

명세서

발명의 명칭: 신규 프로모터 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 출원은 신규한 프로모터 및 이를 이용한 목적 물질의 생산 방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 프로모터 활성을 가지는 신규 폴리뉴클레오티드, 이를 포함하는 벡터 및 숙주세포, 및 상기 미생물을 이용한 목적 물질의 생산 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 미생물에서 목적 물질(예를 들어, 아미노산)을 생산하는 공정은 친환경적이고 안전한 생산 방법으로 다양한 연구가 진행되어 왔으며, 그 중 코리네박테리움 속 미생물에서 목적 물질을 다량으로 생산하기 위한 연구가 지속적으로 이루어져 왔다. 코리네박테리움(*Corynebacterium* sp.) 속 미생물, 특히 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)은 L-아미노산 및 기타 유용물질 생산에 많이 이용되고 있는 그람 양성 미생물이다. 상기 L-아미노산 및 기타 유용물질을 생산하기 위하여, 고효율 생산 미생물 및 발효공정기술 개발을 위한 다양한 연구들이 수행되고 있다.
- [4] 코리네박테리움속 미생물에서 생산되는 대표적인 물질인 L-라이신은 동물사료, 사람의 의약품 및 화장품 산업에 사용되고 있으며 코리네박테리움 균주를 이용한 발효에 의해 생성되고 있다. L-라이신 생합성 관련 유전자가 강화된 미생물 및 이를 이용한 L-라이신 생산 방법 등이 알려져 있다(KR 10-0924065B1).
- [5] 또한, L-쓰레오닌은 필수 아미노산의 일종으로 사료 및 식품 첨가제로 널리 사용되며 의약품으로 수액제, 의약품의 합성 원료로도 사용된다. L-쓰레오닌은 식물성 단백질에 적게 들어 있어 동물 사료용 첨가제로서 유용하게 사용되고 있다. L-쓰레오닌은 주로 인공변이법 또는 유전자 재조합 방법에 의해 개발된 대장균 또는 코리네박테리움 미생물 등을 이용한 발효법으로 생산된다. 대표적으로, 대장균 유래의 쓰레오닌 오페론을 쓰레오닌 생산 균주인 브레비박테리움 플라븀(*Brevibacterium flavum*)에 도입하여 L-쓰레오닌을 생산하는, 유전자 재조합 균주를 이용하는 방법(TURBA E, et al, Agric. Biol. Chem. 53:2269~2271, 1989) 등이 알려져 있다.
- [6] O-아세틸 호모세린은 메치오닌 생산의 전구체로 사용되는 물질로 메치오닌 생합성 경로상에 있는 중간체이다(WO2008/013432). O-아세틸-L-호모세린은 호모세린 O-아세틸 트랜스퍼라아제(O-acetyl transferase)에 의해 L-호모세린 및 아세틸-CoA를 기질로 하여 합성된다.
- [7] L-이소류신은 다른 분지쇄 아미노산인 L-발린, L-류신과 주된 생합성 경로를

공유하고 있다. L-이소류신의 생합성 경로를 살펴보면 해당 과정(Glycolysis)에서 생성되는 피루브산(pyruvate)과 아스파르트산(Aspartate; Aspartic acid) 유래 아미노산인 L-쓰레오닌으로부터 생성된 2-케토부티르산(2-ketobutyrate)이 전구체로 사용된다. 두 개의 전구체로부터 아세트하이드록시산 신타제(acetohydroxy acid synthase, AHAS)라는 효소의 작용을 통해 2-아세트-2-하이드록시아세트산(2-aceto-2-hydroxyacetate)이 합성된 후, 아세트하이드록시산 아이소머리덕타제(acetohydroxy acid isomeroreductase)를 통해 2,3-디하이드록시-3-메틸발레르산(2,3-dihydroxy-3-methylvalerate)이 생성된다. 그 후, 디하이드록시산 디하이드라타제(dihydroxy acid dehydratase)를 통해 2-케토-3-메틸발레르산(2-keto-3-methylvalerate)을 거쳐 아미노트랜스퍼라제(aminotransferase)의 반응을 통해 최종적으로 L-이소류신이 생산된다. 또한, 상기 아세트하이드록시산 신타아제는 피루브산(pyruvate)의 디카르복실화(decarboxylation)와 다른 피루브산 분자와의 축합 반응을 촉매하여 발린 및 류신의 전구체인 아세트젯산을 생산한다.

- [8] L-트립토판은 필수 아미노산의 하나로 사료 첨가제 등, 또는 수액제 등의 의약품 원료 및 건강식품소재 등으로 널리 사용되어 왔다. 현재에는 미생물을 이용한 직접 발효법이 L-트립토판 생산에 주로 이용되고 있다.
- [9] L-타이로신은 아미노산의 하나로써, 약품 원료와 식품 첨가제, 동물 사료, 영양제 등의 중요 소재로 사용된다. 상기 L-타이로신 및 기타 유용물질을 생산하기 위하여, 고효율 생산 미생물 및 발효공정기술 개발을 위한 다양한 연구들이 수행되고 있다. 미생물의 L-타이로신 생산 과정은 5탄당 회로의 중간 물질인 E4P(Erythrose-4-Phosphate)와 해당과정(glycolysis)의 중간 물질인 PEP(Phosphoenolpyruvate)가 중합 반응하여 만들어지는 DAHP(3-Deoxy-D-arobino-heptulosonate-7-phosphate)로부터 시작된다. 이후 DAHP는 방향족 공통 생합성 경로를 거쳐 코리스믹산(chorismate)에서 프레펜산(prephenate)을 거쳐 L-타이로신 생합성 경로를 통해 최종적으로 L-타이로신으로 전환된다. 이 과정에서 코리스믹산은 L-트립토판으로 프레펜산은 L-타이로신 또는 L-페닐알라닌으로 분기 될 수 있다. 따라서, L-타이로신 생산량을 늘리기 위해 방향족 공통 생합성 경로를 강화할 경우에 L-트립토판과 L-페닐알라닌의 생산도 동시에 늘어날 것으로 예상할 수 있다. 즉, L-타이로신을 생산하고자 하는 경우, 부산물로서 페닐알라닌과 트립토판이 함께 생산되므로 유전자 재조합 및 정제 등의 다양한 연구가 수반되어야 한다. 한편, L-트립토판은 미생물이 생산하는 L-트립토판 농도에 따라 억제자(repressor)와 조절자(attenuator)가 이의 생산을 동시에 조절하는 것으로 알려져 있다(한국등록특허10-0792095 B1).
- [10] L-페닐알라닌은 감미제인 L-아스파르틸-L-페닐알라닌 메틸 에스테르의 출발 물질이다.
- [11] 특정한 유용 물질에 제한되지 않는 범용적인 프로모터를 개발할 경우, 다양한

유용 물질 생산에 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

- [12] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 코리네박테리움 속 미생물에서 높은 생산성으로 목적물질을 제조할 수 있는 신규한 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드를 개발하였고, 이를 미생물에 도입하면 목적하는 물질의 생산성을 증가시킬 수 있음을 확인하여 본 출원을 완성하였다.

[13]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [14] 본 발명자들은 신규한 프로모터 활성을 가지는 폴리뉴클레오티드를 제조하기 위해 예의 노력한 결과, 목적 유전자 프로모터를 염기치환을 통해 개량시키고, 개량된 프로모터가 이와 작동가능하게 연결된 유전자의 발현을 조절시킬 수 있음을 확인함으로써 본 출원을 완성하였다.

[15]

과제 해결 수단

- [16] 본 출원의 하나의 목적은 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드 서열에서 218번, 219번, 220번, 221번, 222번, 225번 및 227번 뉴클레오티드가 다른 뉴클레오티드로 치환된 프로모터 활성을 가지는 폴리뉴클레오티드를 제공하는 것이다.
- [17] 본 출원의 다른 하나의 목적은 상기 폴리뉴클레오티드; 및 상기 폴리뉴클레오티드와 작동 가능하게 연결된 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 유전자 발현 카세트를 제공하는 것이다.
- [18] 본 출원의 또 다른 하나의 목적은 상기 폴리뉴클레오티드; 및 상기 폴리뉴클레오티드와 작동 가능하게 연결된 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 숙주세포를 제공하는 것이다.
- [19] 본 출원의 또 다른 하나의 목적은 상기 숙주세포를 배지에서 배양하는 단계; 및 상기의 배지에서 목적 물질을 회수하는 단계를 포함하는, 목적 물질을 생산하는 방법을 제공하는 것이다.
- [20] 본 출원의 또 다른 하나의 목적은 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드 서열에서 218번, 219번, 220번, 221번, 222번, 225번 및 227번 뉴클레오티드가 다른 뉴클레오티드로 치환된 폴리뉴클레오티드의 프로모터로서의 용도를 제공한다.

[21]

발명의 효과

- [22] 본 출원의 신규 프로모터는 목적 물질을 생산하는 미생물에 도입되어 미생물의 목적 물질 생산량을 증가시킬 수 있다. 향상된 생산 수율로 인해, 산업적인 면에서 생산의 편의성과 함께 제조원가 절감 등의 효과를 기대할 수 있다.

[23]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [24] 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.
- [25] 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.
- [26]
- [27] 본 출원의 하나의 양태는 프로모터 활성을 가지는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [28] 구체적으로, 본 출원의 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드 서열에 하나 이상의 뉴클레오티드 치환을 포함하는, 프로모터 활성을 가지는 폴리뉴클레오티드일 수 있다.
- [29] 본 출원에서 용어, "폴리뉴클레오티드"는 뉴클레오티드 단위체(monomer)가 공유결합에 의해 길게 사슬모양으로 이어진 뉴클레오티드의 중합체(polymer)로 일정한 길이 이상의 DNA 가닥이다.
- [30] 본 출원에서 용어 "프로모터"는 폴리머라제(polymerase)에 대한 결합 부위를 포함하고 프로모터 목적 유전자의 mRNA로의 전사 개시 활성을 가지는, 코딩 영역의 상위(upstream)의 비 해독된 뉴클레오티드 서열, 즉 폴리머라제가 결합하여 유전자의 전사를 개시하도록 하는 DNA 영역을 의미한다. 상기 프로모터는 mRNA 전사 개시부위의 5' 부위에 위치할 수 있다.
- [31] 본 출원에서 용어, "프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드"는 뒤에 작동가능하게 연결시키는 유전자, 즉 목적 유전자의 발현을 위해 RNA 폴리머라제 또는 인핸서 등이 결합하는 부위를 포함하는 목적 유전자의 전사시키는 부위 근처에 존재하는 DNA 영역을 의미한다. 본 출원의 목적상 상기 폴리뉴클레오티드는 범용적 프로모터로 이용될 수 있으며, 상기 폴리뉴클레오티드는, 세포 내에서, 기존의 프로모터 또는 세포 내재 프로모터와 비교하여, 이와 작동 가능하게 연결된 목적 유전자의 발현, 상기 목적 유전자에 의하여 암호화되는 단백질의 생산 및/또는 활성이 조절(예컨대, 증가 또는 감소)되는 것일 수 있으며, 상기 단백질이 생산에 관여하는 목적 산물(생물학적 활성 물질로서 예를 들어, 아미노산, 핵산, 비타민, 단백질, 지방산 및 유기산 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상)의 생산 및/또는 활성을 조절(예컨대, 증가 또는 감소)시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [32] 예를 들어, 본 출원의 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드는 트랜스케톨라제(Transketolase, tkt) 활성을 갖는 폴리펩티드의 발현을 강화시킬 수 있는 프로모터로 사용될 수 있다. 또한 상기 폴리뉴클레오티드는 목적 물질, 구체적으로, 라이신, 쓰레오닌, O-아세틸 호모세린, 이소류신, 트립토판, 타이로신 또는 페닐알라닌의 생산, 또는 생산량을 증가시키는 데 관여하는

폴리뉴클레오티드 일 수 있다.

[33]

[34] 본 출원의 폴리뉴클레오티드는 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드 서열이라면 제한 없이 포함될 수 있다.

[35]

[36] 일 구현예로, 본 출원의 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1의 뉴클레오티드 서열 중 하나 이상의 뉴클레오티드가 다른 뉴클레오티드로 치환된, 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것일 수 있다. 구체적으로, 본 출원에서, 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드 서열에 1 이상, 2 이상, 3 이상, 4 이상, 5 이상, 6 이상, 또는 7 이상의 뉴클레오티드 치환을 포함하는, 프로모터 활성을 가지는 폴리뉴클레오티드일 수 있다. 상기 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드는 본원에서 "변이형 프로모터"와 혼용 될 수 있으며, 본 명세서에서는 상기 기술된 용어가 모두 사용될 수 있다.

[37]

본 출원에서, 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드 서열은 트랜스케톨라제의 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드의 한 예로 들 수 있다. 또한, 프로모터 활성을 갖는 한, 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드 서열에서 특정 뉴클레오티드가 치환된 폴리뉴클레오티드 역시 트랜스케톨라제의 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드일 수 있다. 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드 서열은 변이 위치를 표시하기 위한 대표적인 폴리뉴클레오티드 서열일 수 있으며, 프로모터 활성을 가지는 이에 상응하는 다른 폴리뉴클레오티드 서열 역시 변이를 도입할 수 있는 서열에 포함된다. 예를 들어 트랜스케톨라제(Transketolase, tkt) 혹은 이에 상응하는 활성을 갖는 폴리펩티드의 프로모터 역할을 할 수 있는 폴리뉴클레오티드 서열이라면 본 출원의 변이를 도입할 수 있는 서열의 범위에 제한 없이 포함될 수 있다.

[38]

상기 서열번호 1의 뉴클레오티드 서열은 공지의 데이터 베이스인 NCBI Genbank에서 그 서열을 확인할 수 있으며, 상기 트랜스케톨라제의 프로모터 역할을 할 수 있는 서열로 상기 서열번호 1에 상응하는 서열은 코리네박테리움 (*Corynebacterium* sp.) 유래일 수 있고, 구체적으로는 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)의 서열일 수 있으나, 상기 폴리뉴클레오티드와 동등 또는 그 이상의 활성을 갖는 서열은 본 출원의 프로모터에 제한 없이 포함될 수 있다.

[39]

[40] 본 출원의 상기 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드는 기존의 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드 서열에서, 특이적 위치의 뉴클레오티드가 치환되어 프로모터 활성이 강화된 것일 수 있다.

[41]

일 구현예로, 본 출원의 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1의 뉴클레오티드 서열 중 하나 이상의 뉴클레오티드가 다른 뉴클레오티드로

치환된, 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것일 수 있다. 구체적으로 서열번호 1의 뉴클레오티드 서열 중 하나 이상의 뉴클레오티드가 다른 뉴클레오티드로 치환된, 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드로 이루어진 것일 수 있다. 상기 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드는 본원에서 "변이형 프로모터"와 혼용 될 수 있다.

- [42] 일 구현예로, 상기 변이형 프로모터는 서열번호 1의 218번, 219번, 220번, 221번, 222번, 225번 및 227번 뉴클레오티드로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 뉴클레오티드의 다른 뉴클레오티드로의 치환을 포함하는, 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드 일 수 있다. 구체적으로, 상기 변이형 프로모터는 상기 위치에서 어느 하나 이상, 둘 이상, 셋 이상, 넷 이상, 다섯 이상, 여섯 이상 또는 일곱 위치 모두 또는 이들의 상응하는 위치에서 다른 뉴클레오티드로 치환된 것일 수 있다.
- [43] 상기 "다른 뉴클레오티드"는 치환 전의 뉴클레오티드와 다른 것이면, 제한되지 않는다. 예를 들어, "서열번호 1에서 218번 뉴클레오티드가 다른 뉴클레오티드로 치환되었다"고 기재하는 경우, 시토신(C)을 제외한 아데닌(A), 티민(T), 구아닌(G)으로 치환되는 것을 의미한다. 또한 달리 표시하지 않더라도 본 출원에서 어떤 뉴클레오티드가 "치환되었다"고 기재하는 경우, 치환 전의 뉴클레오티드와 다른 뉴클레오티드로 치환되는 것을 의미한다.
- [44] 한편, 당업자라면 당업계에 알려진 서열 얼라인먼트를 통해 임의의 폴리뉴클레오티드 서열에서 본 출원의 서열번호 1의 218번, 219번, 220번, 221번, 222번, 225번, 227번 뉴클레오티드에 상응하는 위치의 뉴클레오티드를 파악할 수 있으며, 본 출원에서 별도로 기재하지 않더라도 "특정 서열번호에서 특이적 위치의 뉴클레오티드"를 기재하는 경우, 임의의 폴리뉴클레오티드 서열에서 그와 "상응하는 위치의 뉴클레오티드"까지 포함하는 의미임은 자명하다. 따라서 프로모터 활성을 갖는 임의의 폴리뉴클레오티드 서열 내에서 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드 218번, 219번, 220번, 221번, 222번, 225번 및 227번에 상응하는 위치의 뉴클레오티드로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 뉴클레오티드가 다른 뉴클레오티드로 치환된 폴리뉴클레오티드 서열 역시 본 출원의 범위에 포함된다.
- [45] 일 예로, 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드의 218번, 219번, 220번, 221번, 222번, 225번 및 227번에 상응하는 위치 중 1 이상, 2이상, 3이상, 4이상, 5이상, 6이상, 또는 7개 뉴클레오티드를 다른 뉴클레오티드로 치환할 경우, 비치환된(비변형된) 프로모터 서열보다 더 높은 활성을 갖는 프로모터를 제공할 수 있다.
- [46] 구체적으로, 본 출원의 프로모터 활성을 가지는 폴리뉴클레오티드는 상기 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드 서열에서 218번, 219번, 220번, 221번, 222번, 225번 및 227번 뉴클레오티드가 다른 뉴클레오티드로 치환된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [47] 구체적인 예로, 본 출원의 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드 서열에서 218번 뉴클레오티드인 시토신(C)이 티민(T)으로, 219번 뉴클레오티드인 시토신(C)이 구아닌(G)으로, 220번 뉴클레오티드인 아데닌(A)이 티민(T)으로, 221번 뉴클레오티드인 아데닌(A)이 구아닌(G)으로, 222번 뉴클레오티드인 티민(T)이 구아닌(G)으로, 225번 뉴클레오티드인 아데닌(A)이 티민(T)으로, 227번 뉴클레오티드인 시토신(C)이 아데닌(A)으로 치환된 폴리뉴클레오티드일 수 있다.
- [48] 보다 구체적인 예로, 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오티드 일 수 있다. 구체적으로, 본 출원에서 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 2의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하거나, (필수적으로) 구성되는 것일 수 있다.
- [49] 또한 전술한 구현예에 제한되지 않고, 프로모터 활성을 크게 감소시키지 않는 범위에서 폴리뉴클레오티드 서열에 다양한 변형도 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 출원의 뉴클레오티드 서열은 종래 알려진 돌연변이 유발법, 예를 들어 방향성 진화법(direct evolution) 및 부위특이적 돌연변이법(site-directed mutagenesis)등에 의하여 변형될 수 있다.
- [50] 이때, 상기 용어 "변이"는 유전적 또는 비유전적으로 안정적인 표현형적 변화를 의미하며, 본 명세서에서 "변형" 또는 "돌연변이"와 혼용되어 명명될 수 있다.
- [51] 따라서, 본 출원에서 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드는, 서열번호 1, 또는 서열번호 2, 또는 상기 서열번호 1 또는 서열번호 2와 적어도 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 상동성(homology) 또는 동일성(identity)을 가지는 폴리뉴클레오티드 서열일 수 있다. 상동성 또는 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열은 상기 범주 중 100% 동일성을 갖는 서열은 제외되거나, 100% 미만의 동일성을 갖는 서열일 수 있다.
- [52] 한편 본 출원에서 '특정 서열번호로 기재된 뉴클레오티드 서열을 가지는 폴리뉴클레오티드', '특정 서열번호로 기재된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드' 라고 기재되어 있다 하더라도, 해당 서열번호의 뉴클레오티드 서열로 구성된 폴리뉴클레오티드와 동일 혹은 상응하는 활성을 가지는 경우라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 뉴클레오티드 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드도 본 출원에서 사용될 수 있음은 자명하다.
- [53] 예를 들어, 상기 폴리뉴클레오티드와 동일 혹은 상응하는 활성을 가지는 경우라면 해당 서열번호의 뉴클레오티드 서열 내부나 말단에 무의미한 서열이 부가되거나 혹은 해당 서열번호의 뉴클레오티드 서열 내부나 말단의 일부 서열이 결실된 폴리뉴클레오티드도 본원의 범위 내에 속하는 것이 자명하다.
- [54]
- [55] 상동성(homology) 및 동일성(identity)은 두 개의 주어진 염기 서열과 관련된 정도를 의미하며 백분율로 표시될 수 있다.

- [56] 용어 상동성 및 동일성은 종종 상호교환적으로 이용될 수 있다.
- [57] 보존된(conserved) 폴리뉴클레오티드의 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 코돈 대신 축퇴 코돈을 함유하는 폴리뉴클레오티드 또한 고려된다.
- [58] 임의의 두 폴리뉴클레오티드 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.
- [59] 폴리뉴클레오티드의 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 정의한다. 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. 따라서, 본원에서 사용된 것으로서, 용어 "상동성" 또는 "동일성"은 서열들간의 관련성(relevance)을 나타낸다.
- [60] 또한 공지의 유전자 서열로부터 조제될 수 있는 프로브, 예를 들어 전술한

폴리뉴클레오티드 서열의 전체 또는 일부에 대한 상보 서열과 엄격한 조건 하에 하이브리드화하고 동일한 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드 서열이라면 제한 없이 포함할 수 있다. 상기 "엄격한 조건(stringent condition)"이란 폴리뉴클레오티드 간의 특이적 혼성화를 가능하게 하는 조건을 의미한다. 이러한 조건은 문헌(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)에 구체적으로 기재되어 있다. 예를 들어, 상동성(homology) 또는 동일성(identity)이 높은 유전자끼리, 40% 이상, 구체적으로는 70% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 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.

- [61] 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 출원은 또한 실질적으로 유사한 핵산 서열뿐만 아니라 전체 서열에 상보적인 단리된 핵산 단편을 포함할 수 있다.
- [62] 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.
- [63] 폴리뉴클레오티드를 혼성화하는 적절한 엄격도는 폴리뉴클레오티드의 길이 및 상보성 정도에 의존하고 변수는 해당기술분야에 잘 알려져 있다(Sambrook et al., *supra*, 9.50-9.51, 11.7-11.8 참조).
- [64] 본 출원의 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드는 표준 분자 생물학 기술을 이용하여 분리 또는 제조할 수 있다. 예를 들어, 자동화된 DNA 합성기를 이용하는 표준 합성 기술을 이용하여 제조할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [65]
- [66] 본 출원의 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드는 프로모터로서 이용될 수 있다.

- [67] 상기 프로모터는 mRNA로의 전사 개시부위의 5' 부위에 위치할 수 있다.
- [68] 상기 프로모터는 종래의 프로모터에 비하여 증가 또는 감소된 프로모터 활성을 가질 수 있다. 즉, 숙주 세포에서 목적 유전자의 발현뿐만 아니라 목적 유전자에 의해 코딩되는 단백질의 발현 및/또는 활성을 증가 또는 감소시킬 수 있다. 본 출원의 목적상, 생산하고자 하는 산물에 따라 발현 강화 또는 약화를 위한 목적 유전자가 변경될 수 있고, 상기 프로모터는 목적 유전자의 강화 또는 약화를 위한 범용적 프로모터로서 사용될 수 있다.
- [69]
- [70] 본 출원의 다른 하나의 양태는 상기 폴리뉴클레오타이드 및 목적 유전자를 포함하는 유전자 발현 카세트를 제공한다.
- [71] 본 출원의 폴리뉴클레오타이드는 앞서 설명한 바와 같다.
- [72] 본 출원에서 용어 "유전자 발현 카세트"란, 프로모터와 목적 유전자를 포함하고 있어서, 프로모터 하류에 작동 가능하게 연결되어 있는 목적 유전자를 발현시킬 수 있는 단위 카세트를 의미한다. 이와 같은 유전자 발현 카세트의 내부 또는 외부에는 상기 목적 유전자의 효율적인 발현을 도울 수 있는 다양한 인자가 포함될 수 있다. 상기 유전자 발현 카세트는 통상 상기 목적 유전자에 작동 가능하게 연결되어 있는 프로모터(promoter) 외에 전사 종결신호, 리보솜 결합부위 및 번역 종결신호를 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [73]
- [74] 상기 "목적 유전자"는, 본 출원의 목적상 본 출원의 프로모터 서열에 의해 발현을 조절하고자 하는 유전자를 의미한다. 상기 목적 유전자에 의해 코딩되는 단백질은 "목적 단백질"로 표현할 수 있고, 상기 "목적 단백질"을 코딩하는 유전자는 "목적 유전자"로 표현할 수 있다.
- [75] 또한, 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 코돈의 축퇴성(degeneracy)으로 인하여 또는 상기 폴리뉴클레오타이드를 발현시키고자 하는 생물에서 선호되는 코돈을 고려하여, 폴리펩티드 서열을 변화시키지 않는 범위 내에서 코딩 영역에 다양한 변형이 이루어질 수 있다. 폴리뉴클레오타이드 서열에 대한 설명은 전술한 바와 같다.
- [76] 일 구현예로, 상기 목적 단백질은, 트랜스케톨라제(Transketolase, tkt) 활성을 갖는 폴리펩티드일 수 있다. 즉, 상기 프로모터의 목적 유전자는 트랜스케톨라제(Transketolase, tkt) 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 유전자일 수 있다.
- [77] 본 출원에서 "트랜스케톨라제(Transketolase, tkt)"는 오탄당 인산 경로에 영향을 미치는 효소로서 D-크실룰로오스-5-인산과 D-리보오스-5-인산으로부터 D-세도헥툴로오스-7-인산과 D-글리세르알데히드-3-인산을 생성하며, 이의 활성 조절을 통해 라이신, 쓰레오닌, O-아세틸 호모세린, 이소류신, 트립토판, 타이로신 및 페닐알라닌 등의 유용 물질 생산성 향상 효과를 얻을 수 있다.
- [78] 트랜스케톨라제를 코딩하는 유전자의 예로는, 코리네박테리움 글루타미쿰

ATCC13032의 tkt 유전자(NCg11512) 등이 있을 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 당업자는 공지의 데이터 베이스(GenBank 등)에서 트랜스케톨라제를 코딩하는 유전자 정보를 쉽게 얻을 수 있다.

- [79] 또한 상기 트랜스케톨라제를 구성하는 아미노산 서열은 공지의 데이터 베이스인 NCBI의 GenBank에서 그 서열을 얻을 수 있다. 일 예로, 코리네박테리움 글루타미쿰 유래일 수 있다.
- [80] 또한, 본 출원의 "트랜스케톨라제 활성을 갖는 폴리펩티드"는 상기 트랜스케톨라제의 야생형, 비변이형 혹은 자연형뿐만 아니라, 이와 동일한 활성을 갖거나, 이보다 활성이 강화된 변이체 또한 포함한다.
- [81] 본 출원에서, "변이형 폴리펩티드"는 "변이체(variant)"와 동일한 의미로, 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.
- [82] 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 증가될 수 있다. 또한, 일부 변이체는 N-말단 리더 서열 또는 막전이 도메인(transmembrane domain)과 같은 하나 이상의 부분이 제거된 변이체를 포함할 수 있다.
- [83] 상기 용어 "변이체"는 변이형, 변형, 변이된 단백질, 변이 등의 용어(영문 표현으로는 modification, modified protein, modified polypeptide, mutant, mutein, divergent, variant 등)가 사용될 수 있으며, 변이된 의미로 사용되는 용어라면 이에 제한되지 않는다. 본 출원의 목적상, 상기 변이체는 천연의 야생형 또는 비변형 단백질 대비 변이된 단백질의 활성이 증가된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [84] 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.
- [85] 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.

- [86]
- [87] 본 출원의 트랜스케톨라제 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 유전자는 "tkt 유전자"로 칭할 수 있다.
- [88] 상기 유전자는 코리네박테리움 속 미생물 유래, 구체적으로는 코리네박테리움 글루타미쿰 유래일 수 있다.
- [89] 본 출원에서 "tkt 유전자" 즉 트랜스케톨라제 활성을 갖는 폴리펩티드를 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.
- [90] 본 출원의 트랜스케톨라제 활성을 갖는 폴리펩티드는 변이체 서열도 포함하며, 구체적으로는 트랜스케톨라제의 강화된 활성을 나타내도록 변이된 단백질 변이체도 포함할 수 있다.
- [91]
- [92] 본 출원의 다른 하나의 양태는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하거나, 상기 폴리뉴클레오티드와 작동 가능하게 연결된 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 유전자 발현 카세트를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.
- [93] 본 출원의 폴리뉴클레오티드, 목적 단백질 및 유전자 발현 카세트는 앞서 설명한 바와 같다.
- [94] 일 구현예로, 상기 목적 단백질은 트랜스케톨라제 활성을 갖는 폴리펩티드 일 수 있다.
- [95] 본 출원에서 용어 "벡터"는 적합한 숙주 내에서 목적 유전자를 발현시킬 수 있도록 유전 물질을 보유하는 인위적 DNA 분자로서, 구체적으로, 이에 작동 가능하게 연결된 목적 단백질을 코딩하는 유전자의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 DNA 제조물을 의미한다.
- [96] 본 출원에서 용어 "작동 가능하게 연결된"(operatively linked)은 본 출원의 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드가 목적 유전자의 전사를 개시 및 매개하도록 상기 유전자 서열과 기능적으로 연결되어 있는 것을 의미한다. 작동 가능한 연결은 당업계의 공지된 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당업계의 절단 및 연결 효소 등을 사용하여 제작할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [97] 본 출원의 목적 상, 상기 조절 서열에는, 본 출원의 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드가 포함될 수 있다.
- [98] 한편 상기 조절 서열은 전사를 개시할 수 있는 프로모터, 그러한 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합부위를 코딩하는 서열, 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열 등의 구성을 포함할 수 있다. 벡터는 적당한 숙주세포 내로 형질전환된 후, 숙주 세포와 무관하게

복제되거나 기능할 수 있으며, 게놈 그 자체에 통합될 수 있다.

- [99] 본 출원에서 사용되는 벡터는 숙주세포 내에서 발현 가능한 것이면 특별히 제한되지 않으며, 당업계에 알려진 임의의 벡터를 이용하여 숙주세포를 형질전환시킬 수 있다. 통상 사용되는 벡터의 예로는 천연 상태이거나 재조합된 상태의 플라스미드, 코스미드, 바이러스 및 박테리오파지를 들 수 있다.
- [100] 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 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로는 pDZ, pDC, pDCM2, pACYC177, pACYC184, pCL, pECCG117, pUC19, pBR322, pMW118, pCC1BAC 벡터 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 폴리뉴클레오티드의 염색체 내로의 삽입은 당업계에 알려진 임의의 방법, 예를 들면, 상동재조합에 의하여 이루어질 수 있다.
- [101] 본 출원의 벡터는 상동재조합을 일으켜서 염색체 내로 삽입될 수 있으므로 상기 염색체 삽입 여부를 확인하기 위한 선별 마커(selection marker)를 추가로 포함할 수 있다. 선별 마커는 벡터로 형질전환된 세포를 선별, 즉 폴리뉴클레오티드의 삽입 여부를 확인하기 위한 것으로, 약물 내성, 영양 요구성, 세포 독성제에 대한 내성 또는 표면 단백질의 발현과 같은 선택가능 표현형을 부여하는 마커들이 사용될 수 있다. 선택제(selective agent)가 처리된 환경에서는 선별 마커를 발현하는 세포만 생존하거나 다른 표현 형질을 나타내므로, 형질전환된 세포를 선별할 수 있다.
- [102] 본 출원에서 용어 "형질전환"은 표적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 숙주세포 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 표적 단백질을 코딩하는 DNA 및 RNA를 포함하며, 숙주세포 내로 도입되어 발현될 수 있는 것이면, 어떠한 형태로 도입되는 것이든 상관없다. 예를 들면, 상기 폴리뉴클레오티드는 자체적으로 발현되는데 필요한 모든 요소를 포함하는 유전자 구조체인 발현 카세트(expression cassette)의 형태 또는 이를 포함하는 벡터의 형태로 숙주세포에 도입될 수 있다.
- [103] 상기 형질전환하는 방법은 상기 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 세포 내로 도입하는 모든 방법을 포함하며, 숙주세포에 따라 당 분야에서 공지된 바와 같이 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 예를 들어, 전기천공법(electroporation), 인산칼슘(CaPO_4) 침전, 염화칼슘(CaCl_2) 침전, 미세주입법(microinjection), 폴리에틸렌글리콜(PEG)법, DEAE-텍스트란법, 양이온 리포솜법, 및 초산 리튬-DMSO법 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [104]
- [105] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 상기 폴리뉴클레오티드; 및 상기 폴리뉴클레오티드와 작동 가능하게 연결된 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 숙주세포를 제공한다.
- [106] 구체적으로, 상기 숙주세포는 코리네박테리움 속 미생물, 보다 구체적으로 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [107] 상기 폴리뉴클레오티드, 목적 단백질은 앞서 설명한 바와 같다.
- [108]
- [109] 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. 구체적으로는, 본 출원의 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드와 목적 단백질을 포함하는 미생물일 수 있다.
- [110] 상기 목적 단백질은 트랜스케톨라제(Transketolase, tkt) 활성을 갖는 폴리펩티드일 수 있다. 본 출원의 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드, 목적 단백질, 트랜스케톨라제(Transketolase, tkt) 활성을 갖는 폴리펩티드, 및 벡터에 대해서는 전술한 바와 같다.
- [111] 상기 미생물은 코리네박테리움 속 미생물일 수 있고, 구체적으로는 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)일 수 있다.
- [112] 상기 미생물은 트랜스케톨라제를 발현하는 미생물, 또는 트랜스케톨라제 활성을 갖는 폴리펩티드를 발현하는 미생물, 또는 트랜스케톨라제 활성을 갖는 폴리펩티드가 도입된 미생물 일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [113] 본 출원에서, 상기 미생물은 본 출원의 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있고, 구체적으로 상기 폴리뉴클레오티드 및/또는 상기 폴리뉴클레오티드와 작동 가능하게 연결되고 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함할 수 있다. 또는, 상기 미생물은 상기 폴리뉴클레오티드 또는 유전자 발현 조절 서열 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 폴리뉴클레오티드, 상기 목적 단백질을 코딩하는 유전자 및 벡터는 형질전환에 의해 상기 미생물에 도입될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 나아가, 상기 미생물은 상기 유전자가 발현될 수 있다면, 상기 폴리뉴클레오티드 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자가, 염색체 상에 위치하거나 염색체 외에 위치하는 것과는 무관하다.
- [114] 본 출원에서 용어, 단백질이 "발현되도록/되는"은 목적 단백질, 예를 들어 트랜스케톨라제 혹은 이의 변이체가 미생물 내에 도입되거나, 미생물 내에서 발현되도록 변형된 상태를 의미한다. 상기 목적 단백질이 미생물 내 존재하는 단백질인 경우 내재적 또는 변형 전에 비하여 그 활성이 강화된 상태를 의미할

수 있다.

- [115] 구체적으로, "단백질의 도입"은, 미생물이 본래 가지고 있지 않았던 특정 단백질의 활성을 나타나게 되는 것 또는 해당 단백질의 내재적 활성 또는 변형 전 활성에 비하여 향상된 활성을 나타나게 되는 것일 수 있다. 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.
- [116] 또한, "활성의 강화"는 미생물이 가진 특정 단백질의 내재적 활성 또는 변형 전 활성에 비하여 활성이 향상된 것일 수 있다. "내재적 활성"은 자연적, 또는 인위적 요인에 의한 유전적 변이로 미생물의 형질이 변화하는 경우, 형질 변화 전 모균주가 본래 가지고 있던 특정 단백질의 활성을 의미하는 것일 수 있다.
- [117] 본 출원의 목적 상, 상기 활성 강화는 본 출원의 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드 서열을 목적 단백질의 발현 조절 서열로 사용하여 이루어지는 것일 수 있다. 상기 목적 단백질은 전술한 바와 같이 자연형 혹은 변이형 일 수 있으므로, 상기 발현 조절 서열은 단백질 변이체를 암호화하는 유전자의 발현 조절 서열이거나, 염색체 상의 자연형 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 조절 서열일 수 있다.
- [118] 그 밖에, 다른 활성 강화 방법 또한 조합하여 사용할 수 있다. 예를 들어, 본 출원의 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드 서열을 목적 단백질의 발현 조절 서열로 사용하는 것 이외에도, 목적 단백질을 코딩하는 유전자의 세포 내 카피수 증가, 염색체 상의 자연형 단백질을 코딩하는 유전자를 상기 단백질 변이체를 암호화하는 유전자로 대체하는 방법, 상기 단백질 변이체의 활성이 강화되도록 상기 단백질을 암호화하는 유전자에 변이를 추가적으로 도입시키는 방법, 및 미생물에 단백질 변이체를 도입하는 방법으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 방법을 사용할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [119] 본 출원의 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드를 미생물에서 목적 단백질의 발현 조절로 사용함으로써, 목적 단백질의 활성이 강화될 수 있다.
- [120] 예를 들어, 상응하는 단백질의 활성 또는 농도가 야생형이나 비변형 미생물 균주에서의 단백질의 활성 또는 농도를 기준으로 하여 일반적으로 최소 1%, 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400% 또는 500%, 최대 1000% 또는 2000%까지 증가되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [121] 본 출원에서 용어 "비변형 미생물"은 미생물에 자연적으로 발생할 수 있는 돌연변이를 포함하는 균주를 제외하는 것이 아니며, 천연형 균주 자체이거나, 본 출원의 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드를 포함하지 않는 미생물, 또는 본 출원의 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터로 형질전환되지 않은 미생물도 포함한다.
- [122] 본 출원에서 "목적 물질을 생산하는 미생물"은 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 물질 생산을 위한 유전적 변이가 일어나거나 활성을 강화시킨 미생물일 수 있다. 본 출원의 목적상 상기 목적 물질을 생산하는 미생물은, 본 출원의 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드를 포함하여, 야생형이나 비변형 미생물과 비교하여 목적하는 물질을 과량으로 생산할 수 있는 미생물을 의미할 수 있다.

- [123] 상기 "목적 물질을 생산하는 미생물"은 "목적 물질 생산 미생물", "목적 물질 생산능을 갖는 미생물", "목적 물질 생산 균주", "목적 물질 생산능을 갖는 균주" 등의 용어와 혼용되어 사용될 수 있다.
- [124] 상기 목적 물질은 아미노산, 구체적으로 라이신, 쓰레오닌, O-아세틸 호모세린, 이소류신, 트립토판, 타이로신 또는 페닐알라닌일 수 있다. 보다 구체적인 예로, 상기 라이신은 L-라이신, 상기 쓰레오닌은 L-쓰레오닌, 상기 O-아세틸 호모세린은 O-아세틸-L-호모세린, 상기 이소류신은 L-이소류신, 상기 트립토판은 L-트립토판, 상기 타이로신은 L-타이로신, 상기 페닐알라닌은 L-페닐알라닌일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [125] 본 출원의 목적상, 상기 목적 물질을 생산하는 미생물은 목적 물질, 구체적으로, 라이신, 쓰레오닌, O-아세틸 호모세린, 이소류신, 트립토판, 타이로신 또는 페닐알라닌의 생산능이 향상된 것일 수 있다.
- [126] 한편, 상기 목적 물질 생산 미생물은 야생형 미생물일 수 있고, 또는 재조합 미생물일 수 있다. 상기 재조합 미생물은 전술한 바와 같다. 상기 미생물은 추가로 목적 물질 생산능 증가를 위한 생합성경로 강화, 피드백 저해 해제, 분해경로 혹은 생합성 경로를 약화시키는 유전자 불활성화 등의 변이를 포함하는 것일 수 있고, 이러한 변이는 인공적으로, 예를 들어 UV 조사에 의해 일어날 수 있으나, 자연적인 것을 배제하는 것은 아니다.
- [127] 구체적으로, 상기 목적 물질 생산 미생물은 상기 목적 물질을 생산할 수 있도록 변이된 것일 수 있다. 예를 들어, 목적 물질의 생산능이 없는 미생물을 목적 물질의 생산능을 갖도록 변이되거나, 생산능을 강화시킨 미생물일 수 있다. 하나의 예로, 야생형 미생물에 목적 물질을 생산할 수 있도록 생합성 경로에 관여하는 단백질 또는 그의 변이체가 도입된 미생물일 수 있다(KR 10-2011994, KR 10-1947959).
- [128] 본 출원의 미생물은 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드를 포함하지 않는 미생물에 비해 최소 1%, 5%, 10%, 13%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 또는 25% 이상의 목적 물질 생산능을 갖는 것일 수 있다.
- [129]
- [130] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 상기 숙주세포를 배지에서 배양하는 단계; 및 상기의 배지에서 목적 물질을 회수하는 단계를 포함하는, 목적 물질을 생산하는 방법을 제공한다.
- [131] 상기 숙주세포, 목적 물질은 앞서 설명한 바와 같다.

- [132] 본 출원에서 용어 "배양"은 미생물을 적당히 인공적으로 조절한 환경조건에서 생육시키는 것을 의미한다. 본 출원에서 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 미생물을 이용하여 목적 물질을 생산하는 방법은 당업계에 널리 알려져 있는 방법을 이용하여 수행할 수 있다. 구체적으로, 상기 배양은 배치 공정, 주입 배치 또는 반복 주입 배치 공정(fed batch or repeated fed batch process)에서 연속식으로 배양할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 배양에 사용되는 배지는 적절한 방식으로 특정 균주의 요건을 충족해야 한다. 코리네박테리움 균주에 대한 배양 배지는 공지되어 있다(예를 들면, *Manual of Methods for General Bacteriology by the American Society for Bacteriology, Washington D.C., USA, 1981*).
- [133] 배지 중에서 사용될 수 있는 당원으로는 포도당, 사카로즈, 유당, 과당, 말토즈, 전분, 셀룰로스와 같은 당 및 탄수화물, 대두유, 해바라기유, 피마자유, 코코넛유 등과 같은 오일 및 지방, 팔미트산, 스테아린산, 리놀레산과 같은 지방산, 글리세롤, 에탄올과 같은 알코올, 아세트산과 같은 유기산이 포함된다. 이들 물질은 개별적으로 또는 혼합물로서 사용될 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [134] 사용될 수 있는 질소원으로는 펩톤, 효모 추출물, 육즙, 맥아 추출물, 옥수수 침지액, 대두밀 및 요소 또는 무기 화합물, 예를 들면 황산암모늄, 염화암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄 및 질산암모늄이 포함된다. 질소원 또한 개별적으로 또는 혼합물로서 사용할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [135] 사용될 수 있는 인원으로는 인산이수소칼륨 또는 인산수소이칼륨 또는 상응하는 나트륨을 함유하는 염이 포함될 수 있다. 또한, 배양 배지는 성장에 필요한 황산마그네슘 또는 황산철과 같은 금속염을 함유할 수 있다. 마지막으로, 상기 물질에 더하여 아미노산 및 비타민과 같은 필수 성장 물질이 사용될 수 있다. 또한, 배양 배지에 적절한 전구체들이 사용될 수 있다. 상기된 원료들은 배양과정에서 배양물에 적절한 방식에 의해 회분식으로 또는 연속식으로 첨가될 수 있다.
- [136] 상기 미생물의 배양 중 수산화나트륨, 수산화칼륨, 암모니아와 같은 기초 화합물 또는 인산 또는 황산과 같은 산 화합물을 적절한 방식으로 사용하여 배양물의 pH를 조절할 수 있다. 또한, 지방산 폴리글리콜 에스테르와 같은 소포제를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다. 호기 상태를 유지하기 위해 배양물 내로 산소 또는 산소-함유 기체(예, 공기)를 주입할 수 있다.
- [137] 배양물(배지)의 온도는 보통 20°C 내지 45°C, 구체적으로는 25°C 내지 40°C일 수 있다. 배양 시간은 원하는 목적 물질의 생성량이 얻어질 때까지 계속할 수 있으나, 구체적으로는 10 내지 160시간일 수 있다.
- [138] 배양물(배지)로부터의 목적 물질의 회수는 당업계에 알려진 통상적인 방법에 의하여 분리되어 회수될 수 있다. 이러한 분리 방법에는, 원심분리, 여과, 크로마토그래피 및 결정화 등의 방법이 이용될 수 있다. 예를 들면, 배양물을 저속 원심분리하여 바이오매스를 제거하고 얻어진 상등액을, 이온교환

- 크로마토그래피를 통하여 분리할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [139] 상기 회수 단계는 정제 공정을 추가로 포함할 수 있다.
- [140]
- [141] 본 출원의 다른 하나의 양태는 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드 서열에서 218번, 219번, 220번, 221번, 222번, 225번 및 227번 뉴클레오티드가 다른 뉴클레오티드로 치환된 폴리뉴클레오티드의 프로모터로서의 용도를 제공한다.
- [142] 상기 폴리뉴클레오티드에 대해서는 전술한 바와 같다.
- [143]

발명의 실시를 위한 형태

- [144] 이하 본 출원을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 출원을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 출원의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [145]
- [146] 실시예 1. 신규 프로모터의 목적 유전자 발현 유도 활성 확인
- [147] 실시예 1-1. 무작위 돌연변이법을 이용한 tkt 프로모터 변이 라이브러리 제작
- [148]
- [149] 먼저, 미국 국립 보건원의 유전자은행(NIH GenBank)을 근거로 하여 야생형(wild type) 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032의 tkt 유전자(NCBI 등록번호 NCg11512)의 프로모터 부위를 포함하는 염기서열(서열번호 1)을 확보하였다. 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 tkt 유전자의 프로모터(Pmtkt)를 주형으로 Diversify PCR Random Mutagenesis Kit(takara)를 이용하였고, 서열번호 3 및 4의 프라이머를 이용하여 제조사의 매뉴얼대로 랜덤으로 돌연변이를 유발시켜 서열이 다른 tkt 프로모터 변이 PCR 산물(Pmtkt)을 수득하였다. 또한, GFP 유전자의 ORF(Open Reading Frame)는 pGFPuv 벡터(clontech, 미국)를 주형으로, 서열번호 5 및 6의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 중합효소는 SolgTM Pfu-X DNA 폴리머라제를 사용하였으며, PCR 증폭 조건은 95 °C에서 5분간 변성 후, 95°C 30초 변성, 58°C 30초 어닐링, 72°C 60초 중합을 30회 반복한 후, 72°C에서 5분간 중합반응을 수행하여, GFP의 ORF를 포함하는 유전자 절편을 수득하였다.
- [150] 상기 증폭 산물인 tkt 프로모터 변이 PCR 산물(Pmtkt) 및 GFP를 BamHI/SalI 제한효소로 절단하여 준비한 대장균-코리네박테리움 셔틀벡터(shuttle vector)인 pCES208(J.Microbiol. Biotechnol. 18:639-647, 2008)과 혼합하여, 김슨 어셈블리(DG Gibson et al., NATURE METHODS, VOL.6 NO.5, MAY 2009, NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix) 방법을 이용하여 클로닝함으로써 재조합 플라스미드를 획득하였으며, 각 벡터는 pCES208_Pm1tkt_gfp 부터 pCES208_Pm50tkt_gfp까지로 명명하였다. 클로닝은 김슨 어셈블리 시약과 각 유전자 단편들을 계산된 몰수로 혼합 후 50°C에 1시간 보존함으로써 수행하였다.

[151]

[152] tkt 프로모터 변이 라이브러리의 활성을 확인하기 위한 대조군으로는 야생형 tkt 유전자의 프로모터(서열번호 1)와 GFP가 연결되어 있는 재조합 벡터를 사용하였다. 야생형 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032를 주형으로, 서열번호 3 및 4의 프라이머를 이용하여 야생형 tkt 유전자의 프로모터 유전자(Pntkt)를 획득하였다. 또한, GFP 유전자의 ORF는 pGFPuv 벡터를 주형으로, 서열번호 5 및 6의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 증합효소는 SolgTM Pfu-X DNA 폴리머라제를 사용하였으며, PCR 증폭 조건은 95 °C에서 5분간 변성 후, 95°C 30초 변성, 58°C 30초 어닐링, 72°C 60초 증합을 30회 반복한 후, 72°C에서 5분간 증합반응을 수행하여, GFP의 ORF를 포함하는 유전자 절편을 획득하였다.

[153] 상기 증폭 산물인 tkt 야생형 프로모터 PCR 산물(Pntkt) 및 GFP를 BamHI/SalI 제한효소로 절단하여 준비한 pCES208과 혼합하여, 겔슨 어셈블리 방법을 이용하여 클로닝함으로써 재조합 플라스미드를 획득하였으며, 이를 pCES208_Pntkt_gfp라 명명하였다. 클로닝은 겔슨 어셈블리 시약과 각 유전자 단편들을 계산된 몰수로 혼합 후 50°C에 1시간 보존함으로써 수행하였다.

[154]

[155] 실시예 1-2. 형질전환 균주의 제작

[156] 벡터 pCES208과 상기 실시예 1-1에서 제작된 재조합 벡터 라이브러리 pCES208_Pm1tkt_gfp 부터 pCES208_Pm50tkt_gfp 및 pCES208_Pntkt_gfp를 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032에 전기천공법(Appl. Microbiol. Biothcnol.(1999) 52:541-545)으로 형질전환 한 후, 카나마이신(kanamycin) 25mg/L를 함유한 선별배지에서 형질전환 된 균주를 선별하여, 이를 각각 ATCC13032/pCES208, ATCC13032/pCES208_Pm1tkt_gfp 부터 ATCC13032/pCES208_Pm50tkt_gfp 및 ATCC13032/pCES208_Pntkt_gfp로 명명하였다.

[157]

[158] 실시예 1-3. tkt 프로모터 변이 선별

[159] tkt 프로모터 변이체의 활성을 확인하기 위해, 상기 실시예 1-2에서 획득한 형질전환 균주들을 하기와 같은 방법으로 배양하고, GFP의 활성을 측정하였다.

[160] 구체적으로, 배지(포도당 20 g, 황산암모늄 5 g, 효모 추출물 5 g, 요소 1.5 g, KH₂PO₄ 4 g, K₂HPO₄ 8 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g, 바이오틴 150 µg, 티아민 염산염 1.5 mg, 칼슘 판토테인산 3 mg, 니코틴아마이드 3 mg (중류수 1 L 기준), pH 7.2) 25 ml이 담긴 플라스크에 형질전환 된 코리네박테리움 글루타미쿰 균주들을 각각 접종하고 30°C 에서 20 시간 동안 진탕 배양하였다. 원심분리(5,000 rpm, 15분)를 통하여 배양액으로부터 균체를 수거하여, 50mM Tris-HCl(pH 8.0) 완충용액으로 2회 세척한 후, 동 완충용액으로 현탁 하였다. 현탁액 1.5ml 당 1.25g의 글래스 비드(glass bead)를 첨가한 후, 비드 비터 (bead beater)를 이용하여, 6분간 균체를

과채한 다음, 원심분리(15,000 rpm, 20분)를 통하여 상층액을 수거, 브레드포드 방법에 의한 단백질 농도를 정량하였다. 동일량의 균체 추출물에 대하여 Laure Gory 등의 방법(FEMS Microbiology Letters 194, 127-133, 2001)을 이용하여 488nm에서 여기광을 조사하고, 511nm 발출광을 LS-50B spectrophotometer(Perkin-Elmer) 기기를 이용하여 측정함으로써, GFP 유전자의 발현 정도를 측정하였다. 그 결과, 대조군 ATCC13032/pCES208_Pntkt_gfp 균주의 GFP 유전자 발현 정도와 비교하여, 가장 GFP 유전자 발현 정도가 높은 균주 1종을 선별하였다(표 1).

[161]

[162] [표1]

균주	형광 감도
ATCC13032/pCES208	0
ATCC13032/pCES208_Pntkt_gfp	1321
ATCC13032/pCES208_Pm4tkf_gfp	2967

[163]

[164] 상기 표 1에 나타난 바와 같이, Pm4tkf 프로모터는 코리네박테리움 글루타미쿰에서 프로모터 활성을 나타내며, 야생형 tkf 프로모터보다 높은 형광 감도를 나타내는 것을 확인하였다.

[165] 상기에서 선별된 Pm4tkf 프로모터에 도입된 변이를 확인하기 위하여, 서열 번호 7 및 8의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행한 후, 서열 분석을 진행하였다. 야생형 tkf 프로모터 서열인 서열번호 1과 비교하였으며, 이를 통해 변이형 tkf 프로모터의 서열을 확인하였고, 그 서열은 하기 표 2와 같다(표 2).

[166]

[167] [표2]

서열 번호	변이체	서열
2	Pm4tkf	GCTTGCCGAACATTTTTCTTTTCCTTTCGGTTTTTCGAGAA TTTTACCTACAAAAGCCACGTCACAGCTCCCAGACTT AAGATTGATCACACCTTTGACACATTTGAACCACAGTTG GTTATAAAATGGGTTCAACATCACTATGGTTAGAGGTGT TGACGGGTCAGATTAAGCAAAGACTACTTTCGGGGTAGA TCACCTTTGCCAAATTTGAATGTGGTATCATAAGTCGTAG ATCTGATCATCGGATCTAACGAAAACGAACCAAACTTT GGTCCCGGTTTAACCCAGGAAGGA

[168]

- [169] 실시예 2. Pm4tkk 프로모터 변이 도입 벡터 제작
- [170] 실시예 2-1. 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032 Pm4tkk 프로모터 변이 도입 벡터 제작
- [171] 상기 Pm4tkk 프로모터 변이를 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032 에 도입하기 위한 벡터를 제작하기 위하여, 서열번호 9 및 10과 서열번호 13 및 14의 프라이머 세트를 이용하여 각각 야생형 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032 균주의 염색체를 주형으로 tkt 프로모터 업스트림(upstream) 영역과 tkt의 ORF 일부를 포함하는 다운스트림(downstream) 영역을 수득하였다. 또한 서열번호 11 및 12를 이용하여 pCES208_Pm4tkk_gfp의 벡터를 주형으로 프로모터 변이에 해당하는 PCR 산물을 수득 하였다. 중합효소는 SolgTM Pfu-X DNA 폴리머라제를 사용하였으며, PCR 증폭 조건은 95 °C에서 5분간 변성 후, 95°C 30초 변성, 58°C 30초 어닐링, 72°C 60초 중합을 30회 반복한 후, 72°C에서 5분간 중합반응을 수행 하여, 각각의 PCR 산물을 수득하였다. 상기 세 증폭 산물을 미리 SmaI 제한효소로 절단하여 준비한 pDCM2 벡터(대한민국 공개번호 제10-2020-0136813호)와 혼합하여 겐슨 어셈블리 방법을 이용하여 클로닝함으로써 재조합 플라스미드를 획득하였으며, 이를 pDCM2-Pm4tkk_tkt라 명명하였다. 클로닝은 겐슨 어셈블리 시약과 각 유전자 단편들을 계산된 몰수로 혼합 후 50°C에 1시간 보존함으로써 수행하였다.
- [172]
- [173] 실시예 2-2. 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13869 Pm4tkk_tkt 도입 벡터 제작
- [174] 상기 Pm4tkk 프로모터 변이(서열번호 2)를 갖는 tkt 유전자를 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13869 에 1copy 도입하기 위한 벡터를 제작하였다.
- [175] 염색체상 상동재조합(Homologous recombination)이 발생하는 위치로 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13869의 aroP(Gamma-aminobutyrate permease, GenBank Accession No. WP_060564335.1) 위치를 결손 하면서 목적 유전자를 삽입하는 벡터를 제작하였다.
- [176] 구체적으로, 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13869 염색체 DNA를 주형으로 하여 서열번호 15 및 16, 서열번호 17 및 18의 프라이머 세트를 이용하여 염색체상 상동재조합이 발생하는 aroP의 업스트림(upstream) 지역과 다운스트림(downstream) 지역의 유전자 단편을 PCR 수행을 통해 수득하였다. 중합효소는 SolgTM Pfu-X DNA 폴리머라제를 사용하였으며, PCR 증폭 조건은 95 °C에서 5분간 변성 후, 95°C 30초 변성, 58°C 30초 어닐링, 72°C 60초 중합을 30회 반복한 후, 72°C에서 5분간 중합반응을 수행하였다.
- [177] 증폭된 aroP 업스트림과 다운스트림 지역, 그리고 BamHI/SalI 제한효소로 절단된 염색체 형질전환용 벡터 pDCM2 벡터와 겐슨 어셈블리 방법을 이용하여 클로닝함으로써 재조합 플라스미드를 획득하였으며, pDCM2-ΔaroP로 명명하였다. 클로닝은 겐슨 어셈블리 시약과 각 유전자 단편들을 계산된 몰수로

혼합 후 50°C에 1시간 보존함으로써 수행하였다.

[178]

[179] pCES208_Pm4tk_t_gfp를 주형으로 서열번호 19 및 20의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였고 Pm4tk_t 프로모터 변이를 갖는 유전자 단편을 PCR을 통하여 수득 하였다. 또한 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13869 염색체 DNA를 주형으로 서열번호 21 및 22의 프라이머를 이용하여 tk_t 유전자의 ORF를 수득하였다. 중합효소는 SolgTM Pfu-X DNA 폴리머라제를 사용하였으며, PCR 증폭 조건은 95 °C에서 5분간 변성 후, 95°C 30초 변성, 58°C 30초 어닐링, 72°C 60초 중합을 30회 반복한 후, 72°C에서 5분간 중합반응을 수행하였다.

[180] 증폭된 Pm4tk_t, tk_t 유전자 그리고 ScaI 제한효소로 절단된 염색체 형질전환용 벡터 pDCM2-ΔaroP는 김슨 어셈블리 방법을 이용하여 클로닝함으로써 재조합 플라스미드를 획득하였으며, pDCM2-ΔaroP::Pm4tk_t_tk_t로 명명하였다. 클로닝은 김슨 어셈블리 시약과 각 유전자 단편들을 계산된 몰수로 혼합 후 50°C에 1시간 보존함으로써 수행하였다.

[181]

[182] 또한 Pm4tk_t 프로모터와의 비교를 위하여 tk_t 유전자의 자체 프로모터(Pntk_t) 형태로 tk_t 유전자를 1copy 추가 시키기 위한 벡터를 제작 하였다. 구체적으로, 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13869 염색체 DNA를 주형으로 서열번호 19 및 22의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였고, tk_t 유전자의 자체 프로모터를 갖는 tk_t 유전자를 수득 하였다. 이를 상기 제작한 ScaI 제한효소로 절단된 염색체 형질전환용 벡터 pDCM2-ΔaroP와 김슨 어셈블리 방법을 이용하여 클로닝함으로써 재조합 플라스미드를 획득하였으며, 이를 pDCM2-ΔaroP::Pntk_t_tk_t로 명명하였다. 클로닝은 김슨 어셈블리 시약과 각 유전자 단편들을 계산된 몰수로 혼합 후 50°C에 1시간 보존함으로써 수행하였다.

[183]

[184] 실시예 2-3. 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13869 Pm4tk_t 프로모터 변이 도입 벡터 제작

[185] aroP 위치에 기 도입된 자가 프로모터의 tk_t 유전자의 프로모터를 Pm4tk_t 프로모터 변이체로 교체하기 위하여 실시예 2-2에서 제작된 pDCM2-ΔaroP::Pm4tk_t_tk_t 벡터를 주형으로 서열번호 23 및 24를 이용하여 PCR을 수행, Pm4tk_t 서열이 포함된 유전자 단편을 수득 하였다. 이를 SmaI 제한효소로 절단하여 준비한 pDCM2 벡터와 혼합하여 김슨 어셈블리방법을 이용하여 클로닝함으로써 재조합 플라스미드를 획득하였으며, 이를 pDCM2-ΔPn::Pm4tk_t_tk_t라 명명하였다. 클로닝은 김슨 어셈블리 시약과 각 유전자 단편들을 계산된 몰수로 혼합 후 50°C에 1시간 보존함으로써 수행하였다.

[186]

[187] 실시예 3. 목적산물 생산능 평가

[188] 3-1. 라이신 생산능 평가

- [189] **3-1-1. tkt 프로모터 변이체가 도입된 L-라이신 생산 균주의 제작**
- [190] 실시예 2-1에서 제작된 pDCM2-Pm4tkt_tkt 벡터를 이용하여 tkt 프로모터 변이체가 형질전환된 균주를 제작하였다. 이를 위해 L-라이신 생산 균주인 코리네박테리움 글루타미쿰 CJ3P(US 9556463 B2) 균주에 상기 벡터를 형질전환시켜, 염색체 내로 tkt 프로모터 변이체 서열을 도입하였다. CJ3P 균주는 기 공지된 기술을 바탕으로 야생주에 3종의 변이(pyc(P458S), hom(V59A), lysC(T311I))를 도입하여 L-라이신 생산능을 갖게 된 코리네박테리움 글루타미쿰 균주이다.
- [191]
- [192] 구체적으로, 상기 실시예 2-1에서 제작한 벡터를 전기천공법으로 CJ3P 균주에 도입한 후 카나마이신 25mg/L를 함유한 선별배지에서 형질전환 균주를 획득하였다. 2차 재조합과정(cross-over)으로 염색체상에 삽입된 DNA 단편에 의하여 tkt 프로모터 변이체가 도입된 균주를 서열번호 7 및 8의 프라이머를 이용하여 PCR 및 염기서열 분석을 통해 선별하였고, 상기 선별된 균주를 코리네박테리움 글루타미쿰 CJ3P::Pm4tkt_tkt(CM03-1661)라 명명하였으며, 부다페스트조약 하의 수탁기관인 한국미생물보존센터에 2021년 04월 05일자로 기탁하여 수탁번호 KCCM12971P를 부여받았다.
- [193]
- [194] **3-1-2. tkt 프로모터 변이체가 도입된 균주의 L-라이신 생산능 평가**
- [195] 모균주로 이용한 코리네박테리움 글루타미쿰 CJ3P 균주 및 실시예 3-1-1에서 제작된 코리네박테리움 글루타미쿰 CJ3P::Pm4tkt_tkt 균주의 L-라이신 생산능을 평가하기 위해 하기와 같은 방법으로 균주를 배양한 후, 분석하였다.
- [196]
- [197] 먼저, 종 배지 25ml를 함유하는 250ml 코너-바플 플라스크에 각 균주들을 접종하고, 30°C에서 20시간 동안 200rpm으로 진탕 배양하였다. 그런 다음, 생산 배지 24ml를 함유하는 250ml 코너-바플 플라스크에 1ml의 종 배양액을 접종하고, 32°C에서 48시간 동안, 200rpm으로 진탕 배양하였다. 상기 종 배지 및 생산 배지의 조성은 하기와 같다.
- [198]
- [199] <종 배지(pH 7.0)>
- [200] 포도당 20g, 펩톤 10g, 효모추출물 5g, 요소 1.5g, KH₂PO₄ 4g, K₂HPO₄ 8g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5g, 바이오틴 100 μ g, 티아민 염산염 1000 μ g, 칼슘-판토텐산 2000 μ g, 니코틴아미드 2000 μ g (중류수 1 리터 기준)
- [201]
- [202] <생산 배지(pH 7.0)>
- [203] 포도당 45g, 대두 단백질 10g, 당밀 10g, (NH₄)₂SO₄ 15 g, KH₂PO₄ 0.55 g, MgSO₄·7H₂O 0.6 g, FeSO₄·7H₂O 9mg, MnSO₄ · 5H₂O 9mg, 바이오틴 0.9mg, 티아민 염산염 4.5mg, CaCO₃ 30 g, 칼슘-판토텐산 4.5mg, 니코틴아미드 30mg,

ZnSO₄ 0.45mg, CuSO₄ 0.45mg (중류수 1 리터 기준)

[204]

[205] 배양 종료 후 HPLC를 이용해 L-라이신의 생산량을 측정하였다.
코리네박테리움 글루타미쿰 CJ3P, CJ3P::Pm4tk_t_tk_t 균주에 대한 배양액 중의 L-라이신 농도 및 농도 증가율은 하기 표 3과 같다.

[206]

[207] [표3]

균주명	L-라이신 농도(g/L)	L-라이신 농도 증가율(%)
CJ3P	4.03	-
CJ3P::Pm4tk _t _tk _t	4.99	23.82%

[208]

[209] 상기 표 3에 나타난 바와 같이 tk_t 프로모터 변이체가 도입된 CJ3P::Pm4tk_t_tk_t 균주가 모균주인 CJ3P에 비해 L-라이신의 농도가 23.82% 증가하는 것을 확인하였다.

[210]

[211] 실시예 3-2. 쓰레오닌 생산능 평가

[212] 3-2-1. L-쓰레오닌 생산 균주의 제작

[213] 실시예 2-1에서 제작된 pDCM2-Pm4tk_t_tk_t 벡터를 이용하여 tk_t 프로모터 변이체로 형질전환 된 균주를 제작하기 위하여, 우선 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032 균주를 기반으로 lysC(L377K) 변이체(대한민국 등록특허 제10-2011994호)와 hom(R398Q) 변이체(대한민국 등록특허 제10-1947959호)를 도입한 L-쓰레오닌 생산 균주를 제작하였다.

[214] 구체적으로, L-쓰레오닌 생산 균주를 제작하기 위해 먼저, lysC(L377K)를 도입하기 위한 벡터를 제작하였다. 벡터를 제작하기 위해 야생형 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032 균주의 염색체를 주형으로 하여 서열번호 25 및 26, 서열번호 27 및 28의 프라이머 세트를 이용하여 PCR을 수행하였다. 중합효소는 SolgTM Pfu-X DNA 폴리머라제를 사용하였으며, PCR 증폭 조건은 95 °C에서 5분간 변성 후, 95°C 30초 변성, 58°C 30초 어닐링, 72°C 60초 중합을 30회 반복한 후, 72°C에서 5분간 중합반응을 수행하였다. 상기 증폭 산물을 SmaI 제한효소로 절단된 염색체 형질전환용 벡터 pDCM2 벡터와 겹순 어셈블리 방법을 이용하여 클로닝함으로써 재조합 플라스미드를 획득하였으며, pDCM2-lysC(L377K)로 명명하였다. 클로닝은 겹순 어셈블리 시약과 각 유전자 단편들을 계산된 몰수로 혼합 후 50°C에 1시간 보존함으로써 수행하였다.

[215]

[216] 상기에서 제작한 pDCM2-lysC(L377K) 벡터를 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032 균주에 전기천공법으로 도입한 후 카나마이신 25mg/L를 함유한

선별배지에서 형질전환 균주를 획득하였다. 2차 재조합과정(cross-over)으로 염색체상에 삽입된 DNA 단편에 의하여 *lysC* 유전자에 뉴클레오티드 변이가 도입된 균주를 서열번호 29 및 30의 프라이머를 이용하여 PCR 및 염기서열 분석을 통해 선별하였고, 상기 선별된 균주를 ATCC13032::*lysC*(L377K)라 명명하였다.

- [217] 또한 *hom*(R398Q)를 도입하는 벡터를 제작하기 위하여 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032 균주의 염색체를 주형으로 서열번호 31 및 32, 서열번호 33 및 34의 프라이머 세트를 이용하여 PCR을 진행하였다. 중합효소는 SolgTM Pfu-X DNA 폴리머라제를 사용하였으며, PCR 증폭 조건은 95 °C에서 5분간 변성 후, 95°C 30초 변성, 58°C 30초 어닐링, 72°C 60초 중합을 30회 반복한 후, 72°C에서 5분간 중합반응을 수행하였다. 상기 증폭 산물을 *Sma*I 제한효소로 절단된 염색체 형질전환용 벡터 pDCM2 벡터와 김슨 어셈블리방법을 이용하여 클로닝함으로써 재조합 플라스미드를 획득하였으며, pDCM2-*hom*(R398Q)로 명명하였다. 클로닝은 김슨 어셈블리 시약과 각 유전자 단편들을 계산된 몰수로 혼합 후 50°C에 1시간 보존함으로써 수행하였다.

[218]

- [219] pDCM2-*hom*(R398Q) 벡터를 상기에서 제작한 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032::*lysC*(L377K) 균주에 전기천공법으로 도입한 후 카나마이신 25mg/L를 함유한 선별배지에서 형질전환 균주를 획득하였다. 2차 재조합과정(cross-over)으로 염색체상에 삽입된 DNA 단편에 의하여 *hom* 유전자에 뉴클레오티드 변이가 도입된 균주를 서열번호 35 및 36의 프라이머를 이용하여 PCR 및 염기서열 분석을 통해 선별하였고, 상기 선별된 균주를 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032::*lysC*(L377K)-*hom*(R398Q)라 명명하였다.

[220]

- [221] **3-2-2. *tkl* 프로모터 변이체가 도입된 L-쓰레오닌 생산 균주의 제작**

- [222] 상기 실시예 2-1에서 제작한 pDCM2-Pm4*tkl*_{tkl} 벡터를 전기천공법으로 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032::*lysC*(L377K)-*hom*(R398Q) 균주에 도입한 후 카나마이신 25mg/L를 함유한 선별배지에서 형질전환 균주를 획득하였다. 2차 재조합과정(cross-over)으로 염색체상에 삽입된 DNA 단편에 의하여 *tkl* 프로모터 변이체가 도입된 균주를 서열번호 7 및 8의 프라이머를 이용하여 PCR 및 염기서열 분석을 통해 선별하였고, 상기 선별된 균주를 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032::*lysC*(L377K)-*hom*(R398Q)-Pm4*tkl*_{tkl}라 명명하였다.

[223]

- [224] **3-2-3. *tkl* 프로모터 변이체가 도입된 균주의 L-쓰레오닌 생산능 평가**

- [225] 모균주로 이용한 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032::*lysC*(L377K)-*hom*(R398Q), 실시예 3-2-2에서 제작된

ATCC13032::lysC(L377K)-hom(R398Q)-Pm4tk_t_tk_t 균주의 L-쓰레오닌 생산능을 평가하기 위해 하기와 같은 방법으로 균주를 배양한 후, 분석하였다.

[226]

[227] 먼저, 종 배지 25ml를 함유하는 250ml 코너-바플 플라스크에 각 균주들을 접종하고, 30°C에서 20시간 동안 200rpm으로 진탕 배양하였다. 그런 다음, 생산 배지 24ml를 함유하는 250ml 코너-바플 플라스크에 1ml의 종 배양액을 접종하고, 32°C에서 48시간 동안, 200rpm으로 진탕 배양하였다. 상기 종 배지 및 생산 배지의 조성은 하기와 같다.

[228]

[229] <종 배지(pH 7.0)>

[230] 포도당 20g, 펩톤 10g, 효모추출물 5g, 요소 1.5g, KH₂PO₄ 4g, K₂HPO₄ 8g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5g, 바이오틴 100μg, 티아민 염산염 1000μg, 칼슘-판토텐산 2000μg, 니코틴아미드 2000μg (증류수 1 리터 기준)

[231]

[232] <생산 배지(pH 7.0)>

[233] 포도당 45g, 대두 단백질 10g, 당밀 10g, (NH₄)₂SO₄ 15 g, KH₂PO₄ 0.55 g, MgSO₄·7H₂O 0.6 g, FeSO₄·7H₂O 9mg, MnSO₄ · 5H₂O 9mg, 바이오틴 0.9mg, 티아민 염산염 4.5mg, CaCO₃ 30 g, 칼슘-판토텐산 4.5mg, 니코틴아미드 30mg, ZnSO₄ 0.45mg, CuSO₄ 0.45mg (증류수 1 리터 기준)

[234]

[235] 배양 종료 후 HPLC를 이용해 L-쓰레오닌의 생산량을 측정하였다. 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032::lysC(L377K)-hom(R398Q), ATCC13032::lysC(L377K)-hom(R398Q)-Pm4tk_t_tk_t 균주에 대한 배양액 중의 L-쓰레오닌 농도 및 농도 증가율은 하기 표 4와 같다.

[236]

[237] [표4]

균주명	L-쓰레오닌 농도(g/L)	L-쓰레오닌 농도 증가율(%)
ATCC13032::lysC(L377K)-hom(R398Q)	0.92	-
ATCC13032::lysC(L377K)-hom(R398Q)-Pm4tk _t _tk _t	1.30	41.30%

[238]

[239] 상기 표 4에 나타난 바와 같이 tk_t 프로모터 변이체가 도입된 ATCC13032::lysC(L377K)-hom(R398Q)-Pm4tk_t_tk_t 균주가 모균주인 ATCC13032::lysC(L377K)-hom(R398Q)에 비해 L-쓰레오닌의 농도가 41.30% 증가하는 것을 확인하였다.

[240]

[241] 실시예 3-3. O-아세틸 호모세린 생산능 평가

[242] 3-3-1. tkt 프로모터 변이체가 도입된 O-아세틸 호모세린 생산 균주의 제작

[243] 상기 실시예 2-1에서 제작한 pDCM2-Pm4tkt_tkt 벡터를 전기천공법으로 야생형 균주인 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032에 도입한 후 카나마이신 25mg/L를 함유한 선별배지에서 형질전환 균주를 획득하였다. 2차 재조합과정(cross-over)으로 염색체상에 삽입된 DNA 단편에 의하여 tkt 프로모터 변이체가 도입된 균주를 서열번호 7 및 8의 프라이머를 이용하여 PCR 및 염기서열 분석을 통해 선별하였고, 상기 선별된 균주를 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032::Pm4tkt_tkt라 명명하였다.

[244]

[245] 3-3-2. tkt 프로모터 변이체가 도입된 균주의 O-아세틸 호모세린 생산능 평가

[246] 모균주로 이용한 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032, 실시예 3-3-1에서 제작된 ATCC13032::Pm4tkt_tkt 균주의 O-아세틸 호모세린 생산능을 평가하기 위해 하기와 같은 방법으로 균주를 배양한 후, 분석하였다.

[247]

[248] 하기의 배지 25ml을 함유하는 250ml 코너-바플 플라스크에 균주를 1백금이 접종하고, 33도에서 20시간 동안, 200 rpm으로 진탕 배양하였다.

[249]

[250] <생산 배지(pH 7.2)>

[251] 포도당 30g, KH₂PO₄ 2g, 요소 3g, (NH₄)₂SO₄ 40g, 펩톤 2.5g, CSL(Corn steep liquor, Sigma) 5g(10ml), MgSO₄ · 7H₂O 0.5g, CaCO₃ 20g (중류수 1 리터 기준)

[252]

[253] 배양 종료 후 HPLC로 O-아세틸 호모세린의 생산능을 측정하였다.

코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032, ATCC13032::Pm4tkt_tkt 균주에 대한 배양액 중의 O-아세틸 호모세린 농도 및 농도 증가율은 하기 표 5와 같다.

[254]

[255] [표5]

균주명	O-아세틸 호모세린 농도(g/L)	O-아세틸 호모세린 농도 증가율(%)
ATCC13032	0.28	-
ATCC13032::Pm4tkt_tkt	0.41	46.43%

[256]

[257] 상기 표 5에 나타난 바와 같이 tkt 프로모터 변이체가 도입된 ATCC13032::Pm4tkt_tkt 균주가 모균주인 야생형 균주 ATCC13032에 비해 O-아세틸 호모세린의 농도가 46.43% 증가하는 것을 확인하였다.

[258]

[259] 실시예 3-4. 이소류신 생산능 평가

[260] 3-4-1. tkt 프로모터 변이체가 도입된 L-이소류신 생산 균주의 제작

[261] 실시예 2-1에서 제작된 pDCM2-Pm4tk_t-tk_t 벡터를 이용하여 tkt 프로모터 변이체가 형질전환 된 균주를 제작하기 위하여, 우선 코리네박테리움 글루타미쿰 CJP1(대한민국 등록특허 제10-1996769호) 균주에 상기 벡터를 형질전환시켜, 염색체 내로 tkt 프로모터 변이체 서열을 도입하였다. 이후, 기 공지된 L-쓰레오닌 디하이드라타제(L-threonine dehydratase)를 코딩하는 ilvA 유전자의 323번째 아미노산인 발린이 알라닌으로 변이된 ilvA 유전자(V323A)(Appl. Environ. Microbiol., Dec. 1996, p.4345-4351)를 포함하는 벡터를 추가로 도입하여 L-이소류신 생산 균주를 제작하였다(대한민국 등록특허 제10-1996769호).

[262]

[263] 구체적으로, 상기 실시예 2-1에서 제작한 pDCM2-Pm4tk_t-tk_t 벡터를 전기천공법으로 CJP1 균주에 도입한 후 카나마이신 25mg/L를 함유한 선별배지에서 형질전환 균주를 획득하였다. 2차 재조합과정(cross-over)으로 염색체상에 삽입된 DNA 단편에 의하여 tkt 프로모터 변이체가 도입된 균주를 서열번호 7 및 8의 프라이머를 이용하여 PCR 및 염기서열 분석을 통해 선별하였고, 상기 선별된 균주를 코리네박테리움 글루타미쿰 CJP1::Pm4tk_t-tk_t라 명명하였다.

[264]

상기 제작된 CJP1::Pm4tk_t-tk_t 균주와 CJP1 균주에 pECCG117-ilvA(V323A) 벡터(대한민국 등록특허 제10-1996769호)를 각각 전기천공법으로 도입한 후, 카나마이신 25mg/L를 함유한 선별배지에서 형질전환 균주를 획득하였고, 상기 선별된 균주를 각각 코리네박테리움 글루타미쿰 CJP1/pECCG117-ilvA(V323A), CJP1::Pm4tk_t-tk_t/pECCG117-ilvA(V323A)라 명명하였다.

[265]

[266] 3-4-2. tkt 프로모터 변이체가 도입된 균주의 L-이소류신 생산능 평가

[267] 모균주로 이용한 코리네박테리움 글루타미쿰 CJP1/pECCG117-ilvA(V323A), CJP1::Pm4tk_t-tk_t/pECCG117-ilvA(V323A) 균주의 L-이소류신 생산능을 평가하기 위해 하기와 같은 방법으로 균주를 배양한 후, 분석하였다.

[268]

[269] 먼저, 종 배지 25ml를 함유하는 250ml 코너-바플 플라스크에 각 균주들을 접종하고, 30°C에서 20시간 동안 200rpm으로 진탕 배양하였다. 그런 다음, 생산 배지 24ml를 함유하는 250ml 코너-바플 플라스크에 1ml의 종 배양액을 접종하고, 32°C에서 48시간 동안, 200rpm으로 진탕 배양하였다. 상기 종 배지 및 생산 배지의 조성은 하기와 같다.

[270]

[271] <종 배지(pH 7.0)>

- [272] 포도당 20g, 펙톤 10g, 효모추출물 5g, 요소 1.5g, KH₂PO₄ 4g, K₂HPO₄ 8g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5g, 바이오틴 100 μ g, 티아민 염산염 1000 μ g, 칼슘-판토텐산 2000 μ g, 니코틴아미드 2000 μ g (증류수 1 리터 기준)
- [273]
- [274] <생산 배지(pH 7.0)>
- [275] 포도당 45g, 대두 단백질 10g, 당밀 10g, (NH₄)₂SO₄ 15 g, KH₂PO₄ 0.55 g, MgSO₄·7H₂O 0.6 g, FeSO₄·7H₂O 9mg, MnSO₄ · 5H₂O 9mg, 바이오틴 0.9mg, 티아민 염산염 4.5mg, CaCO₃ 30 g, 칼슘-판토텐산 4.5mg, 니코틴아미드 30mg, ZnSO₄ 0.45mg, CuSO₄ 0.45mg (증류수 1 리터 기준)
- [276]
- [277] 배양 종료 후 HPLC를 이용해 L-이소류신의 생산량을 측정하였다. 코리네박테리움 글루타미쿰 CJP1/pECCG117-ilvA(V323A), CJP1::Pm4tk_t_tk_t/pECCG117-ilvA(V323A) 균주에 대한 배양액 중의 L-이소류신 농도 및 농도 증가율은 하기 표 6과 같다.
- [278]
- [279] [표6]
- | 균주명 | L-이소류신
농도(g/L) | L-이소류신
농도 증가율(%) |
|--|-------------------|---------------------|
| CJP1/pECCG117-ilvA(V323A) | 0.68 | - |
| CJP1::Pm4tk _t _tk _t /pECCG117-ilvA(V323A)
) | 1.07 | 57.35% |
- [280]
- [281] 상기 표 6에 나타난 바와 같이 tk_t 프로모터 변이체가 도입된 CJP1::Pm4tk_t_tk_t/pECCG117-ilvA(V323A) 균주가 CJP1/pECCG117-ilvA(V323A) 균주에 비해 L-이소류신의 농도가 57.35% 증가하는 것을 확인하였다.
- [282]
- [283] 실시예 3-5. 트립토판 생산능 평가
- [284] 3-5-1. L-트립토판 생산 균주의 제작
- [285] Pm4tk_t 프로모터 변이체의 효과를 확인 하기 위하여, 우선 야생형 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13869 균주를 기반으로 L-트립토판 생산 균주를 제작 하였다.
- [286] 구체적으로, L-트립토판 생합성 유전자의 오페론(operon)을 프로모터 강화를 통해 발현을 향상시켰다. 또한 TrpE 단백질의 피드백 제한(feedback inhibition) 해소를 위해 trpE의 38번 아미노산인 세린(Serine)을 알지닌(Arginine)으로 치환하였다(JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Nov. 1987, p. 5330-5332).
- [287] 이러한 유전자 조작을 위해 우선 염색체상 상동재조합(Homologous

recombination)이 발생하는 trpE 프로모터 업스트림(upstream) 지역과 다운스트림(downstream) 지역을 수득하였다. 구체적으로, 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13869 염색체 DNA를 주형으로 하여 서열번호 37 및 38의 프라이머를 이용하여 trpE 프로모터 업스트림(upstream) 지역을, 서열번호 41 및 42의 프라이머를 이용하여 다운스트림(downstream) 지역의 유전자 단편을 PCR을 통해 수득하였다. 또한 합성 제작한 프로모터 SPL7(대한민국 등록특허 제 10-1783170호) 및 trpE(S38R) 서열(서열번호 43)을 주형으로 서열번호 39 및 40의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 중합효소는 SolgTM Pfu-X DNA 폴리머라제를 사용하였으며, PCR 증폭 조건은 95 °C에서 5분간 변성 후, 95°C 30초 변성, 58°C 30초 어닐링, 72°C 60초 중합을 30회 반복한 후, 72°C에서 5분간 중합반응을 수행하였다.

[288] 상기 세 증폭 산물을 SmaI 제한효소로 절단된 염색체 형질전환용 벡터 pDCM2 벡터와 겹흔 어셈블리 방법을 이용하여 클로닝함으로써 재조합 플라스미드를 획득하였으며, pDCM2-PSPL7_trpE(S38R)로 명명하였다. 클로닝은 겹흔 어셈블리 시약과 각 유전자 단편들을 계산된 몰수로 혼합 후 50°C에 1시간 보존함으로써 수행하였다.

[289]

[290] 제작된 pDCM2-PSPL7_trpE(S38R) 벡터를 야생형 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13869 균주에 전기천공법으로 형질 전환 후 카나마이신 25mg/L를 함유한 선별배지에서 형질전환 균주를 획득하였다. 2차 재조합과정(cross-over)으로 염색체 상에서 trpE의 프로모터를 보다 강한 프로모터인 SPL7 프로모터로 교체하고, TrpE의 38번 아미노산이 세린에서 알지닌으로 교체된 균주를 얻었다. 이를 유전자가 삽입된 상동재조합 업스트림 지역과 다운스트림 지역을 증폭할 수 있는 서열번호 44 및 45를 이용한 PCR 및 게놈 시퀀싱을 통해 해당 유전적 조작을 확인하였으며, 이를 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13869::PSPL7_trpE(S38R)로 명명하였다.

[291]

[292] **3-5-2. tkt 유전자가 1copy 삽입 된 L-트립토판 생산 균주의 제작**

[293] 트립토판 생산은 방향족 아미노산 대사회로부터 기인하며, 이 대사회로는 포스포엔올피루베이트(Phosphoenolpyruvate)와 에리스로즈 4-포스페이트(Erythrose 4-phosphate)의 축합반응으로 시작된다. 따라서 두 가지 전구체의 원활한 공급은 트립토판 생산 향상에 필수적이며 상대적으로 부족하다고 알려진 에리스로즈 4-포스페이트의 원활한 공급을 위해 tkt 유전자의 과발현이 필수적이다. 이에 실시예 2-2에서 제작된 pDCM2-ΔaroP, pDCM2-ΔaroP::Pm4tkt_tkt 및 pDCM2-ΔaroP::Pntkt_tkt를 이용하여 L-트립토판 생산 균주를 제작 하였다.

[294]

[295] 실시예 3-5-1에서 제작 된 코리네박테리움 글루타미쿰

ATCC13869::PSPL7_trpE(S38R) 균주에 상기 세 벡터를 전기천공법으로 도입한 후 카나마이신 25mg/L를 함유한 선별배지에서 형질전환 균주를 획득하였다. 2차 교차 과정을 거쳐 염색체 상에서 aroP가 결손 되거나, aroP 위치에 Pntkt_tkt 유전자와 Pm4tk_tkt 유전자가 각각 삽입된 균주를 수득하였다. 이는 서열번호 46 및 47을 이용한 PCR과 게놈 시퀀싱을 통해 해당 유전적 조작을 확인하였으며, 제작된 균주를 각각 ATCC13869::PSPL7_trpE(S38R) Δ aroP, ATCC13869::PSPL7_trpE(S38R) Δ aroP::Pntkt_tkt, ATCC13869::PSPL7_trpE(S38R) Δ aroP::Pm4tk_tkt로 명명하였다.

[296]

[297] **3-5-3. tkt 유전자가 1copy 삽입 된 균주의 L-트립토판 생산능 평가**

[298] 모균주로 이용한 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13869::PSPL7_trpE(S38R), 실시예 3-5-2에서 제작된 ATCC13869::PSPL7_trpE(S38R) Δ aroP, ATCC13869::PSPL7_trpE(S38R) Δ aroP::Pntkt_tkt, ATCC13869::PSPL7_trpE(S38R) Δ aroP::Pm4tk_tkt 균주의 L-트립토판 생산능을 평가하기 위해 하기와 같은 방법으로 균주를 배양한 후, 분석하였다.

[299]

[300] 먼저, 종 배지 25ml를 함유하는 250ml 코너-바플 플라스크에 각 균주들을 접종하고, 30°C에서 20시간 동안 200rpm으로 진탕 배양하였다. 그런 다음, 생산 배지 25ml를 함유하는 250ml 코너-바플 플라스크에 1ml의 종 배양액을 접종하고, 30°C에서 24시간 동안, 200rpm으로 진탕 배양하였다. 상기 종 배지 및 생산 배지의 조성은 하기와 같다.

[301]

[302] <종 배지(pH 7.0)>

[303] 포도당 20g, 펩톤 10g, 효모추출물 5g, 요소 1.5g, KH₂PO₄ 4g, K₂HPO₄ 8g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5g, 바이오틴 100 μ g, 티아민 염산염 1000 μ g, 칼슘-판토텐산 2000 μ g, 니코틴아미드 2000 μ g (중류수 1 리터 기준)

[304]

[305] <생산 배지(pH 7.0)>

[306] 포도당 30g, (NH₄)₂SO₄ 15 g, MgSO₄ 7H₂O 1.2 g, KH₂PO₄ 1 g, 효모추출물 5 g, 바이오틴 900 μ g, 티아민 염산염 4500 μ g, 칼슘-판토텐산 4500 μ g, CaCO₃ 30 g (중류수 1리터 기준).

[307]

[308] 배양 종료 후 HPLC를 이용해 L-트립토판의 생산량을 측정하였다. 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13869::PSPL7_trpE(S38R), ATCC13869::PSPL7_trpE(S38R) Δ aroP, ATCC13869::PSPL7_trpE(S38R) Δ aroP::Pntkt_tkt, ATCC13869::PSPL7_trpE(S38R) Δ aroP::Pm4tk_tkt 균주에 대한 배양액 중의 L-트립토판 농도 및 농도 증가율은 하기 표 7과 같다.

[309]

[310] [표 7]

균주명	L-트립토판 농도(g/L)	L-트립토판 농도 증가율(%)
ATCC13869::PSPL7_trpE(S38R)	0.21	-
ATCC13869::PSPL7_trpE(S38R) Δ aroP	0.24	-
ATCC13869::PSPL7_trpE(S38R) Δ aroP::Pntkt_tkt	0.30	25.00%
ATCC13869::PSPL7_trpE(S38R) Δ aroP::Pm4tkk_tkt	0.39	62.50%

[311]

[312] 상기 표 7에 나타난 바와 같이 Pm4tkk_tkt 유전자가 1copy 도입된 ATCC13869::PSPL7_trpE(S38R) Δ aroP::Pm4tkk_tkt 균주가 대조균인 ATCC13869::PSPL7_trpE(S38R) Δ aroP 균주에 비해 L-트립토판의 농도가 62.50% 증가하는 것을 확인하였다.

[313]

[314] 실시예 3-6. 타이로신 생산능 평가

[315] 3-6-1. L-타이로신 생산 균주의 제작

[316] Pm4tkk 프로모터 변이체의 효과를 확인 하기 위하여, L-타이로신 생산 균주인 CM06-0010(대한민국 등록특허 제 10-2134418호, 한국미생물보존센터(KCCM) 기탁번호 KCCM 12487P) 균주를 모균주로 하여 형질전환을 진행 하였다.

[317] 구체적으로, 실시예 2-3에서 제작된 pDCM2- Δ Pn::Pm4tkk_tkt 벡터를 CM06-0010 균주에 전기천공법으로 도입한 후 카나마이신 25mg/L를 함유한 선별배지에서 형질전환 균주를 획득하였다. 2차 교차 과정을 거쳐 염색체 상에서 tkk 자가 프로모터(Pntkt)가 염색체상에 삽입된 DNA 단편에 의하여 tkk 프로모터 변이체로 교체 된 균주를 수득하였다. 이는 서열번호 48 및 49를 이용한 PCR과 게놈 시퀀싱을 통해 해당 유전적 조작을 확인하였으며, 제작된 균주를 CM06-0010 Δ Pn::Pm4tkk_tkt로 명명하였다.

[318]

[319] 3-6-2. tkk 프로모터 변이체가 도입된 균주의 L-타이로신 생산능 평가

[320] 모균주로 이용한 코리네박테리움 글루타미쿰 CM06-0010 균주와 실시예 3-6-1에서 제작된 CM06-0010 Δ Pn::Pm4tkk_tkt 균주의 L-타이로신 생산능을 평가하기 위해 하기와 같은 방법으로 균주를 배양한 후, 분석하였다.

[321]

[322] 먼저, 종 배지 25ml를 함유하는 250ml 코너-바플 플라스크에 각 균주들을

접종하고, 30°C에서 20시간 동안 200rpm으로 진탕 배양하였다. 그런 다음, 생산 배지 25ml를 함유하는 250ml 코너-바플 플라스크에 1ml의 종 배양액을 접종하고, 30°C에서 24시간 동안, 200rpm으로 진탕 배양하였다. 상기 종 배지 및 생산 배지의 조성은 하기와 같다.

[323]

[324] <종 배지(pH 7.0)>

[325] 포도당 20g, 펩톤 10g, 효모추출물 5g, 요소 1.5g, KH₂PO₄ 4g, K₂HPO₄ 8g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5g, 바이오틴 100μg, 티아민 염산염 1000μg, 칼슘-판토텐산 2000μg, 니코틴아미드 2000μg (중류수 1 리터 기준)

[326]

[327] <생산 배지(pH 7.0)>

[328] 포도당 30g, (NH₄)₂SO₄ 15 g, MgSO₄ 7H₂O 1.2 g, KH₂PO₄ 1 g, 효모추출물 5 g, 바이오틴 900 μg, 티아민 염산염 4500 μg, 칼슘-판토텐산 4500 μg, CaCO₃ 30 g (중류수 1리터 기준).

[329]

[330] 배양 종료 후 HPLC를 이용해 L-타이로신의 생산량을 측정하였다. CM06-0010, CM06-0010ΔPn::Pm4tk_t_tk_t 균주에 대한 배양액 중의 L-타이로신 농도 및 농도 증가율은 하기 표 8과 같다.

[331]

[332] [표8]

균주명	L-타이로신 농도(g/L)	L-타이로신 농도 증가율(%)
CM06-0010	2.01	-
CM06-0010ΔPn::Pm4tk _t _tk _t	2.86	42.29%

[333]

[334] 상기 표 8에 나타난 바와 같이 tk_t 유전자의 자체 프로모터가 Pm4tk_t 변이체로 교체된 CM06-0010ΔPn::Pm4tk_t_tk_t 균주가 대조균인 CM06-0010 균주에 비해 L-타이로신의 농도가 42.29% 증가하는 것을 확인하였다.

[335]

[336] 실시예 3-7. 페닐알라닌 생산능 평가

[337] 3-7-1. L-페닐알라닌 생산 균주의 제작

[338] Pm4tk_t 프로모터 변이체의 효과를 확인 하기 위하여, 우선 야생형 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13869 균주를 기반으로 L-페닐알라닌 생산 균주를 제작 하였다(대한민국 등록특허 제10-2134418호 참고).

[339]

[340] 구체적으로, L-타이로신에 의한 피드백 조절을 받는 tyrA 유전자를 강한

프로모터인 gapA 프로모터를 포함한 대장균 유래의 피드백 조절을 받지 않는 변이형 tyrA로 교체하였다. 대장균 유래 tyrA 단백질은 53번 메치오닌(Methionine)이 아이소루신(Isoleucine)으로, 354번 알라닌(Alanine)이 발린(Valine)으로 변이되면 피드백이 해제되는 것으로 알려져 있고 이 형태(서열번호 50)를 사용하였다(Appl. Microbiol. Biotechnol. 75, 103-110 (2007)).

[341]

[342] 상기 유전자 조작을 위해 우선 tyrA 유전자를 교체 삽입할 tyrA 업스트림(upstream)과 다운스트림(downstream) 지역을 수득하였다. 구체적으로 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13869 염색체 DNA를 주형으로 하여 서열번호 51 및 52의 프라이머를 이용하여 tyrA 업스트림 지역을, 서열번호 53 및 54의 프라이머를 이용하여 다운스트림 지역의 유전자 단편을 수득하였다. 또한, gapA 프로모터를 포함한 대장균 유래 변이 tyrA 유전자를 확보하기 위해서 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC 13869 염색체 DNA를 주형으로 하여 서열번호 55 및 56의 프라이머를 이용하여 gapA 프로모터 단편을 PCR 수행을 통해 수득하였고, 대장균 유래 변이 tyrA는 합성 DNA를 주형(서열번호 50)으로 하여 서열번호 57 및 58의 프라이머를 이용하여 대장균 유래 변이 tyrA 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, 60°C 30초 어닐링, 72°C 60초 중합을 30회 반복한 후, 72°C에서 5분간 중합반응을 수행하였다.

[343]

[344] 증폭된 tyrA 업스트림과 다운스트림 지역, gapA 프로모터, 대장균 유래 변이 tyrA 유전자 단편, 그리고 SmaI 제한효소로 절단된 염색체 형질전환용 pDCM2 벡터를 김슨 어셈블리 방법을 이용하여 클로닝함으로써 재조합 플라스미드를 획득하였으며, pDCM2-ΔtyrA::PgapA-tyrAm로 명명하였다. 클로닝은 김슨 어셈블리 시약과 각 유전자 단편들을 계산된 몰수로 혼합 후 50°C에 1시간 보존함으로써 수행하였다.

[345]

제작된 pDCM2-ΔtyrA::PgapA-tyrAm 벡터를 야생형 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13869 균주에 전기천공법으로 형질 전환 후, 2차 교차 과정을 거쳐 tyrA 유전자를 결손 하는 동시에 gapA 프로모터를 포함하는 대장균 유래 변이 tyrA 유전자가 삽입된 균주를 얻었다. 서열번호 59 및 60의 프라이머를 이용한 PCR 법과 게놈 시퀀싱을 통해 해당 유전적 조작을 확인하였으며, ATCC13869ΔtyrA::PgapA-tyrAm로 명명하였다.

[346]

[347] 방향족 공통 생합성 경로의 첫 단계인 aroG 유전자를 대장균 유래 피드백 조절 해제 변이형 aroG에 강한 프로모터를 추가하여 강화하였다. 대장균 유래 aroG 단백질은 150번 프롤린(Proline)이 루이신(Leucine)으로 치환될 경우 피드백이 해제되는 것으로 알려져 있으며, 이 형태(서열번호 61)를 사용하였다(Appl.

Environ. Microbiol. 63, 761-762 (1997)).

- [348] 이러한 유전자 조작을 위해 우선 *aroG* 유전자를 추가 삽입할 업스트림(upstream)과 다운스트림(downstream) 지역을 수득하였다. 구체적으로, 염색체상 상동재조합(Homologous recombination)이 발생하는 위치로 코리네박테리움 글루타미쿰의 트랜스포사제(Transposase)들 중 하나인 BBD29_14470 위치를 사용하여 벡터를 제작하였다.
- [349] 구체적으로, 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13869 염색체 DNA를 주형으로 하여 서열번호 62 및 63의 프라이머를 이용하여 BBD29_14470 유전자의 업스트림 지역을, 서열번호 64 및 65의 프라이머를 이용하여 다운스트림 지역의 유전자 단편을 PCR 수행을 통해 수득하였다. 또한, *gapA* 프로모터를 포함한 대장균 유래 변이형 *aroG* 유전자를 확보하기 위하여 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13869 염색체 DNA를 주형으로 하여 서열번호 66 및 67의 프라이머를 이용하여 *gapA* 프로모터 단편을 PCR 수행을 통해 수득하였고, 대장균 유래 피드백 해제 변이형 *aroG*는 합성 DNA를 주형(서열번호 61)으로 하여 서열번호 68 및 69의 프라이머를 이용하여 변이형 *aroG* 유전자 단편을 PCR 수행을 통해 수득하였다. 중합효소는 SolgTM Pfu-X DNA 폴리머라제를 사용하였으며, PCR 증폭 조건은 95°C에서 5분간 변성 후, 95°C 30초 변성, 60°C 30초 어닐링, 72°C 60초 중합을 30회 반복한 후, 72°C에서 5분간 중합반응을 수행하였다.
- [350] 증폭된 BBD29_14470 유전자의 업스트림과 다운스트림 지역, *gapA* 프로모터, 대장균 유래 변이형 *aroG* 유전자 단편, 그리고 *SmaI* 제한효소로 절단된 염색체 형질전환용 벡터 pDCM2를 김슨 어셈블리 방법을 이용하여 클로닝함으로써 재조합 플라스미드를 획득하였으며, pDCM2-ΔBBD29_14470::PgapA-*aroGm*으로 명명하였다. 클로닝은 김슨 어셈블리 시약과 각 유전자 단편들을 계산된 몰수로 혼합 후 50°C에 1시간 보존함으로써 수행하였다.
- [351]
- [352] 제작된 pDCM2-ΔBBD29_14470::PgapA-*aroGm* 벡터를 ATCC13869Δ*tyrA*::PgapA-*tyrAm* 균주에 전기천공법으로 형질 전환 후, 2차 교차 과정을 거쳐 *gapA* 프로모터를 포함하는 대장균 유래 피드백 해제 변이형 *aroG* 유전자가 삽입된 균주를 얻었다. 서열번호 70 및 71의 프라이머를 이용한 PCR 법과 게놈 시퀀싱을 통해 해당 유전적 조작을 확인하였으며, ATCC13869Δ*tyrA*::PgapA-*tyrAm*ΔBBD29_14470::PgapA-*aroGm* 로 명명하였다.
- [353]
- [354] **3-7-2. tkt 유전자가 1copy 삽입 된 L-페닐알라닌 생산 균주의 제작**
- [355] 실시예 2-2에서 제작된 pDCM2-Δ*aroP*, pDCM2-Δ*aroP*::Pm4tkt_tkt 및 pDCM2-Δ*aroP*::Pntkt_tkt를 이용하여 L-페닐알라닌 생산 균주를 제작 하였다. 실시예 3-7-1에서 제작 된 ATCC13869Δ*tyrA*::PgapA-*tyrAm*ΔBBD29_14470::PgapA-*aroGm* 균주에 상기 세

백터를 전기천공법으로 도입한 후 카나마이신 25mg/L를 함유한 선별배지에서 형질전환 균주를 획득하였다. 2차 교차 과정을 거쳐 염색체 상에서 aroP가 결손되거나, aroP 위치에 Pntkt_tkt 유전자와 Pm4tk_tkt 유전자가 각각 삽입된 균주를 획득하였다. 서열번호 46 및 47을 이용한 PCR과 게놈 시퀀싱을 통해 해당 유전적 조작을 확인하였으며, 제작된 균주를 각각

ATCC13869 Δ tyrA::PgapA-tyrAm Δ BBD29_14470::PgapA-aroGm Δ aroP,
ATCC13869 Δ tyrA::PgapA-tyrAm Δ BBD29_14470::PgapA-aroGm Δ aroP::Pntkt_tkt,
ATCC13869 Δ tyrA::PgapA-tyrAm Δ BBD29_14470::PgapA-aroGm Δ aroP::Pm4tk_tkt로 명명하였다.

[356]

[357] **3-7-3. tkt 유전자가 1copy 삽입 된 균주의 L-페닐알라닌 생산능 평가**

[358] 모균주로 이용한 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13869 Δ tyrA::PgapA-tyrAm Δ BBD29_14470::PgapA-aroGm, 실시예 3-7-2에서 제작된

ATCC13869 Δ tyrA::PgapA-tyrAm Δ BBD29_14470::PgapA-aroGm Δ aroP,
ATCC13869 Δ tyrA::PgapA-tyrAm Δ BBD29_14470::PgapA-aroGm Δ aroP::Pntkt_tkt,
ATCC13869 Δ tyrA::PgapA-tyrAm

Δ BBD29_14470::PgapA-aroGm Δ aroP::Pm4tk_tkt 균주의 L-페닐알라닌 생산능을 평가하기 위해 하기와 같은 방법으로 균주를 배양한 후, 분석하였다.

[359]

[360] 먼저, 종 배지 25ml를 함유하는 250ml 코너-바플 플라스크에 각 균주들을 접종하고, 30°C에서 20시간 동안 200rpm으로 진탕 배양하였다. 그런 다음, 생산 배지 25ml를 함유하는 250ml 코너-바플 플라스크에 1ml의 종 배양액을 접종하고, 30°C에서 24시간 동안, 200rpm으로 진탕 배양하였다. 상기 종 배지 및 생산 배지의 조성은 하기와 같다.

[361]

[362] <종 배지(pH 7.0)>

[363] 포도당 20g, 펩톤 10g, 효모추출물 5g, 요소 1.5g, KH₂PO₄ 4g, K₂HPO₄ 8g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5g, 바이오틴 100 μ g, 티아민 염산염 1000 μ g, 칼슘-판토텐산 2000 μ g, 니코틴아미드 2000 μ g (중류수 1 리터 기준)

[364]

[365] <생산 배지(pH 7.0)>

[366] 포도당 30g, (NH₄)₂SO₄ 15 g, MgSO₄ 7H₂O 1.2 g, KH₂PO₄ 1 g, 효모추출물 5 g, 바이오틴 900 μ g, 티아민 염산염 4500 μ g, 칼슘-판토텐산 4500 μ g, CaCO₃ 30 g (중류수 1리터 기준).

[367]

[368] 배양 종료 후 HPLC를 이용해 L-페닐알라닌의 생산량을 측정하였다.
코리네박테리움 글루타미쿰
ATCC13869 Δ tyrA::PgapA-tyrAm Δ BBD29_14470::PgapA-aroGm,

ATCC13869 Δ tyrA::PgapA-tyrAm Δ BBD29_14470::PgapA-aroGm Δ aroP,
 ATCC13869 Δ tyrA::PgapA-tyrAm Δ BBD29_14470::PgapA-aroGm Δ aroP::Pntkt_tkt,
 ATCC13869 Δ tyrA::PgapA-tyrAm Δ BBD29_14470::PgapA-aroGm Δ aroP::Pm4tk_tk
 t 균주에 대한 배양액 중의 L-페닐알라닌 농도 및 농도 증가율은 하기 표 9과 같다.

[369]

[370] [표9]

균주명	L-페닐알라닌 농도(g/L)	L-페닐알라닌 농도 증가율(%)
ATCC13869 Δ tyrA::PgapA-tyrAm Δ BBD29_14470::PgapA-aroGm	1.04	-
ATCC13869 Δ tyrA::PgapA-tyrAm Δ BBD29_14470::PgapA-aroGm Δ aroP	1.05	-
ATCC13869 Δ tyrA::PgapA-tyrAm Δ BBD29_14470::PgapA-aroGm Δ aroP::Pntkt_tkt	1.28	21.90%
ATCC13869 Δ tyrA::PgapA-tyrAm Δ BBD29_14470::PgapA-aroGm Δ aroP::Pm4tk_tkt	1.46	39.05%

[371]

[372] 상기 표 9에 나타난 바와 같이 Pm4tk_tkt 유전자가 1copy 도입 된
 ATCC13869 Δ tyrA::PgapA-tyrAm Δ BBD29_14470::PgapA-aroGm Δ aroP::Pm4tk_tk
 t 균주가 대조균인
 ATCC13869 Δ tyrA::PgapA-tyrAm Δ BBD29_14470::PgapA-aroGm Δ aroP 균주에
 비해 L-페닐알라닌의 농도가 39.05% 증가하는 것을 확인하였다.

[373]

[374] 이상의 결과를 통해, 본 출원의 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드를
 포함하는 재조합 미생물이 산업에 유용한 L-라이신, L-쓰레오닌, O-아세트
 호모세린 L-이소류신, 방향족 아미노산 (Aromatic amino acid)인 L-트립토판,
 L-타이로신 및 L-페닐알라닌의 생산성을 증가시키는 것을 확인하였다.

[375]

[376] 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.

[377]

[378]

특허출원을 위한 부나페스트 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 정무한 미생물 식별에 대한 표시: <i>Corynebacterium glutamicum</i> CM03-1661	국제 기탁기관이 부여한 수탁번호: KCCM12971P
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 04월 05일에 기탁된 항목 I에 표시된 미생물을 수탁하였다. ¹	
IV. 전환 요청의 수령	
상기 항목 I에 표시된 미생물은 에 본 국제기탁기관에 수탁되었고, 원기탁을 부나페스트 조약 하의 기탁으로 전환하기 위한 요청을 에 받았다.	
V. 국제기탁기관	
명칭: 한국미생물보존센터 주소: 대한민국 서울시 서대문구 홍제내 2가길 45 유림빌딩 (우) 120-861	국제기탁기관을 대표하는 권한을 가진 자 또는 권한을 부여받은 공무원 서명: 서명일: 2021. 04. 05.

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

상기 번역은 원문의 내용과 상위 없음을 증명함.

2021년 5월 20일

특허법인 한얼



청구범위

- [청구항 1] 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드 서열에서 218번, 219번, 220번, 221번, 222번, 225번 및 227번 뉴클레오티드가 다른 뉴클레오티드로 치환된, 프로모터 활성을 가지는 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드 서열에서 218번 뉴클레오티드인 시토신(C)이 티민(T)으로, 219번 뉴클레오티드인 시토신(C)이 구아닌(G)으로, 220번 뉴클레오티드인 아데닌(A)이 티민(T)으로, 221번 뉴클레오티드인 아데닌(A)이 구아닌(G)으로, 222번 뉴클레오티드인 티민(T)이 구아닌(G)으로, 225번 뉴클레오티드인 아데닌(A)이 티민(T)으로, 227번 뉴클레오티드인 시토신(C)이 아데닌(A)으로 치환된 것인, 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열로 이루어지는, 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 4] 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 목적 단백질을 코딩하는 유전자와 작동 가능하게 연결되는, 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 5] 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 폴리뉴클레오티드; 및 상기 폴리뉴클레오티드와 작동 가능하게 연결된 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 유전자 발현 카세트.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 목적 단백질은 트랜스케톨라제(Transketolase)인, 유전자 발현 카세트.
- [청구항 7] 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 폴리뉴클레오티드; 및 상기 폴리뉴클레오티드와 작동 가능하게 연결된 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는, 숙주세포.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 목적 단백질은 트랜스케톨라제(Transketolase)인, 숙주세포.
- [청구항 9] 제7항에 있어서, 상기 숙주세포는 코리네박테리움 속 미생물인, 숙주세포.
- [청구항 10] 제9항에 있어서, 상기 코리네박테리움 속 미생물은 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)인, 숙주세포.
- [청구항 11] 제7항의 숙주세포를 배지에서 배양하는 단계; 및 상기의 배지에서 목적 물질을 회수하는 단계;를 포함하는 목적 물질을 생산하는 방법.
- [청구항 12] 제11항에 있어서, 상기 목적 물질은 아미노산인, 방법.
- [청구항 13] 제11항에 있어서, 상기 목적 물질은 라이신, 쓰레오닌, O-아세틸 호모세린, 이소류신, 트립토판, 타이로신 및 페닐알라닌으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인, 방법.