

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2014년 12월 24일 (24.12.2014)



(10) 국제공개번호
WO 2014/204058 A1

- (51) 국제특허분류:
C12N 1/19 (2006.01) C12P 1/00 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2013/009643
- (22) 국제출원일: 2013년 10월 28일 (28.10.2013)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2013-0071130 2013년 6월 20일 (20.06.2013) KR
- (71) 출원인: 경상대학교산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY) [KR/KR]; 660-701 경상남도 진주시 진주대로 501, Gyeongsangnam-do (KR).
- (72) 발명자: 김선원 (KIM, Seon Won); 660-712 경상남도 진주시 내동면 순환로 425-61 남강휴먼빌아파트 101-1404, Gyeongsangnam-do (KR). 장희정 (JANG, Hui

Jeong); 660-290 경상남도 진주시 주약동 110-10 #305, Gyeongsangnam-do (KR). 이현서 (LEE, Hyeon Seo); 621-916 경상남도 김해시 어방동 어방아파트 205-304, Gyeongsangnam-do (KR). 윤상환 (YOON, Sang Hwal); 660-701 경상남도 진주시 진주대로 501 경상대학교, Gyeongsangnam-do (KR).

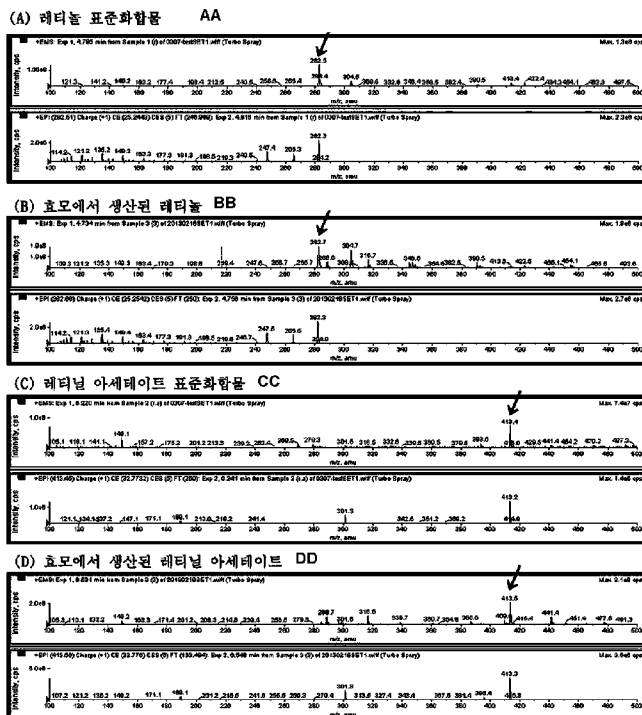
(74) 대리인: 이준호 (LEE, Joon Ho) 등; 137-953 서울시 서초구 서초중앙로 53 6층 (서초동, 대림빌딩), Seoul (KR).

(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, BN, 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, IR, IS, JP, KE, KG, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, 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.

[다음 쪽 계속]

(54) Title: MICROORGANISM COMPRISING GENE FOR CODING ENZYME INVOLVED IN PRODUCING RETINOID AND METHOD FOR PRODUCING RETINOID BY USING SAME

(54) 발명의 명칭 : 레티노이드 생산에 관여하는 효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 미생물 및 이를 이용한 레티노이드의 생산 방법



AA ... Retinol reference compound
BB ... Retinol produced in an enzyme
CC ... Retinyl acetate reference compound
DD ... Retinyl acetate produced in an enzyme

(57) Abstract: The present invention relates to a microorganism comprising a gene for coding an enzyme involved in producing retinoid and a method for producing retinoid by using the same, and more specifically, to: a microorganism capable of mass-producing retinoid at a remarkable efficiency by comprising a gene for coding an enzyme involved in producing retinoid; and a method for producing retinoid by using the same.

(57) 요약서: 본 발명은 레티노이드 생산에 관여하는 효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 미생물 및 이를 이용한 레티노이드의 생산 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 레티노이드 생산에 관여하는 효소를 코딩하는 유전자를 포함함으로써, 안전하면서 우수한 효율로 레티노이드를 대량 생산할 수 있는 미생물 및 이를 이용한 레티노이드의 생산 방법에 관한 것이다.



(84) **지정국** (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, 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, RS, SE, SI, SK,

SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 레티노이드 생산에 관여하는 효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 미생물 및 이를 이용한 레티노이드의 생산 방법 기술분야

- [1] 본 발명은 레티노이드 생산에 관여하는 효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 미생물 및 이를 이용한 레티노이드의 생산 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 레티노이드는 비타민 A와 화학적으로 관련된 친지질성 이소프레노이드 분자의 클래스이다. 레티노이드는 알코올(예를 들면, 레티놀), 알데히드(예를 들면, 레티날), 카르복실산(예를 들면, 레티노산), 또는 에스테르(예를 들면, 레티닐 아세테이트) 기능기와 함께, β -이논 고리 및 다불포화(polyunsaturated) 결사슬로 구성된다. 이들은 시력보호, 골 발달 및 재생, 항산화 효과와 더불어 피부 노화 방지와 같은 인체 건강에 있어 필수적인 역할을 하고 특정 암의 위험을 감소시킨다고 알려져 있다.
- [3] 레티노이드는 최근 수년간 주름개선 및 피부 질환 치료를 위한 효과적인 화장품 및 의약품 원료로서 큰 관심을 받아 왔다. 레티노이드 시장 규모는 세계적으로 약 160억불 정도로 추정된다. 화학적으로 합성된 레티노이드는 대표적인 상업적 원료이다. 레티놀은 펜타디엔 유도체의 환원에 의해 화학적으로 합성된 레티날의 산성화 또는 가수분해로부터 생산된다. 그러나 이러한 화학적 과정은 복잡한 정제 단계 및 원하지 않는 부산물 형성과 같은 단점을 갖는다. 동물은 과일 및 야채로부터 얻은 카로티노이드로부터 레티노이드를 생산하는 반면, 식물은 레티노이드를 합성할 수 없다. 레티노이드 합성의 전체 경로는 보조기(prosthetic group)로서 레티날을 갖는 박테리오텍신 또는 프로테오텍신을 포함하는 미생물에서만 가능하다. 그러나, 미생물은 레티날의 단백질 결합 형태를 생산하므로 자유 레티노이드의 대량 생산에는 적합하지 않다. 지금까지 생물학적 생산을 위해서 효소를 이용한 일부 제한적인 시도가 있었지만 성공적인 결과는 없었다. 따라서, 대사적으로 형질전환된 미생물을 사용하는, 레티노이드 생산을 위한 생명공학적인 방법의 개발이 필요하다.
- [4] 레티노이드는 그의 반응성 있는 콘쥬게이트된 이중 결합으로 인해 화학적으로 매우 불안정하고, 열, 산소 및 빛에 의해 쉽게 산화되고 이성체화된다. 또한 레티노이드는 생물학적으로 레티노산을 통해 쉽게 분해된다. 따라서, 레티노이드를 보다 효율적으로 생산하는 방법이 요구되고 있다.
- [5] 한국공개특허 제2008-42387호에는 이소프레노이드와 카로티노이드 생합성 유전자로 형질전환된 대장균 및 이를 이용한 아스타잔틴의 대량 생산방법이 개시되어 있다.

- [6] <선행기술문헌>
- [7] <특허문헌>
- [8] 한국공개특허 제2008-42387호

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [9] 본 발명은 안전하면서 우수한 효율로 레티노이드를 생산할 수 있는 미생물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [10] 본 발명은 이러한 미생물을 이용하여 레티노이드를 생산하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제 해결 수단

- [11] 1. 레티노이드 생산에 관여하는 효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 사카로마이세스 속 미생물.
- [12] 2. 위 1에 있어서, 상기 유전자는 서열번호 2 내지 9로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 아미노산 서열을 코딩하는 것인, 미생물.
- [13] 3. 위 1에 있어서, 상기 유전자는 서열번호 2, 3 및 10 중 적어도 하나; 서열번호 4 및 11 중 적어도 하나; 서열번호 5, 6 및 12 중 적어도 하나; 서열번호 7; 서열번호 8; 및 서열번호 9, 13 및 21 중 적어도 하나;의 아미노산 서열을 코딩하는 것인, 미생물.
- [14] 4. 위 3에 있어서, 서열번호 1의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자를 더 포함하는, 미생물.
- [15] 5. 위 1에 있어서, 사카로마이세스 세레비지에에 상기 유전자를 도입한 것인, 미생물.
- [16] 6. 위 1에 있어서, 사카로마이세스 세레비지에 Y2805에 상기 유전자를 도입한 것인, 미생물.
- [17] 7. 레티노이드 생산에 관여하는 효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 코리네박테리움 속 미생물.
- [18] 8. 위 7에 있어서, 상기 유전자는 서열번호 2 내지 9로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 아미노산 서열을 코딩하는 것인, 미생물.
- [19] 9. 위 7에 있어서, 상기 유전자는 서열번호 2, 3 및 10 중 적어도 하나; 서열번호 4 및 11 중 적어도 하나; 서열번호 5, 6 및 12 중 적어도 하나; 서열번호 7; 서열번호 8; 및 서열번호 9, 13 및 21 중 적어도 하나;의 아미노산 서열을 코딩하는 것인, 미생물.
- [20] 10. 위 9에 있어서, 서열번호 14 및 15 중 적어도 하나의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자를 더 포함하는, 미생물.
- [21] 11. 위 9에 있어서, 서열번호 16 내지 20의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자를 더 포함하는, 미생물.
- [22] 12. 위 7에 있어서, 서열번호 22 내지 24로 이루어진 군에서 선택된 적어도

- 하나의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자를 불활성화 또는 결손화한, 미생물.
- [23] 13. 위 7에 있어서, 코리네박테리움 글루타미쿰에 상기 유전자를 도입한 것인, 미생물.
- [24] 14. 위 7에 있어서, 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032에 상기 유전자를 도입한 것인, 미생물.
- [25] 15. 위 1 내지 14 중 어느 한 항에 있어서, 유전자는 벡터에 의해 도입된 것인, 미생물.
- [26] 16. 위 1 내지 15 중 어느 한 항의 미생물을 배양하는 단계; 및 상기 미생물의 배양물로부터 레티노이드를 분리하는 단계를 포함하는 레티노이드의 생산 방법.
- [27] 17. 위 16에 있어서, 상기 미생물의 배양은 친유성 물질을 포함하는 배지 중에서 수행되는 것인, 방법.
- [28] 18. 위 17에 있어서, 상기 분리는 친유성 물질 상으로부터 되는 것인, 방법.
- [29] 19. 위 17에 있어서, 상기 친유성 물질은 옥탄, 데칸, 도데칸, 테트라데칸, 피토스쿠알란, 미네랄 오일, 이소프로필 미리스테이트, 세틸 에틸헥사노에이트, 디옥타노일 데카노일 글리세롤, 스쿠알란, 또는 이들의 조합인, 방법.

발명의 효과

- [30] 본 발명의 레티노이드 생산에 관여하는 효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 미생물은 안전하면서도 우수한 효율로 레티노이드를 대량생산할 수 있다.
- [31] 본 발명의 미생물을 이용한 레티노이드 생산 방법을 통해 얻어진 레티노이드는 화장품, 식품, 의약품 등의 소재로 널리 활용될 수 있고, 화장품, 식품, 의약품 등의 제조를 위해 특정 레티노이드의 효과적인 생산이 필요할 경우 본 발명의 레티노이드 생산 방법을 활용하기 적합하다.

도면의 간단한 설명

- [32] 도 1은 β -카로틴의 레티날, 레티놀, 레티노산, 및 레티닐 에스테르를 포함하는 레티노이드로의 변환을 나타낸 도면이다.
- [33] 도 2는 레티날 생합성의 MEP 경로 및 외래의 MVA 경로를 도식적으로 나타낸 도면이다.
- [34] 도 3은 레티노이드 표준화합물(A)과 사카로마이세스(B)를 통해 생산된 레티노이드의 HPLC 피크를 나타낸 것이다.
- [35] 도 4는 레티노이드 표준화합물(A, C)과 사카로마이세스에서 생산된 레티노이드(B, D)의 LC-MS 피크를 나타낸 것이다.
- [36] 도 5는 레티노이드 표준화합물(A)과 코리네박테리움(B)를 통해 생산된 레티노이드의 HPLC 피크를 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [37] 본 발명은 레티노이드 생산에 관여하는 효소를 코딩하는 유전자를 포함함으로써, 안전하면서 우수한 효율로 레티노이드를 대량 생산할 수 있는

미생물 및 이를 이용한 레티노이드의 생산 방법에 관한 것이다.

[38]

[39] 본 명세서에는 한국특허출원번호 10-2013-0071130의 명세서 및 도면에 기재되어 있는 모든 내용이 참조로 포함된다.

[40] 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

[41] 본 발명은 레티노이드 생산능을 갖는 미생물을 제공한다.

[42] 용어 "레티노이드 (retinoids)"는 비타민 A에 화학적으로 관련된 화학물질의 부류를 나타낸다. 레티노이드의 구조는 시클릭 말단기, 폴리엔 측쇄 및 극성 말단기로 구성된다. 상기 폴리엔 측쇄의 C=C 이중결합이 교대로 되어 형성된 공액 시스템 (conjugated system)은 레티노이드의 색 (보통 노란색, 오렌지 또는 적색)을 띄게 한다. 많은 레티노이드는 발색소(chromophore)이다. 측쇄 및 말단기를 변화시킴으로써 다양한 레티노이드가 생성될 수 있다. 상기 레티노이드는 레티날, 레티놀, 레티노산, 레티닐 아세테이트, 또는 이들의 조합일 수 있다. 또한, 상기 레티노이드는 레티날, 레티놀, 레티노산, 레티닐 아세테이트, 또는 이들의 조합의 생체 내 분해 산물일 수 있다.

[43] 본 발명의 레티노이드 생산능을 갖는 미생물은 레티노이드 생산에 관여하는 효소를 코딩하는 유전자를 포함한다.

[44] 상기 미생물은 사카로마이세스 속 또는 코리네박테리움 속 미생물에 상기 유전자를 도입한 것일 수 있다.

[45] 사카로마이세스 속 미생물은 특별히 한정되지 않고 레티노이드 생산능에 따라 적절히 선택될 수 있으며, 예를 들면 사카로마이세스 세레비지에, 바람직하게는 사카로마이세스 세레비지에 Y2805에 상기 유전자를 도입한 것일 수 있다.

[46] 사카로마이세스 세레비지에 Y2805 균주는 사카로마이세스 세레비지에의 야생형(wild-type) 균주로서, 식약청 등으로부터 분양받아 사용할 수 있다.

[47] 코리네박테리움 속 미생물은 특별히 한정되지 않고 레티노이드 생산능에 따라 적절히 선택될 수 있으며, 예를 들면 코리네박테리움 글루타미쿰, 바람직하게는 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032(*Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, taxid: 196627; GenBank NID: NC_003450, ATCC13032)에 상기 유전자를 도입한 것일 수 있다.

[48] 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032는 국제 기탁 기관인 ATCC(American Type Culture Collection, Manassas, USA)에 기탁되어 있으므로 분양받아 사용할 수 있다.

[49] 본 발명의 레티노이드 생산능을 갖는 미생물은 레티노이드 생산에 관여하는 효소를 코딩하는 유전자를 포함한다.

[50] 본 발명에서 레티노이드 생산에 관여하는 효소는 레티노이드의 생산에 필요한 효소, 레티노이드의 생산량을 증가시키는 효소 또는 이들의 조합을 총칭한다.

[51] 상기 유전자는 서열번호 2의 판토에아 아글로메란스(*Pantoea agglomerans*) 유래의 제라닐제라닐 피로포스페이트(GGPP) 신타제의 아미노산 서열,

서열번호 3의 시네코시스티스 중 PCC6803(*Synechocystis* sp. PCC6803) 유래의 제라닐제라닐 피로포스페이트(GGPP) 신타제의 아미노산 서열, 서열번호 4의 판토에아 아글로메란스 유래의 피토엔 신타제의 아미노산 서열, 서열번호 5의 판토에아 아글로메란스 유래의 피토엔 디히드로게나제의 아미노산 서열, 서열번호 6의 로도수도모나스 팔러스트리스(*Rhodopseudomonas palustris*) 유래의 피토엔 디히드로게나제의 아미노산 서열, 서열번호 7의 판토에아 아나나티스(*Pantoea ananatis*) 유래의 라이코펜-베타-시클라제의 아미노산 서열, 서열번호 8의 배양되지 않는 해양 세균 66A03(uncultured marine bacterium 66A03) 유래의 베타-카로틴 모노옥시게나제의 아미노산 서열 및 서열번호 9의 크로노박터 사카자키(*Cronobacter sakazakii*) 유래의 IPP 이소머라제의 아미노산 서열 등을 코딩하는 것일 수 있다. 이들은 단독 또는 2종 이상 조합하여 사용할 수 있다.

[52] 본 발명의 레티노이드 생산능을 갖는 미생물이 사카로마이세스 속인 경우에는, 바람직하게는 상기 유전자는 서열번호 2, 3 및 10 중 적어도 하나; 서열번호 4 및 11 중 적어도 하나; 서열번호 5, 6 및 12 중 적어도 하나; 서열번호 7; 서열번호 8; 및 서열번호 9, 13 및 21 중 적어도 하나;의 아미노산 서열을 코딩하는 것일 수 있다. 그러한 경우에, 보다 효율적으로 레티노이드를 생산하여 생산량을 극대화할 수 있다.

[53] 서열번호 10은 내재적인 GGPP 신타제의 아미노산 서열, 서열번호 11은 내재적인 피토엔 신타제의 아미노산 서열, 서열번호 12는 내재적인 피토엔 디히드로게나제의 아미노산 서열, 서열번호 13은 코리네박테리움 글루타미쿰 유래의 이소펜테닐 디포스페이트 (IPP) 이소머라제의 아미노산 서열, 서열번호 21은 대장균 유래의 이소펜테닐 디포스페이트 (IPP) 이소머라제의 아미노산 서열이다.

[54] 또한, 사카로마이세스 속 미생물은 서열번호 1의 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*) 유래의 하이드록시메틸글루타릴(HMG)-CoA 리덕타제의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자를 더 포함할 수 있다. 이는 레티노이드 생산량을 더욱 촉진하는 역할을 한다.

[55] 본 발명의 레티노이드 생산능을 갖는 미생물이 코리네박테리움 속인 경우에는, 바람직하게는 상기 유전자는 서열번호 2, 3 및 10 중 적어도 하나; 서열번호 4 및 11 중 적어도 하나; 서열번호 5, 6 및 12 중 적어도 하나; 서열번호 7; 서열번호 8; 및 서열번호 9, 13 및 21 중 적어도 하나;의 아미노산 서열을 코딩하는 것일 수 있다. 그러한 경우에, 보다 효율적으로 레티노이드를 생산하여 생산량을 극대화할 수 있다.

[56] 또한, 코리네박테리움 속 미생물은 서열번호 14의 대장균 유래 1-테옥시자일롤로즈-5-포스페이트 (DXP) 신타제의 아미노산 서열, 서열번호 15의 내재적인 1-테옥시자일롤로즈-5-포스페이트 (DXP) 신타제의 아미노산 서열 등을 코딩하는 유전자를 더 포함할 수 있다. 이들은 단독 또는 2종 이상

조합하여 사용할 수 있다. 이는 레티노이드 생산량을 더욱 촉진하는 역할을 한다.

- [57] DXP는 내재적 MEP 경로에서 속도 결정 단계에 해당하는 효소이므로, 본 발명의 미생물은 DXP 신타제의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자를 더 포함함으로써 베타-카로틴을 고농도로 생산할 수 있다. 도 1은 β -카로틴의 레티날, 레티놀, 레티노산, 및 레티닐 에스테르를 포함하는 레티노이드로의 변환을 나타낸다.
- [58] 또한, 코리네박테리움 속 미생물은 내재적으로 MEP 경로를 가지고 있는 것이나, 아세틸-CoA로부터 IPP를 생산하는데 관여하는 외래 메발로네이트 경로의 효소를 코딩하는 유전자를 더 포함할 수 있다. 도 2는 레티날 생합성의 MEP 경로 및 외래의 MVA 경로를 도식적으로 나타낸 도면이다.
- [59] 상기 외래 메발로네이트 경로의 효소를 코딩하는 유전자는 예를 들면, 서열번호 16의 엔테로코커스 패칼리스 (*Enterococcus faecalis*) 유래의 아세틸-CoA 아세틸트랜스퍼라제/하이드록시메틸글루타릴 (HMG)-CoA 리덕타제의 아미노산 서열, 서열번호 17의 엔테로코커스 패칼리스 유래의 HMG-CoA 신타제의 아미노산 서열, 서열번호 18의 스트렙토코커스 뉴모니아 (*Streptococcus pneumoniae*) 유래의 메발로네이트 키나제의 아미노산 서열, 서열번호 19의 스트렙토코커스 뉴모니아 유래의 포스포메발로네이트 키나제의 아미노산 서열, 서열번호 20의 스트렙토코커스 뉴모니아 유래의 메발로네이트 디포스포이트 데카르복실라제의 아미노산 서열 등을 코딩하는 것일 수 있다. 이들은 단독 또는 2종 이상 조합하여 사용할 수 있다.
- [60] IPP 이소머라제는 카로테노이드 또는 이소프레노이드 생합성 과정에서 이소프렌 단위의 조합 비율, 즉, 각각의 이소프렌 단위에 대하여 IPP와 DMAPP의 비율을 조절하는 결정적인 역할을 한다.
- [61] 또한, 본 발명의 미생물은 상기 IPP로부터 베타-카로틴을 합성하는데 관여하는 효소를 코딩하는 유전자가 추가적으로 도입된 것일 수 있고, 두 카피의 IPP 이소머라제가 도입되어 IPP로부터 DMAPP로의 전환이 촉진된 것일 수 있다. 따라서, 상기 미생물은 베타-카로틴을 고농도로 생산할 수 있다.
- [62] 상기 유전자는 당업계에 알려진 임의의 방법에 의하여 도입되는 것일 수 있다. 상기 유전자는 예를 들면, 벡터에 의하여 도입되는 것일 수 있다.
- [63] 용어 "벡터"란 연결되어 있는 다른 핵산을 전달할 수 있는 핵산 분자를 의미한다. 특정한 유전자의 도입을 매개하는 핵산 서열이라는 관점에서, 본 발명에서 벡터는, 핵산 구조체, 및 카세트와 상호 교환 가능하게 사용될 수 있는 것으로 해석된다.
- [64] 벡터에는 예를 들면 플라스미드 또는 바이러스 유래 벡터 등이 포함된다. 플라스미드란 추가의 DNA가 연결될 수 있는 원형의 이중가닥 DNA 고리를 말한다. 본 발명에서 사용되는 벡터에는 예를 들면, 플라스미드 발현벡터, 플라스미드 셔틀벡터, 바이러스 발현벡터(예, 복제결합 레트로바이러스 벡터,

레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 헤르페스 심플렉스 바이러스 벡터, 폭스바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 아데노 연관 바이러스 벡터 등) 및 이들과 동등한 기능을 수행할 수 있는 바이러스 벡터가 포함되나 이들에 한정되는 것은 아니다.

- [65] 본 발명은 미생물은 레티노이드의 생산능을 촉진하기 위해 특정 유전자를 활성화시키거나, 불활성화 또는 결손한 것일 수 있다. 예를 들어, 코리네박테리움 속 미생물은 서열번호 22 내지 24로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자를 불활성화 또는 결손한 것일 수 있다.
- [66] 코리네박테리움 속 미생물은 내재적인 crtEb 유전자가 코딩하는 서열번호 24의 아미노산 서열을 갖는 프레닐 트랜스퍼라제에 의해 라이코펜으로부터 플라부크산틴(flavuxanthin)을 합성하고, 합성된 플라부크산틴은 내재적인 crtYe 및 crtYf 유전자가 각각 코딩하는 서열번호 23 및 24의 서열을 갖는 카로티노이드-엡실론-시클라아제(carotenoid-ε-cyclase)에 의해 테카프레노크산틴으로 전환된다.
- [67] 본 발명은 서열번호 22 내지 24로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자를 불활성화 또는 결손시킴으로써, 테카프레노크산틴 생산을 억제하고 라이코펜을 축적시켜, 이를 최종 산물인 레티노이드의 전구체로 이용할 수 있다.
- [68] 용어 "결손" 또는 "불활성화"란 상기 유전자의 발현이 감소되거나 발현이 이루어지지 않는 것을 의미한다. 상기 "불활성화"는 당업계에 알려진 방법에 의하여 이루어질 수 있다. 예를 들면, 상동 재조합(homologous recombination)에 의하여 불활성화된 것일 수 있다. 상기 상동 재조합은 예를 들면, 전이인자 돌연변이(transposon mutagenesis) 또는 P1 형질도입(P1 transduction)에 의하여 매개된 것일 수 있다.
- [69] 서열번호 1의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자(HMG1)는 서열번호 25의 뉴클레오티드 서열을 갖고, 서열번호 2의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자(crtE)는 서열번호 26의 뉴클레오티드 서열을 갖고, 서열번호 3의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자(crtE)는 서열번호 27의 뉴클레오티드 서열을 갖고, 서열번호 4의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자(crtB)는 서열번호 28의 뉴클레오티드 서열을 갖고, 서열번호 5의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자(crtI)는 서열번호 29의 뉴클레오티드 서열을 갖고, 서열번호 6의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자(crtI)는 서열번호 30의 뉴클레오티드 서열을 갖고, 서열번호 7의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자(crtY)는 서열번호 31의 뉴클레오티드 서열을 갖고, 서열번호 8의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자(SR)는 서열번호 32의 뉴클레오티드 서열을 갖고, 서열번호 9의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자(idi)는 서열번호 33의 뉴클레오티드 서열을 갖고, 서열번호 10의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자(crtE)는 서열번호 34의

뉴클레오티드 서열을 갖는다.

- [70] 서열번호 11의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자(*crtB*)는 서열번호 35의 뉴클레오티드 서열을 갖고, 서열번호 12의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자(*crtI*)는 서열번호 36의 뉴클레오티드 서열을 갖고, 서열번호 13의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자(*idi*)는 서열번호 37의 뉴클레오티드 서열을 갖고, 서열번호 14의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자(*dxs*)는 서열번호 38의 뉴클레오티드 서열을 갖고, 서열번호 15의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자(*dxs*)는 서열번호 39의 뉴클레오티드 서열을 갖고, 서열번호 16의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자(*mvaE*)는 서열번호 40의 뉴클레오티드 서열을 갖고, 서열번호 17의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자(*mvaS*)는 서열번호 41의 뉴클레오티드 서열을 갖고, 서열번호 18의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자(*mvaK1*)는 서열번호 42의 뉴클레오티드 서열을 갖고, 서열번호 19의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자(*mvaK2*)는 서열번호 43의 뉴클레오티드 서열을 갖고, 서열번호 20의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자(*mvaD*)는 서열번호 44의 뉴클레오티드 서열을 갖는다.
- [71] 서열번호 21의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자(*idi*)는 서열번호 45의 뉴클레오티드 서열을 갖고, 서열번호 22의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자(*crtYe*)는 서열번호 46의 뉴클레오티드 서열을 갖고, 서열번호 23의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자(*crtYf*)는 서열번호 47의 뉴클레오티드 서열을 갖고, 서열번호 24의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자(*crtEb*)는 서열번호 48의 뉴클레오티드 서열을 갖는다.
- [72] 또한, 본 발명은 레티노이드의 생산능을 갖는 미생물을 이용하여 레티노이드를 생산하는 방법을 제공한다.
- [73] 본 발명의 일 구현예에 따라 본 발명의 레티노이드의 생산 방법을 단계별로 상세히 설명한다.
- [74] 먼저, 상기 레티노이드 생산능을 갖는 미생물을 배양한다.
- [75] 배양은 합성, 반합성, 또는 복합 배양 배지에서 수행될 수 있다.
- [76] 배양 배지는 특별히 한정되지 않으며, 탄소원, 질소원, 비타민 및 미네랄로 구성된 배지를 사용할 수 있다. 예를 들어, MRS (Man-Rogosa-Sharp) 액체 배지, 우유가 첨가된 액체 배지 등을 사용할 수 있다.
- [77] 배지의 탄소원으로는 예를 들면 전분, 포도당, 자당, 갈락토스, 과당, 글리세롤 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 것을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 포도당 또는 갈락토스를 사용할 수 있다.
- [78] 배지의 질소원으로는 예를 들면 황산암모늄, 질산암모늄, 질산나트륨, 글루탐산, 카사미노산, 사카로마이세스추출물, 펩톤, 트립톤, 대두박 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 것을 사용할 수 있으며, 미네랄은 예를 들면 염화나트륨, 인산제이칼륨, 황산마그네슘 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 것을 사용할 수 있다.

- [79] 배지 내에서 탄소원, 질소원 및 미네랄의 함량은 특별히 한정되지 않으며, 예를 들면 리터당 10 내지 100g, 5 내지 40g 및 0.5 내지 4 g일 수 있다.
- [80] 비타민은 예를 들면, 비타민 B, 비타민 C, 비타민 D, 비타민 E 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 비타민은 탄소원, 질소원, 미네랄 등의 배지와 동시에 첨가하거나, 멸균하여 준비된 배지에 첨가할 수 있다.
- [81] 배양은 통상의 사카로마이세스 속 또는 코리네박테리움 속의 배양 조건 하에 수행될 수 있으며, 예를 들면 15 내지 45°C에서 24 내지 96시간 동안 수행될 수 있다.
- [82] 배양액 중의 배양 배지를 제거하고 농축된 균체만을 분리하거나 제거하기 위해 원심분리 또는 여과과정을 거칠 수 있으며 이러한 단계는 당업자의 필요에 따라 수행할 수 있다. 농축된 균체는 통상적인 방법에 따라 냉동하거나 냉동건조하여 그 활성을 잃지 않도록 보존할 수 있다.
- [83] 레티노이드 생산능을 갖는 미생물이 사카로마이세스 속인 경우, 배양은 탄소원으로서 포도당과 갈락토스를 포함하는 배지에서 수행될 수 있다. 갈락토스는 도입된 유전자의 프로모터 발현을 촉진하므로, 갈락토스를 포함하는 배지에서 배양시 레티노이드의 생산이 더욱 촉진된다.
- [84] 갈락토스를 포함하는 배지의 갈락토스 함량은 특별히 한정되지 않고 프로모터의 발현을 충분히 촉진하면서 최적의 생육을 나타낼 수 있도록 적절히 선택될 수 있으며, 예를 들면 0.5 내지 2부피%로 포함될 수 있고, 바람직하게는 0.5 내지 1.5부피%로 포함될 수 있다.
- [85] 상기 배지는 예를 들면, 펩톤 0.5 내지 4중량%, 사카로마이세스 추출물 0.5 내지 2중량%, 포도당 0.5 내지 2부피%, 갈락토스 0.5 내지 2부피%를 포함하는 것일 수 있다.
- [86] 레티노이드 생산능을 갖는 미생물이 코리네박테리움 속인 경우, 배양은 탄소원으로서 포도당을 포함하는 배지에서 수행될 수 있다.
- [87] 포도당을 포함하는 배지의 포도당 함량은 특별히 한정되지 않고 최적의 생육을 나타낼 수 있도록 적절히 선택될 수 있으며, 예를 들면 0.5 내지 2부피%로 포함될 수 있고, 바람직하게는 0.5 내지 1.5부피%로 포함될 수 있다.
- [88] 상기 배지는 예를 들면, 리터 당 K_2HPO_4 0.5 내지 2g, $(NH_4)_2SO_4$ 5 내지 20g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1 내지 1g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 5 내지 40mg, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 5 내지 40mg, NaCl 20 내지 80mg, 요소 0.5 내지 4g, 비오틴 0.05 내지 0.5mg 및 티아민 0.05 내지 0.5mg을 포함하는 것일 수 있다.
- [89] 본 발명에 따른 레티노이드 생산능을 갖는 미생물의 배양은 친유성 물질 존재하의 배양 배지에서 수행될 수 있다. 그러한 경우에 상기 미생물을 배지 표면의 친유성 물질 상(phase)에 위치시켜 배양한다.
- [90] 레티노이드 생산능을 갖는 미생물로부터의 레티노이드의 생산량은 일정 시점에서 최고치를 나타내고 그 이후에는 점차 감소한다. 이는 미생물 성장의

정체 상태 동안 추가적인 레티노이드의 합성은 중단되고, 세포 내에서 레티노이드의 산화적 분해가 일어나기 때문이다.

[91] 그러나 친유성 물질은 생성된 레티노이드가 세포 내에서 분해되기 전에 흡수함으로써, 레티노이드 생산 효율을 개선할 수 있다.

[92] 친유성 물질은 상기 기능을 할 수 있으면서 미생물의 성장에 영향을 미치지 않는 것이라면 특별히 한정되지 않으며, 예를 들면 옥탄, 데칸, 도데칸, 테트라데칸, 피토스쿠알란, 미네랄 오일, 이소프로필 미리스테이트, 세틸에틸헥사노에이트, 디옥타노일 데카노일 글리세롤, 스쿠알란, 또는 이들의 조합일 수 있고, 바람직하게는 데칸, 도데칸, 중량 미네랄 오일, 또는 이들의 조합일 수 있다.

[93] 상기 친유성 물질은 미생물의 성장에 영향을 미치지 않으면서, 소수성 레티노이드 추출을 위해 소수성이고 낮은 휘발성을 갖는 것일 수 있다.

[94] 본 발명의 미생물이 사카로마이세스 속인 경우 도데칸 또는 데칸을 포함하는 배지, 코리네박테리움 속인 경우 중량 미네랄 오일을 포함하는 배지에서 배양하는 것이 보다 바람직하다.

[95] 친유성 물질의 배지 내에서의 함량은 상기 기능을 다 할 수 있는 범위 내라면 특별히 한정되지 않으며, 예를 들면 배지 대 친유성 물질의 부피비가 1:0.1-3.0, 1:0.2-3.0, 1:0.5-3.0, 1:1.0-3.0, 1:1.5-3.0, 1:2.0-3.0, 1:2.5-3.0, 1:0.2-2.5, 1:0.2-2.0, 1:0.2-1.5, 1:0.2-1.0, 1:0.2-0.5, 1:0.5-2.5, 1:0.5-2.0, 1:0.5-1.5, 1:0.5-1.0, 1:0.8-2.5, 1:0.8-2.0, 1:0.8-1.5, 1:0.8-1.2, 1:0.8-1.0 등이 가능하다.

[96] 배양은 교반되는 상태로 수행될 수 있다.

[97] 교반되는 경우, 100 내지 300rpm, 예를 들면, 100 내지 280rpm, 100 내지 260rpm, 100 내지 240rpm, 100 내지 220rpm, 100 내지 200rpm, 100 내지 180rpm, 100 내지 160rpm, 100 내지 140rpm, 100 내지 120rpm, 120 내지 300rpm, 120 내지 280rpm, 120 내지 260rpm, 120 내지 240rpm, 120 내지 220rpm, 120 내지 200rpm, 120 내지 180rpm, 120 내지 160rpm, 120 내지 140rpm, 150 내지 300rpm, 150 내지 280rpm, 150 내지 260rpm, 150 내지 240rpm, 150 내지 220rpm, 150 내지 200rpm, 150 내지 180rpm, 140 내지 160rpm, 200 내지 300rpm, 200 내지 280rpm, 200 내지 260rpm, 200 내지 240rpm, 200 내지 220rpm 또는 100 내지 150 rpm으로 교반될 수 있다.

[98] 배양이 친유성 물질을 포함하는 배지에서 수행되는 경우, 교반 시에 상기 친유성 물질은 배지 중에서 분산되어 세포와 접촉된다. 친유성 물질은 배지 중에 분산됨으로써 미생물과 접촉하는 면적이 넓어져 배양 중 레티노이드를 효율적으로 세포로부터 분리되게 하여 안정화 및/또는 용해시킬 수 있다.

[99] 이후, 상기 미생물의 배양물로부터 레티노이드를 분리한다.

[100] 미생물의 배양이 친유성 물질 존재하의 배양 배지에서 수행된 경우에는, 분리는 친유성 물질 상으로부터 수행된다.

[101] 레티노이드를 분리하는 방법은 특별히 한정되지 않고 당 분야에 공지된 방법에 의할 수 있으며, 예를 들면 원심분리, 여과, 결정화, 이온교환 크로마토그래피,

고성능 액체크로마토그래피(HPLC 등의 방법을 들 수 있다. 구체적으로, 균체를 분리한 후에 아세톤 등의 용매를 이용한 추출 후에 고순도의 제품을 얻기 위해서는 HPLC 또는 결정화 작업등을 통한 분리정제가 진행될 수 있다.

[102] 레티노이드는 화장품, 식품 또는 의약품의 소재로 널리 활용된다.

[103] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다.

[104]

[105] 실시예 1-1. 사카로마이세스 세레비지에 형질전환체의 제조

[106] 사카로마이세스 세레비지에를 레티노이드를 생산하도록 형질전환하기 위하여 우선 레티노이드 생산 유전자 6 종을 프로모터와 종결자(terminator)를 갖는 벡터의 프로모터와 종결자 사이에 도입하여 생산유전자가 각각 프로모터와 종결자를 갖도록 한 벡터 6종을 제조하였다.

[107] 상기 재조합 벡터로부터 중합효소연쇄반응(PCR)을 이용하여 GAL10 프로모터와 GAL7 종결자를 갖는 각각의 유전자를 증폭하고 이를 대장균-사카로마이세스 셔틀벡터에 순차적으로 도입하여 최종적으로 레티노이드 생산용 재조합 셔틀벡터를 제조하였다.

[108] 상기 재조합 셔틀벡터를 사카로마이세스 세레비지에에 형질전환하여 레티노이드 생산능을 갖는 사카로마이세스 형질전환체를 제조하였다. 상기 내용을 아래의 항목에서 상세히 설명하도록 한다.

[109]

[110] (1) 레티노이드 생산에 관여하는 유전자를 포함하는 재조합 셔틀 벡터의 제조

[111] 사카로마이세스 세레비지에를 레티노이드를 생산능을 갖도록 형질전환하기 위하여 우선 레티노이드 생산 유전자 6 종을 프로모터와 종결자(terminator)를 갖는 벡터의 프로모터와 종결자 사이에 도입하여 이들 유전자가 각각 프로모터와 종결자를 갖도록 한 벡터 6종을 제조하였다.

[112] 레티노이드 생산에 관여하는 유전자 6종의 정보는 하기 표 1에 나타내었고, 해당 유전자를 증폭하기 위한 프라이머는 하기 표 2에 나타내었다.

[113] 프라이머 1과 2를 이용하여 사카로마이세스 세레비지에의 게놈으로부터 HMG1 유전자를 증폭한 후 제한 효소 EcoRI과 SalI으로 절단 하고 이를 동일한 제한효소로 처리한 YEG α -HIR525(KCTC 8519P, Choi et al., Appl. Microbial. biotechnol., 1994, 42, 587)에 도입하여 재조합 벡터 pGAL-HMG1를 제조하였다.

[114] 프라이머 3과 4를 이용하여 판토에아 아글로메란스의 게놈으로부터 crtE를 증폭한 후 제한 효소 EcoRI과 SalI으로 절단하고 이를 동일한 제한효소로 처리한 YEG α -HIR525 벡터에 도입하여 pGAL-YEPAcrtE를 제조하였다.

[115] 프라이머 5와 6을 이용하여 판토에아 아글로메란스의 게놈으로부터 crtB를 증폭한 후 제한 효소 EcoRI과 SalI으로 절단하고 이를 동일한 제한효소로 처리한 YEG α -HIR525 벡터에 도입하여 pGAL-YEPAcrtB를 제조하였다.

[116] 프라이머 7과 8을 이용하여 판토에아 아글로메란스의 게놈으로부터 crtI를

증폭한 후 제한 효소 EcoRI과 SalI으로 절단하고 이를 동일한 제한효소로 처리한 YEG α -HIR525 벡터에 도입하여 pGAL-YEPActrI를 제조하였다.

[117] 프라이머 9와 10을 이용하여 판토에아 아나나티스의 게놈으로부터 crtY를 증폭한 후 제한 효소 EcoRI과 SalI으로 절단하고 이를 동일한 제한효소로 처리한 YEG α -HIR525 벡터에 도입하여 pGAL-YEPAUcrtY를 제조하였다.

[118] 프라이머 11과 12를 이용하여 pT-DHBSR 재조합 플라스미드 벡터 (HJ Jang et al, 2011, Microbial Cell Factories, 10:59)로부터 SR을 증폭한 후 제한 효소 EcoRI과 SalI으로 절단하고 이를 동일한 제한효소로 처리한 YEG α -HIR525 벡터에 도입하여 pGAL-YESYNSR을 제조하였다.

[119]

[120] 표 1

[Table 1]

서열번호	유전자명	효소명	참고문헌 또는 Genbank 허가번호
1	<i>HMG1</i>	HMG-CoA 리덕타제	10-2009-0104505
2	<i>crtE</i>	제라닐제라닐 피로포스페이트 신타제	M37280
4	<i>crtB</i>	피토엔 신타제	M37280
5	<i>crtI</i>	피토엔 테히드로게나제	M37280
7	<i>crtY</i>	라이코펜 베타-시클라제	D90087
8	<i>SR</i>	베타-카로틴 모노옥시게나제	HJ Jang et al, 2011, Microbial Cell Factories, 10:59

[121] 표 2

[Table 2]

프라이머 번호	염기서열 (5'-3')	서열번호
1	GCGCGAATTCATGGACCAATTGGTGAAGTGAAGTC	49
2	GCGCGTCGACTTTTAGGATTTAATGCAGGTGACGGAC	50
3	GCGCGAATTCAAAAATGGTGGCAGTAAAGCGG	51
4	GCGCGTCGACTTAGGCGATTTTCATGACCGGTG	52
5	GCGCGAATTCAAAAATGAGCAACCGCCGCTG	53
6	GCGCGTCGACTTAAACGGGACGCTGCCAAG	54
7	GCGCGAATTCAAAAATGAAAAAACCGTTGTGATGG	55
8	GCGCGTCGACTTATTCAGATCCTCAATCATCAGG	56
9	GCGCGAATTCAAAAATGCAACCGCATTATGATCTGATTC	57
10	GCGCGTCGACTTAACGATGAGTGTGATATGCGCTTG	58
11	GCGCGAATTCAAAAATGGTCTGATGCTGATTTGATGG	59
12	GCGCGTCGACTTACTTTTGTATTTGATACGGGAAGAG	60

[122]

[123] 상기 제조한 재조합 플라스미드 벡터 pGAL-YEPActrE, pGAL-HMG1, pGAL-YEPActrI, pGAL-YEPActrB, pGAL-YEPAUcrtY, pGAL-YESYNSR로부터 하기 표 3의 프라이머를 이용하여 각각 6종의 GAL10 프로모터와 GAL7 종결자를 가진 유전자를 증폭하였으며, 이를 상기에서 사용한 YEG α -HIR525 셔틀벡터에 순차적으로 도입하였다.

- [124] 상세히 설명하면 우선 프라이머 13과 14를 이용하여 pGAL-YEPActrE 으로부터 GAL10 프로모터와 GAL7 종결자를 가진 crtE를 증폭하여 제한효소 KpnI과 NotI으로 절단한 후 동일 효소로 절단한 YEG α -HIR525 서플벡터에 삽입하였다.
- [125] 프라이머 15와 16을 이용하여 pGAL-HMG1 으로부터 GAL10 프로모터와 GAL7 종결자를 가진 HMG1을 증폭하여 제한효소 NotI과 SpeI으로 절단한 후 상기 제조한 제조합 벡터의 동일 제한부위에 삽입하였다.
- [126] 프라이머 17과 18을 이용하여 pGAL-YEPActrI 으로부터 GAL10 프로모터와 GAL7 종결자를 가진 crtI를 증폭하여 제한효소 EcoRV와 NheI으로 절단한 후 상기 제조한 제조합 벡터의 동일 제한부위에 삽입하였다.
- [127] 프라이머 19와 20을 이용하여 pGAL-YEPActrB 으로부터 GAL10 프로모터와 GAL7 종결자를 가진 crtB를 증폭하여 제한효소 NheI과 BglII로 절단한 후 상기 제조한 제조합 벡터의 동일 제한부위에 삽입하였다.
- [128] 프라이머 21과 22를 이용하여 pGAL-YEPAUcrtY 으로부터 GAL10 프로모터와 GAL7 종결자를 가진 crtY를 증폭하여 제한효소 BamHI과 PacI으로 절단한 후 상기 제조한 제조합 벡터의 동일 제한부위에 삽입하였다.
- [129] 프라이머 23과 24를 이용하여 pGAL-YESYNSR 으로부터 GAL10 프로모터와 GAL7 종결자를 가진 SR을 증폭하여 제한효소 PacI과 XbaI으로 절단한 후 상기 제조한 제조합 벡터의 동일 제한부위에 최종적으로 삽입하여 사카로마이세스에서 레티노이드를 생합성 하도록 제조된 제조합 서플벡터 pGAL-EHIBYSR을 제조하였다.

[130]

[131] 표 3

[Table 3]

프라이머 번호	염기서열 (5'-3')	서열번호
13	GCGCGCGGCCGCATCGCTTCGCTGATTAATTACCCC	61
14	GCGCACTAGTACAATGAGCCTTGCTGCAACATC	62
15	GCGCGGTACCATCGCTTCGCTGATTAATTACCCC	63
16	GCGCGCGGCCGCACAATGAGCCTTGCTGCAACATC	64
17	GCGCGATATCACTAGTATCGCTTCGCTGATTAATTACCCC	65
18	GCGCGCTAGCACAATGAGCCTTGCTGCAACATC	66
19	GCGCGCTAGCATCGCTTCGCTGATTAATTACCCC	67
20	GCGCAGATCTACAATGAGCCTTGCTGCAACATC	68
21	GCGCGGATCCATCGCTTCGCTGATTAATTAC	69
22	GCGCTTAATTAAACAATGAGCCTTGCTGCAACATC	70
23	GCGCTTAATTAAATCGCTTCGCTGATTAATTACCCC	71
24	GCGCTCTAGAGGGGAACTTAAAGAAATTCTATTCTTG	72

[132]

[133] (2) 제조된 제조합 서플벡터를 이용한 형질전환체의 제조

- [134] 사카로마이세스 세레비지에 Y2805 균주를 3 mL YPD(리터당 펩톤 20g, 사카로마이세스 추출물 10g, 포도당 20g)배지에 30°C에서 250rpm으로 교반하며 종배양(seed)을 한 뒤, 다음 날 50mL YPD 배지에 종배양액 0.5 mL을 접종하여 30°C에서 180rpm으로 교반하며 3시간 동안 본배양(main)을 하였다.
- [135] 배양액을 3,000rpm, 4°C 조건으로 5분간 원심분리하여 상층액은 제거하고, 균체를 25 mL의 1X TE/ 0.1M LiAC 버퍼(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 100mM LiAC, pH 7.5)로 1회 세척한 후, 0.5mL의 1X TE/ 0.1M LiAC 버퍼에 재현탁하여 수용성 세포(competent cell)를 얻었다.
- [136] 제조된 수용성 세포 100 μ l, 벡터 5 μ l, salmon sperm DNA (carrier DNA, Sigma D9156, USA) 5 μ l와 0.6mL PEG/LiAC(40% PEG3350 (Quiagen NeXtal Stock PEG3350 (200), Cat. No. 133083), 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 100mM LiAC, pH 7.5)를 섞은 뒤 혼합액을 30°C에서 30분간 방치 후, 100 μ l의 DMSO를 넣고 다시 혼합하였다. 제조된 세포 혼합액을 42°C에서 15분간 열충격 처리 후, 얼음에서 5분을 식히고 4°C에서 1분간 원심분리 후 상층액을 제거하였다. 얻어진 펠렛을 200 μ l의 TE 버퍼(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7.5)에 재현탁하여 선택배지인 UD 고체배지(리터 당 Yeast nitrogen base without Amino Acids (Difco™, Cat. No. 291940) 6.7 g, -Ura DO Supplement(Clontech Cat. No. 630416) 0.77g, 텍스트로즈 20g, 한천 20g, pH 5.8)에 도말 한 뒤, 30°C에서 2일간 배양하여 형질전환체를 제조하였다.
- [137]
- [138] 실시예 1-2. 사카로마이세스 형질전환체로부터 레티노이드의 생산
- [139] (1) 사카로마이세스 형질전환체의 배양
- [140] UD 배지 3mL에 단일 집락을 접종하고, 30°C에서 250rpm으로 교반하며 종배양하였다.
- [141] 본배양은 실험군으로서 갈락토스를 함유하는 YPDG 배지(리터 당 펩톤 20g, 사카로마이세스 추출물 10g, 포도당 10g 및 갈락토스 10g)를 사용하였으며, 그에 대한 대조군으로 갈락토스를 함유하지 않은 YPD 배지 (리터 당 펩톤 20g, 사카로마이세스 추출물 10g, 포도당 20g)를 이용하였다. 배양은 YPDG 배지와 YPD 배지를 300mL 홈이 파인 플라스크(baffled flask)에 25mL씩 분주한 뒤, 레티노이드 생산의 2-상(two-phase) 배양에서, 5mL의 도데칸(Cat. No. 297879, Sigma, USA)을 배양 배지 25 mL 위에 위치시켰다.
- [142] 초기 배양한 균주를 균체 농도를 OD_{600nm}가 0.1이 되도록 접종하였고, 30°C에서 180rpm으로 교반하면서 96시간 동안 배양하였다. 세포 성장은 배양 72시간 후에 600nm(OD_{600nm})에서 광학 밀도를 측정함으로써 평가하였다.
- [143]
- [144] (2) 레티노이드의 고성능 액체크로마토그래피(HPLC) 분석
- [145] 도데칸 씩음을 갖는 2-상 배양에서, 레티노이드를 포함하는 도데칸 상을 수집하여 14,000rpm에서 10분 동안 원심분리시켜 모든 세포 파편들을 제거한

후에 HPLC 분석에 사용하였다. 도데칸 상을 검출 파장 370nm(레티날) 및 340nm(레티놀 및 레티닐 아세테이트)에서 HPLC(LC-20A, Shimadzu, Kyoto, Japan)로 분석하였다. 분석은 Sentry Guard C18(15mm×4.6mm, 5m)을 갖는 Symmetry C18(250mm×4.6mm, 5m)의 HPLC 컬럼을 사용하여 수행하였다. 이동상으로 부피비 95:5의 메탄올 및 아세토니트릴을 사용하였다. HPLC 분석은 이동상의 유동 속도는 1.0ml/분, 컬럼 온도는 40°C 조건하에서 수행하였다.

[146] 레티날(Cat. No. R2500), 레티놀(Cat. No. R7632) 및 레티닐 아세테이트(Cat. No. R4632)를(Sigma사) 아세톤에 용해시켜 표준 화합물로서 사용하였다(도 3 (A)).

[147] 도 3을 참조하면, 상기 형질전환체에서 생산된 레티노이드(도 3 (B))의 피크가 표준화합물로 사용한 레티놀, 레티날 및 레티날 아세테이트(도 3 (A))와 동일한 머무름 시간에 주요하게 나타나는 것을 확인할 수 있다. 이에 따라, 상기 형질전환체에서 생산된 레티노이드는 표준화합물로서의 레티노이드와 같은 성분으로 판명되었다.

[148]

[149] **(3) 레티노이드의 액체크로마토그래피-질량(LC-MS/MS) 분석**

[150] 상기의 사카로마이세스 형질전환체로부터 생산된 레티노이드를 분석하기 위하여 액체크로마토그래피-질량분석(LC-MS/MS)을 실시하였다.

[151] 상기 형질전환체의 배양액 중의 도데칸 상을 취하여 이를 진공 증발시키고, 증발 전 도데칸 상과 동일 중량의 메탄올에 용해하여 이온포획 질량 분석기(Ion Trap Mass Spectrometer)를 이용하여 생산된 레티노이드의 성분을 분석하였다.

[152] LC-MS 분석에는 Sentry Guard C18(15mm×4.6mm, 5m)을 갖는 Symmetry C18(250mm×4.6mm, 5m) 컬럼과 분석 기기로 AB SCIEX Qtrap 3200(AB SCIEX사)을 사용하였다. 이동상으로 부피비 95:5의 메탄올 및 아세토니트릴을 사용하였다.

[153] HPLC 분석은 이동상의 유동 속도는 1.0ml/분, 컬럼 온도는 30°C 조건하에서 수행하였다.

[154] 레티놀 (Cat. No. R7632) 및 레티닐 아세테이트 (Cat. No. R4632)(Sigma사)를 메탄올에 용해시켜 이를 표준 화합물로서 사용하였다.

[155] 분석 결과는 도 4에 나타내었다.

[156] 도 4을 참조하면, 상기 형질전환체에서 생산된 레티노이드(도 4 (B), (D))의 피크가 표준화합물로 사용한 레티놀(도 4 (A))과 레티닐 아세테이트(도 4 (C))와 동일한 머무름 시간에 주요하게 나타나는 것을 확인할 수 있다.

[157] 이에 따라, 상기 형질전환체에서 생산된 레티노이드는 표준화합물로서의 레티노이드와 같은 성분으로 판명되어, 본 발명의 미생물이 레티노이드를 유효하게 생산해 낼 수 있음을 확인하였다.

[158]

[159] **(4) 배양 결과**

[160] 배양 결과는 하기 표 4에 나타내었다.

[161]

[162] 표 4

[Table 4]

구분	균체 농도(OD _{600nm})	레티날 ($\mu\text{g/L}$)	레티놀 ($\mu\text{g/L}$)	레티닐 아세테이트($\mu\text{g/L}$)
실험군	22.76 $\pm$ 0.5	36 $\pm$ 0.67	2.8 $\pm$ 0.52	32.1 $\pm$ 2.6
대조군	18.6 $\pm$ 1.2	19.6 $\pm$ 0.96	1.49 $\pm$ 0.1	30.6 $\pm$ 0.98

[163]

[164] 상기 표 4를 참조하면, 배양 72시간 후의 균체 농도(OD_{600nm})는 갈락토스를 포함하는 배지에서 배양한 실험군이 22.8로서 갈락토스를 포함하지 않은 배지에서 배양한 대조군의 18.6보다 높은 것을 확인할 수 있다.

[165] 실험군은 레티날 36 $\mu\text{g/L}$, 레티놀 2.8 $\mu\text{g/L}$, 레티닐 아세테이트 32.1 $\mu\text{g/L}$ 를 생산하여 총 레티노이드를 약 71 $\mu\text{g/L}$ 를 생산하였으나, 대조군은 레티날 19.6 $\mu\text{g/L}$, 레티놀 1.49 $\mu\text{g/L}$, 레티닐 아세테이트 30.6 $\mu\text{g/L}$ 를 생산하여 총 레티노이드를 약 51.7 $\mu\text{g/L}$ 생산하였다.

[166] 형질전환체의 총 레티노이드 생산량을 균체농도로 나누었을 때 실험군은 3.11, 대조군은 2.78로 실험군이 더 높게 나타나, 갈락토스를 첨가한 배지에서 배양한 실험군에서 레티노이드 생산에 관여하는 효소의 발현이 유도된 것을 확인하였다.

[167]

[168] 실시예 2-1. 코리네박테리움 형질전환체의 제조

[169] 또한 상기와 같이 라이코펜이 축적되는 형질전환체를 제조한 후 이종적으로(heterologous) 선별된 레티노이드 생합성 유전자인 crtE, crtB, crtI, idi, crtY, BCMO를 포함하는 서플렉터를 도입하여 레티노이드를 생산할 수 있는 코리네박테리움 형질전환체를 제조하였다. 이에 대하여 하기 항목을 통하여 상세히 설명하도록 한다.

[170]

[171] (1) 코리네박테리움 글루타미쿰의 카로티노이드-엡실론-시클라아제를 코딩하는 유전자 crtYe/f의 불활성화

[172] 테카프레노크산틴 생산을 억제하고 라이코펜을 축적시키기 위하여 서열번호 22와 서열번호 23의 아미노산 서열을 코딩하는 crtYe/f 유전자(군)를 불활성화 하였다.

[173] crtYe/f 유전자를 불활성하기 위해 자살 벡터(suicide vector) pK19mobsacB를 사용하였다("Handbook of Corynebacterium glutamicum", Lothar Eggeling 등, ISBN 0-8493-1821-1, 2005 by CRC press).

[174] 프라이머 25와 26을 이용하여 crtYe/f 유전자의 업스트림(upstream) 부분인 1036bp를 증폭하였고, 프라이머 27과 28을 이용하여 crtYe/f 유전자의 다운스트림(downstream) 부분인 1057bp를 증폭하였다.

[175] 증폭된 두 가지 PCR 산물을 주형으로 사용하고 프라이머 25과 28을 이용하여

PCR 증폭하여 crtYe/f 유전자를 결손시키고, 21bp 링커 서열을 가진 2102bp 길이의 PCR 산물을 얻었다. 얻어진 2102bp 산물을 HindIII와 SbfI으로 절단하여 벡터 pK19mobsacB의 동일 부위에 삽입하여 재조합 자살벡터 pK19mobsacB-KOY를 제조하였다.

- [176] 제조된 재조합 벡터를 Handbook of Corynebacterium glutamicum에 기재된 방법으로 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032에 형질전환시켰다.
- [177] 2 단계의 상동성 재조합(homologous recombination)을 통해 특정한 유전자 부위를 결손하는 방법은 "Handbook of Corynebacterium glutamicum"(published in 2005 by CRC press)에 보고되어 있다.
- [178] 첫 번째 재조합은 결손을 위해 상기에서 제조한 pK19mobsacB-KOY 플라스미드를 코리네박테리움에 형질전환 할 경우 일어난다. 이때 벡터 서열이 게놈에 삽입(integration)되는데 이는 카나마이신 저항성을 통해 선별할 수 있으며, 재조합 벡터가 삽입된 게놈을 가진 균주는 sacB 유전자에 의해 레반수크레아제(levansurase)를 생성하기 때문에 10% 수크로스(sucrose)가 있는 경우 민감성을 보인다. 또한 첫 번째 재조합체는 하기 표 5의 프라이머 29와 30을 이용하여 PCR 증폭을 할 경우, 169bp와 987bp 크기의 PCR 산물을 얻는 것으로 재조합을 한번 더 확인 할 수 있다.
- [179] 두 번째 재조합에 의해 유전자 결손을 위한 재조합 벡터는 제거되며 이는 수크로스에 저항성이 있는 것으로 선별하였다. 상세히 설명하면, 두 번째 재조합을 위하여 5ml BHI 배지(리터 당 calf brains(송아지 뇌) 12.5g, beef heart(소 심장) 5g, 펩톤 10g, 염화나트륨 5g, 글루코스 2g, 인산수소이나트륨 2.5g)에 첫 번째 재조합체를 접종하여 30°C에서 250rpm으로 교반하여 12시간 배양하였다.
- [180] BHI 배지를 이용하여 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} 배로 배양액을 희석한 뒤 100 μ l씩 10% sucrose를 포함하는 LB(리터 당 트립톤 10g, 사카로마이세스 추출물 5g 및 염화나트륨 10g) 한천 플레이트에 도말하여 30°C에서 3일간 배양하여 콜로니를 얻었다. 이러한 두 번째 재조합체는 프라이머 29와 30을 이용하여 PCR 증폭을 할 경우, 169bp의 PCR 산물을 얻는 것으로 재조합을 한번 더 확인할 수 있으며 이 클론은 20 μ g/ml 카나마이신에 민감하여 자라지 못하게 되며, 최종적으로 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC 13032의 crtYe/f 유전자가 불활성화된 Δ crtYe/f 균주를 제조하였다.

[181]

[182] 표 5

[Table 5]

프라이머 번호	염기서열 (5'-3')	서열번호
25	ATAAGCTTCTTCCTGCTTCCGACCCACTAC	73
26	CCCATCCACTAAACTTAAACAAATTTAATGATCGTATGAGGTCTTTGAGATG	74
27	TGTTTAAGTTTAGTGGATGGGTCATGATGAAAAATAAGACTAATCTATGTCTC	75
28	AAACCTGCAGGTGATTCTGTTTGGTTACTCATCCCG	76
29	ACTGCCCGAACCATTCGCG	77
30	AGGCCAGACCAAGGGGTAGGC	78

[183]

[184] (2) 레티노이드 생산에 관여하는 유전자를 포함하는 재조합 서틀벡터의 제조

[185] 코리네박테리움 글루타미쿰에서 레티노이드 생산 유전자군을 발현하기 위하여 대장균-코리네박테리움 서틀벡터인 pCES208 (J. Microbiol. Biotechnol., 18:639-647, 2008)을 바탕으로 종결자(terminator)와 프로모터가 삽입되어 있는 pSGT208 서틀벡터를 제조하였다.

[186] 상세히 설명하면, 종결자의 삽입을 위하여 pTrc99A 벡터로부터 프라이머 31과 32를 이용하여 유전자를 증폭한 후 제한효소 HindIII와 ClaI으로 절단하고 동일 제한효소로 절단한 pSTV28 (Takara biotech) 벡터에 삽입하였다. 상기 재조합 플라스미드에 프로모터 선별과정을 용이하게 하기 위하여 제한부위 및 lacZ 알파 절편을 함유하는 lac 프로모터를 삽입하였다. 이때, lacZ 알파 절편은 프로모터를 대체할 경우 X-gal을 도입하여 식별자로서 기능할 수 있도록 고안된 것이다.

[187] 프라이머 33과 34를 이용하여 대장균의 게놈으로부터 lac 프로모터 및 lacZ 알파 절편을 증폭한 후 제한효소 NgoMIV와 EcoRI으로 절단한 후 상기 구축한 재조합 플라스미드의 동일제한효소 부위에 삽입하였다. 이상에서 구축한 재조합 플라스미드로부터 ScaI과 ClaI으로 절단한 후 Klenow 절편효소를 처리하여 blunt 말단을 만든 후 제한효소 NotI과 KpnI으로 절단한 후 blunt 말단을 만든 pCES208 서틀벡터에 삽입하여 pSGT208 서틀벡터를 제조하였다.

[188] 상기 pSGT208 서틀벡터는 대장균과 코리네박테리움의 복제원점을 지니며, 카나마이신(kanamycin) 저항성 유전자, 다중제한부위 (multi-cloning site)를 갖고, 프로모터 대체를 용이하게 하기 위한 lacZ 알파절편 식별자 및 종결자를 갖도록 구성되었다. 사용된 프라이머의 정보는 표 6에 나타내었다.

[189]

[190] 표 6

[Table 6]

프라이머 번호	염기서열 (5'-3')	서열번호
31	GCTAAGCTTGGCTGTTTGGCGGATGAGAG	79
32	CGAATCGATAGAGTTTGTAGAAACGCAAAAAGGCC	80
33	GCTGCCGGCAGATCTCATATGCCAATACGCAACCGCCTCTC	81
34	GCTGAATTCAGTAGTGCAGCGCGCTTATTGCGCATTCAGGCTGCGC	82

[191]

[192] (3) 제조된 재조합 서플렉터를 이용한 형질전환체의 제조

[193] 상기 제조된 대장균-코리네박테리움 서플렉터 pSGT208에 하기 표 7에 나타낸 레티노이드의 합성에 관여하는 6종의 유전자를 표 8에 나타낸 프라이머를 이용하여 순차적으로 도입하였다.

[194] 상세히 설명하면 시네코시스티스 종 PCC6803의 게놈으로부터 프라이머 35와 36을 이용하여 crtE를 증폭하여 제한효소 SpeI과 XhoI으로 절단한 후 pSGT208 서플렉터의 동일 부위에 삽입하였다.

[195] 다음으로 로도수도모나스의 게놈으로부터 프라이머 37과 38을 이용하여 crtI를 증폭하여 XhoI과 NheI으로 절단한 후 상기 제조한 재조합 벡터의 동일 제한부위로 순차적으로 삽입하였다.

[196] 다음으로 팔러스트리스판토에아 아글로메란스의 게놈으로부터 프라이머 39와 40을 이용하여 crtB를 증폭하여 NheI과 XbaI으로 절단하고 이를 상기 제조한 재조합 벡터의 동일 부위로 순차적으로 삽입하였다.

[197] 다음으로 크로노박터 사카자키의 게놈으로부터 프라이머 41과 42를 이용하여 idi를 증폭한 후 XbaI과 NotI으로 절단 후 상기 제조한 재조합 벡터의 동일 부위로 순차적으로 삽입하였다.

[198] 다음으로 판토에아 아나나티스의 게놈으로부터 프라이머 43과 44를 이용하여 crtY를 증폭한 후 SalI과 StuI으로 절단하고 상기 제조한 재조합 벡터의 동일 부위로 순차적으로 삽입하였다.

[199] 마지막으로 pT-DHBSR로부터 프라이머 45와 46을 이용하여 SR을 증폭한 후 StuI과 SbfI로 절단한 후 상기 제조한 재조합 벡터의 동일 부위로 삽입하여 레티노이드 생산 유전자가 순차적으로 모두 포함된 재조합 서플렉터 pS208-RET를 완성하였다.

[200]

[201] 표 7

[Table 7]

서열번호	유전자명	효소명	참고문헌 또는 Ggenbank 허가번호
3	crtE	제라닐제라닐 피로포스페이트 (GGPP) 신타제	slr0739, GI:16329282
4	crtB	피토엔 신타제	M87280
6	crtI	피토엔 디히드로게나제	RPA1512, GI:39934584
9	idi	IPP 이소머라제	ESA_00346, GI:156932565
7	crtY	라이코펜-베타-시클라제	D90087
8	SR	베타-카로틴 모노옥시 게나제	HJ Jang et al, 2011, Microbial Cell Factories, 10:59

[202]

[203] 표 8

[Table 8]

프라이머 번호	염기서열 (5'-3')	서열번호
35	CATACTAGTAGGAGGTAATAAATATGGTTGCCCAACAAACACGA	83
36	CGGCTCGAGTTAATATTTTCTGGCAACAATATATTCGGCG	84
37	GCTCTCGAGGAGGTAATAAATATGCTCGATCCTGGCCCCAATC	85
38	GCAGCTAGCTTATGATGTCACCAGACTGTGGGCTC	86
39	GCAGCTAGCAGGAGGTAATAAATATGAGCCAACCGCCGCTGC	87
40	CTCCTCTAGATTACTAAACGGGACGCTGC	88
41	CCATCTAGAGGAGGTAATAAATATGAAGGACAAGGAAGTGC	89
42	CGTGCGGCCGCTTATTCCTCATCCCGACGCGC	90
43	CGGTGACAGGAGGTAATAAATATGCAACCGCATTATGATCTGATTCTC	91
44	CGCCTGCAGGAGGCTTTAACGATGAGTCGTCATAATGGCTTG	92
45	CGAGGCCTAGGAGGTAATAAATATGGGCTGATGCTGATTGATTGGTG	93
46	CGCCTGCAGGTTAGTTTTGATTTTGATACGGGAAGAGTG	94

[204]

[205] 상기 제조한 재조합 서플 벡터 pS208-RET를 제조한 카로테노이드
 엡실론-시클라제를 코딩하는 crtYe와 crtYf가 불활성화된 재조합
 코리네박테리움 글루타미쿰인 코리네박테리움 글루타미쿰
 ATCC13032ΔcrtYe/f에 Handbook of Corynebacterium glutamicum에 기재된
 방법으로 형질전환시켰다.

[206]

[207] 실시예 2-2. 코리네박테리움 형질전환체로부터 레티노이드의 생산

[208] (1) 코리네박테리움 형질전환체의 배양

[209] 2YT 배지 3mL에 단일 집락을 접종하였고, 30°C에서 250rpm으로 교반하며
 증배양하였다.

[210] 본배양은 구멍 최소배지(리터 당 K₂HPO₄ 1g, (NH₄)₂SO₄ 10g, MgSO₄·7H₂O 0.4g,
 FeSO₄·7H₂O 20mg, MnSO₄·H₂O 20mg, 염화나트륨 50mg, 요소 2g, 비오틴 0.1mg 및
 티아민 0.1mg)에 항생제 카나마이신을 20μg/mL로 사용하였다. 배양은 25mL
 배지를 포함하는 홈이 파인 플라스크(baffled flask) 중에서 30°C에서 180rpm으로
 교반하며 수행하였다.

[211] 레티노이드 생산의 2-상 배양에서, 10mL의 중량 미네랄 오일(Cat. No.
 5658-4400, 대정화금, 한국)을 배양 배지 25mL 위에 위치시켰다.

[212] 세포 성장은 600nm(OD₆₀₀)에서 광학 밀도를 측정하였다.

[213]

[214] (2)레티노이드의 고성능 액체크로마토그래피(HPLC) 분석

[215] 중량 미네랄 오일층을 갖는 2-상 배양에서, 레티노이드를 포함하는 중량
 미네랄 오일을 수집하여 14,000rpm에서 10분 동안 원심분리시켜 모든 잔류 세포
 파편 및 수용성 물질들을 제거하였다. 그 후 분리된 중량 미네랄 오일 층의

레티노이드를 상온에서 15분간 아세톤 추출하여 14,000rpm에서 10분 동안 원심분리시켜 모든 중량 미네랄 오일 상은 제거한 후 아세톤 추출물을 분석에 사용하였다.

- [216] 레티노이드를 함유한 아세톤 추출물을 검출 파장 370nm(레티날) 및 340nm(레티놀 및 레티닐 아세테이트)에서 HPLC(LC-20A, Shimadzu, Kyoto, Japan)로 분석하였다.
- [217] 분석은 Sentry Guard C18(15mm×4.6mm, 5m)을 갖는 Symmetry C18 (250mm×4.6mm, 5m)의 HPLC 컬럼을 사용하여 수행하였다. 이동상으로 부피비 95:5의 메탄올 및 아세토니트릴을 사용하였다. HPLC 분석은 이동상의 유동 속도는 1.5ml/분, 컬럼 온도는 40°C 조건하에서 수행하였다.
- [218] 레티날(Cat. No. R2500), 레티놀(Cat. No. R7632) 및 레티닐 아세테이트(Cat. No. R4632)(Sigma사)를 아세톤에 용해시켜 표준 화합물로서 사용하였다(도 5 (A)).
- [219] 도 5를 참조하면, 상기 형질전환체에서 생산된 레티노이드(도 5 (B))의 피크가 표준화합물로 사용한 레티날(도 3 (A))과 동일한 머무름 시간에 주요하게 나타나는 것을 확인할 수 있다. 이에 따라, 상기 형질전환체에서 생산된 레티노이드는 표준화합물로서의 레티날과 같은 성분으로 판명되었다.

[220]

[221] **(3) 배양 결과**

[222] 배양 결과는 하기 표 9에 나타내었다.

[223]

[224] 표 9

[Table 9]

구분	백터	균체 농도 (OD _{600nm})	레티날 (μg/L)	레티놀 (μg/L)	레티닐 아세테이트(μg/L)
실시예	pS208-RET	14.9 ± 2.9	3277.87 ± 134.79	-	-
비교예	pSGT208	9.5 ± 0.5	-	-	-

[225]

[226] 상기 표 9를 참조하면, 48시간 배양한 후의 균체 농도(OD_{600nm})는 실시예의 레티노이드 생산에 관여하는 효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 형질전환체의 경우 15로서, 레티노이드 생산에 관여하는 효소를 코딩하는 유전자를 포함하지 않는 서플렉터만이 도입된 비교예의 9.5보다 높은 것을 확인할 수 있다.

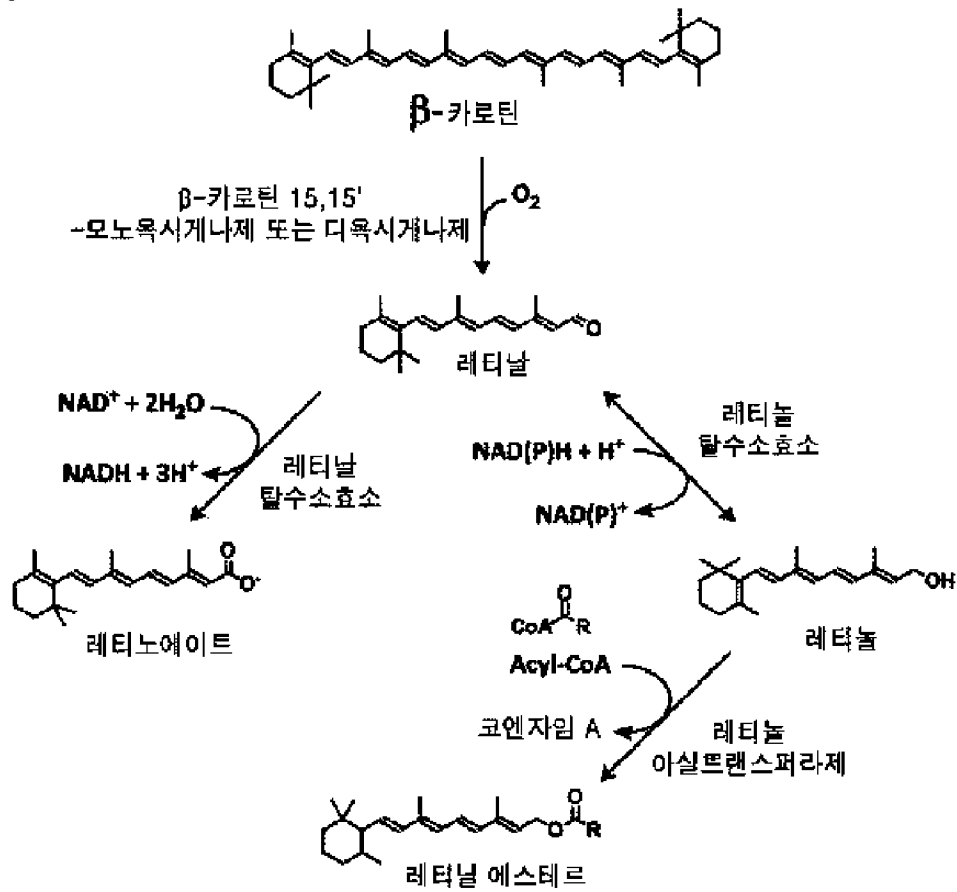
[227] 실시예는 레티날이 약 3,278μg/L가 생산되었으나, 비교예는 전혀 생산되지 않았다.

청구범위

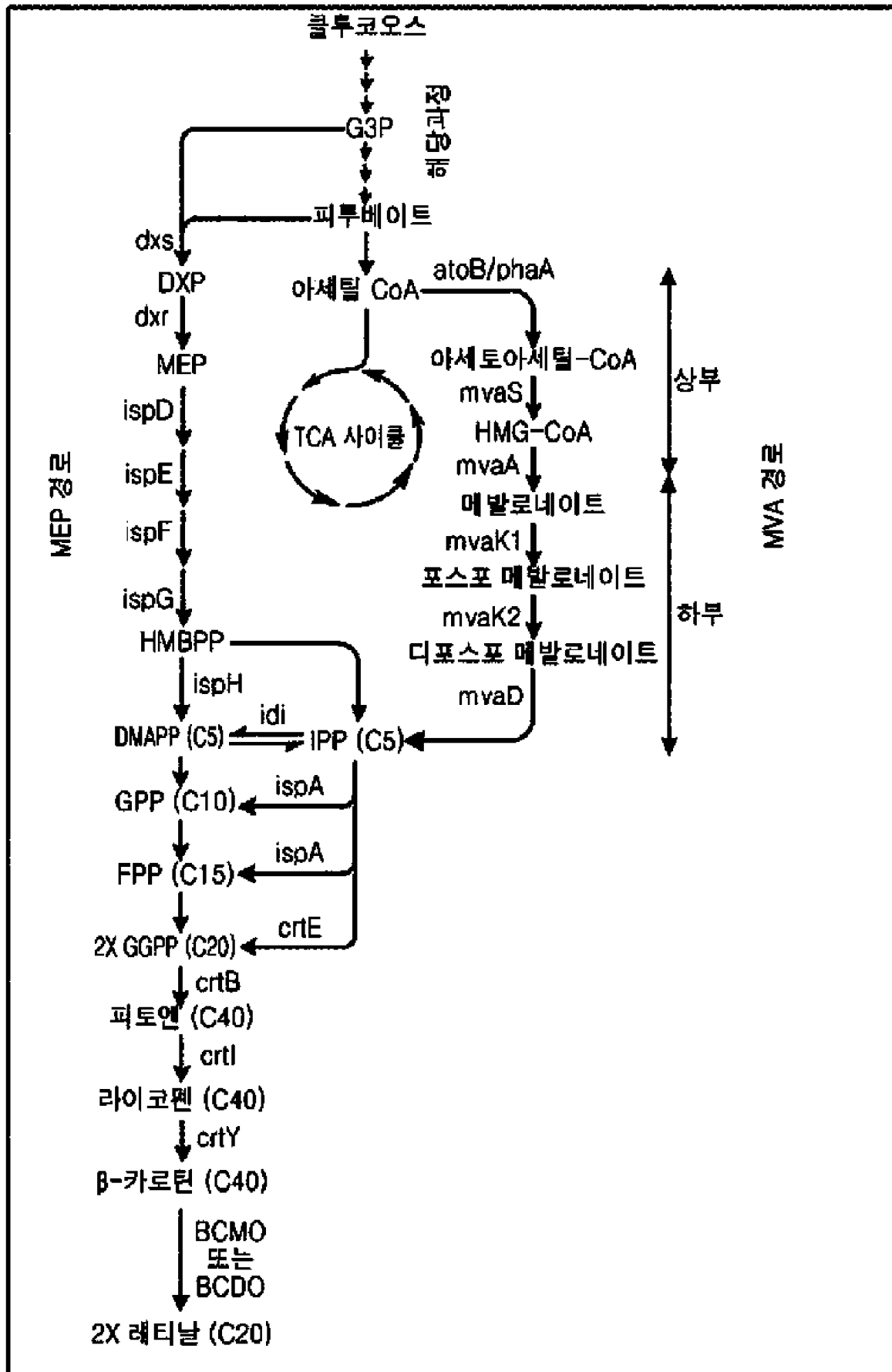
- [청구항 1] 레티노이드 생산에 관여하는 효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 사카로마이세스 속 미생물.
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서, 상기 유전자는 서열번호 1 내지 9로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 아미노산 서열을 코딩하는 것인, 미생물.
- [청구항 3] 청구항 1에 있어서, 상기 유전자는 서열번호 2, 3 및 10 중 적어도 하나; 서열번호 4 및 11 중 적어도 하나; 서열번호 5, 6 및 12 중 적어도 하나; 서열번호 7; 서열번호 8; 및 서열번호 9, 13 및 21 중 적어도 하나;의 아미노산 서열을 코딩하는 것인, 미생물.
- [청구항 4] 청구항 3에 있어서, 서열번호 1의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자를 더 포함하는, 미생물.
- [청구항 5] 청구항 1에 있어서, 사카로마이세스 세레비지에에 상기 유전자를 도입한 것인, 미생물.
- [청구항 6] 청구항 1에 있어서, 사카로마이세스 세레비지에 Y2805에 상기 유전자를 도입한 것인, 미생물.
- [청구항 7] 레티노이드 생산에 관여하는 효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 코리네박테리움 속 미생물.
- [청구항 8] 청구항 7에 있어서, 상기 유전자는 서열번호 2 내지 9로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 아미노산 서열을 코딩하는 것인, 미생물.
- [청구항 9] 청구항 7에 있어서, 상기 유전자는 서열번호 2, 3 및 10 중 적어도 하나; 서열번호 4 및 11 중 적어도 하나; 서열번호 5, 6 및 12 중 적어도 하나; 서열번호 7; 서열번호 8; 및 서열번호 9, 13 및 21 중 적어도 하나;의 아미노산 서열을 코딩하는 것인, 미생물.
- [청구항 10] 청구항 9에 있어서, 서열번호 14 및 15 중 적어도 하나의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자를 더 포함하는, 미생물.
- [청구항 11] 청구항 9에 있어서, 서열번호 16 내지 20의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자를 더 포함하는, 미생물.
- [청구항 12] 청구항 7에 있어서, 서열번호 22 내지 24로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자를 불활성화 또는 결손화한, 미생물.
- [청구항 13] 청구항 7에 있어서, 코리네박테리움 글루타미쿰에 상기 유전자를 도입한 것인, 미생물.
- [청구항 14] 청구항 7에 있어서, 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032에 상기 유전자를 도입한 것인, 미생물.
- [청구항 15] 청구항 1 내지 14 중 어느 한 항에 있어서, 유전자는 벡터에 의해

- 도입된 것인, 미생물.
- [청구항 16] 청구항 1 내지 15 중 어느 한 항의 미생물을 배양하는 단계; 및 상기 미생물의 배양물로부터 레티노이드를 분리하는 단계를 포함하는 레티노이드의 생산 방법.
- [청구항 17] 청구항 16에 있어서, 상기 미생물의 배양은 친유성 물질을 포함하는 배지 중에서 수행되는 것인, 방법.
- [청구항 18] 청구항 17에 있어서, 상기 분리하는 친유성 물질 상으로부터 되는 것인, 방법.
- [청구항 19] 청구항 17에 있어서, 상기 친유성 물질은 옥탄, 데칸, 도데칸, 테트라데칸, 피토스쿠알란, 미네랄 오일, 이소프로필 미리스테이트, 세틸 에틸헥사노에이트, 디옥타노일 데카노일 글리세롤, 스쿠알란, 또는 이들의 조합인, 방법.

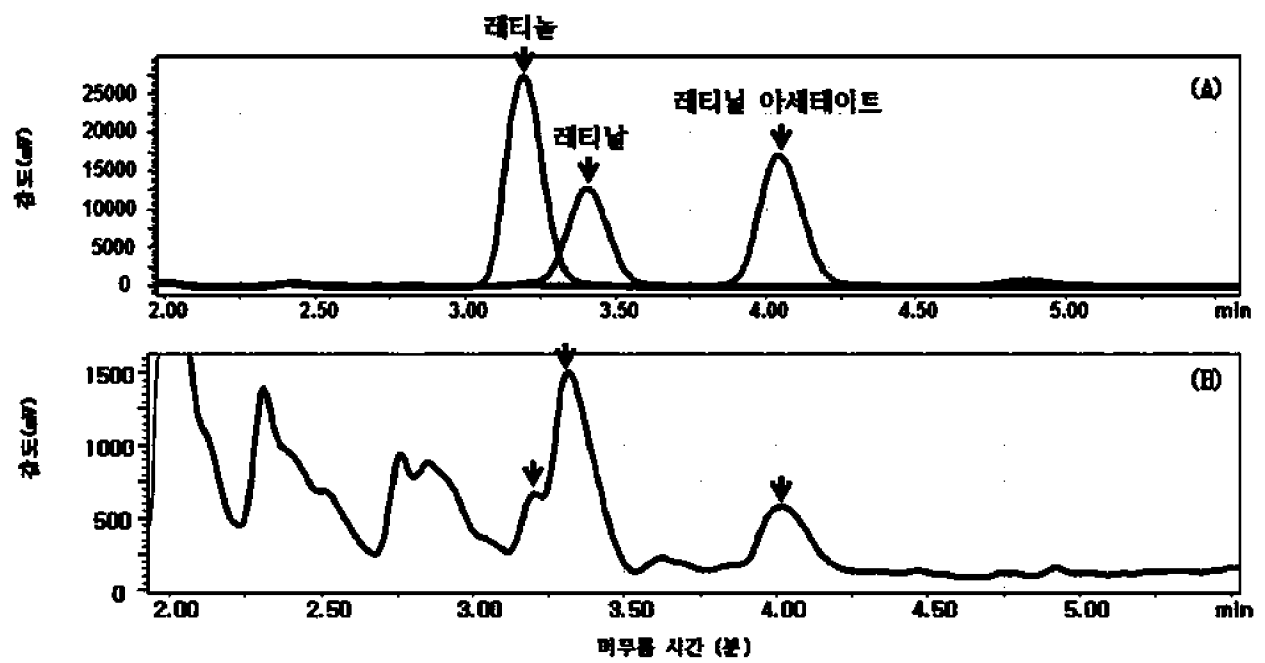
[Fig. 1]



[Fig. 2]

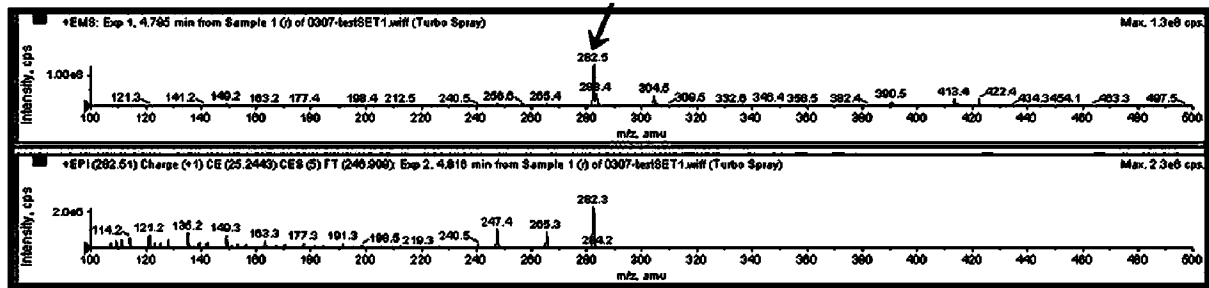


[Fig. 3]

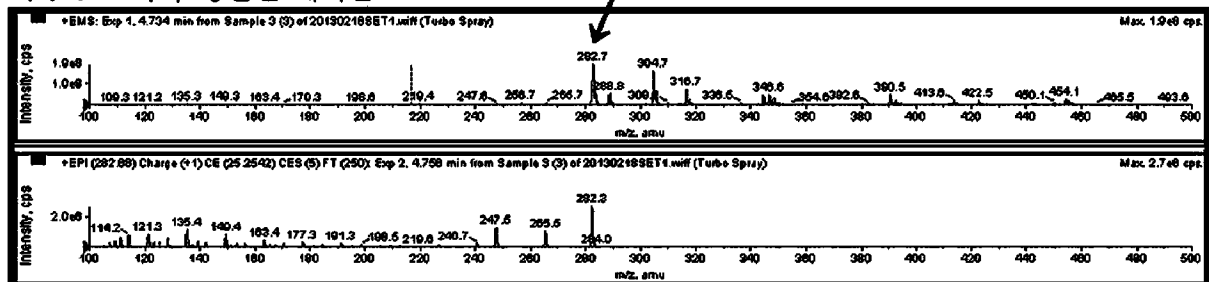


[Fig. 4]

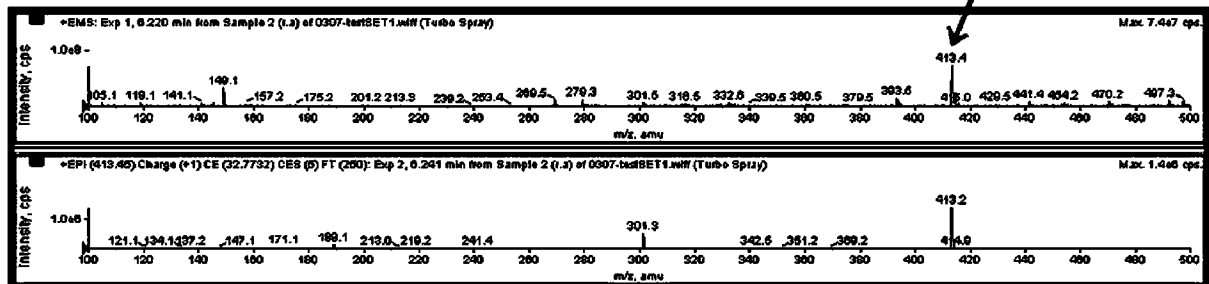
(A) 레티놀 표준화합물



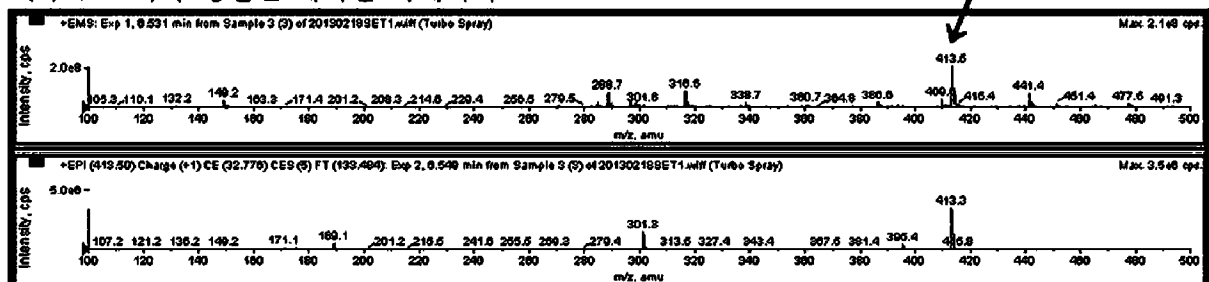
(B) 효모에서 생산된 레티놀



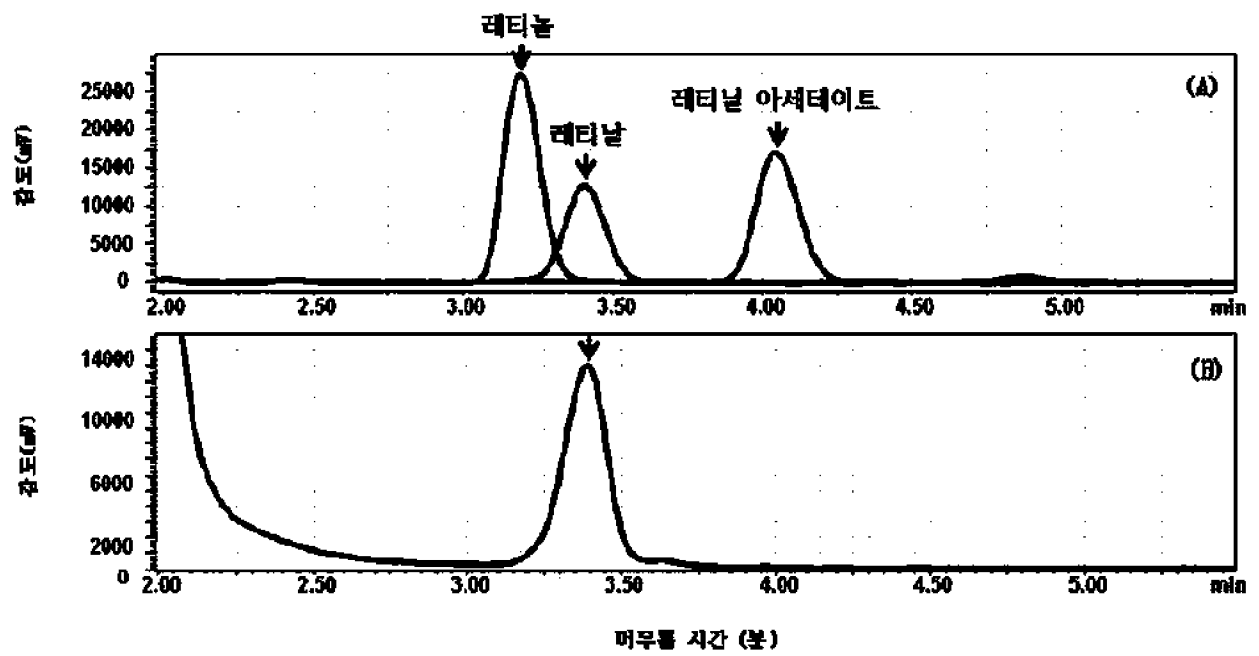
(C) 레티닐 아세테이트 표준화합물



(D) 효모에서 생산된 레티닐 아세테이트



[Fig. 5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2013/009643**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER***C12N 1/19(2006.01)i, C12N 1/21(2006.01)i, C12P 1/00(2006.01)i*

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 1/19; C12P 1/04; C12N 15/52; C12N 1/20; C12N 1/21; C12P 1/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: retinoids, Saccharomyces, Corynebacterium, microorganism, enzyme, vector

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2013-0014445 A (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY) 07 February 2013	1-2,5-8,13-15
Y	See claim 14 and paragraphs 8, 16 and 87.	3,4,9-10
A		11-12
Y	NCBI, Genbank accession no. CAE26954.1 (17 April 2005) See sequence.	3,4,9-10
Y	NCBI, Genbank accession no. YP_001436481.1 (10 June 2013) See sequence.	3,4,9-10
Y	NCBI, Genbank accession no. NP_013636 (25 February 2013) See sequence.	4
Y	NCBI, Genbank accession no. NP_601108.1 (10 June 2013) See sequence.	10
A	NCBI, Genbank accession no. WP_002357756.1 (12 May 2013) See sequence.	1-15
A	KR 10-1137026 B1 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) 19 April 2012 See the entire document.	1-15



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 MARCH 2014 (24.03.2014)

Date of mailing of the international search report

25 MARCH 2014 (25.03.2014)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2013/009643

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: **17-19**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Claims 17 to 19 refer to a claim which is not drafted in compliance with the regulations of PCT Rule 6.4(a), or to a claim referring to the claim which is not drafted in compliance with the regulations of PCT Rule 6.4(a), and thus the claims are unclear. Therefore, a meaningful international search cannot be carried out under PCT Article 6.

3. ☒ Claims Nos.: **16**
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2013/009643

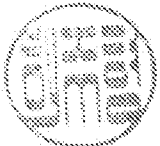
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MOON, MIN-WOO et al., "Analyses of enzyme II gene mutants for sugar transport and heterologous expression of fructokinase gene in <i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032", FEMS Microbiology Letters, 15 March 2005, vol. 244, no. 2, pp. 259-266 See the entire document.	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2013/009643

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2013-0014445 A	07/02/2013	KR 10-2013-0014673 A	08/02/2013
		KR 10-2013-0014674 A	08/02/2013
		WO 2013-019052 A2	07/02/2013
		WO 2013-019052 A3	04/07/2013
		WO 2013-019053 A2	07/02/2013
		WO 2013-019053 A3	04/07/2013
KR 10-1137026 B1	19/04/2012	US 2012-0322129 A1	20/12/2012
		WO 2011-053079 A2	05/05/2011
		WO 2011-053079 A3	22/09/2011

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 1/19(2006.01)i, C12N 1/21(2006.01)i, C12P 1/00(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 1/19; C12P 1/04; C12N 15/52; C12N 1/20; C12N 1/21; C12P 1/00 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드:레티노이드, 사카로마이세스, 코리네박테리움, 미생물, 효소, 벡터		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2013-0014445 A (경상대학교산학협력단) 2013.02.07. 청구항 14 및 단락 8, 16 및 87 참조.	1-2,5-8,13-15
Y		3,4,9-10
A		11-12
Y	NCBI, Genbank accession no. CAE26954.1 (2005.04.17.) 서열 참조.	3,4,9-10
Y	NCBI, Genbank accession no. YP_001436481.1 (2013.06.10.) 서열 참조.	3,4,9-10
Y	NCBI, Genbank accession no. NP_013636 (2013.02.25.) 서열 참조.	4
Y	NCBI, Genbank accession no. NP_601108.1 (2013.06.10.) 서열 참조.	10
A	NCBI, Genbank accession no. WP_002357756.1 (2013.05.12.) 서열 참조.	1-15
A	KR 10-1137026 B1 (한국생명공학연구원) 2012.04.19. 전체 문헌 참조.	1-15
☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2014년 03월 24일 (24.03.2014)		국제조사보고서 발송일 2014년 03월 25일 (25.03.2014)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-472-7140		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-8150 

제1기제란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

a. 출원시 또는 추후 제출된 서열목록

☐ 서면

☒ 전자적 형태

b. 제출시기

☒ 출원시 국제출원에 포함

☐ 전자적 형태로 국제출원과 함께 제출

☐ 조사를 위해 본 기관에 추후 제출

2. ☐ 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시의 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☐ 청구항:
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
2. ☒ 청구항: 17-19
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
청구항 제17-19항은 PCT 규칙 제6.4조(a)의 규정을 충족시키지 않는 청구항 또는 그것을 인용하는 청구항을 인용하고있어 청구범위가 불명확하므로 유효한 국제조사를 할 수 없습니다(PCT 조약 제6조).
3. ☒ 청구항: 16
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

C (계속). 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	MOON, MIN-WOO 외 6명, ‘Analyses of enzyme II gene mutants for sugar transport and heterologous expression of fructokinase gene in Corynebacterium glutamicum ATCC 13032’ , FEMS Microbiology Letters, 15 March 2005, Vol.244, No.2, pp.259-266 전체 문헌 참조.	1-15

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2013-0014445 A	2013/02/07	KR 10-2013-0014673 A	2013/02/08
		KR 10-2013-0014674 A	2013/02/08
		WO 2013-019052 A2	2013/02/07
		WO 2013-019052 A3	2013/07/04
		WO 2013-019053 A2	2013/02/07
		WO 2013-019053 A3	2013/07/04
KR 10-1137026 B1	2012/04/19	US 2012-0322129 A1	2012/12/20
		WO 2011-053079 A2	2011/05/05
		WO 2011-053079 A3	2011/09/22