

명세서

발명의 명칭: 신규한 프로모터 및 이를 이용한 L-아미노산 생산 방법

기술분야

- [1] 본 출원은 신규한 프로모터 및 이를 이용한 L-아미노산 생산 방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 프로모터 활성을 가지는 신규 폴리뉴클레오티드, 이를 포함하는 벡터 및 코리네박테리움 속 미생물, 상기 미생물을 이용한 L-아미노산의 생산 방법, 발효 조성물의 제조 방법, 및 상기 발효 조성물에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 글루탐산은 발효에 의하여 생산되는 대표적인 아미노산으로, 특유의 독특한 맛을 지니고 있어 식품 분야에서는 물론 의약품 분야, 기타 동물 사료 분야 등에 널리 이용되고 있는 중요한 아미노산 중의 하나이다.

[4]

- [5] 글루탐산을 생산하는 통상적인 방법으로는 주로 브레비박테리움(*Brevibacterium*)이나 코리네박테리움 속 및 그 변이주를 포함한 코리네형 박테리아(*Coryneform bacteria*)를 이용해 발효를 통해 생산하며(Amino Acid Fermentation, Gakkai Shuppan Center: 195-215, 1986) 그 외에도 대장균(*Escherichia coli*), 고초균(*Bacillus*), 방선균(*Streptomyces*), 페니실리움(*Penicillium*) 속, 크렙시엘라(*Klebsiella*), 어위니아(*Erwinia*), 판토에아(*Pantoea*) 속 등의 미생물을 이용하는 방법 등이 알려져 있다(미국 특허 제3,220,929호, 제6,682,912호). 미생물 발효를 통하여 글루탐산을 제조하는 경우, 발효물 내에는 L-글루탐산 외에도 유기산을 비롯한 다양한 물질이 혼합된다.

[6]

- [7] 상기의 유기산은 산성의 유기화합물로서, 젖산, 아세트산, 포름산, 시트르산, 옥살산, 요산 등을 포함한다. 식품 내 유기산은 신맛과 감칠맛을 나타내며, 식품의 pH를 낮춰주어 부패를 방지하는 효과를 갖는다. 통상적으로, 젖산은 미생물 발효를 통해 생성되는 유기산 중에서 가장 많은 비중을 차지하고 있는 것으로 알려져 있다.

[8]

- [9] 하지만, 발효로 생산되는 젖산의 비중이 높을수록 발효물 내 신맛이 증가하므로, 기호성이 저하될 우려가 있다. 따라서, 미생물 발효를 통하여 생성되는 발효물 내 젖산의 생성량을 조절할 필요가 있다.

[10]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [11] 본 발명자들은 글루탐산을 생산하는 미생물의 유기산 생성능을 저감시키기 위해 노력한 결과, 본 출원의 프로모터 활성을 갖는 신규 폴리뉴클레오티드를 개발하였고, 이는 균주의 글루탐산 생성능을 증가시키고 젖산 생성능은 저하시킬 수 있음을 확인하여 본 출원을 완성하였다.

[12]

과제 해결 수단

- [13] 본 출원의 하나의 목적은 서열번호 2로 표시되는 뉴클레오티드 서열의 37번째 뉴클레오티드가 G로 치환된, 프로모터 활성을 가지는 폴리뉴클레오티드를 제공하는 것이다.
- [14] 본 출원의 다른 하나의 목적은 상기 폴리뉴클레오티드; 및 상기 폴리뉴클레오티드와 작동 가능하게 연결된 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터를 제공하는 것이다.
- [15] 본 출원의 또 다른 하나의 목적은 상기 폴리뉴클레오티드; 및 상기 폴리뉴클레오티드와 작동 가능하게 연결된 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 코리네박테리움 속 미생물을 제공하는 것이다.
- [16] 본 출원의 또 다른 하나의 목적은 상기 코리네박테리움 속 미생물을 배지에서 배양하는 단계; 및 상기의 배지에서 목적 물질을 회수하는 단계를 포함하는, 목적 물질을 생산하는 방법을 제공하는 것이다.
- [17] 본 출원의 또 다른 하나의 목적은 상기 코리네박테리움 속 미생물을 배지에서 배양하여 발효하는 단계를 포함하는, 발효 조성물의 제조 방법을 제공하는 것이다.
- [18] 본 출원의 또 다른 하나의 목적은 상기 방법에 의해 제조된 발효 조성물을 제공하는 것이다.

[19]

발명의 효과

- [20] 본 출원의 신규 프로모터는 아미노산을 생산하는 미생물에 도입되어, 미생물의 아미노산의 생성량은 증가시키고 유기산의 생성량은 감소시킬 수 있다. 구체적으로, 본 출원의 신규 프로모터를 이용하여 글루탐산을 제조하는 경우, 발효물 내 글루탐산의 양과 유기산의 양을 조절하여 발효물의 맛과 기호성을 개선시킬 수 있다.

[21]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [22] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 출원에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 출원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 출원의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 출원의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

- [23]
- [24] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 출원의 하나의 양태는 서열번호 2로 표시되는 뉴클레오티드 서열의 37번째 뉴클레오티드가 G로 치환된, 프로모터 활성을 가지는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [25]
- [26] 본 출원에서 용어 "서열번호 2로 표시되는 뉴클레오티드 서열"은 락테이트 디하이드로게나제(lactate dehydrogenase: LDH)를 코딩하는 유전자의 프로모터 서열의 일부를 의미할 수 있다.
- [27] 이때, 상기 용어 "락테이트 디하이드로게나제"는 피루베이트를 기질로 하여 락테이트, 즉 젖산을 생성하는 효소이며, 본 명세서에서 "LDH"로 혼용되어 명명될 수 있다. 구체적으로, 상기 락테이트 디하이드로게나제의 유전자는 서열번호 3의 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있고, 이의 단백질은 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [28]
- [29] 본 출원에서 용어 "프로모터"는 폴리머라제(polymerase)에 대한 결합 부위를 포함하고 프로모터 목적 유전자의 mRNA로의 전사 개시 활성을 가지는, 코딩 영역의 상위(upstream)의 비 해독된 뉴클레오티드 서열, 즉 폴리머라제가 결합하여 유전자의 전사를 개시하도록 하는 DNA 영역을 의미한다. 상기 프로모터는 mRNA 전사 개시부위의 5' 부위에 위치할 수 있다. 이때, 상기 프로모터의 목적 유전자는 락테이트 디하이드로게나제일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [30]
- [31] 본 출원의 폴리뉴클레오티드는 상기 서열번호 2로 표시되는 뉴클레오티드 서열, 즉 락테이트 디하이드로게나제 유전자의 프로모터 서열이 변이된 것이며, 구체적으로 상기 변이는 상기 서열의 37번째 뉴클레오티드인 T가 G로 치환된 것일 수 있다. 그에 따라, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1의 뉴클레오티드 서열로 이루어지는 것(consist of)일 수 있다.
- [32] 이때, 상기 용어 "변이"는 유전적 또는 비유전적으로 안정적인 표현형적 변화를 의미하며, 본 명세서에서 "돌연변이"와 혼용되어 명명될 수 있다.
- [33]
- [34] 구체적으로, 상기 폴리뉴클레오티드는 변이를 포함하지 않는 폴리뉴클레오티드에 비해 변이된(증가 또는 감소된) 프로모터 활성을 가질 수 있다. 따라서, 상기 폴리뉴클레오티드와 작동 가능하게 연결된 목적 유전자의 발현 및 상기 목적 유전자에 의해 코딩되는 단백질의 활성을 조절(증가 또는 감소)할 수 있으며, 나아가 목적 유전자 이외의 다른 유전자의 발현을 조절할 수 있다.
- [35]
- [36] 본 출원의 목적상, 상기 폴리뉴클레오티드는 락테이트 디하이드로게나제의

활성 약화를 위한 것일 수 있다.

- [37] 또한, 상기 폴리뉴클레오티드는 글루탐산의 생성량 증가 및/또는 젖산의 생성량 감소를 위한 것일 수 있다.
- [38] 상기 락테이트 디하이드로게나제는 젖산 생성에 관여한다는 것이 알려져 있었으나, 글루탐산 생성과의 연관성에 대해서는 공지된 바 없으며 본 발명자들에 의해 처음으로 규명되었다. 특히, 상기와 같은 락테이트 디하이드로게나제의 프로모터 변이에 의한 락테이트 디하이드로게나제의 활성 감소, 및 이에 따른 글루탐산 생성량 증가와 젖산 생성량 감소 효과는 본 발명자들에 의해 처음으로 규명되었다.
- [39] 이때, 상기 용어, "글루탐산"(L-glutamic acid, L-glutamate)은 아미노산의 일종으로 비필수 아미노산으로 구분된다. 중추 신경계에서 가장 흔한 흥분성 신경 전달 물질로 알려져 있으며, 또한 감칠맛이 난다고 하여 이의 모노나트륨염(monosodium glutamate: MSG)이 조미료로 개발되어 널리 사용되고 있다. 일반적으로 글루탐산을 생산하는 미생물의 발효를 통해 제조된다.
- [40] 또한, 상기 용어, "젖산"은 신맛이 나는 유기산의 일종으로, 락트산, 유산 등으로 불린다. 식용으로는 과일엑기스, 시럽, 청량음료의 산미제로 이용되며 주류의 발효 초기에 부패균의 번식 방지도 사용된다. 일반적으로 젖산을 생산하는 미생물의 발효를 통해 제조되는데, 과다 생성되는 경우 과도한 신맛에 의해 발효물의 품질을 저하시킬 수 있으므로 젖산의 농도는 배양 시 적절히 조절될 필요가 있다.
- [41]
- [42] 구체적으로, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1의 뉴클레오티드 서열로 이루어지는 것일 수 있다.
- [43] 또한, 본 출원의 뉴클레오티드 서열은 종래 알려진 돌연변이 유발법, 예를 들면 방향성 진화법(directional evolution) 및 부위특이적 돌연변이법(site-directed mutagenesis) 등에 의하여 변형될 수 있다.
- [44] 따라서, 상기 폴리뉴클레오티드는 상기 서열번호 1의 뉴클레오티드 서열에 대해서 적어도 60% 이상, 구체적으로는 70% 이상, 보다 구체적으로는 80% 이상, 보다 더 구체적으로는 83% 이상, 84% 이상, 88% 이상, 90% 이상, 93% 이상, 95% 이상, 또는 97% 이상의 상동성을 가지는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 상기 서열과 상동성을 갖는 서열로서 실질적으로 서열번호 1의 뉴클레오티드 서열과 동일하거나 상응하는 생물학적 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 폴리뉴클레오티드 서열을 갖는 경우도 역시 본 출원의 범주에 포함됨은 자명하다.
- [45]
- [46] 본 출원에서 용어 "상동성"은 주어진 뉴클레오티드 서열과 일치하는 정도를 의미하며 백분율로 표시될 수 있다. 본 명세서에서, 주어진 뉴클레오티드 서열과

동일하거나 유사한 활성을 갖는 그의 상동성 서열이 "% 상동성"으로 표시된다. 상기 뉴클레오티드 서열에 대한 상동성은 예를 들면, 문헌에 의한 알고리즘 BLAST[참조: Karlin 및 Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 5873(1993)]나 Pearson에 의한 FASTA(참조: *Methods Enzymol.*, 183, 63, 1990)를 사용하여 결정할 수 있다. 이러한 알고리즘 BLAST에 기초하여, BLASTN이나 BLASTX라고 불리는 프로그램이 개발되어 있다(참조: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

- [47] 상기 "엄격한 조건"은 폴리뉴클레오티드 간의 특이적 혼성화를 가능하게 하는 조건을 의미한다. 이러한 조건은 문헌(예컨대, J. Sambrook et al., *상동*)에 구체적으로 기재되어 있다. 예를 들어, 상동성이 높은 유전자끼리, 60% 이상, 구체적으로는 90% 이상, 보다 구체적으로는 95% 이상, 더욱 구체적으로는 97% 이상, 특히 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 갖는 유전자끼리 하이브리드화하고, 그보다 상동성이 낮은 유전자끼리 하이브리드화하지 않는 조건, 또는 통상의 써던 하이브리드화의 세척 조건인 60°C, 1×SSC, 0.1% SDS, 구체적으로는 60°C, 0.1×SSC, 0.1% SDS, 보다 구체적으로는 68°C, 0.1×SSC, 0.1% SDS에 상당하는 염 농도 및 온도에서, 1회, 구체적으로는 2회 내지 3회 세정하는 조건을 열거할 수 있다. 혼성화는 비록 혼성화의 엄격도에 따라 염기 간의 미스매치(mismatch)가 가능할지라도, 두 개의 뉴클레오티드가 상보적 서열을 가질 것을 요구한다. 상기 용어 "상보적"은 서로 혼성화가 가능한 뉴클레오티드 염기 간의 관계를 기술하는데 사용된다. 예를 들면, DNA에 관하여, 아데노신은 티민에 상보적이며 시토신은 구아닌에 상보적이다. 따라서, 본 출원은 또한 실질적으로 유사한 폴리뉴클레오티드 서열뿐만 아니라 전체 서열에 상보적인 단리된 폴리뉴클레오티드 단편을 포함할 수 있다.
- [48] 구체적으로, 상동성을 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. 폴리뉴클레오티드를 혼성화하는 적절한 엄격도는 폴리뉴클레오티드의 길이 및 상보성 정도에 의존하고 변수는 해당기술분야에 잘 알려져 있다(Sambrook et al., *supra*, 9.50-9.51, 11.7-11.8 참조).
- [49]
- [50] 특히, 상기에서 서열번호 1의 뉴클레오티드 서열로 이루어진다(consist of)는 표현은 해당 폴리뉴클레오티드를 프로모터로서 목적 유전자에 연결하여 사용할 때, 제한효소 사용과 같이 목적 유전자에 연결하는 과정 중에 발생할 수 있는 뉴클레오티드의 추가, 및/또는 삭제, 및/또는 변이 등의 경우를 배제하지 않는다.
- [51] 예를 들어, 서열번호 1로 표시되는 뉴클레오티드 서열로 이루어진 프로모터 활성을 갖는 상기 폴리뉴클레오티드는, 서열번호 1의 뉴클레오티드 서열의 전체 또는 일부에 대한 상보 서열과 엄격한 조건 하에 하이브리드화되어 본 출원의

프로모터 활성을 갖는 뉴클레오티드 서열이라면 제한 없이 포함할 수 있다.

[52]

[53] 나아가, 본 출원의 폴리뉴클레오티드는 목적 단백질을 코딩하는 유전자와 작동 가능하게 연결될 수 있다.

[54]

[55] 본 출원에서 용어 "유전자 발현 조절 서열"은 본 출원의 폴리뉴클레오티드를 포함하며, 이에 작동 가능하게 연결되어 있는 목적 유전자를 발현시킬 수 있는 서열을 의미한다.

[56]

본 출원에서 용어 "작동 가능하게 연결된"(operatively linked)은 본 출원의 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드가 목적 유전자의 전사를 개시 및 매개하도록 상기 유전자 서열과 기능적으로 연결되어 있는 것을 의미한다. 작동 가능한 연결은 당업계의 공지된 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당업계의 절단 및 연결 효소 등을 사용하여 제작할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[57]

[58] 나아가, 본 출원의 유전자 발현 조절 서열은 유전자의 전사를 실시하기 위한 프로모터 외에 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 DNA 등을 더 포함할 수 있다.

[59]

예를 들면, 원핵생물에 적합한 조절 서열은 프로모터 외에, 리보솜 결합 부위를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 출원의 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드는 통상의 당업자에 의해 필요에 따라 상기한 바와 같은 유전자 발현 조절을 위한 서열을 구성할 수 있다.

[60]

[61] 본 출원에서, 상기 목적 유전자는 미생물에서 발현을 조절하고자 하는 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 의미한다.

[62]

예를 들면, 아미노산(글루탐산 등), 유기산(젖산 등) 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 산물의 생산에 관여하는 유전자일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 구체적으로, 상기 유전자는 아미노산(글루탐산 등) 생합성 관련된 효소를 코딩하는 유전자 및/또는 유기산(젖산 등) 생합성에 관련된 효소를 코딩하는 유전자일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 더욱 구체적으로, 상기 유전자는 락테이트 디하이드로게나제(LDH)를 코딩하는 유전자일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 LDH를 코딩하는 유전자의 서열은 미국 국립보건원의 GenBank와 같은 공지의 데이터 베이스를 통하여 당업자가 용이하게 입수할 수 있다.

[63]

[64] 예를 들면, 본 출원의 상기 유전자 발현 조절 서열은 LDH를 코딩하는 유전자 서열과 작동 가능하게 연결되어, 미생물 내 글루탐산 생성량을 증가시키고, 젖산

생성량을 감소시킬 수 있다.

[65]

[66] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 상기 폴리뉴클레오티드 및 상기 폴리뉴클레오티드와 작동 가능하게 연결된 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터를 제공한다.

[67] 상기 폴리뉴클레오티드는 앞서 설명한 바와 같다.

[68]

[69] 구체적으로, 상기 목적 단백질은 락테이트 디하이드로게나제(lactate dehydrogenase: LDH)일 수 있다.

[70]

[71] 본 출원에서 용어 "벡터"는 적합한 숙주 내에서 목적 유전자를 발현시킬 수 있도록 유전 물질을 보유하는 인위적 DNA 분자로서, 상기 폴리뉴클레오티드 또는 적합한 유전자 발현 조절 서열; 및 이에 작동 가능하게 연결된 목적 단백질을 코딩하는 유전자의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 DNA 제조물을 의미한다.

[72]

[73] 본 출원에서 사용되는 벡터는 숙주세포 내에서 발현 가능한 것이면 특별히 제한되지 않으며, 당업계에 알려진 임의의 벡터를 이용하여 숙주세포를 형질전환시킬 수 있다. 통상 사용되는 벡터의 예로는 천연 상태이거나 재조합된 상태의 플라스미드, 코스미드, 바이러스 및 박테리오파지를 들 수 있다.

[74]

예를 들어, 파지 벡터 또는 코스미드 벡터로서 pWE15, M13, λLB3, λBL4, λIXII, λASHII, λAPII, λt10, λt11, Charon4A, 및 Charon21A 등을 사용할 수 있으며, 플라스미드 벡터로서 pBR계, pUC계, pBluescriptII계, pGEM계, pTZ계, pCL계 및 pET계 등을 사용할 수 있다.

[75]

또한, 숙주세포 내 염색체 삽입용 벡터를 통해 염색체 내에 내재적 프로모터를 본 출원의 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드로 교체시킬 수 있다. 예를 들면, pECCG117, pDZ, pACYC177, pACYC184, pCL, pUC19, pBR322, pMW118, pCC1BAC, pCES208, pXMJ19 벡터 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[76]

또한, 상기 폴리뉴클레오티드의 염색체 내로의 삽입은 당업계에 알려진 임의의 방법, 예를 들면, 상동재조합에 의하여 이루어질 수 있다.

[77]

본 출원의 벡터는 상동재조합을 일으켜서 염색체 내로 삽입될 수 있으므로 상기 염색체 삽입 여부를 확인하기 위한 선별 마커(selection marker)를 추가로 포함할 수 있다. 선별 마커는 벡터로 형질전환된 세포를 선별, 즉 폴리뉴클레오티드의 삽입 여부를 확인하기 위한 것으로, 약물 내성, 영양 요구성, 세포 독성제에 대한 내성 또는 표면 단백질의 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]

[79] 본 출원에서 용어 "형질전환"은 상기 폴리뉴클레오티드 또는 유전자 발현 조절 서열 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터를 숙주세포 내에 도입하여, 숙주세포 내에서 상기 유전자가 발현할 수 있도록 하는 것을 의미한다. 나아가, 숙주세포 내에서 목적 유전자가 발현될 수 있지만 한다면, 형질전환된 상기 폴리뉴클레오티드 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자는, 숙주세포의 염색체 상에 위치하거나 염색체 외에 위치하거나 상관없이 이들 모두의 경우를 포함할 수 있다.

[80]

[81] 상기 형질전환하는 방법은 상기 유전자 발현 조절 서열 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 세포 내로 도입하는 모든 방법을 포함하며, 숙주세포에 따라 당 분야에서 공지된 바와 같이 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 예를 들어, 전기천공법(electroporation), 인산칼슘(CaPO_4) 침전, 염화칼슘(CaCl_2) 침전, 미세주입법(microinjection), 폴리에틸렌글리콜(PEG)법, DEAE-덱스트란법, 양이온 리포솜법, 및 초산 리튬-DMSO법 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[82]

[83] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 상기 폴리뉴클레오티드; 및 상기 폴리뉴클레오티드와 작동 가능하게 연결된 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는, 코리네박테리움 속 미생물을 제공한다.

[84]

상기 폴리뉴클레오티드 및 상기 폴리뉴클레오티드와 작동 가능하게 연결된 목적 단백질을 코딩하는 유전자는 앞서 설명한 바와 같다.

[85]

[86] 본 출원에서 용어 "미생물"은 야생형 미생물이나, 자연적 또는 인위적으로 유전적 변형이 일어난 미생물을 모두 포함하며, 외부 유전자가 삽입되거나 내재적 유전자의 활성이 강화되거나 약화되는 등의 원인으로 인해서 특정 기작이 약화되거나 강화된 미생물을 모두 포함하는 개념이다.

[87]

[88] 본 출원에서, 상기 미생물은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있고, 구체적으로 상기 폴리뉴클레오티드 및/또는 상기 폴리뉴클레오티드와 작동 가능하게 연결되고 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함할 수 있다. 또는, 상기 미생물은 상기 폴리뉴클레오티드 또는 유전자 발현 조절 서열 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 폴리뉴클레오티드, 상기 목적 단백질을 코딩하는 유전자 및 벡터는 형질전환에 의해 상기 미생물에 도입될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 나아가, 상기 미생물은 상기 유전자가 발현될 수 있다면, 상기 폴리뉴클레오티드 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자가, 염색체 상에 위치하거나 염색체 외에 위치하는 것과는 무관하다.

- [89]
- [90] 본 출원의 목적상, 상기 폴리뉴클레오티드 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 미생물은 글루탐산의 생성량이 증가되고, 젖산의 생성량이 감소된 것일 수 있다.
- [91] 예를 들어, 상기 미생물은 폴리뉴클레오티드는 락테이트 디하이드로게나제의 활성이 약화된 것일 수 있다.
- [92]
- [93] 본 출원에서 상기 미생물은 본 출원의 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드가 도입되어 프로모터로 작동할 수 있는 미생물이라면 제한 없이 포함될 수 있다.
- [94] 구체적으로, 상기 미생물은 코리네박테리움 속 미생물일 수 있으며, 더욱 구체적으로는 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) 또는 코리네박테리움 플라븀(*Corynebacterium flavum*)일 수 있고, 가장 구체적으로 코리네박테리움 글루타미쿰일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [95]
- [96] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 상기 코리네박테리움 속 미생물을 배지에서 배양하는 단계; 및 상기의 배지에서 목적 물질을 회수하는 단계를 포함하는, 목적 물질을 생산하는 방법을 제공한다.
- [97] 상기 폴리뉴클레오티드 및 미생물은 앞서 설명한 바와 같다.
- [98]
- [99] 본 출원에서, 상기 목적 물질은 아미노산일 수 있다. 구체적으로, 상기 아미노산은 다른 언급이 없는 한 L-형태의 아미노산일 수 있으며, 글리신, 알라닌, 발린, 로이신, 아이소로이신, 트레오닌, 세린, 시스테인, 글루타민, 메치오닌, 아스파라트산, 아스파라긴, 글루탐산, 라이신, 알지닌, 히스티딘, 페닐알라닌, 티로신, 트립토판, 프롤린, 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [100] 더욱 구체적으로, 상기 아미노산은 글루탐산일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [101]
- [102] 본 출원에서 용어 "배양"은 미생물을 적당히 인공적으로 조절된 환경조건에서 생육시키는 것을 의미한다. 본 출원에서 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 미생물을 이용하여 목적 물질을 생산하는 방법은 당업계에 널리 알려져 있는 방법을 이용하여 수행할 수 있다. 구체적으로, 상기 배양은 배치 공정, 주입 배치 또는 반복 주입 배치 공정(fed batch or repeated fed batch process)에서 연속식으로 배양할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 배양에 사용되는 배지는 적절한 방식으로 특정 균주의 요건을 충족해야 한다. 코리네박테리움 균주에 대한 배양 배지는 공지되어 있다(예를 들면, *Manual of Methods for General Bacteriology* by the American Society for Bacteriology, Washington D.C., USA, 1981).

- [103] 배지 중에서 사용될 수 있는 당원으로는 포도당, 사카로즈, 유당, 과당, 말토즈, 전분, 셀룰로즈와 같은 당 및 탄수화물, 대두유, 해바라기유, 피마자유, 코코넛유 등과 같은 오일 및 지방, 팔미트산, 스테아린산, 리놀레산과 같은 지방산, 글리세롤, 에탄올과 같은 알코올, 아세트산과 같은 유기산이 포함된다. 이들 물질은 개별적으로 또는 혼합물로서 사용될 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [104] 사용될 수 있는 질소원으로는 펩톤, 효모 추출물, 육즙, 맥아 추출물, 옥수수 침지액, 대두밀 및 요소 또는 무기 화합물, 예를 들면 황산암모늄, 염화암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄 및 질산암모늄이 포함된다. 질소원 또한 개별적으로 또는 혼합물로서 사용할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [105] 사용될 수 있는 인원으로는 인산이수소칼륨 또는 인산수소이칼륨 또는 상응하는 나트륨을 함유하는 염이 포함될 수 있다. 또한, 배양 배지는 성장에 필요한 황산마그네슘 또는 황산철과 같은 금속염을 함유할 수 있다. 마지막으로, 상기 물질에 더하여 아미노산 및 비타민과 같은 필수 성장 물질이 사용될 수 있다. 또한, 배양 배지에 적절한 전구체들이 사용될 수 있다. 상기된 원료들은 배양과정에서 배양물에 적절한 방식에 의해 회분식으로 또는 연속식으로 첨가될 수 있다.
- [106] 상기 미생물의 배양 중 수산화나트륨, 수산화칼륨, 암모니아와 같은 기초 화합물 또는 인산 또는 황산과 같은 산 화합물을 적절한 방식으로 사용하여 배양물의 pH를 조절할 수 있다. 또한, 지방산 폴리글리콜 에스테르와 같은 소포제를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다. 호기 상태를 유지하기 위해 배양물 내로 산소 또는 산소-함유 기체(예, 공기)를 주입할 수 있다.
- [107] 배양물(배지)의 온도는 보통 20°C 내지 45°C, 구체적으로는 25°C 내지 40°C일 수 있다. 배양 시간은 원하는 목적 물질의 생성량이 얻어질 때까지 계속할 수 있으나, 구체적으로는 10 내지 160시간일 수 있다.
- [108]
- [109] 배양물(배지)로부터의 목적 물질의 회수는 당업계에서 알려진 통상적인 방법에 의하여 분리되어 회수될 수 있다. 이러한 분리 방법에는, 원심분리, 여과, 크로마토그래피 및 결정화 등의 방법이 이용될 수 있다. 예를 들면, 배양물을 저속 원심분리하여 바이오매스를 제거하고 얻어진 상등액을, 이온교환 크로마토그래피를 통하여 분리할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또 다른 방법으로, 배양물(배지)로부터 균체 분리 및 여과 공정을 수행하고, 별도의 정제 공정 없이 목적 물질을 회수할 수도 있다. 또 다른 방법으로, 상기 회수 단계는 정제 공정을 추가로 포함할 수 있다.
- [110]
- [111] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 상기 코리네박테리움 속 미생물을 배지에서 배양하여 발효하는 단계를 포함하는, 발효 조성물의 제조 방법을 제공한다.
- [112] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 상기 방법에 의해 제조된 발효 조성물을

제공한다.

[113] 상기 폴리뉴클레오티드 및 미생물은 앞서 설명한 바와 같으며, 상기 미생물을 배지에서 배양하는 단계 역시 앞서 설명한 바와 같다.

[114]

[115] 본 출원에서 용어 "상기 발효 조성물"은, 본 출원의 미생물을 배양하여 수득된 조성물을 의미한다. 나아가, 상기 발효 조성물은 상기 미생물을 배양한 후, 적절한 후처리공정을 거친 후 수득된 액상 또는 분말 형태의 조성물을 포함할 수 있다. 이 때, 적절한 후처리공정은, 예를 들어, 상기 미생물의 배양 공정, 균체 제거 공정, 농축 공정, 여과 공정, 및 담체 혼합 공정을 포함할 수 있으며, 추가적으로 건조 공정을 더 포함할 수도 있다. 경우에 따라서는, 상기 후처리공정은 정제 공정을 포함하지 않을 수 있다. 상기 발효 조성물은 본 출원의 미생물을 배양함으로써 글루탐산의 생성량이 증가되고 젖산의 생성량이 감소된 조성물을 포함함에 따라 최적의 맛을 낼 수 있다.

[116] 또한, "상기 발효 조성물"은 상기의 액상 또는 분말 형태의 조성물이 포함된 조미료 제품(예를 들어, 육수용 분말 제품, 스낵 시즈닝 제품 등)을 배제하지 않는다. 나아가, "상기 발효 조성물"은 본 출원의 미생물을 배양하여 수득된 조성물을 포함하기만 한다면, 비발효 공정으로 수득된 물질 및/또는 비천연 공정으로 수득된 또 다른 물질을 추가로 혼합한 경우를 배제하지 않는다.

[117]

발명의 실시를 위한 형태

[118] 이하 본 출원을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 출원을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 출원의 범위가 이들 실시예에 국한되는 것은 아니다.

[119]

[120] 실시예 1. 젖산 생성능 저하 변이주 선별

[121] 실시예 1-1. UV조사를 통한 무작위 돌연변이 유발

[122] 발효의 목적 산물인 글루탐산의 생성능은 향상되고, 발효 산물의 기호성을 저하시키는 젖산의 생성능은 저하된 변이 균주를 선별하기 위하여, 먼저 야생형 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*, ATCC13869)을 한천을 포함하는 영양배지에 도말하여 30°C에서 16시간 동안 배양하였다. 이렇게 획득한 수백 개의 콜로니를 실온에서 UV를 조사하여 균주 내 게놈상에 무작위 돌연변이를 유발시켰다.

[123]

[124] 실시예 1-2. 돌연변이 유발 균주 발효역가 실험 및 균주 선별

[125] 이후, 무작위 돌연변이가 유발된 상기 돌연변이 균주들을 대상으로 발효 역가 실험을 실시하였다.

[126] 각각의 콜로니를 영양배지에서 계대 배양한 후, 발효배지에서 5시간

배양하였다. 그런 다음, 각각의 배지에 25% 트윈40(tween40)를 0.4% 농도로 추가하였으며, 각각의 콜로니를 다시 32시간 동안 배양하였다.

[127]

[128] 영양배지:

[129] 포도당 1%, 육즙 0.5%, 폴리펩톤 1%, 염화나트륨 0.25%, 효모엑기스 0.5%, 한천 2%, 유레아 0.2%, pH 7.2

[130]

[131] 발효배지:

[132] 원당 6%, 탄산칼슘 5%, 황산암모늄 2.25%, 일인산칼륨 0.1%, 황산마그네슘 0.04%, 황산철 10 mg/L, 바이오틴 0.3 mg/L, 티아민 염산염 0.2 mg/L

[133]

[134] 상기 조건에서 각각의 콜로니를 배양하여, 야생형 코리네박테리움 글루타미쿰(ATCC13869)과 동등하거나 그 이상의 L-글루탐산을 생산하는 돌연변이 균주들을 선별하였다. 이후, 선별한 돌연변이 균주들에 대하여, YSI를 이용하여 L-글루탐산 농도를 측정하였고, HPLC를 이용하여 젖산 농도를 측정하였다. 측정된 L-글루탐산 및 젖산의 농도는 하기 표 1에 나타내었다.

[135]

[136] [표1]

균주명	L-글루탐산(g/L)	젖산(g/L)
ATCC13869	14.5	1.5
ATCC13869-m1	15.1	1.2
ATCC13869-m2	14.0	0.7
ATCC13869-m3	17.7	1.5
ATCC13869-m4	13.9	2.0
ATCC13869-m5	14.4	1.8
ATCC13869-m6	16.7	0.9
ATCC13869-m7	18.8	0.4
ATCC13869-m8	16.2	0.7
ATCC13869-m9	18.9	0.1
ATCC13869-m10	12.4	2.1
ATCC13869-m11	13.8	2.1
ATCC13869-m12	15.7	1.4
ATCC13869-m13	15.3	0.8
ATCC13869-m14	16.4	1.0
ATCC13869-m15	17.2	1.1
ATCC13869-m16	18.2	0.7

[137]

[138] 표 1을 참고하여, 야생형 균주에 비하여 글루탐산의 생산량이 증가하고, 젖산의 생산량이 감소한 돌연변이 균주로서 "ATCC13869-m7" 및 "ATCC13869-m9"을 선별하였다.

[139]

[140] 실시예 2. 유전자 시퀀싱을 통한 변이 확인

[141] 상기 돌연변이 균주의 유전자 변이를 확인하기 위하여, ATCC13869-m7 및 ATCC13869-m9 균주의 유전자들을 야생형 균주와 비교하였다.

[142] 그 결과, 상기 ATCC13869-m7 및 ATCC13869-m9 균주는 락테이트 디하이드로게나제(lactate dehydrogenase)를 코딩하는 유전자의 프로모터 영역(promoter region)의 특정 위치에 동일한 변이를 포함하고 있다는 것을 확인하였다.

[143] 구체적으로, ATCC13869-m7 및 ATCC13869-m9는 서열번호 2로 표시되는 프로모터 영역의 서열 내 37번째 뉴클레오타이드 T가 G로 치환된 변이를 포함하고

있음을 확인하였다. 서열번호 2로 표시되는 상기 프로모터 영역은 코리네박테리움 속 미생물, 보다 구체적으로, 야생형 코리네박테리움 글루타미쿰(ATCC13032, ATCC13869, ATCC14067)에 공통적으로 포함된 서열임을 확인하였다.

- [144] 따라서, 이하 실시예 3 및 4에서는, 상기 변이가 코리네박테리움 속 미생물의 글루탐산 및 젖산 생성량에 영향을 미치는지 확인하고자 하였다.
- [145]
- [146] 실시예 3. 변이가 도입된 균주 제작 및 젖산 생성량 확인
- [147] 실시예 3-1. 변이가 도입된 균주 제작
- [148] 상기 실시예 2를 통해 확인한 변이가 도입된, 변이 균주를 제작하고자 하였다. 구체적으로, 상기 변이를 야생형 코리네박테리움 글루타미쿰(ATCC13869 및 ATCC13032)에 도입(서열번호 2로 표시되는 폴리뉴클레오티드 서열의 37번째 뉴클레오티드를 G로 치환)하기 위하여 타겟 변이를 포함하는 역방향의 올리고뉴클레오티드를 75-머(mer)의 길이로 디자인하였다.
- [149] 구체적으로, 서열번호 5의 올리고뉴클레오티드 30 μ g을 코리네박테리움 글루타미쿰 야생형 ATCC13869 균주와 ATCC13032 균주에 전기펄스법(Appl. Microbiol. Biothcnol., 1999, 52:541-545)으로 형질전환하고, 복합액체배지를 1 ml 첨가하여 30°C에서 30분 동안 160 rpm으로 진탕 배양하였다. 이후, 배양액을 얼음에서 10분간 인큐베이션(incubation)하고, 4°C에서 10분 동안 4000 rpm으로 원심분리한 후 상등액을 제거하여 균체를 확보하였다. 이후, 4°C의 10% 글리세롤 용액을 1 ml 첨가하고 혼합한 후, 4°C에서 10분 동안 4000 rpm으로 원심분리하고 상등액을 제거하여 균체를 세척하였다. 이와 같이 균체를 1회 더 세척하고, 4°C의 10% 글리세롤 용액을 0.1 ml 첨가하여 다음 형질전환을 위한 균주를 준비하였다. 이후, 상기와 같은 전기펄스법으로 서열번호 5의 올리고뉴클레오티드를 이용하여 형질전환하는 과정을 10회 반복한 후, 복합평판배지에 도말하여 콜로니를 확보하였다(Nat. Protoc., 2014 Oct;9(10):2301-16).
- [150] 상기 확보한 콜로니의 유전자 서열 분석을 수행한 결과, 균주에 상기의 타겟 변이가 도입된 것을 확인하였으며, 변이가 도입된 상기 균주를 "ATCC13869::ldh-pro-1mt" 및 "ATCC13032::ldh-pro-1mt"로 명명하였다.
- [151]
- [152] 실시예 3-2. 젖산 생산량 확인
- [153] 상기 실시예 3-1을 통해 제작한 변이 균주 ATCC13869::ldh-pro-1mt 및 ATCC13032::ldh-pro-1mt와 이들의 각 야생형 코리네박테리움 글루타미쿰(ATCC13869 및 ATCC13032)은 각각 실시예 1-2와 동일한 방법으로 배양하였다.
- [154] 배양이 완료된 후, 각 배지 내 L-글루탐산 농도 및 젖산 농도를 측정하였다. 측정된 L-글루탐산 및 젖산의 농도는 하기 표 2에 나타내었다.

[155]

[156] [표2]

균주명	L-글루탐산(g/L)	젖산(g/L)
ATCC13869	14.5	1.5
ATCC13869::ldh-pro-1mt	19.2	0.0
ATCC13032	8.2	2.7
ATCC13032::ldh-pro-1mt	10.8	0.3

[157]

[158] 표 2에 나타낸 바와 같이, 변이가 도입된 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13869::ldh-pro-1mt 균주가 생산한 L-글루탐산의 농도는, 야생형 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13869이 생산한 L-글루탐산 농도 대비 약 4.7 g/L(약 32%) 더 높음을 확인하였다. 반면에, 야생형 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13869은 젖산을 1.5 g/L 생산하였으나, ATCC13869::ldh-pro-1mt 균주를 배양한 배지에서는 젖산이 측정되지 않았다.

[159] 또한, 변이가 도입된 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032::ldh-pro-1mt 균주가 생산한 L-글루탐산의 농도는, 야생형 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032이 생산한 L-글루탐산 농도 대비 약 2.6 g/L(약 32%) 더 높음을 확인하였다. 반면에, 야생형 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032은 젖산을 2.7 g/L 생산하였으나, ATCC13032::ldh-pro-1mt 균주를 배양한 배지에서는 젖산이 매우 미량(0.3 g/L) 측정되었다.

[160] 즉, 상기 변이는 미생물의 L-글루탐산 생성능을 증가시키고 젖산의 생성능을 감소시킨다는 것을 확인하였다.

[161] 또한, 상기 균주 ATCC13869::ldh-pro-1mt를 CA02-9209로 명명하고 2018년 2월 28일자로 부다페스트 조약 하의 기탁기관인 한국미생물보존센터(KCCM)에 국제 기탁하여 KCCM12227P의 기탁번호를 부여받았다.

[162]

[163] 실시예 4. 변이가 도입된 KFCC11074 균주의 젖산 생성량 및 효소 활성 확인

[164] 실시예 4-1. 변이가 도입된 벡터 제작

[165] 야생형 균주 이외에, 글루탐산 생산능이 증가된 균주에서도 상기 변이가 동일한 효과를 나타내는지 확인하기 위하여, 글루탐산 생산 균주로 알려진 KFCC11074 균주(한국 등록특허공보 제10-0292299호)에 상기 변이를 도입하고자 하였다.

[166] 구체적으로, 상기 균주가 포함하는 서열번호 2로 표시되는 폴리뉴클레오티드 서열의 37번째 뉴클레오티드를 G로 치환하기 위하여 유전자 치환 벡터를 제작하였다. 벡터를 제작하기 위한 유전자 단편은 ATCC13869 게노믹 DNA를 주형으로 PCR을 통하여 획득하였다. 미국 국립보건원 진뱅크(NIH GenBank)에

등록되어 있는 코리네박테리움 글루타미쿰(ATCC13869) 유전자 및 주변 염기서열에 대한 정보를 바탕으로, 서열번호 6, 7, 8 및 9의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 프라이머를 제작하였다.

- [167] PCR은 95°C에서 5분간 변성 후, 95°C 20초 변성, 55°C 20초 어닐링, 72°C 30초 중합을 30회 반복한 후, 72°C에서 5분간 중합반응으로 수행하였다. 보다 구체적으로, 서열번호 6 및 7의 프라이머를 이용하여 증폭한 500 bp의 폴리뉴클레오티드와 서열번호 8 및 9의 프라이머를 이용하여 증폭한 500 bp의 폴리뉴클레오티드를 얻었다. 상기 수득한 두 유전자 단편을 제한효소 BamHI, SalI으로 절단한 pDZ 벡터(대한민국 등록특허 제10-0924065호 및 국제 공개특허 제2008-033001호)에 인퓨전 효소를 이용하여 연결함으로써 유전자 치환 벡터를 제작하였고, 이를 "pDZ-ldh-pro-1mt"로 명명하였다. 상기의 벡터 제작을 위해 사용된 프라이머 서열 정보는 하기 표 3에 나타내었다.

[168]

[169] [표3]

서열번호	프라이머 명	5'서열3'
6	ldh-pro-1mt-AF	CGGTACCCGGGGATCCTGTGGGTGGCGT TGTA
7	ldh-pro-1mt-AR	CTTTGTTACACCTTTACTTATGCCCGATT ATGT
8	ldh-pro-1mt-BF	GTAAAGGTGTAACAAAGGAATCCGGGC ACAAGC
9	ldh-pro-1mt-BR	ATGCCTGCAGGTCGACCCACACTGCGTA GGTC

[170]

[171] 실시예 4-2. 변이가 도입된 KFCC11074의 제작 및 젖산 생성량 확인

[172] 상기 실시예 4-1을 통해 제작한 유전자 치환 벡터를 KFCC11074 균주에 도입하여 변이가 도입된 글루탐산 생산 균주 "KFCC11074::ldh-pro-1mt"를 제작하였다. 변이가 도입되지 않은 코리네박테리움 글루타미쿰 KFCC11074 및 상기 KFCC11074::ldh-pro-1mt 균주는 각각 실시예 1-2와 동일한 방법으로 배양하였다.

[173] 배양이 완료된 후, 각 배지 내 L-글루탐산 농도 및 젖산 농도를 측정하였다. 측정된 L-글루탐산 및 젖산의 농도는 하기 표 4에 나타내었다.

[174]

[175] [표4]

균주명	L-글루탐산(g/L)	L-젖산(g/L)
KFCC11074	9.1	22.5
KFCC11074::ldh-pro-1mt	17.1	6.5

[176]

[177] 표 4에 나타난 바와 같이, 변이가 도입된 코리네박테리움 글루타미쿰 KFCC11074::ldh-pro-1mt 균주가 생산한 L-글루탐산의 농도는, 변이가 도입되지 않은 코리네박테리움 글루타미쿰 KFCC11074이 생산한 L-글루탐산 농도 대비 약 8 g/L(약 88%) 더 높음을 확인하였다.

[178] 반면에, 상기 KFCC11074::ldh-pro-1mt 균주가 생산한 젖산의 농도는, 변이가 도입되지 않은 코리네박테리움 글루타미쿰 KFCC11074가 생산한 젖산의 농도 대비 17 g/L 낮음을 확인하였다.

[179] 즉, 상기 변이는 미생물의 L-글루탐산 생성능을 증가시키고 젖산의 생성능을 감소시킨다는 것을 다시 한 번 확인하였다.

[180]

[181] 실시예 4.3. 변이가 도입된 KFCC11074의 LDH 효소 활성 확인

[182] 상기 실시예 4-2를 통해 제작한 KFCC11074::ldh-pro-1mt 균주의 젖산 생성능 감소에 대한 메커니즘을 확인함과 동시에, 상기 변이는 락테이트 디하이드로게나제(lactate dehydrogenase: LDH)의 프로모터 내에 포함되어 있음을 확인한바, 상기 변이에 따른 젖산 생산 효소인 락테이트 디하이드로게나제의 활성을 확인하고자 하였다.

[183] 구체적으로, 상기 효소의 활성 평가는 다음과 같은 방법으로 수행하였다. 먼저, 세포를 하기 조성의 #3호 배지 25 ml(250 ml flask)에 6시간(30°C, 200rpm) 동안 배양한 뒤, 세포를 침전시켜(4000rpm, 10분) 상층액을 제거하고 20 mM Tris-HCl(pH7.5) 25 ml로 세포 세척을 반복적으로 3회 실시하였다. 세척 후 상층액을 제거하였고, 세포 추출을 위해 20 mM Tris(pH 7.5)의 조성에 15% 글리콜 버퍼(glycerol buffer) 2 ml로 재현탁(resuspension)하여 1 ml을 비드 튜브(bead tube)에 넣고 균질기를 이용해 46/30초 조건으로 균질화를 6회 진행하였다. 이후 4°C, 13000rpm에서 20분 동안 원심분리하였다.

[184]

[185] #3호 배지:

[186] (포도당 2%, 폴리펩톤 1%, (NH₄)₂SO₄ 1%, KH₂PO₄ 0.52%, K₂HPO₄ 1.07%, 효모엑기스 1%, 유레아(urea) 0.15%, MgSO₄·7H₂O 0.05%, d-비오틴(d-Biotin) 1.8 mg/L, 티아민-HCl(Thiamin-HCl) 9 mg/L, 칼슘-판토텐산(Ca-pantothenic) 9 mg/L, 니아신아미드(Niacinamide) 60 mg/L

[187]

- [188] 이후, 비드 튜브에서 수득한 상층액(샘플)에 포함되어 있는 단백질의 농도를 확인 및 표준화하기 위하여 브래드포드 어세이(Bradford assay)를 진행하였다. 브래드포드 어세이는 아래의 표 5 및 6을 참고하여 표준 곡선(standard curve)을 확보하고, 샘플의 농도를 확인하였다. 이때, 총 20 μl 부피의 샘플에 1x 바이오라드 프로틴 어세이(Biorad protein assay) 시약을 980 μl 첨가 및 볼텍싱(vortexing)하여 흡광도를 3분 내외로 595nm에서 측정하였다.

[189]

[190] [표5]

<STD 및 추출 샘플링>					
mg/mL	0	0.025	0.05	0.1	0.2
BSA(1mg/mL) (μl)	0	0.5	1	2	4
추출 버퍼 (μl)	20	19.5	19	18	16
총 부피 (μl)	20	20	20	20	20

[191]

[192] [표6]

세포 추출물	1/10희석	1/5희석	1/20희석	1/50희석
세포 추출물 (μl)	2	4	(1/10)10	(1/10)4
추출 버퍼 (μl)	18	16	10	16
총 부피 (μl)	20	20	20	20

[193]

- [194] 이후, KFCC11074 및 KFCC11074::ldh-pro-1mt 균주의 락테이트 디하이드로게나제에 대한 활성 실험은 하기 표 7의 반응액 조성비를 이용하여 진행하였고, 스타터(Starter)로서 30 mM 피루브산나트륨(sodium pyruvate)을 사용하였다. 또한, 하기 표 8의 조건으로 측정된 상기 두 균주의 락테이트 디하이드로게나제 활성은 하기 표 9에 나타내었다.

[195]

[196] [표7]

반응액	1번 반응 기준
0.2 M 트리스-HCl pH 7.5 (μl)	500
30 mM 피루브산나트륨 (μl)	100
6.6 mM NADH (μl)	50
세포추출물 (mg/ml)	178 μg
DDW	Up to 1 ml

[197]

[198] [표8]

Cuvette		10 mm	
Wavelength		340	nm
Unit		U	
Factor		-1	
Decimal places		3	
Temperature on		on	
	Temperature	25	°C
Measuring Procedure		lin. regr.	
	Delay	00:01	min:sec
	Measuring time	1:30	min:sec
	Interval	00:8	min:sec
Autoprint		off	

[199]

[200] [표9]

균주명	LDH 활성 (U)
KFCC11074	0.398
KFCC11074::ldh-pro-1mt	0.150

[201]

[202] 표 9에 나타난 바와 같이, 변이가 도입된 균주에서는 락테이트 디하이드로게나제의 활성이 감소함을 확인할 수 있었다.

[203] 즉, 상기 변이는 미생물의 락테이트 디하이드로게나제의 활성을 감소시킴으로써 젖산의 생성능을 감소시킨다는 것을 확인하였다.

[204]

[205] 상기 결과를 모두 종합하면, 본 출원의 폴리뉴클레오티드는 하나의 염기가 치환된 변이를 포함하는 락테이트 디하이드로게나제의 프로모터인바, 변이된 프로모터 활성을 통해 야생형 또는 글루탐산 생산 균주에서 락테이트 디하이드로게나제의 활성을 약화시켜 발효의 목적 산물인 글루탐산의 생산능을 증가시키며, 나아가 발효 산물의 기호성을 저하시키는 젖산의 생산능을 감소시킬 수 있으므로, 글루탐산을 고수율로 생산하고자 하는 다양한 산업 분야에 유용하게 사용될 수 있다.

[206]

[207] 이상의 설명으로부터, 본원이 속하는 기술분야의 당업자는 본원이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한

실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본원의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본원의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

[208]

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>Corynebacterium glutamicum</i> C602-9209	국제 기탁기관이 부여한 수탁번호: KCCM12227P
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 2018년 2월 28일에 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: 2018. 02. 28

상기 번역은 원문의 내용과 상위 없음을 증명함.

2019년 3월 8일

변리사 손민

