

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0035102

(43) 공개일자 2025년03월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/77 (2006.01) *C07K 14/195* (2006.01)*C12P 23/00* (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 15/77 (2013.01)*C07K 14/195* (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-0117193

(22) 출원일자 2023년09월04일

심사청구일자 2023년09월04일

(71) 출원인

인천대학교 산학협력단

인천광역시 연수구 갯벌로 27, 인천대학교 이노베이션센터(송도동)

(72) 발명자

서명지

인천광역시 연수구 컨벤시아대로274번길 62, 1903동 3801호

조의상

인천광역시 남동구 남동대로370번길 122, 104동 701호

(74) 대리인

차준용

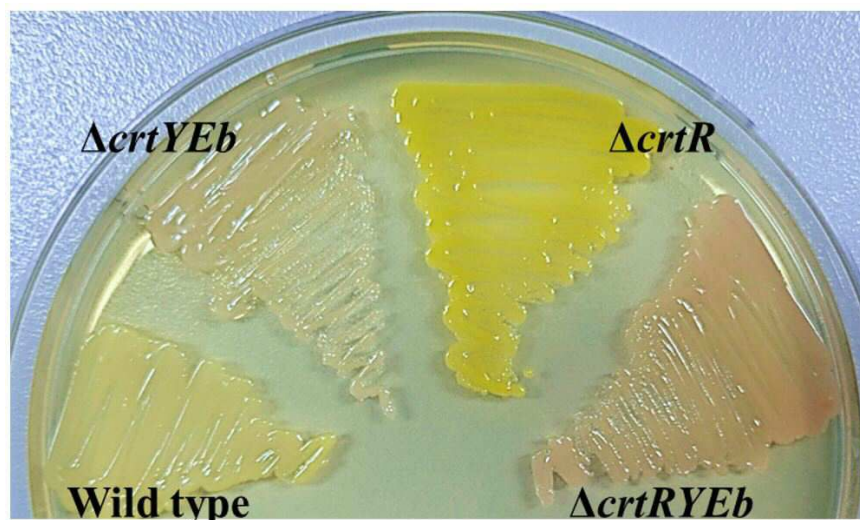
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 C50 카로티노이드 생산능을 갖는 코리네박테리움 글루타미쿰 재조합 균주 및 이를 이용한 C50 카로티노이드 생산방법

(57) 요약

박테리오투베린(Bacterioruberin, BR)은 강력한 항산화 특성을 지닌 대부분의 호염성 고세균에서 널리 퍼진 적색 색소 C50 카로티노이드이다. 본 발명자는 라이코펜(lycopene)을 과잉 생산하는 대사적으로 조작된 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)에 의한 BR의 완전한 생합성을 보고한다. *Haloferax marinum*로부터 이작용성 라이코펜 엘롱가제(bifunctional lycopene elongase) 및 1,2-히드라타제(lyeJ), 카로티노이드 3,4-불포화효소(crtD) 및 C50 카로티노이드 2",3"-히드라타제(cruF)를 *C. glutamicum* $\Delta crtRYEb$ 균주에 도입하였다. 이 결과는 *C. glutamicum*이 천연 고리형 C50 카로티노이드 데카프레녹산틴 대신 비천연 BR을 축적할 수 있다는 첫 번째 증거이다. 유가 발효(fed-batch fermentation)에서 1.50 $\mu\text{g/ml}$ 의 박테리오투베린이 재조합 균주에 의해 생성되었다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12P 23/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711189339
과제번호	2022R1F1A1062699
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	기본연구사업
연구과제명	조합생합성 및 최적 코리네박테리움 글루타미쿰 시스템 기반 희귀 C30 카로티노이드
천연색소 생산 공정 개발	
기 여 율	0.8/1
과제수행기관명	인천대학교 산학협력단
연구기간	2022.06.01 ~ 2025.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711131389
과제번호	2019R1A2C1006038
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중견연구자지원사업
연구과제명	4,4'-Diaponeurosporene을 생합성하는 기능성 유산균을 활용한 항암 파마바이오틱스
개발	
기 여 율	0.1/1
과제수행기관명	인천대학교 산학협력단
연구기간	2019.03.01 ~ 2022.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395075872
과제번호	PJ017085022022
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	K-농식품자원 기능성 성분 활용기반 고도화
연구과제명	K-농식품자원의 카로티노이드 정보 개발
기 여 율	0.1/1
과제수행기관명	단국대학교 산학협력단
연구기간	2022.04.01 ~ 2026.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 *lyeJ* 유전자, 서열번호 2의 *cruF* 유전자, 서열번호 3의 *crtD* 유전자를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 재조합 벡터는 서열번호 4의 *E. coli*-*C. glutamicum* 셔틀 벡터 pXMJ19인, 재조합 벡터.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 재조합 벡터는 C50 카로티노이드 생산 용도인 것을 특징으로 하는 재조합 벡터.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 재조합 벡터는 서열번호 7 또는 서열번호 9의 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 재조합 벡터.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 재조합 벡터로 형질전환된 숙주 세포.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 숙주 세포는 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)인 것인, 숙주 세포.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 숙주 세포는 C50 카로티노이드를 생산하는 것인, 숙주세포.

청구항 8

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 재조합 벡터를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하는 C50 카로티노이드 생산 방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 배양은 CGXII 최소 배지에서 수행되는 것을 특징으로 하는 C50 카로티노이드 생산 방법.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 CGXII 최소 배지는 1 ~ 10%(w/v)의 포도당을 포함하는 것을 특징으로 하는 C50 카로티노이드 생산 방법.

청구항 11

제8항에 있어서,

배양 단계 이전에 상기 숙주 세포를 BHI 배지에서 밤새 전배양하는 단계를 더 포함하는 C50 카로티노이드 생산 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 C50 카로티노이드 생산능을 갖는 코리네박테리움 글루타미쿰 재조합 균주 및 이를 이용한 C50 카로티노이드 생산방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 카로티노이드(carotenoid)는 이소프레노이드 화합물(isoprenoid compounds)로 널리 알려진 터펜(terpene) 계열 화합물 중에서 C30-C50 계열의 유용한 색소 군으로서 자연계에 널리 분포되어 있다. 카로티노이드는 분자 구조에 따라서 갈색(푸코잔틴, fucoxanthin), 적색(라이코펜, lycopene), 주황색(β -카로틴, β -carotene) 등 다양한 색을 띠며 과도한 빛에 의한 광합성 기관의 광산화적 손상에 대한 보호 역할을 한다.

[0003] 이러한 카로티노이드는 특유의 색소로 인해 식품 산업에 있어서 천연 색소로 사용이 가능할 뿐만 아니라 인체 내에서 비타민 A의 전구체, 활성산소 소거, 항산화 및 암세포 증식억제 작용 등 다양한 생물학적 기능을 가지며 순환기 질환 및 성인병 등을 예방하는데 탁월한 효과가 있어서 기능성 식품 및 의약품 소재로 널리 활용되고 있다. 또한 면역기능 향상을 통해 과도한 자외선 노출로부터의 피부 손상 예방 및 멜라닌 생합성 억제 등 미용 소재로서도 각광을 받고 있다.

[0004] 지금까지 약 750여의 카로티노이드가 자연계로부터 분리되었으며 주로 식물로부터 추출되어 생산되어 왔다. 또한 카로티노이드 화합물 중 강력한 항산화제로 알려진 아스타잔틴(astaxanthin)의 경우에는 화학적 합성을 통해 생산이 되기도 하는데 이러한 방법은 부작용 발생, 부산물 생성 및 생산수율 저하 등으로 인해 식품 산업에 직접 적용하기에는 부적절하다. 따라서 조류, 효모 및 세균 등으로부터 카로티노이드를 생산하는 방법이 최근 대두되고 있다.

[0005] 하지만 미생물 배양을 통한 카로티노이드 생산은 높은 생산단가로 인하여 β -카로틴과 아스타잔틴 등 극소수의 카로티노이드만이 산업적으로 생산이 가능한 실정이다. 최근에는 이러한 한계를 극복하고자 카로티노이드를 생산하는 새로운 계열의 미생물 분리 및 저가 산업부산물을 활용한 배양 최적화 등이 시도되고 있다.

[0006] 코리네박테리움 글루타미쿰(Corynebacterium glutamicum)은 산업적으로 이용가능한 생합성 숙주로, 안전하며 생산성 증가를 위한 대사공학 방법들이 알려져 이미 아미노산, 비타민, 핵산의 생산에 이용되고 있다. 코리네박테리움 글루타미쿰은 자체적으로 카로티노이드를 생산할 수 없지만 전구체에 해당하는 FDP와 GPP를 생산할 수 있고 다른 생물체로부터 이형의 카로티노이드 생산 유전자를 받아 카로티노이드를 생산할 수 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-2113215호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 C50 카로티노이드 생산 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 C50 카로티노이드 생산 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 숙주 세포를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 C50 카로티노이드 생산 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 숙주 세포를 이용하여 C50 카로티노이드 생산방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명은 서열번호 1의 *lyeJ* 유전자, 서열번호 2의 *cruF* 유전자, 서열번호 3의 *crtD* 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다. 상기 유전자는 호염성 고균 (*Haloferax marinus* sp.) MBLA0078^T에서 유래한 카로티노이드 생합성 유전자로, 각 유전자의 코돈을 최적화하여 사용되었다. 코돈 최적화된 상기 *lyeJ*, *crtD*, *cruF* 유전자 및 원래 유전자의 서열 유사성을 비교한 결과, 상동성은 각각 66.5, 67.1 및 65.9%인 것으로 나타났다.

[0012] 상기 재조합 벡터는 서열번호 4의 *E. coli*-*C. glutamicum* 셔틀 벡터 pXMJ19일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0013] 상기 재조합 벡터는 C50 카로티노이드 생산 용도인 것을 특징으로 한다.

[0014] 상기 재조합 벡터는 서열번호 7 또는 서열번호 9의 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하고, 바람직하게 상기 재조합 벡터는 서열번호 7의 염기서열을 갖고, 이 경우 C50 카로티노이드 생산성이 가장 높은 것을 확인할 수 있다.

[0015] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 상기 재조합 벡터로 형질전환된 숙주 세포를 제공한다.

[0016] 상기 숙주 세포는 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0017] 상기 숙주 세포는 *crtR*, *crtYe* 또는 *crtEb* 중 하나 이상의 유전자가 결실된 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) 균주일 수 있으며, 바람직하게는 *crtR*, *crtYe* 및 *crtEb* 유전자가 모두 결실된 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) 균주일 수 있다.

[0018] 상기 숙주 세포는 박테리오투베린 생합성의 전구체인 라이코펜은 높은 수율로 생산하는 것을 특징으로 한다. 상기 *crtR*, *crtYe* 또는 *crtEb* 중 하나 이상의 유전자가 결실된 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) 균주의 경우, wild-type 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) 균주보다 라이코펜의 생산 수율이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

[0019] 상기 숙주 세포는 C50 카로티노이드를 생산하는 것을 특징으로 한다.

[0020] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 상기 재조합 벡터로 형질전환된 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하는 C50 카로티노이드 생산 방법을 제공한다.

[0021] 상기 배양은 CGXII 최소 배지에서 수행되는 것을 특징으로 한다.

[0022] 상기 CGXII 최소 배지는 3-morpholinopropanesulfonic acid, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ urea, KH_2PO_4 , protocatechuic acid, K_2HPO_4 , CaCl_2 , $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CuSO_4 , $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, biotin, 3,4-dihydroxybenzoic acid 및 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를 포함할 수 있으며, pH 7.0로 조절될 수 있다.

[0023] 상기 CGXII 최소 배지는 1 ~ 10%(w/v)의 포도당을 포함하는 것을 특징으로 하고, 바람직하게는 3 ~ 5%(w/v)의 포도당을 포함할 수 있다.

[0024] 상기 배양 단계 이전에 상기 숙주 세포를 BHI 배지에서 밤새 전배양하는 단계를 더 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0025] 본 발명은 C50 카로티노이드 생산 유전자를 포함하는 재조합 벡터, 상기 재조합 벡터로 형질전환된 숙주 세포 및 상기 숙주 세포를 이용한 C50 카로티노이드 생산방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 호염성 고균 (*Haloferax marinus* sp.) MBLA0078^T에서 유래한 카로티노이드 생합성 유전자가 형질전환된 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) 재조합 균주 및 이를 이용한 C50 카로티노이드의 생산방법에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은 *C. glutamicum*의 유전자-지정 결실 돌연변이에 대한 색상 비교 사진이다. Wild-type *C. glutamicum* 균주는 담황색(야생형)이었다. 천연 C50 카로티노이드 생합성 경로의 결실시($\Delta crtYeb$), 콜로니는 옅은 분홍색이었으며, 이는 라이코펜의 존재를 나타낸다. Wild-type *C. glutamicum*에서 *crtR* 유전자의 결실은 황색($\Delta crtR$)이었다. Wild-type *C. glutamicum*에서 *crtR* 및 *crtYeb* 유전자의 결실은 분홍색($\Delta crtRYeb$)이었다.

도 2는 *C. glutamicum*의 유전자-지정 결실 돌연변이에서 카로티노이드 생산성을 나타낸 그래프이다. (A) *C. glutamicum* $\Delta crtR$ (왼쪽) 및 *C. glutamicum* $\Delta crtRYeb$ (오른쪽); (B) Wild-type *C. glutamicum* 및 *C. glutamicum* $\Delta crtR$ 의 상대 카로티노이드 수율; (C) *C. glutamicum* $\Delta crtYeb$ 및 *C. glutamicum* $\Delta crtRYeb$ 의 상대 카로티노이드 수율.

도 3은 유전자 발현 벡터용 PCR 산물의 겔 전기영동 분석 결과를 나타낸다. (A) *lyeJ* 유전자; (B) *lyeJ-crtD* 유전자; (C) *lyeJ-cruF* 유전자; (D) *lyeJ-crtD-cruF* 유전자; (E) *lyeJ-cruF-crtD* 유전자. 벡터 상의 각 유전자는 M13 프라이머 세트를 사용하여 PCR로 증폭하였다.

도 4는 *Hfx. marinus* MBLA0078^T 및 재조합 *C. glutamicum* 카로티노이드 추출물의 UPLC 분석 및 세포 펠렛 색상을 나타낸다. (A) 490nm에서 *Hfx. marinus* MBLA0078^T; (B) 470 nm에서 pXMJ19를 보유하는 *C. glutamicum* $\Delta crtRYeb$; (C) 470 nm에서 pXMJ19::*lyeJ*를 보유하는 *C. glutamicum* $\Delta crtRYeb$; (D) 490nm에서 pXMJ19::*lyeJ-crtD*를 보유하는 *C. glutamicum* $\Delta crtRYeb$; (E) 470 nm에서 *C. glutamicum* $\Delta crtRYeb$::pXMJ19::*lyeJ-cruF*; (F) 490 nm에서 *C. glutamicum* $\Delta crtRYeb$::pXMJ19::*lyeJ-crtD-cruF*; (G) *C. glutamicum* $\Delta crtRYeb$::pXMJ19::*lyeJ-cruF-crtD* at 490 nm.

도 5는 pXMJ19::*lyeJ-crtD-cruF*를 포함하는 *C. glutamicum* $\Delta crtRYeb$ 균주의 유가 발효 결과를 나타내는 사진이다. 각 기호는 세포 성장(원), 카로티노이드 생산(삼각형) 및 포도당 소비(사각형)를 의미한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 이상의 본 발명은 이하의 실시예를 통해 보다 구체적으로 설명된다. 그러나 본 발명은 실시예에 한정되지 않고 어떠한 형태로든 구체화될 수 있다. 소개된 실시예는 본 발명의 이해를 돕기 위해 제시되는 것이다.

<실험방법>

1. 균주 및 배양 조건

박테리아 균주, 플라스미드 및 프라이머는 [표 1]에 나열되어 있다.

표 1

Strain, plasmid or oligonucleotide	Relevant characteristics
OTHER STRAINS	
<i>E. coli</i> DH5 α	F- <i>thi</i> -1 <i>endA1</i> <i>hsdR17</i> (r ⁻ m ⁻) <i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (Φ 80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i>) <i>recA1</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i>
<i>C. glutamicum</i> STRAINS	
WT	ATCC13032
WT $\Delta crtR$	<i>crtR</i> deletion mutant of <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032
WT $\Delta crtYeb$ (LO)	<i>crtYe/fEb</i> deletion mutant of <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032

L1	<i>crtR</i> deletion mutant of L0
BR0	L1::pXMJ19
BR1	L1:: pXMJ19:: <i>lyeJ</i> _{Hfx, marium}
BR2	L1::pXMJ19:: <i>lyeJ-crtD</i> _{Hfx, marium}
BR3	L1::pXMJ19:: <i>lyeJ-crtD-cruF</i> _{Hfx, marium}
BR4	L1::pXMJ19:: <i>lyeJ-cruF</i> _{Hfx, marium}
BR5	L1::pXMJ19:: <i>lyeJ-cruF-crtD</i> _{Hfx, marium}
PLASMIDS	
pK19mobsacB	KmR; <i>E. coli</i> / <i>C. glutamicum</i> shuttle vector for construction of insertion and deletion mutants in <i>C. glutamicum</i> (pK18 <i>oriV_{ec}</i> <i>sacB lacZ a</i>)
pK19mobsacB- Δ <i>crtY</i> <i>Eb</i>	pK19mobsacB with a <i>crtY</i> <i>E</i> / <i>f-crtEb</i> deletion construct
pK19mobsacB- Δ <i>crtR</i>	pK19mobsacB with a <i>crtR</i> deletion construct
pXMJ19	CmR; <i>E. coli</i> / <i>C. glutamicum</i> shuttle vector for regulated gene expression (Ptac, <i>lacIq</i> , <i>oriV_{Cg}</i>)
pXMJ19:: <i>lyeJ</i>	pXMJ19 derivative for IPTG-inducible expression of codon optimized <i>lyeJ</i> _{Hfx, marium} containing artificial ribosome binding site
pXMJ19:: <i>lyeJ-crtD</i>	pXMJ19: <i>lyeJ</i> derivative for IPTG-inducible expression of codon optimized <i>crtD</i> _{Hfx, marium} containing artificial ribosome binding sites each
pXMJ19:: <i>lyeJ-cruF</i>	pXMJ19: <i>lyeJ</i> derivative for IPTG-inducible expression of codon optimized <i>cruF</i> _{Hfx, marium} containing artificial ribosome binding sites each
pXMJ19:: <i>lyeJ-crtD-cruF</i>	pXMJ19: <i>lyeJ-crtD</i> derivative for IPTG-inducible expression of codon optimized <i>cruF</i> _{Hfx, marium} containing artificial ribosome binding sites each
pXMJ19:: <i>lyeJ-cruF-crtD</i>	pXMJ19: <i>lyeJ-cruF</i> derivative for IPTG-inducible expression of codon optimized <i>crtD</i> _{Hfx, marium} containing artificial ribosome binding sites each
Primer	
For gene deletion	
<i>crtR</i> _A	GCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCGCGCAAGATTTGATGGG
<i>crtR</i> _B	CCCATCCACCCGGGTAAACATTCCTGCATATTCAGCATAGTAATC
<i>crtR</i> _C	TGTTTACCCGGGTGGATGGGTCCCTTAATAATGCACCATGGC
<i>crtR</i> _D	CCAGTGAATTCGAGCTCGGTACCCCTTGTCACCACAGCACTACT
<i>crtY</i> _AG	GCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCAGTCGGCTTCAGCATCC
<i>crtY</i> _B	CCCATCCACTAAACTTAAACATGAAATATCGATGATAGGGATCAA
<i>crtY</i> _C	TGTTTAAGTTTAGTGGATGGGAGCCAGAAAAGCCGTAG
<i>crtY</i> _DGpK19	CCAGTGAATTCGAGCTCGGTACCCCGTTCTTTAAACGCAATTCG
<i>crtEb</i> _C	TGTTTAAGTTTAGTGGATGGGACGATACTGCTAATAGCAATTCATCAGATATAA
<i>crtEb</i> _DGpK19	CCAGTGAATTCGAGCTCGGTACCCATGTGTGGGAGGCTTCGC
For gene overexpression	
<i>lyeJ</i> PstIF	TTAAGCTTGCATGCCGAAAGGAGAGGATTGCATGAGTACTGATATGGCGACCG
<i>lyeJ</i> PstIR	GATCCTCTAGAGTCGACCTCAACCGTTAACAATGGACC
<i>crtD</i> XbaIF	AGGTGCACTCTAGGAAAGGAGAGGATTGCATGTCCGACGGTGATGCACATG
<i>crtD</i> XbaIR	CGGGGATCCTCTAGTTAGCGTGCATCCTCTGCC
<i>cruF</i> BamHIF	GCTAACTAGAGGATCGAAAGGAGGGGATTGCATGGCCGATCTTCGCACCAAGCT
<i>cruF</i> BamHIR	CGGTACCCGGGGATCTATGATTGCCATGGAAAGCGGCGAGGG
<i>crtD</i> SmaIF	GTCGACTCTAGAGGATCCCCGAAAGGAGAGGATTGCATGTCCGACGGTGATGCACATGAGCCACTGG
<i>crtD</i> SmaIR	TGAATTTCGAGCTCGGTACCCCTAGCGTGCATCCTCTGCCATTTC
For sequencing	
<i>crtY</i> _E	TTGCACCTGCTGGATACGAA
<i>crtY</i> _F	ATCGCTGCTGAAGGAGATGT
<i>crtEb</i> _F	AAAACAATGCGCAGCGCA
<i>crtR</i> _E	GCGCGAAGATTTGATGGG
<i>crtR</i> _F	ACTTGTCACCACAGCACTAC

M13F-pUC(-40)	GTTTTCCTCCAGTCACGAC
M13R-pUC(-40)	CAGGAAACAGCTATGAC
F_seq	CTGAAATGAGCTGTTGACAA
R_seq	CAGACCGCTTCTGCGTTCTG

[0033] *C. glutamicum* ATCC 13032^T는 한국농업기술원(KACC)에서 구입하여 야생형(WT)으로 유전공학의 기초 균주로 사용하였다. *C. glutamicum*의 배양은 BHI broth를 사용하였고, 이는 beef heart infusion (9.8 g), calf brains infusion (7.7 g), protease peptone (10 g), dextrose (2 g), NaCl (5 g), Na₂PO₄ (2.5 g)를 포함하고, 1L에서 pH 7.0~8.0으로 조절되었다. 카로티노이드 생산을 위한 주 배양액으로 CGXII 최소 배지 배지를 사용하였고, 이는 3-morpholinopropanesulfonic acid (42 g), (NH₄)₂SO₄ (20 g), CO(NH₂)₂ urea (5 g), KH₂PO₄ (1 g), protocatechuic acid (0.03 mg), K₂HPO₄ (1 g), CaCl₂ (10 mg), MnSO₄·H₂O (10 mg), FeSO₄·7H₂O (10 mg), ZnSO₄·7H₂O (1 mg), CuSO₄ (0.2 mg), NiCl₂·6H₂O (0.02 mg), biotin (0.2 mg), 3,4-dihydroxybenzoic acid (30 mg) 및 MgSO₄·7H₂O (0.25 g)를 포함하고, 1L에서 pH 7.0으로 조절되었다.

[0034] 코리네박테리움 글루타미쿰 균주는 Brain Heart Infusion Broth(LB; MB cell, South Korea) 또는 1.75% 한천을 포함하는 BHI 플레이트에서 배양하였다. 구체적으로 언급하지 않는 한, *C. glutamicum*을 BHI 배지에서 밤새 전 배양하고, 탄소원이 없는 CGXII 배지로 1회 세척하고, 초기 광학 밀도(OD)(λ=600nm) 1.0에서 4%(w/v) 포도당을 함유한 CGXII에 접종하였다. 적절한 경우 배지에 10 μg/mL 클로람페니콜 또는 25 μg/mL 카나마이신 및 1mM IPTG를 첨가했다. 성장은 Shimadzu UV-1280 분광광도계(Shimadzu, Japan)를 사용하여 OD600에서 측정하였다. 플라스크를 사용한 성장 실험은 30° C, 120rpm에서 500mL의 배플 플라스크를 사용하여 50mL의 CGXII 4%(w/v) 포도당에서 수행되었다. 대장균 균주는 진탕(220rpm)하면서 37°C의 LB 배지 또는 1.75% 한천을 함유하는 LB 플레이트에서 배양하였다.

[0036] 2. 전기천공에 의한 코리네박테리움 글루타미쿰의 형질전환

[0037] Handbook of Corynebacterium glutamicum(Eggeling & Bott, 2005) 및 Ruan et al.,(2015)에 제시된 방법을 간단히 수정하여 수행하였다. 각 균주의 단일 콜로니를 91.1g/l 소르비톨 및 10g/l 글루코스(BHISG)가 보충된 15mL의 BHI에 접종하고, 200rpm에서 교반하면서 30°C에서 밤새 배양하였다. 이 전배양물로부터 1 ml/1 Tween 80 및 4 g/l 글리신이 보충된 200 ml BHISG에 4 ml를 접종하였다. OD600이 ~0.25에 접근했을 때 세포를 수확하고 전기적격자(electrocompetent)로 만들었다. 세포를 얼음 위에서 20분 동안 냉각시키고 3,500 rpm 및 4°C에서 20분 동안 원심분리를 통해 수확하고 50 ml의 얼음으로 냉각된 15% 글리세롤로 2회 세척하였다. 적격 세포를 15% 글리세롤 2mL에 재현탁하고 150 μl 분취량을 -80도 에 보관했습니다. 플라스미드(~2 μg)를 얼음 위에서 해동한 전기적격 세포에 첨가한 다음 사전 냉각된 전기천공 큐벳으로 옮기고 400 μl의 15% 글리세롤로 덮었습니다. 전기천공은 4도 사전 냉각된 전기천공 큐벳(폭, 2mm)(Bio-Rad, US)을 사용하여 25 μF, 200Ω 및 2.5kV에서 수행되었습니다. Electroporation은 2,500 V, 25 uF, 200 Ω에서 Gene Pulser Xcell Microbial System(Bio-Rad, U S)을 사용한다. 전기천공 후, 즉시 800 μl BHISG 국물로 옮기고 46도에서 6분 동안 열 충격을 가한다. 그 후, 세포를 200rpm에서 교반하면서 30°C에서 2시간 동안 회복시켰다. 적절한 양의 형질전환체를 적절한 항생제와 함께 selection BHI agar plate에 펴 바르고 2~4일 동안 30도에서 배양하였다.

[0039] 3. 박테리오투베린 생합성 유전자의 과발현을 위한 벡터의 제작

[0040] *C. glutamicum*에서 박테리오투베린 생합성 유전자의 과발현은 *E. coli*-*C. glutamicum* 셔틀 벡터 pXMJ19를 사용하여 달성하였다. 이 연구에 사용된 올리고뉴클레오타이드는 표 1에 나열되어 있다. 번역이 원핵생물에서 비효율적일 수 있기 때문에, *Hfx. marinum* MBLA0078^T 계통의 이기능성 라이코펜 엘롱가제(bifunctional lycopene elongase) 및 1,2-하이드라타제(1,2-hydratase)(lyeJ), 카로티노이드 3,4-불포화효소(carotenoid 3,4-desaturase)(crtD) 및 C50 카로티노이드 2",3"-하이드라타제(C50 carotenoid 2",3"-hydratase)(cruF) 유전자의 코돈이 최적화되었다. 각각의 유전자는 L&C Bio(Seoul, South Korea)에서 합성되었다. PCR로 생성된 단편을 KOD-plus(KOD, Toyobo, Japan)를 사용하여 증폭하고 QIAquick Gel Extraction Kit(Qiagen, 독일)를 사용하여 정제하였다. 플라스미드는 PCR로 생성된 단편으로부터 *E. coli* DH5 α에서 구성되었고 제조업체의 프로토콜에 따

라 QIAprep spin miniprep 키트(QIAGEN, 독일)로 분리되었다. 일반적인 결찰 반응인 Gibson 어셈블리는 플라스미드 구성을 위해 수행되었다(Gibson et al., 2009).

4. *C. glutamicum*에서 카로티노이드 추출 및 식별

배양된 세포를 수집하고 10,000 rpm에서 10분 동안 4℃에서 원심분리하여 수확하여 배양 배지를 제거하였다. 세포 펠릿을 0.85% 식염수로 2회 세척한 다음 산화 스트레스로부터 색소를 방지하기 위해 0.1%(w/v) 아스코르브산을 함유하는 3mL 메탄올에 재현탁했다. 현탁액을 50℃에서 15분 동안 배양하고 5분마다 볼텍싱하고 즉시 얼음 위에서 식힌다. 현탁액을 완전히 식힌 후 증류수 1.5mL를 넣어 유기층을 분리한다. 카로티노이드를 4℃에서 5분 동안 10,000rpm에서 원심분리에 의해 헥산/톨루엔(1:1, v/v)의 혼합물로 추출하고 수집된 유기상을 질소 퍼징으로 건조하고 MeOH로 재현탁했다. 카로티노이드 추출물을 0.45μm 주사기 필터로 여과하여 입자를 제거하였다. 원심분리 후 얻은 상등액을 여과하고 초고성능액체크로마토그래피(UPLC)로 분석하였다.

5. 재조합 *C. glutamicum*의 유가 발효

*C. glutamicum*의 사전 시드 배양물을 얻기 위해, BHIS 플레이트로부터의 세포를 20g/L 글루코스가 보충된 20mL의 BHIS 배지를 함유하는 250mL 진탕 플라스크로 옮겼다. 그런 다음 배양물을 200rpm 및 30℃에서 12시간 동안 회전 진탕기에서 배양했다. 생성된 예비-종균 배양물을 사용하여 5% 접종(v/v)에서 40g/L 글루코스로 보충된 종균 배지 CGXII를 접종하였다. 18시간 후, 종자 배양물을 20% 접종(v/v)에서 80g/L 포도당이 보충된 2L의 CGXII 배지가 있는 5L 생물반응기(Kobiotech, South Korea)로 옮겼다. 발효 동안 pH는 28%(v/v) 수산화암모늄과 6N HCl 용액을 사용하여 7.0으로 유지하였다. 배지의 용존산소량이 20ppm 이하로 떨어지면 회전수를 300rpm에서 10,000rpm으로 20rpm씩 증가시켰다. 500g/L 포도당, 80g/L (NH₄)₂SO₄ 및 2g/L MgSO₄ · 7H₂O로 구성된 공급 용액이 사용되었습니다(Ghiffary et al., 2021). 포도당 농도가 2%(w/v) 미만으로 감소하면 공급 용액 100mL를 간헐적으로 첨가했다. 재현성을 보장하기 위해 두 번의 독립적인 유가 발효를 수행했다.

<실험 결과>

1. 라이코펜 생산 균주의 구축

라이코펜은 박테리오투베린 생합성의 전구체이다. *C. glutamicum*에서 라이코펜은 표적 생성물 박테리오투베린으로부터 플럭스를 전환시킬 수 있는 테카프레녹산틴으로 연장될 수 있다(Heider et al., 2012). 박테리오투베린 생산 *C. glutamicum* 균주를 구축하기 위해 먼저 라이코펜을 생산할 수 있는 기초 균주를 pK19mobsacBΔ*crtYEB* 및 Δ*crtR*로 조작하였다(도 1). 천연 C50 카로티노이드 생합성 경로(*crtEb*에서 *crtYe*로)를 암호화하는 유전자가 삭제되었고 또한 *crt* 오페론을 억제하는 *crtR* 유전자도 제거되었다. *crtEb*, *crtYeYf* 또는 *crtR*이 결여된 *C. glutamicum*의 유전자-지정 결실 돌연변이체를 구성하고 콜로니 PCR 및 카로티노이드 생산에 대해 특성화하였다(도 2). *C. glutamicum* Δ*crtYEB*는 옅은 분홍색을 나타내고 세포 추출물에서 라이코펜의 생성이 관찰되었다(도 2). 다중 결실 균주 *C. glutamicum* Δ*crtYEB*는 Δ*crtYEB* 균주와 비교하여 분홍색 세포색을 띠고 라이코펜의 축적이 관찰되었다(도 1-2). 야생형에 비해 *C. glutamicum* Δ*crtR*의 카로티노이드 수율은 약 9.7배 증가했다(도 2B). 또한, 조작된 라이코펜 생산 *C. glutamicum*에서 *crtR* 결실 균주는 약 14.6배 더 높은 생산 수율을 보였다(도 2C).

2. 박테리오투베린 생산 균주의 구축

*C. glutamicum*에서 박테리오투베린을 생성하기 위해, *Hfx. marinum* MBLA0078^T의 게놈의 박테리오투베린 생합성 유전자 서열은 각 유전자의 코돈을 최적화하여 사용되었다. 코돈 최적화된 *lyeJ*, *crtD*, *cruF* 및 원래 유전자의 서열 유사성을 비교한 결과, 상동성은 각각 66.5, 67.1 및 65.9%인 것으로 나타났다. *C. glutamicum*에서 각 박테리오투베린 생합성 유전자의 발현을 *E. coli*-*C. glutamicum* 셔틀 pXMJ19 벡터를 이용하여 확인하였다(도 3). *lyeJ* 유전자를 pXMJ19 벡터에 연결한 다음 *crtD* 및 *cruF* 유전자를 각각 도입했다. 둘째, *cruF* 및 *crtD* 유전자를 pXMJ19::*lyeJ*-*crtD* 및 pXMJ19::*lyeJ*-*cruF* 벡터에 각각 도입하였다(도 3). 재조합 벡터는 PCR 및 시퀀싱으로 확인하였다. 각각의 유전자가 도입될수록 삽입된 유전자의 크기만큼 PCR 산물의 길이가 늘어나는 것을 서열 분석

으로 확인하였다(Fig 3).

3. 카로티노이드의 과발현 및 식별

각 균주의 카로티노이드 추출물은 UV-Vis 스펙트럼, MS 스펙트럼 및 머무름 시간(retention time)을 기반으로 확인되었다.

표 2

Strain	Peak	Carotenoid (Tentative identification)	R.T (min)	$Cis \ddot{e}_{max}^c$ (nm)	$\ddot{e}_{max}^c$ (nm)	$(M+H)^+$ (m/z)
<i>Hfx. marinum</i> WT*	1	All- <i>trans</i> -BR	6.1	388	467, 494, 527	742.1
	2	5- <i>cis</i> , 9'- <i>cis</i> -BR	6.3	388	463, 486, 517	742.1
	3	BR isomer	7.1	-	454, 485, 522	742.1
	4	9- <i>cis</i> -BR	7.9	386	462, 486, 520	742.1
	5	13- <i>cis</i> -BR	8.8	385	461, 487, 519	742.1
	6	15- <i>cis</i> -BR	9.3	385	465, 490, 523	742.1
	7	MABR	10.4	388	467, 494, 527	724.1
	8	IDR	12.5	375	457, 483, 517	-
	9	Unidentified	13.4	-	-	-
	10	Unidentified	14.6	385	461, 488, 519	-
	11	All- <i>trans</i> -BABR	20.2	388	465, 494, 526	706.1
	12	Unidentified	24.3	-	-	-
$\Delta crtRYEb::pXMJ19$	26	Lycopene isomer	111.6	360	439, 463, 493	537.5
	27	Lycopene	114.9	-	443, 469, 500	537.5
$\Delta crtRYEb::pXMJ19::lyeJ$	13	Unidentified	22	-	412, 433, 461	-
	14	Unidentified	22.5	342	411, 433, 461	-
	15	DH-IDR	23	-	411, 433, 461	623.1
	16	Unidentified	23.9	-	407, 429, 457	-
	17	Unidentified	24.8	-	407, 430, 457	-
	18	TH-BABR	29.1	-	444, 469, 500	710.7
	19	Unidentified	30.4	-	414, 437, 467	-
	20	Unidentified	31.1	-	431, 458, 466	-
	21	TH-BABR isomer	32.1	-	433, 459, 490	-
	22	TH-BABR isomer	33.5	-	447, 471, 502	710.1
	23	TH-BABR isomer	34.5	360	437, 463, 493	710.1
	26	lycopene isomer	111.6	360	438, 463, 493	537.5
	27	lycopene	114.9	-	443, 469, 500	537.5
$\Delta crtRYEb::pXMJ19::lyeJ-crtD$	11	All- <i>trans</i> -BABR	20.7	-	467, 493, 526	706.1
	14'	BABR isomer, DH-IDR	22.6	-	438, 462, 489, 521	706.1, 623.1
	15'	BABR isomer, DH-IDR	23.4	-	459, 486, 518	706.1, 623.1
	16'	BABR isomer, DH-IDR isomer	25	386	455, 484, 517	706.1, 623.1
	17'	DH-BABR <i>cis</i> isomer	26.3	385	472, 494, 523	706.1
	26	lycopene isomer	111.6	360	438, 463, 493	537.5
	27	lycopene	114.9	-	443, 469, 500	537.5
$\Delta crtRYEb::pXMJ19::lyeJ-cruF$	1'	TH-BR	6.8	-	433, 470, 499	746.1
	2'	Unidentified	7.3	-	-	-
	3'	Unidentified	7.7	-	-	-
	4'	Unidentified	8.1	-	439, 463, 494	-
	5'	TH-BR isomer	8.4	-	412, 433, 461	746.1

	6'	Unidentified	9	-	433, 468, 499	-
	7'	Unidentified	9.8	-	436, 460, 494	-
	8'	Unidentified	10.3	-	-	-
	9'	Unidentified	10.6	358	436, 464, 492	-
	10'	TH-MABR	13.5	-	436, 463, 497	728.1
	11'	TH-MABR isomer	14.4	-	413, 438, 466	728.1
	12'	TH-MABR isomer	16.3	-	435, 461, 494	728.1
	13'	TH-MABR isomer	17.8	-	437, 464, 494	728.1
	13	Unidentified	22	-	412, 433, 461	-
	14	Unidentified	22.5	342	411, 433, 461	-
	15	DH-IDR	23	-	411, 433, 461	623.1
	16	Unidentified	23.9	-	407, 429, 457	-
	17	Unidentified	24.8	-	407, 430, 457	-
	18	TH-BABR	29.1	-	433, 467, 498	710.7
	22	TH-BABR isomer	33.5	-	453, 471, 501	710.7
	23	TH-BABR isomer	34.6	-	437, 462, 494	710.7
	24	Unidentified	40.4	-	411, 435, 462	-
	25	Unidentified	42.1	-	409, 431, 458	-
	26	lycopene isomer	111.6	360	438, 463, 493	537.5
	27	lycopene	114.9	-	443, 469, 500	537.5
$\Delta crtRYEb::pXMJ19::lyeJ-crtD-cruF$	1	All-trans-BR	6.1	388	467, 494, 527	742.1
	2	5-cis, 9'-cis-BR	6.3	388	463, 486, 517	742.1
	3	BR isomer	7.1	-	454, 485, 522	742.1
	4	9-cis-BR	7.9	386	462, 486, 520	742.1
	5	15-cis-BR	8.8	385	461, 487, 519	742.1
	6	13-cis-BR	9.3	385	465, 490, 523	742.1
	7	All-trans-MABR	10.4	388	467, 494, 527	724.1
	8	IDR	12.5	375	457, 483, 517	-
	9	Unidentified	13.6	-	428, 453, 483, 520	-
	10	Unidentified	14.8	-	-	-
	11	All-trans-BABR	20.2	388	465, 494, 526	706.1
	13	DH-IDR isomer	23	-	412, 435, 462	623.1
	26	lycopene isomer	111.6	360	438, 463, 493	537.5
	27	lycopene	114.9	-	443, 469, 500	537.5
$\Delta crtRYEb::pXMJ19::lyeJ-cruF-crtD$	1	All-trans-BR	6.1	388	467, 494, 527	742.1
	2	5-cis, 9'-cis-BR	6.3	388	463, 486, 517	742.1
	3	BR isomer	7.1	-	454, 485, 522	742.1
	4	9-cis-BR	7.9	386	462, 486, 520	742.1
	5	13-cis-BR	8.8	385	461, 487, 519	742.1
	6	15-cis-BR	9.3	385	465, 490, 523	742.1
	7	All-trans-MABR	10.4	388	467, 494, 527	724.1
	9	Unidentified	13.6	-	-	-
	10	Unidentified	14.8	-	-	-
	11	All-trans-BABR	20.2	388	465, 494, 526	706.1
	13	DH-IDR isomer	23	-	412, 435, 462	623.1
	26	lycopene isomer	111.6	360	438, 463, 493	537.5
	27	lycopene	114.9	-	443, 469, 500	537.5

[0058]

대조군으로서 pXMJ19 벡터를 포함하는 *C. glutamicum* $\Delta crtRYEb$ 의 경우, 주요 피크가 111분 및 115분에 관찰되었다(도 4B, 표 2). 115분에 관찰된 피크 27은 m/z 값이 536인 443, 469 및 500nm의 최대값을 가졌고, 이는 11개의 공액 이중 결합(n=11)을 갖는 비환식 카로티노이드에 해당한다. 111분에 관찰된 피크 26은 UV-Vis 스펙트럼 패턴이 다른 피크 27과 동일한 m/z 값을 가졌으므로 동일한 비환식 카로티노이드의 이성질체로 식별되었다

(도 4B). 머무름 시간, 흡광도 스펙트럼 및 질량 분석 결과에 기초하여 *C. glutamicum* $\Delta crtRYEb::pXMJ19$ 의 피크 26 및 27은 라이코펜(피크 27) 및 이의 이성질체(피크 26)를 나타내는 것으로 확인되었다.

[0060] pXMJ19::*lyeJ*를 발현하는 재조합 *C. glutamicum* $\Delta crtRYEb$ 에서, 질량 분석은 피크 15와 피크 18 및 21-23이 m/z 값이 622(IDR보다 2 질량 유닛 더 큼) 및 709(IDR보다 4 질량 유닛 더 큼)를 가짐을 보여주었으며, 이는 각각 분홍색에서 주황색으로 색상 변화를 나타낸다(도 4C, 표 2). 이들 데이터에 기초하여, 피크 15 및 피크 18 및 21-23은 각각 디히드로이소펜테닐데히드로로도핀(dihydroisopentenyldehydrorhodopin)(DH-IDR; C45), 테트라히드로비스안히드로박테리오루베린(tetrahydrobisanhydrobacterioruberin)(TH-BABR) 및 그의 이성질체를 나타내는 것으로 확인되었다. *LyeJ*는 라이코펜을 DH-IDR로 변환하는 촉매로 제안되었다(Yang et al., 2015). *LyeJ*는 라이코펜을 DH-IDR로 변환하는 촉매로 라이코펜 엘롱가제(lycopene elongase)와 1,2-하이드라타제(1,2-hydratase)의 이중 기능을 하는 것으로 제안되었다(Yang et al., 2015). 이 변환은 2개의 반응을 수반한다: C-2에서 C5 이소프렌 단위의 첨가 및 라이코펜 말단의 C-1,2에서 수화. *C. glutamicum*에서 TH-BABR의 추가 확장을 위해, CrtD 또는 CruF는 pXMJ19::*lyeJ-crtD* or pXMJ19::*lyeJ-cruF*로 발현되었다.

[0062] pXMJ19::*lyeJ-crtD*의 경우, 재조합 *C. glutamicum*의 색이 연적색으로 변한 것을 확인하였고, UV-spectra 및 LC/MS 분석은 디히드로비스안히드로박테리오루베린(dihydrobisanhydrobacterioruberin)(피크 17', DH-BABR) 및 비스안히드로박테리오루베린(bisanhydrobacterioruberin)(피크 11, BABR)이 생성되었음을 뒷받침했다(도 4D, 표 2). 색상 변화는 카로티노이드 3,4-불포화효소인 CrtD에 의해 TH-BABR의 양쪽에 있는 C-3,4 및 C-3',4'에 이중 결합이 형성되기 때문이며, 빛 흡수의 파장을 변경한다. 피크 14', 15' 및 16'과 같은 몇몇 피크는 UV-Vis 및 MS 스펙트럼에서 서로 다른 카로티노이드(BABR 및 DH-IDR 이성질체)와 겹치는 것으로 밝혀졌다(표 2).

[0064] pXMJ19::*lyeJ-cruF*를 포함하는 재조합 *C. glutamicum*에서, 피크 1'은 m/z 값이 745인 443, 470 및 500nm의 최대값을 가졌고, 이는 테트라히드로박테리오루베린(tetrahydrobacterioruberin)(피크 1', TH-BR)으로 추정되었다. C50 카로티노이드 2",3"-하이드라타제로서 CruF에 의해 하이드록시 그룹이 TH-BABR의 양쪽 말단에 있는 탄소에 부착될 때, 극성은 흡수 스펙트럼의 변화 없이 증가하며, 이는 TH-BABR에 비해 머무름 시간이 앞으로 이동함을 시사합니다(도 4E). 피크 10'은 m/z 값이 727인 피크 1'과 유사한 스펙트럼 패턴을 나타내며, 이는 TH-BABR에 하나의 하이드록시 그룹이 부착된 테트라하이드로모노안하이드로박테리오루베린(tetrahydromonoanhydrobacterioruberin)(TH-MABR)임을 시사한다(도 4E, 표 2). 주요 피크 외에도 다양한 카로티노이드(피크 2'-4', 6'-9', 24, 25)가 검출되었으나 정보가 부족하여 확인할 수 없었다(도 4E, 표 2). 이러한 피크는 박테리오루베린 전구체의 유도체를 나타낼 수 있다. 이들을 식별하기 위해서는 각각의 카로티노이드를 정제하고 구조적으로 분석해야 한다.

[0066] *C. glutamicum*에서의 완전한 박테리오루베린 생합성 경로에 대해, *LyeJ*, CrtD 및 CruF는 (i) pXMJ19::*lyeJ-crtD-cruF* 및 (ii) pXMJ19::*lyeJ-cruF-crtD*로 발현되었다. 두 경우 모두 BR(피크 1, m/z 값 741), BR 이성질체(피크 2-6, m/z 값 741) 및 BR 전구체가 생성되었다(도 4F-G, 표 2). 이 결과는 *Hfx. marinum* MBLA0078^T의 카로티노이드와 동일한 프로필을 보여주었다(도 4, 표 2). 박테리오루베린 생산을 위한 *C. glutamicum* $\Delta crtRYEb$ pXMJ19::*lyeJ-crtD-cruF* 및 pXMJ19::*lyeJ-cruF-crtD*의 결과 각각 $0.58 \pm 0.02 \mu\text{g/ml}$ 및 $0.47 \pm 0.01 \mu\text{g/ml}$ 생산 수율을 얻었다. 각 균주의 카로티노이드 생산의 차이는 crtD 유전자의 발현량의 차이로 인한 것으로 예측되었다. 종합하면, *lyeJ*, crtD 및 cruF에 대한 이중 유전자 발현 결과는 각 유전자에 의해 암호화되는 효소의 기능을 설명합니다.

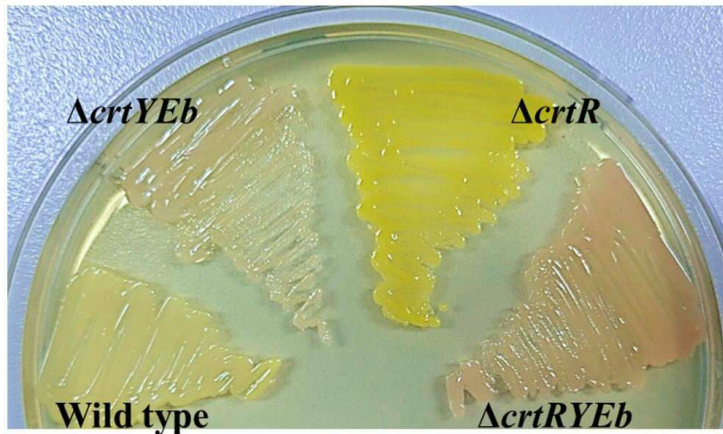
[0068] 균주 $\Delta crtRYEb::pXMJ19::lyeJ-crtD-cruF$ 에서 박테리오루베린의 생산은 5L 유가 발효 실험으로 확장되었습니다. 성장 및 박테리오루베린 생성을 42시간 동안 모니터링하였다(도 5). 세포 성장은 32시간 배양 후 114(OD600)에 도달했습니다. 박테리오루베린의 축적은 배양의 세포 성장에 따라 기하급수적으로 증가하여 32시간에 최대 $1.50 \pm 0.14 \mu\text{g/ml}$ 의 박테리오루베린에 도달했다(도 5).

[0070]

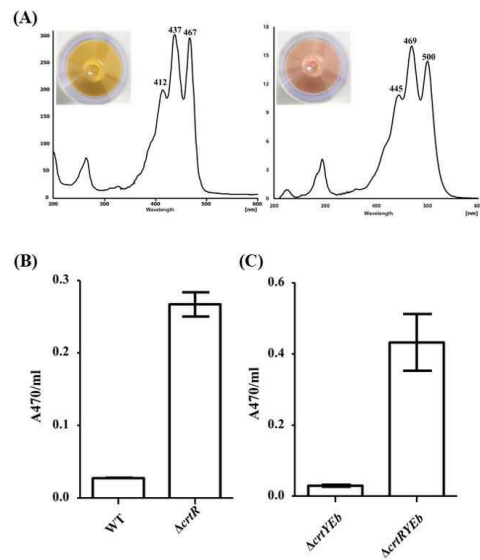
이상에서 본 발명의 바람직한 실시예에 대하여 상세하게 설명하였지만 본 발명의 권리범위는 이에 한정되는 것은 아니고 다음의 청구범위에서 정의하고 있는 본 발명의 기본 개념을 이용한 당업자의 여러 변형 및 개량 형태 또한 본 발명의 권리범위에 속하는 것이다.

도면

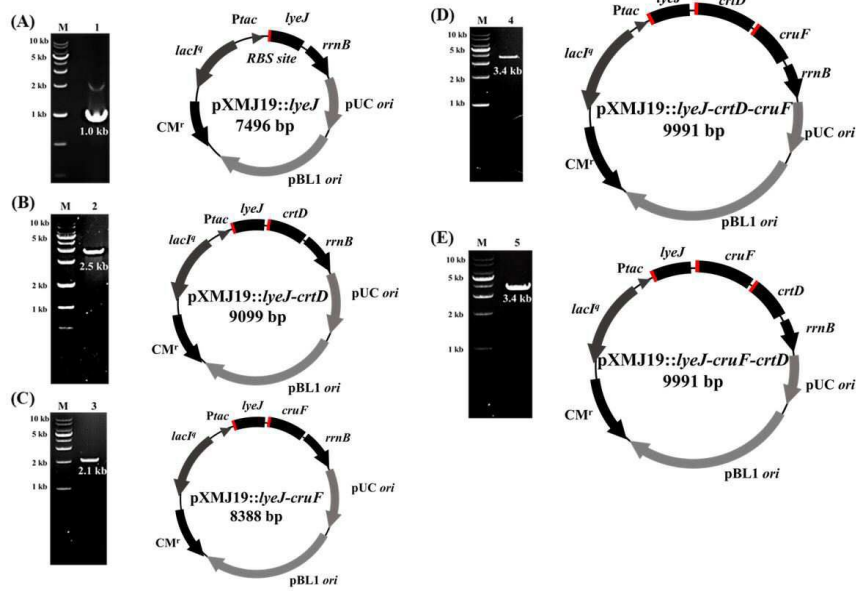
도면1



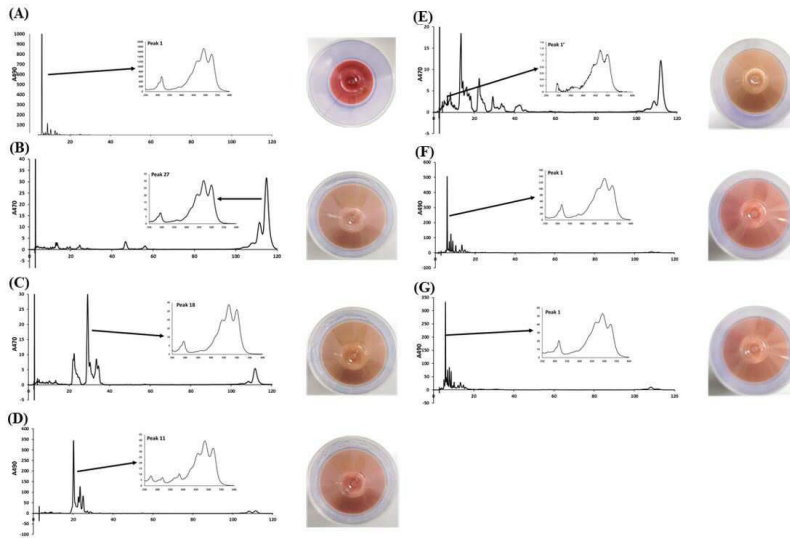
도면2



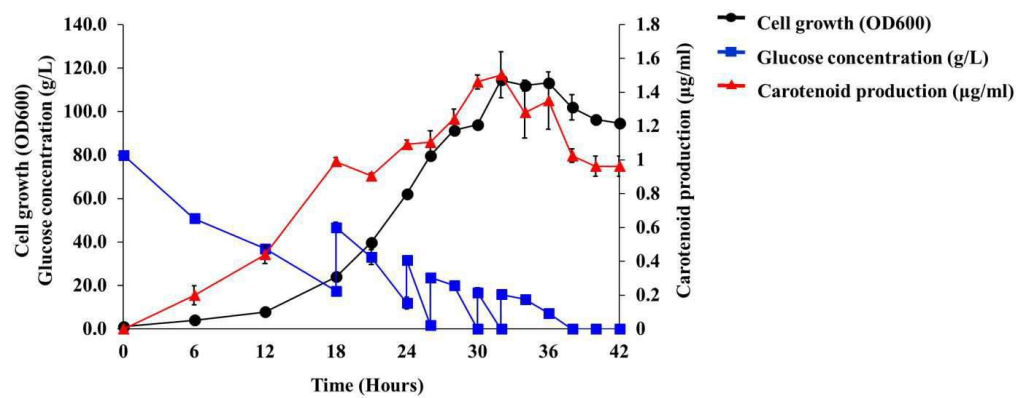
도면3



도면4



도면5



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.