



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0143699

(43) 공개일자 2015년12월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/77 (2006.01) C12N 9/04 (2006.01)

C12N 9/92 (2006.01) C12P 13/08 (2006.01)

C12P 13/24 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 15/77 (2013.01)

C12N 9/0006 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-7032480

(22) 출원일자(국제) 2015년02월04일

심사청구일자 2015년11월12일

(85) 번역문제출일자 2015년11월12일

(86) 국제출원번호 PCT/CN2015/072220

(87) 국제공개번호 WO 2015/120775

국제공개일자 2015년08월20일

(30) 우선권주장

201410050868.2 2014년02월14일 중국(CN)

(71) 출원인

인스티튜트 오브 마이크로바이올로지, 차이니스
아카데미 오브 사이언스

중국, 베이징 100101, 샤오양 디스트릭트, 바이첸
시 로드 1-3

(72) 발명자

원, 텅이

중국, 베이징 100101, 샤오양 디스트릭트, 바이첸
시 로드 1-3

샹, 시우링

중국, 베이징 100101, 샤오양 디스트릭트, 바이첸
시 로드 1-3

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

임상엽

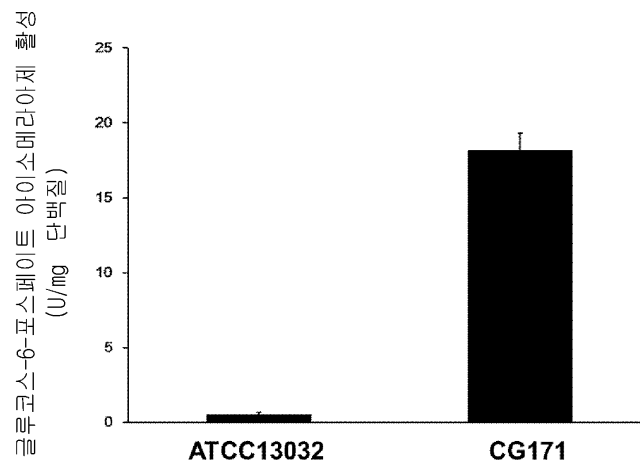
전체 청구항 수 : 총 25 항

(54) 발명의 명칭 L-아미노산을 생산하는 재조합균, 이의 구성 방법 및 L-아미노산 생산 방법

(57) 요약

본 발명에서는 L-아미노산을 생산하는 재조합균, 이의 구성 방법 및 L-아미노산 생산 방법을 제공한다. 본 발명에서 생산하는 L-아미노산의 재조합균은 시작균에 비하여 낮아진 글루코스-6-포스페이트 아이소메라아제 Pgi의 발현과 향상된 글루코스-6-포스페이트 데히드로게나아제 Zwf-0pcA의 발현을 가지며, 그 중에서 상기 시작균은 목표 아미노산을 누적시킬 수 있는 균주이다. 본 발명의 재조합균을 발효 배양하면서 중첩적으로 수율을 향상시키는 효과를 관찰하게 되었으며, L-아미노산의 수율을 크게 향상시킨다. 본 발명의 조합 개조 방식은 L-아미노산의 발효 수율을 향상시킬 수 있는 새로운 방법을 제시하였기 때문에, 실제적으로 세균 발효를 통하여 L-아미노산을 생산하는데 이용될 수 있다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

C12N 9/92 (2013.01)

C12P 13/08 (2013.01)

C12P 13/24 (2013.01)

C12Y 101/01043 (2013.01)

C12Y 503/01009 (2013.01)

(72) 발명자

장, 윤

중국, 베이징 100101, 샤오양 디스트릭트, 바이첸
시 로드 1-3

리우, 슈웬

중국, 베이징 100101, 샤오양 디스트릭트, 바이첸
시 로드 1-3

리양, 용

중국, 베이징 100101, 샤오양 디스트릭트, 바이첸
시 로드 1-3

장, 유

중국, 베이징 100101, 샤오양 디스트릭트, 바이첸
시 로드 1-3

명세서

청구범위

청구항 1

L-아미노산을 생산하는 재조합균에 있어서, 상기 재조합균은 시작균에 비하여 낮아진 글루코스-6-포스페이트 아 이소메라아제 *Pgi*의 발현과 향상된 글루코스-6-포스페이트 데히드로게나아제 *Zwf*-*OpcA*의 발현을 가지며, 그 중 에서 상기 시작균은 목표 아미노산을 누적시킬 수 있는 균주이며, 바람직하게는, 상기 목표 아미노산은 L-히스 티딘, L-라이신, L-발린, L-트레오닌, L-프롤린 또는 L-히드록시프롤린인 것을 특징으로 하는 L-아미노산을 생 산하는 재조합균.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 재조합균의 염색체 상의 *pgi* 유전자는 이미 불활성화되며 바람직하게는 이미 녹아웃되거 나, 또는 *pgi* 유전자의 조절 요소가 이미 낮은 전사 또는 낮은 발현 활성의 조절 요소로 교체되고, 아울러 상기 재조합균 중에는 두 개 또는 더욱 많은 카피한 *zwf-opcA* 유전자를 가지거나, 또는 강한 프로모터로 상기 시작균 염색체 상의 *tkt-tal-zwf-opcA-devB* 오페론의 프로모터를 교체하는 바, 바람직하게는, 상기 강한 프로모터는 원 시균의 P_{efu} 프로모터인 것을 특징으로 하는 L-아미노산을 생산하는 재조합균.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 시작균은 원시균에 비하여 L-히스티딘 합성 오페론의 *hisEG* 유전자와 *hisDCB* 유전자의 향 상된 발현을 가지며, 바람직하게는, 강한 프로모터로 상기 *hisEG* 유전자와 *hisDCB* 유전자의 프로모터를 교체시 키고, 더욱 바람직하게는 상기 원시균 염색체 상의 P_{glyA} 프로모터로 각각 *hisEG* 유전자와 *hisDCB* 유전자의 프로 모터를 교체시키며;

나아가 바람직하게는, 상기 시작균은 원시균에 비하여 향상된 PRPP 합성 효소 *PrsA*의 발현을 가지며, 더욱 바람 직하게는, 상기 시작균 중에는 두 개 또는 더욱 많은 카피의 *prsA* 유전자를 가지거나, 또는 강한 프로모터로 *prsA* 유전자의 프로모터를 교체하는 바, 바람직하게는 상기 프로모터는 상기 원시균의 P_{sod} 프로모터인; 것을 특 징으로 하는 L-아미노산을 생산하는 재조합균.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 시작균은 원시균에 비하여 향상된 *dapA* 유전자 또는 *lysC* 유전자의 발현을 가지거나; 또는

상기 시작균은 원시균에 비하여 향상된 발린 합성 유전자 *ilvBNCE*의 발현을 가지거나; 또는

상기 시작균은 원시균에 비하여 향상된 트레오닌 합성 유전자 *hom* 및 *thrB*의 발현을 가지거나; 또는

상기 시작균은 원시균에 비하여 향상된 *ocd* 유전자의 발현을 가지거나; 또는

상기 시작균은 원시균에 비하여 향상된 *p4hD* 유전자의 발현을 가지는; 것을 특징으로 하는 L-아미노산을 생산하 는 재조합균.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 재조합균은 상기 시작균에 비하여 향상된 AICAR 트랜스메틸라제/IMP 환히드라제 *PurH*의

발현을 가지며;

바람직하게는, 상기 시작균 중에는 두 개 또는 더욱 많은 카피의 *purH* 유전자를 가지거나, 또는 강한 프로모터로 *purH* 유전자의 프로모터를 교체시키는 바, 바람직하게는, 상기 프로모터는 상기 원시균의 P_{eftu} 프로모터인; 것을 특징으로 하는 L-아미노산을 생산하는 재조합균.

청구항 6

제3항 또는 제5항에 있어서, 상기 재조합균은 상기 시작균에 비하여 약화된 아미도포스포리보실 전이효소 PurF의 발현을 가지며;

바람직하게는, 약한 프로모터로 *purF* 유전자의 프로모터를 교체하고, 더욱 바람직하게는, 상기 약한 프로모터는 상기 원시균 중의 P_{hom} 프로모터인; 것을 특징으로 하는 L-아미노산을 생산하는 재조합균.

청구항 7

제1항 내지 제6항의 임의 항에 있어서, 상기 원시균은 코리네박테리움 속, 다이어리스터 속 또는 브레비박테리움 속으로부터 선택되는 한 가지 세균주이며;

바람직하게는, 상기 코리네박테리움 속의 세균은 *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium pekinense*, *Corynebacterium efficiens*, *Corynebacterium crenatum*, *Corynebacterium thermoaminogenes*, *Corynebacterium aminogenes*, *Corynebacterium lilium*, *Corynebacterium callunae* 및 *Corynebacterium herculis*로부터 선택되는 한 가지 세균주이며;

상기 다이어리스터 속의 세균은 *Microbacterium ammoniaphilum*으로부터 선택되는 한 가지 세균주이며;

상기 브레비박테리움 속의 세균은 *Brevibacteriaceae flvum*, *Brevibacteriaceae lactofermentum* 및 *Brevibacteriaceae ammoniagenes*으로부터 선택되는 한 가지 세균주인; 것을 특징으로 하는 L-아미노산을 생산하는 재조합균.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 원시균은 야생형 *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032인 것을 특징으로 하는 L-아미노산을 생산하는 재조합균.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 시작균의 염색체 상에는 각각 상기 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032 염색체 상의 L-히스티딘 합성 오페론 *hisEG*와 *hisDCB*의 프로모터를 교체하는 서열 7 중의 5' 말단 제863-1038번 뉴클레오티드 서열이 보여주는 P_{glyA} 프로모터를 가지며;

상기 시작균은 돌연변이된 ATP-포스포리보실 전이효소를 발현할 수 있는 바, 상기 돌연변이된 ATP-포스포리보실 전이효소는 서열 6이 보여주는 ATP-포스포리보실 전이효소의 제215번의 아스파라진이 라이신으로 돌연변이되고, 제231번의 류신이 페닐알라닌으로 돌연변이되며, 제235번의 트레오닌이 알라닌으로 돌연변이된 효소이며, 바람직하게는, 상기 시작균의 염색체 상에는 상기 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032 염색체 상의 *hisG* 유전자를 교체하는 서열 4 중의 제1007-1852번 뉴클레오티드 서열이 보여주는 *hisG*^{fbr} 유전자를 가지며;

상기 시작균의 염색체 상에는 상기 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032 염색체 상의 *prsA* 유전자의 프로모터를 교체하는 서열 11 중의 5' 말단 제656-847번 뉴클레오티드 서열이 보여주는 P_{sod} 프로모터를 가지거나;

또는, 상기 시작균 중에는 두 개 또는 더욱 많은 카피의 *prsA* 유전자와 *hisG*^{fbr} 유전자를 가지며;

그 중에서, 상기 *prsA* 유전자는 인코딩 서열 5가 보여주는 PrsA의 유전자에서 선택되며; 코드가 상기 PrsA와 비하여 적어도 60%의 상동성을 가지고, 바람직하게는 적어도 70%의 상동성을 가지며, 더욱 바람직하게는 적어도 80% 상동성을 가지고, 나아가 바람직하게는 적어도 95%의 상동성을 가지며, 더욱 바람직하게는 적어도 98% 내지는 99%의 상동성을 가지며 또한 PrsA 활성을 가지는 유전자 중의 하나이고, 바람직하게는, 상기 *prsA* 유전자는 서열표 중의 서열 4가 보여주는 제15-992번 뉴클레오티드 서열인; 것을 특징으로 하는 L-아미노산을 생산하는 재조합균.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 *pgi* 유전자는 인코딩 서열표 중의 서열 14가 보여주는 Pgi의 유전자에서 선택되며; 코드가 상기 Pgi와 비하여 적어도 60%의 상동성을 가지고, 바람직하게는 적어도 70%의 상동성을 가지며, 더욱 바람직하게는 적어도 80% 상동성을 가지고, 나아가 바람직하게는 적어도 95%의 상동성을 가지며, 더욱 바람직하게는 적어도 98% 내지는 99%의 상동성을 가지며 또한 글루코스-6-포스페이트 아이소메라아제 활성을 가지는 유전자 중의 하나이고, 바람직하게는, 상기 *pgi* 유전자는 서열 13이 보여주는 뉴클레오티드 서열이며;

상기 *zwf-opcA* 유전자는 서열표 중의 인코딩 서열표 중의 서열 3이 보여주는 *zwf-opcA*의 유전자에서 선택되며; 코드가 상기 *zwf-opcA*와 비하여 적어도 60%의 상동성을 가지고, 바람직하게는 적어도 70%의 상동성을 가지며, 더욱 바람직하게는 적어도 80% 상동성을 가지고, 나아가 바람직하게는 적어도 95%의 상동성을 가지며, 더욱 바람직하게는 적어도 98% 내지는 99%의 상동성을 가지며 또한 *zwf-opcA* 활성을 가지는 유전자 중의 하나이고, 바람직하게는, 상기 *zwf-opcA* 유전자는 서열 2가 보여주는 뉴클레오티드 서열이며;

상기 *P_{effu}* 프로모터는 서열 12가 보여주는 5' 말단 제635-834번의 뉴클레오티드 서열인; 것을 특징으로 하는 L-아미노산을 생산하는 재조합균.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 *purH* 유전자는 인코딩 서열표 중의 서열 16이 보여주는 *purH*의 유전자에서 선택되며; 코드가 상기 *purH*와 비하여 적어도 60%의 상동성을 가지고, 바람직하게는 적어도 70%의 상동성을 가지며, 더욱 바람직하게는 적어도 80% 상동성을 가지고, 나아가 바람직하게는 적어도 95%의 상동성을 가지며, 더욱 바람직하게는 적어도 98% 내지는 99%의 상동성을 가지며 또한 *purH* 활성을 가지는 유전자 중의 하나이고, 상기 *purH* 유전자는 서열표 중의 서열 15가 보여주는 뉴클레오티드 서열인 것을 특징으로 하는 L-아미노산을 생산하는 재조합균.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 *P_{hom}* 프로모터는 서열 18이 보여주는 5' 말단 제736-865번의 뉴클레오티드 서열인 것을 특징으로 하는 L-아미노산을 생산하는 재조합균.

청구항 13

L-아미노산을 생산하는 재조합균의 구성 방법에 있어서, 하기 단계가 포함되는 바, 즉 시작균 중의 글루코스-6-포스페이트 아이소메라아제 Pgi의 발현을 낮추고, 또한 글루코스-6-포스페이트 데히드로게나아제 *Zwf-OpcA*의 발현을 향상시켜 상기 재조합균을 취득하며;

그 중에서 상기 시작균은 목표 아미노산을 누적시킬 수 있는 균주이며, 더욱 바람직하게는, 상기 목표 아미노산은 L-히스티딘, L-라이신, L-발린, L-트레오닌, L-프롤린 또는 L-히드록시프롤린인; 것을 특징으로 하는 L-아미노산을 생산하는 재조합균의 구성 방법.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 시작균 중의 *Pgi*의 발현을 낮추는 것은 하기 A) 또는 B) 방식을 통하여 구현하는 바, 즉

A) 상기 시작균 염색체 상의 *pgi* 유전자를 불활성화시킨 것으로서, 상기 불활성화는 녹아웃인 것이 바람직하며;

B) 상기 시작균 중의 *pgi* 유전자의 조절 요소를 낮은 전사와 낮은 발현 활성의 조절 요소로 교체하여 구현하며;

상기 시작균 중의 *Zwf-OpcA*의 발현을 향상시키는 것은 하기 C) 또는 D) 방식을 통하여 구현한다.

C) 상기 시작균 중의 *zwf-opcA* 유전자의 카피 수량을 증가시키며;

D) 상기 시작균 염색체 상의 *tkt-tal-zwf-opcA-devB* 오페론의 프로모터를 강한 프로모터로 교체시키는 바, 바람직하게는, 상기 강한 프로모터는 상기 원시균 염색체 상의 *P_{eftu}* 프로모터인; 것을 특징으로 하는 L-아미노산을 생산하는 재조합균의 구성 방법.

청구항 15

제13항에 있어서, 상기 시작균을 취득하는 것은 원시균 염색체 상의 L-히스티딘 합성 오페론 *hisEG*와 *hisDCB*의 프로모터를 각각 강한 프로모터로 교체하는 단계가 포함되는 바, 바람직하게는, 상기 강한 프로모터는 상기 원시균 염색체 상의 *P_{glyA}* 프로모터이며;

바람직하게는 상기 시작균을 취득하는 것에는 더우기 상기 시작균 중의 PRPP 합성 효소 *PrsA*의 발현을 향상시키는 단계를 포함하며;

더욱 바람직하게는, 상기 시작균 중의 *PrsA*의 발현을 향상시키는 것은 하기 E) 또는 F) 방식을 통하여 구현한다.

E) 상기 시작균 중의 *prsA* 유전자의 카피 수량을 증가시키며;

F) 상기 시작균 염색체 상의 *prsA* 유전자의 프로모터를 강한 프로모터로 교체시키는 바, 바람직하게는, 상기 강한 프로모터는 상기 원시균 염색체 상의 *P_{sod}* 프로모터인; 것을 특징으로 하는 L-아미노산을 생산하는 재조합균의 구성 방법.

청구항 16

제13항에 있어서, 상기 시작균을 취득하는 것에는,

dapA 유전자 또는 *lysC* 유전자의 발현을 향상시키는 단계; 또는

발린 합성 유전자 *ilvBNCE*의 발현을 향상시키는 단계; 또는

트레오닌 합성 경로 유전자 *hom* 및 *thrB*의 발현을 향상시키는 단계; 또는

ocd 유전자의 발현을 향상시키는 단계; 또는

p4hD 전자의 발현을 향상시키는 단계가 포함되는; 것을 특징으로 하는 L-아미노산을 생산하는 재조합균의 구성 방법.

청구항 17

제15항에 있어서, 상기 방법에는 나아가 상기 재조합균 중의 AICAR 트랜스메틸라제/IMP 환히드라제 *PurH*의 발현을 향상시키는 단계를 포함하며;

바람직하게는, 상기 재조합균 중의 *PurH*의 발현을 향상시키는 것은 하기 G) 또는 H) 방식을 통하여 구현하는

바, 즉

G) 상기 시작균 중의 *purH* 유전자의 카피 수량을 증가시키며;

F) 상기 시작균 염색체 상의 *purH* 유전자의 프로모터를 강한 프로모터로 교체시키는 바, 바람직하게는, 상기 강한 프로모터는 상기 원시균 염색체 상의 P_{eftu} 프로모터인; 것을 특징으로 하는 L-아미노산을 생산하는 재조합균의 구성 방법.

청구항 18

제15항 또는 제17항에 있어서, 상기 방법에는 나아가 상기 재조합균 중의 아미도포스포리보실 전이효소 PurF의 발현을 약화시키는 단계가 포함되며;

상기 재조합균 중의 PurF의 발현을 약화시키는 것은 약한 프로모터로 *purF* 유전자의 프로모터를 교체시키는 방식으로 구현하며, 더욱 바람직하게는, 상기 시작균 염색체 상의 *purF* 유전자의 프로모터를 상기 원시균 중의 염색체 상의 P_{hom} 프로모터로 교체시키는 것을 통하여 구현하는; 것을 특징으로 하는 L-아미노산을 생산하는 재조합균의 구성 방법.

청구항 19

제13항 내지 제18항의 임의 항에 있어서, 상기 시작균을 취득하기 위한 상기 원시균은 코리네박테리움 속, 다이어리스터 속 또는 브레비박테리움 속으로부터 선택되는 한 가지 세균주이며;

바람직하게는, 상기 코리네박테리움 속의 세균은 *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium pekinense*, *Corynebacterium efficiens*, *Corynebacterium crenatum*, *Corynebacterium thermoaminogenes*, *Corynebacterium aminogenes*, *Corynebacterium lilium*, *Corynebacterium callunae* 및 *Corynebacterium herculis*로부터 선택되는 한 가지 세균주이며;

상기 다이어리스터 속의 세균은 *Microbacterium ammoniaphilum*으로부터 선택되는 한 가지 세균주이며;

상기 브레비박테리움 속의 세균은 *Brevibacteriaceae flvum*, *Brevibacteriaceae lactofermentum* 및 *Brevibacteriaceae ammoniagenes*으로부터 선택되는 한 가지 세균주인; 것을 특징으로 하는 L-아미노산을 생산하는 재조합균의 구성 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 원시균은 야생형 *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032인 것을 특징으로 하는 L-아미노산을 생산하는 재조합균의 구성 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 시작균을 취득하는 것에는 하기 단계가 포함되는 바, 즉

상기 *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 염색체 상의 L-히스티딘 합성 오페론 *hisEG*와 *hisDCB*의 프로모터를 각각 서열 7 중의 5' 말단 제863-1038번 뉴클레오티드가 보여주는 P_{glyA} 프로모터로 교체하며;

상기 *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 이 발현하는 서열 6이 보여주는 ATP-포스포리보실 전이효소는 서열 6이 보여주는 ATP-포스포리보실 전이효소의 제215번의 아스파라진을 라이신으로 돌연변이시키고, 제231번의 류신이 페닐알라닌으로 돌연변이시키며, 제235번의 트레오닌이 알라닌으로 돌연변이시키며; 바람직하게는, 상기 돌연변이를 진행하기 위한 유전자는 서열 4 중의 제1007-1852번 뉴클레오티드 서열이 보여주는 *hisG^{fbr}* 유전자이며;

바람직하게는, 상기 시작균을 취득하는 것에는 나아가 하기 단계가 포함되는 바, 즉

상기 *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 염색체 상의 *prsA* 프로모터를 서열 11 중의 5' 말단 제656-847번 뉴클레오티드가 보여주는 P_{sod} 프로모터로 교체하거나;

또는 나아가 하기 단계를 포함하는 바, 즉

상기 *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 중의 *prsA* 유전자의 카피 수량을 증가시키고,

상기 *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 중의 $hisG^{fbr}$ 유전자의 카피 수량을 증가시키며;

그 중에서, 상기 *prsA* 유전자는 인코딩 서열 5가 보여주는 PrsA의 유전자에서 선택되며; 코드가 상기 PrsA와 비하여 적어도 60%의 상동성을 가지고, 바람직하게는 적어도 70%의 상동성을 가지며, 더욱 바람직하게는 적어도 80% 상동성을 가지고, 나아가 바람직하게는 적어도 95%의 상동성을 가지며, 더욱 바람직하게는 적어도 98% 내지는 99%의 상동성을 가지며 또한 PrsA 활성을 가지는 유전자 중의 하나이고, 바람직하게는, 상기 *prsA* 유전자는 서열표 중의 서열 4가 보여주는 제15-992번 뉴클레오티드 서열인; 것을 특징으로 하는 L-아미노산을 생산하는 제조합균의 구성 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 *pgi* 유전자는 인코딩 서열표 중의 서열 14가 보여주는 Pgi의 유전자에서 선택되며; 코드가 상기 Pgi와 비하여 적어도 60%의 상동성을 가지고, 바람직하게는 적어도 70%의 상동성을 가지며, 더욱 바람직하게는 적어도 80% 상동성을 가지고, 나아가 바람직하게는 적어도 95%의 상동성을 가지며, 또한 글루코스-6-포스페이트 아이소메라아제 활성을 가지는 유전자 중의 하나이고, 바람직하게는, 상기 *pgi* 유전자는 서열 13이 보여주는 뉴클레오티드 서열이며;

상기 *zwf-opcA* 유전자는 인코딩 서열표 중의 서열 3이 보여주는 *zwf-opcA*의 유전자에서 선택되며; 코드가 상기 *zwf-opcA*와 비하여 적어도 60%의 상동성을 가지고, 바람직하게는 적어도 70%의 상동성을 가지며, 더욱 바람직하게는 적어도 80% 상동성을 가지고, 나아가 바람직하게는 적어도 95%의 상동성을 가지며, 더욱 바람직하게는 적어도 98% 내지는 99%의 상동성을 가지며 또한 *zwf-opcA* 활성을 가지는 유전자 중의 하나이고, 바람직하게는, 상기 *zwf-opcA* 유전자는 서열 2가 보여주는 뉴클레오티드 서열이며;

상기 P_{eftu} 프로모터는 서열 12가 보여주는 5' 말단 제635-834번의 뉴클레오티드 서열인; 것을 특징으로 하는 L-아미노산을 생산하는 제조합균의 구성 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 *purH* 유전자는 인코딩 서열표 중의 서열 16이 보여주는 *purH*의 유전자에서 선택되며; 코드가 상기 *purH*와 비하여 적어도 60%의 상동성을 가지고, 바람직하게는 적어도 70%의 상동성을 가지며, 더욱 바람직하게는 적어도 80% 상동성을 가지고, 나아가 바람직하게는 적어도 95%의 상동성을 가지며, 더욱 바람직하게는 적어도 98% 내지는 99%의 상동성을 가지며 또한 *purH* 활성을 가지는 유전자 중의 하나이고, 상기 *purH* 유전자는 서열표 중의 서열 15가 보여주는 뉴클레오티드 서열인 것을 특징으로 하는 L-아미노산을 생산하는 제조합균의 구성 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 P_{hom} 프로모터는 서열 18이 보여주는 5' 말단 제736-865번의 뉴클레오티드 서열인 것을 특징으로 하는 L-아미노산을 생산하는 제조합균의 구성 방법.

청구항 25

L-아미노산을 생산하는 방법에 있어서, 청구항 1 내지 12의 재조합균을 발효 배양하는 단계를 포함하는 바, 상기 L-아미노산은 L-히스티딘, L-라이신, L-발린, L-트레오닌, L-프롤린 또는 L-히드록시프롤린이 바람직한 것을 특징으로 하는 L-아미노산을 생산하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 미생물 발효 분야에 관한 것으로서, 특히 미생물 발효를 통하여 L-아미노산을 생산하는 방법 및 이의 전용 재조합균에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

미생물 발효법을 통하여 L-아미노산을 생산하는 것은 현재 가장 널리 사용되고 있는 아미노산 생산 방법으로서, 아미노산 생산균의 발효 생산 성능은 발효법이 대규모 산업화 응용을 구현할 수 있을지 여부에 영향을 미치는 주요한 요소이다. 현재 여전히 소수의 아미노산 제품은 발효 성능이 훌륭한 생산 균주가 부족하기 때문에 발효법으로 생산을 구현하지 못하고 있다. 이미 발효법으로 생산을 구현한 아미노산 생산 균주는 생산 원가를 절감하기 위하여 이의 산 수율 수준과 당-산 전환율은 여전히 진일보로 제고되어야 한다. L-히스티딘을 예로 들면, L-히스티딘은 인간과 동물의 제9번째 필수 아미노산으로서, 인체 생장 발육, 산화 방지 및 면역 조절 등 중요한 생리 과정에 참여하고, 중요한 약용 아미노산이며 심장 질환, 빈혈, 위장 궤양 치료의 수액 제제에 이용될 수 있다. 현재 L-히스티딘 생산은 주로 돼지(소) 혈분을 원료로 하는 단백질 가수분해 추출법을 이용하는 바, 단백질 가수분해 추출법은 원료 원가가 높고 이용율이 낮으며, 추출 공정이 복잡하고 환경 오염 등 큰 결함을 갖고 있어, L-히스티딘의 생산 원가가 높고 가격이 비싸게 된다. 미생물 발효법으로 L-히스티딘을 생산하는 것은 아직 대규모의 산업화 응용을 구현하지 못하고 있다. L-히스티딘의 생물 합성은 뉴클레오타이드 합성과 전구체 물질을 경쟁하고, 대사 조절 제어 기전이 복잡하며 합성 과정 중에 에너지 수요가 높음 등의 특징을 가짐으로써, 이의 공정균의 산 수율과 전환율이 상대적으로 낮게 된다. L-히스티딘 생산 균주의 생산은 주로 다수 회의 전통적인 돌연변이 스크린을 선정하고, 돌연변이 균주의 기초 상에서 유전공학 개조를 진행하는 방법을 이용한다. 돌연변이 스크린을 통하여 취득한 균주는 대량의 부정효과 돌연변이를 누적하고 있기 때문에, 균주 생장이 느리고 환경 저항성이 떨어지며 영양 수요가 높아지는 문제를 가진다. 이러한 결함은 균주의 산업화 응용을 제약하고 있다. 현재 시스템 대사 공정을 통한 L-히스티딘 공정균의 개조 및 구성에 관한 연구는 단지 하나만 보도되어 있다 (Doroshenko, V. G., Lobanov, A. O., Fedorina, E. A., 2013. The directed modification of *Escherichia coli* MG1655 to obtain histidine-producing mutants. Appl Biochem Microbiol. 49, 130-135.). 해당 연구는 야생형 대장간균의 MG1655를 시작균으로 하여, *hisG* 유전자 중에 E271K 돌연변이를 도입하여, 히스티딘의 피드백 억제 조절을 약화시키며; 히스티딘 합성 오페론의 전사 감쇠 인자 *hisL*을 녹아웃시키고, 히스티딘 합성 오페론의 발현을 증가시키며; 아울러 *purR* 유전자를 녹아웃시키고, 히스티딘 합성 전구체 PRPP의 합성을 증가시켜 L-히스티딘을 생산하는 공정균을 구성하였다. 해당 연구에서는 단지 L-히스티딘 터미널 합성의 개조를 진행하였고, 이의 L-히스티딘의 수율은 단지 4.9 g/L로서, 산업화 응용을 구현하는 것과 비교적 큰 차이를 보이고 있다.

[0003]

L-히스티딘 생물 합성의 주요한 커런트 캐링 경로는 펜토오스 포스페이트 경로이고, 글루코스를 카본 소스로 할 때, 펜토오스 포스페이트 경로를 통하여 L-히스티딘 합성 전구체 포스포리보실 피로포스페이트(PRPP)를 생성하고, PRPP가 동시에 뉴클레오타이드 합성 경로와 L-히스티딘 합성 경로로 진입하여, 뉴클레오타이드 합성 경로를 통하여 L-히스티딘 합성의 다른 한 전구체 ATP를 생성한다.

[0004]

그리고, 펜토오스 포스페이트 경로는 또한 여러 가지 아미노산(예를 들면 L-라이신, L-발린, L-트레오닌, L-프롤린 및 L-히드록시프롤린 등) 합성에 필요한 보조 인자 NADPH의 주요한 생성 경로이며, 그 중에서 1 분자의 L-라이신을 합성하려면 4 분자의 NADPH를 소모하여야 하고, 1 분자의 L-트레오닌, L-프롤린 및 L-히드록시 프롤린을 합성하려면 3 분자의 NADPH를 소모하여야 하며, 1 분자의 L-발린을 합성하려면 2 분자의 NADPH를 소모하여야 한다.

[0005]

불활성 당분해 경로의 글루코스-6-포스페이트 아이소메라아제를 통하여 카본 대사의 흐름을 펜토오스 포스페이트 경로로 가이드할 수 있지만, 균주의 생장과 글루코스 대사 능력이 약화되기 때문에 균주 발효 생산 중의 응용에 불리하다(Marx, A., Hans, S., Mockel, B., Bathe, B., de Graaf, A. A., McCormack, A. C., Stapleton, C., Burke, K., O'Donohue, M., Dunican, L. K., 2003. Metabolic phenotype of phosphoglucose isomerase

mutants of *Corynebacterium glutamicum*. J Biotechnol. 104, 185-197.). 본 발명자의 전 단계의 연구 결과에 의하여 증명된데 의하면, 글루코스-6-포스페이트 아이소메라아제 인코딩 유전자 *pgi*를 녹아웃시키면, 균주의 성장과 글루코스 대사 능력이 현저하게 낮아지며, 아울러 L-히스티딘 수율도 따라 낮아진다. 그리고, 본 발명자는 또한 단독으로 글루코스-6-포스페이트 아이소메라아제의 발현량을 향상시키는 것은 L-히스티딘 수율의 향상에 큰 영향을 미치지 못함을 발견하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 L-아미노산, 특히 펜토오스 포스페이트 경로에 의하여 전구체 물질 또는 보조 인자 NADPH를 제공하여 합성되는 L-아미노산, 예를 들면, L-히스티딘, L-라이신, L-발린, L-트레오닌, L-프롤린 및 L-히드록시프롤린 수율을 향상시킬 수 있는 재조합균, 이의 구성 방법 및 상기 재조합균을 이용하여 L-아미노산을 생산하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 이를 위하여, 본 발명의 일 방법에 의하면, L-아미노산을 생산하는 재조합균을 제공하는 바, 상기 재조합균은 시작균에 비하여 낮아진 글루코스-6-포스페이트 아이소메라아제 *Pgi*의 발현과 향상된 글루코스-6-포스페이트 데히드로게나아제 *Zwf-OpcA*의 발현을 가지며, 그 중에서 상기 시작균은 목표 아미노산을 누적시킬 수 있는 균주이다.

[0008] 한 실시방식에 의하면, 원시균의 염색체에 대하여 돌연변이 또는 유전공학 개조를 진행하여 상기 시작균을 취득한다. 목표 아미노산을 취득하기 위하여, 상기 시작균은 종래의 목표 아미노산을 누적시킬 수 있는 균주일 수도 있고, 또는 적합한 원시균에 대하여 유전공학 개조를 진행해서 취득한 목표 아미노산을 누적시킬 수 있는 균주일 수도 있다. 높은 수율의 공정균을 취득하기 위하여, 목표 아미노산에 대하여 비교적 높은 수율을 가지는 균주를 시작균으로 하는 것이 바람직하다.

[0009] 본 발명에서 언급되는 목표 아미노산은 펜토오스 포스페이트 경로에 의하여 전구체 물질 또는 보조 인자 NADPH를 제공하여 합성되는 L-아미노산이다. 바람직하게는, 상기 목표 아미노산은 L-히스티딘, L-라이신, L-발린, L-트레오닌, L-프롤린 또는 L-히드록시프롤린이다.

[0010] 한 실시방식에 의하면, 상기 재조합균은 시작균에 비하여 *pgi* 유전자 발현을 약화시키고, 아울러 *zwf-opcA* 유전자의 향상된 발현을 가진다. 구체적으로 말하면, 상기 재조합균의 염색체 상의 *pgi* 유전자는 이미 불활성화, 바람직하게는 이미 녹아웃되거나, 또는 *pgi* 유전자의 조절 요소가 이미 낮은 전사 또는 낮은 발현 활성의 조절 요소로 교체되고, 아울러 상기 재조합균 중에는 두 개 또는 더욱 많은 카피의 *zwf-opcA* 유전자를 가지거나, 또는 *tkt-tal-zwf-opcA-devB* 오페론의 프로모터가 강한 프로모터로 교체되는 바, 예를 들면 원시균의 P_{eftu} 프로모터로 교체된다.

[0011] L-히스티딘을 생산하는 재조합균에 있어서, 이의 시작균은 원시균에 비하여 L-히스티딘 합성 오페론의 *hisEG* 유전자와 *hisDCB* 유전자의 향상된 발현을 가질 수 있다. 구체적으로 말하면, 강한 프로모터로 상기 유전자의 프로모터를 교체할 수 있다. 예를 들면, 원시균 염색체 상의 P_{glyA} 프로모터로 원시균의 염색체 상의 *hisEG*와 *hisDCB*의 프로모터를 교체한다. 나아가, 바람직하게는 상기 시작균은 원시균에 비하여 또한 PRPP 합성 효소 *PrsA*의 향상된 발현을 가질 수 있다. 더욱 바람직하게는, 상기 시작균 중에는 두 개 또는 더욱 많은 카피의 *prsA* 유전자를 가지거나, 또는 강한 프로모터로 *prsA* 유전자의 프로모터를 교체시키는 바, 예를 들면 원시균의 P_{sod} 프로모터로 *prsA* 유전자의 프로모터를 교체시킬 수 있다.

[0012] L-라이신을 생산하는 재조합균에 있어서, 이의 시작균은 원시균에 비하여 *dapA* 유전자(디히드로디피콜린산 합성 효소의 인코딩 유전자) 또는 *lysC* 유전자(아스파르트키나아제의 인코딩 유전자)의 향상된 발현을 가진다 (Cremer, J., Eggeling, L., Sahm, H., 1991. Control of the lysine biosynthesis sequence in *Corynebacterium glutamicum* as analyzed by overexpression of the individual corresponding genes. Appl Environ Microbiol. 57, 1746-1752). 구체적으로 말하면, 상기 시작균 중에는 두 개 또는 더욱 많은 카피의 *dapA* 유전자 또는 *lysC* 유전자를 가지거나, 또는 강한 프로모터로 *dapA* 유전자 또는 *lysC* 유전자의 프로모터를 교체시킬 수 있다.

- [0013] L-발린을 생산하는 재조합균에 있어서, 이의 시작균은 원시균에 비하여 발린 합성 유전자 *ilvBNCE*의 향상된 발현을 가진다(Blombach, B., Schreiner, M. E., Holatko, J., Bartek, T., Oldiges, M., Eikmanns, B. J., 2007. l-Valine production with pyruvate dehydrogenase complex-deficient *Corynebacterium glutamicum*. Appl Environ Microbiol. 73, 2079-2084). 구체적으로 말하면, 상기 시작균 중에는 두 개 또는 더욱 많은 카피의 *ilvBNCE* 유전자를 가지거나, 또는 강한 프로모터로 *ilvBNCE* 유전자의 프로모터를 교체시킬 수 있다.
- [0014] L-트레오닌을 생산하는 재조합균에 있어서, 이의 시작균은 원시균에 비하여 트레오닌 합성 경로 유전자 *hom*과 *thrB*의 향상된 발현을 가진다(Reinscheid, D. J., Kronmeyer, W., Eggeling, L., Eikmanns, B. J., Sahm, H., 1994. Stable expression of *hom-1-thrB* in *Corynebacterium glutamicum* and its effect on the carbon flux to threonine and related amino acids. Appl Environ Microbiol. 60, 126-132). 구체적으로 말하면, 상기 시작균 중에는 두 개 또는 더욱 많은 카피의 *hom*과 *thrB* 유전자를 가지거나, 또는 강한 프로모터로 각각 *hom* 유전자와 *thrB* 유전자의 프로모터를 교체시킬 수 있다.
- [0015] L-프로린을 생산하는 재조합균에 있어서, 이의 시작균은 원시균에 비하여 *ocd* 유전자(오르니틴 시클로데아미나아제 인코딩 유전자)의 향상된 발현을 가진다(Jensen, J. V. K., Wendisch, V., 2013. Ornithine cyclodeaminase-based proline production by *Corynebacterium glutamicum*. Microb Cell Fact. 12, 63). 구체적으로 말하면, 상기 시작균 중에는 두 개 또는 더욱 많은 카피의 *ocd* 유전자를 가지거나, 또는 강한 프로모터로 *ocd* 유전자의 프로모터를 교체시킬 수 있다.
- [0016] L-히드록시프로린을 생산하는 재조합균에 있어서, 이의 시작균은 원시균에 비하여 *p4hD* 유전자(프로린히드록시화효소 인코딩 유전자)의 향상된 발현을 가진다(Yi, Y., Sheng, H., Li, Z., Ye, Q., 2014. Biosynthesis of trans-4-hydroxyproline by recombinant strains of *Corynebacterium glutamicum* and *Escherichia coli*. BMC Biotechnol. 14, 44.). 구체적으로 말하면, 상기 시작균 중에는 두 개 또는 더욱 많은 카피의 *p4hD* 유전자를 가지거나, 또는 강한 프로모터로 *p4hD* 유전자의 프로모터를 교체시킬 수 있다.
- [0017] L-히스티딘을 생산하는 재조합균에 있어서, 하나의 바람직한 실시방식에 의하면, 상기 재조합균은 상기 시작균에 비하여 AICAR 트랜스메틸라제/IMP 환히드라제 *PurH*의 발현을 증가시킨다. 바람직하게는, 상기 시작균 중에는 두 개 또는 더욱 많은 카피의 *purH* 유전자를 가지거나, 또는 강한 프로모터로 *purH* 유전자의 프로모터를 교체시키는 바, 예를 들면 원시균의 P_{eftu} 프로모터로 *purH* 유전자의 프로모터를 교체시킬 수 있다.
- [0018] 하나의 더욱 바람직한 실시방식에 의하면, 상기 재조합균은 상기 시작균에 비하여 약화된 아미도포스포리보실 전이효소 *PurF*의 발현을 가진다. 구체적으로 말하면, 약한 프로모터로 *purF* 유전자의 프로모터를 교체할 수 있다. 바람직하게는, 상기 재조합균의 염색체 상에서 상기 원시균 중의 P_{hom} 프로모터로 *purF* 유전자의 프로모터를 교체시킨다.
- [0019] 상기 서로 다른 실시방식 중에서 강한 프로모터의 예시를 보여주기는 하였지만, 강한 프로모터에 대하여 본 명세서에서는 특별한 제한이 없으며, 유전자의 발현을 향상시킬수만 있으면 된다. 본 발명에 이용될 수 있는 강한 프로모터로는 원시균의 P_{eftu} , P_{sod} , P_{glyA} , P_{pck} , P_{pgk} 프로모터 등이 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0020] 바람직하게는, 상기 원시균은 코리네박테리움 속, 다이어리스터 속 또는 브레비박테리움 속으로부터 선택되는 한 가지 세균주이다. 바람직하게는, 상기 코리네박테리움 속의 세균은 *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium pekinense*, *Corynebacterium efficiens*, *Corynebacterium crenatum*, *Corynebacterium thermoaminogenes*, *Corynebacterium aminogenes*, *Corynebacterium lilium*, *Corynebacterium callunae* 및 *Corynebacterium herculis*으로부터 선택되는 한 가지 세균주이다. 바람직하게는, 상기 다이어리스터 속의 세균은 *Microbacterium ammoniaphilum*으로부터 선택되는 한 가지 세균주이다. 바람직하게는, 상기 브레비박테리움 속의 세균은 *Brevibacteriaceae flvum*, *Brevibacteriaceae lactofermentum* 및 *Brevibacteriaceae ammoniagenes*으로부터 선택되는 한 가지 세균주이다.
- [0021] 한 구체적인 실시방식에 의하면, 상기 원시균은 야생형 *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032이다.
- [0022] 이러한 상황 하에서, L-히스티딘을 생산하는 재조합균에 있어서, 상기 시작균의 염색체 상에는 각각 상기 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032 염색체 상의 L-히스티딘 합성 오페론 *hisEG*와 *hisDCB*의 프로모터를 교체로 하는 서열 7 중의 5' 말단 제863-1038번 뉴클레오타이드 서열이 보여주는 P_{glyA} 프로모터 및 상기 시작균이 돌연변이를 발현할 수 있는 ATP-포스포리보실 전이효소를 갖고 있다.

- [0023] 상기 돌연변이된 ATP-포스포리보실 전이효소는 서열 6이 보여주는 ATP-포스포리보실 전이효소의 제215번의 아스파라긴이 라이신으로 돌연변이되고, 제231번의 류신이 페닐알라닌으로 돌연변이되며, 제235번의 트레오닌이 알라닌으로 돌연변이된 효소이다. 바람직하게는, 상기 시작균의 염색체 상에는 상기 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032 염색체 상의 *hisG* 유전자를 교체로 하는 서열 4 중의 제1007-1852번 뉴클레오타이드 서열이 보여주는 *hisG*^{fbr} 유전자를 가진다.
- [0024] 하나의 바람직한 실시방식에 의하면, 상기 시작균의 염색체 상에는 상기 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032 염색체 상의 *prsA* 유전자의 프로모터를 교체로 하는 서열 11 중의 5' 말단 제656-847번 뉴클레오타이드 서열이 보여주는 *P*_{sod} 프로모터를 가진다.
- [0025] 다른 하나의 바람직한 실시방식에 의하면, 상기 시작균 중에는 두 개 또는 더욱 많은 카피의 *prsA* 유전자와 *hisG*^{fbr} 유전자를 가진다. 상기 *prsA* 유전자는 인코딩 서열 5가 보여주는 PrsA의 유전자에서 선택될 수 있으며; 코드가 상기 PrsA와 비교하여 적어도 60%의 상동성을 가지고, 바람직하게는 적어도 70%의 상동성을 가지며, 더욱 바람직하게는 적어도 80% 상동성을 가지고, 나아가 바람직하게는 적어도 95%의 상동성을 가지며, 더욱 바람직하게는 적어도 98% 내지는 99%의 상동성을 가지며 또한 PrsA 활성을 가지는 유전자 중의 하나이다. 구체적으로는 서열표 중의 서열 4가 보여주는 제15-992번의 뉴클레오타이드 서열일 수 있다.
- [0026] 본 발명의 재조합균에 있어서, 상기 *pgi* 유전자는 인코딩 서열표 중의 서열 14가 보여주는 Pgi의 유전자에서 선택될 수 있으며; 코드가 상기 Pgi와 비교하여 적어도 60%의 상동성을 가지고, 바람직하게는 적어도 70%의 상동성을 가지며, 더욱 바람직하게는 적어도 80% 상동성을 가지고, 나아가 바람직하게는 적어도 95%의 상동성을 가지며, 더욱 바람직하게는 적어도 98% 내지는 99%의 상동성을 가지며 또한 글루코스-6-포스페이트 아이소메라아제 Pgi 활성을 가지는 유전자 중의 하나이다. 구체적으로는 서열 13이 보여주는 뉴클레오타이드 서열일 수 있다.
- [0027] 상기 *zwf-opcA* 유전자는 인코딩 서열표 중의 서열 3이 보여주는 *zwf-opcA*의 유전자에서 선택될 수 있으며; 코드가 상기 *zwf-opcA*와 비교하여 적어도 60%의 상동성을 가지고, 바람직하게는 적어도 70%의 상동성을 가지며, 더욱 바람직하게는 적어도 80% 상동성을 가지고, 나아가 바람직하게는 적어도 95%의 상동성을 가지며, 더욱 바람직하게는 적어도 98% 내지는 99%의 상동성을 가지며 또한 *zwf-opcA* 활성을 가지는 유전자 중의 하나이다. 구체적으로는 서열 2가 보여주는 뉴클레오타이드 서열일 수 있다.
- [0028] 상기 *P*_{effu} 프로모터는 서열 12가 보여주는 5' 말단 제635-834번의 뉴클레오타이드 서열일 수 있다.
- [0029] 상기 *purH* 유전자는 인코딩 서열표 중의 서열 16이 보여주는 *purH*의 유전자에서 선택될 수 있으며; 코드가 상기 *purH*와 비교하여 적어도 60%의 상동성을 가지고, 바람직하게는 적어도 70%의 상동성을 가지며, 더욱 바람직하게는 적어도 80% 상동성을 가지고, 나아가 바람직하게는 적어도 95%의 상동성을 가지며, 더욱 바람직하게는 적어도 98% 내지는 99%의 상동성을 가지며 또한 *purH* 활성을 가지는 유전자 중의 하나이고, 상기 *purH* 유전자는 서열표 중의 서열 15가 보여주는 뉴클레오타이드 서열일 수 있다.
- [0030] 상기 *P*_{hom} 프로모터는 서열 18이 보여주는 5' 말단 제736-865번의 뉴클레오타이드 서열일 수 있다.
- [0031] 본 발명의 재조합균에 있어서, 어떠한 유전자를 포함하는 재조합 플라스미드를 도입하여 해당 유전자의 카피 수량을 증가시킬 수 있고, 또한 직접 어떠한 유전자를 균주 염색체 상의 적합한 위치에 삽입할 수도 있다. 재조합 플라스미드를 구성하는 벡터에 대하여 제한이 없으며, 임의의 적합한 플라스미드일 수 있는 바, 예를 들면 pXMJ19이다.
- [0032] 본 발명의 두번째 방면에 의하면, L-아미노산을 생산하는 재조합균의 구성 방법을 제공한다. 상기 방법에는 하기 단계가 포함되는 바, 즉 시작균 중의 글루코스-6-포스페이트 아이소메라아제 Pgi의 발현을 낮추고, 또한 글루코스-6-포스페이트 데히드로게나아제 *Zwf-OpcA*의 발현을 향상시켜 상기 재조합균을 취득하는 바, 그 중에서 상기 시작균은 목표 아미노산을 누적시킬 수 있는 균주이다.
- [0033] 공지된 방법에 의하여 예를 들면 돌연변이 또는 유전공학 개조 등의 방법을 통하여 시작균을 취득하거나, 또는 기존의 목표 아미노산을 생산할 수 있는 균주를 시작균으로 채용할 수 있다. 바람직하게는 높은 수율의 균주를 사용하는 것이다.
- [0034] 본 발명의 목표 아미노산은 L-히스티딘, L-라이신, L-발린, L-트레오닌, L-프롤린 또는 L-히드록시프롤린 등인 것이 바람직하다.

- [0035] 하나의 실시방식에 의하면, 시작균 중의 Pgi의 발현을 낮추는 것은 하기 A) 또는 B) 방식을 통하여 구현한다.
- [0036] A) 상기 시작균 염색체 상의 *pgi* 유전자를 불활성화시킨 것으로서, 상기 불활성화는 녹아웃인 것이 바람직하며;
- [0037] B) 상기 시작균 중 *pgi* 유전자의 조절 요소를 낮은 전사 또는 낮은 발현 활성의 조절 요소로 교체한다.
- [0038] 상기 시작균 중 Zwf-OpcA의 발현을 향상시키는 것은 하기 C) 또는 D) 방식을 통하여 구현한다.
- [0039] C) 상기 시작균 중 *zwf-opcA* 유전자의 카피 수량을 증가시키며;
- [0040] D) 상기 시작균 염색체 상 *tkt-tal-zwf-opcA-devB* 오페론의 프로모터를 강한 프로모터로 교체시키는 바, 예를 들면 상기 원시균 염색체 상의 P_{eftu} 프로모터이다.
- [0041] L-히스티딘에 있어서, 한 실시방식에 의하면, 상기 시작균을 취득하는 것은 원시균 염색체 상의 L-히스티딘 합성 오페론 *hisEG*와 *hisDCB*의 프로모터를 각각 강한 프로모터로 교체하는 것이 포함한다. 예를 들면 원시균 염색체 상의 P_{glyA} 프로모터인 단계를 포함할 수 있다. 나아가, 바람직하게는 상기 시작균을 취득하는 것에는 더욱 상기 시작균 중 PRPP 합성 효소 PrsA의 발현을 향상시키는 단계를 포함할 수 있다. 더욱 바람직하게는, 상기 시작균 중 PrsA의 발현을 향상시키는 것은 하기 E) 또는 F) 방식을 통하여 구현한다.
- [0042] E) 상기 시작균 중 *prsA* 유전자의 카피 수량을 증가시키며;
- [0043] F) 상기 시작균 염색체 상 *prsA* 유전자의 프로모터를 강한 프로모터로 교체시키는 바, 예를 들면 상기 원시균 염색체 상의 P_{sod} 프로모터이다.
- [0044] L-라이신에 있어서, 한 실시방식에 의하면, *dapA* 유전자(디히드로디피콜린산 합성 효소의 인코딩 유전자) 또는 *lysC* 유전자(아스파르트키나아제의 인코딩 유전자)의 발현을 향상시키는 것을 통하여 L-라이신을 누적시킬 수 있는 시작균을 취득할 수 있다. 구체적으로 말하면, 상기 시작균 중의 *dapA* 유전자 또는 *lysC* 유전자의 카피 수량을 증가시키거나, 또는 강한 프로모터로 *dapA* 유전자 또는 *lysC* 유전자의 프로모터를 교체시킨다.
- [0045] L-발린에 있어서, 한 실시방식에 의하면, 발린 합성 유전자 *ilvBNCE*의 발현을 향상시키는 것을 통하여 상기 시작균을 취득할 수 있다. 구체적으로 말하면, 상기 시작균 중의 *ilvBNCE* 유전자의 카피 수량을 증가시키거나, 또는 강한 프로모터로 *ilvBNCE* 유전자의 프로모터를 교체시킨다.
- [0046] L-트레오닌에 있어서, 한 실시방식에 의하면, 상기 시작균을 취득하는 것에는 트레오닌 합성 경로 유전자 *hom*과 *thrB*의 발현을 향상시키는 단계가 포함된다. 구체적으로 말하면, 상기 시작균 중의 *hom* 유전자와 *thrB* 유전자의 카피 수량을 증가시키거나, 또는 강한 프로모터로 각각 *hom*과 *thrB* 유전자의 프로모터를 교체시킨다.
- [0047] L-프롤린에 있어서, 한 실시방식에 의하면, 상기 시작균을 취득하는 것에는 *ocd* 유전자(오르니틴 시클로테아미나아제 인코딩 유전자)의 발현을 향상시키는 단계가 포함된다. 구체적으로 말하면, 상기 시작균 중의 *ocd* 유전자의 카피 수량을 증가시키거나, 또는 강한 프로모터로 *ocd* 유전자의 프로모터를 교체시킨다.
- [0048] L-히드록시프롤린에 있어서, 한 실시방식에 의하면, 상기 시작균을 취득하는 것에는 *p4hD* 유전자(프롤린히드록시화효소 인코딩 유전자)의 발현을 향상시키는 단계가 포함된다. 구체적으로 말하면, 상기 시작균 중의 *p4hD* 유전자의 카피 수량을 증가시키거나, 또는 강한 프로모터로 *p4hD* 유전자의 프로모터를 교체시킨다. 한 바람직한 실시방식에 의하면, L-히스티딘에 있어서, 상기 방법에는 나아가 상기 재조합균 중의 AICAR 트랜스메틸라제/IMP 환히드라제 PurH의 발현을 향상시키는 단계를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 상기 재조합균 중의 PurH의 발현을 향상시키는 것은 하기 G) 또는 H) 방식을 통하여 구현할 수 있다.
- [0049] G) 상기 시작균 중 *purH* 유전자의 카피 수량을 증가시키며;
- [0050] H) 상기 시작균 염색체 상 *purH* 유전자의 프로모터를 강한 프로모터로 교체시키는 바, 예를 들면 상기 원시균 염색체 상의 P_{eftu} 프로모터이다.
- [0051] 더욱 바람직한 실시방식에 의하면, L-히스티딘에 있어서, 상기 방법에는 나아가 상기 재조합균 중의 아미도포스포리보실 전이효소 PurF를 약화시키는 단계를 포함할 수 있다. 구체적으로 말하면, 약한 프로모터로 *purF* 유전자의 프로모터를 교체할 수 있다. 바람직하게는, 상기 재조합균 중 PurF의 발현을 약화시키는 것은 상기 시작균 염색체 상의 *purF* 유전자의 프로모터를 상기 원시균 중 염색체 상의 P_{hom} 프로모터로 교체시키는 것을 통하여 구현한다.

- [0052] 마찬가지로, 강한 프로모터에 대하여 특별한 제한이 없으며, 유전자의 발현을 향상시킬수만 있으면 된다. 예를 들면 원시균의 P_{eftu} , P_{sod} , P_{glyA} , P_{pck} 또는 P_{pgk} 프로모터 등이 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0053] 바람직하게는, 원시균으로 가능한 균주는 코리넨박테리움 속, 다이어리스터 속 또는 브레비박테리움 속으로부터 선택되는 한 가지 세균주이다. 바람직하게는, 상기 코리넨박테리움 속의 세균은 *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium pekinense*, *Corynebacterium efficiens*, *Corynebacterium crenatum*, *Corynebacterium thermoaminogenes*, *Corynebacterium aminogenes*, *Corynebacterium lilium*, *Corynebacterium callunae* 및 *Corynebacterium herculis*으로부터 선택되는 한 가지 세균주이다. 바람직하게는, 상기 다이어리스터 속의 세균은 *Microbacterium ammoniaphilum*으로부터 선택되는 한 가지 세균주이다. 바람직하게는, 상기 브레비박테리움 속의 세균은 *Brevibacteriaceae flvum*, *Brevibacteriaceae lactofermentum* 및 *Brevibacteriaceae ammoniagenes*으로부터 선택되는 한 가지 세균주이다. 가장 바람직하게는 *Corynebacterium glutamicum* 또는 *Brevibacteriaceae flvum*이다.
- [0054] 한 구체적인 실시방식에 의하면, 원시균은 야생형 *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032이다.
- [0055] 상기 실시방식에 있어서, L-히스티딘을 생산하는 재조합균에 있어서, 상기 시작균은 상기 원시균에 대하여 하기 재조합을 진행하여 취득할 수 있다.
- [0056] 상기 *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 염색체 상L-히스티딘 합성 오페론 *hisEG*와 *hisDCB*의 프로모터를 각각 서열 7 중의 5' 말단 제863-1038번 뉴클레오티드(또는 서열 8 중의 5' 말단 제752-927번 뉴클레오티드)가 보여주는 P_{glyA} 프로모터로 교체하고,
- [0057] 상기 *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 이 발현하는 서열 6이 보여주는ATP-포스포리보실 전이효소의 제215번의 아스파라진을 라이신으로 돌연변이시키고, 제231번의 류신을 페닐알라닌으로 돌연변이시키며, 제235번의 트레오닌을 알라닌으로 돌연변이시킨다. 상기 돌연변이된 유전자는 서열 4 중의 제1007-1852번 뉴클레오티드가 보여주는 *hisG^{fbr}* 유전자이다.
- [0058] 하나의 바람직한 실시방식에 의하면, L-히스티딘 누적 효과가 더욱 좋은 시작균을 취득하기 위하여, 나아가 상기 *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 염색체에 대하여 개조를 진행하여, 염색체 상의 *prsA* 유전자의 프로모터를 서열 11 중의 5' 말단 제656-847번 뉴클레오티드 서열이 보여주는 P_{sod} 프로모터로 교체시킨다.
- [0059] 다른 한 바람직한 실시방식에 의하면, 상기 *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 중의 *prsA* 유전자의 카피 수량과 상기 *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 중의 *hisG^{fbr}* 유전자의 카피 수량을 증가시켜 L-히스티딘 누적 효과가 더욱 좋은 시작균을 취득할 수 있다.
- [0060] 상기 *prsA* 유전자는 인코딩 서열 5가 보여주는 PrsA의 유전자에서 선택될 수 있으며; 코드가 상기 PrsA와 비교하여 적어도 60%의 상동성을 가지고, 바람직하게는 적어도 70%의 상동성을 가지며, 더욱 바람직하게는 적어도 80% 상동성을 가지고, 나아가 바람직하게는 적어도 95%의 상동성을 가지며, 더욱 바람직하게는 적어도 98% 내지는 99%의 상동성을 가지며 또한 PrsA 활성을 가지는 유전자 중의 하나이다. 구체적으로는 서열표 중의 서열 4가 보여주는 제15-992번의 뉴클레오티드 서열일 수 있다.
- [0061] 상기 *pgi* 유전자는 인코딩 서열표 중의 서열 14가 보여주는 Pgi의 유전자에서 선택될 수 있으며; 코드가 상기 Pgi와 비교하여 적어도 60%의 상동성을 가지고, 바람직하게는 적어도 70%의 상동성을 가지며, 더욱 바람직하게는 적어도 80% 상동성을 가지고, 나아가 바람직하게는 적어도 95%의 상동성을 가지며, 더욱 바람직하게는 적어도 98% 내지는 99%의 상동성을 가지며 또한 글루코스-6-포스페이트 아이소메라아제 활성을 가지는 유전자 중의 하나이다. 구체적으로는 서열 13이 보여주는 뉴클레오티드 서열일 수 있다.
- [0062] 상기 *zwf-opcA* 유전자는 인코딩 서열표 중의 서열 3이 보여주는 *zwf-opcA*의 유전자에서 선택될 수 있으며; 코드가 상기 *zwf-opcA*와 비교하여 적어도 60%의 상동성을 가지고, 바람직하게는 적어도 70%의 상동성을 가지며, 더욱 바람직하게는 적어도 80% 상동성을 가지고, 나아가 바람직하게는 적어도 95%의 상동성을 가지며, 더욱 바람직하게는 적어도 98% 내지는 99%의 상동성을 가지며 또한 *zwf-opcA* 활성을 가지는 유전자 중의 하나이다. 구체적으로는 서열 2가 보여주는 뉴클레오티드 서열일 수 있다.
- [0063] 상기 P_{eftu} 프로모터는 서열 12가 보여주는 5' 말단 제635-834번(또는 서열 20이 보여주는 5' 말단 제634-833번)의 뉴클레오티드 서열이다.

- [0064] 상기 *purH* 유전자는 인코딩 서열표 중의 서열 16이 보여주는 *purH*의 유전자에서 선택될 수 있으며; 코드가 상기 *purH*와 비교하여 적어도 60%의 상동성을 가지고, 바람직하게는 적어도 70%의 상동성을 가지며, 더욱 바람직하게는 적어도 80% 상동성을 가지고, 나아가 바람직하게는 적어도 95%의 상동성을 가지며, 더욱 바람직하게는 적어도 98% 내지는 99%의 상동성을 가지며 또한 *purH* 활성을 가지는 유전자 중의 하나이다. 구체적으로는 서열표 중의 서열 15가 보여주는 뉴클레오티드 서열일 수 있다.
- [0065] 상기 P_{hom} 프로모터는 서열 18이 보여주는 5' 말단 제736-865번의 뉴클레오티드 서열이다.
- [0066] 본 발명의 방법에 있어서, 어느 한 유전자의 카피 수량을 증가시키는 것은 해당 유전자를 포함하는 재조합 플라스미드를 구성하고, 이어 재조합 플라스미드를 시작균/원시균 중에 도입하여 구현할 수 있다. 이러한 방법은 당 업계에서 통상적으로 사용되는 것이기 때문에 상세한 설명을 생략하도록 한다. 재조합 플라스미드를 구성하는 벡터에 대하여 제한이 없으며, 임의의 적합한 플라스미드일 수 있는 바, 예를 들면 pXMJ19이다.
- [0067] 본 발명의 재조합균은 상기 구성 방법을 통하여 취득한 재조합균일 수 있다.
- [0068] 본 발명의 세번째 방법에 의하면, L-아미노산을 생산하는 방법을 제공하는 바, 상기 재조합균을 발효 배양하는 단계가 포함된다. 바람직하게는, 상기 L-아미노산은 L-히스티딘, L-라이신, L-발린, L-트레오닌, L-프롤린 또는 L-히드록시프롤린이다.
- [0069] 본 발명에서 제공하는 재조합균을 구성하는 방법에는 하기 단계가 포함되는 바, 즉 시작균 중 글루코스-6-포스페이트 아이소메라아제의 발현을 낮추고, 또한 글루코스-6-포스페이트 데히드로게나아제와 PRPP 합성 효소의 발현을 향상시켜 재조합균을 취득하는 것이다.
- [0070] 상기 방법 중에서, 상기 시작균 중 글루코스-6-포스페이트 아이소메라아제의 발현을 낮추는 것은 하기 A) 또는 B) 방식을 통하여 구현한다.
- [0071] A) 상기 시작균 염색체 상의 *pgi* 유전자를 불활성화시킨 것으로서, 상기 불활성화는 구체적으로는 녹아웃이며;
- [0072] B) 상기 시작균 중의 *pgi* 유전자의 조절 요소를 낮은 전사와 낮은 발현 활성의 조절 요소로 교체하여 구현하며;
- [0073] 상기 시작균 중의글루코스-6-포스페이트 데히드로게나아제와 PRPP 합성 효소의 발현을 향상시키는 것은 하기 C) 또는 D) 방식을 통하여 구현한다.
- [0074] C) 상기 시작균 중 *zwf-opcA* 유전자와 *prsA* 유전자의 카피 수량을 증가시키며;
- [0075] D) 상기 시작균 염색체 상의 *tkl-tal-zwf-opcA-devB* 오페론의 프로모터를 P_{effu} 프로모터로 교체시키며, 또한 상기 염색체 상 *prsA* 유전자의 프로모터를 P_{sod} 프로모터로 교체한다.
- [0076] 상기 방법에 있어서, 상기 재조합균을 구성하는 방법은 하기 I 또는 II와 같다.
- [0077] I의 방법으로는 상기 시작균 염색체의 *pgi* 유전자를 녹아웃시키고, 또한 상기 시작균 중의 *zwf-opcA* 유전자와 *prsA* 유전자의 카피 수량을 증가시켜 재조합균을 취득하며;
- [0078] II의 방법으로는 상기 시작균 염색체의 *pgi* 유전자를 녹아웃시키고, 상기 시작균 염색체 상의 *tkl-tal-zwf-opcA-devB* 오페론의 프로모터를 P_{effu} 프로모터로 교체시키며, 또한 상기 염색체 상의 *prsA* 유전자의 프로모터를 P_{sod} 프로모터로 교체한다.
- [0079] 상기 방법에 있어서,
- [0080] 상기 녹아웃은 녹아웃하고자 하는 유전자 *pgi*의 업/다운 스트림 상동 암을 포함하는 세그먼트를 상기 시작균에 도입하여 상동 재조합을 진행하는 것이며;
- [0081] 상기 시작균 중의 *zwf-opcA* 유전자와 *prsA* 유전자의 카피 수량을 증가시키는 것은 *zwf-opcA* 유전자와 *prsA-hisG^{fbr}* 세그먼트를 재조합 벡터를 통하여 상기 시작균으로 도입하는 것이며;
- [0082] 상기 재조합 벡터는 *zwf-opcA* 유전자와 *prsA-hisG^{fbr}* 세그먼트를 발현 벡터에 삽입시켜 취득한 재조합 벡터이며; 상기 발현 벡터는 IPTG 유발성 발현 벡터 pXMJ19일 수 있으며;
- [0083] 본 발명의 실시예2에 있어서, 재조합 벡터는 pXMJ19-*zwf-opcA-prsA-hisG^{fbr}*로서, *zwf-opcA* 유전자(서열 2)을

pXJM19의 *Hind* III과 *Xba* I 사이에 삽입하고, 또한 *prsa-hisG^{fbr}* 세그먼트(서열 4)를 *Xba* I과 *Sma* I 사이에 삽입하여 취득한 벡터이다.

- [0084] 상기 시작균 염색체 상의 *tkl-tal-zwf-opcA-devB* 오페론의 프로모터를 P_{eftu} 프로모터로 교체시키는 것은 P_{eftu} 프로모터가 포함된 세그먼트를 상기 시작균에 도입하여 상동 재조합을 진행하는 것이며;
- [0085] 상기 시작균 염색체 상의 *prsa* 유전자의 프로모터를 P_{sod} 프로모터로 교체시키는 것은 P_{sod} 프로모터가 포함된 세그먼트를 상기 시작균에 도입하여 상동 재조합을 진행하는 것이다.
- [0086] 상기 방법에 있어서,
- [0087] 상기 녹아웃하고자 하는 유전자 *pgi*의 업/다운 스트림 상동 암을 포함하는 세그먼트의 뉴클레오티드 서열은 서열표 중의 서열 1이고, 그 중에서 서열 1의 5' 말단 제1-834번 뉴클레오티드는 녹아웃하고자 하는 유전자 *pgi*의 업스트림 상동 암이고, 서열 1의 5' 말단 제2835-1672번 뉴클레오티드는 녹아웃하고자 하는 유전자 *pgi*의 다운스트림 상동 암이며; 유전자 *pgi*의 뉴클레오티드 서열은 서열 13이며;
- [0088] 상기 *zwf-opcA* 유전자의 뉴클레오티드 서열은 서열표 중의 서열 2이며;
- [0089] 상기 *prsa-hisG^{fbr}* 세그먼트의 뉴클레오티드 서열은 서열표 중의 서열 4이며;
- [0090] 상기 재조합 벡터는 상기 *zwf-opcA* 유전자와 상기 *prsa-hisG^{fbr}* 세그먼트를 발현 벡터에 삽입시켜 취득한 벡터이며;
- [0091] 상기 P_{eftu} 프로모터의 뉴클레오티드 서열은 서열표 중의 서열 12의 5' 말단 제635-834번 뉴클레오티드이며;
- [0092] 상기 P_{eftu} 프로모터의 세그먼트를 포함하는 뉴클레오티드 서열은 서열표 중의 서열 12이며;
- [0093] 상기 P_{sod} 프로모터의 세그먼트를 포함하는 뉴클레오티드 서열은 서열표 중의 서열 11이다.
- [0094] 상기 방법에 있어서, 상기 시작균은 하기 단계를 포함하는 방법에 따라 제조되는 바, 즉 세균 염색체 상의 L-히스티딘 합성 오페론의 프로모터를 P_{glyA} 프로모터로 교체시키고, 또한 상기 세균 염색체 상의 *hisG* 유전자를 점 돌연변이시켜 시작균을 취득하며;
- [0095] 상기 L-히스티딘 합성 오페론은 *hisEG*와 *hisDCB*이며;
- [0096] 상기 P_{glyA} 프로모터의 뉴클레오티드 서열은 서열표 중 서열 7의 제863-1038번 뉴클레오티드 또는 서열표 중 서열 8의 제752-927번 뉴클레오티드이며;
- [0097] 상기 점 돌연변이는 상기 세균 염색체의 *hisG* 유전자로 인코딩된 단백질의 제215번의 아스파라진을 라이신으로 돌연변이시키고, 제231번의 류신을 페닐알라닌으로 돌연변이시키며, 제235번의 트레오닌을 알라닌으로 돌연변이시킨 것이다.
- [0098] 상기 방법에 있어서, 상기 세균 염색체 상의 L-히스티딘 합성 오페론의 프로모터를 P_{glyA} 프로모터로 교체시키는 것은 *hisEG*의 P_{glyA} 프로모터가 포함된 세그먼트와 *hisDCB*의 P_{glyA} 프로모터가 포함된 세그먼트를 세균 중에 도입하여 상동 재조합을 진행하는 것이며; 그 중에서 *hisEG*의 P_{glyA} 프로모터가 포함된 세그먼트의 뉴클레오티드 서열은 서열표 중의 서열 7이며; *hisDCB*의 P_{glyA} 프로모터가 포함된 세그먼트의 뉴클레오티드 서열은 서열표 중의 서열 8이다.
- [0099] 상기 방법에 있어서, 상기 세균 염색체 상의 *hisG* 유전자를 점 돌연변이시키는 것은 서열 9가 보여주는 뉴클레오티드 서열을 상기 세균 중에 도입하여 상동 재조합을 진행하고, 다시 서열 10이 보여주는 뉴클레오티드 서열을 중간균에 도입시켜 상동 재조합을 진행하기 위한 것이다.
- [0100] 상기 방법에 있어서, 상기 세균은 코리네박테리움 속 세균이고, 상기 코리네박테리움 속 세균은 구체적으로 *Corynebacterium glutamicum*이다.
- [0101] 상기 방법에 의하여 제조된 재조합균도 본 발명의 보호 범위에 속한다.

- [0102] 상기 재조합균의 L-히스티딘 제조 중의 응용도 본 발명의 보호 범위에 속한다.
- [0103] 본 발명에서는 또한 L-히스티딘을 제조하는 방법을 제공하는 바, 상기 재조합균을 발효 배양하여 L-히스티딘을 취득하는 단계가 포함된다.
- [0104] 본 발명의 상기 불활성화 세균의 *pgi* 유전자에 있어서, "불활성화"는 상응하게 개조된 객체에 변화가 발생하여 일정한 효과에 달하는 것을 말하는 바, 점 돌연변이, 삽입 불활성화 및/또는 녹아웃이 포함되나 이에 제한되지 않는다.
- [0105] 본 발명에서 이용되는 염색체 유전자 녹아웃, 삽입 불활성화, 녹인, 프로모터 교체와 점 돌연변이의 방법은 자살 벡터 pK18mobsacB가 개조 타겟 유전자의 상동 암을 휴대하고 상동 재조합을 발생하는 것을 통하여 구현한다.
- [0106] 본 발명의 상기 L-히스티딘 공정균에 있어서, 24 시간 발효시킨 L-히스티딘 생산 강도는 0.01~1 g/L/h이고, 발효 종료 시에 L-히스티딘 생산량은 1~60 g/L이며, 일반적으로 발효 수율이 2 g/L 이상에 달할 수 있다.
- [0107] 본 발명의 실험에 의해 증명된데 의하면, 종래의 L-히스티딘 공정균과 L-히스티딘 발효 생산법에 비하여, 본 발명은 하기 장점을 가진다.
- [0108] (1) 본 발명에서 제공하는 재조합균은 *pgi* 유전자를 녹아웃시켜 업스트림 당분해 경로를 차단시킴과 아울러, *zwf-opcA* 유전자를 과도 발현시켜 펜토오스 포스페이트 경로의 대사 능력을 향상시키는 조합 개조 방식을 통하여, 공정균의 생장과 글루코스 소모 능력이 야생형 균주에 비하여 약화되는 것을 보이지 않고 L-아미노산 수율이 크게 향상되었다.
- [0109] (2) 본 발명에서 제공하는 재조합균은 기본 배양지(플라스크 진탕 발효 실험용)에서 양호하게 성장하며, 영양물질 결핍형이 없어 산업화 제어에 유리하다.
- [0110] (3) 본 발명에서 제공하는 재조합균의 발효 주기가 짧은 바, 발효 탱크 스케일업 실험에서 약 45-72 시간에 최대 누적량에 도달할 수 있어(허나 현재 보도된 가장 높은 수율의 L-히스티딘 공정균 발효 시간은 120 시간에 달함)(Mizukami, T., Hamu, A., Ikeda, M., Oka, T., Katsumata, R., 1994. Cloning of the ATP phosphoribosyl transferase gene of *Corynebacterium glutamicum* and application of the gene to l-histidine production. Biosci. Biotechnol. Biochem. 58, 635-638.), 과정 및 원가 제어에 유리하다.
- [0111] (4) 본 발명은 최초로 *pgi* 유전자가 결실된 기초 상에서, 아울러 글루코스-6-포스페이트 데히드로게나아제의 발현을 향상시키는 조합 개조 방식을 제안하여, *pgi* 유전자 결실에 의하여 초래되는 균주 성장 및 글루코스 대사의 제한을 해제하고, 최대한으로 중심 카본 대사 유동을 펜토오스 포스페이트 경로로 유도할 수 있으며, 아울러 세균의 비교적 높은 성장 대사와 ATP 수준을 유지할 수 있으며, 아미노산 수율을 크게 향상시킴으로써 실천 상에서 세균 발효 산업화 생산에 이용될 수 있다.
- [0112] (5) 본 발명에서는 또한 최초로 히스티딘 합성 경로와 뉴클레오티드 합성 경로를 커플링시키는 방안을 제안하여, 히스티딘 합성 부산물 AICAR를 이용하여 히스티딘의 전구체 ATP를 합성하여 L-히스티딘 수율을 크게 향상시킴으로써 실천 상에서 세균 발효 산업화 생산에 이용될 수 있다.
- [0113] 상기한 바와 같이, 본 발명의 유익한 효과라면, L-아미노산의 발효 수율을 향상시킬 수 있는 새로운 방법을 제안 및 증명하고, 또한 상응한 공정균을 구성하였으며, 중첩적으로 수율을 향상시킬 수 있는 효과를 발견하여 실천 상에서 세균 발효를 통하여 L-아미노산을 생산하는데 이용될 수 있어 보급에 유리하다.
- [0114] 아래, 이해를 돕기 위하여 구체적인 실시예를 통하여 본 발명에 대하여 상세한 설명을 진행하도록 한다. 유의할 바로는 이러한 설명은 예시적인 것으로서, 본 발명의 범위를 제한하는 것이 아니다. 본 명세서에 의한 설명에 의하면, 본 발명의 많은 변화, 수정은 당업계의 기술자들에 있어서는 자명한 것이다.
- [0115] 그리고 본 발명에서는 공개 문헌을 인용하였는바, 이러한 문헌은 더욱 명확하게 본 발명을 설명하기 위한 것으로서, 이들의 모든 내용은 모두 본 명세서에 참조되는 바, 이 모든 내용들이 본 명세서에서 중복 기술된 것과 같다.

발명의 효과

- [0116] 본 발명에서 생산하는 L-아미노산의 재조합균은 시작균에 비하여 낮아진 글루코스-6-포스페이트 아이소메라아제 Pgi의 발현과 향상된 글루코스-6-포스페이트 데히드로게나아제 Zwf-OpcA의 발현을 가지며, 그 중에서 상기 시작균은 목표 아미노산을 누적시킬 수 있는 균주이다. 본 발명의 재조합균을 발효 배양하면서 중첩적으로 수율을

향상시키는 효과를 관찰하게 되었으며, L-아미노산의 수율을 크게 향상시킨다. 본 발명의 조합 개조 방식은 L-아미노산의 발효 수율을 향상시킬 수 있는 새로운 방법을 제시하였기 때문에, 실제로 세균 발효를 통하여 L-아미노산을 생산하는데 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

하기 도면을 참조하면, 본 발명의 방안 및 유익한 효과를 더욱 잘 이해하는데 도움이 된다.

도 1은 재조합 플라스미드 pXMJ19-*prsA-hisG*^{fbr}의 도면.

도 2는 CG161 균주(*pgi* 유전자가 녹아웃됨) 게놈 DNA의 PCR 검증 전기 이동도.

도 3은 재조합 플라스미드 pXMJ19-*zwf-opcA-prsA-hisG*^{fbr}의 도면.

도 4는 L-히스티딘 공정균 CG171 발현 단백질의 SDS-PAGE 도면.

도 5는 L-히스티딘 공정균 CG171 중의 글루코스-6-포스페이트 데히드로게나아제 효소 활성 측정도.

도 6은 재조합 플라스미드 pXMJ19-*zwf-opcA-prsA-hisG*^{fbr}-*purH*의 도면.

도 7은 CG328 균주가 플라스미드 DNA를 휴대한 PCR 검증 전기 이동도.

도 8은 CG353 균주(*purF* 유전자가 약화됨) 게놈 DNA의 PCR 검증 전기 이동도.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

아래 첨부된 도면과 실시예를 통하여 본 발명의 구체적인 실시방식에 대하여 더욱 상세한 설명을 진행하여 본 발명의 방안 및 여러 가지 방법의 장점을 이해하는 것을 돕도록 한다. 하지만 하기 기술된 구체적인 실시방식과 실시예는 단지 설명을 위한 것이며 본 발명을 제한하는 것이 아니다. 구체적으로 말하면, 하기 기술은 모두 (야생형) *Corynebacterium glutamicum*을 예로 들어 공정균의 구성 및 L-히스티딘의 생산에 대하여 설명과 실험을 진행하지만, 당업계의 기술자들은 본 발명의 아미노산 대사 경로의 개조 방식이 기타 적합한 균주에 적용되어 L-히스티딘의 수율을 향상시키는 공정균을 구성할 수 있음을 이해하여야 할 것이다. 뿐만 아니라, 적합한 플러그인을 조합시키는 것을 통하여 유사한 대사 경로를 갖는 아미노산, 특히 L-라이신, L-발린, L-트레오닌, L-프롤린 또는 L-히드록시프롤린 등의 수율을 향상시키는데 이용될 수 있다.

배경기술 중에서 언급된 바와 같이, *pgi* 유전자로 인코딩된 글루코스-6-포스페이트 아이소메라아제는 당분해 경로의 핵심 효소이다. L-히스티딘 합성의 전구체 PRPP는 펜토오스 포스페이트 경로를 거쳐 합성된 것이기 때문에, *pgi* 유전자를 녹아웃시키면 당분해 경로의 대사 유동을 약화시키고, 중심 카본 대사 유동을 펜토오스 포스페이트 경로로 유도하여 L-히스티딘 합성 경로 대사 유동을 향상시킬 수 있다는 것을 추정할 수 있다.

pgi 유전자를 녹아웃시키는 것을 통하여 펜토오스 포스페이트 경로 대사 유동을 향상시키는 개조 방식은 문헌과 특허에 모두 보도된 바 있다(L-라이신, L-발린과 뉴클레오티드 등 생성물 생산. Marx, A., Hans, S., Mockel, B., Bathe, B., de Graaf, A. A., McCormack, A. C., Stapleton, C., Burke, K., O'Donohue, M., Dunican, L. K., 2003. Metabolic phenotype of phosphoglucose isomerase mutants of *Corynebacterium glutamicum*. J Biotechnol. 104, 185-197; Blombach, B., Schreiner, M. E., Bartek, T., Oldiges, M., Eikmanns, B. J., 2008. *Corynebacterium glutamicum* tailored for high-yield l-valine production. Appl Microbiol Biotechnol. 79, 471-479; Peifer, S., Barduhn, T., Zimmet, S., Volmer, D., Heinzle, E., Schneider, K., 2012. Metabolic engineering of the purine biosynthetic pathway in *Corynebacterium glutamicum* results in increased intracellular pool sizes of IMP and hypoxanthine. Microb Cell Fact. 11, 138; US6586214B1; EP1087015A2).

하지만 본 발명인은 실제상에서 *pgi* 유전자를 녹아웃시키면 당 대사 중간 대사물이 과도하게 누적되어 당대사 압력을 초래하며, 나아가 균체 글루코스 대사와 생장이 늦어짐을 발견하였다. 본 발명인은 또한 *pgi* 유전자를 녹아웃시킨 후, L-히스티딘을 생산하는 공정균의 L-히스티딘 수율이 증가되지 않을 뿐 아니라 오히려 크게 낮아짐을 발견하였다. 이의 주요한 원인으로는 히스티딘은 펜토오스 포스페이트 경로를 통하여 이의 분자 골격을 합성하는 전구체를 제공하지만, 라이신과 발린은 펜토오스 포스페이트 경로를 통하여 이의 합성 효소의 보조 인자 NADPH를 제공하기 때문이다. 그리고, 히스티딘 합성 과정에 대량의 에너지 벡터 ATP를 소모하기 때문에, *pgi* 유전자의 발현을 약화시키고 펜토오스 포스페이트 경로 대사 유동을 향상시키는 방식으로 히스티딘의 수율을 향상

시키려면, 펜토오스 포스페이트 경로와 당대사 경로 대사 유동의 평형을 유지하여 이의 합성 전구체와 에너지 공급을 확보하여야 한다.

[0122] 이러한 문제에 대하여, 본 발명에서는 실험을 통하여 *zwf-opcA* 유전자(해당 유전자는 글루코스-6-포스페이트 데히드로게나아제를 인코딩하는 바, 펜토오스 포스페이트 경로의 핵심 속도 제한 효소이다)를 과도 발현시키는 것은 균체의 당 대사 능력을 향상시키고 당 대사 압력을 완화시킬 수 있으며, 균주의 글루코스 대사와 생장 능력을 회복시키고, 아울러 펜토오스 포스페이트 경로와 당대사 경로 대사 유동의 평형시키고, 히스티딘 합성 전구체 PRPP와 ATP공급을 평형시켜, 나아가 L-히스티딘 수율을 향상시키는 것을 발견하였다.

[0123] 본 발명에 의하면, *pgi* 유전자를 약화(예를 들면 녹아웃)시키고 아울러, *zwf-opcA* 유전자를 과도 발현시키는 개조 방식을 통하여, 이미 *prsA* 유전자와 L-히스티딘 합성 오페론 유전자 발현을 향상시킨 균주에 대하여 재조합 개조를 진행하여 취득한 균주의 L-히스티딘 수율은 크게 향상되었다.

[0124] 마찬가지로, L-트레오닌, L-라이신, L-발린, L-프롤린 및 L-히드록시프롤린 등 기타 아미노산에 있어서, 이들은 펜토오스 포스페이트 경로를 통하여 이의 합성 효소의 NADPH를 제공하기 때문에, 본 발명의 *pgi* 유전자를 약화시키고 아울러, *zwf-opcA* 유전자를 과도 발현시키는 개조 방식은 NADPH를 증가시키고 아울러, 펜토오스 포스페이트 경로와 당대사 경로 대사 유동의 평형도 평형시키고, *pgi* 유전자 약화로 인하여 균체 글루코스 대사와 생장이 늦어지는 문제를 해결함으로써, 마찬가지로 나아가 이러한 아미노산의 수율을 향상시킨다.

[0125] 이 기초 상에서, 본 발명에서는 나아가 L-히스티딘 합성 경로와 뉴클레오티드 합성 경로를 상호 커플링시키는 방식을 제안하였다. L-히스티딘 합성 과정에 있어서, *hisH*와 *hisF* 유전자에 의하여 인코딩된 이미다졸글리세롤포스페이트 합성 효소가 이미다졸글리세롤포스페이트와5-포스포리보실-4-포름아미도-5-아미노이미다졸(AICAR)을 촉매 작용 및 생성하는 바, 그 중에서 이미다졸글리세롤포스페이트가 히스티딘 합성 경로를 따라 최종으로 L-히스티딘을 합성하고, AICAR는 퓨린 합성 경로로 진입하여 최종적으로 퓨린 뉴클레오티드(AMP, ATP 등)를 생성한다. ATP는 히스티딘 합성의 전구 물질 중의 하나이고, 아울러 히스티딘 합성을 위하여 에너지를 제공한다. *purH* 유전자에 의하여 인코딩되는 이중 기능 효소, AICAR 트랜스메틸라제/IMP 환히드라제는 AICAR 생성되는 IMP의 두 단계 반응에 대하여 촉매 작용을 일으킨다. 본 발명인은 *Corynebacterium glutamicum* 중의 *purH* 유전자의 발현을 향상시키는 L-히스티딘 누적에 대하여 큰 촉진 작용을 가지며, 상기 개조 방식과 조합하면 더욱 효과를 향상시킬 수 있음을 발견하였다.

[0126] 그리고, L-히스티딘 합성 경로와 퓨린 뉴클레오티드 합성 경로는 대사물 AICAR 위치에서 커플링되고, 아울러 두 경로가 전구체 물질 PRPP를 공유한다. 본 발명인은 퓨린 뉴클레오티드의 합성에 대하여 촉매 작용을 하는 제1 반응 단계의 효소(아미도포스포리보실 전이효소)의 인코딩 유전자 *purF*를 약화시키면, 뉴클레오티드 합성과 히스티딘 합성 경로에 대하여 대사 커플링을 진행할 수 있고, 히스티딘 합성 부산물 AICAR을 이용하여 뉴클레오티드를 합성하면 히스티딘 합성 전구체 물질 PRPP의 공급을 증가시킬 수 있을 뿐 아니라, 히스티딘 합성 경로 대사 유동을 증가시켜 L-히스티딘 누적을 촉진시키는 것을 발견하였다. 상기 유전자 개조는 마찬가지로 더욱 L-히스티딘의 수율을 향상시킬 수 있다.

[0127] 이로부터 알 수 있는 바와 같이, 본 발명은 히스티딘 합성 관련 경로 중의 다수의 타겟에 대하여 조합 개조를 진행하여 L-히스티딘의 누적을 효과적으로 구현하였다. 그리고, 히스티딘 합성 경로를 개조시키고 아울러, 히스티딘 합성 경로와 뉴클레오티드 합성 경로를 커플링시켜, 히스티딘 합성과 뉴클레오티드 합성의 커플링 노드 AICAR을 효과적으로 이용하여 퓨린 뉴클레오티드의 경로를 생성하고 합성 전구체 PRPP를 절약함으로써, 히스티딘을 합성하기 위하여 더욱 많은 전구체 물질 PRPP와 ATP를 제공하여, 더욱 L-히스티딘의 누적을 증가시킨다.

[0128] 정의:

[0129] 본 명세서에서 언급되는 "시작균(starting bacteria)"(또는 본 명에서 기저균(base bacteria)라고도 함)은 본 발명의 유전자 개조 방식에 이용되는 초기 균주를 말한다. 상기 균주는 천연적으로 존재하는 균주일 수도 있고, 또는 돌연변이 또는 유전공학 개조 등 방식을 통하여 형성된 것일 수도 있다. 어떠한 L-아미노산(예를 들면 L-히스티딘)을 생산하는 공정균을 구성하기 위하여, 상기 시작균은 상기 L-아미노산(예를 들면 L-히스티딘)을 누적시킬 수 있는 균주인 것이 바람직하다.

[0130] 본 명세서에서 언급되는 "원시균(original bacteria)"은 아무런 유전공학 개조도 거치지 않은 균주를 말하는 바, 자연계에 존재하는 균주일 수도 있고, 또는 인공 돌연변이를 통하여 형성된 균주일 수도 있다.

[0131] 본 명세서에서 언급되는 "상동성(homology)"은 DNA의 뉴클레오티드 서열 또는 단백질의 아미노산 서열 사이의 유사도를 말하는 바, 아울러 본 명세서에서 말하는 (일정한 수준의) 상동성을 갖는 DNA에 의하여 인코딩된 단백

질은 적어도 본 발명의 기능에 사용되는 방법에서 동일하거나 더욱 훌륭한 활성을 가지며, 마찬가지로 (일정한 수준의) 상동성을 가지는 단백질은 본 발명의 기능에 사용되는 방법에서 동일하거나 더욱 훌륭한 활성을 가진다. 예를 들면, *hisG* 유전자와 세 돌연변이를 거친 *hisG^{fbr}* 유전자는 높은 유사도를 가지며, 그 중에서 전자는 ATP-포스포리보실 전이효소를 인코딩하고, 후자는 히스티딘 피드백 억제 조절이 해제된 ATP-포스포리보실 전이효소를 인코딩하며, 이 두 효소는 전반적으로 보면 기능과 활성이 조금 다르지만, 본 발명의 "히스티딘 합성의 제1 단계 촉매 효소"의 기능 면에서는 양자가 동일하기 때문에, *hisG* 유전자와 *hisG^{fbr}* 유전자 및 양자에 의하여 인코딩되는 효소는 각각 본 발명의 의미상의 상동성을 가지는 DNA와 단백질에 속한다. 이들은 모두 본 발명의 보호범위에 속한다 하여야 할 것이다.

[0132] 본 명세서에서 언급되는 방법 중의 각 단계의 실행 순서는 특별한 설명이 있는 것을 제외하고, 본 명세서에서의 순서에 제한되지 않는 바, 즉 각 단계의 실행 순서는 변화될 수 있고, 두 단계 사이에 수요에 따라 기타 단계를 증가시킬 수 있다.

[0133] 아래, 구체적인 실시예를 통하여 본 발명에 대하여 더욱 상세한 설명을 진행하도록 한다. 하기 실시예 중에 이용되는 실험 방법은 특수한 설명이 있는 것을 제외하고는 모두 일반적인 방법이다. 하기 실시예 중에 이용되는 재료, 시제 등은 특수한 설명이 있는 것을 제외하고 모두 상업 경로를 통하여 취득할 수 있다.

[0134] 특별한 설명이 없는 한, 실시예 중에 이용되는 기술수단은 모두 당업계 기술자들이 숙지하고 있는 일반적인 수단인 바, "분자 클론 실험 지침(제3판)"(과학출판사), "미생물학 실험(제4판)"(고등교육출판사) 및 상응한 기기와 시제의 업체 설명서를 참조할 수 있다. 실시예 중에 이용되는 기기와 시제는 시중의 일반적인 기기와 시제이다. 아래 실시예 중의 정량적 실험은 모두 3번 중복 실험을 진행하고 결과는 평균치를 취한다.

[0135] **실시예 1 : L-히스티딘 기저 공정균 CG160의 취득**

[0136] 본 발명의 전단계 연구에 의하여, 본 실시예는 야생형 *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032에 대하여 히스티딘 합성을 향상시키는 개조를 진행하여 본 발명의 상기 다수의 타겟의 개조를 진행하는 기저균을 취득한다. 우선, *hisEG*와 *hisDCB*(두 개의 히스티딘 합성 유전자 오페론)의 프로모터를 *Corynebacterium glutamicum* 내생성의 강한 프로모터 *P_{glyA}*(서열 7 중의 5' 말단 제863-1038번 뉴클레오티드 서열이 보여주는 바와 같거나, 또는 서열 8 중의 5' 말단 제752-927번 뉴클레오티드 서열이 보여주는 바와 같음)로 교체시키고(Zhang, Y., Shang, X., Lai, S., Zhang, G., Liang, Y., Wen, T., 2012. Development and application of an arabinose-inducible expression aystem by facilitating inducer uptake in *Corynebacterium glutamicum*. Appl Environ Microbiol. 78, 5831-5838.), 아울러 *hisE*와 *hisD* 유전자의 리보솜 결합 사이트(RBS)를 *Corynebacterium glutamicum* 높은 발현 유전자의 보수 RBS 서열(AAAGGAGGA)(서열 7 중의 5' 말단 제1039-1047번 뉴클레오티드 서열이 보여주거나, 또는 서열 8 중의 5' 말단 제928-936번 뉴클레오티드 서열이 보여주는 바와 같음)로 교체하여, 이 두 히스티딘 합성 유전자 오페론의 전사와 번역의 약화된 조절을 제거하고, *hisE* 유전자의 초기 코돈 GTG를 ATG(서열 7 중의 5' 말단 제1053-1055번 뉴클레오티드 서열이 보여주는 바와 같음)로 교체하여 이의 발현을 향상시킨다. 이어, 히스티딘 합성 경로의 핵심 속도 제한 효소와 ATP-포스포리보실 전이효소 (*HisG*, 서열 6에서 보여주는 바와 같음)의 인코딩 유전자 *hisG*를 세 아미노산 돌연변이를 포함하는 *hisG^{fbr}* 유전자(서열 4 중의 5' 단 제1007-1852번 뉴클레오티드 서열이 보여주는 바와 같음)로 교체하여, 히스티딘의 해당 효소에 대한 피드백 억제 조절을 제거함으로써 해당 효소의 촉매 활성을 향상시킨다(Zhang, Y., Shang, X., Deng, A., Chai, X., Lai, S., Zhang, G., Wen, T., 2012. Genetic and biochemical characterization of *Corynebacterium glutamicum* ATP phosphoribosyltransferase and its three mutants resistant to feedback inhibition by histidine. Biochimie. 94, 829-838.).

[0137] **1. *Corynebacterium glutamicum* 야생형 ATCC13032 중의 L-히스티딘 합성 오페론 프로모터를 강한 프로모터 *P_{glyA}*로 교체**

[0138] Genbank 중의 *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032의 *hisEG* 오페론 및 이의 업/다운 스트림 서열과 *P_{glyA}* 프로모터에 의하여 각각 프라이머를 디자인한다.

[0139] *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 게놈 DNA를 템플릿으로 하고, P1과 P2를 프라이머로 하여 *hisEG* 오페론 프로모터 업 스트림 상동 암을 PCR 증폭시킴; P3과 P4를 프라이머로 하여 프로모터 *P_{glyA}*를 증폭시킴; P5와 P6을 프라이머로 하여 *hisEG* 프로모터 다운 스트림 상동 암을 증폭시킨다. 이어 정제된 상기 PCR 생성물을 템플릿으로 하고, P1과 P6을 프라이머로 하여 중첩 확대 PCR 기술(SOE)을 이용하여 증폭을 진행하여 1920 bp의

PCR 생성물 취득하여, 교체할 프로모터 P_{glyA} 및 교체될 프로모터 P_{hisEG} 를 포함하는 업/다운 스트림 상동 암의 세그먼트(서열 7)로 한다.

[0140] 그 중에서, 서열 7의 5' 말단 제1-862번 뉴클레오티드는 교체될 프로모터 P_{hisEG} 의 업 스트림 상동 암이고, 서열 7의 5' 말단 제863-1038번 뉴클레오티드는 프로모터 P_{glyA} 이며, 서열 7의 5' 말단 제1053-1920번 뉴클레오티드는 교체될 프로모터 P_{hisEG} 의 다운 스트림 상동 암이다.

[0141] 상기 1920 bp의 PCR 생성물에 대해 *Xba* I과 *Bam*H I 이중 효소 절단한 후, 마찬가지로 이중 효소 절단을 거친 상동 재조합 벡터 pK18mobsacB(미국의 군주보관기관 ATCC로부터 구입, 상품 번호 87097)와 연결시킨다. 연결 생성물을 화학 전환법을 통하여 대장간균 DH5 α 로 변형시키고, 카나마이신(50 μ g/mL)이 함유된 LB 플레이트 상에서 형질전환체를 스크리닝하고, 형질전환체를 3 세대 서브 배양한 후, P13과 P14를 프라이머로 하여 세균 집락 PCR를 이용하여 형질전환체를 검증하여 2132 bp의 양성 형질전환체를 취득하고, 검증을 거친 형질전환체에 대하여 플라스미드를 추출하고 또한 플라스미드에 대하여 *Xba* I과 *Bam*H I 이중 효소 절단을 진행하여 양성 1920 bp를 취득한다.

[0142] 양성 플라스미드에 대하여 서열 측정을 진행하는 바, 결과적으로 해당 플라스미드는 서열표 중의 서열 7가 보여주는 뉴클레오티드를 벡터 pK18mobsacB 중에 삽입하여 취득한 재조합 플라스미드이며, pK18mobsacB- $P_{glyA}::P_{hisEG}$ 라 명한다.

[0143] 동일한 방법을 이용하여 상동 재조합 플라스미드 pK18mobsacB- $P_{glyA}::P_{hisDCB}$ 를 구성하는 바, 구체적으로는 P7과 P8을 프라이머로 *hisDCB* 오페론 프로모터 업 스트림 상동 암을 증폭시키며; P9와 P10을 프라이머로 하여 프로모터 P_{glyA} 를 증폭시키며; P11과 P12를 프라이머로 하여 *hisDCB*의 프로모터의 다운 스트림 상동 암을 증폭시킨다. P7과 P12를 프라이머로 하여 중첩 확대 PCR 기술(SOE)을 이용하여 증폭시킨다. 취득한 1694 bp의 PCR 생성물은 교체할 프로모터 P_{glyA} 및 교체될 프로모터 P_{hisDCB} 를 포함하는 업/다운 스트림 상동 암의 긴 세그먼트(서열 8)이고, 그 중에서, 서열 8의 5' 말단 제1-751번 뉴클레오티드는 교체될 프로모터 P_{hisDCB} 의 업 스트림 상동 암이고, 서열 8의 5' 말단 제752-927번 뉴클레오티드는 프로모터 P_{glyA} 이며, 서열 8의 5' 말단 제942-1694번 뉴클레오티드는 교체될 프로모터 P_{hisDCB} 의 다운 스트림 상동 암이다.

[0144] 상기 1694 bp의 PCR 생성물에 대해 *Hind* III과 *Bam*H I 이중 효소 절단한 후, 마찬가지로 이중 효소 절단을 거친 상동 재조합 벡터 pK18mobsacB와 연결시킨다. 연결 생성물을 화학 전환법을 통하여 대장간균 DH5 α 로 변형시키고, 카나마이신(50 μ g/mL)이 함유된 LB 플레이트 상에서 형질전환체를 스크리닝하고, 형질전환체를 3 세대 서브 배양한 후, P13과 P14를 프라이머로 하여 콜로니 PCR를 이용하여 형질전환체를 검증하여 1906 bp의 양성 형질전환체를 취득하고, 검증을 거친 형질전환체에 대하여 플라스미드를 추출하고 또한 플라스미드에 대하여 *Hind* III과 *Bam*H I 이중 효소 절단을 진행하여 양성 1694 bp를 취득한다. 양성 플라스미드에 대하여 서열 측정을 진행하는 바, 결과적으로 해당 플라스미드는 서열표 중의 서열 5가 보여주는 뉴클레오티드를 벡터 pK18mobsacB 중에 삽입하여 취득한 재조합 플라스미드이며, pK18mobsacB- $P_{glyA}::P_{hisDCB}$ 라 명한다.

[0145] 상기 이용되는 프라이머 서열은 하기와 같다.

[0146] P1: GCTCTAGAGTATCGGCGTGGAGTTGTC(*Xba* I)(서열 21)

[0147] P2: TAGTGGAGTAGCTTTATTTTGGACACCTGCC(서열 22)

[0148] P3: GTCGCA AAATAAGCTACTCCACTAGTGTGATCG(서열 23)

[0149] P4: GGTTCCTCCTTTGCGTAAGACCTCACTCGC(서열 24)

[0150] P5: GAGGTCTTACGCAAAGGAGGAACCGAATGAAGACATTGA(서열25)

[0151] P6: CGCGGATCCAGGATCTGCTGCTCTGG(*Bam*H I)(서열 26)

[0152] P7: CCCAAGCTTCGAGGAAACCGTTGAGGA(*Hind* III)(서열 27)

[0153] P8: TAGTGGAGTAGCTATGGATTTACCTCTGTGAATG(서열 28)

[0154] P9: TCTCCACTTTAGGTAAGCTACTCCACTAGTGTGATCG(서열 29)

- [0155] P10: CGATCCTCCTTTGCGTAAGACCTCACTCGC(서열 30)
- [0156] P11: GAGGTCTTACGCAAAGGAGGATCGCCATGTTGAATGTC(서열 31)
- [0157] P12: CGCGGATCCGGCAGAGGCATCAGCAAG(*Bam*H I)(서열 32)
- [0158] P13: ATGTGCTGCAAGGCGATTAA(서열 33)
- [0159] P14: ATGCTTCCGGCTCGTATGT(서열 34)
- [0160] P15: TTTTATATATGGGTATCGGCGGTCTATGCT(서열 35).
- [0161] 서열 측정이 정확한 상동 재조합 플라스미드 pK18mobsacB- $P_{glyA}::P_{hisEG}$ 를 *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 중에 전기적으로 전환한다. 카나마이신 저항성 순방향 스크리닝을 통하여 재조합 플라스미드를 취득하여 염색체 상의 세균 집락에 통합한다. 자당 역방향 스크리닝을 통하여 2회 상동 재조합이 발생한 양성 세균 집락을 취득한다. 양성 세균 집락에 대하여 P15와 P6을 프라이머로 하여 PCR 증폭 검증을 진행하여 재조합균으로서의 948 bp를 취득하며, *Corynebacterium glutamicum* WT- $P_{glyA}::P_{hisEG}$ 로 명한다.
- [0162] 서열 측정이 정확한 상동 재조합 플라스미드 pK18mobsacB- $P_{glyA}::P_{hisDCB}$ 를 *Corynebacterium glutamicum* WT- $P_{glyA}::P_{hisEG}$ 중에 전기적으로 전환한다. 카나마이신 저항성 순방향 스크리닝을 통하여 재조합 플라스미드를 취득하여 염색체 상의 세균 집락에 통합한다. 자당 역방향 스크리닝을 통하여 2회 상동 재조합이 발생한 양성 세균 집락을 취득한다. 양성 세균 집락에 대하여 P15와 P12를 프라이머로 하여 PCR 증폭 검증을 진행하여 재조합균으로서의 833 bp를 취득하며, *Corynebacterium glutamicum* CG158(WT- $P_{glyA}::P_{hisEG}$ - $P_{glyA}::P_{hisDCB}$)로 명한다.
- [0163] 재조합균의 게놈 DNA에 대하여 추출 및 서열 측정을 진행하면, 결과적으로 성공적으로 *Corynebacterium glutamicum* 야생형 ATCC13032 중의 *hisEG*와 *hisDCB*의 프로모터를 모두 *Corynebacterium glutamicum* 내생성의 강한 프로모터 P_{glyA} 로 교체하였고, *hisE*와 *hisD* 유전자의 RBS를 *Corynebacterium glutamicum* 높은 발현 유전자의 보수 RBS 서열(AAAGGAGGA)로 교체하였으며, *hisE* 유전자의 초기 코돈 GTG을 높은 발현 강도의 ATG로 교체하였고, *Corynebacterium glutamicum* CG158(WT- $P_{glyA}::P_{hisEG}$ - $P_{glyA}::P_{hisDCB}$) 구성에 성공하였다.
- [0164] **2. 염색체 상의 유전자 *hisG*의 부위 지정 돌연변이로 L-히스티딘 기저 공정균 CG160 취득**
- [0165] 염색체 *hisG* 유전자의 부위 지정 돌연변이는 두 단계 교체의 방법을 이용하여 동시에 상기 유전자의 3개 부위 지정 돌연변이를 구현하는 바, 우선 서열표 중의 서열 9가 보여주는 클로람페니콜 저항성 유전자 *Cmr* 및 *hisG* 유전자 돌연변이 세그먼트 업/다운 스트림 상동 암을 포함하는 긴 세그먼트와 CG158 상동 재조합시켜 재조합균 WT- $P_{glyA}::P_{hisEG}$ -*Cmr::hisG*- $P_{glyA}::P_{hisDCB}$ 를 취득하며; 다시 서열표 중의 서열 10이 보여주는 세 점의 돌연변이를 포함하는 *hisG* 유전자 말단 264 bp 세그먼트 및 업/다운 스트림 상동 암의 긴 세그먼트와 재조합균 WT- $P_{glyA}::P_{hisEG}$ -*Cmr::hisG*- $P_{glyA}::P_{hisDCB}$ 를 상동 재조합하여 CG160을 취득한다.
- [0166] 구체적으로 하기와 같다.
- [0167] *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 게놈 DNA를 템플릿으로 하고, P16과 P17을 프라이머로 하여 *hisG* 유전자 돌연변이 세그먼트의 업 스트림 상동 암의 PCR 증폭을 진행하고, P18과 P19를 프라이머로 하여 *hisG* 유전자 돌연변이 세그먼트의 다운링크 스트림 상동 암을 증폭시키며; P20과 P21을 프라이머로 하고, 플라스미드 pXMJ19(Biovector Science Lab, Inc로부터 구매함, 상품 번호 SMD1168H)를 템플릿으로 하여, 클로람페니콜 저항성 유전자 *Cmr*을 증폭시킨다. 다시 정제된 상기 PCR 생성물을 템플릿으로 하고, P16과 P21을 프라이머로 하여, 중첩 확대 PCR 기술(SOE)을 이용하여 증폭을 진행하여 1689 bp의 클로람페니콜 저항성 유전자 *Cmr* 및 *hisG* 유전자 돌연변이 세그먼트 업/다운 스트림 상동 암을 포함하는 긴 세그먼트(서열 9)를 취득한다.
- [0168] 그 중에서, 서열 9의 5' 말단 제1-420번 뉴클레오티드는 *hisG* 유전자 돌연변이 세그먼트 업 스트림 상동 암이고, 서열 9의 5' 말단 제421-1281번 뉴클레오티드는 클로람페니콜 저항성 유전자 *Cmr*이며, 서열 9의 5' 말단 제1282-1689번 뉴클레오티드는 *hisG* 유전자 돌연변이 세그먼트 다운 스트림 상동 암이다.
- [0169] *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 게놈 DNA를 템플릿으로 하고, P28과 P29를 프라이머로 하여 C645G(제 215번의 아스파라진이 라이신으로 변함) 돌연변이 로커스가 포함된 *hisG* 유전자 세그먼트를 증폭시키고, P30과 P31을 프라이머로 하여 A693C와 A703G(제231번의 류신이 페닐알라닌으로 변하고, 제235번의 트레오닌이 알라닌

으로 변함) 돌연변이 로커스가 포함된 *hisG* 세그먼트를 증폭시키며, 다시 정제된 상기 PCR 생성물을 템플릿으로 하고, P28과 P31을 프라이머로 하여 중첩 확대 PCR 기술(SOE)을 이용하여 증폭을 진행하여 846 bp의 세 점의 돌연변이를 포함하는 *hisG* 유전자(서열 4의 5' 말단 제1007-1852번 뉴클레오티드)를 취득한다. P16과 P22를 프라이머로 하여 *hisG* 유전자 부위 지정 돌연변이의 업 스트림 상동 암의 PCR 증폭을 진행하고, P25와 P21을 프라이머로 하여 *hisG* 유전자 부위 지정 돌연변이의 다운 스트림 상동 암을 증폭시키며; P23과 P24를 프라이머로 하고, 상기 취득한 세 점의 돌연변이를 포함하는 *hisG* 유전자를 템플릿으로 하여, 세 점의 돌연변이를 포함하는 *hisG* 유전자 말단 264 bp 세그먼트를 증폭시킨다. 다시 정제된 상기 PCR 생성물을 템플릿으로 하고, P16과 P21을 프라이머로 하여, 중첩 확대 PCR 기술(SOE)을 이용하여 증폭을 진행하여 1092 bp의 세 점의 돌연변이를 포함하는 *hisG* 유전자 말단 264 bp 세그먼트 및 이의 업/다운 스트림 상동 암의 긴 세그먼트(서열 10)를 취득한다.

[0170] 그 중에서, 서열 10의 5' 말단 제1-420번 뉴클레오티드는 업 스트림 상동 암이고, 서열 10의 5' 말단 제421-684번 뉴클레오티드는 세 점 돌연변이의 *hisG* 유전자 말단 264 bp 세그먼트이며, 서열 10의 5' 말단 제685-1092번 뉴클레오티드는 다운 스트림 상동 암이다.

[0171] 정제 회수되는 두 개의 PCR 생성물은 각각 *BamH* I과 *EcoR* I 이중 효소 절단을 거친 후, 각각 마찬가지로 이중 효소 절단을 거친 녹아웃 벡터 pK18*mobsacB*와 연결된다. 연결된 생성물을 화학 전환법을 통하여 대장간균 DH5 α 로 변형시키고, 카나마이신(50 μ g/mL)이 함유된 LB 플레이트 상에서 형질전환체를 스크리닝하고, 형질전환체를 3 세대 서브 배양한 후, P13과 P14를 프라이머로 하여 세균 집락 PCR를 이용하여 형질전환체를 검증하여 1901 bp와 1304 bp인 각각 두 가지 재조합 플라스미드를 휴대하는 양성 형질전환체를 취득하고, 검증을 거친 형질전환체에 대하여 플라스미드를 추출하고 또한 플라스미드에 대하여 *BamH* I과 *EcoR* I 이중 효소 절단을 진행하여 각각 두 가지 재조합 플라스미드인 1689 bp와 1092 bp를 취득한다. 나아가 서열 측정 검증을 거쳐, 재조합 플라스미드 pK18*mobsacB*-*Cmr*::*hisG*와 pK18*mobsacB*-*hisG*^{fbr}::*Cmr*의 구성에 성공한다.

[0172] pK18*mobsacB*-*Cmr*::*hisG*는 클로람페니콜 저항성 유전자 *Cmr* 및 *hisG* 유전자 돌연변이 세그먼트 업/다운 스트림 상동 암을 포함하는 긴 세그먼트(서열 9)를 벡터 pK18*mobsacB* 중에 삽입하여 취득한 재조합 벡터이다.

[0173] pK18*mobsacB*-*hisG*^{fbr}::*Cmr*는 세 점의 돌연변이를 포함하는 *hisG* 유전자 말단 264 bp 세그먼트 및 이의 업/다운 스트림 상동 암의 긴 세그먼트(서열 10)를 벡터 pK18*mobsacB* 중에 삽입하여 취득한 재조합 벡터이다.

[0174] 상기 이용되는 프라이머 서열은 하기와 같다.

[0175] P16: CGCGGATCCATCTACGTTGCTGGTGGC(*BamH* I)(서열 36)

[0176] P17: ACGGCAACAGCTGCTGCTGGGGTGAC(서열 37)

[0177] P18: CAGAGCAGCAGCTGTTGCCGCTCTACTGGT(서열 38)

[0178] P19: GGTAGTTAAATACGCCCGCCCTGCCACT(서열 39)

[0179] P20: GCGGGGCGTAATTTTAACTACCCCCGAAAAT(서열 40)

[0180] P21: CCGGAATTCGAATGAAATCTGGGACG(*EcoR* I)(서열 41)

[0181] P22: CGAAGCAGGATCTGCTGCTGGGGTGAC(서열 42)

[0182] P23: CAGAGCAGCAGATCCTGCTTCGCCGATCCA(서열 43)

[0183] P24: GGTAGTTAAACTAGATGCGGGCGATGCG(서열 44)

[0184] P25: CCCGCATCTAGTTTAACTACCCCCGAAAAT(서열 45)

[0185] P26: TCCCAAACAAGGCTCGC(서열 46)

[0186] P27: CAGTCGGCGTTTGCTAA(서열 47)

[0187] P28: ATGTTGAAAATCGCTG(서열 48)

[0188] P29: TTACTGCAGTGGCAGCGTCCAGGTTGTCGGGTCGACCTTGTAATCCAGCAT(서열 49)

[0189] P30: ACCTGGACGCTGCCACTGCAGTAACCCAGGCTTCTCCGGCCAGCGGTATC(서열 50)

[0190] P31: CTAGATGCGGGCGATGCGG(서열 51).

- [0191] 서열 측정이 정확한 상동 재조합 플라스미드 pK18mobsacB-Cmr::hisG를 *Corynebacterium glutamicum* CG158 중에 전기적으로 전환하고, 카나마이신 저항성 순방향 스크리닝을 통하여 재조합 플라스미드를 취득하고 염색체 상의 세균 집락에 통합한다. 자당 역방향 스크리닝을 통하여 2회 상동 재조합이 발생한 양성 세균 집락을 취득한다.
- [0192] P26과 P27을 프라이머로 하여 양성 균에 대하여 PCR 증폭 검증을 진행하여 1872 bp의 재조합균 WT- $P_{glyA}::P_{hisEG}$ -Cmr::hisG- $P_{glyA}::P_{hisDCB}$ 를 취득한다.
- [0193] 서열 측정이 정확한 상동 재조합 플라스미드 pK18mobsacB-hisG^{fbr}::Cmr를 상기 구성된 재조합균 WT- $P_{glyA}::P_{hisEG}$ -Cmr::hisG- $P_{glyA}::P_{hisDCB}$ 중에 전기적으로 전환하고, 카나마이신 저항성 순방향 스크리닝을 통하여 재조합 플라스미드를 취득하여 염색체 상의 세균 집락에 통합한다. 자당 역방향 스크리닝을 통하여 2회 상동 재조합이 발생한 양성 세균 집락을 취득한다.
- [0194] P26과 P27을 프라이머로 하여 양성 균에 대하여 PCR 증폭 검증을 진행하여 1275 bp의 재조합균을 취득하고, *Corynebacterium glutamicum* CG160(WT- $P_{glyA}::P_{hisEG}$ -hisG^{fbr}- $P_{glyA}::P_{hisDCB}$)으로 명한다.
- [0195] 재조합균의 게놈 DNA에 대하여 추출 및 서열 측정을 진행하면, 결과적으로 성공적으로 *Corynebacterium glutamicum* CG158의 염색체 hisG 유전자의 N215K/L231F/T235A 점 돌연변이에 성공하고, *Corynebacterium glutamicum* CG160(WT- $P_{glyA}::P_{hisEG}$ -hisG^{fbr}- $P_{glyA}::P_{hisDCB}$) 구성에 성공하였다.
- [0196] 상기 hisG 유전자의 N215K/L231F/T235A 점 돌연변이는 hisG 유전자에 의하여 인코딩되는 ATP-포스포리보실 전이 효소(HisG)의 제215번의 아스파라진을 라이신으로 돌연변이시키고, 제231번의 류신이 페닐알라닌으로 돌연변이시키며, 제235번의 트레오닌이 알라닌으로 돌연변이시키는 것이다.
- [0197] **실시예 2 : 플라스미드를 포함하는 높은 수율의 L-히스티딘의 재조합균 CG171의 구성**
- [0198] 본 실시예에 있어서, 실시예1에서 취득한 프라이머리 공정균의 기초 상에서, 나아가 prsA 유전자를 과도 발현시킨 킴과 아울러, hisG^{fbr} 유전자(서열 4의 제1007-1852번 뉴클레오티드 서열)를 과도 발현시킨 후, pgi 유전자(서열 13)를 녹아웃하는 것과 zwf-opcA 유전자(서열 2)를 과도 발현시키는 개조를 조합시켜 높은 수율의 공정균 CG171를 취득한다.
- [0199] **1. L-히스티딘 프라이머리 공정균 CG176의 구성**
- [0200] prsA 유전자는 PRPP 합성 효소(PrsA, 서열 5가 보여주는 바와 같으며, PRPP는 히스티딘 합성의 전구체 물질)를 인코딩하고, prsA 유전자의 발현을 향상시켜 히스티딘 합성 전구체 PRPP의 합성을 증가시키고, 히스티딘 합성을 위하여 더욱 많은 전구체 물질을 제공한다.
- [0201] 실시예1에서 취득한 기저 공정균 CG160의 기초 상에서, prsA 유전자(서열 4 중의 5' 말단 제15-992번 뉴클레오티드 서열이 보여주는 바와 같음)를 과도 발현시킨 킴과 아울러, hisG^{fbr} 유전자(서열 4 중의 5' 말단 제1007-1852번 뉴클레오티드 서열이 보여주는 바와 같음)를 과도 발현시켜 비교적 훌륭한 히스티딘 수율을 가지는 프라이머리 공정균 CG176를 취득하여 본 발명의 방식을 실시하여 더욱 훌륭한 효과를 얻도록 한다. 당업계의 기술자들은 본 발명의 개조 방식이 본 실시예에서 취득하는 프라이머리 공정균에 대하여 재조합 개조를 진행하는 것에 제한되지 않고, 기타 히스티딘 공정균 중에 이용될 수 있음을 이해하여야 할 것이다.
- [0202] 균주 CG160의 게놈 DNA를 템플릿으로 하고, 각각 P32/P33과 P34/P35를 프라이머로 하여 prsA 유전자(992 bp)와 hisG^{fbr} (860 bp)에 대하여 PCR 증폭을 진행한다. 중첩 확대 PCR를 이용하여 두 유전자를 연결시키고, 증폭된 hisG^{fbr} 과 prsA 유전자를 템플릿으로 하며, P32와 P35를 프라이머로 하여 PCR 증폭을 진행하여 1852 bp의 PCR 생성물인 prsA-hisG^{fbr} 세그먼트(서열 4)를 취득한다.
- [0203] 그 중에서, 서열 4의 5' 말단 제15-992번 뉴클레오티드는 prsA이고, 서열 4의 5' 말단 제1007-1852번 뉴클레오티드는 hisG^{fbr} (세 점의 돌연변이를 포함하는 hisG 유전자)이다.
- [0204] 상기 PCR 생성물에 대해 Xba I과 Sma I 이중 효소 절단한 후, 마찬가지로 이중 효소 절단을 거친 *Corynebacterium glutamicum*-대장간균 서틀 플라스미드 pXMJ19와 연결시킨다. 연결 생성물을 화학 전환법을 통

하여 대장간균 DH5 α 로 변형시키고, 클로람페니콜(20 μ g/mL)이 함유된 LB 플레이트 상에서 형질전환체를 스크리닝하고, 형질전환체를 3 세대 서브 배양한 후, P36과 P37을 프라이머로 하여 세균 집락 PCR를 이용하여 형질전환체를 검증하여 2054 bp의 양성 형질전환체를 취득하고, 검증을 거친 형질전환체에 대하여 플라스미드를 추출하고 또한 플라스미드에 대하여 *Xba* I과 *Sma* I 이중 효소 절단을 진행하여 양성 1852 bp를 취득한다.

[0205] pXMJ19-*prsA-hisG*^{fbr}는 나아가 서열 측정 분석을 거치는 바, 해당 플라스미드는 *prsA-hisG*^{fbr} 세그먼트(서열 4)를 플라스미드 pXMJ19의 *Xba* I과 *Sma* I 효소 사이트 사이에 삽입하여 벡터 pXMJ19-*prsA-hisG*^{fbr}를 취득하는 바, 재조합 플라스미드 pWYE 1230(도 1 참조)로 명한다.

[0206] 플라스미드 pXMJ19-*prsA-hisG*^{fbr}을 상기 구성된 기저 공정균 CG160 중으로 전환시키고, P36과 P37을 프라이머로 하여, 세균 집락 PCR를 이용하여 형질전환체를 검증하여 2054 bp의 양성 형질전환체를 취득하고, 검증을 거친 형질전환체에 대하여 플라스미드를 추출하여 검증하여, 더욱 과도 발현 플라스미드를 성공적으로 공정균 중에 전환시켜 L-히스티딘 공정균 CG176(WT-*P*_{glyA}::*P*_{hisEG}-*hisG*^{fbr}-*P*_{glyA}::*P*_{hisDCB}/pXMJ19-*prsA-hisG*^{fbr})의 구성에 성공하였다.

[0207] 상기 이용되는 프라이머 서열은 하기와 같다.

[0208] P32: GCTCTAGAAAAGGAGGATCCTCATGACTGCTCACTGG(*Xba* I)(서열 52)

[0209] P33: TTGTCTCCTTTTTAGGCCTCGCCCTCGAA(서열 53)

[0210] P34: GGCGAGGCCTAAAAAGGAGGACAATCATGTTGAAAATCGCTG(서열 54)

[0211] P35: TCCCCGGGCTAGATGCGGGCGATGCGG(*Sma* I)(서열 55)

[0212] P36: CAATTAATCATCGGCTCGTA(서열 56)

[0213] P37: ACCGCTTCTGCGTCTGATT(서열 57).

[0214] **2. L-히스티딘 프라이머리 공정균 CG161와 CG172의 취득**

[0215] *pgi* 유전자는 글루코스-6-포스페이트 아이소메라아제(Pgi, 서열 14에서 보여주는 바와 같음)를 인코딩한다. 상기 취득한 기저균 160의 기초 상에서, *pgi* 유전자(서열 13)를 녹아웃시켜 프라이머리 공정균 CG161을 취득하며; CG161의 기초 상에서, *prsA* 유전자를 과도 발현시킵과 아울러, *hisG*^{fbr} 유전자를 과도 발현시켜 *pgi* 유전자를 녹아웃시킨 공정균 CG172를 취득하였다.

[0216] 프라이머리 공정균 CG161은 L-히스티딘 기저 공정균 CG160 중의 *pgi* 유전자(서열 13)를 녹아웃시켜 취득한 것으로서, 구체적으로는 하기와 같다.

[0217] 우선, Genbank 중의 *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032의 *pgi* 유전자 및 이의 업/다운 스트림 서열에 의하여 각각 프라이머를 디자인한다.

[0218] *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 게놈 DNA를 템플릿으로 하고, P38과 P39를 프라이머로 하여 PCR을 통하여 *pgi* 유전자 업 스트림 상동 암을 증폭시키며; P40과 P41을 프라이머로 하여 *pgi* 유전자 다운 스트림 상동 암을 증폭시킨다. 이어 정제된 상기 PCR 생성물을 템플릿으로 하고, P38과 P41을 프라이머로 하여 중첩 확대 PCR 기술(SOE)을 이용하여 증폭을 진행하여 1672 bp의 녹아웃하고자 하는 유전자 *pgi*의 업/다운 스트림 상동 암을 포함하는 세그먼트(서열 1)를 취득한다.

[0219] 그 중에서 서열 1의 5' 말단 제1-834번 뉴클레오티드는 녹아웃하고자 하는 유전자 *pgi*의 업스트림 상동 암이고, 서열 1의 5' 말단 제2835-1672번 뉴클레오티드는 녹아웃하고자 하는 유전자 *pgi*의 다운스트림 상동 암이다.

[0220] 정제 회수되는 PCR 생성물은 각각 *Bam*H I과 *Eco*R I 이중 효소 절단을 거친 후, 마찬가지로의 이중 효소 절단을 거친 상동 재조합 벡터 pK18mobsacB와 연결된다. 연결 생성물을 화학 전환법을 통하여 대장간균 DH5 α 로 변형시키고, 카나마이신(50 μ g/mL)이 함유된 LB 플레이트 상에서 형질전환체를 스크리닝하고, 형질전환체를 3 세대 서브 배양한 후, P13과 P14를 프라이머로 하여 세균 집락 PCR를 이용하여 형질전환체를 검증하여 양성 형질전환체로서의 1884 bp를 취득하고, 검증을 거친 형질전환체에 대하여 플라스미드를 추출하고 또한 플라스미드에 대하여 *Bam*H I과 *Eco*R I 이중 효소 절단을 진행하여 양성인 1672 bp를 취득한다. 나아가 서열 측정 검증을 거쳐 재

조합 플라스미드 pK18mobsacB- Δpgi 의 구성에 성공하는 바, 이는 녹아웃하고자 하는 유전자 pgi 의 업/다운 스트림 상동 암을 포함하는 세그먼트(서열 1)를 벡터 pK18mobsacB의 *Bam*H I과 *Eco*R I 효소 절단 사이트 사이에 삽입하여 취득한 벡터이다.

[0221] 상기 이용되는 프라이머 서열은 하기와 같다.

[0222] P38: CGCGGATCCGCTCTTTTCGGAGTGACCT(*Bam*H I)(서열 58)

[0223] P39: TAAGCAAGCGAGAAAACCTCTTTATTGTGTC(서열 59)

[0224] P40: TAAAGGAGTTTCTCGCTTGCTTATAGGGTC(서열 60)

[0225] P41: CCGGAATTCTCGGAAGCAGTTAGTGAAG(*Eco*R I)(서열 61)

[0226] P42: TTGACGACGCAAGAGCCA(서열 62)

[0227] P43: CACCATTACCGATGAGAAAC(서열 63).

[0228] 서열 측정이 정확한 상동 재조합 플라스미드 pK18mobsacB- Δpgi 를 *Corynebacterium glutamicum* CG160 중에 전기적으로 전환하고, 카나마이신 저항성 순방향 스크리닝을 통하여 재조합 플라스미드를 통합하여 염색체 상의 세균 집락을 취득하며 자당 역방향 스크리닝을 통하여 제2회 상동 재조합이 발생한 세균 집락을 취득한다. P42와 P43을 프라이머로 하여 세균 집락에 대하여 게놈 DNA 추출 및 PCR 증폭 검증을 진행하여 양성인 1759 bp를 취득하고(도 2 참조), CG161(WT- $P_{glyA}::P_{hisEG}-hisG^{fbr}-P_{glyA}::P_{hisDCB}-\Delta pgi$)로 명한다.

[0229] CG161(WT- $P_{glyA}::P_{hisEG}-hisG^{fbr}-P_{glyA}::P_{hisDCB}-\Delta pgi$)는 나아가 서열 측정 분석을 진행하는 바, 결과적으로 L-히스티딘 기저 공정균 CG160의 염색체 pgi 유전자 녹아웃에 성공하고, CG161 구성에 성공하였다.

[0230] 공정균 CG172은 플라스미드 pXMJ19-*prsA-hisG*^{fbr}을 공정균 CG161에 도입하여 취득한 재조합균(WT- $P_{glyA}::P_{hisEG}-hisG^{fbr}-P_{glyA}::P_{hisDCB}-\Delta pgi$ /pXMJ19-*prsA-hisG*^{fbr})이다. 구체적인 조작 방법은 일반적인 방법이기 때문에 여기에서는 설명을 생략하도록 한다.

[0231] 3. L-히스티딘 높은 수율 공정균 CG171 및 대조로서의 공정균 CG173의 구성

[0232] *zwf-opcA* 유전자는 글루코스-6-포스페이트 데히드로게나아제(*Zwf*-*OpcA*, 서열 3에서 보여주는 바와 같으며, 그 중에서 5' 말단 제1-514번 아미노산이 *Zwf* 서브 유닛을 구성하고, 제515-833번 아미노산 잔기가 *OpcA* 서브 유닛을 구성함)를 인코딩한다. pgi 유전자를 녹아웃시키는 것과 *zwf-opcA* 유전자(서열 2)를 과도 발현시키는 것을 조합하여 개조를 진행하여 높은 수율의인 공정균 CG171를 취득하였다. 대조로서, pgi 유전자를 녹아웃시키지 않았으나, *zwf-opcA* 유전자를 과도 발현시킨 공정균 CG173을 취득하였다.

[0233] Genbank 중의 *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032의 *zwf-opcA* 유전자 서열에 의하여 프라이머를 디자인하고, *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032의 게놈 DNA를 템플릿으로 하고, P44와 P45를 프라이머로 이용하고 PCR을 통하여 2519 bp의 *zwf-opcA* 세그먼트(*zwf* 유전자의 초기 코돈은 GTG로부터 ATG로 교체되어 이의 발현을 향상시킴)(서열 2)를 증폭시킨다. *Hind* III과 *Xba* I 이중 효소 절단을 거친 후, 우선 마찬가지로 이중 효소 절단 처리를 거친 발현 플라스미드 pXMJ19와 연결시켜 재조합 플라스미드 pXMJ19-*zwf-opcA*를 취득하며, pXMJ19-*zwf-opcA*는 다시 *Xba* I과 *Sma* I 이중 효소 절단을 거친 후, 상기 제조된 플라스미드 pXMJ19-*prsA-hisG*^{fbr}이 *Xba* I과 *Sma* I 이중 효소 절단을 거쳐 취득한 1852 bp의 *prsA-hisG*^{fbr} 세그먼트와 연결된다.

[0234] *zwf-opcA* 세그먼트에 있어서 그 중의 서열 2의 5' 말단 제1-1545번 뉴클레오티드는 *zwf* 유전자이고, 서열 2의 5' 말단 제1560-2519번 뉴클레오티드는 *opcA* 유전자이다.

[0235] 연결 생성물을 화학 전환법을 통하여 대장간균 DH5 α 로 변형시키고, 클로람페니콜(20 μ g/mL)이 함유된 LB 플레이트 상에서 형질전환체를 스크리닝하고, 형질전환체를 3 세대 서브 배양한 후, P36과 P37을 프라이머로 하여 세균 집락 PCR를 이용하여 형질전환체를 검증하여 4587 bp의 양성 형질전환체를 취득한다. 검증을 거친 형질전환체에 대하여 플라스미드를 추출하고 또한 플라스미드에 대하여 *Xba* I/*Sma* I과 *Hind* III/*Xba* I 이중 효소 절단을 진행하여 각각 1852 bp와 2533 bp의 양성을 취득한다.

[0236] 서열 측정을 통하여 검증을 거쳐 재조합 플라스미드는 pXMJ19-*zwf-opcA-prsA-hisG*^{fbr}의 구성에 성공하고, pWYE

1229(도 3 참조)로 명하며, 이는 *zwf-opcA* 유전자(서열 2)을 pXMJ19의 *Hind* III과 *Xba* I 사이에 삽입하고, 또한 *prsA-hisG^{fbr}* 세그먼트(서열 4)를 *Xba* I과 *Sma* I 사이에 삽입하여 취득한 벡터이다.

[0237] P44: CCCAAGCTTAAAGGAGGACCATCATGAGCACAAACGACCCCT(*Hind* III)(서열 64)

[0238] P45: GCTCTAGATTAGACGGTTTCCAGCTTG(*Xba* I)(서열 65)

[0239] 재조합 플라스미드 pXMJ19-*zwf-opcA-prsA-hisG^{fbr}*을 각각 *pgi* 결실되지 않은 공정균 CG160와 *pgi* 결실된 공정균 CG161 중으로 전기 전환한다. P36과 P37을 프라이머로 하고, 세균 집락 PCR를 이용하여 형질전환체를 검증하여 4587 bp의 양성 형질전환체를 취득하고, 정확하다고 검증된 형질전환체에 대하여 플라스미드를 추출한다.

[0240] 서열 측정을 진행하고, L-히스티딘 공정균 CG173(WT-*P_{glyA}::P_{hisEG}-hisG^{fbr}-P_{glyA}::P_{hisDCB}*/ pXMJ19-*zwf-opcA-prsA-hisG^{fbr}*)에는 플라스미드 재조합 플라스미드 pXMJ19-*zwf-opcA-prsA-hisG^{fbr}*가 포함되고, 이는 재조합 플라스미드 pXMJ19-*zwf-opcA-prsA-hisG^{fbr}*를 공정균 CG160에 도입하여 취득한 균이다.

[0241] CG171(WT-*P_{glyA}::P_{hisEG}-hisG^{fbr}-P_{glyA}::P_{hisDCB}-Δ*pgi*/pXMJ19-*zwf-opcA-prsA-hisG^{fbr}*)에는 플라스미드 재조합 플라스미드 pXMJ19-*zwf-opcA-prsA-hisG^{fbr}*가 포함되고, 이는 재조합 플라스미드 pXMJ19-*zwf-opcA-prsA-hisG^{fbr}*를 공정균 CG161에 도입하여 취득한 균이다.*

[0242] 나아가 과도 발현 플라스미드 휴대 유전자가 공정균 중에 발현 상황을 검증한다. CG171의 세포 용해액을 제고하여 SDS-PAGE 테스트를 진행하는 바, 결과는 도 4에 도시된 바와 같으며, 여기에서 레인 1과 2는 CG171의 세포 용해액이고, 레인 3은 대조를 위한 것으로서 ATCC13032/pXMJ19(pXMJ19 플라스미드를 ATCC13032 중에 도입하여 취득)의 세포 용해액이며, 과도 발현 플라스미드가 휴대하는 *zwf*(57.5 kDa), *opcA*(34.8 kDa) *prsA*(35.6 kDa)와 *hisG^{fbr}*(30.2 kDa) 유전자는 공정균 중에서 성공적으로 발현된다.

[0243] 나아가 공정균 CG171 중의 글루코스-6-포스페이트 데히드로게나아제(*Zwf-opcA*)의 비활성을 측정한다. 측정 반응계는 하기와 같은 바(0.5 mL), 즉 100 mmol/L Tris-HCl (pH 7.8), 200 mmol/L KCl, 1 mmol/L NADP, 10 mmol/L MgCl₂, 5 mmol/L 글루코스-6-포스페이트(G6P), 적당량의 세포 용해액이다. 30 °C에서 5 min 동안 반응시킨다. 340 nm에서의 흡광도의 변화를 측정하는 것을 통하여 생성물 NADPH의 생성량을 반영한다. 효소 활성 단위(U)는 매 분 1 nmol의 환원형 니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드 포스페이트(NADPH)를 생성하는 필요한 효소의 양으로 정의된다. 결과는 도5에 도시된 바와 같으며, 야생형 균주에 비하여 플라스미트를 통하여 *zwf-opcA*를 과도 발현시키는 것을 통하여, 글루코스-6-포스페이트 데히드로게나아제의 비활성은 34배 향상된다.

[0244] **실시예 3 : 플라스미드가 포함된 L-히스티딘 높은 수율 공정균 CG319의 구성**

[0245] 상기 취득한 높은 수율 공정균 CG171의 기초 상에서, 나아가 AICAR 트랜스메틸라제/IMP 환히드라제(*PurH*, 서열 16이 보여주는 바와 같음)의 *purH* 유전자를 과도 발현시키기 위하여, 히스티딘 합성 경로가 향상되어 증가되는 부산물 AICAR을 더욱 많이 퓨린 뉴클레오티드 합성 경로로 가이드하여 재조합 플라스미드 pXMJ19-*zwf-opcA-prsA-hisG^{fbr}-purH*를 구성하고, 또한 프라이머리 균 CG161 중에 도입하여 높은 수율 공정균 CG319를 취득한다.

[0246] Genbank 중의 *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032의 *purH* 유전자 서열에 의하여 프라이머를 디자인하고, ATCC13032 게놈 DNA를 템플릿으로 하고, P46과 P47을 프라이머로 하여 *purH* 유전자(563 bp)(서열 15)를 PCR 증폭시킨다.

[0247] 상기 PCR 생성물에 대해 *Sma* I과 *EcoR* 이중 효소 절단한 후, 마찬가지로 이중 효소 절단을 거친 *Corynebacterium glutamicum*-대장간균 서틀 플라스미드 pXMJ19와 연결시킨다. 연결 생성물을 화학 전환법을 통하여 대장간균 DH5 α로 변형시키고, 클로람페니콜(20 μg/mL)이 함유된 LB 플레이트 상에서 형질전환체를 스크리닝하고, 형질전환체를 3 세대 서브 배양한 후, P52와 P53을 프라이머로 하여 세균 집락 PCR를 이용하여 형질전환체를 검증하여 1779 bp의 양성 형질전환체를 취득하고, 검증을 거친 형질전환체에 대하여 플라스미드를 추출하고 또한 플라스미드에 대하여 *Xba* I과 *Sma* I 이중 효소 절단을 진행하여 1577 bp의 양성을 취득하고, 재조합 플라스미드 pXMJ19-*purH*로 명한다.

[0248] 재조합 플라스미드 pXMJ19-*zwf-opcA-prsA-hisG^{fbr}*을 템플릿으로 하고, 각각 P48/P49와 P50/P51을 프라이머로 하

여 *zwf-opcA* (2519 bp)와 *prsA-hisG^{fbr}* 세그먼트(1852 bp) PCR 증폭시킨다. 중첩 확대 PCR를 이용하여 두 세그먼트를 연결시켜 4385 bp의 *zwf-opcA-prsA-hisG^{fbr}* 세그먼트(서열 17)를 취득한다.

[0249] 그 중에서, 서열 17의 5' 말단 제15-2533번 뉴클레오티드는 *zwf-opcA*이고, 서열 17의 5' 말단 제2534-4385번 뉴클레오티드는 *prsA-hisG^{fbr}*이다.

[0250] 상기 PCR 생성물에 대해 *Xba* I과 *Sma* I 이중 효소 절단한 후, 마찬가지로 이중 효소 절단을 거친 재조합 pXMJ19-*purH*와 연결시킨다. 연결 생성물을 화학 전환법을 통하여 대장간균 DH5 α로 변형시키고, 클로람페니콜 (20 μg/mL)이 함유된 LB 플레이트 상에서 형질전환체를 스크리닝하고, 형질전환체를 3 세대 서브 배양한 후, P52와 P53을 프라이머로 하여 세균 집락 PCR를 이용하여 형질전환체를 검증하여 6164 bp의 양성 형질전환체를 취득하고, 검증을 거친 형질전환체에 대하여 플라스미드를 추출하고 또한 플라스미드에 대하여 *Xba* I과 *Sma* I 이중 효소 절단을 진행하여 4385 bp의 양성을 취득하고, 재조합 플라스미드 pWYE1507 (pXMJ19-*zwf-opcA-prsA-hisG^{fbr}-purH*)(도 6 참조)로 명한다.

[0251] pXMJ19-*zwf-opcA-prsA-hisG^{fbr}-purH* 나아가 서열 측정 분석을 진행하는 바, 해당 플라스미드는 *zwf-opcA-prsA-hisG^{fbr}* 세그먼트(서열 17)을 플라스미드 pXMJ19의 *Xba* I과 *Sma* I 효소 절단 사이트 사이에 삽입하고, 아울러 *purH*를 플라스미드 pXMJ19의 *Sma* I과 *EcoR* I 효소 절단 사이트 사이에 삽입하여 취득한 벡터이다.

[0252] 플라스미드 pXMJ19-*zwf-opcA-prsA-hisG^{fbr}-purH*를 공정균 CG161 중으로 전환시키고, P52와 P53을 프라이머로 하며, 세균 집락 PCR를 이용하여 형질전환체를 검증하여 6164 bp의 양성 형질전환체를 취득하고, 검증을 거친 형질전환체에 대하여 플라스미드를 추출하여 검증하여, 더욱 과도 발현 플라스미드를 성공적으로 공정균 중에 전환시켜 L-히스티딘 공정균 CG319(WT-*P_{glyA}::P_{hisEG}-hisG^{fbr}-P_{glyA}::P_{hisDCB}-Δ*pgi*/pXMJ19-*zwf-opcA-prsA-hisG^{fbr}-purH*)의 구성에 성공하였다.*

[0253] 상기 이용되는 프라이머 서열은 하기와 같다.

[0254] P46: TCCCCCGGAAAGGAGGACCTTCATGAGCGATGATCGTAAG(*Sma* I)(서열 66)

[0255] P47: CCGGAATTCCTTAGTGAGCGAAGTGTCGCG(*EcoR* I)(서열 67)

[0256] P48: GCTCTAGAAAAGGAGGACCATCATGAGCACAAACACGACCC(*Xba* I)(서열 68)

[0257] P49: AGTCATGAGGATCCTCTTTTATAGACGGTTTCCAGCTTG(서열 69)

[0258] P50: TCAAGCTGGAACCGTCTAAAAAGGAGGATCCTCATGACTGCTCACTG(서열 70)

[0259] P51: TCCCCCGGGCTAGATGCGGGCGATGCGATTTC(*Sma* I)(서열 71)

[0260] P52: CAATTAATCATCGGCTCGTA(서열 72)

[0261] P53: ACCGCTTCTGCGTTCTGATT(서열 73)

[0262] **실시예 4 : 플라스미드가 포함된 L-히스티딘 높은 수율 공정균 CG328의 구성**

[0263] 상기 CG319를 취득한 기초 상에서, 아미도포스포리보실 전이효소(PurF, 서열 19)를 인코딩하는 *purF* 유전자를 약화시키고, 히스티딘 합성 전구체 물질 PRPP의 히스티딘 합성 경로를 향한 유동을 증가시키기 위하여, 프라이머리 공정균 CG161 중의 *purF*의 프로모터를 *P_{hom}*으로 교체시켜 CG327를 취득하고, 다시 플라스미드 pXMJ19-*zwf-opcA-prsA-hisG^{fbr}-purH*를 도입하여 높은 수율 공정균 CG328을 취득하였다.

[0264] 프라이머리 공정균 CG161의 *purF* 유전자의 프로모터를 *P_{hom}*으로 교체시켜 공정균 CG327를 취득하는 것은 구체적으로 하기와 같다.

[0265] 우선, Genbank 중의 *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032의 *purF* 유전자 및 이의 업/다운 스트림 서열에 의하여 각각 프라이머를 디자인한다.

[0266] *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 게놈 DNA를 템플릿으로 하고, P54와 P55를 프라이머로 하여 PCR을 통하여 *purF* 유전자 업 스트림 상동 암을 증폭시키며; P56과 P57를 프라이머로 하여 *purF* 프로모터를 증폭시킨다.

P58과 P59를 프라이머로 하여 *purF* 유전자 다운 스트림 상동 암을 증폭시킨다. 이어 정제된 상기 PCR 생성물을 템플릿으로 하고, P54와 P59를 프라이머로 하여 중첩 확대 PCR 기술(SOE)을 이용하여 증폭을 진행하여 1654 bp의 P_{hom} 프로모터 및 *purF* 유전자 프로모터 업/다운 스트림 상동 암을 포함하는 세그먼트(서열 18)를 취득한다.

[0267] 그 중에서, 서열 18의 5' 말단 제1-735번 뉴클레오티드는 *purF* 유전자 업 스트림 상동 암이고, 서열 18의 5' 말단 제736-865번 뉴클레오티드는 P_{hom} 프로모터이며, 서열 18의 5' 말단 제866-1654번 뉴클레오티드는 *purF* 유전자 프로모터의 다운 스트림 상동 암이다.

[0268] 정제 회수되는 PCR 생성물은 각각 *BamH* I과 *EcoR* I 이중 효소 절단을 거친 후, 마찬가지로의 이중 효소 절단을 거친 상동 재조합 벡터 pK18mobsacB와 연결된다. 연결 생성물을 화학 전환법을 통하여 대장간균 DH5 α 로 변형시키고, 카나마이신(50 μ g/mL)이 함유된 LB 플레이트 상에서 형질전환체를 스크리닝하고, 형질전환체를 3 세대 서브 배양한 후, P13과 P14를 프라이머로 하여 세균 집락 PCR를 이용하여 형질전환체를 검증하여 양성 형질전환체로서의 1866 bp를 취득하고, 검증을 거친 형질전환체에 대하여 플라스미드를 추출하고 또한 플라스미드에 대하여 *BamH* I과 *EcoR* I 이중 효소 절단을 진행하여 양성 1654 bp를 취득한다. 나아가 서열 측정 검증을 진행하는 바, 재조합 플라스미드 pK18mobsacB- $P_{hom}::P_{purF}$ 의 구성에 성공하였고, 이는 프로모터 P_{hom} 및 교체하고자 하는 프로모터를 포함하는 업/다운 스트림 상동 암의 세그먼트(서열 18)를 벡터 pK18mobsacB의 *BamH* I과 *EcoR* I 효소 절단 사이트 사이에 삽입하여 취득한 벡터이다.

[0269] 상기 이용되는 프라이머 서열은 하기와 같다.

[0270] P54: CGCGGATCCTCCGCGAGAAAGCACCTCA(*BamH* I)(서열 74)

[0271] P55: TTTAGTTTTCACCGGCTAAAGTTTGACCACTGG(서열 75)

[0272] P56: GTGGTCAAACCTTTAGCCGTTGAAACTAAAAAGC(서열 76)

[0273] P57: TCCGGTCCTCCTTTTACTTTGTTTCGGCCACCC(서열 77)

[0274] P58: GGCCGAAACAAAGTAAAGGAGGACCGGAATGACCCAGGTAAACCAC(서열 78)

[0275] P59: CCGGAATTCACCTTTGCGGGTTGTCT(*EcoR* I)(서열 79)

[0276] 서열 측정이 정확한 상동 재조합 플라스미드 pK18mobsacB- $P_{hom}::P_{purF}$ 를 *Corynebacterium glutamicum* CG161 중에 전기적으로 전환하고, 카나마이신 저항성 순방향 스크리닝을 통하여 재조합 플라스미드를 취득하여 염색체 상의 세균 집락에 통합하며, 자당 역방향 스크리닝을 통하여 제2회 상동 재조합이 발생한 세균 집락을 취득한다. P56과 P59를 프라이머로 하여 세균 집락에 대하여 게놈 DNA 추출 및 PCR 증폭 검증을 진행하여 905 bp의 양성을 취득하고, CG327(WT- $P_{glyA}::P_{hisEG}-hisG^{fbr}-P_{glyA}::P_{hisDCB}-\Delta pgi::P_{hom}::P_{purF}$)로 명한다.

[0277] CG327(WT- $P_{glyA}::P_{hisEG}-hisG^{fbr}-P_{glyA}::P_{hisDCB}-\Delta pgi::P_{hom}::P_{purF}$)는 나아가 서열 측정 분석을 진행하는 바, 결과적으로 L-히스티딘 프라이머리 공정균 CG161의 염색체 *purF* 유전자 프로모터를 P_{hom} 으로 교체하고, CG327 구성에 성공하였다.

[0278] 공정균 CG328는 플라스미드 pXMJ19-*zwf-opcA-prsA-hisG^{fbr}-purH*를 공정균 CG327 도입하여 취득한 재조합균(WT- $P_{glyA}::P_{hisEG}-hisG^{fbr}-P_{glyA}::P_{hisDCB}-\Delta pgi::P_{hom}::P_{purF}$ /pXMJ19-*zwf-opcA-prsA-hisG^{fbr}-purH*)이다. 구체적인 조작 방법은 상기 공정균 CG319를 제조하는 것이고 일반적인 방법이기 때문에 여기에서는 설명을 생략하도록 한다. CG328 균주가 휴대한 플라스미드에 대하여 PCR 검증을 진행하는 바, P52와 P53을 프라이머로 하여 6164 bp 세그먼트(도 7 참조)를 취득하고, 이 DNA 세그먼트에 대하여 서열 측정을 진행한 결과로는 *zwf-opcA-prsA-hisG^{fbr}-purH* 세그먼트로서, CG328 균주 구성에 성공하였다.

[0279] 실시예 5 : 플라스미드가 없는 L-히스티딘 높은 수율 재조합균 CG351의 구성

[0280] 플라스미드를 휴대하면 공정균의 대사 부담을 증가시킬 뿐 아니라, 아울러 공정균의 산업화 발효 제어와 발효 제품의 안전성에 불리하다. 그러므로, 본 실시예에 있어서, 플라스미드 휴대 유전자를 염색체 상에서 발현을 향상시키고, 플라스미드가 없는 히스티딘 공정균을 구성하여 공정균의 대사 부담을 줄이고 발효 기저물로부터 제품으로의 최대 전환을 구현한다.

- [0281] 본 실시예에 있어서, *pgi* 유전자를 녹아웃시킨 프라이머리 균 CG161의 기초 상에서 나아가 개조를 진행하는 바, P_{sod} 프로모터로 *prsA* 유전자의 프로모터를 교체시켜 PRPP 합성 효소(PrsA)의 발현을 향상시킴으로써, CG350을 취득하며; 나아가 P_{eftu} 프로모터로 *tkt-tal-zwf-opcA-devB* 오페론의 프로모터를 교체시켜 글루코스-6-포스페이트 데히드로게나아제(Zwf-OpcA)의 발현을 향상시켜 CG351을 취득한다.
- [0282] Genbank 중의 *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032의 *prsA* 유전자 및 이의 업/다운 스트림 서열과 P_{sod} 프로모터에 의하여 각각 프라이머를 디자인한다.
- [0283] *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 게놈 DNA를 템플릿으로 하고, P60과 P61을 프라이머로 하여 *prsA* 프로모터 업 스트림 상동 암을 증폭시키며; P62와 P63을 프라이머로 하여 P_{sod} 프로모터를 증폭시키며; P64와 P65를 프라이머로 하여 *prsA* 프로모터 다운 스트림 상동 암을 증폭시킨다. 이어 정제된 상기 PCR 생성물을 템플릿으로 하고, P60과 P65를 프라이머로 하여 중첩 확대 PCR 기술(SOE)을 이용하여 증폭을 진행하여 1455 bp의 PCR 생성물 취득하여, 교체할 프로모터 P_{sod} 및 교체될 프로모터 P_{prsA} 를 포함하는 업/다운 스트림 상동 암의 세그먼트(서열 11)로 한다.
- [0284] 그 중에서, 서열 11의 5' 말단 제1-655번 뉴클레오티드는 교체될 프로모터 P_{prsA} 의 업 스트림 상동 암이고, 서열 11의 5' 말단 제656-847번 뉴클레오티드는 프로모터 P_{sod} 이며, 서열 11의 5' 말단 제848-1455번 뉴클레오티드는 교체될 프로모터 P_{prsA} 의 다운 스트림 상동 암이다.
- [0285] 상기 1455 bp의 PCR 생성물에 대해 *Hind* III과 *Bam*HI 이중 효소 절단한 후, 마찬가지로 이중 효소 절단을 거친 상동 재조합 벡터 pK18mobsacB와 연결시킨다. 연결 생성물을 화학 전환법을 통하여 대장간균 DH5 α 로 변형시키고, 카나마이신(50 μ g/mL)이 함유된 LB 플레이트 상에서 형질전환체를 스크리닝하고, 형질전환체를 3 세대 서브 배양한 후, P13과 P14를 프라이머로 하여 콜로니 PCR를 이용하여 형질전환체를 검증하여 1667 bp의 양성 형질전환체를 취득하고, 검증을 거친 형질전환체에 대하여 플라스미드를 추출하고 또한 플라스미드에 대하여 *Hind* III과 *Bam*HI 이중 효소 절단을 진행하여 양성 1455 bp를 취득한다.
- [0286] 양성 플라스미드에 대하여 서열 측정을 진행하는 바, 결과적으로 해당 플라스미드는 서열표 중의 서열 11이 보여주는 뉴클레오티드를 벡터 pK18mobsacB 중에 삽입하여 취득한 재조합 플라스미드이며, pK18mobsacB- $P_{sod}::P_{prsA}$ 라 명한다.
- [0287] 동일한 방법을 이용하여 상동 재조합 플라스미드 pK18mobsacB- $P_{eftu}::P_{tkl}$ 를 구성하고, *tkt-tal-zwf-opcA-devB* 오페론의 프로모터를 강한 프로모터 P_{eftu} 로 교체시킨다. 구체적으로 말하면, P66과 P67을 프라이머로 하여 *tkt-tal-zwf-opcA-devB* 오페론 프로모터 업 스트림 상동 암을 증폭시키며; P68과 P69를 프라이머로 하여 프로모터 P_{eftu} 를 증폭시키며; P70과 P71을 프라이머로 하여 *tkt-tal-zwf-opcA-devB* 오페론 프로모터 다운 스트림 상동 암을 증폭시킨다. P66과 P71을 프라이머로 하여 중첩 확대 PCR 기술(SOE)을 이용하여 증폭시킨다. 취득한 1512 bp의 PCR 생성물은 교체할 프로모터 P_{eftu} 및 교체될 프로모터 P_{tkl} 를 포함하는 업/다운 스트림 상동 암의 긴 세그먼트(서열 12)이고, 그 중에서, 서열 12의 5' 말단 제1-634번 뉴클레오티드는 교체될 프로모터 P_{tkl} 의 업 스트림 상동 암이고, 서열 12의 5' 말단 제635-834번 뉴클레오티드는 프로모터 P_{eftu} 이며, 서열 12의 5' 말단 제835-1512번 뉴클레오티드는 교체될 프로모터 P_{tkl} 의 다운 스트림 상동 암이다.
- [0288] 상기 1512 bp의 PCR 생성물을 *Hind* III과 *Bam*HI 이중 효소 절단한 후, 마찬가지로 이중 효소 절단을 거친 상동 재조합 벡터 pK18mobsacB와 연결시킨다. 연결 생성물을 화학 전환법을 통하여 대장간균 DH5 α 로 변형시키고, 카나마이신(50 μ g/mL)이 함유된 LB 플레이트 상에서 형질전환체를 스크리닝하고, 형질전환체를 3 세대 서브 배양한 후, P13과 P14를 프라이머로 하여 콜로니 PCR를 이용하여 형질전환체를 검증하여 1724 bp의 양성 형질전환체를 취득하고, 검증을 거친 형질전환체에 대하여 플라스미드를 추출하고 또한 플라스미드에 대하여 *Hind* III과 *Bam*HI 이중 효소 절단을 진행하여 양성 1512 bp를 취득한다. 양성 플라스미드에 대하여 서열 측정을 진행하는 바, 결과적으로 해당 플라스미드는 서열표 중의 서열 12가 보여주는 뉴클레오티드를 벡터 pK18mobsacB 중에 삽입하여 취득한 재조합 플라스미드이며, pK18mobsacB- $P_{eftu}::P_{tkl}$ 라 명한다.
- [0289] 상기 이용되는 프라이머 서열은 하기와 같다.

- [0290] P60: CCCAAGCTTTCAGCAACCACTGGAT (*Hind* III)(서열 80)
- [0291] P61: AATTGGCAGCTATTAGCCTTCCTGGTTGTG(서열 81)
- [0292] P62: CAGGAAGGCTAATAGCTGCCAATTATTCG(서열 82)
- [0293] P63: TTGTCCTCCTTTGGGTAAAAATCCTTTCG(서열 83)
- [0294] P64: GATTTTTTACCCAAAGGAGGACAACCATGACTGCTCACTGGAA(서열 84)
- [0295] P65: CGCGGATCCCGCCATTGGGGCATCGCC(*Bam*H I)(서열 85)
- [0296] P66: CCCAAGCTTTCACGATCACTGCCAG(*Hind* III)(서열 86)
- [0297] P67: GGGTAACGCCAGTGTGTCTAGAAAATG(서열 87)
- [0298] P68: CTAAGACACACTGGCCGTTACCTGCGAA(서열 88)
- [0299] P69: TTGTCCTCCTTTGTATGCTCCTCGGACT(서열 89)
- [0300] P70: GGAGGACATACAAAAGGAGGACAACCTTGACCACCTTGACGCTG(서열 90)
- [0301] P71: CGCGGATCCAGCGATCTCAGTGTGT(*Bam*H I)(서열 91)
- [0302] P72: TGTGACCCGCTACCCGATAA(서열 92)
- [0303] P73: CGTTACCCTGCGAATGTC(서열 93)
- [0304] 서열 측정이 정확한 상동 재조합 플라스미드 pK18mobsacB- $P_{sod}::P_{prSA}$ 를 L-히스티딘 재조합균 CG161 중에 전기적으로 전환하고, 카나마이신 저항성 순방향 스크리닝을 통하여 재조합 플라스미드를 취득하여 염색체 상의 세균 집락에 통합하며, 자당 역방향 스크리닝을 통하여 2회 상동 재조합이 발생한 양성 세균 집락을 취득한다. 양성 세균 집락을 P72와 P65를 프라이머로 하여 PCR 증폭 검증을 진행하여 778 bp의 재조합균 WT- $P_{glyA}::P_{hisEG}-hisG^{fbr}-P_{glyA}::P_{hisDCB}-P_{sod}::P_{prSA}-\Delta pgi$ 를 취득하고, CG350으로 명한다.
- [0305] 서열 측정이 정확한 상동 재조합 플라스미드 pK18mobsacB- $P_{eftu}::P_{tkl}$ 를 *Corynebacterium glutamicum* CG350 중에 전기적으로 전환하고, 카나마이신 저항성 순방향 스크리닝을 통하여 재조합 플라스미드를 취득하여 염색체 상의 세균 집락에 통합하며, 자당 역방향 스크리닝을 통하여 2회 상동 재조합이 발생한 양성 세균 집락을 취득한다. 양성 세균 집락을 P73과 P71을 프라이머로 하여 PCR 증폭 검증을 진행하여 874 bp의 재조합균 WT- $P_{glyA}::P_{hisEG}-hisG^{fbr}-P_{glyA}::P_{hisDCB}-P_{eftu}::P_{tkl}-P_{sod}::P_{prSA}-\Delta pgi$ 를 취득하고, *Corynebacterium glutamicum* CG351로 명한다.
- [0306] 재조합균의 게놈 DNA에 대하여 추출 및 서열 측정을 진행하면, 결과적으로 성공적으로 L-히스티딘 재조합균 CG161 중의 *tkl-tal-zwf-opcA-devB* 오페론과 *prSA* 유전자의 프로모터를 각각 *Corynebacterium glutamicum* 내생성 강한 프로모터 P_{eftu} 와 P_{sod} 로 교체하였고, 플라스미드가 없는 L-히스티딘 재조합균 CG351(WT- $P_{glyA}::P_{hisEG}-hisG^{fbr}-P_{glyA}::P_{hisDCB}-P_{eftu}::P_{tkl}-P_{sod}::P_{prSA}-\Delta pgi$) 구성에 성공하였다.
- [0307] **실시예 6 : 플라스미드가 없는 L-히스티딘 높은 수율 재조합균 CG352와 G353의 구성**
- [0308] 본 실시예에 있어서, 상기 실시예 5의 기초 상에서, 강한 프로모터 P_{eftu} 로 *purH* 유전자의 프로모터를 교체시켜 *purH*가 인코딩한 이중 기능 효소 AICAR 트랜스메틸라제/IMP 환히드라제(PurH, 서열 16)의 발현을 향상시킴으로써, 나아가 CG352를 구성하며; 그 후 P_{hom} 프로모터로 *purF* 유전자 프로모터를 교체하여 뉴클레오티드 합성 경로 중의 제1 효소, 아미도포스포리보실 전이효소(PurF, 서열 19)를 약화시켜 CG353을 구성한다.
- [0309] 상기 실시예 5에서와 동일한 방법을 이용하여 상동 재조합 플라스미드 pK18mobsacB- $P_{eftu}::P_{purH}$ 를 구성하고, *purH* 유전자의 프로모터를 강한 프로모터 P_{eftu} 로 교체시킨다. Genbank 중의 *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032의 *purH* 유전자 업/다운 스트림 서열에 의하여 프라이머를 디자인한다. *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 게놈 DNA를 템플릿으로 하고, P74과 P75를 프라이머로 하여 증폭시켜 P_{eftu} 프로모터를 취득하고, P76과 P77을 프라이머로 하여 증폭시켜 업 스트림 상동 암을 취득하며, P78과 P79를 프라이머로 하여 증폭시켜 다운 스트림 상

동 압을 취득하고, 다시 정제된 상기 PCR 생성물을 템플릿으로 하고, P76과 P79를 프라이머로 하여, 중첩 확대 PCR 기술(SOE)을 이용하여 증폭을 진행하여 1473 bp의 업/다운 스트림 상동 압 및 프로모터 P_{eftu} 를 포함하는 세그먼트(서열 20)를 취득한다.

[0310] 그 중에서, 서열 20의 5' 말단 제1-633번 뉴클레오티드는 업 스트림 상동 압이고, 서열 20의 5' 말단 제634-833번 뉴클레오티드는 P_{eftu} 이며, 서열 20의 5' 말단 제834-1473번 뉴클레오티드는 다운 스트림 상동 압이다.

[0311] 상기 1473 bp의 PCR 생성물에 대해 *Xba* I과 *Sma* I 이중 효소 절단한 후, 마찬가지로 이중 효소 절단을 거친 상동 재조합 벡터 pK18mobsacB와 연결시킨다. 연결 생성물을 화학 전환법을 통하여 대장균 DH5 α 로 변형시키고, 카나마이신(50 μ g/mL)이 함유된 LB 플레이트 상에서 형질전환체를 스크리닝하고, 형질전환체를 3 세대 서브 배양한 후, P13과 P14를 프라이머로 하여 세균 집락 PCR를 이용하여 형질전환체를 검증하여 1685 bp의 양성 형질전환체를 취득하고, 검증을 거친 형질전환체에 대하여 플라스미드를 추출하고 또한 플라스미드에 대하여 *Xba* I과 *Sma* I 이중 효소 절단을 진행하여 양성 1473 bp를 취득한다.

[0312] 양성 플라스미드에 대하여 서열 측정을 진행하는 바, 결과적으로 해당 플라스미드는 서열표 중의 서열 20이 보여주는 뉴클레오티드를 벡터 pK18mobsacB 중에 삽입하여 취득한 재조합 플라스미드이며, pK18mobsacB- $P_{eftu}::P_{purH}$ 라 명한다.

[0313] P74: CTGGAGAGGCTAATGGCCGTTACCTGCGAA(서열 94)

[0314] P75: ATCATCGCTCATGTATGTCCTCTGGACT(서열 95)

[0315] P76: GCTCTAGAATGATGGTTCCGAGGCCG(*Xba* I)(서열 96)

[0316] P77: GGGTAACGGCCATTAGCCTCTCCAGTTGAG(서열 97)

[0317] P78: GGAGGACATACAATGAGCGATGATCGTAAG(서열 98)

[0318] P79: TCCCCGGGTGGTGCCGATCCAACCTG(*Sma* I)(서열 99)

[0319] 서열 측정이 정확한 상동 재조합 플라스미드 pK18mobsacB- $P_{eftu}::P_{purH}$ 를 L-히스티딘 재조합균 공정균 CG351 중에 전기적으로 전환하고, 카나마이신 저항성 순방향 스크리닝을 통하여 재조합 플라스미드를 통합하여 염색체 상의 세균 집락을 취득하며, 자당 역방향 스크리닝을 통하여 2회 상동 재조합이 발생한 양성 세균 집락을 취득한다. 양성 세균 집락에서 게놈 DNA를 추출하고, 추출한 게놈 DNA를 템플릿으로 하고, P74와 P79를 프라이머로 하여 PCR 증폭을 진행하여 840 bp의 양성 클론을 취득하며, 서열 측정 검증에 의하면, 이미 성공적으로 L-히스티딘 재조합균 CG351 중의 *purH* 유전자의 프로모터를 *Corynebacterium glutamicum* 내생성 강한 프로모터 P_{eftu} 로 교체시키고, 플라스미드가 없는 L-히스티딘 재조합균 CG352(WT- $P_{glyA}::P_{hisEG}$ -*hisG*^{fbr}- $P_{glyA}::P_{hisDCB}$ - $P_{eftu}::P_{tkl}$ - $P_{sod}::P_{prSA}$ - Δpgi - $P_{eftu}::P_{purH}$)의 구성에 성공하였다.

[0320] 실시예 4에서 제조한 서열 측정이 정확한 상동 재조합 플라스미드 pK18mobsacB- $P_{hom}::P_{purF}$ 를 *Corynebacterium glutamicum* CG352 중에 전기적으로 전환하고, 카나마이신 저항성 순방향 스크리닝을 통하여 재조합 플라스미드를 취득하여 염색체 상의 세균 집락에 통합하며, 자당 역방향 스크리닝을 통하여 제2회 상동 재조합이 발생한 세균 집락을 취득한다. P56과 P59를 프라이머로 하여, 세균 집락에 대하여 게놈 DNA 추출 및 PCR 증폭 검증을 진행하여 905 bp의 양성을 취득하며(도 8 참조), CG353(WT-WT- $P_{glyA}::P_{hisEG}$ -*hisG*^{fbr}- $P_{glyA}::P_{hisDCB}$ - $P_{eftu}::P_{tkl}$ - $P_{sod}::P_{prSA}$ - Δpgi - $P_{eftu}::P_{purH}$ - $P_{hom}::P_{purF}$)로 명한다.

[0321] CG353에 대하여 나아가 서열 측정 분석을 진행하는 바, 결과로는 공정균 CG352의 염색체 *purF* 유전자 프로모터는 P_{hom} 으로 교체되고, CG353의 구성에 성공하였다.

[0322] 실시예 7 : L-히스티딘 공정균의 L-히스티딘 생산 중의 응용

[0323] 1. 플라스미드를 포함하는 높은 수율의 L-히스티딘의 재조합균의 발효

[0324] 1) 플라스미드를 포함하는 높은 수율의 L-히스티딘의 공정균의 진탕 발효

[0325] 진탕 발효에 이용되는 발효 배지는 구체적으로 하기와 같은 바, 즉 글루코스 40 g/L, (NH₄)₂SO₄ 20 g/L, KH₂PO₄

0.5 g/L, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.5 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25 g/L, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g/L, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.01 g/L, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.001 g/L, $CuSO_4$ 0.0002 g/L, $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.00002 g/L, 비오틴 0.0002 g/L, pH 7.0-7.2, $CaCO_3$ 20 g/L. 글루코스는 단독 멸균을 진행하며, 115 °C 하에서 고압 멸균을 15 min 진행한다. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 및 무기염 이온은 단독 멸균을 진행하며, 121 °C 하에서 고압 멸균을 20 min 진행한다. 비오틴은 0.22 μm 무균 필터링 필터를 이용하여 필터링시켜 세균을 제거한다. 나머지 성분은 121 °C 하에서 고압 멸균을 20 min 진행한다.

[0326] 씨드 배지는 구체적으로 하기와 같은 바, 즉 글루코스 20 g/L, 황산암모늄 5 g/L, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 1 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.4 g/L, 비오틴 50 μg , 비타민 B₁ 1 mg, Angel Yeast 분말(FM802) 10 g/L, Angel peptone(FP318) 10 g/L.

[0327] (1) 종자액의 취득

[0328] 상기 실시예 2에서 제조된 공정균 CG176, CG172, CG173과 CG171을 각각 종자 배지에 접종시키는 바, 종자액 배양 조건은 배양 온도 32°C, 셰이커 회전 속도 220 r/min, 배양 시간 8 h, OD₆₀₀는 20이다.

[0329] (2) 발효

[0330] 종자액을 체적 백분 함량 3%로 최종 농도가 10 $\mu g/ml$ 인 클로람페니콜이 포함된 발효 배지(500 mL 칸막이 플라스크 용액 투여량은 30 mL)에 접종시키고, 32 °C, 220 r/min에서 72 h 배양시키며, 6 h 발효 배양시켰을 때 최종 농도가 1 mmol/L인 isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside(IPTG)를 첨가하여 목표 유전자의 유도 발현을 진행한다. 간헐적으로 질은 암모니아수를 보충 첨가하여 발효액의 pH를 7.0-7.2 사이로 제어하고, 잔당 상황에 의하여 농도가 400 g/L인 글루코스 모액을 보충 첨가하여 발효액의 잔당을 5-10 g/L로 제어한다.

[0331] 발효 생성물을 수집한 후 12000×g에서 5 min 동안 원심 분리시켜 상청액을 수집한다.

[0332] (3) L-히스티딘 함량의 측정

[0333] 고효율 액상법(2,4-DNFB 프리 컬럼 파생 고효율 액상법)을 이용하는데, 구체적인 방법은 하기와 같은 바, 즉 2 mL의 원심관에 50 μL 의 상기 상청액을 취하고, 200 μL $NaHCO_3$ 수용액(0.5 mol/L, pH 9.0)과 100 μL 1%의 2,4-DNFB-아세트나이트릴 용액(체적비)을 첨가하고, 60°C의 수욕 중에서 어두운 곳에서 일정한 온도로 60 min 가열시키며, 그 후 25°C까지 냉각시켜 650 μL KH_2PO_4 수용액(0.01 mol/L, pH 7.2 $\pm$ 0.05, NaOH 수용액으로 pH 조절)을 첨가하고, 15 min 방치하고 필터링시킨 후 주입할 수 있는 바, 주입량은 15 μL 이다.

[0334] 사용되는 크로마토그래픽 컬럼은 C18 컬럼(ZORBAX Eclipse XDB-C18, 4.6*150 mm, Agilent, USA); 컬럼 온도: 40°C; 자외선 탐지 파장: 360nm; 유동상 A는 0.04 mol/L KH_2PO_4 수용액(pH 7.2 $\pm$ 0.05, 40 g/L KOH 수용액으로 pH 조절)이고, 유동상 B는 55% 아세트나이트릴 수용액(체적비)이며, 유동상의 유속은 1 mL/min이고 용출 과정은 하기 표 1에 표시된 바와 같다.

표 1

시간(min)	유동상 A(%)	유동상 B(%)
0	86	14
2	88	12
4	86	14
10	70	30
20	30	70
21	10	90
24	0	100

[0335] 야생형 균주 *C. glutamicum* ATCC13032를 대조로 하여, 발효 과정인 글루코스 소모, OD₆₀₀ 및 최종의 L-히스티딘 수율을 측정한다. 결과는 하기 표 2에 표시된 바와 같다.

[0337] 표 2는 진탕 발효 실험 중의 L-히스티딘 공정균 CG160, CG176, CG172, CG173과 CG171의 글루코스 소모, 최대 OD₆₀₀, 비성장 속도 및 L-히스티딘 수율을 보여준다.

표 2

균주	글루코스 소모량(g)	최대 OD ₆₀₀	비성장 속도(h ⁻¹)	L-히스티딘 수율(g/L)
CG160	3.8	62.67	0.131	0.03
CG176	3.8	60.97	0.127	1.18
CG172	1.2	46.67	0.073	0.77
CG173	3.8	59.07	0.120	1.50
CG171	1.8	53.83	0.108	2.40

진탕 발효 실험에 있어서, 72 h 발효시키고, 야생형 균주 *C. glutamicum* ATCC13032에서는 L-히스티딘의 누적이 검출되지 않았으며, 기저균 CG160의 L-히스티딘 수율은 0.03 g/L이다. 단지 L-히스티딘 터미널 대사 경로 개조를 진행한 기저 공정균 CG176의 L-히스티딘 수율은 1.18 g/L이다. 이 기초 상에서, 단지 *pgi* 유전자가 결실된 공정균 CG172의 L-히스티딘 수율은 0.77 g/L이며; 단지 *zwf-opcA*가 과도 발현된 공정균 CG173의 L-히스티딘 수율은 1.50 g/L이다. *pgi* 유전자가 결실됨과 아울러 *zwf-opcA*가 과도 발현된 공정균 CG171의 L-히스티딘 수율은 2.40 g/L로서, 단지 *pgi* 유전자가 결실된 공정균 CG172에 비하여 수율이 2.1배 향상되고, 단지 *zwf-opcA*가 과도 발현된 균주 CG173에 비해서는 60% 향상되었으며, 단지 L-히스티딘 터미널 대사 경로 개조를 진행한 균주 CG176에 비해서는 102% 향상되었다.

2) L-히스티딘 공정균 CG171, CG319와 CG328 발효 탱크로 L-히스티딘 발효 생산

씨드 배지는 구체적으로 하기와 같은 바, 즉 글루코스 20 g/L, 황산암모늄 5 g/L, K₂HPO₄ · 3H₂O 1 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 0.9 g/L, 비오틴 50 μg, 비타민 B₁ 1 mg, Angel Yeast 분말(FM802) 2 g/L, Angel peptone(FP318) 2 g/L.

이용된 발효 배지는 구체적으로 하기와 같은 바, 즉 글루코스 20 g/L, 황산암모늄 5 g/L, KH₂PO₄ 0.5 g/L, K₂HPO₄ · 3H₂O 0.5 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 0.25 g/L, FeSO₄ · 7H₂O 10 mg/L, MnSO₄ · H₂O 10 mg/L, 비타민 B₁ 0.5 mg/L, Angel Yeast 분말(FM802) 5 g/L.

(1) 종자액의 취득

공정균 CG171, CG319와 CG328를 종자 배지에 접종시키는 바, 종자액 배양 조건은 배양 온도 32℃, 셰이커 회전 속도 220 r/min, 배양 시간 8 h, OD₆₀₀는 20이다.

(2) 발효

종자액을 체적 백분 함량 10%으로 최종 농도가 10 μg/ml인 클로람페니콜이 포함된 발효 배지에 접종시킨다.

이용되는 발효 탱크는 7.5 L 발효 탱크(BioFlo115, NBS)로서, 정속도 프로그램가능한 펌포가 내장되어 정속도로 내용물을 보충할 수 있다. 발효 과정에서 연동 펌프를 이용하여 600 g/L의 글루코스를 보충 첨가하여, 발효 시스템 중의 글루코스의 농도를 5~10 g/L로 제어하며, 아울러 10 g/L의 Angel Yeast 분말(FM802)을 드립시킨다. 가열 자켓 및 냉각수를 통하여 발효 온도를 제어하여 32 ℃로 유지하며; 공기를 통과시켜 용존 산소를 제공하고, 회전 속도와 용존 산소 신호를 연속 제어하여 용존 산소를 30%로 유지하며; 질은 암모니아수를 보충 첨가하여 pH를 조절하여 약 6.9로 유지한다. 발효는 연속 52 h 진행한다. OD₆₀₀=4~5일 때, IPTG(isopropyl thiogalactopyranoside, 최종 농도는 0.5 mmol/L)를 첨가하여 재조합 플라스미드가 휴대한 유전자의 발현을 유도한다.

발효 생성물을 수집한 후 12000×g에서 5 min 동안 원심 분리시켜 상청액을 수집한다.

(3) L-히스티딘 함량의 측정

상기 1) 중의 (3)의 방법에 따라 상청액 중의 L-히스티딘 함량을 측정하는 바, 결과는 하기 표와 같으며, 공정균 CG171의 L-히스티딘 최고 함량은 10.87 g/L이고, 생산 강도는 0.21 g/L/h이며; 공정균 CG319의 L-히스티딘 최고 함량은 14.15 g/L이고, 생산 강도는 0.30 g/L/h이며; 공정균 CG328의 L-히스티딘 최고 함량은 15.96 g/L이고, 생산 강도는 0.32 g/L/h이다. 결과는 표 3에 표시된 바와 같다.

표 3

균주	히스티딘 수율(g/L)	발효 시간(h)
CG171	10.87	52
CG319	14.15	47
CG328	15.96	50

상기 표에서 알 수 있는 바와 같이, 발효 탱크 실험에서 CG171 균주가 아주 훌륭한 효과를 거두었는 바, 히스티딘 수율은 52 시간 발효시 10.87g/L에 달했다. 나아가 *purH*를 과도 발현시킨 공정균 CG319 및 나아가 동시에 *purH*를 과도 발현시키고 *purF*를 약화시킨 공정균 CG328은 CG171에 비하여, 발효 시간이 더욱 짧은 상황 하에서, 히스티딘 수율이 각각 약 30% 및 50% 향상되었다. 다시 말하면, *pgi*를 약화시키고 *zwf-opcA*를 과도 발현시킨 기초 상에서, 히스티딘 합성 경로와 뉴클레오티드 합성 경로를 커플링시켜, 히스티딘 합성 경로의 대사 유동을 증가시키고 나아가 히스티딘의 수율이 크게 향상되도록 하였다.

2. 플라스미드가 없는 L-히스티딘 공정균 CG350, CG351, CG352 및 CG353 진탕 발효로 L-히스티딘 생산

공정균 CG350, CG351, CG352 및 CG353 종자액의 취득과 진탕 발효 방법은 상기 1에서와 같으나, 다른 점이래면 발효 과정 중에 클로람페니콜과 유도제 IPTG를 첨가할 필요가 없는 것이다. L-히스티딘 함량 측정은 본 실시예의 제1항에서와 같다. 야생형 *C. glutamicum* ATCC13032를 대조로 한다.

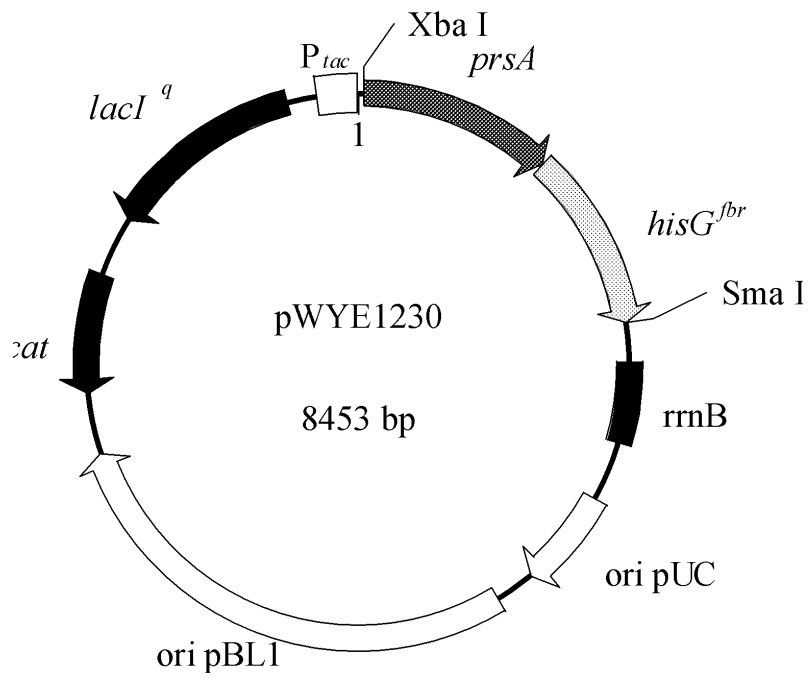
진탕 발효 실험에 있어서, 72 h 발효시키고, 야생형 균주 *C. glutamicum* ATCC13032에서 L-히스티딘의 누적이 검출되지 않았으며, 단지 *pgi* 유전자가 결실된 것으로 구성된 공정균 CG350의 L-히스티딘 수율은 0.65 g/L이고, 이 기초 사에서 동시에 *zwf-opcA*의 발현량을 향상시켜 구성한 공정균 CG351의 L-히스티딘 수율은 1.86 g/L이며, 단지 *pgi* 유전자가 결실된 공정균 CG350에 비하여 186% 향상되었다. 나아가 *purH* 유전자 발현을 향상시킨 균주 CG352의 L-히스티딘 수율은 2.23 g/L이고, 더욱 나아가 *purF* 유전자 발현을 낮춘 균주 CG353의 L-히스티딘 수율은 2.34 g/L이다. 결과는 표 4에 표시된 바와 같다.

표 4

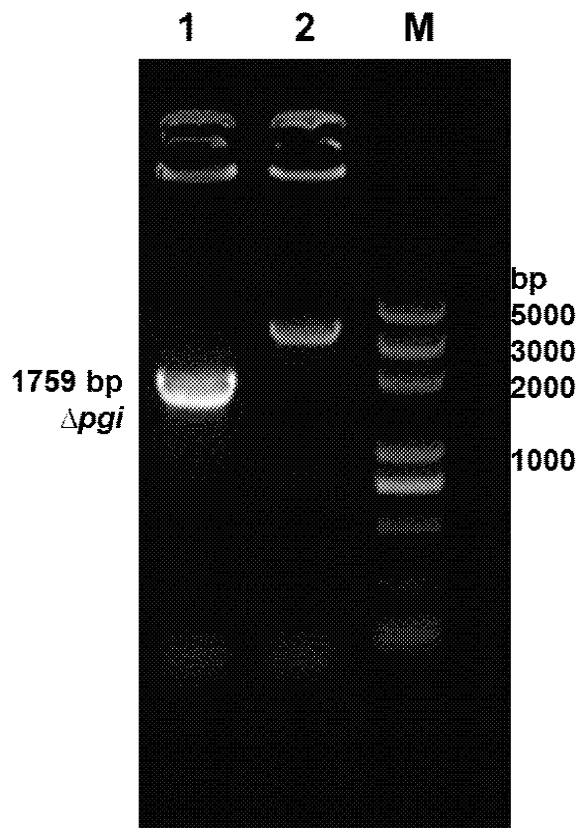
균주	히스티딘 수율(g/L)
야생형	---
CG350	0.65
CG351	1.86
CG352	2.23
CG353	2.34

도면

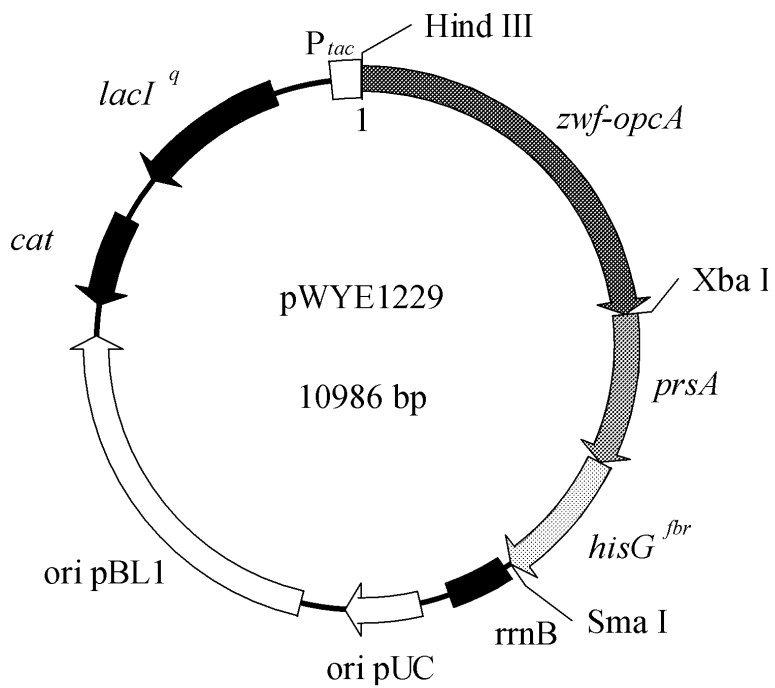
도면1



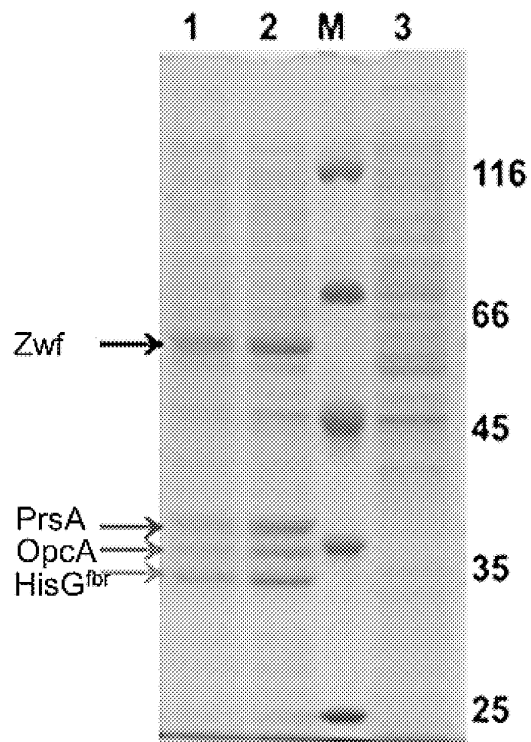
도면2



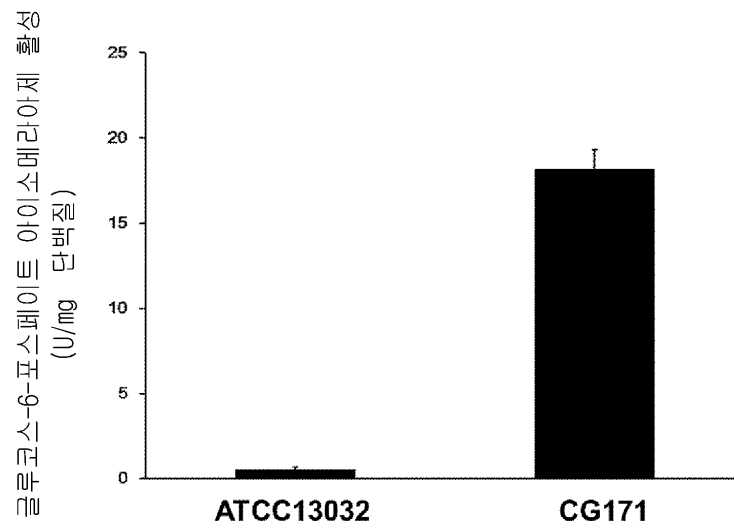
도면3



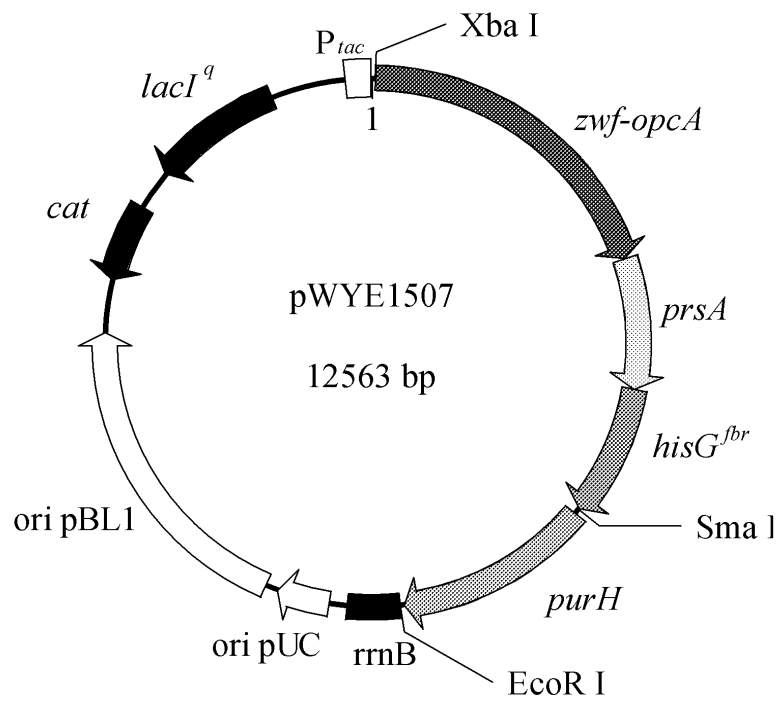
도면4



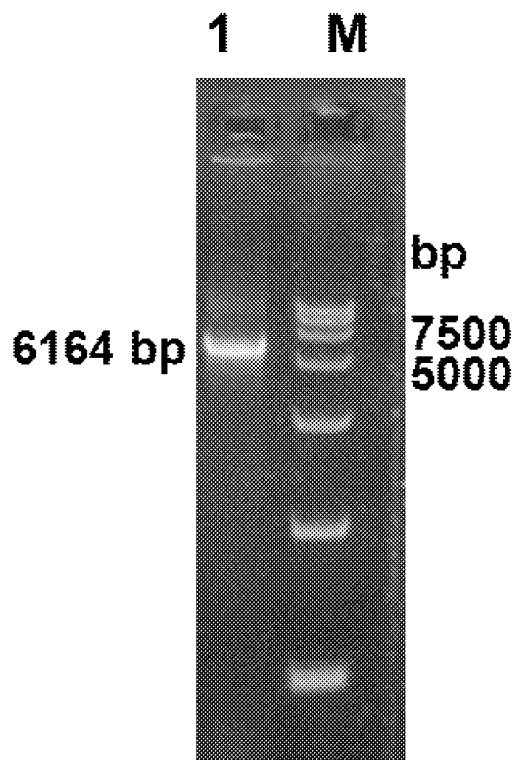
도면5



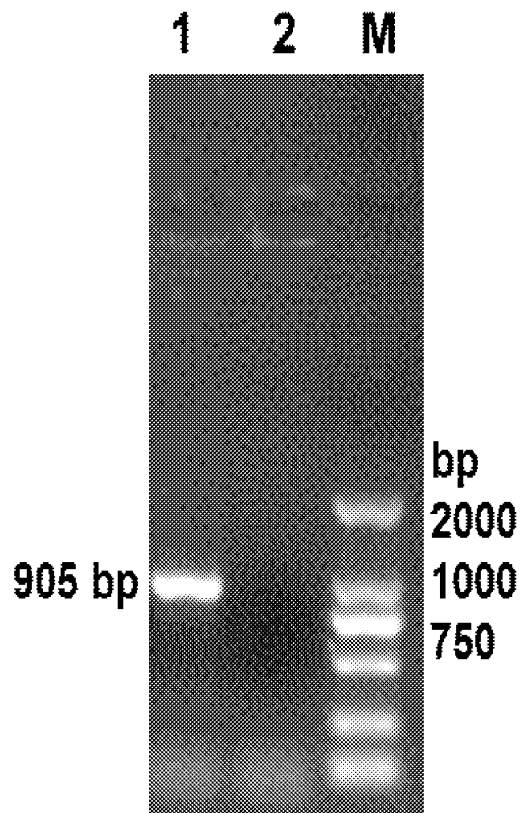
도면6



도면7



도면8



서열 목록

- <110> Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences
- <120> RECOMBINANT STRAIN PRODUCING L-AMINO ACIDS, CONSTRUCTING METHOD THEREFOR AND METHOD FOR PRODUCING L-AMINO ACIDS
- <130> IP-2015-0123CN
- <150> CN 201410050868.2
- <151> 2014-02-14
- <160> 99
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 1672
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Artificial Sequence
- <400> 1

gctctttcgg agtgaccttc tccccagacg gaaccgccga aatcggagcc tccgtcgatg 60

ctgtggacgg gcacatcatc aacgacgccg tcaccaaca cgccaagaaa aacgacctca 120

cctacggcga agctttcagc gacatccttc ggaacaatat ccaagtcaag gtagtcctca 180

acttgtacac cgccaaagac ctgcccaacg cccagtggtg ggccagcgga atcggctggt 240

tggatgcca gactggaaca ttctgggtcag agaaagccaa caaagaacaa gacatggatg 300

cggctgcca aatcagcacc gacaaacacg atcctccacc agcgttgctg gacgcaactca 360

ttggtcgtga tggcacctgc cgattccctg gctgttcagt cccagcgtc aaaaccaag 420

ccgaccaccg catccctac gaagaaggcg gagaaacttg cctaggcgga atcggctgcc 480

tctgtcaaca ccaccacaac atgaaaaccg acggccgagt cacctacctt ctcgatccct 540

tctccggcat catcgtctgg ctcatgggag acggaacatg ggtagtgta gaaccaacg 600

ggccgctcaa tccccaaat gcgagatggg cgcaaacagt cgccaacac cgggcacgcc 660

accacaagcg ttgggttaag gaggacgcca agtagccgga tggccacgtc gaaaagcagc 720

ccaataaacg cacctaaatt tgtcgtgttt cccactttga acactcttcg atgcgcttgg 780

ccacaaaagc aagctaacct gaagatgtta tttaacgaca ataaaggagt tttctcgctt 840

gcttataggg tcaggggctg gaagaatcct cgcctcatag cactggccgc tatcatcctg 900

acctcggtca atctgcgaac agctattact gctttagctc cgctgggttc tgagattcgg 960

gatgatattg gggtagtgcc ttctcttatt ggtgtgttgg gcatgatccc gactgctatg 1020

ttcgcggttg ctgcgtttgc gcttccgtcg ttgaagagga agttcactac ttcccaactg 1080

ttgatgtttg ccatgctgtt gactgctgcc ggtcagatta ttcgtgtcgc tggacctgct 1140

tcgctgttga tggtcggtac tgtgttcgag atgtttgcga tcggagtac caatgtgttg 1200

cttccgattg ctgttaggga gtattttccg cgtcacgtcg gtggaatgtc gacaacttat 1260

ctggtgtcgt tccagattgt tcaggcactt gctccgacgc ttgccgtgcc gatttctcag 1320

tgggctacac atgtggggtt gaccggttgg aggggtgtcg tcggttcgtg ggcgctgctg 1380

gggttggttg cggcgatttc gtggattccg ctgttgagtt tgcagggtgc cagggttgtt 1440

gcggcgccgt cgaagggttc tcttctgtg ttgaagtctt cgggttggtg ggggctcggg 1500

ttgatgtttg gggttacttc gtttgcgacg tataacctca tgggttttat gccgcagatg 1560

gtaggtagtc ctacgtcgg tgcggtgttg ttaggctggt ggtcaatttt gggattgccg 1620

ctgaacattc tgggaccgtg gttggtgacg cgtttacta actgcttccc ga 1672

<210> 2

<211> 2519

<212> DNA

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 2

atgagcacia acacgacccc ctccagctgg acaaaccac tgcgcgaccc gcaggataaa	60
cgactccccc gcatcgctgg cccttcgggc atggtgatct tcggtgtcac tggcgacttg	120
gctcgaaaga agctgctccc cgccatttat gatctagcaa accgcggatt gctgccccca	180
ggattctcgt tggtaggtta cggccggcgc gaatggtcca aagaagactt tgaanaatac	240
gtacgcgatg ccgcaagtgc tgggtgctcgt acggaattcc gtgaaatgt ttgggagcgc	300
ctcgccgagg gtatggaatt tgttcggcgc aactttgatg atgatgcagc tttcgacaac	360
ctcgctgcaa cactcaagcg catcgacaaa acccgcgga cgcgggcaa ctgggcttac	420
tacctgtcca ttccaccaga ttcttcaca gcggtctgcc accagctgga gcgttcgggc	480
atggctgaat ccaccgaaga agcatggcgc cgcgtgatca tcgagaagcc tttcgccac	540
aacctgaat ccgcacacga gctcaaccag ctggtcaacg cagtcttccc agaattctct	600
gtgttcgca tcgaccacta tttgggcaag gaaacagttc aaaacatcct ggctctgct	660
tttgctaacc agctgtttga gccactgtgg aactccaact acgttgacca cgtccagatc	720
accatggctg aagatattgg cttgggtgga cgtgctggtt actacgacgg catcggcga	780
gcccgcgacg tcatccagaa ccacctgatc cagctcttgg ctctggttgc catggaagaa	840
ccaatttctt tcgtgccagc gcagctgcag gcagaaaaga tcaaggtgct ctctgcgaca	900
aagccgtgct acccattgga taaaacctcc gctcgtggtc agtacgctgc cggttggcag	960
ggctctgagt tagtcaaggg acttcgcgaa gaagatggct tcaacctga gtccaccact	1020
gagacttttg cggtttgtac cttagagatc acgtctcgtc gctgggctgg tgtgccgttc	1080
tacctgcgca ccggttaagcg tcttggtcgc cgtgttactg agattgccgt ggtgtttaaa	1140
gacgcaccac accagccttt cgacggcgac atgactgtat cccttgcca aaacgccatc	1200
gtgattcgcg tgcagcctga tgaagggtgt ctcacccgt tcggttccaa ggttccaggt	1260
tctgccatgg aagtcctga cgtcaacatg gacttctcct actcagaatc cttactgaa	1320
gaatcacctg aagcatacga gcgcctcatt ttggatgcgc tgttagatga atccagcctc	1380
ttccctacca acgaggaagt ggaactgagc tggaagattc tggatccaat tcttgaagca	1440
tgggatgccg atggagaacc agaggattac ccagcgggta cgtggggtcc aaagagcgt	1500
gatgaaatgc tttccgcaa cggtcacacc tggcgcaggc cataatttag gggcaaaaaa	1560

tgatctttga acttccggat accaccaccc agcaaatttc caagacccta actcgactgc 1620

gtgaatcggg caccacggtc accaccggcc gagtgtcac cctcatcgtg gtcactgact 1680
ccgaaagcga tgtcgtgca gttaccgagt ccaccaatga agcctcgcgc gagcacccat 1740
ctcgcgtgat ctttttggtg gttggcgata aaactgcaga aaacaaagt t gacgcagaag 1800
tccgtatcgg tggcgacgct ggtgcttccg agatgatcat catgatctc aacggacctg 1860
tcgctgacaa gctccagtat gtcgtcacac cactgttgct tcctgacacc cccatcgttg 1920
cttgggtggc aggtgaatca ccaaagaatc cttcccagga cccaattgga cgcacgcac 1980
aacgacgcat cactgatgct ttgtacgacc gtgatgacgc actagaagat cgtgttgaga 2040

actatcacc aggtgatacc gacatgacgt gggcgcgcct taccagtggt cggggacttg 2100
ttgcctctc attggatcac ccaccacaca gcgaaatcac ttccgtgagg ctgaccggtg 2160
caagcggcag tacctcgtg gatttggctg caggctggtt ggcgcggagg ctgaaagtgc 2220
ctgtgatccg cgaggtgaca gatgctcca ccgtgccaac cgatgagttt ggtactccac 2280
tgctggctat ccagcgcctg gagatcgttc gcaccaccgg ctcgatcatc atcaccatct 2340
atgacgctca tacccttcag gtagagatgc cggaatccgg caatgcccc tgcctgggtg 2400
ctattggtcg tcgaagttag tccgactgct tgtctgagga gcttcgccac atggatccag 2460

atttgggcta ccagcacgca ctatccggct tgtccagcgt caagctggaa accgtctaa 2519

<210> 3

<211> 833

<212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 3

Met Ser Thr Asn Thr Thr Pro Ser Ser Trp Thr Asn Pro Leu Arg Asp

1 5 10 15

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

20 25 30

Ile Phe Gly Val Thr Gly Asp Leu Ala Arg Lys Lys Leu Leu Pro Ala

35 40 45

Ile Tyr Asp Leu Ala Asn Arg Gly Leu Leu Pro Pro Gly Phe Ser Leu

50 55 60

Val Gly Tyr Gly Arg Arg Glu Trp Ser Lys Glu Asp Phe Glu Lys Tyr

65 70 75 80

Val Arg Asp Ala Ala Ser Ala Gly Ala Arg Thr Glu Phe Arg Glu Asn
85 90 95

Val Trp Glu Arg Leu Ala Glu Gly Met Glu Phe Val Arg Gly Asn Phe
100 105 110

Asp Asp Asp Ala Ala Phe Asp Asn Leu Ala Ala Thr Leu Lys Arg Ile
115 120 125

Asp Lys Thr Arg Gly Thr Ala Gly Asn Trp Ala Tyr Tyr Leu Ser Ile
130 135 140

Pro Pro Asp Ser Phe Thr Ala Val Cys His Gln Leu Glu Arg Ser Gly
145 150 155 160

Met Ala Glu Ser Thr Glu Glu Ala Trp Arg Arg Val Ile Ile Glu Lys
165 170 175

Pro Phe Gly His Asn Leu Glu Ser Ala His Glu Leu Asn Gln Leu Val
180 185 190

Asn Ala Val Phe Pro Glu Ser Ser Val Phe Arg Ile Asp His Tyr Leu
195 200 205

Gly Lys Glu Thr Val Gln Asn Ile Leu Ala Leu Arg Phe Ala Asn Gln
210 215 220

Leu Phe Glu Pro Leu Trp Asn Ser Asn Tyr Val Asp His Val Gln Ile
225 230 235 240

Thr Met Ala Glu Asp Ile Gly Leu Gly Gly Arg Ala Gly Tyr Tyr Asp
245 250 255

Gly Ile Gly Ala Ala Arg Asp Val Ile Gln Asn His Leu Ile Gln Leu
260 265 270

Leu Ala Leu Val Ala Met Glu Glu Pro Ile Ser Phe Val Pro Ala Gln
275 280 285

Leu Gln Ala Glu Lys Ile Lys Val Leu Ser Ala Thr Lys Pro Cys Tyr
290 295 300

Pro Leu Asp Lys Thr Ser Ala Arg Gly Gln Tyr Ala Ala Gly Trp Gln
305 310 315 320

Gly Ser Glu Leu Val Lys Gly Leu Arg Glu Glu Asp Gly Phe Asn Pro

325	330	335	
Glu Ser Thr Thr Glu Thr Phe Ala Ala Cys Thr Leu Glu Ile Thr Ser			
340	345	350	
Arg Arg Trp Ala Gly Val Pro Phe Tyr Leu Arg Thr Gly Lys Arg Leu			
355	360	365	
Gly Arg Arg Val Thr Glu Ile Ala Val Val Phe Lys Asp Ala Pro His			
370	375	380	
Gln Pro Phe Asp Gly Asp Met Thr Val Ser Leu Gly Gln Asn Ala Ile			
385	390	395	400
Val Ile Arg Val Gln Pro Asp Glu Gly Val Leu Ile Arg Phe Gly Ser			
405	410	415	
Lys Val Pro Gly Ser Ala Met Glu Val Arg Asp Val Asn Met Asp Phe			
420	425	430	
Ser Tyr Ser Glu Ser Phe Thr Glu Glu Ser Pro Glu Ala Tyr Glu Arg			
435	440	445	
Leu Ile Leu Asp Ala Leu Leu Asp Glu Ser Ser Leu Phe Pro Thr Asn			
450	455	460	
Glu Glu Val Glu Leu Ser Trp Lys Ile Leu Asp Pro Ile Leu Glu Ala			
465	470	475	480
Trp Asp Ala Asp Gly Glu Pro Glu Asp Tyr Pro Ala Gly Thr Trp Gly			
485	490	495	
Pro Lys Ser Ala Asp Glu Met Leu Ser Arg Asn Gly His Thr Trp Arg			
500	505	510	
Arg Pro Met Ile Phe Glu Leu Pro Asp Thr Thr Thr Gln Gln Ile Ser			
515	520	525	
Lys Thr Leu Thr Arg Leu Arg Glu Ser Gly Thr Gln Val Thr Thr Gly			
530	535	540	
Arg Val Leu Thr Leu Ile Val Val Thr Asp Ser Glu Ser Asp Val Ala			
545	550	555	560
Ala Val Thr Glu Ser Thr Asn Glu Ala Ser Arg Glu His Pro Ser Arg			
565	570	575	

Val Ile Ile Leu Val Val Gly Asp Lys Thr Ala Glu Asn Lys Val Asp
580 585 590

Ala Glu Val Arg Ile Gly Gly Asp Ala Gly Ala Ser Glu Met Ile Ile
595 600 605

Met His Leu Asn Gly Pro Val Ala Asp Lys Leu Gln Tyr Val Val Thr
610 615 620

Pro Leu Leu Leu Pro Asp Thr Pro Ile Val Ala Trp Trp Pro Gly Glu
625 630 635 640

Ser Pro Lys Asn Pro Ser Gln Asp Pro Ile Gly Arg Ile Ala Gln Arg
645 650 655

Arg Ile Thr Asp Ala Leu Tyr Asp Arg Asp Asp Ala Leu Glu Asp Arg
660 665 670

Val Glu Asn Tyr His Pro Gly Asp Thr Asp Met Thr Trp Ala Arg Leu
675 680 685

Thr Gln Trp Arg Gly Leu Val Ala Ser Ser Leu Asp His Pro Pro His
690 695 700

Ser Glu Ile Thr Ser Val Arg Leu Thr Gly Ala Ser Gly Ser Thr Ser
705 710 715 720

Val Asp Leu Ala Ala Gly Trp Leu Ala Arg Arg Leu Lys Val Pro Val
725 730 735

Ile Arg Glu Val Thr Asp Ala Pro Thr Val Pro Thr Asp Glu Phe Gly
740 745 750

Thr Pro Leu Leu Ala Ile Gln Arg Leu Glu Ile Val Arg Thr Thr Gly
755 760 765

Ser Ile Ile Ile Thr Ile Tyr Asp Ala His Thr Leu Gln Val Glu Met
770 775 780

Pro Glu Ser Gly Asn Ala Pro Ser Leu Val Ala Ile Gly Arg Arg Ser
785 790 795 800

Glu Ser Asp Cys Leu Ser Glu Glu Leu Arg His Met Asp Pro Asp Leu
805 810 815

Gly Tyr Gln His Ala Leu Ser Gly Leu Ser Ser Val Lys Leu Glu Thr
820 825 830

Val

<

210> 4

<211> 1852

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 4

aaaggaggat cctcatgact gctcactgga aaaaaacca aaagaacctc atgctgtttt 60
cggttcgtgc gcaccagaa ctggcagaag ctgtagctaa agagctcgac gtcaacgtca 120
cccaatgac ggcacgcgat ttcccaacg gtgaaatcta cgtccgcttc gaggaatcag 180
ttcgtggctc cgactgcttc gtcctgcagt ccacaccca gcctctcaac aagtggctca 240
tggaacagct gctgatgac gacgtttga agcgtggctc cgcaaagcgc atcaccgcga 300

tcctgccgtt ctacccatat gcccgccagg acaagaagca ccgcgccgc gagccaattt 360
ctgctgcct catcgccgac ctcatgctca ccgtggcgc ggaccgtatc gtgtccgtgg 420
acttgacac cgatcagatc cagggttct tcgacggccc agtcgatcac atgcacgcca 480
tgccgatcct caccgatcac atcaaggaaa actacaacct ggacaacatc tgcgtggtct 540
cccctgacgc aggtcgctg aaggttcgag agaagtgggc taacaccttg ggcgatgccc 600
caatggcgtt cgtgcacaag acccgctcca ccgaggtagc aaaccaggtt gtcgccaacc 660
gcgtcgtcgg tgacgtcgac ggcaaggact gcgtgcttct cgacgacatg atcgacactg 720

gcggcaccat cgccggcgtt gtggcgctcc tgaagaaggc tggcgcaaag tcagtcgtca 780
tcgctgcac ccacggtgtg ttctctgacc cagcccgca gcgcctgtct gcatgcggtg 840
ctgaagaagt catcaccacc gacacctgc cacagtccac cgagggttgg agcaacctga 900
ccgtttgtc gatcgaccg ctgctggctc gcaccatcaa cgagatcttc gaaaacggtt 960
ccgtcaccac cctcttcgag ggcgaggcct aaaaaggagg acaatcatgt tgaatcgc 1020
tgtccaaac aaaggctcgc tgtccgagcg cgccatggaa atcctcgccg aagcaggcta 1080
cgcaggccgt ggagattcca aatccctcaa cgtttttgat gaagcaaaca acgttgaatt 1140

cttttctt cgccctaaag atatcgccat ctacgttgct ggtggccagc tcgatttggg 1200
tatcaccggc cgcgaccttg ctccgattc ccaggctgat gtccacgaag ttttttccct 1260
cggttcggt tcttccatt tccgttacgc agcaccagct gatgaagagt ggagcatcga 1320
aaagctcgac ggcaagcgca tcgtacctc ttacccaac cttgttcgag atgacctcgc 1380

agcacgtggg ctttcgctg aggtgctcgc cctcgacggt gcagtagagg tatccatcaa 1440
gcttgggtgc gcagatgccca tcgccgatgt tgtatccacc ggccgcacgc tgcgtcagca 1500
aggctttgca ctttcggcgc aggtttctgtg cacctctgag gctgtcattg ttggccgcaa 1560

ggatgaaaag gtcacccagc agcagcagat cctgcttcgc cgcattccagg gaattttgca 1620
cgcgcagaac ttctcatgc tggattacaa ggtcgaccgc gacaacctgg acgtgccac 1680
tgcagtaacc ccaggcttct ccggcccagc ggtatcccca ctggcacgcg acaactgggt 1740
tgctgtacgc gccatggtgc cacgcaggtc agctaagcc atcatggata agcttgctgg 1800
actcggcgct gaagccatcc tggcttctga aatccgcac gcccgcatct ag 1852

<210> 5

<211> 325

<212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 5

Met Thr Ala His Trp Lys Gln Asn Gln Lys Asn Leu Met Leu Phe Ser

1	5	10	15
Gly Arg Ala His Pro Glu Leu Ala Glu Ala Val Ala Lys Glu Leu Asp			
	20	25	30
Val Asn Val Thr Pro Met Thr Ala Arg Asp Phe Ala Asn Gly Glu Ile			
	35	40	45
Tyr Val Arg Phe Glu Glu Ser Val Arg Gly Ser Asp Cys Phe Val Leu			
	50	55	60
Gln Ser His Thr Gln Pro Leu Asn Lys Trp Leu Met Glu Gln Leu Leu			
65	70	75	80

Met Ile Asp Ala Leu Lys Arg Gly Ser Ala Lys Arg Ile Thr Ala Ile			
	85	90	95
Leu Pro Phe Tyr Pro Tyr Ala Arg Gln Asp Lys Lys His Arg Gly Arg			
	100	105	110
Glu Pro Ile Ser Ala Arg Leu Ile Ala Asp Leu Met Leu Thr Ala Gly			
	115	120	125
Ala Asp Arg Ile Val Ser Val Asp Leu His Thr Asp Gln Ile Gln Gly			
130	135	140	

Phe Phe Asp Gly Pro Val Asp His Met His Ala Met Pro Ile Leu Thr

145 150 155 160

Asp His Ile Lys Glu Asn Tyr Asn Leu Asp Asn Ile Cys Val Val Ser

165 170 175

Pro Asp Ala Gly Arg Val Lys Val Ala Glu Lys Trp Ala Asn Thr Leu

180 185 190

Gly Asp Ala Pro Met Ala Phe Val His Lys Thr Arg Ser Thr Glu Val

195 200 205

Ala Asn Gln Val Val Ala Asn Arg Val Val Gly Asp Val Asp Gly Lys

210 215 220

Asp Cys Val Leu Leu Asp Asp Met Ile Asp Thr Gly Gly Thr Ile Ala

225 230 235 240

Gly Ala Val Gly Val Leu Lys Lys Ala Gly Ala Lys Ser Val Val Ile

245 250 255

Ala Cys Thr His Gly Val Phe Ser Asp Pro Ala Arg Glu Arg Leu Ser

260 265 270

Ala Cys Gly Ala Glu Glu Val Ile Thr Thr Asp Thr Leu Pro Gln Ser

275 280 285

Thr Glu Gly Trp Ser Asn Leu Thr Val Leu Ser Ile Ala Pro Leu Leu

290 295 300

Ala Arg Thr Ile Asn Glu Ile Phe Glu Asn Gly Ser Val Thr Thr Leu

305 310 315 320

Phe Glu Gly Glu Ala

325

<210> 6

<211> 281

<212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 6

Met Leu Lys Ile Ala Val Pro Asn Lys Gly Ser Leu Ser Glu Arg Ala

1 5 10 15

Met Glu Ile Leu Ala Glu Ala Gly Tyr Ala Gly Arg Gly Asp Ser Lys

20 25 30
Ser Leu Asn Val Phe Asp Glu Ala Asn Asn Val Glu Phe Phe Phe Leu
35 40 45
Arg Pro Lys Asp Ile Ala Ile Tyr Val Ala Gly Gly Gln Leu Asp Leu
50 55 60
Gly Ile Thr Gly Arg Asp Leu Ala Arg Asp Ser Gln Ala Asp Val His
65 70 75 80
Glu Val Leu Ser Leu Gly Phe Gly Ser Ser Thr Phe Arg Tyr Ala Ala
85 90 95

Pro Ala Asp Glu Glu Trp Ser Ile Glu Lys Leu Asp Gly Lys Arg Ile
100 105 110
Ala Thr Ser Tyr Pro Asn Leu Val Arg Asp Asp Leu Ala Ala Arg Gly
115 120 125
Leu Ser Ala Glu Val Leu Arg Leu Asp Gly Ala Val Glu Val Ser Ile
130 135 140
Lys Leu Gly Val Ala Asp Ala Ile Ala Asp Val Val Ser Thr Gly Arg
145 150 155 160
Thr Leu Arg Gln Gln Gly Leu Ala Pro Phe Gly Glu Val Leu Cys Thr

165 170 175
Ser Glu Ala Val Ile Val Gly Arg Lys Asp Glu Lys Val Thr Pro Glu
180 185 190
Gln Gln Ile Leu Leu Arg Arg Ile Gln Gly Ile Leu His Ala Gln Asn
195 200 205
Phe Leu Met Leu Asp Tyr Asn Val Asp Arg Asp Asn Leu Asp Ala Ala
210 215 220
Thr Ala Val Thr Pro Gly Leu Ser Gly Pro Thr Val Ser Pro Leu Ala
225 230 235 240

Arg Asp Asn Trp Val Ala Val Arg Ala Met Val Pro Arg Arg Ser Ala
245 250 255
Asn Ala Ile Met Asp Lys Leu Ala Gly Leu Gly Ala Glu Ala Ile Leu

260	265	270
Ala Ser Glu Ile Arg Ile Ala Arg Ile		
275	280	
<210> 7		
<211> 1920		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> Artificial Sequence		
<400> 7		
gtatcggcgt ggagttgtcc gaggaactcc agctgcaccc agagcagtc acagacgcgt	60	
tttgtctcta ccaccagag gcaaagtact ttaacgtcta acacctttga gagggaaaac	120	
tttccgcac attgcagatc gtgccacttt aactaagggt gacggcatga ttaaggcgat	180	
tttctgggac atggacggca cgatggtgga ctctgagcca cagtggggca ttgctaccta	240	
cgagctcagc gaagccatgg gccgccgct caccgccgag ctccgggaac tcaccgtcgg	300	
ctcgagcctg ccgcgcacca tgcgcttatg cgcagagcac gcaggcatta cattgagcga	360	
cgcggaactac gagcgctacc gggctggcat gttcgcccgg gtccatgagc ttttcgacga	420	
atccctcgtc ccaaatccag gcgtcaccga actcctgaca gaggtaagg ccctcgagat	480	
ccccatgttg gtcaccacca acacagagcg cgatctcgcg acccgttcag tcgcagccgt	540	
gggaaatgag ttcttcatcg gttctatcgc tggatgatgaa gtcccaacag caaagccagc	600	
ccccgacatg tacctcgaag cagcacgacg tgtgggcttt gacctatcag agtgcctcgt	660	
gttcgaagat tcctacaacg gcatgctggg cgctgttact gcaggttgcc gcgtcattgg	720	
tctgcaccca gaagaagtcc aagcgccaga aggtgtagtg ctttgcgtt ccctccacgg	780	
taaaaactct ttcgaagggtg tcaccgtga gatggtcact gcctgggtacc accagatcga	840	
gccggcaggt gtcgcaaat aaagctactc cactagtgtg atcgggggta ttttttact	900	
tcaatgggtg gctaaaagac gtgggcacgt gaggtaactc atgcgcgcga aacgatggga	960	
gtgaacccat acttttatat atgggtatcg gcggtctatg cttgtgggcg tacctgtccc	1020	
gcgagtgagg tcttacgcaa aggaggaacc gaatgaagac atttgactcg ctgtacgaag	1080	
aacttcttaa ccgtgctcag acccgccctg aagggtctgg aaccgtggcc gccttgata	1140	
aaggcatcca tcacttaggt aagaaggtca tcgaagaagc cggagaggtc tggattgcag	1200	
ccgagtatga gaccgatgaa gagtagccg gagaatctc ccagctcatt tattggaccc	1260	
aggtcatcat ggttgctcgc ggctgaagc cagaagatat ctacaagaac ctgtaggagt	1320	

tttaaagcaa tcatgttgaa aatcgctgtc ccaaacaag gtcgctgtc cgagcgcgcc	1380
atggaaatcc tcgccgaagc aggtacgca ggccgtggag attccaaatc cctcaacgtt	1440
tttgatgaag caaacaacgt tgaattcttc ttcttcgcc cttaaagatat cgccatctac	1500
gttgctggtg gccagctcga tttgggtatc accggccgcg accttgctcg cgattcccag	1560
gctgatgtcc acgaagtctt ttccctcggc ttcggttctt ccactttccg ttacgcagca	1620
ccagctgatg aagagtggag catcgaaaag ctgcacggca agcgcacgcg tacctcttac	1680
cccaaccttg ttgcgatga cctgcagca cgtgggcttt ccgctgaggt gtcgccctc	1740
gacggtgcag tagaggtatc catcaagctt ggtgtcgcag atgccatcgc cgatgttgta	1800
tccaccggcc gcacgtcgcg tcagcaaggt cttgcacctt tcggcgaggt tctgtgcacc	1860
tctgaggtcg tcattgttgg cgcgaaggat gaaaaggta cccagagca gcagatcctg	1920
	1920
<210> 8	
<211> 1694	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Artificial Sequence	
<400> 8	
cgaggaaacc gttgaggagt tcgtccatgt cgacttcttc aggttcgaag tagtcacgt	60
ctgtttccca ttcatattct gattcatcgt ctaggtatgc gtcttctgca tcctcgtctg	120
ccatgtctga ttcttccac tctgcgtctt ctagggattc gatgagctct tcaactggag	180
tgggaacgta cagcccccg attttctcta cgagatctgc ttggtcttgt tcgtcgtga	240
gttcatcggc attgttcgtg tcgtcagggc ttccggtgtc gctgaagtta agttctgaaa	300
aacgtccag aatataggtc acagccatgg cgggtggtgtc caaggacagg ttgatgaatt	360
ggcgtagctg ttgggtgctt aacccttcac cgatgcagat ggtcgtgcgg aatttcaatt	420
ccacttcgcc gtcgttgcgc agatggacga gggtgttgg ccgatgcgt tcggcattcc	480
attcggtgac agtcgcgcc gcacgttga tggcaaacat gtccaaatta aggcgcgtgc	540
gaccaaggat ggtgagcatt tgcctgatt cgtggctgaa gtacatcgaa atgcggtgat	600
cttgccacgg cacgatgatg cgatcttctg agtcaaata gtggtagccc aaggaatcaa	660
cagcctccgt cactcgattc aggtcaactg ggaaaggaa ggaggtgttg ggtgcaggga	720
cgtttcgatc attcacagag gtgaaatcca tagctactcc actagtgtga tcggggttat	780
tttttcaatt caatgggtgg ctaaaagacg tgggcacgtg agtaaaactca tgcgcgcgaa	840

acgatgggag tgaaccata cttttatata tgggtatcgg cggctctatgc ttgtgggcgt 900

acctgtcccc cgagttaggt cttacgcaaa ggaggatcgc catgttgaat gtcactgacc 960

tgcgagggtca aacacccatcc aagagcgaca tccgacgtgc ttgcccacgt ggtggcactg 1020

acgtgtggtc tgtgcttccc atagtgcagc ctgttgtaga agatgtccaa aaccgcggcg 1080

ctgaagctgc ttggtattac ggcgagaagt tcgaccatat tcgccccgcc tcggtgcggg 1140

tgccagctga ggttattgct gcagcagaaa acaccttaga tccgttgggtg cgtgaatcga 1200

ttgaagagtc gattcgtcgc gtccgcaagg ttcacgctga gcaaaagcca tccgagcaca 1260

ccactgaact ttcaccaggt ggcaccgtca ctgagcggtt catgccgatt gatcgcggtg 1320

gactgtacgt tccaggcggc aatgcggtgt acccatcaag cgtgattatg aatactgtcc 1380

cagctcaaga ggctgggtgtg aatcccttg tggttgcgtc gcctcctcag gctgagcacg 1440

gtggctggcc tcacccacc attttggcgg cgtgttccat cttgggtgtt gatgaggtgt 1500

gggctgtcgg cggcggtcag gccgtggcgt tgctggctta tggatgatgac gctgcaggtc 1560

tcgagcctgt ggatgatgac actggacctg gcaatatctt tgtcaccgt gcgaagcgcc 1620

tggtcagggg agtggtaggt actgattctg aggctggccc tacagaaatc gctgtgcttg 1680

ctgatgcctc tgcc 1694

<210> 9

<211> 1689

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 9

atctacgttg ctgggtggcca gctcgatttg ggtatcacgc gccgcgacct tgctcgcgat 60

tcccaggctg atgtccacga agttctttcc ctccggttcg gttcctccac tttccgttac 120

gcagcaccag ctgatgaaga gtggagcatc gaaaagctcg acggcaagcg catcgctacc 180

tcttacccca accttgttcg cgatgacctc gcagcacgtg ggctttccgc tgagggtgctc 240

cgctcgcagc gtgcagtaga ggtatccatc aagcttgggtg tcgcagatgc catcgccgat 300

gttgtatcca ccggccgcac gctgcgtcag caaggctctg cacctttcgg cgagggttctg 360

tgcacctctg aggtgtcat tgttggccgc aaggatgaaa aggtcacccc agagcagcag 420

ctgttgcccc tctcactggt gaaaagaaaa accaccctgg cgccggggat cagccccgga 480

tgttttgat acggtctatg agctggcagc gtatttgacc gatccggaca cctgggataa 540

tgtgtggatt ttgtcggatc agcttagta ggacaaatcc gccgagcttc gacgagattt 600

tcaggagcta aggaagctaa aatggagaaa aaaatcactg gatataccac cgttgatata	660
tccaatggc atcgtaaaga acattttgag gcatttcagt cagttgctca atgtacctat	720
aaccagaccg ttcagctgga tattacggcc tttttaaaga ccgtaaagaa aaataagcac	780
aagttttatc cggcctttat tcacattctt gccgcctga tgaatgctca tccggagttc	840
cgtatggcaa tgaaagacgg tgagctgggtg atatgggata gtgttcaccc ttgttacacc	900
gttttccatg agcaaactga aacgttttca tcgctctgga gtgaatacca cgacgatttc	960
cggcagtttc tacacatata ttcgcaagat gtggcgtgtt acggtgaaaa cctggcctat	1020
ttccctaaag gggtttattga gaatatgttt ttcgtctcag ccaatccctg ggtgagtttc	1080
accagttttg atttaaacgt ggccaatatg gacaacttct tcgccccctg tttcaccatg	1140
ggcaaatatt atacgcaagg cgacaagggtg ctgatgccgc tggcgattca ggttcacat	1200
gccgtctgtg atggcttcca tgtcggcaga atgcttaatg aattacaaca gtactgcgat	1260
gagtggcagg gcggggcgta attttaacta cccccgaaaa tgtagtgggt agttccacac	1320
tgcctcttac aagtagtag gataatccac agcaccattg tgatttcctt caacttgtga	1380
gaggcagtac atgtctaaga cgagcaacaa gtcttcagca gactcaaaga atgacgcaaa	1440
agccgaagac attgtgaacg gcgagaacca aatcgccacg aatgagtcgc agtcttcaga	1500
cagcgctgca gtttcggaac gtgtcgtcga accaaaaacc acggttcaga aaaagtccg	1560
aatcgaatcg gatctgcttg gtgaacttca gatcccatcc cacgcatatt acggggtgca	1620
caccttcgt gcggtggaca acttccaaat ctacgaacc accatcaacc acgtcccaga	1680
tttcattcg	1689
<210> 10	
<211> 1092	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Artificial Sequence	
<400> 10	
atctacgttg ctggtggcca gctcgatttg ggtatcacg gccgcgacct tgctcgcat	60
tcccaggtg atgtccaga agttctttcc ctgggttcg gttctccac tttccgttac	120
gcagcaccag ctgatgaaga gtggagcatc gaaaagctcg acggcaagcg catcgctacc	180
tcttaccceca acctgtttcg cgatgacctc gcagcacgtg ggctttccgc tgagggtgctc	240
cgcctcgacg gtgcagtaga ggtatccatc aagcttggtg tcgcagatgc catcgccgat	300
gttgtatcca ccggccgcac gctgcgtcag caaggctctg cacctttcgg cgaggttctg	360

tgcacctctg aggcctgtcat tgttgccgc aaggatgaaa aggtcacccc agagcagcag	420
atcctgcttc gccgcatcca gggaattttg cacgcgcaga acttctcat gctggattac	480
aaggctgacc gcgacaacct ggacgtgcc actgcagtaa cccaggtt ctcggccca	540
gcggtatccc cactggcagc cgacaactgg gttgctgtac gcgccatggt gccacgcagg	600
tcagctaacg ccatcatgga taagcttgct ggactcggcg ctgaagccat cctggcttct	660
gaaatccgca tcgcccgcct ctagttttaa ctaccccga aaatgtagtg ggtagttcca	720
cactgcctct tacaagtacg taggataatc cacagcacca ttgtgatttc cttcaacttg	780
tgagaggcag tacatgtcta agacgagcaa caagtcttca gcagactcaa agaatgacgc	840
aaaagccgaa gacattgtga acggcgagaa ccaaatgcc acgaatgagt cgcagtcttc	900
agacagcgct gcagtttcgg aacgtgtcgt cgaacaaaa accacggttc agaaaaagtt	960
ccgaatcgaa tcggtatctg ttggtgaact tcagatccca tcccacgcat attacgggt	1020
gcacaccctt cgtgcggtgg acaacttcca aatctcacga accacatca accacgtccc	1080
agatttcatt cg	1092
<210> 11	
<211> 1455	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Artificial Sequence	
<400> 11	
tccagcaacc acctggatcg atgtggaggt ttctatcggc cgcgacgtga tcatccacc	60
tggcaccag ctcaaggcg aaactgtcat cggagaccgc gttgaagttg gtccagacac	120
caccttgacc aacatgacca tcggcgacgg cgcacccgta atccgcaccc acggtttcga	180
ctccaccatc ggtgaaaacg ccaccgttgg ccccttcacc tacatccgcc caggaaccac	240
actgggacca gaaggcaagc tcggtggctt cgtagaaacc aagaaggcca caatcggccg	300
tggtccaag gttccacacc tcacctatgt cggcgacgcc accatcgcg aggaatcaa	360
catcggagcc tctctgtct tcgtgaacta cgacggtgaa aacaagcacc acaccacat	420
cggcagccac gttcgactg gttctgacac catgtttatc gctccagtga ccgtgggtga	480
cggagcgtat tccggagccg gtacagtaat taaagacgat gttccgccag gagcccttgc	540
cggtgccggc ggacccaac gaaacatcga aggcctgggtg caaaagaagc gccctggaac	600
cgctgcagca caagccgag aagccgcca aaacgtccac aaccaggaag gctaatagct	660
gccaattatt cgggcttgt gaccgcgtac ccgataaata ggtcggctga aaaatttcgt	720

tgcaatatca acaaaaaggc ctatcattgg gaggtgtcgc accaagtact tttgcgaagc	780
gccatctgac ggattttcaa aagatgtata tgctcgggtgc ggaaacctac gaaaggattt	840
tttaccctaaa ggaggacaac catgactgct cactggaaac aaaaccaaaa gaacctcatg	900
ctgttttcgg gtcgtgcgca cccagaactg gcagaagctg tagctaaaga gctcgacgtc	960
aacgtcaccc caatgacggc acgcgatttc gccaacgggtg aaatctacgt ccgcttcgag	1020
gaatcagttc gtggctccga ctgcttcgtc ctgcagtcac acaccagcc tctcaacaag	1080
tggtctatgg aacagctgct gatgatcgac gctttgaagc gtggttcgc aaagcgcac	1140
accgcatcc tgcgtttcta cccatagcc cgcaggaca agaagcaccg cggccgcgag	1200
ccaattttctg ctgcctcat cgcgacctc atgctaccg ctggcgcgga ccgtatcgtg	1260
tccgtggact tgcacaccga tcagatccag ggcttcttcg acggcccagt cgatcacatg	1320
cacgcatgc cgatcctcac cgatcacatc aaggaaaact acaacctgga caacatctgc	1380
gtggtctccc ctgacgcagg tcgctgaag gttgcagaga agtgggctaa caccttgggc	1440
gatgccccaa tggcg	1455
<210> 12	
<211> 1512	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Artificial Sequence	
<400> 12	
tcaacgatca ctgcccagcc gacgagcact ggcatacaac ctgcggctcc gcccacacg	60
atattcatgt gcgtgcggcg cttcagccac ttggtgtaga caaaaatgta gaagaaaatc	120
gtgatcaaca cgaagatgcc ggcgagcatc gaatcgaca gcagccacag ccacaagaag	180
ctggccactg tcaggaccca cgcaaaaatg gaggcgtcgc gattactcac ggtgtggcgc	240
accaaagggc gagccctagt gcgtcccatg cgctgatcaa tatcgagtc tgccaccatg	300
ttgaaggtgt tggcggcggc cgcacccatc cagccaccga acacagtcag caagatgagc	360
acaatgttgt tctcaccgcg ttcagcctga agcattgtgg ggattgtggc gacaaggagg	420
agttcaataa ccttgggctt cgtagcgca atataggcct tgatcgtgic caagggttct	480
cctccagaac gttgcatttt caaatcactc atatatttaa gttgtgagtc cttattattt	540
aaatatccct gcggtgagtg tgcaccttgc gttgaaggcc cagactctga cagaagcgtc	600
agagtgttta ctcaagacat ttctaaagac aactggccg ttaccctgcg aatgtccaca	660
gggtagctgg tagtttgaat atcaacgccg ttgcccttag gattcagtaa ctggcacatt	720

ttgtaatcgc ctatagctgt gtgctcagtc ttccaggctg cttatcacag tgaagcaaa	780
accaattcgt ggctgcgaaa gtcgtagcca ccacgaagtc caggaggaca taaaaagga	840
ggacaacctt gaccaccttg acgtgtcac ctgaacttca ggcgctcact gtacgcaatt	900
acccctctga ttggtccgat gtggacacca aggtgtaga cactgttcgt gtcctcgctg	960
cagacgctgt agaaaactgt ggctccggcc acccaggcac cgcaatgagc ctggctcccc	1020
ttgcatacac cttgtaccag cgggttatga acgtagatcc acaggacacc aactgggcag	1080
gccgtgaccg cttcgttctt tcttgtggcc actcctcttt gaccagtac atccagcttt	1140
acttgggtgg attcggcctt gagatggatg acctgaaggc tctgcgcacc tgggattcct	1200
tgaccccagg acacctgag taccgccaca ccaagggcgt tgagatcacc actggccctc	1260
ttggccaggg tcttgcatct gcagttggta tggccatggc tgctcgctgt gacgtggcc	1320
tattcgacc aaccgtctgt gagggcgaat cccattcga ccaccacatc tacgtcattg	1380
cttctgatgg tgacctgcag gaaggtgtca cctctgaggc atcctccatc gctggcacc	1440
agcagctggg caacctcatc gtgttctggg atgacaaccg catctccatc gaagacaaca	1500
ctgagatcgc tt	1512
<210> 13	
<211> 1623	
<212> DNA	
<213> Corynebacterium glutamicum	
<400> 13	
atggcggaca ttctgaccac ccaggtttgg caagacctga ccgacatta ctcaaacttc	60
caggcaacca ctctgcgtga acttttcaag gaagaaaacc gcgccgagaa gtacaccttc	120
tccgcggtcg gcctccacgt cgacctgtcg aagaatctgc ttgacgacgc caccctcacc	180
aagtccttg cactgaccga agaatctggc cttcgcgaa ccatcgacgc gatgtttgcc	240
ggtgaacacc tcaacaacac cgaagaccgc gctgtcctcc acaccgcgt gcgccttcct	300
gccgaagctg atctgtcagt agatggccaa gatgttgctg ctgatgtcca cgaagttttg	360
ggacgcatgc gtgacttcgc tactgcgtcg cgctcaggca actggttggg acacaccggc	420
cacacgatca agaagatcgt caacattggt atcgggtggc ctgacctcgg accagccatg	480
gctacgaagg ctctgcgtgc atacgcgacc gctggtatct cagcagaatt cgtctccaac	540
gtcgaccag cagacctcgt ttctgtgttg gaagacctcg atgcagaatc cacattgttc	600
gtgatcgctt cgaaaacttt caccaccag gagacgtgt ccaacgctcg tgcagctcgt	660
gcttggctgg tagagaagct cggatgaagag gctgtcgca agcacttcgt cgcagtgtcc	720

accaatgctg aaaaggtcgc agagttcggg atcgacacgg acaacatgtt cggtttcttg 780
gactgggtcg gaggtcgta ctccgtggac tccgcagtig gtctttccct catggcagtg 840
atcgccctc ggcacttcat gcgtttctc ggtggattcc acgcgatgga tgaacacttc 900
cgcaccacca agttcgaaga gaacgttcca atcttgatgg ctctgctcgg tgtctggtac 960
tccgatttct atgggtcaga aaccacgct gtctacctt attccgagga tctcagccgt 1020
tttctgctt acctccagca gctgacctg gaatcaaag gcaagtcagt ccaccgcgac 1080

ggctccccg tttccactgg cactggcgaa atttactggg gtgagcctgg cacaaatggc 1140
cagcacgctt tcttcagct gatccaccag ggcactcgcc ttgttcagc tgatttcatt 1200
ggtttcgctc gtccaaagca ggatcttctt gccggtgagc gcaccatgca tgaccttttg 1260
atgagcaact tcttcgcaca gaccaagggt ttggctttcg gtaagaacgc tgaagagatc 1320
gctgcggaag gtgtcgcacc tgagctggtc aaccacaagg tcatgccagg taatcgccca 1380
accaccacca ttttggcgga ggaacttacc cttctattc tcggtgcgtt gatcgctttg 1440
tacgaacaca tcgtgatggt tcagggcggtg atttgggaca tcaactcctt cgaccaatgg 1500

ggtgttgaac tgggcaaaca gcaggcaaat gacctcgtc cggtgtctc tggatgaagag 1560
gatgttgact cgggagattc ttccactgat tcaactgatta agtggtagc cgcaaatagg 1620
tag 1623

<210> 14

<211> 540

<212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 14

Met Ala Asp Ile Ser Thr Thr Gln Val Trp Gln Asp Leu Thr Asp His

1 5 10 15

Tyr Ser Asn Phe Gln Ala Thr Thr Leu Arg Glu Leu Phe Lys Glu Glu

20 25 30

Asn Arg Ala Glu Lys Tyr Thr Phe Ser Ala Ala Gly Leu His Val Asp

35 40 45

Leu Ser Lys Asn Leu Leu Asp Asp Ala Thr Leu Thr Lys Leu Leu Ala

50 55 60

Leu Thr Glu Glu Ser Gly Leu Arg Glu Arg Ile Asp Ala Met Phe Ala

65 70 75 80

Gly Glu His Leu Asn Asn Thr Glu Asp Arg Ala Val Leu His Thr Ala

85	90	95
Leu Arg Leu Pro Ala Glu Ala Asp Leu Ser Val Asp Gly Gln Asp Val		
100	105	110
Ala Ala Asp Val His Glu Val Leu Gly Arg Met Arg Asp Phe Ala Thr		
115	120	125
Ala Leu Arg Ser Gly Asn Trp Leu Gly His Thr Gly His Thr Ile Lys		
130	135	140
Lys Ile Val Asn Ile Gly Ile Gly Gly Ser Asp Leu Gly Pro Ala Met		
145	150	155
Ala Thr Lys Ala Leu Arg Ala Tyr Ala Thr Ala Gly Ile Ser Ala Glu		
165	170	175
Phe Val Ser Asn Val Asp Pro Ala Asp Leu Val Ser Val Leu Glu Asp		
180	185	190
Leu Asp Ala Glu Ser Thr Leu Phe Val Ile Ala Ser Lys Thr Phe Thr		
195	200	205
Thr Gln Glu Thr Leu Ser Asn Ala Arg Ala Ala Arg Ala Trp Leu Val		
210	215	220
Glu Lys Leu Gly Glu Glu Ala Val Ala Lys His Phe Val Ala Val Ser		
225	230	235
Thr Asn Ala Glu Lys Val Ala Glu Phe Gly Ile Asp Thr Asp Asn Met		
245	250	255
Phe Gly Phe Trp Asp Trp Val Gly Gly Arg Tyr Ser Val Asp Ser Ala		
260	265	270
Val Gly Leu Ser Leu Met Ala Val Ile Gly Pro Arg Asp Phe Met Arg		
275	280	285
Phe Leu Gly Gly Phe His Ala Met Asp Glu His Phe Arg Thr Thr Lys		
290	295	300
Phe Glu Glu Asn Val Pro Ile Leu Met Ala Leu Leu Gly Val Trp Tyr		
305	310	315
Ser Asp Phe Tyr Gly Ala Glu Thr His Ala Val Leu Pro Tyr Ser Glu		
325	330	335

Asp Leu Ser Arg Phe Ala Ala Tyr Leu Gln Gln Leu Thr Met Glu Ser
340 345 350

Asn Gly Lys Ser Val His Arg Asp Gly Ser Pro Val Ser Thr Gly Thr
355 360 365

Gly Glu Ile Tyr Trp Gly Glu Pro Gly Thr Asn Gly Gln His Ala Phe
370 375 380

Phe Gln Leu Ile His Gln Gly Thr Arg Leu Val Pro Ala Asp Phe Ile
385 390 395 400

Gly Phe Ala Arg Pro Lys Gln Asp Leu Pro Ala Gly Glu Arg Thr Met
405 410 415

His Asp Leu Leu Met Ser Asn Phe Phe Ala Gln Thr Lys Val Leu Ala
420 425 430

Phe Gly Lys Asn Ala Glu Glu Ile Ala Ala Glu Gly Val Ala Pro Glu
435 440 445

Leu Val Asn His Lys Val Met Pro Gly Asn Arg Pro Thr Thr Thr Ile

450 455 460
Leu Ala Glu Glu Leu Thr Pro Ser Ile Leu Gly Ala Leu Ile Ala Leu
465 470 475 480

Tyr Glu His Ile Val Met Val Gln Gly Val Ile Trp Asp Ile Asn Ser
485 490 495

Phe Asp Gln Trp Gly Val Glu Leu Gly Lys Gln Gln Ala Asn Asp Leu
500 505 510

Ala Pro Ala Val Ser Gly Glu Glu Asp Val Asp Ser Gly Asp Ser Ser
515 520 525

Thr Asp Ser Leu Ile Lys Trp Tyr Arg Ala Asn Arg
530 535 540

<210> 15

<211> 1563

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 15

atgagcgatg atcgtaaggc aattaaacgc gcactaatta gcgtgtatga caagactggc

60

ctggaggatc tagcccaggc acttcaccgc gagaacgtgg aaattgtttc caccgcatcc	120
actgcggcga agattgtcga gcttggtatt cctgttacc cggttgagga gctcaccgt	180
tccctgagt gccttgaggg ccgtgtgaag aactgcacc ctaagggtca cgctggcatc	240
ttggcggaca cccgaagga agaccacctg cgtcagctca aggaacttga ggtcgcccca	300
ttccagcttg tcgtggtgaa cctgtacca tttgtgaga ccgttgcgtc cggcgccgat	360
ttcgtatgctt gcgttgagca gatcgacatc ggaggcccat ccatggttcg tgtcggca	420
aagaaccacc catctgtcgc tgtggttgtt tcaccgaacc gctacgagga tgtccaggaa	480
gctttgaaga ccgttggtt ctcgccgcgc gagcgacca agttggctgc tgaaggcttc	540
cgccacaccg caacctacga tgtcaccgtt gcaacctgga tgagcgagca gctggctgcc	600
gaagattctg agactgagtt cccaggttgg atcggcacca ccaacacctt gtccgcgac	660
ttgcgttacg gtgagaacct tcaccagtct gcagctttgt acgtgggcaa caccgcgga	720
cttgacacagg ctaagcagtt ccacggcaag gaaatgagct acaacaacta caccgattct	780
gatctgcat ggcgtgcagc gtgggatcac gagcgtcctt gtgtagctat catcaagcat	840
gcaaaccctt gtggcattgc tgtttctgat gattccatcg cagcggcaca ccgcgaggca	900
cacgcatgtg actctgtgc cgcattcggg ggctcatcg cgtccaaccg tgaagtcagc	960
gttgagatgg ctaaccaggt tgcagagatc ttactgagg tcatcatcgc tccttcctat	1020
gaagaggcg ctgtggagat cctgagccag aagaagaaca tccgtattct tcaggctgaa	1080
gcacctgtgc gtaagggctt tgagtcctcg gagatctccg gcggtctgct tgttcaggaa	1140
cgcgacttga tccacgtga gggcgacaac tccgcaaact ggactcttgc tgccggtct	1200
gctgtttctc ctgaggttct gaaggacctg gatttcgct ggactgcagt tcgttccgtg	1260
aagtccaacg caattctgtt ggctaagaac ggcgtaccg ttggcgttgg catgggacag	1320
gtcaaccgcg ttgactctgc tcgcttggct gtcgaccgtg caggtgcaga gcgcgtacc	1380
ggttccgttg ctgcttcga tgcgtttctt ccattcgctg acggctttga ggttctcgt	1440
gaggctggca tactgtctgt tgtgcagcct ggtggatcca ttcgcgaca cgaggctatt	1500
gaggcagcca acaaggctgg cgtgacctg tacctgactg gtgcgcgaca cttcgtcac	1560
taa	1563
<210> 16	
<211> 520	
<212> PRT	
<213> Corynebacterium glutamicum	
<400> 16	

Met Ser Asp Asp Arg Lys Ala Ile Lys Arg Ala Leu Ile Ser Val Tyr
1 5 10 15
Asp Lys Thr Gly Leu Glu Asp Leu Ala Gln Ala Leu His Arg Glu Asn
20 25 30
Val Glu Ile Val Ser Thr Gly Ser Thr Ala Ala Lys Ile Ala Glu Leu
35 40 45
Gly Ile Pro Val Thr Pro Val Glu Glu Leu Thr Gly Phe Pro Glu Cys
50 55 60
Leu Glu Gly Arg Val Lys Thr Leu His Pro Lys Val His Ala Gly Ile
65 70 75 80
Leu Ala Asp Thr Arg Lys Glu Asp His Leu Arg Gln Leu Lys Glu Leu
85 90 95
Glu Val Ala Pro Phe Gln Leu Val Val Val Asn Leu Tyr Pro Phe Ala
100 105 110
115 120 125
Asp Ile Gly Gly Pro Ser Met Val Arg Ala Ala Ala Lys Asn His Pro
130 135 140
Ser Val Ala Val Val Val Ser Pro Asn Arg Tyr Glu Asp Val Gln Glu
145 150 155 160
Ala Leu Lys Thr Gly Gly Phe Ser Arg Ala Glu Arg Thr Lys Leu Ala
165 170 175
Ala Glu Ala Phe Arg His Thr Ala Thr Tyr Asp Val Thr Val Ala Thr
180 185 190
Trp Met Ser Glu Gln Leu Ala Ala Glu Asp Ser Glu Thr Glu Phe Pro
195 200 205
Gly Trp Ile Gly Thr Thr Asn Thr Leu Ser Arg Ser Leu Arg Tyr Gly
210 215 220
Glu Asn Pro His Gln Ser Ala Ala Leu Tyr Val Gly Asn Thr Arg Gly
225 230 235 240
Leu Ala Gln Ala Lys Gln Phe His Gly Lys Glu Met Ser Tyr Asn Asn

245 250 255
 Tyr Thr Asp Ser Asp Ala Ala Trp Arg Ala Ala Trp Asp His Glu Arg
 260 265 270
 Pro Cys Val Ala Ile Ile Lys His Ala Asn Pro Cys Gly Ile Ala Val
 275 280 285
 Ser Asp Glu Ser Ile Ala Ala Ala His Arg Glu Ala His Ala Cys Asp
 290 295 300
 Ser Val Ser Ala Phe Gly Gly Val Ile Ala Ser Asn Arg Glu Val Ser
 305 310 315 320
 Val Glu Met Ala Asn Gln Val Ala Glu Ile Phe Thr Glu Val Ile Ile

 325 330 335
 Ala Pro Ser Tyr Glu Glu Gly Ala Val Glu Ile Leu Ser Gln Lys Lys
 340 345 350
 Asn Ile Arg Ile Leu Gln Ala Glu Ala Pro Val Arg Lys Gly Phe Glu
 355 360 365
 Ser Arg Glu Ile Ser Gly Gly Leu Leu Val Gln Glu Arg Asp Leu Ile
 370 375 380
 His Ala Glu Gly Asp Asn Ser Ala Asn Trp Thr Leu Ala Ala Gly Ser
 385 390 395 400

 Ala Val Ser Pro Glu Val Leu Lys Asp Leu Glu Phe Ala Trp Thr Ala
 405 410 415
 Val Arg Ser Val Lys Ser Asn Ala Ile Leu Leu Ala Lys Asn Gly Ala
 420 425 430
 Thr Val Gly Val Gly Met Gly Gln Val Asn Arg Val Asp Ser Ala Arg
 435 440 445
 Leu Ala Val Asp Arg Ala Gly Ala Glu Arg Ala Thr Gly Ser Val Ala
 450 455 460
 Ala Ser Asp Ala Phe Phe Pro Phe Ala Asp Gly Phe Glu Val Leu Ala

 465 470 475 480
 Glu Ala Gly Ile Thr Ala Val Val Gln Pro Gly Gly Ser Ile Arg Asp
 485 490 495

Asn Glu Val Ile Glu Ala Ala Asn Lys Ala Gly Val Thr Met Tyr Leu

500

505

510

Thr Gly Ala Arg His Phe Ala His

515

520

<210> 17

<211> 4385

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 17

aaaggaggac catcatgagc acaaacacga cccctccag ctggacaaac ccactgcgcg 60

acccgcagga taaacgactc ccccgcatcg ctggcccttc cggcatggtg atcttcggtg 120

tacttggcga cttggctcga aagaagctgc tccccccat ttatgatcta gcaaaccgcg 180

gattgtgcc cccaggattc tcgttggttag gttacggcgg ccgcgaatgg tccaaagaag 240

actttgaaaa atactgtacg gatgccgcaa gtgctgggtc tcgtacggaa ttccgtgaaa 300

atgtttggga ggcctcgcg gagggtatgg aatttggtcg cggcaacttt gatgatgatg 360

cagctttcga caacctcgct gcaaacactca agcgcacga caaaaccgc ggacccgcg 420

gcaactgggc ttactacctg tccattccac cagattcctt cacagcggtc tgccaccagc 480

tggagcggtc cggcatggct gaatccaccg aagaagcatg gcgccgcgtg atcatcgaga 540

agcctttcgg ccacaacctc gaatccgcac acgagctcaa ccagctggtc aacgcagtct 600

tcccagaatc ttctgtgttc cgcacgacc actatttggg caaggaaaca gttcaaaaca 660

tcctggctct gcgttttctt aaccagctgt ttgagccact gtggaactcc aactacgttg 720

accacgtcca gatcaccatg gctgaagata ttggcttggg tggacgtgct ggttactacg 780

acggcatcgg cgcagcccg gacgtcatcc agaaccacct gatccagctc ttggctctgg 840

ttgccatgga agaaccaatt tctttcgtgc cagcgcagct gcaggcagaa aagatcaagg 900

tgtctctgc gacaaagccg tgctacccat tggataaaac ctccgctcgt ggtcagtacg 960

ctgccggttg gcagggtctt gagttagtca agggacttcg cgaagaagat ggcttcaacc 1020

ctgagtccac cactgagact tttcggctt gtaccttaga gatcacgtct cgtcgctggg 1080

ctggtgtgcc gttctacgt cgcaccggta agcgtcttgg tcgccgtgtt actgagattg 1140

ccgtggtgtt taaagacga ccacaccagc ctttcgacgg cgacatgact gtatcccttg 1200

gcaaaaacgc catcgtgatt cgcgtgcagc ctgatgaagg tgtgtcatc cgcttcggtt 1260

ccaaggttcc aggttctgcc atggaagtcc gtgacgtcaa catggacttc tectactcag	1320
aatccttcac tgaagaatca cctgaagcat acgagcgcct cattttggat gcgctgttag	1380
atgaatccag cctcttcctt accaacgagg aagtggaaact gagctggaag attctggatc	1440
caattcttga agcatgggat gccgatggag aaccagagga ttaccagcgg ggtacgtggg	1500
gtccaaagag cgtgatgaa atgctttccc gcaacgggtca cacctggcgc aggccataat	1560
ttaggggcaa aaaatgatct ttgaacttcc ggataccacc acccagcaaa tttccaagac	1620
cctaactcga ctgcgtgaat cgggcaccca ggtcaccacc ggccgagtgc tcacctcat	1680
cgtggtcact gactccgaaa gcgatgtcgc tgcagttacc gattccacca atgaagcctc	1740
gcgcgagcac ccatctcgcg tgatcatttt ggtggttggc gataaaactg cagaaaacaa	1800
agttgacgca gaagtccgta tcggtggcga cgttggtgct tccgagatga tcatcatgca	1860
tctcaacgga cctgtcgtcg acaagctcca gtatgtcgtc acaccactgt tgcttcctga	1920
cacccccatc gttgcttggg ggccaggatga atcaccaaag aatccttccc aggaccaat	1980
tggacgcatc gcacaacgac gcatcactga tgctttgtac gaccgtgatg acgactaga	2040
agatcgtgtt gagaactatc acccaggatga taccgacatg acgtgggcgc gccttaccca	2100
gtggcgggga cttgttgctt cctcattgga tcaccacca cacagcgaat tcacttcctg	2160
gaggctgacc ggtgcaacgc gcagtacctc ggtggatttg gctgcaggct ggttggcgcg	2220
gaggctgaaa gtgcctgtga tccgcgaggt gacagatgct cccaccgtgc caaccgatga	2280
gtttgggtact cactgtctgg ctatccagcg cctggagatc gttcgacca cggctcgat	2340
catcatcacc atctatgacg ctcataccct tcaggtagag atgccggaat cggcaatgc	2400
cccacgtcg gtggtctatg gtcgtcgaag tgagtccgac tgcttgtctg aggagcttcg	2460
ccacatggat ccagatttgg gctaccagca cgcactatcc ggcttgtcca gcgtcaagct	2520
ggaaaccgtc taaaaaggag gatcctcatg actgctcact ggaaacaaaa caaaagaac	2580
ctcatgctgt tttcgggtcg tgcgcacca gaactggcag aagctgtagc taaagagctc	2640
gacgtcaacg tcacccaat gacggcacgc gatttcgcca acggtgaaat ctacgtccgc	2700
ttcgaggaat cagttcgtgg ctccgactgc ttcgtcctgc agtccacac ccagccttc	2760
aacaagtggc tcatggaaca gctgctgatg atcgacgtt tgaagcgtgg ttccgcaaag	2820
cgcacaccg cgatcctgcc gttctacca tatccccgc aggacaagaa gcaccgcggc	2880
cgcgagccaa tttctgctcg cctcatgcc gacctcatgc tcaccgtgg cgcgaccgt	2940
atcgtgtccg tggacttgca caccgatcag atccagggt tcttcgacgg ccagtcgat	3000

cacatgcacg ccatgccgat cctcaccgat cacatcaagg aaaactacaa cctggacaac	3060
atctgcgtgg tctccctga cgcaggctgc gtgaagggtg cagagaagtg ggctaacacc	3120
ttgggcgatg cccaatggc gttcgtgcac aagacccgct ccaccgaggt agcaaaccag	3180
gttgtcgcca accgcgtcgt cggtagctgc gacggcaagg actgcgtgct tctcgacgac	3240
atgatcgaca ctggcggcac catcgccggc gctgtggcg tctgaagaa ggctggcgca	3300
aagtcagtcg tcatcgctg caccacgggt gtgttctctg acccagcccg cgagcgcctg	3360
tctgcatcgc gtgtgaaga agtcacc accgacacc tgccacagtc caccgagggc	3420
tggagcaacc tgaccgtttt gtcgatcgca ccgtgctgg ctgcaccat caacgagatc	3480
ttcgaacacg gttccgtcac caccctcttc gagggcgagg cctaaaaagg aggacaatca	3540
tgttgaacat cgctgtccca aacaaaggct cgctgtccga gcgcgccatg gaaatcctcg	3600
ccgaagcagg ctacgcaggc cgtggagatt ccaaatccct caacgttttt gatgaagcaa	3660
acaacgttga attcttcttc cttcgcccta aagatatcgc catctacgtt gctggtggcc	3720
agctcgatgtt gggtatcacc ggccgcgacc ttgctcgca tccccaggt gatgtccacg	3780
aagtctcttc cctcggttc ggttctcca ctttcgtta cgcagcacca gctgatgaag	3840
agtggagcat cgaaaagctc gacggcaagc gcacgctac ctcttacctc aaccttgctc	3900
gcgatgacct cgcagcacgt gggctttccg ctgagggtct ccgcctcgac ggtgcagtag	3960
aggtatccat caagcttggg gtcgcagatg ccacgcga tgttgtatcc accggccgca	4020
cgctgcgtca gcaaggtctt gcaccttctg gcgaggttct gtgcacctct gagctgtca	4080
ttgttggccg caaggatgaa aaggtcaccc cagagcagca gatcctgctt cgccgcatcc	4140
agggaatttt gcacgcgag aacttctca tgcgtgatta caaggtcgac cgcgacaacc	4200
tggacgtgc cactgcagta acccaggt tctccggccc agcggtatcc cactggcac	4260
gcgacaactg ggttgctgta cgcgcatgg tgccacgag gtcagctaac gccatcatgg	4320
ataagcttgc tggactcggc gctgaagcca tctggcttc tgaatccgc atgccccga	4380
tctag	4385
<210> 18	
<211> 1654	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Artificial Sequence	
<400> 18	
tccgcagaaa gcacctcatt cacgatgtgc atggaggaac ggccagtcac cgcaatgcgg	60

gaacgcacct cgaccatgtg gccagaggga atagggcgag tgaagtgaat gtgaccaaca	120
taagcagtga cacagtaggt tccagaccac tgggtagcac aagcataagc agccttatcg	180
atccattcca ggactcggcc accgccaacg ccatggctac cagccatcaa aacgtcagta	240
ggggcagcca tgaaacgaag gacgacttct ggggagcggg gtggattctc acggggattc	300
tcatgcggat tatcagacat atggacactt taacggttcg tactaggctg atgcttcatg	360
aggattgac cgctggaaac cggccaagcc gtattggcgg tcaaagactg gattgaaggg	420
gagggagacg tcgaaaagcc tggtcgtgcg gcacttgccg ccgcaactcg cctgagcgtc	480
cgactgctcg cgcaagacgc gccgggaaac agcgtggagg tgcgggtacc cccatttggt	540
gcggtgcaat gcatagaggg gccaaaacat acacgcggca caccaccaa cgtggaggag	600
accgacgcca agacctggtt acgcttagca actgggcaaa ccacattga tgcagaattt	660
gaaagcggaa aaattagcgc atcaggtacc cgagccaaag agattgcgga ctggttacca	720
gtggtcaaac tttagccgtt gaaaactaaa aagctgggaa ggtgaatcga atttcggggc	780
tttaaagcaa aaatgaacag cttggtctat agtggctagg tacccttttt gttttggaca	840
catgtagggt ggccgaaaca aagtaaaagg aggaccggaa tgaccaggt aaaccaccg	900
tacgatgac tcaacgaaca ggcaccgcag gaagaatcgc gcgttttcgg cgtttggcg	960
ccaggtaggg aagtctcga acttacctac tttggcctct tcgcacttca gcaccgtgt	1020
caagaagccg cgggcatcgc agtaggcgat ggccaacaga tcctggtttt caaagatttg	1080
ggcctagtct cccaagtfff cgacgaacca attctggaat ccctccgcgg aaacatcgcc	1140
atcggacaca cccgatacac caccgccggc ggaacacct gggaaaatgc ccagcctatg	1200
ttccgcatgg caccagatgg caccgatatc gcccttgga acaacggcaa cctgattaat	1260
tacatcgagt tgttggaaca agccaccgaa cttggcctcg tcgatccgc caagaagcca	1320
tcagataccg atgtgctcac tggactgctc gcaagcggcg tccatgacgg aaataatctc	1380
tttgattccg ccaaggaact cctccccagc gtcaaggag cctactgcct caccttcacc	1440
gacggacaca ccctgtacgc agcgcgtgat ccattcgga tccgccact gtccatcggc	1500
cgcctcgagc gcggctgggt agtcgcact gaaaccgcag cgctcgacat cgtaggtgcc	1560
tcgcatgtgc gcgaggtcga accaggcgaa ctgattgcta tcgacgaatc cggcctcaag	1620
tccgcacgat tcgccgagac aaccgcaaa ggtt	1654
<210> 19	
<211> 494	
<212> PRT	
<213> Corynebacterium glutamicum	

<400> 19

Met Thr Gln Val Asn His Pro Tyr Asp Asp Leu Asn Glu Gln Ala Pro

1 5 10 15
Gln Glu Glu Cys Gly Val Phe Gly Val Trp Ala Pro Gly Glu Glu Val
20 25 30
Ser Lys Leu Thr Tyr Phe Gly Leu Phe Ala Leu Gln His Arg Gly Gln
35 40 45
Glu Ala Ala Gly Ile Ala Val Gly Asp Gly Glu Gln Ile Leu Val Phe
50 55 60
Lys Asp Leu Gly Leu Val Ser Gln Val Phe Asp Glu Pro Ile Leu Glu
65 70 75 80

Ser Leu Arg Gly Asn Ile Ala Ile Gly His Thr Arg Tyr Thr Thr Ala
85 90 95
Gly Gly Asn Thr Trp Glu Asn Ala Gln Pro Met Phe Arg Met Ala Pro
100 105 110
Asp Gly Thr Asp Ile Ala Leu Gly His Asn Gly Asn Leu Ile Asn Tyr
115 120 125
Ile Glu Leu Leu Asp Lys Ala Thr Glu Leu Gly Leu Val Asp Pro Ala
130 135 140
Lys Lys Pro Ser Asp Thr Asp Val Leu Thr Gly Leu Leu Ala Ser Gly

145 150 155 160
Val His Asp Gly Asn Asn Leu Phe Asp Ser Ala Lys Glu Leu Leu Pro
165 170 175
Ser Val Lys Gly Ala Tyr Cys Leu Thr Phe Thr Asp Gly His Thr Leu
180 185 190
Tyr Ala Ala Arg Asp Pro Phe Gly Ile Arg Pro Leu Ser Ile Gly Arg
195 200 205
Leu Glu Arg Gly Trp Val Val Ala Ser Glu Thr Ala Ala Leu Asp Ile
210 215 220

Val Gly Ala Ser His Val Arg Glu Val Glu Pro Gly Glu Leu Ile Ala
225 230 235 240

Ile Asp Glu Ser Gly Leu Lys Ser Ala Arg Phe Ala Glu Thr Thr Arg
 245 250 255
 Lys Gly Cys Val Phe Glu Tyr Val Tyr Leu Ala Arg Pro Asp Ser Val
 260 265 270
 Ile Lys Gly Arg Asn Val Asn Glu Ala Arg Leu Glu Ile Gly Arg Lys
 275 280 285
 Leu Ala Ala Glu Ala Pro Ala Val Gly Asp Leu Val Ile Pro Thr Pro

 290 295 300
 Glu Ser Gly Thr Pro Ala Ala Val Gly Phe Ala Gln Ala Ser Gly Ile
 305 310 315 320
 Pro Phe Gly Gln Gly Met Val Lys Asn Ala Tyr Val Gly Arg Thr Phe
 325 330 335
 Ile Gln Pro Ser Asp Thr Leu Arg Gln Leu Gly Ile Arg Leu Lys Leu
 340 345 350
 Asn Pro Leu Arg Glu Val Ile Ala Gly Lys Arg Leu Val Val Val Asp
 355 360 365

 Asp Ser Ile Val Arg Gly Asn Thr Gln Arg Ala Val Ile Arg Met Leu
 370 375 380
 Arg Glu Ala Gly Ala Ala Glu Val His Val Arg Ile Ala Ser Pro Pro
 385 390 395 400
 Val Lys Trp Pro Cys Phe Tyr Gly Ile Asp Phe Ala Thr Pro Gly Glu
 405 410 415
 Leu Ile Ala Asn Ala Val Thr Ser Asp Asn Glu Ala Glu Met Val Glu
 420 425 430
 Ala Val Arg Ser Ala Ile Gly Ala Asp Thr Leu Gly Tyr Val Ser Ile

 435 440 445
 Asp Ser Met Val Ala Ala Thr Glu Gln Pro Ala Asn Glu Leu Cys Ile
 450 455 460
 Ala Cys Phe Asp Gly Lys Tyr Pro Met Gly Leu Pro Gln Gly Asn Ser
 465 470 475 480
 Asn Ala Asp Leu Val Arg Lys Met Gln Ala Thr Ala Ser Ser
 485 490

<210> 20
 <211> 1473
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence

<400> 20

atgatggttc cgaggccgaa gaccgttaac atatctgttg tgaattctga ctctacgacc 60
 accattgtcg tgctagcttc cggaacaggc accctccttc agtcactcat tgaagcgcaa 120
 ggtacctatt cgatcgtggg cgttgtctct gacgtcgaat gccctgcact ttccagagcc 180
 gcagatgcag gtattgatac tgcagttgtt ccgcttgga aagatcgtgc acagtggaa 240
 cacgagcttg cagacgcagt tgcagtaagc gaccagatt tgggtggtctc tgcgggattc 300
 atgaaaattt tgggcgaagg ttctctctca aggttcccgt cccgcatcat caacaccac 360
 ccagctttat tgccttcttt ccctggtgcc cagcgggttc gcgatgcttt ggcatacgg 420

gtgaaagtgt caggttcgac agttcacctt gtcgatgctg gtgtggatac cggcccaatt 480
 attgtcaac gagcagtgcc ggtagaagt aatgatgatg aatccagcct gcatgaaaga 540
 atcaagcagg ttgagcgtaa actcattgta gaagtcctga acagcgtgga attttcgct 600
 caggggtggcg tacaactcaa ctggagagggc taatggccgt tacctgcga atgtccacag 660
 ggtagctggt agtttgaaaa tcaacgccgt tgcccttagg attcagtaac tggcacattt 720
 tgtaatgcgc tagatctgtg tgctcagctt tccaggctgc ttatcacagt gaaagcaaaa 780
 ccaattcgtg gctgcgaaag tcgtagccac cacgaagtcc aggaggacat acaatgagcg 840

atgatcgtaa ggcaattaaa cgcgactaa ttagcgtgta tgacaagact ggcttgagg 900
 atctagccca ggcacttcac cgcgagaacg tggaaattgt ttccaccgga tccactgcgg 960
 cgaagattgc tgagcttggt attcctgtta ccccggttga ggagctcacc gggttccctg 1020
 agtgcttga gggccgtgtg aagacactgc accctaaggt tcacgctggc atcttggcgg 1080
 acaccgcaa ggaagaccac ctgctgcagc tcaaggaact tgaggtcgcc ccattccagc 1140
 ttgtcgtggt gaacctgtac ccatttctg agaccgttgc gtcggcgcc gatttcgatg 1200
 cttgcgttga gcagatcgac atcggaggcc catccatggt tcgtgctgcg gcaaagaacc 1260

acccatctgt cgctgtggtt gtttcacga accgctacga ggatgtccag gaagctttga 1320
 agaccggtgg attctccgc gcggagcgca ccaagttggc tgctgaggct ttccgccaca 1380
 ccgcaaccta cgatgtcacc gttgcaacct ggatgagcga gcagctggct gccgaagatt 1440
 ctgagactga gttcccaggt tggatcgga cca 1473

<210> 21
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence
 <400> 21
 gctctagagt atcggcgtgg agttgtc 27

<210> 22
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence
 <400> 22
 tagtggagta gctttatattt gcgacacctg cc 32

<210> 23
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence
 <400> 23
 gtcgcaaaat aaagctactc cactagtgtg atcg 34

<210> 24
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence
 <400> 24
 ggcttctcct ttgcgtaaga cctcactcgc 30

<210> 25
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence

<400>	25	
gaggtcttac gcaaaggagg aaccgaatga agacatttga		40
<210>	26	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	
<400>	26	
cgcggatccc aggatctgct gctctgg		27
<210>	27	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	
<400>	27	
cccaagcttc gaggaaaccg ttgagga		27
<210>	28	
<211>	35	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	
<400>	28	
tagtggagta gctatggatt tcacctctgt gaatg		35
<210>	29	
<211>	37	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	
<400>	29	
tctccacttt aggtaagcta ctccactagt gtgatcg		37
<210>	30	
<211>	30	
<212>	DNA	

<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	
<400>	30	
	cgatcctcct ttgcgtaaga cctcactcgc	30
<210>	31	
<211>	38	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	
<400>	31	
	gaggtcttac gcaaaggagg atgccatgt tgaatgtc	38
<210>	32	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	
<400>	32	
	cgcggatccg gcagaggcat cagcaag	27
<210>	33	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	
<400>	33	
	atgtgctgca aggcgattaa	20
<210>	34	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	
<400>	34	
	tatgcttcg gctcgatatgt	20
<210>	35	

<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	
<400>	35	
	ttttatatat gggatatcggc ggtctatgct	30
<210>	36	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	
<400>	36	
	cgcggatcca tctacgttgc tgggtggc	27
<210>	37	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	
<400>	37	
	acgggcaaca gctgctgctc tggggtgac	29
<210>	38	
<211>	31	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	
<400>	38	
	cagagcagca gctgttgccc gtctcactgg t	31
<210>	39	
<211>	31	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	
<400>	39	
	ggtagttaaa attacgcccc gccctgccac t	31

<210>	40	
<211>	31	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	
<400>	40	
gcggggcgta attttaacta cccccgaaaa t		31
<210>	41	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	
<400>	41	
ccggaattcc gaatgaaatc tgggacg		27
<210>	42	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	
<400>	42	
cgaagcagga tctgctgctc tggggtgac		29
<210>	43	
<211>	31	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	
<400>	43	
cagagcagca gatcctgctt cgccgcatcc a		31
<210>	44	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	

<400>	44	
ggtagttaaa actagatgcg ggcgatgcg		29
<210>	45	
<211>	31	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	
<400>	45	
cccgcatacta gttttaacta cccccgaaaa t		31
<210>	46	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	
<400>	46	
tcccaaacaa aggetcgc		18
<210>	47	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	
<400>	47	
cagtcggcgg ttgctaa		18
<210>	48	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	
<400>	48	
atgttgaaaa tcgctg		16
<210>	49	
<211>	52	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 49

ttactgcagt ggcagcgtcc aggttgctgc ggtcgacctt gtaatccagc at 52

<210> 50

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 50

acctggacgc tgccactgca gtaacccag gcttctcgg cccagcgga tc 52

<210> 51

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 51

ctagatgcgg gcgatgcgg 19

<210> 52

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 52

gctctagaaa aggaggatcc tcatgactgc tcaactgg 37

<210> 53

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 53

ttgtcctect ttttaggcct cgcctcgaa 30

<210> 54

<211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence
 <400> 54
 ggcgaggcct aaaaaggagg acaatcatgt tgaaaatcgc tg 42
 <210> 55
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence
 <400> 55

 tcccccgggc tagatgcggg cgatgcgg 28
 <210> 56
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence
 <400> 56
 caattaatca tcggctcgta 20
 <210> 57
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence
 <400> 57
 accgcttctg cgttctgatt 20
 <210> 58
 <211> 27

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence
 <400> 58

cgcggtatccg ctctttcgga gtgacct	27
<210> 59	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Artificial Sequence	
<400> 59	
taagcaagcg agaaaactcc tttattgtcg	30
<210> 60	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Artificial Sequence	
<400> 60	
taaaggagtt ttctcgcttg cttatagggt c	31
<210> 61	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Artificial Sequence	
<400> 61	
ccggaattct cggaagcag ttagtgaaa	29
<210> 62	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Artificial Sequence	
<400> 62	
ttgacgacgc aagagcca	18
<210> 63	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Artificial Sequence

<400> 63

caccattacc gatgagaaac

20

<210> 64

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 64

cccaagctta aaggaggacc atcatgagca caaacacgac ccct

45

<210> 65

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 65

gctctagatt agacggtttc cagcttg

27

<210> 66

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 66

tccccggga aaggaggacc ttcagagcg atgatcgtaa g

41

<210> 67

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 67

ccggaattct tagtgagcga agtgtcgcg

29

<210> 68

<211> 41

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	
<400>	68	
gctctagaaa aggaggacca tcatgagcac aaacacgacc c		41
<210>	69	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	
<400>	69	
agtcatgagg atcctccttt ttagacgggt tccagcttg		39
<210>	70	
<211>	48	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	
<400>	70	
tcaagctgga aaccgtctaa aaaggaggat cctcatgact gctcactg		48
<210>	71	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	
<400>	71	
tcccccgggc tagatgcggg cgatgcggat ttc		33
<210>	72	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	
<400>	72	
caattaatca tcggctcgta		20

<210> 73
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence
 <400> 73
 accgcttctg cgttctgatt 20

<210> 74
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence
 <400> 74
 cgcggatcct ccgcagaaag cacctca 27

<210> 75
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence
 <400> 75
 tttagttttc aacggctaaa gtttgaccac tgg 33

<210> 76
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence
 <400> 76
 gtggtcaaac tttagccgtt gaaaactaaa aagc 34

<210> 77
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence

<400>	77	
tccggtcctc cttttacttt gtttcggcca ccc		33
<210>	78	
<211>	47	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	
<400>	78	
ggccgaaaca aagtaaaagg aggaccggaa tgaccaggt aaaccac		47
<210>	79	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	
<400>	79	
ccggaattca acctttgcgg gttgtct		27
<210>	80	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	
<400>	80	
cccaagcttt ccagcaacca cctggat		27
<210>	81	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	
<400>	81	
aattggcagc tattagcctt cctggtgtg		30
<210>	82	
<211>	30	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 82

caggaaggct aatagctgcc aattattccg 30

<210> 83

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 83

ttgtcctcct ttgggtaaaa aatcctttcg 30

<210> 84

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 84

gattttttac ccaaaggagg acaaccatga ctgctcactg gaa 43

<210> 85

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 85

cgcggatccc gccattgggg catcgcc 27

<210> 86

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 86

cccaagcttt caacgatcac tgcccag 27

<210> 87

<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	
<400>	87	
gggtaacggc cagtgtgtct tagaaaatg		29
<210>	88	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	
<400>	88	
ctaagacaca ctggccgtta ccctgcgaa		29
<210>	89	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	
<400>	89	
ttgtcctcct tttgtatgtc ctctggact		30
<210>	90	
<211>	44	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	
<400>	90	
ggaggacata caaaaggagg acaaccttga ccaccttgac gctg		44
<210>	91	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	
<400>	91	
cgcggatcca agcgatctca gtgttgt		27

<210>	92	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	
<400>	92	
tgtgacccgc	tacccgataa	20
<210>	93	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	
<400>	93	
cgttaccctg	cgaatgtc	18
<210>	94	
<211>	31	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	
<400>	94	
ctggagaggc	taatggccgt	31
taccctgcga	a	
<210>	95	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	
<400>	95	
atcatcgctc	attgtatgtc	30
ctcctggact		
<210>	96	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	

<400>	96	
gctctagaat gatggttccg aggccg		26
<210>	97	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	
<400>	97	
gggtaacggc cattagcctc tccagttgag		30
<210>	98	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	
<400>	98	
ggaggacata caatgagcga tgatcgtaag		30
<210>	99	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	
<400>	99	
tccccgggt ggtgccgatc caacctg		27