

명세서

발명의 명칭: 글라이신 생산능이 증가된 미생물 및 이를 이용한 발효 조성물 생산 방법

기술분야

- [1] 본 출원은 글라이신 생산능이 증가된 미생물 및 이를 이용한 발효 조성물 생산 방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 HisG에 변이가 도입되어 글라이신 생산능이 증가된 코리네박테리움 속 미생물, 이를 이용한 글라이신 및 글루탐산을 포함하는 발효 조성물의 제조 방법, 및 상기 발효 조성물에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] L-아미노산은 단백질의 기본 구성단위로서,약품 원료와 식품첨가제, 동물 사료, 영양제, 살충제, 살균제 등의 중요 소재로 사용된다. 그 중에서도, L-글루탐산은 발효에 의하여 생산되는 대표적인 아미노산으로, 특유의 독특한 맛(감칠맛)을 지니고 있어 식품 분야에서는 물론, 의약품 분야, 기타 동물 사료 분야 등에 널리 이용되고 있는 중요한 아미노산 중의 하나이다. 또한, 글라이신은 주로 단맛을 내어 식품공업에서 조미료로 사용되고, 천연조미료와 함께 사용하여 맛을 높인다. 나아가, 산화방지작용, 완충작용 등에도 이용되고 있으며, 의약 면에서는 수액, 제산제, 종합 아미노산제제, 영양 보급제로 이용되고 있다.

[4]

- [5] 상기 아미노산을 생산하는 통상적인 방법으로는 주로 브레비박테리움(*Brevibacterium*)이나 코리네박테리움(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 이용한 발효 방법이 있고(미국 특허 제3,220,929호, 제6,682,912호), 또한 모노클로로초산법, 스트렉커(Strecker)법 등의 합성법을 통한 공업적인 방법으로도 생산된다.

[6]

- [7] 또한, 아미노산을 효율적으로 생산하기 위한 다양한 연구, 예를 들어, 아미노산 고효율 생산 미생물이나 발효공정 기술을 개발하기 위한 노력이 이루어지고 있다. 구체적으로, 코리네박테리움 속 균주에서 아미노산 생합성에 관여하는 효소를 암호화하는 유전자의 발현을 증가시키거나 또는 아미노산 생합성에 불필요한 유전자를 제거하는 것과 같은 목적 물질 특이적인 접근 방법이 개발되었고(한국 등록특허공보 제10-0924065호, 제1208480호), 이러한 방법 이외에 아미노산 생산에 관여하지 않는 유전자를 제거하는 방법, 아미노산

생산에 있어 구체적으로 기능이 알려지지 않은 유전자를 제거하는 방법 또한 활용되고 있다. 그러나, 여전히 효율적이고 높은 수율로 아미노산을 생산할 수 있는 방법에 대한 연구의 필요성이 대두되고 있다.

[8]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [9] 본 발명자들은 여러 개의 아미노산을 동시 생산할 수 있는 방법을 개발하기 위해 노력한 결과, 글루탐산 생산 균주에서, 모균주와 비교하여 HisG 활성을 강화하는 경우, 글루탐산의 생성능은 유지하면서 글라이신 생성능을 향상시킬 수 있음을 확인하여 본 출원을 완성하였다.

[10]

과제 해결 수단

- [11] 본 출원의 하나의 목적은 ATP 포스포리보실트랜스퍼라제(ATP phosphoribosyltransferase: HisG)의 활성이 강화된, 글라이신 생산능이 증가된 코리네박테리움 속 미생물을 제공하는 것이다.
- [12] 본 출원의 또 다른 하나의 목적은 상기 코리네박테리움 속 미생물을 배지에서 배양하여 발효하는 단계를 포함하는, 글라이신 및 글루탐산을 포함하는 발효 조성물의 제조 방법을 제공하는 것이다.
- [13] 본 출원의 또 다른 하나의 목적은 상기 방법에 의해 제조된 발효 조성물을 제공하는 것이다.

[14]

발명의 효과

- [15] 본 출원의 HisG 변이는 미생물에 도입되어 글루탐산과 글라이신을 동시 생산할 수 있으므로 아미노산 생산에 유용하게 활용될 수 있다. 또한, 발효물 내 글루탐산의 양과 글라이신의 양을 조절하여 발효물의 맛과 기호성을 개선시켜 발효액 및 이를 이용한 조미소재 제품에 적용시킬 수 있다.

[16]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [17] 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.

[18]

- [19] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 출원의 하나의 양태는 ATP 포스포리보실트랜스퍼라제(ATP phosphoribosyltransferase: HisG)의 활성이 강화된, 글라이신 생산능이 증가된 코리네박테리움 속 미생물을 제공한다.

- [20] 구체적으로, 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열의 233번째 아미노산이

히스티딘(H)으로 치환된 ATP 포스포리보실트랜스퍼라제(ATP phosphoribosyltransferase: HisG)를 포함하는, 글라이신 생산능이 증가된 코리네박테리움 속 미생물을 제공할 수 있다.

- [21] 또한, 구체적으로, 상기 서열번호 4로 아미노산 서열의 233번째 아미노산이 히스티딘(H)으로 치환되고 235번째 아미노산이 글루타민(Q)으로 치환된 ATP 포스포리보실트랜스퍼라제(ATP phosphoribosyltransferase: HisG)를 포함하는, 글라이신 생산능이 증가된 코리네박테리움 속 미생물을 제공할 수 있다.
- [22]
- [23] 본 출원에서 "ATP 포스포리보실트랜스퍼라제(ATP phosphoribosyltransferase)"는 "HisG"로도 명명되며, 히스티딘 합성 경로에 관여하는 효소를 의미한다. 히스티딘 합성 경로는 총 9개의 효소로 이루어져 있는데(HisG-HisE-HisI-HisA-HisH-HisB-HisC-HisN-HisD) 상기 HisG는 그 중 1단계를 구성한다.
- [24] 상기 HisG는 히스티딘 생성에 관여한다는 것이 알려져 있었으나, 글라이신 생성과의 연관성에 대해서는 공지된 바 없으며 본 발명자들에 의해 처음으로 규명되었다. 더욱 구체적으로, HisG 활성 강화를 통해 글라이신 생성량이 증가한다는 점, 특히, HisG는 생산물인 히스티딘에 의해 피드백 억제를 받는데, 본 출원에서는 히스티딘 피드백 억제를 해제한 변이를 도입하였고, 이에 따른 글라이신 생성량 증가 및 글루탐산 생성량 유지 효과는 본 발명자들에 의해 처음으로 규명되었다.
- [25] 본 출원에서 "HisG의 활성 강화"는 HisG 효소의 활성이 코리네박테리아 속 미생물이 천연의 상태로 가지고 있는 효소의 활성 상태인, 내재적 활성보다 증가된 것을 의미한다. HisG의 활성을 강화시키는 방법의 예로, i) HisG를 암호화하는 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 추가로 염색체에 삽입하는 방법 또는 HisG를 암호화하는 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 벡터 시스템에 도입하는 방법 등에 의하여 상기 효소를 암호화하는 염기서열의 카피수를 증가시키는 방법, ii) hisG 유전자의 프로모터를 강화하는 방법, 예를 들어, 강한 프로모터로 교체하는 방법, 또는 프로모터에 변이를 도입하는 방법이 포함될 수 있으며 iii) 유전자 변이에 의해 활성이 강한 효소로 변이시키는 방법 등이 있다.
- [26]
- [27] 구체적으로, 본 출원에서는 서열번호 4로 표시되는 HisG 아미노산 서열의 233번째 아미노산인 글라이신이 히스티딘으로 치환되거나, 서열번호 4로 표시되는 HisG 아미노산 서열의 233번째 아미노산이 글라이신이 히스티딘으로 치환되고 235번째 아미노산인 트레오닌이 글루타민으로 치환될 수 있다. 그에 따라, 상기과 같은 변이된 HisG를 포함하는 코리네박테리움 속 미생물은, 글루탐산의 생성능에는 별다른 영향을 미치지 않고 유지하면서, 글라이신 생성능을 현저하게 증가시킬 수 있다. 상기 글라이신 생산능의 증가는 본 출원의

변형, 즉 상기 치환을 포함하지 않는 HisG를 가진 미생물에 비하여 증가된 것일 수 있다.

- [28] 또 다른 예로, HisG 효소의 프로모터를 변이 또는 치환을 통해 내재적 프로모터에 비하여 강한 프로모터로 변이시킬 수 있다. 상기 내재적 효소의 프로모터 대신 염기치환 변이를 갖는 개량형 프로모터 또는 이중 프로모터가 연결될 수 있는데, 상기 이중 프로모터의 예로는 cj7 프로모터, lysCP1 프로모터, EF-Tu 프로모터, groEL 프로모터, aceA 프로모터, aceB 프로모터 등이 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [29] 또한, 상기 hisG 유전자는 hisE 유전자와 오페론으로 구성되어 있으므로, hisEG 유전자의 프로모터 서열이 변이 또는 치환으로 인한 hisG 과발현을 통해 HisG 효소의 활성을 강화시킬 수 있다. 더욱 구체적으로, hisEG 유전자의 프로모터 서열이 변이는 서열번호 1로부터 폴리뉴클레오티드 서열의 53번째 및 55번째 뉴클레오티드를 T로 치환, 또는 폴리뉴클레오티드 서열의 53번째 및 55번째 뉴클레오티드를 T로 60번째 뉴클레오티드를 G로 치환하여, 내재적 프로모터에 비해 강한 프로모터로 HisG 효소의 활성을 강화할 수 있다. 코리네박테리움 글루타미쿰의 프로모터 서열 연구 문헌(Microb Biotechnol. 2013 Mar; 6(2): 103-117.)을 보면 RNA sequencing(RNA-seq)을 통해 다수의 transcriptional start point (TSP) 및 프로모터 위치를 파악할 수 있게 된다. 이에 코리네박테리움 글루타미쿰 야생형 ATCC13869균주의 RNA seq 실험을 통해서 hisEG 유전자의 프로모터 서열을 확인하게 되었고, 내재적(native) 프로모터 변형을 통해 hisEG 과발현을 유도하고자 하였다. 내재적 프로모터 변형의 방식 중 하나로, 코리네박테리움 글루타미쿰의 프로모터의 -35 및 -10 region 서열의 변이를 통해 컨센서스 서열에 가까워 지도록 하는 방법이 있다. 특히, hisEG 유전자의 프로모터 서열로부터 -10 region(TATA box)의 서열을 컨센서스 서열에 가까워 지게 변이한 경우, 내재적 프로모터에 비하여 강한 프로모터로 변형시킬 수 있다.
- [30]
- [31] 구체적으로, 상기 코리네박테리움 속 미생물에 포함되는 ATP 포스포리보실트랜스퍼라제는 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어지는 것일 수 있고, 또는 상기 ATP 포스포리보실트랜스퍼라제는 서열번호 6의 아미노산 서열로 이루어지는 것일 수 있다.
- [32] 또한, 본 출원의 아미노산 서열은 종래 알려진 돌연변이 유발법, 예를 들면 방향성 진화법(direct evolution) 및 부위특이적 돌연변이법(site-directed mutagenesis)등에 의하여 변형될 수 있다.
- [33] 따라서, 상기 ATP 포스포리보실트랜스퍼라제는 상기 서열번호 5 또는 서열번호 6의 아미노산 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

아미노산 서열을 포함하는 HisG를 포함할 수 있다. 상기 서열과 상동성을 갖는 서열로서 실질적으로 서열번호 5 또는 서열번호 6의 아미노산 서열과 동일하거나 상응하는 생물학적 활성을 갖는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 경우도 역시 본 출원의 범주에 포함됨은 자명하다.

[34]

[35] 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.

[36] 또한, 상기 용어, "글라이신"(glycine)은 단맛이 나는 무색 결정의 아미노산으로, 글리신이라고도 한다. 식품 조미료로 주로 사용되며, 의약 면에서는 수액, 제산제, 종합 아미노산제제, 영양 보충제로도 이용되고 있다. 일반적으로 모노클로로초산법, 스트렉커(Strecker)법 등의 공업적인 합성법을 통해 제조되는데, 합성법은 D형 및 L형의 아미노산이 혼합되어 제조되므로 광학분할을 해야하는 불편함이 있다. 따라서, 반응조건이 온화하고 단시간에 대량생산이 가능하며 공정이 환경 친화적이며 생산물질이 생분해성이라는 등의 다양한 장점을 갖는 발효법으로 글라이신을 제조할 필요가 있다.

[37]

[38] 본 출원에서 용어 "상동성"은 주어진 아미노산 서열 또는 뉴클레오타이드 서열과 일치하는 정도를 의미하며 백분율로 표시될 수 있다. 본 명세서에서, 주어진 아미노산 서열 또는 뉴클레오타이드 서열과 동일하거나 유사한 활성을 갖는 그의 상동성 서열이 "% 상동성"으로 표시된다. 상기 아미노산 서열 또는 뉴클레오타이드 서열에 대한 상동성은 예를 들면, 문헌에 의한 알고리즘 BLAST[참조: Karlin 및 Altschul, Pro. 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>).

[39] 상기 "엄격한 조건"은 폴리뉴클레오타이드 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.

- [40] 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).

[41]

- [42] 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.

[43]

- [44] 본 출원에서, 상기 미생물은 상기 ATP 포스포리보실트랜스퍼라제를 포함할 수 있다. 또한, 상기 ATP 포스포리보실트랜스퍼라제는 벡터를 통한 형질전환에 의해 상기 미생물에 도입될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 나아가, 상기 미생물은 상기 HisG가 발현될 수 있다면, 상기 HisG를 코딩하는 유전자가, 염색체 상에 위치하거나 염색체 외에 위치하는 것과는 무관하다.

[45]

- [46] 본 출원에서 용어 "벡터"는 적합한 숙주 내에서 목적 유전자를 발현시킬 수 있도록 유전 물질을 보유하는 인위적 DNA 분자로서, 상기 HisG를 코딩하는 유전자의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 DNA 제조물을 의미할 수 있다.

[47]

- [48] 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.

[49]

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.
- [50] 또한, 숙주세포 내 염색체 삽입용 벡터를 통해 염색체 내에 본 출원의 HisG를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 도입시킬 수 있다. 예를 들면, pECCG117, pDZ, pACYC177, pACYC184, pCL, pUC19, pBR322, pMW118, pCC1BAC, pCES208, pXMJ19 벡터 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [51] 또한, 상기 폴리뉴클레오티드의 염색체 내로의 삽입은 당업계에서 알려진 임의의 방법, 예를 들면, 상동재조합에 의하여 이루어질 수 있다.
- [52] 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.
- [53]
- [54] 본 출원에서 용어 "형질전환"은 상기 폴리뉴클레오티드 또는 HisG를 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터를 숙주세포 내에 도입하여, 숙주세포 내에서 상기 유전자 및 HisG가 발현할 수 있도록 하는 것을 의미한다. 나아가, 숙주세포 내에서 목적 유전자가 발현될 수 있기만 한다면, 형질전환된 유전자는, 숙주세포의 염색체 상에 위치하거나 염색체 외에 위치하거나 상관없이 이들 모두의 경우를 포함할 수 있다.
- [55]
- [56] 상기 형질전환하는 방법은 상기 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(CaPO₄) 침전, 염화칼슘(CaCl₂) 침전, 미세주입법(microinjection), 폴리에틸렌글리콜(PEG)법, DEAE-텍스트란법, 양이온 리포솜법, 및 초산 리튬-DMSO법 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [57]
- [58] 본 출원에서 상기 미생물은 본 출원의 HisG가 도입되어 글라이신 생산능을 증가시킬 수 있는 미생물이라면 제한 없이 포함될 수 있다.
- [59] 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.
- [60]
- [61] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 상기 코리네박테리움 속 미생물을 배지에서

배양하여 발효하는 단계를 포함하는, 글라이신 및 글루탐산을 포함하는 발효 조성물의 제조 방법을 제공한다.

- [62] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 상기 방법에 의해 제조된 발효 조성물을 제공한다.
- [63] 상기 발효 조성물은 글라이신의 함량이 증가된 것일 수 있다.
- [64] 상기 미생물은 앞서 설명한 바와 같다.
- [65]
- [66] 본 출원에서 용어 "배양"은 미생물을 적당히 인공적으로 조절된 환경조건에서 생육시키는 것을 의미한다. 본 출원에서 상기 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 요구를 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).
- [67] 배지 중에서 사용될 수 있는 당원으로는 포도당, 사카로즈, 유당, 과당, 말토스, 전분, 셀룰로스와 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.
- [68] 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.
- [69] 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.
- [70] 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.

[71] 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.

[72]

[73] 배양물(배지)로부터의 목적 물질의 회수는 당업계에 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.

[74]

[75] 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 따라서, 상기 후처리공정은 정제 공정을 포함하지 않을 수 있다. 상기 발효 조성물은 본 출원의 미생물을 배양함으로써 일정 수준의 글루탐산 함량을 유지하면서 글라이신의 함량이 증가된 조성물을 포함함에 따라 최적의 맛을 낼 수 있다.

[76] 또한, "상기 발효 조성물"은 상기의 액상 또는 분말 형태의 조성물이 포함된 조미소재 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.

[77]

발명의 실시를 위한 형태

[78] 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.

[79]

[80] 실시예 1. 글라이신 생산능 증가를 위한 KFCC11074 균주에의 변이 도입 및 변이가 도입된 KFCC11074의 글루탐산 및 글라이신 생성량 확인

[81] 실시예 1-1. 변이가 도입된 벡터 제작

[82] 글루탐산 생산균주에서 HisG 활성 강화를 통해 글라이신 생성능 증가 효과를

확인하기 위하여, HisEG 유전자의 프로모터 내 변이를 일으킨 균주 및 히스티딘 피드백 억제를 해제한 변이를 도입한 균주를 제작하였으며, 이의 글라이신 생산능을 확인하였다.

- [83] 한편, HisE와 HisG 유전자는 오페론으로 구성되어 있으며 이들 유전자는 히스티딘 생합성 경로에 관여하는 유전자이다. 특히 상기 HisG는 생산물인 히스티딘에 의해 피드백 억제를 받으므로, 피드백 억제가 해제된 변이를 도입하여 HisG 유전자의 활성을 증가시키는 경우, 균주의 글라이신 생산능이 증가되는지 확인하고자 하였다. 이에 글루탐산 생산 균주로 알려진 KFCC11074 균주(한국 등록특허공보 제10-0292299호)에 HisEG 프로모터 변이 및 HisG의 히스티딘 피드백 저해 해제변이를 각각 도입하고자 하였다. 구체적으로, HisEG 프로모터를 포함하는 서열번호 1로부터 폴리뉴클레오티드 서열의 53번째 및 55번째 뉴클레오티드를 T로 치환, 폴리뉴클레오티드 서열의 53번째 및 55번째 뉴클레오티드를 T로 60번째 뉴클레오티드를 G로 치환하기 위하여 유전자 치환 벡터를 제작하였다.
- [84] 또한 서열번호 4로 표시되는 HisG 아미노산 서열의 233번째 글라이신(Gly/G)을 히스티딘(His/H)으로 치환, 233번째 및 235번째 글라이신(Gly/G)과 쓰레오닌(Thr/T)을 히스티딘(His/H)과 글루타민(Gln/Q)으로 치환하기 위하여 유전자 치환 벡터를 제작하였다. 각각의 치환벡터를 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, 각각의 프라이머를 제작하였다.
- [85] HisEG 프로모터 치환 벡터를 제작하기 위한 PCR의 조건은 95°C에서 5분간 변성 후, 95°C 30초 변성, 55°C 30초 어닐링, 72°C 1분 중합을 30회 반복한 후, 72°C에서 5분간 중합반응을 수행하였다. 보다 구체적으로, 서열번호 7 및 8 프라이머를 이용하여 증폭한 500bp의 폴리뉴클레오티드와 서열번호 9 및 10의 프라이머를 이용하여 증폭한 500bp의 폴리뉴클레오티드를 얻었다. 상기 수득한 두 유전자 단편을 제한효소 SalI으로 절단한 pDZ 벡터(대한민국 등록특허 제10-0924065호 및 국제 공개특허 제2008-033001호)에 인퓨전 효소를 이용하여 연결함으로써 hisEG 프로모터를 포함하는 두개의 유전자 치환 벡터를 제작하였고, 이를 "pDZ-hisEG-pro-2mt"로 명명하였다. 또한 서열번호 7 및 11 프라이머를 이용하여 증폭한 500bp의 폴리뉴클레오티드와 서열번호 10 및 12의 프라이머를 이용하여 증폭한 500bp의 폴리뉴클레오티드를 얻었다. 상기 수득한 두 유전자 단편을 제한효소 SalI으로 절단한 pDZ 벡터(대한민국 등록특허 제10-0924065호 및 국제 공개특허 제2008-033001호)에 인퓨전 효소를 이용하여 연결함으로써 HisEG 프로모터를 포함하는 하나의 유전자 치환 벡터를 제작하였고, 이를 "pDZ-hisEG-pro-3mt"로 명명하였다. 상기의 벡터 제작을 위해 사용된 프라이머 서열 정보는 하기 표 1에 나타내었다.

- [86] HisG 아미노산 서열의 233번째, 233번째 및 235번째 아미노산을 각각 H, H와 Q로 치환하기 위하여, 유전자 치환백터를 제작하였다. 구체적으로, PCR의 조건은 95°C에서 5분간 변성 후, 95°C 30초 변성, 55°C 30초 어닐링, 72°C 1분 중합을 30회 반복한 후, 72°C에서 5분간 중합반응을 수행하였다. 서열번호 13 및 14의 프라이머를 이용하여 증폭된 722bp의 폴리뉴클레오티드와 서열번호 15 및 16의 프라이머를 이용하여 증폭된 798bp의 폴리뉴클레오티드를 얻었다. 상기 수득한 두 유전자 단편을 제한효소 SalI으로 절단한 pDZ 벡터(대한민국 등록특허 제10-0924065호 및 국제 공개특허 제2008-033001호)에 인퓨전 효소를 이용하여 연결함으로써 HisG(G233H) 변이를 포함하는 폴리뉴클레오티드가 포함된, 하나의 1.5kbp 유전자 치환 백터를 제작하였고, 이를 "pDZ-hisG(G233H)"로 명명하였다. 또한 서열번호 13 및 17의 프라이머를 이용하여 증폭된 722bp의 폴리뉴클레오티드와 서열번호 16 및 18의 프라이머를 이용하여 증폭된 798bp의 폴리뉴클레오티드를 얻었다. 상기 수득한 두 유전자 단편을 제한효소 SalI으로 절단한 pDZ 벡터(대한민국 등록특허 제10-0924065호 및 국제 공개특허 제2008-033001호)에 인퓨전 효소를 이용하여 연결함으로써 HisG(G233H/T235Q) 변이를 포함하는 폴리뉴클레오티드가 포함된, 하나의 1.5kbp 유전자 치환 백터를 제작하였고, 이를 "pDZ-hisG(G233H/T235Q)"로 명명하였다. 상기의 벡터 제작을 위해 사용된 프라이머 서열 정보는 하기 표 1에 나타내었다.

[87]

[88] [표1]

서열번호	프라이머 명	5' 서열 3'
7	hisEG-pro-2mt-AF	GATCCTCTAGAGTCGACTTCGACGAATC CCTCG
8	hisEG-pro-2mt-AR	CGGT <u>ACATTATA</u> ACCACACAACAGTTATC AATG
9	hisEG-pro-2mt-BF	GTGGT <u>TATAATGT</u> ACCGAGTGAAGACATT TGAC
10	hisEG-pro-2mt-BR	ATGCCTGCAGGTCGACTGATACCCAAAT CGAG
11	hisEG-pro-3mt-AR	CGGT <u>CCATTATA</u> ACCACACAACAGTTATC AATG
12	hisEG-pro-3mt-BF	GTGGT <u>TATAATGG</u> ACCGAGTGAAGACATT TGAC
13	hisG(G233H)-AF	GATCCTCTAGAGTCGACCCCAACAAGG GCTCGC
14	hisG(G233H)-AR	CGTGCCAGTGGGGATACCGTTGGGTGGG
15	hisG(G233H)-BF	AACCCCAGGCCTATCCCACCCAACGGTA TC
16	hisG(G233H)-BR	ATGCCTGCAGGTCGACGCAAGGTTGGCA ACAAC
17	hisG(G233H/T235Q)-AR	CGTGCCAGTGGGGATACCTGTGGGTGGG
18	hisG(G233H/T235Q)-BF	AACCCCAGGCCTATCCCACCCACAGGTA TC

[89] 실시예 1-2. 변이가 도입된 KFCC11074의 제작 및 글루탐산 및 글라이신 생성량 확인

[90] 상기 실시예 1-1을 통해 제작한 HisEG 프로모터 치환 벡터인 pDZ-hisEG-pro-2mt 및 pDZ-hisEG-pro-3mt 와 HisG 유전자 치환 벡터인 pDZ-hisG(G233H) 및 pDZ-hisG(G233H/T235Q)를 각각 KFCC11074 균주에 일렉트로포레이션법으로 도입하였다. 변이가 각각 도입된 글루탐산 및 글라이신 생산 균주 "KFCC11074_Pro(2mt)_hisEG",

"KFCC11074_Pro(3mt)_hisEG", "KFCC11074_hisG(G233H)" 및 "KFCC11074_hisG(G233H/T235Q)"를 제작하였다.

[91] 구체적으로, 형질전환(Appl. Microbiol. Biotechnol., 1999, 52: 541-545)을 통해 제작하였으며, 상동성 서열의 재조합에 의해 염색체 상에 벡터가 삽입된 균주를 카나마이신(kanamycin) 25 mg/L를 함유한 한천 영양배지에서 선별하였다. 선별한 1차 균주를 다시 2차 교차(cross-over)를 거쳐, 타겟 변이 도입된 균주를 각각 선별하였다. 최종 형질전환된 균주의 변이(치환) 여부는 서열번호 7 및 10의 프라이머 쌍과 서열번호 13 및 16의 프라이머 쌍을 이용하여 각각 PCR을 수행한 후 시퀀싱을 통해 확인하였다.

[92] 이후, 선별한 균주 KFCC11074_Pro(2mt)_hisEG, KFCC11074_Pro(3mt)_hisEG, KFCC11074_hisG(G233H) 및 KFCC11074_hisG(G233H/T235Q)를 영양배지에 도말하여 30°C에서 16시간 배양하였다. 이후 121°C에서 15분간 가압 살균된 발효배지 25 ml을 250 ml 진탕용 삼각플라스크에 분주하고 영양배지에서 배양된 균주를 접종하여 48시간 배양하였다. 배양 조건은 회전 수 200rpm, 온도 37°C, pH 8.0으로 조절하였다. 상기 영양배지와 발효배지 조성은 다음과 같다.

[93]

[94] 영양배지:

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

[96]

[97] 발효배지:

[98] 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

[99]

[100] 배양 종료 후, HPLC를 이용한 방법을 통해 L-글루탐산 및 글라이신 생산량을 측정하였으며, 측정 결과는 하기 표 2에 나타내었다.

[101]

[102] [표2]

균주명	L-글루탐산(g/L)	L-글라이신(mg/L)
KFCC11074	11.5	165
KFCC11074_Pro(2mt)_hisEG	11.4	198
KFCC11074_Pro(3mt)_hisEG	12.0	209
KFCC11074_hisG(G233H)	11.8	210
KFCC11074_hisG(G233H/T235Q)	12.3	433

[103] 표 2에 나타낸 바와 같이, 변이가 도입된 코리네박테리움 글루타미쿰

- KFCC11074_Pro(2mt)_hisEG, KFCC11074_Pro(3mt)_hisEG, KFCC11074_hisG(G233H) 및 KFCC11074_hisG(G233H/T235Q) 균주가 생산한 L-글루탐산의 농도는, 변이가 도입되지 않은 코리네박테리움 글루타미쿰 KFCC11074 균주가 생산한 L-글루탐산 농도와 유사함을 확인하였다.
- [104] 반면에, 상기 KFCC11074_Pro(2mt)_hisEG 및 KFCC11074_Pro(3mt)_hisEG 및 KFCC11074_hisG(G233H) 균주가 생산한 글라이신의 농도는, 상기 KFCC11074가 생산한 글라이신 농도 대비 각각 33 mg/L, 44 mg/L, 45 mg/L 증가함을 확인하였다. 특히, KFCC11074_hisG(G233H/T235Q) 균주의 경우 글라이신 농도가 268 mg/L으로 월등히 증가함을 확인하였다.
- [105] 즉, HisEG 프로모터 변이와 HisG 피드백 저해 해제를 포함하고 있는 상기 변이들은 미생물의 L-글루탐산 생성능에는 별다른 영향을 미치지 않고 유지하면서, 글라이신 생성능을 현저하게 증가시킨다는 것을 확인하였다.
- [106]
- [107] 실시예 2. 변이가 도입된 ATCC13869 균주의 글루탐산 및 글라이신 생성량 확인
- [108] 상기의 변이들이 야생형 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) ATCC13869 균주에서도 글루탐산 생성능에는 영향을 미치지 않고, 글라이신 생성능 증가효과가 있는지 확인하기 위해, 변이가 도입된 ATCC13869 기반 균주를 제작하고자 하였다.
- [109] 상기 실시예 1-1을 통해 제작한 HisEG 프로모터 치환 벡터인 pDZ-hisEG-pro-2mt 및 pDZ-hisEG-pro-3mt 와 HisG 유전자 치환 벡터인 pDZ-hisG(G233H) 및 pDZ-hisG(G233H/T235Q)를 각각 ATCC13869 균주에 일렉트로포레이션법으로 도입하였다. 변이가 각각 도입된 글루탐산 및 글라이신 생산 균주 "ATCC13869_Pro(2mt)_hisEG", "ATCC13869_Pro(3mt)_hisEG", "ATCC13869_hisG(G233H)" 및 "ATCC13869_hisG(G233H/T235Q)"를 제작하였다.
- [110] 구체적으로, 형질전환(*Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1999, 52: 541-545)을 통해 제작하였으며, 상동성 서열의 재조합에 의해 염색체 상에 벡터가 삽입된 균주를 카나마이신(kanamycin) 25 mg/L를 함유한 한천 영양배지에서 선별하였다. 선별한 1차 균주를 다시 2차 교차(cross-over)를 거쳐, 타겟 변이 도입된 균주를 각각 선별하였다. 최종 형질전환된 균주의 변이(치환) 여부는 서열번호 7 및 10의 프라이머 쌍과 서열번호 13 및 16의 프라이머 쌍을 이용하여 각각 PCR을 수행한 후 시퀀싱을 통해 확인하였다.
- [111] 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.
- [112]
- [113] 영양배지:

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

[115]

[116] 발효배지:

[117] 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

[118]

[119] 상기 조건에서 각각의 콜로니를 배양하여, YSI를 이용하여 L-글루탐산 농도를 측정하였고, HPLC를 이용하여 글라이신 농도를 측정하였다. 측정된 L-글루탐산 및 글라이신의 농도는 표 3에 나타내었다.

[120]

[121] [표3]

균주명	L-글루탐산(g/L)	L-글라이신(mg/L)
ATCC13869	13.8	117
ATCC13869_Pro(2mt)_hisEG	13.7	128
ATCC13869_Pro(3mt)_hisEG	14.0	135
ATCC13869_hisG(G233H)	13.5	144
ATCC13869_hisG(G233H/T235Q)	13.7	306

[122] 표 3에 나타난 바와 같이, 야생형 코리네박테리움 글루타미쿰(ATCC13869)에 변이가 도입된 ATCC13869_Pro(2mt)_hisEG, ATCC13869_Pro(3mt)_hisEG, ATCC13869_hisG(G233H) 및 ATCC13869_hisG(G233H/T235Q) 균주가 생산한 L-글루탐산의 농도는, ATCC13869 균주가 생산한 L-글루탐산 농도와 유사하였으나, 글라이신 농도는 모두 증가함을 확인하였다.

[123] 즉, HisEG 프로모터 변이와 HisG 피드백 저해 해제를 포함하고 있는 상기 변이들은 미생물의 L-글루탐산 생성능에는 별다른 영향을 미치지 않고 유지하면서, 글라이신 생성능을 현저하게 증가시킨다는 것을 다시 한번 확인하였다.

[124] 한편, 상기 ATCC13869_hisG(G233H) 및 ATCC13869_hisG(G233H/T235Q) 균주는 2019년 3월 00일자로 부다페스트 조약 하의 기탁기관인 한국미생물보존센터(KCCM)에 균주명 "CA02-9216" 및 "CA02-9217"로 국제 기탁하여 "KCCM12458P" 및 "KCCM12459P"의 기탁번호를 부여받았다.

[125]

[126] 실시예 3. 조미소재 제품 제조를 위한 발효 조성물 제조

[127]

[128] 상기와 같이 HisG 활성을 강화한 균주가 L-글루탐산 생성능에 별다른 영향을

미치지 않으면서 글라이신 생성능이 증가됨을 확인하였다. 따라서, 본 출원의 HisG 활성 강화 코리네박테리움 속 미생물을 이용한 발효 조성물을 제조하고자 하였다.

[129]

[130] 예시적으로, 기본적으로 잘 알려진 조미료 소재인 글루탐산을 주성분으로 하여 제조하되, 풍부한 맛의 구성을 높이기 위해서 다른 조미료 소재 부산물 성분을 증가시키고자 발효균주 및 발효과정을 조절하였다.

[131]

[132] 상기의 HisEG 프로모터 변이와 HisG 피드백 저해 해제를 포함하고 있는 상기 변이를 둘 모두 포함하는 균주를 이용하여, 5L 발효조를 이용한 발효 조성물을 제조하고자 하였다.

[133]

[134] 배양 배지의 제조에 사용된 성분은 모두 식품 등급에 해당하는 성분만을 사용하였다.

[135]

[136] 1차 종배지: 포도당 1%, 효모추출물 1%, 펩톤 1%, 황산암모늄 0.1%, 염화나트륨 0.25%, 인산제1칼륨 0.15%, 인산제2칼륨 0.15% 를 함유하며, pH가 8.0인 1차 종배지를 제조하였다.

[137]

2차 종배지: 순도 98.5%의 유기농 원당 4.6%, 황산마그네슘 0.05%, 효모추출물 0.5%, 인산제1칼륨 0.2%, 황산철 0.002%, 비오틴 1mg/l, 티아민염산염 2 mg/l 및 약간의 소포제를 함유하며, pH가 7.2인 2차 종배지를 제조하였다.

[138]

발효 배지: 순도 98.5%의 유기농 원당 4%, 황산마그네슘 0.03%, 효모추출물 1%, 인산 0.22%, 수산화칼륨 0.4%, 비오틴 0.2mg/l, 티아민염산염 0.6mg/l, 황산망간 0.002%, 황산철 0.002%, 황산아연 0.002%, 황산구리 0.0006% 및 약간의 소포제를 함유하며, pH가 7.4인 발효 배지를 제조하였다.

[139]

[140] 상기 1차 종배지 50 ml를 500 ml 용량의 진탕용 삼각플라스크에 분주하고 121°C에서 20분간 가압 살균하여 냉각시킨 다음, 상기 균주를 각각 접종하여 회전수 200회/분, 온도 30°C에서 5~7시간 동안 진탕 배양하였다.

[141]

[142] 상기 2차 종배지를 1.5L 용량의 시험 발효조에 0.25L 조제하고 121°C에서 20분간 가압 살균하여 냉각시킨 다음, 상기 1차 종배양액을 50 ml 접종한 후, 회전수 900회/분, 31.5°C에서 15시간 동안 배양하였다.

[143]

[144] 상기 발효 배지를 5 L 용량의 시험 발효조에 0.25L 조제하고 121°C에서 20분간 가압 살균하여 냉각시킨 다음, 상기 2차 종배양액 0.26 L를 접종한 후, 회전수 900회/분, 30~34°C에서 배양하였다.

[145]

[146] 상기 조건으로 배양하면서 상기 코리네박테리움 글루타미쿰의 배양 중 발효액의 pH가 7.0~7.4의 범위가 되도록 28% 암모니아수를 사용하여 계속 조절하였다. 배양 중 잔당의 농도가 0.5~1.5%로 되면 살균된 유기농 원당을 수시로 투입하여 첨가된 당의 합계가 발효액량 대비 30~34%가 될 때까지 계속 배양하였다.

[147]

[148] [표4]

균주명	분석 결과 (g/l)						
	주요 성분			부산물			
	고형분	글루탐산	글라이신	아미노산	유기산	잔류당	이온
KFCC11074	140.2	64.2	0.18	11.5	3.5	12.0	11.1
KFCC11074_hisG(G233H/T235Q)_Pro(3mt)_hisEG	147.3	59.0	2.43	16.4	2.7	15.1	10.7

[149] 그 결과, 상기 표 4에 나타난 바와 같이, 양 균주 간의 글루탐산 생산량은 크게 차이가 없으면서도, 변이가 도입된 코리네박테리움 글루타미쿰 KFCC11074_hisG(G233H/T235Q)_Pro(3mt)_hisEG 균주가 생산한 발효액 내 글라이신의 함량이 현저히 증가함을 확인하였다.

[150]

[151] 3kL 발효조를 이용한 발효 조성물의 경우에도, 양 균주 간의 글루탐산 생산량은 크게 차이가 없으면서도, 변이가 도입된 코리네박테리움 글루타미쿰 KFCC11074_hisG(G233H/T235Q)_Pro(3mt)_hisEG 균주는 KFCC11074 균주와 비교하여, 글루탐산 생산량에 큰 차이가 없으면서도(64.2 g/L vs 73 g/L) 글라이신의 함량이 현저히 증가(0.2 g/L vs 3.2 g/L) 함을 확인하였다.

[152]

[153] 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 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 출원의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

[154]

[155]

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> Ck02-9216	국제 기탁기관에 부여한 수탁번호: KCCCM12458P
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 2019년 3월 14일에 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: 2019. 03. 14.

상기 번역은 원문의 내용과 상위 없음을 증명함.

2019년 3월 27일

변리사 손민



[156]

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> Ck02-9217	국제 기탁기관에 부여한 수탁번호: KCCCM12459P
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 2019년 3월 14일에 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: 2019. 03. 14.

상기 번역은 원문의 내용과 상위 없음을 증명함.

2019년 3월 27일

변리사 손민

