(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2022 년 8 월 18 일 (18.08.2022)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2022/173135 A1

(51) 국제특허분류:
C12N 15/77 (2006.01) *C12N 9/02* (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01) *C12N 9/88* (2006.01)
C07K 14/34 (2006.01) *C12N 9/90* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2022/000697

(22) 국제출원일: 2022 년 1 월 14 일 (14.01.2022)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2021-0018908 2021 년 2 월 10 일 (10.02.2021) KR
10-2021-0059751 2021 년 5 월 10 일 (10.05.2021) KR

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

(72) 발명자: **한성옥 (HAN, Sung Ok)**; 05502 서울시 송파구 올림픽로 135, 225동 2802호, Seoul (KR). **고영진 (KO, Young Jin)**; 24405 강원도 춘천시 동내면 거두택지길26번길 9-13, 201호, Gangwon-do (KR).

(74) 대리인: **특허법인다해 (DAHAI INTERNATIONAL PATENT & LAW FIRM)**; 06775 서울시 서초구 논현로 87, 삼호물산빌딩 B동 703호, Seoul (KR).

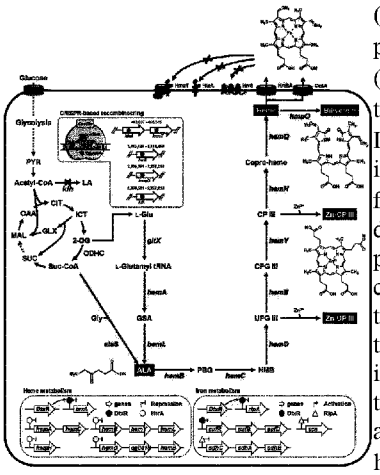
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK,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

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:
— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) **Title:** RECOMBINANT MICROORGANISM WITH IMPROVED PRODUCTION CAPACITY OF HEME, COPROPORPHYRIN III, UROPORPHYRIN III, ZINC-COPROPORPHYRIN III, ZINC-UROPORPHYRIN III, AND BILIVERDIN, AND METHOD FOR PRODUCTION OF HEME, COPROPORPHYRIN III, UROPORPHYRIN III, ZINC-COPROPORPHYRIN III, ZINC-UROPORPHYRIN III, AND BILIVERDIN BY USING SAME

(54) **발명의 명칭:** 헴, 코프로포르피린 III, 우로포르피린 III, 아연-코프로포르피린 III, 아연-우로포르피린 III 및 빌리버딘의 생산능력이 향상된 재조합 미생물, 및 이를 이용한 헴, 코프로포르피린 III, 우로포르피린 III, 아연-코프로포르피린 III, 아연-우로포르피린 III 및 빌리버딘의 생산방법



(57) **Abstract:** The present invention relates to a recombinant microorganism with improved production capability of heme, coproporphyrin III, uroporphyrin III, zinc-coproporphyrin III (Zn-coproporphyrin III), zinc-uroporphyrin III (Zn-uroporphyrin III), and biliverdin, a preparation method therefor, and a method for production of heme, coproporphyrin III, uroporphyrin III, zinc-coproporphyrin III, zinc-uroporphyrin III, and biliverdin by using same. In the present invention, a synergistic effect of the introduction of genes related to the C4 and C5 pathways for synthesis of 5-aminolevulinic acid (ALA), genes related to the coproporphyrin III-dependent pathway, and transcriptional regulatory factors was first evidenced through the improved porphyrin productivity effect of the recombinant microorganism. In addition, in contrast to the conventional recombinant microorganisms which are induced for extracellular production by introducing an extracellular secretion protein thereinto, the present invention first identified that the extracellular secretion of heme can be remarkably increased through the strategy of modifying microorganism cell walls. The recombinant microorganism according to the present invention is provided with enhanced production capability of porphyrin-based materials through the aforementioned metabolism engineering strategy and exhibits high productivity therefor. Thus, heme, coproporphyrin III, uroporphyrin III, zinc-coproporphyrin III, zinc-uroporphyrin III, and biliverdin, which are all high value-added materials, can be economically and efficiently produced by using the recombinant microorganism of the present invention.

WO 2022/173135 A1

[다음 쪽 계속]

(57) 요약서: 본 발명은 헴 (heme), 코프로포르피린 III (coproporphyrin III), 우로포르피린 III (uroporphyrin III), 아연-코프로포르피린 III (Zn-coproporphyrin III), 아연-우로포르피린 III (Zn-uroporphyrin III) 및 빌리버딘 (Biliverdin)의 생산능력이 향상된 재조합 미생물, 이의 제조방법 및 이를 이용한 헴, 코프로포르피린 III, 우로포르피린 III, 아연-코프로포르피린 III, 아연-우로포르피린 III 및 빌리버딘의 생산방법에 관한 것이다. 본 발명에서는 재조합 미생물의 포르피린 생산능 향상 효과를 통해 5-아미노레불린산 (5-aminolevulinic acid, ALA)의 합성을 위한 C4 및 C5 경로 관련 유전자의 도입, 코프로포르피린 III 의존성 경로 관련 유전자의 도입 및 전사조절인자의 도입을 통한 시너지 효과를 처음 입증하였으며, 또한 종래 재조합 미생물에서 외분비 단백질을 도입하여 세포외 생산을 유도한 것과 달리 최초로 상기 미생물의 세포벽을 개량하는 전략을 통해 헴의 세포외 분비를 현저히 증가시킬 수 있음을 확인하였다. 이에, 본 발명에 따른 재조합 미생물은 상기와 같은 대사공학적 전략을 통해 포르피린 계열 물질의 생산능력이 강화되어 높은 생산능을 나타내는바, 본 발명의 재조합 미생물을 이용하면 고부가가치의 헴, 코프로포르피린 III, 우로포르피린 III, 아연-코프로포르피린 III, 아연-우로포르피린 III 및 빌리버딘을 경제적이고 효율적으로 생산할 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 헴, 코프로포르피린 III, 우로포르피린 III, 아연-코프로포르피린 III, 아연-우로포르피린 III 및 빌리버딘의 생산능력이 향상된 재조합 미생물, 및 이를 이용한 헴, 코프로포르피린 III, 우로포르피린 III, 아연-코프로포르피린 III, 아연-우로포르피린 III 및 빌리버딘의 생산방법

기술분야

[1] 본 발명은 헴 (heme), 코프로포르피린 III (coproporphyrin III), 우로포르피린 III (uroporphyrin III), 아연-코프로포르피린 III (Zn-coproporphyrin III), 아연-우로포르피린 III (Zn-uroporphyrin III) 및 빌리버딘 (Biliverdin)의 생산능력이 향상된 재조합 미생물, 이의 제조방법 및 이를 이용한 헴, 코프로포르피린 III, 우로포르피린 III, 아연-코프로포르피린 III, 아연-우로포르피린 III 및 빌리버딘의 생산방법에 관한 것이다.

배경기술

[2] 헴, 코프로포르피린 III, 우로포르피린 III, 아연-코프로포르피린 III, 아연-우로포르피린 III 및 빌리버딘과 같은 포르피린 (porphyrin)은 네 개의 피롤 (pyrrole)이 메틴 (methine) 그룹으로 연결된 이종고리식 거대유기화합물 (heterocyclic macrocyle organic compound)이다. 헴 및 포르피린 유사체들은 숙시닐-코에이 (succinyl-CoA)와 글리신 (glycine)의 중합반응에 의한 경로 (C4 경로) 또는 글루타메이트 (glutamate)를 출발물질로 하여 ATP, NADPH 조효소를 사용하는 경로 (C5 경로)를 통하여 생체 내에서 합성된다. 이 두 경로에 대한 선호도는 종에 따라 다르며, 구체적으로 C4 경로의 경우 5-아미노레불린산 합성효소 (5-aminolevulinic acid synthase, ALAS)의 작용, C5 경로의 경우 글루타메이트로부터 글루타밀-tRNA 합성효소 (glutamyl-tRNA synthetase; GltX), 글루타밀-tRNA 리덕테이즈 (glutamyl-tRNA reductase, HemA) 및 글루타메이트-1-세미알데하이드 아미노트랜스퍼레이즈 (glutamate-1-semialdehyde aminotransferase, HemL)의 작용에 의한 5-아미노레불린산 (5-aminolevulinic acid, ALA)의 합성으로부터 헴 대사경로가 시작된다. 2분자의 5-아미노레불린산은 포르포빌리노겐 합성효소 (porphobilinogen synthase, HemB)가 촉매하는 축합 (condensation) 반응을 통해 포르포빌리노겐 (porphobilinogen, PBG)으로 합성되고, 4분자의 포르포빌리노겐은 포르포빌리노겐 디아미네이즈 (porphobilinogen deaminase, HemC)의 촉매 작용을 통해 1-하이드록시메틸빌란 (1-hydroxymethylbilane, HMB)으로 합성된다. 1-하이드록시메틸빌란은 우로포르피리노겐 III 합성효소 (uroporphyrinogen III synthase, HemD)에 의해 고리화되어 포르피린의 기본

골격인 우로포르피리노겐 III (uroporphyrinogen III)로 합성된다.

[3] 이후 우로포르피리노겐 III로부터 헴이 합성되는 방식은 종에 따라 세 가지 경로를 통해 진행된다. 첫 번째는 네 가지 효소 반응으로 구성된 프로토포르피린 IX 의존성 경로 (protoporphyrin IX-dependent pathway)로 생물학 및 생화학 분야에서 잘 알려져 있으며 주로 프로테오박테리아 (Proteobacteria) 및 진핵생물에서 발견된다. 두 번째는 황산염 환원 세균 (sulfate reducing bacteria)와 고세균 (archaea)에서 발견되는 원시 헴 경로로, 6가지 효소 반응을 통해 헴을 합성한다. 마지막은 네 가지 효소 반응으로 구성된 코프로포르피린 III 의존성 경로 (coproporphyrin III-dependent pathway)로, 최근에 발견된 방선균 (actinobacteria)과 후벽균 (firmicutes)에서 발견된다. 코프로포르피린 III 의존성 경로와 프로토포르피린 IX 의존성 경로에서 우로포르피리노겐 III를 코프로피리노겐 III (coproporphyrinogen III, CPG III)로 전환시키는 반응은 우로포르피리노겐 III 디카복실레이즈 (uroporphyrinogen III decarboxylase, HemE)에 의해 진행된다. 코프로포르피린 III 의존성 경로에서는 코프로포르피리노겐 III (coproporhyrinogen III)가 코프로포르피리노겐 III 산화효소 (Coproporphyrinogen III oxidase, HemY)에 의해 코프로포르피린 III (coproporhyrin III)로 전환된다. 이어서 코프로포르피린 III로부터 코프로포르피린 III 페로킬라테이즈 (Coproporphyrin III ferrochelatase, HemH)에 의해 철이온 첨가로 코프로-헴 (copro-heme)이 합성되고, 과산화수소 의존성 헴 합성효소 (Hydrogen peroxide-dependent heme synthase, HemQ)에 의해 코프로-헴은 최종적으로 헴으로 전환된다. 빌리버딘은 헴 옥시게네이즈 (Heme oxygenase, HmuO)에 의해 헴이 분해되어 형성된다.

[4] 헴은 호흡, 산소 전달, 광합성, 전자전달과 관련된 생명체의 필수 보조인자로 식품 산업에서 유기 철 보충제뿐만 아니라 의료 분야의 급성 간헐성 포르피린증 (acute intermittent porphyria)에 대한 생체 이용 및 제약 화합물로 널리 사용되고 있다. 또한 헴은 최근 식품 산업에서 인공육의 주요 원료로 활발히 사용되고 있다.

[5] 아연 포르피린 유도체는 최근 빛을 수확하여 태양 에너지를 전기 에너지로 변환하는 태양전지의 광감응제로 이용되거나 인터페이스 (interface)에서 다단계 반응을 촉매하는 촉매제로 주목받고 있다. 전자 및 물리 화학적 응용 외에도 아연 포르피린은 항종양 및 항균활성에 대한 광감응제로 광역학치료 (photodynamic therapy)에서 이용되고 있다.

[6] 빌리버딘은 항산화 성질을 가져 유용한 생리적 기능을 수행할 수 있으며, 퍼옥시라디칼의 강력한 제거제로 알려져 있다. 빌리버딘은 돌연변이 유발 물질인 다환 방향족 탄화수소, 헤테로사이클릭아민 및 산화제의 영향을 억제하는 효과가 있는 것으로 확인되었으며, 일부 연구에 따르면 체내에 빌리버딘의 농도가 높은 사람들은 암 및 심혈관 질환의 빈도가 낮다고 보고된바 있다.

[7] 종래 헴 생합성을 향상시키기 위한 연구로는 대장균을 통해 수행된 바 있으며 C5 경로, 프로토포르피린 IX 의존성 경로를 포함하는 헴 생합성 경로 강화를 통해 헴 생산을 증대시킨 결과가 보고되어 있다. 또한 헴 및 다른 포르피린 계열 물질의 생산을 증대시키기 위한 재조합 균주 및 이의 생산 효과가 일부 보고되고 있으나, 포르피린 및 이의 유사체를 보다 효율적으로 고생산하고 세포외 분비능을 더욱 증대시킨 재조합 미생물 및 최적화된 방법에 대한 연구개발이 추가적으로 필요한 실정이다.

[8] [선행기술문헌] 한국등록특허 10-2168039

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[9] 이에, 본 발명자들은 L-글루탐산 (L-glutamic acid) 생성능을 갖는 미생물을 이용하여 헴을 포함한 다양한 포르피린의 생산능이 향상된 재조합 미생물을 개발하고자 연구 노력한 결과, 헴의 전구물질인 5-아미노레불린산을 과생산하는 C4 및 C5 경로 유전자, 코프로포르피린 III 의존성 경로 관련 유전자 및 전사조절인자의 도입, 해당 미생물의 세포벽 개량 전략을 적용함으로써 헴을 비롯한 포르피린 및 이의 유사체의 생산능력 및 이의 외분비가 향상된 재조합 미생물을 제조하였는바, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.

[10] 이에, 본 발명은 헴 (Heme), 코프로포르피린 III (Coproporphyrin III) 및 우로포르피린 III (Uroporphyrin III) 생산능력이 향상된 재조합 미생물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[11] 또한, 본 발명은 아연-코프로포르피린 III (Zn-coproporphyrin III) 및 아연-우로포르피린 III (Zn-uroporphyrin III) 생산능력이 향상된 재조합 미생물을 제공하는 것을 다른 목적으로 한다.

[12] 또한, 본 발명은 빌리버딘 (Biliverdin) 생산능력이 향상된 재조합 미생물을 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

[13] 또한, 본 발명은 상기 재조합 미생물의 제조방법을 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

[14] 또한, 본 발명은 상기 재조합 미생물을 배양하는 단계를 포함하는, 헴의 생산방법을 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

[15] 또한, 본 발명은 상기 재조합 미생물을 배양하는 단계를 포함하는, 코프로포르피린 III 및 우로포르피린 III의 생산방법을 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

[16] 또한, 본 발명은 상기 재조합 미생물을 배양하는 단계를 포함하는, 아연-코프로포르피린 III 및 아연-우로포르피린 III의 생산방법을 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

[17] 또한, 본 발명은 상기 재조합 미생물을 배양하는 단계를 포함하는, 빌리버딘의 생산방법을 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

[18]

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

과제 해결 수단

[20] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 글루탐산 (glutamic acid) 생성능을 가지는 미생물에 글루타밀-tRNA 리덕테이즈 (glutamyl-tRNA reductase, HemA), 글루타메이트-1-세미알데하이드 아미노트랜스퍼레이즈 (glutamate-1-semialdehyde aminotransferase, HemL), 아미노레불린산 합성효소 (Aminolevulinic acid synthase, AlaS), 전사조절인자 디프테리아 톡신 리프레서 (Diphtheria toxin Repressor, DtxR), 우로포르피리노겐 III 디카복실레이즈 (Uroporphyrinogen III decarboxylase, HemE), 코프로포르피리노겐 III 산화효소 (Coproporphyrinogen III oxidase, HemY), 코프로포르피린 III 페로킬라테이즈 (Coproporphyrin III ferrochelatase, HemH), 과산화수소 의존성 헴 합성효소 (Hydrogen peroxide-dependent heme synthase, HemQ) 및 헴 수송단백질 (heme regulated transporter A and B, HrtAB)로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상을 암호화하는 유전자가 도입된, 헴 (Heme), 코프로포르피린 III (coproporphyrin III, CP III) 및 우로포르피린 III (uroporphyrin III, UP III) 생산능력이 향상된 재조합 미생물을 제공한다.

[21] 본 발명의 일구현예로, 상기 재조합 미생물은 추가적으로 막결합 헴 단백질 히스티딘 키네이즈 (Histidine kinase HrrS), 세포표면 헴 수용체 단백질 (cell surface heme receptor, HtaA) 및 헴결합 세포질 단백질 (Hemin-binding periplasmic protein, HmuT)로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상을 암호화하는 유전자의 발현이 억제된 것일 수 있다.

[22] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 재조합 미생물은 HemA, HemL, AlaS, DtxR, HemE, HemY, HemH, HemQ 및 HrtAB를 암호화하는 유전자가 도입되고; 및 HrrS, HtaA 및 HmuT를 암호화하는 유전자의 발현이 억제된 것일 수 있다.

[23] 또한, 본 발명은 글루탐산 (glutamic acid) 생성능을 가지는 미생물에 글루타밀-tRNA 리덕테이즈 (glutamyl-tRNA reductase, HemA), 글루타메이트-1-세미알데하이드 아미노트랜스퍼레이즈 (glutamate-1-semialdehyde aminotransferase, HemL), 아미노레불린산 합성효소 (Aminolevulinic acid synthase, AlaS), 전사조절인자 디프테리아 톡신 리프레서 (Diphtheria toxin Repressor, DtxR) 및 우로포르피리노겐 III 디카복실레이즈 (Uroporphyrinogen III decarboxylase, HemE)를 암호화하는 유전자가 도입된, 아연-코프로포르피린 III (Zn-coproporphyrin III, Zn-CP III) 및 아연-우로포르피린 III (Zn-uroporphyrin III, Zn-UP III) 생산능력이 향상된 재조합 미생물을 제공한다.

[24] 또한, 본 발명은 글루탐산 (glutamic acid) 생성능을 가지는 미생물에

글루타밀-tRNA 리덕테이즈 (glutamyl-tRNA reductase, HemA), 글루타메이트-1-세미알데하이드 아미노트랜스퍼레이즈 (glutamate-1-semialdehyde aminotransferase, HemL), 아미노레불린산 합성효소 (Aminolevulinic acid synthase, AlaS), 전사조절인자 디프테리아 톡신 리프레서 (Diphtheria toxin Repressor, DtxR), 우로포르피리노겐 III 디카복실레이즈 (Uroporphyrinogen III decarboxylase, HemE), 코프로포르피리노겐 III 산화효소 (Coproporphyrinogen III oxidase, HemY), 코프로포르피린 III 페로킬라테이즈 (Coproporphyrin III ferrochelatase, HemH), 과산화수소 의존성 헴 합성효소 (Hydrogen peroxide-dependent heme synthase, HemQ) 및 헴 옥시게네이즈 (Heme oxygenase, HmuO)를 암호화하는 유전자가 도입된, 빌리버딘 (Biliverdin) 생산능력이 향상된 재조합 미생물을 제공한다.

[25] 또한, 본 발명은 막결합 헴 단백질 히스티딘 키네이즈 (Histidine kinase HrrS), 세포표면 헴 수용체 단백질 (cell surface heme receptor, HtaA) 및 헴결합 세포질 단백질 (Hemin-binding periplasmic protein, HmuT)로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상을 암호화하는 유전자의 발현이 억제된, 헴 (Heme)의 외분비능이 향상된 재조합 미생물을 제공한다.

[26] 또한, 본 발명은 글루탐산 (glutamic acid) 생성능을 가지는 미생물에 글루타밀-tRNA 리덕테이즈 (glutamyl-tRNA reductase, HemA), 글루타메이트-1-세미알데하이드 아미노트랜스퍼레이즈 (glutamate-1-semialdehyde aminotransferase, HemL), 아미노레불린산 합성효소 (Aminolevulinic acid synthase, AlaS), 전사조절인자 디프테리아 톡신 리프레서 (Diphtheria toxin Repressor, DtxR), 우로포르피리노겐 III 디카복실레이즈 (Uroporphyrinogen III decarboxylase, HemE), 코프로포르피리노겐 III 산화효소 (Coproporphyrinogen III oxidase, HemY), 코프로포르피린 III 페로킬라테이즈 (Coproporphyrin III ferrochelatase, HemH), 과산화수소 의존성 헴 합성효소 (Hydrogen peroxide-dependent heme synthase, HemQ) 및 헴 수송단백질 (heme regulated transporter A and B, HrtAB)로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상을 암호화하는 유전자를 도입시키는 단계를 포함하는, 상기 헴 (Heme), 코프로포르피린 III (coproporphyrin III, CP III) 및 우로포르피린 III (uroporphyrin III, UP III) 생산능력이 향상된 재조합 미생물의 제조방법을 제공한다.

[27] 본 발명의 일구현예로, 상기 제조방법은 막결합 헴 단백질 히스티딘 키네이즈 (Histidine kinase HrrS), 세포표면 헴 수용체 단백질 (cell surface heme receptor, HtaA) 및 헴결합 세포질 단백질 (Hemin-binding periplasmic protein, HmuT)로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상을 암호화하는 유전자의 발현을 억제시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[28] 또한, 본 발명은 글루탐산 (glutamic acid) 생성능을 가지는 미생물에 글루타밀-tRNA 리덕테이즈 (glutamyl-tRNA reductase, HemA), 글루타메이트-1-세미알데하이드 아미노트랜스퍼레이즈

(glutamate-1-semialdehyde aminotransferase, HemL), 아미노레불린산 합성효소 (Aminolevulinic acid synthase, AlaS), 전사조절인자 디프테리아 톡신 리프레서 (Diphtheria toxin Repressor, DtxR) 및 우로포르피리노겐 III 디카복실레이즈 (Uroporphyrinogen III decarboxylase, HemE)를 암호화하는 유전자를 도입시키는 단계를 포함하는, 상기 아연-코프로포르피린 III (Zn-coproporphyrin III, Zn-CP III) 및 아연-우로포르피린 III (Zn-uroporphyrin III, Zn-UP III) 생산능력이 향상된 재조합 미생물의 제조방법을 제공한다.

[29] 또한, 본 발명은 글루탐산(glutamic acid) 생성능을 가지는 미생물에 글루타밀-tRNA 리덕테이즈 (glutamyl-tRNA reductase, HemA), 글루타메이트-1-세미알데하이드 아미노트랜스퍼레이즈 (glutamate-1-semialdehyde aminotransferase, HemL), 아미노레불린산 합성효소 (Aminolevulinic acid synthase, AlaS), 전사조절인자 디프테리아 톡신 리프레서 (Diphtheria toxin Repressor, DtxR), 우로포르피리노겐 III 디카복실레이즈 (Uroporphyrinogen III decarboxylase, HemE), 코프로포르피리노겐 III 산화효소 (Coproporphyrinogen III oxidase, HemY), 코프로포르피린 III 페로킬라테이즈 (Coproporphyrin III ferrochelatase, HemH), 과산화수소 의존성 헴 합성효소 (Hydrogen peroxide-dependent heme synthase, HemQ) 및 헴 옥시게네이즈(Heme oxygenase, HmuO)를 암호화하는 유전자를 도입시키는 단계를 포함하는, 상기 빌리버딘 (Biliverdin) 생산능력이 향상된 재조합 미생물의 제조방법을 제공한다.

[30] 본 발명의 일구현예로, 상기 글루탐산 생성능을 가지는 미생물은 코리네박테리움 글루타믹쿰 (*Corynebacterium glutamicum*)일 수 있다.

[31] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 HemA, HemL, AlaS, DtxR, HemE, HemY, HemH, HemQ, HrtA, HrtAB 및 HmuO는 각각 서열번호 1 내지 11로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

[32] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 HrrS, HtaA 및 HmuT은 각각 서열번호 13 내지 15로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

[33] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 헴 (Heme)의 생산방법을 제공한다.

[34] (a) 상기 재조합 미생물을 철 이온 (Fe^{2+})을 포함하는 배지에서 배양하여 헴을 생성시키는 단계; 및

[35] (b) 상기 생성된 헴을 추출 및 수득하는 단계.

[36] 본 발명의 일구현예로, 상기 단계 (a)에서 배지 내에 5 내지 100mg/L 농도의 에탐부톨 (ethambutol)이 추가로 포함될 수 있다.

[37] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 단계 (a)에서 배지는 질소원으로 트립톤 (Tryptone)이 포함된 것일 수 있다.

[38] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 배양은 유가식 발효 공정으로 이루어지는 것일 수 있다.

[39] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 코프로포르피린 III (coproporphyrin III, CP III) 및 우로포르피린 III (uroporphyrin III, UP III)의 생산방법을 제공한다.

[40] (a) 상기 재조합 미생물을 배지에서 배양하여 코프로포르피린 III 및 우로포르피린 III를 생성시키는 단계; 및

[41] (b) 상기 생성된 코프로포르피린 III 및 우로포르피린 III를 추출 및 수득하는 단계.

[42] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 아연-코프로포르피린 III (Zn-coproporphyrin III, Zn-CP III) 및 아연-우로포르피린 III (Zn-uroporphyrin III, Zn-UP III)의 생산방법을 제공한다.

[43] (a) 상기 재조합 미생물을 아연 이온 (Zn^{2+})을 포함하는 배지에서 배양하여 아연-코프로포르피린 III 및 아연-우로포르피린 III를 생성시키는 단계; 및

[44] (b) 상기 생성된 아연-코프로포르피린 III 및 아연-우로포르피린 III를 추출 및 수득하는 단계.

[45] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 빌리버딘 (Biliverdin)의 생산방법을 제공한다.

[46] (a) 상기 재조합 미생물을 배지에서 배양하여 빌리버딘을 생성시키는 단계; 및

[47] (b) 상기 생성된 빌리버딘을 추출 및 수득하는 단계.

발명의 효과

[48] 본 발명에서는 재조합 미생물의 포르피린 생산능 향상 효과를 통해 5-아미노레불린산 (5-aminolevulinic acid, ALA)의 합성을 위한 C4 및 C5 경로 관련 유전자의 도입, 코프로포르피린 III 의존성 경로 관련 유전자의 도입 및 전사조절인자의 도입을 통한 시너지 효과를 처음 입증하였으며, 또한 종래 재조합 미생물에서 외분비 단백질을 도입하여 세포외 생산을 유도한 것과 달리 최초로 상기 미생물의 세포벽을 개량하는 전략을 통해 헴의 세포외 분비를 현저히 증가시킬 수 있음을 확인하였다. 이에, 본 발명에 따른 재조합 미생물은 상기와 같은 대사공학적 전략을 통해 포르피린 계열 물질의 생산능력이 강화되어 높은 생산능을 나타내는바, 본 발명의 재조합 미생물을 이용하면 고부가가치의 헴, 코프로포르피린 III, 우로포르피린 III, 아연-코프로포르피린 III, 아연-우로포르피린 III 및 빌리버딘을 경제적이고 효율적으로 생산할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[49] 도 1은 각각 야생형 코리네박테리움 글루타믹쿰 (WT), S, AL 및 ALS 재조합 균주를 플라스크 배양한 후 세포 성장 (Cell growth), 글루코오스 (Glucose), 글루타메이트 (Glutamate) 및 글리신 (Glycine) 소비량과 함께 헴 (Heme), 5-아미노레불린산 (ALA), 코프로포르피린 III (CP III), 우로포르피린 III (UP III)의 생산량을 측정한 결과이다.

[50] 도 2는 *hemY*, *hemH*, *hemQ* 및/또는 *dtxR* 유전자가 도입된 재조합 균주를 플라스크 배양한 후 헴 생산 및 mRNA 발현수준을 측정한 결과를 나타낸 것으로, 도 2a는 ALS, ALS-Y, ALS-H, ALS-Q, ALS-HQ 및 ALS-YHQ 재조합 균주에서 각각 헴, 코프로포르피린 III (CP III), 우로포르피린 III (UP III)의 생산량을 측정한

결과이고, 도 2b는 ALSdt, ALSdt-Y, ALSdt-H, ALSdt-Q, ALSdt-HQ, ALSdt-YHQ 재조합 균주에서 각각 헴, 코프로포르피린 III, 우로포르피린 III의 생산량을 측정한 결과이며, 도 2c는 각각 ALS-H 및 ALSdt-H에서 mRNA 발현수준을 측정한 결과이다.

[51] 도 3은 세포벽 개량 전략이 적용된 재조합 균주에서 헴 생산을 측정한 결과로서, 도 3a는 본 발명에 따른 코리네박테리움 글루타믹쿰 균주의 세포벽 개량 전략을 그림으로 도시한 것이고, 도 3b는 ALSdt-YHQ, ALSdt-YHQBA, ALSdt-YHQcA, ΔS::ALSdt-YHQBA, ΔSA::ALSdt-YHQBA, ΔSAT::ALSdt-YHQBA, ΔSAT::ALSdtE-YHQBA 재조합 균주를 에탐부톨 (ETB)의 첨가 또는 미첨가 조건에서 플라스크 배양한 후 각각 세포 성장과 함께 총 헴 (Total heme), 외분비 헴 (Secreted heme), 코프로포르피린 III 및 우로포르피린 III 생산 수준을 측정한 결과이다.

[52] 도 4는 ALSdt-YHQ, ALSdt-YHQBA, ALSdt-YHQcA, ΔS::ALSdt-YHQBA, ΔSA::ALSdt-YHQBA, ΔSAT::ALSdt-YHQBA, ΔSAT::ALSdtE-YHQBA 재조합 균주를 에탐부톨 (ETB)의 첨가 또는 미첨가 조건에서 플라스크 배양한 후 총 우로포르피린 III (Total UP III) 및 외분비된 우로포르피린 III (Secreted UP III) 수준을 각각 측정한 결과이다.

[53] 도 5는 질소원을 최적화하기 위하여 ΔSAT::ALSdtE-YHQBA 재조합 균주를 상이한 질소원이 포함된 각 mCGXII-Y10 배지 (mCGXII-AS, mCGXII-AC, mCGXII-Tr 및 mCGXII-Ca)에서 플라스크 배양한 후 세포 성장과 함께 세포 내외의 헴 생산 수준을 측정한 결과이다.

[54] 도 6은 ΔSAT::ALSdtE-YHQBA2 균주를 각각 mCGXII 배지, mCGXII에 에탐부톨이 첨가된 배지 (mCGXII + ETB) 및 mCGXII-Tr 배지에서 유가식 발효공정으로 배양하면서 세포 성장 및 글루코오스 소비와 함께 세포 내외의 헴 생산 수준을 측정한 결과이다.

[55] 도 7은 ΔSAT::ALSdtE-YHQBA와 ΔSATO::ALSdtE-YHQBA 재조합 균주를 에탐부톨 (ETB)의 첨가 또는 미첨가 조건에서 플라스크 배양한 후 세포 내외의 헴, 코프로포르피린 III 및 우로포르피린 III 생산 수준을 측정한 결과이다.

[56] 8은 ALSdtE, ΔLdh::ALSdtE, ALSdtE-BA 재조합 균주를 플라스크 배양한 후 세포 성장과 함께 각각 세포 내외의 총 아연-포르피린 (ZnPP), 아연-코프로포르피린 III (Zn-CP III) 및 아연-우로포르피린 III (Zn-UP III)의 생산 수준을 측정한 결과이다.

[57] 도 9는 에탐부톨 농도를 최적화하기 위하여 ALSdtE 균주를 에탐부톨이 다양한 농도 (5, 25, 50, 100mg/L)로 첨가된 조건에서 플라스크 배양한 후 세포 성장과 함께 세포 내외의 아연-포르피린, 아연-코프로포르피린 III 및 아연-우로포르피린 III의 생산 수준을 측정한 결과이다.

[58] 도 10은 ALSdtE 균주를 유가식 발효공정으로 배양하면서 세포 성장 및 글루코오스 소비와 함께 세포 내외의 아연-포르피린 (Zn-porphyrin) 수준을

측정한 결과이다.

[59] 도 11은 ALSdtE-YHQ 및 ALSdtE-YHQO 재조합 균주를 CGXII 배지에서 프라스크 배양한 후 헴, 코프로포르피린 III 및 빌리버딘 (Biliverdin)의 생산 수준을 각각 측정한 결과이다.

[60] 도 12는 본 발명에 따른 재조합 미생물에 대한 대사공학 전략을 종합하여 모식도로 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 형태

[61] 본 발명자들은 L-글루탐산 (L-glutamic acid) 생성능을 갖는 미생물에 헴의 전구물질인 5-아미노레불린산을 과생산하는 C4 및 C5 경로 유전자, 코프로포르피린 III 의존성 경로 관련 유전자 및 전사조절인자의 도입, 해당 미생물의 세포벽 개량 전략을 적용함으로써 헴 및 다양한 포르피린의 생산능력 및 이의 외분비 능력이 향상된 재조합 미생물을 제조하였다.

[62] 이에, 본 발명은 글루탐산 (glutamic acid) 생성능을 가지는 미생물에 글루타밀-tRNA 리덕테이즈 (glutamyl-tRNA reductase, HemA), 글루타메이트-1-세미알데하이드 아미노트랜스퍼레이즈 (glutamate-1-semialdehyde aminotransferase, HemL), 아미노레불린산 합성효소 (Aminolevulinic acid synthase, AlaS), 전사조절인자 디프테리아 톡신 리프레서 (Diphtheria toxin Repressor, DtxR), 우로포르피리노겐 III 디카복실레이즈 (Uroporphyrinogen III decarboxylase, HemE), 코프로포르피리노겐 III 산화효소 (Coproporphyrinogen III oxidase, HemY), 코프로포르피린 III 페로킬라테이즈 (Coproporphyrin III ferrochelatase, HemH), 과산화수소 의존성 헴 합성효소 (Hydrogen peroxide-dependent heme synthase, HemQ) 및 헴 수송단백질 (heme regulated transporter A and B, HrtAB)로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상을 암호화하는 유전자가 도입된, 헴 (Heme), 코프로포르피린 III (coproporphyrin III, CP III) 및 우로포르피린 III (uroporphyrin III, UP III) 생산능력이 향상된 재조합 미생물을 제공한다.

[63] 본 발명에 있어서, 상기 재조합 미생물은 추가적으로 막결합 헴 단백질 히스티딘 키네이즈 (Histidine kinase HrrS), 세포표면 헴 수용체 단백질 (cell surface heme receptor, HtaA) 및 헴결합 세포질 단백질 (Hemin-binding periplasmic protein, HmuT)로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상을 암호화하는 유전자의 발현이 억제된 것일 수 있다.

[64] 본 발명에 있어서, 상기 헴, 코프로포르피린 III 및 우로포르피린 III의 생산능력이 향상된 재조합 미생물은 하기 재조합 미생물을 모두 포함한다.

[65] i) HemA, HemL 및 AlaS를 암호화하는 유전자가 도입된, 재조합 미생물;

[66] ii) HemA, HemL, AlaS 및 DtxR를 암호화하는 유전자가 도입된, 재조합 미생물;

[67] iii) HemA, HemL, AlaS, DtxR 및 HemE를 암호화하는 유전자가 도입된, 재조합 미생물;

[68] iv) HemA, HemL, AlaS, DtxR 및 HemY를 암호화하는 유전자가 도입된, 재조합 미생물;

[69] v) HemA, HemL, AlaS, DtxR 및 HemH를 암호화하는 유전자가 도입된, 재조합 미생물;

[70] vi) HemA, HemL, AlaS, DtxR 및 HemQ를 암호화하는 유전자가 도입된, 재조합 미생물;

[71] vii) HemA, HemL, AlaS, DtxR, HemH 및 HemQ를 암호화하는 유전자가 도입된, 재조합 미생물;

[72] viii) HemA, HemL, AlaS, DtxR, HemY, HemH 및 HemQ를 암호화하는 유전자가 도입된, 재조합 미생물; 및

[73] ix) HemA, HemL, AlaS, DtxR, HemY, HemH, HemQ 및 HrtAB를 암호화하는 유전자가 도입된, 재조합 미생물.

[74] 또한, 본 발명은 막결합 헴 단백질 히스티딘 키네이즈 (Histidine kinase HrrS), 세포표면 헴 수용체 단백질 (cell surface heme receptor, HtaA) 및 헴결합 세포질 단백질 (Hemin-binding periplasmic protein, HmuT)로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상을 암호화하는 유전자의 발현이 억제된, 헴 (Heme)의 외분비능이 향상된 재조합 미생물을 제공한다.

[75] 본 발명에 있어서, 하기의 재조합 미생물은 헴, 코프로포르피린 III 및 우로포르피린 III의 생산능력이 향상되고, 세포벽의 헴 결합능이 감소되어 헴 외분비능이 향상된 것일 수 있다.

[76] i) HemA, HemL, AlaS, DtxR, HemY, HemH, HemQ 및 HrtAB를 암호화하는 유전자가 도입되어 있고, HrrS를 암호화하는 유전자의 발현이 억제된, 재조합 미생물;

[77] ii) HemA, HemL, AlaS, DtxR, HemY, HemH, HemQ 및 HrtAB를 암호화하는 유전자가 도입되어 있고, HrrS 및 HtaA를 암호화하는 유전자의 발현이 억제된, 재조합 미생물;

[78] iii) HemA, HemL, AlaS, DtxR, HemY, HemH, HemQ 및 HrtAB를 암호화하는 유전자가 도입되어 있고, HrrS, HtaA 및 HmuT를 암호화하는 유전자의 발현이 억제된, 재조합 미생물; 및

[79] iv) HemA, HemL, AlaS, DtxR, HemE, HemY, HemH, HemQ 및 HrtAB를 암호화하는 유전자가 도입되어 있고, HrrS, HtaA 및 HmuT를 암호화하는 유전자의 발현이 억제된, 재조합 미생물.

[80] 본 발명에 있어서, 바람직하게 상기 재조합 미생물은 HemA, HemL, AlaS, DtxR, HemE, HemY, HemH, HemQ 및 HrtAB를 암호화하는 유전자가 도입되고; 및 HrrS, HtaA 및 HmuT를 암호화하는 유전자의 발현이 억제된 것일 수 있다.

[81] 또한, 본 발명은 글루탐산 (glutamic acid) 생성능을 가지는 미생물에 글루타밀-tRNA 리덕테이즈 (glutamyl-tRNA reductase, HemA), 글루타메이트-1-세미알데하이드 아미노트랜스퍼레이즈

(glutamate-1-semialdehyde aminotransferase, HemL), 아미노레불린산 합성효소 (Aminolevulinic acid synthase, AlaS), 전사조절인자 디프테리아 독신 리프레서 (Diphtheria toxin Repressor, DtxR) 및 우로포르피리노겐 III 디카복실레이즈 (Uroporphyrinogen III decarboxylase, HemE)를 암호화하는 유전자가 도입된, 아연-코프로포르피린 III (Zn-coproporphyrin III, Zn-CP III) 및 아연-우로포르피린 III (Zn-uroporphyrin III, Zn-UP III) 생산능력이 향상된 재조합 미생물을 제공한다.

[82] 또한, 본 발명은 글루탐산 (glutamic acid) 생성능을 가지는 미생물에 글루타밀-tRNA 리덕테이즈 (glutamyl-tRNA reductase, HemA), 글루타메이트-1-세미알데하이드 아미노트랜스퍼레이즈 (glutamate-1-semialdehyde aminotransferase, HemL), 아미노레불린산 합성효소 (Aminolevulinic acid synthase, AlaS), 전사조절인자 디프테리아 독신 리프레서 (Diphtheria toxin Repressor, DtxR), 우로포르피리노겐 III 디카복실레이즈 (Uroporphyrinogen III decarboxylase, HemE), 코프로포르피리노겐 III 산화효소 (Coproporphyrinogen III oxidase, HemY), 코프로포르피린 III 페로킬라테이즈 (Coproporphyrin III ferrochelatase, HemH), 과산화수소 의존성 헴 합성효소 (Hydrogen peroxide-dependent heme synthase, HemQ) 및 헴 옥시게네이즈(Heme oxygenase, HmuO)를 암호화하는 유전자가 도입된, 빌리버딘 (Biliverdin) 생산능력이 향상된 재조합 미생물을 제공한다.

[83] 본 발명에서, 상기 HemA, HemL, AlaS, DtxR, HemE, HemY, HemH, HemQ, HrtA, HrtB 및 HmuO는 각각 서열번호 1 내지 11로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다. 또한 상기 HrrS, HtaA 및 HmuT은 각각 서열번호 13 내지 15로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다. 이때, 상기 각 단백질들은 서열번호 1 내지 11, 13 내지 15로 표시되는 아미노산 서열과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[84] 또한, 본 발명은 글루탐산 (glutamic acid) 생성능을 가지는 미생물에 글루타밀-tRNA 리덕테이즈 (glutamyl-tRNA reductase, HemA), 글루타메이트-1-세미알데하이드 아미노트랜스퍼레이즈 (glutamate-1-semialdehyde aminotransferase, HemL), 아미노레불린산 합성효소 (Aminolevulinic acid synthase, AlaS), 전사조절인자 디프테리아 독신 리프레서 (Diphtheria toxin Repressor, DtxR), 우로포르피리노겐 III 디카복실레이즈 (Uroporphyrinogen III decarboxylase, HemE), 코프로포르피리노겐 III 산화효소 (Coproporphyrinogen III oxidase, HemY), 코프로포르피린 III 페로킬라테이즈 (Coproporphyrin III ferrochelatase, HemH), 과산화수소 의존성 헴 합성효소 (Hydrogen peroxide-dependent heme synthase, HemQ) 및 헴 수송단백질 (heme regulated transporter A and B, HrtAB)로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상을 암호화하는 유전자를 도입시키는 단계를 포함하는, 상기 헴 (Heme),

코프로포르피린 III (coproporphyrin III, CP III) 및 우로포르피린 III (uroporphyrin III, UP III) 생산능력이 향상된 재조합 미생물의 제조방법을 제공한다.

[85] 본 발명에서, 상기 제조방법은 막결합 헴 단백질 히스티딘 키네이즈 (Histidine kinase HrrS), 세포표면 헴 수용체 단백질 (cell surface heme receptor, HtaA) 및 헴결합 세포질 단백질 (Hemin-binding periplasmic protein, HmuT)로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상을 암호화하는 유전자의 발현을 억제시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[86] 또한, 본 발명은 글루탐산 (glutamic acid) 생성능을 가지는 미생물에 글루타밀-tRNA 리덕테이즈 (glutamyl-tRNA reductase, HemA), 글루타메이트-1-세미알데하이드 아미노트랜스퍼레이즈 (glutamate-1-semialdehyde aminotransferase, HemL), 아미노레불린산 합성효소 (Aminolevulinic acid synthase, AlaS), 전사조절인자 디프테리아 톡신 리프레서 (Diphtheria toxin Repressor, DtxR) 및 우로포르피리노겐 III 디카복실레이즈 (Uroporphyrinogen III decarboxylase, HemE)를 암호화하는 유전자를 도입시키는 단계를 포함하는, 상기 아연-코프로포르피린 III (Zn-coproporphyrin III, Zn-CP III) 및 아연-우로포르피린 III (Zn-uroporphyrin III, Zn-UP III) 생산능력이 향상된 재조합 미생물의 제조방법을 제공한다.

[87] 또한, 본 발명은 글루탐산 (glutamic acid) 생성능을 가지는 미생물에 글루타밀-tRNA 리덕테이즈 (glutamyl-tRNA reductase, HemA), 글루타메이트-1-세미알데하이드 아미노트랜스퍼레이즈 (glutamate-1-semialdehyde aminotransferase, HemL), 아미노레불린산 합성효소 (Aminolevulinic acid synthase, AlaS), 전사조절인자 디프테리아 톡신 리프레서 (Diphtheria toxin Repressor, DtxR), 우로포르피리노겐 III 디카복실레이즈 (Uroporphyrinogen III decarboxylase, HemE), 코프로포르피리노겐 III 산화효소 (Coproporphyrinogen III oxidase, HemY), 코프로포르피린 III 페로킬라테이즈 (Coproporphyrin III ferrochelatase, HemH), 과산화수소 의존성 헴 합성효소 (Hydrogen peroxide-dependent heme synthase, HemQ) 및 헴 옥시게네이즈(Heme oxygenase, HmuO)를 암호화하는 유전자를 도입시키는 단계를 포함하는, 상기 빌리버딘 (Biliverdin) 생산능력이 향상된 재조합 미생물의 제조방법을 제공한다.

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

[89] 본 발명에 있어서, 바람직하게 재조합 미생물은 글루탐산 생성능을 가지는 미생물을 유전자재조합 기술을 통해 포르피린 계열 물질, 바람직하게 헴, 코프로포르피린 III, 우로포르피린 III, 아연-코프로포르피린 III, 아연-우로포르피린 III 및/또는 빌리버딘의 생산능이 향상된 것일 수 있고, 상기 글루탐산 생성능을 가지는 미생물은 바람직하게 코리네박테리움 글루타믹쿰 (

Corynebacterium glutamicum)일 수 있다.

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

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

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

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

[94] 상기 "형질전환" 또는 "트랜스펙션"은 원핵 또는 진핵 숙주세포 내로 외인성 핵산 (DNA 또는 RNA)을 도입하는 데에 통상 사용되는 여러 종류의 다양한 기술,

예컨대 전기천공법 (electroporation), 인산칼슘 침전법, DEAE-덱스트란 트랜스펙션 또는 리포펙션 (lipofection) 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며 당업자가 적절히 선택하여 이용할 수 있다.

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

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

[97] 본 발명에서, 숙주세포에서 상기 유전자의 발현 억제는 CRISPR 기술을 이용하여 표적 유전자의 발현을 억제함으로써 이루어질 수 있으며, 바람직하게는 CRISPR용 재조합 벡터를 이용할 수 있고, 더욱 바람직하게는 pJYS1_Peftu 및 pJYS2_crtYf의 공지된 벡터를 이용할 수 있으나, 유전자의 발현 억제 방법이 이것으로 제한되는 것은 아니며 당업자가 공지된 기술을 적절히 선택하여 이용할 수 있다.

[98] 본 발명의 구체적인 실시예에서는, 본 발명에 따른 다양한 재조합 균주를 배양한 후 헴, 코프로포르피린 III, 우로포르피린 III, 아연-코프로포르피린 III, 아연-우로포르피린 III 또는 빌리버딘 (Biliverdin) 각각을 추출함으로써 생산량을 측정 및 비교하였고, 상기 각 물질의 가장 높은 생산량을 달성하기 위한 배양 조건, 예컨대 배지 내 질소원, 배양방법 및 에탐부톨의 농도를 최적화하였다.

[99] 이에, 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 헴 (Heme)의 생산방법을 제공한다.

[100] (a) 상기 재조합 미생물을 철 이온 (Fe^{2+})을 포함하는 배지에서 배양하여 헴을 생성시키는 단계; 및

[101] (b) 상기 생성된 헴을 추출 및 수득하는 단계.

[102] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 아연-코프로포르피린 III (Zn-coproporphyrin III, Zn-CP III) 및 아연-우로포르피린 III (Zn-uroporphyrin III, Zn-UP III)의 생산방법을 제공한다.

[103] (a) 상기 재조합 미생물을 아연 이온 (Zn^{2+})을 포함하는 배지에서 배양하여

아연-코프로포르피린 III 및 아연-우로포르피린 III를 생성시키는 단계; 및

[104] (b) 상기 생성된 아연-코프로포르피린 III 및 아연-우로포르피린 III를 추출 및 수득하는 단계.

[105] 본 발명에 있어서, 상기 각 (a) 단계에서 배지는 바람직하게 CGXII 배지에 효모 추출물이 첨가된 mCGXII-Y10 배지일 수 있고, 더욱 바람직하게는 상기 mCGXII-Y10 배지에 질소원으로 $(NH_4)_2SO_4$, NH_4Cl, 트립톤 및 카제인가수분해물이 각각 첨가된 mCGXII-AS, mCGXII-AC, mCGXII-Tr 및 mCGXII-Ca 배지일 수 있으며, 가장 바람직하게는 트립톤이 첨가된 mCGXII-Tr일 수 있다.

[106] 본 발명에 있어서, 상기 각 (a) 단계에서 배지는 에탐부톨 (ethambutol)이 추가로 첨가된 것일 수 있으며, 에탐부톨은 바람직하게 5 내지 100mg/L, 더욱 바람직하게 5 내지 50mg/L, 더더욱 바람직하게는 10 내지 25mg/L, 가장 바람직하게는 25mg/L의 농도로 포함될 수 있다.

[107] 본 발명에 있어서, 상기 배양은 재조합 미생물, 바람직하게 재조합 코리네박테리움 글루타믹쿰의 성장이 가능한 조건에서 특별한 제한 없이 이루어질 수 있으며, 바람직하게는 유가식 발효 공정으로 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[108] 본 발명에서 사용되는 용어, "유가식 발효"란 미생물의 배양방법 중 액체배양의 한 종류로서 기질의 공급방식에 따라 분류되는 유가식 배양방법이다. 구체적으로, 배지를 간헐적으로 공급하는 배양법으로써 배양액 중의 기질 농도를 임의로 제어할 수 있다. 기질은 적당한 속도로 첨가되며 유출이 없기 때문에 공급되는 기질의 양과 미생물에 의한 소비량 사이에 균형을 유지함으로써 기질을 자유롭게 제어할 수 있다. 본 발명에서, 상기 발효 공정은 30℃, 250 ~ 600rpm에서 수행되었고, 배양 종료시까지 pH 7.0이 유지되도록 하였으며, 공기 유입 속도와 최소 용존 산소는 각각 2vvm과 20% 공기 포화도로 유지하고 공기포화도 수준이 70%에 도달했을 때 배지가 공급되도록 하는 방법으로 수행되었으나, 구체적인 공정이 상기 조건으로 제한되는 것은 아니다.

[109] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 코프로포르피린 III (coproporphyrin III, CP III) 및 우로포르피린 III (uroporphyrin III, UP III)의 생산방법을 제공한다.

[110] (a) 상기 재조합 미생물을 배지에서 배양하여 코프로포르피린 III 및 우로포르피린 III를 생성시키는 단계; 및

[111] (b) 상기 생성된 코프로포르피린 III 및 우로포르피린 III를 추출 및 수득하는 단계.

[112] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 빌리버딘 (Biliverdin)의 생산방법을 제공한다.

[113] (a) 상기 재조합 미생물을 배지에서 배양하여 빌리버딘을 생성시키는 단계; 및

[114] (b) 상기 생성된 빌리버딘을 추출 및 수득하는 단계.

[115] 본 발명에 있어서, 상기 헴을 포함한 세포 내 포르피린의 추출은 각각

아세톤-산 처리 방법을 통해 수행될 수 있고, 바람직하게 상기 아세톤-산 처리 방법의 산은 염화수소 (HCl)일 수 있으며, 더욱 바람직하게 아세톤-산 처리방법은 99% 아세톤과 1.6M 염화수소 (HCl) 혼합물이 95 : 5 비율로 혼합된 혼합물일 수 있다.

[116]

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

[118]

[119] [실시예]

[120] 실시예 1. AlaS, DtxR, HemE, HemY, HemH, HemQ, HrtBA, HmuO, CcsA 유전자의 확보

[121] 본 발명의 실시예에서, AlaS 유전자는 로도박터 캡슐라투스 (*Rhodobacter capsulatus*)의 genomic DNA에서 확보하였고, DtxR, HemE, HemY, HemH, HemQ, HrtB, HrtA, HmuO 및 CcsA 유전자는 모두 코리네박테리움 글루타믹쿰 (*Corynebacterium glutamicum*)의 genomic DNA로부터 확보하였다. 또한, lacI에 의해 발현이 조절되고 고발현 tac 프로모터를 가지는 pMT-tac 또는 pEKEx2 벡터로 상기 각 유전자들을 클로닝하기 위하여, 벡터의 해당 제한효소 서열을 포함하는 정방향 및 역방향 프라이머를 각각 디자인하였으며, 합성된 프라이머를 이용하여 중합효소연쇄반응 (PCR)을 수행하였다. 상기 각 유전자에 특이적으로 합성된 프라이머 서열은 하기 표 1에 나타내었다.

[122] [표1]

프라이머	서열 (5'→3')	서열번호
alaS_F	ATAGTCGACAAGGAGATATAGATGGACTACAATCTCGCGC	17
alaS_R	ATAGGATCCTCAGGCAGAGGCC	18
dtxR_F	ATAGGATCCAAGGAGATATAGATGAAGGATCTGG	19
dtxR_R	ATAGAGCTCTTAGCCCTCAACCTTTTCTACG	20
hemE_F	AAAAGGTTGAGGGCTAAGAGCTAAGGAGATATAGATGTGGCTTCTTTTCCTAAATTGGGA	21
hemE_R	CGACGGCCAGTGAATTCGAGCTCTTAAGAATGAATGATGGAGACGGCT	22
hemY_F	ATAGGATCCATGCGTTTTGCCATCATCG	23
hemY_R	ATAGGTACCTTATCCCAGCAACCTGTGTAC	24
hemY_F2	TCACACAGGAGATATCATATCGATGCGTTTTGCCATCATCG	25
hemY_R2	ATTCATGTATATCTCCTTATCGTTATCCCAGCAACCTGTGTAC	26
hemH_F	CCCATCGATAAGGAGATATACATGAATGAACGCACATCGGATGC	27
hemH_R	AAAGGATCCCTAGTTGGCAGCTGGCGC	28
hemQ_F	CACGGATCCATGAGCGAGCTCGATATTAAACAGC	29
hemQ_R	CCAGCGGCCGCTTAAGGAAGAACCTTAATCAGATCTGCAATG	30
hrtB_F	TCTTCCTTAAGCGGCCAAGGAGATATACATGTTTCAAGGACTAAAAGAAC	31
hrtA_R	GCCAAAACAGGCGGCCGCTACAGGGTGTGGGGTGTGA	32
ccsA_F	TCTTCCTTAAGCGGCCAAGGAGATATACATGTTGCCCGTAAACCAAACG	33

ccsA_R	GCCAAAACAGGCGGCCGCTTAGTTCAGTCCGGCGTA	34
cmR_F	CACCCCACACCCTGTAGCGGCCGCCTGTTTTGGCGG	35
cmR_R	ACTAGGAGAAGTTAATAAATACAATTACGCCCCGCCCTGC	36
hmuO_F	GTTCTTCCTTAAGCGGCCAAGGAGATATACATGACAAGCATTATTGCAAGCAACA	37
hmuO_R	CCGCCAAAACAGGCGGCCGCTTAAGCAAGAGCCTGAAAAACTTGC	38

[123] PCR 수행 결과, 1230bp의 AlaS 유전자, 687bp의 DtxR 유전자, 1125bp의 HemE 유전자, 1347bp의 HemY 유전자, 1113bp의 HemH 유전자, 699bp의 HemQ 유전자, 1680bp의 HrtBA 유전자, 648bp의 HmuO 및 1026bp의 CcsA 유전자를 각각 확보하였다. 상기 각 유전자들이 암호화하는 단백질의 아미노산 서열은 서열번호 3 내지 12로 나타내었다.

[124]

[125] 실시예 2. 확보된 유전자 및 HemA, HemL을 각각 포함하는 재조합 벡터 및 재조합 미생물 제작

[126] 본 발명자들은 상기 실시예 1을 통해 확보된 유전자인 AlaS, DtxR, HemE, HemY, HemH, HemQ, HrtBA, HmuO 및 CcsA에 더하여 HemA 및 HemL 유전자를 단일 또는 조합으로 포함하는 재조합 벡터를 제조하고, 상기 벡터를 도입한 재조합 미생물을 제작하고자 하였다.

[127] 상기 각 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 구축하기 위한 목표 유전자, 벡터, 프라이머, 제한효소 부위 및 클로닝 방법은 하기 표 2에 정리하여 나타내었다.

[128] [표2]

타겟 벡터	도입 유전자	억셉터 벡터	프라이머	제한효소	클로닝 방법
pX2-S	*alaS*	pEKEx2	alaS_F	SalI	T4 DNA Ligation
pX2-ALS		pX2-AL	alaS_R	BamHI	
pX2-ALSDt	*dtxR*	pX2-ALS	dtxR_F	BamHI	T4 DNA Ligation
			dtxR_R	SacI	
pX2-ALSDtE	*hemE*	pX2-ALSDt	hemE_F	SacI	Gibson assembly
			hemE_FR		
pMTZ-Y	*hemY*	pMTZ	hemY_F	BamHI	T4 DNA Ligation
			hemY_R	KpnI	
pMTZ-H	*hemH*	pMTZ	hemH_F	ClaI	T4 DNA Ligation
			hemH_R	BamHI	
pMTZ-Q	*hemQ*	pMTZ and	hemQ_F	BamHI	T4 DNA Ligation
pMTZ-HQ		pMTZ-HQ	hemQ_R	NotI	
pMTZ-YHQ	*hemY*	pMTZ-HQ	hemY_F2	ClaI	Gibson assembly
			hemY_R2		
pMTC-YHQ	*CmR*	pMTZ-YHQ	cmR_F	NotI	T4 DNA Ligation
			cmR_R	SnaBI	
pMTZ-YHQ BA	*hrtBA*	pMTZ-YHQ	hrtB_F	NotI	Gibson assembly
			hrtB_R		
pMTZ-YHQc A	*ccsA*	pMTZ-YHQ	ccsA_F	NotI	Gibson assembly
			ccsA_R		
pMTC-YHQ BA	*CmR*	pMTZ-YHQ BA	cmR_F	NotI	T4 DNA Ligation
			cmR_R	SnaBI	
pMTC-YHQ O	*hmuO*	pMTC-YHQ	hmuO_F	NotI	T4 DNA Ligation
			hmuO_R	SnaBI	

pMTC-HrtBA	*hrtBA*	pMTC	hrtB_F		Gibson assembly
			hrtA_R		
pJYS2_empty	pJYS2 fragment 1		JYS2_F		Gibson assembly
			JYS2_R		
	pJYS2 fragment 2		JYS2_F2		
			JYS2_R2		
pJYS2_hrrS	crRNA	pJYS2_empty	hrrS_F	BamHI	Gibson assembly
	Of *hrrS*		hrrS_R		
pJYS2_htaA	crRNA	pJYS2_empty	htaA_F	BamHI	Gibson assembly
	Of *htaA*		htaA_R		
pJYS2_hmuT	crRNA	pJYS2_empty	hmuT_F	BamHI	Gibson assembly
	Of *hmuT*		hmuT_R		
pJYS2_hmuO	crRNA	pJYS2_empty	hmuO_F	BamHI	Gibson assembly
	Of *hmuO*		hmuO_R		
pJYS2_ldh	crRNA_	pJYS2_empty	ldh_F		Gibson assembly
	ldh		ldh_R		

[129] 상기 유전자 클로닝에서, 대장균의 배양은 5g/L 효모 추출물, 10g/L 트립톤 및 10g/L NaCl로 구성된 LB 배지를 사용하였다. 또한, 코리네박테리움 균주의 유전자 클로닝을 위한 배양은 3.7g/L BHI 배지, 9.1g/L 솔비톨 및 20g/L 글루코오스로 구성된 BHISG 배지에서 수행하였다. T4 DNA 라이게이션 (ligation)을 위해서는 적절한 제한효소 (New England Biolab)를 이용하여 삽입 DNA와 벡터 DNA를 절단한 다음, 혼합물 형태에서 T4 DNA ligase (Enzynomics)로 연결하였다. Gibson assembly는 삽입 DNA를 DpnI로 처리하고 벡터 DNA는 적절한 제한효소를 이용하여 절단한 후 혼합물 형태에서 Gibson assembly 키트 (New England Biolab)를 이용해 연결하였다. 재조합 벡터를 구축하기 위한 모든 실험은 제조업체의 지침에 따라 수행되었으며, 직접 제작하거나 공지된 본 실시예에서 사용된 모든 재조합 벡터를 하기 표 3에

정리하여 나타내었다. 이후 상기에서 구축된 재조합 벡터를 대장균 또는 코리네박테리움 글루타믹쿰으로 도입하여 균주를 형질전환시켰으며, 이를 통해 제조된 모든 재조합 미생물을 하기 표 4에 나타내었다.

[130] [표3]

재조합 벡터	특성	참조
pEKEx2	C. glutamicum-E. coli 셔틀 벡터 (shuttle vector), P_{tac}, lacI, Kan^R, pBL1 ori	(Ko et al., 2018)
pX2-AL	Salmonella typhimurium 유래 $hemA^M$ 유전자 및 E. coli 유래 hemL 유전자 전달용 pEKEx2	(Seok et al., 2019)
pX2-S	Rhodobacter capsulatus 유래 alaS 유전자 전달용 pEKEx2	-
pX2-ALS	$hemA^M$, hemL 및 alaS 유전자 전달용 pEKEx2	-
pX2-ALSDt	$hemA^M$, hemL, alaS 및 dtxR 유전자 전달용 pEKEx2	-
pX2-ALSDtE	$hemA^M$, hemL, alaS, dtxR 및 hemE 유전자 전달용 pEKEx2	-
pMTZ	C. glutamicum-E. coli 셔틀 벡터, P_{tac}, Amp^R, Zeo^R, pCG1 ori	(Seok et al., 2019)
pMTZ-Y	C. glutamicum 유래 hemY 유전자 전달용 pMTZ	-
pMTZ-H	C. glutamicum 유래 hemH 유전자 전달용 pMTZ	-
pMTZ-Q	C. glutamicum 유래 hemQ 유전자 전달용 pMTZ	-
pMTZ-HQ	C. glutamicum 유래 hemH 및 hemQ 유전자 전달용 pMTZ	-
pMTZ-YHQ	C. glutamicum 유래 hemY, hemH 및 hemQ 유전자 전달용 pMTZ	-
pMTZ-YHQBA	C. glutamicum 유래 hemY, hemH, hemQ, hrtB 및 hrtA 유전자 전달용 pMTZ	-
pMTZ-YHQcA	C. glutamicum 유래 hemY, hemH, hemQ 및 ccsA 유전자 전달용 pMTZ	-
pMTC	C. glutamicum-E. coli 셔틀 벡터, P_{tac}, Amp^R, CmR^R, pCG1 ori	-
pMTC-YHQBA	C. glutamicum 유래 hemY, hemH, hemQ, hrtB 및 hrtA 유전자 전달용 pMTC	-
pMTC-YHQO	C. glutamicum 유래 hemY, hemH, hemQ 및 hmuO 유전자 전달용 pMTC	-
pMTC-HrtBA	C. glutamicum 유래 hrtB 및 hrtA 유전자 전달용	-

	pMTC	
pJYS1Peftu	pBL1ts oriVC.glu. Knr pSC101 oriVE. coli PlacM-FnCpf1 Peftu-RecT	Addgene:85546
pJYS2_crtYf	rep oriVC.glu. Spr pMB1 oriVE. coli Pj23119-crRNA targeting crtYf This	Addgene:85544
pJYS2_empty	pJYS2_crtYf deleting the crRNA of the crtYf gene for pJYS2 derivatives	-
pJYS2_hrrS	hrrS 유전자에 대한 crRNA이 삽입된 pJYS2_empty	-
pJYS2_htaA	htaA 유전자에 대한 crRNA이 삽입된 pJYS2_empty	-
pJYS2_hmuT	hmuT 유전자에 대한 crRNA이 삽입된 pJYS2_empty	-
pJYS2_hmuO	hmuO 유전자에 대한 crRNA이 삽입된 pJYS2_empty	-
pJYS2_ldh	ldh 유전자에 대한 crRNA이 삽입된 pJYS2_empty	-

[131] [표4]

재조합 미생물	특성	참조
코리네박테리움 유래		
ATCC 13032	L-glutamate 생산 균주	KCTC 1445
ATCC 13826	L-glutamate 생산 균주	KCTC 3017
ATCC 13059	L-glutamate 생산 균주	KCTC 1447
ATCC 14067	L-glutamate 생산 균주	KCTC 1738
13032 AL	*C. glutamicum* ATCC 13032, pX2 *hemAL*	-
13826 AL	*C. glutamicum* ATCC 13826, pX2 *hemAL*	(Ko et al., 2018)
13059 AL	*C. glutamicum* ATCC 13059, pX2 *hemAL*	-
14067 AL (AL)	*C. glutamicum* ATCC 14067, pX2 *hemAL*	-
S	*C. glutamicum* ATCC 14067, pX2-S	-
ALS	*C. glutamicum* ATCC 14067, pX2-ALS	-
ALSdt	*C. glutamicum* ATCC 14067, pX2-ALSDt	-
ALSdtE	*C. glutamicum* ATCC 14067, pX2-ALSDtE	-
ALS-Y	pMTZ-Y가 도입된 ALS	-
ALS-H	pMTZ-H가 도입된 ALS	-
ALS-Q	pMTZ-Q가 도입된 ALS	-
ALS-HQ	pMTZ-HQ가 도입된 ALS	-
ALS-YHQ	pMTZ-YHQ가 도입된 ALS	-
ALSdtE	*C. glutamicum* ATCC 14067, pX2-ALSDt	-
ALSDt-Y	pMTZ-Y가 도입된 ALSDt	-
ALSDt-H	pMTZ-H가 도입된 ALSDt	-
ALSDt-Q	pMTZ-Q가 도입된 ALSDt	-
ALSDt-HQ	pMTZ-HQ가 도입된 ALSDt	-
ALSDt-YHQ	pMTZ-YHQ가 도입된 ALSDt	-

ALSDt-YHQBA	pMTZ-YHQBA가 도입된 ALSDt	-
ALSDt-YHQcA	pMTZ-YHQcA가 도입된 ALSDt	-
ALSdtE	*C. glutamicum* ATCC 14067, pX2-ALSDtE	-
ALSDtE-YHQBA	pMTZ-YHQBA가 도입된 ALSDtE	-
ALSDtE-YHQBA2	pMTC-YHQBA가 도입된 ALSDtE	-
ALSDtE-YHQO	pMTC-YHQO가 도입된 ALSDtE	-
ALSDtE-BA	pMTC-HrtBA가 도입된 ALSDtE	-
ΔS	ATCC14067의 *hrrS* 넉아웃 (knockout) 변이체	-
ΔSA	ΔS의 *htaA* 넉아웃 변이체	-
ΔSAT	ΔSA의 *hmuT* 넉아웃 변이체	-
ΔSATO	ΔSAT의 *hmuO* 넉아웃 변이체	-
ΔS:: ALSDt-YHQBA	pX2-ALSDt 및 pMTZ-YHQBA가 도입된 ΔS	-
ΔSA:: ALSDt-YHQBA	pX2-ALSDt 및 pMTZ-YHQBA가 도입된 ΔSA	-
ΔSAT:: ALSDt-YHQBA	pX2-ALSDt 및 pMTZ-YHQBA가 도입된 ΔSAT	-
ΔSAT:: ALSDtE-YHQBA	pX2-ALSDtE 및 pMTZ-YHQBA가 도입된 ΔSAT	-
ΔSAT:: ALSDtE-YHQBA(c)	pX2-ALSDtE 및 pMTC-YHQBA가 도입된 ΔSAT	-
ΔSATO:: ALSDtE-YHQBA	pX2-ALSDtE 및 pMTZ-YHQBA가 도입된 ΔSATO	-
ΔLdh	ATCC14067의 *ldh* 넉아웃 변이체	-
ΔLdh::ALSDtE	pX2-ALSDtE 및 pMTC가 도입된 ΔLdh	-
ΔLdh::ALSDtE-BA	pX2-ALSDtE 및 pMTC-HrtBA가 도입된 ΔLdh	-

[132] 실시예 3. CRISPR 기술을 이용한 재조합 미생물의 세포벽 단백질 및 헴 분해 단백질 발현 억제

[133] 본 발명자들은 CRISPR 기술을 이용하여 상기 실시예 2에서 제조된 재조합 미생물의 세포벽 단백질 및 헴 분해 단백질의 발현을 억제시키고자 하였다.

[134] 이를 위해, 표적 유전자의 crRNA-Spacer 서열을 합성하였으며, ssODNs

(single-stranded oligodeoxynucleotides) 합성을 위한 프라이머 정보는 상기 표 1에 나타내었다. 또한 CRISPR용 재조합 벡터를 구축하기 위한 목표 유전자 Spacer 서열, 벡터, 프라이머, 제한 효소 부위 및 클로닝 방법은 상기 표 2에서 확인할 수 있다. CRISPR 시스템을 도입하기 위한 pJYS1_Peftu 및 pJYS2_crtYf 벡터는 Addgene (미국)에서 구입하였고, CRISPR용 재조합 벡터의 구축 전에 상기 pJYS2_crtYf 벡터에서 crtYf 유전자의 Spacer 서열을 제거하였다. 구체적으로는 crtYf 유전자의 crRNA-Spacer 서열을 제외한 벡터 서열을 두개의 PCR 단편으로 확보한 후 Gibson assembly를 통해 연결하여 pJYS2_empty 벡터를 생성하였다. 상기 방법으로 구축된 모든 재조합 벡터는 상기 표 3에 나타내었다.

[135] 한편, HrrS, HtaA, HmuT, HmuO 및 Ldh 유전자의 crRNA-Spacer 서열 및 PAM 부위는 CRISPR RGEN tool Cas-Designer (http://www.rgenome.net/cas-designer/)를 이용해 설계하였으며, 사용된 CRISPR 기술용 프라이머 정보를 하기 표 5에 나타내었다. 또한 HrrS, HtaA, HmuT, Ldh 유전자가 암호화하는 단백질의 아미노산 서열은 서열번호 13 내지 16으로 나타내었다.

[136] [표5]

프라이머	서열 (5'→3')	서열번호
crRNA		
hrrS_F	CTAGGTATAATGGATCGAATTTCTACTGTTGTAGATACAGCCTCGCTG	39
hrrS_R	TTTATTTAAATGGATCCCCACAACCAGCAGCGAGGCTGTATCTACAA	40
htaA_F	CTAGGTATAATGGATCGAATTTCTACTGTTGTAGATGGCAATCGTTCC	41
htaA_R	TTTATTTAAATGGATCGATGTAATTGCGGAACGATTGCCATCTACAAC	42
hmuT_F	CTAGGTATAATGGATCGAATTTCTACTGTTGTAGATGACGCACCCTTA	43
hmuT_R	TTTATTTAAATGGATCGACTACGGATGTAAGGGTGCGTCATCTACAAC	44
hmuO_F	CTAGGTATAATGGATCGAATTTCTACTGTTGTAGATTGAATGATCTGC	45
hmuO_R	TTTATTTAAATGGATCCTTCCCGGTGAGCAGATCATTCAATCTACAAC	46
ldh_F	CTAGGTATAATGGATCGAATTTCTACTGTTGTAGATGGCTGCGCCGGC	47
ldh_R	TTTATTTAAATGGATCTTGTCATTTGTGCCGGCGCAGCCATCTACAAC	48
Lagging strand		
Lagging_hrrS	CGGAAGCACCCAGCCCCACAACCAGCAGCTAGGCTGTCAAAATGTGGATACTGTTGCGA	49
Lagging_htaA	GCCACGCCGGTTTGGATGTAATTGCGGAATTATTGCCTAAATCCCCAGTTCAGGGAGCC	50
Lagging_hmuT	AGGCCAAGCTAGCGGCGAGGACTACGGATTAAAGGGTGCGTCGAAAAGCGTTATTCATG	51
Lagging_hmuO	ATGCCTGCGCATCGAGCTTCCCGGTGAGCTAATCATTCATAAACGTTGAGTGCTCGGCC	52

Lagging_ldh 1	ACGCAGCCATGGTTGTCATTTGTGCCGGCTAAGCCC AAAAGCCAGGCGAGACCCGCCTC	53
Lagging_ldh 2	ATGGTTGTCATTTGTGCCGGCGCAGCCCAGTAGCC AGGCGAGACCCGCCTCCAGCTGGT	54
Lagging_ldh 3	ACGCAGCCATGGTTGTCATATGAGCAGGATAAGCC CACAAGCCAGGCGAGACCCGCCTC	55
Sequencing		
hrrS_seq1	ATGCAGTCAAGCCTAGATCG	56
hrrS_seq2	CGTTGACGTTCCGCAGCAAT	57
htaA_seq1	ATGAAACTTGCACCTCGTATGCGGA	58
htaA_seq2	GCAACCAAATCCACAACTAGCTGCG	59
hmuT_seq1	CCCGCTAACCAAAACAGCCAGTTCC	60
hmuT_seq2	CCATCAGCATCCGTCAAAGACACAG	61
hmuO_seq1	ATGACAAGCATTATTGCAAGCAACA	62
hmuO_seq2	GGACATAGTGATGAGCAACCAAACG	63
pJYS2_seq_ F	CACGCTGTCGGCAGAGAA	64
pJYS2_seq_ R	TCACACCGCATATGAAGCTTAAGAGTTTGTAGAAA CG	65
pJYS1_seq_ F	GAGATCCTGTCCTCCGTGTG	66
pJYS1_seq_ R	GGTCCTTCTTGATCTGCTCG	67
ldhseq1	GCAACAATGACGGCGAGA	68
ldhseq2	GGAGCTTTCGCAGGTGAA	69
etc.		
JYS2_F	TAATGGATCCATTTAAATAAAACGAAAGGC	70
JYS2_R	GGCAAATAGGCAGGATTGAT	71
JYS2_F2	TTATTTAAATGGATCCATTATACCTAGGACTG	72
JYS2_R2	ATCAATCCTGCCTATTTGCC	73

[137] CRISPR 기술을 이용한 유전체 편집은 공지된 방법을 참고하여 하기 과정에 따라 수행하였다. 구체적으로, 극저온 (-80℃)에서 보관한 Competent 상태의

코리네박테리움 균주를 10분 동안 천천히 해동시켰다. 이어서 pJYS1_eftu (1㎍ 이상), pJYS2_목표 유전자 (1㎍ 이상) 및 ssODNs (9㎍ 이상)를 80㎕의 Competent 세포에 주입하였다. 이후 20분 동안 얼음에서 대기한 다음, 세포를 미리 냉각된 0.2cm 큐벳 (Bio-Rad, USA)으로 옮기고, 2.5kV의 전압과 200Ω의 저항값으로 전기천공법을 수행하였다. 이후 세포가 들어있는 큐벳에 솔비톨과 글루코오스가 함유된 BHI (Brain-heart infusion) 배지 (BHISG) 1ml를 즉시 넣은 후 46℃에서 6분 동안 열 충격 처리를 하였다. 이어서 30℃에서 2-3시간 동안 세포를 회복시킨 후, 카나마이신 (25mg/L)과 스펙티노마이신 (200mg/L)이 함유된 BHISG 배지 한천 플레이트에 접종하고 30℃에서 2-3일 동안 배양하였다.

[138] 이후 재조합 미생물의 유전자 편집 여부를 확인하기 위해 다음과 같이 colony PCR을 수행하였다. 이를 위해, 한 개의 콜로니를 확보한 후 상기 표 5에 기재된 시퀀싱 (Sequencing) 프라이머를 이용해 PCR을 수행하여 게놈 상의 유전자를 확보하였다. PCR 산물의 염기서열은 코스모젠텍이나 마크로젠사에 분석을 의뢰하여 유전자 편집 여부를 확인하였으며, 그 결과 각 재조합 미생물에서 목표 유전자의 편집 효율을 하기 표 6에 나타내었다.

[139] [표6]

표적 유전자	표적 균주	crRNA	Lagging strand		Colony Forming Unit	편집효율
			크기 (bp)	DNA (ug)		
hrrS	WT	crRNA_hrrS	59	9.05	2.28×10^3	8/8
htaA	WT	crRNA_htaA	59	9.05	2.31×10^3	4/4
htaA	S	crRNA_htaA	59	9.05	2.25×10^2	2/2
hmuT	WT	crRNA_hmuT	59	12.6	6.09×10^3	2/2
hmuT	SA	crRNA_hmuT	59	12.6	1.15×10^4	2/2
hmuO	SAT	crRNA_hmuO	59	9.05	4.75×10^2	0/8
hmuO	SAT	crRNA_hmuO	59	18.13	2.75×10^2	2/5
hmuO	SAT	crRNA_hmuO	59	45.33	2.0×10^2	2/5
hmuO	SAT	crRNA_hmuO	59	90.66	1.25×10^2	3/3
ldh	WT	crRNA_ldh1	1	59	1.30×10^2	0/20
ldh	WT	crRNA_ldh2	2	59	6.25 x 10	0/20
ldh	WT	crRNA_ldh3	3	59	3.75 x 10	2/3

[140] 이어서 CRISPR용 재조합 벡터가 제거된 균주를 얻기 위해 플라스미드 제거(Curing)를 하기 3단계로 수행하였다. 1단계, 콜로니를 5ml의 BHISG가 들어있는 50ml 튜브에 접종하고 37℃에서 24시간 이상 배양하였다. 2단계, 상기 세포 배양액 일부를 BHISG 배지 한천 플레이트에 스트리킹하고 37℃에서 24시간 이상 배양하였다. 3단계, 상기 1단계를 반복 수행할 경우 재조합 벡터가 모두 완전히 제거되었다.

[141]

[142] 실시예 4. 재조합 코리네박테리움의 헴, 코프로포르피린 III, 우로포르피린 III, 아연-코프로포르피린 III, 아연-우로포르피린 III 및 빌리버딘의 생산을 위한 배양 및 분석방법

[143]

[144] 4-1. 배지 및 배양방법

[145] 목적 산물의 생산을 위한 본 배양은 42g/L 3-morpholinopropanesulfonic acid (MOPS), 40g/L 포도당, 20g/L $(NH_4)_2SO_4$, 5g/L 요소, 2g/L 효모 추출물, 1g/L KH_2PO_4, 1g/L K_2HPO_4, 250mg/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 10mg/L $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 10mg/L $CaCl_2$, 1mg/L $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.31mg/L $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 200μg/L 비오틴, 100μg/L $MnSO_4 \cdot H_2O$ 및 20μg/L $NiCl_2 \cdot 6H_2O$이 포함된 변형된 CGXII 배지 (mCGXII 배지)에서 수행되었다. 단, 빌리버딘 생산을 위한 본 배양 시에는 나머지 조성은 동일하되 효모 추출물을 첨가하지 않은 CGXII 배지를 이용하였다.

[146] 또한, 질소 공급원의 최적화를 위해 하기와 같은 배지들을 테스트하였다. mCGXII-Y10 배지는 mCGXII 배지에 8g/L 효모 추출물을 첨가하여 제조하였다. mCGXII-AS, mCGXII-AC, mCGXII-Tr 및 mCGXII-Ca는 각각 mCGXII-Y10 배지에 10g/L $(NH_4)_2SO_4$, NH_4Cl, 트립톤 및 카제인가수분해물을 첨가하여 제조하였다. 유가식 발효를 위해, mCGXII 배지 및 mCGXII-Tr 배지에서는 42g/L MOPS를 제외하였다. 카나마이신 (25mg/L), 암피실린 (대장균의 경우 50mg/L), 클로람페니콜 (대장균의 경우 33mg/L, 코리네박테리움 글루타믹쿰의 경우 5mg/L), 스펙티노마이신 (대장균의 경우 50mg/L, 코리네박테리움 글루타믹쿰의 경우 200mg/L) 및/또는 제오신 (25mg/L)을 경우에 따라 배지에 첨가하였다. 또한 이소프로필 β-D-1-티오갈락토피라노사이드 (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside, IPTG) (1mM) 및 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (20mg/L)를 플라스크 배양 8시간 및 12시간에 각각 첨가하고 유가식 발효를 진행하였다. 필요한 경우 10mg/L 에탐부톨 (ethambutol)을 첨가하였다. 유가식 발효를 위한 유입 용액 (Feeding solution)은 500g/L 글루코오스, 10g/L $(NH_4)_2SO_4$, 10g/L 효모 추출물, 2g/L KH_2PO_4 및 2g/L K_2HPO_4로 구성되었다. 아연-포르피린 생산을 위한 에탐부톨 농도 최적화 실험은 5mg/L, 25mg/L, 50mg/L, 100mg/L의 에탐부톨이 첨가된 mCGXII-Tr 배지에서 수행하였다.

[147] 플라스크 배양은 하기 과정에 따라 수행되었다. 구체적으로, 극저온에서 보관된 모든 야생형 및 재조합 코리네박테리움을 BHISG 한천 플레이트에 스트리킹하고 30℃에서 24시간 동안 배양하였다. 이후 한 개의 콜로니를 20mL의 BHISG 배지에 접종하고 30℃, 200rpm에서 16시간 동안 전배양하였다. 전배양된 세포를 50mL의 mCGXII 배지 또는 질소 공급원 최적화 배지 (mCGXII-Y10, mCGXII-AS, mCGXII-AC, mCGXII-Tr 및 mCGXII-Ca 배지)가 포함된 250mL 진탕 플라스크 (baffled flask)에 광학밀도 (Optical density, OD) 600 파장값 1의 농도로 접종하였다. 이후 30℃, 200rpm에서 48시간 동안 진탕 배양하여 본 배양을 진행하였다. 아연-코프로포르피린 III와 아연-우로포르피린 III 생산을 위한 배양 실험은 mCGXII-Tr 배지로 수행하였으며 이외 조건은 상기 조건과 동일하게 수행하였다.

[148] 유가식 발효는 하기와 같이 수행되었다. 극저온에서 보관된 모든 야생형 및 재조합 코리네박테리움을 BHISG 한천 플레이트에 스트리킹하고 30℃에서

24시간 동안 배양하였다. 이후 한 개의 콜로니를 20mL의 BHISG 배지에 접종하고 30℃, 200rpm에서 16시간 동안 전배양하였다. 첫 번째로 전 배양된 세포는 200mL의 BHISG 배지를 포함하는 1000mL 진탕 플라스크에 접종하여 30℃, 200rpm에서 16시간 동안 전배양하였고, 두 번째로 전배양된 세포는 2L mCGXII 배지 또는 mCGXII-Tr 배지를 함유하는 6L 발효기에 광학밀도 600 파장값 2의 농도로 접종하였다. 발효는 30℃, 250~600rpm 조건에서 수행되었으며, 28% NH_4OH와 6M H_2SO_4를 사용하여 pH 7.0 조건을 배양 종료 시까지 유지하였다. 공기 유입 속도와 최소 용존 산소는 각각 2vvm과 20% 공기 포화도로 유지되도록 하였고, 생성된 거품은 Antifoam 204 (Sigma-Aldrich)를 사용하여 제거하였다. 유입 용액은 공기포화도 수준이 70%에 도달했을 때 자동 공급되었다. 아연-코프로포르피린 III와 아연-우로포르피린 III 생산을 위한 유가식 발효 실험은 mCGXII-Tr 배지로 수행하였으며 이외 조건은 상기 조건과 동일하게 수행하였다.

[149]

[150] 4-2. 세포 성장 및 헴, 아연-코프로포르피린 III, 아연-우로포르피린 III 및 빌리버딘의 생산 분석

[151] 세포 성장은 UV-vis 분광 광도계 (Mecasys Co., Ltd.)를 사용하여 광학밀도 600 파장값에서 측정하였고, 글루코오스 농도는 제조사의 지침에 따라 포도당 분석 키트 (Sigma-Aldrich)를 사용하여 측정하였다.

[152] 세포 내 헴, 코프로포르피린 III, 우로포르피린 III, 아연-코프로포르피린 III, 아연-우로포르피린 III 및 빌리버딘 측정을 위한 전처리과정은 하기 과정에 따라 수행되었다. 구체적으로, 배양액 1mL을 13000rpm에서 2분 동안 원심분리하고 상층액을 분리하여 세포만을 확보한 후 세포 펠렛에 산성 아세톤 완충액 1mL(99% 아세톤 : 1.6M HCl = 95 : 5 비율)을 첨가하여 세포 내 포르피린을 추출하였다. 이어서 상기 샘플을 약 30초 동안 볼텍싱 (Vortexing)한 다음, 13000rpm에서 2분 동안 원심분리하였다. 세포 추출에서 얻은 상층액은 1:1 비율로 0.1N NaOH와 혼합하여 중화하였다. 세포 외 헴, 아연-코프로포르피린 III, 아연-우로포르피린 III 측정은 세포 배양액의 상층액을 0.1N NaOH와 1:1 비율로 혼합한 후 측정하였다.

[153] 헴, 코프로포르피린 III, 우로포르피린 III, 아연-코프로포르피린 III, 아연-우로포르피린 III 및 빌리버딘의 정량 분석은 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC) 시스템 (Waters Corporation)을 이용하여 실시하였다. 세포 내 아미노산 농도 측정을 위해 Fastprep 24 (MP biomedicals, USA)를 사용한 Bead beating으로 세포 펠렛을 파쇄되었다. 상등액 및 추출된 세포 내부 샘플은 AccQ-Tag 아미노산 분석 키트 (Waters)를 이용해 제조사의 프로토콜에 따라 유도체화 한 후 HPLC 시스템으로 분석하였다.

[154]

[155] 4-3. mRNA 발현수준 분석

[156] 재조합 코리네박테리움 균주의 mRNA 발현수준은 하기 과정에 따라 수행하였다. ALS, ALS-H 및 ALSdt-H 재조합 코리네박테리움의 mRNA 발현 수준을 확인하기 위해 상기 실시예 4의 플라스크 배양과 동일한 조건으로 실험을 진행하였고, 16시간 배양 후 샘플을 회수하였다. 총 RNA는 Hybrid-R prep kit (GeneAll)를 이용하여 제조업체의 지침에 따라 추출하였으며, 상기 추출된 RNA에 대하여 M-MLV 역전사 효소 (Bioneer)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 cDNA를 합성하였다. 상기 합성된 cDNA에 대하여 제조업체의 지침에 따라 HiPi Real-Time PCR 2x Master Mix (SYBR green)를 이용해 CFX connect Real-Time PCR (Bio-Rad) 기기를 이용하여 mRNA 수준을 측정하였으며, ΔΔCt 방법으로 상대적 mRNA 수준을 분석하였다. 이때, 16S rRNA를 내부 표준 물질로 사용하였다. 본 mRNA 발현 분석에 사용된 모든 프라이머는 서열 정보는 하기 표 7에 나타내었다.

[157] [표7]

프라이머	Sequence (5'→3')	서열번호
RT hemA F	GGAATACGATCAGCGAGCTT	74
RT hemA R	CTCGTGGCATGGACAAATCC	75
RT hemB F	CGATGACCTGCTGATTATGG	76
RT hemB R	GCCTGAGCAACAGCCATCTG	77
RT hemC F	GATGCTGTGATGCTCGCCTA	78
RT hemC R	GCGGACGGTTTCAGTGTCGT	79
RT hemD F	CGTGAAGTTCTGGGCAACGC	80
RT hemD R	CTTCGCTTCAATGCAGATGC	81
RT hemE F	GTTGCCTGAGTACAAGAAGG	82
RT hemE R	CAACGGCACCACAATGTCAG	83
RT hemH F	CCTTGACCTGTGTGGAATAC	84
RT hemH R	TTGGTTCAGGATTCCTACGC	85
RT hemL F	GCGGTTACACTCAGCGTTCC	86
RT hemL R	TAGTGTCAGAAGTCTGAGCG	87
RT hemQ F	GCACAGTGTTGGCACGAACA	88
RT hemQ R	TGGGTGAAGAAGCAAAGGAC	89
RT hemY F	AGGTGGAGTGATGGGTATTC	90
RT hemY R	GCGAAGACACCACAGTATCG	91
RT sdhA F	ACCACATGAACCTGGTCTCC	92
RT sdhA R	TGGTAGGTGAACGCCTTGAC	93
RT sdhB F	GAGCTGCTTGACCACGTAAA	94
RT sdhB R	CAGGCTTATTCTGGTCAGCG	95
RT sdhC F	GGTGGCTTCGTTCTTGTTCA	96
RT sdhC R	TCCGATCTCACGCAGGAACT	97
RT narG F	CCAGCAGATTTTCCTTCAGG	98
RT narG R	CATACACTTTCCACGAGCAG	99
RT narH F	ATAAATGGGAAGGCGGTTGG	100
RT narH R	CACGGCTCGTAGTAATCATC	101
RT narK F	GGATTTGATCTCTCAGCAGG	102

RT narK R	GACCAATTTGCGGGTTCCAA	103
RT sufB F	AACTATGGTTGGCACGACTC	104
RT sufB R	GCTGCTGAAGCATCCATTCT	105
RT sufD F	ATTTCCCTACGCCGTCTTCG	106
RT sufD R	CAGTCGAGCATCGTCCTTTG	107
RT acn F	CATGGAGAAGCTGCCGTACT	108
RT acn R	GGTGAACTGGATTTCGATGC	109

[158] 실시예 5. 헴 합성 경로 관련 유전자가 도입된 재조합 코리네박테리움 균주의 헴, 코프로포르피린 III 및 우로포르피린 III의 생산 수준 측정 및 분석

[159] 본 발명자들은 본 실시예에서 확보한 재조합 코리네박테리움 균주들의 헴, 코프로포르피린 III 및 우로포르피린 III의 생산량을 측정 및 비교 분석하기 위해, 먼저 야생형 코리네박테리움 글루타믹쿰 (WT), S (*alaS* 유전자 도입), AL (*hemA* 및 *hemL* 유전자 도입) 및 ALS (*hemA*, *hemL* 및 *alaS* 유전자 도입) 재조합 균주에서 헴 생산 수준을 측정하였다.

[160] 그 결과, 도 1에 나타낸 바와 같이 야생형 균주와 비교할 때 상기 3 종류의 재조합 균주에서 전구물질인 글루탐산 (Glutamate)과 글리신 (Glycine)의 소모와 함께 헴 (Heme) 생산 및 중간물질인 5-아미노레불린산 (ALA), 코프로포르피린 III (CP III), 우로포르피린 III (UP III)의 생산이 증가하는 것으로 나타났다. 더욱이, 그중에서도 C4 경로와 C5 경로를 통합한 ALS 재조합 균주에서 5-아미노레불린산의 생산이 현저히 증가하였으며, 헴 및 다른 전구물질들도 가장 높은 수준으로 생산이 증가하는 것을 확인하였다.

[161] 상기 결과에 근거하여, 본 발명자들은 ALS 재조합 균주에 코프로포르피린 III 의존성 경로에 관여하는 코프로포르피리노겐 III 산화효소 (HemY), 코프로포르피린 III 페로킬라테이즈 (HemH) 및 과산화수소 의존성 헴 합성효소 (HemQ)를 각각 암호화하는 유전자 및 디프테리아 톡신 리프레서 (DtxR)를 암호화하는 유전자를 단일 또는 조합하여 추가적으로 도입한 하기 재조합 균주들에서 헴, 코프로포르피린 III 및 우로포르피린 III의 생산 수준을 측정하고자 하였다.

[162] 먼저, ALS 재조합 균주에 *hemY*, *hemH* 및 *hemQ* 유전자를 각각 또는 조합하여 도입한 재조합 균주 (ALS-Y, ALS-H, ALS-Q, ALS-HQ 및 ALS-YHQ)에서 상기 물질들의 생산을 측정하였다. 그 결과, 도 2a에서 볼 수 있는 바와 같이 ALS-Q 재조합 균주의 경우에만 ALS 균주 보다 약간 증가된 헴 (Heme) 생산을 나타내었을뿐, 다른 재조합 균주들에서는 헴 생산 및 전구물질인 코프로포르피린 III (CP III), 우로포르피린 III (UP III)의 생산이 감소하였다.

[163] 다음으로, 상기 재조합 균주들에서 *dtxR* 유전자가 함께 도입된 균주 (ALS-dtY, ALSdt-H, ALSdt-Q, ALSdt-HQ 및 ALSdt-YHQ)의 생산능력을 분석하였다. 그

결과, 도 2b에서 볼 수 있는 바와 같이 HemY, HemH 및 HemQ가 동시에 과발현과 함께 DtxR의 과발현이 성공적으로 헴 생산을 증가시키는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 도 2c의 mRNA 발현 수준 측정 결과를 통해, 디프테리아 톡신 리프레서가 헴 생산 과정 중 발생하는 저해 요소를 해소해주는 것을 알 수 있었다.

[164]

[165] 실시예 6. 세포벽이 개량된 재조합 코리네박테리움 균주의 헴, 코프로포르피린 III 및 우로포르피린 III의 생산 및 외분비 수준 측정 및 분석

[166] 본 발명자들은 상기 재조합 코리네박테리움 균주에서 헴 생산량이 현저히 증가되는 것을 확인하였는바, 헴이 세포 외부로도 높은 수준으로 분비되는지를 검증하고자 하였다. 이를 위해 하기 방법에 따라 코리네박테리움 균주에서 세포벽에 대한 헴 결합 테스트를 수행하였다.

[167] 구체적으로, 극저온에서 보관된 각 코리네박테리움 균주를 BHISG 한천 플레이트에 스트리킹하고 30℃에서 24시간 동안 배양하였다. 이후 한 개의 콜로니를 20mL BHISG 배지 또는 10mg/L의 에탐부톨이 보충된 20mL의 BHISG 배지에 접종하고 30℃, 200rpm에서 16시간 동안 전 배양하였다. 이후 전 배양된 세포를 1mL의 mCGXII 배지를 포함하는 1.5mL 튜브에 광학밀도 600 파장값 5의 농도로 접종하였다. 접종 즉시 10mg/L 헤민 (hemin)을 튜브에 넣고 10초 동안 볼텍싱하여 혼합한 후 세포를 13000rpm에서 2분 동안 원심분리하였다. 상등액과 세포 펠렛은 앞서 언급한 전처리 방법과 동일한 방식으로 수행한 후 HPLC로 분석하여 헤민의 소재를 확인하였다. 그 결과, 하기 표 8에서 볼 수 있는 바와 야생형 코리네박테리움 균주의 경우 세포 내에서 생성되어 외부로 분비되는 헴의 86.91%가 세포벽에 결합하는 것을 확인하였다.

[168] 이에 본 발명자들은 도 3a에 도시된 바와 같이 코리네박테리움 균주의 세포벽 단백질과 헴의 결합을 저해하고자 하였으며, 이를 위해 상기 실시예 3에 기재된 바에 따라 ΔS (*hrrS* 유전자넉아웃), ΔSA (*hrrS* 및 *htaA* 유전자 넉아웃), 및 ΔSAT (*hrrS*, htaA 및 hmuT 유전자 넉아웃) 재조합 균주를 제조하고, 상기 방법과 동일하게 상기 재조합 균주들에서 헴의 세포벽 결합율을 측정하였다. 그 결과, 하기 표 8에서 볼 수 있는 바와 같이 ΔSAT 재조합 코리네박테리움 균주에서 헴의 세포벽 결합율이 가장 낮게 측정되었으며, 더욱이 배지에 에탐부톨을 첨가한 후 배양하였을 때 상기 결합율이 현저히 감소하는 것을 확인하였다.

[169] [표8]

균주	DCW (g l^{-1})	세포벽 결합 헴 (mg g_{DCW}^{-1})	결합/비결합 비율[a] (%)
WT	1.71	4.28 ± 0.05	86.91
ΔS	1.58	4.22 ± 0.20	83.45
ΔSA	1.51	3.93 ± 0.29	75.26
ΔSAT	1.49	3.41 ± 0.35	72.51
WT (ETB)	1.48	3.27 ± 0.12	44.89
ΔSAT (ETB)	1.45	2.70 ± 0.12	36.83

[170] [a] 세포벽 결합/비결합 비율: [세포벽 결합 헴]/[세포벽 결합 헴 + 비결합 헴] x 100

[171] 상기 결과에 근거하여, 본 발명자들은 상기 실시예 5에서 헴 생산을 가장 성공적으로 증가시킨 ALSdt-YHQ 재조합 균주를 기준으로 하여 헴 외분비 단백질인 HrtBA를 과발현하도록 형질전환된 ALSdt-YHQBA (ALSdt-YHQ 균주에 hrtBA 도입) 균주에서 헴의 외분비 (secreted heme) 수준을 분석하였다. 그 결과, 도 3b에 나타낸 바와 같이 HrtBA의 과발현에 의해 헴의 외분비가 증가하였으며, 에탐부톨이 포함된 배지에서 배양한 경우 헴의 세포외 생산이 더욱 증가한 것으로 나타났다. 이에 더하여, 상기 ALSdt-YHQBA 재조합 균주에 세포벽 단백질 발현을 함께 저해시킨 재조합 균주 (ΔS::ALSdt-YHQBA, ΔSA::ALSdt-YHQBA 및 ΔSAT::ALSdt-YHQBA)의 경우 헴의 세포 외분비가 더욱 증가하였고, 역시 에탐부톨이 포함된 배지에서 그 수준이 더 증진되는 것을 확인하였다.

[172] 한편, 특이하게도 도 4에서 볼 수 있는 바와 같이 헴 외분비 단백질을 과발현시킨 재조합 균주를 에탐부톨 첨가 하에 배양한 경우, 헴 외분비 증대와 함께 우로포르피린 III의 외분비 증대가 확인되었다. 이러한 결과를 개선하기 위해, 본 발명자들은 ΔSAT::ALSdt-YHQBA 재조합 균주에 추가로 hemE 유전자를 도입하여 우로포르피리노겐 III 디카복실레이즈 (HemE)를 과발현하는 재조합 균주 (ΔSAT::ALSdtE-YHQBA)를 제조하였고, 상기 재조합 균주의 경우 도 3b에서 볼 수 있는 바와 같이 에탐부톨 첨가 하에 배양 시 우로포르피리노겐 III의 외분비가 거의 증대되지 않으면서 가장 높은 헴의 세포외 생산능을 갖는 것을 확인하였다.

[173]

[174] 실시예 7. 재조합 코리네박테리움 균주의 배양 조건 최적화

[175] 먼저, 본 발명자들은 상기 실시예 6의 결과에서 확인된 헴의 세포외 생산능이 가장 높은 ΔSAT::ALSDtE_YHQBA 균주를 이용하여, 헴 생산을 가장 효율적으로 높일 수 있는 최적의 배지 내 질소 공급원을 테스트하고자 하였다. 이를 위해

상기 실시예 4에 기재된 바와 같이 mCGXII 배지에 효모 추출물을 첨가한 mCGXII-Y10 배지 및 상기 mCGXII-Y10에 각각 $(NH_4)_2SO_4$, NH_4Cl, 트립톤 및 카제인가수분해물을 첨가한 mCGXII-AS, mCGXII-AC, mCGXII-Tr 및 mCGXII-Ca 배지를 이용하여 상기 ΔSAT::ALSDtE_YHQBA 균주와 ΔSAT::ALSDtE_YHQBA2 균주 (클로람페니콜 항생제 저항성 ΔSAT::ALSDtE_YHQBA 균주)를 배양하였다. 그 결과, 도 5에서 볼 수 있는 바와 같이 mCGXII-Tr 배지 조건에서 배양한 경우 상기 재조합 균주에 의한 헴 생산이 가장 높게 측정되었다. 따라서 상기 결과를 통해 트립톤이 본 발명에 따른 재조합 균주의 헴 생산능을 높일 수 있는 가장 최적의 질소원임을 알 수 있었다.

[176] 나아가 본 발명자들은 각각 mCGXII 배지, mCGXII에 에탐부톨이 첨가된 배지 (mCGXII + ETB), mCGXII-Tr 배지를 이용하여 ΔSAT::ALSDtE_YHQBA 균주와 ΔSAT::ALSDtE_YHQBA2 균주를 48시간 동안 유가식 배양을 진행하면서 글루코오스 (Glucose) 소비, 균주 성장 (Cell growth), 헴 외분비 및 총 헴 생산량을 배양 시간에 따라 측정하였다. 그 결과, 도 6에 나타낸 바와 같이 ΔSAT::ALSDtE_YHQBA2 균주를 mCGXII-Tr 배지에서 유가식 발효시킨 경우 각각 mCGXII 배지 및 mCGXII에 에탐부톨이 첨가된 배지에서 유가식 발효시킨 경우 보다 더 높은 헴 생산량이 달성되었으며, 더욱이 가장 높은 헴의 세포외 생산량을 확인하였다.

[177] 이에 더하여, 본 발명자들은 추가적으로 생성된 헴의 분해를 억제하기 위해 상기 재조합 균주에서 추가적으로 hmuO 유전자를 넉아웃시켜 HmuO 단백질의 발현이 억제된 ΔSATO::ALSDtE-YHQBA 균주를 제조하고 ΔSAT::ALSDtE_YHQBA 균주와 각각 플라스크 배양한 후 헴 생산 수준을 측정하였다. 그 결과, 도 7에서 볼 수 있는 바와 같이 hmuO 유전자가 함께 넉아웃된 ΔSATO::ALSDtE_YHQBA 균주의 경우 총 헴 생산량 및 세포 성장이 모두 크게 감소하는 것으로 나타났다. 이를 통해 HmuO 단백질의 발현 억제는 헴 생산과 세포 성장에 부정적인 영향을 미치는 것을 알 수 있었다.

[178]

[179] <u>실시예 8. 재조합 코리네박테리움 균주의 아연-코프로포르피린 III 및 아연-우로포르피린 III 생산 측정 및 분석</u>

[180] 다음으로, 본 발명자들은 아연-코프로포르피린 III와 아연-우로포르피린 III 생산능이 증대된 재조합 코리네박테리움 균주를 얻고자 하였다. 이를 위해, ALSDtE 재조합 균주 및 상기 균주에서 포르피린의 생산량을 증가시키기 위하여 L-젖산 탈수소효소 (L-lactate dehydrogenase)를 암호화하는 ldh 유전자를 넉아웃시킨 ΔLdh::ALSdtE 균주 및 헴 외분비 단백질인 HrtBA의 발현을 증가시킨 ALSdtE-BA 균주를 mCGXY10-Tr 배지에서 각각 플라스크 배양하고 아연-코프로포르피린 III (Zn-CP III)와 아연-우로포르피린 III (Zn-UP III)의 생산 및 외분비량을 측정하였다.

[181] 그 결과, 도 8에 나타낸 바와 같이 ALSDtE 균주를 배양한 경우

아연-코프로포르피린 III와 아연-우로포르피린 III의 생산량이 가장 높은 것으로 나타났으며, ΔLdh::ALSdtE 및 ALSdtE-BA 균주에서 아연-코프로포르피린 III 및 아연-우로포르피린 III의 생산과 외분비가 증가하지 않은 것을 확인하였다.

[182] 나아가 상기 ALSDtE 균주에서 아연-코프로포르피린 III 및 아연-우로포르피린 III의 생산 및 분비를 효과적으로 높일 수 있는 에탐부톨의 최적 농도를 선정하고자 하였다. 이를 위해, mCGXII-Tr 배지에 에탐부톨을 다양한 농도 (5, 25, 50, 100mg/L)로 첨가하여 배양한 후 아연-코프로포르피린 III와 아연-우로포르피린 III의 생산량을 측정하였다. 그 결과, 도 9에 나타낸 바와 같이 에탐부톨을 25mg/L 농도로 첨가하여 배양한 경우 가장 높은 아연-코프로포르피린 III와 아연-우로포르피린 III 생산량을 확인하였다. 또한, 도 10에서 볼 수 있는 바와 같이 ALSDtE 균주를 mCGXII-Tr 배지를 이용하여 유가식 발효공정을 진행한 결과 가장 높은 아연-코프로포르피린 III와 아연-우로포르피린 III 생산량을 달성하였다.

[183]

[184] 실시예 9. 재조합 코리네박테리움 균주의 빌리버딘 생산 측정 및 분석

[185] 본 발명자들은 마지막으로 재조합 코리네박테리움 균주의 빌리버딘 (Biliverdin) 생산능을 증대시키고자 하였다. 이를 위해 상기 실시예 7에서 확인한 결과에 근거하여 헴의 세포외 생산능이 가장 높은 ΔSAT::ALSDtE-YHQBA 재조합 균주에서 세포벽 단백질들과 헴 외분비 단백질인 HrtBA의 발현을 증가시키지 않은 ALSDtE-YHQ 균주에 추가적으로 *hmuO* 유전자를 도입하여 헴 분해를 통한 빌리버딘 생성에 관여하는 HmuO 단백질을 과발현하는 ALSDtE-YHQO 균주를 제작하였다. 이후 ALSDtE-YHQ 및 ALSDtE-YHQO 균주를 CGXII 배지에서 배양한 후 빌리버딘 생산량을 측정하였다.

[186] 그 결과, 도 11에서 볼 수 있는 바와 같이 ALSDtE-YHQ 균주의 경우 빌리버딘이 전혀 생성되지 않은 반면, HmuO 단백질을 과발현하는 ALSDtE-YHQO 균주에서 빌리버딘의 생산량이 현저히 증가된 것을 확인하였다.

[187]

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

청구범위

[청구항 1] 글루탐산 (glutamic acid) 생성능을 가지는 미생물에 글루타밀-tRNA 리덕테이즈 (glutamyl-tRNA reductase, HemA), 글루타메이트-1-세미알데하이드 아미노트랜스퍼레이즈 (glutamate-1-semialdehyde aminotransferase, HemL), 아미노레불린산 합성효소 (Aminolevulinic acid synthase, AlaS), 전사조절인자 디프테리아 톡신 리프레서 (Diphtheria toxin Repressor, DtxR), 우로포르피리노겐 III 디카복실레이즈 (Uroporphyrinogen III decarboxylase, HemE), 코프로포르피리노겐 III 산화효소 (Coproporphyrinogen III oxidase, HemY), 코프로포르피린 III 페로킬라테이즈 (Coproporphyrin III ferrochelatase, HemH), 과산화수소 의존성 헴 합성효소 (Hydrogen peroxide-dependent heme synthase, HemQ) 및 헴 수송단백질 (heme regulated transporter A and B, HrtAB)로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상을 암호화하는 유전자가 도입된, 헴 (Heme), 코프로포르피린 III (coproporphyrin III, CP III) 및 우로포르피린 III (uroporphyrin III, UP III) 생산능력이 향상된 재조합 미생물.

[청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 재조합 미생물은 추가로 막결합 헴 단백질 히스티딘 키네이즈 (Histidine kinase HrrS), 세포표면 헴 수용체 단백질 (cell surface heme receptor, HtaA) 및 헴결합 세포질 단백질 (Hemin-binding periplasmic protein, HmuT)로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상을 암호화하는 유전자의 발현이 억제된 것을 특징으로 하는, 재조합 미생물.

[청구항 3] 제1항 또는 제2항에 있어서,
상기 재조합 미생물은 HemA, HemL, AlaS, DtxR, HemE, HemY, HemH, HemQ 및 HrtAB를 암호화하는 유전자가 도입되고; 및
HrrS, HtaA 및 HmuT를 암호화하는 유전자의 발현이 억제되어 있는 것을 특징으로 하는, 재조합 미생물.

[청구항 4] 글루탐산 (glutamic acid) 생성능을 가지는 미생물에 글루타밀-tRNA 리덕테이즈 (glutamyl-tRNA reductase, HemA), 글루타메이트-1-세미알데하이드 아미노트랜스퍼레이즈 (glutamate-1-semialdehyde aminotransferase, HemL), 아미노레불린산 합성효소 (Aminolevulinic acid synthase, AlaS), 전사조절인자 디프테리아 톡신 리프레서 (Diphtheria toxin Repressor, DtxR) 및 우로포르피리노겐 III 디카복실레이즈 (Uroporphyrinogen III decarboxylase, HemE)를 암호화하는 유전자가 도입된, 아연-코프로포르피린 III (Zn-coproporphyrin III, Zn-CP III) 및 아연-우로포르피린 III (Zn-uroporphyrin III, Zn-UP III) 생산능력이 향상된 재조합 미생물.

[청구항 5] 글루탐산 (glutamic acid) 생성능을 가지는 미생물에 글루타밀-tRNA 리덕테이즈 (glutamyl-tRNA reductase, HemA), 글루타메이트-1-세미알데하이드 아미노트랜스퍼레이즈 (glutamate-1-semialdehyde aminotransferase, HemL), 아미노레불린산 합성효소 (Aminolevulinic acid synthase, AlaS), 전사조절인자 디프테리아 톡신 리프레서 (Diphtheria toxin Repressor, DtxR), 우로포르피리노겐 III 디카복실레이즈 (Uroporphyrinogen III decarboxylase, HemE), 코프로포르피리노겐 III 산화효소 (Coproporphyrinogen III oxidase, HemY), 코프로포르피린 III 페로킬라테이즈 (Coproporphyrin III ferrochelatase, HemH), 과산화수소 의존성 헴 합성효소 (Hydrogen peroxide-dependent heme synthase, HemQ) 및 헴 옥시게네이즈(Heme oxygenase, HmuO)를 암호화하는 유전자가 도입된, 빌리버딘 (Biliverdin) 생산능력이 향상된 재조합 미생물.

[청구항 6] 제1항, 제4항 및 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 글루탐산 생성능을 가지는 미생물은 코리네박테리움 글루타믹쿰 (*Corynebacterium glutamicum*)인 것을 특징으로 하는, 재조합 미생물.

[청구항 7] 제1항, 제4항 및 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 글루타밀-tRNA 리덕테이즈 (glutamyl-tRNA reductase, HemA), 글루타메이트-1-세미알데하이드 아미노트랜스퍼레이즈 (glutamate-1-semialdehyde aminotransferase, HemL), 아미노레불린산 합성효소 (Aminolevulinic acid synthase, AlaS), 디프테리아 톡신 리프레서(Diphtheria toxin Repressor, DtxR), 우로포르피리노겐 III 디카복실레이즈 (Uroporphyrinogen III decarboxylase, HemE), 코프로포르피리노겐 III 산화효소 (Coproporphyrinogen III oxidase, HemY), 코프로포르피린 III 페로킬라테이즈 (Coproporphyrin III ferrochelatase, HemH), 과산화수소 의존성 헴 합성효소 (Hydrogen peroxide-dependent heme synthase, HemQ), 헴 수송단백질 (heme regulated transporter A and B) 및 헴 옥시게네이즈(Heme oxygenase, HmuO)는 각각 서열번호 1 내지 11로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 재조합 미생물.

[청구항 8] 제2항에 있어서, 상기 막결합 헴 단백질 히스티딘 키네이즈 (Histidine kinase HrrS), 세포표면 헴 수용체 단백질 (cell surface heme receptor, HtaA) 및 헴결합 세포질 단백질 (Hemin-binding periplasmic protein, HmuT)은 각각 서열번호 13 내지 15로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 재조합 미생물.

[청구항 9] 막결합 헴 단백질 히스티딘 키네이즈 (Histidine kinase HrrS), 세포표면 헴 수용체 단백질 (cell surface heme receptor, HtaA) 및 헴결합 세포질 단백질

(Hemin-binding periplasmic protein, HmuT)로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상을 암호화하는 유전자의 발현이 억제된, 헴 (Heme)의 외분비능이 향상된 재조합 미생물.

[청구항 10] 글루탐산 (glutamic acid) 생성능을 가지는 미생물에 글루타밀-tRNA 리덕테이즈 (glutamyl-tRNA reductase, HemA), 글루타메이트-1-세미알데하이드 아미노트랜스퍼레이즈 (glutamate-1-semialdehyde aminotransferase, HemL), 아미노레불린산 합성효소 (Aminolevulinic acid synthase, AlaS), 전사조절인자 디프테리아 톡신 리프레서 (Diphtheria toxin Repressor, DtxR), 우로포르피리노겐 III 디카복실레이즈 (Uroporphyrinogen III decarboxylase, HemE), 코프로포르피리노겐 III 산화효소 (Coproporphyrinogen III oxidase, HemY), 코프로포르피린 III 페로킬라테이즈 (Coproporphyrin III ferrochelatase, HemH), 과산화수소 의존성 헴 합성효소 (Hydrogen peroxide-dependent heme synthase, HemQ) 및 헴 수송단백질 (heme regulated transporter A and B, HrtAB)로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상을 암호화하는 유전자를 도입시키는 단계를 포함하는, 제1항 또는 제2항의 헴 (Heme), 코프로포르피린 III (coproporphyrin III, CP III) 및 우로포르피린 III (uroporphyrin III, UP III) 생산능력이 향상된 재조합 미생물의 제조방법.

[청구항 11] 제10항에 있어서,
상기 제조방법은 막결합 헴 단백질 히스티딘 키네이즈 (Histidine kinase HrrS), 세포표면 헴 수용체 단백질 (cell surface heme receptor, HtaA) 및 헴결합 세포질 단백질 (Hemin-binding periplasmic protein, HmuT)로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상을 암호화하는 유전자의 발현을 억제시키는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 제조방법.

[청구항 12] 글루탐산 (glutamic acid) 생성능을 가지는 미생물에 글루타밀-tRNA 리덕테이즈 (glutamyl-tRNA reductase, HemA), 글루타메이트-1-세미알데하이드 아미노트랜스퍼레이즈 (glutamate-1-semialdehyde aminotransferase, HemL), 아미노레불린산 합성효소 (Aminolevulinic acid synthase, AlaS), 전사조절인자 디프테리아 톡신 리프레서 (Diphtheria toxin Repressor, DtxR) 및 우로포르피리노겐 III 디카복실레이즈 (Uroporphyrinogen III decarboxylase, HemE)를 암호화하는 유전자를 도입시키는 단계를 포함하는, 제4항의 아연-코프로포르피린 III (Zn-coproporphyrin III, Zn-CP III) 및 아연-우로포르피린 III (Zn-uroporphyrin III, Zn-UP III) 생산능력이 향상된 재조합 미생물의 제조방법.

[청구항 13] 글루탐산 (glutamic acid) 생성능을 가지는 미생물에 글루타밀-tRNA 리덕테이즈 (glutamyl-tRNA reductase, HemA), 글루타메이트-1-세미알데하이드 아미노트랜스퍼레이즈

(glutamate-1-semialdehyde aminotransferase, HemL), 아미노레불린산 합성효소 (Aminolevulinic acid synthase, AlaS), 전사조절인자 디프테리아 톡신 리프레서 (Diphtheria toxin Repressor, DtxR), 우로포르피리노겐 III 디카복실레이즈 (Uroporphyrinogen III decarboxylase, HemE), 코프로포르피리노겐 III 산화효소 (Coproporphyrinogen III oxidase, HemY), 코프로포르피린 III 페로킬라테이즈 (Coproporphyrin III ferrochelatase, HemH), 과산화수소 의존성 헴 합성효소 (Hydrogen peroxide-dependent heme synthase, HemQ) 및 헴 옥시게네이즈 (Heme oxygenase, HmuO)를 암호화하는 유전자를 도입시키는 단계를 포함하는, 제5항의 빌리버딘 (Biliverdin) 생산능력이 향상된 재조합 미생물의 제조방법.

[청구항 14] 하기 단계를 포함하는, 헴 (Heme)의 생산방법:
(a) 제1항 또는 제2항의 재조합 미생물을 철 이온 (Fe^{2+})을 포함하는 배지에서 배양하여 헴을 생성시키는 단계; 및
(b) 상기 생성된 헴을 추출 및 수득하는 단계.

[청구항 15] 제14항에 있어서,
상기 단계 (a)에서 배지 내에 5 내지 100mg/L 농도의 에탐부톨 (ethambutol)이 추가로 포함된 것을 특징으로 하는, 생산방법.

[청구항 16] 제14항에 있어서,
상기 단계 (a)에서 배지 내에 질소원으로 트립톤 (Tryptone)이 포함된 것을 특징으로 하는, 생산방법.

[청구항 17] 제14항에 있어서,
상기 배양은 유가식 발효 공정으로 이루어지는 것을 특징으로 하는, 생산방법.

[청구항 18] 하기 단계를 포함하는, 코프로포르피린 III (coproporphyrin III, CP III) 및 우로포르피린 III (uroporphyrin III, UP III)의 생산방법:
(a) 제1항 또는 제2항의 재조합 미생물을 배지에서 배양하여 코프로포르피린 III 및 우로포르피린 III를 생성시키는 단계; 및
(b) 상기 생성된 코프로포르피린 III 및 우로포르피린 III를 추출 및 수득하는 단계.

[청구항 19] 하기 단계를 포함하는, 아연-코프로포르피린 III (Zn-coproporphyrin III, Zn-CP III) 및 아연-우로포르피린 III (Zn-uroporphyrin III, Zn-UP III)의 생산방법:
(a) 제4항의 재조합 미생물을 아연 이온 (Zn^{2+})을 포함하는 배지에서 배양하여 아연-코프로포르피린 III 및 아연-우로포르피린 III를 생성시키는 단계; 및
(b) 상기 생성된 아연-코프로포르피린 III 및 아연-우로포르피린 III를 추출 및 수득하는 단계.

[청구항 20] 제19항에 있어서,

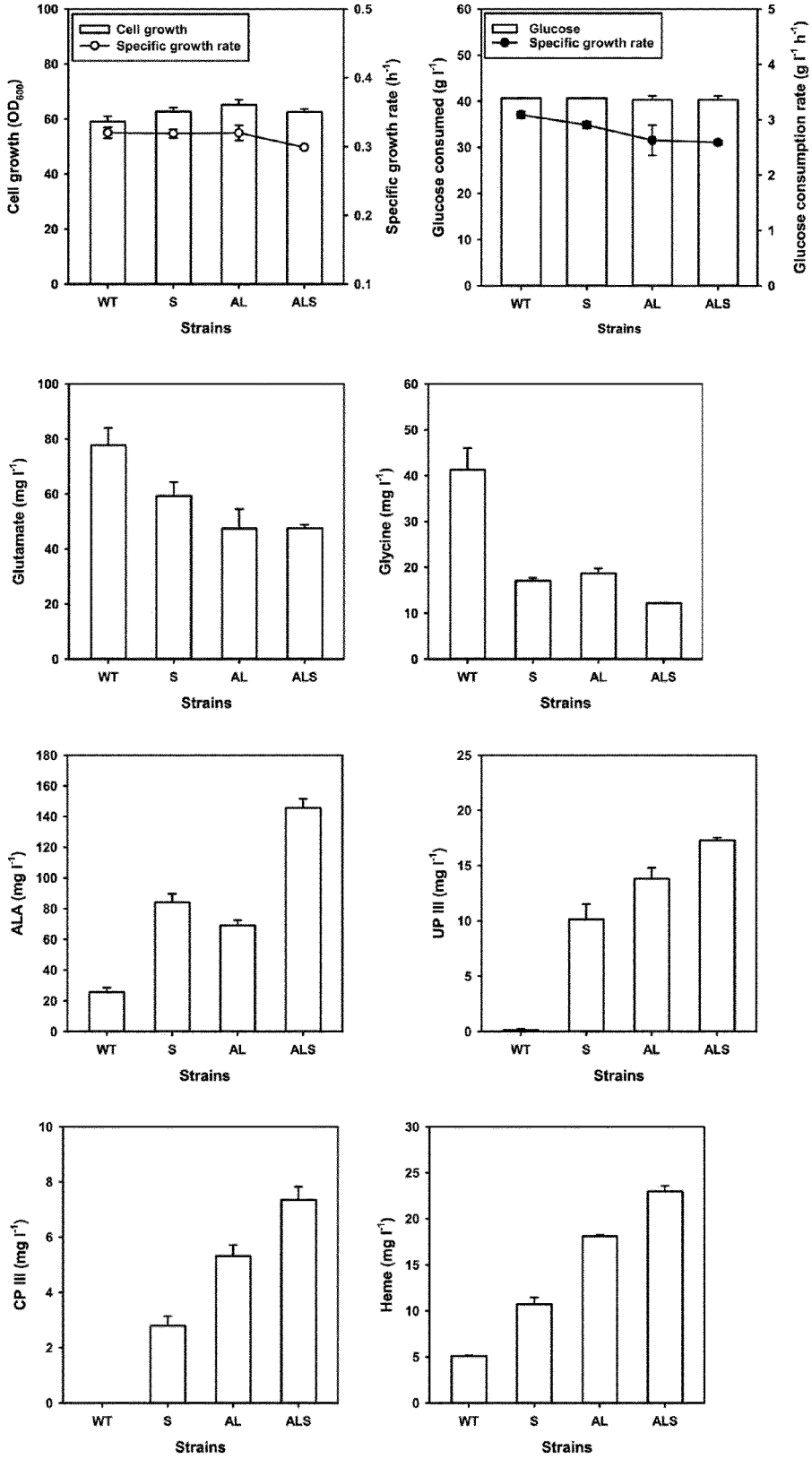
상기 단계 (a)에서 배지 내에 5 내지 100mg/L 농도의 에탐부톨 (ethambutol)이 추가로 포함된 것을 특징으로 하는, 생산방법.

[청구항 21] 제19항에 있어서,
상기 단계 (a)에서 배지는 질소원으로 트립톤 (Tryptone)이 포함된 것을 특징으로 하는, 생산방법.

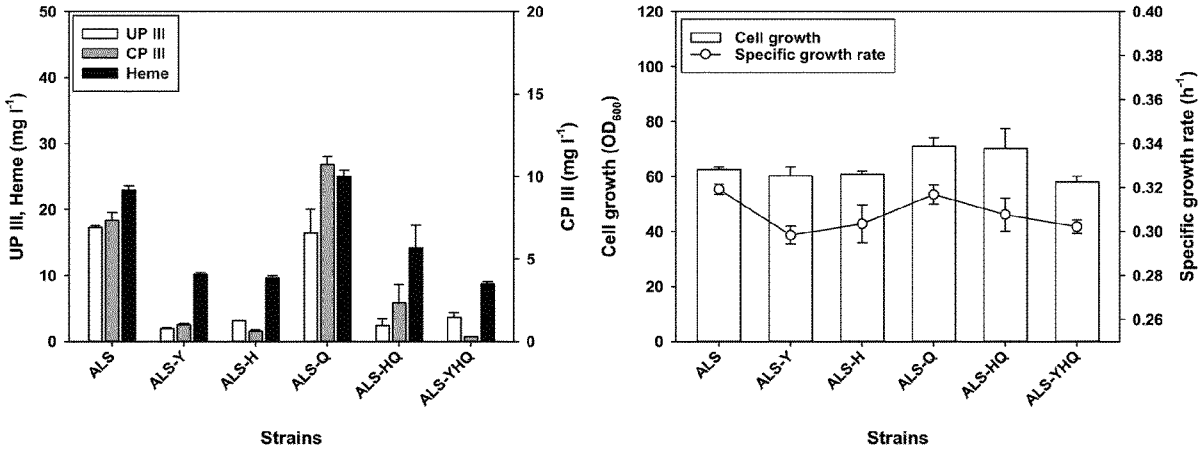
[청구항 22] 제19항에 있어서,
상기 배양은 유가식 발효 공정으로 이루어지는 것을 특징으로 하는, 생산방법.

[청구항 23] 하기 단계를 포함하는, 빌리버딘 (Biliverdin)의 생산방법:
(a) 제5항의 재조합 미생물을 배지에서 배양하여 빌리버딘을 생성시키는 단계; 및
(b) 상기 생성된 빌리버딘을 추출 및 수득하는 단계.

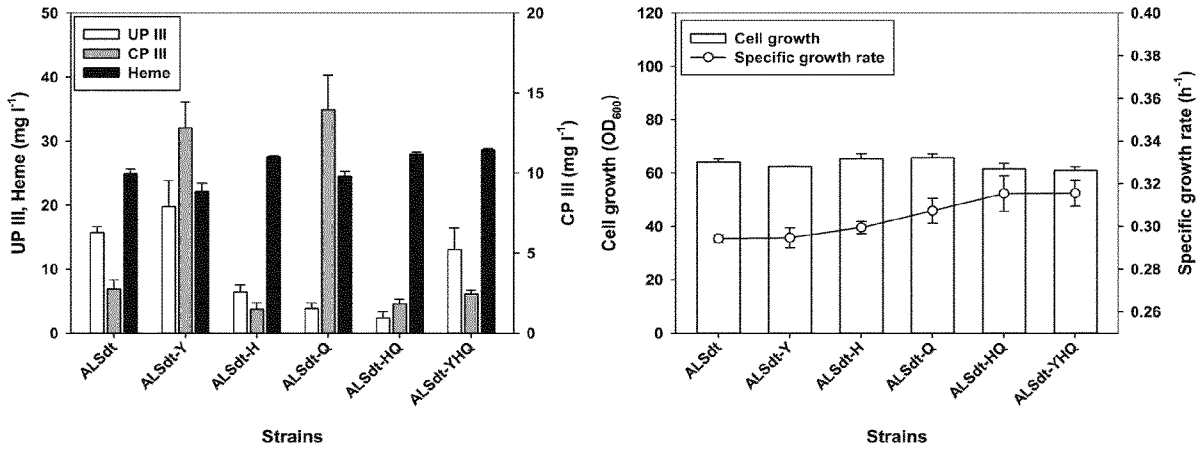
[도1]


Cell growth
Specific growth rate
Cell growth (OD600)
Specific growth rate (h-1)
Strains
WT
S
AL
ALS
Glucose
Specific growth rate
Glucose consumed (g l-1)
Glucose consumption rate (g l-1 h-1)
Glutamate (mg l-1)
Glycine (mg l-1)
ALA (mg l-1)
UP III (mg l-1)
CP III (mg l-1)
Heme (mg l-1)

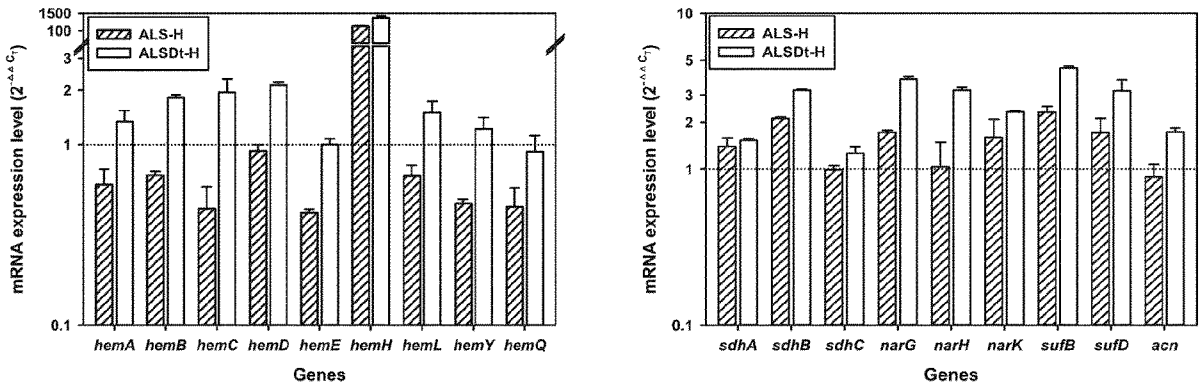
[도2a]


UP III
CP III
Heme
UP III, Heme (mg l-1)
CP III (mg l-1)
ALS
ALS-Y
ALS-H
ALS-Q
ALS-HQ
ALS-YHQ
Strains
Cell growth
Specific growth rate
Cell growth (OD600)
Specific growth rate (h-1)

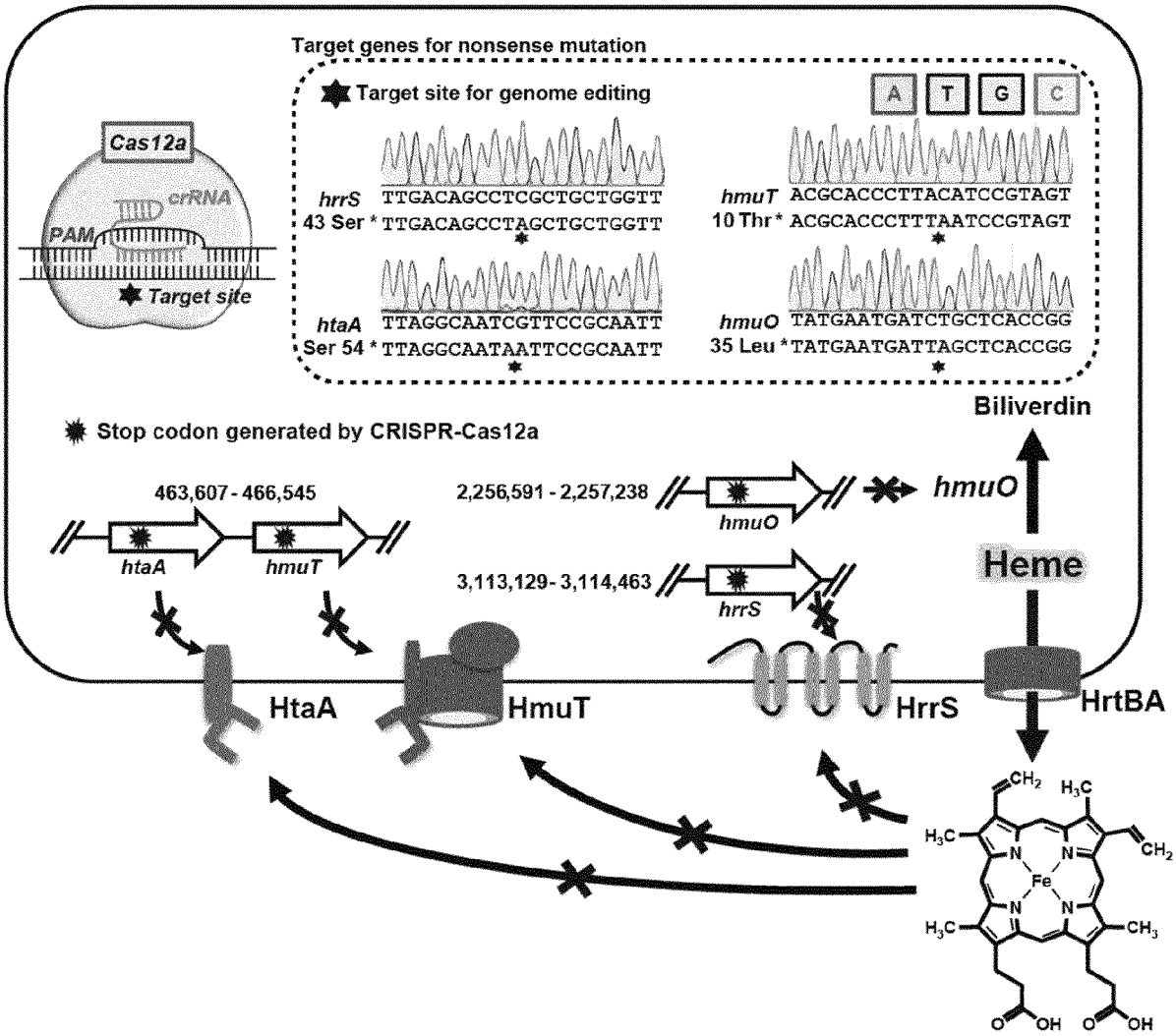
[도2b]


UP III
CP III
Heme
UP III, Heme (mg l-1)
CP III (mg l-1)
ALSdt
ALSdt-Y
ALSdt-H
ALSdt-Q
ALSdt-HQ
ALSdt-YHQ
Strains
Cell growth
Specific growth rate
Cell growth (OD600)
Specific growth rate (h-1)

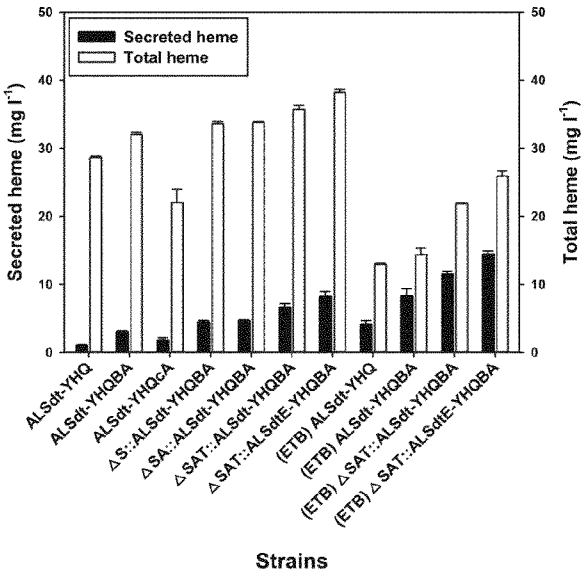
[도2c]

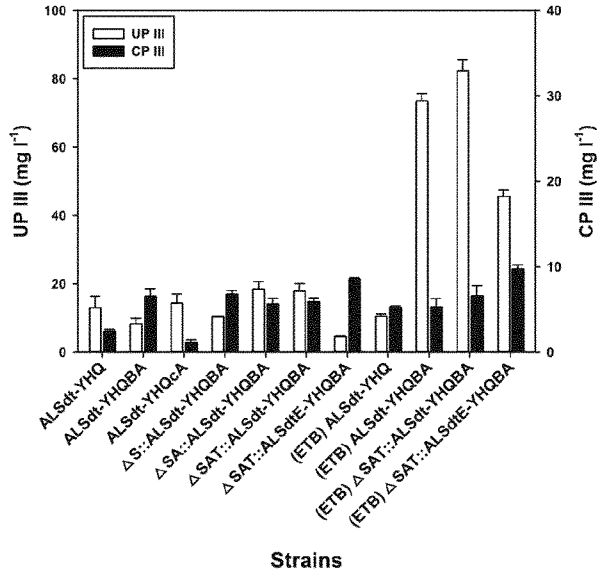

ALS-H
ALSDt-H
mRNA expression level
hemA hemB hemC hemD hemE hemH hemL hemY hemQ
Genes
sdhA sdhB sdhC narG narH narK sufB sufD acn

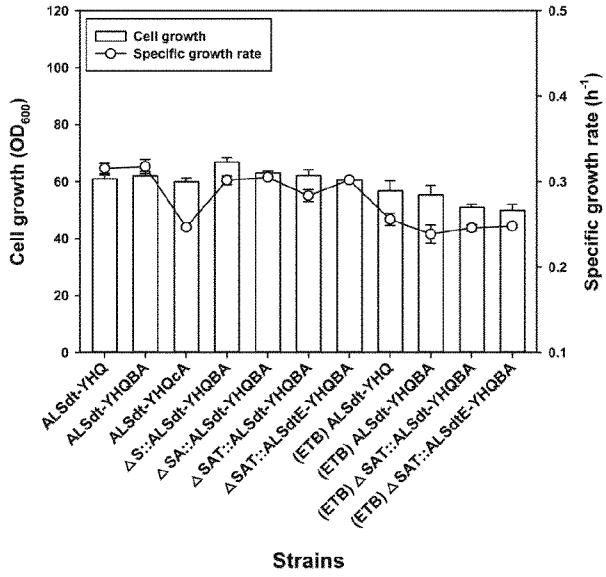
[도3a]


Target genes for nonsense mutation
Target site for genome editing
A T G C
Cas12a
crRNA
PAM
Target site
hrrS TTGACAGCCTCGCTGCTGGTT
43 Ser * TTGACAGCCTAGCTGCTGGTT
hmuT ACGCACCCTTACATCCGTAGT
10 Thr * ACGCACCCTTTAATCCGTAGT
htaA TTAGGCAATCGTTCCGCAATT
Ser 54 * TTAGGCAATAATTCCGCAATT
hmuO TATGAATGATCTGCTCACCGG
35 Leu * TATGAATGATTAGCTCACCGG
Biliverdin
Stop codon generated by CRISPR-Cas12a
463,607 - 466,545
htaA
hmuT
2,256,591 - 2,257,238
hmuO
hmuO
3,113,129 - 3,114,463
hrrS
Heme
HtaA
HmuT
HrrS
HrtBA
Fe
N
OH
O
CH2
CH3

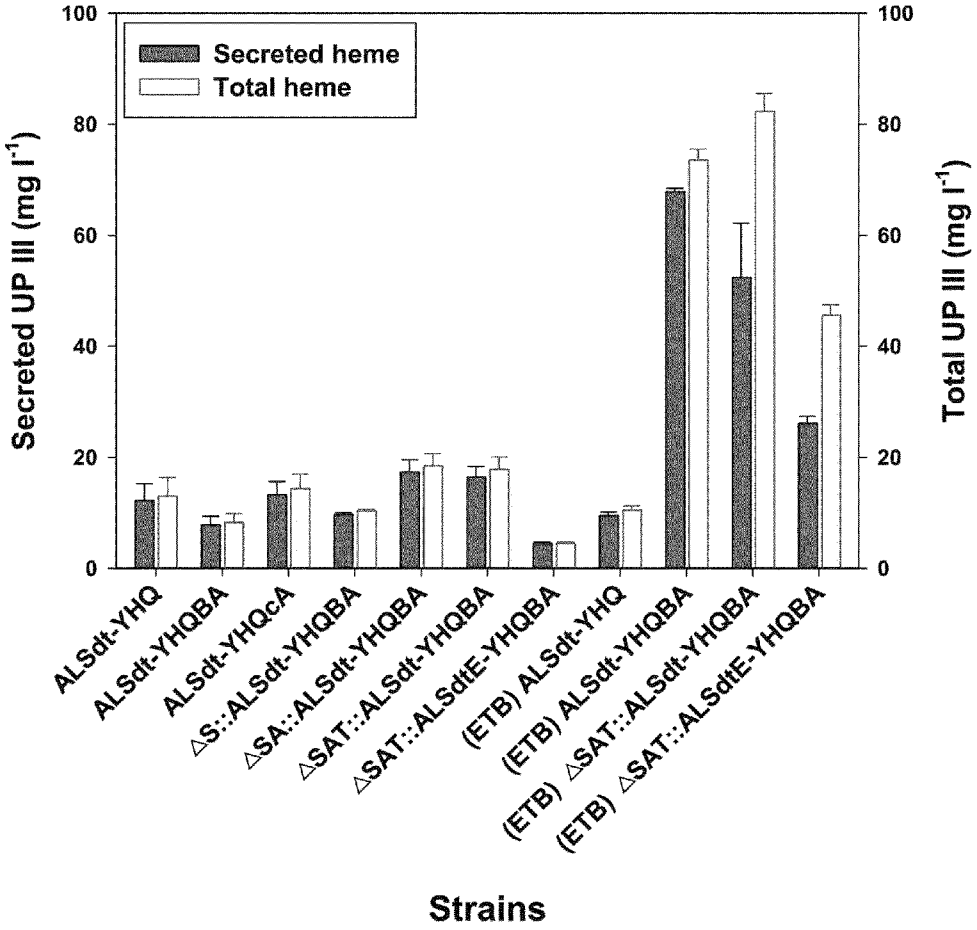
[도3b]


Secreted heme
Total heme
Secreted heme (mg l-1)
Total heme (mg l-1)
ALSdt-YHQ
ALSdt-YHQBA
ALSdt-YHQcA
ΔS::ALSdt-YHQBA
ΔSA::ALSdt-YHQBA
ΔSAT::ALSdt-YHQBA
ΔSAT::ALSdtE-YHQBA
(ETB) ALSdt-YHQ
(ETB) ALSdt-YHQBA
(ETB) ΔSAT::ALSdt-YHQBA
(ETB) ΔSAT::ALSdtE-YHQBA
Strains

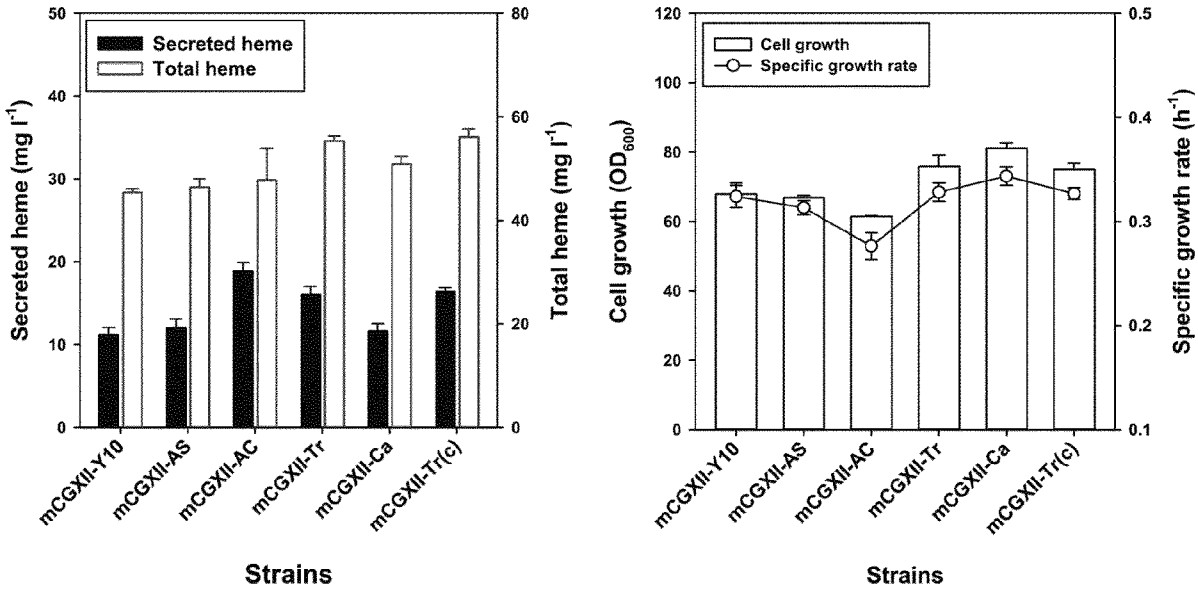

UP III
CP III
UP III (mg l-1)
CP III (mg l-1)
ALSdt-YHQ
ALSdt-YHQBA
ALSdt-YHQcA
ΔS::ALSdt-YHQBA
ΔSA::ALSdt-YHQBA
ΔSAT::ALSdt-YHQBA
ΔSAT::ALSdtE-YHQBA
(ETB) ALSdt-YHQ
(ETB) ALSdt-YHQBA
(ETB) ΔSAT::ALSdt-YHQBA
(ETB) ΔSAT::ALSdtE-YHQBA
Strains


Cell growth
Specific growth rate
Cell growth (OD600)
Specific growth rate (h-1)
ALSdt-YHQ
ALSdt-YHQBA
ALSdt-YHQcA
ΔS::ALSdt-YHQBA
ΔSA::ALSdt-YHQBA
ΔSAT::ALSdt-YHQBA
ΔSAT::ALSdtE-YHQBA
(ETB) ALSdt-YHQ
(ETB) ALSdt-YHQBA
(ETB) ΔSAT::ALSdt-YHQBA
(ETB) ΔSAT::ALSdtE-YHQBA
Strains

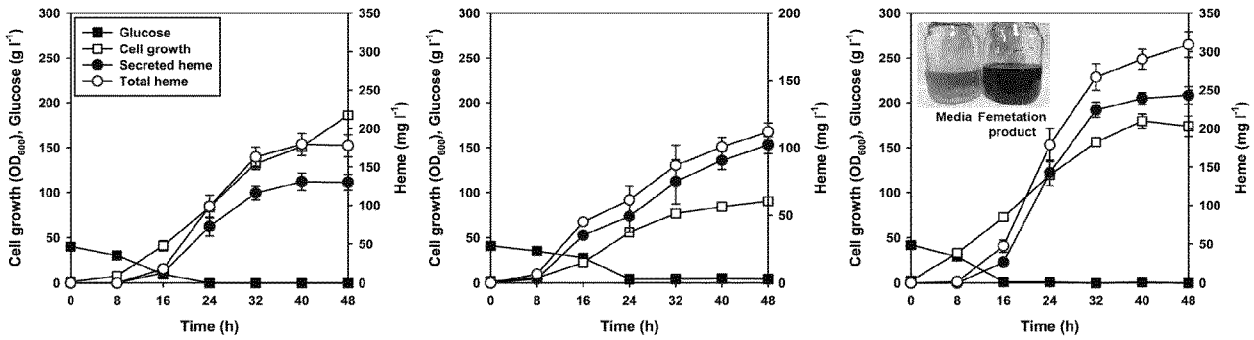
[도4]


Secreted heme
Total heme
Secreted UP III (mg l-1)
Total UP III (mg l-1)
0
20
40
60
80
100
ALSdt-YHQ
ALSdt-YHQBA
ALSdt-YHQcA
ΔS::ALSdt-YHQBA
ΔSA::ALSdt-YHQBA
ΔSAT::ALSdt-YHQBA
ΔSAT::ALSdtE-YHQBA
(ETB) ALSdt-YHQ
(ETB) ALSdt-YHQBA
(ETB) ΔSAT::ALSdt-YHQBA
(ETB) ΔSAT::ALSdtE-YHQBA
Strains

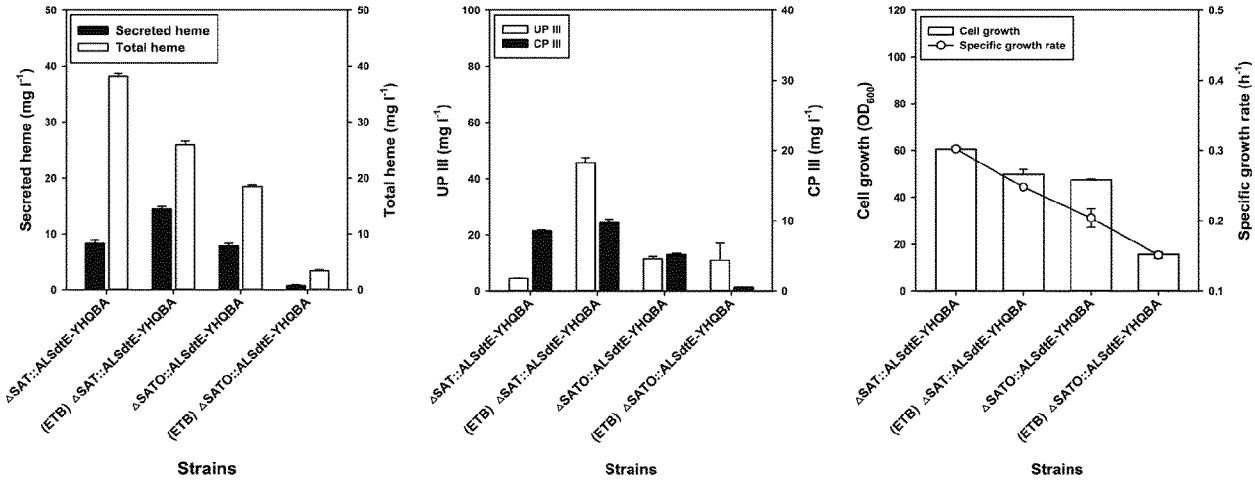
[도5]


Secreted heme
Total heme
Secreted heme (mg l-1)
Total heme (mg l-1)
0
10
20
30
40
50
0
20
40
60
80
mCGXII-Y10
mCGXII-AS
mCGXII-AC
mCGXII-Tr
mCGXII-Ca
mCGXII-Tr(c)
Strains
Cell growth
Specific growth rate
Cell growth (OD600)
Specific growth rate (h-1)
0
20
40
60
80
100
120
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
mCGXII-Y10
mCGXII-AS
mCGXII-AC
mCGXII-Tr
mCGXII-Ca
mCGXII-Tr(c)
Strains

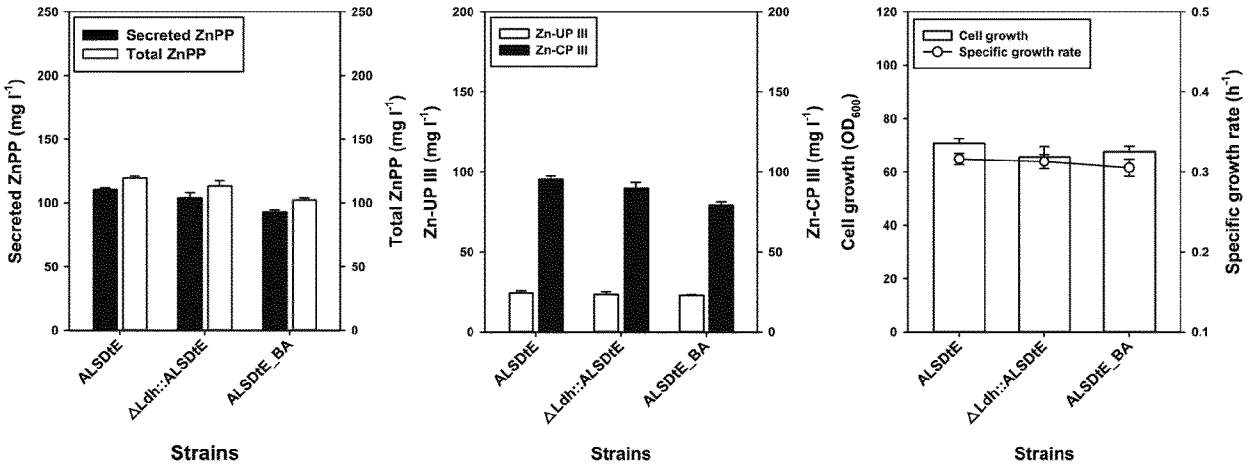
[도6]


Glucose
Cell growth
Secreted heme
Total heme
Cell growth (OD600), Glucose (g l-1)
Heme (mg l-1)
Time (h)
Media
Fermentation product

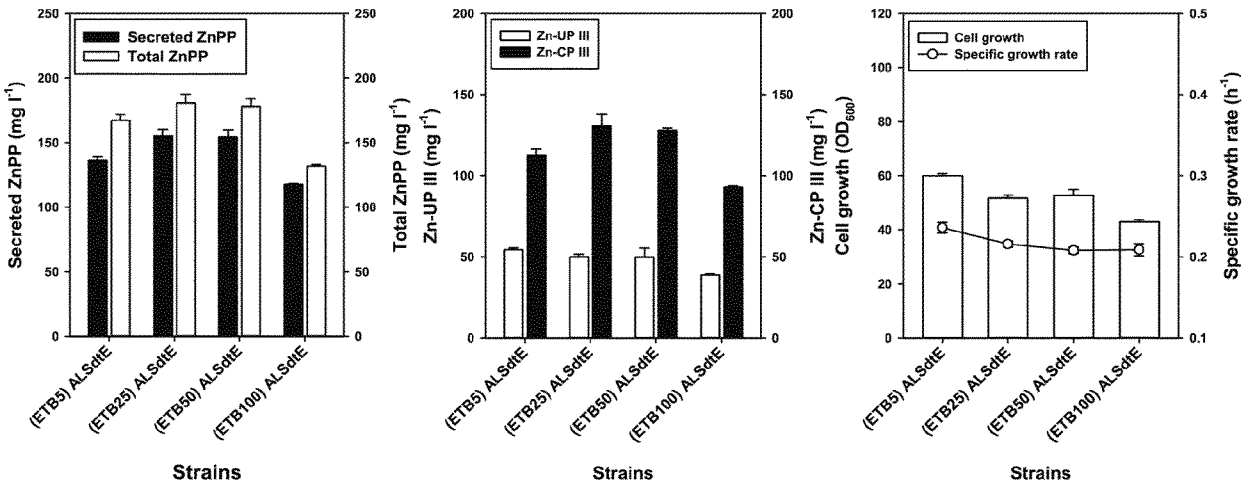
[도7]


Secreted heme
Total heme
Secreted heme (mg l-1)
Total heme (mg l-1)
UP III
CP III
UP III (mg l-1)
CP III (mg l-1)
Cell growth
Specific growth rate
Cell growth (OD600)
Specific growth rate (h-1)
ΔSAT::ALSdtE-YHQBA
(ETB) ΔSAT::ALSdtE-YHQBA
ΔSATO::ALSdtE-YHQBA
(ETB) ΔSATO::ALSdtE-YHQBA
Strains

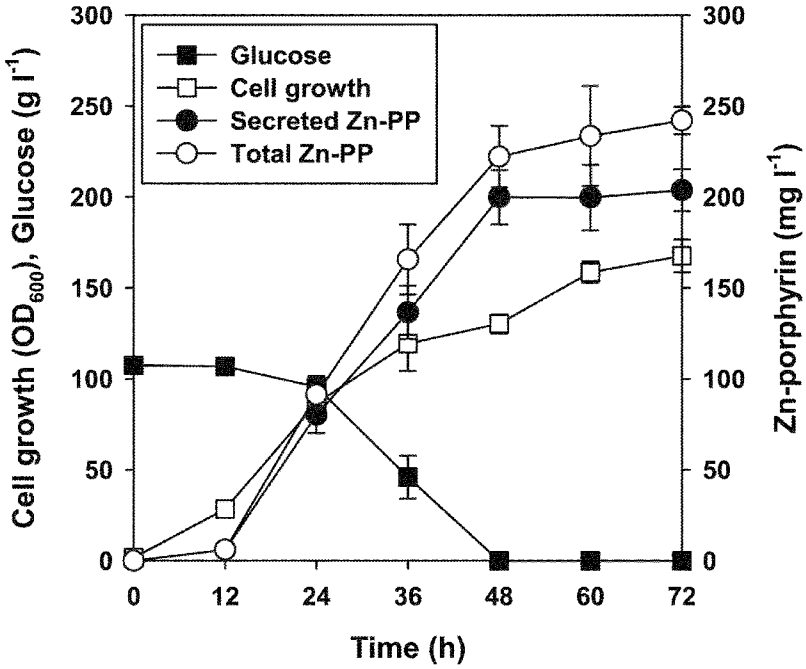
[도8]


Secreted ZnPP
Total ZnPP
Secreted ZnPP (mg l-1)
Total ZnPP (mg l-1)
Zn-UP III
Zn-CP III
Zn-UP III (mg l-1)
Zn-CP III (mg l-1)
Cell growth
Specific growth rate
Cell growth (OD600)
Specific growth rate (h-1)
ALSdtE
ΔLdh::ALSdtE
ALSdtE_BA
Strains

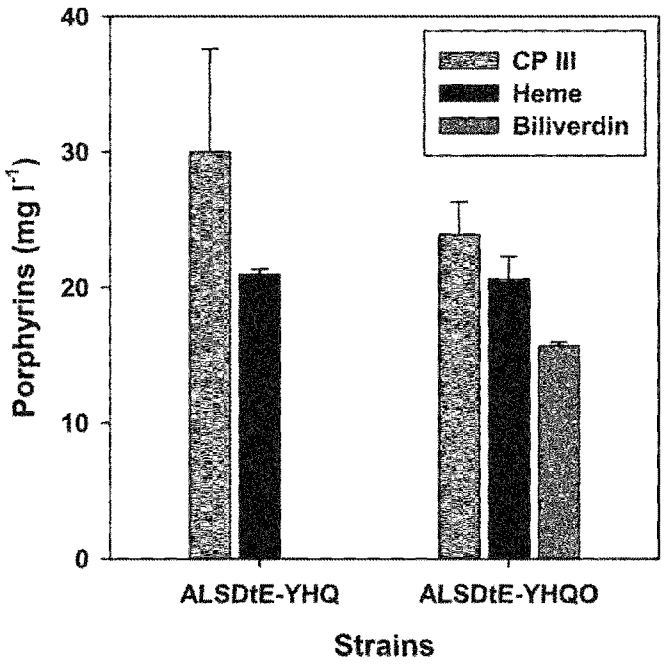
[도9]


Secreted ZnPP
Total ZnPP
Secreted ZnPP (mg l-1)
Total ZnPP (mg l-1)
Zn-UP III
Zn-CP III
Zn-UP III (mg l-1)
Zn-CP III (mg l-1)
Cell growth
Specific growth rate
Cell growth (OD600)
Specific growth rate (h-1)
(ETB5) ALSdtE
(ETB25) ALSdtE
(ETB50) ALSdtE
(ETB100) ALSdtE
Strains

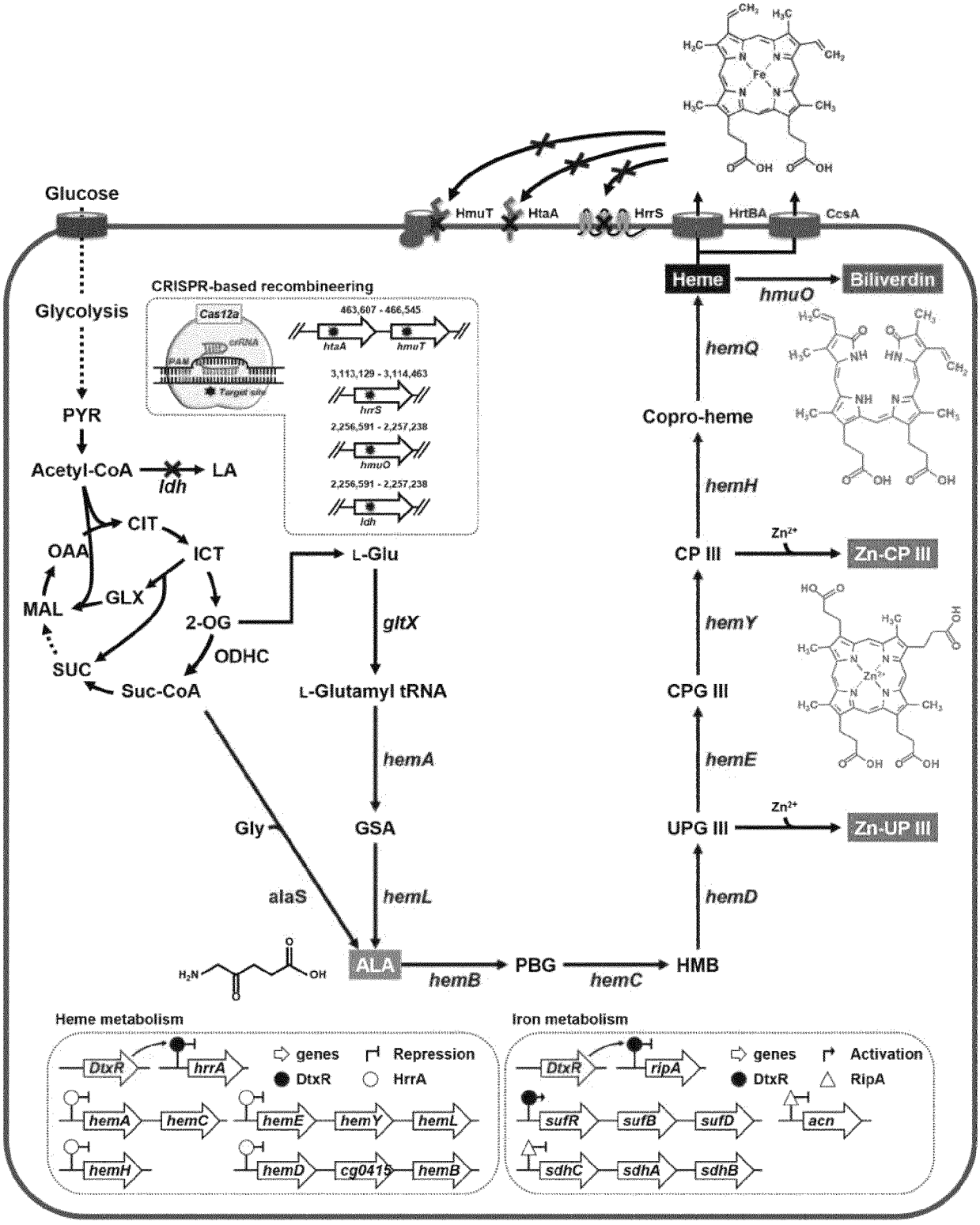
[도10]


Glucose
Cell growth
Secreted Zn-PP
Total Zn-PP
Cell growth (OD600), Glucose (g l-1)
Zn-porphyrin (mg l-1)
Time (h)
0
12
24
36
48
60
72
0
50
100
150
200
250
300

[도11]


CP III
Heme
Biliverdin
Porphyrins (mg l-1)
ALSDtE-YHQ
ALSDtE-YHQO
Strains
0
10
20
30
40

[도12]


Glucose
HmuT
HtaA
HrrS
HrtBA
CcsA
Heme
hmuO
Biliverdin
CRISPR-based recombineering
Cas12a
crRNA
PAM
Target site
463,607 - 466,545
htaA
hmuT
3,113,129 - 3,114,463
hrrS
2,256,591 - 2,257,238
hmuO
2,256,591 - 2,257,238
ldh
Glycolysis
PYR
Acetyl-CoA
LA
ldh
CIT
OAA
ICT
MAL
GLX
2-OG
L-Glu
gltX
SUC
ODHC
Suc-CoA
L-Glutamyl tRNA
hemA
Gly
GSA
alaS
hemL
ALA
hemB
PBG
hemC
HMB
hemD
UPG III
hemE
CPG III
hemY
CP III
hemH
Copro-heme
hemQ
Zn2+
Zn-UP III
Zn-CP III
Heme metabolism
DtxR
hrrA
genes
Repression
DtxR
HrrA
hemA
hemC
hemE
hemY
hemL
hemH
hemD
cg0415
hemB
Iron metabolism
DtxR
ripA
genes
Activation
DtxR
RipA
sufR
sufB
sufD
acn
sdhC
sdhA
sdhB

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2022/000697

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/77(2006.01)i; **C12N 9/10**(2006.01)i; **C07K 14/34**(2006.01)i; **C12N 9/02**(2006.01)i; **C12N 9/88**(2006.01)i; **C12N 9/90**(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 15/77(2006.01); C07K 14/34(2006.01); C12N 15/67(2006.01); C12N 9/02(2006.01); C12P 17/18(2006.01)

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

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

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

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 헴(heme), HemA, HemL, AlaS, DtxR, HemE, HemY, HemH, HemQ, HrtAB, 코프로포르피린 III(coproporphyrin III, CP III), 우로포르피린 III(uroporphyrin III, UP III), HemQ, HmuO, 빌리버딘(biliverdin), 에탐부톨(ethambutol)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	KR 10-2018-0127239 A (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 28 November 2018 (2018-11-28)	
X	See claims 1, 2-7, 11 and 12; and paragraphs [0003], [0073]-[0075], [0082] and [0092].	1,4,6,7,10,12,14,16-19,21,22
Y		2,3,5,8,11,13,23
A		9,15,20
	FRUNZKE, J. et al. Control of heme homeostasis in Corynebacterium glutamicum by the two-component system HrrSA. Journal of Bacteriology. March 2011, vol. 193, no. 5, pp. 1212-1221.	
X	See abstract; page 1219, left column, second paragraph; and figure 4.	9
Y		2,3,8,11
	KR 10-2020-0137754 A (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 09 December 2020 (2020-12-09)	
Y	See claim 4; paragraphs [0037], [0062], [0071] and [0072]; and figure 1.	3,5,13,23

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

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
02 May 2022	**02 May 2022**

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	NCBI. GenBank accession no. WP_003859750.1 (13 May 2017). See all sequences.	8
A	KR 10-2019-0070290 A (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 20 June 2019 (2019-06-20) See entire document.	1-23
PX	KO, Y. J. et al. Animal-free heme production for artificial meat in Corynebacterium glutamicum via systems metabolic and membrane engineering. Metabolic Engineering. (electronic publication) 01 May 2021, vol. 66, pp. 217-228. See abstract; pages 218-222 and 225; and figures 1 and 5.	1-6,9-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2022/000697

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed:
      ☑ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
      ☐ on paper or in the form of an image file.
   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2022/000697

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
KR 10-2018-0127239 A	28 November 2018	KR 10-2052134 B1	08 January 2020
		US 1193152 B2	07 December 2021
		US 2020-0270658 A1	27 August 2020
		WO 2018-212626 A1	22 November 2018
KR 10-2020-0137754 A	09 December 2020	KR 10-2198107 B1	05 January 2021
		US 1066683 B2	20 July 2021
		US 2020-0377915 A1	03 December 2020
KR 10-2019-0070290 A	20 June 2019	CN 110382700 A	25 October 2019
		EP 3567109 A1	13 November 2019
		EP 3567109 A4	02 September 2020
		JP 2020-509740 A	02 April 2020
		KR 10-2168039 B1	21 October 2020
		US 2019-0382817 A1	19 December 2019
		WO 2019-117612 A1	20 June 2019

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2022/000697

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 15/77(2006.01)i; **C12N 9/10**(2006.01)i; **C07K 14/34**(2006.01)i; **C12N 9/02**(2006.01)i; **C12N 9/88**(2006.01)i; **C12N 9/90**(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 15/77(2006.01); C07K 14/34(2006.01); C12N 15/67(2006.01); C12N 9/02(2006.01); C12P 17/18(2006.01)

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

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

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

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 헴(heme), HemA, HemL, AlaS, DtxR, HemE, HemY, HemH, HemQ, HrtAB, 코프로포르피린 III(coproporphyrin III, CP III), 우로포르피린 III(uroporphyrin III, UP III), HemQ, HmuO, 빌리버딘(biliverdin), 에탐부톨(ethambutol)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2018-0127239 A (고려대학교 산학협력단) 2018.11.28 청구항 1, 2-7, 11, 12; 단락 [0003], [0073]-[0075], [0082], [0092]	1,4,6,7,10,12,14,16-19,21,22
Y		2,3,5,8,11,13,23
A		9,15,20
X	FRUNZKE, J. 등, 'Control of heme homeostasis in Corynebacterium glutamicum by the two-component system HrrSA', Journal of Bacteriology, 2011.03, 193권, 5호, 1212-1221 페이지 초록; 페이지 1219, 좌컬럼, 2번째 단락; 도면 4	9
Y		2,3,8,11
Y	KR 10-2020-0137754 A (고려대학교 산학협력단) 2020.12.09 청구항 4; 단락 [0037], [0062], [0071], [0072]; 도면 1	3,5,13,23
Y	NCBI, GenBank accession no. WP_003859750.1(2017.05.13) 전체 서열	8

☑ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☑ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

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

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2022년05월02일(02.05.2022)	**2022년05월02일(02.05.2022)**

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

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

팩스 번호 **+82-42-481-8578**

심사관

허주형

전화번호 **+82-42-481-5373**

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2022/000697

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2019-0070290 A (한국과학기술원) 2019.06.20 전체 문헌	1-23
PX	KO, Y. J. 등, 'Animal-free heme production for artificial meat in Corynebacterium glutamicum via systems metabolic and membrane engineering', Metabolic Engineering, (전자공개)2021.05.01, 66권, 217-228 페이지 초록; 페이지 218-222, 225; 도면 1, 5	1-6,9-23

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2022/000697

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

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

   a. ☑ 아래의 형태로 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
      - ☑ 부록 C/ST.25 텍스트 파일
      - ☐ 서면 혹은 이미지 파일

   b. ☐ PCT 규칙 13의3.1(a)에 따라 국제출원과 함께 국제조사만을 목적으로 부록 C/ST.25 텍스트 파일의 형태로 제출된 서열목록

   c. ☐ 국제조사만을 목적으로 국제출원일 이후에 아래 형태로 제출된 서열목록
      - ☐ 부록 C/ST.25 텍스트 파일 (규칙 13의3.1(a))
      - ☐ 서면 혹은 이미지 파일 (규칙 제13의3.1(b) 및 시행세칙 713).

2. ☐ 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시 출원의 일부를 구성하는 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2022/000697

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2018-0127239 A	2018/11/28	KR 10-2052134 B1	2020/01/08
		US 1193152 B2	2021/12/07
		US 2020-0270658 A1	2020/08/27
		WO 2018-212626 A1	2018/11/22
KR 10-2020-0137754 A	2020/12/09	KR 10-2198107 B1	2021/01/05
		US 1066683 B2	2021/07/20
		US 2020-0377915 A1	2020/12/03
KR 10-2019-0070290 A	2019/06/20	CN 110382700 A	2019/10/25
		EP 3567109 A1	2019/11/13
		EP 3567109 A4	2020/09/02
		JP 2020-509740 A	2020/04/02
		KR 10-2168039 B1	2020/10/21
		US 2019-0382817 A1	2019/12/19
		WO 2019-117612 A1	2019/06/20