



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년01월26일
 (11) 등록번호 10-2207867
 (24) 등록일자 2021년01월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 C12N 15/77 (2006.01) C07K 14/34 (2006.01)
 (52) CPC특허분류
 C12N 15/77 (2013.01)
 C07K 14/34 (2013.01)
 (21) 출원번호 10-2020-0008025
 (22) 출원일자 2020년01월21일
 심사청구일자 2020년01월21일
 (56) 선행기술조사문헌
 US20060257983 A1
 (뒷면에 계속)

(73) 특허권자
 씨제이제일제당 주식회사
 서울특별시 중구 동호로 330 (쌍림동)
 (72) 발명자
 배지연
 서울특별시 중구 동호로 330 (쌍림동)
 윤병훈
 서울특별시 중구 동호로 330 (쌍림동)
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
 특허법인한일

전체 청구항 수 : 총 4 항

심사관 : 안규정

(54) 발명의 명칭 **NADP 의존적 글리세르알데하이드-3-포스페이트 디하이드로지나제를 포함하는 미생물을 이용하여 L-아미노산을 생산하는 방법**

(57) 요약

본 출원은 락토바실러스 속 유래의 NADP 의존적 글리세르알데하이드-3-포스페이트 디하이드로지나제(NADP dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)를 포함하는 L-아미노산 생산능이 증가된 코리네박테리움 속 미생물에 관한 것으로, 본 출원에 따라 락토바실러스 델부루키 아종 불가리쿠스(*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*) 유래의 NADP 의존적 글리세르알데하이드-3-포스페이트 디하이드로지나제를 도입함으로써 상기 NADP 의존적 글리세르알데하이드-3-포스페이트 디하이드로지나제 활성을 통해 환원력을 증가시켜 코리네박테리움 속(*Corynebacterium* sp.) 균주의 L-아미노산 생산능을 증대시킬 수 있다.

(72) 발명자
권수연
서울특별시 중구 동호로 330 (쌍림동)
김경림
서울특별시 중구 동호로 330 (쌍림동)
김주은
서울특별시 중구 동호로 330 (쌍림동)
변효정
서울특별시 중구 동호로 330 (쌍림동)
조승현
서울특별시 중구 동호로 330 (쌍림동)
권나라
서울특별시 중구 동호로 330 (쌍림동)
김형준
서울특별시 중구 동호로 330 (쌍림동)

(56) 선행기술조사문헌
US20100009418 A1
KR1020190009872 A
KR1020170002574 A
Applied and Environmental Microbiology
Vol.76(21):7154-7160 (2010. 9. 17.)
Amino Acids. 2014 Sep;46(9):2165-75. doi:
10.1007/s00726-014-1768-1. Epub 2014 May 31.
KR1020060078687 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명세서

청구범위

청구항 1

락토바실러스 델부루키 아종 불가리쿠스(*Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*) 유래인 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진, NADP 의존적 글리세르알데하이드-3-포스페이트 디하이드로지나제(NADP dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)가 도입된 코리네박테리움 속 미생물을 배지에서 배양하는 단계; 및 상기 배양된 미생물 또는 배양물로부터 L-아미노산을 회수하는 단계;를 포함하는, L-아미노산 생산 방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 코리네박테리움 속 미생물은 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)인, L-아미노산 생산 방법.

청구항 4

락토바실러스 델부루키 아종 불가리쿠스(*Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*) 유래인 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진, NADP 의존적 글리세르알데하이드-3-포스페이트 디하이드로지나제(NADP dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)가 도입된, L-아미노산 생산능이 증가된 코리네박테리움 속 미생물.

청구항 5

삭제

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 코리네박테리움 속 미생물은 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)인, 코리네박테리움 속 미생물.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 출원은 NADP 의존적 글리세르알데하이드-3-포스페이트 디하이드로지나제(NADP dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)를 포함하는 L-아미노산 생산능이 증가된 코리네박테리움 속 미생물 및 이를 이용한 L-아미노산의 생산방법에 관한 것이다.

배경기술

[0003] 코리네박테리움 속 미생물(*Corynebacterium sp.*)은 L- 아미노산 및 각종 핵산을 포함한 사료, 의약품 및 식품 등의 다양한 용도를 갖는 물질을 산업적으로 생산하는데에 자주 이용되는 그람양성 미생물이다. 근래에는 디아민(diamine), 케토산(keto-acid) 등을 코리네박테리움 속 미생물로부터 생산하기도 한다.

[0004] 미생물 발효를 통하여 유용 산물을 생산하기 위하여, 미생물내 목적산물의 생합성 경로 강화와 함께 에너지원 또는 환원력에 대한 요구가 증가한다. 이 중, 환원력을 공급하는데 있어 NADPH(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)는 필수요소이다. 산화형인 NADP+와 환원형인 NADPH는 서로 생체내 전자 전달 물질로, 여러 합성과정에 관여한다. 중앙대사 경로중 NADPH를 생산하는 경로에는 1) 산화적 오탄당 인산경로(oxidative

pentose phosphate pathway)와 2) TCA경로의 NADP 의존성 이소시트르산 탈수소효소(NADP-dependent isocitrate dehydrogenase; Icd 유전자)에 의해 주로 생산되는 것으로 알려져 있다. 이외 여러 미생물에서 NADPH를 공급하기 위한 다양한 대안경로로써 말레익 효소(malate enzyme), 글루코즈 디하이드로지나제(glucose dehydrogenase), 비인산화 글리세르알데하이드-3-포스페이트 디하이드로지나제(nonphosphorylation glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)를 가지고 있다.

[0005] 또한 중앙대사경로와 무관하게 NADPH를 생산하는 효소로는 트랜스수소화효소(transhydrogenase), 페레독신 NADP+ 산화환원효소(Ferredoxin: NADP+ oxidoreductase) 등이 있다.

[0006] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 아미노산 생산 미생물에서 각각의 아미노산 생산을 증가시키기 위해 예의 노력한 결과, NADP 의존적 글리세르알데하이드-3-포스페이트 디하이드로지나제를 코리네박테리움 속 미생물에 도입하는 다방면의 연구를 통하여 코리네박테리움 속 미생물에서 아미노산 및 그의 전구체 생산이 증가됨을 확인함으로써 본 출원을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 출원의 하나의 목적은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진, NADP 의존적 글리세르알데하이드-3-포스페이트 디하이드로지나제(NADP dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)를 포함하는 코리네박테리움 속 미생물을 배지에서 배양하는 단계; 및 상기 배양된 미생물 또는 배양물로부터 L-아미노산을 회수하는 단계를 포함하는, L-아미노산 생산 방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 출원의 또 다른 목적은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진, NADP 의존적 글리세르알데하이드-3-포스페이트 디하이드로지나제(NADP dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)를 포함하는, L-아미노산 생산능이 증가된 코리네박테리움 속 미생물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 출원에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 출원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 출원의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 출원의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[0013] 상기 목적을 달성하기 위한 본 출원의 하나의 양태는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진, NADP 의존적 글리세르알데하이드-3-포스페이트 디하이드로지나제(NADP dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)를 포함하는 코리네박테리움 속 미생물을 배지에서 배양하는 단계; 및 상기 배양된 미생물 또는 배양물로부터 L-아미노산을 회수하는 단계를 포함하는, L-아미노산 생산 방법을 제공하는 것이다.

[0014] 본 출원에서, 용어 "NADP 의존적 글리세르알데하이드-3-포스페이트 디하이드로지나제"는 글리세르알데하이드-3-포스페이트(glyceraldehyde-3-phosphate)를 기질로 하고 조효소인 NADP를 이용하여 3-포스포글리세레이트(3-phosphateglycerate)로 전환하는 활성을 갖는 폴리펩티드를 의미한다. 상기 NADP 의존적 글리세르알데하이드-3-포스페이트 디하이드로지나제에는 동물, 식물, 및 박테리아로부터 유래한 NADP 의존적 글리세르알데하이드-3-포스페이트 디하이드로지나제가 포함될 수 있다. 구체적으로 상기 NADP 의존적 글리세르알데하이드-3-포스페이트 디하이드로지나제는 박테리아로부터 유래하는 것일 수 있고, 보다 구체적으로 락토바실러스 속(*Lactobacillus sp.*)으로부터 유래하는 것일 수 있으며, 락토바실러스 텔부루키 아종 불가리쿠스(*Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*)로부터 유래하는 것일 수 있다. 상기 NADP 의존적 글리세르알데하이드-3-포스페이트 디하이드로지나제는 예를 들면, 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 단백질일 수 있다. 상기 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 단백질, 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되는 단백질과 혼용하여 사용될 수 있다.

[0015] 본 출원에서 상기 서열번호 1은 NADP 의존적 글리세르알데하이드-3-포스페이트 디하이드로지나제 활성을 갖는 아미노산 서열을 의미한다. 구체적으로, 상기 서열번호 1은 gapN 유전자에 의해 코딩되는 NADP 의존적 글리세르알데하이드-3-포스페이트 디하이드로지나제 활성을 갖는 단백질 서열일 수 있다. 본 출원의 목적상, 상기 단백질은 락토바실러스 속(*Lactobacillus sp.*) 유래일 수 있고, 구체적으로 락토바실러스 텔부루키 아종 불가리쿠스(*Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*)로부터 유래일 수 있으나, 이에 제한되지 않으며 상기 아미노산과 동일한 활성을 갖는 서열은 제한 없이 포함될 수 있다. 상기 서열번호 1의 아미노산 서열은 공지 데이터

베이스인 미국국립보건원 진뱅크(NIH GenBank)에서 얻을 수 있다. 또한, 본 출원에서의 NADP 의존적 글리세르알데하이드-3-포스페이트 디하이드로지나제 활성을 갖는 단백질은 비록 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 단백질이라고 정의하였으나, 서열번호 1의 아미노산 서열 앞뒤로의 무의미한 서열 추가 또는 자연적으로 발생할 수 있는 돌연변이, 혹은 이의 잠재적 돌연변이(silent mutation)를 제외하는 것이 아니다. 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 단백질과 서로 동일 또는 상응하는 활성을 가지는 경우라면 본 출원의 NADP 의존적 글리세르알데하이드-3-포스페이트 디하이드로지나제 활성을 갖는 단백질에 해당됨은 당업자에게 자명하다. 구체적인 예를 들어, 본 출원의 NADP 의존적 글리세르알데하이드-3-포스페이트 디하이드로지나제 활성을 갖는 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 이와 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 갖는 아미노산 서열로 구성되는 단백질일 수 있다. 또한, 이러한 상동성 또는 동일성을 가지며 상기 단백질에 상응하는 효능을 나타내는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열로 이루어진 단백질도 본 출원의 변이 대상이 되는 단백질의 범위 내에 포함됨은 자명하다.

[0016] 즉, 본 출원에서 '특정 서열번호로 기재된 아미노산 서열로 이루어진 단백질 또는 폴리펩티드', '특정 서열번호로 기재된 아미노산 서열로 이루어진 단백질 또는 폴리펩티드'라고 기재되어 있다 하더라도, 해당 서열번호의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드와 동일 혹은 상응하는 활성을 가지는 경우라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열로 이루어진 단백질도 본 출원에서 사용될 수 있음은 자명하다. 예를 들어, '서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드'는, 이와 동일 혹은 상응하는 활성을 가지는 경우라면 '서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드'에 속할 수 있음은 자명하다.

[0017] 본 출원에서 상기 NADP 의존적 글리세르알데하이드-3-포스페이트 디하이드로지나제를 코딩하는 유전자는 gapN 유전자이며, 상기 유전자는 박테리아로부터 유래하는 것일 수 있고, 보다 구체적으로 락토바실러스 속 (*Lactobacillus sp.*) 미생물로부터 유래하는 것일 수 있으나, gapN 유전자를 발현할 수 있는 락토바실러스 속 미생물이라면 특별히 제한되지 않는다. 구체적으로, 상기 락토바실러스 속 미생물은 락토바실러스 텔부루키 아종 불가리쿠스(*Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*)일 수 있다. 상기 유전자는 서열번호 1의 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열일 수 있으며, 보다 구체적으로는 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 서열일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 2의 염기서열을 가지는 폴리뉴클레오티드, 서열번호 2의 염기서열로 구성되는 폴리뉴클레오티드와 혼용하여 사용될 수 있다.

[0019] 본 출원에서 용어, "폴리뉴클레오티드"는 뉴클레오티드 단위체(monomer)가 공유결합에 의해 길게 사슬모양으로 이어진 뉴클레오티드의 중합체(polymer)로 일정한 길이 이상의 DNA 또는 RNA 가닥으로서, 보다 구체적으로는 상기 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 단편을 의미한다.

[0020] 구체적으로, 본 출원의 폴리뉴클레오티드는 코돈의 축퇴성(degeneracy)으로 인하여 또는 상기 폴리펩티드를 발현시키고자 하는 생물에서 선호되는 코돈을 고려하여, 폴리펩티드의 아미노산 서열을 변화시키지 않는 범위 내에서 코딩 영역에 다양한 변형이 이루어질 수 있다. 구체적으로, 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어지는 NADP 의존적 글리세르알데하이드-3-포스페이트 디하이드로지나제를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열이라면 제한 없이 포함할 수 있다.

[0021] 또한 공지의 유전자 서열로부터 조제될 수 있는 프로브, 예를 들면, 상기 염기서열의 전체 또는 일부에 대한 상보 서열과 엄격한 조건 하에 하이브리드화하여, 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어지는 NADP 의존적 글리세르알데하이드-3-포스페이트 디하이드로지나제 활성을 가지는 단백질을 코딩하는 서열이라면 제한없이 포함될 수 있다. 상기 "엄격한 조건(stringent condition)"이란 폴리뉴클레오티드 간의 특이적 혼성화를 가능하게 하는 조건을 의미한다. 이러한 조건은 문헌(예컨대, J. Sambrook et al., 상동)에 구체적으로 기재되어 있다. 예를 들어, 상동성 또는 동일성이 높은 유전자끼리, 40% 이상, 구체적으로는 90% 이상, 보다 구체적으로는 95% 이상, 더욱 구체적으로는 97% 이상, 특히 구체적으로는 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 갖는 유전자끼리 하이브리드화하고, 그보다 상동성 또는 동일성이 낮은 유전자끼리 하이브리드화하지 않는 조건, 또는 통상의 써던 하이브리드화(southern hybridization)의 세척 조건인 60 °C, 1XSSC, 0.1% SDS, 구체적으로는 60 °C, 0.1XSSC, 0.1% SDS, 보다 구체적으로는 68 °C, 0.1XSSC, 0.1% SDS에 상당하는 염 농도 및 온도에서, 1회, 구체적으로는 2회 내지 3회 세정하는 조건을 열거할 수 있다.

[0022] 혼성화는 비록 혼성화의 엄격도에 따라 염기 간의 미스매치(mismatch)가 가능할지라도, 두 개의 핵산이 상보적 서열을 가질 것을 요구한다. 용어, "상보적"은 서로 혼성화가 가능한 뉴클레오티드 염기 간의 관계를 기술하는데 사용된다. 예를 들면, DNA에 관하여, 아데노신은 티민에 상보적이며 시토신은 구아닌에 상보적이다. 따라서,

본 출원은 또한 실질적으로 유사한 핵산 서열뿐만 아니라 전체 서열에 상보적인 단리된 핵산 단편을 포함할 수 있다.

- [0023] 구체적으로, 상동성 또는 동일성을 가지는 폴리뉴클레오티드는 55 °C의 T_m 값에서 혼성화 단계를 포함하는 혼성화 조건을 사용하고 상술한 조건을 사용하여 탐지할 수 있다. 또한, 상기 T_m 값은 60 °C, 63 °C 또는 65 °C일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니고 그 목적에 따라 당업자에 의해 적절히 조절될 수 있다.
- [0024] 폴리뉴클레오티드를 혼성화하는 적절한 엄격도는 폴리뉴클레오티드의 길이 및 상보성 정도에 의존하고 변수는 해당기술분야에 잘 알려져 있다(Sambrook et al., supra, 9.50-9.51, 11.7-11.8 참조).
- [0026] 본 출원에서, 용어 '상동성(homology)' 또는 '동일성(identity)'은 두 개의 주어진 아미노산 서열 또는 염기서열과 관련된 정도를 의미하며 백분율로 표시될 수 있다. 용어 상동성 및 동일성은 종종 상호교환적으로 이용될 수 있다.
- [0027] 보존된(conserved) 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 서열 상동성 또는 동일성은 표준 배열 알고리즘에 의해 결정되며, 사용되는 프로그램에 의해 확립된 디폴트 갭 페널티가 함께 이용될 수 있다. 실질적으로, 상동성을 갖거나(homologous) 또는 동일한(identical) 서열은 일반적으로 서열 전체 또는 전체-길이의 적어도 약 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%를 따라 중간 또는 높은 엄격한 조건(stringent conditions)에서 하이브리드할 수 있다. 하이브리드화는 폴리뉴클레오티드에서 코돈 대신 축퇴 코돈을 함유하는 폴리뉴클레오티드 또한 고려된다.
- [0028] 임의의 두 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열이 상동성, 유사성 또는 동일성을 갖는지 여부는 예를 들어, Pearson et al (1988)[Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85]: 2444에서와 같은 디폴트 파라미터를 이용하여 "FASTA" 프로그램과 같은 공지의 컴퓨터 알고리즘을 이용하여 결정될 수 있다. 또는, EMBOSS 패키지의 니들만 프로그램(EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277)(버전 5.0.0 또는 이후 버전)에서 수행되는 바와 같은, 니들만-운치(Needleman-Wunsch) 알고리즘(Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453)이 사용되어 결정될 수 있다(GCG 프로그램 패키지(Devereux, J., et al, Nucleic Acids Research 12: 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, [S.] [F.,] [ET AL, J MOLEC BIOL 215]: 403 (1990); Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, [ED.] Academic Press, San Diego,1994, 및 [CARILLO ETA/.](1988) SIAM J Applied Math 48: 1073을 포함한다). 예를 들어, 국립 생물공학 정보 데이터베이스 센터의 BLAST, 또는 ClustalW를 이용하여 상동성, 유사성 또는 동일성을 결정할 수 있다.
- [0029] 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 상동성, 유사성 또는 동일성은 예를 들어, Smith and Waterman, Adv. Appl. Math (1981) 2:482 에 공지된 대로, 예를 들면, Needleman et al. (1970), J Mol Biol. 48:443과 같은 GAP 컴퓨터 프로그램을 이용하여 서열 정보를 비교함으로써 결정될 수 있다. 요약하면, GAP 프로그램은 두 서열 중 더 짧은 것에서의 기호의 전체 수로, 유사한 배열된 기호(즉, 뉴클레오티드 또는 아미노산)의 수를 나눈 값으로 정의한다. GAP 프로그램을 위한 디폴트 파라미터는 (1) 이진법 비교 매트릭스(동일성을 위해 1 그리고 비-동일성을 위해 0의 값을 함유함) 및 Schwartz and Dayhoff, eds., Atlas Of Protein Sequence And Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358 (1979)에 의해 개시된 대로, Gribskov et al(1986) Nucl. Acids Res. 14: 6745의 가중된 비교 매트릭스(또는 EDNAFULL(NCBI NUC4.4의 EMBOSS 버전) 치환 매트릭스); (2) 각 갭을 위한 3.0의 페널티 및 각 갭에서 각 기호를 위한 추가의 0.10 페널티(또는 갭 개방 페널티 10, 갭 연장 페널티 0.5); 및 (3) 말단 갭을 위한 무 페널티를 포함할 수 있다.
- [0030] 또한, 임의의 두 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열이 상동성, 유사성 또는 동일성을 갖는지 여부는 정의된 엄격한 조건하에서 써던 혼성화 실험에 의해 서열을 비교함으로써 확인할 수 있으며, 정의되는 적절한 혼성화 조건은 해당 기술 범위 내이고, 당업자에게 잘 알려진 방법(예컨대, J. Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, 1989; F.M. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., New York)으로 결정될 수 있다.
- [0032] 상기 NADP 의존적 글리세르알데하이드-3-포스페이트 디하이드로지나제를 코딩하는 유전자는 당업계에 알려진 통상적인 방법에 의하여 코리네박테리움 속 미생물 내에 도입되어, 코리네박테리움 속 미생물 내에서 NADP 의존적 글리세르알데하이드-3-포스페이트 디하이드로지나제가 발현될 수 있다.
- [0033] 본 출원에서 용어, 단백질이 "발현되도록/되는"은 목적 단백질이 미생물 내에 도입되거나, 미생물 내에서 발현되도록 변형된 상태를 의미한다. 본 출원의 목적상 "목적 단백질"은 전술한 NADP 의존적 글리세르알데하이드-3-포

스페이트 디하이드로지나제일 수 있다.

- [0034] 구체적으로, "단백질의 도입"은, 미생물이 본래 가지고 있지 않았던 목적 단백질의 활성을 나타나게 되는 것을 의미한다. 예를 들어, 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 미생물 내 염색체로 도입되거나, 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터가 미생물 내로 도입되어 이의 활성이 나타나는 것일 수 있다. 비록 상기 목적 단백질이 미생물 내 이미 존재하더라도, 상기 목적 단백질이 미생물 내 도입됨으로 인하여, 미생물 내 상기 단백질의 발현 또는 활성이 비변형 미생물에 비하여 증가되거나 강화될 수 있다.
- [0035] 또한, "활성의 강화"는 미생물 내 특정 단백질의 활성이 내재적 활성에 비하여 향상된 것을 의미하거나, 또는 비변이 미생물 내 단백질의 활성에 비하여 향상된 것을 의미한다. 상기 "내재적 활성"은 자연적, 또는 인위적 요인에 의한 유전적 변이로 미생물의 형질이 변화하는 경우, 형질 변화 전 모균주가 본래 가지고 있던 특정 단백질의 활성을 말한다.
- [0036] 구체적으로, 활성 강화는 상기 미생물에 단백질을 도입하는 방법, 단백질을 코딩하는 유전자의 세포 내 카피수 증가 방법, 상기 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 조절 서열에 변이를 도입하는 방법, 상기 단백질을 암호화하는 유전자 발현 조절 서열을 활성이 강력한 서열로 교체하는 방법 및 상기 단백질의 활성이 강화되도록 단백질을 암호화하는 유전자에 변이를 추가적으로 도입시키는 방법으로 이루어진 균으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 방법으로 이루어질 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0037] 상기에서 미생물에 단백질을 도입하는 방법 또는 단백질을 코딩하는 유전자의 세포 내 카피수 증가 방법은 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 벡터를 이용하여 미생물 내 염색체 또는 플라스미드에 삽입하여 수행될 수 있다. 구체적으로, 본 출원의 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 작동 가능하게 연결된, 숙주와 무관하게 복제되고 기능할 수 있는 벡터가 숙주세포 내에 도입되는 것일 수 있다. 또는, 상기 폴리뉴클레오티드가 작동 가능하게 연결된, 숙주세포 내의 염색체 내로 상기 폴리뉴클레오티드를 삽입시킬 수 있는 벡터가 숙주세포의 염색체 내에 도입되는 것일 수 있다. 상기 폴리뉴클레오티드의 염색체 내로의 삽입은 당업계에 알려진 임의의 방법, 예를 들면, 상동재조합에 의하여 이루어질 수 있다.
- [0038] 다음으로, 폴리뉴클레오티드의 발현이 증가하도록 발현 조절 서열을 변형하는 것은, 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 발현 조절 서열의 활성을 더욱 강화하도록 핵산 서열을 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합으로 서열상의 변이를 유도하여 수행하거나, 더욱 강한 활성을 갖는 핵산 서열로 교체함에 의하여 수행될 수 있다. 상기 발현 조절서열은, 특별히 이에 제한되지 않으나, 프로모터, 오퍼레이터 서열, 리보솜 결합부위를 코딩하는 서열, 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열 등을 포함할 수 있다.
- [0039] 상기 폴리뉴클레오티드 발현 단위의 상부에는 본래의 프로모터 대신 강력한 프로모터가 연결될 수 있으며 이에 한정되는 것은 아니다. 공지된 강력한 프로모터의 예에는 cj1 내지 cj7 프로모터(대한민국 등록특허 제10-0620092호), lac 프로모터, trp 프로모터, trc 프로모터, tac 프로모터, 람다 파아지 PR 프로모터, PL 프로모터, tet 프로모터, gapA 프로모터, SPL7 프로모터, SPL13(sm3) 프로모터(대한민국 등록특허 제10-1783170호), O2 프로모터(대한민국 등록특허 제10-1632642), tkt 프로모터 및 yccA 프로모터 등이 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0040] 아울러, 염색체상의 폴리뉴클레오티드 서열의 변형은, 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 폴리뉴클레오티드 서열의 활성을 더욱 강화하도록 핵산 서열을 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합으로 발현 조절서열상의 변이를 유도하여 수행하거나, 더욱 강한 활성을 갖도록 개량된 폴리뉴클레오티드 서열로 교체함에 의하여 수행될 수 있다.
- [0041] 이와 같은 단백질 활성의 도입 및 강화는, 상응하는 단백질의 활성 또는 농도가 야생형이나 비변형 미생물 균주에서의 단백질의 활성 또는 농도에 비하여 증가되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0042] 구체적으로, 상기 NADP 의존적 글리세르알데하이드-3-포스페이트 디하이드로지나제의 활성 도입 또는 강화는, 이를 코딩하는 유전자를 포함하는 발현용 재조합 벡터를 제조하고, 상기 벡터를 코리네박테리움 속 미생물 내에 도입하여 형질전환된 코리네박테리움 속 미생물을 생산함으로써 이루어질 수 있다. 즉, 상기 NADP 의존적 글리세르알데하이드-3-포스페이트 디하이드로지나제를 코딩하는 유전자를 포함하는 미생물은 상기 유전자를 포함하는 벡터로 형질전환되어 제조되는 재조합 미생물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0043] 본 출원에서 사용된 용어 "벡터"는 적합한 숙주 내에서 목적 단백질 또는 폴리펩티드를 발현시킬 수 있도록, 적합한 조절 서열 및 상기 목적 단백질 또는 폴리펩티드의 염기서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다. 상기 조절 서열은 전사를 개시할 수 있는 프로모터, 그러한 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한

mRNA 리보솜 결합부위를 코딩하는 서열, 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함할 수 있다. 벡터는 적당한 숙주세포 내로 형질전환된 후, 숙주 계놈과 무관하게 복제되거나 기능할 수 있으며, 계놈 그 자체에 통합될 수 있다.

[0044] 본 출원에서 사용되는 벡터는 숙주세포 내에서 복제 가능한 것이면 특별히 한정되지 않으며, 당업계에 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, λEMBL3, λEMBL4, λFIXII, λDASHII, λZAPII, λgt10, λgt11, MBL3, MBL4, IXII, ASHII, APII, t10, t11, Charon4A, 및 Charon21A 등을 사용할 수 있으며, 플라스미드 벡터로서 pBR계, pUC계, pBluescriptII계, pGEM계, pTZ계, pET계, pMal계, pQE계 및 pCL계 등을 사용할 수 있다. 구체적으로는 pDZ, pACYC177, pACYC184, pCL, pECCG117, pUC19, pBR322, pMW118, pCC1BAC 벡터 등을 사용할 수 있다.

[0045] 상기 NADP 의존적 글리세르알데하이드-3-포스페이트 디하이드로지나제 발현용 재조합 벡터는 통상적인 방법 즉, 적절한 벡터에 제한효소를 사용하여 NADP 의존적 글리세르알데하이드-3-포스페이트 디하이드로지나제의 유전자 염기서열을 라이게이션시킴으로써 제조된 것일 수 있다.

[0046] 상기 단백질 발현용 재조합 벡터를 통해 염색체 내에 목적 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 염색체 내로 삽입할 수 있다. 상기 폴리뉴클레오티드의 염색체 내로의 삽입은 당업계에 알려진 임의의 방법, 예를 들면, 상동재조합(homologous recombination)에 의하여 이루어질 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다. 상기 염색체 삽입 여부를 확인하기 위한 선별 마커(selection marker)를 추가로 포함할 수 있다. 선별 마커는 벡터로 형질전환된 세포를 선별, 즉 목적 핵산 분자의 삽입 여부를 확인하기 위한 것으로, 약물 내성, 영양 요구성, 세포 독성제에 대한 내성 또는 표면 폴리펩티드의 발현과 같은 선택가능 표현형을 부여하는 마커들이 사용될 수 있다. 선택제(selective agent)가 처리된 환경에서는 선별 마커를 발현하는 세포만 생존하거나 다른 표현 형질을 나타내므로, 형질전환된 세포를 선별할 수 있다.

[0047] 본 출원에서 용어 "형질전환"은 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 숙주세포 내에 도입하여 숙주세포 내에서 상기 폴리뉴클레오티드가 코딩하는 단백질이 발현할 수 있도록 하는 것을 의미한다. 형질전환된 폴리뉴클레오티드는 숙주세포 내에서 발현될 수 있지만 한다면, 숙주세포의 염색체 내에 삽입되어 위치하거나 염색체 외에 위치하거나 상관없이 이들 모두를 포함할 수 있다. 또한, 상기 폴리뉴클레오티드는 표적 단백질을 코딩하는 DNA 및 RNA를 포함한다. 상기 폴리뉴클레오티드는 숙주세포 내로 도입되어 발현될 수 있는 것이면, 어떠한 형태로 도입되는 것이든 상관없다. 예를 들면, 상기 폴리뉴클레오티드는 자체적으로 발현되는데 필요한 모든 요소를 포함하는 유전자 구조체인 발현 카세트(expression cassette)의 형태로 숙주세포에 도입될 수 있다. 상기 발현 카세트는 통상 상기 폴리뉴클레오티드에 작동 가능하게 연결되어 있는 프로모터(promoter), 전사 종결신호, 리보솜 결합부위 및 번역 종결신호를 포함할 수 있다. 상기 발현 카세트는 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 있으며, 이에 한정되지 않는다.

[0048] 또한, 상기에서 용어 "작동 가능하게 연결"된 것이란 본 출원의 목적 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 전사를 개시 및 매개하도록 하는 프로모터 서열과 상기 유전자 서열이 기능적으로 연결되어 있는 것을 의미한다.

[0049] 본 출원의 벡터를 형질전환 시키는 방법은 핵산을 세포 내로 도입하는 어떤 방법도 포함되며, 숙주세포에 따라 당 분야에서 공지된 바와 같이 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 예를 들어, 전기천공법(electroporation), 인산칼슘(CaPO₄) 침전, 염화칼슘(CaCl₂) 침전, 미세주입법(microinjection), 폴리에틸렌 글리콜(PEG)법, DEAE-덱스트란법, 양이온 리포솜법, 및 초산 리튬-DMSO법 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0051] 본 출원의 목적상, 상기 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는, NADP 의존적 글리세르알데하이드-3-포스페이트 디하이드로지나제를 발현하도록 유전적으로 변형된 코리네박테리움 속 미생물은 비변형 미생물에 비하여, L-아미노산 생산능이 증가된 미생물일 수 있다.

[0052] 본 출원에서 용어, "L-아미노산을 생산하는 미생물" 또는 "L-아미노산을 생산하는 코리네박테리움 속 미생물"은 자연적 또는 인위적으로 유전적 변형이 일어난 미생물 또는 코리네박테리움 속 미생물을 모두 포함하며, 외부 유전자가 삽입되거나 내재적 유전자의 활성이 강화되거나 불활성화되는 등의 원인으로 인해서 특정 기작이 약화되거나 강화된 미생물로서, 목적하는 L-아미노산 생산을 위하여 유전적 변이가 일어나거나 활성을 강화시킨 코리네박테리움 속 미생물일 수 있다.

- [0053] 구체적으로, 상기 L-아미노산을 생산하는 미생물은, 목적하는 L-아미노산의 생합성 경로 내 단백질 일부의 활성이 강화되거나, 목적하는 L-아미노산 분해 경로 내 단백질 일부의 활성이 약화되어 목적하는 L-아미노산의 생산능이 강화된 미생물일 수 있다. 예를 들면, 상기 미생물은, 아스파테이트 키나제(aspartate kinase, lysC), 호모세린 디히드로게나제(homoserine dehydrogenase, hom), L-쓰레오닌 디히드라타제(L-threonine dehydratase, ilvA), 2-이소프로필말레이트 신타제(2-isopropylmalate synthase, leuA), 아세토락테이트 신타제(Acetolactate synthase, ilvN), 또는/및 호모세린 O-아세틸트랜스퍼라제(Homoserine O-acetyltransferase, metX)의 활성이 강화된 미생물일 수 있다. 또한, 예를 들면, 상기 미생물은 피드백 저해(feedback inhibition) 저항성을 갖도록 변형되어 활성이 강화된 유전자 또는 단백질을 포함할 수 있다. 또한, 예를 들면, 상기 미생물은 목적하는 L-아미노산을 분해하는 다양한 유전자 또는 단백질의 활성이 약화되거나 불활성화된 것일 수 있다. 또한, 예를 들면, 상기 미생물은 랜덤 변이로 L-아미노산 생산능이 증가된 미생물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 즉, 상기 미생물은 목적하는 L-아미노산 생합성경로의 단백질 활성을 강화시키거나 분해경로의 단백질 활성을 불활성화/약화시켜, 목적하는 L-아미노산의 생산이 증가된 미생물일 수 있다.
- [0054] 전술한 바와 같은 단백질의 활성 강화는, 해당 단백질을 코딩하는 유전자의 세포 내 카피수 증가; 단백질을 암호화하는 염색체상 유전자 및/또는 이의 발현 조절 서열에 변이 도입; 단백질을 암호화하는 염색체상의 유전자 발현 조절 서열을 활성이 강력한 서열로 교체; 단백질 발현을 증가시키거나 피드백 저해 저항성을 갖도록, 단백질을 암호화하는 염색체상의 유전자 일부에 변이 도입; 또는 이를 조합한 방법으로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0055] 본 출원의 용어 "단백질 활성의 약화/불활성화"는 효소 또는 단백질의 발현이 천연의 야생형 균주, 모균주 또는 해당 단백질이 비변형된 균주에 비하여 전혀 발현이 되지 않거나 또는 발현이 되더라도 그 활성이 없거나 감소된 것을 의미한다. 이때, 상기 감소는 상기 단백질을 암호화하는 유전자의 변이, 발현조절서열의 변형, 유전자 일부 또는 전체의 결손 등으로 단백질의 활성이 본래 미생물이 가지고 있는 단백질의 활성에 비해 감소한 경우와, 이를 암호화하는 유전자의 발현 저해 또는 번역(translation) 저해 등으로 세포 내에서 전체적인 단백질의 활성 정도가 천연형 균주 또는 변형전의 균주에 비하여 낮은 경우, 이들의 조합 역시 포함하는 개념이다. 본 출원에 있어서, 상기 불활성화는 당해 분야에 잘 알려진 다양한 방법의 적용으로 달성될 수 있다. 상기 방법의 예로, 상기 단백질을 암호화하는 상기 유전자의 전체 또는 일부를 결실시키는 방법; 상기 단백질을 암호화하는 상기 유전자의 발현이 감소하도록 발현 조절 서열의 변형; 상기 단백질의 활성이 제거 또는 약화되도록 단백질을 암호화하는 상기 유전자 서열의 변형; 상기 단백질을 암호화하는 상기 유전자의 전사체에 상보적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오티드(예컨대, 안티센스 RNA)의 도입; 상기 단백질을 암호화하는 상기 유전자의 사인-달가르노(Shine-Dalgarno) 서열 앞단에 사인-달가르노 서열과 상보적인 서열을 부가하여 2차 구조물을 형성시켜 리보솜(ribosome)의 부착을 불가능하게 만드는 방법; 상기 단백질을 암호화하는 상기 유전자의 폴리뉴클레오티드 서열의 ORF(open reading frame)의 3' 말단에 반대 방향으로 전사되는 프로모터를 부가하는 방법(Reverse transcription engineering, RTE) 등이 있으며, 이들의 조합으로도 달성할 수 있으나, 이에 특별히 제한되는 것은 아니다.
- [0056] 다만 전술한 방법은 하나의 예시로, 단백질의 활성 강화 또는 불활성화 방법 및 유전자 조작 방법은 당업계에 공지되어 있는 바, 상기 L-아미노산 생산 미생물은 공지된 다양한 방법을 적용하여 제조될 수 있다.
- [0057] 본 출원의 목적상 상기 NADP 의존적 글리세르알데히드-3-포스페이트 디하이드로지나제를 포함하는 상기 L-아미노산을 생산하는 코리네박테리움 속 미생물은, 배지 중의 탄소원으로부터 목적하는 L-아미노산을 비변형 야생형 균주 또는 비변형 변이주와 비교하여 과량으로 생산할 수 있으며, 이에 대해서는 전술한 바와 같다. 본 출원에서 상기 "L-아미노산을 생산하는 코리네박테리움 속 미생물"은 "L-아미노산 생산능을 갖는 코리네박테리움 속 균주" 또는 "L-아미노산 생산 코리네박테리움 속 균주"와 혼용되어 사용될 수 있다.
- [0059] 상기 NADP 의존적 글리세르알데히드-3-포스페이트 디하이드로지나제 활성을 갖는 단백질이 발현되도록 변형된, L-아미노산을 생산하는 코리네박테리움 속 미생물은, L-아미노산을 생산할 수 있는 코리네박테리움 속 미생물이라면 특별히 제한되지 않는다. 구체적으로, 상기 코리네박테리움 속(*Corynebacterium sp.*) 미생물은 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*), 코리네박테리움 암모니아게네스(*Corynebacterium ammoniagenes*), 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 폴루티솔리(*Corynebacterium pollutisoli*), 코리네

박테리움 이미탄스(*Corynebacterium imitans*), 코리네박테리움 테스투디노리스(*Corynebacterium testudinoris*) 및 코리네박테리움 플라베스센스(*Corynebacterium flavescens*)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있고, 구체적으로 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0060] 상기 L-아미노산을 생산하는 코리네박테리움 속 미생물은 재조합 미생물일 수 있다. 상기 재조합 미생물은 전술한 바와 같다.
- [0062] 본 출원에서, 용어 "배양"은 상기 미생물을 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 유가식일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0063] 본 출원에서 용어, "배지"는 상기 미생물을 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. 구체적으로, 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 찾아 볼 수 있다.
- [0064] 본 출원에서 상기 탄소원으로는 글루코오스, 사카로오스, 락토오스, 프룩토오스, 수크로오스, 말토오스 등과 같은 탄수화물; 만니톨, 소르비톨 등과 같은 당 알코올, 피루브산, 락트산, 시트르산 등과 같은 유기산; 글루탐산, 메티오닌, 리신 등과 같은 아미노산 등이 포함될 수 있다. 또한, 전분 가수분해물, 당밀, 블랙스트랩 당밀, 쌀겨울, 카사버, 사탕수수 찌꺼기 및 옥수수 칩지액 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.
- [0065] 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 칩지액, 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.
- [0066] 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.
- [0067] 본 출원에서, 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.
- [0068] 배지의 온도는 20 °C 내지 45 °C, 구체적으로는 25 °C 내지 40 °C일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 배양 기간은 유용 물질의 원하는 생성량이 수득될 때까지 계속될 수 있으며, 구체적으로는 10 시간 내지 160 시간일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0069] 상기 배양에 의하여 생산된 L-아미노산은 배지 증으로 배출되거나 미처 배출되지 못하고 세포 내에 잔류할 수 있다.
- [0070] 본 출원의 상기 배양 단계에서 생산된 L-아미노산을 회수하는 방법은 배양방법에 따라 당해 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 배양액으로부터 목적하는 L-아미노산을 수집(collect)하는 것일 수 있다. 예를 들어, 원심 분리, 여과, 음이온 교환 크로마토그래피, 결정화 및 HPLC 등이 사용될 수 있으며, 당해 분야에 공지된 적합한

방법을 이용하여 배지 또는 미생물로부터 목적하는 L-아미노산을 회수 할 수 있다.

[0071] 또한, 상기 회수 단계는 정제 공정을 포함할 수 있으며, 당해 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 수행될 수 있다. 따라서, 상기의 회수되는 L-아미노산은 정제된 형태 또는 L-아미노산을 함유한 미생물 발효액일 수 있다 (Introduction to Biotechnology and Genetic Engineering, A. J. Nair., 2008).

[0073] 본 출원에 따른 L-아미노산 생산 방법으로 생산되는 L-아미노산은 그 종류에 제한이 없다. 즉, 코리네박테리움 속 미생물로부터 생산될 수 있는 L-아미노산은 제한 없이 모두 포함될 수 있고, L-아미노산의 중간체도 포함될 수 있다. 상기 L-아미노산은 예를 들면, L-아르기닌, L-히스티딘, L-라이신, L-아스파르트산, L-글루탐산, L-세린, L-쓰레오닌, L-아스파라긴, L-글루타민, L-티로신, L-알라닌, L-이소류신, L-루이신, L-발린, L-페닐알라닌, L-메티오닌, L-트립토판, L-글리신, L-프롤린 및 L-시스테인 등일 수 있으며, 구체적으로 L-라이신, L-쓰레오닌, L-이소류신, L-루이신, L-발린, L-아르기닌, L-글루탐산일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 상기 L-아미노산의 중간체는 예를 들면, O-아세틸 호모세린일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0075] 본 출원의 또 하나의 양태는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진, NADP 의존적 글리세르알데하이드-3-포스페이트 디하이드로지나제(NADP dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)를 포함하는, L-아미노산 생산능이 증가된 코리네박테리움 속 미생물을 제공하는 것이다.

[0076] 상기 NADP 의존적 글리세르알데하이드-3-포스페이트 디하이드로지나제, 이를 코딩하는 유전자, 이의 발현 및 코리네박테리움 속 미생물에 대해서는 전술한 바와 같다.

[0077] 본 출원에서, NADP 의존적 글리세르알데하이드-3-포스페이트 디하이드로지나제를 코딩하는 유전자를 포함하는 코리네박테리움 속 미생물은 NADP 의존적 글리세르알데하이드-3-포스페이트 디하이드로지나제가 발현되어 비변형 미생물에 비하여 L-아미노산 생산능이 증대 또는 향상된 것일 수 있다.

[0078] 본 출원의 코리네박테리움 속 미생물은 L-아미노산을 생산할 수 있는 미생물로서, 야생형 미생물뿐만 아니라, L-아미노산 생산능이 개선되도록 유전적으로 변형된 미생물을 포함할 수 있다. L-아미노산을 생산하는 미생물에 대해서는 전술한 바와 같다.

[0080] 본 출원의 미생물은, 상기 락토바실러스 속 유래의 NADP 의존적 글리세르알데하이드-3-포스페이트 디하이드로지나제를 포함하는 재조합 미생물로서, 상기 NADP 의존적 글리세르알데하이드-3-포스페이트 디하이드로지나제를 포함하지 않는 미생물에 비하여 배지 중의 탄소원으로부터 목적하는 L-아미노산을 과량으로 생산할 수 있다. 상기 재조합 미생물의 증대된 L-아미노산 생산능은 상기 NADP 의존적 글리세르알데하이드-3-포스페이트 디하이드로지나제의 활성화에 의해 증가된 환원력으로 얻어지는 것일 수 있다. 즉, 상기 NADP 의존적 글리세르알데하이드-3-포스페이트 디하이드로지나제를 L-아미노산을 생산하는 코리네박테리움 속 미생물에 도입함으로써 NAD를 조효소로 이용하는 대신에 NADP를 이용하도록 상기 NADP 의존적 글리세르알데하이드-3-포스페이트 디하이드로지나제를 활성화시키고, 이를 통해 NADPH의 양을 늘려 L-아미노산 생합성 과정에서 에너지원인 환원력으로 사용할 수 있다.

[0081] 본 출원에서 용어 "비변형 미생물"은 천연형 균주 자체이거나, 상기 NADP 의존적 글리세르알데하이드-3-포스페이트 디하이드로지나제를 포함하지 않는 미생물, 또는 상기 NADP 의존적 글리세르알데하이드-3-포스페이트 디하이드로지나제를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터로 형질전환되지 않은 미생물을 의미할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0082] 상기 L-아미노산에 대해서는 전술한 바와 같다.

[0084] 본 출원에 따른 NADP 의존적 글리세르알데하이드-3-포스페이트 디하이드로지나제를 코딩하는 유전자가 도입되어 L-아미노산 생산능이 증대된 코리네박테리움 속 미생물은 수탁번호 KCCM 12580P, 수탁번호 KCCM 12581P, 수탁번호 KCCM 12582P, 수탁번호 KCCM 12583P, 수탁번호 KCCM 12584P, 수탁번호 KCCM 12585P, 수탁번호 KCCM 12586P 또는 수탁번호 KCCM 12587P로 기탁된 코리네박테리움 속 미생물로 이루어지는 균으로부터 선택되는 어느 하나인 것일 수 있다.

발명의 효과

[0086] 본 출원에 따른 락토바실러스 델부루키 아종 불가리쿠스(*Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*) 유래의 gapN을 암호화하는 유전자를 도입함으로써 gapN 활성을 통해 환원력을 증가시켜 코리네박테리움 속 (*Corynebacterium sp.*) 미생물의 L-아미노산 생산능을 증대시킬 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0088] 이하 본 출원을 실시예에 의해 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 출원을 예시적으로 설명하기 위한 것으로, 본 출원의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니며, 본 출원이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 명백할 것이다.
- [0090] **실시예 1-1. 락토바실러스 델부루키 아종 불가리쿠스 ATCC 11842 유래의 NADP 의존적 글리세르알데히드-3-포스페이트 디하이드로지나제(gapN(L))를 코리네박테리움 속 미생물 염색체 내 트랜스포존에 도입하기 위한 벡터 제작**
- [0092] 코리네박테리움에 친화력이 높은 NADP 의존적 글리세르알데히드-3-포스페이트 디하이드로지나제로 락토바실러스 델부루키 아종 불가리쿠스(*Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*) 유래의 NADP 의존적 글리세르알데히드-3-포스페이트 디하이드로지나제를 선정하였다. 이후 상기 활성을 향상시키기 위해 다음의 실험을 진행하였다.
- [0093] 락토바실러스 델부루키 아종 불가리쿠스 ATCC 11842 유래의 gapN을 암호화 하는 Ldb1179 유전자의 아미노산 서열(서열번호 1)과 염기서열(서열번호 2)은 미국국립보건원 진뱅크(NIH GenBank)로부터 확보하였다.
- [0094] 또한, 코리네박테리움 속 미생물의 트랜스포존 유전자 부위를 이용하여 염색체 내 Ldb1179 유전자를 도입하기 위하여 형질전환용 벡터 4종을 각각 제작하였고, 프로모터는 cj7(대한민국 등록특허 제10-0620092호)를 이용하였다.
- [0096] 1-1-1) pDZ2457::P(cj7)-gapN(L) 벡터 제작
- [0097] Ldb1179 유전자는 락토바실러스 델부루키 아종 불가리쿠스 ATCC 11842 균주의 염색체를 주형으로 서열번호 3 및 4 프라이머를 이용하여 개시코돈 TTG를 ATG로 변경한 형태로 약 1.43 kb 의 유전자 단편을 증폭하였다(표 1). 이때, PCR 반응은 95℃에서 30초의 변성, 55℃에서 30초의 어닐링 및 72℃에서 1분 30초의 신장 과정을 30회 반복하였다. 이 PCR 결과물을 0.8% 아가로스 겔에서 전기 영동한 후 약 1.4 kb 밴드를 용리하여 정제하였다. 또한, cj7 프로모터 부위는 서열번호 5 및 6의 프라이머 쌍을 이용하여 동일한 조건에서 PCR을 수행하여 PCR 산물을 수득하였다. 이때, PCR 반응은 95℃에서 30초의 변성, 55℃에서 30초의 어닐링 및 72℃에서 30초의 신장 과정을 30회 반복하였다. 상기에서 수득한 PCR 산물을 퓨전 클로닝하였다. 퓨전 클로닝시 In-Fusion® HD 클로닝 키트(Clontech)를 사용하였다. 이로부터 얻은 플라스미드를 pDZ2457::P(cj7)-gapN(L)라 명명하였다.
- [0098] 상기 벡터는 라이신, 루이신 또는 아세틸 호모세린 생산 균주에 gapN을 도입하기 위해 사용하였다.
- [0100] 1-1-2) pDZ1108::P(cj7)-gapN(L) 벡터 제작
- [0101] Ldb1179 유전자는 락토바실러스 델부루키 아종 불가리쿠스 ATCC 11842 균주의 염색체를 주형으로 서열번호 3 및 7 프라이머를 이용하여 개시코돈 TTG를 ATG로 변경한 형태로 약 1.43 kb 의 유전자 단편을 증폭하였다(표 1). 이때, PCR 반응은 95℃에서 30초의 변성, 55℃에서 30초의 어닐링 및 72℃에서 1분 30초의 신장 과정을 30회 반복하였다. 이 PCR 결과물을 0.8% 아가로스 겔에서 전기 영동한 후 약 1.4 kb 밴드를 용리하여 정제하였다. 또한, cj7 프로모터 부위는 서열번호 8 및 6의 프라이머 쌍을 이용하여 동일한 조건에서 PCR을 수행하여 PCR 산물을 수득하였다. 이때, PCR 반응은 95℃에서 30초의 변성, 55℃에서 30초의 어닐링 및 72℃에서 30초의 신장 과정을 30회 반복하였다. 상기에서 수득한 PCR 산물을 퓨전 클로닝하였다. 퓨전 클로닝시 In-Fusion® HD 클로닝 키트(Clontech)를 사용하였다. 이로부터 얻은 플라스미드를 pDZ1108::P(cj7)-gapN(L)라 명명하였다.
- [0102] 상기 벡터는 이소류신 또는 쓰레오닌 생산 균주에 gapN을 도입하기 위해 사용하였다.
- [0104] 1-1-3) pDZTn5::P(cj7)-gapN(L) 벡터 제작
- [0105] Ldb1179 유전자는 락토바실러스 델부루키 아종 불가리쿠스 ATCC 11842 균주의 염색체를 주형으로 서열번호 3 및 10 프라이머를 이용하여 개시코돈 TTG를 ATG로 변경한 형태로 약 1.43 kb 의 유전자 단편을 증폭하였다(표 1). 이때, PCR 반응은 95℃에서 30초의 변성, 55℃에서 30초의 어닐링 및 72℃에서 1분 30초의 신장 과정을 30회 반복하였다. 이 PCR 결과물을 0.8% 아가로스 겔에서 전기 영동한 후 약 1.4 kb 밴드를 용리하여 정제하였다. 또한, cj7 프로모터 부위는 서열번호 9 및 6의 프라이머 쌍을 이용하여 동일한 조건에서 PCR을 수행하여 PCR 산물을 수득하였다. 이때, PCR 반응은 95℃에서 30초의 변성, 55℃에서 30초의 어닐링 및 72℃에서 30초의 신장 과정을 30회 반복하였다. 상기에서 수득한 PCR 산물을 퓨전 클로닝하였다. 퓨전 클로닝시 In-Fusion® HD 클로닝 키트(Clontech)를 사용하였다. 이로부터 얻은 플라스미드를 pDZTn5::P(cj7)-gapN(L)라 명명하였다.

[0106] 상기 벡터는 발린 또는 아르기닌 생산 균주에 gapN을 도입하기 위해 사용하였다.

[0108] 1-1-4) pDZ0286::P(cj7)- gapN(L) 벡터 제작

[0109] Ldb1179 유전자는 락토바실러스 델부루키 아종 불가리쿠스 ATCC 11842 균주의 염색체를 주형으로 서열번호 3 및 12 프라이머를 이용하여 개시코돈 TTG를 ATG로 변경한 형태로 약 1.43 kb 의 유전자 단편을 증폭하였다(표 1). 이때, PCR 반응은 95℃에서 30초의 변성, 55℃에서 30초의 어닐링 및 72℃에서 1분 30초의 신장 과정을 30회 반복하였다. 이 PCR 결과물을 0.8% 아가로스 겔에서 전기 영동한 후 약 1.4 kb 밴드를 용리하여 정제하였다. 또한, cj7 프로모터 부위는 서열번호 11 및 6의 프라이머 쌍을 이용하여 동일한 조건에서 PCR을 수행하여 PCR 산물을 수득하였다. 이때, PCR 반응은 95℃에서 30초의 변성, 55℃에서 30초의 어닐링 및 72℃에서 30초의 신장 과정을 30회 반복하였다. 상기에서 수득한 PCR 산물을 퓨전 클로닝하였다. 퓨전 클로닝시 In-Fusion® HD 클로닝 키트(Clontech)를 사용하였다. 이로부터 얻은 플라스미드를 pDZ0286::P(cj7)- gapN(L)라 명명하였다.

[0110] 상기 벡터는 글루탐산 생산 균주에 gapN을 도입하기 위해 사용하였다.

표 1

서열번호	서열(5'-3')
3	CCCAACGAAAGGAAACACTC ATGACAGAACACTATTTAAA
4	GCTTGTGAATAAGCCTGCCCTTAGTCTTCGATGTTGAAGACAACG
5	GATTCCAGGTTCCTTAACCCAGAAACATCCCAGCGCTACT
6	TTTAAATAGTGTCTGTCATGAGTGTTCCTTTCGTTGGG
7	TTCGTCGAGTCTAGAAGTTTAGTCTTCGATGTTGAAGA
8	ACGAGGTCAGCATCTCGAGTAGAAACATCCCAGCGCTACT
9	CGCGGAACTGTACTAGTAGAAACATCCCAGCGCTAC
10	GGAAGGATATCTCTAGAAGATAAAACGAAAGGCC
11	CCCTTCGGTTTAGTACTAGAAACATCCCAGCGCTA
12	CTCTTCTGTTTAGTACTTTAGTCTTCGATGTTGAAG

[0114] 실시에 1-2. 스트렙토코커스 변이주 (*Streptococcus mutans*) ATCC 25175 유래의 NADP 의존적 글리세르알데히드-3-포스페이트 디하이드로지나제(gapN(S))를 코리네박테리움 속 미생물 염색체 내 트랜스포존에 도입하기 위한 벡터 제작

[0116] 락토바실러스 델부루키 아종 불가리쿠스 ATCC 11842 유래의 gapN의 대조군으로써, 스트렙토코커스 변이주 (*Streptococcus mutans*) ATCC 25175 내 NADP 의존적 글리세르알데히드-3-포스페이트 디하이드로지나제 활성을 가진 SMUFR_0590(대한민국 등록특허 제10-1182033호)을 도입하기 위해 다음의 실험을 진행하였다.

[0117] 스트렙토코커스 변이주 ATCC 25175 유래의 gapN을 암호화하는 SMUFR_0590 유전자의 아미노산 서열(서열번호 13) 및 염기서열(서열번호 14)은 미국국립보건원 진뱅크(NIH GenBank)로부터 확보하였고, 트랜스포존 유전자 내 CJ7 프로모터에 의해 발현되는 SMUFR_0590을 도입하기 위한 벡터를 제작하였다.

[0118] 실시예 1-1에서와 마찬가지로 형질전환용 벡터 pDZ를 사용하였으며, 프로모터는 cj7를 이용하였다. 스트렙토코커스 변이주 ATCC 25175유래의 SMUFR_0590 유전자는 pECCG122-Pcj7-gapN(대한민국 등록특허 제10-1182033호)을 주형으로 서열번호 15 및 16 프라이머를 이용하여 약 1.7 kb 의 유전자 단편을 증폭하였다(표 2). 이때, PCR 반응은 95℃에서 30초의 변성, 55℃에서 30초의 어닐링 및 72℃에서 2분의 신장 과정을 30회 반복하였다. 이 PCR 결과물을 0.8% 아가로스 겔에서 전기 영동한 후 원하는 크기의 밴드를 용리하여 정제하였다. 상기에서 수득한 PCR 산물을 퓨전 클로닝하였다. 퓨전 클로닝시 In-Fusion® HD 클로닝 키트(Clontech)를 사용하였다. 이로부터 얻은 플라스미드를 pDZTn::P(cj7)-gapN(S)라 명명하였다.

표 2

서열번호	서열(5'-3')
15	TAGATGTCGGGCCCATATGAGAAACATCCCAGCGCTACT
16	GCCAAAACAGCCTCGAGTTATTGATATCAAATACGACGGATTTA

[0122] 실시에 2-1. L-라이신 생산 균주 KCCM11016P에서 gapN(L) 또는 gapN(S)이 도입된 균주의 제작 및 평가

[0124] 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032 균주 기반으로 *L.delbrueckii subsp. Bulgaricus* 또는 *S.mutans* 유래의 gapN이 도입에 의한 L-라이신 생산능에 미치는 효과를 확인하고자 실시예 1-1-1에서 제작한 플라스미드와 실시예 1-2에서 제작한 플라스미드를 전기천공법으로 코리네박테리움 글루타미쿰 KCCM11016P(대한민국 등록특허 제 10-0159812호)에 도입하여 형질전환체를 수득하고, 상기 형질전환체를 카나마이신(25 µg/ml)과 X-gal(5-브로모-4-클로로-3-인돌린-β-D-갈락토시드, 5-bromo-4-chloro-3-indoline-β-D-galactoside)이 함유된 BHIS 평판배지(Braine heart infusion 37 g/l, 소르비톨 91 g/l, 한천 2%)에 도달하여 배양함으로써 콜로니를 형성시켰다. 이로부터 형성된 콜로니 중에서 푸른색의 콜로니를 선택함으로써 P(CJ7)-gapN(L) 또는 P(CJ7)-gapN(S)가 도입된 균주를 선발하였다.

[0125] 상기 선발된 균주를 각각 KCCM11016P::P(cj7)-gapN(L), KCCM11016P::P(cj7)-gapN(S)라 명명하였다.

[0126] 제작된 균주를 다음과 같은 방법으로 배양하여 라이신 생산능을 비교하였다. 종 배지 25 ml을 함유하는 250 ml 코너-바플 플라스크에 각 균주들을 접종하고, 30℃에서 20 시간 동안, 200 rpm으로 진탕 배양하였다. 그런 다음, 생산 배지 24 ml을 함유하는 250 ml 코너-바플 플라스크에 1 ml의 종 배양액을 접종하고 30℃에서 72시간 동안, 200 rpm에서 진탕 배양하였다. 상기 종 배지와 생산 배지의 조성은 각각 하기와 같다.

[0128] <종 배지(pH 7.0)>

[0129] 포도당 20 g, 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)

[0131] <생산 배지(pH 7.0)>

[0132] 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 1 리터 기준).

[0134] 배양 종료 후 HPLC로 L-라이신의 생산능을 측정하였다. 실험한 각 균주에 대한 배양액 중의 L-라이신 농도 및 농도 증가율은 하기 표 3과 같다.

표 3

균주명	L-라이신 농도(g/L)	L-라이신 농도 증가율(%)
KCCM11016P	43 g/L	-
KCCM11016P::P(cj7)-gapN(S)	50 g/L	16%
KCCM11016P::P(cj7)-gapN(L)	52 g/L	20%

[0138] 상기 표 3에서 나타난 바와 같이 L-라이신 생산 균주 KCCM11016P에 비하여 gapN 유전자가 도입된 KCCM11016P::P(cj7)-gapN(S)에서는 L-라이신의 농도가 약 16% 증가, KCCM11016P::P(cj7)-gapN(L)에서는 L-라이신의 농도가 약 20% 증가함을 확인하였다.

[0139] KCCM11016P::P(cj7)-gapN(L)는 CA01-7528이라고 명명하고, 부다페스트조약 하의 수탁기관인 한국미생물보존센터에 2019년 9월 2일자로 기탁하여 수탁번호 KCCM12585P를 부여받았다.

[0141] **실시예 2-2. L-라이신 생산 균주 KCCM11347P에서 gapN(L) 또는 gapN(S)이 도입된 균주의 제작 및 평가**

[0143] 코리네박테리움 글루타미쿰에 속하는 다른 라이신 생산 균주에서 라이신 생산능을 확인하기 위해 실시예 1-1-1에서 제작한 플라스미드와 실시예 1-2에서 제작한 플라스미드를 이용하여, 상기 실시예 2-1와 동일한 방법으로 L-라이신 생산 균주인 코리네박테리움 글루타미쿰 KCCM11347P(대한민국 등록특허 제10-0073610호)에 도입한 균주를 제작하고, 각각 KCCM11347P::P(cj7)-gapN(L), KCCM11347P::P(cj7)-gapN(S)라 명명하였다.

[0144] 제작된 균주를 상기 실시예 2-1과 동일한 방법으로 배양하고 배양 종료 후 HPLC로 L-라이신의 생산능을 측정하였다. 실험한 각 균주에 대한 배양액 중의 L-라이신 농도 및 농도 증가율은 하기 표 4와 같다.

표 4

균주명	L-라이신 농도(g/L)	L-라이신 농도 증가율(%)
KCCM11347P	38 g/L	-

KCCM11347P::P(cj7)-gapN(S)	43 g/L	14%
KCCM11347P::P(cj7)-gapN(L)	45 g/L	19%

[0148] 상기 표 4에서 나타난 바와 같이 L-라이신 생산 균주 KCCM11347P에 비하여 gapN 유전자가 도입된 KCCM11347P::P(cj7)-gapN(S)에서는 L-라이신의 농도가 약 14% 증가, KCCM11347P::P(cj7)-gapN(L)에서는 L-라이신의 농도가 약 19% 증가함을 확인하였다.

[0150] **실시예 2-3. L-라이신 생산 균주 CJ3P에서 gapN(L) 또는 gapN(S)이 도입된 균주의 제작 및 평가**

[0152] 코리네박테리움 글루타미쿰에 속하는 또 다른 라이신 생산 균주에서 효과를 확인하기 위해 실시예 1-1-1에서 제작한 플라스미드와 실시예 1-2에서 제작한 플라스미드를 이용하여, 상기 실시예 2-1와 동일한 방법으로 L-라이신 생산 균주인 코리네박테리움 글루타미쿰 CJ3P(Binder et al. Genome Biology 2012, 13:R40)에 도입한 균주를 제작하고, 각각 CJ3P::P(cj7)-gapN(L), CJ3P::P(cj7)-gapN(S)라 명명하였다. CJ3P 균주는 기 공지된 기술을 바탕으로 야생주에 3종의 변이(pyc(Pro458Ser), hom(Va159Ala), lysC(Thr311Ile))를 도입하여 L-라이신 생산능을 갖게 된 코리네박테리움 글루타미쿰 균주이다.

[0153] 제작된 균주를 상기 실시예 2-1과 동일한 방법으로 배양하고 배양 종료 후 HPLC로 L-라이신의 생산능을 측정하였다. 실험한 각 균주에 대한 배양액 중의 L-라이신 농도 및 농도 증가율은 하기 표 5와 같다.

표 5

균주명	L-라이신 농도(g/L)	L-라이신 농도 증가율(%)
CJ3P	8.3 g/L	-
CJ3P::P(cj7)-gapN(S)	9.0 g/L	8%
CJ3P::P(cj7)-gapN(L)	9.4 g/L	13%

[0157] 상기 표 5에서 나타난 바와 같이 L-라이신 생산 균주 CJ3P에 비하여 gapN 유전자가 도입된 CJ3P::P(cj7)-gapN(S)에서는 L-라이신의 농도가 약 8% 증가, CJ3P::P(cj7)-gapN(L)에서는 L-라이신의 농도가 약 13% 증가함을 확인하였다.

[0159] **실시예 2-4. L-라이신 생산 균주 KCCM10770P에서 gapN(L) 또는 gapN(S)이 도입된 균주의 제작 및 평가**

[0161] 코리네박테리움 글루타미쿰에 속하는 또 다른 라이신 생산 균주에서 효과를 확인하기 위해 실시예 1-1-1에서 제작한 플라스미드와 실시예 1-2에서 제작한 플라스미드를 이용하여, 상기 실시예 2-1와 동일한 방법으로 라이신 생합성 경로가 강화된 L-라이신 생산 균주인 코리네박테리움 글루타미쿰 KCCM10770P(대한민국 등록특허 제10-0924065호)에 도입한 균주를 제작하고, 각각 KCCM10770P::P(cj7)-gapN(L), KCCM10770P::P(cj7)-gapN(S)라 명명하였다. 상기 KCCM10770P 균주는 라이신 생합성 경로 구성 유전자들 중 aspB(아스파테이트 아미노트랜스퍼라제를 코딩하는 유전자), lysC(아스파테이트 키나제를 코딩하는 유전자), asd(아스파테이트 세미알데히드 디히드로게나제를 코딩하는 유전자), dapA(디히드로디피콜리네이트 신타제를 코딩하는 유전자), dapB(디히드로디피콜리네이트 리덕타제를 코딩하는 유전자) 및 lysA(디아미노디피멜레이트 디카르복실라제를 코딩하는 유전자), 즉, 6종의 유전자를 염색체 상에 각각 2 카피씩 보유한 L-라이신 생산 균주이다.

[0162] 제작된 균주를 상기 실시예 2-1과 동일한 방법으로 배양하고 배양 종료 후 HPLC로 L-라이신의 생산능을 측정하였다. 실험한 각 균주에 대한 배양액 중의 L-라이신 농도 및 농도 증가율은 하기 표 6과 같다.

표 6

균주명	L-라이신 농도(g/L)	L-라이신 농도 증가율(%)
KCCM10770P	48 g/L	-
KCCM10770P::P(cj7)-gapN(S)	56 g/L	17%
KCCM10770P::P(cj7)-gapN(L)	60 g/L	25%

[0166] 상기 표 6에서 나타난 바와 같이 L-라이신 생산 균주 KCCM10770P에 비하여 gapN 유전자가 도입된 KCCM10770P::P(cj7)-gapN(S)에서는 L-라이신의 농도가 약 17% 증가, KCCM10770P::P(cj7)-gapN(L)에서는 L-라이신의 농도가 약 25% 증가함을 확인하였다.

[0168] 상기의 실시예 2-1~4의 결과들로부터 서로 다른 계열의 다양한 L-라이신 생산 코리네박테리움 글루타미쿰 균주에서 *L.delbrueckii subsp. Bulgaricus* 유래의 gapN 도입이 L-라이신 생산에 효과적임을 알 수 있었다. 또한 기 공지된 대한민국 등록특허 제10-1182033호의 *S.mutans* 유래 gapN을 도입한 균주보다 *L.delbrueckii subsp. Bulgaricus* 유래 gapN을 도입한 균주가 L-라이신 생산능이 월등함을 확인하였다.

[0170] **실시예 3-1. L-쓰레오닌 생산 균주에서 gapN(L) 또는 gapN(S)이 도입된 균주의 제작 및 평가**

[0172] 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032(이하 WT) 균주 기반으로 lysC(L377K) 변이체(대한민국 등록특허 제10-2011994호)와 hom(R398Q) 변이체(대한민국 등록특허 제10-1947959호)를 도입하여 L-쓰레오닌 생산 균주를 제작하였다. 이 균주에 실시예 1-1-2에서 제작한 플라스미드와 실시예 1-2에서 제작한 플라스미드를 도입하여, 상기 실시예 2-1와 동일한 방법으로 균주를 제작하고 쓰레오닌 생산능을 비교하였다.

[0173] lysC(L377K)를 도입하는 벡터를 제작하기 위하여 WT의 염색체를 주형으로 하여 서열번호 17 및 18 혹은 서열번호 19 및 20 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 95 °C에서 5분간 변성 후, 95°C 30초 변성, 55°C 30초 어닐링, 72°C 30초 중합을 30회 반복한 후, 72°C에서 7분간 중합반응을 수행하였다. 그 결과 lysC 유전자의 변이를 중심으로 5' 상단 부위의 509 bp DNA 단편과 3' 하단 부위의 520 bp의 DNA 단편을 각각 수득하였다.

[0174] 증폭된 두 가지의 DNA 절편을 주형으로 하여, 서열번호 17 및 20의 프라이머로 PCR을 수행하였다. 95°C에서 5분간 변성 후, 95°C 30초 변성, 55°C 30초 어닐링, 72°C 60초 중합을 30회 반복한 후, 72°C에서 7분간 중합반응을 수행하였다. 그 결과, 377번째 루신이 라이신으로 치환된 아스파토키나제 변이체를 암호화하는 lysC 유전자의 변이를 포함하는 1011 bp의 DNA 단편이 증폭되었다.

[0175] 코리네박테리움 글루타미쿰 내에서 복제가 불가능한 pDZ 벡터(대한민국 등록특허 제10-0924065호)와 1011 bp의 DNA 단편들을 제한효소 XbaI으로 처리한 뒤, DNA 접합 효소를 이용하여 연결한 후, 클로닝함으로써 플라스미드를 획득하였고 이를 pDZ-lysC(L377K)라 명명하였다.

[0176] 위에서 획득한 pDZ-lysC(L377K) 벡터를 WT 균주에 균주에 전기천공법으로 도입한 후 카나마이신 25mg/L를 함유한 선별배지에서 형질전환 균주를 획득하였다. 2차 재조합과정(cross-over)으로 염색체상에 삽입된 DNA 단편에 의하여 lysC 유전자에 뉴클레오티드 변이가 도입된 균주 WT::lysC(L377K)를 획득하였다.

표 7

[0178]

서열번호	서열(5'-3')
17	TCCTCTAGAGCTGCCGAGTGTGAATACG
18	TGGAAATCTTTTCGATGTTACAGTTGACAT
19	ACATCGAAAAGATTTCCACCTCTGAGATTC
20	GACTCTAGAGTTCACCTCAGAGACGATTA

[0180] 또한 hom(R398Q)를 도입하는 벡터를 제작하기 위하여 WT 게놈 DNA를 주형으로 서열번호 21 및 22의 프라이머, 서열번호 23 및 24의 프라이머를 이용하여 PCR을 진행하였다. PCR 조건은 95°C에서 5분간 변성 후, 95°C 30초 변성, 55°C 30초 어닐링, 72°C 30초 중합을 30회 반복한 후, 72°C에서 7분간 중합반응을 수행하였다. 그 결과 hom 유전자의 변이를 중심으로 5' 상단 부위의 290 bp DNA 단편과 3' 하단 부위의 170bp의 DNA 단편을 수득하였다. 이 두 개의 PCR 생산물을 주형으로 서열번호 21와 24의 프라이머를 이용하여 PCR을 진행하였다. 95°C에서 5분간 변성 후, 95°C 30초 변성, 55°C 30초 어닐링, 72°C 30초 중합을 30회 반복한 후, 72°C에서 7분간 중합반응을 수행하였다. 그 결과, hom 유전자의 변이를 포함하는 440 bp의 DNA 단편이 증폭되었다.

표 8

[0182]

서열번호	서열(5'-3')
21	TCCTCTAGACTGGTCGCCTGATGTTCTAC
22	CTCTTCCTGTTGGATTGTAC
23	GTACAATCCAACAGGAAGAG
24	GACTCTAGATTAGTCCCTTTCGAGGCGGA

[0184] 앞서 사용된 pDZ 벡터와 440 bp의 DNA 단편을 제한효소 XbaI으로 처리한 뒤, DNA 접합 효소를 이용하여 연결한 후, 클로닝함으로써 플라스미드를 획득하였고 이를 pDZ-hom(R398Q)라 명명하였다.

[0185] 획득한 pDZ-hom(R398Q) 벡터를 WT::lysC(L377K) 균주에 전기천공법으로 도입한 후 카나마이신 25mg/L를 함유한 선별배지에서 형질전환 균주를 획득하였다. 2차 재조합과정(cross-over)으로 염색체상에 삽입된 DNA 단편에 의하여 hom 유전자에 뉴클레오티드 변이가 도입된 균주, WT::lysC(L377K)-hom(R398Q)를 획득하였다.

[0187] 상기 WT::lysC(L377K)-hom(R398Q) 균주에 실시예 1-1-2에서 제작한 플라스미드와 실시예 1-2에서 제작한 플라스미드를 도입하여, 상기 실시예 2-1과 동일한 방법으로 균주를 제작하고 각각 WT::lysC(L377K)-hom(R398Q)::P(cj7)-gapN(L), WT::lysC(L377K)-hom(R398Q)::P(cj7)-gapN(S)라 명명하였다.

[0188] 제작된 균주를 상기 실시예 2-1과 동일한 방법으로 배양하고 배양 종료 후 L-쓰레오닌 생산능을 비교하였다. 실험한 각 균주에 대한 배양액 중의 L-쓰레오닌 농도 및 농도 증가율은 하기 표 9과 같다.

표 9

균주명	L-쓰레오닌 농도(g/L)	L-쓰레오닌 농도 증가율(%)
WT::lysC(L377K)-hom(R398Q)	1.21 g/L	-
WT::lysC(L377K)-hom(R398Q)::P(cj7)-gapN(S)	1.39 g/L	15%
WT::lysC(L377K)-hom(R398Q)::P(cj7)-gapN(L)	1.48 g/L	22%

[0192] 상기 표 9에서 나타난 바와 같이 WT::lysC(L377K)-hom(R398Q)에 비하여 gapN 유전자가 도입된 WT::lysC(L377K)-hom(R398Q)::P(cj7)-gapN(S)에서는 L-쓰레오닌의 농도가 약 15% 증가, WT::lysC(L377K)-hom(R398Q)::P(cj7)-gapN(L)에서는 L-쓰레오닌의 농도가 약 22% 증가함을 확인하였다.

[0193] WT::lysC(L377K)-hom(R398Q)::P(cj7)-gapN(L)는 CA09-0906이라고 명명하고, 부다페스트조약 하의 수탁기관인 한국미생물보존센터에 2019년 9월 2일자로 기탁하여 수탁번호 KCCM12586P를 부여받았다.

[0195] **실시예 3-2. L-쓰레오닌 생산 균주 KCCM11222P에서 gapN(L) 또는 gapN(S)이 도입된 균주의 제작 및 평가**

[0197] L-쓰레오닌 생산 균주인 코리네박테리움 글루타미쿰 KCCM11222P(W02013/081296)에 실시예 1-1-2에서 제작한 플라스미드와 실시예 1-2에서 제작한 플라스미드를 도입하여, 상기 실시예 2-1과 동일한 방법으로 균주를 제작하고, 각각 KCCM11222P::P(cj7)-gapN(L), KCCM11222P::P(cj7)-gapN(S)라 명명하였다.

[0198] 제작된 균주를 상기 실시예 2-1과 동일한 방법으로 배양하고 배양 종료 후 L-쓰레오닌 생산능을 비교하였다. 실험한 각 균주에 대한 배양액 중의 L-쓰레오닌 농도 및 농도 증가율은 하기 표 10과 같다.

표 10

균주명	L-쓰레오닌 농도(g/L)	L-쓰레오닌 농도 증가율(%)
KCCM11222P	3.6 g/L	-
KCCM11222P::P(cj7)-gapN(S)	4.1 g/L	14%
KCCM11222P::P(cj7)-gapN(L)	4.3 g/L	20%

[0202] 상기 표 10에서 나타난 바와 같이 L-쓰레오닌 생산 균주 KCCM11222P에 비하여 gapN 유전자가 도입된 KCCM11222P::P(cj7)-gapN(S)에서는 L-쓰레오닌의 농도가 약 14% 증가, KCCM11222P::P(cj7)-gapN(L)에서는 L-쓰레오닌의 농도가 약 20% 증가함을 확인하였다.

[0203] 상기 실시예의 결과는 코리네박테리움 속 L-쓰레오닌 생산 균주에서 *L.delbrueckii subsp. Bulgaricus* 유래의 gapN의 도입이 L-쓰레오닌 생산에 효과적임을 나타내었다.

[0205] **실시예 4-1. L-이소류신 생산 균주에서 gapN(L) 또는 gapN(S)이 도입된 균주의 제작 및 평가**

[0207] 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032(이하 WT) 균주 기반으로 *L.delbrueckii subsp. Bulgaricus* 또는 *S.mutans* 유래의 gapN 도입에 의한 L-이소류신 생산능에 미치는 효과를 확인하고자 기 공지된 쓰레오닌 디하이드라타제(L-threonine dehydratase)를 코딩하는 유전자인 *ilvA* 변이[*ilvA*(V323A); S. Morbach et al., Appl. Environ. Microbiol., 62(12): 4345-4351, 1996]를 도입하여 L-이소류신 생산능이 강화된 균주를 제작하였다.

[0208] *ilvA* 유전자를 대상으로 변이 도입 벡터를 제작하기 위하여 변이 위치를 중심으로 5' 상단 부위를 증폭하기 위

한 프라이머 한쌍(서열번호 25 및 26)과 3' 하단 부위를 증폭하기 위한 프라이머 한쌍(서열번호 27 및 28)을 고안하였다. 서열번호 25 및 28의 프라이머는 각 말단에 BamHI 제한 효소 부위(밑줄로 표시)를 삽입하였고, 서열번호 26 및 27의 프라이머는 서로 교차되도록 고안한 부위에 뉴클레오티드 치환 변이(밑줄로 표시)가 위치하도록 하였다.

표 11

서열번호	서열(5'-3')
25	ACGGATCCCAGACTCCAAGCAAAAGCG
26	ACACCACGGCAGAACCCAGGTGCAAAGGACA
27	CTGGTTCTGCCGTGGTGCATCATCTCTG
28	ACGGATCCAACCAAACTTGCTCACACTC

[0210] WT의 염색체를 주형으로 하여 서열번호 25 및 서열번호 26, 서열번호 27 및 서열번호 28의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 95℃에서 5분간 변성 후, 95℃ 30초 변성, 55℃ 30초 어닐링, 72℃ 30초 중합을 30회 반복한 후, 72℃에서 7분간 중합반응을 수행하였다. 그 결과 ilvA 유전자의 변이를 중심으로 5' 상단 부위의 627 bp DNA 단편과 3' 하단 부위의 608 bp의 DNA 단편을 수득하였다.

[0213] 증폭된 두 가지의 DNA 절편을 주형으로 하여, 서열번호 25 및 서열번호 28의 프라이머로 PCR을 수행하였다. 95℃에서 5분간 변성 후, 95℃ 30초 변성, 55℃ 30초 어닐링, 72℃ 60초 중합을 30회 반복한 후, 72℃에서 7분간 중합반응을 수행하였다. 그 결과, 323번째 발린이 알라닌으로 치환된 IlvA 변이체를 암호화하는 ilvA 유전자의 변이를 포함하는 1217 bp의 DNA 단편이 증폭되었다.

[0214] pECCG117 벡터(대한민국 등록특허 제10-0057684호)와 1011 bp의 DNA 단편을 제한 효소 BamHI으로 처리하고, DNA 접합 효소를 이용하여 연결한 후, 클로닝함으로써 플라스미드를 획득하였고 이를 pECCG117-ilvA(V323A)라 명명하였다.

[0215] 상기 pECCG117-ilvA(V323A) 벡터를 상기 실시예 3-1의 WT::lysC(L377K)-hom(R398Q)::P(cj7)-gapN(L), WT::lysC(L377K)-hom(R398Q)::P(cj7)-gapN(S) 균주에 도입하여, ilvA(V323A) 변이가 도입된 균주를 제작하였다. 또한 이의 대조균으로 WT::lysC(L377K)-hom(R398Q)에 ilvA(V323A) 변이만 도입한 균주도 제작하였다.

[0216] 제작된 균주를 상기 실시예 2-1과 동일한 방법으로 배양하고 배양 종료 후 L-이소류신 생산능을 비교하였다. 실험한 각 균주에 대한 배양액 중의 L-이소류신 농도 및 농도 증가율은 하기 표 12와 같다.

표 12

균주명	L-이소류신 농도(g/L)	L-이소류신 농도 증가율(%)
WT::lysC(L377K)-hom(R398Q)/pECCG117-ilvA(V323A)	4.3 g/L	-
WT::lysC(L377K)-hom(R398Q)::P(cj7)-gapN(S)/pECCG117-ilvA(V323A)	5.1 g/L	18%
WT::lysC(L377K)-hom(R398Q)::P(cj7)-gapN(L)/pECCG117-ilvA(V323A)	5.6 g/L	30%

[0220] 상기 표 12에서 나타난 바와 같이 WT::lysC(L377K)-hom(R398Q)/pECCG117-ilvA(V323A)에 비하여 gapN 유전자가 도입된 WT::lysC(L377K)-hom(R398Q)::P(cj7)-gapN(S)/pECCG117-ilvA(V323A)에서는 L-이소류신의 농도가 약 18.6% 증가, WT::lysC(L377K)-hom(R398Q)::P(cj7)-gapN(L)/pECCG117-ilvA(V323A)에서는 L-이소류신의 농도가 약 30% 증가함을 확인하였다.

[0221] WT::lysC(L377K)-hom(R398Q)::P(cj7)-gapN(L)/pECCG117-ilvA(V323A)는 CA10-3108이라고 명명하고, 부다페스트 조약 하의 수탁기관인 한국미생물보존센터에 2019년 9월 2일자로 기탁하여 수탁번호 KCCM12582P를 부여받았다.

[0223] **실시예 4-2. L-이소류신 생산 균주 KCCM11248P에서 gapN(L) 또는 gapN(S)이 도입된 균주의 제작 및 평가**

[0225] L-이소류신 생산 균주인 코리네박테리움 글루타미쿰 KCCM11248P(대한민국 등록특허 제10-1335789호)에 실시예 1-1-2에서 제작한 플라스미드와 실시예 1-2에서 제작한 플라스미드를 도입하여, 상기 실시예 2-1과 동일한 방법으로 균주를 제작하고, 각각 KCCM11248P::P(cj7)-gapN(L), KCCM11248P::P(cj7)-gapN(S)라 명명하였다.

[0226] 제작된 균주를 실시예 2-1와 같은 방법으로 배양하여 L-이소류신 생산능을 비교하였다. 배양 종료 후 HPLC로 L-이소류신의 생산능을 측정하였으며, 실험한 각 균주에 대한 배양액 중의 L-이소류신 농도 및 농도 증가율은 하기 표 13과 같다.

표 13

균주명	L-이소류신 농도(g/L)	L-이소류신 농도 증가율(%)
KCCM11248P	1.3 g/L	-
KCCM11248P::P(cj7)-gapN(S)	1.8 g/L	38%
KCCM11248P::P(cj7)-gapN(L)	2.1 g/L	61.5%

[0230] 상기 표 13에서 나타난 바와 같이 L-이소류신 생산 균주 KCCM11248P에 비하여 gapN 유전자가 도입된 KCCM11248P::P(cj7)-gapN(S)에서는 L-이소류신의 농도가 약 38% 증가, KCCM11248P::P(cj7)-gapN(L)에서는 L-이소류신의 농도가 약 61.5% 증가함을 확인하였다.

[0232] 상기의 결과는 코리네박테리움 속 L-이소류신 생산 균주에서 *L.delbrueckii subsp. Bulgaricus* 유래 gapN의 도입이 L-이소류신 생산에 효과적임을 나타내었다.

[0234] **실시예 5-1. L-루이신 생산 균주에서 gapN(L) 또는 gapN(S)이 도입된 균주의 제작 및 평가**

[0236] 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032 균주 기반으로 *L.delbrueckii subsp. Bulgaricus* 또는 *S.mutans* 유래의 gapN 도입에 의한 L-루이신 생산능에 미치는 효과를 확인하고자 기 공지된 2-이소프로필말레이트 신타제(2-isopropylmalate synthase)를 코딩하는 유전자인 leuA의 변이[leuA (R558H, G561D)]; 대한민국 공개번호 제 2018-0077008호]를 도입하여 L-루이신 생산능이 향상된 균주를 제작하였다.

[0237] 구체적으로, 상기 특허에서 제작된 재조합 플라스미드 pDZ-leuA(R558H, G561D)를 WT균주에 전기펄스법으로 도입한 후 카나마이신(kanamycin) 25mg/1를 함유한 배지에서 선별하였다. 2차 재조합과정(cross-over)으로 염색체상에 삽입된 DNA단편에 의하여 leuA 유전자에 뉴클레오타이드 변이가 도입된 균주, WT::leuA(R558H, G561D)를 획득하였고, 이를 CJL8001라 명명하였다.

[0238] L-루이신 생산능을 획득한 코리네박테리움 글루타미쿰 CJL8001를 대상으로 실시예 1-1-1에서 제작한 플라스미드와 실시예 1-2에서 제작한 플라스미드를 도입하여, 상기 실시예 2-1와 동일한 방법으로 균주를 제작하고, 각각 CJL8001::P(cj7)-gapN(S), CJL8001::P(cj7)-gapN(L)로 명명하였다.

[0239] 제작된 균주의 L-루이신 생산능을 비교하고자 제작된 균주를 하기와 같은 방법으로 배양하여 루이신 생산능을 비교하였다. 각 균주들을 영양배지에서 계대 배양한 후, 생산 배지 25 ml을 함유하는 250 ml 코너-바플 플라스크에 각 균주들을 접종하고, 30℃에서 72시간 동안, 200rpm에서 진탕 배양하였다. 이후, HPLC를 이용하여 L-루이신의 농도를 분석하였고, 분석한 L-루이신의 농도 및 농도 증가율을 하기 표 14에 나타내었다.

[0241] <영양 배지(pH 7.2)>

[0242] 포도당 10g, 옥즙 5g, 폴리펩톤 10g, 염화나트륨 2.5g, 효모엑스 5g, 한천 20g, 유레아 2g (증류수 1 리터 기준)

[0244] <생산 배지(pH 7.0)>

[0245] 포도당 50 g, 황산암모늄 20 g, 옥수수침지고형분(Corn Steep Solids) 20 g, 제2인산칼륨 1 g, 황산마그네슘7수염 0.5 g, 바이오틴 100 µg, 티아민-HCl 1 mg, 탄산칼슘 15 g (증류수 1 리터 기준)

표 14

균주명	L-루이신 농도(g/L)	L-루이신 농도 증가율(%)
CJL8001	3.4	-
CJL8001::P(cj7)-gapN(S)	3.9	15%
CJL8001::P(cj7)-gapN(L)	4.1	21%

[0249] 상기 표 14에서 나타난 바와 같이 L-루이신 생산 균주 CJL8001에 비하여 gapN 유전자가 도입된 CJL8001::P(cj7)-gapN(S)에서는 L-루이신의 농도가 약 15% 증가, CJL8001::P(cj7)-gapN(L)에서는 L-루이신의

농도가 약 21% 증가함을 확인하였다.

[0250] CJL8001::P(cj7)-gapN(L)는 CA13-8102이라고 명명하고, 부다페스트조약 하의 수탁기관인 한국미생물보존센터에 2019년 9월 2일자로 기탁하여 수탁번호 KCCM12583P를 부여받았다.

[0252] **실시예 5-2: L-루이신 생산 균주 KCCM11661P, KCCM11662P에서 gapN(L) 또는 gapN(S)이 도입된 균주의 제작 및 평가**

[0254] L-루이신 생산 균주인 코리네박테리움 글루타미쿰 KCCM11661P(대한민국 등록특허 제10-1851898호), KCCM11662P(대한민국 등록특허 제10-1796830호)를 대상으로 실시예 1-1-1에서 제작한 플라스미드와 실시예 1-2에서 제작한 플라스미드를 도입하여, 상기 실시예 2-1와 동일한 방법으로 균주를 제작하고, 각각 KCCM11661P::P(cj7)-gapN(L), KCCM11661P::P(cj7)-gapN(S), KCCM11662P::P(cj7)-gapN(L), KCCM11662P::P(cj7)-gapN(S)라 명명하였다.

[0255] 제작된 균주를 상기 실시예 5-1과 동일한 방법으로 배양하고 배양 종료 후 L-루이신 생산능을 비교하였다. 각 균주에서 생산한 L-루이신의 농도 및 농도 증가율을 하기 표 15에 나타내었다.

표 15

균주명	L-루이신 농도(g/L)	L-루이신 농도 증가율(%)
KCCM11661P	2.7 g/L	-
KCCM11661P::P(cj7)-gapN(S)	2.8 g/L	4%
KCCM11661P::P(cj7)-gapN(L)	3.0 g/L	11%
KCCM11662P	3.0 g/L	-
KCCM11662P::P(cj7)-gapN(S)	3.1 g/L	3%
KCCM11662P::P(cj7)-gapN(L)	3.3 g/L	11%

[0259] 상기 표 15에서 나타난 바와 같이 L-루이신 생산 균주 KCCM11661P 및 KCCM11662P 비하여 gapN 유전자가 도입된 KCCM11661P::P(cj7)-gapN(S), KCCM11662P::P(cj7)-gapN(S)에서는 L-루이신의 농도가 약 4% 증가, KCCM11661P::P(cj7)-gapN(L), KCCM11661P::P(cj7)-gapN(L)에서는 L-루이신의 농도가 약 11% 증가함을 확인하였다.

[0261] 상기의 결과는 코리네박테리움 속 L-루이신 생산 균주에서 *L.delbrueckii subsp. Bulgaricus* 유래의 gapN 도입이 L-루이신 생산에 효과적임을 나타내었다.

[0263] **실시예 6-1. L-발린 생산 균주에서 gapN(L) 또는 gapN(S)이 도입된 균주의 제작 및 평가**

[0265] *L.delbrueckii subsp. Bulgaricus* 또는 *S.mutans* 유래의 gapN의 도입이 L-발린 생산능에 미치는 효과를 확인하고자 야생주 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13869에 1종의 변이[ilvN(A42V); Biotechnology and Bioprocess Engineering, June 2014, Volume 19, Issue 3, pp 456-467]를 도입하여 L-발린 생산능을 갖게 된 변이주를 제작하고, 상기 재조합 균주를 코리네박테리움 글루타미쿰 CJ8V라 명명하였다.

[0266] 구체적으로, 코리네박테리움 글루타미쿰 야생형인 ATCC13869 균주의 게놈 DNA를 주형으로 PCR을 실시하였다. ilvN 유전자에 A42V 변이를 도입하는 벡터를 제작하기 위해서, 서열번호 29 및 서열번호 30의 프라이머 쌍, 서열번호 31 및 서열번호 32의 프라이머 쌍을 이용하여 유전자 단편(A, B)을 각각 얻었다. PCR의 조건은 94℃에서 5분간 변성한 후, 94℃에서 30초 변성, 55℃에서 30초 어닐링, 및 72℃에서 60초 중합을 25회 반복하고, 72℃에서 7분간 중합반응을 수행하였다.

[0267] 그 결과, 단편 A, B 모두 537bp의 폴리뉴클레오티드를 획득할 수 있었다. 상기 두 단편을 주형으로 서열번호 29와 서열번호 32의 프라이머를 이용하여 Overlapping PCR을 실시하여 1044bp의 DNA 단편을 얻었다.

[0268] 상기 얻어진 1044bp의 DNA 단편과 앞서 사용된 pDZ 벡터를 제한효소 XbaI으로 처리한 뒤, 접합 효소를 이용하여 연결한 후, 클로닝함으로써 플라스미드를 획득하였고, 이를 pDZ-ilvN(A42V)라 명명하였다.

표 16

서열번호	서열(5'-3')
29	AATTCTAGAGGCAGACCCCTATTCTATGAAGG
30	AGTGTTCGGTCTTTACAGACACGAGGGAC

31	GTCCCTCGTGTCTGTAAGACCGAAACACT
32	AATTCTAGACGTGGGAGTGCTACTCGCTTGG

[0272] 이후, 상기에서 제작된 재조합 플라스미드 pDZ-i1vN(A42V)를 염색체 상에서의 상동 재조합에 의해 야생형인 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13869에 전기펄스법으로 도입한 후 카나마이신(kanamycin) 25mg/L를 함유한 선별 배지에서 형질전환 균주를 획득하였다. 2차 재조합이 완료된 상기 코리네박테리움 글루타미쿰 형질 전환주를 대상으로 서열번호 29 및 서열번호 32의 프라이머를 이용한 PCR을 통하여 유전자 단편을 증폭한 뒤, 유전자 서열 분석을 통하여 변이 도입 균주를 확인하였다. 상기 재조합 균주를 코리네박테리움 글루타미쿰 CJ8V라 명명하였다.

[0273] 마지막으로, L-발린 생산능을 갖게 된 코리네박테리움 글루타미쿰 CJ8V를 대상으로 실시예 1-1-3에서 제작한 플라스미드와 실시예 1-2에서 제작한 플라스미드를 도입하여, 상기 실시예 2-1와 동일한 방법으로 균주를 제작하고 각각 CJ8V::P(cj7)-gapN(L), CJ8V::Pcj7-gapN(S)라 명명하였다. 제작된 균주를 하기와 같은 방법으로 배양하여 L-발린 생산능을 비교하였다.

[0274] 각각 균주를 영양배지에서 계대 배양한 후, 생산 배지 25 ml을 함유하는 250 ml 코너-바플 플라스크에 각 균주들을 접종하고, 30℃에서 72시간 동안, 200rpm에서 진탕 배양하였다. 이후, HPLC를 이용하여 L-발린의 농도를 분석하였고, 분석한 L-발린의 농도 및 농도 증가율을 하기 표 17에 나타내었다.

[0276] <영양 배지(pH 7.2)>

[0277] 포도당 10g, 육즙 5g, 폴리펩톤 10g, 염화나트륨 2.5g, 효모엑기스 5g, 한천 20g, 유레아 2g (증류수 1 리터 기준)

[0279] <생산 배지(pH 7.0)>

[0280] 포도당 100 g, 황산암모늄 40 g, 대두단백질 2.5 g, 옥수수침지고형분(Corn Steep Solids) 5 g, 요소 3 g, 제2인산칼륨 1 g, 황산마그네슘7수염 0.5 g, 바이오틴 100 µg, 티아민-HCl 1 mg, 판토텐산칼슘 2 mg, 니코틴아마이드 3 mg, 탄산칼슘 30 g (증류수 1 리터 기준)

표 17

균주명	L-발린 농도(g/L)	L-발린 농도 증가율(%)
CJ8V	3.4 g/L	-
CJ8V-Pcj7/gapN(S)	3.8 g/L	12%
CJ8V-Pcj7/gapN(L)	4.0 g/L	18%

[0284] 상기 표 17의 결과와 같이, CJ8V-Pcj7/gapN(L), CJ8V-Pcj7/gapN(S) 균주의 L-발린 생산능은 대조균 대비 각각 18%, 12% 증가함을 확인하였다.

[0286] 결과적으로, 코리네박테리움 속 L-발린 생산 균주에서 *L.delbrueckii subsp. Bulgaricus* 또는 *S.mutans* 유래의 gapN 유전자 도입이 L-발린의 생산능을 향상시킬 수 있음을 확인하였다.

[0287] CJ8V-Pcj7/gapN(L)는 CA08-2038이라고 명명하고, 부다페스트조약 하의 수탁기관인 한국미생물보존센터에 2019년 9월 2일자로 기탁하여 수탁번호 KCCM12581P를 부여받았다.

[0289] **실시예 6-2. L-발린 생산 균주 KCCM11201P에서 gapN(L) 또는 gapN(S)이 도입된 균주의 제작 및 평가**

[0291] L-발린 생산 균주인 코리네박테리움 글루타미쿰 KCCM11201P(대한민국 등록특허 제10-1117022호)에 실시예 1-1-3에서 제작한 플라스미드와 실시예 1-2에서 제작한 플라스미드를 도입하여, 상기 실시예 2-1와 동일한 방법으로 균주를 제작하고 각각 KCCM11201P::P(cj7)-gapN(L), KCCM11201P::P(cj7)-gapN(S)라 명명하였다.

[0292] 제작된 균주의 L-발린 생산능을 비교하고자 상기 실시예 6-1과 동일한 방법으로 배양하여 L-발린의 농도를 분석하였고, 분석한 L-발린의 농도 및 농도 증가율을 하기 표 18에 나타내었다.

표 18

균주명	L-발린 농도(g/L)	L-발린 농도 증가율(%)
KCCM11201P	2.8	-

KCCM11201P::P(cj7)-gapN(S)	3.3	17%
KCCM11201P::P(cj7)-gapN(L)	3.7	32%

[0296] 상기 결과와 같이, KCCM11201P::P(cj7)-gapN(L), KCCM11201P::P(cj7)-gapN(S) 균주의 L-발린 생산능은 대조균 대비 각각 32.1%, 17.9% 증가함을 확인하였다.

[0298] 결과적으로, 코리네박테리움 속 L-발린 생산 균주에서 *L.delbrueckii subsp. Bulgaricus* 또는 *S.mutans* 유래의 gapN 유전자 도입이 L-발린의 생산능을 향상시킬 수 있음을 확인하였다.

[0300] **실시예 7-1. L-아르기닌 생산 균주에서 gapN(L) 또는 gapN(S)이 도입된 균주의 제작 및 평가**

[0302] *L.delbrueckii subsp. Bulgaricus* 또는 *S.mutans* 유래의 gapN의 도입이 L-아르기닌 생산능에 미치는 효과를 확인하고자 야생주 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC21831을 대상으로 실시예 1-1-3에서 제작한 플라스미드와 실시예 1-2에서 제작한 플라스미드를 도입 하여, 상기 실시예 2-1와 동일한 방법으로 균주를 제작하고 각각 ATCC21831::P(cj7)gapN(L), ATCC21831::P(cj7)-gapN(S)라 명명하였다.

[0303] 제작된 균주를 다음과 같은 방법으로 배양하여 L-아르기닌 생산능을 비교하였다. 각각 균주를 영양배지에서 계대 배양한 후, 종배지 25 ml을 함유하는 250 ml 코너-바플 플라스크에 각각 접종하고, 30℃에서 20시간 동안 200 rpm으로 진탕 배양하였다. 그런 다음, 생산 배지 24 ml을 함유하는 250 ml 코너-바플 플라스크에 1ml의 종 배양액을 접종하고 30℃에서 72시간 동안, 200 rpm에서 진탕 배양하였다. 상기 영양 배지, 종 배지, 생산 배지의 조성은 각각 하기와 같다. 배양 종료 후 HPLC에 의해 L-아르기닌의 생산량을 측정하였고, 분석한 L-아르기닌의 농도 및 농도 증가율을 하기 표 19에 나타내었다.

[0305] <영양 배지(pH 7.2)>

[0306] 포도당 10 g, 육즙 5 g, 폴리펩톤 10 g, 염화나트륨 2.5 g, 효모엑기스 5 g, 한천 20 g, 유레아 2 g (증류수 1 리터 기준)

[0308] <종 배지(pH 7.0)>

[0309] 수크로스 20 g, 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 1 mg, 칼슘-판토텐산 2 mg, 니코틴아미드 2 mg (증류수 1 리터 기준)

[0311] <생산 배지(pH 7.0)>

[0312] 수크로스 6%, 황산암모늄 3%, 제1인산칼륨 0.1%, 황산마그네슘7수염 0.2%, CSL(옥수수 침지액) 1.5%, NaCl 1%, 효모 추출물 0.5%, 비오틴 100 mg/L (증류수 1 리터 기준).

표 19

균주명	L-아르기닌 농도(g/L)	L-아르기닌 농도 증가율(%)
ATCC21831	4.1 g/L	-
ATCC21831::P(cj7)gapN(S)	4.6 g/L	12%
ATCC21831::P(cj7)-gapN(L)	4.9 g/L	19%

[0316] 상기 결과와 같이, ATCC21831::P(cj7)gapN(L), ATCC21831::P(cj7)-gapN(S)균주의 L-아르기닌 생산능은 대조균 대비 각각 19.5%, 12.1% 증가함을 확인하였다.

[0317] ATCC21831::P(cj7)gapN(L)는 CA06-2951이라고 명명하고, 부다페스트조약 하의 수탁기관인 한국미생물보존센터에 2019년 9월 2일자로 기탁하여 수탁번호 KCCM12580P를 부여받았다.

[0319] 결과적으로, 코리네박테리움 속 L-아르기닌 생산 균주에서 *L.delbrueckii subsp. Bulgaricus* 또는 *S.mutans* 유래의 gapN 유전자 도입이 L-아르기닌의 생산능을 향상시킬 수 있음을 확인하였다.

[0321] **실시예 7-2. L-아르기닌 생산 균주 KCCM10741P에서 gapN(L) 또는 gapN(S)이 도입된 균주의 제작 및 평가**

[0323] L-아르기닌 생산 균주인 코리네박테리움 글루타미쿰 KCCM10741P(대한민국 등록특허 제10-0791659호)을 대상으로 실시예 1-1-3에서 제작한 플라스미드와 실시예 1-2에서 제작한 플라스미드를 도입하여, 상기 실시예 2-1와 동일한 방법으로 균주를 제작하고 각각 KCCM10741P::P(cj7)-gapN(L), KCCM10741P::P(cj7)-gapN(S)라 명명하였다.

[0324] 제작된 균주의 L-아르기닌 생산능을 비교하고자 상기 실시예 7-1과 동일한 방법으로 배양하여 L-아르기닌의 농도를 분석하였고, 분석한 L-아르기닌의 농도 및 농도 증가율을 하기 표 20에 나타내었다.

표 20

균주명	L-아르기닌 농도(g/L)	L-아르기닌 농도 증가율(%)
KCCM10741P	3.1 g/L	-
KCCM10741P::P(cj7)-gapN(S)	3.4 g/L	9%
KCCM10741P::P(cj7)-gapN(L)	3.8 g/L	22%

[0328] 상기 결과와 같이, KCCM10741P::P(cj7)-gapN(L), KCCM10741P::P(cj7)-gapN(S) 균주의 L-아르기닌 생산능은 대조군 대비 각각 22.6%, 9.7% 증가함을 확인하였다.

[0330] 결과적으로, 코리네박테리움 속 L-아르기닌 생산 균주에서 *L.delbrueckii subsp. Bulgaricus* 또는 *S.mutans* 유래의 gapN 유전자 도입이 L-아르기닌의 생산능을 향상시킬 수 있음을 확인하였다.

[0332] **실시예 8-1. 0-아세틸 호모세린 생산 균주에서 gapN(L) 또는 gapN(S)이 도입된 균주의 제작 및 평가**

[0334] 야생형 균주인 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032에 실시예 1-1-1에서 제작한 플라스미드와 실시예 1-2에서 제작한 플라스미드를 도입하여, 상기 실시예 2-1와 동일한 방법으로 균주를 제작하고, 각각 ATCC13032::P(cj7)-gapN(L), ATCC13032::P(cj7)-gapN(S)라 명명하였다. 제작된 균주를 하기와 같은 방법으로 배양하여 0-아세틸 호모세린 생산능을 비교하였다.

[0335] 종 배지 25 ml을 함유하는 250 ml 코너-바플 플라스크에 각 균주들을 접종하고, 30℃에서 20 시간 동안, 200 rpm으로 진탕 배양하였다. 그런 다음, 생산 배지 24 ml을 함유하는 250 ml 코너-바플 플라스크에 1 ml의 종 배양액을 접종하고 30℃에서 48시간 동안, 200 rpm에서 진탕 배양하였다. 상기 종 배지와 생산 배지의 조성은 각각 하기와 같다.

[0337] <종 배지(pH 7.0)>

[0338] 포도당 20 g, 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)

[0340] <생산 배지(pH 7.0)>

[0341] 포도당 50 g, (NH₄)₂SO₄ 12.5 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 1 리터 기준)

[0343] 배양 종료 후 HPLC로 0-아세틸 호모세린의 생산능을 측정하였다. 실험한 각 균주에 대한 배양액 중의 0-아세틸 호모세린 농도 및 농도 증가율은 하기 표 21과 같다.

표 21

균주명	0-아세틸 호모세린 농도(g/L)	0-아세틸 호모세린 농도 증가율(%)
ATCC13032	0.3 g/L	-
ATCC13032::P(cj7)-gapN(S)	0.4 g/L	33%
ATCC13032::P(cj7)-gapN(L)	0.5 g/L	67%

[0347] 상기 표 21에서 나타난 바와 같이 야생형 균주인 ATCC13032에 비하여 gapN 유전자가 도입된 ATCC13032::P(cj7)-gapN(S)에서는 0-아세틸 호모세린의 농도가 약 33% 증가, ATCC13032::P(cj7)-gapN(L)에서는 0-아세틸 호모세린의 농도가 약 67% 증가함을 확인하였다.

[0348] ATCC13032::P(cj7)-gapN(L)는 CM04-0531이라고 명명하고, 부다페스트조약 하의 수탁기관인 한국미생물보존센터에 2019년 9월 2일자로 기탁하여 수탁번호 KCCM12584P를 부여받았다.

[0350] **실시예 8-2. 0-아세틸 호모세린 생산 균주 코리네박테리움 글루타미쿰 균주에서 *L.delbrueckii subsp.***

Bulgaricus 유래의 gapN(L) 또는 S.mutans 유래의 gapN(S) 이 도입된 균주의 제작 및 평가

[0352] *L.delbrueckii subsp. Bulgaricus* 또는 *S.mutans* 유래의 gapN 도입이 0-아세틸 호모세린 생산능에 미치는 효과를 확인하고자 코리네박테리움 글루타미쿰의 자가 호모세린 0-아세틸트랜스퍼라제(MetX)를 강화하였다.

[0353] MetX를 코딩하는 유전자를 증폭하기 위하여 WT(Wild type) 유래의 보고된 서열에 근거하여 프로모터 부위(개시 코돈 상단 약 300bp)로부터 터미네이터 부위(중결코돈 하단 약 100bp)까지 증폭하기 위한 서열번호 33 및 34를 고안하였다. 서열번호 33 및 34의 프라이머의 양 말단에 BamHI 제한 효소 부위를 삽입하였다. PCR 조건은 95℃에서 5분간 변성 후, 95℃ 30초 변성, 55℃ 30초 어닐링, 72℃ 90초 중합을 30회 반복한 후, 72℃에서 7분간 중합반응을 수행하였다. 그 결과 metX 유전자의 코딩 부위 1546 bp의 DNA 단편을 수득하였다. pECCG117 벡터(대한민국 등록특허 제10-0057684호)와 metX DNA 단편을 BamHI 으로 처리하고, DNA 접합 효소를 이용하여 연결한 후, 클로닝함으로써 플라스미드를 획득하였고 이를 pECCG117-metX WT라 명명하였다.

[0354]

표 22

[0355]

서열번호	서열(5'-3')
33	GGATCCCCTCGTTGTTACCCAGCAACC
34	GGATCCCAAAGTCACAACACTACTTATGTTAG

[0357] pECCG117-metX WT 벡터를 상기 실시예 3-1의 WT::lysC(L377K)-hom(R398Q)::P(cj7)-gapN(L), WT::lysC(L377K)-hom(R398Q)::P(cj7)-gapN(S) 균주에 도입하여, 코리네박테리움 글루타미쿰 자가 metX가 과발현된 균주를 제작하였다. 또한 이의 대조균으로 WT::lysC(L377K)-hom(R398Q)에도 동일한 벡터를 도입하였다.

[0358] 제조된 균주들을 실시예 8-1의 플라스크 배양법과 동일한 방법으로 배양하여 배양액 중의 0-아세틸 호모세린 농도 및 농도 증가율을 분석하고, 그 결과를 표 23에 나타내었다.

표 23

[0360]

균주명	0-아세틸 호모세린 농도(g/L)	0-아세틸 호모세린 농도 증가율(%)
WT::lysC(L377K)-hom(R398Q)/pECCG117-metX WT	2.0 g/L	-
WT::lysC(L377K)-hom(R398Q)::P(cj7)-gapN(S)/pECCG117-metX WT	2.7 g/L	35%
WT::lysC(L377K)-hom(R398Q)::P(cj7)-gapN(L)/pECCG117-metX WT	3.1 g/L	55%

[0362] 상기 표 23에서 나타난 바와 같이 WT::lysC(L377K)-hom(R398Q)/pECCG117-metX WT에 비하여 gapN 유전자가 도입된 WT::lysC(L377K)-hom(R398Q)::P(cj7)-gapN(S)/pECCG117-metX WT에서는 0-아세틸 호모세린의 농도가 약 35% 증가, WT::lysC(L377K)-hom(R398Q)::P(cj7)-gapN(L)/pECCG117-metX WT에서는 0-아세틸 호모세린의 농도가 약 55% 증가함을 확인하였다.

[0364] 상기의 결과는 코리네박테리움 속 야생형 균주에서 *L.delbrueckii subsp. Bulgaricus* 유래의 gapN의 도입이 0-아세틸 호모세린 생산에 효과적임을 나타낸다.

실시예 9-1. 글루탐산 생산 균주에서 gapN(L) 또는 gapN(S)이 도입된 균주의 제작 및 평가

[0368] *L.delbrueckii subsp. Bulgaricus* 또는 *S.mutans* 유래 gapN의 도입이 글루탐산 생산능에 미치는 효과를 확인하고자 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13869 균주를 대상으로 실시예 1-1-4에서 제작한 플라스미드와 실시예 1-2에서 제작한 플라스미드를 도입하여, 상기 실시예 2-1와 동일한 방법으로 제작된 균주를 각각 ATCC13869::P(cj7)-gapN(L), ATCC13869::P(cj7)-gapN(S)라 명명하였다.

[0369] 종 배지 25 ml을 함유하는 250 ml 코너-바플 플라스크에 각 균주들을 접종하고, 30℃에서 20 시간 동안, 200 rpm으로 진탕 배양하였다. 그런 다음, 생산 배지 25 ml을 함유하는 250 ml 코너-바플 플라스크에 1 ml의 종 배양액을 접종하고 30℃에서 40시간 동안, 200 rpm에서 진탕 배양하였다. 배양은 비오틴 제한 조건에서 진행되었다. 배양 종료 후, HPLC를 이용한 방법을 통해 L-글루탐산 농도 및 농도 증가율을 측정하였으며, 측정 결과는

하기 표 24에 나타내었다.

- [0371] <중 배지(pH 7.2)>
- [0372] 포도당 1%, 육즙 0.5%, 폴리펩톤 1%, 염화나트륨 0.25%, 효모엑기스 0.5%, 한천 2%, 유레아 0.2%
- [0374] <생산 배지>
- [0375] 원당 6%, 탄산칼슘 5%, 황산암모늄 2.25%, 일인산칼륨 0.1%, 황산마그네슘 0.04%, 황산철 10 mg/L, 티아민 염산염 0.2 mg/L

표 24

균주명	L-글루탐산 농도(g/L)	L-글루탐산 농도 증가율(%)
ATCC13869	0.5	-
ATCC13869::P(cj7)-gapN(S)	0.8	60%
ATCC13869::P(cj7)-gapN(L)	0.9	80%

- [0379] 상기 표 24에서 나타난 바와 같이 야생형 균주인 ATCC13869에 비하여 gapN 유전자가 도입된 ATCC13869::P(cj7)-gapN(S)에서는 글루탐산의 농도가 약 60% 증가, ATCC13869::P(cj7)-gapN(L)에서는 글루탐산의 농도가 약 80% 증가함을 확인하였다.
- [0380] ATCC13869::P(cj7)-gapN(L)는 CA02-1360이라고 명명하고, 부다페스트조약 하의 수탁기관인 한국미생물보존센터에 2019년 9월 2일자로 기탁하여 수탁번호 KCCM12587P를 부여받았다.

실시예 9-2. L-글루탐산 생산 균주 KFCC11074에서 gapN(L) 또는 gapN(S)이 도입된 균주의 제작 및 평가

- [0384] L-글루탐산 생산 균주인 코리네박테리움 글루타미쿰 KFCC11074 균주(대한민국 등록특허 제10-0292299호)에 실시예 1-1-4에서 제작한 플라스미드와 실시예 1-2에서 제작한 플라스미드를 도입하여, 상기 실시예 2-1와 동일한 방법으로 제작된 균주를 각각 KFCC11074::P(cj7)-gapN(L), KFCC11074::P(cj7)-gapN(S)라 명명하였다.
- [0385] 제작된 균주의 L-글루탐산 생산능을 비교하고자 상기 실시예 10-1과 동일한 방법으로 배양하여 L-글루탐산의 농도를 분석하였고, 분석한 L-글루탐산의 농도 및 농도 증가율을 하기 표 25에 나타내었다.

표 25

균주명	L-글루탐산 농도(g/L)	L-글루탐산 농도 증가율(%)
KFCC11074	11.8	-
KFCC11074::P(cj7)-gapN(S)	14.5	22%
KFCC11074::P(cj7)-gapN(L)	16.2	37%

- [0389] 상기 표 25에서 나타난 바와 같이 KFCC11074에 비하여 gapN 유전자가 도입된 KFCC11074::P(cj7)-gapN(S)에서는 글루탐산의 농도가 약 22.9% 증가, KFCC11074::P(cj7)-gapN(L)에서는 글루탐산의 농도가 약 37.3% 증가함을 확인하였다.
- [0391] 결과적으로, 코리네박테리움 속 L-글루탐산 생산 균주에서 *L.delbrueckii subsp. Bulgaricus* 또는 *S.mutans* 유래의 gapN 유전자 도입이 L-글루탐산의 생산능을 향상시킬 수 있음을 확인하였다.
- [0393] 상기 실시예 1-9의 결과들을 종합하여 보면, 코리네박테리움 속 L-글루탐산 생산 균주에서 *L.delbrueckii subsp. Bulgaricus* 또는 *S.mutans* 유래의 gapN 유전자 도입이 L-아미노산의 생산능을 향상시키며, 특히 *S.mutans* 유래의 gapN 유전자를 도입했을 때보다 *L.delbrueckii subsp. Bulgaricus* 유래의 gapN 유전자를 도입했을 때 더 우수한 L-아미노산 생산능을 나타내는 것을 확인하였다.
- [0395] 이상의 설명으로부터, 본 출원이 속하는 기술분야의 당업자는 본 출원이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 출원의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 출원의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

수탁번호

[0397]

기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

수탁번호 : KCCM12580P

수탁일자 : 20190902

기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

수탁번호 : KCCM12581P

수탁일자 : 20190902

기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

수탁번호 : KCCM12582P

수탁일자 : 20190902

기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

수탁번호 : KCCM12583P

수탁일자 : 20190902

기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

수탁번호 : KCCM12584P

수탁일자 : 20190902

기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

수탁번호 : KCCM12585P

수탁일자 : 20190902

기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

수탁번호 : KCCM12586P

수탁일자 : 20190902

기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

수탁번호 : KCCM12587P

수탁일자 : 20190902

서열목록

- <110> CJ CheilJedang Corporation
- <120> Method for producing L-amino acids using microorganisms containing NADP dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
- <130> KPA190827-KR
- <160> 34
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 476
- <212> PRT
- <213> Unknown
- <220><223> Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus gapN amino acid
- <400> 1

Met Thr Glu His Tyr Leu Asn Tyr Val Asn Gly Glu Trp Arg Asp Ser
 1 5 10 15

Ala Asp Ala Ile Glu Ile Phe Glu Pro Ala Thr Gly Lys Ser Leu Gly
 20 25 30

Thr Val Pro Ala Met Ser His Glu Asp Val Asp Tyr Val Met Asn Ser
 35 40 45

Ala Lys Lys Ala Leu Pro Ala Trp Arg Ala Leu Ser Tyr Val Glu Arg
 50 55 60

Ala Ala Tyr Leu Gln Lys Ala Ala Asp Ile Leu Tyr Arg Asp Ala Glu
 65 70 75 80

Lys Ile Gly Ser Thr Leu Ser Lys Glu Ile Ala Lys Gly Leu Lys Ser
 85 90 95

Ser Ile Gly Glu Val Thr Arg Thr Ala Glu Ile Val Glu Tyr Thr Ala
 100 105 110

Lys Val Gly Val Thr Leu Asp Gly Glu Val Met Glu Gly Gly Asn Phe
 115 120 125

Glu Ala Ala Ser Lys Asn Lys Leu Ala Val Val Arg Arg Glu Pro Val
 130 135 140

Gly Leu Val Leu Ala Ile Ser Pro Phe Asn Tyr Pro Val Asn Leu Ala

145 150 155 160
 Gly Ser Lys Ile Ala Pro Ala Leu Met Gly Gly Asn Val Val Ala Phe
 165 170 175
 Lys Pro Pro Thr Gln Gly Ser Ile Ser Gly Leu Leu Leu Ala Lys Ala
 180 185 190
 Phe Ala Glu Ala Gly Leu Pro Ala Gly Val Phe Asn Thr Ile Thr Gly
 195 200 205
 Arg Gly Arg Val Ile Gly Asp Tyr Ile Val Glu His Pro Ala Val Asn
 210 215 220
 Phe Ile Asn Phe Thr Gly Ser Ser Ala Val Gly Lys Asn Ile Gly Lys

 225 230 235 240
 Leu Ala Gly Met Arg Pro Ile Met Leu Glu Leu Gly Gly Lys Asp Ala
 245 250 255
 Ala Ile Val Leu Glu Asp Ala Asp Leu Asp Leu Thr Ala Lys Asn Ile
 260 265 270
 Val Ala Gly Ala Phe Gly Tyr Ser Gly Gln Arg Cys Thr Ala Val Lys
 275 280 285
 Arg Val Leu Val Met Asp Ser Val Ala Asp Glu Leu Val Glu Lys Val
 290 295 300

 Thr Ala Leu Ala Lys Asp Leu Thr Val Gly Ile Pro Glu Glu Asp Ala
 305 310 315 320
 Asp Ile Thr Pro Leu Ile Asp Thr Lys Ser Ala Asp Tyr Val Gln Gly
 325 330 335
 Leu Ile Glu Glu Ala Ala Glu Lys Gly Ala Lys Pro Leu Phe Asp Phe
 340 345 350
 Lys Arg Glu Gly Asn Leu Ile Tyr Pro Met Val Met Asp Gln Val Thr
 355 360 365
 Thr Asp Met Arg Leu Ala Trp Glu Glu Pro Phe Gly Pro Val Leu Pro

 370 375 380
 Phe Ile Arg Val Lys Ser Ala Asp Glu Ala Val Met Ile Ala Asn Glu
 385 390 395 400

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

Ser Ser Gly Ala Gly Val Gln Gly Val Lys Tyr Ser Ile Gln Ala Met
 450 455 460
 Thr Arg Val Lys Ser Val Val Phe Asn Ile Glu Asp
 465 470 475

<210> 2

<211> 1431

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus gapN nucleotide

<400> 2

atgacagaac actatntaaa ctatgtcaat ggcgaatggc gggactccgc tgacgcgatt 60
 gaaattttcg aaccagcaac tggcaagtcc ctgggtactg tacctgcat gtmccacgaa 120

 gacgtggact acgtaatgaa cagcgcctaaa aaggcccttc cagcctggcg ggcctctca 180
 tacgttgaac gggccgcata cttgcaaaaag gcagcggaca tcctttaccg agatgctgaa 240
 aagatcgggt ctaccttgc caaggaaatc gccaaaggcc tcaagtcctc tatcgcgaa 300
 gtaaccggga cggcggaaat cgttgaatac acggccaagg tcggcgtaac tttggacggg 360
 gaagtcatgg agggcggcaa ctttgaagcg gcaagcaaga acaagttggc tgttgtccgc 420
 cgggaaccag tcggcctggt tttggcaatt tcaccctca actaccggt taacctggcc 480
 ggctcaaaga tcgcgcctgc tttgatgggc gggaacgtgg tggccttcaa gccgccgaca 540

 caagggtcaa tctccggtct gcttttggcc aaggccttcg ccgaagctgg cctgccagcc 600
 ggcgtcttca acaccattac cggccggggt cgggttatcg gcgactacat cgttgaacac 660
 ccggcagtea acitcatcaa cttaccggt tccagtctg tcggcaagaa catcgcaaaa 720
 ctggccggga tgcggccgat tatgctgaa cttggcggca aggacgcggc catcgtcttg 780
 gaagacgctg acttggacct gacggccaag aacatcgttg ccggcgcctt tggctactcc 840
 ggccagcgtt gtaccgctt taagcgggtt ctggtcatgg acagcgtggc tgacgaattg 900

gttgaaaagg tgactgcttt ggccaaggat ttgacggctg ggataccaga agaggatgcc 960

gacatcactc ctttgatcga cactaagtct gccgactacg tacaaggctt aattgaagaa 1020

gccgcagaaa agggcgctaa gcctttgttt gacttcaagc gcgaaggcaa cetgatctac 1080

ccaatgggtca tggaccaagt gacgactgac atgcgcctgg cctgggaaga accatttga 1140

ccagtattgc cattcatccg cgtcaagtca gctgacgaag ctgtcatgat tgccaatgaa 1200

tcagaatacg gccttcaaag ctccgtcttc tcacggaact ttgaaaaagc ctttgccatt 1260

gcaggaaaat tggaaagtggg cacggtccac atcaacaaca agacccaaag aggtccggac 1320

aacttcccat tcttgggcgt aaagagctca ggggcaggcg tacagggggt caagtactcc 1380

attcaagcca tgaccgggt caagtccgtt gtcttcaaca tcgaagacta a 1431

<210> 3

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> gapN F

<400> 3

cccaacgaaa gaaacactc atgacagaac actatttaaa 40

<210> 4

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> gapN R

<400> 4

gcttgtaat aagcctgccc ttagtcttcg atgttgaaga caacg 45

<210> 5

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pcj7 F

<400> 5

gattccaggt tccttaaccc agaaacatcc cagcgtact 40

<210> 6

<211> 40

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Pcj7 R
 <400> 6
 tttaaatagt gttctgtcat gagtgtttcc tttcgttggg 40
 <210> 7
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Ldb1179 R
 <400> 7
 tttcgtgcca gtctagaagt ttagtcttcg atgttgaaga 40
 <210> 8
 <211> 40

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Pcj7_2 F
 <400> 8
 acgaggtcag catctcgagt agaaacatcc cagcgctact 40
 <210> 9
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Pcj7_3 F
 <400> 9
 cgcggaactg tactagtaga aacatcccag cgctac 36
 <210> 10
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Ldb1179_2 R
 <400> 10
 ggaaggatat ctctagaaga taaaacgaaa ggcc 34

<210> 11
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Pcj7_4 F
 <400> 11
 cccttccggt ttagtactag aaacatccca gcgcta 36

<210> 12
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Ldb1179_3 R
 <400> 12
 ctcttctgt ttagtacttt agtcttcgat gttgaag 37

<210> 13
 <211> 475
 <212> PRT
 <213> Unknown
 <220><223> Streptococcus mutans gapN amino acid
 <400> 13

Met Thr Lys Gln Tyr Lys Asn Tyr Val Asn Gly Glu Trp Lys Leu Ser
 1 5 10 15
 Glu Asn Glu Ile Lys Ile Tyr Glu Pro Ala Ser Gly Ala Glu Leu Gly
 20 25 30
 Ser Val Pro Ala Met Ser Thr Glu Glu Val Asp Tyr Val Tyr Ala Ser
 35 40 45
 Ala Lys Lys Ala Gln Pro Ala Trp Arg Ser Leu Ser Tyr Ile Glu Arg
 50 55 60
 Ala Ala Tyr Leu His Lys Val Ala Asp Ile Leu Met Arg Asp Lys Glu
 65 70 75 80
 Lys Ile Gly Ala Val Leu Ser Lys Glu Val Ala Lys Gly Tyr Lys Ser
 85 90 95
 Ala Val Ser Glu Val Val Arg Thr Ala Glu Ile Ile Asn Tyr Ala Ala

Lys Arg Glu Gly Asn Leu Ile Cys Pro Ile Leu Phe Asp Lys Val Thr

355 360 365

Thr Asp Met Arg Leu Ala Trp Glu Glu Pro Phe Gly Pro Val Leu Pro

370 375 380

Ile Ile Arg Val Thr Ser Val Glu Glu Ala Ile Glu Ile Ser Asn Lys

385 390 395 400

Ser Glu Tyr Gly Leu Gln Ala Ser Ile Phe Thr Asn Asp Phe Pro Arg

405 410 415

Ala Phe Gly Ile Ala Glu Gln Leu Glu Val Gly Thr Val His Ile Asn

420 425 430

Asn Lys Thr Gln Arg Gly Thr Asp Asn Phe Pro Phe Leu Gly Ala Lys

435 440 445

Lys Ser Gly Ala Gly Ile Gln Gly Val Lys Tyr Ser Ile Glu Ala Met

450 455 460

Thr Thr Val Lys Ser Val Val Phe Asp Ile Lys

465 470 475

<210> 14

<211> 1428

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Streptococcus mutans gapN nucleotide

<400> 14

atgacaaaac aatataaaaa ttatgtcaat ggcgagtgga agctttcaga aatgaaatt 60

aaaatctacg aaccggccag tggagctgaa ttgggttcag ttccagcaat gagtactgaa 120

gaagtagatt atgtttatgc ttcagccaag aaagctcaac cagcttggcg atcactttca 180

tacatagaac gtgctgccta ccttcacaag gtagcagata ttttgatgcg tgataaagaa 240

aaaataggtg ctgttctttc caaagaggtt gctaaaggtt ataaatcagc agtcagcgaa 300

gtgttcgta ctgcagaaat cattaattat gcagctgaag aaggccttcg tatggaaggt 360

gaagtccctg aaggcggcag ttttgaagca gccagcaaga aaaaaattgc cgttgttcgt 420

cgtgaaccag taggtcttgt attagctatt tcaccattta actaccctgt taacttgga 480

ggttcgaaaa ttgcaccggc tcttattgcg ggaaatgta ttgcttttaa accaccgacg 540

caaggatcaa ttcagggt cttacttgct gaagcattg ctgaagctgg acttcctgca 600
 ggtgtcttta ataccattac aggtcgtggt tctgaaattg gagactatat ttagaacat 660
 caagccgtta actttatcaa ttttactggt tcaacaggaa ttggggaacg tattggcaaa 720
 atggctggta tgcgtccgat tatgcttgaa ctcggtggaa aagattcagc catcgttctt 780
 gaagatgcag accttgaatt gactgctaaa aatattattg caggigcttt tggttattca 840
 ggtcaacgct gtacagcagt taaacgtgtt cttgtgatgg aaagtgttgc tgatgaactg 900

gtcgaaaaaa tccgtgaaaa agttcttgca ttaacaattg gtaatccaga agacgatgca 960
 gatattacac cgttgattga taaaaatca gctgattatg tagaaggtct tattaatgat 1020
 gccaatgata aaggagccgc tgcccttact gaaatcaaac gtgaaggtaa tcttatctgt 1080
 ccaatcctct ttgataaggt aacgacagat atgcgtcttg cttgggaaga accatttgg 1140
 cctgttcttc cgatcattcg tgtgacatct gtagaagaag ccattgaaat ttctaacaaa 1200
 tcggaatatg gacttcaggc ttctatcttt acaaatgatt tcccacgcgc ttttggatt 1260
 gctgagcagc ttgaagtgg tacagttcat atcaataata agacacagcg cggcacggac 1320

aacttccat tcttaggggc taaaaatca ggtgcaggta ttcaaggggt aaaatattct 1380
 attgaagcta tgacaactgt taaatccgtc gtatttgata tcaaataa 1428

<210> 15
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Pcj7-gapN1 F
 <400> 15

tagatgtcgg gccccatattg agaaacatcc cagcgtact 40

<210> 16
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Pcj7-gapN1 R
 <400> 16

gccaaaacag cctcgagtta tttgatatca aatcacgagc attta 45

<210> 17
 <211> 29
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> lysC-1 F
 <400> 17
 tcctctagag ctgcgcagtg ttgaatacg 29
 <210> 18
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> lysC-1 R
 <400> 18
 tggaaatctt ttcgatgttc acgttgacat 30
 <210> 19
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> lysC-2 F
 <400> 19
 acatcgaaaa gatttcacc tctgagattc 30
 <210> 20
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> lysC-2 R
 <400> 20
 gactctagag ttcacctcag agacgatta 29
 <210> 21
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Hom-1 F
 <400> 21
 tcctctagac tggtcgcctg atgttctac 29
 <210> 22
 <211> 20

<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Hom-1 R	
<400> 22	
ctcttcctgt tggattgtac	20
<210> 23	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Hom-2 F	
<400> 23	
gtacaatcca acaggaagag	20
<210> 24	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Hom-2 R	
<400> 24	
gactctagat tagtcccttt cgaggcggga	29
<210> 25	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> ilvA-1 F	
<400> 25	
acggatccca gactccaaag caaaagcg	28
<210> 26	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> ilvA-1 R	
<400> 26	
acaccacggc agaaccaggt gcaaaggaca	30

<210> 27
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ilvA-2 F
 <400> 27
 ctggttctgc cgtgggtgtgc atcatctctg 30
 <210> 28
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ilvA-2 R
 <400> 28
 acggatccaa ccaaacttgc tcacactc 28

 <210> 29
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ilvN-1 F
 <400> 29
 aatttctaga ggcagaccct attctatgaa gg 32
 <210> 30
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ilvN-1 R
 <400> 30
 agtgtttcgg tctttacaga cagagggac 30
 <210> 31
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ilvN-2 F
 <400> 31

gtccctcgtg tctgtaaaga ccgaaacact 30

<210> 32

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ilvN-2 R

<400> 32

aatttctaga cgtgggagtg tcactcgctt gg 32

<210> 33

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MetX F

<400> 33

ggatccctc gttgttcacc cagcaacc 28

<210> 34

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MetX R

<400> 34

ggatcccaaa gtcacaacta cttatgtag 30