



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년05월22일

(11) 등록번호 10-2113368

(24) 등록일자 2020년05월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/02 (2006.01) C12P 23/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 9/0073 (2013.01)
C12N 9/0069 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-7019232
(22) 출원일자(국제) 2013년08월27일
심사청구일자 2018년08월24일
(85) 번역문제출일자 2015년07월16일
(65) 공개번호 10-2015-0099787
(43) 공개일자 2015년09월01일
(86) 국제출원번호 PCT/IB2013/056583
(87) 국제공개번호 WO 2014/096990
국제공개일자 2014년06월26일
(30) 우선권주장
12198352.2 2012년12월20일
유럽특허청(EPO)(EP)
61/830,273 2013년06월03일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
KR1020050092739 A*
KR1020020013847 A
KR1020090046376 A
US20080060096 A1
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
디에스엠 아이피 어셋츠 비.브이.
네덜란드 엔엘-6411 티이 헤르렌 헤트 오버룬 1
(72) 발명자
파렐 크리스토퍼 엠
미국 매사추세츠주 02421 렉싱턴 렉싱턴 리지 드
라이브 6134
마요르가 마리아 엘레나
미국 매사추세츠주 02155 메드포드 브래드포드 애
비뉴 22
쉐브로익스 바스티엔
스위스 체하-4002 바젤 피오 박스 2676 디에스엠
뉴트리셔널 프로덕츠 리미티드 패튼트 디파트먼트
(74) 대리인
제일특허법인(유)

전체 청구항 수 : 총 13 항

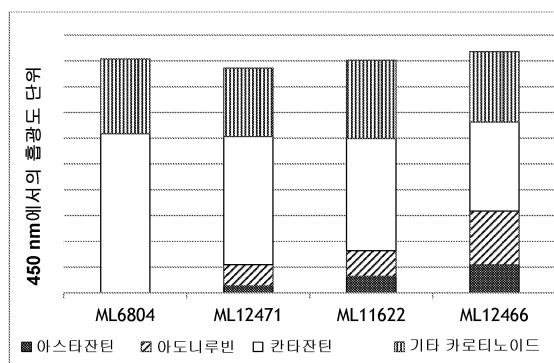
심사관 : 문명순

(54) 발명의 명칭 카로틴 수산화효소 및 이의 카로티노이드 생산에 있어서의 용도

(57) 요약

본 발명은 신규 수산화효소, 이를 암호화하는 핵산 서열, 이러한 서열을 포함하는 발현 구축물 및 벡터, 이에 의해 형질전환된 미생물, 및 이소프레노이드의 미생물 수산화 방법, 예를 들면 베타-카로틴을 베타-크립토잔틴 및 제아잔틴으로 전환시키고 칸타잔틴을 아스타잔틴으로 전환시키는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12P 23/00 (2013.01)

C12Y 114/13129 (2013.01)

Y02P 20/52 (2015.11)

명세서

청구범위

청구항 1

(a) 서열번호 2의 폴리펩티드

로 구성된 군에서 선택되는, 이소프레노이드의 미생물 수산화를 위한 수산화효소 활성을 갖는 폴리펩티드.

청구항 2

제1항에 있어서,

수산화 효소 활성이 β -카로틴을 β -크립토잔틴 및/또는 제아잔틴으로 전환시키는 효소 활성, 및/또는 칸타잔틴을 아도니루빈 및/또는 아스타잔틴으로 전환시키는 것인 폴리펩티드.

청구항 3

제1항에 따른 폴리펩티드를 암호화하는 단리된 핵산.

청구항 4

제3항에 있어서,

서열번호 1 또는 서열번호 3으로 표시된 서열로 구성된 단리된 핵산.

청구항 5

발현 숙주 세포에서 폴리펩티드의 생산을 지시하는 하나 이상의 제어 서열에 작동적으로 연결된 제1항에 따른 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 핵산 구축물.

청구항 6

제3항 또는 제4항에 따른 핵산이 발현되는 형질전환된 미생물.

청구항 7

제6항에 있어서,

야생형의 카로티노이드 대사작용과 상이한 카로티노이드 대사작용을 갖는 형질전환된 미생물.

청구항 8

제7항에 있어서,

유질(oleaginous) 균주인 형질전환된 미생물.

청구항 9

제8항에 있어서,

유질 균주가 야로위아 리포라이티카(*Yarrowia lipolytica*) 균주인 형질전환된 미생물.

청구항 10

하나 이상의 조절 신호에 기능적으로 연결된, 서열번호 1로 표시된 서열로 구성된 핵산 또는 핵산 구축물을 도입하는 단계를 포함하는, 제6항에 따른 형질전환된 미생물을 생산하는 방법.

청구항 11

제1항에 따른 폴리펩티드의 존재하에 β -이오논을 하이드록시- β -이오논으로 전환시키고/시키거나 4-케토- β -이

오논을 3-하이드록시-4-케토- β -이오논 구조적 요소로 전환시키는 단계를 포함하는, 카로티노이드 또는 카로티노이드 유도체의 제조 방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

(a) 제6항에 따른 형질전환된 미생물을 카로티노이드의 생산을 조장하는 조건하에 배양하는 단계; 및

(b) 카로티노이드 또는 카로티노이드 유도체를 회수하는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 13

제1항 또는 제2항에 따른 폴리펩티드를 포함하는 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신규한 수산화효소, 이를 암호화하는 핵산 서열, 발현 구축물 및 이러한 서열을 포함하는 벡터, 이에 의해 형질전환되는 미생물, 및 이소프레노이드(isoprenoid)의 미생물 수산화 방법, 예를 들어 베타-카로틴을 제아잔틴(zeaxanthin) 또는 베타-크립토잔틴(cryptoxanthin)으로 전환시키고 칸타잔틴(canthaxanthin)을 아스타잔틴(astaxanthin)으로 전환시키는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 카로티노이드는 특정 유기체, 예를 들어 광합성 유기체(예컨대 식물, 조류, 시아노박테리아(cyanobacteria)), 및 몇몇 진균에 의해 천연적으로 생산되는 황색 내지 적색 색상 범위의 유기 안료이다.

[0003] 카로티노이드, 예컨대 루테인, 제아잔틴 또는 아스타잔틴은 안료 물질 및 비타민 A 유도체의 전구체로서 인간 및 가축 식이에 중요한 첨가제이다. 또한, 카로티노이드는 건강-촉진 작용을 갖고, 예컨대 면역 반응을 증진시키고, 이들 항산화제 특성으로 인해 암-예방 작용을 하는데, 이는 흥미로운 기능식품으로서 이들을 사용할 수 있게 한다. 따라서 카로티노이드의 경제적 제조 방법 및 증가된 카로티노이드 함량을 갖는 식품이 매우 중요하다. 카로티노이드를 제조하기 위한 특히 경제적인 방법은 카로티노이드-생산 유기체로부터의 카로티노이드 생합성의 생합성 유전자 및 단백질을 사용하는 생물공학 방법이다.

[0004] β -카로틴의 β -크립토잔틴을 경유한 제아잔틴으로의 효소적 전환을 촉매화하는 원핵생물 β -카로틴 수산화효소, 및 이들 단백질을 암호화하는 유전자는 세균 에르위니아 우레도보라(*Erwinia uredovora*)[미사와(Misawa) 등의 문헌 "*J. Bacteriol.* 1990, 6704-6712"; 유럽 특허 제EP 393690 B1호], 에리위니아 헤르비콜라(*Erwinia herbicola*)(국제 특허출원공개 제WO 9113078호), 아그로박테리움 아우란티아쿰(*Agrobacterium aurantiacum*)[미사와 등의 문헌 "*J. Bacteriol.* 1995, 6575-6584"; 유럽 특허출원공개 제735 137 A1호], 알칼리게네스(*Alcaligenes*) 종 PC-1(유럽 특허출원공개 제735 137 A1호), 플라보박테리움(*Flavobacterium*) 종 균주 R1534[파사몬테스(Pasamontes) 등의 문헌 "*Gene.* 1997, 185: 35-41"; 유럽 특허출원공개 제747483 A2호] 및 시아노박테리아 시네코사이스티스(*Synechocystis*) 종 PCC6803[마사모토(Masamoto) 등의 문헌 "*Plant Cell Physiol.* 1998, 39(5): 560-564"]로부터 공지되어 있다.

[0005] 아그로박테리움 아우란티아쿰, 알칼리게네스 및 에르위니아 우레도보라로부터의 원핵생물 β -카로틴 수산화효소가 추가적으로 칸타잔틴을 아도니루빈(adonirubin)을 경유해 아스타잔틴으로 전환시킬 수 있음이 공지되어 있다 [미사와 등의 문헌 "*J. Bacteriol.* 1995, 6575-6584"; 프레이저(Fraser) 등의 문헌 "*J. Biol. Chem.* 1997, 272: 6128-6135"].

[0006] 진핵생물 공급원으로부터, 3종의 식물 β -카로틴 수산화효소가 β -카로틴의 β -크립토잔틴을 경유한 제아잔틴으로의 효소적 전환을 촉매화하는 것으로 공지되어 있다. 상응하는 cDNA는 아라비도시스 탈리아나(*Arabidopsis thaliana*)[쿰닝햄(Cunningham) 등의 문헌 "*J. Biol. Chem.* 1996, 271: 24349-24352", 국제 특허출원공개 제WO 9736998호], 및 캡시쿰 안눔 엘(*Capsicum annuum L.*)[부비르(Bouvier) 등의 문헌 "*Biochim. Biophys. Acta.*

1998, 1391: 320-328"]로부터 단리되었다.

[0007] 진핵생물 기원의 유전자는, 이들이 식물과 같은 보다 고등 유전자이식 유기체에서 더 잘 발현하므로 원핵생물 유전자에 비해 유리하다. 그럼에도 불구하고, 진핵생물 핵산을 유기체내로 혼입함으로써 증가된 카로티노이드 함량을 갖는 카로티노이드 유도체 또는 식품을 제조하기 위한 경제적 방법을 위해 카로티노이드 생산성을 개선 시키고 증가시킬 필요가 여전히 존재한다.

[0008] 또한, 선행 기술에서 적절한 진핵생물 β -카로틴 수산화효소는, 이들이 단지 좁은 기질 범위를 가져서 수산화효소에 의해 전환될 수 없고 수산화효소에 저해 효과를 미칠 수 있는 대사산물을 축적시킨다는 단점을 갖는다.

발명의 내용

[0009] 본 발명의 목적은 선행 기술의 기재된 결점을 바로 잡고 개선된 특성을 갖는 진핵생물 카로틴 수산화효소를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명자들은 상기 목적이 놀랍게도 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는, 이소프레노이드, 예를 들면 β -카로틴 또는 칸타잔틴을 수산화시키는 효소 활성을 갖는 단백질에 의해 달성됨을 발견하였다.

[0011] 따라서, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열, 또는 아미노산의 치환, 삽입 또는 결실에 의해 이러한 서열로부터 유래되고 서열번호 2의 서열과 아미노산 수준에서 50% 이상의 상동성을 갖는 서열을 포함하는 단백질 또는 폴리펩티드에 관한 것이다.

[0012] 특히, 선택된 균주에서 발견되거나 특정 카로티노이드를, 예를 들면 제아잔틴 또는 아스타잔틴으로서 생산할 수 있는 경우 본 발명에 따른 수산화효소는 본 발명에 따른 단백질 또는 폴리펩티드를 암호화하는 유전자에 의해 형질전환되지 않은 균주와 비교하여 이들 카로티노이드의 수준을 증가시킨다.

[0013] 본 발명은 또한 본 발명의 폴리펩티드를 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 핵산 구축물, 제조합 발현 벡터, 및 제조합 숙주 세포, 및 상기 폴리펩티드를 생산하는 방법에 관한 것이다.

[0014] 본 발명은 또한 카로티노이드의 생물학적 생산을 위한 개선된 시스템을 제공한다. 하나의 바람직한 예에서, 본 발명은 하나 이상의 카로티노이드를 생산하는 유질(oleaginous) 진균(예를 들면 효모 포함)을 제공한다. 본 발명은 또한 이러한 효모 및 진균을 구축하는 방법, 카로티노이드를 생산하기 위해 이러한 효모 및 진균을 사용하는 방법, 및 이러한 유질 효모 또는 진균에서 생산된 카로티노이드를 사용하여 카로티노이드-함유 조성물, 예컨대 음식 또는 사료 첨가물, 또는 영양 보충제를 제조하는 방법을 제공한다. 특히, 본 발명은 본 발명의 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 함유하는 효모 및 진균을 생성하는 시스템 및 방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1, 2 및 3은 각각 실시예 2A, 2B 및 2C에 따라 수행된, 수산화효소 유전자가 도입된 균주와 모 균주의 카로티노이드 생산의 비교를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 서열 목록에 대한 개요

[0017] 서열번호 1은 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*)로부터의 저빈도 카로틴 수산화효소를 암호화하는 비-최적화된 DNA 서열이다.

[0018] 서열번호 2는 서열번호 1로부터 추론된 아미노산 서열이다.

[0019] 서열번호 3은 야로위아 리포라이티카(*Yarrowia lipolytica*)에서의 발현을 위해 최적화된 경우의 헤마토코쿠스 플루비알리스로부터의 저빈도 카로틴 수산화효소를 암호화하는 DNA 서열이다.

[0020] 서열번호 4는 야로위아 리포라이티카에서의 발현을 위해 최적화된 경우의 크로노박터 풀베리스(*Cronobacter pulveris*)[이전에 엔테로박터 풀베리스(*Enterobacter pulveris*)](Ep)로부터의 카로틴 수산화효소를 암호화하는 DNA 서열이다.

- [0021] 서열번호 5는 야로위아 리포라이티카에서의 발현을 위해 최적화된 경우의 엔테로박테리아세아 박테리움 (*Enterobacteriaceae bacterium*) DC404(Dc)로부터의 카로틴 수산화효소를 암호화하는 DNA 서열이다.
- [0022] 정의
- [0023] **단리된 폴리펩티드:** 용어 "단리된 폴리펩티드"는 자연에서 발견되는 폴리펩티드에 비해 인간의 손으로 변형된 폴리펩티드를 의미한다. 하나의 양태에서, 폴리펩티드는, SDS-PAGE로 결정시 1% 이상, 예컨대 5% 이상, 10% 이상, 20% 이상, 40% 이상, 60% 이상, 80% 이상, 또는 90% 이상 순수하다.
- [0024] **실질적으로 순수한 폴리펩티드:** 용어 "실질적으로 순수한 폴리펩티드"는 이것이 고유적으로 또는 재조합적으로 회합되는 다른 폴리펩티드 물질을 10% 이하, 8% 이하, 6% 이하, 5% 이하, 4% 이하, 3% 이하, 2% 이하, 1% 이하, 또는 0.5% 이하(중량 기준) 함유하는 조제물을 의미한다. 바람직하게는, 폴리펩티드는 조제물에 존재하는 총 폴리펩티드 물질의 중량으로 92% 이상, 예컨대 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상, 99.5% 이상, 또는 100% 순수하다. 본 발명의 폴리펩티드는 바람직하게는 실질적으로 순수한 형태로 존재한다. 이는, 예컨대 주지된 재조합 방법에 의해 또는 고전적 정제 방법에 의해 폴리펩티드를 제조함으로써 달성될 수 있다.
- [0025] **서열 동일성:** 2개의 아미노산 서열 사이 또는 2개의 뉴클레오티드 서열 사이의 관계는 매개변수 "서열 동일성"에 의해 설명된다.
- [0026] 본 발명의 목적을 위해, 2개의 아미노산 서열 사이의 서열 동일성의 정도는 엠보스(EMBOSS) 패키지[EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite; 라이스(Rice) 등의 문헌 "2000, *Trends Genet.* 16: 276-277"], 바람직하게는 버전 3.0.0 또는 그 이상의 니들 프로그램(Needle program)에서 실행될 경우 니들만-운쉬 알고리즘(Needleman-Wunsch algorithm)[니들만(Needleman) 및 운쉬(Wunsch)의 문헌 "1970, *J. Mol. Biol.* 48: 443-453"]을 사용하여 결정된다. 사용된 선택적인 매개변수는 10의 갭 개방 페널티(gap open penalty), 0.5의 갭 연장 페널티(gap extension penalty), 및 EBLOSUM62(BLOSUM62의 엠보스 버전) 치환 행렬이다. 니들 표지된 "최장 동일성"의 출력물(노브리프(nobrief) 옵션을 사용하여 수득됨)은 동일성 퍼센트로서 사용되고 다음과 같이 계산된다:
- [0027]
$$(\text{동일한 잔기} \times 100) / (\text{정렬의 길이} - \text{정렬중 갭의 총 수})$$
- [0028] 본 발명의 목적을 위해, 2개의 데옥시리보뉴클레오티드 서열 사이의 서열 동일성 정도는 엠보스 패키지[EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite; 라이스 등의 상기 문헌(2000)], 바람직하게는 버전 3.0.0 또는 그 이상의 니들 프로그램에서 실행될 경우, 니들만-운쉬 알고리즘[상기 니들만 및 운쉬의 문헌 (1970)]을 사용하여 결정된다. 사용된 선택적 매개변수는 10의 갭 개방 페널티, 0.5의 갭 연장 페널티, 및 EDNAFULL(NCBI NUC4.4의 엠보스 버전) 치환 행렬이다. 니들 표지된 "최장 동일성"의 출력물(노브리프 옵션을 사용하여 수득됨)은 동일성 퍼센트로서 사용되고 다음과 같이 계산된다:
- [0029]
$$(\text{동일한 데옥시리보뉴클레오티드} \times 100) / (\text{정렬의 길이} - \text{정렬중 갭의 총 수})$$
- [0030] **단편:** 용어 "단편"은 성숙한 폴리펩티드의 아미노 및/또는 카복실 말단으로부터 결실된 하나 이상의(수 개의) 아미노산을 갖는 폴리펩티드를 의미하고, 여기서 단편은 수산화효소 활성을 갖는다.
- [0031] **대립형질 변이체:** 용어 "대립형질 변이체"는 동일한 염색체 유전자자리를 차지하는 유전자의 임의의 둘 이상의 대체 형태를 의미한다. 대립형질 변이는 돌연변이를 통해 천연적으로 발생하고, 개체군내에 다형성(polymorphism)을 일으킬 수 있다. 유전자 돌연변이는 침묵(silent)할 수 있거나(암호화된 폴리펩티드에서 변화가 없음), 변경된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 암호화할 수 있다. 폴리펩티드의 대립형질 변이체는 유전자의 대립형질 변이체에 의해 암호화된 폴리펩티드이다.
- [0032] **단리된 폴리뉴클레오티드:** 용어 "단리된 폴리뉴클레오티드"는 자연에서 발견되는 폴리뉴클레오티드에 비해 인간의 손으로 변형된 폴리뉴클레오티드를 의미한다. 하나의 양태에서, 단리된 폴리뉴클레오티드는 아가로스 전기영동에 의해 결정시 1% 이상, 예컨대 5% 이상, 10% 이상, 20% 이상, 40% 이상, 60% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 또는 95% 이상 순수하다. 폴리뉴클레오티드는 게놈, cDNA, RNA, 반합성, 합성 기원, 또는 이의 임의의 조합일 수 있다.
- [0033] **실질적으로 순수한 폴리뉴클레오티드:** 용어 "실질적으로 순수한 폴리뉴클레오티드"는 유전자 조작된 폴리펩티드 생산 시스템에서 사용하기에 적합한 형태의, 다른 외부의 또는 원치않는 뉴클레오티드가 존재하지 않는 폴리뉴클레오티드 조제물을 의미한다. 이와 같이, 실질적으로 순수한 폴리뉴클레오티드는 이것이 고유적으로 또는 재

조합적으로 회합되는 다른 폴리뉴클레오티드 물질을 10% 이하, 8% 이하, 6% 이하, 5% 이하, 4% 이하, 3% 이하, 2% 이하, 1% 이하, 또는 0.5% 이하(중량에 의함) 함유한다. 그러나, 실질적으로 순수한 폴리뉴클레오티드는 천연적으로 발생하는 5' 및 3' 미번역된 영역, 예컨대 프로모터 및 종결자를 함유할 수 있다. 바람직하게는, 폴리뉴클레오티드는 90% 이상, 예컨대 92% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상, 또는 99.5% 이상(중량 기준) 순수하다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 바람직하게는 실질적으로 순수한 형태로 존재한다.

[0034] **암호화 서열:** 용어 "암호화 서열"은 폴리펩티드의 아미노산 서열을 직접적으로 명시하는 폴리뉴클레오티드를 의미한다. 암호화 서열의 경계는 일반적으로 개방 판독 프레임(open reading frame)에 의해 결정되고, 이는 보통 ATG 개시 코돈 또는 대안의 개시 코돈, 예컨대 GTG 및 TTG에 의해 시작되고 종결 코돈, 예컨대 TAA, TAG, 및 TGA에 의해 끝난다. 암호화 서열은 DNA, cDNA, 합성, 또는 재조합 폴리뉴클레오티드일 수 있다.

[0035] **cDNA:** 용어 "cDNA"는 진핵 세포로부터 수득된 성숙한 스플라이싱된 mRNA 분자로부터 역전사에 의해 제조될 수 있는 DNA 분자를 의미한다. cDNA는 상응하는 게놈 DNA에 존재할 수 있는 인트론 서열이 결핍되었다. 초기의 1차 RNA 전사물은, 성숙한 스플라이싱된 mRNA로서 출현하기 이전에, 스플라이싱을 비롯한 일련의 단계를 통해 가공되는 mRNA에 대한 전구체이다.

[0036] **핵산 구축물:** 용어 "핵산 구축물"은 천연 발생 유전자로부터 단리되거나, 다르게는 자연에서 존재하지 않거나 합성적인 방식으로 핵산의 분절을 함유하도록 변형된 단일- 또는 이중-가닥의 핵산 분자를 의미한다. 용어 핵산 구축물은, 핵산 구축물이 본 발명의 암호화 서열의 발현에 필요한 제어 서열을 함유하는 경우 용어 "발현 카세트(cassette)"와 동의어이다.

[0037] **제어 서열:** 용어 "제어 서열"은 본 발명의 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 발현에 필수적인 모든 성분을 의미한다. 각각의 제어 서열은 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드에 고유적이거나 외래적일 수 있거나, 서로에 대해 고유적이거나 외래적일 수 있다. 이러한 제어 서열로는, 제한되지 않지만, 리더(leader), 폴리아데닐화 서열, 전구펩티드 서열, 프로모터, 신호 펩티드 서열, 및 전사 종결자가 포함된다. 최소한으로, 제어 서열은 프로모터, 및 전사 및 번역 종결 신호를 포함한다. 제어 서열과 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 암호화 영역의 결찰을 용이하게 하는 특정 제한 부위를 도입할 목적으로 제어 서열에 연결기가 제공될 수 있다.

[0038] **작동적으로 연결된:** 용어 "작동적으로 연결된"은 제어 서열이 암호화 서열의 발현을 지시하도록 폴리뉴클레오티드의 암호화 서열에 대해 적절한 위치에 제어 서열이 위치되는 배열형태를 의미한다.

[0039] **발현:** 용어 "발현"은 폴리펩티드의 생산에 관여되는 임의의 단계, 예컨대 제한되지 않지만, 전사, 전사후 변형, 번역, 번역후 변형, 및 분비를 포함한다.

[0040] **발현 벡터:** 용어 "발현 벡터"는 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하고 이의 발현을 위해 제공되는 추가의 뉴클레오티드에 작동적으로 연결된 선형 또는 환형 DNA 분자를 의미한다.

[0041] **숙주 세포:** 용어 "숙주 세포"는 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 핵산 구축물 또는 발현 벡터에 의한 형질전환, 형질감염, 형질도입 등에 감수성인 임의의 세포 유형을 의미한다. 용어 "숙주 세포"는 복제 동안 일어나는 돌연변이에 의해 모 세포와 동일하지 않은 모 세포의 임의의 자손을 포괄한다.

[0042] **변이체:** 용어 "변이체"는 하나 이상의(또는 수 개의) 위치에서 하나 이상의(또는 수 개의) 아미노산 잔기의 변경, 즉 치환, 삽입, 및/또는 결실을 포함하는 수산화효소 활성을 갖는 폴리펩티드를 의미한다. 치환은 하나의 위치를 차지하는 아미노산을 상이한 아미노산에 의해 대체함을 의미하고; 결실은 하나의 위치를 차지하는 아미노산을 제거함을 의미하며; 삽입은 하나의 위치를 차지하는 아미노산에 인접한 1 내지 3개의 아미노산을 부가함을 의미한다.

[0043] 발명의 상세한 설명

[0044] 이후 카로틴 수산화효소는 서열번호 2의 아미노산 서열, 또는 아미노산의 치환, 삽입 또는 결실에 의해 이러한 서열로부터 유래되고 서열번호 2의 서열과 아미노산 수준에서 50% 이상의 상동성을 갖는 서열을 포함하는 본 발명에 따른 단백질 또는 폴리펩티드, 즉 예를 들면 β -카로틴을 제아잔틴으로 또는 칸타잔틴을 아스타잔틴으로 전환시키는 효소 활성을 갖는 단백질을 의미한다.

[0045] 서열번호 2로 표시된 아미노산 서열은 서열번호 1로 표시된 cDNA 서열의 번역으로부터 유래된다. 서열번호 1의

최적화된 서열은 서열번호 3으로 제시된다.

- [0046] 치환은 하나 이상의 아미노산을 하나 이상의 아미노산으로 대체함을 의미한다. 대체는 바람직하게는 보존적으로 지칭되는 대체이고, 여기서 대체된 아미노산은 본래의 아미노산에 유사한 특성을 갖고, 예를 들면 Asp에 의한 Glu, Asn에 의한 Gln, Ile에 의한 Val, Ile에 의한 Leu, Thr에 의한 Ser의 대체이다.
- [0047] 결실은 아미노산의 직접 결함에 의한 대체를 의미한다. 결실을 위한 바람직한 위치는 폴리펩티드의 중점 및 개별 단백질 도메인 사이의 연결부이다.
- [0048] 삽입은 아미노산의 폴리펩티드 쇄로의 도입이고, 공식적으로 하나 이상의 아미노산에 의해 직접 결함이 대체된다.
- [0049] 2개의 단백질 사이의 상동성은 각각의 단백질의 전체 길이에 걸친 아미노산의 동일성을 의미하고, 이는 컴퓨터 프로그램 GAP[UWCGC(University of Wisconsin, Genetic Computer Group), 니들만 및 운쉬의 프로그램 알고리즘 (*J. Mol. Biol.* 1970, 48: 443-453)]의 보조하에 하기 매개변수를 설정하여 비교함으로써 계산된다:
- [0050] 갭 중량: 12
- [0051] 길이 중량: 4
- [0052] 평균 부합성(match): 2.912
- [0053] 평균 비부합성(mismatch): -2.003
- [0054] 서열번호 2의 서열과 아미노산 수준에서 50% 이상의 상동성을 갖는 단백질은, 상기 매개변수 세트로 상기 프로그램 알고리즘을 사용하여 그의 서열과 서열번호 2의 서열을 비교할때 50% 이상, 바람직하게는 60%, 특히 바람직하게는 70%의 동일성을 갖는 단백질을 의미한다.
- [0055] 본 발명에 따른 단백질은 β -이오논 구조적 요소의 3-하이드록시- β -이오논 구조적 요소로의 전환, 예컨대 β -카로틴의 제아잔틴으로의 전환, β -카로틴의 β -크립토잔틴으로의 전환, β -크립토잔틴의 제아잔틴으로의 전환, 에키네논(echinenone)의 3'-하이드록시에키네논으로의 전환, 3-하이드록시에키네논의 아도니잔틴(adonixanthin)(4-케토제아잔틴)으로의 전환, α -카로틴의 α -크립토잔틴으로의 전환 또는 40개 이하의 C 원자를 갖고 β -이오논 고리를 함유하는 기타 화합물의 상응하는 3-하이드록시- β -이오논 화합물로의 전환, 또는 4-케토- β -이오논 구조적 요소의 3-하이드록시-4-케토- β -이오논 구조적 요소로의 전환, 예컨대 칸타잔틴의 아스타잔틴으로의 전환, 칸타잔틴의 포에니코잔틴(phoenicoxanthin)(아도니루빈)으로의 전환, 포에니코잔틴(아도니루빈)의 아스타잔틴으로의 전환, 에키네논의 3-하이드록시에키네논으로의 전환, 3'-하이드록시에키네논의 아도니잔틴(4-케토제아잔틴)으로의 전환 또는 40개 이하의 C 원자를 갖고 4-케토- β -이오논 고리를 함유하는 기타 화합물의 상응하는 3-하이드록시-4-케토- β -이오논 화합물로의 전환을 촉매화할 수 있다.
- [0056] 카로틴 수산화효소는, 이후 기재된 바와 같이, 천연 또는 유전자 조작된 유기체로부터의 이들 단백질을 암호화하는 적절한 핵산의 유전자 발현에 의해 제조될 수 있다.
- [0057] 본 발명은 추가로 본 발명에 따른 단백질의 존재하에 β -이오논 구조적 요소를 3-하이드록시- β -이오논 구조적 요소로 전환시키고/시키거나 4-케토- β -이오논 구조적 요소를 3-하이드록시-4-케토- β -이오논 구조적 요소로 전환시키는 단계를 포함하는, 카로티노이드 및 카로티노이드 유도체의 제조 방법에 관한 것이다.
- [0058] 카로티노이드 및 카로티노이드 유도체는 예를 들면 제아잔틴, β -크립토잔틴, 3'-하이드록시에키네논, 3-하이드록시에키네논, 아도니잔틴(4-케토제아잔틴), 아스타잔틴, 포에니코잔틴(아도니루빈), α -크립토잔틴, 또는 루테인 또는 40개 이하의 C 원자를 갖고 하나 이상의 3-하이드록시- β -이오논 또는 하나 이상의 3-하이드록시-4-케토- β -이오논 구조적 요소를 분자에 함유하는 이의 유도체, 예컨대, 예를 들면 3-하이드록시-6-비닐- β -이오논, 3-하이드록시-4-케토-6-비닐- β -이오논, 3-하이드록시레티놀, 3-하이드록시-4-케토레티놀, 3-하이드록시레티날, 3-하이드록시-4-케토레티날, 3-하이드록시레티노산 또는 3-하이드록시-4-케토레티노산이다.
- [0059] 본 발명에 따른 방법에서, 본 발명에 따른 단백질의 존재하에 β -이오논 구조적 요소의 3-하이드록시- β -이오논 구조적 요소로의 전환, 예컨대 β -카로틴의 β -크립토잔틴을 경유한 제아잔틴으로의 전환, β -카로틴의 β -크립토잔틴으로의 전환, β -크립토잔틴의 제아잔틴으로의 전환, 에키네논의 3'-하이드록시에키네논 또는 3-하이드록시에키네논으로의 전환, 3-하이드록시에키네논 또는 3'-하이드록시에키네논의 아도니잔틴(4-케토제아잔틴)으로의 전환, α -카로틴의 자이노잔틴(zeinoxanthin) 또는 α -크립토잔틴으로의 전환 또는 40개 이하의 C 원자를 갖고 β -이오논 고리를 함유하는 기타 화합물의 상응하는 3-하이드록시- β -이오논 화합물로의 전환, 또는 4-케토-

β -이오논 구조적 요소의 3-하이드록시-4-케토- β -이오논 구조적 요소로의 전환, 예컨대 칸타잔틴의 아도니루빈을 경유한 아스타잔틴으로의 전환, 칸타잔틴의 포에니코잔틴(아도니루빈)으로의 전환, 포에니코잔틴(아도니루빈)의 아스타잔틴으로의 전환, 에키네논의 3-하이드록시에키네논으로의 전환, 3'-하이드록시에키네논의 아도니잔틴(4-케토제아잔틴)으로의 전환 또는 40개 이하의 C 원자를 갖고 4-케토- β -이오논 고리를 함유하는 화합물의 상응하는 3-하이드록시-4-케토- β -이오논 화합물로의 전환이 존재한다.

- [0060] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 수산화효소를 암호화하는 핵산 서열에 관한 것이다. 바람직한 핵산은 서열번호 1 및 서열번호 3의 서열을 갖는다.
- [0061] 본 발명은 게다가 개별적 또는 다수의 뉴클레오티드의 부가, 치환, 삽입 및/또는 결실에 의해 수득되는 서열번호 1 및 서열번호 3의 서열에 따른 핵산의 기능적 유사체에 관한 것으로, 이는 원하는 특이성을 갖는 수산화효소를 추가로 암호화한다.
- [0062] 본 발명은 또한 소위 침묵 돌연변이를 포함하거나, 특정 기원 또는 숙주 유기체, 및 이러한 핵산 서열의 천연 발생 변이체의 코돈 사용빈도에 따라서 구체적으로 언급된 서열과 비교시 변형된 핵산 서열을 포괄한다.
- [0063] 본 발명은 또한 유전자 코드의 변성(즉, 상응하는 아미노산 서열에서는 어떠한 변화도 없음) 또는 보존적 뉴클레오티드 치환(즉, 상응하는 아미노산이 동일한 전하, 크기, 극성, 및/또는 용해도의 또 다른 아미노산에 의해 대체됨)에 의해 수득된 핵산 서열, 및 뉴클레오티드 부가, 삽입, 역전 또는 결실에 의해 변형된 서열의 변형을 포괄하고, 이러한 서열은 "변형된 기질 프로파일", 및 상응하는 상보성 서열을 갖는 본 발명에 따른 수산화효소를 암호화한다.
- [0064] 본 발명은 추가로 조절 핵산 서열의 유전자 제어하에 본 발명에 따른 핵산 서열을 포함하는 발현 구축물; 및 하나 이상의 이들 발현 구축물을 포함하는 벡터에 관한 것이다.
- [0065] 바람직하게는, 본 발명에 따른 구축물은 해당 암호화 서열의 5'-상류(upstream)의 프로모터 및 3'-하류(downstream)의 종결자 서열, 및 임의적으로, 추가로 통례적 조절 요소를 포함하고, 각각의 경우 암호화 서열에 작동적으로 연결된다. 작동적 연결은, 프로모터, 암호화 서열, 종결자 및, 적절하다면, 다른 조절 요소의 순차적 정렬(각각의 조절 요소가 암호화 서열의 발현시 그의 의도된 기능을 만족시킬 수 있는 방식으로)을 의미하는 것으로 이해된다. 작동적으로 연결가능한 서열의 예는 표적화 서열, 또는 번역 증진자(enhancer), 증진자, 폴리아데닐화 신호 등이다. 추가의 조절 요소는 선택가능한 마커, 증폭 신호, 복제 기원 등을 포함한다.
- [0066] 인공 조절 서열에 더하여, 천연 조절 서열이 여전히 실제 구조적 유전자의 상류에 존재할 수 있다. 필요에 따라, 이러한 천연 조절은 유전자 변형에 의해 차단될 수 있고, 유전자의 발현은 증진되거나 저하될 수 있다. 그러나, 유전자 구축물은 구축시 더욱 단순화될 수도 있고, 즉 어떠한 추가의 조절 신호도 구조적 유전자의 상류에 삽입되지 않고, 그의 조절을 받는 천연 프로모터는 제거되지 않는다. 그 대신, 천연 조절 서열은, 더 이상 조절이 발생되지 않고 유전자 발현이 증가되거나 감소되는 방식으로 돌연변이된다. 핵산 서열의 하나 이상의 복사물이 유전자 구축물에 존재할 수 있다.
- [0067] 적합한 프로모터의 예는 다음과 같다: cos, tac, trp, tet, trp-tet, lpp, lac, lpp-lac, lacIq, T7, T5, T3, gal, trc, ara, SP6, I-PR 또는 I-PL 프로모터(이는 그램(Gram)-음성 세균에서 유리하게 이용됨); 및 그램-양성 프로모터 amy 및 SP02, 효모 프로모터 ADC1, MFa, Ac, P-60, CYC1, GAPDH, TEF1 또는 식물 프로모터 CaMV/35S, SSU, OCS, lib4, usp, STLS1, B33, nos 또는 유비퀴틴(ubiquitin) 또는 파세올린(phaseolin) 프로모터. 유도성 프로모터, 예를 들면 경질(light) 프로모터, 및 특히 온도-유도성 프로모터, 예컨대 PrP1 프로모터가 특히 바람직하다.
- [0068] 원칙적으로, 이들 조절 서열을 갖는 모든 천연 프로모터가 사용될 수 있다. 더욱이, 합성 프로모터 또한 유리한 양식으로 사용될 수 있다.
- [0069] 상기 언급된 조절 서열은 핵산 서열의 표적화된 발현 및 단백질 발현을 허용하도록 의도된다. 숙주 유기체에 의존하여, 이는, 예컨대 단지 유도가 일어난 후에만 유전자가 발현되거나 과발현됨을 의미하거나, 이것이 즉각적으로 및/또는 구성적으로 발현되고/되거나 과발현됨을 의미할 수 있다.
- [0070] 조절 서열 또는 인자는 바람직하게는 발현에 긍정적인 영향을 가질 수 있고, 이러한 방식으로 발현을 증가 또는 감소시킬 수 있다. 이와 같이, 조절 요소의 증진은, 강한 전사 신호, 예컨대 프로모터 및/또는 "증진자"를 사용함으로써 유리하게는 전사 수준에서 일어날 수 있다. 더욱이, 번역은 또한, 예컨대 mRNA 안정성을 개선시킴으로써 증진될 수 있다.

- [0071] 발현 카세트는 적합한 프로모터를 적합한 수산화효소 뉴클레오타이드 서열 및 종결자 신호 또는 폴리아데닐화 신호와 융합시킴으로써 생성된다. 이를 위해, 통례적인 재조합 및 클로닝 기법이 사용되고, 이들은, 예컨대 마니아티스(T. Maniatis), 프리취(E. F. Fritsch) 및 샘브룩(J. Sambrook)의 문헌[Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)] 및 실하비(T. J. Silhavy), 베르만(M. L. Berman) 및 엔퀴스트(L. W. Enquist)의 문헌[Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1984)] 및 어수벨(Ausubel, F. M.) 등의 문헌[Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience (1987)]에 기재된 바와 같다.
- [0072] 적합한 숙주 유기체에서의 발현을 위해, 재조합 핵산 구축물 또는 유전자 구축물은 유리하게는 숙주에서 최적의 유전자 발현을 허용하는 숙주-특이적 벡터내로 삽입된다. 벡터는 당업자에게 주지되어 있고, 예컨대 문헌["Cloning Vector" (Pouwels P. H. et al., Ed., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985)]에서 찾아볼 수 있다. 벡터는 플라스미드 뿐만 아니라 당업자에게 공지된 모든 다른 벡터, 예를 들면 파아지, 바이러스, 예컨대 SV40, CMV, 바쿨로바이러스(baculovirus) 및 아데노바이러스(adenovirus), 트랜스포손(transposon), IS 요소, 플라스미드, 코스미드(cosmid), 및 선형 또는 환형 DNA를 의미하는 것으로 이해되어야 한다. 이들 벡터는 숙주 유기체에서 자체적으로 또는 염색체로 복제될 수 있다.
- [0073] 본 발명에 따른 벡터는, 예컨대 본 발명에 따른 하나 이상의 벡터에 의해 형질전환되고 돌연변이체를 생산하기 위해 이용될 수 있는 재조합 미생물의 생성을 허용한다. 본 발명에 따른 상기 기재된 재조합 구축물은 유리하게는 적합한 숙주 유기체내로 도입되고 발현된다. 해당 발현 시스템에서 전술된 핵산의 발현을 일으키기 위해 당업자에게 공지된 일반적인 클로닝 및 형질감염 방법을 사용하는 것이 바람직하다. 적합한 시스템은, 예컨대 분자 생물학에서 현행되는 프로토콜로서, 어수벨(F. Ausubel) 등의 문헌[Ed., Wiley Interscience, New York 1997]에 기재되어 있다.
- [0074] 적합한 숙주 유기체는, 원칙적으로, 본 발명에 따른 핵산, 이들의 대립형질 변이체, 및 이들의 기능적 등가물 또는 유도체의 발현을 허용하는 모든 유기체이다. 바람직한 초기 유기체는 천연적으로 카로티노이드를 합성할 수 있는 것이다. 그러나, 카로티노이드 생합성 유전자의 도입으로 인해 카로티노이드를 합성할 수 있는 초기 유기체 또한 적합하다. 초기 유기체는 원핵 또는 진핵 유기체, 예컨대 미생물 또는 식물이다. 바람직한 미생물은 세균, 효모, 조류 또는 진균이다.
- [0075] 따라서, 본 발명은 본 발명에 따른 수산화효소 유전자가 초기 유기체의 게놈내로 도입되는, 추가로 이후 기재된 유전자 변형된 유기체의 제조 방법에 관한 것이다. 초기 유기체는 본 발명에 따른 유전자 변형 이전의 유기체를 의미한다.
- [0076] 본 발명에 따른 수산화효소 유전자는 원칙적으로 당업자에게 공지된 모든 방법에 의해 이후 기재된 초기 유기체내로 도입될 수 있고, 이러한 유기체는 이로써 유전자 변형된다.
- [0077] 이들은 형질전환, 형질감염, 전기천공에 의해, 소위 입자 건(gun)을 사용하여, 또는 마이크로주입에 의해 초기 유기체 또는 이의 세포내로 도입되는 것이 유리하다.
- [0078] 당업자는 교재, 즉 샘브룩(Sambrook, J.) 등의 문헌[(1989) Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press], 어수벨(F. M. Ausubel) 등의 문헌[(1994) Current protocols in molecular biology, John Wiley and Sons], 글로버(D. M. Glover) 등의 문헌[DNA Cloning Vol. 1, (1995), IRL Press (ISBN 019-963476-9)], 카이저(Kaiser) 등의 문헌[(1994) Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press] 또는 구트리에(Guthrie) 등의 문헌[Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, 1994, Academic Press]에서 미생물에 대해 적절한 방법을 찾아볼 수 있다.
- [0079] 언급될 수 있는 유리한 방법의 예는, 예컨대 독일 특허 출원 제19801120.2호에 기재된 바와 같이, *URA3* 유전자, 구체적으로 애쉬비아(*Ashbya*)로부터의 *URA3* 유전자를 사용하는, 동종성 또는 이종성 재조합에 의한 DNA의 도입, 및/또는 이후 기재된 REMI 방법("제한 효소 증대된 통합")에 의한 DNA의 도입이다.
- [0080] REMI 기법은, 동일한 제한 엔도뉴클레아제(endonuclease)에 의해 양쪽 말단이 절단된 선형 DNA 구축물을, DNA 구축물의 이러한 제한을 위해 사용되는 제한 엔도뉴클레아제와 함께 유기체내로 공동형질전환시킴에 기초한다. 제한 엔도뉴클레아제는 이어서 DNA 구축물이 제한 효소와 함께 도입되는 유기체의 게놈 DNA를 절단한다. 이는 세포 자체의 수선 기작의 활성화를 이끈다. 이러한 수선 기작은 엔도뉴클레아제에 의해 초래된 게놈 DNA에서의 가닥 파괴를 수선하고, 그 동안 공동형질전환된 DNA 구축물을 게놈내로 특정 빈도를 갖고 혼입시킨다. 통상적

으로, 제한 절단 부위는 그 동안 DNA의 양쪽 말단에서 보유된다.

- [0081] 이러한 기법은 볼커(Bolker) 등의 문헌[Mol. Gen. Genet. 1995, 248: 547-552]에 진균의 삽입 돌연변이생성에 대해 기재되어 있다. 이 방법은 본 쉬에스틀(Von Schiestl) 및 페테스(Petes)[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991, 88: 7585-7589]에 의해 사용되어 사카로마이세스(*Saccharomyce*)에 이중성 재조합이 존재하는지의 여부를 확인하였다. 이 방법은 브라운(Brown) 등의 문헌[Mol. Gen. Genet. 1996, 251: 75-80]에 유도성 리포터(reporter) 유전자의 안정한 형질전환 및 조절된 발현에 대해 기재되어 있다.
- [0082] 본 발명에 따른 핵산 단편 또는 본 발명에 따른 전술된 카로틴 수산화효소 유전자를 게놈에서 전사적으로 활성 부위에 위치시키는 REMI 방법을 사용할 수 있다.
- [0083] 핵산을 하나 이상의 리포터 유전자와 함께 DNA 구축물로 클로닝하는 것이 가능하고 유리하며, 이 구축물은 게놈 내로 도입된다. 이러한 리포터 유전자는 성장, 형광, 화학발광 또는 생물발광 검정에 의해 또는 광도계 측정에 의해 검출능을 용이하게 만들어야 한다. 리포터 유전자로 언급될 수 있는 예는 항생제 내성 유전자, 가수분해 효소 유전자, 형광 단백질 유전자, 생물발광 유전자, 글루코시다아제(glucosidase) 유전자, 루시페라아제(luciferase) 유전자, β -갈락토시다아제(galactosidase) 유전자, gfp 유전자, 리파아제(lipase) 유전자, 에스테라아제(esterase) 유전자, 퍼옥시다아제(oxidase) 유전자, β -락타마아제(lactamase) 유전자, 아세틸-, 포스포- 또는 아데닐 전환효소 유전자이다. 이들 유전자는 전사 활성, 및 이에 따라 유전자의 발현을 쉽게 측정하고 정량화할 수 있게 만든다. 이는 2 배까지 차이 나는 생산성을 갖는 게놈에서의 부위를 식별하는 것을 가능하게 함을 의미한다.
- [0084] 복수 개의 유전자, 예컨대 카로티노이드 생합성의 추가의 유전자를 유기체내로 도입하고자 한다면, 이들은 단일 벡터에서 리포터 유전자와 함께 모두 도입될 수 있거나, 리포터 유전자와 각각의 개별적 유전자는 유기체내로 각각의 경우 하나의 벡터에 도입될 수 있고, 다양한 벡터를 동시에 또는 연속적으로 도입하는 것이 가능하다. REMI 기법을 사용하여 각각의 활성에 대해 암호화하는 유전자 단편을 삽입하는 것이 또한 가능하다.
- [0085] 초기 유기체의 게놈내로 본 발명에 따른 카로틴 수산화효소 유전자 또는 핵산 구축물을 통합시키기에 원칙적으로 적합한 제한 효소는 당업자에게 모두 공지되어 있다. 제한 절단 부위로서 단지 4개의 염기 쌍을 인식하는 제한 효소는, 이들이 통합될 게놈에서 또는 벡터에서 너무 자주 절단하기 때문에 덜 바람직하고, 바람직한 효소는 절단 부위, 예컨대 BamHI, EcoRI, BglII, SphI, SpeI, XbaI, XhoI, NcoI, SalI, ClaI, KpnI, HindIII, SacI, PstI, BpnI, NotI, SrfI 또는 SfiI로서 6, 7, 8개 이상의 염기 쌍을 인식하여, 단지 소수의 가능한 효소를 언급한다. 사용된 효소가 도입될 DNA에 절단 부위를 더 이상 갖지 않을 경우 유리하고; 이는 통합의 효율을 증가시킨다. 통상적으로, 5 내지 500 U, 바람직하게는 10 내지 250, 특히 바람직하게는 10 내지 100 U의 효소가 REMI 혼합물에서 사용된다. 효소는 유리하게는 삼투 안정화를 위한 물질, 예컨대 수크로스, 트레할로스 또는 글루코스, 폴리올, 예컨대 글리세롤 또는 폴리에틸렌 글리콜, pH 5 내지 9, 바람직하게는 6 내지 8, 특히 바람직하게는 7 내지 8의 범위로 유리하게 완충시키는 완충제, 예컨대 트리스, MOPS, HEPES, MES 또는 PIPES 및/또는 핵산을 안정화시키는 물질, 예컨대 Mg, Cu, Co, Fe, Mn 또는 Mo의 무기 또는 유기 염을 함유하는 수용액에서 이용된다. 또한 적절한 경우 다른 물질, 예컨대 EDTA, EDDA, DTT, β -머캅토에탄올 또는 뉴클레아제 저해제가 존재할 수 있다. 그러나, 이들 첨가 없이 REMI 기법을 수행할 수도 있다.
- [0086] 상기 방법은 5 내지 80°C, 바람직하게는 10 내지 60°C, 특히 바람직하게는 20 내지 40°C 범위의 온도에서 수행된다. 세포 막을 불안정화시키는 다른 공지된 방법은 예컨대 전기천공, 로딩된 소포(loaded vesicle)와의 융합, 또는 다양한 알칼리 금속 또는 알칼리 토 금속 염, 예컨대 리튬, 루비듐 또는 칼슘 염(리튬 염이 바람직함)에 의한 불안정화와 같은 방법에 적합하다.
- [0087] 본 발명은 추가로 상응하게 유전자 변형된 유기체에 관한 것으로, 본 발명에 따른 카로틴 수산화효소 유전자의 발현은 초기 유기체가 카로틴 수산화효소 유전자를 함유하는 경우에 야생형 유기체와의 비교시 증가되거나, 초기 유기체가 카로틴 수산화효소 유전자를 함유하지 않은 경우에 유전자 변형에 의해 초래된다.
- [0088] 유전자 변형된 유기체는 본 발명에 따른 카로틴 수산화효소 유전자 또는 핵산 구축물이, 바람직하게는 상기 기재된 방법중 하나에 의해 삽입되어진 유기체를 의미한다.
- [0089] 유전자 변형된 유기체는 본 발명에 따른 하나 이상의 카로틴 수산화효소 유전자 또는 본 발명에 따른 하나 이상의 핵산 구축물을 함유한다. 초기 유기체에 의존하여, 핵산은 염색체 내부 또는 외부에 존재할 수 있다.
- [0090] 유전자 변형된 유기체에서 카로티노이드 대사작용은 바람직하게는 야생형과 비교하여 변경된다.

- [0091] 바람직한 유기체는 재조합 진균 또는 효모이다. 특별한 실시태양에서, 재조합 진균은, 그의 건조 세포 중량의 약 20% 이상으로 지질을 축적할 수 있다는 점에서 유질이고; 안테라잔틴(antheraxanthin), 아도니루빈, 아도니잔틴, 아스타잔틴, 칸타잔틴(canthaxanthin), 캅소루브린(capsorubin), β -크립토잔틴, α -카로틴, β , ψ -카로틴, δ -카로틴, ϵ -카로틴, 에키네논, 3-하이드록시에키네논, 3'-하이드록시에키네논, γ -카로틴, 4-케토- γ -카로틴, ζ -카로틴, α -크립토잔틴, 데옥시플렉시잔틴(deoxyflexixanthin), 디아토잔틴(diatoxanthin), 7,8-디테하이드로아스타잔틴, 디테하이드로라이코펜, 푸코잔틴(fucoxanthin), 푸코잔티놀(fucoxanthinol), 이소레니에라텐(isorenieratene), β -이소레니에라텐, 락투카잔틴(lactucaxanthin), 루테인, 라이코펜, 마익소박톤(myxobactone), 네오잔틴(neoxanthin), 뉴로스포렌(neurosporene), 하이드록시뉴로스포렌, 페리디닌(peridin), 파이토엔(phytoene), 로도핀(rhodopin), 로도핀 글루코시드, 4-케토-루비잔틴, 시포나잔틴(siphonaxanthin), 스페로이텐(spheroidene), 스페로이데논(spheroidenone), 스피릴로잔틴(spirilloxanthin), 토룰렌(torulene), 4-케토-토룰렌, 3-하이드록시-4-케토-토룰렌, 유리올리드(urilide), 유리올리드 아세테이트, 비올라잔틴(violaxanthin), 제아잔틴- β -디글루코시드, 제아잔틴, C30 카로티노이드, 및 그의 조합물로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 카로티노이드를 생산하고, 생산된 카로티노이드를 그의 건조 세포 중량의 약 1% 이상으로 축적할 수 있다. 바람직하게는, 재조합 진균은 아스페르길러스(*Aspergillus*), 블라케슬레아(*Blakeslea*), 보트리티스(*Botrytis*), 캔디다(*Candida*), 세르코스포라(*Cercospora*), 크립토코쿠스(*Cryptococcus*), 쿨링하멜라(*Cunninghamella*), 푸사리움(*Fusarium*)(기베렐라(*Gibberella*)), 클루이베로마이세스(*Kluyveromyces*), 리포마이세스(*Lipomyces*), 모르티에렐라(*Mortierella*), 무코(*Mucor*), 뉴로스포라(*Neurospora*), 페니실럼(*Penicillium*), 파이코마이세스(*Phycomyces*), 피키아(*Pichia*)(한센울라(*Hansenula*)), 푸시니아(*Puccinia*), 파이티움(*Pythium*), 로도스포리디움(*Rhodosporidium*), 로도토룰라(*Rhodotorula*), 사카로마이세스(*Saccharomyces*), 스크레로티움(*Sclerotium*), 트리코데마(*Trichoderma*), 트리코스포론(*Trichosporon*), 잔토피로마이세스(*Xanthophyllomyces*)[파피아(*Phaffia*)], 및 야로위아로 구성된 군에서 선택된 속의 일원이거나, 아스페르길러스 테레우스(*Aspergillus terreus*), 아스페르길러스 니들란스(*Aspergillus nidulans*), 아스페르길러스 니거(*Aspergillus niger*), 블라케슬레아 트리스포라(*Blakeslea trispora*), 보트리티스 시네레아(*Botrytis cinerea*), 칸디다 자포니카(*Candida japonica*), 칸디다 풀체리마(*Candida pulcherrima*), 칸디다 레브카우피(*Candida revkaufi*), 칸디다 트로피칼리스(*Candida tropicalis*), 칸디다 유틸리스(*Candida utilis*), 세르코코스포라 니코티아나(*Cercospora nicotianae*), 크립토코쿠스 쿠르바투스(*Cryptococcus curvatus*), 쿨링하멜라 에키놀라타(*Cunninghamella echinulata*), 쿨링하멜라 엘레간스(*Cunninghamella elegans*), 푸사리움 푸지쿠로이(*Fusarium fujikuroi*)[기베렐라 제아(*Gibberella zeae*)], 클루이베로마이세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*), 리포마이세스 스타르케위(*Lipomyces starkeyi*), 리포마이세스 리포페루스(*Lipomyces lipoferus*), 모르티에렐라 알피나(*Mortierella alpina*), 모르티에렐라 라만니아나(*Mortierella ramanniana*), 모르티에렐라 이사벨리나(*Mortierella isabellina*), 모르티에렐라 비나세아(*Mortierella vinacea*), 무코 시르시넬로이데스(*Mucor circinelloides*), 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*), 파이코마이세스 블라케스레아누스(*Phycomyces blakesleanus*), 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 푸시니아 디스틴크타(*Puccinia distincta*), 파이티움 이레귤라레(*Pythium irregulare*), 로도스포리디움 토룰로이데스(*Rhodosporidium toruloides*), 로도토룰라 글루티니스(*Rhodotorula glutinis*), 로도토룰라 그라미니스(*Rhodotorula graminis*), 로도토룰라 무실라기노사(*Rhodotorula mucilaginosa*), 로도토룰라 피니콜라(*Rhodotorula pinicola*), 로도토룰라 그라실리스(*Rhodotorula gracilis*), 사카로마이세스 세레비지아(*Saccharomyces cerevisiae*), 스크레로티움 롤프시(*Sclerotium rolfsii*), 트리코데마 리세이(*Trichoderma reesei*), 트리코스포론 쿠타네움(*Trichosporon cutaneum*), 트리코스포론 풀루란스(*Trichosporon pullulans*), 잔토피로마이세스 덴드로르하우스(*Xanthophyllomyces dendrorhous*)[파피아 로도자이마(*Phaffia rhodozyma*)], 및 야로위아 리포라이티카로 구성된 군에서 선택되는 종의 일원이다.
- [0092] 이들 천연적으로 유질인 균주들중, 몇몇은 또한 천연적으로 카로티노이드를 생산하지만, 몇몇은 생산하지 않고; 이들 균주는 추가적으로 미국 특허 제7,851,199호에 개시된 바와 같은 카로티노이드 생합성 유전자의 도입에 의해 숙주 세포로서 이용될 수 있다.
- [0093] 다른 실시태양에서, 본 발명은 카로티노이드의 생산을 허용하는 조건하에 진균을 배양하는 단계, 및 생산된 카로티노이드를 분리하는 단계를 포함하는, 카로티노이드의 생산 방법을 제공한다.
- [0094] 본 발명에 따른 유전자 변형된 유기체의 배양은 그 자체로 공지된 방식으로 수행하고, 예컨대 미생물의 경우 적합한 배지에서, 예컨대 한천 플레이트 상에서 또는 현탁 배양액에서, 또는 식물의 경우 토양 또는 적절히 적합한 영양 배지에서, 적절한 야생형을 배양한다. '수확'은 미생물의 경우 미생물의 단리를 의미하고, 식물의 경

우 식물, 또는 적절한 경우, 카로티노이드를 함유하는 특정 식물 부분의 잘라내기를 의미한다. 카로티노이드는 그 자체로 공지된 방식으로, 예를 들면 유기체 세포의 과일, 카로티노이드의 추출, 및 화학적 또는 물리적 분리 방법, 예컨대 추출 또는 크로마토그래피에 의한 카로티노이드의 후속적인 정제에 의해 분리된다.

[0095] 하기 실시예는 본 발명을 예시한다.

[0096] 실시예

[0097] 하기 표 1은 하기 예시에서 사용된 특정 야로위아 리포라이티카 균주를 기술한다:

표 1

[0098] 야로위아 리포라이티카 균주

ML5252	MATA erg9-4789::ura3 tef1P-{HMG-tr-GGS carB carRP} 독립영양성	고전적인 표준 분자 유전학 기법
ML6804	MATB erg9-4789::ura3 tef1P-{HMG-tr-GGS carB carRP crtW} 독립영양성	고전적인 표준 분자 유전학 기법
ML9335	MATA erg9-4789::URA3 tef1P-{HMG-tr-GGS carB carRP crtW Dc-crtZ} 독립영양성	고전적인 표준 분자 유전학 기법
ML9863	MATB erg9-4789::URA3 tef1P-{HMG-tr-GGS carB carRP crtW Xa-crtZ Dc-crtZ} 독립영양성	고전적인 표준 분자 유전학 기법
ML11218	ML9863 crtW-△6180	Hyg ^R 카세트에 의한 표적화된 과일; cre-lox 시스템을 사용하는 후속적 마커 제거
ML11453	ML9335 tef1P-carRP/Hyg ^R	비표적화된 형질전환; 미리-존재하는 활성의 추가의 비표지화된 복사물이 또한 혼입되었다.
ML11584	ML9863 tef1P-Ep-crtZ/Nat ^R	비표적화된 형질전환; 미리-존재하는 활성의 추가의 비표지화된 복사물이 또한 혼입되었다.
ML11956	MATB erg9-4789::ura3 tef1P-{HMG-tr-GGS carB carRP crtW Dc-crtZ}	ML11453 x ML11584
ML12526	tef1P-HMG-tr tef1P-carB 3X-tef1P-carRP를 갖는 ML9335	비표적화된 형질전환 및 이어서 cre-lox 시스템을 사용하는 Hyg ^R 및 Nat ^R 의 제거

[0099] 미국 특허 제7,851,199호에 기재된 바와 같이 ML350 및 ATCC201249로 출발하여, 교잡육종(crossbreeding)의 몇몇 세대와 커플링되는, 이중성 유전자를 내생성 TEF1 프로모터의 제어하에 도입함으로써 야로위아 균주 ML5252, ML6804, ML9863, 및 ML9335를 구축하였다. GGS 유전자 및 절두된(truncated) HMG 유전자("HMG-tr")는 고유의 제라닐제라닐 피로포스페이트 신타아제(geranylgeranyl pyrophosphate synthase) 및 하이드록시메틸글루타릴-CoA 환원효소 유전자 각각에 상응하는 야로위아 서열로부터 유래되었다. carRP 및 carB 유전자는 무코 시르시넬로이드로부터 유래되었고, 이들은 이작용성 파이토엔(phytoene) 신타아제/라이코펜 사이클라아제(cyclase) 및 파이토엔 탈수소효소를 각각 암호화한다. crtW 유전자를 합성하여 파르불라르쿨라 베르무덴시스(*Parvularcula bermudensis*)의 카로틴 케톨라아제를 암호화하였다(US 2012/0156718).

[0100] crtZ 유전자를 잔토박터 오토트로피쿠스(*Xanthobacter autotrophicus*)(Xa)로부터 증폭시키거나 합성하여 크로노박터 풀베리스(이전에 엔테로박터 풀베리스로서 공지됨)(Ep)(서열번호 4) 또는 엔테로박테리아세아 박테리움 DC404(Dc)(서열번호 5) 또는 플라보박테리움 종 R1534(Fb)(미국 특허 제6,087,152호)의 카로틴 수산화효소를 암호화하였다. 이들 유전자는 항상은 아니지만 때때로 영양요구성 마커(URA3, LEU2, URA2, LYS1, ADE1) 또는 loxP 부위, 나머지 Hyg^R[하이그로마이신(hygromycin) 내성] 또는 Nat^R[노르세오티리신(nourseothricin) 내성] 마커와 회합된다.

표 2

[0101] 플라스미드

플라스미드	주쇄	삽입물	올리고 또는 공급원
pMB6486	pMB6157(Hyg ^R tef1P-xprT)	HP ^{LF} -crtZ	합성된 NheI-MluI 단편
pMB6487	pMB6157(Hyg ^R tef1P-xprT)	Fb-crtZ	합성된 NheI-MluI 단편

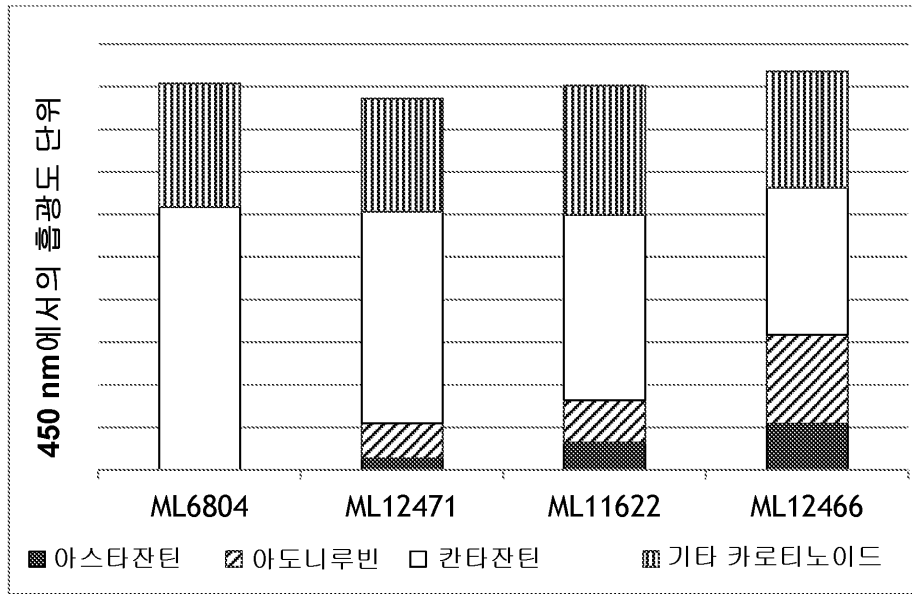
pMB6056	pMB6157(Hyg ^R tef1P-xprT)	Ep-crtZ	합성된 NheI-MluI 단편
---------	--------------------------------------	---------	------------------

- [0102] 본원에 기재된 모든 기초 분자 생물학 및 DNA 조작 절차는 샘브룩(Sambrook) 등 또는 어수벨(Ausubel) 등의 문헌[J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis (eds). 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York; F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, K. Struhl (eds.). 1998. *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley: New York]에 따라 유전적으로 수행된다.
- [0103] **실시예 1a: 헤마토코쿠스 플루비알리스 LF 카로틴 수산화효소를 암호화하는 pMB6486(Hyg^R tef-Hp^{LF}-crtZ)의 생산**
- [0104] 헤마토코쿠스 플루비알리스(UTEX No. 2505)를 사용한 mRNA 서열 분석의 결과로서, 본 발명자들은 놀랍게도 신규 β -카로틴 수산화효소를 발견하였고, 이를 Hp^{LF}-CrtZ[헤마토코쿠스 플루비알리스 저빈도(LF: low frequency) 수산화효소]로 지칭하였다.
- [0105] 코돈 최적화된 카로틴 수산화효소(Hp^{LF}-CrtZ) ORF 서열을, 헤마토코쿠스 플루비알리스 유전자의 추론된 단백질 서열에 기초하여, 서열번호 3으로 명시된 바와 같은 야로위아 리포리티카 코돈 편향을 사용하여 드노보(de novo) 합성하였다. 드노보 합성 동안, NheI 제한 부위를 함유하는 서열 5'-TGCTAGCCACAAAA, 및 효율적 번역을 가능하게 하기 위해 전형적인 코자크(Kozak) 서열을 ATG의 바로 상류에 첨가하였다. MluI 제한 부위를 포함하는 서열 ACGCGT-3'을 종결 코돈의 바로 하류에 첨가하였다. 이러한 서열을 NheI 및 MluI에 의해 절단하고, NheI 및 MluI에 의해 절단된 pMB6157에 결합시켜 pMB6486을 생산하였다. pMB6486의 생성된 암호화된 Hp^{LF}-CrtZ 단백질을 서열번호 2로 명시한다.
- [0106] **실시예 1b: 크로노박터 풀베리스(이전에 엔테로박터 풀베리스로서 공지됨) 카로틴 수산화효소를 암호화하는 pMB6056(Hyg^R tef-crtZ-Ep)의 생산**
- [0107] 이전에 엔테로박터 풀베리스로서 공지된 크로노박터 풀베리스(EMBL 수탁 번호 CAZ90621.1)의 추론된 단백질 서열에 기초하여 서열번호 4로 명시된 바와 같은 야로위아 리포라이티카 코돈 편향을 사용하여 코돈 최적화된 카로틴 수산화효소(Ep-CrtZ) ORF 서열을 드노보 합성하였다. 드노보 합성 동안, NheI 제한 부위를 함유하는 서열 5'-TGCTAGCCACAAAA, 및 효율적 번역을 가능하게 하기 위해 전형적인 코자크 서열을 ATG의 바로 상류에 첨가하였다. MluI 제한 부위를 포함하는 서열 ACGCGT-3'을 종결 코돈의 바로 하류에 첨가하였다. 이러한 서열을 NheI 및 MluI에 의해 절단하고, NheI 및 MluI에 의해 절단된 pMB6157에 결합시켜 pMB6056을 생산하였다.
- [0108] **실시예 1c: 플라보박테리움 중 R1534 카로틴 수산화효소를 암호화하는 pMB6487(Hyg^R tef-crtZ-Fb)의 생산**
- [0109] 미국 특허 제6,087,152호에 명시된 바와 같은 플라보박테리움 중 R1534의 단백질 서열에 기초하여 야로위아 리포라이티카 코돈 편향을 사용하여 코돈 최적화된 카로틴 수산화효소(Fb-CrtZ)를 드노보 합성하였다. 드노보 합성 동안, NheI 제한 부위를 함유하는 서열 5'-TGCTAGCCACAAAA, 및 효율적 번역을 가능하게 하기 위해 전형적인 코자크 서열을 ATG의 바로 상류에 첨가하였다. MluI 제한 부위를 포함하는 서열 ACGCGT-3'을 종결 코돈의 바로 하류에 첨가하였다. 서열을 NheI 및 MluI에 의해 절단하고, NheI 및 MluI에 의해 절단된 pMB6157에 결합시켜 pMB6487을 생산하였다.
- [0110] **실시예 2A: 아스타잔틴을 생산하기 위한 야로위아 리포라이티카 칸타잔틴 생산 균주 ML6804로의 3종의 카로틴 수산화효소 유전자의 도입**
- [0111] Hp^{LF} CrtZ의 수산화 가능성을 시험하고 이를 Fb CrtZ 및 Ep CrtZ와 비교하기 위해, 균주 ML6804를 하기 3종의 상이한 구축물로 형질전환시켰다:
- [0112] 1) tef1p 및 하이그로마이신 내성 마커 Hyg^R의 제어하에 플라보박테리움 crtZ 유전자를 함유한 pMB6487의 HindIII - XbaI 단편;
- [0113] 2) tef1p 및 하이그로마이신 내성 마커 Hyg^R의 제어하에 크로노박터 풀베리스(이전에 엔테로박터 풀베리스로서 공지됨) crtZ 유전자를 함유한 pMB6056의 PvuII 단편;

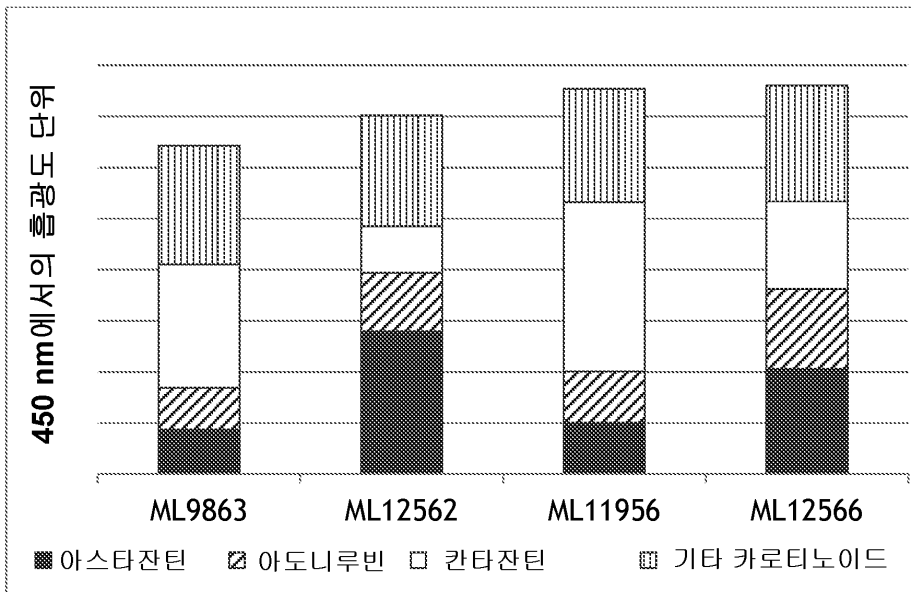
- [0114] 3) *tef1p* 및 하이그로마이신 내성 마커 Hyg^R 의 제어하에 헤마토코쿠스 플루비알리스 "저빈도" *crtZ* 유전자를 함유한 pMB6486의 HindIII - XbaI 단편.
- [0115] 형질전환체를 YPD(100 mg/ℓ의 하이그로마이신 포함) 상에서 30℃에서 3 내지 4일 성장시킨 후 선택하였다. 각각의 구축물로부터의 10개의 형질전환체를 YPD 중에서 4일 동안 진탕 플라스크에서 성장시켰다. 모든 형질전환체가 아스타잔틴을 생산하였다. 각각의 형질전환으로부터의 대표적인 형질전환체는 모 균주 ML6804와 함께 도 1에 제시된다. 플라보박테리움 중 R1534 *crtZ* 유전자를 함유한 균주 ML12471은 3%의 아스타잔틴 및 9%의 아도니루빈(총 카로티노이드의 백분율로서)을 생산하였다. 크로노박터 풀베리스(이전에 엔테로박터 풀베리스로서 공지됨) *crtZ* 유전자를 함유한 균주 ML11622는 7%의 아스타잔틴 및 11%의 아도니루빈을 생산하였다. 헤마토코쿠스 플루비알리스^{LF} *crtZ* 유전자를 함유한 균주 ML12466은 12%의 아스타잔틴 및 22%의 아도니루빈을 생산하였다.
- [0116] **실시예 2B. 아스타잔틴 순도를 증가시키기 위한 야로위아 리포라이티카 아스타잔틴 생산 균주로의 헤마토코쿠스 플루비알리스 LF 카로틴 수산화효소의 도입**
- [0117] 균주 ML9863 및 ML11956을 *tef1* 프로모터, Hp^{LF} *crtZ* 유전자 및 하이그로신 내성에 대해 선택가능한 마커 Hyg^R 이 함유된 pMB6486의 HindIII - XbaI 단편으로 형질전환시켰다. 형질전환 플레이트(100 mg/ℓ의 하이그로마이신이 포함된 YPD) 상에서 30℃에서 3 내지 4일 성장시킨 후 모 균주에 비해 더 진해진 것으로 나타난 각각의 균주로부터의 20개의 Hyg^R 형질전환체를 선택하였다. 형질전환체를 진탕 플라스크에서 YPD 중에서 4일 동안 성장시켰다. 2개의 대표적인 형질전환체는 이들의 모 균주와 비교되어 도 2에 제시된다. ML12562는 ML9863으로부터 유래되고 ML12566은 ML11956으로부터 유래된다. 총 카로티노이드의 백분율로서, ML12562 및 ML12566은 이들의 모 균주에 비해 각각 3배(40% 대 13%) 및 2배(27% 대 13%) 이상의 아스타잔틴을 생산하였다(도 2).
- [0118] **실시예 2C. β-크립토잔틴을 생산하기 위한 야로위아 리포라이티카 β-카로틴 생산 균주로의 헤마토코쿠스 플루비알리스 LF 수산화효소의 도입:**
- [0119] 균주 ML5252를 하기 3종의 상이한 구축물로 형질전환시켰다:
- [0120] 1) *tef1p* 및 하이그로마이신 내성 마커 Hyg^R 의 제어하에 플라보박테리움 중 R1534 *crtZ* 유전자를 함유한 pMB6487의 HindIII - XbaI 단편;
- [0121] 2) *tef1p* 및 하이그로마이신 내성 마커 Hyg^R 의 제어하에 크로노박터 풀베리스(이전에 엔테로박터 풀베리스로서 공지됨) *crtZ* 유전자를 함유한 pMB6056의 PvuII 단편;
- [0122] 3) *tef1p* 및 하이그로마이신 내성 마커 Hyg^R 의 제어하에 헤마토코쿠스 플루비알리스 LF *crtZ* 유전자를 함유한 pMB6486의 HindIII - XbaI 단편.
- [0123] 형질전환체를 YPD(100 mg/ℓ의 하이그로마이신 포함) 상에서 30℃에서 3 내지 4일 성장시킨 후 선택하였다. 각각의 구축물로부터의 10개의 형질전환체를 YPD 중에서 4일 동안 진탕 플라스크에서 성장시켰다. 모든 형질전환체가 제아잔틴 및 β-크립토잔틴을 생산하였다. 대표적인 형질전환체는 모 균주 ML5252와 비교되어 도 3에 제시된다. 플라보박테리움 *crtZ* 유전자를 함유한 균주 ML12458은 6%의 β-크립토잔틴 및 6%의 제아잔틴(총 카로티노이드의 백분율로서)을 생산하였다. 크로노박터 풀베리스(이전에 엔테로박터 풀베리스로서 공지됨) *crtZ* 유전자를 함유한 균주 ML10341은 3%의 β-크립토잔틴 및 39%의 제아잔틴(총 카로티노이드의 백분율로서)을 생산하였다. 헤마토코쿠스 플루비알리스 LF *crtZ* 유전자를 함유한 균주 ML12453은 21%의 β-크립토잔틴 및 4%의 제아잔틴(총 카로티노이드의 백분율로서)을 생산하였다.
- [0124] **야로위아 리포라이티카 세포로부터의 카로티노이드 생산에 대한 HPLC에 의한 추출 및 정량화**
- [0125] 생성된 균주의 진탕 플라스크 시험 및 카로티노이드 분석을 미국 특허 제7,851,199 B2호에 이전에 기재된 방법에 따라서 수행하였다.

도면

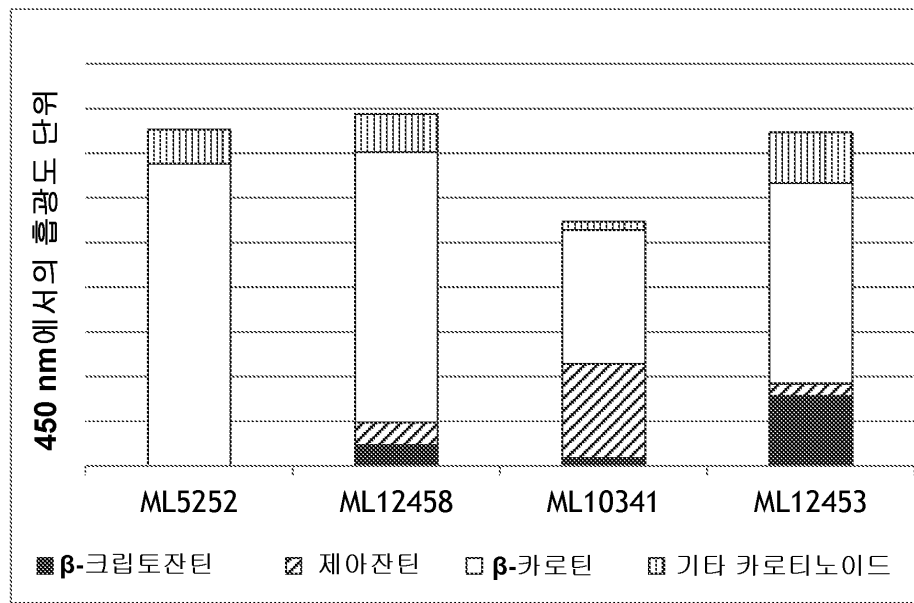
도면1



도면2



도면3



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> DSM IP Assets B.V.

<120> Carotene Hydroxylase

<130> Case 28352 PCT

<160> 5

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 894

<212> DNA

<213> Haematococcus pluvialis

<400> 1

```

atggctttgt cgaagatgca gccaatgggg gtgcaaggac ggcgcatcgc attgcctcgt      60
gacatctcaa ggcctcagat gccctctcaa aggcagccat tggcccaggt gctacgcgta      120
gcagcccccag acacagaggc ggtggagtcc tcacgggtgc agccgtctgt cgggtgcaggc      180
aatcagcaaa ctgcagacga cgccctccaa cagctcgacc ggtccatcgc tctgcgccgc      240

gctcaacgca aaaggagca gctgacctac caggctgcag ccatagcagc gtccgtgggc      300
atatcaagcc ttgccatcct tgccacctac acgcggtttt caatgcacat cacatcagat      360
ggcgagatgc cttggagcga cctcttgggc accctctcac tgggtggcagg tggcgcgttt      420
ggcatggaga tgtatgcgcg ttatgcacac aaggccctat ggcatgagtc ccccttgggt      480
    
```

tggctgctgc acaagagcca ccacactccc cgcaccggac ctttgaagc caatgactta 540
 ttcgccatca tcaatggcct gccagccatg ctgctgtgct attatgggtt ctgggagcct 600
 ggcatggctg gcgcctcatg ctttgggtgct gggtgggca tcacctgta cgggatggcg 660

tacatgttca tccatgacgg cctagtccac cggcgctttc ccaccgggcc catctcagac 720
 ctgcctaca tgaagcgctt gacagtggcc caccagatcc accacagcgg caagtatgat 780
 ggcgcgccct ggggcatgtt cctggggcct caggagctgg aggcaatgc aggtgccaca 840
 gaggagctgg accgcttggg ggcagacctg gactgggtcaa agcgcagggt gtga 894

<210> 2

<211> 297

<212> PRT

<213> Haematococcus pluvialis

<400> 2

Met Ala Leu Ser Lys Met Gln Pro Met Gly Val Gln Gly Arg Arg Ile

1 5 10 15

Ala Leu Pro Arg Asp Ile Ser Arg Pro Gln Met Pro Ser Gln Arg Gln

20 25 30

Pro Leu Ala Gln Val Leu Arg Val Ala Ala Pro Asp Thr Glu Ala Val

35 40 45

Glu Ser Ser Arg Val Gln Pro Ser Val Gly Ala Gly Asn Gln Gln Thr

50 55 60

Ala Asp Asp Ala Leu Gln Gln Leu Asp Arg Ser Ile Ala Leu Arg Arg

65 70 75 80

Ala Gln Arg Lys Arg Glu Gln Leu Thr Tyr Gln Ala Ala Ala Ile Ala

85 90 95

Ala Ser Val Gly Ile Ser Ser Leu Ala Ile Leu Ala Thr Tyr Thr Arg

100 105 110

Phe Ser Met His Ile Thr Ser Asp Gly Glu Met Pro Trp Ser Asp Leu

115 120 125

Leu Gly Thr Leu Ser Leu Val Ala Gly Gly Ala Phe Gly Met Glu Met

130 135 140

Tyr Ala Arg Tyr Ala His Lys Ala Leu Trp His Glu Ser Pro Leu Gly

145 150 155 160
 Trp Leu Leu His Lys Ser His His Thr Pro Arg Thr Gly Pro Phe Glu
 165 170 175
 Ala Asn Asp Leu Phe Ala Ile Ile Asn Gly Leu Pro Ala Met Leu Leu
 180 185 190
 Cys Tyr Tyr Gly Phe Trp Glu Pro Gly Met Val Gly Ala Ser Cys Phe
 195 200 205

Gly Ala Gly Leu Gly Ile Thr Leu Tyr Gly Met Ala Tyr Met Phe Ile
 210 215 220
 His Asp Gly Leu Val His Arg Arg Phe Pro Thr Gly Pro Ile Ser Asp
 225 230 235 240
 Leu Pro Tyr Met Lys Arg Leu Thr Val Ala His Gln Ile His His Ser
 245 250 255
 Gly Lys Tyr Asp Gly Ala Pro Trp Gly Met Phe Leu Gly Pro Gln Glu
 260 265 270

Leu Glu Ala Ile Ser Gly Ala Thr Glu Glu Leu Asp Arg Leu Val Ala
 275 280 285
 Asp Leu Asp Trp Ser Lys Arg Arg Val
 290 295

<210> 3

<211> 891

<212> DNA

<213> Haematococcus pluvialis

<400> 3

atggctctgt ccaagatgca gcccattgggt gtccagggcc gacgaattgc tctccccga	60
gacatctccc gacccagat gccttcccag cgacagctc tcgcccaggt tctgcgagtt	120
gctgcccccg acaccgagge cgtcgagtct tctcgagtcc agccctcgt cgggtgccgc	180
aaccagcaga ccgccagca cgccctccag cagctcgacc gatccattgc tctgcgacga	240
gcccagcgaa agcgagagca gctcacctac caggctgctg ccattgccgc ctccgttggt	300
atctctctc tcgccatcct gcgcacctac acccgattct ccatgcacat cacctccgac	360
ggcgagatgc cctgggtccga tctctctcgt actctgtctc tcgtcgccgg tgggtgccttt	420
ggcatggaga tgtacgccc atacgcccac aaggctctgt ggcacgagtc tcccctcggc	480

tggctcctcc acaagtccca ccacactccc cgaaccggcc ccttcgaggc caacgacctc 540
 tttgccatca tcaacgggtct gcccgccatg ctctctgct actacggctt ctgggagccc 600

 ggtatggctg gtgcttcttg tttcgggtgt ggctcggta tcacctcta cggtatggcc 660
 tacatgttca tccacgacgg tctgggccac cgacgattcc cactggccc catctccgat 720
 ctgccctaca tgaagcgact caccgtcgcc caccagatcc accactccgg caagtacgac 780
 ggtgctccct ggggtatgtt cctcggcccc caggagctgg aggccatttc cggtgccacc 840
 gaggagcttg accgactcgt tgccgatctc gactggcca agcgacgagt c 891

 <210> 4
 <211> 567
 <212> DNA
 <213> Enterobacter pulveris
 <400> 4

 atgcttgtgc tgtggaatac gcttatctc atcacgacat tttgcctgat ggagattgtg 60

 gcaacgcttg ccataaata catcatgcac ggctggggat ggggctggca cgttcgcac 120
 cacgagccgc ggcacggctg gtttgaggtc aacgatctct acgcagtggg gttcgactg 180
 ctgcccatcg tctgatcgc actgggaaca gcaggctggg ggccgctgca atggcttggc 240
 gcaggcatga cgtctacgg tctgttctat ttctctgtgc acgacggtct ggtgcaccgg 300
 agatggccgt ttaactacat tccgcggaga ggctacctta agcggttta ccaggcacac 360
 cggctgcacc acgcagtga tggcaaagag ggttgcgtct ccttcggttt tctctacgca 420
 gctaagccgg aagcacttca ggcagagctg cggagacgtc acggtcggaa acctaaagca 480

 gacgccgcca gagcccgccg ggacggtaaa cctgtcgcac agagcgagag ccgagcacia 540
 gacctgccgc cgaaatcggc agagtaa 567

 <210> 5
 <211> 558
 <212> DNA
 <213> Enterobacteriaceae DC404
 <400> 5

 atgcttgcgt tgtggaatac cgggatcgtg ctactgacta tcatcatcat ggaaggggtg 60
 gcaacgttcg cacacaagta catcatgcac ggctggggat ggggctggca tcattcgcac 120
 cataccccgc gcaaaggggc gtttgagcgt aacgatctct atgcggtggg gtttgcgcta 180
 ctggccattg cgctgattta cgcgggcagc gaagggtact ggccgcttca gtggattggc 240

gcgggaatga ccggctacgg cgtgatctac ttatcgttc acgatggtct tgtccaccag	300
cgctggccgt tccgttacgt gccgcgccgc ggctatctgc gccgcctcta catggcacac	360
cggctgcatc acgcggtgcg ggggcgcgaa gggcgcgtct cttcgggtt tatctacgcc	420
ccaccggtgg acaagctgca ggcggtgctg cgcgaacgta acggcagacc cgccagcgcg	480
ggcgcctgcca gaggtgcgga tcgcgcggcg gccagctgc cttccgggaa gccatgcct	540
gcttcgcgcc ggaataa	558