

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.⁷
C12N 15/54

(11) 공개번호 특2001-0051134
(43) 공개일자 2001년06월25일

(21) 출원번호	10-2000-0061572
(22) 출원일자	2000년 10월 19일
(30) 우선권주장	19950409.1 1999년 10월 20일 독일(DE)
(71) 출원인	대구사-휠스 악티엔게젤샤프트 독일 데-60287 프랑크푸르트포르슘스젠트룸 올리히 게엠베하 아달베르트 베. 플라텐타이히, 하 독일 데-52425 올리히 발헬름-요오넨-슈트라쎄 (72) 발명자 아이크만스베른하르트 독일데-89081울름글라이쎄슈테텐49 리델크리스티안 독일데-89233노이-울름게르스트마이어-슈트라쎄23 잠헤르만 독일데-52428올리히벤델리누스슈트라쎄71 목켈베티나 독일데-40597뒤셀도르프벤로데슈트라쎄35 (74) 대리인 이병호

심사청구 : 없음

(54) p c k 유전자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열

요약

본 발명은 서열 2의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드와의 상동성이 70% 이상인 폴리뉴클레오타이드 a),

벡터 pK19mobsacBΔpck상에 함유된 pck 유전자에 의해 기탁된 이. 콜라이(E. coli) 균주 DSM 13047에서 발현되는 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드와의 상동성이 70% 이상인 폴리뉴클레오타이드 b),

서열 2의 아미노산 서열과의 상동성이 70% 이상인 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 c),

위의 폴리뉴클레오타이드 a), b) 및 c)에 상보적인 폴리뉴클레오타이드 d) 및

위의 폴리뉴클레오타이드 서열 a), b), c) 및 d)의 15개 이상의 연속하는 염기를 포함하는 폴리뉴클레오타이드 e)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 코리네형 박테리아로부터 분리된 폴리뉴클레오타이드에 관한 것이다.

대표도

도1

색인어

pck 유전자, L-아미노산, L-리신, L-트레오닌 및 코리네형 박테리아

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 플라스미드 pEK-pckA의 제한 지도이다.

도 2는 플라스미드 pEK-pckB의 제한 지도이다.

도 3은 플라스미드 pk19mobsacBΔpck의 제한 지도이다.

언급된 염기쌍 번호는 재생산성과 관련하여 수득된 대략적인 값이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 pck 유전자를 암호화하는 코리네형 박테리아로부터의 뉴클레오타이드 서열, 및 pck 유전자를 암호화시켜 L-아미노산, 특히 L-리신 및 L-트레오닌을 발효에 의해 제조하는 방법을 제공한다.

아미노산, 특히 리신 및 트레오닌은 동물 사료, 식료품 산업, 약제 산업 및 사람의 의약품에 사용된다.

공지된 바와 같이, 이들 물질은 코리네형 박테리아 균주, 특히 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)의 발효에 의해 생산된다. 이들의 지대한 중요성 때문에, 상기 제조 방법을 개선하기 위한 시도가 계속적으로 행해지고 있다. 상기 방법에 대한 개선은, 발효 기술(예: 교반 및 산소 공급), 영양 배지의 조성(예: 발효중의 당 농도), 제품의 후처리(예: 이온 교환 크로마토그래피), 또는 미생물 자체의 고유 성능 특징과 관련될 수 있다.

이들 미생물의 성능 특징은 돌연변이유발법, 선별법 및 돌연변이체 선별법을 사용하여 개선된다. 이러한 방식으로, 향대사물질에 내성을 갖거나, 중요한 조절 대사 산물에 대한 영양요구성이며, 아미노산을 생성하는 균주가 수득된다.

수년 동안, 재조합 DNA 기술의 방법을 사용하여 또한 L-아미노산을 생산하는 코리네박테리움 균주를 개선시켜 왔다.

발명이 이루고자하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 일반적으로 아미노산의 발효에 의한 제조를 개선시키기 위한 신규한 방법을 제공하는 것이다.

아미노산, 특히 L-리신과 L-트레오닌은 동물 사료, 식료품 산업, 약제 산업 및 사람의 의약품에 사용되고 있다. 따라서, 이들 제품의 제조를 위한 개선된 새로운 방법을 제공하는 것이 일반적인 관심사이다.

발명의 구성 및 작용

본 발명은 서열 2의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드와의 상동성이 70% 이상인 폴리뉴클레오타이드 a),

언급된 폴리펩타이드를 암호화하고, 플라스미드 pEK-pckA(도 1) 및 pEK-pckB(도 2)에 함유된 폴리뉴클레오타이드와의 상동성이 70% 이상인 폴리뉴클레오타이드 b),

서열 2의 아미노산 서열과의 상동성이 70% 이상인 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 c),

위의 폴리뉴클레오타이드 a), b) 및 c)에 상보적인 폴리뉴클레오타이드 d) 및

위의 폴리뉴클레오타이드 서열 a), b), c) 및 d)의 15개 이상의 연속하는 염기를 포함하는 폴리뉴클레오타이드 e)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 코리네형 박테리아로부터 분리된 폴리뉴클레오타이드에 관한 것이다.

또한, 본 발명은 코리네형 미생물에서 복제가능하고 서열 1에 제시된, pck 유전자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 적어도 함유하는 코리네박테리움 기원의 바람직한 재조합 DNA를 제공한다.

또한, 본 발명은 서열 1에 제시된 뉴클레오타이드 서열(i) 또는

유전자 코드의 축소 범위내에서 서열(i)에 상응하는 하나 이상의 서열(ii) 또는

서열(i) 또는 서열(ii)에 상보적인 서열과 하이브리드화하는 하나 이상의 서열(iii) 및/또는 임의로

(i)에서 중성 기능을 갖는 센스 돌연변이체(iv)를 포함하는, 제1항에 따르는 복제가능한 DNA를 제공한다.

또한, 본 발명은 서열 1에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2항에 따른 폴리뉴클레오타이드,

서열 2에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 암호화하는 제2항에 따르는 폴리뉴클레오타이드,

도 1 및 도 2에 제시된, 제1항에 따르는 폴리뉴클레오타이드, 특히 pEK-pckA 또는 pEK-pckB를 함유하는 벡터 및

Δ pck 결실체가 삽입된, 숙주 세포로서 사용되는 코리네형 박테리아를 제공한다.

본 발명은 또한 서열 1에 상응하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 갖는 완전한 유전자를 포함하는 상응하는 유전자 라이브러리를 서열 1에 따르는 언급된 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 프로브 또는 이의 단편과 하이브리드화하여 스크리닝하고 언급된 DNA 서열을 분리하여 수득할 수 있는, 폴리뉴클레오타이드 서열을 실질적으로 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.

본 발명에 따르는 폴리뉴클레오타이드 서열은 전체 길이에서 포스포에놀 피루베이트 카복시키나제를 암

호화하는 cDNA를 분리하기 위한 및 포스포에놀 피루베이트 카복시키나제 유전자의 서열과 서열 유사성이 높은 cDNA 또는 유전자를 분리하기 위한 RNA, cDNA 및 DNA용 하이브리드화 프로브로서 적합하다.

본 발명에 따르는 폴리뉴클레오타이드 서열은 또한 폴리머라제 연쇄 반응(PCR)에 의해 포스포에놀 피루베이트 카복시키나제를 암호화하는 유전자의 DNA를 제조하기 위한 프라이머로서 적합하다.

프로브 또는 프라이머로서 사용되는 이러한 올리고뉴클레오타이드는 30개 이상, 바람직하게는 20개 이상, 특히 바람직하게는 15개 이상의 연속하는 염기를 포함한다. 40개 또는 50개 이상의 염기쌍 길이를 갖는 올리고뉴클레오타이드가 또한 적합하다.

"분리된"은 이의 천연 환경으로부터 분리된다는 것을 의미한다.

"폴리뉴클레오타이드"는 일반적으로 RNA 또는 DNA가 변형되거나 변형되지 않을 수 있는 폴리리보뉴클레오타이드 및 폴리데옥시리보뉴클레오타이드와 관련된다.

"폴리펩타이드"는 펩타이드 결합으로 연결된 2개 이상의 아미노산을 함유하는 펩타이드 또는 단백질을 의미한다.

본 발명에 따른 폴리펩타이드는 서열 2에 따르는 폴리펩타이드, 특히 PEP 카복시키나제의 생물학적 활성을 갖는 폴리펩타이드 및 또한 서열 2에 따르는 폴리펩타이드와의 상동성이 70% 이상, 바람직하게는 서열 2에 따르는 폴리펩타이드와의 상동성이 80% 이상 및 특히 90% 내지 95% 이상이고 상술된 활성을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다.

본 발명은 또한 특히 L-아미노산을 이미 생성하고 pck 유전자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 약독화, 특히 낮은 수준으로 발현시키는 코리네형 박테리아를 사용하여 L-아미노산, 특히 L-리신과 L-트레오닌을 발효에 의해 제조하는 방법을 제공한다.

이와 관련하여, 용어 "약독화"는 예를 들어 약한 프로모터 또는 활성이 낮은 상응하는 효소를 암호화하거나 상응하는 효소(단백질)를 불활성화시키는 유전자 또는 대립인자를 사용하고 임의로 이들 수단을 조합함으로써, 상응하는 DNA에 의해 암호화되어 있는 미생물에서 하나 이상의 효소(단백질)의 세포내 활성의 감소 또는 제거를 기술한다.

본 발명에 의해 제공되는 미생물은 글루코즈, 수크로즈, 락토즈, 프럭토즈, 말토즈, 당밀, 전분, 셀룰로즈 또는 글리세롤 및 에탄올로부터 L-아미노산, 특히 리신과 트레오닌을 생산할 수 있다. 이들 미생물은 대표적으로 코리네형 박테리아 및 특히 코리네박테리움속 박테리아를 포함할 수 있다. 코리네박테리움속 중에서, 코리네박테리움 글루타미쿰을 특히 언급할 수 있는데, 이는 L-아미노산의 생산능에 대해 전문가에게 널리 공지되어 있다.

코리네박테리움 속의 적합한 균주, 특히 코리네박테리움 글루타미쿰 종의 적합한 균주는 공지된 야생형 균주, 예를 들어

코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032,

코리네박테리움 아세토글루타미쿰(*C. acetoglutamicum*) ATCC15806,

코리네박테리움 아세토엑시도필룸(*C. acetoacidophilum*) ATCC13870,

코리네박테리움 테르모아미노게네스(*C. thermoaminogenes*) FERM BP-1539,

코리네박테리움 멜라세콜라(*C. melassecola*) ATCC17965,

브레비박테리움 플라붐(*Brevibacterium flavum*) ATCC14067,

브레비박테리움 락토퍼멘툼(*B. lactofermentum*) ATCC13869 및

브레비박테리움 디바리카툼(*B. divaricatum*) ATCC14020;

및 L-아미노산-생산 돌연변이체 또는 이로부터 제조된 균주,

예를 들어, L-리신 생산 균주로서

코리네박테리움 글루타미쿰 FERM-P 1709,

브레비박테리움 플라붐 FERM-P 1708,

브레비박테리움 락토퍼멘툼 FERM-P 1712,

코리네박테리움 글루타미쿰 FERM-P 6463,

코리네박테리움 글루타미쿰 FERM-P 6464 및

코리네박테리움 글루타미쿰 DSM 5714; 또는

예를 들어, L-트레오닌 생산 균주로서

코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC21649,

브레비박테리움 플라붐 BB69,

브레비박테리움 플라붐 DSM5399,

브레비박테리움 락토퍼멘툼 FERM-BP 269,

브레비박테리움 락토퍼멘툼 TBB-10,

코리네박테리움 글루타미쿰 MH20-22B-DR170I 있다.

본 발명자들은 효소 포스포에놀 피루베이트 카복시키나제(PEP 카복실라제)(EC 4.1.1.49)를 암호화하는 코리네박테리움 글루타미쿰의 새로운 pck 유전자를 분리하는데 성공하였다.

코리네박테리움 글루타미쿰의 pck 유전자 또는 기타 유전자를 분리하기 위해, 당해 미생물의 유전자 라이브러리를 이. 콜라이(E. coli)에서 먼저 작제한다. 유전자 라이브러리의 작제법은 일반적으로 익히 공지된 교과서 및 안내서에 기술되어 있다. 교과서[참조: Winnacker, Genes und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie[Genes and Clones, An Introduction to Genetic Engineering](Verlag Chemie, Weinheim, Germany, 1990) 또는 안내서[참조: Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)]가 예로서 언급될 수 있다. 매우 익히 공지된 유전자 라이브러리는 코하라(Kohara) 등[참조: Cell 50, 495-508 (1987)]에 의해 入 벡터내에서 작제된 이. 콜라이 K-12 균주 W3110의 라이브러리이다. 문헌[참조: Bathe et al., Molecular and General Genetics, 252, 255-265 (1996)]에는 코스미드 벡터 SuperCos I[참조: Wahl et al., 1987, Proceedings of the National Academy of Science USA, 84: 2160-2164]을 이용하여 이. 콜라이 K-12 균주 NM554[참조: Raleigh et al., 1988, Nucleic Acids Research 16: 1563-1575]내에서 작제된 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC 13032의 유전자 라이브러리가 기술되어 있다. 또한, 문헌[참조: Bormann et al., Molecular Microbiology 6(3), 317-326]에는 코스미드 pHCT9[참조: Hohn and Collins, Gene 11, 291-298(1980)]을 사용하는 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC 13032의 유전자 라이브러리가 기술되어 있다.

또한, 이. 콜라이내에서 코리네박테리움 글루타미쿰의 유전자 라이브러리를 제조하기 위해, 예를 들어 pBR322[참조: Bolivar, Life Sciences, 25, 807-818(1979)], pUC9[참조: Vieira et al., 1982, Gene, 19: 259-268], pACYC177[참조: Chang and Cohen, Journal of Bacteriology 134, 1141-1156(1978)] 또는 pSC101[참조: Cohen and Chang, Journal of Bacteriology 132, 734-737(1977)]와 같은 플라스미드 또는 플라스미드 벡터를 사용할 수 있다. 제한- 및 재조합-결합 이. 콜라이 균주가 특히 적합한 숙주이다.

이어서, 유전자 라이브러리를 형질전환[참조: Hanahan, Journal of Molecular Biology 166, 557-580, 1983] 또는 전기천공[참조: Tauch et al., 1994, FEMS Microbiological Letters, 123: 343-347]에 의해 지시 균주내로 삽입한다. 지시 균주의 특징은 검출가능한 표현형을 유발하는 당해 유전자내에 돌연변이를 갖는다는 것이다. 본 발명과 관련하여, 문헌[참조: Goldie and Sanwal, Journal of Bacteriology 141: 1115-1121(1980)]에 기술된 이. 콜라이 돌연변이체 HG4가 중요하다. 이 균주는 pck 유전자의 돌연변이를 포함하기 때문에, 탄소의 단독 공급원으로서 석시네이트상에서의 성장이 상당히 손상된다. pck 유전자를 함유하는 벡터로 형질전환시킴으로써 석시네이트상에서의 성장을 재-확립할 수 있다.

이어서, 코스미드 또는 기타 벡터의 보조하에 클로닝된 장쇄 DNA 단편을 짧은 DNA 단편의 형태로 공지된 플라스미드 벡터내로 서브클로닝할 수 있다. 그 결과, 특이적 DNA 절편에 대한 본 발명에 따르는 유전자의 정렬이 가능하다. 이를 위해, 선행 기술로부터 공지된 플라스미드 벡터, 예를 들어 pBR322[참조: Bolivar, Life Sciences, 25, 807-818(1979)] 또는 pSU 벡터[참조: Bartolome et al., Gene 102, 75-78(1991)]이 사용된다. 그러나, 에스케리키아 콜라이 및 코리네박테리움 글루타미쿰 모두에서 복제되는 셔플 벡터, 예를 들어 pZ1[참조: Menkel et al., Applied and Environmental Microbiology(1989) 64: 549-554] 또는 pEK0[참조: Eikmanns et al., Gene 102(1991)]을 바람직하게 사용하여 상기 두 종에서 조사를 수행할 수 있다. 이들의 예는 플라스미드 pEK-pckA(도 1) 및 pEK-pckB(도 2)인데, 이들은 플라스미드 벡터 pEK0으로부터 출발하여 제조되고 본 발명에 따르는 pck 유전자를 포함한다.

이어서, 이러한 방식으로 특성화된 DNA 절편을 DNA 서열분석에 적합한 통상의 벡터에 서브클로닝한다. 또는, 코스미드내에 클로닝된 긴 DNA 절편을 서열분석용 벡터내로 직접 서브클로닝할 수 있다. DNA 서열분석에 적합한 이러한 벡터의 예는 프로메가 코포레이션(Promega Corporation)(Promega Protocols and Application Guide, Second Edition, 1991, part number Y981, Promega Corporation, Madison, WI, USA)사의 플라스미드 pGEM-5zf(-) 또는 pGEM-5zf(+)이다.

DNA 서열분석 방법은 특히 문헌[참조: Sanger et al., Proceedings of the National of Sciences of the United States of America USA, 74: 5463-5467, 1977]에 기술되어 있다.

이어서, 수득된 DNA 서열은 예를 들어 문헌[참조: Staden(Nucleic Acids Research 14, 217-232(1986))]의 프로그램, 문헌[참조: Butler(Methods of Biochemical Analysis 39, 74-97(1998))]의 GCG 프로그램, 문헌[참조: Pearson and Lipman(Proceedings of the National Academy of Sciences USA 85, 2444-2448(1988))]의 FASTA 알고리즘 또는 문헌[참조: Altschul et al.(Nature Genetics 6, 119-129(1994))]의 BLAST 알고리즘과 같은 공지된 알고리즘 또는 서열 분석 프로그램으로 시험하고, 일반인이 접근가능한 데이터베이스에 존재하는 서열 목록과 비교할 수 있다. 일반인이 접근가능한 뉴클레오타이드 서열의 데이터베이스는 예를 들어 European Molecular Biologies Laboratories 데이터베이스(EMBL, Heidelberg, Germany) 또는 National Center for Biotechnology Information 데이터베이스(NCBI, Bethesda, MD, USA)이다.

pck 유전자를 암호화하고 서열 1과 같이 본 발명의 성분인 코리네박테리움 글루타미쿰의 새로운 DNA 서열은 이러한 방식으로 수득한다. 상응하는 단백질의 아미노산 서열은 또한 상술된 방법에 의해 본 DNA 서열로부터 유도된다. pck 유전자 생성물의 생성된 아미노산 서열은 서열 2에 제시되어 있다.

유전자 코드의 축퇴에 의해 서열 1로부터 수득되는 암호화 DNA 서열이 또한 본 발명의 성분이다. 동일한 방식으로, 서열 1 또는 서열 1의 일부와 하이브리드화하는 DNA 서열이 본 발명의 구성요소이다. 마지막으로, 서열 1로부터 수득되는 프라이머를 사용하는 폴리머라제 연쇄 반응(PCR)에 의해 제조되는 DNA 서열이 본 발명의 구성요소이다. 이러한 올리고뉴클레오타이드는 전형적으로 15개 이상의 염기쌍 길이

를 갖는다.

당업자는 특히 문헌[참조: "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" from Boehringer Mannheim GmbH(Mannheim, Germany, 1993)] 및 문헌[참조: Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology (1991) 41: 255-260)]에서 하이브리드화에 의해 DNA 서열을 확인하는 지침을 발견할 것이다. 당업자는 특히 문헌[참조: Gait: Oligonucleotide synthesis: a practical approach(IRL Press, Oxford, UK, 1984)] 및 문헌[참조: Newton & Graham: PCR(Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Germany, 1994)]에서 폴리머라제 연쇄 반응(PCR)을 사용하여 DNA 서열을 증폭시키는 지침을 발견할 수 있다.

본 발명자들은, pck 유전자를 약독화시킨 후, 코리네형 박테리아가 L-아미노산, 특히 리신과 트레오닌을 개선된 방법으로 생산한다는 것을 발견하였다.

약독화는 pck 유전자의 발현 또는 효소 단백질의 촉매적 특성을 감소시키거나 차단시킴으로써 달성될 수 있다. 두 가지 수단은 임의로 조합할 수도 있다.

유전자 발현의 감소는 적합한 배양에 의해 또는 유전자 발현의 시그널 구조물의 유전적 변형(돌연변이)에 의해 달성할 수 있다. 유전자 발현의 시그널 구조물은 예를 들어 억제인자 유전자, 활성인자 유전자, 오퍼레이터, 프로모터, 약독화인자, 리보솜 결합 부위, 출발 코돈 및 터미네이터이다. 당업자는 이와 관련한 정보를 문헌[참조: 특허원 제WO 96/15246호; Boyd and Murphy, Journal of Bacteriology 170: 5949(1988); Voskuil and Chambliss, Nucleic Acids Research 26: 3548(1998); Jensen and Hammer, Biotechnology and Bioengineering 58: 191(1998); Patek et al., Microbiology 142: 1297(1996)] 및 유전자 및 분자생물학의 공지된 교과서[참조: Knippers, "Molekulare Genetik[Molecular Genetics]", 6th edition, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Germany, 1995; Winnacker, "Gene und Klone[Genes and Clones]", VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany, 1990]에서 발견할 수 있다.

효소 단백질의 촉매적 특성을 변형 또는 감소시키는 돌연변이는 당 기술 분야에 공지되어 있다. 언급될 수 있는 문헌의 예는 다음과 같다: Qiu & Goodman, Journal of Biological Chemistry 272: 8611-8617(1997); Sugimoto et al., Bioscience Biotechnology and Biochemistry 61: 1760-1762(1997); Mockel, "Die Threonindehydratase aus Corynebacterium glutamicum: Aufhebung der allosterischen Regulation und Struktur des Enzyms[Threonine dehydratase from Corynebacterium glutamicum: Cancelling the allosteric regulation and structure of the enzyme]"; Julich Research Centre의 보고서, Jul-2906, ISSN09442952, Julich, Germany, 1994. 대표적인 기재는 유전자 및 분자생물학의 공지된 교과서[참조: Hagemann, "Allgemeine Genetik[General Genetics]", Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986]에서 발견할 수 있다.

가능한 돌연변이는 치환, 전좌, 삽입 및 결실이다. 효소 활성에 대한 아미노산의 교환 효과에 따라, 돌연변이는 미스센스 돌연변이 또는 논센스 돌연변이로 부를 수 있다. 유전자내에 하나 이상의 염기쌍의 삽입 또는 결실은 프레임 이동 돌연변이를 생성하며, 이에 의해 부정확한 아미노산이 삽입되거나 해독이 조기에 종결된다. 수개의 코돈의 결실은 통상 효소 활성을 완전히 파괴시킨다. 이러한 돌연변이를 생성하는 것에 대한 지침은 선행 기술에 포함되고, 유전학 및 분자생물학의 공지된 교과서, 예를 들어 문헌[참조: Knippers, "Molekulare Genetik[Molecular Genetics]", 6th edition, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Germany, 1995; Winnacker, "Gene und Klone[Genes and Clones]", VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany, 1990; Hagemann, "Allgemeine Genetik[General Genetics]", Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986]에서 발견할 수 있다.

돌연변이된 pck 유전자의 예는 플라스미드 pK19mobsacBΔpck에 함유된 Δpck 대립인자이다(도 3). Δpck 대립인자는 pck 유전자의 5' 및 3' 플랭킹 영역만을 함유하고, 암호화 영역 1071bp 길이의 절편은 소실되어 있다(결실). 이 Δpck 대립인자는 삽입 돌연변이유발에 의해 코리네형 박테리아에 삽입할 수 있다. 코리네박테리움 글루타미쿰에서 복제할 수 없는 상술된 플라스미드 pK19mobsacBΔpck가 여기에 사용된다. pck 유전자에서 삽입을 일으키는 제1 "교환" 및 분해를 일으키는 제2 "교환"에 의해 접합 또는 형질전환 및 상동성 재조합으로 이입시킨 후, Δpck 대립인자를 삽입하고 특정 균주에서 효소 기능을 완전히 소실시킨다.

삽입 돌연변이유발에 대한 지침 및 설명은 예를 들어 문헌[참조: Schwarzer & Puhler, Bio/Technology 9, 84-87(1991); Peters-Wendisch et al., Microbiology 144, 915-927(1998)]에서 발견할 수 있다.

약독화된 pck 유전자를 갖는 코리네형 박테리아의 아미노산-생산 균주의 예는 리신-생산 균주 MH20-22B Δpck 및 트레오닌-생산 균주 DM368-2Δpck이다.

또한, pck 유전자의 약독화 이외에, L-아미노산을 생산하기 위해서는 특정한 생합성 경로에서 하나 이상의 효소를 과발현시키는 것이 유리할 수 있다.

예를 들면, L-리신을 제조하는 경우, 디하이드로디피콜리네이트 신타제를 암호화하는 dapA 유전자를 동시에 과발현시키거나(EP-B 0 197 335),

S-(2-아미노에틸)시스테인 내성을 부여하는 DNA 단편을 동시에 증폭시킬 수 있다(EP-A 0 088 166).

따라서, 예를 들어 L-트레오닌을 제조하는 경우, 호모세린 데하이드로게나제[참조: Peoples et al., Molecular Microbiology 2, 63-72(1988)] 또는 "피드백 내성" 호모세린 데하이드로게나제[참조: Archer et al., Gene 107, 53-59(1991); Reinscheid et al., Journal of Bacteriology 173, 3228-3230(1991)]를 암호화하는 hom^{dr} 또는 hom^{FBR} 대립인자를 동시에 과발현시킬 수 있다.

pck 유전자를 약독화시키는 것과는 별도로, L-아미노산, 특히 리신과 트레오닌을 생산하기 위해서는 목적하지 않는 부반응을 제거하는 것이 바람직할 수 있다[참조: Nakayama: "Breeding of Amino Acid

Producing Micro-organisms", Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982].

본 발명에 따라 제조된 미생물은 L-아미노산, 특히 리신과 트레오닌을 생산하기 위해 배치식(배치 배양) 또는 유가식 또는 반복적인 유가식으로 연속 배양되거나 불연속적으로 배양된다. 공지된 배양 방법에 대한 요약은 교과서[참조: Chmiel, Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik[Bioprocess Technology 1. Introduction to Bioprocess Technology(Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991); Storhas, Bioreaktoren und periphere Einrichtungen[Bioreactors and Peripheral Equipment](Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)]에 기술되어 있다.

사용되는 배양 배지는 적당한 방식으로 특정 균주의 요구 조건을 충족시켜야만 한다. 다양한 미생물을 위한 배양 배지는 문헌[참조: "Manual of Methods for General Bacteriology" of the American Society for Bacteriology(Washington D.C., USA, 1981)]에 기술되어 있다. 당 및 탄수화물(예: 글루코즈, 수크로즈, 락토즈, 프럭토즈, 말토즈, 당밀, 전분 및 셀룰로즈), 오일 및 지방(예: 대두유, 해바라기유, 땅콩유 및 코코넛 지방), 지방산(예: 팔미트산, 스테아르산 및 리놀레산), 알콜(예: 글리세롤 및 에탄올) 및 유기산(예: 아세트산)이 탄소원으로서 사용될 수 있다. 이들 물질은 단독으로 또는 혼합물로서 사용될 수 있다. 유기 질소-함유 화합물(예: 펩톤, 효모 추출물, 고기 추출물, 맥아 추출물, 옥수수 침지액, 대두분 및 우레아) 또는 무기 화합물(예: 황산암모늄, 염화암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄 및 질산암모늄)이 질소원으로서 사용될 수 있다. 질소원은 단독으로 또는 혼합물로서 사용될 수 있다. 인산, 인산이수소칼륨 또는 인산수소이칼륨 또는 상응하는 나트륨 함유 염이 인 공급원으로서 사용될 수 있다. 배양 배지는 또한 증식을 위해 요구되는 황산마그네슘 또는 황산철과 같은 금속의 염을 포함해야만 한다. 최종적으로, 상기 언급된 물질 이외에도 필수 성장 물질(예: 아미노산 및 비타민)이 사용될 수 있다. 적당한 전구체가 또한 배양 배지에 첨가될 수 있다. 언급된 원료는 단일 배치로서 배양물에 첨가되거나 배양중에 적절한 방식으로 공급될 수 있다.

수산화나트륨, 수산화칼륨, 암모니아 또는 암모니아수와 같은 염기성 화합물 또는 인산 또는 황산과 같은 산성 화합물이 배양물의 pH를 조절하기 위해 적합한 방식으로 사용될 수 있다. 소포제(예: 지방산 폴리글리콜 에스테르)는 거품 형성을 조절하기 위해 사용될 수 있다. 플라스미드의 안정성을 유지시키기 위해, 선택적으로 작용하는 적합한 물질, 예를 들어 항생제가 배지에 첨가될 수 있다. 호기성 조건을 유지하기 위해, 산소 또는 산소 함유 기체 혼합물(예: 공기)을 배양물에 도입할 수 있다. 배양 온도는 일반적으로 20°C 내지 45°C이고, 바람직하게는 25°C 내지 40°C이다. 목적하는 L-아미노산의 최대량이 형성될 때까지 배양은 계속된다. 상기 목적은 일반적으로 10시간 내지 160시간내에 성취된다.

하기 미생물은 부다페스트 조약에 따라 도이체 잠룽 폰 미크로오르가니즘엔 운트 쉘쿨투렌(DSMZ=German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany)에 1999년 9월 17일자로 수탁 번호 DSM 13047호로 기탁되었다:

- DSM 13047로서 에스케리키아 콜라이 균주 DH5 α /pK19mobsacB Δ pck

본 발명에 따르는 방법은 코리네형 박테리아에 의해 L-아미노산, 특히 L-아스파르트산, L-아스파라긴산, L-호모세린, L-트레오닌, L-이소류신 및 L-메티오닌을 발효적으로 제조하기 위해, 특히 L-리신과 L-트레오닌을 제조하기 위해 사용된다.

실시에

본 발명은 하기 실시예를 이용하여 하기에 더욱 상세히 설명된다.

이를 위해, 특히 리신 생산자 코리네박테리움 글루타미쿰 균주 MH20-22B 및 트레오닌 생산자 브레비박테리움 플라툼 균주 DM368-2를 사용하여 실험을 수행한다. 균주 MH20-22B는 부다페스트 조약에 따라 도이체 잠룽 폰 미크로오르가니즘엔 운트 쉘쿨투렌(DSMZ, Brunschweig, Germany)에 DSM5715(EP-B-0435 132)로서 기탁되었고, 균주 DM368-2는 DSM5399(EP-B-0385 940)로서 기탁되었다.

실시예 1

pck 유전자의 분리

코리네박테리움 글루타미쿰으로부터 PEP 카복시키나제 유전자(pck)를 분리하기 위해, 코스미드 유전자 라이브러리를 공지된 방법[참조: Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Handbook, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press]에 의해 코스미드 pH79[참조: Hohn and Collins, Gene 11(1980) 291-298]에 기초하여 작제한다. 이를 위해, 염색체 DNA를 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032(Eikmanns et al., Microbiology 140(1994) 1817-1828)로부터 분리하고, 제한 효소 Sau3A로 부분적으로 분해한다. 생성된 단편을 코스미드 pH79의 BamHI 절단 부위에 연결시킨 후, 배치를 람다 박테리오파지의 단백질 엔벨로프에 패키징하고, 이것으로 이. 콜라이 균주 ED8654[참조: Murray et al. Molecular and General Genetics 150(1997) 53-61]를 형질감염시킨다. 재조합 코스미드를 문헌[참조: Sternberg et al., Gene 1(1979) 255-280]의 방법에 의해 람다 파지의 단백질 엔벨로프에 패키징하고, 이. 콜라이 ED8654의 형질감염을 문헌[참조: Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Handbook, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press]의 방법으로 수행한다. 상응하는 코스미드를 전체 30개의 생성된 재조합 이. 콜라이 클론[참조: Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Handbook, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press]으로부터 분리하고, 효소 HindIII으로 제한 분석한다. 20개의 코스미드는 삽입체를 포함하고 삽입체의 크기는 약 35kb인 것으로 밝혀졌다. 코스미드를 함유하는 전체 2200개의 이. 콜라이 클론을 합하고, 코스미드 DNA를 공지된 방법[참조: Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Handbook, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press]에 의해 이 혼합물로부터 제조한다.

코리네박테리움 글루타미쿰으로부터 pck 유전자를 분리하기 위해, 코스미드 유전자 라이브러리를 공지된

방법[참조: Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Handbook, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press]에 의해 PEP 카복시키나제-결함 이. 콜라이 돌연변이체 HG4[참조: Goldie and Sanwal, Journal of Bacteriology 141 (1980) 115-1121]내로 형질전환시킨다. 이것은 PEP 카복시키나제-결함이 있기 때문에, 돌연변이체 HG4는 더이상 탄소원으로서 석시네이트상에서 성장할 수 없다. 이러한 돌연변이체에 코스미드 유전자 라이브리리를 형질전환시킨 후, 전체 1200개 클론이 수득된다. 이들 중, 전체 2개의 클론은 탄소원으로서 석시네이트(0.4%)를 포함하는 M9 최소 배지[참조: Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Handbook, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press]상에서 성장하는 것으로 나타났다. 이들 클론으로부터의 상응하는 코스미드[참조: Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Handbook, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press]의 분리 후, 이. 콜라이 돌연변이체 HG4를 다시 형질전환시킨 결과, 수득된 클론은 탄소원으로서 석시네이트를 포함하는 M9 배지에서 다시 성장할 수 있다.

코리네박테리움 글루타미쿰으로부터 pck 유전자를 보다 작은 단편으로 제한하기 위해, 2개의 상보성 코스미드를 제한 효소 XhoI, ScaI 및 PvuII으로 분해하고, 공지된 방법[참조: Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Handbook, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press]에 의해 0.8% 아가로즈 겔상에서 전기장하에 분리한다. 크기가 3.0kb 이상인 단편을 전기용출[참조: Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Handbook, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press]에 의해 겔로부터 분리하고, 벡터 pEK0[참조: Eikmanns et al., Gene 102(1991) 93-98]의 SalI(XhoI-분해) 또는 클레노우-처리된 EcoRI 절단 부위(ScaI 및 PvuII 분해)에 연결한다. 이. 콜라이 HG4를 연결 배치로 형질전환시키고, 수득된 형질전환체를 탄소원 단독으로서 석시네이트상에서 성장하는 이들의 능력에 대해 다시 조사한다. 석시네이트상에서 돌연변이체 HG4를 성장시키는 플라스미드를 갖는 7개의 클론이 PvuII 연결 배치를 갖는 형질전환 배치에서 발견되었다. 상응하는 플라스미드는 재조합 균주로부터 분리하고, 제한지도작성한다. 7개의 모든 플라스미드는 동일한 4.3kb PvuII 삽입체를 포함하는 것으로 밝혀졌다(하나의 방향으로 3개 및 마주보는 방향으로 4개). 새롭게 작제된 플라스미드를 벡터내의 삽입체 배향에 따라 pEK-pckA 및 pEK-pckB로서 명명한다. 2개의 플라스미드의 제한 지도는 도 1 및 도 2에 제시되어 있다.

실시예 2

pck 구조 유전자 및 인접한 영역의 서열분석

서열분석을 위해, 대략 3.9kb의 EcoRI 단편을 공지된 방법으로 pEK-pckA(여기서, EcoRI 절단 부위는 벡터 pEK0로부터 기원한다)로부터 분리한다. 단편의 현수 말단을 충전하여 클레노우 폴리머라제[참조: Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Handbook, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press]로 말단 평활화시키고, 벡터 pGEM-5zf(+)(Promega Corporation, Madison, WI, USA)의 EcoRI 절단 부위에 연결시킨다. 이렇게 생성된 플라스미드의 삽입을 쇠-정지 서열분석 방법[참조: Sanger et al., Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 74(1977) 5463-5467]에 의해 서열분석한다. 이는 서열 1로서 제시된다. 3935bp의 생성된 뉴클레오타이드 서열은 Deutsche Krebsforschungszentrum (DKFZ=German Cancer Research Centre, Heidelberg, Germany)의 HUSAR 프로그램 패키지(release 3.0)으로 분석한다. 단편의 서열 분석은 610개 아미노산으로 이루어진 단백질을 암호화하는, 길이가 1830bp인 오픈 리딩 프레임을 나타냈다.

실시예 3

pck 유전자의 과발현

플라스미드 pEK-pckA 및 pEK-pckB를 전기천공에 의해 코리네박테리움 글루타미쿰 균주 ATCC13032내로 삽입하여 카나마이신(50 μ g/ml)-함유 BHI 아가 플레이트[참조: Liebl et al., FEMS Microbiology Letters 65(1989) 299-304]상에서 후속적으로 선별하고, 생성된 균주를 ATCC13032/pEK-pckA 및 ATCC13032/pEK-pckB로 명명한다. 이들 2개의 균주 및 출발 균주를 Luria-Bertani 복합 배지[참조: Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory manual(1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press]에서 배양하고, 문헌[참조: Bentle and Lardy, Journal of Biological Chemistry 251(1976) 2916-2921]에 기재된 방법에 따라 PEP 카복시키나제 시험을 수행한다. 분석 결과는 표 1에 제시되어 있으며, 플라스미드 pEK-pckA 및 pEK-pckB를 갖는 2개의 균주에서 PEP 카복시키나제 활성이 출발 균주보다 10 내지 12배 더 높음을 보여준다.

[표 1]

각종 균주에서 PEP 카복시키나제 활성

균주	PEP 카복시키나제(nmol/분/단백질 mg)
ATCC13032	120
ATCC13032/pEK-pckA	1270
ATCC13032/pEK-pckB	1510

실시예 4

pck 유전자의 결실 돌연변이유발을 위한 삽입 플라스미드의 제조

PEP 카복시키나제 유전자를 불활성화시키기 위해, pck 유전자의 EcoRI-SacI 단편을 벡터 pEK-pckB로부터 분리하고(도 2), 벡터 pGEM-7zf(+)(Promega Corporation, Madison, WI, USA)에 연결시킨다. pck-내부 1.07kb의 HindII-HindIII 단편을 생성된 플라스미드로부터 결실시키고, 1.07kb가 결실된 pck 유전자를

BfrI-SacI 단편으로서 분리하며, 현수 말단을 충전시킨 후 코리네박테리움 글루타미쿰에서 비-복제성인 벡터 pk19mobsacB내로 연결시킨다[참조: Schafer et al., Gene 145, 69-73(1994)]. 이러한 방식으로 작 제된 삽입 플라스미드 pk19mobsacBΔpck(도 3)에서, pck 유전자(350bp)의 5' 영역은 pck 유전자(340bp) 의 3' 영역에 직접 인접하고, 게놈에서 2개의 영역은 서로 1071bp까지 분리되어 있다. 이 단계까지의 모든 클로닝은 숙주로서 이. 콜라이 DH5α에서 수행한다.

실시예 5

리신 생산자 MH20-22B에서 pck 유전자의 결실 돌연변이유발

이어서, 이. 콜라이 S17-1을 삽입 플라스미드 pk19mobsacBΔpck[참조: Simon et al., Bio/Technology 1, 784-791(1983)]으로 형질전환시킨다. 이 균주는 접합[참조: Schafer et al., Journal of Bacteriology 172(1990) 1663-1666]에 의해 코리네박테리움 글루타미쿰으로 플라스미드를 전달한다. 리 신 생산 균주 코리네박테리움 글루타미쿰 MH20-22B를 접합 수용체[참조: Schrupf et al., Applied Microbiology and Biotechnology 37(1992) 566-571]로서 사용한다. 수개의 전환접합체를 이. 콜라이 S17-1/pk19mobsacBΔpck 및 코리네박테리움 글루타미쿰 MH20-22B 사이의 접합으로부터 수득한 다음 카나 마이신(25μg/ml) 및 날리딕산(50μg/ml)으로 Luria-Bertani 아가 플레이트상에서 선별한다. pck 유전자 와 함께 벡터의 분해를 유도하는 제2 재조합에 대한 선별을 위해, 이들 전환접합체를 1% 글루코즈를 함 유하는 항생제-비함유 Luria-Bertani 복합 배지[참조: Sambrook et al.; Molecular Cloning, A Laboratory manual(1989), Cold Spring Harbour Laboratory Press]상에서 배양한 다음 동일한 배지 + 10% 수크로즈상에 플레이팅한다. 벡터 pk19mobsacB상에 존재하는 sacB 유전자는 효소 레반(levan) 수크 라제를 암호화하고, 수크로즈로부터 레반의 합성을 유도한다. 레반은 코리네박테리움 글루타미쿰에 독 성이기 때문에, 삽입 플라스미드를 소실한 코리네박테리움 글루타미쿰 세포만이 수크로즈-함유 배지[참 조: Jager et al., Journal of Bacteriology 174(1992), 5462-5466]상에서 성장할 수 있다. 30개의 수 크로즈-내성 클론을 이들의 카나마이신 감수성에 대해 조사한다. 수크로즈 내성 이외에, 시험된 클론중 11개에 대해 목적하는 카나마이신 감수성을 또한 확인할 수 있다. 이들 11개의 클론에서, 벡터 배후가 또한 다시 제거되었다. 목적하는 결실이 또한 발생되었는지의 여부는 폴리머라제 연쇄 반응(PCR)에 의 한 분석으로 시험한다. 이를 위해, 염색체 DNA를 출발 균주의 콜로니 및 11개의 카나마이신-감수성 클 론의 콜로니로부터 유리시킨다. 이를 위해, 특정한 콜로니를 아가 플레이트로부터 이쑤시게로 제거하 고, 50μl H₂O에 현탁시켜 95℃에서 5분 동안 항온처리한다. 수득된 용액 1μl 분획을 PCR에서 주형으로서 사용한다. 서열 1의 뉴클레오타이드 2136 내지 2158 및 3815 내지 3793 영역을 포함하는 올리고뉴클레 오타이드를 프라이머로서 사용한다. PCR 조건은 다음과 같다: 94℃에서 150초간 선행 변성; 94℃에서 60초간 변성; 60℃에서 30초간 하이브리드화; 72℃에서 120초간 증폭; 30주기, 72℃에서 240초간 말단 신장. 선택된 프라이머에 기초하여, 1.68kb의 PCR 생성물은 배치에서 출발 균주의 DNA를 갖는 것으로 예상된다. 0.61kb의 PCR 생성물은 PCR에서 pck 결실 돌연변이체를 갖는 것으로 예상된다. 0.61kb 크기 의 PCR 생성물은 하나의 클론에 의해 수득되었다. 이러한 클론내에 내부 1071bp pck 단편을 갖는 목적 하는 결실은 이에 의해 입증되었다. 이 클론은 MH20-22BΔpck로서 명명한다. 1.68kb PCR 생성물은 다 른 클론의 배치에서 검출된다. 이들에서, 벡터는 게놈 출발 상황이 재확립되도록 분해된다.

균주 MH20-22BΔpck 및 출발 균주 MH20-22B를 Luria-Bertani 복합 배지 + 1% 글루코즈에서 성장시키고, 문헌[참조: Bente and Lardy, Journal of Biological Chemistry 251(1976) 2916-2921]에 기술된 방법에 따라 PEP 카복시키나제 시험을 수행한다. 분석 결과(표 2)는, 출발 균주 MH20-22B와는 대조적으로, 돌 연변이체 MH20-22BΔpck에서 PEP 카복시키나제 활성을 더이상 검출할 수 없음을 나타낸다.

[표 2]

각종 균주에서 PEP 카복시키나제 활성

균주	PEP 카복시키나제(nmol/분/단백질 mg)
MH20-22B	65
MH20-22BΔpck	<3*
* 3nmol/분/단백질 mg은 검출 한계이다.	

실시예 6

L-리신의 생산

리신 생산에 대한 PEP 카복시키나제 유전자의 불활성화 효과를 조사하기 위해, 균주 MH20-22B[참조: Schrupf et al., Applied Microbiology and Biotechnology 1992, 37: 566-571] 및 PEP 카복시키나제-네 가티브 돌연변이체 MH20-22BΔpck(실시예 5)를 Luria-Bertani 복합 배지 + 1% 글루코즈에서 배양하고, 발효 배지 CGXII[참조: Keilhauer et al., Journal of Bacteriology 1993, 175: 5595-5603]을 2개의 예 비-배양물(5% 이노쿨럼, 600nm에서의 광학 밀도 약 0.5)로부터 접종한다. 상기 배지는 또한 3mM 루신을 포함하는데, 이는 상기 2개의 균주가 루신-영양요구성이기 때문이다. 배지는 각각 배플을 갖는 500ml 원뿔형 플라스크에서 수득한 60ml 배양물을 포함한다. 24시간 동안 28℃에서 Certomat S/50 유형[참조: B. Braun Biotech International, Melsungen, Germany]의 회전 진탕 기계상에서 120rpm으로 배양한 후, 배지내로 분비된 리신의 농도를 측정한다.

아미노산 농도는 고압 액체 크로마토그래피[참조: Jones und Gilligan, Journal of Chromatography 1983, 266: 471-482]에 의해 측정한다. 발효 결과는 표 3에 제시되어 있다.

[표 3]

균주 MH20-22B 및 MH20-22B Δpck의 배양 상청액중 리신 농도

균주	L-리신(mM)
MH20-22B	54
MH20-22B Δpck	65

실시예 7

트레오닌 생산자 DM368-2에서 pck 유전자의 결실 돌연변이유발

리신 생산자 MH20-22B의 경우에서와 같이, 제1 및 제2 재조합에 대한 후속적인 선별과 함께 이. 콜라이 균주 S17-1/pk19mobsacB Δpck를 사용하여 트레오닌 생산자 DM368-2와의 접합을 수행한다(실시예 5 참조). 30개의 수크로즈-내성 클론 중에서, 14개의 클론은 카나마이신-감수성이다. 이들 중에서, pck 유전자내의 1071bp 결실은 실시예 5에 기재된 PCR 분석을 이용하여 DM368-2 Δpck16 및 DM368-2 Δpck18로 명명된 2개의 클론중에서 검출할 수 있다.

출발 균주 DM368-2 및 2개의 pck 결실 균주 DM368-2 Δpck16 및 DM368-2 Δpck18을 사용한 효소 시험을 실시예 5에 기술된 바와 같이 수행한 결과, 이들 돌연변이체에서 어떠한 PEP 카복시키나제 활성도 검출되지 않는 것으로 나타났다(표 4).

[표 4]

각종 균주에서 PEP 카복시키나제 활성

균주	PEP 카복시키나제(nmol/분/단백질 mg)
DM368-2	79
DM368-2B Δpck16	<3*
DM368-2B Δpck18	<3*
* 3nmol/분/단백질 mg은 검출 한계이다.	

실시예 8

L-트레오닌의 생산

L-리신 생산에 대한 실험과 유사하게, PEP 카복시키나제-결함 균주 DM368-2B Δpck16의 배양 상청액중 트레오닌의 축적을 출발 균주 DM368-2와 비교하여 조사한다. 이를 위해, 2개의 균주를 Luria-Bertani 복합 배지 + 1% 글루코즈에서 배양하고, 발효 배지 CGXII를 예비배양물로부터 접종한다. 24시간 동안 28 °C에서 회전 진탕 기계상에서 120rpm으로 배양한 후, 배지로 분비된 트레오닌의 농도를 측정한다.

아미노산 농도는 고압 액체 크로마토그래피(상기 참조)에 의해 측정한다. 발효 결과는 표 5에 제시되어 있다.

[표 5]

균주 DM368-2 및 DM368-2 Δpck16의 배양 상청액중 트레오닌 농도

균주	L-트레오닌(mM)
DM368-2	8
DM368-2 Δpck16	22

도에서 사용된 약어 및 명칭은 다음과 같이 정의된다:

sacB: sacB 유전자

ori V: 복제 기점 V

ori T: 전달 복제 기점

Km-r: 카나마이신 내성

KpnI: 제한 효소 KpnI의 절단 부위

HindIII: 제한 효소 HindIII의 절단 부위

HindII: 제한 효소 HindII의 절단 부위

PstI: 제한 효소 PstI의 절단 부위

SphI: 제한 효소 SphI의 절단 부위
 XbaI: 제한 효소 XbaI의 절단 부위
 SalI: 제한 효소 SalI의 절단 부위
 SacI: 제한 효소 SacI의 절단 부위
 BfrI: 제한 효소 BfrI의 절단 부위
 Scal: 제한 효소 Scal의 절단 부위
 BamHI: 제한 효소 BamHI의 절단 부위
 EcoRI: 제한 효소 EcoRI의 절단 부위
 pck': pck 유전자의 3' 말단 단편
 pck": pck 유전자의 5' 말단 단편
 pck: pck 유전자

발명의 효과

본 발명에 따라, 발효에 의해 아미노산을 개선된 방법으로 제조할 수 있다.

<110> Degussa-Huls AG
 Forschungszentrum Julich GmbH
 <120> Nucleotide sequences which code for the pck gene
 <130> 519990243334; 519980826110
 <150> DE 199 50 409.1
 <151> 1999-10-20
 <160> 2
 <170> KOPATIN 1.5
 <210> 1
 <211> 3935
 <212> DNA
 <213> Corynebacterium glutamicum
 <220>
 <221> CDS
 <222> (2022)..(3851)
 <400> 1

ctggcagttc tcctaattga tcgcgggaat tatcagaaat agacattatt tgttatTTTT	60
cctgttcaac tttaaaactt caatatctgt gagtttggat gaatccctag agcactacct	120
tttagacctc tcgctgcaat ttaggccagt tgagatttaa gctttccgac gattcttctc	180
attactgcaa tcgtaccggc gatggtggac acgatgacat gaaagagcat taaagcaatc	240
aagtacaggc tgaagtagtt aaaccactcc actccggtgc tctgtgataa aaaatgcgca	300
cccaaaactca aagtgccaac tgggaaggta ctggcccacc atgtggggct gtatgtcgcc	360
cctttgaaaa cagctctgta gaacacaaag tgagcgatgg ctcccagagg aatcgtaaaa	420
attcccatga tgatgccgta aataatgccc attgtgattg ctgtcttggg tccaaaggac	480
gcaccgatga gctgagctgc tgcagtggat tggcccacca taccacaaagg aatccatgat	540
gttgggtgtg ccatcagtgg gatgccctgc gccttggggc cgaaatagta gaaatacact	600
cggttaaaaa ctgctggtgc agacgcaaaa gttaaaagga agagcccgaa agaaaccac	660
agcatcgccg gaagttcaaa gtgctcatgg agttgtgctg ccgaggtgga agcaaccatc	720
ggcgtgacaa gaggaagacc ccacgcaaaa gttggtgtgc ccgccttaga tcgcaaaatg	780
gccgttataat ataaggaata ggcaacaagt ccacaggctg tgccaataga ccagcacaca	840
aacataaatc ccacagatc atcacccaaa actacggggc ttgcagttcc caatgcgac	900

aaacccatgg acagcattgc ccatgccggc atgacttcag ttttgaatga aggagagcgg	960
tagattagcc aaccgccaat aatgacaatt gccaccacaa cagctaacgc gaagaagaaa	1020
tctgcgacga ctggaaaacc atggattttc aacagtgatg acaacaatga gatgcccatg	1080
aggggaaccag cccacgaggg gccagggtgga ggtaagaccg cagcgtagct tttggtcgaa	1140
gaaggagtgg gcatgcccat tactttaagc ctttggggca gtgaaaccgc taaatgggag	1200
cgttgtgcgc tcgatcactg gtctagacct ttgggtccca aaagtgtcaa tttcggaat	1260
acttcaacac ttgtttgcaa tgtttgttaa taaatgggtt cgctagtgga ttctgtcgtt	1320
agtactggcc gtctgtgttg ggtcatgtat ttaggtaggg caaagttaag atcagagcac	1380
tttttgatac gactaactgg atataacctt tggggtaacg tggggatgtg tgtgagtaat	1440
tttcaaagta tttaaaaggg ggatctaggg taaaaattt gcttcaagta catatcttta	1500
gttcggtagt tgagggcggg tggtagacagt gcgggcatgc atgtgagtgt aaatgttgtt	1560
ttaaaaaggt gtgtactgac agtgggccgg tttgtgctgg tcggccacta gcggagtgt	1620
tggattgtga tggcagggtg agggaaaagg attaccatta ccgctgttct tggcgttttg	1680
ttgcctattg tccgaatgtt aagtgttaat ggtgggaaaa ctgggaaagt tgtcccttg	1740
aatgtgtgag aattgcccaa atctgaaccc aatggccatg gacggggaat gaactgtcgg	1800
agaacggttg aggttaattc ttgaaccac ccccaaaata ggctatttaa acgggtgctc	1860
tcatattaaa gaaagtgtgt agatgcgtgt gggcaggggg taggtccact ggtaatgaca	1920
aatgtgtccg ttgtctcacc taaagtttta actagtctg tatctgaaag ctacgctagg	1980
gggcgagaac tctgtcgaat gacacaaaat ctggagaagt a atg act act	2030
Met Thr Thr	
1	
gct gca atc agg ggc ctt cag ggc gag gcg ccg acc aag aat aag gaa	2078
Ala Ala Ile Arg Gly Leu Gln Gly Glu Ala Pro Thr Lys Asn Lys Glu	
5 10 15	
ctg ctg aac tgg atc gca gac gcc gtc gag ctc ttc cag cct gag gct	2126
Leu Leu Asn Trp Ile Ala Asp Ala Val Glu Leu Phe Gln Pro Glu Ala	
20 25 30 35	
gtt gtg ttc gtt gat gga tcc cag gct gag tgg gat cgc atg gcg gag	2174
Val Val Phe Val Asp Gly Ser Gln Ala Glu Trp Asp Arg Met Ala Glu	
40 45 50	
gat ctt gtt gaa gcc ggt acc ctc atc aag ctc aac gag gaa aag cgt	2222
Asp Leu Val Glu Ala Gly Thr Leu Ile Lys Leu Asn Glu Glu Lys Arg	
55 60 65	
ccg aac agc tac cta gct cgt tcc aac cca tct gac gtt gcg cgc gtt	2270
Pro Asn Ser Tyr Leu Ala Arg Ser Asn Pro Ser Asp Val Ala Arg Val	
70 75 80	
gag tcc cgc acc ttc atc tgc tcc gag aag gaa gaa gat gct ggc cca	2318
Glu Ser Arg Thr Phe Ile Cys Ser Glu Lys Glu Glu Asp Ala Gly Pro	
85 90 95	
acc aac aac tgg gct cca cca cag gca atg aag gac gaa atg tcc aag	2366
Thr Asn Asn Trp Ala Pro Pro Gln Ala Met Lys Asp Glu Met Ser Lys	
100 105 110 115	
cat tac gct ggt tcc atg aag ggg cgc acc atg tac gtc gtg cct ttc	2414
His Tyr Ala Gly Ser Met Lys Gly Arg Thr Met Tyr Val Val Pro Phe	

120	125	130	
tgc atg ggt cca atc agc gat ccg gac cct aag ctt ggt gtg cag ctc			2462
Cys Met Gly Pro Ile Ser Asp Pro Asp Pro Lys Leu Gly Val Gln Leu			
135	140	145	
act gac tcc gag tac gtt gtc atg tcc atg cgc atc atg acc cgc atg			2510
Thr Asp Ser Glu Tyr Val Val Met Ser Met Arg Ile Met Thr Arg Met			
150	155	160	
ggt att gaa gcg ctg gac aag atc ggc gcg aac ggc agc ttc gtc agg			2558
Gly Ile Glu Ala Leu Asp Lys Ile Gly Ala Asn Gly Ser Phe Val Arg			
165	170	175	
tgc ctc cac tcc gtt ggt gct cct ttg gag cca ggc cag gaa gac gtt			2606
Cys Leu His Ser Val Gly Ala Pro Leu Glu Pro Gly Gln Glu Asp Val			
180	185	190	195
gca tgg cct tgc aac gac acc aag tac atc acc cag ttc cca gag acc			2654
Ala Trp Pro Cys Asn Asp Thr Lys Tyr Ile Thr Gln Phe Pro Glu Thr			
200	205	210	
aag gaa att tgg tcc tac ggt tcc ggc tac ggc gga aac gca atc ctg			2702
Lys Glu Ile Trp Ser Tyr Gly Ser Gly Tyr Gly Gly Asn Ala Ile Leu			
215	220	225	
gca aag aag tgc tac gca ctg cgt atc gca tct gtc atg gct cgc gaa			2750
Ala Lys Lys Cys Tyr Ala Leu Arg Ile Ala Ser Val Met Ala Arg Glu			
230	235	240	
gaa gga tgg atg gct gag cac atg ctc atc ctg aag ctg atc aac cca			2798
Glu Gly Trp Met Ala Glu His Met Leu Ile Leu Lys Leu Ile Asn Pro			
245	250	255	
gag ggc aag gcg tac cac atc gca gca gca ttc cca tct gct tgt ggc			2846
Glu Gly Lys Ala Tyr His Ile Ala Ala Ala Phe Pro Ser Ala Cys Gly			
260	265	270	275
aag acc aac ctc gcc atg atc act cca acc atc cca ggc tgg acc gct			2894
Lys Thr Asn Leu Ala Met Ile Thr Pro Thr Ile Pro Gly Trp Thr Ala			
280	285	290	
cag gtt gtt ggc gac gac atc gct tgg ctg aag ctg cgc gag gac ggc			2942
Gln Val Val Gly Asp Asp Ile Ala Trp Leu Lys Leu Arg Glu Asp Gly			
295	300	305	
ctc tac gca gtt aac cca gaa aat ggt ttc ttc ggt gtt gct cca ggc			2990
Leu Tyr Ala Val Asn Pro Glu Asn Gly Phe Phe Gly Val Ala Pro Gly			
310	315	320	
acc aac tac gca tcc aac cca atc gcg atg aag acc atg gaa cca ggc			3038
Thr Asn Tyr Ala Ser Asn Pro Ile Ala Met Lys Thr Met Glu Pro Gly			
325	330	335	
aac acc ctg ttc acc aac gtg gca ctc acc gac gac ggc gac atc tgg			3086
Asn Thr Leu Phe Thr Asn Val Ala Leu Thr Asp Asp Gly Asp Ile Trp			
340	345	350	355
tgg gaa ggc atg gac ggc gac gcc cca gct cac ctc att gac tgg atg			3134
Trp Glu Gly Met Asp Gly Asp Ala Pro Ala His Leu Ile Asp Trp Met	360		365

370

ggc aac gac tgg acc cca gag tcc gac gaa aac gct gct cac cct aac	3182
Gly Asn Asp Trp Thr Pro Glu Ser Asp Glu Asn Ala Ala His Pro Asn	
375 380 385	
tcc cgt tac tgc gta gca atc gac cag tcc cca gca gca gca cct gag	3230
Ser Arg Tyr Cys Val Ala Ile Asp Gln Ser Pro Ala Ala Ala Pro Glu	
390 395 400	
ttc aac gac tgg gaa ggc gtc aag atc gac gca atc ctc ttc ggt gga	3278
Phe Asn Asp Trp Glu Gly Val Lys Ile Asp Ala Ile Leu Phe Gly Gly	
405 410 415	
cgt cgc gca gac acc gtc cca ctg gtt acc cag acc tac gac tgg gag	3326
Arg Arg Ala Asp Thr Val Pro Leu Val Thr Gln Thr Tyr Asp Trp Glu	
420 425 430 435	
cac ggc acc atg gtt ggt gca ctg ctc gca tcc ggt cag acc gca gct	3374
His Gly Thr Met Val Gly Ala Leu Leu Ala Ser Gly Gln Thr Ala Ala	
440 445 450	
tcc gca gaa gca aag gtc ggc aca ctc cgc cac gac cca atg gca atg	3422
Ser Ala Glu Ala Lys Val Gly Thr Leu Arg His Asp Pro Met Ala Met	
455 460 465	
ctc cca ttc att ggc tac aac gct ggt gaa tac ctg cag aac tgg att	3470
Leu Pro Phe Ile Gly Tyr Asn Ala Gly Glu Tyr Leu Gln Asn Trp Ile	
470 475 480	
gac atg ggt aac aag ggt ggc gac aag atg cca tcc atc ttc ctg gtc	3518
Asp Met Gly Asn Lys Gly Gly Asp Lys Met Pro Ser Ile Phe Leu Val	
485 490 495	
aac tgg ttc cgc cgt ggc gaa gat gga cgc ttc ctg tgg cct ggc ttc	3566
Asn Trp Phe Arg Arg Gly Glu Asp Gly Arg Phe Leu Trp Pro Gly Phe	
500 505 510 515	
ggc gac aac tct cgc gtt ctg aag tgg gtc atc gac cgc atc gaa ggc	3614
Gly Asp Asn Ser Arg Val Leu Lys Trp Val Ile Asp Arg Ile Glu Gly	
520 525 530	
cac gtt ggc gca gac gag acc gtt gtt gga cac acc gct aag gcc gaa	3662
His Val Gly Ala Asp Glu Thr Val Val Gly His Thr Ala Lys Ala Glu	
535 540 545	
gac ctc gac ctc gac ggc ctc gac acc cca att gag gat gtc aag gaa	3710
Asp Leu Asp Leu Asp Gly Leu Asp Thr Pro Ile Glu Asp Val Lys Glu	
550 555 560	
gca ctg acc gct cct gca gag cag tgg gca aac gac gtt gaa gac aac	3758
Ala Leu Thr Ala Pro Ala Glu Gln Trp Ala Asn Asp Val Glu Asp Asn	
565 570 575	
gcc gag tac ctc act ttc ctc gga cca cgt gtt cct gca gag gtt cac	3806
Ala Glu Tyr Leu Thr Phe Leu Gly Pro Arg Val Pro Ala Glu Val His	
580 585 590 595	
agc cag ttc gat gct ctg aag gcc cgc att tca gca gct cac gct	3851

Ser Gln Phe Asp Ala Leu Lys Ala Arg Ile Ser Ala Ala His Ala
600 605 610
taaagttca cgcttaagaa ctgctaaata acaagaaagg ctcccaccga aagtgggagc 3910
ctttcttgtc gtttaagcgat gaatt 3935
<210> 2
<211> 610
<212> PRT
<213> Corynebacterium glutamicum
<400> 2
Met Thr Thr Ala Ala Ile Arg Gly Leu Gln Gly Glu Ala Pro Thr Lys
1 5 10 15
Asn Lys Glu Leu Leu Asn Trp Ile Ala Asp Ala Val Glu Leu Phe Gln
20 25 30
Pro Glu Ala Val Val Phe Val Asp Gly Ser Gln Ala Glu Trp Asp Arg
35 40 45
Met Ala Glu Asp Leu Val Glu Ala Gly Thr Leu Ile Lys Leu Asn Glu
50 55 60
Glu Lys Arg Pro Asn Ser Tyr Leu Ala Arg Ser Asn Pro Ser Asp Val
65 70 75 80
Ala Arg Val Glu Ser Arg Thr Phe Ile Cys Ser Glu Lys Glu Glu Asp
85 90 95
Ala Gly Pro Thr Asn Asn Trp Ala Pro Pro Gln Ala Met Lys Asp Glu
100 105 110
Met Ser Lys His Tyr Ala Gly Ser Met Lys Gly Arg Thr Met Tyr Val
115 120 125
Val Pro Phe Cys Met Gly Pro Ile Ser Asp Pro Asp Pro Lys Leu Gly
130 135 140
Val Gln Leu Thr Asp Ser Glu Tyr Val Val Met Ser Met Arg Ile Met
145 150 155 160
Thr Arg Met Gly Ile Glu Ala Leu Asp Lys Ile Gly Ala Asn Gly Ser
165 170 175
Phe Val Arg Cys Leu His Ser Val Gly Ala Pro Leu Glu Pro Gly Gln
180 185 190
Glu Asp Val Ala Trp Pro Cys Asn Asp Thr Lys Tyr Ile Thr Gln Phe
195 200 205
Pro Glu Thr Lys Glu Ile Trp Ser Tyr Gly Ser Gly Tyr Gly Gly Asn
210 215 220
Ala Ile Leu Ala Lys Lys Cys Tyr Ala Leu Arg Ile Ala Ser Val Met
225 230 235 240
Ala Arg Glu Glu Gly Trp Met Ala Glu His Met Leu Ile Leu Lys Leu
245 250 255
Ile Asn Pro Glu Gly Lys Ala Tyr His Ile Ala Ala Ala Phe Pro Ser
260 265 270
Ala Cys Gly Lys Thr Asn Leu Ala Met Ile Thr Pro Thr Ile Pro Gly

275	280	285
Trp Thr Ala Gln Val Val Gly Asp Asp Ile Ala Trp Leu Lys Leu Arg		
290	295	300
Glu Asp Gly Leu Tyr Ala Val Asn Pro Glu Asn Gly Phe Phe Gly Val		
305	310	315
Ala Pro Gly Thr Asn Tyr Ala Ser Asn Pro Ile Ala Met Lys Thr Met		
325	330	335
Glu Pro Gly Asn Thr Leu Phe Thr Asn Val Ala Leu Thr Asp Asp Gly		
340	345	350
Asp Ile Trp Trp Glu Gly Met Asp Gly Asp Ala Pro Ala His Leu Ile		
355	360	365
Asp Trp Met Gly Asn Asp Trp Thr Pro Glu Ser Asp Glu Asn Ala Ala		
370	375	380
His Pro Asn Ser Arg Tyr Cys Val Ala Ile Asp Gln Ser Pro Ala Ala		
385	390	395
Ala Pro Glu Phe Asn Asp Trp Glu Gly Val Lys Ile Asp Ala Ile Leu		
405	410	415
Phe Gly Gly Arg Arg Ala Asp Thr Val Pro Leu Val Thr Gln Thr Tyr		
420	425	430
Asp Trp Glu His Gly Thr Met Val Gly Ala Leu Leu Ala Ser Gly Gln		
435	440	445
Thr Ala Ala Ser Ala Glu Ala Lys Val Gly Thr Leu Arg His Asp Pro		
450	455	460
Met Ala Met Leu Pro Phe Ile Gly Tyr Asn Ala Gly Glu Tyr Leu Gln		
465	470	475
Asn Trp Ile Asp Met Gly Asn Lys Gly Gly Asp Lys Met Pro Ser Ile		
485	490	495
Phe Leu Val Asn Trp Phe Arg Arg Gly Glu Asp Gly Arg Phe Leu Trp		
500	505	510
Pro Gly Phe Gly Asp Asn Ser Arg Val Leu Lys Trp Val Ile Asp Arg		
515	520	525
Ile Glu Gly His Val Gly Ala Asp Glu Thr Val Val Gly His Thr Ala		
530	535	540
Lys Ala Glu Asp Leu Asp Leu Asp Gly Leu Asp Thr Pro Ile Glu Asp		
545	550	555
Val Lys Glu Ala Leu Thr Ala Pro Ala Glu Gln Trp Ala Asn Asp Val		
565	570	575
Glu Asp Asn Ala Glu Tyr Leu Thr Phe Leu Gly Pro Arg Val Pro Ala		
580	585	590
Glu Val His Ser Gln Phe Asp Ala Leu Lys Ala Arg Ile Ser Ala Ala		
595	600	605
His Ala		
610		

(57) 청구의 범위

청구항 1

서열 2의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드와의 상동성이 70% 이상인 폴리뉴클레오타이드 a),

언급된 폴리펩타이드를 암호화하고 플라스미드 pEK-pckA(도 1) 또는 pEK-pckB(도 2)에 함유된 폴리뉴클레오타이드와의 상동성이 70% 이상인 폴리뉴클레오타이드 b),

서열 2의 아미노산 서열과의 상동성이 70% 이상인 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 c),

위의 폴리뉴클레오타이드 a), b) 또는 c)에 상보성인 폴리뉴클레오타이드 d) 및

위의 폴리뉴클레오타이드 서열 a), b), c) 및 d)의 15개 이상의 연속하는 염기를 포함하는 폴리뉴클레오타이드 e)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 코리네형 박테리아로부터 분리된 폴리뉴클레오타이드.

청구항 2

제1항에 있어서, 폴리뉴클레오타이드가 복제가능한, 바람직하게는 재조합 DNA인 폴리뉴클레오타이드.

청구항 3

제1항에 있어서, 폴리뉴클레오타이드가 RNA인 폴리뉴클레오타이드.

청구항 4

제2항에 있어서, 서열 1에 제시된 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드.

청구항 5

제2항에 있어서, 서열 1에 제시된 뉴클레오타이드 서열(i) 또는

유전자 코드의 축퇴 범위내에서 서열(i)에 상응하는 하나 이상의 서열(ii) 또는

서열(i) 또는 서열(ii)에 상보성인 서열과 하이브리드화하는 하나 이상의 서열(iii) 및/또는 임의로 (i)에서 중성 기능을 갖는 센스 돌연변이체(iv)를 포함하는, 복제가능한 DNA.

청구항 6

제2항에 있어서, 서열 2에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열.

청구항 7

도 1에 제시된 벡터 pEK-pckA.

청구항 8

도 2에 제시된 벡터 pEK-pckB.

청구항 9

도 3에 제시되고 균주 이. 콜라이 DH5 α 로서 기탁번호 DSM 13047하에 기탁된 벡터 pk19mobsacB Δ pck.

청구항 10

제6항 내지 제8항 중의 어느 한 항에 따른 벡터중 하나를 함유하거나 Δ pck 결실체가 도입되어 있는, 숙주 세포로서 사용되는 코리네형 박테리아.

청구항 11

제1항에 따른 폴리뉴클레오타이드가 약독화되거나, 위의 폴리뉴클레오타이드를 암호화하는 폴리펩타이드의 활성이 감소된 박테리아 a),

목적 생성물이 배지 또는 박테리아 세포에서 농축된 박테리아 b) 및

생성물이 분리된 박테리아 c)를 사용하는, 발효에 의한 L-아미노산의 제조 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) 속 박테리아가 사용되는 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 약독화가 도 3에 제시되고 DSM 13047로서 기탁된 플라스미드 pK19mobsacB Δ pck의 보조하에 삽입 돌연변이유발에 의해 수행되는 방법.

청구항 14

제12항에 있어서, 임의로 디하이드로디피콜리네이트 신타제를 암호화하는 *dapA* 유전자를 동시에 과발현시키고/시키거나,

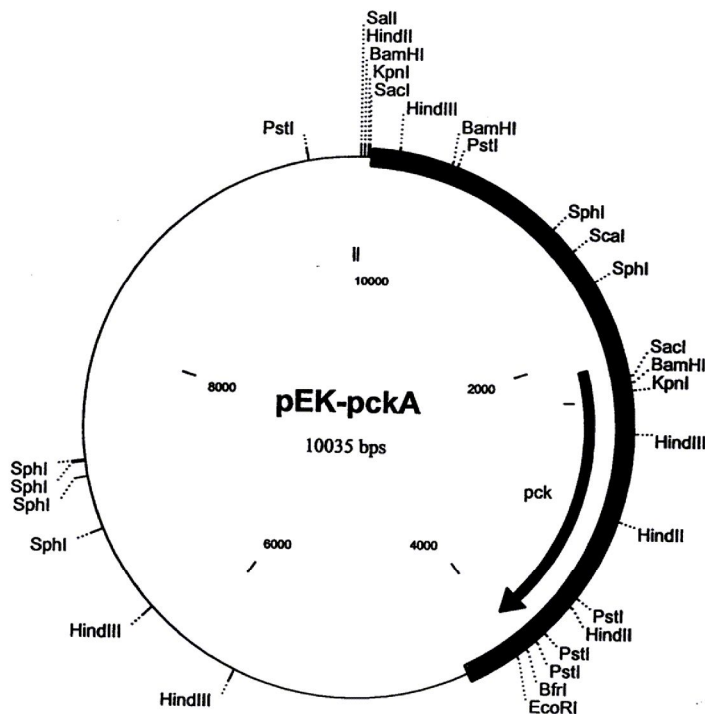
S-(2-아미노에틸)시스테인 내성을 부여하는 DNA 단편을 동시에 증폭시키는 박테리아를 발효시켜 L-리신을 제조하는 방법.

청구항 15

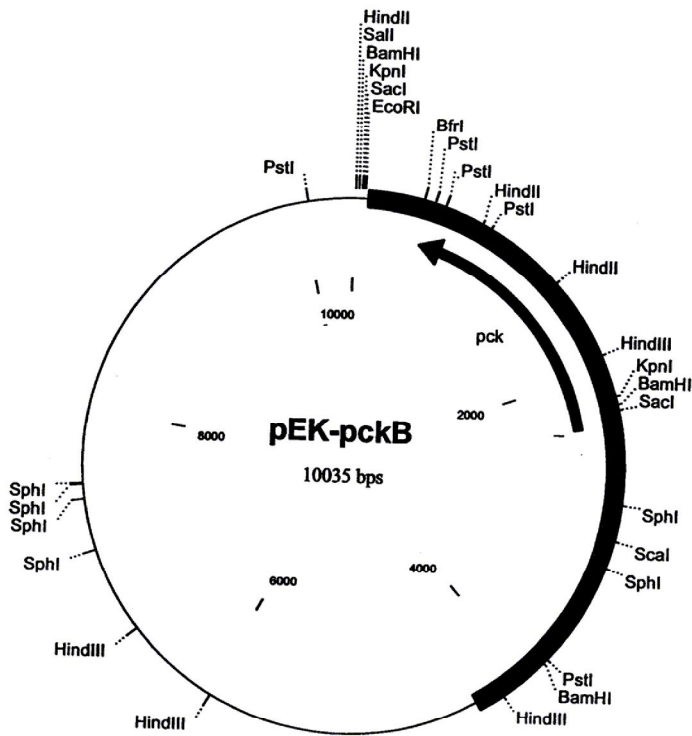
제12항에 있어서, 임의로 호모세린 데하이드로게나제를 암호화하는 *hom* 유전자 및/또는 "피드백 내성" 호모세린 데하이드로게나제를 암호화하는 *hom^{dr}* 또는 *hom^{FBR}* 대립인자를 동시에 과발현시키는 박테리아를 발효시켜 L-트레오닌을 제조하는 방법.

도면

도면1



도면2



도면3

