



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.

A61K 35/66 (2006.01)

A61K 35/76 (2006.01)

C12N 15/52 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2006-0125804

(43) 공개일자 2006년12월06일

(21) 출원번호 10-2006-7011961

(22) 출원일자 2006년06월16일

심사청구일자 없음

변역문 제출일자 2006년06월16일

(86) 국제출원번호 PCT/IB2004/004429

(87) 국제공개번호 WO 2005/059139

국제출원일자 2004년12월17일

국제공개일자 2005년06월30일

(30) 우선권주장 PCT/IB2003/006456 2003년12월18일 국제사무국(IB)(IB)

(71) 출원인 바스프 악티엔게젤샤프트
독일 테-67056 루드빅샤펜 칼-보쉬-스트라쎄 38

(72) 발명자 젤더, 오스카르
독일 67346 스파이어 프란츠-스투첼 8
클로프프록게, 코린나
독일 67065 루드빅샤펜 디머스타인스트라쎄 3
쉬뢰더, 하르트빅
독일 69226 누블로호 벤쯔스트라쎄 4
해프너, 스테판
독일 67063 루드빅샤펜 루이트폴트스트라쎄 11
크뢰거, 부르크하르트
독일 67117 림부르거호프 임 발트호프 1
키퍼, 파트리크
독일 66123 사르브뤼켄 암 홈부르크 5개
하인즐레, 엘마르
독일 66123 사르브뤼켄 제나토르-리차르트-벡커-스트라쎄 48
비트만, 크리스토프
독일 66127 사르브뤼켄 암 칼코펜 13

(74) 대리인 장수길
김영

전체 청구항 수 : 총 55 항

(54) 코리네박테륨 글루타미쿰의 발효에 의한 리신의 제조 방법

(57) 요약

본 발명은 특정 효소 코딩 유전자, 즉 프럭토스-1,6-비스포스파타제를 탈제어시킴으로써, 특정 미생물, 예를 들어 코리네박테리움으로부터 정밀 화학물질 (예: 리신)의 생산을 증가시키는 방법을 특징으로 한다. 바람직한 양태에서, 본 발명은 프럭토스-1,6-비스포스파타제 활성의 발현을 증가시킴으로써, 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*)에서 리신 생산을 증가시키는 방법을 제공한다. 또한, 본 발명은 옥살로아세테이트 (OAA)를 향한 탄소 유량을 조절함으로써 리신을 생산하기 위한 신규한 방법을 제공한다. 바람직한 양태에서, 본 발명은 탄소원으로서는 프럭토스 또는 수크로스를 활용함으로써 리신을 생산하는 방법을 제공한다.

특허청구의 범위

청구항 1.

펜토스 포스페이트 경로를 통한 대사 유량이 증가되는 조건하에서, 탈제어 (deregulation)된 유전자를 포함하는 미생물을 배양하는 단계를 포함하는, 미생물에서 펜토스 포스페이트 경로를 통한 대사 유량을 증가시키는 방법.

청구항 2.

제1항에 있어서, 프럭토스 또는 수크로스가 탄소원으로서는 사용되는 것인 방법.

청구항 3.

제1항에 있어서, 프럭토스가 탄소원으로서는 사용되는 것인 방법.

청구항 4.

제1항에 있어서, 유전자가 프럭토스-1,6-비스포스파타제인 방법.

청구항 5.

제4항에 있어서, 프럭토스-1,6-비스포스파타제 유전자가 코리네박테리움 (*Corynebacterium*)으로부터 유래된 것인 방법.

청구항 6.

제4항에 있어서, 프럭토스-1,6-비스포스파타제 유전자가 과발현되는 것인 방법.

청구항 7.

제1항에 있어서, 유전자가 프럭토스-1,6-비스포스파타제를 코딩하는 것인 방법.

청구항 8.

제7항에 있어서, 프럭토스-1,6-비스포스파타제가 증가된 활성을 지니는 것인 방법.

청구항 9.

제1항에 있어서, 미생물이 그람 양성 (Gram positive) 미생물인 방법.

청구항 10.

제1항에 있어서, 미생물이 코리네박테륨 속에 속하는 것인 방법.

청구항 11.

제10항에 있어서, 미생물이 코리네박테륨 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*)인 방법.

청구항 12.

제1항에 있어서, 미생물이 발효되어 정밀 화학물질 (fine chemical)을 생산하는 것인 방법.

청구항 13.

제1항에 있어서, 미생물이 하나 이상 추가의 탈제어된 유전자를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 14.

제13항에 있어서, 하나 이상 추가의 탈제어된 유전자가 ask 유전자, dapA 유전자, asd 유전자, dapB 유전자, ddh 유전자, lysA 유전자, lysE 유전자, pycA 유전자, zwf 유전자, pepCL 유전자, gap 유전자, zwa1 유전자, tkt 유전자, tad 유전자, mqo 유전자, tpi 유전자, pgk 유전자 및 sigC 유전자로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 15.

제14항에 있어서, 하나 이상 추가의 탈제어된 유전자가 과발현되는 것인 방법.

청구항 16.

제13항에 있어서, 하나 이상 추가의 탈제어된 유전자가 피드백 내성 아스파르토키나제, 디히드로디피콜리네이트 신타제, 아스파르테이트 세미알데히드 데히드로게나제, 디히드로디피콜리네이트 리덕타제, 디아미노피멜레이트 데히드로게나제, 디아미노피멜레이트 에피머라제, 리신 외수송 인자 (exporter), 피루베이트 카르복실라제, 글루코스-6-포스페이트 데히드로게나제, 포스포에놀피루베이트 카르복실라제, 글리세르알데히드-3-포스페이트 데히드로게나제, RPF 단백질 전구체, 트랜스케톨라제, 트랜스알돌라제, 메나퀴논 옥시도리덕타제, 트리오스포스페이트 이소머라제, 3-포스포글리세레이트 키나제 및 RNA-폴리머라제 시그마 인자 sigC로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질을 코딩하는 것인 방법.

청구항 17.

제16항에 있어서, 상기 단백질이 증가된 활성을 지니는 것인 방법.

청구항 18.

제13항에 있어서, 하나 이상 추가의 탈제어된 유전자가 pepCK 유전자, malE 유전자, glgA 유전자, pgi 유전자, dead 유전자, menE 유전자, citE 유전자, mikE17 유전자, poxB 유전자, zwa2 유전자 및 sucC 유전자로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 19.

제18항에 있어서, 하나 이상 추가의 탈제어된 유전자가 감쇠, 감소 또는 억제되는 것인 방법.

청구항 20.

제13항에 있어서, 하나 이상 추가의 탈제어된 유전자가 포스포에놀피루베이트 카르복시키나제, 말산 효소, 글리코겐 신타제, 글루코스-6-포스페이트 이소머라제, ATP 의존성 RNA 헬리카제, o-숙시닐벤조산-CoA 리가제, 시트레이트 라이아제 베타쇄, 전사 조절자, 피루베이트 데히드로게나제, RPF 단백질 전구체 및 숙시닐-CoA-신테타제로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질을 코딩하는 것인 방법.

청구항 21.

제20항에 있어서, 상기 단백질이 감소된 활성을 지니는 것인 방법.

청구항 22.

- a) 프럭토스-1,6-비스포스파타제를 탈제어시킨 미생물을 배양하는 단계, 및
- b) 배지 또는 상기 미생물의 세포 중에 정밀 화학물질을 축적시켜서 정밀 화학물질을 생산하는 단계를 포함하는, 정밀 화학물질의 생산 방법.

청구항 23.

정밀 화학물질이 생산되는 조건하에서, 하나 이상의 펜토스 포스페이트 생합성 경로 유전자 또는 효소를 탈제어시킨 미생물을 배양하는 단계를 포함하는, 정밀 화학물질의 생산 방법.

청구항 24.

제23항에 있어서, 생합성 경로 유전자가 프럭토스-1,6-비스포스파타제인 방법.

청구항 25.

제23항에 있어서, 생합성 경로 효소가 프럭토스-1,6-비스포스파타제인 방법.

청구항 26.

제22항 또는 제24항에 있어서, 프럭토스-1,6-비스포스파타제 발현이 증가되는 것인 방법.

청구항 27.

제22항 또는 제25항에 있어서, 프럭토스-1,6-비스포스파타제 활성이 증가되는 것인 방법.

청구항 28.

제22항 또는 제23항에 있어서, 정밀 화학물질을 회수하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 29.

제22항 또는 제23항에 있어서, 하나 이상 추가의 유전자가 탈제어되는 것인 방법.

청구항 30.

제29항에 있어서, 하나 이상 추가의 탈제어된 유전자가 ask 유전자, dapA 유전자, asd 유전자, dapB 유전자, ddh 유전자, lysA 유전자, lysE 유전자, pycA 유전자, zwf 유전자, pepCL 유전자, gap 유전자, zwa1 유전자, tkt 유전자, tad 유전자, mqo 유전자, tpi 유전자, pgk 유전자 및 sigC 유전자로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 31.

제30항에 있어서, 하나 이상 추가의 탈제어된 유전자가 과발현되는 것인 방법.

청구항 32.

제29항에 있어서, 하나 이상 추가의 탈제어된 유전자가 피드백 내성 아스파르트키나제, 디히드로디피콜리네이트 신타제, 아스파르테이트 세미알데히드 데히드로게나제, 디히드로디피콜리네이트 리덕타제, 디아미노피멜레이트 데히드로게나제, 디아미노피멜레이트 에피머라제, 리신 외수송 인자, 피루베이트 카르복실라제, 글루코스-6-포스페이트 데히드로게나제, 포스포에놀피루베이트 카르복실라제, 글리세르알데히드-3-포스페이트 데히드로게나제, RPF 단백질 전구체, 트랜스케톨라제, 트랜스알돌라제, 메나퀴논 옥시도리덕타제, 트리오스포스페이트 이소머라제, 3-포스포글리세레이트 키나제 및 RNA-폴리머라제 시그마 인자 sigC로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질을 코딩하는 것인 방법.

청구항 33.

제32항에 있어서, 상기 단백질이 증가된 활성을 지니는 것인 방법.

청구항 34.

제29항에 있어서, 하나 이상 추가의 탈제어된 유전자가 pepCK 유전자, malE 유전자, glgA 유전자, pgi 유전자, dead 유전자, menE 유전자, citE 유전자, mikE17 유전자, poxB 유전자, zwa2 유전자 및 sucC 유전자로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 35.

제34항에 있어서, 하나 이상 추가의 탈제어된 유전자가 감쇠, 감소 또는 억제되는 것인 방법.

청구항 36.

제29항에 있어서, 하나 이상 추가의 탈제어된 유전자가 포스포에놀피루베이트 카르복시키나제, 말산 효소, 글리코젠 신타제, 글루코스-6-포스페이트 이소머라제, ATP 의존성 RNA 헬리카제, o-숙시닐벤조산-CoA 리가제, 시트레이트 라이아제 베타쇄, 전사 조절자, 피루베이트 탈수소효소, RPF 단백질 전구체 및 숙시닐-CoA-신테타제로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질을 코딩하는 것인 방법.

청구항 37.

제36항에 있어서, 상기 단백질이 감소된 활성을 지니는 것인 방법.

청구항 38.

제22항 또는 제23항에 있어서, 미생물이 그람 양성 미생물인 방법.

청구항 39.

제22항 또는 제23항에 있어서, 미생물이 코리네박테륨 속에 속하는 것인 방법.

청구항 40.

제39항에 있어서, 미생물이 코리네박테륨 글루타미쿰인 방법.

청구항 41.

제22항 또는 제23항에 있어서, 정밀 화학물질이 리신인 방법.

청구항 42.

제41항에 있어서, 리신이 100 g/L 이상의 수율로 생산되는 것인 방법.

청구항 43.

제41항에 있어서, 리신이 150 g/L 이상의 수율로 생산되는 것인 방법.

청구항 44.

제22항 또는 제23항에 있어서, 프럭토스 또는 수크로스가 탄소원으로 사용되는 것인 방법.

청구항 45.

제22항 또는 제23항에 있어서, 프럭토스가 탄소원으로 사용되는 것인 방법.

청구항 46.

제22항 또는 제24항에 있어서, 프럭토스-1,6-비스포스파타제가 서열 1의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 47.

제22항 또는 제24항에 있어서, 프럭토스-1,6-비스포스파타제가 서열 2의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 코딩하는 것인 방법.

청구항 48.

탈제어된 펜토스 포스페이트 생합성 경로를 갖는 재조합 미생물.

청구항 49.

탈제어된 펜토스 포스페이트 생합성 유전자를 포함하는 재조합 미생물.

청구항 50.

제49항에 있어서, 탈제어된 유전자가 프럭토스-1,6-비스포스파타제인 재조합 미생물.

청구항 51.

제50항에 있어서, 프럭토스-1,6-비스포스파타제 발현이 증가된 재조합 미생물.

청구항 52.

제50항에 있어서, 프럭토스-1,6-비스포스파타제 유전자가, 증가된 활성을 지닌 프럭토스-1,6-비스포스파타제 단백질을 코딩하는 재조합 미생물.

청구항 53.

제49항에 있어서, 미생물이 코리네박테륨 속에 속하는 재조합 미생물.

청구항 54.

제53항에 있어서, 미생물이 코리네박테륨 글루타미쿰인 재조합 미생물.

청구항 55.

서열 1의 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩되고, 프럭토스-1,6-비스포스파타제 활성을 지닌 폴리펩티드.

명세서

배경기술

아미노산 리신을 산업적으로 생산하는 것은 경제적으로 중요한 산업 공정이 되어 왔다. 리신은 기타 아미노산의 흡수를 증가시킴으로써 사료의 질을 향상시킬 수 있는 능력으로 인해 동물 사료 보충물로서 상업적으로 사용되고 있고, 인체 의학에서는 특히 주입용 용액제의 성분으로서 사용되며, 제약 산업에도 사용되고 있다.

이러한 리신의 상업적 생산은 그람 양성균 코리네박테륨 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*), 브레비박테륨 플라움 (*Brevibacterium flavum*) 및 브레비박테륨 락토펙페르멘툼 (*Brevibacterium lactofermentum*)을 활용함으로써 주로 수행되고 있다 [참고: Kleemann, A., et. al., "Amino Acids," in ULLMANN'S ENCYCLOPEDIA OF INDUSTRIAL CHEMISTRY, vol. A2, pp.57-97, Weinham: VCH-Verlagsgesellschaft (1985)]. 이들 유기체가 현재, 매년 생산되는 대략 250,000 톤의 리신을 책임지고 있다. 보다 많은 양의 리신을 생산하는 돌연변이체 세균성 균주를 분리하기 위한 상당량의 학술 조사가 시작되었다. 아미노산 생산을 위한 미생물 공정에 이용되는 미생물은 다음 4가지 부류로 나뉘어진다: 야생형 균주, 영양요구성 돌연변이체, 조절성 돌연변이체 및 영양요구성 조절성 돌연변이체 [참고: K. Nakayama et al., in *Nutritional Improvement of Food and Feed Proteins*, M. Friedman, ed., (1978), pp. 649-661]. 코리네박테륨의 돌연변이체 및 관련 유기체는 값이 싼 탄소원, 예를 들어 당밀, 아세트산 및 에탄올로부터 직접적인 발효에 의해 아미노산을 저렴하게 생산할 수 있게 해준다. 또한, 발효에 의해 생산된 아미노산의 입체특이성 (L 이성체)은 합성 공정과 비교해서 유리한 공정이 되도록 한다.

리신의 상업적 생산 효율을 개선시키기 위한 또다른 방법은 리신 생산과 펜토스 포스페이트 경로를 통한 대사 유량 (유속) (metabolic flux) 간의 상관 관계를 조사하는 것이다. 발효 공정에 의해 리신을 생산하는 것이 경제적으로 중요하다고 가정하고, 표면상 리신 총 생산량을 증가시키고 생산 비용을 감소시킬 목적으로, 생화학적 리신 합성 경로가 집중적으로 연구되어 왔다 [참고: Sahm et al., (1996) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 782: 25-39]. 글루코스 유래 탄소 흐름이 방향족 아미노산 형성 쪽으로 지시되도록 하는 대사 공학을 이용하는데 있어서 일부 성공적인 결과가 나타났다 [참고: Flores, N. et al., (1996) *Nature Biotechnol.* 14: 620-623]. 세포성 흡수시, 글루코스는 포스포에놀피루베이트의 소모와 함께 인산화된 다음 (포스포트랜스퍼라제 시스템) [참고: Malin & Bourd, (1991) *Journal of Applied Bacteriology* 71, 517-523], 글루코스-6-포스페이트로서 세포에 이용 가능하다. 수크로스는 포스포트랜스퍼라제 시스템 [참고: Shio et al., (1990) *Agricultural and Biological Chemistry* 54, 1513-1519] 및 전화 효소 (invertase) 반응 [참고: Yamamoto, et al., (1986) *Journal of Fermentation Technology* 64, 285-291]에 의해 프럭토스 및 글루코스-6-포스페이트로 전환된다.

글루코스 이화 대사 (catabolism) 동안, 효소 글루코스-6-포스페이트 데히드로게나제 (EC 1.1.14.9)와 글루코스-6-포스페이트 이소머라제 (EC 5.3.1.9)는 기질 글루코스-6-포스페이트를 놓고 서로 경쟁한다. 효소 글루코스-6-포스페이트 이소머라제는 엠브덴-마이여호프-파르나스 (Embden-Meyerhof-Parnas) 경로의 제1 반응 단계, 또는 당분해, 즉 프럭토스-6-포스페이트로의 전환 공정을 촉매한다. 효소 글루코스-6-포스페이트 데히드로게나제는 펜토스 포스페이트 주기의 산화적 부분의 제1 반응 단계, 즉 6-포스포글루코놀락톤으로의 전환 단계를 촉매한다.

펜토스 포스페이트 주기의 산화적 부분에서는, 글루코스-6-포스페이트가 리불로스-5-포스페이트로 전환되므로, NADPH 형태의 환원 등가물이 생성된다. 펜토스 포스페이트 주기가 추가로 진행됨에 따라, 펜토스 포스페이트, 헥소스 포스페이트 및 트리오스 포스페이트가 상호 전환된다. 펜토스 포스페이트, 예를 들어 5-포스포리보실-1-피로포스페이트가, 예를 들어 뉴클레오타이드 생합성에 요구된다. 5-포스포리보실-1-피로포스페이트는 더우기, 방향족 아미노산과 아미노산 L-히스티딘에 대한 전구체이다. NADPH는 수 많은 동화 (anabolic) 생합성에서 환원 등가물로서 작용한다. 이로써, 옥살아세트산으로부터 리신 1 분자를 생합성하기 위해서는 NADPH 4 분자가 소모된다. 따라서, 옥살로아세트산 (OAA)로의 탄소 유량은 시스템 변동과 상관없이 일정하게 유지된다 [참고: J. Vallino et al., (1993) *Biotechnol. Bioeng.*, 41, 633-646].

발명의 요약

본 발명은 적어도 부분적으로는, 코리네박테륨 글루타미쿰에서 펜토스 포스페이트 경로의 주요 효소-코딩 유전자, 예를 들어 프럭토스-1,6-비스포스파타제의 발견과, 프럭토스-1,6-비스포스파타제의 발현 또는 활성을 탈제어 (deregulation), 예를 들어 증가시키면 리신 생산이 증가된다는 발견에 기초한 것이다. 추가로, 프럭토스-1,6-비스포스파타제 발현 또는 활성을 탈제어, 예를 들어 증가시킴으로써 리신 생산 동안 탄소 수율을 증가시키는 것이, 리신 생산 증가를 선도한다는 사실이 밝혀졌다. 한 양태에서, 탄소원이 프럭토스 또는 수크로스이다. 따라서, 본 발명은 프럭토스 또는 수크로스가 기질인, 미생물, 예를 들어 코리네박테륨 글루타미쿰 (*C. glutamicum*)에 의해 리신 생산을 증가시키는 방법을 제공해 준다.

따라서, 한 국면에서, 본 발명은 펜토스 포스페이트 경로를 통한 대사 유량이 증가되는 조건하에서 탈제어된 유전자를 포함하는 미생물을 배양하는 단계를 포함하는, 미생물에서 펜토스 포스페이트 경로를 통한 대사 유량을 증가시키는 방법을 제공한다. 한 양태에서, 상기 미생물을 발효시켜 정밀 화학물질 (fine chemical), 예를 들어 리신을 생산한다. 또다른 양태에서, 프럭토스 또는 수크로스가 탄소원으로서 사용된다. 또다른 양태에서, 유전자가 프럭토스-1,6-비스포스파타제이다. 관련 양태에서, 프럭토스-1,6-비스포스파타제 유전자가 코리네박테륨, 예를 들어 코리네박테륨 글루타미쿰으로부터 유래된 것이다. 또다른 양태에서, 프럭토스-1,6-비스포스파타제 유전자가 과발현된다. 추가의 양태에서, 프럭토스-1,6-비스포스파타제 유전자에 의해 코딩된 단백질이 증가된 활성을 지니고 있다.

또다른 양태에서, 상기 미생물이 하나 이상 추가의 탈제어된 유전자를 추가로 포함한다. 이러한 하나 이상 추가의 탈제어된 유전자에는 ask 유전자, dapA 유전자, asd 유전자, dapB 유전자, ddh 유전자, lysA 유전자, lysE 유전자, pycA 유전자, zwf 유전자, pepCL 유전자, gap 유전자, zwa1 유전자, tkt 유전자, tad 유전자, mqo 유전자, tpi 유전자, pgk 유전자 및 sigC 유전자가 포함될 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 특정한 양태에서, 상기 유전자가 과발현되거나 불충분하게 발현될 수 있다. 더우기, 탈제어된 유전자는 피드-백 내성 아스파르트키나제, 디히드로디피콜리네이트 신타제, 아스파르트이트 세미알데히드 데히드로게나제, 디히드로디피콜리네이트 리덕타제, 디아미노피멜레이트 데히드로게나제, 디아미노피멜레이트 에피머라제, 리신 외수송 인자 (exporter), 피루베이트 카르복실라제, 글루코스-6-포스페이트 데히드로게나제, 포스포에놀피루베이트 카르복실라제, 글리세르알데히드-3-포스페이트 데히드로게나제, RPF 단백질 전구체, 트랜스케툴라제, 트랜스알돌라제, 메나퀴닌 옥시도리덕타제, 트리오스포스페이트 이소머라제, 3-포스포글리세레이트 키나제 및 RNA-폴리머라제 시그마 인자 sigC로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질을 코딩할 수 있다. 특정한 양태에서, 상기 단백질이 증가되거나 감소된 활성을 지닐 수도 있다.

본 발명의 방법에 따르면, 상기 하나 이상 추가의 탈제어된 유전자에는 pepCK 유전자, malE 유전자, glgA 유전자, pgi 유전자, dead 유전자, menE 유전자, citE 유전자, mikE17 유전자, poxB 유전자, zwa2 유전자 및 sucC 유전자가 포함될 수도 있지만, 이에 제한되지 않는다. 특정한 양태에서, 하나 이상의 유전자의 발현이 상향 조절, 감쇠, 감소, 하향 조절 또는 억제된다. 더우기, 탈제어된 유전자는 포스포에놀피루베이트 카르복시키나제, 말산 효소, 글리코겐 신타제, 글루코스-6-포스페이트 이소머라제, ATP 의존성 RNA 헬리카제, o-숙시닐벤조산-CoA 리가제, 시트레이트 라이아제 베타쇄, 전사 조절자, 피루베이트 데히드로게나제, RPF 단백질 전구체 및 숙시닐-CoA-신테타제로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질을 코딩할 수 있다. 특정한 양태에서, 상기 단백질이 감소되거나 증가된 활성을 지닐 수 있다.

한 양태에서, 본 발명의 방법에 사용된 미생물이 코리네박테륨 속, 예를 들어 코리네박테륨 글루타미쿰에 속한다.

또다른 국면에서, 본 발명은 프럭토스-1,6-비스포스파타제를 탈제어시킨 미생물을 발효하는 단계; 및 배지 또는 상기 미생물의 세포 중에 정밀 화학물질 (예: 리신)를 축적시켜서 정밀 화학물질을 생산하는 단계를 포함하는, 정밀 화학물질의 생산 방법을 제공한다. 한 양태에서, 이러한 방법이 정밀 화학물질을 회수하는 단계를 포함한다. 또다른 양태에서, 프럭토스-1,6-비스포스파타제 유전자가 과발현된다, 또다른 양태에서, 프럭토스 또는 수크로스가 탄소원으로서 사용된다.

한 국면에서, 프럭토스-1,6-비스포스파타제는 코리네박테륨 글루타미쿰으로부터 유래된 것이고, 이는 서열 1의 뉴클레오티드 서열 및 서열 2의 아미노산 서열을 포함한다.

본 발명의 기타 특징 및 이점은 다음 상세한 설명과 청구의 범위로부터 명백할 것이다.

발명의 상세한 설명

본 발명은 적어도 부분적으로는, 펜토스 포스페이트 경로의 필수 효소를 코딩하는 유전자, 예를 들어 코리네박테륨 글루타미쿰 유전자를 확인 (동정)하는 것에 기초한다. 본 발명은 탄소 수율을 증가시키고 특정의 목적하는 정밀 화학물질 (예: 리신)이 생산되도록, 예를 들면 증가된 수율로 생산되도록, 펜토스 포스페이트 생합성 경로를 특정 미생물, 예를 들어 코리네박테륨 글루타미쿰에서 조작하는 단계를 포함하는 방법을 특징으로 한다. 특히, 본 발명은 탈제어된, 예를 들어 증가된 프럭토스-1,6-비스포스파타제 발현 또는 활성을 지니고 있는 미생물, 예를 들어 코리네박테륨 글루타미쿰을 발효시킴으로써, 정밀 화학물질 (예: 리신)을 생산하는 방법을 포함한다. 한 양태에서, 프럭토스 또는 사카로스가 상기 미생물 발효에 있어 탄소원으로서 사용된다. 프럭토스는 미생물로부터 정밀 화학물질 (예: 리신)을 생산하는데 있어 덜 효율적인 기질인 것으로 확립된 바 있다. 그러나, 본 발명은 프럭토스 또는 수크로스가 기질인, 미생물, 예를 들어 코리네박테륨 글루타미쿰에 의해 리신을 최적으로 생산하는 방법을 제공한다. 프럭토스-1,6-비스포스파타제 발현 또는 활성을 탈제어, 예를 들어 증폭시키면, 펜토스 포스페이트 경로를 통하여 보다 많은 유량이 생기게 되어, NADPH 발생이 증가하고 리신 수율 역시 증가한다.

용어 "펜토스 포스페이트 경로"에는 정밀 화학물질 (예: 리신)의 형성 또는 합성에 활용된 펜토스 포스페이트 효소 (예: 생합성 효소-코딩 유전자에 의해 코딩된 폴리펩티드), 화합물 (예: 전구체, 기질, 중간체 또는 생성물), 보조인자 등이 관여하는 경로가 포함된다. 펜토스 포스페이트 경로는 글루코스 분자를, 생화학적으로 유용한 보다 작은 분자로 전환시켜 준다.

본 발명을 보다 용이하게 이해할 수 있도록 하기 위해, 특정 용어가 본원에 다음과 같이 규정된다.

용어 "펜토스 포스페이트 생합성 경로"에는 정밀 화학물질 (예: 리신)의 형성 또는 합성에 활용된 펜토스 포스페이트 생합성 유전자, 효소 (예: 생합성 효소-코딩 유전자에 의해 코딩된 폴리펩티드), 화합물 (예: 전구체, 기질, 중간체 또는 생성물), 보조인자 등이 관여하는 생합성 경로가 포함된다. 용어 "펜토스 포스페이트 생합성 경로"에는 정밀 화학물질 (예: 리신)을 시험관 내에서 합성시켜 줄 수 있는 생합성 경로 뿐만 아니라 정밀 화학물질 (예: 리신)을 미생물 (예: 생체내)에서 합성시켜 줄 수 있는 생합성 경로가 포함된다. 용어 "펜토스 포스페이트 생합성 경로 단백질" 또는 "펜토스 포스페이트 생합성 경로 효소"에는 펜토스 포스페이트 생합성 경로에 직접 또는 간접적으로 관여하는 펩티드, 폴리펩티드, 단백질, 효소 및 그들의 단편, 예를 들어 프럭토스-1,6-비스포스파타제 효소가 포함된다.

용어 "펜토스 포스페이트 생합성 경로 유전자"에는 펜토스 포스페이트 생합성 경로에 직접 또는 간접적으로 관여하는 펩티드, 폴리펩티드, 단백질 및 효소를 코딩하는 유전자 및 그의 단편, 예를 들어 프럭토스-1,6-비스포스파타제 유전자가 포함된다.

용어 "아미노산 생합성 경로 유전자"에는 아미노산의 합성에 직접적으로 관여하는 펩티드, 폴리펩티드, 단백질 및 효소, 예를 들어 프럭토스-1,6-비스포스파타제를 코딩하는 유전자 및 그의 단편이 포함된다. 이들 유전자는 숙주 세포 내에서 천연적으로 발생하는 유전자와 동일할 수 있고, 이는 이러한 숙주 세포 내에서 모든 아미노산, 특히 리신의 합성에 관여한다.

용어 "리신 생합성 경로 유전자"에는 리신의 합성에 직접적으로 관여하는 펩티드, 폴리펩티드, 단백질 및 효소, 예를 들어 프럭토스-1,6-비스포스파타제를 코딩하는 유전자 및 그의 단편이 포함된다. 이들 유전자는 숙주 세포 내에서 천연적으로 발생하는 유전자와 동일할 수 있고, 이는 이러한 숙주 세포 내에서 리신의 합성에 관여한다. 또다른 한편, 상기 유전자의 변형 또는 돌연변이물이 존재할 수 있는데, 예를 들어, 이들 유전자는 코딩된 단백질의 생물학적 활성에는 상당한 영향을 미치지 않는 변형 또는 돌연변이를 함유할 수 있다. 예를 들어, 천연 유전자는 돌연변이가 유발시키거나, 하나 이상의 뉴클레오타이드를 도입 또는 치환하거나, 또는 상기 유전자의 비필수 영역을 제거함으로써 변형시킬 수 있다. 이러한 변형은 표준 기술에 의해 용이하게 수행한다.

용어 "리신 생합성 경로 단백질"에는 리신의 합성에 직접적으로 관여하는 펩티드, 폴리펩티드, 단백질, 효소 및 그들의 단편이 포함된다. 이들 단백질은 숙주 세포 내에서 천연적으로 발생하는 것과 동일할 수 있고, 이는 이러한 숙주 세포 내에서 리신의 합성에 관여한다. 또다른 한편, 상기 단백질의 변형 또는 돌연변이물이 존재할 수 있는데, 예를 들어, 이들 단백질은 단백질의 생물학적 활성에는 상당한 영향을 미치지 않는 변형 또는 돌연변이를 함유할 수 있다. 예를 들어, 천연 단백질은 돌연변이가 유발시키거나, 하나 이상의 아미노산을 도입 또는 치환하거나, 바람직하게는 보존적 아미노산 치환하거나, 또는 상기 단백질의 비필수 영역을 제거함으로써 변형시킬 수 있다. 이러한 변형은 표준 기술에 의해 용이하게 수행한다. 또다른 한편, 리신 생합성 단백질은 특정한 숙주 세포에 대해 이종 (heterologous)일 수 있다. 이러한 단백질은 동일하거나 유사한 생합성 역할을 지닌 단백질을 코딩하는 유전자를 갖는 모든 유기체로부터 유래될 수 있다.

용어 "탄소 유량"은 경합 경로에 비해 특정한 대사 경로 아래로 진행되는 글루코스 분자 수를 지칭한다. 특히, 특정 미생물의 당분해 경로와 펜토스 포스페이트 경로 간의 탄소 유량 분포를 변경시킴으로써, 이러한 미생물 내에서 NADPH를 증가시킬 수 있다.

"프럭토스-1,6-비스포스파타제 활성"에는 표준 기술에 따라서 생체내 또는 시험관 내에서 결정된 바와 같이 프럭토스-1,6-비스포스파타제 단백질, 폴리펩티드 또는 핵산 분자에 의해 발현된 모든 활성이 포함된다. 프럭토스-1,6-비스포스파타제는 상이한 많은 대사 경로에 관여하고, 대부분의 유기체에서 발견된다. 바람직하게는, 프럭토스-1,6-비스포스파타제 활성에는 프럭토스 1,6-비스포스페이트를 프럭토스 6-포스페이트로 가수분해시키는 것을 촉매하는 활성이 포함된다.

용어 '정밀 화학물질'은 당해 분야에 인식되어 있고, 이에에는 각종 산업 (이에에는 제약, 농업 및 화장품 산업이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다)에 적용되는 유기체에 의해 생산된 분자가 포함된다. 이러한 화합물에는 유기 산, 예를 들어 타르타르산, 이타콘산 및 디아미노피멜산, 단백질 생성 가능한 및 단백질 생성 가능하지 않는 아미노산, 퓨린 및 피리미딘 염기, 뉴클레오시드 및 뉴클레오티드 [참고: Kuninaka, A. (1996) Nucleotides and related compounds, p. 561-612, in Biotechnology vol. 6, Rehm et al., eds. VCH: Weinheim 및 이에 언급된 참고 문헌], 지질, 포화 및 불포화 지방산 (예: 아라키돈산), 디올 (예: 프로판 디올 및 부탄 디올), 탄수화물 (예: 히알루론산 및 트레할로스), 방향족 화합물 (예: 방향족 아민, 바닐린 및 인디고), 비타민 및 보조인자 [참고: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, vol. A27, "Vitamins", p.443-613 (1996) VCH: Weinheim and references therein; and Ong, A.S., Niki, E. & Packer, L. (1995) "Nutrition, Lipids, Health, and Disease" Proceedings of the UNESCO/Confederation of Scientific and Technological Associations in Malaysia, and the Society for Free Radical Research-Asia, held Sept. 1-3, 1994 at Penang, Malaysia, AOCS Press, (1995)], 효소, 폴리케티드 (polyketide) [참고: Cane et al. (1998) Science 282: 63-68] 및 문헌 [참고: Gutcho (1983) Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation, ISBN: 0818805086 및 이에 기재된 참고문헌]에 기재된 기타 모든 화학물질이 포함된다. 이들 특정의 정밀 화학물질의 대사 및 용도가 다음에 추가로 자세히 설명된다.

아미노산 대사 및 용도

아미노산은 모든 단백질의 기본 구조 단위를 차지하므로, 모든 유기체에서 정상적인 세포 기능을 위해 필수적이다. 용어 "아미노산"은 당해 분야에 잘 인식되어 있다. 단백질 생성 가능한 아미노산 (이에에는 20가지 종류가 있다)은 단백질에 대한 구조 단위로서 제공되고, 이들은 펩티드 결합에 의해 연결되어 있는 반면, 단백질 생성 가능하지 않는 아미노산 (수 많은 것들이 공지되어 있다)은 단백질에서 정상적으로 발견되지 않는다 [참고: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, vol. A2, p. 57-97 VCH: Weinheim (1985)]. 아미노산은 D- 또는 L- 광학 배위로 존재할 수 있지만, L-아미노산이 일반적으로, 천연-발생적 단백질에서 발견되는 유일한 유형이다. 단백질 생성 가능한 20개 아미노산 각각의 생합성 및 분해 경로는 원핵성 세포와 진핵성 세포 모두에서 널리 성상 확인되었다 [참고: 예를 들어, Stryer, L.

Biochemistry, 3rd edition, pages 578-590 (1988)]. '필수' 아미노산 (히스티딘, 이소류이신, 루이신, 리신, 메티오닌, 페닐알라닌, 트레오닌, 트립토판 및 발린) [이와 같이 '필수'로 명명된 이유는 이들 아미노산을 생합성하는 것이 복잡하기 때문에 이들 아미노산이 일반적으로 영양적으로 요구되기 때문이다]은 간단한 생합성 경로에 의해 나머지 11개 '비필수' 아미노산 (알라닌, 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르테이트, 시스테인, 글루타메이트, 글루타민, 글리신, 프롤린, 세린 및 티로신)으로 용이하게 전환된다. 보다 고등 동물은 이들 아미노산 중의 몇 가지를 합성할 수 있는 능력을 보유하고 있긴 하지만, 정상적인 단백질 합성이 일어나도록 하기 위해서는 필수 아미노산이 음식물로부터 공급되어야만 한다.

단백질 생합성에 있어서의 그들의 기능은 제쳐 놓고도, 이들 아미노산은 본래의 권리로도 흥미로운 화학물질이며, 많은 것들이 식품, 사료, 화학제품, 화장품, 농업 및 제약 산업에서 다양하게 적용되는 것으로 밝혀졌다. 리신은 인간 뿐만 아니라 단위 동물 (monogastric animal), 예를 들어 가금류 및 돼지의 영양에 있어 중요한 아미노산이다. 글루타메이트는 향미용 첨가제 (모노-나트륨 글루타메이트, MSG)로서 가장 흔히 사용되고 있고, 이는 아스파르테이트, 페닐알라닌, 글리신 및 시스테인과 마찬가지로, 식품 산업 전반에 걸쳐 광범위하게 사용되고 있다. 글리신, L-메티오닌 및 트립토판은 모든 제약 산업에 활용되고 있다. 글루타민, 발린, 루이신, 이소류이신, 히스티딘, 아르기닌, 프롤린, 세린 및 알라닌은 제약 산업과 화장품 산업 모두에 사용되고 있다. 트레오닌, 트립토판 및 D/L-메티오닌은 통상적인 사료 첨가제이다 [참고:

Leuchtenberger, W. (1996) Amino acids-technical production and use, p. 466-502 in Rehm et al. (eds.) Biotechnology vol. 6, chapter 14a, VCH: Weinheim]. 부가적으로, 이들 아미노산은 합성 아미노산 및 단백질, 예를 들면 N-아세틸시스테인, S-카르복시메틸-L-시스테인, (S)-5-히드록시트립토판 및 문헌 [참고: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, vol. A2, p. 57-59, VCH: Weinheim, 1985]에 기재된 것들을 합성하기 위한 전구체로서 유용한 것으로 밝혀졌다.

이들 천연 아미노산을 생산할 수 있는 유기체, 예를 들어 세균에서 이들 아미노산을 생합성하는 것은 널리 성상확인 되었다 [이들의 세균성 아미노산 생합성 및 조절에 관한 고찰은 문헌 (Umbarger, H.E. (1978) *Ann. Rev. Biochem.* 47: 533-606)을 참고할 수 있다]. 글루타메이트는 시트르산 주기에 있어 중간체인 α -케토글루타레이트를 환원적 아민화시킴으로써 합성한다. 글루타민, 프롤린 및 아르기닌은 각각, 글루타메이트로부터 후속 생성된다. 세린의 생합성은 3-포스포글리세레이트 (당분해에 있어 중간체)로부터 시작하는 3-단계 공정인데, 산화, 아민기 전이 반응 및 가수분해 단계 후에 세린이 생성된다. 시스테인과 글리신 둘 다는 세린으로부터 생성되는데, 시스테인은 호모시스테인과 세린의 축합 반응에 의해 생성되고, 글리신은 세린 트랜스히드록시메틸라제에 의해 촉매된 반응에서, 측쇄 β -탄소 원자를 테트라히드로폴레이트로 전이시킴으로써 생성된다. 페닐알라닌 및 티로신은 프레페네이트의 합성 후 마지막 2 단계에서만 상이한 9-단계 생합성 경로에서 당분해 및 펜토스 포스페이트 경로 전구체 에리트로스 4-포스페이트 및 포스포에놀피루베이트로부터 합성된다. 트립토판은 이들 2개의 초기 분자로부터 생성되기도 하지만, 그의 합성은 11-단계 경로이다. 티로신은 또한, 페닐알라닌 히드록실라제에 의해 촉매된 반응에서 페닐알라닌으로부터 합성될 수 있다. 알라닌, 발린 및 루이신은 모두, 당분해의 마지막 생성물인 피루베이트의 생합성 생성물이다. 아스파르테이트는 시트르산 주기의 중간체인 옥살로아세테이트로부터 형성된다. 아스파라긴, 메티오닌, 트레오닌 및 리신은 각각, 아스파르테이트의 전환에 의해 생성된다. 이소루이신은 트레오닌으로부터 형성된다. 복잡한 9-단계 경로로 인해, 활성화 당인 5-포스포리보실-1-피로포스페이트로부터 히스티딘이 생성된다.

세포의 단백질 합성에 필요한 것 보다 과량으로 존재하는 아미노산은 저장될 수 없고, 대신 분해되어 세포의 주요 대사 경로에 대한 중간체를 제공한다 [참고: Stryer, L. *Biochemistry* 3rd ed. Ch. 21 "Amino Acid Degradation and the Urea Cycle" p.495-516 (1988)]. 세포가 불필요한 아미노산을 유용한 대사 중간체로 전환시킬 수 있긴 하지만, 아미노산 생산은 에너지, 전구체 분자 및 이를 합성하는데 필요한 효소 측면에서 보면 비용이 많이 든다. 따라서, 아미노산 생합성이 피드백 억제 (여기서는, 특정한 아미노산의 존재가 그 자신의 생산을 느리게 하거나 완전히 중지시키는 작용을 한다)에 의해 조절된다는 것은 놀라운 일이 아니다 [아미노산 생합성 경로에서의 피드백 기전에 관한 고찰은 문헌 (Stryer, L. *Biochemistry*, 3rd ed. Ch.24: "Biosynthesis of Amino Acids and Heme" p. 575-600 (1988)을 참고할 수 있다]. 따라서, 특정한 모든 아미노산의 산출량은 세포 내에 존재하는 이러한 아미노산의 양에 의해 제한된다.

비타민, 보조인자 및 영양보조식품 대사 및 용도

비타민, 보조인자 및 영양보조식품은 세균과 같은 기타 유기체에 의해서는 용이하게 합성되긴 하지만, 고등 동물은 이들을 합성할 수 있는 능력을 상실하였기 때문에, 반드시 섭취해야만 하는 또다른 분자 군을 포함한다. 이들 분자는 그 자체가 생체 활성 분자이거나, 또는 각종 대사 경로에서 전자 운반체 또는 중간체로서 제공될 수 있는 생물학적 활성 물질의 전구체이다. 이들의 영양가는 별도로 하고도, 이들 화합물은 또한, 착색제, 산화방지제 및 촉매 또는 기타 공정 보조제로서 상당한 산업적 가치를 지니고 있다 [이들 화합물의 구조, 활성 및 산업적 적용에 대한 개요는 예를 들어, 문헌 (Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, "Vitamins" vol. A27, p. 443-613, VCH: Weinheim, 1996)을 참고할 수 있다]. 용어 "비타민"은 당해 분야에 잘 인식되어 있고, 이에는 유기체가 정상적인 기능을 하기 위해서는 반드시 필요하지만, 유기체가 스스로 합성할 수는 없는 영양분이 포함된다. 비타민 군에는 보조인자 및 영양보조식품 화합물이 포괄될 수 있다. 용어 "보조인자"에는 정상적인 효소적 활성을 유발시키는데 요구되는 비-단백질성 화합물이 포함된다. 이러한 화합물은 유기 또는 무기일 수 있고; 본 발명의 보조인자 분자는 바람직하게 유기이다. 용어 "영양보조식품"에는 식물 및 동물, 특히 인간에게 건강상 이익을 제공해 주는 건강보조식품이 포함된다. 이러한 분자의 예가 비타민, 산화방지제 및 특정 지질 (예: 다불포화 지방산)이다.

이들 분자를 생산할 수 있는 유기체, 예를 들어 세균에서 이들 분자를 생합성하는 것은 광범위하게 성상확인 되었다 [참고: Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry, "Vitamins" vol. A27, p. 443-613, VCH: Weinheim, 1996; Michal, G. (1999) *Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology*, John Wiley & Sons; Ong, A.S., Nile, E. & Packer, L. (1995) "Nutrition, Lipids, Health, and Disease", Proceedings of the UNESCO/Confederation of Scientific and Technological Associations in Malaysia, and the Society for Free Radical Research-Asia, held Sept. 1-3, 1994 at Penang, Malaysia, AOCS Press: Champaign, IL X, 374 S].

티아민 (비타민 B₁)은 피리미딘과 티아졸 잔기를 화학적 커플링시킴으로써 생성된다. 리보플라빈 (비타민 B₂)은 구아노신-5'-트리포스페이트 (GTP) 및 리보스-5'-포스페이트로부터 합성된다. 리보플라빈은 결국, 플라빈 모노뉴클레오타이드 (FMN)와 플라빈 아데닌 디뉴클레오타이드 (FAD)의 합성을 위해 활용된다. 집합적으로 '비타민 B₆'으로 명명된 화합물 계열 (예: 피리독신, 피리독사민, 피리독사-5'-포스페이트 및 상업적으로 사용되는 피리독신 히드로클로라이드)는 모두, 공통

구조 단위, 5-히드록시-6-메틸피리딘의 전구체이다. 판토테네이트 [판토텐산, (R)-(+)-N-(2,4-디히드록시-3,3-디메틸-1-옥소부틸)-β-알라닌]은 화학적 합성이나 발효에 의해 생성될 수 있다. 판토테네이트 생합성의 마지막 단계는 β-알라닌과 판토텐산을 ATP-구동된 축합 반응시키는 것으로 이루어진다. 판토텐산, β-알라닌으로 전환시키기 위한 생합성 단계와, 판토텐산으로 축합시키기 위한 생합성 단계에 책임이 있는 효소는 공지되어 있다. 대사적 활성 형태의 판토테네이트가 조효소 A인데, 이에 대한 생합성은 5가지 효소적 단계로 진행된다. 판토테네이트, 피리독살-5'-포스페이트, 시스테인 및 ATP가 조효소 A의 전구체이다. 이들 효소는 판토테네이트의 형성을 촉매할 뿐만 아니라 (R)-판토텐산, (R)-판토티론, (R)-판테놀 (프로비타민 B₅), 판테테인 (및 그의 유도체) 및 조효소 A의 생성을 촉매한다.

미생물에서 전구체 분자 피멜로일-CoA로부터 바이오틴을 생합성하는 것에 관해 상세히 연구한 결과, 이에 관여한 몇 가지 유전자를 확인(동정)하였다. 상응하는 유전자 중의 상당 수가 Fe-군집 합성에 또한 관여하는 것으로 밝혀졌고, 이는 nifS 부류 단백질의 구성원이다. 리포산이 옥타노산으로부터 유래되고, 이는 에너지 대사에서 조효소로서 제공되는데, 여기서 이는 피루베이트 데히드로게나제 복합체와 α-케토글루타레이트 데히드로게나제 복합체의 일부가 된다. 폴레이트는 L-글루탐산, p-아미노-벤조산 및 6-메틸프테린으로부터 유래되는, 폴산의 모든 유도체인 물질 군이다. 대사 중간체 구아노신-5'-트리포스페이트 (GTP), L-글루탐산 및 p-아미노-벤조산으로부터 출발하여, 폴산 및 그의 유도체를 생합성하는 것이 특정 미생물에서 상세히 연구되었다.

코리노이드 (예: 코발라민 및 특히 비타민 B₁₂) 및 포르피린은 테트라피롤 환 시스템을 특징으로 하는 화합물 질 군에 속한다. 비타민 B₁₂의 생합성은 아직까지 완전히 정상 확인되지 않을 정도로 충분히 복잡하지만, 이에 관여한 많은 효소와 기질이 현재 공지되어 있다.

니코틴산 (니코티네이트) 및 니코틴아미드는 '니아신'으로 지칭되기도 하는 피리딘 유도체이다. 니아신은 중요한 조효소 NAD (니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드) 및 NADP (니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드 포스페이트) 및 그들의 환원 형태의 전구체이다.

이들 화합물을 대규모로 생산하는 것이 상당 부분 세포-무합유 화학적 합성에 좌우되어 왔지만, 이들 화합물 질 중의 일부, 예를 들어 리보플라빈, 비타민 V₆, 판토테네이트 및 바이오틴은 미생물을 대규모 배양함으로써 생산하기도 하였다. 비타민 B₁₂ 만이 발효에 의해서만 생산되는데, 이는 이를 합성하는 것이 복잡하기 때문이다. 시험관내 방법론은 상당량의 물질과 시간을 투입해야 하고, 종종 비용이 많이 든다.

퓨린, 피리미딘, 뉴클레오시드 및 뉴클레오티드 대사 및 용도

퓨린 및 피리미딘 대사 유전자와 그들의 상응하는 단백질은 종양 질환과 바이러스성 감염증 요법을 위한 중요한 표적이다. 용어 "퓨린" 또는 "피리미딘"에는 핵산, 조효소 및 뉴클레오티드의 구성분인 질소 함유 염기가 포함된다. 용어 "뉴클레오티드"에는 핵산 분자의 기본 구조 단위가 포함되는데, 이는 질소 함유 염기, 펜토스 당 (RNA의 경우에는, 당이 리보스이고; DNA의 경우에는, 당이 D-데옥시리보스이다) 및 인산으로 구성된다. 용어 "뉴클레오시드"에는 뉴클레오티드에 대한 전구체로서 제공되는 분자가 포함되는데, 이에는 뉴클레오티드는 보유하고 있는 인산 잔기가 결여되어 있다. 이들 분자의 생합성을 억제하거나, 또는 핵산 분자를 형성하기 위해 이들 분자를 동원하는 것을 억제함으로써, RNA 및 DNA 합성을 억제하는 것이 가능하고; 암성 세포에 대한 표적화 방식으로 상기 활성을 억제함으로써, 분할 및 복제할 수 있는 종양 세포의 능력을 억제시킬 수 있다. 부가적으로, 핵산 분자를 형성하지 않고, 오히려 에너지 저장고 (즉, AMP) 또는 조효소 (즉, FAD 및 NAD)로서 제공되는 뉴클레오티드가 존재한다.

몇 가지 공개 문헌에는 퓨린 및(또는) 피리미딘 대사에 영향을 미침으로써, 상기 의학적 적응증에 대한 이들 화합물 질의 용도가 보고되었다 [참고: 예를 들어, Christopherson, R.I. and Lyons, S.D. (1990) "Potent inhibitors of de novo pyrimidine and purine biosynthesis as chemotherapeutic agents." *Med. Res. Reviews* 10: 505-548]. 퓨린 및 피리미딘 대사에 관여한 효소에 관한 연구는, 예를 들어 면역저해제 또는 항증식제로서 사용할 수 있는 새로운 약물 개발에 초점을 맞추었다 [참고: Smith, J.L., (1995) "Enzymes in nucleotide synthesis." *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5: 752-757; (1995) *Biochem Soc. Transact.* 23: 877-902]. 그러나, 퓨린 및 피리미딘 염기, 뉴클레오시드 및 뉴클레오티드는 다른 용도, 즉 몇 가지 정밀 화합물 질을 생합성하는데 있어서의 중간체 (예: 티아민, S-아데노실-메티오닌, 폴레이트 또는 리보플라빈)로서, 세포에 대한 에너지 운반체 (예: ATP 또는 GTP)로서 및 항미증강제로서 흔히 사용되는 화합물 질 그 자체에 대해, 또는 몇 가지 약제의 적용을 위해 사용된다 [참고: Kuninaka, A. (1996) *Nucleotides and Related Compounds in*

Biotechnology vol. 6, Rehm et al., eds. VCH: Weinheim, p. 561-612]. 또한, 퓨린, 피리미딘, 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 대사에 관여하는 효소가, 작물 보호를 위한 화학제품, 예를 들어 살진균제, 제초제 및 살충제를 개발하는 것에 대한 표적으로서 제공되는 것이 증가하고 있다.

세포에서의 이들 화합물의 대사에 관하여 성상 확인되었다 [참고: 예를 들어, Zalkin, H. and Dixon, J.E. (1992) "de novo purine nucleotide biosynthesis", in: Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, vol. 42, Academic Press; p. 259-287; and Michal, G. (1999) "Nucleotides and Nucleosides", Chapter 8 in: Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology, Wiley: New York]. 퓨린 대사가 집중적인 조사 대상이었고, 이는 세포의 정상적인 기능에 필수적이다. 고등 동물에서 퓨린 대사가 손상되면, 이는 심각한 (중증) 질환, 예를 들어 통풍 (gout) 을 유발시킬 수 있다. 퓨린 뉴클레오타이드는 중간 화합물 이노신-5'-포스페이트 (IMP)을 통한 일련의 단계에서, 리보스-5'-포스페이트로부터 합성되어, 구아노신-5'-모노포스페이트 (GMP) 또는 아데노신-5'-모노포스페이트 (AMP)를 생성시키는데, 이로부터 뉴클레오타이드로서 활용된 트리포스페이트 형태가 용이하게 형성된다. 이들 화합물은 또한, 에너지 저장고로서 활용되기 때문에, 이들의 분해는 세포 내에서의 많은 상이한 생화학적 과정을 위한 에너지를 제공한다. 피리미딘 생합성은 리보스-5'-포스페이트로부터 우리딘-5'-모노포스페이트 (UMP)가 형성됨으로써 다음 단계로 속행한다. UMP는 결국, 시티딘-5'-트리포스페이트 (CTP)로 전환된다. 이들 뉴클레오타이드 모두의 데옥시-형태는, 뉴클레오타이드의 디포스페이트 리보스 형태에서부터 뉴클레오타이드의 디포스페이트 데옥시리보스 형태로의 1-단계 환원 반응에서 생성된다. 인산화시, 이들 분자는 DNA 합성에 참여할 수 있다.

트레할로스 대사 및 용도

트레할로스는 α, α -1,1 연쇄로 결합된 2개의 글루코스 분자로 이루어진다. 이는 식품 산업에서 감미제로서, 건조 또는 냉동 식품에 대한 첨가제로서 및 음료에 흔히 사용된다. 그러나, 이는 제약, 화장품 및 생물공학 산업에 적용되기도 한다 [참고: 예를 들어, Nishimoto et al., (1998) U.S. Patent No. 5,759,610; Singer, M. A. and Lindquist, S. (1998) *Trends Biotech.* 16: 460-467; Paiva, C.L.A. and Panek, A.D. (1996) *Biotech. Ann. Rev.* 2: 293-314; and Shiosaka, M. (1997) *J. Japan* 172: 97-102]. 트레할로스는 많은 미생물로부터의 효소에 의해 생산되고, 주변 매질 내로 자연적으로 방출되는데, 당해 분야에 공지된 방법을 사용하여 그로부터 트레할로스를 수집할 수 있다.

I. 정밀 화학물질이 생산되도록 미생물을 배양하는 방법 및 이를 위한 재조합 미생물

본 발명의 방법론은 본원에 기재된 바와 같고(같거나) 목적하는 정밀 화학물질 (예: 리신)을 생산하는 방식으로 배양된, 바람직하게는 벡터 또는 유전자 (예: 야생형 및(또는) 돌연변이된 유전자)를 포함한 미생물, 예를 들어 재조합 미생물을 특징으로 한다. 용어 "재조합" 미생물에는 유전적 변형이, 그들이 유래되는 천연 발생적 미생물과 비교해서 변경, 변형 또는 상이한 유전형 및(또는) 표현형을 나타내도록 (예를 들어, 유전적 변형이 미생물의 코딩 핵산 서열에 영향을 미치는 경우) 유전적으로 변경, 변형 또는 공학적으로 처리시킨 (예를 들어, 유전 공학적으로 처리시킨) 미생물 (예: 세포, 효모 세포, 진균 세포 등)이 포함된다. 바람직하게, 본 발명의 "재조합" 미생물은 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 세균성 유전자 또는 유전자 생성물, 바람직하게는 본원에 기재된 바와 같은 재조합 벡터 내에 포함된 생합성 효소 코딩 유전자, 예를 들어 프럭토스-1,6-비스포스파타제 및(또는) 재조합 벡터로부터 발현된 생합성 효소, 예를 들어 프럭토스-1,6-비스포스파타제를 과발현하도록 유전 공학적으로 처리시켰다. 당업자는 특정 유전자 생성물을 발현 또는 과발현하는 미생물이, 이러한 유전자 생성물을 코딩하는 핵산 서열 및(또는) 유전자의 발현 또는 과발현의 결과로서 유전자 생성물을 생산 또는 과생산한다는 것을 인지할 것이다. 한 양태에서, 재조합 미생물이 증가된 생합성 효소, 예를 들어 프럭토스-1,6-비스포스파타제 활성을 지녔다.

본 발명의 특정 양태에서, 프럭토스-1,6-비스포스파타제 유전자 또는 효소 이외에도, 하나 이상의 유전자 또는 단백질을 탈제어시켜 L-아미노산의 생산을 증강시킬 수 있다. 예를 들어, 생합성 경로, 예를 들면, 당분해, 보전 (anaplerosis), 시트르산 주기, 펜토스 포스페이트 주기 또는 아미노산 외수송의 유전자 또는 효소를 탈제어시킬 수 있다. 부가적으로, 조절성 유전자 또는 단백질을 탈제어시킬 수 있다.

각종 양태에서, 특정 유전자의 발현을 증가시켜, 이러한 유전자에 의해 코딩된 단백질의 세포내 활성 또는 농도를 증가시킴으로써, 궁극적으로 목적하는 아미노산의 생산을 향상시킬 수 있다. 당업자는 이러한 목적하는 결과를 달성하기 위해 다양한 기술을 사용할 수 있다. 예를 들어, 숙련된 전문가들은 유전자(들)의 카피(복사) 수를 증가시킬 수 있고, 강력한 프로모터를 사용할 수 있고(있거나) 높은 활성을 지닌 상응하는 효소를 코딩하는 유전자 또는 대립 유전자를 사용할 수 있다. 예를 들어, 특정한 유전자를 과발현하는 본 발명의 방법을 사용하여, 상응하는 단백질의 활성 또는 농도를, 출발 활성 또는 농도를 기준으로 하여 약 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400%, 500%, 1000% 또는 2000% 이상 증가시킬 수 있다.

각종 양태에서, 탈제어된 유전자에는 다음 유전자 또는 단백질을 중의 하나 이상이 포함될 수 있지만, 이에 제한되지 않는다:

- 피드백 내성 아스파르토키나제를 코딩하는 ask 유전자 [국제공개공보 W02004069996에 기재된 바와 같음];
- 디히드로디피콜리네이트 신타제를 코딩하는 dapA 유전자 [국제공개공보 W0200100843에서, 각각 서열 55 및 56에 기재된 바와 같음];
- 아스파르테이트 세미알데히드 데히드로게나제를 코딩하는 asd 유전자 [유럽공개공보 1108790에서, 각각 서열 3435 및 6935에 기재된 바와 같음];
- 디히드로디피콜리네이트 리덕타제를 코딩하는 dapB 유전자 [국제공개공보 W0200100843에서, 각각 서열 35 및 36에 기재된 바와 같음];
- 디아미노피멜레이트 데히드로게나제를 코딩하는 ddh 유전자 [유럽공개공보 1108790에서, 각각 서열 3444 및 6944에 기재된 바와 같음];
- 디아미노피멜레이트 에피머라제를 코딩하는 lysA 유전자 [유럽공개공보 1108790에서, 각각 서열 3451 및 6951에 기재된 바와 같음];
- 리신 외수송 인자를 코딩하는 lysE 유전자 [유럽공개공보 1108790에서, 각각 서열 3455 및 6955에 기재된 바와 같음];
- 피루베이트 카르복실라제를 코딩하는 pycA 유전자 [유럽공개공보 1108790에서, 각각 서열 765 및 4265에 기재된 바와 같음];
- 글루코스-6-포스페이트 데히드로게나제를 코딩하는 zwf 유전자 [국제공개공보 W0200100844에서, 각각 서열 243 및 244에 기재된 바와 같음];
- 포스포에놀피루베이트 카르복실라제를 코딩하는 pepCL 유전자 [유럽공개공보 1108790에서, 각각 서열 3470 및 6970에 기재된 바와 같음];
- 글리세르알데히드-3-포스페이트 데히드로게나제를 코딩하는 gap 유전자 [국제공개공보 W0200100844에서, 각각 서열 67 및 68에 기재된 바와 같음];
- RPF 단백질 전구체를 코딩하는 zwa1 유전자 [유럽공개공보 1108790에서, 각각 서열 917 및 4417에 기재된 바와 같음];
- 트랜스케톨라제를 코딩하는 tkt 유전자 [국제공개공보 W0200100844에서, 각각 서열 247 및 248에 기재된 바와 같음];
- 트랜스알돌라제를 코딩하는 tad 유전자 [국제공개공보 W0200100844에서, 각각 서열 245 및 246에 기재된 바와 같음];
- 메나퀴닌 옥시도리덕타제를 코딩하는 mqo 유전자 [국제공개공보 W0200100844에서, 각각 서열 569 및 570에 기재된 바와 같음];
- 트리오스포스페이트 이소머라제를 코딩하는 tpi 유전자 [국제공개공보 W0200100844에서, 각각 서열 61 및 62에 기재된 바와 같음];
- 3-포스포글리세레이트 키나제를 코딩하는 pgk 유전자 [국제공개공보 W0200100844에서, 각각 서열 69 및 70에 기재된 바와 같음]; 및
- RNA-폴리머라제 시그마 인자 sigC를 코딩하는 sigC 유전자 [유럽공개공보 1108790에서, 각각 서열 284 및 3784에 기재된 바와 같음].

특정 양태에서, 상기 유전자를 과발현시킬 수 있고(있거나) 단백질의 활성을 증가시킬 수 있다.

또다른 한편, 기타 양태에서, 특정 유전자의 발현을 감쇠, 감소 또는 억제시켜, 이러한 유전자에 의해 코딩된 단백질의 세포내 활성 또는 농도를 감소, 예를 들어 없앴으로써, 궁극적으로 목적하는 아미노산의 생산을 향상시킬 수 있다. 예를 들어, 당업자는 약한 프로모터를 사용할 수 있다. 또다른 한편 또는 조합하여, 숙련된 전문가가 활성이 낮은 상응하는 효소를 코딩하거나 또는 상응하는 유전자 또는 단백질을 불활성화시키는 유전자 또는 대립 유전자를 사용할 수 있다. 본 발명의 방법을 사용하여, 상응하는 단백질의 활성 또는 농도를, 야생형 단백질의 활성 또는 농도의 약 0 내지 50%, 0 내지 25%, 0 내지 10%, 0 내지 9%, 0 내지 8%, 0 내지 7%, 0 내지 6%, 0 내지 5%, 0 내지 4%, 0 내지 3%, 0 내지 2% 또는 0 내지 1%로 저하시킬 수 있다.

특정 양태에서, 탈제어된 유전자에는 다음 유전자 또는 단백질들 중의 하나 이상이 포함될 수 있지만, 이에 제한되지 않는다:

- 포스포에놀피루베이트 카르복시키나제를 코딩하는 pepCK 유전자 [국제공개공보 W0200100844에서, 각각 서열 179 및 180에 기재된 바와 같음];
- 말산 효소를 코딩하는 malE 유전자 [유럽공개공보 1108790에서, 각각 서열 3328 및 6828에 기재된 바와 같음];
- 글리코젠 신타제를 코딩하는 glgA 유전자 [유럽공개공보 1108790에서, 각각 서열 1239 및 4739에 기재된 바와 같음];
- 글루코스-6-포스페이트 이소머라제를 코딩하는 pgi 유전자 [국제공개공보 W0200100844에서, 각각 서열 41 및 42에 기재된 바와 같음];
- ATP 의존성 RNA 헬리카제를 코딩하는 dead 유전자 [유럽공개공보 1108790에서, 각각 서열 1278 및 4778에 기재된 바와 같음];
- o-숙시닐벤조산-CoA 리가제를 코딩하는 menE 유전자 [유럽공개공보 1108790에서, 각각 서열 505 및 4005에 기재된 바와 같음];
- 시트레이트 라이아제 베타쇄를 코딩하는 citE 유전자 [국제공개공보 W0200100844에서, 각각 서열 547 및 548에 기재된 바와 같음];
- 전사 조절자를 코딩하는 mikE17 유전자 [유럽공개공보 1108790에서, 각각 서열 411 및 3911에 기재된 바와 같음];
- 피루베이트 데히드로게나제를 코딩하는 poxB 유전자 [국제공개공보 W0200100844에서, 각각 서열 85 및 86에 기재된 바와 같음];
- RPF 단백질 전구체를 코딩하는 zwa2 유전자 [유럽공개공보 1106693에 기재된 바와 같음]; 및
- 숙시닐-CoA-신테타제를 코딩하는 sucC 유전자 [유럽공개공보 1103611에 기재된 바와 같음].

특정 양태에서, 상기 유전자의 발현을 감쇠, 감소 또는 억제할 수 있고(있거나) 단백질의 활성을 감소시킬 수 있다.

용어 "조작된 미생물"에는 탄소 대사의 변화를 유발시키기 위해 대사 경로의 붕괴 또는 변경을 가져다 주도록 공학적으로 처리시켰거나 (예를 들어, 유전 공학적으로 처리시켰거나) 변형시킨 미생물이 포함된다. 특정 효소가 대사적 공학적으로 처리시킨 세포에서, 필적하는 야생형 세포에서 발현되는 수준 보다 높은 수준으로 발현되는 경우에, 이러한 효소는 대사적 공학적으로 처리시킨 세포에서 "과발현"된다. 특정한 효소를 내인적으로 발현하지 않는 세포에서는, 이러한 세포에서의 상기 효소의 어떠한 발현 수준도 본 발명의 목적상 상기 효소의 "과발현"인 것으로 간주된다. 과발현으로 인해, 해당 유전자, 예를 들어 프럭토스-1,6-비스포스파타제에 의해 코딩된 단백질의 활성이 증가될 수 있다.

이러한 미생물을 변형시키거나 공학적으로 처리하는 것은 생합성 경로의 탈제어 및(또는) 하나 이상의 생합성 효소의 과발현을 포함하지만 이에 제한되지 않는, 본원에 기재된 모든 방법론에 따라서 수행할 수 있다. "조작된" 효소 (예: "조작된" 생

합성 효소)에는 특정 효소의 하나 이상의 상단 또는 하단 전구체, 기질 또는 생성물이, 예를 들어 상응하는 야생형 또는 천연 발생적 효소와 비교해서 변경 또는 변형되도록, 예를 들어 증가된 활성을 지니도록 그의 발현 또는 생산을 변경 또는 변형시킨 효소가 포함된다.

용어 "과발현된" 또는 "과발현"에는 미생물을 조작하기에 앞서 발현된 수준 또는 조작하지 않은 필적하는 미생물에서 발현된 수준 보다 높은 수준으로 유전자 생성물 (예: 펜토스 포스페이트 생합성 효소)이 발현되는 것이 포함된다. 한 양태에서, 미생물을 조작하기에 앞서 발현된 수준 또는 조작하지 않은 필적하는 미생물에서 발현된 수준 보다 높은 수준으로 유전자 생성물이 과발현되도록, 미생물을 유전적으로 조작 (예를 들어, 유전 공학적으로 처리)할 수 있다. 유전적 조작에는 특정한 유전자의 발현과 연관된 조절성 서열 또는 부위를 변경 또는 변형시키거나 (이는, 예를 들어 강력한 프로모터, 유도성 프로모터 또는 다중 프로모터를 부가하거나 또는 발현이 구성성이 되도록 조절성 서열을 제거함으로써 수행됨); 특정한 유전자의 염색체성 위치를 변형시키거나; 특정한 유전자에 인접한 핵산 서열, 예를 들어 리보솜 결합 부위 또는 전사 종결자를 변경시키거나; 특정한 유전자의 카피 수를 증가시키거나; 특정한 유전자의 전사 및(또는) 특정한 유전자 생성물의 해독에 관여한 단백질 (예: 조절성 단백질, 저해자, 증강자, 전사 활성화자 등)을 변형시키거나; 또는 당해 분야에 통상적인 특정한 유전자의 발현을 탈제어하기 위한 기타 통상적인 모든 수단 (이에는, 예를 들어 억제 단백질의 발현을 차단시키기 위해 안티센스 핵산 분자를 사용하는 것이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다)이 포함될 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.

또다른 양태에서, 미생물을 조작하기에 앞서 발현된 수준 또는 조작하지 않은 필적하는 미생물에서 발현된 수준 보다 높은 수준으로 유전자 생성물이 과발현되도록, 미생물을 물리적 또는 환경적으로 조작할 수 있다. 예를 들어, 미생물을, 특정한 유전자의 전사 및(또는) 특정한 유전자 생성물의 해독을 증가시키는 것으로 공지되어 있거나 증가시킬 것으로 추정되는 작용제로 처리하거나 이러한 작용제의 존재 하에 배양하여, 전사 및(또는) 해독을 증강 또는 증가시킬 수 있다. 또다른 한편, 특정한 유전자의 전사 및(또는) 특정한 유전자 생성물의 해독을 증가시키기 위해 선택된 온도 하에 미생물을 배양하여, 전사 및(또는) 해독을 증강 또는 증가시킬 수 있다.

용어 "탈제어된" 또는 "탈제어"에는 생합성 경로 중의 효소를 코딩하는 미생물 내의 하나 이상의 유전자를 변경 또는 변형시켜, 이러한 미생물에서의 생합성 효소의 수준 또는 활성이 변경 또는 변형되도록 하는 것이 포함된다. 바람직하게는, 유전자 생성물을 증강 또는 증가시킴으로써 유전자 생성물의 활성이 증강 또는 증가되도록, 생합성 경로 중의 효소를 코딩하는 하나 이상의 유전자를 변경 또는 변형시킨다. "탈제어된 경로"에는 하나 이상의 생합성 효소의 수준 또는 활성이 변경 또는 변형되도록, 생합성 경로 중의 효소를 코딩하는 하나 이상의 유전자를 변경 또는 변형시킨 생합성 경로가 포함될 수도 있다. 미생물에서 특정 경로를 "탈제어"할 수 있는 능력 (예를 들어, 소정의 생합성 경로 중의 하나 이상의 유전자를 동시에 탈제어시킬 수 있는 능력)은, 하나 이상의 유전자 (예: 2개 또는 3개의 생합성 효소)가 "오페론"으로 명명된 유전적 물질의 인접한 조각 상에서 서로 이웃하여 발생하는 유전자에 의해 코딩되는, 미생물의 특별한 현상으로부터 비롯된다.

용어 "오페론"에는 프로모터를 함유하고, 가능하게는 하나 이상, 바람직하게는 2개 이상의 구조 유전자 (예: 효소, 예를 들어 생합성 효소를 코딩하는 유전자)와 연관된 조절성 요소를 함유하는, 협조적 유전자 발현 단위가 포함된다. 구조 유전자의 발현은, 예를 들어 조절성 요소와 결합하는 조절성 단백질에 의해 또는 전사의 항-종결에 의해 협조적으로 조절될 수 있다. 이러한 구조 유전자는 전사되어, 구조 단백질 모두를 코딩하는 단일 mRNA를 제공할 수 있다. 오페론 내에 포함된 유전자의 협조적 조절로 인해, 단일 프로모터 및(또는) 조절성 요소를 변경 또는 변형시키면, 오페론에 의해 코딩된 각 유전자 생성물이 변경 또는 변형될 수 있다. 조절성 요소의 변경 또는 변형에는, 내인성 프로모터 및(또는) 조절성 요소(들)를 제거하거나; 강력한 프로모터, 유도성 프로모터 또는 다중 프로모터를 부가하거나 또는 조절성 서열을 제거하여 유전자 생성물의 발현이 변형되도록 하거나; 오페론의 염색체성 위치를 변형시키거나; 오페론에 인접하거나 오페론 내에 있는 핵산 서열, 예를 들어 리보솜 결합 부위를 변경시키거나; 오페론의 카피 수를 증가시키거나; 오페론의 전사 및(또는) 오페론의 유전자 생성물의 해독에 관여한 단백질 (예: 조절성 단백질, 저해자, 증강자, 전사 활성화자 등)을 변형시키거나; 또는 당해 분야에 통상적인 유전자의 발현을 탈제어하기 위한 기타 통상적인 모든 수단 (이에는, 예를 들어 억제 단백질의 발현을 차단시키기 위해 안티센스 핵산 분자를 사용하는 것이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다)이 포함될 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 탈제어는 또한, 하나 이상의 유전자의 코딩 영역을 변형시켜, 예를 들어 피드백 내성이거나 보다 높거나 낮은 특이 활성을 지닌 효소를 산출하는 것을 포함할 수 있다.

본 발명의 특히 바람직한 "재조합" 미생물은 세균에 의해 유래된 유전자 또는 유전자 생성물을 과발현하도록 유전 공학적으로 처리시켰다. 용어 "세균에 의해 유래된" 또는 예를 들어, "세균으로부터 유래된"에는 세균에서 천연상 발견되는 유전자, 또는 세균성 유전자에 의해 코딩되는 (예를 들어, 프럭토스-1,6-비스포스파타제에 의해 코딩된) 유전자 생성물이 포함된다.

본 발명의 방법론은 하나 이상의 유전자, 예를 들어 프럭토스-1,6-비스포스파타제 유전자를 과발현하거나, 또는 증가 또는 증강된 프럭토스-1,6-비스포스파타제 활성을 지니고 있는 재조합 미생물을 특징으로 한다. 본 발명의 특히 바람직한

재조합 미생물 [예: 코리네박테륨 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*), 코리네박테륨 아세트글루타미쿰 (*Corynebacterium acetoglutamicum*), 코리네박테륨 아세트아시도필름 (*Corynebacterium, acetoacidophilum*) 및 코리네박테륨 더모아미노게네스 (*Corynebacterium thermoaminogenes*) 등]은 생합성 효소 (예를 들어, 서열 2의 아미노산 서열을 갖거나 서열 1의 핵산 서열에 의해 코딩된 프럭토스-1,6-비스포스파타제)을 과발현하도록 유전 공학적으로 처리시켰다.

본 발명의 기타 바람직한 "재조합" 미생물은 펜토스 포스페이트 경로 중에 탈제어된 효소를 갖는다. "탈제어된 펜토스 포스페이트 경로를 지닌 미생물"에는 펜토스 포스페이트 경로의 효소를 코딩하는 하나 이상의 유전자에서 변경 또는 변형을 나타내거나, 또는 펜토스 포스페이트 경로의 효소를 코딩하는 하나 이상의 유전자를 포함한 오페론에서 변경 또는 변형을 나타내는 미생물이 포함된다. 바람직한 "탈제어된 펜토스 포스페이트 경로를 지닌 미생물"은 코리네박테륨 (예: 코리네박테륨 글루타미쿰) 생합성 효소를 과발현하도록 유전 공학적으로 처리시켰다 (예를 들어, 프럭토스-1,6-비스포스파타제를 과발현하도록 공학적으로 처리시켰다).

또다른 바람직한 양태에서, 하나 이상의 펜토스 포스페이트 생합성 효소가 과발현 또는 탈제어되도록, 재조합 미생물을 고안하거나 공학적으로 처리시킨다.

또다른 바람직한 양태에서, 본 발명의 미생물이, 세균에 의해 유래되는 유전자 또는 생합성 효소 (예: 펜토스 포스페이트 생합성 효소)를 과발현하거나 이러한 유전자 또는 효소에 대해 돌연변이된다. 용어 "세균에 의해 유래된" 또는 예를 들어, "세균으로부터 유래된"에는 세균성 유전자에 의해 코딩되는 유전자 생성물 (예: 프럭토스-1,6-비스포스파타제)이 포함된다.

한 양태에서, 본 발명의 재조합 미생물이 그람 양성 유기체 (예: 미생물을 둘러 싸고 있는 그람 양성 벽의 존재로 인해, 염기성 염료, 예를 들어 크리스털 바이올렛을 보유하고 있고 미생물)이다. 바람직한 양태에서, 재조합 미생물이 바실루스 (*Bacillus*), 브레비박테륨 (*Brevibacterium*), 코리네박테륨 (*Corynebacterium*), 락토바실러스 (*Lactobacillus*), 락토코쿠스 (*Lactococcus*) 및 스트렙토마이세스 (*Streptomyces*)로 이루어진 군으로부터 선택된 속에 속하는 미생물이다. 보다 바람직한 양태에서, 재조합 미생물이 코리네박테륨 속 미생물이다. 또다른 바람직한 양태에서, 재조합 미생물이 코리네박테륨 글루타미쿰, 코리네박테륨 아세트글루타미쿰, 코리네박테륨 아세트아시도필름, 또는 코리네박테륨 더모아미노게네스로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특히 바람직한 양태에서, 재조합 미생물이 코리네박테륨 글루타미쿰이다.

본 발명의 중요한 국면은 목적하는 화합물 (예: 목적하는 정밀 화학물질)이 생산되도록, 본원에 기재된 재조합 미생물을 배양하는 단계를 포함한다. 용어 "배양"하는 것에는 본 발명의 살아 있는 미생물을 유지 및(또는) 성장 (예를 들어, 배양물 또는 균주를 유지 및(또는) 성장)시키는 것이 포함된다. 한 양태에서, 본 발명의 미생물을 액상 배지에서 배양한다. 또다른 양태에서, 본 발명의 미생물을 고형 배지 또는 반-고형 배지에서 배양한다. 바람직한 양태에서, 본 발명의 미생물을, 이러한 미생물의 유지 및(또는) 성장에 필수적이거나 유리한 영양분을 포함하는 배지 (예: 멸균성 액상 배지)에서 배양한다. 사용될 수 있는 탄소원에는 당 및 탄수화물, 예를 들어 글루코스, 수크로스, 락토스, 프럭토스, 말토스, 당밀, 전분 및 셀룰로스; 오일 및 지방, 예를 들어 대두유, 해바라기유, 땅콩유 및 코코넛 오일; 지방산, 예를 들어 팔미트산, 스테아르산 및 리놀레산; 알코올, 예를 들어 글리세롤 및 에탄올; 및 유기 산, 예를 들어 아세트산이 포함된다. 바람직한 양태에서, 프럭토스 또는 사카로스이다. 이들 물질은 개별적으로 사용하거나 혼합물로서 사용할 수 있다.

사용될 수 있는 질소원은 질소를 함유하는 유기 화합물, 예를 들어 펩톤, 효모 추출물, 고기 추출물, 맥아 추출물, 옥수수 담금액, 콩가루 및 우레아; 또는 무기 화합물, 예를 들어 황산암모늄, 염화암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄 및 질산암모늄을 포함한다. 이러한 질소원은 개별적으로 사용하거나 혼합물로서 사용할 수 있다. 사용될 수 있는 인 공급원은 인산, 인산이수소 칼륨 또는 인산수소 이칼륨, 또는 나트륨을 함유하는 상응하는 염이다. 배양 배지는 성장에 필요한 금속 염, 예를 들어 황산마그네슘 또는 황산철을 추가로 함유해야만 한다. 최종적으로, 상기 언급된 물질 이외에도, 필수 성장-촉진 물질, 예를 들어 아미노산 및 비타민이 사용될 수도 있다. 적합한 전구체를 배양 배지에 추가로 첨가할 수 있다. 언급된 사료 물질을 단일 배지물로서 배양물에 가하거나 또는 배양 동안 적당하게 공급할 수 있다.

바람직하게는, 본 발명의 미생물을 제어된 pH 하에 배양한다. 용어 "제어된 pH"에는 목적하는 정밀 화학물질 (예: 리신)을 생산시켜 주는 모든 pH가 포함된다. 한 양태에서, 미생물을 약 pH 7에서 배양한다. 또다른 양태에서, 미생물을 약 pH 6.0 내지 8.5에서 배양한다. 목적하는 pH는 당업자에게 공지된 수 많은 방법에 의해 유지시킬 수 있다. 예를 들어, 염기성 화합물, 예를 들면, 수산화나트륨, 수산화칼륨, 암모니아 또는 암모니아 수, 또는 산성 화합물, 예를 들면, 인산 또는 황산을 사용하여 배양물의 pH를 적절히 제어한다.

또한 바람직하게는, 본 발명의 미생물을 제어된 통기성 하에 배양한다. 용어 "제어된 통기성"에는 목적하는 정밀 화학물질 (예: 리신)을 생산시켜 주기에 충분한 통기성 (예: 산소)이 포함된다. 한 양태에서, 통기성이, 배양물 중의 산소 수준을 조절함으로써, 예를 들어 배양 배지에 용해된 산소의 양을 조절함으로써 제어된다. 바람직하게, 배양물의 통기성은 배양물을 진탕시킴으로써 제어된다. 진탕은 추진체 또는 유사한 기계적 진탕 장비에 의해, 성장 용기 (예: 발효기)를 회전 또는 진탕 시키거나, 또는 각종 펌핑 장비에 의해 제공될 수 있다. 통기성은 멸균성 공기 또는 산소를 배지 내로 (예를 들어, 발효 혼합물 내로) 통과시킴으로써 추가로 제어할 수 있다. 또한 바람직하게는, 본 발명의 미생물을 과도한 발포 없이 (예를 들어, 지방산 폴리글리콜 에스테르와 같은 소포제의 첨가를 통하여) 배양한다.

더우기, 본 발명의 미생물은 제어된 온도 하에 배양할 수 있다. 용어 "제어된 온도"에는 목적하는 정밀 화학물질 (예: 리신)의 생산을 가져다 주는 모든 온도가 포함된다. 한 양태에서, 제어된 온도에 15 내지 95℃의 온도가 포함된다. 또다른 양태에서, 제어된 온도에 15 내지 70℃의 온도가 포함된다. 바람직한 온도는 20 내지 55℃이고, 보다 바람직한 온도는 30 내지 45℃ 또는 30 내지 50℃이다.

미생물을 액상 배지에서 배양 (예를 들어, 유지 및(또는) 성장)할 수 있고, 바람직하게는 통상적인 배양 방법, 예를 들어 정지 배양, 시험관 배양, 진탕 배양 (예: 회전식 진탕 배양, 진탕 플라스크 배양 등), 통기성 스피너 배양 또는 발효에 의해 지속적으로 또는 간헐적으로 배양한다. 바람직한 양태에서, 미생물을 진탕 플라스크에서 배양한다. 보다 바람직한 양태에서, 미생물을 발효기에서 배양한다 (예를 들어, 발효 공정). 본 발명의 발효 공정에는 배치식, 공급-배치식 및 연속식 발효 방법이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. "배치식 공정" 또는 "배치식 발효"는 배지, 영양분, 보충 첨가제 등의 조성을 발효 개시시 설정하고 발효 동안에는 전혀 변경시키지 않지만, 과도한 배지 산성화 및(또는) 미생물 사멸을 방지하기 위해 pH 및 산소 농도와 같은 요인들을 제어하기 위한 시도는 수행할 수 있는 폐쇄된 시스템을 지칭한다. "공급-배치식 공정" 또는 "공급-배치식" 발효는 발효가 진행됨에 따라 하나 이상의 기질 또는 보충물을 첨가 (예를 들어, 일정하게 증액시키거나 지속적으로 첨가함)하는 것을 제외한 배치식 발효를 지칭한다. "연속식 공정" 또는 "연속식 발효"는 규정된 발효 배지를 발효기에 연속적으로 첨가하고, 바람직하게는 목적하는 정밀 화학물질 (예: 리신)을 회수하기 위해, 이와 등량의 사용된 배지 또는 "적응용 (conditioned)" 배지를 동시에 제거하는 시스템을 지칭한다. 이러한 각종 공정이 개발되었고 이는 당해 분야에 널리 공지되어 있다.

"목적하는 정밀 화학물질 (예: 리신)이 생산되는 조건하에서 배양한다"는 것에는 목적하는 정밀 화학물질의 생산을 획득하거나 또는 생산되는 특별한 정밀 화학물질 (예: 리신)의 목적하는 수율을 획득하기에 적당하거나 충분한 조건 (예: 온도, 압력, pH, 기간 등) 하에 미생물을 유지 및(또는) 성장시키는 것이 포함된다. 예를 들어, 목적량의 정밀 화학물질 (예: 리신)을 생산하기에 충분한 시간 동안 배양을 지속시킨다. 바람직하게는, 이러한 정밀 화학물질의 최대 생산에 실질적으로 도달하기에 충분한 시간 동안 배양을 지속시킨다. 한 양태에서, 배양을 약 12 내지 24시간 동안 지속시킨다. 또다른 양태에서, 배양을 약 24 내지 36 시간, 36 내지 48 시간, 48 내지 72 시간, 72 내지 96 시간, 96 내지 120 시간, 120 내지 144 시간, 또는 144 시간 초과 동안 지속시킨다. 또다른 양태에서, 정밀 화학물질의 생산 수율에 도달하기에 충분한 시간 동안 배양을 지속하는데, 예를 들면, 약 15 내지 20 g/L 이상의 정밀 화학물질이 생산되거나, 약 20 내지 25 g/L 이상의 정밀 화학물질이 생산되거나, 약 25 내지 30 g/L 이상의 정밀 화학물질이 생산되거나, 약 30 내지 35 g/L 이상의 정밀 화학물질이 생산되거나, 약 35 내지 40 g/L 이상의 정밀 화학물질이 생산되거나, 약 40 내지 50 g/L 이상의 정밀 화학물질이 생산되거나, 약 50 내지 60 g/L 이상의 정밀 화학물질이 생산되거나, 약 60 내지 70 g/L 이상의 정밀 화학물질이 생산되거나, 약 70 내지 80 g/L 이상의 정밀 화학물질이 생산되거나, 약 80 내지 90 g/L 이상의 정밀 화학물질이 생산되거나, 약 90 내지 100 g/L 이상의 정밀 화학물질이 생산되거나, 약 100 내지 110 g/L 이상의 정밀 화학물질이 생산되거나, 약 110 내지 120 g/L 이상의 정밀 화학물질이 생산되거나, 약 120 내지 130 g/L 이상의 정밀 화학물질이 생산되거나, 약 130 내지 140 g/L 이상의 정밀 화학물질이 생산되거나, 또는 약 140 내지 160 g/L 이상의 정밀 화학물질이 생산되도록 세포를 배양한다. 또다른 양태에서, 정밀 화학물질의 바람직한 수율, 예를 들면 상기 제시된 범위 내의 수율이 약 24시간 이내, 약 36시간 이내, 약 40시간 이내, 약 48시간 이내, 약 72시간 이내, 약 96시간 이내, 약 108시간 이내, 약 122시간 이내, 또는 약 144시간 이내에 생산되는 조건하에서 미생물을 배양한다.

본 발명의 방법론은 목적하는 정밀 화학물질 (예: 리신)을 회수하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 목적하는 정밀 화학물질 (예: 리신)을 "회수하는 것"에는 이러한 화합물을 배양 배지로부터 추출, 수거, 분리 또는 정제하는 것이 포함된다. 상기 화합물을 회수하는 것은 당해 분야에 공지된 모든 통상적인 분리 또는 정제 방법에 따라서 수행할 수 있는데, 이러한 방법에는 통상적인 수지 (예: 음이온 또는 양이온 교환 수지, 비-이온성 흡착 수지 등)로의 처리, 통상적인 흡착제 (예: 활성화 목탄, 규산, 실리카 겔, 셀룰로스, 알루미나 등)로의 처리, pH 변경, 용매 추출 (예를 들어, 알코올, 에틸 아세테이트, 헥산 등과 같은 통상적인 용매로 수행함), 투석, 여과, 농축, 결정화, 재결정화, pH 조정, 동결건조 등이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, 정밀 화학물질 (예: 리신)은 먼저, 배양물로부터 미생물을 제거함으로써 배양 배지로부터 회수할 수

있다. 그 다음, 배지를 양이온 교환 수지 내로 또는 수지 상으로 통과시켜 불필요한 양이온을 제거한 다음, 음이온 교환 수지 내로 또는 수지 상으로 통과시켜 불필요한 무기 음이온과, 관심있는 정밀 화학물질 (예: 리신) 보다 산도가 더 강한 유기산을 제거한다.

바람직하게, 본 발명의 목적하는 정밀 화학물질은, 생성되는 제제가 실질적으로 기타 성분이 없도록 (예를 들면, 배지 성분 및/또는) 발효 부산물이 실질적으로 없도록) "추출", "분리" 또는 "정제"한다. "기타 성분이 실질적으로 없는" 제제에는 목적하는 화합물이, 이를 생산시킨 배양물의 발효 부산물 또는 배지 성분들로부터 격리 (예를 들어, 정제 또는 부분적으로 정제)되는, 목적 화합물의 제제가 포함된다.

한 양태에서, 상기 제제가 목적 화합물을 약 80% 초과 (건조 중량을 기준으로 함) (예를 들어, 기타 배지 성분 또는 발효 부산물 약 20% 미만), 보다 바람직하게는 목적 화합물을 약 90% 초과 (예를 들어, 기타 배지 성분 또는 발효 부산물 약 10% 미만), 보다 더 바람직하게는 목적 화합물을 약 95% 초과 (예를 들어, 기타 배지 성분 또는 발효 부산물 약 5% 미만), 가장 바람직하게는 목적 화합물을 약 98 내지 99% 초과 (예를 들어, 기타 배지 성분 또는 발효 부산물 약 1 내지 2% 미만) 포함한다.

대체 양태에서, 예를 들어 미생물이 생물학적으로 해롭지 않는 경우 (예를 들어, 안전한 경우)에는, 목적하는 정밀 화학물질 (예: 리신)을 이러한 미생물로부터 정제하지 않는다. 예를 들어, 전체 배양물 (또는 배양 상등액)이 생성물 공급원 (예: 조 생성물)로서 사용될 수 있다. 한 양태에서, 배양물 (또는 배양 상등액)을 변형시키지 않고 사용한다. 또다른 양태에서, 배양물 (또는 배양 상등액)을 농축시킨다. 또다른 양태에서, 배양물 (또는 배양 상등액)을 건조 또는 동결건조시킨다.

II. 전구체 공급 요구와는 독립적인 (관계없는) 정밀 화학물질의 생산 방법

조작된 생합성 효소 또는 생합성 효소 조합물에 따라서, 정밀 화학물질 (예: 리신)이 생산되도록 하나 이상의 펜토스 포스페이트 경로 생합성 전구체를 본 발명에 미생물에 제공 (예를 들어, 공급)하는 것이 바람직하거나 필요할 수 있다. 용어 "펜토스 포스페이트 경로 생합성 전구체" 또는 "전구체"에는 미생물의 배양 배지에 제공되거나, 이와 접촉하거나, 또는 이에 포함되는 경우에, 펜토스 포스페이트 생합성을 증강 또는 증가시키는 작용을 하는 작용제 또는 화합물이 포함된다. 한 양태에서, 펜토스 포스페이트 생합성 전구체가 글루코시다. 또다른 양태에서, 펜토스 포스페이트 생합성 전구체가 프럭토시다. 글루코스 또는 프럭토스 첨가량은 바람직하게는, 미생물의 생산성을 증강시키기에 충분한 배양 배지 중의 농도 [예를 들어, 정밀 화학물질 (예: 리신)의 생산을 증강시키기에 충분한 농도]를 가져다 주는 양이다. 본 발명의 펜토스 포스페이트 생합성 전구체는 농축된 용액 또는 현탁액 (예를 들어, 물 또는 완충액과 같은 적합한 용매 중에서)의 형태, 또는 고형물 형태 (예를 들어, 분말 형태)로 첨가될 수 있다. 더우기, 본 발명의 펜토스 포스페이트 생합성 전구체는 소정의 시간에 걸쳐 단일 분취액으로서 지속적 또는 간헐적으로 첨가할 수 있다.

펜토스 포스페이트 생합성 전구체를 본 발명의 펜토스 포스페이트 생합성 방법론에 제공하는 것은, 예를 들어, 정밀 화학물질을 고 수율로 생산하기 위해 이러한 방법론을 이용하는 경우에는, 많은 비용이 발생할 수 있다. 따라서, 본 발명의 바람직한 방법론은 리신 또는 목적하는 기타 정밀 화학물질이 전구체 공급과 독립적인 (관계없는) 방식으로 생산되도록 조작된 하나 이상의 생합성 효소 또는 생합성 효소 조합물 (예를 들면, 하나 이상의 펜토스 포스페이트 생합성 효소)를 갖는 미생물을 특징으로 한다. 예를 들어, 목적하는 화합물을 생산하는 방법을 지칭하는 경우의 "전구체 공급과 독립적인 방식"에는 목적 화합물을 생산하기 위해 활용되는 미생물에 제공 (예: 공급)되는 전구체에 의존하지 않고, 목적 화합물을 생산하기 위한 접근법 또는 생산 방식이 포함된다. 예를 들어, 본 발명의 방법론에 있어 특징인 미생물을 사용하여, 전구체 글루코스 또는 프럭토스의 공급을 요구하지 않는 방식으로 정밀 화학물질을 생산할 수 있다.

본 발명의 또다른 바람직한 방법론은 L-리신 또는 기타 정밀 화학물질이 전구체 공급과는 실질적으로 독립적인 방식으로 생산되도록 조작한 하나 이상의 생합성 효소 또는 생합성 효소 조합물을 갖는 미생물을 특징으로 한다. "전구체 공급과는 실질적으로 독립적인 방식"에는, 활용되는 미생물에 제공 (예: 공급)되는 전구체에 의존하는 정도가 훨씬 덜한 방식으로, 목적 화합물을 생산하기 위한 접근법 또는 생산 방법이 포함된다. 예를 들어, 본 발명의 방법론에 있어 특징인 미생물을 사용하여, 상당히 감소된 양의 전구체 글루코스 또는 프럭토스의 공급을 요구하는 방식으로 정밀 화학물질을 생산할 수 있다.

전구체 공급과는 독립적인 방식으로, 또는 전구체 공급과는 실질적으로 독립적인 방식으로 목적하는 정밀 화학물질을 생산하는 바람직한 방법은, 하나 이상의 펜토스 포스페이트 생합성 효소의 발현이 변형되도록 조작시킨 (예를 들어, 고안하거나 공학적으로, 예를 들어, 유전 공학적으로 처리시킨) 미생물을 배양하는 단계를 포함한다. 예를 들어, 한 양태에서, 하나 이상의 펜토스 포스페이트 생합성 효소의 생산이 탈제어되도록, 미생물을 조작한다 (예를 들어, 고안 또는 공학적으로 처리시킨다). 바람직한 양태에서, 본원에 규정된 바와 같은 탈제어된 생합성 경로, 예를 들어 탈제어된 펜토스 포스페이트

생합성 경로를 갖도록, 미생물을 조작한다 (예를 들어, 고안 또는 공학적으로 처리시킨다). 또다른 바람직한 양태에서, 하나 이상의 펜토스 포스페이트 생합성 효소, 예를 들어 프럭토스-1,6-비스포스파타제가 과발현되도록, 미생물을 조작한다 (예를 들어, 고안 또는 공학적으로 처리시킨다).

III. 고 수율 생산 방법론

본 발명의 특히 바람직한 양태는, 리신이 상당히 높은 수율로 생산되는 조건하에서 조작된 미생물을 배양하는 단계를 포함하는, 정밀 화학물질 (예: 리신)을 생산하기 위한 고 수율 생산 방법이다. "고 수율 생산 방법", 예를 들어 목적하는 정밀 화학물질 (예: 리신)을 생산하기 위한 고 수율 생산 방법에는 필적하는 생산 방법에 대해 통상적인 수준 보다 상승되거나 높은 수준으로 목적하는 정밀 화학물질을 생산시켜 주는 방법이 포함된다. 바람직하게는, 고 수율 생산 방법이 목적 화합물을 상당히 높은 수율로 생산시킨다. "상당히 높은 수율"에는 필적하는 생산 방법에 대해 통상적인 수준 보다 충분히 상승되거나 높은 수준, 예를 들어 목적 생성물을 상업적으로 생산 (예: 목적 생성물을 상업적으로 실행 가능한 비용으로 생산)하는데 충분한 수준으로 상승된 생산 수준 또는 수율이 포함된다. 한 양태에서, 본 발명은 리신을 2 g/L, 10 g/L, 15 g/L, 20 g/L, 25 g/L, 30 g/L, 35 g/L, 40 g/L, 45 g/L, 50 g/L, 55 g/L, 60 g/L, 65 g/L, 70 g/L, 75 g/L, 80 g/L, 85 g/L, 90 g/L, 95 g/L, 100 g/L, 110 g/L, 120 g/L, 130 g/L, 140 g/L, 150 g/L, 160 g/L, 170 g/L, 180 g/L, 190 g/L 또는 200 g/L 초과 수준으로 생산하도록 하는 조건하에서 조작된 미생물을 배양하는 단계를 포함하는, 리신을 생산하기 위한 고 수율 생산 방법을 특징으로 한다.

본 발명은 추가로, 충분히 상승된 수준의 화합물을 상업적으로 바람직한 시간 내에 생산시키도록 하는 조건하에서 조작된 미생물을 배양하는 단계를 포함하는, 목적하는 정밀 화학물질 (예: 리신)을 생산하기 위한 고 수율 생산 방법을 특징으로 한다. 예시 양태에서, 본 발명은 리신을 5시간 내에 15 내지 20 g/L 초과 수준으로 생산시키도록 하는 조건하에서 조작된 미생물을 배양하는 단계를 포함하는, 리신을 생산하기 위한 고 수율 생산 방법을 특징으로 한다. 또다른 양태에서, 본 발명은 리신을 10시간 내에 25 내지 40 g/L 초과 수준으로 생산시키도록 하는 조건하에서 조작된 미생물을 배양하는 단계를 포함하는, 리신을 생산하기 위한 고 수율 생산 방법을 특징으로 한다. 또다른 양태에서, 본 발명은 리신을 20시간 내에 50 내지 100 g/L 초과 수준으로 생산시키도록 하는 조건하에서 조작된 미생물을 배양하는 단계를 포함하는, 리신을 생산하기 위한 고 수율 생산 방법을 특징으로 한다. 또다른 양태에서, 본 발명은 리신을 40시간 내에 140 내지 160 g/L 초과 수준, 예를 들어 40시간 내에 150 g/L 초과 수준으로 생산시키도록 하는 조건하에서 조작된 미생물을 배양하는 단계를 포함하는, 리신을 생산하기 위한 고 수율 생산 방법을 특징으로 한다. 또다른 양태에서, 본 발명은 리신을 40시간 내에 130 내지 160 g/L 초과 수준, 예를 들어 40시간 내에 135, 145 또는 150 g/L 초과 수준으로 생산시키도록 하는 조건하에서 조작된 미생물을 배양하는 단계를 포함하는, 리신을 생산하기 위한 고 수율 생산 방법을 특징으로 한다. 본원에 기재된 범위 내에 포함된 값 및 범위 및(또는) 중간치 역시, 본 발명의 범주 내에 속한다. 예를 들어, 40시간 내에 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149 및 150 g/L 이상 수준의 리신 생산은 40시간 내에 140 내지 150 g/L 범위의 리신 생산 범위에 포함된다. 또다른 예에서는, 140 내지 145 g/L, 또는 145 내지 150 g/L의 범위가 40시간 내의 140 내지 150 g/L의 범위 내에 포함된다. 더우기, 당업자는, 예를 들어 "40시간 내에 140 내지 150 g/L"의 생산 수준을 달성하기 위해 조작된 미생물을 배양하는 것에, 임의로 리신을 훨씬 더 높은 수율로 생산시켜 주는 추가의 시간 (예를 들어, 40시간 보다 긴 기간) 동안 미생물을 배양하는 것이 포함된다는 것을 인지할 것이다.

IV. 분리된 핵산 분자 및 유전자

본 발명의 또다른 국면은 본 발명의 방법에 사용하기 위한 단백질 (예: 코리네박테륨 글루타미쿰 단백질), 예를 들어 코리네박테륨 펜토스 포스페이트 생합성 효소 (예: 코리네박테륨 글루타미쿰 펜토스 포스페이트 효소)를 코딩하는 분리된 핵산 분자를 특징으로 한다. 한 양태에서, 본 발명의 방법에 사용된 분리된 핵산 분자가 프럭토스-1,6-비스포스파타제 핵산 분자이다.

용어 "핵산 분자"에는 DNA 분자 (예: 선형, 환상, cDNA 또는 염색체성 DNA) 및 RNA 분자 (예: tRNA, rRNA, mRNA) 및 뉴클레오타이드 유사체를 사용하여 생성시킨 DNA 또는 RNA의 유사체가 포함된다. 핵산 분자는 일본쇄 또는 이분쇄일 수 있지만, 바람직하게는 이분쇄 DNA이다. 용어 "분리된" 핵산 분자에는 이러한 핵산이 유래되는 유기체의 염색체성 DNA에서 핵산 분자를 천연적으로 플랭킹하는 서열 (즉, 이러한 핵산 분자의 5' 및 3' 말단에 위치한 서열)을 없는 핵산 분자가 포함된다. 각종 양태에서, 분리된 핵산 분자가, 이러한 핵산 분자가 유래되는 미생물의 염색체성 DNA에서 핵산 분자를 천연적으로 플랭킹하는 뉴클레오타이드 서열 약 10 kb, 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0.5 kb, 0.1 kb, 50 bp, 25 bp 또는 10 bp 미만을 함유할 수 있다. 더우기, "분리된" 핵산 분자, 예를 들어 cDNA 분자는 재조합 기술에 의해 생성되는 경우에는, 기타 세포성 물질이 실질적으로 없을 수 있거나, 또는 화학적으로 합성된 경우에는 화학적 전구체 또는 기타 화학물질이 실질적으로 없을 수 있다.

본원에 사용된 바와 같은 용어 "유전자"에는 특정 유기체 내에서, 유전자간 DNA (즉, 상기 유기체의 염색체성 DNA에서 유전자를 천연적으로 플랭킹하고(하거나) 유전자들을 격리시키는 간섭 또는 스페이서 DNA)에 의해 또다른 유전자 또는 기타 유전자들로부터 격리되는 핵산 분자 (예: DNA 분자 또는 그의 절편), 예를 들어 단백질 또는 RNA-코딩 핵산 분자가 포함된다. 유전자는 특정 효소 또는 기타 단백질 분자의 합성을 지시할 수 있거나 [예를 들어, 코딩 서열, 예를 들면, 단백질을 코딩하는 인접한 개방 관독 프레임 (ORF)를 포함할 수 있다], 또는 그 자체가 유기체 내에서 기능적일 수 있다. 특정 유기체 내의 유전자는 본원에 규정된 바와 같은 오페론에 군집될 수 있는데, 이러한 오페론은 유전자간 DNA에 의해 다른 유전자 및(또는) 오페론으로부터 격리된다. 오페론 내에 함유된 개개의 유전자는, 이러한 개개 유전자들 간의 유전자간 DNA를 사용하지 않고서도 중복될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 "분리된 유전자"에는, 이러한 유전자가 유래하는 유기체의 염색체성 DNA에서 유전자를 천연적으로 플랭킹하는 서열이 본질적으로 없는 (즉, 제2의 또는 별개의 단백질 또는 RNA 분자를 코딩하는 인접한 코딩 서열, 인접한 구조 서열 등이 없는) 유전자가 포함되고, 임의로 5' 및 3' 조절성 서열, 예를 들어 프로모터 서열 및(또는) 종결자 서열을 포함한다. 한 양태에서, 분리된 유전자가 특정 단백질에 대해 우세한 코딩 서열 (예: 코리네박테륨 단백질을 코딩하는 서열)을 포함한다. 또다른 양태에서, 분리된 유전자가 특정 단백질 (예: 코리네박테륨 단백질)에 대한 코딩 서열과, 이러한 유전자가 유래하는 유기체의 염색체성 DNA로부터의 인접한 5' 및(또는) 3' 조절성 서열 (예: 인접한 5' 및(또는) 3' 코리네박테륨 조절성 서열)을 포함한다. 바람직하게는, 분리된 유전자가, 이러한 유전자가 유래하는 유기체의 염색체성 DNA에서 유전자를 천연적으로 플랭킹하는 뉴클레오티드 서열 약 10 kb, 5 kb, 2 kb, 1 kb, 0.5 kb, 0.2 kb, 0.1 kb, 50 bp, 25 bp 또는 10 bp 미만을 함유한다.

한 국면에서, 본 발명의 방법은 분리된 프럭토스-1,6-비스포스파타제 핵산 서열 또는 유전자의 사용을 특징으로 한다.

바람직한 양태에서, 이러한 핵산 또는 유전자가 바실루스로부터 유래된다 (예를 들어, 코리네박테륨-유래된다). 용어 "코리네박테륨으로부터 유래된" 또는 "코리네박테륨-유래된"에는 코리네박테륨 속의 미생물에서 천연적으로 발견되는 핵산 또는 유전자가 포함된다. 바람직하게는, 상기 핵산 또는 유전자가 코리네박테륨 글루타미쿰, 코리네박테륨 아세트글루타미쿰, 코리네박테륨 아세트아시도필름, 또는 코리네박테륨 더모아미노게네스로 이루어진 군으로부터 선택된 미생물로부터 유래된다. 특히 바람직한 양태에서, 상기 핵산 또는 유전자가 코리네박테륨 글루타미쿰으로부터 유래된다 (예를 들어, 코리네박테륨 글루타미쿰-유래된다). 또다른 바람직한 양태에서, 상기 핵산 또는 유전자가 코리네박테륨 유전자 상동체이다 (예를 들어, 코리네박테륨과는 별개의 종으로부터 유래하지만, 본 발명의 코리네박테륨 유전자, 예를 들어 코리네박테륨 프럭토스-1,6-비스포스파타제 유전자와는 상당히 상동성이다).

세균성-유래된 핵산 분자 또는 유전자 및(또는) 코리네박테륨-유래된 핵산 분자 또는 유전자 (예: 코리네박테륨-유래된 핵산 분자 또는 유전자), 예를 들어 본 발명자들에 의해 확인된 유전자, 예를 들면, 코리네박테륨 또는 코리네박테륨 글루타미쿰 프럭토스-1,6-비스포스파타제 유전자가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 추가로, 천연 발생적 세균 및(또는) 코리네박테륨 핵산 분자 또는 유전자 (예: 코리네박테륨 글루타미쿰 핵산 분자 또는 유전자)와는 상이한 세균성-유래된 핵산 분자 또는 유전자 및(또는) 코리네박테륨-유래된 핵산 분자 또는 유전자 (예: 코리네박테륨 글루타미쿰-유래된 핵산 분자 또는 유전자) (예: 코리네박테륨 글루타미쿰 핵산 분자 또는 유전자), 예를 들어, 치환, 삽입 또는 결실된 핵산을 갖고 있지만, 본 발명의 천연 발생적 유전자 생성물과 실질적으로 유사한 단백질을 코딩하는 핵산 분자 또는 유전자가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 한 양태에서, 분리된 핵산 분자가 서열 1로서 나타난 뉴클레오티드 서열을 포함하거나, 또는 서열 2에 나타난 아미노산 서열을 코딩한다.

또다른 양태에서, 본 발명의 분리된 핵산 분자는 서열 1로서 나타난 뉴클레오티드 서열과 약 60 내지 65% 이상, 바람직하게는 약 70 내지 75% 이상, 보다 바람직하게는 약 80 내지 85% 이상, 보다 더 바람직하게는 약 90 내지 95% 이상 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 또다른 양태에서, 분리된 핵산 분자가 엄격한 조건하에, 서열 1로서 나타난 뉴클레오티드 서열을 갖는 핵산 분자와 혼성화한다. 이러한 엄격한 조건은 당업자에게 공지되어 있고, 다음 문헌에 기재되어 있다 [참고: *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6]. 엄격한 (예: 고도로 엄격한) 혼성화 조건의 바람직한 비-제한적 예는 6X 염화나트륨/나트륨 시트레이트 (SSC)에서 약 45°C 하에 혼성화한 다음, 50 내지 65°C 하에 0.2X SSC, 0.1% SDS에서 1회 이상 세척하는 것이다. 바람직하게는, 엄격한 혼성화 조건하에서 서열 1의 서열과 혼성화하는 본 발명의 분리된 핵산 분자는 천연 발생적 핵산 분자에 상응한다. 본원에 사용된 바와 같은 "천연 발생적" 핵산 분자는 천연 상태로 존재하는 뉴클레오티드 서열을 갖는 RNA 또는 DNA 분자를 지칭한다.

본 발명의 핵산 분자 (예를 들어, 서열 1의 뉴클레오티드 서열을 갖는 핵산 분자)는 표준 분자 생물학 기술과 본원에 제공된 서열 정보를 이용하여 분리할 수 있다. 예를 들어, 핵산 분자는 문헌 [참고: Sambrook, J., Fritsh, E.F., and Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989]에 기재된 바와 같은 표준 혼성화 및 클로닝 기술을 사용하여 분리할 수 있거나, 또는 서열 1의 서열에 기초하여 고안한 합성 올리고뉴클레오티드 프라이머를 사용하여 폴리머라제 연쇄 반응

에 의해 분리할 수 있다. 본 발명의 핵산은 주형으로서 cDNA, mRNA 또는 게놈성 DNA를 사용하고, 표준 PCR 증폭 기술에 따라서 적당한 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하여 증폭시킬 수 있다. 또다른 바람직한 양태에서, 본 발명의 분리된 핵산 분자가 서열 1에 나타난 뉴클레오타이드 서열의 보체인 핵산 분자를 포함한다.

또다른 양태에서, 분리된 핵산 분자가 프럭토스-1,6-비스포스파타제 유전자, 또는 그의 일부 또는 단편이거나 이를 포함한다. 한 양태에서, 분리된 프럭토스-1,6-비스포스파타제 핵산 분자 또는 유전자가 서열 1에 제시된 바와 같은 뉴클레오타이드 서열을 포함한다 (예를 들어, 코리네박테룸 글루타미쿰 프럭토스-1,6-비스포스파타제 뉴클레오타이드 서열을 포함한다). 또다른 양태에서, 분리된 프럭토스-1,6-비스포스파타제 핵산 분자 또는 유전자가 서열 2에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 코딩하는 (예를 들어, 코리네박테룸 글루타미쿰 프럭토스-1,6-비스포스파타제 아미노산 서열을 코딩하는) 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 또다른 양태에서, 분리된 프럭토스-1,6-비스포스파타제 핵산 분자 또는 유전자가 서열 2의 아미노산 서열을 갖는 프럭토스-1,6-비스포스파타제 단백질의 상동체를 코딩한다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "상동체"에는 본원에 기재된 야생형 단백질 또는 폴리펩티드의 아미노산 서열과 약 30 내지 35% 이상, 바람직하게는 약 35 내지 40% 이상, 보다 바람직하게는 약 40 내지 50% 이상, 보다 더 바람직하게는 약 60%, 70%, 80%, 90% 이상 동일하고, 상기 야생형 단백질 또는 폴리펩티드와 실질적으로 등가의 기능적 또는 생물학적 활성을 지니고 있는 단백질 또는 폴리펩티드가 포함된다. 예를 들어, 프럭토스-1,6-비스포스파타제 상동체는 서열 2로서 제시된 아미노산 서열을 갖는 단백질과 약 30 내지 35% 이상, 바람직하게는 약 35 내지 40% 이상, 보다 바람직하게는 약 40 내지 50% 이상, 보다 더 바람직하게는 약 60%, 70%, 80%, 90% 이상 동일하고, 서열 2로서 제시된 아미노산 서열을 갖는 단백질의 실질적으로 등가의 기능적 또는 생물학적 활성 (즉, 기능적 등가)을 지니고 있다 (예를 들면, 실질적으로 등가의 판토테네이트 키나제 활성을 지니고 있다). 바람직한 양태에서, 분리된 프럭토스-1,6-비스포스파타제 핵산 분자 또는 유전자가 서열 2에 제시된 바와 같은 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 또다른 양태에서, 분리된 프럭토스-1,6-비스포스파타제 핵산 분자가 서열 1에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산 분자 전부 또는 그의 일부와 혼성화하거나, 또는 서열 2의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산 분자 전부 또는 그의 일부와 혼성화한다. 이러한 혼성화 조건은 당업자에게 공지되어 있고, 문헌 [참고: *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al., eds., John Wiley Sons, Inc. (1995), sections 2, 4 and 6]에 기재되어 있다. 추가의 엄격한 조건은 문헌 [참고: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Sambrook et al., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (1989), chapters 7, 9 and 11]에 기재되어 있다. 엄격한 혼성화 조건의 바람직한 비-제한적 예에는 4X 염화나트륨/나트륨 시트레이트 (SSC)에서 약 65 내지 70°C 하에 혼성화 (또는 4X SSC + 50% 포름아미드에서 약 42 내지 50°C 하에 혼성화)한 다음, 약 65 내지 70°C 하에 1X SSC에서 1회 이상 세척하는 것이 포함된다. 고도로 엄격한 혼성화 조건의 바람직한 비-제한적 예에는 1X SSC에서 약 65 내지 70°C 하에 혼성화 (또는 1X SSC + 50% 포름아미드에서 약 42 내지 50°C 하에 혼성화)한 다음, 약 65 내지 70°C 하에 0.3X SSC에서 1회 이상 세척하는 것이 포함된다. 엄격성이 저하된 혼성화 조건의 바람직한 비-제한적 예에는 4X SSC에서 약 50 내지 60°C 하에 혼성화 (또는 6X SSC + 50% 포름아미드에서 약 40 내지 45°C 하에 혼성화)한 다음, 약 50 내지 60°C 하에 2X SSC에서 1회 이상 세척하는 것이 포함된다. 상기 인용된 수치에 대한 중간 범위, 예를 들어 65 내지 70°C 또는 42 내지 50°C 역시 본 발명에 의해 포괄된다. SSPE (1X SSPE는 0.15 M NaCl, 10 mM NaH₂PO₄ 및 1.25 mM EDTA, pH 7.4이다)가 혼성화 및 세척 완충액에서 SSC (1X SSC는 0.15 M NaCl 및 15 mM 나트륨 시트레이트이다)를 대체할 수 있고; 세척은 혼성화를 완료한 후 각각 15분 동안 수행한다. 길이가 50개 염기쌍 미만일 것으로 예상되는 하이브리드에 대한 혼성화 온도는 이러한 하이브리드의 용점 (T_m) 보다 5 내지 10°C 낮아야 하는데, T_m은 다음 방정식에 따라서 결정된다. 길이가 18개 염기쌍 미만인 하이브리드의 경우, T_m (°C) = 2 (A + T 염기의 #) + 4 (G + C 염기의 #)이다. 길이가 18 내지 49개 염기쌍인 하이브리드의 경우에는, T_m (°C) = 81.5 + 16.6 (log₁₀[Na⁺]) + 0.41 (% G+C) - (600/N)인데, 여기서 N은 하이브리드 내의 염기 수이고, [Na⁺]는 혼성화 완충액 중의 나트륨 이온 농도이다 (1X SSC에 대한 [Na⁺]는 0.165 M이다). 막, 예를 들어 니트로셀룰로스 또는 나일론 막에 대한 핵산 분자의 비-특이적 혼성화를 감소시키기 위해 추가의 시약을 혼성화 및(또는) 세척 완충액에 부가할 수 있다는 것을 당업자는 또한 인지할 것인데, 이러한 부가 시약에는 차단제 (예: BSA, 또는 연어 또는 청어 정액 운반체 DNA), 세정제 (예: SDS), 킬레이트제 (예: EDTA), 피콜 (Ficoll), PVP 등이 포함되지만 이에 제한되지 않는다. 특히 나일론 막을 사용하는 경우에, 엄격한 혼성화 조건의 추가의 바람직한 비-제한적 예에는 0.25 내지 0.5 M NaH₂PO₄, 7% SDS에서 약 65°C 하에 혼성화한 다음, 0.02 M NaH₂PO₄, 1% SDS에서 65°C 하에 1회 이상 세척하는 것이다 [참고: 예를 들어, Church and Gilbert (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 1991-1995] (또는 0.2X SSC, 1% SDS에서 세척함). 또다른 바람직한 양태에서, 분리된 핵산 분자가 본원에 제시된 바와 같은 프럭토스-1,6-비스포스파타제 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함한다 (예를 들어, 서열 1로서 제시된 뉴클레오타이드 서열의 완전한 보체이다).

본 발명의 핵산 분자 (예를 들어, 프럭토스-1,6-비스포스파타제 핵산 분자 또는 유전자)는 표준 분자 생물학 기술과 본원에 제공된 서열 정보를 이용하여 분리할 수 있다. 예를 들어, 핵산 분자는 문헌 [참고: Sambrook, J., Fritsh, E.F., and Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring

Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989]에 기재된 바와 같은 표준 혼성화 및 클로닝 기술을 사용하여 분리할 수 있거나, 또는 본원에 제시된 프럭토스-1,6-비스포스파타제 뉴클레오티드 서열 또는 그의 플랜킹 서열에 기초하여 고안한 합성 올리고뉴클레오티드 프라이머를 사용하여 폴리머라제 연쇄 반응에 의해 분리할 수 있다. 본 발명의 핵산 (예를 들어, 프럭토스-1,6-비스포스파타제 핵산 분자 또는 유전자)은 주형으로서 cDNA, mRNA 또는 염색체성 DNA를 사용하고, 표준 PCR 증폭 기술에 따라서 적당한 올리고뉴클레오티드 프라이머를 사용하여 증폭시킬 수 있다.

본 발명의 또다른 양태는 돌연변이체 프럭토스-1,6-비스포스파타제 핵산 분자 또는 유전자를 특징으로 한다. 본원에 사용된 바와 같은 표현 "돌연변이체 핵산 분자" 또는 "돌연변이체 유전자"에는 이러한 돌연변이체에 의해 코딩될 수 있는 폴리펩티드 또는 단백질이 야생형 핵산 분자 또는 유전자에 의해 코딩된 폴리펩티드 또는 단백질과는 상이한 활성을 나타내도록 한 가지 이상 변경 (예: 치환, 삽입, 결실)을 수반하는 뉴클레오티드 서열을 갖는 핵산 분자 또는 유전자가 포함된다. 바람직하게는, 돌연변이체 핵산 분자 또는 돌연변이체 유전자 (예: 돌연변이체 프럭토스-1,6-비스포스파타제 유전자)가, 예를 들어 유사한 조건하에서 검정할 경우 (예: 동일한 온도 하에 배양된 미생물에서 검정할 경우)에 야생형 핵산 분자 또는 유전자에 의해 코딩된 폴리펩티드 또는 단백질과 비교해서 증가된 활성 (예: 증가된 프럭토스-1,6-비스포스파타제 활성)을 지닌 폴리펩티드 또는 단백질을 코딩한다. 돌연변이체 유전자는 또한, 야생형 폴리펩티드의 증가된 생산 수준을 지닐 수 있다.

본원에 사용된 바와 같은 "증가 또는 증강된 활성" 또는 "증가 또는 증강된 효소적 활성"은 야생형 핵산 분자 또는 유전자에 의해 코딩된 폴리펩티드 또는 단백질의 활성 보다 5% 초과한 것, 바람직하게는 야생형 핵산 분자 또는 유전자에 의해 코딩된 폴리펩티드 또는 단백질의 활성 보다 5 내지 10% 이상, 보다 바람직하게는 10 내지 25% 이상, 보다 더 바람직하게는 25 내지 50% 이상, 50 내지 75% 이상 또는 75 내지 100% 이상 초과한 것이다. 상기 인용된 수치에 대한 중간 범위, 예를 들어 75 내지 85%, 85 내지 90%, 90 내지 95% 역시 본 발명에 의해 포괄된다. 활성은 관심있는 특정한 단백질의 활성을 측정하기 위해 널리 허용된 검정에 따라서 결정할 수 있다. 활성은 직접적으로 검정 또는 측정할 수 있는데, 예를 들어 특정 세포로부터 분리 또는 정제된 단백질의 활성을 측정한다. 또다른 한편, 활성은 특정 세포 내에서 또는 세포의 매질에서 측정 또는 검정할 수 있다.

핵산 또는 유전자 서열 내에서의 단일 치환 (예를 들면, 상응하는 아미노산 서열 내의 아미노산 변화를 코딩하는 염기 치환)도, 상응하는 야생형 폴리펩티드 또는 단백질과 비교해서 코딩된 폴리펩티드 또는 단백질의 활성에 상당한 영향을 미칠 수 있다는 사실을 당업자는 인지할 것이다. 본원에 규정된 바와 같은 돌연변이체 핵산 또는 돌연변이체 유전자 (예를 들어, 돌연변이체 폴리펩티드 또는 단백질을 코딩함)는 야생형 유전자 또는 핵산을 발현하거나 돌연변이체 단백질 또는 폴리펩티드를 생산하는 상응하는 미생물과 비교해서, 상기 돌연변이체 유전자 또는 핵산을 발현하거나 돌연변이체 단백질 또는 폴리펩티드를 생산하는 미생물 (즉, 돌연변이체 미생물)에서 상이하거나 별개의 표현형으로서 임의로 관찰 가능한, 변경된 활성을 지닌 단백질 또는 폴리펩티드를 코딩한다는 점에서, 이러한 돌연변이체 핵산 또는 돌연변이체 유전자는 상기 언급된 바와 같은 단백질 상동체를 코딩하는 핵산 또는 유전자와 용이하게 구별 가능하다. 이와는 달리, 단백질 상동체는 야생형 유전자 또는 핵산을 발현하는 상응하는 미생물과 비교해서, 미생물에서 생성되는 경우에 임의로 표현형별로는 분간하기 어려운 동일하거나 실질적으로 유사한 활성을 지니고 있다. 따라서, 상동체와 돌연변이체 간을 구별시켜 주는 것은 제공되는 핵산 분자, 유전자, 단백질 또는 폴리펩티드들 간의 서열 동일률이 아니라, 상동체와 돌연변이체를 구별시켜 주는 것은 코딩된 단백질 또는 폴리펩티드의 활성이다: 즉, 상동체는, 예를 들어 낮은 서열 동일률 (예: 30 내지 50% 서열 동일률)을 나타내지만 실질적으로 등가의 기능적 활성을 지니고 있고, 돌연변이체는, 예를 들어 99% 서열 동일률을 나타내지만 현격하게 상이하거나 변경된 기능적 활성을 지니고 있다.

V. 재조합 핵산 분자 및 벡터

본 발명은 추가로, 본원에 기재된 핵산 분자 및(또는) 유전자 (예: 분리된 핵산 분자 및(또는) 유전자), 바람직하게는 코리네박테륨 유전자, 보다 바람직하게는 코리네박테륨 글루타미쿰 유전자, 보다 더 바람직하게는 코리네박테륨 글루타미쿰 프럭토스-1,6-비스포스파타제 유전자를 포함하는 재조합 핵산 분자 (예: 재조합 DNA 분자)를 특징으로 한다.

본 발명은 추가로, 본원에 기재된 핵산 분자 (예: 분리된 또는 재조합 핵산 분자 및(또는) 유전자)를 포함하는 벡터 (예: 재조합 벡터)를 특징으로 한다. 특히, 재조합 벡터는 본원에 기재된 바와 같은 세균성 유전자 생성물, 바람직하게는 코리네박테륨 유전자 생성물, 보다 바람직하게는 코리네박테륨 글루타미쿰 유전자 생성물 (예: 펜토스 포스페이트 효소, 예를 들면, 프럭토스-1,6-비스포스파타제)을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.

용어 "재조합 핵산 분자"에는, 이러한 재조합 핵산 분자가 유래한 본래의 또는 천연의 핵산 분자와는 뉴클레오티드 서열 상에서 상이하도록 (예를 들어, 하나 이상의 뉴클레오티드의 부가, 결실 또는 치환에 의해) 변경, 변형 또는 공학적으로 처리

시킨 핵산 분자 (예: DNA 분자)가 포함된다. 바람직하게, 재조합 핵산 분자 (예: 재조합 DNA 분자)에는 조절성 서열과 작동적으로 연결된 본 발명의 분리된 핵산 분자 또는 유전자 (예: 분리된 프럭토스-1,6-비스포스파타제 유전자)가 포함된다.

용어 "재조합 벡터"에는, 이러한 재조합 벡터가 유래한 본래의 또는 천연의 핵산 분자 내에 포함된 것 보다 훨씬 더 크거나, 더 작거나 또는 상이한 핵산 서열을 함유하도록 변경, 변형 또는 공학적으로 처리시킨 벡터 (예: 플라스미드, 파아지, 플라스미드, 바이러스, 코스미드 또는 기타 정제된 핵산 벡터)가 포함된다. 바람직하게는, 재조합 벡터가 조절성 서열, 예를 들어 프로모터 서열, 종결자 서열 및(또는) 인공 리보솜 결합 부위 (RBSs)와 작동적으로 연결된, 프럭토스-1,6-비스포스파타제 유전자 또는 이러한 프럭토스-1,6-비스포스파타제 유전자를 포함하는 재조합 핵산 분자를 포함한다.

"조절성 서열(들)에 작동적으로 연결된"이란 관심있는 핵산 분자 또는 유전자의 뉴클레오티드 서열이, 이러한 뉴클레오티드 서열의 발현 (예: 증강된, 증가된, 구성성, 기본, 감소된, 감소된 또는 억제된 발현), 바람직하게는 상기 뉴클레오티드에 의해 코딩된 유전자 생성물의 발현 (예를 들어, 재조합 핵산 분자가 본원에 규정된 바와 같은 재조합 벡터 내에 포함되어, 미생물 내로 도입되는 경우)을 허용해 주는 방식으로 조절성 서열(들)에 연결되는 것을 의미한다.

용어 "조절성 서열"에는 다른 핵산 서열의 발현에 영향을 미치는 (예: 조정 또는 조절해주는) 핵산 서열이 포함된다. 한 양태에서, 관심있는 조절성 서열 및 유전자가 천연적으로, 예를 들어 본래의 위치 및(또는) 배향에서 보여지는 바 대로 관찰된 바와 같은, 관심있는 특정한 유전자와 비교해서 유사하거나 동일한 위치 및(또는) 배향에서 재조합 핵산 분자 또는 재조합 벡터 내에 조절성 서열이 포함된다. 예를 들어, 관심있는 유전자는 천연 유기체 내의 관심있는 유전자를 수반하거나 이와 인접한 조절성 서열에 작동적으로 연결되어 (예: "본래의" 조절성 서열, 예를 들어 "본래의" 프로모터에 작동적으로 연결되어), 재조합 핵산 분자 또는 재조합 벡터 내에 포함될 수 있다. 또다른 한편, 관심있는 유전자는 천연 유기체 내의 또다른 (예를 들어, 상이한) 유전자를 수반하거나 이와 인접한 조절성 서열에 작동적으로 연결되어, 재조합 핵산 분자 또는 재조합 벡터 내에 포함될 수 있다. 또다른 한편, 관심있는 유전자는 또다른 유기체로부터의 조절성 서열에 작동적으로 연결되어, 재조합 핵산 분자 또는 재조합 벡터 내에 포함될 수 있다. 예를 들어, 기타 미생물로부터의 조절성 서열 (예: 기타 세균성 조절성 서열, 박테리오파지 조절성 서열 등)은 관심있는 특정한 유전자에 작동적으로 연결될 수 있다.

한 양태에서, 조절성 서열이 비-본래의 또는 비-천연 발생적 서열 (예: 화학적으로 합성되는 서열을 포함한, 변형, 돌연변이, 치환, 유도체화, 결실시킨 서열)이다. 바람직한 조절성 서열에는 프로모터, 증강자, 종결 신호, 항-종결 신호 및 기타 발현 제어 요소 (예: 억제자 또는 유도자와 결합하는 서열 및(또는) 예를 들어, 전사된 mRNA에서 전사 및(또는) 해독 조절성 단백질에 대한 결합 부위)가 포함된다. 이러한 조절성 서열은, 예를 들어, 다음 문헌에 기재되어 있다 [참고: Sambrook, J., Fritsh, E.F., and Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989]. 조절성 서열에는 특정 미생물에서 뉴클레오티드 서열의 구성성 발현을 지시하는 것 (예: 구성성 프로모터 및 강력한 구성성 프로모터); 특정 미생물에서 뉴클레오티드 서열의 유도성 발현을 지시하는 것 (예: 유도성 프로모터, 예를 들면, 크실로스 유도성 프로모터); 및 특정 미생물에서 뉴클레오티드 서열의 발현을 감소 또는 억제시키는 것 (예: 감소 신호 또는 억제자 신호)이 포함된다. 조절성 서열을 제거 또는 결실시킴으로써 관심있는 유전자의 발현을 조절하는 것도 본 발명의 범위 내에 속한다. 예를 들어, 전사의 음성 조절에 관여한 서열을 제거하여, 관심있는 유전자의 발현을 증강시킬 수 있다.

한 양태에서, 본 발명의 재조합 핵산 분자 또는 재조합 벡터에는 프로모터 또는 프로모터 서열에 작동적으로 연결된 하나 이상의 세균성 유전자 생성물 (예: 펜토스 포스페이트 생합성 효소, 예를 들면, 프럭토스-1,6-비스포스파타제)을 코딩하는 핵산 서열 또는 유전자가 포함된다. 본 발명의 바람직한 프로모터에는 코리네박테륨 프로모터 및(또는) 박테리오파지 프로모터 (예: 코리네박테륨을 감염시키는 박테리오파지)가 포함된다. 한 양태에서, 프로모터가 코리네박테륨 프로모터, 바람직하게는 강력한 코리네박테륨 프로모터 [예: 코리네박테륨 내의 생화학적 하우스키핑 (housekeeping) 유전자와 연합된 프로모터, 또는 코리네박테륨 내의 당분해 경로 유전자와 연합된 프로모터]이다. 또다른 양태에서, 프로모터가 박테리오파지 프로모터이다.

또다른 양태에서, 본 발명의 재조합 핵산 분자 또는 재조합 벡터가 종결자 서열(들) (예: 전사 종결자 서열)을 포함한다. 용어 "종결자 서열"에는 특정 유전자의 전사를 종결시키는 작용을 하는 조절성 서열이 포함된다. 종결자 서열 (또는 직렬 전사 종결자)은, 예를 들어 뉴클레아제에 대항하여 mRNA를 안정화시키는 (예를 들어, mRNA에 구조를 부가함으로써) 작용을 추가로 할 수 있다.

또다른 양태에서, 본 발명의 재조합 핵산 분자 또는 재조합 벡터가, 상기 서열을 함유하는 벡터의 탐지를 허용해 주는 서열 (즉, 탐지 가능한 및(또는) 선별성 마커), 예를 들어 영양요구성 돌연변이를 극복해 주는 서열, 예를 들면, *ura3* 또는 *ilvE*, 형광성 마커 및(또는) 비색 마커 (예: *lacZ*/β-갈락토시다제) 및(또는) 항생제 내성 유전자 (예: *amp* 또는 *tet*)를 포함한다.

또다른 양태에서, 본 발명의 재조합 벡터가 항생제 내성 유전자를 포함한다. 용어 "항생제 내성 유전자"는 숙주 유기체 (예: 바실루스) 상에 항생제에 대한 내성을 부여하거나 증진시키는 서열을 포함한다. 한 양태에서, 항생제 내성 유전자가 *cat* (클로람페니콜 내성) 유전자, *tet* (테트라사이클린 내성) 유전자, *erm* (에리트로마이신 내성) 유전자, *neo* (네오마이신 내성) 유전자 및 *spec* (스펙티노마이신 내성) 유전자로 이루어진 군으로부터 선택된다. 본 발명의 재조합 벡터는 상동 재조합 서열 (예: 관심있는 유전자의 숙주 유기체 염색체 내로의 재조합을 허용하도록 고안된 서열)을 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, *amyE* 서열이 숙주 염색체 내로 재조합하기 위한 상동 표적으로서 사용될 수 있다.

유전 공학적으로 처리시키고자 하는 미생물의 선택, 목적하는 유전자 생성물의 발현 수준 등과 같은 요인들에 따라서 벡터를 고안할 수 있다는 것을 당업자는 추가로 인지할 것이다.

VI. 분리된 단백질

본 발명의 또다른 국면은 분리된 단백질 (예: 분리된 펜토스 포스페이트 생합성 효소, 예를 들면, 분리된 프럭토스-1,6-비스포스파타제)을 특징으로 한다. 한 양태에서, 단백질 (예: 분리된 펜토스 포스페이트 효소, 예를 들면, 분리된 프럭토스-1,6-비스포스파타제)가 재조합 DNA 기술에 의해 생성되고, 이는 표준 단백질 정제 기술을 이용하는 적당한 정제 도식에 의해 본 발명의 미생물로부터 분리할 수 있다. 또다른 양태에서, 표준 펩티드 합성 기술을 사용하여 단백질을 화학적으로 합성한다.

"분리된" 또는 "정제된" 단백질 (예: 분리되거나 정제된 생합성 효소)은, 이러한 단백질이 유래하는 미생물로부터의 세포성 물질 또는 기타 오염 단백질이 실질적으로 없거나, 또는 화학적으로 합성된 경우에는 화학적 전구체 또는 기타 화학물질이 실질적으로 없다. 한 양태에서, 분리되거나 정제된 단백질이 오염 단백질을 약 30% (건조 중량 기준) 미만, 보다 바람직하게는 오염 단백질을 약 20% 미만, 보다 더 바람직하게는 오염 단백질을 약 10% 미만, 가장 바람직하게는 오염 단백질을 약 5% 미만 갖는다.

바람직한 양태에서, 단백질 또는 유전자 생성물이 코리네파테룸으로부터 유래된다 (예를 들어, 코리네파테룸-유래된다). 용어 "코리네파테룸으로부터 유래된" 또는 "코리네파테룸-유래된"에는 코리네파테룸 유전자에 의해 코딩되는 단백질 또는 유전자 생성물이 포함된다. 바람직하게는, 이러한 유전자 생성물이 코리네파테룸 글루타미쿰, 코리네파테룸 아세토글루타미쿰, 코리네파테룸 아세토아시도필쿰, 또는 코리네파테룸 더모아미노게네스로 이루어진 군으로부터 선택된 미생물로부터 유래된다. 특히 바람직한 양태에서, 상기 단백질 또는 유전자 생성물이 코리네파테룸 글루타미쿰으로부터 유래된다 (예를 들어, 코리네파테룸 글루타미쿰-유래된다). 용어 "코리네파테룸 글루타미쿰으로부터 유래된" 또는 "코리네파테룸 글루타미쿰-유래된"에는 코리네파테룸 글루타미쿰 유전자에 의해 코딩되는 단백질 또는 유전자 생성물이 포함된다. 또 다른 바람직한 양태에서, 상기 단백질 또는 유전자 생성물이 코리네파테룸 유전자 상동체 (예를 들어, 코리네파테룸과는 별개의 종으로부터 유래되지만, 본 발명의 코리네파테룸 유전자, 예를 들어 코리네파테룸 프럭토스-1,6-비스포스파타제 유전자와는 상당히 상동성인 유전자)에 의해 코딩된다.

천연 발생적 세균성 및(또는) 코리네파테룸 유전자 (예: 코리네파테룸 글루타미쿰 유전자), 예를 들어 본 발명자들에 의해 확인된 유전자, 예를 들면, 코리네파테룸 또는 코리네파테룸 글루타미쿰 프럭토스-1,6-비스포스파타제 유전자에 의해 코딩되는 세균성-유래된 단백질 또는 유전자 생성물 및(또는) 코리네파테룸-유래된 단백질 또는 유전자 생성물 (예: 씨. 코리네파테룸-유래된 유전자 생성물)이 본 발명의 범위 내에 포함된다. 추가로, 천연 발생적 세균성 및(또는) 코리네파테룸 유전자 (예: 코리네파테룸 글루타미쿰 유전자)와는 상이한 세균성 및(또는) 코리네파테룸 유전자 (예: 코리네파테룸 글루타미쿰 유전자), 예를 들어, 돌연변이된, 삽입된 또는 결실된 핵산을 갖고 있지만, 본 발명의 천연 발생적 유전자 생성물과 실질적으로 유사한 단백질을 코딩하는 유전자에 의해 코딩되는 세균성-유래된 단백질 또는 유전자 생성물 및(또는) 코리네파테룸-유래된 단백질 또는 유전자 생성물 (예: 씨. 코리네파테룸-유래된 유전자 생성물)이 본 발명의 범위 내에 포함된다. 예를 들어, 당업자가 유전 코드의 동의성(degeneracy)로 인해, 천연 발생적 유전자에 의해 코딩된 것과 동일한 아미노산을 코딩하는 핵산을 돌연변이 (예: 치환)시킬 수 있다는 것은 널리 인식되고 있다. 더우기, 당업자가 보존적 아미노산 치환물을 코딩하는 핵산을 돌연변이 (예: 치환)시킬 수 있다는 것도 널리 인식되고 있다. 추가로, 당업자는 천연 발생적 유전자 생성물과 비교해서 유전자 생성물의 기능에 실질적으로 영향을 미치지 않으면서 아미노산을 특정 정도로 치환, 부가 또는 결실시킬 수 있다는 것이 널리 인식되고 있는데, 이들 각 경우가 본 발명의 범위 내에 포함된다.

바람직한 양태에서, 본 발명의 분리된 단백질 (예: 분리된 펜토스 포스페이트 생합성 효소, 예를 들면, 분리된 프럭토스-1,6-비스포스파타제)가 서열 2에 나타난 아미노산 서열을 갖는다. 기타 양태에서, 본 발명의 분리된 단백질이 서열 2로서 제시된 단백질의 상동체이고 (예를 들어, 서열 2의 아미노산 서열과 약 30 내지 40% 이상 동일한, 바람직하게는 약 40 내

지 50% 이상 동일한, 보다 바람직하게는 약 50 내지 60% 이상 동일한, 보다 더 바람직하게는 약 60 내지 70%, 70 내지 80%, 80 내지 90%, 90 내지 95% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하고), 서열 2의 아미노산 서열에 의해 코딩된 단백질과 실질적으로 유사한 활성을 지니고 있다.

두 아미노산 서열 간의 상동률(%) 또는 두 핵산 간의 상동률(%)을 결정하기 위해, 이들 서열을 최적의 비교 목적을 위해 정렬시킨다(예를 들어, 제2의 아미노산 또는 핵산 서열과 최적으로 정렬하기 위해 제1 아미노산 또는 핵산 서열에 갭을 도입할 수 있다). 제1 서열 내의 위치가 제2 서열 내의 상응하는 위치와 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드에 의해 점유된 경우에는, 이러한 분자가 상기 위치에서 동일하다. 두 서열 간의 동일률(%)은, 바람직하게는 최적 정렬을 생성시키기 위해 필요한 상기 갭의 크기와 갭의 수를 고려하여, 해당 서열에 의해 공유된 동일한 위치 수의 함수이다(즉, 동일률(%) = 동일한 위치의 수/위치의 총수 X 100%).

서열들을 비교하고 두 서열 간의 상동률을 결정하는 것은 수학 알고리즘을 사용하여 수행할 수 있다. 서열들을 비교하기 위해 활용된 수학 알고리즘의 바람직한 비-제한적 예는 문헌 [참고: Karlin and Altschul, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 5873-5877]에서와 같이 변형된, 문헌 [참고: Karlin and Altschul, (1990), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 2264-2268]의 알고리즘이다. 이러한 알고리즘을 문헌 [참고: Altschul et al. (1990), *J. Mol. Biol.* 215: 403-10]의 NBLAST 및 XBLAST 프로그램 (버전 2.0)에 혼입시킨다. BLAST 뉴클레오티드 조사는 NBLAST 프로그램, 스코어 = 100, 단어 길이 = 12를 사용하여 수행하여 본 발명의 핵산 분자와 상동성인 뉴클레오티드 서열을 수득할 수 있다. BLAST 단백질 조사는 XBLAST 프로그램, 스코어 = 50, 단어 길이 = 3을 사용하여 수행하여 본 발명의 단백질 분자와 상동성인 아미노산 서열을 수득할 수 있다. 비교 목적상 갭이 있는 정렬을 수득하기 위해서는, 문헌 [참고: Altschul et al. (1997), *Nucleic Acids Res.* 25(17): 3389-3402]에 기재된 바와 같은 갭이 있는 BLAST를 활용할 수 있다. BLAST 및 갭이 있는 BLAST 프로그램을 활용하는 경우, 각각의 프로그램(예를 들어, XBLAST 및 NBLAST)의 디폴트(default) 파라미터를 사용할 수 있다(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 참고). 서열을 비교하기 위해 활용된 수학 알고리즘의 또다른 바람직한 비-제한적 예는 문헌 [참고: Myers and Miller, (1988), *Comput Appl Biosci.* 4: 11-17]의 알고리즘이다. 이러한 알고리즘은, 예를 들어 GENESTREAM 네트워크 서버, IGH 몬트펠리에(Montpellier), FRANCE(<http://vega.igh.cnrs.fr>), 또는 ISREC 서버(<http://www.ch.embnet.org>)에서 입수 가능한 ALIGN 프로그램에 혼입되어 있다. 아미노산 서열을 비교하기 위해 ALIGN 프로그램을 활용하는 경우에는, PAM120 중량 잔기 표, 갭 길이 페널티 12 및 갭 페널티 4를 사용할 수 있다.

또다른 바람직한 양태에서, 두 아미노산 서열 간의 상동률(%)은 블로섬(Blossom) 62 매트릭스 또는 PAM250 매트릭스 및 갭 중량 12, 10, 8, 6 또는 4 및 길이 중량 2, 3 또는 4를 사용하여, GCG 소프트웨어 패키지(<http://www.gcg.com>에서 입수 가능함) 내의 GAP 프로그램을 사용하여 결정할 수 있다. 또다른 바람직한 양태에서, 두 핵산 서열 간의 상동률(%)은 갭 중량 50 및 길이 중량 3을 사용하여, GCG 소프트웨어 패키지(<http://www.gcg.com>에서 입수 가능함) 내의 GAP 프로그램을 사용하여 결정할 수 있다.

본 발명은 다음 실시예에 의해 추가로 예시되지만, 이로써 제한되지 않는다. 본 명세서 전반에 걸쳐 인용된 모든 참고 문헌, 특허, 서열 목록, 도면 및 공개된 특허원 전문이 본원에 참고로 도입된다.

실시예

일반적 방법론:

균주: 코리네박테륨 글루타미쿰 ATCC 21526을 아메리칸 타입 앤드 컬처 컬렉션 [American Type and Culture Collection (Manassas, USA)]로부터 수득하였다. 이러한 호모세린 영양요구성 균주는 일치된 아스파르테이트 키나제 억제제의 바이패스(bypass)로 인해 L-트레오닌 제한 동안 리신을 배출한다. 프럭토스 또는 글루코스 5 g/L을 함유하는 복합 배지에서 예비배양물을 성장시켰다. 한천 판에 대해서는 이러한 복합 배지에 한천 12 g/L을 부가적으로 보정하였다. 추적자 실험용 접종물로서 사용하고 추적자 연구 그 자체에 사용하기 위한 세포를 생성시키기 위해, 1 mg/ml 칼슘 판토테네이트·HCl이 보정된 최소 배지를 사용하였다 [참고: Wittmann, C. and E. Heinzle. 2002. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:5843-5859]. 이러한 배지에서는 탄소원 글루코스 또는 프럭토스의 농도, 필수 아미노산 트레오닌, 메티오닌 및 루이신의 농도 및 시트레이트의 농도가 다음에 명시된 바와 같이 다양하였다.

배양: 예비배양은 (i) 접종물로서 한천 판으로부터의 세포를 수반한 복합 배지에서 발효균(starter) 배양하는 단계, (ii) 최소 배지에 적응하도록 하기 위한 단기간 배양 단계 및 (iii) 필수 아미노산 농도를 상승시킨 필수 배지 상에서의 연장된 배양 단계를 포함하는 3 단계로 이루어졌다. 한천 판으로부터 접종된 예비배양물을 10 ml 복합 배지 상에서 조절판이 있는 100 ml 진탕 플라스크 내에서 밤새 성장시켰다. 그 후, 세포를 원심분리(8800 g, 2분, 30°C)함으로써 수거하고, 최소 배

지에 접종한 다음, 광학 밀도 2가 될 때까지 성장시켜, 최소 배지에 맞도록 적응시킨 지수적으로 증식하는 세포를 수득하였다. 그 다음, 세포를 멸균성 0.9% NaCl로 세척 단계를 포함하여, 원심분리 (8800 g, 2분, 30°C)함으로써 수거하였다. 이어서, 이들을 0.30 g/L 트레오닌, 0.08 g/L 메티오닌, 0.20 g/L 루이신 및 0.57 g/L 시트레이트의 초기 농도를 수반한, 조절판이 있는 50 ml 진탕 플라스크에서 6 ml 최소 배지에 접종하였다. 탄소원으로서, 70 mM 글루코스 또는 80 mM 프럭토스를 각각 가하였다. 필수 아미노산이 고갈될 때까지 (이는 HPLC 분석에 의해 검사하였다) 세포를 성장시켰다. 성장기가 끝날 무렵, 세포를 수거하고, 이를 멸균성 NaCl (0.9%)로 세척하였다. 연속해서, 이들을 리신 생산 조건하에서 대사 유량 분석을 위해 조절판이 있는 25 ml 진탕 플라스크 내의 4 ml 최소 추적자 배지에 옮겼다. 이러한 추적자 배지는 트레오닌, 메티오닌, 루이신 및 시트레이트를 전혀 함유하지 않았다. 각 탄소원에 대해, (i) 40 mM [^{13}C] 표지된 기질 및 (ii) 20 mM [$^{13}\text{C}_6$] 표지된 기질 + 20 mM의 천연적 표지된 기질을 각각 함유하는 2개의 병렬 플라스크를 항온 배양하였다. 모든 배양을 회전식 진탕기 (공급처: Inova 4230, New Brunswick, Edison, NJ, USA) 상에서 30°C 및 150 rpm 하에 수행하였다.

화학물질: 99% [^{13}C] 글루코스, 99% [^{13}C] 프럭토스, 99% [$^{13}\text{C}_6$] 글루코스 및 99% [$^{13}\text{C}_6$] 프럭토스를 캠프로 사이언티픽 [Campro Scientific (Veenendaal, Netherlands)]로부터 구입하였다. 효모 추출물과 트립톤은 디프코 라보라토리즈 [Difco Laboratories (Detroit, Michigan USA)]로부터 획득하였다. 적용된 기타 모든 화학물질은 시그마 [Sigma (St. Louis, MI USA)], 머크 [Merck (Darmstadt, Germany)] 또는 플루카 [Fluka (Buchs, Switzerland)]로부터 각각 분석 등급용으로 구입하였다.

기질 및 생성물 분석: 세포 농도는 광도계 [공급처: Marsha Pharmacia biotech, Freiburg, Germany]를 사용하여 660 nm에서의 세포 밀도 ($\text{OD}_{660\text{nm}}$)를 측정하거나 중량측정함으로써 결정하였다. 후자는 물로의 세척 단계를 포함하여, 3700 g으로 10분 동안 실온 하에 배양 육즙으로부터 세포 10 ml를 수거함으로써 결정하였다. 중량이 일정하게 유지될 때까지 상기 세척된 세포를 80°C 하에 건조시켰다. 무수 세포 건조 중량과 $\text{OD}_{660\text{nm}}$ 간의 상관 인자 ($\text{g 생물량}/\text{OD}_{660\text{nm}}$)가 0.353으로 결정되었다.

세포의 기질과 생성물의 농도를, 16000 g으로 3분간 원심분리시켜 수득한 배양 상등액에서 결정하였다. 프럭토스, 글루코스, 수크로스 및 트레할로스는 옥심 트리메틸실릴 유도체로 유도체화한 후에 GC에 의해 정량화하였다. 이를 위해, HP 5MS 칼럼 (5% 페닐-메틸-실록산-디페닐디메틸폴리실록산, 30 m x 250 μm , 공급처: Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA)이 장착된 HP 6890 기체 크로마토그래프 (공급처: Hewlett Packard, Palo Alto, USA) 및 70 eV에서의 전자 충격 이온화를 나타내는 4중극 질량 선택적 탐지기 (공급처: Agilent Technologies, Waldbronn, Germany)를 적용하였다. 샘플 제조는 배양 상등액을 동결건조시키고, 피리딘에 용해시킨 다음, 상기 당을 히드록실아민 및 (트리메틸실릴)트리플루오로아세트아미드 (BSTFA) (공급처: Macherey & Nagel, Duren, Germany)(13,14)로 2-단계 유도체화하는 단계를 포함하였다. β -D-리보스를 정량화를 위한 내부 표준물질로서 사용하였다. 주사된 샘플 용적은 0.2 μl 였다. GC 분석을 위한 시간 프로그램은 다음과 같다: 150°C (0 내지 5분), 8°C/min (5 내지 25분), 310°C (25 내지 35분). 헬륨을 운반체 기체로서 1.5 l/min의 유속으로 사용하였다. 유입 온도는 310°C였고 탐지기 온도는 320°C였다. 아세테이트, 락테이트, 피루베이트, 2-옥소글루타레이트 및 디히드록시아세톤은 이동 상으로서 4 mM 황산을 0.8 ml/min의 유속으로 사용하고 210 nm에서 UV-탐지하는 아미넥스 (Aminex)-HPX-87H 바이오래드 (Biorad) 칼럼 (300 x 7.8 mm, Hercules, CA, USA)을 활용하여 HPLC함으로써 결정하였다. 글리세롤은 효소적 측정기 [공급처: Boehringer, Mannheim, Germany]에 의해 정량화하였다. 아미노산은 2 ml/min의 유속으로 자동화 온라인 유도체화 (o-프탈디알데히드 + 3-머캅토프로피온산)하고 형광 탐지하는 조르박스 에클립세 (Zorbax Eclipse)-AAA 칼럼 (150 x 4.6 mm, 5 μm , Agilent Technologies, Waldbronn Germany)을 활용하여 HPLC (공급처: Agilent Technologies, Waldbronn, Germany)함으로써 분석하였다. 상세 내역은 지시 매뉴얼에 제공되었다. α -아미노 부티레이트가 정량화를 위한 내부 표준물질로서 사용되었다.

^{13}C 표지화 분석: 배양 상등액 중의 리신 및 트레할로스의 표지화 패턴을 GC-MS에 의해 정량화하였다. 이렇게 함으로써, 단일 질량 이소토포머 분획을 결정하였다. 현재의 작업에서는 이들이 M_0 (표지되지 않은 질량 이소토포머 분획의 상대적 양), M_1 (단일 표지된 질량 이소토포머 분획의 상대적 양) 및 보다 높은 표지화에 대한 상응하는 용어로서 정의된다. 리신의 GC-MS 분석은 기존 문헌 [참고: Rubino, F. M. 1989. J. Chromatogr. 473: 125-133]에 기재된 바와 같이, t-부틸-디메틸실릴 (TBDMS) 유도체로 전환시킨 후에 수행하였다. 질량 이소토포머 분포물의 정량화는 이온 군집 m/z 431-437에 대해 선택적 이온 모니터링 (SIM) 방식으로 수행하였다. 이러한 이온 군집은 상기 유도체화 잔기로부터의 t-부틸기 상실에 의해 형성되므로, 리신의 완전한 탄소 골격을 포함하는 단편 이온에 상응한다 [참고: Wittmann, C., M. Hans and E. Heinzle. 2002. Analytical Biochem. 307:379-382]. 트레할로스의 표지화 패턴은 기존 문헌 [참고: Wittmann, C., H.M. Kim and E. Heinzle. 2003. Metabolic flux analysis at miniaturized scale. submitted]에 기재된 바와 같이, 그의 트리

메틸실릴 (TMS) 유도체로부터 결정하였다. 트레할로스의 표지화 패턴은 트레할로스의 전체 단량체 단위를 함유하므로 글루코스-6-포스페이트에 대해 등가인 탄소 골격을 함유한 단편 이온에 상응하는 m/z 361-367 하의 이온 군집을 통하여 평가하였다. 모든 샘플은 먼저, 분석된 생성물과 기타 샘플 성분들 간의 동중 (isobaric) 간섭은 제외시키는, 이들로의 스캔 방식으로 측정하였다. SIM에 의한 모든 측정을 두 번 되풀이하였다. 프럭토스 사용시의 추적자 실험에서 단일 질량 이소토포머 분획의 실험상 오차는 각각, $[1-^{13}\text{C}]$ 프럭토스 사용시의 리신의 경우에는 0.85% (M_0), 0.16% (M_1), 0.27% (M_2), 0.35% (M_3), 0.45% (M_4)였고, $[1-^{13}\text{C}]$ 프럭토스 사용시의 트레할로스의 경우에는 0.87% (M_0), 0.19% (M_1), 0.44% (M_2), 0.45% (M_3), 0.88% (M_4)였으며, 50% $[^{13}\text{C}_6]$ 프럭토스 사용시의 트레할로스의 경우에는 0.44% (M_0), 0.54% (M_1), 0.34% (M_2), 0.34% (M_3), 0.19% (M_4), 0.14% (M_5) 및 0.52% (M_6)였다. 글루코스 추적자 실험에서 MS 측정의 실험상 오차는 각각, $[1-^{13}\text{C}]$ 글루코스 사용시의 리신의 경우에는 0.47% (M_0), 0.44% (M_1), 0.21% (M_2), 0.26% (M_3), 0.77% (M_4)였고, $[1-^{13}\text{C}]$ 글루코스 사용시의 트레할로스의 경우에는 0.71% (M_0), 0.85% (M_1), 0.17% (M_2), 0.32% (M_3), 0.46% (M_4)였으며, 50% $[^{13}\text{C}_6]$ 글루코스 사용시의 트레할로스의 경우에는 1.29% (M_0), 0.50% (M_1), 0.83% (M_2), 0.84% (M_3), 1.71% (M_4), 1.84% (M_5) 및 0.58% (M_6)였다.

대사 모델링 및 파라미터 평가: 모든 대사적 시뮬레이션 (metabolic simulation)을 개인용 컴퓨터 상에서 수행하였다. 리신-생산성 코리네박테륨 글루타미쿰의 대사 경로망을 매트랩 (Matlab) 6.1 및 시뮬링크 (Simulink) 3.0 (공급처: Mathworks, Inc., Natick, MA USA)에서 이행하였다. 이러한 소프트웨어 이행은 상기 대사 경로망에서 ^{13}C 표지화 분포를 계산하기 위한 시뮬링크에서의 이소토포머 모델을 포함하였다. 파라미터 평가를 위해, 이소토포머 모델을 매트랩에서 반복 최적화 알고리즘과 연계하였다. 적용된 계산 도구에 대한 상세 내역이 다음 문헌에 기재되어 있다 [참고: Wittmann, C. and E. Heinzle. 2002. Appl. Environ. Microbiol. 68:5843-5859].

대사 경로망은 기존의 연구 작업에 기초한 것이고, 이는 당분해, 펜토스 포스페이트 경로 (PPP), 트리카르복실산 (TCA) 주기, 피루베이트의 보존적 카르복실화, 리신과 기타 분비된 생성물 (표 1)의 생합성 및 중간 전구체로부터 바이오매스의 동화 작용성 유량을 포함하였다. 또한, 글루코스 및 프럭토스에 대한 흡수 시스템을 이행하였다. 글루코스의 흡수는 PTS를 통하여 글루코스-6-포스페이트로 인산화시키는 단계를 포함하였다 [참고: Ohnishi, J., S. Mitsuhashi, M. Hayashi, S. Ando, H. Yokoi, K. Ochiai and M. A. Ikeda. 2002. Appl. Microbiol. Biotechnol. 58: 217-223]. 프럭토스의 경우에는, 다음 2가지 흡수 시스템이 고려되었다: (i) PTS_{프럭토스}에 의한 흡수 및 프럭토스-1-포스페이트를 통하여 프럭토스의 프럭토스-1,6-비스포스파타제로의 전환 및 (ii) 프럭토스-6-포스페이트를 유발시키는 PTS_{만노스}에 의한 흡수 [참고: Dominguez, H., C. Rollin, A. Guyonvarch, J.L. Guerquin-Kern, M. Coccagn-Bousquet and N. D. Lindley. 1998. Eur. J. Biochem. 254: 96-102]. 또한, 프럭토스-1,6-비스포스파타제를 상기 모델에 이행하여, 상부 당분해의 양방향에서 탄소 유량이 일어날 수 있도록 하였다. 가역적인 것으로 고려된 반응물은 PPP에서 트랜스알돌라제 및 트랜스케톨라제였다. 부가적으로, 글루코스 6-포스페이트 이소머라제는 글루코스를 사용한 실험에 대해 가역적인 것으로 간주되었으므로, 트레할로스 표지화는 이러한 효소의 가역성을 민감하게 반영하였다. 이와는 달리, 프럭토스에 대해서는 글루코스 6-포스페이트 이소머라제의 가역성을 결정할 수 없었다. 프럭토스-성장된 세포에서는 글루코스 6-포스페이트가 프럭토스-6-포스페이트로부터 독립적으로 형성되어, 2개의 풀에 대한 동일한 표지화 패턴이 발생한다. 따라서, 가역적 글루코스 6-포스페이트 이소머라제에 의한 글루코스 6-포스페이트와 프럭토스 6-포스페이트 간의 호환성이, 글루코스 6-포스페이트 이소머라제 가역성을 평가하기 위해 사용될 수 있었던 표지화 차이를 가져다 주지 못한다. 리신과 트레할로스의 측정된 표지화는 (i) 포스포에놀피루베이트/피루베이트와 말레이트/옥살로아세트레이트의 한 무더기 풀 간의 유동 가역성에 대해 민감하지 못하였고, (ii) TCA 주기에서 말레이트 데히드로게나제 및 푸마레이트 히드라타제의 가역성에 대해 민감하지 못하였다. 따라서, 이들 반응은 비가역적인 것으로 간주되었다. 이들 유량 파라미터에 대해 민감한, 천연적으로 표지된 기질과 $[^{13}\text{C}_6]$ 표지된 기질의 혼합물로부터의 알라닌의 표지화는 본 연구에서 이용 가능하지 못하였다. 기존의 결과를 근거로 하면, 글리옥살레이트 경로는 불활성인 것으로 추정되었다 [참고: Wittmann, C. and E. Heinzle. 2002. Appl. Environ. Microbiol. 68: 5843-5859].

코리네박테륨 글루타미쿰의 성장, 생성물 형성 및 바이오매스 조성에 대한 화학량적 데이터를, 분비된 리신 및 트레할로스의 질량 분광측정 표지화 데이터와 함께 사용하여 대사 유량 분포를 계산하였다. 2가지 병렬 실험의 리신 및 트레할로스의 실험적 ($M_{i,exp}$) 질량 이소토포머 분획과 시뮬레이션된 ($M_{i,calc}$) 질량 이소토포머 분획 간에 최소 편차를 제공해주는 유량

세트를 세포내 유량 분포에 대한 가장 우수한 평가치로서 간주하였다. 부록에 기재된 바와 같이, 글루코스-성장된 세포와 프럭토스-성장된 세포의 2가지 경로망을 중복 결정하였다. 따라서, 최소 제곱 접근법이 가능하였다. 오차 기준으로서, 최소 제곱법 (SLS)의 칭량 합계를 사용하였는데, 여기서 $S_{i,exp}$ 이 측정치의 표준 편차이다 (수학식 1):

$$SLS = \sum_i \frac{(M_{i,exp} - M_{i,calc})^2}{S_{i,exp}^2}$$

다중 파라미터 초기화를 적용하여, 수득된 유량 분포가 포괄적인 최적치를 나타내었는지를 연구 조사하였다. 모든 균주에 대해, 리신 생산 동안의 글루코스 흡수 유량을 100%로 설정하고, 경로망 내의 다른 유량을, 이러한 글루코스 흡수 유량에 대해 표준화시킨 상대적 몰 유량으로서 제공하였다.

통계적 평가: 수득된 대사 유량의 통계적 분석을 기존 문헌 [참고: Wittmann, C. and E. Heinzle. 2002. Appl. Environ. Microbiol. 68: 5843-5859]에 기재된 바와 같이 몬테-카를로 (Monte-Carlo) 접근법에 의해 수행하였다. 각 균주에 대해, 100가지 파라미터 평가 수행에 의해 통계적 분석을 수행하였는데, 이로써 질량 이소토포머 비 측정치와 유량 측정치를 포함하는 실험적 데이터가 통계적으로 다양하였다. 이와 같이 수득된 데이터로부터, 단일 파라미터에 대한 90% 신뢰 한계치를 계산하였다.

실시예 1: 프럭토스 및 글루코스를 사용한, 코리네박테륨 글루타미쿰에 의한 리신 생산

리신 생산성 코리네박테륨 글루타미쿰의 대사 유량을 글루코스 및 프럭토스를 사용한 비교 배치 배양물에서 분석하였다. 이를 위하여, 예비-성장시킨 세포를 추적자 배지에 옮긴 다음, 약 5시간 동안 항온 배양하였다. 추적자 실험 초기와 말기에 기질과 생성물을 분석한 결과, 두 탄소원 간에는 현격한 차이가 있는 것으로 밝혀졌다. 글루코스의 경우에는 총 11.1 mM 리신이 생산된 반면, 프럭토스의 경우에는 이 보다 낮은 농도인 8.6 mM 만이 생산되었다. 5시간에 걸친 항온 배양 동안, 세포 농도가 3.9 g/L에서 6.0 g/L으로 증가하였고 (글루코스), 3.5 g/L에서 4.4 g/L으로 증가하였다 (프럭토스). 트레오닌과 메티오닌이 상기 배지에 존재하지 않았다는 사실 때문에, 내부 공급원이 바이오매스 합성을 위해 상기 세포에 의해 활용된 것으로 추정되었다. 평균 특이 당 흡수 속도는 글루코스 (1.71 mmol/g.h)와 비교해서 프럭토스의 경우가 더 높았다 (1.93 mmol/g.h). 표 1에 나타난 바와 같이, 수득된 코리네박테륨 글루타미쿰 ATCC 21526의 수율은 프럭토스와 글루코스 간에 현격하게 상이하였다. 이는 주요 생성물 리신 및 다양한 부산물과 관련이 있었다. 리신에 관해 언급하면, 프럭토스 경우의 수율은 244 mmol/mol이므로, 글루코스 경우의 수율 (281 mmol/mol)과 비교해서 더 낮았다. 부가적으로, 탄소원은 바이오매스 수율에 대해 현격한 영향을 미쳤는데, 이는 글루코스와 비교해서 프럭토스의 경우에 거의 50% 정도 감소하였다. 부산물 형성에 대한 탄소원의 가장 유의적인 (상당한) 영향은 디히드록시아세톤, 글리세롤 및 락테이트에 대해 관찰되었다. 프럭토스의 경우에는 이들 부산물의 축적이 강력히 증강되었다. 글리세롤에 대한 수율은 10배 더 높은 반면, 디히드록시아세톤 및 락테이트 분비는 6배 정도 증가하였다. 디히드록시아세톤이 프럭토스의 경우에서 우세하게 나타나는 부산물이었다. 보다 낮은 바이오매스 수율로 인해, 프럭토스-성장된 세포에 대해서는, 동화 전구체에 대한 수요가 상당히 감소되었다 (표 2).

[표 1]

글루코스 (좌측) 및 프럭토스 (우측)로부터 코리네박테륨 글루타미쿰 ATCC 21526에 의한 리신 생산기에서의 바이오매스 및 대사물. 실험적 수율은 (i) 40 mM [$1-^{13}C$] 표지된 기질 및 (ii) 20 mM [$^{13}C_6$] 표지된 기질 + 20 mM 천연적으로 표지된 기질 상에서의 2가지 병렬 항온 배양물의 평균 값인데, 2가지 항온 배양물 간의 상응하는 편차를 수반하였다. 모든 수율은 바이오매스에 대한 수율 [이는 (건조 바이오매스 mg) (mmol) $^{-1}$ 로 제시된다]을 제외하고는 (mmol 생성물) (mmol) $^{-1}$ 로 제시된다.

수율	글루코스 사용시의 리신 생산량	프럭토스 사용시의 리신 생산량
바이오매스	54.1 ± 0.8	28.5 ± 0.0
리신	281.0 ± 2.0	244.4 ± 23.3
발린	0.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0
알라닌	0.1 ± 0.0	0.4 ± 0.1
글리신	6.6 ± 0.0	7.1 ± 0.4
디히드록시아세톤	26.3 ± 15.3	156.6 ± 25.8
글리세롤	3.8 ± 2.4	38.4 ± 3.9
트레할로스	3.3 ± 0.5	0.9 ± 0.1
α-케토글루타레이트	1.6 ± 0.4	6.5 ± 0.3
아세테이트	45.1 ± 0.3	36.2 ± 5.7
피루베이트	1.2 ± 0.4	2.1 ± 0.5
락테이트	7.1 ± 1.7	38.3 ± 3.5

[표 2]

글루코스 (좌측) 및 프럭토스 (우측)로부터의 리신 생산기에서 세포내 대사물에 대한 코리네박테륨 글루타미쿰 ATCC 21526의 동화 요구량. 실험적 데이터는 (i) $[1-^{13}\text{C}]$ 표지된 기질 및 (ii) 천연적으로 표지된 기질과 $[^{13}\text{C}_6]$ 표지된 기질의 1:1 혼합물 상에서의 2가지 병렬 향온 배양물의 평균 값인데, 2가지 향온 배양물 간의 편차를 수반하였다.

전구체 요구량 * mmol (mol 글루코스) ⁻¹	글루코스 사용시의 리신 생산량	프럭토스 사용시의 리신 생산량
글루코스 6-포스페이트	11.09 ± 0.16	5.84 ± 0.05
프럭토스 6-포스페이트	3.84 ± 0.06	2.02 ± 0.02
펜토스 5-포스페이트	47.50 ± 0.70	25.05 ± 0.21
에리트로스 4-포스페이트	14.50 ± 0.22	7.64 ± 0.06
글리세르알데히드 3-포스페이트	6.98 ± 0.10	3.68 ± 0.03
3-포스포글리세레이트	59.95 ± 0.89	36.85 ± 0.31
피루베이트/포스포에놀피루베이트	107.80 ± 1.60	56.80 ± 0.48
α-케토글루타레이트	92.51 ± 1.37	48.73 ± 0.41
옥살로아세테이트	48.91 ± 0.72	45.76 ± 0.38
아세틸 CoA	135.30 ± 2.00	71.25 ± 0.60
디아미노피멜레이트 + 리신**	18.83 ± 0.28	9.92 ± 0.08

*전구체 요구량의 평가는 각 균주에 대해 수득된 실험적 바이오매스 수율 (표 1) 및 기존에 코리네박테륨 글루타미쿰에 대해 측정된 바이오매스 조성에 기초하였다 [참고: Marx, A., A.A. de Graaf, W. Wiechert, L. Eggeling and H. Sahm. 1996. Biotechnol. Bioeng. 49:111-129].

**디아미노피멜레이트 및 리신은 별도의 동화 전구체로서 간주되고 있다. 이는 피루베이트 및 옥살로아세테이트로부터 디아미노피멜레이트 (세포 벽) 및 리신 (단백질)로의 동화 유량이, 리신 분비 유량에 덧붙여 리신 생합성 경로를 통하여 전반적인 유량에도 기여하고 있다는 사실 때문이다.

실시예 II: 추적자 실험에서 ^{13}C -표지화 패턴의 수동 검사

분비된 리신 및 트레할로스의 상대적 질량 이소토포머 분획을 GC-MS에 의해 정량화하였다. 이들 질량 이소토포머 분획은 세포내 유량에 대해 민감하므로, 연구 조사된 생물학적 시스템의 플럭스 (fluxome)의 지문을 나타낸다. 도 2에 도시된 바와 같이, 분비된 리신과 트레할로스의 표지화 패턴은 코리네박테륨 글루타미쿰의 글루코스-성장된 세포와 프럭토스-성장된 세포 간에 상당한 차이를 나타내었다. 이러한 차이는 적용된 추적자 표지화 둘 다와, 측정된 생성물 둘 다에 대해 발견되었다. 이는 적용된 탄소원에 따라서 탄소 유량 패턴 상에 있어 상당한 차이가 있다는 것을 지시해준다. 앞서 나타낸 바와 같이, $[1-^{13}\text{C}]$ 글루코스와 $[^{13}\text{C}_6]$ 글루코스의 혼합물 상에서의 코리네박테륨 글루타미쿰의 2가지 병렬 배양물로부터의 질량 이소토포머 분획은 거의 동일하였다 [참고: Wittmann, C., H.M. Kim and E. Heinzle. 2003. Metabolic flux analysis at miniaturized scale. submitted]. 따라서, 관찰된 차이점은 대사 유량 상의 기질 특이적 차이와 명백한 관계가 있을 수 있다.

실시예 III: 세포내 유량에 관한 평가

수행된 연구의 핵심적인 과제는 탄소원으로 각각 글루코스 및 프럭토스를 사용한 리신 생산 동안 코리네박테륨 글루타미쿰의 세포내 유량에 관한 비교 연구였다. 이를 위해, 추적자 실험으로부터 수득한 실험적 데이터를 사용하여, 앞서 기재된 바와 같은 유량 평가 소프트웨어를 적용하여 각 기질에 대한 대사 유량 분포를 계산하였다. 실험적 질량 이소토포머 분획과 계산된 질량 이소토포머 분획 간의 편차를 최소화함으로써 파라미터 평가를 수행하였다. 수행된 접근법은 각 최적화 단계 동안 대사물 밸런싱을 활용하였다. 이는 (i) 생성물 분비에 관한 화학량적 데이터 (표 2) 및 (ii) 바이오매스 전구체에 대한 동화 요구량에 관한 화학량적 데이터 (표 3)를 포함하였다. 실험적 표지화 패턴과 시뮬레이션된 표지화 패턴 간의 최소 편차를 제공해주는 세포내 유량 세트를 세포내 유량 분포에 대한 가장 우수한 평가치로서 간주하였다. 양 시나리오에 대해, 다중 초기화 값을 이용하여 동일한 유량 분포를 수득하였는데, 이는 포괄적인 최소가 확인되었다는 것을 제안해준다. 명백하게, 실험적으로 결정된 질량 이소토포머 비율과 계산된 질량 이소토포머 비율이 일치하였다 (표 4).

[표 3]

글루코스 및 프럭토스를 사용하여 각각 배양된 리신 생산성 코리네박테륨 글루타미쿰 ATCC 21526의 분비된 리신 및 트레할로스의 상대적 질량 이소토포머 분획. 양 탄소원에 대해, (i) $[1-^{13}\text{C}]$ 표지된 기질 및 (ii) 천연적으로 ^{13}C 표지된 기질과 $[^{13}\text{C}_6]$ 표지된 추적자 기질의 1:1 혼합물 상에서의 2가지 병렬 추적자 실험을 수행하였다. 실험적 GC/MS 데이터 (exp) 및 값은 최적화 유량 세트 (calc)에 상응하는 수학 모델의 해석에 의해 예측하였다. M_0 는 표지되지 않은 질량 이소토포머 분획의 상대량을 의미하고, M_1 은 단일 표지된 질량 이소토포머 분획의 상대량을 의미하며, 상응하는 용어들은 보다 높은 표지화를 의미한다.

	($[1-^{13}\text{C}]$ 표지된 기질 사용시) 리신					($[1-^{13}\text{C}]$ 표지된 기질 사용시) 트레할로스					(50% $[^{13}\text{C}_6]$ 표지된 기질 사용시) 트레할로스						
	M_0	M_1	M_2	M_3	M_4	M_0	M_1	M_2	M_3	M_4	M_0	M_1	M_2	M_3	M_4	M_5	M_6
글루코스 exp	0.234	0.360	0.247	0.110	0.037	0.110	0.551	0.216	0.094	0.023	0.271	0.114	0.087	0.115	0.069	0.066	0.279
calc	0.242	0.355	0.245	0.110	0.037	0.114	0.549	0.212	0.094	0.023	0.268	0.113	0.085	0.113	0.068	0.064	0.289
프럭토스 exp	0.133	0.316	0.304	0.162	0.062	0.212	0.412	0.244	0.092	0.030	0.141	0.103	0.104	0.250	0.133	0.110	0.159
calc	0.139	0.321	0.298	0.159	0.061	0.195	0.419	0.254	0.094	0.030	0.144	0.103	0.102	0.245	0.131	0.111	0.164

실시예 IV: 리신 생산 동안 프럭토스 및 글루코스의 대사 유량

글루코스 및 프럭토스를 사용하여 리신-생산성 코리네박테륨 글루타미쿰에 대해 수득된 세포내 유량 분포가 도 4 및 5에 도시되어 있다. 명백하게, 세포내 유량은 적용된 탄소원에 따라서 굉장한 차이를 나타내었다. 글루코스의 경우에는 탄소 유량의 62%가 PPP를 향해 지시된 반면, 36%만이 당분해 연쇄를 통하여 전달되었다 (도 4). 이로 인해, 비교적 다량인 124% NADPH가 PPP 효소 글루코스 6-포스페이트 데히드로게나제 및 6-포스포글루코네이트 데히드로게나제에 의해 생성되었다. 프럭토스의 경우에는 상황이 완전히 상이하였다 (도 5). 유량 분석을 수행한 결과, 프럭토스 흡수에 대한 2개의 PTS의 생체내 활성화에 의해, 프럭토스의 92.3%가 프럭토스 특이적 PTS_{프럭토스}에 의해 흡수되었다. 동등하게 작은 분획의 7.7% 프럭토스가 PTS_{만노스}에 의해 흡수되었다. 따라서, 대부분의 프럭토스가 프럭토스 1,6-비스포스파타제의 수준에서 당분해에 유입된 반면, 단지 작은 분획만이 프럭토스 6-포스페이트 상단에 유입되어 당분해 연쇄 내로 전달되었다. 글루코스-성장된 세포와 비교하면, PPP는 단지 14.4%의 현격하게 감소된 활성을 나타내었다. 글루코스 6-포스페이트 이소머라제는 2개의 탄소원에 대하여 반대 방향으로 작동하였다. 글루코스-성장된 세포에서는 36.2% 순 유동이 글루코스 6-포스페이트로부터 프럭토스 6-포스페이트로 지시된 반면, 프럭토스의 경우에는 뒤를 향한 15.2%의 순 유동이 관찰되었다.

프럭토스의 경우에는, 글루코스 6-포스페이트 이소머라제 및 PPP를 통한 유량이 PTS_{만노스}를 통한 유량 만큼 높은 약 2배였다. 그러나, 이는 PPP 쪽으로의 여분의 탄소 유량을 공급해줄 수 있었던, 프럭토스 1,6-비스포스파타제로부터 프럭토스 6-포스페이트로의 글루코스신합성적 (gluconeogenic) 탄소 유량에 기인한 것은 아니었다. 사실상, 이러한 반응을 촉매하는 프럭토스 1,6-비스포스파타제를 통한 유량은 제로였다. PPP 쪽으로의 부가 유량에 대해 책임이 있는 대사 반응물은 PPP에서의 가역적 효소 트랜스알돌라제 및 트랜스케톨라제였다. 이러한 부가 유량의 약 3.5%가 트랜스케톨라제 2에 의해 공급되었는데, 이는 PPP로부터 유래하는 탄소를 상기 경로로 되돌아가도록 재순환시켰다. 더욱이, 유량의 4.2%가 프럭토스 6-포스페이트를 향하도록 지시되었고, 트랜스알돌라제의 작용에 의해 PPP를 향하도록 지시되었다.

탄소원에 따라서, 리신 생산성 코리네박테륨 글루타미쿰에서 완전히 상이한 유량 패턴이 피루베이트 노드 주변에서 또한 관찰되었다 (도 4, 5). 글루코스의 경우에는, 리신 경로로의 유량이 30.3%인 반면, 프럭토스의 경우에는 25.4%로 감소된 유량이 발견되었다. 프럭토스와 비교해서 글루코스의 경우에 리신 수율이 상승한 것이, 이러한 유량 차이에 대한 주

요 이유이긴 하지만, 세포벽 합성을 위해 디아미노피멜레이트를 보다 많이 요구하고 단백질 합성을 위해 리신을 보다 많이 요구하게 만드는 보다 높은 바이오매스 수율도 이의 원인이 된다. 글루코스의 경우에서의 보전적 유량은 44.5%이므로, 프럭토스의 경우에서의 유량 (33.5%)과 비교해서 상당히 더 높았다. 이는 주로, 리신 생산을 위해 옥살로아세트산을 보다 많이 요구하기 때문이긴 하지만, 글루코스의 경우에서 옥살로아세트산 및 2-옥소글루타레이트에 대한 동화 요구량이 더 많기 때문이기도 하다. 한편, 피루베이트 데히드로게나제를 통한 유량은 프럭토스 (92.5%)와 비교해서 글루코스의 경우에서 실질적으로 더 낮았다 (70.9%). 이와 같이 TCA 주기 내로의 탄소 유량이 감소되면, 글루코스의 경우에서 TCA 주기 효소를 통한 유량이 30% 이상 감소되었다 (도 3, 4).

이와 같이 수득된 유량을 몬테-카를로 접근법에 의해 통계적으로 평가하는 것을 이용하여, 결정된 유량 파라미터에 대한 90% 신뢰 간격을 계산하였다. 표 5에서의 다양한 주요 유량에 대해 나타낸 바와 같이, 신뢰 간격은 일반적으로 협소하였다. 예로서, 글루코스 6-포스페이트 데히드로게나제를 통한 유량에 대한 신뢰 간격은 글루코스-성장된 세포의 경우에는 단지 1.2%였고, 프럭토스-성장된 세포의 경우에는 3.5%였다. 따라서, 선택된 접근법은 정확한 유량 평가를 허용해주었다. 글루코스 및 프럭토스의 경우에서 각각 관찰된 유량 차이는 명백하게도, 적용된 탄소원에 의해 야기되었다고 결론지을 수 있다.

프럭토스의 경우에서의 평균 특이 기질 흡수 속도 1.93 mmol/g.h는 글루코스의 경우에서 밝혀진 1.77 mmol/g.h 보다 약간 더 높았다는 것을 인지해야 한다. 이로 인해, mmol/g.h로 표현된 절대 세포내 유량이 상기 논의된 상대적 유량과 비교해서 글루코스와 관련하여 약간 증가되었다. 그러나, 프럭토스 및 글루코스를 사용할 때 리신 생산성 코리네박테룸 글루타미쿰의 유량 분포는 각각 완전히 상이하기 때문에, 상기 언급된 모든 비교가 절대 탄소 유량에 대해서도 유효하다.

[표 4]

질량 분광법과 대사물 밸런싱을 이용한 ^{13}C 추적자 연구에 의해 결정된 프럭토스 (좌측) 및 글루코스 (우측)를 사용하여 성장시킨 리신 생산성 코리네박테룸 글루타미쿰 ATCC 21526의 대사 유량에 관한 통계적 평가: 주요 유량 파라미터의 90% 신뢰 간격은, 통계적으로 다양한 실험적 데이터를 이용하여 각 기질에 대한 100가지 독립적인 파라미터 평가 수행을 포함한 몬테-카를로 접근법에 의해 수득하였다.

유량 파라미터	글루코스	프럭토스
순 유동		
PTSFrc에 의한 프럭토스 흡수	-	[90.0 96.1]
PTSMan에 의한 프럭토스 흡수	-	[3.9 10.0]
글루코스 6-포스페이트 이소머라제	[35.7 36.8]	[13.4 16.9]
포스포프럭토키나제	[35.7 36.8]	-
프럭토스 1,6-비스포스파타제*	-	[-2.1 3.4]
프럭토스 1,6-비스포스파타제 알돌라제	[73.7 73.8]	[91.7 92.9]
글루코스 6-포스페이트 데히드로게나제	[62.5 63.7]	[12.6 16.1]
트랜스알돌라제	[19.4 19.8]	[3.6 4.1]
트랜스케톨라제 1	[19.4 19.8]	[3.6 4.1]
트랜스케톨라제 2	[17.9 18.3]	[2.9 4.0]
글리세르알데히드-3-포스페이트 데히드로게나제	[158.1 164.5]	[163.3 174.6]
피루베이트 키나제	[156.2 167.4]	[158.9 168.2]
피루베이트 데히드로게나제	[69.5 72.5]	[87.1 102.3]
피루베이트 카복실라제	[43.7 44.8]	[29.9 37.3]
시트레이트 신타제	[51.2 54.8]	[76.5 91.5]
이소시트레이트 데히드로게나제	[51.2 54.8]	[76.5 91.5]
옥소글루타레이트 데히드로게나제	[41.6 45.6]	[70.9 86.0]
아스파르토키나제	[29.6 30.3]	[21.8 29.2]
유동 가역성**		
글루코스 6-포스페이트 이소머라제	[4.5 5.1]	-
트랜스알돌라제	[4.3 4.9]	[14.5 18.2]
트랜스케톨라제 1	[0.0 0.0]	[0.0 0.1]
트랜스케톨라제 2	[0.4 0.6]	[0.0 0.1]

*보다 낮은 신뢰 경계에 대한 음성 유량은 (포스포프럭토키나제를 통한) 가역적 방향에서의 양성 유량과 동등하다.

**유동 가역성은 순 유동에 대한 되돌아가는 유동의 비로서 규정된다.

실시예 I 내지 IV에 관한 논의:

A. 기질 특이적 배양 특징

리신 생산성 코리네박테륨 글루타미쿰을 프럭토스 및 글루코스를 사용하여 각각 배양한 결과, 성장과 생성물 형성이 적용된 탄소원에 의해 크게 좌우된다는 사실이 밝혀졌다. 프럭토스의 경우에는 리신과 바이오매스 수율이 상당히 감소되었다는 것은 코리네박테륨 글루타미쿰의 또다른 균주에 대해 기존에 보고된 바 있는데, 여기서는 리신과 바이오매스 수율이 글루코스에 비해 각각 30% 및 20% 감소하였다 [참고: Kiefer, P., E. Heinzle and C. Wittmann. 2002. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 28: 338-43]. 프럭토스의 경우에서 코리네박테륨 글루타미쿰 및 코리네박테륨 멜라세콜라 (*C. melassecola*)를 배양하는 것은, 글루코스와 비교해서 보다 높은 이산화탄소 생산 속도와 관련이 있었다 [참고: Dominguez, H., C. Rollin, A. Guyonvarch, J.L. Guerquin-Kern, M. Coccagn-Bousquet and N. D. Lindley. 1998. Eur. J. Biochem. 254:96-102; Kiefer, P., E. Heinzle and C. Wittmann. 2002. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 28: 338-43]. 이는 이러한 탄소원에 대한 본 연구에서 관찰된 TCA 주기를 통한 유량 상승과 일치한다. 기질 특이적 차이가 부산물에 대해서도 관찰되었다. 트레할로스 형성은 글루코스와 비교해서 프럭토스의 경우에서 더 낮았다. 이는 글루코스와 프럭토스가 당분해 주기에 유입되는 지점이 서로 상이한 것과 관계가 있을 수 있다 [참고: Kiefer, P., E. Heinzle and C. Wittmann. 2002. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 28: 338-43]. 코리네박테륨 글루타미쿰에서의 흡수 시스템을 고려하면, 글루코스를 활용하는 것이 트레할로스 전구체 글루코스 6-포스페이트의 형성을 가져다 주는 반면, 프럭토스는 프럭토스 1,6-비스포스파타제로 전환되므로, 글루코스 6-포스페이트로부터 하단 중추 대사 작용에 유입되었다 [참고: Dominguez, H., C. Rollin, A. Guyonvarch, J.L. Guerquin-Kern, M. Coccagn-Bousquet and N. D. Lindley. 1998. Eur. J. Biochem. 254: 96-102]. 프럭토스를 탄소원으로 사용 적용한 경우에, 디히드록시아세톤, 글리세롤 및 락테이트와 같은 기타 부산물이 상당히 증가하였다. 리신 생산 관점에서 보면, 이는 바람직하지 않은데, 이는 상당한 분획의 탄소가 중추 대사 작용으로부터 철수하여 형성된 부산물 내로 유입되기 때문이다. 프럭토스의 경우에서의 특이 기질 흡수 속도 (1.93 mmol/g.h)는 글루코스의 경우에서의 특이 기질 흡수 속도 (1.77 mmol/g.h) 보다 더 높았다. 이러한 결과는, 프럭토스 및 글루코스의 경우에서 유사한 특이 흡수 속도가 관찰되었던, 지수적으로 성장하는 코리네박테륨 멜라세콜라 ATCC 17965에 대한 기존의 연구 결과 [참고: Dominguez, H., C. Rollin, A. Guyonvarch, J.L. Guerquin-Kern, M. Coccagn-Bousquet and N. D. Lindley. 1998. Eur. J. Biochem. 254: 96-102]와는 상이하였다. 본 발명자들의 연구에서 관찰된 프럭토스 사용시의 보다 높은 흡수 속도는, 연구된 균주가 상이하다는 사실에 기인될 수도 있다. 코리네박테륨 멜라세콜라와 코리네박테륨 글루타미쿰은 서로 관계가 있는 종이긴 하지만, 특정 대사 특성에 있어서는 서로 상이할 수 있다. 본 발명의 작업에서 연구된 균주는 기존에, 전통적인 균주 최적화에 의해 유래시킨 것이었다. 이에 기질 흡수에 영향을 미치는 돌연변이를 도입할 수도 있다. 또다른 설명은 배양 조건 상의 차이이다. 프럭토스는 제한된 성장 및 리신 생산 조건하에서 보다 효과적으로 활용될 수 있다.

B. 대사 유량 분포

글루코스 및 프럭토스를 사용하여 리신 생산성 코리네박테륨 글루타미쿰에 대해 수득된 세포내 유량 분포는 대단한 차이를 나타내었다. 수득된 유량을 통계적으로 평가한 결과, 협소한 90% 신뢰 간격이 나타났기 때문에, 관찰된 유량 차이는 적용된 탄소원에 명백하게 기인될 수 있다. 가장 현저한 차이들 중의 하나가 당분해와 PPP 간의 유량 분할에 관한 것이다. 글루코스의 경우에는 탄소의 62.3%가 PPP를 통하여 전달되었다. 이러한 기질 상에서 리신 생산성 코리네박테륨 글루타미쿰의 PPP 우세는 기존에 상이한 연구에서 관찰된 바 있다 [참고: Marx, A., A. A. de Graaf, W. Wiechert, L. Eggeling and H. Sahm. 1996. Biotechnol. Bioeng. 49: 111-129; Wittmann, C. and E. Heinzle. 2001. Eur. J. Biochem. 268: 2441-2455; Wittmann, C. and E. Heinzle. 2002. Appl. Environ. Microbiol. 68: 5843-5859]. 프럭토스의 경우에는, PPP로의 유량이 14.4%로 감소되었다. 수행된 대사 유량 분석에 의해 확인된 바와 같이, 이는 주로, 프럭토스 1,6-비스포스파타제 수준에서의 프럭토스의 유입과 프럭토스 1,6-비스포스파타제의 불활성 간의 불리한 조합에 기인된 것이었다. 관찰된 프럭토스 1,6-비스포스파타제의 불활성은, 프럭토스 및 글루코스의 경우에서의 각각의 지수적 성장 동안 코리네박테륨 멜라세콜라 ATCC 17965의 효소적 측정치와 잘 일치하였다 [참고: Dominguez, H., C. Rollin, A. Guyonvarch, J. L. Guerquin-Kern, M. Coccagn-Bousquet and N. D. Lindley. 1998. Eur. J. Biochem. 254: 96-102].

놀랍게도, 코리네박테륨 글루타미쿰을 프럭토스를 사용하여 배양한 경우에는, 글루코스 6-포스페이트 이소머라제 및 PPP를 통한 유량이 PTS_{탄소}를 통한 유량 만큼 높은 약 2배였다. 프럭토스 1,6-비스포스파타제의 불활성 때문에, 이는 글루코스신합성 유량에 기인한 것은 아니었다. 사실상, 코리네박테륨 글루타미쿰은 프럭토스 6-포스페이트, 글루코스 6-포스페이트 및 리보스 5-포스페이트를 통하여 작동하는 대사 주기를 보유하고 있다. PPP 내로의 부가 유량은 트랜스케톨라제 2 (이는 PPP로부터 유래하는 탄소를 상기 경로로 되돌아가도록 재순환시켰다) 및 트랜스알돌라제의 작용 (글리세르알데히드 3-포스페이트가 PPP 내로 되돌아가도록 재지시함으로써 글루코스신합성을 우회시켰다)에 의해 공급되었다. 이러한 사이클링 활성은 세포가 프럭토스 사용시의 NADPH 한계를 극복하는데 도움을 줄 수 있다. 프럭토스-성장된 코리네

박테륨 글루타미쿰에 대하여, 글루코스 6-포스페이트에 도달하는데 있어서의 유량의 현격한 감소가, 상기 기질 상에서의 트레할로스의 형성 저하를 설명해줄 수도 있다 [참고: Kiefer, P., E. Heinzle and C. Wittmann. 2002. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 28: 338-43]. 글루코스 6-포스페이트 이소머라제는 탄소원에 따라서 반대 방향으로 작동하였다. 글루코스-성장된 세포에서의 순 유동은 글루코스 6-포스페이트로부터 프럭토스 6-포스페이트로 지시된 반면, 프럭토스의 경우에는 역 순유동이 관찰되었다. 이는 코리네박테륨 글루타미쿰에서의 대사 가요성 (metabolic flexibility)을 위해서는 상기 효소의 가역성이 중요하다는 것을 강조한다.

C. NADPH 대사

다음 계산치는 프럭토스 및 글루코스를 사용할 때 리신 생산성 코리네박테륨 글루타미쿰의 NADPH 대사 비교를 제공한다. NADPH의 전체 공급량은 글루코스 6-포스페이트 데히드로게나제, 6-포스포글루코네이트 데히드로게나제 및 이소시트레이트 데히드로게나제를 통하여 추정된 유량으로부터 계산하였다. 글루코스의 경우에는, PPP 효소 글루코스 6-포스페이트 데히드로게나제 (62.0%) 및 글루코스 6-포스페이트 데히드로게나제 (62.0%)가 NADPH의 대부분 분획을 공급하였다. 이소시트레이트 데히드로게나제 (52.9%)는 소수 정도만 기여하였다. 프럭토스의 경우에는, NADPH 공급량에 대한 PPP와 TCA 주기의 완전히 상이한 기여도가 관찰되었는데, 여기서는 이소시트레이트 데히드로게나제 (83.3%)가 NADPH에 대한 주요 공급원이었다. 프럭토스의 경우에는, 글루코스 6-포스페이트 데히드로게나제 (14.4%) 및 글루코스 6-포스페이트 데히드로게나제 (14.4%)가 훨씬 더 적은 양의 NADPH를 생성시켰다. NADPH는 리신의 성장과 형성에 요구된다. 성장을 위해 요구되는 NADPH 양은 $11.51 \text{ mmol NADPH (g 바이오매스)}^{-1}$ 의 화학량적 요구량 [이는 글루코스과 프럭토스에 대해 동일한 것으로 추정되었다] [참고: Dominguez, H., C. Rollin, A. Guyonvarch, J.L. Guerquin-Kern, M. Coccagn-Bousquet and N. D. Lindley. 1998. Eur. J. Biochem. 254: 96-102] 및 본 발명의 작업의 실험적 바이오매스 수율 (표 1)으로부터 계산하였다. 코리네박테륨 글루타미쿰은 글루코스를 사용한 바이오매스 생산을 위해 NADPH의 62.3%를 소모하였는데, 이는 탄소원으로서 프럭토스 (32.8%)와 비교해서 훨씬 더 높았다. 생성물 합성에 요구되는 NADPH의 양은 리신 내로의 추정 유량 (표 1)과, $4 \text{ mol (mol 리신)}^{-1}$ 의 상응하는 화학량적 NADPH 요구량으로부터 결정하였다. 이는 글루코스로부터의 리신 생산의 경우에는 112.4%였고, 프럭토스로부터의 리신 생산의 경우에는 97.6%였다. 글루코스의 경우에서의 NADPH 전체 공급량은 프럭토스 (112.1%)와 비교해서 상당히 더 높았는데 (176.9%), 이는 글루코스의 경우에서의 PPP 유량 증가에 주로 기인될 수 있다. NADPH 밸런스는 글루코스의 경우에서 거의 근접하였다. 이와는 달리, 프럭토스의 경우에는 NADPH에 대한 상당히 명백한 결핍 (18.3%)이 관찰되었다. 이는 상기 언급된 효소 글루코스 6-포스페이트 데히드로게나제, 6-포스포글루코네이트 데히드로게나제 및 이소시트레이트 데히드로게나제 이외에도, NADPH를 공급할 수 있었던 대사 반응을 촉매하는 효소에 대한 의문을 유발시킨다. 예상되는 후보는 NADPH-의존성 말산 효소인 것으로 여겨진다. 기존에는, 이러한 효소의 증가된 특이 활성이 글루코스-성장된 세포와 비교해서 프럭토스-성장된 코리네박테륨 펠라세콜라 상에서 탐지되었다 [참고: Dominguez, H., C. Rollin, A. Guyonvarch, J.L. Guerquin-Kern, M. Coccagn-Bousquet and N. D. Lindley. 1998. Eur. J. Biochem. 254: 96-102]. 그러나, 이러한 특정한 효소를 통한 유량이, 본 발명의 작업에서의 실험적 설정에 의해 해명될 수는 없었다. 말산 효소를 결손되는 NADPH 생성 효소에서 간주한 경우에는, 가시적으로 결손하는 NADPH를 공급하는데 18.3%의 유량이면 충분할 것이다. 탄소원으로서 글루코스를 사용한 코리네박테륨 글루타미쿰의 상세한 유량 연구 결과, 말산 효소의 상당한 활성은 전혀 없는 것으로 밝혀졌다 [참고: Petersen, S., A. A. de Graaf, L. Eggeling, M. Mollney, W. Wiechert and H. Sahm. J. Biol. Chem. 75: 35932-35941]. 그러나, 프럭토스의 경우에서의 상황은 상기 효소의 생체내 활성 상승과 연계될 수도 있다.

D. NADH 대사

프럭토스의 경우에는 코리네박테륨 글루타미쿰이 증가된 NADH 형성 효소 활성을 나타내었다. 421.2% NADH가 프럭토스의 경우에서 글리세르알데히드-3-포스페이트 데히드로게나제, 피루베이트 데히드로게나제, 2-옥소글루타레이트 데히드로게나제 및 말레이트 데히드로게나제에 의해 형성되었다. 글루코스의 경우에는 NADH 생산율이 단지 322.4%였다. 부가적으로, 동화 NADH 요구량은 글루코스의 경우에서 보다 프럭토스의 경우에서 상당히 더 적었다. 대사 요구량 감소와 연계된 NADH 생산율의 상당한 증강으로 인해, NADH/NAD 비가 증가할 수 있었다. 코리네박테륨 펠라세콜라의 경우에는, 프럭토스가 글루코스보다 NADH/NAD 비를 증가시켰다는 사실이 이미 밝혀졌다 [참고: Dominguez, H., C. Rollin, A. Guyonvarch, J.L. Guerquin-Kern, M. Coccagn-Bousquet and N. D. Lindley. 1998. Eur. J. Biochem. 254: 96-102]. 이는 프럭토스를 사용한 리신 생산 동안 NADH 재생 이전에 대한 의문을 유발시킨다. 프럭토스-성장된 세포는 디히드록시아세톤, 글리세롤 및 락테이트의 분비 증강을 나타내었다. 디히드록시아세톤과 글리세롤의 형성이 증가한 것은 보다 높은 NADH/NAD 비에 기인된 것일 수 있다. NADH는 기존에 글리세르알데히드 데히드로게나제를 억제하는 것으로 밝혀졌기 때문에, 디히드록시아세톤과 글리세롤의 과도한 유출은 상기 효소의 유동 능력 저하와 관계가 있을 수 있다. 높은 NADH/NAD 비에 의해서는 디히드록시아세톤이 글리세롤로 환원되는 것이 부가적으로 선호될 수 있었기 때문에, 이는

과도한 NADH의 재생의 원인이 될 수 있다. 피루베이트로부터의 NADH 요구성 락테이트 형성은 글리세롤의 생산과 유사한 배경을 지닐 수 있었다. 지수 성장과 비교하면, 비교적 높은 TCA 주기 활성화와 감소된 바이오매스 수율을 특징으로 하는, 리신 생산성 조건하에서 과도한 NADH가 훨씬 더 많아질 수도 있다.

E. 프럭토스 사용시 리신 생산성 코리네박테륨 글루타미쿰의 최적화를 위한 잠재적 표적

수득된 유량 패턴을 근거로 하여, 프럭토스 사용시 코리네박테륨 글루타미쿰에 의한 리신 생산의 최적화를 위한 몇 가지 잠재적 표적을 체계화하였다. 중심점이 NADPH의 공급이다. 프럭토스 1,6-비스포스파타제가 NADPH의 공급량을 증가시키기 위한 하나의 표적이다. 그의 활성을 탈제어, 예를 들어 증폭시키면, PPP를 통하여 보다 많은 유량이 생겨 NADPH 발생이 증가하고 리신 수율이 증가하였다. 프럭토스 1,6-비스포스파타제의 증폭을 통한 PPP 내로의 유량 증가는 또한, 방향족 아미노산 생산에 유리하였다 [참고: Ikeda, M. 2003. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 79: 1-36]. 프럭토스를 사용할 때의 성장 동안 프럭토스 1,6-비스포스파타제의 불활성은 리신 생산 측면에서 보면 해가 되지만, 이러한 글루코스신합성 효소가 당을 사용한 성장 동안 요구되지 않고 아마도 저해되기 때문에, 놀라운 일도 아니다. 원핵 생물에서는, 상기 효소가 예를 들어, 프럭토스 1,6-비스포스파타제, 프럭토스 2,6-비스포스파타제, 금속 이온 및 AMP에 의해 효율적인 대사 제어 하에 있다 [참고: Skrypal, I. G. and O. V. Iastrebova. 2002. Mikrobiol Z. 64: 82-94]. 코리네박테륨 글루타미쿰이 아세테이트를 사용하여 성장할 수 있다는 것은 공지되어 있는데 [참고: Wendisch, V. F., A. A. de Graaf, H. Sahm H. and B. Eikmans. 2000. J. Bacteriol. 182: 3088-3096], 여기서는 상기 효소가 글루코스신합성을 유지하는데 있어 필수적이다. PPP를 통한 유량을 증가시키기 위한 또다른 잠재적 표적은 프럭토스 흡수를 위한 PTS이다. PTS_{프럭토스}와 PTS_{만노스} 간의 유량 분할을 변형시키면, 프럭토스가 보다 높은 비율로 산출될 수 있는데, 이는 프럭토스 6-포스페이트 수준으로 유입되므로, PPP 유량을 증가시킬 수 있다. 부가적으로, 프럭토스의 경우에서 NADPH 공급량에 상당한 기여를 하는 것으로 추정되는 말산 효소의 증폭이 흥미로운 표적일 수 있었다.

또다른 병목 (bottleneck)은 디히드록시아세톤, 글리세롤 및 락테이트의 강력한 분비를 포함한다. 디히드록시아세톤과 글리세롤의 형성은 상응하는 효소의 탈제어, 예를 들어 결실에 의해 차단될 수 있었다. 디히드록시아세톤 포스페이트가 디히드록시아세톤으로 전환되는 것은 상응하는 포스파타제에 의해 촉매될 수 있었다. 그러나, 디히드록시아세톤 포스파타제는 아직까지 코리네박테륨 글루타미쿰에 주석을 달지는 않았다 [참고: the National Center for Biotechnology Information (NCBI) Taxonomy website: <http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/>]. 이러한 반응은 키나제, 예를 들어 글리세롤 키나제에 의해 촉매될 수도 있다. 현재 코리네박테륨 글루타미쿰의 게놈 데이터베이스에 등록된 2가지는 디히드록시아세톤 키나제에 관한 것이다 [참고: the National Center for Biotechnology Information (NCBI) Taxonomy website: <http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/>].

락테이트 분비는 락테이트 데히드로게나제의 탈제어, 예를 들어 녹아웃 (knockout)에 의해 피할 수도 있다. 글리세롤과 락테이트 형성은 NADH 재생에 중요할 수 있기 때문에, 유기체의 전반적인 성능에 대한 음성 효과를 배제시킬 수 없다. 보다 낮은 당분해 연쇄를 통한 탄소 유량이 기존에 추측된 바와 같이 글리세르알데히드 3-포스페이트 데히드로게나제의 능력에 의해 제한되는 경우에는 [참고: Dominguez, H., C. Rollin, A. Guyonvarch, J.L. Guerquin-Kern, M. Coccagn-Bousquet and N. D. Lindley. 1998. Eur. J. Biochem. 254: 96-102], 디히드록시아세톤과 글리세롤 생산 저해가 궁극적으로, 프럭토스-1,6-비스포스파타제의 활성화를 유발시키고 PPP를 통한 탄소 유량의 재지시를 유발시킬 수 있었다. 디히드록시아세톤이 코리네박테륨 글루타미쿰의 배양 동안 재활용된 것이 아니므로, 생성물 합성에 관하여 폐기된 산소를 표시하는 반면, 이것이 락테이트에 대해서는 마찬가지로 적용되지 않는다는 것을 인지해야 한다 [참고: Coccagn-Bousquet, M. and N. D. Lindley. 1995. Enz. Microbiol. Technol. 17: 260-267].

한 양태에서, 조합된 상기 유전자들 중의 하나 이상의 탈제어가 정밀 화학물질 (예: 리신)의 생산에 있어 유용하다.

또한, 수크로스가, 예를 들어 본 발명의 방법과 연계해서 사용된 코리네박테륨 글루타미쿰에 의한 리신 생산에 대한 탄소 원으로서 또한 유용하다. 수크로스는 당밀에 있어 주요 탄소원이다. 앞서 나타난 바와 같이, 수크로스의 프럭토스 단위가 프럭토스 1,6-비스포스파타제 수준에서 당분해 반응에 유입된다 [참고: Dominguez, H. and N. D. Lindley. 1996. Appl. Environ. Microbiol. 62:3878-3880]. 따라서, 불활성 프럭토스 1,6-비스포스파타제를 고려하면, 이러한 수크로스 분자 일부가 PPP 내로 유입되지 않는 것으로 예상되기 때문에, 리신 생산성 균주에서의 NADPH 공급량은 제한될 수 있었다.

실시예 V: 플라스미드 pCIS LysC의 구축

균주 구축의 제1 단계는 코리네박테륨 글루타미쿰 ATCC 13032에서 lysC 야생형 유전자의 대립유전자 치환을 요구한다. 이에서, lysC 유전자 내의 뉴클레오티드 치환을 수행하여, 이로써 생성되는 단백질의 위치 311에서의 아미노산 Thr를 Ile

로 치환시켰다. PCR 반응에 대한 주형으로서 ATCC 13032로부터의 염색체성 DNA로부터 출발하고 올리고뉴클레오티드 프라이머 서열 3 및 서열 4를 사용하여, 제조업자의 지시에 따라서 Pfu 터보 (Turbo) PCR 시스템 (공급처: Stratagene USA)을 사용함으로써 lysC를 증폭시켰다. 문헌 [참고: Tauch et al. (1995) Plasmid 33:168-179 or Eikmanns et al. (1994) Microbiology 140: 1817-1828]에 따라서, 코리네박테륨 글루타미쿰 ATCC 13032로부터 염색체성 DNA를 제조하였다. 이로써 증폭된 단편을 이의 5' 말단에서 SalI 제한 절단에 의해 플랜킹하고, 그의 3' 말단에서 MluI 제한 절단에 의해 플랜킹하였다. 클로닝에 앞서, 증폭된 단편을 이들 2개의 제한 효소로 분해시키고, GFX™ PCR DNA 및 겔 밴드 정제용 키트 (공급처: Amersham Pharmacia, Freiburg)를 사용하여 정제하였다:

서열 3

5'-GAGAGAGAGACGCGTCCCAGTGGCTGAGACGCATC-3'

서열 4

5'-CTCTCTCTGTCGACGAATCAATCTTACGGCCTG-3'

수득된 폴리뉴클레오티드를, pCIS (서열 5)로서 다음에 지칭된, 통합된 SacB를 수반한 pCLIK5 MCS에서 SalI 및 MluI 제한 절단을 통하여 클로닝하고, 이를 이. 콜라이 (*E.coli*) XL-1 블루 (blue)에서 형질전환시켰다. 플라스미드-수반 세포에 대한 선별은 카나마이신 (20 µg/mL)-함유 LB 한천 [참고: Lennox, 1955, Virology, 1:190] 상으로 도말함으로써 수행하였다. 이 플라스미드를 분리하고, 예상되는 뉴클레오티드 서열을 서열 분석함으로써 확인하였다. 플라스미드 DNA의 제조는 공급처 [퀴아젠 (Qiagen)]의 재료를 사용하고, 이의 방법에 따라서 수행하였다. 서열 분석 반응은 문헌 [참고: Sanger et al. (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74: 5463-5467]에 따라서 수행하였다. 서열 분석 반응들은 ABI 프리즘 (Prism) 377 (공급처: PE Applied Biosystems, Weiterstadt)을 통하여 격리시키고 분석하였다. 이로써 수득된 플라스미드 pCIS lysC가 서열 6으로서 기재되었다.

실시예 VI: 코리네박테륨 글루타미쿰으로부터 lysC 유전자의 돌연변이 유발

코리네박테륨 글루타미쿰으로부터 lysC 유전자의 표적화 돌연변이 유발은, 제조업자의 지시에 따라서 퀵체인지 (QuickChange) 키트 (공급처: Stratagene/USA)를 사용하여 수행하였다. 이러한 돌연변이 유발은 플라스미드 pCIS lysC, 서열 6에서 수행하였다. 퀵체인지 방법 (공급처: Stratagene)을 사용함으로써 thr 311을 311 ile로 치환시키기 위해 다음 올리고뉴클레오티드 프라이머를 합성하였다:

서열 7

5'-CGGCACCACCGACATCATCTTCACCTGCCCTCGTTCCG-3'

서열 8

5'-CGGAACGAGGGCAGGTGAAGATGATGTCGGTGGTGCCG-3'

상기 퀵체인지 반응에서 이들 올리고뉴클레오티드 프라이머를 사용하면, lysC 유전자 (서열 9)에서 위치 932의 뉴클레오티드가 치환되었다 (C에서 T로 치환됨). 이로써 생성된, lysC 유전자에서의 아미노산 치환 Thr311Ile은, 이. 콜라이 XLI-블루에서 형질전환시키고 플라스미드 제조 후에, 서열 분석 반응에 의해 확인하였다. 이 플라스미드는 pCIS lysC thr311ile로 명명되었고 서열 10으로서 기재되었다.

플라스미드 pCIS lysC thr311ile는, 다음 문헌에 기재된 바와 같이 전기천공에 의해 코리네박테륨 글루타미쿰 ATCC 13032에서 형질전환시켰다 [참고: Liebl, et al. (1989) FEMS Microbiology Letters 53: 299-303]. 이러한 프로토콜의 변형이 DE 10046870에 기재되어 있다. 개개 형질전환체의 lysC 유전자자리의 염색체성 배열은, 문헌 [참고: Sambrook et al. (1989), Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor]에 기재된 바와 같이, 서던 블롯 및 혼성화에 의한 표준 방법을 이용하여 검사하였다. 이로써, 이에 관여한 형질전환체가, lysC 유전자자리에서 상동 재조합에 의해 형질전환된 플라스미드를 통합한 것인 사실이 확립되었다. 항생제를 전혀 함유하지 않는 배지에서 상기 콜로니를 밤새 성장시킨 후, 세포를 사카로스 CM 한천 배지 (10% 사카로스) 상으로 도말하고 30°C 하에 24시간 동안 항온 배양하였다. 벡터 pCIS lysC thr311ile 내에 함유된 sacB 유전자가 사카로스를 독성 물질로 전환시키기 때문에, 야생형 lysC 유전자

와 돌연변이된 유전자 lysC thr31lle 간의 제2의 상동 재조합 단계에 의해 sacB 유전자를 결실시킨 콜로니들 만이 성장할 수 있다. 이러한 상동 재조합 동안, 야생형 유전자 또는 돌연변이된 유전자가 sacB 유전자와 함께 결실될 수 있다. sacB 유전자가 야생형 유전자와 함께 제거된 경우에는, 돌연변이된 형질전환체가 생성된다.

성장하고 있는 콜로니를 골라내고, 이를 대상으로 하여 카나마이신-민감성 표현형에 대해 조사하였다. SacB 유전자가 결실된 클론은 카나마이신-민감성 성장 행위를 동시에 나타내야만 한다. 이러한 카나마이신-민감성 클론을 대상으로 하여, 그의 리신 생산성을 알아보기 위해 진탕 플라스크에서 연구하였다 (실시예 6 참고). 비교를 위해, 처리시키지 않은 코리네박테륨 글루타미쿰 ATCC 13032를 취하였다. 대조군과 비교해서 리신 생산이 상승된 클론을 선별하고, 염색체성 DNA를 회수한 다음, 상응하는 lysC 유전자 영역을 PCR 반응에 의해 증폭시키고 서열 분석하였다. 리신 합성이 상승되었고 위치 932의 lysC에서 돌연변이가 탐지된 1개의 클론이 ATCC13032 lysCfbr로 명명되었다.

실시예 VII: 플라스미드 pK19 MOB sacB Peftu 프릭토스 1,6-비스포스파타제의 제조

코리네박테륨 글루타미쿰 ATCC 13032로부터의 염색체성 DNA를 문헌 [참고: Tauch et al. (1995) Plasmid 33: 168-179 or Eikmanns et al. (1994) Microbiology 140:1817-1828]에 따라서 제조하였다.

PCR 1: 올리고뉴클레오타이드 프라이머 서열 11 및 서열 12, 주형으로서의 염색체성 DNA 및 Pfu 터보 폴리머라제 (공급처: Stratagene)를 이용하여, 연장 인자 TU의 출발 코돈의 상단에 놓여있는 영역을 문헌 [참고: Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press]에 기재된 바와 같이 표준 방법에 따라서 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)을 사용함으로써 증폭시켰다.

서열 11

5'-TGGCCGTTACCCTGCGAATG-3' 및

서열 12

5'-TGTATGTCCTCCTGGACTTC-3'

이로써 수득된, 크기가 대략 200 bp인 DNA 단편을, 제조업자의 지시에 따라서 GFX™ PCR DNA 및 겔 밴드 정제용 키트 (공급처: Amersham Pharmacia, Freiburg)를 사용하여 정제하였다.

PCR 2: 올리고뉴클레오타이드 프라이머 서열 13 및 서열 14, 주형으로서의 염색체성 DNA 및 Pfu 터보 폴리머라제 (공급처: Stratagene)를 이용하여, 프릭토스 1,6-비스포스파타제에 대한 유전자의 5' 영역을 문헌 [참고: Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press]에 기재된 바와 같이 표준 방법에 따라서 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)을 사용함으로써 증폭시켰다.

서열 13

5'-GAAGTCCAGGAGGACATACAATGAACCTAAAGAACCCCGA-3' 및

서열 14

5'-ATCTACGTCGACCCAGGATGCCCTGGATTTC-3'

이로써 수득된, 크기가 대략 740 bp인 DNA 단편을, 제조업자의 지시에 따라서 GFX™ PCR DNA 및 겔 밴드 정제용 키트 (공급처: Amersham Pharmacia, Freiburg)를 사용하여 정제하였다.

PCR 3: 올리고뉴클레오타이드 프라이머 서열 15 및 서열 16, 주형으로서의 염색체성 DNA 및 Pfu 터보 폴리머라제 (공급처: Stratagene)를 이용하여, 프릭토스 1,6-비스포스파타제의 출발 코돈의 상단에 놓여있는 영역을 문헌 [참고: Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press]에 기재된 바와 같이 표준 방법에 따라서 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)을 사용함으로써 증폭시켰다.

서열 15

5'-TATCAACGCGTTCTTCATCGGTAGCAGCACC-3' 및

서열 16

5'-CATTGGCAGGGTAACGGCCACTGAAGGGCCTCCTGGG-3'.

이로써 수득된, 크기가 대략 720 bp인 DNA 단편을, 제조업자의 지시에 따라서 GFX™ PCR DNA 및 겔 밴드 정제용 키트 (공급처: Amersham Pharmacia, Freiburg)를 사용하여 정제하였다.

PCR 4: 올리고뉴클레오티드 프라이머 서열 17 및 서열 14, 주형으로서의 PCR 1 및 2로부터의 PCR 생성물 및 Pfu 터보 폴리머라제 (공급처: Stratagene)를 이용하여, 융합 PCR을 문헌 [참고: Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press]에 기재된 바와 같이 표준 방법에 따라서 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)을 사용함으로써 수행하였다. 이로써 수득된, 크기가 대략 920 bp인 DNA 단편을, 제조업자의 지시에 따라서 GFX™ PCR DNA 및 겔 밴드 정제용 키트 (공급처: Amersham Pharmacia, Freiburg)를 사용하여 정제하였다.

PCR 5: 올리고뉴클레오티드 프라이머 서열 15 및 서열 14, 주형으로서의 PCR 3 및 4로부터의 PCR 생성물 및 Pfu 터보 폴리머라제 (공급처: Stratagene)를 이용하여, 융합 PCR을 문헌 [참고: Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press]에 기재된 바와 같이 표준 방법에 따라서 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)을 사용함으로써 수행하였다.

이로써 수득된, 크기가 대략 1640 bp인 DNA 단편을, 제조업자의 지시에 따라서 GFX™ PCR DNA 및 겔 밴드 정제용 키트 (공급처: Amersham Pharmacia, Freiburg)를 사용하여 정제하였다. 그 후, 이를 제한 효소 MluI 및 SalI (공급처: Roche Diagnostics, Mannheim)를 사용하여 절단시키고, GFX™ PCR DNA 및 겔 밴드 정제용 키트를 사용하여 DNA 단편을 정제하였다.

벡터 pCIS를 제한 효소 MluI 및 SalI로 절단하고, 전기영동적 분리시킨 후, GFX™ PCR DNA 및 겔 밴드 정제용 키트를 사용함으로써 4.3 kb 크기의 단편을 분리하였다.

이러한 벡터 단편을, 제조업자의 지시에 따라서 래피드 (Rapid) DNA 연결용 키트 (공급처: Roche Diagnostics, Mannheim)를 사용함으로써 PCR 5로부터의 PCR 단편과 함께 연결시키고, 이러한 연결 배치를 문헌 [참고: Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, (1989))]에 기재된 바와 같이 표준 방법에 따라서 적절한 이. 콜라이 XL-1 블루 (공급처: Stratagene, La Jolla, USA)에서 형질전환시켰다. 플라스미드-수반 세포에 대한 선별은 카나마이신 (20 µg/mL)-함유 LB 한천 [참고: Lennox, 1955, Virology, 1:190] 상으로 도말함으로써 수행하였다.

플라스미드 DNA의 제조는 공급처 [Quiagen]의 재료를 사용하고, 이의 방법에 따라서 수행하였다. 서열 분석 반응은 문헌 [참고: Sanger et al. (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74: 5463-5467]에 따라서 수행하였다. 서열 분석 반응들은 ABI 프리즘 377 (공급처: PE Applied Biosystems, Weiterstadt)을 통하여 격리시키고 분석하였다.

이로써 수득된 플라스미드 pCIS Peftu 프럭토스 1,6-비스포스파타제가 서열 17로서 기재되었다.

실시예 VIII: 리신의 생산

플라스미드 pCIS Peftu 프럭토스 1,6-비스포스파타제는, 다음 문헌에 기재된 바와 같이 전기천공에 의해 코리네박테륨 글루타미쿰 ATCC 13032 lysCfbr에서 형질전환시켰다 [참고: Liebl, et al. (1989) FEMS Microbiology Letters 53: 299-303]. 이러한 프로토콜의 변형이 DE 10046870에 기재되어 있다. 개개 형질전환체의 프럭토스 1,6-비스포스파타제 유전자자리의 염색체성 배열은, 문헌 [참고: Sambrook et al. (1989), Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor]에 기재된 바와 같이, 서던 블롯 및 혼성화에 의한 표준 방법을 이용하여 검사하였다. 이로써, 이에 관련한 형질전환체가, 프럭토스 1,6-비스포스파타제 유전자자리에서 상동 재조합에 의해 형질전환된 플라스미드를 통합한 것이란 사실이 확립되었다. 항생제를 전혀 함유하지 않는 배지에서 상기 콜로니를 밤새 성장시킨 후, 세포를 사카로스 CM 한천 배지 (10% 사카로스) 상으로 도말하고 30℃ 하에 24시간 동안 항온 배양하였다.

벡터 pCIS Peftu 프럭토스 1,6-비스포스파타제 내에 함유된 sacB 유전자가 사카로스를 독성 물질로 전환시키기 때문에, 야생형 프럭토스 1,6-비스포스파타제 유전자와 Peftu 프럭토스 1,6-비스포스파타제 융합물 간의 제2의 상동 재조합 단계에 의해 sacB 유전자를 결실시킨 콜로니들만이 성장할 수 있다. 이러한 상동 재조합 동안, 상기 야생형 유전자 또는 융합물이 sacB 유전자와 함께 결실될 수 있다. sacB 유전자가 야생형 유전자와 함께 제거된 경우에는, 돌연변이된 형질전환체가 생성된다.

성장하고 있는 콜로니를 골라내고, 이를 대상으로 하여 카나마이신-민감성 표현형에 대해 조사하였다. SacB 유전자가 결실된 클론은 카나마이신-민감성 성장 행위를 동시에 나타내야만 한다. 천연 프로모터가 Peftu 프로모터에 의해 목적하는 바 대로 치환되었는지의 여부는 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)을 통하여 검사하였다. 이러한 분석을 위해, 출발 균주 및 이로써 생성된 클론으로부터의 염색체성 DNA를 분리하였다. 이를 위해, 이쑤시개를 사용하여 한천 판으로부터 각각의 클론을 꺼내어, 이를 100 μ L의 H₂O에 현탁시키고 95°C 하에 10분 동안 비등시켰다. 각 경우에 있어, 생성된 용액 10 μ L를 PCR에서 주형으로서 사용하였다. 프라이머로서 사용된 것은 Peftu 프로모터와 프럭토스 1,6-비스포스파타제 유전자에 대해 상동성인 올리고뉴클레오티드였다. PCR 조건을 다음과 같이 선택하였다: 초기 변성: 95°C 하에서 5분; 변성: 95°C 하에서 30초; 혼성화: 55°C 하에서 30초; 증폭: 72°C 하에서 2분; 30 주기; 말단 연장: 72°C 하에서 5분. 출발 균주의 DNA를 수반한 배지에서는, 올리고뉴클레오티드의 선별로 인해 PCR 생성물이 전혀 형성될 수 없었다. 제2 재조합을 통하여 천연 프로모터가 Peftu 프로모터에 의해 완전히 치환된 클론에 대해서만, 예상 크기가 340 bp인 밴드를 나타내었다. 전반적으로, 시험된 클론 중의 2개 클론이 양성이었다. 이들 클론이 ATCC 13032 lysCfbr Peftu 프럭토스-1,6-비스포스파타제 1 및 2로서 명명되었다.

리신 생산에 대한 Peftu 프럭토스-1,6-비스포스파타제 구조물의 효과를 연구 조사하기 위해, 균주 ATCC13032, ATCC13032 lysCfbr 및 ATCC13032 lysCfbr Peftu 프럭토스-1,6-비스포스파타제 1을 CM 판 [10.0 g/L D-글루코스, 2.5 g/L NaCl, 2.0 g/L 우레아, 10.0 g/L 박토 펩톤 (공급처: Difco), 5.0 g/L 효모 추출물 (공급처: Difco), 5.0 g/L 고기 추출물 (공급처: Difco), 22.0 g/L 한천 (공급처: Difco), 오토클레이브 (20분, 121°C)] 상에서 30°C 하에 2일 동안 배양하였다. 연속해서, 세포를 판으로부터 긁어내고, 식염수에 재현탁시켰다. 주 배양을 위해, 10 mL의 배지 I 및 0.5 g의 오토클레이브된 CaCO₃ (Riedel de Haen)를, 1.5의 OD₆₀₀이 되도록 세포 현탁시키면서 100 mL 에rlenmeyer (Erlenmeyer) 플라스크에 접종하고, 유형 인포르스 (Infors) AJ118 (공급처: Infors, Bottmingen, Switzerland)의 진탕 항온 배양기 상에서 39시간 동안 220 rpm으로 항온 배양하였다. 연속해서, 배지에서 격리시킨 리신의 농도를 결정하였다:

배지 I:

40 g/L 사카로스

60 g/L 당밀 (100% 당 함량에 대하여 계산됨)

10 g/L (NH₄)₂SO₄

0.4 g/L MgSO₄*7H₂O

0.6 g/L KH₂PO₄

0.3 mg/L 티아민*HCl

1 mg/L 바이오틴 (NH₄OH를 사용하여 pH 8.0으로 조정시킨, 1 mg/mL 멸균성 여과된 스톡 용액으로부터)

2 mg/L FeSO₄

2 mg/L MnSO₄

NH₄OH를 사용하여 pH 7.8로 조정시키고, 오토클레이브시킴 (121°C, 20 분).

또한, 스탁 용액 (200 $\mu\text{g/mL}$, 멸균성 여과됨)으로부터의 비타민 B12 (히드록시코발라민 Sigma Chemicals)을 최종 농도 100 $\mu\text{g/L}$ 가 되도록 가하였다.

아미노산 농도의 결정은 애질런트 (Agilent) 1100 시리즈 LC 시스템 HPLC 상에서 애질런트에 따라서 고압 액체 크로마토그래피함으로써 수행하였다. 오르토-프탈알데히드를 이용한 예비칼럼 유도체화는, 형성되는 아미노산의 정량화를 가능케 해주고; 아미노산 혼합물의 격리를 하이퍼실 (Hypersil) AA 칼럼 (공급처: Agilent) 상에서 수행하였다.

실시예 IX: 플라스미드 pCIS PSOD 프럭토스 1,6-비스포스파타제의 제조

코리네박테륨 글루타미쿰 ATCC 13032로부터의 염색체성 DNA를 문헌 [참고: Tauch et al. (1995) Plasmid 33: 168-179 or Eikmanns et al. (1994) Microbiology 140:1817-1828]에 따라서 제조하였다.

PCR 1: 올리고뉴클레오타이드 프라이머 서열 18 및 서열 19, 주형으로서의 염색체성 DNA 및 Pfu 터보 폴리머라제 (공급처: Stratagene)를 이용하여, 슈퍼옥시드 디스무타제의 출발 코돈의 상단에 놓여있는 영역을 문헌 [참고: Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press]에 기재된 바와 같이 표준 방법에 따라서 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)을 사용함으로써 증폭시켰다.

서열 18

5'-tagctgccattattccggg-3' 및

서열 19

5'-GGGTAAAAAATCCTTTTCGTA-3'.

이로써 수득된, 크기가 대략 200 bp인 DNA 단편을, 제조업자의 지시에 따라서 GFX™ PCR DNA 및 겔 밴드 정제용 키트 (공급처: Amersham Pharmacia, Freiburg)를 사용하여 정제하였다.

PCR 2: 올리고뉴클레오타이드 프라이머 서열 20 및 서열 21, 주형으로서의 염색체성 DNA 및 Pfu 터보 폴리머라제 (공급처: Stratagene)를 이용하여, 프럭토스 1,6-비스포스파타제에 대한 유전자의 5' 영역을 문헌 [참고: Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press]에 기재된 바와 같이 표준 방법에 따라서 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)을 사용함으로써 증폭시켰다.

서열 20

5'-CCCGGAATAATTGGCAGCTACTGAAGGGCCTCCTGGG-3' 및

서열 21

5'-TATCAACGCGTTCTTCATCGGTAGCAGCACC-3'.

이로써 수득된, 크기가 대략 720 bp인 DNA 단편을, 제조업자의 지시에 따라서 GFX™ PCR DNA 및 겔 밴드 정제용 키트 (공급처: Amersham Pharmacia, Freiburg)를 사용하여 정제하였다.

PCR 3: 올리고뉴클레오타이드 프라이머 서열 22 및 서열 23, 주형으로서의 염색체성 DNA 및 Pfu 터보 폴리머라제 (공급처: Stratagene)를 이용하여, 프럭토스 1,6-비스포스파타제의 출발 코돈의 상단에 놓여있는 영역을 문헌 [참고: Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press]에 기재된 바와 같이 표준 방법에 따라서 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)을 사용함으로써 증폭시켰다.

서열 22

5'-TACGAAAGGATTTTTTACCCATGAACCTAAAGAACCCCGA-3' 및

서열 23

5'-ATCTACGTCGACCCAGGATGCCCTGGATTTC-3'.

이로써 수득된, 크기가 대략 740 bp인 DNA 단편을, 제조업자의 지시에 따라서 GFX™ PCR DNA 및 겔 밴드 정제용 키트 (공급처: Amersham Pharmacia, Freiburg)를 사용하여 정제하였다.

PCR 4: 올리고뉴클레오티드 프라이머 서열 18 및 서열 23, 주형으로서의 PCR 1 및 3으로부터의 PCR 생성물 및 Pfu 터보 폴리머라제 (공급처: Stratagene)를 이용하여, 융합 PCR을 문헌 [참고: Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press]에 기재된 바와 같이 표준 방법에 따라서 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)을 사용함으로써 수행하였다. 이로써 수득된, 크기가 대략 930 bp인 DNA 단편을, 제조업자의 지시에 따라서 GFX™ PCR DNA 및 겔 밴드 정제용 키트 (공급처: Amersham Pharmacia, Freiburg)를 사용하여 정제하였다.

PCR 5: 올리고뉴클레오티드 프라이머 서열 21 및 서열 23, 주형으로서의 PCR 2 및 4로부터의 PCR 생성물 및 Pfu 터보 폴리머라제 (공급처: Stratagene)를 이용하여, 융합 PCR을 문헌 [참고: Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press]에 기재된 바와 같이 표준 방법에 따라서 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)을 사용함으로써 수행하였다.

이로써 수득된, 크기가 대략 1650 bp인 DNA 단편을, 제조업자의 지시에 따라서 GFX™ PCR DNA 및 겔 밴드 정제용 키트 (공급처: Amersham Pharmacia, Freiburg)를 사용하여 정제하였다. 그 후, 이를 제한 효소 MluI 및 SalI (공급처: Roche Diagnostics, Mannheim)를 사용하여 절단시키고, GFX™ PCR DNA 및 겔 밴드 정제용 키트를 사용하여 DNA 단편을 정제하였다.

벡터 pCIS를 제한 효소 MluI 및 SalI로 절단하고, 전기영동적 분리시킨 후, GFX™ PCR DNA 및 겔 밴드 정제용 키트를 사용함으로써 4.3 kb 크기의 단편을 분리하였다.

이러한 벡터 단편을, 제조업자의 지시에 따라서 래피드 DNA 연결용 키트 (공급처: Roche Diagnostics, Mannheim)를 사용함으로써 PCR 5로부터의 PCR 단편과 함께 연결시키고, 이러한 연결 배치를 문헌 [참고: Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, (1989))]에 기재된 바와 같이 표준 방법에 따라서 적절한 이. 콜라 이 XL-1 블루 (공급처: Stratagene, La Jolla, USA)에서 형질전환시켰다. 플라스미드-수반 세포에 대한 선별은 카나마이신 (20 µg/mL)-함유 LB 한천 [참고: Lennox, 1955, Virology, 1:190] 상으로 도말함으로써 수행하였다.

플라스미드 DNA의 제조는 공급처 [Quiagen]의 재료를 사용하고, 이의 방법에 따라서 수행하였다. 서열 분석 반응은 문헌 [참고: Sanger et al. (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74: 5463-5467]에 따라서 수행하였다. 서열 분석 반응들은 ABI 프리즘 377 (공급처: PE Applied Biosystems, Weiterstadt)을 통하여 격리시키고 분석하였다.

이로써 수득된 플라스미드 pCIS Psod 프럭토스 1,6-비스포스파타제가 서열 24로서 기재되었다.

실시예 X: 리신의 생산

플라스미드 pCIS Psod 프럭토스 1,6-비스포스파타제는, 다음 문헌에 기재된 바와 같이 전기천공에 의해 코리네박테륨 글루타미쿰 ATCC 13032 lysCfbr에서 형질전환시켰다 [참고: Liebl, et al. (1989) FEMS Microbiology Letters 53: 299-303]. 이러한 프로토콜의 변형이 DE 10046870에 기재되어 있다. 개개 형질전환체의 프럭토스 1,6-비스포스파타제 유전자자리의 염색체성 배열은, 문헌 [참고: Sambrook et al. (1989), Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor]에 기재된 바와 같이, 서던 블롯 및 혼성화에 의한 표준 방법을 이용하여 검사하였다. 이로써, 이에 관련한 형질전환체가, 프럭토스 1,6-비스포스파타제 유전자자리에서 상동 재조합에 의해 형질전환된 플라스미드를 통합한 것이란 사실이 확립되었다. 항생제를 전혀 함유하지 않는 배지에서 상기 콜로니를 밤새 성장시킨 후, 세포를 사카로스 CM 한천 배지 (10% 사카로스) 상으로 도말하고 30℃ 하에 24시간 동안 항온 배양하였다.

벡터 pCIS Psod 프럭토스 1,6-비스포스파타제 내에 함유된 sacB 유전자가 사카로스를 독성 물질로 전환시키기 때문에, 야생형 프럭토스 1,6-비스포스파타제 유전자와 Psod 프럭토스 1,6-비스포스파타제 융합물 간의 제2의 상동 재조합 단계

에 의해 sacB 유전자를 결실시킨 콜로니들 만이 성장할 수 있다. 이러한 상동 재조합 동안, 상기 야생형 유전자 또는 융합물이 sacB 유전자와 함께 결실될 수 있다. sacB 유전자가 야생형 유전자와 함께 제거된 경우에는, 돌연변이된 형질전환체가 생성된다.

성장하고 있는 콜로니를 골라내고, 이를 대상으로 하여 카나마이신-민감성 표현형에 대해 조사하였다. SacB 유전자가 결실된 클론은 카나마이신-민감성 성장 행위를 동시에 나타내야만 한다. 천연 프로모터가 Psod 프로모터에 의해 목적하는 바 대로 치환되었는지의 여부는 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)을 통하여 검사하였다. 이러한 분석을 위해, 출발 균주 및 이로써 생성된 클론으로부터의 염색체성 DNA를 분리하였다. 이를 위해, 이쑤시개를 사용하여 한천 판으로부터 각각의 클론을 꺼내어, 이를 100 μ L의 H₂O에 현탁시키고 95°C 하에 10분 동안 비등시켰다. 각 경우에 있어, 생성된 용액 10 μ L를 PCR에서 주형으로서 사용하였다. 프라이머로서 사용된 것은 Psod 프로모터와 프럭토스 1,6-비스포스파타제 유전자에 대해 상동성인 올리고뉴클레오타이드였다. PCR 조건을 다음과 같이 선택하였다: 초기 변성: 95°C 하에서 5분; 변성: 95°C 하에서 30초; 혼성화: 55°C 하에서 30초; 증폭: 72°C 하에서 2분; 30 주기; 말단 연장: 72°C 하에서 5분. 출발 균주의 DNA를 수반한 배지에서는, 올리고뉴클레오타이드의 선별로 인해 PCR 생성물이 전혀 형성될 수 없었다. 제2 재조합을 통하여 천연 프로모터가 Psod 프로모터에 의해 완전히 치환된 3개 클론 만이, 예상 크기가 350 bp인 밴드를 나타내었다. 전반적으로, 시험된 클론 중의 3개 클론이 양성이었다. 이들 클론이 ATCC 13032 lysCfbr Psod 프럭토스-1,6-비스포스파타제 1, 2 및 3 으로서 명명되었다.

리신 생산에 대한 Psod 프럭토스-1,6-비스포스파타제 구조물의 효과를 연구 조사하기 위해, 균주 ATCC13032, ATCC13032 lysCfbr 및 ATCC13032 lysCfbr Psod 프럭토스-1,6-비스포스파타제 1을 CM 판 [10.0 g/L D-글루코스, 2.5 g/L NaCl, 2.0 g/L 우레아, 10.0 g/L 박토 펩톤 (공급처: Difco), 5.0 g/L 효모 추출물 (공급처: Difco), 5.0 g/L 고기 추출물 (공급처: Difco), 22.0 g/L 한천 (공급처: Difco), 오토클레이브 (20분, 121°C)] 상에서 30°C 하에 2일 동안 배양하였다. 연속해서, 세포를 판으로부터 긁어내고, 식염수에 재현탁시켰다. 주 배양을 위해, 10 mL의 배지 I 및 0.5 g의 오토클레이브된 CaCO₃ (Riedel de Haen)를, 1.5의 OD₆₀₀이 되도록 세포 현탁시키면서 100 mL 에를렌마이어어 플라스크에 접종하고, 유형 인포르스 AJ118 (공급처: Infors, Bottmingen, Switzerland)의 진탕 항온 배양기 상에서 39시간 동안 220 rpm으로 항온 배양하였다. 연속해서, 배지에서 격리시킨 리신의 농도를 결정하였다:

배지 I:

40 g/L 사카로스

60 g/L 당밀 (100% 당 함량에 대하여 계산됨)

10 g/L (NH₄)₂SO₄

0.4 g/L MgSO₄*7H₂O

0.6 g/L KH₂PO₄

0.3 mg/L 티아민*HCl

1 mg/L 바이오틴 (NH₄OH를 사용하여 pH 8.0으로 조정시킨, 1 mg/mL 멸균성 여과된 스톡 용액으로부터)

2 mg/L FeSO₄

2 mg/L MnSO₄

NH₄OH를 사용하여 pH 7.8로 조정시키고, 오토클레이브시킴 (121°C, 20 분).

또한, 스톡 용액 (200 μ g/mL, 멸균성 여과됨)으로부터의 비타민 B12 (히드록시코발라민 Sigma Chemicals)을 최종 농도 100 μ g/L가 되도록 가하였다.

아미노산 농도의 결정은 애질런트 1100 시리즈 LC 시스템 HPLC 상에서 애질런트에 따라서 고압 액체 크로마토그래피함으로써 수행하였다. 오르토-프탈알데히드를 이용한 예비칼럼 유도체화는, 형성되는 아미노산의 정량화를 가능케 해주고; 아미노산 혼합물의 격리를 하이퍼실 AA 칼럼 (공급처: Agilent) 상에서 수행하였다.

등가 양태

당업자는 통상적인 실험 만을 사용하고서도, 본원에 기재된 본 발명의 구체적 양태에 대한 많은 등가 양태를 인식하거나 확인할 수 있을 것이다. 이러한 등가 양태는 다음 청구의 범위에 의해 포괄된다.

도면의 간단한 설명

도 1은 펜토스 생합성 경로를 도시적으로 표현한 것이다.

도 2는 글루코스 및 프럭토스를 사용한 리신 생산 동안 코리네박테륨 글루타미쿰 ATCC 21526의 추적자 실험에서 GC/MS에 의해 측정된, 분비된 리신과 트레할로스의 상대 질량 이소토포머 (isotopomer) 분획을 비교한 것이다.

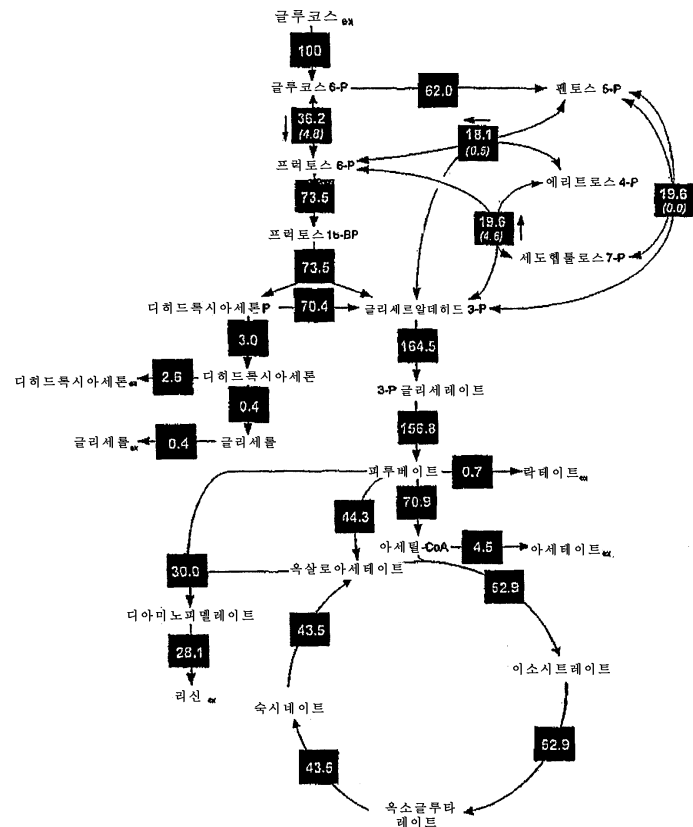
도 3은 분비된 리신 및 트레할로스를 각각 GC/MS에 의해 표지화 측정하면서 ^{13}C 추적자 실험에 대한 조합 대사산물 밸런싱과 이소토포머 모델링에 관한 포괄적인 접근법을 이용하여 실험 결과에 대한 적합도로부터 평가된, 글루코스를 사용한 리신 생산 동안 코리네박테륨 글루타미쿰 ATCC 21526의 중추 대사에 있어서 생체내 탄소 유량 분포 (flux distribution)이다. 순 유동 (net fluxes)은 사각형 부호로 제시됨으로써, 가역적 반응에 대한 순 유동의 방향은 상응하는 검은색 박스 옆에 있는 화살표로써 지시된다. 트랜스알돌라제, 트랜스케톨라제 및 글루코스-6-포스페이트 이소머라제의 유동 아래 괄호 안의 숫자는 유동 가역성을 지시해준다. 모든 유량은 평균 특이 글루코스 흡수 속도 ($1.77 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$)의 몰%로서 표현된다.

도 4는 분비된 리신 및 트레할로스를 각각 GC/MS에 의해 표지화 측정하면서 ^{13}C 추적자 실험에 대한 조합 대사산물 밸런싱과 이소토포머 모델링에 관한 포괄적인 접근법을 이용하여 실험 결과에 대한 적합도로부터 평가된, 프럭토스를 사용한 리신 생산 동안 코리네박테륨 글루타미쿰 ATCC 21526의 중추 대사에 있어서 생체내 탄소 유량 분포이다. 순 유동은 사각형 부호로 제시됨으로써, 가역적 반응에 대한 순 유동의 방향은 상응하는 검은색 박스 옆에 있는 화살표로써 지시된다. 트랜스알돌라제, 트랜스케톨라제 및 글루코스-6-포스페이트 이소머라제의 유동 아래 괄호 안의 숫자는 유동 가역성을 지시해준다. 모든 유량은 평균 특이 프럭토스 흡수 속도 ($1.93 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$)의 몰%로서 표현된다.

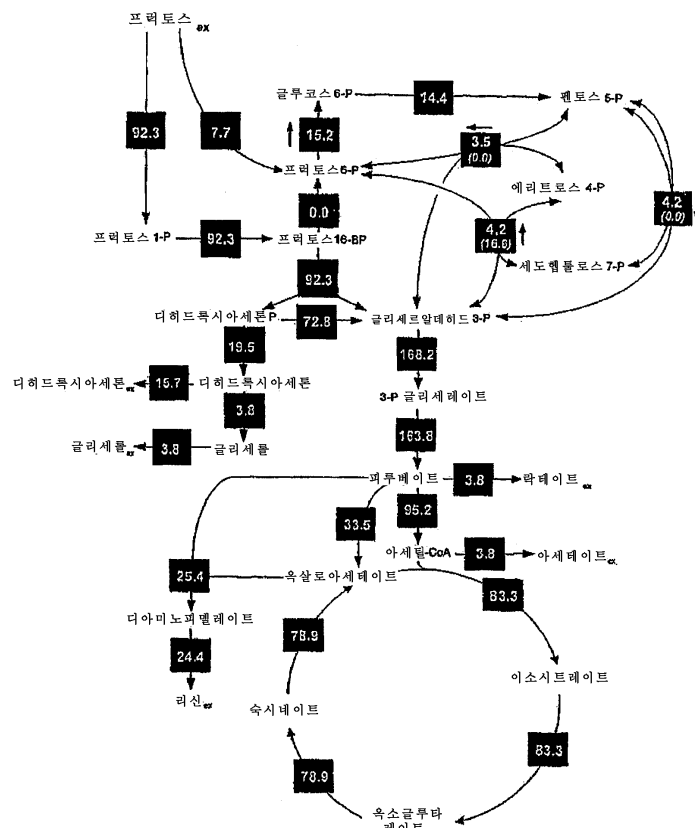
도 5는 수송 유동, 동화 유동 및 중간 대사산물 풀 간의 유동을 포함한, 글루코스-성장된 (A) 및 프럭토스-성장된 (B) 리신 생산성 코리네박테륨 글루타미쿰에 대한 중추 대사의 대사 경로망을 도시한 것이다.

도면

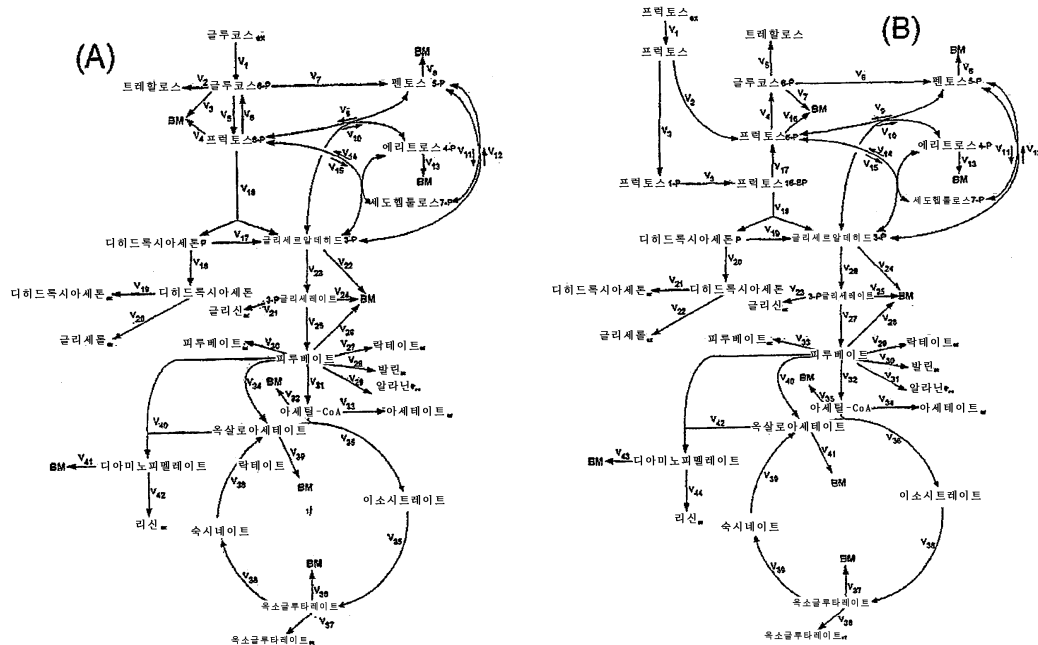
도면3



도면4



도면5



서열목록

<110> BASF AKTIENGESELLSCHAFT et al.

<120> METHODS FOR THE PREPARATION OF A
FINE CHEMICAL BY FERMENTATION

<130> BGI-158PC2

<150> PCT/IB2003/006456

<151> 2003-12-18

<160> 24

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 1070

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<221> CDS

<222> (22) ... (1029)

<400> 1

gtgccccagg aggccottca g atg aac cta aag aac ccc gaa acg cca gac 51
Met Asn Leu Lys Asn Pro Glu Thr Pro Asp

	1	5	10	
cgt aac ctt gct atg gag ctg gtg cga gtt acg gaa gca gct gca ctg				99
Arg Asn Leu Ala Met Glu Leu Val Arg Val Thr Glu Ala Ala Ala Leu				
	15	20	25	
gct tct gga cgt tgg gtt gga cgt ggc atg aag aat gaa ggc gac ggt				147
Ala Ser Gly Arg Trp Val Gly Arg Gly Met Lys Asn Glu Gly Asp Gly				
	30	35	40	
gcc gct gtt gac gcc atg cgc cag ctc atc aac tca gtg acc atg aag				195
Ala Ala Val Asp Ala Met Arg Gln Leu Ile Asn Ser Val Thr Met Lys				
	45	50	55	
ggc gtc gtt gtt atc ggc gag ggc gaa aaa gac gaa gct cca atg ctg				243
Gly Val Val Val Ile Gly Glu Gly Glu Lys Asp Glu Ala Pro Met Leu				
	60	65	70	
tac aac ggc gaa gag gtc gga acc ggc ttt gga cct gag gtt gat atc				291
Tyr Asn Gly Glu Glu Val Gly Thr Gly Phe Gly Pro Glu Val Asp Ile				
	75	80	85	90
gca gtt gac cca gtt gac ggc acc acc ctg atg gct gag ggt cgc ccc				339
Ala Val Asp Pro Val Asp Gly Thr Thr Leu Met Ala Glu Gly Arg Pro				
	95	100	105	
aac gca att tcc att ctc gca gct gca gag cgt ggc acc atg tac gat				387
Asn Ala Ile Ser Ile Leu Ala Ala Ala Glu Arg Gly Thr Met Tyr Asp				
	110	115	120	
cca tcc tcc gtc ttc tac atg aag aag atc gcc gtg gga cct gag gcc				435
Pro Ser Ser Val Phe Tyr Met Lys Lys Ile Ala Val Gly Pro Glu Ala				
	125	130	135	
gca ggc aag atc gac atc gaa gct cca gtt gcc cac aac atc aac gcg				483
Ala Gly Lys Ile Asp Ile Glu Ala Pro Val Ala His Asn Ile Asn Ala				
	140	145	150	
gtg gca aag tcc aag gga atc aac cct tcc gac gtc acc gtt gtc gtg				531
Val Ala Lys Ser Lys Gly Ile Asn Pro Ser Asp Val Thr Val Val Val				
	155	160	165	170
ctt gac cgt cct cgc cac atc gaa ctg atc gca gac att cgt cgt gca				579
Leu Asp Arg Pro Arg His Ile Glu Leu Ile Ala Asp Ile Arg Arg Ala				
	175	180	185	
ggc gca aag gtt cgt ctc atc tcc gac ggc gac gtt gca ggt gca gtt				627
Gly Ala Lys Val Arg Leu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ala Gly Ala Val				
	190	195	200	
gca gca gct cag gat tcc aac tcc gtg gac atc atg atg ggc acc ggc				675
Ala Ala Ala Gln Asp Ser Asn Ser Val Asp Ile Met Met Gly Thr Gly				

205	210	215	
gga acc cca gaa ggc atc atc act gcg tgc gcc atg aag tgc atg ggt			723
Gly Thr Pro Glu Gly Ile Ile Thr Ala Cys Ala Met Lys Cys Met Gly			
220	225	230	
ggc gaa atc cag ggc atc ctg gcc cca atg aac gat ttc gag cgc cag			771
Gly Glu Ile Gln Gly Ile Leu Ala Pro Met Asn Asp Phe Glu Arg Gln			
235	240	245	250
aag gca cac gac gct ggt ctg gtt ctt gat cag gtt ctg cac acc aac			819
Lys Ala His Asp Ala Gly Leu Val Leu Asp Gln Val Leu His Thr Asn			
255	260	265	
gat ctg gtg agc tcc gac aac tgc tac ttc gtg gca acc ggt gtg acc			867
Asp Leu Val Ser Ser Asp Asn Cys Tyr Phe Val Ala Thr Gly Val Thr			
270	275	280	
aac ggt gac atg ctc cgt ggc gtt tcc tac cgc gca aac ggc gca acc			915
Asn Gly Asp Met Leu Arg Gly Val Ser Tyr Arg Ala Asn Gly Ala Thr			
285	290	295	
acc cgt tcc ctg gtt atg cgc gca aag tca ggc acc atc cgc cac atc			963
Thr Arg Ser Leu Val Met Arg Ala Lys Ser Gly Thr Ile Arg His Ile			
300	305	310	
gag tct gtc cac cag ctg tcc aag ctg cag gaa tac tcc gtg gtt gac			1011
Glu Ser Val His Gln Leu Ser Lys Leu Gln Glu Tyr Ser Val Val Asp			
315	320	325	330
tac acc acc gcg acc taa gagctcttag ttcgaaaaac cgccggccat			1059
Tyr Thr Thr Ala Thr *			
335			
tgtggtcggc g			1070

<210> 2

<211> 335

<212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 2

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

Gly Thr Gly Phe Gly Pro Glu Val Asp Ile Ala Val Asp Pro Val Asp
85 90 95
Gly Thr Thr Leu Met Ala Glu Gly Arg Pro Asn Ala Ile Ser Ile Leu
100 105 110
Ala Ala Ala Glu Arg Gly Thr Met Tyr Asp Pro Ser Ser Val Phe Tyr
115 120 125
Met Lys Lys Ile Ala Val Gly Pro Glu Ala Ala Gly Lys Ile Asp Ile
130 135 140
Glu Ala Pro Val Ala His Asn Ile Asn Ala Val Ala Lys Ser Lys Gly
145 150 155 160
Ile Asn Pro Ser Asp Val Thr Val Val Val Leu Asp Arg Pro Arg His
165 170 175
Ile Glu Leu Ile Ala Asp Ile Arg Arg Ala Gly Ala Lys Val Arg Leu
180 185 190
Ile Ser Asp Gly Asp Val Ala Gly Ala Val Ala Ala Ala Gln Asp Ser
195 200 205
Asn Ser Val Asp Ile Met Met Gly Thr Gly Gly Thr Pro Glu Gly Ile
210 215 220
Ile Thr Ala Cys Ala Met Lys Cys Met Gly Gly Glu Ile Gln Gly Ile
225 230 235 240
Leu Ala Pro Met Asn Asp Phe Glu Arg Gln Lys Ala His Asp Ala Gly
245 250 255
Leu Val Leu Asp Gln Val Leu His Thr Asn Asp Leu Val Ser Ser Asp
260 265 270
Asn Cys Tyr Phe Val Ala Thr Gly Val Thr Asn Gly Asp Met Leu Arg
275 280 285
Gly Val Ser Tyr Arg Ala Asn Gly Ala Thr Thr Arg Ser Leu Val Met
290 295 300
Arg Ala Lys Ser Gly Thr Ile Arg His Ile Glu Ser Val His Gln Leu
305 310 315 320
Ser Lys Leu Gln Glu Tyr Ser Val Val Asp Tyr Thr Thr Ala Thr
325 330 335

<210> 3
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic construct

<400> 3
gagagagaga cgctcccag tggctgagac gcac

35

<210> 4
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic construct

<400> 4

ctctctctgt cgacgaattc aatcttacgg cctg

34

<210> 5

<211> 4323

<212> DNA

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 5

```

tcgagaggcc tgacgtcggg cccggtacca cgcgtcatat gactagtctg gacctaggga 60
tatcgtcgac atcgatgctc ttctgcgtta attaacaatt gggatcctct agaccgggga 120
tttaaatcgc tagcgggctg ctaaagggaag cggaacacgt agaaagccag tccgcagaaa 180
cgggtgctgac cccgatgaa tgctcagctac tgggctatct ggacaaggga aaacgcaagc 240
gcaaagagaa agcaggtagc ttgcagtggg cttacatggc gatagctaga ctgggcgggt 300
ttatggacag caagcgaacc ggaattgcc gctggggcgc cctctggtaa ggttgggaag 360
ccctgcaaag taaactggat ggctttcttg ccgccaagga tctgatggcg caggggatca 420
agatctgatc aagagacagg atgaggatcg tttcgcata ttgaacaaga tggattgcac 480
gcaggttctc cgccgcttg ggtggagagg ctattcggct atgactgggc acaacagaca 540
atcggctgct ctgatgccgc cgtgttccgg ctgtcagcgc aggggcgccc ggttcttttt 600
gtcaagaccg acctgtccgg tgccctgaat gaactgcagg acgaggcagc gcggctatcg 660
tggctggcca cgacgggctg tccttgccga gctgtgctcg acgttgtcac tgaagcggga 720
agggactggc tgctattggg cgaagtgccg gggcaggatc tcctgtcatc tcaccttgct 780
cctgccgaga aagtatccat catggctgat gcaatgcggc ggctgcatac gcttgatccg 840
gctacctgcc cattcgacca ccaagcgaaa catcgcacg agcgagcacg tactcggatg 900
gaagccggtc ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc atcaggggct cgcgccagcc 960
gaactgttcg ccaggctcaa ggcgcgcacg cccgacggcg aggatctcgt cgtgacccat 1020
ggcgatgcct gcttgccgaa tatcatgggt gaaaatggcc gcttttcttg attcatcgac 1080
tgtggccggc tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag cgttggctac ccgtgatatt 1140
gctgaagagc ttggcggcga atgggctgac cgttctctcg tgctttacgg tatcgccgct 1200
cccgattcgc agcgcacgc cttctatcgc cttcttgacg agttcttctg agcgggactc 1260
tggggttcga aatgaccgac caagcgacgc ccaacctgcc atcacgagat ttcgattcca 1320
ccgccgcctt ctatgaaaag ttgggcttcg gaatcgtttt ccgggacgcc ggctggatga 1380
tcctccagcg cggggatctc atgctggagt tcttcgcca cgctagcggc gcgccggccg 1440
gcccggtgtg aaataaccga cagatgcgta aggagaaaat accgcatcag gcgctcttcc 1500
gcttctcgc tactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct 1560
cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg 1620
tgagcaaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgtttttc 1680
cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga 1740
aaccgcagag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct 1800
cctgttccga ccctgccgct taccggatac ctgtccgcct ttctcccttc gggaagcgtg 1860
gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat ctgagttcgg tgtaggctcg tcgctccaag 1920
ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag cccgaccgct gcgccttata cggttaactat 1980
cgtcttgagt ccaaccgggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac 2040
aggattagca gagcgaggta tgtaggcggg gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac 2100
tacggctaca ctagaaggac agtatattgg atctgcgctc tgctgaagcc agttaccttc 2160
ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cgggtggtttt 2220
tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc 2280
ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaa gaaaactcac gttaagggat tttggtcatg 2340
agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaagg ccggccgcgg ccgccatcgg 2400
cattttcttt tgcgttttta tttgttaact gttaattgtc cttgttcaag gatgctgtct 2460
ttgacaacag atgttttctt gcctttgatg ttcagcagga agctcggcgc aaacgttgat 2520

```

```

tgtttgtctg cgtagaatcc tctgtttgtc ataatagcttg taatcacgac attgtttcct 2580
ttcgcttgag gtacagcgaa gtgtgagtaa gtaaagggtta catcgttagg atcaagatcc 2640
atttttaaca caaggccagt tttgttcagc ggcttgtagg ggccagttaa agaattagaa 2700
acataaccaaa gcatgtaaat atcgtttagac gtaatgccgt caatcgatcat ttttgatccg 2760
cgggagtcag tgaacaggta ccatgtgccc ttcatttttaa agacgttcgc gcgttcaatt 2820
tcatctgtta ctgtgttaga tgcaatcagc ggtttcatca cttttttcag tgtgtaatca 2880
tcgttttagct caatcatacc gagagcgccg tttgctaact cagccgtgag ttttttatcg 2940
ctttgcagaa gtttttgact ttcttgacgg aagaatgatg tgcttttgcc atagtatgct 3000
ttgttaaata aagattcttc gccttggtag ccatcttcag ttccagtgtt tgcttcaaatt 3060
actaagtatt tgtggccttt atcttctacg tagtgaggat ctctcagcgt atgggtgtcg 3120
cctgagctgt agttgccttc atcgatgaac tgctgtacat tttgatacgt ttttccgtca 3180
ccgtcaaaga ttgatttata atcctctaca ccgttgatgt tcaaagagct gtctgatgct 3240
gatacgtaaa cttgtgcagt tgtcagtgtt tgtttgccgt aatgtttacc ggagaaatca 3300
gtgtagaata aacggatttt tccgtcagat gtaaagtgtg ctgaacctga ccattcttgt 3360
gtttggtctt ttaggtaga atcatttgca tcgaatttgt cgctgtcttt aaagacgcgg 3420
ccagcgtttt tccagctgtc aatagaagtt tcgccgactt tttgatacaa catgtaaatc 3480
gatgtgtcat ccgcatTTTT aggatctccg gctaattgaa agacgatgtg gtagccgtga 3540
tagtttgca cagtgcctgc agcgttttgt aatggccagc tgtcccaaac gtccaggcct 3600
tttgcaagag agataTTTT aattgtggac gaatcaaatt cagaaacttg atatttttca 3660
tttttttgct gttcagggat ttgcagcata tcatggcgtg taatatggga aatgccgtat 3720
gtttccttat atggcttttg gttcgtttct ttgcgaaacg cttgagttgc gcctcctgcc 3780
agcagtgcgg tagtaaagggt taatactgtt gcttgttttg caaacttttt gatgttcatc 3840
gttcatgtct ctttttttat gtactgtgtt agcgggtctgc ttcttcagc cctcctgttt 3900
gaagatggca agtttagttac gcacaataaa aaaagacctt aaatatgtaa ggggtgacgc 3960
caaagtatac actttgccct ttacacattt taggtcttgc ctgctttatc agtaacaaac 4020
ccgcgcgatt tacttttcga cctcattcta ttagactctc gtttggtattg caactggtct 4080
attttcctct tttgtttgat agaaaatcat aaaaggattt gcagactacg ggcctaaaga 4140
actaaaaaat ctatctgttt cttttcattc tctgtatttt ttatagtttc tgttgcatgg 4200
gcataaagtt gcctttttta tcacaattca gaaaatatca taatatctca tttcactaaa 4260
taatagttaa cggcagggtat atgtgatggg ttaaaaagga tcggcgcccg ctcgatttaa 4320
atc 4323

```

<210> 6

<211> 5860

<212> DNA

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 6

```

cccgtacca cgcgtcccag tggctgagac gcatccgcta aagccccagg aaccctgtgc 60
agaaagaaaa cactcctctg gctaggtaga cacagtttat aaaggtagag ttgagcgggt 120
aactgtcagc acgtagatcg aaagggtgcac aaagggtggc ctggtcgtac agaaatatgg 180
cggttcctcg cttgagagtg cggaacgcac tagaaacgtc gctgaacgga tcgttgccac 240
caagaaggct ggaaatgatg tcgtgggtgt ctgctccgca atgggagaca ccacggatga 300
acttctagaa cttgcagcgg cagtgaatcc cgttccgcca gctcgtgaaa tggatatgct 360
cctgactgct ggtgagcgta tttctaacgc tctcgtcgcc atggctattg agtcccttgg 420
cgcagaagcc caatctttca cgggctctca ggctggtgtg ctcaccaccg agcgccacgg 480
aaacgcacgc attgttgatg tcaactccagg tcgtgtgcgt gaagcactcg atgagggcaa 540
gatctgcatt gttgctggtt tccagggtgt taataaagaa acccgcgatg tcaccacgtt 600
gggtcgtggt ggttctgaca ccaactgcagt tgctgtggca gctgctttga acgctgatgt 660
gtgtgagatt tactcgagcg ttgacgggtg gtataaccgt gaccgcgcga tcgttcctaa 720
tgcacagaag ctggaaaagc tcagcttcga agaaatgctg gaacttgctg ctgttggtct 780
caagattttg gtgctgcgca gtgttgaata cgctcgtgca ttcaatgtgc cacttcgcgt 840

```

acgctcgtct tatagtaatg atccccggcac tttgattgcc ggctctatgg aggatattcc 900
 tgtggaagaa gcagtcctta ccggtgtcgc aaccgacaag tccgaagcca aagtaaccgt 960
 tctgggtatt tccgataaag caggcgaggc tgcgaagggt ttcggtgcgt tggctgatgc 1020
 agaaatcaac attgacatgg ttctgcagaa cgtctcttct gtagaagacg gcaccaccga 1080
 catcaccttc acctgccctc gttccgacgg ccgcccgcgc atggagatct tgaagaagct 1140
 tcaggttcag ggcaactgga ccaatgtgct ttacgacgac caggtcggca aagtctccct 1200
 cgtgggtgct ggcatgaagt ctcacccagg tgttaccgca gattcatgg aagctctgcg 1260
 cgatgtcaac gtgaacatcg aattgatttc cacctctgag attcgtattt ccgtgctgat 1320
 ccgtgaagat gatctggatg ctgctgcacg tgcattgcat gagcagttcc agctgggcgg 1380
 cgaagacgaa gccgtcgttt atgcaggcac cggacgctaa agttttaaag gagtagtttt 1440
 acaatgacca ccatcgaggt tgttggtgca accggccagg tcggccaggt tatgcgacc 1500
 cttttggaag agcgcaatth cccagctgac actgttcggt tctttgcttc cccacgttcc 1560
 gcaggccgta agattgaatt cgtcgacatc gatgctcttc tgcgttaatt aacaattggg 1620
 atcctctaga cccgggattt aaatcgctag cgggctgcta aaggaagcgg aacacgtaga 1680
 aagccagtc gcagaaacgg tgcagacccc ggatgaatgt cagctactgg gctatctgga 1740
 caaggaaaa cgcaagcgca aagagaaagc aggtagcttg cagtgggctt acatggcgat 1800
 agctagactg ggcggtttta tggacagcaa gcgaaccgga attgccagct ggggcgcctt 1860
 ctggttaagg tgggaagccc tgcaaagtaa actggatggc tttcttgccg ccaaggatct 1920
 gatggcgag gggatcaaga tctgatcaag agacaggatg aggatcggtt cgcagattg 1980
 aacaagatgg attgcacgca ggttctccgg ccgcttggtt ggagaggcta ttcggctatg 2040
 actgggcaca acagacaatc ggctgctctg atgccgccgt gttccggctg tcagcgagg 2100
 ggcgcccgg tctttttgtc aagaccgacc tgtccgggtg cctgaatgaa ctgcaggacg 2160
 aggacgcgc gctatcgtgg ctggccacga cgggcgttcc ttgcccagct gtgctcgacg 2220
 ttgtcactga agcgggaagg gactggctgc tattgggcga agtgccgggg caggatctcc 2280
 tgtcatctca ccttgctcct gccgagaaag tatccatcat ggctgatgca atgcccgggc 2340
 tgcatacgt tgatccggct acctgcccac tcgaccacca agcgaacat cgcacgagc 2400
 gagcacgtac tcggatggaa gccggtcttg tcgatcagga tgatctggac gaagagcatc 2460
 aggggctcgc gccagccgaa ctgttcgcca ggctcaaggc gcgcatgcc gacggcgagg 2520
 atctcgtcgt gacctatggc gatgcctgct tgccgaatat catggtggaa aatggccgct 2580
 tttctggatt catcgactgt ggccggctgg gtgtggcgga ccgctatcag gacatagcgt 2640
 tggctacccg tgatattgct gaagagcttg gcggcgaaat ggctgaccgc ttcctcgtgc 2700
 ttacggtat cgccgctccc gattcgcagc gcacgcctt ctatgcctt cttgacgagt 2760
 tctctgagc gggactctgg ggttcgaaat gaccgaccaa gcgacgcca acctgccatc 2820
 acgagatttc gattccaccg ccgccttcta tgaaagggtt ggcttcgga tcgttttccg 2880
 ggacgccggc tggatgatcc tcacgcgcgg ggtctctatg ctggagttct tcgcccacgc 2940
 tagcggcgcg ccggccggcc cgggtgtgaa taccgcacag atgcgtaagg agaaaatacc 3000
 gcatcaggcg ctcttccgct tcctcgtcga ctgactcgt gcgctcggtc gttcggctgc 3060
 ggcgagcgg atcagctcac tcaaaggcgg taatacgggt atccacagaa tcaggggata 3120
 acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg 3180
 cgttgctggc gtttttccat aggtccgcgc cccctgacga gcacacaaa aatcgacgct 3240
 caagtacag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcggtt ccccttgga 3300
 gctccctcgt gcgctctcct gttccgaccc tgccgcttac cggatacctg tccgcctttc 3360
 tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata gctcacgctg taggtatctc agttcgggtg 3420
 aggtcggtcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaacccc cgttcagccc gaccgctgcg 3480
 cttatccgg taactatcgt cttgagtcca acccggttaag acacgactta tcgccactgg 3540
 cagcagccac tggtaaacag attagcagag cgaggatgt aggcgggtgct acagagttct 3600
 tgaagtgggt gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggtatc tgcgctctgc 3660
 tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg 3720
 ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc 3780
 aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt 3840
 aagggttttt ggcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaaggccg 3900
 gccgcggccg ccatcggcgt tttcttttgc gtttttattt gttactgtt aattgtcctt 3960

```

gttcaaggat gctgtctttg acaacagatg ttttcttgcc tttgatgttc agcaggaagc 4020
tcggcgcaaa cggttgattgt ttgtctgcgt agaatcctct gtttgtcata tagcttgtaa 4080
tcacgacatt gtttcctttc gcttgaggta cagcgaagtg tgagtaagta aaggttacat 4140
cgttaggatc aagatccatt tttaacacaa ggccagtttt gttcagcggc ttgtatgggc 4200
cagttaaaga attagaaaca taaccaagca tgtaaataac gtttagacgta atgccgtcaa 4260
tcgtcatttt tgatccgcgg gagtcagtga acaggtagca tttgccgttc attttaaaga 4320
cgttcgcgcg ttcaattttca tctgttactg tgtagatgc aatcagcggc ttcactactt 4380
ttttcagtgt gtaatcatcg tttagctcaa tcataccgag agcgccgttt gctaactcag 4440
ccgtgcgttt tttatcgctt tgcagaagtt tttgactttc ttgacggaag aatgatgtgc 4500
ttttgccata gtatgctttg ttaaataaag attcttcgcc ttggtagcca tcttcagttc 4560
cagtgtttgc ttcaaatact aagtatttgt ggccctttatc ttctacgtag tgaggatctc 4620
tcagcgtatg gttgtgcgct gagctgtagt tgccttcacg gatgaactgc tgtacatttt 4680
gatacgtttt tccgtcaccg tcaaagattg atttataatc ctctacaccg ttgatgttca 4740
aagagctgtc tgatgctgat acgttaactt gtgcagttgt cagtgtttgt ttgccgtaat 4800
gtttaccgga gaaatcagtg tagaataaac ggatttttcc gtcagatgta aatgtggctg 4860
aacctgacca ttcttggtt tggtctttta ggatagaatc atttgcatcg aatttgctgc 4920
tgtctttaa gacgcggcca gcgtttttcc agctgtcaat agaagtttcg ccgacttttt 4980
gatagaacat gtaaatacgat gtgtcatccg cattttttagg atctccggct aatgcaaaga 5040
cgatgtggta gccgtgatag tttgcgacag tgcgctcagc gttttgtaat ggccagctgt 5100
cccaaacgtc caggcctttt gcagaagaga tttttttaat tgtggacgaa tcaaattcag 5160
aaacttgata tttttcatth ttttgctgtt cagggatttg cagcatatca tggcgtgtaa 5220
tatgggaaat gccgtatgtt tccttatatg gcttttggtt cgtttctttc gcaaacgctt 5280
gagttgcgcc tcctgccagc agtgcggtag taaagggtta tactgttgct tgttttgcaa 5340
actttttgat gttcatcggt catgtctctt tttttatgta ctgtgttagc ggtctgcttc 5400
ttccagccct cctgtttgaa gatggcaagt tagttacgca caataaaaaa agacctaaaa 5460
tatgtaaggg gtgacgccaa agtatacact ttgcccttta cacatttttag gtcttgccctg 5520
ctttatcagt aacaaaccg cgcgatttac ttttcgacct cattctatta gactctcggt 5580
tggtattgcaa ctggtctatt ttctctttt gtttgataga aaatcataaa aggatttgca 5640
gactacgggc ctaaaagaact aaaaaatcta tctgtttctt ttcattctct gtatttttta 5700
tagtttctgt tgcatgggca taaagttgcc tttttaatca caattcagaa aatatcataa 5760
tatctcattt cactaaataa tagtgaacgg caggtatatg tgatgggtta aaaaggatcg 5820
gcggccgctc gattttaaatac tcgagaggcc tgacgtcggg 5860

```

<210> 7

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 7

cggcaccacc gacatcatct tcacctgcc tcgttccg 38

<210> 8

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 8

cggaacgagg gcaggtgaag atgatgtcgg tgggtgccg

38

<210> 9

<211> 1263

<212> DNA

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 9

gtggccctgg tcgtacagaa atatggcggg tctctgcttg agagtgcgga acgcattaga 60
aacgtcgtcg aacggatcgt tgccaccaag aaggctggaa atgatgtcgt ggttgtctgc 120
tccgcaatgg gagacaccac ggatgaactt ctagaacttg cagcggcagt gaatcccgtt 180
ccgccagctc gtgaaatgga tatgctcctg actgctgggt agcgtatttc taacgctctc 240
gtcgccatgg ctattgagtc ccttggcgca gaagcccaat ctttcacggg ctctcaggct 300
ggtgtgctca ccaccgagcg ccacggaaac gcacgcattg ttgatgtcac tccaggctcg 360
gtgctggaag cactcgatga gggcaagatc tgcattgttg ctggtttcca ggggtgtaat 420
aaagaaaccc gcgatgtcac cacgttgggt cgtgggtggt ctgacaccac tgcagttgcg 480
ttggcagctg ctttgaacgc tgatgtgtgt gagatttact cggacgttga cgggtgtgtat 540
accgctgacc cgcgcacatcgt tcctaatagca cagaagctgg aaaagctcag cttcgaagaa 600
atgctggaac ttgctgctgt tggctccaag attttgggtgc tgcgcagtgt tgaatacgct 660
cgtgcattca atgtgccact tcgcgtacgc tctgtcttata gtaatgatcc cggcactttg 720
attgccggct ctatggagga tattcctgtg gaagaagcag tccttaccgg tgtcgcaacc 780
gacaagtccg aagccaaaagt aaccgttctg ggtatttccg ataagccagg cgaggctgcg 840
aaggttttcc gtgcgttggc tgatgcagaa atcaacattg acatggttct gcagaacgtc 900
tcttctgtag aagacggcac caccgacatc accttcacct gccctcgttc cgacggccgc 960
cgcgcgatgg agatcttgaa gaagcttcag gttcagggca actggacca tgtgctttac 1020
gacgaccagg tcggcaaaagt ctccctcgtg ggtgctggca tgaagtctca cccagggtgt 1080
accgcagagt tcatggaagc tctgcgcgat gtcaacgtga acatcgaatt gatttccacc 1140
tctgagattc gtatttccgt gctgatccgt gaagatgatc tggatgctgc tgcacgtgca 1200
ttgcatgagc agttccagct gggcggcgaa gacgaagccg tcgtttatgc aggcaccgga 1260
cgc 1263

<210> 10

<211> 5860

<212> DNA

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 10

cccgttacca cgcgtcccag tggctgagac gcatccgcta aagccccagg aaccctgtgc 60
agaaagaaaa cactcctctg gctaggtaga cacagtttat aaaggtagag ttgagcgggt 120
aactgtcagc acgtagatcg aaaggtgcac aaaggtggcc ctggctgtac agaaatatgg 180
cggttcctcg cttgagagtg cggaacgcac tagaaacgtc gctgaacgga tcgttgccac 240
caagaaggct ggaaatgatg tcgtggttgt ctgctccgca atgggagaca ccacggatga 300
acttctagaa cttgcagcgg cagtgaatcc cgttccgcca gctcgtgaaa tggatatgct 360
cctgactgct ggtgagcgtg tttctaacgc tctcgtcgcc atggctattg agtcccttgg 420
cgcagaagcc caatctttca cgggctctca ggctggtgtg ctcaccaccg agcggccagg 480
aaacgcacgc attgttgatg tcaactccagg tcgtgtgctg gaagcactcg atgagggcaa 540
gatctgcatt gttgctggtt tccagggtgt taataaagaa acccgcgatg tcaccacgtt 600
gggtcgtggg ggttctgaca ccaactgcagt tgcgttggca gctgctttga acgctgatgt 660
gtgtgagatt tactcggacg ttgacgggtg gtataaccgt gacccgcgca tcgttcctaa 720

tgcacagaag ctggaanaag tcagcttcga agaaatgctg gaacttgctg ctgttggtc 780
 caagattttg gtgtgctgca gtgttggaata cgctcgtgca ttcaatgtgc cacttcgcgt 840
 acgctcgtct tatagtaatg atccccgcac tttgattgcc ggctctatgg aggatattcc 900
 tgtggaagaa gcagtcctta ccggtgtcgc aaccgacaag tccgaagcca aagtaaccgt 960
 tctgggtatt tccgataagc caggcgaggc tgcgaagggt ttccgtgcgt tggctgatgc 1020
 agaaatcaac attgacatgg ttctgcagaa cgtctcttct gtagaagacg gcaccaccga 1080
 catcatcttc acctgccctc gttccgacgg ccgcccgcgg atggagatct tgaagaagct 1140
 tcaggttcag ggcaactgga ccaatgtgct ttacgacgac caggtcggca aagtctccct 1200
 cgtgggtgct ggcatgaagt ctcacccagg tgttaccgca gagttcatgg aagctctgcg 1260
 cgatgtcaac gtgaacatcg aattgatttc cacctctgag attcgtatct ccgtgctgat 1320
 ccgtgaagat gatctggatg ctgctgcacg tgcattgcat gagcagttcc agctgggagg 1380
 cgaagacgaa gccgtcgttt atgcaggcac cggacgctaa agttttaaag gagtagtttt 1440
 acaatgacca ccacgcaggt tgttggtgca accggccagg tcggccagggt tatgcgacc 1500
 cttttggaag agcgcaattt cccagctgac actgttcgtt tctttgcttc cccacgttcc 1560
 gcaggccgta agattgaatt cgtcgacatc gatgctcttc tgcgttaatt aacaattggg 1620
 atcctctaga cccgggattt aaatcgctag cgggctgcta aaggaagcgg aacacgtaga 1680
 aagccagtcc gcagaaacgg tgcagacccc ggatgaatgt cagctactgg gctatctgga 1740
 caagggaaaa cgcaagcgca aagagaaagc aggtagcttg cagtgggctt acatggcgat 1800
 agctagactg ggcggtttta tggacagcaa gcgaaccgga attgccagct gggggcgccct 1860
 ctggtaaggt tgggaagccc tgcaaagtaa actggatggc tttcttgccg ccaaggatct 1920
 gatggcgagc gggatcaaga tctgatcaag agacaggatg aggatcgttt cgcagattg 1980
 aacaagatgg attgcacgca ggttctccgg ccgcttggtt ggagaggcta ttcggctatg 2040
 actgggcaca acagacaatc ggctgctctg atgccgccgt gttccggctg tcagcgagg 2100
 ggcgcccgggt tctttttgtc aagaccgacc tgtccgggtg cctgaatgaa ctgcaggacg 2160
 aggcagcgcg gctatcgtgg ctggccacga cgggctgtcc ttgctcagct gtgctcgacg 2220
 ttgtcactga agcgggaagg gactggctgc tattgggcca agtgccgggg caggatctcc 2280
 tgtcatctca ccttgctcct gccgagaaag tatccatcat ggctgatgca atgcggcggc 2340
 tgcatacgct tgatccggct acctgcccac tcgaccacca agcgaaacat cgcacgagc 2400
 gagcacgtac tcggatggaa gccggtcttg tcgatcagga tgatctggac gaagagcatc 2460
 aggggctcgc gccagccgaa ctgttcgcca ggctcaaggc gcgcatgcc gacggcgagg 2520
 atctcgtcgt gaccatggc gatgcctgct tgccgaatat catggtggaa aatggccgct 2580
 tttctggatt catcgactgt ggccggctgg gtgtggcgga ccgctatcag gacatagcgt 2640
 tggctacccg tgatattgct gaagagcttg gcggcgaaat ggctgaccgc ttcctcgtgc 2700
 tttacggtat cgcgctccc gatcgcagc gcacgcctt ctatcgctt cttgacgagt 2760
 tcttctgagc gggactctgg ggttcgaaat gaccgaccaa gcgacgcca acctgccatc 2820
 acgagatttc gattccaccg ccgccttcta tgaaagggtt ggcttcggaa tcgttttccg 2880
 ggacgccggc tggatgatcc tccagcgcg ggatctcatg ctggagttct tcgcccacgc 2940
 tagcggcgcg ccggccggcc cgggtgtgaaa taccgcacag atgcgtaagg agaaaatacc 3000
 gcatcaggcg ctcttcgct tctcgtccta ctgactcgt gcgctcggtc gttcggtgc 3060
 ggcgagcgg atcagctcac tcaaaggcgg taatacgggt atccacagaa tcaggggata 3120
 acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc cagggaaccgt aaaaaggccg 3180
 cgttgctggc gtttttccat aggctccgcc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct 3240
 caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt cccctggaa 3300
 gtcctcgt gcgctctcct gttccgacct tgcgcttac cggatacctg tccgccttcc 3360
 tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata gctcacgctg taggtatctc agttcggtgt 3420
 aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaacccc cgttcagccc gaccgctgcg 3480
 ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca acccggttaag acacgactta tcgccactgg 3540
 cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggatgt aggcgggtgt acagagttct 3600
 tgaagtgggt gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggatct tgcgctctgc 3660
 tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg 3720
 ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc 3780
 aagaagatcc tttgatcttt tctacgggggt ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt 3840


```

aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaaggccg 3900
gccgcggccg ccacgcgcac tttcttttgc gtttttattt gttaactgtt aattgtcctt 3960
gttcaaggat gctgtctttg acaacagatg ttttcttgcc tttgatgttc agcaggaagc 4020
tcggcgcaaa cgttgattgt ttgtctgcgt agaatcctct gtttgtcata tagcttgtaa 4080
tcacgacatt gtttcctttc gcttgaggta cagcgaagtg tgagtaagta aaggttacat 4140
cgtaggatc aagatccatt tttaacacaa ggccagtttt gttcagcggc ttgtatgggc 4200
cagttaaaaga attagaaaca taaccaagca tgtaaatatc gttagacgta atgccgtcaa 4260
tcgtcatttt tgatccgcgc gagtcagtga acaggtacca tttgccgttc attttaaaga 4320
cgttcgcgcg ttcaattttca tctgttactg tgttagatgc aatcagcggc ttcactactt 4380
ttttcagtg gtaatcatcg tttagctcaa tcataccgag agcgccgttt gctaactcag 4440
ccgtgcgttt tttatcgctt tgcagaagtt tttgactttc ttgacggaag aatgatgtgc 4500
ttttgccata gtatgctttg ttaaataaag attcttcgcc ttggtagcca tcttcagttc 4560
cagtgtttgc ttcaataact aagtatttgt ggccctttatc ttctacgtag tgaggatctc 4620
tcagcgtatg gttgtgcgct gagctgtagt tgccttcac gatgaactgc tgtacatttt 4680
gatacgtttt tccgtcaccg tcaaagattg atttataatc ctctacaccg ttgatgttca 4740
aagagctgtc tgatgctgat acgttaactt gtgcagttgt cagtgtttgt ttgccgtaat 4800
gtttaccgga gaaatcagtg tagaataaac ggatttttcc gtcagatgta aatgtggctg 4860
aacctgacca ttcttgtgtt tggctcttta ggatagaatc atttgcatcg aatttgtcgc 4920
tgtctttaa gacgcggcca gcgtttttcc agctgtcaat agaagtctcg ccgacttttt 4980
gatagaacat gtaaactgat gtgtcatccg ctttttagg atctccggct aatgcaaaga 5040
cgatgtggta gccgtgatag tttgcgacag tgcgcgcagc gttttgtaat ggccagctgt 5100
cccaaacgtc caggcccttt gcagaagaga ttttttaat tgtggacgaa tcaaattcag 5160
aaacttgata tttttcattt ttttgctgtt cagggatttg cagcatatca tggcgtgtaa 5220
tatgggaaat gccgtatgtt tccttatatg gcttttggtt cgtttctttc gcaaacgctt 5280
gagttgcgcc tcctgccagc agtgccgtag taaaggttaa tactgttgct tgttttgcaa 5340
actttttgat gttcatcggt catgtctcct tttttatgta ctgtgttagc ggtctgcttc 5400
ttccagccct cctgtttgaa gatggcaagt tagttacgca caataaaaaa agacctaaaa 5460
tatgtaagg gtagcgccaa agtatacact ttgcccttta cacatttttag gtcttgccctg 5520
ctttatcagt aacaaaacccg cgcgatttac ttttcgacct cattctatta gactctcggt 5580
tggattgcaa ctggtctatt ttctctttt gtttgataga aaatcataaa aggatttgca 5640
gactacgggc ctaaagaact aaaaaatcta tctgtttctt ttcattctct gtatttttta 5700
tagtttctgt tgcattgggc taaagttgcc tttttaatca caattcagaa aatatcataa 5760
tatctcattt cactaaataa tagtgaacgg caggtatatg tgatgggtta aaaaggatcg 5820
gcggccgctc gatttaaatc tcgagaggcc tgacgtcggg 5860

```

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 11

tggccgttac cctgcgaatg

20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic construct

<400> 12
 tgtatgtcct cctggacttc 20

<210> 13
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic construct

<400> 13
 gaagtccagg aggacataca atgaacctaa agaaccgccga 40

<210> 14
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic construct

<400> 14
 atctacgtcg acccaggatg ccctggattt c 31

<210> 15
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic construct

<400> 15
 tatcaacgcg ttcttcatcg gtagcagcac c 31

<210> 16
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic construct

<400> 16
 cattcgcagg gtaacggcca ctgaagggcc tcctggg 37

<210> 17

<211> 5928

<212> DNA

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 17

tcgagaggcc	tgacgtcggg	cccggtagca	cgcgttcttc	atcggttagca	gcacccgaga	60	
ccatgacgcg	ggcatcgccc	agatccatca	cacgcagatc	acgcacatca	gattcctgtg	120	
aggtgtaa	at	ccccacgtcg	tgcccatcaa	gatcataaga	ctcagaaaga	180	
gagtatcata	accagccaca	gcatacctcaa	cggtttcacc	agtttgagt	g	240	
agccctcatc	tgcggtgaca	tatccaacta	cagatgccgg	ggtgtcatcc	accatggtgc	300	
gtcgagctga	atttgtggtc	cagccttcag	gagtttcagg	caacctagtt	gcatgatcag	360	
tcattgcgcg	cgcttccatt	gacataaaaag	tgggaagcatc	aacttcagg	acctgccccat	420	
tttcagggga	tcctgtattg	aaagaacaca	ttcccgtaga	ttccaccgct	accaacatga	480	
tgatcgcgga	gactaccaac	gagataatca	tgtctcgact	gccatcaaaa	attttcgggtc	540	
gtttctcagc	cacccgccta	gtatgtcacg	agtttggtac	gaaacccct	tttgggtgtc	600	
cagaatccaa	aattccgggc	acaaaagtgc	aacaatagat	gacgtgcggg	ttgatacagc	660	
ccaagcgccg	atacatcttat	aatgcgccta	gatacgtgca	accacgtaa	ccagggtcaga	720	
tcaagtgc	ccc	caggaggccc	ttcagtggcc	gttaccctgc	gaatgtccac	agggtagctg	780
gtagtttgaa	aatcaacgcc	gttgccctta	ggattcagta	actggcacat	tttgtaatgc	840	
gctagatctg	tgtgctcagt	cttccaggct	gcttatcaca	gtgaaagcaa	aaccaattcg	900	
tggctgcgaa	agtcgtagcc	accacgaagt	ccaggaggac	atacaatgaa	cctaaagaac	960	
cccgaaacgc	cagaccgtaa	ccttgctatg	gagctggtgc	gagttacgga	agcagctgca	1020	
ctggcttctg	gacgttggtg	tggacgtggc	atgaagaatg	aaggcgacgg	tgccgctgtt	1080	
gacgccatgc	gccagctcat	caactcagtg	accatgaagg	gcgtcgttgt	tatcggcgag	1140	
ggcgaaaaag	acgaagctcc	aatgctgtac	aacggcgaag	aggtcggaac	cggcttttga	1200	
cctgaggttg	atatacgcagt	tgacccagtt	gacggcacca	ccctgatggc	tgagggtcgc	1260	
cccaacgcaa	tttccattct	cgcagctgca	gagcgtggca	ccatgtacga	tccatcctcc	1320	
gtcttctaca	tgaagaagat	cgcctgagg	ccg	caggcaagat	cgacatcgaa	1380	
gctccagttg	cccacaacat	caacgcggtg	gcaaagtcca	agggaatcaa	cccttccgac	1440	
gtcaccgttg	tcgtgcttga	ccgtcctcgc	cacatcgaa	tgatcgcaga	cattcgtcgt	1500	
gcaggcgcaa	aggttcgtct	catctccgac	ggcgacgttg	cagggtgcagt	tgacgcagct	1560	
caggattcca	actccgtgga	catcatgatg	ggcacccggc	gaaccccgag	aggcatcatc	1620	
actgcgtgcg	ccatgaagtg	catgggtggc	gaaatccagg	gcatacctgg	tcgacatcga	1680	
tgctcttctg	cgtaatttaa	caattgggat	cctctagacc	cgggatttaa	atcgctagcg	1740	
ggctgctaaa	ggaagcgga	cacgtagaaa	gccagtcgcg	agaaacgggtg	ctgaccccg	1800	
atgaatgtca	gctactgggc	tatctggaca	agggaaaacg	caagcgcaaa	gagaaagcag	1860	
gtagcttgca	gtgggcttac	atggcgatag	ctagactggg	cggttttatg	gacagcaagc	1920	
gaaccggaat	tgccagctgg	ggcgccctct	ggtaagggtg	ggaagccctg	caaagtaaac	1980	
tgatggctt	tcttgccgcc	aaggatctga	tggcgacagg	gatcaagatc	tgatcaagag	2040	
acaggatgag	gatcgtttcg	catgattgaa	caagatggat	tgacgcagcg	ttctccggcc	2100	
gcttgggtgg	agaggctatt	cggctatgac	tgggcacaac	agacaatcgg	ctgctctgat	2160	
gccgccgtgt	tccggtgtgc	agcgcagggg	cgcgcgggtt	tttttgtcaa	gaccgacctg	2220	
tccggtgccc	tgaatgaact	gcaggacgag	gcagcgcggc	tatcgtggct	ggccacgacg	2280	
ggcgttcctt	gcgcagctgt	gctcgacgtt	gtcactgaag	cgggaaggga	ctggctgcta	2340	
ttgggcgaag	tgccggggca	ggatctcctg	tcatactcacc	ttgctcctgc	cgagaaagta	2400	
tccatcatgg	ctgatgcaat	gcggcggtgt	catacgcttg	atccggctac	ctgcccattc	2460	
gaccaccaag	cgaaacatcg	catcgagcga	gcacgtactc	ggatggaagc	cggctctgtc	2520	
gatcaggatg	atctggacga	agagcatcag	gggctcgcgc	cagccgaact	gttcgccagg	2580	
ctcaaggcgc	gcatgcccga	cggcgaggat	ctcgtcgtga	cccatggcga	tgccctgctt	2640	
ccgaatatca	tgggtgaaaa	tggccgcttt	tctggattca	tcgactgtgg	ccggctgggt	2700	
gtggcggacc	gctatcagga	catagcgttg	gctacccgtg	atattgctga	agagcttggc	2760	

```

ggcgaatggg ctgaccgctt cctcgtgctt tacggatatcg ccgctcccga ttcgcagcgc 2820
atcgcccttct atcgcccttct tgacgagttc ttctgagcgg gactctgggg ttcgaaatga 2880
ccgaccaagc gacgccaac ctgccatcac gagatttcga ttccaccgcc gccttctatg 2940
aaaggttggg cttcggaaatc gttttccggg acgcggctg gatgacctc cagcgcgggg 3000
atctcatgct ggagtctctt gccacgcta ggcgcgcgc gcccgggccg gtgtgaaata 3060
ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgct cttccgcttc ctgcctcact 3120
gactcgctgc gctcggctcg tcggctgcgg cgagcggtat cagctcactc aaaggcggtg 3180
atacggttat ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag 3240
caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt tttccatag gctccgcccc 3300
cctgacgagc atcacaaaaa tcgacgctca agtcagaggt ggcgaaaccc gacaggacta 3360
taaagatacc aggcgtttcc ccttgaagc tccctcgtgc gctctcctgt tccgaccctg 3420
ccgcttaccg gatacctgtc cgcctttctc ccttcgggaa gcggtggcgt ttctcatagc 3480
tcacgctgta ggatatctcag ttcggtgtag gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac 3540
gaaccccccg ttcagcccga ccgctgcgc ttatccggta actatcgtct tgagtccaac 3600
ccggtaaagc acgacttatc gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg 3660
aggatgttag gcggtgctac agagttcttg aagtgggtgg ctaactacgg ctacactaga 3720
aggacagtat ttggtatctg cgctctgctg aagccagtta ctttcggaaa aagagttggt 3780
agctcttgat ccggcaaaaa aaccaccgct ggtagcgggt gtttttttgt ttgcaagcag 3840
cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc tacggggtct 3900
gacgctcagt ggaacgaaaa ctcacgttaa gggatttttg tcatgagatt atcaaaaagg 3960
atcttcacct agatcctttt aaaggccggc cgcggccgcc atcggcattt tcttttgctg 4020
ttttatttgt taactgttaa ttgtccttgt tcaaggatgc tgtctttgac aacagatgtt 4080
ttcttgccct tgatgttcag caggaagctc ggcgcaaacg ttgattgttt gtctgcgtag 4140
aatcctctgt ttgtcatata gcttgtaatc acgacattgt ttcttttcgc ttgaggtaca 4200
gcgaagtgtg agtaagtaaa ggttacatcg ttaggatcaa gatccatttt taacacaagg 4260
ccagttttgt tcagcggtt gtatgggcca gttaaagaat tagaaacata accaagcatg 4320
taaatatcgt tagacgtaat gccgtcaatc gtcatttttg atccgcggga gtcagtgaac 4380
aggtagcatt tgccgttcat tttaaagacg ttccgcggtt caatttcac tgttactgtg 4440
ttagatgcaa tcagcggttt catcactttt ttcagtgtgt aatcatcggt tagctcaatc 4500
ataccgagag cgccgtttgc taactcagcc gtgcgttttt tatcgctttg cagaagtttt 4560
tgactttctt gacggaagaa tgatgtgctt ttgccatagt atgctttgtt aaataaagat 4620
tcttcgcctt ggtagccatc ttcagttcca gtgtttgctt caaataactaa gtatttgttg 4680
cctttatctt ctacgtagtg aggatctctc agcgtatggg tgtcgcctga gctgtagttg 4740
ccttcacatga tgaactgctg tacattttga tacgtttttc cgtcaccgct aaagattgat 4800
ttataatcct ctacaccgtt gatgttcaaa gagctgtctg atgctgatac gtttaactgt 4860
gcagttgtca gtgtttgttt gccgtaatgt ttaccggaga aatcagtgtg gaataaacgg 4920
atttttccgt cagatgtaaa tgtggctgaa cctgaccatt cttgtgtttg gtcttttagg 4980
atagaatcat ttgcatcgaa tttgtcgtg tctttaaaga cgcggccagc gtttttccag 5040
ctgtcaatag aagtttcgcc gactttttga tagaacatgt aaatcgatgt gtcacccgca 5100
tttttaggat ctccggctaa tgcaaagacg atgtggtagc cgtgatatgt tgcgacagtg 5160
ccgtcagcgt tttgtaatgg ccagctgtcc caaacgtcca ggccttttgc agaagagata 5220
tttttaattg tggacgaatc aaattcagaa acttgatatt tttcattttt ttgctgttca 5280
gggatttgca gcatatcatg gcgtgtaata tgggaaatgc cgtatgtttc cttatatggc 5340
ttttggttcg tttcttttcg aaacgcttga gttgcgcctc ctgccagcag tgcggtagta 5400
aaggtttaata ctgttgcttg ttttgcaaac tttttgatgt tcatcgttca tgtctccttt 5460
tttatgtact gtgttagcgg tctgcttctt ccagccctcc tgtttgaaga tggcaagtta 5520
gttacgcaca ataaaaaaag acctaaaata tgtaaggggt gacgcaaag tatacacttt 5580
gccctttaca catttttagt cttgcctgct ttatcagtaa caaacccgcg cgatttactt 5640
ttcgacctca ttctattaga ctctcgtttg gattgcaact ggtctatttt cctcttttgt 5700
ttgatagaaa atcataaaaag gatttgacaga ctacgggcct aaagaactaa aaaatctatc 5760
tgtttctttt cattctctgt attttttata gtttctgttg catgggcata aagttgcctt 5820
tttaatcaca attcagaaaa tatcataata tctcatttca ctaaataata gtgaacggca 5880
ggtatatgtg atgggttaaa aaggatcggc ggccgctcga tttaaatc 5920

```

<210> 18
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic construct

<400> 18
 tagctgccaa ttattccggg 20

<210> 19
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic construct

<400> 19
 gggtaaaaaa tcctttcgta 20

<210> 20
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic construct

<400> 20
 cccggaataa ttggcagcta ctgaagggcc tcctggg 37

<210> 21
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic construct

<400> 21
 tatcaacgcg ttcttcatcg gtagcagcac c 31

<210> 22
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic construct

<400> 22

tacgaaagga tttttttaccc atgaacctaa agaaccocga 40

<210> 23

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic construct

<400> 23

atctacgtcg acccaggatg ccctggattt c 31

<210> 24

<211> 5920

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic construct

<400> 24

cgcggttcttc atcggttagca gcacccgaga ccatgacgcg ggcatcgccc agatccatca 60
cacgcagatc acgcacatca gattcctgtg aggtgtaaat tcccacgtcg tggccatcaa 120
gatcataaga ctcagaaaaga tcacgccagc gagtatcata accagccaca gcatcctcaa 180
cggtttcacc agtttgagtg agctgaatat agccctcatc tgcggtgaca tatccaacta 240
cagatgccgg ggtgtcatcc accatggtgc gtcgagctga atttgtggtc cagccttcag 300
gagtttccgg caacctagtt gcatgatcag tcattgcgcg cgcttcatt gacataaaag 360
tggaagcatc aacttcaggt acctgcccatt tttcagggga tctgtattg aaagaacaca 420
ttcccgtaga tcccaccgct accaacaatga tgatcgcgga gactaccaac gagataatca 480
tgtctcgact gccatcaaaa attttcgggtc gtttctcagc caccgccta gtatgtcacg 540
agtttggtac gaaaccccct tttgggtgtc cagaatcaa aattccgggc aaaaagtgc 600
aacaatagat gacgtgcggg ttgatacagc ccaagcgccg atacatttat aatgcgccta 660
gatacgtgca acccacgtaa ccaggtcaga tcaagtgcgc caggaggccc ttcagtagct 720
gccaattatt cggggcttgt gaccgcgtac ccgataaata ggtcgggtga aaaatttcgt 780
tgcaatatca aaaaaaggc ctatcatttg gaggtgtcgc accaagtact tttgcgaagc 840
gccatctgac ggatttttcaa aagatgtata tgctcgggtgc ggaaacctac gaaaggattt 900
tttaccatg aacctaaaga accccgaaac gccagaccgt aaccttgcta tggagctggt 960
gcgagttacg gaagcagctg cactggcttc tggacgttg gttggacgtg gcatgaagaa 1020
tgaaggcgac ggtgccgctg ttgacccat gcgccagctc atcaactcag tgaccatgaa 1080
gggcgtcgtt gttatcggcg agggcgaaaa agacgaagct ccaatgctgt acaacggcga 1140
agaggtcgga accggctttg gacctgaggt tgatatcgca gttgaccag ttgacggcac 1200
caccctgatg gctgagggtc gccccaacgc aatttcatt ctcgcagctg cagagcgtgg 1260
caccatgtac gatccatcct ccgtcttcta catgaagaag atcgccgtgg gacctgaggc 1320
cgcaggcaag atcgacatcg aagctccagt tgcccacaac atcaacgcgg tggcaaagtc 1380
caagggaatc aacccttcgg acgtcaccgt tgtcgtgctt gaccgtcctc gccacatcga 1440
actgatcgca gacattcgtc gtgcaggcgc aaaggttcgt ctcactctcg acggcgacgt 1500
tgcaggtgca gttgcagcag ctcaggattc caactccgtg gacatcatga tgggcaccgg 1560
cggaaccca gaaggcatca tcaactgcgt cgccatgaag tgcattgggtg gcgaaatcca 1620

gggcatcctg ggtcgacatc gatgctcttc tgcgttaatt aacaattggg atcctctaga 1680
 cccgggattt aaatcgctag cgggctgcta aaggaagcgg aacacgtaga aagccagtcc 1740
 gcagaaacgg tgctgacccc ggatgaatgt cagctactgg gctatctgga caagggaaaa 1800
 cgcaagcgca aagagaaaagc aggtagcttg cagtgggctt acatggcgat agctagactg 1860
 ggcggtttta tggacagcaa gcgaaccgga attgccagct ggggcgccct ctggtaaggt 1920
 tgggaagccc tgcaaagtaa actggatggc tttcttgccg ccaaggatct gatggcgag 1980
 gggatcaaga tctgatcaag agacaggatg aggatcgttt cgcatgattg aacaagatgg 2040
 attgcacgca ggttctccgg ccgcttgggt ggagaggcta ttcggctatg actgggcaca 2100
 acagacaatc ggctgctctg atgccgcctg gttccggctg tcagcgagcagg ggcgcccgg 2160
 tctttttgtc aagaccgacc tgtccggtgc cctgaatgaa ctgcaggacg aggcagcgcg 2220
 gctatctgtg ctggccacga cgggcttcc ttgocgagct gtgctcgacg ttgtcactga 2280
 agcgggaagg gactggctgc tattgggcga agtgccgggg caggatctcc tgtcatctca 2340
 ccttgctcct gccgagaaaag tatccatcat ggctgatgca atgcggcggc tgcatacgct 2400
 tgatccggct acctgcccac tcgaccacca agcgaacat cgcatcgagc gagcacgtac 2460
 tcggatggaa gccggtcttg tcgatcagga tgatctggac gaagagcatc aggggctcgc 2520
 gccagccgaa ctgttcgcca ggctcaaggc gcgcatgccc gacggcgagg atctcgtcgt 2580
 gacccatggc gatgcctgct tgccgaatat catggtggaa aatggccgct tttctggatt 2640
 catcgactgt ggccggctgg gtgtggcgga ccgctatcag gacatagcgt tggctaccg 2700
 tgatattgct gaagagcttg gcggcgaatg ggctgaccgc ttcctcgtgc tttacggtat 2760
 cgccgctccc gattcgagc gcacgcctt ctatgcctt cttgacgagt tcttctgagc 2820
 gggactctgg ggttcgaaat gaccgaccaa gcgacgcca acctgccatc acgagatttc 2880
 gattccaccg ccgccttcta tgaaagggtg ggcttcggaa tcgttttccg ggacgccggc 2940
 tggatgatcc tccagcgcgg ggatctcatg ctggagttct tcgcccacgc tagcggcgcg 3000
 ccggccggcc cgggtgtgaa taccgcacag atgcgtaagg agaaaatacc gcacagggcg 3060
 ctcttccgct tccctcgctca ctgactcgct gcgctcggtc gttcggctgc ggcgagcgg 3120
 atcagctcac tcaaaggcgg taatacgggt atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa 3180
 gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg cgttgctggc 3240
 gtttttccat aggtccgccc cccctgacga gcacacaaa aatcgacgct caagtcagag 3300
 gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcggtt cccctggaa gctccctcgt 3360
 gcgctctcct gttccgaccc tgccgcttac cggatacctg tccgccttcc tcccttcggg 3420
 aagcgtggcg ctttctcata gctcacgctg taggtatctc agttcgggtg aggtcgttcg 3480
 ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cggttcagccc gaccgctgcg cttatccg 3540
 taactatcgt cttgagtcca acccggtaa acacgactta tcgccactgg cagcagccac 3600
 tggtaacagg attagcagag cgaggatgt agggcggtgct acagagttct tgaagtgg 3660
 gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggtatc tgcgctctgc tgaagccagt 3720
 taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg ctggtagcgg 3780
 tggttttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc 3840
 tttgatcttt tctacggggg ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt aagggtttt 3900
 ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaaggccg gccgcggccg 3960
 ccatcgcatc tttcttttgc gtttttattt gtttaactgtt aattgtcctt gttcaaggat 4020
 gctgtctttg acaacagatg ttttcttgcc tttgatgttc agcaggaagc tcggcgcaaa 4080
 cggtgattgt ttgtctgcgt agaatcctct gtttgtcata tagcttgtaa tcacgacatt 4140
 gtttcctttc gcttgaggta cagcgaagtg tgagtaagta aaggttacat cgtaggatc 4200
 aagatccatt tttaacacaa ggccagtttt gttcagcggc ttgtatgggc cagttaaaga 4260
 attagaaaca taaccaagca tgtaaatac gtttagacgt atgccgtcaa tcgtcatttt 4320
 tgatccgcgg gagtcagtga acaggtaacca tttgccgttc attttaaaga cgttcgcgcg 4380
 ttcaatttca tctgttactg tgtagatgc aatcagcggg ttcactactt ttttcagtgt 4440
 gtaatcatcg ttttagctcaa tcataccgag agcgcggtt gtaactcag ccgtgcgttt 4500
 tttatcgctt tgcagaagtt tttgactttc ttgacggaag aatgatgtgc ttttgccata 4560
 gtatgctttg ttaaataaaag attcttgcgc ttggtagcca tcttcagttc cagtgtttgc 4620
 ttcaaatact aagtatttgt ggcctttatc ttctacgtag tgaggatctc tcagcgatg 4680
 gttgtcgctt gagctgtagt tgccttcac gatgaactgc tgtacatttt gatacgtttt 4740

```

tccgtcaccg tcaaagattg atttataatc ctctacaccg ttgatgttca aagagctgtc 4800
tgatgctgat acgttaactt gtgcagttgt cagtgtttgt ttgccgtaat gtttaccgga 4860
gaaatcagtg tagaataaac ggatttttcc gtcagatgta aatgtggctg aacctgacca 4920
ttcttgtgtt tggctcttta ggatagaatc atttgcatcg aatttgtcgc tgtctttaa 4980
gacgcggcca gcgtttttcc agctgtcaat agaagtttcg ccgacttttt gatagaacat 5040
gtaaactgat gtgtcatccg catttttagg atctccggct aatgcaaaga cgatgtggta 5100
gccgtgatag tttgcgacag tgccgtcagc gttttgtaat ggccagctgt cccaaacgtc 5160
caggcctttt gcagaagaga tatttttaat tgtggacgaa tcaaattcag aaacttgata 5220
tttttcattt ttttgctgtt cagggatttg cagcatatca tggcgtgtaa tatgggaaat 5280
gccgtatgtt tccttatatg gcttttggtt cgtttctttc gcaaacgctt gagttgcgcc 5340
tcctgccagc agtgcggtag taaaggttta tactgttgct tgttttgcaa actttttgat 5400
gttcatcggt catgtctcct tttttatgta ctgtgttagc ggtctgcttc ttccagccct 5460
cctgtttgaa gatggcaagt tagttacgca caataaaaaa agacctaaaa tatgtaaggg 5520
gtgacgcaa agtatacact ttgcccttta cacattttag gtcttgccctg ctttatcagt 5580
aacaacccg cgcgatttac ttttcgacct cattctatta gactctcggt tggattgcaa 5640
ctggtctatt ttcctctttt gtttgataga aaatcataaa aggatttgca gactacgggc 5700
ctaaagaact aaaaaatcta tctgtttctt ttcattctct gtatttttta tagtttctgt 5760
tgcatgggca taaagttgcc tttttaatca caattcagaa aatatcataa tatctcattt 5820
cactaaataa tagtgaacgg caggtatatg tgatgggtta aaaaggatcg gcggccgctc 5880
gatttaaadc tcgagaggcc tgacgtcggg cccgggtacca 5920

```