

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(43) 국제공개일
2010년 9월 10일 (10.09.2010)

PCT

(10) 국제공개번호
WO 2010/101360 A2

- (51) 국제특허분류:
C12N 15/52 (2006.01) C12P 13/04 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01) C12R 1/19 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2010/000933
- (22) 국제출원일: 2010년 2월 16일 (16.02.2010)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2009-0018128 2009년 3월 3일 (03.03.2009) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 씨제이 제일제당(주) (CJ CHEILJEDANG CORP.) [KR/KR]; 서울시 중구 남대문로 5가 500, 100-749 Seoul (KR).
- (72) 발명자: 겸
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 주재영 (JU, Jae Yeong) [KR/KR]; 경기도 성남시 분당구 구미동 무지개마을대림아파트 104-401, 463-703 Gyeonggi-do (KR). 이광호 (LEE, Kwang Ho) [KR/KR]; 대전시 유성구 어은동 99 한빛아파트 116-805, 305-755 Daejeon (KR). 배현애 (BAE, Hyun Ae) [KR/KR]; 서울시 강서

구 화곡 4동 504-180 번지 국제아트빌 201 호, 157-894 Seoul (KR).

- (74) 대리인: 리엔목특허법인 (Y.P.LEE, MOCK & PARTNERS); 서울시 서초구 서초동 1575-1, 137-875 Seoul (KR).

- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

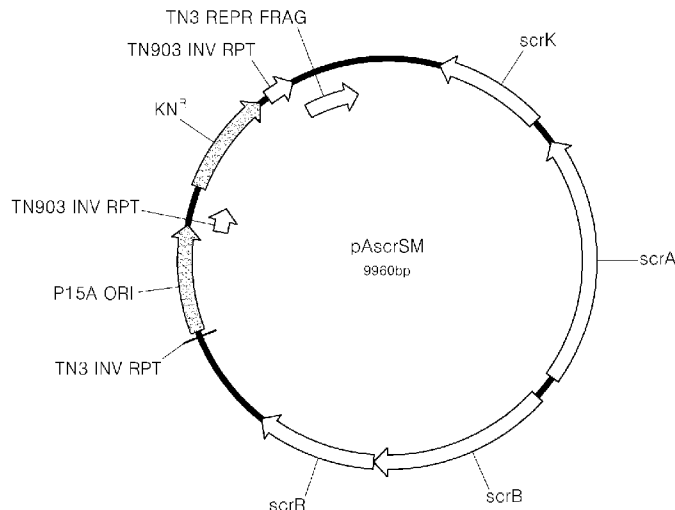
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: MICROORGANISM WHICH PRODUCES L-AMINO ACID AND METHOD FOR PRODUCING L-AMINO ACID USING THE SAME

(54) 발명의 명칭 : L-아미노산 생산 미생물 및 이를 이용한 L-아미노산 생산 방법

[Fig. 1]



(57) Abstract: The present invention relates to an Escherichia sp. microorganism and a method for producing L-amino acid using the same. The Escherichia sp. microorganism with sucrose assimilative property and L-amino acid producing ability is obtained by introducing a gene encoding a sucrose assimilative microorganism-derived sucrose metabolic enzyme to the sucrose non-assimilative Escherichia sp. microorganism having an L-amino acid producing ability.

(57) 요약서: 본 발명은 L-아미노산 생산능을 갖는 수크로오스 비자화성(non-assimilative) 에스케리시아(Escherichia) 속 미생물에 수크로오스 자화성 미생물 유래의 수크로오스 대사 효소를 코딩하는 유전자를 도입하여 수득된, 수크로오스 자화성 및 L-아미노산 생산능을 갖는 에스케리시아 속 미생물 및 이를 이용한 L-아미노산의 생산 방법에 관한 것이다.

WO 2010/101360 A2



BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

명세서와 별도로 규칙 13의 2에 의하여 제출한 기탁된 생물학적 물질에 관한 표시와 함께 (규칙 13의 2.4(d)(i) 및 48.2(a)(viii))

공개:

— 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도로 공개함 (규칙 48.2(g))

명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: L-아미노산 생산 미생물 및 이를 이용한 L-아미노산 생산 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 L-아미노산 생산능을 갖는 수크로오스 비자화성(non-assimilative) 에스케리시아(*Escherichia*) 속 미생물에 수크로오스 자화성 미생물 유래의 수크로오스 대사 효소를 코딩하는 유전자를 도입하여 수득된, 수크로오스 자화성 및 L-아미노산 생산능을 갖는 에스케리시아 속 미생물 및 이를 이용한 L-아미노산의 생산 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 발효 산업에서 주요 탄소원으로 이용되는 전분당은 최근 바이오 연료 개발이 가속화됨에 따라 수요가 급증하고, 이상 기후에 의한 작물의 흉작으로 가격이 급상승하고 있다. 따라서, 전분당에 비해 값이 싼 수크로오스 또는 수크로오스를 다량 포함하는 당밀(molasses)을 발효 산업의 탄소원으로 이용할 경우, 보다 높은 원가 경쟁력을 확보할 수 있다.
- [3] 자연계에 존재하는 야생형 대장균의 약 50 % 정도는 수크로오스를 대사할 수 있는 능력을 갖지만, 발효 산업에서 주로 이용되고 있는 산업용 대장균 K12 균주, B 균주, C 균주 등은 수크로오스를 탄소원으로 이용할 수 있는 수크로오스 자화성이 없다(*Mol. Microbiol.* (1988) 2:1-8, *Can. J. Microbiol.* (1999) 45:418-422). 그러므로 수크로오스 자화능과 관련된 유전자들을 규명하고 이를 개량하여 강화된 수크로오스 자화성 관련 유전자들을 확보하는 것과 이들을 수크로오스 비자화성 산업용 대장균에 도입하여 목적하는 대사산물을 생산하는 것은 발효산업의 가장 중요한 연구주제 중 하나이다.
- [4] 산업용 대장균에 수크로오스 자화성을 부여하기 위해 수크로오스 자화성을 갖는 미생물 유래의 수크로오스 이용성 유전자 또는 유전자군을 도입하는 방법이 주로 이용되고 있다. 예를 들면, 엔테로박테리아세(*Enterobacteriaceae*) 과에 속하는 살모넬라(*Salmonella*) 종(*J. Bacteriol.* (1982) 151:68-76, *Mol. Microbiol.* (1988) 2:1-8, *J. Bacteriol.* (1991) 173:7464-7470, 미국등록특허 제7179623호), 클렙시엘라 뉴모니에(*Klebsiella pneumoniae*)(*J. Gen. Microbiol.* (1988) 134:1635-1644), 및 어위니아 아밀로보라(*Erwinia amylovora*)(*J. Bacteriol.* (2000) 182:5351-5358)에 존재하는 *scr* 레귤론(regulon)을 대장균 K12에 형질전환하여 수크로오스 자화성을 부여한 것이 알려져 있다. 또한 수크로오스 자화성을 갖는 비-K12(non-K12) 대장균 또는 병원성 대장균(*Appl. Environ. Microbiol.* (1992) 58:2081-2088, 미국등록특허 제6960455호) 유래의 *csc* 레귤론, 대장균 AB1281 (미국공개특허 4806480)의 접합 플라스미드(conjugative plasmid) *scr53*에 존재하는 수크로오스 이용성 유전자군 및 그람 양성 미생물인

스트렙토코코스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*)(*J. Bacteriol.* (1989) 171:263-271), *Bacillus subtilis* (*J. Bacteriol.* (1989) 171:1519-1523) 유래의 *scr* 레귤론, *sac* 오페론(operon) 등이 수크로오스 비자화성 미생물에 수크로오스 자화성을 부여하기 위해 이용되고 있다. 미국등록특허 제7179623호는 대장균 VKPM B-7915 유래의 *scr* 레귤론을 도입한 대장균 K12를 이용하여 라이신, 이소루이신, 및 발린을 생산하는 방법을 개시한다.

- [5] 그러나, 수크로오스를 효율적으로 이용할 수 있는 대사 시스템을 갖춘, 산업 미생물 및 이를 이용한 발효 방법에 대한 요구가 여전히 존재한다. 이에, 본 발명자들은 수크로오스 자화성을 갖는 스트렙토코코스 뮤탄스 유래의 수크로오스 이용 유전자군이 도입된, L-아미노산 생산 에스케리시아 속 미생물이 수크로오스로부터 고수율로 L-아미노산을 생산한다는 것을 발견하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 본 발명의 목적은 L-아미노산 생산능을 갖는 수크로오스 비자화성 에스케리시아 속 미생물에 수크로오스 자화성을 부여하여, 수크로오스 자화성 및 L-아미노산 생산능을 갖는 에스케리시아 속 미생물을 제공하는 것이다.
- [7] 본 발명의 또 다른 목적은 수크로오스 자화성 및 L-아미노산 생산능을 갖는 에스케리시아 속 미생물을 이용하여 수크로오스로부터 L-아미노산을 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [8] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 L-아미노산 생산능을 갖는 수크로오스 비자화성(non-assimilative) 에스케리시아(*Escherichia*) 속 미생물에 수크로오스 자화성 미생물 유래의 수크로오스 대사 효소를 코딩하는 유전자를 도입하여 수득된, 수크로오스 자화성 및 L-아미노산 생산능을 갖는 에스케리시아 속 미생물을 제공한다.
- [9] 본 발명에서 "수크로오스 비자화성(non-assimilative) 미생물"은 수크로오스를 탄소원으로 이용하지 못하는 미생물을 의미하고, "수크로오스 자화성 및 L-아미노산 생산능을 갖는 미생물"은 수크로오스를 탄소원으로 대사하여 L-아미노산을 생산할 수 있는 미생물을 의미한다.
- [10] 본 발명에서 "수크로오스 대사 효소"는 수크로오스를 탄소원으로 이용하기 위해 필요한 효소를 의미하며, 프럭토키나아제(fructokinase), 수크로오스 PTS 퍼미아제(sucrosre PTS permease), 수크로오스 히드롤라아제(sucrose hydrolase), 인버타아제(invertase) 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [11] 본 발명에서, "수크로오스 대사 효소"는 "Scr-PTS 효소"로도 지칭된다.
- [12] 수크로오스를 탄소원으로 이용할 수 있는 대사계(metabolic system)는 세포 내로 유입된 수크로오스의 인산화를 위한 포스페이트의 제공원(source)에 따라,

크게 PTS(phosphoenolpyruvate dependent sucrose phosphotransferase)-기반 수크로오스 대사계(Scr-PTS 시스템)와 비-PTS 기반 수크로오스 대사계(Scr-non PTS 시스템)으로 나눌 수 있다. 대부분의 수크로오스를 이용할 수 있는 미생물은 Scr-PTS 시스템을 갖는다.

- [13] 포스포에놀피루베이트(PEP)를 수크로오스의 인산화를 위한 포스페이트의 제공원으로 이용하는 PTS에 기반한 Scr-PTS 시스템의 대표적인 예는 그람 음성 미생물인 살모넬라 타이프뮤리움(*Salmonella typhimurium*)의 접합 플라스미드 pUR400이나 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*)의 염색체 상에 존재하는 *scr* 레귤론 등이 있다. *scr* 레귤론은 *scrK*(프럭토키나아제), *scrY*(수크로오스 포린), *scrA*(수크로오스-특이적 EIIBC 성분), *scrB*(수크로오스-6-포스페이트 히드롤라아제) 및 *scrR*(LacI-관련 수크로오스-특이적 리프레서)의 5개의 유전자로 구성되며, 두 개의 오페론인 *scrK*와 *scrYAB*는 ScrR 리프레서(repressor)에 의하여 음성적으로 조절된다(*Mol. Microbiol.* (1993) 9:195-209). *scr* 레귤론의 작용 기작에 따르면, 외부막 단백질(OMP, outer membrane protein)인 ScrY를 통해서 외부의 수크로오스가 세포외질(periplasmic space)로 유입되고, 유입된 수크로오스는 ScrA가 포함된 수크로오스 PTS 회로(cycle)를 통해 수크로오스-6-포스페이트(sucrose-6-phosphate)의 형태로 세포내부로 들어오게 된다. 수크로오스-6-포스페이트는 ScrB에 의해 글루코오스-6-포스페이트와 프럭토오스로 가수분해되고, 프럭토오스는 ATP 의존적 ScrK에 의해 프럭토오스-6-포스페이트로 전환되어 글루코오스-6-포스페이트와 함께 해당과정을 통해 대사된다(*J. Biotechnol.* (2001) 92:133-158). 수크로오스를 수크로오스-6-포스페이트의 형태로 세포 내로 운반하는 작용을 하는 수크로오스 PTS 회로는 효소 I(EI, Enzyme I), 히스티딘 단백질(HPr, histidine protein), 글루코오스-특이적 효소 IIA(EIIA^{crr}_{Glc}, enzyme IIA) 및 수크로오스-특이적 효소 IIBC(EIIBC^{scr}, enzyme IIBC)로 구성된다(*J. Biotechnol.* (2001) 92:133-158/ *J. Biotechnol.* (2004) 110:181-199).
- [14] 그람 양성균의 Scr-PTS 시스템은 그람 음성 미생물에 비해 다양하다. 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)의 Scr-PTS 시스템으로, *sacA*(수크로오스-6-포스페이트 히드롤라아제), *sacP*(수크로오스-특이적 EIIBC 성분), 및 *sacT*(전사항종결인자(transcriptional antiterminator))로 구성된 *sac* 오페론이 잘 알려져 있다(*J. Bacteriol.* (1989) 171:1519-1523). 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)의 경우, *ptsS*(수크로오스-특이적 EII 성분) 및 *scrB*(수크로오스-6-포스페이트 히드롤라아제)를 통해 수크로오스를 이용하나, ScrB에 의해 수크로오스-6-포스페이트가 가수분해 되어 생성된 유리 프럭토오스가 세포 내에서 바로 이용되지 못하고, 세포 외부로 나와서 프럭토오스 PTS 시스템을 통해서 다시 세포 내로 유입되는 불완전한 구조를 가지고 있다(*J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* (2007) 12:43-50). 그람 양성균의 Scr-PTS 시스템의 또 다른 예로는 스트렙토코쿠스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*

)의 *scr* 레귤론이 알려져 있다. 스트렙토코코스 뮤탄스의 *scr* 레귤론은 *scrK* (프럭토키나아제), *scrA* (수크로오스-특이적 EIIABC 성분), *scrB* (수크로오스-6-포스페이트 히드롤라아제) 및 *scrR* (LacI-관련 수크로오스-특이적 리프레서)의 4개의 유전자로 구성되며, *scrA*와 *scrB*는 ScrR 리프레서에 의하여 음성적으로 조절을 받는다(*J. Bacteriol.* (2003) 185:5791-5799). 스트렙토코코스 뮤탄스의 *scr* 레귤론은 바실러스 서브틸리스나 코리네박테리움 글루타미쿰과 달리 프럭토키나아제 및 수크로오스 전사 조절자까지 모두 보유하고 있는 완전한 Scr-PTS 시스템을 갖추고 있는 것이 특징이다. 따라서, 스트렙토코코스 뮤탄스의 Scr-PTS 시스템은 수크로오스 비자화성 균주에 도입하여 이용하기에 용이하다.

- [15] 스트렙토코코스 속 미생물의 *scr* 레귤론의 작용 기작은 다음과 같다. 외부의 수크로오스가 ScrA를 통하여 수크로오스-6-포스페이트(sucrose-6-phosphate) 형태로 세포내부로 유입된다. 수크로오스-6-포스페이트는 ScrB에 의해서 글루코오스-6-포스페이트와 프럭토오스로 가수분해되고, 프럭토오스는 ATP 의존적 ScrK에 의해 프럭토오스-6-포스페이트로 전환되어 글루코오스-6-포스페이트와 함께 해당과정을 통해 대사된다(*J. Bacteriol.* (1986) 166:426-434, *FEMS Microbiol. Lett.* (1991) 79:339-346). 특히, 스트렙토코코스 속 미생물을 포함한 대부분의 그람 양성균의 ScrA는 그람 음성균인 엔테로박테리아세과에 속하는 미생물이 보유한 ScrA와 다른 특성을 갖는다. 엔테로박테리아세과에 속하는 ScrA의 경우 수크로오스 PTS 회로로 효소 I (EI, Enzyme I), 히스티딘 단백질 (HPr, histidine protein), 및 글루코오스 특이적 효소 IIA (EIIA^{crr}, enzyme IIA)의 활성이 유지되어야 하나(*J. Biotechnol.* (2004) 110:181-199), 스트렙토코코스 뮤탄스의 ScrA의 경우는 효소 IIA의 기능까지 포함하기 때문에 에스케리시아 속 미생물에 도입되었을 때 글루코오스 특이적 효소 IIA의 활성이 유지될 필요가 없다. 실제로, 글루코오스 특이적 효소 IIA를 코딩하는 유전자 *crr*이 불활성화 되어 있는 야생형 균주에 스트렙토코코스 뮤탄스의 *scr* 레귤론과 클렙시엘라 뉴모니아 유래의 *scr* 레귤론을 도입한 균주를 1 % 수크로오스가 포함된 맥콘키 고체 배지 (MacConkey agar plate)에 도말한 경우, 스트렙토코코스 뮤탄스 유래의 *scr* 레귤론을 포함한 균주의 콜로니가 진한 보라색을 띠는 반면, 클렙시엘라 뉴모니아 유래의 *scr* 레귤론이 도입된 균주의 경우는 보라색을 띠지 않는다는 것을 확인할 수 있었다.

- [16] 수크로오스의 세포 내로의 유입을 위해 PTS에 기반하지 않는 수크로오스 대사계인 Scr-non PTS 시스템으로는 *csc* 레귤론이 잘 알려져 있다. *csc* 레귤론은 주로 수크로오스 자화성을 갖는 대장균에서 유래되며, 예를 들면, 야생형 대장균 중 EC3132의 *csc* 레귤론(*Mol. Gen. Genet.* (1992) 235:22-32, 미국등록특허 제6960455호), 대장균 KO11 *csc* 레귤론(*Biotechnol. Lett.* (2004) 26:689-693), 병원성 대장균 O157:H7의 *csc* 레귤론(*J. Bacteriol.* (2002) 184:5307-5316), 및 ATCC13281의 *csc* 레귤론(*Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2007) 74:1031-1040) 등이

알려져 있다. *csc* 레귤론은 *cscB* (양성자 공수송(proton symport)-타입 수크로오스 퍼미아제), *cscK* (프럭토키나아제), *cscA* (수크로오스 히드롤라아제) 및 *cscR* (LacI-관련 수크로오스-특이적 리프레서)로 구성되며, 2개의 오페론, *cscKB*와 *cscA*는 CscR에 의해 음성적으로 조절을 받는다 (*J. Bacteriol.* (2002) 184: 5307-5316).

- [17] Scr-non PTS 시스템은 낮은 농도의 수크로오스를 효율적으로 이용할 수 없기 때문에, *csc* 레귤론이 도입된 대장균은 0.2 % 이하의 수크로오스가 포함된 배지에서 대수 증식기 (doubling time)가 20시간에 이르는 것으로 보고되었다(*J. Bacteriol.* (2002) 184:5307-5316). 그러나 Scr-PTS 시스템은 Scr-non PTS 시스템과는 달리 낮은 농도의 수크로오스까지 세포내로 효율적으로 유입할 수 있다. Scr-PTS 시스템은, 수소의 농도 구배에 의해 외부의 수크로오스를 세포내로 유입하는 Scr-non PTS 의 CscB와는 달리, 에너지원으로 이용되는 PEP를 사용하여 수크로오스를 세포 내로 유입하므로 낮은 농도의 수크로오스까지 세포 내로 효율적으로 유입할 수 있다.
- [18] 본 발명의 일 구체예에서, 수크로오스 자화성 미생물 유래의 수크로오스 대사 효소를 코딩하는 유전자는 수크로오스 자화성을 갖는 미생물에서 유래된 유전자이며, 바람직하게는, PTS에 기반한 Scr-PTS 시스템을 갖는 미생물로부터 유래되는 유전자일 수 있다.
- [19] 본 발명의 일 구체예에서, 수크로오스 자화성 미생물 유래의 수크로오스 대사 효소를 코딩하는 유전자는 수크로오스 자화성 스트렙토코코스 뮤탄스에서 유래된 유전자일 수 있다.
- [20] 본 발명의 일 구체예에서, 수크로오스 자화성 미생물 유래의 수크로오스 대사 효소를 코딩하는 유전자는 수크로오스 자화성 스트렙토코코스 뮤탄스 ATCC700610에서 유래된 유전자일 수 있다.
- [21] 본 발명의 일 구체예에서, 수크로오스 자화성 미생물 유래의 수크로오스 대사 효소를 코딩하는 유전자는 스트렙토코코스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*)에서 유래된 프럭토키나아제, 수크로오스 PTS 퍼미아제, 수크로오스 히드롤라아제, 및 수크로오스 전사 조절자를 코딩하는 유전자로 구성된 조합일 수 있다.
- [22] 본 발명의 일 구체예에서, 수크로오스 자화성 미생물 유래의 프럭토키나아제, 수크로오스 PTS 퍼미아제, 수크로오스 히드롤라아제, 및 수크로오스 전사 조절자를 코딩하는 유전자는 각각 서열번호 4의 *scrK*, 서열번호 5의 *scrA*, 서열번호 6의 *scrB*, 및 서열번호 7의 *scrR*일 수 있다.
- [23] 본 발명에 따른 수크로오스 자화성 및 L-아미노산 생산능을 갖는 에스케리시아 속 미생물의 제조를 위해, 수크로오스 비자화성 에스케리시아 속 미생물에 수크로오스 자화성 미생물에서 유래된 수크로오스 PTS 퍼미아제, 수크로오스 히드롤라아제, 프럭토키나아제, 및 수크로오스 전사 조절자를 코딩하는 유전자를 도입하는 것은 당해 분야에서 잘 알려진 다양한 방법에 의해 수행될 수 있다.

- [24] 본 발명의 일 구체예에서, 수크로오스 PTS 퍼미아제, 수크로오스 히드롤라아제, 프럭토키나아제 및 수크로오스 전사 조절자를 코딩하는 염기서열을 벡터에 도입하여 재조합 벡터를 작제하고, 작제된 재조합 벡터로 수크로오스 비자화성 및 L-아미노산 생산능을 갖는 에스케리시아 속 미생물을 형질전환하는 것에 의해 수크로오스 자화성 및 L-아미노산 생산능을 갖는 에스케리시아 속 미생물을 수득할 수 있다.
- [25] 본 발명의 에스케리시아 속 미생물을 수득하기 위해 사용 가능한 벡터는 특별히 제한되지 않으며 공지된 발현 벡터를 사용할 수 있다. 바람직하게는 pACYC177, pACYC184, pCL, pECCG117, pUC19, pBR322, 또는 pMW118 벡터 등을 사용할 수 있다.
- [26] 본 명세서에서 "형질전환"이라는 용어는 유전자를 숙주 세포 내에 도입하여 숙주 세포에서 발현시킬 수 있도록 하는 것을 의미한다. 형질전환된 유전자는 숙주세포 내에서 발현될 수 있다면, 세포 내에서 숙주세포의 염색체 내에 삽입되어 존재하거나, 또는 염색체와 독립적으로 존재할 수 있다. 또한, 형질전환 유전자는 폴리펩티드를 코딩할 수 있는 폴리뉴클레오티드로 정의되며 DNA 및 RNA를 포함한다. 형질전환 유전자는 숙주세포 내로 도입되어 발현될 수 있는 적합한 형태일 수 있다. 예를 들면, 형질전환 유전자는, 자체적으로 발현되는데 필요한 모든 요소를 포함하는 폴리뉴클레오티드 구조체인 발현 카세트(expression cassette)의 형태로 숙주세포에 도입될 수 있다. 발현 카세트는 통상적으로 형질전환 유전자에 작동 가능하게 연결되어 있는 프로모터(promoter), 전사 종결 신호, 리보솜 결합부위 및 번역 종결신호를 포함한다. 발현 카세트는 자체 복제가 가능한 발현 벡터 형태일 수 있다. 또한, 형질전환 유전자는 그 자체 또는 폴리뉴클레오티드 구조체의 형태로 숙주세포에 도입되어, 숙주세포에서 발현에 필요한 서열과 작동 가능하게 연결되는 것일 수도 있다.
- [27] 본 발명의 일 구체예에서, L-아미노산 생산능을 갖는 수크로오스 비자화성 에스케리시아 속 미생물은 수크로오스 자화성을 얻기 위해 스트렙토코쿠스 뮤탄스 유래의 Scr-PTS 효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터에 의해 형질전환될 수 있다.
- [28] 본 발명의 일 구체예에서, L-아미노산 생산능을 갖는 수크로오스 비자화성 에스케리시아 속 미생물은 수크로오스 자화성을 얻기 위해 서열번호 8의 서열을 포함하는 재조합 플라스미드에 의해 형질전환될 수 있다. 구체적으로, 서열번호 8의 재조합 플라스미드는 스트렙토코쿠스 뮤탄스(ATCC700610)로부터 유래된 *scrKABR*, 즉, 프럭토키나아제를 코딩하는 서열번호 4의 *scrK*, 수크로오스 PTS 퍼미아제를 코딩하는 서열번호 5의 *scrA*, 수크로오스 히드롤라아제를 코딩하는 서열번호 6의 *scrB*, 및 수크로오스 전사 조절자를 코딩하는 서열번호 7의 *scrR*을 포함한다.
- [29] 본 발명에 따른 수크로오스 자화성 및 L-아미노산 생산능을 갖는 에스케리시아

속 미생물은 L-아미노산을 생산할 수 있고, 동시에 수크로오스 PTS 퍼미아제, 수크로오스 히드롤라아제, 프럭토키나아제 및 수크로오스 전사 조절자의 활성을 가져서 수크로오스를 탄소원으로 이용할 수 있는 에스케리시아 속 미생물이며, 바람직하게는 대장균(*Escheichia coli*)일 수 있다.

- [30] 본 발명의 일 구체예에서, L-아미노산은 L-쓰레오닌, O-숙시닐-호모세린, O-아세틸-호모세린, L-메티오닌, L-라이신, L-호모세린, L-이소루신, L-발린, 또는 L-트립토판일 수 있다.
- [31] 본 발명의 일 구체예에서, L-아미노산은 L-쓰레오닌일 수 있다.
- [32] 본 발명의 일 구체예에서, 수크로오스 자화성 및 L-아미노산 생산능을 갖는 에스케리시아 속 미생물은 L-쓰레오닌 생산능을 갖는 대장균 ABA5G을 스트렙토코크스 뮤탄스 유래의 *scrKABR* 유전자군을 포함하는 서열번호 8의 염기서열을 갖는 벡터로 형질전환하여 수득된 대장균 CA03-0208(KCCM 10994)일 수 있다.
- [33] 또한, 본 발명은 수크로오스 자화성 및 L-아미노산 생산능을 갖는 에스케리시아 속 미생물을 수크로오스를 탄소원으로 포함하는 배지에서 배양하는 단계, 및 상기 배양액으로부터 L-아미노산을 회수하는 단계를 포함하는, L-아미노산을 생산하는 방법을 제공한다.
- [34] 본 발명의 일 구체예에서, L-아미노산은 L-쓰레오닌, O-숙시닐-호모세린, O-아세틸-호모세린, L-메티오닌, L-라이신, L-호모세린, L-이소루신, L-발린, 또는 L-트립토판일 수 있다.
- [35] 본 발명의 일 구체예에서, L-아미노산은 L-쓰레오닌일 수 있다.
- [36] 본 발명에 따른 L-아미노산을 생산하는 방법은 수크로오스 자화성 및 L-아미노산 생산능을 갖는 에스케리시아 속 미생물을 배양하는 단계를 포함한다.
- [37] 본 발명의 일 구체예에서, 에스케리시아 속 미생물을 배양하는 단계는 해당 미생물에 적당한 배지와 배양조건에서 수행될 수 있다. 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자는 주어진 균주에 적당한 배지 및 배양조건을 용이하게 선택할 수 있고 조정할 수 있다. 배양 방법은 회분식, 연속식 및 유가식 배양을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [38] 본 발명의 일 구체예에서, 에스케리시아 속 미생물을 배양하는 단계는 균주를 수크로오스를 포함한 적당한 탄소원, 질소원, 아미노산, 비타민 등을 함유한 통상의 배지 내에서 호기성 조건 하에 온도, pH 등을 조절하면서 배양한다.
- [39] 본 발명에서 사용되는 배지는 수크로오스 또는 수크로오스를 다량으로 포함한 당밀도 주탄소원으로 포함하며, 주탄소원 외에 다양한 탄소원을 적정량으로 포함할 수 있다. 배지에 포함될 수 있는 질소원은 단독으로 또는 조합되어 사용될 수 있는 펩톤, 효모 추출물, 육즙, 맥아 추출물, 옥수수 침지액, 및 대두밀과 같은 유기 질소원 및 요소, 황산암모늄, 염화암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄, 및 질산암모늄과 같은 무기질소원을 포함한다. 배지 내에 인의

공급원으로는 인산이수소칼륨, 인산수소이칼륨 또는 그의 소듐-함유 염이 포함될 수 있다. 그 외에 아미노산, 비타민 및 적절한 전구체 등이 포함될 수 있다. 배지의 주요 성분들은 배양물에 회분식 또는 연속식으로 첨가될 수 있다.

- [40] 배양 중에 수산화암모늄, 수산화칼륨, 암모니아, 인산 및 황산과 같은 화합물을 배양물에 적절한 방식으로 첨가하여, 배양물의 pH를 조정할 수 있다. 또한 배양 중에 지방산 폴리글리콜 에스테르와 같은 소포제를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다. 배양 온도는 보통 27°C 내지 37°C, 바람직하게는 30°C 내지 35°C일 수 있다. 배양은 목적 물질인 L-아미노산의 생성량이 주어진 조건 하에서 증가되는 한 지속될 수 있고, 예를 들면, 10 내지 100 시간일 수 있다.

- [41] 본 발명에 따른 L-아미노산을 생산하는 방법은 미생물의 배양물로부터 L-아미노산을 회수하는 단계를 포함한다. 배양물로부터 L-아미노산의 회수는 배양 방법, 예를 들어 회분식, 연속식 또는 유가식 배양 방법 등에 따라 당해 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 수행될 수 있다.

- [42] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

- [43] 본 발명에 따른 수크로오스 자화성을 갖는, L-아미노산 생산 미생물을 이용하면, 값싼 수크로오스를 탄소원으로 이용하여 경제적으로 L-아미노산을 생산할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [44] 도 1은 본 발명의 일 구체예에 따른 스트렙토코코스 뮤탄스 유래의 *scrKABR*를 포함하는 재조합 플라스미드 pAscrSM의 작제도이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [45] **실시예 1: 수크로오스 이용성 유전자 *scr* 레귤론의 클로닝 및 염기서열 결정**

- [46] (1) 수크로오스 자화성 미생물 유래의 *scr* 레귤론의 클로닝

- [47] 수크로오스 비자화성 에스케리시아 속 미생물에 수크로오스 자화성을 부여하기 위해 수크로오스 이용성 유전자군인 *scr* 레귤론을 수크로오스 자화성 미생물인 스트렙토코코스 뮤탄스로부터 획득하였다. 그람 양성균인 스트렙토코코스 뮤탄스의 *scr* 레귤론은 *scrK* (프럭토키나아제), *scrA* (수크로오스-특이적 EIIBC 성분), *scrB* (수크로오스-6-포스페이트 히드롤라아제), 및 *scrR* (LacI-관련 수크로오스-특이적 리프레서)의 4개의 유전자로 구성되며, *scrA*와 *scrB*는 ScrR 리프레서 (repressor)에 의하여 음성적으로 조절된다(J. Bacteriol. (2003) 185:5791-5799). 특히, 스트렙토코코스 뮤탄스의 *scr* 레귤론은 바실러스 서브틸리스나 코리네박테리움 글루타미쿰과 달리 프럭토키나아제 및 수크로오스 전사 조절자까지 모두 보유하고 있는 완전한 Scr-PTS 시스템을 갖추고 있는 것이 특징이다.

- [48] Scr-PTS 시스템인 *scrKABR* 유전자를 미국생물자원센터(American Type Culture Collection)로부터 구매한 스트렙토코코스 뮤탄스의 염색체(ATCC700610D-5)를 주형으로 한 PCR(Polymerase Chain Reaction)을 통해 수득하였다.
스트렙토코코스 뮤탄스의 *scr* 레귤론인 *scrKABR*는 서열번호 1과 서열번호 2의 프라이머 쌍을 이용한 PCR을 통해 게놈 상에 연속적으로 존재하는 4종의 유전자 전부를 단일 폴리뉴클레오티드로 증폭시켜 수득하였다. 서열번호 1의 프라이머는 제한 효소 *ApaLI* 부위를 가지며, 서열번호 2의 프라이머는 *StuI* 부위를 갖는다. 이 때 이용한 프라이머는 KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)에 등록된 스트렙토코코스 뮤탄스(KEGG organism, smu)의 *scrKABR* 및 주변 염기서열에 대한 정보를 바탕으로 제작하였다.
- [49] PCR은 94°C에서의 3분의 변성 후, 94°C에서의 30초 변성, 56°C에서의 30초 어닐링(annealing) 및 72°C에서의 5분 중합으로 구성된 사이클을 25회 반복한 후, 72°C에서 7분간 중합반응을 수행하였다. 그 결과 스트렙토코코스 뮤탄스로부터 6480 bp의 폴리뉴클레오티드를 수득하였다. PCR에 의해 수득된 폴리뉴클레오티드를 *ApaLI* 및 *FspI*에 의해 처리한 후, pACYC177 벡터의 *ApaLI*, *FspI* 위치에 클로닝하고, 대장균 DH5α에 형질전환하여 1% 수크로오스를 함유한 맥콘키 고체배지(MacConkey agar plate)에 도말하였다. 형성된 콜로니 중 진한 보라(purple)색을 띠는 콜로니를 선별한 후 통상적으로 알려진 플라스미드 미니프렙(mini-prep)법을 이용하여 스트렙토코코스 뮤탄스 유래의 플라스미드를 수득하였다.
- [50]
- [51] (2) *scrKABR* 유전자의 염기서열 결정
- [52] 상기 (1)에서 수득된 스트렙토코코스 뮤탄스의 *scr* 레귤론이 포함된 플라스미드를 pAscrSM으로 명명하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상적으로 이용되는 염기서열 결정 방법을 이용하여 *ApaLI*, *FspI* 위치에 클로닝된 *scrKABR*의 염기서열을 결정하였다(서열번호 3). 도 1은 스트렙토코코스 뮤탄스 유래의 *scrKABR*을 포함하는 재조합 플라스미드 pAscrSM의 작제도이다. 서열번호 3의 *scrKABR* 서열에서 392번째부터 1273번째 염기서열은 *scrK* 유전자(서열번호 4), 1473번째부터 3467번째 염기서열은 *scrA* 유전자(서열번호 5), 3663번째부터 5102번째 염기서열은 *scrB* 유전자(서열번호 6), 및 5105번째부터 6067번째 염기서열은 *scrR* 유전자(서열번호 7)로 확인하였다.
- [53]
- [54] 실시예 2. 수크로오스 자화성, L-아미노산 생산 미생물의 작제
- [55] (1) 재조합 플라스미드에 의한 형질전환
- [56] 실시예 1에서 수득된, 수크로오스 이용성 유전자군인 *scr* 레귤론을 포함하는 pAscrSM(서열번호 8)을 쓰레오닌을 생산하는 대장균에 도입하였을 때, 수크로오스를 탄소원으로 이용하여 성장하고, 실제로 효율적인 쓰레오닌

생산이 가능한지 여부를 확인하기 위해 통상적인 형질전환 방법을 통해 상기 플라스미드를 대장균 ABA5G에 도입하였다. pAscrSM에 의해 형질전환된 대장균 ABA5G를 1% 수크로오스를 함유한 맥콘키 고체배지(MacConkey agar plate)에 도말하고, 형성된 콜로니 중 진한 보라(purple)색을 띠는 콜로니를 선별하였다. 선별된 콜로니에 대해 PCR을 통해 수크로오스 이용성 유전자가 포함된 플라스미드를 갖는 것을 확인하였다.

[57]

[58] (2) pAscrSM 형질전환 미생물에 의한 쓰레오닌 생산

[59] 상기 (1)에서 수득한 콜로니를 33°C 배양기(incubator)에서 LB 고체 배지(트립톤 1 g, NaCl 1g, 효모 추출물 0.5g/100ml, 1.5% 한천) 중에 밤새 배양한 후, 하기 표 1에 표시된 조성을 갖는 수크로오스를 주 탄소원으로 포함하는 25 mL 역가 배지에 한 백금이씩 접종한 다음, 33°C, 200 rpm의 배양기에서 90 시간 배양했다.

[60] 표 1

조성물	농도 (리터당)
수크로오스	70 g
KH ₂ PO ₄	2 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	25 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	5 mg
MnSO ₄ ·4H ₂ O	5 mg
효모 추출물	2 g
탄산칼슘	30 g
pH	6.8

[61] 대조균은 플라스미드에 의해 형질전환되지 않은 모균주인 대장균 ABA5G였고, 글루코오스 대비 수크로오스의 이용율 및 쓰레오닌 생산성을 비교하기 위해, 수크로오스를 글루코오스로 치환한 표 1의 조성의 배지에서도 배양을 수행하였다. 배양 결과가 하기 표 2에 요약된다.

[62] 표 2

	글루코오스 (70 g/L)		수크로오스 (70 g/L)	
	OD	L-쓰레오닌(g/L)	OD	L-쓰레오닌(g/L)
ABA5G	14.2	21.2	-	-
ABA5G/pAscrSM	12.1	17.4	13.2	21.7

- [63] 표 2에 표시된 바와 같이 pAscrSM을 포함하는 대장균 ABA5G/pAscrSM은 글루코오스가 포함된 역가 배지에서 90 시간 배양하여 17.4 g/L의 L-쓰레오닌을 생산하였고, 수크로오스가 포함된 역가 배지에서는 21.7 g/L의 L-쓰레오닌을 생산하였다. 반면에, 수크로오스 이용성 유전자를 포함하지 않는 모균주인 대장균 ABA5G균주는 글루코오스를 이용하여 90 시간 배양하였을 경우 21.2 g/L의 L-쓰레오닌을 생산하였으나, 수크로오스가 유일한 탄소원으로 포함된 배지에서는 전혀 성장하지 못했다. 이 결과는 L-쓰레오닌 생산능을 갖는 수크로오스 비자화성 대장균 ABA5G에 pAscrSM이 도입되면서 수크로오스 자화성이 부여되었고, 수크로오스를 이용하여 글루코오스 역가 배지를 이용하는 모균주 대장균 ABA5G와 동등 수준 이상의 L-쓰레오닌 생산성을 갖는다는 것을 보여준다.
- [64] 따라서, pAscrSM이 포함한 재조합 균주의 경우, 수크로오스 자화성 및 L-쓰레오닌의 생산성이 우수함을 확인할 수 있었으며, 상기 형질전환된 미생물을 CA03-0208로 명명하고, 2009년 2월 23일자로 대한민국 서울 특별시 서대문구 홍제 1동 361-221 번지에 소재하는 국제기탁기관인 한국종균협회 부설 한국미생물보존센터에 수탁번호 KCCM 10994로 기탁하였다.
- [65] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않으면서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아닌 것으로 이해되어야 한다.

서열목록 Free Text

- [66] 본 명세서에 기재된 서열번호 1 내지 서열번호 8의 서열이 첨부된 서열 목록에 기재된다.

청구범위

- [청구항 1] L-아미노산 생산능을 갖는 수크로오스 비자화성(non-assimilative) 에스케리시아(*Escherichia*) 속 미생물에 스트렙토코커스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*)에서 유래된 프럭토키나아제, 수크로오스 PTS 퍼미아제, 수크로오스 히드롤라아제, 및 수크로오스 전사 조절자를 코딩하는 유전자를 도입하여 수득된, 수크로오스 자화성 및 L-아미노산 생산능을 갖는 에스케리시아 속 미생물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 프럭토키나아제, 수크로오스 PTS 퍼미아제, 수크로오스 히드롤라아제, 및 수크로오스 전사 조절자를 코딩하는 유전자는 각각 서열번호 4의 *scrK*, 서열번호 5의 *scrA*, 서열번호 6의 *scrB*, 및 서열번호 7의 *scrR*인 것인 에스케리시아 속 미생물.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 에스케리시아 속 미생물은 상기 수크로오스 비자화성 에스케리시아 속 미생물을 서열번호 8의 재조합 벡터로 형질전환시켜 수득된 것인 에스케리시아 속 미생물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 에스케리시아 속 미생물은 대장균(*E. coli*)인 것인 에스케리시아 속 미생물.
- [청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 대장균은 대장균 CA03-0208(KCCM 10994)인 것인 에스케리시아 속 미생물.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 L-아미노산은 L-쓰레오닌인 것인 에스케리시아 속 미생물.
- [청구항 7] 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 에스케리시아 속 미생물을 수크로오스를 탄소원으로 포함하는 배지에서 배양하는 단계, 및 상기 배양액으로부터 L-아미노산을 회수하는 단계를 포함하는, L-아미노산을 생산하는 방법.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 L-아미노산은 L-쓰레오닌인 것인 방법.

[Fig. 1]

