(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2024 년 3 월 7 일 (07.03.2024)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2024/049268 A1

(51) 국제특허분류:
C12N 15/81 (2006.01) *C12N 9/02* (2006.01)
C12N 1/16 (2006.01) *C12N 9/12* (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01) *C12P 13/02* (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2023/013073

(22) 국제출원일: 2023 년 9 월 1 일 (01.09.2023)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2022-0110854 2022 년 9 월 1 일 (01.09.2022) KR

(71) 출원인: 고려대학교 산학협력단 (**KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION**) [KR/KR]; 02841 서울특별시 성북구 안암로 145, Seoul (KR).

(72) 발명자: 오민규 (**OH, Min-Kyu**); 13554 경기도 성남시 분당구 정자일로 248, 602동 1601호, Gyeonggi-do (KR). 유석우 (**YOO, Seok Woo**); 17103 경기도 용인시 기흥구 서그내로16번길 14, 101동 1001호, Gyeonggi-do (KR).

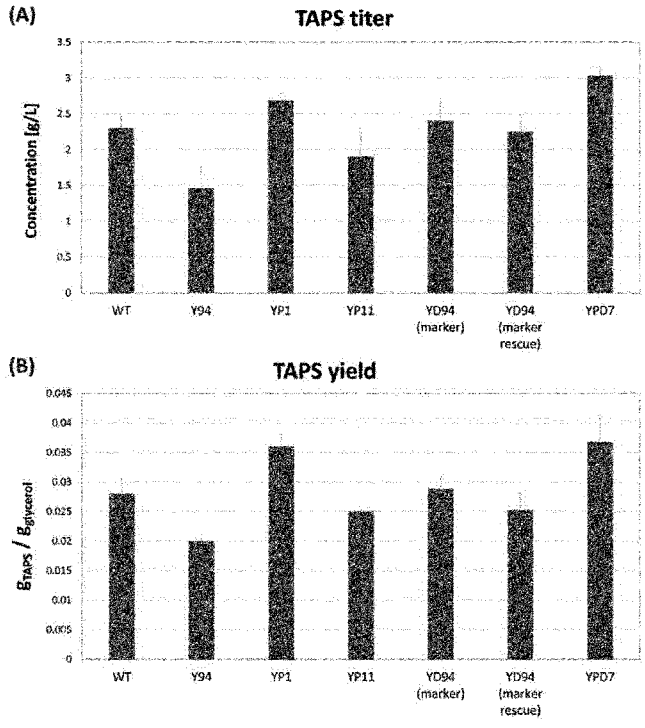
(74) 대리인: 정은열 등 (**JUNG, Eun Youl** et al.); 06149 서울특별시 강남구 테헤란로55길 21, 402호 (정앤김 특허법률사무소), Seoul (KR).

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

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM,

(54) **Title:** MUTANT *WICKERHAMMYCES CIFERRII* STRAIN HAVING IMPROVED PRODUCTIVITY FOR TAPS, AND METHOD FOR PRODUCING TAPS USING SAME

(54) **발명의 명칭:** TAPS 생산능이 증진된 위커해모마이시스 시페라이 (WICKERHAMOMYCES CIFERRII) 돌연변이 균주 및 이를 이용한 TAPS 생산방법



(57) **Abstract:** The present invention relates to a *Wickerhamomyces ciferrii* mutant with improved productivity for tetraacetylphytosphingosine (TAPS), and a method for producing TAPS using same. The *Wickerhamomyces ciferrii* mutant strain provided by the present invention exhibits excellent productivity for TAPS, and thus may be widely used in development of various products that use TAPS.

(57) **요약서:** 본 발명은 테트라아세틸파이토스핑고신(TAPS)의 생산능이 증진된 위커해모마이시스 시페라이(*Wickerhamomyces ciferrii*) 변이주 및 이를 이용한 테트라아세틸파이토스핑고신의 생산 방법에 관한 것이다. 본 발명에서 제공하는 위커해모마이시스 시페라이 변이주는 테트라아세틸파이토스핑고신의 생산성이 우수하므로, 테타르아세틸파이토스핑고신을 이용한 다양한 제품의 개발에 널리 활용될 수 있을 것이다.

WO 2024/049268 A1

[다음 쪽 계속]

TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

— 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

— 명세서와 별도로 규칙 13의2에 의하여 제출한 기탁된 생물학적 물질에 관한 표시와 함께 (규칙 13의2.4(d)(i) 및 48.2(a)(viii))

TAPS 생산능이 증진된 위커해모마이시스 시페라이 (*WICKERHAMOMYCES CIFERRII*) 돌연변이 균주 및 이를 이용한 TAPS 생산방법

기술분야

[1] 본 발명은 TAPS 생산능이 증진된 위커해모아이시스 시페라이 돌연변이 균주 및 이를 이용한 TAPS 생산방법에 관한 것이다.

배경기술

[2] 바이오리파이너리(Biorefinery)는 바이오매스를 원료로 바이오화학물질, 바이오폴리머, 바이오연료 등 고부가가치 제품을 생산하는 기술이다. 화석연료의 대안인 바이오매스는 식물, 동물, 미생물을 포함한 재생 가능한 유기 물질로, 한정된 화석연료와 달리 태양에너지는 존재하는 한 무한한 자원이다. 따라서 석유 의존도를 줄이고 온실 가스 문제를 해결할 수 있는 대안이 될 수 있다. 최근 몇 년 동안, 효모, 대장균, 고초균, 사상균 등 여러 플랫폼의 사용이 증가하고 있는데, 그 중 효모는 게놈 시퀀싱을 한 최초의 진핵 유기체로, 시스템 생물학 및 합성 생물학에서 광범위한 기술 플랫폼을 보유하고 있다.

[3] 한편, 세라마이드는 인간 피부 표피층의 최상층인 각질층(SC) 구조에서 지질층의 주성분으로, 지질의 40~50%를 차지하는 가장 중요한 피부 지질로 알려져 있으며, 보습제, 핸드크림 등의 화장품에 사용된다. 세라마이드는 스핑고지질로 지방산의 아실 사슬이 아미드 결합으로 스핑고이드 염기에 연결되고, 스핑고이드 염기는 스핑고신, 파이토스핑고신, 스핑가닌을 골격으로 가지고 있다. 스핑고지질은 모든 생물의 막 구조를 형성하는 성분으로 세포 성장 및 증식과 함께 핵심적인 역할을 하는데, 테트라아세틸 파이토스핑고신(TAPS)은 완전히 아세틸화된 형태의 파이토스핑고신으로서, 특히, TAPS는 아세틸기를 제거하는 과정을 거쳐 세라마이드의 스핑고이드 염기 중 하나인 파이토스핑고신으로 전환될 수 있으므로 세라마이드 합성에 중요하다고 보고된다. TAPS는 세린 팔미토일트랜스퍼라제(SPT)에 의한 촉매 작용으로 L-세린 및 팔미토일-CoA 축합으로부터 합성된다. 이로써 3-케토-스핑가닌이 합성되고, 이는 스핑가닌과 피토스핑고신으로 전환된다(도 1 참조). 파이토스핑고신의 구조는 인간 피부에 존재하는 스핑고신과 동일한 D-erythro(2S, 3R) 구조를 갖는다. 또한, 피부 깊숙이 침투하여 세라마이드 합성을 촉진하여 아토피 등 만성 염증을 동반하는 피부질환에 효과적이라고 보고된다.

[4] 종래 TAPS를 생산하여 세포 밖으로 분비하는 특성을 지닌 피치아 시페라이(Pichia ciferrii)로 알려진 시페라이는 전통적인 사카로마이시스 세레비지애(Saccharomyces cerevisiae) 효모와 다른 특성을 지닌 비전통적인 효모다. 위커해모아이시스 시페라이(W. ciferrii)에서 TAPS 생산을 개선하기 위한 많은 연구가

진행되었는데, 주로 에틸메탄 설포네이트(EMS), γ-선 조사, UV 및 NTG를 사용한 무작위 돌연변이로 TAPS 생산이 개선된 균주를 구축하거나 유전자 조적을 통한 전형적인 방법이다.

[5] 그 중, 위커해모아이시스 시페라이를 조작하는 종래 방법은 상동 재조합을 기반으로 한 유전자 조작 방법으로, 특히, 특정 유전자의 과발현을 위해 프로모터를 교체하거나 유전자 삽입을 수행하였다. 그러나, 선택 마커 제거에 시간과 노동력이 많이 소요되고, 유전자에 흔적이 남는 등 몇 가지 단점이 존재하였다. 따라서 여전히 과발현을 위한 효율적인 유전적 도구를 확립하는 것이 필요하다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[6] 본 발명의 하나의 목적은 신규한 위커해모아이시스 시페라이(*Wickerhammyces ciferrii*) 유전자 조작을 위한 발현 플라스미드를 제공하는 것이다.

[7] 본 발명의 다른 목적은 테트라아세틸파이토스핑고신의 생산능이 증진된 위커해모마이시스 시페라이(*Wickerhammyces ciferrii*) 변이주를 제공하는 것이다.

[8] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 변이주를 포함하는 테트라아세틸파이토스핑고신 생산용 조성물을 제공하는 것이다.

[9] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 위커해모마이시스 시페라이 변이주를 이용하여 테트라아세틸파이토스핑고신을 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

[10] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 위커해모마이시스 시페라이 변이주의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

[11] 본원에서 개시되는 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술되는 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 할 수 없다.

[12] 또한, 당해 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 통상의 실험만을 사용하여 본 출원에 기재된 본 발명의 특정 양태에 대한 다수의 등가물을 인지하거나 확인할 수 있다. 또한, 이러한 등가물은 본 발명에 포함되는 것으로 의도된다.

[13] 아울러, 본원의 명세서 전체에 있어서, 어떤 부분이 어떤 구성 요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성 요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[14]

[15] 본 발명은 종래 위커해모아이시스 시페라이 균주에 발현 플라스미드 적용이 어려운 문제의 해결을 위하여, 위커해모아이시스 시페라이 형질전환을 위한 발현 플라스미드를 제작하고, 이를 이용하여 유전자 조작 시 보다 효과적으로 TAPS 생산을 증진시킬 수 있음을 새롭게 규명한 것에 기인한다.

[16] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 바람직한 실시형태를 상세히 설명하기로 한다.

[17]

[18] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 위커해모아이시스 시페라이(*Wickerhammyces ciferrii*) 균주에서의 형질전환을 위한 발현 플라스미드를 제공한다.

[19] 구체적으로, 상기 발현 플라스미드는 CEN/ARS 복제원점 및 우라실 선택 마커를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[20] 본 발명의 용어, "위커해모마이시스 시페라이(*Wickerhammyces ciferrii*) 균주"는 TAPS를 비롯한 다양한 스핑고지질을 생산하는 효모 균주를 의미한다. TAPS는 상기 균주에서 연쇄반응에 의해 세린(Serine)과 팔미토일-CoA(PalmitoylCoA)로부터 TAPS를 생합성하는 것으로 알려져 있다. 보다 구체적으로는, 첫 번째로, LCB1과 LCB2 유전자에 의해 발현되는 세린C-팔미토일전이효소(Serin Cpalmitoyltransferase)에 의해 세린과 팔미토일-CoA의 축합 반응이 일어나 3-케토스핑고닌(3-keto-sphingonine)이 합성된다. 두 번째로, TSC10 유전자에 의해 발현되는 3-케토-스핑가닌(3-ketosphingaine) 환원 효소에 의해 3-케토-스핑고닌은 3-케토-스핑가닌으로 환원되며, 세 번째로, 3-케토-스핑가닌은 SYR2 유전자에 의해 발현되는 스핑가닌 C-4-수산화효소(Sphinganine C-4-hydroxylase)에 의해 수산기가 첨가되어 파이토스핑고신(Phytosphingosine)으로 전환된다. 마지막으로, Slli1 및 Atf2 유전자에 의해 발현되는 아세틸전이효소에 의해 파이토스핑고신의 N과 O부분에 아세틸기가 결합된 TAPS가 생산된다(도 1).

[21]

[22] 본 발명에서 용어, "플라스미드"는 생장에 필수적인 염색체(chromosom) DNA에서 물리적으로 분리되어 있는 대표적인 에피솜(episome) DNA 분자로, 1952년 미국의 유전학자 J. 레더버그가 최초로 플라스미드를 세균의 염색체 이외의 독자적으로 증식할 수 있는 DNA 분자라는 의미로 명명하였다. 플라스미드는 1 kilo base에서 1 Mega base에 이르는 다양한 크기로 존재하며, 대부분 환형이지만 선형 플라스미드도 보고된다. 플라스미드는 세균 내에서 분리되어 새로운 숙주세포 안으로 전달될 수 있는데, 이와 같이 쉽게 형질전환이 가능한 플라스미드를 이용해 유전자공학에 광범위하게 이용되고 있다. 세균에서 DNA를 추출하고 다중 제한효소 클로닝 부위가 존재하는 벡터를 활용하여 재조합된 DNA서열의 복제를 촉진하기 위해 사용된다. 또한 원하는 유전자를 세포 내에서 단백질로 발현하기 위해 발현 벡터가 사용되기도 한다.

[23] 본 발명에서 용어, "복제원점"은 유전체 상의 특정 DNA 서열로서, DNA 복제가 시작되는 곳이며, 복제 개시점이라고도 한다. 원핵생물의 경우에는 DNA 복제가 단 하나의 복제원점으로부터 시작되어 양방향(bidirectionally)으로 진행된다. 대부분 A와 T 뉴클레오티드가 반복적으로 나타나는 특징을 가지고 있으며, A와 T의 함량이 높으므로 DNA의 다른 지역보다 이중나선구조가 풀리기 쉽다.

[24] 본 발명에서, 상기 복제원점은 CEN/ARS 복제원점인 것이 특징이다.

[25] 상기 CEN/ARS에서 CEN은 센트로미어(centromere)의 약자이며, ARS는 autonomous replicating sequence의 약자로, 효모 유전자 운반체의 유형을 특징짓는 부위이다.

[26] 본 발명에서 용어, "선택 마커"는 플라스미드가 형질전환체에 잘 주입되었는지를 확인하기 위한 것으로서, 선별표지, 선발표지라고도 한다. 본 발명에서는 위커해모아이시스 시페라이 균주에 상기 발현 플라스미드가 형질전환으로 잘 도입되었는지 확인하기 위한 것으로, 우라실 선택 마커를 사용하는 것이 특징이다.

[27] 상기 우라실(uracil)은 피리미딘 염기의 유도체로 RNA에 존재하고 DNA에 존재하지 않는다. 본 발명에서는 우라실 선택 마커로 일 예로 5-FOA((5-Fluoroorotic acid), Monohydrate)일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[28] 상기 5-Fluoroorotic acid(5-FOA)는 URA3 유전자의 부재를 확인하기 위해 효모 유전학에서 사용되는 것으로서, URA3은 5-FOA에서 독성 대사산물인 5-fluorouracil로의 탈탄산 반응을 포함하여 사망에 이르게 하기 때문이다.

[29] 본 발명의 구체적인 실시예에서는, 균주 스크리닝 과정에서 5-FOA를 사용하여 우라실 영양요구성 균주를 제작하였다. 또한 이렇게 제조된 우라실 영양요구성 균주에서 5-FOA를 플라스미드 내 우라실 선택마커로 포함하고 있음을 확인하였다.

[30]

[31] 상기 본 발명의 발현 플라스미드는 세린 팔미토일-트랜스퍼라제를 코딩하는 유전자 및 스핑가닌 C4-하이드록실라제을 코딩하는 유전자를 추가 삽입한 것일 수 있다.

[32] 본 발명에서 용어, "세린 팔미토일-트랜스퍼라제(Serine palmitoyl-transferase)"는 L-세린과 팔미토일-CoA에서 3-케토스핑가닌을 만들 때 관여하는 단백질이다.

[33] 상기 단백질은 서열번호 1 및/또는 상기 서열번호 1과 적어도 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 상동성(homology) 또는 동일성(identity)을 가지는 아미노산 서열일 수 있다. 또한, 이러한 상동성 또는 동일성을 가지며 상기 단백질에 상응하는 효능을 나타내는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질도 본 출원의 범위 내에 포함됨은 자명하다.

[34] 더불어, 공지의 유전자 서열로부터 조제될 수 있는 프로브, 예를 들면, 상기 폴리펩티드를 암호화하는 염기서열의 전체 또는 일부에 대한 상보 서열과 엄격한 조건 하에 하이브리드화되는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 폴리펩티드로서, 세린 팔미토일-트랜스퍼라제 활성을 갖는 폴리펩티드도 제한 없이 포함될 수 있다.

[35] 상기 세린 팔미토일-트랜스퍼라제 단백질은 LCB1, LCB2 폴리뉴클레오티드 또는 이들의 조합에 의해 코딩되는 것일 수 있다.

[36]

[37] 본 발명에서 용어 "폴리뉴클레오티드"는 DNA 또는 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 가지며, 폴리뉴클레오티드에서 기본 구성 단위인 뉴클레오티드는 천연 뉴클레오티드 뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체도 포함할 수 있다(Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, Chemical Reviews, 90:543-584(1990) 참조).

[38] 상기 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 세린 팔미토일-트랜스퍼라제 단백질 또는 이의 기능적 단편의 활성을 갖는 단백질을 코딩할 수 있는 서열이라면 제한 없이 포함될 수 있다.

[39] 일 예로, 상기 LCB1 유전자는 서열번호 2의 폴리뉴클레오티드, 상기 LCB2는 서열번호 3의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것일 수 있다.

[40] 또한, 본 발명은 상기 유전자 서열을 모균주의 코돈 출연 빈도에 기반하여 코돈 최적화한 서열도 포함할 수 있음이 자명하다.

[41]

[42] 본 발명에서 용어, “스핑가닌 C4-하이드록실라제”는 스핑가닌에서 파이토스핑고신으로의 전환에 관여하는 단백질이다.

[43] 상기 단백질은 서열번호 4 및/또는 상기 서열번호 4와 적어도 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 상동성(homology) 또는 동일성(identity)을 가지는 아미노산 서열일 수 있다. 또한, 이러한 상동성 또는 동일성을 가지며 상기 단백질에 상응하는 효능을 나타내는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질도 본 출원의 범위 내에 포함됨은 자명하다.

[44] 상기 스핑가닌 C4-하이드록실라제는 SYR2에 의해 코딩되는 것일 수 있다. 상기 SYR2 유전자는 일 예로 서열번호 5의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것일 수 있다.

[45]

[46] 상기 본 발명의 발현 플라스미드는 장쇄 염기 키나아제 인코딩하는 유전자의 상동성 암(homology arm)을 추가 포함할 수 있다.

[47] 본 발명에서 용어, “장쇄 염기 키나아제”는 스핑가닌을 스핑가닌-1-P로 전환시키는 단백질로 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[48] 상기 단백질은 LCB4 폴리뉴클레오티드 서열로 코딩된 것일 수 있으며, 일 예로 상기 유전자 LCB4 서열은 서열번호 7의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것일 수 있다.

[49] 본 발명에서 용어, “상동성 암(homology arm)” 에서의 상동성(homology)이란 어떠한 형질이 진화의 과정 동안 보존된 것을 말하며, 이는 형태적 형질이나 분자적 형질, 유전자 서열에도 해당될 수 있다. 따라서 상동성 암(homology arm)은 상동 염기서열이라 할 수 있다.

[50] 일 실시예에서, 상기 본 발명의 발현 플라스미드는 CEN/ARS 복제원점 및/또는 우라실 선택 마커를 포함하고, 세린 팔미토일-트랜스퍼라제를 인코딩하는 유전자, 및 스핑가닌 C4-하이드로실라제를 인코딩하는 유전자가 추가 삽입된 발현 플라스미드일 수 있다. 일 예로, p416GPD 플라스미드를 백본으로 하여, CEN/ARS 복제원점을 포함하고, 세린 팔미토일-트랜스퍼라제를 인코딩하는 유전자인 LCB1 및 LCB2와 스핑가닌 C4-하이드로실라제를 인코딩하는 유전자인 SYR2가 과발현된 발현 플라스미드는 pEXP일 수 있으나, 이에 제한된 것은 아니다.

[51] 다른 일 실시예세어, 상기 본 발명의 발현 플라스미드는 장쇄 염기 키나아제를 인코딩하는 유전자의 상동성 암을 추가 포함하는 발현 플라스미드일 수 있다. 일 예로, pCM184 플라스미드를 백본으로 하여, 우라실 선택 마커를 포함하고, 장쇄 염기 키나아제 인코딩하는 유전자인 LCB4의 상동성 암을 포함하여 cre-loxP 시스템으로 LCB4 유전자를 결실시킬 수 있는 결실 플라스미드인 pCM1842일 수 있으나, 이에 제한된 것은 아니다.

[52]

[53] 본 발명의 벡터는 작동 가능하도록 연결된 목적 단백질을 코딩하는 유전자의 발현을 지시할 수 있는데, 이러한 벡터를 발현 벡터라고 한다. 일반적으로, 재조합 DNA 기술의 사용에 있어서 발현 벡터는 플라스미드 형태이다.

[54] 상기 발현벡터는 숙주세포에 따라, 사용 가능한 발현벡터의 종류가 결정될 수 있는데, 위커해모마이시스 시페라이를 숙주로서 사용하는 경우는 발현 벡터로서, 일 예로 pSH471, pSH472, pEXP, pCM1841, pCM1842 벡터를 이용할 수 있으며, 프로모터로서 ENO1 프로모터, TDH3 프로모터 및 GPD 프로모터를 이용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[55]

[56] 위커해모마이시스 시페라이로의 DNA의 도입방법으로서는, 예를 들면 일렉트로포레이션법(Method Enzymol., 194, 182- 187(1990)), 스페로플라스트법(Proc. Natl. Acad. Sci.USA, 84, 1929-1933(1978)), 아세트산리튬법(J. Bacteriol., 153, 163-168(1983)) 등이 이용가능하다.

[57] 아울러, 상기 발현벡터에는, 목적 유전자의 발현의 억제 또는 증폭, 또는 유도를 위한 각종의 기능을 가진 발현 억제용의 단편이나, 형질전환체의 선택을 위한 마커나 항생물질에 대한 내성유전자, 균체 밖으로의 분비를 목적으로 한 시그널을 코딩하는 유전자, 난발현성 단백질에 적합한 맞춤형 융합인자 등을 추가로 포함할 수도 있다.

[58] 본 발명에서 용어, "형질전환"은 DNA를 숙주세포로 도입하여 DNA가 염색체외 인자로서 또는 염색체 통합완성에 의해 복제가능하게 되는 것을 의미한다.

[59] 본 발명에 따른 형질전환에 사용되는 숙주 세포는 당업계에 널리 알려져 있는 숙주세포는 어떤 것이나 사용할 수 있으나, 본 발명의 LCB1, 2 및 SYR2를 코딩하는 유전자의 도입효율과 발현효율이 높은 숙주를 사용할 수 있으며, 나아가

LCB4 유전자를 결실시킬 수 있는데, 본 발명에서는 위커해모마이시스 시페라이를 사용하는 것이 특징이다.

[60]

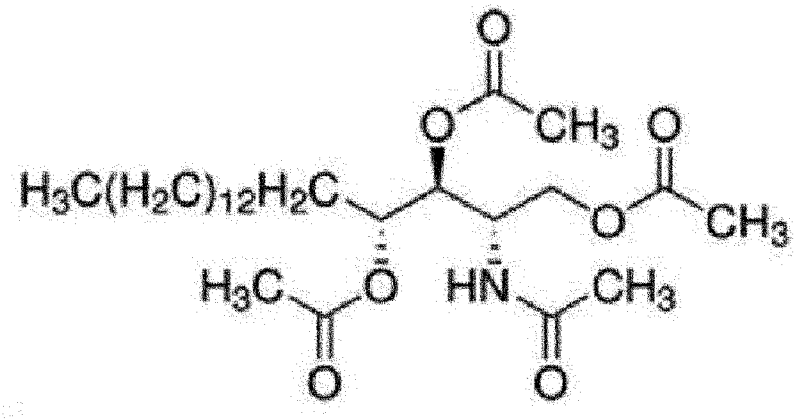
[61] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 다른 일 실시양태는 상기 CEN/ARS 복제원점 및 우라실 선택 마커를 포함하는 발현 플라스미드를 이용하여 세린 팔미토일-트랜스퍼라제 및 스핑가닌 C4-하이드로실라제의 활성을 추가로 강화하고, 장쇄 염기 키나아제의 활성을 추가로 약화시킨, 테트라아세틸파이토스핑고신 (TAPS) 생산능이 증진된 위커해모아이시스 시페라이(*Wickerhammyces ciferrii*) 균주를 제공한다.

[62] 본 발명의 용어, "위커해모아이시스 시페라이 균주", "CEN/ARS 복제원점", "우라실 선택 마커", "발현 플라스미드", "세린 팔미토일-트랜스퍼라제", "스핑가닌 C4-하이드로실라제", 및 "장쇄 염기 키나아제"는 상기에서 설명한 바와 같다.

[63] 본 발명의 용어, "테트라아세틸파이토스핑고신 (Tetraacetylphytosphingosine; TAPS)"은 하기 화학식 I의 구조를 갖는 화합물을 의미한다.

[64] [화학식 1]

[65]



[66]

[67] 본 발명의 미생물에 있어서 TAPS의 생합성은 도 1에 나타난 생합성의 연속적 과정을 통해 TAPS가 생합성되는 것으로 알려져 있다.

[68]

[69] 본 발명에서 제공하는 위커해모마이시스 시페라이 균주는 팔미토일-CoA를 합성하는 대사흐름이 향상되어 상기 TAPS 생산능이 강화된 신규 위커해모마이시스 시페라이 변이주임을 확인하였으며, 본 발명에서 위커해모마이시스 시페라이 균주는 위커해모마이시스 시페라이 변이주 또는 돌연변이주와 혼용되어 사용될 수 있다.

[70] 또한, 본 발명의 신규 위커해모아이시스 시페라이 균주는 수탁번호 KCTC14970BP로 기탁된 것일 수 있다.

[71]

[72] 본 발명에서 용어, “활성 강화” 또는 “활성 약화”는 각각 단백질의 활성을 강화 또는 약화시키는 것을 말한다.

[73] 특정 단백질 및/또는 유전자의 활성을 도입, 강화, 불활성화 하는 방법은 미생물이 가진 특징에 따라 당해 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 수행될 수 있다.

[74] 본 출원에서 용어, 단백질의 활성의 "강화"는 상기 단백질의 활성이 도입되거나, 또는 내재적 활성에 비하여 증가되는 것을 의미한다. 상기 활성의 "도입"은, 자연적 혹은 인위적으로 미생물이 본래 가지고 있지 않았던 특정 폴리펩타이드의 활성이 나타나게 되는 것을 의미한다.

[75] 본 출원에서 용어, 단백질의 활성이 내재적 활성에 비하여 "증가"한다는 것 은, 미생물이 가진 단백질의 내재적 활성 또는 변형 전 활성에 비하여 활성이 향상된 것을 의미한다. 상기 "내재적 활성"은, 자연적 또는 인위적 요인에 의한 유전적 변이로 미생물의 형질이 변화하는 경우, 형질 변화 전 모균주 또는 비변형 미생물이 본래 가지고 있던 특정 단백질의 활성을 말한다. 변형 전 활성으로 혼용되어 사용될 수 있다. 상기 활성 증가는, 외래의 단백질을 도입하는 것과, 내재적인 단백 질의 활성 강화를 모두 포함할 수 있다. 상기 단백질의 활성 증가/강화는, 유전자의 발현 증가/강화에 의해 달성될 수 있다.

[76] 구체적으로, 본 출원에서 활성 증가는,

[77] 1) 상기 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 카피수 증가,

[78] 2) 상기 폴리뉴클레오티드의 발현이 증가하도록 발현조절 서열의 변형,

[79] 3) 상기 단백질의 활성이 강화되도록 염색체 상의 폴리뉴클레오티드 서열의 변형,

[80] 4) 상기 단백질의 활성을 나타내는 외래 폴리뉴클레오티드 또는 상기 폴리뉴클레오티드의 코돈 최적화된 변이형 폴리뉴클레오티드의 도입, 또는

[81] 5) 이의 조합에 의해 강화되도록 변형하는 방법 등에 의하여 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[82]

[83] 상기 1) 폴리뉴클레오티드의 카피수 증가는, 특별히 이에 제한되지 않으나, 벡터에 작동 가능하게 연결된 형태로 수행되거나, 숙주세포 내의 염색체 내로 삽입됨으로써 수행될 수 있다. 구체적으로, 숙주와 무관하게 복제되고 기능할 수 있는 벡터에 본원의 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 작동 가능하게 연결되어 숙주세포 내에 도입됨으로써 수행될 수 있거나, 숙주세포 내의 염색체 내로 상기 폴리뉴클레오티드를 삽입시킬 수 있는 벡터에 상기 폴리뉴클레오티드가 작동 가능 하게 연결되어 숙주세포 내에 도입됨으로써 상기 숙주세포의 염색체 내 상기 폴리뉴클레오티드의 카피수를 증가하는 방법으로 수행될 수 있다.

[84] 다음으로, 2) 폴리뉴클레오티드의 발현이 증가하도록 발현조절 서열의 변형은, 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 발현조절 서열의 활성을 더욱 강화하도록 핵산 서열을 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합으로 서

열상의 변이를 유도하여 수행하거나, 더욱 강한 활성을 가지는 핵산 서열로 교체함에 의하여 수행될 수 있다. 상기 발현조절 서열은, 특별히 이에 제한되지 않으나 프로 모터, 오퍼레이터 서열, 리보좀 결합 부위를 코딩하는 서열, 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열 등을 포함할 수 있다.

[85] 상기 폴리뉴클레오티드 발현 단위의 상부에는 본래의 프로모터 대신 강력한 이종 프로모터가 연결될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 아울러, 3) 염색체 상의 폴리뉴클레오티드 서열의 변형은, 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 폴리뉴클레오티드 서열의 활성을 더욱 강화하도록 핵산 서열을 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합으로 발현조절 서열상의 변이를 유도하여 수행하거나, 더욱 강한 활성을 갖도록 개량된 폴리뉴클레오티드 서열로 교체함에 의하여 수행될 수 있다.

[86] 또한, 4) 외래 폴리뉴클레오티드 서열의 도입은, 상기 단백질과 동일/유사한 활성을 나타내는 단백질을 암호화하는 외래 폴리뉴클레오티드, 또는 이의 코돈 최적화된 변이형 폴리뉴클레오티드를 숙주세포 내로 도입하여 수행될 수 있다. 상기 외래 폴리뉴클레오티드는 상기 단백질과 동일/유사한 활성을 나타내는 한 그 유래나 서열에 제한 없이 사용될 수 있다. 또한 도입된 상기 외래 폴리뉴클레오티드가 숙주세포 내에서 최적화된 전사, 번역이 이루어지도록 이의 코돈을 최적화하여 숙주세포 내로 도입할 수 있다. 상기 도입은 공지된 형질전환 방법을 당업자가 적절히 선택하여 수행될 수 있으며, 숙주 세포 내에서 상기 도입된 폴리뉴클레오티드가 발현됨으로써 단백질이 생성되어 그 활성이 증가될 수 있다.

[87]

[88] 마지막으로, 5) 상기 1) 내지 4)의 조합에 의해 강화되도록 변형하는 방법 은, 상기 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 카피수 증가, 이의 발현이 증가하도록 발현조절 서열의 변형, 염색체 상의 상기 폴리뉴클레오티드 서열의 변형 및 상기 단백질의 활성을 나타내는 외래 폴리뉴클레오티드 또는 이의 코돈 최적화된 변이형 폴리뉴클레오티드의 변형 중 하나 이상의 방법을 함께 적용하여 수행될 수 있다.

[89]

[90] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 위커해모아이시스 시페라이에서 작동할 수 있는 효과적인 발현 플라스미드를 구축하였으며, 이러한 특정 발현 플라스미드를 이용하여, 간단하면서도 효과적으로 LCB1, 2 및 SYR2 유전자의 도입으로 단백질 세린 팔미토일 트랜스퍼라제 및 스핑가닌 C-4-하이드록실라제의 활성을 강화시켰으며, 나아가 LCB4 유전자를 결실시켜 장쇄 염기 키나아제 활성을 약화시킴으로써, 제조된 위커해모아이시스 시페라이 균주에서 TAPS 생산능이 현저히 증가되는 것을 확인하였다.

[91]

[92] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 또 다른 실시양태는 우라실 선택마커를 포함하는 우라실 영양요구성 위커해모아이시스 시페라이 균주에서, CEN/ARS

복제원점을 포함하는 발현 플라스미드를 이용하여 세린 팔미토일-트랜스퍼라제 및 스핑가닌 C4-하이드로실라제의 활성을 강화하고, 장쇄 염기 키나아제 활성을 추가로 약화시킨, 테트라아세틸파이토스핑고신(TAPS) 생산능이 증진된 위커해모아이시스 시페라이 균주를 제공한다.

[93] 본 발명의 용어, "위커해모아이시스 시페라이 균주", "CEN/ARS 복제원점", "우라실 선택 마커", "발현 플라스미드", "세린 팔미토일-트랜스퍼라제", "스핑가닌 C4-하이드로실라제", "장쇄 염기 키나아제" 및 "테트라아세틸파이토스핑고신(TAPS) "는 상기에서 설명한 바와 같다.

[94]

[95] 본 발명의 또 다른 실시양태는 상기 균주, 균주의 배양물, 균주의 파쇄물 또는 균주의 추출물을 포함하는, 테트라아세틸파이토스핑고신(TAPS) 생산용 조성물을 제공한다.

[96] 본 발명의 용어, "위커해모아이시스 시페라이 균주" 및 "테트라아세틸파이토스핑고신(TAPS) "는 상기에서 설명한 바와 같다.

[97] 본 발명에서 용어, "균주의 배양물" 본 발명의 위커해모아이시스 시페라이 균주의 배양물을 의미하는 것으로, 본 발명의 균주를 배지에서 배양하여 생기는 배양 결과물을 말한다. 일 예로, 본 발명의 균주의 배양물의 여과액 또는 배양물을 원심분리한 배양 상등액을 포함할 수 있다.

[98] 용어, "이의 파쇄물"은 본 발명의 위커해모아이시스 시페라이 균주 의 파쇄물로서, 상기 균주를 파쇄하여 방출될 수 있는 균주 내에 존재하는 모든 유용 물질을 포함하는 것을 의미한다.

[99] 용어, "이의 추출물"은 본 발명의 위커해모아이시스 시페라이 균주를 용매를 이용하여 추출한 추출물을 의미하는 것으로서, 용매는 공지된 것이라면 제한 없이 포함될 수 있고, 추출 방법 또한 제한 없이 포함될 수 있다.

[100] 용어, "배양물의 추출물"은 본 발명의 위커해모아이시스 시페라이 균주의 배양물을 용매를 이용하여 추출한 추출물을 의미하는 것으로서, 용매는 공지된 것이라면 제한 없이 포함될 수 있고, 추출 방법 또한 제한 없이 포함될 수 있다.

[101] 용어, "파쇄물의 추출물"은 본 발명의 위커해모아이시스 시페라이 균주 파쇄물을 용매를 이용하여 추출한 추출물을 의미하는 것으로서, 용매는 공지된 것이라면 제한 없이 포함될 수 있고, 추출 방법 또한 제한 없이 포함될 수 있다.

[102] 상기 본 발명의 위커해모아이시스 시페라이 균주, 이의 배양물, 이의 파쇄물, 이의 추출물, 상기 배양물의 추출물 또는 상기 파쇄물의 추출물은 조성물 대비 10~50 중량% 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로, 10 중량% 미만일 경우에는 그 효과가 미비하고, 50 중량%를 초과하는 경우에는 사용량 대비 효과 증가가 미미하여 비경제적일 수 있다.

[103]

[104] 본 발명의 또 다른 실시양태는 상기 위커해모마이시스 시페라이 변이주를 이용하여 테트라아세틸파이토스핑고신을 생산하는 방법을 제공한다.

[105] 구체적으로, 본 발명의 테트라아세틸파이토스핑고신 생산방법은 상기 위커해모마이시스 시페라이 변이주를 배양하여 배양물을 수득하는 단계를 포함하며, 추가로 상기 수득한 배양물로부터 테트라아세틸파이토스핑고신을 회수하는 단계를 포함할 수 있다.

[106] 이때, 상기 "위커해모마이시스 시페라이" 및 "테트라아세틸파이토스핑고신"에 대한 설명은 상기에서 서술한 바와 같다,

[107] 상기 용어, "배양"은 상기 재조합 미세조류가 성장할 수 있도록 하는 것으로서, 본 발명의 형질전환체를 배양하기 위한 배지 및 배양조건은 숙주 세포에 따라 적절히 선택 이용할 수 있다. 영양배지는 숙주세포의 생육에 필요한 탄소원, 무기질소원 또는 유기질소원을 포함하고 있는 것이 바람직하다. 탄소원으로는 글루코오스, 덱스트란, 가용성 전분, 수크로오스, 및 메탄올 등이 예시된다. 무기질소원 또는 유기 질소원으로는 암모늄염류, 질산염류, 아미노산, 콘스팁 리쿼(corn steep liquer), 펩톤, 카제인, 소 추출물, 대두백, 및 감자추출물 등이 예시된다. 필요에 따라 다른 영양소, 예를 들어 염화나트륨, 염화칼슘, 인산이수소나트륨, 염화마그네슘 같은 무기염, 비타민류, 및 항생물질(테트라사이클린, 네오마신, 암피실린, 및 카나마이신)등을 포함할 수 있다. 배양 시는 세포의 생육과 단백질의 대량 생산에 적합하도록 온도, 배지의 pH 및 배양 시간 등의 조건들을 적절하게 조절할 수 있다.

[108]

[109] 상기 방법에 있어서, 상기 미생물을 배양하는 단계는, 특별히 이에 제한되지 않으나, 공지된 회분식 배양방법, 연속식 배양방법, 유가식 배양방법 등에 의해 수행될 수 있으며, 일 예로는 유가식 배양방법으로 배양될 수 있다.

[110] 이때, 배양조건은, 특별히 이에 제한되지 않으나, 염기성 화합물 (예: 수산화나트륨, 수산화칼륨 또는 암모니아) 또는 산성 화합물 (예: 인산 또는 황산)을 사용하여 적정 pH (예컨대, pH 5 내지 9, 구체적으로는 pH 6 내지 8, 가장 구체적으로는 pH 6.8)를 조절할 수 있고, 산소 또는 산소-함유 가스 혼합물을 배양 물에 도입시켜 호기성 조건을 유지할 수 있다. 배양온도는 20 내지 45 ℃, 구체적으로는 25 내지 40 ℃를 유지할 수 있고, 약 10 내지 200 시간 동안 배양할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 배양에 의하여 생산된 퓨트레신은 배지 중으로 분비되거나 세포 내에 잔류할 수 있다.

[111] 아울러, 사용되는 배양용 배지는 세린, 글루타메이트, 글리신 또는 이들의 조합을 포함할 수 있고, 구체적으로는 글루타메이트 및 글리신 조합을 포함하는 것일 수 있다.

[112] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 본 발명의 신규 위커해모마이시스 시페라이 균주를 유가식 배양할 때, 글루타메이트 및 글리신 조합을 배지에 첨가하였을 때가 다른 아미노산이나 하나의 아미노산을 첨가한 경우 대비 효과적으로 TAPS를 생산하고 수율도 높은 것을 확인하였다.

[113]

[114] 상기 배양용 배지는 탄소 공급원, 질소 공급원 및/또는 인 공급원을 추가로 포함할 수 있으며, 그 외 공급원도 추가로 포함할 수 있다.

[115] 탄소 공급원으로는 당 및 탄수화물 (예: 글루코오스, 슈크로오스, 락토오스, 프럭토오스, 말토오스, 몰라세, 전분 및 셀룰로오스), 유지 및 지방 (예: 대두유, 해바라기씨유, 땅콩유 및 코코넛유), 지방산 (예: 팔미트산, 스테아르산 및 리놀레산), 알코올 (예: 글리세롤 및 에탄올) 및 유 기산 (예: 아세트산) 등을 개별적으로 사용하거나 또는 혼합하여 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 질소 공급원으로는 질소-함유 유기 화합물 (예: 펩톤, 효모 추출액, 육즙, 맥아 추출액, 옥수수 침지액, 대두 박분 및 우레아), 또는 무기 화합물 (예: 황산암모늄, 염화암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄 및 질산암모늄) 등을 개별적으로 사용하거나 또는 혼합하여 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[116] 인 공급원으로 인산 이수소칼륨, 인산수소이칼륨, 이에 상응하는 나트륨 함유 염 등을 개별적으로 사용하거나 또는 혼합하여 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 일 예로 KH2PO4일 수 있다.

[117] 또한, 배지에는 기타 금속염 (예: 황산마그네슘 또는 황산철), 아미노산 및 비타민과 같은 필수성장-촉진 물질을 포함할 수 있다.

[118] 또한, 배지에는 소포제를 추가로 포함할 수 있다.

[119] 본 발명에서 용어, "소포제는" 유해한 기포를 제거하는 것으로서, 일반적으로 휘발성이 적고 확산력이 큰 기름상의 물질, 또는 수용성의 계면활성제가 이용될 수 있다.

[120]

[121] 본 발명의 상기 배양 단계에서 생산된 TAPS를 회수하는 방법은 배양방법에 따라 당해 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 배양액으로부터 목적하는 아미노산을 수집할 수 있다. 예를 들어, 원심분리, 여과, 음이온 교환 크로마토그래피, 결정화 및 HPLC 등이 사용될 수 있으며, 당해 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 배지 또는 미생물로부터 목적하는 TAPS를 회수할 수 있다.

[122]

[123] 본 발명의 또 다른 실시양태는 테트라아세틸파이토스핑고신(TAPS) 생산능이 증진된 위커해모아이시스 시페라이 균주의 제조방법을 제공한다. 구체적으로, 우라실 영양요구성 위커해모아이시스 시페라이 균주를 제조하는 단계; CEN/ARS 복제원점을 포함하는 발현 플라스미드로 세린 팔미토일-트랜스퍼라제와 스핑가닌 C4-하이드로실라제의 활성을 강화하는 단계; 및 장쇄 염기 키나아제 활성을 약화시키는 단계를 포함할 수 있다.

[124] 이때, 상기 "위커해모마이시스 시페라이", "테트라아세틸파이토스핑고신", "CEN/ARS 복제원점", "발현 플라스미드", "세린 팔미토일-트랜스퍼라제", "스핑가닌 C4-하이드로실라제", "활성 강화", "장쇄 염기 키나아제" 및 "활성 약화"에 대한 설명은 상기에서 서술한 바와 같다,

[125]

[126] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 위커해모아이시스 시페라이에서 작동할 수 있는 효과적인 발현 플라스미드를 구축하여 간단하면서도 효과적으로 유전자를 발현하고자, 종래 효모에서 사용하던 다양한 원점 테스트를 수행하여 CEN/ARS 원점을 찾고, 효율적인 선택마커의 확보를 위해 5-FOA를 사용하여 우라실 영양요구성 위커해모아이시스 시페라이 균주를 제작하였다. 그 다음, CEN/ARS 원점과 우라실 선택마커가 있는 발현 플라스미드에 과발현할 유전자를 클로닝 후, 이를 상기 구축한 우라실 영양요구성 위커해모아이시스 시페라이 균주에 형질전환하여, TAPS 생산량이 제일 우수한 균주 YP1을 선별하고, YP1의 최종 역가가 2.68g/L로 이는 우라실 영양요구성 균주 역가인 1.46 g/L보다 1.8배 증가한 것을 확인하였다. 또한, LCB4 유전자 결실을 통해 확보된 YPD7의 TAPS 역가가 3.03 g/L로 대조군에 비해 2배 증가하는 것까지 확인하였다. 마지막으로, 세린 합성과 관련된 전구체인 아미노산을 배지에 첨가하여 배지 조건을 최적화함으로써 최종 균주 YPD7에서 TAPS 역가가 20g/L로, 종래 공지된 것보다 매우 높은 농도로 TAPS를 생산할 수 있음을 확인하였다.

[127] 이는 특정 복제원점 및 우라실 선택마커를 가지는 발현 플라스미드로 제작한 우라실 영양요구성 위커해모아이시스 시페라이 변이주를 이용하여 엔지니어링을 수행할 시, 보다 효과적으로 유가 배양에서 TAPS 생산량을 향상시킬 수 있음을 시사한다.

발명의 효과

[128] 본 발명에서 제공하는 위커해모마이시스 시페라이 변이주는 TAPS의 생산성이 우수하므로, TAPS를 이용한 다양한 제품의 개발에 널리 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[129] 도 1은 TAPS의 생합성 경로를 나타낸 도이다.

[130] 도 2는 본 발명의 개략도를 나타낸 도이다.

[131] 도 3은 우라실 영양요구성 위커해모마이시스 시페라이의 제조 과정을 나타낸 도이다.

[132] 도 4는 cre-loxP 시스템의 Ends-in 및 Ends-out 방법을 나타낸 도이다.

[133] 도 5는 효모에 사용되는 4가지 유형의 플라스미드를 나타낸 도이다.

[134] 도 6은 KanMX 및 URA3 선택 마커가 있는 CEN/ARS 원점을 나타낸 도이다.

[135] 도 7은 CEN/ARS 유래 발현 플라스미드를 이용한 EGFP 발현을 나타낸 도이다.

[136] 도 8은 아미노산 보충에 따른 TAPS 생산을 나타낸 도이다.

[137] 도 9은 발현 플라스미드 pEXP가 있는 Y94 균주의 후보를 나타낸 도이다.

[138] 도 10은 YP1 균주 및 YP11 균주의 TAPS 역가 및 수율을 나타낸 도이다.

[139] 도 11은 YD94 균주 및 YPD7 균주의 TAPS 역가 및 수율을 나타낸 도이다.

[140] 도 12는 최종 균주 YPD7을 사용한 높은 세포 밀도 발효를 나타낸 도이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[141] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[142]

[143] **실험예 1: 균주 및 플라스미드 구축**

[144] 위커해모마이시스 시페라이(*Wickerhammyces ciferrii*)에는 아직 발현 플라스미드가 적용되지 않는다는 점을 감안하여, 위커해모마이시스 시페라이에서 작동할 수 있는 발현 플라스미드를 구축하여, 보다 간단하고 효과적인 유전자 과발현 방법을 확보하고자 하였다.

[145] 먼저, 발현 플라스미드에서 복제원점(origin) 및 선택 마커를 최적화하여 우라실 영양요구성 균주를 구축하였다. 그런 다음, SPT를 인코딩하는 LCB1 및 LCB2 및 스핑가닌 C4-하이드록실라제를 인코딩하는 SYR2을 과발현시켜 TAPS 생산을 증가시켰다. 또한 LCB4를 결실시켜 TAPS 생산을 개선하였다. 마지막으로, TAPS의 높은 생산을 달성하기 위해 높은 세포 밀도 발효를 수행하였다(도 2).

[146]

[147] 본 발명에서 사용된 모든 조작된 균주, 재조합 플라스미드 및 올리고머는 하기 표 1 및 표 2와 같다.

[148] [표1]

Name	**Description**	**Reference**
Strains		
WT		
Y94	*W. ciferrii* uracil auxotroph	This study
YP1	Y94 with pEXP, colony No.1	This study
YD94-M	Y94 △*LCB4* with selection marker	This study
YD94	Y94 △*LCB4* without selection marker	This study
YPD7	Y94 △*LCB4* with pEXP, colony No.7	This study
Plasmids		
pSH47	*AmpR*, ColE1 origin, GAL1 promoter, *Cre recombinase*::*URA3*, CEN/ARS origin	Addgene
pSH471	pSH47::*egfp*	This study
pSH471_ARS	pSH471::*URA3*, ARS origin △CEN/ARS	This study
pSH471_2μ	pSH471::*URA3*, 2μ origin △CEN/ARS	This study
pSH472	pSH471::*KanMX* △*URA3*,	This study

pSH472_ARS	pSH472::*KanMX* , ARS origin △CEN/ARS	This study
pSH472_2μ	pSH472::*KanMX*, 2μ origin △CEN/ARS	This study
p416GPD	*AmpR*, CEN/ARS origin, pBR322 origin, GPD promoter, *URA3*	ATCC (Manassas, USA)
pEXP	p416GPD harboring P_{ENO1}*:: LCB1*, P_{TDH3}::*LCB2*, P_{GPD} *::SYR2*	This study
pCM184	*AmpR*, *KanR*, *ColE1* origin, *loxP*	Addgene
pCM1841	pCM184::*URA3*	This study
pCM1842	pCM1841::homology arms of *LCB4* from *W. ciferrii*	This study

[149]

[150] [표2]

Oligomer	Sequence (5' → 3')	Description
egfp_for	tggatcccccgggctgcaggatctcgccac cATGGTGAGCAAGGGCGAG	Cloning for *egfp*
egfp_rev	gcccctcgacggtatcgataTTACTTG TACAGCTCGTCCATG	
KanMX_for	ctttaatttgcggccggtacCAGTATAG CGACCAGCATTC	Cloning for *KanMX*
KanMX_rev	gcacagaacaaaaacctgcaGACATG GAGGCCCAGAATAC	
ARS_for	tgcctgtaacttTCCCTTGTTTGAT TCAGAAG	Cloning for ARS
ARS_rev	gggttccgcgcacatttccccgaaaACTA TGTGTTGCCCTACC	
2μ_for	cgcacatttccccgaaaagtGCCTCGT GATACGCCTATTTTTATAG	Cloning for 2μ
2μ_rev	aggttttcaccgtcatcaccAAAGTGC CACCTGAACGAAG	
SYR2_for	GATCATATACACAAAAGAC	Amplification of *SYR2*
SYR2_rev	TAATGAAAATTTGATCGAAA	
ENO1_for	CAGATCAAACCACATCATG	Amplification of *ENO1*
ENO1_rev	TGTGTAATGTGTATATGTTT TATC	
LCB1_for	ATGAACGTCACTGCTACAA C	Amplification of *LCB1*
LCB1_rev	TTAAATAACTTCTTCAGTTA ATAATGATAATG	
TDH3_for	GGACCGTTAATTACCAAC	Amplification of *TDH3*
TDH3_rev	TGTTAATTAATTATTTGTTTG TTTGTTTG	
LCB2_for	ATGTCATTGGTAATACCTCA AATAG	Amplification of *LCB2*
LCB2_rev	TCAATTATTTGCAGTTGCAA TAAAATATTTAG	
EO_for	cgaagttatctagacctgcaCGGTGAA AACCTCTGACAC	Cloning for *URA3*
EO_rev	gaagttatctaggacctgcaTTTCACA CCGCATAGGGTAATAAC	
LCB4_LHR_for	ATATATAGAATTCTGCGCTAT GATTATTTAAGGACTTT	Cloning for LHR of *LCB4*
LCB4_LHR_rev	ATATATGGTACCTGGATGGG TTGAAGTATGTCTTT	
LCB4_RHR_for	cgcgtgttaaccggtgagctTTGAAAT TCTACCCGGTG	Cloning for RHR of *LCB4*
LCB4_RHR_rev	gctggatcctctagtgagctACACCAG TAGCTGCATTTTG	

[151]

[152] 위커해모마이시스 시페라이 ATCC 14091은 5-FOA를 통한 5-FOA(Fluoroorotic acid) 무작위 돌연변이 유발로부터 얻은 Y94라는 이름의 우라실 영양요구성 균주를 구축하기 위한 모균주로 사용되었다. 우라실 영양요구성 균주 Y94의 제작을 위해, 0.1g/L 5-FOA를 YEPD 배지에 첨가한 후 야생형(WT) 균주를 접종하

였다. 상기 균주가 성장함에 따라, 점차적으로 배지의 5-FOA 농도를 증가시켜 1.5g/L 5-FOA를 포함하는 배지에서 성장하는 균주를 수득하였다. 수득한 균주를 1.5g/L의 5-FOA를 함유하는 YEPD 한천 플레이트에 스크리닝하였다. 그 다음, 우라실이 포함된 SD 플레이트와 포함되지 않은 플레이트가 있는 마스터 플레이트에서 40개의 콜로니를 선택하였다. 또한, 우라실이 포함되지 않은 플레이트에서 빛을 발하는 콜로니를 선택하였다. 이 광성장 콜로니를 위의 과정과 동일하게 5-FOA가 포함된 배지에 다시 스크리닝하여 광성장 콜로니를 선별하였다. 이러한 과정을 통해 우라실이 포함된 SD 플레이트에서는 자라지만 우라실이 없는 플레이트에서는 성장하지 않는 균주를 확보하였다. 최종적으로, 이렇게 확보된 균주가 우라실이 없는 액체 배지에서는 성장하지 않는 것을 확인하였다(도 3).

[153]

[154] 한편, *E. coli* DH5α를 유전자 클로닝을 위한 숙주로 사용하였다. pSH471 제조를 위해, egfp_for 및 egfp_rev의 프라이머 세트로 pSH47 플라스미드에 egfp를 도입하였다. 이후, egfp 및 pSH47의 PCR 산물을 HindIII 및 EcoRI를 사용하여 절단하고, NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix(New England Biolabs, MA, USA)를 사용하여 연결하였다. URA3 선택 마커가 있는 플라스미드 pSH471과 KanMX 마커가 있는 pSH472를 사용하여 원점 테스트를 수행하였다. pSH472 플라스미드 제조를 위해, pML104 플라스미드에서 KanMX_for 및 KanMX_rev 프라이머 세트를 사용하고, NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix를 사용하여 연결하였다. 이후, ARS_for 및 ARS_rev의 프라이머 세트와 2μ_for 및 2μ_rev의 프라이머 세트를 각각 사용하여, 각 플라스미드에 대해 CEN/ARS origin을 ARS origin 및 2μ origin으로 변경하였다. S. cerevisiae 게놈 서열에서 ARS를 증폭하고, 2μ origin은 pML104 플라스미드에서 증폭하였다. pEXP를 제조하기 위해, p416GPD 플라스미드를 백본으로 사용하였다. LCB1, LCB2 및 SYR2의 과발현을 위해, ENO1 프로모터, TDH3 프로모터 및 GPD 프로모터를 각각 사용하였다. 먼저, ENO1_for 및 ENO1_rev/LCB1_for 및 LCB1_rev/TDH3_for 및 TDH3_rev/LCB2_for 및 LCB2_rev/SYR2_for 및 SYR2_rev 프라이머 세트를 사용하여, PCR 산물을 증폭시켰다(표 2).

[155] 그런 다음, 증폭된 DNA 단편을 NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix를 사용하여 EagI에 의해 절단된 p416GPD 플라스미드에 삽입하였다. LCB4 결실 벡터를 구축하기 위해, pCM184 플라스미드를 백본으로 사용하였다. Y94 균주에서 유전자 결실을 진행하기 위해, URA3 선택 마커를 pCM184에 도입하여 pCM1841을 제작하였다. pCM1841의 구성을 위해 EO_for 및 EO_rev의 프라이머 세트를 사용하여 URA3을 증폭하고 pCM184를 PstI를 사용하여 절단하였다. 그런 다음, 두 개의 단편을 NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix로 연결하였다. pCM1841을 제작한 후, LCB4_LHR_for 및 LCB4_LHR_rev의 프라이머 세트를 사용하여, LCB4의 좌측 상동성 영역(LHR)을 증폭시켰다. pCM1841 및 LHR 단편의 경우 EcoRI 및 KpnI로 절단하고 Mighty Mix(Takara, Shiga, Japan)로 연결하였다. 그런

다음 LCB4의 오른쪽 상동 영역(RHR)을 LCB4의 LHR을 포함하는 pCM1841에 삽입하였다. 벡터를 SacI로 절단하고, NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix로 LCB4_RHR_for 및 LCB4_RHR_rev를 사용하여 증폭된 RHR의 PCR 산물과 연결했다. 이러한 PCR 산물을 T100 Thermal Cycler(Bio-rad, CA, USA)를 사용하여 Q5 High-Fidelity DNA Polymerase(New England Biolabs, MA, USA)로 증폭하였다.

[156] 여기에서, 모든 제한 효소는 New England Biolabs에서 구입하였다. 또한, 모든 벡터는 전압이 2500V인 Eporator(Eppendorf, Hamburg, Germany)를 사용하여 형질전환하였다. pEXP를 Y94로 형질전환한 후, W. ciferrii YP1 및 YP11을 얻었다. pEXP의 형질전환 후, 12개의 콜로니를 대조군 균주 WT 및 Y94로 미리 배양하였다. 그런 다음, WT 및 Y94에 비해 TAPS 역가가 더 높은 YP1 및 YP11을 선택하였다. 유전자 LCB4는 상동성 암이 있는 pCM1842를 사용하는 Ends-out 방법으로 cre-loxP 시스템에 의해 결실되어 YD94를 생성하였다(도 4). 그런 다음, pEXP를 YD94로 형질전환시켰다. 마찬가지로 12개의 콜로니를 전배양하여 TAPS 생산이 개선된 YPD7을 얻었다.

[157]

[158] **실험예 2. 배지와 배양**

[159] Luria-Bertani(LB) 브로쓰(5g/L 효모 추출물, 10g/L 트립톤 및 10g/L NaCl)에서 유전자 클로닝용 E. coli DH5α를 37℃에서 배양하였다. 선택을 위해 50 μg/L 카르베니실린을 보충했다. 위커해모마이시스 시페라이 야생형 씨드(seed) 균주를 3 ml YEPD 배지(10 g/L Bacto 효모 추출물, 20 g/L Bacto peptone 및 100 ml/L 20% D-glucose)에서 성장시켰다. 우라실 영양요구성 균주를 선택된 아미노산 혼합물(10ml/L L-히스티딘, L-류신, L-트립토판)을 포함하는 SD 배지 (6.7 g/L YNB w/o 아미노산, 및 100 ml/L 20% D-glucose)에서 성장시켰다. 그런 다음 씨드 균주로 5 ml TAPS 배지(100 g/L 글리세롤, 2 g/L 효모 추출물, 3 g/L KNO3, 3 g/L 아세트산나트륨, 1 g/L NH4NO3 및 1.5 g /L 옥수수 침지 분말)에 접종(inoculation)하고 1.5일동안 배양하였다. TAPS 배지에서 프리 배양 후, 본 배양을 위해 OD600이 0.1인 50ml의 신선한 TAPS 배지에 다시 접종하였다. 전체 배양 절차는 250 rpm의 진탕 인큐베이터에서 30 ℃에서 호기적으로 수행하였다.

[160] 위커해모마이시스 시페라이 YPD7의 유가식 발효는 7일 동안 100g/L의 글리세롤, 1g/L의 KH2PO4 및 1g/L의 MgSO4를 함유하는 1L TAPS 배지 부피는 3L 생물반응기에서 수행하였다. 이 때 발효 초기 OD600은 1.0이었다. 유가식 발효는 30℃에서 통기 속도 1L/min 및 교반 속도 650rpm으로 수행하였다. 상기 통기 속도, 교반 속도의 경우 용존 산소를 30% 이상으로 유지하기 위해 5 L/min, 800 rpm까지 증가시켰다. 추가 공급을 위해, 1000g/L의 글리세롤 공급원료를 보충하여 글리세롤의 잔류 농도를 확인한 후 글리세롤 농도를 100g/L로 유지하였다. 또한 100g/L 아미노산(글루타메이트 및 글리신) 10ml, 200g/L 효모 추출물 10ml, 100g/L MgSO4 10ml 및 100g/L KH2PO4 공급원료 10ml를 매 24시간마다 첨가하였다.

[161]

[162] **실험예 3. 분석방법**

[163] DU730 UV-Vis 분광 광도계(Beckman coulter, Brea, CA, USA)로 광학 밀도(OD600)를 측정하여 균주의 성장을 확인하였다. EGFP 발현은 Biotek Synergy H1 마이크로플레이트 리더(Biotek, VT, US)를 사용하여 측정하였다. 배지 내 글리세롤 농도는 배양액의 원심분리 후 Waters 2414 굴절률 검출기(Waters, Milford, MA, USA)와 Shodex SH1011 컬럼(Shodex, Tokyo, Japan)이 장착된 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)를 사용하여 측정하였으며, 10mM의 H2SO4를 0.6mL/min의 유속으로 HPLC의 이동상으로 확인하였다.

[164] 다음으로, TAPS 분석을 위해 250 μL의 각 액체 배양 샘플을 사용하여 TAPS 생산을 측정하였다. 구체적으로, 샘플을 1ml 아세톤과 혼합하고 30분 동안 와류시켰다. 그런 다음, 원심 분리로 700 μL의 상층액을 수집한 후, 수집된 상청액을 Waters 2695 HPLC(Waters, Milford, MA), Agilent XDB-C18 컬럼(Agilent, Santa Clara, CA) 및 Waters 2487 검출기(Waters, Milford, MA)가 장착된 HPLC를 사용하여 분석하였다. 메탄올(81.5% w/w), H2O(18.45%, w/w) 및 트리플루오로아세트산(0.05% w/w)으로 구성된 이동상은 30분/run 동안 1.4ml/분의 유속으로 사용되었다. 여기에서 UV 검출을 위한 파장은 200 nm였다.

발명의 실시를 위한 형태

[165] **실시예 1. 위커해모마이시스 시페라이의 발현 플라스미드 확립**

[166] 효모에 사용되는 플라스미드에는 네 가지 유형이 있다: ARS origin의 효모 복제 플라스미드(YRp), CEN/ARS origin의 효모 중심체 플라스미드(YCp), 2μ origin의 효모 에피솜 플라스미드(YEp), 효모 통합 플라스미드(YIp)로, 상기 효모 통합 플라스미드는 origin이 없으며 숙주 염색체에서 상동 재조합을 통해 직접 통합될 수 있다(도 5).

[167] 이에, 위커해모마이시스 시페라이에서 어떤 원점(origin)이 작용할 수 있는지 먼저 확인하였다. 구체적으로, ARS, CEN/ARS 및 2μ 원점을 갖는 3개의 플라스미드를 각각 위커해모마이시스 시페라이 WT로 형질전환시켰다. 상기 플라스미드는 KanMX 선택 마커를 포함하는 pSH47에서 유래되었다. 위커해모마이시스 시페라이에서는 Colony PCR이 적용되지 않기 때문에 플라스미드가 포함되어 있는지 확인하기 위해 gDNA를 추출하였다. 순방향 및 역방향 프라이머를 원점의 측면 위치 서열로 설정하고, PCR로 위커해모마이시스 시페라이가 플라스미드를 보유하고 있는지 확인하였다. 그 결과, 도 6A에서 확인할 수 있는 것과 같이, 위커해모마이시스 시페라이 내에 ARS 원점의 플라스미드와 2μ 원점의 플라스미드는 존재하지 않았으나, CEN/ARS 원점의 플라스미드 만이 유지되는 것을 확인할 수 있었다(도 6A).

[168] 다음으로, 녹색 형광 단백질 egfp를 발현시키고 이를 통해 형광 수치를 측정하여, 플라스미드 내 유전자가 균주 내에서 안정적으로 발현되고 있는지를 확인하

였다. 그 결과, 도 7에서 확인할 수 있는 것과 같이, egfp가 균주 내에서 안정적으로 발현되고 있음을 확인하였다(도 7).

[169]

[170] 한편, Kanamycin/G418에 내성이 있는 KanMX 선택 마커는 효모에 사용되는 항생제 마커이다. 그러나 상기 선택 마커는 선택 효율이 낮고 불안정하다는 몇 가지 단점이 있다. 따라서 새롭고 효율적인 선택 마커를 구축할 필요가 있다. 일반적으로, 5-Fluoroorotic acid(5-FOA)는 URA3 유전자의 부재를 확인하기 위해 효모 유전학에서 사용된다. URA3은 5-FOA에서 독성 대사산물인 5-fluorouracil로의 탈탄산 반응을 포함하여 사망에 이르게 하기 때문이다(Boeke et al., 1987, Luo et al., 2021, Shivhare et al., 2021). 이러한 5-FOA를 사용하여 상기 실험예 1의 스크리닝 과정으로 우라실 영양요구성 균주를 성공적으로 제작하였다. 이후, 새로 제작한 우라실 영양요구성 균주를 이용하여 원점 테스트를 다시 실시하였다. URA3 선택 마커가 있는 플라스미드에 3개의 기점을 클로닝한 결과, 도 6B에서 확인할 수 있는 것과 같이, 앞서 확인한 도 6A의 결과처럼 균주 내에서 CEN/ARS 유래의 플라스미드만 유지되고 있음을 재확인할 수 있었다. 또한, 카나마이신이 선택 마커인 경우와 달리, 모든 콜로니에서 밴드가 나타나는 것을 확인하여 100%의 형질전환 효율을 보였다. 이를 통해, 효율적이고 안정적인 선택 마커를 가진 균주가 효과적으로 구축되었음을 확인할 수 있었다(도 6B).

[171]

[172] **실시예 2. TAPS 생산을 위한 유전자 조작**

[173] 상기 실시예 1에서 제작한 균주를 이용하여, 일부 아미노산 첨가가 TAPS 생산에 미치는 영향을 알아보기 위한 실험을 수행하였다. 먼저, 세린의 경우 TAPS의 전구체이고, 글루타메이트와 글리신의 경우 TAPS 생산에 가장 효과적이기 때문에 TAPS 배지에 3개의 아미노산을 첨가하여 야생형 배양을 수행하였다(도 8). 아미노산은 세포가 초기-중간 지수 단계(24시간)에 들어갔을 때 배지에 보충하였다. 이러한 아미노산 시험 결과, 도 8에서 확인할 수 있는 것과 같이, 배지에 글루타메이트와 글리신을 함께 첨가하였을 때 TAPS 티터(titer)가 고정상에서 가장 높게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 특히, WT 균주의 TAPS 역가는 TAPS 배지에서만 1.65g/L인 반면, 글루타메이트 및 글리신이 포함된 TAPS 배지에서는 1.5배 증가된 2.5g/L인 것으로 확인되었다. 수율 역시, 글루타메이트와 글리신이 포함된 배지에서 0.032gTAPS/gglycerol로 가장 높았고 WT는 0.022gTAPS/gglycerol인 것으로 확인할 수 있었다.

[174]

[175] 이후, 배지 조건을 최적화한 후, CEN/ARS 원점 및 URA3 선택 마커를 포함하는 발현 플라스미드를 사용하여 위커해모마이시스 시페라이가 LCB1, LCB2 및 SYR2를 과발현하도록 엔지니어링하였다. 여기에서 LCB1 및 LCB2는 SPT를 코딩하는 유전자이고, SYR2는 스핑가닌 C4-히드록실라제를 코딩하는 유전자이다. 게놈에서 이러한 유전자의 프로모터 엔지니어링을 통한 과발현은 종래 S.

cerevisiae에서 TAPS 생산을 57% 증가시킨 것으로 보고되었다(Schorsch et al., 2012). p416GPD로 이들 유전자를 과발현하기 위해 위커해모마이시스 시페라이에서 사용할 수 있는 3개의 강력한 프로모터를 선택하였다. LCB1 및 LCB2 유전자는 각각 ENO1 및 TDH3 프로모터에서 과발현하였고, SYR2는 GAP 프로모터에서 과발현하였다. 상기 3개의 유전자 및 3개의 강력한 상이한 프로모터를 갖는 pEXP 발현 플라스미드를 Y94 균주로 형질전환시켰다. 형질전환 후 호기성 튜브에서 전배양을 위해 12개의 콜로니 후보를 선택하였다. 4일 배양 후, 야생형보다 TAPS 생산이 더 좋은 두 후보 YP1과 YP11을 선택하였다(도 9). YP1 및 YP11의 배양은 대조군 균주와 비교하여 글루타메이트 및 글리신이 보충된 TAPS 배지에서 수행되었다(도 10).

[176] 그 결과, 도 11에서 확인할 수 있는 것과 같이, 각 WT 균주 및 Y94 균주의 TAPS 역가는 각각 2.3g/L 및 1.46g/L인 반면, YP1 및 YP11의 TAPS 역가는 각각 2.68g/L 및 1.9g/L이었다. YP1의 역가는 야생형 및 Y94의 역가보다 높았다. 수율 또한, 0.036gTAPS/gglycerol만큼 증가했으며, 이는 Y94에 비해 1.8배 증가하는 것으로 확인할 수 있었다(도 11).

[177]

[178] 나아가, TAPS 생산의 더 많은 증가를 위해 장쇄 염기 키나아제를 인코딩하는 LCB4를 cre-loxP 시스템으로 결실하여 YD94를 생성하였다.

[179] 상동 재조합을 기반으로 한 표적 유전자의 교체에는 Ends-in 및 Ends-out 방법의 두 가지 방법이 있다. 그 중 Ends-out 방식을 주로 사용하기 때문에 Ends-out 방식으로 결실 시스템을 구축하였다. 결실 방법의 수립을 위해, pCM184 플라스미드를 URA3 선택 마커가 있는 표적 유전자 및 loxP 부위에 대한 상동성 암에 사용하였고, pSH47 플라스미드를 KanMX 선택 마커가 있는 Cre 재조합효소에 사용하였다. 그 결과, YD94의 TAPS 역가는 2.25g/L이고 수율은 0.0252gTAPS/gglycerol로, TAPS 생산이 모균주 Y94의 생산보다 높음을 확인할 수 있었다(도 11). 이러한 YD94를 사용하여 pEXP로 형질전환하여 YPD7을 제작하였다. 그 다음, YPD7을 배양하여 TAPS 역가 및 수율을 측정하였다(도 11). 그 결과, YPD7에서는 TAPS 역가와 YPD7의 수율이 각각 3.03g/L 및 0.03675gTAPS/gglycerol로, 모균주인 Y94에 비해 2배 향상되는 것을 확인할 수 있었다. 참고로, 여기에서 제작한 YPD7 균주는 2022년 5월 4일 자로 기탁번호 KCTC14970BP로 한국생명공학연구원에 기탁하였다.

[180]

[181] 결론적으로, 위커해모마이시스 시페라이에서 CEN/ARS 원점과 URA3 선택 마커를 가지고 있는 발현 플라스미드를 이용한 과발현과 cre-loxP 시스템을 이용한 결실이 TAPS 생산의 개선을 효과적으로 가능하게 함을 확인할 수 있다.

[182]

[183] **실시예 3. TAPS 생산을 위한 유가식 배양**

[184] TAPS에서 높은 생산을 달성하기 위해 최종 균주로 YPD7을 사용하여 높은 세포 밀도 발효를 수행하였다. 배양방법은 유가식 배양으로 하고 글리세롤, 글루타메이트 및 글리신을 주기적으로 배양액에 첨가하였다. 또한 성장 촉진을 위해, 지질 생산성을 향상시키는 MgSO4와 인(P) 공급원으로 KH2PO4와 같은 영양소를 보충하였다. 거품 발생을 차단하기 위해, 발효조에 소포제를 연결하여 자동으로 공급하였다.

[185] 그 결과, 도 12에서 확인할 수 있는 바와 같이, 가장 높은 TAPS 역가는 20.2g/L이었고 생산성은 0.12g/L/h인 것으로 확인하였다(도 12).

[186] 이를 통해, 글리세롤, 글루타메이트, 글리신, MgSO4 및 KH2PO4의 주기적인 공급에 의한 유가식 발효는 이전 연구에 비해 가장 높은 TAPS 역가를 달성하는 것을 확인하였다(표 3).

[187]

[188] [표3]

Strain	TAPS titer	TAPS productivity	Reference
W. ciferrii CSS.L4.O.L2.L1.S2	2 g/L	0.02 g/L/h	(Schorsch et al., 2012)
W. ciferrii Mutant 736	17.7 g/L	0.1475 g/L/h	(Choi et al., 2021)
W. ciferrii ATCC 14091	7.2 g/L	0.06 g/L/h	(Hong & Yu, 2003)
W. ciferrii UV-P63-NTG4	9.65 g/L	0.057 g/L/h	(Hong & Yu, 2002)
W. ciferrii DSCC7-25	5.66 g/L	0.03 g/L/h	(오대일, 2004)
***W. ciferrii* YD7 strain**	**20.2 g/L**	**0.12 g/L/h**	**This study**

[189]

[190] 종합하면, 위커해모아이시스 시페라이에서 작동할 수 있는 효과적인 발현 플라스미드를 구축하여 간단하면서도 효과적으로 유전자를 발현하고자, 종래 효모에서 사용하던 다양한 원점 테스트를 수행하여 CEN/ARS 원점을 찾고, 효율적인 선택마커의 확보를 위해 5-FOA를 사용하여 우라실 영양요구성 위커해모아이시스 시페라이 균주를 제작하였다. 그 다음, CEN/ARS 원점과 우라실 선택마커

가 있는 발현 플라스미드에 과발현할 유전자를 클로닝 후, 이를 상기 구축한 우라실 영양요구성 위커해모아이시스 시페라이 균주에 형질전환하여, TAPS 생산량이 제일 우수한 균주 YP1을 선별하고, YP1의 최종 역가가 2.68g/L로 이는 우라실 영양요구성 균주 역가인 1.46 g/L보다 1.8배 증가한 것을 알 수 있었다. 또한, LCB4 유전자 결실을 통해 확보된 YPD7의 TAPS 역가가 3.03 g/L로 대조군에 비해 2배 증가하는 것까지 확인하였다. 그 외, 세린 합성과 관련된 전구체인 아미노산을 배지에 첨가하여 배지 조건을 최적화함으로써 최종 균주 YPD7에서 TAPS 역가가 20g/L로, 종래 공지된 것보다 매우 높은 농도로 TAPS를 생산할 수 있음을 확인하였다.

[191] 이는 특정 복제원점 및 우라실 선택마커를 가지는 발현 플라스미드로 제작한 우라실 영양요구성 위커해모아이시스 시페라이 변이주를 이용하여 엔지니어링을 수행할 시, 보다 효과적으로 유가 배양에서 TAPS 생산량을 향상시킬 수 있음을 시사하는 것이다.

[192]

[193] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

[194] [수탁번호]

[195] 기탁기관명 : 한국생명공학연구원

[196] 수탁번호 : KCTC14970BP

[197] 수탁일자 : 20220504

산업상 이용가능성

[198] 본 발명에 따른 위커해모마이시스 시페라이 변이주는 TAPS의 생산성이 우수하므로, TAPS가 이용되는 다양한 분야에 유용하게 활용될 수 있다.

[200]

번역문

특허절차를 위한 목적의 미생물 기탁의 국제적 인식에 대한 부다페스트 협약

국제 형식

원본에 대한 영수증

규칙 7.1에 따라 발행됨

수신: 오, 민규

대한민국 서울시

성북구 안암로 145

고려대학교

I. 미생물 명칭	
기탁자에 의해서 부여된 명칭: 위커해모아이시스 시페라이	국제 기탁 기관에 의해서 부여된 기탁 번호: KCTC14970BP
II. 과학적 설명 및/또는 제안된 분류학적 표시	
상기 I에서 지칭된 미생물은 하기를 수반함: ▣ 과학적 설명 ☐ 제안된 분류학적 표시 (해당되는 경우 십자 표시로 마킹할 것)	
III. 수령 및 수탁	
본 국제 기탁 기관은 상기 I에서 확인된 미생물을 수탁하였으며, 이는 2022년 05월 04일자로 수령되었음	
IV. 변환 요청 수령	
상기 I에서 확인된 미생물은 본 국제 기탁 기관에 접수되었으며, 부다페스트 협약에 의거한 기탁으로의 변환 요청이 수령되었음	
V. 국제 기탁 기관	
명칭: 생물 자원 센터 주소: (56212) 대한민국 전라북도 정읍시 입신길 181 한국생명공학연구원(KRIBB)	국제 기탁 기관을 대표하는 사람(들) 또는 승인된 담당자(들)의 서명(들): 김, 송건, 디렉터 일자: 2022년 05월 04일

양식 BP/4(KCTC 양식 17)

1 페이지

위 번역문은 원본의 내용과 다름없음을 증명함.

변 리 사 정 은 열 (인)

[201]

txt_JKP-1779.txt

Sequence Listing Information:
DTD Version: V1_3
File Name: JKP-1779.xml
Software Name: WIPO Sequence
Software Version: 2.1.2
Production Date: 2022-09-01
General Information:
Current application / Applicant file reference: JKP-1779
Applicant name: Korea University Research and Business Foundation
Applicant name / Language: en
Invention title: A mutated Wickerhammyces ciferrii strain over-producing tetraacetylphytosphingosine and process for preparing tetraacetylphytosphingosine using the same (en)
Sequence Total Quantity: 7
Sequences:
Sequence Number (ID): 1
Length: 473
Molecule Type: AA
Features Location/Qualifiers:
- REGION, 1..473
> note, Amino acid sequence of Serine palmitoyl-transferase
- source, 1..473
> mol_type, protein
> organism, synthetic construct
Residues:
MATATEQWVL VEMVQALYEA PAYHLILEGI LILWIIRLLF SKTYKLQERS DLTVKEKEEL 60
IEEWQPEPLV PPVPKDHPAL NYNIVSGPPS HKTVVNGKEC INFASFNFLG LLDNPRVKAA 120
ALASLKKYGV GTCGPRGFYG TFDVHLDLED RLAKFMKTEE AIIYSYGFAT IASAIPAYSK 180
RGDIVFVDRA ACFAIQKGLQ ASRSDIKLFK HNDMADLERL LKEQEIEDQK NPRKARVTRR 240
FIVVEGLYMN TGTICPLPEL VKLKYKYKAR IFLEESLSFG VLGEHGRGVT EHYGINIDDI 300
DLISANMENA LASIGGFCCG RSFVIDHQRL SGQGYCFSAS LPPLLAAAAI EALNIMEENP 360
GIFAVLKEKC GQIHKALQGI SGLKVVGESL SPAFHLQLEE STGSREQDVR LLQEIVDQCM 420
NRSIALTQAR YLEKEEKCLP PPSIRVVVTV EQTEEELERA ASTIKEVAQA VLL 473

Sequence Number (ID): 2
Length: 1713
Molecule Type: DNA
Features Location/Qualifiers:
- misc_feature, 1..1713
> note, polynucleotide sequence of LCB1
- source, 1..1713
> mol_type, other DNA
> organism, synthetic construct
Residues:
atgaacgtca ctgctacaac tataacaact tcaacaacaa caattgcatt acaagatatt 60
tggaatacaa cttctgatgt tgtttctcgt tatttattca ttatattaaa ttatattgaa 120

ttaatacctg gtggttcaat tttagttcgt tatataaaat cttctcataa aaatgatcca 180
attagaactt tatttgaaat tgctttattt atttttgcaa ttagatattt tactacagca 240
aaatatgaaa gatctaaaaa agatcatatt aaattgaaaa attctgaaat tgatgaatta
300
attgatgatt ggatgccgga acctttagtt ttggatatta gtccaaagga acaatggcaa
360
ttaaattcaa ttccaattgt taaaggtcca atagatacta aagtgaacct agttggtgaa
420
gaaggtgact ttttaaattt tgcttcttca aatttttaa attttggtat taatccaatt 480
gttaaaaatg aatgtaaaaa aattattcat agtaatggtg ttggtgcttg tggtccacca
540
aatttttatg gtaatcaaga tattcatatt aaattagaaa atgatttagc aaaatttttc 600
gaagttggtg gtgctgtatt atatggtcaa gatttttgta ctgcaggttc agttttacca 660
agtttttttaa aaagaggtga ttttgttatt gctgatgctt catcaaatgt tgcaattcaa 720
aaagctttac aattatcaag atgtgaaatt tattggttta atcataatga tttggatcat 780
ttagaagaaa ttttaattga tttacaaaaa aatattttta aatttgaaaa accaatttca 840
agaaaattta ttgttactga aggtattttt gcaaataaag gtgattcacc atatttacca 900
agattaattg aattaaagaa aaaatttaaa tttagattat ttttggatga atctttatct 960
ttaggtgttt taggtaaatc tggtaaaggt ttagctgaac attataatat taaaagatca
1020
gaaattgatg taactataag ttcaatggct aattcattct cttcttcagg tgctttttgt 1080
attggtgata aagttatgac ttatcatcaa agaattggtt caatggctta ttgttttagt 1140
gcttcattac ctgcttatgt tgcaagagct acatcagttg cattaagatt attaactgat 1200
tctcaagatt cccagggtga atcatcaatt gtaaaaaaat tacaatcaaa taattatcaa
1260
ttatttaatt tatttaataa agatagaaaa ttaagtaaat atttaaaaat tatatcaaat 1320
gaaatttcac caattttaca ttttgaaatt aattcagatt taagaaaact tttaaatttc 1380
ccaattagtt atacaggtaa aggatcagaa attgaatata aaaataaaaa aggaatttct
1440
gataaatttg ttgaatcatt taattatgaa aatttaattt ttcaaaaaat tataaattta 1500
tccaagaaac aaggtatttt aataacaaga tcaatttta caattgaaca agaagctctg
1560
cctctgattc caaatttaaa aattcattca aatgttgatt ttactaagga tgaaattgaa 1620
aaagtttata aaattgtttc caaagtaatt ttagatgttt ttgaaaattt aactgttgaa 1680
tcattatcat tattaactga agaagttatt taa 1713

Sequence Number (ID): 3
Length: 1689
Molecule Type: DNA
Features Location/Qualifiers:
- misc_feature, 1..1689
> note, polynucleotide sequence of LCB2
- source, 1..1689
> mol_type, other DNA
> organism, synthetic construct
Residues:
atgtcattgg taatacctca aatagatcta tcaggtcttt ccatcgaaga caagaaacaa
60
aatgaattcg gtgctctaac ttcaaatgaa tatcgttaca aaacaatttc aagacagggg
120
aaaccattac ctgatccaat tgaagatgaa ccaccatatc atgtcctttt catcacttat 180
ttaaactatt taatcttgat tatcgttggt catattaaag atttcacagg tattctgttc 240
aacccaaaaa attaccaaga tttattagaa caaaatggcc ttgctccatg gtataataaa
300
tttgaaagtt tttatattcg tcgtatgaaa caaaaaattg atgattgttt tgcaagacca 360
acttgtggtg tcccaggtag attaatcact tgtattgatc gtgatgctca tgattataat 420

tcatatttta gttatcctgg tactacttca acttgtttaa atttatcatc atataattat 480
ttggggtttg cacaatctga aggggcatgt actcaagccg ctttagaaat tttggattat 540
tatggtgttg gttctggtgg tccaagaaat gttattggta ctactgattt acatttaaaa 600
actgaaaaaa ctatagcaaa atttattggt aaagatgatt caatcttatt ttcaatgggg 660
tatgcaacaa atgcaagttt atttagttct ttattggata agaaatcact tgttatttct 720
gatgaattaa atcatgcttc aattagaact ggtgttagat tatctggttc tacagttaaa 780
actttccctc ataataatat gattgccttg gaaaaaattc ttagagaaca aatttctcaa 840
ggtcaaccaa gatctcatcg tccatggaaa aaaatcattg ttgcagttga agggctttat
900
tcaatggagg gtacaatggc aaatttacct gcattaattg aattaagaag aaaatataaa
960
tttaatttat ttgttgatga agctcattca attggtgcta ttggtccatc aggtcgtggt 1020
gtttgtgatt attttggtat agatccctca aatgttgatt tattaatggg gactttaact 1080
aaatcatttg gtgctgcagg tggttatatt gctggttcac aacaaattat aaatcgttta 1140
aaattaaata ttaattcaca aaattatgca gaatctatcc ctgcacctgt tttggcacaa
1200
attatttctt cgttaaatat catctcgggt gatttaaatc ctggtgaagg ttcggaaaga
1260
ttagaaagaa ttgcttttaa ttcacgttat ttaagattag gtttacaaag attaggtttt 1320
atcgtatacg gagttgatga ttcaccagtg atcccattat tattattcgc cccagccaaa
1380
atgccagcat tttcacgtat gctatatcaa ggaaaaattt cagttgttgt tgttggatac 1440
ccggcaactc cactgacttc atcaggagtt cgtcttggtg ttcctgcatc tttaccaaag
1500
gaggatatgg attatctttt acgtcattta tccgagttgg gtgataaatt atttttaaaa 1560
tttagttctg gtattgctgg tggttcttta gatggttcac caccaagatg gaatattgaa 1620
gatgttttga aagagactcc aaaggattgt aaagaatcta aatattttat tgcaactgca
1680
aataattga 1689

Sequence Number (ID): 4
Length: 349
Molecule Type: AA
Features Location/Qualifiers:
- REGION, 1..349
> note, Amino acid sequence of Sphinganine C4-hydroxylase
- source, 1..349
> mol_type, protein
> organism, synthetic construct
Residues:
MNVTSNATAA GSFPLAFGLK TSFGFMHYAK APAINLRPKE SLLPEMSDGV LALVAPVVAY 60
WALSGIFHVI DTFHLAEKYR IHPSEEVAKR NKASRMHVFL EVILQHIIQT IVGLIFMHFE 120
PIYMTGFEEN AMWKLRADLP RIIPDAAIYY GYMYGMSALK IFAGFLFVDT WQYFLHRLMH 180
MNKTLYKWFH SVHHELYVPY AYGALFNNPV EGFLLDTLGT GIAMTLTHLT HREQIILFTF 240
ATMKTVDDHC GYALPLDPFQ WLFPNNAVYH DIHHQQFGIK TNFAQPFFTF WDNLFQTNFK 300
GFEEYQKKQR RVTIDKYKEF LQERELEKKE KLKNFKAMNA AENEVKKEK 349

Sequence Number (ID): 5
Length: 1017

Molecule Type: DNA
Features Location/Qualifiers:
- misc_feature, 1..1017
> note, polynucleotide sequence of SYR2
- source, 1..1017
> mol_type, other DNA
> organism, synthetic construct
Residues:
gatcatatac acaaaagaca tgagctctca tcagtttttg atcaaccaaa caactttggc 60
ggctccacct gttcatttgg tggagaaacc aagtttgatt aatggcatac cggataacat 120
tttagccttg attgcacctg ttatagctta ttattcatat tcaggatttt tctatgtgat 180
tgatacttta gaaattgcag aactttatag aattcatcca cctgaagaag ttagttcaag 240
aaataaagct acaaaatttg atgttttaaa agatgttgtt ttacaacatt ttatacagag 300
tgttgttggt tatatcttta catattttga tccaattcaa tatactggtg atgaagaata 360
tcaagcttgg aaattacaac aaactttacc atttttacca tttgatgttg catattattg 420
gaatatgtat ggttggagtt gtttgaaaat tggtcttgca tttttaatta ttgattcatg 480
gcaatattgg ttacatagaa ttatgcattt aaacaagaca ttatacaaaa gattccattc 540
aagacatcat cgtctttatg tcccatatgc ttttggtgct ttatataatg atccatttga 600
agggtttta ttggatacct taggtaccgg tattgctgca attgttactc aattaactcc 660
aagagaatct attgttttat atacattttc aactttgaaa actgttgatg atcattgtgg 720
ttattcatta ccttatgatc ctttccaaat tttgttccca aataactcaa tttatcatga 780
tattcatcat caacaatttg gtatcaagac caatttttca caacctttct ttacacattg 840
ggatgttttc agtaatacaa gatataaaga aattgatgaa tacagagaaa agcaaaaagc 900
tattacaatt gccaaatata aagagttttt acatgatcgt gaaattgcaa aacaaaagaa 960
gaaggctgaa atttataaag ataagaaaac tgattgattt cgatcaaatt ttcatta 1017

Sequence Number (ID): 6
Length: 624
Molecule Type: AA
Features Location/Qualifiers:
- REGION, 1..624
> note, Amino acid sequence of long chain base kinase
- source, 1..624
> mol_type, protein
> organism, synthetic construct
Residues:
MVVQKKLRAI LTDEGVLIKS QSHHMFNKHG QLRSGDSLSL LSCLSCLDDG TLSSDGGSFD 60
EDDSLELLPL NTTIPFNRIL NAKYVNVGQK GFNNGKISSN PFQTENLSSS SENDDVENHS 120
LSNDKAPVSE SQSFPKKDKW DTKTNTVKVS PDDSQDNSPS LGIKDNQQLI ELTFAVPKGH 180
DVIPQKLTLL IDHVSRKSRA NTGEENISSG TVEEILEKSY ENSKRNRSIL VIINPHGGKG 240
TAKNLFLTKA RPILVESGCK IEIAYTKYAR HAIDIAKDLD ISKYDTIACA SGDGIPYEVI 300
NGLYRRPDRV DAFNKLAVTQ LPCGSGNAMS ISCHWTNNPS YAALCLVKSI ETRIDLMCCS 360
QPSYMNEWPR LSFLSQTYGV IAESDINTEF IRWMGPVRFN LGVAFNIIQG

KKYPCEVFVK 420
YAAKSKKELK VHFLENKDKN KGCLTFEPNP SPNSSPDLLS KNNINNSTKD ELSPNFLNED 480
NFKLKYPMTE PVPRDWEKMD SELTDNLTIF YTGKMPYIAK DTKFFPAALP ADGTIDLVIT 540
DARIPVTRMT PILLSLDKGS HVLEPEVIHS KILAYKIIPK VESGLFSVDG EKFPLEPLQV 600
EIMPMLCKTL LRNGRYIDTE FESM 624

Sequence Number (ID): 7
Length: 1875
Molecule Type: DNA
Features Location/Qualifiers:
- misc_feature, 1..1875
> note, polynucleotide sequence of LCB4
- source, 1..1875
> mol_type, other DNA
> organism, synthetic construct
Residues:
atggtggtgc agaaaaaact tagggctatc ttgaccgatg aaggtgtatt gatcaaatcg 60
caatcacacc atatgttcaa taagcatggt caactcagaa gcggagattc tttatccttg 120
ttgagctgct tgtcctgtct ggatgatgga actttgagct ctgatggagg ttcttttgat 180
gaggatgatt ccctggaact gttgcctctt aatactacca ttccgttcaa cagaattttg 240
aacgcaaaat atgtgaatgt cggtcagaaa ggcttcaata atggcaaaat ttcttcgaat 300
ccttttcaaa cggaaaatct gagttcttcg tctgaaaatg acgacgttga gaatcatagt 360
ttgagcaatg ataaggctcc tgtaagcgaa tcacagtcat ttcccaaaaa agacaagtgg 420
gatacaaaaa cgaacactgt gaaggtgtct cccgatgatt cacaggataa ctcaccatct 480
ttagggataa aagataatca acagttaatt gagttaactt ttgctgtacc caagggccat 540
gatgttatac cacaaaaatt aaccttgtta atagatcacg tttctaggaa atcgagagca 600
aataccggag aggagaacat ttcttctggt actgtggaag aaatcctgga aaaaagttat 660
gaaaattcca agagaaacag atcgatatta gtcattatta atccccacgg tggtaaaggt 720
actgctaaaa atttattcct gacaaaagca aggccaatac tagtggaaag tggctgcaaa 780
atagaaattg catacacaaa atatgcccgt cacgccatcg atattgccaa agatttagat 840
atcagcaaat acgataccat tgcatgtgcc tcgggtgatg gtattccata cgaagtaatt 900
aatgggcttt atagaagacc cgacagagtg gatgcgttca ataaactagc cgtaactcag 960
ctaccttgcg gttcaggaaa tgctatgagc atttcatgtc attggacaaa taacccatcg 1020
tacgccgctc tgtgccttgt caaatccatt gaaacaagaa tagacttaat gtgttgttcc 1080
caaccttctt atatgaacga atggccaaga ttatcctttt tgagtcagac gtacggcgtt 1140
attgcagaat ctgatattaa cactgaattc atcagatgga tgggtcccgt taggtttaat

1200
ttgggtgtag cattcaacat tatccaaggt aagaaatatc cctgcgaagt tttcgtcaaa
1260
tatgctgcca aatctaaaaa ggaattaaaa gttcatttct tagaaaataa agataaaaac
1320
aaaggatgtt taaccttcga accaaatcct agcccaaact cttcgccgga tttactatct
1380
aaaaacaata tcaacaacag tacaaaagat gaactttcac cgaattttct caacgaggac
1440
aactttaaat taaagtatcc gatgacggaa ccagtaccta gagactggga gaaaatggat
1500
tcagagctaa ctgataactt aacaatcttt tacacaggga aaatgccgta tattgctaag
1560
gacaccaaat tttttcccgc tgctttacca gcggatggta ccattgattt agtcataacg
1620
gatgcaagaa tcccagtgac aagaatgaca ccaattttat tatccttgga taaaggttct
1680
catgtattag agccagaagt tattcactca aaaatattgg cttataagat tataccaaaa
1740
gtggagtcag gtttattttc agtggatggt gaaaagtttc ctttggaacc cttgcaagtg
1800
gaaataatgc ccatgttatg caagacgttg ctaaggaatg gtagatatat cgatacagag
1860
tttgaatcca tgtag 1875
END

청구범위

[청구항 1] CEN/ARS 복제원점 및 우라실 선택 마커를 포함하는, 위커해모아이시스 시페라이(*Wickerhammyces ciferrii*) 유전자 조작을 위한 발현 플라스미드.

[청구항 2] 제1항에 있어서,
우라실 선택 마커는 5-FOA인 것인, 발현 플라스미드.

[청구항 3] 제1항에 있어서,
세린 팔미토일-트랜스퍼라제를 인코딩하는 유전자, 및 스핑가닌 C4-하이드로실라제를 인코딩하는 유전자를 추가 삽입한 것인 발현 플라스미드.

[청구항 4] 제3항에 있어서,
상기 세린 팔미토일-트랜스퍼라제를 인코딩하는 유전자는 LCB1, LCB2 또는 이들의 조합인 것인, 발현 플라스미드.

[청구항 5] 제4항에 있어서,
스핑가닌 C4-하이드로실라제를 인코딩하는 유전자는 SYR2인 것인, 발현 플라스미드.

[청구항 6] 제3항에 있어서,
상기 발현 플라스미드는 pEXP인 것인, 발현 플라스미드.

[청구항 7] 제1항에 있어서,
장쇄 염기 키나아제를 인코딩하는 유전자의 상동성 암을 추가로 포함하는, 발현 플라스미드.

[청구항 8] 제7항에 있어서,
장쇄 염기 키나아제를 인코딩하는 유전자는 LCB4인 것인, 발현 플라스미드.

[청구항 9] 제8항에 있어서,
상기 발현 플라스미드는 pCM1842인 것인, 발현 플라스미드.

[청구항 10] 제3항 내지 제6항 중 어느 한 항의 발현 플라스미드로 형질전환하여 세린 팔미토일-트랜스퍼라제 및 스핑가닌 C4-하이드로실라제의 활성을 강화하고,
제7항 내지 제9항 중 어느 한 항의 발현 플라스미드로 장쇄 염기 키나아제의 활성을 약화시킨, 테트라아세틸파이토스핑고신(TAPS) 생산능이 증진된 위커해모아이시스 시페라이(*Wickerhammyces ciferrii*) 균주.

[청구항 11] 제10항에 있어서,
상기 위커해모아이시스 시페라이 균주는 수탁번호 KCTC14970BP로 기탁된 것인, 위커해모아이시스 시페라이 균주.

[청구항 12] 우라실 선택마커를 포함하는 우라실 영양요구성 위커해모아이시스 시페라이 균주에서,
CEN/ARS 복제원점을 포함하는 발현 플라스미드를 이용하여 세린 팔미토일-트랜스퍼라제 및 스핑가닌 C4-하이드로실라제의 활성을 강화하고,

장쇄 염기 키나아제 활성을 추가로 약화시킨, 테트라아세틸파이토스핑고신(TAPS) 생산능이 증진된 위커해모아이시스 시페라이 균주.

[청구항 13] 제12항에 있어서,
상기 세린 팔미토일-트랜스퍼라제는 LCB1 또는 LCB2로 인코딩되는 것인, 위커해모아이시스 시페라이 균주.

[청구항 14] 제12항에 있어서,
상기 스핑가닌 C4-하이드로실라제는 SYR2로 인코딩되는 것인, 위커해모아이시스 시페라이 균주.

[청구항 15] 제12항에 있어서,
상기 장쇄 염기 키나아제는 LCB4로 인코딩되는 것인, 위커해모아이시스 시페라이 균주.

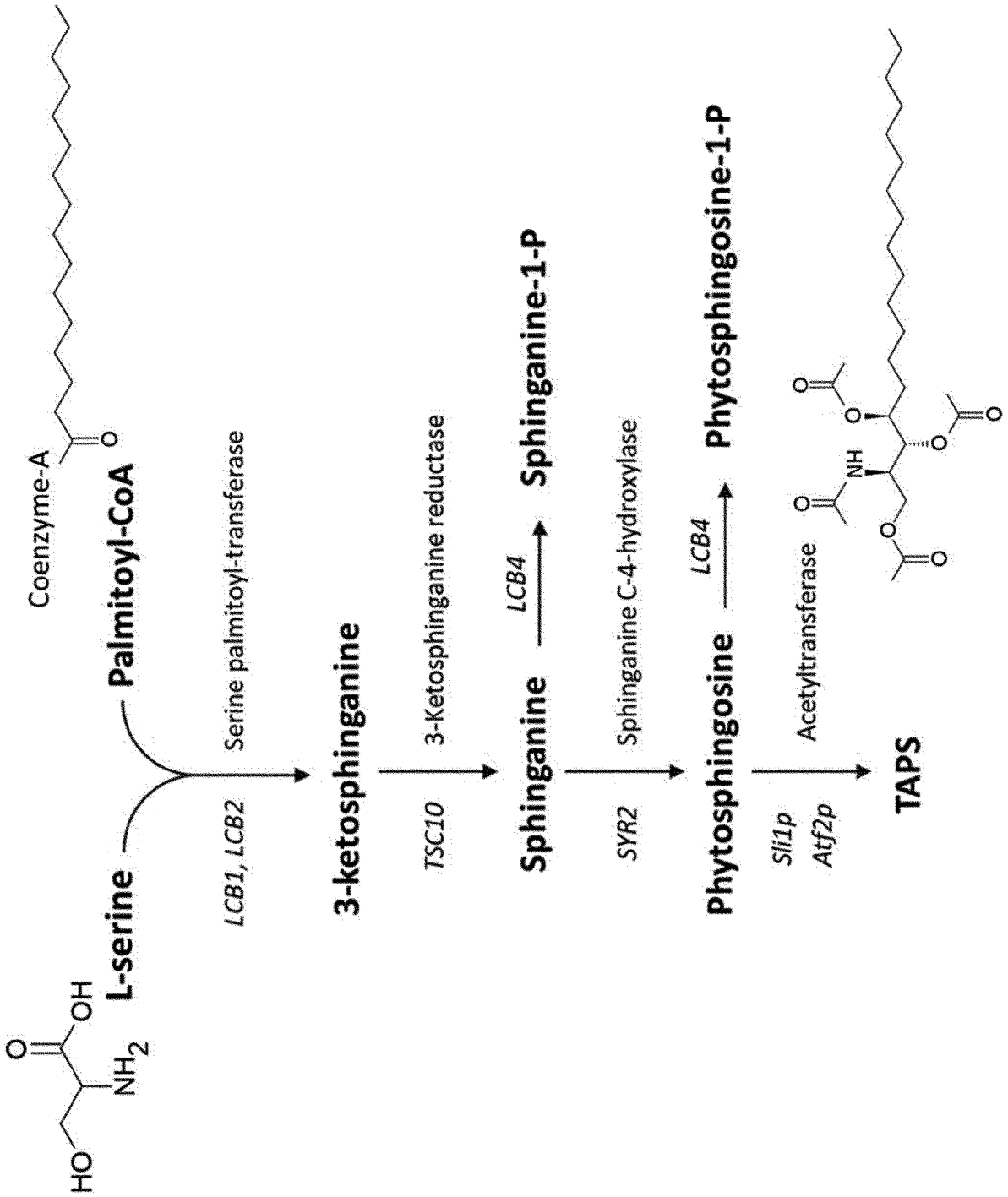
[청구항 16] 제12항에 있어서,
상기 위커해모아이시스 시페라이 균주는 수탁번호 KCTC14970BP로 기탁된 것인, 위커해모아이시스 시페라이 균주.

[청구항 17] 제12항 내지 제16항 중 어느 한 항의 균주, 균주의 배양물, 균주의 파쇄물 또는 균주의 추출물을 포함하는, 테트라아세틸파이토스핑고신(TAPS) 생산용 조성물.

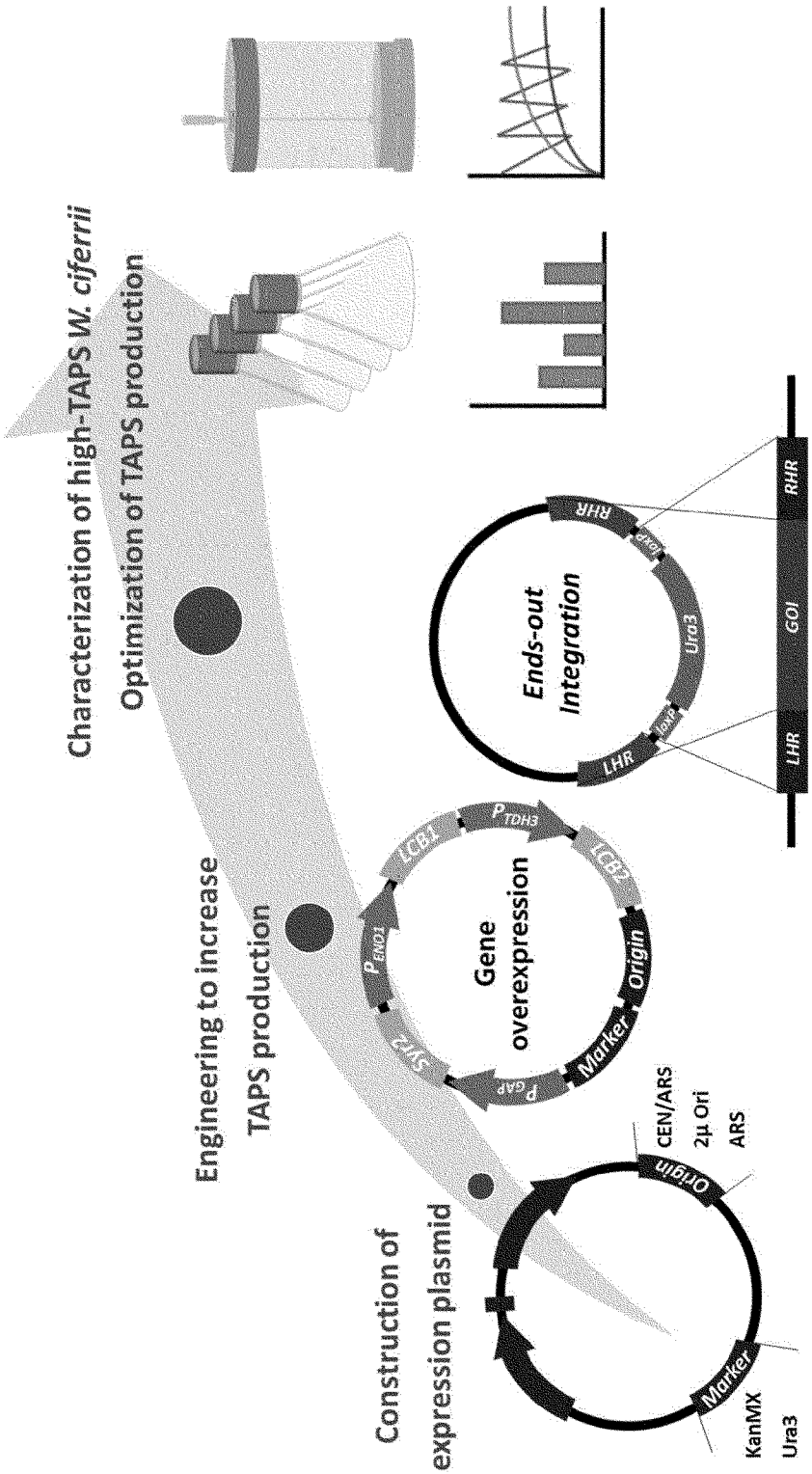
[청구항 18] 제12항 내지 제16항 중 어느 한 항의 균주를 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 테트라아세틸파이토스핑고신(TAPS) 생산 방법.

[청구항 19] 5-FOA를 이용하여 우라실 영양요구성 위커해모아이시스 시페라이 균주를 제조하는 제1단계;
CEN/ARS 복제원점을 포함하는 발현 플라스미드로 세린 팔미토일-트랜스퍼라제와 스핑가닌 C4-하이드로실라제의 활성을 강화하는 제2단계; 및
장쇄 염기 키나아제 활성을 약화시키는 제3단계를 포함하는, 테트라아세틸파이토스핑고신(TAPS) 생산능이 증진된 위커해모아이시스 시페라이 균주의 제조방법.

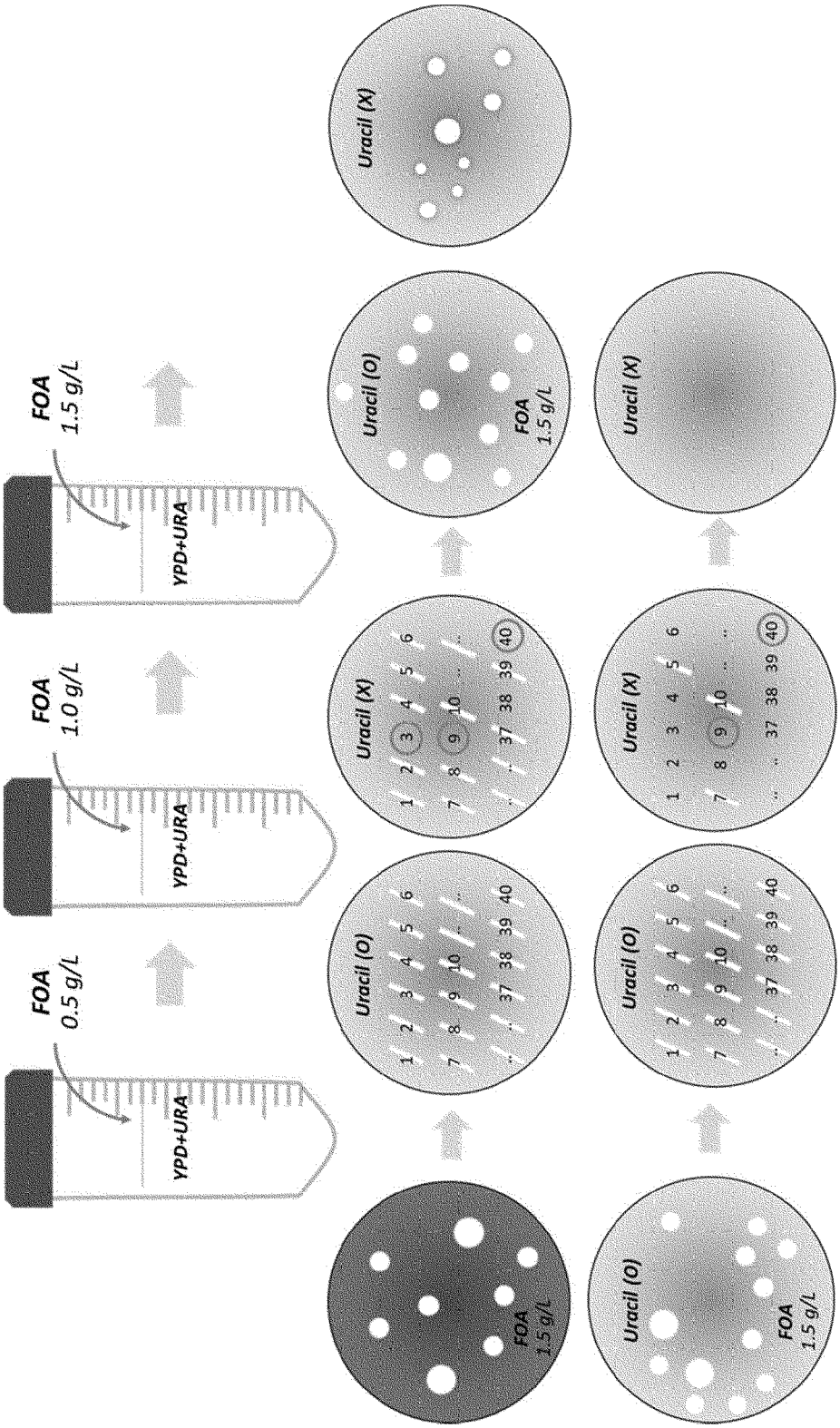
[도1]


Coenzyme-A
Palmitoyl-CoA
L-serine
Serine palmitoyl-transferase
LCB1, LCB2
3-ketosphinganine
3-Ketosphinganine reductase
TSC10
Sphinganine
LCB4
Sphinganine-1-P
Sphinganine C-4-hydroxylase
SYR2
Phytosphingosine
LCB4
Phytosphingosine-1-P
Acetyltransferase
Sli1p
Atf2p
TAPS

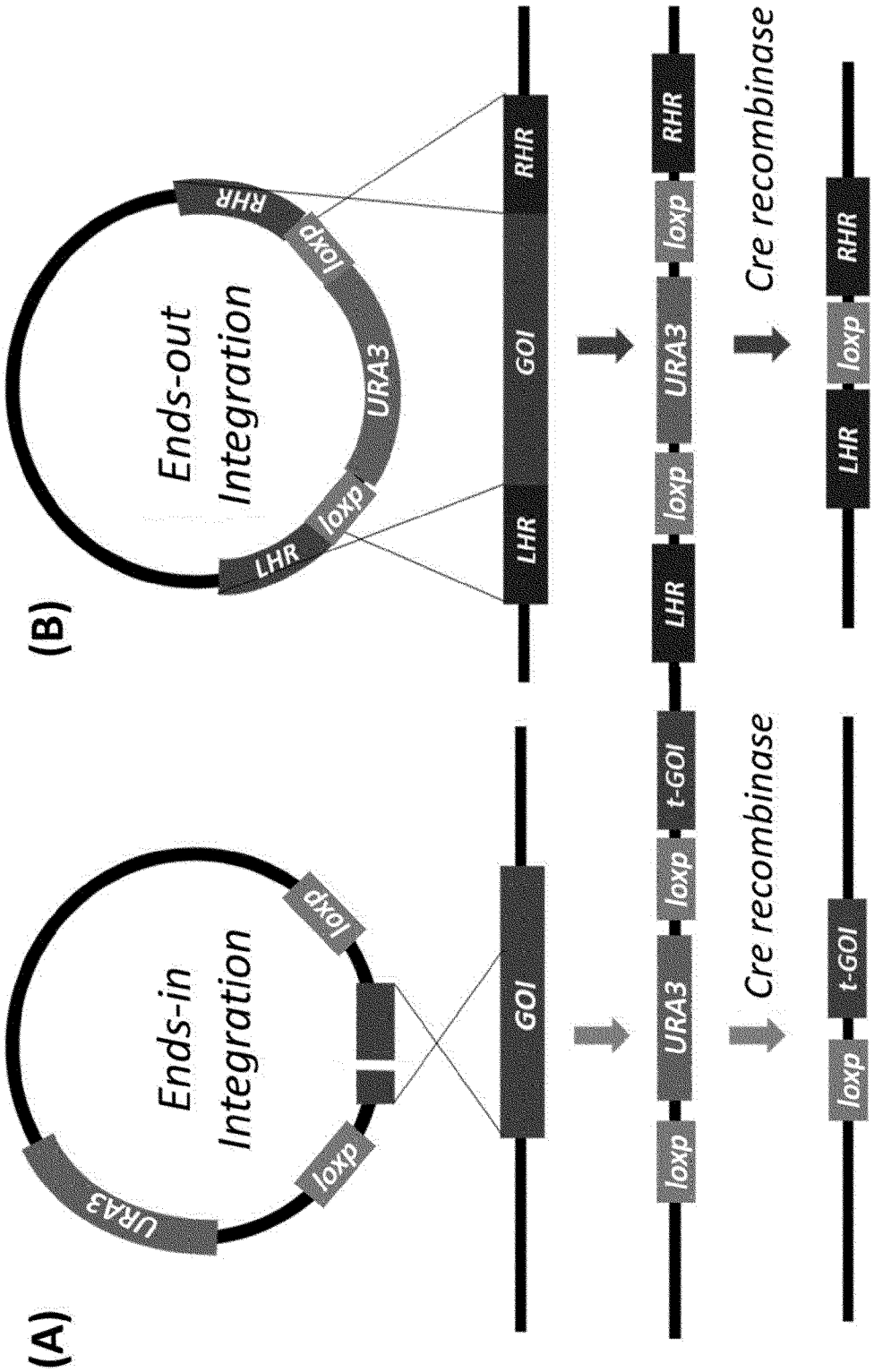
[도2]


Characterization of high-TAPS W. ciferrii
Optimization of TAPS production
Engineering to increase
TAPS production
Construction of
expression plasmid
Gene
overexpression
Ends-out
Integration
Origin
CEN/ARS
2μ Ori
ARS
Marker
KanMX
Ura3
LHR
RHR
GOI

[도3]


FOA
0.5 g/L
YPD+URA
FOA
1.0 g/L
YPD+URA
FOA
1.5 g/L
YPD+URA
Uracil (O)
FOA
1.5 g/L
Uracil (X)
Uracil (O)
FOA
1.5 g/L
Uracil (X)
Uracil (O)
FOA
1.5 g/L
Uracil (X)

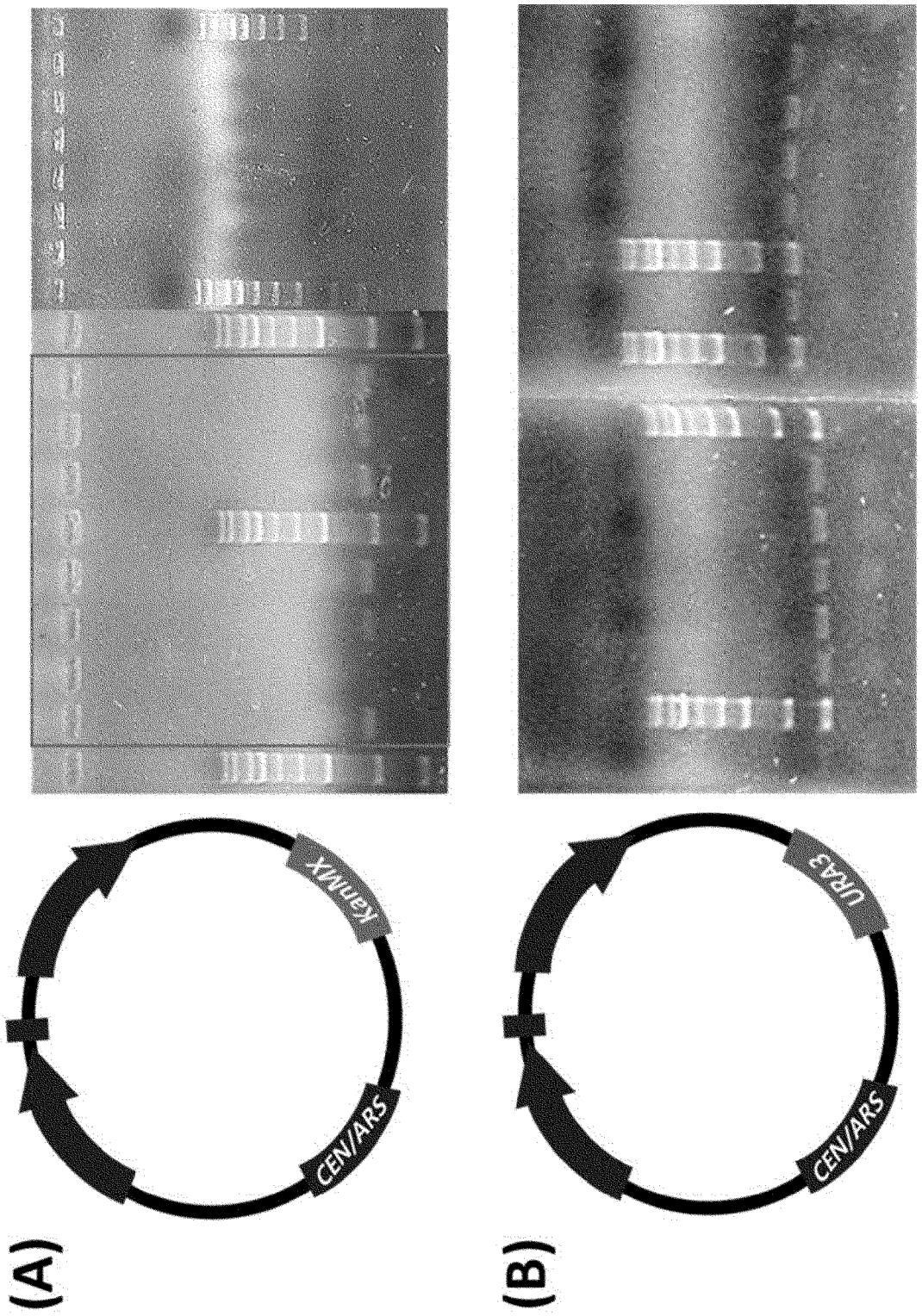
[도4]


(A)
Ends-in Integration
URA3
loxp
loxp
GOI
URA3
loxp
t-GOI
loxp
loxp
Cre recombinase
loxp
t-GOI
(B)
Ends-out Integration
RHR
loxp
URA3
loxp
LHR
RHR
GOI
LHR
RHR
loxp
URA3
loxp
LHR
Cre recombinase
RHR
loxp
LHR

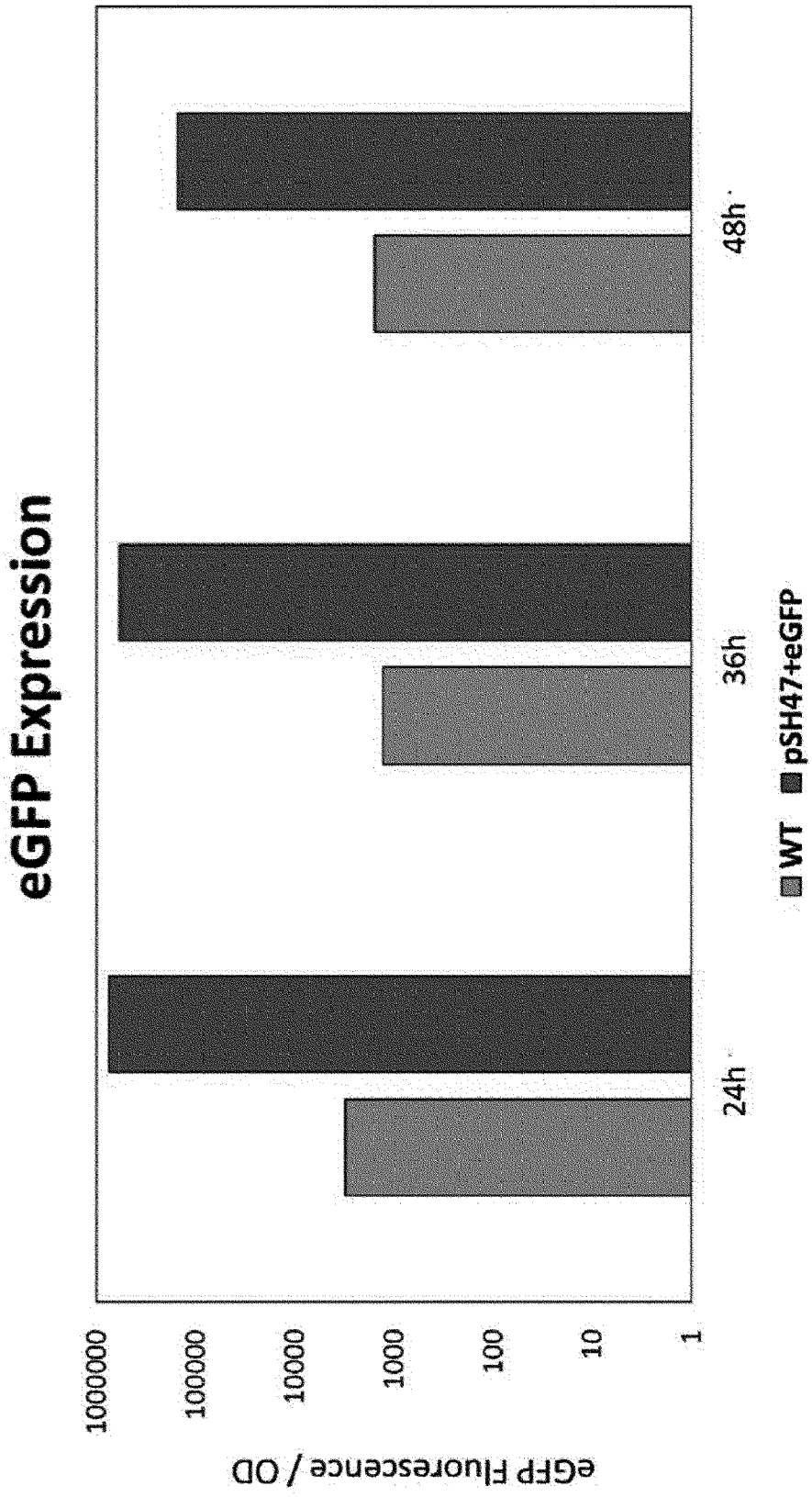
[도5]

Abbrv.	Full name	Origin	Copy number
YIp	Yeast Integrating plasmid	No origin	Genomic integration
YRp	Yeast Replicating plasmid	**ARS**	Medium (50-100)
YCp	Yeast Centromere plasmid	**CEN/ARS**	Low (1 or 2)
YEp	Yeast Episomal plasmid	**2μ**	High (15-300)

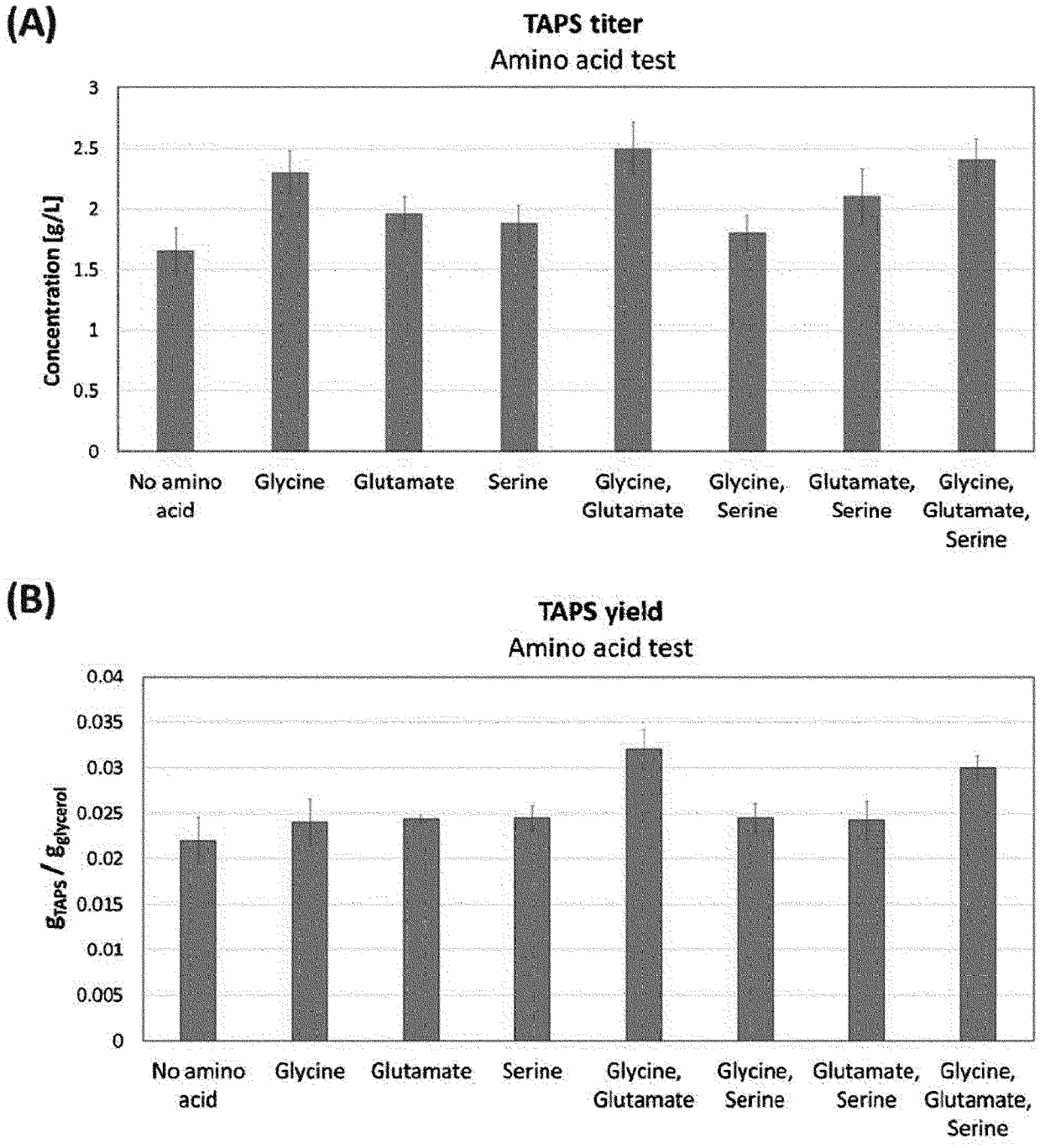
[도6]



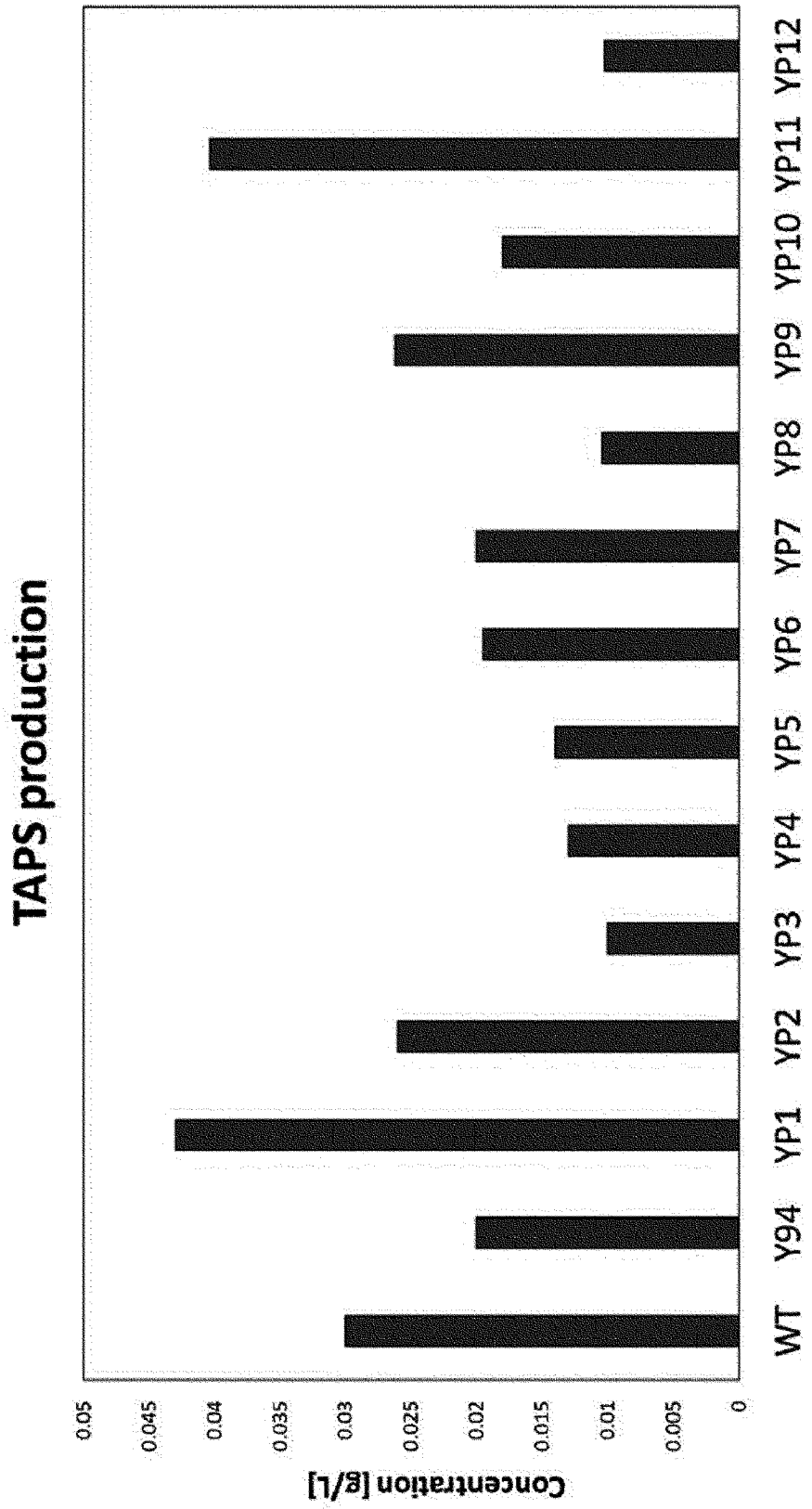
[도7]


eGFP Expression
eGFP Fluorescence / OD
1000000
100000
10000
1000
100
10
1
24h
36h
48h
WT
pSH47+eGFP

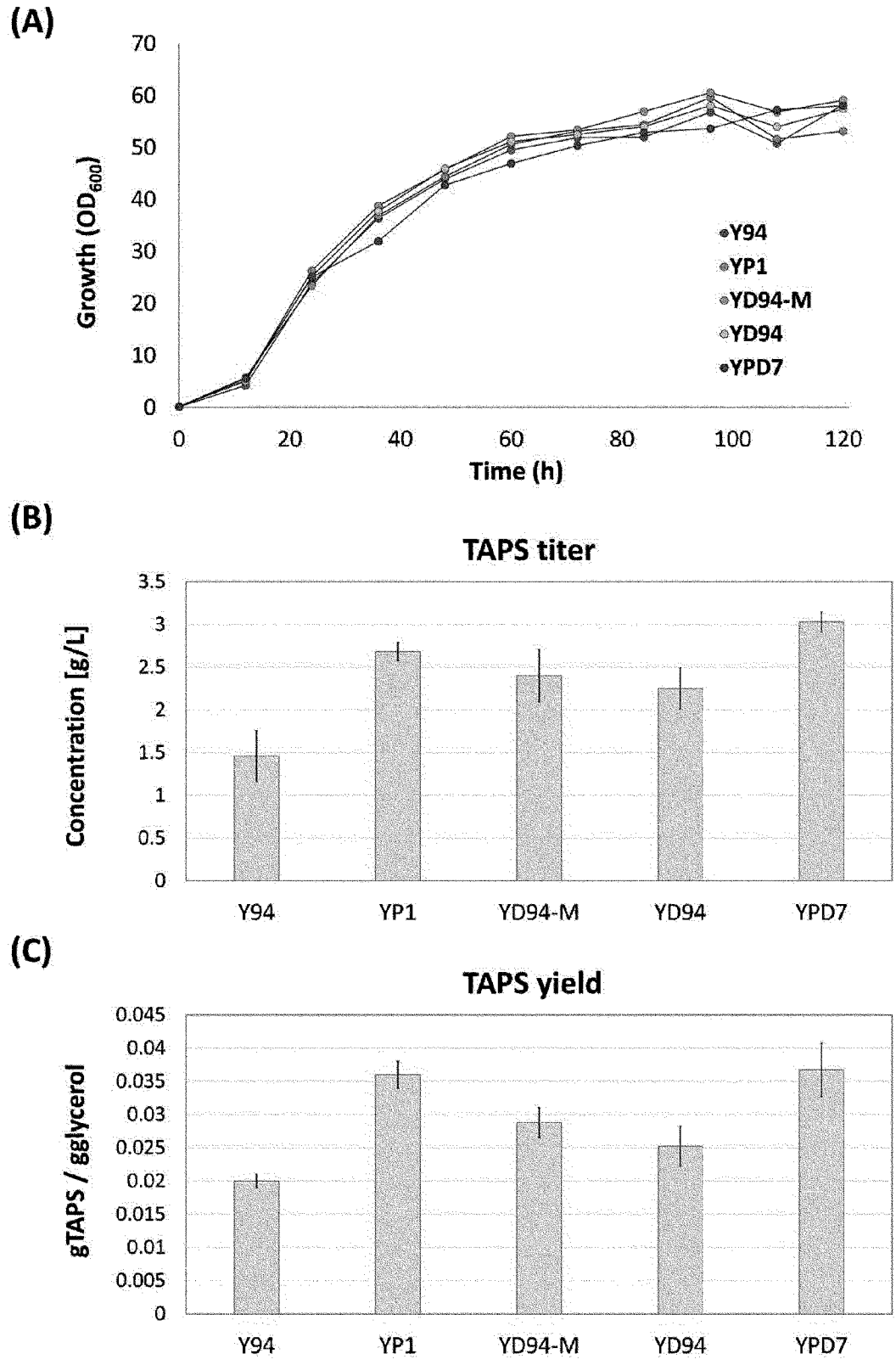
[도8]


(A)
TAPS titer
Amino acid test
Concentration [g/L]
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
No amino acid
Glycine
Glutamate
Serine
Glycine, Glutamate
Glycine, Serine
Glutamate, Serine
Glycine, Glutamate, Serine
(B)
TAPS yield
Amino acid test
g_{TAPS} / $g_{glycerol}$
0.04
0.035
0.03
0.025
0.02
0.015
0.01
0.005
0
No amino acid
Glycine
Glutamate
Serine
Glycine, Glutamate
Glycine, Serine
Glutamate, Serine
Glycine, Glutamate, Serine

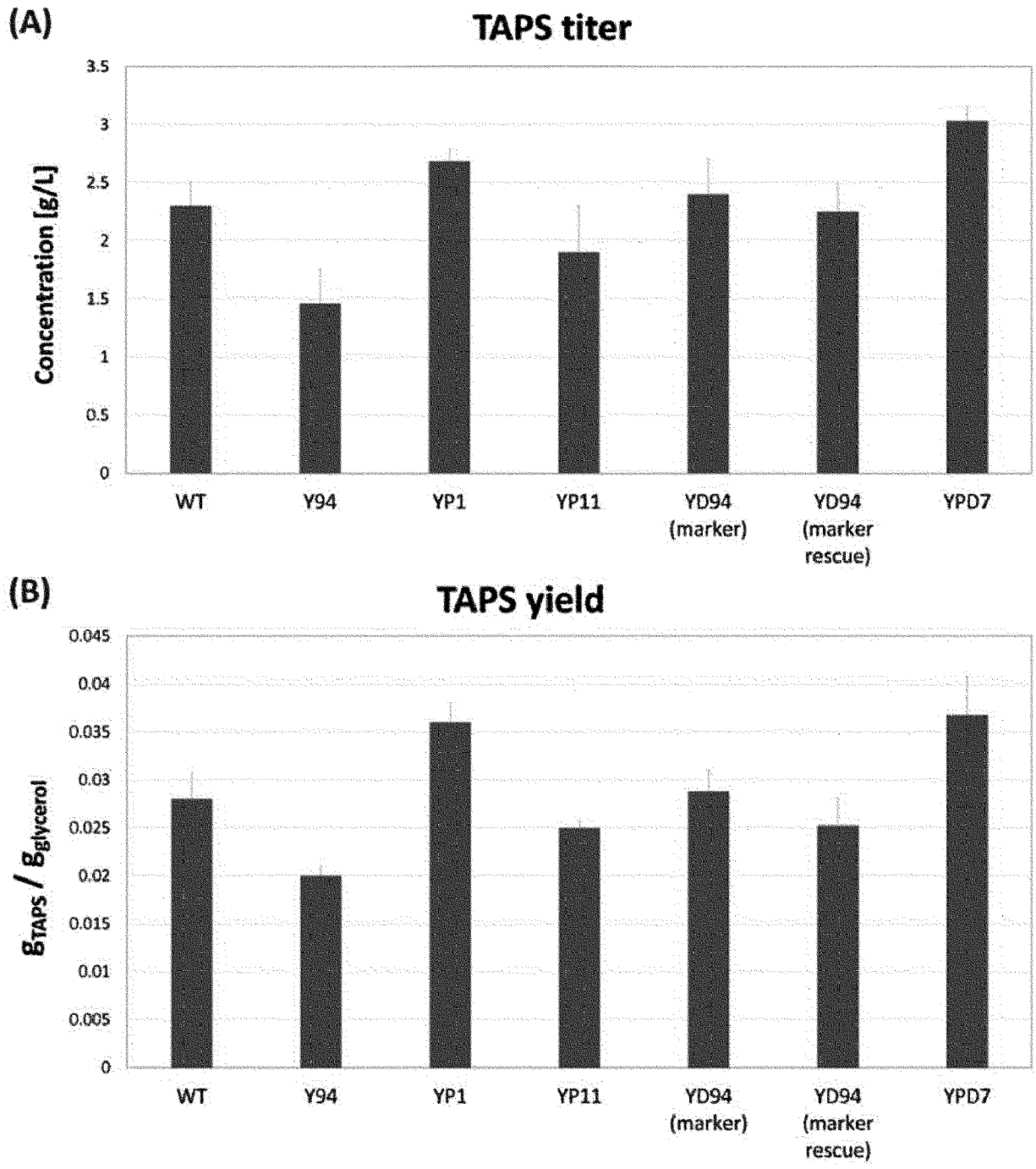
[도9]


TAPS production
Concentration [g/L]
0.05
0.045
0.04
0.035
0.03
0.025
0.02
0.015
0.01
0.005
0
WT
Y94
YP1
YP2
YP3
YP4
YP5
YP6
YP7
YP8
YP9
YP10
YP11
YP12

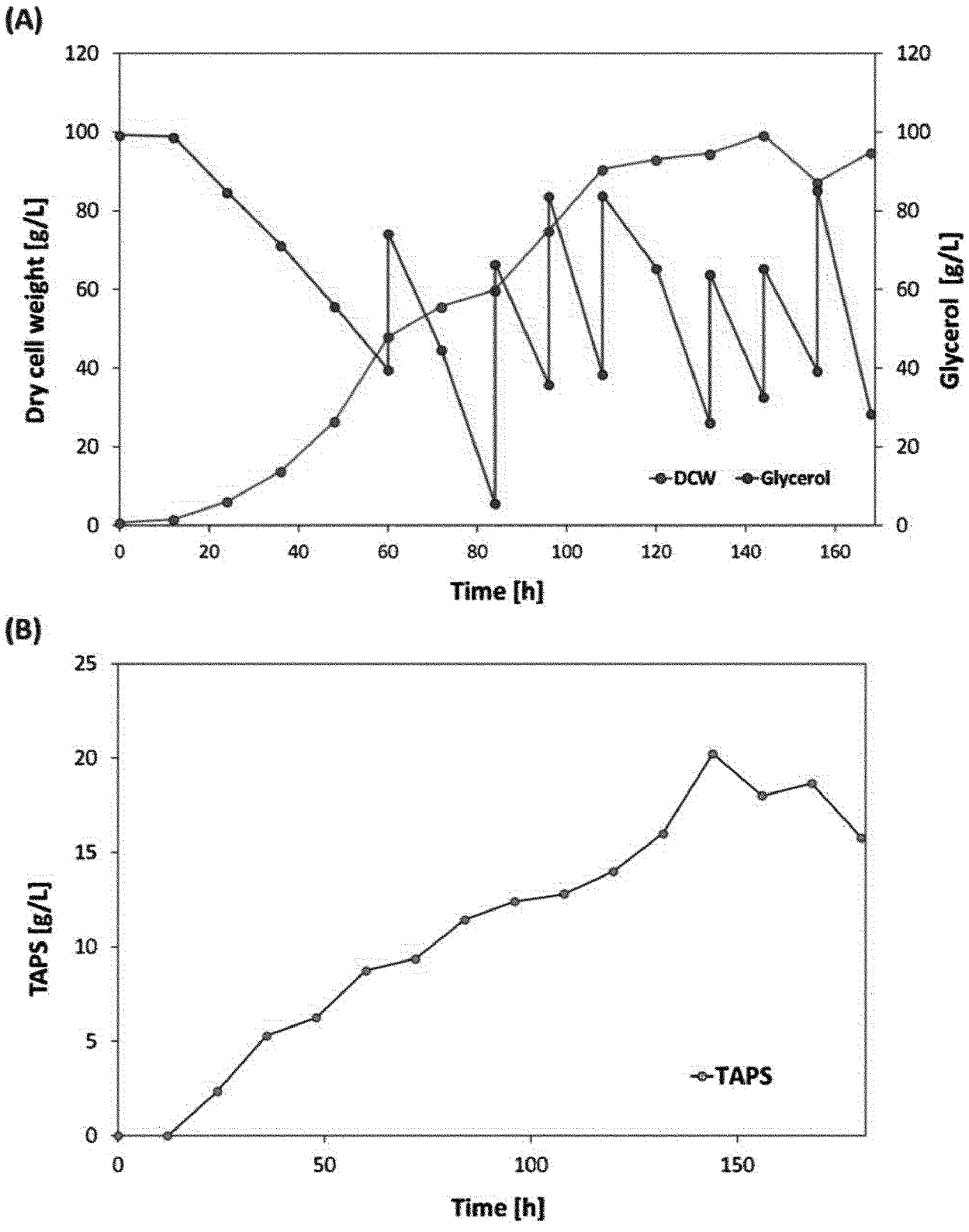
[도10]


(A)
Growth (OD_{600})
Time (h)
Y94
YP1
YD94-M
YD94
YPD7
(B)
TAPS titer
Concentration [g/L]
Y94
YP1
YD94-M
YD94
YPD7
(C)
TAPS yield
gTAPS / gglycerol
Y94
YP1
YD94-M
YD94
YPD7

[도11]


(A)
TAPS titer
Concentration [g/L]
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
WT
Y94
YP1
YP11
YD94 (marker)
YD94 (marker rescue)
YPD7
(B)
TAPS yield
g_{TAPS} / $g_{glycerol}$
0.045
0.04
0.035
0.03
0.025
0.02
0.015
0.01
0.005
0
WT
Y94
YP1
YP11
YD94 (marker)
YD94 (marker rescue)
YPD7

[도12]


(A)
Dry cell weight [g/L]
Glycerol [g/L]
Time [h]
DCW
Glycerol
(B)
TAPS [g/L]
Time [h]
TAPS

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2023/013073

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/81(2006.01)i; **C12N 1/16**(2006.01)i; **C12N 15/52**(2006.01)i; **C12N 9/10**(2006.01)i; **C12N 9/02**(2006.01)i; **C12N 9/12**(2006.01)i; **C12P 13/02**(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 15/81(2006.01); C12N 1/16(2006.01); C12N 15/10(2006.01); C12P 1/02(2006.01); C12P 13/00(2006.01); C12P 13/02(2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 위커해모마이시스 시페라이(Wickerhamomyces ciferrii), 테트라아세틸파이토스핑고신(tetraacetylphytosphingosine), CEN/ARS, 우라실 선택 마커(uracil selection marker), LCB1, LCB2, SYR2, LCB4

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2018-0179562 A1 (AJINOMOTO CO., INC. et al.) 28 June 2018 (2018-06-28) See abstract; and paragraphs [0047]-[0048], [0056]-[0058], [0060]-[0061] and [0141]-[0142].	1-9
Y		10-19
Y	US 2018-0179563 A1 (AJINOMOTO CO., INC. et al.) 28 June 2018 (2018-06-28) See paragraphs [0052], [0054] and [0058]; and claims 1, 6, 8, 10 and 13.	10-19
A	KR 10-2187234 B1 (AJOU UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 04 December 2020 (2020-12-04) See entire document.	1-19
A	KR 10-2343479 B1 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY et al.) 27 December 2021 (2021-12-27) See entire document.	1-19

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
26 December 2023	**29 December 2023**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office **Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 35208**	
Facsimile No. **+82-42-481-8578**	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2023/013073

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CHOI, Jun Young et al. Differences in the fatty acid profile, morphology, and tetraacetylphytosphingosine-forming capability between wild-type and mutant Wickerhamomyces ciferrii. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. 09 June 2021, vol. 9, article no. 662979, pp. 1-10. See entire document.	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2023/013073

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☐ forming part of the international application as filed.
   b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)),
      ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☑ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2023/013073

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	2018-0179562	A1	28 June 2018	CN	108473968	A	31 August 2018
				EP	3341476	A1	04 July 2018
				EP	3341476	B1	07 August 2019
				JP	2018-525018	A	06 September 2018
				JP	6973702	B2	01 December 2021
				US	11111511	B2	07 September 2021
				WO	2017-033464	A1	02 March 2017
US	2018-0179563	A1	28 June 2018	CN	108779480	A	09 November 2018
				EP	3341488	A1	04 July 2018
				JP	2018-525017	A	06 September 2018
				JP	6869960	B2	12 May 2021
				US	11155841	B2	26 October 2021
				WO	2017-033463	A1	02 March 2017
KR	10-2187234	B1	04 December 2020	WO	2020-251290	A1	17 December 2020
KR	10-2343479	B1	27 December 2021	CN	116157518	A	23 May 2023
				EP	4170038	A1	26 April 2023
				US	2023-0242951	A1	03 August 2023
				WO	2021-261816	A1	30 December 2021

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2023/013073

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 15/81(2006.01)i; **C12N 1/16**(2006.01)i; **C12N 15/52**(2006.01)i; **C12N 9/10**(2006.01)i; **C12N 9/02**(2006.01)i; **C12N 9/12**(2006.01)i; **C12P 13/02**(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 15/81(2006.01); C12N 1/16(2006.01); C12N 15/10(2006.01); C12P 1/02(2006.01); C12P 13/00(2006.01); C12P 13/02(2006.01)

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 위커해모마이시스 시페라이(Wickerhamomyces ciferrii), 테트라아세틸파이토스핑고신(tetraacetylphytosphingosine), CEN/ARS, 우라실 선택 마커(uracil selection marker), LCB1, LCB2, SYR2, LCB4

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	US 2018-0179562 A1 (AJINOMOTO CO., INC. 등) 2018.06.28 요약; 단락 [0047]-[0048], [0056]-[0058], [0060]-[0061], [0141]-[0142] 참조.	1-9
Y		10-19
Y	US 2018-0179563 A1 (AJINOMOTO CO., INC. 등) 2018.06.28 단락 [0052], [0054], [0058]; 청구항 1, 6, 8, 10, 13 참조.	10-19
A	KR 10-2187234 B1 (아주대학교 산학협력단) 2020.12.04 전체 문헌 참조.	1-19
A	KR 10-2343479 B1 (한국생명공학연구원 등) 2021.12.27 전체 문헌 참조.	1-19

☑ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☑ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌
"D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌
"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌
"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌
"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌
"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌
"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌
"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.
"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2023년12월26일(26.12.2023)	**2023년12월29일(29.12.2023)**

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 **+82-42-481-8578**

심사관

허주형

전화번호 **+82-42-481-5373**

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2023/013073

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	CHOI, JUN YOUNG 등, 'Differences in the fatty acid profile, morphology, and tetraacetylphytosphingosine-forming capability between wild-type and mutant Wickerhamomyces ciferrii', Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2021.06.09, 9권, article no. 662979, 페이지 1-10 전체 문헌 참조.	1-19

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2023/013073

제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

   a. ☐ 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록

   b. ☐ 국제조사를 목적으로 국제출원일 이후에 제출된 서열목록(규칙 13의3.1(a))

      ☐ 서열목록이 출원시 국제출원의 개시 범위를 넘지 않는다는 취지의 진술서를 첨부

2. ☑ 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열에 대해, 본 보고서는 WIPO 표준 ST.26을 준수하는 서열목록이 없이 유효한 조사를 할 수 있는 범위에서 작성되었습니다

3. 추가 의견:

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2023/013073

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2018-0179562 A1	2018/06/28	CN 108473968 A	2018/08/31
		EP 3341476 A1	2018/07/04
		EP 3341476 B1	2019/08/07
		JP 2018-525018 A	2018/09/06
		JP 6973702 B2	2021/12/01
		US 11111511 B2	2021/09/07
		WO 2017-033464 A1	2017/03/02
US 2018-0179563 A1	2018/06/28	CN 108779480 A	2018/11/09
		EP 3341488 A1	2018/07/04
		JP 2018-525017 A	2018/09/06
		JP 6869960 B2	2021/05/12
		US 11155841 B2	2021/10/26
		WO 2017-033463 A1	2017/03/02
KR 10-2187234 B1	2020/12/04	WO 2020-251290 A1	2020/12/17
KR 10-2343479 B1	2021/12/27	CN 116157518 A	2023/05/23
		EP 4170038 A1	2023/04/26
		US 2023-0242951 A1	2023/08/03
		WO 2021-261816 A1	2021/12/30