

명세서

발명의 명칭: 고농도 L-글루탐산을 생산하기 위한 균주 및 이를 이용한 L-글루탐산 생산방법

기술분야

- [1] 본 출원은 고농도 L-글루탐산을 생산하기 위한 균주 및 이를 이용한 L-글루탐산 생산방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] L-글루탐산(L-glutamic acid)은 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. L-글루탐산은 코리네박테리움(*Corynebacterium*) 속, 대장균(*Escherichia coli*), 고초균(*Bacillus*), 방선균(*Streptomyces*), 페니실리움(*Penicillium*) 속, 크렙시엘라(*Klebsiella*), 어위니아(*Erwinia*), 또는 판토에아(*Pantoea*) 속 등의 미생물을 이용하여 생산하는 방법이 알려져 있다(미국 특허 제3,220,929호, 미국 특허 제6,682,912호).
- [4] 현재 L-글루탐산을 고효율로 생산하는 미생물 및 발효공정 기술 개발을 위한 다양한 연구들이 수행되고 있다. 예를 들어, 코리네박테리움 속 미생물에서 아미노산 생합성에 관여하는 효소를 암호화하는 유전자의 발현을 증가시키거나 또는 아미노산 생합성에 불필요한 유전자를 제거하는 것과 같은 목적 물질 특이적인 접근 방법이 L-글루탐산 생산 수율 향상을 위하여 주로 이용되고 있다.

[5]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 본 발명자들은 L-글루탐산을 고수율로 생산하기 위해 예의 노력한 결과, 불활성화된 VKOR 단백질에 의해 L-글루탐산 생산능이 증가됨을 확인함으로써 본 출원을 완성하였다.

[7]

과제 해결 수단

- [8] 본 출원의 하나의 목적은 VKOR(vitamin K epoxide reductase family protein) 단백질이 불활성화된, 코리네박테리움 속 미생물을 제공하는 것이다.
- [9] 본 출원의 다른 하나의 목적은 VKOR 단백질이 불활성화된, 코리네박테리움 속 미생물을 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, L-글루탐산 생산방법을 제공하는 것이다.
- [10] 본 출원의 또 다른 하나의 목적은 VKOR 단백질이 불활성화된, 코리네박테리움 속 미생물; 이를 배양한 배지; 또는 이들의 조합을 포함하는,

L-글루탐산 생산용 조성물을 제공하는 것이다.

- [11] 본 출원의 또 다른 하나의 목적은 VKOR 단백질을 불활성화하는 단계를 포함하는, 코리네박테리움 속 미생물의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [12] 본 출원의 또 다른 하나의 목적은 VKOR 단백질이 불활성화된, 코리네박테리움 속 미생물; 이를 배양한 배지; 또는 이들의 조합을 포함하는, L-글루탐산 생산용 조성물을 제공하는 것이다.
- [13] 본 출원의 또 다른 하나의 목적은 VKOR 단백질을 불활성화하는 단계를 포함하는, 코리네박테리움 속 미생물의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [14] 본 출원의 또 다른 하나의 목적은 VKOR 단백질이 불활성화된, 코리네박테리움 속 미생물의 L-글루탐산 생산 용도를 제공하는 것이다.

[15]

발명의 효과

- [16] 본 출원의 VKOR 단백질을 불활성화시킨 L-글루탐산 생산 코리네박테리움 속 미생물은 고수율로 L-글루탐산을 생산할 수 있어 L-글루탐산의 산업적 생산에 유용하게 이용될 수 있다.

[17]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [18] 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. 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.

[19]

- [20] 본 출원의 하나의 양태는 VKOR(vitamin K epoxide reductase family protein) 단백질이 불활성화된, 코리네박테리움 속 미생물을 제공하는 것이다.

[21]

- [22] 본 출원에서 용어, "VKOR(vitamin K epoxide reductase family protein)"은 비타민 K 2,3-에폭사이드(vitamin K 2,3-epoxide)와 비타민 K(vitamin K)를 비타민 K 하이드로퀴논(vitamin K hydroquinone)으로 환원하는 활성을 갖는 효소이다(Vitamins & Hormones Volume 78, 2008, Pages 103-130).

- [23] 일 구현예로, 본 출원의 VKOR 단백질은 미생물로부터 유래하는 것일 수 있다. 상기 미생물은, 구체적으로 코리네박테리움 속 미생물로부터 유래하는 것일 수 있으며, 보다 구체적으로 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*), 코리네박테리움 데세르티(*Corynebacterium deserti*), 코리네박테리움 크루디락티스(*Corynebacterium crudilactis*), 코리네박테리움 이피시엔스(*Corynebacterium jeikeium*)

Corynebacterium efficiens), 코리네박테리움 칼루네(*Corynebacterium callunae*) 등으로부터 유래하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [24] 상기 VKOR 단백질의 아미노산 서열은 VKOR 유전자에 의해 코딩되는 것일 수 있다. 일 예로, VKOR 유전자는 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032 유래 NCgl0775 또는 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13869 유래 BBD29_04485일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [25] 본 출원의 VKOR 단백질은 서열번호 1로 기재된 아미노산 서열과 80% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 기재된 폴리펩티드를 포함하거나, 이로 이루어진 것일 수 있다. 또한, 본 출원의 VKOR 단백질은 서열번호 1로 기재된 아미노산 서열과 80% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 가지거나, 상기 아미노산 서열로 필수적으로 이루어질(essentially consisting of) 수 있다. 구체적으로, 상기 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열로 기재된 폴리펩티드로 이루어지는 것일 수 있다.
- [26] 상기 서열번호 1의 아미노산 서열은 공지의 데이터 베이스인 미국국립보건원 진뱅크(NIH GenBank)에서 얻을 수 있다. 본 출원에 있어서, 상기 서열번호 1의 아미노산 서열은 상기 서열번호 1로 기재된 아미노산 서열과 적어도 70%, 75%, 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. 또한, 이러한 상동성 또는 동일성을 가지며 상기 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 단백질에 상응하는 효능을 나타내는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환, 보존적 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 단백질도 본 출원의 범위 내에 포함됨은 자명하다.
- [27] 예를 들어, 상기 아미노산 서열 N-말단, C-말단 그리고/또는 내부에 본 출원의 단백질의 기능을 변경하지 않는 서열 추가 또는 결실, 자연적으로 발생할 수 있는 돌연변이, 잠재성 돌연변이(silent mutation) 또는 보존적 치환을 가지는 경우이다.
- [28] 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 활성에 거의 영향을 미치지 않거나 또는 영향을 미치지 않을 수 있다.
- [29]
- [30] 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.
- [31] 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.

- [32] 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.
- [33] 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.
- [34]
- [35] 본 출원에 있어서, 상기 VKOR 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 VKOR 유전자일 수 있다. VKOR 유전자의 일례로, NCgl0775 또는 BBD29_04485 유전자 등이 있으며, 이에 대해서는 전술한 바와 같다.

- [36] 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 상기 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 단편을 의미한다.
- [37] 본 출원의 VKOR 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1으로 기재된 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열을 포함할 수 있다. 본 출원의 일 예로, 본 출원의 폴리뉴클레오티드는 서열번호 2의 서열을 가지거나 포함할 수 있다. 또한, 본 출원의 폴리뉴클레오티드는 서열번호 2의 서열로 이루어지거나, 필수적으로 구성될 수 있다. 구체적으로, 상기 VKOR 단백질은 서열번호 2의 염기서열로 기재된 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 것일 수 있다.
- [38] 본 출원의 폴리뉴클레오티드는 코돈의 축퇴성(degeneracy) 또는 본 출원의 VKOR 단백질을 발현시키고자 하는 생물에서 선호되는 코돈을 고려하여, VKOR 단백질의 아미노산 서열을 변화시키지 않는 범위 내에서 코딩 영역에 다양한 변형이 이루어질 수 있다. 구체적으로, 본 출원의 폴리뉴클레오티드는 서열번호 2의 서열과 상동성 또는 동일성이 70% 이상, 75% 이상, 76% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상인 염기서열을 가지거나 포함하거나, 또는 서열번호 2의 서열과 상동성 또는 동일성이 70% 이상, 75% 이상, 76% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상인 염기서열로 이루어지거나 필수적으로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [39] 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, 76% 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.
- [40] 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.

- [41] 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.
- [42] 상기 폴리뉴클레오티드를 혼성화하는 적절한 엄격도는 폴리뉴클레오티드의 길이 및 상보성 정도에 의존하고 변수는 해당기술분야에 잘 알려져 있다(예컨대, J. Sambrook et al., 상동).
- [43]
- [44] 본 출원에서 용어, "미생물(또는, 균주)"은 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.
- [45]
- [46] 본 출원에서 용어, 폴리펩티드 활성의 "불활성화"는 내재적 활성에 비하여 활성이 감소되거나 또는 활성이 없는 것을 모두 포함하는 개념이다. 상기 불활성화는 약화(inactivation), 결핍(deficiency), 하향조절(down-regulation), 감소(decrease), 저하(reduce), 감쇠(attenuation) 등의 용어와 혼용될 수 있다.
- [47] 상기 불활성화는 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, 약화, 결핍, 감소, 하향조절, 저하, 감쇠"한다는 것은, 형질 변화 전

모균주 또는 비변형 미생물이 본래 가지고 있던 특정 폴리펩티드의 활성에 비하여 낮아진 것을 의미한다.

- [48] 이러한 폴리펩티드의 활성의 불활성화는, 당업계에서 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).
- [49]
- [50] 구체적으로, 본 출원의 폴리펩티드 활성의 불활성화는
- [51] 1) 폴리펩티드를 코딩하는 유전자 전체 또는 일부의 결손;
- [52] 2) 폴리펩티드를 코딩하는 유전자의 발현이 감소하도록 발현조절영역(또는 발현조절서열)의 변형;
- [53] 3) 폴리펩티드의 활성이 제거 또는 약화되도록 상기 폴리펩티드를 구성하는 아미노산 서열의 변형(예컨대, 아미노산 서열 상의 1 이상의 아미노산의 삭제/치환/부가);
- [54] 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);
- [55] 5) 폴리펩티드를 코딩하는 유전자 전사체의 개시코돈, 샤인-달가르노(Shine-Dalgarno) 서열 또는 5'-UTR 지역을 코딩하는 염기서열의 변형;
- [56] 6) 폴리펩티드를 코딩하는 상기 유전자의 전사체에 상보적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오티드(예컨대, 안티센스 RNA)의 도입;
- [57] 7) 리보솜(ribosome)의 부착이 불가능한 2차 구조물을 형성시키기 위하여 폴리펩티드를 코딩하는 유전자의 샤인-달가르노(Shine-Dalgarno) 서열 앞단에 샤인-달가르노 서열과 상보적인 서열의 부가;
- [58] 8) 폴리펩티드를 코딩하는 유전자 서열의 ORF(open reading frame)의 3' 말단에 반대 방향으로 전사되는 프로모터의 부가(Reverse transcription engineering, RTE); 또는
- [59] 9) 상기 1) 내지 8) 중 선택된 2 이상의 조합일 수 있으나, 이에, 특별히 제한되는 것은 아니다.
- [60] 예컨대,
- [61] 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 교체될 수 있다.
- [62] 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.

- [63] 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 갖도록 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.
- [64] 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.
- [65] 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.
- [66] 상기 7) 리보솜(ribosome)의 부착이 불가능한 2차 구조물을 형성시키기 위하여 폴리펩티드를 코딩하는 유전자의 샤인-달가르노(Shine-Dalgarno) 서열 앞단에 샤인-달가르노 서열과 상보적인 서열의 부가는 mRNA 번역을 불가능하게 하거나 속도를 저하시키는 것일 수 있다.
- [67] 또한, 상기 8) 폴리펩티드를 코딩하는 유전자서열의 ORF(open reading frame)의 3' 말단에 반대 방향으로 전사되는 프로모터의 부가(Rreverse transcription engineering, RTE)는 상기 폴리펩티드를 코딩하는 유전자의 전사체에 상보적인 안티센스 뉴클레오티드를 만들어 활성을 약화하는 것일 수 있다.
- [68]
- [69] 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.

- [70] 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.
- [71] 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).
- [72]
- [73] 구체적으로, 본 출원의 폴리펩티드 활성의 강화는
- [74] 1) 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 세포 내 카피수 증가;
- [75] 2) 폴리펩티드를 코딩하는 염색체상의 유전자 발현조절영역을 활성이 강력한 서열로 교체;
- [76] 3) 폴리펩티드를 코딩하는 유전자 전사체의 개시코돈 또는 5'-UTR 지역을 코딩하는 염기서열의 변형;
- [77] 4) 폴리펩티드 활성이 강화되도록 상기 폴리펩티드의 아미노산 서열의 변형;
- [78] 5) 폴리펩티드 활성이 강화되도록 상기 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열의 변형(예를 들어, 폴리펩티드의 활성이 강화되도록 변형된 폴리펩티드를 코딩하도록 상기 폴리펩티드 유전자의 폴리뉴클레오티드 서열의 변형);
- [79] 6) 폴리펩티드의 활성을 나타내는 외래 폴리펩티드 또는 이를 코딩하는 외래 폴리뉴클레오티드의 도입;
- [80] 7) 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 코돈 최적화;
- [81] 8) 폴리펩티드의 삼차구조를 분석하여 노출 부위를 선택하여 변형하거나 화학적으로 수식; 또는
- [82] 9) 상기 1) 내지 8) 중 선택된 2 이상의 조합일 수 있으나, 이에, 특별히 제한되는 것은 아니다.
- [83] 보다 구체적으로,
- [84] 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.

- [85] 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.
- [86] 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), tkt 프로모터, yccA 프로모터 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [87] 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.
- [88] 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 상동 재조합에 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.
- [89] 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.

- [90] 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.
- [91] 또한, 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.
- [92] 이와 같은 폴리펩티드 활성의 강화는, 상응하는 폴리펩티드의 활성 또는 농도 발현량이 야생형이나 변형 전 미생물에서 발현된 폴리펩티드의 활성 또는 농도를 기준으로 하여 증가되거나, 해당 폴리펩티드로부터 생산되는 산물의 양이 증가되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [93]
- [94] 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.
- [95]
- [96] 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.

- [97] 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 pDZ계, pBR계, pUC계, pBluescriptII계, pGEM계, pTZ계, pCL계 및 pET계 등을 사용할 수 있다. 구체적으로는 pDZ, pDC, pDCM2, pACYC177, pACYC184, pCL, pECCG117, pUC19, pBR322, pMW118, pCC1BAC 벡터 등을 사용할 수 있다.

- [98] 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, 상동 재조합(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.

- [99] 본 출원에서 용어 "형질전환"은 목적 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.

- [100] 또한, 상기에서 용어 "작동 가능하게 연결"된 것이란 본 출원의 목적 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 전사를 개시 및 매개하도록 하는 프로모터 서열과 상기 폴리뉴클레오티드 서열이 기능적으로 연결되어 있는 것을 의미한다.
- [101]
- [102] 본 출원의 미생물은 VKOR 단백질 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 불활성화된 미생물; 또는 VKOR 단백질 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 불활성화되도록 벡터를 통해 유전적으로 변형된 미생물(예컨대, 재조합 미생물)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 벡터는 전술한 바와 같다.
- [103] 본 출원의 미생물은 L-글루탐산 생산능을 가진 미생물일 수 있다.
- [104] 본 출원의 미생물은 자연적으로 L-글루탐산 생산능을 가지고 있는 미생물 또는 L-글루탐산 생산능이 없는 모균주에 VKOR 단백질 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 불활성화되어 L-글루탐산 생산능이 부여된 미생물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [105]
- [106] 일 예로, 본 출원의 재조합 미생물은, VKOR 단백질 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 불활성화되도록 벡터를 통해 형질전환되어, VKOR 단백질 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 불활성화된 미생물로서, VKOR 단백질 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 불활성화되어 L-글루탐산을 생산할 수 있는 미생물을 모두 포함할 수 있다.
- [107] 본 출원의 목적상, 본 출원의 재조합 미생물은 천연의 야생형 미생물 또는 VKOR 단백질 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하여 L-글루탐산을 생산하는 미생물에 상기 VKOR 단백질 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 불활성화되어, 상기 천연의 야생형 미생물 또는 VKOR 단백질 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하여 L-글루탐산을 생산하는 미생물에 비해 L-글루탐산 생산능이 증가된 미생물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 그 예로, 상기 L-글루탐산 생산능의 증가 여부를 비교하는 대상 균주인, VKOR 단백질이 불활성화되지 않은, 비변형 미생물은 L-글루탐산 생산 균주로 알려진 *odhA* 유전자가 결손된 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13869 균주, L-글루탐산 생산 NTG 변이 균주로 알려진 코리네박테리움 글루타미쿰 BL2 균주(KFCC11074, 한국 등록특허 제10-0292299호)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [108] 일 예로, 상기 생산능이 증가된 재조합 균주는 변이 전 모균주 또는 비변형 미생물의 L-글루탐산 생산능에 비하여 약 1% 이상, 구체적으로는 약 1% 이상, 약 2.5% 이상, 약 5% 이상, 약 6% 이상, 약 7% 이상, 약 8% 이상, 약 9% 이상, 약 10% 이상, 약 14.3% 이상, 약 20% 이상, 약 28.6% 이상, 약 30% 이상, 약 31.9% 이상, 약

33.3% 이상, 약 37.7% 이상, 약 40% 이상, 약 42.9% 이상, 약 46.3% 이상, 약 50% 이상 또는 약 52.4% 이상 (상한값은 특별한 제한은 없으며, 예컨대, 약 200% 이하, 약 150% 이하, 약 100% 이하, 약 50% 이하, 약 40% 이하, 약 30% 이하, 약 20% 이하 또는 약 15% 이하일 수 있음) 증가된 것일 수 있으나, 변이 전 모균주 또는 비변형 미생물의 생산능에 비해 +값의 증가량을 갖는 한, 이에 제한되지 않는다. 다른 예에서, 상기 생산능이 증가된 미생물은 변이 전 모균주 또는 비변형 미생물에 비하여, L-글루탐산 생산능이 약 1.01배 이상, 약 1.02배 이상, 약 1.03배 이상, 약 1.05배 이상, 약 1.06배 이상, 약 1.07배 이상, 약 1.08배 이상, 약 1.09배 이상, 약 1.1배 이상, 약 1.14배 이상, 약 1.28배 이상, 약 1.32배 이상, 약 1.33배 이상, 약 1.37배 이상, 약 1.43배 이상, 약 1.46배 이상 또는 약 1.52배 이상 (상한값은 특별한 제한은 없으며, 예컨대, 약 10배 이하, 약 5배 이하, 약 3배 이하, 또는 약 2배 이하일 수 있음) 증가된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [109] 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 명세서에 기재된 VKOR 단백질 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 불활성화되지 않거나 불활성화되기 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.
- [110] 본 출원의 또 다른 일 예로, 본 출원의 미생물은 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*), 코리네박테리움 스테이셔니스(*Corynebacterium stationis*), 코리네박테리움 크루디락티스(*Corynebacterium crudilactis*), 코리네박테리움 데세르티(*Corynebacterium deserti*), 코리네박테리움 이피시엔스(*Corynebacterium efficiens*), 코리네박테리움 칼루나(*Corynebacterium callunae*), 코리네박테리움 싱굴라레(*Corynebacterium singulare*), 코리네박테리움 할로톨레란스(*Corynebacterium halotolerans*), 코리네박테리움 스트리아툼(*Corynebacterium striatum*), 코리네박테리움 암모니아게네스(*Corynebacterium ammoniagenes*), 코리네박테리움 폴루티솔리(*Corynebacterium pollutisoli*), 코리네박테리움 이미탄스(*Corynebacterium imitans*), 코리네박테리움 테스투디노리스(*Corynebacterium testudinoris*) 또는 코리네박테리움 플라베스센스(*Corynebacterium flavescens*)일 수 있으며, 구체적으로 코리네박테리움 글루타미쿰일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [111]
- [112] 다른 하나의 예로, 본 출원의 재조합 미생물은, L-글루탐산 생합성 경로 내 단백질 일부의 활성이 추가적으로 강화되거나, L-글루탐산 분해 경로 내 단백질 일부의 활성이 추가적으로 불활성화되어 L-글루탐산 생산능이 강화된 미생물일 수 있다.

- [113] 구체적으로, 본 출원의 미생물은 OdhA 단백질이 추가로 불활성화되거나, *odhA* 유전자가 추가로 결손된 미생물일 수 있다. 보다 구체적으로, 본 출원의 미생물은 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13869에서 OdhA 단백질이 불활성화된 코리네박테리움 글루타미쿰, 상기 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13869에서 *odhA* 유전자가 결손된 미생물일 수 있다. 상기 OdhA 단백질은 NCBI Sequence ID WP_060564343.1의 아미노산 서열(서열번호 32)을 포함하는 것일 수 있고, 상기 *odhA* 유전자는 NCBI GenBank BBD29_06050의 염기서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [114] 다만, 상기 OdhA 단백질 불활성화 또는 *odhA* 유전자 결손은 한 가지 예이며 이에 제한되지 않고, 본 출원의 미생물은 다양한 공지의 L-글루탐산 생합성 경로의 단백질 활성이 강화되거나 분해 경로의 단백질 활성이 불활성화된 미생물일 수 있다.
- [115]
- [116] 본 출원의 다른 하나의 양태는 VKOR 단백질이 불활성화된, 코리네박테리움 속 미생물을 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, L-글루탐산 생산방법을 제공한다.
- [117] 본 출원의 L-글루탐산 생산방법은 VKOR 단백질 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 불활성화된 미생물; 또는 VKOR 단백질 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 불활성화되도록 벡터를 통해 유전적으로 변형된 코리네박테리움 속 미생물을 배지에서 배양하는 단계를 포함할 수 있다.
- [118] 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 미생물에 따라 당업자가 용이하게 조정하여 사용할 수 있다. 구체적으로 상기 배양은 회분식, 연속식 및/또는 유가식일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [119] 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.
- [120] 구체적으로, 코리네박테리움 속 미생물에 대한 배양 배지는 문헌["Manual of Methods for General Bacteriology" by the American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981)]에서 찾아 볼 수 있다.
- [121] 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.

- [122] 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.
- [123] 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.
- [124] 또한, 본 출원의 미생물의 배양 중에 수산화암모늄, 수산화칼륨, 암모니아, 인산, 황산 등과 같은 화합물을 배지에 적절한 방식으로 첨가하여, 배지의 pH를 조절할 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 험기 및 미호기 상태를 유지하기 위해 기체의 주입 없이 혹은 질소, 수소 또는 이산화탄소 가스를 주입할 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [125] 본 출원의 배양에서 배양온도는 20 내지 45°C, 구체적으로는 25 내지 40°C를 유지할 수 있고, 약 10 내지 160 시간 동안 배양할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [126] 본 출원의 배양에 의하여 생산된 L-글루탐산은 배지 중으로 분비되거나 세포 내에 잔류할 수 있다.
- [127]
- [128] 본 출원의 L-글루탐산 생산방법은, 본 출원의 미생물을 준비하는 단계, 상기 미생물을 배양하기 위한 배지를 준비하는 단계, 또는 이들의 조합(순서에 무관, in any order)을, 예를 들어, 상기 배양하는 단계 이전에, 추가로 포함할 수 있다.
- [129] 본 출원의 L-글루탐산 생산방법은, 상기 배양에 따른 배지(배양이 수행된 배지)

- 또는 배양된 미생물로부터 L-글루탐산을 회수하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 회수하는 단계는 상기 배양하는 단계 이후에 추가로 포함될 수 있다.
- [130] 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 L-글루탐산을 수집(collect)하는 것일 수 있다. 예를 들어, 원심분리, 여과, 결정화 단백질 침전제에 의한 처리(염석법), 추출, 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 L-글루탐산을 회수할 수 있다.
- [131] 또한, 본 출원의 L-글루탐산 생산방법은, 추가적으로 정제 단계를 포함할 수 있다. 상기 정제는 당해 기술분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여, 수행할 수 있다. 일 예에서, 본 출원의 L-글루탐산 생산방법이 회수 단계와 정제 단계를 모두 포함하는 경우, 상기 회수 단계와 정제 단계는 순서에 상관없이 연속적 또는 비연속적으로 수행되거나, 동시에 또는 하나의 단계로 통합되어 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [132] 본 출원의 방법에서, VKOR 단백질, 폴리뉴클레오티드, 벡터 및 미생물 등은 상기 다른 양태에서 기재한 바와 같다.
- [133]
- [134] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 VKOR 단백질이 불활성화된, 코리네박테리움 속 미생물; 이를 배양한 배지; 또는 이들의 조합을 포함하는, L-글루탐산 생산용 조성물을 제공한다.
- [135] 본 출원의 조성물은 L-글루탐산 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 제한되지 않는다.
- [136]
- [137] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 VKOR 단백질을 불활성화하는 단계를 포함하는, 코리네박테리움 속 미생물의 제조방법을 제공한다.
- [138]
- [139] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 VKOR 단백질이 불활성화된, 코리네박테리움 속 미생물의 L-글루탐산 생산 용도를 제공한다.
- [140]
- [141] 상기 VKOR 단백질, 불활성화, 코리네박테리움 속 미생물 등은 상기 다른 양태에서 기재한 바와 같다.
- [142]

발명의 실시를 위한 형태

- [143] 이하 본 출원을 실시예에 의해 보다 상세하게 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 출원을 예시하기 위한 바람직한 실시양태에 불과한 것이며 따라서, 본 출원의 권리범위를 이에 한정하는 것으로 의도되지는 않는다. 한편, 본 명세서에 기재되지 않은 기술적인 사항들은 본 출원의 기술 분야 또는 유사 기술 분야에서 숙련된 통상의 기술자이면 충분히 이해하고 용이하게 실시할 수 있다.
- [144]
- [145] 실시예 1: 트랜스포존을 이용한 무작위적 돌연변이 라이브러리 제작
- [146] 실시예 1-1: 야생형 코리네박테리움 글루타미쿰 유래 L-글루탐산 생산능을 갖는 코리네박테리움 글루타미쿰 균주 제작
- [147] 야생형 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13869 유래 L-글루탐산 생산능을 갖는 균주를 제작하기 위해 선행문헌(Appl Environ Microbiol. 2007 Feb;73(4):1308-19. Epub 2006 Dec 8.)을 바탕으로 *odhA* 유전자를 결손한 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13869 Δ *odhA* 균주를 제작하였다.
- [148] 구체적으로 *odhA* 유전자 결손을 위하여 야생형 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13869 염색체 DNA를 주형으로 하여 서열번호 3와 서열번호 4, 서열번호 5와 서열번호 6의 프라이머 세트를 이용하여 *odhA* 유전자의 업스트림(Upstream) 지역과 다운스트림(Downstream) 지역을 PCR 수행을 통해 획득하였다. 증합효소는 Solg™ Pfu-X DNA 폴리머라제를 사용하였으며, PCR 증폭 조건은 95°C에서 5분간 변성 후, 95°C 30초 변성, 55°C 30초 어닐링, 72°C 60초 증합을 30회 반복한 후, 72°C에서 5분간 증합반응을 수행하였다.
- [149] 증폭된 *odhA* 업스트림과 다운스트림 지역, 그리고 SmaI 제한효소로 절단된 염색체 형질전환용 벡터 pDCM2(대한민국 공개번호 제 10-2020-0136813호)를 김슨 어셈블리(DG Gibson et al., NATURE METHODS, VOL.6 NO.5, MAY 2009, NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix) 방법을 이용하여 클로닝함으로써 재조합 벡터를 획득하였으며, pDCM2- Δ *odhA*로 명명하였다. 클로닝은 김슨 어셈블리 시약과 각 유전자 단편들을 계산된 몰수로 혼합 후 50°C에 1시간 보존함으로써 수행하였다.
- [150] 제작된 pDCM2- Δ *odhA* 벡터를 야생형 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13869 균주에 전기천공법으로 형질전환 후, 2차 교차 과정을 거쳐 염색체 상에서 *odhA* 유전자가 결손된 균주를 획득하였다. 유전자 결손 여부는 서열번호 7과 서열번호 8을 이용한 PCR과 계능 시퀀싱을 통해 확인하였으며, 제작된 균주를 ATCC13869 Δ *odhA*로 명명하였다.
- [151] 여기에서 사용된 프라이머 서열은 하기 표 1과 같다.
- [152]

[153] [표1]

서열 번호	명칭	서열
3	odhA_up_F	TGAATTCGAGCTCGGTACCCTTGAACGGAATTGGGTGG
4	odhA_up_R	CCCAGGTGGCATCGGTACCTTCACCCAGCGCCACGCAG
5	odhA_down_F	CGCTGGGTGAAGGTACCGATGCCACCTGGGTTGGTCAA G
6	odhA_down_R	GTCGACTCTAGAGGATCCCCGGACAAGGAATGGAGAGA
7	odhA_del_F	CTTACCGTTGTTGCCCTT
8	odhA_del_R	CTCCTTCACCCACATCATT

[154]

[155] 실시예 1-2: 트랜스포존을 이용한 무작위적 돌연변이 라이브러리 제작

[156] L-글루탐산 생산능이 증가된 균주를 얻기 위하여, 하기의 방법으로 벡터 라이브러리를 제작하였다.

[157] EZ-Tn5™ <R6Kγori/KAN-2>Tnp Transposome™ Kit(Epicentre)를 사용하여 얻은 플라스미드를 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13869ΔodhA을 모균주로 하여 전기천공법(Appl. Microbiol. Biothcnol.(1999) 52:541-545)으로 형질전환하고, 카나마이신(25 mg/l)이 포함된 복합평판배지에 도말하여 약 5,000 개의 콜로니를 확보하였다.

[158]

[159] <복합평판배지 (pH 7.0)>

[160] 포도당 10 g, 펩톤 10 g, 쇠고기 추출물 5 g, 효모 추출물 5 g, 뇌심장 침출액(Brain Heart Infusion) 18.5 g, NaCl 2.5 g, 요소 2 g, 소르비톨 91 g, 한천 20 g (증류수 1 리터 기준)

[161]

[162] 실시예 2: 트랜스포존을 이용한 무작위적 돌연변이 라이브러리 스크리닝

[163] 상기 실시예 1-2에서 확보된 약 5,000개의 콜로니를 각각 300 μL의 하기의 선별배지에 접종하여 96 딥 웰 플레이트(96-deep well plate)에서 37°C, 1000 rpm 으로 약 48시간 동안 배양하였다.

[164]

- [165] <선별배지 (pH 7.0)>
- [166] 원당 5%, 1M 인산 완충액(pH 8.0) 100ml, 대두박 가수분해물(HSM, hydrolysed soybean meal) 0.096%, 황산암모늄 2.25%, 일인산칼륨 0.1%, 황산마그네슘 0.04%, 황산철 10 mg/L, 티아민 염산염 0.2 mg/L, 비오틴 0.3 mg/L (중류수 1L 기준)
- [167]
- [168] 배양이 완료된 후 YSI(YSI 2900 Biochemistry Analyzer)를 통하여 L-글루탐산을 측정하였다. 모균주인 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13869 Δ odhA와 비교하여 높은 L-글루탐산 값을 보이는 변이주로 10개의 콜로니를 선별하였다. 그 외 콜로니들은 모균주로 이용된 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13869 Δ odhA 균주와 L-글루탐산 값이 유사하거나 감소하였다.
- [169] 상기 선별된 10종의 균주들을 상기와 동일한 방법으로 다시 배양하여 결과적으로 모균주인 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13869 Δ odhA 균주 대비 L-글루탐산 생산능이 향상된 상위 1종의 돌연변이주 ATCC13869 Δ odhA/mt-8를 선별하였다.
- [170]
- [171] 실시예 3: 선별된 돌연변이주에서의 L-글루탐산 생산능 증가 원인 규명
- [172] 상기 실시예 2에서 선별된 ATCC13869 Δ odhA/mt-8를 대상으로 트랜스포존의 무작위적인 삽입에 의해 결손된 유전자를 제조사의 매뉴얼 및 Kit의 프라이머 1(서열번호 9) 및 프라이머 2(서열번호 10)를 사용하여 분석한 결과, 미국 국립보건원의 유전자은행(NIH Genbank)에 보고된 염기서열에 근거하여 서열번호 2의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자(*BBD29_04485*)가 불활성화되어 있음을 확인하였다.
- [173] 여기에서 사용된 프라이머 서열은 하기 표 2와 같다.
- [174]
- [175] [표2]

서열 번호	명칭	서열
9	프라이머1	ACCTACAACAAAGCTCTCATCAACC
10	프라이머2	CTACCCTGTGGAACACCTACATCT

- [176]
- [177] 실시예 4: VKOR 단백질 불활성화를 위한 재조합 벡터 제작
- [178] 실시예 4-1: VKOR 단백질을 코딩하는 *BBD29_04485* 유전자 결손을 위한 재조합 벡터 제작
- [179] 상기 실시예 3에서 확인된 바와 같이, 코리네박테리움 속 균주의 염색체 상에서 VKOR 단백질을 코딩하는 *BBD29_04485* 유전자(서열번호 2)를 결손시켰을 때 L-글루탐산의 생산능이 향상되는지 확인하기 위하여 유전자 결손 재조합 벡터를

제작하였다.

[180] 이를 위해, 먼저 상기 유전자의 결손을 위한 단편을 제작하고자 서열번호 11 내지 14의 프라이머를 합성하였다.

[181] 구체적으로, 야생형 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13869 염색체 DNA를 주형으로 하여 서열번호 11과 서열번호 12, 서열번호 13과 서열번호 14의 프라이머 세트를 이용하여 *BBD29_04485* 유전자 단편을 PCR 수행을 통해 획득하였다. 중합효소는 Solg™ Pfu-X DNA 폴리머라제를 사용하였으며, PCR 증폭 조건은 95°C에서 5분간 변성 후, 95°C 30초 변성, 55°C 30초 어닐링, 72°C 60초 중합을 30회 반복한 후, 72°C에서 5분간 중합반응을 수행하였다.

[182] 증폭된 유전자 단편과 *SmaI* 제한효소로 절단된 염색체 형질전환용 벡터 pDCM2를 김슨 어셈블리 방법을 이용하여 클로닝함으로써 재조합 벡터를 획득하였으며, pDCM2-Δ*BBD29_04485*로 명명하였다. 클로닝은 김슨 어셈블리 시약과 각 유전자 단편들을 계산된 몰수로 혼합 후 50°C에 1시간 보존함으로써 수행하였다.

[183] 여기에서 사용된 프라이머 서열은 하기 표 3과 같다.

[184]

[185] [표3]

서열 번호	명칭	서열
11	BBD29_04 485_up_F	AATTCGAGCTCGGTACCCGTGAGTCCAACCAGGTCGAA G
12	BBD29_04 485_up_R	CTGAAAGCCTTAAATGCTGGCTTGATTTCTTGTGCTGTG
13	BBD29_04 485_down_ F	ACAAGAAATCAAGCCAGCATTTAAGGCTTTCAGGCCG
14	BBD29_04 485_down_ R	CGACTCTAGAGGATCCCCGTATCGACAAGGGTGAGTGA TG

[186]

[187] 실시예 4-2: VKOR 단백질을 코딩하는 *BBD29_04485*의 개시코돈 변경을 위한 재조합 벡터 제작

[188] 코리네박테리움 속 균주의 염색체 상에서 *BBD29_04485* 유전자의 개시코돈을 각 TTG 및 CTG로 변경하였을 때 L-글루탐산의 생산능이 향상되는지 확인하기 위하여 우선 개시코돈 변경 재조합 벡터를 제작하였다.

[189] 이를 위해, 먼저 상기 유전자의 개시코돈 변경을 위한 단편을 제작하고자

서열번호 15 내지 20의 프라이머를 합성하였다.

- [190] 구체적으로, 야생형 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13869 염색체 DNA를 주형으로 하여 서열번호 15와 서열번호 16, 서열번호 17과 서열번호 18, 그리고 서열번호 15와 서열번호 19, 서열번호 18와 서열번호 20의 프라이머 세트를 이용하여 유전자 단편을 PCR 수행을 통해 획득하였다. 중합효소는 Solg™ Pfu-X DNA 폴리머라제를 사용하였으며, PCR 증폭 조건은 95°C에서 5분간 변성 후, 95°C 30초 변성, 55°C 30초 어닐링, 72°C 60초 중합을 30회 반복한 후, 72°C에서 5분간 중합반응을 수행하였다.
- [191] 증폭된 유전자 단편과 SmaI 제한효소로 절단된 염색체 형질전환용 벡터 pDCM2를 김슨 어셈블리 방법을 이용하여 클로닝함으로써 재조합 벡터를 획득하였으며, 각각 pDCM2-△BBD29_04485::BBD29_04485(g1t) 벡터와 pDCM2-△BBD29_04485::BBD29_04485(g1c)로 명명하였다. 클로닝은 김슨 어셈블리 시약과 각 유전자 단편들을 계산된 몰수로 혼합 후 50°C에 1시간 보존함으로써 수행하였다.
- [192] 여기에서 사용된 프라이머 서열은 하기 표 4와 같다.
- [193]

[194] [표4]

서열 번호	명칭	서열
15	BBD29_04 485_up_F_2	TTCGAGCTCGGTACCCGTTGATGATCAGGGAAGGCTGT
16	BBD29_04 485_up_R_2	TGGATTTCGGTAGACAaGGGGAGACCTCCGGGTGGGAA
17	BBD29_04 485_down_F_2	ACCCGGAGGTCTCCCCtGTCTACCGAAATCCACAACG
18	BBD29_04 485_down_R_2	ACTCTAGAGGATCCCCTCGGTCAGGTGTGTGTAAATAG
19	BBD29_04 485_up_R_3	TGGATTTCGGTAGACAGGGGGAGACCTCCGGGTGGGAA
20	BBD29_04 485_down_F_3	ACCCGGAGGTCTCCCCCTGTCTACCGAAATCCACAACG

[195]

[196] 실시예 4-3: VKOR 단백질을 코딩하는 **BBD29_04485**의 라이보솜 결합

서열(Ribosome binding site, RBS) 변경을 위한 재조합 벡터 제작

[197] 코리네박테리움 속 균주의 염색체 상에서 **BBD29_04485** 유전자를 약화시키기 위해 상기 유전자의 상단 35개의 염기쌍(base pair)과, 오픈리딩프레임(open reading frame, ORF)의 N-말단으로부터 35개의 염기쌍을 포함하는 염기서열로부터 샤인-달가노 서열(Shine-Dalgano, SD)을 예측하였다.

[198] 상기의 염기서열을 토대로 하여, RBS Calculator(github)를 통해 RBS1, RBS2, RBS3의 총 3종의 라이보솜 결합 서열 후보군을 예측하였다. 그 결과, 상기 3종의 라이보솜 결합 서열 후보군은 기존 라이보솜 결합 서열에 비해 각각 발현이 50%, 20%, 10%로 감소되었다고 예측되었다.

[199] 예측된 라이보솜 결합 서열은 하기의 표 5와 같다.

[200]

[201] [표5]

명칭	샤인-달가노 서열	예측 발현양	발현 정도 (%)
Original	ACCCGGAGG	13122	100%
RBS1	CTCGAAAGT	6581	50%
RBS2	ACTCGAGGC	2620	20%
RBS3	GCCCTGGAC	1312	10%

[202]

[203] 코리네박테리움 속 균주의 염색체 상에서 *BBD29_04485*의 라이보솜 결합 서열을 변경하여 유전자를 약화시켰을 때 L-글루탐산의 생산능이 향상되는지 확인하기 위하여 앞서 예측한 라이보솜 결합 서열 3가지 각각에 대한 라이보솜 결합 서열 변경 재조합 벡터를 제작하였다.

[204] 이를 위해, 먼저 상기 유전자의 라이보솜 결합 서열 변경을 위한 단편을 제작하고자 서열번호 21 내지 28의 프라이머를 합성하였다.

[205] 구체적으로, 야생형 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13869 염색체 DNA를 주형으로 하여 서열번호 21와 서열번호 22, 서열번호 23과 서열번호 24, 서열번호 21와 서열번호 25, 서열번호 24와 서열번호 26, 그리고 서열번호 21와 서열번호 27, 서열번호 24와 서열번호 28의 프라이머 세트를 이용하여 유전자 단편을 PCR 수행을 통해 수득하였다. 중합효소는 Solg™ Pfu-X DNA 폴리머라제를 사용하였으며, PCR 증폭 조건은 95°C에서 5분간 변성 후, 95°C 30초 변성, 55°C 30초 어닐링, 72°C 60초 중합을 30회 반복한 후, 72°C에서 5분간 중합반응을 수행하였다.

[206] 증폭된 유전자 단편과 SmaI 제한효소로 절단된 염색체 형질전환용 벡터 pDCM2는 김슨 어셈블리 방법을 이용하여 클로닝함으로써 재조합 벡터를 획득하였으며, 각각 pDCM2-ΔRBS(wt)::RBS1 벡터, pDCM2-ΔRBS(wt)::RBS2 벡터, 그리고 pDCM2-ΔRBS(wt)::RBS3 벡터로 명명하였다. 클로닝은 김슨 어셈블리 시약과 각 유전자 단편들을 계산된 몰수로 혼합 후 50°C에 1시간 보존함으로써 수행하였다.

[207] 여기에서 사용된 프라이머 서열은 하기 표 6과 같다.

[208]

[209] [표6]

서열 번호	명칭	서열
21	BBD29_04485 _up_F_4	TTCGAGCTCGGTACCCAGCATCTTCTTCTTCGCCGAA
22	BBD29_04485 _up_R_4	GTAGACACGGGGAGAACTTTCGAGGGGAAAACGTTT GTTG
23	BBD29_04485 _down_F_4	AACAAACGTTTTCCCTCGAAAGTTCTCCCGTGTCTA CC
24	BBD29_04485 _down_R_4	ACTCTAGAGGATCCCCCTTTTCTGAGCTGGAGGAACA A
25	BBD29_04485 _up_R_5	GTAGACACGGGGAGAGCCTCGAGTGGGAAAACGTTT GTTG
26	BBD29_04485 _down_F_5	AACAAACGTTTTCCCACTCGAGGCTCTCCCGTGTCT ACC
27	BBD29_04485 _up_R_6	GTAGACACGGGGAGAGTCCAGGGCGGGAAAACGTTT GTTG
28	BBD29_04485 _down_F_6	AACAAACGTTTTCCCGCCCTGGACTCTCCCGTGTCTA CC

[210]

[211] 실시예 5: VKOR 단백질을 코딩하는 **BBD29_04485**가 약화된 야생형
코리네박테리움 글루타미쿰 유래 L-글루탐산 생산능을 갖는 균주 제작

[212] 상기 실시예 1에서 제작된 ATCC13869 Δ odhA 균주를 대상으로 실시예 4에서
제작된 pDCM2- Δ BBD29_04485 벡터와
pDCM2- Δ BBD29_04485::BBD29_04485(g1t) 벡터,
pDCM2- Δ BBD29_04485::BBD29_04485(g1c) 벡터, pDCM2- Δ RBS(wt)::RBS1
벡터, pDCM2- Δ RBS(wt)::RBS2 벡터, 그리고 pDCM2- Δ RBS(wt)::RBS3 벡터를
도입하여 L-글루탐산 생산능에 미치는 효과를 확인하였다.

[213] 먼저, pDCM2- Δ BBD29_04485 벡터를 코리네박테리움 글루타미쿰
ATCC13869 Δ odhA 균주에 전기천공법으로 형질전환한 후, 2차 교차 과정을
거쳐 염색체 상에서 **BBD29_04485** 유전자가 결손된 균주를 얻었다.

[214] 상동 재조합 업스트림 지역과 다운스트림 지역을 각각 증폭할 수 있는
서열번호 29와 서열번호 30을 이용한 PCR과 게놈 시퀀싱을 통해 해당 유전적
조작을 확인하였으며, 이를 CA02-1624로 명명하였다.

[215]

- [216] 다음으로, pDCM2- Δ BBD29_04485::BBD29_04485(g1t) 벡터, pDCM2- Δ BBD29_04485::BBD29_04485(g1c) 벡터를 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13869 Δ odhA 균주에 전기천공법으로 형질전환한 후, 2차 교차 과정을 거쳐 염색체 상에서 *BBD29_04485* 유전자의 개시코돈이 GTG에서 각각 TTG 및 CTG로 변경된 균주를 얻었다.
- [217] 상동 재조합 업스트림 지역과 다운스트림 지역을 각각 증폭할 수 있는 서열번호 31와 서열번호30을 이용한 PCR과 게놈 시퀀싱을 통해 해당 유전적 조작을 확인하였으며, 이를 각각 CA02-1625, CA02-1630로 명명하였다.
- [218]
- [219] 다음으로, pDCM2- Δ RBS(wt)::RBS1 벡터, pDCM2- Δ RBS(wt)::RBS2 벡터, 그리고 pDCM2- Δ RBS(wt)::RBS3 벡터를 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13869 Δ odhA 균주에 전기천공법으로 형질전환한 후, 2차 교차 과정을 거쳐 염색체 상에서 *BBD29_04485* 유전자의 라이보솜 결합 서열이 각각 RBS1, RBS2, RBS3로 변경된 균주를 얻었다.
- [220] 상동 재조합 업스트림 지역과 다운스트림 지역을 각각 증폭할 수 있는 서열번호 31와 서열번호 30의 프라이머를 이용한 PCR과 게놈 시퀀싱을 통해 해당 유전적 조작을 확인하였으며, 이를 각각 CA02-1631, CA02-1632, 그리고 CA02-1633로 명명하였다.
- [221] 여기에서 사용된 프라이머 서열은 하기 표 7과 같다.

[222]

[223] [표7]

서열 번호	명칭	서열
29	BBD29_04 485_del_F	ATAATCCACCAAAACTGCC
30	BBD29_04 485_del_R	AGGTGTGTGTAAATAGGGA
31	BBD29_04 485_seq_F	GTGGTTGTCTTCGATAGT

[224]

- [225] 상기에서 제작된 CA02-1624, CA02-1625, CA02-1630, CA02-1631, CA02-1632, 그리고 CA02-1633 균주, 총 6종을 ATCC13869 Δ odhA 균주를 대조균으로 하여 L-글루탐산 생산능을 확인하고자 아래와 같은 방법으로 배양하였다.

[226]

- [227] 종배지로 이루어진 평판배지에 상기 균주들을 접종하여 30°C에서 20시간 동안 배양하였다. 그런다음 하기의 생산 배지 25ml을 함유하는 250ml 코너-바플

플라스크에 균주를 1백금이 접종하고, 30°C에서 40시간 동안, 200rpm에서 진탕 배양하였다. 배양 종료 후, 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)를 이용하여 L-글루탐산 생산량을 측정하였으며, 측정 결과는 하기 표 8에 나타내었다.

[228]

[229] <종배지>

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

[231]

[232] <생산배지>

[233] 원당 6%, 탄산칼슘 5%, 황산암모늄 2.25%, 일인산칼륨 0.1%, 황산마그네슘 0.04%, 황산철 10 mg/L, 티아민 염산염 0.2 mg/L, 비오틴 50 µg/L

[234]

[235] [표8]

균주명	L-글루탐산 농도(g/L)	L-글루탐산 농도 증가율(%)
ATCC13869 Δ odhA	2.1	-
CA02-1624	3.2	52.4%
CA02-1625	2.7	28.6%
CA02-1630	3.0	42.9%
CA02-1631	2.4	14.3%
CA02-1632	2.8	33.3%
CA02-1633	3.0	42.9%

[236]

[237] 상기 표 8에서 나타난 바와 같이 야생형 유래 ATCC13869 Δ odhA 균주에 비하여 *BBD29_04485* 유전자가 결손된 CA02-1624, *BBD29_04485* 유전자의 개시코돈이 각각 TTG, CTG로 약화된 CA02-1625, CA02-1630, *BBD29_04485* 유전자의 라이보솜 결합 서열이 각각 RBS1, RBS2, 그리고 RBS3로 약화된 CA02-1631, CA02-1632, 그리고 CA02-1633에서 L-글루탐산의 농도가 모두 증가함을 확인하였다.

[238]

이를 통해, 구체적인 수단에 관계 없이 VKOR 단백질의 활성이 불활성화되기만 하면, L-글루탐산의 생산능이 강화되는 것을 알 수 있다.

[239]

상기 균주 중, CA02-1624는 부다페스트조약 하의 수탁기관인 한국미생물보존센터에 2021년 1월 13일자로 기탁하여 수탁번호 KCCM12928P를 부여받았다.

[240]

- [241] **실시예 6:**
N-메틸-N'-니트로-N-니트로소구아니딘(N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, NTG) 변이주 코리네박테리움 글루타미쿰 균주에서 VKOR 단백질을 코딩하는 BBD29_04485의 결손 효과 확인
- [242] 야생형 코리네박테리움 속 유래 균주 이외에, L-글루탐산 생산능이 증가된 NTG 변이 코리네박테리움 속 유래 균주에서도 상기 유전자가 동일한 효과를 나타내는지 확인하기 위하여, L-글루탐산 생산 NTG 변이 균주로 알려진 코리네박테리움 글루타미쿰 BL2 균주(KFCC11074, 한국 등록특허 제10-0292299호)에 상기 실시예 5에서 확인된 상기 유전자의 약화 효과를 검증하였다.
- [243] 구체적으로, 실시예 5에서 L-글루탐산의 농도가 40% 이상 증가한, pDCM2- Δ BBD29_04485 벡터, pDCM2- Δ BBD29_04485::BBD29_04485(g1c) 벡터, 그리고 pDCM2- Δ RBS(wt)::RBS3 벡터 총 3종을 KFCC11074 균주에 도입하여 L-글루탐산 생산능에 미치는 효과를 확인하였다.
- [244]
- [245] 먼저, pDCM2- Δ BBD29_04485 벡터를 KFCC11074 균주에 전기천공법으로 형질전환한 후, 2차 교차 과정을 거쳐 염색체 상에서 *BBD29_04485* 유전자가 결손된 균주를 얻었다.
- [246] 상동 재조합 업스트림 지역과 다운스트림 지역을 각각 증폭할 수 있는 서열번호 29와 서열번호 30의 프라이머를 이용한 PCR과 게놈 시퀀싱을 통해 해당 유전적 조작을 확인하였으며, 이를 CA02-1634으로 명명하였다.
- [247]
- [248] 다음으로, pDCM2- Δ BBD29_04485::BBD29_04485(g1c) 벡터를 KFCC11074 균주에 전기천공법으로 형질전환한 후, 2차 교차 과정을 거쳐 염색체 상에서 *BBD29_04485* 유전자의 개시코돈이 GTG에서 CTG로 변경된 균주를 얻었다.
- [249] 상동 재조합 업스트림 지역과 다운스트림 지역을 각각 증폭할 수 있는 서열번호 31과 서열번호 30을 이용한 PCR과 게놈 시퀀싱을 통해 해당 유전적 조작을 확인하였으며, 이를 CA02-1635로 명명하였다.
- [250]
- [251] 다음으로, pDCM2- Δ RBS(wt)::RBS3 벡터를 KFCC11074 균주에 전기천공법으로 형질전환한 후, 2차 교차 과정을 거쳐 염색체 상에서 *BBD29_04485* 유전자의 라이보솜 결합 서열이 RBS3로 변경된 균주를 얻었다.
- [252] 상동 재조합 업스트림 지역과 다운스트림 지역을 각각 증폭할 수 있는 서열번호 31과 서열번호 30을 이용한 PCR과 게놈 시퀀싱을 통해 해당 유전적 조작을 확인하였으며, 이를 CA02-1636로 명명하였다.
- [253] 제작한 CA02-1634, CA02-1635, CA02-1636 균주, 총 3종을 KFCC11074 균주를 대조군으로 하여 L-글루탐산 생산능을 확인하고자 아래와 같은 방법으로 배양하였다.

[254]

[255] 종배지로 이루어진 평판배지에 상기 균주들을 접종하여 30°C에서 20시간 동안 배양하였다. 그런다음 하기의 생산 배지 25ml을 함유하는 250ml 코너-바플 플라스크에 균주를 1백금이 접종하고, 30°C에서 40시간 동안, 200rpm에서 진탕 배양하였다. 배양 종료 후, 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)를 이용하여 L-글루탐산 생산량을 측정하였으며, 측정 결과는 하기 표 9에 나타내었다.

[256]

[257] <종배지>

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

[259]

[260] <생산배지>

[261] 원당 6%, 탄산칼슘 5%, 황산암모늄 2.25%, 일인산칼륨 0.1%, 황산마그네슘 0.04%, 황산철 10 mg/L, 티아민 염산염 0.2 mg/L, 비오틴 500µg/L

[262]

[263] [표9]

균주명	L-글루탐산 농도(g/L)	L-글루탐산 농도 증가율(%)
KFCC11074	6.9	-
CA02-1634	10.1	46.4%
CA02-1635	9.5	37.7%
CA02-1636	9.1	31.9%

[264]

[265] 상기 표에서 나타난 바와 같이 KFCC11074 균주에 비하여 *BBD29_04485* 유전자가 결손된 CA02-1634에서 L-글루탐산의 농도가 약 46.4% 증가함을 확인하였다. 또한, *BBD29_04485* 유전자의 개시코돈이 CTG로 약화된 CA02-1635에서 L-글루탐산의 농도가 약 37.7% 증가함을 확인하였다. 또한, *BBD29_04485* 유전자의 라이보솜 결합 서열이 RBS3로 약화된 CA02-1636에서 L-글루탐산의 농도가 약 31.9% 증가함을 확인하였다.

[266]

[267] 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.

[268]

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> CA02-1624	국제 기탁기관이 부여한 수탁번호: KCCM12928P
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 1월 13일에 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. 1. 13.

상기 번역은 원문의 내용과 상위 없음을 증명함.

2021년 6월 30일

특허법인 한얼 인



청구범위

- [청구항 1] VKOR(vitamin K epoxide reductase family protein) 단백질이 불활성화된, 코리네박테리움 속 미생물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서 상기 VKOR 단백질은 코리네박테리움 속 유래인 것인, 미생물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 VKOR 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열과 80% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 기재된 폴리펩티드로 이루어지는 것인, 미생물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 VKOR 단백질은 서열번호 2의 염기서열로 기재된 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 것인, 미생물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 VKOR 단백질의 불활성화는 서열번호 2의 염기서열로 기재된 폴리뉴클레오티드의 결손 또는 약화인 것인, 미생물.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 코리네박테리움 속 미생물은 코리네박테리움 글루타미쿰인, 미생물.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 미생물은 VKOR 단백질이 불활성화되지 않은 모균주 또는 야생형에 비하여 L-글루탐산 생산능이 증가된, 미생물.
- [청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 미생물은 OdhA 단백질이 추가로 불활성화된 것인, 미생물.
- [청구항 9] VKOR 단백질이 불활성화된, 코리네박테리움 속 미생물을 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, L-글루탐산 생산방법.
- [청구항 10] 제9항에 있어서 상기 VKOR 단백질은 코리네박테리움 속 유래인 것인, 생산방법.
- [청구항 11] 제9항에 있어서, 상기 VKOR 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열과 80% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열로 기재된 폴리펩티드로 이루어지는 것인, 생산방법.
- [청구항 12] 제9항에 있어서, 상기 VKOR 단백질은 서열번호 2의 염기서열로 기재된 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 것인, 생산방법.
- [청구항 13] 제9항에 있어서, 상기 VKOR 단백질의 불활성화는 서열번호 2의 염기서열로 기재된 폴리뉴클레오티드의 결손 또는 약화인 것인, 생산방법.
- [청구항 14] 제9항에 있어서, 상기 코리네박테리움 속 미생물은 코리네박테리움 글루타미쿰인 것인, 생산방법.
- [청구항 15] 제9항에 있어서, 상기 미생물은 OdhA 단백질이 추가로 불활성화된 것인, 생산방법.