



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2019-0114982  
(43) 공개일자 2019년10월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 15/52 (2006.01) C12N 9/10 (2006.01)  
C12N 9/12 (2006.01) C12N 9/88 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
C12N 15/52 (2013.01)  
C12N 9/1022 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2019-7022622  
(22) 출원일자(국제) 2018년01월26일  
심사청구일자 없음  
(85) 번역문제출일자 2019년07월31일  
(86) 국제출원번호 PCT/EP2018/052004  
(87) 국제공개번호 WO 2018/138288  
국제공개일자 2018년08월02일  
(30) 우선권주장  
1750696 2017년01월27일 프랑스(FR)

(71) 출원인  
이노브라큐  
프랑스, 31520 라몽빌-세인트-아그네, 3 뤼 아리  
안, 나파 센터 비, 티더블유비 파크 테크놀로지크  
듀 카날 바티먼트  
(72) 발명자  
보이스아트 세드릭  
프랑스, 31450 벨베르로드, 7비 뤼 두 세르즈  
모린 니콜라스  
프랑스, 31400 툴루즈, 레지던스 르 까레 앙쓰 에  
투아르, 아파트 비17, 6 세민먼트 두 독퇴에르 디  
다에르 다스퀴  
(74) 대리인  
손민

전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 **대상 분자의 생산을 위한 유전자 최적화 미생물**

**(57) 요약**

본 발명은 기능성 I형 또는 II형 RuBisCO 효소 및 기능성 포스포리볼로키나제 (PRK)를 발현하고, 5탄당 포스페이  
트 경로의 비 산화성 분지가 적어도 부분적으로 억제된 유전자 변형 미생물에 관한 것이며, 상기 미생물은 외인  
성 분자를 생산하고/거나, 내인성 분자를 과생산하도록 유전자 변형된다. 본 발명은 또한 대상 분자의 생산 또는  
과생산을 위한 이러한 유전자 변형 미생물의 용도 및 대상 분자의 합성 또는 생물전환을 위한 방법에 관한 것이  
다.

(52) CPC특허분류

*C12N 9/1205* (2013.01)

*C12N 9/88* (2013.01)

*C12Y 202/01001* (2013.01)

*C12Y 202/01002* (2013.01)

*C12Y 207/01019* (2013.01)

*C12Y 401/01039* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

기능성 RuBisCO 효소 및 기능성 포스포리블로키나제 (PRK)를 발현하고, 5탄당 포스페이트 경로(pentose phosphate pathway)의 비 산화성 분지(non-oxidative branch)가 적어도 부분적으로 억제된 유전자 변형 미생물로서, 상기 미생물은 RuBisCO 효소 및/또는 포스포리블로키나제 (PRK) 이외에 대상 외인성 분자를 생산하고/거나 대상 내인성 분자를 과생산하도록 유전자 변형된 유전자 변형 미생물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 미생물은 재조합 RuBisCO 효소 및/또는 PRK를 발현하도록 유전자 변형된, 유전자 변형 미생물.

#### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 미생물은 리블로스-5-포스페이트 생산 하류의 5탄당 포스페이트 경로의 비 산화성 분지가 억제되도록 유전자 변형된, 유전자 변형 미생물.

#### 청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 알돌전이효소 (E.C.2.2.1.2) 및/또는 케톨전이효소 (E.C.2.2.1.1)를 인코딩하는 유전자의 발현은 적어도 부분적으로 억제된, 유전자 변형 미생물.

#### 청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 대상 외인성 분자 및/또는 대상 내인성 분자는 아미노산, 펩타이드, 단백질, 비타민, 스테롤, 플라보노이드, 테르펜, 테르페노이드, 지방산, 폴리올 및 유기산으로부터 선택되는, 유전자 변형 미생물.

#### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 미생물은 우선적으로는 효모, 진균류, 미세조류로부터 선택되는 진핵 세포, 또는 원핵 세포, 우선적으로는 박테리아인, 유전자 변형 미생물.

#### 청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 미생물은 기능성 I형 또는 II형 RuBisCO 및 기능성 포스포리블로키나제 (PRK)를 발현하고, TAL1 및/또는 NQM1 유전자의 발현은 적어도 부분적으로 억제되도록 유전자 변형된 사카로마이세스 세레비시아에 속(genus *Saccharomyces cerevisiae*)의 효모인, 유전자 변형 미생물.

#### 청구항 8

RuBisCO 효소 및/또는 포스포리블로키나제 (PRK) 이외에, 우선적으로는 아미노산, 펩타이드, 단백질, 비타민, 스테롤, 플라보노이드, 테르펜, 테르페노이드, 지방산, 폴리올 및 유기산으로부터 선택되는 대상 분자의 생산 또는 과생산을 위한, 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 유전자 변형 미생물의 용도.

#### 청구항 9

RuBisCO 효소 및/또는 포스포리블로키나제 (PRK) 이외에, 적어도 하나의 대상 분자를 생산하는 생명공학적인 공정으로서, 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 유전자 변형 미생물을 상기 미생물에 의한 상기 대상 분자의 합성 또는 생물전환(bioconversion)을 가능하게 하는 조건하에서 배양하는 단계 및 선택적으로 상기 대상 분자를 회수하고/거나 정제하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 생명공학적인 공정.

#### 청구항 10

제9항에 있어서, 미생물은 상기 대상 분자의 생물전환 또는 합성에 관여하는 적어도 하나의 효소를 발현하도록

유전자 변형된, 생명공학적인 공정.

#### 청구항 11

제9항 또는 제10항에 있어서, 미생물은 상기 대상 분자의 분해에 관여하는 효소를 적어도 부분적으로 억제되도록 유전자 변형된, 생명공학적인 공정.

#### 청구항 12

RuBisCO 효소 및/또는 포스포리불로키나제 (PRK) 이외에, 대상 분자를 생산하는 공정으로서, (i) 상기 대상 분자의 합성 또는 생물전환에 관여하는 효소를 인코딩하는 적어도 하나의 서열을 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 재조합 미생물에 삽입하는 단계, (ii) 상기 미생물을 상기 효소의 발현을 가능하게 하는 조건하에서 배양하는 단계 및 선택적으로 (iii) 상기 대상 분자를 회수하고/거나 정제하는 단계를 포함하는, 공정.

#### 청구항 13

RuBisCO 효소 및/또는 포스포리불로키나제 (PRK) 이외에, 대상 분자를 생산하는 공정으로서, (i) 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 재조합 미생물에서 상기 대상 분자의 분해에 관여하는 효소를 인코딩하는 적어도 하나의 유전자의 발현을 억제하는 단계, (ii) 상기 미생물을 상기 효소의 발현을 가능하게 하는 조건하에서 배양하는 단계 및 선택적으로 (iii) 상기 대상 분자를 회수하고/거나 정제하는 단계를 포함하는, 공정.

### 발명의 설명

#### 기술 분야

[0001] 본 발명은 대상 분자의 생산을 위해 적어도 부분적인 탄소원으로서 이산화탄소를 사용할 수 있는 유전자 변형 미생물에 관한 것이다. 더욱 구체적으로, 본 발명은 적어도 5탄당 포스페이트 경로(pentose phosphate pathway)의 비 산화성 분지(non-oxidative branch)는 적어도 부분적으로 억제된 미생물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 이러한 미생물을 사용하여 적어도 하나의 대상 분자를 생산하는 공정에 관한 것이다.

#### 배경 기술

[0002] 지난 몇 년 동안 다량의 대상 분자를 생산할 수 있는 다수의 미생물학적 공정이 개발되었다.

[0003] 예를 들어, 발효 공정은 미생물에 의한 글루코스와 같은 발효성 탄소원으로부터의 분자 생산에 사용된다.

[0004] 미생물이 동화할 수 없는 보조 기질을 상기 미생물이 대상 분자로 전환시킬 수 있도록 하기 위한 생물전환(bioconversion) 공정이 또한 개발되었다. 여기서 다시 탄소원이 필요하지만, 이는 대상 분자의 실제 생산이 아니라, 생물전환에 필요할 수 있는 보조 인자, 더욱 특히 NADPH의 생산을 위해 필요한 것이다. 일반적으로, 주로 보조 인자에 대한 필요성과 산화환원 대사 반응의 평형의 어려움 때문에 이러한 미생물학적 공정의 생산 수율은 낮다. 미생물에 의해 동화될 수 있는 탄소원이 여전히 필요하기 때문에, 이러한 분자의 비용이 문제가 된다. 즉, 현재 미생물학적 공정을 통해 대상 분자를 생산하기 위해서는 확실히 산업적 가치가 더 낮으나, 경제적으로 유리하지 않은 특정 분자를 생산하기에 충분한 분자 (글루코스 또는 기타)를 제공할 필요가 있다.

[0005] 동시에 대기로의 방출이 지속적으로 증가하는 이산화탄소 (CO<sub>2</sub>)는 현재의 미생물학적 공정에서 거의 사용되지 않고, 일부 경우, 전혀 사용되지 않지만, 대상 분자의 생산을 위한 미생물에 의한 소모는 생산 비용을 감소시킬뿐만 아니라, 특정 생태적 문제를 해결할 것이다.

[0006] 따라서, 현재 공정보다 더 낮은 비용으로 다량의 대상 분자를 생산할 수 있는 미생물학적 공정이 여전히 필요하다.

#### 발명의 내용

[0007] CO<sub>2</sub>를 포획하고, 이를 식물 및 광합성 미생물과 동일한 방식으로 주요 탄소원으로 사용하도록 유전자 변형된 비 광합성 미생물을 사용하는 이점은 이미 입증되었다. 예를 들어, 캘빈 회로를 재현하고, 이산화탄소를 포획함으로써, 리불로스-5-포스페이트를 2개의 3-포스포글리세레이트 분자로 전환시키기 위해, 기능성 RuBisCO (리불로스-1,5-bis포스페이트 카복실라제/옥시게나제 - EC 4.1.1.39) 및 기능성 PRK (포스포리불로키나제 - EC 2.7.1.19)를 발현하도록 변형된 미생물이 개발되었다.

- [0008] 탄소원으로서는 CO<sub>2</sub>를 사용하여 대상 분자를 생산하기 위해, 캘빈 회로에 의해 제공되는 용액을 연구함으로써, 본 발명자는 5탄당 포스페이트 경로의 비 산화성 분지의 적어도 부분적 억제와 캘빈 회로 (PRK/RuBisCO)의 일부를 결합시킴으로써, 대상 분자의 생산 수율을 증가시킬 수 있음을 발견하였다. 흥미롭게도, 이러한 억제를 유리하게는 리블로스-5-포스페이트의 생산의 하류에서 수행함으로써, 미생물에 의한 외인성 CO<sub>2</sub>의 소모가 촉진된다. 이렇게 개발된 미생물은 아미노산, 유기산, 테르펜, 테르페노이드, 펩타이드, 지방산, 폴리올 등과 같은 다수의 대상 분자를 산업적으로 유리한 수율로 대규모로 생산할 수 있다.
- [0009] 본 발명은 따라서 기능성 RuBisCO 효소 및 기능성 포스포리블로키나제 (PRK)를 발현하고, 5탄당 포스페이트 경로의 비 산화성 분지가 적어도 부분적으로 억제된 유전자 변형 미생물에 관한 것이며, 상기 미생물은 RuBisCO 및/또는 포스포리블로키나제 (PRK) 효소 이외에 대상 외인성 분자를 생산하고/거나, 대상 내인성 분자를 과생산하도록 유전자 변형된다.
- [0010] 본 발명은 또한 RuBisCO 효소 및/또는 포스포리블로키나제 (PRK) 이외에, 우선적으로는 아미노산, 펩타이드, 단백질, 비타민, 스테롤, 플라보노이드, 테르펜, 테르페노이드, 지방산, 폴리올 및 유기산으로부터 선택되는 대상 분자의 생산 또는 과생산을 위한, 본 발명에 따른 유전자 변형 미생물의 용도에 관한 것이다.
- [0011] 본 발명은 또한 RuBisCO 효소 및/또는 포스포리블로키나제 (PRK) 이외에, 적어도 하나의 대상 분자를 생산하거나, 과생산하는 생명공학적인 공정에 관한 것이며, 이는 본 발명에 따른 유전자 변형 미생물을 상기 미생물에 의한 상기 대상 분자의 합성 또는 생물전환을 가능하게 하는 조건하에서 배양하는 단계 및 선택적으로 상기 대상 분자의 회수 및/또는 정제 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0012] 이는 또한 RuBisCO 효소 및/또는 포스포리블로키나제 (PRK) 이외에, 대상 분자를 생산하는 공정에 관한 것이며, 이는 (i) 상기 대상 분자의 합성 또는 생물전환에 관여하는 효소를 인코딩하는 적어도 하나의 서열을 본 발명에 따른 재조합 미생물에 삽입하는 단계, (ii) 상기 미생물을 상기 효소의 발현을 가능하게 하는 조건하에서 배양하는 단계 및 선택적으로 (iii) 상기 대상 분자를 회수하고/거나 정제하는 단계를 포함한다.

### 도면의 간단한 설명

- [0013] 도 1: 본 발명에 따른 5탄당 포스페이트 경로의 비 산화성 분지의 억제를 도시하는 해당과정, 엔트너-도우도로프 경로 및 5탄당 포스페이트 경로의 개략도.
- 도 2: 본 발명에 따른 5탄당 포스페이트 경로의 비 산화성 분지의 억제 및 PRK 및 RuBisCO에 의한 리블로스-5-포스페이트의 조작을 도시하는 해당과정 및 5탄당 포스페이트 경로의 개략도이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0014] 정의
- [0015] 용어 "재조합 미생물", "변형된 미생물" 및 "재조합 숙주 세포"는 본 명세서에서 혼용되며, 내인성 뉴클레오타이드 서열을 발현하거나, 과발현하거나, 이중 뉴클레오타이드 서열을 발현하도록 유전자 변형되거나, 내인성 유전자의 발현이 변이된 미생물을 지칭한다. "변이"는 하나 이상의 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드 하위단위를 인코딩하는 유전자의 발현 또는 RNA 분자 또는 균등한 RNA 분자의 수준, 또는 하나 이상의 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드 하위단위의 활성을 조절하여, 발현, 수준 또는 활성이 변형의 부재시 관찰되는 것보다 더 높거나, 더 낮도록 한 것을 의미한다.
- [0016] 용어 "재조합 미생물", "변형된 미생물" 및 "재조합 숙주 세포"는 특정 재조합 미생물뿐만 아니라, 이러한 미생물의 하위 세대 또는 잠재적 하위 세대를 지칭하는 것으로 이해된다. 이후의 세대에서 돌연변이 또는 환경적 영향으로 인해 일부 변형이 발생할 수 있으므로, 이들 자손은 모세포와 동일하지 않을 수 있지만, 이는 여전히 본 명세서에 사용되는 용어의 범위 내로 이해된다.
- [0017] 본 발명과 관련하여, 적어도 부분적으로 "억제된" 또는 "불활성화된" 대사 경로는 동일한 야생형 미생물 (상기 대사 경로가 억제되도록 유전자 변형되지 않음)과 비교하여, 고려된 미생물에서 더 이상 적절하게 기능하지 못하는 변이된 대사 경로를 지칭한다. 특히, 대사 경로가 중단되어, 중간 대사산물의 축적이 야기된다. 이러한 중단은, 예를 들어 고려된 대사 경로의 중간 대사산물의 분해에 필요한 효소를 억제하고/거나, 상기 효소를 인코딩하는 유전자의 발현을 억제함으로써 달성될 수 있다. 대사 경로는 또한 감소, 즉 지연될 수 있다. 이러한 감쇠는, 예를 들어 고려되는 대사 경로에 관여하는 하나 이상의 효소를 부분적으로 억제하고/거나, 이들 효소 중

적어도 하나를 인코딩하는 유전자의 발현을 부분적으로 억제하고/거나, 특정 반응에 필요한 보조 인자를 이용함으로써 달성될 수 있다. "적어도 부분적으로 억제된 대사 경로"라는 표현은 고려되는 대사 경로의 수준이 야생형 미생물에서의 수준과 비교하여 적어도 20%, 더욱 우선적으로는 적어도 30%, 40%, 50% 이상 감소한 것을 의미한다. 감소는 더 클 수 있으며, 특히 적어도 60%, 70%, 80%, 90%를 초과할 수 있다. 본 발명에 따르면, 고려된 대사 경로가 상기 미생물에 의해 더 이상 사용되지 않는다는 의미에서 억제가 전면적일 수 있다. 본 발명에 따르면, 이러한 억제는 일시적이거나 영구적일 수 있다.

[0018] 본 발명에 따르면, "유전자 발현의 억제"는 고려된 미생물에서 유전자가 더 이상 발현되지 않거나, 야생형 미생물 (유전자 발현이 억제되도록 유전자 변형되지 않음)과 비교하여, 그 발현이 감소함으로써, 해당 단백질의 생산의 부재 또는 그 생산의 유의한 저하 및 특히 20% 초과, 더욱 우선적으로는 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%의 저하가 야기됨을 의미한다. 일 실시형태에서, 억제는 전면적일 수 있으며, 즉, 상기 유전자에 의해 인코딩되는 단백질은 더 이상 전혀 생산되지 않는다. 유전자 발현의 억제는 고려된 유전자의 하나 이상의 뉴클레오타이드의 결실, 돌연변이, 삽입 및/또는 치환에 의해 달성될 수 있다. 우선적으로, 유전자 발현의 억제는 해당 뉴클레오타이드 서열의 전면적인 결실에 의해 달성된다. 본 발명에 따르면, 당업자가 그 자체로 이해하고, 미생물에 적용 가능한 임의의 유전자 억제 방법이 사용될 수 있다. 예를 들어, 유전자 발현의 억제는 상동성 재조합 (문헌[Datsenko et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2000; 97:6640-5; Lodish et al., Molecular Cell Biology 4th ed. 2000. W. H. Freeman and Company. ISBN 0-7167-3136-3]); 유전자 발현 및/또는 인코딩된 단백질 활성을 변형시키기 위한 무작위 또는 유도된 돌연변이 유발 (문헌[Thomas et al., Cell. 1987;51:503-12]); 그의 발현을 변이시키기 위한 유전자의 프로모터 서열의 변형 (문헌[Kaufmann et al., Methods Mol Biol. 2011;765:275-94. doi: 10.1007/978-1-61779-197-0\_16]); 게놈 내의 유도된 국소 손상부의 표적화 (TILLING); 접합 등에 의해 달성될 수 있다. 또 다른 특정 접근법은, 예를 들어 천연 또는 인위적 유래의 이동성 유전 요소 (트랜스포존 (transposon))를 이용한 트랜스포존 돌연변이 유발에 의한 외래 서열의 삽입에 의한 유전자 불활성화이다. 또 다른 바람직한 실시형태에 따르면, 유전자 발현의 억제는 녹아웃 (knock-out) 기법에 의해 달성된다. 유전자 발현의 억제는 또한 간섭, 리보자임 또는 안티센스 RNA를 사용하여 유전자를 소멸시킴으로써 달성될 수 있다 (문헌[Daneholt, 2006]. 노벨 생리의학상 수상). 본 발명과 관련하여, 용어 "간섭 RNA" 또는 "iRNA"는 표적 유전자의 발현을 차단하고/거나, 해당 mRNA의 분해를 촉진할 수 있는 임의의 iRNA 분자 (예를 들어, 단일 가닥 RNA 또는 이중 가닥 RNA)를 지칭한다. 유전자 억제는 또한 아연 핑거 뉴클레아제 (문헌[Kim et al., PNAS; 93: 1156-1160]), 전사 활성화기 유사 이펙터 뉴클레아제 또는 "TALEN" (문헌[Ousterout et al., Methods Mol Biol. 2016;1338:27-42. doi: 10.1007/978-1-4939-2932-0\_3]), Cas9 뉴클레아제와 집합적인 규칙적 간격의 짧은 회문식 반복 또는 "CRISPR" (문헌[Mali et al., Nat Methods. 2013 Oct; 10(10):957-63. doi: 10.1038/nmeth.2649]), 또는 메가뉴클레아제 (문헌[Daboussi et al., Nucleic Acids Res. 2012. 40:6367-79])의 조합 시스템의 사용을 통해 소정의 게놈의 유도된 유전자 변형을 가능하게 하는 게놈 편집 방법에 의해 달성될 수 있다. 유전자 발현의 억제는 또한 상기 유전자에 의해 인코딩되는 단백질을 불활성화시킴으로써 달성될 수 있다.

[0019] 본 발명과 관련하여, "NADPH-의존성" 또는 "NADPH-소모성" 생합성 또는 생물전환은 하나 이상의 효소가 NADPH 보조 인자의 산화에 의해 수득된 전자의 동시 공급이 필요한 모든 생합성 또는 생물전환 경로를 의미한다. "NADPH-의존성" 생합성 또는 생물전환 경로는 특히 아미노산 (예를 들어, 아르기닌, 리신, 메티오닌, 트레오닌, 프롤린, 글루타메이트, 호모세린, 이소류신, 발린), 테르페노이드 및 테르펜 (예를 들어, 파르네센), 비타민 및 전구체 (예를 들어, 판토에이트, 판토테네이트, 트랜스뉴로스포렌, 필로퀴논, 토코페롤), 스테롤 (예를 들어, 스쿠알렌, 콜레스테롤, 테스토스테론, 프로게스테론, 코르티손), 플라보노이드 (예를 들어, 프람비논, 베스티논), 유기산 (예를 들어, 쿠마르산, 3-하이드록시프로피온산), 폴리올 (예를 들어, 소르비톨, 자일리톨, 글리세롤), 폴리아민 (예를 들어, 스페르미딘), NADP 의존성 시토크롬 p450을 통한 입체 특이적 하이드록실화로 부터의 방향족 분자 (예를 들어, 페닐프로파노이드, 테르펜, 지질, 탄닌, 향, 호르몬)의 합성과 관련된다.

[0020] 다양한 분자 (뉴클레오타이드 서열, 펩타이드, 효소 등)와 관련하여 본 명세서에 사용되는 용어 "외인성"은 고려되는 미생물에 정상적으로 또는 자연적으로는 존재하지 않고/거나, 그에 의해 생산되지 않는 분자를 지칭한다. 반대로, 용어 "내인성" 또는 "천연"은 고려된 미생물에 정상적으로 또는 자연적으로 존재하고/거나, 그에 의해 생산되는 분자를 나타내는 다양한 분자 (뉴클레오타이드 서열, 펩타이드, 효소 등)를 지칭한다.

[0021] 미생물

[0022] 본 발명은 내인성 또는 외인성 대상 분자의 생산을 위한 유전자 변형 미생물을 제시한다.



- [0023] "유전자 변형" 미생물은 대상 분자의 생합성 또는 생물전환 경로에 관여하는 효소를 인코딩하거나, 그의 생물학적 활성 단편을 인코딩하는 핵산 서열을 혼입하여, 미생물의 계놈을 변형시켰음을 의미한다. 상기 핵산 서열은 임의의 적합한 분자 클로닝 방법에 의해 상기 미생물 또는 그의 상위 세대 중 하나의 계놈에 도입될 수 있다. 본 발명과 관련하여, 미생물의 계놈은 예를 들어 플라스미드, 에피솜, 합성 염색체 등에 포함된 염색체 외 유전 물질을 포함하여 미생물에 포함된 모든 유전 물질을 지칭한다. 도입된 핵산 서열은 이중 서열, 즉 상기 미생물에 자연적으로 존재하지 않는 서열 또는 동종 서열을 포함한다. 유리하게는, 대상 핵산 서열을 갖는 전사 단위를 하나 이상의 프로모터의 제어하에 미생물의 계놈에 도입시킨다. 이러한 전사 단위는 또한 유리하게는 전사 종결인자 및 필요한 경우 다른 전사 조절 요소와 같은 통상적인 서열을 포함한다.
- [0024] 본 발명에서 사용 가능한 프로모터는 항시적 프로모터, 즉 대부분의 세포 상태 및 환경 조건에서 활성인 프로모터뿐만 아니라, 외인성의 물리적 또는 화학적 자극에 의해 활성화되거나 억제됨으로써, 이러한 자극의 유무에 따라 가변적인 발현 상태를 유도하는 유도성 프로모터를 포함한다. 예를 들어, 미생물이 효모인 경우, 항시적 프로모터, 예컨대 *TEF1*, *TDH3*, *PGI1*, *PGK*, *ADH1* 중 유전자의 프로모터를 사용할 수 있다. 효모에서 사용할 수 있는 유도성 프로모터의 예는 *tetO-2*, *GAL10*, *GAL10-CYC1*, *PHO5*이다.
- [0025] 일반적으로, 본 발명에 따른 유전자 변형된 미생물은 다음과 같은 특징을 갖는다:
- [0026] - 기능성 RuBisCO (EC 4.1.1.39)의 발현;
- [0027] - 기능성 PRK (EC 2.7.1.19)의 발현;
- [0028] - 5탄당 포스페이트 경로의 비 산화성 분지의 적어도 부분적인 억제; 및
- [0029] - 대상 분자의 합성 및/또는 생물전환에 관여하는 적어도 하나의 유전자의 발현, 및/또는 대상 분자의 합성 및/또는 생물전환과 경쟁적인 활성을 인코딩하는 적어도 하나의 유전자의 억제.
- [0030] 본 발명에 따르면, 임의의 미생물이 사용될 수 있다. 바람직하게는 미생물은 우선적으로는 효모, 진균류, 미세 조류로부터 선택되는 진핵 세포, 또는 원핵 세포, 우선적으로는 박테리아 또는 시아노박테리아이다.
- [0031] 일 실시형태에서, 본 발명에 따른 유전자 변형 미생물은 우선적으로는 자낭균류 (스페르모프토라세아에 (Spermothoraceae) 및 사카로마이세타세아에 (Saccharomycetaceae)), 담자균류 (레우코스포리둠 (*Leucosporidium*), 로도스포리둠 (*Rhodospiridium*), 스포리디오볼루스 (*Sporidiobolus*), 필로바시둠 (*Filobasidium*), 및 필로바시디엘라 (*Filobasidiella*)) 및 편자이 임페르펙티 (*Fungi imperfecti*)에 속하는 불완전균류 효모 (스포로볼로미세타세아에 (Sporobolomycetaceae), 및 크립토크카세아에 (Cryptococcaceae)) 중 선택되는 효모이다. 우선적으로는, 본 발명에 따른 유전자 변형된 효모는 피치아 (*Pichia*), 클루이베로마이세스 (*Kluyveromyces*), 사카로마이세스 (*Saccharomyces*), 쉬조사카로마이세스 (*Schizosaccharomyces*), 칸디아 (*Candida*), 리포마이세스 (*Lipomyces*), 로도토룰라 (*Rhodotorula*), 로도스포리둠 (*Rhodospiridium*), 야로위아 (*Yarrowia*), 또는 데바료마이세스 (*Debaryomyces*) 속에 속한다. 더욱 우선적으로는, 본 발명에 따른 유전자 변형된 효모는 피치아 파스토리스 (*Pichia pastoris*), 클루이베로마이세스 락티스 (*Kluyveromyces lactis*), 클루이베로마이세스 마룩시아누스 (*Kluyveromyces marxianus*), 사카로마이세스 세레비시아에 (*Saccharomyces cerevisiae*), 사카로마이세스 칼스베르겐시스 (*Saccharomyces carlsbergensis*), 사카로마이세스 디아스타티쿠스 (*Saccharomyces diastaticus*), 사카로마이세스 도우글라시 (*Saccharomyces douglasii*), 사카로마이세스 클루이베리 (*Saccharomyces kluyveri*), 사카로마이세스 노르벤시스 (*Saccharomyces norbensis*), 사카로마이세스 오비포르미스 (*Saccharomyces oviformis*), 쉬조사카로마이세스 폼베 (*Schizosaccharomyces pombe*), 칸디다 알비칸스 (*Candida albicans*), 칸디다 트로피칼리스 (*Candida tropicalis*), 로도토룰라 글루티니스 (*Rhodotorula glutinis*), 로도스포리둠 토룰로이데스 (*Rhodospiridium toruloides*), 야로위아 리폴리티카 (*Yarrowia lipolytica*), 데바료마이세스 한세니 (*Debaryomyces hansenii*) 및 리포마이세스 스타르케이 (*Lipomyces starkeyi*)로부터 선택된다.
- [0032] 또 다른 실시형태에서, 본 발명에 따른 유전자 변형 미생물은 진균류, 및 더욱 특히 "사상균류"이다. 본 발명과 관련하여, "사상균류"는 하위 분류인 유마이코티나 (*Eumycotina*)의 모든 사상균 형태를 지칭한다. 예를 들어, 본 발명에 따른 유전자 변형된 진균류는 아스페르길루스 (*Aspergillus*), 트리코테르마 (*Trichoderma*), 네우로스 포라 (*Neurospora*), 포도스포라 (*Podospora*), 엔도티아 (*Endothia*), 무코르 (*Mucor*), 코클리오볼루스 (*Cochliobolus*) 또는 피리쿨라리아 (*Pyricularia*) 속에 속한다. 우선적으로는, 본 발명에 따른 유전자 변형 진균류는 아스페르길루스 니둘란스 (*Aspergillus nidulans*), 아스페르길루스 니게르 (*Aspergillus niger*), 아스페르길루스 아요마리 (*Aspergillus awomari*), 아스페르길루스 오리자에 (*Aspergillus oryzae*), 아스페르길루스

테레우스 (*Aspergillus terreus*), 네우로스포라 크라사 (*Neurospora crassa*), 트리코데르마 레세이 (*Trichoderma reesei*), 및 트리코데르마 비리데 (*Trichoderma viride*)로부터 선택된다.

[0033]

또 다른 실시형태에서, 본 발명에 따른 유전자 변형 미생물은 미세조류이다. 본 발명과 관련하여, "미세조류"는 클로로피세아에 (*Chlorophyceae*), 크리소피세아에 (*Chrysophyceae*), 프림네시오피세아에 (*Prymnesiophyceae*), 디아토마에 (*Diatomae*) 또는 바실라리오피타 (*Bacillariophyta*), 에우글레노피세아에 (*Euglenophyceae*), 로도피세아에 (*Rhodophyceae*), 또는 트레보욱시오피세아에 (*Trebouxioophyceae*) 강 또는 상강에 속하는 모든 진핵 미세조류를 지칭한다. 우선적으로는, 본 발명에 따른 유전자 변형 미세조류는 난노클로로프시스 (*Nannochloropsis*) 종 (예를 들어, 난노클로로프시스 오굴라타 (*Nannochloropsis oculata*), 난노클로로프시스 가디타나 (*Nannochloropsis gaditana*), 난노클로로프시스 살리나 (*Nannochloropsis salina*), 테트라셀미스 (*Tetraselmis*) 종 (예를 들어, 테트라셀미스 수에시카 (*Tetraselmis suecica*), 테트라셀미스 쿠이 (*Tetraselmis chuii*)), 클로렐라 (*Chlorella*) 종 (예를 들어, 클로렐라 살리나 (*Chlorella salina*), 클로렐라 프로토테코이데스 (*Chlorella protothecoides*), 클로렐라 엘립소이데아 (*Chlorella ellipsoidea*), 클로렐라 에메르손이 (*Chlorella emersonii*), 클로렐라 미누티시마 (*Chlorella minutissima*), 클로렐라 피레노이도사 (*Chlorella pyrenoidosa*), 클로렐라 소로키니아나 (*Chlorella sorokiniana*), 클로렐라 불가리스 (*Chlorella vulgaris*)), 클라미도모나스 (*Chlamydomonas*) 종 (예를 들어, 클라미도모나스 레인하르트티 (*Chlamydomonas reinhardtii*)), 두날리엘라 (*Dunaliella*) 종 (예를 들어, 두날리엘라 테르티올렉타 (*Dunaliella tertiolecta*), 두날리엘라 살리나 (*Dunaliella salina*)), 파에오닥툴룸 트리코르누툼 (*Phaeodactylum tricornutum*), 보트리코쿠스 브라우니 (*Botryococcus braunii*), 크로오모나스 살리나 (*Chroomonas salina*), 사이클로텔라 크립티카 (*Cyclotella cryptica*), 사이클로텔라 (*Cyclotella*) 종, 에틀리아 텍센시스 (*Ettlia texensis*), 에우글레나 그라실리스 (*Euglena gracilis*), 짐노디늄 넬소니 (*Gymnodinium nelsoni*), 하에마토코쿠스 플루비알리스 (*Haematococcus pluvialis*), 이소크리시스 갈바나 (*Isochrysis galbana*), 모노라피둠 미누툼 (*Monoraphidium minutum*), 모노라피둠 (*Monoraphidium*) 종, 네오클로리스 올레오아분단스 (*Neochloris oleoabundans*), 니츠쉬아 라에비스 (*Nitzschia laevis*), 오노라피둠 (*Onoraphidium*) 종, 파블로바 루테리 (*Pavlova lutheri*), 파에오닥툴룸 트리코르누툼 (*Phaeodactylum tricornutum*), 포르피리둠 크루엔툼 (*Porphyridium cruentum*), 스케네데스무스 (*Scenedesmus*) 종 (예를 들어, 스케네데스무스 오블리쿠스 (*Scenedesmus obliquus*), 스케네데스무스 쿠아드리카울라우라 (*Scenedesmus quadricaulaula*), 스케네데스무스 (*Scenedesmus*) 종), 스티코코쿠스 바실라리스 (*Stichococcus bacillaris*), 스피룰리나 플라텐시스 (*Spirulina platensis*), 탈라시오시라 (*Thalassiosira*) 종으로부터 선택된다.

[0034]

일 실시형태에서, 본 발명에 따른 유전자 변형 미생물은 우선적으로는 필라 아시도박테리아 (phyla Acidobacteria), 악티노박테리아 (Actinobacteria), 아퀴피카에 (Aquificae), 박테리오테테스 (Bacteroidetes), 클라미디아 (Chlamydia), 클로로비 (Chlorobi), 클로로플렉시 (Chloroflexi), 크리시오게네테스 (Chrysiogenetes), 시아노박테리아 (Cyanobacteria), 데페리박터 (Deferribacter), 데이노코쿠스-서무스 (Deinococcus-Thermus), 디티오글로미 (Dictyoglomi), 피브로박터 (Fibrobacter), 피르미쿠테스 (Firmicutes), 푸소박테리아 (Fusobacteria), 겐마티모나테테스 (Gemmatimonadetes), 니트로스피라에 (Nitrospirae), 플란토마이세테스 (Planctomycetes), 프로테오박테리아 (Proteobacteria), 스피로샤에테스 (Spirochaetes), 서모데술포박테리아 (Thermodesulfobacteria), 서모미크로비아 (Thermomicrobia), 서모토가에 (Thermotogae) 또는 베루코미크로비아 (Verrucomicrobia)로부터 선택되는 박테리아이다. 바람직하게는, 본 발명에 따른 유전자 변형된 박테리아는 아카리오클로리스 (*Acaryochloris*), 아세토박터 (*Acetobacter*), 악티노바실루스 (*Actinobacillus*), 아그로박테리움, (*Agrobacterium*), 알리사이클로바실루스 (*Alicyclobacillus*), 아나바에나 (*Anabaena*), 아나시스티스 (*Anacystis*), 아나에어로비오스피릴룸 (*Anaerobiospirillum*), 아퀴펙스 (*Aquifex*), 아르트로박터 (*Arthrobacter*), 아르트로스피라 (*Arthrospira*), 아조박터 (*Azobacter*), 바실루스 (*Bacillus*), 브레비박테리움 (*Brevibacterium*), 부르홀데리아 (*Burkholderia*), 클로로비움 (*Chlorobium*), 크로마티움 (*Chromatium*), 클로로바쿨룸 (*Chlorobaculum*), 클로스트리디움 (*Clostridium*), 코리네박테리움 (*Corynebacterium*), 쿠프리아비두스 (*Cupriavidus*), 시아노테세 (*Cyanothecae*), 엔테로박터 (*Enterobacter*), 데이노코쿠스 (*Deinococcus*), 에르위니아 (*Erwinia*), 에세리키아 (*Escherichia*), 게오박터 (*Geobacter*), 글로에오박터 (*Gloeobacter*), 글루코노박터 (*Gluconobacter*), 하이드로제노박터 (*Hydrogenobacter*), 클렙시엘라 (*Klebsiella*), 락토바실루스 (*Lactobacillus*), 락토코쿠스 (*Lactococcus*), 만헤이미아 (*Mannheimia*), 메소리조비움 (*Mesorhizobium*), 메틸로박테리움 (*Methylobacterium*), 마이크로박테리움 (*Microbacterium*), 마이크로시스티스 (*Microcystis*), 니트로박터 (*Nitrobacter*), 니트로소모나스 (*Nitrosomonas*), 니트로스피나 (*Nitrospina*), 니트로스피라 (*Nitrospira*), 노스톡 (*Nostoc*), 포르미디움 (*Phormidium*), 프로클로코쿠스 (*Prochlorococcus*), 슈도모나스



(*Pseudomonas*), 랄스토니아 (*Ralstonia*), 리조비움 (*Rhizobium*), 로도박터 (*Rhodobacter*), 로도코쿠스 (*Rhodococcus*), 로도슈도모나스 (*Rhodopseudomonas*), 로도스피릴룸 (*Rhodospirillum*), 살모넬라 (*Salmonella*), 세네테스문 (*Scenedesmon*), 세라티아 (*Serratia*), 쉬겔라 (*Shigella*), 스타필로코쿠스 (*Staphylococcus*), 스트렙토마이세스, (*Streptomyces*), 시네코쿠스 (*Synechococcus*), 시네코시스티스 (*Synechocystis*), 서모시네코코쿠스 (*Thermosynechococcus*), 트리코테스미움 (*Trichodesmium*) 또는 지모모나스 (*Zymomonas*) 속에 속한다. 또한 바람직하게는, 본 발명에 따른 유전자 변형 박테리아는 아그로박테리움 투메파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens*), 아나에어로비오스피릴룸 숙시니시프로두센스 (*Anaerobiospirillum succiniciproducens*), 악티노바실루스 숙시노제네스 (*Actinobacillus succinogenes*), 아퀴팩스 에어리쿠스 (*Aquifex aeolicus*), 아퀴팩스 피로필루스 (*Aquifex pyrophilus*), 바실루스 숄틸리스 (*Bacillus subtilis*), 바실루스 아밀로리퀘파시네스 (*Bacillus amyloliquefaciens*), 브레비박테리움 암모니아제네스 (*Brevibacterium ammoniagenes*), 브레비박테리움 이마리오필룸 (*Brevibacterium immariophilum*), 클로스트리디움 파스테리아눔 (*Clostridium pasteurianum*), 클로스트리디움 르중다리 (*Clostridium ljungdahlii*), 클로스트리디움 아세트부틸리움 (*Clostridium acetobutylicum*), 클로스트리디움 베이게린키 (*Clostridium beigerinckii*), 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*), 쿠프리아비두스 네카토르 (*Cupriavidus necator*), 쿠프리아비두스 메탈리두란스 (*Cupriavidus metallidurans*), 엔테로박터 사카자키 (*Enterobacter sakazakii*), 에세리키아 콜라이 (*Escherichia coli*), 글루코노박터 옥시단스 (*Gluconobacter oxydans*), 하이드로제네박터 서모필루스 (*Hydrogenobacter thermophilus*), 클렙시엘라 옥시토카 (*Klebsiella oxytoca*), 락토코쿠스 락티스 (*Lactococcus lactis*), 락토바실루스 플란타룸 (*Lactobacillus plantarum*), 만헤이미아 숙시니시프로두센스 (*Mannheimia succiniciproducens*), 메소리조비움 로티 (*Mesorhizobium loti*), 슈도모나스 아에루기노사 (*Pseudomonas aeruginosa*), 슈도모나스 메발로니 (*Pseudomonas mevalonii*), 슈도모나스 푸디카 (*Pseudomonas putida*), 슈도모나스 플루오레센스 (*Pseudomonas fluorescens*), 리조비움 에틀리 (*Rhizobium etli*), 로도박터 캡슐라투스 (*Rhodobacter capsulatus*), 로도박터 스파에어로이데스 (*Rhodobacter sphaeroides*), 로도스피릴룸 루브룸 (*Rhodospirillum rubrum*), 살모넬라 엔테리카 (*Salmonella enterica*), 살모넬라 엔테리카 (*Salmonella enterica*), 살모넬라 티피 (*Salmonella typhi*), 살모넬라 티피무리움 (*Salmonella typhimurium*), 쉬겔라 디센테리아에 (*Shigella dysenteriae*), 쉬겔라 플렉스네리 (*Shigella flexneri*), 쉬겔라 소네이 (*Shigella sonnei*), 스타필로코쿠스 아우레우스 (*Staphylococcus aureus*), 스트렙토마이세스 코엘리콜로르 (*Streptomyces coelicolor*), 지모모나스 모빌리스 (*Zymomonas mobilis*), 아카리오크로리스 마리나 (*Acaryochloris marina*), 아나바에나 바리아빌리스 (*Anabaena variabilis*), 아르트로스피라 플란텐시스 (*Arthrospira platensis*), 아르트로스피라 막사 (*Arthrospira maxa*), 클로로비움 테피둠 (*Chlorobium tepidum*), 클로로바쿨룸 (*Chlorobaculum*) 종, 시아노테케 (*Cyanothece*) 종, 글로에오박터 비오라세우스 (*Gloeobacter violaceus*), 마이크로시스티스 아에루기노사 (*Microcystis aeruginosa*), 노스톡 폰티포르메 (*Nostoc punctiforme*), 프로클로코쿠스 마리누스 (*Prochlorococcus marinus*), 시네코코쿠스 엘롱가투스 (*Synechococcus elongatus*), 시네코시스티스 (*Synechocystis*) 종, 서모시네코코쿠스 엘롱가투스 (*Thermosynechococcus elongatus*), 트리코테스미움 에리트라에움 (*Trichodesmium erythraeum*) 및 로도슈도모나스 팔루스트리스 (*Rhodopseudomonas palustris*) 종으로부터 선택된다.

[0035] 기능성 RuBisCO 및 기능성 PRK의 발현

[0036] 본 발명에 따르면, 미생물은 기능성 RuBisCO 및 기능성 PRK를 자연적으로 발현할 수 있다. 예를 들어 미세조류 및 시아노박테리아와 같은 광합성 미생물의 경우이다.

[0037] 자연계에 RuBisCO의 여러 형태가 존재한다 (문헌[Tabita *et al.*, J Exp Bot. 2008;59(7):1515-24. doi: 10.1093/jxb/erm361]). I형, II형 및 III형은 리불로스-1,5-바이포스페이트의 카복실화 및 산소화 반응을 촉매한다. I형은 진핵 생물 및 박테리아에 존재한다. 이는 큰 하위단위 (RbcL) 및 작은 하위단위 (RbcS)의 두 가지 유형의 하위단위로 구성된다. 기능적 효소 복합체는 8개의 L 하위단위 및 8개의 S 하위단위로 이루어진 16량체이다. 이러한 하위단위의 올바른 조립에는 또한 적어도 하나의 특이적 샤프론 (chaperone): RbcX의 개입이 필요하다 (문헌[Liu *et al.*, Nature. 2010 Jan 14;463(7278):197-202. doi: 10.1038/nature08651]). II형은 주로 프로테오박테리아, 고세균 및 외편모조류에서 발견된다. 그 구조는 훨씬 더 단순하다: 이는 동종이량체이다 (2개의 동일한 RbcL 하위단위에 의해 형성됨). 유기체에 따라 I형 RuBisCO를 인코딩하는 유전자는 *rbcL/rbcS* (예를 들어 시네코코쿠스 엘롱가투스), 또는 *cbxLC/cbxSC*, *cfxLC/cfxSC*, *cbbL/cbbS* (예를 들어 쿠프리아비두스 네카토르)로 지칭될 수 있다. 유기체에 따라, II형 RuBisCO를 인코딩하는 유전자는 일반적으로 *cbbM* (예를 들어 로도스피릴룸 루브룸)으로 지칭된다. III형은 고세균에 존재한다. 이는 일반적으로 RbcL 하위단위의 2량체 형태 또는 2량체의 5량체 형태로 발견된다. 유기체에 따라, III형 RuBisCO를 인코딩하는 유전자는 *rbcL* (예를 들어

서모코쿠스 코다카렌시스), *cbbL* (예를 들어 할로페락스 중)로 지칭될 수 있다.

[0038] PRK의 2가지 부류가 알려져 있다: 프로테아박테리아에서 발견되는 I 부류 효소는 6량체이며, 시아노박테리아 및 식물에서 발견되는 II 부류 효소는 4량체 또는 2량체이다. 유기체에 따라, PRK를 인코딩하는 유전자는 *prk* (예를 들어 시네코코쿠스 엘롱가투스), *prkA* (예를 들어 클라미도모나스 레인하르트티), *prkB* (예를 들어 에세리키아 콜라이), *prk1*, *prk2* (예를 들어 램툴링비아 중), *cbbP* (예를 들어 니트로박터 불가리스) 또는 *cfxP* (예를 들어 쿠프리아비두스 네카토르)로 지칭될 수 있다.

[0039] 사용된 미생물이 기능적 RuBisCO 및 기능적 PRK를 자연적으로 발현하지 않는 경우, 상기 미생물을 이중의 RuBisCO 및 PRK를 발현하도록 유전자 변형시킨다. 유리하게는, 이러한 경우에, 상기 단백질을 인코딩하는 서열, 유리하게는 적절한 전사 인자를 혼입시키는 하나 이상의 발현 카세트를 미생물의 게놈에 혼입시켜, 미생물을 형질전환시킨다. 발현되는 RuBisCO의 유형에 따라, 이는 또한 RuBisCO를 형성하는 하위단위의 적절한 조립을 촉진하기 위해, 미생물에 의해 발현된 하나 이상의 샤프론 단백질을 가질 필요가 있을 수 있다. 이는 특히 기능성 RuBisCO를 수득하기 위해, 특이적 샤프론 (Rbcx) 및 전문 샤프론 (예를 들어, GroES 및 GroEL)을 인코딩하는 유전자의 도입 및 발현이 필요한 I형 RuBisCO의 경우이다. 출원 W02015/107496은 기능성 I형 RuBisCO 및 PRK를 발현하도록 효모를 유전자 변형시키는 방법을 상세히 기재한다. 또한 문헌[GUADALUPE-MEDINA *et al.* (Biotechnology for Biofuels, 6, 125, 2013)]에 기재된 방법을 참조할 수 있다.

[0040] 일 실시형태에서, 미생물은 I형 RuBisCO를 발현하도록 유전자 변형된다. 또 다른 실시형태에서, 미생물은 II형 RuBisCO를 발현하도록 유전자 변형된다. 또 다른 실시형태에서, 미생물은 III형 RuBisCO를 발현하도록 유전자 변형된다.

[0041] 하기 표 1 및 표 2에는 예로서, 기능성 RuBisCO 및 기능성 PRK를 발현하도록 미생물을 형질전환하는데 사용될 수 있는 RuBisCO 및 PRK를 인코딩하는 서열이 열거되어 있다.

표 1

RuBisCO를 인코딩하는 서열의 예

유전자	GenBank	GI	유기체
<i>rbcl</i>	BAD78320.1	56685098	시네코코쿠스 엘롱가투스
<i>rbcs</i>	BAD78319.1	56685097	시네코코쿠스 엘롱가투스
<i>cbbL2</i>	CAJ96184.1	113529837	쿠프리아비두스 네카토르
<i>cbbS</i>	P09658.2	6093937	쿠프리아비두스 네카토르
<i>cbbM</i>	P04718.1	132036	토도스피릴룸 두브룸
<i>cbbM</i>	Q21YM9.1	115502580	토도페락스 페리레두센스
<i>cbbM</i>	Q479W5.1	115502578	데칼로모나스 아로마티카
<i>rbcl</i>	O93627.5	37087684	서모코쿠스 코다카렌시스
<i>cbbL</i>	CQR50548.1	811260688	할로페락스 중 Arc-Hr

[0042]

표 2

PRK를 인코딩하는 서열의 예

유전자	GenBank	GI	유기체
<i>Prk</i>	BAD78757.1	56685535	시네코코쿠스 엘롱가투스
<i>cfxP</i>	P19023.3	125575	쿠프리아비두스 네카토르
<i>PRK</i>	P09559.1	125579	스피나시아 올레라세아
<i>cbbP</i>	P37100.1	585367	니트로박터 불가리스

[0043]

[0044] 5탄당 포스페이트 경로의 비 산화성 분지의 억제

[0045] 본 발명에 따르면, 5탄당 포스페이트 경로의 비 산화성 분지가 적어도 부분적으로 억제됨으로써, 미생물은 더 이상 5탄당 포스페이트 경로를 통해 해당과정 경로에 접속할 수 없다.

- [0046] 우선적으로는, 미생물은 리불로스-5-포스페이트 생산 하류의 5탄당 포스페이트 경로의 비 산화성 분지가 억제되도록 유전자 변형된다 (도 1).
- [0047] 리불로스-5-포스페이트 (Ru5P) 생산 하류의 5탄당 포스페이트 경로의 비 산화성 분지의 중단은 유리하게는, 미생물에 의해 정상적으로 생산되는 알돌전이효소 (E.C. 2.2.2.1.2)의 적어도 부분적 억제에 의해 달성된다.
- [0048] 알돌전이효소는 대사산물 쌍인 세도헥툴로스 7-포스페이트/글리세르알데하이드 3-포스페이트와 에리스로스-4-포스페이트/프룩토스 6-포스페이트 사이의 전이효소 유형의 반응을 촉매하는 효소이다.
- [0049] 유기체에 따라, 알돌전이효소를 인코딩하는 유전자는 tal, talA, talB (예를 들어 에세리키아 콜라이, 시네코시스티스 종), TALDO, TALDO1, TALDOR (예를 들어 호모 사피엔스 (*Homo sapiens*), 무스 무스쿨루스), TAL1 (예를 들어 사카로마이세스 세레비시아에), TAL2 (예를 들어 노스톡 폰크티포르메), talA1, talA2 (예를 들어 스트렙토코쿠스 갈릴리티쿠스), talB1, talB2 (예를 들어 아조토박터 비넬란디), 또는 NQM1 (예를 들어 사카로마이세스 세레비시아에)로 지칭될 수 있다.
- [0050] 대안적 또는 추가적으로, 리불로스-5-포스페이트 (Ru5P) 생산 하류의 5탄당 포스페이트 경로의 비 산화성 분지의 중단은 미생물에 의해 정상적으로 생산되는 케톨전이효소 (E.C. 2.2.2.1.1)의 적어도 부분적 억제에 의해 수득될 수 있다.
- [0051] 케톨전이효소는 대사산물 쌍인 세도헥툴로스-7-포스페이트/글리세르알데하이드 3-포스페이트와 리보스-5-포스페이트/자일루로스-5-포스페이트뿐만 아니라, 프룩토스-6-포스페이트/포스페이트/글리세르알데하이드 3-포스페이트와 에리스로스-4-포스페이트/자일루로스-5-포스페이트 사이의 전이효소 반응을 촉매하는 효소이다. 유기체에 따라, 케톨전이효소를 인코딩하는 유전자는 TKL, TKL1, TKL2 (예를 들어 사카로마이세스 세레비시아에), tk1A, tk1B (예를 들어 로도박터 사에로이데스), tktA, tktB, (예를 들어 에세리키아 콜라이), TKT, TKT1, TKT2 (예를 들어 호모 사피엔스, 딕티오스텔룸 디스코이데움), 또는 TKTL1, TKTL2 (예를 들어 보스 타우루스), 또는 cbbT, cbbTC, cbbTP (예를 들어 쿠프리아비두스 네카토르, 시네코코쿠스 종)로 지칭될 수 있다.
- [0052] 특정의 일례에서, 미생물은 알돌전이효소를 인코딩하는 유전자의 발현은 적어도 부분적으로 억제되도록 유전자 변형된다. 우선적으로는, 유전자 발현은 완전히 억제된다. 대안적 또는 추가적으로, 미생물은 케톨전이효소를 인코딩하는 유전자의 발현은 적어도 부분적으로 억제되도록 유전자 변형된다. 우선적으로는, 유전자 발현은 완전히 억제된다.
- [0053] 하기 표 3 및 표 4에는 예로서, 표적 미생물에 따라 억제될 수 있는 알돌전이효소 또는 케톨전이효소를 인코딩하는 서열이 열거되어 있다. 당업자는 미생물에 따라 어느 유전자가 억제될 대상 효소에 해당하는지를 인지하고 있다.

### 표 3

알돌전이효소를 인코딩하는 서열의 예

유전자	GenBank	GI	유기체
TAL1	P15019.4	1729825	사카로마이세스 세레비시아에
NQM1	P63228.1	1729826	사카로마이세스 세레비시아에
talA	BAA21821.1	2337774	에세리키아 콜라이
talB	BAA16812.1	1651885	시네코시스티스 종

[0054]

### 표 4

케톨전이효소를 인코딩하는 서열의 예

유전자	GenBank	GI	유기체
TKL1	NP_015399.1	6325331	사카로마이세스 세레비시아에
TKL2	NP_009675.3	398364879	사카로마이세스 세레비시아에
tktA	AAA69102.1	882464	에세리키아 콜라이
cbbT	AHF62567.1	572996306	시네코코쿠스 종

[0055]

- [0056] 일반적으로, 본 발명에 따른 유전자 변형된 미생물에서, 5탄당 포스페이트 경로와 해당과정 경로 사이의 접속은 더이상 5탄당 포스페이트 경로의 비 산화성 분지를 통해 이루어질 수 없거나, 적어도 유의하게 저하된다.
- [0057] 특정의 예시적 실시형태에서, 미생물은 NQM1 및/또는 TAL1 유전자의 발현이 적어도 부분적으로 억제된 사카로마 이세스 세레비시아에 속의 효모이다.
- [0058] 또 다른 특정의 예시적 실시형태에서, 미생물은 talA 유전자의 발현이 적어도 부분적으로 억제된 에세리키아 콜 라이 속의 박테리아이다.
- [0059] 본 발명에 따르면, 기능성 RuBisCO 및 기능성 PRK를 발현하고, 5탄당 포스페이트 경로의 비 산화성 분지가 적어도 부분적으로 억제된 유전자 변형 미생물은 더이상 5탄당 포스페이트를 통해 해당과정 경로에 접속할 수 없다. 한편, 이는 추가의 탄소 분자를 고정시키면서, PRK와 RuBisCO의 이중 발현을 통해, 5탄당 포스페이트 경로의 산 화성 분지에 의해 합성된 Ru5P로부터 글리세르알데하이드-3-포스페이트 (G3P)를 생산할 수 있다 (도 2).
- [0060] 따라서, 유전자 변형 미생물은 보충 탄소원으로서 외인성 CO<sub>2</sub>, 특히 대기 CO<sub>2</sub>를 사용하여 PRK 및 RuBisCO의 이중 발현을 통해 G3P를 생산할 수 있으며, 5탄당 포스페이트 경로의 산화성 분지를 통해 NADPH를 생산할 수 있다.
- [0061] 따라서, 본 발명에 따른 유전자 변형된 미생물은 NADPH 및 G3P (및 후속하여 대상 분자)의 생산을 위해 외인성 CO<sub>2</sub>를 고정하여, 사용함으로써, 탄소 수율을 증가시킬 수 있도록 한다. 여기서 다시, 탄소 수율이 증가한다.
- [0062] 엔트너-도우도로프 경로의 억제
- [0063] 특정의 일 실시형태에서, 본 발명에 따른 유전자 변형된 미생물은 엔트너-도우도로프 경로를 가지며, 이는 적어도 부분적으로 억제된다. 이 경로는 주로 박테리아 (특히 그람 음성 박테리아)에서 발견되며, 글루코스로부터 피루베이트의 생산을 위한 해당과정 및 5탄당 경로의 대안적 경로이다. 더욱 정확하게, 이 경로는 해당과정을 제공하기 위해, P-글루코네이트, 특히 피루베이트에서 5탄당 포스페이트 경로에 연결된다.
- [0064] 우선적으로는, 미생물을 6-포스포글루코네이트 생산의 하류의 엔트너-도우도로프 경로 반응이 억제되도록 유전 자 변형시킨다. 이러한 억제는 가능한 경쟁 경로를 제거하여, PRK/RuBisCO 조작을 위한 기질로서 6-포스포글루 코네이트의 이용 가능성을 보장한다.
- [0065] 6-포스포글루코네이트 생산의 하류의 엔트너-도우도로프 경로의 중단은 6-포스포글루코네이트로부터 피루베이트 합성 공정의 하나 이상의 반응을 특이적으로 표적화한다. 이러한 합성은 (i) 6-포스포글루코네이트 탈수 효소 ("EDD" - EC. 4.2.1.12) 및 (ii) 2-데하이드로-3-데옥시-포스포글루코네이트 알돌라제 ("EDA" - E.C. 4.1.2.14)의 2가지 효소의 연속 작용에 의해 개시된다.
- [0066] 6-포스포글루코네이트 탈수 효소는 6-포스포글루코네이트의 2-케토-3-데옥시-6-포스포글루코네이트로의 탈수 반 응을 촉매한다. 유기체에 따라, 6-포스포글루코네이트 탈수 효소를 인코딩하는 유전자는 *edd* (GenBank NP\_416365, 예를 들어, 에세리키아 콜라이), 또는 *ilvD* (예를 들어, 미코박테리움 종)로 지칭될 수 있다.
- [0067] 2-데하이드로-3-데옥시-포스포글루코네이트 알돌라제는 6-포스포글루코네이트 탈수 효소에 의해 생산된 2-케토-3-데옥시-6-포스포글루코네이트로부터 피루베이트 분자 및 글리세르알데하이드-3-포스페이트 분자의 합성을 촉 매한다. 유기체에 따라, 2-데하이드로-3-데옥시-포스포글루코네이트 알돌라제를 인코딩하는 유전자는 *eda* (GenBank NP\_416364, 예를 들어, 에세리키아 콜라이), 또는 *kdgA* (예를 들어 서모프로테우스 테낙스), 또는 *dgaF* (예를 들어 살모넬라 티피무리움)로 지칭될 수 있다.
- [0068] 특정의 일례에서, 미생물을 6-포스포글루코네이트 탈수 효소를 인코딩하는 유전자의 발현이 적어도 부분적으로 억제되도록 유전자 변형시킨다. 우선적으로는, 유전자 발현은 완전히 억제된다.
- [0069] 대안적 또는 추가적으로, 미생물은 2-데하이드로-3-데옥시-포스포글루코네이트 알돌라제를 인코딩하는 유전자의 발현은 적어도 부분적으로 억제되도록 유전자 변형된다. 우선적으로는, 유전자 발현은 완전히 억제된다.
- [0070] 하기 표 5 및 표 6에는 예로서, 표적 미생물에 따라 억제될 수 있는 6-포스포글루코네이트 탈수 효소 및 2-데하 이드로-3-데옥시-포스포글루코네이트 알돌라제를 인코딩하는 서열이 열거된다. 당업자는 미생물에 따라 어느 유 전자가 억제될 대상 효소에 해당하는지를 인지하고 있다.



표 5

EDD를 인코딩하는 서열의 예

유전자	GenBank	GI	유기체
edd	NP_416365.1	16120804	에세리키아 콜라이
ilvD	CND70554.1	803638835	미코박테리움 투베르쿨로시스
edd	AJQ65426.1	764046652	살모넬라 엔테리카

[0071]

표 6

EDA를 인코딩하는 서열의 예

유전자	GenBank	GI	유기체
cda	AKF72280.1	817591701	에세리키아 콜라이
kdgA	Q704D1.1	74500902	서모프로테우스 테낙스
cda	O68283.2	81637643	슈도모나스 아에루기노사

[0072]

[0073] 일반적으로, 본 실시형태에서, 피루베이트 생산은 더이상 엔트너-도우도로프 경로를 통해 이루어질 수 없거나, 적어도 유의하게 감소한다.

[0074] 특정의 예시적 실시형태에서, 미생물은 edd 유전자의 발현이 적어도 부분적으로 억제된 에세리키아 콜라이 속의 박테리아이다.

[0075] 특정의 일례에서, 에세리키아 콜라이 속의 박테리아를 talA 및 edd 유전자의 발현이 적어도 부분적으로 억제되도록 유전자 변형시킨다.

[0076] 본 발명에 따르면, 기능성 RuBisCO 및 기능성 PRK를 발현하고, 5탄당 포스페이트 경로의 비 산화성 분지 및 엔트너-도우도로프 경로가 적어도 부분적으로 억제된 유전자 변형 미생물은 더이상 엔트너-도우도로프 경로 또는 5탄당 포스페이트 경로에 의해 피루베이트를 생산할 수 없다. 따라서, NADPH의 생산 동안 글루코스로부터의 탄소 흐름은 바람직하게는 PRK/RuBisCO 조작으로 유도된다.

[0077] 대상 분자의 생산

[0078] 본 발명에 따르면, 대상 외인성 분자를 생산하고/거나, 대상 내인성 분자를 과생산하도록 유전자 변형 미생물을 형질전환시킨다.

[0079] 본 발명과 관련하여, 대상 분자는 우선적으로 0.8 kDa 이하의 분자량을 갖는 소형 유기 분자를 지칭한다.

[0080] 일반적으로, 상기에 기재된 바와 같이, 미생물에 대한 유전자 변형은 대상 분자의 합성 및/또는 생물전환 경로의 탄소 수율을 개선시킨다.

[0081] 본 발명과 관련하여, "개선된" 수율은 최종 산물의 양을 지칭한다. 일반적으로, 본 발명과 관련하여, 탄소 수율은 최종 산물의 양 대 발효 가능한 당의 양의 비율, 특히 중량비에 해당한다. 본 발명에 따르면, 동일한 배양 조건하에 적용된 야생형 미생물과 비교하여, 본 발명에 따른 유전자 변형된 미생물에서 탄소 수율이 증가한다. 유리하게는, 탄소 수율은 2%, 5%, 10%, 15%, 18%, 20% 이상 증가한다. 본 발명에 따른 유전자 변형된 미생물은 유전자 변형된 미생물에 의해 생산된 이종 분자보다 더 많은 양의 대상 분자 (최종 산물)를 생산하여, 간단하게, 해당 분자를 생산하거나 과생산할 수 있다. 본 발명에 따르면, 유전자 조작 미생물은 또한 야생형 미생물에 비해 내인성 분자를 과생산할 수 있다. 내인성 분자의 과생산은 주로 양적 용어로 이해된다. 유리하게는, 유전자 변형된 미생물은 야생형 미생물보다 적어도 20 중량%, 30 중량%, 40 중량%, 50 중량% 이상의 내인성 분자를 생산한다. 유리하게는, 본 발명에 따른 미생물을 아미노산, 테르페노이드, 테르펜, 비타민 및/또는 비타민 전구체, 스테롤, 플라보노이드, 유기산, 폴리올, 폴리아민, NADP 의존성 시토크롬 p450을 통한 입체 특이적 하이드록실화로부터 수득된 방향족 분자 등 중 적어도 하나의 분자를 생산하거나, 과생산하도록 유전



자 변형시킨다.

- [0082] 특정의 일례에서, 우선적으로는 아르기닌, 리신, 메티오닌, 트레오닌, 프롤린, 글루타메이트, 호모세린, 이소류신 및 발린으로부터 선택된 적어도 하나의 아미노산을 과생산하도록 미생물을 유전자 변형시킨다.
- [0083] 특정의 일례에서, 파르네센과 같은 테르페노이드 경로 및 테르펜 경로로부터 분자를 생산하거나, 과생산하도록 미생물을 유전자 변형시킨다.
- [0084] 특정의 일례에서, 우선적으로는 판토에이트, 판토테네이트, 트랜스뉴로스포렌, 필로퀴논 및 토코페롤로부터 선택되는 비타민 또는 전구체를 생산하거나, 과생산하도록 미생물을 유전자 변형시킨다.
- [0085] 특정의 일례에서, 우선적으로 스쿠알렌, 콜레스테롤, 테스토스테론, 프로게스테론 및 코르티손으로부터 선택되는 스테롤을 생산하거나, 과생산하도록 미생물을 유전자 변형시킨다.
- [0086] 특정의 일례에서, 우선적으로는 프람비논 및 베스티논으로부터 선택된 플라보노이드를 생산하거나, 과생산하도록 미생물을 유전자 변형시킨다.
- [0087] 특정의 일례에서, 우선적으로는 쿠마르산 및 3-하이드록시프로피온산으로부터 선택된 유기산을 생산하거나, 과생산하도록 미생물을 유전자 변형시킨다.
- [0088] 특정의 일례에서, 우선적으로는 소르비톨, 자일리톨 및 글리세롤로부터 선택된 폴리올을 생산하거나, 과생산하도록 미생물을 유전자 변형시킨다.
- [0089] 특정의 일례에서, 폴리아민, 우선적으로는 스페르미딘을 생산하거나, 과생산하도록 미생물을 유전자 변형시킨다.
- [0090] 특정의 일례에서, 우선적으로는 페닐프로파노이드, 테르펜, 지질, 탄닌, 향, 호르몬으로부터 선택된 NADP 의존성 시토크롬 p450을 통해 입체 특이적 하이드록실화로부터 방향족 분자를 생산하거나, 과생산하도록 미생물을 유전자 변형시킨다.
- [0091] 대상 분자가 생물전환에 의해 수득되는 경우에, 유리하게는, 전환될 기질을 포함하는 배양 배지에서 유전자 변형된 미생물을 배양시킨다. 일반적으로, 본 발명에 따른 유전자 변형된 미생물에 의한 대상 분자의 생산 또는 과생산은 당업자에게 공지된 적절한 배양 배지에서 상기 미생물을 배양함으로써 수득된다.
- [0092] 용어 "적절한 배양 배지"는 일반적으로 상기 미생물의 유지 및/또는 성장을 위한 필수 영양 물질 또는 유익한 영양 물질, 예컨대 탄소원; 황산암모늄과 같은 질소원; 제1인산칼륨과 같은 인의 공급원; 미량 원소, 예를 들면 구리, 요오드화물, 철, 마그네슘, 아연 또는 몰리브덴산의 염; 비타민 및 아미노산 또는 기타 성장 촉진제와 같은 다른 성장 인자를 제공하는 멸균 배양 배지를 지칭한다. 필요에 따라 소포체를 첨가할 수 있다. 본 발명에 따르면, 이러한 적절한 배양 배지는 화학적으로 규정되거나 복잡적일 수 있다. 따라서 배양 배지는 문헌 [Verduyn *et al.* (Yeast. 1992. 8:501-17)]에 규정되고, 문헌 [Visser *et al.* (Biotechnology and bioengineering. 2002. 79:674-81)]에 의해 규정된 바와 같은 합성 배지 또는 시판 배지, 예컨대 효모 질소 염기 (YNB) 배지 (MP Biomedicals 또는 Sigma-Aldrich)와 조성이 동일하거나 유사할 수 있다.
- [0093] 특히, 배양 배지는 선택적으로 탄소 보조 기질로서 CO<sub>2</sub>가 보충된 글루코스, 갈락토스, 수크로스, 몰라세스 또는 이들 당류의 부산물과 같은 단순 탄소원을 포함할 수 있다. 본 발명에 따르면, 단순 탄소원은 대상 미생물의 정상적인 성장을 가능하게 해야한다. 일부 경우에는 또한 리그노셀룰로스 바이오매스, 볏짚 또는 전분과 같은 복합 탄소원을 사용할 수 있다. 복합 탄소원을 사용하려면 일반적으로 사용하기 전에 전처리할 필요가 있다.
- [0094] 특정의 일 실시형태에서, 배양 배지는 처리되거나 또는 처리되지 않은 글리세롤, 폴리하이드록시알카노에이트 (PHA)의 상이한 종류를 촉진하기 위해, 글루코스, 자일로스 또는 아라비노스와 같은 단당류, 수크로스와 같은 이당류, 아세테이트, 뷰티레이트, 프로피오네이트 또는 발레레이트와 같은 유기산 중 적어도 하나의 탄소원을 포함한다.
- [0095] 생산 및/또는 과생산되는 분자에 따라, 영양 인자 (N, O, P, S, K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Mn, Co, Cu, Ca, Sn; 문헌 [Koller *et al.*, Microbiology Monographs, G.-Q. Chen, 14: 85-119, (2010)])의 공급원을 사용할 수 있다. 이는 특히 PHB를 포함한 PHA의 합성 및 세포 내 축적을 촉진시키는 경우이다.
- [0096] 본 발명에 따르면, 대상 분자를 산업적 규모로 생산할 수 있는 임의의 배양 방법이 고려될 수 있다. 유리하게, 배양은 생물반응기에서, 특히 회분식, 유가식 및/또는 연속 배양 모드에서 수행된다. 우선적으로 대상 분자의

생산과 관련된 배양은, 예를 들어 200 g/L 내지 700 g/L의 농도일 수 있는 농축 글루코스 용액을 첨가함으로써, 하나 이상의 기질의 제어 공급에 해당하는 유가식 모드이다. 이 과정 중 비타민의 제어 공급이 또한 생산성에 유리할 수 있다 (문헌[Alfenore *et al.*, Appl Microbiol Biotechnol. 2002. 60:67-72]). 또한 질소 공급을 제한하기 위해 암모늄염 용액을 첨가할 수 있다.

[0097] 발효는 대상 분자의 생산에 필요한 최소한 단순 탄소원 및/또는 외인성 CO<sub>2</sub> 공급원을 포함하는 적절한 배양 배지에 의해 삼각 플라스크에서 고체 및/또는 액체의 사전 배양의 가능한 단계에 의해 생물반응기에서 일반적으로 수행된다.

[0098] 일반적으로, 본 발명에 따른 미생물의 배양 조건은 미생물 및/또는 생산/과생산되는 분자에 따라 당업자가 용이하게 적용할 수 있다. 예를 들어, 효모의 배양 온도는 20℃ 내지 40℃, S. 세레비시아에의 배양온도는 바람직하게는 28℃ 내지 35℃, 더욱 특히 약 30℃이다. 쿠프리아비두스 네카토르의 배양 온도는 25℃ 내지 35℃, 바람직하게는 30℃이다.

[0099] 따라서, 본 발명은 RuBisCO 효소 및/또는 포스포리불로키나제 (PRK) 이외에, 우선적으로는 아미노산, 펩타이드, 단백질, 비타민, 스테롤, 플라보노이드, 테르펜, 테르페노이드, 지방산, 폴리올 및 유기산으로부터 선택되는 대상 분자의 생산 또는 과생산을 위한, 본 발명에 따른 유전자 변형 미생물의 용도에 관한 것이다.

[0100] 본 발명은 또한 RuBisCO 효소 및/또는 포스포리불로키나제 (PRK) 이외에, 적어도 하나의 대상 분자를 생산하는 생명공학적 공정에 관한 것이며, 본 발명에 따른 유전자 변형 미생물을 상기 미생물에 의한 상기 대상 분자의 합성 또는 생물전환을 가능하게 하는 조건하에서 배양하는 단계, 및 선택적으로 상기 대상 분자를 회수하고/거나 정제하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0101] 특정의 일 실시형태에서, 미생물은 상기 대상 분자의 합성에 관여하는 적어도 하나의 효소를 발현하도록 유전자 변형된다.

[0102] 또 다른 특정 실시형태에서, 미생물은 상기 대상 분자의 생물전환에 관여하는 적어도 하나의 효소를 발현하도록 유전자 변형된다.

[0103] 본 발명은 또한 대상 분자를 생산하는 공정에 관한 것이며, 이는 (i) 상기 대상 분자의 합성 또는 생물전환에 관여하는 효소를 인코딩하는 적어도 하나의 서열을 본 발명에 따른 재조합 미생물에 삽입하는 단계, (ii) 상기 미생물을 상기 효소의 발현을 가능하게 하는 조건하에서 배양하는 단계 및 선택적으로 (iii) 상기 대상 분자를 회수하고/거나 정제하는 단계를 포함한다.

[0104] 예를 들어, 기능성 PRK 및 RuBisCO, 파르네센 합성효소를 발현하고, TAL1 유전자 (유전자 ID: 851068)의 발현은 적어도 부분적으로 억제되도록 유전자 변형된 사카로마이세스 세레비시아에 속의 효모와 같은 효모에 의해 파르네센을 생산할 수 있다.

[0105] 또한 기능성 PRK 및 RuBisCO를 발현하고, talA (유전자 ID: 947006.) 및 sucA (유전자 ID: 945303) 유전자의 발현은 적어도 부분적으로 억제되도록 유전자 변형된 에세리키아 콜라이 속의 박테리아와 같은 박테리아에 의해 글루타메이트를 과생산할 수 있다.

[0106] **실시예**

[0107] **실시예 1: 생물정보학적 분석**

[0108] a) 본 발명에 따른 변형 균주 및 5탄당 포스페이트 경로 및 해당과정을 사용한 야생형 균주 사이의 글루코스로부터의 탄소 고정 수율의 비교

[0109] 본 발명에 따른 변형의 이점을 평가하기 위해, 관련된 반응의 화학량론을 기반으로 하여 이론적 수율 계산을 수행하였다.

[0110] 2가지 경우를 분석하였다 : (i) NADPH 의존성 생합성 경로 (예를 들어, 파르네센 합성)를 공급하기 위한 5탄당 포스페이트 경로를 사용하는 야생형 균주 및 (ii) 동일한 조건하의 본 발명에 따른 변형 균주.

[0111] NADPH 의존성 생합성 경로의 개선과 관련하여, 5탄당 포스페이트 경로를 통한 글루코스로부터 NADPH 및 글리세르알데하이드-3-포스페이트 (G3-P)의 형성의 이론적 평형을 하기 식 (1)에 따라 계산하였다:

[0112] (1)  $3 \text{ 글루코스} + 5 \text{ ATP} + 6 \text{ NADP}^+ + 3 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow 5 \text{ G3-P} + 5 \text{ ADP} + 6 \text{ NADPH} + 11\text{H}^+ + 3 \text{ CO}_2$

- [0113] G3P로부터 피루베이트가 형성되기까지, 하기 평형에 도달한다:
- [0114]  $(2) \quad 3 \text{ 글루코스} + 5 \text{ ADP} + 6 \text{ NADP}^+ + 5 \text{ NAD}^+ + 5 \text{ P}_i \rightarrow 5 \text{ 피루베이트} + 5 \text{ ATP} + 6 \text{ NADPH} + 5 \text{ NADH} + 11 \text{ H}^+ + 3 \text{ CO}_2 + 2 \text{ H}_2\text{O}$
- [0115] 글루코스 1 몰에 대한 평형을 정규화하여, 하기 수율이 수득된다:
- [0116]  $(3) \quad \text{글루코스} + 1.67 \text{ ADP} + 2 \text{ NADP}^+ + 1.67 \text{ NAD}^+ + 1.67 \text{ P}_i \rightarrow 1.67 \text{ 피루베이트} + 1.67 \text{ ATP} + 2 \text{ NADPH} + 1.67 \text{ NADH} + 3.67 \text{ H}^+ + \text{CO}_2 + 0.67 \text{ H}_2\text{O}$
- [0117] 5탄당 경로를 통해, 1.67 몰의 피루베이트 및 2 몰의 NADPH가 1 몰의 글루코스로부터 생산된다. 그러나 6-포스포글루코네이트 탈수소 효소 (EC 1.1.1.44)에 의한 리불로스-5-포스페이트의 형성 동안 탈카복실화에 의해 1 몰의 탄소가 손실된다.
- [0118] 5탄당 포스페이트 경로에 의해 2개의 NADPH를 생산할 때의 피루베이트의 최대 이론적 생산 수율은  $0.82 \text{ g피루베이트} / \text{g글루코스}$  (소모된 글루코스당 합성 피루베이트의 g)이다.
- [0119] 5탄당 포스페이트 경로의 비 산화성 분지가 억제된 균주 (예를 들어  $\Delta \text{TAL1-}\Delta \text{NQM1}$  S. 세레비시아에 효모)에 PRK/RuBisCO 조작을 혼입함으로써, 탄소 고정 흐름은 5탄당 포스페이트 경로의 산화성 분지로부터 PRK/RuBisCO 조작으로 재유도된다 (도 2). 이러한 흐름은 3-포스포글리세레이트 (3PG)의 수준에서 해당과정 경로의 종결과 관련되며, 수율은 하기와 같다:
- [0120]  $(5) \quad \text{글루코스} + 2 \text{ ATP} + 2 \text{ NADP}^+ + 2 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow 2 \text{ 3PG} + 2 \text{ ADP} + 2 \text{ NADPH} + 6 \text{ H}^+$
- [0121] 3PG로부터 피루베이트가 형성되기까지, 하기의 평형에 도달한다:
- [0122]  $(6) \quad \text{글루코스} + 2 \text{ NADP}^+ \rightarrow 2 \text{ 피루베이트} + 2 \text{ NADPH} + 4 \text{ H}^+$
- [0123] 본 발명에 따른 변형의 혼입은 달리, 5탄당 포스페이트 경로에서 탈카복실화에 의해 손실된 탄소 분자를 회수할 수 있게 한다. 따라서 조작에 의한 2개의 NADPH의 생산 동안 피루베이트 합성의 최대 이론적 수율은  $0.98 \text{ g피루베이트} / \text{g글루코스}$ 이며, 이는 5탄당 포스페이트 경로에 의해 수득된 것보다 20.5% 개선을 가능하게 한다.
- [0124] *b) 흐름 평형 분석에 의한 생합성 수율의 시뮬레이션*
- [0125] 생물정보학적 접근법에서, 상이한 생합성 경로의 수율에 대한 본 발명에 따라 기재된 변형의 영향을 시뮬레이션하기 위해, 흐름 평형 분석 (FBA)을 또한 수행하였다.
- [0126] FBA는 게놈 규모에서 대사 네트워크를 시뮬레이션하는 수학적 모델을 기반으로 한다 (문헌[Orth *et al.*, Nat Biotechnol. 2010; 28: 245-248]). 재구성된 네트워크는 소정의 유기체의 공지된 대사 반응을 포함하고, 특히 세포 유지 또는 성장을 보장하기 위해 세포에 필요한 것을 혼입시킨다. FBA는 이러한 네트워크를 통해 대사산물의 흐름을 계산할 수 있도록 함으로써, 대사산물 생산 수율뿐만 아니라, 이론적 성장율의 예측을 가능하게 한다.
- [0127] *i) 절차*
- [0128] OptFlux 소프트웨어 (문헌[Rocha *et al.*, BMC Syst Biol. 2010 Apr 19;4:45. doi: 10.1186/1752-0509-4-45]), 및 사카로마이세스 세레비시아에 대사 모델 iMM904 (문헌[Mo *et al.*, BMC Syst Biol. 2009 Mar 25;3:37. doi: 10.1186/1752-0509-37])에 의해 FBA 시뮬레이션을 수행하였다. 이 모델을 (i) PRK 유형 반응의 첨가, (ii) RuBisCO 유형 반응의 첨가와 함께 이중의 CO<sub>2</sub> 고정 경로를 포함시켜, 본 발명에 따라 기재된 개선점을 포함하도록 변형시켰다.
- [0129] 특정의 예시적 실시형태에서, 이중 경로를 통한 분자 생산을 시뮬레이션하기 위해 필요한 반응을 또한 이 모델에 첨가하였다.
- [0130] 특정의 예시적 실시형태에서, 파르네센의 이중 생산을 위해 파르네센 합성효소 반응 (EC 4.2.3.46 또는 EC 4.2.3.47)을 첨가하였다.

- [0131] 제2의 특징의 예시적 실시형태에서, 아세토아세틸-CoA 환원 효소 (EC 1.1.1.36) 및 폴리-β-하이드록시부티레이트 합성효소 (EC 2.3.1.B2 또는 2.3.1.B5) 반응을 이 모델에 첨가하여, 폴리하이드록시부티레이트의 단량체인 β-하이드록시부티레이트의 이중 생산 경로를 시뮬레이션하였다. 본 발명에 따라 기재된 조건 (예를 들어, 배양 중 비제한 글루코스의 존재, 호기성 배양 조건)하에서 S. 세레비시아에 균주의 생체내 배양 조건을 시뮬레이션 하기 위해 당업자에 의해 재현 가능한 제한 조건 세트를 모델에 적용함으로써 시뮬레이션을 수행하였다.
- [0132] 본 발명에 따라 기재된 조건 (예를 들어, 배지 중 비제한 글루코스의 존재, 호기성 배양 조건)하에서 S. 세레비시아에 균주의 생체내 배양 조건을 시뮬레이션하기 위해 당업자에 의해 재현 가능한 제한 조건 세트를 모델에 적용함으로써 시뮬레이션을 수행하였다.
- [0133] 특징의 예시적 실시형태에서, 본 발명에 따라 기재된, 5탄당 경로의 비산화성 분지의 활성 저하를 시뮬레이션하기 위해, 알돌전이효소 효소 TAL1 및 NQM1의 반응을 사실상 불활성화시킴으로써 시뮬레이션을 수행한다.
- [0134] 시험된 생합성 경로의 생산 수율에 대한 본 발명에 따라 기재된 개선의 영향을 평가하기 위해 변형되지 않은 "야생형 균주" 모델에 대해 병렬 방식으로 시뮬레이션을 수행한다.
- [0135] ii) 결과
- [0136] 수득된 이론적 수율 및 본 발명에 의해 제공된 개선된 백분율이 하기 표 7에 기재되어 있다.

표 7

상이한 분자의 생성을 위한 야생형 균주 및 본 발명에 따른 변형 균주에 대해 FBA에 의해 평가된 최대 이론적 생성 수율.

표적 분자	야생형 균주에 의한 최대 이론적 생성 수율			본 발명에 따른 변형 균주에 의한 최대 이론적 생성 수율			본 발명에 의해 제공되는 이론적 질량 수율 $g_X/g_{GLUC}$ 의 개선 백분율
	$Mol_X/Mol_{GLUC}$	$CMol_X/CMol_{GLUC}$	$g_X/g_{GLUC}$	$Mol_X/Mol_{GLUC}$	$CMol_X/CMol_{GLUC}$	$g_X/g_{GLUC}$	
글루타메이트	0.92	0.77	0.75	1	0.83	0.82	+9.3%
β-하이드록시부티르산	0.92	0.61	0.53	1	0.67	0.58	+9.4%
파르네센	0.21	0.54	0.24	0.22	0.56	0.25	+4.2%

$Mol_X/Mol_{GLUC}$ : 소모된 글루코스의 몰 대비 생성된 분자 X의 몰

$CMol_X/CMol_{GLUC}$ : 소모된 글루코스의 탄소의 몰 대비 생성된 분자 X의 탄소의 몰

$g_X/g_{GLUC}$ : 소모된 글루코스의 g 대비 생성된 분자 X의 g

- [0137]
- [0138] 실시예 2: S. 세레비시아에에서의 이중 파르네센 생산의 개선
- [0139] 시판 균주 CEN.PK 113-7D (GenBank: [JRIV000000000](#))로부터 유래한 사카로마이세스 세레비시아에 효모 균주, CEN.PK 1605 (Mat HIS3 leu2-3.112 trp1-289 ura3-52 MAL.28c)를 CO<sub>2</sub>가 손실됨이 없이 NADPH를 생산함으로써, 글루코스로부터 파르네센 알파의 생산이 개선되도록 조작한다.
- [0140] a) 5탄당 포스페이트 경로의 비 산화성 분지의 불활성화
- [0141] TAL1 유전자 및 그의 파라로그 NQM1을 결실시킴으로써, 5탄당 포스페이트 경로의 비 산화성 분지를 불활성화시켰다.
- [0142] i) TAL1 유전자의 불활성화: 염색체 XI (836350 내지 837357, 상보적 가닥)
- [0143] 이를 위해, 플라스미드 pUG6 (P30114) -Euroscarf에 포함된 KanMX 카세트로부터 유래한 G418 내성 유전자의 코딩 상을 올리고뉴클레오타이드 Sdtal1-Rdtal1로 증폭시켰다 (표 8).



표 8

올리고뉴클레오타이드

명칭	서열
Sdtall (서열번호 : 1)	ACGATAGTAAATACTTCTCGAACTCGTCACATATACGTGTACATAATGGGTAAGGAAAAGACTCAAGT TTC
Rdtall (서열번호 : 2)	ATCAAAAGAAACGTGCATAAGGACATGGCCTAAATTAATATTTTCGAGATACTTCCTTAGAAAACTCA TCGAGCATCAAAATGAAAC
Sdnqm1 (서열번호 : 3)	TGCTAGCGTAAGTCATAAAAAATAGGAAATAATCACATATATACAAGAAATTAATATGGGTAAAAAG CCTGAATCACC
Rdnqm1 (서열번호 : 4)	AGTGGTATATATATTTATATATATAAGTAGGTACCTCTACTCTTAATGATTATCCTTTGCCCTCGG ACG

[0144]

[0145] 올리고뉴클레오타이드의 밑줄 친 부분은 KanMX 서열과 완전하게 상동성이며, 나머지 서열은 사카로마이세스 세레비시아에 게놈상의 TAL1 유전자 코딩 상에 인접한 영역에 상응하므로, 그 말단에 TAL1 유전자 좌위의 상동성 재조합 서열을 포함하는 PCR 증폭물이 생산된다.

[0146] 형질전환 반응을 위해, 균주 CEN.PK 1605를 30℃에서 50 mL의 용적의 복합 고 영양 배지 YPD (효모 추출물 펩톤 텍스트로스)에서, 600 nm에서의 광학 밀도가 0.8이 될 때까지 성장시켰다. 세포를 실온에서 2,500 rpm으로 5분간 원심분리하였다. 상청액을 제거하고, 세포를 25 mL의 멸균 수에 재현탁하고, 실온에서 2,500 rpm으로 5분간 다시 원심분리하였다. 상청액을 제거한 후, 세포를 100 mM 멸균 아세트산리튬 400 μL에 재현탁하였다.

[0147] 동시에, 형질전환 혼합물을 하기와 같이 2 mL 튜브에 제조하였다: 250 μL의 50% PEG, 5 mg/mL의 "담체" DNA 10 μL, 36 μL의 1 M 아세트산리튬, 10 μL의 정제된 PCR 반응 (결실 카세트) 및 350 μL의 물.

[0148] 재현탁된 세포 (50 μL)를 형질전환 혼합물에 첨가하고, 수조에서 42℃에서 40분 동안 인큐베이션하였다.

[0149] 인큐베이션 후, 튜브를 실온에서 5,000 rpm으로 1분간 원심분리하고, 상청액을 따라내었다. 세포를 2 mL의 YPD에 재현탁하고, 14 mL 튜브에 옮기고, 2시간 동안 30℃에서 200 rpm으로 인큐베이션하였다. 그 후, 세포를 실온에서 5,000 rpm으로 1분간 원심분리하였다. 상청액을 제거하고, 세포를 1 mL의 멸균 수에 재현탁하고, 다시 1분간 원심분리하고, 100 μL의 멸균 수에 재현탁하고, YPD+180 μg/mL G418에 도포하였다.

[0150] 수득된 콜로니를 TAL1 유전자의 결실을 검증하기 위해 유전자형을 분석하고, EQ-0520 (CEN.PK1605 Δ*tal1::kan*)라는 참조번호를 붙였다.

[0151] ii) NQM1 유전자의 불활성화: 염색체 VII (580435 내지 581436, 상보적 가닥)

[0152] hphMX 카세트 (loxP-pAgTEF1-hphMX-tAgTEF1-loxP)로부터 유래하고, 플라스미드 pUG75 (P30671) - Euroscarf에 포함된 하이그로마이신 B 내성 유전자의 코딩 상을 올리고뉴클레오타이드 Sdnqm1 및 Rdnqm1로 증폭시킨다 (표 8). 이는 알돌전이효소 NQM1 유전자 좌위의 상동성 재조합 서열을 그 말단에 포함하는 Δnm1 PCR 증폭물을 생산한다.

[0153] 형질전환 반응을 위해, 균주 EQ-0520 (CEN.PK1605 Δ*tal1::kan*)을 30℃에서 50 mL의 용적의 복합 고 영양 배지 YPD (효모 추출물 펩톤 텍스트로스)에서, 600 nm에서의 광학 밀도가 0.8이 될 때까지 성장시켰다. 세포를 실온에서 2,500 rpm으로 5분간 원심분리하였다. 상청액을 제거하고, 세포를 25 mL의 멸균 수에 재현탁하고, 실온에서 2,500 rpm으로 5분간 다시 원심분리하였다. 상청액을 제거한 후, 세포를 100 mM 멸균 아세트산리튬 400 μL에 재현탁하였다. 동시에, 형질전환 혼합물을 하기와 같이 2 mL 튜브에 제조하였다: 250 μL의 50% PEG, 5 mg/mL의 "담체" DNA 10 μL, 36 μL의 1 M 아세트산리튬, 10 μL의 정제된 PCR 반응 (결실 카세트) 및 350 μL의 물.

[0154] 재현탁된 세포 (50 μL)를 형질전환 혼합물에 첨가하고, 수조에서 42℃에서 40분 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 튜브를 실온에서 5,000 rpm으로 1분간 원심분리하고, 상청액을 따라내었다. 세포를 2 mL의 YPD에 재현탁하고, 14 mL 튜브에 옮기고, 2시간 동안 30℃에서 200 rpm으로 인큐베이션하였다. 그 후, 세포를 실온에서



5,000 rpm으로 1분간 원심분리하였다. 상청액을 제거하고, 세포를 1 mL의 멸균 수에 재현탁하고, 다시 1분간 원심분리하고, 100  $\mu$ L의 멸균 수에 재현탁하고, YPD + 200  $\mu$ g/mL 히그로마이신 B +180  $\mu$ g/mL G418에 도포하였다.

[0155] 수득된 콜로니를 TAL1 유전자의 결실을 검증하기 위해 유전자형을 분석하고, EQ-0521 (CEN.PK1605  $\Delta$ *tal1::kan*  $\Delta$ *nqm1::hph*)라는 참조번호를 붙였다.

[0156] b) PRK/RuBisCO/파르네센 합성효소 효소의 도입

[0157] 해당과정에 대한 대안적 경로를 생산하고, 균주 EQ-0521 (CEN.PK1605  $\Delta$ *tal1::kan*  $\Delta$ *nqm1::hph*)가 CO<sub>2</sub>를 고정함으로써 특정 대사산물의 수율을 증가시킬 수 있도록 하기 위해, 상기 균주를 다음을 발현하도록 변형시킨다:

[0158] • 리불로스-5P를 소모시키고, 리불로스-1.5bisP를 제공함으로써, 5탄당 포스페이트 경로에 관여하는 포스포리불로키나제 PRK를 인코딩하는 유전자 및

[0159] • I형 RuBisCO (구조 유전자 RbcL 및 RbcS 및 샤프론 RbcX, GroES 및 GroEL). RuBisCO는 리불로스-1.5bisP 및 1 몰의 CO<sub>2</sub>를 소모하여, 3-포스포글리세레이트를 형성시킨다.

[0160] 알파-파르네센을 생산하기 위해, 알파-파르네센 합성효소 유전자 (AFS1; GenBank 수탁 번호 AY182241)를 효모로부터 분리시킨다.

## 표 9

발현 카세트 및 플라스미드 조성

단백질	GenBank	코돈 최적화	프로모터	종결인자	복제 기점	영양 요구 마커	플라스미드		
RbcL	BAD78320.1	예	TDH3p	ADH1	2 $\mu$	URA3	pFPP45	pL4	
RbcS	BAD78319.1	예	TEF1p	PGK1	2 $\mu$	URA3	pFPP45	pL4	
RbcX	BAD80711.1	예	TEF1p	PGK1	ARS-CEN6	LEU2	pFPP56		
GroES	U00096	아니오	PGI1p	CYC1	ARS-CEN6	LEU2	pFPP56		
GroEL	AF009048	아니오	TDH3	ADH1	ARS-CEN6	LEU2	pFPP56		
PRK	BAD78757.1	예	Tet-OFF	CYC1	ARS416-CEN4	TRP1	pFPP20		
알파-파르네센 합성효소	AY182241	예	PGI1p	CYC1	2 $\mu$	URA3		pL4	pL5
부			Tet-OFF	CYC1	ARS416-CEN4	TRP1	pCM185		
부					ARS-CEN6	LEU2	pFL36		

[0161]

[0162] 자가 복제가 가능하고, 적합한 복제 기점을 가지며, 각각 상이한 영양 요구의 보충을 위한 유전자를 보유함으로써, 3개의 플라스미드 작제물을 포함하는 균주의 선택이 가능한 3개의 플라스미드 벡터에 조작에 필요한 7개의 유전자 (표 9)를 클로닝하였다. 이들 플라스미드 중 2개는 단일 카피이고, Ars/CEN 복제 기점을 가지며, 세 번째는 2  $\mu$  복제 기점을 갖는 다중 카피이다.

[0163] 시네코코쿠스 엘롱가투스로부터의 유전자, 예컨대 RbcL, RbcS, RbcX 및 PRK (WO 2015107496 A1에 종래 기재됨) 및 말루스 도메스티카로부터의 알파-파르네센 합성효소 (문헌[Tippmann *et al.*, Biotechnol Bioeng. 2016 Jan;113(1):72-81])를 사카로마이세스 세레비시아에 효모에서의 코돈의 사용을 위해 최적화하였다.

- [0164] 상기 기재된 프로토콜에 따라, 균주 EQ-0521을 30℃에서 50 mL의 용적의 복합 고 영양 배지 YPD에서 다음 형질 전환 혼합물을 사용하여 성장시켰다: 250  $\mu$ L의 50% PEG, 5 mg/mL의 "담체" DNA 10  $\mu$ L, 36  $\mu$ L의 1 M 아세트산리튬, 10  $\mu$ L (3  $\mu$ g의 pFPP45+pFPP56+pFPP20 또는 pL4+pFPP56+pFPP20 또는 pL5+pFL36+pCM185의 조합) 및 350  $\mu$ L의 물.
- [0165] 재현탁된 세포 (50  $\mu$ L)를 형질전환 혼합물에 첨가하고, 수조에서 42℃에서 40분 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 튜브를 실온에서 5,000 rpm으로 1분간 원심분리하고, 상청액을 따라내었다. 선택 마커에 적합한 시판 배지 CSM (MP Biomedicals)이 보충된 2 mL의 YNB (황산암모늄, 글루코스가 보충된 질소성 염기 무함유 효모)에 세포를 재현탁하고, 14 mL 튜브에 옮기고, 2시간 동안 30℃에서 인큐베이션하였다. 최종 혼합물을 20 g/L 글루코스 및 2  $\mu$ g/mL 독시사이클린 중 YNB+황산암모늄+CSM - LUW (류신 우라실, 트립토판에 도포하였다.
- [0166] 수득된 균주는 다음과 같다:
- [0167] · EQ-0523 (CEN.PK1605  $\Delta$ tal1::kan  $\Delta$ nqm1::hph) (pFPP45+pFPP56+pFPP20)
- [0168] · EQ-0524 (CEN.PK1605  $\Delta$ tal1::kan  $\Delta$ nqm1::hph) (pL4+pFPP56+pFPP20)
- [0169] · EQ-0525 (CEN.PK1605) (pL5+pFL36+pCM185)
- [0170] 균주 EQ-0523 (PRK/RuBisCO/ $\Delta$ tal1::kan  $\Delta$ nqm1::hph), EQ-0524 (PRK/RuBisCO/ $\Delta$ tal1::kan  $\Delta$ nqm1::hph + 파르네센 합성효소) 및 EQ-0525 (파르네센 합성효소)를 20 g/L 글루코스 및 10% CO<sub>2</sub>를 함유하는 액체 배지 YNB에서 성장시킨다.
- [0171] 진탕 인큐베이터 (120 rpm, 30℃)에서 적절한 배양 배지 및 외인성 10% CO<sub>2</sub> 공급원을 포함하는 삼각 플라스크에서의 회분식 배양을, EON 분광분석기 (BioTek Instruments)를 사용하여 측정된 0.05 OD<sub>600nm</sub>에서 접종하여, 수행한다. 대상 균주를 20 g/L 글루코스 및 외인성 10% CO<sub>2</sub> 공급원을 포함하는 YNB+CSM-LUW 배지에서 성장시킨다.
- [0172] 유의한 성장 개시가 관찰된 후, CSM-LUW에 함유된 아미노산 및 질소성 염기 무함유 최소 미네랄 배지, 즉 20 g/L 글루코스 및 외인성 10% CO<sub>2</sub> 공급원을 함유하는 YNB만에 균주를 적용시킨다.
- [0173] c) 삼각 플라스크에서의 파르네센의 생산
- [0174] TAL1 및 NQM1 유전자의 억제에 의해, 5탄당 포스페이트 경로의 비 산화성 분지가 억제된 사카로마이세스 세레비시아에 균주 EQ-0524를 성장시켜, 외인성 PRK 및 RuBisCO를 사용하여, CO<sub>2</sub> 손실 없이 NADPH를 과생산시킴으로써, 파르네센을 생산시킨다. 외인성 PRK 및 RuBisCO를 첨가하거나, TAL1 및 NQM1이 결실되지 않은 이중 파르네센 합성효소를 첨가한 후, 파르네센을 생산하는 참조 균주 EQ-0525와 대상 균주를 비교한다. 삼각 플라스크에서의 회분식 배양을 상기에 기재된 조건하에 수행한다.
- [0175] 파르네센 농도를 발효 상청액으로부터 정량화해야 한다. 간단히 말해, 세포 현탁액을 5000 rpm에서 5분간 원심 분리한다. 도데칸 상을 헥산에서 10배로 희석하고, GC-MS에 주입하고, 문헌[Tippman *et al.* (Biotechnol Bioeng. 2016; 1131:72-81)]에 기재된 프로토콜에 따라 분석한다.
- [0176] 균주 EQ-0253과 비교하여 균주 EQ-0253에서 3%의 생산 수율 (소모된 글루코스의 그램당 파르네센의 그램)의 증가가 관찰되었다.
- [0177] **실시예 3: E. 콜라이 (E. coli)에서의 글루타메이트 생산의 개선**
- [0178] 알파-케토글루타레이트 탈수소 효소 유전자의 결실이 글루타메이트 생산을 증가시킨다는 것이 이미 기재된 바 있다 (문헌[Usuda *et al.*, J Biotechnol. 2010 May 3;147(1):17-30. doi: 10.1016/j.jbiotec.2010.02.018]). 따라서, 다음 실험을 sucA 유전자가 결실된 에세리키아 콜라이 K12 균주 MG1655에서 수행하였다. 이 균주는 에세리키아 콜라이에서 유전자 결실 은행 (문헌[Baba *et al.*, Mol Syst Biol. 2006;2:2006.0008])으로부터 유래되었으며, 콜라이 유전자 스톡 센터 (Coli Genetic Stock Center)로부터 JW0715-2 및 참조 번호 8786 (JW0715-2:MG1655  $\Delta$ sucA::Kan)으로 공급되었다.
- [0179] a) Flp 재조합에 의한 FTR 영역의 특이적 재조합에 의한 선택 카세트의 제거
- [0180] 상기 균주 JW0715-2를 작제하는데 사용된 것과 동일한 결실 전략을 재사용할 수 있도록 하기 위해, 재조합 효소

를 사용하여 선택 카세트를 제거해야 하였다.

- [0181] 플라스미드 p707-Flpe (Gene Bridges에 의한 Quick & Easy E. 콜라이 유전자 결실 Red®/ET® 재조합 키트에 제공됨)에 키트 프로토콜에 따라 전기천공법을 수행한다. 0.2% 글루코스, 0.0003% 테트라사이클린이 보충되고, 0.3% L-아라비노스가 첨가된 LB 한천에서 세포를 선택한다. 0.0015% 카나마이신이 보충된 동일한 배지에서 상기 세포가 더 이상 성장할 수 없음을 확인함으로써 수득된 클론의 역 선택을 수행한다.
- [0182] 수득된 균주는 EQ.EC002: MG1655  $\Delta$ sucA라 칭한다.
- [0183] b) 엔트너-도우도로프 대사 경로를 인코딩하는 edd-eda 오페론의 결실
- [0184] 상동성 재조합에 의해, 제조사의 프로토콜에 따라 Quick & Easy E. 콜라이 유전자 결실 Red®/ET® 재조합 키트 (Gene Bridges)를 사용하여, edd-eda 오페론의 결실을 수행한다.
- [0185] 1. FRT-PKG-gb2-neo-FRT 내성 유전자 발현 카세트를 증폭시키기 위해 설계되고, 염색체 상에 결실 좌위 (위치 1932065-1932115 및 1934604-1934654)의 인접 영역에 50개 초과 뉴클레오타이드에 걸쳐 상동성인 5' 서열을 가짐으로써, 전체 오페론의 어느 한쪽에 박테리아 게놈 상 카세트의 재조합 아암을 생산시키는 올리고뉴클레오타이드;
- [0186] 2. 에세리키아 콜라이 K-12 균주 EQ.EC002를 키트 프로토콜에 따라 전기천공에 의해 플라스미드 pRedET로 형질 전환시킨다. 0.2% 글루코스, 0.0003% 테트라사이클린을 함유하는 고 영양 복합 배지 LB 한천에서 수득된 콜로니를 선택하였다;
- [0187] 3. 1시간 동안 액체 LB 중의 0.3% 아라비노스에 의해 유도된, RedET 재조합 효소의 존재하에 제1 단계에서 수득된 앰플리콘의 형질전환. 그 결과, 결실 카세트에 의한 RedET를 발현하는 세포의 제2 전기천공을 수행하고, 0.2% 글루코스, 0.0003% 테트라사이클린이 보충되고, 0.3% L-아라비노스 및 0.0015% 카나마이신이 첨가된 LB 한천에서 콜로니를 선택한다.
- [0188] 4. 플라스미드 p707-Flpe (Gene Bridges에 의한 Quick & Easy E. 콜라이 유전자 결실 Red®/ET® 재조합 키트에 제공됨)를 키트 프로토콜에 따라 전기천공에 의해 형질전환시킨다. 0.2% 글루코스, 0.0003% 테트라사이클린이 보충되고, 0.3% L-아라비노스가 첨가된 LB 한천에서 세포를 선택한다. 세포가 0.0015% 카나마이신이 보충된 동일한 배지에서 더 이상 성장할 수 없음을 확인함으로써 수득된 클론의 역 선택을 수행한다.
- [0189] 5. 수득된 균주는 EQ.EC003: MG1655  $\Delta$ sucA  $\Delta$ edd-eda로 칭한다.
- [0190] c) talA 유전자의 결실
- [0191] 상동성 재조합에 의해, 제조사의 프로토콜에 따라 Quick & Easy E. 콜라이 유전자 결실 Red®/ET® 재조합 키트 (Gene Bridges)를 사용하여, talA 유전자의 결실을 수행한다.
- [0192] 1. FRT-PKG-gb2-neo-FRT 내성 유전자 발현 카세트를 증폭시키기 위해 설계되고, 유전자 (talA) (유전자 ID: 947006)의 코딩 상, 즉, 결실 좌위의 인접 영역에 50개 초과 뉴클레오타이드에 걸쳐 상동성인 5' 서열을 가짐으로써, 박테리아 게놈 상 카세트의 재조합 아암을 생산시키는 올리고뉴클레오타이드.
- [0193] 2. 에세리키아 콜라이 K-12 균주 EQ.EC003를 키트 프로토콜에 따라 전기천공에 의해 플라스미드 pRedET로 형질 전환시킨다. 0.2% 글루코스, 0.0003% 테트라사이클린을 포함하는 고 영양 복합 배지 LB 한천에서 수득된 콜로니를 선택하였다.
- [0194] 3. 1시간 동안 액체 LB에서 0.3% 아라비노스에 의해 유도된 RedET 재조합 효소의 존재하에 제1 단계에서 수득된 앰플리콘의 형질전환. 마지막으로, 결실 카세트에 의해 RedET를 발현하는 세포의 제2 전기천공을 수행하고, 0.2% 글리세롤 및 0.3% 피루베이트, 0.0003% 테트라사이클린이 보충되고, 0.3% L-아라비노스 및 0.0015% 카나마이신이 첨가된 LB 한천에서 콜로니를 선택한다.
- [0195] 유전자형 분석 및 시퀀싱에 의해 결실을 확인하고, 수득된 균주의 명칭은 다음과 같다:
- [0196] • EQ.EC002: MG1655  $\Delta$ sucA
- [0197] • EQ.EC003: MG1655  $\Delta$ sucA  $\Delta$ edd-eda
- [0198] • EQ.EC020: MG1655  $\Delta$ sucA  $\Delta$ edd-eda  $\Delta$ talA::kan

[0199] d) CO<sub>2</sub> 고정을 위한 PRK/RuBisCO 조작의 삽입

[0200] E. 콜라이에서 I형 RuBisCO의 상이한 성분의 재조합 발현을 위해, 하기 표에 기재된 유전자를 포함하는 합성 오페론으로서 하기 표에 기재된 유전자를 클로닝한다.

[0201] 이들 유전자의 발현 수준을 제어하기 위해, 문헌[Zelcbuch *et al.* (Zelcbuch *et al.*, Nucleic Acids Res. 2013 May;41(9):e98; Levin-Karp *et al.*, ACS Synth Biol. 2013 Jun 21;2(6):327-36. doi: 10.1021/sb400002n)]에 기재된 바와 같이, 다양한 번역 효율을 갖고, 표에 제시된 리보솜 결합 서열 (RBS)을 각 유전자의 코딩 상 사이에 삽입한다. PLtet0-1 프로모터, p15A 복제 기점 및 암피실린 내성 유전자를 포함하는 pZA11 벡터 (Expressys) 내로의 연속 삽입에 의해 RBS 서열에 의해 산재된 각 코딩 상의 연결체를 작제한다.

### 표 10

유전자 참조번호

유전자	GenBank	유기체
rbcL	BAD78320.1	시네코코쿠스 엘롱가투스
rbcS	BAD78310.1	시네코코쿠스 엘롱가투스
rbcX	BAD80711.1	시네코코쿠스 엘롱가투스
Prk	BAD78757.1	시네코코쿠스 엘롱가투스

[0202]

### 표 11

플라스미드 상의 발현 카세트의 조성

플라스미드	벡터 pZA11의 합성 오페론의 구조								
	유전자 A	RBS1	유전자 B	RBS2	유전자 C	RBS3	유전자 D	RBS4	유전자 E
pZA11									
pEQEC005	rbcS	D	rbcL	B	RbcX	F			
pEQEC006	rbcS	D	rbcL	B	RbcX	F	Prk		
pEQEC008	Prk								

[0203]

### 표 12

리보솜 결합 부위 (RBS) 시스템 사이의 서열

명칭	RBS 서열
A (서열번호 : 5)	AGGAGGTTTGGA
B (서열번호 : 6)	AACAAAATGAGGAGGTACTGAG
C (서열번호 : 7)	AAGTTAAGAGGCAAGA
D (서열번호 : 8)	TTGCAGGGGGAAG
E (서열번호 : 9)	TAAGCAGGACCGGCGGCG
F (서열번호 : 10)	CACCATACACTG

[0204]

[0205] 상기 계획에 따라 제시된 상이한 벡터를 전기천공하여 수종의 균주를 생산한다:

[0206] EQ.EC 020 → (EQ.EC 003+ pZA11): MG1655 △*sucA* △*edd-eda*

[0207] EQ.EC 021 → (EQ.EC 004+ pEQEC005): MG1655 △*sucA* △*edd-eda* -*talA::kan* (RuBisCO)

- [0208] EQ.EC 022 → (EQ.EC 004+ pEQEC006): MG1655  $\Delta$ *sucA*  $\Delta$ *edd-eda* *talA::kan* (*RuBisCO*+*PRK*)
- [0209] EQ.EC 024 → (EQ.EC 003+ pEQEC008): MG1655  $\Delta$ *sucA*  $\Delta$ *edd-eda*  $\Delta$ *talA::kan* (*PRK*)
- [0210] 100 mg/L 암피실린이 보충된 LB 배지에서 클론을 선택한다. 충분한 양의 바이오매스를 수득한 후, 적어도 250 mL의 삼각 플라스크에서 50 mL 이상의 용적의 배양물을 집중하여, *PRK*/*RuBisCO* 조작 사용에 균주를 적용한다. 상기에 기재된 바와 같이, 37°C에서 외인성의 1기압 CO<sub>2</sub> 공급원 및 2g/L 글루코스를 포함하는 LB 배양 배지에서 이러한 적용 단계를 수행한다.
- [0211] e) 글루타메이트 생산
- [0212] 글루타메이트 생산을 위해, 500 mL의 LB 배양물로부터의 세포를 0.1 기압의 CO<sub>2</sub>의 압력에서 20 mL의 MS 배지 (40 g/L 글루코스, 1 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 20 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mg/L FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 10 mg/L MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 2 g/L 효모 추출물, 30 g/L CaCO<sub>3</sub>, 100 mg/L 암피실린)에 접종한다.
- [0213] 잔류 글루타메이트 및 글루코스를 생물분석기 (Sakura Seiki)로 측정한다. 탄소 수율 Y<sub>p/s</sub>를 소모된 글루코스 1 그램당 생산된 글루타메이트의 그램으로 계산한다. 이 수율은 대조균 균주 EQ.EC 020 (무), EQ.EC 021 (*RuBisCO* 단독)과 비교하여 EQ.EC 022 균주 (*RuBisCO*+*PRK*)에서 8% 증가한다. 대조균 균주 EQ.EC 024 (*PRK* 단독)는 생존하지 못한다.
- [0214] **실시예 4: C. 네카토르에서의 PHB 생산의 개선**
- [0215] a) 5탄당 포스페이트 경로의 비 산화성 분지의 억제
- [0216] 또한 환원력을 증가시키면 기존 대사 경로의 효율을 유의하게 개선할 수 있다. 이는 자연적으로 폴리하이드록시 부티레이트 (PHB)를 생산하는 박테리아 균주 랄스토니아 유트로파 ATCC 17699 (쿠프리아비두스 네카토르)의 경우이다. 이 박테리아는 독립 영양 및 종속 영양 조건하 모두에서 성장할 수 있다.
- [0217] 본 발명에 따른 *tal* 유전자 (알돌전이효소 MF\_00492)의 결실은 NADPH-환원된 뉴클레오타이드의 풀을 증가시킴으로써, PHB 생산 수율을 증가시킬 수 있도록 하나, 또한 해당과정 경로의 사용을 가능하게 하여, 산화성 5탄당 포스페이트 경로에 대사 플럭스를 집중시킨다.
- [0218] 이러한 쿠프리아비두스 네카토르 균주 (R. 유트로파 H16)는 메가플라스미드 pHG1 및 2개의 염색체를 갖는다. *tal* 유전자의 결실은 문헌[Quandt *et al.* and Lindenkamp *et al.* (Quandt *et al.*, Gene. 1993 May 15;127(1):15-21; Lindenkamp *et al.*, Appl Environ Microbiol. 2010 Aug;76(16):5373-82; Lindenkamp *et al.*, Appl Environ Microbiol. 2012 Aug;78(15):5375-83)]에 기재된 바와 같이 그람 음성 박테리아의 *SacA* 자살 유전자를 포함하는 벡터를 생산함으로써 달성된다.
- [0219] *tal* 유전자의 인접 영역에 해당하는 2개의 PCR 증폭물을 문헌[Lindenka *et al.* (Appl Environ Microbiol. 2012 Aug;78(15):5375-83)]에 기재된 절차에 따라 제한하여, 플라스미드 pJQ200mp18Tc에 클로닝한다. 이어서, 변형된 플라스미드 pJQ200mp18Tc:: $\Delta$ *tal*을 염화칼슘 형질전환 방법에 의해 E. 콜라이 균주 S17-1에 형질전환시킨다. 그리고 S17-1 박테리아의 세포 단층을 포함하는 접시에 랄스토니아 유트로파 배양의 스팟을 한천에 도포함으로써, 유전 물질의 전달을 접합에 의해 수행하고, 선택을 위해, 10% 수크로스의 존재하에 30°C의 영양 브로스 (NT) 배지에서 선택을 수행하고 (문헌[Hogrefe *et al.*, J Bacteriol. 1984 Apr;158(1):43-8.]), 25 µg/mL의 테트라사이클린을 포함하는 미네랄 배지에서 검증한다.
- [0220] 결실을 유전자형 분석 및 시퀀싱에 의해 검증한다. 따라서, 생산된 균주 EQCN\_002는 *tal* 유전자가 결실되어 있다. **EQCN\_010: H16  $\Delta$ *tal***
- [0221] b) 엔트너-도우도로프 대사 경로의 불활성화
- [0222] *edd* 및 *eda* 유전자의 인접한 영역 (*edd*의 상류 및 *eda*의 하류)에 해당하는 2개의 PCR 증폭물을 문헌[Srinivasan *et al.* (Appl Environ Microbiol. 2002 Dec;68(12):5925-32)]에 기재된 절차에 따라 제한하여, 플라스미드 pJQ200mp18Cm에 클로닝하였다.
- [0223] 이어서, 변형된 플라스미드 pJQ200mp18Cm:: $\Delta$ *edd-eda*를 염화칼슘 형질전환 방법에 의해 E. 콜라이 균주 S17-1에 형질전환시킨다. 그리고 S17-1 박테리아의 세포 단층을 포함하는 접시에 랄스토니아 유트로파 **EQCN\_010** 배양의 스팟을 한천에 장착시킴으로써, 유전 물질의 전달을 접합에 의해 수행하고, 선택을 위해, 10% 수크로스의 존재



하에 30℃의 영양 브로스 (NT) 배지에서 선택을 수행하고 (문헌[Hogrefe *et al.*, J Bacteriol. 1984 Apr;158(1):43-8.]), 50 µg/mL의 클로람페니콜을 포함하는 미네랄 배지에서 검증한다.

[0224] 결실을 유전자형 분석 및 시퀀싱에 의해 검증한다. 따라서, 생산된 균주 EQCN\_003은 *tal* 유전자가 결실되어 있다. EQCN\_011: H16  $\Delta tal \Delta edd-eda$

[0225] c) 생물반응기에서 PHB의 생산

[0226] 동결 스톱으로부터의 접종물을 글루코스의 존재하에 30℃에서 48시간 내지 96시간 동안 배양한 동결 튜브로부터 50 내지 100 µL의 속도로 고체 배지 상에 도포한다. RuBisCO 및 PRK를 인코딩하는 유전자의 발현을 종속 영양 호기성 조건하에서 C. 네카토르에서 유지시킨다 (문헌[Rie Shimizu *et al.*, Sci Rep. 2015; 5: 11617], 2015년 7월 1일 온라인 공개됨). 진탕 인큐베이터 (100 내지 200 rpm, 30℃)에서 20 g/L 글루코스 중 적절한 배양 배지 및 외인성 10% CO<sub>2</sub> 공급원을 포함하는 삼각 플라스크에서의 회분식 배양 (50 mL 중 10 mL, 그 후 250 mL 중 50 mL)을, 0.01 OD<sub>620nm</sub>에서 최소 접종하여, 수행한다.

[0227] PHB 생산 수율을 개선시키는 대상 균주 EQCN\_011을 영양 제한 존재하의 종속 영양 조건하에서 PHB를 자연적으로 축적하는 참조 균주 H16과 비교한다.

[0228] 균주의 생산성을 생물반응기에서 비교한다. 생물반응기에서 수행된 배양에 상기에 기재된 조건하에 삼각 플라스크에서 고체 및/또는 액체 증폭 연쇄 단계로부터 시딩한다. My-control (Applikon Biotechnology, Delft, Netherlands) 750 mL 또는 Biostat B (Sartorius Stedim, Goettingen, Germany) 2.5 L 유형의 생물반응기에 0.01 OD<sub>620nm</sub>에 해당하는 최소 농도로 시딩한다.

[0229] PHB의 축적은 성장과 분리된다. 배양을 30℃로 조절하고, 최소 용존 산소 농도를 20%를 초과하여 유지하기 위해 (30℃, 1 bar), 공기 유입량을 0.1 VVM (기체 부피/액체 부피/분) 내지 1 VVM으로 유지한다. 사용된 생물반응기의 규모에 따라 진탕을 적용한다. 유입구 기체 유량은 선택적으로 CO<sub>2</sub>가 보충된 공기로 구성된다. CO<sub>2</sub> 보충은 1% 내지 10%에서 이루어진다. 14% 또는 7% 암모니아 용액을 첨가하여 pH를 7로 조정한다. 유기식 배양 배양 방법은 일정한 탄소/인 또는 탄소/질소 비율을 유지하면서, 인 또는 질소의 제한과 조합하여, 비 제한적 탄소 기질을 공급하는 것을 가능하게 한다.

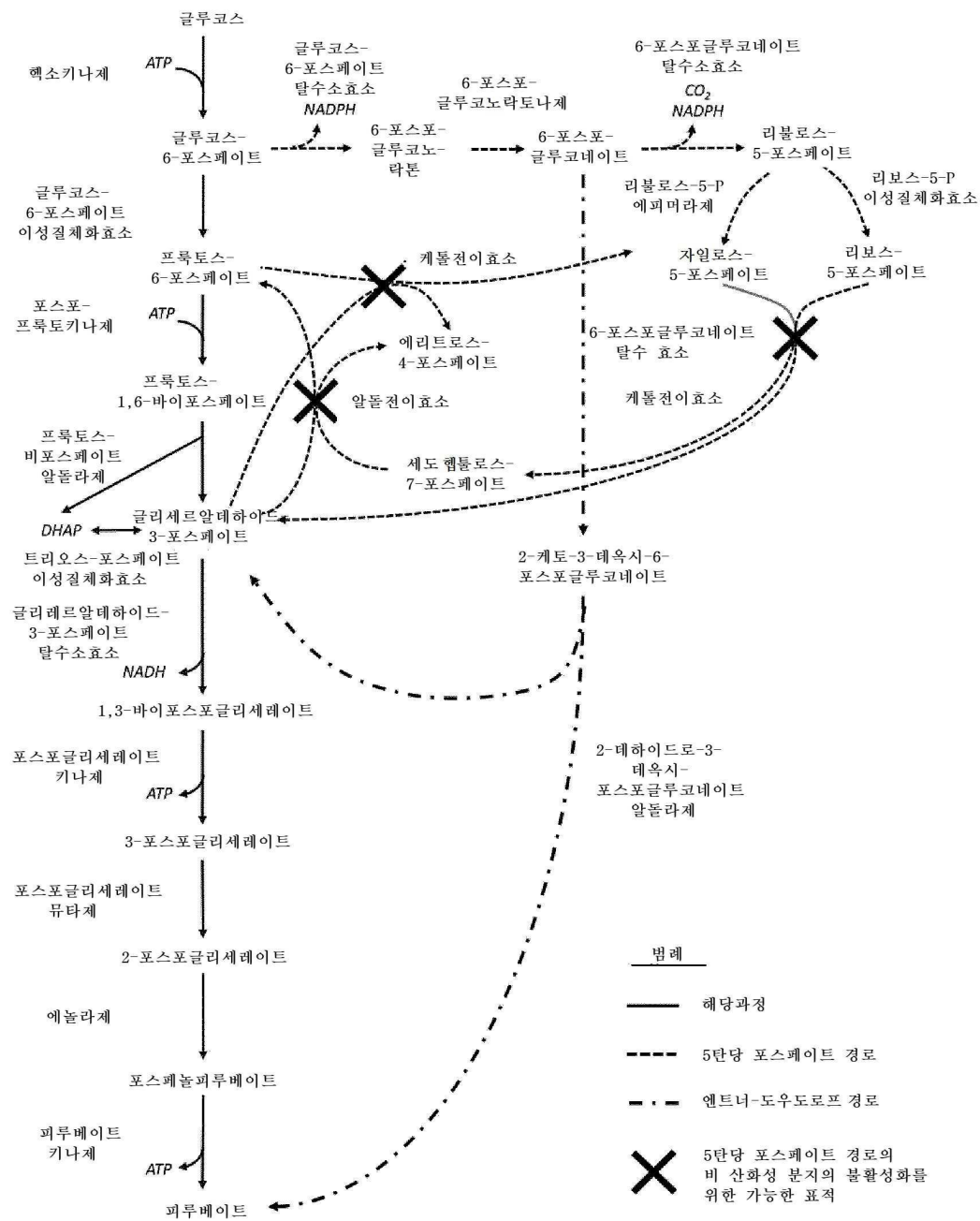
[0230] PHB 추출 및 정량화를 문헌[Brandl *et al.* (Appl Environ Microbiol. 1988 Aug; 54(8):1977-82.)]의 방법에 따라 수행한다.

[0231] 프로토콜은 10 mg의 동결건조된 세포에 1 mL의 클로로포름을 첨가한 후, 850 µL의 메탄올 및 150 µL의 황산을 첨가하는 단계로 이루어진다. 혼합물을 100℃에서 2.5시간 동안 가열하고, 냉각시켜, 500 µL의 물을 첨가한다. 2개의 상을 원심분리에 의해 분리하고, 황산나트륨을 첨가하여 유기상을 건조한다.

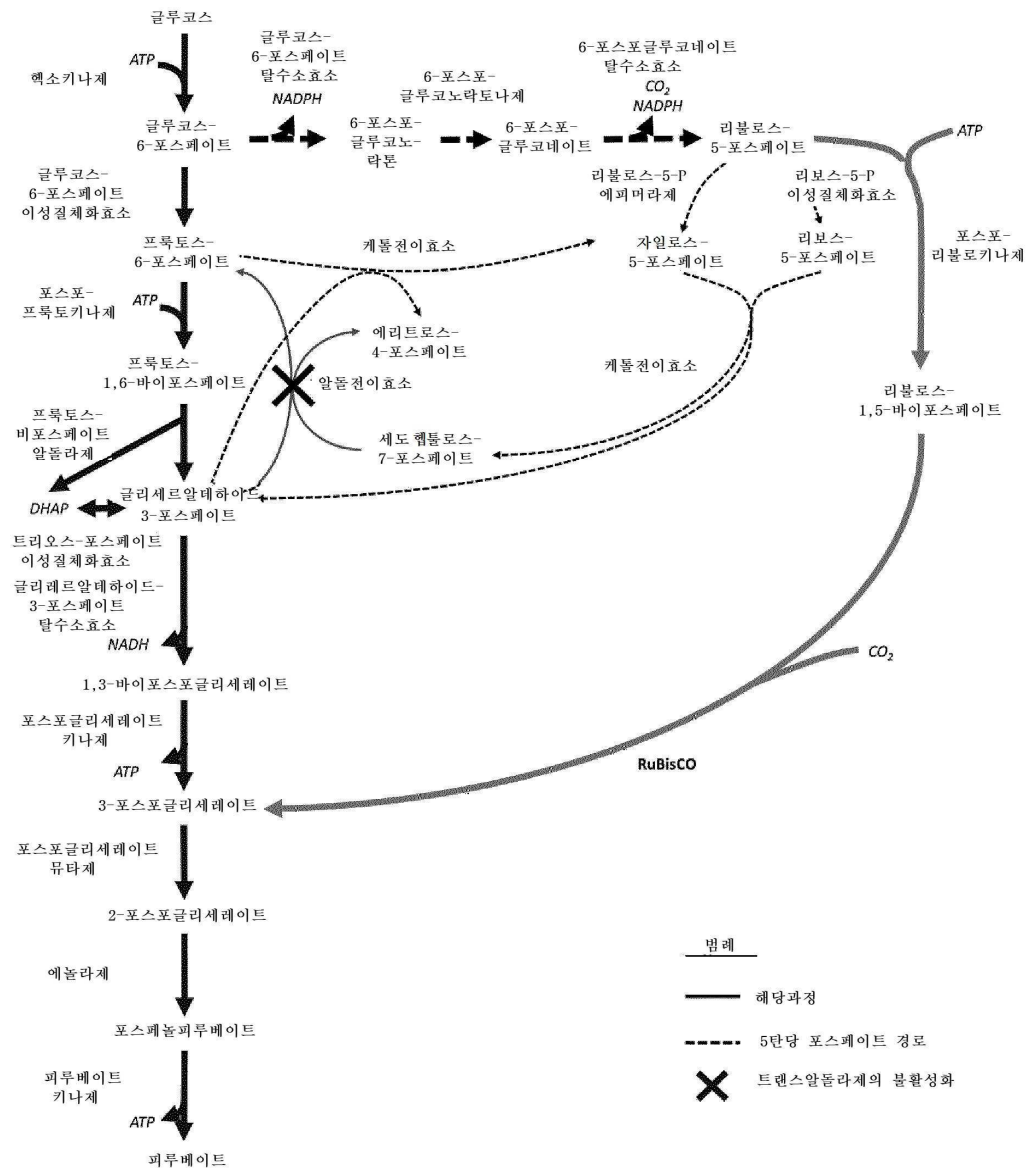
[0232] 샘플을 여과하고, 문헌[Mueller *et al.* (Appl Environ Microbiol. 2013 Jul;79(14):4433-9)]에 기재된 바와 같이 분석한다. 각각 야생형 C. 네카토르 H16 및 균주 EQCN\_011: H16  $\Delta tal \Delta edd-eda$ 의 배양물을 비교하면, 본 발명에 따른 변형된 균주에서 PHB 생산 수율 (소비된 글루코스 1 그램당 PHB의 그램)이 2% 증가한 것으로 나타난다.

도면

도면1



도면2



## 서 열 목 록

## SEQUENCE LISTING

<110> ENOBRAQ

&lt;120&gt; GENETICALLY OPTIMISED MICROORGANISM FOR PRODUCING MOLECULES OF INTEREST

<130> IPA190902-FR

<150> FR 1750696

<151> 2017-01-27

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

 $\langle 210 \rangle$  1

<211> 72  
 <212> DNA  
 <213> artificial sequence  
 <220><223> oligonucleotide Sdtal1  
 <400> 1  
 acgatatgtaa aatacttctc gaactcgtca catatacgtg tacataatgg gtaaggaaaa 60  
 gactcacgtt tc 72

<210> 2  
 <211> 87  
 <212> DNA  
 <213> artificial sequence  
 <220><223> Oligonucleotide Rdtal1  
 <400> 2  
 atcaaaagaa acgtgcataa ggacatggcc taaattaata tttccgagat acttccttag 60  
 aaaaactcat cgagcatcaa atgaaac 87

<210> 3  
 <211> 82  
 <212> DNA  
 <213> artificial sequence  
 <220><223> Oligonucleotide Sdnqm1  
 <400> 3  
 ttgctagcgt aagtcataaa aaataggaaa taatcacata tatacaagaa attaaatatg 60  
 ggtaaaaagc ctgaactcac cg 82

<210> 4  
 <211> 72  
 <212> DNA  
 <213> artificial sequence  
 <220><223> Oligonucleotide Rdnqm1  
 <400> 4  
 agtggatat atatatttat atatataagt aggtacctct actcttaatg attattcctt 60  
 tgccctcgga cg 72

<210> 5  
 <211> 12

<212> DNA  
 <213> artificial sequence  
 <220><223> s?uence RBS  
 <400> 5  
 aggaggtttg ga 12  
 <210> 6  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> artificial sequence  
 <220>  
 ><223> s?uence RBS  
 <400> 6  
 aacaaaatga ggaggtactg ag 22  
 <210> 7  
 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> artificial sequence  
 <220><223> s?uence RBS  
 <400> 7  
 aagttaagag gcaaga 16  
 <210> 8  
 <211> 14  
 <212> DNA  
 <213> artificial sequence  
 <220><223> s?uence RBS  
 <400> 8  
 ttcgcagggg gaag 14  
 <210> 9  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> artificial sequence  
 <220><223> s?uence RBS  
 <400> 9  
 taagcaggac cggcggcg 18



<210> 10

<211> 12

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> s?uence RBS

<400> 10

caccatacac tg

12