



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0136448
(43) 공개일자 2023년09월26일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>C12N 1/20</i> (2006.01) <i>C12N 15/77</i> (2006.01)
 <i>C12N 9/88</i> (2006.01) <i>C12P 13/06</i> (2006.01)
 <i>C12R 1/15</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>C12N 1/20</i> (2021.05)
 <i>C12N 15/77</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2022-0034234
 (22) 출원일자 2022년03월18일
 심사청구일자 2022년03월18일</p> | <p>(71) 출원인
 씨제이제일제당 (주)
 서울특별시 중구 동호로 330 (쌍림동)</p> <p>(72) 발명자
 장연재
 서울특별시 중구 동호로 330 (쌍림동)
 신광수
 서울특별시 중구 동호로 330 (쌍림동)
 (뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
 유미특허법인</p> |
|---|--|

전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **거짓쌀도둑거저리 유래 아스파테이트 1-디카복실라아제의 활성이 강화된 미생물, 및 이의 용도**

(57) 요약

본 출원은 거짓쌀도둑거저리 유래 아스파테이트 1-디카복실라아제의 활성이 강화된 미생물, 상기 미생물을 포함하는 베타 알라닌 및/또는 베타-알라닌 유래 화합물 생산용 조성물, 및 상기 미생물을 배양하는 단계를 포함하는 베타 알라닌 및/또는 베타-알라닌 유래 화합물 생산 방법을 제공하며, 베타 알라닌 및/또는 베타-알라닌 유래 화합물의 생산능이 우수하다.

(52) CPC특허분류

C12N 9/88 (2013.01)

C12P 13/06 (2013.01)

C12Y 401/01011 (2013.01)

C12R 2001/15 (2021.05)

(72) 발명자

소이슬

서울특별시 중구 동호로 330 (쌍림동)

이광우

서울특별시 중구 동호로 330 (쌍림동)

명세서

청구범위

청구항 1

거짓쌀도둑거저리 (*Tribolium castaneum*) 유래의 아스파테이트 1-디카복실라아제 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드가 도입된, 베타-알라닌 또는 베타-알라닌 유래 화합물을 생산하는 코리네박테리움속 미생물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 아스파테이트 1-디카복실라아제는 PanD 단백질인, 미생물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 아스파테이트 1-디카복실라아제는 서열번호 27의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 미생물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 아스파테이트 1-디카복실라아제는 서열번호 38의 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드에 의해 코딩되는 것인, 미생물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 코리네박테리움 속 미생물은 코리네박테리움 글루타미쿰인, 미생물.

청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 미생물은 상기 아스파테이트 1-디카복실라아제 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드가 도입되지 않은 모균주 또는 야생형에 비하여 베타-알라닌 또는 베타-알라닌 유래 화합물의 생산능이 증가된, 미생물.

청구항 7

거짓쌀도둑거저리 유래의 아스파테이트 1-디카복실라아제 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드가 도입된 코리네박테리움 속 미생물을 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, 베타-알라닌 또는 베타-알라닌 유래 화합물의 생산 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 배양에 따른 배지 또는 미생물로부터 베타-알라닌 또는 베타-알라닌 유래 화합물을 회수하는 단계를 추가로 포함하는, 생산 방법.

청구항 9

거짓쌀도둑거저리 유래의 아스파테이트 1-디카복실라아제 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드가 도입된 코리네박테리움 속 미생물을 포함하는 베타-알라닌 또는 베타-알라닌 유래 화합물 생산용 조성물.

발명의 설명

기술분야

거짓쌀도둑거저리 유래 아스파테이트 1-디카복실라아제의 활성이 강화된 미생물, 상기 미생물을 포함하는 베타-알라닌 및/또는 베타-알라닌 유래 화합물 생산용 조성물, 및 상기 미생물을 배양하는 단계를 포함하는 베타-알라닌 및/또는 베타-알라닌 유래 화합물의 생산 방법이 제공된다.

[0001]

배경 기술

- [0003] 베타-알라닌(β -alanine)은 β 탄소에 아미노기가 결합하고 있는 자연적으로 생성되는 β -아미노산이다. 베타-알라닌은 가금류, 육류 및 생선과 같은 식품에서 자연적으로 발견되며, 근육에서 카르노신을 합성하는데 사용된다.
- [0004] 베타-알라닌과 판토텐산과 같은 베타-알라닌 유래 화합물은 건강보조식품, 식품, 제약, 동물 사료 등과 같은 다양한 산업 분야에서 적용되는 상업적으로 중요한 물질 중 하나이다.
- [0005] 이에, 생물공학적으로 베타-알라닌 및/또는 베타-알라닌 유래 화합물을 제조하는데 유리한 효과를 갖는 미생물 및 이를 이용하여 베타-알라닌 및/또는 베타-알라닌 유래 화합물을 고효율로 제조하는 기술의 개발이 요구된다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0007] (특허문헌 0001) 미국 등록특허 제7718205호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 출원은 아스파테이트 1-디카복실라아제의 활성이 강화되고, 베타-알라닌 및/또는 베타-알라닌 유래 화합물의 생산능이 향상된 미생물을 제공한다.
- [0009] 본 출원은 상기 미생물을 포함하는 베타 알라닌 및/또는 베타-알라닌 생산용 조성물을 제공한다.
- [0010] 본 출원은 상기 미생물을 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, 베타-알라닌 및/또는 베타-알라닌 유래 화합물의 생산 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

- [0012] 본 출원은 아스파테이트 1-디카복실라아제, 예컨대, 거릿쌀도둑거저리(*Tribolium castaneum*) 유래 아스파테이트 1-디카복실라아제의 베타-알라닌 및/또는 베타-알라닌 유래 화합물의 생산 및/또는 생산능 향상을 위한 용도에 관한 것이다.
- [0013] 본 출원의 일 양상은 아스파테이트 1-디카복실라아제의 활성이 강화된 미생물(또는 균주, 재조합 세포)을 제공한다.
- [0014] 본 출원에서 아스파테이트 1-디카복실라아제(aspartate 1-decarboxylase; 또는 PanD 단백질)는 아스파테이트 1-디카복실라아제 활성(aspartate 1-decarboxylase activity)을 갖는 단백질을 의미할 수 있다. 상기 아스파테이트 1-디카복실라아제는 거릿쌀도둑거저리 (Red flour beetle; *Tribolium castaneum*), 대장균 (*Escherichia coli*), 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*), 세라티아 루비대아 (*Serratia rubidaea*), 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*), 또는 슈도모나스 속 세균 (*Pseudomonas* sp.) 유래의 것일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 일 예에서, 상기 아스파테이트 1-디카복실라아제는 거릿쌀도둑거저리 유래의 것일 수 있고, 상기 거릿쌀도둑거저리 유래의 아스파테이트 1-디카복실라아제는 공지의 데이터 베이스인 NCBI에서 그 서열을 얻을 수 있고, 예를 들면 NCBI Reference Sequence: NP_001096055.1로 표현될 수 있다. 일 예에서 상기 거릿쌀도둑거저리 유래의 아스파테이트 1-디카복실라아제는 서열번호 27의 아미노산 서열을 가지거나, 포함하거나, 상기 아미노산 서열로 이루어지거나, 또는 상기 아미노산 서열로 필수적으로 이루어질(essentially consisting of) 수 있다. 구체적으로 상기 아스파테이트 1-디카복실라아제는 서열번호 27의 아미노산 서열로 기재된 폴리펩타이드로 이루어지는 것일 수 있다.
- [0015] 일 예에서, 상기 아스파테이트 1-디카복실라아제 단백질은 서열번호 27으로 기재된 아미노산 서열과 적어도

70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.7% 또는 99.9% 이상의 상동성 또는 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하거나 상기 서열로 이루어진 것일 수 있다. 또한, 이러한 상동성 또는 동일성을 가지며 아스파테이트 1-디카복실라아제에 상응하는 효능을 나타내는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환, 보존적 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 변이체도 상기 아스파테이트 1-디카복실라아제 포함될 수 있다. 예를 들어, 상기 아미노산 서열 N-말단, C-말단 및/또는 내부에 아스파테이트 1-디카복실라아제 활성을 변경하지 않는 서열 추가 또는 결실, 자연적으로 발생할 수 있는 돌연변이, 잠재성 돌연변이(silent mutation) 또는 보존적 치환을 가지는 경우이다.

[0016] 상기 “보존적 치환(conservative substitution)”은 한 아미노산을 유사한 구조적 및/또는 화학적 성질을 갖는 또 다른 아미노산으로 치환시키는 것을 의미한다. 이러한 아미노산 치환은 일반적으로 잔기의 극성, 전하, 용해도, 소수성, 친수성 및/또는 양친매성(amphipathic nature)에서의 유사성에 근거하여 발생할 수 있다. 통상적으로, 보존적 치환은 단백질 또는 폴리펩타이드의 활성에 거의 영향을 미치지 않거나 또는 영향을 미치지 않을 수 있다.

[0017] 본 출원에서 상기 아스파테이트 1-디카복실라아제는 아스파테이트 1-디카복실라아제 유전자에 의해 코딩되는 아스파테이트 1-디카복실라아제 활성을 갖는 폴리펩타이드일 수 있다. 상기 아스파테이트 1-디카복실라아제 유전자는 거짓쌀도둑거저리 (Red flour beetle; *Tribolium castaneum*), 대장균 (*Escherichia coli*), 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*), 세라티아 루비대아 (*Serratia rubidaea*), 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*), 또는 슈도모나스 속 세균 (*Pseudomonas* sp.) 유래의 것일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 일 예에서 상기 아스파테이트 1-디카복실라아제 유전자는 거짓쌀도둑거저리 유래의 것일 수 있다. 상기 거짓쌀도둑거저리 유래의 아스파테이트 1-디카복실라아제 유전자는 공지의 데이터 베이스인 NCBI에서 그 서열을 얻을 수 있고, 예를 들면 NCBI Reference Sequence: NM_001102585.1로 표현될 수 있다. 일 예에서 상기 거짓쌀도둑거저리 유래의 아스파테이트 1-디카복실라아제 유전자는 서열번호 38의 핵산 서열을 가지거나, 포함하거나, 상기 핵산 서열로 이루어지거나, 또는 상기 핵산 서열로 필수적으로 이루어질(essentially consisting of) 수 있다. 구체적으로 상기 아스파테이트 1-디카복실라아제 유전자는 서열번호 38의 핵산 서열로 이루어지는 것일 수 있다. 일 예에서, 상기 아스파테이트 1-디카복실라아제 유전자는 서열번호 38의 핵산 서열과 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.7% 또는 99.9% 이상의 상동성 또는 동일성을 가지는 핵산 서열을 포함하거나 상기 서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0019] 본 출원에서, 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드가 “특정 핵산 서열(염기서열) 또는 아미노산 서열을 가진다, 포함한다, 상기 서열로 이루어진다, 또는 상기 서열로 필수적으로 이루어진다(essentially consisting of)”라 함은 상기 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드가 상기 특정 핵산 서열(염기서열) 또는 아미노산 서열을 필수적으로 포함하는 것을 의미할 수 있으며, 상기 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드의 본래의 기능 및/또는 목적하는 기능을 유지하는 범위에서 상기 특정 핵산 서열(염기서열) 또는 아미노산 서열에 변이(결실, 치환, 변형, 및/또는 부가)가 가해진 “실질적으로 동등한 서열”을 포함하는 것(또는 상기 변이를 배제하지 않는 것)으로 해석될 수 있다. 일 예에서, 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드가 “특정 핵산 서열(염기서열) 또는 아미노산 서열을 가진다, 포함한다, 상기 서열로 이루어진다, 또는 상기 서열로 필수적으로 이루어진다”라 함은 상기 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드가 (i) 상기 특정 핵산 서열(염기서열) 또는 아미노산 서열을 필수적으로 포함하거나, 또는 (ii) 상기 특정 핵산 서열(염기서열) 또는 아미노산 서열과 70% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 98% 이상, 99% 이상, 99.5% 이상, 또는 99.9% 이상의 상동성 또는 동일성을 갖는 핵산 서열 또는 아미노산 서열로 이루어지거나 이를 필수적으로 포함하고 본래의 기능 및/또는 목적하는 기능을 유지하는 것을 의미할 수 있다. 일 예에서, 상기 목적하는 기능은 미생물의 베타 알라닌 및/또는 베타-알라닌 유래 화합물 생산능을 증가(향상)시키거나 부여하는 기능을 의미할 수 있다.

[0020] 본 출원에서, ‘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.

[0021] 보존된(conserved) 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드의 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 폴리뉴클레오타이드에서 일반 코돈 또는 코돈 축퇴성을 고려한 코돈을 함유하는 폴리뉴클레오타이드와의 하이브리드화 역시 포함됨이 자명하다.

[0022] 임의의 두 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드 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.

[0023] 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드의 상동성, 유사성 또는 동일성은, 예를 들어, Smith and Waterman, Adv. Appl. Math (1981) 2:482에 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, 뉴클레오타이드 또는 아미노산)의 수를 나누어 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.

[0025] 본 출원에서 용어, "미생물(또는, 균주)"은 야생형 미생물이나 자연적 또는 인위적으로 유전적 변형이 일어난 미생물을 모두 포함하며, 외부 유전자가 삽입되거나 내재적 유전자의 활성이 강화되거나 약화되는 등의 원인으로 인해서 특정 기작이 강화되거나 약화된 미생물로서, 목적하는 폴리펩타이드, 단백질 또는 산물(예컨대, 아스파테이트 1-디카복실라아제)의 생산을 위하여 유전적 변형(modification)을 포함하는 미생물일 수 있다.

[0026] 본 출원에서 용어, 폴리펩타이드 활성의 "강화"는, 폴리펩타이드의 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 폴리펩타이드의 활성을 의미한다. 이는 "변형 전 활성"과 혼용되어 사용될 수 있다. 폴리펩타이드의 활성이 내재적 활성에 비하여 "강화", "상향조절", "과발현" 또는 "증가"한다는 것은, 형질 변화 전 모균주 또는 비변형 미생물이 본래 가지고 있던 특정 폴리펩타이드의 활성 및/또는 농도(발현량)에 비하여 향상된 것을 의미한다.

[0027] 상기 강화는 외래의 폴리펩타이드를 도입하거나, 내재적인 폴리펩타이드의 활성 강화 및/또는 농도(발현량) 증가를 통해 달성할 수 있다. 상기 폴리펩타이드의 활성의 강화 여부는 해당 폴리펩타이드의 활성 정도, 발현량 또는 해당 폴리펩타이드 활성에 의한 산물의 양의 증가로부터 확인할 수 있다.

[0028] 상기 폴리펩타이드의 활성의 강화는 당해 분야에 잘 알려진 다양한 방법의 적용이 가능하며, 목적 폴리펩타이드의 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).

[0029] 구체적으로, 본 출원의 폴리펩타이드의 강화는

- [0030] 1) 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 세포 내 카피수 증가;
- [0031] 2) 폴리펩타이드를 코딩하는 염색체상의 유전자 발현조절영역을 활성이 강력한 서열로 교체;
- [0032] 3) 폴리펩타이드를 코딩하는 유전자 전사체의 개시코돈 또는 5'-UTR 지역을 코딩하는 염기서열의 변형;
- [0033] 4) 폴리펩타이드 활성이 강화되도록 상기 폴리펩타이드의 아미노산 서열의 변형;
- [0034] 5) 폴리펩타이드 활성이 강화되도록 상기 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열의 변형 (예를 들어, 폴리펩타이드의 활성이 강화되도록 변형된 폴리펩타이드를 코딩하도록 상기 폴리펩타이드 유전자의 폴리뉴클레오티드 서열의 변형);
- [0035] 6) 폴리펩타이드의 활성을 나타내는 외래 폴리펩타이드 또는 이를 코딩하는 외래 폴리뉴클레오티드의 도입;
- [0036] 7) 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 코돈 최적화;
- [0037] 8) 폴리펩타이드의 삼차구조를 분석하여 노출 부위를 선택하여 변형하거나 화학적으로 수식; 또는
- [0038] 9) 상기 1) 내지 8) 중 선택된 2 이상의 조합일 수 있으나, 이에, 특별히 제한되는 것은 아니다.
- [0039] 보다 구체적으로,
- [0040] 상기 1) 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 세포 내 카피수 증가는, 해당 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 작동가능하게 연결된, 숙주와 무관하게 복제되고 기능할 수 있는 벡터의 숙주세포 내로의 도입에 의해 달성되는 것일 수 있다. 또는, 해당 폴리펩타이드를 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.
- [0041] 상기 2) 폴리펩타이드를 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.
- [0042] 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.
- [0043] 상기 3) 폴리펩타이드를 코딩하는 유전자 전사체의 개시코돈 또는 5'-UTR 지역을 코딩하는 염기서열 변형은, 예를 들면, 내재적 개시코돈에 비해 폴리펩타이드 발현율이 더 높은 다른 개시코돈을 코딩하는 염기 서열로 치환하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0044] 상기 4) 및 5)의 아미노산 서열 또는 폴리뉴클레오티드 서열의 변형은, 폴리펩타이드의 활성을 강화하도록 상기 폴리펩타이드의 아미노산 서열 또는 상기 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 결실, 삽입, 비보존적 또는 보존적 치환 또는 이들의 조합으로 서열상의 변이 발생, 또는 더욱 강한 활성을 갖도록 개량된 아미노산 서열 또는 폴리뉴클레오티드 서열 또는 활성이 증가하도록 개량된 아미노산 서열 또는 폴리뉴클레오티드 서열로의 교체일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 교체는 구체적으로 상동재조합에 의하여 폴리뉴클레오티드를 염색체내로 삽입함으로써 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 이때 사용되는 벡터는 염색체 삽입 여부를 확인하기 위한 선별 마커 (selection marker)를 추가로 포함할 수 있다. 상기 선별 마커는 전술한 바와 같다.
- [0045] 상기 6) 폴리펩타이드의 활성을 나타내는 외래 폴리뉴클레오티드의 도입은, 상기 폴리펩타이드와 동일/유사한 활성을 나타내는 폴리펩타이드를 코딩하는 외래 폴리뉴클레오티드의 숙주세포 내 도입일 수 있다. 상기 외래 폴리뉴클레오티드는 상기 폴리펩타이드와 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 폴리펩타이드가 생성되어 그 활성이 증가될 수 있다.

- [0046] 상기 7) 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 코돈 최적화는, 내재 폴리뉴클레오타이드가 숙주세포 내에서 전사 또는 번역이 증가하도록 코돈 최적화한 것이거나, 또는 외래 폴리뉴클레오타이드가 숙주세포 내에서 최적화된 전사, 번역이 이루어지도록 이의 코돈을 최적화한 것일 수 있다.
- [0047] 상기 8) 폴리펩타이드의 삼차구조를 분석하여 노출 부위를 선택하여 변형하거나 화학적으로 수식하는 것은, 예를 들어 분석하고자 하는 폴리펩타이드의 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.
- [0048] 이와 같은 폴리펩타이드 활성의 강화는, 상응하는 폴리펩타이드의 활성 또는 농도 발현량이 야생형이나 변형 전 미생물 균주에서 발현된 폴리펩타이드의 활성 또는 농도를 기준으로 하여 증가되거나, 해당 폴리펩타이드로부터 생산되는 산물의 양의 증가되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0050] 본 출원에서 용어, 폴리펩타이드의 “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.
- [0051] 상기 약화는 상기 폴리펩타이드(또는 단백질, 예를 들면 아스파테이트 1-디카복실라아제)를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드의 변이 등으로 폴리펩타이드 자체의 활성이 본래 미생물이 가지고 있는 폴리펩타이드의 활성에 비해 감소 또는 제거된 경우, 이를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드의 유전자의 발현 저해 또는 폴리펩타이드로의 번역(translation) 저해 등으로 세포 내에서 전체적인 폴리펩타이드 활성 정도 및/또는 농도(발현량)가 천연형 균주에 비하여 낮은 경우, 상기 폴리뉴클레오타이드의 발현이 전혀 이루어지지 않은 경우, 및/또는 폴리뉴클레오타이드의 발현이 되더라도 폴리펩타이드의 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 폴리펩타이드의 활성을 의미한다. 이는 “변형 전 활성”과 혼용되어 사용될 수 있다. 폴리펩타이드의 활성이 내재적 활성에 비하여 “불활성화, 결핍, 감소, 하향조절, 저하, 감쇠” 한다는 것은, 형질 변화 전 모균주 또는 비변형 미생물이 본래 가지고 있던 특정 폴리펩타이드의 활성에 비하여 낮아진 것을 의미한다.
- [0052] 이러한 폴리펩타이드(또는 단백질, 예를 들면 아스파테이트 1-디카복실라아제)의 활성의 약화는, 당업계에 알려진 임의의 방법에 의하여 수행될 수 있으나 이로 제한되는 것은 아니며, 당해 분야에 잘 알려진 다양한 방법의 적용으로 달성될 수 있다(예컨대, Nakashima N et al., Bacterial cellular engineering by genome editing and gene silencing. Int J Mol Sci. 2014;15(2):2773-2793, Sambrook et al. Molecular Cloning 2012 등).
- [0053] 구체적으로, 폴리펩타이드(또는 단백질, 예를 들면 아스파테이트 1-디카복실라아제; 이하 폴리펩타이드로 기재함)의 약화는
- [0054] 1) 폴리펩타이드를 코딩하는 유전자 전체 또는 일부의 결손;
- [0055] 2) 폴리펩타이드를 코딩하는 유전자의 발현이 감소하도록 발현조절영역(또는 발현조절서열)의 변형;
- [0056] 3) 폴리펩타이드의 활성이 제거 또는 약화되도록 상기 폴리펩타이드를 구성하는 아미노산 서열의 변형(예컨대, 아미노산 서열 상의 1 이상의 아미노산의 삭제/치환/부가);
- [0057] 4) 폴리펩타이드의 활성이 제거 또는 약화되도록 상기 폴리펩타이드를 코딩하는 유전자 서열의 변형(예를 들어, 폴리펩타이드의 활성이 제거 또는 약화되도록 변형된 폴리펩타이드를 코딩하도록 상기 폴리펩타이드 유전자의 핵산 염기 서열 상의 1 이상의 핵산염기의 삭제/치환/부가);
- [0058] 5) 폴리펩타이드를 코딩하는 유전자 전사체의 개시코돈 또는 5'-UTR 지역을 코딩하는 염기서열의 변형;
- [0059] 6) 폴리펩타이드를 코딩하는 상기 유전자의 전사체에 상보적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드(예컨대, 안티센스 RNA)의 도입;
- [0060] 7) 리보솜(ribosome)의 부착이 불가능한 2차 구조물을 형성시키기 위하여 폴리펩타이드를 코딩하는 유전자의 사인-달가르노(Shine-Dalgarno) 서열 앞단에 사인-달가르노 서열과 상보적인 서열의 부가;
- [0061] 8) 폴리펩타이드를 코딩하는 유전자 서열의 ORF(open reading frame)의 3' 말단에 반대 방향으로 전사되는 프로

모터의 부가(Reverse transcription engineering, RTE); 또는

- [0062] 9) 상기 1) 내지 8) 중 선택된 2 이상의 조합일 수 있으나, 이에, 특별히 제한되는 것은 아니다.
- [0063] 예컨대,
- [0064] 상기 1) 폴리펩타이드를 코딩하는 상기 유전자 일부 또는 전체의 결손은, 염색체 내 내재적 목적 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 전체의 제거, 일부 뉴클레오타이드가 결실된 폴리뉴클레오타이드로의 교체 또는 마커 유전자로 교체될 수 있다.
- [0065] 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.
- [0066] 또한, 상기 3) 폴리펩타이드를 코딩하는 유전자 전사체의 개시코돈 또는 5'-UTR 지역을 코딩하는 염기서열 변형은, 예를 들면, 내재적 개시코돈에 비해 폴리펩타이드 발현율이 더 낮은 다른 개시코돈을 코딩하는 염기서열로 치환하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0067] 또한, 상기 4) 및 5)의 아미노산 서열 또는 폴리뉴클레오타이드 서열의 변형은 폴리펩타이드의 활성을 약화하도록 상기 폴리펩타이드의 아미노산 서열 또는 상기 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 결실, 삽입, 비보존적 또는 보존적 치환 또는 이들의 조합으로 서열상의 변이 발생, 또는 더욱 약한 활성을 갖도록 개량된 아미노산 서열 또는 폴리뉴클레오타이드 서열 또는 활성이 없도록 개량된 아미노산 서열 또는 폴리뉴클레오타이드 서열로의 교체일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 예를 들면, 폴리뉴클레오타이드 서열 내 변이를 도입하여 종결 코돈(stop codon)을 형성시킴으로써, 유전자의 발현을 저해하거나 약화시킬 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 "종결 코돈(stop codon)"은 mRNA 상의 코돈 중 아미노산을 지정하지 않고 단백질 합성 과정이 끝났음을 알리는 신호로 작용하는 코돈으로, 일반적으로 UAA, UAG, UGA의 3가지가 종결코돈으로 사용될 수 있다.
- [0068] 상기 6) 폴리펩타이드를 코딩하는 상기 유전자의 전사체에 상보적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드(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.
- [0069] 상기 7) 리보솜(ribosome)의 부착이 불가능한 2차 구조물을 형성시키기 위하여 폴리펩타이드를 코딩하는 유전자의 사인-달가르노(Shine-Dalgarno) 서열 앞단에 사인-달가르노 서열과 상보적인 서열의 부가는 mRNA 번역을 불가능하게 하거나 속도를 저하시키는 것일 수 있다.
- [0070] 상기 8) 폴리펩타이드를 코딩하는 유전자서열의 ORF(open reading frame)의 3' 말단에 반대 방향으로 전사되는 프로모터의 부가(Reverse transcription engineering, RTE)는 상기 폴리펩타이드를 코딩하는 유전자의 전사체에 상보적인 안티센스 뉴클레오타이드를 만들어 활성을 약화하는 것일 수 있다.
- [0071] 본 출원의 미생물은 아스파테이트 1-디카복실라아제 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드의 활성이 강화되도록 벡터를 통해 유전적으로 변형된 미생물(예컨대, 재조합 미생물)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 벡터는 전술한 바와 같다.
- [0072] 본 출원의 미생물(또는 균주, 재조합 세포)은 베타 알라닌 및/또는 베타-알라닌 유래 화합물 생산능을 가지거나 베타 알라닌 및/또는 베타-알라닌 유래 화합물 생산능(또는 생산량)이 향상된 미생물일 수 있다.
- [0073] 본 출원의 미생물은 자연적으로 베타 알라닌 및/또는 베타-알라닌 유래 화합물 생산능이 없는 미생물, 또는 베타 알라닌 및/또는 베타-알라닌 유래 화합물 생산능을 가지고 있는 미생물에 아스파테이트 1-디카복실라아제의 활성이 도입 또는 강화되어 베타 알라닌 및/또는 베타-알라닌 유래 화합물 생산능이 부여되거나 향상된 미생물일 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 상기 베타 알라닌 및/또는 베타-알라닌 유래 화합물 생산능이 부여되거나 향상된 미생물은 거짓쌀도둑거저리 유래의 아스파테이트 1-디카복실라아제가 도입된 미생물일 수 있다.
- [0074] 상기 미생물(또는 균주, 재조합 세포)이 베타-알라닌 또는 베타-알라닌 유래 화합물 생산능(또는 생산량)이 향상되거나 베타-알라닌 또는 베타-알라닌 유래 화합물 생산능을 갖는다는 것은 상기 미생물(또는 균주, 재조합 세포)이 비변형 미생물, 재조합 전의 세포, 모균주, 야생형 균주, 및/또는 다른 미생물 유래의 아스파테이트 1-디카복실라아제가 도입된 미생물보다 베타-알라닌 또는 베타-알라닌 유래 화합물 생산능이 향상되거나, 베타-알

라닌 또는 베타-알라닌 유래 화합물 생산능이 없는 비변형 미생물, 재조합 전의 세포, 모균주 및/또는 야생형 균주와는 달리 베타-알라닌 또는 베타-알라닌 유래 화합물 생산능이 부여된 것을 의미할 수 있다.

- [0076] 일 예에 따른 아스파테이트 1-디카복실라아제의 활성이 강화된 미생물은 강화 전 미생물, 즉 동종의 비변형 미생물과 비교하여, 베타 알라닌 및/또는 베타-알라닌 유래 화합물 생산능이 향상(증가)된 것일 수 있다. 본 출원 예에서, "비변형 미생물"은 미생물에 자연적으로 발생할 수 있는 돌연변이를 포함하는 균주를 제외하는 것이 아니며, 야생형 균주 또는 천연형 균주 자체이거나, 자연적 또는 인위적 요인에 의한 유전적 변이로 형질이 변화되기 전 균주를 의미할 수 있다. 예를 들어, 상기 비변형 미생물은 일 예에 따라 아스파테이트 1-디카복실라아제의 활성이 강화되지 않거나 강화되기 전의 균주(또는 아스파테이트 1-디카복실라아제의 활성의 강화를 유도하는 변이가 도입되지 않거나 도입되기 전의 균주)를 의미할 수 있다. 상기 "비변형 미생물"은 "변형 전 균주", "변형 전 미생물", "비변이 균주", "비변형 균주", "비변이 미생물" 또는 "기준 미생물" 과 혼용될 수 있다. 상기 아스파테이트 1-디카복실라아제의 활성이 강화된다는 것은 전술한 바와 같다. 일 예에서 상기 베타 알라닌 및/또는 베타-알라닌 유래 화합물 생산능의 증가 여부를 비교하는 대상 균주인, 비변형 미생물은 야생형 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032 균주일 수 있다.
- [0077] 일 예에 따른 아스파테이트 1-디카복실라아제의 활성이 강화된 미생물은 거깃쌀도둑거저리 유래의 아스파테이트 1-디카복실라아제가 도입된 미생물일 수 있으며, 상기 미생물은 다른 미생물 유래의 아스파테이트 1-디카복실라아제가 도입된 미생물과 비교하여, 베타 알라닌 및/또는 베타-알라닌 유래 화합물 생산능이 더욱 향상(증가)된 것일 수 있다. 상기 다른 미생물 유래의 아스파테이트 1-디카복실라아제는 대장균 (*Escherichia coli*), 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*), 세라티아 루비다아 (*Serratia rubidaea*), 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*), 또는 슈도모나스 속 세균 (*Pseudomonas* sp.) 유래의 것일 수 있다.
- [0078] 상기 미생물(또는 균주, 재조합 세포)은 추가적으로 베타 알라닌 및/또는 베타-알라닌 유래 화합물 생산이 증가 되도록 하는 변이를 포함할 수 있고, 상기 변이의 위치 및/또는 변이 대상이 되는 유전자 및/또는 단백질의 종류는 베타 알라닌 및/또는 베타-알라닌 유래 화합물 생산이 증가되도록 하는 것이면 제한 없이 포함될 수 있다. 상기 재조합 세포는 형질전환이 가능한 세포라면 제한 없이 사용 가능할 수 있다.
- [0079] 상기 베타-알라닌 유래 화합물은 β -니트로프로파노에이트(β -nitropropanoate), β -아미노-프로피오니트릴(β -amino-propionitrile), N-아세틸- β -알라닌(N-acetyl- β -alanine), L-아스파테이트(L-aspartate), 안세린(anserine), 스퍼민(spermine), 카르노신(carnosine), β -알라닐 아르기닌(β -alanyl arginine), 퀴놀리네이트(quinolinate), 판토텐에이트(또는 판토텐산, pantothenate), 말로네이트 세미알데하이드(malonate semialdehyde), 말로네이트(malonate), 아세틸린-모노카복실레이트(acetylene-monocarboxylate) 등으로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0080] 일 예로, 상기 베타 알라닌 및/또는 베타-알라닌 유래 화합물 생산능(또는 생산량)이 향상된(증가된) 미생물(또는 균주, 재조합 세포)은 변이 전 모균주, 비변형 미생물, 또는 다른 미생물 유래의 아스파테이트 1-디카복실라아제가 도입된 미생물과 비교하여, 베타 알라닌 및/또는 베타-알라닌 유래 화합물 생산능이 약 10% 이상, 약 20% 이상, 약 30% 이상, 약 50% 이상, 약 100% 이상, 약 200% 이상, 약 300% 이상, 약 400% 이상, 약 500% 이상, 약 600% 이상, 약 700% 이상, 약 800% 이상, 약 900% 이상, 약 1,000% 이상, 약 1,500% 이상, 약 2,000% 이상, 약 2,500% 이상, 또는 약 3,000% 이상 증가된 것일 수 있으며, 일 예에서 약 33.3% 이상, 약 100% 이상, 약 175% 이상, 약 243.75% 이상, 약 266.6% 이상, 약 300% 이상, 약 450% 이상, 약 500% 이상, 약 587.5% 이상, 약 700% 이상, 또는 약 2,650% 이상 증가된 것일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0081] 다른 예에서, 상기 생산능(또는 생산량)이 증가된 미생물(또는 균주, 재조합 세포)는 변이 전 모균주, 비변형 미생물, 또는 다른 미생물 유래의 아스파테이트 1-디카복실라아제가 도입된 미생물과 비교하여, 베타 알라닌 및/또는 베타-알라닌 유래 화합물 생산능(또는 생산량)이 약 1.1배 이상, 약 1.3배 이상, 약 1.5배 이상, 약 2배 이상, 약 3배 이상, 약 4배 이상, 약 5배 이상, 약 6배 이상, 약 7배 이상, 약 8배 이상, 약 9배 이상, 약 10배 이상, 약 15배 이상, 약 20배 이상, 약 25배 이상, 또는 약 30배 이상(상한값은 특별한 제한이 없으며, 예컨대, 약 1,000배 이하일 수 있음)일 수 있으며, 일 예에서 약 1.3배 이상, 약 2배 이상, 약 2.75배 이상, 약 3.43배 이상, 약 3.6배 이상, 약 4배 이상, 약 5.5배 이상, 약 6배 이상, 약 6.8배 이상, 약 8배 이상, 또는 약 27.5배 이상 증가된 것일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0082] 다른 예에서, 상기 생산능(또는 생산량)이 증가된 미생물(또는 균주, 재조합 세포)는 변이 전 모균주, 비변형

미생물, 또는 다른 미생물 유래의 아스파테이트 1-디카복실라아제가 도입된 미생물과 비교하여, 베타 알라닌 및 /또는 베타-알라닌 유래 화합물 생산능(또는 생산량)이 약 0.5g/L 이상, 약 1g/L 이상, 약 1.5g/L 이상, 약 2.0g/L 이상, 약 2.5g/L 이상, 약 3g/L 이상, 약 3.5g/L 이상, 약 4g/L 이상, 약 4.5g/L 이상, 약 5g/L 이상, 약 5.5g/L 이상, 약 6g/L 이상, 약 7g/L 이상, 약 8g/L 이상, 약 9g/L 이상, 약 10g/L 이상, 약 15g/L 이상, 약 20g/L 이상, 약 25g/L 이상, 약 30g/L 이상(상한값은 특별한 제한이 없으며, 예컨대, 약 100g/L 이하일 수 있음)일 수 있으며, 일 예에서 약 0.6g/L 이상, 약 1.2g/L 이상, 약 1.8g/L 이상, 약 2g/L 이상, 약 2.4g/L 이상, 약 3.5g/L 이상, 약 3.9g/L 이상, 약 4g/L 이상, 약 4.5g/L 이상, 약 4.7g/L 이상, 약 5.3g/L 이상 증가된 것일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0083] 보다 구체적으로는, 상기 생산능(또는 생산량)이 증가된 미생물(또는 균주, 재조합 세포)는 변이 전 모균주, 비 변형 미생물, 또는 다른 미생물 유래의 아스파테이트 1-디카복실라아제가 도입된 미생물과 비교하여, 베타 알라닌 및/또는 베타-알라닌 유래 화합물 생산능(또는 생산량)이 약 33.3%, 약 100%, 약 175%, 약 243.75%, 약 266.6%, 약 300%, 약 450%, 약 500%, 약 587.5%, 약 700%, 또는 약 2,650%(또는 약 1.3배, 약 2배, 약 2.75배, 약 3.43배, 약 3.6배, 약 4배, 약 5.5배, 약 6배, 약 6.8배, 약 8배, 또는 약 27.5배; 또는 약 0.6g/L, 약 1.2g/L, 약 1.8g/L, 약 2g/L, 약 2.4g/L, 약 3.5g/L, 약 3.9g/L, 약 4g/L, 약 4.5g/L, 약 4.7g/L, 약 5.3g/L) 증가된 것일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0084] 상기 용어 “약(about)” 은 ±0.5, ±0.4, ±0.3, ±0.2, ±0.1 등을 모두 포함하는 범위로, 약 이란 용어 뒤에 나오는 수치와 동등하거나 유사한 범위의 수치를 모두 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0085] 일 예에서, 상기 아스파테이트 1-디카복실라아제의 활성이 강화된 미생물은 코리네박테리움 속(*Corynebacterium* sp.) 미생물일 수 있다. 상기 코리네박테리움 속 미생물은 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*), 코리네박테리움 크루디락티스 (*Corynebacterium crudilactis*), 코리네박테리움 데세르티 (*Corynebacterium deserti*), 코리네박테리움 이피시엔스 (*Corynebacterium efficiens*), 코리네박테리움 칼루네 (*Corynebacterium callunae*), 코리네박테리움 스테이션리스 (*Corynebacterium stationis*), 코리네박테리움 싱굴라레 (*Corynebacterium singulare*), 코리네박테리움 할로톨레란스 (*Corynebacterium halotolerans*), 코리네박테리움 스트리아툼 (*Corynebacterium striatum*), 코리네박테리움 암모니아게네스 (*Corynebacterium ammoniagenes*), 코리네박테리움 폴루티솔리 (*Corynebacterium pollutisoli*), 코리네박테리움 이미탄스 (*Corynebacterium imitans*), 코리네박테리움 테스트디노리스 (*Corynebacterium testudinoris*), 및/또는 코리네박테리움 플라베스센스 (*Corynebacterium flavescens*)일 수 있다.

[0087] 본 출원의 또 다른 하나의 양상은 본 출원의 미생물을 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, 베타 알라닌 및/또는 베타-알라닌 유래 화합물 생산방법 (또는 제조방법)을 제공한다.

[0088] 본 출원의 베타 알라닌 및/또는 베타-알라닌 유래 화합물 생산방법은 본 출원의 미생물을 배지에서 배양하는 단계를 포함할 수 있다. 본 출원의 미생물, 베타-알라닌 유래 화합물 등에 대해서는 전술한 바와 같다.

[0089] 본 출원에서, "배양"은 본 출원의 아스파테이트 1-디카복실라아제의 활성이 강화된 미생물, 예컨대 코리네박테리움 글루타미쿰 균주를 적당히 조절된 환경 조건에서 생육시키는 것을 의미한다. 본 출원의 배양과정은 당업계에 알려진 적당한 배지와 배양조건에 따라 이루어질 수 있다. 이러한 배양 과정은 선택되는 균주에 따라 당업자가 용이하게 조정하여 사용할 수 있다. 구체적으로 상기 배양은 회분식, 연속식 및/또는 유가식일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0090] 본 출원에서, "배지"는 본 출원의 아스파테이트 1-디카복실라아제의 활성이 강화된 미생물, 예컨대 코리네박테리움 글루타미쿰 균주를 배양하기 위해 필요로 하는 영양물질을 주성분으로 혼합한 물질을 의미하며, 생존 및 발육에 불가결한 물을 비롯하여 영양물질 및 발육인자 등을 공급한다. 구체적으로, 본 출원의 미생물의 배양에 사용되는 배지 및 기타 배양 조건은 통상의 미생물의 배양에 사용되는 배지라면 특별한 제한 없이 어느 것이나 사용할 수 있으나, 본 출원의 미생물을 적당한 탄소원, 질소원, 인원, 무기화합물, 아미노산 및/또는 비타민 등을 함유한 통상의 배지 내에서 호기성 조건 하에서 온도, pH 등을 조절하면서 배양할 수 있다.

[0091] 구체적으로, 본 출원의 미생물, 예컨대 코리네박테리움 속 균주에 대한 배양 배지는 문헌["Manual of Methods for General Bacteriology" by the American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981)]에서 찾아볼 수 있다.

[0092] 본 출원에서 상기 탄소원으로는 글루코오스, 사카로오스, 락토오스, 프룩토오스, 수크로오스, 말토오스 등과 같

은 탄수화물; 만니톨, 소르비톨 등과 같은 당 알코올, 피루브산, 락트산, 시트르산 등과 같은 유기산; 글루탐산, 메티오닌, 라이신 등과 같은 아미노산 등이 포함될 수 있다. 또한, 전분 가수분해물, 당밀, 블랙스트랩 당밀, 쌀겨울, 카사버, 사탕수수 찌꺼기 및 옥수수 침지액 같은 천연의 유기 영양원을 사용할 수 있으며, 구체적으로는 글루코오스 및 살균된 전처리 당밀(즉, 환원당으로 전환된 당밀) 등과 같은 탄수화물이 사용될 수 있으며, 그 외의 적정량의 탄소원을 제한 없이 다양하게 이용할 수 있다. 이들 탄소원은 단독으로 사용되거나 2 종 이상이 조합되어 사용될 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0093] 상기 질소원으로는 암모니아, 황산암모늄, 염화암모늄, 초산암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄, 질산암모늄 등과 같은 무기질소원; 글루탐산, 메티오닌, 글루타민 등과 같은 아미노산, 펩톤, NZ-아민, 육류 추출물, 효모 추출물, 맥아 추출물, 옥수수 침지액, 카세인 가수분해물, 어류 또는 그의 분해생성물, 탈지 대두 케이크 또는 그의 분해 생성물 등과 같은 유기 질소원이 사용될 수 있다. 이들 질소원은 단독으로 사용되거나 2 종 이상이 조합되어 사용될 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0094] 상기 인원으로는 인산 제1칼륨, 인산 제2칼륨, 또는 이에 대응되는 소듐-함유 염 등이 포함될 수 있다. 무기 화합물로는 염화나트륨, 염화칼슘, 염화철, 황산마그네슘, 황산철, 황산망간, 탄산칼슘 등이 사용될 수 있으며, 그 외에 아미노산, 비타민 및/또는 적절한 전구체 등이 포함될 수 있다. 이들 구성성분 또는 전구체는 배지에 회분식 또는 연속식으로 첨가될 수 있다. 그러나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0095] 또한, 본 출원의 미생물의 배양 중에 수산화암모늄, 수산화칼륨, 암모니아, 인산, 황산 등과 같은 화합물을 배지에 적절한 방식으로 첨가하여, 배지의 pH를 조절할 수 있다. 또한, 배양 중에는 지방산 폴리글리콜 에스테르와 같은 소포제를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다. 또한, 배지의 호기 상태를 유지하기 위하여, 배지 내로 산소 또는 산소 함유 기체를 주입하거나 혐기 및 미호기 상태를 유지하기 위해 기체의 주입 없이 혹은 질소, 수소 또는 이산화탄소 가스를 주입할 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0096] 본 출원의 배양에서 배양온도는 20 내지 45°C 구체적으로는 25 내지 40°C 를 유지할 수 있고, 약 10 내지 160 시간 동안 배양할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0097] 본 출원의 배양에 의하여 생산된 베타 알라닌 및/또는 베타-알라닌 유래 화합물은 배지 중으로 분비되거나 세포 내에 잔류할 수 있다.

[0098] 본 출원의 베타 알라닌 및/또는 베타-알라닌 유래 화합물 생산방법은, 본 출원의 미생물(균주)을 준비하는 단계, 상기 미생물을 배양하기 위한 배지를 준비하는 단계, 또는 이들의 조합(순서에 무관, in any order)을, 예를 들어, 상기 배양하는 단계 이전에, 추가로 포함할 수 있다.

[0099] 본 출원의 베타 알라닌 및/또는 베타-알라닌 유래 화합물 생산방법은, 상기 배양에 따른 배지(배양이 수행된 배지) 또는 미생물(예컨대, 코리네박테리움 속 균주)로부터 베타 알라닌 및/또는 베타-알라닌 유래 화합물을 회수하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 회수하는 단계는 상기 배양하는 단계 이후에 추가로 포함될 수 있다.

[0100] 상기 회수는 본 출원의 미생물의 배양 방법, 예를 들어 회분식, 연속식 또는 유가식 배양 방법 등에 따라 당해 기술 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 목적하는 베타 알라닌 및/또는 베타-알라닌 유래 화합물을 수집(collect)하는 것일 수 있다. 예를 들어, 원심분리, 여과, 결정화 단백질 침전제에 의한 처리(염석법), 추출, 초음파 파쇄, 한외여과, 투석법, 분자체 크로마토그래피(겔여과), 흡착크로마토그래피, 이온교환 크로마토그래피, 친화도 크로마토그래피 등의 각종 크로마토그래피, HPLC 또는 이들의 방법을 조합하여 사용될 수 있으며, 당해 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 배지 또는 미생물로부터 목적하는 베타 알라닌 및/또는 베타-알라닌 유래 화합물을 회수할 수 있다.

[0101] 또한, 본 출원의 베타 알라닌 및/또는 베타-알라닌 유래 화합물 생산방법은, 추가적으로 정제 단계를 포함할 수 있다. 상기 정제는 당해 기술분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여, 수행할 수 있다. 일 예에서, 본 출원의 베타 알라닌 및/또는 베타-알라닌 유래 화합물 생산방법이 회수 단계와 정제 단계를 모두 포함하는 경우, 상기 회수 단계와 정제 단계는 순서에 상관없이 연속적 또는 비연속적으로 수행되거나, 동시에 또는 하나의 단계로 통합되어 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0103] 본 출원의 또 다른 하나의 양상은 본 출원의 미생물, 상기 미생물을 배양한 배지, 또는 이들의 조합을 포함하는 베타 알라닌 및/또는 베타-알라닌 유래 화합물 생산용 조성물을 제공하는 것이다.

[0104] 본 출원의 조성물은 베타 알라닌 및/또는 베타-알라닌 유래 화합물 생산용 조성물에 통상 사용되는 임의의 적합

한 부형제를 추가로 포함할 수 있으며, 이러한 부형제는, 예를 들어 보존제, 습윤제, 분산제, 현탁화제, 완충제, 안정화제 또는 등장화제 등일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0105] 본 출원의 조성물에서, 미생물(균주), 배지, 베타-알라닌 유래 화합물 등은 상기 다른 양상에서 기재한 바와 같다.

발명의 효과

[0107] 본 출원은 거짓쌀도둑거저리 유래 아스파테이트 1-디카복실라아제의 활성이 강화된 미생물을 제공하며, 상기 미생물은 베타 알라닌 및/또는 베타-알라닌 유래 화합물의 생산능이 우수하다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0109] 이하 본 발명을 다음의 실시예에 의하여 보다 구체적으로 설명하고자 한다. 그러나 이들은 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 제한되는 것은 아니다.

실시예 1. 아스파테이트 1-디카복실라아제 유전자 탐색 및 선별

[0112] 미생물 유래의 아스파테이트 1-디카복실라아제(aspartate 1-decarboxylase; 또는 PanD)는 두 가지 종류, 즉 발현이 되면서 활성을 가지는 형태 및 PanD 조절인자(PanM, PanD regulatory factor)에 의해서 활성화되는 형태로 분류된다. 따라서, PanM 조절인자가 필요한 미생물 유래의 아스파테이트 1-디카복실라아제와, 활성형 아스파테이트 1-디카복실라아제를 가지고 있는 미생물의 유전자 탐색을 진행하였다. 원핵세포 및 진핵세포 기반으로 아스파테이트 1-디카복실라아제를 가지고 있는 생물체를 기반으로 후보 유전자들과 그것들을 보유한 미생물들을 선별하였다. 그 중 생물안전도 (biosafety level)가 1인 미생물 유래의 아스파테이트 1-디카복실라아제를 표 1 과 같이 선별하였다.

표 1

[0113] 아스파테이트 1-디카복실라아제의 활성을 보유하고 있을 것으로 추정되는 미생물

균주	균주번호	프라이머 서열번호	플라스미드
대장균 (<i>Escherichia coli</i>)	KCTC1116	서열번호 1, 2 서열번호 3, 4	pECCG117-panD_panM(EC)
바실러스 서브틸리스 (<i>Bacillus subtilis</i>)	ATCC33234	서열번호 5, 6	pECCG117-panD(BS)
세라티아 루비대아 (<i>Serratia rubidaea</i>)	KCTC2927	서열번호 7, 8서열번호 9, 10	pECCG117-panD_panM(SR)
코리네박테리움 글루타미쿰 (<i>Corynebacterium glutamicum</i>)	ATCC13032	서열번호 11, 12	pECCG117-panD(CG)
슈도모나스 속 세균 (<i>Pseudomonas sp.</i>)	KCTC72094	서열번호 13, 14	pECCG117-panD(PA)
거짓쌀도둑거저리 (Red flour beetle; <i>Tribolium castaneum</i>)	GCA_000002335.3 (Genebank accession No)	서열번호 15, 16	pECCG117-panD(TC)

실시예 2. 외래 미생물 유래 아스파테이트 1-디카복실라아제가 도입된 코리네박테리움 속 미생물 제작

[0115] 확보된 미생물들의 게놈을 추출한 후 주형으로 아스파테이트 1-디카복실라아제를 암호화하는 DNA 단편을 표 1의 프라이머 서열(서열번호 1 및 2, 서열번호 5 및 6, 서열번호 7 및 8, 서열번호 11 및 12, 서열번호 13 및 14, 서열번호 15 및 16)을 이용하여 PCR을 수행하였다. PfuUltraTM 고-신뢰 DNA 폴리머라제(Stratagene)를 사용하여 PCR 하였으며, PCR 조건은 변성 95℃, 30초; 어닐링 55℃, 30초; 및 중합반응 72℃, 3분을 30회 반복하였다.

그 결과 각 미생물 유래의 아스파테이트 1-디카복실라아제를 획득하였다. 또한 대장균 및 세라티아 루비대아 미생물의 계놈을 주형으로 PanD 조절인자(PanM)를 암호화하는 DNA 단편을 표 1의 프라이머 서열(서열번호 3 및 4, 서열번호 9 및 10)을 이용하여 PCR을 수행하였다. PfuUltraTM 고-신뢰 DNA 폴리머라제(Stratagene)를 사용하여 PCR 하였으며, PCR 조건은 변성 95℃, 30초; 어닐링 55℃, 30초; 및 중합반응 72℃, 3분을 30회 반복하였다. 그 결과 대장균 및 세라티아 루비대아 유래의 PanD 조절인자를 획득하였다. 코리네박테리움 글루타미쿰 유래의 lysC 프로모터를 확보하기 위하여 코리네박테리움 글루타미쿰 계놈 DNA를 주형으로 프라이머 17와 18를 이용하여 프로모터를 상기 방법과 동일하게 PCR하여 DNA 단편을 획득하였다. 제한효소 BamHI으로 처리한 후 65℃에서 20분간 열처리한 pECCG117 (대한민국 등록특허 제10-0057684호) 벡터와 DNA단편들을 다카라(TaKaRa)의 Infusion Cloning Kit를 사용하여 제공된 매뉴얼에 따라 클로닝함으로써 플라스미드를 획득하였고 이는 표 1에 벡터의 이름과 도입된 유전자의 정보를 표기하였다.

[0116] 제작된 6종의 벡터들을 전기천공법에 의해 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC 13032에 형질전환하여 외래의 아스파테이트 1-디카복실라아제(PanD)를 발현하는 균주들을 제작하였다.

[0118] **실시예 3. 외래 미생물 유래 아스파테이트 1-디카복실라아제가 발현되는 코리네박테리움 속 미생물의 베타-알라닌 생산능 조사**

[0119] 상기 실시예 2에서 얻어진 균주들을 하기와 같은 조성으로 이뤄진 생산배지 25 ml을 함유하는 250 ml 코너-바플 플라스크에 모균주와 함께 접종하고, 33 ℃에서 48시간동안 200 rpm으로 진탕 배양하였다. 상기 얻어진 배양액을 20,000 rcf에서 10분동안 원심분리 후 상등액을 TDW(triple distilled water)로 1/10 희석한 후 HPLC 분석을 수행하여 베타-알라닌의 농도를 측정하고, 그 결과를 하기의 표 2에 나타내었다.

[0121] <생산배지>

[0122] 포도당 10%, 효모추출물 0.4%, 황산암모늄 1.5%, 제1인산칼륨 0.1%, 황산마그네슘7수염 0.05%, 황산철7수염 10 mg/l, 황산망간1수염 6.7 mg/l, 비오틴 50 µg/l, 티아민·HCl 100 µg/l, pH 7.2

표 2

[0124] 다양한 미생물 유래의 아스파테이트 1-디카복실라아제를 발현하는 미생물의 베타-알라닌 생산능

	베타-알라닌 농도 (g/L)
ATCC13032 (야생형)	0.0
ATCC13032pECCG117-panD_panM(EC)	0.6
ATCC13032pECCG117-panD(BS)	1.8
ATCC13032pECCG117-panD_panM(SR)	0.4
ATCC13032pECCG117-panD(CG)	1.2
ATCC13032pECCG117-panD(PS)	0.3
ATCC13032pECCG117-panD(TC)	2.4

[0125] 그 결과 상기 표 2에 나타난 바와 같이, 모균주인 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032는 베타-알라닌을 생산하지 않았고 코리네박테리움 글루타미쿰의 아스파테이트 1-디카복실라아제를 발현한 균주인 ATCC13032 pECCG117-panD(CG)에서는 약 1.2 g/L의 베타-알라닌이 생산되는 것을 확인하였다. 외래 미생물 유래의 아스파테이트 1-디카복실라아제를 발현한 균주들 중에서 거짓쌀도둑거저리(*Tribolium castaneum*) 유래의 아스파테이트 1-디카복실라아제를 발현한 균주인 ATCC13032 pECCG117-panD(TC)가 2.4 g/L로 가장 높은 베타-알라닌 생산성을 보였다.

[0126] 상기의 결과는 본 발명에서 선별한 6종의 효소 중 거짓쌀도둑거저리 유래의 아스파테이트 1-디카복실라아제가 베타-알라닌을 보다 더 효율적으로 생산할 수 있음을 의미한다.

[0127] 본 실시예에서 베타-알라닌 생산능이 가장 우수한 것으로 확인된 ATCC13032 pECCG117-panD(TC) 균주(*Corynebacterium glutamicum* CV03-5003로 명명)를 2021년 11월 23일자로 대한민국 서울특별시 서대문구 홍제

동에 소재하는 한국미생물보존센터에 기탁하여 KCCM13076P의 기탁번호를 부여받았다.

- [0129] 실시예 4. 외래 미생물 유래 아스파테이트 1-디카복실라아제가 발현되는 코리네박테리움 속 미생물의 베타-알라닌 유래 화합물 생산능 조사
- [0130] 상기 실시예 3에서 확인된 거짓쌀도독거저리의 아스파테이트 1-디카복실라아제의 베타-알라닌 유래 화합물 (판토텐산) 생산능을 확인하기 위하여 3-메틸-2-케토뷰타노에이트 하이드록시메틸트랜스퍼라아제(3-methyl-2-oxobutanoate hydroxymethyltransferase; 또는 PanB 단백질)의 활성이 강화된 미생물을 제작하였다.
- [0131] 먼저, 모균주에 존재하는 panB 유전자를 결손시키기 위한 백터를 제작하였다. 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032의 게놈 DNA를 주형으로 하여 서열번호 28와 29 및 서열번호 30와 31의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR은 변성 95 °C, 30초; 어닐링 55 °C, 30초; 및 중합반응 72 °C, 1분을 30회 반복하는 조건으로 수행하였다. 그 결과, panB 유전자 상단부위 1000 bp와 panB 유전자 하단부위 1000 bp의 유전자 단편을 각각 획득하였고, QIAGEN사의 PCR Purification kit를 사용하여 각 증폭산물을 정제하여, 백터 제작을 위한 삽입 DNA 단편으로 사용하였다.
- [0132] 제한효소 smaI로 처리한 후 65 °C에서 20분간 열처리한 pDCM2(대한민국 등록 특허 번호 제2278000호) 백터와 DNA 단편(panB 유전자 상단부위 1000 bp의 유전자 단편 및 panB 유전자 하단부위 1000 bp의 유전자 단편)을 몰농도 (M) 2:1:1이 되도록 하여 다카라(TaKaRa)의 Infusion Cloning Kit를 사용하여 제공된 매뉴얼에 따라 클로닝함으로써 panB 유전자를 염색체상에 결손하기 위한 백터 pDCM2_ΔpanB를 제작하였다.
- [0133] 대장균 유래 panB 유전자를 준비하기 위하여, 대장균 K12 야생형균주 (KCTC1116)의 게놈 DNA를 주형으로 하여 프라이머 32와 33를 이용하여 PCR하였다. PCR은 변성 95 °C, 30초; 어닐링 55 °C, 30초; 및 중합반응 72 °C, 1분을 30회 반복하여 수행하고, 그 결과 795 bp의 DNA단편을 획득하였다. 코리네박테리움 글루타미쿰 유래의 lysC 프로모터를 확보하기 위하여 코리네박테리움 글루타미쿰 게놈 DNA를 주형으로 프라이머 34와 35를 이용하여 프로모터를 상기 예의 방법과 동일하게 PCR하여 DNA 단편을 획득하였다. 제한효소 smaI로 처리한 후 65°C에서 20분간 열처리한 pDCM2_ΔpanB 백터와 상기 얻어진 DNA 단편들을 몰농도 (M) 2:1:1가 되도록 하여 다카라 (TaKaRa)의 Infusion Cloning Kit를 사용하여 제공된 매뉴얼에 따라 클로닝함으로써, 대장균 유래의 panB 유전자를 염색체상에 도입하기 위한 백터 pDCM2_ΔpanB::panB(EC)를 제작하였다.
- [0134] 제작된 백터 pDCM2_ΔpanB::panB(EC)를 전기천공법을 통해 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032 에 형질전환하고, 2차 교차 과정을 거쳐 염색체 상에 대장균 유래 panB가 도입된 균주(ΔpanB::panB(EC))를 각각 얻었다. 대장균 유래 panB의 적절한 치환 여부는 하기의 프라이머 조합을 사용하여 MASA(Mutant Allele Specific Amplification) PCR 기법(Takeda et al., Hum. Mutation, 2, 112-117 (1993))을 사용하여 확인하였다. 즉, 대장균 panB에 부합하는 프라이머 조합(서열 36와 35 및 서열번호 37와 32)에서는 증폭되는 균주를 선별함으로써 1차 결정하였으며, 선별된 균주의 panB 서열은 서열번호 36 및 서열번호 37의 프라이머 조합을 이용하여 분석함으로써 2차 확인하였다.
- [0135] 상기 실시예 1에서 얻어진 플라스미드들을 ATCC13032 ΔpanB::panB(EC) 균주에 도입 후 상기 실시예와 같은 조성으로 이뤄진 생산배지 25 ml을 함유하는 250 ml 코너-바플 플라스크에 모균주 및 상기 균주들을 각각 접종한 후, 33 °C에서 48시간동안 200 rpm으로 진탕 배양하여 판토텐산 생산능을 측정하였다.

표 3

[0137] 다양한 미생물 유래의 아스파테이트 1-디카복실라아제를 발현하는 미생물의 판토텐산 생산능

	판토텐산 농도 (g/L)
ATCC13032 ΔpanB::panB(EC)	0.2
ATCC13032 ΔpanB::panB(EC)pECCG117-panD_panM(EC)	1.0
ATCC13032 ΔpanB::panB(EC)pECCG117-panD(BS)	1.6
ATCC13032 ΔpanB::panB(EC)pECCG117-panD_panM(SR)	0.8
ATCC13032 ΔpanB::panB(EC)pECCG117-panD(CG)	2.0
ATCC13032 ΔpanB::panB(EC)pECCG117-panD(PS)	1.5
ATCC13032 ΔpanB::panB(EC)pECCG117-panD(TC)	5.5

- [0138] 그 결과 상기 표 3에 나타난 바와 같이, 모균주인 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032 ΔpanB::panB(EC) 균주는 판토텐산을 거의 생산하지 않았고 코리네박테리움 글루타미쿰의 아스파테이트 1-디카복실라아제를 발현한 균주(ATCC13032 ΔpanB::panB(EC) pECCG117-panD(CG))에서는 약 2.0 g/L의 판토텐산이 생산되는 것을 확인하였다. 외래 미생물 유래의 아스파테이트 1-디카복실라아제를 발현한 균주들 중에서 거짓쌀도둑거저리(*Tribolium castaneum*) 유래의 아스파테이트 1-디카복실라아제를 발현한 균주인 ATCC13032 ΔpanB::panB(EC) pECCG117-panD(TC)가 5.5 g/L로 가장 높은 판토텐산 생산성을 보였다.
- [0139] 상기의 결과는 본 발명에서 선별한 6종의 효소 중 거짓쌀도둑거저리 유래의 아스파테이트 1-디카복실라아제가 베타-알라닌뿐만 아니라 판토텐산도 보다 더 효율적으로 생산할 수 있음을 의미한다.
- [0141] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

수탁번호

[0143]

기탁기관명 : 한국미생물보존센터

수탁번호 : KCCM13076P

수탁일자 : 20211123

서열목록

<110> CJ CheilJedang Corporation

<120> MICROORGANISM HAVING INHANCED ACTIVITY OF ASPARTATE
1-DECARBOXYLASE FROM TRIBOLIUM CASTANEUM AND USES THEREOF

<130> DPP20213223KR

<160> 38

<170> koPatent In 3.0

<210> 1

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic_primer

<400> 1

tagatcgaaa ggtgcacaaa gatgattcgc acgatg

36

<210> 2

<211> 36

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223>
 > synthetic_primer
 <400> 2
 ccgctctaga actagtggat ctcaagcaac ctgtac 36
 <210> 3
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic_primer
 <400> 3
 tagatcgaaa ggtgcacaaa gatgaagctg accatc 36
 <210> 4
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic_primer
 <400> 4
 ccgctctaga actagtggat cttaacactt ctecca 36
 <
 210> 5
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic_primer
 <400> 5
 tagatcgaaa ggtgcacaaa gatgattcgc acgatg 36
 <210> 6
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic_primer
 <400> 6
 ccgctctaga actagtggat ctcaagcaac ctgtac 36

<210> 7
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic_primer
 <400> 7

 tagatcgaaa ggtgcacaaa gatgatacgt actatgc 37
 <210> 8
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic_primer
 <400> 8

 ccgctctaga actagtggat ctcaggcaac ctgtac 36
 <210> 9
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic_primer
 <400> 9

 tagatcgaaa ggtgcacaaa gatgaaactc actatc 36
 <210> 10
 <211> 36
 <212> DNA

 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic_primer
 <400> 10

 ccgctctaga actagtggat ctcatttctg ccagat 36
 <210> 11
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic_primer

<400>	11	
	tagatcgaaa ggtgcacaaa gatgctgcgc accatc	36
<210>	12	
<211>	37	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	synthetic_primer	
<400>	12	
	ccgctctaga actagtggat cctaaatget tctcgac	37
<210>	13	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	synthetic_primer	
<400>	13	
	tagatcgaaa ggtgcacaaa gatgcagcc ataatg	36
<210>	14	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	synthetic_primer	
<400>	14	
	ccgctctaga actagtggat ctcaggcgac ctgtat	36
<210>	15	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	synthetic_primer	
<400>	15	
	tagatcgaaa ggtgcacaaa gatgccggca accgga	36
<210>	16	
<211>	37	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic_primer
 <400> 16
 ccgctctaga actagtggat ctggttcaga ttgtaa 37
 <210> 17
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic_primer
 <400> 17
 cttgatatcg aattcctgca ttcaggtag ttgactaaag a 41
 <210> 18
 <211> 17
 <212> DNA

 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic_primer
 <400> 18
 ctttgtgcac ctttga 17
 <210> 19
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic_primer
 <400> 19
 attcgagctc ggtaccggc ctcacggatc gtggt 35
 <210> 20
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic_primer
 <400> 20
 agctaaaacg cccgggtcc tgtggtgcc tta 33

 <210> 21

<211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic_primer
 <400> 21
 aggacaccac aggaccccgg gcgttttagc tcgcc 35
 <210> 22
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic_primer
 <400> 22
 tcgactctag aggatccctt ctcacggcg tgctg 35
 <210> 23
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic_primer
 <400> 23

 aggacaccac aggaccctt caggtagtt gact 34
 <210> 24
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic_primer
 <400> 24
 tggcgagcta aaagccctt acaaatctga acca 34
 <210> 25
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic_primer
 <400> 25
 tctagatcag cgattg 16

<210> 26
 <211> 16
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic_primer

<400> 26
 atcgcgcact aaccga

16

<210> 27
 <211> 540
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic_PanD from Tribolium castaneum (wild type)

<400> 27
 Met Pro Ala Thr Gly Glu Asp Gln Asp Leu Val Gln Asp Leu Ile Glu

1 5 10 15

Glu Pro Ala Thr Phe Ser Asp Ala Val Leu Ser Ser Asp Glu Glu Leu
 20 25 30

Phe His Gln Lys Cys Pro Lys Pro Ala Pro Ile Tyr Ser Pro Val Ser
 35 40 45

Lys Pro Val Ser Phe Glu Ser Leu Pro Asn Arg Arg Leu His Glu Glu
 50 55 60

Phe Leu Arg Ser Ser Val Asp Val Leu Leu Gln Glu Ala Val Phe Glu
 65 70 75 80

Gly Thr Asn Arg Lys Asn Arg Val Leu Gln Trp Arg Glu Pro Glu Glu
 85 90 95

Leu Arg Arg Leu Met Asp Phe Gly Val Arg Ser Ala Pro Ser Thr His

100 105 110

Glu Glu Leu Leu Glu Val Leu Lys Lys Val Val Thr Tyr Ser Val Lys
 115 120 125

Thr Gly His Pro Tyr Phe Val Asn Gln Leu Phe Ser Ala Val Asp Pro
 130 135 140

Tyr Gly Leu Val Ala Gln Trp Ala Thr Asp Ala Leu Asn Pro Ser Val

145 150 155 160
 Tyr Thr Tyr Glu Val Ser Pro Val Phe Val Leu Met Glu Glu Val Val
 165 170 175

 Leu Arg Glu Met Arg Ala Ile Val Gly Phe Glu Gly Gly Lys Gly Asp
 180 185 190
 Gly Ile Phe Cys Pro Gly Gly Ser Ile Ala Asn Gly Tyr Ala Ile Ser
 195 200 205
 Cys Ala Arg Tyr Arg Phe Met Pro Asp Ile Lys Lys Lys Gly Leu His
 210 215 220
 Ser Leu Pro Arg Leu Val Leu Phe Thr Ser Glu Asp Ala His Tyr Ser
 225 230 235 240
 Ile Lys Lys Leu Ala Ser Phe Gln Gly Ile Gly Thr Asp Asn Val Tyr

 245 250 255
 Leu Ile Arg Thr Asp Ala Arg Gly Arg Met Asp Val Ser His Leu Val
 260 265 270
 Glu Glu Ile Glu Arg Ser Leu Arg Glu Gly Ala Ala Pro Phe Met Val
 275 280 285
 Ser Ala Thr Ala Gly Thr Thr Val Ile Gly Ala Phe Asp Pro Ile Glu
 290 295 300
 Lys Ile Ala Asp Val Cys Gln Lys Tyr Lys Leu Trp Leu His Val Asp
 305 310 315 320

 Ala Ala Trp Gly Gly Gly Ala Leu Val Ser Ala Lys His Arg His Leu
 325 330 335
 Leu Lys Gly Ile Glu Arg Ala Asp Ser Val Thr Trp Asn Pro His Lys
 340 345 350
 Leu Leu Thr Ala Pro Gln Gln Cys Ser Thr Leu Leu Leu Arg His Glu
 355 360 365
 Gly Val Leu Ala Glu Ala His Ser Thr Asn Ala Ala Tyr Leu Phe Gln
 370 375 380
 Lys Asp Lys Phe Tyr Asp Thr Lys Tyr Asp Thr Gly Asp Lys His Ile

 385 390 395 400

Gln Cys Gly Arg Arg Ala Asp Val Leu Lys Phe Trp Phe Met Trp Lys
 405 410 415
 Ala Lys Gly Thr Ser Gly Leu Glu Lys His Val Asp Lys Val Phe Glu
 420 425 430
 Asn Ala Arg Phe Phe Thr Asp Cys Ile Lys Asn Arg Glu Gly Phe Glu
 435 440 445
 Met Val Ile Ala Glu Pro Glu Tyr Thr Asn Ile Cys Phe Trp Tyr Val
 450 455 460

Pro Lys Ser Leu Arg Gly Arg Lys Asp Glu Ala Asp Tyr Lys Asp Lys
 465 470 475 480
 Leu His Lys Val Ala Pro Arg Ile Lys Glu Arg Met Met Lys Glu Gly
 485 490 495
 Ser Met Met Val Thr Tyr Gln Ala Gln Lys Gly His Pro Asn Phe Phe
 500 505 510
 Arg Ile Val Phe Gln Asn Ser Gly Leu Asp Lys Ala Asp Met Val His
 515 520 525
 Leu Val Glu Glu Ile Glu Arg Leu Gly Ser Asp Leu

530 535 540

<210> 28

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic_primer

<400> 28

tgaattcgag ctcggtaccc gaaatagcgc ttgatgaatc 40

<210> 29

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic_primer

<400> 29

ggttgctacc tgcacccggg gggcatgagt atagatgtga 40

<210> 30

<211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220><223> synthetic_primer
 <400> 30
 ctatactcat gccccccggg tgcaggtagc aaccacaaag 40
 <210> 31
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic_primer
 <400> 31
 gtcgactcta gaggatcccc tatgtggcgt tgggtgcagc 40
 <210> 32
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic_primer
 <400> 32
 tagatcgaaa ggtgcacaaa gatgaaaccg accacca 37

 <210> 33
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic_primer
 <400> 33
 ccgctctaga actagtggat cttaatggaa actgtgttct t 41
 <210> 34
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic_primer
 <400> 34

catctatact catgcccccc ttcagggtag ttgac 35
 <210> 35
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic_primer
 <400> 35

ggtggtcggg ttcacctttg tgcacctttc gatct 35
 <210> 36
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic_primer
 <400> 36

cccacccggg gtcattcgac 20
 <210> 37
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic_primer
 <400> 37

gcgcatccag ctcatcggg 19
 <210> 38
 <211> 1623
 <212>
 > DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic_gene coding PanD from Tribolium castaneum (wild type)
 <400> 38

atgccggcaa ccggagagga ccaagacttg gttcaggact tgatcgagga acctgccact 60
 ttcagcgacg ctgtgttgc ctccgacgag gaactgtttc accagaaatg cccgaagccg 120
 gcaccaatth actcgcaggt gtcaaaacc gtttcattcg agagcctgcc caatcggcg 180
 ctatgaag aatttctccg ctcatcgggt gatgtactcc tgcaggagcg cgttttcgag 240

ggaactaatc ggaagaatcg ggtgcttcag tggcgtgagc cagaggaatt gcggcgtctc 300

 atggatTTTg gcgttcggtc tgctccttca acccacgaag aactgctgga agttcttaaa 360
 aaagtagtca cgtacagcgt caagaccggc caccctact ttgtaaatca actcttcagc 420
 gctgtcgacc cctatggcct ggtcgcgcaa tgggctaccg atgccttgaa tcctcagtg 480
 tacacgtacg aagttagccc ggtcttcgtc cttatggagg aagtgcctct gcgtgaaatg 540
 cgtgcgattg teggctttga gggaggcaag ggagacggaa ttttctgtcc aggtggctct 600
 atcgccaacg gttacgcaat ttcgtgtgca cggtatcgtt tcatgccgga tattaagaaa 660
 aaaggactgc actcacttcc acggctggta ctcttcacct cggaagacgc tcactactcg 720

 atcaaaaaac tggcatcctt ccagggcac cggcaccgata acgtttacct tatccgtact 780
 gatgcacggg gccggatgga tgtttctcac ctggtggagg aaattgagcg ctcgttgcgt 840
 gaggtgccc ccccgttcat ggtatccgc accgcaggta cgacggtgat cggagctttt 900
 gaccctatcg aaaagatcgc cgatgtctgc cagaaataca aattgtggct ccacgttgac 960
 gctgcctggg gtggaggagc cttggtctcg gctaagcadc gccatctgct caaaggcadc 1020
 gagcgggctg attctgttac gtggaatect cataaactgc ttaccgcacc ccaacagtgc 1080
 agcactttgc ttcttcgcca tgaaggcgtc ctggcggaag cacatagcac caatgctgct 1140

 tacctgttcc agaaggacaa gttttacgac accaaatagc acaccggcga taaacacadc 1200
 caatgtggtc ggcgtgccga cgtgttgaaa ttctggttca tgtggaaggc taaaggcacc 1260
 tccggttgg aaaaacacgt tgataaggta ttgaaaacg ctcggttctt taccactgt 1320
 attaaaaacc gtgagggatt cgagatggta attgctgagc cagagtatac gaacatctgt 1380
 ttctggtacg taccaaaatc cctgcggggc cggaaggatg aagctgatta taaagacaaa 1440
 ttgcataaag tcgtccacg tatcaaggaa cgcgatgaga aagagggtc gatgatggtt 1500
 acgtaccagg cacagaaggc ccaccgaat tttttccgta ttgtgttcca aaatagcgga 1560

 ctcgataaag ctgatatggt ccaccttgc gaagagatcg aacggcttgg ttcagatttg 1620
 taa 1623