타카로틴 및 스쿠알렌의 농도 및 함량 측정 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

[204]

[205] [표 2]

Numb.	OD	β -carotene(mg/L)	Squalene(mg/L)	β -carotene(%)	Squalene(%)
PC	60	38	248	0.25	1.66
1	59	54	154	0.36	1.04
2	61	35	214	0.23	1.41
3	65	62	212	0.38	1.32
4	50	30	102	0.24	0.82
5	62	61	194	0.39	1.24
6	62	55	282	0.36	1.83
7	55	46	173	0.33	1.27
8	48	40	180	0.34	1.52
9	56	34	132	0.25	0.95
10	50	46	185	0.36	1.48
11	51	41	120	0.33	0.94
12	62	52	218	0.34	1.42
13	63	57	210	0.37	1.34
14	59	53	230	0.36	1.57
15	58	57	185	0.39	1.29
16	53	40	219	0.31	1.66
17	60	60	121	0.40	0.81
18	59	53	206	0.36	1.40
19	62	50	207	0.32	1.33
20	62	59	189	0.38	1.22
21	60	69	108	0.46	0.72
22	59	60	148	0.41	1.00
23	62	58	134	0.37	0.86
24	60	57	198	0.38	1.33
25	64	48	214	0.30	1.33
26	67	56	228	0.34	1.37
27	59	47	214	0.32	1.45
28	61	35	183	0.23	1.20

29	60	51	219	0.34	1.45
30	59	48	201	0.33	1.38
31	64	61	198	0.38	1.23
32	65	66	169	0.40	1.04
33	59	47	206	0.32	1.40
34	62	51	238	0.32	1.53
35	53	37	189	0.28	1.42
36	61	53	225	0.35	1.47

[206] 이후, 평가 시료로부터 추출된 베타카로틴과 스쿠알렌 농도를 DCW(g/L)로 나눈 값을 2차 선별을 위한 기준으로 이용하였다. No. 2, No. 4, No. 9, 및 No. 28 균주를 제외한 33종 평가 균주에서, 베타카로틴 농도를 DCW(g/L)로 나눈 값(β -carotene (%))이 PC(positive control) 대비 증가함을 확인되었다. 스쿠알렌 농도를 DCW(g/L)로 나눈 값은 모든 평가 균주에서 PC(positive control) 대비 감소함을 확인되었다.

[207] 따라서, PC(positive control)로부터 계산된 값을 기반으로 기준값을 설정하고 두 조건 모두에 해당되는 균주를 선별하였으며, 조건 1과 조건 2를 동시에 해당되는 후보군 총 4종을 선별하였다. 상기 2차 선별 기준 값과 2차 선별 후보 4종은 하기 표 3에 나타내었다.

[208]

[209] [표3]

조건	기준	선별 결과(플라스크 번호)	비고
#1	베타카로틴 함량(%) $\geq$ 0.38	3, 5, 15, 17, 20, 21, 22, 24, 31, 32	GGS1(PC)=0.25
#2	스쿠알렌 함량(%) $<$ 1.05	2, 4, 9, 11, 17, 21, 22, 23, 32	GGS1(PC)=1.66
조건 1 + 조건 2		17, 21, 22, 32	

[210] 선별된 4종의 균주에서 형질 전환된 플라스미드를 추출하여 GGS1 ORF에 위치한 random 변이를 확인하기 위한 서열분석을 진행하였다. Zymoprep yeast plasmid miniprep kit 2(Zymo research 社)를 사용하여 선별된 균주로부터 형질 전환된 GGS1 플라스미드를 추출하고 서열분석의 신뢰도를 높이기 위해 서열번호 59와 서열번호 60의 프라이머를 사용하여 양방향으로 서열분석을 진행하였다. GGS1 ORF 서열 분석 결과 확인된 아미노산 변이는 하기 표 4에 나타내었으며, 4종 후보군은 하기 표 4 중 1개 또는 2개의 돌연변이를 포함하는 것으로 확인되었다.

[211]

[212] [표4]

변이주 플라스크 번호.	Genotype
17	GGs1(I122V, R141K)
21	GGs1(N29T, L90R)
22	GGs1(M103I)
32	GGs1(F43I)

[213] 실시예 5. GGS1 선별 변이체 활성 검증

[214] 실시예 3 및 실시예 4에서 선별된 GGS1 변이체의 활성 검증 실험을 진행하였다.

[215] 이를 위하여, NC(negative control) 및 PC(positive control) 벡터 및 실시예 4에서 선별된 변이체 4종(M103I 변이체, F43I 변이체, N29T 및 L90R 변이체, 및 I122V 및 R141K 변이체), 및 관련 단독 변이체 4종(N29T 변이체, L90R 변이체, I122V 변이체, 및 R141K 변이체) 발현 벡터를 형질 전환하여 제작한 총 10종 균주의 플라스크 평가를 진행하였다.

[216] 단독 변이체 4종(N29T 변이체, L90R 변이체, I122V 변이체, 및 R141K 변이체) 각각의 발현 벡터 제작방법은 하기와 같다. 단독 변이체 4종(N29T 변이체, L90R 변이체, I122V 변이체, 및 R141K 변이체) DNA 절편을 확보하기 위해 야생형 GGS1 서열을 포함하는 pIMR53-EXP1p-GGS1-CYC1t 벡터를 주형으로 서열번호 61와 서열번호 62, 서열번호 63과 서열번호 64, 서열번호 65와 서열번호 66, 서열번호 67과 서열번호 68의 프라이머를 이용하여 각각 PCR을 수행하였다. PCR 조건으로, 변성 95°C, 1분; 어닐링 55°C, 1분; 및 중합반응 68°C, 5분을 32회 반복 수행하였다. 이중 변이체인 N29T 및 L90R 변이체, 또는 I122V 및 R141K 변이체의 발현 벡터는 각각 상기에서 제작된 N29T 발현 벡터 또는 I122V 발현 벡터를 주형으로 하여 서열번호 63과 서열번호 64의 프라이머 또는 서열번호 67과 서열번호 68의 프라이머를 이용하여 동일하게 PCR을 수행하여 제작하였다.

[217] 그 결과, PCR로 증폭된 상기 변이체가 도입된 DNA는 Infusion 클로닝 키트(Invitrogen)를 사용해 대장균 DH5α에 형질전환하고, 30 mg/L의 앰피실린이 포함된 LB 고체배지에 도말하였다. 형질전환된 GGS1 변이체 4종 벡터가 삽입된 플라스미드로 형질전환된 콜로니를 선별한 후, 통상적으로 알려진 플라스미드 추출법을 이용하여 플라스미드를 획득하였고, 서열번호 59와 서열번호 60를 사용하여 변이체 서열을 확인하였다.

[218] 구체적으로, 우라실이 포함되지 않은 YLMM2(Yarrowia lipolytica minimal media 2) 50 ml을 함유하는 250 ml 코너-바플 플라스크에, 상기 10종의 균주를 초기 OD가 1이 되도록 접종하고, 30°C에서 48시간 동안, 250 rpm으로 진탕

배양하였다.

- [219] 배양 종료 후, 배양액 1 ml을 원심 분리하여 상등액을 제거하였다. 그 후, DMSO(Dimethyl sulfoxide, sigma 社) 0.5 ml을 첨가하고 55°C에서 10분동안 2000rpm에서 진탕하여 셀을 파쇄하였다. 추가적으로, 아세톤 (sigma社) 0.5 ml을 첨가하고 45°C에서 15분동안 2000rpm에서 진탕하여 베타카로틴 및 스쿠알렌을 추출하였고, HPLC 설비로 농도를 분석하였다. 분석된 OD, 베타카로틴 및 스쿠알렌의 농도 및 함량을 측정된 결과는 하기 표 5에 나타내었다.

[220]

[221] [표5]

Genotype	OD	β -carotene (mg/L)	Squalene (mg/L)	β -carotene (%)	Squalene (%)
NC	62	5	208	0.03	1.34
PC	56	30	133	0.21	0.95
M103I	62	59	91	0.38	0.59
F43I	63	69	71	0.44	0.45
N29T/L90R	64	67	89	0.42	0.56
N29T	61	55	88	0.36	0.58
L90R	64	58	90	0.36	0.56
I122V/R141K	62	62	65	0.40	0.42
I122V	57	43	118	0.30	0.83
R141K	59	44	111	0.30	0.75

- [222] 상기 표 5에 나타난 바와 같이, PC(positive control) 대비 선별된 M103I, F43I, N29T, L90R, I122V, 및/또는 R141K 변이가 적용된 GGS1 변이체 모두에서 베타카로틴 농도가 143 내지 230% 증가하고 스쿠알렌 농도는 11 내지 51% 감소하는 것을 확인하였다. 결과적으로, 단독 변이체를 도입한 6종의 균주 중에서는 F43I 변이체를 도입한 균주의 효과가 가장 우수하였으며, I122V 및 R141K 변이체의 경우, 두 변이체 단독 적용에 비해 동시 적용할 때 베타카로틴 농도 증가 및 스쿠알렌 생산량감소 효과가 더욱 증가됨을 확인하였다. 또한 N29T 및 L90R 변이체에서는 두 변이체 단독 적용에 비해 동시 적용할 때 스쿠알렌 생산 감소 효과가 더욱 증가됨을 확인하였다.

[223]

[224] **실시예 6. GGS1 변이체 도입주 제작 및 평가**

- [225] 앞선 실시예를 통해 가장 우수하다고 판단된 GGS1 F43I 변이체가 실제 균주 내 도입되었을 때의 효과를 검증하고자 하였다.

- [226] 이를 위하여, CC08-1023을 기반으로 GGS1 유전자의 프로모터가 교체된

균주(CC08-1214) 및 GGS1 43번째 페닐알라닌이 이소류신으로 치환된 변이체를 발현하는 균주(CC08-1215)를 순차적으로 제작하였다.

[227]

[228] **실시예 6-1. GGS1 promoter 치환주("CC08-1214") 제작**

[229] 야로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*) 염색체 상에서 GGS1의 promoter를 TEFInt promoter로 치환할 수 있는 cassette 제작을 위해 KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)에 등록되어 있는 염기서열에 근거하여 *TEF1* (YALI0C09141p)의 promoter 및 splicing point를 포함하는 서열번호 69의 폴리뉴클레오티드 서열을 확보하였다. 또한, GGS1의 promoter 치환을 위해 GGS1(YALI0D17050g)의 서열번호 2의 폴리뉴클레오티드 서열을 확보하였다. *Yarrowia lipolytica* PO1f 게놈 DNA를 주형으로 하여 서열번호 70과 서열번호 71, 서열번호 72와 서열번호 73, 서열번호 74와 서열번호 75, 및 서열번호 76과 서열번호 77의 프라이머를 이용하여 각각 PCR을 수행하였다. 그리고 URA3 auxotrophic marker를 주형으로 하여 서열번호 78과 서열번호 79의 프라이머를 사용해 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 변성 95°C, 1분; 어닐링 55°C, 1분; 및 중합반응 72°C, 1분 30초를 35회 반복 수행하였다.

[230] 그 결과, 1500bp의 5'UTR arm, 531bp의 5'UTR_RP, 1500bp의 GGS1 arm 그리고 1533bp의 URA3를 얻었다. PCR로 증폭된 DNA 단편은 overlap extension PCR을 통해 하나의 *GGS1* promoter 교체 cassette로 제작되었으며, cassette design은 5'UTR arm-TEFInt-URA3-TEFInt-GGS1 arm의 순서로 이루어졌다.

[231] *GGS1* promoter 교체 cassette를 CC08-1023에 열충격법(heat-shock)으로 형질전환하고, uracil이 포함되지 않은 YLMM1 고체배지에서 선별하였다. 선별된 1차 균주는 다시 2차 교차를 거쳐 최종적으로 *GGS1* 유전자의 promoter가 TEFInt promoter로 교체된 균주를 제작하였다. 이렇게 제작된 균주를 "CC08-1214"라 명명하였다.

[232]

[233] **실시예 6-2. GGS1(F43I) 변이주("CC08-1215") 제작**

[234] 야로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*) 염색체 상에 GGS1 단백질 F43I 변이체 발현 서열을 도입하기 위해 서열번호 2의 폴리뉴클레오티드 서열 중 127번째 티민을 아데닌으로 치환하는 cassette를 제작하였다.

[235] 구체적으로 *Yarrowia lipolytica* PO1f 게놈 DNA를 주형으로 하여 서열번호 80과 서열번호 81, 서열번호 82와 서열번호 83, 서열번호 84와 서열번호 85, 서열번호 86과 서열번호 83, 서열번호 84와 서열번호 87, 및 서열번호 90과 서열번호 91 프라이머를 이용하여 각각 PCR을 수행하였다. 그리고 URA3 auxotrophic marker를 주형으로 하여 서열번호 88과 서열번호 89의 프라이머를 사용해 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 변성 95°C, 1분; 어닐링 55°C, 1분; 및 중합반응 72°C, 1분 30초를 35회 반복 수행하였다.

[236] 그 결과 1500bp의 5'UTR arm, 661bp의 TEFInt-GGS1_1, 1390bp의 GGS1_2,

661bp의 RP_1, 1390bp의 RP_2, 1500bp의 3'UTR arm 그리고 1533bp의 URA3를 얻었다. PCR로 증폭된 DNA 단편은 overlap extension PCR을 통해 하나의 *GGS1* promoter 교체 cassette로 제작되었으며, cassette design은 5'UTR arm-TEFINt-GGS1_1- GGS1_2- RP_1- RP_2-3'UTR arm의 순서로 이루어졌다.

- [237] *GGS1* (F43I) 변이 교체 cassette를 CC08-1214에 열충격법(heat-shock)으로 형질전환하고, uracil이 포함되지 않은 YLMM1 고체배지에서 선별하였다. 선별된 1차 균주는 다시 2차 교차를 거쳐 최종적으로 *GGS1*의 43번째 아미노산 잔기가 이소류신으로 교체된 F43I 변이체를 발현하는 균주를 제작하였다. 이렇게 제작된 균주를 "CC08-1215"라 명명하였다.

[238]

[239] **실시예 6-3. *GGS1* 변이체 도입주 평가**

- [240] CC08-1023 를 negative control로 CC08-1214를 positive control로 CC08-1215와 함께 플라스크 평가를 진행하였다.

- [241] 구체적으로, 우라실이 포함된 YLMM2(Yarrowia lipolytica minimal media 2) 50 ml을 함유하는 250 ml 코너-바플 플라스크에, 상기 CC08-1215, CC08-1023(negative control), 및 CC08-1214(positive control)를 초기 OD가 1이 되도록 접종하고, 30°C에서 48시간 동안, 250 rpm으로 진탕 배양하였다.

- [242] 배양 종료 후, 배양액 1 ml을 원심 분리하여 상등액을 제거하였다. 그 후, DMSO(Dimethyl sulfoxide, sigma 社) 0.5 ml을 첨가하고 55°C에서 10분동안 2000rpm에서 진탕하여 셀을 파쇄하였다. 추가적으로, 아세톤 (sigma社) 0.5 ml을 첨가하고 45°C에서 15분동안 2000rpm에서 진탕하여 베타카로틴 및 스쿠알렌을 추출하였고, HPLC 설비로 농도를 분석하였다. 분석된 OD, 베타카로틴 및 스쿠알렌의 농도 및 함량을 측정한 결과는 하기 표 6에 나타내었다.

[243]

[244] [표6]

Genotype	OD	β -carotene (mg/L)	Squalene (mg/L)	β -carotene (%)	Squalene (%)
CC08-1023(NC)	46	5	41	0.04	0.36
CC08-1214(PC)	50	32	17	0.26	0.14
CC08-1215	48	49	2	0.41	0.02

- [245] 상기 표 6에 나타난 바와 같이, CC08-1214(PC) 대비 선별된 F43I 변이가 적용된 CC08-1215 균주에서 베타카로틴 농도가 51.3% 증가하고 스쿠알렌 농도는 88.5% 감소하는 것을 확인하였다. 결과적으로, F43I 단독 변이체를 도입한 효과가 실제 균주에 적용되어도 베타카로틴 농도 증가 및 스쿠알렌 생산량 감소 효과가 있음을 확인하였다.

[246]

- [247] 상기 결과들로부터 본 출원의 GGS1 변이체를 도입할 경우 베타카로틴 생산량을 증가시킬 수 있음을 확인하였다. 또한, GGS1 변이체를 도입하여 베타카로틴 생산과 경쟁경로인 스쿠알렌 합성을 감소시킴으로써, 베타카로틴 생산 효율을 더욱 증가시킬 수 있음을 확인하였다.
- [248] 또한, 상기 결과들로부터, 베타카로틴 생산과 마찬가지로, GGS1이 관여하는 테트라테르펜류 생산 효율을 더욱 증가시킬 수 있음을 확인하였다.
- [249]
- [250] 이상의 설명으로부터, 본 출원이 속하는 기술분야의 당업자는 본 출원이 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. 본 출원의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 출원의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

[251]

특허출원을 위한 부다페스트 국제 조약 하의 미생물 수탁 증명

국 제 양 식

수신: 씨제이제일제당 주식회사,
대한민국 서울시 중구 동호로 330 CJ 제일제당센터 (우) 100-400

국제기탁기관에 의해 규칙 7.1에 따라 발행된 원기탁에 대한 수탁증

I. 미생물의 표시	
기탁자가 첨부한 미생물 식별에 대한 표시: <i>Yarrowia lipolytica</i> C008-0125	국제 기탁기관에 부여한 수탁번호: KCCM12972P
II. 과학적 성질의 설명 및/또는 분류학상의 위치	
항목 I에 표시된 미생물에 대하여 다음 사항이 포함되어 있다: ☐ 과학적 성질의 설명 ☐ 제안된 분류학상의 위치 (적용시 x 표시)	
III. 기탁 및 수탁	
본 국제기탁기관은 2021년 4월 9일에 기탁된 항목 I에 표시된 미생물을 수탁하였다.	
IV. 전환 요청의 수령	
상기 항목 I에 표시된 미생물은 에 본 국제기탁기관에 수탁되었고, 원기탁을 부다페스트 조약 하의 기탁으로 전환하기 위한 요청을 에 받았다.	
V. 국제기탁기관	
명칭: 한국미생물보존센터 주소: 대한민국 서울시 서대문구 홍제내 2가길 45 유림빌딩 (우) 03641	국제기탁기관을 대표하는 권한을 가진 자 또는 권한을 부여받은 공무원 서명: 서명일: 2021. 4. 9.

상기 번역은 원문의 내용과 상위 없음을 증명함.

2022년 6월 7일

특허법인 한얼 인



청구범위

- [청구항 1] 서열번호 1의 아미노산 서열의 N-말단으로부터 29번, 43번, 90번, 103번, 122번, 및 141번 위치에 상응하는 아미노산 중 어느 하나 이상의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 제라닐제라닐 피로포스페이트 신타아제(Geranylgeranyl pyrophosphate synthase) 변이체.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 변이체는 서열번호 1의 아미노산 서열의 N-말단으로부터 29번 위치에 상응하는 아미노산이 아스파라긴 외의 아미노산으로 치환; 43번 아미노산에 상응하는 아미노산이 페닐알라닌 외의 아미노산으로 치환; 90번 아미노산에 상응하는 아미노산이 류신 외의 아미노산으로 치환; 103번 아미노산에 상응하는 아미노산이 메티오닌 외의 아미노산으로 치환; 122번 아미노산에 상응하는 아미노산이 이소류신 외의 아미노산으로 치환; 및 141번 아미노산에 상응하는 아미노산이 아르기닌 외의 아미노산으로 치환 중 하나 이상의 치환을 포함하는, 제라닐제라닐 피로포스페이트 신타아제 변이체.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 다른 아미노산으로의 치환은 비극성(nonpolar) 아미노산, 극성(polar) 아미노산, 또는 양으로 하전된(염기성) 아미노산으로의 치환인 것인, 제라닐제라닐 피로포스페이트 신타아제 변이체.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 다른 아미노산은 트레오닌(Thr), 이소류신(Ile), 아르기닌(Arg), 발린(Val), 및 라이신(Lys)으로 구성되는 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 제라닐제라닐 피로포스페이트 신타아제 변이체.
- [청구항 5] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 제라닐제라닐 피로포스페이트 신타아제 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 6] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 제라닐제라닐 피로포스페이트 신타아제 변이체 및 상기 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 중 어느 하나 이상을 포함하는, 미생물.
- [청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 미생물은 테트라테르펜, 테트라테르펜의 전구체, 또는 테트라테르펜을 전구체로 하는 물질을 생산하는 것인, 미생물.
- [청구항 8] 제6항에 있어서, 상기 미생물은 야로위아 속(*Yarrowia sp.*)인, 미생물.
- [청구항 9] 제6항에 있어서, 상기 미생물은 야로위아 리폴리티카 (*Yarrowia lipolytica*)인, 미생물.
- [청구항 10] 제6항에 있어서, 상기 미생물은 베타카로틴, 베타카로틴의 전구체, 또는 베타카로틴을 전구체로 하는 물질을 생산하는 것인, 미생물.
- [청구항 11] 제6항의 미생물을 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, 테트라테르펜, 테트라테르펜의 전구체, 또는 테트라테르펜을 전구체로 하는 물질 생산 방법.
- [청구항 12] 제11항에 있어서, 상기 방법은 상기 배지 또는 미생물로부터 테트라테르펜, 테트라테르펜의 전구체, 또는 테트라테르펜을 전구체로

- 하는 물질을 회수하는 단계를 추가로 포함하는, 생산 방법.
- [청구항 13] 제11항에 있어서, 상기 미생물은 야로위아 속(*Yarrowia sp.*)인, 생산 방법.
- [청구항 14] 제11항에 있어서, 상기 방법은 스쿠알렌 생산을 감소시키는 것인, 생산 방법.
- [청구항 15] 제1항의 변이체, 제6항의 미생물, 또는 상기 미생물의 배양물을 포함하는, 테트라테르펜, 테트라테르펜의 전구체, 또는 테트라테르펜을 전구체로 하는 물질 생산용 조성물.
- [청구항 16] 서열번호 1의 아미노산 서열의 N-말단으로부터 29번, 43번, 90번, 103번, 122번, 및 141번 위치에 상응하는 아미노산 중 어느 하나 이상의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 제라닐제라닐 피로포스페이트 신타아제 변이체; 및 상기 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 중 어느 하나 이상을 포함하는, 미생물의 테트라테르펜, 테트라테르펜의 전구체, 또는 테트라테르펜을 전구체로 하는 물질 생산 용도.