

명세서

발명의 명칭: 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈 1 변이체 및 이를 이용한 글루타치온 또는 그 유도체의 생산방법

기술분야

- [1] 본 출원은 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈 1 변이체, 및 이를 이용한 글루타치온 또는 그 유도체의 생산방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 글루타치온(Glutathione, GSH)은 세포 내에서 가장 일반적으로 존재하는 유기 황화합물로 글리신(glycine), 글루타메이트(glutamate), 시스테인(cysteine)의 세 가지 아미노산들이 결합한 트리펩타이드(tripeptide) 형태이다.
- [4] 글루타치온은 체내에서는 환원형 글루타치온(GSH)과 산화형 글루타치온(GSSG) 두 가지 형태로 존재한다. 일반적인 상황에서 상대적으로 높은 비율로 존재하는 환원형 글루타치온(GSH)은 인체의 간과 피부 세포에 주로 분포하며 활성산소를 분해·제거하는 항산화 기능, 독성물질과 같은 외인성 화합물의 제거 등 해독 작용, 멜라닌 색소 생성을 억제하는 미백작용 등 중요한 역할을 한다.
- [5]
- [6] 이와 같이 다양한 기능을 지닌 글루타치온은 제약, 건강기능식품, 화장품 등 다양한 분야의 소재로 각광받고 있으며 맛소재, 식품 및 사료 첨가제 제조에 이용되기도 한다. 글루타치온은 원물의 맛 상승과 풍부한 맛 지속성 유지효과가 크며, 단독으로 사용하거나 다른 물질과 배합하여 고쿠미(kokumi) 향미증진제로 사용 할 수 있음이 알려져 있다. 보통 고쿠미 소재는 기존 핵산, MSG 등의 우마미(umami) 소재보다 농후감을 가지며, 단백질이 분해 숙성되어 생성되는 것으로 알려져 있다. 또한, 글루타치온은 다른 감마-글루타밀 펩타이드로 전환되기도 한다(Sofyanovich OA et al,(2019) Multiple pathways for the formation of the γ -glutamyl peptides γ -glutamyl-valine and γ -glutamyl-valylglycine in *Saccharomyces cerevisiae*. PLoS ONE 14 (5): e0216622). 감마-글루타밀 펩타이드는 분자의 N-말단에 글루탐산의 감마-카복실 그룹을 가지는 저분자 화합물로, 고쿠미 향미증진제로도 널리 사용되는 것으로 알려져 있다.
- [7] 그러나 이와 같이 다양한 분야에 사용할 수 있는 글루타치온 및 그 유도체에 대한 수요가 증가되고 있음에도 불구하고, 높은 생산 단가로 인해 효소 합성 공정은 아직 상용화가 되어 있지 않아, 글루타치온 및 그 유도체의 산업적 생산에 적지 않은 비용이 필요하기 때문에 시장이 크게 활성화되지 못하는 실정이다.
- [8]

발명의 상세한 설명**기술적 과제**

- [9] 본 출원의 해결하고자 하는 과제는 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈 1 변이체, 및 이를 이용한 글루타치온 또는 그 유도체의 생산방법을 제공하는 것이다.

[10]

과제 해결 수단

- [11] 본 출원은 서열번호 1의 아미노산 서열의 N-말단으로부터 37번째 위치에 상응하는 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈 1 변이체를 제공한다.
- [12] 본 출원은 상기 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 및 이를 포함하는 벡터를 제공한다.
- [13] 본 출원은 상기 변이체 및 상기 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 중 어느 하나 이상을 포함하는 미생물을 제공한다.
- [14] 본 출원은 상기 미생물을 배양하는 단계를 포함하는 글루타치온 또는 그 유도체의 생산 방법을 제공한다.

[15]

발명의 효과

- [16] 본 출원의 신규한 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈 1 변이체는 글루타치온 또는 그 유도체의 고생산에 유용하게 사용될 수 있다.

[17]

도면의 간단한 설명

- [18] 도 1 및 도 2는 사카로마이세스 세레비지에 균주에 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈 1 변이체를 도입하여 글루타치온 생산수준을 확인한 결과이다.

[19]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [20] 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.
- [21] 또한, 당해 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 통상의 실험만을 사용하여 본 출원에 기재된 본 출원의 특정 양태에 대한 다수의 등가물을 인지하거나 확인할 수 있다. 또한, 이러한 등가물은 본 출원에 포함되는 것으로 의도된다.
- [22] 또한, 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

[23]

- [24] 본 출원의 하나의 양태는, 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈 1(SOD1) 활성을 갖는

단백질에서 아미노산 치환을 포함하고, 상기 치환은 서열번호 1의 N-말단으로부터 37번째 위치에 상응하는 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 것을 포함하는, 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈 1 변이체를 제공할 수 있다.

- [25] 상기 변이체는 서열번호 1의 아미노산 서열에서 N-말단으로부터 37번째 위치에 상응하는 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 단백질 변이체일 수 있다.
- [26] 본 출원의 "슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈 1(superoxide dismutase 1)"은 "SOD1" 또는 "Superoxide dismutase [Cu-Zn]"라고도 칭해지는 효소이다. 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈는 다음의 반응을 촉매하는 것으로 알려져 있다:
- [27] $2 O_2 + 2 H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$
- [28] 본 출원에서 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈 1의 아미노산 서열은 sod1 유전자에 의해 코딩되는 아미노산 서열로, "SOD1 단백질"로 지칭할 수 있다. 본 출원의 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈 1을 구성하는 아미노산 서열은 공지의 데이터베이스인 NCBI의 GenBank에서 그 서열을 얻을 수 있다. 상기 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈 1은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 단백질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또 다른 일 예로, 상기 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈 1은 사카로마이세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) 유래일 수 있고, 다른 예로, 서열번호 1의 아미노산 서열에서 37번째 위치에 상응하는 아미노산이 글리신인 것일 수 있다. 그러나 이에 제한되지 않으며 상기 아미노산 서열과 동일한 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈 1의 활성을 갖는 서열은 제한 없이 포함될 수 있다.
- [29] 구체적인 예를 들어, 본 출원의 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈 1은 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 이와 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 단백질일 수 있다. 또한, 이러한 상동성 또는 동일성을 가지며 상기 단백질에 상응하는 효능을 나타내는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 단백질도 본 출원의 변이 대상이 되는 단백질의 범위 내에 포함됨은 자명하다.
- [30] 또한, 본 출원에서 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈 1의 일 예로, 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 단백질이라고 정의하였으나, 서열번호 1의 아미노산 서열 앞뒤로의 무의미한 서열 추가 또는 자연적으로 발생할 수 있는 돌연변이, 혹은 이의 잠재성 돌연변이(silent mutation)를 제외하는 것이 아니며, 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 단백질과 서로 동일 또는 상응하는 활성을 가지는 경우라면 본 출원의 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈 1에 해당됨은 당업자에게 자명하다.
- [31] 즉, 본 출원에서 '특정 서열번호로 기재된 아미노산 서열을 갖는 단백질 또는 폴리펩티드', '특정 서열번호로 기재된 아미노산 서열을 포함하는 단백질 또는 폴리펩티드'라고 기재되어 있다 하더라도, 해당 서열번호의 아미노산 서열로

이루어진 폴리펩티드와 동일 혹은 상응하는 활성을 가지는 경우라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 단백질도 본 출원에서 사용될 수 있음은 자명하다.

[32]

[33] 본 출원에서 용어, "변이체(variant)" 또는 "변이형 폴리펩티드(modified polypeptide)"는 하나 이상의 아미노산이 보존적 치환(conservative substitution) 및/또는 변형(modification)에 있어서 상기 열거된 서열(the recited sequence)과 상이하나, 상기 단백질의 기능(functions) 또는 특성(properties)이 유지되는 단백질을 지칭한다.

[34]

상기 변이체는 수 개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가에 의해 식별되는 서열(identified sequence)과 상이하다. 이러한 변이체는 일반적으로 상기 단백질의 아미노산 서열 중 하나 이상의 아미노산을 변형하고, 상기 변형된 단백질의 특성을 평가하여 식별될 수 있다. 즉, 변이체의 능력은 본래 단백질(native protein)에 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 변이형 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 다른 변이체는 성숙 단백질(mature protein)의 N- 및/또는 C-말단으로부터 일부분이 제거된 변이체를 포함할 수 있다. 상기 용어 "변이체" 또는 "변이형 폴리펩티드"는 변이형, 변형, 변이된 단백질, 변이 등의 용어(영문 표현으로는 modification, modified protein, mutant, mutein, divergent, variant 등)가 혼용되어 사용될 수 있으며, 변이된 의미로 사용되는 용어라면 이에 제한되지 않는다.

[35]

본 출원에서 용어 "보존적 치환(conservative substitution)"은 한 아미노산을 유사한 구조적 및/또는 화학적 성질을 갖는 또 다른 아미노산으로 치환시키는 것을 의미한다. 상기 변이체는 하나 이상의 생물학적 활성을 여전히 보유하면서, 예를 들어 하나 이상의 보존적 치환을 가질 수 있다. 이러한 아미노산 치환은 일반적으로 잔기의 극성, 전하, 용해도, 소수성, 친수성 및/또는 양친매성(amphipathic nature)에서의 유사성에 근거하여 발생할 수 있다.

[36]

예를 들면, 전하를 띠는 곁사슬(electrically charged amino acid)을 갖는 아미노산 중 양으로 하전된 (염기성) 아미노산은 아르기닌, 라이신, 및 히스티딘을, 음으로 하전된 (산성) 아미노산은 글루탐산 및 아스파르트산을 포함하고; 전하를 띠지 않는 곁사슬(uncharged side chain)을 갖는 아미노산은 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 트립토판, 프롤린, 세린, 스레오닌, 시스테인, 타이로신, 아스파라긴, 글루타민을 포함하는 것으로 분류할 수 있다.

[37]

또한, 변이체는 폴리펩티드의 특성과 2차 구조에 최소한의 영향을 갖는 아미노산들의 결실 또는 부가를 포함할 수 있다. 예를 들면 폴리펩티드는 번역-동시에(co-translationally) 또는 번역-후에(post-translationally) 단백질의 이전(transfer)에 관여하는 단백질 N-말단의 시그널(또는 리더) 서열과 친유게이트 할 수 있다. 또한 상기 폴리펩티드는 폴리펩티드를 확인, 정제, 또는

합성할 수 있도록 다른 서열 또는 링커와 컨주게이트 될 수 있다.

- [38] 하나의 구현예로, 본 출원의 변이체는 전술한 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈 1 중, 서열번호 1의 N-말단으로부터 37번째 위치에 상응하는 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈 1 변이체 또는 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈 1 활성을 갖는 변이형 폴리펩티드일 수 있다. 본 출원의 변이체는 "슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈 1 변이체"는 "슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈 1 활성을 갖는 (변이형) 폴리펩티드", "SOD1 변이체"로도 기재될 수 있으며, 변이 전의 단백질, 천연의 야생형 폴리펩티드 또는 비변형 폴리펩티드에 비해 글루타치온 생산량을 증가시킬 수 있는 것일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [39] 앞선 구현예 중 어느 하나의 구현예로, 상기 변이체는 서열번호 1의 아미노산 서열의 N-말단으로부터 37번째 위치에 상응하는 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈 1 변이체 일 수 있다.
- [40] 본 출원에서, '다른 아미노산으로 치환'은 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.
- [41] 앞선 구현예 중 어느 하나의 구현예로, 상기 "다른 아미노산"은 글리신을 제외한 아미노산일 수 있다. 구체적으로, 상기 다른 아미노산은 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 트립토판, 프롤린, 세린, 스레오닌, 시스테인, 타이로신, 아스파라긴, 글루타민, 아스파르트산, 글루탐산, 라이신, 아르기닌 및 히스티딘 중 선택되는 아미노산일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [42]
- [43] 본 출원에서 용어 "상응하는 위치(corresponding position)"는, 단백질 또는 폴리펩티드에서 열거되는 위치의 아미노산 잔기이거나, 또는 단백질 또는 폴리펩티드에서 열거되는 잔기와 유사하거나 동일하거나 상동한 아미노산 잔기를 지칭한다. 본 출원에 사용된 "상응 영역"은 일반적으로 관련 단백질 또는 레퍼런스 단백질에서의 유사하거나 대응되는 위치를 지칭한다.
- [44] 본 출원에서, 본 출원에 사용되는 단백질 내의 아미노산 잔기 위치에 특정 넘버링이 사용될 수 있다. 예를 들면, 비교하고자 하는 대상 단백질과 본 출원의 단백질의 폴리펩티드 서열을 정렬함으로써, 본 출원의 단백질의 아미노산 잔기 위치에 상응하는 위치에 대해 재넘버링 하는 것이 가능하다.
- [45]
- [46] 본 출원의 서열번호 1의 아미노산 서열의 N-말단으로부터 37번째 위치에 상응하는 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈 1 변이체는, 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 이와 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 갖는 아미노산 서열 중,

서열번호 1의 37번째 위치에 상응하는 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 단백질일 수 있다.

- [47] 이와 같은 변이체는 서열번호 1과 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 가지고, 서열번호 1과 100% 미만의 상동성 또는 동일성을 가지는 변이체일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [48] 본 출원의 서열번호 1의 아미노산 서열의 N-말단으로부터 37번째 위치에 상응하는 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 슈퍼옥사이드 디스뮤테아제 1 변이체는, 서열번호 12 내지 30 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다. 구체적으로 서열번호 12 내지 30 중 어느 하나의 아미노산 서열로 필수적으로 구성되는 (consisting essentially of) 것일 수 있고, 보다 구체적으로는 서열번호 12 내지 30 중 어느 하나의 아미노산 서열로 구성되는 것일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [49] 또한 상기 변이체는 서열번호 12 내지 30 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 상기 아미노산 서열에서 37번 아미노산은 고정되고(즉, 변이체의 아미노산 서열에서 상기 서열번호 12 내지 30의 아미노산 서열에서 37번 위치에 상응하는 아미노산은 상기 서열번호 12 내지 30의 아미노산 서열에서 37번 위치의 아미노산과 동일하고), 이와 80% 이상의 상동성 또는 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [50] 구체적으로 본 출원의 상기 변이체는 서열번호 12 내지 30 중 어느 하나의 아미노산 서열 및 상기 서열번호 12 내지 30 중 어느 하나의 아미노산 서열의 아미노산 서열과 적어도 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 상동성 또는 동일성을 가지고, 상기 서열번호 12 내지 30 중 어느 하나의 아미노산 서열에서 37번 위치에 상응하는 아미노산은 글리신 이외의 아미노산인, 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 또한, 이러한 상동성 또는 동일성을 가지며 상기 변이체에 상응하는 효능을 나타내는 아미노산 서열이라면, 37번 위치 이외에, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 단백질도 본 출원의 범위에 포함됨은 자명하다.
- [51]
- [52] 본 출원에서 용어, '상동성 (homology)' 또는 '동일성 (identity)'은 두 개의 주어진 아미노산 서열 또는 염기 서열과 관련된 정도를 의미하며 백분율로 표시될 수 있다. 용어 상동성 및 동일성은 종종 상호교환적으로 이용될 수 있다.
- [53] 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 전체-길이의 적어도 약 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%를 따라 중간 또는 높은 엄격한 조건(stringent conditions)에서 하이브리드할 수 있다. 하이브리드화는 폴리뉴클레오티드에서 일반 코돈 또는 코돈 축퇴성을 고려한 코돈을 함유하는

폴리뉴클레오티드 역시 포함됨이 자명하다.

- [54] 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 et al.](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.
- [55] 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.
- [56] 또한, 임의의 두 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열이 상동성, 유사성 또는 동일성을 갖는지 여부는 정의된 엄격한 조건하에서 써던 혼성화 실험에 의해 서열을 비교함으로써 확인할 수 있으며, 정의되는 적절한 혼성화 조건은 해당 기술 범위 내이고, 당업자에게 잘 알려진 방법(예컨대, 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)으로 결정될 수 있다.
- [57]

- [58] 본 출원의 다른 하나의 양태는 상기 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공할 수 있다.
- [59] 본 출원에서 용어, "폴리뉴클레오티드"는 뉴클레오티드 단위체(monomer)가 공유결합에 의해 길게 사슬모양으로 이어진 뉴클레오티드의 중합체(polymer)로 일정한 길이 이상의 DNA 또는 RNA 가닥을 의미한다.
- [60] 본 출원의 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈 1을 코딩하는 유전자는 *sod1* 유전자일 수 있다.
- [61] 상기 유전자는 효모 유래 일 수 있다. 구체적으로는 사카로마이세스(*Saccharomyces*) 속, 보다 구체적으로는 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) 유래일 수 있다. 구체적으로는 사카로마이세스 세레비지애 유래의 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈 1 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 것이면 제한없이 포함하고, 일 구현예로 서열번호 1의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자일 수 있으며, 일 구현예로 서열번호 2 또는 서열번호 3의 염기서열을 포함하는 것일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [62] 본 출원의 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈 1 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는, 본 출원의 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈 1 변이체 및 이에 상응하는 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드라면 제한없이 포함될 수 있다.
- [63] 본 출원의 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈 1 및 이의 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 코돈의 축퇴성(degeneracy)으로 인하여 또는 상기 폴리펩티드를 발현시키고자 하는 생물에서 선호되는 코돈을 고려하여, 폴리펩티드의 아미노산 서열을 변화시키지 않는 범위 내에서 코딩 영역에 다양한 변형이 이루어질 수 있다.
- [64] 구체적으로, 본 출원의 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈 1 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는, 서열번호 1의 아미노산 서열에서 37번째 위치에 상응하는 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 단백질 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열이라면 제한 없이 포함할 수 있다.
- [65] 예를 들어, 본 출원의 단백질 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 본 출원의 단백질 변이체, 구체적으로는 서열번호 12 내지 30 중 어느 하나의 아미노산 서열, 또는 이와 상동성 또는 동일성을 가지는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열로서, 서열번호 12 내지 30 중 어느 하나의 아미노산 서열에서 37번째 위치에 상응하는 아미노산을 코딩하는 서열은 글리신 이외의 아미노산을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 상동성 또는 동일성에 대해서는 전술한 바와 같다.
- [66] 또한, 본 출원의 단백질 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 공지의 유전자 서열로부터 제조될 수 있는 프로브, 예를 들면, 상기 염기 서열의 전체 또는 일부에 대한 상보 서열과 엄격한 조건 하에 하이브리드화하여, 서열번호 1의 아미노산 서열에서 37번째 위치에 상응하는 아미노산이 다른 아미노산으로

치환된 단백질 변이체를 코딩하는 서열이라면 제한 없이 포함할 수 있다.

- [67] 상기 "엄격한 조건(stringent condition)"이란 폴리뉴클레오티드 간의 특이적 혼성화를 가능하게 하는 조건을 의미한다. 이러한 조건은 문헌(예컨대, J. Sambrook et al., 1989, 상동)에 구체적으로 기재되어 있다. 예를 들어, 상동성 또는 동일성이 높은 폴리뉴클레오티드끼리, 40% 이상, 구체적으로 90% 이상, 보다 구체적으로 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 더욱 구체적으로 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.
- [68] 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.
- [69] 구체적으로, 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.
- [70] 폴리뉴클레오티드를 혼성화하는 적절한 엄격도는 폴리뉴클레오티드의 길이 및 상보성 정도에 의존하고 변수는 해당기술분야에 잘 알려져 있다(Sambrook et al., 1989, supra, 9.50-9.51, 11.7-11.8 참조).
- [71]
- [72] 본 출원의 다른 하나의 양태는 상기 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공할 수 있다.
- [73] 본 출원에서 사용된 용어 "벡터"는 적합한 숙주 내에서 목적 폴리펩티드를 발현시킬 수 있도록 적합한 발현조절영역(또는 발현조절서열)에 작동 가능하게 연결된 상기 목적 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 염기서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다. 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 세포와 무관하게 복제되거나 기능할 수 있으며, 세포 그 자체에 통합될 수 있다.

- [74] 일례로 세포 내 염색체 삽입용 벡터를 통해 염색체 내에 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 변이된 폴리뉴클레오티드로 교체시킬 수 있다. 상기 폴리뉴클레오티드의 염색체 내로의 삽입은 당업계에 알려진 임의의 방법, 예를 들면, 상동재조합에 의하여 이루어질 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다. 상기 염색체 삽입 여부를 확인하기 위한 선별 마커(selection marker)를 추가로 포함할 수 있다. 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 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.
- [75] 본 출원에서 사용되는 벡터는 특별히 한정되지 않으며, 당업계에 알려진 임의의 벡터를 이용할 수 있다. 효모 발현 벡터는 조합 효모 플라스미드(YIp: integrative yeast plasmid) 및 염색체 외 플라스미드 벡터(extrachromosomal plasmid vector)가 모두 가능하다. 상기 염색체 외 플라스미드 벡터는 에피솜 효모 플라스미드(YEp: episomal yeast plasmid), 복제 효모 플라스미드(YRp: replicative yeast plasmid) 및 효모 중심체 플라스미드(YCp: yeast centromer plasmid)를 포함할 수 있다. 또한, 인위적 효모 염색체들(YACs: artificial yeast chromosomes)도 본 출원의 벡터로 이용이 가능하다. 구체적인 예로서, 이용 가능한 벡터는 pESCHIS, pESC-LEU, pESC-TRP, pESC-URA, Gateway pYES-DEST52, pAO815, pGAPZ A, pGAPZ B, pGAPZ C, pGAP α A, pGAP α B, pGAP α C, pPIC3.5K, pPIC6 A, pPIC6 B, pPIC6 C, pPIC6 α A, pPIC6 α B, pPIC6 α C, pPIC9K, pYC2/CT, pYD1 Yeast Display Vector, pYES2, pYES2/CT, pYES2/NT A, pYES2/NT B, pYES2/NT C, pYES2/CT, pYES2.1, pYES-DEST52, pTEF1/Zeo, pFLD1, PichiaPinkTM, p427-TEF, p417-CYC, pGAL-MF, p427-TEF, p417-CYC, PTEF-MF, pBY011, pSGP47, pSGP46, pSGP36, pSGP40, ZM552, pAG303GAL-ccdB, pAG414GAL-ccdB, pAS404, pBridge, pGAD-GH, pGAD T7, pGBK T7, pHIS-2, pOBD2, pRS408, pRS410, pRS418, pRS420, pRS428, yeast micron A form, pRS403, pRS404, pRS405, pRS406, pYJ403, pYJ404, pYJ405 및 pYJ406를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [76]
- [77] 본 출원에서 용어 "형질전환"은 표적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 숙주세포 혹은 미생물 내에 도입하여 숙주세포 내에서 상기 폴리뉴클레오티드가 코딩하는 단백질이 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 단백질을 코딩하는 DNA 및 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.

- [78] 또한, 상기에서 용어 "작동 가능하게 연결"된 것이란 본 출원의 목적 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 전사를 개시 및 매개하도록 하는 프로모터 서열과 상기 유전자 서열이 기능적으로 연결되어 있는 것을 의미한다.
- [79] 본 출원의 벡터를 형질전환 시키는 방법은 핵산을 세포 내로 도입하는 어떤 방법도 포함되며, 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), 폴리에틸렌 글리콜(PEG)법, DEAE-덱스트란법, 양이온 리포솜법, 및 초산 리튬-DMSO법 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [80]
- [81] 본 출원은 슈퍼옥사이드 디스뮤티이즈 1 및 상기 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 중 어느 하나 이상을 포함하는 미생물을 제공할 수 있다.
- [82] 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.
- [83] 하나의 구현예로, 상기 미생물은 글루타치온을 생산하는 미생물일 수 있다. 본 출원에서 "글루타치온을 생산하는 미생물"은 "글루타치온 생산 미생물", "글루타치온 생산능을 갖는 미생물", "글루타치온 생산 균주", "글루타치온 생산능을 갖는 균주" 등의 용어와 혼용되어 사용될 수 있다.
- [84] 전술한 구현예 중 어느 하나의 구현예로, 상기 미생물은 글루타치온 유도체를 생산하는 미생물일 수 있다.
- [85] 전술한 구현예 중 어느 하나의 구현예로, 본 출원의 미생물은 슈퍼옥사이드 디스뮤티이즈 1을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 포함할 수 있다.
- [86] 본 출원의 "글루타치온(glutathione)"은 "글루타티온", "GSH"와 상호 교환적으로 사용되며, 글루타메이트(glutamate), 시스테인(Cysteine), 글리신(glycine)의 세가지 아미노산으로 구성된 트리펩타이드를 의미한다. 글루타치온은 제약, 건강기능식품, 맛소재, 식품, 사료 첨가제, 화장품 등의 원료로 이용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [87] 본 출원의 "글루타치온 유도체"는 글루타치온을 출발 물질로 하여 전환될 수 있는 물질이라면, 제한 없이 포함된다.
- [88] 본 출원에서, 글루타치온 또는 그 유도체는 "감마-글루타밀 펩타이드"로 통칭될 수 있다. 감마-글루타밀 펩타이드는 분자의 N-말단에 글루탐산의 감마-카복실 그룹을 가지는 저분자 화합물을 지칭한다.
- [89] 구체적으로, 감마-글루타밀 펩타이드는 하기 일반식 1로 표시되는 화합물일 수 있다:
- [90] [일반식 1]
- [91] $\gamma\text{-Glu} - \text{X} - \text{Y}$
- [92] 상기 일반식 1에서, X는 시스테인, 글루탐산, 타이로신, 메티오닌, 발린, 트립토판, 아스파르트산, 이소류신, 류신, 아스파라긴, 글루타민, 히스티딘, 라이신, 오르니틴, 아르기닌, S-메틸시스테인(S-methylcysteine) 또는 S-에틸시스테인(S-ethylcysteine) 이고;
- [93] Y는 글리신, 알라닌, 류신, 이소류신, 세린, 쓰레오닌, 메티오닌, 시스테인, 아스파르트산, 아스파라긴, 글루타민, 라이신, 오르니틴, 아르기닌, 페닐알라닌, 타이로신, 프롤린, 하이드록시프롤린, 알파-아미노뷰티르산, 또는 부존제함.
- [94] 일 구현예로, 감마-글루타밀 펩타이드는 $\gamma\text{-Glu-Cys-Gly}$ (글루타치온), $\gamma\text{-Glu-Glu}(\gamma\text{-EF})$, $\gamma\text{-Glu-Tyr}(\gamma\text{-EY})$, $\gamma\text{-Glu-Met}(\gamma\text{-EM})$, $\gamma\text{-Glu-Val}(\gamma\text{-EV})$, $\gamma\text{-Glu-Trp}(\gamma\text{-EW})$, $\gamma\text{-Glu-Asp}(\gamma\text{-ED})$, $\gamma\text{-Glu-Ile}(\gamma\text{-EI})$, $\gamma\text{-Glu-Leu}(\gamma\text{-EL})$, $\gamma\text{-Glu-Cys-Gly}(\gamma\text{-ECG})$, $\gamma\text{-Glu-Val-Gly}(\gamma\text{-EVG})$, $\gamma\text{-glutamyl-S-methyl-cysteine}(\gamma\text{-E-S-methyl-C})$, $\gamma\text{-glutamyl-S-ethenyl-cysteine}(\gamma\text{-E-S-ethenyl-C})$, 및 $\gamma\text{-glutamyl-cysteinyl-}\beta\text{-alanine}(\gamma\text{-E-C-}\beta\text{-A})$ 중에서 선택되는 것일 수 있다.
- [95]
- [96] 전술한 구현예 중 어느 하나의 구현예로, 상기 감마-글루타밀 펩타이드는 글루타치온일 수 있다. 그러나, 이에 제한되지 않는다.
- [97] 본 출원의 미생물은 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈 1을 포함하여, 야생형이나 비변형 미생물과 비교하여 목적하는 글루타치온을 과량으로 생산할 수 있는 미생물을 의미할 수 있다. 상기 미생물은 글루타치온 생산이 가능하다면 그 종류가 특별히 제한되지는 않으나, 사카로마이세스 속 (the genus *Saccharomyces*) 미생물일 수 있고, 구체적으로는 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [98] 상기 변이체를 포함하는 글루타치온 생산 미생물의 모균주는, 글루타치온 생산이 가능한 것이면 특별히 제한되지 않는다. 상기 미생물은 추가로 글루타치온 생산능 증가를 위한 생합성경로 강화, 피드백 저해 해제, 분해경로 혹은 생합성 경로를 약화시키는 유전자 불활성화 등의 변이를 포함하는 것일 수 있고, 이러한 변이는 자연적인 것을 배제하는 것은 아니다.
- [99]
- [100] 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.

- [101] 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.
- [102] 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).
- [103] 구체적으로, 본 출원의 폴리펩티드 활성의 강화는
- [104] 1) 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 세포 내 카피수 증가;
- [105] 2) 폴리펩티드를 코딩하는 염색체상의 유전자 발현조절영역을 활성이 강력한 서열로 교체;
- [106] 3) 폴리펩티드를 코딩하는 유전자 전사체의 개시코돈 또는 5'-UTR 지역을 코딩하는 염기서열의 변형;
- [107] 4) 폴리펩티드 활성이 강화되도록 상기 폴리펩티드의 아미노산 서열의 변형;
- [108] 5) 폴리펩티드 활성이 강화되도록 상기 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열의 변형 (예를 들어, 폴리펩티드의 활성이 강화되도록 변형된 폴리펩티드를 코딩하도록 상기 폴리펩티드 유전자의 폴리뉴클레오티드 서열의 변형);
- [109] 6) 폴리펩티드의 활성을 나타내는 외래 폴리펩티드 또는 이를 코딩하는 외래 폴리뉴클레오티드의 도입;
- [110] 7) 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 코돈 최적화;
- [111] 8) 폴리펩티드의 삼차구조를 분석하여 노출 부위를 선택하여 변형하거나 화학적으로 수식; 또는

- [112] 9) 상기 1) 내지 8) 중 선택된 2 이상의 조합일 수 있으나, 이에, 특별히 제한되는 것은 아니다.
- [113] 보다 구체적으로,
- [114] 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.
- [115] 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.
- [116] 진핵 생물에 대해 공지된 프로모터의 예에는 번역 신장 인자 1(TEF1), 글리세롤-3-인산 탈수소 효소 1(GPD1), 3-포스포글리세레이트 키나제 또는 다른 글리콜분해 효소, 예컨대 에놀라제, 글리세르알데히드-3-포스페이트 데히드로게나제, 헥소키나제, 피루베이트 데카르복실라제, 포스포프рук토키나제, 글루코스-6-포스페이트 이소머라제, 3-포스포글리세레이트 뮤타제, 피루베이트 키나제, 트리오스포스페이트 이소머라제, 포스포글루코스 이소머라제, 및 글루코키나제에 대한 프로모터를 포함할 수 있고, 성장 조건에 의해 제어되는 전사의 추가의 이점을 갖는 유도성 프로모터인 다른 효모 프로모터의 예에는 알콜 데히드로게나제 2, 이소사이토크롬 C, 산 포스파타제, 질소 대사와 연관된 분해 효소, 메탈로티오네인, 글리세르알데히드-3-포스페이트 데히드로게나제, 및 말토스 및 갈락토스 이용을 담당하는 효소에 대한 프로모터가 있고, 숙주 세포가 효모인 경우 이용가능한 프로모터는 TEF1 프로모터, TEF2 프로모터, GAL10 프로모터, GAL1 프로모터, ADH1 프로모터, ADH2 프로모터, PHO5 프로모터, GAL1-10 프로모터, TDH3 프로모터(GPD 프로모터), TDH2 프로모터, TDH1 프로모터, PGK1 프로모터, PYK2 프로모터, ENO1 프로모터, ENO2 프로모터 및 TPI1 프로모터를 포함할 수 있으며, 효모 발현에 사용하기에 적합한 벡터 및 프로모터는 EP 073657에 추가로 기재되어 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 효모 인핸서도 효모 프로모터와 함께 유리하게 사용될 수 있으나, 이에

제한되지 않는다.

- [117] 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.
- [118] 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.
- [119] 상기 6) 폴리펩티드의 활성을 나타내는 외래 폴리뉴클레오티드의 도입은, 상기 폴리펩티드와 동일/유사한 활성을 나타내는 폴리펩티드를 코딩하는 외래 폴리뉴클레오티드의 숙주세포 내 도입일 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.
- [120] 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.
- [121] 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.
- [122] 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.

- [123] 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.
- [124]
- [125] 본 출원에서 용어, 폴리펩티드의 "약화"는 내재적 활성에 비하여 활성이 감소되거나 또는 활성이 없는 것을 모두 포함하는 개념이다. 상기 약화는 불활성화(inactivation), 결핍(deficiency), 하향조절(down-regulation), 감소(decrease), 저하(reduce), 감쇠(attenuation) 등의 용어와 혼용될 수 있다.
- [126] 상기 약화는 상기 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 변이 등으로 폴리펩티드 자체의 활성이 본래 미생물이 가지고 있는 폴리펩티드의 활성에 비해 감소 또는 제거된 경우, 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 유전자의 발현 저해 또는 폴리펩티드로의 번역(translation) 저해 등으로 세포 내에서 전체적인 폴리펩티드 활성 정도 및/또는 농도(발현량)가 천연형 균주에 비하여 낮은 경우, 상기 폴리뉴클레오티드의 발현이 전혀 이루어지지 않은 경우, 및/또는 폴리뉴클레오티드의 발현이 되더라도 폴리펩티드의 활성이 없는 경우 역시 포함할 수 있다. 상기 "내재적 활성"은 자연적 또는 인위적 요인에 의한 유전적 변이로 형질이 변화하는 경우, 형질 변화 전 모균주, 야생형 또는 비변형 미생물이 본래 가지고 있던 특정 폴리펩티드의 활성을 의미한다. 이는 "변형 전 활성"과 혼용되어 사용될 수 있다. 폴리펩티드의 활성이 내재적 활성에 비하여 "불활성화, 결핍, 감소, 하향조절, 저하, 감쇠"한다는 것은, 형질 변화 전 모균주 또는 비변형 미생물이 본래 가지고 있던 특정 폴리펩티드의 활성에 비하여 낮아진 것을 의미한다.
- [127] 이러한 폴리펩티드의 활성의 약화는, 당업계에 알려진 임의의 방법에 의하여 수행될 수 있으나 이로 제한되는 것은 아니며, 당해 분야에 잘 알려진 다양한 방법의 적용으로 달성될 수 있다(예컨대, Nakashima N et al., Bacterial cellular engineering by genome editing and gene silencing. Int J Mol Sci. 2014;15(2):2773-2793, Sambrook et al. Molecular Cloning 2012 등).
- [128] 구체적으로, 본 출원의 폴리펩티드 활성의 약화는
- [129] 1) 폴리펩티드를 코딩하는 유전자 전체 또는 일부의 결손;
- [130] 2) 폴리펩티드를 코딩하는 유전자의 발현이 감소하도록 발현조절영역(또는 발현조절서열)의 변형;

- [131] 3) 폴리펩티드의 활성이 제거 또는 약화되도록 상기 폴리펩티드를 구성하는 아미노산 서열의 변형(예컨대, 아미노산 서열 상의 1 이상의 아미노산의 삭제/치환/부가);
- [132] 4) 폴리펩티드의 활성이 제거 또는 약화되도록 상기 폴리펩티드를 코딩하는 유전자 서열의 변형 (예를 들어, 폴리펩티드의 활성이 제거 또는 약화되도록 변형된 폴리펩티드를 코딩하도록 상기 폴리펩티드 유전자의 핵산염기 서열 상의 1 이상의 핵산염기의 삭제/치환/부가);
- [133] 5) 폴리펩티드를 코딩하는 유전자 전사체의 개시코돈 또는 5'-UTR 지역을 코딩하는 염기서열의 변형;
- [134] 6) 폴리펩티드를 코딩하는 상기 유전자의 전사체에 상보적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오티드(예컨대, 안티센스 RNA)의 도입;
- [135] 7) 리보솜(ribosome)의 부착이 불가능한 2차 구조물을 형성시키기 위하여 폴리펩티드를 코딩하는 유전자의 사인-달가르노(Shine-Dalgarno) 서열 앞단에 사인-달가르노 서열과 상보적인 서열의 부가;
- [136] 8) 폴리펩티드를 코딩하는 유전자 서열의 ORF(open reading frame)의 3' 말단에 반대 방향으로 전사되는 프로모터의 부가(Reverse transcription engineering, RTE); 또는
- [137] 9) 상기 1) 내지 8) 중 선택된 2 이상의 조합일 수 있으나, 이에, 특별히 제한되는 것은 아니다.
- [138] 예컨대,
- [139] 상기 1) 폴리펩티드를 코딩하는 상기 유전자 일부 또는 전체의 결손은, 염색체 내 내재적 목적 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 전체의 제거, 일부 뉴클레오티드가 결실된 폴리뉴클레오티드로의 교체 또는 마커 유전자로 교체일 수 있다.
- [140] 또한, 상기 2) 발현조절영역(또는 발현조절서열)의 변형은, 결실, 삽입, 비보존적 또는 보존적 치환 또는 이들의 조합으로 발현조절영역(또는 발현조절서열) 상의 변이 발생, 또는 더욱 약한 활성을 갖는 서열로의 교체일 수 있다. 상기 발현조절영역에는 프로모터, 오퍼레이터 서열, 리보솜 결합부위를 코딩하는 서열, 및 전사와 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [141] 또한, 상기 5) 폴리펩티드를 코딩하는 유전자 전사체의 개시코돈 또는 5'-UTR 지역을 코딩하는 염기서열 변형은, 예를 들면, 내재적 개시코돈에 비해 폴리펩티드 발현율이 더 낮은 다른 개시코돈을 코딩하는 염기서열로 치환하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [142] 또한, 상기 3) 및 4)의 아미노산 서열 또는 폴리뉴클레오티드 서열의 변형은 폴리펩티드의 활성을 약화하도록 상기 폴리펩티드의 아미노산 서열 또는 상기 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 결실, 삽입, 비보존적 또는 보존적 치환 또는 이들의 조합으로 서열상의 변이 발생, 또는 더욱 약한 활성을

갓도록 개량된 아미노산 서열 또는 폴리뉴클레오티드 서열 또는 활성이 없도록 개량된 아미노산 서열 또는 폴리뉴클레오티드 서열로의 교체일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 예를 들면, 폴리뉴클레오티드 서열 내 변이를 도입하여 종결 코돈을 형성시킴으로써, 유전자의 발현을 저해하거나 약화시킬 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [143] 상기 6) 폴리펩티드를 코딩하는 상기 유전자의 전사체에 상보적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오티드(예컨대, 안티센스 RNA)의 도입은 예를 들어 문헌 [Weintraub, H. et al., Antisense-RNA as a molecular tool for genetic analysis, Reviews - Trends in Genetics, Vol. 1(1) 1986]을 참고할 수 있다.
- [144] 상기 7) 리보솜(ribosome)의 부착이 불가능한 2차 구조물을 형성시키기 위하여 폴리펩티드를 코딩하는 유전자의 사인-달가르노(Shine-Dalgarno) 서열 앞단에 사인-달가르노 서열과 상보적인 서열의 부가는 mRNA 번역을 불가능하게 하거나 속도를 저하시키는 것일 수 있다.
- [145] 상기 8) 폴리펩티드를 코딩하는 유전자서열의 ORF(open reading frame)의 3' 말단에 반대 방향으로 전사되는 프로모터의 부가(Reverse transcription engineering, RTE)는 상기 폴리펩티드를 코딩하는 유전자의 전사체에 상보적인 안티센스 뉴클레오티드를 만들어 활성을 약화하는 것일 수 있다.
- [146]
- [147] 전술한 구현예 중의 어느 하나의 구현예로, 본 출원의 미생물은 글루타메이트-시스테인 리가아제(GSH1)의 발현조절영역에 글루타치온 생산능이 증가되도록 하는 변이를 포함하는 것일 수 있다. 상기 변이는 GSH1 ORF 상단의 -250(C→T), -252(G→A), -398(A→T), -399(A→C), -407(T→C) 및 -409(T→C) 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 변이일 수 있다.
- [148] 전술한 구현예 중의 어느 하나의 구현예로, 상기 미생물은 글루타메이트-시스테인 리가아제(GSH1)의 86번째 아미노산 및/또는 653번째 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 변이를 포함하는 것일 수 있다. 구체적으로, 86번 아미노산이 아르기닌으로, 653번 아미노산이 메티오닌으로 치환된 변이를 포함할 수 있다. 그러나, 이에 제한되지 않는다.
- [149] 전술한 구현예 중의 어느 하나의 구현예로, 상기 미생물은 글루타메이트-시스테인 리가아제(GSH1)의 활성이 강화되는 변이를 포함하는 것일 수 있다. 그러나, 이에 제한되지 않는다.
- [150]
- [151] 본 출원의 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈 1 변이체 및 상기 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 중 어느 하나 이상을 포함하는 미생물은, "서열번호 1의 아미노산 서열에서 37번째 위치에 상응하는 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈 1을 발현하는 미생물"일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [152] 상기 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈 1 및 이의 변이체에 대해서는 전술한 바와

같다.

[153]

[154] 본 출원에서 용어, 단백질이 "발현되도록/되는"은 목적 단백질이 미생물 내에 도입되거나, 미생물 내에서 발현되도록 변형된 상태를 의미한다.

[155] 본 출원의 단백질 변이체를 발현하는 미생물은, 본 출원의 단백질 변이체를 발현하도록 변형된 미생물일 수 있고, 따라서 본 출원의 다른 하나의 양태는 본 출원의 단백질 변이체를 발현하는 미생물의 제조 방법을 제공한다.

[156]

[157] 본 출원에서 용어, "변형 전 균주" 또는 "변형 전 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. 상기 "변형 전 균주" 또는 "변형 전 미생물"은 "비변이 균주", "비변형 균주", "비변이 미생물", "비변형 미생물" 또는 "기준 미생물"과 혼용될 수 있다.

[158]

[159] 본 출원에서 상기 슈퍼옥사이드 디스뮤티이즈 1 변이체를 포함하거나 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 포함하는 미생물은, 재조합 미생물일 수 있고, 상기 재조합은 형질전환과 같은 유전적 변형(genetically modification)에 의해 이루어질 수 있다.

[160] 예를 들면, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터로 형질전환에 의해 제조되는 재조합 미생물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 재조합 미생물은 효모일 수 있으며, 그 예로, 사카로마이세스 속 미생물일 수 있고, 구체적으로 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[161]

[162] 본 출원의 다른 하나의 양태는 상기 미생물을 배양하는 단계를 포함하는 글루타치온 또는 그 유도체의 제조방법을 제공한다. 상기 미생물, 글루타치온 또는 그 유도체에 대해서는 전술한 바와 같다.

[163] 본 출원의 균주의 배양에 사용되는 배지 및 기타 배양 조건은 통상의 사카로마이세스속 미생물의 배양에 사용되는 배지라면 특별한 제한 없이 어느 것이나 사용될 수 있으며, 구체적으로는 본 출원의 균주를 적당한 탄소원, 질소원, 인원, 무기화합물, 아미노산 및/또는 비타민 등을 함유한 통상의 배지 내에서 호기성 또는 혐기성 조건 하에서 온도, pH 등을 조절하면서 배양할 수 있다.

[164] 본 출원에서 상기 탄소원으로는 글루코오스, 프룩토오스, 수크로오스, 말토오스 등과 같은 탄수화물; 만니톨, 소르비톨 등과 같은 당 알코올, 피루브산, 락트산, 시트르산 등과 같은 유기산; 글루타메이트, 메티오닌, 라이신 등과 같은 아미노산 등이 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 전분 가수분해물,

당밀, 블랙스트랩 당밀, 쌀겨울, 카사버, 사탕수수 찌꺼기 및 옥수수 침지액 같은 천연의 유기 영양원을 사용할 수 있으며, 글루코오스 및 살균된 전처리 당밀(즉, 환원당으로 전환된 당밀) 등과 같은 탄수화물이 사용될 수 있고, 그 외의 적정량의 탄소원을 제한 없이 다양하게 이용할 수 있다. 이들 탄소원은 단독으로 사용되거나 2 종 이상이 조합되어 사용될 수 있다.

- [165] 상기 질소원으로는 암모니아, 황산암모늄, 염화암모늄, 초산암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄, 질산암모늄 등과 같은 무기질소원; 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 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [166] 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 있다.
- [167] 그 외에 상기 배지에는 아미노산, 비타민 및/또는 적절한 전구체 등이 포함될 수 있다. 구체적으로, 상기 균주의 배양 배지에는 L-아미노산 등이 첨가될 수 있다. 구체적으로는 글리신(glycine), 글루타메이트(glutamate), 및/또는 시스테인(cysteine) 등이 첨가될 수 있고, 필요에 따라서는 라이신(lysine) 등의 L-아미노산 이 더 첨가될 수 있으나 반드시 이에 제한되지 않는다.
- [168]
- [169] 상기 배지 또는 전구체는 배양물에 회분식 또는 연속식으로 첨가될 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.
- [170] 본 출원에서, 균주의 배양 중에 수산화암모늄, 수산화칼륨, 암모니아, 인산, 황산 등과 같은 화합물을 배양물에 적절한 방식으로 첨가하여, 배양물의 pH를 조절할 수 있다. 또한, 배양 중에는 지방산 폴리글리콜 에스테르와 같은 소포체를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다. 또한, 배양물의 호기 상태를 유지하기 위하여, 배양물 내로 산소 또는 산소 함유 기체를 주입하거나 혐기 및 미호기 상태를 유지하기 위해 기체의 주입 없이 혹은 질소, 수소 또는 이산화탄소 가스를 주입할 수 있다.
- [171] 배양물의 온도는 25°C 내지 40°C일 수 있으며, 보다 구체적으로는 28°C 내지 37°C일 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 배양 기간은 원하는 유용 물질의 생성량이 수득될 때까지 계속될 수 있으며, 구체적으로는 1 시간 내지 100 시간일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [172]
- [173] 상기 제조방법은, 상기 배양 단계 이후, 추가적인 공정을 더 포함할 수 있다. 상기 추가 공정은 글루타치온 또는 그 유도체의 용도에 따라 적절히 선택될 수 있다.
- [174] 구체적으로, 상기 글루타치온 또는 그 유도체의 제조방법은 상기 배양 단계에

의해 균체 내에 축적된 글루타치온 또는 그 유도체를 회수하는 단계를 포함할 수 있고, 예를 들면 상기 배양 단계 이후 상기 균주, 이의 건조물, 추출물, 배양물, 파쇄물 중에서 선택된 하나 이상의 물질로부터 글루타치온 또는 그 유도체를 회수하는 단계를 포함할 수 있다. 다른 예로, 상기 글루타치온 유도체의 제조방법은 상기 글루타치온을 유도체로 전환하는 단계를 포함할 수 있다.

- [175] 상기 방법은 상기 회수 단계 이전, 혹은 동시에 균주를 용균시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 균주의 용균은 본 출원이 속하는 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 방법, 예를 들어, 용균용 완충용액, 소니케이터, 열 처리 및 후렌치 프레스 등에 의해 실시할 수 있다. 또한 상기 용균 단계는 세포벽 분해 효소, 핵산 분해 효소, 핵산 전이 효소, 단백질 분해 효소 등 효소반응을 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [176] 본 출원의 제조방법을 통해 글루타치온 또는 그 유도체가 고함량으로 포함된 건조 효모(Dry yeast), 효모 추출물(yeast extract), 효모추출물 혼합 분말(yeast extract mix powder), 순수 정제된 글루타치온(pure glutathione) 또는 그 유도체를 제조할 수 있으나 이에 제한되지 않으며, 목적하는 제품에 따라 적절하게 제조될 수 있다.
- [177] 본 출원에서 건조 효모(dry yeast)는 "균주 건조물" 등의 용어와 교환적으로 사용될 수 있다. 상기 건조 효모는 글루타치온을 축적한 효모 균체를 건조시켜 제조할 수 있으며, 구체적으로 사료용 조성물, 식품용 조성물 등에 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [178] 본 출원에서 효모 추출물(yeast extract)은 "균주 추출물" 등의 용어와 상호 교환적으로 사용될 수 있다. 상기 균주 추출물은, 상기 균주의 균체에서 세포벽을 분리하고 남은 물질을 의미할 수 있다. 구체적으로, 균체를 용균시켜 수득한 성분에서 세포벽을 제외한 나머지 성분을 의미할 수 있다. 상기 균주 추출물은 글루타치온 또는 그 유도체를 포함하며, 그 외의 성분으로는 단백질, 탄수화물, 핵산, 섬유질 중 하나 이상의 성분이 포함되어 있을 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [179] 상기 회수 단계는 당해 기술 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여, 목적 물질인 글루타치온 또는 그 유도체를 회수할 수 있다.
- [180] 상기 회수 단계는 정제 공정을 포함할 수 있다. 상기 정제 공정은 균주로부터 글루타치온 또는 그 유도체만을 분리하여 순수 정제하는 것일 수 있다. 상기 정제 공정을 통해, 순수 정제된 글루타치온(pure glutathione)이 제조될 수 있다.
- [181] 필요에 따라, 상기 글루타치온의 제조방법은, 상기 배양 단계 이후 수득된 균주, 이의 건조물, 추출물, 배양물, 파쇄물 및 이들로부터 회수된 글루타치온 중에서 선택된 물질과 부형제를 혼합하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 혼합 단계를 통해 효모추출물 혼합 분말(yeast extract mix powder)이 제조될 수 있다. 이는 글루타치온의 유도체에 대해서도 동일하게 적용될 수 있다.
- [182] 상기 부형제는 목적하는 용도나 형태에 따라 적절히 선택하여 사용할 수

있으며, 예를 들어, 전분, 글루코오스, 셀룰로오스, 락토오스, 글리코젠, D-만니톨, 소르비톨, 락티톨, 말토덱스트린, 탄산칼슘, 합성규산알루미늄, 인산일수소칼슘, 황산칼슘, 염화나트륨, 탄산수소나트륨, 정제 라놀린, 텍스트린, 알긴산나트륨, 메틸셀룰로오스, 콜로이드성실리카겔, 하이드록시프로필스타치, 하이드록시프로필메틸셀룰로오스, 프로필렌글리콜, 카제인, 젖산칼슘, 프리모젤, 아라비아 검 중에서 선택되는 것일 수 있으며, 구체적으로는 전분, 글루코오스, 셀룰로오스, 락토오스, 텍스트린, 글리코젠, D-만니톨, 말토덱스트린 중에서 선택되는 하나 이상의 성분일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[183] 상기 부형제는, 예를 들어, 보존제, 습윤제, 분산제, 현탁화제, 완충제, 안정화제 또는 등장화제 등을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[184]

발명의 실시를 위한 형태

[185] 이하 본 출원을 실시예 및 실험예를 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.

[186]

[187] 실시예 1: 글루타치온 생산 균주 개량

[188] 기탁번호 KCCM12568P로 기탁된, 글루타치온 생산 균주인 CJ-5 균주(KR 10-222210 B1)의 글루타치온 생산능을 추가적으로 개선하기 위해 다음과 같은 방법으로 돌연변이를 유도하였다.

[189] CJ-5 균주를 고체배지에 배양한 후 broth에 접종하여 배양액을 수득하였으며, UV 램프를 이용하여 균체에 UV를 조사하였다. 이후, UV 조사된 배양액을 평판배지에 도말하여 콜로니를 형성한 변이 균주만을 분리 수득하였으며, 글루타치온 생산능이 가장 많이 향상된 균주를 분리하였다.

[190] 분리된 균주의 유전체를 확인해본 결과 GSH1 ORF 상단 -250(C→T), -252(G→A), -398(A→T), -399(A→C), -407(T→C), -409(T→C) 변이가 일어났으며, gsh1 유전자가 코딩하는 GSH1 단백질의 86번째 아미노산인 시스테인이 아르기닌으로, 653번째 아미노산(글리신)이 메티오닌으로 치환된 것을 확인하였다.

[191] 상기 균주를 CC02-2816으로 명명하고 부다페스트조약 하의 수탁기관인 한국미생물보존센터에 2020년 12월 8일자로 기탁하여 수탁번호 KCCM12891P를 부여받았다.

[192]

[193] 실시예 2: 균주 추가 개량실험

[194] 실시예 1의 CC02-2816 균주의 글루타치온 생산능을 추가적으로 개선하기 위해 다음과 같은 방법으로 돌연변이를 유도하였다.

- [195] CC02-2816 균주를 고체배지에 배양한 후 broth에 접종하여 배양액을 수득하였으며, UV 램프를 이용하여 균체에 UV를 조사하였다. 이후, UV 조사된 배양액을 평판배지에 도말하여 콜로니를 형성한 변이 균주만을 분리 수득하여 염기서열을 분석하였다.
- [196] 실험 결과, 글루타치온 함량이 26% 향상된 균주의 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈 1을 코딩하는 *sod1*이 코딩하는 단백질인 SOD1(서열번호 1)의 37번째 아미노산(글리신)이 아르기닌으로 치환된 것을 확인하였다.
- [197]
- [198] **실시예 3: SOD1 단백질의 37번 잔기 변이 실험**
- [199] 상기 실시예 2의 결과로부터 SOD1 단백질의 37번 위치가 글루타치온 생산에 중요할 것이라고 판단하여, 야생형 *S. cerevisiae* CEN.PK2-1D 및 실시예 1의 CC02-2816 균주가 SOD1 단백질의 37번째 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 변이 단백질을 발현하도록 제작하여 글루타치온 생산량 증가 여부를 확인하고자 하였다.
- [200] 사카로마이세스 세레비지에 효모의 SOD1 단백질의 37번 아미노산을 아르기닌으로 치환한 균주를 제작하기 위하여 Lee TH, et al.(*J. Microbiol. Biotechnol.* (2006), 16(6), 979-982) 논문에서 개시된 내용을 참고로 하여 pWAL100 및 pWBR100 플라스미드를 이용하였다.
- [201] 구체적으로 CJ-5 균주의 genomic DNA를 주형(template)으로 하여 다음과 같이 PCR을 수행하였다. 서열번호 4와 서열번호 6의 프라이머를 이용한 PCR을 수행하여 N-terminal BamHI flanking 서열, SOD1 ORF의 개시코돈 및 G37R 변이 암호화 서열을 포함하는 SOD1 N-terminal 일부 서열을 수득하고, 서열번호 5와 서열번호 7의 프라이머를 이용하여 C-terminal XhoI flanking 서열, SOD1 ORF 종결코돈 및 G37R 변이 암호화 서열을 포함하는 SOD1 C-terminal 일부 서열을 수득하였다. 이후 이 두 서열을 주형(template)으로 하여 서열번호 4와 서열번호 7을 이용하여 overlap PCR을 수행한 결과 37번째 아미노산이 아르기닌으로 치환된 SOD1 변이 단백질 암호화 서열, N-terminal BamHI, C-terminal XhoI 제한효소 서열을 포함하는 SOD1 ORF 절편을 수득하였다. 상기 ORF 절편은 BamHI 및 XhoI처리 후 동일한 효소로 처리한 pWAL100 벡터에 클로닝하여 pWAL100-SOD1(G37R) 벡터를 제조하였다.
- [202] 또한, CJ-5 균주의 genomic DNA를 template으로 하여 서열번호 8과 서열번호 9를 이용한 PCR을 수행하여 N-terminal SpeI, C-terminal NcoI 제한효소 서열을 포함하는 SOD1 ORF 종결코돈 이후 500bp 단편을 수득하고 SpeI, NcoI 제한효소를 처리하였다. 이후 동일한 제한효소를 처리한 pWBR100에 클로닝하여 pWBR100-SOD1 벡터를 제조하였다.
- [203] 최종적으로 효모에 도입할 DNA 절편을 제작하기 위해 앞서 제작한 pWAL100-SOD1(G37R) 벡터를 주형(template)으로 하여 서열번호 4와 서열번호 10의 프라이머를 이용하여 아르기닌 변이 암호화서열과 KIURA3 일부를

포함하는 PCR 산물을 획득하고 pWBR100-SOD1 벡터를 주형(template)으로 하여 서열번호 11과 서열번호 9의 프라이머를 이용하여 KIURA3 일부와 SOD1 종결코돈 이후 500bp를 포함하는 PCR 산물을 획득한 후 각 PCR 산물을 동일한 물비율로 *S. cerevisiae* CEN.PK2-1D 및 *S. cerevisiae* CC02-2816에 형질전환 하였다. PCR은 95°C에서 열변성 과정 5분, 53°C에서 결합과정 1분, 72°C에서 중합과정 1kb당 1분의 조건으로 수행하였으며 효모의 형질전환은 Geitz의 논문(Nucleic Acid Research, 20(6), 1425)을 변형한 리튬아세테이트 방법(Lithium acetate method)을 사용하였다. 구체적으로 O.D. 0.7 ~ 1.2 사이의 효모 세포를 리튬아세테이트/TE buffer로 2회 세척한 후, 상기 PCR산물들과 single stranded DNA (Sigma D-7656)을 함께 섞어 리튬아세테이트/TE/40 % PEG buffer에서 30분간 30°C, 42°C에서 15분간 정치배양한 후 cell들을 우라실(Uracil)이 포함되지 않은 SC (2% glucose) agar plate에서 콜로니가 보일 때까지 배양하여 SOD1 G37R 변이 암호화 서열과 KIURA3 유전자가 도입된 균주를 획득하였다. 이후 KIURA3를 제거하기 위하여 각 균주를 2ml의 YPD에 overnight 배양 후 1/100 희석하여 0.1%의 5-FOA가 포함된 SC (2% glucose) agar plate에 도말하여 우라실(Uracil)마커가 제거된 *S. cerevisiae* CEN.PK2-1D SOD1의 G37R 변이 균주 및 *S. cerevisiae* CC02-2816 SOD G37R 변이 균주를 제작하였다. 아르기닌 외에 다른 종류의 아미노산으로 치환된 SOD1 변이 단백질을 발현할 수 있는 균주도 서열번호 5 및 서열번호 6의 프라이머 서열상의 37번 아르기닌 코딩 서열을 다른 아미노산을 코딩하는 서열로 치환한 프라이머쌍을 이용한 점을 제외하고는 동일한 방식으로 제작하였다.

[204] [표1]

프라이머	5' -> 3' 서열
F_BamHI_SOD1(서열 번호 4)	GGTAGGATCC ATGGTTCAAGCAGTCGCAGTGTTAA
F_SOD1_G37R(서열번 호 5)	TTACGAGATCGCTCGCAACAGTCCT
R_SOD1_G37R(서열번 호 6)	AGGACTGTTGCGAGCGATCTCGTAA
R_XhoI_SOD1(서열번 호 7)	ATGACTCGAG TTAGTTGGTTAGACCAATGACACCA
F_SpeI_SOD1_DW(서 열번호 8)	TAGAACTAGT TGTTAATGATAATATACTTGAATA
R_NcoI_SOD1_DW(서 열번호 9)	GCTGCCATGG ACACTACTAGCTCCTGAAGACCAAG
R_AL killer(서열번호 10)	GAGCAATGAACCCAATAACGAAATCTT
F_BR killer(서열번호 11)	CTTGACGTTCGTTCTGACTGATGAG

[205] 상기에서 제작된 각 균주를 26시간 배양하여 생산한 글루타치온 (GSH) 농도 및 함량을 측정한 결과를 하기 표 2, 3과 도 1, 2에 표기하였다.

[206]

[207]

[208] [표2]

S.cerevisiae CC02-2816		
	합량(fold)	농도(fold)
WT(야생형)	1.00	1.00
SOD1 G37A	1.25	1.16
SOD1 G37C	1.26	1.14
SOD1 G37D	1.25	1.11
SOD1 G37E	1.24	1.14
SOD1 G37F	1.18	0.90
SOD1 G37H	1.23	1.12
SOD1 G37I	1.31	1.16
SOD1 G37K	1.06	1.14
SOD1 G37L	1.28	1.17
SOD1 G37M	1.18	0.95
SOD1 G37N	1.28	1.14
SOD1 G37P	1.13	0.73
SOD1 G37Q	1.24	1.18
SOD1 G37R	1.26	1.18
SOD1 G37S	1.25	1.24
SOD1 G37T	1.22	1.22
SOD1 G37V	1.21	1.24
SOD1 G37W	1.16	0.69
SOD1 G37Y	1.21	1.21

[209] [표3]

S. cerevisiae CEN.PK2-1D		
	농도(fold)	함량(fold)
CEN.PK	1.00	1.00
SOD1 G37A	1.06	1.10
SOD1 G37C	1.05	1.08
SOD1 G37D	1.08	1.11
SOD1 G37E	1.07	1.12
SOD1 G37F	1.34	1.26
SOD1 G37H	1.24	1.11
SOD1 G37I	1.32	1.19
SOD1 G37K	1.19	1.13
SOD1 G37L	1.31	1.25
SOD1 G37M	1.18	1.07
SOD1 G37N	1.27	1.17
SOD1 G37P	1.12	1.12
SOD1 G37Q	1.26	1.17
SOD1 G37R	1.10	1.06
SOD1 G37S	1.26	1.21
SOD1 G37T	1.22	1.18
SOD1 G37V	1.18	1.12
SOD1 G37W	1.26	1.23
SOD1 G37Y	1.23	1.14

[210] 이를 통해, SOD1 단백질의 37번 아미노산을 다른 아미노산으로 치환함으로써 글루타치온 생산능이 증대될 수 있음을 확인하였는바, 본 출원에서 제공하는 SOD1 단백질 변이체가 감마-글루타밀 펩타이드의 생산에 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있다.

[211]

[212] 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.

[213]

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>Saccharomyces cerevisiae</i> CC02-2816	국제 기탁기관이 부여한 수탁번호: KCCM12891P
II. 과학적 성질의 설명 및/또는 분류학상의 위치	
항목 I에 표시된 미생물에 대하여 다음 사항이 포함되어 있다: ☐ 과학적 성질의 설명 ☐ 제인된 분류학상의 위치 (적용시 x 표시)	
III. 기탁 및 수탁	
본 국제기탁기관은 2020년 12월 8일에 기탁된 항목 I에 표시된 미생물을 수탁하였다. ¹	
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 시명: 서명일: 2020. 12. 08.

¹ 규칙 6.4(d)에 따르면, 상기 일자는 국제 기탁기관이 획득한 상태의 날짜이다.

상기 번역은 원문의 내용과 상이 없음을 증명함.

2021년 1월 4일

특허법인 한얼



청구범위

- [청구항 1] 서열번호 1의 아미노산 서열의 N-말단으로부터 37번째 위치에 상응하는 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈 1(SOD1) 변이체.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 다른 아미노산은 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 트립토판, 프롤린, 세린, 쓰레오닌, 시스테인, 타이로신, 아스파라긴, 글루타민, 아스파르트산, 글루탐산, 라이신, 아르기닌 및 히스티딘 중 선택되는 아미노산인 것인, 변이체.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 변이체는 서열번호 12 내지 30 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 변이체.
- [청구항 4] 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈 1 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 5] 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈 1 변이체; 및 상기 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 중 어느 하나 이상을 포함하는 미생물.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 미생물은 글루타치온 또는 그 유도체를 생산하는 것인, 미생물.
- [청구항 7] 제5항에 있어서, 상기 미생물은 사카로마이세스 속(*Saccharomyces* sp.)인, 미생물.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 미생물은 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)인, 미생물.
- [청구항 9] 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈 1 변이체; 및 상기 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 중 어느 하나 이상을 포함하는 미생물을 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, 글루타치온 또는 그 유도체의 생산 방법.
- [청구항 10] 제9항에 있어서, 상기 방법은 상기 배양된 미생물, 상기 미생물의 건조물, 상기 미생물의 추출물, 상기 미생물의 배양물, 및 상기 미생물의 파쇄물 중에서 선택된 하나 이상의 물질로부터 글루타치온 또는 그 유도체를 회수하는 단계를 추가로 포함하는, 글루타치온 또는 그 유도체의 생산 방법.