

명세서

발명의 명칭: 푸트레신 생산 미생물 및 이를 이용한 푸트레신 생산방법

기술분야

- [1] 본 출원은 푸트레신 생산 미생물 및 당해 미생물을 이용한 푸트레신 생산방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 나일론 등의 원료인 푸트레신(putrescine)은 주로 식유화합물을 원료물질로 하는 화학적 방법으로 생산되며, 구체적으로 아크릴로니트릴 (acrylonitrile)에 시안화 수소를 첨가하여 숙시노니트릴(succinonitrile)을 만든 후 수소화를 과정을 거쳐서 푸트레신이 생산된다. 이러한 화학적 공정은 효율성 및 경제성을 지녔으나 친환경적이지 않은 단점이 있는 바, 최근 강화되고 있는 환경규제와 더불어 생물 기반 경로를 통한 대체물질 생산의 필요성이 대두되고 있다.
- [4] 이와 관련하여, 대장균과 코리테박테리움속 미생물을 형질전환하여 푸트레신을 고농도로 생산하는 방법이 공개되어 있다(Morris et al., J Biol. Chem. 241: 13, 3129-3135, 1996, 국제특허공개 WO06/005603; 국제특허공개 WO09/125924; Qian ZD et al., Biotechnol. Bioeng. 104: 4, 651-662, 2009; Schneider et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 88: 4, 859-868, 2010; Schneider et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 91: 17-30, 2011). 이외에도, 미생물을 이용하여 푸트레신을 생산하기 위한 다양한 방법이 알려져 있다(US13/992242, US14/372000, US14/373265, EP 2236613 B1, US 8497098 B2).
- [5] 푸트레신 생합성 경로와 관련된 단백질 중 이중기능성 오르니틴 아세틸트랜스퍼라제/N-아세틸글루타메이트 신타제(bifunctional ornithine acetyltransferase/N-acetylglutamate synthase)인 argJ는 아세틸-CoA(acetyl-CoA)와 N-아세틸오르니틴(N-acetylornithine)의 2 가지 물질에 대해서 전환 반응을 수행할 수 있는 효소로, 오르니틴 아세틸트랜스퍼라제(L-글루타메이트 N-아세틸트랜스퍼라제, glutamate N-acetyltransferase)와 N-아세틸글루타메이트 신타제의 기능을 모두 가진다. argJ는 하나의 효소가 2개의 효소 반응을 매개함으로써 부산물을 저감하고 푸트레신 생성에 대한 부담을 덜 수 있다. 그러나, argJ는 오르니틴과 같은 중간 대사 물질에 의해서 그 활성이 저해될 수 있고(Sakanyan V, Petrosyan P, Lecocq M, Boyen A, Legrain C, Demarez M, Hallet J, Glansdorff N: Genes and enzymes of the acetyl cycle of arginine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*: enzyme evolution in the early steps of the arginine pathway. Microbiology 1996, 142:99-108.), 이에 따라 푸트레신 생합성 효율이 낮아질 수 있다.

- [6] 한편, 코리네박테리움 글리타미쿰에 존재하는 N-아세틸트랜스퍼라제(N-acetyltransferase)는 아세틸-CoA와 글루타메이트의 존재 하에 N-아세틸-L-글루타메이트 생성능을 가진다. 그러나, 상기 N-아세틸트랜스퍼라제는 argJ 대비 9.43배 높은 비활성을 가지는 것으로 보고된 바 있다(A novel type of N-acetylglutamate synthase is involved in the first step of arginine biosynthesis in Corynebacterium glutamicum."BMC genomics 2013(14) p713).

[7]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [8] 본 발명자들은 미생물에서 푸트레신의 생산을 증가시키기 위해 예의 노력한 결과, 코리네박테리움 속 미생물에 코리네박테리움 속 균주 유래 N-아세틸트랜스퍼라제(N-acetyltransferase) 및 대장균 유래 아세틸오르니틴 디아세틸라제(Acetylornithine deacetylase)의 활성을 도입하였을 때 푸트레신 생산이 증가됨을 확인함으로써 본 출원을 완성하였다.

[9]

과제 해결 수단

- [10] 본 출원은 코리네박테리움 속 균주 유래 N-아세틸트랜스퍼라제(N-acetyltransferase) 및 대장균 유래 아세틸오르니틴 디아세틸라제(Acetylornithine deacetylase, argE)의 활성이 도입된, 푸트레신 생산능을 가지는 코리네박테리움 속 미생물을 제공하는 것이다.
- [11] 본 출원은 코리네박테리움 속 균주 유래 N-아세틸트랜스퍼라제(N-acetyltransferase) 및 대장균 유래 아세틸오르니틴 디아세틸라제(Acetylornithine deacetylase, argE)의 활성이 도입된, 푸트레신 생산능을 가지는 코리네박테리움 속 미생물을 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, 푸트레신 생산 방법을 제공하는 것이다.
- [12] 본 출원은 코리네박테리움 속 균주 유래 N-아세틸트랜스퍼라제(N-acetyltransferase) 및 대장균 유래 아세틸오르니틴 디아세틸라제(Acetylornithine deacetylase, argE)의 활성이 도입된, 푸트레신 생산능을 가지는 코리네박테리움 속 미생물을 포함하는, 푸트레신 생산용 조성물을 제공하는 것이다.

[13]

발명의 효과

- [14] 본 출원의 코리네박테리움 속 균주 유래 N-아세틸트랜스퍼라제(N-acetyltransferase) 및 대장균 유래 아세틸오르니틴 디아세틸라제(Acetylornithine deacetylase, argE)의 활성이 도입된, 푸트레신 생산능을 가지는 코리네박테리움 속 미생물을 배양하는 경우, 기존 비변형

미생물에 비해 고수율의 푸트레신 생산이 가능하다.

[15]

도면의 간단한 설명

[16] 도 1은 A. 코리네박테리움 속 미생물의 푸트레신 및 오르니틴 생합성 경로 B. 대장균의 푸트레신 및 오르니틴 생합성 경로를 나타낸 모식도이다.

[17] 도 2는 코리네 Ncg12644 강화 및 대장균 argE 도입을 통한 푸트레신 및 오르니틴 생산능이 향상된 코리네박테리움 속 미생물의 푸트레신 및 오르니틴 생합성 경로를 나타낸 모식도이다.

[18]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[19] 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.

[20]

[21] 본 출원의 하나의 양태는 코리네박테리움 속 균주 유래 N-아세틸트랜스퍼라제(N-acetyltransferase) 및 대장균 유래 아세틸오르니틴 디아세틸라제(Acetylornithine deacetylase, argE)의 활성이 도입된, 푸트레신 생산능을 가지는 코리네박테리움 속 미생물을 제공한다.

[22]

[23] 본 출원에서 용어, "푸트레신(putrescine)"은 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$ 의 분자식을 가지는 4개의 탄소로 구성된 다이아민(diamine) 유기화합물이며, 1,4-디아미노부탄(1,4-diaminobutane) 또는 부탄디아민(butanediamine)으로도 명명된다.

[24]

[25] 본 출원에서 용어, "N-아세틸트랜스퍼라제(N-acetyltransferase)"는 아세틸-CoA(acetyl-CoA)로부터 아릴아민(arylamine), 아릴히드록시라민(arylhydroxylamine) 및 아릴히드라진(arylhydrazine)으로 아세틸기의 전달을 촉매하는 효소(EC2.3.1.5)이다. 상기 효소는 CoA 없이 아릴아민 간의 아세틸 전이를 촉매할 수 있고, 아세틸-CoA와 글루타메이트 존재하에 N-아세틸-L-글루타메이트 생성능을 가질 수 있다. 상기 효소는 방향족 아민에 대해 넓은 특이성을 갖는 것으로 알려져 있다.

[26]

본 출원에 있어서, 상기 N-아세틸트랜스퍼라제는 GNAT(GCN5-related N-acetyltransferases) 패밀리에 속하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[27]

상기 N-아세틸트랜스퍼라제는 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지거나, 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어지거나 또는 서열번호 1으로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기

서열번호 1의 서열은 공지의 데이터 베이스인 NCBI 진뱅크(Genbank)에서 그 서열을 확인할 수 있다.

- [28] 구체적으로, 상기 N-아세틸트랜스퍼라제는 서열번호 1 및/또는 상기 서열번호 1과 적어도 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 상동성(homology) 또는 동일성(identity)을 가지는 아미노산 서열을 가질 수 있다. 또한, 이러한 상동성 또는 동일성을 가지며 상기 N-아세틸트랜스퍼라제에 상응하는 기능을 나타내는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 N-아세틸트랜스퍼라제도 본 출원의 범위 내에 포함됨은 자명하다. 즉, 본 출원에서 '특정 서열번호로 기재된 아미노산 서열을 포함하는 단백질 또는 폴리펩티드', '특정 서열번호로 기재된 아미노산 서열로 이루어진 단백질 또는 폴리펩티드'라고 기재되어 있다 하더라도, 당해 서열번호의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드와 동일 혹은 상응하는 활성을 가지는 경우라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열로 이루어진 단백질도 본 출원에서 사용될 수 있음은 자명하다. 예를 들어, '서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드'는, 이와 동일 혹은 상응하는 활성을 가지는 경우라면 '서열번호 1의 아미노산 서열로 포함하는 폴리펩티드'에 속할 수 있음은 자명하다.

[29]

- [30] 본 출원에서 상기 N-아세틸트랜스퍼라제를 코딩하는 유전자는 코리네박테리움 속 균주로부터 유래하는 것일 수 있고, 구체적으로 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)로부터 유래하는 것일 수 있으나, N-아세틸트랜스퍼라제를 코딩하는 유전자를 발현할 수 있는 코리네박테리움 속 균주이라면 특별히 제한되지 않는다. 상기 유전자는 서열번호 1의 아미노산 서열을 코딩하는 염기 서열을 포함할 수 있으며, 보다 구체적으로는 서열번호 2의 염기 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 서열번호 2의 염기 서열은 공지의 데이터 베이스인 진뱅크에서 얻을 수 있고, Ncgl2644로 명명될 수 있다. 상기 서열번호 2의 염기 서열을 포함하는 유전자는 서열번호 2의 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드, 서열번호 2의 염기 서열을 가지는 유전자 또는 폴리뉴클레오티드, 서열번호 2의 염기 서열로 이루어지는 유전자 또는 폴리뉴클레오티드와 혼용하여 사용될 수 있다.

- [31] 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 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 단편을 의미한다. 상기 폴리뉴클레오티드는 기능을 할 수 있는 폴리뉴클레오티드 집합체인 경우 유전자로 기재될 수 있다. 본 출원에서 폴리뉴클레오티드와 유전자는 혼용될 수 있다.

- [32] 구체적으로, 본 출원의 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. 구체적으로, 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어지는 N-아세틸트랜스퍼라제를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열이라면 제한 없이 포함할 수 있다.
- [33] 또한 공지의 유전자 서열로부터 조제될 수 있는 프로브, 예를 들면, 상기 염기 서열의 전체 또는 일부에 대한 상보 서열과 엄격한 조건 하에 하이브리드화하여, 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어지는 N-아세틸트랜스퍼라제를 코딩하는 서열이라면 제한 없이 포함될 수 있다. 상기 "엄격한 조건(stringent condition)"이란 폴리뉴클레오티드 간의 특이적 혼성화를 가능하게 하는 조건을 의미한다. 이러한 조건은 당해기술분야에 잘 알려져 있다. 예를 들어, 상동성 또는 동일성이 높은 유전자끼리, 40% 이상, 구체적으로는 90% 이상, 보다 구체적으로는 95% 이상, 더욱 구체적으로는 97% 이상, 특히 구체적으로는 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 갖는 유전자끼리 하이브리드화하고, 그보다 상동성 또는 동일성이 낮은 유전자끼리 하이브리드화하지 않는 조건, 또는 통상의 써던 하이브리드화(southern hybridization)의 세척 조건인 60 °C, 1XSSC, 0.1% SDS, 구체적으로는 60 °C, 0.1XSSC, 0.1% SDS, 보다 구체적으로는 68 °C, 0.1XSSC, 0.1% SDS에 상당하는 염 농도 및 온도에서, 1회, 구체적으로는 2회 내지 3회 세정하는 조건을 열거할 수 있다.
- [34] 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, 아데노신은 티민에 상보적이며 시토신은 구아닌에 상보적이다. 따라서, 본 출원은 또한 실질적으로 유사한 핵산 서열뿐만 아니라 전체 서열에 상보적인 단리된 핵산 단편을 포함할 수 있다.
- [35] 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.
- [36] 폴리뉴클레오티드를 혼성화하는 적절한 엄격도는 폴리뉴클레오티드의 길이 및 상보성 정도에 의존하고 변수는 당해기술분야에 잘 알려져 있다(Sambrook et al., supra, 9.50-9.51, 11.7-11.8 참고).
- [37]
- [38] 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.

- [39] 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.
- [40] 임의의 두 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열이 상동성, 유사성 또는 동일성을 갖는지 여부는, 예를 들어, Pearson et al (1988) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85]: 2444에서와 같은 디폴트 파라미터를 이용하여 "FASTA" 프로그램과 같은 공지의 컴퓨터 알고리즘을 이용하여 결정될 수 있다. 또는, EMBOSS 패키지의 니들만 프로그램(EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277)(버전 5.0.0 또는 이후 버전)에서 수행되는 바와 같은, 니들만-운치(Needleman-Wunsch) 알고리즘(Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453)이 사용되어 결정될 수 있다(GCG 프로그램 패키지 (Devereux, J., et al, Nucleic Acids Research 12: 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, [S.] [F.,] [ET AL, J MOLEC BIOL 215]: 403 (1990); Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, [ED.,] Academic Press, San Diego, 1994, 및 [CARILLO ETA/.] (1988) SIAM J Applied Math 48: 1073을 포함한다). 예를 들어, 국립 생물공학 정보 데이터베이스 센터의 BLAST, 또는 ClustalW를 이용하여 상동성, 유사성 또는 동일성을 결정할 수 있다.
- [41] 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.
- [42] 본 출원의 일 예로, 본 출원의 변이체는 피토엔 탈포화효소(Phytoene desaturase) 활성을 가질 수 있다. 또한, 본 출원의 변이체는 피토엔 탈포화효소 활성을 갖는

야생형 폴리펩티드에 비해 IMP(5'-inosine monophosphate) 생산능이 증가되도록 하는 활성을 가질 수 있다.

- [43] 본 출원에서 용어, "피토엔 탈포화효소(Phytoene desaturase)"는 폴리 트랜스(poly-trans) 경로라고 불리는 생화학적 경로에서 무색의 15-시스-피토엔(15-cis-phytoene)을 밝은 적색의 리코펜(lycopene)으로 전환시키는 폴리펩티드이다. 구체적으로, 본 출원의 피토엔 탈포화효소는 피토엔 디세치라제 또는 *CrtI*와 혼용하여 사용될 수 있다. 본 출원에서 상기 피토엔 탈포화효소는 공지의 데이터 베이스인 NCBI의 GenBank에서 그 서열을 얻을 수 있다. 구체적으로 *crtI*에 의해 코딩되는 피토엔 탈포화효소 활성을 갖는 폴리펩티드일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [44]
- [45] 본 출원에서 용어, "아세틸오르니틴 디아세틸라제(Acetylornithine deacetylase)"는 아세틸오르니틴의 가수분해를 매개하여 아세트산과 오르니틴이 생성되는 반응을 매개하는 효소(EC3.5.1.16)이다. 본 출원에 있어서, 상기 아세틸오르니틴 디아세틸라제는 *argE*일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [46] 상기 *argE*는 서열번호 3의 아미노산 서열을 가지거나, 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어지거나 또는 서열번호 3으로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 서열번호 3의 서열은 공지의 데이터 베이스인 NCBI 진뱅크에서 그 서열을 확인할 수 있다.
- [47] 본 출원에서 상기 *argE*를 코딩하는 유전자는 박테리아로부터 유래하는 것일 수 있고, 구체적으로 대장균으로부터 유래하는 것일 수 있으나, *argE*를 코딩하는 유전자를 발현할 수 있는 균주이라면 특별히 제한되지 않는다. 상기 유전자는 서열번호 3의 아미노산 서열을 코딩하는 염기 서열을 포함할 수 있으며, 보다 구체적으로는 서열번호 4의 염기 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 서열번호 4의 염기 서열은 공지의 데이터 베이스인 진뱅크에서 얻을 수 있다.
- [48]
- [49] 본 출원에 있어서, 상기 퓨트레신 생산능을 가지는 코리네박테리움 속 미생물은 코리네박테리움 속 균주 유래 이중기능성 오르니틴 아세틸트랜스퍼라제/N-아세틸글루타메이트 신타제(bifunctional ornithine acetyltransferase/N-acetylglutamate synthase, *argJ*)의 활성이 약화된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [50] 본 출원에서 용어, "이중기능성 오르니틴 아세틸트랜스퍼라제/N-아세틸글루타메이트 신타제(bifunctional ornithine acetyltransferase/N-acetylglutamate synthase)"는 아세틸-CoA(acetyl-CoA)와 N-아세틸오르니틴(N-acetylornithine)의 2 가지 물질에 대해서 전환 반응을 수행할 수 있는 효소로, 오르니틴 아세틸트랜스퍼라제[L-글루타메이트 N-아세틸트랜스퍼라제, glutamate N-acetyltransferase(EC2.3.1.35)]와

N-아세틸글루타메이트 신타제(EC2.3.1.1)의 기능을 모두 가진다. 상기 오르니틴 아세틸트랜스퍼라제는 N2-아세틸-L-오르니틴(N2-acetyl-L-ornithine) 및 L-글루타메이트(L-glutamate)를 L-오르니틴(L-ornithine) 및 N-아세틸-L-글루타메이트(N-acetyl-L-glutamate)로 전환하고, 상기 N-아세틸글루타메이트 신타제는 글루타메이트(glutamate) 및 아세틸-CoA로부터 N-아세틸글루타메이트(N-acetylglutamate)의 생성을 촉매한다. 본 출원에 있어서, 상기 이중기능성 오르니틴 아세틸트랜스퍼라제/N-아세틸글루타메이트 신타제는 argJ일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [51] 상기 argJ는 하나의 효소가 2개의 효소 반응을 매개함으로써 부산물을 저감하고 퓨트레신 생성에 대한 부담을 덜 수 있다. 그러나, argJ는 오르니틴과 같은 중간 대사 물질에 의해서 그 활성이 저해될 수 있고, 이에 따라 퓨트레신 생합성 효율이 낮아질 수 있다.
- [52] 상기 argJ는 서열번호 5 또는 서열번호 7의 아미노산 서열을 가지거나, 서열번호 5 또는 서열번호 7의 아미노산 서열로 이루어지거나, 혹은 서열번호 5 또는 서열번호 7로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 서열번호 5 또는 서열번호 7의 서열은 공지의 데이터 베이스인 NCBI 진뱅크에서 그 서열을 확인할 수 있다.
- [53] 본 출원에서 상기 argJ를 코딩하는 유전자는 코리네박테리움 속 균주로부터 유래하는 것일 수 있고, 구체적으로 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)로부터 유래하는 것일 수 있으나, argJ를 코딩하는 유전자를 발현할 수 있는 코리네박테리움 속 균주이라면 특별히 제한되지 않는다. 구체적으로, 상기 서열번호 5의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자는 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13869 유래일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 유전자는 서열번호 5의 아미노산 서열을 코딩하는 염기 서열을 포함할 수 있으며, 보다 구체적으로는 서열번호 6의 염기 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 서열번호 6의 염기 서열은 공지의 데이터 베이스인 진뱅크에서 얻을 수 있다.
- [54] 또한, 상기 서열번호 7의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자는 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032 유래일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 유전자는 서열번호 7의 아미노산 서열을 코딩하는 염기 서열을 포함할 수 있으며, 보다 구체적으로는 서열번호 8의 염기 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 서열번호 8의 염기 서열은 공지의 데이터 베이스인 진뱅크에서 얻을 수 있다.
- [55]
- [56] 본 출원에서 용어, "퓨트레신 생산능을 가지는 미생물"이란, 자연적으로 퓨트레신의 생산능을 가지고 있는 미생물 또는 퓨트레신의 생산능이 없는 모균주에 퓨트레신의 생산능이 부여된 미생물을 의미한다. 구체적으로 상기 미생물은 코리네박테리움 속 균주 유래 N-아세틸트랜스퍼라제 및 대장균 유래

argE의 활성이 도입된, 퓨트레신을 생산하는 미생물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [57] 구체적으로, 상기 "퓨트레신을 생산하는 미생물"은 야생형 미생물이나 자연적 또는 인위적으로 유전적 변형이 일어난 미생물을 모두 포함한다. 더욱 구체적으로, 외부 유전자가 삽입되거나 내재적 유전자의 활성이 강화되거나 약화되는 등의 원인으로 인해서 특정 기작이 약화되거나 강화된 미생물로서, 목적하는 퓨트레신 생산을 위하여 유전적 변이가 일어나거나 퓨트레신 생산 활성을 강화시킨 미생물일 수 있다.
- [58] 본 출원에서 용어, 활성의 "도입"은, 미생물이 본래 가지고 있지 않았던 유전자가 그 미생물내에서 발현됨에 따라 특정 단백질의 활성을 나타나게 되는 것 또는 해당 단백질의 내재적 활성 또는 변형 전 활성에 비하여 증가 또는 향상된 활성을 나타나게 되는 것을 의미한다. 예를 들어, 특정 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 미생물 내 염색체로 도입되거나, 특정 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터가 미생물 내로 도입되어 이의 활성이 나타나는 것일 수 있다.
- [59] 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.
- [60] 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.
- [61] 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).

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

- [76] 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.
- [77] 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.
- [78] 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.
- [79] 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.
- [80] 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.
- [81] 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.

[82]

[83] 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.

[84]

[85] 이와 같은 단백질의 활성 강화는, 상응하는 단백질의 활성 또는 농도가 야생형이나 변형전 미생물 균주에서 발현된 단백질의 활성 또는 농도를 기준으로 하여 증가되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 출원에서 용어, "변형전 균주" 또는 "변형전 미생물"은 미생물에 자연적으로 발생할 수 있는 돌연변이를 포함하는 균주를 제외하는 것이 아니며, 천연형 균주 자체이거나, 인위적 요인에 의한 유전적 변이로 형질이 변화되기 전 균주를 의미한다. 본 출원에 있어서, 상기 형질 변화는 코리네박테리움 속 균주 유래 N-아세틸트랜스퍼라제 및 대장균 유래 argE 활성의 도입일 수 있다. 상기 "변형전 균주" 또는 "변형전 미생물"은 "비변이 균주", "비변형 균주", "비변이 미생물", "비변형 미생물" 또는 "기준 미생물"과 혼용될 수 있다.

[86]

본 출원에 있어서, 상기 기준 미생물은 푸트레신을 생산하는 미생물이라면 특별히 제한되지 않으며, 야생형에 비해 푸트레신 생산능이 강화된 변이 균주 역시 제한 없이 포함된다. 그 예로, 야생형 코리네박테리움 글루타미쿰 균주 ATCC13032 균주, 야생형 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13869 균주 또는 푸트레신 생합성 경로를 강화하기 위하여 상기 균주에 하나 이상의 유전적 변형이 추가된 균주가 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[87]

상기 하나 이상의 유전적 변형은 예를 들면, 푸트레신 생합성 경로의 유전자를 강화시키거나; 푸트레신 오페론(operon)의 활성을 과발현시키거나; 푸트레신의 전구체의 공급 및 효율을 개선하거나; 푸트레신의 배출을 향상시키거나; 경쟁경로의 유전자, 푸트레신 오페론의 방향성 경로의 조절자, 푸트레신 유입 유전자, 푸트레신 유입 및 분해 유전자의 활성을 약화시키는; 것 중 선택되는 어느 하나 이상의 유전적 변형일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[88]

상기 푸트레신 생합성 경로의 유전자를 강화시키는 유전적 변형은 예를 들면, 야생형 대장균 W3110 균주 유래의 오르니틴 디카복실레이즈(ODC)를 코딩하는

- 유전자(*speC*)를 염색체 내에 도입하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [89] 상기 퓨트레신 오페론의 활성을 과발현시키는 유전적 변형은 예를 들면, 글루타메이트에서 오르니틴 합성에 관여하는 효소를 코딩하는 *argCJBD* 유전자군의 프로모터를 치환하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [90] 상기 퓨트레신의 배출을 향상시키거나; 경쟁경로의 유전자, 퓨트레신 오페론의 방향성 경로의 조절자, 퓨트레신 유입 유전자, 퓨트레신 유입 및 분해 유전자의 활성을 약화시키는 유전적 변형은 예를 들면, 염색체 내 오르니틴 카르바모일 트랜스퍼레이즈를 암호화하는 유전자(*argF*) 및 글루타메이트 배출에 관여하는 글루타메이트 엑스포터(*NCgl1221*)를 암호화하는 유전자를 결손시키거나; 히스톤 아세틸 트랜스퍼레이즈 HPA2 및 관련 아세틸 트랜스퍼레이즈(*histone acetyltransferase HPA2 and related acetyltransferase*)로 정의되는 *NCgl1469* 단백질의 활성을 결실시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [91] 상기 하나 이상의 유전적 변형이 추가된 균주는 예를 들면, ATCC13032에서 염색체 내 오르니틴 카르바모일 트랜스퍼레이즈를 암호화하는 유전자(*argF*) 및 글루타메이트 배출에 관여하는 글루타메이트 엑스포터(*NCgl1221*)를 암호화하는 유전자가 결손되고, 야생형 대장균 W3110 균주 유래의 오르니틴 디카복실레이즈(*ODC*)를 암호화하는 유전자(*speC*)가 염색체 내에 도입되며, 글루타메이트에서 오르니틴 합성에 관여하는 효소를 코딩하고 있는 *argCJBD* 유전자군의 프로모터가 치환되어 퓨트레신 생산능을 갖는 CC01-0064 균주(대한민국 공개특허 제2012-0064046호, KCCM11138P), CC01-0064 균주에 히스톤 아세틸 트랜스퍼레이즈 HPA2 및 관련 아세틸 트랜스퍼레이즈(*histone acetyltransferase HPA2 and related acetyltransferase*)로 정의되는 *NCgl1469* 단백질의 활성이 결실된 CC01-0163 균주(대한민국 공개특허 제10-2013-0082478호, KCCM11240P)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [92]
- [93] 또한, 상기 퓨트레신을 생산하는 미생물은 코리네박테리움 속 균주 유래 *argJ*의 활성이 약화된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [94]
- [95] 본 출원에서 용어, 단백질의 "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.
- [96] 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.

- [97] 이러한 폴리펩티드의 활성의 약화는, 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).
- [98] 본 출원에 있어서, 상기 약화의 대상이 되는 단백질, 즉, 목적 단백질은 argJ일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [99]
- [100] 1) 폴리펩티드를 코딩하는 유전자 전체 또는 일부의 결손;
- [101] 2) 폴리펩티드를 코딩하는 유전자의 발현이 감소하도록 발현조절영역(또는 발현조절서열)의 변형;
- [102] 3) 폴리펩티드의 활성이 제거 또는 약화되도록 상기 폴리펩티드를 구성하는 아미노산 서열의 변형(예컨대, 아미노산 서열 상의 1 이상의 아미노산의 삭제/치환/부가);
- [103] 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);
- [104] 5) 폴리펩티드를 코딩하는 유전자 전사체의 개시코돈 또는 5'-UTR 지역을 코딩하는 염기서열의 변형;
- [105] 6) 폴리펩티드를 코딩하는 상기 유전자의 전사체에 상보적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오티드(예컨대, 안티센스 RNA)의 도입;
- [106] 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;
- [107] 8) 폴리펩티드를 코딩하는 유전자 서열의 ORF(open reading frame)의 3' 말단에 반대 방향으로 전사되는 프로모터의 부가(Reverse transcription engineering, RTE); 또는
- [108] 9) 상기 1) 내지 8) 중 선택된 2 이상의 조합일 수 있으나, 이에, 특별히 제한되는

것은 아니다.

- [109] 예컨대,
- [110] 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.
- [111] 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.
- [112] 또한, 상기 3) 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.
- [113] 또한, 상기 4) 및 5)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.
- [114] 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.
- [115] 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.
- [116] 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.
- [117]

- [118] 상기 퓨트레신을 생산하는 미생물은 전술한 방법으로 코리네박테리움 속 균주 유래 N-아세틸트랜스퍼라제 및 대장균 유래 *argE*의 활성이 도입되어, 퓨트레신을 생산할 수 있는 미생물이라면 모두 가능하다. 본 출원의 목적상, 상기 퓨트레신을 생산하는 미생물은 전술한 방법으로 코리네박테리움 속 균주 유래 N-아세틸트랜스퍼라제 및 대장균 유래 *argE*의 활성이 도입되고, 코리네박테리움 속 균주 유래 *argJ*의 활성이 약화되어, 목적하는 퓨트레신 생산능이 증가된 것을 특징으로 하며, 유전적으로 변형된 미생물 또는 재조합 미생물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 출원에서 상기 "퓨트레신을 생산하는 미생물"은 "퓨트레신 생산 미생물", "퓨트레신 생산능을 갖는 미생물"과 혼용되어 사용될 수 있다.
- [119] 상기 미생물은 예를 들면, 코리네박테리움(*Corynebacterium*) 속, 에스케리키아(*Escherichia*) 속, 엔테로박터(*Enterbacter*) 속, 어위니아(*Erwinia*) 속, 세라티아(*Serratia*) 속, 프로비덴시아(*Providencia*) 속 및 브레비박테리움(*Brevibacterium*) 속에 속하는 미생물 일 수 있고, 구체적으로, 코리네박테리움(*Corynebacterium*) 속 미생물일 수 있다.
- [120] 보다 구체적으로, 코리네박테리움(*Corynebacterium*) 속 미생물은 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*), 코리네박테리움 암모니아게네스(*Corynebacterium ammoniagenes*), 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 폴루티솔리(*Corynebacterium pollutisoli*), 코리네박테리움 이미탄스(*Corynebacterium imitans*), 코리네박테리움 테스투디노리스(*Corynebacterium testudinoris*) 또는 코리네박테리움 플라베스센스(*Corynebacterium flavescens*) 등일 수 있고, 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)일 수 있으며, 코리네박테리움 속에 속하는 미생물은 제한 없이 포함될 수 있다.
- [121]
- [122] 본 출원의 다른 하나의 양태는 코리네박테리움 속 균주 유래 N-아세틸트랜스퍼라제(N-acetyltransferase) 및 대장균 유래 아세틸오르니틴 디아세틸라제(Acetylornithine deacetylase, *argE*)의 활성이 도입된, 퓨트레신 생산능을 가지는 코리네박테리움 속 미생물을 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, 퓨트레신 생산 방법을 제공한다. 상기 N-아세틸트랜스퍼라제, 아세틸오르니틴 디아세틸라제, 퓨트레신 및 미생물에 대해서는 전술한 바와 같다.
- [123] 상기 코리네박테리움 속 미생물은 코리네박테리움 속 균주 유래 이중기능성

오르니틴 아세틸트랜스퍼라제/N-아세틸글루타메이트 신타제(bifunctional ornithine acetyltransferase/N-acetylglutamate synthase, argJ)의 활성이 약화된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [124] 상기 방법은 당업계에 공지된 최적화된 배양 조건 및 효소 활성 조건에서 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 구체적으로, 상기 미생물을 배양하는 단계는, 특별히 이에 제한되지 않으나, 공지된 회분식 배양방법, 연속식 배양방법, 유가식 배양방법 등에 의해 수행될 수 있다. 이때, 배양조건은, 특별히 이에 제한되지 않으나, 혐기성 화합물 (예: 수산화나트륨, 수산화칼륨 또는 암모니아) 또는 산성 화합물 (예: 인산 또는 황산)을 사용하여 적정 pH (예컨대, pH 5 내지 9, 구체적으로는 pH 6 내지 8, 가장 구체적으로는 pH 6.8)를 조절할 수 있고, 산소 또는 산소-함유 가스 혼합물을 배양물에 도입시켜 호기성 조건을 유지할 수 있다. 배양온도는 20 내지 45°C, 구체적으로는 25 내지 40°C를 유지할 수 있고, 약 10 내지 160 시간 동안 배양할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 배양에 의하여 생산된 푸트레신은 배지 중으로 분리되거나 세포 내에 잔류할 수 있다.
- [125] 아울러, 사용되는 배양용 배지는 탄소 공급원으로는 당 및 탄수화물 (예: 글루코오스, 슈크로오스, 락토오스, 프럭토오스, 말토오스, 몰라세, 전분 및 셀룰로오스), 유지 및 지방 (예: 대두유, 해바라기씨유, 땅콩유 및 코코넛유), 지방산 (예: 팔미트산, 스테아르산 및 리놀레산), 알코올 (예: 글리세롤 및 에탄올) 및 유기산 (예: 아세트산) 등을 개별적으로 사용하거나 또는 혼합하여 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 질소 공급원으로는 질소-함유 유기 화합물 (예: 펩톤, 효모 추출액, 육즙, 맥아 추출액, 옥수수 침지액, 대두 박분 및 우레아), 또는 무기 화합물 (예: 황산암모늄, 염화암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄 및 질산암모늄) 등을 개별적으로 사용하거나 또는 혼합하여 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 인 공급원으로 인산 이수소칼륨, 인산수소이칼륨, 이에 상응하는 나트륨 함유 염 등을 개별적으로 사용하거나 또는 혼합하여 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 배지에는 기타 금속염 (예: 황산마그네슘 또는 황산철), 아미노산 및 비타민과 같은 필수성장-촉진 물질을 포함할 수 있다.
- [126] 상기 방법은 상기 배양 단계 이후 배양된 배지 또는 미생물에서 푸트레신을 회수하는 단계를 추가로 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [127] 상기 배양 단계에서 생산된 푸트레신을 회수하는 방법은 배양방법에 따라 당해 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 배양액으로부터 목적하는 푸트레신을 수집할 수 있다. 예를 들어, 원심분리, 여과, 음이온 교환 크로마토그래피, 결정화 및 HPLC 등이 사용될 수 있으며, 당해 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 배지 또는 미생물로부터 목적하는 푸트레신을 회수 할 수 있다.
- [128] 상기 푸트레신을 회수하는 방법은, 정제 단계를 추가적으로 포함할 수 있다. 상기 정제 단계는 당해 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 수행될 수 있다. 따라서, 상기의 회수되는 푸트레신은 정제된 형태 또는 푸트레신을 함유한

미생물 발효액일 수 있다.

[129]

[130] 본 출원의 또 하나의 양태는 코리네박테리움 속 균주 유래 N-아세틸트랜스퍼라제(N-acetyltransferase) 및 대장균 유래 아세틸오르니틴 디아세틸라제(Acetylornithine deacetylase, argE)의 활성이 도입된, 푸트레신 생산능을 가지는 코리네박테리움 속 미생물을 포함하는, 푸트레신 생산용 조성물을 제공한다.

[131] 상기 N-아세틸트랜스퍼라제, 아세틸오르니틴 디아세틸라제, 푸트레신 및 미생물에 대해서는 전술한 바와 같다.

[132] 상기 코리네박테리움 속 미생물은 코리네박테리움 속 균주 유래 이중기능성 오르니틴 아세틸트랜스퍼라제/N-아세틸글루타메이트 신타제(bifunctional ornithine acetyltransferase/N-acetylglutamate synthase, argJ)의 활성이 약화된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[133] 상기 푸트레신 생산용 조성물은 상기 코리네박테리움 속 균주 유래 N-아세틸트랜스퍼라제(N-acetyltransferase) 및 대장균 유래 아세틸오르니틴 디아세틸라제(Acetylornithine deacetylase, argE)의 활성을 도입시킬 수 있는 구성을 제한없이 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 구성은 도입된 숙주 세포에서 작동가능하게 연결된 유전자를 발현시킬 수 있도록 벡터 내에 포함된 형태일 수 있으며, 이에 대해서는 전술한 바와 같다.

[134] 상기 코리네박테리움 속 균주 유래 N-아세틸트랜스퍼라제는 서열번호 1 또는 이와 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으며, 이에 대해서는 전술한 바와 같다.

[135] 상기 대장균 유래 아세틸오르니틴 디아세틸라제는 서열번호 3 또는 이와 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으며, 이에 대해서는 전술한 바와 같다.

[136] 본 출원의 조성물은 아미노산 생산용 조성물에 통상 사용되는 임의의 적합한 부형제를 추가로 포함할 수 있으며, 이러한 부형제는, 예를 들어 보존제, 습윤제, 분산제, 현탁화제, 완충제, 안정화제 또는 등장화제 등일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[137]

[138] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 푸트레신 생산을 위한, 조성물의 용도를 제공한다.

[139]

[140] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 코리네박테리움 속 균주 유래 N-아세틸트랜스퍼라제(N-acetyltransferase) 및 대장균 유래 아세틸오르니틴 디아세틸라제(Acetylornithine deacetylase, argE)의 활성이 도입된, 푸트레신 생산능을 가지는 코리네박테리움 속 미생물의 푸트레신 생산 용도를 제공한다.

[141]

발명의 실시를 위한 형태

- [142] 이하 본 출원을 실시예에 의해 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 출원을 예시적으로 설명하기 위한 것으로, 본 출원의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니며, 본 출원이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 명백할 것이다.
- [143]
- [144] 실시예 1: 코리네 유래 *argJ* 유전자 강화 균주의 푸트레신 생산능 확인
- [145]
- [146] 1-1. ATCC13032 기반 푸트레신 생산 균주의 트랜스포존 유전자 내로의 ATCC13869 유래 *argJ* 강화 균주의 제작
- [147] 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032 기반의 푸트레신 생산 균주에서 코리네박테리움 속 균주 유래 이중기능성 오르니틴 아세틸트랜스퍼라제/N-아세틸글루타메이트 신타제(bifunctional ornithine acetyltransferase/N-acetylglutamate synthase)를 코딩하는 *argJ* 유전자를 강화하기 위해, *argJ* 유전자를 상기 균주의 트랜스포존 유전자 내로 도입하였다.
- [148] 코리네박테리움 속 미생물의 트랜스포존 유전자 부위를 이용하여 염색체 내 유전자 도입을 가능하게 하는 형질전환용 벡터로 pDZTn(국제공개특허 WO 2009/125992)를 사용하였으며, 프로모터로 코리네박테리움 글루타미쿰 유래 *lysC-asd* 오페론 유전자의 프로모터를 개량한 *lysCP1* 프로모터(국제공개특허 WO 2009/096689, 서열번호 9)를 이용하였다.
- [149] 구체적으로, 상기 pDZTn 벡터의 제작 과정은 다음과 같다. 트랜스포존 유전자를 확보하기 위하여 NIH 유전자 은행(NIH GenBank)으로부터 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032 유래의 전체 염기서열 중 트랜스포존 유전자의 염기서열 정보(NCBI 등록번호 NC_003450, NCgl1021)를 확보하고, 이에 근거하여 두 쌍의 프라이머(표 1, 서열번호 10 내지 13)를 합성하였다.
- [150] 코리넭박테리움 글루타미쿰 ATCC13032의 염색체 DNA를 주형으로 하고, 하기 서열번호 10 내지 13의 프라이머 쌍을 이용하여 PCR을 수행하였다. 중합효소는 PfuUltra™ 고-신뢰 DNA 폴리머라제(Stratagene)를 사용하였으며, PCR 조건은 변성 96°C 30초; 어닐링 58°C 30초; 및 중합반응 72°C 1분을 30회 반복하였다.
- [151]

[152] [표1]

서열번호	명칭	서열
10	Tn-A-F	atcctctagagtcgaccatcgctgacaccatctgcc
11	Tn-A-R	gggccactagtctcgagttcaccgcgggagccaagcc
12	Tn-B-F	ctcgagactagtgggccctggattccaaggctacgcc
13	Tn-B-R	atgcctgcaggctcgaccctgaatggataaggcaccg

[153] 그 결과, PCR 결과물로 약 500bp의 프로모터 부위를 포함한 트랜스포존 유전자 두 쌍 (Tn-A, Tn-B)을 수득하였다. Tn-A(서열번호 14)은 서열번호 10과 11을 프라이머로 사용하여 증폭된 것이며, Tn-B(서열번호 15)는 서열번호 12와 13을 프라이머로 사용하여 증폭된 것이다. 상기 증폭 산물을 BD 인퓨전 키트(In-Fusion kit, BD)를 이용하여 미리 SalI 제한효소로 처리한 pDZ 벡터에 클로닝하여 pDZTn 벡터를 얻었다. 두 개의 증폭된 산물 사이에는 프라이머 제작시 인위적으로 삽입한 다수의 제한효소 인식 부위를 포함하고 있다.

[154] lysCP1 프로모터의 제작 과정은 다음과 같다. 코리네박테리움 글루타미쿰 KFCC10881을 lysCP1 프로모터를 포함하는 벡터로 형질전환시킨 CA01-0135 균주(국제공개특허 WO 2009-096689, KCCM10919P)의 염색체 DNA를 주형으로 하고, 하기 서열번호 16 및 17의 프라이머 쌍을 이용하여 PCR을 수행하였다. 중합효소는 PfuUltra™ 고-신뢰 DNA 폴리머라제(Stratagene)를 사용하였으며, PCR 조건은 95°C에서 30초의 변성, 55°C에서 30초의 어닐링 및 72°C에서 30초 과정을 30회 반복하였다.

[155] 여기에서 사용된 프라이머의 서열은 하기 표 2와 같다.

[156]

[157] [표2]

서열번호	명칭	서열
16	lysCP1 promotor_F	GAATGAGTTCCTCGAGCCGATGCTAGGGCGAAA A
17	lysCP1 promotor_R	CTTTGTGCACCTTTCGATCTACGTGCTGACAGTT AC

[158] 그 결과, PCR 결과물로 lysCP1 프로모터 부위(서열번호 9)를 수득하였다.

[159] argJ 유전자를 수득하기 위하여, 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13869 유래 argJ 유전자의 염기서열(서열번호 6)에 근거하여 argJ ORF(open-reading frame) 상동 재조합 단편을 얻기 위한 서열번호 18 및 19의 프라이머 쌍을 제작하였다.

[160] 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13869 균주의 염색체 DNA를 주형으로 하고, 하기 서열번호 18 및 19의 프라이머 쌍을 이용하여 PCR을 수행하였다. 중합효소는 PfuUltra™ 고-신뢰 DNA 폴리머라제(Stratagene)를 사용하였으며,

PCR 조건은 95°C에서 30초의 변성, 55°C에서 30초의 어닐링 및 72°C에서 1분 30초의 신장 과정을 30회 반복하였다.

[161] 여기에서 사용된 프라이머의 서열은 하기 표 3과 같다.

[162]

[163] [표3]

서열번호	명칭	서열
18	argJ _F	GTTCCACATGGCCAAAAAAGGCATTAC
19	argJ _R	TTCTTTTAAAGAGCTGTACGCGGAGTTGATCTCC

[164] 그 결과, PCR 결과물로 약 1.2kb의 argJ 유전자 단편이 증폭되었으며, 이를 0.8% 아가로스 겔에서 전기 영동한 후 원하는 크기의 밴드를 용리하여 정제하였다.

[165] 앞서 제작한 pDZTn 벡터에 제한효소인 XhoI을 처리하고 상기에서 수득한 각 PCR 산물(lysCP1프로모터 부위 및 argJ 유전자 단편)을 인퓨전 HD 클로닝 키트(In-Fusion® HD Cloning Kit, Clontech)를 이용하여 퓨전 클로닝한 후, 이의 결과로 얻은 플라스미드를 pDZTn-lysCP1-argJ라 명명하였다.

[166]

[167] 다음으로, 제작한 상기 플라스미드 pDZTn-lysCP1-argJ를 야생형 코리네박테리움 글루타미쿰 균주 ATCC13032에서 염색체 내 오르니틴 카르바모일 트랜스퍼레이즈를 암호화하는 유전자(argF) 및 글루타메이트 배출에 관여하는 글루타메이트 엑스포터(NCgl1221)를 암호화하는 유전자가 결손되고, 야생형 대장균 W3110 균주 유래의 오르니틴 디카복실레이즈(ODC)를 암호화하는 유전자(speC)가 염색체 내에 도입되며, 글루타메이트에서 오르니틴 합성에 관여하는 효소를 코딩하고 있는 argCJBD 유전자군의 프로모터가 치환되어 퓨트레신 생산능을 갖는 CC01-0064 균주(미국등록특허 US 9890404, KCCM11138P)에서 히스톤 아세틸 트랜스퍼레이즈 HPA2 및 관련 아세틸 트랜스퍼레이즈(histone acetyltransferase HPA2 and related acetyltransferase)로 정의되는 NCgl1469 단백질의 활성이 결실된 CC01-0163 균주(미국등록특허 US 9677099, KCCM11240P)에 전기천공법(electroporation)으로 도입하여 형질전환체를 수득하고, 상기 형질전환체를 카나마이신 25 µg/ml과 X-gal(5-bromo-4-chloro-3-indolin-D-galactoside)이 함유된 BHIS 평판 배지(Brain heart infusion 37 g/l, 소르비톨 91 g/l, 한천 2%)에 도말하고 배양하여 콜로니를 형성시켰다. 형성된 콜로니 중에서 백색의 콜로니를 선택함으로써 상기 플라스미드 pDZTn-lysCP1-argJ가 도입된 형질전환 균주를 선별하였다.

[168] 상기 선별된 균주를 CM 배지(글루코오스(glucose) 10 g/l, 폴리펩톤(polypeptone) 10 g/l, 효모 추출물(yeast extract) 5 g/l, 소고기 추출물(beef extract) 5 g/l, NaCl 2.5 g/l, 요소(urea) 2 g/l, pH 6.8)에서 30°C에서 8시간 동안 진탕 배양하고, 각각 10⁻⁴부터 10⁻¹⁰까지 순차적으로 희석한 후 X-gal 함유 고체배지에

도말하고 배양하여 콜로니를 형성시켰다. 형성된 콜로니 중에서 상대적으로 낮은 비율로 나타나는 백색의 콜로니를 선택함으로써 2차 교차(crossover)에 의해 *argJ*를 코딩하는 유전자가 도입된 균주를 최종 선별하였다.

[169] 최종 선별된 균주를 대상으로 서열번호 18 및 19의 프라이머 쌍을 이용해 PCR을 수행하여 *argJ*를 코딩하는 유전자가 도입되었음을 확인하고, 상기 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주를 CC01-0163 Tn:lysCP1-*argJ* 로 명명하였다.

[170]

[171] 1-2. 코리네 유래 *argJ* 유전자가 강화된 코리네 기반 균주의 푸트레신 생산능 평가

[172] 푸트레신 생산 균주에 코리네박테리움 유래 *argJ* 유전자를 강화시켰을 때 푸트레신 생산에 미치는 효과를 확인하기 위하여, 상기 실시예 1-1에서 제작한 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주를 대상으로 푸트레신 생산능을 비교하였다.

[173] 구체적으로, 상기 실시예 1-1에서 제작한 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주(CC01-0163 Tn:lysCP1-*argJ*)를 각각 1 mM 아르기닌 함유 CM 평판 배지(글루코오스 1%, 폴리펩톤 1%, 효모 추출물 0.5%, 소고기 추출물 0.5%, NaCl 0.25%, 요소 0.2%, 50% NaOH 100 μ l, 한천 2%, pH 6.8, 1 L 기준)에 도말하여 30°C에서 24시간 동안 배양하였다.

[174] 이로부터 배양된 각 균주를 25 ml의 역가 배지(글루코오스 8%, 대두단백질 0.25%, 옥수수고형 0.50%, (NH₄)₂SO₄ 4%, KH₂PO₄ 0.1%, MgSO₄·7H₂O 0.05%, 요소 0.15%, 바이오틴 100 μ g, 티아민 염산염 3 mg, 칼슘-판토텐산 3 mg, 니코틴아미드 3 mg, CaCO₃ 5%, 1 L 기준)에 한 백금이 정도로 접종한 후 30°C에서 200 rpm으로 98시간 동안 진탕 배양하였다. 모든 균주의 배양 시 배지에 1 mM 아르기닌을 첨가하였다. 각 배양물로부터 생산된 푸트레신 농도를 측정하고 그 결과를 하기 표 4에 나타내었다.

[175]

[176] [표4]

균주명	푸트레신 (g/L)
CC01-0163	11.7
CC01-0163 Tn:lysCP1- <i>argJ</i>	12.4

[177] 그 결과, 상기 표 4에 나타난 바와 같이, 코리네박테리움 유래 *argJ*가 강화된 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주에서 푸트레신 생산이 6% 증가하였음을 확인하였다.

[178]

[179] 실시예 2: 대장균 유래 *argA* 및 *argE*의 푸트레신 생산 균주 내 도입 및 이의 푸트레신 생산능 확인

[180]

- [181] 2-1. ATCC13032 기반 푸트레신 생산 균주의 트랜스포존 유전자 내로의 대장균 유래 argA 및 argE 동시 도입한 균주의 제작
- [182] 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032 기반의 푸트레신 생산 균주(CC01-0163)에 대장균 유래 N-아세틸글루타메이트 신타아제(N-acetylglutamate synthase)를 코딩하는 argA와 아세틸오르니틴 디아세틸라제(Acetylornithine deacetylase)를 코딩하는 argE 유전자를 삽입하였을 때 푸트레신 생산능이 향상하는지를 확인하기 위해, argA와 argE를 상기 균주의 트랜스포존 유전자 내로 도입하였다.
- [183] 이를 위해, 상기 대장균 유래 argA 유전자의 염기서열(서열번호 20)로부터 argA ORF 부위의 상동 제조합 단편을 얻기 위한 서열번호 21 및 22의 프라이머 쌍을 제작하고, argE 유전자의 염기서열(서열번호 4)로부터 argE ORF 부위의 상동 제조합 단편을 얻기 위한 서열번호 23 및 24의 프라이머 쌍을 제작하였다.
- [184] 상기 프라이머의 서열은 하기 표 5와 같다.
- [185]
- [186] [표5]

서열번호	명칭	서열
21	argA ORF_F	GAAAGGTGCACAAAGATGGTAAAGGAACGTAA AACCG
22	argA ORF_R	GCCCACTAGTCTCGAGCATGCGGCGTTGATTTTG
23	argE ORF_F	GAAAGGTGCACAAAGATGAAAAACAAATTACC GCC
24	argE ORF_R	GCCCACTAGTCTCGAGGTTTGAGTCACTGTCGGT CG

- [187] lysCP1 프로모터 부위는 실시예 1-1과 동일한 방법으로 KCCM10919P 균주 염색체를 주형으로 하고 서열번호 16 및 17의 프라이머 쌍을 이용한 PCR을 통해 수득하였다.
- [188] argA 유전자를 수득하기 위하여, 대장균 W3110 균주의 염색체를 주형으로 서열번호 21 및 22의 프라이머 쌍을 이용하여 PCR을 수행하였다. 중합효소는 PfuUltra™ 고-신뢰 DNA 폴리머라제(Stratagene)를 사용하였으며, PCR 조건은 95°C에서 30초의 변성, 55°C에서 30초의 어닐링 및 72°C에서 1분 30초의 신장 과정을 30회 반복하였다.
- [189] 그 결과, PCR 결과물로 약 1.6kb의 argA 유전자 단편이 증폭되었으며, 이를 실시예 1-1에서 제작한 pDZTn 벡터에 실시예 1-1과 동일한 방법으로 lysCP1 프로모터 부위와 퓨전 클로닝하였다. 그 결과로 얻은 플라스미드를 pDZTn-lysCP1-argA라 명명하였다.

[190]

[191] 실시예 1-1에서 제작한 pDZTn 벡터에 제한효소인 XhoI을 처리하고 상기에서 수득한 각 PCR 산물(lysCP1프로모터 부위 및 argA 유전자 단편)을 실시예 1-1과 동일한 방법으로 퓨전 클로닝한 후, 이의 결과로 얻은 플라스미드를 pDZTn-lysCP1-argA라 명명하였다.

[192]

[193] argE 유전자를 수득하기 위하여, 상기와 동일한 방법으로 대장균 W3110 균주의 염색체를 주형으로 서열번호 23 및 24의 프라이머 쌍을 이용하여 PCR을 수행하였다. 중합효소는 PfuUltra™ 고-신뢰 DNA 폴리머라제(Stratagene)를 사용하였으며, PCR 조건은 95°C에서 30초의 변성, 55°C에서 30초의 어닐링 및 72°C에서 1분 30초의 신장 과정을 30회 반복하였다.

[194] 그 결과, PCR 결과물로 약 1.4kb의 argE 유전자 단편이 증폭되었으며, 이를 실시예 1-1에서 제작한 pDZTn 벡터에 실시예 1-1과 동일한 방법으로 기 수득한 lysCP1 프로모터 부위와 퓨전 클로닝하였다. 그 결과로 얻은 플라스미드를 pDZTn-lysCP1-argE라 명명하였다.

[195]

[196] 다음으로, 상기 플라스미드 pDZTn-lysCP1-argA를 CC01-0163에 전기천공법으로 도입하여 형질전환체를 수득하고, 실시예 1-1과 동일한 방법으로 상기 플라스미드 pDZTn-lysCP1-argA가 도입된 형질전환 균주를 선별하였다.

[197] 상기 선별된 균주를 2차 교차에 의해 argA를 코딩하는 유전자가 도입된 균주를 최종 선별하였다. 최종 선별된 균주를 대상으로 서열번호 21 및 22의 프라이머 쌍을 이용해 PCR을 수행하여 argA를 코딩하는 유전자가 도입되었음을 확인하고, 상기 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주를 CC01-0163 Tn:lysCP1-argA로 명명하였다.

[198] 상기 제작된 argA가 도입된 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주에 argE를 도입하기 위해, 앞서 제작한 pDZTn-lysCP1-argE를 상기와 동일한 방법으로 CC01-0163 Tn:lysCP1-argA에 형질전환하였으며, 최종 선별된 균주를 대상으로 서열번호 23 및 24의 프라이머 쌍을 이용해 PCR을 수행하여 트랜스포존 내 argE가 도입되었음을 확인하였다.

[199] 이로부터 선별된 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주를 CC01-0163 Tn:lysCP1-argA Tn:lysCP1-argE라 명명하였다.

[200]

[201] 2-2. 대장균 유래 argA 및 argE 유전자가 도입된 퓨트레신 생산 코리네박테리움 속 균주의 퓨트레신 생산능 평가

[202] 퓨트레신 생산 균주에 대장균 유래 argA와 argE 도입이 퓨트레신 생산에 미치는 효과를 확인하기 위하여, 상기 실시예 2-1에서 제작한 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주를 대상으로 퓨트레신 생산능을 비교하였다.

[203] 구체적으로, 상기 실시예 2-1에서 제작한 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주(CC01-0163 Tn:lysCP1-argA Tn:lysCP1-argE)와 모균주(CC01-0163)를 각각 실시예 1-2와 동일한 방법으로 배양하고 각 배양물로부터 생산된 푸트레신 농도를 측정하고 그 결과를 하기 표 6에 나타내었다.

[204]

[205] [표6]

균주명	푸트레신 (g/L)
CC01-0163	12.2
CC01-0163 Tn:lysCP1-argA Tn:lysCP1-argE	13.4

[206] 그 결과, 상기 표 6에 나타난 바와 같이, 대장균 유래 argA와 argE 유전자가 동시에 도입된 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주에서 푸트레신 생산량이 9.8% 증가하였음을 확인하였다.

[207]

[208] 실시예 3: 코리네 유래 Ncgl2644 유전자 강화 균주의 푸트레신 생산능 확인

[209]

[210] 3-1. ATCC13032 기반 푸트레신 생산 균주의 트랜스포존 유전자 내로의 ATCC13869 유래 Ncgl2644 도입 균주의 제작

[211] 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032 기반의 푸트레신 생산 균주(CC01-0163)에서 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13869 유래 GNAT(GCN5-related N-acetyltransferases) 패밀리의 N-아세틸트랜스퍼라제(GNAT family N-acetyltransferase)를 코딩하는 Ncgl2644 유전자를 강화하였을 때 푸트레신 생산능이 향상하는지를 확인하기 위해, Ncgl2644를 상기 균주의 트랜스포존 유전자 내로 도입 및 강화하였다.

[212] 이를 위해, 상기 코리네박테리움 유래 유전자 Ncgl2644의 염기서열(서열번호 2)로부터 Ncgl2644 ORF 부위의 상동 제조합 단편을 얻기 위한 서열번호 25 및 26의 프라이머 쌍을 제작하였다.

[213] 상기 프라이머의 서열은 하기 표 7과 같다.

[214]

[215] [표7]

서열번호	명칭	서열
25	Ncgl2644 ORF_F	GAGGAGATCAAAACACATATGACGCCTAGTCTT CCCCG
26	Ncgl2644 ORF_R	TTAGAATTTCCGTTTCGGCGTACC

[216] Ncgl2644 유전자를 획득하기 위하여, 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13869

균주의 염색체를 주형으로 서열번호 25 및 26의 프라이머 쌍을 이용하여 PCR을 수행하였다. 중합효소는 PfuUltra™ 고-신뢰 DNA 폴리머라제(Stratagene)를 사용하였으며, PCR 조건은 95°C에서 30초의 변성, 55°C에서 30초의 어닐링 및 72°C에서 1분의 신장 과정을 30회 반복하였다. 그 결과, PCR 결과물로 약 1kb의 Ncgl2644유전자 단편이 증폭되었으며, 이를 실시예 1-1에서 제작한 pDZTn 벡터에 실시예 1-1과 동일한 방법으로 실시예 2-1에서 수득한 lysCP1 프로모터 부위와 퓨전 클로닝하였다. 그 결과로 얻은 플라스미드를 pDZTn-lysCP1-Ncgl2644라 명명하였다.

- [217] 다음으로, 상기 플라스미드 pDZTn-lysCP1-Ncgl2644를 CC01-0163에 전기천공법으로 도입하여 형질전환체를 수득하고, 실시예 1-1과 동일한 방법으로 상기 플라스미드 pDZTn-lysCP1-Ncgl2644가 도입된 형질전환 균주를 선별하였다.
- [218] 상기 선별된 균주를 2차 교차에 의해 Ncgl2644를 코딩하는 유전자가 도입된 균주를 최종 선별하였다. 최종 선별된 균주를 대상으로 서열번호 25 및 26의 프라이머 쌍을 이용해 PCR을 수행하여 Ncgl2644를 코딩하는 유전자가 도입되었음을 확인하고, 상기 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주를 CC01-0163 Tn:lysCP1-Ncgl2644로 명명하였다.
- [219]
- [220] 3-2. 코리네 유래 Ncgl2644 유전자가 강화된 퓨트레신 생산 코리네박테리움 속 균주의 퓨트레신 생산능 평가
- [221] 퓨트레신 생산 균주에서 코리네박테리움 유래 Ncgl2644 유전자를 강화시켰을 때 퓨트레신 생산에 미치는 효과를 확인하기 위하여, 상기 실시예 3-1에서 제작한 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주를 대상으로 퓨트레신 생산능을 비교하였다.
- [222] 구체적으로, 상기 실시예 3-1에서 제작한 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주(CC01-0163 Tn:lysCP1- Ncgl2644)와 모균주(CC01-0163)를 각각 실시예 1-2와 동일한 방법으로 배양하고 각 배양물로부터 생산된 퓨트레신 농도를 측정하고 그 결과를 하기 표 8에 나타내었다.

[223]

[224] [표8]

균주명	퓨트레신 (g/L)
CC01-0163	12.0
CC01-0163 Tn:lysCP1-Ncgl2644	10.1

- [225] 그 결과, 상기 표 8에 나타난 바와 같이, 코리네박테리움 유래 Ncgl2644가 강화된 경우에는 퓨트레신 생산능이 감소하는 것을 확인하였다. 이는 퓨트레신 생산 경로의 중간 대사 물질인 아세틸 글루타메이트의 농도가 증가되면서

생합성 경로의 병목현상이 일어남에 따라 나타나는 현상일 수 있다. 이에, 하기의 추가적인 실시예를 통하여 푸트레신 생산에 대한 Ncgl2644의 영향성을 평가하였다.

[226]

[227] 실시예 4: argJ 유전자 결손, Ncgl2644 강화 균주의 푸트레신 생산능 확인

[228]

[229] 4-1. ATCC13032 기반 푸트레신 생산 균주의 argJ 결손 균주 제작

[230] 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032 기반의 푸트레신 생산 균주(CC01-0163)에서 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032 유래 argJ 유전자를 결손한 균주를 제작하였다.

[231] 이를 위해, 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032 유래 argJ 유전자의 염기서열(서열번호 8)로부터 argJ의 N-말단 부위의 상동 재조합 단편을 얻기 위한 서열번호 27 및 28의 프라이머 쌍과, argJ의 C-말단 부위의 상동 재조합 단편을 얻기 위한 서열번호 29 및 30의 프라이머 쌍을 제작하였다.

[232] 상기 프라이머의 서열은 하기 표 9와 같다.

[233]

[234] [표9]

서열번호	명칭	서열
27	argJ_N_F	CGGGATCCCACGCCTGTCTGGTCGC
28	argJ_N_R	ACGCGTCGACGGATCTAAAGCGGCGCTTC
29	argJ_C_F	ACGCGTCGACTCCGGCGCTGACATTGATGTCC
30	argJ_C_R	CTAGTCTAGAGAGCTGCACCAGGTAGACG

[235] argJ의 N-말단 부위와 C-말단 부위의 상동 재조합 단편을 각각 수득하기 위해, 상기 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032의 게놈 DNA를 주형으로 하고, 서열번호 27 및 28, 서열번호 29 및 30의 프라이머 쌍을 이용한 PCR을 각각 수행하였다. 중합효소는 PfuUltra™ 고-신뢰 DNA 폴리머라제(Stratagene)를 사용하였으며, PCR 조건은 95°C에서 30초의 변성, 55°C에서 30초의 어닐링 및 72°C에서 30초의 신장 과정을 30회 반복하였다. 그 결과, PCR 결과물로 N-말단 부위와 C-말단 부위의 PCR 단편이 각각 증폭되었으며, 이를 0.8% 아가로스 겔에서 전기 영동한 후 원하는 크기의 밴드를 용리하여 정제하였다.

[236]

[237] 수득된 N-말단 부위의 단편을 제한효소인 BamHI 및 SalI으로, C-말단 부위의 단편을 제한효소인 SalI 및 XbaI으로 처리하였으며, 처리된 단편을 제한효소인 BamHI과 XbaI으로 처리된 pDZ 벡터에 클로닝하여 플라스미드 pDZ-1'argJ(K/O)를 제작하였다.

[238] 제작한 플라스미드 pDZ-1'argJ(K/O)를 전기천공법으로 코리네박테리움

글루타미쿰 CC01-0163에 도입하여 형질전환체를 수득하고, 실시예 1-1과 동일한 방법으로 pDZ-1'NCglargJ(K/O)가 도입된 균주를 선발하였다.

[239] 상기 선발된 균주로부터 argJ를 코딩하는 유전자가 결실되어 푸트레신 생산성이 약화된 코리네박테리움 글루타미쿰 균주를 최종 선별하였으며, 상기와 같이 제작된 푸트레신 배출능이 약화된 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주를 CC01-0163 ΔargJ로 명명하였다.

[240] 제작된 CC01-0163 ΔargJ 균주에 실시예 3-1과 동일한 방법으로 Ncgl2644 유전자를 형질전환시켜 CC01-0163 ΔargJ Tn:lysCP1-Ncgl2644 균주를 제작하였다.

[241]

[242] 4-2. 코리네 유래 argJ 결손, Ncgl2644 유전자가 강화된 푸트레신 생산 코리네박테리움 속 균주의 푸트레신 생산능 평가

[243] 푸트레신 생산 균주에서 코리네박테리움 유래 argJ 유전자를 결손 및 Ncgl2644를 강화시켰을 때 푸트레신 생산에 미치는 효과를 확인하기 위하여, 상기 실시예 4-1에서 제작한 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주를 대상으로 푸트레신 생산능을 비교하였다.

[244] 구체적으로, 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주(CC01-0163 ΔargJ Tn:lysCP1-Ncgl2644)와 모균주(CC01-0163 ΔargJ)를 각각 각각 실시예 1-2와 동일한 방법으로 배양하고 각 배양물로부터 생산된 푸트레신 농도를 측정하고 그 결과를 하기 표 10에 나타내었다.

[245]

[246] [표10]

균주명	푸트레신 (g/L)
CC01-0163 ΔargJ	0.1
CC01-0163 ΔargJ Tn:lysCP1-Ncgl2644	0.3

[247] 그 결과, 상기 표 10에 나타난 바와 같이, argJ가 결손된 균주는 푸트레신 생산능을 가지기 어려운 것으로 확인되었으며, 아세틸글루타메이트(acetyl glutamate)를 생성할 수 있는 Ncgl2644가 도입되더라도 이후 생성되는 중간 대사 물질인 아세틸 오르니틴(acetyl ornithine)을 탈아세틸화시킬 수 있는 효소의 부재로 인해 푸트레신 생산이 낮은 것으로 사료되었다. 이에, 하기의 추가적인 실시예를 통하여 Ncgl2644 및 argE가 동시 강화된 균주에서 푸트레신 생산능을 평가하였다.

[248]

[249] 실시예 5: 코리네 유래 Ncgl2644 유전자 강화와 대장균 유래 argE 유전자 도입 균주의 푸트레신 생산능 확인

[250]

- [251] 5-1. ATCC13032 기반 푸트레신 생산 균주들에 대한 Ncgl2644 유전자 강화 균주 제작
- [252] 상기 실시예 3-1에서 제작된 CC01-0163 Tn:lysCP1-Ncgl2644 균주와 실시예 4-1에서 제작된 CC01-0163 Δ argJ Tn:lysCP1-Ncgl2644 균주에 아세틸 오르니틴(acetyl ornithine)을 탈아세틸화시킬 수 있는 대장균 W3110 유래 아세틸오르니틴 디아세틸라제(Acetylornithine deacetylase)를 코딩하는 argE 유전자를 도입하였다.
- [253] 구체적으로, 상기 실시예 2-1에서 제작된 pDZTn-lysCP1-argE 플라스미드를 실시예 2-1과 동일한 방법으로 CC01-0163 Tn:lysCP1-Ncgl2644 균주와 CC01-0163 Δ argJ Tn:lysCP1-Ncgl2644 균주에 형질전환하여 형질전환체를 수득하고, 실시예 1-1과 동일한 방법으로 상기 플라스미드 pDZTn-lysCP1-argE가 도입된 형질전환 균주를 선별하였다.
- [254] 상기 선별된 균주로부터 argE가 도입된 코리네박테리움 글루타미쿰 균주를 최종 선별하였으며, 상기와 같이 제작된 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주 CC01-0163 Tn:lysCP1-Ncgl2644 Tn:lysCP1-argE와 CC01-0163 Δ argJ Tn:lysCP1-Ncgl2644 Tn:lysCP1-argE를 제작하였으며, CC01-0163 Δ argJ Tn:lysCP1-Ncgl2644 Tn:lysCP1-argE의 경우 *Corynebacterium glutamicum* CC01-1425로 명명하였다. 또한, 상기 *Corynebacterium glutamicum* CC01-1425(CC01-0163 Δ argJ Tn:lysCP1-Ncgl2644 Tn:lysCP1-argE)는 2020년 7월 24일자로 기탁(KCCM12774P)하였다.
- [255]
- [256] 5-2. Ncgl2644 유전자 및 argE가 강화된 푸트레신 생산 코리네박테리움 속 균주의 푸트레신 생산능 평가
- [257] 푸트레신 생산 균주에서 코리네박테리움 유래 Ncgl2644를 강화 및 argE를 도입했을 때 푸트레신 생산에 미치는 효과를 확인하기 위하여, 상기 실시예 5-1에서 제작한 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주를 대상으로 푸트레신 생산능을 비교하였다.
- [258] 구체적으로, 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주(CC01-0163 Tn:lysCP1-Ncgl2644 Tn:lysCP1-argE, CC01-0163 Δ argJ Tn:lysCP1-Ncgl2644 Tn:lysCP1-argE)와 모균주(CC01-0163)를 각각 각각 실시예 1-2와 동일한 방법으로 배양하고 각 배양물로부터 생산된 푸트레신 농도를 측정하고 그 결과를 하기 표 11에 나타내었다.
- [259]

[260] [표11]

균주명	퓨트레신 (g/L)
CC01-0163	12.0
CC01-0163 Tn:lysCP1-Ncgl2644 Tn:lysCP1-argE	15.7
CC01-0163 Δ argJ Tn:lysCP1-Ncgl2644 Tn:lysCP1-argE	16.4

[261] 상기 표 11에 나타난 바와 같이, Ncgl2644와 argE가 동시에 도입되면서 CC01-0163 균주보다 현저히 향상된 퓨트레신 생산량을 확인할 수 있었다. 특히, argJ의 활성이 제거된 CC01-0163 Δ argJ Tn:lysCP1-Ncgl2644 Tn:lysCP1-argE 균주의 경우 CC01-0163 균주보다 36.6% 향상된 퓨트레신 생산능을 보이며, argJ의 활성이 남아있는 CC01-0163 Tn:lysCP1-Ncgl2644 Tn:lysCP1-argE 균주의 경우 argJ의 활성이 제거된 균주 대비 낮은 퓨트레신 생산능을 보이지만 CC01-0163 균주 대비 30.8%만 향상된 퓨트레신 생산능을 가지는 것으로 확인되었다. 또한, argJ의 활성이 남아있는 CC01-0163 Tn:lysCP1-Ncgl2644 Tn:lysCP1-argE 균주는 Ncgl2644와 유사한 기능을 나타내는 대장균 유래 argA와 argE 유전자가 동시에 도입된 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주보다 현저히 높은 퓨트레신 생산량을 나타내었다(표 6).

[262] 본 실시예의 결과를 통하여, argJ를 결손시키고 Ncgl2644와 argE를 동시 발현할 경우, argJ를 결손시키지 않거나, argJ를 결손시키고 Ncgl2644와 유사한 기능을 나타내는 대장균 유래 argA 및 argE를 도입했을 때보다 현저한 퓨트레신 생산능을 가지는 것을 확인하였다.

[263]

[264] 이상의 설명으로부터, 본 출원이 속하는 기술분야의 당 업자는 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 것으로서 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.

[265]

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> CC01-1425	국제 기탁기관에 부여한 수탁번호: KCCM12774P
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 2020년 7월 24일에 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: 2020. 7. 24.

상기 번역은 원문의 내용과 상위 없음을 증명함.

2020년 8월 13일

특허법인 한얼



청구범위

- [청구항 1] 코리네박테리움 속 균주 유래 N-아세틸트랜스퍼라제(N-acetyltransferase) 및 대장균 유래 아세틸오르니틴 디아세틸라제(Acetylornithine deacetylase, argE)의 활성이 도입된, 푸트레신 생산능을 가지는 코리네박테리움 속 미생물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 코리네박테리움 속 균주 유래 N-아세틸트랜스퍼라제는 서열번호 1 또는 이와 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것인, 코리네박테리움 속 미생물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 대장균 유래 아세틸오르니틴 디아세틸라제는 서열번호 3 또는 이와 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것인, 코리네박테리움 속 미생물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 코리네박테리움 속 미생물은 코리네박테리움 속 균주 유래 이중기능성 오르니틴 아세틸트랜스퍼라제/N-아세틸글루타메이트 신타제(bifunctional ornithine acetyltransferase/N-acetylglutamate synthase, argJ)의 활성이 약화된 것인, 코리네박테리움 속 미생물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 코리네박테리움 속 미생물은 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)인, 푸트레신 생산능을 가지는 코리네박테리움 속 미생물.
- [청구항 6] 코리네박테리움 속 균주 유래 N-아세틸트랜스퍼라제(N-acetyltransferase) 및 대장균 유래 아세틸오르니틴 디아세틸라제(Acetylornithine deacetylase, argE)의 활성이 도입된, 푸트레신 생산능을 가지는 코리네박테리움 속 미생물을 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, 푸트레신 생산 방법.
- [청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 방법은 배양된 배지 또는 미생물에서 푸트레신을 회수하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 푸트레신 생산 방법.
- [청구항 8] 제6항에 있어서, 상기 코리네박테리움 속 균주 유래 N-아세틸트랜스퍼라제는 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 것인, 푸트레신 생산 방법.
- [청구항 9] 제6항에 있어서, 상기 대장균 유래 아세틸오르니틴 디아세틸라제는 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는 것인, 푸트레신 생산 방법.
- [청구항 10] 코리네박테리움 속 균주 유래 N-아세틸트랜스퍼라제(N-acetyltransferase) 및 대장균 유래 아세틸오르니틴 디아세틸라제(Acetylornithine deacetylase, argE)의 활성이 도입된, 푸트레신 생산능을 가지는 코리네박테리움 속 미생물을 포함하는, 푸트레신 생산용 조성물.
- [청구항 11] 제10항에 있어서, 상기 코리네박테리움 속 균주 유래 N-아세틸트랜스퍼라제는 서열번호 1 또는 이와 90% 이상의 서열

- [청구항 12] 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것인, 푸트레신 생산용 조성물.
제10항에 있어서, 상기 대장균 유래 아세틸오르니틴 디아세틸라제는
서열번호 3 또는 이와 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을
포함하는 것인, 푸트레신 생산용 조성물.
- [청구항 13] 코리네박테리움 속 균주 유래 N-아세틸트랜스퍼라제(N-acetyltransferase)
및 대장균 유래 아세틸오르니틴 디아세틸라제(Acetylornithine deacetylase,
argE)의 활성이 도입된, 푸트레신 생산능을 가지는 코리네박테리움 속
미생물의 푸트레신 생산 용도.