



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년05월26일
 (11) 등록번호 10-1740807
 (24) 등록일자 2017년05월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/77 (2006.01) *C12P 13/08* (2006.01)
C12R 1/15 (2006.01)
 (52) CPC특허분류
C12N 15/77 (2013.01)
C12P 13/08 (2013.01)
 (21) 출원번호 10-2015-0120871
 (22) 출원일자 2015년08월27일
 심사청구일자 2015년08월27일
 (65) 공개번호 10-2017-0025045
 (43) 공개일자 2017년03월08일
 (56) 선행기술조사문헌
 KR10-2015-0043717A
 GenBank Accession Number WP_011265442
 (2015.03.25.)

(73) 특허권자
씨제이제일제당 (주)
 서울특별시 중구 동호로 330 (쌍림동)
 (72) 발명자
변효정
 서울시 강서구 등촌로 163, 113-102(등촌2동, 등촌
 아이파크아파트)
정윤희
 서울시 서초구 서초대로1길 34, 201-704(방배
 4동, 현대2차아파트)
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
조인제

전체 청구항 수 : 총 4 항

심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 **L-라이신 생산능을 가지는 코리네박테리움 속 미생물 및 이를 이용한 L-라이신 생산방법**

(57) 요약

본 발명은 L-라이신 생산능을 가지는 코리네박테리움 속 미생물 및 이를 이용한 L-라이신 생산방법에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

C12R 1/15 (2013.01)

(72) 발명자

김형준

서울시 구로구 경인로 343, 106-2104(고척1동, 삼환
로즈빌아파트)

이선영

서울시 강서구 허준로 47, 206-1404(가양1동, 가양
2단지아파트)

남현구

서울시 동작구 상도로 320, 101-1104(상도동, 중앙
하이츠)

박선미

서울시 동작구 사당로 27길 67, 202호(사당동)

이상목

서울시 강서구 강서로47길 158, 206-1203(
내발산동, 마곡수명산파크2단지)

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어지는 단백질이 불활성화된, L-라이신 생산능을 가지는 코리네박테리움 속 미생물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 단백질은 서열번호 2의 염기서열로 이루어지는 유전자에 의해 코딩되는, L-라이신 생산능을 가지는 코리네박테리움 속 미생물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 코리네박테리움속 미생물은 코리네박테리움 글루타미쿰인, L-라이신 생산능을 가지는 코리네박테리움 속 미생물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 미생물을 배지에서 배양하는 단계; 및

상기 미생물 또는 배지로부터 L-라이신을 회수하는 단계를 포함하는, L-라이신을 생산하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 L-라이신 생산능을 가지는 코리네박테리움 속 미생물 및 이를 이용하여 L-라이신을 생산하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] L-라이신은 필수 아미노산의 일종으로 동물사료, 사람의 의약품 및 화장품 산업에 사용되고 있으며, 코리네박테리움 속 균주나 에스케리키아 속 균주를 이용한 발효에 의해 생산되고 있다.

[0003] 코리네박테리움 속 균주 (*Corynebacterium*), 특히 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*)은 L-아미노산 생산에 많이 이용되고 있는 그람 양성미생물이다. L-라이신의 생산을 위해 코리네박테리움 속 균주에서 주로 L-라이신 생합성에 관여하는 효소를 코딩하는 유전자의 발현을 증가시키거나 또는 L-라이신의 생합성에 불필요한 유전자를 제거하는 것과 같은 목적 물질 특이적인 접근 방법이 주로 이용되고 있다. 그러나, 이러한 방법 이외에 L-라이신 생산에 관여하지 않는 유전자를 제거하는 방법, 구체적으로 기능이 알려지지 않은 유전자를 제거하는 방법 또한 활용되고 있다.

[0004] 이에, 본 발명자들은 라이신 생산능을 증가시킬 수 있는 유효 형질을 지속적으로 탐색하기 위하여 예의 연구한 결과, 코리네박테리움 속 미생물의 내재적 유전자를 무작위적으로 결손시켜 고농도로 L-라이신을 생산하는 미생물을 선별하였고, 그 미생물로부터 지금까지 그 기능이 보고된 바 없는 단백질을 암호화하는 유전자가 결손될 경우 L-라이신 생산능이 증가한다는 사실을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) KR 10-0838035 B1 (공고일 2008.06.12)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명의 목적은 L-라이신 생산능을 가지는 코리네박테리움 속 미생물을 제공하는 것이다.
- [0007] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 미생물을 이용한 L-라이신 생산방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0008] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 단백질이 불활성화된, L-라이신 생산능을 가지는 코리네박테리움 속 미생물을 제공한다.
- [0009] 본 발명은 또한 본 발명의 미생물을 배지에서 배양하는 단계; 및 상기 미생물 또는 배지로부터 L-라이신을 회수하는 단계를 포함하는, L-라이신 생산방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0010] 본 발명은 L-라이신을 생산하는 코리네박테리움 속 미생물에서 기능이 알려지지 않은 서열번호1의 아미노산 서열을 포함하는 단백질을 불활성화시켜 L-라이신 생산능이 증가된 재조합 코리네박테리움 속 미생물을 제공하며, 상기 재조합 코리네박테리움 속 미생물은 L-라이신을 고수율로 생산할 수 있으므로 L-라이신 생산에서 산업상 유용하게 이용할 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0011] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0012] 본 발명의 첫 번째 양태로서, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 단백질이 불활성화된, L-라이신 생산능을 가지는 코리네박테리움 속 미생물을 제공한다.
- [0013] 상기 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 단백질은 코리네박테리움 속 미생물에 내재적으로 존재하는 단백질이나, 기능이 알려지지 않은 추정상의 단백질(hypothetical protein)이다.
- [0015] 상기 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 단백질은 상기 서열번호 1의 아미노산 서열에 대해서 80% 이상, 구체적으로는 90% 이상, 보다 구체적으로는 95% 이상, 특히 구체적으로는 97% 이상의 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 단백질 또한 포함할 수 있다. 상기 서열과 상동성을 갖는 서열로서 실질적으로 서열번호 1의 아미노산 서열과 동일하거나 상응하는 생물학적 활성을 갖는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 경우도 역시 본 발명의 범주에 포함됨은 자명하다.
- [0016] 상기 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 단백질을 코딩할 수 있는 뉴클레오티드 서열이면 본 발명의 범주에 포함되나, 구체적으로 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열을 가질 수 있다. 또한, 상기 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열에 대해서 80% 이상, 구체적으로는 90% 이상, 보다 구체적으로는 95% 이상, 특히 구체적으로는 97% 이상의 상동성을 가지는 뉴클레오티드 서열 또한 본 발명에 포함될 수 있다. 또한, 유전 암호의 축퇴성(genetic code degeneracy)에 기인하여 동일 아미노산 서열을 코딩하는 상기 서열들의 변이체 또한 본 발명에 포함될 수 있다.
- [0017] 본 발명에서 용어 “상동성”은 주어진 아미노산 서열 또는 뉴클레오티드 서열과 일치하는 정도를 의미하며 백분율로 표시될 수 있다. 본 명세서에서, 주어진 아미노산 서열 또는 뉴클레오티드 서열과 동일하거나 유사한 활성을 갖는 그의 상동성 서열이 "% 상동성"으로 표시된다.
- [0018] 상기 아미노산 또는 뉴클레오티드 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)]를 사용하여 결정할 수 있다. 이러한 알고리즘 BLAST에 기초하여, BLASTN이나 BLASTX라고 불리는 프로그램이 개발되어 있다[참조: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>].
- [0019] 본 발명에서 용어 “불활성화”는 상기 내재적 유전자의 발현이 모균주 또는 변형 전의 균주 또는 야생형 균주에 비하여 낮은 수준으로 감소되거나 전혀 발현이 되지 않는 유전자 및 발현이 되더라도 그 활성이 없거나 감소되어 있는 유전자가 생성되는 것을 의미하는 것으로써, 당업계에 알려진 임의의 불활성화 방법에 의하여 이루어질 수 있다. 본 발명에 있어서, 불활성화 방법으로 상기 유전자 내로 하나 이상의 염기쌍의 삽입에 의한 삽입

(insertion) 돌연변이, 상기 유전자 내의 하나 이상의 염기쌍의 결실을 갖는 결실(deletion) 돌연변이, 및 상기 유전자 내의 넌센스 코돈을 도입시키는 염기쌍의 전이 (transition) 또는 전환 (transversion) 돌연변이로 이루어지는 균으로부터 선택되는 하나 이상의 돌연변이에 의한 것이거나, 상기 유전자의 내재적 프로모터를 더 약한 프로모터로 교체하거나, 상기 유전자의 전체 또는 일부를 결손시키는 방법일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0020] 유전자를 결손시키는 방법에는 당업계에 공지된 유전자 결손방법을 사용할 수 있으며, 방법에는 제한이 없다. 일례로, 자외선과 같은 빛 또는 화학물질을 이용하여 돌연변이를 유발하고, 얻어진 돌연변이체로부터 목적 유전자가 결손된 균주를 선별할 수 있다. 또한, 상기 유전자 결손은 예를 들면, 목적 유전자와 상동성이 있는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열 또는 벡터를 상기 미생물에 주입하여 상동 재조합(homologous recombination)이 일어나게 함으로써 이루어질 수 있다. 또한, 상기 주입되는 뉴클레오티드 서열 또는 벡터에는 우성 선별 마커를 포함할 수 있다.

[0021] 상기 벡터는 목적 단백질을 불활성화시킬 수 있는데 사용할 수 있다면 천연 상태이거나 재조합된 상태의 플라스미드, 코스미드, 바이러스 및 박테리오파지일 수 있다. 예를 들어, 파지 벡터 또는 코스미드 벡터로서 pWE15, M13, λEMBL3, λEMBL4, λFIXII, λDASHII, λZAPII, λgt10, λgt11, Charon4A, 및 Charon21A 등을 사용할 수 있으며, 플라스미드 벡터로서 pDZ 벡터, pBR계, pUC계, pBluescriptII계, pGEM계, pTZ계, pCL계 및 pET계 등을 사용할 수 있다. 사용 가능한 벡터는 특별히 제한되는 것이 아니며 공지된 발현 벡터를 사용할 수 있다.

[0023] 상기 재조합 벡터의 도입은 당업계의 통상적인 방법에 따라 용이하게 수행할 수 있다. 일반적으로 CaCl₂ 침전법, CaCl₂ 방법에 DMSO(dimethyl sulfoxide)라는 환원물질을 사용함으로써 효율을 높인 Hanahan 방법, 전기천공법(electroporation), 인산칼슘 침전법, 원형질 융합법, 실리콘 카바이드 섬유를 이용한 교반법, PEG를 이용한 형질전환법, 텍스트란 설페이트, 리포펙타딘 및 건조/억제 매개된 형질전환 방법 등이 있다.

[0025] 본 발명에서 용어 "형질전환"은 목적 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 숙주 세포 내에 도입하여 숙주 세포 내에서 상기 폴리뉴클레오티드가 발현하거나 불활성화시킬 수 있도록 하는 것을 의미한다. 상기 폴리뉴클레오티드는 표적 단백질을 암호화하는 DNA 및 RNA 또는 표적 단백질 발현을 감소시키는 프로모터 또는 표적 단백질 발현을 불활성화시킬 수 있는 마커 유전자 등을 포함할 수 있다. 상기 폴리뉴클레오티드는 숙주 세포 내로 도입되어 발현될 수 있는 것이면, 어떠한 형태로 도입되는 것이든 상관없다. 상기 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 단백질이 불활성될 모균주로는 L-라이신을 생산할 수 있는 미생물이거나 제한 없이 사용할 수 있으며, 코리네박테리움(Corynebacterium) 속, 브레비박테리움(Brevibacterium) 속, 에스케리키아(Escherichia) 속, 엔테로박터(Enterbacter) 속, 어위니아(Erwinia) 속, 세라티아(Serratia) 속 및 프로비덴시아(Providencia) 속에 속하는 미생물일 수 있다. 구체적으로는 코리네박테리움 속 미생물, 보다 구체적으로는 코리네박테리움 글루타미쿰을 사용할 수 있다.

[0026] 본 발명에서 용어 "L-라이신 생산능을 가지는 미생물"은 L-라이신을 생산할 수 있도록 통상적으로 공지된 유전자를 조작하여 얻어진 미생물일 수 있으며, 예를 들어, L-아미노산의 생산에 관여하는 코리네박테리움 속 미생물에 내재하는 *aspB* (아스파테이트 아미노트랜스퍼라제를 암호화하는 유전자), *lysC* (아스파테이트 키나제를 암호화하는 유전자), *asd* (아스파테이트 세미알데히드 디히드로게나제를 암호화하는 유전자), *dapA* (디히드로디피콜리네이트 신타제를 암호화하는 유전자), *dapB* (디히드로디피콜리네이트 리덕타제를 암호화하는 유전자) 및 *lysA* (디아미노디피멜레이트 디카르복실라제를 암호화하는 유전자) 등의 L-라이신 생합성 구성 유전자들로 이루어진 균으로부터 선택된 유전자 중 하나 또는 그 이상의 발현을 강화하도록 하여 얻어지는 미생물일 수 있다. 또한, 돌연변이 처리, 일례로 L-루이신 영양요구성을 도입한 변이균주에 N-메틸-N'-니트로-N-니트로소구아니딘(NTG)를 처리하여 얻어지는 미생물일 수 있다.

[0028] 본 발명의 두 번째 양태로서, 본 발명은 상기 본 발명의 미생물을 배지에서 배양하는 단계; 및 상기 미생물 또는 배지로부터 L-라이신을 회수하는 단계를 포함하는, L-라이신 생산방법을 제공한다.

[0029] 상기 본 발명의 미생물은 앞서 설명한 바와 같다.

[0030] 본 발명의 방법에 있어서, 코리네박테리움 속 미생물의 배양은 당업계에 알려진 임의의 배양 조건 및 배양 방법이 사용될 수 있다.

[0031] 코리네박테리아 균주 배양을 위하여 사용될 수 있는 배지로는 예를 들면, Manual of Methods for General Bacteriology by the American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981)에 개시된 배지가 사용될 수 있다.

- [0032] 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 한정되는 것은 아니다.
- [0033] 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 한정되는 것은 아니다.
- [0034] 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.
- [0035] 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 소포체를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다. 호기 상태를 유지하기 위해 배양물 내로 산소 또는 산소-함유 기체 (예, 공기)를 주입할 수 있다. 배양물의 온도는 보통 20 °C 내지 45 °C, 구체적으로는 25 °C 내지 40 °C일 수 있다. 배양 시간은 원하는 L-아미노산의 생성량이 얻어질 때까지 계속할 수 있으나, 구체적으로는, 10 내지 160 시간일 수 있다.
- [0036] 본 발명의 방법에 있어서, 배양은 배치 공정, 주입 배치 및 반복 주입 배치 공정과 같은 연속식 또는 회분식으로 이루어질 수 있다. 이러한 배양은 방법은 당업계에 잘 알려져 있으며, 당업자에 의해 선택되는 임의의 방법이 사용될 수 있다.
- [0037] L-라이신은 음이온 교환 크로마토그래피 및 후속으로 다투린 유도체화에 의하여 분리되고 분석될 수 있다. 또한 본 발명의 방법은 L-라이신을 회수하는 단계를 포함한다. 미생물 또는 배양 배지로부터 L-라이신을 회수하는 방법은 당업계에 널리 알려져 있다. 상기 L-라이신 회수 방법에는, 여과, 음이온 교환 크로마토그래피, 결정화 및 HPLC 등이 사용될 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.
- [0038] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0040] **[실시예]**
- [0041] **실시예 1: 트랜스포존을 이용한 무작위적 돌연변이 라이브러리 제작**
- [0042] 라이신 생산능이 증가된 균주를 얻기 위하여, 하기의 방법으로 벡터 라이브러리를 제작하였다.
- [0043] 먼저 EZ-Tn5™ <R6K γ ori/KAN-2>Tnp Transposome™ Kit(Epicentre)를 사용하여 얻은 플라스미드를 코리네박테리움 글루타미쿰 KCCM11016P(대한민국 등록특허번호 제10-0159812호; 상기 미생물은 KFCC10881로 공개되었다가, 부다페스트 조약하인 국제기탁기관에 재기탁되어 KCCM11016P로 기탁번호를 부여 받음)를 모균주로 하여 전기펄스법(Appl. Microbiol. Biothcnol.(1999) 52:541-545)으로 형질전환하고, 카나마이신 (25 mg/1)이 포함된 복합평판배지에 도말하여 약 20,000 개의 콜로니를 확보하였다.
- [0044] <복합평판배지 (pH 7.0)>
- [0045] 포도당 10 g, 펩톤 10 g, 쇠고기 추출물 5 g, 효모 추출물 5 g, 뇌심장 침출액(Brain Heart Infusion) 18.5 g, NaCl 2.5 g, 요소 2 g, 소르비톨 91 g, 한천 20 g (증류수 1 리터 기준)
- [0047] **실시예 2: 트랜스포존을 이용한 무작위적 돌연변이 라이브러리 스크리닝**
- [0048] 상기 실시예 1에서 확보된 약 20,000개의 콜로니를 각각 300 μ L의 하기의 선별배지에 접종하여 96 딥 웰 플레이트(96-deep well plate)에서 32°C, 1000 rpm 으로 약 24시간 동안 배양하였다.
- [0049] <선별배지 (pH 8.0)>
- [0050] 포도당 10 g, 5.5 g 암모늄 설페이트(ammonium sulfate), MgSO₄7H₂O 1.2 g, KH₂PO₄ 0.8 g, K₂HPO₄ 16.4 g, 바이

오틴 100 μg , 티아민 HCl 1000 μg , 칼슘-판토텐산 2000 μg , 니코틴아미드 2000 μg (증류수 1 리터 기준)

[0051] 배양액에 생산된 L-라이신의 생산량을 분석하기 위하여 닐하이드린 방법을 이용하였다(Moore, S., Stein, W. H., Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. J. Biol. Chem.1948, 176, 367-388).

[0052] 배양이 완료된 후 배양 상층액 10 μl 와 닐하이드린 반응용액 190 μl 를 65°C에서 30분간 반응시킨 후, 파장 570 nm에서 분광 광도계(spectrophotometer)로 흡광도를 측정하고, 대조구인 코리네박테리움 글루타미쿰 KCCM11016P 균주와 비교하여 높은 흡광도를 보이는 변이균주들로서 약 60여 종의 콜로니를 선별하였다. 그 외 콜로니들은 대조구로 이용된 코리네박테리움 글루타미쿰 KCCM11016P 균주와 유사하거나 감소한 흡광도를 보였다.

[0053] 상기 선별된 60여 종의 균주들을 상기와 동일한 방법으로 다시 배양한 후 닐하이드린 반응을 반복 수행하여, 결과적으로 모균주인 코리네박테리움 글루타미쿰 KCCM11016P 균주 대비 L-라이신 생산능이 향상된 상위 10종의 돌연변이주를 선별하였다.

[0055] **실시예 3: 선별된 무작위적 돌연변이주들의 L-라이신 생산능 분석**

[0056] 상기 실시예 2에서 선별된 10 종의 돌연변이주들을 대상으로 L-라이신 생산능이 재현성 있게 증가된 균주들을 최종 선별하기 위하여, 하기의 배지를 이용한 플라스크 배양을 실시하였다. 배양이 완료된 후 HPLC를 이용하여 배양액 내 L-라이신 농도를 분석하였고, 각 돌연변이주들의 L-라이신 생산 농도를 하기 표 1에 나타내었다.

[0057] <종배지 (pH 7.0)>

[0058] 포도당 20 g, 펩톤 10 g, 효모추출물 5 g, 요소 1.5 g, KH_2PO_4 4 g, K_2HPO_4 8 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, 바이오틴 100 μg , 티아민 HCl 1000 μg , 칼슘-판토텐산 2000 μg , 니코틴아미드 2000 μg (증류수 1 리터 기준)

[0059] <생산배지 (pH 7.0)>

[0060] 포도당 100 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 40 g, 대두 단백질 2.5 g, 옥수수 침지 고형분(Corn Steep Solids) 5 g, 요소 3 g, KH_2PO_4 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, 바이오틴 100 μg , 티아민 염산염 1000 μg , 칼슘-판토텐산 2000 μg , 니코틴아미드 3000 μg , CaCO_3 30 g (증류수 1리터 기준).

표 1

[0062] 선별된 무작위 돌연변이주 10종의 L-라이신 생산 농도

	균주	L-라이신(g/l)			
		배치 1	배치 2	배치 3	평균
대조균	KCCM11016P	42.9	42.5	42.4	42.6
1	KCCM11016P/mt-1	43.2	43.6	43.8	43.5
2	KCCM11016P/mt-2	43.0	43.1	43.4	43.2
3	KCCM11016P/mt-3	42.6	42.8	42.9	42.8
4	KCCM11016P/mt-4	43.1	42.8	42.9	42.9
5	KCCM11016P/mt-5	43.0	42.9	42.7	42.9
6	KCCM11016P/mt-6	41.0	41.7	41.6	41.4
7	KCCM11016P/mt-7	43.2	42.8	42.7	42.9
8	KCCM11016P/mt-8	53.2	53.1	53	53.1
9	KCCM11016P/mt-9	42.7	42.5	42	42.4
10	KCCM11016P/mt-10	48.9	48.2	48.5	48.5

[0064] 선별된 10 종의 변이주들 중 L-라이신 생산능이 의미있게 향상된 균주로서 KCCM11016P/mt-10 이 최종 선별되었다.

[0066] **실시예 4: 최종 선별주들에서의 L-라이신 생산능 증가 원인 규명**

[0067] 본 실시예에서는 상기 실시예 3으로부터 최종 선별된 돌연변이주를 대상으로 트랜스포존의 무작위적인 삽입에 의해 결손된 유전자를 동정하고자 하였다.

[0068] KCCM11016P/mt-10 의 Genomic DNA를 추출하여 절단한 후 연결하여 대장균 DH5 α 에 형질전환하고, 카나마이신

(25 mg/1)이 포함된 LB 고체배지에 도말하였다. 형질전환된 콜로니 20종을 선별한 후, 미지의 유전자 일부가 포함된 플라스미드를 획득하였고, EZ-Tn5™ <R6K γ ori/KAN-2>Tnp Transposome™ Kit의 프라이머 1(서열번호 3) 및 프라이머 2(서열번호 4)를 사용하여 염기서열을 분석한 결과 미국 국립보건원의 유전자은행(NIH Genbank)에 보고된 염기서열에 근거하여 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자가 불활성화되어 있음을 알게 되었다.

[0069] 프라이머 1(서열번호 3): ACCTACAACAAAGCTCTCATCAACC

[0070] 프라이머 2(서열번호 4): CTACCCTGTGGAACCTACATCT

[0072] **실시예 5: 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 결손을 위한 재조합 벡터 제작**

[0073] 코리네박테리움 속 균주의 염색체 상에서 상기 실시예 4에서 확인된 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자를 결손시킬 수 있는 재조합 벡터의 제작을 위하여, 상기 유전자의 결손을 위한 단편을 제작하기 위하여 프라이머 3 내지 6을 합성하였고 이를 표2에 나타내었다.

표 2

[0075] 유전자의 결손을 위한 단편을 제작하기 위한 프라이머 3 내지 6

유전자	사용된 프라이머	염기 서열
서열번호2	프라이머 3(서열번호 5)	CGCTCTAGATTTTCATGTCTGCCTCAAGC
	프라이머 4(서열번호 6)	TACTGGTGACAAACTAGTCGGACTCACACCAGAGAAA
	프라이머 5(서열번호 7)	GGTGTGAGTCCGACTAGTTTGTACCAGTATCGCACT
	프라이머 6(서열번호 8)	CGCTCTAGACGCTGATAACGATGAGGTC

[0077] 서열번호 2에 근거하여 ORF 부위를 결손하기 위하여, 프라이머 3(서열번호 5), 프라이머 4(서열번호 6), 프라이머 5(서열번호 7), 프라이머 6(서열번호 8)를 합성하고 야생형 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC 13032의 염색체 DNA를 주형으로 PCR[Sambrook et al, Molecular Cloning, a Laboratory Manual (1989), Cold Spring Harbor Laboratories]을 수행하였다. 이로부터 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열로 코딩되는 단백질을 암호화하는 부분의 상단 364bp와 하단 375bp가 연결된 DNA 단편을 획득하였다. 이때, PCR 조건은 변성 95도에서 5분간 변성 후, 95/30초 변성, 56/30초 어닐링, 72/1분 중합을 30회 반복한 후, 72에서 7분간 중합반응을 시켜서 수행되었다. 코리네박테리움 글루타미쿰 내에서 복제가 불가능한 pDZ 벡터(대한민국 특허 등록번호 제10-0924065호)와 PCR로 증폭된 상기 단편을 염색체 도입용 제한효소 XbaI 으로 처리한 뒤, DNA 접합 효소를 이용하여 연결한 후, 대장균 DH5 a 에 형질전환하고 카나마이신(25mg/1)이 포함된 LB 고체배지에 도말하였다.

[0078] PCR을 통해 상기 목적인 유전자가 삽입된 플라스미드로 형질전환된 콜로니를 선별한 후, 플라스미드 추출법을 이용하여 플라스미드를 획득하였고, 이 플라스미드를 pDZ-ΔMT10DS1 라 명명하였다.

[0080] **실시예 6: 코리네박테리움 글루타미쿰 KCCM11016P 유래의 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자가 결손된 균주의 제작 및 L-라이신 생산능 평가**

[0081] 상기 실시예 5에서 제작한 재조합 플라스미드 pDZ-ΔMT10DS1 를 염색체 상에서의 상동 재조합에 의해 L-라이신 생산균주인 코리네박테리움 글루타미쿰 KCCM11016P에 형질전환시켰다(van der Rest et al., Appl Microbiol Biotechnol 52:541-545, 1999).

[0082] 그 후, 4%의 수크로오스를 포함하는 고체평판배지에서 2차 재조합을 하였다. 2차 재조합이 완료된 상기 코리네박테리움 글루타미쿰 형질전환주를 대상으로 프라이머 3과 프라이머 6을 이용하여 PCR법을 통하여 염색체상에서 서열번호 2의 유전자가 결손된 균주를 획득하였다. 상기 재조합 균주를 코리네박테리움 글루타미쿰 KCCM11016P-ΔMT10DS1라 명명하였다.

[0083] 상기 제작된 코리네박테리움 글루타미쿰 KCCM11016P-ΔMT10DS1 균주의 L-라이신 생산능을 분석하기 위해 모균주인 코리네박테리움 글루타미쿰 KCCM11016P 균주와 함께 아래와 같은 방법으로 배양하였다.

[0084] 하기의 종배지 25 ml을 함유하는 250 ml 코너-바플 플라스크에 모균주인 코리네박테리움 글루타미쿰 KCCM11016P 와 실시예 6에서 제작된 균주 코리네박테리움 글루타미쿰 KCCM11016P-ΔMT10DS1 를 접종하고, 30℃에서 20시간 동안, 200 rpm으로 진탕 배양하였다. 그런 다음, 생산 배지 24 ml을 함유하는 250ml 코너-바플 플라스크에 1ml 의 종 배양액을 접종하고 30℃에서 72시간 동안, 200 rpm에서 진탕 배양하였다. 상기 종 배지와 생산 배지의

조성은 각각 하기와 같다.

[0085] <종배지 (pH 7.0)>

[0086] 포도당 20g, 펩톤 10 g, 효모추출물 5 g, 요소 1.5 g, KH₂PO₄ 4 g, K₂HPO₄ 8 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, 바이오틴 100 μg, 티아민 HCl 1000 μg, 칼슘-판토텐산 2000 μg, 니코틴아미드 2000 μg (증류수 1 리터 기준)

[0087] <생산배지 (pH 7.0)>

[0088] 포도당 100 g, (NH₄)₂SO₄ 40 g, 대두 단백질 2.5 g, 옥수수 침지 고형분(Corn Steep Solids) 5 g, 요소 3 g, KH₂PO₄ 1 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, 바이오틴 100 μg, 티아민 염산염 1000 μg, 칼슘-판토텐산 2000 μg, 니코틴아미드 3000 μg, CaCO₃ 30 g (증류수 1리터 기준).

[0089] 배양 종료 후 HPLC (Waters 2478)에 의해 L-라이신의 생산량을 측정하였고, 분석한 L-라이신의 농도를 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

[0090] KCCM11016P 유래 KCCM11016P-△MT10DS1의 L-라이신 생산능 분석

	균주	L-라이신(g/ℓ)			
		배치 1	배치 2	배치 3	평균
대조군	KCCM11016P	41.2	41.7	41.8	41.6
실험군	KCCM11016P-△MT10DS1	49.4	49.6	50	49.7

[0092] 상기 결과와 같이, L-라이신 생산균주인 코리네박테리움 글루타미쿰 KCCM11016P으로부터 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자를 결손시켰을 경우, 모균주 대비 L-라이신 생산능이 평균 19% 증가함을 확인하였다.

[0093] 따라서, 코리네박테리움 속 미생물에서 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자를 결손시킴으로써 L-라이신 생산능을 향상시킬 수 있음을 확인하였다.

[0094] 상기의 결과들로부터, L-라이신 생산균주에서 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자를 결손시켜 기능이 알려지지 않은 추정상의 단백질(hypothetical protein)을 불활성화시킴으로써 L-라이신 생산능을 증가시키는데 효과가 있음을 확인하였고, 상기 균주 KCCM11016P-△MT10DS1를 CA01-2285로 명명하고 2014년 12월 5일자로 한국미생물보존센터(KCCM)에 국제기탁하여 KCCM11626P로 기탁번호를 부여받았다.

[0096] **실시예 7: 코리네박테리움 글루타미쿰 KCCM11347P 유래의 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자가 결손된 균주의 제작 및 L-라이신 생산능 평가**

[0097] L-라이신을 생산하는 다른 코리네박테리움 글루타미쿰에 속하는 균주들에서도 상기와 동일한 효과가 있는지를 확인하기 위하여, 상기 실시예 6과 같은 방법으로 L-라이신 생산균주인 코리네박테리움 글루타미쿰 KCCM11347P (상기 미생물은 KFCC10750으로 공개되었다가 부다페스트 조약 하의 국제기탁기관에 제기탁되어, KCCM11347P를 부여받았음. 한국 등록특허 제10-0073610호)를 대상으로 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자가 결손된 균주를 제작하고 KCCM11347P-△MT10DS1로 명명하였다.

[0098] 상기 실시예 6과 동일한 방법으로 배양하고, 배양 종료 후 HPLC (Waters 2478)에 의해 L-라이신의 생산량을 측정하였고, 분석한 L-라이신의 농도를 하기 표 4에 나타내었다.

표 4

[0099] KCCM11347P 유래 KCCM11347P-△MT10DS1의 L-라이신 생산능 분석

	균주	L-라이신(g/ℓ)			
		배치 1	배치 2	배치 3	평균
대조군	KCCM11347P	37.9	38.1	37.9	38.0
실험군	KCCM11347P-△MT10DS1	45.9	45.7	45.6	45.7

- [0101] 상기 결과와 같이, L-라이신 생산균주인 코리네박테리움 글루타미쿰 KCCM11347P를 대상으로 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자를 결손시켰을 경우, L-라이신 생산능이 평균 20% 증가함을 확인하였다.
- [0102] 따라서, 실시예 6의 결과와 마찬가지로, 코리네박테리움 속 미생물에서 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자를 결손시킴으로써 L-라이신 생산능을 향상시킬 수 있음을 확인하였다.
- [0104] **실시예 8: 코리네박테리움 글루타미쿰 CJ3P 유래의 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자가 결손된 균주의 제작 및 L-라이신 생산능 평가**
- [0105] L-라이신을 생산하는 다른 코리네박테리움 글루타미쿰에 속하는 균주들에서도 상기와 동일한 효과가 있는지를 확인하기 위하여, 상기 실시예 6과 같은 방법으로 야생주에 3종의 변이[pyc(P458S), hom(V59A), lysC(T311I)]를 도입하여 L-라이신 생산능을 갖게된 코리네박테리움 글루타미쿰 CJ3P(Binder et al. Genome Biology 2012, 13:R40)를 대상으로 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자가 결손된 균주를 제작하고 CJ3P-△MT10DS1 로 명명하였다.
- [0106] 상기 실시예 6과 동일한 방법으로 배양하고, 배양 종료 후 HPLC (Waters 2478)에 의해 L-라이신의 생산량을 측정하였고, 분석한 L-라이신의 농도를 하기 표 5에 나타내었다.

표 5

[0108] CJ3P 유래 CJ3P-△MT10DS1 의 L-라이신 생산능

	균주	L-라이신(g/ℓ)			
		배치 1	배치 2	배치 3	평균
대조균	CJ3P	8.2	8.1	8.4	8.2
실험균	CJ3P-△MT10DS1	9.5	9.6	9.7	9.6

- [0110] 상기 결과와 같이, L-라이신 생산균주인 코리네박테리움 글루타미쿰 CJ3P를 대상으로 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자를 결손시켰을 경우, L-라이신 생산능이 평균 17% 증가함을 확인하였다.
- [0111] 따라서, 실시예 6 및 실시예 7의 결과와 마찬가지로, 코리네박테리움 속 미생물에서 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자를 결손시킴으로써 L-라이신 생산능을 향상시킬 수 있음을 확인하였다.

수탁번호

- [0113] 기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)
- 수탁번호 : KCCM11626P
- 수탁일자 : 20141205

서열 목록

- <110> CJ Cheiljedang Corporation
- <120> A microorganism of corynebacterium genus having L-lysine productivity and method for producing L-lysine using the same
- <130> PA14-0395
- <160> 8
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 308

<212> PRT

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 1

Met Ile Val Asn His Phe Phe Ser Gly Val Ser Pro Leu Ile Val Ala

1 5 10 15

Ile Ile Leu Gly Ile Ile Leu Thr Asn Leu Ile Gln Leu Pro Ala Ser

20 25 30

Thr Ser Pro Gly Ile Thr Leu Ala Ser Lys Lys Leu Leu Arg Leu Gly

35 40 45

Ile Val Phe Leu Gly Leu Gln Leu Val Phe Ser Asp Ile Leu Ser Leu

50 55 60

Gly Phe Pro Met Leu Ala Val Ile Val Cys Ile Val Ala Gly Gly Ile

65 70 75 80

Phe Gly Thr Ile Leu Met Gly His Leu Leu Arg Met Lys Pro Thr Gln

85 90 95

Val Leu Leu Ile Ala Cys Gly Phe Ser Ile Cys Gly Ala Ala Ala Val

100 105 110

Ala Gly Val Glu Gly Val Thr Asp Ser Glu Glu Glu Glu Val Val Thr

115 120 125

Ala Val Ala Leu Val Val Ile Phe Gly Thr Leu Met Ile Pro Phe Ile

130 135 140

Pro Phe Ala Thr Lys Val Leu Gly Leu Ser Pro Glu Ile Gly Gly Met

145 150 155 160

Trp Ala Gly Gly Ser Ile His Glu Ile Ala Gln Val Val Ala Ala Gly

165 170 175

Gly Val Ile Gly Gly Gly Ala Leu Gly Val Ala Val Val Val Lys Leu

180 185 190

Ala Arg Val Leu Leu Leu Ala Pro Ile Ala Ala Ile Leu Ser Phe Arg

195 200 205

Gln Arg Arg Gln Gly Tyr Thr Ser Pro Asp Gly Lys Arg Pro Pro Val

210 215 220

Val Pro Leu Phe Ile Leu Gly Phe Leu Ala Met Val Val Leu Arg Ser

ggcacctac tcaccacct cggatag 927

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer 1

<400> 3

acctacaaca aagctctcat caacc 25

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer 2

<400> 4

ctaccctgtg gaacacctac atct 24

<210> 5

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer 3

<400> 5

cgctctagat ttcattgtctg cctcaagc 28

<210> 6

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer 4

<400> 6

tactggtgac aaactagtcg gactcacacc agagaaa 37

<210> 7

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer 5
<400> 7
gggtgtgagtc cgactagttt gtcaccagta tcgcact 37
<210> 8
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Primer 6
<400> 8
cgctctagac gctgataacg atgaggtc 28