(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0123287
(43) 공개일자 2024년08월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/77 (2006.01) *C12N 9/10* (2006.01)
C12N 9/12 (2006.01) *C12P 13/24* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/77 (2013.01)
C12N 9/1077 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-0101027(분할)
(22) 출원일자 2024년07월30일
심사청구일자 2024년07월30일
(62) 원출원 특허 10-2021-0060669
원출원일자 2021년05월11일
심사청구일자 2021년05월11일
(30) 우선권주장
1020210047556 2021년04월13일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
한성옥
서울특별시 송파구 올림픽로 135, 225동 2802호
김민혜
경기도 안양시 동안구 관악대로388번길 25, 2층
고영진
강원도 춘천시 동내면 거두택지길26번길 9-13, 201호
(74) 대리인
위병갑

전체 청구항 수 : 총 8 항

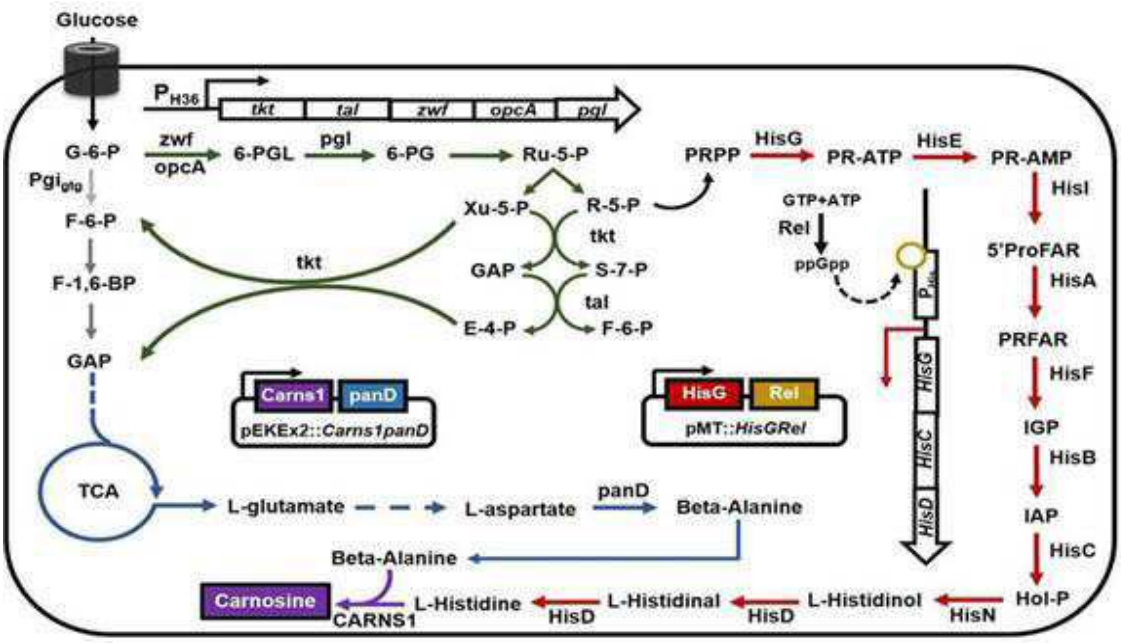
(54) 발명의 명칭 **카르노신, 히스티딘, 베타알라닌 생산용 재조합 미생물 및 이를 이용한 카르노신, 히스티딘, 베타알라닌의 생산방법**

(57) 요 약

본 발명은 카르노신, 히스티딘, 베타알라닌 생산용 재조합 미생물 및 이를 이용한 카르노신, 히스티딘, 베타알라닌의 생산방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 대사경로의 재설계를 통해 제조된 카르노신, 히스티딘, 베타알라닌 고생산 재조합 미생물, 이의 제조방법, 및 이를 이용한 카르노신, 히스티딘, 베타알라닌의 생산방법에 관한

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도1



것이다. 본 발명에 따르면 히스티딘 및 베타알라닌 생산이 가능한 미생물에서 오탄당 인산 경로 (pentose phosphate pathway) 관련 오페론 유전자의 고발현성 합성 프로모터로의 교체 및 pgi 유전자의 개시코돈 교체를 통한 오탄당 인산 경로의 강화, 각각 히스티딘 및 베타알라닌 대사경로 상의 유전자 과발현을 통해 히스티딘 및 베타알라닌의 생성 증진을 유도함으로써 히스티딘 및 베타알라닌 고생산 재조합 미생물의 개발이 가능하며, 포유류 유래 카르노신 합성효소 유전자인 Carns1을 도입함으로써 친환경적인 방법으로 종래 카르노신 합성 방법의 한계점을 극복하면서 카르노신을 고수율로 대량생산할 수 있다.

(52) CPC특허분류
C12N 9/1235 (2013.01)
C12P 13/24 (2013.01)
C12Y 204/02017 (2013.01)
C12Y 207/06005 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

오탄당 인산 경로(Pentose phosphate pathway)가 강화되고; 및

HisG (ATP phosphoribosyltransferase) 유전자 또는 Rel (GTP pyrophosphokinase) 유전자의 과발현으로 히스티딘(L-Histidine) 생합성 경로가 강화된, 히스티딘 생산 재조합 미생물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 오탄당 인산 경로의 강화는 오페론 형태 유전자의 프로모터를 고발현성 합성 프로모터인 H36으로 교체한 것인, 재조합 미생물.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 오탄당 인산 경로의 강화는 pgi (glucose-6-phosphate isomerase) 유전자 개시코돈을 ATG에서 GTG로의 변경하는 것인, 재조합 미생물.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 HisG 유전자는 서열번호 13의 염기서열을 포함하는 것이고;

상기 Rel 유전자는 서열번호 14의 염기서열을 포함하는 것인; 재조합 미생물.

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 미생물은 코리네박테리움 글루타믹쿰 (*Corynebacterium glutamicum*)인 것인, 재조합 미생물.

청구항 6

제 5항에 있어서,

상기 코리네박테리움 글루타믹쿰은 글루탐산(glutamic acid) 생성능을 가지는 것인, 재조합 미생물.

청구항 7

글루탐산 생성능을 가지는 미생물에서, 오탄당 인산 경로를 강화시키는 단계;

상기 오탄당 인산 경로가 강화된 미생물에 HisG (ATP phosphoribosyltransferase) 유전자를 과발현 시키는 단계; 및

상기 오탄당 인산 경로 및 HisG 유전자가 과발현된 미생물에, Rel (GTP pyrophosphokinase) 유전자를 과발현시키는 단계;를 포함하는, 히스티딘 생합성 경로가 강화된, 히스티딘 생산 재조합 미생물의 제조방법.

청구항 8

제 1항의 히스티딘 생산 재조합 미생물을 배양하는 단계를 포함하는, 히스티딘(L-Histidine) 생산 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 카르노신, 히스티딘, 베타알라닌 생산용 재조합 미생물 및 이를 이용한 카르노신, 히스티딘, 베타알라닌의 생산방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 대사경로의 재설계를 통해 제조된 카르노신, 히스티딘, 베타알라닌 고생산 재조합 미생물, 이의 제조방법, 및 이를 이용한 카르노신, 히스티딘, 베타알라닌의 생산방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 히스티딘 (L-Histidine)은 20개의 단백질성 아미노산 중 하나로서, 필수 아미노산이므로 인체에서 동화작용으로 합성되지 않아 인간과 같은 동물들은 반드시 이를 포함하는 단백질을 섭취해야 한다. 따라서 히스티딘의 생합성은 대장균을 포함한 원핵생물에서 많이 연구되어 왔는데, 히스티딘의 생합성은 8개 유전자의 단백질 (효소) 산물을 이용한 10단계의 과정을 거쳐 일어나며, 포스포리보실 피로인산 (phosphoribosyl pyrophosphate, PRPP)을 시작 물질로 하여 최종 히스티딘이 합성된다. 히스티딘의 생합성은 이 작용을 시작하는 ATP-포스포리보실전이효소 (ATP phosphoribosyltransferase)가 ATP를 필요로하기 때문에 에너지가 소모된다. 또한 상기 전이효소는 속도 결정 효소 (rate-determining enzyme)이므로 피드백에 의해 억제되어 히스티딘이 존재할 때 활성이 억제된다.

[0003] 히스티딘은 생물학적 활성을 가지는 다른 아민으로 변환되기도 하는데, 구체적으로 일종의 면역 자극제로써 염증 반응에서 중요한 역할을 하는 히스타민 (Histamine)의 전구물질이다. 히스티딘 암모니아-절단효소는 히스티딘을 우로카닌산과 암모니아로 분해하는데, 이 효소의 결함은 매우 희귀한 대사장애인 히스티딘혈증을 유발한다고 알려져 있다. 또한, 히스티딘은 3-메틸 히스티딘으로 전환될 수 있는데, 이는 골격근 손상을 나타내는 생물지표가 되며 특정 메틸기 전달 효소가 작용한다. 더욱이, 히스티딘은 골격근에서 발견되는 디펩타이드인 카르노신 (Carnosine)의 생합성에서 전구체로써 기능하는 것으로 알려져 있다.

[0004] 베타알라닌 (Beta-alanine, β-alanine)은 β 탄소에 아미노기가 결합하고 있는 자연적으로 생성되는 β-아미노산으로, IUPAC 명명법으로는 3-아미노프로판산 (3-aminopropanoic acid)이라고 한다. 베타알라닌은 디하이드로우라실 (dihydrouracil)과 카르노신의 분해에 의해 생성되며, 베타알라닌 에틸에스터 (β-alanine ethyl ester)는 체내에서 가수분해 되어 베타알라닌을 형성한다. 또한 산업적으로는 암모니아와 β-프로피오락톤 (β-Propiolactone)의 반응을 통해 생산된다.

[0005] 베타알라닌은 주요 단백질이나 효소에서 발견되지 않으며, 자연적으로 생성되는 펩타이드인 카르노신과 안세린 (anserine)의 구성 성분이다. 또한, 조효소 A의 구성 요소인 판토텐산 (비타민 B5)의 구성 성분으로 알려져 있고, 정상 상태에서는 아세트산으로 대사된다. 베타알라닌은 카르노신의 속도 제한 전구체로, 즉 카르노신의 수준이 히스티딘이 아닌 이용 가능한 베타알라닌의 양에 의해 제한된다. 따라서 베타알라닌 보충제는 근육에서 카르노신의 농도를 증가시키고 운동선수들의 피로를 감소시키며, 전체 근육 활동을 증가시키는 것으로 나타났다. 또한 단순히 카르노신만을 보충하는 것은 구강으로 섭취했을 때 소화 과정에서 카르노신이 히스티딘과 베타알라닌으로 분해되기 때문에 베타알라닌만을 보충하는 것보다 효과적이지는 않다고 보고되어 있다. 이에 카르노신을 섭취할 경우 무게를 기준으로 할 때 복용량의 약 40%만을 베타알라닌으로 이용할 수 있다.

[0006] 상기 히스티딘과 베타알라닌의 축합반응으로 생성되는 디펩티드 (dipeptide)인 카르노신 (Carnosine)은 근육 및 뇌에서 다량으로 발견되며, 다양한 연구를 통해 이의 항산화, 항-라디칼, 소염 활성이 보고되었다. 또한 카르노신은 항당화제로 작용하여 진행된 당화 최종산물, 예컨대 당뇨병, 죽상경화증, 만성 신부전 및 알츠하이머병과 같은 많은 퇴행성 질환의 발생 또는 악화에 요인이 될 수 있는 물질의 형성 속도를 감소시키고, 여러 전임상 연구에서 신경보호효과가 입증되었으며, 신체능력 향상 효능 등이 알려져 최근에는 식품, 의약, 사료 산업 등 다양한 분야에서 이의 필요성이 증가하여 이로 인한 수요 또한 증가하는 추세이다.

[0007] 이에 따라 종래에는 산업적으로 카르노신을 생산하기 위해 무수프탈산 (Phthalic Anhydride), 하이드라진 (hydrazine)으로부터 화학적인 방법으로 생산하거나 또는 베타-아미노펩티다아제 (β-aminopeptidase)를 이용해 효소적으로 카르노신을 생산하는 방법이 이용되어 왔다. 그러나 상기와 같은 방법 중 식품, 효소기반 합성법의 경우에는 동물유래 원료의 사용으로 인해 항생제, 호르몬, 아미노산과 같은 불순물이 함유될 문제가 있으며, 화학적 방법의 경우에는 화학폐기물 및 유기용매로 인한 환경오염 등의 문제가 있다. 따라서 상기와 같은 종래의 카르노신 합성방법들을 대체할 수 있는 친환경적인 카르노신 합성기술의 개발이 절실히 필요한 실정이다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) Adv Clin Exp Med. Sep-Oct 2013;22(5):739-44.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 이에, 본 발명자들은 상기와 같은 종래의 한계점을 극복할 수 있는 친환경적 카르노신 생산기술을 개발하기 위해, FDA에서 인증된 그라스 (Generally Recognized as Safe, GRAS) 균주인 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*)에서 대사공학적 기술을 이용해 카르노신의 생산을 위한 관련 대사경로를 재설계하여 카르노신, 히스티딘 및 베타알라닌을 높은 수준으로 생산할 수 있는 신규한 재조합 균주를 각각 개발함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0010] 이에, 본 발명은 카르노신 고생산 재조합 미생물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0011] 또한, 본 발명은 히스티딘 고생산 재조합 미생물을 제공하는 것을 다른 목적으로 한다.

[0012] 또한, 본 발명은 베타알라닌 고생산 재조합 미생물을 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 카르노신 고생산 재조합 미생물의 제조방법을 제공하는 것을 다른 목적으로 한다.

[0014] 또한, 본 발명은 상기 카르노신 고생산 재조합 미생물을 배양하는 단계를 포함하는 카르노신의 생산방법을 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

[0015] 또한, 본 발명은 상기 히스티딘 고생산 재조합 미생물을 배양하는 단계를 포함하는 히스티딘의 생산방법을 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

[0016] 또한, 본 발명은 상기 베타알라닌 고생산 재조합 미생물을 배양하는 단계를 포함하는 베타알라닌의 생산방법을 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

[0018] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0019] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 오탄당 인산 경로 (Pentose phosphate pathway)가 강화되고; 및 포유류 유래 Carns1 (Carnosine synthase 1) 유전자가 도입된, 카르노신 고생산 재조합 미생물을 제공한다.

[0020] 본 발명의 일구현예로, 상기 재조합 미생물은 히스티딘 (L-Histidine) 생합성 경로 및 베타알라닌 (Beta-alanine) 생합성 경로 중 하나 이상의 경로가 추가적으로 강화된 것일 수 있다.

[0021] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 Carns1 유전자는 서열번호 22로 표시되는 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0022] 또한, 본 발명은 오탄당 인산 경로 (Pentose phosphate pathway) 및 히스티딘 (L-Histidine) 생합성 경로 중 하나 이상의 경로가 강화된, 히스티딘 고생산 재조합 미생물을 제공한다.

[0023] 또한, 본 발명은 오탄당 인산 경로 (Pentose phosphate pathway) 및 베타알라닌 (Beta-alanine) 생합성 경로 중 하나 이상의 경로가 강화된, 베타알라닌 고생산 재조합 미생물을 제공한다.

[0024] 본 발명의 일구현예로, 상기 오탄당 인산 경로의 강화는 오페론 형태 유전자의 프로모터를 고발현성 합성 프로모터로 교체, pgi (glucose-6-phosphate isomerase) 유전자 개시코돈의 변경, 또는 이들의 조합에 의해 이루어지는 것일 수 있다.

[0025] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 고발현성 합성 프로모터는 H36인 것일 수 있다.

[0026] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 pgi 유전자의 개시코돈은 ATG에서 GTG로 변경된 것일 수 있다.

[0027] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 히스티딘 생합성 경로의 강화는 HisG (ATP phosphoribosyltransferase) 유전자의 과발현, Rel (GTP pyrophosphokinase) 유전자의 과발현, 또는 이들의 조합에 의해 이루어지는 것일 수 있다.

[0028] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 HisG 및 Rel 유전자는 각각 서열번호 13 및 서열번호 14로 표시되는 염기서열로 이루어지는 것일 수 있다.

[0029] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 베타알라닌 생합성 경로의 강화는 PanD (Aspartate 1-decarboxylase) 유전자의 과발현에 의해 이루어지는 것일 수 있다.

[0030] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 PanD 유전자는 서열번호 19로 표시되는 염기서열로 이루어지는 것일 수 있다.

[0031] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 재조합 미생물은 코리네박테리움 글루타믹쿰 (*Corynebacterium glutamicum*)에서 유래된 것일 수 있다.

[0032] 또한, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는, 상기 카르노신 고생산 재조합 미생물의 제조방법을 제공한다.

[0033] (a) 글루탐산 (glutamic acid) 생성능을 가지는 미생물에서, 오페론 형태 유전자의 프로모터를 고발현성 합성 프로모터로 교체, pgi (glucose-6-phosphate isomerase) 유전자 개시코돈의 변경, 또는 이들의 조합을 통해 오탄당 인산 경로 (Pentose phosphate pathway)를 강화시키는 단계; 및

[0034] (b) 포유류 유래 Carns1 (Carnosine synthase 1) 유전자를 도입하는 단계.

[0035] 본 발명의 일구현예로, 상기 제조방법은 HisG (ATP phosphoribosyltransferase) 및 Rel (GTP pyrophosphokinase) 유전자의 과발현, PanD (Aspartate 1-decarboxylase) 유전자의 과발현, 또는 이들의 조합을 추가적으로 포함할 수 있다.

[0036] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 글루탐산 (glutamic acid) 생성능을 가지는 미생물은 코리네박테리움 글루타믹쿰 (*Corynebacterium glutamicum*)일 수 있다.

[0037] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 단계 (a)에서 고발현성 합성 프로모터는 H36인 것일 수 있다.

[0038] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 단계 (a)에서 pgi 유전자의 개시코돈은 ATG에서 GTG로 변경되는 것일 수 있다.

[0039] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 포유류 유래 Carns1 유전자는 생쥐 (*Mus musculus*)에서 유래된 것일 수 있다.

[0040] 또한, 본 발명은 상기 카르노신 고생산 재조합 미생물을 배양하는 단계를 포함하는, 카르노신 (Carnosine) 생산 방법을 제공한다.

[0041] 본 발명의 일구현예로, 상기 배양은 유가 배양식 발효 (fed-batch fermentation)를 통해 이루어질 수 있다.

[0042] 또한, 본 발명은 상기 히스티딘 고생산 재조합 미생물을 배양하는 단계를 포함하는, 히스티딘 (L-Histidine) 생산방법을 제공한다.

[0043] 또한, 본 발명은 베타알라닌 고생산 재조합 미생물을 배양하는 단계를 포함하는, 베타알라닌 (Beta-alanine) 생산방법을 제공한다.

발명의 효과

[0044] 본 발명에 따르면 히스티딘 및 베타알라닌 생산이 가능한 미생물에서 오탄당 인산 경로 (pentose phosphate pathway) 관련 오페론 유전자의 고발현성 합성 프로모터로의 교체 및 pgi 유전자의 개시코돈 교체를 통한 오탄당 인산 경로의 강화, 각각 히스티딘 및 베타알라닌 대사경로 상의 유전자 과발현을 통해 히스티딘 및 베타알라닌의 생성 증진을 유도함으로써 히스티딘 및 베타알라닌 고생산 재조합 미생물의 개발이 가능하며, 포유류 유래 카르노신 합성효소 유전자인 Carns1을 도입함으로써 친환경적인 방법으로 종래 카르노신 합성 방법의 한계점을 극복하면서 카르노신을 고수율로 대량생산할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0045] 도 1은 본 발명에 따른 재조합 미생물에서 지속 가능한 카르노신의 생산을 위한 생합성 경로를 도시한 것으로서, 붉은색 경로는 강화된 히스티딘 생합성 경로, 초록색은 강화된 오탄당 인산 경로, 파란색은 강화된 베타알라닌 생합성 경로 및 보라색은 새롭게 도입된 포유류 유래 카르노신 합성 경로를 나타낸 것이다.

도 2는 코리네박테리움 글루타믹쿰 genomic DNA의 tkt 프로모터를 합성 프로모터인 H36으로 교체하기 위해 제작한 pK19*mobsacB LA-H36-RA* 벡터의 구조를 나타낸 것이다.

도 3은 코리네박테리움 글루타믹쿰 genomic DNA에서 pgi 유전자의 개시코돈을 gtg로 교체하기 위해 제작한 pJYS2::*crRNA-pgi* 벡터의 구조를 나타낸 것이다.

도 4는 코리네박테리움 글루타믹쿰에서 각각 히스티딘 생합성 경로 강화, 베타알라닌 생합성 경로의 강화 및/또는 카르노신 합성 경로의 도입을 위해 제작한 pMT-*tac*::*HisG*, pMT-*tac*::*Rel*, pMT-*tac*::*HisGRel*, pEKEx2::*Carns1* 및 pEKEx2::*Carns1panD* 재조합 벡터의 구조를 나타낸 것이다.

도 5는 대조군 코리네박테리움 글루타믹쿰 (Car0), 대조군 균주에 *Carns1* 유전자를 도입하여 카르노신 합성 경로를 도입한 재조합 균주 (Car1), 코리네박테리움 글루타믹쿰의 tkt 프로모터를 합성 프로모터인 H36으로 교체하여 오탄당 인산 경로를 강화시킨 균주 (Car2) 및 오탄당 인산 경로를 강화시키고 카르노신 합성 경로를 도입한 재조합 균주 (Car3)에서 각각 히스티딘 및 카르노신 생산량을 측정한 결과이다.

도 6은 대조군 코리네박테리움 글루타믹쿰 (Car4)에 HisG, Rel, 또는 HisG 및 Rel을 과발현하여 히스티딘 생합성 경로를 강화시킨 재조합 균주 (각각 Car5, Car6, Car7), 및 코리네박테리움 글루타믹쿰의 tkt 프로모터를 고발현성 합성 프로모터인 H36으로 교체하여 오탄당 인산 경로를 강화시킨 재조합 균주 (Car8)에 HisG, Rel, 또는 HisG 및 Rel을 과발현시킨 재조합 균주 (각각 Car9, Car10, Car11)의 배양기간 동안 성장곡선 및 히스티딘 생산성을 측정하여 나타낸 것이다.

도 7은 오탄당 인산 경로가 강화되고 *Carns1* 유전자를 도입하여 카르노신 합성 경로가 도입된 재조합 균주 (Car12); 오탄당 인산 경로 및 베타알라닌 생합성 경로가 강화되고 카르노신 합성 경로가 도입된 재조합 균주 (Car13); 오탄당 인산 경로 및 히스티딘 생합성 경로가 강화되고 카르노신 합성 경로가 도입된 재조합 균주 (Car14); 및 오탄당 인산 경로, 베타알라닌 및 히스티딘 생합성 경로가 강화되고 카르노신 합성 경로가 도입된 재조합 균주 (Car15)를 배양한 후 각 균주에서 히스티딘, 베타알라닌 및 카르노신 생산량을 측정한 결과이다.

도 8은 오탄당 인산 경로, 베타알라닌 및 히스티딘 생합성 경로가 강화되고 카르노신 합성 경로가 도입된 재조합 균주 (Car15)를 유가식 발효공정으로 배양하면서 세포 성장 및 글루코오스와 함께 카르노신 (L-Carnosine) 생산량을 측정한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0046] 본 발명자들은 대사공학적 기술을 이용한 대사경로의 재설계를 통해 오탄당 인산 경로 (Pentose phosphate phathway), 히스티딘 (L-Histidine) 생합성 경로 및 베타-알라닌 (Beta-alanine) 생합성 경로의 강화, 카르노신 (Carnosine) 합성 경로를 도입하여 카르노신, 히스티딘, 베타알라닌의 생산능이 향상된 재조합 미생물을 개발함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0047] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0048] 이에, 본 발명은 오탄당 인산 경로 (Pentose phosphate pathway)가 강화되고; 및

[0049] 포유류 유래 Carns1 (Carnosine synthase 1) 유전자가 도입된, 카르노신 고생산 재조합 미생물을 제공한다.

[0050] 본 발명에 있어서, 상기 카르노신 고생산 재조합 미생물은 히스티딘 (Histidine) 생합성 경로 및 베타알라닌 (Beta-alanine) 생합성 경로 중 하나 이상의 경로가 추가적으로 강화된 것일 수 있다.

[0051] 본 발명에서, 상기 Carns1 (Carnosine synthase 1) 유전자는 카르노신 합성 경로의 도입을 위해 상기 재조합 미생물에 도입된 것으로, 본 발명에 따른 카르노신 고생산 재조합 미생물은 도입된 *Carns1* 유전자의 발현으로 생성된 카르노신 합성효소의 작용으로, 세포내에서 생합성된 베타알라닌과 L-히스티딘으로부터 카르노신을 지속적으로 생산할 수 있다.

[0052] 본 발명에 있어서, 상기 포유류 유래 Carns1 유전자는 바람직하게는 생쥐 (*Mus musculus*)에서 유래된 것일 수 있고, 서열번호 22로 표시되는 염기서열로 이루어진 것일 수 있다. 이때, 상기 유전자는 서열번호 22로 표시되는 염기서열과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95%, 96%,

97%, 98%, 99% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 포함할 수 있다.

[0053] 본 발명의 일실시예에서는, 오탄당 인산 경로를 강화시키고 Carns1 유전자를 도입한 코리네박테리움 재조합 균주에서 오탄당 인산 경로 강화 여부에 따른 카르노신 생산량 변화를 비교하였다. 그 결과, 상기 경로를 강화시키지 않은 대조군 균주 (Car1)에 비해 오페론 유전자의 프로모터가 고발현성 합성 프로모터로 교체된 균주 (Car2)에서 카르노신 생산량이 약 2배 증가하였다. 추가적으로 상기 Car2 균주에 pgi 유전자의 개시코돈을 변경시켜 오탄당 인산 경로를 더욱 강화시킨 Car12 균주에서는 대조군 대비 카르노신 생산량이 약 7배 증가한 것을 확인하였다(실시예 5 참조).

[0054] 본 발명의 다른 실시예에서는, 상기 오탄당 인산 경로를 강화시킨 코리네박테리움 재조합 균주에 추가적으로 베타알라닌 및/또는 히스티딘 생합성 경로를 강화시킨 후 카르노신 생산량 변화를 측정하였다. 그 결과, 베타알라닌 생합성 경로를 추가로 강화시킨 Car13 균주에서는 오탄당 인산 경로만을 강화시킨 균주에 비하여 카르노신 생산량이 약 7.2배, 히스티딘 생합성 경로를 추가로 강화시킨 Car14 균주에서는 약 2.4배, 베타알라닌 및 히스티딘 생합성 경로를 함께 강화시킨 Car15 균주에서는 약 10.5배로 카르노신이 가장 높은 수준으로 증가한 것을 확인하였다(실시예 7 참조).

[0055] 이에 본 발명의 카르노신 고생산 재조합 미생물은 구체적으로 하기에 기재된 범위의 재조합 미생물을 포함할 수 있다.

[0056] i) 오탄당 인산 경로가 강화되고, Carns1 유전자가 도입된, 재조합 미생물;

[0057] ii) 오탄당 인산 경로 및 베타알라닌 생합성 경로가 강화되고, Carns1 유전자가 도입된, 재조합 미생물;

[0058] iii) 오탄당 인산 경로 및 히스티딘 생합성 경로가 강화되고, Carns1 유전자가 도입된, 재조합 미생물; 및

[0059] iv) 오탄당 인산 경로, 베타알라닌 및 히스티딘 생합성 경로가 강화되고, Carns1 유전자가 도입된, 재조합 미생물.

[0060] 본 발명에서, 카르노신 고생산 재조합 미생물은 가장 바람직하게는 오탄당 인산 경로, 베타알라닌 및 히스티딘 생합성 경로가 강화되고, Carns1 유전자가 도입된 것일 수 있다.

[0061] 또한, 본 발명은 오탄당 인산 경로 (Pentose phosphate pathway) 및 히스티딘 (L-Histidine) 생합성 경로 중 하나 이상의 경로가 강화된, 히스티딘 고생산 재조합 미생물을 제공한다.

[0062] 본 발명의 일실시예에서는, 코리네박테리움 글루타믹쿰의 히스티딘 생합성 경로를 강화시키기 위해 HisG 및/또는 Rel 유전자를 재조합 벡터를 이용하여 과발현시킨 결과 상기 유전자를 동시에 과발현시킨 균주 (Car7)에서 히스티딘의 생산이 증가하였으며, 오탄당 인산 경로를 단독으로 또는 히스티딘 생합성 경로와 함께 강화시킨 재조합 균주 (Car8 내지 Car11)에서 히스티딘 생산이 높은 수준으로 증가된 것을 알 수 있었다 (실시예 6 참조).

[0063] 또한, 본 발명은 오탄당 인산 경로 (Pentose phosphate pathway) 및 베타알라닌 (Beta-alanine) 생합성 경로 중 하나 이상의 경로가 강화된, 베타알라닌 고생산 재조합 미생물을 제공한다.

[0064] 본 발명의 일실시예에서는, 오탄당 인산 경로가 강화되고 Carns1 유전자가 도입된 Car12 균주에 추가적으로 PanD 유전자를 재조합 벡터를 이용해 과발현하여 베타알라닌 생합성 경로를 강화시킨 결과, Car13 균주에서 베타알라닌의 생산량이 약 4배 이상 증가된 것을 확인하였다 (실시예 7 참조).

[0065] 따라서 본 발명의 일 실시양태에서, 상기 재조합 미생물은 추가적으로 포유류 유래 Carns1 유전자가 도입된 것일 수 있다.

[0066] 본 발명에서, 상기 재조합 미생물은 바람직하게 코리네박테리움 글루타믹쿰(*Corynebacterium glutamicum*) 유래일 수 있다.

[0067] 상기 오탄당 인산 경로 (pentose phosphate pathway, PPP)는 포스포글루콘산 경로 (phosphogluconate pathway) 또는 육탄당 일인산 경로 (hexose monophosphate pathway)라고도 하며, 포도당 6-인산 (G-6-P)을 오탄당 인산으로 산화시키는 대사 경로이다. 오탄당 인산 경로는 NADPH와 오탄당 유도체인 리보스 5-인산 (R-5-P)을 생성하는데, 리보스 5-인산은 뉴클레오타이드의 합성을 위한 전구물질이다. 오탄당 인산 경로는 포도당의 산화를 포함하고 있지만, 오탄당 인산 경로의 주된 역할은 이화작용 보다는 동화작용에 있다.

[0068] 본 발명에 있어서, 상기 오탄당 인산 경로의 강화는 i) 오페론으로 구성된 유전자 즉, tkt (transaldolase), tal (transaldolase), zwf (glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase), opcA (glucose-6-phosphate 1-

dehydrogenase) 및 pgl (6-phosphogluconolactonase)의 과발현을 위해 기존 프로모터를 고발현성 합성 프로모터로 교체, ii) pgi (glucose-6-phosphate isomerase) 유전자 개시코돈의 변경, 또는 이들의 조합에 의해 이루어질 수 있다.

[0069] 본 발명에 있어서, 상기 고발현성 합성 프로모터는 서열번호 3으로 표시되는 염기서열로 이루어진 H36일 수 있으나, 상기 유전자들의 발현수준을 높일 수 있는 합성 프로모터라면 이것으로 제한되지 않는다.

[0070] 본 발명에 있어서, 상기 pgi 유전자 개시코돈은 바람직하게 ATG에서 GTG로 변경되는 것일 수 있다.

[0071] 본 발명에서, 상기 히스티딘 생합성 경로의 강화는 HisG (ATP phosphoribosyltransferase) 유전자의 과발현, Rel (GTP pyrophosphokinase) 유전자의 과발현, 또는 이들의 조합에 의해 이루어지는 것일 수 있다.

[0072] 본 발명에서, 상기 베타알라닌 생합성 경로의 강화는 PanD (Aspartate 1-decarboxylase) 유전자의 과발현에 의해 이루어지는 것일 수 있다.

[0073] 상기 HisG, Rel 및 PanD 유전자는 각각 서열번호 13, 서열번호 14 및 서열번호 19로 표시되는 염기서열로 이루어진 것일 수 있다. 이때, 상기 유전자는 서열번호 13, 서열번호 14 및 서열번호 19로 표시되는 염기서열과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 포함할 수 있다.

[0074] 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는, 상기 카르노신 고생산 재조합 미생물의 제조방법을 제공한다.

[0075] (a) 글루탐산 (glutamic acid) 생성능을 가지는 미생물에서, 오페론 형태 유전자의 프로모터를 고발현성 합성 프로모터로 교체, pgi (glucose-6-phosphate isomerase) 유전자 개시코돈의 변경 또는 이의 조합을 통해 오탄당 인산 경로 (Pentose phosphate pathway)를 강화시키는 단계; 및

[0076] (b) 포유류 유래 Carns1 (Carnosine synthase 1) 유전자를 도입하는 단계.

[0077] 본 발명에 있어서, 상기 제조방법은 HisG (ATP phosphoribosyltransferase) 및 Rel (GTP pyrophosphokinase) 유전자의 과발현, PanD (Aspartate 1-decarboxylase) 유전자의 과발현, 또는 이들의 조합을 추가적으로 포함할 수 있다.

[0078] 또한, 본 발명은 글루탐산 (glutamic acid) 생성능을 가지는 미생물에서, 오페론 형태 유전자의 프로모터를 고발현성 합성 프로모터로 교체, pgi (glucose-6-phosphate isomerase) 유전자 개시코돈의 변경, 또는 이들의 조합을 통해 오탄당 인산 경로 (Pentose phosphate pathway)를 강화시키는 단계를 포함하는, 히스티딘 (L-Histidine) 고생산 재조합 미생물의 제조방법을 제공한다.

[0079] 또한, 본 발명은 글루탐산 (glutamic acid) 생성능을 가지는 미생물에서, 오페론 형태 유전자의 프로모터를 고발현성 합성 프로모터로 교체, pgi (glucose-6-phosphate isomerase) 유전자 개시코돈의 변경 또는 이의 조합을 통해 오탄당 인산 경로 (Pentose phosphate pathway)를 강화시키는 단계; 및

[0080] HisG (ATP phosphoribosyltransferase) 유전자 및 Rel (GTP pyrophosphokinase) 유전자 중 하나 이상을 과발현시키는 단계를 포함하는, 히스티딘 (L-Histidine) 고생산 재조합 미생물의 제조방법을 제공한다.

[0081] 또한, 본 발명은 글루탐산 (glutamic acid) 생성능을 가지는 미생물에서, 오페론 형태 유전자의 프로모터를 고발현성 합성 프로모터로 교체, pgi (glucose-6-phosphate isomerase) 유전자 개시코돈의 변경 또는 이의 조합을 통해 오탄당 인산 경로 (Pentose phosphate pathway)를 강화시키는 단계를 포함하는, 베타알라닌 (Beta-alanine) 고생산 재조합 미생물의 제조방법을 제공한다.

[0082] 또한, 본 발명은 글루탐산 (glutamic acid) 생성능을 가지는 미생물에서, 오페론 형태 유전자의 프로모터를 고발현성 합성 프로모터로 교체, pgi (glucose-6-phosphate isomerase) 유전자 개시코돈의 변경 또는 이의 조합을 통해 오탄당 인산 경로 (Pentose phosphate pathway)를 강화시키는 단계; 및

[0083] PanD (Aspartate 1-decarboxylase) 유전자를 과발현시키는 단계를 포함하는, 베타알라닌 (Beta-alanine) 고생산 재조합 미생물의 제조방법을 제공한다.

[0084] 본 발명의 일 실시양태에서, 베타알라닌 고생산 재조합 미생물의 제조방법은 포유류 유래 Carns1 (Carnosine synthase 1) 유전자를 도입하는 단계를 추가로 포함할 수 있으며, 바람직하게는 Carns1 유전자와 PanD 유전자를 하나의 재조합 벡터에서 동시에 발현시키는 것일 수 있다.

[0085] 본 발명에서 사용되는 용어, "재조합 미생물"은 유전자재조합 기술로 도입된 유전자재조합 DNA에 의하여 유전물질이 재조합된 미생물을 말한다. 상기 유전자재조합 DNA는 어떤 세포 내에서 복제 가능한 DNA (운반체)와 이종의 DNA를 효소 등을 이용하여 시험관 안에서 결합시켜 제작한 DNA를 말한다.

[0086] 본 발명에 있어서, 바람직하게 재조합 미생물은 글루탐산 생성능을 가지는 미생물을 유전자재조합 기술을 통해 카르노신, 히스티딘, 베타알라닌 생산능이 향상된 것일 수 있고, 상기 글루탐산 생성능을 가지는 미생물은 바람직하게 코리네박테리움 글루타믹쿰 (*Corynebacterium glutamicum*)일 수 있다.

[0087] 본 발명에서 사용되는 용어, "벡터 (vector)"는 적합한 숙주 내에서 DNA를 발현시킬 수 있는 적합한 조절 서열에 작동가능하게 연결된 DNA 서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다. 벡터는 플라스미드, 파지 입자 또는 간단하게 잠재적 게놈 삽입물일 수 있다. 적당한 숙주로 형질전환되면, 벡터는 숙주 게놈과 무관하게 복제하고 기능할 수 있거나, 또는 일부 경우에 게놈 그 자체에 통합될 수 있다. 플라스미드가 현재 벡터의 가장 통상적으로 사용되는 형태이므로, 본 발명의 명세서에서 "플라스미드 (plasmid)" 및 "벡터 (vector)"는 때로 상호 교환적으로 사용된다.

[0088] 본 발명의 목적상, 플라스미드 벡터를 이용하는 게 바람직하다. 이러한 목적에 사용될 수 있는 전형적인 플라스미드 벡터는 (a) 숙주세포 당 수 개에서 수백 개의 플라스미드 벡터를 포함하도록 복제가 효율적으로 이루어지도록 하는 복제 개시점, (b) 플라스미드 벡터로 형질전환된 숙주세포가 선발될 수 있도록 하는 항생제 내성 유전자 및 (c) 외래 DNA 절편이 삽입될 수 있는 제한효소 절단부위를 포함하는 구조를 지니고 있다. 적절한 제한효소 절단부위가 존재하지 않을지라도, 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터 (oligonucleotide adaptor) 또는 링커 (linker)를 사용하면 벡터와 외래 DNA를 용이하게 라이게이션 (ligation) 할 수 있다.

[0089] 본 발명에서 용어 "재조합 벡터"는 통상 이종의 DNA의 단편이 삽입된 재조합 캐리어 (recombinant carrier)로서 일반적으로 이중 가닥의 DNA의 단편을 의미한다. 여기서, 이종 DNA는 숙주세포에서 천연적으로 발견되지 않는 DNA인 이형 DNA를 의미한다. 재조합 벡터는 일단 숙주세포 내에 있으면 숙주 염색체 DNA와 무관하게 복제할 수 있으며 벡터의 수 개의 카피 및 그의 삽입된 (이종) DNA가 생성될 수 있다. 이후 상기 재조합 벡터는 숙주세포에 형질전환 또는 트랜스펙션 (transfection) 될 수 있다.

[0090] 본 발명에 사용된 용어 "형질전환"은 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체 외 인자로서 또는 염색체 통합완성에 의해 복제 가능하게 되는 것을 의미한다. 물론 모든 벡터가 본 발명의 DNA 서열을 발현하는데 모두 동등하게 기능을 발휘하지는 않는다는 것을 이해하여야만 한다. 마찬가지로 모든 숙주가 동일한 발현 시스템에 대해 동일하게 기능을 발휘하지는 않는다. 그러나 당업자라면 과도한 실험적인 부담 없이 본 발명의 범위를 벗어나지 않는 채로 여러 벡터, 발현 조절 서열 및 숙주 중에서 적절한 선택을 할 수 있다. 예를 들어, 벡터를 선택함에 있어서는 숙주를 고려하여야 하는데, 이는 벡터가 그 안에서 복제되어야만 하기 때문이다. 벡터의 복제 수, 복제 수를 조절할 수 있는 능력 및 당해 벡터에 의해 코딩되는 다른 단백질, 예를 들어 항생제 마커의 발현도 또한 고려되어야만 한다.

[0091] 상기 "형질전환" 또는 "트랜스펙션"은 원핵 또는 진핵 숙주세포 내로 외인성 핵산 (DNA 또는 RNA)을 도입하는 데에 통상 사용되는 여러 종류의 다양한 기술, 예컨대 전기천공법, 인산칼슘 침전법, DEAE-덱스트란 트랜스펙션 또는 리포펙션 (lipofection) 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며 당업자가 적절히 선택하여 이용할 수 있다.

[0092] 당업계에 주지된 바와 같이, 숙주세포에서 형질전환 유전자의 발현 수준을 높이기 위해서는, 해당 유전자가 선택된 발현 숙주 내에서 기능을 발휘하는 전사 및 해독 발현 조절 서열에 작동 가능하도록 연결되어야만 한다. 바람직하게는 발현 조절서열 및 해당 유전자는 세균 선택 마커 및 복제 개시점 (replication origin)을 같이 포함하고 있는 하나의 재조합 벡터 내에 포함되게 된다. 숙주세포가 진핵세포인 경우에는, 재조합벡터는 진핵 발현 숙주 내에서 유용한 발현 마커를 더 포함하여야만 한다.

[0093] 본 발명에 있어서, 선호되는 숙주세포는 원핵세포일 수 있고, 바람직하게 상기 원핵 숙주세포는 *C. glutamicum* ATCC 13826, *C. glutamicum* ATCC 13032, *C. glutamicum* 13059, *C. glutamicum* ATCC 14067, *C. glutamicum* ATCC 13761, *C. glutamicum* ATCC 13058, *C. glutamicum* ATCC 13745 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, *E.coli* DH5α, *E.coli* JM101, *E.coli* TOP10, *E.coli* K12, *E.coli* W3110, *E.coli* X1776, *E.coli* XL1-Blue (Stratagene), *E.coli* B, *E.coli* BL21 등과 같은 *E.coli* 균주 및 다른 원핵생물의 종 (species) 및 속 (genera)에 포함되는 균주가 사용될 수 있다.

[0094] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 카르노신 고생산 재조합 미생물을 배양하는 단계를 포함하는, 카르노신 (Carnosine) 생산방법을 제공한다.

[0095] 또한, 본 발명은 상기 히스티딘 고생산 재조합 미생물을 배양하는 단계를 포함하는, 히스티딘 (L-Histidine) 생산방법을 제공한다.

[0096] 또한, 본 발명은 베타알라닌 고생산 재조합 미생물을 배양하는 단계를 포함하는, 베타알라닌 (Beta-alanine) 생산방법을 제공한다.

[0097] 본 발명에서, 상기 배양은 본 발명에 따른 재조합 미생물, 바람직하게 재조합 코리네박테리움 글루타믹쿰의 성장이 가능한 조건이라면 온도, 환경, 배지, 배양 용기 등의 배양을 위한 조건이 구체적으로 한정되지 않으며, 당업자가 해당 재조합 미생물 및 생산하고자 하는 물질의 종류와 수득하고자 하는 양에 따라 적절한 조건을 설정 및 적용하여 적절한 시간 동안 배양할 수 있다.

[0098] 본 발명의 일실시예에서는 오탄당 인산 경로, 베타알라닌 합성 경로 및 히스티딘 합성 경로가 강화되고 카르노신 합성 경로가 도입된 재조합 균주 (Car15)를 한천 플레이트에서 standing incubator에서 배양하고, 진탕 플라스크에서 1차 및 2차 전배양한 다음 48시간 동안 유가식 배양 발효를 진행한 결과, 동일한 균주에서 플라스크 배양만 진행한 경우와 비교해 2배 이상 카르노신 생산량이 더욱 증대된 것을 확인하였다.

[0099] 이에 본 발명에 있어서, 카르노신 생산 균주의 배양은 바람직하게 유가 배양식 발효 (fed-batch fermentation)를 통해 이루어질 수 있으나, 이것으로 제한되는 것은 아니며 당업자가 적절히 선택하여 적용할 수 있다.

[0100] 본 발명에서 사용되는 용어, "유가식 배양 발효"란 미생물의 배양방법 중 액체배양의 한 종류로서 기질의 공급 방식에 따라 분류되는 유가식 배양방법이다. 구체적으로, 배지를 간헐적으로 공급하는 배양법으로써 배양액 중의 기질 농도를 임의로 제어할 수 있다. 기질은 적당한 속도로 첨가되며 유출이 없기 때문에 공급되는 기질의 양과 미생물에 의한 소비량 사이에 균형을 유지함으로써 기질을 자유롭게 제어할 수 있다. 본 발명에서, 상기 발효 공정은 30℃, 200 ~ 400rpm에서 수행되었고, 배양 종료 시까지 pH 6.8이 유지되도록 하였으나, 구체적인 조건이 상기 범위로 제한되는 것은 아니다.

[0102] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0104] **[실시예]**

[0105] **실시예 1. 오탄당 인산 경로 (Pentose phosphate pathway)가 강화된 재조합 균주의 제작**

[0106] **1-1. 합성 프로모터로 교체된 균주 확보**

[0107] 본 발명자들은 오탄당 인산 경로가 강화된 코리네박테리움 균주를 개발하기 위하여, 오페론으로 구성된 관련 유전자들, 즉 트랜스케톨라아제 (transketolase, tkt), 트랜스알돌라아제 (transaldolase, tal), 포도당-6-인산 탈수소효소 (glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase, zwf), 포도당-6-인산탈수소효소 조립 단백질 (glucose-6-phosphate dehydrogenase assembly protein OpcA, OpcA), 6-포스포글루코노락토나아제 (6-phosphogluconolactonase, pgl)의 과발현을 위해 자연 상태의 프로모터를 고발현성 합성프로모터인 H36 프로모터로 교체하고자 하였으며, 이를 위해 하기 과정에 따라 도 2에 도시된 바와 같은 Integration 벡터를 구축하였다.

[0108] 구체적으로 상기 벡터를 제작하기 위해 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC 13032의 genomic DNA로부터 제한효소 서열을 포함하는 정방향 및 역방향 프라이머 (tkt LA F(*EcoR1*), tkt LA R(*Xma1*))를 이용하여 PCR을 통해 증폭된 587bp의 left arm 서열 (서열번호 1)을 확보하였다. 또한 상기 left arm으로부터 정방향 및 역방향 프라이머 (tkt RA F(*Xba1*), tkt RA R(*Sal1*))를 이용하여 PCR 증폭을 통해 추가적으로 600bp의 right arm (서열번호 2)을 확보하였다. 이어서 자연 상태의 프로모터를 교체하기 위해 제한효소 서열을 포함하는 정방향 및 역방향 프라이머 (H36 BamH1 F, H36 Xba1 R)를 이용하여 PCR 증폭을 통해 추가적으로 74bp의 H36 프로모터 (서열번호 3)를 확보하였다. 이후 도 2의 pK19mobsacB-*H36* 벡터를 제작하기 위해 확보된 유전자 (left arm-H36 프로모터-right arm)와 pK19mobsacB 벡터에 각각 제한효소를 처리하고 라이게이션 반응을 진행한 다음 대장균 (*Escherichia coli*; *E. Coli*) DH5a 균주와 코리네박테리움 글루타미쿰 균주로 도입하여 형질전환시켰다. 형질전환시킨 코리네

박테리움 글루타미쿰 균주는 카나마이신 (kanamycin)이 포함된 BHI 플레이트에서 밤새 배양한 후 1차 재조합 (first recombination) 확인을 위해 콜로니 PCR을 진행하였고, 1차 재조합이 확인된 균주는 2차 재조합 (second recombination) 진행을 위해 10% 수크로오스가 포함된 LB 플레이트에서 30℃ 조건하에 배양되었다. 배양 후 형성된 콜로니들을 카나마이신이 포함된 LB 플레이트와 10% 수크로오스가 포함된 플레이트에 각각 접종하고 배양하였다. 이후 10% 수크로오스 배지에서만 성장하는 콜로니를 선택해 자연 상태의 프로모터가 고발현성 프로모터로 교체됨을 확인함으로써 프로모터가 교체된 균주를 확보하였다.

[0110] **1-2. 추가적으로 pgi 유전자의 개시코돈이 변경된 균주 확보**

[0111] 상기 실시예 1-1을 통해 프로모터를 교체하여 오탄당 인산 경로를 강화시킨 코리네박테리움 균주에, 상기 경로를 추가적으로 강화시키기 위하여 CRISPR 시스템을 이용하여 pgi 유전자의 개시코돈을 gtg로 변경시키고자 하였다.

[0112] 이를 위해, 하기 방법에 따라 도 3에 도시된 pJYS2::*crRNA-pgi* 벡터를 구축하였다. 구체적으로, 벡터의 제작을 위해 정방향 및 역방향 프라이머 (crRNA pgi F, crRNA pgi R)를 이용하여 PCR 증폭을 실시함으로써 75bp의 crRNA_pgi 단편 (서열번호 4)을 확보하였다. 이후 pJYS2 벡터에 제한효소를 처리하고 깁슨 어셈블리 (Gibbson assembly) 방법을 통해 상기 crRNA_pgi 단편의 라이게이션 반응을 진행하였고, 제조된 벡터를 *E. coli* DH5a 균주에 도입하여 형질전환을 유도하였다. 다음으로, CRISPR를 위해 코리네박테리움 글루타미쿰 균주에 Cas12a가 포함된 pJYS1 벡터를 도입하여 형질전환시켜 Competent 세포로 제작하였고, pJYS2_*crRNA_pgi* 벡터 및 lagging strand를 도입하였다. 이후 pgi 유전자 내 개시코돈 염기서열의 변화를 확인하기 위해 카나마이신과 스펙티노마이신 (Spectinomycin)이 포함된 BHISG 배지에서 형성된 콜로니를 이용하여 콜로니 PCR을 진행한 후 시퀀싱을 진행하였으며, 염기서열의 변화를 확인한 후에는 Curing을 통해 CRISPR 벡터를 제거하여 최종 오탄당 인산 경로 강화 균주를 확보하였다. 상기 실시예 1-1 및 1-2에서 이용된 프라이머 서열은 하기 표 1에 정리하여 나타내었다.

표 1

[0113]

타겟	방향	서열 (5'-3')	서열번호
tkt LA	Forward	ATATGAATTCTTAAGTTGTGAGTCCTTAT	5
	Reverse	ATACCCGGGCAATCTTAAGTCTGGGA	6
tkt RA	Forward	ATATCTAGATTGACCACCTTGACGCTGTCACCTG	7
	Reverse	ATAGTCGACCAGCTGCTGGGTGCCAGCGA	8
H36	Forward	ATAGGATCCTCTATCTGGTGCCCTAAACG	9
	Reverse	ATATCTAGACATGCTACTCCTACCAACCA	10
crRNA pgi	Forward	CTAGGTATAATGGATCGAATTTCTACTGTTGTAGATATGGCGGACATT	11
	Reverse	TTTATTTAAATGGATCTGGGTGGTCGAAATGTCCGCCATATCTACAAC	12

[0115] **실시예 2. 히스티딘 생합성 경로가 강화된 재조합 균주의 제작**

[0116] 본 발명자들은 상기 실시예 1을 통해 제조된 오탄당 인산 경로가 강화된 코리네박테리움 균주에 추가적으로 히스티딘 합성 경로를 강화시키기 위하여, HisG 및 Rel 유전자를 도입하는 방법을 이용하였다. 이를 위해 도 4에 도시된 HisG, Rel, HisG 및 Rel 과발현 코리네박테리움 글루타미쿰 형질전환용 재조합 벡터인 pMT_*tac::HisG*, pMT_*tac::Rel* 및 pMT_*tac::HisG-Rel*을 하기 과정에 따라 제작하였다.

[0117] 구체적으로, pMT_*tac::HisG*의 제작을 위해 코리네박테리움 글루타미쿰의 genomic DNA로부터 pMT_tac 벡터의 해당 제한효소 서열을 포함하는 정방향 및 역방향 프라이머(HisG F (*ClaI*), HisG R (*BamHI*))를 이용하여 PCR을 수행하였고 그 결과 846bp의 *HisG* 유전자 (서열번호 13)를 확보하였다. 또한 pMT_*tac::Rel*의 제작을 위해 코리네박테리움 글루타미쿰의 genomic DNA로부터 pMT_tac 벡터의 해당 제한효소 서열을 포함하는 정방향 및 역방향 프라이머 (Rel F(*SmaI*), Rel R (*XmaI*))를 이용하여 PCR을 수행하였고 그 결과 2283bp의 *Rel* 유전자 (서열번호 14)를 확보하였다. 상기 pMT_*tac::Rel* 제작을 위한 정방향 프라이머에는 HisG 유전자의 번역이 완료된 후 상기 Rel 유전자의 번역을 돕기 위해 유전자의 번역 시 필요한 리보솜 (Ribosome)이 상보적으로 결합하는 특정 서열인 RBS (ribosome binding site) 서열 (AAGGAGATATAG)을 삽입하였다.

[0118] 이후 각각의 유전자를 발현하는 재조합 벡터를 구축하기 위해 PCR을 통해 증폭된 유전자와 pMT-tac 벡터에 제한효소를 처리한 후, 라이게이션 반응을 진행하였고 이후 *E. coli* DH5a 균주와 코리네박테리움 글루타미쿰 균주에 도입하여 형질전환시켰다. 이에 더하여, 제작된 pMT-*tac::HisG* 벡터에 *Rel* 유전자를 도입하기 위해 pMT-tac::*HisG* 벡터에 제한효소를 처리한 후, 라이게이션 반응을 진행하여 *HisG*와 *Rel*을 함께 발현하는 pMT_*tac::HisGRel* 벡터를 제작하였다. 상기 제작된 벡터를 *E. coli* DH5a 균주와 코리네박테리움 글루타미쿰 균주로 도입하여 형질전환시켰으며, 상기 실험에서 이용된 프라이머 서열은 하기 표 2에 정리하여 나타내었다.

표 2

[0119]

유전자	방향	서열 (5'-3')	서열번호
HisG	Forward	ATAATCGATATGTTGAAAATCGCTGTCCC	15
	Reverse	ATAGGATCCCTAGATGCGGGCGATGC	16
Rel	Forward	ATACCCGGGAAGGAGATATAGATGAGTCTGGAGCGCAACAC	17
	Reverse	ATAGCGGCCGCCTAGCCACCCGAGGTCAC	18

[0121] **실시예 3. 오탄당 인산 경로 및 베타알라닌 생합성 경로가 강화된 재조합 균주의 제작**

[0122] 본 발명자들은 상기 실시예 1에서 제작된 오탄당 인산 경로가 강화된 코리네박테리움 균주에서 추가적으로 베타알라닌 경로가 강화된 균주를 제작하기 위해 하기 과정에 따라 *PanD* 유전자 과발현 벡터를 제작하였다.

[0123] 구체적으로, 코리네박테리움 글루타미쿰의 genomic DNA로부터 정방향 및 역방향 (PanD F(*EcoR1*): 5'-GGTACCGAGCTCGAATTATGCTGCGCACCATCCT-3' (서열번호 20), PanD R(*EcoR1*): 5'-AAAACGACGGCCAGTGGAATTCTAAATGCTTCTCGACGTCAAAAGC-3' (서열번호 21)) 프라이머를 이용하여 PCR 증폭을 통해 *PanD* 유전자 (서열번호 19)를 확보하였다. 다음으로 *PanD* 유전자를 과발현하는 재조합 벡터를 구축하기 위해 pEKEx2 벡터에 제한효소를 처리한 후, 깁슨 어셈블리를 통해 라이게이션 반응을 진행하였고 *E. coli* DH5a 균주와 코리네박테리움 글루타미쿰 균주에 도입하여 형질전환을 진행하였다.

[0125] **실시예 4. 카르노신 생합성 경로가 도입된 재조합 균주의 제작**

[0126] 본 발명자들은 코리네박테리움 글루타믹쿰 균주 또는 상기 실시예 1 내지 3에서 제작된 재조합 코리네박테리움 균주에 카르노신 생합성 경로를 도입하기 위해 포유류 유래 *Carns1* 유전자를 도입하고자 하였다. 이를 위해, 한국인간유전자은행로부터 구입된 pCMV-SPORT6::*Carns1* 벡터로부터 정방향 및 역방향 (Carns1 F(*Sal1*): 5'-ATAGTCGACATGTGCTTGGCAAAGCAGAAG-3' (서열번호 23), Carns1 R(*EcoR1*): 5'-ATAGAATTCCTATTTGAAATGAGACAGGAAATGGGCAAC-3' (서열번호 24)) 프라이머를 이용하여 PCR을 통해 *Carns1* 유전자를 증폭시켜 확보하였다 (서열번호 22). 다음으로 도 4에 도시된 *Carns1* 유전자를 과발현하는 재조합 벡터를 구축하기 위해 pEKEx2 벡터 또는 pEKEx2*::panD* 벡터에 제한효소를 처리한 후, 라이게이션 반응을 진행하였고 *E. coli* DH5a 균주와 코리네박테리움 글루타미쿰 균주에 형질전환을 진행함으로써 카르노신 생합성 경로가 도입된 재조합 균주를 제작하였다.

[0128] **실시예 5. 오탄당 인산 경로의 강화를 통한 히스티딘 및 카르노신 생산량 변화 확인**

[0129] 본 발명자들은 상기 실시예 1에서 제작한 오탄당 인산 경로 강화 균주에서 히스티딘 및 카르노신 생산량을 확인하고자 하였으며, 카르노신 생산을 위해 상기 실시예 4의 방법에 따라 카르노신 생산 경로를 도입하였다. 이후 오탄당 인산 경로가 강화된 재조합 균주 및 오탄당 인산 경로가 강화되고 카르노신 생산 경로가 도입된 형질전환 균주들을 50ml의 CGAF 배지가 포함된 250ml 진탕 삼각 플라스크에서 30℃, 200rpm의 조건으로 48시간 동안 배양하였다.

[0130] 그 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이, 먼저 L-히스티딘 생산량을 측정하였을 때 오탄당 인산 경로가 강화된 13032 균주 (Ptkt to H36 13032; Car2)에서 약 5g/L의 히스티딘이 생산되었고, 대조군인 13032 균주(13032 pEKEx2; Car0)에서는 0.3 mg/L의 히스티딘이 생산되었다.

[0131] 또한 카르노신 생산량을 측정한 결과, 오탄당 인산 경로가 강화되지 않은 대조군 (Car0)에 *Carns1*을 도입한 균

주 (13032 pEKEx2::Carns1; Car1)에서 약 1.9 mg/L의 카르노신이 합성되었고, 오탄당 인산 경로가 강화된 균주 (Car2)에 *Carns1*을 도입한 균주 (Ptkt to H36 13032 pEKEx2::Carns1; Car3)에서 약 2배인 3.9 mg/L인 카르노신이 합성된 것을 확인하였다. 추가적으로 고발현성 합성 프로모터 H36으로 변경한 것에 더하여 pgi 개시코돈의 변경을 통해 오탄당 인산 경로를 더욱 강화시키고 *Carns1*을 도입한 재조합 균주 (Ptkt to H36 pgi(gtg) Carns1; Car12)에서는 도 7에서 볼 수 있는 바와 같이 카르노신 생산량이 13.8 mg/L로 약 7배 증가한 것을 확인하였다.

[0133] **실시예 6. 히스티딘 생합성 경로의 강화를 통한 히스티딘 생산 증대 확인**

[0134] 본 발명자들은 상기 실시예 1에서 얻은 오탄당 인산 경로가 강화된 균주에 실시예 2의 방법에 따라 HisG, Rel, 또는 HisG 및 Rel을 과발현시킴으로써 히스티딘 생합성 경로를 추가적으로 강화시킨 재조합 균주를 제작한 후 히스티딘 생산량을 측정하였다. 모든 형질전환 균주들은 50ml의 CGAF 배지를 포함한 250ml 진탕 삼각 플라스크에서 30℃, 200rpm의 조건으로 48시간 배양하였다.

[0135] 그 결과, 도 6에서 볼 수 있는 바와 같이, 오탄당 인산 경로를 강화시키지 않은 재조합 균주 Car4 내지 Car7에서 대조군 균주 (13032 pMT-tac; Car4)와 비교할 때 HisG 및 Rel의 과발현을 통해 히스티딘 생합성 경로를 강화시킨 재조합 균주 (13032 pMT-tac::HisGRel; Car7)에서 히스티딘 생산이 증진된 것을 확인하였다. 또한, 오탄당 인산 경로를 강화시킨 재조합 균주 Car8 내지 Car11에서 전반적으로 히스티딘 생산이 현저히 증진되었으며, 오탄당 인산 경로가 강화되고 HisG 및 Rel가 과발현된 재조합 균주 (Ptkt to H36 13032 pMT-tac::HisGRel; Car11)에서 히스티딘 생산능이 가장 높은 것을 확인하였다. 상기 결과로부터 오탄당 인산 경로, 히스티딘 생합성 경로의 강화를 통해 히스티딘 생산을 증대시킬 수 있음을 알 수 있었다.

[0137] **실시예 7. 베타알라닌 및/또는 히스티딘 생합성 경로의 강화를 통한 카르노신 생산 증대 확인**

[0138] 본 발명자들은 각각 오탄당 인산 경로가 강화되고 *Carns1*을 도입하여 카르노신 합성 경로가 도입된 재조합 균주 (Ptkt to H36 pgi(gtg) Carns1; Car12); 오탄당 인산 경로 및 베타알라닌 합성 경로가 강화되고 카르노신 합성 경로가 도입된 재조합 균주 (Ptkt to H36 pgi(gtg) Carns1 panD; Car13); 오탄당 인산 경로 및 히스티딘 합성 경로가 강화되고 카르노신 합성 경로가 도입된 재조합 균주 (Ptkt to H36 pgi(gtg) Carns1 HisGRel; Car14); 및 오탄당 인산 경로, 베타알라닌 합성 경로 및 히스티딘 합성 경로가 강화되고 카르노신 합성 경로가 도입된 재조합 균주 (Ptkt to H36 pgi(gtg) Carns1 panD HisGRel; Car15)에서 히스티딘, 베타알라닌 및 카르노신 생산량을 각각 측정하여 비교하였다. 상기 형질전환체들은 50ml의 CGAF 배지를 포함한 250ml 진탕 삼각 플라스크에서 30℃, 200rpm의 조건으로 48시간 동안 배양하였다.

[0139] 그 결과, 도 7에 나타낸 바와 같이 대조군인 오탄당 인산 경로만이 강화되고 카르노신 합성 경로가 도입된 Car12에 비하여 베타알라닌 생산 관련 유전자인 panD를 추가적으로 과발현시킨 재조합 균주 Car13에서 베타알라닌이 219.17mg/L로 4배 증가하였고, 카르노신이 약 99mg/L로 7.2배 증가한 것으로 나타났다. 한편, 오탄당 인산 경로 및 히스티딘 합성 경로가 강화된 재조합 균주 (Car14)에서는 대조군 Car12 균주와 비교하여 히스티딘 생산량이 감소한 대신 카르노신 생산량이 약 33mg/L로 약 2.4배 증가한 것을 확인하였다. 최종적으로 오탄당 인산 경로, 베타알라닌 합성 경로 및 히스티딘 합성 경로가 강화된 재조합 균주 (Car15)에서는 최종적으로 145mg/L의 가장 높은 카르노신 생산량이 측정되었다.

[0140] 상기 결과로부터, 오탄당 인산 경로, 히스티딘 합성 경로, 베타알라닌 합성 경로를 강화시키고, 카르노신 합성 경로를 도입함으로써 카르노신의 생산량을 가장 높은 수준으로 증가시킬 수 있음을 알 수 있었다.

[0141]

[0142] **실시예 8. 유가식 배양을 통한 카르노신 생산량 증대 확인**

[0143] 본 발명자들은 상기 실시예 7에서 가장 높은 수준으로 카르노신을 생산하는 것으로 확인된 오탄당 인산 경로, 베타알라닌 합성 경로 및 히스티딘 합성 경로가 강화되고 카르노신 합성 경로가 도입된 재조합 균주 (Car15)에서 카르노신 생산량을 더욱 증진시킬 수 있는 방법을 모색하였다.

[0144] 이를 위해, 본 발명자들의 이전 연구결과들에 근거하여 상기 균주를 유가식 배양법으로 배양하여 카르노신 생산량을 증대시키고자 하였다. 구체적으로, 유가식 배양을 진행하기 전, Car15 균주를 BHISG 한천 플레이트 (agar

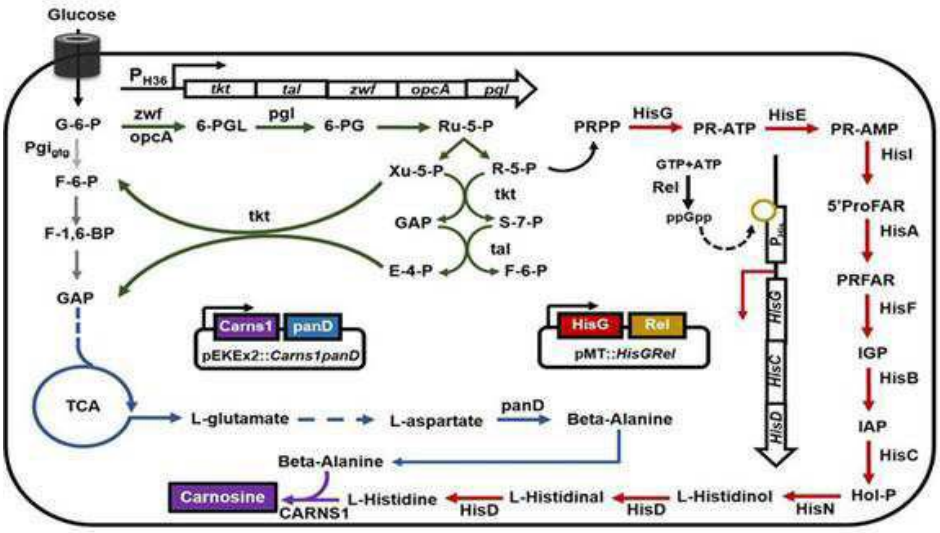
plate)에서 30℃ 조건으로 24시간 동안 standing incubator에서 배양하였고, 이후 20ml의 전배양 (preculture) 배지 (리터 당 10g 효모 추출물, 10g 펩톤 (peptone), 2g 요소 (urea), 2.5g NaCl, 40g 포도당 및 0.1mg biotine)가 포함된 100ml 진탕 삼각 플라스크에서 30℃, 200rpm의 조건으로 24시간 동안 1차 전배양하였다. 다음으로, 2차 전배양을 위해 상기 배양된 균주를 상기와 동일한 조성의 전배양 배지 50ml가 포함된 250ml 진탕 삼각 플라스크에 접종한 후 30℃, 200rpm의 조건으로 24시간 동안 배양하였다. 이후 유가식 배양을 위해 2L CGAF 배지가 포함된 발효기 (fermentor)에서 상기 배양된 균주를 30℃, 200-400 rpm 조건으로 48시간 동안 배양하였고 pH는 6.8로 유지되도록 하였다.

[0145] 이후 상기 유가식 배양된 Car15 균주에서 카르노신 생산량을 측정한 결과, 도 8에서 볼 수 있는 바와 같이 카르노신 생산량이 현저히 증가하여 최종적으로 323.26mg/L의 가장 높은 수준의 카르노신이 생산된 것을 확인하였다.

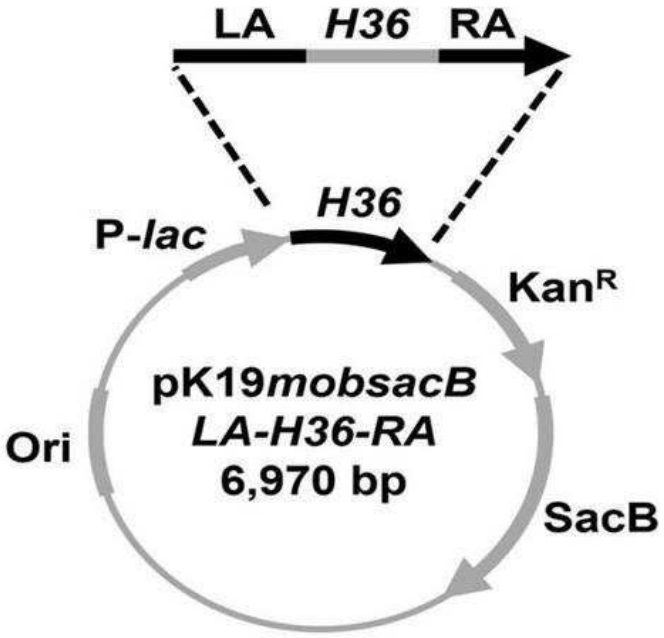
[0147] 상기 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

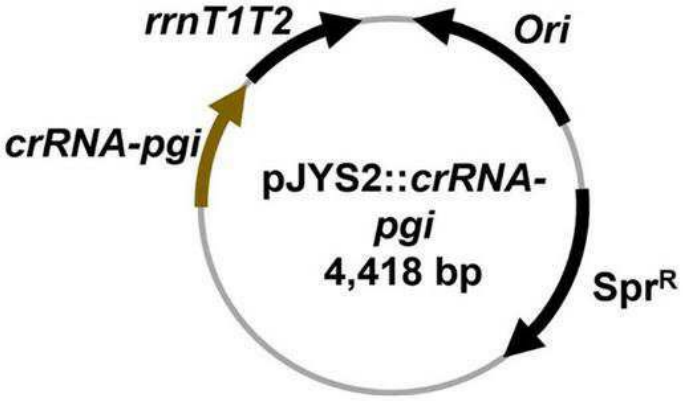
도면1



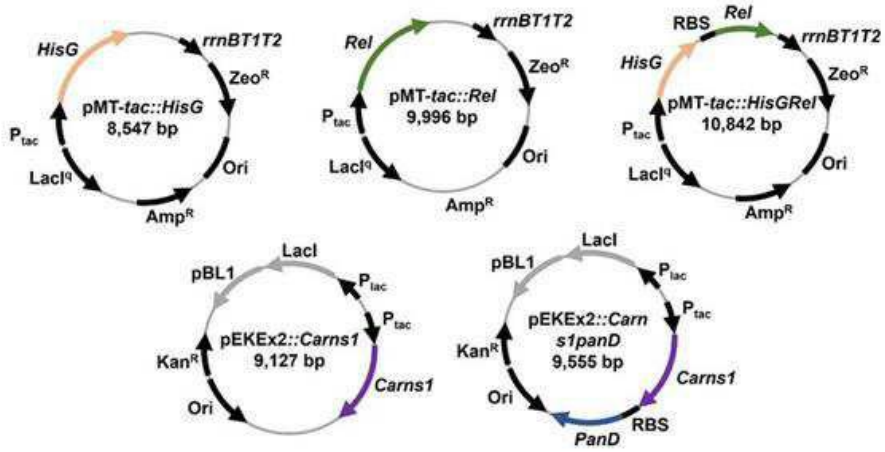
도면2


LA
H36
RA
H36
P-lac
Kan^R
pK19mobsacB
LA-H36-RA
6,970 bp
Ori
SacB

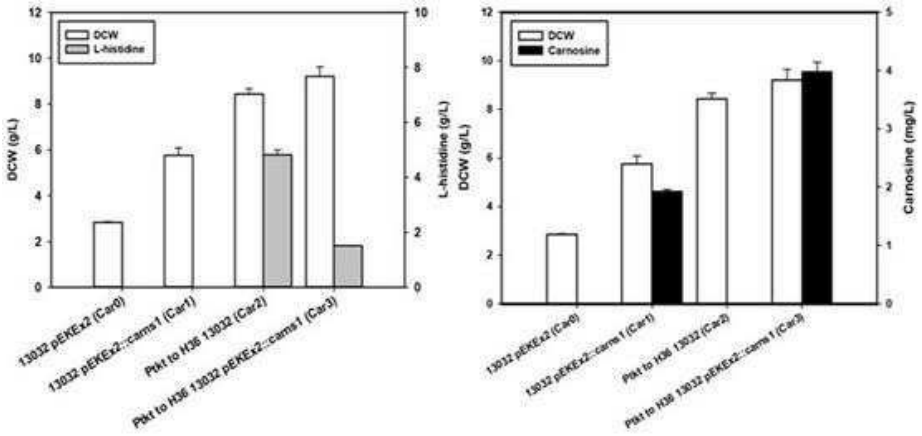
도면3


rrnT1T2
Ori
crRNA-pgi
pJYS2::crRNA-pgi
4,418 bp
Spr^R

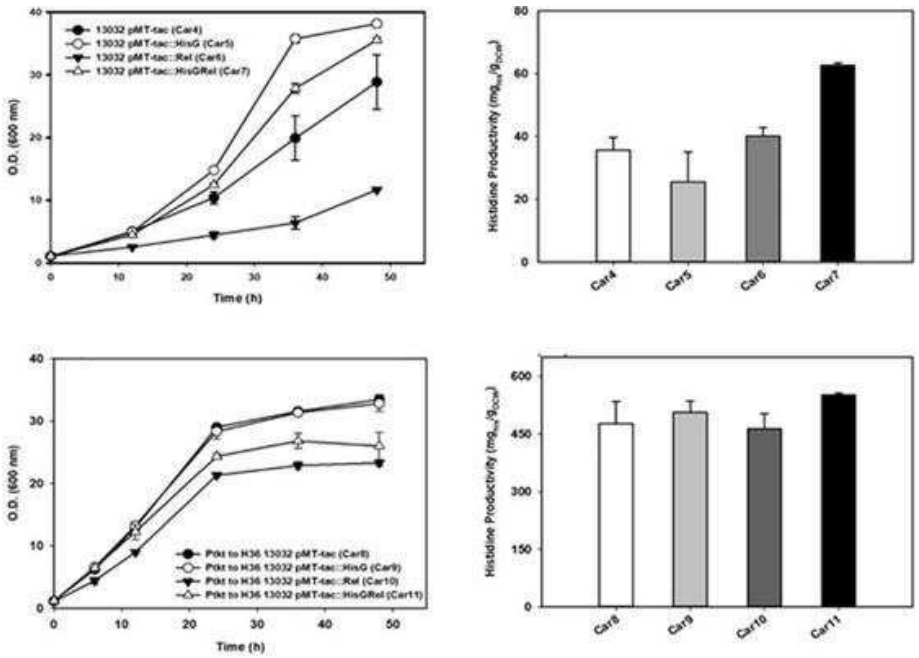
도면4


HisG
rrnBT1T2
Zeo^R
pMT-tac::HisG
8,547 bp
P_tac
LacI^q
Ori
Amp^R
Rel
rrnBT1T2
Zeo^R
pMT-tac::Rel
9,996 bp
P_tac
LacI^q
Ori
Amp^R
RBS
Rel
HisG
rrnBT1T2
Zeo^R
pMT-tac::HisGRel
10,842 bp
P_tac
LacI^q
Ori
Amp^R
LacI
pBL1
P_tac
P_tac
pEKEx2::Carns1
9,127 bp
Kan^R
Ori
Carns1
LacI
pBL1
P_tac
P_tac
pEKEx2::Carns1panD
9,555 bp
Kan^R
Ori
Carns1
RBS
PanD

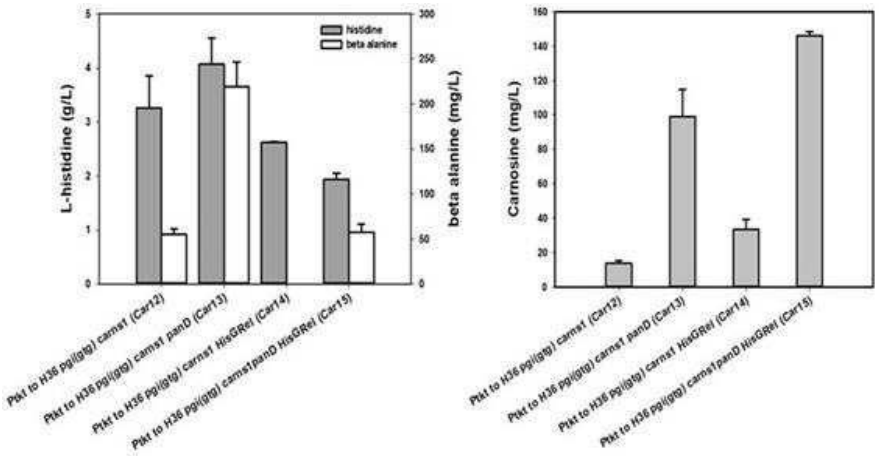
도면5


DCW
L-histidine
DCW (g/L)
L-histidine (g/L)
13032 pEKEx2 (Car0)
13032 pEKEx2::cams1 (Car1)
Ptkt to H36 13032 (Car2)
Ptkt to H36 13032 pEKEx2::cams1 (Car3)
DCW
Carnosine
DCW (g/L)
Carnosine (mg/L)
13032 pEKEx2 (Car0)
13032 pEKEx2::cams1 (Car1)
Ptkt to H36 13032 (Car2)
Ptkt to H36 13032 pEKEx2::cams1 (Car3)

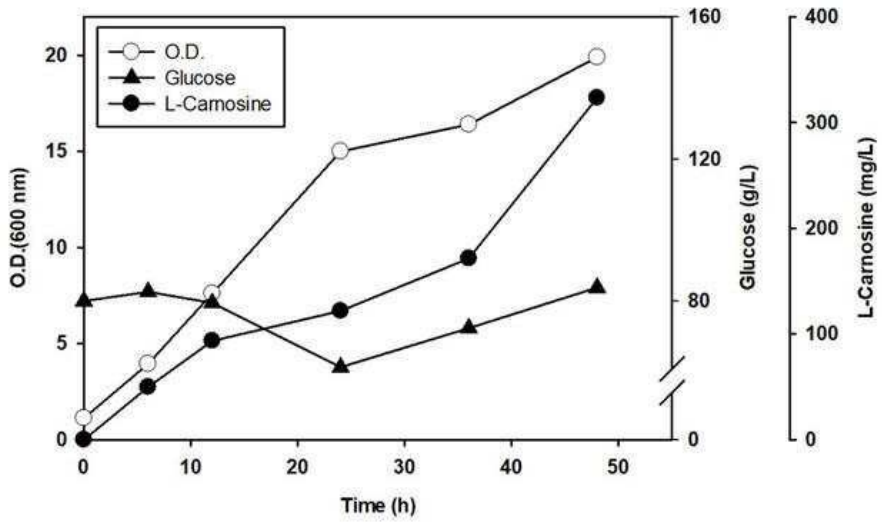
도면6


13032 pMT-tac (Car4)
13032 pMT-tac::HisG (Car5)
13032 pMT-tac::Rel (Car6)
13032 pMT-tac::HisGRel (Car7)
O.D. (600 nm)
Time (h)
Histidine Productivity
Car4
Car5
Car6
Car7
Ptkt to H36 13032 pMT-tac (Car8)
Ptkt to H36 13032 pMT-tac::HisG (Car9)
Ptkt to H36 13032 pMT-tac::Rel (Car10)
Ptkt to H36 13032 pMT-tac::HisGRel (Car11)
O.D. (600 nm)
Time (h)
Histidine Productivity
Car8
Car9
Car10
Car11

도면7


histidine
beta alanine
L-histidine (g/L)
beta alanine (mg/L)
Ptkt to H36 pgi(gtg) cams1 (Car12)
Ptkt to H36 pgi(gtg) cams1 panD (Car13)
Ptkt to H36 pgi(gtg) cams1 HisGRel (Car14)
Ptkt to H36 pgi(gtg) cams1panD HisGRel (Car15)
Carnosine (mg/L)
Ptkt to H36 pgi(gtg) cams1 (Car12)
Ptkt to H36 pgi(gtg) cams1 panD (Car13)
Ptkt to H36 pgi(gtg) cams1 HisGRel (Car14)
Ptkt to H36 pgi(gtg) cams1panD HisGRel (Car15)

도면8



서 열 목 록

<110> Korea University Research and Business Foundation

<120> Recombinant microorganism for producing carnosine, histidine, beta-alanine and method for producing carnosine, histidine, beta-alanine using thereof

<130> PN2407-328

<150> KR 10-2021-0047556

<151> 2021-04-13

<160> 24

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 587

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> tkt left arm

<400> 1

ttaagttgtg agtccttatt atttaaatat ccctgcggtg agtgtgcacc ttgcgttgaa 60

ggcccagact ctgacagaag cgtcagagtg tttactcaag acattttcta agacacacgg 120

caaattagtc ggatgaagtt aattaaaagt tcccgaatca atctttttaa tgttttcaaa 180

ccatttgaag gtgtgctgac ccaggtggac gccaaccttt aaaaagcttc agacttttat 240

ttccacttca taaaaactgc ctgtgacgat tccgttaaag attgtgccaa atcactgcgc 300

aaaactcgcg cggaaccaga ccttgccatg ctatcgccta ttcacactat ttgagtaatc 360

ggaaatagat gggtgtagac gcttgattgg cggacggttc acagcggacg atttcaggcc 420

ctcgtagctc gagagtttga aggggtccga ttcgttccgt tcgtgacgct ttgtgaggtt 480

ttttgacgtt gcaccgtatt gcttgccgaa catttttctt ttcctttcgg tttttcgaga 540

attttcacct acaaaagccc acgtcacagc tcccagactt aagattg 587

<210> 2

<211> 600

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> tkt right arm

<400> 2

ttgaccacct tgacgctgtc acctgaactt caggcgctca ctgtacgcaa ttacccctct 60

gattggtccg atgtggacac caaggctgta gacactgttc gtgtcctcgc tgcagacgct 120

gtagaaaact gtggctccgg ccacccaggc accgcaatga gcctggctcc ccttgcatac 180

accttgtacc agcgggttat gaacgtagat ccacaggaca ccaactgggc aggccgtgac 240

cgcttcgttc tttcttgtgg ccactcctct ttgacccagt acatccagct ttacttgggt 300

ggattcggcc ttgagatgga tgacctgaag gctctgcgca cctgggattc cttgacccca 360

ggacaccctg agtaccgcca caccaagggc gttgagatca ccactggccc tcttggccag 420

ggtcttgcat ctgcagttgg tatggccatg gctgctcgtc gtgagcgtgg cctattcgac 480

ccaaccgctg ctgagggcga atccccattc gaccaccaca tctacgtcat tgcttctgat 540

ggtgacctgc aggaaggtgt cacctctgag gcatcctcca tcgctggcac ccagcagctg 600

600

<210> 3

<211> 74

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> H36 promoter

<400> 3

tctatctggt gccctaaacg ggggaatatt aacgggccca gggtggtcgc accttggttg 60

gtaggagtag catg 74

<210> 4

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> crRNA pgi

<400> 4

ctaggtataa tggatcgaat ttctactgtt gtagatatgg cggacatttc gaccacccag 60

atccatttaa ataaa 75

<210> 5

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> tkt LA_Forward

<400> 5

atatgaattc ttaagttgtg agtccttat 29

<210> 6

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> tkt LA_Reverse

<400> 6

atacccgggc aatcttaagt ctggga 26

<210> 7

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> tkt RA_Forward

<400> 7

atatctagat tgaccacctt gacgctgtca cctg 34

<210> 8

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> tkt RA_Reverse

<400> 8

atagtcgacc agctgctggg tgccagcga 29

<210> 9

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> H36_Forward

<400> 9

ataggatcct ctatctggtg ccctaaacg 29

<210> 10

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> H36_Reverse

<400> 10

atatctagac atgctactcc taccaacca 29

<210> 11

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> crRNA pgi_Forward

<400> 11

ctaggtataa tggatcgaat ttctactgtt gtagatatgg cggacatt 48

<210> 12

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> crRNA pgi_Reverse

<400> 12

tttatttaaa tggatctggg tggtcgaaat gtccgccata tctacaac 48

<210> 13

<211> 846

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Corynebacterium glutamicum_HisG

<400> 13

atgttgaaaa tcgctgtccc aaacaaaggc tcgctgtccg agcgcgccat ggaaatcctc 60

gccgaagcag gctacgcagg ccgtggagat tccaaatccc tcaacgtttt tgatgaagca 120

aacaacgttg aattcttctt ccttcgccct aaagatatcg ccatctacgt tgctggtggc 180

cagctcgatt tgggtatcac cggccgcgac cttgctcgcg attcccaggc tgatgtccac 240

gaagttcttt ccctcggctt cggttcctcc actttccgtt acgcagcacc agctgatgaa 300

gagtggagca tcgaaaagct cgacggcaag cgcatcgcta cctcttaccc caaccttgtt 360

cgcgatgacc tcgcagcacg tgggctttcc gctgaggtgc tccgcctcga cggtgcagta 420

gaggtatcca tcaagcttgg tgtcgcagat gccatcgccg atgttgtatc caccggccgc 480

acgctgcgtc agcaaggtct tgcacctttc ggcgaggttc tgtgcacctc tgaggctgtc 540

attgttggcc gcaaggatga aaaggtcacc ccagagcagc agatcctgct tcgccgcatc 600

cagggaattt tgcacgcgca gaacttcctc atgctggatt acaacgtcga ccgcgacaac 660

ctggacgctg ccactgcagt aaccccaggc ttatccggcc caacggtatc cccactggca 720

cgcgacaact gggttgctgt acgcgccatg gtgccacgca ggtcagctaa cgccatcatg 780

gataagcttg ctggactcgg cgctgaagcc atcctggctt ctgaaatccg catcgcccgc 840

atctag 846

<210> 14

<211> 2283

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Corynebacterium glutamicum_Rel

<400> 14

atgagtctgg agcgcaacac acaaaaatct tccatgggtg tgcgaagcat gtcagccagg 60

cttgcccgca gcctcacagg aaaccgcgtt cgcaccaacc ctgtgctgga tccgctgctg 120

agcatccacc ggcaatttca cccacgcgcc gacgtacaag tgttggaacg tgcatatgac 180

accgcggaac gtcttcatga tggtgtgatt cgaaaatcgg gcgatccgta tattacccac 240

ccgttggctg tcgccaccat cgccgcggaa atcggcatgg acaccaccac gctcgtcgca 300

gccttgttgc atgacacggt ggaagacacc gactactctt tggacgatct cacccgagat 360

ttcggagaag aagttgccag gcttgtcgac ggtgtcacca agctcgacaa agtcgcacta 420

ggtgctgccg cggaggccga aacgattcgc aaaatgatcg tcgccatgag ccaggacccc 480

cgcgtgctgg tgattaaagt ggccgaccgt ttgcacaata tgcgcaccat gcggttcctg 540

ccgccggaaa agcaagctaa aaaagcacgc caaacccttg aagtgattgc tcctttggca 600

caccgcctgg gcatggccag cgtgaaatgg gaattggaag atctatcctt tgccattttg 660

taccccaaga agtacgaaga gatcgtgcgt cttgttgccg accgcgcgcc ctctagagac 720

cggtacctca aagaaattat tgatcaagtc accggtggct tgcgcgaaaa caacatcgcg 780

gcagaagtgc ttggtcgacc aaagcactac tggtctatct atcaaaagat gatcgttcgc 840

ggtcgtgatt ttgacgatat ttttgatctt gttggcatcc gcatcctggt agacaacgtg 900

aacaactgtt acgccgccat cggtgtcgtg cactccctgt tcaatgctct gcctggccga 960

ttcaaagact atatttcagc cccgcgcttc ggtgtctacc aatccctgca caccaccgtg 1020

atgggacctg gcggtaagcc tctggaagtt caggcacgta cccacgacat gcactacaac 1080

gccgaattcg gcattgcagc gcactggcga tacaaagaaa ccaaaggcag ccacagtggc 1140

gagcaagccg aagtggatca aatggcgtgg atgcgccaac ttctggactg gcaaaaagaa 1200

gcagccgacc ccaacgagtt cctggacagc ctgcgctacg atctgacttc caagcagatc 1260

ttcgtgttca cacccaaagg tgatgtggtc aacctgccgg tgaactccac cccggtggac 1320

ttcgcctacg cggtgcacac cgaagtgggg caccgctgca tcggcgccaa aatcaacggc 1380

aaactggtcg ctttggaaac gaaactcaaa tccggcgatc gtgttgaagt ctttacctcc 1440

aaggaccaaa acgctggccc aagtagggga tggcaagaat ttgttgtctc acctcgtgca 1500

aaggccaaga ttcgccagtg gtttgccaag gaacgacgcg aagaatacct agaagccgga 1560

cgcgatgcgc tggcagcagt tattcagcgt ggcggcctgc caatgcaccg cttgttcacc 1620

gcgtcctcca tgaagacggt ggcaacagag ctgcactacc cagatgtaga tgcgctctac 1680

acagccatcg gctccggttc tgtatctgcg caacacgtag tcaaccgtct catggctatc 1740

tttggtgacg aagaagatgc cgaagacgca ttggttgcac gcaccccatt cagcgagctg 1800

gtcaactccc gtgccaccac ggaaagcagc accggcatcc tggtcgaagg cagcccagat 1860

gtcatggcta agctcgctaa atgctgtatg ccagtgccag gagatgaaat ctttggattc 1920

gtcacccgtg gtggcggtgt ctccgtacac cgaacagact gcacgaatgt ggaaaagctc 1980

aaagaagagc cagaacgcat tgtctccgtc tcctgggctt cggaaggtca aggttcagta 2040

ttctctgcca cactgcagct tgaagcactt gatcgcgcag gcctgctctt tgagctcacc 2100

cgcgtaatca acgaacaaaa ggtctccgtt accgcaatga actcccattg ctcagaagac 2160

cgcgtagcca ccgtgcgctt cacctttgcg gtctctgaca ccaagcagtt gggatccctg 2220

atgacacagc tgcgcaatgc cgaaggagtg tttgatgtct accgagtgac ctcgggtggc 2280

tag 2283

<210> 15

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HisG_Forward

<400> 15

ataatcgata tgttgaaaat cgctgtccc 29

<210> 16

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HisG_Reverse

<400> 16

ataggatccc tagatgcggg cgatgc 26

<210> 17

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Rel_Forward

<400> 17

atacccggga aggagatata gatgagtctg gagcgcaaca c 41

<210> 18

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Rel_Reverse

<400> 18

atagcggccg cctagccacc cgaggtcac 29

<210> 19

<211> 411

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Corynebacterium glutamicum_PanD

<400> 19

atgctgcgca ccatcctcgg aagtaagatt caccgagcca ctgtcactca agctgatcta 60

gattatgttg gctctgtaac catcgacgcc gacctggttc acgccgccgg attgatcgaa 120

ggcgaaaaag ttgccatcgt agacatcacc aacggcgctc gtctggaaac ttatgtcatt 180

gtgggcgacg ccggaacggg caatatttgc atcaatggtg ccgctgcaca ccttattaat 240

cctggcgatc ttgtgatcat catgagctac cttcaggcaa ctgatgcgga agccaaggcg 300

tatgagccaa agattgtgca cgtggacgcc gacaaccgca tcgttgcgct cggcaacgat 360

cttgcggaag cactacctgg atccgggctt ttgacgtcga gaagcattta g 411

<210> 20

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PanD_Forward

<400> 20

ggtaccgagc tcgaattatg ctgcgcacca tcct 34

<

210> 21

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PanD_Reverse

<400> 21

aaaacgacgg ccagtggaat tctaaatgct tctcgacgtc aaaagc 46

<210> 22

<211> 993

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mus musculus_Carns1

<400> 22

atgtgcttgg caaagcagaa gagccgcaca cagctacatc tgttgcggtg ccagggccca 60

ccctggcctt cgacctctct ccatgctgtg gcctgttgcc cattggagaa tgaggctgat 120

gtggagagag ccatttacca ggtacccctg ccaggtgtga tgaaactgga atttgggtca 180

ggagcagtag gcgtgcagct ggtgaaggat gggcctcagt gccgtgagca cttttcccgg 240

atcctccatg acctgcaggg tgaggctgac caccctggca tcgggctggg ctggggcaat 300

gctatgctgc tgatggagtt tgttgagggc acagagcatg acgtggacct ggtggtgttc 360

ggtggacggt tgctggctgc tttcgtctcc gataatggcc ccacaaggct gcctggcttc 420

acagagactg cagcctgcat gcccactggg ctagcaccag agcaggaggc ccagatggtg 480

caggcagcct ttcgctgctg cctgggctgt gggctgctgg atggggtttt caatgtggag 540

ctcaagatga ctggggctgg gccaaggctc atcgagatta accctcgaat gggaggcttc 600

taccttcgag actggatcct agagctctat ggtgtggatt tgcttctggc ttctacaatg 660

gtggcctgtg gcctgcagcc tgccttgcct gctcaccctc gtgcccgtgg ctacctagtg 720

ggcatcatgt gcctggtgtc ccagcaccta cagctgctga gttccccgag cagtagagag 780

actctgcaaa ccctccatga ccaggggcaa ttacgactca acctgctgga ggaggccctg 840

atacctggcc agtatgagga gccctactgc aatgtggcct gtgctgggcc cagccctgct 900

gaggcctgtc accgcctgct aggcatctgt cagggcttgg gcattgacag gcccaactac 960

cctgttgccc atttcctgtc tcatttcaaa tag 993

<210> 23

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Carns1_Forward

<400> 23

atagtcgaca tgtgcttggc aaagcagaag 30

<210> 24

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Carns1_Reverse

<400> 24

atagaattcc tatttgaaat gagacaggaa atgggcaac 39