



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0030866  
(43) 공개일자 2022년03월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 15/77 (2006.01) C12N 9/10 (2006.01)  
C12P 13/08 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
C12N 15/77 (2013.01)  
C12N 9/1025 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2021-0050318  
(22) 출원일자 2021년04월19일  
심사청구일자 2021년04월19일  
(30) 우선권주장  
1020200112339 2020년09월03일 대한민국(KR)

(71) 출원인  
대상 주식회사  
서울특별시 종로구 창경궁로 120 (인의동, 종로플  
레이스)  
(72) 발명자  
유 미  
대전광역시 동구 한밭대로1237번길 52, 신동아 아  
파트 10동 203호  
홍인표  
경기도 이천시 마장면 중부대로 697  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
특허법인 퍼씨알

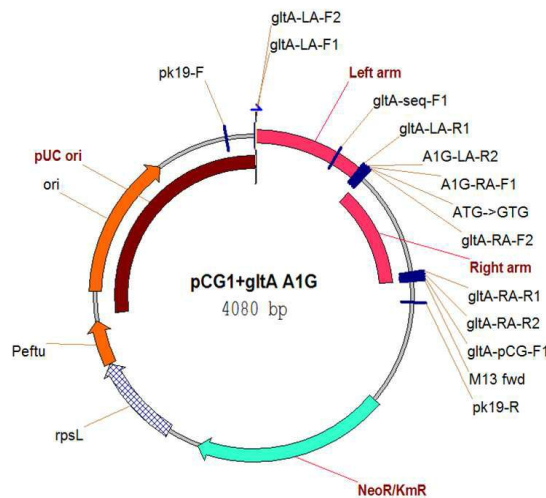
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 L-라이신 생산능이 향상된 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주 및 이를 이용한 L-라이신의 생  
산 방법

(57) 요약

본 발명은 L-라이신 생산능이 향상된 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주 및 이를 이용한 L-라이신의 생산 방법에  
관한 것으로, 상기 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주는 시트레이트 합성효소를 암호화하는 유전자의 발현을 감  
소 또는 약화시킴으로써 옥살로아세테이트의 구연산 전환을 억제하여 L-라이신의 생산 수율을 향상시킬 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

*C12P 13/08* (2013.01)

*C12Y 203/03001* (2013.01)

(72) 발명자

**최민진**

경기도 이천시 마장면 중부대로 697

**박석현**

경기도 남양주시 경춘로 468-40 지금동 힐스테이트  
108동 904호

---

**한재춘**

서울 노원구 마들로 31 그랑빌 APT 103동 1006호

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

시트레이트 합성효소(citrate synthase)의 활성이 약화되어 L-라이신 생산능이 향상된 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) 변이주.

#### 청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 시트레이트 합성효소의 활성 약화는 시트레이트 합성효소를 암호화하는 유전자의 개시코돈이 GTG로 치환된 것인 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주.

#### 청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 시트레이트 합성효소의 활성 약화는 시트레이트 합성효소를 암호화하는 유전자의 개시코돈이 TTG로 치환된 것인 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주.

#### 청구항 4

청구항 2 또는 3에 있어서,

상기 시트레이트 합성효소를 암호화하는 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 것인 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주.

#### 청구항 5

- a) 청구항 1의 변이주를 배지에서 배양하는 단계; 및
- b) 상기 변이주 또는 변이주가 배양된 배지로부터 L-라이신을 회수하는 단계를 포함하는 L-라이신의 생산 방법.

### 발명의 설명

#### 기술분야

[0001] 본 발명은 L-라이신 생산능이 향상된 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주 및 이를 이용한 L-라이신의 생산 방법에 관한 것이다.

#### 배경기술

[0003] L-라이신은 사람이나 동물 체내에서 합성되지 않는 필수아미노산으로서 외부에서 공급되어야 하며, 일반적으로 세균이나 효모와 같은 미생물을 이용한 발효에 의해 생산된다. L-라이신 생산은 자연상태에서 수득된 야생형 균주나 이의 L-라이신 생산능이 향상되도록 변형된 변이주를 이용할 수 있다. 최근에는 L-라이신의 생산 효율을 개선시키기 위해 L-아미노산 및 기타 유용물질 생산에 많이 이용되는 대장균, 코리네박테리움 등의 미생물을 대

상으로 유전자 재조합 기술을 적용하여 우수한 L-라이신 생산능을 갖는 다양한 재조합 균주 또는 변이주 및 이를 이용한 L-라이신 생산 방법이 개발되고 있다. 한국등록특허 제10-0838038호 및 제10-2139806호에 따르면, L-라이신 생산과 관련된 효소의 유전자의 발현을 증가시키거나 불필요한 유전자를 제거함으로써 L-라이신 생산능이 향상될 수 있다.

[0004] L-라이신은 아스파테이트(aspartate) 유래 아미노산으로, 아스파테이트의 전구체인 옥살로아세테이트(oxaloacetate)의 합성 수준은 L-라이신의 생산에도 영향을 미친다. 옥살로아세테이트의 경우, 미생물의 해당과정(glycolysis)에서 생성되며 시트레이트 합성효소(citrate synthase)에 의해 아세틸 코에이(acetyl CoA)와 중합되어 시트레이트(citrate)로 생성된다. 따라서, 옥살로아세테이트를 시트레이트로 전환하는 시트레이트 합성효소의 발현 수준을 조절함으로써 L-라이신의 생산량 또한 조절할 수 있을 것으로 기대된다.

### 선행기술문헌

#### 특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-0838038호  
 (특허문헌 0002) 한국등록특허 제10-2139806호

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 L-라이신 생산능이 향상된 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) 변이주를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 변이주를 이용한 L-라이신의 생산 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

#### 과제의 해결 수단

[0010] 본 발명자들은 코리네박테리움 글루타미쿰 균주를 이용하여 L-라이신 생산능이 향상된 새로운 변이주를 개발하기 위해 연구한 결과, 시트레이트 합성효소의 활성을 약화하기 위해 시트레이트 합성효소를 암호화하는 유전자의 서열, 특히 개시코돈 ATG를 GTG 또는 TTG로 치환한 경우 L-라이신 생산량이 증가하는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0011] 본 발명의 일 양상은 시트레이트 합성효소의 활성이 약화되어 L-라이신 생산능이 향상된 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주를 제공한다.

[0012] 본 발명에서 사용된 “시트레이트 합성효소(citrate synthase)”는 TCA 회로에 작용하는 효소로서 해당과정에서 생성된 아세틸 CoA와 옥살로아세테이트를 중합하여 시트레이트를 합성하는 반응을 촉매하는 효소를 의미한다.

[0013] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 시트레이트 합성효소는 코리네박테리움(*Corynebacterium*) 속 균주에서 유래된 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 코리네박테리움속 균주는 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*), 코리네박테리움 크루디락티스(*Corynebacterium crudilactis*), 코리네박테리움 데저티(*Corynebacterium deserti*), 코리네박테리움 칼루나에(*Corynebacterium callunae*), 코리네박테리움 수라나레에(*Corynebacterium suranareeae*), 코리네박테리움 루브리칸티스(*Corynebacterium lubricantis*), 코리네박테리움 두사넨세(*Corynebacterium doosanense*), 코리네박테리움 이피시엔스(*Corynebacterium efficiens*), 코리네박테리움 우테레키(*Corynebacterium uterequi*), 코리네박테리움 스테셔널리스(*Corynebacterium stationis*), 코리네박테리움 파켄세(*Corynebacterium pacaense*), 코리네박테리움 싱귤라레(*Corynebacterium singulare*), 코리네박테리움 휴미레듀센스(*Corynebacterium humireducens*), 코리네박테리움 마리눔(*Corynebacterium marinum*), 코리네박테리움 할로톨레란스(*Corynebacterium halotolerans*), 코리네박테리움 스페니스코룸(*Corynebacterium spheniscorum*), 코리네박테리움 프레이부르겐제(*Corynebacterium freiburgense*), 코리네박테리움 스트리아툼(*Corynebacterium striatum*), 코리네박테리움 카니스(*Corynebacterium canis*), 코리네박테리움 암모니아게네스

(*Corynebacterium ammoniagenes*), 코리네박테리움 레날레(*Corynebacterium renale*), 코리네박테리움 폴루티솔리(*Corynebacterium pollutisoli*), 코리네박테리움 이미탄스(*Corynebacterium imitans*), 코리네박테리움 카스피움(*Corynebacterium caspium*), 코리네박테리움 테스트디노리스(*Corynebacterium testudinoris*), 코리네박테리움 슈도펠라지(*Corynebacterium pseudopelargi*) 또는 코리네박테리움 플라베스센스(*Corynebacterium flavescens*)일 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0014] 본 발명에서 사용된 “활성이 약화”는 객체인 유전자의 발현량이 본래의 발현량보다 감소되는 것을 의미한다. 이러한 활성의 약화는 유전자를 암호화하는 뉴클레오티드 치환, 삽입, 결실 또는 이들의 조합을 통하여 단백질 자체의 활성이 본래 미생물이 가지고 있는 단백질의 활성에 비해 감소한 경우와, 이를 암호화하는 유전자의 발현 저해 또는 번역 저해 등으로 세포 내에서 전체적인 효소 활성 정도가, 야생형 균주 또는 변형 전의 균주에 비하여 낮은 경우, 이들의 조합 역시 포함한다.
- [0015] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 시트레이트 합성효소의 활성 약화는 시트레이트 합성효소를 암호화하는 유전자의 개시코돈이 GTG로 치환된 것일 수 있다.
- [0016] 또한, 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 시트레이트 합성효소의 활성 약화는 시트레이트 합성효소를 암호화하는 유전자의 개시코돈이 TTG로 치환된 것일 수 있다.
- [0017] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 시트레이트 합성효소를 암호화하는 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 표시된 것일 수 있다.
- [0018] 또한, 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 시트레이트 합성효소를 암호화하는 유전자는 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 것일 수 있다.
- [0019] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 코리네박테리움 글루타미쿰 균주의 시트레이트 합성효소 gltA 유전자를 암호화하는 서열번호 1의 염기서열에서 개시코돈을 ATG에서 GTG로 치환하여 gltA 유전자의 새로운 개시코돈을 가지는 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주를 획득하였다. 이러한 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주는 서열번호 3의 염기서열 또는 서열번호 4의 아미노산 서열로 암호화된 시트레이트 합성효소 유전자를 포함하는 것일 수 있다.
- [0020] 또한, 본 발명의 일 실시예에 따르면, 코리네박테리움 글루타미쿰 균주의 시트레이트 합성효소 gltA 유전자를 암호화하는 서열번호 1의 염기서열에서 개시코돈을 ATG에서 TTG로 치환하여 gltA 유전자의 새로운 개시코돈을 가지는 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주를 획득하였다. 이러한 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주는 서열번호 5의 염기서열 또는 서열번호 6의 아미노산 서열로 암호화된 시트레이트 합성효소 유전자를 포함하는 것을 확인하였다.
- [0021] 본 발명에서 사용된 “생산능이 향상된”은 모균주에 비해 L-라이신의 생산성이 증가된 것을 의미한다. 상기 모균주는 변이의 대상이 되는 야생형 또는 변이주를 의미하며, 직접 변이의 대상이 되거나 재조합된 벡터 등으로 형질전환되는 대상을 포함한다. 본 발명에 있어서, 모균주는 야생형 코리네박테리움 글루타미쿰 균주 또는 야생형으로부터 변이된 균주일 수 있다. 예를 들면, 모균주는 라이신 생산에 관여하는 유전자 (예컨대, lysC, zwf 및 hom 유전자)의 서열에 변이가 유발된 변이주로서 한국미생물보존센터(Korean Culture Center of Microorganisms)에 2021년 4월 2일자 수탁번호 KCCM12969P로 기탁된 코리네박테리움 글루타미쿰 균주 (이하 '코리네박테리움 글루타미쿰 DS1 균주'라 함)일 수 있다.
- [0022] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 L-라이신 생산능이 향상된 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주는 모균주에 비해 증가된 L-라이신 생산능을 나타내며, 특히 모균주에 비해 L-라이신 생산량이 5% 이상, 구체적으로는 5 내지 20% 증가되어 균주 배양액 1 ℓ 당 66 ~ 80 g의 L-라이신을 생산할 수 있으며, 바람직하게는 68 ~ 78 g의 L-라이신을 생산할 수 있다.
- [0024] 본 발명의 일 구체예에 따른 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주는 모균주에 시트레이트 합성효소 유전자의 개시코돈이 GTG 또는 TTG로 치환된 변이체를 포함하는 재조합 벡터를 통해 구현될 수 있다.
- [0025] 본 발명에서 사용된 “변이체”는 L-라이신의 생합성에 관여하는 시트레이트 합성효소 유전자의 개시코돈이 ATG에서 GTG 또는 TTG로 치환된 유전자 변이체를 의미한다.
- [0026] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 시트레이트 합성효소 유전자의 개시코돈이 GTG로 치환된 변이체는 서열번호 3의 염기서열 또는 서열번호 4의 아미노산 서열을 가지는 것일 수 있다.

- [0027] 또한, 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 시트레이트 합성효소 유전자의 개시코돈이 TTG로 치환된 변이체는 서열번호 5의 염기서열 또는 서열번호 6의 아미노산 서열을 가지는 것일 수 있다.
- [0028] 본 발명에서 사용된 “백터”는 적당한 숙주세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있는 발현 백터로서 유전자 삽입 물이 발현되도록 작동 가능하게 연결된(operably linked) 필수적인 조절요소를 포함하는 유전자 제조물을 의미한다. 여기서, “작동 가능하게 연결된”은 발현이 필요한 유전자와 이의 조절 서열이 서로 기능적으로 결합되어 유전자 발현을 가능케 하는 방식으로 연결된 것을 의미하고, “조절요소”는 전사를 수행하기 위한 프로모터, 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 암호화하는 서열, 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다. 이러한 백터는 플라스미드 백터, 코즈미드 백터, 박테리 오파아지 백터, 바이러스 백터 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0029] 본 발명에서 사용된 “재조합 백터”는 적합한 숙주세포 내로 형질전환된 후, 숙주세포의 게놈과 무관하게 복제 가능하거나 게놈 그 자체에 통합될 수 있다. 이때, 상기 “적합한 숙주세포”는 백터가 복제 가능한 것으로서 복제가 개시되는 특정 염기서열인 복제 원점을 포함할 수 있다.
- [0030] 상기 형질전환은 숙주세포에 따라 적합한 백터 도입 기술이 선택되어 목적하는 유전자를 숙주세포 내에서 발현시킬 수 있다. 예를 들면, 백터 도입은 전기천공법(electroporation), 열 충격(heat-shock), 인산칼슘(CaPO4) 침전, 염화칼슘(CaCl2) 침전, 미세주입법(microinjection), 폴리에틸렌글리콜(PEG)법, DEAE-덱스트란법, 양이온 리포솜법, 초산 리튬-DMSO법, 또는 이들의 조합에 의해 수행될 수 있다. 형질전환된 유전자는 숙주세포 내에서 발현될 수 있으면 숙주세포의 염색체 내 삽입 또는 염색체 외에 위치하고 있는 것이든 제한하지 않고 포함될 수 있다.
- [0031] 상기 숙주세포는 생체내 또는 시험관내에서 본 발명의 재조합 백터 또는 폴리뉴클레오티드로 형질감염, 형질전환, 또는 감염된 세포를 포함한다. 본 발명의 재조합 백터를 포함하는 숙주 세포는 재조합 숙주 세포, 재조합 세포 또는 재조합 미생물이다.
- [0032] 또한, 본 발명에 의한 재조합 백터는 선택 마커(selection marker)를 포함할 수 있는데, 상기 선택 마커는 백터로 형질전환된 형질전환체(숙주세포)를 선별하기 위한 것으로서 상기 선택 마커가 처리된 배지에서 선택 마커를 발현하는 세포만 생존할 수 있기 때문에, 형질전환 된 세포의 선별이 가능하다. 상기 선택 마커는 대표적인 예로 카나마이신, 스트렙토마이신, 클로람페니콜 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0033] 본 발명의 형질전환용 재조합 백터 내에 삽입된 유전자들은 상동성 재조합 교차로 인하여 코리네박테리움 속 미생물과 같은 숙주세포 내로 치환될 수 있다.
- [0034] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 숙주세포는 코리네박테리움속 균주일 수 있으며, 예를 들면 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) 균주일 수 있다.
- [0036] 또한, 본 발명의 다른 일 양상은 a) 상기 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주를 배지에서 배양하는 단계; 및 b) 상기 변이주 또는 변이주가 배양된 배지로부터 L-라이신을 회수하는 단계를 포함하는 L-라이신의 생산 방법을 제공한다.
- [0037] 상기 배양은 당업계에 알려진 적절한 배지와 배양 조건에 따라 이루어질 수 있으며, 통상의 기술자라면 배지 및 배양 조건을 용이하게 조정하여 사용할 수 있다. 구체적으로, 상기 배지는 액체 배지일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 배양 방법은 예를 들면, 회분식 배양(batch culture), 연속식 배양(continuous culture), 유가식 배양(fed-batch culture) 또는 이들의 조합 배양을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0038] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 배지는 적절한 방식으로 특정 균주의 요건을 충족해야 하며, 통상의 기술자에 의해 적절하게 변형될 수 있다. 코리네박테리움 속 균주에 대한 배양 배지는 공지된 문헌 (Manual of Methods for General Bacteriology, American Society for Bacteriology, Washington D.C., USA, 1981)을 참조할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0039] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 배지에 다양한 탄소원, 질소원 및 미량원소 성분을 포함할 수 있다. 사용될 수 있는 탄소원으로는 글루코스, 수크로스, 락토스, 프락토스, 말토스, 전분, 셀룰로스 및 같은 당 및 탄수화물, 대두유, 해바라기유, 피마자유, 코코넛유 등과 같은 오일 및 지방, 팔미트산, 스테아린산, 리놀레산과 같은 지방산, 글리세롤, 에탄올과 같은 알코올, 아세트산과 같은 유기산이 포함된다. 이들 물질은 개별적으로 또는 혼합물로서 사용될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 사용될 수 있는 질소원으로는 펩톤, 효모 추출물, 육즙,



맥아 추출물, 옥수수 침지액, 대두밀 및 요소 또는 무기 화합물, 예를 들면 황산 암모늄, 염화암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄 및 질산암모늄이 포함될 수 있다. 질소원 또한 개별적으로 또는 혼합물로서 사용할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 사용될 수 있는 인의 공급원으로는 인산이수소칼륨 또는 인산수소이칼륨 또는 상응하는 나트륨-함유 염이 포함될 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 배양 배지는 성장에 필요한 황산 마그네슘 또는 황산철과 같은 금속염을 함유할 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다. 그 외에, 아미노산 및 비타민과 같은 필수 성장 물질이 포함될 수 있다. 또한 배양 배지에 적절한 전구체들이 사용될 수 있다. 상기 배지 또는 개별 성분은 배양과정에서 배양액에 적절한 방식에 의해 회분식으로 또는 연속식으로 첨가될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0040] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 배양 중에 수산화암모늄, 수산화칼륨, 암모니아, 인산 및 황산과 같은 화합물을 미생물 배양액에 적절한 방식으로 첨가하여 배양액의 pH를 조정할 수 있다. 또한, 배양 중에 지방산 폴리글리콜 에스테르와 같은 소포제를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다. 추가적으로, 배양액의 호기 상태를 유지하기 위하여, 배양액 내로 산소 또는 산소-함유 기체 (예, 공기)를 주입할 수 있다. 배양액의 온도는 통상 20°C 내지 45°C, 예를 들면 25°C 내지 40°C일 수 있다. 배양기간은 유용물질이 원하는 생산량으로 수득될 때까지 계속될 수 있으며, 예를 들면 10 내지 160 시간일 수 있다.

[0041] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 배양된 변이주 및 변이주가 배양된 배지에서 L-라이신을 회수하는 단계는 배양 방법에 따라 당해 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 배지로부터 생산된 L-라이신을 수집 또는 회수할 수 있다. 예를 들면 원심분리, 여과, 추출, 분무, 건조, 증발, 침전, 결정화, 전기영동, 분별용해 (예를 들면, 암모늄 설페이트 침전), 크로마토그래피 (예를 들면, 이온 교환, 친화성, 소수성 및 크기배제) 등의 방법을 사용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 않는다.

[0042] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 라이신을 회수하는 단계는 배양 배지를 저속 원심분리하여 바이오매스를 제거하고 얻어진 상등액을 이온교환 크로마토그래피를 통하여 분리할 수 있다.

[0043] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 L-라이신을 회수하는 단계는 L-라이신을 정제하는 공정을 포함할 수 있다.

### 발명의 효과

[0045] 본 발명에 따른 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주는 시트레이트 합성효소를 암호화하는 유전자의 발현을 감소 또는 약화시킴으로써 옥살로아세테이트의 구연산 전환을 억제하여 L-라이신의 생산 수율을 향상시킬 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0047] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따라 개시코돈이 ATG에서 GTG로 치환된 시트레이트 합성효소 gltA 유전자를 포함하는 pCGI(gltA-A1G) 박터의 구조를 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따라 개시코돈이 ATG에서 TTG로 치환된 시트레이트 합성효소 gltA 유전자를 포함하는 pCGI(gltA-A1T) 박터의 구조를 나타낸 것이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0048] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이러한 설명은 본 발명의 이해를 돕기 위하여 예시적으로 제시된 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이러한 예시적인 설명에 의하여 제한되는 것은 아니다.

#### 실시예 1. 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주의 제조

[0051] 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주를 제조하기 위해 코리네박테리움 글루타미쿰 DS1 균주 및 *E. coli* DH5a (HIT Competent cells™, Cat No. RH618)를 사용하였다.

[0052] 상기 코리네박테리움 글루타미쿰 DS1 균주는 증류수 1 L에 글루코오스 5 g, NaCl 2.5 g, 효모 추출물 5.0 g, 우레아(urea) 1.0 g, 폴리펩톤 10.0 g 및 비프(beef) 추출물 5.0 g 조성의 CM-broth 배지 (pH 6.8)에서 30°C의 온도로 배양하였다.

[0053] 상기 *E. coli* DH5a는 증류수 1 L에 트립톤 10.0 g, NaCl 10.0 g 및 효모 추출물 5.0 g 조성의 LB 배지 상에서 37°C의 온도로 배양하였다.

[0054] 항생제 (Ampicillin, Kanamycin, Chloramphenicol)는 시그마(Sigma)사의 제품을 사용하였고, DNA 시퀀싱 분석은 마크로젠(주)에 의뢰하여 분석하였다.

[0056] **1-1. 재조합 벡터의 제작**

[0057] 균주에 TCA 회로를 약화시키고 탄소원 효율성을 증가시키기 위해 시트레이트 합성효소의 약화를 도입하였다. 본 실시예에서 이용한 방법은 시트레이트 합성효소를 암호화하고 있는 *gltA* 유전자의 발현을 감소하기 위하여, 해당 유전자의 해독 개시코돈에 특이적 변이를 유발하였다. *gltA* 유전자의 해독 개시코돈을 ATG에서 GTG로 변이를 도입하였고, 코리네박테리움 글루타미쿰 계통 상에서 *gltA* 유전자 한 가운데를 중심으로 좌측암 478 bp 부분과 우측암 475 bp 부분을 PCR로 증폭하여, 오버랩 PCR(overlap PCR) 방법으로 연결한 후 재조합 벡터인 pCGI (문헌 [Kim et al., Journal of Microbiological Methods 84 (2011) 128-130] 참조)에 클로닝하였다. 상기 플라스미드를 pCGI(*gltA*-A1G)라고 명명하였다 (도 1 참조). 상기 플라스미드를 제작하기 위하여 각각의 유전자 단편을 증폭하는데 하기 표 1의 프라이머를 사용하였다.

**표 1**

프라이머(primer)			서열번호
gltA 좌측상동암 증폭 프라이머	gltA-LA-F1	5' - tgattacgccggttgcttatagggtggc - 3'	7
	gltA-LA-F2	5' - ggttgcttatagggtggc - 3'	8
	gltA-LA-R1	5' - ttgttcggaaaaaactcttcc - 3'	9
	A1G-LA-R2	5' - tcaaacacatttgttcggaaa - 3'	10
gltA 우측상동암 증폭 프라이머	A1G-RA-F1	5' - atgtgttgaaagggatcgtggctactga - 3'	11
	gltA-RA-F2	5' - aagggatcgtggctactga - 3'	12
	gltA-RA-R1	5' - agctggtcctggtagtaggtaga - 3'	13
	gltA-RA-R2	5' - gagtgggttcagctggtcct - 3'	14

[0060] 이상의 프라이머를 이용하여 아래의 조건 하에 PCR을 수행하였다. Thermocycler (TP600, TAKARA BIO Inc., 일본)를 이용하여 각각의 데옥시뉴클레오타이드 트리포스페이트 (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 100 μM가 첨가된 반응액에 올리고뉴클레오타이드 1 pM, 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC 13032의 염색체 DNA 10 ng을 주형(template)으로 이용하여, pfu-X DNA 폴리머라제 혼합물 (Solgent) 1 유닛의 존재 하에서 25 ~ 30 주기(cycle)를 수행하였다. PCR 수행 조건은 (i) 변성(denaturation) 단계: 94°C에서 30초, (ii) 결합(annealing) 단계: 58°C에서 30초, 및 (iii) 확장(extension) 단계: 72°C에서 1 ~ 2분 (1 kb 당 2분의 중합시간 부여)의 조건에서 실시하였다.

[0061] 이와 같이 제조된 유전자 단편을 self-assembly cloning을 이용하여, pCGI 벡터에 클로닝하였다. 상기 벡터를 *E. coli* DH5a에 형질전환시키고, 50 μg/ml의 카나마이신(kanamycin)을 함유하는 LB-한천 플레이트 상에 도말하여, 37°C에서 24시간 배양하였다. 최종 형성되는 콜로니를 분리하여 삽입물(insert)이 정확히 벡터에 존재하는지 확인한 후, 이 벡터를 분리하여 코리네박테리움 글루타미쿰 균주의 재조합에 사용하였다.

[0062] 상기 방법에서 공통적으로 진행된 과정으로서, 해당 유전자들의 증폭은 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC 13032의 genomic DNA로부터 PCR 방법으로 증폭하여 전략에 따라 self-assembled cloning 방법으로 pCGI 벡터에 삽입하여 *E. coli* DH5a에서 선별하였다. 염색체의 유전자 염기 치환(Chromosomal base substitution)은 각각 단편의 유전자를 개별 증폭하여 오버랩 PCR로 목적 DNA 단편을 제조하였다. 유전자 조작 시 PCR 증폭 효소로는 Ex Taq 중합효소 (Takara), Pfu 중합효소 (Solgent)를 이용하였고, 각종 제한효소 및 DNA modifying 효소는 NEB 제품을 사용하였으며, 공급된 버퍼 및 프로토콜에 따라 사용하였다.

[0064] **1-2. 변이주의 제조**

[0065] 상기 pCGI(*gltA*-A1G) 벡터를 이용하여 변이 균주인 DS2 균주를 제조하였다. 상기 벡터의 최종 농도가 1 μg/μl 이상 되도록 준비하여 코리네박테리움 글루타미쿰 DS1 균주에 전기천공법 (문헌 [Tauch et al., FEMS



Microbiology letters 123 (1994) 343-347] 참조)을 사용하여 1차 재조합을 유도하였다. 이때, 전기 천공한 균주를 카나마이신이 20  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  포함되는 CM-한천 플레이트에 도말하여 콜로니를 분리한 후 계능상의 유도한 위치에 적절히 삽입되었는지 PCR 및 염기서열 분석을 통해 확인하였다. 이렇게 분리된 균주를 다시 2차 재조합을 유도하기 위하여 스트렙토마이신(streptomycin)을 함유한 CM-한천 액체배지에 접종하고, 하룻밤 이상 배양하여 동일 농도의 스트렙토마이신을 함유한 한천배지에 도말하여 콜로니를 분리하였다. 최종 분리한 콜로니 중에서 카나마이신에 대한 내성 여부를 확인한 후, 항생제 내성이 없는 균주들 중 *gltA* 유전자에 변이가 도입되었는지 염기서열 분석을 통해 확인하였다 (문헌 [Schafer et al., Gene 145 (1994) 69-73] 참조). 최종적으로 변이 *gltA* 유전자가 도입된 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주 (DS2)를 획득하였다.

[0067] **실시예 2. 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주의 제조**

[0068] *gltA* 유전자의 개시코돈을 TTG로 치환한 것을 제외하고는, 실시예 1과 동일한 방법으로 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주를 제조하였다.

[0069] 여기서 플라스미드를 제작하기 위하여 각각의 유전자 단편을 증폭하는데 하기 표 2의 프라이머를 사용하였고, 제작된 플라스미드 pCGI(*gltA*-A1T) 벡터를 이용하여 변이 균주인 DS2-1 균주를 제조하였다. 최종적으로 변이 *gltA* 유전자가 도입된 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주 (DS2-1)를 획득하였다.

**표 2**

프라이머(primer)			서열번호
gltA 좌측상동암 증폭 프라이머	gltA-LA-F1	5' - tgattacgccggttgcttatagggtggc - 3'	15
	gltA-LA-F2	5' - ggttgcttatagggtggc - 3'	16
	gltA-LA-R1	5' - tcaacacaatttgttcgaaa - 3'	17
	A1T-LA-R2	5' - atttgttgaaagggatcctggctactga - 3'	18
gltA 우측상동암 증폭 프라이머	A1T-RA-F1	5' - atgtgttgaaagggatcctggctactga - 3'	19
	gltA-RA-F2	5' - aagggatcctggctactga - 3'	20
	gltA-RA-R1	5' - agctggtcctgtagtaggtaga - 3'	21
	gltA-RA-R2	5' - gagggttcagctggtcct - 3'	22

[0072] **실험예 1. 변이주의 L-글루탐산 생산성 비교**

[0073] 모균주 코리네박테리움 글루타미쿰 DS1 균주와 실시예 1 및 2에서 제조된 라이신 생산 변이주인 DS2 균주 및 DS2-1 균주의 L-라이신 생산성을 비교하였다.

[0074] 하기 표 3과 같은 조성을 갖는 라이신 배지 10 ml를 함유한 100 ml 플라스크에 모균주 (DS1) 또는 변이주 (DS2 또는 DS2-1)를 각각 접종하고, 30°C에서 28시간, 180 rpm의 조건으로 진탕 배양하였다. 배양 종료 후 라이신 분석은 HPLC (Shimazu, 일본)로 L-라이신의 생산량을 측정하였고, 그 결과를 하기 표 4에 나타내었다.

**표 3**

조성	함량 (증류수 1 L 기준)
Glucose	100 g
Ammonium sulfate	55 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	35 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.1 g
MgSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	1.2 g
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	180 mg
FeSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	180 mg
Thiamine · HCl	9 mg
Biotin	1.8 mg
CaCO <sub>3</sub>	5%
pH	7.0

표 4

[0076]

균주	L-라이신 (g/L)	단위 균체 당 L-라이신 생산량 (g/gDCW)
모균주 (DS1)	65.2	7.0
변이주 (DS2)	69.7	7.2
변이주 (DS2-1)	69.8	7.2

[0078]

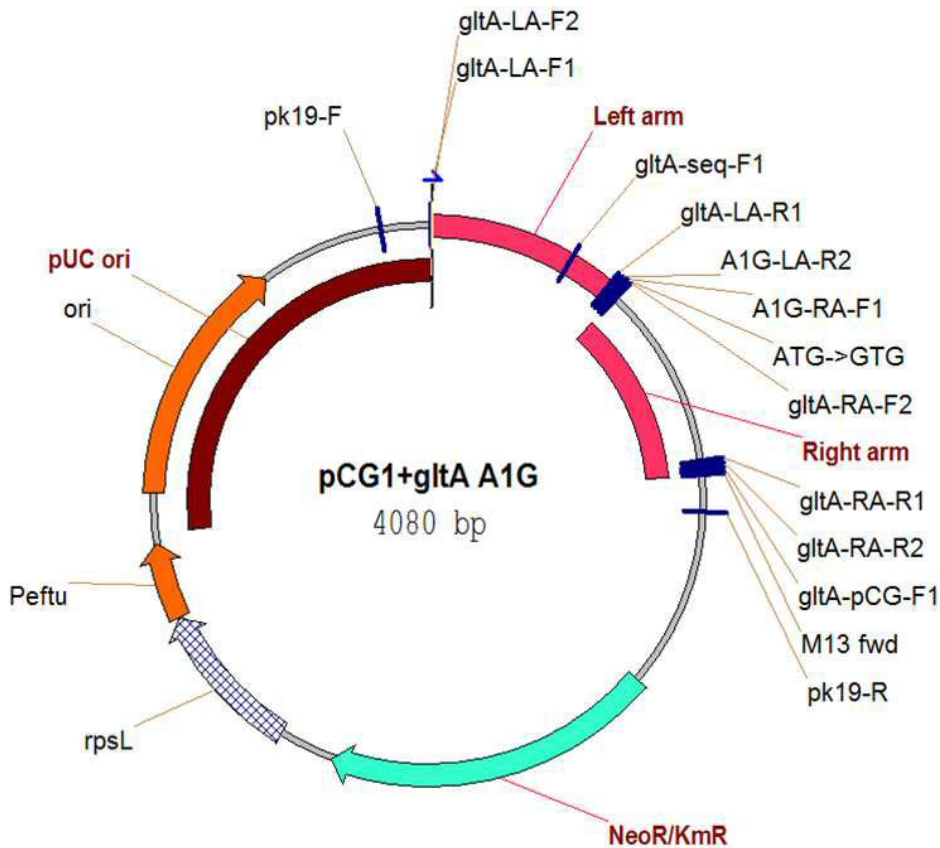
상기 표 4에 나타낸 바와 같이, 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주 DS2와 DS2-1은 라이신 생합성 경로의 강화를 위해 gltA 유전자가 최적의 번역 개시 서열 (GTG 또는 TTG)로 치환됨으로써 모균주 코리네박테리움 글루타미쿰 DS1 균주에 비해 L-라이신의 생산성이 약 6.9% 증가한 것으로 확인되었다. 이러한 결과를 통해, gltA 유전자의 발현 약화가 대사의 탄소원 흐름을 감소시킴으로써 균주의 L-라이신 생산능을 향상시킨다는 것을 알 수 있었다.

[0080]

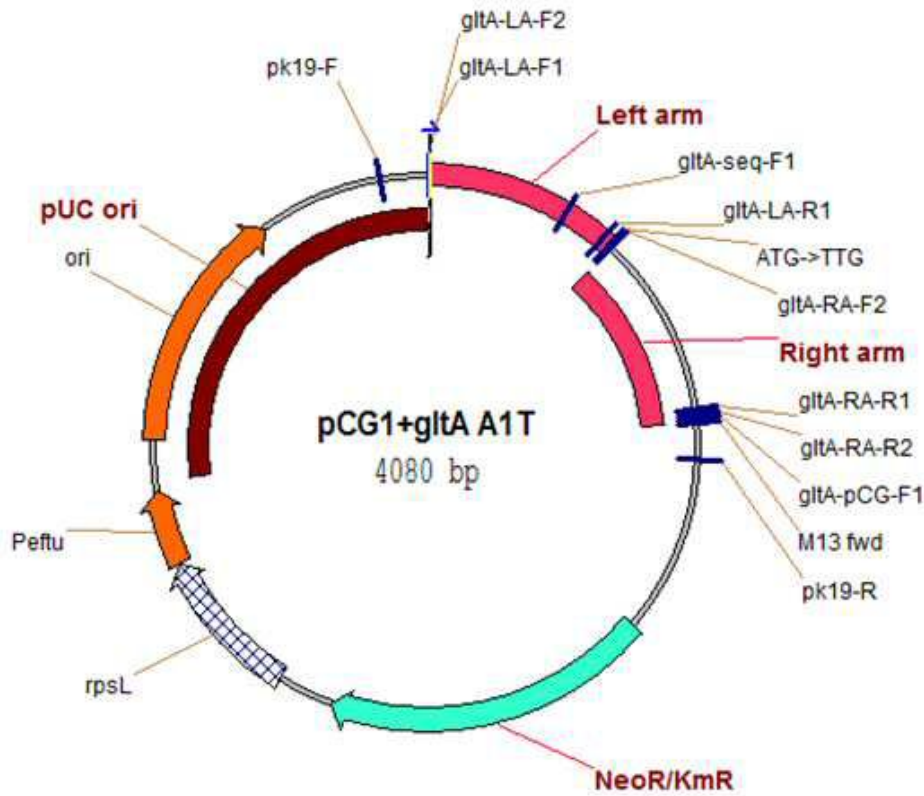
이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

도면1



도면2



서열목록

- <110> DAESANG CORPORATION
- <120> Mutant of Corynebacterium glutamicum with enhanced L-lysine productivity and method for preparing L-lysine using the same
- <130> PN200252P3
- <150> KR 10-2020-0112339
- <151> 2020-09-03
- <160> 22
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 1314
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Corynebacterium glutamicum gltA
- <400> 1

atgtttgaaa gggatatcgt ggctactgat aacaacaagg ctgtcctgca ctaccccggt

ggcagattcg aaatggacat catcgaggct tctgaggta acaacggtgt tgcctgggc 120

aagatgctgt ctgagactgg actgatcact ttgaccag gttatgtgag cactggctcc 180

accgagtcga agatcaccta catcgatggc gatgcgggaa tcctgcgtta ccgcggctat 240

gacatcgctg atctggctga gaatgccacc ttaacgagg tttcttacct acttatcaac 300

ggtgagctac caacccaga tgagcttcac aagtttaacg acgagattcg ccaccacacc 360

cttctggacg aggacttcaa gtcccagttc aacgtgttcc cacgcgacgc tcaccaatg 420

gcaaccttgg ctctctcggt taacattttg tctacctact accaggacca gctgaacca 480

ctcgatgagg cacagcttga taaggcaacc gttcgctca tggcaaaggt tccaatgctg 540

gctgcgtacg cacaccgcgc acgcaagggt gctccttaca tgtaccaga caactcctc 600

aatgcgctgt agaacttctt gcgcatgatg ttcggttacc caaccgagcc atacgagatc 660

gaccaatca tggtaaggc tctggacaag ctgctcatcc tgcacgctga ccacgagcag 720

aactgctcca cctccaccgt tcgtatgatc ggttccgcac aggccaacat gtttgtctcc 780

atcgctggtg gcatcaacgc tctgtccggc cactgcacg gtggcgcaaa ccaggctgtt 840

ctggagatgc tcgaagacat caagagcaac cacggtggcg acgcaaccga gttcatgaac 900

aaggtcaaga acaaggaaga cggcgtccgc ctcatgggct tcggacaccg cgtttacaag 960

aactacgac cactgcagc aatcgtcaag gagaccgac acgagatcct cgagcacctc 1020

ggtggcgacg atcttctgga tctggcaatc aagctggaag aaattgcact ggctgatgat 1080

tacttcactc cccgcaagct ctaccgcaac gtagacttct acaccggcct gatctaccgc 1140

gcaatgggct tccaactga cttcttcacc gtattgttcg caatcggtcg tctgccagga 1200

tggatcgctc actaccgca gcagctcggg gcagcaggca acaagatcaa ccgcccacgc 1260

caggtctaca ccggcaacga atcccgcaag ttggttctc gcgaggagcg ctaa 1314

<210> 2  
 <211> 437  
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Corynebacterium glutamicum gltA

<400> 2

Met Phe Glu Arg Asp Ile Val Ala Thr Asp Asn Asn Lys Ala Val Leu

1 5 10 15

His Tyr Pro Gly Gly Glu Phe Glu Met Asp Ile Ile Glu Ala Ser Glu

20 25 30

Gly Asn Asn Gly Val Val Leu Gly Lys Met Leu Ser Glu Thr Gly Leu  
 35 40 45  
 Ile Thr Phe Asp Pro Gly Tyr Val Ser Thr Gly Ser Thr Glu Ser Lys  
 50 55 60  
 Ile Thr Tyr Ile Asp Gly Asp Ala Gly Ile Leu Arg Tyr Arg Gly Tyr  
 65 70 75 80  
 Asp Ile Ala Asp Leu Ala Glu Asn Ala Thr Phe Asn Glu Val Ser Tyr  
 85 90 95  
 Leu Leu Ile Asn Gly Glu Leu Pro Thr Pro Asp Glu Leu His Lys Phe  
 100 105 110  
 Asn Asp Glu Ile Arg His His Thr Leu Leu Asp Glu Asp Phe Lys Ser  
 115 120 125  
  
 Gln Phe Asn Val Phe Pro Arg Asp Ala His Pro Met Ala Thr Leu Ala  
 130 135 140  
 Ser Ser Val Asn Ile Leu Ser Thr Tyr Tyr Gln Asp Gln Leu Asn Pro  
 145 150 155 160  
 Leu Asp Glu Ala Gln Leu Asp Lys Ala Thr Val Arg Leu Met Ala Lys  
 165 170 175  
 Val Pro Met Leu Ala Ala Tyr Ala His Arg Ala Arg Lys Gly Ala Pro  
 180 185 190  
 Tyr Met Tyr Pro Asp Asn Ser Leu Asn Ala Arg Glu Asn Phe Leu Arg  
 195 200 205  
 Met Met Phe Gly Tyr Pro Thr Glu Pro Tyr Glu Ile Asp Pro Ile Met  
 210 215 220  
 Val Lys Ala Leu Asp Lys Leu Leu Ile Leu His Ala Asp His Glu Gln  
 225 230 235 240  
 Asn Cys Ser Thr Ser Thr Val Arg Met Ile Gly Ser Ala Gln Ala Asn  
 245 250 255  
 Met Phe Val Ser Ile Ala Gly Gly Ile Asn Ala Leu Ser Gly Pro Leu  
 260 265 270  
  
 His Gly Gly Ala Asn Gln Ala Val Leu Glu Met Leu Glu Asp Ile Lys





ggtgagctac caacccaga tgagcttcac aagtttaacg acgagattcg ccaccacacc 360  
 cttctggacg aggacttcaa gtcccagttc aacgtgttcc cacgcgacgc tcaccaatg 420  
 gcaaccttgg cttcctcggg taacattttg tctacctact accaggacca gctgaacca 480  
 ctcgatgagg cacagcttga taaggcaacc gttcgcctca tggcaaaggt tccaatgctg 540  
 gctgcgtacg cacaccgacg acgcaagggt gctccttaca tgtaccaga caactcctc 600

aatgcgctg agaacttct ggcgatgatg ttcggttacc caaccgagcc atacgagatc 660  
 gaccaatca tggcaaggc tctggacaag ctgctcatcc tgcacgctga ccacgagcag 720  
 aactgctcca cctccaccgt tcgtatgatc ggttccgcac aggccaacat gtttgtctcc 780  
 atcgctggtg gcatcaacgc tctgtccggc cactgcacg gtggcgcaaa ccaggctgtt 840  
 ctggagatgc tcgaagacat caagagcaac cacggtggcg acgcaaccga gttcatgaac 900  
 aaggtcaaga acaaggaaga cggcgtccgc ctcatgggct tcggacaccg cgtttacaag 960  
 aactacgatc cacgtgcagc aatcgtcaag gagaccgac acgagatcct cgagcacctc 1020

ggtggcgacg atcttctgga tctggcaatc aagctggaag aaattgcact ggctgatgat 1080  
 tacttcatct cccgaagct ctaccgaac gtagacttct acaccggcct gatctaccgc 1140  
 gcaatgggct tccaactga cttcttcacc gtattgttcg caatcggtcg tctgccagga 1200  
 tggatcgtc actaccgca gcagctcggg gcagcaggca acaagatcaa ccgccacgc 1260  
 caggtctaca cggcaacga atcccgcaag ttggttctc gcgaggagcg ctaa 1314

<210> 4

<211> 437

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Corynebacterium glutamicum gltA - substituted ATG with GTG

<400> 4

Val Phe Glu Arg Asp Ile Val Ala Thr Asp Asn Asn Lys Ala Val Leu

1 5 10 15

His Tyr Pro Gly Gly Glu Phe Glu Met Asp Ile Ile Glu Ala Ser Glu

20 25 30

Gly Asn Asn Gly Val Val Leu Gly Lys Met Leu Ser Glu Thr Gly Leu

35 40 45

Ile Thr Phe Asp Pro Gly Tyr Val Ser Thr Gly Ser Thr Glu Ser Lys

50 55 60



305                    310                    315                    320  
 Asn Tyr Asp Pro Arg Ala Ala Ile Val Lys Glu Thr Ala His Glu Ile  
                          325                    330                    335  
 Leu Glu His Leu Gly Gly Asp Asp Leu Leu Asp Leu Ala Ile Lys Leu  
                          340                    345                    350  
 Glu Glu Ile Ala Leu Ala Asp Asp Tyr Phe Ile Ser Arg Lys Leu Tyr

                         355                    360                    365  
 Pro Asn Val Asp Phe Tyr Thr Gly Leu Ile Tyr Arg Ala Met Gly Phe  
                          370                    375                    380  
 Pro Thr Asp Phe Phe Thr Val Leu Phe Ala Ile Gly Arg Leu Pro Gly  
 385                    390                    395                    400  
 Trp Ile Ala His Tyr Arg Glu Gln Leu Gly Ala Ala Gly Asn Lys Ile  
                          405                    410                    415  
 Asn Arg Pro Arg Gln Val Tyr Thr Gly Asn Glu Ser Arg Lys Leu Val  
                          420                    425                    430

Pro Arg Glu Glu Arg

435

<210> 5

<211> 1314

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Corynebacterium glutamicum gltA - substituted ATG with TTG

<400> 5

ttgtttgaaa gggatatcgt ggctactgat aacaacaagg ctgtcctgca ctaccccggt            60  
 ggcgagttcg aaatggacat catcgagget tctgagggta acaacggtgt tgtcctgggc            120  
 aagatgctgt ctgagactgg actgatcact tttgaccag gttatgtgag cactggctcc            180  
 accgagtcga agatcaccta catcgatggc gatgcgggaa tctgcgtta ccgcgctat            240  
  
 gacatcgctg atctggctga gaatgccacc ttaacgagg tttcttacct acttatcaac            300  
 ggtgagctac caacccaga tgagcttac aagttaacg acgagattcg ccaccacacc            360  
 cttctggacg aggacttcaa gtcccagttc aacgtgttcc cacgcgacgc tcaccaatg            420  
 gcaaccttgg cttcctcggg taacatcttg tctacctact accaggacca gctgaacca            480  
 ctcatgagg cacagcttga taaggcaacc gttcgcctca tggcaaaggt tccaatgctg            540

gctgcgtagc cacaccgcgc acgcaagggt gtccttaca tgtaccaga caactcctc 600  
aatgcgctg agaacttct gcgcatgat ttcggttacc caaccgagcc atacgagatc 660

gaccaatca tggtaagc tctggacaag ctgctcatcc tgcacgtga ccacgagcag 720  
aactgctcca cctccaccgt tcgatgatc ggttccgcac aggccaacat gtttgtctcc 780  
atcgctggtg gcatcaacgc tctgtccgc ccaactgcac gtggcgcaa ccagctgtt 840  
ctggagatgc tgaagacat caagagcaac cacggtggcg acgcaaccga gttcatgaac 900  
aaggtcaaga acaaggaaga cggcgtccgc tcatgggct tcggacaccg cgtttacaag 960  
aactacgac cactgcagc aatcgtcaag gagaccgcac acgagatcct cgagcacctc 1020  
ggtggcgacg atcttctgga tctggcaatc aagctggaag aaattgact ggctgatgat 1080

tacttcatct cccgaagct ctaccgaac gtagacttct acaccggcct gatctaccgc 1140  
gcaatgggct tcccaactga cttcttcacc gtattgttcg caatcggtcg tetgccagga 1200  
tggatcgctc actaccgca gcagctcggc gcagcaggca acaagatcaa cgccccacgc 1260  
caggtctaca cggcaacga atcccgaag ttggttctc gcgaggagcg ctaa 1314

<210> 6

<211> 437

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Corynebacterium glutamicum gltA - substituted ATG with TTG

<400> 6

Leu Phe Glu Arg Asp Ile Val Ala Thr Asp Asn Asn Lys Ala Val Leu

1	5	10	15
His Tyr Pro Gly Gly Glu Phe Glu Met Asp Ile Ile Glu Ala Ser Glu			
	20	25	30
Gly Asn Asn Gly Val Val Leu Gly Lys Met Leu Ser Glu Thr Gly Leu			
	35	40	45
Ile Thr Phe Asp Pro Gly Tyr Val Ser Thr Gly Ser Thr Glu Ser Lys			
	50	55	60
Ile Thr Tyr Ile Asp Gly Asp Ala Gly Ile Leu Arg Tyr Arg Gly Tyr			
	65	70	75
Asp Ile Ala Asp Leu Ala Glu Asn Ala Thr Phe Asn Glu Val Ser Tyr			
	85	90	95

Leu Leu Ile Asn Gly Glu Leu Pro Thr Pro Asp Glu Leu His Lys Phe  
 100 105 110  
 Asn Asp Glu Ile Arg His His Thr Leu Leu Asp Glu Asp Phe Lys Ser  
 115 120 125  
 Gln Phe Asn Val Phe Pro Arg Asp Ala His Pro Met Ala Thr Leu Ala  
 130 135 140  
 Ser Ser Val Asn Ile Leu Ser Thr Tyr Tyr Gln Asp Gln Leu Asn Pro  
 145 150 155 160  
 Leu Asp Glu Ala Gln Leu Asp Lys Ala Thr Val Arg Leu Met Ala Lys  
 165 170 175  
 Val Pro Met Leu Ala Ala Tyr Ala His Arg Ala Arg Lys Gly Ala Pro  
 180 185 190  
 Tyr Met Tyr Pro Asp Asn Ser Leu Asn Ala Arg Glu Asn Phe Leu Arg  
 195 200 205  
 Met Met Phe Gly Tyr Pro Thr Glu Pro Tyr Glu Ile Asp Pro Ile Met  
 210 215 220  
 Val Lys Ala Leu Asp Lys Leu Leu Ile Leu His Ala Asp His Glu Gln  
 225 230 235 240  
 Asn Cys Ser Thr Ser Thr Val Arg Met Ile Gly Ser Ala Gln Ala Asn  
 245 250 255  
 Met Phe Val Ser Ile Ala Gly Gly Ile Asn Ala Leu Ser Gly Pro Leu  
 260 265 270  
 His Gly Gly Ala Asn Gln Ala Val Leu Glu Met Leu Glu Asp Ile Lys  
 275 280 285  
 Ser Asn His Gly Gly Asp Ala Thr Glu Phe Met Asn Lys Val Lys Asn  
 290 295 300  
 Lys Glu Asp Gly Val Arg Leu Met Gly Phe Gly His Arg Val Tyr Lys  
 305 310 315 320  
 Asn Tyr Asp Pro Arg Ala Ala Ile Val Lys Glu Thr Ala His Glu Ile  
 325 330 335  
 Leu Glu His Leu Gly Gly Asp Asp Leu Leu Asp Leu Ala Ile Lys Leu  
 340 345 350

Glu Glu Ile Ala Leu Ala Asp Asp Tyr Phe Ile Ser Arg Lys Leu Tyr  
 355 360 365

Pro Asn Val Asp Phe Tyr Thr Gly Leu Ile Tyr Arg Ala Met Gly Phe  
 370 375 380

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

Trp Ile Ala His Tyr Arg Glu Gln Leu Gly Ala Ala Gly Asn Lys Ile  
 405 410 415

Asn Arg Pro Arg Gln Val Tyr Thr Gly Asn Glu Ser Arg Lys Leu Val  
 420 425 430

Pro Arg Glu Glu Arg

435

<210> 7

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> gltA-LA-F1

<400> 7

tgattacgcc ggttgcgta tagggtggc 29

<210> 8

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> gltA-LA-F2

<400> 8

ggttgcgta tagggtggc 19

<210> 9

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> gltA-LA-R1

<400> 9



ttgttcggaa aaaaactctt cc 22

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> A1G-LA-R2

<400> 10

tcaaacacat ttgttcggaa a 21

<210> 11

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> A1G-RA-F1

<400> 11

atgtgtttga aagggatatc gtggctactg a 31

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213>

Artificial Sequence

<220><223> g1tA-RA-F2

<400> 12

aagggatatc gtggctactg a 21

<210> 13

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> g1tA-RA-R1

<400> 13

agctggtcct ggtagtaggt aga 23

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> g1tA-RA-R2

<400> 14	
gagtgggttc agctggtcct	20
<210> 15	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> gltA-LA-F1	
<400> 15	
tgattacgcc ggttgcgtta tagggtggc	29
<210> 16	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> gltA-LA-F2	
<400> 16	
ggttgcgtta tagggtggc	19
<210> 17	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> gltA-LA-R1	
<400> 17	
tcaaacaaat ttgttcggaa a	21
<210> 18	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> A1T-LA-R2	
<400> 18	
at ttgtttga aaggatatac gtggctactg a	31
<210> 19	
<211> 31	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence  
 <220><223> A1T-RA-F1  
 <400> 19  
 atgtgtttga aagggatatc gtggctactg a 31  
 <210> 20  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> gltA-RA-F2  
 <400> 20  
 aagggatatc gtggctactg a 21  
  
 <210> 21  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> gltA-RA-R1  
 <400> 21  
 agctggtcct ggtagtaggt aga 23  
 <210> 22  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> gltA-RA-R2  
 <400> 22  
 gagtgggttc agctggtcct 20