



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0007855
(43) 공개일자 2012년01월25일

(51) Int. Cl.

C12N 1/21 (2006.01) *C12N 15/54* (2006.01)

C12P 13/10 (2006.01) *C12R 1/15* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0068619

(22) 출원일자 2010년07월15일

심사청구일자 2010년07월15일

(71) 출원인

상지대학교산학협력단

강원도 원주시 상지대길 83 (우산동, 상지대학교)

(72) 발명자

조재용

강원도 원주시 서원대로 427, 한신2차휴플러스아파트 206동 802호 (단구동)

고영웅

서울특별시 강남구 선릉로 221, 207동 102호 (도곡동, 도곡렉슬아파트)

(74) 대리인

손민

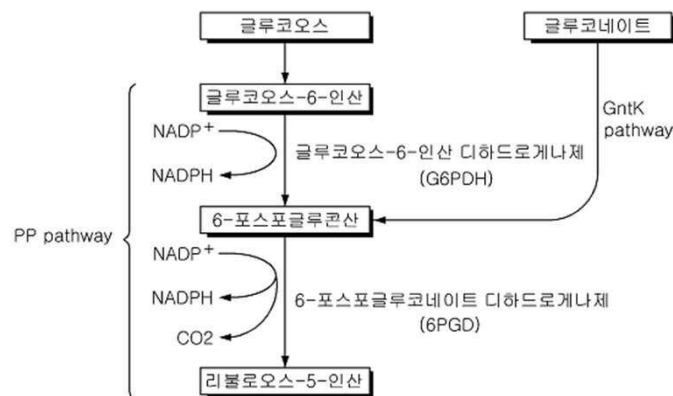
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) L-오르니틴 생산능이 향상된 미생물 및 이를 이용한 L-오르니틴 생산방법

(57) 요약

본 발명은 글루코네이트 키나아제(GntK) 활성이 내재적 활성에 비하여 약화된 L-오르니틴 생산 미생물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 L-오르니틴 생산 미생물을 배양하는 단계 및 L-오르니틴을 회수하는 단계를 포함하는 L-오르니틴의 생산방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 000356980109

부처명 중소기업청

연구관리전문기관

연구사업명 산학연공동기술개발사업 선도과제

연구과제명 미생물 세포기능 재설계 및 재구성 기술을 이용한 고부가가치 기능성 유제품 개발

기여율

주관기관 상지대학교 산학협력단

연구기간 2009년06월01일 ~ 2011년05월31일

특허청구의 범위

청구항 1

글루코네이트 키나아제(GntK) 활성이 내재적 활성에 비하여 약화된, L-오르니틴 생산 미생물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 미생물은 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 글루코네이트 키나아제 및 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 글루코네이트 키나아제 중 하나 이상의 활성이 내재적 활성에 비하여 약화된 것인 미생물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 미생물은 코리네박테리움 속인 미생물.

청구항 4

제1항에 있어서, 글루코네이트 키나아제 활성을 갖는 단백질을 코딩하는 염색체상의 유전자의 결실, 치환 또는 삽입에 의하여 상기 단백질의 내재적 활성이 약화된 것인 미생물.

청구항 5

제1항에 있어서, 글루코네이트 키나아제 활성을 갖는 단백질을 코딩하는 염색체상의 유전자의 발현 조절 서열이 돌연변이 되어 상기 단백질의 내재적 활성이 약화된 것인 미생물.

청구항 6

제1항에 있어서, 글루코네이트 키나아제의 일부를 포함하는 재조합 벡터가 도입되어 내재적 활성이 약화된 것인 미생물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 미생물은 도 2의 재조합 벡터 및 도 3의 재조합 벡터 중 하나 이상이 도입되어 글루코네이트 키나아제의 활성이 내재적 활성에 비하여 약화된 것인 미생물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 미생물은 추가로 argCJBD 오페론의 활성이 증가된 미생물.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 미생물은 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032를 모균주로 하는 것인 미생물.

청구항 10

1) 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 미생물을 배양하는 단계: 및 2) L-오르니틴을 회수하는 단계를 포함하는 L-오르니틴의 생산방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 글루코네이트 키나아제(GntK) 활성이 내재적 활성에 비하여 약화된 L-오르니틴 생산 미생물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 L-오르니틴 생산 미생물을 배양하는 단계 및 L-오르니틴을 회수하는 단계를 포함하는 L-오르니틴의 생산방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 오르니틴은 생체 내의 요소 회로 상에 존재하는 아미노산 중의 하나이다. 혈중의 암모니아 농도가 높으면 간 손상을 일으키는데 오르니틴과 시트룰린은 혈중의 암모니아와 결합하여 각각 시트룰린과 아르기닌이 되어 혈중의 암모니아 농도를 감소시켜준다. L-오르니틴은 시트룰린, 프롤린과 같이 암모니아에 대한 해독 기능을 갖고 있어 간장 질환의 치료제로서 사용될 뿐만 아니라, 비만을 예방하는 식품소재로서도 이용되고 있으며, 주름살 개선과 같은 피부미용에의 효과도 밝혀지고 있다.

[0003] 한편, 코리네박테리움 균주(*Corynebacterium*), 특히 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)은 L-아미노산 생산에 많이 이용되고 있는 그람 양성 미생물이다. 이와 같이 코리네박테리움 균주를 이용한 L-아미노산의 제법은 중요하기 때문에 그 제조방법을 개선하기 위해 많은 시도가 행해지고 있다. 구체적으로 오르니틴 생산에 이용되는 미생물로는 자외선 처리 등에 의한 시트룰린 또는 아르기닌 영양 요구성 돌연변이주인 마이크로코커스 글루타미쿠스(*Micrococcus glutamicus*)(교와화꼬공업(주), 일본, 미국등록특허 제2,988,489호), 브레비박테리움 락토펙페멘툼(*Brevibacterium lactofermentum*), 브레비박테리움 카와사키(*B. kawasaki*), 브레비박테리움 플라븀(*B. flavum*)(아지노모토, 일본공고특허 제68-8712호, 제68-8714호 및 제69-26,910호), 브레비박테리움 케토글루타미쿰(*B. ketoglutamicum*), 아스로박터 파라피네우스(*Arthrobacter paraffineus*), 코리네박테리움 히드로카보클라스투스(*Corynebacterium hydrocarboclastus*)(교와화꼬공업(주), 일본, 미국등록특허 제3,574,061호) 등이 알려져 있다. 또한 아르기닌이나 시트룰린 영양 요구성 균주인 아스로박터 시트레우스(*A. citreus*), 브레비박테리움 락토펙페멘툼(*B. Lactofermentum*), 또는 코리네박테리움 글루타미쿰(*C. glutamicum*)(아지노모토(주), 유럽공개특허 제0393708호)은 마이코페놀산(mycofenolic acid) 또는 오르니티놀(ornithinol)에 저항성을 갖는 영양 요구성 돌연변이주를 선별하여 오르니틴을 생산하는데 사용한다. 미국등록특허 제3,574,061호에서는 영양 요구성 돌연변이주인 브레비박테리움 케토글루타미쿰 ATCC 21092을 탄화수소, 예를 들어, 파라핀을 주요 탄소원으로 하는 배지에서 배양하여 L-오르니틴을 제조하는 방법을 개시하고 있으나, 이 방법에 의하면 오르니틴의 생산성은 4일간의 배양에서 8.6 mg/ml로 그다지 높지 않았다. 이처럼 L-오르니틴을 생산하는 방법에 관한 연구들이 보고되고 있으나 생산 수율이 높지 않다는 문제점이 있다. 그러나 L-오르니틴의 산업적 대량생산은 여전히 요구되고 있기 때문에 L-오르니틴의 고효율, 고수율적인 생산 방법을 개발할 필요성이 있다.

[0004] 한편, L-오르니틴은 코리네박테리움 글루타미쿰에서 L-글루탐산으로부터 순환경로(cyclic pathway)를 통해 생합성 되고(Cunin et al., Microbiol Rev 50: 314-352, 1986), 상기 생합성 과정 중 세번째 단계는 *argC* 유전자에 의해 코딩된 NADPH 의존성 환원효소에 의해 촉매화된다. NADPH의 재생과 특정 대사체의 생합성 간의 직접적인 연관관계는 코리네박테리움 글루타미쿰에서의 L-라이신의 생합성을 통해 밝혀졌다(Wittmann and Heinzle, Microbiol 68:5843-5849, 2002; Marx et al., J Biotechnol 104:185-197, 2003; Ohnishi et al., Microbiol Lett 242:265-274, 2005). NADPH는 코리네박테리움 글루타미쿰에서 라이신을 생산하는 동안 오탄당 인산화 경로(pentose phosphate pathway)를 촉매하는 효소인 글루코오스-6-포스페이트 디하이드로게나제(glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PDH) 및 6-포스포글루코네이트 디하이드로게나제(6-phosphogluconate dehydrogenase, 6PGD)에 의한 산화과정에서 주로 생산된다(Marx et al., J Biotechnol 104:185-197, 2003; Wittmann and Heinzle, Microbiol 68:5843-5849, 2002). 일련의 연구들은 오탄당 인산화 경로로의 탄소 흐름의 전환이, NADPH 공급이 필요한 특정 대사물질의 생합성을 증대하기 위한 대사공학적 타겟이 될 수 있다는 점을 제시하였다. (Mascarenhas et al., Appl Environ Microbiol 57:2995-2999, 1991; Sauer et al., Appl Environ

Microbiol 62:3687-3696, 1996; Marx et al., J Biotechnol 104:185-197, 2003; Ohnishi et al., Microbiol Lett 242:265-274, 2005).

[0005] 본 발명자들은 이전의 연구에서, 시트룰린과 프롤린 생합성 유전자가 결손되고 아르기닌 억제자(ArgR)에 의한 피드백 제어가 차단된 돌연변이 균주에서 *argCJBD*의 상동적 발현(homologous expression)으로 L-오르니틴의 생산량이 증가하였음을 보여주었다(Hwang et al., J Microbiol Biotechnol 18:704-710, 2008). 그러나 L-오르니틴의 생합성 경로로 최대의 카본 플럭스를 유지하기 위해서는 *argCJBD*의 과발현뿐만 아니라, 오타당 인산화 경로로 탄소 흐름의 전환에 따른 NADPH가 충분하게 공급되어야 한다.

[0006] 이러한 배경 하에서 본 발명자들은 L-오르니틴을 고효율, 고수율로 수득하기 위한 방법을 찾기 위해 예의 노력한 결과, 산화적 오타당 인산화 경로의 대사적 활성을 유전적으로 변형시켜 오타당 인산화 경로를 통해 NADPH 생산을 증가시킴으로써 결과적으로 L-오르니틴 생산량을 증가시킬 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 하나의 목적은 글루코네이트 키나아제(GntK) 활성이 내재적 활성에 비하여 약화된 L-오르니틴 생산 미생물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 1) 상기 L-오르니틴 생산 미생물을 배양하는 단계: 및 2) L-오르니틴을 회수하는 단계를 포함하는 L-오르니틴의 생산방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 하나의 양태로서 본 발명은, 글루코네이트 키나아제(gluconate kinase, GntK) 활성이 내재적 활성에 비하여 약화된 L-오르니틴 생산 미생물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명에서 용어, "L-오르니틴"은 고등동물의 생체 내의 요소 회로 상에 존재하는 염기성 아미노산으로서, 간에 대해 독성이 강한 암모니아를 무독성의 요소로 변환, 오줌으로 배출함으로써 간을 보호하는 역할을 하는 아미노산을 말한다. L-오르니틴은 성장호르몬을 분비시킴으로써 근육합성을 증가시키고 기초대사를 촉진시켜 비만을 예방하는 식품소재로서 많이 이용되고 있다. 최근에는 주름살 개선과 같은 피부미용 작용 등의 새로운 기능이 있는 것으로 밝혀졌다. L-오르니틴은 L-오르니틴알파케토글루타릴산염(OKG: L-오르니틴과 알파케토글루타릴산이 2:1의 비율로 함유되어 있음)의 형태로 근육증강, 비만예방 및 면역증강소재로서도 폭넓게 이용되고 있다. L-오르니틴은 유럽에서는 간장장애를 개선하는 의약품으로서 이용되고 있고, 일본에서는 L-오르니틴산염의 형태로 식품소재로서 사용되고 있으며, 미국에서는 식품보조제로서 사용되고 있다.

[0011] 본 발명에서 용어, "글루코네이트 키나아제(gluconate kinase, GntK)"란 미생물의 오타당 인산화 경로의 산화과정 중간체인 6-포스포글루콘산의 생합성을 위한 GntK 경로에 관여하는 효소를 의미한다. 코리네박테리움 속 미생물은 오타당 인산화 경로의 산화과정의 중간체인 6-포스포글루콘산의 생합성에 있어 2가지 대사경로, 즉 G6PDH 경로 및 GntK 경로를 지니고 있으며(도 1), 이것은 GntK 경로를 통해 적어도 글루코스의 일부를 대사할 수 있다는 것을 의미한다. 이에, 본 발명자들은 상기 GntK 경로의 차단을 통하여 6-포스포글루콘산으로의 탄소 흐름을 차단함으로써 오타당 인산화 경로의 산화과정으로 더 많은 탄소흐름이 진행되어, 6-포스포글루코네이트 디하이드로게나제(6PGD)의 활성이 특이적으로 증가하여 NADPH 재생량이 증가할 것으로 예측하고, 결과적으로 L-오르니틴의 생산량이 증가할 수 있는 메커니즘을 제안하였다. 이에, 미생물 내에서 글루코네이트 키나아제(GntK) 활성을 갖는 것으로 추정되는 효소의 활성을 약화시키고자 하였다. 바람직하게 본 발명에서 글루코네이트 키나아제(GntK) 활성을 갖는 효소는 서열번호 1로 나타내는 NCg12399 또는 서열번호 2로 나타내는 NCg12905이다.

[0012] 본 발명에서 용어, "내재적 활성"이란 미생물이 천연의 상태로 가지고 있는 효소의 활성 상태를 의미하는 것으로, 본 발명에서는 미생물이 천연적으로 가지고 있는 GntK의 활성 상태를 의미한다.

[0013] 본 발명에서 "GntK 활성이 내재적 활성에 비해 약화" 되었다는 것은, GntK를 코딩하는 염색체상의 유전자의 결손 또는 돌연변이에 의해 GntK가 정상적으로 작용하지 않아 미생물이 천연의 상태로 가지고 있는 GntK 활성이 약해진 상태를 의미한다. 바람직하게는 NCg12399 또는 NCg12905를 암호화하는 유전자 또는 상기 유전자 모두가

결실, 치환 또는 삽입에 의하여 돌연변이 되거나 이의 발현 조절 서열이 돌연변이 되어, GntK가 정상적으로 작용하지 않는 상태를 의미한다.

- [0014] 본 발명에서는 글루코네이트 키나아제 유전자의 일부를 포함하는 재조합 벡터를 미생물에 도입하여 내재적 글루코네이트 키나아제 유전자를 결손 또는 돌연변이시킴으로써 GntK 내재적 활성이 약화된 미생물을 제조할 수 있다. 상기 유전자의 염색체 내로의 삽입은 당업계에 알려진 임의의 방법, 예를 들면 상동 재조합에 의하여 이루어질 수 있다.
- [0015] 본 발명에서 용어, "재조합 벡터"란 적당한 숙주세포에서 목적 단백질을 또는 목적 RNA를 발현할 수 있는 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절요소를 포함하는 유전자 작제물을 말한다. 바람직하게 본 발명에서는 도 2 또는 도 3의 개열지도로 표시되는 재조합 벡터를 사용할 수 있다.
- [0016] 상기 재조합 벡터를 도입하는 모균주로는 L-오르니틴을 생산할 수 있는 미생물이거나 제한없이 사용할 수 있으나, 바람직하게는 코리네박테리움 속 또는 브레비박테리움 속 미생물을 사용할 수 있다. 예를 들면, 코리네박테리움 히드로카보클라스투스(*Corynebacterium hydrocarboclastus*), 코리네박테리움 글루타미쿰(*C. glutamicum*), 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032, 코리네박테리움 써모아미노게네스(*thermoaminogenes*) FERM BP-1539, 브레비박테리움 플라븀(*Brevibacterium flavum*) ATCC 14067, 브레비박테리움 락토퍼멘툼(*lactofermentum*) ATCC 13869, 및 이들로부터 제조된 L-아미노산 생산 돌연변이체 또는 균주, 예를 들면, 코리네박테리움 글루타미쿰 KFCC10881, 코리네박테리움 글루타미쿰 KFCC11001, 코리네박테리움 글루타미쿰 KCCM10770P가 포함될 수 있으며, 바람직하게는, 코리네박테리움 글루타미쿰 SJC8039(*C. glutamicum* ATCC13032, *argF*Δ, *argR*Δ)일 수 있다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는 코리네박테리움 글루타미쿰 SJC8039(*C. glutamicum* ATCC13032, *argF*Δ, *argR*Δ)이 사용되었으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0017] 구체적인 일 구현예에 따르면, 코리네박테리움 글루타미쿰 내에서 복제되지 않고 표적 유전자의 마커-프리 결실(marker-free deletion)을 수행하는 기능이 있는 pK18mobsacB 벡터(Schafer et al., Gene 145: 69-73, 1994)를 이용함으로써 유전자 결실을 수행하였다. 즉, 상기 pK18mobsacB 벡터에 NCg12399 또는 NCg12905 를 암호화하는 유전자의 일부분과 항생제 마커 및 레반수크레아제 유전자(*SacB*)를 포함하도록 재조합 벡터를 제작한 후, 당업계에 알려진 임의의 방법으로 상기 재조합 벡터를 미생물에 형질전환 및 염색체 내 상동 재조합시킴으로써, GntK 활성이 약화된 L-오르니틴 생산용 코리네박테리움 미생물을 제작하였다.
- [0018] 본 발명에서는 pK18mobsacB 벡터에서 NCg12399 를 암호화하는 유전자의 일부를 포함하는 pK18mobsacB 유도체를 제조하여 pSJ1034 로 명명하였으며, 이를 형질전환시켜 NCg12399 를 암호화하는 유전자가 파괴된 재조합 균주를 SJC8245 라고 명명하였다. 또한, pK18mobsacB 벡터에서 NCg12905를 암호화하는 유전자의 일부를 포함하는 pK18mobsacB 유도체를 제조하여 pSJ1035 로 명명하였으며, 이를 상기 SJC8245 균주 내에 형질전환시켜 NCg12905를 암호화하는 유전자가 추가로 파괴된 재조합 균주를 SJC8399로 명명하였다.
- [0019] 구체적인 일 구현예에 따르면, NCg12399 유전자가 결손된 코리네박테리움 글루타미쿰 균주인 SJC8245를 배양한 결과, GntK의 특이적 활성이 41% 정도 남아있었고, NADPH의 농도는 23.5% 증가하였으며, L-오르니틴의 생산량은 24.8% 증가함을 확인하였다. 또한 상기 SJC8245 균주 내에서 글루코네이트 키나아제 활성을 갖는 효소의 또 다른 유전자로 추정되는 NCg12905 유전자를 추가적으로 파괴한 코리네박테리움 글루타미쿰 균주인 SJC8399를 배양한 결과, SJC8245에 비하여 상기 GntK 경로의 활성이 더욱 감소되는 것을 확인하였고, NADPH의 농도는 51.8% 증가하였으며, L-오르니틴의 생산량은 63.8% 증가함을 확인하였다(표 3 및 4). 이러한 결과는 본 발명의 미생물에 의해 L-오르니틴 생산량이 증가되었음을 보여주며, 또한 과량의 NADPH가 L-오르니틴 생산량의 증가에 영향을 주는 요인임을 보여주었다.
- [0020] 결과적으로 본 발명의 미생물은 GntK의 활성이 약화되고, 6GDP 의 활성이 특이적으로 증가함으로써 오타당 인산화 경로의 산화과정이 증대되었으며, 세포 내 NADPH의 농도가 유의적으로 증가 되었다(표 4). 코리네박테리움 속 미생물에서의 L-오르니틴의 생합성 경로는 NADPH 의존성 환원효소에 의해 촉매화되므로, 결과적으로 본 발명의 미생물이 L-오르니틴 생산량을 증가시킬 수 있었다.
- [0021] 또한 본 발명에서는 L-오르니틴 제조량을 더욱 증가시키기 위해, L-오르니틴의 생합성에 관련된 공지의 효소들의 활성을 추가로 조절할 수 있다. 바람직하게 본 발명에서는 추가로 *argCJBD* 오페론 활성을 조절하여 *argCJBD* 유전자를 과발현시켜 L-오르니틴 생산량을 증대시킬 수 있다(Hwang et al., J Microbiol Biotechnol 18:704-710, 2008).

- [0022] 또 하나의 양태로서 본 발명은, 1) 상기 L-오르니틴 생산 미생물을 배양하는 단계; 및 2) L-오르니틴을 회수하는 단계를 포함하는 L-오르니틴의 생산방법을 제공하는 것이다.
- [0023] 본 발명에서 용어 "배양"은 미생물을 적당히 인공적으로 조절한 환경조건에서 생육시키는 것을 의미한다. 본 발명에서 코리네박테리아를 이용하여 L-오르니틴을 배양하는 방법은 당업계에 널리 알려져 있는 방법을 이용하여 수행할 수 있다. 구체적으로 상기 배양은 배치 공정 또는 주입 배치 또는 반복 주입 배치 공정(fed batch or repeated fed batch process)에서 연속식으로 배양할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0024] 배양에 사용되는 배지는 적절한 방식으로 특정 균주의 요건을 충족해야 한다. 코리네박테리아 균주에 대한 배양 배지는 공지되어 있다 (예를 들면, Manual of Methods for General Bacteriology. American Society for Bacteriology. Washington D.C., USA, 1981). 사용될 수 있는 당원으로는 글루코즈, 사카로즈, 락토즈, 프락토즈, 말토즈, 전분, 셀룰로스와 같은 당 및 탄수화물, 대두유, 해바라기유, 피마자유, 코코넛유 등과 같은 오일 및 지방, 팔미트산, 스테아린산, 리놀레산과 같은 지방산, 글리세롤, 에탄올과 같은 알코올, 아세트산과 같은 유기산이 포함된다. 이들 물질은 개별적으로 또는 혼합물로서 사용될 수 있다. 사용될 수 있는 질소원으로는 펩톤, 효모 추출물, 육즙, 맥아 추출물, 옥수수 침지액, 대두밀 및 요소 또는 무기 화합물, 예를 들면 황산암모늄, 염화암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄 및 질산암모늄이 포함된다. 질소원 또한 개별적으로 또는 혼합물로서 사용할 수 있다. 사용될 수 있는 인원으로는 인산이수소칼륨 또는 인산수소이칼륨 또는 상응하는 나트륨-함유 염이 포함된다. 또한, 배양 배지는 성장에 필요한 황산마그네슘 또는 황산철과 같은 금속염을 함유해야 한다. 마지막으로, 상기 물질에 더하여 아미노산 및 비타민과 같은 필수 성장 물질이 사용될 수 있다. 또한, 배양 배지에 적절한 전구체들이 사용될 수 있다. 상기된 원료들은 배양과정에서 배양물에 적절한 방식에 의해 회분식으로 또는 연속식으로 첨가될 수 있다.
- [0025] 수산화나트륨, 수산화칼륨, 암모니아와 같은 기초 화합물 또는 인산 또는 황산과 같은 산 화합물을 적절한 방식으로 사용하여 배양물의 pH를 조절할 수 있다. 또한, 지방산 폴리글리콜 에스테르와 같은 소포체를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다. 호기 상태를 유지하기 위해 배양물 내로 산소 또는 산소-함유 기체 (예, 공기)를 주입한다. 배양물의 온도는 보통 20℃ 내지 45℃, 바람직하게는 25℃ 내지 40℃이다. 배양은 L-오르니틴의 생성량이 최대로 얻어질 때까지 계속한다. 이러한 목적으로 보통 10 내지 160 시간에서 달성된다. L-오르니틴은 배양 배지 중으로 배출되거나, 세포 중에 포함되어 있을 수 있다.
- [0026] 본 발명의 L-오르니틴을 생산하는 방법은, 세포 또는 배양 배지로부터 오르니틴을 회수하는 단계를 포함한다. 세포 또는 배양 배지로부터 L-오르니틴을 회수하는 방법은 당업계에 널리 알려져 있다. 상기 L-오르니틴 회수 방법에는, 여과, 음이온 교환 크로마토그래피, 결정화 및 HPLC 등이 사용될 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

- [0027] 본 발명은 글루코네이트 키나아제(GntK) 활성이 내재적 활성에 비하여 약화된 L-오르니틴 생산 미생물을 제공함에 따라 고수율 및 고효율로 L-오르니틴을 생산할 수 있으며, 이와 같이 생성된 L-오르니틴은 인간 의약 및 약학산업, 식품산업, 사료산업, 화학산업에 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0028] 도 1은 코리네박테리움 글루타미쿰의 오타당 인산화 경로 대사과정의 개략도이다.
- 도 2는 코리네박테리움 염색체 내 NCg12399 유전자의 마커-프리 결손용 벡터 pSJ1034를 나타내는 도이다.
- 도 3은 코리네박테리움 염색체 내 NCg12905 유전자의 마커-프리 결손용 벡터 pSJ1035를 나타내는 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0029] 이하 본 발명을 하기의 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

- [0030] **실시예 1: 부위-특이적 유전자가 결실된 변이주의 제조**

[0031] 본 발명에서는 모균주로 코리네박테리움 글루타미쿰 SJC8039(*C. glutamicum* ATCC13032, *argF*△, *argR*△) (Hwang et al., J Microbiol Biotechnol 18:704-710, 2008)을 사용하였다. 상기 모균주로부터 본 발명의 재조합 균주 SJC8399와 SJC8245를 제조하기 위하여 프라이머를 제작하였다. 우선, NCg12905 또는 NCg12399를 암호화하는 유전자의 불활성화 단편을 제작하기 위해 NCg12399(서열번호 1) 및 NCg12905(서열번호 2)의 서열을 근거로 각각 프라이머 2399F1, 2399F2, 2399R1, 2399R2, 2905F1, 2905F2, 2905R1, 2905R2를 제작하였다(표 1). 밑줄 친 서열은 괄호 안에 나타낸 바와 같은 제한효소에 대한 제한위치를 나타내며, 대문자는 미생물 유전자의 서열을 의미한다.

표 1

프라이머	염기 서열	서열번호
2399F1	<u>gctctaga</u> CCCCAGAACATGCTGACG (XbaI)	3
2399R1	gggggtaccCGCTGCTAGGGCTTTACC (KpnI)	4
2399F2	gggggtaccGGAACCGTCTTCGTCCACC (KpnI)	5
2399R2	<u>gctctaga</u> GTCACCGCTGGTACATCC (XbaI)	6
2905F1	<u>gctctaga</u> CATTGGAGCATCCGTAGC (XbaI)	7
2905R1	tccccgggGCCTTCACCATCGACCAA (SmaI)	8
2905F2	tccccgggGTTCCCGAACAGATCCCC (SmaI)	9
2905R2	<u>gctctaga</u> CGCTCTGACCTGCCTAAC (XbaI)	10

[0033] 부위-특이적 유전자 결실(site specific gene disruption)을 위하여 코리네박테리움 글루타미쿰 내에서 복제되지 않고 표적 유전자의 마커-프리 결실(marker-free deletion)을 수행하는 기능이 있는 pK18mobsacB 벡터(Schafer et al., Gene 145: 69-73, 1994)를 사용하여 수행하였으며, 유전자가 파괴된 변이주(gene-disrupted mutant strain)를 만들기 위하여 NCg12399와 NCg12905의 개방해독틀(open reading frame)이 내부적으로 결실된 pK18mobsacB 유도체를 만들었다. 상기 pK18mobsacB 유도체는 각각 pSJ1034와 pSJ1035로 명명하였다.

[0034] pSJ1034는 2,267 bp짜리 NCg12399의 *XbaI* 말단을 포함하는 pK18mobsacB 유도체로 NCg12399의 내부적 유전자 소실을 포함한다. 상기 NCg12399 내부적 유전자 소실은 코리네박테리움 글루타미쿰 SJC8039 게놈 DNA를 주형으로 2399F1-2399R1 프라이머와 2399F2-2399R2 프라이머 쌍으로 교차 PCR을 하여 생성된 것이다. pSJ1035는 2,819 bp짜리 NCg12905의 *XbaI* 말단이 있는 pK18mobsacB 유도체로 NCg12905의 내부적 유전자 소실을 포함한다. 상기 NCg12905 내부적 유전자 소실은 코리네박테리움 글루타미쿰 SJC8039 게놈 DNA를 주형으로 2905F1-2905R1 프라이머와 2905F2-2905R2 프라이머 쌍으로 교차 PCR을 하여 생성된 것이다.

[0035] 상기의 재조합 플라스미드를 야생의 코리네박테리움 글루타미쿰에 전기천공법으로 형질전환시키고(van der Rest et al., Appl Microbiol Biotechnol 52:541-545, 1999), 상기 플라스미드는 1차 재조합(교차)에 의해 염색체에 도입하였다. 그 후 10%의 수크로오스를 포함하는 고체평판배지에서 2차 재조합(교차)을 통해 염색체로부터 플라스미드를 절제(excision)하였다.

[0036] 상기 2차 재조합이 완료된 코리네박테리움 글루타미쿰 형질전환주들을 대상으로 각 유전자 특이적 프라이머(gene-specific primer) 쌍인 2905F1-2905R2 및 2399F1-2399R2를 사용한 다이아그너스틱 PCR(diagnostic PCR)을 통해 각각 NCg12905 및 NCg12399 유전자의 결실을 확인하였다. 상기 NCg12905, NCg12399의 개방해독틀 DNA 서열의 Genbank accession number는 NC_003450이다.

[0037] 실시예 2: NCg12905 및/또는 NCg12399 유전자가 결실된 코리네박테리움 글루타미쿰의 배양

[0038] L-오르니틴 생산균주인 코리네박테리움 글루타미쿰 SJC8399와 코리네박테리움 SJC8245를 L-오르니틴 생산을 위해 아래와 같은 방법으로 배양하였다. 종배지로 Recovery Glucose 배지(80g BHI, 20g 글루코오스, 60g 소르비톨/L)을 사용하여 24시간 배양하였다. 생산배지는 MMY 배지[0.8 g KH₂PO₄, 10 g (NH₄)₂SO₄, 1 g MgSO₄ · 7H₂O, 1.2 g Na₂HPO₄, 20 mg MnSO₄ · H₂O, 20 mg FeSO₄ · 7H₂O, 10 mg, ZnSO₄ · 7H₂O, 10 g yeast extract, 및 60 g 글루코오스/L, pH 7.0]를 사용하였다. 종배지를 함유하는 100ml 배플 플라스크에 코리네박테리움 글루타미쿰 모균주 SJC8039와 본 발명의 균주 코리네박테리움 글루타미쿰 SJC8399 및 코리네박테리움 글루타미쿰 SJC8245를 각각 접종하고 진탕배양(200rpm)하였다. 종배지에서 배양된 상기 글루타미쿰을 분리하여 수확한 후 상기 글루타미쿰

은 600nm에서 흡광도가 0.4~0.5일 때까지 상기 생산배지 10ml을 함유하는 100ml 배플 플라스크에서 재현탁하였다. 그 후, 10ml 당 0.2 g의 멸균된 CaCO₃를 첨가하고, 필요한 경우 카나마이신(kanamycin)은 50 µg/ml 의 최종농도까지 첨가하였다. 상기의 배양은 30℃의 200rpm 회전식 교반기에서 수행하였다.

[0039] 실시예 3: 효소 활성 및 이에 따른 L-오르니틴 생산량 측정

[0040] 상기 생산배지에서 배양된 코리네박테리움 글루타미쿰은 지수 성장기(exponential phase)동안 원심분리법을 사용하여 의해 수확하였고 100mM Tris/HCl buffer(pH 7.5)으로 재현탁 하였다. 세포벽은 유리 비드(glass bead)를 사용하여 파괴하였고 세포 추출물을 얻기 위해 원심분리 하였다. 이 모든 처리는 4℃에서 이루어졌으며, 상층액은 특이적 효소 활성 분석을 위하여 채취하였다.

[0041] 효소분석을 위한 단백질의 양은 브래드포드법에 의해 결정하였다(Bradford 1976). G6PDH와 6PGD의 활성은 340nm에서 NADPH 분광학적 형성을 통해 측정하였다(Frunzke et al., Mol Microbiol 67:305-322, 2008). GntK 활성은 6PGD의 coupled enzymatic assay으로 측정하였다(Frunzke et al., Mol Microbiol 67:305-322, 2008). 600nm에서 분광법으로 셀 성장률을 측정하였고, L-오르니틴 농도는 닐하이드린을 사용한 비색법으로 결정하였다(Chinard et al., J Biol Chem 199: 91-95, 1952). 건조균체량은 600nm에서의 흡광도 값 1은 1L당 건조중량 0.3g에 해당한다는 점을 기초로 측정하였다. NADPH의 농도는 EnzyChrom™ NADP⁺/NADPH 분석 키트를 사용한 enzymatic cycling reaction으로 결정하였다(BioAssay Systems, CA, USA).

[0042] 실험결과, 본 발명의 NCg12399를 암호화하는 유전자가 결손된 코리네박테리움 글루타미쿰 균주인 SJC8245는 GntK의 특이적 활성이 41% 정도 남아있게 되는 것으로 나타났다(0.51 vs 0.21 U mg/protein). 또한 상기 SJC8245 균주 내에서 역시 글루코네이트 키나아제 (EC:2.7.1.12) 활성을 갖는 효소의 또 다른 유전자로 추정되는 NCg12905를 추가적으로 파괴함으로써 SJC8399로 명명되는 코리네박테리움 글루타미쿰을 얻었고, 상기 SJC8399의 경우 상기 SJC8245에 비하여 상기 GntK 경로의 활성이 더욱 감소되는 것을 확인하였다(0.11 U mg/protein).

[0043] 한편, NCg12399의 불활성화의 경우 NADPH의 농도는 23.5% 증가하였고, L-오르니틴의 생산량은 24.8% 증가하였다. 또한 NCg12399 및 NCg12905를 모두 불활성화시킨 경우에는 NADPH의 농도는 51.8% 증가하였고, L-오르니틴의 생산량은 63.8% 증가하였다. 이러한 결과는 과량의 NADPH는 코리네박테리움 글루타미쿰 내의 L-오르니틴의 농도를 증가시키기 위해 요구된다는 것을 나타낸다.

[0044] 표 2는 코리네박테리움 글루타미쿰의 성장률을, 표 3은 NADPH와 L-오르니틴의 축적농도를 나타내며, 표 4는 중심탄소대사과정의 핵심 효소의 특이적 활성도를 나타낸다. 표 2와 표 3에서 보는 바와 같이 SJC8245(NCg12399 이 불활성화된 것)과 SJC8399(NCg12399 및 NCg12905 모두가 불활성화된 것)는 SJC8039(모균주)에 비교하여, 성장률은 거의 비슷하거나 다소 감소하지만, 세포내 NADPH 농도와 L-오르니틴의 생산량은 현격히 증가하였다.

표 2

코리네박테리움 글루타미쿰	성장률(μ_{max})
SJC8039	0.69
SJC8245	0.70
SJC8399	0.61

표 3

코리네박테리움 글루타미쿰	NADPH(mmol/g)	L-오르니틴(mg/L)
SJC8039	2.55	141
SJC8245	3.15	176
SJC8399	3.87	231

[0047] 구체적으로 G6PDH와 6PGD의 특이적 활성을 비교하면, 표 4에서 보는 것과 같이 6PGD의 특이적 활성은 SJC8039에 비해 SJC8245 및 SJC8399 내에서 현격히 증가하였다. 그러나 G6PDH 활성은 거의 변화가 없다는 것이 관측되었다.

표 4

[0048]

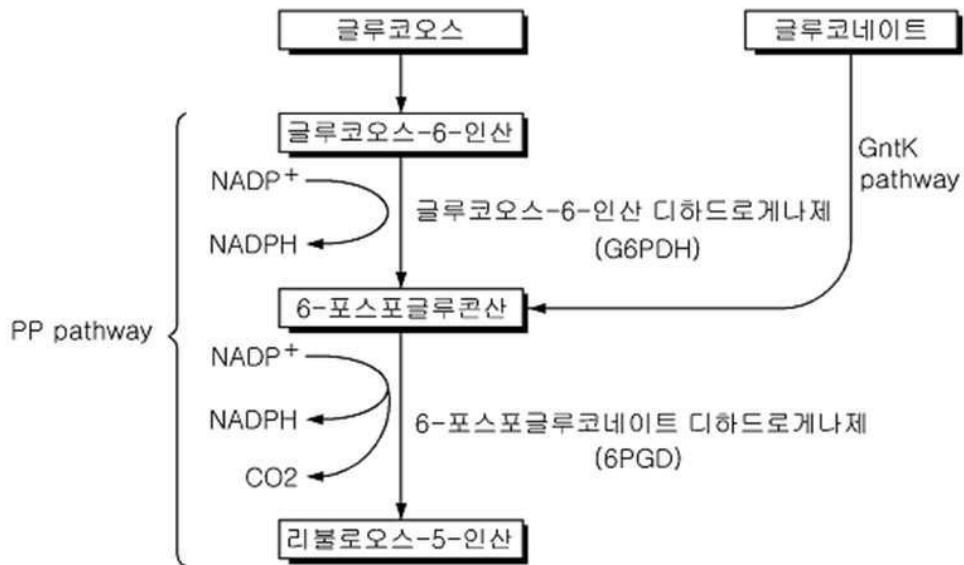
코리네박테리움 글루타미쿰	활성(U mg / protein)		
	G6PDH	6PGD	GntK
SJC8039	0.12	0.25	0.51
SJC8245	0.18	0.52	0.21
SJC8399	0.12	0.69	0.11

[0049]

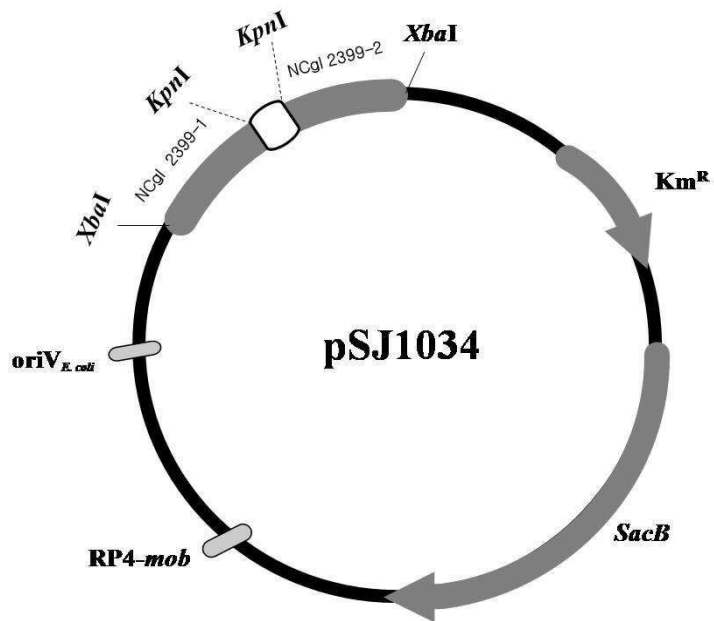
상기의 값은 적어도 3개의 독립적인 배양에서 얻어진 결과를 기초로 한 평균값을 나타내며 모든 경우에 있어서 표준편차가 10% 이하였다.

도면

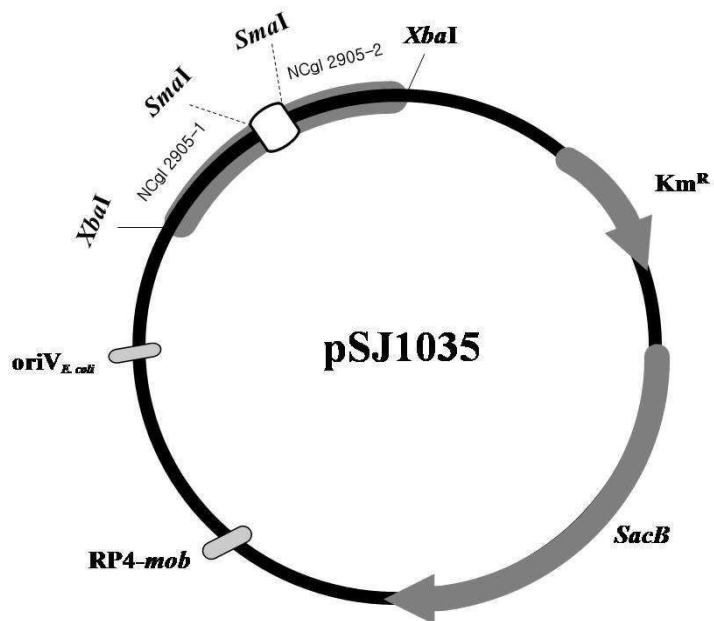
도면1



도면2



도면3



서열 목록

- <110> SANGJI UNIVERSITY INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION
- <120> A microorganism having enhanced L-ornithine productivity and a method of producing L-ornithine using the same
- <130> PA100296/KR
- <160> 10
- <170> Kopatent In 1.71

<210> 1
 <211> 167
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum ATCC 13032
 <220><221> PEPTIDE
 <222> (1)..(167)
 <223> NCg12399 gluconate kinase
 <400> 1

Met Ser Ala Ala Glu Gly Leu His Ile Val Val Met Gly Val Ser Gly

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

Cys Ser Ala Leu Lys Arg Ser Tyr Arg Asp Leu Leu Arg Thr Lys Cys			
85	90	95	
Pro Gly Thr Val Phe Val His Leu His Gly Asp Tyr Asp Leu Leu Leu			
100	105	110	
Ser Arg Met Lys Ala Arg Glu Asp His Phe Met Pro Ser Thr Leu Leu			
115	120	125	
Asp Ser Gln Phe Ala Thr Leu Glu Pro Leu Glu Asp Asp Glu Asp Gly			
130	135	140	
Lys Val Phe Asp Val Ala His Thr Ile Ser Glu Leu Ala Ala Gln Ser			

145	150	155	160
Ala Glu Trp Val Arg Asn Lys			
165			

<210> 2
 <211> 494

<212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum ATCC 13032

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(494)

<223> NCgl2905 gluconate kinase

<400> 2

Met Gly Ser Ile Pro Thr Met Ser Ile Pro Phe Asp Asp Ser Arg Gly

1 5 10 15

Pro Tyr Val Leu Ala Met Asp Ile Gly Ser Thr Ala Ser Arg Gly Gly

20 25 30

Leu Tyr Asp Ala Ser Gly Cys Pro Ile Lys Gly Thr Lys Gln Arg Glu

35 40 45

Ser His Glu Phe Thr Thr Gly Glu Gly Val Ser Thr Ile Asp Ala Asp

50 55 60

Gln Val Val Ser Glu Ile Thr Ser Val Ile Asn Gly Ile Leu Asn Ala

65 70 75 80

Ala Asp His His Asn Ile Lys Asp Gln Ile Ala Ala Val Ala Leu Asp

85 90 95

Ser Phe Ala Ser Ser Leu Ile Leu Val Asp Gly Glu Gly Asn Ala Leu

100 105 110

Thr Pro Cys Ile Thr Tyr Ala Asp Ser Arg Ser Ala Gln Tyr Val Glu

115 120 125

Gln Leu Arg Ala Glu Ile Asp Glu Glu Ala Tyr His Gly Arg Thr Gly

130 135 140

Val Cys Leu His Thr Ser Tyr His Pro Ser Arg Leu Leu Trp Leu Lys

145 150 155 160

Thr Glu Phe Glu Glu Glu Phe Asn Lys Ala Lys Tyr Val Met Thr Ile

165 170 175

Gly Glu Tyr Val Tyr Phe Lys Leu Ala Gly Ile Thr Gly Met Ala Thr

180 185 190

Ser Ile Ala Ala Trp Ser Gly Ile Leu Asp Ala His Thr Gly Glu Leu

195 200 205

Asp Leu Thr Ile Leu Glu His Ile Gly Val Asp Pro Ala Leu Phe Gly
 210 215 220
 Glu Ile Arg Asn Pro Asp Glu Pro Ala Thr Asp Ala Lys Val Val Asp
 225 230 235 240
 Lys Lys Trp Lys His Leu Glu Glu Ile Pro Trp Phe His Ala Ile Pro
 245 250 255
 Asp Gly Trp Pro Ser Asn Ile Gly Pro Gly Ala Val Asp Ser Lys Thr
 260 265 270
 Val Ala Val Ala Ala Ala Thr Ser Gly Ala Met Arg Val Ile Leu Pro
 275 280 285
 Ser Val Pro Glu Gln Ile Pro Ser Gly Leu Trp Cys Tyr Arg Val Ser
 290 295 300
 Arg Asp Gln Cys Ile Val Gly Gly Ala Leu Asn Asp Val Gly Arg Ala
 305 310 315 320
 Val Thr Trp Leu Glu Arg Thr Ile Ile Lys Pro Glu Asn Leu Asp Glu
 325 330 335
 Val Leu Ile Arg Glu Pro Leu Glu Gly Thr Pro Ala Val Leu Pro Phe
 340 345 350
 Phe Ser Gly Glu Arg Ser Ile Gly Trp Ala Ala Ser Ala Gln Ala Thr
 355 360 365
 Ile Thr Asn Ile Gln Glu Gln Thr Gly Pro Glu His Leu Trp Arg Gly
 370 375 380
 Val Phe Glu Ala Leu Ala Leu Ser Tyr Gln Arg Val Trp Glu His Met
 385 390 395 400
 Gly Lys Ala Gly Ala Ala Pro Glu Arg Val Ile Ala Ser Gly Arg Val
 405 410 415
 Ser Thr Asp His Pro Glu Phe Leu Ala Met Leu Ser Asp Ala Leu Asp
 420 425 430
 Thr Pro Val Ile Pro Leu Glu Met Lys Arg Ala Thr Leu Arg Gly Thr
 435 440 445
 Ala Leu Ile Val Leu Glu Gln Leu Glu Pro Gly Gly Thr Arg Ala Thr

450	455	460	
Pro Pro Phe Gly Thr Thr His Gln Pro Arg Phe Ala His His Tyr Ser			
465	470	475	480
Lys Ala Arg Glu Leu Phe Asp Ala Leu Tyr Leu Lys Leu Val			
	485	490	
<210>	3		
<211>	26		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	primer 2399F1		
<400>	3		
gctctagacc ccagaacatg ctgacg			26
<210>	4		
<211>	26		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	primer 2399R1		
<400>	4		
ggggtaccg ctgctagggc ttacc			26
<210>	5		
<211>	27		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	primer 2399F2		
<400>	5		
ggggtaccgg aaccgtcttc gtccacc			27
<210>	6		
<211>	26		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	primer 2399R2		
<400>	6		
gctctagagt caccgtggt acatcc			26

<

<210> 7

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer 2905F1

<400> 7

gctctagaca ttggagcatc cgtagc

26

<210> 8

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer 2905R1

<400> 8

tcccccgagg ccttcacat cgaccaa

27

<210> 9

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer 2905F2

<400> 9

tcccccgagg ttccgaaca gatcccc

27

<210> 10

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer 2905R2

<400> 10

gctctagacg ctctgacctg cctaac

26