

(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.⁶

C12N 15/52

C12N 1/21

(11) 공개번호 특2000-0029691

(43) 공개일자 2000년05월25일

(21) 출원번호 10-1999-7000770

(22) 출원일자 1999년01월29일

번역문제출일자 1999년01월29일

(86) 국제출원번호 PCT/US1997/13359 (87) 국제공개번호 WO 1998/04715

(86) 국제출원출원일자 1997년07월30일 (87) 국제공개일자 1998년02월05일

(81) 지정국 AP ARIP0특허 : 캐나 레소토 말라위 수단 스와질랜드 우간다 가나 징바브웨

EA 유라시아특허 : 아르메니아 아제르바이잔 벨라루스 키르기즈 카자흐스탄 몰도바 러시아 타지키스탄 투르크메니스탄

EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 독일 덴마크 스페인 프랑스 영국 그리스 아일랜드 이탈리아 룩셈부르크 모나코 네덜란드 포르투칼 스웨덴 핀란드

OA OAPI특허 : 부르키나파소 베냉 종앙아프리카 콩고 코트디브와르 카메룬 가봉 기네 말리 모리타니 니제르 세네갈 차드 토고

국내특허 : 알바니아 아르메니아 오스트리아 오스트레일리아 아제르바이잔 보스니아-헤르체고비나 바베이도스 불가리아 브라질 벨라루스 캐나다 스위스 총국 쿠바 체코 독일 덴마크 에스토니아 스페인 핀란드 영국 그루지야 헝가리 이스라엘 아이슬란드 일본 캐나 키르기즈 북한 대한민국 카자흐스탄 세인트루시아 스리랑카 라이베리아 레소토 리투아니아 룩셈부르크 라트비아 몰도바 마다가스카르 마케도니아 몽고 말라위 멕시코 노르웨이 뉴질랜드 슬로베니아 슬로바키아 타지키스탄 투르크메니스탄 터키 트리니다드토바고 우크라이나 우간다 우즈베키스탄 베트남 폴란드 포르투칼 루마니아 러시아 수단 스웨덴 싱가포르 가나 시에라리온 유고슬라비아 징바브웨

(30) 우선권주장 60/022,407 1996년07월30일 미국(US)

(71) 출원인 아처 다니엘 미드랜드 캠퍼니

(72) 발명자 미국, 일리노이 62526, 테카투르, 박스 1470
왕명-더

미국캘리포니아주92128샌디에고밀피트례로로드12037

브래드쇼질에스

미국일리노이주62526데카터해롤드서클899

스위셔스타시아엘

미국일리노이주62526데카터이스트힌즈데일애비뉴1643

리아우형밍제임스

미국일리노이주61821샴페인갤런드라이브1013

행크풀디

미국일리노이주61801어바나노스애비309

바인더토마스피

미국일리노이주62522데카터웨스트패커드2323

(74) 대리인 나영환, 이상섭

심사청구 : 없음(54) 에스케리챠콜리의신규균주, 그제조방법및그균주를엘-트레오닌생산을위한발효공정에사용하는용도요약

본 발명은 에스케리챠 콜리의 신규 균주 및 이들 미생물을 포함하는 발효 공정에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 유전적으로 변형된 에스케리챠 콜리 균주 및 이것을 아미노산, 특히 트레오닌과 같은 아스파르테이트군의 아미노산들의 생산에 사용하는 용도에 관한 것이다. 본 발명은 또한 아미노산의 발효 생산에 사용하는 이. 콜리 균주의 제조 방법에 관한 것이다.

대표도

도5

색인어

아미노산 생산 이. 콜리 균주

영세서

기술분야

본 발명은 에스케리차 콜리의 신규 균주 및 이 미생물을 포함하는 발효 공정에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 유전적으로 변형된 에스케리차 콜리 균주 및 이것을 아미노산, 특히 트레오닌과 같은 아스파르테이트군의 아미노산들의 생산에 사용하는 용도에 관한 것이다. 본 발명은 또한 아미노산의 발효 생산에 사용하는 이. 콜리 균주의 제조 방법에 관한 것이다.

배경기술

에스케리차 콜리에서, 아미노산 L-트레오닌, L-이소루이신, L-리신 및 L-메티오닌은 아래와 같은 공통 생합성 경로를 통해 아스파르테이트(아스파르긴산)로부터 그 탄소 원자의 전부 또는 일부를 유도한다(G.N. Cohen, "The common pathway to lysine, methionine and threonine," 147-171면, *Amino Acids: Biosynthesis and Genetic Regulation*, K.M. Herrmann and R.L. Somerville 편집, Addison-Wesley Publishing Co., Inc., Reading, Mass. (1983)):

아스파르테이트 → 아스파르틸 포스페이트 → 아스파르테이트 세미알데하이드 → 호모세린 → → MET/THR/ILE
 ↓
 LYS

이러한 공통 경로의 첫 번째 반응은 3개의 별개의 아스파르테이트 키나제(AK I, II 또는 III)중 하나에 의해 촉매되는데, 이를 촉매하는 각각 별개의 유전자에 의해 암호화되며 그 활성 및 합성이 조절되는 방식에 있어 서로 상이한 것이다. 예를 들면, 아스파르테이트 키나제 I은 *thrA*에 의해 암호화되고, 그 활성은 트레오닌에 의해 저해되며(inhibit), 그 합성은 트레오닌과 이소루이신의 공동 작용에 의해 억제된다(repress). 그러나, AK II는 *metL*에 의해 암호화되고, 그 합성은 메티오닌에 의해 억제된다(그 활성이 메티오닌에 의해 또는 메티오닌, 리신, 트레오닌 및 이소루이신의 합동 작용에 의해 저해되지는 않지만[F. Falcoz-Kelly 등, *Eur. J. Biochem.* 8:146-152(1969); J.C. Patte 등, *Biochim. Biophys. Acta* 136:245-257 (1967)]). AK III은 *lysC*에 의해 암호화되고, 그 활성 및 합성은 리신에 의해 각각 저해 및 억제된다.

AK중 I 및 II의 두 개는 별개의 단백질이 아니라, 각각 아스파르테이트 세미알데하이드를 호모세린으로 환원시키는 반응을 촉매하는 호모세린 디하이드로게나제 I 또는 II를 포함하는 복합 효소의 도메인이다(P. Truffa-Bachi 등, *Eur. J. Biochem.* 5:73-80 (12968)). 그러므로, 호모세린 디하이드로게나제 I은 *thrA*에 의해 암호화되며, 그 합성은 트레오닌과 이소루이신에 의해 억제되고, 그 활성은 트레오닌에 의해 저해된다. HD II는 *metL*에 의해 유사하게 암호화되고, 그 합성은 메티오닌에 의해 억제된다.

트레오닌 생합성은 다음과 같은 추가의 반응을 포함한다: 호모세린 → 호모세린 포스페이트 → 트레오닌. 호모세린의 인산화는 호모세린 키나제에 의해 촉매되는데, 이 단백질은 *thrB*에 의해 암호화된 두 개의 동일한 29 kDa 서브유닛으로 구성되고 그 활성은 트레오닌에 의해 억제된다(B. Burr 등, *J. Biochem.* 62:519-526 (1976)). 최종 단계인 호모세린 포스페이트의 L-트레오닌으로의 복합 전환 반응은 트레오닌 신타제, 즉 *thrC*에 의해 암호화된 47 kDa 단백질에 의해 촉매화된다(C. Parsot 등, *Nucleic Acids Res.* 11:7331-7345 (1983)).

thrA, *thrB* 및 *thrC* 유전자는 모두 이. 콜리의 유전자 지도상의 0분 위치에 위치한 단일 오페론인 *thr* 오페론에 속한다(J. Theze and I. Saint-Girons, *J. Bacteriol.* 118:990-998 (1974); J. Theze 등, *J. Bacteriol.* 117:133-143 (1974)). 이들 유전자는 각각 아스파르테이트 키나제 I-호모세린 디하이드로게나제 I, 호모세린 키나제 및 트레오닌 신타제를 암호화한다. 이들 효소의 생합성은 트레오닌 및 이소루이신에 의한 다중적 억제의 자배를 받는다(M. Freundlich, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 10:277-282 (1963)).

조절 영역은 *thr* 오페론의 첫 번째 구조 유전자의 상류에서 발견되고, 그 서열은 결정되었다(J.F. Gardner, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 미국 76:1706-1710 (1979)). 전사 개시 부위의 하류의 *thr* 감쇄신호(attenuator)는 리더 펩티드를 암호화하는 서열을 포함하며; 이 서열은 8개의 트레오닌 코돈 및 4개의 이소루이신 코돈을 포함한다. *thr* 감쇄신호는 또한 중전된 트레오닐-tRNA 및 이소루이실-tRNA의 레벨에 따라 *thr* 오페론에서 구조 유전자의 RNA 폴리머라제 전사를 허용 또는 방지하는 상호 배타적인 고전적인 2차 구조를 포함한다.

자연적 생합성을 통해 고레벨의 아미노산 생산과 관련한 문제(예: 목적 생성물에 의한 *thr* 오페론의 억제)로 인해, 박테리아 균주는 피드백에 대한 내성이 있는 효소를 암호화하는 *thrA* 유전자를 가진 *thr* 오페론을 포함하는 플라스미드를 보유하는 것으로서 생성되었다. 그러한 플라스미드를 사용하여, 브레비박테리움 플라비움(*Brevibacterium flavum*), 세라티아 마르세센스(*Serratia marcescens*) 및 에스케리차 콜리와 같은 광범위한 미생물을 이용하는 발효 공정에 의해 산업적 규모로 L-트레오닌이 생산되었다.

예를 들면, 플라스미드 pVIC40을 포함하는 이. 콜리 균주 BKIIM B-3996(Debabov 등, 미국 특허 제

5,175,107호)은 36 시간내에 약 85g/L를 생산한다. 숙주는 결합성 트레오닌 신타제로 인해 트레오닌 요구성 균주이다. BKIIIM B-3996에서, 숙주는 트레오닌 생합성에 필요한 중대한 효소 활성, 즉 피드백 내성의 AK I-HD I, 호모세린 키나제 및 트레오닌 신타제를 제공하는 재조합 플라스미드 pVIC400이다. 이 플라스미드는 또한 숙주의 트레오닌 영양요구성을 상보한다.

이. 콜리 균주 29-4(E. Shimizu 등, *Biosci. Biotech. Biochem.* 59:1095-1098 (1995))가 재조합 이. 콜리 트레오닌 생산자의 또 하나의 예이다. 균주 29-4는 트레오닌 대량 생산 돌연변이 균주인 이. 콜리 K-12(β IM-4)(이. 콜리 균주 ATCC 21277에서 유래함)의 thr 오페론을 플라스미드 pBR322내로 클로닝한 다음, 모균주내로 도입시켜(K. Wiwa 등, *Agric. Biol. Chem.* 47:2329-2334 (1983)) 구성하였다. 균주 29-4는 72 시간내에 약 65 g/L의 L-트레오닌을 생산한다.

유사하게 구성된 재조합 균주는 기타 유기체를 사용하여 만들었다. 예를 들면, 에스. 마르세센스 균주 T2000은 피드백 내성 thrA 유전자 생성물을 암호화하고, 96 시간내에 약 100 g/L의 트레오닌을 생산하는 thr 오페론 보유 플라스미드를 포함한다(M. Masuda 등, *Applied Biochemistry and Biotechnology* 37:255-262 (1992)). 이들 균주는 모두 상기 효소를 대량 발현시키는 트레오닌 생합성 효소를 암호화하는 유전자의 다수 사본을 보유한 플라스미드를 포함한다. 트레오닌 생합성 효소를 암호화하는 플라스미드-유래 유전자, 특히 피드백 내성의 AK I-HD I을 암호화하는 thrA 유전자의 상기 대량 발현으로 인해 이들 균주는 다량의 트레오닌을 생산할 수 있게 된다. 플라스미드 보유 미생물의 기타 예는 미국 특허 제4,321,325호, 제4,347,318호, 제4,371,615호, 제4,601,983호, 제4,757,009호, 제4,945,058호, 제4,946,781호, 제4,980,285호, 제5,153,123호 및 제5,236,831호에 기재되어 있다.

그러나, 이들과 같은 플라스미드 보유 균주는 아미노산의 상업적 발효 생산에 대한 그 유용성이 제한된다는 문제점을 갖고 있다. 예를 들면, 이들 균주의 심각한 문제점은 플라스미드 보유 균주의 완전성이 세포 성장 및 분열중의 플라스미드의 잠재적인 상실로 인해 발효 공정 전반을 통해 유지되도록 하여야 한다는 점이다. 이 문제를 피하기 위해, 플라스미드상에 항생물질 내성 유전자를 이용하는 방법과 같이 배양중에 플라스미드가 없는 세포를 선택적으로 제거할 필요가 있다. 그러나, 이러한 해결책은 발효 배지에 하나 이상의 항생물질을 첨가할 필요가 있어서 대규모 발효에는 실용적이지 못하다.

플라스미드 보유 균주의 또 다른 심각한 문제점은 플라스미드 안정성이다. 당해 유전자가 플라스미드상에 암호화되어 있는 효소의 대량 발현은 실용적인 발효 공정에 필수적인 것으로서, 종종 플라스미드 불안정성을 초래한다(E. Shimizu 등, *Biosci. Biotech. Biochem.* 59:1095-1098 (1995)). 플라스미드 안정성은 또한 배양 온도 및 배양 배지중의 용존 산소의 레벨과 같은 인자에도 의존된다. 예를 들면, 플라스미드 보유 균주 29-4는 보다 낮은 배양 온도(30°C 대 37°C) 및 보다 고레벨의 용존 산소에서 더 안정하였다(E. Shimizu 등, *Biosci. Biotech. Biochem.* 59:1095-1098 (1995)).

상기한 것들보다 덜 효율적이지만 플라스미드 비보유 미생물도 트레오닌 생산자로서 사용되었다. H-8460과 같은 이. 콜리 균주는 일련의 통상의 돌연변이 유발 및 여러 가지 대사 유사물에 대한 내성에 의한 선별에 의해 얻어지는 균주로서, 70 시간내에 75 g/L의 L-트레오닌을 생산한다(Kino 등, 미국 특허 제5,474,918호). 균주 H-8460은 재조합 플라스미드를 보유하지 않으며, 염색체상에 트레오닌 생합성 유전자의 사본을 1개 가지고 있다. BKIIIM B-3996과 같은 플라스미드 보유 균주에 비교되는 이 균주의 생산성이 낮은 것은 이들 플라스미드 비보유 균주가 단 1개 사본의 트레오닌 생합성 유전자를 보유하기 때문에 보다 낮은 효소 활성(특히 thr 오페론에 의해 암호화되는 것들)을 갖기 때문인 것으로 생각된다. 적합한 플라스미드 비보유 미생물의 다른 예는 미국 특허 제5,376,538호, 제5,342,766호, 제5,264,353호, 제5,217,883호, 제5,188,949호, 제5,164,307호, 제5,098,835호, 제5,087,566호, 제5,077,207호, 제5,019,503호, 제5,017,483호, 제4,996,147호, 제4,463,094호, 제4,452,890호, 제3,742,144호, 제3,711,375호, 제3,684,654호, 제3,684,653호, 제3,647,628호, 제3,622,453호, 제3,582,471, 제3,580,810호, 제3,984,830 및 제3,375,173호에 기재되어 있다.

이. 콜리의 플라스미드 보유 균주 및 비보유 균주 양자 모두에서, thr 오페론은 특정 균주의 각각의 천연 트레오닌 프로모터에 의해 제어된다. 상기한 바와 같이, 천연 프로모터의 발현은 다수의 트레오닌 및 이소루이신 코돈을 보유하고 리더 펩티드를 암호화하는 DNA 영역에 의해 제어되는 감쇄 메카니즘에 의해 조절된다. 이 영역은 트레오닐-tRNA 및 이소루이시닐-tRNA의 레벨을 감지하는 리보솜에 의해 해독된다. 이들 레벨이 리더 펩티드를 해독하기에 충분한 경우에, 전사는 조기 종결되나, 이 레벨이 리더 펩티드를 해독하기에 불충분한 경우에, 전사는 종결되지 않고, 전체 오페론이 전사되고, 해독이 뒤따르며, 트레오닌 생합성 효소의 생산이 증가하게 된다. 따라서, 트레오닐-tRNA 및/또는 이소루이시닐-tRNA 레벨이 낮은 경우, thr 오페론이 최대로 전사되며, 트레오닌 생합성 효소가 최대로 만들어진다.

이. 콜리 트레오닌 생산 균주 BKIIIM B-3996에서, 플라스미드의 트레오닌 오페론은 그 천연 프로모터에 의해 제어된다. 결과적으로, 균주에 트레오닌 및/또는 이소루이신이 부족할 때만, thr 오페론이 최대로 발현된다. 트레오닌 생산 균주에서 트레오닌의 부족은 일어날 수 없기 때문에, 이들 균주는 이소루이신에 대해 영양요구성으로 되어 보다 고레벨의 효소 활성을 나타냈다.

감쇄 제어를 극복하기 위한 또 한 가지 방법은 세포내 트레오닐-tRNA 및/또는 이소루이시닐-tRNA의 레벨(들)을 낮추는 것이다. 예를 들면, 트레오닌에 대해 200배 감소된 외관상 친화도를 나타내는 트레오닐-tRNA 신타제를 보유하는 thrS 돌연변이체는 thr 오페론의 대량 발현을 초래하는데, 이는 트레오닐-tRNA의 낮은 레벨 때문인 것으로 보인다(E.J. Johnson 등, *J. Bacteriol.* 129:66-70 (1977)).

그러나, 상기 균주를 사용하는 발효 공정에서, 세포는 그 결합성 이소루이신 생합성으로 인해 성장 단계에서 이소루이신으로 보충되어야 한다. 결국, 생산 단계에서, 세포는 이소루이신이 결핍되어 트레오닌 생합성 효소의 발현이 유도된다. 그러므로, 트레오닌 생합성 효소의 발현을 제어하기 위해 천연의 트레오닌 프로모터를 사용하는 주요한 단점은 세포들에 이소루이신이 보충되어야 한다는 점이다.

또한, 항생물질 보렐리딘이 트레오닐 tRNA-신터타제(synthetase)의 효소 활성을 감소시키고, 따라서 이. 콜리의 성장을 저해하는 것으로 알려져 있다(G. Nass 등, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 34:84 (1969)). 이러한 감소된 활성을 고려하여, 이. 콜리의 특정 보렐리딘-민감성 균주를 이용하여 고레벨의 트레오닌을 생산하여 왔다(일본 공개 특허출원 제6752/76; 미국 특허 제5,264,353호). 보렐리딘을 배양물

에 첨가하면 L-트레오닌의 수율이 증가하는 것으로 확인되었다. 브레비박테리움 및 코리네박테리움의 보렐리딘-민감성 균주를 사용하여 고레벨의 트레오닌을 생산하기도 하였다(일본 특허 제53-101591호).

이. 콜리의 보렐리딘 내성 돌연변이체는 트레오닐 tRNA-신서타제 활성의 변화를 유사하게 나타낸다. 보다 구체적으로, 보렐리딘 내성 이. 콜리는 다음 특징중 하나를 나타내는 것으로 나타났다: (i) 야생형 트레오닐 tRNA-신서타제 레벨의 구성적 증가; (ii) 트레오닐 tRNA-신서타제의 구조적 변형; 또는 (iii) 막 변화에 의한 것일 수 있는 일부 미지의 세포 변형(G. Nass and J. Thomale, FEBS Lett. 39:182-186 (1974)). 그러나, 이들 돌연변이 균주는 어느 것도 L-트레오닌의 발효 생산에는 사용된 바 없다.

상기 논의한 사항을 고려하면, 트레오닌과 같은 아미노산을 효율적으로 생산하면서, 종래 기술과 관련된 문제점이 없는 미생물 균주에 대한 필요성이 당해 분야에서 대두된다.

발명의 상세한 설명

그러므로, 본 발명의 한 가지 목적은 L-트레오닌을 고수율로 효율적으로 생산하면서, 트레오닌 생합성 효소를 암호화하는 유전자를 보유하는 어떠한 재조합 플라스미드도 요구하지 않고 바람직하게는 아미노산 영양 요구성도 갖지 않는 미생물을 제공하는 것이다. 본 발명의 기타 목적, 특징 및 장점은 후술하는 바람직한 실시 양태에 대한 상세한 설명에서 제시할 것이며, 이들은 부분적으로는 그 설명으로부터 명백하거나 또는 본 발명의 실시에 의해 이해될 수 있다. 본 발명의 이러한 목적 및 장점은 본 발명의 상세한 설명 및 특허청구범위에 구체적으로 제시된 방법에 의해 실현되고 얻어질 것이다.

상기 목적 및 기타 목적은 본 발명의 방법에 의해 달성되는데, 이 방법은 제1의 양태로 이. 콜리 균주를 배지에서 배양하는 단계 및 배지로부터 아미노산을 회수하는 단계를 포함하는, L-트레오닌과 같은 아미노산을 생산하는 방법에 관한 것이다. 이 방법에 사용된 이. 콜리 균주는 다음과 같은 특성을 가진다: (i) 비천연 프로모터의 제어하에 염색체상에 트레오닌 오페론(트레오닌 생합성 효소를 암호화함)과 같은 아미노산 생합성의 유전자 결정인자를 포함하고; (ii) 트레오닌을 생산하는 트레오닌 생합성 효소를 암호화하는 유전자를 보유하는 어떠한 재조합 플라스미드도 필요로 하지 않는다.

본 발명의 또 하나의 실시 양태는 상기 특성을 가진 이. 콜리 균주의 생물학적 순수 배양물에 관한 것이다.

본 발명의 또 다른 실시 양태는 L-트레오닌과 같은 아미노산을 생산하는 방법으로서, 이. 콜리 균주를 배지에서 배양하는 단계 및 배지로부터 아미노산을 회수하는 단계를 포함하며, 여기서, 이. 콜리 균주는 보렐리딘에 대해 내성이 있는 것인 방법에 관한 것이다.

본 발명의 또 다른 실시 양태는 트레오닌과 같은 아미노산의 발효 생산에 유용한 이. 콜리 균주의 생산 방법으로서, (a) 아미노산 생산 미생물에서 얻은 유전 물질을 이. 콜리 영양요구주의 염색체내로 도입시켜 이. 콜리를 독립영양성으로 만드는 단계; (b) 아미노산 생합성 유전자를 염색체에 위치시키기 전에 비천연 프로모터를 염색체내로 삽입하여 그 발현을 제어하는 단계; 및 선택적으로 (c) 염색체로부터 아미노산 생합성에 대한 아미노산 영양 요구성 및/또는 이 생합성에 대한 조절적 방해 작용을 제거하는 단계를 포함하는 이. 콜리 균주의 생산 방법에 관한 것이다.

상기의 일반적인 설명과 하기의 구체적인 설명은 예시 및 설명을 목적으로 할 뿐이며, 특허청구범위에 청구된 본 발명을 추가로 설명하기 위한 것임을 이해하여야 한다.

본 발명의 바람직한 실시 양태에 관한 상세한 설명

제1의 양태로, 본 발명은 아미노산 생산을 위한 발효 공정에 사용될 수 있는 신규의 박테리아 균주에 관한 것이다. 본 발명의 신규 박테리아 균주는 다음과 같은 특성을 가진다:

(i) 세포들이 하나 이상의 thr 오페론, 즉 트레오닌 생합성 효소를 암호화하는 유전자의 하나 이상의 세트를 비천연 프로모터의 제어하에 염색체상에 보유하며; (ii) 세포들이 트레오닌을 생산하는 트레오닌 생합성 효소를 암호화하는 어떠한 재조합 플라스미드도 필요로 하지 않는다.

본 발명의 균주는 약 30 시간내에 약 50 g/L 이상, 보다 바람직하게는 약 30 시간내에 약 70 g/L 이상, 보다 더 바람직하게는 약 30 시간내에 약 80 g/L 이상, 가장 바람직하게는 약 30 시간내에 약 90 g/L 이상의 트레오닌을 생산할 수 있는 균주가 바람직하다. 본 발명의 균주는 약 48 시간내에 약 90 g/L 이상, 보다 바람직하게는 약 48 시간내에 약 100 g/L 이상, 가장 바람직하게는 약 48 시간내에 약 110 g/L 이상의 트레오닌을 생산할 수 있는 균주가 바람직하다.

본 발명의 균주는 약 2 g/L/hr 이상의 속도, 보다 바람직하게는 약 2.5 g/L/hr의 속도, 보다 더 바람직하게는 약 3 g/L/hr의 속도, 가장 바람직하게는 약 3.6 g/L/hr의 속도로 생산할 수 있는 균주가 바람직하다.

특히 바람직한 실시 양태에서, 신규의 박테리아 균주는 또한 트레오닌의 발효 생산을 위해 아미노산 영양 요구성을 갖지 않는다. 즉, 세포들은 성장 및 트레오닌 생산을 위한 아미노산 보충을 필요로 하지 않는다.

본 발명에 따르면, 본 발명의 박테리아 균주는 트레오닌 생산을 위한 트레오닌 생합성 효소를 암호화하는 하나 이상의 유전자를 보유하는 어떠한 재조합 플라스미드도 필요로 하지 않는다. 즉, 이 균주는 재조합 플라스미드에 보유된 유전자에 의해 암호화되는 하나 이상의 트레오닌 생합성 효소를 필요로 하지 않고 트레오닌을 생산할 수 있다. 물론 본 발명의 균주는 목적에 따라 선택적으로 하나 이상의 재조합 플라스미드를 보유할 수도 있다. 예를 들면, 그러한 플라스미드는 트레오닌 생산에는 필요하지 않은 반면에, 그럼에도 불구하고 본 발명의 균주는 트레오닌 생산을 증가시키기 위한 트레오닌 생합성 효소를 암호화하는 재조합 플라스미드를 포함할 수 있다. 본 발명의 균주는 마찬가지로 아스파르테이트 세미알데히드 디히드로게나제(asd)와 같이 트레오닌 생합성에 관련된 기타 효소를 암호화하는 재조합 플라스미드를 포함할 수도 있다.

본 발명의 박테리아 균주는 에스케리차 콜리 균주가 바람직하다. 본 발명의 균주는 마크로라이드계 항생물질인 보렐리딘에 대한 내성을 나타내는 이. 콜리 균주가 더 바람직하다. 본 발명의 박테리아 균주의 특히 바람직한 예는 이. 콜리 균주 kat-13인데, 이것은 1996년 6월 28일자로 미국 일리노이주 61604 피오리아 노스 유니버시티 스트리트에 소재하는 농업연구소 배양 수집소(NRRL)에 기탁되어 수탁번호 NRRL B-21593호를 부여받았다.

본 발명의 박테리아 균주의 세포들의 염색체상의 트레오닌(thr) 오페론은 트레오닌 생합성에 필요한 효소를 암호화한다. 트레오닌 오페론은 AK-HD 유전자(thrA 또는 metL), 호모세린 키나제 유전자(thrB) 및 트레오닌 신타제 유전자(thrC)로 구성되는 것이 바람직하다. thr 오페론은 thrA(AK I-HD I 유전자), thrB 및 thrC로 구성되는 것이 더 바람직하다. 적합한 thr 오페론은 이. 콜리 균주 ATCC 21277 및 균주 ATCC 21530으로부터 얻을 수 있다. 균주 ATCC 21277에서 유래한 thr 오페론이 특히 바람직하다. thr 오페론은 염색체상에 다수 사본으로 존재할 수 있다.

thr 오페론은 하나 이상의 비감쇄된 유전자를 포함하는 것이 바람직하며, 여기서 비감쇄된 유전자란 그 유전자의 발현이 하나 이상의 트레오닌 생합성 효소 및/또는 그 생성물(예: 트레오닌 및 이소루이신)의 레벨(세포외 및/또는 세포내)에 의해 억제되지 않는 유전자를 말한다. 본 발명의 균주는 또한 결함성 thr 감쇄신호(전사 개시부위의 하류이고 첫 번째 구조 유전자의 상류의 조절 영역)를 포함하는 thr 오페론 또는 thr 감쇄신호가 부재하는 thr 오페론을 함께 포함할 수도 있다.

본 발명의 특히 바람직한 실시 양태에서, thr 오페론은 하나 이상의 피드백 내성 트레오닌 생합성 효소를 암호화한다. 즉, 효소의 활성은 트레오닌 생합성의 중간체 및 생성물의 세포외 및/또는 세포내 레벨에 의해 저해되지 않는다. thr 오페론은 피드백 내성의 AK I-HD I과 같은 피드백 내성의 AK-HD를 암호화하는 유전자를 포함하는 것이 가장 바람직하다. 피드백 내성 AK-HD를 사용하면 트레오닌 생합성을 위한 보다 고레벨의 효소 활성이 얻어지며, 이 효과는 L-트레오닌의 존재하에서도 산출된다.

본 발명의 균주에서 트레오닌 오페론(들)의 발현은 비천연 프로모터, 즉 자연에서 통상 발견되는 이. 콜리 박테리아 균주에서 thr 오페론의 발현을 제어하지 않는 프로모터에 의해 제어된다. 트레오닌 생합성 효소의 천연 프로모터를 강력한 비천연 프로모터로 대체하여 thr 오페론의 발현을 제어하면, thr 오페론이 단일의 유전자 사본 뿐인 경우에도 다양한 트레오닌이 생산된다. 또한, 비천연 프로모터를 사용하여 트레오닌 오페론의 발현을 제어하기 때문에, 보다 많은 트레오닌을 생산하기 위해 박테리아 균주를 이소루이신 영양요구성으로 만들 필요가 없다. 적합한 프로모터의 예로는 lac 프로모터, trp 프로모터, λ 박테리오파지의 P_L 프로모터, P_R 프로모터, I_{pp} 프로모터 및 tac 프로모터가 있으나, 이들에 국한되지 않는다. 본 발명의 박테리아 균주에 사용하기에 특히 적합한 프로모터는 tac 프로모터이다.

트레오닌 오페론 외에도, 본 발명의 박테리아 균주의 세포내 염색체는 또한 아스파르테이트 세미알데히드 디히드로게나제(asd)를 암호화하는 하나 이상의 유전자를 포함하는 것이 바람직하다. 본 발명의 세포의 염색체는 하나 이상의 asd 유전자, 하나 이상의 thrA 유전자, 하나 이상의 thrB 유전자 및 하나 이상의 thrC 유전자를 포함하는 것이 가장 바람직하다. 물론 염색체는 하나 이상의 상기 유전자들의 다수 사본을 포함할 수 있다.

트레오닌 디히드로게나제(tdh)는 L-트레오닌을 α -아미노- β -케토부티레이트로 산화시키는 반응을 촉매한다. 따라서, 특히 바람직한 실시 양태에서, 본 발명의 세포의 염색체는 하나 이상의 결함성 트레오닌 디히드로게나제(tdh⁻) 유전자를 추가로 포함한다. 결함성 tdh⁻ 유전자는 트레오닌 디히드로게나제의 감소된 발현 레벨을 가진 유전자 또는 천연 트레오닌 디히드로게나제와 비교하여 감소된 효소 활성을 가지는 트레오닌 디히드로게나제 돌연변이체를 암호화하는 유전자일 수 있다. 본 발명의 균주에 이용된 결함성 tdh⁻ 유전자는 트레오닌 디히드로게나제를 발현시키지 않는 것이 바람직하다. 트레오닌 디히드로게나제를 발현시키지 않는 적합한 tdh⁻ 유전자의 예로는 내부에 삽입된 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라제(cat) 유전자를 가진 tdh⁻ 유전자 또는 미국 특히 제5,175,107호에 기재된 바와 같이 내부에 삽입된 트랜스포존을 가지는 tdh⁻ 유전자가 있다.

본 발명의 박테리아 균주는 당해 분야의 당업자에게 공지되어 있고 이용 가능한 임의의 방법 및 기술에 의해 제조할 수 있다. 본 발명의 박테리아 균주를 구성하는 적합한 방법의 예로는 NTG와 같은 적당한 작용제를 사용한 돌연변이 유발법, 선형 DNA 단편의 형질전환 및 상동 재조합에 의해 매개되는 유전자 통합기술; 및 박테리오파지 P1에 의해 매개되는 형질도입법이 있다. 이들 방법은 당해 분야에 널리 공지되어 있는데, 예를 들면 문헌[J.H. Miller, Experiments in Molecular Genetics, 뉴욕 콜드 스프링 하버 소재의 콜드 스프링 하버 래보러토리 프레스(1972); J.H. Miller, A Short Course in Bacterial Genetics, 뉴욕 콜드 스프링 하버 소재의 콜드 스프링 하버 래보러토리 프레스(1992); M. Singer and P. Berg, Genes & Genomes, 캘리포니아 밀 뱃리 소재의 유니버시티 사이언스 북스(1991); J. Sambrook, E.F. Fritsch and T. Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 제2판, 뉴욕 콜드 스프링 하버 소재의 콜드 스프링 하버 래보러토리 프레스(1989); P.B. Kaufman 등, Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine, 플로리다 보카 레이던 소재의 CRC 프레스(1995); Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, B.R. Glick and J.E. Thompson 편집, 플로리다 보카 레이던 소재의 CRC 프레스(1993); 및 P.F. Smith-Kearny, Molecular Genetics of Escherichia coli, 뉴욕주 뉴욕 소재의 길포드 프레스 (1989)]에 기재되어 있다.

본 발명의 특히 바람직한 실시 양태에서, 성장을 위해 트레오닌이 필요한 이. 콜리 균주 472T23은 P1-매개의 형질도입법을 사용하여 이. 콜리 균주 ATCC 21277의 트레오닌 오페론을 도입시키는 트레오닌 생산자로 전환시킬 수 있으며, 여기서, ATCC 21277 균주는 미국 매릴랜드주 20852 록빌 파크론 드라이브 12301 소재의 미국 모식균 배양 수집소에서 입수할 수 있다. 이 thr 오페론은 피드백 내성의 아스파르테이트 키나제-호모세린 디히드로게나제 유전자(thrA), 호모세린 키나제 유전자(thrB) 및 트레오닌 신타제 유전자(thrC)로 구성된다.

본 발명의 균주에서 트레오닌 생산성을 향상시키기 위해, 이. 콜리 균주 CGSC6945(관련 유전자형: tdh⁻:cat1212; 미국 코네티컷주 06520-8104 뉴 헤이븐 소재의 예일 대학교 생물학과 355 오스본 메모리얼

래보러토리 이. 콜리 유전자 종균 센터에서 입수함)에서 유래한 결함성 트레오닌 디히드로게나제 유전자를 P1 형질도입법으로 도입시킬 수 있다. 생성된 트레오닌 생산 균주는 NTG로 돌연변이를 유발하고/하거나 보렐리딘 내성에 대해 선별함으로써 추가로 개량될 수 있다.

Kan(카나마이신 내성을 암호화함)과 같은 항생물질 내성 마커 유전자를 보유하고, *thrA*의 상류 DNA 및 야생형 *thrA* 유전자의 수백 염기쌍(즉, 전체 *thrA* 유전자는 아님)에 인접하는 것이 바람직한 *P_L* 또는 *tac*와 같은 강력한 프로모터를 보유하는 플라스미드를 구성하고 운반체로 사용하여 목적 DNA 단편을 염색체내로 전달할 수 있다. 플라스미드상의 단편은 적합한 제한 효소로 처리하여 분리하고, 정제한 다음, 형질전환 또는 전기사출법으로 균주내로 도입시켜 트레오닌 오페론의 제어 영역을 제거하고 그것을 목적 단편, 즉 *thrA* 유전자의 초기 부분의 항생물질 내성 마커 유전자 및 강력 프로모터와의 상동 재조합에 의해 대체할 수 있다. 그 후, 이 단편은 P1 형질도입법에 의해 보렐리딘 내성 균주내로 전이시킬 수 있다.

바람직한 숙주 균주인 472T23의 이소루이신 요구성은 예를 들면, P1 형질도입법을 통해 마커의 야생형 대립유전자를 도입시킴으로써 제거할 수 있다. 기타 숙주의 원하지 않는 영양 요구성은 유사한 방법으로 또는 당업자에게 공지되고 이용가능한 기타 방법에 따라 제거될 수 있다.

본 발명의 제2의 실시 양태는 아스파르테이트군의 아미노산의 생산을 위한 발효 공정에 상기 박테리아 균주를 사용하는 용도에 관한 것이다. 예를 들면, L-트레오닌은 1종 이상의 탄소원, 1종 이상의 질소원 및 적당한 경우 무기염, 성장인자 등을 함유하는 합성 또는 천연 배지에서 본 발명의 박테리아 균주를 배양하여 얻는다.

적합한 탄소원의 예로는 글루코스, 프로토스, 슈크로스, 전분 가수분해물, 셀룰로스 가수분해물 및 당밀과 같은 탄수화물; 아세트산, 프로피온산, 포름산, 말산, 시트르산 및 푸마르산과 같은 유기산; 및 글리세롤과 같은 알코올이 있으나, 이들에 국한되지 않는다.

적합한 질소원의 예로는 암모니아 가스 및 수성 암모니아를 비롯한 암모니아; 염화암모늄, 인산암모늄, 황산암모늄 및 아세트산암모늄과 같은 무기산 또는 유기산의 암모늄염; 및 식육 추출물, 펩톤, 옥수수에 담근 술, 카세인 가수분해물, 콩 케이크 가수분해물 및 효모 추출물을 비롯한 질소 함유물이 있으나, 이들에 국한되지 않는다.

배양후, 배양 브로스에 축적된 L-트레오닌은 공자의 방법에 따라, 예를 들면, 미국 특허 제5,342,766호에 기재된 이온 교환 수지를 사용하여 분리할 수 있다. 이 방법은 배양 브로스로부터 원심분리에 의해 미생물을 먼저 제거하는 단계 및 염산을 사용하여 브로스의 pH를 약 2로 조정하는 단계가 필요하다. 이어서, 산성화된 용액을 강산성의 양이온 교환 수지 및 희석된 수성 암모니아를 사용하여 용출시킨 흡착제에 통과시킨다. 암모니아는 진공하에 증발시켜 제거하고, 생성된 용액을 응축한다. 알코올의 첨가 및 후속의 냉각에 의해 L-트레오닌의 결정을 얻는다.

아스파르테이트군의 기타 아미노산은 상기에 상세히 설명한 것과 유사한 방법으로 생산할 수 있다. 예를 들면, 이소루이신은 염색체상에 또는 플라스미드상에 증폭된 *iIvA* 유전자 또는 *tdc* 유전자(이들 두 유전자는 트레오닌을 이소루이신으로 생체 전환시키는 공정에 관여하는 첫 번째 효소인 트레오닌 디아미나제를 암호화함)를 보유하는 본 발명의 박테리아 균주로부터 생산할 수 있다. 이 유전자의 증폭, 예를 들면, 피드백 내성 효소를 암호화하는 *iIv* 유전자를 사용한 증폭에 의해 이소루이신의 생합성이 증가하게 된다.

유사하게, 메티오닌은 염색체상에 하나 이상의 *met* 오페론, 즉 *metL* 유전자(AK II-HD II를 암호화함), *metA* 유전자(호모세린 숙시닐트랜스퍼라제), *metB* 유전자(시스타치오닌 γ -신타제), *metC* 유전자(시스타치오닌 β -리아제) 및 *metE* 및 *metH* 유전자(호소시스테인 메틸라제)를 포함하는 이. 콜리와 같은 미생물에 의해 생산할 수 있다. 그 피드백 내성 변형체 및 선택적으로 비천연 프로모터를 포함하는 이들 유전자는 상기에 언급하고/하거나 당업자에게 공지된 하나 이상의 일반 방법에 따라 숙주 미생물의 염색체내로 도입시킬 수 있다. 리신은 마찬가지로 리신 생합성 효소(바람직하게는, *lysC* 및/또는 *dapA*에 의해 암호화된 피드백 내성 리신 생합성 효소) 및 선택적으로 비천연 프로모터를 암호화하는 유전자를 포함하는 미생물에 의해 생산할 수 있다.

본 발명의 제3의 양태는 L-트레오닌의 생산을 위한 발효 공정에 보렐리딘 내성 박테리아 균주를 사용하는 용도에 관한 것이다. 보렐리딘 내성 균주는 이. 콜리 균주의 돌연변이체가 바람직하다. 그러한 돌연변이체의 특히 바람직한 양태는 이. 콜리 균주 kat-13인데, 이것은 1996년 6월 28일자로 미국 일리노이주 61604 피오리아 노스 유니버시티 스트리트 1815에 소재하는 농업연구소 배양 수집소(NRRL)에 기탁되어 수탁번호 NRRL B-21593호를 부여받았다.

보렐리딘 내성은 당업자에게 공지되고 용인되는 임의의 방법에 의해 측정할 수 있다. 예를 들면, 보렐리딘 내성 균주는 문헌[G. Nass and J. Thomale, FEBS Lett. 39:182-186 (1974)]에 기재된 바와 같이, 약 139 μ M의 보렐리딘을 함유하는 최소 배지상에 후보 균주를 도말함으로써 분리할 수 있다. 또한, 특정 균주의 보렐리딘 내성은 세포의 하나 이상의 표현형적 특성의 변화로서 입증된다. 예를 들면, 이. 콜리 균주 6-8의 보렐리딘 내성 돌연변이체 및 그 유도체는 막대형보다는 둥근형으로 보인다. 그러한 경우에, 표현형적 특성 변화의 증거는 보렐리딘 내성 균주를 적절히 확인하기에 충분할 수 있다.

본 발명의 상기 양태에 유용한 보렐리딘 내성 돌연변이체는 트레오닌을 생산할 수 있다. 트레오닌 생합성 효소를 암호화하는 유전자는 염색체상에 존재하거나 또는 플라스미드 또는 그 혼합물에 보유될 수 있다. 상기 유전자가 다수의 사본으로 존재할 수도 있다. 트레오닌 생합성 효소를 암호화하는 유전자는 감쇄 제어에 내성이 있고/있거나 피드백 내성 효소를 암호화하는 것이 바람직하다.

상기한 바와 같이, 본 발명의 보렐리딘 내성 균주는 목적에 따라 하나 이상의 재조합 플라스미드를 포함할 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 미생물은 트레오닌 생합성 효소를 암호화하는 재조합 플라스미드를 포함할 수 있다. 본 발명의 박테리아 균주는 마찬가지로 아스파르테이트 세미알데하이드 디히드로게나제(as d)와 같은 트레오닌 생합성에 관여하는 기타 효소 또는 성장을 증가시키는 효소를 암호화하는 재조합 플라스미드를 포함할 수 있다.

또한, 보렐리딘 내성 균주는 당업자에게 공지되고 이용가능한 임의의 방법 및 기술을 사용하여 목적에 따

라 변형시켜, 예를 들면, 트레오닌 생산을 증가시키고, 영양 요구성을 제거할 수 있다. 보렐리딘 내성이. 콜리 돌연변이체 및 변형체를 변형시키는 적합한 방법의 예로는 자외광 또는 X-선 조사에 의한 돌연변이 유발법, 또는 니트로소구아닌(N-메틸-N'-니트로-N-니트로소구아닌), 메틸메탄솔포네이트, 질소머스타드 등과 같은 화학적 돌연변이원 처리에 의한 돌연변이 유발법; 선형 DNA 단편의 형질전환 및 상동재조합에 의해 매개되는 것과 같은 유전자 통합 기술; 및 P1과 같은 박테리오파지에 의해 매개되는 형질도입법이 있으나, 이들에 국한되지 않는다. 이들 방법은 당해 분야에 널리 공지되어 있는데, 예를 들면, 문헌[J.H. Miller, Experiments in Molecular Genetics, 뉴욕 콜드 스프링 하버 소재의 콜드 스프링 하버 래보러토리 프레스(1972); J.H. Miller, A Short Course in Bacterial Genetics, 뉴욕 콜드 스프링 하버 소재의 콜드 스프링 하버 래보러토리 프레스(1992); M. Singer and P. Berg, Genes & Genomes, 캘리포니아 밀 뱃리 소재의 유니버시티 사이언스 북스(1991); J. Sambrook, E.F. Fritsch and T. Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 제2판, 뉴욕 콜드 스프링 하버 소재의 콜드 스프링 하버 래보러토리 프레스(1989); P.B. Kaufman 등, Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine, 플로리다 보카 레이던 소재의 CRC 프레스(1995); Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, B.R. Glick and J.E. Thompson 편집, 플로리다 보카 레이던 소재의 CRC 프레스(1993); 및 P.F. Smith-Keary, Molecular Genetics of Escherichia coli, 뉴욕주 뉴욕 소재의 길포드 프레스 (1989)]에 기재되어 있다.

본 발명의 보렐리딘 내성 돌연변이체는 트레오닌 생합성 효소를 암호화하는 하나 이상의 유전자가 염색체상에 존재하고/하거나 플라스미드에 보유되는지 여부와 상관없이 이들 유전자의 상류에 그리고 이들 유전자와 작동 가능한 연결 상태로 비천연 프로모터를 포함하도록 변형된 것이 바람직하다.

본 발명의 상기 양태의 특히 바람직한 형식에 따르면, L-트레오닌은 상기한 바와 같이, 1종 이상의 탄소원, 1종 이상의 질소원 및 적당한 경우 무기염, 성장인자 등을 함유하는 합성 또는 천연 배지에서 하나 이상의 보렐리딘 내성 박테리아 균주를 배양함으로써 얻는다. 축적된 트레오닌은 당업자에게 공지된 임의의 방법으로 회수할 수 있다.

하기의 실시예는 예시를 목적으로 할 뿐이며, 첨부한 특허청구범위에 의해 정해지는 본 발명의 범위를 제한하고자 하는 것이 아니다. 당업자에게는 본 발명의 사상 및 범위를 벗어나지 않고 본 발명의 방법에 대해 다양한 개조예 및 변형예를 만들 수 있음이 자명할 것이다. 따라서, 본 발명은 본 발명의 개조예 및 변형예가 특허청구범위 및 그 균등범위내에 있다면 그들을 포함하는 것이다.

본원에 언급된 모든 특허 및 공개문헌은 명백히 참고로 인용된 것이다.

도면의 간단한 설명

도 1은 코하라 람다 676에서 유래한 플라스미드 pAD103과 플라스미드 pUC19의 제작과정을 도시한 것이다.

도 2는 플라스미드 pAD103과 플라스미드 pUC4K로부터 플라스미드 pAD106을 제작하는 과정을 도시한 것이다.

도 3은 플라스미드 pAD103과 플라스미드 pkk223-3으로부터 플라스미드 pAD115를 제작하는 과정을 도시한 것이다.

도 4는 플라스미드 pAD115와 플라스미드 pAD106으로부터 플라스미드 pAD123을 제작하는 과정을 도시한 것이다.

도 5는 플라스미드 pAD123의 프로모터 영역을 이. 콜리의 염색체내로 통합시키는 과정을 도시한 것이다.

실시예

실시예 1: 이. 콜리 균주 kat-13의 제조

A. 이. 콜리 균주 ATCC 21277의 트레오닌 오페론을 이. 콜리 균주 472T23의 염색체내로 전이시키는 공정

미국 매릴랜드주 20852 롤빌 파크론 드라이브 12301 소재의 미국 모식균 배양 수집소에서 입수 가능한 이. 콜리 균주 ATCC 21277(미국 특허 제 3,580,810호)은 아미노-β-히드록시발레르산(AHV) 내성이지만, 최소 배지에서 성장하기 위해서는 프롤린, 티아민, 이소루이신, 메티오닌을 필요로 한다. ATCC 21277은 발효 공정에서 트레오닌을 6.20 g/L 축적시키는 것으로 보고되어 있다. ATCC 21277은 비드백 내성 효소를 암호화하는 아스파르테이트 키나제 I-호모세린 디히드로게나제 I 유전자(thrA), 호모세린 키나제 유전자(thrB) 및 트레오닌 신타제 유전자(thrC)로 구성된다.

이. 콜리 균주 472T23은 USSR 항생물질 연구소의 USSR 상업용 미생물 수집소에 수탁번호 BKIIM B-2307로 기탁된 것으로서, 글루코스, 암모니아, 비타민 B1 및 광물염을 함유하는 최소 배지에서 성장하기 위해 트레오닌과 이소루이신을 필요로 하는 것으로 보고되어 있다. 이 균주는 트레오닌 생합성의 필수 유전자인 thrC 유전자에 결함이 있기 때문에 트레오닌을 생산할 수 없다. 균주 472T23은 또한 이소루이신 생합성의 첫 번째 효소를 암호화하는 결함성 트레오닌 디아미나제 유전자 ilvA를 보유한다.

박테리오파지 P1 용균물은 ATCC 21277상에서 파지를 성장시켜서 제조하였다. 그 후, 균주 472T23을 이 P1 용균물로 감염시켰는데, 이 용균물에서는 소수의 파지 입자가 ATCC 21277의 트레오닌 오페론을 보유하였다. 감염후, 0.25 g/L의 이소루이신으로 보충한 최소 배지 E[글루코스 0.05 g/L; MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g/L; 시트르산 · H₂O 2.0 g/L; K₂HPo₄ 10.0 g/L; NaNH₄PO₄ · 4H₂O 3.5 g/L; 아가 15.0 g/L] 아가 평판상에 도말함으로써 트레오닌 합성 박테리아를 선별하였다. ATCC 21277의 트레오닌 오페론을 보유한 몇 개의 트레오닌 독립영양성 형질도입체는 이제 이소루이신으로만 보충된 최소 평판에서 성장할 수 있었다.

이러한 형질도입체는 하기 실시예 2에 설명하는 트레오닌 생산을 위한 진탕 플라스크 발효에 의해 검색하였다. 이들중 하나로서 트레오닌을 생산하는 G9가 추가의 균주 개발에 선택되었다.

B. 클로琅페니콜 아세틸트랜스퍼라제(cat) 유전자가 삽입된 결함성 트레오닌 디하이드로게나제(tdh⁻) 유전자를 이. 콜리 균주 G9의 염색체내로 전이시키는 공정

결함성 트레오닌 디하이드로게나제 유전자(tdh⁻)를 보유하는 균주 CGSC6945는 미국 코네티컷주 06520-8104 뉴 헤이븐 소재의 예일 대학교 생물학과 355 오스본 메모리얼 래보러토리의 이. 콜리 유전자 종균 센터에서 입수하였다. 트레오닌 디하이드로게나제 유전자는 거기에 클로琅페니콜 아세틸트랜스퍼라제(cat) 유전자가 삽입되어 있기 때문에 결함성이다. 이 결함성 유전자를 G9에 전이시키기 위해서, P1 파지를 CSCG6945 상에서 성장시키고, 그 용균물을 G9 감염에 사용하였다. G9의 몇 개의 클로琅페니콜 내성 형질도입체가 선별되었고, 하기 실시예 2에서 설명하는 바와 같은 진탕 플라스크 발효에 의해 트레오닌 생산에 대해 검색하였다. 이들중 하나로서 G9보다 더 높은 트레오닌 역가를 가진 G909가 추가의 연구에 선택되었다.

C. 비천연 프로모터를 이. 콜리 균주 G909의 염색체내로 삽입시키는 공정

tac 프로모터를 G909의 염색체내로 전달하기 위해, 선형 DNA 단편과 엑소뉴클레아제 V가 없는 균주(recD)의 염색체 사이에서의 상동 재조합을 이용하였다.

선형 DNA 단편은 트레오닌 오페론의 상류(5') 서열 1.5 kb, 카나마이신 내성 마커, tac 프로모터 서열 및 thrA 유전자 약 480 bp를 포함하였다. 이 단편은 5' 말단 상동성, 선별용 마커(카나마이신 내성), 트레오닌 오페론(tac)에 대한 강력하고 제어가능한 프로모터, 및 3' 말단 상동성을 각각 제공하는 것으로서, 다음과 같이 생성시켰다.

일본 나고야 지쿠사쿠 나고야 대학교 공학부 분자생물학과의 유지 코하라 박사에게서 입수한 람다 클론 676의 DNA를 사용하여 야생형 이. 콜리 W3110의 트레오닌 오페론을 플라스미드 pUC19의 제한 효소 SphI 부위내로 클로닝하였다. 람다 클론 676 및 pUC19의 DNA를 SphI로 처리하였다. 이어서, pUC19 단편을 새우의 알칼리 포스파타제(SAP)로 탈인산화하고, 아가로스 겔 정제하였다. 람다 클론의 트레오닌 오페론의 6.9 kb 단편도 정제하였다. 이어서, T4 DNA 리가제에 의해 이들 두 단편을 결합하여 플라스미드 pAD103을 생성시켰다.

그 다음, 상동 재조합 및 카나마이신 내성 마커에 대한 상류 인접 영역을 구성하였다. pAD103을 제한효소 BstEII, XbaI로 처리하고, 클리나우 단편 처리에 의해 평활 말단을 만들었다. 트레오닌 오페론의 5' 말단 (상류)만을 포함하는 1.5 kb 단편(thr 오페론 자체 또는 그 제어 영역은 아님)을 분리하고 pUC4K(파마시아)의 카나마이신 내성 유전자의 단편에 결합시키고, 제한효소 SallI로 처리하고 클리나우 단편으로 처리하여 3' 돌출부를 채워서 중간 플라스미드 pAD106을 생성시켰다.

pAD103은 또한 제한효소 TaqI로 처리하고, 클리나우 단편 처리에 의해 평활 말단을 만들었다. thrA 유전자의 암호 서열의 약 480 bp 및 천연 리보솜 결합 부위를 포함하는 단편을 분리한 다음, 제한효소 SmaI로 처리하고 SAP로 탈인산화한 pKK233-3(파마시아)의 단편에 결합시켜 플라스미드 pA115를 얻었는데, 이것은 tac 프로모터, 리보솜 결합 부위 및 thrA 유전자의 수백개의 염기를 포함하였다.

이어서, pAD115는 제한효소 BamHI으로 처리하고, 목적 DNA 서열을 포함하는 DNA 단편 0.75 kb를 분리하였다. pAD106도 BamHI로 처리한 다음, SAP로 탈인산화하였다. 그 다음, 두 단편을 결합하여 플라스미드 pAD123을 얻었는데, 이것은 트레오닌 오페론의 상류의 DNA 서열, 카나마이신 내성 마커 유전자, tac 프로모터 및 thrA 유전자의 개시부 약 480 kb를 포함하였다.

그 후, pAD123을 SpeI, BglI로 처리하고, 목적 DNA 서열을 포함하는 단편을 분리하였다.

엑소뉴클레아제 V가 없는 균주(recD)는 이. 콜리 균주 KW251(관련 유전자형: argA81::Tn10, recD1014; 파마시아에서 입수함)상에서 P1 파지를 성장시켜서 제조하였는데, 상기 KW251은 argA에 동시 형질도입 가능한 트랜스포존 Tn10 삽입물을 가진 recD 유전자를 포함한다. 그 후, 파지로부터 얻은 용균물을 사용하여 균주 G9를 감염시키고, 테트라사이클리 내성의 형질도입체 G9T7을 분리하였다.

플라스미드 pAD123의 DNA 단편은 전기사출법으로 이. 콜리 균주 G9T7에 전달하였다. G9T7의 카나마이신 내성 균주를 분리하고, 이 균주상에서 파지를 성장시킴으로써 P1 파지 용균물을 만들었다. 그 다음, P1 파지 용균물을 사용하여 G909를 형질도입시켰다. G909의 카나마이신 내성 형질도입체중 하나인 tac30I 분리되었는데, 이것은 진탕 플라스크 연구에서 IPTG의 존재하에 보다 높은 트레오닌 역가를 나타냈다.

이어서, P1 파지 용균물을 균주 tac3을 사용하여 준비하여 균주 6-8(후술함)의 감염에 사용하였다. 카나마이신 내성 형질도입체를 선별하고, 이들중 하나인 균주 6-8tac30I 분리되었는데, 이것은 진탕 플라스크 연구에서 tac3보다 훨씬 더 높은 역가를 산출하였다.

D. NTG 돌연변이 유발 및 이. 콜리 균주 G909 및 6-8로부터 보렐리딘 내성 돌연변이체의 분리

균주 G909의 세포를 통상의 방법을 사용하여 N-메틸-N'-니트로-N-니트로소구아니딘(NTG) 처리(50 mg/L, 36°C에서 30분)에 의해 돌연변이를 유발시켰다. 생성된 세포를 L-이소루이신 0.25 g/L 및 보렐리딘 0.1% v/v를 함유하는 최소 배지 E 아가 평판상에 도말하였다. 36°C에서 3일 내지 5일 동안 항온배양한 후, 평판상에 형성된 대형 콜로니는 균주 6-8을 함유한 것으로서, 보렐리딘 내성 및 L-트레오닌 생산에 대한 시험으로 선별하였다.

보렐리딘 내성을 시험하기 위해, 각각의 균주를 20 mL의 시드 배지 SM[글루코스 32.5 g/L; MgSO₄ · 7H₂O 1 g/L; K₂HPo₄ 24.36 g/L; KH₂PO₄ 9.52 g/L; (NH₄)₂SO₄ 5 g/L; 효모 추출물 15 g/L; pH 7.2]에서 진탕하여 36°C에서 17 시간 동안 배양하였다. 세포를 수집하고 최소 배지 E로 세척하였다. 그 다음, 세포 혼탁액을 최소 배지 E 3 mL 및 보렐리딘 0 mM, 0.1 mM, 0.5 mM 또는 1 mM을 함유하는 멀균된 튜브에 접종하였다. 진탕하면서 36°C에서 24 시간후에, 660 nm에서의 광학 밀도를 측정함으로써 성장을 측정하였다. 그 결과는 보렐리딘의 부재하에서의 성장과 비교하여 아래에 나타낸다.

보렐리딘(mM)	G909	6-8
0	100.0	100.0
0.1	24.2	134.5
0.5	2.9	141.0
1	0.9	184.5

E. 이소루이신 요구성의 제거 및 락토스 리프레서 유전자(lacI)

비천연 tac 프로모터 및 피드백 내성 thrA 유전자를 도입시킴으로써, thr 오페론(thrA, thrB, thrC)의 발현은 더 이상 감쇄 메카니즘에 의해 제어되지 않는다. 결과적으로, 이소루이신의 부족 및/또는 *IlvA*⁻ 종속 영향 마커의 존재는 더 이상 트레오닌 생산에 요구되지 않는다.

따라서, 야생형 *IlvA* 마커는 형질도입에 의해 6-8tac3내로 도입시켜 균주의 이소루이신 요구성을 고정시키고, 즉 세포 성장을 위해 이소루이신 보충된 배지에 대한 필요성을 제거하였다. CGSC7334(관련 유전자형: lacI42::Tn10, lacZU118; 미국 코네티컷주 06520-8104 뉴 헤이븐 소재의 예일 대학교 생물학과 355 오스본 메모리얼 래보러토리 이. 콜리 유전자 종균 센터에서 입수함)로부터 제조된 P1 파지 용균물을 사용하여 6-8tac3를 감염시켜고, 이소루이신 생합성에 대해 양성인 형질도입체를 선별하였다. 이들 형질도입체는 진탕 플라스크 연구에 균주 6-8tac과 대략 동일한 양의 L-트레오닌을 생산하였다. 이들 형질도입체 중 하나인 6-8tac3ile⁺를 추가의 연구에 선택하였다.

6-8tac3ile⁺의 트레오닌 오페론은 tac 프로모터의 제어하에 있기 때문에, 이소프로필-β-D-티오갈락토사이드(IPTG)는 세포가 thr 오페론을 충분히 발현시키도록 유도하는 데에 필요하다. 그러나, thr 오페론의 발현을 유도하기 위해 IPTG를 사용하는 것은 본 발명의 방법에 따르면 덜 바람직하다.

따라서, 이러한 불필요한 조절적 장애를 제거하기 위해, 6-8tac3ile⁺를 CGSC로부터 제조된 P1 파지로 감염시킴으로써, 결합성 lac 리프레서(lacI) 유전자를 도입시킨다. 생성된 형질도입체(6-8tac3lacI⁻를 테트라사이클린에 대한 내성을 시험하고, 테트라사이클린 내성 콜로니를 선별하였다.

실시예 2 트레오닌 생산의 진탕 플라스크 발효 연구

다양한 이. 콜리 균주에서의 트레오닌 생산은 진탕 플라스크 발효를 통해 실시하여 비교 측정하였다. 시험할 균주는 LB 아가 배지[트립تون 10 g/L, 추출물 5 g/L, 아가 15 g/L]에서 성장시켰다. 1일 내지 2일 동안 성장시킨 후, 세포를 pH 7.2의 시드 배지[덱스트로스 32.5 g/L; K₂HPO₄ 24.35 g/L; KH₂PO₄ 9.5 g/L; 효모 추출물 15 g/L; (NH₄)₂SO₄ 5 g/L; MgSO₄ · 7H₂O 1 g/L] 5 mL에 현탁시켰다. 시드를 37°C에서 250 rpm의 교반 속도로 24 시간 동안 성장시켰다. pH 7.2의 발효 배지[덱스트로스 40 g/L; 효모 추출물 2 g/L; 시트르산 2 g/L; (NH₄)₂SO₄ 25 g/L; MgSO₄ · 7H₂O 2.8 g/L; CaCO₃ 20 g/L; 미량 금속 용액 2 mL] 15 mL를 시드에 첨가하고 250 rpm의 교반 속도로 37°C에서 발효 공정을 수행하였다. 배양후, 배양 브로스내에 축적된 L-트레오닌의 양을 HPLC(ISC0 모델 2353 펌프, 레이닌 모델 RI-1 굴절률 검출기 및 아미넥스 Hp87-CA 칼럼)에 의해 분석하였다.

각각의 시험한 균주에 의해 생산된 L-트레오닌의 양을 아래에 제시한다.

균주	생산된 L-트레오닌(g/L)
G909	4.95
6-8	11.45
tac3	12.9(IPTG에 의해 유도됨)
	10.6(유도되지 않음)
6-8 tac3 ile ⁺	12.7(IPTG에 의해 유도됨)
6-8 tac lacI ⁻	13.9
kat 13	14.0

실시예 3 발효 연구

본 발명의 이. 콜리 균주 및 그 전구 균주를 발효에 의한 L-트레오닌 생산에 대해 시험하였다.

다음 조건하에서 G909를 시험하였다. 2L의 차단된 진탕 플라스크내에 트립신 분해성 간장 브로스 30 g/L 및 효모 추출물 5 g/L을 함유하는 수성 배양 배지 0.5L을 G909 1.5 mL로 접종하고, 진탕기상에서 35°C 및 200 rpm으로 8.5 시간 동안 항온배양하였다. 성숙 접종물 0.9 mL(0.03%)를 시드 발효기 배지[옥수수로 담근 솔 10 g/L d.s., L-이소루이신 0.4 g/L, KH₂PO₄ 2.5 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 2.0 g/L, (NH₄)₂SO₄ 0.5 g/L, 무수 시트르산 0.192 g/L; FeSO₄ · 7H₂O 0.03 g/L, MnSO₄ · H₂O 0.021 g/L 및 덱스트로스 80 g/L] 3.0 L을 함유하는 유리 발효기에 첨가하였다. 다음 조건하에서 항온배양을 수행하였다: 39°C의 온도에서 처음 18 시간, 그 후, 지속 기간중에 37°C; pH 6.9(NH₄OH의 첨가에 의해 유지됨); 기류 3.5 LPM; 초기 교반속도 500 rpm, 그 후, DO를 20%로 유지하기 위해 속도를 증가시킴; 및 역압 1 psi 내지 2 psi. 시드 발효기 단계의 완료는 덱스트로스의 고갈에 의해 측정하였다. 다음 사항을 제외하고는 상기 언급한 배지와 동일한 배지(주 발효기 배지)를 함유하는 유리 발효기에 시드 발효기로부터 유래한 성숙 접종물 315 mL(15%)를 첨가하였다: 부피는 2.1 L였고, L-이소루이신 0.34 g/L을 첨가하였다. 다음 조건하에 48 시간 동안 항온 배양을 수행하였다: 온도 37°C; pH 6.9(NH₄OH로 유지함); 20 시간까지는 3.5 LPM의 기류, 그 후, 4.0 LPM까지 증

가시킹; 초기 교반 속도 500 rpm, 그 후, DO를 20%로 유지하기 위해 증가시킴; 역압 1 psi 내지 2 psi; 및 덱스트로스 레벨 10 g/L(50% w/w 덱스트로스 용액을 공급하여 유지함). 발효는 48 시간 후에 종결시켰다. G909는 다음과 같은 결과를 산출하였다: 총 생산량 274 g 및 수율 23.2%의 트레오닌의 최종 역가 62.3 g/L.

주발효기 단계의 개시시에 IPTG 1 mg/L을 첨가한 것을 제외하고는, 상기한 G909와 동일한 조건하에 tac3을 시험하였다. IPTG의 첨가에 의해, tac3은 총 생산량 355g 및 수율 28.8%의 트레오닌 85.7 g/L의 최종 역가를 산출하였다.

상기한 G909와 동일한 조건하에 6-8을 시험하였다. 6-8은 다음의 결과를 산출하였다: 총 생산량 290 g 및 수율 28.3%의 트레오닌 74.1 g/L의 최종 역가.

IPTG의 첨가를 포함하여, 상기한 tac3과 동일한 조건하에 6-8tac3을 시험하였다. 6-8tac3은 다음의 결과를 산출하였다: 총 생산량 421 g 및 수율 35.1%의 트레오닌 99.3 g/L의 최종 역가.

시드 발효기 단계 또는 주 발효기 단계중 어느 하나에서 L-이소루이신이 필요하지 않은 것을 제외하고는, 상기한 6-8tac3과 동일한 조건하에서, 6-8tac3ile+를 시험하였다. 22.5 시간에 이르렀을 때 교반이 실패하였기 때문에, 22 시간에서의 역가만을 기록하였다(트레오닌 62 g/L).

IPTG를 첨가하지 않은 것을 제외하고는, 상기한 6-8tac3과 동일한 조건하에 kat-13을 시험하였다. 이러한 조건하에, kat-13은 총 생산량 445g 및 수율 33.1%의 트레오닌 102 g/L의 최종 역가를 산출하였다.

구성된 균주의 관련 유전자형, 트레오닌의 발효 생산에 필요한 보충물 및 기록된 역가는 하기 표에 제시한다

균주	관련 유전자형	생산 보충물	30시간에서의 역가	48시간에서의 역가	수율
G9	ilvA ⁻	l ⁺ le	ND	ND	ND
G909	ilvA ⁻ , tdh::Cm	l ⁺ le	53	62.3	23.2
tac3	ilvA ⁻ , tdh::Cm, ptacthrABC	l ⁺ le, IPTG	86	85.7	28.8
6-8	ilvA ⁻ , tdh::Cm, Bor-R	l ⁺ le	70	74.1	28.3
6-8tac3	ilvA ⁻ , tdh::Cm, ptacthrABC, Bor-R	l ⁺ le, IPTG	75	99.3	35.1
6-8tac3ile+	tdh::Cm, Bor-R, ptacthrABC	IPTG	62(22시간에서)	NA	NA
kat 13	tdh::Cm, Bor-R, ptacthrABC lacI ⁻	l ⁺ le	92.1	102	33.1

Bor-R: 보렐리딘 내성

ND: 시행하지 않음

NA: 이용 불가

ptacthrABC: tac 프로모터의 제어하의 thrA, thrB 및 thrC 유전자

(57) 청구의 범위

청구항 1

(a) i). coli(E. coli) 균주를 배지에서 배양하는 단계 및 (b) 상기 i). coli에 의해 생산된 L-트레오닌을 회수하는 단계를 포함하는, L-트레오닌의 생산 방법으로서, 이 때, 상기 i). coli 균주는 (i) 하나 이상의 비천연 프로모터와 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 트레오닌(thr) 오페론을 염색체상에 포함하고, (ii) 트레오닌을 생산하는 하나 이상의 트레오닌 생합성 효소를 암호화하는 하나 이상의 유전자를 보유하는 어떠한 재조합 플라스미드도 필요로 하지 않는 균주인, L-트레오닌의 생산 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 i). coli가 약 30 시간내에 L-트레오닌을 약 50 g/L 이상 생산할 수 있는 것인, L-트레오닌의 생산 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 비천연 프로모터가 tac 프로모터, lac 프로모터, trp 프로모터, lpp 프로모터, P_L 프로모터 및 P_R 프로모터로 구성된 군에서 선택되는 것인, L-트레오닌의 생산 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 트레오닌 오페론이 피드백 내성의 아스파르테이트 키나제-호모세린 디하이드로게나제를 암호화하는 유전자를 포함하는 것인, L-트레오닌의 생산 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 이. 콜리가 kat-13 균주인, L-트레오닌의 생산 방법.

청구항 6

제3항에 있어서, 상기 비천연 프로모터가 tac 프로모터인, L-트레오닌의 생산 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 이. 콜리가 염색체상에 결함성 트레오닌 디하이드로게나제 유전자를 포함하는 것인, L-트레오닌의 생산 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 트레오닌 오페론이 ATCC 21277로부터 입수한 것인, L-트레오닌의 생산 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 이. 콜리가 보렐리딘 내성인, L-트레오닌의 생산 방법.

청구항 10

아미노산에 대한 하나 이상의 생합성 효소를 암호화하는 재조합 플라스미드를 보유하지 않은 아미노산 생산 이. 콜리 균주를 제조하는 방법으로서, (a) 아미노산 생산 미생물에서 얻은 유전 물질을 이. 콜리 균주의 염색체내로 도입시키는 단계; (b) 아미노산 생합성 유전자를 작동 가능한 연결 상태로 염색체에 배치하기 전에 비천연 프로모터를 상기 염색체내로 삽입하여 그 발현을 제어하는 단계; 및 (c) 선택적으로, 상기 염색체로부터 아미노산 생합성에 대한 영양 요구성 및/또는 이 생합성에 대한 조절적 방해 작용을 제거하는 단계를 포함하는 아미노산 생산 이. 콜리 균주의 제조 방법.

청구항 11

미생물 이. 콜리 균주로서, (i) 그 염색체가 하나 이상의 비천연 프로모터와 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 트레오닌(thr) 오페론을 포함하고, (ii) 이 균주가 트레오닌을 생산하는 하나 이상의 트레오닌 생합성 효소를 암호화하는 하나 이상의 유전자를 보유하는 어떠한 재조합 플라스미드도 필요로 하지 않는 특성을 보유한 이. 콜리 균주.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 트레오닌 오페론이 피드백 내성의 아스파르테이트 키나제 I-호모세린 디하이드로게나제 I 유전자(thrA), 호모세린 키나제(thrB), 트레오닌 신타제 유전자(thrC)로 구성되는 것인, 이. 콜리 균주.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 이. 콜리가 kat-13 균주인 이. 콜리 균주.

청구항 14

제11항에 있어서, 상기 비천연 프로모터가 tac 프로모터인 이. 콜리 균주.

청구항 15

제11항에 있어서, 상기 이. 콜리가 염색체상에 결함성 트레오닌 디하이드로게나제 유전자를 포함하는 것인, 이. 콜리 균주.

청구항 16

제11항에 있어서, 상기 트레오닌 오페론이 ATCC 21277로부터 입수한 것인, 이. 콜리 균주.

청구항 17

제11항에 있어서, 상기 이. 콜리가 보렐리딘 내성인 이. 콜리 균주.

청구항 18

제11항에 있어서, 상기 이. 콜리가 균주 NRRL B-21593의 특성을 가진 것인 이. 콜리 균주.

청구항 19

(a) 보렐리딘 내성의 이. 콜리 균주를 배지에서 배양하는 단계 및 (b) 상기 이. 콜리에 의해 생산된 L-트레오닌을 회수하는 단계를 포함하는, L-트레오닌의 생산 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 이. 콜리가 약 30 시간내에 L-트레오닌을 약 50 g/L 이상 생산할 수 있는 것인, L-트레오닌의 생산 방법.

청구항 21

제19항에 있어서, 상기 이. 콜리가 하나 이상의 비천연 프로모터와 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 트레오닌(thr) 오페론을 포함하는 것인, L-트레오닌의 생산 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 트레오닌 오페론이 피드백 내성의 아스파르테이트 키나제-호모세린 디히드로게나제를 암호화하는 유전자를 포함하는 것인, L-트레오닌의 생산 방법.

청구항 23

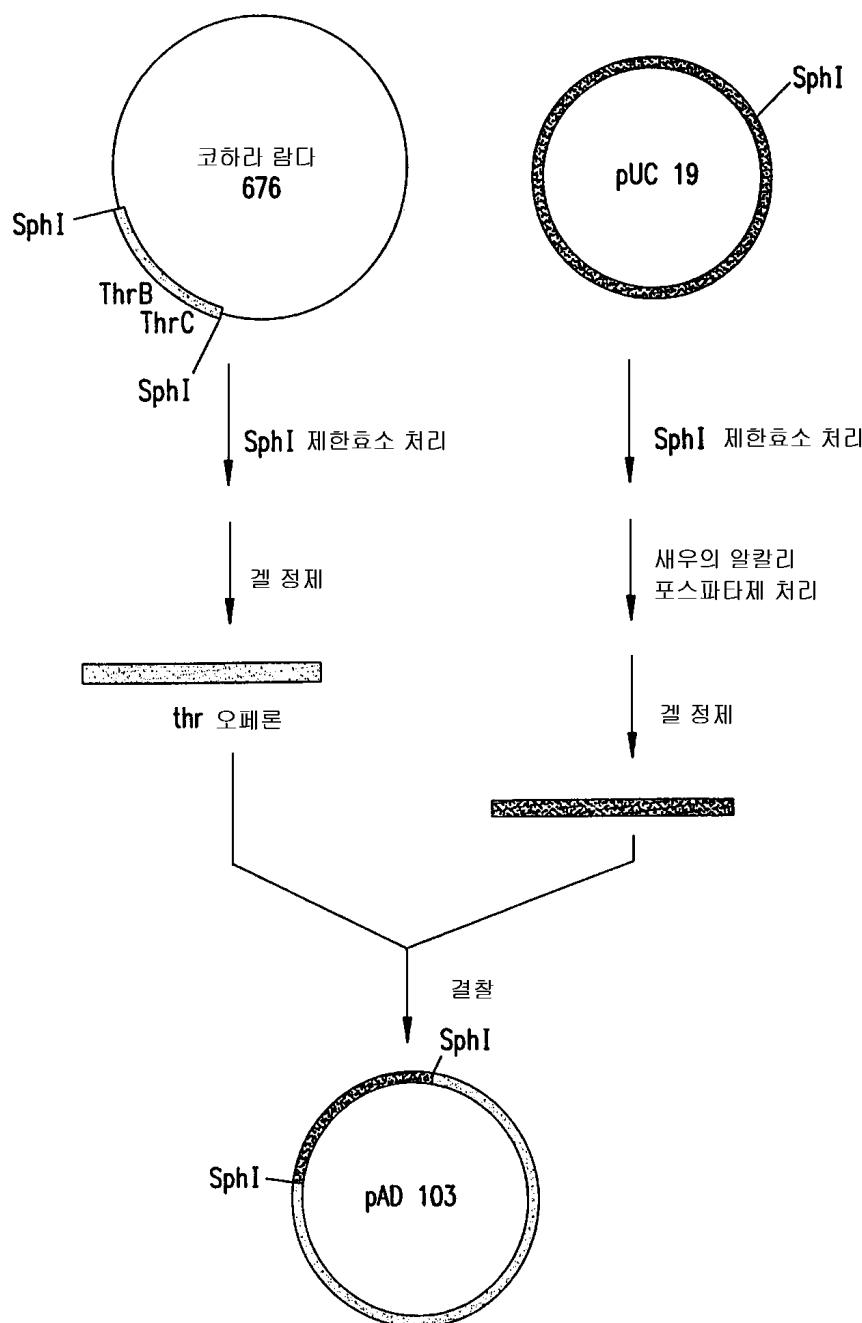
제19항에 있어서, 상기 이. 콜리가 kat-13 균주인, L-트레오닌의 생산 방법.

청구항 24

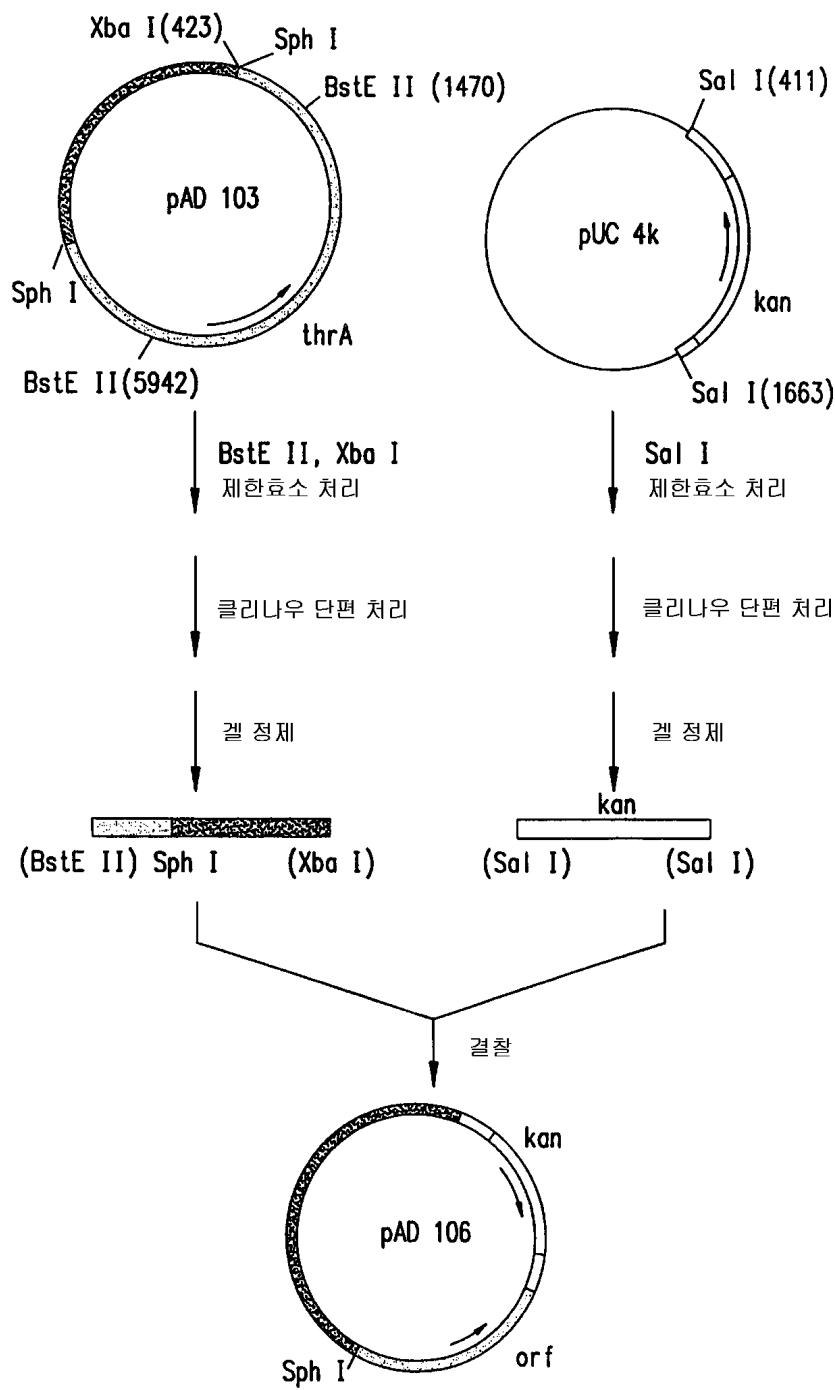
제21항에 있어서, 상기 비천연 프로모터가 tac 프로모터인, L-트레오닌의 생산 방법.

도면

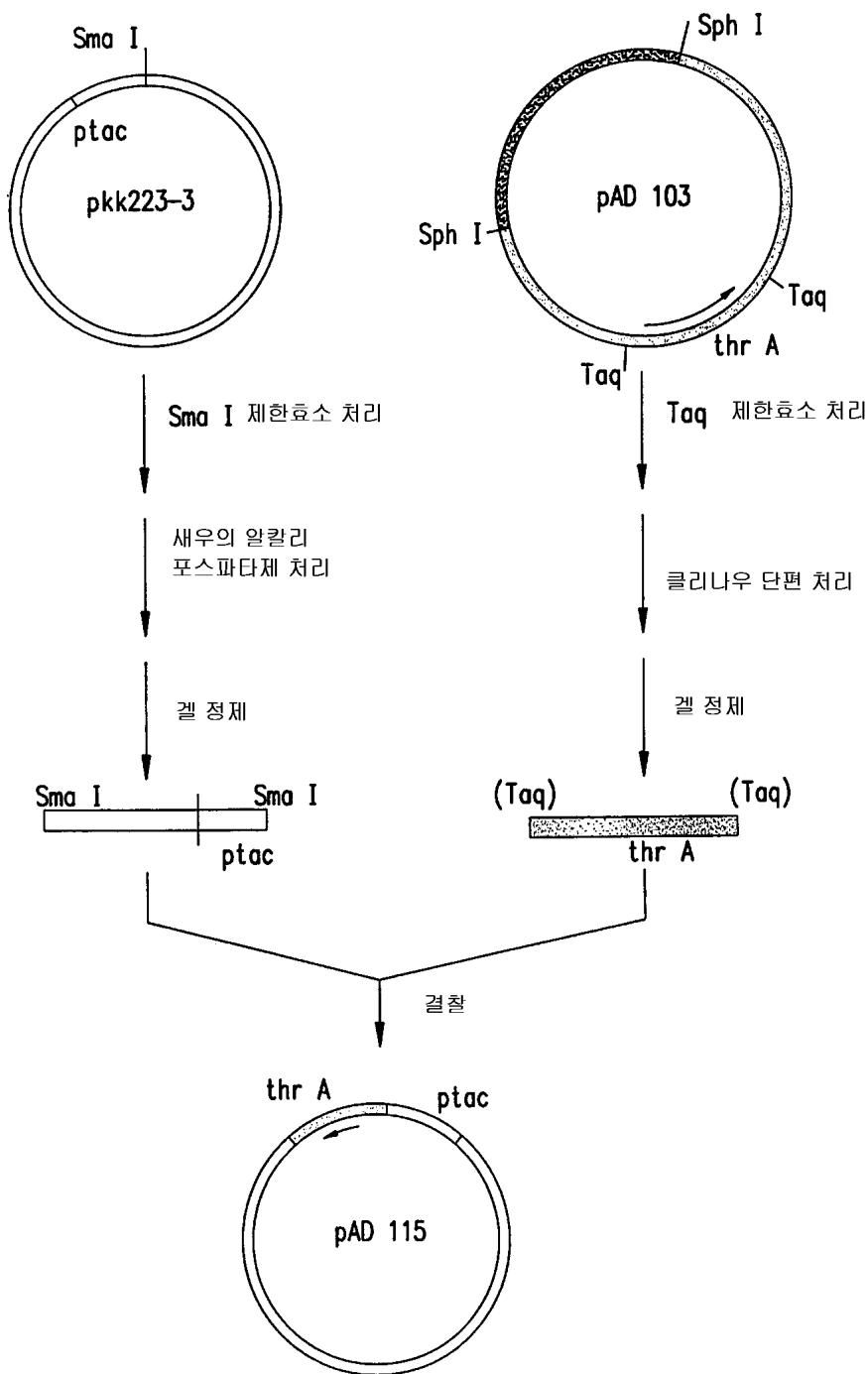
도면1



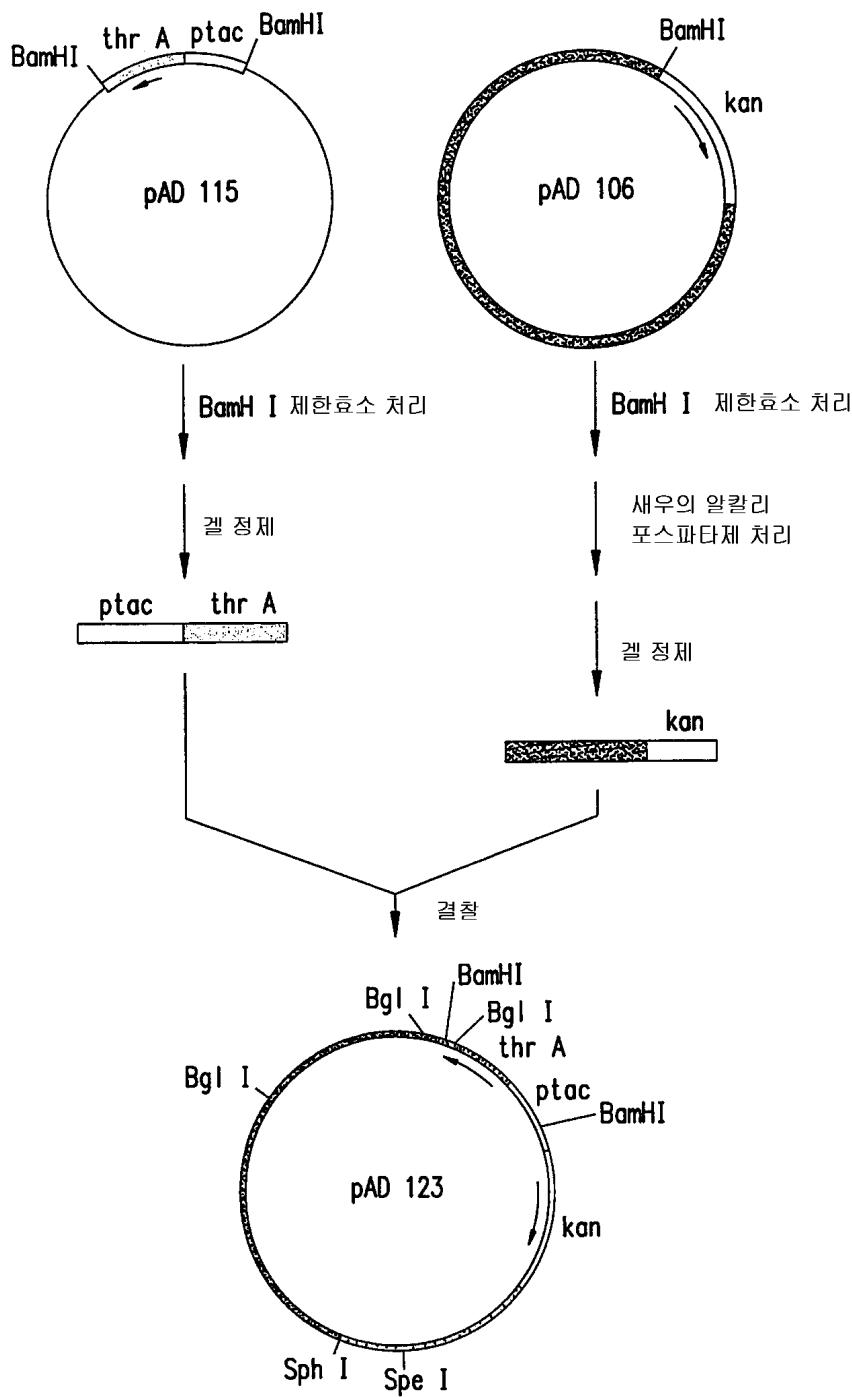
도면2



도면3



도면4



도면5

