



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년03월26일
(11) 등록번호 10-0816472
(24) 등록일자 2008년03월18일

(51) Int. Cl.

C12N 15/03 (2006.01) *C12N 1/20* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2006-0132085

(22) 출원일자 2006년12월21일

심사청구일자 2006년12월21일

(56) 선행기술조사문헌

US 6696561B1 (2004.02.24)

J Biotechnol 2003 Sep 4:104(1-3): 5-25

(73) 특허권자

씨제이제일제당 (주)

서울 중구 남대문로5가 500

(72) 발명자

장재우

경기 수원시 팔달구 인계동 선경1차아파트 2동 1104호

성진석

경기 용인시 기흥구 구갈동 603번지 씨미트빌 605동 1901호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이덕록

전체 청구항 수 : 총 5 항

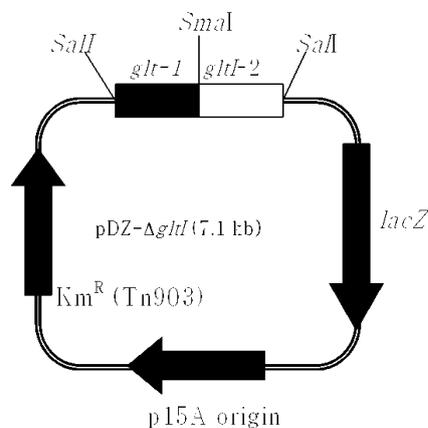
심사관 : 조경주

(54) 글루타메이트 에이비씨-타입 트랜스포터 활성이 결실된코리네박테리아 및 이를 이용한 엘-라이신 생산방법

(57) 요약

본 발명은 글루타메이트 ABC-타입 트랜스포터 활성이 결실된 코리네박테리아 및 이를 이용한 L-라이신 생산방법에 관한 것으로, 본 발명은 글루타메이트 ABC-타입 트랜스포터 효소 활성이 내재적 활성보다 감소되어 있어 L-라이신 생산능이 향상된 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) CA01-014 (수탁번호: KCCM-10801P) 균주를 제공하는 뛰어난 효과가 있다. 또한, 상기 균주를 발효 배양하면 L-라이신의 높은 생산 효율을 얻을 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

임상조

인천 남구 학익동 신동아아파트 3차 20동 1205호

양영렬

경기 고양시 덕양구 행신동 946 햇빛마을
2204-1506

최종수

서울 강서구 화곡동 1091번지 대우 푸르지오
136-203

박영훈

경기 성남시 분당구 구미동 무지개마을라이프아파
트 705동 102호

특허청구의 범위

청구항 1

글루타메이트 ABC-타입 트랜스포터를 코딩하는 유전자 *gltI*를 불활성화시킴으로써 L-라이신 생산능이 향상된 코리네박테리움 속 미생물 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*).

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 불활성화는 상기 글루타메이트 ABC-타입 트랜스포터를 코딩하는 유전자 내로 하나 이상의 염기쌍의 삽입에 의한 삽입 돌연변이, 상기 유전자 내의 하나 이상의 염기쌍의 결실을 갖는 결실 돌연변이, 및 상기 유전자 내의 넌센스 코돈을 도입시키는 염기쌍의 전이 (transition) 또는 전환 (transversion) 돌연변이로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 돌연변이에 의한 것임을 특징으로 하는 코리네박테리움 속 미생물 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*).

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 불활성화는 상기 글루타메이트 ABC-타입 트랜스포터를 코딩하는 유전자의 일부분을 포함하는 벡터에 의한 코리네박테리움 속 미생물의 형질전환에 의한 것임을 특징으로 하는 코리네박테리움 속 미생물 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*).

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 미생물은 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*) CA01-014 KCCM-10801P임을 특징으로 하는 코리네박테리움 속 미생물 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*).

청구항 5

제1항 기재의 미생물 또는 상기 미생물의 배양액을 발효 배양하여 L-라이신을 생산하는 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <2> 본 발명은 글루타메이트 ABC-타입 트랜스포터 활성이 결실된 코리네박테리아 및 이를 이용한 L-라이신 생산방법에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 본 발명은 글루타메이트 ABC-타입 트랜스포터 (glutamate ABC-type transporter EC: 1.2.1.27; 이하 '*gltI*'라 함) 효소 활성이 내재적 활성보다 감소되어 있는 코리네박테리움 글루타미쿰과 이를 이용하여 L-라이신을 생산하는 방법에 관한 것이다.
- <3> 코리네박테리움 (*Corynebacterium*), 특히 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*)은 L-아미노산 생산에 많이 이용되고 있는 그람 양성 미생물이다. L-아미노산, 특히 L-라이신은 동물사료, 사람의 의약품 및 화장품 산업에 사용되고 있으며 코리네박테리움 균주를 이용한 발효에 의해 주로 생성되고 있다.
- <4> 이와 같이 코리네박테리움 균주를 이용한 L-아미노산의 제법은 중요하기 때문에 그 제조방법을 개선하기 위해 많은 시도가 행해지고 있다.
- <5> 특히, 재조합 DNA 기술을 이용하여 각각의 L-아미노산 생합성 관련 유전자를 증폭시켜 L-아미노산 생성에 미치는 효과를 연구하고, L-아미노산 생산 코리네박테리움 균주를 개량하려는 연구가 많이 있어 왔다 [Kinoshita, "glutamic acid bacteria" in Biology of industrial Microorganisms, Demain and Solomon (Eds), Benjamin Chummings, London, UK, 1985, 115-142; Hiliger, BioTec 2, 40-44(1991); Eggeling, *Amino Acids* 6, 261-272(1994); Jetten and Sinskey, *Critical Reviews in Biotechnology* 15, 73-103 (1995); 및 Sahn *et al*, *Annals of the New York Academy of Science* 782, 25-39 (1996)].

- <6> 또는, 특정유전자를 과표현하거나 감쇠발현(Underexpression) 시킴으로써 L-아미노산 생산 코리네박테리움 균주를 개량하는 연구가 시도되었다. 예를 들면, 대구사-휠스 약티엔게젤샤프트의 대한민국 특허공개 제2001-51915호 및 제2001-62279호에는 코리네박테리움 글루타미쿰으로부터 유래된 *sucC* 및 *sucD* 유전자 및 *zwa2* 유전자를 감쇠 발현(underexpression)시켜 코리네형 박테리아로부터 L-아미노산의 생산성을 증대시키는 방법이 기술되어 있다.
- <7> 또한, 외부의 다른 박테리아 유래의 유전자를 도입하는 경우도 있다. 예를 들어, 일본 특허공보 제(평)7-121228호에서는 에스케리키아 콜리 유래의 시트르산 신타제를 암호화하는 유전자의 도입하는 방법이 기술되어 있다.
- <8> L-아미노산을 생산하는 코리네박테리움 균주를 이용하여 L-아미노산을 제조하는 경우, 코리네박테리움 균주 배양 시 질소원으로 주로 암모늄 설페이트(Ammonium sulfate)의 암모니아 이온을 주로 사용한다. 발효과정 내에서 배지 내 암모니아의 농도는 다양하게 변화한다. 초기에는 암모니아가 풍부하게 존재하다가 발효과정이 진행되면서 점점 소비하게 되어 말기에는 암모니아가 부족한 상태가 된다. 이를 극복하기 위해 다시 배지 내에 암모니움 설페이트를 추가하기도 한다. 만약, 배지 내 암모니아 이온이 부족한 상태가 되면 세포 대사의 변화가 심하기 때문에 라이신 농도와 성장속도가 떨어진다는 보고가 있다[Maike Silberbach, "Adaption of *C.glutamicum* to Ammonium Limitation: a Global Analysis Using Transcriptome and Proteome Techniques", *Applied and Environmental Microbiology* 71,2391-2401(2005)].
- <9> 저농도 암모니아 상태에서 코리네박테리움 균주는 주로 두 가지 방법으로 대처해 나간다. 첫 번째 방법은 세포막 성분 중 일부를 사용하는 방법이다. 세포막 성분 중 D-알라닌 같은 아미노산을 세포 내로 유입하여 질소원으로 사용한다. 두 번째 방법은 세포외부의 다른 유기 질소원을 이용하는 방법으로 크레아틴(Creatine), 요소(Urea), 글루타메이트(glutamate) 등을 세포 외부로부터 내부로 수송하여 질소원으로 사용한다. 이때, 수송하는 단백질들 중에서 글루타메이트를 세포내부로 수송하는 단백질이 글루타메이트 ABC-타입 트랜스포터이다. 글루타메이트 ABC-타입 트랜스포터는 크게 3가지 단백질로 구성되어 있다. 각각의 단백질은 *gltI*, *gltK*, *gltL* 유전자에 의해 만들어진다. 그 중 *gltI*는 직접 글루타메이트와 결합하는 부위로서 세포외부의 암모니아 농도와 글루타메이트 농도를 감지하는 등 3개 단백질 중에서 가장 중요한 역할을 한다. 저농도 암모니아 상태를 *gltI*가 감지하면 그 신호를 세포내로 전달하여 세포내 대사를 저농도 암모니아 상태를 극복하기 위한 방향으로 변화시킨다. 하지만, 이러한 대사 변화는 세포성장이나 라이신 생산을 저해시키게 된다. 이 때문에 발효 말기에 암모니아가 부족한 상태가 되면 라이신 생산성이 떨어진다.
- <10> 본 발명자들은 라이신 생산 균주인 코리네박테리움에서 글루타메이트 ABC-타입 트랜스포터 유전자인 *gltI*를 파괴하여, 발효 배양중 암모니아 부족상태를 세포가 감지하지 못하게 하여 세포내 대사변화를 못하게 함으로써 암모니아 부족상태에서 라이신 생산성을 유지 또는 증진시키고자 본 발명을 안출하였다.
- <11> 따라서, 본 발명의 목적은, 글루타메이트 ABC-타입 트랜스포터 활성이 내재적 활성보다 감소되어 있는 코리네박테리움 글루타미쿰을 제공하는 것이다.
- <12> 본 발명의 다른 목적은 상기 미생물을 이용하여 L-라이신을 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

- <13> 본 발명의 상기 목적은 코리네박테리움 글루타미쿰의 글루타메이트 ABC-타입 트랜스포터 코딩 유전자(*gltI*)를 분리하고, 상기 유전자 일부가 결실된 재조합 벡터를 제작하고, 상기 재조합 벡터를 코리네박테리움 글루타미쿰 균주에 형질전환시켜 글루타메이트 ABC-타입 트랜스포터 효소 활성이 내재적 활성보다 감소된 형질전환 코리네박테리움 글루타미쿰 균주를 제작하고, 상기 형질전환 균주를 직접발효법으로 배양하여 발효액 중에 L-라이신을 생산함으로써 달성하였다.

발명의 구성 및 작용

- <14> 본 발명은 코리네박테리움의 글루타메이트 ABC-타입 트랜스포터 효소 활성이 내재적 활성보다 감소된 코리네박테리움 글루타미쿰 균주를 제작하는 단계와, 상기 균주를 직접발효법으로 배양하여 발효액 중에 L-라이신을 생산하는 단계로 구성된다.
- <15> 본 발명은 L-라이신의 생산능을 가진 미생물로서, 바람직하게는 상기 미생물 내의 글루타메이트 ABC-타입 트랜스포터를 코딩하는 유전자를 불활성화시킴으로써 L-라이신의 생산능이 향상된 코리네박테리움 속 미생물을 제공한다.
- <16> 본 발명에 있어서, 상기 불활성화는 당업계에서 알려진 임의의 불활성화 방법에 의하여 이루어질 수 있다. 본 발

명에 있어서, 불활성화란 상기 글루타메이트 ABC-타입 트랜스포터를 코딩하는 유전자의 발현이 야생 균주에 비하여 낮은 수준으로 감소하거나 전혀 발현이 되지 않는 유전자 및 발현이 되더라도 그 활성이 없거나 감소되어 있는 유전자가 생성되는 것을 의미한다.

- <17> 본 발명에 있어서, 상기 불활성화는 상기 글루타메이트 ABC-타입 트랜스포터를 코딩하는 유전자 내로 하나 이상의 염기쌍의 삽입에 의한 삽입 돌연변이, 상기 유전자 내의 하나 이상의 염기쌍의 결실을 갖는 결실 돌연변이, 및 상기 유전자 내의 넌센스 코돈을 도입시키는 염기쌍의 전이 (transition) 또는 전환 (transversion) 돌연변이로 이루어지는 균으로부터 선택되는 하나 이상의 돌연변이에 의하여 불활성화된 것일 수 있다.
- <18> 본 발명의 구체적인 실시예에서, 상기 불활성화는 상기 글루타메이트 ABC-타입 트랜스포터를 코딩하는 유전자 (*gltI*)의 일부분을 포함하는 벡터를 코리네박테리움 속 미생물에 형질전환시키고, 배양하여 선발되는 것일 수 있다.
- <19> 본 발명에서는 재조합 발현벡터를 코리네박테리아에 삽입하여 기능이 결실된 *gltI*를 발현시키는 방법을 사용하였으나, 재조합벡터 이외에도 외래 유전자의 발현을 위한 바이러스의 감염 등 공지의 방법을 이용하여 *gltI* 유전자를 발현할 수 있어 이에 한정하지 않는다.
- <20> L-라이신을 제조하기 위한 상기 코리네박테리움 속 미생물은 글루타메이트 ABC-타입 트랜스포터(*gltI*) 효소 활성이 내재적 활성보다 감소된 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) CA01-014 (수탁번호: KCCM-10801P)임을 특징으로 한다.
- <21> 본 명세서에 사용된 용어 '벡터'는 적합한 숙주 내에서 DNA의 발현을 실시할 수 있는 적합한 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 DNA 서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다. 그러한 조절 서열은 전사를 실시하기 위한 프로모터, 그러한 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열, 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다. 벡터는 플라스미드, 파지 입자, 또는 간단하게 잠재적 게놈 삽입물일 수 있다. 적당한 숙주로 형질전환되면, 벡터는 숙주 게놈과 무관하게 복제하고 기능을 할 수 있거나, 또는 일부 경우에 게놈 그 자체에 통합될 수 있다. 플라스미드가 현재 벡터의 가장 통상적으로 사용되는 형태이므로, 본 발명의 명세서에서 "플라스미드" 및 "벡터"는 때로 상호교환적으로 사용된다.
- <22> 또한, 본 발명은 상기 코리네박테리움 속 미생물 또는 그 배양액을 발효 배양하여 L-라이신을 생산하는 방법을 제공한다.
- <23> 본 발명에 따라 사용되는 코리네박테리아 균주는 배치 공정(batch process) 또는 주입 배치 또는 반복 주입 배치 공정(fed batch or repeated fed batch process)에서 연속식 또는 회분식으로 배양할 수 있다. 이들 공지된 배양 방법은 문헌[Chmiel, (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991); 및 Storhas(Bioreaktoren und periphere Einrichtungen(Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994))]에 기술되어 있다.
- <24> 본 발명에서 사용되는 코리네박테리아 배양 배지는 적절한 방식으로 특정 균주의 요건을 충족해야 한다. 코리네박테리아 균주에 대한 배양 배지는 문헌["Manual of Methods for General Bacteriology" by the American Society for Bacteriology(Washington D.C., USA, 1981)]에서 찾아 볼 수 있다.
- <25> 미생물 배양 배지에서 사용될 수 있는 당원으로는 글루코즈, 사카로즈, 락토즈, 프락토즈, 말토즈, 전분, 셀룰로즈와 같은 당 및 탄수화물, 대두유, 해바라기유, 피마자유, 코코넛유 등과 같은 오일 및 지방, 팔미트산, 스테아린산, 리놀레산과 같은 지방산, 에탄올과 같은 알코올, 아세트산과 같은 유기산이 포함된다. 이들 물질은 개별적으로 또는 혼합물로서 사용될 수 있다.
- <26> 상기 배지의 질소원으로는 펩톤, 효모 추출물, 육즙, 맥아 추출물, 옥수수 침지액, 대두밀 및 요소 또는 무기 화합물, 예를 들면 황산암모늄, 염화암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄 및 질산암모늄이 포함된다. 질소원 또한 개별적으로 또는 혼합물로서 사용할 수 있다.
- <27> 상기 배지의 인원으로는 인산이수소칼륨 또는 인산수소이칼륨 또는 상응하는 나트륨-함유 염이 포함된다.
- <28> 또한, 배양 배지는 성장에 필요한 황산마그네슘 또는 황산철과 같은 금속염을 함유해야 한다.
- <29> 마지막으로, 상기 물질에 더하여 아미노산 및 비타민과 같은 필수 성장 물질이 사용될 수 있다. 또한, 배양 배지에 적절한 전구체들이 사용될 수 있다. 상기된 원료들은 배양과정에서 배양물에 적절한 방식에 의해 회분식으로 또는 연속식으로 첨가될 수 있다. 수산화나트륨, 수산화칼륨, 암모니아와 같은 기초 화합물 또는 인산 또는

황산과 같은 산 화합물을 적절한 방식으로 사용하여 배양물의 pH를 조절할 수 있다.

- <30> 또한, 지방산 폴리글리콜 에스테르와 같은 소포체를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다. 호기 상태를 유지하기 위해 배양물내로 산소 또는 산소-함유 기체 (예, 공기)를 주입한다.
- <31> 배양물의 온도는 보통 20 내지 45℃, 바람직하게는 25 내지 40℃이다. 배양은 원하는 L-아미노산의 생성량이 최대로 얻어질 때까지 계속한다. 이러한 목적으로 보통 10 내지 160시간에서 달성된다. L-라이신은 배양 배지 중으로 배출되거나, 세포 중에 포함되어 있을 수 있다.
- <32> 본 발명의 L-라이신을 생산하는 방법은 세포 또는 배양 배지로부터 라이신을 회수하는 단계를 포함한다. 세포 또는 배양 배지로부터 L-라이신을 회수하는 방법은 당업계에서 널리 알려져 있다. 상기 L-라이신 회수 방법에는 여과, 음이온 교환 크로마토그래피, 결정화 및 HPLC 등이 사용될 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.
- <33> 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 실시하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- <34> [실시예]
- <35> **실시예 1: 라이신 생산균주 코리네박테리움 글루타미쿰 KFCC-10881 유래 *gltI* 유전자의 클로닝, 재조합벡터 (pDZ-D*gltI*) 제작, *gltI* 결손 균주의 개발**
- <36> 씨제이 주식회사의 대한민국 특허등록번호 제0159812호에 개시된 라이신 생산균주 코리네박테리움 글루타미쿰 KFCC10881의 염색체 DNA를 주형으로 한 PCR을 통하여, *gltI* 유전자를 확보하였다. 미국 국립 보건원의 유전자는 행(NIH GenBank)을 근거로 하여 *gltI* 유전자의 염기서열 정보(NCBI 등록번호 NCg11278, 서열번호 1)를 확보하고, 이에 근거하여 두 쌍의 프라이머 (표 1, 서열번호 2 내지 5)를 합성하였다.
- <37> 코리네박테리움 글루타미쿰 KFCC10881의 염색체 DNA를 주형으로 하고, 상기 서열번호 2와 3의 올리고뉴클레오티드를 프라이머로 하여 PCR을 수행하였다. 중합효소는 *PfuUltra*TM 고-신뢰 DNA 폴리머라제(스트라타진)를 사용하였으며, PCR 조건은 변성 96℃, 30초; 어닐링 57℃, 30초; 및 중합반응 72℃, 60초를 30회 반복하였다. 그 결과, 약 400bp의 *gltI* 유전자의 5' 일부를 포함하는 유전자 단편(*gltI*-1)을 얻었다.
- <38> 상기와 같은 방법으로 서열번호 4와 5의 올리고뉴클레오티드를 프라이머로 하여 PCR을 수행하였으며, 이에 따라 약 300bp의 *gltI* 유전자의 3' 일부를 포함하는 유전자 단편(*gltI*-2)을 얻었다. *gltI*-1은 서열번호 2와 3을 프라이머로 사용하여 증폭된 것이며, *gltI*-2는 서열번호 4와 5를 프라이머로 사용하여 증폭된 것이다.

표 1

프라이머	염기서열	서열번호
F- <i>gltI</i> -1-SalI	A TCC TCT AGA <u>GTC GAC</u> CCA AAA TCC CCA CGC GCG CT	2
R- <i>gltI</i> -1-SmaI	GAG <u>CCC GGG</u> TAT CAA GGG TGC CAG CTT GA	3
F- <i>gltI</i> -2-SmaI	GAG <u>CCC GGG</u> TCC GTC CTC GCT CAG CTC AA	4
R- <i>gltI</i> -2-SalI	A TGC CTG CAG <u>GTC GAC</u> CCA TGA TGC GCT GGT AAT CG	5

- <40> 상기 증폭 산물들을 제한효소 *SalI* 및 *SmaI*으로 절단한 후, 미리 *SalI*으로 절단한 벡터 pDZ[대한민국 특허출원번호 10-2006-089672에 개시됨]에 혼합하여 3조각 접합하여, 최종적으로 내부의 약 200bp가 결실된 *gltI* 유전자를 포함하는 pDZ-D*gltI* 재조합 벡터를 제작하였다. 도 1은 코리네박테리움 염색체 삽입용 벡터 pDZ-D*gltI*를 나타낸 것이다.
- <41> 상기에서 제작된 pDZ-D*gltI* 벡터를 라이신 생산균주 코리네박테리움 글루타미쿰 KFCC-10881에 형질전환[*Appl. Microbiol. Biotechnol.* (1999) 52:541-545에 의한 형질전환법 이용]후, 카나마이신 25mg/L를 함유한 선별 배지에서 염색체상의 동 유전자와 상동성에 의해 삽입된 균주를 선별하였다. 벡터의 성공적인 염색체 삽입은 X-gal(5-브로모-4-클로로-3-인돌릴-β-D-갈락토시드)을 포함한 고체배지에서 푸른색을 나타내다가 여부로 결정하였다. 1차 염색체 삽입된 균주를 영양 배지에서 진탕배양(30℃, 8시간)한 후, 각각 10⁻⁴으로부터 10⁻¹⁰까지 희석하여, X-gal을 포함하고 있는 고체배지에 도말하였다. 대부분의 콜로니가 푸른색을 띄는데 반해 낮은 비율로 나타나는 백색의 콜로니를 선별함으로써, 2차 교차(crossover)에 의해 삽입된 염색체상의 벡터 서열이 제거된 균주를 선별하였다. 이상과 같이 선별된 균주는 최종적으로 항생제 카나마이신에 대한 감수성 여부의 확인 및 PCR

을 통하여 유전자 구조 확인 과정을 거쳐 염색체상의 *gltI* 유전자 일부가 결실된 라이신 생산주 코리네박테리움 글루타미쿰 CA01-014을 얻었다. 결실된 *gltI* 유전자는 서열번호 2와 5의 프라이머를 이용한 PCR을 통하여 최종 확인하였다.

<42> 상기 유전자 *gltI* 가 파괴된 코리네박테리움 라이신 생산균주는 2006년 11월 27일자로 사단법인 한국중균협회부설 한국미생물보존센터에 기탁하고, 기탁번호 제 KCCM-10801P호를 부여받았다.

<43> **실시예 2: 유전자 *gltI* 결실 균주에서의 라이신 생산**

<44> 실시예 1에서 최종적으로 제작된 L-라이신 생산균주인 코리네박테리아 글루타미쿰 CA01-014를 L-라이신 생산을 위해 다음과 같이 배양하였다.

<45> 종 배지 (pH 7.0): 증류수 1 리터 기준

<46> 원당 20g, 펩톤 10g, 효모추출물 5g, 요소 1.5g, KH₂PO₄ 4g, K₂HPO₄ 8g, MgSO₄ 7H₂O 0.5g, 바이오틴 100μg, 티아민 HCl 1000μg, 칼슘-판토텐산 2000μg, 니코틴아마이드 2000μg

<47> 생산 배지 (pH 7.0): 증류수 1리터 기준

<48> 포도당 100g, (NH₄)₂SO₄ 40g, 대두 단백질 2.5g, 옥수수 침지 고형분(Corn Steep Solids) 5g, 요소 3g, KH₂PO₄ 1g, MgSO₄ 7H₂O 0.5g, 바이오틴 100μg, 티아민 염산염 1000μg, 칼슘-판토텐산 2000μg, 니코틴아마이드 3000μg, CaCO₃ 30g

<49> 상기 종 배지 25ml를 함유하는 250ml 코너-바플 플라스크에 코리네박테리움 글루타미쿰 모균주 KFCC-10881와 CA01-014를 접종하고 30℃에서 20시간 동안 200rpm으로 진탕 배양하였다. 상기 생산 배지 24ml를 함유하는 250 ml 코너-바플 플라스크에 1ml의 종 배양액을 접종하고 30℃에서 120시간 동안 200rpm으로 진탕 배양하였다.

<50> 배양 종료 후 HPLC를 이용한 방법에 의해 L-라이신의 생산량을 측정하였다.

<51> 코리네박테리움 글루타미쿰 KFCC-10881와 CA01-014에 대한 배양액 중의 L-라이신 대한 결과는 표 2와 같다.

표 2

균주	L-라이신 생산량(g/L)			모균주 대비 L-라이신 생산증가율		
	배치 1	배치 2	배치 3	배치 1	배치 2	배치 3
KFCC-10881	40.79	40.12	41.6	10.9%	16.3%	5.6%
CA01-0014	45.24	46.65	43.93			

<53> 표 2에 나타난 바와 같이, *gltI* 유전자가 결실에 의해 파괴된 코리네박테리움 글루타미쿰 CA01-014 (수탁번호: KCCM-10801P)은 모균주 KFCC-10881에 비하여 라이신 생산이 평균 10.6% 증가하였음을 확인할 수 있었다.

발명의 효과

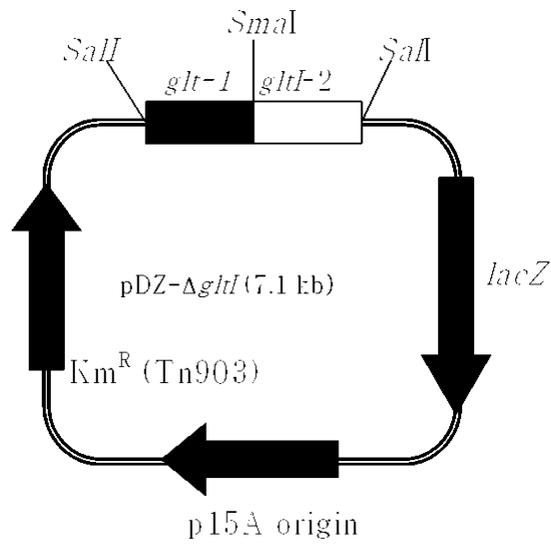
<54> 상기 실시예를 통해 살펴본 바와 같이, 본 발명은 글루타메이트 ABC-타입 트랜스포터 활성이 결실된 코리네박테리아 및 이를 이용한 L-라이신 생산방법에 관한 것으로, 본 발명은 글루타메이트 ABC-타입 트랜스포터 효소 활성이 내재적 활성보다 감소되어 있어 L-라이신 생산능이 향상된 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) CA01-014 (수탁번호: KCCM-10801P) 균주를 제공하는 뛰어난 효과가 있다. 또한, 상기 균주를 발효 배양하면 L-라이신의 높은 생산 효율을 얻을 수 있다.

도면의 간단한 설명

<1> 도 1은 코리네박테리움 염색체 삽입용 벡터 pDZ-DgltI를 도시한 것이다.

도면

도면1



서열 목록

[서열목록 전자파일 첨부](#)