



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2011년10월17일  
(11) 등록번호 10-1073370  
(24) 등록일자 2011년10월07일

(51) Int. Cl.  
C12Q 1/00 (2006.01) G06F 19/00 (2011.01)  
(21) 출원번호 10-2006-7002048  
(22) 출원일자(국제출원일자) 2004년07월29일  
심사청구일자 2008년12월30일  
(85) 번역문제출일자 2006년01월27일  
(65) 공개번호 10-2006-0056970  
(43) 공개일자 2006년05월25일  
(86) 국제출원번호 PCT/JP2004/011212  
(87) 국제공개번호 WO 2005/010794  
국제공개일자 2005년02월03일  
(30) 우선권주장  
JP-P-2003-00202842 2003년07월29일 일본(JP)  
(56) 선행기술조사문헌  
Enzyme and Microbial Technology, 26 (2000)  
45-60\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
아지노모토 가부시카가이샤  
일본국 도쿄도 주오구 교바시 1쵸메15반1고  
(72) 발명자  
반 디엔 스티븐  
일본 가나가와켄 2108681 가와사키시 가와사키쿠  
스즈키초 1-1  
이와타니 신타로  
일본 가나가와켄 2108681 가와사키시 가와사키쿠  
스즈키초 1-1  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
이범래, 장훈

전체 청구항 수 : 총 6 항

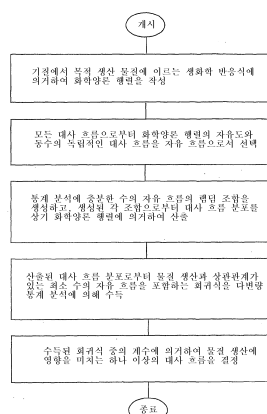
심사관 : 문동현

(54) 물질 생산에 영향을 미치는 대사 흐름을 결정하는 방법

(57) 요약

세포를 사용한 물질 생산에 영향을 미치는 대사 흐름은, 1) 기질에서 목적 생산 물질에 이르는 생화학 반응식에 의거하여 화학양론 행렬을 작성하고, 2) 모든 대사 흐름으로부터 화학양론 행렬의 자유도와 동수의 독립적인 대사 흐름을 자유 흐름으로서 선택하고, 3) 통계 분석에 충분한 수의 자유 흐름의 랜덤 조합을 생성하고, 생성된 각 조합으로부터 대사 흐름 분포를 상기 화학양론 행렬에 의거하여 산출하고, 4) 산출된 대사 흐름 분포로부터 물질 생산과 상관관계가 있는 최소 수의 자유 흐름을 포함하는 회귀식을 다변량 통계 분석에 의해 획득하고, 5) 획득된 회귀식 중의 계수에 의거하여 물질 생산에 영향을 미치는 하나 이상의 대사 흐름을 결정하는 방법에 의해 결정된다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

**우스다 요시히로**

일본 가나가와켄 2108681 가와사키시 가와사키쿠  
스즈키초 1-1

**마쓰이 가즈히코**

일본 가나가와켄 2108681 가와사키시 가와사키쿠  
스즈키초 1-1

**우에다 다쿠지**

일본 가나가와켄 2108681 가와사키시 가와사키쿠  
스즈키초 1-1

**쓰지 유이치로**

일본 가나가와켄 2108681 가와사키시 가와사키쿠  
스즈키초 1-1

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

- 1) 기질에서 목적 생산 물질에 이르는 생화학 반응식에 의거하여 화학양론 행렬을 생성하는 단계,
- 2) 모든 대사 흐름(metabolic flux)으로부터 화학양론 행렬의 자유도와 동수의 독립적인 대사 흐름을 자유 흐름으로서 선택하는 단계,
- 3) 통계 분석에 충분한 수의 자유 흐름의 랜덤 조합을 생성하고, 생성된 각 조합으로부터 대사 흐름 분포를 상기 화학양론 행렬에 의거하여 산출하는 단계,
- 4) 산출된 대사 흐름 분포로부터 물질 생산과 상관관계가 있는 최소 수의 자유 흐름을 포함하는 회귀식을 다변량 통계 분석에 의해 획득하는 단계, 및
- 5) 획득된 회귀식 중의 계수에 의거하여 물질 생산에 영향을 미치는 하나 이상의 대사 흐름을 결정하는 단계를 포함하는, 세포를 이용한 물질 생산에 영향을 미치는 하나 이상의 대사 흐름을 결정하는 방법.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 통계 분석이 다변량 선형 회귀 분석인 방법.

### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 세포가 아미노산, 핵산 또는 유기산을 생산하는 능력을 가진 미생물의 세포인 방법.

### 청구항 4

제1항 또는 제2항에 기재된 방법에 의해 결정된 물질 생산에 영향을 미치는 대사 흐름 또는 상기 대사 흐름을 포함하는 동일한 독립적인 대사 흐름 그룹에 속하는 임의의 대사 흐름 중에서, 상기 대사 흐름이 물질 생산과 정(positive)의 상관관계를 보이는 경우에 이에 관한 활성이 증가되도록 하거나, 상기 대사 흐름이 물질 생산과 부(negative)의 상관관계를 보이는 경우에 이에 관한 활성이 저하되도록 하거나, 또는 상기 둘 모두에 해당하도록, 세균주를 변형시킴을 포함하여, 물질 생산 능력을 가진 세균주를 생성하는 방법.

### 청구항 5

제4항에 기재된 방법에 의해 생성된 세균주를 배양 배지에서 배양하여 당해 배양 배지 또는 세균의 세포 내에 아미노산, 핵산 또는 유기산인 물질을 생성 축적시키고, 당해 물질을 상기 배양 배지 또는 세포로부터 채취함을 포함하여, 물질을 제조하는 방법.

### 청구항 6

삭제

### 청구항 7

- 1) 기질에서 목적 생산 물질에 이르는 생화학 반응식에 의거하여 화학양론 행렬을 생성하는 수순(procedure),
- 2) 모든 대사 흐름으로부터 화학양론 행렬의 자유도와 동수의 독립적인 대사 흐름을 자유 흐름으로서 선택하는 수순,
- 3) 통계 분석에 충분한 수의 자유 흐름의 랜덤 조합을 생성하고, 생성된 각 조합으로부터 대사 흐름 분포를 상기 화학양론 행렬에 의거하여 산출하는 수순,
- 4) 산출된 대사 흐름 분포로부터 물질 생산과 상관관계가 있는 최소 수의 자유 흐름을 포함하는 회귀식을 다변량 통계 분석에 의해 획득하는 수순, 및
- 5) 획득된 회귀식 중의 계수에 의거하여 물질 생산에 영향을 미치는 하나 이상의 대사 흐름을 결정하는 수순을 포함하는 대사 흐름 결정 방법을 컴퓨터로 실행하기 위한, 세포를 이용한 물질 생산에 영향을 미치는 하나

이상의 대사 흐름을 결정하기 위한 프로그램을 기록하는 컴퓨터-판독가능한 기록 매체.

## 명세서

### 기술분야

[0001] 본 발명은 물질 생산에 영향을 미치는 대사 흐름을 결정하는 방법, 상기 결정 방법을 이용하여 세균주를 생성하는 방법, 상기 결정 방법을 실행하기 위한 프로그램, 및 상기 프로그램을 저장한 기록 매체에 관한 것이다.

### 배경기술

[0002] 흐름 균형 분석(flux balance analysis)으로 호칭되는 대사 흐름 분석( metabolic flux analysis)은, 세포내 생화학적 반응의 화학양론 모델을 구축하고 선형 최적화함으로써 세포내 대사 흐름 분포를 추정하는 기술이다. 이러한 기술은 미생물 내의 생화학적 반응계의 능력에 대해 연구하거나, 상이한 외부 조건하에서 세포내 대사 흐름을 추정하는데 사용되어왔다[비-특허문헌 1, 2 및 3]. 또한, 에스체리키아(*Escherichia coli*)에 대한 화학양론 모델이 구축되었다는 것이 보고되었다[비-특허문헌 4 및 5]. 또한, 아미노산 생산에 사용되는 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)의 리신 생산을 위한 대사 공학에서 이러한 화학양론 모델을 사용하는 예가 알려졌다[비-특허문헌 6]. 추가로, 대사 흐름 분석을 위한 다수의 이론적 또는 실험적 방법 및 이들의 응용이 보고되었다[비-특허문헌 7, 8 및 특허문헌 1, 2 및 3]. 특허문헌 1은 화학양론 모델에 의거한 성장에 요구되는 유전자를 예측하는 방법을 제시한다. 특허문헌 2는 세포에 최적 기능을 부여하기 위하여 세포를 유전학적 내지 진화학적으로 변화시키기는 기법을 제시한다. 또한, 특허문헌 3은 화학양론 모델에 대하여, 질적 동력학 정보의 제한, 질적 제어 정보의 제한, 및 상이한 조건하에 DNA 마이크로어레이 실험 데이터에 의거한 제한을 적용하는 방법을 제시한다. 비록 이들 방법이 모두 보다 바람직한 세포내 대사 흐름 분포를 추정하기 위한 방법이지만, 세포의 물질 생산을 직접적으로 향상시키기 위한 표적으로서 흐름을 이론적으로 예측하는 방법을 제시하지는 못하였다.

[0003] <비-특허문헌 1>

[0004] Varma, A. and Palsson, B.O. Appl. Environ. Microbiol. 60:3724-3731, 1994

[0005] <비-특허문헌 2>

[0006] Schilling, C.H. et al., Biotechnol. Prog., 15:288-295, 1999

[0007] <비-특허문헌 3>

[0008] Schilling, C.H. et al., Biotechnol. Prog., 15:296-303, 1999

[0009] <비-특허문헌 4>

[0010] Pramanik, J. and Keasling, J.D., Biotechnol. Bioeng., 56:398-421, 1997

[0011] <비-특허문헌 5>

[0012] Ibarra, R.U. et al., Nature, 420:186-189, 2002

[0013] <비-특허문헌 6>

[0014] Vallino, J.J. and Stephanopoulos, G., Biotechnol. Bioeng., 41:633-646, 1993

[0015] <비-특허문헌 7>

[0016] Wiechert, W., Journal of Biotechnology, 94:37-63, 2002

[0017] <비-특허문헌 8>

[0018] Wiechert, W., Metabolic Engineering, 3:195-205, 2001

[0019] <특허문헌 1>

- [0020] International Publication No. W000/46405
- [0021] <특허문헌 2>
- [0022] International Publication No. W002/061115
- [0023] <특허문헌 3>
- [0024] International Publication No. W002/055995
- [0025] 발명의 개요
- [0026] 본 발명은, 미생물 등의 세포를 이용하여 아미노산, 유기산 및 핵산과 같은 물질을 생산하는데 있어서 표적 생성물 또는 바이오매스(biomass)의 수율 및 생성물의 생산성을 향상시키기 위하여, 세포내 대사 흐름 분석을 이용하여으로써 세포를 효과적으로 변형시키는 수법을 예측하는 방법을 제공한다. 보다 구체적으로, 본 발명은 물질 생성에 영향을 미치는 대사 흐름을 결정하는 방법, 상기 결정 방법을 이용하여 세균주를 생산하는 방법, 상기 결정 방법을 실행하기 위한 프로그램, 및 상기 프로그램을 저장한 기록 매체를 제공한다.
- [0027] 상기 목적의 관점에서, 본 발명의 발명자들은 근면히 연구한 결과, 물질 생산에 영향을 미치는 대사 흐름이, 기질로부터 목적 생산 물질(생성시키고자 하는 물질)에 이르는 생화학 반응식에 의거하여 계산된 화학양론 행렬의 자유도와 동수의 자유 흐름을 선택하고, 통계 분석에 충분한 수의 자유 흐름의 각 랜덤 조합으로부터 화학양론 행렬에 의거하여 대사 흐름 분포를 산출하고, 산출된 대사 흐름 분석으로부터 물질 생산과 상관관계가 있는 최소 수의 자유 흐름을 포함하는 회귀식을 통계 분석에 의해 수득함으로써, 결정될 수 있다는 것을 밝혀내었다. 본 발명은 상기한 발견을 토대로 하여 완성되었으며, 적어도 아래의 요지를 포함한다:
- [0028] (1)
- [0029] 1) 기질에서 목적 생산 물질에 이르는 생화학 반응식에 의거하여 화학양론 행렬을 작성하는 단계,
- [0030] 2) 모든 대사 흐름으로부터 화학양론 행렬의 자유도와 동수의 독립적인 대사 흐름을 자유 흐름으로서 선택하는 단계,
- [0031] 3) 통계 분석에 충분한 수의 자유 흐름의 랜덤 조합을 생성하고, 생성된 각 조합으로부터 대사 흐름 분포를 상기 화학양론 행렬에 의거하여 산출하는 단계,
- [0032] 4) 산출된 대사 흐름 분포로부터 물질 생산과 상관관계가 있는 최소 수의 자유 흐름을 포함하는 회귀식을 다변량 통계 분석에 의해 수득하는 단계, 및
- [0033] 5) 수득된 회귀식 중의 계수에 의거하여 물질 생산에 영향을 미치는 하나 이상의 대사 흐름을 결정하는 단계
- [0034] 를 포함하는, 세포를 이용한 물질 생산에 영향을 미치는 하나 이상의 대사 흐름을 결정하는 방법.
- [0035] (2) 상기 (1) 항목에 있어서, 통계 분석이 다변량 선형 회귀 분석인 방법.
- [0036] (3) 상기 (1) 또는 (2) 항목에 있어서, 세포가 아미노산, 핵산 또는 유기산을 생산하는 능력을 가진 미생물의 세포인 방법.
- [0037] (4) 상기 (1) 내지 (3) 항목 중의 어느 하나에 기재된 방법에 의해 결정된 물질 생산에 영향을 미치는 대사 흐름 또는 상기 대사 흐름을 포함하는 동일한 독립적인 대사 흐름 그룹에 속하는 임의의 대사 흐름 중에서, 상기 대사 흐름이 물질 생산과 정(positive)의 상관관계를 보이는 경우에 이에 관한 활성이 증가되도록 하거나, 상기 대사 흐름이 물질 생산과 부(negative)의 상관관계를 보이는 경우에 이에 관한 활성이 저하되도록 하거나, 또는 상기 둘 모두에 해당하도록, 세균주를 변형시킴을 포함하여, 물질 생산 능력을 가진 세균주를 생성하는 방법.
- [0038] (5) 상기 (4) 항목에 기재된 방법에 의해 생성된 세균주를 배양 배지에서 배양하여 당해 배양 배지 또는 세균의 세포 내에 아미노산, 핵산 또는 유기산인 물질을 생성 축적시키고, 당해 물질을 상기 배양 배지 또는 세포로부터 채취함을 포함하여, 물질을 제조하는 방법.
- [0039] (6)
- [0040] 1) 기질에서 목적 생산 물질에 이르는 생화학 반응식에 의거하여 화학양론 행렬을 생성하는 수순(procedure),

- [0041] 2) 모든 대사 흐름으로부터 화학양론 행렬의 자유도와 동수의 독립적인 대사 흐름을 자유 흐름으로서 선택하는 수순,
- [0042] 3) 통계 분석에 충분한 수의 자유 흐름의 랜덤 조합을 생성하고, 생성된 각 조합으로부터 대사 흐름 분포를 상기 화학양론 행렬에 의거하여 산출하는 수순,
- [0043] 4) 산출된 대사 흐름 분포로부터 물질 생산과 상관관계가 있는 최소 수의 자유 흐름을 포함하는 회귀식을 다변량 통계 분석에 의해 획득하는 수순, 및
- [0044] 5) 획득된 회귀식 중의 계수에 의거하여 물질 생산에 영향을 미치는 하나 이상의 대사 흐름을 결정하는 수순을 포함하는 대사 흐름 결정 방법을 컴퓨터로 실행하기 위한, 세포를 이용한 물질 생산에 영향을 미치는 하나 이상의 대사 흐름을 결정하기 위한 프로그램.
- [0045] (7) 상기 (6) 항목에 기재된 프로그램을 기록하는 컴퓨터-판독가능한 기록 매체.

### 발명의 상세한 설명

- [0051] 이후, 본 발명은 상세히 설명될 것이다.
- [0052] <1> 본 발명의 결정 방법
- [0053] 본 발명의 결정 방법은, 세포를 이용한 물질 생산에 영향을 미치는 대사 흐름을 측정하는 방법이다.
- [0054] 본 발명에 사용된 대사 흐름은, 세포내 생화학 반응의 화학양론 모델 및 대사물질간 질량 작용의 법칙으로부터 유도된 대사 반응 속도(흐름(flux))로서 표현되며; 한편, 본원에 사용된 대사 흐름 분포는, 개개의 대사 흐름이 개개의 생화학 반응에 상당하는, 대사 흐름 전부로 이루어진다.
- [0055] 본 발명에 사용된 세포는, 그것이 물질 생산에 사용되는 한, 특별히 제한되지 않는다. 이의 예로는 각종 배양 세포, 진균, 효모, 각종 세균 등이 포함된다. 유용한 화합물, 예를 들어 아미노산, 핵산 또는 유기산을 생성할 수 있는 능력을 가진 미생물의 세포가 바람직하다. 아미노산, 핵산 또는 유기산을 생성할 수 있는 능력을 가진 미생물로서, 에스체리키아 콜라이, 바실러스(*Bacillus*) 세균, 코리네형 세균 등이 바람직하게 사용된다. 아미노산 생산 능력 및/또는 유기산 생산 능력을 가진 미생물이 보다 바람직하다. 유용한 화합물을 생산할 수 있는 능력을 가진 이러한 미생물로서, 예를 들어 에스체리키아 콜라이는 문헌[EP-A 1016710]에 공지되어있고, 바실러스 세균은 문헌[JP-A 2003-259861]에 공지되어있고, 코리네형 세균은 문헌[WO 00/18935]에 공지되어있다. 상기 미생물을, 이의 물질-생산 능력이 향상되도록, 본 발명에 의해 획득될 수 있는 물질 생산에 영향을 미치는 대사 흐름에 관한 정보에 의거하여 변형시킨다.
- [0056] 본 발명의 결정 방법의 제1 단계에서, 화학양론 행렬을 기질에서 목적 생산 물질에 이르는 생화학 반응식에 의거하여 생성한다.
- [0057] 생화학 반응은, 세포내 대사물질이 세포 내에서 효소 반응에 의해 전환되어지는 과정을 말하고, 이는 생물체 유형에 따라 각종 데이터베이스에 축적되었다. 예를 들면, 기관[Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG, [www.genome.ad.jp/kegg/](http://www.genome.ad.jp/kegg/))]이 참조로서 이용될 수 있다.
- [0058] 기질은 탄소원으로서 세포에 의해 통상적으로 사용되는 물질이며, 이의 예로는 글루코스, 수크로스, 프럭토스 등이 포함된다.
- [0059] 생성 물질은 단일 종류의 대사물질뿐만 아니라, 바이오매스(균체)와 같은 대사물질의 집합체를 포함한다. 물질 생산은 통상적으로 물질의 생산 속도로서 평가된다. 특히, 목적 물질이 바이오매스일 때, 이는 바이오매스 수율로서 평가된다. 바이오매스 수율은 글루코스와 같은 기질로부터 단백질, 탄수화물, 핵산 또는 지질과 같은 세포 성분으로의 전환 효율을 나타낸다.
- [0060] 화학양론 행렬은 대사 흐름 분석에 통상적으로 사용되는 행렬이며, 기질에서 목적 생성 물질에 이르는 생화학 반응식을 대사 흐름 분석에 사용되는 통상적인 방법으로 열거함으로써 생성될 수 있다. 세포내 대사 중간체의 준-정상 상태를 가정하는 이러한 방법은 일반적으로 문헌[Savinell, J.M. and Palsson, B.O.J., Theor. Biol., 154:421-454, 1992; Vallino, J.J. and Stephanopoulos, G., Biotechnol. Bioeng., 41:633-646, 1993]에 공지되어있다. 반응식을 열거하는 경우에, 분지 없는 일련의 반응식을 하나의 반응으로서 취급하거나, 반응 전 및 후에 높은 대사 속도의 반응에 의해 전환되는 대사물질을 하나의 대사물질로서 취급함으로써, 반응 경



로가 간략화될 수 있다. 생산 물질이 바이오매스인 경우에, 화학양론 행렬은, 세포 성분으로 이르는 생화학 반응을 열거하는 방법으로 기술될 수 있다.

[0061] 본 발명의 결정 방법의 제2 단계에서, 상기 화학양론 행렬의 자유도와 동수의 독립적인 대사 흐름이 모든 대사 흐름 중에서 자유 흐름으로서 선택된다.

[0062] 독립적인 흐름은, 화학양론식에 의해 정의되는 대사 네트워크 체계 내에서 흐름을 일의적으로 정의하기 위하여 특정되어야 하는 흐름의 세트이다.

[0063] 자유 흐름을 설정하는 방법은, 분석될 상기 체계의 자유도와 동수의 독립적 대사 흐름이 선택될 수 있는 한, 특별히 제한되지 않는다. 비록 임의적으로 선택된 흐름의 독립성이 확인될 수 있어도, 레더(Reder)에 의해 제안된 SIMS 행렬 (정상-상태 내부 대사 화학양론 행렬)이 사용될 수 있다[참조 문헌: Reder, C.J., Theor. Biol., 135:175-201, 1988]. 이 방법에서, 상기 화학양론 행렬의 자유도와 동수의 대사 흐름의 특이 그룹이 상기 생화학 반응식에 의거하여 결정된 대사 흐름 그룹 중에서 결정되며, 대사 흐름이 각각의 결정된 대사 흐름 그룹으로부터 자유 흐름으로서 선택된다. 흐름 그룹 중에서 특이적 그룹을 결정하는 것이, 한 그룹 중의 임의의 흐름이 다른 그룹 중의 흐름에 영향을 주지 않으면서 변화될 수 있다는 것을 보장한다. 따라서, 각 그룹으로부터 하나의 흐름을 독립적인 자유 흐름으로서 선택하는 것이 가능하게 되었다. 자유 흐름이 흐름 그룹으로부터 선택되는 경우, 분지점에 근접한 흐름이 바람직하게 선택된다.

[0064] 본 발명의 결정 방법의 제3 단계에서, 자유 흐름의 랜덤 조합이 통계 분석에 충분한 수로 생성되며, 생성된 각각의 조합으로부터 상기 화학양론 행렬에 의거하여 대사 흐름 분포가 산출된다.

[0065] 자유 흐름의 랜덤 조합은, 앞 단계에서 선택된 자유 흐름에 랜덤 값을 부여하여 상이한 흐름 분포의 조합의 데이터세트를 생성시킴으로써 생성될 수 있다. 자유 흐름에 랜덤 값을 부여하는 방법은, 특이적 경계 내에서 자유 흐름의 조합을 생성시키는 방법이 선택되는 한, 특별히 제한되지 않는다. 상기 특이적 경계는 후의 계산에서 생물학적으로 의미 있는 값을 부여하기 위하여 설정된다. 자유 흐름의 수가 특정 화학양론 행렬의 자유도와 동수인 경우에, 일의적 대사 흐름 분포가 해결될 수 있다. 해결을 위해, 역 행렬을 사용하는 행렬 연산을 일반적으로 사용하며, 모든 흐름은 예를 들어 일정량의 기질로 규정화하는 것이 바람직하다. 기질이 글루코스인 경우에, 모든 흐름 값은 10 mmol의 글루코스 섭취 당 값으로 나타낼 수 있다. 상기한 바와 같이 랜덤 자유 흐름 값으로부터 수득된 대사 흐름 분포의 해법은 생물학적으로 의미가 있어야 한다. 즉, 비-가역 반응의 모든 흐름은 0 이상이어야 하며, 바이오매스 형성 흐름은 0 이상이어야 한다. 보다 바람직한 자유 흐름의 조합을 수득하기 위하여, 세포를 사용한 물질 생산에서 이론적 및/또는 경험적 지식을 토대로 한 조건이 또한 부가될 수 있다. 생성될 조합의 수, 즉 산출될 생물학적으로 의미 있는 흐름 분포의 수는, 그것이 통계 분석에 충분한 한, 특별히 제한되지 않는다. 하나의 자유 흐름에 대하여 3 또는 5 값이 통상적으로 사용된다. 따라서, n개의 자유 흐름이 존재하는 경우에, 조합은 하나의 자유 흐름에 대한 값의 수의 약 n제곱 개이다. 예를 들어, 하나의 자유 흐름에 대하여 3 값이 사용되는 경우에, 조합은 3의 n제곱 ( $3^n$ ) 개이다. 즉, 약 2,200 개 조합이 7개의 자유 흐름( $n=7$ )에 대하여 사용될 수 있다. 달리, 생물학적으로 의미 있는 흐름 분포의 데이터세트 내의 각 자유 흐름에 대한 값의 수가 선택된 자유 흐름 또는 부가적 조건에 따라 변화될 수 있기 때문에, n 개의 자유 흐름에 대하여 사용될 수 있는 조합의 수는 총 약 3의 n제곱 ( $3^n$ ) 개 내지 약 5의 n제곱 ( $5^n$ ) 개이다. 이러한 수로 생물학적으로 의미 있는 흐름 분포의 해법을 구하기 위하여, 하나의 자유 흐름에 대하여 6 내지 10 값을 사용하는 랜덤 자유 흐름의 조합, 즉 6의 n제곱 ( $6^n$ ) 개 내지 10의 n제곱 ( $10^n$ ) 개의 조합으로부터 시작하는 것이 일반적이다.

[0066] 본 발명의 결정 방법의 제4 단계에서, 물질 생산과의 상관관계를 보여주는 최소 수의 자유 흐름을 포함하는 회귀식은 다변량 통계 분석에 의해 대사 흐름 분포 (대사 흐름 분포의 데이터세트)로 부터 수득된다.

[0067] 앞 단계에서 수득된 자유 흐름의 랜덤 조합으로부터 산출된 흐름 분포의 데이터세트에 대한 다변량 통계 분석을 수행함으로써, 물질 생산과의 상관관계를 보여주는 최소 수의 자유 흐름을 포함하는 회귀식이 수득될 수 있다. 다변량 통계 분석 (다변량 비-선형 회귀 분석 및 다변량 선형 회귀 분석 포함)은, 물질 생산과 자유 흐름 조합의 상관관계를 조사할 수 있는 기법을 선택하는 한, 어떠한 기법으로도 수행할 수 있다. 그러나, 다변량 선형 회귀 분석이 유용하다. 이 방법은 예를 들어 문헌[Kachigan, S.K., Chapter 4, Regression Analysis in Multivariate Statistical Analysis 2nd Ed., Radius Press, New York, pp.160-193]에 기재되어 있다.

[0068] "물질 생산과의 상관관계를 보여준다"는 표현은, 결정 계수가 유의적으로 크다는 것을 의미하며, "유의적으로

크다"는 표현은 통상적으로 결정 계수  $R^2$ 가 0.8 이상, 바람직하게는 0.9 이상이라는 것을 의미한다.

[0069] 물질 생산과의 상관관계를 보여주는 최소 수의 자유 흐름 (항)을 포함하는 회귀식은, 항의 수를 순차적으로 변화시켜 회귀식을 수득하는 방법으로 수득될 수 있다. 항의 각 수를 포함하는 최대 결정 계수를 보여주는 이러한 식을 구하여, 유의적으로 큰 결정 계수를 보여주는 최소 수의 항을 포함하는 회귀식을 선택할 수 있다. 달리, 항의 제외로 인한 결정 계수의 저하 정도를 조사하기 위하여 총 항에서 하나의 항을 제외하여 회귀식을 수득할 수 있으며; 총 항으로서, 결정 계수의 저하 정도가 적은 항을 제외한 항들을 사용하여 동일한 수순 (procedure)을 반복할 수 있고; 물질 생산과의 상관관계를 보여주는 회귀식이 더 이상 수득될 수 없는 경우에, 직전의 회귀식이 선택될 수 있다.

[0070] 이들 수학적 처리는 개별적으로 프로그래밍될 수 있으나, 이들은 시판되는 수학 계산 프로그램, 예를 들면 MatLab<sup>®</sup> (상품명, MathWorks) 및 Mathematica<sup>®</sup> (상품명, Wolfram Research)을 사용하여 쉽게 실행될 수 있다.

[0071] 본 발명의 결정 방법의 제5 단계에서, 물질 생산에 영향을 미치는 대사 흐름은 수득된 회귀식 중의 계수에 의거하여 결정된다.

[0072] 미생물 등의 세포를 이용한 물질 생산, 특히 물질 생산에 중요한 바이오매스 수율 또는 생성 물질 수율에 대한 자유 흐름의 기여도는, 앞의 단계에서 수득된 회귀식을 이용하여 결정할 수 있다. 즉, 회귀식에서 나타나는 자유 흐름은 물질 생산에 영향을 미치는 것으로서 결정될 수 있다. 또한, 회귀식 중의 계수가 기여도의 크기를 나타내기 때문에, 실질적으로 큰 계수를 갖는 자유 흐름 (흐름이 규격화될 때, 상대 계수의 절대값이 큰 자유 흐름)은, 물질 생산에 크게 영향을 미치는 대사 흐름으로서 결정될 수 있다.

[0073] 본 발명의 결정 방법은, 세균주에 중요한 정보, 즉 자유 흐름이 표적 물질의 생성에 큰 영향을 주며, 자유 흐름이 표적 물질의 생성에 정(positive)의 효과 또는 부(negative)의 효과를 갖는다는 정보를 제공할 수 있다. 표적 생성물의 수율 및 생산성에 유리하게 영향을 주도록 변화시킬 필요가 있는 흐름이 또한 예측될 수 있다.

[0074] <2> 본 발명의 생성 방법

[0075] 발명의 생성 방법은 물질 생산 능력을 가진 세균주를 작제하는 방법이다. 본 방법은, 본 발명의 결정 방법에 의해 결정된 물질 생산에 영향을 미치는 대사 흐름 또는 상기 대사 흐름을 포함하는 동일한 독립적인 대사 흐름 그룹에 속하는 임의의 대사 흐름 중에서, 상기 대사 흐름이 물질 생산과 정(positive)의 상관관계를 보이는 경우에 이에 관한 활성이 증가되도록 하고/하거나, 상기 대사 흐름이 물질 생산과 부(negative)의 상관관계를 보이는 경우에 이에 관한 활성이 저하되도록 함으로써, 세균주를 변형시킴을 포함한다.

[0076] 본 발명의 결정 방법에 의해 결정된 대사 흐름에 추가하여, 상기 대사 흐름을 포함하는 동일한 독립적인 대사 흐름 그룹에 속하는 임의의 대사 흐름에 관여하는 활성이 변경될 수 있는데, 이는 동일한 대사 흐름에 포함되는 대사 흐름이 또한 동일한 효과를 갖는다고 간주되기 때문이다. 그러나, 실제 대사 공학 기법의 용이성 및 효소 활성 변화의 효과의 정도는 흐름에 관여하는 효소에 따라 달라질 것으로 예상된다. 세균 생성의 개량시 노력과 효과가 고려된다면, 분지점에 근접한 흐름이 효과적일 것이라고 예상될 수 있다. 예를 들면, 펜토스 포스페이트 경로에서, 글루코스-6-포스페이트 데하이드로게나제의 선택이 트랜스케툴라제의 선택 만큼 효과적일 것으로 예상된다.

[0077] 특정 흐름에 관여하는 활성을 변화시키기 위한 각종 방법이 공지되어있다. 효소 활성을 증가시키기 위한 방법으로서, 플라스미드와 같은 염색체의 DNA를 사용하여 효소를 암호화하는 유전자의 복사 수를 증가시키거나, 염색체 상의 복사 수를 증가시키거나, 효소를 암호화하는 유전자의 프로모터 속에 돌연변이를 도입하여 활성을 증가시키거나, 또는 프로모터를 보다 강한 프로모터로 대체하는 방법이 공지되어있다. 효소 활성을 저하시키기 위한 방법으로서, 효소를 암호화하는 유전자를 파괴하거나, 효소를 암호화하는 유전자의 프로모터 속에 돌연변이를 도입하여 활성을 저하시키거나, 프로모터를 보다 약한 프로모터로 대체하는 방법이 공지되어있다. 이들 방법에 의해, 특정 흐름에 관여하는 활성을 변화시켜, 표적 생성물의 수율 또는 생산성을 향상시킬 수 있다. 예를 들면, 후에 기술될 실시예에 기재되는 바와 같이, 향상된 리신-생산 능력을 가진 세균주가, 에스체리키아 콜라이를 사용한 리신 생산에서 포스포엔올피루베이트 카복실라제의 활성을 증가시킴으로써 생성될 수 있으며, 국제 공보 제WO 01/53459호는, 포스포엔올피루베이트 카복실라제 활성을 증가시킴으로써 리신 생성을 향상시키는 예를 제시한다. 따라서, 본 발명의 결정 방법에 의거한 본 발명의 생성 방법은 극히 유용한 것으로 입증되었다.



- [0078] <3> 본 발명의 제조 방법
- [0079] 본 발명은, 아미노산, 핵산 또는 유기산을 생성할 수 있는 능력을 가진 세균을 배지에서 배양하여, 당해 배지 또는 세균의 세포 내에 아미노산, 핵산 또는 유기산을 축적시키고, 당해 배지 또는 세포로부터 아미노산, 핵산 또는 유기산을 채취하는 단계를 포함하여, 아미노산, 핵산 또는 유기산을 제조하는 방법이다. 본원에서 사용된 "핵산"이란 용어는 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드를 의미한다.
- [0080] 본 발명에 사용된 배양 배지는, 미생물을 사용한 아미노산, 핵산 또는 유기산의 발효 생산에 통상적으로 사용되는 배지일 수 있다. 탄소원, 질소원, 무기 이온 및 기타 유기 성분들을 포함하는 통상의 배지가, 필요에 따라 사용될 수 있다. 탄소원으로서, 글루코스, 수크로스, 갈락토스, 프럭토스 및 전분 가수분해물과 같은 각종 당류, 글리세롤 및 소르비톨과 같은 각종 알코올, 및 푸마르산, 시트르산 및 석신산과 같은 각종 유기산이 사용될 수 있다. 질소원으로서, 황산암모늄, 염화암모늄 및 인산암모늄과 같은 각종 무기 암모늄 염, 대두 가수분해물, 암모니아 가스 및 암모니아 수용액과 같은 유기 질소 등이 사용될 수 있다. 유기 미량 영양원으로서, 비타민 B<sub>1</sub>, 호모세린 또는 호모 추출물 등과 같은 요구 물질을 첨가하는 것이 바람직하다. 추가로, 인산칼륨, 황산마그네슘, 철 이온, 망간 이온의 미량이 첨가될 수 있다. 배양에 사용된 배지는, 당해 배지가 탄소원, 질소원 및 무기 이온, 및 필요에 따라, 유기 미량 영양원을 포함하는 한, 합성 배지 또는 천연 배지일 수 있다.
- [0081] 배양은 바람직하게는 호기성 조건하에, 24 내지 37℃의 온도 및 5 내지 9의 pH에서 1 내지 7일 동안 수행될 수 있다. 배양 중의 pH는 무기 또는 유기 산 또는 알칼린 물질, 예를 들어 암모니아 가스 등으로 조절할 수 있다. 배양 배지로부터의 아미노산, 핵산 또는 유기산의 채취는 통상의 방법, 예를 들어 이온-교환 수지법, 침전법 및 기타 공지된 방법, 및 이들의 조합을 사용하여 수행할 수 있다. 아미노산, 핵산 또는 유기산이 세포 내에 축적되는 경우에, 아미노산, 핵산 또는 유기산은, 초음파 등으로 세포를 파괴하고 원심분리로 세포 부산물을 제거함으로써 수득된 상청액으로부터 이온-교환 수지법 등에 의해 채취할 수 있다.
- [0082] <4> 본 발명의 프로그램
- [0083] 본 발명은 또한 본 발명의 결정 방법을 실행하기 위한 프로그램을 제공한다. 본 발명의 프로그램은,
- [0084] 1) 기질에서 목적 생산 물질에 이르는 생화학 반응식에 의거하여 화학양론 행렬을 생성하는 수순,
- [0085] 2) 모든 대사 흐름으로부터 화학양론 행렬의 자유도와 동수의 독립적인 대사 흐름을 자유 흐름으로서 선택하는 수순,
- [0086] 3) 통계 분석에 충분한 수의 자유 흐름의 랜덤 조합을 생성하고, 생성된 각 조합으로부터 대사 흐름 분포를 상기 화학양론 행렬에 의거하여 산출하는 수순,
- [0087] 4) 산출된 대사 흐름 분포로부터 물질 생산과 상관관계가 있는 최소 수의 자유 흐름을 포함하는 회귀식을 다변량 통계 분석에 의해 수득하는 수순, 및
- [0088] 5) 수득된 회귀식 중의 계수에 의거하여 물질 생산에 영향을 미치는 하나 이상의 대사 흐름을 결정하는 수순을 포함하는 대사 흐름 결정 방법을 컴퓨터로 실행하기 위한, 세포를 이용한 물질 생산에 영향을 미치는 하나 이상의 대사 흐름을 결정하기 위한 프로그램이다.
- [0089] 추가로, 본 발명의 또 다른 양태는 상기 프로그램을 기록함을 특징으로 하는 컴퓨터-판독가능한 기록 매체에 관한 것이다.
- [0090] 본 발명의 플로우차트는 도 3에 도시되어 있다. 각 수순은 본 발명의 결정 방법 중의 단계 1) 내지 5)를 실행하기 위한 수순이다. 이들 수순을 컴퓨터로 실행할 수 있는 프로그램은 통상적 프로그래밍 방법에 따라 작성될 수 있다.
- [0091] 또한, 본 발명에 따른 프로그램은 컴퓨터-판독가능한 기록 매체 중에 저장될 수 있다. 본원에 사용된 "기록 매체"란 용어는, 플로피(Floppy) (등록 상표) 디스크, 광자기 디스크, ROM, EPROM, EEPROM, CD-ROM, MO 및 DVD와 같은 임의의 "이동식 물리 매체", 각종 컴퓨터 내에 내장된 ROM, RAM 및 HD와 같은 임의의 "고정식 물리 매체", 및 LAN, WAN 및 인터넷으로 대표되는 네트워크를 통해 프로그램을 전송하기 위한 통신 회로 및 운송파와 같이 프로그램을 일시적으로 저장하기 위한 "통신 매체"를 포함한다.

[0092] 또한, "프로그램"은 임의의 언어 또는 연산 표기법으로 기술된 데이터를 처리하기 위한 것이며, 소스 코드(source code) 또는 2진 코드(binary code)와 같은 이의 형식은 제한되지 않는다. 상기 "프로그램"은 반드시 단일 프로그램으로 제한될 필요는 없으며, 2 이상의 모듈 또는 라이브러리를 포함하는 분산 구성으로 기술되고, 운영 체제(OS)로 대표되는 별개의 프로그램과 협동하여 이의 기능을 달성하는 프로그램이 포함된다. 익히-공지된 구성 및 수순은, 실시 태양에 제시된 각 장치에서 기록 매체 내에 저장된 프로그램을 판독하기 위한 구체적인 구성, 판독 수순, 판독 후 설치 수순 등으로서 사용될 수 있다.

## 실시예

[0093] 본 발명은 실시예를 참조하여 추가로 설명될 것이다.

### [0094] 실시예 1

#### [0095] L-리신에 관한 대사 흐름의 결정

##### [0096] (1) 화학양론 행렬의 생성

[0097] 세포내 대사 중간체의 준-정상 상태를 가정하여, 대사 흐름을 계산하기 위한 화학양론식을 구축하였다 [참조 문헌: Savinell, J.M. and Palsson, B.O.J., Theor. Biol., 154:421-454, 1992; Vallino, J.J. and Stephanopoulos, G., Biotechnol. Bioeng., 41:633-646, 1993]. 이러한 모델에 포함된 반응식은 표 2에 제시되어있다. 본 발명에서 사용된 약어의 설명은 표 1에 기재되어있다. 분지 없는 몇몇 반응을 통합하여, 상기식을 간편화하였다. 펜토스 포스페이트 경로는 복잡하기 때문에, 이는 2개의 식으로 나타내었다. 보고된 데이터는 바이오매스의 성분비에 대하여 사용되었으며[참조 문헌: Neidhardt, F.C. et al., Physiology of the Bacterial Cell., Sinauer Associates, Massachusetts, 1990], 바이오매스는 반응식 [68]을 사용하여 나타내었다. 이러한 모델에서 화학양론 행렬의 자유도는 7 이었다.

표 1a

3PG	3-포스포 -D-글리세르산
AcCoA	아세틸 조효소 A
AcOH	아세트산
AIVA	A-케토 -이소발레르산
AKG	2-옥소글루타르산
Ala	알라닌
ALC	아세토하이드록시산
Arg	아르기닌
ASA	아스파르트산 세미알데하이드
Asn	아스파라긴
Asp	아스파르트산
CHR	코리슴산(Chorismic acid)
Cit	시트르산
CO2	이산화탄소
CoA	조효소 A
Cys	시스테인
DDP	디하이드로디피콜린산
E4P	에리트로스 -4-포스페이트
F6P	프럭토스 -6-포스페이트
FBP	프럭토스 비스포스페이트
Form	포름산
Fum	푸마르산
G6P	글루코스 -6-포스페이트
GAP	글리세르알데히드 포스페이트
Glc	글루코스
Gln	글루타민
Glu	글루탐산
Gly	글리신
Glyox	글리옥살산
His	히스티딘
Hse	호모세린
Ile	이소루이신
Ind	인돌 글리세롤 포스페이트
Isocit	이소시트르산
Leu	루이신
Lys	리신
Lysext	리신 산물 (세포외)
Mal	말산
Met	메티오닌

[0098]

표 1b

mDAP	메소 -디아미노피멜산
mTHF	메틸 테트라하이드로폴레이트
NH3	암모니아
OAA	옥살로아세트산
PEP	포스포엔올피루브산
Phe	페닐알라닌
PPA	프레벤산
Pro	프롤린
PRPP	포스포리보실 피로포스페이트
Pyr	피루브산
R5P	리보스 -5-포스페이트
Ribu5P	리불로스 -5-포스페이트
SDAP	N-석시닐-L-2,6-디아미노헵탄디오에이트
SKA	시킴산(Shikimic acid)
Sed7P	D-세도헵톨로스 -7-포스페이트
Ser	세린
Suc	석신산
SucCoA	석시닐 조효소 A
THDP	테트라하이드로디피콜린산
THF	테트라하이드로폴산
Thr	트레오닌
Trp	트립토판
Tyr	티로신
Val	발린
X5P	크실룰로스 -5-포스페이트

[0099]

## 표 2a

반응식에 사용된 목록. 역반응은 r로 표시한다.

```
[1]      Glc + PEP --> G6P + Pyr
[2]      G6P + 2NADP --> Ribu5P + 2NADPH + CO2
[3] r    Ribu5P --> R5P
[4] r    Ribu5P --> X5P
[5] r    X5P + R5P --> Sed7P + GAP
[6] r    Sed7P + GAP --> E4P + F6P
[7] r    X5P + E4P --> F6P + GAP
[8] r    G6P --> F6P
[9] r    F6P + ATP --> FBP +ADP
[10] r   FBP --> 2GAP
[11] r   GAP + NAD +ADP --> 3PG + NADH + ATP
[12] r   3PG -->PEP
[13]     PEP + ADP --> Pyr + ATP
[14]     Pyr + NAD + CoA --> AcCoA + NADH +CO2
[15]     PEP + CO2 --> OAA
[16]     AcCoA + ADP --> AcOH + ATP + CoA
[17]     AcCoA + OAA --> Cit + CoA
[18] r   Cit --> Isocit
[19] r   Isocit + NADP --> aKG + NADPH + CO2
[20]     aKG + NADPH + NH3 --> Glu + NADP
[21]     aKG + NAD + CoA --> SucCoA + NADH + CO2
[22] r   SucCoA + ADP --> Suc + ATP + CoA
[23] r   Suc + FAD --> Fum +FADH
[24] r   Fum --> Mal
[25] r   Mal + NAD --> OAA +NADH
[26]     OAA + Glu --> Asp + aKG
[27]     Asp + ATP + NADPH --> ASA + ADP + NADP
[28]     ASA + Pyr --> DDP
[29]     DDP + NADPH --> THDP + NADP
[30]     THDP + SucCoA + Glu --> SDAP + aKG + CoA
[31]     SDAP --> mDAP + Suc
[32]     mDAP --> Lys + CO2
[33] r   Glu + ATP + NH3 --> Gln + ADP
[34]     Glu + 2NADPH + ATP --> Pro + 2NADP + ADP
[35]     Glu + 5ATP + NADPH + Gln + Asp + AcCoA + CO2 -->
        Arg + 5ADP + NADP + aKG + Fum
[36]     ASA + NADPH --> Hse + NADP
```

[0100]

표 2b

```

[37] Hse + SucCoA + Cys + mTHF --> Met + Suc + CoA + THF
      + Pyr + NH3
[38] Hse + ATP --> Thr + ADP
[39] Thr + Glu + NADPH + Pyr --> Ile + aKG + NADP + NH3
      + CO2
[40] r 3PG --> Ser
[41] r Ser + THF --> Gly + mTHF
[42] r PEP + E4P + NADPH --> SKA + NADP
[43] CHR --> PPA
[44] PPA + NAD + Glu --> Tyr + NADH + CO2 + Akg
[45] PPA + Glu --> Phe + CO2 + aKG
[46] CHR + R5P + 2ATP + Gln --> Ind + Glu + Pyr + CO2 +
      GAP +2ADP
[47] 2Pyr --> ALC
[48] aIVA + Glu --> Val + aKG
[49] Val + Pyr --> ALA + aIVA
[50] aIVA + AcCoA + NAD + Glu --> Leu + NADH + CO2 + aKG
      + CoA
[51] PRPP + ATP + Gln + Glu + 2NAD --> His + ADP + Glu +
      aKG + 2NADH
[52] Ser + AcCoA + H2S --> Cys + AcOH
[53] SKA + PEP + ATP --> CHR + ADP
[54] Ind + Ser --> Trp
[55] ALC + NADPH --> aIVA + NADP + CO2
[56] r NADH --> NADPH
[57] 2NADH + O2 + 2ADP --> 2ATP + 2NAD
[58] 2FADH + O2 +ADP --> ATP + 2FAD
[59] r Asp + 2 ATP + NH3 --> Asn + 2 ADP
[60] Isocit --> Glyox + Succ
[61] AcCoA + Glyox --> Mal + CoA
[62] Mal + NAD --> Pyr + CO2 + NADH
[63] r R5P + 2 ATP --> PRPP + 2 ADP
[64] mTHF + NADP --> NADPH + THF + Form
[65] NAD + Gly + THF --> mTHF + NADH + CO2 + NH3
[66] ATP --> ADP
[67] Lys --> Lysext

```

[0101]

표 2c

[68] 바이오매스 합성 (후술)  
 RNA (21.33%)  
 3.47 PRPP + 5.02 Gln + -5.02 Glu + 3.08 Gly + 6.17 Asp +  
 32.41 ATP + -32.41 ADP + 6.17 mTHF + -6.17 THF + 3.09 NAD +  
 -3.09 NADH + 6.17 NADP + -6.17 NADPH + 1.16 CO<sub>2</sub> + -3.47 Fum  
 + -3.86 NH<sub>3</sub>

DNA (3.23%)  
 3.37 PRPP + 4.88 Gln + -4.88 Glu + 3 Gly + 6 Asp + 31.5 ATP  
 + -31.5 ADP + 7.12 mTHF + -7.12 THF + 3 NAD + -3 NADH +  
 3.75 NADP + -3.75 NADPH + 1.12 CO<sub>2</sub> + -3.37 Fum + -3.75 NH<sub>3</sub>

인지질 (9.47%)  
 20.8 AcCoA + -20.8 CoA + 1.95 GAP + 0.65 Ser + 44.2 ATP + -  
 44.2 ADP + 38.35 NADH + -38.35 NAD + -0.65 CO<sub>2</sub>

펩티도글리칸 (2.60%)  
 1.94 F6P + 1.94 AcCoA + -1.94 CoA + 1.94 Gln + -1.94 Glu +  
 2.91 Ala + 0.97 PEP + 0.97 Lys + 6.97 ATP + -6.97 ADP +  
 0.97 NADPH + -0.97 NADP + -0.97 CO<sub>2</sub>

리포폴리사카라이드 (3.54%)  
 0.91 R5P + 0.91 F6P + 0.91 PEP + 15.47 AcCoA + -0.91 AcOH +  
 -0.91 Glu + 0.91 Gln + 32.76 ATP + 12.74 NADH

단백질 (57.23%)  
 0.77 Gly + 0.96 Ala + 0.67 Val + 0.85 Leu + 0.44 Ile + 0.44  
 Ser + 0.48 Thr + 0.30 Phe + 0.26 Tyr + 0.01 Trp + 0.15 Cys  
 + 0.22 Met + 0.54 Lys + 0.46 Arg + 0.16 His + 0.46 Asp +  
 0.52 Glu + 0.46 Asn + 0.52 Gln + 0.34 Pro

글리코겐 (2.60%)  
 F6P + ATP

[0102]

[0103]

(2) 자유 흐름의 선택 및 이들의 랜덤 조합의 생성

[0104]

특이적 흐름 그룹을 레더(Reder)의 방법에 따라 결정하였다[참조 문헌: Reder, C.J., Theor. Biol., 135:175-201, 1988]. 분지점에 근접한 흐름이 각 그룹으로부터 선택되었다. 7개의 선택된 자유 흐름이 표 3에 제시되어 있다. 흐름 균형을 위한 특유 해법이 이들 7개의 흐름을 특정함으로써 획득될 수 있다.

표 3

[0105]

랜덤 흐름 분포를 획득하기 위한 자유 흐름의 목록

반응 번호	효소 명칭 또는 반응 경로 명칭
2	글루코스-6-포스페이트 데하이드로게나제
15	PEP 카복실라제
16	아세트산 분비
60	이소시트레이트 리아제 (글리옥실레이트 사이클
62	말산 효소
64	포름산 분비
66	ATPase

[0106]

7 랜덤 자유 흐름에 대한 값의 약 300,000 조합으로부터, 역반응성에 관한 임의의 제약을 침해하는 것들, 및 리신 및 바이오매스 양자에 대한 값이 각 최대 값의 20%에서 설정된 역치를 초과하는 것들을 배제하였다. 결과로



서, 생물학적으로 의미 있는 특이 영역에서 5000 대사 흐름 분포의 데이터셋이 생성되었다. 당해 결과는 10 mmol 글루코스 섭취에 의거한 값으로 나타내었으며, 랜덤 흐름 분포에 해당하는 5000 행(行) 및 각각이 반응 흐름에 해당하는 68 열(列)을 가진 행렬이 생성되었다.

[0107] (3) 다변량 분석에 의한 상관관계 분석 및 물질 생산에 영향을 미치는 대사 흐름의 결정

[0108] 7 자유 흐름에 상응하는 열(列)만의 Z-스코어를 포함하는 축약 행렬의 다변량 선형 회귀를 수행하였다. MatLab 통계 툴박스(toolbox)의 단계적 회귀 함수(stepwise regression function)를 다변량 선형 회귀에 대하여 사용하였다. 이러한 기법을 사용하여, 바이오매스 또는 리신 생성을 7 자유 흐름의 선형 함수로 유도할 수 있다. 이들 7 흐름이 특정됨으로써, 시스템의 상태가 일의적으로 정의되었다. 따라서, 7 항이 전부 파라미터로서 사용되는 경우에, 상관 계수는 1이 되며, 이는 완전한 적합도(fit)를 암시한다. 그러나, 식 중에서 보다 항의 수가 더 적은 비교적 적절한 적합도를 획득하는 것이 통상적으로 가능하다. 항들의 다양한 조합을 시도하기 위하여, MatLab 프로그램의 단계적 함수를 사용하여, 보유한 항들의 각 수에 대한 최상의 적합도를 나타내는 식을 선택하였다. 바이오매스 수율에 관하여, 단지 4항, 즉 이소시트레이트 (ICL), 말산 효소 (MEZ), PEP 카복실라제 (PEPC) 및 ATPase만으로  $R^2 = 0.980$ 의 적합도를 획득하였다. 항의 수가 더욱 감소되는 경우에,  $R^2$  값은 현저하게 감소되며, 타당한 적합도가 전혀 획득될 수 없다. 반응 흐름이 10 mmol 글루코스 당 값으로 규격화되고 입력으로서 사용되는 경우에, 정확한 식을 다음과 같이 나타내었다:

[0109] 식 1) 바이오매스 수율 =  $1.552 - 0.194 (ICL) + 0.184 (MEZ) - 0.194 (PEPC) - 0.011 (ATPase)$

[0110] 리신 수율은 동일한 4개의 파라미터를 포함하는 모델을 사용하여 적합화시킬 수 있으며,  $R^2 = 0.997$ 의 결과가 획득되었다. ATPase에 대한 항이 배제되는 경우에,  $R^2$ 는 단지 0.856으로 감소되며, 적합도는 여전히 적절하였다. 따라서, 리신 모델에 대하여 아래의 3개의 파라미터를 사용하였다.

[0111] 식 2) 리신 수율 =  $-1.694 + 1.176 (ICL) - 1.095 (MEZ) + 1.162 (PEPC)$

[0112] 최종적으로, 바이오매스 및 리신에 대한 탄소 원자 총수로 정의된 전체 탄소 수율 (C 원자)은, 아래의 식에 따라 ATPase에 대한 항만을 사용하여,  $R^2 = 0.956$ 로 적합화될 수 있다.

[0113] 식 3) C 원자 =  $34.3 - 0.314 (ATPase)$

[0114] 이들 결과는 바이오매스 수율이 말산 효소의 흐름과 정의 상관관계가 있으며, 리신 생성은 PEP 카복실라제 및 이소시트레이트 리아제 (글리옥실레이트 사이클)과 정의 상관관계가 있음을 나타내었다. 이러한 회귀 분석의 유용성은 도 1 및 2에 도시되어있다. 이소시트레이트 리아제 및 말산 효소의 흐름이 별도로 고려되는 경우에, 리신 생성과의 상관관계는 도 1 (a) 및 (b)에 도시된 바와 같이 전혀 관찰되지 않았다. 그러나, 이들 흐름이 회귀식 2)의 일부로서 고려되는 경우에, 도 2에 도시된 바와 같은 상관관계가 관찰될 수 있으며, 효과가 분명해진다. 따라서, 대사 흐름 사이의 보이지 않는 관계가 이러한 기법에 의해 밝혀질 수 있다. 표적 생성물의 수율은, 정의 상관관계를 보이는 흐름에 관여하는 활성을 증가시키고, 부의 상관관계를 보이는 흐름에 관여하는 활성을 저하시킴으로써 향상될 수 있다. 즉, 이러한 결과로 부터, 세균주를 향상시키기 위한 지침이 획득될 수 있으며, PEP 카복실라제 또는 이소시트레이트 리아제 활성의 증가 또는 부의 상관관계를 보이는 말산 효소의 활성의 저하가 리신 생성에 효과적이다. 실제로, 에스체리키아 콜라이를 사용한 리신 생성에서 PEP 카복실라제의 활성을 증가시킴으로써 향상된 리신 생성 능력을 나타내는 세균주를 생성시키는 예가 국제 공보 WO 01/53459에 제시되었으며, 따라서, 본 발명의 유용성이 지지되었다.

[0115] 실시예 2

[0116] L-트레오닌에 관한 대사 흐름의 결정

[0117] 실시예 1에서와 동일한 방법에 의해, L-트레오닌에 관하여, 보유한 항들의 각 수에 대해 최상의 적합도를 나타내는 식을 선택하였다. 바이오매스 수율에 있어서, 단지 4 항, 즉 이소시트레이트 리아제 (ICL), 말산 효소 (MEZ), PEP 카복실라제 (PEPC) 및 ATPase만을 사용하여,  $R^2 = 0.986$ 의 적합도를 획득하였다.

[0118] 식 4) 바이오매스 수율 =  $1.260 - 0.101 (ICL) + 0.093 (MEZ) - 0.101 (PEPC) - 0.009 (ATPase)$

- [0119] 동일한 3개의 파라미터를 포함하는 모델을 사용하여 트레오닌 수율을 적합화시킬 수 있으며,  $R^2 = 0.937$ 의 결과가 획득되었다.
- [0120] 식 5) 트레오닌 수율 =  $-1.432 + 1.090 (ICL) - 1.080 (MEZ) + 1.087 (PEPC)$
- [0121] 이들 결과는, 바이오매스 수율이 말산 효소의 흐름과 정의 상관관계가 있으며, 트레오닌 생성이 PEP 카복실라제 및 이소시트레이트 리아제 (글리옥실레이트 사이클)의 흐름과 정의 상관관계가 있음을 보여주었다. 따라서, 트레오닌 생성에 있어서, 세균주를 향상시키기 위한 지침이 또한 획득될 수 있으며, PEP 카복실라제 또는 이소시트레이트 리아제 활성의 증가, 또는 부의 상관관계를 보이는 말산 효소의 활성의 저하가 리신 생성에 있어서 효과적이다.
- [0122] **실시예 3**
- [0123] **말산 효소-결손 L-리신-생성 세균의 작제**
- [0124] AEC (S-(2-아미노에틸)시스테인)에 대해 내성인 에스체리키아 콜라이의 L-리신-생산 균주로서 WC196 주를 사용하였다[참조 문헌: 국제 공보 WO 96/17930].
- [0125] 에스체리키아 콜라이로부터의 말산 효소로는 조효소로서 NAD를 사용하는 것 (EC 1.1.1.38) 및 조효소로서 NADP를 사용하는 것 (EC 1.1.1.40)이 포함된다. 이들 효소들은 각각 *sfcA* 및 *b2463* 유전자에 의해 암호화된다.
- [0126] *sfcA* 및 *b2463* 유전자를, 타첸코(Datsenko) 및 와너(Wanner)에 의해 최초로 개발된 "레드-유도된 통합법(red-driven integration method)" [참조 문헌: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, 97, 6640-6645], 및 람다 파아지로부터 유래된 절제 시스템 법(excision system method)[참조 문헌: J. Bacteriol. 2002 Sep; 184(18): 5200-3, Interactions between integrase and excisionase in the phage lambda excisive nucleoprotein complex. Cho EH, Gumpert RI, Gardner JF.]을 병용하여, 결실시킨다. 레드-유도된 통합법에 따르면, 합성 올리고뉴클레오타이드 프라이머의 5' 말단에 표적 유전자의 일부를, 3' 말단에 항생제 내성 유전자의 일부를 포함하도록 설계된 합성 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 획득된 PCR 산물을 사용함으로써 1 단계로 유전자 파괴된 균주가 획득될 수 있다. 또한, 통합된 항생제 내성 유전자는 람다 파아지로부터 유래된 절제 시스템을 레드-유도된 통합 방법과 추가로 조합함으로써 제거될 수 있다.
- [0127] (1) *sfcA* 유전자의 파괴
- [0128] PCR 주형으로서, 플라스미드 pMW118-attL-Cm-attR (이의 제조법은 후술된다)을 사용하였다. pMW118-attL-Cm-attR은, 람다 파아지의 부착 부위인 *attL* 및 *attR* 유전자 및 항생제 내성 유전자인 *cat* 유전자를 pMW118 (TaKaRa Bio)에 삽입함으로써 획득된다. 이들 유전자는 *attL-cat-attR*의 순서로 삽입된다. *attL* 서열은 서열번호 5에 제시되며, *attR* 서열은 서열번호 6에 제시된다.
- [0129] *attL* 및 *attR*의 3' 말단에 상응하는 서열, 및 5' 말단에서 *sfcA* 유전자의 일부에 상응하는 서열을 각각 갖는 서열번호 1 및 2에 제시된 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하였다.
- [0130] 증폭된 PCR 산물을 아가로스 겔 상에서 정제하고, 온도-감수성 복제를 나타내는 플라스미드 pKD46를 함유하는 에스체리키아 콜라이 WC196 속에, 전기천공에 의해 도입하였다. pKD46 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, 97, 6640-6645)는, 아라비노스-유도성  $P_{araB}$  프로모터의 제어하에  $\gamma$ Red 상동 재조합 시스템의 Red 레코비나제(recombinase)를 암호화하는 유전자 ( $\gamma$ ,  $\beta$  및 엑소 유전자)를 함유하는 람다 파아지의 2,154개 뉴클레오타이드 DNA 단편 (GenBank/EMBL 수탁번호 J02459, 31088-33241)를 포함한다. pKD46는 PCR 산물을 WC196 균주의 염색체 내로 통합시키는데 필요하다.
- [0131] 전기천공용 적격 세포(competent cell)를 아래와 같이 제조하였다. 앰피실린 100 mg/l을 함유하는 LB 배지 중 30℃에서 밤새 배양한 에스체리키아 콜라이 WC196을, 앰피실린 (50 mg/l) 및 L-아라비노스 (1 mM)를 함유하는 5 mL SOB 배지[참조 문헌: Sambrook, J. et al., "Molecular Cloning A Laboratory Manual, Second Edition", Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)]로 100 배 희석시켰다. 희석된 생성물을, OD<sub>600</sub>이 약 0.6이 될 때까지 통기하에 30℃에서 배양한 다음, 100배 농축시켰다. 세포를 10% 글리세롤로 3회 세정하여, 세포를 전기천공할 준비를 하였다. 70  $\mu$ l의 적격 세포(competent cell) 및 약 100 ng의 PCR 산물을 사용하여 전기천공을

수행하였다. 1 ml SOC 배지 [참조 문헌: Sambrook, J. et al., "Molecular Cloning A Laboratory Manual, Second Edition", Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)]를 전기천공할 세포에 첨가하였다. 당해 세포를 37℃에서 2.5 시간 동안 배양한 다음, 25 mg/l Cm (클로르암페니콜)을 함유하는 L-아가 배지 중 37℃에서 평판-배양하여, Cm-내성 재조합체를 선별하였다. 이어서, 플라스미드 pKD46을 제거하기 위하여, 세포를 Cm-함유 L-아가 배지 중 42℃에서 2회 계대배양하였다. 수득된 콜로니를 앰피실린 내성에 대하여 시험하였다. pKD46이 부재하는 앰피실린-감수성 균주가 수득되었다.

[0132] 클로르암페니콜 내성 유전자에 의해 식별된 돌연변이체의 *sfcA* 유전자 결손은 PCR로 확인하였다. 수득된 *sfcA*-결손 균주는 WC196  $\Delta sfcA::att-cat$ 로 명명하였다.

[0133] *sfcA* 유전자 속에 통합되어진 *att-cat* 유전자를 제거하기 위하여, 헬퍼 플라스미드 pMW-intxis-ts (이의 제조법은 후술된다)를 사용하였다. pMW-intxis-ts는 람다 파아지의 인테그라제(Int)를 암호화하는 유전자(서열번호 7) 및 엑시시오나제(Xis)를 암호화하는 유전자(서열번호 9)를 보유하고, 온도-감수성 복제를 나타낸다. pMW-intxis-ts를 도입함으로써, 염색체 상의 *attL* (서열번호 5) 및 *attR* (서열번호 6)의 인식으로 인해 재조합이 일어나고, *attL*과 *attR* 사이의 항생제 내성 유전자가 절단되므로, *attL* 또는 *attR* 서열만이 염색체 상에 잔존하는 구조가 된다.

[0134] WC196  $\Delta sfcA::att-cat$  균주의 적격 세포를 통상의 방법에 따라 제조하고, 헬퍼 플라스미드 pMW-intxis-ts로 형질전환시키고, 앰피실린 50 mg/l을 함유하는 L-아가 배지 중 30℃에서 평판-배양하여, 앰피실린-내성 균주를 선별하였다.

[0135] 플라스미드 pMW-intxis-ts를 제거하기 위하여, 세포를 L-아가 배지 중 42℃에서 2회 계대배양하였다. 수득된 콜로니를 앰피실린 내성 및 클로르암페니콜 내성에 대하여 시험하였다. *att-cat* 및 pMW-intxis-ts가 부재하는 앰피실린- 및 클로르암페니콜-감수성 균주가 수득되었다. 이러한 균주를 WC196  $\Delta sfcA$ 로 명명하였다.

[0136] (2) *b2463* 유전자의 파괴

[0137] 서열번호 3 및 4의 프라이머가 *b2463*를 파괴하기 위한 프라이머로서 사용되는 점을 제외하고는 상기 (1)의 방법에 따라 수행하여, WC196 및 WC196  $\Delta sfcA$  균주에서 *b2463* 유전자를 결실시켰다. 따라서, WC196  $\Delta b2463$  및 WC196  $\Delta sfcA \Delta b2463$  균주가 수득되었다. 수득된 WC196  $\Delta sfcA \Delta b2463$  균주를 WC196  $\Delta mezz$ 로서 명명하였다.

[0138] (3) PCR 주형 및 헬퍼 플라스미드의 제조

[0139] PCR 주형 pMW118-*attL*-Cm-*attR* 및 헬퍼 플라스미드 pMW-intxis-ts를 다음과 같이 제조하였다:

[0140] (3-1) pMW118-*attL*-Cm-*attR*

[0141] 플라스미드 pMW118-*attL*-Cm-*attR*를 구축하기 위하여, pMW118-*attL*-Tc-*attR*를 사용하여 개시하였다. 4개의 DNA 단편을 연결시켰다:

[0142] 1) 올리고뉴클레오타이드 P1 및 P2 (서열번호 11 및 12)를 프라이머(이들 프라이머는 *Bgl*II 및 *Eco*RI 엔도뉴클리아제에 대한 부수적 인식 부위를 포함하였다)로서 사용하여 이. 콜라이 W3350 (프로파이지 함유) 염색체의 상응하는 서열을 PCR로 증폭시켜 수득된, *attL*를 보유하는 *Bgl*II-*Eco*RI DNA 단편 (120 bp) (서열번호 5);

[0143] 2) 올리고뉴클레오타이드 P3 및 P4 (서열번호 13 및 14)를 프라이머(이들 프라이머는 *Pst*I 및 *Hind*III 엔도뉴클리아제에 대한 부수적 인식 부위를 포함하였다)로서 사용하여 이. 콜라이 W3350 (프로파이지 함유) 염색체의 상응하는 서열을 PCR로 증폭시켜 수득된, *attR*를 보유하는 *Pst*I-*Hind*III DNA 단편 (182 bp) (서열번호 6);

[0144] 3) pMW118-*ter\_rrnB*의 *Bgl*II-*Hind*III 거대 단편(3916 bp). pMW118-*ter\_rrnB*를 3개의 DNA 단편을 연결시켜 수득하였다:

[0145] ● pMW118의 *Aat*II-*Eco*RIpol 단편을 보유하는 거대 단편(2359 bp). pMW118를 *Eco*RI 제한 엔도뉴클리아제로 절단하고, DNA 폴리머라제 I의 클레노우 단편으로 처리한 다음, *Aat*II 제한 엔도뉴클리아제로 절단한다;

[0146] ● 앰피실린 내성 (ApR)을 위한 *bla* 유전자를 보유하는 pUC19의 *Aat*II-*Bgl*II 소형 단편 (1194 bp)을, 올리고뉴클레오타이드 P5 및 P6 (서열번호 15 및 16)를 프라이머(이들 프라이머는 *Aat*II 및 *Bgl*II 엔도뉴클리아제에 대한

부수적 인식 부위를 포함하였다)로서 사용하여 pUC19 플라스미드의 상응 서열을 PCR로 증폭시켜 수득하였다.

- [0147] ●전사 터미네이터 *ter\_rrnB*의 *Bgl*III-*Pst*IpoI 소형 단편 (363 bp)을, 올리고뉴클레오티드 P7 및 P8 (서열번호 17 및 18)를 프라이머(이들 프라이머는 *Bgl*III 및 *Pst*I 엔도뉴클리아제에 대한 부수적 인식 부위를 포함하였다)로서 사용하여 이. 콜라이 MG1655 염색체의 상응 영역을 PCR로 증폭시켜 수득하였다;
- [0148] 4) 테트라사이클린 내성 및 전사 터미네이터 *ter\_thrL*에 대한 유전자를 포함하는 pML-Tc-*ter\_thrL*의 *Eco*RI-*Pst*I 소형 단편 (1388 bp) (서열번호 23). pML-Tc-*ter\_thrL*를 아래의 방법으로 수득하였다:
- [0149] ●pML-MS (2001 #5)를 *Xba*I 및 *Bam*HI 제한 엔도뉴클리아제로 절단한 다음, 거대 단편 (3342 bp)을, 올리고뉴클레오티드 P9 및 P10 (서열번호 19 및 20)를 프라이머(이들 프라이머는 *Xba*I 및 *Bam*HI 엔도뉴클리아제에 대한 부수적 인식 부위를 포함하였다)로서 사용하여 이. 콜라이 MG1655 염색체의 상응 영역을 PCR로 증폭시킴으로써 수득된, 터미네이터 *ter\_thrL*를 보유하는 *Xba*I-*Bam*HI 단편 (68 bp)과 연결시켰으며, 이 반응의 산물은 플라스미드 pML-*ter\_thrL*이었다;
- [0150] ●이어서, pML-*ter\_thrL*를 *Kpn*I 및 *Xba*I 제한 엔도뉴클리아제로 절단한 다음, DNA 폴리머라제 I의 클레노우 단편으로 처리한 후, 테트라사이클린 내성 유전자를 포함하는 pBR322의 *Eco*RI-*Van*9II 소형 단편 (1317 bp) (pBR322를 *Eco*RI 및 *Van*9II 제한 엔도뉴클리아제로 절단한 다음 DNA 폴리머라제 I의 클레노우 단편으로 처리하였다)과 연결시켰으며, 이 반응의 산물은 플라스미드 pML-Tc-*ter\_thrL*이었다;
- [0151] 이로써, pMW118-attL-Tc-attR가 수득되었다.
- [0152] pMW118-attL-Cm-attR는, pMW118-attL-Tc-attR의 *Bam*HI-*Xba*I 거대 단편 (4413 bp)을 프로모터 P<sub>A2</sub> (파아지 T7의 초기 프로모터), 클로르암페니콜 내성(Cm<sup>R</sup>)을 위한 *cat* 유전자, 전사 터미네이트 *ter\_thrL* 및 attR를 포함하는 *Bgl*III-*Xba*I 인공 DNA 단편 (1162 bp)과 연결함으로써 구축되었다. 인공 DNA 단편 (서열번호 24)을 아래의 방법으로 수득하였다.
- [0153] 1. pML-MS (2001 #5)를 *Kpn*I 및 *Xba*I 제한 엔도뉴클리아제로 절단하고, 올리고뉴클레오티드 P11 및 P12 (서열번호 21 및 22)를 프라이머(이들 프라이머는 *Kpn*I 및 *Xba*I 엔도뉴클리아제에 대한 부수적 인식 부위를 포함하였다)로서 사용하여 파아지 T7 DNA의 상응 영역을 PCR로 증폭시킴으로써 수득된, 프로모터 P<sub>A2</sub> (파아지 T7의 초기 프로모터)를 포함하는 *Kpn*I-*Xba*I 소형 단편 (120 bp)과 연결시켰으며, 이 반응의 산물은 플라스미드 pML-P<sub>A2</sub>-MCS 이었으며;
- [0154] 2. 이어서, pML-P<sub>A2</sub>-MCS로부터 the *Xba*I 부위를 결실시켰으며, 이 반응의 산물은 플라스미드 pML-P<sub>A2</sub>-MCS(*Xba*I<sup>-</sup>)이었으며;
- [0155] 3. 이어서, 프로모터 P<sub>A2</sub> (파아지 T7의 초기 프로모터) 및 클로르암페니콜 내성 (Cm<sup>R</sup>)을 위한 유전자 *cat*를 포함하는 pML-P<sub>A2</sub>-MCS(*Xba*I<sup>-</sup>)의 *Bgl*III-*Hind*III 소형 단편 (928 bp)을, 전사 터미네이터 *ter\_thrL* 및 attR를 포함하는 pMW118-attL-Tc-attR의 *Hind*III-*Hind*III 소형 단편 (234 bp)과 연결시켰으며;
- [0156] 4. 올리고뉴클레오티드 P9 및 P4 (서열번호 19 및 14)를 프라이머(이들 프라이머는 *Hind*III 및 *Xba*I 엔도뉴클리아제에 대한 부수적 인식 부위를 포함하였다)로서 사용하여 연결 반응 혼합물을 PCR로 증폭시켜, 요구된 인공 DNA 단편 (1156 bp)을 수득하였다.
- [0157] (3-2) pMW-intxis-ts
- [0158] 최초로, 파아지 λDNA ("Fermentas")를 주형으로서 사용하여, 두 개의 DNA 단편을 증폭시켰다. 제1 단편은 뉴클레오티드 37168 내지 38046 (서열번호 33)의 영역을 포함하며, 또한 cI 레프레서를 암호화하는 유전자, 프로모터 Prm 및 Pr, 및 *cro* 유전자의 리더 서열을 함유하였다. 이 단편은 P1' 및 P2' 올리고뉴클레오티드 (서열번호 25 및 26)를 프라이머로서 사용하여 수득하였다. 제2 단편은 파아지 λ의 *xis-int* 유전자를 보유하였으며, 뉴클레오티드 27801 내지 29100 (서열번호 34)의 영역을 포함하였다. 이의 증폭을 위하여, 올리고뉴클레오티드 P3' 및 P4' (서열번호 27 및 28)를 프라이머로서 사용하였다. 모든 프라이머는 적당한 엔도뉴



클리아제 인식 부위를 함유하였다.

[0159] cI 레프레서를 보유하는 수득된 PCR-증폭된 단편을 제한 엔도뉴클리아제 *ClaI*로 절단하고, DNA 폴리머라제 I의 클레노우 단편으로 처리한 다음, *EcoRI* 제한 엔도뉴클리아제로 절단하였다. 제2 PCR-증폭된 단편을 *EcoRI* 및 *PstI* 제한 엔도뉴클리아제로 절단하였다. 이어서, pMWPlaclacI-ts 플라스미드를 *BglII* 엔도뉴클리아제로 절단하고, DNA 폴리머라제 I의 클레노우 단편으로 처리한 다음, *PstI* 제한 엔도뉴클리아제로 절단하였다. pMWPlaclacI-ts의 벡터 단편을 아가로스 겔로부터 용출시키고, 절단된 PCR-증폭 단편과 연결시켰다.

[0160] 플라스미드 pMWPlaclacI-ts는 아래의 부분들로 이루어진 pMWPlaclacI의 유도체이다: 1)  $P_{lacUV5}$  프로모터 및 박테리오파지 T7 유전자 10의 RBS의 제어하에 *lacI* 유전자를 포함하는 *BglII-HindIII* 인공 DNA 단편; 2) 올리고뉴클레오티드 P5' 및 P6' (서열번호 29 및 30)를 프라이머(이들 프라이머는 *AatII* 및 *BglII* 엔도뉴클리아제에 대한 부수적 인식 부위를 포함하였다)로서 사용하여 pUC19 플라스미드의 상응 서열을 PCR로 증폭시킴으로써 수득된, 앰피실린 내성 ( $Ap^R$ ) 유전자를 보유하는 *AatII-BglII* DNA 단편; 3) 앞서 구축된 재조합 플라스미드 - pMW118-*ter\_rrnB*의 *AatII-PvuI* 단편을 포함하는 *AatII-HindIII* 단편. 플라스미드 pMW118-*ter\_rrnB*를 아래의 방법으로 구축하였다: 터미네이터 *ter\_rrnB*를 보유하는 *PstI-HindIII* DNA 단편을, 적당한 엔도뉴클리아제 인식 부위를 함유하는 올리고뉴클레오티드 P7' 및 P8' (서열번호 31 및 32)를 프라이머로서 사용하여 이.콜라이 MG1655 염색체의 상응 영역을 PCR로 증폭시켜 수득하였다. 연결 전에, pMW118 플라스미드 및 *ter\_rrnB* DNA 단편 (상보체, 서열번호 35)를 각각 *PvuI* 또는 *PstI* 엔도뉴클리아제로 제한절단하고, DNA 폴리머라제 I의 클레노우 단편으로 처리하여 평할 말단을 수득한 다음, *AatII* 또는 *HindIII* 엔도뉴클리아제로 제한절단하였다. pMWPlaclacI-ts 변이체를 구축하기 위하여, pMWPlaclacI 플라스미드의 *AatII-EcoRV* 단편을, pSC101 레플리콘의 *par*, *ori* 및 *repA<sup>ts</sup>* 유전자 좌를 포함하는 플라스미드 pMAN997의 *AatII-EcoRV* 단편으로 치환하였다.

#### [0161] 실시예 4

#### [0162] 말산 효소-결손 L-트레오닌-생산 세균의 작제

[0163] *sfcA*- 및 *b2463*-결손 균주를 VKPM B-5318 균주로부터 작제하였다. VKPM B-5318 균주는 1987년 11월 19일에 기탁기관[Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM), GNII Genetika]에 기탁되었으며, 수탁번호 VKPM B-5318를 부여받았다.

[0164] 말산 효소 (*mez*) 유전자 (*sfcA*, *b2463*) 중의 하나가 결손된 균주를, 실시예 3에서와 동일한 방법으로 레드-유도된 통합법(red-driven integration method)을 사용하여 수득하였다. 즉, WC196 균주를 대신하여 B-5318 균주를 사용하는 점을 제외하고는 동일한 방법으로 실시예 3에서 레드-유도된 통합법을 사용하여 수행하여, 클로르암페니콜 내성 유전자에 의해 식별된 돌연변이체로서 *sfcA*- 또는 *b2463*-결손 균주를 수득하였다. *sfcA*가 파괴된 B-5318 균주는 B-5318Δ*sfcA*로 명명되었다. *b2463*가 파괴된 B-5318 균주는 B-5318Δ*b2463*로 명명되었다. *sfcA* 및 *b2463* 유전자가 파괴된 B-5318 균주인 B-5318Δ*sfcA*Δ*b2463*은 실시예 3에서와 동일한 방법으로 레드-유도된 통합법 및 절제 시스템(excision system) 법을 사용하여 수득하였다. B-5318Δ*sfcA*Δ*b2463* 균주는 B-5318Δ*mez*로 명명되었다.

#### [0165] 실시예 5

#### [0166] 말산 효소-결손 균주의 평가

#### [0167] <5-1> *b2463*-결손 균주인 L-트레오닌-생산 세균의 평가

[0168] B-5318Δ*b2463* 및 B-5318 균주들을, 20 mg/L의 스트렙토마이신 및 25 mg/L의 카나마이신 설페이트를 함유하는 LB 아가 배지 (10 g/L의 트립톤, 5 g/L의 효모 추출물, 5 g/L의 NaCl 및 15 g/L의 아가) 중 37℃에서 24 시간 동안 배양하고, 상기 플레이트의 1/5 양의 균체를 채취하고, 20 mg/L의 스트렙토마이신 및 25 mg/L의 카나마이신 설페이트를 함유하는 LB 액체 배지 (10 g/L의 트립톤, 5 g/L의 효모 추출물, 및 5 g/L의 NaCl) 50 mL 중에 접종하여, 40℃ 및 144rpm에서 3.5 시간 동안 예비배양을 수행하였다.

[0169] 예비배양 종료 후, 예비배양 브로쓰를, 1 L-용량의 발효조에 함유된 300 mL의 본 배양 배지 중에, 본 배양 배지의 체적의 10%에 상당하는 양으로 접종하여, 40℃ 및 pH 7.0에서 본 배양을 수행하였다. 본 배양 배지의 조성은

아래에 제시된다.

**표 4**

본 배양 배지의 조성

글루코스	100 g/L
효모 추출물	1.8 g/L
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	18 mg/L
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	18 mg/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.0 g/L
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.36 g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4.5 g/L
NaCl	0.6 g/L
스트렙토마이신 설페이트	20 mg/L
카나마이신 설페이트	25 mg/L

배양 중에 암모니아 가스를 첨가하여 pH를 7.0으로 조정하였다.

첨가된 당이 소비된 후, L-트레오닌의 양을 액체 크로마토그래피로 측정하였다. 결과는 표 5에 제시되어있다.

b2463-결손 균주 B-5318Δb2463가 사용되었을 때, 트레오닌 수율은, 대조균 균주 B-5318에 비해 증가하였다.

**표 5**

균주	L-트레오닌의 발효 수율 (%)
B-5318	31.4
B-5318Δb2463	32.1

<5-2> *sfcA*-결손 균주인 L-트레오닌-생산 세균의 평가

B-5318Δ*sfcA* 및 B5318 균주들을 상기 <5-1>에서와 동일한 방법으로 배양하였다.

첨가된 당이 소비된 후, L-트레오닌의 양을 액체 크로마토그래피로 측정하였다. 결과는 표 6에 제시되어있다.

b2463-결손 균주 B-5318Δ*sfcA*가 사용되었을 때, 트레오닌 수율은, 대조균 균주 B-5318에 비해 증가하였다.

**표 6**

균주	L-트레오닌의 발효 수율 (%)
B-5318	31.4
B-5318Δ <i>sfcA</i>	32.2

<5-3> *sfcA* 및 b2463-결손 균주인 L-리신 생산 세균의 평가

WC196, WC196Δ*sfcA* 및 WC196Δb2463 균주들, *dapA*, *dapB* 및 *dapC* 유전자를 보유하는 리신 생산용 플라스미드인, pCABD2 (국제 공보 WO 01/53459)를 사용하여 통상의 방법에 따라 형질전환시켜, WC196/pCABD2, WC196Δ*sfcA*/pCABD2 및 WC196Δb2463/pCABD2 균주들 수득하였다.

상기 균주 WC196/pCABD2, WC196Δ*sfcA*/pCABD2 및 WC196Δb2463/pCABD2를, 20 mg/l의 스트렙토마이신을 함유하는 L 배지 (후술됨)에서, 당해 배지에서의 OD<sub>600</sub>이 약 0.6이 될 때까지, 37℃에서 배양하였다. 이어서, 배양액과 등량의 40% 글리세롤 용액을 당해 배양액에 첨가하였다. 교반 후, 혼합물을 적당한 분취량으로 분배하여 -80℃에서 보관하였다. 보관된 분취량은 글리세롤 스톱으로 불린다.



[0183] 상기 균주의 글리세롤 스톱을 해동하고, 각 100  $\mu$ l를 20 mg/l 스트렙토마이신을 함유하는 L 플레이트 상에 균일하게 도포하고, 37℃에서 24 시간 동안 배양하였다. 수득된 플레이트의 1/8 양의 균체를 채취하여, 20 mg/L의 스트렙토마이신을 함유하는 20 mL의 발효 배지(후술됨) 중에 접종하여, 왕복 진탕기로 37℃에서 약 16 시간 동안 배양하였다. 배양 후, 배지 중에 축적된 리신의 양 및 잔존 글루코스를 Biotech Analyzer AS210 (Sakura Seiki)로 측정하였다.

[0184] L-리신 축적 및 균체-제외 수율은 표 7에 제시되어있다. 균체 형성에 사용된 당의 양을 공제하여 계산된 수율인 균체-제외 수율은, 소비된 당의 50%가 균체 형성에 사용된다는 가정하에 계산된 것이다. 당해 결과로부터 알 수 있는 바와 같이, 상기 균주 WC196  $\Delta$ sfca/pCABD2 및 WC196  $\Delta$ b2463/pCABD2의 균체-제외 수율은 대조균 균주 WC196/pCABD2에 비해 증가하였다.

표 7

균주		건조 균체 중량 (g/L)	균체-제외 수율 (%)
숙주	플라스미드		
WC196	pCABD2	2.5	100.0
WC196 $\Delta$ sfca	pCABD2	2.3	101.6
WC196 $\Delta$ b2463	pCABD2	2.2	104.7

[0185]

[0186] sfca- 또는 b2463-결손 L-리신-생산 균주의 평가에 사용된 배지는 후술될 것이다. 사용된 시약은, 다른 언급이 없는 한, 제조회[Wako Pure Chemicals 또는 Nakarai Tesque]에서 구입하였다. 사용된 배지의 조성은 아래에 제시되어있다. 모든 배지에 대한 pH를 NaOH 또는 HCl로 조정하였다.

표 8

(L 배지)

박토 트립톤 (DIFCO) 10 g/L  
 효모 추출물 (DIFCO) 5 g/L  
 NaCl 5 g/L  
 pH 7.0  
 [120℃에서 20 분간 증기-멸균]

(L 아가 배지)

L 배지  
 박토 아가 (DIFCO) 15 g/L  
 [120℃에서 20 분간 증기-멸균]

(에스체리키아 세균용 L-리신 생산 배지)

글루코스 40 g/L  
 황산암모늄 24 g/L  
 인산이수소칼륨 1.0 g/L  
 황산마그네슘 7 수화물 1.0 g/L  
 황산철 (II) 7 수화물 0.01 g/L  
 황산망간 4 수화물 0.01 g/L  
 효모 추출물 2.0 g/L  
 탄산칼슘 (약전) 30 g/L  
 [수산화칼륨을 사용하여 pH 7.0 로 조정하고, 115℃에서 10 분간 증기-멸균시키나, 단 글루코스 및 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 는 별도로 멸균시킴]

[0187]

[0188] 실시예 6

[0189] 말산 효소-결손 균주 ( $\Delta$ mez)의 평가

[0190] <6-1> 말산 효소 결손 균주인 L-트레오닌-생산 세균의 평가

[0191] B-5318 $\Delta$ mez 및 B-5318 균주를, 20 mg/L의 스트렙토마이신 설페이트 및 25 mg/L의 카나마이신을 함유하는 LB 아가 배지 (10 g/L의 트립톤, 5 g/L의 효모 추출물, 5 g/L의 NaCl 및 15 g/L의 아가) 중 37℃에서 24 시간 동안

각각 배양하고, 상기 플레이트의 1 양에 상당하는 균체를 채취하고 5 ml의 LB 액체 배지 (10 g/L의 트립톤, 5 g/L의 효모 추출물, 및 5 g/L의 NaCl) 중에 현탁시켰다. 0.5 ml의 현탁액을, 20 mg/L의 스트렙토마이신 설페이트 및 25 mg/L의 카나마이신 설페이트를 함유하는 LB 액체 배지 50 mL 중에 접종하여, 39℃ 및 144 rpm에서 4 시간 동안 예비배양을 수행하였다.

[0192] 예비배양 종료 후, 예비배양 브로쓰를, 1 L-용량의 발효조에 함유된 300 mL의 본 배양 배지 중에, 본 배양 배지 체적의 10%에 상당하는 양으로 접종하여, 39℃ 및 pH 7.0에서 본 배양을 수행하였다. 본 배양 배지의 조성은 아래에 제시된다.

## 표 9

[0193] 본 배양 배지의 조성

글루코스	27 g/L
효모 추출물	1.8 g/L
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	18 mg/L
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	18 mg/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.5 g/L
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.36 g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4.5 g/L
NaCl	0.6 g/L
스트렙토마이신 설페이트	20 mg/L
카나마이신 설페이트	25 mg/L

[0194] 배양 중에 암모니아 가스를 첨가하여 pH를 7.0으로 조정하였다.

[0195] 첨가된 당이 소비되어 고갈된 후, 600 g/l의 글루코스 수용액을 첨가하였다.

[0196] 24 시간의 본 배양 후, L-트레오닌의 양을 액체 크로마토그래피로 측정하였다. 결과는 표 10에 제시되어있다.

[0197] 말산 효소-결손 균주 B-5318 Δmez가 사용되었을 때, 트레오닌 수율은, 대조군 균주 B-5318에 비해 증가하였다.

## 표 10

균주	L-트레오닌의 발효 수율 (%)
B-5318	35.9
B-5318 Δmez	38.3

[0199] <6-2> 말산 효소-결손 균주인 L-리신-생산 세균의 평가

[0200] WC196 및 WC196 Δmez 균주를, 리신 생산용 플라스미드인, pCABD2 (국제 공보 WO 01/53459)를 사용하여 통상의 방법에 따라 형질전환시켜, WC196/pCABD2 및 WC196 Δmez/pCABD2 균주를 수득하였다.

[0201] 상기 균주 WC196/pCABD2 및 WC196 Δmez/pCABD2를, 20 mg/l의 스트렙토마이신을 함유하는 L 배지 (실시예 5 <5-3>에 사용된 것과 동일)에서, 당해 배지에서의 OD<sub>600</sub>이 약 0.6이 될 때까지, 37℃에서 배양하였다. 이어서, 배양액과 등량의 40% 글리세롤 용액을 당해 배양액에 첨가하였다. 교반 후, 혼합물을 적당한 분취량으로 분배하여 -80℃에서 보관하였다. 보관된 분취량은 글리세롤 스톱으로 불린다.

[0202] 상기 균주의 글리세롤 스톱을 해동하고, 각 100 μl를 20 mg/l 스트렙토마이신을 함유하는 L 플레이트 상에 균일하게 도포하고, 37℃에서 24 시간 동안 배양하였다. 수득된 플레이트의 1/8 양의 균체를 채취하여, 20 mg/L의 스트렙토마이신을 함유하는 20 mL의 발효 배지(실시예 5 <5-3>에 사용된 것과 동일) 중에 접종하여, 왕복 진탕기로 37℃에서 약 48 시간 동안 배양하였다. 배양 후, 배지 중에 축적된 리신의 양 및 잔존 글루코스를 Biotech Analyzer AS210 (Sakura Seiki)로 측정하였다.

[0203] L-리신 축적 및 균체-제외 수율의 결과를 표 11에 제시되어있다. 균체-제외 수율은, 소비된 당의 50%가 균체

형성에 사용된다는 가정하에 계산된 것이다. 당해 결과로부터 알 수 있는 바와 같이, 상기 균주 WC196Δmez/pCABD2의 균체-제외 수율은 대조균 균주 WC196/pCABD2에 비해 증가하였다.

표 11

균주		건조 균체 중량 (g/L)	균체-제외 수율 (%)
숙주	플라스미드		
WC196	pCABD2	5.2	100.0
WC196Δmez	pCABD2	5.8	103.4

### 산업상 이용 가능성

본 발명에 따르면, 물질 생산에 영향을 미치는 대사 흐름이 효율적으로 결정될 수 있으며, 이에 의해 세균주의 개선을 위한 지침이 제공될 수 있다. 게다가, 이러한 지침에 의거하여 세균주를 향상시키는 방법이 또한 제공될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

도 1은 5000개 랜덤 흐름 분포의 데이터 세트를 사용한, 상이한 값의 자유 흐름의 함수로서 리신 생성을 보여주는 플롯이다. 리신 수율은 (a) 이소시트레이트 리아제 흐름, (b) 말산 효소 흐름 및 (c) PEP 카복실라제 흐름에 대하여 제시되었다.

도 2는 5000개 랜덤 흐름 분포의 데이터 세트에 대한 식 2의 값의 함수로서 리신 생성을 보여주는 플롯이다. 입력 값은 10 mmol/hr의 글루코스 흐름에 대해 mmol/hr로 나타낸 흐름이다.

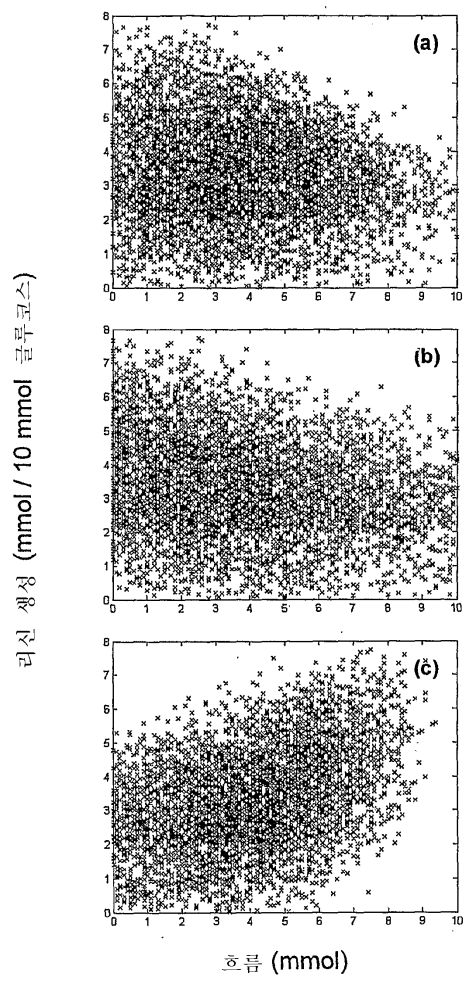
도 3은 대사 흐름 결정 프로그램의 플로우차트이다.

도 4는 pMW118-attL-Tc-attR 및 pMW118-attL-Cm-attR의 구조를 도시한다.

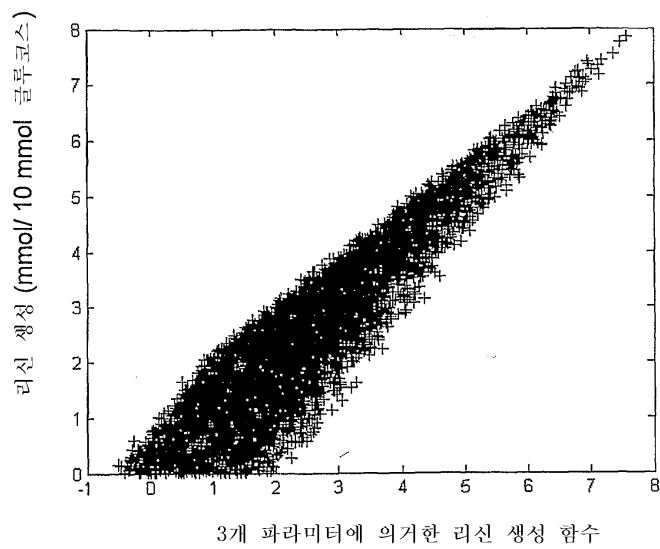
도 5는 pMW-intxis-ts의 구조를 도시한다.

도면

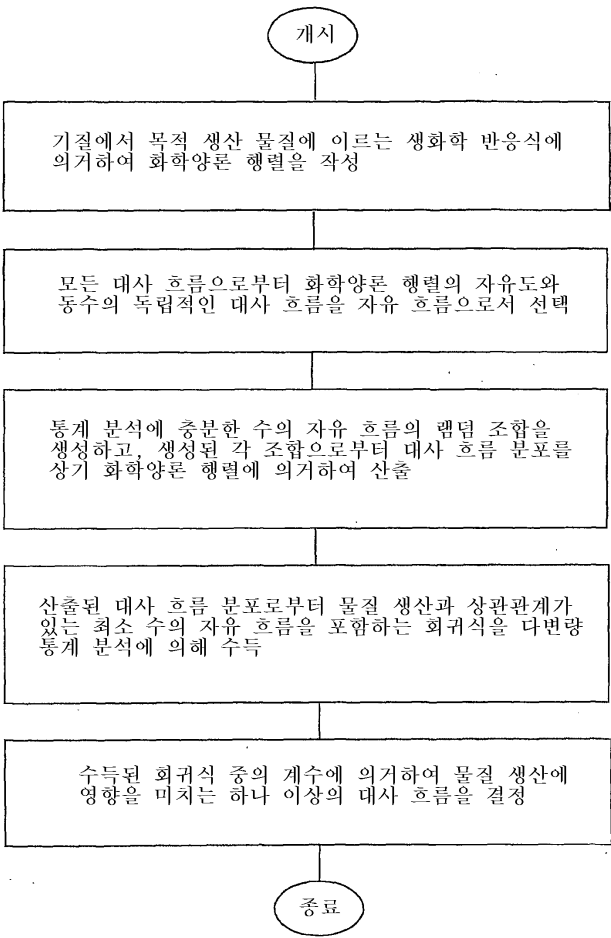
도면1



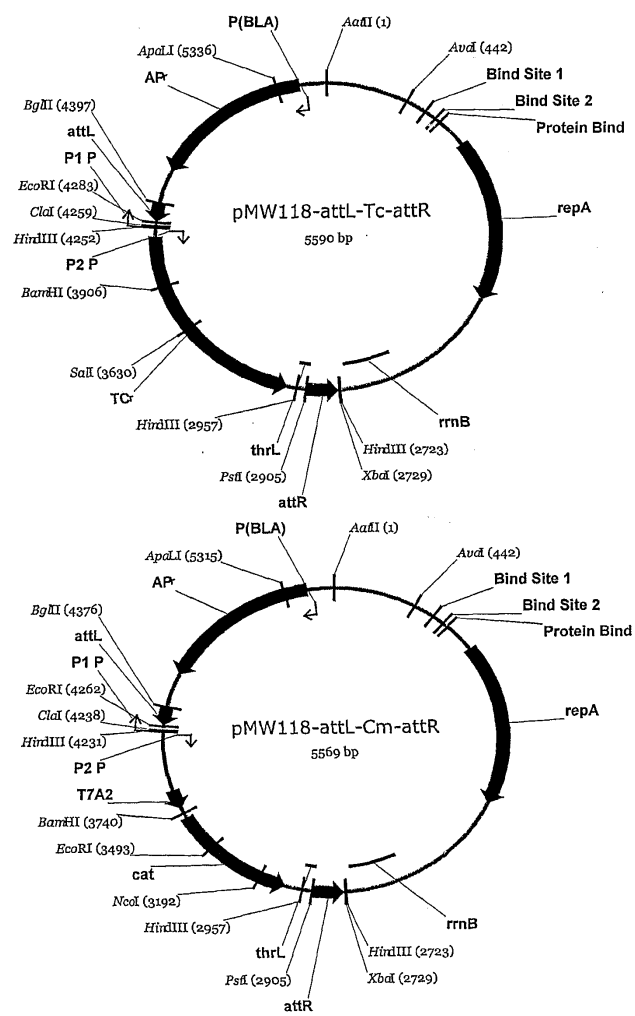
도면2



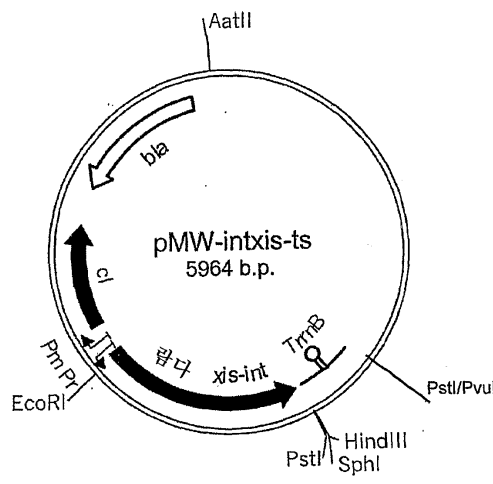
도면3



도면4



도면5





## 서열 목록

<110> Ajinomoto Co., Inc.

<120> Method for determining metabolic flux affecting substance production

<130> C2500PC4076

<150> JP 2003-202842

<151> 2003-07-29

<160> 35

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 1

aatatctttc agttccggca gtaccatacc ttcgcctgaa gcctgctttt ttat 54

<210> 2

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 2

agcatggaag aagccgtaa cttcaacctg ctggggcgct caagttagta taaa 54

<210> 3

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 3  
cgacgggcag tcagaagaac caaagttgga gtgcgatgaa gcctgctttt ttat 54

<210> 4  
<211> 54  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> primer

<400> 4  
gacattgaag ttgacgaact cgacccggac aaatttcgct caagttagta taaa 54

<210> 5  
<211> 120  
<212> DNA  
<213> lambda phage

<400> 5  
agatcttgaa gcctgctttt ttatactaag ttggcattat aaaaaagcat tgcttatcaa 60  
tttgttgcaa cgaacaggtc actatcagtc aaaataaaat cattatttga tttcgaattc 120

<210> 6  
<211> 184  
<212> DNA  
<213> lambda phage

<400> 6  
ctgcagtctg ttacaggtea ctaataccat ctaagtagtt gattcatagt gactgcatat 60  
gttgtgtttt acagtattat gtagtctgtt ttttatgcaa aatctaattt aatatattga 120  
tatttatatc attttacgtt tctcgttcag cttttttata ctaacttgag cgtctagaaa 180  
gctt 184

<210> 7  
<211> 1071  
<212> DNA  
<213> lambda phage

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(1071)

<400> 7  
atg gga aga agg cga agt cat gag cgc cgg gat tta ccc cct aac ctt 48  
Met Gly Arg Arg Arg Ser His Glu Arg Arg Asp Leu Pro Pro Asn Leu

1	5	10	15	
tat ata aga aac aat gga tat tac tgc tac agg gac cca agg acg ggt				96
Tyr Ile Arg Asn Asn Gly Tyr Tyr Cys Tyr Arg Asp Pro Arg Thr Gly				
	20	25	30	
aaa gag ttt gga tta ggc aga gac agg cga atc gca atc act gaa gct				144
Lys Glu Phe Gly Leu Gly Arg Asp Arg Arg Ile Ala Ile Thr Glu Ala				
	35	40	45	
ata cag gcc aac att gag tta ttt tca gga cac aaa cac aag cct ctg				192
Ile Gln Ala Asn Ile Glu Leu Phe Ser Gly His Lys His Lys Pro Leu				
	50	55	60	
aca gcg aga atc aac agt gat aat tcc gtt acg tta cat tca tgg ctt				240
Thr Ala Arg Ile Asn Ser Asp Asn Ser Val Thr Leu His Ser Trp Leu				
65	70	75	80	
gat cgc tac gaa aaa atc ctg gcc agc aga gga atc aag cag aag aca				288
Asp Arg Tyr Glu Lys Ile Leu Ala Ser Arg Gly Ile Lys Gln Lys Thr				
	85	90	95	
ctc ata aat tac atg agc aaa att aaa gca ata agg agg ggt ctg cct				336
Leu Ile Asn Tyr Met Ser Lys Ile Lys Ala Ile Arg Arg Gly Leu Pro				
	100	105	110	
gat gct cca ctt gaa gac atc acc aca aaa gaa att gcg gca atg ctc				384
Asp Ala Pro Leu Glu Asp Ile Thr Thr Lys Glu Ile Ala Ala Met Leu				
	115	120	125	
aat gga tac ata gac gag ggc aag gcg gcg tca gcc aag tta atc aga				432
Asn Gly Tyr Ile Asp Glu Gly Lys Ala Ala Ser Ala Lys Leu Ile Arg				
	130	135	140	
tca aca ctg agc gat gca ttc cga gag gca ata gct gaa ggc cat ata				480
Ser Thr Leu Ser Asp Ala Phe Arg Glu Ala Ile Ala Glu Gly His Ile				
	145	150	155	160
aca aca aac cat gtc gct gcc act cgc gca gca aaa tca gag gta agg				528
Thr Thr Asn His Val Ala Ala Thr Arg Ala Ala Lys Ser Glu Val Arg				
	165	170	175	
aga tca aga ctt acg gct gac gaa tac ctg aaa att tat caa gca gca				576
Arg Ser Arg Leu Thr Ala Asp Glu Tyr Leu Lys Ile Tyr Gln Ala Ala				
	180	185	190	
gaa tca tca cca tgt tgg ctc aga ctt gca atg gaa ctg gct gtt gtt				624
Glu Ser Ser Pro Cys Trp Leu Arg Leu Ala Met Glu Leu Ala Val Val				
	195	200	205	
acc ggg caa cga gtt ggt gat tta tgc gaa atg aag tgg tct gat atc				672
Thr Gly Gln Arg Val Gly Asp Leu Cys Glu Met Lys Trp Ser Asp Ile				
	210	215	220	
gta gat gga tat ctt tat gtc gag caa agc aaa aca ggc gta aaa att				720
Val Asp Gly Tyr Leu Tyr Val Glu Gln Ser Lys Thr Gly Val Lys Ile				
	225	230	235	240
gcc atc cca aca gca ttg cat att gat gct ctc gga ata tca atg aag				768
Ala Ile Pro Thr Ala Leu His Ile Asp Ala Leu Gly Ile Ser Met Lys				
	245	250	255	
gaa aca ctt gat aaa tgc aaa gag att ctt ggc gga gaa acc ata att				816
Glu Thr Leu Asp Lys Cys Lys Glu Ile Leu Gly Gly Glu Thr Ile Ile				
	260	265	270	
gca tct act cgt cgc gaa ccg ctt tca tcc ggc aca gta tca agg tat				864

Ala Ser Thr Arg Arg Glu Pro Leu Ser Ser Gly Thr Val Ser Arg Tyr  
 275 280 285  
 ttt atg cgc gca cga aaa gca tca ggt ctt tcc ttc gaa ggg gat ccg 912  
 Phe Met Arg Ala Arg Lys Ala Ser Gly Leu Ser Phe Glu Gly Asp Pro

290 295 300  
 cct acc ttt cac gag ttg cgc agt ttg tct gca aga ctc tat gag aag 960  
 Pro Thr Phe His Glu Leu Arg Ser Leu Ser Ala Arg Leu Tyr Glu Lys  
 305 310 315 320  
 cag ata agc gat aag ttt gct caa cat ctt ctc ggg cat aag tcg gac 1008  
 Gln Ile Ser Asp Lys Phe Ala Gln His Leu Leu Gly His Lys Ser Asp  
 325 330 335

acc atg gca tca cag tat cgt gat gac aga ggc agg gag tgg gac aaa 1056  
 Thr Met Ala Ser Gln Tyr Arg Asp Asp Arg Gly Arg Glu Trp Asp Lys  
 340 345 350  
 att gaa atc aaa taa 1071  
 Ile Glu Ile Lys  
 355

<210> 8  
 <211> 356  
 <212> PRT  
 <213> lambda phage

<400> 8  
 Met Gly Arg Arg Arg Ser His Glu Arg Arg Asp Leu Pro Pro Asn Leu  
 1 5 10 15  
 Tyr Ile Arg Asn Asn Gly Tyr Tyr Cys Tyr Arg Asp Pro Arg Thr Gly  
 20 25 30  
 Lys Glu Phe Gly Leu Gly Arg Asp Arg Arg Ile Ala Ile Thr Glu Ala  
 35 40 45  
 Ile Gln Ala Asn Ile Glu Leu Phe Ser Gly His Lys His Lys Pro Leu  
 50 55 60

Thr Ala Arg Ile Asn Ser Asp Asn Ser Val Thr Leu His Ser Trp Leu  
 65 70 75 80  
 Asp Arg Tyr Glu Lys Ile Leu Ala Ser Arg Gly Ile Lys Gln Lys Thr  
 85 90 95  
 Leu Ile Asn Tyr Met Ser Lys Ile Lys Ala Ile Arg Arg Gly Leu Pro  
 100 105 110  
 Asp Ala Pro Leu Glu Asp Ile Thr Thr Lys Glu Ile Ala Ala Met Leu  
 115 120 125

Asn Gly Tyr Ile Asp Glu Gly Lys Ala Ala Ser Ala Lys Leu Ile Arg  
 130 135 140  
 Ser Thr Leu Ser Asp Ala Phe Arg Glu Ala Ile Ala Glu Gly His Ile  
 145 150 155 160  
 Thr Thr Asn His Val Ala Ala Thr Arg Ala Ala Lys Ser Glu Val Arg  
 165 170 175  
 Arg Ser Arg Leu Thr Ala Asp Glu Tyr Leu Lys Ile Tyr Gln Ala Ala  
 180 185 190

Glu Ser Ser Pro Cys Trp Leu Arg Leu Ala Met Glu Leu Ala Val Val  
 195 200 205

Thr Gly Gln Arg Val Gly Asp Leu Cys Glu Met Lys Trp Ser Asp Ile  
 210 215 220  
 Val Asp Gly Tyr Leu Tyr Val Glu Gln Ser Lys Thr Gly Val Lys Ile  
 225 230 235 240  
 Ala Ile Pro Thr Ala Leu His Ile Asp Ala Leu Gly Ile Ser Met Lys  
 245 250 255

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

Gln Ile Ser Asp Lys Phe Ala Gln His Leu Leu Gly His Lys Ser Asp  
 325 330 335  
 Thr Met Ala Ser Gln Tyr Arg Asp Asp Arg Gly Arg Glu Trp Asp Lys  
 340 345 350  
 Ile Glu Ile Lys  
 355

<210> 9  
 <211> 219  
 <212> DNA  
 <213> lambda phage

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(219)

<400> 9  
 atg tac ttg aca ctt cag gag tgg aac gca cgc cag cga cgt cca aga 48  
 Met Tyr Leu Thr Leu Gln Glu Trp Asn Ala Arg Gln Arg Arg Pro Arg  
 1 5 10 15  
 agc ctt gaa aca gtt cgt cga tgg gtt cgg gaa tgc agg ata ttc cca 96  
 Ser Leu Glu Thr Val Arg Arg Trp Val Arg Glu Cys Arg Ile Phe Pro  
 20 25 30  
 cct ccg gtt aag gat gga aga gag tat ctg ttc cac gaa tca gcg gta 144  
 Pro Pro Val Lys Asp Gly Arg Glu Tyr Leu Phe His Glu Ser Ala Val  
 35 40 45  
 aag gtt gac tta aat cga cca gta aca ggt ggc ctt ttg aag agg atc 192  
 Lys Val Asp Leu Asn Arg Pro Val Thr Gly Gly Leu Leu Lys Arg Ile  
 50 55 60  
 aga aat ggg aag aag gcg aag tca tga 219  
 Arg Asn Gly Lys Lys Ala Lys Ser

65 70

<210> 10  
 <211> 72

<212> PRT  
<213> lambda phage

<400> 10  
Met Tyr Leu Thr Leu Gln Glu Trp Asn Ala Arg Gln Arg Arg Pro Arg  
1 5 10 15  
Ser Leu Glu Thr Val Arg Arg Trp Val Arg Glu Cys Arg Ile Phe Pro  
20 25 30  
Pro Pro Val Lys Asp Gly Arg Glu Tyr Leu Phe His Glu Ser Ala Val  
35 40 45  
Lys Val Asp Leu Asn Arg Pro Val Thr Gly Gly Leu Leu Lys Arg Ile  
50 55 60  
  
Arg Asn Gly Lys Lys Ala Lys Ser  
65 70

<210> 11  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> oligonucleotide P1

<400> 11  
ctagtaagat cttgaagcct gcttttttat actaagttgg 40

<210> 12  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> oligonucleotide P2

<400> 12  
atgatcgaat tcgaaatcaa ataatgattt tatTTtgact g 41

<210> 13  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> oligonucleotide P3

<400> 13



atgccactgc agtctgttac aggtcactaa taccatctaa g 41

<210> 14  
<211> 46  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> oligonucleotide P4

<400> 14  
accgttaagc ttcttagacg ctcaagttag tataaaaaag ctgaac 46

<210> 15  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> oligonucleotide P5

<400> 15  
ttcttagacg tcaggtggca cttttcgggg aaatgtgc 38

<210> 16  
<211> 37  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> oligonucleotide P6

<400> 16  
taacagagat ctgcgcaga aaaaaaggat ctcaaga 37

<210> 17  
<211> 46  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> oligonucleotide P7

<400> 17

aacagagatc taagcttaga tcctttgcct ggcggcagta gcgcgg 46

<210> 18  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> oligonucleotide P8

<400> 18  
ataaactgca gcaaaaagag tttgtagaaa cgcaa 35

<210> 19  
<211> 36  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> oligonucleotide P9

<400> 19  
agtaattcta gaaagcttaa cacagaaaaa agcccg 36

<210> 20  
<211> 43  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> oligonucleotide P10

<400> 20  
ctagtaggat ccctgcagtg gtcgaaaaaa aaagcccgca ctg 43

<210> 21  
<211> 37  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> oligonucleotide P11

<400> 21

atcgaggtag cagatctccg gataagtaga cagcctg 37

<210> 22  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> oligonucleotide P12

<400> 22  
gaaggtctag agcgcccggt tgacgtgct ag 32

<210> 23  
<211> 1388  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> cloned DNA fragment EcoRI-PstI including gene for tetracycline resistance (small EcoRI-Van911 fragment of pBR322) and transcription terminator ter\_thrL

<400> 23  
gaattctcat gtttgacagc ttatcatcga taagctttaa tgcggtagtt tatcacagtt 60  
aaattgctaa cgcagttagg caccgtgtat gaaatctaac aatgcgctca tcgtcatcct 120  
cggcaccgtc accctggatg ctgtaggcat aggccttggtt atgccggtac tgccgggcct 180  
cttgccggat atcgccattt ccgacagcat cgcagtcac tatggcgtgc tgctagcgtc 240  
atatgcgttg atgcaatttc tatgcgcacc cgttctcgga gcactgtccg accgctttgg 300  
ccgccgccc gtctgtctg ctctgctact tggagccact atcgactacg cgatcatggc 360  
gaccacacc gtctgtgga tcctctacgc cggacgcac gtggccggca tcaccggcgc 420  
  
cacaggtgcg gttgctggcg cctatatcgc cgacatcacc gatggggaag atcgggctcg 480  
ccacttcggg ctcatgagcg cttgtttcgg cgtgggtatg gtggcaggcc ccgtggccgg 540  
gggactgttg ggcgccatct ccttgcatgc accattcctt gcggcgccgg tgctcaacgg 600  
cctcaaccta ctactgggt gcttctaat gcaggagtcg cataaggag agcgtcgacc 660  
gatgcccttg agagccttca acccagtcag ctcttccgg tgggcgcggg gcatgactat 720  
cgtcgcccga cttatgactg tcttctttat catgcaactc gtaggacagg tgccggcagc 780  
gctctgggtc atttccggcg aggaccgctt tcgctggagc gcgacgatga tcggcctgtc 840  
  
gcttgccgga ttcggaatct tgcagccct cgtcaagcc ttcgtcactg gtcccgcac 900  
caaacgtttc ggcgagaagc aggccattat cgcggcatg gcggccgacg cgctgggcta 960  
cgtcttgctg gcgttcgca cgcgaggctg gatggccttc ccattatga tcttctcgc 1020  
ttccggcggc atcgggatgc ccggtttgca ggccatgctg tccaggcagg tagatgacga 1080  
ccatcaggga cagcttcaag gatcgtcgc ggctcttacc agcctaactt cgatcactgg 1140  
accgtgatc gtacggcga tttatgccg ctcggcgagc acatggaacg ggttgcatg 1200  
gattgtaggc gccgccctat acctgtctg cctccccgcg ttgcgtcgcg gtgcatggag 1260  
  
ccgggccacc tcgacctgaa tggaagccgg cggcacctcg ctaacggatt caccactcca 1320  
actagaaagc ttaacacaga aaaaagcccg cacctgacag tgcgggcttt tttttcgac 1380  
cactgcag 1388

<210> 24  
 <211> 1162  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> cloned DNA fragment containing artificial DNA fragment including promoter PA2 (early promoter of phage T7), cat gene for chloramphenicol resistance (CmR), transcription terminator ter\_thrL and attR

<400> 24

```

agatctccgg ataagtagac agcctgataa gtcgcacgaa aaacaggtat tgacaacatg      60
aagtaacatg cagtaagata caaatcgcta ggtaacacta gcagcgtaaa cggggcgctc     120
tagctagagc caagctagct tggccggatc cgagattttc aggagctaag gaagctaaaa      180
tggagaaaaa aatcactgga tataccaccg ttgatataac ccaatggcat cgtaagaac       240
atcttgaggc atttcagtc gttgctcaat gtacctataa ccagaccgtt cagctggata      300
ttacggcctt tttaaagacc gtaaagaaaa ataagcaca gttttatccg gcctttattc     360
acattcttgc cgcctgatg aatgctcatc cggaattccg tatggcaatg aaagacgggtg     420

agctggatgat atgggatagt gttcacctt gttacaccgt tttccatgag caaactgaaa      480
cgttttcatc gctctggagt gaataccacg acgatttccg gcagtttcta cacatatatt      540
cgcaagatgt ggcgtgttac ggtgaaaacc tggcctatct ccctaaaggg tttattgaga      600
atatgttttt cgtctcagcc aatccctggg tgagtgtcac cagttttgat ttaaacgtgg      660
ccaatatgga caacttcttc gcccccggtt tcaccatggg caaatattat acgcaaggcg      720
acaagtgct gatgccgctg gcgattcagg ttcatcatgc cgtctgtgat ggcttccatg      780
tcggcagaat gcttaaatgaa ttacaacagt actgcgatga gtggcagggc ggggcgtaaat     840

ttttttaagg cagttattgg tgcccttaaa cgcctggtgc tacgcctgaa taagtataa      900
taagcggatg aatggcagaa attcgtcgaa gcttaacaca gaaaaagcc cgcacctgac      960
agtgcgggct tttttttcgc accactgcag tctgttacag gtcactaata ccatctaagt     1020
agttgattca tagtgactgc atatgttggt ttttacagta ttatgtagtc tgttttttat     1080
gcaaaatcta attaatata ttgatattta tatcatttta cgtttctcgt tcagcttttt      1140
tatactaact tgagcgtcta ga                                              1162
    
```

<210> 25  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide P1'

<400> 25

```

ctaatatcga tgaagattct tgctcaa                                           27
    
```

<210> 26  
 <211> 34  
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide P2'

<400> 26

gcgttgaatt ccatacaacc tccttagtac atgc

34

<210> 27

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide P3'

<400> 27

gtactagaat tcgtgtaatt gcggagactt tgcg

34

<210> 28

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide P4'

<400> 28

aatagcctgc agttatttga tttcaatttt gtcccaactcc c

41

<210> 29

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide P5'

<400> 29

ttcttagacg tcaggtggca cttttcgggg aaatgtgc

38

<210> 30

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide P6'

<400> 30

taacagagat ctagcgaga aaaaaaggat ctcaaga

37

<210> 31

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide P7'

<400> 31

ataaactgca gcaaaaagag tttgtagaaa cgcaa

35

<210> 32

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide P8'

<400> 32

aacagaagct tttgcctgg cggcagtagc gcgg

34

<210> 33

<211> 879

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> cloned DNA fragment containing cI repressor gene and promoter regions

<400> 33

tcgatgaaga ttcttgctca attgttatca gctatgcgcc gaccagaaca ccttgccgat	60
cagccaaacg tctcttcagg ccaactgacta gcgataactt tccccacaac ggaacaactc	120
tcattgcatg ggatcattgg gtactgtggg tttagtgggt gtaaaaacac ctgaccgcta	180
tccctgatca gtttcttgaa ggtaaaactca tcacccccaa gtctggctat gcagaaatca	240
cctggctcaa cagcctgctc agggtaacg agaattaaca ttccgtcagg aaagcttggc	300
ttggagcctg ttggtgcggg catggaatta ccttcaacct caagccagaa tgcagaatca	360

ctggcttttt tgggtgtgct tacccatctc tccgcatcac ctttggtaaa ggttctaagc 420

tcaggtgaga acatccctgc ctgaacatga gaaaaaacag ggtactcata ctcaattcta 480  
 agtgacggct gcatactaac cgcttcatac atctcgtaga tttctctggc gattgaaggg 540  
 ctaaattctt caacgctaac tttgagaatt tttgcaagca atgcggcggtt ataagcattt 600  
 aatgcattga tgccattaaa taaagcacca acgcctgact gcccacatccc catcttgtct 660  
 gcgacagatt ccigggataa gccaaagtta tttttctttt tttcataaat tgctttaagg 720  
 cgacgtgcgt cctcaagctg ctcttgtgtt aatggtttct ttttgtgtct catacgttaa 780  
 atctatcacc gcaagggata aatatctaac accgtgcgtg ttgactattt tacctctggc 840

ggtgataatg gttgcatgta ctaaggaggt tgtatggaa 879

<210> 34  
 <211> 1290  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> cloned DNA fragment containing int-xis genes

<400> 34

attatttgat ttcaattttg tccactccc tgctctgtc atcacgatac tgtgatgcca 60  
 tgggtgccga cttatgcccg agaagatgtt gagcaaactt atcgcttata tgcttctcat 120  
 agagtcttgc agacaaactg cgcaactcgt gaaaggtagg cggatccctc tcgaaggaaa 180  
 gacctgatgc ttttcgtgcg cgcataaaaat accttgatac tgtgccggat gaaagcggtt 240  
 cgcgacgagt agatgcaatt atggtttctc cgccaagaat ctctttgcat ttatcaagtg 300  
 tttcttcat tgatattccg agagcatcaa tatgcaatgc tgttgggatg gcaattttta 360  
 cgctgtttt gctttgctcg acataaagat atccatctac gatatcagac cacttcattt 420

cgcataaatc accaactcgt tgcccggtaa caacagccag ttccattgca agtctgagcc 480  
 aacatggtga tgattctgct gcttgataaa ttttcaggta ttcgtcagcc gtaagtcttg 540  
 atctccttac ctctgatttt gctgcgcgag tggcagcgac atggtttgtt gttatatggc 600  
 cttcagctat tgctctcgg aatgcacgc tcagtgttga tctgattaac ttggctgacg 660  
 ccgccttgcc ctctctatg tatccattga gcattgccgc aatttctttt tgggtgatgt 720  
 cttaagtgg agcatcagcg agaccctcc ttattgcttt aattttgctc atgtaattta 780  
 tgagtgtctt ctgcttgatt cctctgctgg ccaggatttt ttcgtagcga tcaagccatg 840

aatgtaacgt aacggaatta tcaactgtga ttctcgctgt cagaggcttg tgtttgtgtc 900  
 ctgaaaaata ctcaatgttg gctgtatag cttcagtgat tgcgattcgc ctgtctctgc 960  
 ctaatccaaa ctctttaccg gtcttgggt cctgttagca gtaatatcca ttgtttctta 1020  
 tataaagggt agggggtaaa tcccgccgct catgacttcg ccttcttccc atttctgac 1080  
 ctcttcaaaa ggccacctgt tactggtcga tttaagtcaa cctttaccgc tgattcgtgg 1140  
 aacagatact ctcttccatc cttaaccgga ggtgggaata tctgcatc ccgaacccat 1200  
 cgacgaactg tttcaaggct tcttggacgt cgtggcgtg cgttccactc ctgaagtgtc 1260

aagtacatcg caaagtctcc gcaattacac 1290

<210> 35  
 <211> 351  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> ter\_rrnB fragment (complement)

<400> 35

caaaaagagt ttgtagaaac gcaaaaaggc catccgtcag gatggccttc tgcttaattt	60
gatgcctggc agtttatggc gggcgtcctg cccgccaccc tccgggccgt tgcttcgcaa	120
cgttcaaatc cgctcccggc ggatttgtcc tactcaggag agcggttcacc gacaaacaac	180
agataaaacg aaaggcccag tctttcgact gagcctttcg ttttatttga tgcctggcag	240
ttccctactc tcgcatgggg agaccccaca ctaccatcgg cgctacggcg tttcacttct	300
gagttcggca tgggggtcagg tgggaccacc gcgctactgc cgccaggcaa a	351