(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl. 7
C12P 13/04

(11) 공개번호 특2001-0062270
(43) 공개일자 2001년07월07일

---

(21) 출원번호 10-2000-0074674
(22) 출원일자 2000년12월08일

---

(30) 우선권주장 19959329.9 1999년12월09일 독일(DE)

(71) 출원인 데구사-휠스 악티엔게젤샤프트
추후
독일 데-60287 프랑크푸르트
포르슝스젠트룸 율리히 게엠베하
아달베르트 베. 플라텐타이히, 하
독일 데-52425 율리히 빌헬름-요오넨-슈트라쎄

(72) 발명자 지글러페트라
독일데-52062아헨아달베르트슈트라쎄63
엑겔링로타르
독일데-52428율리히엘젠캄프6
잠헤르만
독일데-52428율리히벤델리누스슈트라쎄71
티르바흐게오르크
독일데-33613빌레펠트군스트슈트라쎄21
페페를레발터
독일데-33790할레(베스트프)얀슈트라쎄33

(74) 대리인 이병호

심사청구 : 없음

---

(54) 코리네형 세균을 이용하는 L-아미노산의 발효적 제조방법

요약

본 발명은

a) 특히 천연 프로모터의 제거에 의해 적어도 glyA 유전자를 약독화시키는, 목적하는 L-아미노산-생산 세균을 발효시키는 단계,

b) 목적하는 산물을 배지 또는 세균의 세포내에서 농축시키는 단계, 및

c) L - 아미노산을 분리하는 단계를 수행하고, 선택적으로 목적하는 L - 아미노산의 생합성 경로의 추가 유전자가 추가로 증폭된 세균을 이용하거나, 목적하는 L - 아미노산의 형성을 감소시키는 물질대사 경로가 적어도 부분적으로 제거된 세균을 이용하는, L - 아미노산의 제조 방법, 및 lacI - tac - 5'glyA 또는 lacI - tac - 5'glyA 단위의 뉴클레오타이드 서열에 관한 것이다.

대표도

도 1

색인어

glyA 유전자, 약독화, 증폭, 코리네형 세균, 코리네박테리움 글루타미쿰, L - 아미노산

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 플라스미드 pK18mobglyA'의 지도이다. 길이 데이터는 근사값으로 이해되어야 한다.

사용된 약어 및 명칭은 다음 의미를 갖는다:

- BamHI: 바실러스 아밀로리쿠에파시엔스(Bacillus amyloliquefaciens)로부터의 제한 엔도뉴클레아제
- BglII: 바실러스 글로비기이(Bacillus globigii)로부터의 제한 엔도뉴클레아제
- BstEII: 바실러스 스테아로테르모필러스(Bacillus stearothermophilus)로부터의 제한 엔도뉴클레아제
- EcoRI: 에스케리키아 콜라이(Escherichia coli)로부터의 제한 엔도뉴클레아제
- EcoRV: 에스케리키아 콜라이로부터의 제한 엔도뉴클레아제
- HindIII: 해모필러스 인플루엔재(Haemophilus influenzae)로부터의 제한 엔도뉴클레아제
- SacI: 스트렙토마이세스 아크로모게네스(Streptomyces achromogenes)로부터의 제한 엔도뉴클레아제
- kan: 카나마이신 내성 유전자
- $lacI^q$: tac 프로모터 Ptac의 억제인자에 대한 유전자
- Ptac: tac 프로모터
- glyA': 세린 하이드록시메틸트랜스퍼라제 유전자의 5' 부분
- glyA2 - 역방향: 삽입 조사용 프라이머
- RSP: 삽입 조사용 역방향 표준 프라이머

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 glyA 유전자를 약독화시키는 코리네형 세균을 이용하는 L-아미노산, 특히 L-트레오닌의 발효적 제조방법에 관한 것이다.

L-아미노산은 동물 영양학, 사람 의학 및 제약 산업에서 사용된다.

아미노산은 코리네형 세균, 특히 코리네박테리움 글루타미쿰(Corynebacterium glutamicum) 균주의 발효에 의해 제조되는 것으로 공지되어 있다. 이들의 큰 중요성으로 인하여, 제조방법을 개선시키기 위한 노력이 지속적으로 이루어져 왔다. 이러한 방법의 개선은 발효 수단, 예를 들어, 교반 및 산소 공급, 또는 예를 들어, 발효 동안의 당 농도와 같은 영양 배지의 조성, 또는 예를 들어, 이온 교환 크로마토그래피에 의한 생성물 형태의 후처리, 또는 미생물 자체의 고유 생산 특성에 관한 것일 수 있다.

이들 미생물의 생산 특성은 돌연변이 유발, 선택 및 돌연변이체 선택 방법을 사용하여 개선시킨다. 상기 방식으로, 항대사물질, 예를 들어, 트레오닌 동족체 α-아미노-β-하이드록시발레르산(AHV)에 대해 내성이거나, 조절상 중요한 대사물질에 대해 영양요구성이며 L-아미노산, 예를 들어, 트레오닌을 생산하는 균주를 수득한다.

몇년 동안, 재조합 DNA 기술 방식이, 또한 개개의 아미노산 생합성 유전자를 증폭시키고 L-아미노산 생산에 대한 영향을 조사함으로써, L-아미노산을 생산하는 코리네박테리움 글루타미쿰 균주를 개선하는데 사용되어 왔다. 이와 관련하여, 특히 개관 논문[참조: Kinoshita, "Glutamic Acid Bacteria", Biology of Industrial Microorganisms, Demain and Solomon(Eds.), Benjamin Cummings, London, UK, 1985, 115-142; Hilliger, BioTec 2, 40-44 (1991); Eggeling, Amino Acids 6:261-272(1994); Jetten 및 Sinskey, Critical Reviews in Biotechnology 15, 73-103(1995); 및 Sahm et al., Annuals of the New York Academy of Science 782, 25-39(1996)]에서 찾아볼 수 있다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명자들은 코리네형 세균을 이용하여 L-아미노산을 발효적으로 제조하기 위한 개선된 방법에 대한 새로운 원리를 제공하는 것을 목적으로 한다.

발명의 구성 및 작용

L-아미노산은 사람 의학 및 제약 산업, 식품 산업, 특히 동물 영양학에서 사용된다. 따라서, 아미노산을 제조하기 위한 신규한 개선된 방법을 제공하는데 일반적인 관심이 있다.

하기에서 L-아미노산이 언급될 경우, 이는 L-트레오닌 또는 L-이소로이신을 의미한다.

본 발명은 적어도 glyA 유전자 산물(glyA 유전자)을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 약독화, 특히 낮은 수준으로 발현시키는 코리네형 세균을 이용하고, 목적하는 산물을 배지 또는 세포내에서 농축시키고, L-아미노산을 분리함을 포함하는, 코리네형 세균을 이용하는 L-아미노산의 발효적 제조 방법을 제공한다.

사용되는 균주는 바람직하게는 glyA 유전자의 약독화 전에 L-아미노산을 미리 생산한다.

바람직한 양태는 특허청구의 범위에서 찾아볼 수 있다.

이와 관련하여, 용어 "약독화"는, 예를 들어, 약한 프로모터 또는 활성이 낮은 상응하는 효소를 암호화하거나 상응하는 유전자 또는 효소(단백질)를 불활성화시키는 유전자 또는 대립형질 유전자를 사용하고, 임의로 이들 수단을 병용함으로써, 상응하는 DNA(본 명세서에서는 glyA 유전자)에 의해 암호화되는 하나 이상의 효소(단백질)의 세포내 활성을 미생물내에서 저하시키거나 제거함을 의미한다.

본 발명과 관련된 미생물은 글루코즈, 슈크로즈, 락토즈, 프럭토즈, 말토즈, 당밀, 전분, 셀룰로즈, 또는 글리세롤 및 에탄올로부터 아미노산을 생산할 수 있다. 이러한 미생물은 특히 코리네박테리움 속의 대표적인 코리네형 세균일 수 있다. 코리네박테리움 속 중에서도, 이의 L - 아미노산 생산능에 대해 당업자에게 공지되어 있는 코리네박테리움 글루타미쿰 종이 특별히 언급될 수 있다.

코리네박테리움 속, 특히 코리네박테리움 글루타미쿰 종의 적합한 균주는, 예를 들어, 다음과 같은 공지된 야생형 균주이다:

코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032,

코리네박테리움 아세토글루타미쿰(Corynebacterium acetoglutamicum) ATCC15806,

코리네박테리움 아세토아시도필룸(Corynebacterium acetoacidophilum) ATCC13870,

코리네박테리움 멜라쎄콜라(Corynebacterium melassecola) ACTT17965,

코리네박테리움 테르모아미노게네스(Corynebacterium thermoaminogenes) FERM - BP 1539,

브레비박테리움 플라붐(Brevibacterium flavum) ATCC14067,

브레비박테리움 락토페르멘툼(Brevibacterium lactofermentum) ATCC13869 및

브레비박테리움 디바리카툼(Brevibacterium divaricatum) ATCC14020, 및 이로부터 제조된 L - 아미노산 - 생산 돌연변이체 또는 균주,

예를 들어, L - 트레오닌 - 생산 균주:

코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC21649,

브레비박테리움 플라붐 BB69,

브레비박테리움 플라붐 DSM5399,

브레비박테리움 락토페르멘툼 FERM - BP 269 및

브레비박테리움 락토페르멘툼 TBB - 10, 및

예를 들어, L - 이소로이신 - 생산 균주

코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC14309,

코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC14310,

코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC14311,

코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC15168 및

코리네박테리움 암모니아게네스 ATCC6871.

본 발명에 이르러, 코리네형 세균이 glyA 유전자의 약독화 후에 개선된 방식으로 L - 아미노산을 생산함을 밝혀내었다.

glyA 유전자는 효소 세린 하이드록시메틸트랜스퍼라제(EC 2.1.2.1)를 암호화한다. glyA 유전자의 뉴클레오타이드 서열은 일본 특허 공개공보 제JP - A - 08107788호에 기술되어 있다. 언급된 참고문헌에 기술되어 있는 glyA 유전자는 본 발명에 따라서 사용할 수 있다. 유전자 코드의 축퇴 또는 중립 기능의 센스 돌연변이로 인해 생성되는 glyA 유전자의 대립형질 유전자를 또한 사용할 수 있다.

약독화를 달성하기 위해, glyA 유전자의 발현 또는 유전자 산물의 촉매적 특성을 저하시키거나 제거할 수 있다. 2가지 수단을 임의로 병용할 수도 있다.

유전자 발현은 유전자 발현의 시그널 구조체를 적합하게 배양하거나 유전자 변형(돌연변이)시킴으로써 저하시킬 수 있다. 유전자 발현의 시그널 구조체는, 예를 들어, 억제인자 유전자, 활성화인자 유전자, 오퍼레이터, 프로모터, 어테뉴에이터, 리보솜 결합 부위, 출발 코돈 및 터미네이터이다. 당업자는 이와 관련한 정보를, 예를 들어, 문헌[참조: 특허원 제WO 96/15246호; Boyd 및 Murphy, Journal of Bacteriology 170: 5949 (1988); Voskuil 및 Chambliss, Nucleic Acids Research 26: 3548 (1998); Jensen 및 Hammer, Biotechnology and Bioengineering 58: 191 (1998); 및 Patek et al., Microbiology 142: 1297 (1996)] 및, 예를 들어, 유전학 및 분자 생물학의 공지된 교과서[참조: Knippers, " Molekulare Genetik" (Molecular Genetics), 6th edition, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Germany, 1995 또는 Winnacker, " Gene und Klone" (Genes and Clones), VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany, 1990]에서 찾아볼 수 있다.

효소 단백질의 촉매적 특성을 변화시키거나 저하시키는 돌연변이는 선행 기술 분야에 공지되어 있으며, 언급할 수 있는 예는 논문[참조: Qiu 및 Goodman, Journal of Biological Chemistry 272: 8611 - 8617 (1997); Sugimoto et al., Bioscience Biotechnology and Biochemistry 61: 1760 - 1762 (1997); Mockel, " Die Threonindehydratase aus Corynebacterium glutamicum: Aufhebung der allosterischen Regulation und Struktur des Enzyms" (Threonindehydratase from Corynebacterium glutamicum: Cancelling the allosteric regulation and structure of the enzyme), Reports from the Julich Research Centre, Jul - 2906, ISSN09442952, Julich, Germany, 1994]이다. 포괄적인 기술은, 예를 들어, 유전학 및 분자 생물학의 공지된 교과서[참조: Hagemann, " Allgemeine Genetik" (General Genetics), Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986]에서 찾아볼 수 있다.

가능한 돌연변이는 전이, 전환, 삽입 및 결실이다. 효소 활성에 미치는 아미노산의 치환 효과에 따라, 미스센스 돌연변이 또는 넌센스 돌연변이로 칭한다. 유전자내에 하나 이상의 염기쌍의 삽입 또는 결실은 프레임 이동 돌연변이를 유발하며, 이에 의해 부적합한 아미노산이 삽입되거나 해독이 조기에 종결된다. 복수개의 코돈의 결실은 전형적으로 효소 활성의 완전한 상실을 유발한다. 이러한 돌연변이의 생성에 관한 지침은 선행 기술이며, 예를 들어, 유전학 및 분자 생물학의 공지된 교과서, 예를 들어, 문헌[참조: Knippers, " Molekulare Genetik" (Molecular Genetics), 6th edition, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Germany, 1995; Winnacker, " Gene und Klone" (Genes and Clones), VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany, 1990; 및 Hagemann, " Allgemeine Genetik" (General Genetics), Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986]에서 찾아볼 수 있다.

예로써, glyA 유전자를 천연 프로모터의 제거 및 상류에 위치하는 조절가능한 제어 인자의 삽입에 의해 약독화시킨다. lacI - tac 시스템을 제어 인자로서 사용한다. 염색체 glyA 유전자의 lacI - tac 시스템 상류의 혼입을 달성하기 위해, 삽입 플라스미드 pK18mobglyA'(도 1)를 제조한다. 플라스미드 pK18mobglyA'는 tac 프로모터[참고문헌: Amann et al., Gene 25: 167 - 178 (1983); De Boer et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA 80: 21 - 25 (1983)] 및 tac 프로모터의 하류에 서열 1에 제시된 glyA 유전자의 5' - 말단 서열을 직접적으로 함유한다. 당해 플라스미드는 Lac 억제인자를 암호화하는 lacI 유전자[참고문헌: Farabaugh, Nature 274: 765 - 769 (1978); Stark et al., Gene 51: 255 - 267 (1987)]를 추가로 함유한다. lacI - tac -

5'glyA 단위의 서열은 서열 2에 제시한다. 플라스미드 pK18mobglyA'는 에스케리키아 콜라이내에서는 복제할 수 있으나, 코리네박테리움 글루타미쿰내에서는 복제할 수 없다. 삽입에 영향을 미치는 " 유전자교환(cross-over)" 에 의한 형질전환 및 상동성 재조합 후, 상류에 위치하는 lacI-tac 제어 인자에 의해 발현을 제어하거나 조절할 수 있는 glyA 유전자의 온전한 복사체, 및 천연 프로모터를 포함한, 3'-말단 상에서 절취된 glyA 유전자의 불활성 복사체를 수득한다. lacI-tac-glyA 단위의 서열은 서열 3에 제시한다. 서열 4는 glyA 유전자 산물의 공지된 아미노산 서열을 제시한다. 락토즈 동족체인 이소프로필 티오갈락토사이드[참고문헌: Furste et al., Gene 48: 119-131 (1986)]를 적합한 농도로 첨가함으로써, glyA 유전자의 발현을 제어하거나 세린 하이드록시메틸트랜스퍼라제의 세포 함량을 감소시키거나 조절할 수 있다.

삽입 돌연변이 유발에 관한 지침 및 설명은, 예를 들어, 문헌[참조: Schwarzer 및 Puhler, Bio/Technology 9, 84-87(1991); Peters-Wendisch et al.(Microbiology 144, 915-927 (1998); 또는 Fitzpatrick et al., Applied Microbiology and Biotechnology 42, 575-580 (1994)]에서 찾아볼 수 있다.

약독화된 glyA 유전자를 갖는 코리네형 세균의 아미노산-생산 균주의 예는 트레오닌 생산자 코리네박테리움 글루타미쿰 DM368-2::pK18mobglyA'이다.

또한, 아미노산의 생산에 있어서, glyA 유전자의 약독화 이외에, 특정 생합성 경로, 해당과정, 보충과정, 시트르산 회로 또는 아미노산 배출의 하나 이상의 효소를 증폭시키는 것이 유리할 수 있다.

이와 같이, 예를 들어, L-트레오닌의 제조를 위해, 동시에 다음 유전자들을 동시에 과발현시킬 수 있다:

· 호모세린 데하이드로게나제를 암호화하는 hom 유전자[참고문헌: Peoples et al., Molecular Microbiology 2, 63-72 (1988)] 또는 " 피드 백(feed back) 내성" 호모세린 데하이드로게나제를 암호화하는 hom ^{dr} 대립형질 유전자[참고문헌: Archer et al., Gene 107, 53-59 (1991)], 및/또는

· 글리세르알데히드 3-포스페이트 데하이드로게나제를 암호화하는 gap 유전자[참고문헌: Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174: 6076-6086], 또는

· 피루베이트 카복실라제를 암호화하는 pyc 유전자[참고문헌: Peters-Wendisch et al., Microbiology, 144: 915-927 (1998)], 또는

· 말레이트:퀴논 옥시도리덕타제를 암호화하는 mqo 유전자[참고문헌: Molenaar et al., European Journal of Biochemistry 254, 395-403 (1998)], 또는

· 트레오닌 배출을 암호화하는 thrE 유전자[참고문헌: DE 199 41 478.5; DSM 12840].

아미노산 제조를 위해, 또한 glyA 유전자 이외에, 하기 유전자를 동시에 약독화시키는 것이 유리할 수도 있다:

· 포스포에놀 피루베이트 카복시키나제를 암호화하는 pck 유전자[참고문헌: DE 199 50 409.1; DSM 13047], 및/또는

· 피루베이트 옥시다제를 암호화하는 poxB 유전자[참고문헌: DE 199 51 975.7; DSM 13114].

마지막으로, 아미노산의 제조에 있어서, glyA 유전자의 약독화 이외에, 바람직하지 않은 부반응을 제거하는 것이 유리할 수 있다[참고문헌: Nakayama: " Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms" , Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek(eds.), Academic Press, London, UK, 1982].

사용되는 배양 배지는 특정 균주의 요구 조건을 적합하게 충족시켜야만 한다. 다양한 미생물용 배양 배지는 편람[참조

: " Manual of Methods for General Bacteriology" , American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981)]에 기술되어 있다. 탄소원으로서는 당 및 탄수화물, 예를 들어, 글루코즈, 슈크로즈, 락토즈, 프럭토즈, 말토즈, 당밀, 전분 및 셀룰로즈, 오일 및 지방, 예를 들어, 대두유, 해바라기유, 땅콩유 및 코코넛유, 지방산, 예를 들어, 팔미트산, 스테아르산 및 리놀레산, 알콜, 예를 들어, 글리세롤 및 에탄올, 및 유기산, 예를 들어, 아세트산을 사용할 수 있다. 이들 물질은 단독으로 또는 혼합물로서 사용할 수 있다. 질소원으로서는 질소 - 함유 유기 화합물, 예를 들어, 펩톤, 효모 추출물, 고기 추출물, 맥아 추출물, 옥수수 침지액, 대두분 및 우레아, 또는 무기 화합물, 예를 들어, 황산암모늄, 염화암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄 및 질산암모늄을 사용할 수 있다. 질소원은 단독으로 또는 혼합물로서 사용할 수 있다. 인 공급원으로서는 인산, 인산이수소칼륨 또는 인산수소이칼륨, 또는 상응하는 나트륨 함유 염을 사용할 수 있다. 배양 배지는 또한 증식에 필수적인 황산마그네슘 또는 황화철과 같은 금속 염을 함유하여야만 한다. 마지막으로, 상기 언급된 물질 이외에도 필수 성장 - 촉진 물질, 예를 들어, 아미노산 및 비타민을 사용할 수 있다. 추가로, 적합한 전구체를 또한 배양 배지에 첨가할 수 있다. 언급된 출발 물질은 단일 배취로서 배양물에 첨가할 수 있거나, 배양 동안 적합한 방식으로 공급할 수 있다.

수산화나트륨, 수산화칼륨, 암모니아 또는 암모니아수와 같은 염기성 화합물, 또는 인산 또는 황산과 같은 산성 화합물을 사용하여 적합한 방식으로 배양물의 pH를 조절할 수 있다. 소포제, 예를 들어, 지방산 폴리글리콜 에스테르를 사용하여 거품 발생을 조절할 수 있다. 플라스미드의 안정성을 유지하기 위해, 선택적으로 작용하는 적합한 물질, 예를 들어, 항생제를 배지에 첨가할 수 있다. 호기성 조건을 유지하기 위해서는, 산소 또는 산소 - 함유 기체 혼합물, 예를 들어, 공기를 배양물에 유입할 수 있다. 배양 온도는 일반적으로 20℃ 내지 45℃, 바람직하게는 25℃ 내지 40℃이다. 목적하는 산물이 최대량 형성될 때까지 배양을 계속한다. 상기 목적은 일반적으로 10시간 내지 160시간내에 성취된다.

L - 아미노산 측정 방법은 선행 기술 분야에 공지되어 있다. 문헌[참조: Spackman et al., Analytical Chemistry, 30, (1958), 1990]에 기술된 바와 같이 음이온 교환 크로마토그래피에 이어서, 닌하이드린 유도체화에 의해 분석하거나, 문헌[참조: Lindroth et al., Analytical Chemistry (1979) 51: 1167 - 1174]에 기술된 바와 같이 역상 HPLC에 의해 분석할 수 있다.

하기 미생물은 부다페스트 조약하에 독일 브라운슈바익에 소재하는 도이췌 잠룽 폰 미크로오르가니즈멘 운트 첼쿨투렌 게엠베하[Deutsche Sammlung fur Mikrorganismen und Zellkulturen GmbH(DSMZ ="German" Collection of Microorganisms and Cell Cultures)]에 수탁되었다:

· DSM 13170으로서 에스케리키아 콜라이 균주 DH5αmcr/pK18mobglyA'.

실시예

본 발명은 양태 실시예를 보조로 하여 아래에 보다 상세히 설명된다.

플라스미드 DNA의 에스케리키아 콜라이로부터의 분리 및 모든 제한 기술, 클레나우 및 알칼리성 포스파타제 처리는 문헌[참조: Sambrook et al., Molecular cloning. A Laboratory manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press]에 기술된 방법에 의해 수행한다. 에스케리키아 콜라이의 형질변환은 달리 명시하지 않는 한 문헌[참조: Chung et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA (1989) 86: 2172 - 2175]에 기술된 방법에 의해 수행한다.

실시예 1

코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032로부터의 glyA 유전자의 클로닝 및 서열화

glyA 유전자를 이. 콜라이 클로닝 벡터 pUC18[참고문헌: Norrander et al., Gene (1983) 26: 101 - 106, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany]내에서 클로닝시킨다. 클로닝은 2단계로 수행한다. 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032로부터의 유전자를, 먼저 일본 특허 공개공보 제JP - A - 08107788호로부터 유래된 하기 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하는 폴리머라제 연쇄 반응(PCR)에 의해 증폭시킨다.

glyA1 - 전방향:

5' - GCT TGC AGC GTT TTG CTC TGC C - 3'

glyA1 - 역방향:

5' - ACC CGT AAC CTC TTC CAC ATA GG - 3'

PCR 반응은, 상응하는 올리고뉴클레오타이드 1μM, 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032로부터의 염색체 DNA 100ng, 1/10 용적 10배 반응 완충액 및 열안정성 Taq - /Pwo - DNA 폴리머라제 혼합물(Expand High Fidelity PCR System; 제조원: Roche Diagnostics; 독일 만하임 소재) 2.6단위를 사용하여 Thermocycler(PTC - 100, 제조원: MJ Research, Inc.; 미국 워싱턴주 소재)내에서 94℃에서 30초, 64℃에서 1분 및 68℃에서 3분 동안의 조건하에 200μM 데옥시뉴클레오타이드 3인산염(dATP, dCTP, dGTP, dTTP)의 존재하에서 30사이클 수행한다.

후속적으로, 크기가 약 1.7kb인 증폭된 단편을 SureClone Ligation Kit(제조원: Amersham Pharmacia Biotech; 스웨덴 업프잘라 소재)의 보조하에 제조업자의 지침에 따라 벡터 pUC18의 SmaI 절단 부위에 연결시킨다. 이. 콜라이 균주 DH5αmcr[참고문헌: Grant et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA (1990) 87: 4645 - 4649]을 완전한 연결 배취로 형질전환시킨다. 형질전환체를, 50㎍/mL 카베니실린을 함유하는 LB - 아가 플레이트 상에서의 이의 카베니실린 내성에 의해 동정한다. 플라스미드를 7개의 형질전환체로부터 제조한 다음, 삽입체로서의 1.7kb PCR 단편의 존재에 대해 제한 분석에 의해 조사한다. 상기 방식으로 형성된 재조합 플라스미드를 이후 pUC18glyA로 칭한다.

플라스미드 pUC18glyA내의 1.7kb PCR 단편의 뉴클레오타이드 서열은 디데옥시 쇄 종결법[참고문헌: Sanger et al., Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America USA (1977) 74: 5463 - 5467]에 의해 확인한다. 이를 위해, pUC18glyA의 완전 삽입체를 하기 프라이머의 보조하에 서열화한다.

만능 프라이머: 5' - GTA AAA CGA CGG CCA GT - 3'

역방향 프라이머: 5' - GGA AAC AGC TAT GAC CAT G - 3'

수득한 뉴클레오타이드 서열을 Lasergene program package(제조원: Biocomputing Software for Windows, DNASTAR; 미국 매디슨 소재)로 분석한다. 분석 결과, 길이가 1302bp인 오픈 리딩 프레임이 확인되었다. 상응하는 유전자를 glyA 유전자로 칭한다. 관련 유전자 산물은 434개 아미노산을 포함하고, 서열 4로서 복제된다.

실시예 2

glyA의 저하된 발현을 위한 벡터의 작제

자체 프로모터 영역을 갖지 않는 glyA 유전자를 함유하는, 크기가 1418bp인 DNA 단편을 제한 효소 EcoRI 및 TfiI로 실시예 1에서 기술된 플라스미드 pUC18glyA로부터 절단한다. 당해 단편의 5' 말단 및 3' 말단을 클레나우 효소로 처

리한다. 생성된 DNA 단편을, 미리 BamHI로 선형화시키고, 클레나우 효소로 처리하고, 탈인산화시킨 벡터 pVWEx2[참고문헌: Wendisch, " Physiologische und NMR - spektroskopische Untersuchungen zur in vivo - Aktivitat zentraler Stoffwechselwege im Wildstamm und in rekomvinanten Stammen von Corynebacterium glutamicum " (Physiological and NMR - spectroscopic analyses of the in vivo activity of central metabolic pathways in the wild - type strain and in recombinant strains of Corynebacterium glutamicum), Reports from the Julich Research Centre, Jul - 3397, ISSN09442952, Julich, Germany, 1997]에 연결시켜, glyA 유전자가 이소프로필 β - D - 티오갈락토사이드(IPTG)로 유도가능한 벡터의 tac 프로모터의 바로 뒤에 동일한 배향으로 놓이도록 한다. 이. 콜라이 균주 DH5αmcr[참고문헌: Grant et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA (1990) 87: 4645 - 4649]을 완전한 연결 배취로 형질전환시킨다. 형질전환체를, 15μg/mL 테트라사이클린을 함유하는 LB - 아가 플레이트 상에서의 이의 테트라사이클린 내성에 의해 동정한다. 플라스미드를 12개의 형질전환체로부터 제조한 다음, tac 프로모터에 대해 올바른 배향으로 삽입체로서의 1418bp 단편의 존재에 대해 제한 분석에 의해 조사한다. 상기 방식으로 형성된 재조합 플라스미드를 이후 pVWEx2glyA로 칭한다.

이후, lacI, tac 프로모터의 억제인자에 대한 유전자, tac 프로모터 및 코리네박테리움 글루타미큼의 최초 438bp의 클로닝된 glyA 유전자를 함유하는 DNA 단편을, 하기 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하여 폴리머라제 연쇄 반응(PCR)에 의해 플라스미드 pVWEx2glyA로부터 증폭시킨다.

glyA2 - 전방향(밑줄에 의해 식별된 부가 EcoRI 인식 서열):

5' - CCGGAA TTCTCA CTG CCC GCT TTC CAG TC - 3'

glyA2 - 역방향(밑줄에 의해 식별된 부가 BamHI 인식 서열):

5' - CGG GAT CCC AGC TTT CCG GAG AAG TTC AAC - 3'

PCR 반응은, 상응하는 올리고뉴클레오타이드 1μM, pVWEx2glyA의 플라스미드 DNA 100ng, 1/10 용적 10배 반응 완충액 및 열안정성 Taq - /Pwo - DNA 폴리머라제 혼합물(Expand High Fidelity PCR System; 제조원: Roche Diagnostics; 독일 만하임 소재) 2.6단위를 사용하여 Thermocycler(PTC - 100, 제조원: MJ Research, Inc.; 미국 워싱턴주 소재)내에서 94°C에서 30초, 58°C에서 30초 및 72°C에서 2분 동안의 조건하에 200μM 데옥시뉴클레오타이드 3인산염(dATP, dCTP, dGTP, dTTP)의 존재하에서 30사이클 수행한다.

후속적으로, 크기가 약 2.0kb인 증폭된 단편을 EcoRI 및 BamHI로 절단하고, NucleoSpin Extract 2 in 1 Kit(제조원: Macherey - Nagel; 독일 뒤렌 소재)의 보조하에 제조업자의 지침에 따라 분리한 다음, 또한 EcoRI 및 BamHI로 절단되고 탈인산화된 벡터 pK18mob[참고문헌: Schafer et al., Gene (1994) 145: 69 - 73]내에 연결시킨다. 이. 콜라이 균주 DH5αmcr[참고문헌: Grant et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA (1990) 87: 4645 - 4649]을 완전한 연결 배취로 형질전환시킨다. 형질전환체를, 50μg/mL 카나마이신을 함유하는 LB - 아가 플레이트 상에서의 이의 카나마이신 내성에 의해 동정한다. 플라스미드를 12개의 형질전환체로부터 제조한 다음, 삽입체로서의 2.0kb PCR 단편의 존재에 대해 제한 분석에 의해 조사한다. 상기 방식으로 형성된 재조합 플라스미드를 이후 pK18mobglyA'로 칭한다(도 1 참조).

실시예 3

저하된 조절가능한 glyA 발현을 갖는 균주 코리네박테리움 글루타미큼 ATCC13032::pK18mobglyA'의 작제

전기천공[참고문헌: Haynes et al., FEMS Microbiology Letters (1989) 61: 329-334]에 의해, 블랭크 벡터 pZ1[참고문헌: Menkel et al., Applied and Environmental Microbiology (1989) 64: 549-554] 및 실시예 2에 기술된 플라스미드 pK18mobglyA'를 야생형 균주 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032[참고문헌: Abe et al., Journal of General and Applied Microbiology (1967) 13: 279-301]내에 삽입시킨다.

pZ1로 형질전환시킨 후, 형질전환체를, 15μg/mL 카나마이신을 함유하는 LB-아가 플레이트[참고문헌: Liebl et al., FEMS Microbiology Letters (1989) 65: 299-304] 상에서의 이의 카나마이신 내성에 의해 동정한다. 플라스미드를 3개의 형질전환체로부터 제조한 다음, pZ1 블랭크 벡터의 존재에 대해 제한 분석에 의해 조사한다. 대조 균주 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032/pZ1을 상기 방식으로 형성시킨다.

pK18mobglyA'로 형질전환시킨 후, glyA의 클로닝된 5' 말단의 상동성 재조합에 의해 플라스미드를 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032의 염색체로 삽입시킨다. 수득된 카나마이신-내성 클론을, 15μg/mL 카나마이신 및 1mM 이소프로필 β-D-티오갈락토사이드(IPTG)를 함유하는 LB-아가 플레이트[참고문헌: Liebl et al., FEMS Microbiology Letters (1989) 65: 299-304] 상에서 동정한다. pK18mobglyA'의 염색체내로의 정확한 삽입을, 하기 올리고뉴클레오타이 프라이머를 사용하여 폴리머라제 연쇄 반응(PCR)에 의해 2개의 생성된 삽입 돌연변이체내에서 조사한다.

역방향 프라이머 (RSP):

5'-GGA AAC AGC TAT GAC CAT G-3'

glyA2-역방향

5'-CGG GAT CCC AGC TTT CCG GAG AAG TTC AAC-3'

PCR 반응은, 상응하는 올리고뉴클레오타이드 1μM, 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032::pK18mobglyA'로부터의 염색체 DNA 100ng, 1/10 용적 10배 반응 완충액 및 열안정성 Taq-/Pwo-DNA 폴리머라제 혼합물(Expand High Fidelity PCR System; 제조원: Roche Diagnostics; 독일 만하임 소재) 2.6단위를 사용하여 Thermocycler(PTC-100, 제조원: MJ Research, Inc.; 미국 워싱턴주 소재)내에서 94℃에서 30초, 48℃에서 30초 및 72℃에서 2분 동안의 조건하에 200μM 데옥시뉴클레오타이드 3인산염(dATP, dCTP, dGTP, dTTP)의 존재하에서 30사이클 수행한다. glyA 유전자가 이소프로필 β-D-티오갈락토사이드(IPTG)로 유도가능한 tac 프로모터의 제어하에 존재하는, 균주 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032::pK18mobglyA'를 상기 방식으로 형성시킨다.

실시예 4

균주 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032::pK18mobglyA'내에서 glyA 유전자에 의해 암호화된 세린 하이드록시메틸트랜스퍼라제 활성의 측정

glyA에 의해 암호화된 세린 하이드록시메틸트랜스퍼라제 활성의 측정을 위한 조 추출물을 수득하기 위해, 실시예 3에 기술된 씨. 글루타미쿰 ATCC13032/pZ1 및 씨. 글루타미쿰 ATCC13032::pK18mobglyA'를 25μg 카나마이신/mL 및 100μM 이소프로필 β-D-티오갈락토사이드(IPTG)를 함유하는 100mL 브레인 하트 인퓨전-배지(제조원: Difco Labratories; 미국 디트로이트 소재)내에서 30℃, 14시간 동안 예비배양한다. 세포를 0.9%(w/v) 염화나트륨 용액으로 1회 세척한 다음, CgXII 배지 100mL 분액을 OD_{600} (600nm에서의 광학 밀도)이 0.5가 되도록 상기 현탁액에 접종시킨다. 배지는 문헌[참조: Keilhauser et al., Journal of Bacteriology (1993) 175: 5593-5603]에 의해 기술된 배지와 동일하나, 25μg 카나마이신/mL, 및 0, 10 또는 100μM 이소프로필 β-D-티오갈락토사이드(IPTG)를 추가로 포함한다. 카일하우어(Keilhauer) 등에 의해 기술된 배지의 조성을 표 1에 제시한다.

[표 1]

배지 CGXII의 조성

성분	농도
$(NH_4)_2SO_2$	20g/L
우레아	5g/L
KH_2PO_4	1g/L
K_2HPO_4	1g/L
$MgSO_4$ x $7H_2O$	0.25g/L
3-모르폴리노프로판설폰산	42g/L
$CaCl_2$	10mg/L
$FeSO_4$ x $7H_2O$	10mg/L
$MnSO_2$ x H_2O	10mg/L
$ZnSO_4$ x $7H_2O$	1mg/L
$CuSO_4$	0.2mg/L
$NiCl_2$ x $6H_2O$	0.02mg/L
비오틴	0.2mg/L
글루코즈	40g/L
프로카테큐산	30mg/L

2종의 균주를 30°C에서 배양한다. 10시간 후, 세포를 50mM 4-(2-하이드록시에틸)-1-피페라진에탄설폰산/수산화나트륨 완충액(pH 7.0)으로 1회 세척한 다음, 원심분리[Minifuge RF(제조원: Heraeus; 독일 오스테로데 소재)를 사용하여 5000rpm에서 10분 동안] 제거하여, 200mM 4-(2-하이드록시에틸)-1-피페라진에탄설폰산/수산화나트륨 완충액(pH 7.0)에 재현탁시켜, 최종 용적을 5mL로 만든다. 2mM 피리독살 5-포스페이트 용액 50μL 및 100mM 디티오트레이톨 용액 50μL를 상기 세포 현탁액에 가한 다음, 세포를 분쇄시킨다. 세포를 초음파 분쇄기(Branson Sonifier W-250, 제조원: Branson Sonic Power Co., 미국 댄버리 소재; 초음파 노출 시간: 6분, 펄스 길이: 100%, 초음파 강도: 2.5)에 의해 0°C에서 분쇄시킨다. 초음파 처리 후, 세포 데브리스를 원심분리[냉각가능한 Sigma 202 MK 원심분리기(제조원: Sigma-Aldrich; 독일 다이젠호펜 소재)내에서 4°C 및 13000rpm에서 30분 동안]에 의해 분리 제거한다. 상청액을 효소 활성 측정용 무세포 조 추출물로서 직접 사용한다.

무세포 조 추출물내에서의 단백질 측정은 문헌[참조: Bensadoun 및 Weinstein, Analytical Biochemistry (1976) 70: 241-250]에 기술된 방법에 의해 측광법적으로 수행한다. 단백질 함량은 소 혈청 알부민을 표준물로 하여 플롯팅된 보정 곡선을 통해 측정한다.

무세포 조 추출물내에서의 세린 하이드록시메틸트랜스퍼라제의 활성을 측정하기 위해, 기질 트레오닌으로부터 글리신 형태를 정량화시키는 불연속 효소 시험을 사용한다. 반응 배취를 최종 용적 1mL 중의 20mM 트레오닌, 200μM 피리독살 5-포스페이트, 900μM 테트라하이드로폴레이트, 100mM 4-(2-하이드록시에틸)-1-피페라진에탄설폰산/수산화나트륨 완충액(pH 7.0) 및 1.0-1.5mg 단백질(조 추출물로부터)의 조성물[문헌(참조: Scrimgeour 및 Huennekens, Methods in Enzymology (1962) Vol. V: 838-843, Academic Press)에 따라 개질됨]내에서 37°C 배양기에서 15분 동안 배양한다. 반응을 0.25용적 25%(w/v) 트리클로로아세트산 용액을 첨가하여 정지시킨 다음, 배취를 0°C에서 15분 동안 배양하고, 변성된 단백질을 원심분리(냉각가능한 Sigma 202 MK 원심분리기(제조원: Sigma-Aldrich; 독일 다이젠호펜 소재)내에서 4°C 및 13000rpm에서 15분 동안]에 의해 원심분리 제거한다. 효소 시험시 상청액으로부터 형성된 글리신의 정량적 측정은 역상 HPLC[참고문헌: Lindroth et al., Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174]에 의해 수행한다. 형광 검출기(G1321A)에 연결된 HP1100 시리즈의 HPLC 장치(제조원: Hewlett-Packard; 독일 발트브론 소재)를 사용하고; HP-Chem-Station(Hewlett-Packard)을 사용하여 시스템을 제어하고 데이터를 평가한다. 분석할 아미노산 용액 1μL를 즉시 사용가능한 오르토-프탈알데히드/2-머캅토에탄올 시약(제조원: Pierce Europe BV; 네덜란드 오우트-바이예르란트 소재) 20μL와 자동 예비칼럼 유도체화기내에서 혼합한

다. 이때 형성된 형광성 티오-치환된 이소인돌[참고문헌: Jones et al., Journal of Chromatography (1983) 266: 471-482]을 점차적인 비극성 상(메탄올)을 갖는 구배 프로그램을 사용하는 결합된 예비칼럼(40x4mm Hypersil ODS 5) 및 본 칼럼(Hypersil ODS 5, 두 칼럼 모두의 제조원: CS-Chromatographie Service GmbH; 독일 랑거베헤 소재) 상에서 분리한다. 극성 용출액은 아세트산나트륨(0.1M, pH 7.2)이고, 유속은 0.8mL/분이다. 유도체화된 아미노산의 형광성 검출은 230nm의 여기 파장 및 450nm의 방출 파장에서 일어난다. 글리신 농도는 외부 표준물 및 추가 내부 표준물로서의 아스파라긴과의 비교에 의해 계산한다.

기질로서 트레오닌을 사용한 효소 시험의 결과를 표 2에 제시한다.

[표 2]

균주	IPTG 농도(μM)	세린 하이드록시메틸트랜스퍼라제 활성 (글리신 nmol/분/단백질 mg)
ATCC13032/pZ1	0	0.9
ATCC13032::pK18mobglyA'	0	0.3
	10	0.7
	100	1.6

실시예 5

저하된 조절가능한 glyA 발현을 갖는 균주 브레비박테리움 플라붐 DM368-2::pK18mobglyA'의 작제

전기천공[참고문헌: Haynes et al., FEMS Microbiology Letters (1989) 61: 329-334]에 의해, 블랭크 벡터 pZ1[참고문헌: Menkel et al., Applied and Environmental Microbiology (1989) 64: 549-554] 및 실시예 2에 기술된 플라스미드 pK18mobglyA'를 트레오닌-생산 균주 브레비박테리움 플라붐 DM368-2내에 삽입시킨다. 균주 DM368-2는 EP-B-0 385 940에 기술되어 있고, DSM5399로 기탁되어 있다.

pZ1로 형질전환시킨 후, 형질전환체를, 15μg/mL 카나마이신을 함유하는 LBHIS-아가 플레이트[참고문헌: Liebl et al., FEMS Microbiology Letters (1989) 65: 299-304] 상에서의 이의 카나마이신 내성에 의해 동정한다. 플라스미드를 3개의 형질전환체로부터 제조한 다음, pZ1 블랭크 벡터의 존재에 대해 제한 분석에 의해 조사한다. 대조 균주 브레비박테리움 플라붐 DM368-2/pZ1을 상기 방식으로 형성시킨다.

pK18mobglyA'로 형질전환시킨 후, glyA의 클로닝된 5' 말단의 상동성 재조합에 의해 플라스미드를 브레비박테리움 플라붐 DM368-2의 염색체로 삽입시킨다. 수득된 카나마이신-내성 클론을, 15μg/mL 카나마이신 및 1mM 이소프로필 β-D-티오갈락토사이드(IPTG)를 함유하는 LBHIS-아가 플레이트[참고문헌: Liebl et al., FEMS Microbiology Letters (1989) 65: 299-304] 상에서 동정한다. pK18mobglyA'의 염색체내로의 정확한 삽입을, 브레비박테리움 플라붐 DM368-2::pK18mobglyA'의 염색체 DNA 100ng을 주형으로서 사용하여, 실시예 3에서 이미 기술된 바와 같이 폴리머라제 연쇄 반응(PCR)에 의해 4개의 생성된 삽입 돌연변이체내에서 조사한다. glyA 유전자가 이소프로필 β-D-티오갈락토사이드(IPTG)로 유도가능한 tac 프로모터의 제어하에 존재하는, 균주 브레비박테리움 플라붐 DM368-2::pK18mobglyA'를 상기 방식으로 형성시킨다.

실시예 6

균주 브레비박테리움 플라붐 DM368-2::pK18mobglyA'내에서 glyA에 의해 암호화된 세린 하이드록시메틸트랜스퍼라제 활성의 측정

실시예 5에 기술된 균주 비. 플라붐 DM368-2/pZ1 및 비. 플라붐 DM368-2::pK18mobglyA'내에서 glyA에 의해 암호화된 세린 하이드록시메틸트랜스퍼라제 활성의 측정을 위한 조 추출물을 실시예 4에 이미 기술된 바와 같이 수득한다. 수득된 무세포 조 추출물 중의 단백질 측정, 및 기질인 트레오닌으로부터 형성된 글리신을 정량화시키는 불연속 효소 시험을 또한 실시예 4에 기술된 바와 같이 수행한다.

기질로서 트레오닌을 사용하는 상기 효소 시험의 결과를 표 3에 기재한다.

[표 3]

균주	IPTG 농도(μM)	세린 하이드록시메틸트랜스퍼라제 활성(글리신 nmol/분/단백질 mg)
DM368-2/pZ1	0	1.6
DM368-2::pK18mobglyA'	0	< 0.1
	10	0.8
	100	1.7

실시예 7

브레비박테리움 플라붐을 사용한 L-트레오닌의 제조

실시예 5에 기술된 균주 비. 플라붐 DM368-2/pZ1 및 비. 플라붐 DM368-2::pK18mobglyA'의 트레오닌 생산능을 조사하기 위해, 이들을 25㎍ 카나마이신/mL 및 100μM 이소프로필 β-D-티오갈락토사이드(IPTG)를 함유하는 100mL 브레인 하트 인퓨전-배지(제조원: Difco Labratories; 미국 디트로이트 소재)내에서 30℃, 14시간 동안 예비배양한다. 세포를 0.9%(w/v) 염화나트륨 용액으로 1회 세척한 다음, CgXII 배지 60mL 분액을 OD$_{600}$ (600nm에서의 광학 밀도)이 0.5가 되도록 상기 현탁액에 접종시킨다. 배지는 문헌[참조: Keilhauser et al., Journal of Bacteriology (1993) 175: 5593-5603]에 의해 기술된 배지와 동일하나, 25㎍ 카나마이신/mL, 및 0, 10 또는 100μM 이소프로필 β-D-티오갈락토사이드(IPTG)를 추가로 포함한다.

2종의 균주를 30℃에서 72시간에 걸쳐 배양한다. 48시간 및 72시간 후, 샘플을 각각에서 채취하여, 세포를 단시간내에 원심분리[Biofuge pico(제조원: Heraeus; 독일 오스테로데 소재)를 사용하여 13000rpm에서 5분 동안] 제거한다.

배양 상청액으로부터의 세포외 아미노산 농도의 정량적 측정은 역상 HPLC[참고문헌: Lindroth et al., Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174]에 의해 실시예 4에 이미 기술된 바와 같이 수행한다. 트레오닌 농도는 외부 표준물 및 추가 내부 표준물로서의 아스파라긴과의 비교에 의해 계산한다.

결과를 표 4에 기재한다.

[표 4]

균주	IPTG 농도	L-트레오닌(g/ℓ)	
	μM	48시간 후	72시간 후
DM368-2/pZ1	0	1.27	1.32
DM368-2::pK18mobglyA'	10	1.32	1.44
	0	1.41	1.60

발명의 효과

본 발명에 의해, glyA 유전자를 약독화시키는 코리네형 세균을 이용하는 개선된 발효적 제조방법으로 L-아미노산을 제조할 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

a) 적어도 glyA 유전자를 약독화시키는, 목적하는 L - 아미노산 - 생산 세균을 발효시키는 단계,

b) 목적하는 산물을 배지 또는 세균의 세포내에서 농축시키는 단계, 및

c) L - 아미노산을 분리하는 단계를 수행함을 특징으로 하는, L - 아미노산의 제조방법.

청구항 2.

제1항에 있어서, 목적하는 L - 아미노산의 생합성 경로의 추가 유전자가 추가로 증폭된 세균이 이용됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 3.

제1항에 있어서, 목적하는 L - 아미노산의 형성을 저하시키는 대사 경로가 적어도 부분적으로 제거된 세균이 이용됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 4.

제1항에 있어서, glyA 유전자를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 발현이 저하됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 5.

제1항에 있어서, 폴리뉴클레오타이드 glyA가 암호화하는 폴리펩타이드(효소 단백질)의 촉매적 특성이 저하됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 6.

제1항에 있어서, 도 1에 도시되고 DSM 13170으로서 기탁된 이. 콜라이내의 벡터 pK18mobglyA'에 의한 삽입 돌연변이 유발 조작이 약독화 달성을 위해 사용됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 7.

제1항에 있어서,

7.1 호모세린 데하이드로게나제를 암호화하는 hom 유전자,

7.2 글리세르알데히드 3 - 포스페이트 데하이드로게나제를 암호화하는 gap 유전자,

7.3 피루베이트 카복실라제를 암호화하는 pyc 유전자,

7.4 말레이트:퀴논 옥시도리덕타제를 암호화하는 mqo 유전자, 및

7.5 트레오닌 배출을 암호화하는 thrE 유전자로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 유전자가 동시에 과발현되거나 증폭된 세균이 발효됨을 특징으로 하는, L - 트레오닌의 제조방법.

청구항 8.

제1항에 있어서,

8.1 포스포에놀 피루베이트 카복시키나제를 암호화하는 pck 유전자, 및

8.2 피루베이트 옥시다제를 암호화하는 poxB 유전자로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 유전자가 동시에 약독화된 세균이 발효됨을 특징으로 하는, L-트레오닌의 제조방법.

청구항 9.

제1항 내지 제8항 중의 어느 한 항에 있어서, 코리네박테리움 글루타미쿰(Corynebacterium glutamicum) 속의 미생물이 사용됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 10.

glyA 유전자가 약독화된 코리네형 세균.

청구항 11.

도 1에 도시되고 DSM 13170으로서 기탁된 이. 콜라이내의 벡터 pK18mobglyA'.

청구항 12.

(i) 서열 2에 제시된 lacI-tac-5'glyA 단위의 뉴클레오타이드 서열,

(ii) 유전자 암호의 축퇴 범위내에서 서열(i)에 상응하는 하나 이상의 서열, 또는

(iii) 서열(i) 또는 (ii)에 상보적인 서열과 하이브리드화하는 하나 이상의 서열, 및 임의로

(iv) (i)에서 기능적으로 중립인 센스 돌연변이체를 포함하는 분리된 폴리뉴클레오타이드.

청구항 13.

(i) 서열 3에 제시된 lacI-tac-glyA 단위의 뉴클레오타이드 서열,

(ii) 유전자 암호의 축퇴 범위내에서 서열(i)에 상응하는 하나 이상의 서열, 또는

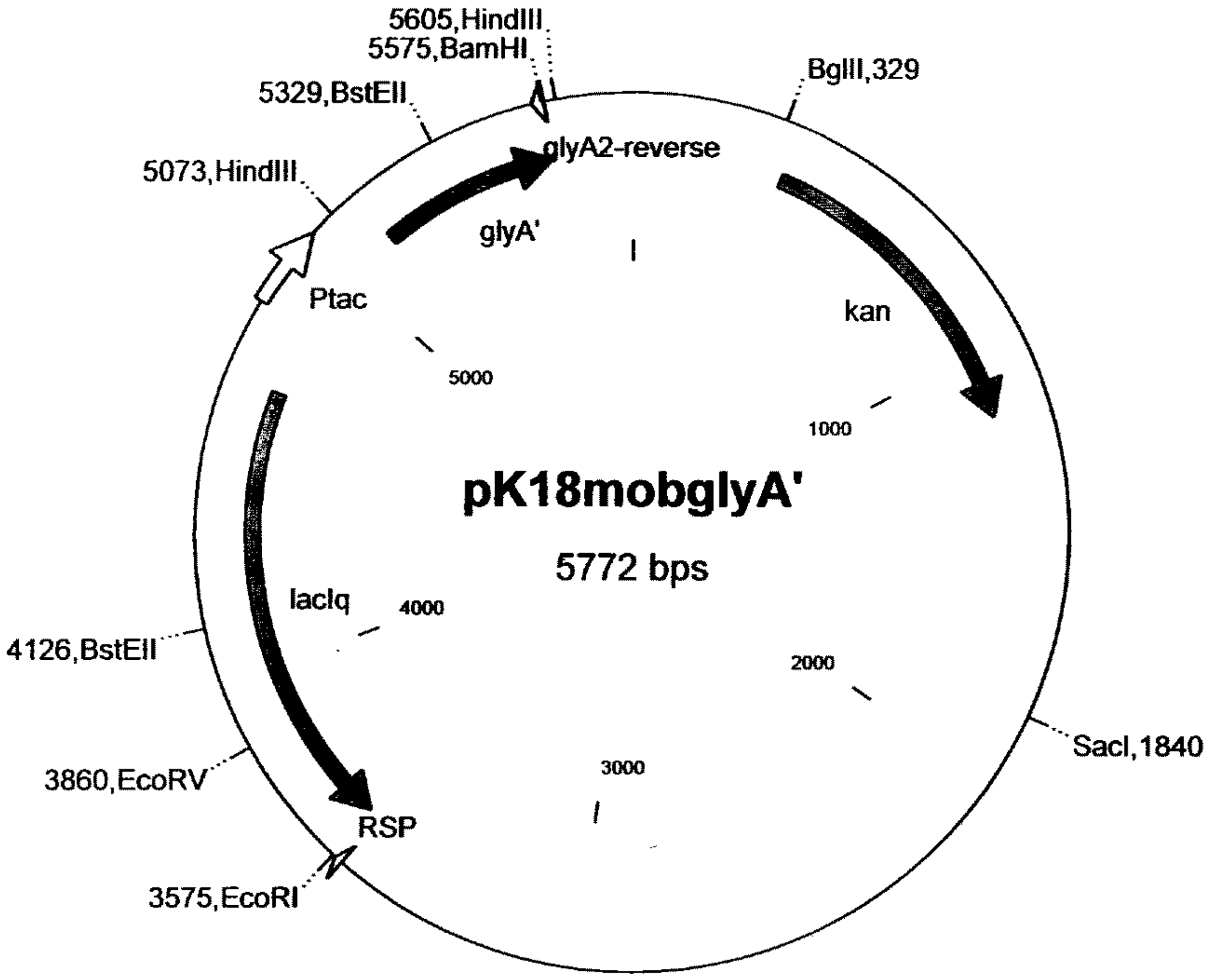
(iii) 서열(i) 또는 (ii)에 상보적인 서열과 하이브리드화하는 하나 이상의 서열, 및 임의로

(iv) (i)에서 기능적으로 중립인 센스 돌연변이체를 포함하는 분리된 폴리뉴클레오타이드.

도면

도면 1

플라스미드 pK18mobglyA'의 지도



< 110 > Degussa-Huls AG Forschungszentrum Julich GmbH

< 120 > Process for the fermentative preparation of L-amino acids using coryneform bacteria

< 130 > 5-1999-024333-4 & 5-1998-082611-0

< 150 > DE 199 59 329.9

< 151 1999 - 12 - 09
>
< 160 4
>
< 170 KOPATIN 1.5
>
< 210 1
>
< 211 438
>
< 212 DNA
>
< 213 Corynebacterium glutamicum ATCC13032
>
< 220
>
< 221 N_region
>
< 222 (1)..(438)
>
< 223 5'glyA
>
< 400 1
>
atgaccgatg cccaccaagc ggacgatgtc cgttaccagc cactgaacga gcttgatcct 60
gaggtggctg ctgccatcgc tggggaactt gcccgtcaac gcgatacatt agagatgatc 120
gcgtctgaga acttcgttcc ccgttctgtt ttgcaggcgc agggttctgt tcttaccaat 180
aagtatgccg agggttaccc tggccgccgt tactacggtg gttgcgaaca agttgacatc 240
attgaggatc ttgcacgtga tcgtgcgaag gctctcttcg gtgcagagtt cgccaatgtt 300
cagcctcact ctggcgcaca ggctaatgct gctgtgctga tgactttggc tgagccaggc 360
gacaagatca tgggtctgtc tttggctcat ggtggtcact tgacccacgg aatgaagttg 420
aacttctccg gaaagctg 438
< 210 2
>
< 211 2000
>
< 212 DNA
>
< 213 Synthetic sequence
>
< 220
>
< 223 lacI - tac - 5'glyA
>
< 220
>
< 221 gene
>
< 222 Complement((6)..(1097))
>

< 223 lacI
>
< 220
>
< 221 promoter
>
< 222 (1391)..(1434)
>
< 223 tac
>
< 220
>
< 221 N_region
>
< 222 (1562)..(1999)
>
< 223 5'glyA
>
< 400 2
>
aattctcact gcccgctttc cagtcgggaa acctgtcgtg ccagctgcat taatgaatcg 60
gccaacgcgc ggggagaggc ggtttgcgta ttgggcgcca gggtggtttt tcttttcacc 120
agtgagacgg gcaacagctg attgcccttc accgcctggc cctgagagag ttgcagcaag 180
cggtccacgc tggtttgccc cagcaggcga aaatcctgtt tgatggtggt tgacggcggg 240
atataacatg agctgtcttc ggtatcgtcg tatcccacta ccgagatatc cgcaccaacg 300
cgcagcccgg actcggtaat ggcgcgcatt gcgcccagcg ccatctgatc gttggcaacc 360
agcatcgcag tgggaacgat gccctcattc agcatttgca tggtttgttg aaaaccggac 420
atggcactcc agtcgccttc ccgttccgct atcggctgaa tttgattgcg agtgagatat 480
ttatgccagc cagccagacg cagacgcgcc gagacagaac ttaatgggcc cgctaacagc 540
gcgatttgct ggtgacccaa tgcgaccaga tgctccacgc ccagtcgcgt accgtcttca 600
tgggagaaaa taatactgtt gatgggtgtc tggtcagaga catcaagaaa taacgccgga 660
acattagtgc aggcagcttc cacagcaatg gcatcctggt catccagcgg atagttaatg 720
atcagcccac tgacgcgttg cgcgagaaga ttgtgcaccg ccgctttaca ggcttcgacg 780
ccgcttcgtt ctaccatcga caccaccacg ctggcaccca gttgatcggc gcgagattta 840
atcgccgcga caatttgcga cggcgcgtgc agggccagac tggaggtggc aacgccaatc 900
agcaacgact gtttgcccgc cagttgttgt gccacgcggt tgggaatgta attcagctcc 960
gccatcgccg cttccacttt ttcccgcgtt ttcgcagaaa cgtggctggc ctggttcacc 1020
acgcgggaaa cggtctgata agagacaccg gcatactctg cgacatcgta taacgttact 1080
ggtttcacat tcaccaccct gaattgactc tcttccgggc gctatcatgc cataccgcga 1140
aaggttttgc accattcgat ggtgtcaacg taaatgcatg ccgcttcgcc ttcgcgcgcg 1200
aattgcaagc tgatccgggc ttatcgactg cacggtgcac caatgcttct ggcgtcaggc 1260
agccatcgga agctgtggta tggctgtgca ggtcgtaaat cactgcataa ttcgtgtcgc 1320
tcaaggcgca ctcccgttct ggataatgtt ttttgcgccg acatcataac ggttctggca 1380
aatattctga aatgagctgt tgacaattaa tcatcggctc gtataatgtg tggaattgtg 1440
agcggataac aatttcacac aggaaacaga attaaaagat atgaccatga ttacgccaag 1500
cttgcatgcc tgcaggtcga ctctagagga tcattcgtct tgtgaaaggt tagctgacct 1560
gatgaccgat gcccaccaag cggacgatgt ccgttaccag ccactgaacg agcttgatcc 1620
tgaggtggct gctgccatcg ctggggaact tgcccgtcaa cgcgatacat tagagatgat 1680
cgcgtctgag aacttcgttc cccgttctgt tttgcaggcg cagggttctg ttcttaccaa 1740
taagtatgcc gagggttacc ctggccgccg ttactacggt ggttgcgaac aagttgacat 1800

cattgaggat cttgcacgtg atcgtgcgaa ggctctcttc ggtgcagagt tcgccaatgt 1860
tcagcctcac tctggcgcac aggctaatgc tgctgtgctg atgactttgg ctgagccagg 1920
cgacaagatc atgggtctgt ctttggctca tggtggtcac ttgacccacg gaatgaagtt 1980
gaacttctcc ggaaagctgg 2000
< 210 3
>
< 211 2866
>
< 212 DNA
>
< 213 Synthetic sequence
>
< 220
>
< 223 lacI - tac - glyA
>
< 220
>
< 221 gene
>
< 222 Complement((6)..(1097))
>
< 223 lacI
>
< 220
>
< 221 promoter
>
< 222 (1391)..(1434)
>
< 223 tac
>
< 220
>
< 221 CDS
>
< 222 (1562)..(2863)
>
< 223 glyA
>
< 400 3
>
aattctcact gcccgctttc cagtcgggaa acctgtcgtg ccagctgcat taatgaatcg 60
gccaacgcgc ggggagaggc ggtttgcgta ttgggcgcca gggtggtttt tcttttcacc 120
agtgagacgg gcaacagctg attgcccttc accgcctggc cctgagagag ttgcagcaag 180
cggtccacgc tggtttgccc cagcaggcga aaatcctgtt tgatggtggt tgacggcggg 240
atataacatg agctgtcttc ggtatcgtcg tatcccacta ccgagatatc cgcaccaacg 300
cgcagcccgg actcggtaat ggcgcgcatt gcgcccagcg ccatctgatc gttggcaacc 360
agcatcgcag tgggaacgat gccctcattc agcatttgca tggtttgttg aaaaccggac 420
atggcactcc agtcgccttc ccgttccgct atcggctgaa tttgattgcg agtgagatat 480

ttatgccagc cagccagacg cagacgcgcc gagacagaac ttaatgggcc cgctaacagc 540
gcgatttgct ggtgacccaa tgcgaccaga tgctccacgc ccagtcgcgt accgtcttca 600
tgggagaaaa taatactgtt gatgggtgtc tggtcagaga catcaagaaa taacgccgga 660
acattagtgc aggcagcttc cacagcaatg gcatcctggt catccagcgg atagttaatg 720
atcagcccac tgacgcgttg cgcgagaaga ttgtgcaccg ccgctttaca ggcttcgacg 780
ccgcttcgtt ctaccatcga caccaccacg ctggcaccca gttgatcggc gcgagattta 840
atcgccgcga caatttgcga cggcgcgtgc agggccagac tggaggtggc aacgccaatc 900
agcaacgact gtttgcccgc cagttgttgt gccacgcggt tgggaatgta attcagctcc 960
gccatcgccg cttccacttt ttcccgcgtt ttcgcagaaa cgtggctggc ctggttcacc 1020
acgcgggaaa cggtctgata agagacaccg gcatactctg cgacatcgta taacgttact 1080
ggtttcacat tcaccaccct gaattgactc tcttccgggc gctatcatgc cataccgcga 1140
aaggttttgc accattcgat ggtgtcaacg taaatgcatg ccgcttcgcc ttcgcgcgcg 1200
aattgcaagc tgatccgggc ttatcgactg cacggtgcac caatgcttct ggcgtcaggc 1260
agccatcgga agctgtggta tggctgtgca ggtcgtaaat cactgcataa ttcgtgtcgc 1320
tcaaggcgca ctcccgttct ggataatgtt ttttgcgccg acatcataac ggttctggca 1380
aatattctga aatgagctgt tgacaattaa tcatcggctc gtataatgtg tggaattgtg 1440
agcggataac aatttcacac aggaaacaga attaaaagat atgaccatga ttacgccaag 1500
cttgcatgcc tgcaggtcga ctctagagga tcattcgtct tgtgaaaggt tagctgacct 1560

g atg acc gat gcc cac caa gcg gac gat gtc cgt cag cca 1603
Met Thr Ala His Gln Ala Val Arg Gln Pro 1
5
10

ctg aac gag gat cct gag gtg gct gct gcc atc gct ggg gaa 1651
Leu Asn Glu Leu Asp Pro Glu Val Ala Ala Ala Ala Gly Glu Leu 15
20
25
30

gcc cgt caa cgc gat aca gag atg atc gcg gag aac gtt 1699
Ala Arg Gln Arg Asp Thr Leu Glu Met Ala Ser Glu Asn Phe Val 35
40
45

ccc cgt gtt ttg cag gcg cag ggt gtt acc aat aag 1747
Pro Arg Ser Val Leu Gln Ala Gln Gly Ser Val Leu Thr Asn Lys Tyr 50
55
60

gcc gag ggt tac cct ggc cgc cgt tac tac ggt ggt tgc gaa caa gtt 1795
Ala Glu Gly Tyr Pro Gly Arg Arg Tyr Tyr Gly Gly Cys Glu Gln Val 65
70
75

gac atc gag gat gca cgt gat cgt gcg aag gct ctc ggt 1843
Asp Glu Asp Leu Ala Arg Asp Arg Ala Lys Ala Leu Phe Gly 80
85
90

gca	gag		gcc	aat	gtt	cag	cct	cac		ggc	gca	cag	gct	aat	gct	1891
Ala	Glu	Phe	Ala	Asn	Val	Gln	Pro	His	Ser	Gly	Ala	Gln	Ala	Asn	Ala	95 100 105 110
gct	gtg	ctg	atg	act	ttg	gct	gag	cca	ggc	gac	aag	atc	atg	ggt	ctg	1939
Ala	Val	Leu	Met	Thr	Leu	Ala	Glu	Pro	Gly	Asp	Lys		Met	Gly	Leu	115 120 125
	ttg	gct	cat	ggt	ggt	cac	ttg	acc	cac	gga	atg	aag	ttg	aac		1987
Ser	Leu	Ala	His	Gly	Gly	His	Leu	Thr	His	Gly	Met	Lys	Leu	Asn	Phe	130 135 140
tcc	gga	aag	ctg	tac	gag	gtt	gtt	gcg	tac	ggt	gtt	gat	cct	gag	acc	2035
Ser	Gly	Lys	Leu	Tyr	Glu	Val	Val	Ala	Tyr	Gly	Val	Asp	Pro	Glu	Thr	145 150 155
atg	cgt	gtt	gat	atg	gat	cag	gtt	cgt	gag		gct	ctg	aag	gag	cag	2083
Met	Arg	Val	Asp	Met	Asp	Gln	Val	Arg	Glu		Ala	Leu	Lys	Glu	Gln	160 165 170
cca	aag	gta		atc	gct	ggc	tgg		gca	tac	cct	cgc	cac		gat	2131
Pro	Lys	Val			Ala	Gly	Trp	Ser	Ala	Tyr	Pro	Arg	His	Leu	Asp	175 180 185 190
	gag	gct		cag			gct	gcg	gaa	gtt	ggc	gcg	aag	ctg	tgg	2179
Phe	Glu	Ala	Phe	Gln	Ser		Ala	Ala	Glu	Val	Gly	Ala	Lys	Leu	Trp	195 200 205
gtc	gat	atg	gct	cac		gct	ggt		gtt	gct	gct	ggt	ttg	cac	cca	2227
Val	Asp	Met	Ala	His	Phe	Ala	Gly	Leu	Val	Ala	Ala	Gly	Leu	His	Pro	210 215 220
agc	cca	gtt	cct	tac		gat	gtt	gtt		tcc	act	gtc	cac	aag	act	2275
Ser	Pro	Val	Pro	Tyr	Ser	Asp	Val	Val	Ser	Ser	Thr	Val	His	Lys	Thr	225 230

																235
ttg	ggt	gga	cct	cgt	tcc	ggc	atc		ctg	gct	aag	cag	gag	tac	gcg	2323
Leu	Gly	Gly	Pro	Arg	Ser	Gly			Leu	Ala	Lys	Gln	Glu	Tyr	Ala	240
																245
																250
aag	aag	ctg	aac		tcc	gta		cca	ggt	cag	cag	ggt	ggt	cct	ttg	2371
Lys	Lys	Leu	Asn	Ser	Ser	Val	Phe	Pro	Gly	Gln	Gln	Gly	Gly	Pro	Leu	255
																260
																265
																270
atg	cac	gca	gtt	gct	gcg	aag	gct	act		ttg	aag		gct	ggc	act	2419
Met	His	Ala	Val	Ala	Ala	Lys	Ala	Thr	Ser	Leu	Lys		Ala	Gly	Thr	275
																280
																285
gag	cag		cgt	gac	cgt	cag	gct	cgc	acg	ttg	gag	ggt	gct	cgc		2467
Glu	Gln	Phe	Arg	Asp	Arg	Gln	Ala	Arg	Thr	Leu	Glu	Gly	Ala	Arg		290
																295
																300
	gct	gag	cgt	ctg	act	gct		gat	gcg	aag	gcc	gct	ggc	gtg	gat	2515
Leu	Ala	Glu	Arg	Leu	Thr	Ala	Ser	Asp	Ala	Lys	Ala	Ala	Gly	Val	Asp	305
																310
																315
gtc	ttg	acc	ggt	ggc	act	gat	gtg	cac	ttg	gtt	ttg	gct	gat	ctg	cgt	2563
Val	Leu	Thr	Gly	Gly	Thr	Asp	Val	His	Leu	Val	Leu	Ala	Asp	Leu	Arg	320
																325
																330
aac	tcc	cag	atg	gat	ggc	cag	cag	gcg	gaa	gat	ctg	ctg	cac	gag	gtt	2611
Asn	Ser	Gln	Met	Asp	Gly	Gln	Gln	Ala	Glu	Asp	Leu	Leu	His	Glu	Val	335
																340
																345
																350
ggt	atc	act	gtg	aac	cgt	aac	gcg	gtt	cct		gat	cct	cgt	cca	cca	2659
Gly		Thr	Val	Asn	Arg	Asn	Ala	Val	Pro	Phe	Asp	Pro	Arg	Pro	Pro	355
																360
																365
atg	gtt	act		ggt	ctg	cgt		ggt	act	cct	gcg	ctg	gct	acc	cgt	2707
Met	Val	Thr	Ser	Gly	Leu	Arg		Gly	Thr	Pro	Ala	Leu	Ala	Thr	Arg	370
																375

```
                                                                                380
ggt       gat       cct  gca       act  gag  gtt  gca  gac  atc       ggt  act       275
                                                                              5
Gly  Phe  Asp       Pro  Ala  Phe  Thr  Glu  Val  Ala  Asp            Gly  Thr       385
                                                                                390
                                                                                395
gct  ttg  gct  aat  ggt  aag  tcc  gca  gac       gag       ctg  cgt  ggc  cgt       280
                                                                              3
Ala  Leu  Ala  Asn  Gly  Lys  Ser  Ala  Asp       Glu  Ser  Leu  Arg  Gly  Arg       400
                                                                                405
                                                                                410
gta  gca  aag       gct  gca  gat  tac  cca  ctg       gag  ggc  ttg  gaa  gac       285
                                                                              1
Val  Ala  Lys  Leu  Ala  Ala  Asp  Tyr  Pro  Leu  Tyr  Glu  Gly  Leu  Glu  Asp       415
                                                                                420
                                                                                425
                                                                                430
tgg            acc            atc            gtc            taa                     2866
Trp                      Thr                      Ile                      Val
< 210  4
>
< 211  434
>
< 212  PRT
>
< 400  4
>
```