

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl. ⁷
C12N 1/20

(11) 공개번호 특2002 - 0003519
(43) 공개일자 2002년01월12일

(21) 출원번호 10 - 2001 - 0039749
(22) 출원일자 2001년07월04일

(30) 우선권주장 JP - P - 2000 - 0020 2000년07월05일 일본(JP)
4256

(71) 출원인 아지노모토 가부시기가이샤
에가시라 구니오
일본국 도쿄도 주오구 교바시 1쵸메15반1고

(72) 발명자 오타키히로미
일본가나가와켄가와사키시가와사키쿠스즈키초1 - 1
나카무라준
일본가나가와켄가와사키시가와사키쿠스즈키초1 - 1
이즈이히로시
일본가나가와켄가와사키시가와사키쿠스즈키초1 - 1
나카마쓰쓰요시
일본가나가와켄가와사키시가와사키쿠스즈키초1 - 1

(74) 대리인 이병호

심사청구 : 없음

(54) L - 글루탐산을 생산하는 세균 및 L - 글루탐산의 생산방법

요약

L - 글루탐산은, 예를 들어, 트레할로스 - 6 - 포스페이트 신타제를 암호화하는 유전자, 말토올리고실트레할로스 신타제를 암호화하는 유전자 또는 이들 유전자 모두를 파괴함으로써 트레할로스 합성 능력이 감소되거나 제거된, L - 글루탐산 생산 능력을 갖는 코리네형 세균을 배양하여 배지에서 L - 글루탐산을 생산, 축적하고, 배지로부터 L - 글루탐산을 수집함으로써 생산된다.

색인어

L - 글루탐산 생산 능력을 갖는 코리네형 세균, otsA 유전자, treY 유전자, 트레할로스 - 6 - 포스페이트 신타제, 말토올리고실트레할로스 신타제,

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 신규한 L-글루탐산을 생산하는 세균 및 이를 이용하는 발효에 의한 L-글루탐산의 생산 방법에 관한 것이다. L-글루탐산은 식료품, 약물 등에 있어서 중요한 아미노산이다.

통상적으로, L-글루탐산은, 브레비박테리움(*Brevibacterium*), 코리네박테리움(*Corynebacterium*) 또는 마이크로박테리움(*Microbacterium*) 속 또는 이들의 돌연변이체 균주에 속하는 소위 L-글루탐산을 생산하는 코리네형 세균을 이용하는 발효 방법에 의해 주로 생산된다[참조 문헌: Amino Acid Fermentation, pp.195 - 215, Gakkai Shuppan Center, 1986].

발효에 의한 L-글루탐산의 생산에서, 트레할로스가 2차 산물로서 또한 생산된다는 사실은 공지되어 있다. 따라서, 생산된 트레할로스를 분해하거나 대사하는 기술이 개발되어 왔다. 이러한 기술은 트레할로스에 대한 증식 능력이 도입된 코리네형 세균을 이용하는 발효에 의한 아미노산의 생산 방법[참조: 일본 공개 특허공보 제5-276935호] 및 트레할로스 이화 효소를 암호화하는 유전자가 증폭된 코리네형 세균을 이용하는 발효에 의한 아미노산의 생산 방법[참조: 대한민국 특허공보 제165836호]을 포함한다. 그러나, L-글루탐산을 생산하는 세균에서 트레할로스 자체의 형성을 억제하는 방법은 공지되어있지 않다.

에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)에서, 트레할로스의 합성은 트레할로스-6-포스페이트 신타제에 의해 촉매된다. 상기 효소는 *otsA* 유전자에 의해 암호화되어 있는 것으로 공지되어 있다. 추가로, *otsA* 유전자가 파괴된 에스케리키아 콜라이 균주는 고삼투압 배지에서 거의 성장하지 못하는 것으로 보고 되어 있다[참조 문헌: H.M. Glaever, et al., J. Bacteriol., 170(6), 2841 - 2849 (1998)]. 그러나, *otsA* 유전자 파괴와 물질 생산 간의 관계는 공지되어 있지 않다.

이와 달리, *treY* 유전자가 브레비박테리움 세균 속에 속하는 세균 중의 브레비박테리움 헬볼럼(*Brevibacterium helvolum*)에 대하여 공지되어 있다 해도, 어떠한 *otsA* 유전자도 브레비박테리움 헬볼럼에 대하여 공지되어 있지 않다. 미코박테리움(*Mycobacterium*) 세균 속에 속하는 세균에 대해서는, 트레할로스 생합성 경로의 효소를 암호화하는 유전자로서 *otsA* 유전자 및 *treY* 유전자와 상이한 *treS* 유전자(트레할로스 신타제(*TreS*))에 의해 암호화되는 생성물에 의해 촉매되는 반응을 통한 경로가 공지되어 있다[참조 문헌: De Smet K.A., et al., Microbiology, 146 (1), 199 - 208 (2000)]. 그러나, 상기 경로는 말토스를 기질로서 사용하며, 글루코스, 프럭토스 또는 수크로스를 출발 물질로서 사용하는 통상적인 L-글루탐산 발효와는 관련되지 않는다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명은, 코리네형 세균을 사용하는 발효에 의한 L-글루탐산 생산에 있어서 L-글루탐산의 생산 효율을 2차 산물로서의 트레할로스 생산을 억제하는 것을 통하여 개선시키는 것을 목적으로 한다.

본 발명의 발명자들은 위에서 언급한 목적을 달성하기 위해 지속적으로 연구하였다. 그 결과, 본 발명자들은 브레비박테리움 속에 속하는 세균은 미코세균 투베르쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*)와 같이 *otsA* 유전자 및 *treY* 유전자를 포함하고, L-글루탐산의 생산 효율은 하나 이상의 이들 유전자를 파괴함으로써 개선시킬 수 있다는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

즉, 본 발명에 의해 다음의 세균이 제공된다.

- 1) 세균내 트레할로스 합성 능력이 감소되거나 결실된, L - 글루탐산 생산 능력을 갖는 코리네형 세균.
 - 2) 트레할로스 합성 경로의 효소를 암호화하는 염색체 유전자내에 돌연변이를 도입시키거나 당해 유전자를 파괴시킴에 의해 트레할로스 합성 능력이 감소되거나 결실된, (1)에 따르는 코리네형 세균.
 - 3) 트레할로스 합성 경로의 효소를 암호화하는 유전자가 트레할로스 - 6 - 포스페이트 신타제를 암호화하는 유전자, 말토올리고실타레할로스 신타제를 암호화하는 유전자 또는 이들 유전자 둘다로 이루어진, (2)에 따르는 코리네형 세균.
 - 4) 트레할로스 - 6 - 포스페이트 신타제를 암호화하는 유전자가 서열 30의 아미노산 서열을 암호화하고, 말토올리고실타레할로스 신타제를 암호화하는 유전자가 서열 32의 아미노산 서열을 암호화하는 (3)에 따르는 코리네형 세균.
 - 5) (1) 내지 (4) 중의 어느 하나에 따르는 코리네형 세균을 배지에서 배양하여 배지중에 L - 글루탐산을 생산하고 축적하여 상기 배지로부터 L - 글루탐산을 수득함을 포함하는, L - 글루탐산의 생산 방법.
 - 6) 다음의 A) 또는 B)에서 정의되는 단백질을 암호화하는 DNA:
 - A) 서열 30의 아미노산 서열을 갖는 단백질,
 - B) 하나 또는 수개의 아미노산 잔기의 치환, 결실, 삽입 또는 첨가를 포함하고 트레할로스 - 6 - 포스페이트 신타제 활성을 갖는 서열 30의 아미노산 서열을 갖는 단백질.
 - 7) 다음의 a) 또는 b)에서 정의되는, (6)에 따르는 DNA:
 - a) 서열 29의 뉴클레오타이드 서열의 484번 내지 1938번 뉴클레오타이드 잔기를 적어도 포함하는 뉴클레오타이드 서열을 함유하는 DNA,
 - b) 엄격한 조건(stringent condition)하에서 서열 29의 뉴클레오타이드 서열의 484번 내지 1938번 뉴클레오타이드 잔기를 적어도 포함하는 뉴클레오타이드 서열과 하이브리드화 가능하고 상기 뉴클레오타이드 서열과 55% 이상의 상동성을 나타내며, 트레할로스 - 6 - 포스페이트 신타제 활성을 갖는 단백질을 암호화하는 DNA.
 - 8) 다음의 A) 또는 B)에서 정의되는 단백질을 암호화하는 DNA:
 - A) 서열 32의 아미노산 서열을 갖는 단백질,
 - B) 하나 또는 수 개의 아미노산 잔기의 치환, 결실, 삽입 또는 첨가를 포함하고 말토올리고실타레할로스 신타제 활성을 갖는 서열 32의 아미노산 서열을 갖는 단백질.
 - 9) 다음의 a) 또는 b)에서 정의되는, (8)에 따르는 DNA:
 - a) 서열 31의 뉴클레오타이드 서열의 82번 내지 2514번 뉴클레오타이드 잔기를 적어도 포함하는 뉴클레오타이드 서열을 함유하는 DNA,
 - b) 엄격한 조건하에서, 서열 31의 뉴클레오타이드 서열의 82번 내지 2514번 뉴클레오타이드 잔기를 적어도 포함하는 뉴클레오타이드 서열과 하이브리드화 가능하고, 위의 뉴클레오타이드 서열과 60% 이상의 상동성을 나타내며, 말토올리고실타레할로스 신타제 활성을 갖는 단백질을 암호화하는 DNA.
- 트레할로스 - 6 - 포스페이트 신타제 활성은, α, α - 트레할로스 - 6 - 포스페이트 및 UDP가 UDP - 글루코스 및 글루코스 - 6 - 포스페이트로부터 생성되는 반응을 촉매하는 활성을 의미하고, 말토올리고실타레할로스 신타제 활성은 말토트리오실타레할로스가 말토펜토스로부터 생성되는 반응을 촉매하는 활성을 의미한다.

본 발명에 있어서, 코리네형 세균을 사용하는 발효에 의한 L - 글루탐산 생산에 있어서 L - 글루탐산의 생산 효율은 2차 산물로서의 트레할로스의 생산 억제를 통하여 개선될 수 있다.

발명의 구성 및 작용

이후에, 본 발명을 상세하게 설명한다.

본 발명의 코리네형 세균은 트레할로스 합성 능력이 감소되거나 결실된, L - 글루탐산 생산 능력을 갖는 코리네형 세균이다.

본 발명에서 언급되는 코리네형 세균은, 산 내성 및 포자 형성 능력을 갖지 않는 호기성 그람 - 양성 간균인, 문헌[참조 문헌: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th edition, p.599 (1974)]에서 정의된 바와 같은 미생물 그룹을 포함한다. 이제까지, 이들 미생물 그룹은 브레비박테리움 속으로 분류되었지만, 현재는 코리네박테리움 속으로 통합되었으며[참조 문헌: Int. J. Syst. Bacteriol., 41, 255 (1981)], 코리네박테리움 속과 밀접하게 관련있는 브레비박테리움 또는 마이크로박테리움 속에 속하는 세균을 포함한다. 이러한 코리네형 세균의 예는 다음과 같이 언급된다:

코리네박테리움 아세토엑시도필럼(*Corynebacterium acetoacidophilum*)

코리네박테리움 아세토글루타미컴(*Corynebacterium acetoglutamicum*)

코리네박테리움 알카놀리티컴(*Corynebacterium alkanolyticum*)

코리네박테리움 칼루내(*Corynebacterium callunae*)

코리네박테리움 글루타미컴(*Corynebacterium glutamicum*)

코리네박테리움 릴리움(*Corynebacterium lilium*: 코리네박테리움 글루타미컴)

코리네박테리움 멜라세콜라(*Corynebacterium melassecola*)

코리네박테리움 서모아미노제네스(*Corynebacterium thermoaminogenes*)

코리네박테리움 헤르쿨리스(*Corynebacterium herculis*)

브레비박테리움 디바리카툼(*Brevibacterium divaricatum*: 코리네박테리움 글루타미컴)

브레비박테리움 플라븀(*Brevibacterium flavum*: 코리네박테리움 글루타미컴)

브레비박테리움 이마리오필럼(*Brevibacterium immariophilum*)

브레비박테리움 락토퍼멘툼(*Brevibacterium lactofermentum*: 코리네박테리움 글루타미컴)

브레비박테리움 로세움(*Brevibacterium roseum*)

브레비박테리움 사카롤리티컴(*Brevibacterium saccharolyticum*)

브레비박테리움 티오제니탈리스(*Brevibacterium thiogenitalis*)

브레비박테리움 암모니아제네스(*Brevibacterium ammoliagenes*: 코리네박테리움 암모니아제네스)

브레비박테리움 알BUM(*Brevibacterium album*)

브레비박테리움 세리움(*Brevibacterium cerium*)

마이크로박테리움 암모니아필럼(*Microbacterium ammoniaphilum*).

특히, 다음의 균주를 예로 들 수 있다.

코리네박테리움 아세트엑시도필럼 ATCC 13870

코리네박테리움 아세트글루타미컴 ATCC 15806

코리네박테리움 알카놀리티컴 ATCC21511

코리네박테리움 칼루네 ATCC 15991

코리네박테리움 글루타미컴 ATCC 13020, 13032, 13060

코리네박테리움 릴리움(코리네박테리움 글루타미컴) ATCC 15990

코리네박테리움 멜라세콜라 ATCC 17965

코리네박테리움 서모아미노제네스 AJ12340(FERM BP - 1539)

코리네박테리움 헤르쿨리스 ATCC13868

브레비박테리움 디바리카툼(코리네박테리움 글루타미컴) ATCC 14020

브레비박테리움 플라BUM(코리네박테리움 글루타미컴) ATCC 13826, ATCC14067

브레비박테리움 이마리오필럼 ATCC14068

브레비박테리움 락토퍼멘툼(코리네박테리움 글루타미컴) ATCC 13665, ATCC 13869

브레비박테리움 로세움 ATCC 13825

브레비박테리움 사카롤리티컴 ATCC 14066

브레비박테리움 티오제니탈리스 ATCC 19240

브레비박테리움 암모니아제네스(코리네박테리움 글루타미컴) ATCC 6871

브레비박테리움 알BUM ATCC 15111

브레비박테리움 세리움 ATCC 15112

마이크로박테리움 암모니아필럼 ATCC 15354.

위에서 언급한 바와 같은 이러한 코리네형 세균의 트레할로스 합성 능력은 돌연변이유발 처리 또는 유전자 재조합 기술을 사용하여 트레할로스 합성 경로의 효소를 암호화하는 유전자를 돌연변이유발시키거나 파괴함으로써 감소시키거나 결실시킬 수 있다. 이러한 돌연변이는 트레할로스 합성 경로의 효소를 암호화하는 유전자의 전사 또는 해독을 억제하는 돌연변이, 또는 트레할로스 합성 경로의 효소의 제거 또는 감소를 유발하는 돌연변이일 수 있다. 트레할로스 합성 경로의 효소는 트레할로스 - 6 - 포스페이트 신타제, 말토올리고실타레할로스 신타제 또는 이들 효소 둘다를 예로 들 수 있다.

트레할로스 합성 경로의 효소를 암호화하는 유전자의 파괴는 동종 재조합을 사용하는 유전자 치환에 의해 수행할 수 있다. 트레할로스 합성 경로의 효소를 암호화하는 유전자를 함유하는 DNA를 사용하여 코리네형 세균을 형질전환함으로써 코리네형 세균 염색체상의 유전자를 파괴하여 효소의 일부를 결실시킬 수 있으며, 따라서 트레할로스 합성 경로의 효소는 정상적인 기능을 하지 못하며(결실형 유전자), 염색체상의 결실형 유전자와 정상 유전자 간의 재조합이 일어난다. 이러한 동종 재조합에 의한 유전자 파괴는 이미 확립되어 있다. 이 때문에, 코리네형 세균 중에서 복제하지 않는 선형 DNA 또는 환상 DNA를 사용하는 방법 및 온도 민감성 복제 오리진을 함유하는 플라스미드를 사용하는 방법을 언급할 수 있다. 그러나, 코리네형 세균내에서 복제하지 않는 환상 DNA 또는 온도 민감성 복제 오리진을 함유하는 플라스미드를 사용하는 방법이 바람직하다.

트레할로스 합성 경로의 효소를 암호화하는 유전자에는 예를 들어, *otsA* 유전자 또는 *treY* 유전자가 있으며, 이들 유전자 둘다로 이루어질 수도 있다. 브레비박테리움 락토퍼멘텀의 *otsA* 유전자 및 *treY*의 뉴클레오타이드 서열 및 이의 플랜킹 영역이 본 발명에 의해 유추되며, 이들 유전자들은 당해 서열을 기초로 한 프라이머를 작제하고 프라이머 및 브레비박테리움 락토퍼멘텀의 염색체 DNA를 주형으로 사용하여 PCR[폴리머라제 연쇄 반응, 참조 문헌: White, T.J. et al., Trends Genet., 5, 185 (1989)]을 수행함으로써 쉽게 수득할 수 있다.

이후에 기술하는 실시예에서 수득되는 브레비박테리움 락토퍼멘텀의 *otsA* 유전자를 포함하는 뉴클레오타이드 서열 및 *treY* 유전자를 포함하는 뉴클레오타이드 서열은 각각 서열 29 및 31에 나타낸다. 추가로, 이들 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화되는 아미노산 서열은 각각 서열 30 및 32에 나타낸다.

각각의 *otsA* 유전자 및 *treY* 유전자는 하나 또는 수 개의 아미노산의 하나 또는 대다수의 위치에서의 치환, 결실, 삽입 또는 첨가를 포함하는 단백질을 암호화하는 유전자가 될 수 있으며, 단, 이에 의해 암호화된 트레할로스 - 6 - 포스페이트 신타제 또는 말토올리고실타레할로스 신타제의 활성이 변질되지 않아야 한다. "몇개의" 아미노산의 수가 3차 구조 단백질의 아미노산 잔기의 위치 또는 유형에 따라 상이하며, 상이한 아미노산의 수는 바람직하게는 1 내지 40개, 보다 바람직하게는 1 내지 20개, 추가로 바람직하게는 1 내지 10개이다.

상기에서 기술한 트레할로스 - 6 - 포스페이트 신타제 또는 말토올리고실타레할로스 신타제와 실질적으로 동일한 단백질을 암호화하는 DNA는 예를 들어, 각각의 뉴클레오타이드 서열을 예를 들어, 부위특이적 돌연변이유발법에 의해 변형시켜 특정 부위의 하나 이상의 아미노산 잔기가 치환, 결실, 삽입, 첨가 또는 역위를 포함하도록 함으로써 수득될 수 있다. 또한, 상기에서 기술한 바와 같이 변형된 DNA는 통상적으로 공지된 돌연변이 처리에 의해 수득할 수 있다. 돌연변이 처리는, 트레할로스 - 6 - 포스페이트 신타제 또는 말토올리고실타레할로스를 암호화하는 DNA를 시험관내에서 예를 들어, 하이드록실아민으로 처리하는 방법 및 미생물, 예를 들어, 트레할로스 - 6 - 포스페이트 신타제 또는 말토올리고실타레할로스를 암호화하는 DNA를 갖는 에스케리키아 속에 속하는 세균을 자외선 조사 또는 돌연변이 처리에서 통상적으로 사용되는 돌연변이유발원(예:N - 메틸 - N' - 니트로 - N - 니트로소구아니딘 (NTG) 및 질산)으로 처리하는 방법을 포함한다.

상기에서 기술한 바와 같은 뉴클레오타이드의 치환, 결실, 삽입, 첨가 또는 역위는, 예를 들어, 개별적인 차이 또는 트레할로스-6-포스페이트 신타제 또는 말토올리고실트레할로스를 갖는 미생물 종 또는 속의 차이를 기초로 하는 천연 발생 돌연변이주 또는 변이주를 또한 포함한다.

상기에서 기술한 바와 같은 트레할로스-6-포스페이트 신타제 또는 말토올리고실트레할로스 신타제와 실질적으로 동일한 단백질을 암호화하는 DNA는, 상기에서 기술한 바와 같이 돌연변이된 이러한 DNA를 적합한 세포내에서 발현시키고 발현 생성물의 트레할로스-6-포스페이트 신타제 활성 또는 말토올리고실트레할로스 신타제의 활성을 조사함으로써 수득할 수 있다.

또한, 트레할로스-6-포스페이트 신타제와 매우 동일한 단백질을 암호화하는 DNA는, 예를 들어, 서열 29에 나타난 뉴클레오타이드 서열의 484 내지 1938번 뉴클레오타이드에 상응하는 뉴클레오타이드 서열 또는 엄격한 조건하에서 뉴클레오타이드 서열로부터 작제할 수 있으며, 위에서 언급한 뉴클레오타이드 서열과 55% 이상, 바람직하게는 65% 이상, 보다 바람직하게는 75% 이상의 상동성을 나타내고, 돌연변이된 트레할로스-6-포스페이트 신타제를 암호화하는 DNA 또는 이를 포함하는 세포로부터의 트레할로스-6-포스페이트 신타제 활성을 갖는 프로브를 갖는 DNA와 하이브리드화 가능한 DNA를 분리함으로써 수득할 수 있다. 유사하게는, 말토올리고실트레할로스 신타제와 실질적으로 동일한 단백질을 암호화하는 DNA는, 예를 들어, 서열 31에 나타난 뉴클레오타이드 서열의 뉴클레오타이드 82번 내지 2514번에 상응하는 뉴클레오타이드 서열 또는 엄격한 조건하에서 뉴클레오타이드 서열로부터 작제할 수 있으며, 상술한 뉴클레오타이드 서열에 대해 60% 이상, 바람직하게는 70% 이상, 보다 바람직하게는 80% 이상의 상동성을 나타내고, 돌연변이된 말토올리고실트레할로스 신타제를 암호화하는 DNA 또는 이를 갖는 세포로부터의 말토올리고실트레할로스 신타제 활성을 갖는 프로브를 갖는 DNA와 하이브리드화 가능한 DNA를 분리함으로써 수득할 수 있다.

본원에서, "엄격한 조건"은 소위 특이적 하이브리드가 형성되며 비-특이적 하이브리드는 형성되지 않는 조건이다. 이러한 조건은 수치로 명확히 표현하는 것은 어렵다. 그러나, 예를 들어, 엄격한 조건은 높은 상동성을 갖는 DNA, 예를 들어, 55% 이상, 바람직하게는 60% 이상의 상동성을 갖는 DNA가 서로 하이브리드화 되며, 상기한 수준보다 낮은 상동성을 갖는 DNA는 서로 하이브리드화되지 않는 조건을 포함한다. 또한, 엄격한 조건의 예에는 DNA가 서던 하이브리드화(Southern hybridization)에서의 세척액의 표준조건(즉, $1\times$ SSC, SDS 0.1%, 바람직하게는 60°C 에서 $0.1\times$ SSC, SDS 0.1%)에 상응하는 염 농도에서 서로 하이브리드화되는 조건이 있다.

프로브로서는, 각각의 유전자의 일부 서열을 또한 사용할 수 있다. 이러한 프로브는, 각각의 유전자의 뉴클레오타이드 서열에 기초하여 제조된 올리고뉴클레오타이드를 프라이머로서 사용하고 각각의 유전자를 함유한 DNA 단편을 주형으로서 사용하는 PCR에 의해 제조할 수 있다. 약 300bp 길이의 DNA 단편을 프로브로서 사용하는 경우, 하이브리드화를 위한 세척액 조건은 50°C , $2\times$ SSC 및 0.1% SDS로 이루어질 수 있다.

상기에서 기술한 바와 같이, 이러한 조건하의 하이브리드화 가능한 유전자는, 유전자의 암호화 영역에서 발생하는 종결 코돈을 갖는 유전자 및 활성 중심부의 돌연변이로 인해 활성을 갖지 않는 유전자를 포함한다. 그러나, 이러한 돌연변이주는 각각의 유전자를 시판되는 발현 벡터와 연결시키고 트레할로스-6-포스페이트 활성 또는 말토올리고실트레할로스 신타제 활성을 측정함으로써 쉽게 제거할 수 있다.

otsA 유전자 또는 treY 유전자를 코리네형 세균 염색체상에서 이들 유전자를 파괴하기 위해 사용하는 경우, 암호화된 트레할로스-6-포스페이트 신타제 또는 말토올리고실트레할로스 신타제가 이의 활성을 갖을 필요는 없다. 또한, 유전자 파괴용으로 사용되는 otsA 유전자 또는 treY 유전자는, 이들이 코리네형 세균의 이들 유전자와 동종 재조합 할 수 있다면, 다른 미생물로부터 유도된 유전자도 가능하다. 예를 들어, 에스케리키아 또는 미코박테리움에 속에 속하는 세균의 otsA 유전자, 알트로박터, 브레비박테리움 헬볼룸 또는 리조비움 속에 속하는 세균의 treY 유전자를 언급할 수 있다.

otsA 유전자 또는 treY 유전자의 결실형 유전자는, 제한효소(들)를 사용하여 이들 유전자의 하나 또는 일부를 함유하는 DNA 단편으로부터 일정 영역을 절단시켜 암호화 영역 또는 발현 조절 서열(예:프로모터)의 일부를 적어도 결실시킴으로써 작제할 수 있다.

추가로, 결실형 유전자는 유전자의 일부가 결실되도록 디자인된 프라이머를 사용하는 PCR을 수행함으로써 또한 수득할 수 있다. 게다가, 결실형 유전자는 단일 뉴클레오타이드 돌연변이, 예를 들어, 프레임 쉬프트 돌연변이에 의해 수득할 수 있다.

otsA 유전자의 유전자 파괴는 이후에 설명한다. treY 유전자의 유전자 파괴도 이와 유사하게 수행할 수 있다.

숙주 염색체상의 otsA 유전자는 하기와 같이 결실형 otsA 유전자로 대체할 수 있다. 즉, 결실형 otsA 유전자 및 약물, 예를 들어, 가나마이신, 클로람페니콜, 테트라사이클린 및 스트렙토마이신 내성용 마커 마커 유전자(marker gene)를 코리네형 세균내에서 자가 복제할 수 없는 플라스미드내에 삽입하여 재조합 DNA를 작제한다. 코리네형 세균을 재조합 DNA로 형질전환시킬 수 있으며 형질전환 균주를 약물을 함유한 배지에서 배양하여 재조합 DNA가 염색체 DNA내로 도입된 형질전환 균주를 수득할 수 있다. 또한, 이러한 형질전환 균주는 플라스미드로서 온도 민감성 플라스미드를 사용하고 온도 민감성 플라스미드가 복제할 수 없는 온도에서 형질전환체를 배양함으로써 수득할 수 있다.

상기에서 기술한 바와 같이, 재조합 DNA가 염색체로 삽입된 균주에서, 재조합 DNA는 염색체상에 원래 존재하는 otsA 유전자 서열과 재조합하며, 염색체 otsA 및 결실형 otsA 유전자를 포함하는 2개의 융합된 유전자가 염색체내에 삽입됨으로써 재조합 DNA의 또 다른 부분(벡터 부분 및 약물 내성 마커 유전자)이 이들 사이에 위치한다.

이어서, 염색체 DNA에 결실형 otsA 유전자만을 남기기 위해, otsA 유전자의 하나의 카피를 2개의 otsA 유전자의 재조합에 의해 (약물 내성 마커 유전자를 포함하는) 벡터 부분과 함께 염색체 DNA로부터 제거한다. 이러한 경우, 정상 otsA 유전자가 염색체 DNA 상에 남겨지며 결실형 otsA 유전자는 절단되거나, 이와 반대로, 결실형 otsA 유전자가 염색체 DNA 상에 남겨지며 정상 otsA 유전자는 제거된다. 어떠한 유형의 유전자가 염색체 DNA 상에 남겨져 있는지는 PCR, 하이브리드화 또는 이와 유사한 방법을 사용하여 염색체상의 otsA 유전자의 구조를 조사함으로써 확인할 수 있다.

본 발명을 위해 사용되는 코리네형 세균은, 이의 트레할로스 합성 능력이 결실되거나 제거되는 것 이외에, L-글루탐산의 생합성을 촉매하는 효소의 활성이 증진된다. L-글루탐산 생합성을 촉매하는 효소의 예에는 글루타메이트 데하이드로게나제, 글루타민 신타제, 글루타메이트 신타제, 이소시트레이트 데하이드로게나제, 아코니테이트 하이드라타제, 시트레이트 신타제, 피루베이트 카복실라제, 포스포에놀피루베이트 카복실라제, 포스포에놀피루베이트 신타제, 에놀라제, 포스포글리세로뮤타제, 포스포글리세레이트 키나제, 글리세르알데히드 - 3 - 포스페이트 데하이드로게나제, 트리오세포스페이트 이소머라제, 프럭토스 비스포스페이트 알돌라제, 포스포프럭토키나제, 글루코스 포스페이트 이소머라제 등이 포함된다.

또한, 본 발명을 위해 사용되는 코리네형 세균 중에서, L-글루탐산의 생합성 경로로부터 분기됨으로써, L-글루탐산 이외의 화합물을 생성하는 반응을 촉매하는 효소를 제거하거나 결손시킬 수 있다. 이러한 효소의 예에는 α -케토 글루타레이트 데하이드로게나제, 이소시트레이트 리아제, 포스페이트 아세틸트랜스퍼라제, 아세테이트 키나제, 아세토하이드록시메이트 신타제, 아세토락테이트 신타제, 포르메이트 아세틸트랜스퍼라제, 락테이트 데하이드로게나제, L-글루타메이트 데카복실라제, 1 - 피롤린 데하이드로게나제 등이 포함된다.

게다가, 비오틴 활성 억제 물질(예: 표면활성제)에 대한 온도 민감성 돌연변이를 L-글루탐산 생산 능력을 갖는 코리네형 세균중에 도입함으로써, 세균은 비오틴 활성 억제 물질의 부재하의 과량의 비오틴을 함유하는 배지에서 L-글루탐산을 생산할 수 있게된다[참조: 제W096/016180호]. 이러한 코리네형 세균으로서는, 제W096/06180호에 공개되어 있는 브레비박테리움 락토퍼멘텀 AJ13029 균주를 언급할 수 있다. AJ13029 균주는 1994년 9월 2일자로 통상산업성 공업기술원 산하 생명공학공업기술연구소[현재는 비독립 행정 법인인 National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, 국제 특허 생물 기탁기관(우편 번호: 305 - 5466, 일본 이바라키켄 쓰쿠바시 1 - 1 히가시 1 - 초메)]에 기탁하였으며 기탁 번호 FERM P - 14501을 부여받았다. 이어서, 이를 부다페스트 조약이 정한 규칙하에 1995년 8월 1일자로 국제 기탁기관으로 이전하였으며 기탁 번호 FERM BP - 5189를 부여받았다.

트레할로스 합성 능력이 감소되거나 결실된, L-글루탐산 생산 능력을 갖는 코리네형 세균을 적합한 배지에서 배양하는 경우, L-글루탐산은 배지에 축적된다.

L-글루탐산 생산을 위해 사용하는 배지는 탄소원, 질소원, 무기 이온 및 기타 필수 미량 영양소를 함유한다. 탄소원으로, 당(예: 글루코스, 락토스, 갈락토스, 프럭토스, 수크로스, 말토스, 블랙스트랩 당밀 및 전분 가수분해물); 알콜(예: 에탄올 및 이노시톨); 또는 유기산(예: 아세트산, 푸마르산, 시트르산 및 석신산)을 사용할 수 있다.

질소원으로서, 무기 암모늄 염(예: 황산암모늄, 질산암모늄, 염화암모늄, 인산암모늄 및 암모늄 아세테이트), 암모니아, 유기 질소(예: 펩톤, 육즙, 효모 추출물, 옥수수 침지액, 대두 가수분해물, 암모니아 기체, 수성 암모니아 등)을 사용할 수 있다.

무기 이온으로서(또는 이의 이온원으로서), 소량의 인산칼륨, 황산마그네슘, 철 이온, 망간 이온등을 첨가한다. 유기 미량 영양소에 대해서는, 적합한 요구량의 필수 물질(예: 비타민 B₁, 효모 추출물 등)을 첨가하는 것이 바람직하다.

바람직하게는, 배양은 통기를 위한 진탕 및 교반 또는 이와 유사한 방법을 사용하여 16 내지 72시간 동안 수행하는 호기성 조건하에서 수행한다. 배양 온도는 30 내지 40°C가 되도록 조절하고, PH는 배양 동안 5 내지 9가 되도록 조절한다. 이러한 PH로 조절하기 위해, 유기 또는 무기 산성 또는 알칼리성 물질, 암모니아 기체 등을 사용할 수 있다.

예를 들어, 이온 교환 수지, 결정화 등을 사용하는 방법에 의해 발효 브로쓰로부터 L-글루탐산을 수집할 수 있다. 상세하게는, L-글루탐산을 음이온 교환 수지에 흡착시켜 이로부터 분리시킬 수 있거나, 중화에 의해 결정화할 수 있다.

실시에

본 발명은 이후에 하기 실시예를 참조로 하여 보다 상세하게 설명된다

실시예 1: 브레비박테리움 락토퍼멘텀의 otsA 유전자가 파괴된 균주의 작제

< 1 > otsA 유전자의 클로닝

브레비박테리움 락토퍼멘텀의 otsA 유전자가 공지되어있지 않기 때문에, 이는 또 다른 미생물 otsA 유전자의 뉴클레오타이드 서열을 참조로 사용하여 수득한다. 이제까지, 에스케리키아 및 미코박테리움의 otsA 유전자를 이의 전체 뉴클레오타이드 서열에 대해서 유추한 바 있다[참조 문헌: Kaasen I., et al., Gene, 145 (1), 9 - 15 (1994); De Smet K.A., et al., Microbiology, 146 (1), 199 - 208 (2000)]. 따라서, 상기 뉴클레오타이드 서열로부터 유추한 아미노산 서열을 참조로, PCR용 DNA 프라이머 P1(서열 1) 및 P2(서열 2)를 먼저 합성한다. DNA 프라이머 P1 및 P2는 에스케리키아 콜라이 otsA 유전자(GenBank accession X69160)의 뉴클레오타이드 서열의 뉴클레오타이드 1894번 내지 1913번 및 2531번 내지 2549번의 영역에 각각 상응한다. 또한, 상기 프라이머는 미코박테리움 투베르쿨로시스(Genbank accession Z95390)의 otsA 유전자의 뉴클레오타이드 40499번 내지 40518번 및 41166번 내지 41184번 영역에 상응한다.

이어서, 프라이머 P1 및 P2를 사용하고 브레비박테리움 락토퍼멘텀 ATCC 13869의 염색체 DNA를 주형으로서 사용하며, 한 사이클이 94°C에서 0.5분 동안, 50°C에서 0.5분 동안, 72°C에서 4분 동안의 반응으로 이루어지는 사이클을 30회 반복하는 PCR을 수행한다. 그 결과, 단일 종의 0.6kbp의 증폭된 단편을 수득한다. 상기 증폭된 단편을 오리진알 TA 클로닝 키트[Original TA Cloned Kit, 제조원: Invitrogen]를 사용하여 플라스미드 벡터 pCR2.1중으로 클로닝하여 pCotsA를 수득한다. 이어서, 클로닝된 단편의 뉴클레오타이드 서열을 측정한다.

상기에서 기술한 바와 같이 수득한 otsA 유전자 일부 단편의 뉴클레오타이드 서열에 기초하여, DNA 프라이머 P10(서열 8) 및 P12(서열 10)을 새롭게 합성하고 일부 단편에 플랭킹된 알지 못하는 영역을 인버스 PCR(inverse PCR)을 사용하여 증폭시킨다[참조 문헌: Triglia, T. et al., Nucleic Acids Res., 16, 81 - 86 (1998); Ochman H., et al., Genetics, 120, 621 - 623 (1988)]. 브레비박테리움 락토퍼멘텀 ATCC 13869의 염색체 DNA를 제한 효소 BamHI, BglII, Cla I, HindIII, Kpn I, MluI, MunI, SalI 또는 XhoI로 절단하고 T4 DNA 리가제[제조원: Takara Shuzo]를 사용하여 자가 연결시킨다. 상기와 같이 수득된 DNA를 주형으로 사용하고 DNA 프라이머 P10 및 P12 사용하며, 한 사이클이 94°C에서 0.5분 동안, 55°C에서 1분 동안 및 72°C에서 4분 동안의 반응으로 이루어진 사이클을 30회 반복하는 PCR을 수행한다. 그 결과, Cla I 또는 BglII을 제한효소로서 사용하는 경우, 각각의 경우에서 증폭된 단편 4kb를 수득한다. 상기 증폭된 단편의 뉴클레오타이드 서열을 DNA 프라이머 P5 내지 P9(서열 3 내지 7) 및 P11 내지 P15(서열 9 내지 13)를 사용함으로써 직접 측정한다. 따라서, 브레비박테리움 락토퍼멘텀 ATCC 13869의 otsA 유전자의 전체 뉴클레오타이드 서열은 서열 29에 나타난 바와 같다. 상기 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 아미노산 서열은 서열 29 및 30에 나타난다.

상기에서 언급한 otsA 유전자 서열의 상동성을 에스케리키아 콜라이(GenBank accession X69610)의 otsA 유전자 및 미코박테리움 투베르쿨로시스(GenBank accession Z95390)에 관해서 측정하는 경우, 뉴클레오타이드 서열은 각각 46.3% 및 55.9%의 상동성을 나타내며 아미노산 서열은 각각 30.9% 및 51.7%의 상동성을 나타낸다. 상동성은 리프만 - 퍼슨법(Lipman - Person method)에 기반하여, 소프트웨어, " GENETIX - WIN" (Software Development)를 사용하여 산출한다[참고 문헌: Science, 227, 1435 - 1441 (1985)].

< 2> otsA 유전자 파괴용 플라스미드의 작제

코리네형 세균종의 트레할로스 생합성 경로의 효소를 암호화하는 유전자의 파괴에 의한 L - 글루탐산 생산력에서의 개선효과 여부를 조사하기 위해, otsA 유전자 파괴용 플라스미드를 작제한다. otsA 유전자 파괴용 플라스미드의 작제는 하기와 같다. otsA 유전자를 클로닝하여 주형으로서 이미 작제한 플라스미드 pCotsA, 및 Cla I 부위를 포함하는 프라이머 P29(서열 33) 및 P30(서열 34)을 사용하여, 94°C에서 0.5분 동안, 55°C에서 0.5분 동안 및 72°C에서 8분 동안의 반응으로 이루어진 사이클을 30회 반복하는 PCR을 수행한다. 증폭된 단편을 Cla I로 분해하고, T4 DNA 폴리머라제(Takara Shuzo)를 사용하여 평활 말단이 되도록하며, T4 리가제(Takara Shizo)를 사용하여 자가 연결시켜 대략 1.5kb의 중심 부분에 프레임 쉬프트 돌연변이(frame shift mutation: 서열 29의 1258번 내지 1300번 뉴클레오타이드가 결실됨)된 otsA 유전자를 포함하는 플라스미드 pCotsAC를 작제한다.

< 3> otsA 유전자가 파괴된 균주의 작제

유전자 파괴용 pCotsAC를 사용하여, L - 글루탐산 생산 세균, 브레비박테리움 락토퍼멘텀 ATCC 13869를 전기 펄스

방법으로 형질전환시키고, 형질전환체를 가나마이신 20mg/L을 함유하는 CM2B 배지에서의 성장 능력에 따라서 선별한다. otsA 유전자 파괴용 플라스미드 pCotsA는 브레비박테리움 락토퍼멘텀에서 기능할 수 있는 복제 오리진을 가지고 있지 않기 때문에, 브레비박테리움 락토퍼멘텀 염색체상의 otsA 유전자와 유전자 파괴용 플라스미드 pCotsAC 간에 발생하는 동종 재조합을 공급하는 플라스미드를 사용하여 형질전환체를 수득한다. 상기에서 기술한 바와 같이 수득한 동종 재조합 균주로부터, 유전자 파괴용 플라스미드 pCotsAC의 벡터 부분이 동종 재조합의 재발생으로 인해 제거된 균주를 마커로서 획득된 가나마이신 민감성을 기반으로하여 선별한다.

상기에서 기술한 바와 같이 수득한 균주로부터, 목적하는 프레임 쉬프트 돌연변이가 도입된 균주를 선별한다. 이러한 균주의 선별은 가나마이신 민감성으로 된 균주로부터 주형으로서 추출한 염색체 DNA 및 DNA 프라이머 P8(서열 14) 및 P13(서열 11)을 사용하고, 한 사이클이 94°C에서 0.5분 동안, 55°C에서 0.5분 동안 및 72°C에서 1분 동안의 반응으로 이루어진 사이클을 30회 반복하는 PCR을 수행하며, DNA 프라이머 P8을 사용하여 수득한 단편을 서열분석하고 프레임 쉬프트 돌연변이의 도입에 의해 otsA 유전자가 파괴되었음을 확인한다. 상기에서 기술한 바와 같이 수득한 균주를 ΔOA 균주로 명명한다.

실시에 2: treY 유전자가 파괴된 균주의 작제

< 1> treY 유전자의 클로닝

브레비박테리움 락토퍼멘텀의 treY 유전자가 공지되어있지 않기 때문에, 이는 또 다른 미생물 treY 유전자의 뉴클레오타이드 서열을 참조로 사용하여 수득한다. 이제까지, treY 유전자의 뉴클레오타이드 서열을 알트로박터, 브레비박테리움 및 리조비움 속에 대하여 유추한 바 있다[참조 문헌: Maruta K., et al., Biochim. Biophys. Acta, 1289 (1), 10 - 13 (1996); Genbank accession AF039919; Maruta k., et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 60 (4), 717 - 720 (1996)]. 따라서, 상기 뉴클레오타이드로부터 유추한 아미노산 서열의 경우에는, PCR용 DNA 프라이머 P3(서열 14) 및 P4(서열 15)를 먼저 합성한다. DNA 프라이머 P3 및 P4는 알트로박터 종(GenBank accession D63343)의 treY 유전자 뉴클레오타이드 서열의 975번 내지 992번 뉴클레오타이드 및 2565번 내지 2584번 뉴클레오타이드 영역에 개별적으로 상응한다. 또한, 상기 프라이머는 브레비박테리움 헬볼럼(Genbank accession AF039919)의 treY 유전자의 893번 내지 910번 뉴클레오타이드 및 2486번 내지 2505번 뉴클레오타이드 영역에 각각 상응한다. 더욱이, 상기 프라이머는 리조비움 종(GenBank accession D78001)의 treY 유전자의 뉴클레오타이드 862번 내지 879번 및 2452번 내지 2471번 영역에 상응한다.

이어서, 프라이머 P3 및 P4를 사용하고 브레비박테리움 락토퍼멘텀 ATCC 13869의 염색체 DNA를 주형으로서 사용하며, 한 사이클이 94°C에서 0.5분 동안, 55°C에서 0.5분 동안, 72°C에서 2분 동안의 반응으로 이루어진 사이클을 30회 반복하는 PCR을 수행한다. 그 결과, 실질적으로 동종인 1.6kbp의 증폭된 단편이 상당량 수득된다.

상기 증폭된 단편을 "오리지날 TA 클로닝 키트[Original TA Cloned Kit, 제조원: Invitrogen]"를 사용하여 플라스미드 벡터 pCR2.1내로 클로닝한다. 이어서, 약 0.6kb에 대한 뉴클레오타이드 서열을 측정한다.

상기에서 기술한 바와 같이 수득한 treY 유전자의 일부 단편의 뉴클레오타이드 서열에 기초하여, DNA 프라이머 P16(서열 16) 및 P26(서열 26)을 새롭게 합성하고 일부 단편에 플랭킹된 알지 못하는 영역을 "인버스 PCR(inverse PCR)"을 사용하여 증폭시킨다[참조 문헌: Triglia, T. et al., Nucleic Acids Res., 16, 81 - 86 (1998); Ochman H., et al., Genetics, 120, 621 - 623 (1988)]. 브레비박테리움 락토퍼멘텀 ATCC 13869의 염색체 DNA를 제한 효소 BamHI, HindIII, SalI 또는 XhoI로 절단하고 T4 DNA 리가제(Takara Shuzo)를 사용하여 자가 연결시킨다. 상기과 같이 수득된 DNA를 주형으로서 사용하고 DNA 프라이머 P16 및 P26을 사용하며, 한 사이클이 94°C에서 0.5분 동안, 55°C에서 1분 동안 및 72°C에서 4분 동안의 반응으로 이루어진 사이클을 30회 반복하는 PCR을 수행한다. 그 결과, H

indIII 또는 Sal I 을 제한 효소로서 사용하는 경우, 각각 0.6kbp 또는 1.5kbp의 증폭된 단편을 수득한다. 상기 증폭된 단편의 뉴클레오타이드 서열을 DNA 프라이머 P16 내지 P28(서열 16 내지 28)을 사용하여 직접 측정한다. 따라서, 브레비박테리움 락토퍼멘텀 ATCC 13869의 treY 유전자의 전체 뉴클레오타이드 서열은 서열 31에 나타난 바와 같이 측정한다. 상기 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 아미노산 서열은 서열 31 및 32에 나타난다.

상기에서 언급한 treY 유전자 서열의 상동성을 알트로박터 종(GenBank accession D63343)의 treY 유전자, 브레비박테리움 헬볼럼(GenBank accession AF039919)의 treY 유전자 및 리조비움 종(GenBank accession D78001)의 treY 유전자에 관해서 측정하는 경우, 뉴클레오타이드 서열은 각각 52.0%, 52.3% 및 51.9%의 상동성을 나타내며 아미노산 서열은 각각 40.9%, 38.5% 및 39.8%의 상동성을 나타낸다. 상동성은 리프만 - 퍼슨법에 기반하여, 소프트웨어, "GENETIX - WIN" (Software Development)를 사용하여 산출한다[참고 문헌: SCIENCE, 227, 1435 - 1441 (1985)].

< 2> treY 유전자 파괴용 플라스미드의 작제

코리네형 세균종의 트레할로스 생합성 경로의 효소를 암호화하는 유전자의 파괴에 의한 L - 글루탐산 생산력의 개선효과 여부를 조사하기 위해, treY 유전자 파괴용 플라스미드를 작제한다. 첫째로, 프라이머 P17(서열 17) 및 P25(서열 25)을 사용하고 ATCC 13869를 주형으로서 사용하며, 한 사이클이 94°C에서 0.5분 동안, 60°C에서 0.5분 동안 및 72°C에서 2분 동안의 반응으로 이루어진 사이클을 30회 반복하는 PCR을 수행한다. 증폭된 단편을 EcoR I 으로 절단하고, T4 리가제(Takara Shuzo)를 사용하여 EcoR I 으로 절단된 pHSG299(Takara Shuzo)에 연결하여 플라스미드 pHtreY를 수득한다. 또한, 상기 pHtreY는 AflII (Takara Shuzo)로 절단하고, T4 DNA 폴리머라제(Takara Shizo)를 사용하여 평할 말단이 되도록하며, T4 리가제(Takara Shizo)를 사용하여 자가 연결시켜 대략 중심 부분에서 프레임 쉬프트 돌연변이된(4개의 뉴클레오타이드가 서열 31의 서열중 1145번째 뉴클레오타이드 뒤에 삽입된) treY 유전자를 포함하는 플라스미드 pHtreYA를 작제한다.

< 3> treY 유전자가 파괴된 균주의 작제

유전자 파괴용 pCtreYA를 사용하여, L - 글루탐산 생산 세균, 브레비박테리움 락토퍼멘텀 ATCC 13869를 전기 펄스 방법으로 형질전환시키고, 형질전환체를 가나마이신 20mg/L을 함유하는 CM2B 배지에서 성장 능력에 따라서 선별한다. treY 유전자 파괴용 플라스미드 pCtreYA는 브레비박테리움 락토퍼멘텀에서 기능할 수 있는 복제 오리진을 가지고 있지 않기 때문에, 브레비박테리움 락토퍼멘텀 염색체상의 treY 유전자와 유전자 파괴용 플라스미드 pCtreYA 간에 발생하는 재조합을 제공하는 플라스미드를 사용하여 형질전환체를 수득한다. 상기에서 기술한 바와 같이 수득한 동종 재조합 균주로부터, 유전자 파괴용 플라스미드 pCtreYA의 벡터 부분이 동종 재조합의 재발생으로 인해 제거된 균주를 마커로써 획득된 가나마이신 민감성을 기초로하여 선별한다.

상기에서 기술한 바와 같이 수득한 균주로부터, 목적하는 프레임 쉬프트 돌연변이가 도입된 균주를 선별한다. 이러한 균주 선별은 DNA 프라이머 P19(서열 19) 및 P25(서열 25)를 사용하고, 한 사이클이 94°C에서 0.5분 동안, 55°C에서 0.5분 동안 및 72°C에서 1.5분 동안의 반응으로 이루어진 사이클을 30회 반복하는 PCR을 수행하며, DNA 프라이머 P21 또는 P23을 사용하여 수득한 단편을 서열분석하여 프레임 쉬프트 돌연변이의 도입에 의해 treY 유전자가 파괴되었음을 확인한다. 상기에서 기술한 바와 같이 수득한 균주를 ΔTA 균주로 명명한다.

실시예 3: ΔOA 균주 및 ΔTA 균주의 L - 글루탐산 생산 능력의 평가

ATCC 13869 균주, Δ OA 균주 및 Δ TA 균주는 하기와 같이 L-글루탐산을 생산하기 위해 개별적으로 배양한다. 이들 각각의 균주를 CM2B 플레이트 배지에서 배양함으로써 보충하고, 각각의 보충된 균주를 글루코스 80g, KH_2PO_4 1g, MgSO_4 0.4g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 30g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01g, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01g, 대두 가수분해물 용액 15ml, 티아민 하이드로클로라이드 200 μg , 비오틴 3 μg 및 (KOH를 사용하여 pH 8.0으로 조절된) 순수한 물 1ℓ 중의 CaCO_3 50g를 함유한 배지에서 31.5°C로 배양한다. 배양 후, 배지에 축적된 L-글루탐산의 양 및 51배 희석된 배양 브로쓰의 620nm에서의 흡광도를 측정한다. 결과는 표 1에 나타낸다.

otsA 유전자 또는 treY 유전자가 파괴된 브레비박테리움 락토퍼멘텀 균주의 성장도는 모 균주(parent strain)의 성장도와 유사하게 나타나며, 또한 L-글루탐산 생산은 모 균주와 비교하여 증가된 것으로 나타난다.

[표 1]

균주	OD ₆₂₀ (x51)	L-글루탐산(g/ℓ)	수율(%)
ATDD 13869	0.930	40.2	48.4
Δ OA	1.063	43.8	52.8
Δ TA	0.850	45.6	54.9

(서열 목록의 설명)

서열 1: otsA의 증폭용 프라이머 P1

서열 2: otsA의 증폭용 프라이머 P2

서열 3: 프라이머 P5

서열 4: 프라이머 P6

서열 5: 프라이머 P7

서열 6: 프라이머 P8

서열 7: 프라이머 P9

서열 8: 프라이머 P10

서열 9: 프라이머 P11

서열 10: 프라이머 P12

서열 11: 프라이머 P13

서열 12: 프라이머 P14

서열 13: 프라이머 P15

서열 14: treY 유전자의 증폭용 프라이머 P3

서열 15: treY 유전자의 증폭용 프라이머 P4

서열 16: 프라이머 P16

서열 17: 프라이머 P17

서열 18: 프라이머 P18

서열 19: 프라이머 P19

서열 20: 프라이머 P20

서열 21: 프라이머 P21

서열 22: 프라이머 P22

서열 23: 프라이머 P23

서열 24: 프라이머 P24

서열 25: 프라이머 P25

서열 26: 프라이머 P26

서열 27: 프라이머 P27

서열 28: 프라이머 P28

서열 29: otsA 유전자의 뉴클레오타이드 서열

서열 30: otsA의 아미노산 서열

서열 31: treY 유전자의 뉴클레오타이드 서열

서열 32: treY의 아미노산 서열

서열 33: 프라이머 P29

서열 34: 프라이머 P30

발명의 효과

본 발명에 의해, 트레할로스 합성 능력이 감소되거나 제거된, L - 글루탐산을 생산하는 세균을 사용하는 발효 방법으로 L - 글루탐산을 고 수율로 생산할 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

세균 내에서 트레할로스 합성 능력이 감소되거나 결실된, L - 글루탐산 생산 능력을 갖는 코리네형 세균.

청구항 2.

제1항에 있어서, 트레할로스 합성 능력이 트레할로스 합성 경로의 효소를 암호화하는 염색체 유전자 속으로 돌연변이를 도입하거나 당해 유전자를 파괴함으로써 감소되거나 결실되는 코리네형 세균.

청구항 3.

제2항에 있어서, 트레할로스 생합성 경로의 효소를 암호화하는 유전자가 트레할로스 - 6 - 포스페이트 신타제를 암호화하는 유전자, 말토올리고실트레할로스 신타제를 암호화하는 유전자 또는 이들 유전자 둘 다로 이루어지는 코리네형 세균.

청구항 4.

제3항에 있어서, 트레할로스 - 6 - 포스페이트 신타제를 암호화하는 유전자가 서열 30의 아미노산 서열을 암호화하고, 말토올리고실트레할로스 신타제를 암호화하는 유전자가 서열 32의 아미노산 서열을 암호화하는 코리네형 세균.

청구항 5.

제1항 내지 제4항 중의 어느 한 항에 따르는 코리네형 세균을 배지에서 배양하여 배지에 L - 글루탐산을 생산, 축적하는 단계 및

당해 배지로부터 L - 글루탐산을 수집하는 단계를 포함하는, L - 글루탐산의 생산방법.

청구항 6.

다음의 (A) 또는 (B)에서 정의되는 단백질을 암호화하는 DNA:

(A) 서열 30의 아미노산 서열을 갖는 단백질,

(B) 하나 이상의 아미노산 잔기의 치환, 결실, 삽입 또는 첨가를 포함하고 트레할로스 - 6 - 포스페이트 신타제 활성을 갖는, 서열 30의 아미노산 서열을 갖는 단백질.

청구항 7.

제6항에 있어서, 다음의 (a) 또는 (b)에서 정의되는 DNA:

(a) 서열 29의 뉴클레오타이드 서열의 484번 내지 1938번 뉴클레오타이드 잔기를 적어도 포함하는 뉴클레오타이드 서열을 함유하는 DNA,

(b) 엄격한 조건(stringent condition)하에서 서열 29의 뉴클레오타이드 서열의 484번 내지 1938번 뉴클레오타이드 잔기를 적어도 포함하는 뉴클레오타이드 서열과 하이브리드화 가능하고, 위의 뉴클레오타이드 서열과 55% 이상의 상동성을 나타내며, 트레할로스 - 6 - 포스페이트 신타제 활성을 갖는 단백질을 암호화하는 DNA.

청구항 8.

다음의 (A) 또는 (B)에서 정의되는 단백질을 암호화하는 DNA:

(A) 서열 32의 아미노산 서열을 갖는 단백질,

(B) 하나 이상의 아미노산 잔기의 치환, 결실, 삽입 또는 첨가를 포함하고 말토올리고실트레할로스 신타제 활성을 갖는 서열 32의 아미노산 서열을 갖는 단백질.

청구항 9.

제8항에 있어서, 다음의 (a) 또는 (b)에서 정의되는 DNA:

(a) 서열 31의 뉴클레오타이드 서열의 82번 내지 2514번 뉴클레오타이드 잔기를 적어도 포함하는 뉴클레오타이드 서열을 함유하는 DNA,

(b) 엄격한 조건하에서 서열 31의 뉴클레오타이드 서열의 82번 내지 2514번 뉴클레오타이드 잔기를 적어도 포함하는 뉴클레오타이드 서열과 하이브리드화 가능하고, 위의 뉴클레오타이드 서열과 60% 이상의 상동성을 나타내며, 말토올리고실트레할로스 신타제 활성을 갖는 단백질을 암호화하는 DNA.

```

<110> Ajinomoto Co., Inc.
<120> Bacterium Producing L-Glutamic Acid and Method for Producing L-Glutamic Acid
<130> 5-1998-096241-9
<150> JP 2000-204256
<151> 2000-07-05
<160> 34
<170> KOPATIN 1.71
<210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR
<220>
<221> misc_feature
<222> (3,9,18)
<223> n=a or g or c or t
<400> 1
canathggnt tyttyytnc          20
<210> 2
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR
<220>
<221> misc_feature
<222> (3,11,19)
<223> n=a or g or c or t
<400> 2
canarrttca tncrctnc          19
<210> 3
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR
<400> 3
gaatcatcca tataagatcc ggc          23
<210> 4
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR
 <400> 4
 tagctttgta gttgttgcta accg 24
 <210> 5
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR
 <400> 5
 agcgaacttg aggtttactt cccg 24
 <210> 6
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR
 <400> 6
 tgctggttcc tggcattttg cgcc 24
 <210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR
 <400> 7
 tcgaacaatc tcttcacgcc 20
 <210> 8
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR
 <400> 8
 gaatcccacc aaatctgcgc c 21
 <210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR
 <400> 9
 tgatgttgaa atgtttgggg 20
 <210> 10
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR

<400> 10	
gatgtcatgc tggttacgcc	20
<210> 11	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR	
<400> 11	
caaagcacca gtgccgtcgc gg	22
<210> 12	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR	
<400> 12	
tgttcgtttt cattcgcgtt gccg	24
<210> 13	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR	
<400> 13	
atagtttcct ggattgtttg gcgc	24
<210> 14	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (9)	
<223> n=a or g or c or t	
<400> 14	
caraayccnt ggtggtgg	18
<210> 15	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (3,6,15)	
<223> n=a or g or c or t	
<400> 15	
ggncgncgrt trtcnggrtc	20

<210> 16
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR
 <400> 16
 cgagctcttc attgatggcg 20
 <210> 17
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR
 <400> 17
 gcagctacac acgagttggg 20
 <210> 18
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR
 <400> 18
 gcaacaccta aatggttggg 20
 <210> 19
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR
 <400> 19
 gcaagaagtc tacaagcgcc 20
 <210> 20
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR
 <400> 20
 gccaacgtat tcacgg 16
 <210> 21
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR
 <400> 21
 tgatgaacca ctcgatcccc 20
 <210> 22
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR
 <400> 22
 aagacaccac cttctaccgc 20
 <210> 23
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR
 <400> 23
 caagtggaat tctgcagcgg 20
 <210> 24
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR
 <400> 24
 cctcctacaa aacctgctgg g 21
 <210> 25
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR
 <400> 25
 tcgcggatag cttttagggc 20
 <210> 26
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR
 <400> 26
 tgagttttta gaagactccc 20
 <210> 27
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR
 <400> 27
 cgcttcagtg gtgttgctccc 20
 <210> 28
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR

<400> 28

cgtaccactc cacggaaatt cccg

24

<210> 29

<211> 2369

<212> DNA

<213> Brevibacterium lactofermentum

<220>

<221> CDS

<222> (484)..(1938)

<400> 29

```

acagaatcag cgccggcaga gaaacgtcca aagactaatc agagattcgg tataaaggta 60
aaaatcaacc tgcttaggcg tctttcgctt aaatagcgta gaatatcggg tcgatcgctt 120
ttaaacactc aggaggatcc ttgccggcca aaatcacgga cactcgtccc accccagaat 180
cccttcacgc tgttgaagag gaaaccgcag ccggtgcccg caggattggt gccacctatt 240
ctaaggactt cttcgacggc gtcactttga tgtgcatgct cggcggtgaa cctcagggcc 300
tgcgttacac caaggtcgct tctgaacacg aggaagctca gccaaagaag gctacaaagc 360
ggactcgtaa ggctaccagc taagaaggct gctgctaaga aaacgaccaa gaagaccact 420
aagaaaacta ctaaaaagac caccgcaaag aagaccacaa agaagtctta agccggatct 480
tat atg gat gat tcc aat agc ttt gta gtt gtt gct aac cgt ctg cca 528
Met Asp Asp Ser Asn Ser Phe Val Val Val Ala Asn Arg Leu Pro
1 5 10 15
gtg gat atg act gtc cac cca gat ggt agc tat agc atc tcc ccc agc 576
Val Asp Met Thr Val His Pro Asp Gly Ser Tyr Ser Ile Ser Pro Ser
20 25 30
ccc ggt ggc ctt gtc acg ggg ctt tcc ccc gtt ctg gaa caa cat cgt 624
Pro Gly Gly Leu Val Thr Gly Leu Ser Pro Val Leu Glu Gln His Arg
35 40 45
gga tgt tgg gtc gga tgg cct gga act gta gat gtt gca ccc gaa cca 672
Gly Cys Trp Val Gly Trp Pro Gly Thr Val Asp Val Ala Pro Glu Pro
50 55 60
ttt cga aca gat acg ggt gtt ttg ctg cac cct gtt gtc ctc act gca 720
Phe Arg Thr Asp Thr Gly Val Leu Leu His Pro Val Val Leu Thr Ala
65 70 75
agt gac tat gaa ggc ttc tac gag ggc ttt tca aac gca acg ctg tgg 768
Ser Asp Tyr Glu Gly Phe Tyr Glu Gly Phe Ser Asn Ala Thr Leu Trp
80 85 90 95
cct ctt ttc cac gat ctg att gtt act ccg gtg tac aac acc gat tgg 816
Pro Leu Phe His Asp Leu Ile Val Thr Pro Val Tyr Asn Thr Asp Trp
100 105 110
tgg cat gcg ttt cgg gaa gta aac ctc aag ttc gct gaa gcc gtg agc 864
Trp His Ala Phe Arg Glu Val Asn Leu Lys Phe Ala Glu Ala Val Ser
115 120 125
caa gtg gcg gca cac ggt gcc act gtg tgg gtg cag gac tat cag ctg 912
Gln Val Ala Ala His Gly Ala Thr Val Trp Val Gln Asp Tyr Gln Leu
130 135 140
ttg ctg gtt cct ggc att ttg cgc cag atg cgc ctt gat ttg aag atc 960
Leu Leu Val Pro Gly Ile Leu Arg Gln Met Arg Leu Asp Leu Lys Ile
145 150 155

```

ggt ttc ttc ctc cac att ccc ttc cct tcc cct gat ctg ttc cgt cag	1008
Gly Phe Phe Leu His Ile Pro Phe Pro Ser Pro Asp Leu Phe Arg Gln	
160 165 170 175	
ctg ccg tgg cgt gaa gag att gtt cga ggc atg ctg ggc gca gat ttg	1056
Leu Pro Trp Arg Glu Glu Ile Val Arg Gly Met Leu Gly Ala Asp Leu	
180 185 190	
gtg gga ttc cat ttg gtt caa aac gca gaa aac ttc ctt gcg tta acc	1104
Val Gly Phe His Leu Val Gln Asn Ala Glu Asn Phe Leu Ala Leu Thr	
195 200 205	
cag cag gtt gcc ggc act gcc ggg tct cat gtg ggt cag ccg gac acc	1152
Gln Gln Val Ala Gly Thr Ala Gly Ser His Val Gly Gln Pro Asp Thr	
210 215 220	
ttg cag gtc agt ggt gaa gca ttg gtg cgt gag att ggc gct cat gtt	1200
Leu Gln Val Ser Gly Glu Ala Leu Val Arg Glu Ile Gly Ala His Val	
225 230 235	
gaa acc gct gac gga agg cga gtt agc gtc ggg gcg ttc ccg atc tcg	1248
Glu Thr Ala Asp Gly Arg Arg Val Ser Val Gly Ala Phe Pro Ile Ser	
240 245 250 255	
att gat gtt gaa atg ttt ggg gag gcg tcg aaa agc gcc gtt ctt gat	1296
Ile Asp Val Glu Met Phe Gly Glu Ala Ser Lys Ser Ala Val Leu Asp	
260 265 270	
ctt tta aaa acg ctc gac gag ccg gaa acc gta ttc ctg ggc gtt gac	1344
Leu Leu Lys Thr Leu Asp Glu Pro Glu Thr Val Phe Leu Gly Val Asp	
275 280 285	
cga ctg gac tac acc aag ggc att ttg cag cgc ctg ctt gcg ttt gag	1392
Arg Leu Asp Tyr Thr Lys Gly Ile Leu Gln Arg Leu Leu Ala Phe Glu	
290 295 300	
gaa ctg ctg gaa tcc ggc gcg ttg gag gcc gac aaa gct gtg ttg ctg	1440
Glu Leu Leu Glu Ser Gly Ala Leu Glu Ala Asp Lys Ala Val Leu Leu	
305 310 315	
cag gtc gcg acg cct tcg cgt gag cgc att gat cac tat cgt gtg tcg	1488
Gln Val Ala Thr Pro Ser Arg Glu Arg Ile Asp His Tyr Arg Val Ser	
320 325 330 335	
cgt tcg cag gtc gag gaa gcc gtc ggc cgt atc aat ggt cgt ttc ggt	1536
Arg Ser Gln Val Glu Glu Ala Val Gly Arg Ile Asn Gly Arg Phe Gly	
340 345 350	
cgc atg ggg cgt ccc gtg gtg cat tat cta cac agg tca ttg agc aaa	1584
Arg Met Gly Arg Pro Val Val His Tyr Leu His Arg Ser Leu Ser Lys	
355 360 365	
aat gat ctc cag gtg ctg tat acc gca gcc gat gtc atg ctg gtt acg	1632
Asn Asp Leu Gln Val Leu Tyr Thr Ala Ala Asp Val Met Leu Val Thr	
370 375 380	
cct ttt aaa gac ggt atg aac ttg gtg gct aaa gaa ttc gtg gcc aac	1680
Pro Phe Lys Asp Gly Met Asn Leu Val Ala Lys Glu Phe Val Ala Asn	
385 390 395	
cac cgc gac ggc act ggt gct ttg gtg ctg tcc gaa ttt gcc ggc gcg	1728
His Arg Asp Gly Thr Gly Ala Leu Val Leu Ser Glu Phe Ala Gly Ala	
400 405 410 415	
gcc act gag ctg acc ggt gcg tat tta tgc aac cca ttt gat gtg gaa	1776
Ala Thr Glu Leu Thr Gly Ala Tyr Leu Cys Asn Pro Phe Asp Val Glu	

```

                420                425                430
tcc atc aaa cgg caa atg gtg gca gct gtc cat gat ttg aag cac aat 1824
Ser Ile Lys Arg Gln Met Val Ala Ala Val His Asp Leu Lys His Asn
                435                440                445
ccg gaa tct gcg gca acg cga atg aaa acg aac agc gag cag gtc tat 1872
Pro Glu Ser Ala Ala Thr Arg Met Lys Thr Asn Ser Glu Gln Val Tyr
                450                455                460
acc cac gac gtc aac gtg tgg gct aat agt ttc ctg gat tgt ttg gcg 1920
Thr His Asp Val Asn Val Trp Ala Asn Ser Phe Leu Asp Cys Leu Ala
                465                470                475
cag tcg gga gaa aac tca tgaaccgcgc acgaatcgcg accataggcg 1968
Gln Ser Gly Glu Asn Ser
480                485
ttcttccgct tgctttactg ctggcgctcct gtgggttcaga caccgtggaa atgacagatt 2028
ccacctgggtt ggtgaccaat atttacaccg atccagatga gtcgaattcg atcagtaatc 2088
ttgtcatttc ccagcccagc ttagattttg gcaattcttc cctgtctggg ttacttggt 2148
gtgtgccttt tacggggcgt gcggaattct tccaaaatgg tgagcaaagc tctgttctgg 2208
atgccgatta tgtgaccttg tcttccttg atttcgataa acttcccgat gattgccaag 2268
gacaagaact caaagttcat aacgagctgg ttgatcttct gcctggttct tttgaaatct 2328
ccaggacttc tggttcagaa atcttgctga ctagcgatgt c 2369
<210> 30
<211> 485
<212> PRT
<213> Brevibacterium lactofermentum
<400> 30
Met Asp Asp Ser Asn Ser Phe Val Val Val Ala Asn Arg Leu Pro Val
  1                5                10                15
Asp Met Thr Val His Pro Asp Gly Ser Tyr Ser Ile Ser Pro Ser Pro
                20                25                30
Gly Gly Leu Val Thr Gly Leu Ser Pro Val Leu Glu Gln His Arg Gly
                35                40                45
Cys Trp Val Gly Trp Pro Gly Thr Val Asp Val Ala Pro Glu Pro Phe
                50                55                60
Arg Thr Asp Thr Gly Val Leu Leu His Pro Val Val Leu Thr Ala Ser
                65                70                75                80
Asp Tyr Glu Gly Phe Tyr Glu Gly Phe Ser Asn Ala Thr Leu Trp Pro
                85                90                95
Leu Phe His Asp Leu Ile Val Thr Pro Val Tyr Asn Thr Asp Trp Trp
                100                105                110
His Ala Phe Arg Glu Val Asn Leu Lys Phe Ala Glu Ala Val Ser Gln
                115                120                125
Val Ala Ala His Gly Ala Thr Val Trp Val Gln Asp Tyr Gln Leu Leu
                130                135                140
Leu Val Pro Gly Ile Leu Arg Gln Met Arg Leu Asp Leu Lys Ile Gly
145                150                155                160
Phe Phe Leu His Ile Pro Phe Pro Ser Pro Asp Leu Phe Arg Gln Leu
                165                170                175
Pro Trp Arg Glu Glu Ile Val Arg Gly Met Leu Gly Ala Asp Leu Val
                180                185                190
Gly Phe His Leu Val Gln Asn Ala Glu Asn Phe Leu Ala Leu Thr Gln

```

195	200	205
Gln Val Ala Gly Thr Ala Gly Ser His Val Gly Gln Pro Asp Thr Leu		
210	215	220
Gln Val Ser Gly Glu Ala Leu Val Arg Glu Ile Gly Ala His Val Glu		
225	230	235
Thr Ala Asp Gly Arg Arg Val Ser Val Gly Ala Phe Pro Ile Ser Ile		
245	250	255
Asp Val Glu Met Phe Gly Glu Ala Ser Lys Ser Ala Val Leu Asp Leu		
260	265	270
Leu Lys Thr Leu Asp Glu Pro Glu Thr Val Phe Leu Gly Val Asp Arg		
275	280	285
Leu Asp Tyr Thr Lys Gly Ile Leu Gln Arg Leu Leu Ala Phe Glu Glu		
290	295	300
Leu Leu Glu Ser Gly Ala Leu Glu Ala Asp Lys Ala Val Leu Leu Gln		
305	310	315
Val Ala Thr Pro Ser Arg Glu Arg Ile Asp His Tyr Arg Val Ser Arg		
325	330	335
Ser Gln Val Glu Glu Ala Val Gly Arg Ile Asn Gly Arg Phe Gly Arg		
340	345	350
Met Gly Arg Pro Val Val His Tyr Leu His Arg Ser Leu Ser Lys Asn		
355	360	365
Asp Leu Gln Val Leu Tyr Thr Ala Ala Asp Val Met Leu Val Thr Pro		
370	375	380
Phe Lys Asp Gly Met Asn Leu Val Ala Lys Glu Phe Val Ala Asn His		
385	390	395
Arg Asp Gly Thr Gly Ala Leu Val Leu Ser Glu Phe Ala Gly Ala Ala		
405	410	415
Thr Glu Leu Thr Gly Ala Tyr Leu Cys Asn Pro Phe Asp Val Glu Ser		
420	425	430
Ile Lys Arg Gln Met Val Ala Ala Val His Asp Leu Lys His Asn Pro		
435	440	445
Glu Ser Ala Ala Thr Arg Met Lys Thr Asn Ser Glu Gln Val Tyr Thr		
450	455	460
His Asp Val Asn Val Trp Ala Asn Ser Phe Leu Asp Cys Leu Ala Gln		
465	470	475
Ser Gly Glu Asn Ser		
485		

<210> 31

<211> 2956

<212> DNA

<213> Brevibacterium lactofermentum

<220>

<221> CDS

<222> (82)..(2514)

<220>

<221> misc_feature

<222> (2953)

<223> n=a or g or c or t

<400> 31

ttttccacg caggaaggc gtgaacta agatcgagga cgtaccgcac gattttgcct 60

aactttttaag ggtgtttcat c	atg gca cgt cca att tcc gca acg tac agg	111
	Met Ala Arg Pro Ile Ser Ala Thr Tyr Arg	
	1 5 10	
ctt caa atg cga gga cct caa gca gat agc gcc ggg cgt ttc ttt ggt	159	
Leu Gln Met Arg Gly Pro Gln Ala Asp Ser Ala Gly Arg Phe Phe Gly		
	15 20 25	
ttt gcg cag gcc aaa gcc cag ctt ccc tat ctg aag aag cta ggc atc	207	
Phe Ala Gln Ala Lys Ala Gln Leu Pro Tyr Leu Lys Lys Leu Gly Ile		
	30 35 40	
agc cac ctg tac ctc tcc cct att ttt acg gcc atg cca gat tcc aat	255	
Ser His Leu Tyr Leu Ser Pro Ile Phe Thr Ala Met Pro Asp Ser Asn		
	45 50 55	
cat ggc tac gat gtc att gat ccc acc gcc atc aat gaa gag ctc ggt	303	
His Gly Tyr Asp Val Ile Asp Pro Thr Ala Ile Asn Glu Glu Leu Gly		
	60 65 70	
ggc atg gag ggt ctt cga gat ctt gct gca gct aca cac gag ttg ggc	351	
Gly Met Glu Gly Leu Arg Asp Leu Ala Ala Ala Thr His Glu Leu Gly		
	75 80 85 90	
atg ggc atc atc att gat att gtt ccc aac cat tta ggt gtt gcc gtt	399	
Met Gly Ile Ile Ile Asp Ile Val Pro Asn His Leu Gly Val Ala Val		
	95 100 105	
cca cat ttg aat cct tgg tgg tgg gat gtt cta aaa aac ggc aaa gat	447	
Pro His Leu Asn Pro Trp Trp Trp Asp Val Leu Lys Asn Gly Lys Asp		
	110 115 120	
tcc gct ttt gag ttc tat ttc gat att gac tgg cac gaa gac aac ggt	495	
Ser Ala Phe Glu Phe Tyr Phe Asp Ile Asp Trp His Glu Asp Asn Gly		
	125 130 135	
tct ggt ggc aag ctg ggc atg ccg att ctg ggt gct gaa ggc gat gaa	543	
Ser Gly Gly Lys Leu Gly Met Pro Ile Leu Gly Ala Glu Gly Asp Glu		
	140 145 150	
gac aag ctg gaa ttc gcg gag ctt gat gga gag aaa gtg ctc aaa tat	591	
Asp Lys Le Glu Phe Ala Glu Leu Asp Gly Glu Lys Val Leu Lys Tyr		
	155 160 165 170	
ttt gac cac ctc ttc cca atc gcg cct ggt acc gaa gaa ggg aca ccg	639	
Phe Asp His Leu Phe Pro Ile Ala Pro Gly Thr Glu Glu Gly Thr Pro		
	175 180 185	
caa gaa gtc tac aag cgc cag cat tac cgc ctg cag ttc tgg cgc gac	687	
Gln Glu Val Tyr Lys Arg Gln His Tyr Arg Leu Gln Phe Trp Arg Asp		
	190 195 200	
ggc gtg atc aac ttc cgt cgc ttc ttt tcc gtg aat acg ttg gct ggc	735	
Gly Val Ile Asn Phe Arg Arg Phe Phe Ser Val Asn Thr Leu Ala Gly		
	205 210 215	
atc agg caa gaa gat ccc ttg gtg ttt gaa cat act cat cgt ctg ctg	783	
Ile Arg Gln Glu Asp Pro Leu Val Phe Glu His Thr His Arg Leu Leu		
	220 225 230	
cgc gaa ttg gtg gcg gaa gac ctc att gac ggc gtg cgc gtc gat cac	831	
Arg Glu Leu Val Ala Glu Asp Leu Ile Asp Gly Val Arg Val Asp His		
	235 240 245 250	
ccc gac ggg ctt tcc gat cct ttt gga tat ctg cac aga ctc cgc gac	879	
Pro Asp Gly Leu Ser Asp Pro Phe Gly Tyr Leu His Arg Leu Arg Asp		

	255	260	265	
ctc att gga cct gac cgc tgg ctg atc atc gaa aag atc ttg agc gtt	927			
Leu Ile Gly Pro Asp Arg Trp Leu Ile Ile Glu Lys Ile Leu Ser Val				
270	275	280		
gat gaa cca ctc gat ccc cgc ctg gcc gtt gat ggc acc act ggc tac	975			
Asp Glu Pro Leu Asp Pro Arg Leu Ala Val Asp Gly Thr Thr Gly Tyr				
285	290	295		
gac ccc ctc cgt gaa ctc gac ggc gtg ttt atc tcc cga gaa tct gag	1023			
Asp Pro Leu Arg Glu Leu Asp Gly Val Phe Ile Ser Arg Glu Ser Glu				
300	305	310		
gac aaa ttc tcc atg ttg gcg ctg acc cac agt gga tcc acc tgg gat	1071			
Asp Lys Phe Ser Met Leu Ala Leu Thr His Ser Gly Ser Thr Trp Asp				
315	320	325	330	
gaa cgc gcc cta aaa tcc acg gag gaa agc ctc aaa cga gtc gtc gcg	1119			
Glu Arg Ala Leu Lys Ser Thr Glu Glu Ser Leu Lys Arg Val Val Ala				
335	340	345		
caa caa gaa ctc gca gcc gaa atc tta agg ctc gcc cgc gcc atg cgc	1167			
Gln Gln Glu Leu Ala Ala Glu Ile Leu Arg Leu Ala Arg Ala Met Arg				
350	355	360		
cgc gat aac ttc tcc acc gca ggc acc aac gtc acc gaa gac aaa ctt	1215			
Arg Asp Asn Phe Ser Thr Ala Gly Thr Asn Val Thr Glu Asp Lys Leu				
365	370	375		
agc gaa acc atc atc gaa tta gtc gcc gcc atg ccc gtc tac cgc gcc	1263			
Ser Glu Thr Ile Ile Glu Leu Val Ala Ala Met Pro Val Tyr Arg Ala				
380	385	390		
gac tac atc tcc ctc tca cgc acc acc gcc acc gtc atc gcg gag atg	1311			
Asp Tyr Ile Ser Leu Ser Arg Thr Thr Ala Thr Val Ile Ala Glu Met				
395	400	405	410	
tcc aaa cgc ttc ccc tcc cgg cgc gac gca ctc gac ctc atc tcg gcc	1359			
Ser Lys Arg Phe Pro Ser Arg Arg Asp Ala Leu Asp Leu Ile Ser Ala				
415	420	425		
gcc cta ctt ggc aat ggc gag gcc aaa atc cgc ttc gcc caa gtc tgc	1407			
Ala Leu Leu Gly Asn Gly Glu Ala Lys Ile Arg Phe Ala Gln Val Cys				
430	435	440		
ggc gcc gtc atg gcc aaa ggt gtg gaa gac acc acc ttc tac cgc gca	1455			
Gly Ala Val Met Ala Lys Gly Val Glu Asp Thr Thr Phe Tyr Arg Ala				
445	450	455		
tct agg ctc gtt gca ctg caa gaa gtc ggt ggc gcg ccg ggc agg ttc	1503			
Ser Arg Leu Val Ala Leu Gln Glu Val Gly Gly Ala Pro Gly Arg Phe				
460	465	470		
ggc gtc tcc gct gca gaa ttc cac ttg ctg cag gaa gaa cgc agc ctg	1551			
Gly Val Ser Ala Ala Glu Phe His Leu Leu Gln Glu Glu Arg Ser Leu				
475	480	485	490	
ctg tgg cca cgc acc atg acc acc ttg tcc acg cac gac acc aaa cgc	1599			
Leu Trp Pro Arg Thr Met Thr Thr Leu Ser Thr His Asp Thr Lys Arg				
495	500	505		
ggc gaa gat acc cgc gcc cgc atc atc tcc ctg tcc gaa gtc ccc gat	1647			
Gly Glu Asp Thr Arg Ala Arg Ile Ile Ser Leu Ser Glu Val Pro Asp				
510	515	520		
atg tac tcc gag ctg gtc aat cgt gtt ttc gca gtg ctc ccc gcg cca	1695			

Met	Tyr	Ser	Glu	Leu	Val	Asn	Arg	Val	Phe	Ala	Val	Leu	Pro	Ala	Pro	
		525					530					535				
gac	ggc	gca	acg	ggc	agt	ttc	ctc	cta	caa	aac	ctg	ctg	ggc	gta	tgg	1743
Asp	Gly	Ala	Thr	Gly	Ser	Phe	Leu	Leu	Gln	Asn	Leu	Leu	Gly	Val	Trp	
		540					545					550				
ccc	gcc	gac	ggc	gtg	atc	acc	gat	gcg	ctg	cgc	gat	cga	ttc	agg	gaa	1791
Pro	Ala	Asp	Gly	Val	Ile	Thr	Asp	Ala	Leu	Arg	Asp	Arg	Phe	Arg	Glu	
555					560					565					570	
tac	gcc	cta	aaa	gct	atc	cgc	gaa	gca	tcc	aca	aaa	acc	acg	tgg	gtg	1839
Tyr	Ala	Leu	Lys	Ala	Ile	Arg	Glu	Ala	Ser	Thr	Lys	Thr	Thr	Trp	Val	
				575					580					585		
gac	ccc	aac	gag	tcc	ttc	gag	gct	gcg	gtc	tgc	gat	tgg	gtg	gaa	gcg	1887
Asp	Pro	Asn	Glu	Ser	Phe	Glu	Ala	Ala	Val	Cys	Asp	Trp	Val	Glu	Ala	
			590					595					600			
ctt	ttc	gac	gga	ccc	tcc	acc	tca	tta	atc	acc	gaa	ttt	gtc	tcc	cac	1935
Leu	Phe	Asp	Gly	Pro	Ser	Thr	Ser	Leu	Ile	Thr	Glu	Phe	Val	Ser	His	
		605					610				615					
atc	aac	cgt	ggc	tct	gtg	aat	atc	tcc	tta	ggt	agg	aaa	ctg	ctg	caa	1983
Ile	Asn	Arg	Gly	Ser	Val	Asn	Ile	Ser	Leu	Gly	Arg	Lys	Leu	Leu	Gln	
		620				625				630						
atg	gtg	ggc	gct	gga	atc	ccc	gac	act	tac	caa	gga	act	gag	ttt	tta	2031
Met	Val	Gly	Ala	Gly	Ile	Pro	Asp	Thr	Tyr	Gln	Gly	Thr	Glu	Phe	Leu	
635					640					645					650	
gaa	gac	tcc	ctg	gta	gat	ccc	gat	aac	cga	cgc	ttt	gtt	gat	tac	acc	2079
Glu	Asp	Ser	Leu	Val	Asp	Pro	Asp	Asn	Arg	Arg	Phe	Val	Asp	Tyr	Thr	
				655					660					665		
gcc	aga	gaa	caa	gtc	ctg	gag	cgc	ctg	caa	acc	tgg	gat	tgg	acg	cag	2127
Ala	Arg	Glu	Gln	Val	Leu	Glu	Arg	Leu	Gln	Thr	Trp	Asp	Trp	Thr	Gln	
			670					675					680			
gtt	aat	tcg	gta	gaa	gac	ttg	gtg	gat	aac	gcc	gac	atc	gcc	aaa	atg	2175
Val	Asn	Ser	Val	Glu	Asp	Leu	Val	Asp	Asn	Ala	Asp	Ile	Ala	Lys	Met	
		685					690					695				
gcc	gtg	gtc	cat	aaa	tcc	ctc	gag	ttg	cgt	gct	gaa	ttt	cgt	gca	agc	2223
Ala	Val	Val	His	Lys	Ser	Leu	Glu	Leu	Arg	Ala	Glu	Phe	Arg	Ala	Ser	
		700				705				710						
ttt	gtt	ggt	gga	gat	cat	cag	gca	gta	ttt	ggc	gaa	ggt	cgc	gca	gaa	2271
Phe	Val	Gly	Gly	Asp	His	Gln	Ala	Val	Phe	Gly	Glu	Gly	Arg	Ala	Glu	
715					720					725					730	
tcc	cac	atc	atg	ggc	atc	gcc	cgc	ggt	aca	gac	cga	aac	cac	ctc	aac	2319
Ser	His	Ile	Met	Gly	Ile	Ala	Arg	Gly	Thr	Asp	Arg	Asn	His	Leu	Asn	
				735					740					745		
atc	att	gct	ctt	gct	acc	cgt	cga	cca	ctg	atc	ttg	gaa	gac	cgt	ggc	2367
Ile	Ile	Ala	Leu	Ala	Thr	Arg	Arg	Pro	Leu	Ile	Leu	Glu	Asp	Arg	Gly	
			750					755					760			
gga	tgg	tat	gac	acc	acc	gtc	acg	ctt	cct	ggt	gga	caa	tgg	gaa	gac	2415
Gly	Trp	Tyr	Asp	Thr	Thr	Val	Thr	Leu	Pro	Gly	Gly	Gln	Trp	Glu	Asp	
		765					770					775				
agg	ctc	acc	ggg	caa	cgc	ttc	agt	ggt	gtt	gtc	cca	gcc	acc	gat	ttg	2463
Arg	Leu	Thr	Gly	Gln	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Val	Pro	Ala	Thr	Asp	Leu	
		780				785						790				

```

ttc tca cat tta ccc gta tct ttg ttg gtt tta gta ccc gat agt gag 2511
Phe Ser His Leu Pro Val Ser Leu Leu Val Leu Val Pro Asp Ser Glu
795      800      805      810
ttt tgatccctgc acaggaaagt tagcggcgct actatgaacg atcgatatgt 2564
Phe
ctgacaacac tctctcccaa tttggcagtt actaccacga attccgacgt gcccattcca 2624
tggccgacgt cgaattcctc ctagcaattg aagaattact cacagacggt ggtgtcacct 2684
tcgatcgcgt caccacacgc atcaaagaat ggtcaagcct gaaagccaag gctcgcaagc 2744
gtcgcgacga tggctcgttg atctaccctg atccgcgcaa agacatccac gacatgatcg 2804
gtgttcggat caccacgtac cactccacgg aaattcccgt ggccttaaaa gtgctccaag 2864
actccttcat cgtccacaaa tccgtagaca aagccgctga aactcgcac tcaggcggct 2924
ttggttacgg ctcccaccac caaggattnt ag 2956
<210> 32
<211> 811
<212> PRT
<213> Brevibacterium lactofermentum
<400> 32
Met Ala Arg Pro Ile Ser Ala Thr Tyr Arg Leu Gln Met Arg Gly Pro
 1      5      10      15
Gln Ala Asp Ser Ala Gly Arg Phe Phe Gly Phe Ala Gln Ala Lys Ala
 20      25      30
Gln Leu Pro Tyr Leu Lys Lys Leu Gly Ile Ser His Leu Tyr Leu Ser
 35      40      45
Pro Ile Phe Thr Ala Met Pro Asp Ser Asn His Gly Tyr Asp Val Ile
 50      55      60
Asp Pro Thr Ala Ile Asn Glu Glu Leu Gly Gly Met Glu Gly Leu Arg
 65      70      75      80
Asp Leu Ala Ala Ala Thr His Glu Leu Gly Met Gly Ile Ile Ile Asp
 85      90      95
Ile Val Pro Asn His Leu Gly Val Ala Val Pro His Leu Asn Pro Trp
100     105     110
Trp Trp Asp Val Leu Lys Asn Gly Lys Asp Ser Ala Phe Glu Phe Tyr
115     120     125
Phe Asp Ile Asp Trp His Glu Asp Asn Gly Ser Gly Gly Lys Leu Gly
130     135     140
Met Pro Ile Leu Gly Ala Glu Gly Asp Glu Asp Lys Leu Glu Phe Ala
145     150     155     160
Glu Leu Asp Gly Glu Lys Val Leu Lys Tyr Phe Asp His Leu Phe Pro
165     170     175
Ile Ala Pro Gly Thr Glu Glu Gly Thr Pro Gln Glu Val Tyr Lys Arg
180     185     190
Gln His Tyr Arg Leu Gln Phe Trp Arg Asp Gly Val Ile Asn Phe Arg
195     200     205
Arg Phe Phe Ser Val Asn Thr Leu Ala Gly Ile Arg Gln Glu Asp Pro
210     215     220
Leu Val Phe Glu His Thr His Arg Leu Leu Arg Glu Leu Val Ala Glu
225     230     235     240
Asp Leu Ile Asp Gly Val Arg Val Asp His Pro Asp Gly Leu Ser Asp
245     250     255
Pro Phe Gly Tyr Leu His Arg Leu Arg Asp Leu Ile Gly Pro Asp Arg

```

Trp	Leu	Ile	Ile	Glu	Lys	Ile	Leu	Ser	Val	Asp	Glu	Pro	Leu	Asp	Pro
Arg	Leu	Ala	Val	Asp	Gly	Thr	Thr	Gly	Tyr	Asp	Pro	Leu	Arg	Glu	Leu
Asp	Gly	Val	Phe	Ile	Ser	Arg	Glu	Ser	Glu	Asp	Lys	Phe	Ser	Met	Leu
305															320
Ala	Leu	Thr	His	Ser	Gly	Ser	Thr	Trp	Asp	Glu	Arg	Ala	Leu	Lys	Ser
Thr	Glu	Glu	Ser	Leu	Lys	Arg	Val	Val	Ala	Gln	Gln	Glu	Leu	Ala	Ala
Glu	Ile	Leu	Arg	Leu	Ala	Arg	Ala	Met	Arg	Arg	Asp	Asn	Phe	Ser	Thr
Ala	Gly	Thr	Asn	Val	Thr	Glu	Asp	Lys	Leu	Ser	Glu	Thr	Ile	Ile	Glu
Leu	Val	Ala	Ala	Met	Pro	Val	Tyr	Arg	Ala	Asp	Tyr	Ile	Ser	Leu	Ser
385															400
Arg	Thr	Thr	Ala	Thr	Val	Ile	Ala	Glu	Met	Ser	Lys	Arg	Phe	Pro	Ser
Arg	Arg	Asp	Ala	Leu	Asp	Leu	Ile	Ser	Ala	Ala	Leu	Leu	Gly	Asn	Gly
Glu	Ala	Lys	Ile	Arg	Phe	Ala	Gln	Val	Cys	Gly	Ala	Val	Met	Ala	Lys
Gly	Val	Glu	Asp	Thr	Thr	Phe	Tyr	Arg	Ala	Ser	Arg	Leu	Val	Ala	Leu
Gln	Glu	Val	Gly	Gly	Ala	Pro	Gly	Arg	Phe	Gly	Val	Ser	Ala	Ala	Glu
465															480
Phe	His	Leu	Leu	Gln	Glu	Glu	Arg	Ser	Leu	Leu	Trp	Pro	Arg	Thr	Met
Thr	Thr	Leu	Ser	Thr	His	Asp	Thr	Lys	Arg	Gly	Glu	Asp	Thr	Arg	Ala
Arg	Ile	Ile	Ser	Leu	Ser	Glu	Val	Pro	Asp	Met	Tyr	Ser	Glu	Leu	Val
Asn	Arg	Val	Phe	Ala	Val	Leu	Pro	Ala	Pro	Asp	Gly	Ala	Thr	Gly	Ser
Phe	Leu	Leu	Gln	Asn	Leu	Leu	Gly	Val	Trp	Pro	Ala	Asp	Gly	Val	Ile
545															560
Thr	Asp	Ala	Leu	Arg	Asp	Arg	Phe	Arg	Glu	Tyr	Ala	Leu	Lys	Ala	Ile
Arg	Glu	Ala	Ser	Thr	Lys	Thr	Thr	Trp	Val	Asp	Pro	Asn	Glu	Ser	Phe
Glu	Ala	Ala	Val	Cys	Asp	Trp	Val	Glu	Ala	Leu	Phe	Asp	Gly	Pro	Ser
Thr	Ser	Leu	Ile	Thr	Glu	Phe	Val	Ser	His	Ile	Asn	Arg	Gly	Ser	Val
Asn	Ile	Ser	Leu	Gly	Arg	Lys	Leu								

660							665					670				
Glu	Arg	Leu	Gln	Thr	Trp	Asp	Trp	Thr	Gln	Val	Asn	Ser	Val	Glu	Asp	
675							680					685				
Leu	Val	Asp	Asn	Ala	Asp	Ile	Ala	Lys	Met	Ala	Val	Val	His	Lys	Ser	
690							695					700				
Leu	Glu	Leu	Arg	Ala	Glu	Phe	Arg	Ala	Ser	Phe	Val	Gly	Gly	Asp	His	
705							710					715				
Gln	Ala	Val	Phe	Gly	Glu	Gly	Arg	Ala	Glu	Ser	His	Ile	Met	Gly	Ile	
725							730					735				
Ala	Arg	Gly	Thr	Asp	Arg	Asn	His	Leu	Asn	Ile	Ile	Ala	Leu	Ala	Thr	
740							745					750				
Arg	Arg	Pro	Leu	Ile	Leu	Glu	Asp	Arg	Gly	Gly	Trp	Tyr	Asp	Thr	Thr	
755							760					765				
Val	Thr	Leu	Pro	Gly	Gly	Gln	Trp	Glu	Asp	Arg	Leu	Thr	Gly	Gln	Arg	
770							775					780				
Phe	Ser	Gly	Val	Val	Pro	Ala	Thr	Asp	Leu	Phe	Ser	His	Leu	Pro	Val	
785							790					795				
Ser	Leu	Leu	Val	Leu	Val	Pro	Asp	Ser	Glu	Phe						
805							810									

<210> 33

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

 $\langle 220 \rangle$

<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR

<400> 33

ccaaaatcga taacatcaat cgagatcggg

30

<210> 34

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

 $\langle 220 \rangle$

<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR

<400> 34

cttgatcgat taaaaacgct cgacgagccg

30