

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.⁶
C12P 13/04

(11) 공개번호 특2000-0048776
(43) 공개일자 2000년07월25일

(21) 출원번호	10-1999-7002764	(87) 국제공개번호	W0 1998/14602
(22) 출원일자	1999년03월30일	(87) 국제공개일자	1998년04월09일
번역문제출일자	1999년03월30일		
(86) 국제출원번호	PCT/US1997/17133		
(86) 국제출원출원일자	1997년09월25일		
(81) 지정국	EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 독일 덴마크 스페인 프랑스 영국 그리스 아일랜드 이탈리아 룩셈부르크 모나코 네덜란드 포르투 갈 스웨덴 핀란드		
	국내특허 : 오스트레일리아 캐나다 일본 대한민국 멕시코		
(30) 우선권주장	8/723,896 1996년09월30일 미국(US)		
(71) 출원인	엔에스씨 테크놀로지스 엘엘씨 제랄드 오브레난, 주니어		
	미합중국, 일리노이주 60056. 마운트 프로스펙트, 이스트 켄싱턴 601		
(72) 발명자	포더링함, 이안, 지.		
	미합중국, 일리노이주60061, 버논힐스, 사우쓰필드드라이브10.		
	테일러, 폴, 피.		
	미합중국, 일리노이주60004, 아링톤하이츠, 플라우어씨클2032.		
	톤, 제니퍼, 엘.		
	미합중국, 일리노이주60067, 파라틴, 이. 프래트드라이브927.		
(74) 대리인	임석재, 김동엽, 김예숙		

심사청구 : 없음

(54) 직접발효 방법에 의한 D-아미노산의 제조방법

요약

본 발명은 천연 및 인공의 D-아미노산의 제조를 위한 물질들 및 방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 재조합 숙주세포를 사용하여 D-아미노산을 제조하는 방법에 관한 것이다.

구체적으로, 본 발명은 하기 단계들을 포함하는, 세포내에서의 D-아미노산의 제조방법에 관한 것이다:

- (a) 세포내로 D-아미노트랜스퍼라제 유전자와 L-아미노디아미나제 유전자를 도입하는 단계;
- (b) 상기 세포를 세포 배양배지내에서 배양하는 단계;
- (c) 상기 세포 배양배지로부터 D-아미노산을 분리하는 단계.

또한 본 발명은 하기 단계들을 포함하는, 세포내에서의 D-페닐알라닌의 제조방법에 관한 것이다:

- (a) D-아미노트랜스퍼라제 유전자, L-아미노디아미나제 유전자 및 페닐피루베이트의 생성을 증가시키는 수단을 세포내로 도입하는 단계;
- (b) 상기 세포를 세포 배양배지에서 배양하는 단계;
- (c) 상기 세포 배양배지로부터 D-페닐알라닌을 분리하는 단계.

또한 본 발명은 거울상적으로 순수한 D-아미노산의 제조를 위해 사용되는 재조합 세포의 제조에 관한 것이다.

명세서

기술분야

본 발명은 D-아미노산의 제조방법과 물질들에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 재조합 숙주 세포를 이용한 천연 및 인공의 D-아미노산 모두의 제조방법에 관한 것이다. 보다 엄밀히, 본 발명은 재조합 세포들을 발효 처리하여 거울상적으로(enantiomerically) 순수한 D-아미노산들을 생성하는 것에 관한 것이다.

배경기술

글리신, 트레오닌 및 이소류신을 제외한, 일반적이고, 천연적으로 존재하는 아미노산들은 편광된 빛의 면이 회전하게 되는 방향에 따라, 좌선성 또는 우선성으로 지칭되는 두개의 광학 이성질체들 중 하나의 형

태로 존재한다. 글리신은 비대칭 탄소원자를 가지지 않으므로, 광학 이성질체를 갖지 않는다. 트레오닌과 이소류신은 각각 두개의 비대칭 탄소원자를 가지므로, 각각 4개의 광학 이성질체를 갖는다. 알라닌과 글루타민 같은 어떤 아미노산들은 양성(오른쪽 방향) 회전을 일으키는 우선성이다. 페닐알라닌과 트립토판 같은 다른 아미노산들은 음성(왼쪽 방향) 회전을 일으키는 좌선성이다. 따라서, 아미노산들은 그들의 키랄성을 표시하기 위하여 l- 이나 d- 아미노산으로 구분하여 언급될 수 있다. 임의의 아미노산에 의해 생성되는 특정적 회전성은 온도와 pH에 따라 다양하다.

통상적으로, 아미노산들은 또한 D 또는 L로써 나타낼 수 있으며(상기의 d 또는 l 명칭과는 달리), 이는 그 아미노산의 α -탄소에 대한 배열(configuration)이, 임의적 표준형인 글리세르알데히드의 D 또는 L 입체 이성질체(에난티오머)중 어느 것에 해당하는냐에 기초한 것이다. 대부분의 천연적으로 존재하는 아미노산들 중 어떤 것들은 중성 pH의 수용액에서 우선성(d)을 나타냄에도 불구하고 이 기준에 근거하여, L-아미노산으로 나타내어 진다. 아미노산들에 활성을 지니는 대부분의 효소들은 그 아미노산의 L-형만을 인식하는 비대칭 결합부위들을 갖는다. 따라서, 대부분의 천연적으로 존재하는 단백질들은 L-아미노산들로 구성된다.

그러나, 예외적으로 D-아미노산들이 세포에 의해 생성되어 이용되기도 한다. 이는 특정 미생물들에 의한 D-글루탐에이트와 D-알라닌의 생성이 대부분이다. 세균 세포내에서는 주로 D-글루탐에이트와 D-알라닌이 생성되고, 이들은 유래인 합성에 사용된다. D-글루탐에이트와 D-알라닌이 없으면 불완전한 세균 세포벽이 생성되어 세포 용해가 일어나게 된다. 대부분의 박테리아는 직접적인 합성이 아닌, 아미노산 특이적 라세미화 효소(racemase)에 의한 L-아미노산을 전환하는 방법으로 D-아미노산들을 생성한다. 많은 세균 세포들이 L-알라닌과 D-알라닌 간의 양방향성 전환을 촉매하여 L-알라닌과 D-알라닌의 라세미 혼합물(50:50)을 형성시키는 알라닌 라세미화 효소를 갖는 것을 예로 들 수 있다. 이와 유사하게, 특히 글루탐에이트 라세미화 효소는 세포 벽에 사용되는 D-글루탐에이트와 단백질을 생성하는 L-글루탐에이트의 라세미 혼합물을 생성시킨다. 이들 두 효소들의 특이성은 둘중의 어느 하나가 결여될 때 불완전한 세포벽의 형성으로 인한 세포용해가 일어나는 사실로써 설명된다.

바실러스속과 같은 어떤 세균들은 D-아미노산들을 만들기 위한 라세미화 효소 대체물로서 D-아미노트랜스퍼라제로 알려진 효소를 가진다. 그러한 효소는 가역적으로 다양한 D-아미노산들과 이에 대응하는 α -케토산들의 아미노기 전달반응(transamination)을 촉매한다. PCT 공보 WO 91/05870에서 매닝은 아미노트랜스퍼라제의 촉매작용으로 인한 D-알라닌과 D-글루탐에이트의 미생물적 합성방법을 보고하고 있다. 매닝의 공보 2페이지에서는, 바실러스 스페리쿠스(*Bacillus sphaericus*) D-아미노트랜스퍼라제의 사용을 기재하고 있기는 하지만, 실질적으로 이 공보는 클로닝, 분리과 단지 미량의 D-아미노산만이 효과적으로 촉매 합성되는 호열성(thermophilic) 종들의 D-아미노트랜스퍼라제의 이용만을 알려주고 있다. 또한, 매닝은 바실러스 스페리쿠스 D-아미노트랜스퍼라제나, 거울상적으로 순수한 D-아미노산들의 합성을 촉매하는 다른 D-아미노트랜스퍼라제를 분리하거나 사용하는 수단들을 알려주지 못하고 있다.

바실러스 스페리쿠스 D-아미노트랜스퍼라제에 대한 매닝의 언급이 잘못되었다는 증거는 매닝의 공보 2페이지에서 찾을 수 있으며, 여기에서 매닝은 D-아미노트랜스퍼라제 DNA가 플라스미드 pICT113으로 클론되었다고 언급하고 있다. 스토다드 등, J. Mol. Biol., 196: 441-442 (1987)에서 보고된 바에 의하면, 플라스미드 pICT113은 호열성 종들의 D-아미노트랜스퍼라제를 운반하나, 바실러스 스페리쿠스 종들의 것은 운반하지 않는다고 한다. 이 사실의 중요성은 호열성 종들이 D-페닐알라닌의 현저한 생성을 효과적으로 촉매하지 못한다는 것이고, 따라서 D-페닐알라닌 산의 재조합 생산 방법에서 사용될 수 없다는 것이다.

본 출원에 선행하여 이루어진 바실러스 스페리쿠스 D-아미노트랜스퍼라제에 대한 보고는 트랜스아미나제, 크리스텐 등(eds.), 464 (1985)에서 밝혀진 단지 일부의 C-말단 서열 뿐이다. 그러나, 본 발명으로 명백해지듯이, 그 일부의 서열은 잘못된 것이며, 바실러스 스페리쿠스 D-아미노트랜스퍼라제를 분리하는데 유용하지 못하다. 따라서, 재조합 수단 또는 다른 방법에 의한 D-아미노산의 생산에서, 바실러스 스페리쿠스 D-아미노트랜스퍼라제를 알려주는 선행 문헌은 없다. 다른 D-아미노트랜스퍼라제들이 분리되었으나 바실러스 스페리쿠스에 의한 것과는 달리, D-페닐알라닌은 그런 분리된 효소들에 대해서 비교적 불충분한(poor) 기질이였다. 타니자와 등, J. Biol. Chem., 264: 2445-2449 (1989).

본 발명은 거울상적으로 순수한 천연의 또는 인공의 D-아미노산들을 제조하기위한 재조합 물질들과 생산방법을 제공한다.

발명의 요약

본 발명은 천연의 또는 인공의 D-아미노산들을 생성하는 물질들과 방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 재조합 숙주 세포들을 이용한 D-아미노산의 생산방법에 관한 것이다.

특히, 본 발명은 세포내에서 D-아미노산을 생산하는 방법에 관한 것으로,

(a) D-아미노트랜스퍼라제 유전자와 L-아미노디아미나제 유전자를 세포내로 도입시키고;

(b) 세포 배양 배지에서 세포를 배양하여,

(c) 세포 배양 배지로부터 D-아미노산을 분리하는 것을 포함한다.

본 발명은 또한 세포에서 D-페닐알라닌을 생산하는 방법에 관한 것으로,

(a) D-아미노트랜스퍼라제 유전자, L-아미노디아미나제 유전자 및 페닐피루베이트의 생산을 증대하는 수단을 세포내로 도입하고;

(b) 세포 배양 배지에서 세포를 배양하여,

(c) 세포 배양 배지로부터 D-페닐알라닌을 분리하는 것을 포함한다.

본 발명의 방법들은 D-아미노디아미나제 유전자가 기능성을 갖지 않도록 D-아미노디아미나제 유전자 돌연변이를 세포내로 도입하는 과정을 더 포함할 수 있다.

본 발명은 또한 거울상적으로 순수한 D-아미노산들의 생산에 사용되는 재조합 세포들의 제조에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명의 D-아미노산 생산방법을 설명하는 일반적인 개략도이다.

도 2는 본 발명의 방법을 사용한 D-페닐알라닌의 생산을 예시하는 도면이다. 다음의 약자들은 도 2에서 사용된 것들이다. E4P는 에리스로-4-포스페이트, PEP는 포스포엔올피루베이트이며, DAHP는 3-데옥시-D-아라비노-헵툴로소네이트-7-포스페이트이다.

도 3은 플라스미드 pIF1002의 구조를 보여주는 도면이다.

도 4는 플라스미드 pIF1003의 구조를 보여주는 도면이다.

도 5는 플라스미드 pIF318의 구조를 보여주는 도면이다.

도 6은 플라스미드 pJN326의 구조를 보여주는 도면이다.

도 7은 플라스미드 pIF319의 구조를 보여주는 도면이다.

도 8은 플라스미드 pIF320의 구조를 보여주는 도면이다.

도 9는 플라스미드 pIF321의 구조를 보여주는 도면이다.

도 10은 플라스미드 pIF333의 구조를 보여주는 도면이다.

도 11은 플라스미드 pALR18의 구조를 보여주는 도면이다.

도 12는 플라스미드 pPT362의 구조를 보여주는 도면이다.

도 13은 플라스미드 pPT363의 구조를 보여주는 도면이다.

발명의 상세한 설명

본 발명은 D-아미노산들의 생성을 위한 물질들과 방법에 관한 것이다. 본 발명의 일반적인 방법은 도 1에 예시하였다. 본 발명은 D-아미노트랜스퍼라제 유전자(dat)와 L-아미노디아미나제 유전자(lad)를 세균 세포내로 도입하는 방법에 관한 것이다. D-아미노트랜스퍼라제 유전자 생성물, 즉 D-아미노트랜스퍼라제 효소(Dat)는 D-아미노산 기질과 케토산 전구체간의 아미노기 전달반응을 촉매한다. 아미노기 전달반응에서 케토산 전구체는 그에 대응하는 D-아미노산으로 전환되고, D-아미노산 기질은 그의 케토산 형태로 전환된다. 따라서, D-아미노산 기질은 아미노기 전달반응에서 아미노기 공여체로서의 역할을 한다.

L-아미노트랜스퍼라제 유전자 생성물, 즉, L-아미노트랜스퍼라제 효소(Lat)는 세포내에 천연적으로 존재한다. D-아미노트랜스퍼라제 유전자 생성물은 세포내에서 기질로서의 케토산 전구체에 대하여 L-아미노트랜스퍼라제 유전자 생성물과 경쟁적이다. L-아미노트랜스퍼라제 효소는 케토산 전구체 형태의 L-아미노산을 형성하기 위하여, L-아미노산기질과 케토산 전구체간의 아미노기 전달반응을 촉매한다. 그러나, L-아미노디아미나제 유전자가 세포내로 도입되면, 이의 유전자 생성물은 세포내에 존재하는 어떤 L-아미노산을 대응하는 케토산 형태로 만드는 디아미네이션을 촉매한다. L-아미노산의 디아미네이션으로 인해 형성된 케토산은 또한 D-아미노트랜스퍼라제 효소에 대한 기질로서 사용되는 케토산 전구체를 제공한다. D-아미노트랜스퍼라제에 의한 케토산 전구체의 대응하는 D-아미노산으로의 전환은 비가역적이며, 이는 D-아미노산 생성물을 탈아미노화하는 L-아미노디아미나제 효소의 생성에 요구되는 D-아미노디아미나제 유전자가 세포내에 존재하지 않기 때문이다.

본 발명의 바람직한 실시예에서, D-아미노트랜스퍼라제와 L-아미노트랜스퍼라제 효소들이 이용할 수 있는 바람직한 기질들을 과생산하기 위하여, 아미노산 기질과 케토산 전구체들의 생성에 대한 효소들을 암호화하는 유전자들이 또한 세포내로 도입될 수 있다. 도입된 유전자들은 라세미화 효소 유전자들 또는 아미노산 기질들 또는 케토산 전구체들의 생합성에 관련된 속도 제한 효소들을 암호화하는 유전자들일 수 있다. 또한, 아미노산 기질들 과/또는 케토산 전구체들이 D-아미노산 생산중에 세포에 대한 배양 배지의 일부로서 제공될 수 있다. 기질로서 L-아미노산 또는 라세미 아미노산을 함유하는 세포 배양 배지의 경우, 세포 배양 배지의 일부로서 첨가된 L-아미노산을 D-아미노산으로 전환하는 라세미화 효소의 과생산을 위하여 라세미화 효소 유전자가 세포내로 도입되는 것도 바람직하다. 또한, L-아미노디아미나제 유전자 생성물의 존재는 세포내에 존재하는 L-아미노산을 탈아미노화 하여 D-아미노트랜스퍼라제 효소에 대해 기질로서 사용되는 상응하는 케토산 전구체를 생성할 것이다.

본 발명의 방법의 이용에 적당한 세포들은 다음 세균 세포들에 제한되지는 않지만, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 스페리쿠스, 바실러스 스테아로써모필러스, 슈도모나스, 클렙시엘라, 살모넬라, 브레비박테리움, 마이크로코커스, 코리네박테리움 및 대장균을 포함한다. 본 발명의 방법에 바람직한 실시예에서 세포는 대장균이다.

본 발명의 또 다른 실시예에서, 바실러스 스테아로써모필러스 세포의 사용은 적당한 호열성균들을 사용하는 부가적인 장점을 갖는데, 이는 상승된 온도에서 더 빠른 반응속도로 D-아미노산들의 제조가 가능하게 되는 것이다. 따라서, D-아미노산들의 제조에 걸리는 생산시간이 단축될 수 있을 것이다.

바람직한 실시예에서 프로테우스 믹소파시엔스로부터의 L-아미노디아미나제 유전자와 바실러스 스페리쿠스로부터의 D-아미노트랜스퍼라제 유전자가 세포내로 도입된다. 이 두 유전자 모두 다음의 표 1에 나타낸 바와 같이 광범위한 기질범위를 가지는 효소들을 암호화한다. 또한, 표준 돌연변이 방법을 사용하여 각각의 유전자들을 돌연변이시킴으로써, 이들 효소들에 대한 기질 범위는 증가될 수 있다.

[표 1]

Lad 및 Dat 효소들에 대한 천연 및 인공 아미노산 기질들.

Lad 기질	Dat 기질
알라닌	피루브산
페닐알라닌	페닐피루브산
이소류신	알파-케토이소캐프로에이트
류신	알파-케토이소발레르산
트립토판	인돌-3-피루브산
티로신	하이드록시 페닐피루브산
발린	알파-케토이소발레르산
아르기닌	5-구아니디노-2-옥소발레르산
아스파라긴	2-옥소숙시남산
글루타민	시험되지 않음
메티오닌	2-옥소-4-(메틸티오)부티르산
오르니틴	5-아미노-2-옥소펜타논산
세린	3-하이드록시피루브산
노르류신	2-옥소헥사논산
노르발린	2-옥소펜타논산
디하이드록시페닐알라닌	디하이드록시페닐피루브산
시트룰린	알파-옥소-감마-우레이도노발레르산
시스테인	시험되지 않음
히스티딘	2-옥소-4-이미다졸프로피온산
리신	6-아미노-2-옥소헥사논산

또 다른 바람직한 실시예에서 프로테우스 미라빌리스로부터의 L-아미노디아미나제 유전자와 바실러스 스페리쿠스로부터의 D-아미노트랜스퍼라제 유전자들이 세포내로 도입된다.

본 발명의 바람직한 실시예에서, 바람직한 숙주 세포는 대장균 균주 pIF3이다. 대장균 균주 pIF3은, 미국 타입 배양 컬렉션(American Type Culture Collection), 12301 파크론 드라이브, 록빌, 메릴랜드 20852, USA(ATCC 기탁번호 69766)으로부터 얻을 수 있는 RY347 균주로부터 유래된다. pIF3 균주는, L-아미노트랜스아미나제 유전자 tyrB와 ilvE의 야생형 복제체들이 본 명세서에서 참고문헌으로 포함된 밀러 등, 세균 유전학 단기코스, 콜드 스프링하버 실험실 출판사(1992)에 개시된 바와 같이 박테리오파지 P1에 의한 형질도입에 의해 염색체 세포내로 도입되었다는 점에서 RY347과 다르다. tyrB 및 ilvE 유전자들은 케토산 전구체들을 그에 상응하는 L-아미노산 형태로 전환하는 L-아미노트랜스아미나제 효소들을 암호화한다.

야생형 아미노트랜스아미나제 유전자 tyrB와 ilvE의 pIF3 세포 내로의 재도입은 RY347에 비해 세포 성장을 향상시킬 수 있는 추가적인 장점을 가지며, 이는 L-아미노트랜스아미나제 유전자 생성물들의 아직은 규명되지 않은 어떤 추가적인 기능에 기인하는 것으로 추정된다. 특히, 바람직한 L-아미노트랜스아미나제 유전자들은 aspC, tyrB와 ilvE를 포함하며, 이에 제한되지는 않는다.

본 발명의 D-아미노산들의 생성에 사용되는 세포들의 염색체는 본 명세서에 참고문헌으로 포함된 밀러 등, 세균 유전학 단기코스, 콜드 스프링하버 실험실 출판사(1992)에서 설명된 바와 같이 표준적 기술들을 사용하여 돌연변이될 수 있을 것이다. 특정한 구체예에서, dadA 유전자 돌연변이는 대장균 세포내로 도입될 수 있으며 도입된 dadA 유전자는 기능성을 갖지 않는다. 대장균 세포들은 유전자 dadA와 dadX를 포함하는 dad 오페론을 가진다. dadX 유전자는 D-형과 L-형들간의 아미노산들의 라세미화에 관계된 알라닌 라세미화 효소를 암호화한다. dadA 유전자는 일군의 D-아미노산들의 산화적 탈아미노화 반응을 수행하는 D-아미노디아미나제를 암호화한다. dad 오페론은 D-알라닌의 존재하에 도입되어 D-아미노디아미나제 및 D-알라닌 라세미화 효소들을 생성한다. DadX 와 DadA 효소들은 D-알라닌의 흡수와 피루베이트로의 이화작용에 관련된 막 복합물을 형성한다. 또한 DadA 효소는 D-페닐알라닌과 같은 다른 D-아미노산들을 탈아미노화 할 수 있다. 따라서, D-아미노산들의 과생산에 사용되는 대장균 세포들에서 DadA 효소의 생성을 막기 위하여, dadA 유전자를 돌연변이시키는 것이 유리하다.

한편, L-아미노트랜스아미나제 유전자들 aspC, ilvE, tyrB의 돌연변이체들 또는 D-아미노디아미나제 dadA 유전자의 돌연변이체를 포함하는 대장균 균주들은 콜리 유전자 보관 센터(예일 대학, 뉴 헤이븐, CT)로부터 얻을 수 있을 것이다. 예를 들어, L-아미노트랜스아미나제 유전자 aspC, ilvE와 tyrB의 돌연변이체를 가지는 다음 대장균 균주들 DG30, DG31, DG34 및 DG와, D-아미노디아미나제 dadA 유전자의 돌연변이체를 가지는 대장균 균주 EB105는 콜리 유전자 보관 센터에서 얻을 수 있을 것이다.

결실을 포함한 돌연변이체들은, 시험관 조건에서 타겟 유전자의 재생된 단편들을 숙주 세포 염색체 내로 운반하는 온도 민감성 재조합 플라스미드를 사용하여 부위 유도된 방식으로 세포내 염색체로 도입될 수 있다. 예를 들어, 미국특허 제 5,354,672호에 개시된 플라스미드 pHSG415의 경우, 플라스미드 복제 통제

부위의 온도 민감성 성질이 플라스미드와 숙주세포 염색체간에 일어나는 재조합을 동정하는데 사용될 수 있다. 플라스미드상의 타겟 유전자의 결실된 복제물은 pHSG415를 이용하여 세포 염색체상의 동일 유전자의 야생형 복제물과 교체될 수 있을 것이다. 그 후 숙주 세포로부터의 플라스미드의 연이는 결실에 의해 타겟 유전자가 변이된 세포가 얻어진다. 따라서, pHSG415는 숙주 세포 염색체를 변이시키거나 또는 변이되었던 숙주 세포 염색체 내로 야생형 유전자를 다시 재도입시키는데 효과적인 수단들을 제공한다.

본 발명의 바람직한 구체예에서, D-페닐알라닌을 세포내에서 생산하는 방법은 D-아미노트랜스퍼라제 유전자와 L-아미노디아미나제 유전자를 세포내로 도입하는 것을 포함한다. D-아미노트랜스퍼라제 유전자 생성물은 D-알라닌 기질과 케토산 전구체인 페닐피루베이트간의 아미노기 전달반응을 촉매하여 D-페닐알라닌과 피루베이트를 생성한다. D-알라닌과 페닐피루베이트 기질들은 일반적으로 세포내에 존재하는데, D-알라닌은 세포벽 내로 포함되고, 페닐피루베이트는 L-페닐알라닌을 생합성하는 경로에서 마지막 전구체로 쓰인다. 또한, 자연적으로 존재하는 L-아미노트랜스퍼라제 유전자 생성물은 L-알라닌과 페닐피루베이트간의 아미노기 전달 반응을 촉매하여 L-페닐알라닌과 피루베이트를 생성한다. 그러나, L-아미노디아미나제 유전자의 세포내로의 도입은 합성된 대부분의 L-페닐알라닌을 페닐피루베이트로 다시 탈아미노화 시키는 L-아미노디아미나제 효소를 생성시키며, 나머지 L-페닐알라닌은 단백질 생산에 사용된다. 탈아미노화 반응의 결과로써 생성되는 페닐피루베이트는 더 많은 D-페닐알라닌을 생성하기 위한 기질로서 D-아미노트랜스퍼라제 효소에 의해 이용될 수 있다. 세포내에서 D-페닐알라닌의 생성은 비가역적이며, 이는 D-페닐알라닌을 탈아미노화 시키는 D-아미노디아미나제 유전자 생성물이 세포내에 존재하지 않기 때문이다.

본 발명의 방법을 사용한 D-아미노산들의 생산에서, 아미노기 전달 반응에서의 아미노기 공여체로서 사용되는 D-아미노산 기질 농도가 증가되는 것이 바람직하다. 예를 들어, D-페닐알라닌의 제조에서 세포에 D-알라닌을 첨가하는 것은 아미노기 전달 반응에 대한 D-알라닌 기질이 충분히 고농도가 되도록 보장하는 것이다.

본 발명의 바람직한 실시예에서 알라닌의 라세미 혼합물이 발효중에 세포 배양 배지의 일부로서 세포에 첨가될 수 있다. 부가적으로, 알라닌 라세미화 효소를 암호화하는 세포질성 알라닌 라세미화 효소 유전자(alr)가 세포내로 도입될 수 있다. 알라닌 라세미화 효소는 세포내에서 50/50 D-, L-알라닌 평형을 유지시킨다. D-아미노트랜스아미나제 효소의 활동으로 인해 세포내의 D-알라닌의 양이 소비됨에 따라 알라닌 라세미화 효소는 L-알라닌을 D-알라닌으로 전환시킨다. 이러한 방식으로, 모든 D-, L-알라닌 혼합물은 아미노기 전달 반응에서 아미노기 공여체로서 사용되는 D-알라닌 기질로서 D-아미노트랜스퍼라제 효소에 의해 이용될 수 있으며, 나머지 소량은 세포벽으로 포함된다. 바람직한 실시예에서, 세포내로 도입되는 alr 유전자는 살모넬라 타이피무리움으로부터 클론된다.

D-아미노산들을 생성하는 동안에 세포 배양액으로 첨가될 수 있는 다른 적합한 아미노기 공여체들은 L-알라닌, L-글루타메이트, L-페닐알라닌, L-아스파르테이트 또는 상기 언급된 L-아미노산들 중 어느 하나의 라세미 혼합물을 포함한다. 존재하는 아미노기 공여체에 따라 글루타메이트 라세미화효소, 아스파르테이트 라세미화 효소 또는 페닐알라닌 라세미화 효소와 같은 라세미화 효소의 유전자도 바람직하게 세포내로 도입될 수 있다. 따라서, D-아미노트랜스아미나제 효소는 아미노기 전달 반응에서 사용될 수 있는 D-아미노기 공여체 기질의 양을 증가시킨다.

세포내에서 D-페닐알라닌의 생산을 증가시키기 위하여, 페닐피루베이트를 생산하는 속도 제한 효소를 암호화하는 유전자를 도입함으로써 케토산 전구체 즉, 페닐피루베이트의 양을 세포내에서 증가시킬 수 있다. 세포의 방향족 아미노산 생합성 경로로부터의 페닐피루베이트 생산은 두개의 속도 제한 효소 PheA와 AroH에 의해 조절된다. PheA와 AroH를 암호화하는 유전자들의 세포내로의 도입은 페닐피루베이트를 과생산하도록 만든다. 따라서, 페닐피루베이트 양의 증가는 D-아미노트랜스퍼라제 유전자 산물이 D-페닐피루베이트로 전환할 수 있는 기질을 더 많이 제공할 수 있게 한다.

세포내에서 케토산 전구체의 양도 상응하는 L-아미노산을 세포에 첨가함으로써 증가시킬 수 있다. L-아미노산을 첨가하는 경우, L-아미노디아미나제 효소는 L-아미노산을 탈아미노화하여 상응하는 케토산 전구체를 형성한다. 그 후, 케토산 전구체는 D-아미노트랜스퍼라제 효소에 의하여 기질로서 사용되어 그에 상응하는 D-아미노산으로 전환된다.

또한 본 발명은 외생의 D-아미노트랜스퍼라제 유전자와 외생의 L-아미노디아미나제 유전자를 포함하는 재조합 세포에 관한 것이다. 본 발명의 재조합 세포는 세포내에서 D-아미노디아미나제 유전자 돌연변이를 포함할 수 있으며, 그러한 D-아미노디아미나제 유전자는 기능성을 갖지 않는다. 본 발명의 재조합 세포는 또한 외생의 알라닌 라세미화 효소 유전자, 외생의 aroH 유전자 및 외생의 pheA 유전자를 포함한다. 외생의 D-아미노트랜스퍼라제 유전자는 바실러스 스팔리쿠스 D-아미노트랜스퍼라제 유전자일 수 있고, 외생의 L-아미노디아미나제 유전자는 프로테우스 미라빌리스 D-아미노디아미나제 유전자일 수 있으며, 외생의 라세미화 효소 유전자는 살모넬라 타이피무리움 라세미화 효소 유전자일 수 있다.

본 발명의 재조합 세포들의 배양은 거울상적으로 순수한 D-아미노산들을 생산하기 위해 사용된다. 개시된 방법을 사용하여 생산된 L-아미노산에 대한 D-아미노산의 거울상 이성질체의 과잉량(enantiomeric excess: ee) 백분율은 존재하는 D-아미노산의 양으로부터 존재하는 L-아미노산의 양을 빼고, D-, L-아미노산의 총 양으로 나눈 후, 100을 곱하여 결정될 수 있다. 바람직한 실시예에서, D-페닐알라닌은 실질적으로 순수한 형태로, 높은 수율로 생산된다. D-페닐알라닌의 생산방법은 도 2에 예시되었다.

D-아미노트랜스퍼라제 유전자 생성물을 만들기 위한 D-알라닌과 페닐피루베이트 기질에 대한 부가적인 공급원으로서의 D-, L-알라닌 및 L-페닐알라닌을 첨가한 본 발명의 재조합 세포들의 배양액을 이용하여 D-페닐알라닌 13.66g/l, L-페닐알라닌 0.47g/l를 생산하였으며, 거울상 이성질체의 과잉량은 94%였다. 발효 과정 중의 배양액에 D-, L-알라닌만을 첨가한 경우에는 D-페닐알라닌 4.15g/l이 생산되었고, L-페닐알라닌은 전혀 생산되지 않았으며, 거울상 이성질체의 과잉량은 100%였다. 반면에, D-, L-알라닌 또는 L-페닐알라닌이 발효 과정중의 세포 배양액에 첨가될 때, D-페닐알라닌 1.12g/l과 L-페닐알라닌 0.47g/l가 생산되었으며, 거울상 이성질체의 과잉량은 41%였다.

본 발명의 방법에 의해 생산된 D-아미노산들은 당 기술분야의 당업자에게 잘 알려진 방법들을 사용하여 분리될 수 있을 것이다. 예로서, 개시된 방법을 사용하여 D-아미노산들을 분리하는 한 방법은 다음과 같

다. 발효 완료시에, 그 발효 배양액을 세포들부터 따라낸다. D-아미노산 생성물의 농도가 증가되도록 그 배양액의 부피를 감소시킬 수 있을 것이다. 배양액의 감소는 일반적으로, 진공하에서 그 배양액을 30℃에서 100℃사이의 온도로 가열함으로써 수행된다. 그 후, 배양액의 pH를 그 아미노산 생성물의 등전점으로부터 +/-1의 범위로 조절하여 D-아미노산을 침전시킨다. pH를 조절하는 동안, D-아미노산 생성물이 침전될 것이다. 침전에 이어, D-아미노산을 표준 방법들에 의하여 배양액으로부터 분리하며, 그 표준 방법들은 여과, 원심분리 또는 따라내는 과정을 포함할 수 있다. 분리된 D-아미노산 생성물을 세척하고 건조한다.

대장균에서, 알라닌, 아스파르트산, 글루탐산, 페닐알라닌, 티로신, 발린, 류신 및 이소류신과 같은 아미노산들은 이들의 케토산 전구체들로부터 직접적으로 합성된다. L-아미노산들이나 라세미 혼합물들 중 하나를 발효중에 재조합 세포들에 첨가하는 것 뿐 아니라, 특정 케토산에 대한 속도 제한 효소들을 생성하는 유전자들의 도입에 의하여 원하는 아미노산의 케토산 전구체도 과생산될 수 있을 것이다.

다음의 실시예들은 본 발명을 보다 명확하게 설명하고, 본 발명을 수행하는 상세한 특정 구체예들을 제공한다. 본 실시예들은 단지 예시적인 목적이며, 출발 물질 과/또는 처리의 변수들에 작은 변화나 변경들이 이루어질 수 있다. 그러한 변화들은 본 방법 또는 최종 산물을 현저히 변경시키지 않는 범위에서, 이하의 청구항들에 의해 기술되는 본 발명의 기술사상 및 범주내에 속하는 것으로 간주한다.

실시예

실시예 1

D-아미노트랜스퍼라제 DNA의 분리

바실러스 스페리쿠스의 배양물은 D-아미노트랜스퍼라제 DNA의 원으로서 American Type Culture Collection, ATCC, (ATCC 기탁번호 10208)로부터 얻었다. 배양물을 보충되지 않은 LB 배지상에 줄무늬로 선을 긋고나서 방새도록 37℃에서 성장시켰다. 염색체 DNA를 제조하기 위하여, 단일 콜로니를 1L 플라스틱 크기의 루리아 브로트(Luria Broth) 50ml에 주입하고, 이를 방새도록 300rpm으로 37℃에서 진탕시켰다. 세포들을 5분동안 10,000G에서 원심분리 시켜서 얻은 후에 0.85%의 식염수로 세척을 하고, 다시 5분동안 10,000G로 원심분리하였다. 생성된 펠릿(pellet)은 10mM 글루코스, pH8.0의 25mM 트리스 HCl, 그리고 10mM 에틸렌디아민 테트라아세트산(EDTA) 5ml중에 재-현탁되었다. RNase A 50μl의 분별액을 첨가하고 용액을 부드럽게 혼합하였다. 다음에, 0.4% 소듐 도데실설페이트(SDS) 10ml와 100μg/ml 프로테아제 K를 혼합된 용액에 첨가하고나서 맑아질때까지 37℃에서 항온처리하였다. pH 5.2의 소듐 아세테이트를 최종농도가 300mM이 될때까지 첨가하였다. 완전한 펠렛 추출은 흰 침전물들이 파아지 경계면에서 보이지 않을 때까지 수용성 파아지와 대략 같은 양의 펠렛을 사용하여 실행되었다. 수용성 파아지는 그후에 제거되었고 염색체 DNA는 2.5배의 에탄올을 사용하여 침전되었다. DNA 펠릿은 제거되었고 pH5.2의 300mM 소듐 아세테이트에서 재-용해되었다. 에탄올 침전이 수행되었고, DNA 펠릿은 제거되고 건조되었으며 2ml의 증류수에서 용해되었다. DNA 농도는 150μg/ml로 결정되었다. 상기 기술한 방법 이외에도 박테리아 DNA의 분리를 위한 표준 방법들이 알려져 있으며, 예를 들어 여기에 참고문헌으로 통합된 Current Protocols in Molecular Biology, 2.4.1-2.4.5.(오수벨 등, 1994)에 보고되어 있다.

상기 기술된 바와 같이 얻은 염색체 DNA는, Mbo I로 부분적으로 소화되었다. 2~10kb 범위의 단편을 얻기 위한 이상적인 소화과정은 염색체 DNA 13μg를 사용하여 40분동안 2.5MboI(New England Biolabs, Beverly, MA)로 소화시켜 수행되었다. 상기한 바와 같이 제조된 대략 13μg의 염색체 DNA는 전체부피가 100μl인 37℃의 바이오랩 Mbo I 완충용액에서 Mbo I 2.5U로 부분적으로 소화되었다. 17μl의 샘플들을 5, 10, 20, 30, 40분에 얻었고, 15μl의 샘플을 50분에 얻었다. 모든 샘플들을 샘플내에 있는 어떤 제한 효소를 파괴하기 위하여 65℃로 가열한 후에 얼음에 방치하였다. 샘플 각각의 5μl 분별액을 여기에 참고 문헌으로 통합된 샘브록 등(eds.)의 Molecular Cloning ; A Laboratory Manual(Cold Spring Harbor Laboratory Press) : 6.3-6.32(1989)에 기술된 TBE 완충용액을 사용하여 0.8%의 아가로스 겔상에서 전기영동 시켰다. 전기영동 자료로부터, 40분에 얻어진 샘플은 대부분 2~10kb 크기의 DNA를 포함하고 있으며, 이들 단편들은 D-아미노트랜스퍼라제의 발현을 위하여 플라스미드 pIF306중에 라이브러리를 구성하기 위하여 사용되었다.

플라스미드 pIF306은 pBR322로부터 유도되었다(New England Biolabs, Beverly, Ma). pIF306을 구성하기 위하여, 변형된 pheA 프로모터가 pBR322상에 있는 독특한 HindIII와 Sph I 부위 사이에 삽입되었다. Hind III에서 Sph I까지의 삽입부위 사이에 독특한 BamHI와 Bal II 부위가 존재한다. 변형된 pheA 프로모터는 여기에 참고문헌으로 통합된 포터링함 등의 공동-소유된 미국특허 제 5,120,837호에서 구체화된 것으로부터 유도되었고, 그 서열은 다음과 같다:

HindIII 35 10

AAGCTTTTTTGTGACAGCGTGAACAGTACGGGTATAATACT

BamHI Start

AAAGTCACAAGGAGGATCCACTATGACATCGGAAACCCGTTACT

Hae II

GGCGCT (서열번호:1)

벡터 DNA는, 각각 Mbo I에 의해서 제조된 것들과 양립가능한 말단을 제조하는 BamHI와 Bgl II로 pIF306을 소화시키므로써 제조되었다. 플라스미드 DNA 0.5μg과 효소 각각의 2 유닛을 사용하여 2시간 동안, 전체 부피를 20μl로 하여 37℃에서 소화시켰다. 4.25kb와 1.25kb의 단편들이 제조되었고 1%의 아가로스 TBE 겔상에서 전기영동으로 분리되었다. 바람직한 4.25kb의 단편은 겔로부터 절단되었고 겔 추출물 키트(Qiagen Inc, Chatsworth, CA)를 사용하여 회수되었다. 그후에 단편은 DNA의 말단을 디포스포릴화시키기 위하여 그리고 재-순환을 방지하기 위하여, 제조자의 지시에 따라서 바이로랩 완충용액 #2에서 1 유닛의

효소를 포함한 20 μ l의 부피에서 1시간 동안 37℃에서 소의 장 포스파타제(New England Biolabs, Beverly, MA)로 처리되었다. 그 후에 효소로부터 유리된 DNA 단편을 분리하기 위하여 혼합물들을 PCR 정제 키트(Qiagen)로 처리하였다.

pIF306 벡터 단편은 약 20ng의 벡터 단편과 남아 있는 약 12 μ l의 40분 부분 소화체를 혼합하므로써 ATCC 10208 염색체 DNA의 40분 부분 소화체(상기 참조)로부터의 단편에 결합되었다. 제조자의 지시에 따라 타카라 결합 키트(Takara Biochemicals, PanVera Corporation, Madison, WI)를 사용하여 결합이 이루어졌다. 17℃에서 2시간 동안 결합이 수행되었고, 그런 다음 DNA는 최종량이 50 μ l인 PCR 정제 키트(Qiagen)를 사용하여 회수되었다. 생성된 플라스미드는 25 μ F 축전기를 지닌 2.5kv로 고정된 Bio-Rad Gene Purser와 200 Ω 의 저항으로 고정된 Bio-Rad pulse controller를 사용한 전기영동에 의해서 대장균 XL1-Blue(Stratagen, La Jolla, Ca)로 삽입되었다.

형질전환체를 50 μ g/ml의 암피실린이 보충된 LB 배지상에 놓았다. 대략 20,000개의 형질전환체들이 제조되어 모아졌다. 그리고 나서 플라스미드 DNA는 여기에 참고문헌으로 통합된 Molecular Cloning : A Laboratory Manual(샘브록 등, 2판, 1989)에 보고된 것처럼 분리되었다. 생성된 플라스미드 DNA는 25 μ F 축전기를 지닌 2.5kv로 고정된 Bio-Rad Gene Purser와 200 Ω 의 저항으로 고정된 Bio-Rad pulse controller를 사용한 전기영동에 의해서 대장균 균주 WM335로 삽입되었다. 균주 WM335는 Phabagen Collection, Department of Molecular Cell Biology, State University of Utrecht, 네덜란드로부터 얻을 수 있고, 여기에 참고문헌으로 통합된 루그텐베르그 등의 J.Bacteriol., 114:499-506에 보고되어 있다. 세포들은 0.2cm의 간격으로 BioRad Gene Pulser 큐벳에서 펄스처리 되었다. 형질전환된 대장균 세포는 600nm에서 0.7의 광학적 농도까지 성장하였다(50ml의 배양물). 세포들은 5분 동안 10,000G에서 원심분리에 의해 회수되었으며, 30ml 탈이온 증류수로 세척되었다. 세포들을 다시-회전시키고 탈이온 증류수 200 μ l에 재-현탁시켰으며, 40 μ l의 세포들을 회수된 결합 혼합물 10 μ l와 혼합한 후 전기영동 큐벳에 넣었다. 단일 펄스가 큐벳에 적용되었고 500 μ l의 SOC 배지 (GIBCO/BRL, Gaithersburg, MD)가 첨가되었으며 세포 현탁액과 혼합되었다. 그후에 큐벳의 내용물들을 20ml의 pvc 튜브로 옮기고 나서 37℃에서 30분 동안 항온처리하였다. 그리고 나서 세포들을 적당한 배지에서 평판배양하였고, 하기 기술한 것처럼 세포들을 선택하였다. DNA를 미생물내로 형질전환/형질유도시키기 위한 많은 배지들은 공지되어 있으며, 본 발명의 방법에 따라서 사용될 수 있다. 예를 들어 창 등, Guide to Electroporation and Electrofusion(Academic Press, 1992)를 참고.

형질전환체는, 티민 50 μ g/l와 암피실린 60 μ g/l은 보충되었지만 D-글루타메이트는 결핍된 LB 배지에서 평판배양되었다. 그러한 형질전환체들만이 상기한 배지에서 D-글루타메이트가 존재하도록 만들 수 있다. 문헌에 보고된 바에 따르면, 바실러스 스페리쿠스는 글루타메이트 라세마제가 결핍되어 있다고 여겨지기 때문에, 모든 세포들은 분명히 바실러스 스페리쿠스의 dat 유전자를 운반하는 형질전환체이어야만 한다. 그러나 두 개의 다른 부류의 형질전환체들이 상기 기술된 방법에 의해서 분리되는데, 하나는 dat 유전자가 포함된 것이고, 다른 하나는 글루타메이트 라세마제가 포함된 것이다. 라세마제가 포함된 클론은 pIF1001로 지정되고, dat가 포함된 클론은 pIF1002로 지정되었다. 도 3은 pIF1002의 구조를 나타내는 개략적인 도면이다.

각각의 경우에 있어서, 클론들은 제한 엔도뉴클레아제 소화에 의해서 배치되고, 유전자들은 서열화되었다. dat 유전자의 서열과 암호화된 단백질의 유추된 아미노산 서열은 서열번호:2와 3에 나타나 있다. dat 유전자는 다른 공지된 dat 유전자 서열과 높은 수준의 서열 상동관계를 가지고 있다는 것이 발견되었다. 타니자와 등, J. Biol.Chem, 264:2450-2454(1989) 참조. 그러나 pIF1002에 있는 바실러스 스페리쿠스 dat 유전자에 의해서 암호화된 D-아미노트랜스퍼라제의 C-말단 아미노산 서열은 C-말단 서열만이 공개되어 있는 바실러스 스페리쿠스 D-아미노트랜스퍼라제의 다른 공개된 보고와 일치하지 않는다. 트랜스아미나제, 크리스텐 등, 464(1995)에 보고된 서열은 Val-Ile-(Phe-Tyr)-Leu-Ala-Leu(서열번호:4)이었다. 이에 반하여, 본 발명에서 제공된 수정된 C-말단 서열은 Leu-Pro-Ile-Ser-Ile-Asn-Ala(서열번호:5)이었다. 바실러스 스페리쿠스 D-아미노트랜스퍼라제-암호화 유전자를 분리하기 위해서 크리스텐에 보고된 서열을 사용한 시도가 있었으나, 성공하지 못하였다.

두 개의 클론들은 dat 유전자의 존재를 확인하기 위하여 생물학적으로 분석되었다. 분석은 여기에 참고문헌으로 통합된 Method in Enzymology, 113:108-113(19)에 보고되었다. 즉, WM335 세포들에 있는 pIF1001 또는 pIF1002의 배양물을 티민 50 μ g/ml와 암피실린 200 μ g/ml이 보충된 LB 배지 50ml에 놓았다. 배양물은 밤새도록 37℃에서 진탕하는 항온처리기 내의 500ml 플라스크에서 성장하였다. 세포들을 10,000G에서 5분동안 원심분리시키므로써 채취하였고, pH8.5의 50mM 포타슘 포스페이트로 세척하였다. 세포들을 다시-회전시켰고 pH8.5의 50mM 포타슘 포스페이트 1ml을 얻었다. 세포들은 1000 lbs/in²에서 프랑스의 프레스 세포(French Pressure Cell)를 사용하여 용해되었고, 용해물들은 30분동안 마이크로퓨즈(microfuge)에서 14,000G로 원심분리 되었다. 그리고 상층액은 마이크로피펫으로 추출되었다. 생성된 세포 추출물들은 여기에 참고문헌으로 통합된 Methods in Enzymology, 113:108-113(19)에 보고된 락테이트 디하이드로게나제-결합 분석법을 사용하여 분석되었다. 분석 혼합물은 pH8.5의 0.3M 포타슘 포스페이트, 25mM D-알라닌, 25mM α -케토-글루타레이트, 0.1mM NADH, 70 μ g/ml 락테이트 디하이드로게나제 및 50 μ l 세포 추출물을 포함하였다. 반응은 25℃의 1ml 큐벳에 있는 다른 성분들에 NADH와 락테이트 디하이드로게나제를 첨가하므로써 개시되었다. 반응에 의해, NADH의 산화를 증명하는 338nm에서의 흡수에 있어서 변화가 일어났다. 비-특이성 산화의 보정을 위해서, 대조군 분석은 세포 추출물이 결핍된 분석 혼합물을 사용함으로써 행해졌다.

추가적인 대조군으로서 D-알라닌이 결핍된 분석 혼합물을 사용하여 분석을 하였다. 형질전환되지 않은 WM335 세포들과 대조군의 추출물은 흡수에서 실질적으로 동일한 변화를 일으켰다 ; 반면에 pIF1002를 포함하고 있는 WM335 세포는 흡수에 있어서 대조군보다 30배 더 큰 변화를 나타내었다. dat가 함유된 클론은 바실러스 스페리쿠스의 추출물보다 약 100배나 더 높은 활성도를 지니고 있으며, 이는 높은 복제수를 갖고 있는 플라스미드 pIF306의 과도한 발현에 의한 결과이다. 플라스미드 pIF1001은 대조군과 동일한 활성도를 지니고 있다.

실시예 2

플라스미드 pIF1003의 제조

플라스미드 pIF1003은 플라스미드 pLG338의 분배(Par) 부위를 운반하는 pIF1002의 유도체였다(스토커 등, Gene, 18:355-341(1982)). 플라스미드 pLG338의 분배 부위(스토커 등, Gene, 18:355-341(1982)) 참조. 분배 부위는 세포 분할이 되는 동안에 플라스미드가 분배 되는 것을 조절하고, 그러므로써 플라스미드 벡터에 분리 안정성을 증가시켜 준다. 이는 플라스미드 유지에 있어서 항생물질에 의한 선택의 필요성을 감소시키거나 제거하는데 유용하다. 분배 부위는 하기의 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 이용한 PCR을 사용하여 pLG338로부터 분리될 수 있다.

5' GCCATCTCCTTGCATGCACCATTC 3' (서열번호:6)

5' CCCTCGCAAGCTCGTCCGAGGCAAATCGCTGAATATTCC 3' (서열번호:7)

생성된 992bp 단편은 그 후에 제한 효소 SphI와 BspEI로 소화되었고(New England Biolabs, Beverly, MA), 생성된 965bp의 SphI에서 BspEI 사이의 단편은 QIAquick 겔 추출 키트(QIAGEN)를 사용하여 분리되고 나서, 1% 아가로스 TBA 겔상에서 전기영동 되었다. 이 단편은 pIF1002의 BspEI 분리와 부분적인 SphI의 분리에 의해서 생성된 5.8kb DNA단편에 결합되어 pIF1003을 생성하였다. 도 4는 pIF1003의 구조를 나타내는 개략적인 도면이다.

실시에 3

플라스미드 pIF321의 제조

숙주세포에서 D-페닐알라닌을 제조할 수 있는 벡터를 만들기 위하여, PCR을 사용하여 pIF1002로부터 dat 유전자를 분리하였다. dat-암호화 영역은, pIF1002 DNA(1 μ l); 10nanomoles/ml 농도의 하기 프라이머들 각각 5 μ l ;

MB1809 5' CGCAGATCTACTATGGCATACTCATTATGG 3' (서열번호:8) ; 그리고

MB1810 5' CATGCCATGGATCCTCCTTTTAGGTAGCTCTTTTAATC 3' (서열번호:9)

dATP, dCTP, dTTP 및 dGTP(각각 10mM) 각각 2 μ l ; 15mM MgCl₂, 500mM KCl₂, 100mM 트리스(pH8.3) 및 0.01% 젤라틴으로 이루어져 있는 완충용액 10 μ l ; 태그 DNA 폴리머라제(5 μ l에서 0.5 μ l, Amplitaq™) ; 그리고 전체 부피가 100 μ l가 되도록 증류수가 첨가된 0.2ml MicroAmp™ 반응 튜브(펄킨-엘머, Norwalk, CT)에서 Amplitaq™ PR 키트(펄킨-엘머, Norwalk, CT)를 사용하여 증폭되었다.

상기 튜브에 뚜껑을 씌우고 펄킨 엘머 9600 서말 사이클러에 넣었다. 3분동안 94℃로 예비-가열하고, 이어서 94℃에서 30초 동안의 변성을 25회 일으키고, 50℃에서 30초 동안 어닐링하고, 72℃에서 90초 동안 확장하므로써 증폭이 수행되었다. 반응 혼합물을 4℃에 저장하였다.

생성된 약 914bp PCR 생성물은 BglII와 NcoI로 소화되었고, 생성물은 그 후에 결찰 키트(타카라 바이오 케미칼)를 사용하여 제조자의 지시에 따라 pIF306의 4.5kb BamHI과 NcoI 사이의 단편에 결찰되었다. 생성된 플라스미드는 pIF318로 지정되었다. pIF318의 구조는 도 5에 나타나 있다.

pIF319 플라스미드는 여기에 참고문헌으로 통합된 미국특허 제5,354,672호에 개시되어 있는 pLG338 플라스미드를 기초로 하였고, 이는 카나마이신 내성 유전자를 운반하는 중요한 숙주 균주인, 대장균 HW857과의 혼동을 피하기 위하여 카나마이신 내성 마커 대신에 클로람페니콜 내성 마커로 치환되어 있다. 플라스미드 pIF319는 여기에 참고문헌으로 통합된 미국특허 제5,120,837호에 개시된 것처럼 pheA34 유전자와 pLG338내의 독특한 EcoRI와 SalI 사이의 합성 오페론에 있는 aroH유전자를 포함한다. pheA34 대립형질 유전자는 효소의 페닐알라닌-중재 피드백 억제를 실질적으로 감소시키는 pheA 암호화 서열에서의 변형을 포함하고 있다. 이는 또한 감쇠 서열이 결핍되어 있고 연관된 유전자의 발현을 증가시키는 pheA 프로모터 영역의 비조절 변형을 포함하고 있다. pheA34와 aroH의 존재는 대장균 W3110과 대장균 K12 균주에서 페닐피루베이트에 대한 경로를 효과적으로 조절하지 못하게 한다. 플라스미드 pIF319는 또한 미국특허 제 5,120,837호에 개시된 pJN307에 있는 독특한 BamHI와 SalI 부위 사이에 대장균 aroH를 도입하고 나서 BamHI 부위에 대장균 aspC 프로모터를 도입하므로써 pJN307로부터 유도될 수 있다. aroH 유전자는 프라이머

5' CGCGGATCCTCGTCATGAACAGAACTGACGAAGTCCG 3' (서열번호:10)과

5' ACGCGTCGACTCAGAAGCGGGTATCTACCGCAGAGG 3' (서열번호:11)을 사용한 PCR에 의하여 대장균 W3110으로부터 분리되었다. 생성된 PCR 단편은 BamHI와 SalI로 절단되었으며, pJN307의 유사한 절단에 의해서 생성된 8kb 단편에 결합되었다. 그런 다음 생성된 중간체 플라스미드의 독특한 BamHI 부위에 aspC 프로모터 영역이 삽입되었다. aspC 프로모터 영역은 프라이머

5' GGAAGATCTTACATCATCAACCAGATCGATTCTG 3' (서열번호:12)와

5' CGCGGATCCATTATGTTACAGAAGGGAAGTCC 3' (서열번호:13)을 사용한 PCR에 의하여 대장균 W3110으로부터 분리되었다. 생성된 약 278bp 단편은 BglII와 BamHI로 절단되었고 독특한 BamHI 부위에서 절단된 벡터에 결합되었다. 결합에 의해, BglII로는 절단될 수 없고 BamHI로만 절단될 수 있는 DNA 서열이 생성되고, aspC 프로모터의 오리엔테이션을 증명하기 위한 간단한 방법을 제공한다. 생성된 구조체는 pJN326이다. pJN326의 구조는 도 6에 나타나 있다. 플라스미드 pJN319는 pJN326으로부터 대부분의 (520bp) 카나마이신 내성 유전자의 HindIII과 XhoI의 절단에 의한 결실과 pHSG415의 클로람페니콜 내성 유전자를 암호화하는 DNA 단편의 삽입에 의하여 생성되었다. pHSG415의 클로람페니콜 내성 유전자는 프라이머 5' CGGCTCGAGCCGACGCACTTTGCGCGCA 3' (서열번호:14) 및

5' CCCAAGCTTATCAGGCTCTGGGAGGCAG 3' (서열번호:15)를 사용한 PCR에 의해서 분리되었다. 생성된 대략 1191bp 단편은 HindIII과 XhoI로 절단되었고, pJN326의 유사한 절단에 의해서 생성된 8.87kb 단편에 결합

되었다. 생성된 플라스미드는 pIF319 이다. pJN319의 구조는 도 7에 나타나 있다.

pIF318 플라스미드는 pIF320 플라스미드를 만들기 위한 dadX 유전자의 삽입을 위하여 BamH I와 Sph I로 절단되었다. 상기 언급된 MB1810 프라이머는 프라이머내에 Nco I 부위와 겹쳐지는 BamH I 부위(GGATCC)를 포함한다. BamH I 부위(그리고 하류의 Sph I 부위)가 dat와 dadX를 포함하는 합성 오페론을 형성하기 위하여 dadX의 도입을 위해 사용되었다. dadX 유전자 서열은 Genbank 데이터베이스, 참고 코드 ECODADAX로부터 얻어졌다. 그 서열로부터, PCR 프라이머들, MB 1811, 5' CGCGGATCCACTATGACCCGTCCGATACAGGCC 3' (서열번호:16) 및

MB1816, 5' TGCCATGCATGCCTACAGTTGCTGACCAGCCGG 3'(서열번호:17)이 디자인되었고, 대장균 균주 W3110(ATCC 기탁번호 27325)으로부터 dadX 유전자를 분리하기 위하여 사용되었다. 증폭 조건은 정확히 상기 기술한 바와 같다. 상기 유전자는 유전자의 원래의 프로모터가 없이 분리되었으며, 즉시 dat 유전자 삽입체의 하류에 연결되었다. 증폭결과인 대략 1171bp 단편은 BamH I와 Sph I로 절단되었으며, 대략 4.8kb 단편을 형성하기 위하여 유사하게 소화된 pIF318에 결찰되었다. 생성된 플라스미드는 pIF320으로 지정되었고, 합성 오페론내에 dat와 dadX 유전자를 운반한다. pIF320의 구조는 도 8에 나타나 있다.

pIF321로 지정된 부가적인 플라스미드가 이어서 만들어졌다. 플라스미드 pIF321은 HindIII과 Sph I로 pIF320을 절단하고 dat와 dadX 유전자를 운반하는 2.1kb 단편을 분리함으로써 생성되었으며, 생성된 후에 pIF319의 유사한 절단에 의해서 제조된 9.2kb 단편에 결찰되었다. pIF321의 구조는 도 9에 나타나 있다. pIF321 플라스미드는 HindIII에서 Sph I까지의 단편(HindIII-프로모터-dat-dadX

-Sph I)상에서 분리된 pIF320의 dat와 dadX 유전자를 포함하고 있으며, 이는 대장균의 트립토판-의존 DAHP 합성효소를 암호화하는 aroH 유전자와 함께 상기-기술된 pheA34 대립형질 유전자를 포함하고 있다.

실시예 4

플라스미드 pIF333의 제조

플라스미드 pIF333을 생성하기 위하여, 우선 플라스미드 pIF321이 6.9kB와 4.5kB의 단편을 생성하기 위하여 효소 Sph I와 Sal I를 사용하여 절단되었다. 6.9kB 단편은 QIAquick 겔 추출물 키트(QIAGEN)를 사용하여 분리될 수 있었으며, 이어서 1% 아가로스 TBE 겔상에서 전기영동되었다. 이 단편은 pBR322(New England Biolabs, Beverly, MA)의 Sph I와 Sal I 절단으로부터 생성된 89bp 단편에 결찰되었고, 유사하게 2% 아가로스 TBA 겔로부터 분리되었다. 생성된 플라스미드는 pIF333이다. pIF333의 구조는 도 10에 나타나 있다.

실시예 5

pALR18의 제조

알라닌 라세마제를 암호화하는 alr 유전자는 ATCC로부터 얻은 ATCC 기탁번호

19585를 갖는 살모넬라 티피유리움 균주로부터 분리되었다. alr 유전자는 올리고뉴클레오타이드 프라이머들:

5' CGCGGATCCACTATGCAAGCGGCAACAGTCGTC 3'(서열번호:18)과

5' GGAGCATGCTTATTCAATATACTTCATGCCAC 3'(서열번호:19)을 사용한 PCR에 의하여 분리되었다.

1098bp PCR 생성체는 BamH I에서 Sph I까지의 1082bp 단편을 생성하기 위해 BamH I와 Sph I로 절단되었고, QIAquick 겔 추출물 키트(QIAGEN)를 사용하여 분리되었으며, 이어서 1% 아가로스 TBE 겔상에서 전기영동되었다. 이 단편은 그후에 pALR18을 생성하기 위하여 pIF333의 5.7kB 단편에 결찰되었다. pALR18의 구조는 도 11에 나타나 있다.

실시예 6

L-아미노디아미나제 유전자의 분리와 pPT363 플라스미드의 제조

L-아미노디아미나제 유전자(lad)는 ATCC 기탁번호 19692인 프로테우스 믹소파시엔스 균주의 염색체로부터 하기의 올리고뉴클레오타이드와 2분의 연장시간을 사용한 표준 조건하에서 수행된 PCR 반응을 사용하여 분리되었다.

MB 2198 :

5' TTGACGCGATGCAAGGAGGATCAACTATGAACATTTCAAGGAGAAAAG 3'(서열번호:20)

MB 2201 :

5' AGCTTTGTCGACGGGGCCCTTACTTAAAACGATCCAAAC 3'(서열번호:21)

단편은 효소 Sph I과 Sal I에 의하여 절단되었으며, 유사한 절단을 하여 생성된 pALR18의 6.84kb 단편에 결찰되었다. 생성된 플라스미드는 pPT362로 명명되었다. pPT362의 구조는 도 12에 나타나 있다.

플라스미드 pPT363은 pPT362와 플라스미드 pIF321로부터 생성되었다. 두 개의 플라스미드 pPT362와 pIF321은 Xho I과 Apa I로 절단되었다. pPT362의 4.67kB 단편과 pIF321의 7.49kB 단편이 분리되고 결찰되어 pPT363을 생성하였다. pPT363의 구조는 도 13에 나타나 있다.

실시예 7

균주 IF3의 제조

대장균 균주 pIF3은 RY347(ATCC 기탁번호 69766)로부터 유도되었다. RY347은 여기에 참고문헌으로 통합된 밀러 등의 A Short Course in Bacterial Genetics에 기술된 표준 P1 형질도입 방법론을 사용하여

tyrB+로 형질도입되었다. tyrB+의 형질도입체는 티로신 보조영양요구성의 상실을 기준으로 선택되었으며, 유사하게 상기 균주는 이소류신 보조영양요구성의 상실을 기준으로 선택되는 ilvE+에 형질도입되었다. 생성된 분리체는 pIF3으로 지정되었다.

실시예 8

외부의 아미노 공여체의 부가 없이 D-페닐알라닌의 제조를 위한 발효 공정

균주 IF3은 플라스미드 pPT363과 pIF1003으로 형질전환되었다. 형질전환된 IF3 균주를 다음의 성장배지 1L를 포함하는 2800mℓ 펜배취 플라스크(Fernbach flask)에서 배양하였다.

포타슘 포스페이트(이염기성)	13g
포타슘 포스페이트(일염기성)	2g
암모늄 포스페이트	4g
제 2철 암모늄 시트레이트	0.24g
효모 추출물	2g
마그네슘 설페이트(7•H ₂ O)	1g
물	930mℓs

균주는 800~900 클렛 유닛(Klett Units)까지 성장하였고 발효기에서의 배양을 위하여 사용되었다. 발효기는 Biolaffite 78-100(St Germain-en Laye, France) 20L이었다. 다음은 발효기가 작동된 조건들이다.

교반	500rpm
온도	32℃
역압력	0.7Bar
pH	50% KOH, 7.2
탄산가스 포화처리	1vvm
설정 부피	10L
배양	1L
공정 시간	67시간

사용된 발효 배지는 하기 표에 나열되어 있다.

마그네슘 설페이트(7•H ₂ O)	5.35g/l
제 2철 암모늄 시트레이트	0.3g/l
포타슘 포스페이트(이염기성)	4.6g/l
망가네즈 설페이트	0.023g/l
안티포움(Mazur Mazu) DF204	0.4mℓ
(NH ₄) ₂ HPO ₄	21g/l
효모 추출물	5g/l
L-알라닌	1g/l

발효공정 동안에 글루코스는 처음 12시간 동안은 10~15g/l의 농도를 만들기 위하여, 나머지 시간 동안은 1g/l 이하의 농도를 만들기 위하여 다양한 속도로 48시간동안 1204g이 공급되었다. 발효결과 D-페닐알라닌 1.12g/l와 L-페닐알라닌 0.47g/l가 생성되었다.

실시예 9

아미노 공여체로서 D-, L-알라닌이 공급된 D-페닐알라닌의 제조를 위한 발효공정

실시예 9의 발효공정은 다음의 측면을 제외하고는 실시예 8의 발효공정과 동일했다. 전체 글루코스는 48시간 이상 동안 1976g 공급되었다. 효모 추출물은 2g/l의 양으로 사용되었다. 발효 배지는 발효의 개시로부터 12시간 경과후부터 1.9mℓ/min의 속도로 공급된 167g/l의 D-, L-알라닌 1400mℓs에 의하여 공급된 D-, L-알라닌을 포함하고 있다. 발효결과 D-페닐알라닌 4.15g/l와 L-페닐알라닌 0g/l가 생성되었다.

실시예 10

아미노 공여체로서 D-, L-알라닌과 케토산 전구체로서의 L-페닐알라닌이 첨가된 D-페닐알라닌의 제조를 위한 발효공정

실시예 10의 발효공정은 다음의 측면을 제외하고는 실시예 8의 발효공정과 동일하였다. 발효에 사용된 성장 배지는 하기 표에 나열되어 있다:

마그네슘 설페이트(7•H ₂ O)	8.03g/l
제 2철 암모늄 시트레이트	0.195g/l
포타슘 포스페이트(이염기성)	6.9g/l

망가네즈 설페이트	0.0345g/l
안티포움(Mazur Mazu)DF204	0.6ml
(NH ₄) ₂ HPO ₄	31.5g/l
효모 추출물	7.5g/l
L-알라닌	1.5g/l

공급된 글루코스의 양은 52시간에 걸쳐 2021g이었다. 발효 배지는 발효의 개시로부터 12시간 경과후부터 1.9ml/min의 속도로 공급된 167g/l의 D-, L-알라닌 1400mls에 의하여 공급된 D-, L-알라닌을 포함하고 있다. 추가로 L-페닐알라닌은 D-, L-알라닌과 같은 농도와 속도로 공급되었다. 발효결과 D-페닐알라닌 13.66g/l와 L-페닐알라닌 0.87g/l가 생성되었다.

실시에 11

플라스미드 pPT361의 제조

플라스미드 pPT361은 다음과 같이 pIF306으로부터 유도되었다. pIF306은 효소 BamHI와 SphI로 절단되었다. 3.9kb 단편이 분리되었고, 유사하게 절단된 대장균 K12 ilvE 유전자를 포함하는 단편에 결합되었으며, 다음의 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용한 PCR에 의해서 W3110 염색체로부터 생성되었다.

5' CGC GGA TCC ACT ATG ACC ACG AAG AAA GCT GAT TAC ATT TGG 3' (서열번호:22)

5' CAG CGT GCA TGC TTA TTG ATT AAC TTG ATC TAA CCA GC 3' (서열번호:23)

생성된 벡터는 pIF307로 명명되었다. 플라스미드 pIF307은 효소 EcoRI와 PstI로 절단되었으며, 4.1kb 단편이 분리되었다. 이는 유사하게 절단되고 정제된, pLG338로부터의 카나마이신 내성 유전자를 포함하고 있는 982bp DNA 단편에 결합되었다. 이는 다음의 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 이용한 PCR을 사용하여 분리되었다.

5' CCG GAA TTC ACG TTG TGT CTC AAA ATC TCT GAT 3' (서열번호:24)

5' CCG CTG CAG GCC GTC CCG TCA AGT CAG CGT AAT G 3' (서열번호:25)

절단되어 생성된 플라스미드는 pIF312라 명명되었다. 플라스미드 pIF312는 EcoRI와 BamHI에 의해서 절단되었으며, 유사하게 절단된 파아지 람다 C1857 유전자에 결합되었으며, 이어서 하기의 올리고뉴클레오타이드 프라이머와 주형으로서 람다 ZapII 벡터(Stragene, La Jolla, CA)를 사용한 PCR에 의해 분리되었다.

5' TTTGGATCCTCCTTAGTACATGCAACC 3' (서열번호:26)

5' TTTGAATTCGGATGAAGATTCTTGCTCGATTGT 3' (서열번호:27)

생성된 플라스미드는 pPT353이라 명명되었다. 이 플라스미드는 PstI과 EagI로 절단되었고, 3.17kb 단편이 분리되었다. 이는 pIF1003의 유사한 절단에 의해서 생성된 2.5kb 단편에 결합되었다. 생성된 벡터는 분리된 4.7kb 단편이라 명명되었다. 이는 하기의 올리고뉴클레오타이드 링커에 결합되었다.

5'

GATCCTAGGTACCGGTGCGGCCGATGCTGACTGACTGAAGATCCCGGGCGATTCTACGCCGGGTTTTTTATG

3' (서열번호:28)

5'

TCGACATAAAAAACCCGGCGTAGAATCGCCGGGATCTTCAGTCAGTCAGCATGCGGCCGCACCGGTACCTAG

3' (서열번호:29)

생성된 플라스미드는 pPOT2라 명명되었다. 이 플라스미드는 XhoI과 PstI로 절단되었고 3.9kb 단편이 분리되었다. 이는 클로람페니콜 내성 유전자를 포함하는 단편에 결합되었고, 하기의 올리고뉴클레오타이드 프라이머와 주형으로서 pIF319 플라스미드 DNA를 사용한 PCR에 의해서 분리되었다.

5' GAC CTC GAG GCA CTT TGC GCC GAA TAA ATA CCT GTG 3' (서열번호:30)

5' GAC CTG CAG CAC CAG GCG TTT AAG GGC ACC AAT AAC 3' (서열번호:31)

생성된 플라스미드는 pPOT3으로 명명되었다. 이는 BamHI과 SphI로 절단되었다. 4.8kb 단편이 분리되었고 프로테우스 막소파시엔스 레드 유전자를 포함하는 유사하게 분리된 단편에 결합되었다. 이는 하기의 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용한 PCR에 의하여 ATCC 19692의 염색체로부터 분리되었다.

5' TTTGGATCCAAGATGAACATTTCAAGGAGAAAG 3' (서열번호:32)

5' AGCTTTGTGCGACGCATGCTTACTTCTTAAACGATCCAAAC 3' (서열번호:33)

실시에 12

Lad 아미노산 기질의 결정

표 1에 기술되어 있는 각각의 아미노산 기질들은 다음의 박막 크로마토 그래피(TLC) Lad 분석을 사용하여 Lad 효소에 대한 적당한 기질로 결정되었다. 사용된 모든 화학물질들은 시그마 화학회사, St, Louis, MO로부터 얻었다.

분석 혼합물은 표 1에 기술되어 있는 아미노산 기질중의 하나를 10mg/ml 그리고 pH7.5의 100mM 트리스 HCl을 포함하고 있다. 분석 혼합물(2ml)은 Lad유전자를 포함하는 플라스미드 pPT361을 포함하는 균주 W3110으로부터의 100mg의 세포 펠렛에 첨가되었다.

세포들은 1L 교반 플라스크에서 37°C에서 밤새도록 배양된 LB 배지(Difco, Detroit, Michigan) 200ml의 배양물로부터 제조되었다. 세포들을 pH7.5의 100mM HCl로 1회 세척하였고 원심분리에 의해서 펠렛화 하였다. 반응은 16시간 동안 37°C에서 수행되었다. 반응 혼합물 0.005ml를 실리카 TLC 플레이트 #60 F-254(EM Science Cincinnati OH)에 두었다.

크로마토그래피 분석법은 다음의 용매를 사용하여 행해졌다 : 물(40%) ; 메탄올(40%) ; 및 아세토니트릴 (20%). TCL 플레이트는 공기 건조하고 에탄올중의 2% 닐하이드린으로 분무하였으며 그후에 10분동안 베이킹 하였다.

표 1에 기술된 아미노산 각각의 그들의 상응하는 케토산으로의 전환은 함께 크로마토그래피 분석된 공지된 대조군에 대한 스폿으로부터 유도된 아미노산의 부재에 의해서 결정되었다. 표 1에 기술된 각각의 아미노산 기질들은 Lad 효소에 대한 적당한 기질인 것으로 밝혀졌다.

실시에 13

Dat 케토산 기질의 결정

Dat 효소는 하기의 조건하에서의 효소 분석법으로 표 1에 기술된 각각의 케토산 기질에 대해 분석되었다. 사용된 모든 화학물질들은 시그마 화학회사, St. Louis, MO로부터 얻었다.

분석 혼합물은 500 μ /ml Dat ; 30mM D-알라닌 ; 30mM 케토산 기질 ; 0.2mM NADH ; 및 100mM 트리스 HCl을 포함하고 있다. 분석 혼합물의 pH는 8.3이었다. 분석은 0.85ml의 분석 혼합물, 0.05ml의 D-락타제 및 0.5~1.0의 0.D.₆₅₀를 갖는 플라스미드 pIF1003을 포함하는 W3110 세포(ATCC27325) 0.1ml를 포함하고 있는 용액 1ml를 사용하여 수행되었다.

세포들은 1L 교반 플라스크에서 37°C에서 밤새도록 배양된 200ml LB 배지(Difco, Detroit, Michigan)의 배양물로부터 제조되었다. 세포들을 pH7.5의 100mM 트리스 HCl로 1회 세척하였고 원심분리하고 나서 물에 방치하였다. 표 1에 있는 케토산 기질 각각의 반응은 37°C에서 ΔA_{340} 을 측정함으로써 조사되었다. 표 1에 있는 각각의 케토산 기질들의 분석에 의해, 이들이 Dat 효소에 대한 적당한 기질이라는 것을 발견하였다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

하기 단계들을 포함하는, 세포내에서의 D-아미노산의 제조방법:

- (a) 세포내로 D-아미노트랜스퍼라제 유전자와 L-아미노디아미나제 유전자를 도입하는 단계;
- (b) 상기 세포를 세포 배양배지내에서 배양하는 단계;
- (c) 상기 세포 배양배지로부터 D-아미노산을 분리하는 단계.

청구항 2

제1항에 있어서, D-아미노디아미나제 유전자가 비기능적이 되도록 상기 세포내에 D-아미노디아미나제 유전자 돌연변이를 도입하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 세포는 박테리아 세포인 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 박테리아 세포는 바실러스 서브틸리스, 바실러스 스페리쿠스, 바실러스 스테아로써 모필러스, 슈도모나스, 클렙시엘라, 살모넬라, 브레비박테리움, 마이크로코커스, 코리네박테리움 및 대장균으로 이루어진 그룹에서 선택되는 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 세포는 대장균인 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, dadA 유전자가 비기능적이 되도록 대장균내에 dadA 유전자 돌연변이를 도입하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, D-아미노트랜스퍼라제 유전자는 바실러스 스페리쿠스 D-아미노트랜스퍼라제 유전자인 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, L-아미노디아미나제 유전자는 프로테우스 믹소파시엔스 L-아미노디아미나제 또는 프로테우스 미라빌리스 L-아미노디아미나제 유전자인 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 세포내에 라세마제 유전자를 도입하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 라세마제 유전자는 알라닌 라세마제, 글루타메이트 라세마제, 아스파르테이트 라세마제 및 페닐알라닌 라세마제로 이루어진 그룹에서 선택되는 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 라세마제 유전자는 알라닌 라세마제인 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, D-아미노산은 천연 또는 인공의 D-아미노산인 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 천연 또는 인공의 D-아미노산은 이소류신, 류신, 트립토판, 티로신, 발린, 아르기닌, 아스파라긴, 글루타민, 메티오닌, 오르니틴, 세린, 노르류신, 노르발린, 페닐알라닌, 디하이드록시페닐알라닌, 시트룰린, 시스테인, 히스티딘 및 리신으로 이루어진 그룹에서 선택되는 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 천연의 D-아미노산은 페닐알라닌인 방법.

청구항 15

제1항에 있어서, 상기 배양배지는 아미노 공여체를 함유하는 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 아미노 공여체는 L-알라닌, L-글루타메이트, L-페닐알라닌, L-아스파르테이트 및 이들의 라세미 혼합물로 이루어진 그룹에서 선택되는 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 아미노 공여체 라세미 혼합물은 아스파르테이트인 방법.

청구항 18

제1항에 있어서, 상기 배양배지는 L-아미노산 기질을 포함하는 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 L-아미노산 기질은 이소류신, 류신, 트립토판, 티로신, 발린, 아르기닌, 아스파라긴, 글루타민, 메티오닌, 오르니틴, 세린, 노르류신, 노르발린, 페닐알라닌, 디하이드록시페닐알라닌, 시트룰린, 시스테인, 히스티딘 및 리신으로 이루어진 그룹에서 선택되는 방법.

청구항 20

제1항의 세포 배양물을 사용하여 실질적으로 순수한 D-아미노산을 제조하는 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 D-아미노산이 고수율로 제조되는 방법.

청구항 22

제1항에 있어서, 상기 D-아미노트랜스퍼라제 유전자와 L-아미노디아미나제 유전자는 플라스미드를 사용하여 세포내로 도입되는 방법.

청구항 23

하기 단계들을 포함하는, 세포내에서의 D-페닐알라닌의 제조방법:

- (a) D-아미노트랜스퍼라제 유전자, L-아미노디아미나제 유전자 및 페닐피루베이트의 생성을 증가시키는 수단을 세포내로 도입하는 단계;
- (b) 상기 세포를 세포 배양배지에서 배양하는 단계;
- (c) 상기 세포 배양배지로부터 D-페닐알라닌을 분리하는 단계.

청구항 24

제23항에 있어서, D-아미노디아미나제 유전자가 비기능적이 되도록 상기 세포내에 D-아미노디아미나제 유전자 돌연변이를 도입하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 25

제23항에 있어서, 상기 세포는 박테리아 세포인 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 박테리아 세포는 바실러스 서브틸리스, 바실러스 스파리쿠스, 바실러스 스테아로써모필러스, 슈도모나스, 클렙시엘라, 살모넬라, 브레비박테리움, 마이크로코커스, 코리네박테리움 및 대장균으로 이루어진 그룹에서 선택되는 방법.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 세포는 대장균인 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, dadA 유전자가 비기능적이 되도록 대장균내에 dadA 유전자 돌연변이를 도입하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 29

제23항에 있어서, D-아미노트랜스퍼라제 유전자는 바실러스 스파리쿠스 D-아미노트랜스퍼라제 유전자인 방법.

청구항 30

제23항에 있어서, L-아미노디아미나제 유전자는 프로테우스 믹소파시엔스 L-아미노디아미나제 또는 프로테우스 미라빌리스 L-아미노디아미나제 유전자인 방법.

청구항 31

제23항에 있어서, 세포내에 라세마제 유전자를 도입하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 32

제31항에 있어서, 상기 라세마제 유전자는 알라닌 라세마제, 글루타메이트 라세마제, 아스파르테이트 라세마제 및 페닐알라닌 라세마제로 이루어진 그룹에서 선택되는 방법.

청구항 33

제32항에 있어서, 상기 라세마제 유전자는 알라닌 라세마제인 방법.

청구항 34

제23항에 있어서, 상기 배양배지는 아미노 공여체를 포함하는 방법.

청구항 35

제34항에 있어서, 상기 아미노 공여체는 L-알라닌, L-글루타메이트, L-페닐알라닌, L-아스파르테이트 및 이들의 라세미 혼합물로 이루어진 그룹에서 선택되는 방법.

청구항 36

제35항에 있어서, 상기 라세미 혼합물은 아스파르테이트인 방법.

청구항 37

제23항에 있어서, 상기 배양배지는 기질로서 L-페닐알라닌을 포함하는 방법.

청구항 38

제23항에 있어서, 페닐피루베이트의 생성을 증가시키는 수단은 aroH 유전자를 세포내로 도입하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 39

제23항에 있어서, 페닐피루베이트의 생성을 증가시키는 수단은 pheA 유전자를 세포내로 도입하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 40

제23항의 배양물을 사용하여 실질적으로 순수한 D-페닐알라닌을 제조하는 방법.

청구항 41

제40항에 있어서, 상기 D-페닐알라닌이 고수율로 제조되는 방법.

청구항 42

제41항에 있어서, 상기 D-아미노트랜스퍼라제 유전자와 L-아미노디아미나제 유전자는 플라스미드를 사용하여 세포내로 도입되는 방법.

청구항 43

외생의 D-아미노트랜스퍼라제 유전자와 외생의 L-아미노디아미나제 유전자를 포함하는 재조합 세포.

청구항 44

제43항에 있어서, D-아미노디아미나제 유전자가 비기능적이 되도록 D-아미노디아미나제 유전자 돌연변이를 세포내에 포함하는 재조합 세포.

청구항 45

제43항에 있어서, 상기 외생의 D-아미노트랜스퍼라제 유전자는 바실러스 스페리쿠스 D-아미노트랜스퍼라제 유전자인 재조합 세포.

청구항 46

제43항에 있어서, 상기 외생의 L-아미노디아미나제 유전자는 프로테우스 믹소파시엔스 L-아미노디아미나제 유전자 또는 프로테우스 미라빌리스 L-아미노디아미나제 유전자인 재조합 세포.

청구항 47

제43항에 있어서, 외생의 라세마제 유전자를 더 포함하는 재조합 세포.

청구항 48

제47항에 있어서, 상기 외생의 라세마제 유전자는 살모넬라 티피무리움 유전자인 재조합 세포.

청구항 49

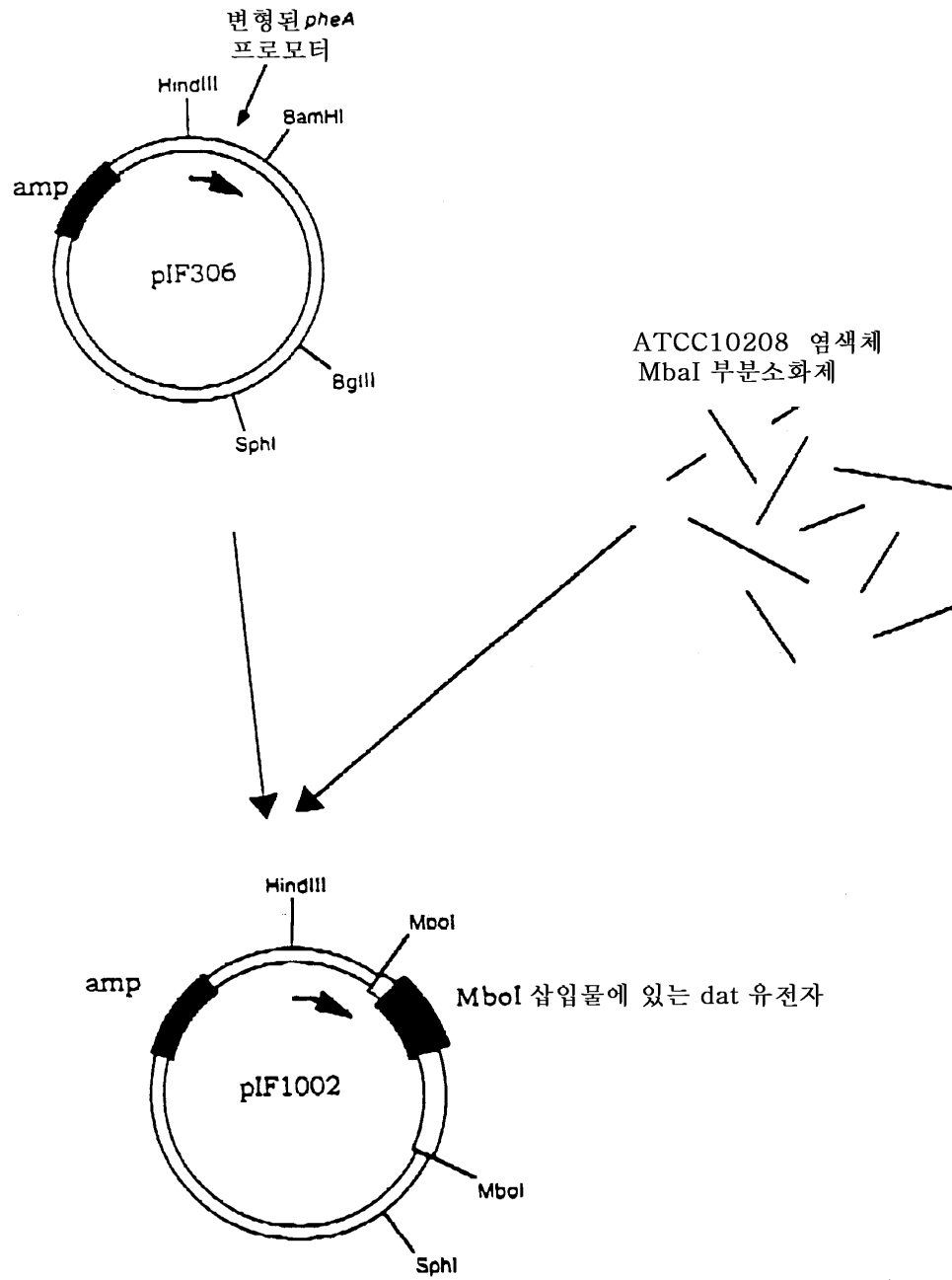
제48항에 있어서, 상기 살모넬라 티피무리움 유전자는 알라닌 라세마제인 재조합 세포.

청구항 50

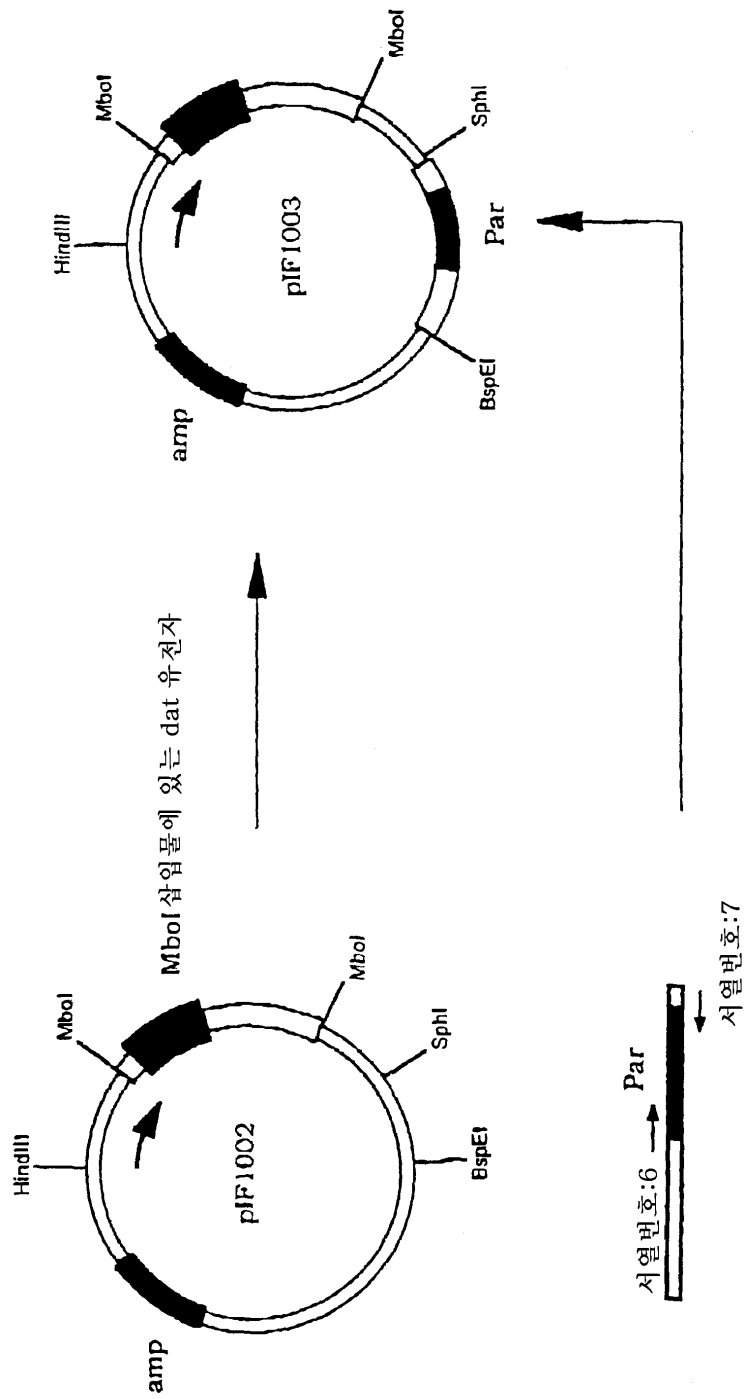
제43항에 있어서, 외생의 *aroH* 유전자 및 외생의 *pheA* 유전자를 더 포함하는 재조합 세포.

도면

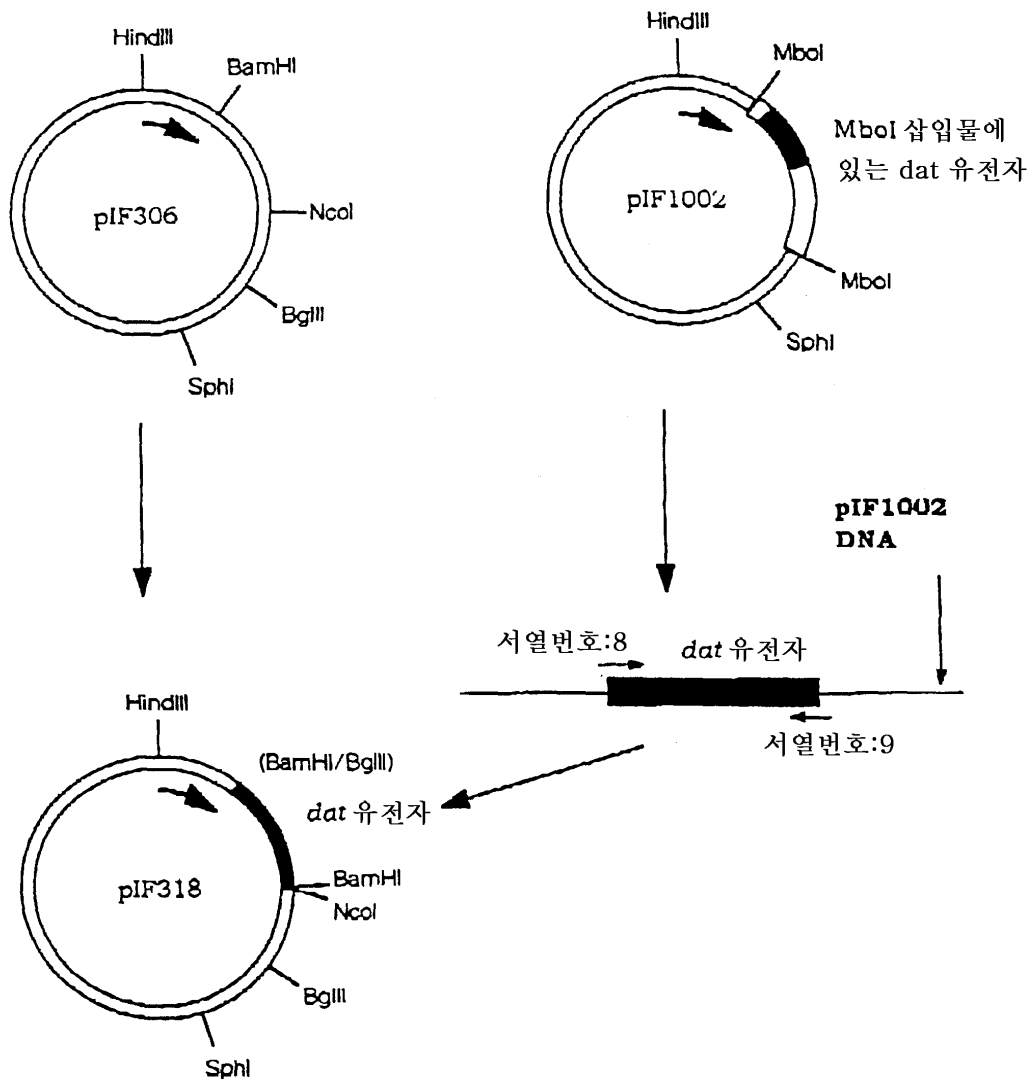
도면3



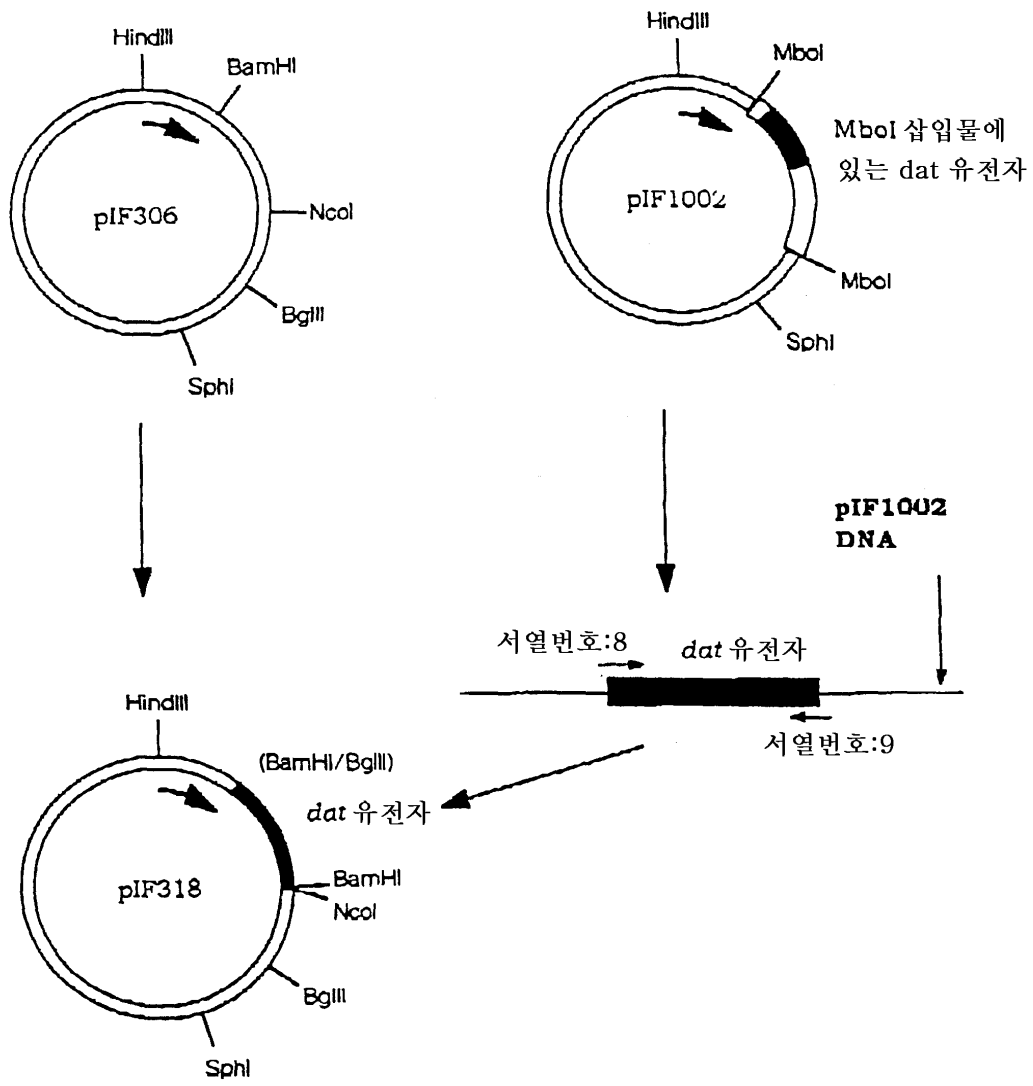
도면4



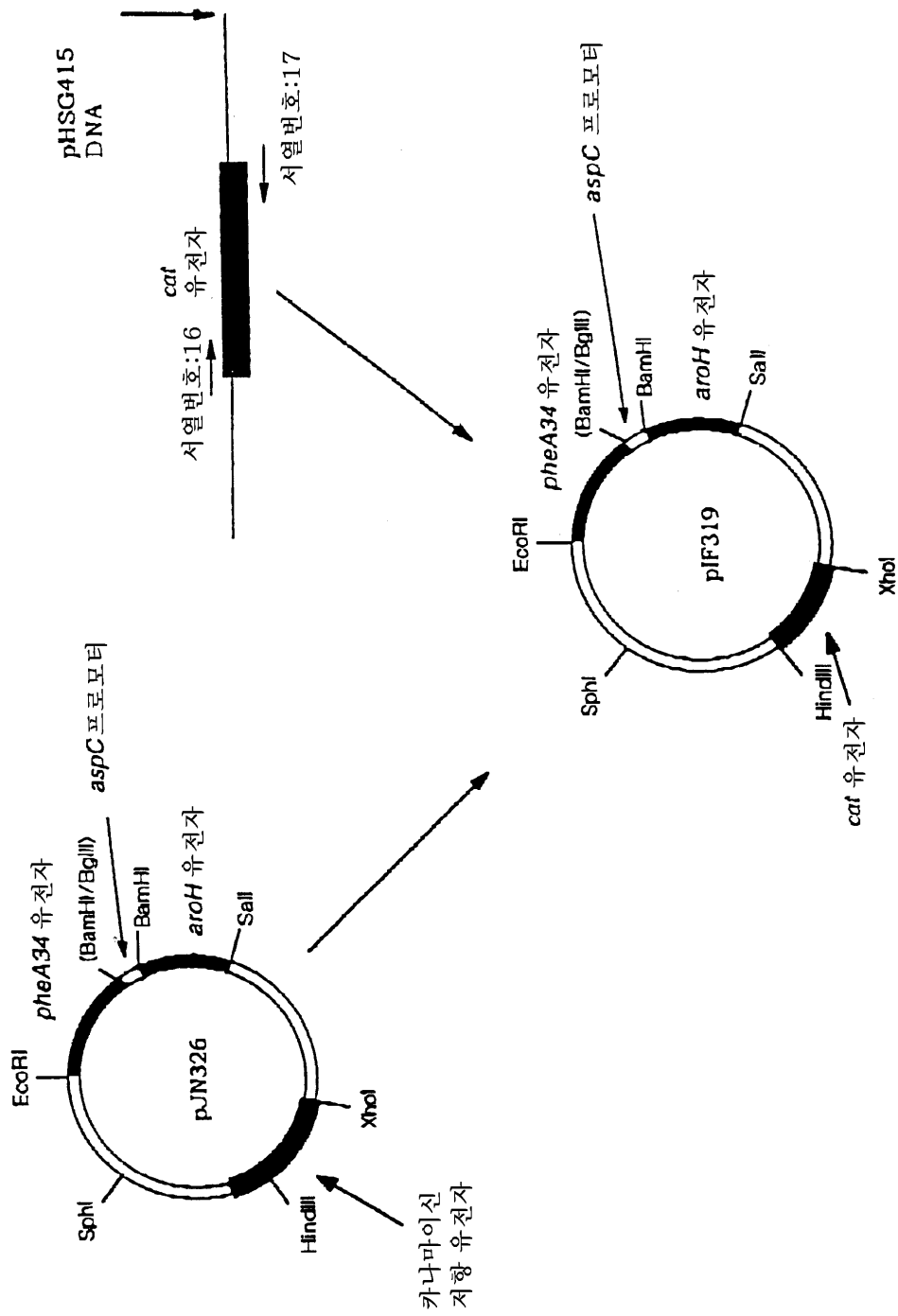
도면5

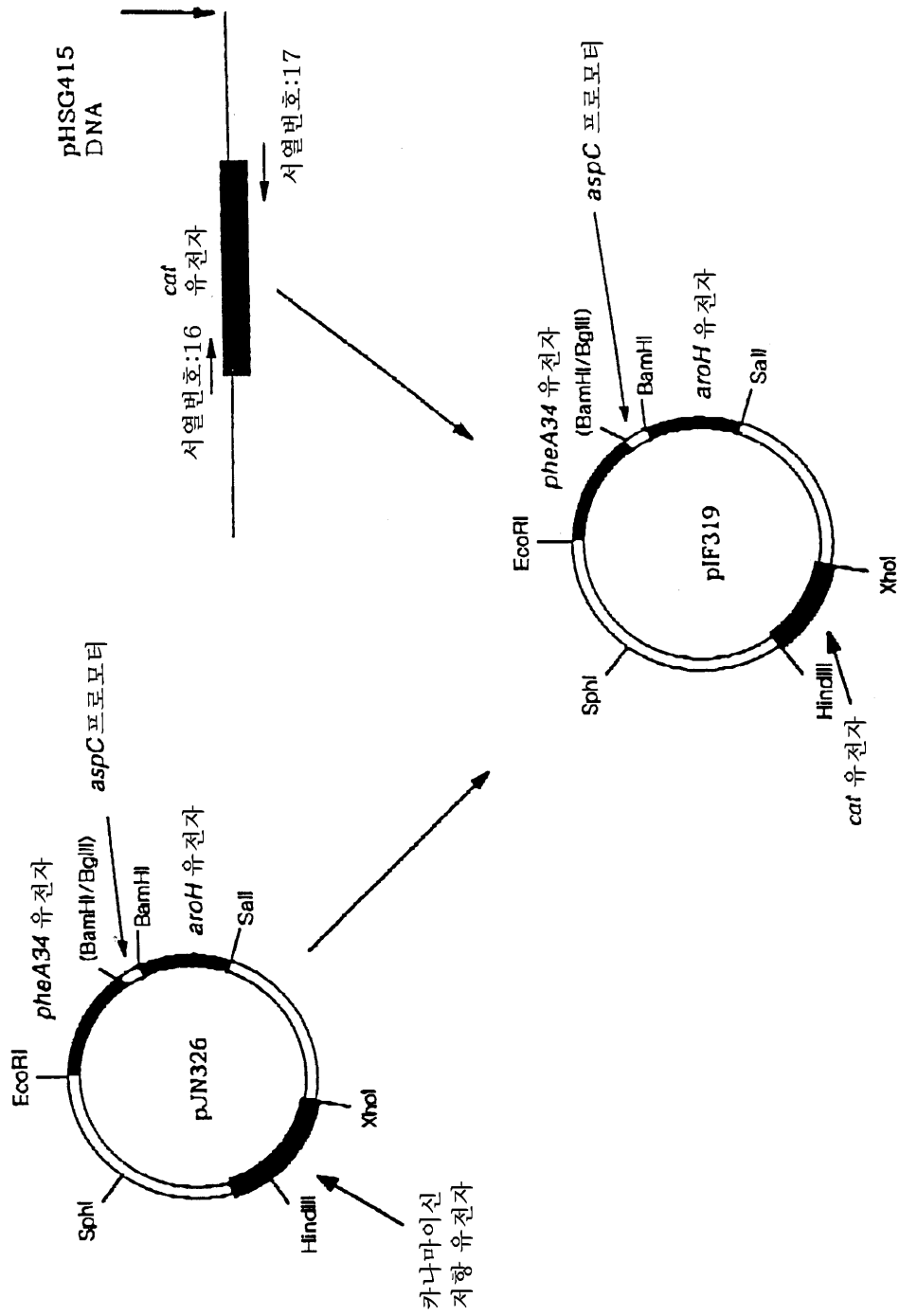


도면6

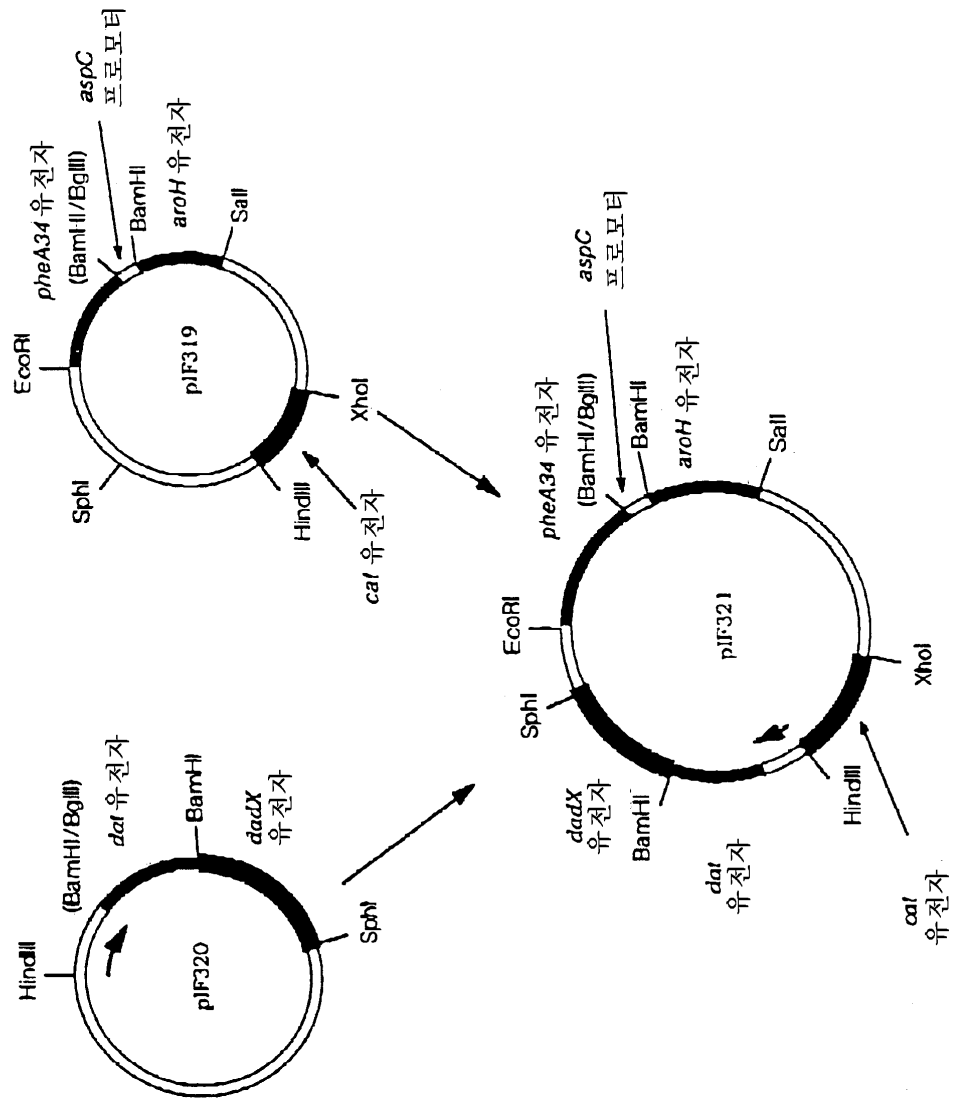


도면7

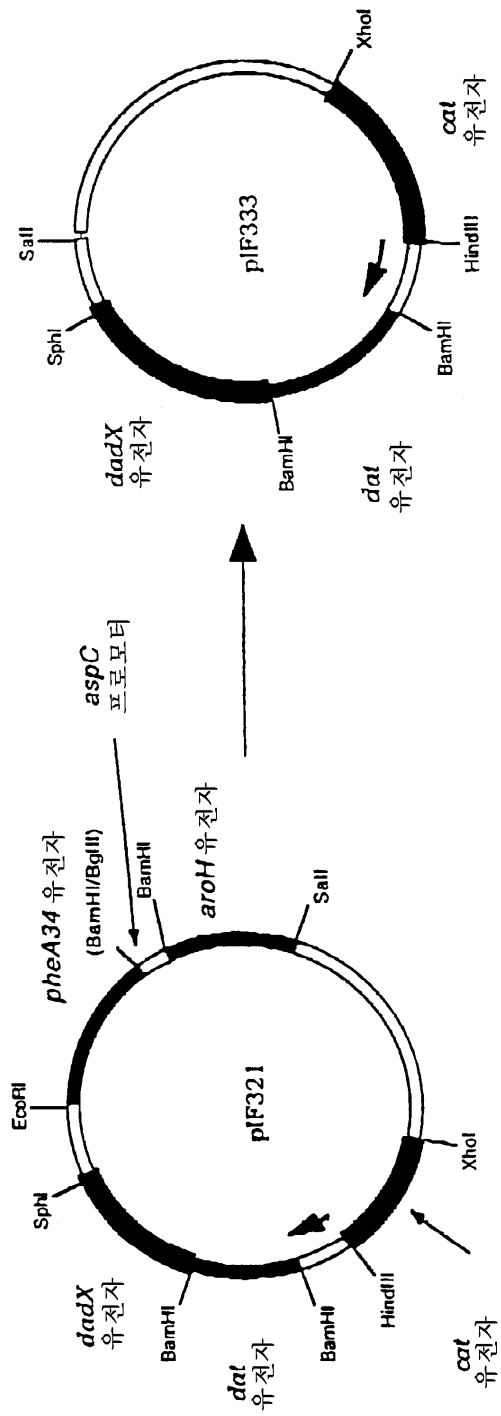


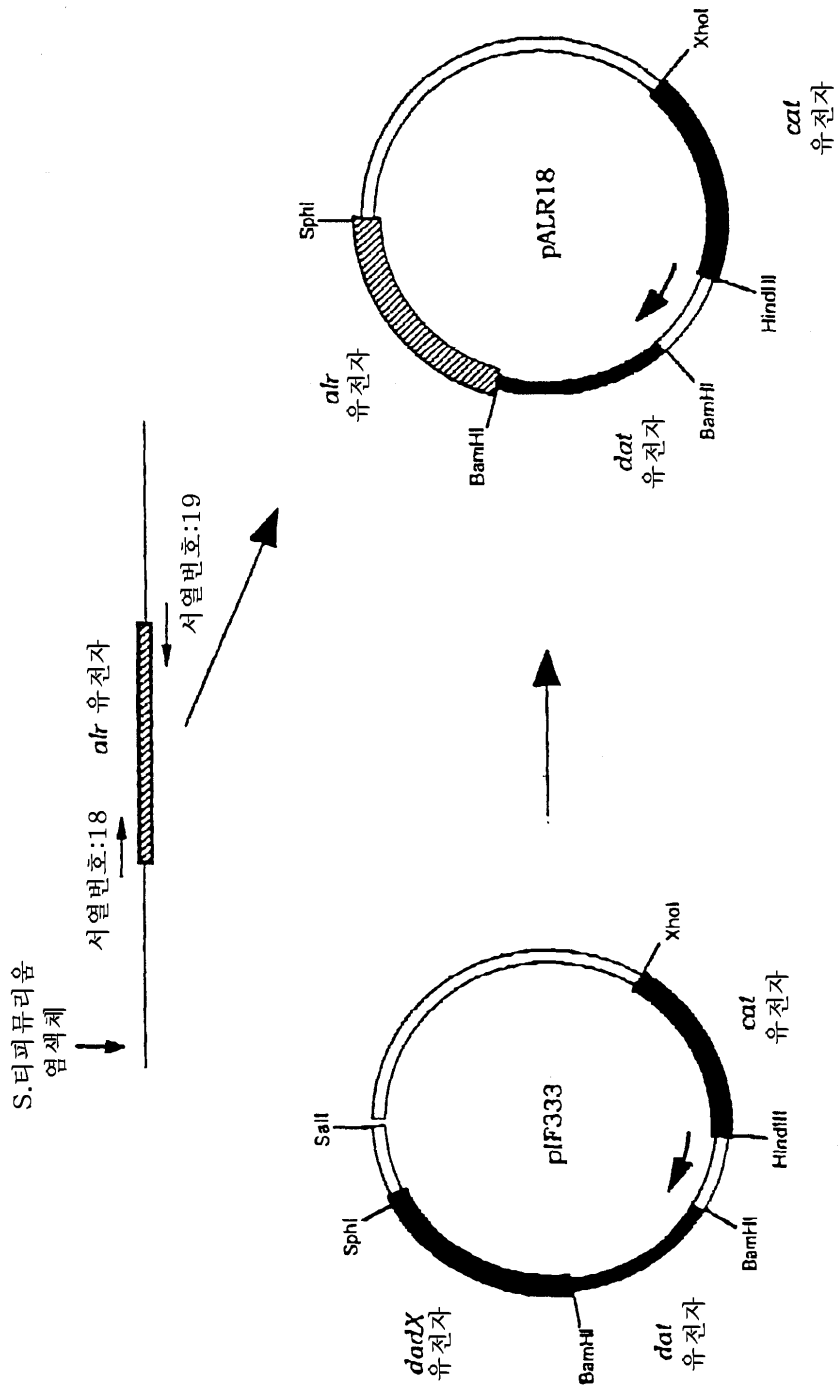


도면9

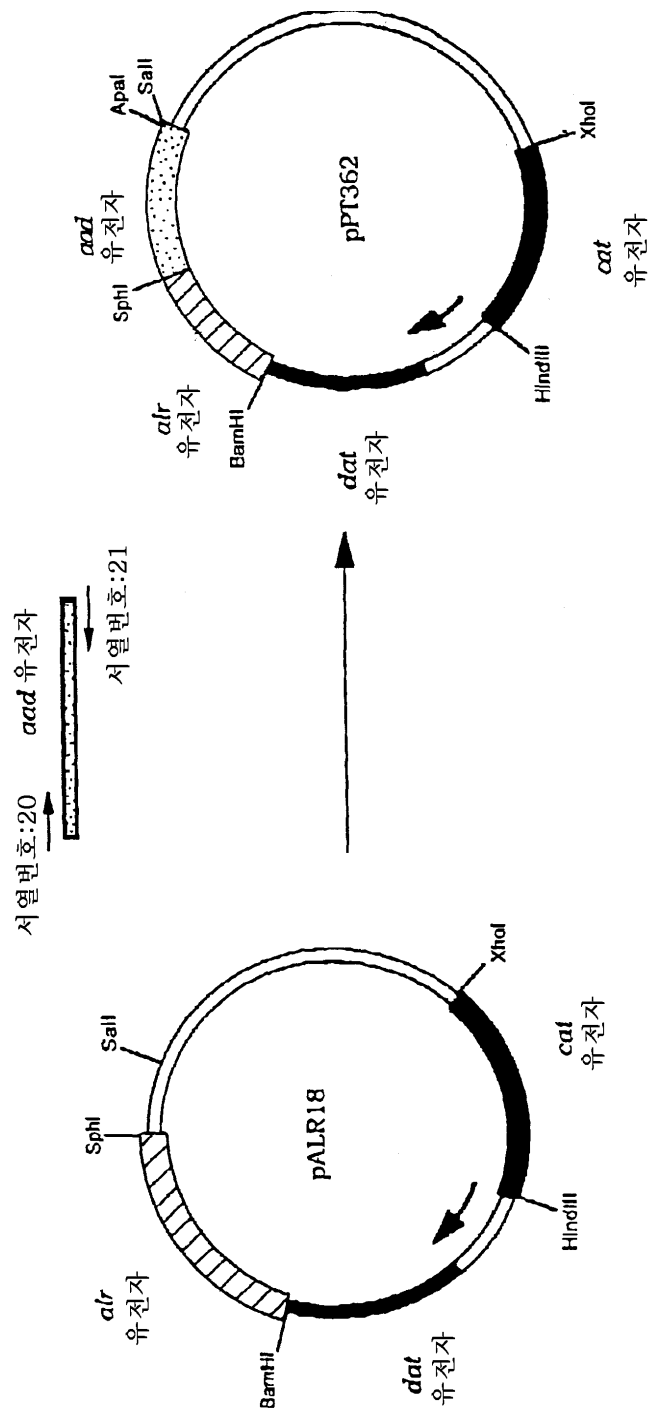


도면 10





도면 12



도면 13

