(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0052519
(43) 공개일자 2025년04월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/77 (2006.01) *C07K 14/395* (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01) *C12P 13/24* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/77 (2013.01)
C07K 14/395 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0135003
(22) 출원일자 2023년10월11일
심사청구일자 2023년10월11일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
한성옥
서울특별시 성북구 고려대로17가길 64, 103동 1003호 (안암동1가, 래미안 안암)
김민혜
경기도 안양시 동안구 관악대로388번길 25, 2층 (관양동)
오준원
서울특별시 강남구 선릉로 120, 10동 1002호 (대치동, 개포1,2차우성아파트)
(74) 대리인
위병갑

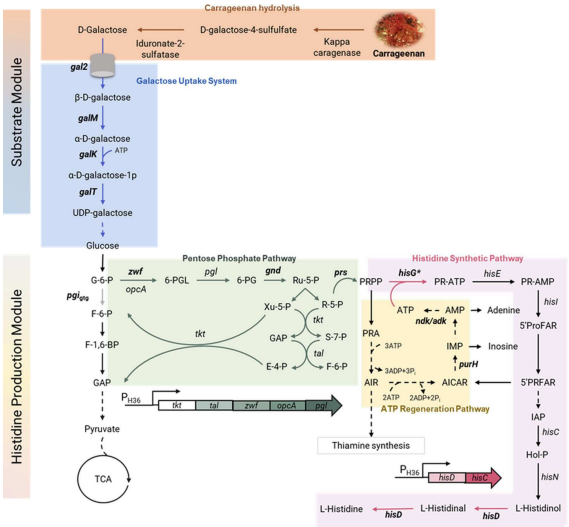
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 **카라기난 분해능 및 갈락토오즈 이용능이 도입된 코리네박테리움 속 균주 및 이를 이용한 해조류로부터 히스티딘을 생산하는 방법**

(57) 요 약

본 발명은 히스티딘 생산능이 강화되고 갈락토오즈 이용능이 도입된 코리네박테리움 속 균주 및 이를 이용한 해조류로부터 히스티딘을 생산하는 방법에 관한 것으로, 본 발명의 형질전환 코리네박테리움 속 균주는 히스티딘 생산 경로의 강화를 통해 우수한 히스티딘 생산능을 가져 아미노산을 친환경 공정 기반으로 생산할 수 있는 효과가 있다. 또한, 해조류의 주성분인 카라기난의 분해를 통해 얻어진 갈라토오즈를 이용하기 때문에 해조류를 바이오매스로 이용할 수 있다는 장점이 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12N 15/52 (2013.01)
C12P 13/24 (2013.01)
C12Y 101/01023 (2013.01)
C12Y 101/01044 (2013.01)
C12Y 101/01049 (2013.01)
C12Y 204/02017 (2013.01)
C12Y 207/04003 (2013.01)
C12Y 207/04006 (2013.01)
C12Y 207/06001 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1525013929
과제번호	202203092
부처명	해양수산부
과제관리(전문)기관명	해양수산과학기술진흥원
연구사업명	해양바이오 산업소재 국산화 기술개발
연구과제명	포르피린 대량생산을 위한 공정표준화 기술 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	고려대학교산학협력단
연구기간	2022.04.01 ~ 2026.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

ATP phosphoribosyltransferase를 코딩하는 유전자, Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase를 코딩하는 유전자, 6-phosphogluconate dehydrogenase를 코딩하는 유전자, Ribose-phosphate pyrophosphokinase를 코딩하는 유전자, Histidinol dehydrogenase를 코딩하는 유전자, Nucleoside diphosphate kinase를 코딩하는 유전자, Adenylate kinase를 코딩하는 유전자 및 Bifunctional purine biosynthesis protein PurH를 코딩하는 유전자가 과발현된, 형질전환 코리네박테리움 속 균주.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 ATP phosphoribosyltransferase를 코딩하는 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 하는, 형질전환 코리네박테리움 속 균주.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase를 코딩하는 유전자는 서열번호 2의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 하는, 형질전환 코리네박테리움 속 균주.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 6-phosphogluconate dehydrogenase를 코딩하는 유전자는 서열번호 3의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 하는, 형질전환 코리네박테리움 속 균주.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 Ribose-phosphate pyrophosphokinase를 코딩하는 유전자는 서열번호 4의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 하는, 형질전환 코리네박테리움 속 균주.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 Histidinol dehydrogenase를 코딩하는 유전자는 서열번호 5의 염기서열료 표시되는 것을 특징으로 하는, 형질전환 코리네박테리움 속 균주.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 Nucleoside diphosphate kinase를 코딩하는 유전자는 서열번호 6의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 하는, 형질전환 코리네박테리움 속 균주.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 Adenylate kinase를 코딩하는 유전자는 서열번호 7의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 하는, 형질전환 코리네박테리움 속 균주.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 Bifunctional purine biosynthesis protein PurH를 코딩하는 유전자는 서열번호 8의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 하는, 형질전환 코리네박테리움 속 균주.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 형질전환 코리네박테리움 속 균주는 *tkt* 유전자(Genbank ID:BAB98967.1)의 tkt promoter 및 *hisD* 유전자(Genbank ID:BAB99495.1)의 hisD promoter를 고발현성 합성프로모터인 H36 promoter로 교체되고, pgi 유전자(Genbank ID: 69621401)의 개시코돈이 ATG에서 GTG로 치환된 것을 특징으로 하는, 형질전환 코리네박테리움 속 균주.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 H36 promoter는 서열번호 9의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 하는, 형질전환 코리네박테리움 속 균주.

청구항 12

제1항에 있어서,

상기 형질전환 코리네박테리움 속 균주는 펜토오즈-인산 경로(pentose phosphate pathway), 히스티딘 생합성 경로(histidine synthetic pathway) 및 ATP 재생 경로(ATP regeneration pathway)가 강화된 것인, 형질전환 코리네박테리움 속 균주.

청구항 13

제1항에 있어서,

상기 형질전환 코리네박테리움 속 균주는 galactose transporter를 코딩하는 유전자, galactose-1-phophate uridylytransferase를 코딩하는 유전자 및 Aldose-1-epimerase를 코딩하는 유전자가 도입되고, galactokinase를 코딩하는 유전자가 과발현된 것인, 형질전환 코리네박테리움 속 균주.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 galactose transporter를 코딩하는 유전자는 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*) 유래인 것을 특징으로 하는, 형질전환 코리네박테리움 속 균주.

청구항 15

제13항에 있어서,

상기 galactose-1-phophate uridylytransferase를 코딩하는 유전자 및 Aldose-1-epimerase를 코딩하는 유전자는 대장균(*Escherichia coli*)유래인 것을 특징으로 하는, 형질전환 코리네박테리움 속 균주.

청구항 16

제13항에 있어서,

상기 형질전환 코리네박테리움 속 균주는 갈락토오즈 이용 경로(galactose uptake system)가 도입된 것인, 형질전환 코리네박테리움 속 균주.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항의 형질전환 코리네박테리움 속 균주를 포함하는, 히스티딘 생산용 조성물.

청구항 18

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항의 형질전환 코리네박테리움 속 균주를 배양하는 단계를 포함하는, 코리네박테리움 속 균주로부터 히스티딘을 생산하는 방법.

청구항 19

해조류, 카라기난 분해효소 및 제13항 내지 제16항 중 어느 한 항의 형질전환 코리네박테리움 속 균주를 포함하는, 히스티딘 생산용 조성물.

청구항 20

카라기난 분해효소를 사용하여 해조류를 당화시켜 해조류 가수분해물을 제조하는 단계; 및

상기 해조류 가수분해물을 포함하는 배지에 상기 형질전환 코리네박테리움 속 균주를 접종 및 발효하는 단계를 포함하는 해조류를 이용한 히스티딘 생산 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 히스티딘 생산능이 향상된 코리네박테리움 속 균주 및 이를 이용한 히스티딘 생산 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 현재 세계적으로 기후변화협약과 환경규제 강화에 의해서 석유 및 석탄을 대체할 수 있고 안정적이며 환경 친화

적인 에너지를 개발하기 위한 바이오, 수소, 태양 등의 신재생에너지의 연구가 활발히 진행되고 있다. 바이오 에너지 생산의 원료로는 주로 사탕수수, 옥수수 등의 곡물류와 임업 및 농업 부산물인 목질계 자원들을 이용하여, 미국, 브라질, 독일과 같은 신재생에너지 생산의 선도국가에서 이에 관한 연구 및 생산이 진행되고 있으나, 식량난 문제와 작물 종류에 따른 지배 면적 한정성 및 영양분 공급의 어려움 그리고 셀룰로오스 이외의 헤미셀룰로오스, 리그닌 등의 추가 전처리 공정에 의한 경제성과 같은 문제로 곡물류와 목질계 자원을 이용한 바이오 연료 생산의 한계가 드러나고 있다.

[0003] 이러한 문제점들을 해결하기 위하여, 최근에는 많은 섬유질 및 다양한 다당류에 의해 세포벽이 구성되어 있는 해양조류가 새로운 바이오 에너지 원료로서 주목을 받고 있다. 해조류를 주로 생산하는 나라는 한국, 일본, 중국, 인도네시아 등의 아시아 국가들이며 육상보다 재배 가능한 바다 면적이 넓다. 또한, 해조류는 목재와 식물계 셀룰로오스보다 빠른 속도로 성장하며 광합성 반응으로 공기 중 이산화탄소를 흡수하므로 온실 가스를 줄일 수 있는 효과가 있고, 해조류 내 리그닌의 함량이 적어 전처리 공정을 간소화 할 수 있을 뿐만 아니라 이러한 대형 해조류에는 60~95 % 정도가 수분이며 나머지 성분들 가운데 50 % 이상이 탄수화물로 이루어져 있어서 바이오 연료 원료로서의 많은 잠재성을 내포하고 있다. 한편 우리나라와 일본에서는 홍조류 중 김(주로 *Porphyra yezoensis*)양식이 활발하게 이루어지고 있으며, 홍조류는 우리나라에서 자생하는 해조류의 절반 이상을 차지하고 있다. 또한, 갈조류나 녹조류보다 서식 범위가 넓고 얕은 수심에서부터 광선이 닿는 깊은 수심에 이르기까지 자생하고 있어 다른 조류보다 종의 수효가 많아 원료 수급 측면에서 매우 우수하며, 타 해조류에 비해 탄수화물, 즉, 미생물이 에탄올로 전환할 수 있는 단당 전환물질을 많이 함유하고 있어 에너지 전환 측면에서도 장점을 지니고 있다. 대형 해조류는 종에 따라 구성하고 있는 다당류의 종류 및 결합 형태가 다양한데, 그 중에서 홍조류는 세포벽 내층의 구조 다당류인 셀룰로오스와 외층 및 세포 사이에 황산기를 가지는 점질성 다당류인 한천, 카라기난, 그리고 그 밖에 자일란, 만난 등으로 구성되어 있다. 특히 한천과 카라기난이 각각 28%, 24%로 대표적이며 셀룰로오스는 3~16%로 그다지 많지 않다.

[0004] 현재까지 홍조류로부터 알칼리, 산 또는 효소 처리 등의 가공 방법을 통해 해조다당류인 한천, 카라기난을 추출하여 식품 및 화장품 첨가제, 건강 식량 자원으로서 산업적으로 많이 유용하게 이용되고 있다. 그러나 홍조류 자체의 분해하기 어려운 복잡한 구조로 인해 바이오 연료 생산용 기질로서 사용하기에 어려움이 있으며, 현재 이용되고 있는 물질 이외에 발생되는 부산물 및 폐기물들의 처리가 문제점으로 남아 있다. 우리나라는 OECD 가입 회원국으로서 폐기물 해양투기를 규제하는 런던협약이 채택한 '96 의정서'를 의무적으로 따라야 할 입장이어서, 2012년 이후에는 폐기되는 해조류 처리문제로 인한 대란이 발생될 가능성을 배제할 수 없다.

[0005] 한편, 히스티딘(Histidine)은 단백질에 존재하는 스무 개의 표준 아미노산들 가운데 하나이다. 인간에게 있어서 필수 아미노산인 히스티딘은 순환기계의 모세혈관투과성을 항진하는 히스타민 합성의 필수성분이다. 히스타민의 전구체로서 히스티딘은 성기능 강화작용과 저산증에 위산 분비를 촉진하여 소화능을 증강시키며, 혈압을 올리고 폐 기관지의 근육을 강화한다. 그리고 조직의 성장과 수복에 필수적이므로 유아의 성장에 반드시 필요하다. 그리고 회복기의 환자에게도 면역력 증강을 위해 히스티딘은 필요한 아미노산이므로, 다른 필수 아미노산들과 같이 아미노산 보충제로서도 충분한 가치가 있다.

[0006] 이에 본 발명자들은 히스티딘 생산 경로, 카라기난 분해 및 갈락토오즈 이용 경로와 관련된 유전자가 과발현 또는 도입된 형질전환 코리네박테리움 속 균주가 우수한 카라기난 분해능 및 히스티딘 생산능을 가지는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2013-0103943호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 ATP phosphoribosyltransferase를 코딩하는 유전자, Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase를

코딩하는 유전자, 6-phosphogluconate dehydrogenase를 코딩하는 유전자, Ribose-phosphate pyrophosphokinase를 코딩하는 유전자, Histidinol dehydrogenase를 코딩하는 유전자, Nucleoside diphosphate kinase를 코딩하는 유전자, Adenylate kinase를 코딩하는 유전자 및 Bifunctional purine biosynthesis protein PurH를 코딩하는 유전자가 과발현된 형질전환 코리네박테리움 속 균주를 제공하는 데 있다.

[0010] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 형질전환 코리네박테리움 속 균주를 포함하는 히스티딘 생산용 조성물을 제공하는 데 있다.

[0011] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 형질전환 코리네박테리움 속 균주를 배양하는 단계를 포함하는 코리네박테리움 속 균주로부터 히스티딘을 생산하는 방법을 제공하는 데 있다.

[0012] 또한, 본 발명의 다른 목적은 해조류, 카라기난 분해효소 및 상기 형질전환 코리네박테리움 속 균주를 포함하는, 히스티딘 생산용 조성물을 제공하는 데 있다.

[0013] 또한, 본 발명의 다른 목적은 해조류를 이용한 히스티딘 생산 방법을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0015] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 ATP phosphoribosyltransferase를 코딩하는 유전자, Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase를 코딩하는 유전자, 6-phosphogluconate dehydrogenase를 코딩하는 유전자, Ribose-phosphate pyrophosphokinase를 코딩하는 유전자, Histidinol dehydrogenase를 코딩하는 유전자, Nucleoside diphosphate kinase를 코딩하는 유전자, Adenylate kinase를 코딩하는 유전자 및 Bifunctional purine biosynthesis protein PurH를 코딩하는 유전자가 과발현된 형질전환 코리네박테리움 속 균주를 제공한다.

[0016] 이어서, 본 발명은 상기 형질전환 코리네박테리움 속 균주를 포함하는 히스티딘 생산용 조성물을 제공한다.

[0017] 나아가, 본 발명은 상기 형질전환 코리네박테리움 속 균주를 배양하는 단계를 포함하는 코리네박테리움 속 균주로부터 히스티딘을 생산하는 방법을 제공한다.

[0018] 더하여, 해조류, 카라기난 분해효소 및 상기 형질전환 코리네박테리움 속 균주를 포함하는, 히스티딘 생산용 조성물을 제공한다.

[0019] 마지막으로, 본 발명은 카라기난 분해효소를 사용하여 해조류를 당화시켜 해조류 가수분해물을 제조하는 단계; 및 상기 해조류 가수분해물을 포함하는 배지에 상기 형질전환 코리네박테리움 속 균주를 접종 및 발효하는 단계를 포함하는 해조류를 이용한 히스티딘 생산 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0021] 본 발명의 형질전환 코리네박테리움 속 균주는 히스티딘 생산 경로의 강화를 통해 우수한 히스티딘 생산능을 가져 아미노산을 친환경 공정 기반으로 생산할 수 있는 효과가 있다. 또한, 해조류의 주성분인 카라기난의 분해를 통해 얻어진 갈라토오즈를 이용하기 때문에 해조류를 바이오매스로 이용할 수 있다는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 있어서, 카라기난 분해를 통한 히스티딘 생산을 위한 생합성 경로를 간단히 나타낸 도이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 있어서, 히스티딘 생산 경로가 강화된 형질전환 코리네박테리움 속 균주의 히스티딘 생산능 확인 결과를 나타낸 도이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 있어서, Iduronate-2-sulfatase 및 Kappa-carrageenase의 카라기난 분해능 확인 결과를 나타낸 도이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 있어서, 갈락토오즈 이용 경로가 도입된 형질전환 코리네박테리움 속 균주의 갈

락토오즈 이용능 및 히스티딘 생산능 확인 결과를 나타낸 도이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 있어서, 최적 배양조건으로 배양된 갈락토오즈 이용 경로가 도입된 형질전환 코리네박테리움 속 균주의 갈락토오즈 이용능 확인 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현 예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허 청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[0025] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(Terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시 예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 “포함”한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0026] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 '%'는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (w/w) %, 고체/액체는 (w/v) %, 그리고 액체/액체는 (v/v) %이다.

[0027] 이하, 본 발명에 대하여 보다 상세하게 설명하도록 한다.

[0029] 일 측면에서, 본 발명은 ATP phosphoribosyltransferase를 코딩하는 유전자, Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase를 코딩하는 유전자, 6-phosphogluconate dehydrogenase를 코딩하는 유전자, Ribose-phosphate pyrophosphokinase를 코딩하는 유전자, Histidinol dehydrogenase를 코딩하는 유전자, Nucleoside diphosphate kinase를 코딩하는 유전자, Adenylate kinase를 코딩하는 유전자 및 Bifunctional purine biosynthesis protein PurH를 코딩하는 유전자가 과발현된 형질전환 코리네박테리움 속 균주에 관한 것이다.

[0030] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 ATP phosphoribosyltransferase를 코딩하는 유전자는 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) 유래일 수 있으며, 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다. 또한, 상기 서열번호 1의 서열과 70% 이상, 구체적으로 80% 이상, 보다 구체적으로는 90% 이상, 보다 더 구체적으로는 95% 이상, 가장 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열로서 실질적으로 ATP phosphoribosyltransferase 활성을 나타내는 단백질을 발현 가능한 경우, 제한 없이 포함될 수 있다.

[0031] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase를 코딩하는 유전자는 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) 유래일 수 있으며, 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다. 또한, 상기 서열번호 2의 서열과 70% 이상, 구체적으로 80% 이상, 보다 구체적으로는 90% 이상, 보다 더 구체적으로는 95% 이상, 가장 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열로서 실질적으로 Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase 활성을 나타내는 단백질을 발현 가능한 경우, 제한 없이 포함될 수 있다.

[0032] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 6-phosphogluconate dehydrogenase를 코딩하는 유전자는 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) 유래일 수 있으며, 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다. 또한, 상기 서열번호 3의 서열과 70% 이상, 구체적으로 80% 이상, 보다 구체적으로는 90% 이상, 보다 더 구체적으로는 95% 이상, 가장 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열로서 실질적으로 6-phosphogluconate dehydrogenase 활성을 나타내는 단백질을 발현 가능한 경우, 제한 없이 포함될 수 있다.

[0033] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 Ribose-phosphate pyrophosphokinase를 코딩하는 유전자는 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) 유래일 수 있으며, 서열번호 4의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다. 또한, 상기 서열번호 4의 서열과 70% 이상, 구체적으로 80% 이상, 보다 구체적으로는 90% 이상, 보다 더 구체적으로는 95% 이상, 가장 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열로서 실질적으로 Ribose-phosphate pyrophosphokinase 활성을 나타내는 단백질을 발현 가능한 경우, 제한 없이 포함될 수 있다.

[0034] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 Histidinol dehydrogenase를 코딩하는 유전자는 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) 유래일 수 있으며, 서열번호 5의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다. 또한, 상

기 서열번호 5의 서열과 70% 이상, 구체적으로 80% 이상, 보다 구체적으로는 90% 이상, 보다 더 구체적으로는 95% 이상, 가장 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열로서 실질적으로 Histidinol dehydrogenase 활성을 나타내는 단백질을 발현 가능한 경우, 제한 없이 포함될 수 있다.

[0035] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 Nucleoside diphosphate kinase를 코딩하는 유전자는 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) 유래일 수 있으며, 서열번호 6의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다. 또한, 상기 서열번호 6의 서열과 70% 이상, 구체적으로 80% 이상, 보다 구체적으로는 90% 이상, 보다 더 구체적으로는 95% 이상, 가장 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열로서 실질적으로 Nucleoside diphosphate kinase 활성을 나타내는 단백질을 발현 가능한 경우, 제한 없이 포함될 수 있다.

[0036] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 Adenylate kinase를 코딩하는 유전자는 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) 유래일 수 있으며, 서열번호 7의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다. 또한, 상기 서열번호 7의 서열과 70% 이상, 구체적으로 80% 이상, 보다 구체적으로는 90% 이상, 보다 더 구체적으로는 95% 이상, 가장 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열로서 실질적으로 Adenylate kinase 활성을 나타내는 단백질을 발현 가능한 경우, 제한 없이 포함될 수 있다.

[0037] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 Bifunctional purine biosynthesis protein PurH를 코딩하는 유전자는 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) 유래일 수 있으며, 서열번호 8의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다. 또한, 상기 서열번호 8의 서열과 70% 이상, 구체적으로 80% 이상, 보다 구체적으로는 90% 이상, 보다 더 구체적으로는 95% 이상, 가장 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열로서 실질적으로 Bifunctional purine biosynthesis protein PurH 활성을 나타내는 단백질을 발현 가능한 경우, 제한 없이 포함될 수 있다.

[0038] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 형질전환 코리네박테리움 속 균주는 *tkt* 유전자(Genbank ID:BAB98967.1)의 tkt promoter 및 *hisD* 유전자(Genbank ID:BAB99495.1)의 hisD promoter를 고발현성 합성프로모터인 H36 promoter로 치환된 것일 수 있으나, 이에 제한된 것은 아니다.

[0039] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 H36 promoter는 서열번호 9의 염기서열로 표시되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0040] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 형질전환 코리네박테리움 속 균주는 펜토오즈-인산 경로(pentose phosphate pathway), 히스티딘 생합성 경로(histidine synthetic pathway) 및 ATP 재생 경로(ATP regeneration pathway)가 강화되어 히스티딘 생산량이 증대된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0041] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 galactose transporter를 코딩하는 유전자는 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*) 유래일 수 있으며, 서열번호 10의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다. 또한, 상기 서열번호 10의 서열과 70% 이상, 구체적으로 80% 이상, 보다 구체적으로는 90% 이상, 보다 더 구체적으로는 95% 이상, 가장 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열로서 실질적으로 galactose transporter 활성을 나타내는 단백질을 발현 가능한 경우, 제한 없이 포함될 수 있다.

[0042] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 galactose-1-phophate uridylytransferase를 코딩하는 유전자는 대장균(*Escherichia coli*) 유래일 수 있으며, 서열번호 11의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다. 또한, 상기 서열번호 11의 서열과 70% 이상, 구체적으로 80% 이상, 보다 구체적으로는 90% 이상, 보다 더 구체적으로는 95% 이상, 가장 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열로서 실질적으로 galactose-1-phophate uridylytransferase 활성을 나타내는 단백질을 발현 가능한 경우, 제한 없이 포함될 수 있다.

[0043] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 Aldose-1-epimerase를 코딩하는 유전자는 대장균(*Escherichia coli*) 유래일 수 있으며, 서열번호 12의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다. 또한, 상기 서열번호 12의 서열과 70% 이상, 구체적으로 80% 이상, 보다 구체적으로는 90% 이상, 보다 더 구체적으로는 95% 이상, 가장 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열로서 실질적으로 Aldose-1-epimerase 활성을 나타내는 단백질을 발현 가능한 경우, 제한 없이 포함될 수 있다.

[0044] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 galactokinase를 코딩하는 유전자는 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) 유래일 수 있으며, 서열번호 13의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다. 또한, 상기 서열번호 13의 서열과 70% 이상, 구체적으로 80% 이상, 보다 구체적으로는 90% 이상, 보다 더 구체적으로는 95% 이상, 가장 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열로서 실질적으로 galactokinase 활성을 나

타내는 단백질을 발현 가능한 경우, 제한 없이 포함될 수 있다.

[0045] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 형질전환 코리네박테리움 속 균주는 갈락토오즈 이용 경로(galactose uptake system)가 도입된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0046] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 코리네박테리움 속 균주는 코리네박테리움 그라눌로숨(*Corynebacterium granulosum*), 코리네박테리움 글루쿠로노리티쿰(*Corynebacterium glucuronolyticum*), 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*), 코리네박테리 글리시노필룸(*Coynebacterium glycinophilum*), 코리네박테리움 디프테리애 (*Corynebacterium diphtheriae*), 코리네박테리움 릴리움(*Corynebacterium lilium*), 코리네박테리움 레나레(*Corynebacterium renale*), 코리네박테리움 멜라쎄콜라(*Corynebacterium melassecola*), 코리네박테리움 마트루코티이(*Corynebacterium matruchotii*), 코리네박테리움 맥긴레이(*Corynebacterium macginleyi*), 코리네박테리움 미누티시멈(*Corynebacterium minutissimum*), 코리네박테리움 보비스(*Corynebacterium bovis*), 코리네박테리움 써모아미노게네스(*Corynebacterium thermoaminogenes*), 코리네박테리움 슈도디프테리티쿰(코리네박테리움 호프마니이)[*Corynebacterium pseudodiphtheriticum*(*Corynebacterium hofmannii*)], 코리네박테리움 슈도투베르큘로시스(*Corynebacterium pseudotuberculosis*), 코리네박테리움 스펙(*Corynebacterium spec*), 코리네박테리움 스트리아텀(*Corynebacterium striatum*), 코리네박테리움 아미콜라텀(*Corynebacterium amycolatum*), 코리네박테리움 아세토액시도필럼(*Corynebacterium acetoacidophilum*), 코리네박테리움 아세토글루타미쿰(*Corynebacterium acetoglutamicum*), 코리네박테리움 아콜렌스(*Corynebacterium accolens*), 코리네박테리움 아쿠아티컴(*Corynebacterium aquaticum*), 코리네박테리움 아퍼멘탄스(*Corynebacterium afermentans*), 코리네박테리움 아우리스(*Corynebacterium auris*), 코리네박테리움 알젠토라텐스(*Corynebacterium argentoratense*), 코리네박테리움 알카노리티쿰(*Corynebacterium alkanolyticum*), 코리네박테리움 암모니아게네스(*Corynebacterium ammoniagenes*), 코리네박테리움 에피시엔스(*Corynebacterium efficiens*), 코리네박테리움 오비스(*Corynebacterium ovis*), 코리네박테리움 우리아리티쿰(*Corynebacterium urealyticum*), 코리네박테리움 울세란스(*Corynebacterium ulcerans*), 코리네박테리움 제로시스(*Corynebacterium xerosis*), 코리네박테리움 제이키움(*Corynebacterium jeikeium*), 코리네박테리움 칼루내(*Corynebacterium callunae*), 코리네박테리움 테누이스(*Corynebacterium tenuis*), 코리네박테리움 파리움(*Corynebacterium parvum*), 코리네박테리움 프로피큠(*Corynebacterium propinquum*), 코리네박테리움 플라베센스(*Corynebacterium flavescens*), 코리네박테리움 피오게네스(*Corynebacterium pyogenes*), 코리네박테리움 할로피티카(*Corynebacterium halofytica*), 코리네박테리움 해모리티쿰(*Corynebacterium haemolyticum*) 및 코리네박테리움 헤르쿨리스(*Corynebacterium herculis*)으로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있으며, 바람직하게는 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0047] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 형질전환 코리네박테리움 속 균주는 ATP phosphoribosyltransferase를 코딩하는 유전자, Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase를 코딩하는 유전자, 6-phosphogluconate dehydrogenase를 코딩하는 유전자, Ribose-phosphate pyrophosphokinase를 코딩하는 유전자, Histidinol dehydrogenase를 코딩하는 유전자, Nucleoside diphosphate kinase를 코딩하는 유전자, Adenylate kinase를 코딩하는 유전자 및 Bifunctional purine biosynthesis protein PurH를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터; 및 galactose transporter를 코딩하는 유전자, galactose-1-phophate uridylytransferase를 코딩하는 유전자, Aldose-1-epimerase를 코딩하는 유전자 및 galactokinase를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터;가 코리네박테리움 속 균주에 도입된 형질전환 미생물일 수 있다.

[0048] 본 발명에서 사용되는 용어, "재조합"은 세포가 이종의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나, 또는 펩티드, 이종의 펩티드 또는 이종의 핵산에 의해 암호화된 단백질을 발현하는 세포를 지칭하는 것이다. 재조합 세포는 상기 세포의 천연 형태에서는 발견되지 않는 유전자 또는 유전자 절편을, 센스 또는 안티센스 형태 중 하나로 발현할 수 있다. 또한 재조합 세포는 천연 상태의 세포에서 발견되는 유전자를 발현할 수 있으며, 그러나 상기 유전자는 변형된 것으로서 인위적인 수단에 의해 세포 내 재도입된 것이다.

[0049] 또한, 상기 재조합 벡터는 선형 DNA, 플라스미드 DNA, 재조합 바이러스성 벡터 등 숙주세포에 도입되어 표적 유전자를 전달할 수 있는 것이라면 제한되지 않고 포함할 수 있다. 상기 재조합 바이러스는 레트로 바이러스, 아데노 바이러스, 아데노 부속 바이러스, 헤르페스 심플렉스 바이러스 및 렌티바이러스로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0050] 본 발명에서 사용되는 용어 “형질전환”은 미생물이 외부로부터 주어진 DNA를 받아들여 미생물의 유전적 성질이 변하는 것을 의미한다.

[0051] 또한, 상기 형질전환은 당 분야에서 공지된 바와 같이 적합한 표준 기술, 예를 들어, 전기천공법(electroporation), 전기주입법 (electroinjection), 미세주입법 (microinjection), 인산칼슘공동-침전법(calcium phosphate co-precipitation), 염화칼슘/염화루비듐법, 레트로바이러스 감염 (retroviral infection), DEAE-덱스트란 (DEAE-dextran), 양이온 리포좀 (cationic liposome)법, 폴리에틸렌 글리콜 침전법(polyethylene glycol-mediated uptake), 유전자총 (gene gun) 등을 이용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0053] 일 측면에서, 본 발명은 상기 형질전환 코리네박테리움 속 균주를 포함하는 히스티딘 생산용 조성물에 관한 것이다.

[0054] 본 발명의 히스티딘 생산용 조성물은 상술한 형질전환 코리네박테리움 속 균주를 포함하기 때문에, 상술한 본 발명의 형질전환 코리네박테리움 속 균주와 중복된 내용은 중복된 내용의 기재에 의한 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.

[0055] 본 발명에서 사용되는 용어 “조성물”은 목적 물질을 생산하기 위한 다양한 물질을 혼합한 것으로서, 미생물 배양배지, 탄소원, 미량 원소 및 미생물 종균이 포함된 것을 의미한다.

[0057] 일 측면에서, 본 발명은 상기 형질전환 코리네박테리움 속 균주를 배양하는 단계를 포함하는 코리네박테리움 속 균주로부터 히스티딘을 생산하는 방법에 관한 것이다.

[0058] 본 발명에서 용어 "배양"은 목적하는 세포 또는 조직 등을 인공적으로 조절한 환경 조건에서 생육하는 것을 의미한다. 상기 환경 조건은 대표적으로 영양소, 온도, 삼투압, pH, 기체 조성, 빛 등이 있으나, 직접적인 영향을 주는 것은 배지이며, 배지는 크게 액체배지와 고체배지로 나뉠 수 있다. 본 발명의 형질전환 코리네박테리움 속 균주의 배양은 당업계에 널리 알려져 있는 방법을 이용하여 수행할 수 있다.

[0059] 구체적으로, 상기 배양은 상기 형질전환 코리네박테리움 속 균주로부터 히스티딘을 생산할 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 배치 공정 또는 주입배치 또는 반복 주입 배치 공정 (fed batch or repeated fed batch process)에서 연속식으로 배양할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0060] 배양에 사용되는 배지는 적절한 방식으로 특정 균주의 요건을 충족해야 한다. 코리네박테리움 속 균주에 대한 배양 배지로 알려진 배지는 제한 없이 사용할 수 있으며, 예를 들면 BHI 배지, BHIS 배지, BHISG 배지, CGXII 배지, CGAF 배지, CN40 배지 등이 있다.

[0061] 사용될 수 있는 당원으로는 글루코스, 사카로스, 락토스, 프락토스, 말토스, 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.

[0062] 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 소포제를 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.

[0063] 배양은 히스티딘의 생성량이 최대로 얻어질 때까지 계속한다. 히스티딘은 배양 배지 중으로 배출되거나, 세포 중에 포함되어 있을 수 있다. 상기 배지는 바람직하게는 히스티딘 생산의 기질이 될 수 있는 글루코스, 갈락토오즈 또는 카라기닌을 포함할 수 있으며, 상기 글루코스, 갈락토오즈 또는 카라기닌의 범위로는 해당 물질이 함유된 천연물(특히, 해조류)을 모두 포함한다.

[0064] 본 발명의 히스티딘을 생산하는 방법은, 세포 또는 배양 배지로부터 히스티딘을 회수하는 단계를 포함한다. 세포 또는 배양 배지로부터 히스티딘을 회수하는 방법은 당업계에 널리 알려져 있다. 상기 히스티딘 회수 방법에는, 원심분리, 여과, 추출, 분무, 건조, 증발, 침전, 결정화, 전기영동, 분별 용해 (예를 들면 암모늄 설페이트 침전), 크로마토그래피(예를 들면 HPLC, 이온교환, 친화성, 소수성 및 크기배제) 등의 방법이 사용될 수 있다.

[0066] 일 측면에서, 본 발명은 해조류, 카라기난 분해효소 및 상기 형질전환 코리네박테리움 속 균주를 포함하는, 히스티딘 생산용 조성물에 관한 것이다.

[0067] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 해조류는 홍조류, 갈조류 및 녹조류으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있고, 바람직하게는 카라기난을 다량 함유하는 홍조류일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0068] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 카라기난 분해효소는 Iduronate-2-sulfatase, Kappa-carrageenase 또는 이들의 혼합물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0069] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 Iduronate-2-sulfatase를 코딩하는 유전자는 조벨리아 갈락타니보란스(*Zobellia galactanivorans*) 유래일 수 있으며, 서열번호 14의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다. 또한, 상기 서열번호 14의 서열과 70% 이상, 구체적으로 80% 이상, 보다 구체적으로는 90% 이상, 보다 더 구체적으로는 95% 이상, 가장 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열로서 실질적으로 Iduronate-2-sulfatase 활성을 나타내는 단백질을 발현 가능한 경우, 제한 없이 포함될 수 있다.

[0070] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 Kappa-carrageenase를 코딩하는 유전자는 조벨리아 갈락타니보란스(*Zobellia galactanivorans*) 유래일 수 있으며, 서열번호 15의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다. 또한, 상기 서열번호 15의 서열과 70% 이상, 구체적으로 80% 이상, 보다 구체적으로는 90% 이상, 보다 더 구체적으로는 95% 이상, 가장 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열로서 실질적으로 Kappa-carrageenase 활성을 나타내는 단백질을 발현 가능한 경우, 제한 없이 포함될 수 있다.

[0072] 일 측면에서, 본 발명은 카라기난 분해효소를 사용하여 해조류를 당화시켜 해조류 가수분해물을 제조하는 단계; 및 상기 해조류 가수분해물을 포함하는 배지에 상기 형질전환 코리네박테리움 속 균주를 접종 및 발효하는 단계를 포함하는 해조류를 이용한 히스티딘 생산 방법에 관한 것이다.

[0073] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 카라기난 분해효소는 Iduronate-2-sulfatase, Kappa-carrageenase 또는 이들의 혼합물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0074] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 해조류는 홍조류, 갈조류 및 녹조류으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있고, 바람직하게는 카라기난을 다량 함유하는 홍조류일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0075] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 홍조류는 우뭇가사리, 김, 코토니, 개도박, 둥근돌김, 개우무, 새발, 참풀가사리, 꼬시래기, 진두발, 참도박, 가시우무, 비단풀, 단박, 돌가사리, 석목, 지누아리 등이 사용될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0076] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 갈조류는 미역, 다시마, 헛가지말, 민가지말, 패, 고리매, 미역쇠, 감태, 곰피, 대황, 쇠미역사촌, 모자반, 괭생이 모자반, 지충이, 톳 등이 사용될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0077] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 녹조류로는 청태, 해캄, 파래, 청각, 구슬청각, 옥덩굴, 염주말 등이 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0078] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 코리네박테리움 속 균주는 BHISG(Brain heart infusion-supplemented with glucose) 배지에서 25 내지 35℃, air 1.5 내지 2.5 L/min 및 pH 6.0 내지 8.0의 배양조건으로 20 내지 28시간 동안 배양된 후, 전 배양 배지(pre-culture medium)에서 25 내지 35, 150 내지 250 rpm, air 1.5 내지 2.5 L/min 및 pH 6.0 내지 8.0의 배양조건으로 20 내지 28시간 동안 배양된 것일 수 있다.

[0080] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 BHISG (Brain heart infusion-supplemented with glucose) 배지는 15 내

지 25 g/L glucose, 33 내지 41 g/L brain heart infusion, 87 내지 95 g/L $C_6H_{14}O_6$, 15 내지 25 g/L $C_6H_{12}O_6$, 20 내지 30 μg/L kanamycin 및 5 내지 15 μg/L chloramphenicol을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0081] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 전 배양 배지(pre-culture medium)는 2 내지 4 g/L peptone, 0.9 내지 1.5 g/L potassium dihydrogen phosphate, 1 내지 3 g/L sodium citrate, 2 내지 4 g/L yeast extract, 17 내지 23 g/L glucose, 0.5 내지 1.5 mg/L biotin, 0.5 내지 1.5 mg/L cobalamine, 0.5 내지 1.5 mg/L pantothenate, 0.5 내지 1.5 mg/L thiamine HCL, 0.5 내지 1.5X trace element를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0082] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 배지는 CN40 배지, CGXII 배지 , CGAF 배지 일 수 있고, 바람직하게는 CN40 배지일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0083] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 CN40 배지는 4 내지 5 g/L peptone, 7 내지 9 g/L ammonium sulfate, 1 내지 3 g/L potassium dihydrogen phosphate, 17 내지 23 g/L corn syrup, 1 내지 3 g/L sodium citrate, 7 내지 9 g/L yeast extract, 9 내지 11 g/L galactose, 1 내지 3 g/L $MgSO_4$, 9 내지 11 mg/L biotin, 1 내지 3 mg/L cobalamine, 1 내지 3 mg/L pantothenate, 9 내지 11 mg/L thiamine HCL 및 0.5 내지 1.5X trace element를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0084] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 발효는 25 내지 35 ℃, 200 내지 600 rpm, air 1.5 내지 2.5 L/min 및 pH 6.0 내지 8.0의 배양조건으로 40 내지 50시간 동안 수행되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0086] 이하, 본 발명의 실시예를 첨부된 도면을 참고하여 보다 상세하게 설명하도록 한다. 그러나, 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 것일 뿐, 이에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아닐 것이다.

[0088] **<실시예 1> 히스티딘 생산 경로가 강화된 코리네박테리움 균주의 개발**

[0089] 히스티딘 생산량 증대 균주의 개발을 위해, 히스티딘 생산 경로에 해당하는 펜토오즈-인산 경로(pentose phosphate pathway), 히스티딘 생합성 경로(histidine synthetic pathway) 및 ATP 재생 경로(ATP regeneration pathway) 관련 유전자의 과발현을 유도하는 재조합 벡터를 제작하고, 상기 재조합 벡터를 코리네박테리움 속 균주에 형질전환하여 히스티딘 생산 경로가 강화된 형질전환 코리네박테리움 균주를 제작하였다(도 1 참조).

[0090] 먼저, 펜토오즈-인산 경로(pentose phosphate pathway) 및 히스티딘 생합성 경로(histidine synthetic pathway)의 강화를 위해 *tkt* 유전자(Genbank ID:BAB98967.1)의 tkt promoter 및 *hisD* 유전자(Genbank ID:BAB99495.1)의 hisD promoter를 고발현성 합성프로모터인 H36 promoter(서열번호 9)로 교체하였으며, pgi 유전자(Genbank ID: 69621401)의 개시코돈을 ATG에서 GTG로 치환하였다. 각 유전자의 프로모터의 교체 및 염기서열의 변경을 위해 CRISPR Vector를 구축하였다. 상기 vector의 구축을 위해, tkt 및 hisD 유전자의 RA, LA서열을 각각 tkt LA F, tkt LA R, tkt RA F, tkt RA R, hisD LA F, hisD LA R, hisD RA F, hisD RA R의 프라이머를 사용하여 PCR을 통해 증폭하였고, tkt RA :600 bp, tkt LA :587 bp, hisD RA :600 bp, hisD LA : 600 bp의 유전자를 증폭하였다. 이후 H36 프로모터의 도입을 위해 관련 프로모터를, H36 F, R 프라이머를 이용해 PCR을 통해 증폭하였으며, 74 bp의 유전자 서열을 확보하였다. 이후, 각각의 유전자들을 pJYS2 벡터에 삽입하여 재조합 벡터를 구축하였다. pgi 유전자의 개시코돈을 변경하기 위해선, crRNA pgi F, R 프라이머를 이용하여 PCR을 통해 관련 유전자를 증폭하였고, 75 bp의 염기서열을 확보한 뒤 관련 염기서열을 pJYS2에 클로닝하여 재조합 벡터를 구축하였다. 이후 펜토오즈-인산 경로(pentose phosphate pathway), 히스티딘 생합성 경로(histidine synthetic pathway) 및 ATP 재생 경로(ATP regeneration pathway)의 강화를 위해 *hisG*(서열번호 1, ATP phosphoribosyltransferase), *zwf*(서열번호 2,Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase), *gnd*(서열번호 3, 6-phosphogluconate dehydrogenase), *prs*(서열번호 4, Ribose-phosphate pyrophosphokinase), *hisD*(서열번호 5, Histidinol dehydrogenase), *ndk*(서열번호 6, Nucleoside diphosphate kinase), *adk*(서열번호 7, Adenylate kinase) 및 *purH*(서열번호 8, Bifunctional purine biosynthesis protein PurH)의 유전자가 포함된 과발현 벡터를 제작하였다. 과발현 벡터의 제작을 위해 hisG 유전자는 코리네박테리움 글루타미쿰 (*C. glutmiaum*) 의 genomic DNA로부터 제한효소 서열을 포함하는 정방향, 역방향 프라이머 (HisG F, HisG R)를 이용하여 PCR을 통해 증폭되었으며 605 bp의 서열을 확보하였다. Zwf 유전자는 코리네박테리움 글루타미쿰 (*C.*

glutmiaum) 의 genomic DNA로부터 제한효소 서열을 포함하는 정방향, 역방향 프라이머 (Zwf F, Zwf R)를 이용하여 PCR을 통해 증폭되었으며 1455 bp의 서열을 확보하였다. Gnd 유전자는 코리네박테리움 글루타미쿰 (*C. glutmiaum)* 의 genomic DNA로부터 제한효소 서열을 포함하는 정방향, 역방향 프라이머 (Gnd F, Gnd R)를 이용하여 PCR을 통해 증폭되었으며 1479 bp의 서열을 확보하였다. Prs 유전자는 코리네박테리움 글루타미쿰 (*C. glutmiaum)* 의 genomic DNA로부터 제한효소 서열을 포함하는 정방향, 역방향 프라이머 (Prs F, Prs R)를 이용하여 PCR을 통해 증폭되었으며 978 bp의 서열을 확보하였다.prs. HisD 유전자는 코리네박테리움 글루타미쿰 (*C. glutmiaum)* 의 genomic DNA로부터 제한효소 서열을 포함하는 정방향, 역방향 프라이머 (HisD F, HisD R)를 이용하여 PCR을 통해 증폭되었으며 1329 bp의 서열을 확보하였다. 증폭된 유전자 및 pEKEx2 벡터들은 BamH1, EcoR1, Kpn1 제한효소를 처리한 뒤 T4 ligase를 통해 Ligation을 진행 한 뒤 재조합 벡터를 구축하였다. 이후, purH, adk, ndk 유전자들은 각각 제한효소 서열을 포함하는 정방향, 역방향 프라이머 (purH F, purH R, adk F, adk R, ndk F, ndk R)를 이용하여 PCR을 통해 증폭되었으며, 각각 411, 546, 1563 bp의 서열을 확보하였다. 이후 증폭된 유전자 및 pMT-tac 벡터들은 BamH1 제한효소를 처리한 뒤 T4 ligase를 통해 Ligation을 진행한 뒤 재조합 벡터를 구축하였다. 이후 구축벡터들은 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)에 전기천공법 (2.5 kV)으로 형질전환한 후, 상기 형질전환체의 히스티딘 생산능을 확인하였다. 구체적으로, 고성능 액체 크로마토 그래피 (HPLC)를 이용하여 Agilent Zorbax Eclipse AAA colum을 기반으로으로 o-phthaladehyde (OPA) 유도체화를 통해 히스티딘의 생산능을 측정하였다.

[0091] 본 발명에서 사용된 재조합 벡터 및 균주는 표 1 및 표 2에 나타내었으며, 본 실험에 사용된 프라이머 정보는 표 3에 나타내었다. 모든 형질전환 균주들은 50 ml의 CN40 배지 (containing 20 g/L glucose) 를 포함한 250 ml 진탕 삼각 플라스크에서 30 ° C, 200 rpm의 조건으로 72시간 배양하였다.

[0092] 그 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이 TDP 균주에 비해 TDPH4균주는 1.44배, TDPH6 균주는 2.15-fold 히스티딘 생산능이 향상되는 것을 확인하였다(도 2a, b). 또한, 펜토오즈인산, 히스티딘 경로가 강화된 TDP 균주 (5.25 ng/gdcw)의 경우, wild type 균주 (1.27 ng/gdcw)에 비해 NADPH량이 4.14배 증대됨을 확인하였고, 추가적으로 *hisG**, *zwf*, *gnd*, 및 *prs*가 과발현되어 펜토오즈-인산 경로가 강화된 균주인 TDPH4 균주의 경우 7.7 ng/gdcw의 NADPH가 생산되어 TDP균주에 비해 NADPH 생산량이 1.48배 증대됨을 확인하였다(도 2c). 또한, *hisD*, *ndk*, *adk* 및 *purH*가 추가적으로 발현된 TDPH6 균주에서 관련 유전자들의 mRNA 발현량이 증대됨을 확인하였다 (도 2d, e).

표 1

[0094]

벡터	특징
pEKEx2	*C. glutamicum-E. coli* shuttle vector, P_{tac},lacI,Kan^R,pBL1ori
pEKEx2::*hisG*::zwf::gnd*	pEKEx2, carrying *hisG** (C-terminal area of *hisG* was deleted), *zwf*, and *gnd* genes originating from *C. glutamicum* originating from *C. glutamicum*
pEKEx2::*hisG*::zwf::gnd::prs*	pEKEx2*::hisG*::zwf::gnd*, carrying *prs* gene originating from *C. glutamicum*
pMT-*tac*	*C. glutamicum-E. coli* shuttle vector, P_{tac},Amp^R,Cm^R,pCG1ori
pMT-*tac::purH::adk::ndk*	pMT-tac, carrying *purH, adk, ndk* genes originating from *C. glutamicum*

표 2

[0095]

균주	특징
C. glutamicum ATCC13032	wild type
TDP	*C. glutamicum* ATCC13032 with replacement of the native promoter of *tkt* gene and *hisD* gene by H36 synthetic promoter and the start codon of *pgi* gene was modified from atg to gtg, harboring pEKEx2
TDPH3	TDP harboring pEKEx2*::hisG*::zwf::gnd*
TDPH4	TDP harboring pEKEx2*::hisG*::zwf::gnd::prs*

TDPH6	TDP harboring pEKEx2::*hisG**::*zwf*::*gnd*::*prs*::*hisD*, pMT-*tac*::*purH*::*adk*::*ndk*

표 3

[0096]

프라이머(제한효소)	염기서열(5 '-3')
tkt LA F(EcoR1)	ATATGAATTCTTAAGTTGTGAGTCCTTAT
tkt LA R(Xma1)	ATACCCGGGCAATCTTAAGTCTGGGA
tkt RA F(Xba1)	ATATCTAGATTGACCACCTTGACGCTGTCACCTG
tkt RA R(Sal1)	ATAGTCGACCAGCTGCTGGGTGCCAGCGA
H36 F (BamH1)	ATAGGATCCTCTATCTGGTGCCCTAAACG
H36 R (Xba1)	ATATCTAGACATGCTACTCCTACCAACCA
crRNA pgi F	CTAGGTATAATGGATCGAATTTCTACTGTTGTAGATATGGCGGACATT
crRNA pgi R	TTTATTTAAATGGATCTGGGTGGTCGAAATGTCCGCCATATCTACAAC
hisD LA F (Sal1)	ATAGTCGACTCATCGGCATTGTTCGTGTCG
hisD LA R (BamH1)	GGGGGGGGATCCAGAGTTCATTTGAATTAGACTTAAAACTTAAAATGACC
hisD RA F (BamH1)	ATAGGATCCTGCGGGCTTAAGAACTTGT
hisD RA R (EcoR1)	ATAGAATTCGCCAGCCACCGTGCTCAG
crRNA hisD F	AAGCTTGCATGGCGGCCGGAATTTCTACTGTTGTAGATCCTATTGTATTCC
crRNA hisD R	TAAATGGATCTGCGGCCGTGTTACGTGGGGAATACAATAGGATCTACAACAGTAG
hisG F (BamH1)	ATAGGATCCATGTTGAAAATCGCTGTCCC
hisG R (Kpn1)	ATAGGTACCCTAGATGCGGGCGATGC
zwf F	GCATCGCCCGCATCTAGGGTACAAGGAGATATAGATGGTGATCTTCGGTGTC
zwf R (Kpn1)	CCAGTGAATTCGAGCTCGGTACCTTATGGCCTGCGCCAGG
gnd F	CCTGGCGCAGGCCATAAGGTACAAGGAGATATAGATGCCGTCAAGTACGATCAA
gnd R (Kpn1)	CCAGTGAATTCGAGCTCGGTACCTTAAGCTTCAACCTCGGAGCG
prs F	GCTCCGAGGTTGAAGCTTAAGGTACAAGGAGATATAGATGACTGCTCACTGGAAACA
prs R (Kpn1)	GGCCAGTGAATTCGAGCTCGGGTACCTTAGGCCTCGCCCTCG
hisD F	TCGAGGGCGAGGCCTAAGGTACAAGGAGATATAGATGTTGAATGTCACTGACCTG
hisD R (Kpn1)	CAGTGAATTCGAGCTCGGGTACCTTAGGCCTCGTCGGTGG
ndk F	GGAGATATCATATCGATGGATCCATGACTGAACGTACTCTCATC
ndk R (BamH1)	GTACGAGTCGCATCTATATCTCCTTTTACAGGTTAGGGAACCAGAT
adk F	CTCCATCTGGTTCCCTAACCTGTAAAAGGAGATATAGATGCGACTCGTACTCCT
adk R	CGCGGTACCCGGGGATCTTATTTGCCCAGTGCCTTG
purH F	GGCAAATAAGATCCCCGGAAGGAGATATAGATGAGCGATGATCGTAAGG
purH R	AACAGGCGGCCGCGGTACCCGGGTTAGTGAGCGAAGTGTCGCG

[0098] **<실시예 2> Iduronate-2-sulfatase 및 Kappa-carrageenase의 카라기난 분해능 확인**

[0099] **2-1. *idsA3* 유전자 및 *cgkA* 유전자를 발현하는 형질전환체의 제조**

[0100] 홍조류의 주성분인 카라기난의 분해를 위해 카라기난 가수분해 경로와 관련된 *idsA3* 유전자(Iduronate-2-sulfatase) 및 *cgkA* 유전자(Kappa-carrageenase)를 pColdII 벡터를 통해 발현시켰다. 본 과발현 벡터의 제작을 위해 *idsA3* 유전자는 조벨리아 갈락타니보란스(*Zobellia galactanivorans*)의 genomic DNA로부터 제한효소 서열을 포함하는 정방향, 역방향 프라이머 (*IdsA* F, IdsA R)를 이용하여 PCR을 통해 증폭되었으며 1531 bp의 서열을 확보하였다(서열번호 14). *cgkA* 유전자는 조벨리아 갈락타니보란스(*Zobellia galactanivorans*)의 genomic DNA로부터 제한효소 서열을 포함하는 정방향, 역방향 프라이머 (CgkA F, CgkA R)를 이용하여 PCR을 통해 증폭되었으며 1641 bp의 서열을 확보하였다(서열번호 15). 상기 카라기난 분해를 위한 kappa-carrageenase 및 Iduronate-2-sulfatase를 발현하여 in vitro 실험을 진행하기 위해, 구축된 재조합 벡터는 *E. coli* BL21에 열충격방법으로 형질전환하였다.

표 4

[0102]

벡터	특징
pColdII	*E. coli* expression vector, P_{CSPA},TEE,lacI,Amp^R,Pbr322ori
pColdII::*cgkA*	PColdII, carrying *cgkA* gene originating from *Zobellia galactanivorans*
pColdII::*idsA3*	PColdII, carrying *idsA3* gene originating from *Z. galactanivorans*

표 5

[0103]

균주	특징
E. coli BL21 pColdII::*cgkA*	*E. coli* BL21 harboring pColdII::*cgkA* vector
E. coli BL21 pColdII::*idsA3*	*E. coli* BL21 harboring pColdII::*idsA3* vector

표 6

[0104]

프라이머(제한효소)	염기서열(5 '-3')
idsA3_F	ATATGAGCTCTGCAGCTCGGCACA
idsA3_R	GCGCAAGCTTTTAGTTTAGGGAATGTTGCTCTTT
CgkA_F	ATATGAGCTCTATGAAAAAACCAAATTTTTATGGC
CgkA_R	GCGCAAGCTTTTACTCCACGAGTATCTTTTT

[0106] **2-2. *idsA3* 유전자 및 *cgkA* 유전자의 발현 확인**

[0107] 실시예 2-1에서 확보한 형질전환체의 단백질 발현을 확인하기 위해 His-Tag을 이용한 정제 및 SDS-PAGE를 수행하였다. 대장균 형질전환체를 1 mM IPTG 농도로 16 ℃에서 12시간 동안 진탕배양 후 원심분리하여 세포를 획득하였다. 상기 세포를 초음파를 이용하여 파쇄하고 원심분리하여 상등액을 준비하고 농축하여 *idsA3* 유전자에 대한 Iduronate-2-sulfatase 단백질 및 *cgkA* 유전자에 대한 Kappa-carrageenase 단백질을 얻은 후 SDS-PAGE에 로딩하였다. 그 결과 Iduronate-2-sulfatase 및 Kappa-carrageenase 사이즈와 동일한 위치에서 밴드가 나타나는 것을 확인하였다(도 3a).

[0109] **2-3. Iduronate-2-sulfatase 및 Kappa-carrageenase의 카라기난 분해능 확인**

[0110] 상기 Iduronate-2-sulfatase 및 Kappa-carrageenase의 활성을 구체적으로 확인하기 위하여, 정제된 Iduronate-2-sulfatase 및 Kappa-carrageenase의 이용하여, 카라기난을 기질로 하는 hydrolysis activity 분석을 수행하였다. 구체적으로 Hydrolysis activity의 측정을 위해서, 각각 10 mg/ml 의 효소들이 처리되었고 1 % (w/v)의 kappa-carrageenan이 이용되었다. 각각의 효소 및 기질은 1.0 mM $MgCl_2$, 1.0mM$MnCl_2$, 100 mM sodium acetate buffer (pH5.0)에서 30도에 반응하였다. 이후, 60도 5분에 반응한 뒤, 99도에서 열처리를 통해 반응을 중지킨 뒤, 각각 갈락토오즈와 Sulfate양의 측정을 통해 hydrolysis activity를 측정하였다. 도 3에서 Control은 50 mM citric acid buffer, IdsA3는 Iduronate-2-sulfatase 단일처리, CgkA는 Kappa-carrageenase 단일처리, CgkA and IdsA3는 Iduronate-2-sulfatase 및 Kappa-carrageenase의 복합처리를 의미한다.

[0111] 그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이 Iduronate-2-sulfatase 및 Kappa-carrageenase의를 동시에 처리한 경우, 카라기난을 기질로 사용하였을 때 각 효소를 단독으로 처리하는 경우와 비교하여 hydrolysis activity가 약 2배 증가하는 것을 확인하였다(도 3b). 또한, 카라기난에 Iduronate-2-sulfatase를 단독으로 처리를 진행하였을 때 약 2mM의 sulfate가 생산됨을 확인하였다(도 3c). 상기 결과를 통해 Iduronate-2-sulfatase의 처리가 카라기난의 잔기로 알려진 sulfate를 성공적으로 제거하고, sulfate의 제거를 통해 Kappa-carrageenase의 hydrolysis가 현저히 증가되는 것을 확인하였다.

[0112] 이러한 결과는 Iduronate-2-sulfatase 및 Kappa-carrageenase이 카라기난 분해 활성을 가져 해조류의 주성분인

카라기난을 갈락토오즈로 분해할 수 있다는 것을 의미하며, 카라기난의 분해를 통해 d-갈락토오즈의 생산을 확인함으로써 해양바이오 매스의 이용가능성 확인하였다.

[0114] **<실시예 3> 갈락토오즈 이용 경로가 도입된 형질전환 코리네박테리움 균주의 개발**

[0115] 상기 실시예 1 및 2에 결과에 따라 본 발명자들은 갈락토오즈 대사가 가능한 재조합 균주를 제작하고, 배지에 Iduronate-2-sulfatase 및 Kappa-carrageenase를 첨가한 후 카라기난을 단일 탄소원으로 하여 상기 재조합 균주를 배양한 후 갈락토오즈 이용 및 히스티딘의 생산능을 확인하였다.

[0116] 구체적으로, 히스티딘 생산경로가 강화된 형질전환 코리네박테리움 균주 (TDPH6)에 갈락토오즈 이용 경로(galactose uptake system)의 도입을 위해, *Saccharomyces cerevisiae* 유래 galactose transporter 유전자 및 갈락토오즈 대사를 위한 *E. coli* K-12 strain 내 Leloir pathway를 도입하였다(도 1 참조). 각각의 유전자들은 과발현 벡터인 pEKEx2 벡터로 도입되었다. Galactose transporter로 알려진 *gal2* 유전자(서열번호 10)는, *S. cerevisiae*의 유전체 DNA로부터 제한효소 서열을 포함하는 정방향, 역방향 프라이머 (Gal2_F, Gal2_R)를 이용하여 PCR을 통해 증폭되었으며 1725 bp의 서열을 확보하였다. 또한 갈락토오즈 이용 경로의 도입 및 강화를 위해 *galT* (서열번호 11, galactose-1-phophate uridylytransferase) 및 *galM* (서열번호 12, Aldose-1-epimerase) 유전자는 *E. coli*의 유전체 DNA로부터 제한효소 서열을 포함하는 정방향, 역방향 프라이머(GalT_F, GalT_R; GalM_F, GalM_R)를 이용하여 PCR을 통해 증폭되었으며, *galK* (서열번호 13, galactokinase) 유전자는 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)의 유전체 DNA로부터 제한효소 서열을 포함하는 정방향, 역방향 프라이머 (GalK_F, GalK_R)를 이용하여 PCR을 통해 증폭되었고, 각각 1296 bp, 1041 bp, 1047 bp의 서열을 확보하였다. 히스티딘 생산경로가 강화된 형질전환 코리네박테리움 균주에 *gal2, galT, galM* 및 *galK*를 포함하는 과발현 벡터를 도입하여 갈락토오즈 이용 경로가 도입된 형질전환 코리네박테리움 균주를 제작하고, 이의 갈락토오즈 이용 및 히스티딘의 생산능을 확인하였다. 모든 형질전환체들은 50 ml의 CN40 배지 (containing 10 g/L galactose)를 포함한 250 ml 진탕 삼각 플라스크에서 30 ° C, 200 rpm의 조건으로 36시간 배양하였다. 본 실험에서 사용된 재조합 벡터 및 균주는 표 7 및 8에 나타내었으며, 프라이머는 표 9에 나타내었다.

[0117] 그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, 갈락토오즈 이용 경로가 도입된 균주에서는 약 23% galactose를 소모하였고 약 150 mg의 히스티딘을 36시간에 생산하는 것을 확인하였다(도 4a). 또한, 6시간대 히스티딘 yield가 약 3 mg/g/h로 가장 높게 나타남을 확인하였다(도 4b). 이러한 결과를 통해 갈락토오즈 이용 경로가 도입된 형질전환 코리네박테리움 균주는 갈락토으즈를 소모하여 히스티딘을 생산할 수 있음을 확인하였다.

표 7

[0119]

벡터	특징
pEKEx2	*C. glutamicum-E. coli* shuttle vector, P_{tac},lacI,Kan^R,pBL1ori
pEKEx2::*hisG*::zwf::gnd*	pEKEx2, carrying *hisG** (C-terminal area of *hisG* was deleted), *zwf and gnd* genes originating from *C. glutamicum*
pEKEx2::*hisG*::zwf::gnd::prs*	pEKEx2::*hisG*::zwf::gnd*, carrying *prs* gene originating from *C. glutamicum*
pEKEx2::*hisG*::zwf::gnd::prs::hisD*	pEKEx2::*hisG*::zwf::gnd::prs*, carrying *hisD* gene originating from *C. glutamicum*
pMT-*tac*	*C. glutamicum-E. coli* shuttle vector, P_{tac},Amp^R,Cm^R,pCG1ori
pMT-*tac::purH::adk::ndk*	pMT-tac, carrying *purH, adk, ndk* genes originating from *C. glutamicum*
pMT-*tac::purH::adk::ndk::gal2KTM*	pMT-*tac::purH::adk::ndk, carrying gal2, galK, galT,and galM* (*gal2* is originating from *Saccharomyces cerevisiae*, *galT* and *galM* are originating from *E. coli* K-12, and *galK* is originating from *C. glutamicum*)

표 8

[0120]

균주	특징
TDPH6G2	TDP harboring pEKEx2::*hisG*::zwf::gnd::prs::hisD*, pMT-*tac*::*purH*::*adk*::*ndk*::*gal2KTM*

표 9

[0121]

프라이머	염기서열(5‘-3’)
Gal2_F	CCAAGCTTGCATGCCTGCAATGGCAGTTGAGGAGAACAA
Gal2_R	TGGCCATGTATATCTCCTTGTCGACTTATTCTAGCATGGCCTTGTACC
GalK_F	ATAGTCGACAAGGAGATATACATGGCCATTTGGCAGCCAA
GalK_R	ATAGGATCCCTAGCCCTGTTCCGCGAC
GalT_F	CCCGGGTACCGAGCTCGAATTAAGGAGATATACATGACGCAATTTAATCCCGT
GalT_R	GTAAAACGACGGCCAGTGAATTCTTACACTCCGGATTCGCGA
GalM_F	ACGTCGCGGAACAGGGCTAGAAGGAGATATACATGCTGAACGAAACTCCCGC
GalM_R	TCTCATCCGCCAAAACAGGCGGCCGCTTACTCAGCAATAAACTGATATTCCGT

[0123] **<실시예 6> 갈락토오즈 이용능이 도입된 균주의 갈락토오즈 이용 최적 배양조건**

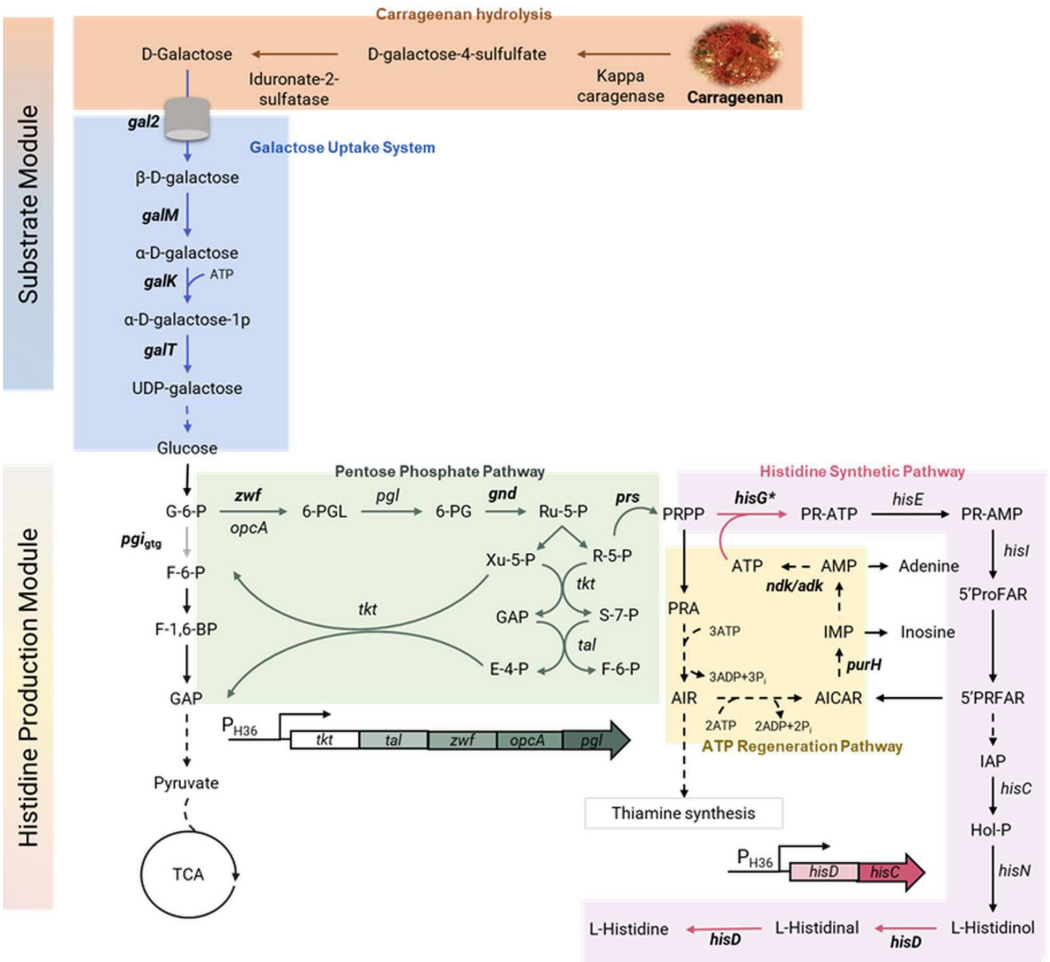
[0124] 갈락토오즈 이용능 증대를 위해 Fermentation을 통해 갈락토오즈 이용능이 도입된 균주의 최적 배양조건을 수립하였다. 상기 균주는 BHISG (20 g/L glucose, 37 g/L brain heart infusion, 91 g/L $C_6H_{14}O_6$, 20 g/L $C_6H_{12}O_6$, 25 μg/L kanamycin 및 10 μg/L chloramphenicol) 고체배지에서 30℃로 24시간 동안 배양한 뒤, pre-culture medium (3 g/L peptone, 1.2 g/L potassium dihydrogen phosphate, 2 g/L sodium citrate, 3 g/L yeast extract, 20 g/L glucose, 1 mg/L biotin, 1 mg/L cobalamine, 1 mg/L pantothenate, 1 mg/L thiamine HCL, 1x trace element, pH 7)에서 30℃, 200 rpm으로 24시간 동안 배양하였다. 이후, 2L의 CN40 medium (4.54 g/L peptone, 8.0 g/L ammonium sulfate, 2.0 g/L potassium dihydrogen phosphate, 20 g/L corn syrup, 2 g/L sodium citrate, 8 g/L yeast extract, 40 g/L galactose, 2 g/L $MgSO_4$, 10 mg/L biotin, 2 mg/L cobalamine, 2 mg/L pantothenate, 10 mg/L thiamine HCL, 1x trace element)에서 30 ℃, 200-600 rpm으로 45시간 동안 배양하였다. 배양 시, air는 2L/min, pH는 7.0으로 조절되었으며, DO는 20 아래로 내려갈시 rpm을 20씩 증가시켜 초반 200에서 600rpm을 최대로 배양되었다.

[0125] 그 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이 BHISG 배지 및 pre-culture medium에서 배양된 균주를 CN40 배지에 접종한 후 24시간이 경과하였을 때 갈락토오즈 이용능이 100%로 증대됨을 확인하여 최적 갈락토오즈 이용 배양조건을 수립하였다.

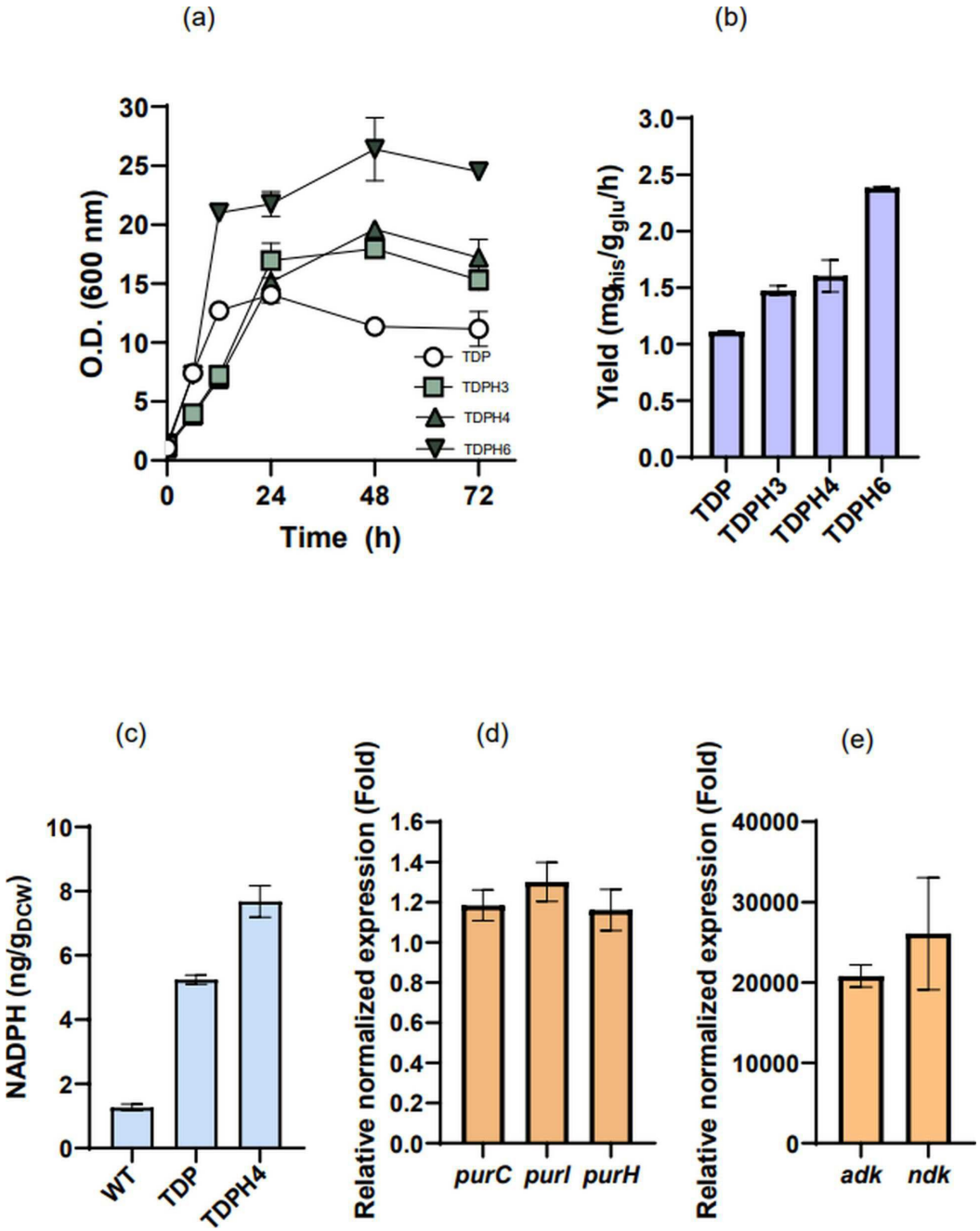
[0127] 이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 구체적인 실시예를 상세하게 설명되었으나, 본 발명의 사상을 이해하는 당업자는 동일한 사상의 범위 내에서 다른 구성요소를 추가, 변경, 삭제 등을 통하여, 퇴보적인 다른 발명이나 본 발명 사상의 범위 내에 포함되는 다른 실시예를 용이하게 제안할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상술한 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구의 범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구의 범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

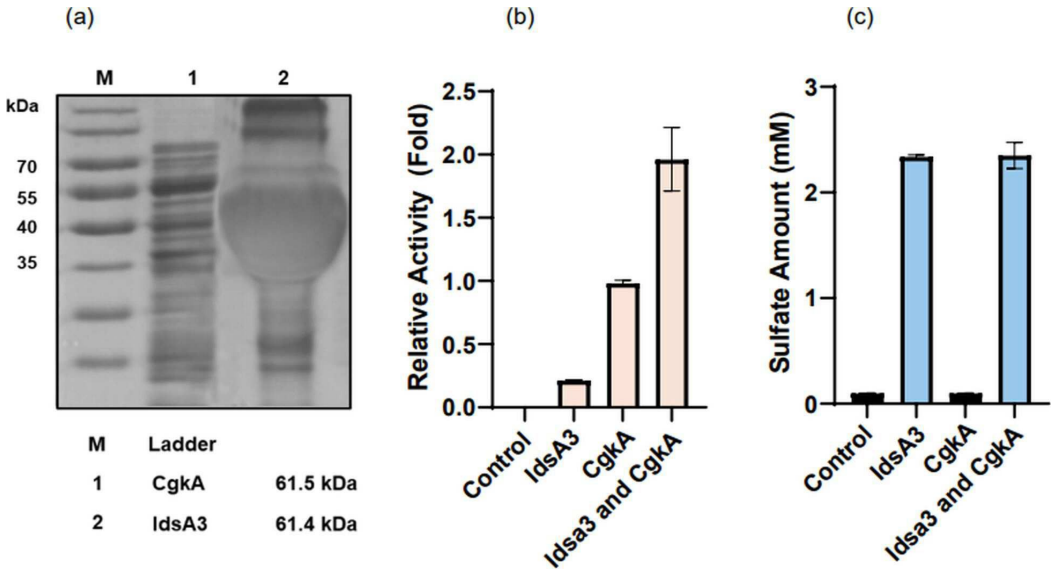
도면1


Substrate Module
Histidine Production Module
Carrageenan hydrolysis
D-Galactose
Iduronate-2-sulfatase
D-galactose-4-sulfulfate
Kappa caragenase
Carrageenan
gal2
Galactose Uptake System
β-D-galactose
galM
α-D-galactose
galK
ATP
α-D-galactose-1p
galT
UDP-galactose
Glucose
G-6-P
zwf
opcA
6-PGL
pgl
6-PG
gnd
Ru-5-P
prs
PRPP
pgi
F-6-P
F-1,6-BP
GAP
Xu-5-P
R-5-P
tkt
GAP
S-7-P
tal
E-4-P
F-6-P
Pentose Phosphate Pathway
P H36
tkt
tal
zwf
opcA
pgl
Pyruvate
TCA
Histidine Synthetic Pathway
hisG*
PR-ATP
hisE
PR-AMP
hisI
5'ProFAR
ATP
AMP
Adenine
ndk/adk
PRA
3ATP
IMP
Inosine
purH
3ADP+3Pi
AIR
AICAR
5'PRFAR
2ATP
2ADP+2Pi
ATP Regeneration Pathway
IAP
hisC
Hol-P
hisN
Thiamine synthesis
P H36
hisD
hisC
L-Histidine
hisD
L-Histidinal
hisD
L-Histidinol

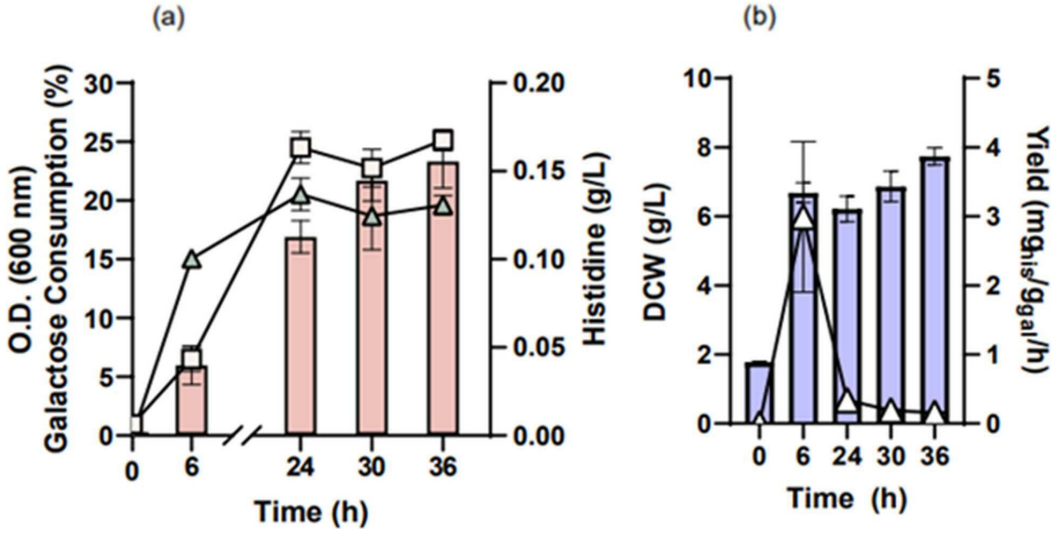
도면2


(a)
O.D. (600 nm)
Time (h)
TDP
TDPH3
TDPH4
TDPH6
(b)
Yield (mg$_{his}$/g$_{glu}$/h)
(c)
NADPH (ng/g$_{DCW}$)
WT
TDP
TDPH4
(d)
Relative normalized expression (Fold)
purC
purI
purH
(e)
Relative normalized expression (Fold)
adk
ndk

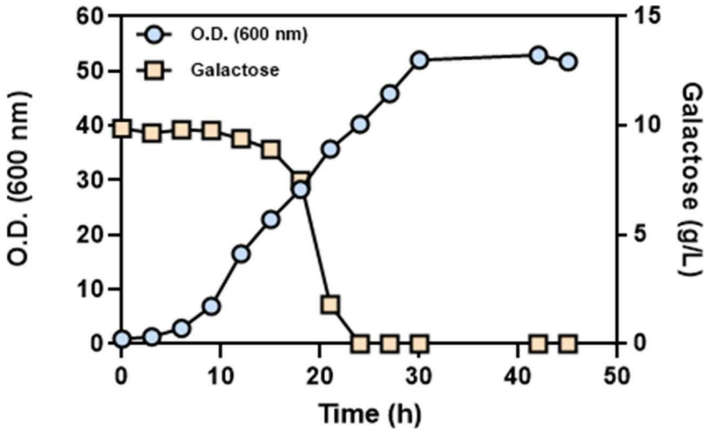
도면3


(a)
(b)
(c)
M
1
2
kDa
70
55
40
35
M Ladder
1 CgkA 61.5 kDa
2 IdsA3 61.4 kDa
Relative Activity (Fold)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Control
IdsA3
CgkA
Idsa3 and CgkA
Sulfate Amount (mM)
3
2
1
0
Control
IdsA3
CgkA
Idsa3 and CgkA

도면4


(a)
(b)
O.D. (600 nm)
Galactose Consumption (%)
Histidine (g/L)
Time (h)
0 6 24 30 36
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
DCW (g/L)
Yield (mg$_{his}$/g$_{gal}$/h)
Time (h)
0 6 24 30 36

도면5


O.D. (600 nm)
Galactose
O.D. (600 nm)
Galactose (g/L)
Time (h)
0 10 20 30 40 50
60
50
40
30
20
10
0
15
10
5
0

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.