(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년08월12일
(11) 등록번호 10-1646310
(24) 등록일자 2016년08월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/12 (2006.01) *C12N 15/54* (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01) *C12P 13/08* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0072181
(22) 출원일자 2013년06월24일
심사청구일자 2013년06월24일
(65) 공개번호 10-2015-0000145
(43) 공개일자 2015년01월02일
(56) 선행기술조사문헌
US20070072194 A1

(73) 특허권자
씨제이제일제당 (주)
서울특별시 중구 동호로 330 (쌍림동)
(72) 발명자
이지선
인천 남동구 경인로 732, (간석동)
이광호
대전 유성구 어은로 57, 105동 404호 (어은동, 한빛아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
조인제

전체 청구항 수 : 총 8 항 심사관 : 김남경

(54) 발명의 명칭 **L-쓰레오닌 생산 미생물 및 이를 이용한 L-쓰레오닌의 생산방법**

(57) 요 약

본 발명은 L-쓰레오닌 생산 미생물 및 이를 이용한 L-쓰레오닌 생산방법에 관한 것이며, 보다 상세하게는, L-쓰레오닌 생산능이 강화된 미생물 및 이를 이용하여 고수율로 L-쓰레오닌을 생산하는 방법에 관한 것이다.

(72) 발명자

고은성

경기 수원시 팔달구 권광로 373, 101동 1802호 (우만동, 월드메르디앙아파트)

김형준

서울 구로구 경인로 343, 103동 1403호 (고척동, 삼환로즈빌)

이근철

경기 화성시 동탄숲속로 36, 882동 1002호 (능동, 모아미래도2단지아파트)

황영빈

서울 강서구 강서로47길 108, 104동 701호 (내발산동, 마곡수명산파크1단지)

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 17로 기재된 아미노산 서열로 이루어지는 RNA 폴리머라아제 시그마-32 팩터(RNA polymerase sigma-32 factor) 변이체.

청구항 2

서열번호 15로 기재되는, 제1항의 변이체를 코딩하는 유전자.

청구항 3

제2항의 유전자을 포함하는 벡터.

청구항 4

제1항의 변이체를 발현하는 L-쓰레오닌 생산능을 가지는 재조합 에스케리키아속 미생물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 발현은 서열번호 17로 기재된 아미노산 서열로 이루어지는 RNA 폴리머라아제 시그마-32 팩터(RNA polymerase sigma-32 factor) 변이체를 암호화하는 염기서열을 포함하는 재조합 벡터가 형질 도입되거나, 상기 염기서열이 염색체 내에 추가로 삽입되어 이루어지는 것을 특징으로 하는, L-쓰레오닌 생산능을 가지는 재조합 에스케리키아속 미생물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 염기서열은 서열번호 15의 염기서열로 이루어지는 것을 특징으로 하는, L-쓰레오닌 생산능을 가지는 재조합 에스케리키아속 미생물.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 에스케리키아 속 미생물은 대장균(*Escherichia coli*)인 것을 특징으로 하는, L-쓰레오닌 생산능을 가지는 재조합 에스케리키아 속 미생물.

청구항 8

제4항 내지 제7항 중 어느 한 항의 L-쓰레오닌 생산능을 가지는 재조합 에스케리키아속 미생물을 배양하는 단계 및 상기 배양하는 단계에서 수득된 배양액으로부터 L-쓰레오닌을 분리하는 단계를 포함하는 L-쓰레오닌 생산방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 RNA 폴리머라아제 시그마-32 팩터 변이체 및 이를 이용하여 L-쓰레오닌을 생산하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] L-쓰레오닌은 필수 아미노산의 일종으로 사료 및 식품첨가제, 그리고 동물 성장 촉진제로 널리 사용되고 있으며, 의약품의 합성원료 및 의약용 수액제로도 유용하게 사용되고 있다.

[0003] L-쓰레오닌은 주로 인공변이법 또는 유전자 재조합 방법에 의해 개발된 대장균 또는 코리네형 세균(*Corynebacterium*)을 이용한 발효법으로 생산된다. 대장균, 코리네형 세균, 세라티아속 세균 및 프로비덴시아속 세균의 야생형 균주로부터 유도된 인공변이주가 L-쓰레오닌의 생산을 위해 널리 사용되고 있다.

[0004] 유전자 재조합 기술이 발전함에 따라 무작위적 돌연변이법에 의해 개발된 L-쓰레오닌 생산주를 대상으로 부위특이적인 유전자 치환, 유전자 증폭 및 결실 등을 도입하여 보다 향상된 L-쓰레오닌 생산주의 개발에 대한 기술들이 보고되고 있다. 쓰레오닌의 생합성에 관련된 유전자 및 이들의 발현을 증가시키는 방법이 다양하게 개발되었으나, 보다 높은 수율의 L-쓰레오닌을 생산할 수 있는 방법에 대한 요구가 여전히 존재한다.

[0005] 광역 전사 기구(global transcription machinery)는 모든 세포 시스템(원핵 및 진핵생물)에서 전사체를 제어하는 역할을 한다. 광역 전사 기구 조작(global transcription machinery engineering)은 광역 전사조절자(global regulator)를 코딩하는 핵산, 또는 이의 발현을 조절하는 프로모터를 돌연변이시켜 형질 개량된 광역 전사조절자를 포함하는 재조합 세포를 제공하며, 이 방법에 의해 향상된 표현형을 가지는 세포를 생산할 수 있다.

[0006] 시그마 팩터는 RNA 폴리머라아제 전효소(holoenzyme)의 프로모터 선호도에 초점을 맞춤으로써 광역 전사를 조정하는데 중요한 역할을 수행하는 광역 전사조절자의 일종이다. 시그마 팩터(Sigma factor, σ factor)는 원핵생물의 전사 시작 인자로서 유전자의 프로모터에 RNA 폴리머라아제의 특이적 결합을 가능하게 한다. 각기 다른 시그마 팩터들은 각기 다른 환경 조건에 반응하여 활성화되며, 모든 RNA 폴리머라아제 분자들은 하나의 시그마 팩터를 포함하게 된다. 대장균은 적어도 여덟 개의 시그마 팩터를 가지고 있으며, 시그마 팩터의 수는 박테리아의 종(bacterial species)에 따라 다르다고 알려져 있다.

[0007] 본 발명자들은 L-쓰레오닌 생산능을 갖는 대장균의 고온에서의 스트레스에 대한 내성을 보다 강화할 목적으로 열충격 반응을 통제하는 것으로 알려진 시그마-32를 코딩하는 rpoH 유전자에 대한 개량연구를 진행하였으며, 그 결과 고온에서도 쓰레오닌 생합성능이 크게 감소하지 않도록 전사기작을 조절하는 RNA 폴리머라아제 시그마-32 팩터 변이체를 개발하고, 이를 쓰레오닌 생산주에 도입하여 쓰레오닌 생산주를 제작함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 RNA 폴리머라아제 시그마-32 팩터 변이체를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 본 발명은 또한 상기 RNA 폴리머라아제 시그마-32 팩터 변이체를 코딩하는 염기서열을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0010] 본 발명은 또한 상기 염기서열을 포함하는 벡터를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0011] 본 발명은 또한 상기 변이체를 발현하는 L-쓰레오닌 생산능을 가지는 재조합 에스케리키아속 미생물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0012] 본 발명은 또한 상기 재조합 에스케리키아속 미생물을 이용하여 L-쓰레오닌을 생산하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 17의 아미노산 서열을 가지는 RNA 폴리머라아제 시그마-32 팩터 변이체를 제공한다.

[0014] 본 발명은 또한 상기 RNA 폴리머라아제 시그마-32 팩터 변이체를 코딩하는 염기서열을 제공한다.

[0015] 본 발명은 또한 상기 변이체를 발현하는 L-쓰레오닌 생산능을 가지는 재조합 에스케리키아속 미생물을 제공한다.

[0016] 본 발명은 또한 상기 재조합 에스케리키아속 미생물을 이용하여 L-쓰레오닌을 생산하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0017] 본 발명에 따른 고온에 의한 스트레스에 내성을 가지는 RNA 폴리머라아제 시그마-32 팩터 변이체를 코딩하는 염

기서열을 포함하는 벡터로 형질전환된 균주는_온도 내성이 부여되었을 뿐만 아니라 L-쓰레오닌의 수율도 향상되어 고온 배양 시에도 종래 균주에 비하여 현저히 높은 쓰레오닌을 생산할 수 있으므로, 고수율로 쓰레오닌을 생산하는데 유용하게 사용될 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0019] 본 발명은 서열번호 17로 기재된 아미노산 서열을 가지는 RNA 폴리머라아제 시그마-32 팩터(RNA polymerase sigma-32 factor) 변이체를 제공한다.

[0020] 본원발명에서 사용된 용어 "시그마 32(sigma-32, σ^{32}) 팩터"는 광역 전사조절자인 시그마 팩터로서 대수기(log phase)에서 열충격 반응을 통제하는 주요 시그마 팩터로 알려져 있으며, *rpoH* 유전자에 의해 코딩된다.

[0021] 본 발명의 변이체는 상기 변이체의 아미노산 서열에 대해서 80% 이상, 바람직하게는 90% 이상, 보다 바람직하게는 95% 이상, 특히 바람직하게는 99% 이상의 상동성을 가지는 변이체 또한 본 발명에 포함된다. 상기 아미노산 서열에 대한 상동성은 예를 들면 문헌에 의한 알고리즘 BLAST [참조: Karlin 및 Altschul, Pro. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 5873(1993)]이나 Pearson에 의한 FASTA[참조: Methods Enzymol., 183, 63(1990)]을 사용하여 결정할 수 있다. 이러한 알고리즘 BLAST에 기초하여, BLASTN이나 BLASTX라고 불리는 프로그램이 개발되어 있다[참조: www.ncbi.nlm.nih.gov]. 본 발명의 변이체는 상기 변이체의 아미노산 서열에 대해서 결실, 삽입, 아미노산 치환 등을 가지는 돌연변이체가 포함되고, 또한 코돈 치환을 갖는 돌연변이체도 포함된다.

[0022] 본 발명의 바람직한 구현에서는 대장균 야생주인 W3110의 무작위적 돌연변이(random mutation)가 도입된 *rpoH*로 이루어진 DNA 풀(mutated *rpoH* DNA pool)로부터 변이체를 추출하여 $rpoH^{2\text{-}G6}$라 명명하였다. 이를 염기서열 분석한 결과, 야생형 RNA 폴리머라아제 시그마-32 팩터의 아미노산 서열(서열번호 16)과 비교하여 아미노산 서열상의 돌연변이가 일어났음을 확인할 수 있었다(실시예 3).

[0023] 본 발명은 또한 상기 변이체를 코딩하는 염기서열을 제공한다.

[0024] 본 발명의 바람직한 구현에서, 상기 RNA 폴리머라아제 시그마-32 팩터 변이체는 바람직하게는 서열번호 15의 염기서열을 가질 수 있다.

[0025] 본 발명의 바람직한 구현에서, 상기 변이체를 코딩하는 염기서열은 유전 암호가 퇴보되어 있을 수 있다. 유전 암호의 퇴보(genetic code degeneracy)는 유전 암호 중의 문자 중 맨 끝자의 의미가 없는 현상으로, 앞의 두 염기만 같으면 제자리의 암호는 달라도 동일한 암호 역할을 한다.

[0026] 이에, 본 발명의 염기서열은 서열번호 15로 기재되는 염기서열과 80% 이상의 상동성, 바람직하게는 90% 이상의 상동성, 더욱 바람직하게는 95% 이상의 상동성, 가장 바람직하게는 99% 이상의 상동성을 가질 수 있다.

[0027] 본 발명은 또한 상기 염기서열을 포함하는 벡터를 제공한다.

[0028] 본 발명에서 사용되는 벡터는 숙주 중에서 복제 가능한 것이면 특별히 한정 되지 않으며 당 업계에 알려진 임의의 벡터를 이용할 수 있다. 통상 사용되는 벡터의 예로는 천연 상태이거나 재조합된 상태의 플라스미드, 코스미드, 바이러스 및 박테리오파지를 들 수 있다. 예를 들어, 파지 벡터 또는 코스미드 벡터로서 pWE15, M13, λMBL3, λMBL4, λIXII, λASHII, λAPII, λt10, λt11, Charon4A, 및 Charon21A 등을 사용할 수 있으며, 플라스미드 벡터로서 pBR계, pUC계, pBluescriptII계, pGEM계, pTZ계, pCL계 및 pET계 등을 사용할 수 있다. 본 발명에서 사용 가능한 벡터는 특별히 제한되는 것이 아니며, 공지된 발현 벡터를 사용할 수 있다. 바람직하게는 pACYC177, pACYC184, pCL, pECCG117, pUC19, pBR322, pMW118, pCC1BAC 벡터 등을 사용할 수 있다. 가장 바람직하게는, pACYC177, pACYC184, pCL, pCC1BAC 벡터를 사용할 수 있다.

[0029] 본 발명은 또한 상기 변이체를 발현하는 L-쓰레오닌 생산능을 가지는 재조합 에스케리키아속 미생물을 제공한다.

[0030] 본 발명에서, 상기 변이체의 발현은 상기 변이체를 코딩하는 유전자를 작동 가능하게 포함하는 재조합 벡터로 형질전환되거나, 상기 변이체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 염색체 내에 삽입되어 달성될 수 있으나, 이로 특별히 제한되지 않는다.

[0031] 본 발명에서 용어 "형질전환"은 목적 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 숙주 세포 내에

도입하여 숙주 세포 내에서 상기 폴리뉴클레오티드가 암호화하는 단백질이 발현할 수 있도록 하는 것을 의미한다. 도입된 폴리뉴클레오티드는 숙주 세포 내에서 발현될 수 있기만 한다면, 숙주세포의 염색체 내에 삽입되어 위치하거나 염색체 외에 위치할 수 있다. 또한, 상기 폴리뉴클레오티드는 표적 단백질을 암호화하는 DNA 및 RNA를 포함한다. 상기 폴리뉴클레오티드는 숙주 세포 내로 도입되어 발현될 수 있는 것이면, 어떠한 형태로 도입되는 것이든 상관없다. 예를 들면, 상기 폴리뉴클레오티드는, 자체적으로 발현되는데 필요한 모든 요소를 포함하는 폴리뉴클레오티드 구조체인 발현카세트(expression cassette)의 형태로 숙주세포에 도입될 수 있다. 상기 발현카세트는 통상 상기 유전자의 오픈 리딩 프레임(open reading frame, 이하 "ORF"라 약칭함)에 작동 가능하게 연결되어 있는 프로모터(promoter), 전사 종결 신호, 리보좀 결합부위 및 번역 종결신호를 포함한다. 상기 발현카세트는 자체 복제가 가능한 발현 벡터 형태일 수 있다. 또한, 상기 폴리뉴클레오티드는 그 자체의 형태로 숙주세포에 도입되어, 숙주세포에서 발현에 필요한 서열과 작동 가능하게 연결되어 있는 것일 수도 있다.

[0032] 본 발명에 있어서, 바람직하게는 상기 형질전환은 RNA 폴리머라아제 시그마-32 팩터 변이체를 코딩하는 염기서열을 포함하는 벡터가 형질도입되거나, 상기 염기서열이 염색체 내에 삽입되어 이루어지는 것을 특징으로 하나 이로 특별히 제한되지 않는다.

[0033] 본 발명의 미생물은 L-쓰레오닌을 생산할 수 있는 한, 원핵 미생물 어느 것이나 포함된다. 예를 들면, 에스케리키아(Escherichia) 속, 어위니아(Erwinia) 속, 세라티아(Serratia) 속, 프로비덴시아(Providencia) 속, 코리네박테리움(Corynebacterium) 속 및 브레비박테리움(Brevibacterium)속에 속하는 미생물 균주가 포함될 수 있다. 바람직하게는, 에스케리키아 속에 속하는 미생물이고, 더욱 바람직하게는 대장균 (*Escherichia coli*)이다.

[0034] 본 발명의 바람직한 구현에서, 본 발명은 모균주로서 쓰레오닌 생산균주를 활용할 수 있다. 상기 쓰레오닌 생산 균주는 메티오닌 요구성, 쓰레오닌 유사체에 대한 내성, 라이신 유사체에 대한 내성, 이소루이신 유사체에 대한 내성 및 메티오닌 유사체에 대한 내성을 갖는 대장균일 수 있다. 또한, 쓰레오닌 생산균주는 쓰레오닌 생합성 유전자 등을 조작한 재조합 대장균일 수 있으며, 예를 들어 포스포에놀 파이루베이트 카르복실레이즈(phosphoenol pyruvate carboxylase; ppc)유전자 및 아스파르토카이네이즈 L-호모세린 디하이드로지네이즈(aspartokinase L-homoserine dehydrogenase; thrA), 호모세린 카이네이즈 (homoserine kinase; thrB), 쓰레오닌 신테이즈(threonine synthase; thrC)가 포함된 오페론이 각각 1카피 도입된 재조합 대장균 또는 L-쓰레오닌 분해과정에 관여하는 오페론 유전자(tdcBC) 및 포스포에놀 파이루베이트 카르복시카이네이즈(PEP carboxykinase, pckA)가 모두 불활성화된 재조합 대장균일 수 있다.

[0035] 바람직하게는, 대장균 FTR2533 KCCM10541P(대한민국 등록특허번호 제10-0576342호), 대장균 ABA5G/ pAcscBAR'-M, pC-Ptrc-scrAB(대한민국 등록특허번호 제10-1145943호) 및 대장균 KCCM11167P(한국 공개특허번호 제10-2012-0083795호)로 이루어진 군으로부터 선택된 균주를 사용할 수 있다.

[0036] 본 발명의 바람직한 구현에서, 본 발명에 따라 형질전환된 미생물은 바람직하게는 대장균 FTR2700일 수 있다.

[0037] 본 발명의 바람직한 구현에서, 본 발명의 미생물은 L-쓰레오닌 생산성 향상을 위한 하나 이상의 바람직한 표현형을 갖는 대장균일 수 있다. 바람직하게는, 하나 이상의 바람직한 표현형은 온도 내성형이다.

[0038] 본 발명은 또한 상기 형질전환된 균주를 이용하여 L-쓰레오닌을 생산하는 방법을 제공한다.

[0039] 본 발명의 상기 배양과정은 당 업계에 알려진 적당한 배지와 배양조건에 따라 이루어질 수 있다. 이러한 배양과정은 당업자라면 선택되는 균주에 따라 용이하게 조정하여 사용할 수 있다. 상기 배양방법의 예에는 회분식, 연속식 및 유가식 배양이 포함되나, 여기에 한정되는 것은 아니다.

[0040] 본 발명의 미생물 배양에 사용되는 배지 및 기타 배양조건은 통상의 에스케리키아 속 미생물의 배양에 사용되는 배지이면 어느 것이나 사용될 수 있으나, 본 발명의 미생물의 요구 조건을 적절하게 만족시켜야 한다.

[0041] 본 발명의 구체적인 양태로서, 본 발명의 미생물을 적당한 탄소원, 질소원, 아미노산, 비타민 등을 함유한 통상의 배지 내에서 호기성 조건 하에서 온도, pH 등을 조절하면서 배양한다.

[0042] 이때 탄소원으로는 글루코오스, 프룩토오스, 수크로스, 말토오스, 만니톨, 소르비톨 같은 탄수화물, 당 알콜, 글리세롤, 피루브산, 락트산 및 시트르산과 같은 알콜 및 유기산, 글루탐산, 메티오닌 및 리신과 같은 아미노산 등이 포함되며, 전분 가수분해물, 당밀, 블랙스트랩 당밀, 쌀겨울, 카사버, 사탕수수찌기 및 옥수수 침지액 같은 천연의 유기 영양원을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 글루코오스 및 살균된 전처리 당밀(즉, 환원당으로 전환된 당밀) 등과 같은 탄수화물이며, 그 외의 적정량의 탄소원을 제한 없이 다양하게 이용할 수 있다. 질소

원으로는 암모니아, 황산암모늄, 염화암모늄, 초산암모늄, 인산암모늄, 탄산안모늄, 및 질산암모늄과 같은 무기 질소원; 글루탐산, 메티오닌, 글루타민과 같은 아미노산 및 펩톤, NZ-아민, 육류 추출물, 효모 추출물, 맥아 추출물, 옥수수 침지액, 카세인 가수분해물, 어류 또는 그의 분해생성물, 탈지 대두 케이크 또는 그의 분해생성물 등 유기질소원이 사용될 수 있다. 이들 질소원은 단독 또는 조합되어 사용될 수 있다. 상기 배지에는 인원으로서 인산 제1칼륨, 인산 제2칼륨 및 대응되는 소듐-함유 염이 포함될 수 있다. 무기화합물로는 염화나트륨, 염화칼슘, 염화철, 황산마그네슘, 황산철, 황산망간 및 탄산칼슘 등이 사용될 수 있으며, 그 외에 아미노산, 비타민 및 적절한 전구체 등이 포함될 수 있다. 이들 배지 또는 전구체는 배양물에 회분식 또는 연속식으로 첨가될 수 있다.

[0043] 배양 중에 수산화암모늄, 수산화칼륨, 암모니아, 인산 및 황산과 같은 화합물을 배양물에 적절한 방식으로 첨가하여, 배양물의 pH를 조정할 수 있다. 또한, 배양 중에는 지방산 폴리글리콜 에스테르와 같은 소포제를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다. 또한, 배양물의 호기 상태를 유지하기 위하여, 배양물 내로 산소 또는 산소 함유 기체를 주입하거나 혐기 및 미호기 상태를 유지하기 위해 기체의 주입 없이 혹은 질소, 수소 또는 이산화탄소 가스를 주입할 수 있다. 배양물의 온도는 보통 27℃ 내지 37℃, 바람직하게는 30℃ 내지 37℃이다. 배양 기간은 원하는 유용 물질의 생성량이 수득될 때까지 계속될 수 있으며, 바람직하게는 10 내지 100 시간이다.

[0044] 본 발명의 상기 배양 단계에서 생산된 L-쓰레오닌은 추가로 정제 또는 회수하는 단계를 포함할 수 있으며, 상기 정제 또는 회수 방법은 본 발명의 미생물의 배양방법, 예를 들어 회분식, 연속식 또는 유가식 배양 방법 등에 따라 당해 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 배양액으로부터 목적하는 L-쓰레오닌을 정제 또는 회수할 수 있다.

[0045] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되는 것은 아니다.

[0046] **< 실시예 >**

[0047] **실시예 1: 재조합 벡터 pCC1BAC-rpoH의 제작**

[0048] (1) *rpoH* 유전자 단편의 준비

[0049] *rpoH* 유전자(서열번호 14, 아미노산 서열번호 16)를 포함하는 DNA 단편 약 1.0 kb를 얻기 위해, 퀴아젠사(Qiagen)의 Genomic-tip 시스템을 이용하여 대장균 야생주인 W3110의 염색체 DNA(gDNA)를 추출하고, 상기 gDNA를 주형으로 PCR HL 프리믹스 키트(BIONEER사 제품, 이하 동일함)를 사용하여 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, 이하 "PCR"이라 약칭함)을 수행하였다.

[0050] *rpoH* 유전자를 증폭시키기 위한 PCR은 서열번호 1 및 2의 프라이머를 사용하여 94℃에서 30초의 변성(denaturation), 55℃에서 30초의 어닐링(annealing) 및 72℃에서 1분의 신장(elongation)으로 이루어진 사이클을 27회 반복 수행하였다.

[0051] 상기 PCR 결과물을 *EcoR*I으로 절단하여 1.0Kb 크기의 DNA 단편(이하, "*rpoH* 단편"이라 명명함)을 0.8% 아가로스 겔(agarose gel)에서 전기영동한 후 용리(鎔離)하여 수득하였다.

[0052] (2) 재조합 벡터 pCC1BAC-rpoH의 제작

[0053] 복제수조절 pCC1BAC *EcoR*I 클로닝-레디 벡터(Copycontrol pCC1BAC *EcoR*I cloning-ready vector; EPICENTRE(USA))와 실시예 1-(1)에서 수득한 *rpoH* 단편을 각각 제한효소 *EcoR*I으로 처리하고 라이게이션(ligation)시켜 pCC1BAC-rpoH 플라스미드를 제작하였다.

[0054] **실시예 2: 재조합 벡터 pCC1BAC-rpoH의 변이체 라이브러리 제작**

[0055] (1) error-prone PCR을 이용한 rpoH 변이체의 준비

[0056] 무작위적 돌연변이(Random mutation)가 도입된 *rpoH* 변이체 단편들로 이루어진 DNA pool을 얻기 위해, 실시예 1-(1)에서 추출한 W3110의 gDNA를 주형으로 클론테크사(clonetech)의 diversify PCR random mutagenesis kit(catalog No. K1830-1)의 사용자 매뉴얼에 제시되어 있는 표 Ⅲ의 돌연변이 반응(mutagenesis reactions) 4

의 조건으로 PCR을 수행하였다. PCR은 서열번호 1 및 2의 프라이머를 사용하여 94℃에서 30초의 변성(denaturation), 68℃에서 1분의 신장(elongation)으로 이루어진 사이클을 25회 반복 수행하였다.

[0057] 상기 PCR 결과물을 *EcoR*I으로 절단하여 1.0Kb 크기의 DNA 단편(이하, "*rpoH*^{m} 단편"이라 명명함)을 0.8% 아가로스 겔(agarose gel)에서 전기영동한 후 용리(鎔離)하여 수득하였다.

[0058] (2) 재조합 벡터 pCC1BAC-rpoH의 변이체 라이브러리의 제작

[0059] 복제수조절 pCC1BAC *EcoR*I 클로닝-레디 벡터를 실시예 2-(1)에서 수득한 *rpoH*^{m} 단편과 라이게이션(ligation)시켜 pCC1BAC-rpoH^{m} 벡터를 제작하였다.

[0060] 이를 트랜스포막스 EPI300 일렉트로컴피턴트 대장균(TransforMax EPI300 Electrocompetent *E.coli*; EPICENTRE(USA))에 형질전환시키고, LB 플레이트 + 15 ㎍/ml 클로람페니콜(chloramphenicol) + 40 ㎍/ml X-Gal + 0.4mM IPTG에서 선별하여 푸른색 콜로니가 나오지 않음을 확인하고 획득된 콜로니들을 모아 플라스미드 프렙(plasmid prep)을 수행하여 pCC1BAC-rpoH의 변이체 라이브러리를 제작하였다.

[0061] (3) pCC1BAC-rpoH의 변이체 라이브러리의 쓰레오닌 생산 균주 도입

[0062] 상기 실시예 1-(2)에서 수득된 pCC1BAC-rpoH 및 실시예 2-(2)에서 수득된 pCC1BAC-rpoH의 변이체 라이브러리를 컴피턴트한 상태로 제조한 쓰레오닌 생산 균주인 대장균 KCCM 10541에 각각 형질전환하여 도입하고, 얻어진 균주를 각각 KCCM 10541/pCC1BAC-rpoH 및 KCCM 10541/pCC1BAC-rpoH mutant library로 명명하였다.

[0063] 본 실시예에서 사용된 모균주인 대장균 KCCM10541은 메티오닌 영양요구성, 이소루이신 리키형 요구성, L-쓰레오닌 유사체 (예, α-아미노-β-히드록시 발레릭산, AHV)에 대한 내성, L-라이신 유사체 (예, S-(2-아미노에틸)-L-시스테인, AEC)에 대한 내성, 이소루이신 유사체 (예, α-아미노부티릭산) 대한 내성, 메티오닌의 유사체 (예, 에티오닌)에 대한 내성 등의 특성을 가지는 모균주인 대장균 (*Escherichia coli*) KCCM 10236의 염색체 내부에 존재하는 *tyrR* 유전자와 *galR* 유전자를 불활성화킴으로써 향상된 L-쓰레오닌 생산능을 갖는 균주이다(대한민국 특허등록번호 제 10-0576342호).

[0064] **실시예 3: 온도에 내성을 가지는 RNA 폴리머라아제 시그마-32 팩터 변이체의 선별**

[0065] 본 실시예에서는 온도에 내성을 가지는 RNA 폴리머라아제 시그마-32 팩터 변이체를 선별하기 위한 실험을 진행하였다.

[0066] 상기 실시예 2-(3)에서 제조한 대장균 KCCM 10541/pCC1BAC-rpoH 및 대장균 KCCM 10541/pCC1BAC-rpoH mutant library를 37℃, 33℃ 배양기(incubator)에서 LB 고체 배지 중에 밤새 배양하고, 이를 각각 하기 표 1의 25 mL 역가 배지에 한 백금이씩 접종한 다음, 이를 37℃, 33℃ 200 rpm의 쉐이킹 배양기에서 48시간 동안 각각 배양하였다.

표 1

[0067]

조성물	농도 (리터당)
포도당	70 g
KH_2PO_4	2 g
$(NH_4)_2SO_4$	27.5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	5 mg
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	5 mg
DL-메티오닌	0.15 g
효모 추출물	2 g
탄산칼슘	30 g
pH	6.8

[0068] *rpoH* 변이체 라이브러리들이 도입된 각각의 콜로니들을 37℃에서 배양하여 KCCM10541/pCC1BAC-rpoH 대비 쓰레오닌의 농도가 상승하는 변이체들을 선별하고, 이들을 33℃에서 배양하여 평가하는 과정을 반복하여 *rpoH* 변이체 라이브러리에 대한 평가를 수행하였다. 이러한 과정을 통해 온도 내성과 수율 향상이 동시에 부여된 클론을 선별하였다. 상기 클론으로부터 벡터를 추출하여 pCC1BAC-rpoH^{2-G6}로 명명하였다.

[0069] 상기 pCC1BAC-rpoH^{2-G6}의 변이를 확인하기 위하여, 복제수조절 pCC1BAC *EcoR*I 클로닝-레디 벡터 키트에 확인용 프라이머로 제공되는 pIB FP(서열번호 3)과 pIB RP(서열번호 4)를 이용하여 pCC1BAC-rpoH^{2-G6}를 PCR하고 얻어진 PCR 결과물을 서열 분석하였다. 서열분석 결과, *rpoH*의 변이체인 rpoH^{2-G6}(서열번호 15)는 서열번호 17의 아미노산 서열을 가짐을 확인하였다.

[0070] **실시예 4: 재조합 균주의 L-쓰레오닌 생산능 비교**

[0071] 상기 실시예 3에서 얻어진 벡터 pCC1BAC-rpoH^{2-G6}를 대장균 KCCM 10541에 형질 전환하여 대장균 KCCM 10541/pCC1BAC-rpoH^{2-G6}을 제조하였다.

[0072] 모균주인 대장균 KCCM 10541, 대장균 KCCM 10541/pCC1BAC-rpoH 및 대장균을 KCCM 10541/pCC1BAC-rpoH^{2-G6}를 각각 상기 표 1의 쓰레오닌 역가 배지를 이용하여 삼각플라스크에서 배양하여 L-쓰레오닌 생산성을 확인하였다. 그 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

[0073]

균주	L-쓰레오닌 (g/L)	
	33℃	37℃
KCCM 10541 (모균주)	30.6	25.0
KCCM 10541/pCC1BAC-rpoH	30.5	26.1
KCCM 10541/pCC1BAC-rpoH^{2-G6}	31.1	31.8

[0074] 상기 표 2에 기재된 바와 같이, 모균주인 대장균 KCCM10541과 대조군 균주인 KCCM10541/pCC1BAC-rpoH 균주는 48시간 배양하였을 경우 30.6 g/L, 30.5 g/L 의 L-쓰레오닌을 생산하였으나, 상기에서 수득된 대장균 KCCM 10541/pCC1BAC-rpoH^{2-G6} 균주는 31.1 g/L의 L-쓰레오닌을 생산하여 모 균주에 비해 약 1% 향상된 L-쓰레오닌 생산능을 나타내었다.

[0075] 37℃에서는 모균주(KCCM 10541)와 대조군 균주(KCCM10541/pCC1BAC-rpoH)의 수율이 하락하는 양상을 보인 반면, KCCM 10541/pCC1BAC-rpoH^{2-G6} 균주는 온도에 따른 농도 하락 현상을 보이지 않았고, 31.8 g/l의 L-쓰레오닌을 생산하여 고온 배양 시 대조군에 비하여 약 8% 향상된 쓰레오닌 생산능이 부여되었음을 확인할 수 있었다.

[0076] **실시예 5: 선별된 *rpoH* 변이체(rpoH^{2-G6})의 쓰레오닌 생산 균주별 효과 비교**

[0077] (1) ABA5G/ pAcscBAR'-M, pC-Ptrc-scrAB 균주에서의 rpoH 변이체(rpoH^{2-G6}) 효과 확인

[0078] 상기 실시예 4에서 효과가 확인된 벡터 pCC1BAC-rpoH^{2-G6}을 쓰레오닌 생산 균주인 ABA5G/ pAcscBAR'-M, pC-Ptrc-scrAB(대한민국 특허등록번호 제10-1145943호)에 도입하여 ABA5G/ pAcscBAR'-M, pC-Ptrc-scrAB, pCC1BAC-rpoH^{2-G6}을 제작하고, 하기 표 3과 같이 역가 배지를 제조하여 역가 평가를 실시하였다. 그 결과를 하기 표 4에 나타내었다.

[0079] 본 실시예에서 사용된 모균주인 ABA5G/ pAcscBAR'-M, pC-Ptrc-scrAB는 쓰레오닌 생산균주인 ABA5G 균주(모균주인 대장균 W3110의 NTG 돌연변이 유도에 의하여 제작된 균주이며, 메치오닌 요구성, 아이소루이신 리키(leaky),

α-아미노-β-히드록시 바레릭산 내성, 2-아미노에틸-1-시스테인 내성, 1-아제티딘-2-카르복시산 내성을 가짐)에 pAcscBAR'-M 유전자군과 pC-Ptrc-scrAB 유전자군을 포함하는 벡터로 형질 전환하여 얻어진 L-쓰레오닌 생산능을 가지는 대장균이다.

표 3

[0080]

조성물	농도 (리터당)
원당	70 g
KH_2PO_4	2 g
$(NH_4)_2SO_4$	27.5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	5 mg
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	5 mg
DL-메티오닌	0.15 g
효모 추출물	2 g
탄산칼슘	30 g
pH	6.8

표 4

[0081]

균주	L-쓰레오닌 (g/L)	
	33℃	37℃
ABA5G/ pAcscBAR'-M, pC-Ptrc-scrAB	22.8	19.8
ABA5G/ pAcscBAR'-M, pC-Ptrc-scrAB, pCC1BAC-rpoH^{2-G6}	22.8	22.0

[0082] 상기 표 4에 기재된 바와 같이, 대장균 KCCM10541 이외의 다른 쓰레오닌 생산균주에 도입했을 경우에도 상기 표 2에서 확인된 것과 유사하게 벡터 pCC1BAC-rpoH^{2-G6}를 도입하면 33℃에서는 쓰레오닌 수율이 유지되고, 37℃에서도 쓰레오닌 수율이 33℃의 수율과 유사한 수준으로 유지되는 것을 확인할 수 있었다.

[0083] (2) 대장균 KCCM11167P 균주에서의 rpoH 변이체(rpoH^{2-G6}) 효과 확인

[0084] 또 다른 쓰레오닌 생산균주인 대장균 KCCM11167P(한국 특허출원번호 제2011-0005136호)에 벡터 pCC1BAC-rpoH^{2-G6}을 도입하여 대장균 KCCM11167P_/pCC1BAC-rpoH^{2-G6}을 제작하고, 상기 표 1의 역가 배지를 제조하여 쓰레오닌 생산능을 평가하였다. 그 결과를 하기 표 5에 나타내었다.

[0085] 본 실시예에서 사용된 모균주인 대장균 KCCM11167P는 KCCM10541 균주(대한민국 특허등록번호 제 10-0576342) 에 *tdcB*를 불활성화 시키고 *nadK*를 2copy로 강화하여 NAD 키나아제 활성을 강화한 균주이다.

표 5

[0086]

균주	L-쓰레오닌 (g/L)	
	33℃	37℃
KCCM11167P	30.1	26.2
KCCM11167P/pCC1BAC- rpoH^{2-G6}	30.2	29.8

[0087] 상기 표 5의 역가 평가 결과를 보면, 상기 5-(1)에서와 같은 다른 쓰레오닌 생산균주에 도입되었을 때와 마찬가지로, 쓰레오닌 생산능이 있는 균주에 pCC1BAC- rpoH^{2-G6} 가 도입되면 33℃에서는 쓰레오닌 수율이 유지되고, 37℃에서는 쓰레오닌 수율이 33℃에서의 수율과 유사하게 유지되는 것을 확인할 수 있었다.

[0088] **실시예 6: 선별된 rpoH 변이체($rpoH^{2-G6}$)의 염색체로의 추가 삽입**

[0089] (1) $rpoH^{2-G6}$ 삽입용 카세트(integration cassette) 단편의 준비

[0090] 상기 실시예 3에서 선별된 $rpoH^{2-G6}$ 변이체를 염색체에 추가 삽입하기 위하여 선형 삽입용 카세트(linear integration cassette)를 제작하였다. 선형 삽입용 카세트는 아래 방법에 따라 제작하였다.

[0091] 서열 번호 5와 6의 프라이머를 이용하여 대장균 W3110 gDNA를 주형으로 하여 PCR을 수행하였다. PCR은 94℃에서 30초의 변성(denaturation), 55℃에서 30초의 어닐링(annealing) 및 72℃에서 30초의 신장(elongation)으로 이루어진 사이클을 27회 반복 수행하였다. 이렇게 얻은 DNA 단편을 상동성 부위(homologus region) 1이라고 명명하였다.

[0092] 서열 번호 7과 8의 프라이머를 이용하여 pMloxCmt를 주형으로 하여 mutant loxP-Cm^r-loxP cassette를 증폭시키기 위한 PCR을 수행하였으며, 94℃에서 30초의 변성, 55℃에서 30초의 어닐링 및 72℃에서 1분의 신장으로 이루어진 사이클을 27회 반복 수행하였다. 여기에서 주형으로 사용된 pMloxCmt는 Suzuki 등이 lox71과 lox66으로 명명한 mutant loxP를 이용한 개선된 유전자 결실방법에 대해 보고한 바 있는 내용을 응용하여 당업자가 제작한 벡터이다 (Suzuki N. *et al*., Appl. Environ. Microbiol. 71:8472, 2005).

[0093] 이렇게 얻은 상동성 부위 1과 mutant loxP-Cm^r-loxP cassette부분을 서열 번호 5와 8을 이용하여 overlap extension PCR을 수행하여 homologous region 1-mutant loxP-Cm^r-loxP 를 수득하였다. 이때, PCR은 프라이머가 없는 상태에서 94℃에서 30초의 변성, 55℃에서 30초의 어닐링 및 72℃에서 1분 30초의 신장으로 이루어진 사이클을 5회 반복 수행한 후, 프라이머를 넣고 23 cycle을 추가적으로 수행하였다.

[0094] 서열 번호 9와 10의 프라이머를 이용하여 pCC1BAC-$rpoH^{2-G6}$를 주형으로 하여, PCR을 수행하였다. 94℃에서 30초의 변성, 55℃에서 30초의 어닐링 및 72℃에서 1분의 신장으로 이루어진 사이클을 27회 반복 수행하였다.

[0095] 서열 번호 11과 12의 프라이머를 이용하여 대장균 W3110 gDNA를 주형으로 하여 PCR을 수행하였다. 94℃에서 30초의 변성, 55℃에서 30초의 어닐링 및 72℃에서 30초의 신장으로 이루어진 사이클을 27회 반복 수행하였다. 이렇게 얻은 DNA 단편을 상동성 부위(homologus region) 2이라고 명명하였다.

[0096] 위의 $rpoH^{2-G6}$과 상동성 부위 2의 부분을 서열 번호 9와 12를 이용하여 overlap extension PCR을 수행하여 $rpoH^{2-G6}$-homologus region 2를 수득하였다. 이때, PCR은 프라이머가 없는 상태에서 94℃에서 30초의 변성, 55℃에서 30초의 어닐링 및 72℃에서 1분 30초의 신장으로 이루어진 사이클을 5회 반복 수행한 후, 프라이머를 넣고 23 cycle을 추가적으로 수행하였다.

[0097] 위에서 얻은 homologus region 1-mutant loxP-Cm^r-loxP, $rpoH^{2-G6}$-homologus region 2를 주형으로 하여 서열번호 5와 12를 이용하여 overlap extension PCR을 수행하여 $rpoH^{2-G6}$ 삽입용 카세트를 제작하였다. 이때, PCR은 프라이머가 없는 상태에서 94℃에서 30초의 변성, 55℃에서 30초의 어닐링 및 72℃에서 3분의 신장으로 이루어진 사이클을 5회 반복 수행한 후, 프라이머를 넣고 23 cycle을 추가적으로 수행하였다. 이러한 과정을 거쳐서 서열번호 13과 같은 $rpoH^{2-G6}$ 삽입용 카세트를 제작하였다.

[0098] (2) 염색체 상에 $rpoH^{2-G6}$ 변이체가 추가 삽입된 재조합 균주의 제조

[0099] 염색체 상에 기 선별된 $rpoH^{2-G6}$ 변이체를 삽입하기 위하여 대장균 KCCM10541에 상기 실시예 6-(1)에서 제작한 $rpoH^{2-G6}$ 삽입용 카세트 DNA 단편을 분리 정제하여 공지의 1단계 불활성화(Warner et al., PNAS, 6;97(12):6640, 2000)와 동일한 방법으로 기존 내재된 rpoH 뒤의 염색체 부분에 $rpoH^{2-G6}$ 변이체를 추가 삽입하였다. 그 후, 항생제 내성 표식 유전자를 제거하여 $rpoH^{2-G6}$ 변이체가 추가적으로 삽입된 균주를 제작하였으며, 염기서열 분석을 통해 PCR 에러가 도입되지 않은 것을 확인하였다. 제작된 $rpoH^{2-G6}$ 추가 삽입 균주를 FTR2700이라 명명하였고, 상기 형질전환된 대장균 FTR2700를 2013년 2월 5일에 한국미생물보존센터(Korean Culture Center of

Microorganisms, 이하 "KCCM"라 약칭함)에 기탁하였다(수탁번호 KCCM11368P).

[0100] (3) L-쓰레오닌 생산성 확인

[0101] 상기 6-(2)에서 제조한 재조합 미생물을 상기 표 1의 쓰레오닌 역가 배지를 이용하여 삼각플라스크에서 배양하여 L-쓰레오닌 생산성을 확인하였다.

[0102] 33℃, 37℃ 배양기(incubator)에서 LB 고체 배지 중에 밤새 배양한 대장균 KCCM 10541 및 대장균 KCCM11368P를 각각 상기 표 1의 25 mL 역가 배지에 한 백금이씩 접종한 다음, 이를 33℃, 37℃ 200 rpm의 쉐이킹 배양기에서 48시간 동안 배양하였다.

[0103] 하기 표 6에 기재된 바와 같이, 모균주인 대장균 KCCM10541 균주는 48시간 배양하였을 경우 30.3 g/L의 L-쓰레오닌을 생산하였고, 본 발명의 상기 실시예 6-(2)에서 제작된 KCCM 11368P 대장균 균주는 30.0 g/L의 L-쓰레오닌을 생산하여 모균주와 유사한 L-쓰레오닌 생산성을 나타내었다. 37℃에서는 모균주(KCCM 10541)가 수율이 하락하는 양상을 보인 반면, KCCM 11368P 균주는 온도에 따른 농도 하락 현상을 보이지 않고 농도가 증가되는 양상을 보였다.

[0104] 이에 따라 벡터 형태로 도입하여 형질전환된 균주와 동일하게 37℃ 배양시에도 33℃ 배양시와 유사 혹은 상회하는 수준의 쓰레오닌 생산능이 부여된 것을 확인할 수 있었다.

표 6

[0105]

균주	L-쓰레오닌 (g/L)	
	33℃	37℃
KCCM 10541 (모균주)	30.3	26.0
KCCM 11368P	30.0	32.0

[0106] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있음을 이해할 수 있다. 이와 관련하여, 본 명세서에서 기술한 실시예 및 실험예 들은 모든 면에서 예시적인 것이며 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아닌 것으로 이해되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 상세한 설명보다는 후술되는 특허청구범위의 의미 및 범위, 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

수탁번호

[0107]

기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

수탁번호 : KCCM11368P

수탁일자 : 20130205

서 열 목 록

<110> CJ Cheiljedang Corporation

<120> Microorganisms for production of L-threonine and process for producing L-threonine using the same

<130> PA12-0483

<160> 17

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 1

cagtatccgg aattcgcttg cattgaactt gtgga 35

<210> 2

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 2

gtcataccgg aattccttaa tagcggaaat tacgc 35

<210> 3

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 3

cagtatccgg aattcgcttg cattgaactt gtgga 35

<210> 4

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 4

gtcataccgg aattccttaa tagcggaaat tacgc 35

<210> 5

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 5

atctagaaag cgcagcgcaa actgttc 27

<210> 6

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 6

ttcgtataat gtatgctata cgaacggtaa ccccggactc tcatccaggg 50

<210> 7

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 7

gcagagaacc ctggatgaga gtccggggtt accgttcgta tagcatacat 50

<210> 8

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 8

gtgattttat ccacaagttc aatgcaagcg gtacctaccg ttcgtataat 50

<210> 9

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 9

tagcatacat tatacgaacg gtaggtaccg cttgcattga acttgtggat 50

<210> 10

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 10

catccagggt tctctgctta atagcggaaa ttacgcttca atggcagcac gc 52

<210> 11

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 11

aaaaattgcg tgctgccatt gaagcgtaat ttccgctatt aagcagagaa 50

<210> 12

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 12

aaagctttgt ttcgggtcac aggcatcg 28

<210> 13

<211> 3136

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> rpoH2-G6 integration cassette

<400> 13

aagcgcagcg caaactgttc ttcaacctgc gtaaaaccaa gcagcgtctg ggctggttta 60

accaggatga agtcgaaatg gtggcccgtg aactgggcgt aaccagcaaa gacgtacgtg 120

agatggaatc acgtatggcg gcacaggaca tgacctttga cctgtcttcc gacgacgatt 180

ccgacagcca gccgatggct ccggtgctct atctgcagga taaatcatct aactttgccg 240

acggcattga agatgataac tgggaagagc aggcggcaaa ccgtctgacc gacgcgatgc 300

agggtctgga cgaacgcagc caggacatca tccgtgcgcg ctggctggac gaagacaaca 360

agtccacgtt gcaggaactg gctgaccgtt acggcgtttc cgctgagcgt gtacgccagc 420

tggaaaagaa cgcgatgaaa aaattgcgtg ctgccattga agcgtaattt ccgctattaa 480

gcagagaacc ctggatgaga gtccggggtt aggtgacact atagaacgcg gccgccagct 540

gaagctttac cgttcgtata gcatacatta tacgaagtta tctgccctga accgacgacc 600

gggtcgaatt tgctttcgaa tttctgccat tcatccgctt attatcactt attcaggcgt 660

agcaccaggc gtttaagggc accaataact gccttaaaaa aattacgccc cgccctgcca 720

ctcatcgcag tactgttgta attcattaag cattctgccg acatggaagc catcacagac 780

ggcatgatga acctgaatcg ccagcggcat cagcaccttg tcgccttgcg tataatattt 840

gcccatggtg aaaacggggg cgaagaagtt gtccatattg gccacgttta aatcaaaact 900

ggtgaaactc acccagggat tggctgagac gaaaaacata ttctcaataa acccttttagg 960

gaaataggcc aggttttcac cgtaacacgc cacatcttgc gaatatatgt gtagaaactg 1020

ccggaaatcg tcgtggtatt cactccagag cgatgaaaac gtttcagttt gctcatggaa 1080

aacggtgtaa caagggtgaa cactatccca tatcaccagc tcaccgtctt tcattgccat 1140

acggaattcc ggatgagcat tcatcaggcg ggcaagaatg tgaataaagg ccggataaaa 1200

cttgtgctta tttttcttta cggtctttaa aaaggccgta atatccagct gaacggtctg 1260

gttataggta cattgagcaa ctgactgaaa tgcctcaaaa tgttctttac gatgccattg 1320

ggatatatca acggtggtat atccagtgat ttttttctcc attttagctt ccttagctcc 1380

tgaaaatctc gataactcaa aaaatacgcc cggtagtgat cttatttcat tatggtgaaa 1440

gttggaacct cttacgtgcc gatcaacgtc tcattttcgc caaaagttgg cccagggctt 1500

cccggtatca acagggacac caggatttat ttattctgcg aagtgatctt ccgtcacagg 1560

tatttattcg gcgcaaagtg cgtcgggtga tgcataactt cgtatagcat acattatacg 1620

aacggtaccc atcagatcca ctagcttgca ttgaacttgt ggataaaatc acggtccgat 1680

aaaacaatga atgataacct cgttgctctt aagctctggc acagttgttg ctaccactga 1740

agcgccagaa gatatcgatt gagaggattt gaatgactga caaaatgcaa agtttagctt 1800

tagccccagt tggcaacctg gattcctaca tccgggcagc taacgcgtgg ccgatgttgt 1860

cggctgacga ggagcgggcg ctggctgaaa agctgcatta ccatggcgat ctggaagcag 1920

ctaaaacgct gatccagtct cacctgcggt ttgttgttca tattgctcgt aattatgcgg 1980

gctatggcct gccacaggcg gatttgattc aggaaggtaa catcggcctg atgaaagcag 2040

tgcgccgttt caacccggaa gcgggtgtgc gcctggtctc cttcgccgtt cactggatca 2100

aagcagagat ccacgaatac gttctgcgta actggcgtat cgtcaaagtt gcgaccacca 2160

aagcgcagcg caaactgttc ttcaacctgc gtaaaaccaa gcagcgtctg ggctggttta 2220

accaggatga agtcgaaatg gtggcccgtg aactgggcgt aaccagcaaa gaagtacgtg 2280

agatggaatc acgtatggcg gcacaggaca tgacctttga cctgtcttcc gacgacgatt 2340

ccgacagcca gccgatggct ccggtgctct atctgcagga taaatcatct aactttgccg 2400

acggcattga agatgatatc tgggaagagc aggcggcaaa ccgtctgacc gacgcgatgc 2460

agggtctgga cgaacgcagc caggacatca tccgtgcgcg ctggctggac gaagacaaca 2520

agtccacgtt gcaggaactg gctgaccgtt acggcgtttc cgctgagcgt gtccgccagc 2580
tggaaaagaa cgcgatgaaa aaattgcgtg ctgccattga agcgtaattt ccgctattaa 2640
gcagagaacc ctggatgaga gtccggggtt tttgtttttt gggcctctgt aataatcaat 2700
ttcccctccg gcaaaacgcc aatccccacg cagattgtta ataaactgtc aaaatagcta 2760
ttccaatatc ataaaaatcg ggtatgtttt agcagagtat gctgctaaag cacgggtagt 2820
catgcataaa acgaaataaa gtgctgaaaa acaacatcac aacacacgta ataaccagaa 2880
gaatggggat tctcaggatg aacataaagg gtaaagcgtt actggcagga tgtatcgcgc 2940

tggcattcag caatatggct ctggcagaag atattaaagt cgcggtcgtg ggcgcaatgt 3000
ccggtccggt tgcgcagtac ggtgaccagg agtttaccgg cgcagagcag gcggttgcgg 3060
atatcaacgc taaaggcggc attaaaggca acaaactgca aatcgtaaaa tatgacgatg 3120
cctgtgaccc gaaaca 3136

<210> 14
<211> 984
<212> DNA
<213> Escherichia coli
<400> 14

gcttgcattg aacttgtgga taaaatcacg gtctgataaa acagtgaatg ataacctcgt 60
tgctcttaag ctctggcaca gttgttgcta ccactgaagc gccagaagat atcgattgag 120

aggatttgaa tgactgacaa aatgcaaagt ttagctttag ccccagttgg caacctggat 180
tcctacatcc gggcagctaa cgcgtggccg atgttgtcgg ctgacgagga gcgggcgctg 240
gctgaaaagc tgcattacca tggcgatctg gaagcagcta aaacgctgat cctgtctcac 300
ctgcggtttg ttgttcatat tgctcgtaat tatgcgggct atggcctgcc acaggcggat 360
ttgattcagg aaggtaacat cggcctgatg aaagcagtgc gccgtttcaa cccggaagtg 420
ggtgtgcgcc tggtctcctt cgccgttcac tggatcaaag cagagatcca cgaatacgtt 480
ctgcgtaact ggcgtatcgt caaagttgcg accaccaaag cgcagcgcaa actgttcttc 540

aacctgcgta aaaccaagca gcgtctgggc tggtttaacc aggatgaagt cgaaatggtg 600
gcccgtgaac tgggcgtaac cagcaaagac gtacgtgaga tggaatcacg tatggcggca 660
caggacatga cctttgacct gtcttccgac gacgattccg acagccagcc gatggctccg 720
gtgctctatc tgcaggataa atcatctaac tttgccgacg gcattgaaga tgataactgg 780
gaagagcagg cggcaaaccg tctgaccgac gcgatgcagg gtctggacga acgcagccag 840

gacatcatcc gtgcgcgctg gctggacgaa gacaacaagt ccacgttgca ggaactggct 900

gaccgttacg gcgtttccgc tgagcgtgta cgccagctgg aaaagaacgc gatgaaaaaa 960

ttgcgtgctg ccattgaagc gtaa 984

<210> 15

<211> 984

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 15

gcttgcattg aacttgtgga taaaatcacg gtccgataaa acaatgaatg ataacctcgt 60

tgctcttaag ctctggcaca gttgttgcta ccactgaagc gccagaagat atcgattgag 120

aggatttgaa tgactgacaa aatgcaaagt ttagctttag ccccagttgg caacctggat 180

tcctacatcc gggcagctaa cgcgtggccg atgttgtcgg ctgacgagga gcgggcgctg 240

gctgaaaagc tgcattacca tggcgatctg gaagcagcta aaacgctgat ccagtctcac 300

ctgcggtttg ttgttcatat tgctcgtaat tatgcgggct atggcctgcc acaggcggat 360

ttgattcagg aaggtaacat cggcctgatg aaagcagtgc gccgtttcaa cccggaagcg 420

ggtgtgcgcc tggtctcctt cgccgttcac tggatcaaag cagagatcca cgaatacgtt 480

ctgcgtaact ggcgtatcgt caaagttgcg accaccaaag cgcagcgcaa actgttcttc 540

aacctgcgta aaaccaagca gcgtctgggc tggtttaacc aggatgaagt cgaaatggtg 600

gcccgtgaac tgggcgtaac cagcaaagaa gtacgtgaga tggaatcacg tatggcggca 660

caggacatga cctttgacct gtcttccgac gacgattccg acagccagcc gatggctccg 720

gtgctctatc tgcaggataa atcatctaac tttgccgacg gcattgaaga tgatatctgg 780

gaagagcagg cggcaaaccg tctgaccgac gcgatgcagg gtctggacga acgcagccag 840

gacatcatcc gtgcgcgctg gctggacgaa gacaacaagt ccacgttgca ggaactggct 900

gaccgttacg gcgtttccgc tgagcgtgtc cgccagctgg aaaagaacgc gatgaaaaaa 960

ttgcgtgctg ccattgaagc gtaa 984

<210> 16

<211> 284

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 16

Met Thr Asp Lys Met Gln Ser Leu Ala Leu Ala Pro Val Gly Asn Leu

1 5 10 15

Asp Ser Tyr Ile Arg Ala Ala Asn Ala Trp Pro Met Leu Ser Ala Asp

20 25 30

Glu Glu Arg Ala Leu Ala Glu Lys Leu His Tyr His Gly Asp Leu Glu

35 40 45

Ala Ala Lys Thr Leu Ile Leu Ser His Leu Arg Phe Val Val His Ile

50 55 60

Ala Arg Asn Tyr Ala Gly Tyr Gly Leu Pro Gln Ala Asp Leu Ile Gln

65 70 75 80

Glu Gly Asn Ile Gly Leu Met Lys Ala Val Arg Arg Phe Asn Pro Glu

85 90 95

Val Gly Val Arg Leu Val Ser Phe Ala Val His Trp Ile Lys Ala Glu

100 105 110

Ile His Glu Tyr Val Leu Arg Asn Trp Arg Ile Val Lys Val Ala Thr

115 120 125

Thr Lys Ala Gln Arg Lys Leu Phe Phe Asn Leu Arg Lys Thr Lys Gln

130 135 140

Arg Leu Gly Trp Phe Asn Gln Asp Glu Val Glu Met Val Ala Arg Glu

145 150 155 160

Leu Gly Val Thr Ser Lys Asp Val Arg Glu Met Glu Ser Arg Met Ala

165 170 175

Ala Gln Asp Met Thr Phe Asp Leu Ser Ser Asp Asp Asp Ser Asp Ser

180 185 190

Gln Pro Met Ala Pro Val Leu Tyr Leu Gln Asp Lys Ser Ser Asn Phe

195 200 205

Ala Asp Gly Ile Glu Asp Asp Asn Trp Glu Glu Gln Ala Ala Asn Arg

210 215 220

Leu Thr Asp Ala Met Gln Gly Leu Asp Glu Arg Ser Gln Asp Ile Ile

225 230 235 240

Arg Ala Arg Trp Leu Asp Glu Asp Asn Lys Ser Thr Leu Gln Glu Leu

245 250 255

Ala Asp Arg Tyr Gly Val Ser Ala Glu Arg Val Arg Gln Leu Glu Lys

260 265 270

Asn Ala Met Lys Lys Leu Arg Ala Ala Ile Glu Ala

275 280

<210> 17

<211> 284

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 17

Met Thr Asp Lys Met Gln Ser Leu Ala Leu Ala Pro Val Gly Asn Leu

1 5 10 15

Asp Ser Tyr Ile Arg Ala Ala Asn Ala Trp Pro Met Leu Ser Ala Asp

20 25 30

Glu Glu Arg Ala Leu Ala Glu Lys Leu His Tyr His Gly Asp Leu Glu

35 40 45

Ala Ala Lys Thr Leu Ile Gln Ser His Leu Arg Phe Val Val His Ile

50 55 60

Ala Arg Asn Tyr Ala Gly Tyr Gly Leu Pro Gln Ala Asp Leu Ile Gln

65 70 75 80

Glu Gly Asn Ile Gly Leu Met Lys Ala Val Arg Arg Phe Asn Pro Glu

85 90 95

Ala Gly Val Arg Leu Val Ser Phe Ala Val His Trp Ile Lys Ala Glu

100 105 110

Ile His Glu Tyr Val Leu Arg Asn Trp Arg Ile Val Lys Val Ala Thr

115 120 125

Thr Lys Ala Gln Arg Lys Leu Phe Phe Asn Leu Arg Lys Thr Lys Gln

130 135 140

Arg Leu Gly Trp Phe Asn Gln Asp Glu Val Glu Met Val Ala Arg Glu

145 150 155 160

Leu Gly Val Thr Ser Lys Glu Val Arg Glu Met Glu Ser Arg Met Ala

165 170 175

Ala Gln Asp Met Thr Phe Asp Leu Ser Ser Asp Asp Asp Ser Asp Ser

180 185 190

Gln Pro Met Ala Pro Val Leu Tyr Leu Gln Asp Lys Ser Ser Asn Phe
195 200 205

Ala Asp Gly Ile Glu Asp Asp Ile Trp Glu Glu Gln Ala Ala Asn Arg
210 215 220
Leu Thr Asp Ala Met Gln Gly Leu Asp Glu Arg Ser Gln Asp Ile Ile
225 230 235 240
Arg Ala Arg Trp Leu Asp Glu Asp Asn Lys Ser Thr Leu Gln Glu Leu
245 250 255
Ala Asp Arg Tyr Gly Val Ser Ala Glu Arg Val Arg Gln Leu Glu Lys
260 265 270
Asn Ala Met Lys Lys Leu Arg Ala Ala Ile Glu Ala

275 280

【심사관 직권보정사항】
【직권보정 1】
【보정항목】 문서전체
【보정세부항목】 청구항 8
【변경전】
상기 배양액으로부터
【변경후】
상기 배양하는 단계에서 수득된 배양액으로부터

【직권보정 2】
【보정항목】 청구범위
【보정세부항목】 청구항 2, 3
【변경전】
염기서열
【변경후】
유전자