

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(43) 국제공개일
2009년 7월 16일 (16.07.2009)

PCT

(10) 국제공개번호
WO 2009/088184 A2

- (51) 국제특허분류:
C12N 1/21 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2009/000017
- (22) 국제출원일: 2009년 1월 2일 (02.01.2009)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2008-0001441 2008년 1월 4일 (04.01.2008) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 씨제이제일제당 주식회사 (CJ CHEILJEDANG CORP.) [KR/KR]; 서울 중구 남대문로 5가 500번지, 100-749 Seoul (KR).
- (72) 발명자: 김
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 김철하 (KIM, Chul Ha) [KR/KR]; 서울 서초구 서초 4동 아크로비스타 C동 1010호, 137-921 Seoul (KR). 최종수 (CHOI, Jong Soo) [KR/KR]; 서울 강서구 화곡동 1091번지 대우푸르지오 136-203 157-010, 137-921 Seoul (KR). 김정환 (KIM, Jeong Hwan) [KR/KR]; 서울 송파구 가락 2동 극동아파트 1-1401, 138-743 Seoul (KR). 김형석 (KIM, Hyung Seok) [KR/KR]; 서울 강서구 가양동 92-1번지 CJ 제일제당 BIO 연구소, 157-200 Seoul (KR). 권중근 (KWON, Jung Gun) [KR/KR]; 서울 양천구 신월 6동 562-5 삼동아파트 3차 201호, 158-096 Seoul (KR). 안태민 (AHN, Tae Min) [KR/KR]; 경기 시흥시 월곶동 풍림아파트 202-206, 429-901 Gyeonggi-Do (KR). 황수연 (HWANG, Soo Youn) [KR/KR]; 경기

용인시 수지구 풍덕천 1동 동보아파트 102-801, 448-759 Gyeonggi-Do (KR). 심재익 (SIM, Jae Ick) [KR/KR]; 경기 이천시 증포동 선경 2차아파트 205-1604, 467-724 Gyeonggi-Do (KR). 백민지 (BAEK, Min Ji) [KR/KR]; 서울 관악구 봉천 3동 대우푸르지오아파트 101-802, 151-764 Seoul (KR). 권나라 (KWON, Na Ra) [KR/KR]; 서울 서대문구 창천동 67-32호, 120-180 Seoul (KR). 최혜진 (CHOI, Hye Jin) [KR/KR]; 서울 관악구 봉천 4동 877-22번지 201호, 151-054 Seoul (KR).

(74) 대리인: 리앤록 특허법인 (Y.P. LEE, MOCK & PARTNERS); 서울시 서초구 서초동 1575-1, 137-875 Seoul (KR).

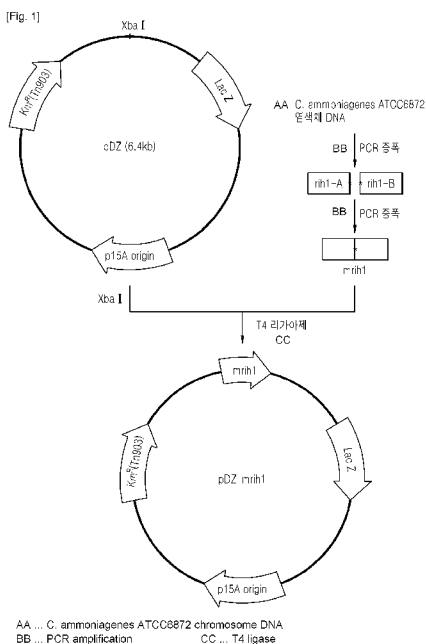
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: MICROORGANISM OF THE GENUS CORYNEBACTERIUM HAVING THE ABILITY TO PRODUCE INOSINE, AND AN INOSINE PRODUCTION METHOD USING THE SAME

(54) 발명의 명칭: 이노신 생산능을 갖는 코리네박테리움속 미생물 및 이를 이용한 이노신의 생산 방법



(57) Abstract: The present invention relates to a microorganism of the genus Corynebacterium having the ability to produce inosine, characterised in that the inosine breakdown pathway is blocked, and has additionally an adenine leakage requirement property and preferably a guanine leakage requirement property; and further relates to a method for producing inosine, comprising a step in which the said microorganism is cultured.

(57) 요약서: 본 발명은 이노신 분해 경로가 차단되고, 아데닌 누출형 요구성 및 바람직하게는 구아닌 누출형 요구성을 더 갖는 것을 특징으로 하는 이노신 생산능을 갖는 코리네 박테리움속 미생물 및 상기 미생물을 배양하는 단계를 포함하는, 이노신을 생산하는 방법에 관한 것이다.

WO 2009/088184 A2



NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

Description

이노신 생산능을 갖는 코리네박테리움속 미생물 및 이를 이용한 이노신의 생산 방법

Technical Field

- [1] 본 발명은 이노신 생산능을 갖는 코리네박테리움속 미생물 및 상기 미생물을 배양하는 단계를 포함하는 이노신 생산 방법에 관한 것이다.

Background Art

- [2] 이노신은 정미성 조미료로 각광받고 있는 이노신산(5'-inosinic acid)의 화학적 합성 및 효소전이 반응에 의한 합성에 있어서 중요한 기질이다. 또한 이노신은 핵산 생합성 대사계의 중간물질로 동식물의 체내에서 생리적으로 중요한 의미를 가질 뿐 아니라 식품 및 의약품 등 여러 분야에서 널리 이용되고 있다.
- [3] 이노신은 종래에는 주로 바실러스(Agric. Biol. Chem., 46, 2347 (1982); 대한민국 등록특허 제27280호) 또는 코리네박테리움 암모니아게네스(Agric. Biol. Chem., 42, 399 (1978)) 등의 미생물을 이용한 직접 발효법이나 5'-이노신산의 열분해법(일특공소 제43-3320호) 등을 이용하여 제조하였다. 그러나, 열분해법의 경우 5'-이노신산을 분해하기 위해 대량의 열 소비가 요구되어 실용성이 낮으며, 직접 발효법의 경우 대장균을 이용한 다양한 유전자형의 균주들이 개발되고 연구되었으나(Biosci Biotechnol Biochem. 2001 Mar;65(3):570-8) 이노신 생산균주의 역가가 낮아 생산원가가 높다는 단점이 있다. 또한 기존의 이노신 연구는 대장균과 바실러스에 집중되어 있었다.
- [4] 따라서, 이노신을 보다 고수율로 생산하여 고농도로 축적시킬 수 있는 균주 및 상기 균주를 이용한 이노신 생산방법의 개발이 여전히 요구되고 있다.
- [5] 이에, 본 발명자들은 미생물을 이용한 직접 발효법에 의해 이노신을 고농도/고수율로 생산하기 위하여 지속적인 연구를 수행하였으며, 그 결과 직접 발효법에 의해 보다 고농도 및 고수율로 이노신을 생산하는 미생물을 개발하여 본 발명을 완성하였다.

Disclosure of Invention

Technical Problem

- [6] 따라서, 본 발명의 목적은 이노신 분해 경로가 차단되고 아테닌 누출형 요구성을 가지며, 바람직하게는 구아닌 누출형 요구성을 더 갖는 것을 특징으로 하는 이노신을 고농도 및 고수율로 생산하는 코리네박테리움 속 미생물을 제공하는 것이다.
- [7] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 미생물을 배양하여 고농도 및 고수율로 이노신을 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

Technical Solution

- [8] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 이노신 분해 경로가 차단되며,

아데닌 누출형 요구성인 것을 특징으로 하는 이노신을 고농도 및 고수율로 생산하는 코리네박테리움(*Corynebacterium*)속 미생물을 제공한다. 본 발명의 미생물은 바람직하게는 구아닌 누출형 요구성을 더 가질 수 있다.

- [9] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 이노신을 생산하는 코리네박테리움속 미생물은 유전자 재조합에 의해 이노신 분해 경로가 차단되고, 즉 각각 리보뉴클레오시드 히드롤라아제(ribonucleoside hydrolase:rih) 1 과 리보뉴클레오시드 히드롤라아제 2 를 코딩하는 유전자가 염기의 삽입, 결실 또는 치환에 의한 서열 변이에 의해 불활성화되며, 동시에 인공변이에 의해 선별된 아데닌 누출형 요구성 및/또는 구아닌 누출형 요구성을 가질 수 있다.
- [10] 본 발명의 코리네박테리움속 미생물은 코리네박테리움 글루타미쿰, 코리네박테리움 이피시언스, 코리네박테리움 디프테리아, 및 코리네박테리움 암모니아게네스를 포함하며, 바람직하게는 코리네박테리움 암모니아게네스이고 가장 바람직하게는 코리네박테리움 암모니아게네스 ATCC 6872 로부터 변이된 코리네박테리움 암모니아게네스 CN04-0027 이다. 모 균주인 코리네박테리움 암모니아게네스 ATCC 6872 는 American Type Culture Collection 에서 제공하는 코리네박테리움 암모니아게네스의 야생형 균주로서 이노신을 전혀 생산하지 않는 균주이다.
- [11] 본 발명의 일 구체예에 따른 코리네박테리움 암모니아게네스 CN04-0027(KCCM 10905) 은 리보뉴클레오시드 히드롤라아제 1 을 코딩하는 유전자 rih1 과 리보뉴클레오시드 히드롤라아제 2 를 코딩하는 유전자 rih2 의 구조를 파괴하여 이노신 분해 경로가 차단됨과 동시에 아데닌 누출형 요구성 및 구아닌 누출형 요구성을 가져서 이노신을 보다 고농도 및 고수율로 배양액 중에 직접 축적시킬 수 있다.
- [12] 본 발명의 상세한 설명 및 실시예에서 언급되는 바와 같이, 본 발명에서 미생물의 배양을 위해 사용되는 영양배지, 최소배지, 종배지, 및 플라스크 발효배지의 일 예는 각각 하기의 표 1 에 표시된 조성으로 이루어진 배지일 수 있다. 그러나, 배지 조성은 표 1 에 제시된 것으로 제한되지는 않으며, 코리네박테리움속 미생물의 배양에 적합한 모든 배양 배지를 사용할 수 있다.
- [13] 표 1. 배지 조성

[Table 1]

[Table]

배지 종류	배지 조성
영양 배지	펩톤 1%, 육즙 1%, 염화나트륨 0.25%, 효모 추출물 1%, 아데닌 100mg/L, 구아닌 100mg/L, 한천 2%, pH 7.2
최소 배지	포도당 2%, 황산나트륨 0.3%, 인산제1칼륨 0.1%, 인산제2칼륨 0.3%, 황산마그네슘 0.3%, 염화칼슘 10mg/L, 황산철 10mg/L, 황산아연 1mg/L, 염화망간 3.6mg/L, L-시스테인 20mg/L, 칼슘판토테네이트 10mg/L, 티아민염산염 5mg/L, 바이오틴 30 µg/L, 아데닌 20mg/L, 구아닌 20mg/L, 한천 2%, pH 7.2
종 배지	포도당 5%, 펩톤 0.5%, 육즙 0.5%, 염화나트륨 0.25%, 효모 추출물 1%, 아데닌 100mg/L, 구아닌 100mg/L, pH 7.2
플라스크 발효 배지	글루타민산나트륨 0.1%, 염화암모늄 1%, 황산마그네슘 1.2%, 염화칼슘 0.01%, 황산철 20mg/L, 황산망간 20mg/L, 황산아연 20mg/L, 황산구리 5mg/L, L-시스테인 23mg/L, 알라닌 24mg/L, 니코틴산 8mg/L, 바이오틴 45ug/L, 티아민염산염 5mg/L, 아데닌 50mg/L, 구아닌 30mg/L, 인산(85%) 1.9%, 과당, 포도당 및 당밀을 혼합하여 환원당으로 6% 가 되게 첨가하여 사용, pH 7.2

- [14] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 본 발명의 미생물은 이노신 분해를 차단하기 위해 리보뉴클레오시드 히드롤라아제 1 및 리보뉴클레오시드 히드롤라아제 2를 코딩하는 *rih1* 및 *rih2* 유전자의 구조를 파괴하여 그 활성을 불활성화시키고 이노신이 배양액 내에 축적됨을 확인한 후, 인공변이를 통하여 아데닌 누출형 요구성을 선별하고, 추가적으로 구아닌 누출형 요구성인 것을 선별하여 완성된 이노신 생산성이 향상된 변이주일 수 있다.
- [15] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 본 발명의 미생물은 코리네박테리움 암모니아게네스 ATCC 6872 에서 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자에 의해 기발표된 리보뉴클레오시드 히드롤라아제1과 리보뉴클레오시드 히드롤라아제2를 코딩하는 유전자(이하 *rih1*, *rih2*) 에 염기의 삽입, 결실 또는 치환에 의해 종료 코돈이 생성되어 서열이 변형된 유전자를 운반하는 재조합 벡터에 의해 형질전환되고 이에 의해 단백질 번역이 저해되어 상기 효소가 불활성화되고, 이노신 분해 경로가 차단된 재조합 균주일 수 있다.
- [16] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 이노신 분해 경로가 차단된 재조합 균주에서 서열이 변형되어 불활성화된 리보뉴클레오시드 히드롤라아제 1 유전자 및 리보뉴클레오시드 히드롤라아제 2 유전자는 각각 서열번호 9 및 서열번호 10

으로 표시되는 서열을 가질 수 있다.

- [17] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 이노신 분해 경로가 차단된 균주에 추가적으로 아데닌 누출형 요구성 형질을 부여하기 위해 X 선, 자외선 또는 N- 메틸-N-니트로-N-니트로소구아닌(N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanine), 디에틸설파이드(diethylsulfide), 에틸아민(ethylamine)등의 화학적 변이 유발제가 처리될 수 있다. 상기 변이 유발제의 처리 후 균주를 상기 표 1 의 조성을 갖는 최소 배지에 도말 후 아데닌이 첨가되지 않은 배지에서 성장하나 아데닌이 첨가된 배지에서 성장이 더욱 촉진되는, 아데닌 누출형 요구성을 보이는 개별적인 콜로니(colony)를 수득하고, 이들을 각각 영양 배지에서 배양하고 종 배지에서 24 시간 배양한 후 발효 배지에서 5 내지 6 일간 배양하여, 발효 배양액에 축적되는 이노신 생산량이 가장 우수한 균주를 이노신 분해 경로가 차단되고, 아데닌 누출형 요구성을 갖는 균주로 선별할 수 있다.
- [18] 또한, 본 발명의 일 구체예에 따르면, 선별된 아데닌 누출형 요구성 균주를 상기와 동일한 방법으로, 즉, 화학적 변이 유발제로 처리하고, 구아닌 누출형 요구성 균주를 선별하고 영양배지 배양, 종배지 배양, 발효 배지 배양을 거쳐 발효 배양액에서 축적되는 이노신 생산량이 가장 우수한 균주를 이노신 분해 경로가 차단되고, 아데닌 누출형 요구성 및 구아닌 누출형 요구성을 갖는 이노신 생산 미생물로 선별할 수 있다.
- [19] 본 발명은 또한, 이노신 분해 경로가 차단되고, 아데닌 누출형 요구성 및 구아닌 누출형 요구성을 가지며, 이노신을 고수율 및 고농도로 생산하는 코리네박테리움속 미생물을 배양하여 상기 미생물 또는 배양액 중에 이노신을 생산하는 단계 및 상기 미생물 또는 배양액으로부터 이노신을 회수하는 단계를 포함하는, 이노신을 생산하는 방법을 제공한다.
- [20] 본 발명의 일 구체예에 따른 이노신을 생산하는 방법에서, 상기 코리네박테리움 속 미생물은 코리네박테리움 암모니아게네스 CN04-0027(KCCM 10905) 일 수 있다.
- [21] 본 발명에 따른 이노신을 생산하는 방법은 코리네박테리움 속 미생물을 배양하여, 미생물 또는 배양액 중에 이노신을 생산하는 단계를 포함한다.
- [22] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 코리네박테리움 속 미생물을 배양하는 단계는 균주를 적당한 탄소원, 질소원, 아미노산, 비타민 등을 함유한 통상의 배지 내에서 호기성 조건 하에서 온도, pH 등을 조절하면서 배양한다.
- [23] 이때 탄소원으로는 글루코오스, 살균된 전처리 당밀(즉, 환원당으로 전환된 당밀) 등과 같은 탄수화물이 사용될 수 있고, 질소원으로는 암모니아, 염화암모늄, 황산암모늄과 같은 각종 무기질소원 및 펩톤, NZ- 아민, 육류 추출물, 효모 추출물, 옥수수 침지액, 카세인 가수분해물, 어류 또는 그의 분해생성물, 탈지 대두 케이크 또는 그의 분해생성물 등 유기질소원이 사용될 수 있다. 무기화합물로는 인산제1칼륨, 인산제2칼륨, 황산마그네슘, 황산철, 황산망간, 탄산칼슘 등이 사용될 수 있으며, 이외에 필요에 따라 비타민 및

영양요구성 염기 등이 첨가될 수 있다.

- [24] 배양은 호기적 조건 하에서, 예를 들면 진탕 배양 또는 통기 교반 배양에 의해, 바람직하게는 28 내지 36 °C의 온도에서 수행된다. 배지의 pH는 배양하는 동안 pH 6 내지 8의 범위에서 유지하는 것이 바람직하다. 배양은 5 내지 6일 동안 수행될 수 있으며, 직접 발효에 의해 축적된 이노신은 HPLC를 이용하여 통상의 방법으로 분석될 수 있다.

- [25] 이하, 본 발명을 실시예에 의거 구체적으로 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 어떤 형태로든 실시예에 의해 제한되는 것을 의미하지는 않는다.

Advantageous Effects

- [26] 본 발명에 따른 코리네박테리움 암모니아게네스 CN04-0027(KCCM 10905) 균주를 이용하여 이노신을 생산하는 경우, 직접 발효법에 의해 이노신을 보다 고농도 및 고수율로 생산할 수 있으며 당 소비량의 감소에 따라 생산 비용이 절감되는 효과를 누릴 수 있다.

Description of Drawings

- [27] 도 1은 리보뉴클레오시드 히드롤라아제 1을 코딩하는 유전자의 구조를 파괴하기 위한 pDZmrih1 벡터의 작제도를 도시한다.
- [28] 도 2는 리보뉴클레오시드 히드롤라아제 2를 코딩하는 유전자의 구조를 파괴하기 위한 pDZmrih2 벡터의 작제도를 도시한다.

Mode for Invention

- [29] 실시예 1: 염색체 삽입용 벡터 (pDZ)를 이용한 리보뉴클레오시드 히드롤라아제 유전자의 구조가 파괴된 균주 제작
- [30] 본 실시예에서는 리보뉴클레오시드 히드롤라아제 1 및 리보뉴클레오시드 히드롤라아제 2를 코딩하는 유전자에서 염기의 삽입, 치환 또는 결실에 의한 서열 변이를 통해 상기 유전자를 불활성화시켜 이노신 분해 경로를 차단하고자 대장균 클로닝용 벡터 pACYC177 (New England Biolab, GenBank accession # X06402) 유래의 pDZ 벡터를 재조합 벡터로 이용하였다(국내 특허 07-94433).
- [31] 도 1 및 도 2는 각각 리보뉴클레오시드 히드롤라아제 1(rih1) 및 리보뉴클레오시드 히드롤라아제 2(rih2)를 코딩하는 유전자의 구조를 파괴하기 위한 pDZmrih1 및 pDZmrih2 벡터의 작제도를 도시한다.
- [32] 리보뉴클레오시드 히드롤라아제 1 및 리보뉴클레오시드 히드롤라아제 2를 코딩하는 유전자를 증폭하기 위해 먼저 코리네박테리움 암모니아게네스 ATCC 6872의 염색체 DNA를 주형으로 각각 서열번호 1 내지 4의 프라이머 및 서열번호 5 내지 8의 프라이머를 이용하여 하기와 같이 PCR을 수행하였다.
- [33] 코리네박테리움 암모니아게네스 ATCC 6872의 염색체 DNA를 주형으로, 각각 서열번호 1과 2 및 서열번호 3과 4의 프라이머를 이용한 PCR을 수행하여 rih1-A 단편 및 rih1-B의 단편을 수득하였다. 그 후, 수득된 rih1-A 및 rih1-B 단편을 주형으로 서열번호 1 및 4의 프라이머를 이용한 PCR을 수행하여 변형된

서열구조를 갖는 변이 유전자 단편인 *mrih1* 을 수득하였다. 또한, 리보뉴클레오시드 히드롤라아제 2 의 서열구조가 변형된 변이 유전자 단편인 *mrih2* 를 수득하기 위해, 상기 코리네박테리움 암모니아게네스 ATCC 6872 의 염색체 DNA 를 주형으로, 각각 서열번호 5 와 6 및 서열번호 7 과 8 의 프라이머를 이용한 PCR 을 수행하여 *rih2-A* 및 *rih2-B* 단편을 수득하고, 상기 수득된 *rih2-A* 및 *rih2-B* 를 주형으로 서열번호 5 와 8 의 프라이머를 이용한 PCR 을 수행하였다. 상기에서 *rih1-A*, *rih1-B*, *rih2-A* 및 *rih2-B* 를 수득하기 위해 수행된 PCR 의 조건은 94 °C에서 5 분의 예비 변성 및 그에 뒤이은 94 °C 30 초, 52 °C 30 초 및 72 °C 1 분으로 구성된 사이클의 20 회 반복 및 72 °C에서 7 분의 최종 신장이었고, 각 A 단편과 B 단편을 통합하여 변이된 유전자 단편을 얻기 위한 PCR 조건은 94 °C에서 5 분의 예비 변성 및 그에 뒤이은 94 °C에서 30 초, 50 °C에서 30 초 및 72 °C에서 1 분으로 구성된 사이클의 25 회 반복 및 72 °C에서 7 분의 최종 신장이었다. 상기 증폭된 *mrih1* 및 *mrih2* 와 pDZ 를 각각 제한효소 *XbaI* 으로 처리한 후, T4 리가아제에 의한 반응을 통해 유전자 구조 파괴용 재조합 벡터인 pDZ*mrih1* 과 pDZ*mrih2* 를 수득하였다.

- [34] 코리네박테리움의 염색체 상의 *rih2* 유전자의 서열을 염기 결실에 의해 변이시키기 위하여 제작된 pDZ*mrih2* 벡터를 야생형인 코리네박테리움 암모니아게네스 ATCC 6872 에 전기천공법(Electroporation)으로 형질전환한 후(Appl. Microbiol.Biotechnol. (1999) 52:541-545 에 의한 형질전환법 이용), 카나마이신 (kanamycin) 25mg/L 를 함유한 선별 배지에서 염색체상의 동 유전자와 상동성 재조합에 의해 상기 벡터가 삽입된 균주를 선별하였다. 벡터의 성공적인 염색체 삽입은 X-gal (5- 브로모-4-클로로-3-인돌릴-β-D-갈락토시드)을 포함한 고체 배지에서 청색을 나타내는가 여부를 조사하여 확인하였다. 1 차 재조합에 의해 벡터가 염색체에 삽입된 균주를 영양 배지에서 30 °C에서 8 시간 동안 진탕배양한 후, 각각 10⁻⁴ 으로부터 10⁻¹⁰ 까지 희석하여, X-gal 을 포함하고 있는 고체 배지에 도말하였다. 대부분의 콜로니가 청색을 띄는데 반해 낮은 비율로 나타나는 백색의 콜로니를 선별함으로써, 2 차 교차(crossover)에 의해 벡터 서열이 염색체로부터 제거된 균주를 선별하였다. 이에 의해, 코리네박테리움 암모니아게네스 ATCC 6872 균주의 염색체상의 *rih2* 유전자의 262 번째 G 가 결실된 균주를 수득하였다. 그 후, *rih1* 유전자에서 염기 치환에 의해 서열을 변이시키기 위해, 상기에서 수득된 *rih2* 유전자의 서열에 결실을 포함하는 균주에 pDZ*mrih1* 을 형질전환에 의해 도입하고, 상기 *rih2* 유전자의 변이 균주의 선별과 동일한 방법을 수행하여 *rih1* 유전자의 148 번째 G 가 T 로 치환되어 이노신 분해 경로가 차단된 코리네박테리움 암모니아게네스 CN04-0092 를 수득하였다. 상기 선별된 균주는 최종적으로 항생제 카나마이신에 대한 감수성 여부 및 PCR 을 통한 유전자 서열 분석을 통해 확인하였다. 상기 균주의 변이된 *rih1* 및 *rih2* 는 각각 서열번호 9 및 10 으로 표시되는 서열을 가졌다.

- [35] 실시예 2: 아데닌 누출형 요구성 변이주 **CN04-0093**의 선별
- [36] 실시예 1에서 수득된 코리네박테리움 암모니아게네스 **CN04-0092**를 포스페이트 완충액(pH 7.0) 혹은 시트레이트 완충액(pH 5.5)에 10^7 내지 10^8 세포/ml로 현탁한 후, N- 메틸-N-니트로- N- 니트로소구아닌을 최종농도가 10 내지 50 $\mu\text{g/ml}$ 가 되도록 첨가하여 실온 혹은 30 내지 32 °C에서 40 내지 90 분 동안 처리하여 돌연변이를 유발하였다. 원심분리 후 수득된 균주를 3 회에 걸쳐서 0.85% 식염수로 세척한 후, 이를 한천 2% 가 함유된 상기 표 1에 표시된 조성을 갖는 최소 배지에 적절히 희석하여 도말한 후, 온도 30 내지 34 °C에서 4 내지 5 일간 배양하여 콜로니를 얻었다. 수득된 콜로니들을 각각 아데닌이 0mg/l 및 100mg/l 이 되도록 첨가된 배지에 옮겨 3~4 일 배양 후 아데닌이 포함되지 않는 배지에서 성장하나 100mg/l 이 포함된 배지에서는 성장이 더욱 촉진되는 콜로니들을 선별하였다. 이와 같이 선별된 균주를 아데닌 누출형 요구성을 갖는 균주로 확인한 후, 수득된 각각의 콜로니를 상기 표 1에 표시된 조성을 갖는 영양 배지에서 배양하고, 뒤이어 종 배지에서의 24 시간 배양 및 발효 배지에서의 5 내지 6 일간의 배양을 통해 이노신 생산량이 가장 우수한 균주를 선별하여, **CN04-0093** 균주로 명명하였다.
- [37] 실시예 3: 구아닌 누출형 요구성 변이주 **CN04-0027(KCCM 10905)**의 선별
- [38] 실시예 2에서 수득된 코리네박테리움 암모니아게네스 **CN04-0093**을 포스페이트 완충액(pH 7.0) 혹은 시트레이트 완충액(pH 5.5)에 10^7 내지 10^8 세포/ml로 현탁한 후, N- 메틸-N-니트로- N- 니트로소구아닌을 최종농도가 10 내지 50 $\mu\text{g/ml}$ 가 되도록 첨가하여 실온 혹은 30 내지 32 °C에서 40 내지 90 분 동안 처리하여 돌연변이를 유발하였다. 원심분리 후 수득된 균주를 3 회에 걸쳐서 0.85% 식염수로 세척한 후, 이를 한천 2% 가 함유된 상기 표 1에 표시된 조성을 갖는 최소 배지에 적절히 희석하여 도말한 후, 온도 30 내지 34 °C에서 4 내지 5 일간 배양하여 콜로니를 얻었다. 수득된 콜로니들을 각각 구아닌이 0mg/l 및 100mg/l 이 되도록 첨가된 배지에 옮겨 3~4 일 배양 후 구아닌이 포함되지 않는 배지에서 성장하나 100mg/l 이 포함된 배지에서는 성장이 더욱 촉진되는 콜로니들을 선별하였다. 선별된 각각의 콜로니를 상기 표 1에 표시된 조성을 갖는 영양 배지에서 배양하고, 뒤이어 종 배지에서의 24 시간 배양 및 발효 배지에서의 5 내지 6 일간의 배양을 통해 이노신 생산량이 가장 우수한 균주를 선별하였다. 상기와 같이 선별된, 이노신 분해 경로가 차단되고, 아데닌 누출형 요구성 및 구아닌 누출형 요구성을 가지며, 이노신을 고수율 및 고농도로 생산하는 코리네박테리움 암모니아게네스를 코리네박테리움 암모니아게네스(*Corynebacterium ammoniagenes*) **CN04-0027**로 명명하고, 이를 부다페스트 조약 하에 서울 서대문구 홍제1동 소재의 한국미생물보존센터(Korean Culture Center of Microorganisms, KCCM)에 2007년 12월 20일자로 수탁번호 KCCM 10905로 기탁하였다.
- [39] 실시예 4: 삼각플라스크 발효 역가

- [40] 상기 표 1 에 표시된 조성을 갖는 종 배지 3ml 를 직경 18mm 의 시험관에 분주하고 120 °C 온도에서 10 분간 가압살균 후 코리네박테리움 암모니아게네스 ATCC 6872 균주, 리보뉴클레오시드 히드롤라아제 1 및 2 의 유전자가 파괴된 균주 CN04-0092, 리보뉴클레오시드 히드롤라아제 1 및 2 유전자의 파괴 및 아데닌 누출형 요구성을 갖는 균주 CN04-0093, 리보뉴클레오시드 히드롤라아제 1 및 2 유전자의 파괴, 아데닌 누출형 요구성 및 구아닌 누출형 요구성을 갖는 균주 CN04-0027 을 각각 접종하고 37 °C 온도에서 24 시간 진탕 배양하여 종 배양액으로 사용하였다. 상기 표 1 에 표시된 조성을 갖는 발효 배지 27ml 를 250ml 진탕용 삼각플라스크에 분주하고 120 °C 온도에서 10 분간 가압살균 후 종 배양액 3ml 을 접종한 다음 5 내지 6 일 동안 진탕 배양하였다. 진탕 배양기의 회전수는 분당 220 회(rpm), 온도 32 °C, pH 7.2 로 조절하였다. 배양 결과, 배지 내 이노신 축적량은 모 균주인 코리네박테리움 암모니아게네스 ATCC 6872 의 경우 0g/L 이었으며 CN04-0092 균주는 약 1g/l 었다 . 추가적으로 아데닌 누출형 요구성이 부여된 변이주인 CN04-0093 는 CN04-0092 보다 이노신 축적량이 약 2g/l 증가하였으며, 추가적으로 구아닌 누출형 요구성이 부여된 변이주인 CN04-0027 는 CN04-0093 보다 약 2g/l 가 증가한 약 5g/l 의 이노신을 생산했다. 각 균주의 이노신 생산성은 하기의 표 2 에 표시된다.

[41] 표 2

[42] [Table 2]

[Table]

균주	이노신 (g/l)	CN04-0092 대비 농도 증가 비율(%) Đ
ATCC6872	0	-
CN04-0092	0.9	-
CN04-0093	2.9	220%
CN04-0027	5.1	460%

Sequence List Text

- [43] <110> CJ Corporation
- [44] <120> Inosine producing microorganism belonging to the genus
- [45] Corynebacterium and process of producing inosine using the same
- [46] <160> 10
- [47] <170> KopatentIn 1.71
- [48] <210> 1
- [49] <211> 29
- [50] <212> DNA
- [51] <213> Artificial Sequence
- [52] <220>

- [53] <223> primer for rih1
- [54] <400> 1
- [55] gctctagaag ccggcggttc aggagtgg 29
- [56] <210> 2
- [57] <211> 21
- [58] <212> DNA
- [59] <213> Artificial Sequence
- [60] <220>
- [61] <223> primer for rih1
- [62] <400> 2
- [63] ttacagagtt tgggtgccgg c 21
- [64] <210> 3
- [65] <211> 21
- [66] <212> DNA
- [67] <213> Artificial Sequence
- [68] <220>
- [69] <223> primer for rih1
- [70] <400> 3
- [71] tgtaaaaagt caccaccaat g 21
- [72] <210> 4
- [73] <211> 27
- [74] <212> DNA
- [75] <213> Artificial Sequence
- [76] <220>
- [77] <223> primer for rih2
- [78] <400> 4
- [79] gctctagaag gagtcatatt gccggtg 27
- [80] <210> 5
- [81] <211> 29
- [82] <212> DNA
- [83] <213> Artificial Sequence
- [84] <220>
- [85] <223> primer for rih2
- [86] <400> 5
- [87] gctctagaac tagtggatct ttatgggtca 29
- [88] <210> 6
- [89] <211> 20
- [90] <212> DNA

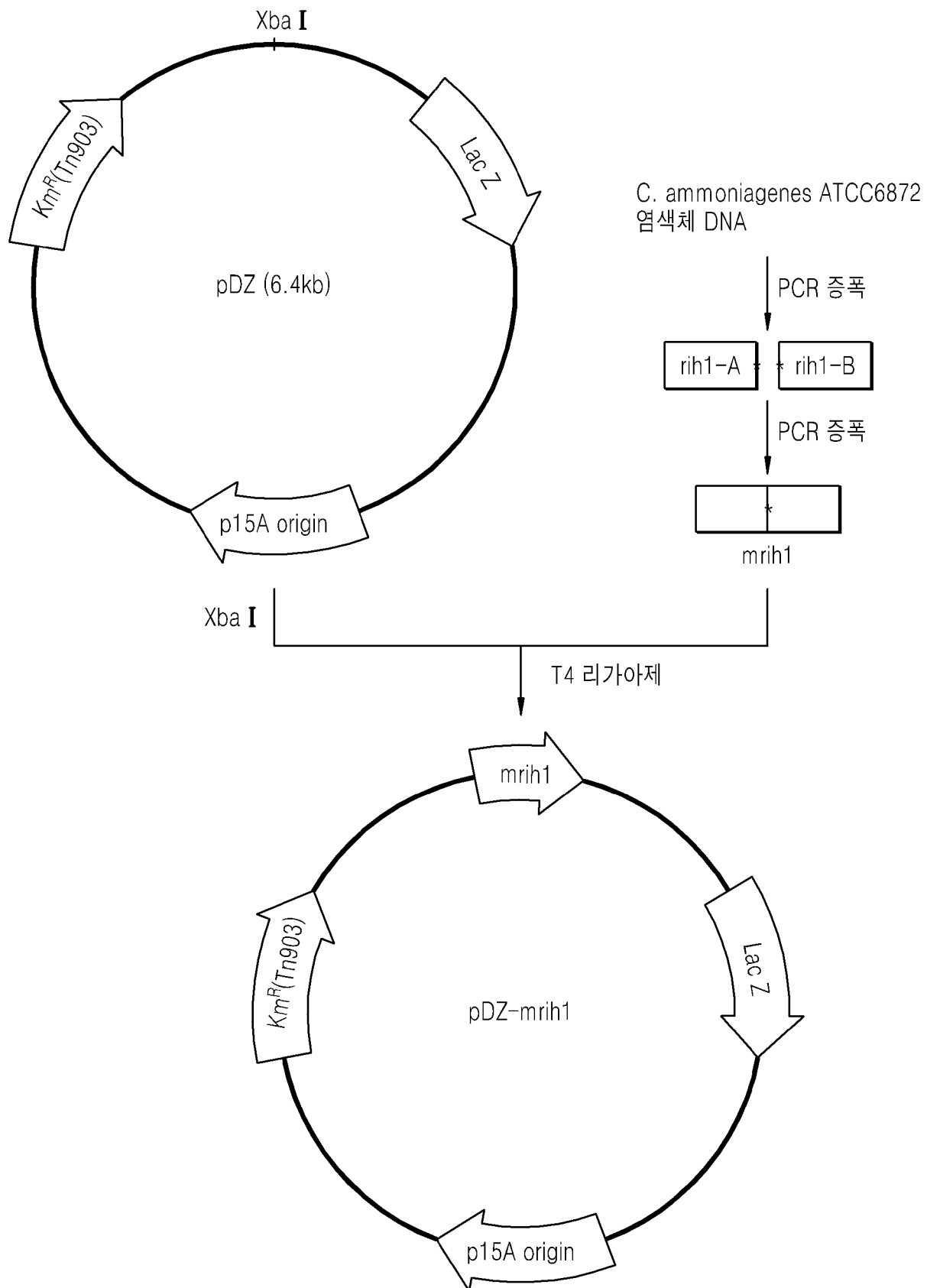
- [91] <213> Artificial Sequence
- [92] <220>
- [93] <223> primer for rih2
- [94] <400> 6
- [95] ctactcacc acgccattgc 20
- [96] <210> 7
- [97] <211> 20
- [98] <212> DNA
- [99] <213> Artificial Sequence
- [100] <220>
- [101] <223> primer for rih2
- [102] <400> 7
- [103] gagtagatat cgctgcagat 20
- [104] <210> 8
- [105] <211> 29
- [106] <212> DNA
- [107] <213> Artificial Sequence
- [108] <220>
- [109] <223> primer for rih2
- [110] <400> 8
- [111] gctctagagc aaccgccacg gccaacggg 29
- [112] <210> 9
- [113] <211> 1014
- [114] <212> DNA
- [115] <213> rih1
- [116] <400> 9
- [117] atgaacgcag attccacctc accggcacag aaaatcatcc tcgattgcga cccgggccat 60
- [118] gacgatgcca ttgccatgct cctggcacat ggcaatccta acctggagct tttagccgta 120
- [119] accaccgtcg ccggcaacca aactctggaa aaagtcacca ccaatgcgcg cgcggtagca 180
- [120] cgcgttgccg gtataccga cattcctttt gccgtggtg cctcgcgtcc gctgggtggc 240
- [121] ccgcaactta tccccgatga aatccacggc gattctggcc tcgacggccc acaactgcct 300
- [122] gagcctagtg tcccgtaga agaaatccac gcggtcaacc tcattgcca ggatcatctet 360
- [123] gagaatgaac ccggttccgt ggtcattatt cctaccggct ctttgactaa categcactt 420
- [124] ttgcgcgcga tgtaccaca gctggttgag cgcgttgccg gaatcacttt gatgggcggc 480
- [125] gggcaccaca ccggcaatat gactcctgct tctgagtcca atatcttggc tgaccagaa 540
- [126] gccgcagcga ttgtcttga agaactctgg ccagtaacca tggtcggact cgatgtcacc 600
- [127] caccaggtac tcgcgggtacc tgagcgcgatg gaacagctca aggccattgg caccgatgtt 660
- [128] gcgcaattta tcgcagagct cgtggaattc ttggtgctt cctacatgaa agagcgcaac 720

[129] taccggggcc cacctatgca cgatecgttg gctgtggcag cagttgccga tccatctatc 780
[130] ctgcgaactg ttcacgcccc gatttatgtg gaaactcaag gacagcacgc ccgcgggcaa 840
[131] accatcgteg atttcgccc cacttggtct aataatgacc cgagcggact aggggttacc 900
[132] gacgatcccg atttcgaggc cccgaatacc gccgtagccg tggacgtaga tgccgagaaa 960
[133] ttctgggata tgetggtcga tgcctaact cgattggca acaccaactt ttaa 1014
[134] <210> 10
[135] <211> 927
[136] <212> DNA
[137] <213> rih2
[138] <400> 10
[139] atgaagatga ttttagatct agacaccggt atcgatgatg ctttgcgtt ggcctatgcc 60
[140] atgcacacc cgggtatcga ttgtattggt gtcaccggaa cttatggcaa tgtcaccatt 120
[141] gaacaaggca tggccaatac ccaggcactg ttgacgtac tgggcgcagc cgatgtgccc 180
[142] gtatatgccg gacgcgtat cgatggcttt gaggtatctg aagcctctgc tegtattcac 240
[143] gggcgcaatg gcgtgggtga ggtagatata gctgcagatg atgcgcaatc tgetggcgat 300
[144] gcacttgaat ttttaagcga agcagcggcg aaatacggcg atgatttggg gatcgttccc 360
[145] accggcgcgc aaacgacgt tgcgcgggct ttagaaaaag atcctgcatt gcgaggcatt 420
[146] cgcattgtca gcatgggcgg cgccttaacc gtcccgggaa atgtgtcacc agcggctgag 480
[147] gcaaatatct cccaggaccc agtctcttc aacactgtgt accagtggc tgaggatatg 540
[148] accatgggtg gcttggtatg cactatgcaa acacagctca cacgtgctga ggcggattcg 600
[149] tggcggggaa cgccagctgg agatgtcttt gctgatatgg ccggctatta catcgacgt 660
[150] tatcaggaaa ataatecgca catggatggc tgcgccttgc atgaccggt ggccgtggcg 720
[151] gttgcagctg atcctgactt ggtggattgt ttgattctc cctgcaggt cgataccgaa 780
[152] ggccccacca ttggtgcac aattggacgg tgggatggct ctgaggtaga aaccgtgta 840
[153] gccgttgggg taaacgtgga tagttctgt ccgatttca tcgacaagct ggcgcaacta 900
[154] tttggacgat tggtcacaaa ccagtaa 927

Claims

- [1] 리보뉴클레오시드 히드롤라아제1(rih1) 및 리보뉴클레오시드 히드롤라아제2(rih2)를 코딩하는 유전자가 불활성화되어 이노신 분해가 차단되며, 아데닌 누출형 요구성인 것을 특징으로 하는 이노신 생산능을 가지는 코리네박테리움속 미생물.
- [2] 제1항에 있어서, 구아닌 누출형 요구성을 더 갖는 것인 코리네박테리움속 미생물.
- [3] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 불활성화된 리보뉴클레오시드 히드롤라아제 1 을 코딩하는 유전자(rih1) 및 상기 리보뉴클레오시드 히드롤라아제 2 를 코딩하는 유전자(rih2)는 각각 서열번호 9 및 서열번호 10 으로 표시되는 서열을 갖는 것인 코리네박테리움속 미생물.
- [4] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 코리네박테리움속 미생물은 코리네박테리움 암모니아게네스인 것인 코리네박테리움속 미생물.
- [5] 제4항에 있어서, 상기 코리네박테리움속 미생물은 코리네박테리움 암모니아게네스 CN04-0027(KCCM 10905) 인 것인 코리네박테리움속 미생물.
- [6] 제1항 또는 제2항에 따른 미생물을 배양하여 상기 미생물 또는 배양액 중에 이노신을 생산하는 단계; 및 상기 미생물 또는 배양액으로부터 이노신을 회수하는 단계를 포함하는, 이노신을 생산하는 방법.

[Fig. 1]



[Fig. 2]

