(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년06월12일
(11) 등록번호 10-0838038
(24) 등록일자 2008년06월05일

(51) Int. Cl.
C12N 15/03 (2006.01) *C12N 1/20* (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01) *C12P 13/08* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2006-0137652
(22) 출원일자 2006년12월29일
심사청구일자 2006년12월29일
(56) 선행기술조사문헌
US20020197605A2
US6872553B2
WO2002053707A1
KR1020050065712A

(73) 특허권자
씨제이제일제당 (주)
서울 중구 남대문로5가 500
(72) 발명자
구현민
경기 고양시 덕양구 토당동 한라비발디아파트 103동 1407호
양영렬
경기 고양시 덕양구 행신동 946 햇빛마을 2204-1506
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
조인제

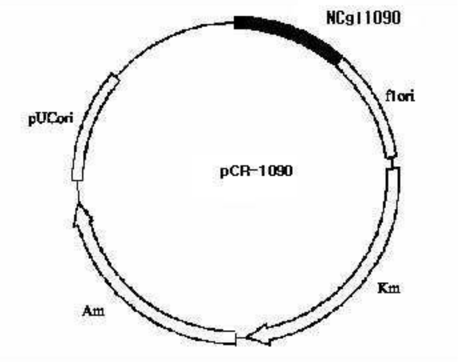
전체 청구항 수 : 총 5 항 심사관 : 조경주

(54) L-라이신 생산능이 향상된 코리네박테리움 속 미생물 및그를 이용한 L-라이신 생산 방법

(57) 요 약

본 발명은 L-라이신 생산능이 향상된 코리네박테리움 속 미생물 및 그를 이용하여 L-라이신을 생산하는 방법에 관한 것이다. 더욱 상세하게는, 본 발명은 아스파테이트 잔기가 반복된 아미노산 서열을 갖는 내재적 NCgl1090 유전자를 불활성화시킴으로써 L-라이신의 생산능이 증가된 재조합 코리네박테리움 속 미생물 및 이를 이용한 L-라이신을 생산하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

김효진

서울 강서구 화곡7동 1075-11번지 리치빌 303호

문준옥

서울 양천구 신월4동 1026번지 양천벽산블루밍아파트 102동 807호

임상조

인천 남구 학익동 신동아아파트 3차 20동 1205호

최종수

서울 강서구 화곡동 1091번지 대우푸르지오 136-203

박영훈

경기 성남시 분당구 구미동 무지개마을 라이프아파트 705동 102호

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1의 뉴클레오티드 서열을 갖는 내재적 NCgl1090 유전자를 불활성화시킴으로써, L-라이신 생산능이 향상된 것을 특징으로 하는 코리네박테리움 글루타미쿰.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 불활성화가 상기 내재적 NCgl1090 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 돌연변이 방법에 의한 것임을 특징으로 하는 코리네박테리움 글루타미쿰.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 불활성화가 상기 내재적 NCgl1090 유전자의 일부분과 항생제 마커를 포함하는 벡터에 의한 코리네박테리움 속 미생물의 형질전환에 의한 것임을 특징으로 하는 코리네박테리움 글루타미쿰.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 항생제의 존재하에서 배양하여 선발되는 것을 특징으로 하는 코리네박테리움 글루타미쿰 KFCC 10881-C001-0018 (KCCM 10810P).

청구항 6

제1항 및 제3항 내지 제5항 중 어느 한 항에 기재된 코리네박테리움 글루타미쿰을 배양하여 배양물 또는 세포 중에 L-라이신을 생산하는 단계; 및

배양물로부터 L-라이신을 회수하는 단계;

를 포함하는, L-라이신을 생산하는 방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<2> 본 발명은 L-라이신 생산능이 향상된 코리네박테리움 속 미생물 및 그를 이용하여 L-라이신을 생산하는 방법에 관한 것이다. 더욱 상세하게는, 본 발명은 아스파테이트 잔기가 반복된 아미노산 서열을 갖는 내재적 NCgl1090 유전자를 불활성화시킴으로써 L-라이신의 생산성이 증가된 재조합 코리네박테리움 속 미생물 및 이를 이용한 L-라이신을 생산하는 방법에 관한 것이다.

<3> L-아미노산, 특히 L-라이신은 동물사료, 사람의 의약품 및 약제산업에 사용되고 있으며 코리네박테리움 균주의 발효에 의해 생성되고 있다.

<4> 코리네박테리움 속 균주 (*Corynebacterium*), 특히 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*)은 L-아미노산 생산에 많이 이용되고 있는 그람 양성의 미생물이다. 이와 같이 코리네박테리움 균주를 이용한 L-아

미노산의 제법은 중요하기 때문에 그 제조방법을 개선하기 위해 많은 시도가 행해지고 있다.

<5> 그 중에서 재조합 DNA 기술을 이용하여 특정유전자를 파괴시키거나 감쇠발현시킴으로써 L-아미노산 생산 코리네박테리움 균주를 개량하려는 연구가 있었다. 예를 들면, 미국특허 제6,872,553호에는 a) 포스포에놀피루베이트 카르복시키나제(phosphoenolpyruvate(PEP) carboxykinase; PCK)를 코딩하는 DNA가 하나 이상의 염기쌍의 삽입에 의한 삽입 돌연변이, 하나 이상의 염기쌍의 결실을 갖는 결실 돌연변이, 및 넌센스 돌연변이의 삽입을 갖는 전이 (transition) 또는 전환 (transversion) 돌연변이로 구성되는 군으로부터 선택되는 돌연변이 방법 중 하나의 방법에 의하여 감쇄되어 있거나, 감쇄되지 않은 코리네박테리움에 비하여 상기 폴리펩티드의 활성이 감소된 코리네박테리움을 성장시키는 단계; b) 배지 또는 상기 박테리아의 세포 중에 원하는 L-아미노산 산물을 농축하는 단계; 및 c) 상기 L-아미노산을 분리하는 단계를 포함하는, 코리네박테리움의 L-라이신을 발효에 의하여 제조하는 방법이 개시되어 있다.

<6> 또한, 각각의 L-아미노산 생합성에 관련된 유전자를 증폭시켜 L-아미노산 생성에 미치는 효과를 연구하고 L-아미노산 생산 코리네박테리움 균주를 개량하려는 연구가 많이 있어 왔다 (Eggeling, Amino Acids 6, 261-272 (1994)). 또한, 다른 박테리아 유래의 외래 유전자를 도입하는 경우도 있다. 예를 들면, 일본 특개평 제7-121228호에는 미생물의 시트르산 신타제의 합성에 관여하는 유전 정보를 갖는 DNA 단편과 벡터 DNA의 재조합체 DNA를 보유하는 코리네박테리움 속 또는 브레비박테리움 속에 속하는 미생물을 배양하고, 배양물 중에 L-글루타민산 및 L-프롤린산을 제조하는 방법이 개시되어 있다.

<7> 그러나, 상기한 종래 방법에 의하더라도 여전히 L-라이신의 생산능이 향상된 균주는 여전히 요구되고 있다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<8> 이에 본 발명자들은 L-라이신 생산 수율을 더욱 높일 수 있는 균주를 개발하기 위하여 계속적으로 연구해왔고, 코리네박테리움 속 미생물에서 아스파테이트 잔기가 반복된 아미노산 서열을 갖는 내재적 NCgl1090 유전자를 표적으로 하여 이를 불활성화시킴으로써 라이신 생합성 과정에 포함되어 있는 세포내 중간 대사물질인 아스파테이트의 불필요한 소비를 줄이고, 궁극적으로 라이신 생산을 증가시키고자 하였다.

<9> 본 발명의 목적은 L-라이신의 생산능이 향상된 코리네박테리움 속 미생물을 제공하는 것이다.

<10> 본 발명의 다른 목적은 상기 미생물을 이용하여 L-라이신을 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

<11> 상기와 같은 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 L-라이신의 생산능을 가진 미생물로서, 바람직하게는 상기 미생물 내의 내재적 NCgl1090 유전자를 불활성화시킴으로써 L-라이신의 생산능이 향상된 코리네박테리움 속 미생물을 제공한다.

<12> 본 발명에 있어서, L-라이신 생산능을 가진 미생물은 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC 13032, 코리네박테리움 써모아미노게네스 FERM BP-1539, 코리네박테리움 글루타미쿰 KFCC 10881, 및 코리네박테리움 글루타미쿰 KFCC 11001이 될 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.

<13> 아스파테이트는 라이신 생합성 과정에 포함되는 중간 대사체로서, 세포의 구성이나 단백질 합성의 단위체나 조절인자로서 작용한다. 세포 구성 단위체로는 세포의 핵산, 아미노산 또는 지방질 합성에 사용되며, 단백질합성의 단위체로는 단백질의 구조나 주요 작용기로서 사용된다. 특히 단백질합성의 단위체에 있어서, 단백질로 번역(translation)되는 유전자는 세포의 생장, 유지 및 조절에 필수적인 유전자와 비필수적인 유전자로 구별될 수 있다. 이 중 비필수 유전자는 또 다른 동일 기능의 유전자로 그 역할이나 필요성이 없어진 경우, 바이러스 유전자와 같이 외래에서 도입된 유전자, 특정 상황에서 필요하나 라이신 생산조건과 같은 임의적 조건에서는 불필요한 유전자, 또는 특별한 기능이 알려지지 않은 유전자로 구별될 수 있다.

<14> 세포내에서는 상기 비필수 유전자의 단백질을 구성하는데 아스파테이트가 다량으로 사용되고 있으므로, 비필수 유전자를 제거한다면 비필수 유전자에 소요되는 다량의 아스파테이트의 불필요한 소비를 감소시킬 수 있다. 즉, 불필요한 아스파테이트의 소비를 줄임으로써 라이신 생합성에 사용될 수 있는 전구체를 증가시킨다는 측면에서 궁극적으로는, 동일조건에서 라이신 생산에 유리하게 작용할 것으로 생각되었다.

<15> 본 발명에 있어서, 상기 내재적 NCgl1090 유전자(NCBI GI : 19552361)(서열번호 1)는 코리네박테리움 속 미생물에 내재적으로 존재하는 유전자로서, 기능이 알려지지 않은 추정상의 단백질(hypothetical protein)을 코딩하는 유전자이다. 본 발명에서 사용된 상기 유전자는 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC 13032의 게놈의 완전한 서열

분석으로부터 그 활성이 예측된 것이다. 바람직하게는, 상기 유전자는 서열 번호 1의 뉴클레오티드 서열을 갖는 것이다.

<16> 본 발명의 L-라이신 생산능이 향상된 미생물을 개발하고자, 본 발명자들은 먼저, 코리네박테리움 글루타미큠 ATCC 13032의 완전 분석된 게놈 서열 데이터베이스(서열번호 1)로부터 단백질을 암호화하는 아미노산 서열 안에 라이신 생합성 중간물질인 아스파테이트 잔기를 가장 많이 포함하고 있는 유전자를 탐색하였다. 그 결과 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는 NCgl1090 유전자가 암호화하고 있는 단백질의 C 말단에 아스파테이트 잔기가 반복적으로 나타나고 있음을 확인할 수 있었다. 그러나, 이러한 아미노산 서열상에 반복된 아스파테이트 잔기가 라이신 생산 균주가 라이신을 생합성하는 데 어떠한 영향을 미치는지에 대하여는 전혀 알려져 있지 않다.

<17> 본 발명에 있어서, 상기 불활성화는 당업계에 알려진 임의의 불활성화 방법에 의하여 이루어질 수 있다. 본 발명에 있어서, 불활성화란 상기 NCgl1090 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.

<18> 본 발명에 있어서, 상기 불활성화는 상기 NCgl1090 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 의하여 불활성화된 것일 수 있다.

<19> 본 발명의 구체적인 실시예에서, 상기 방법에 의해 내재적 NCgl1090 유전자가 불활성화된 미생물은 상기 NCgl1090 유전자의 일부분과 항생제 마커를 포함하는 벡터로 코리네박테리움 속 미생물을 형질전환시키고, 상기 항생제의 존재하에서 배양하여 선별되는 것일 수 있다. 바람직하게는, 상기 벡터는 서열번호 2의 NCgl1090 유전자 단편을 포함하는 pCR-1090 벡터이다. 상기 유전자의 일부 서열을 포함하는 벡터로 상기 미생물을 형질전환시키고, 선별 마커 하에서 배양하는 경우 상기 유전자의 일부 서열과 상기 미생물 내의 내재적 유전자가 상동 재조합을 일으키게 된다. 상기 상동 재조합에 의하여 상기 미생물 내의 상기 내재적 유전자는 재조합되고, 재조합된 유전자 중에서 상기 마커를 포함하는 재조합체만이 선별 마커에 의하여 선별되게 된다. 그 결과, 내재적 NCgl1090 유전자가 불활성화된 코리네박테리움 속 미생물을 얻을 수 있다. 그러나, 본원의 균주를 얻는 방법은 이러한 상동 재조합 방법에 한정되는 것은 아니며, 당업계에 알려진 임의의 방법이 사용될 수 있다.

<20> 본 발명의 형질전환된 L-라이신의 생산능이 향상된 미생물은 코리네박테리움 속 미생물 KFCC10881-C001-0018(수탁번호 KCCM 10810P)일 수 있다.

<21> 발명은 또한 상기 형질전환된 미생물을 이용하여 L-라이신을 생산하는 방법을 제공하는 것이다. 더욱 상세하게는, 본 발명의 미생물을 배양하여 배양물 또는 세포 중에 L-라이신을 생산하는 단계; 및 배양물로부터 L-라이신을 회수하는 단계를 포함하는, L-라이신을 생산하는 방법을 제공한다.

<22> 본 발명의 방법에 있어서, 코리네박테리움 속 미생물의 배양은 당업계에 알려진 임의의 배양 조건 및 배양 방법이 사용될 수 있다.

<23> 코리네박테리아 균주 배양을 위하여 사용될 수 있는 배지로는 예를 들면, Manual of Methods for General Bacteriology by the American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981)에 개시된 배지가 사용될 수 있다.

<24> 배지 중에서 사용될 수 있는 당원으로는 포도당, 사카로즈, 유당, 과당, 말토즈, 전분, 셀룰로즈와 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 있다.

<25> 사용될 수 있는 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.

<26> 사용될 수 있는 인원으로는 인산이수소칼륨 또는 인산수소이칼륨 또는 상응하는 나트륨을 함유하는 염이 포함된다. 또한, 배양 배지는 성장에 필요한 황산마그네슘 또는 황산철과 같은 금속염을 함유해야 한다. 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 연속

식으로 첨가될 수 있다.

<27> 상기 미생물의 배양 중 수산화나트륨, 수산화칼륨, 암모니아와 같은 기초 화합물 또는 인산 또는 황산과 같은 산 화합물을 적절한 방식으로 사용하여 배양물의 pH를 조절할 수 있다. 또한, 지방산 폴리글리콜 에스테르와 같은 소포제를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다. 호기 상태를 유지하기 위해 배양물 내로 산소 또는 산소-함유 기체 (예, 공기)를 주입한다. 배양물의 온도는 보통 20 ℃ 내지 45 ℃, 바람직하게는 25 ℃ 내지 40 ℃이다. 배양 시간은 원하는 L-아미노산의 생성량이 얻어질 때까지 계속할 수 있으나, 바람직하게는, 10 내지 160 시간이다.

<28> 본 발명의 방법에 있어서, 배양은 배치 공정, 주입 배치 및 반복 주입 배치 공정과 같은 연속식 또는 회분식으로 이루어질 수 있다. 이러한 배양은 방법은 당업계에 잘 알려져 있으며, 임의의 방법이 사용될 수 있다.

<29> L-아미노산은 음이온 교환 크로마토그래피 및 후속으로 닌히드린 유도체화에 의하여 분리되고 분석될 수 있다.

<30> 본 발명자들은 상기 유전자를 확인한 것에 더하여, 추가적으로 코리네박테리움 속 미생물 중의 내재적 NCgl1090 유전자를 불활성화시켜 라이신 생산량을 측정하였으며, 실제로 라이신 생산성이 향상되는 것을 확인하였다.

<31> 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<32> [실시예]

<33> 이하의 실시예에서는 상기한 바와 같은, 라이신 생합성 중간 물질인 아스파테이트 잔기가 반복된 아미노산 서열을 갖는 NCgl1090 유전자가 라이신의 생산에 미치는 영향을 확인하기 위하여 코리네박테리움 글루타미쿰 KFCC10881의 내재적 NCgl1090 유전자를 불활성화시키고, 배양하여 라이신의 생산량을 측정하였다.

<34> <u>실시예 1: 코리네박테리움 속 미생물의 내재적 NCgl1090 유전자를 불활성화시키기 위한 벡터 제작</u>

<35> 본 실시예에서는 상기 NCgl1090 유전자의 일부 서열 및 항생제 마커를 포함하는 벡터를 제작하기 위하여 서열번호 4와 5의 올리고뉴클레오티드를 프라이머로 하고, 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC 13032의 염색체 DNA를 주형으로 하여 PCR을 수행하여, 401bp (서열번호 2)(서열번호 1의 160 내지 560번 뉴클레오티드)의 NCgl1090 유전자 단편을 증폭하였다. PCR은 변성 96℃에서 30초, 어닐링 52℃에서 30초, 중합 72℃에서 30초를 30회 반복하였다. 증폭된 NCgl1090 유전자 단편을 TOPO Cloning Kit (Invitrogen, 미국)을 이용하여 대장균 플라스미드 pCR2.1에 클로닝하여 pCR-1090 플라스미드를 얻었다. 도 1은 약 500 bp의 NCgl1090 유전자 단편이 클로닝된 pCR-1090 벡터를 나타내는 도면이다.

<36> <u>실시예 2: 코리네박테리움 글루타미쿰 KFCC10881의 내재적 NCgl1090 유전자가 불활성된 L-라이신 생산균주 제작</u>

<37> Appl. Microbiol.Biotechnol.(1999) 52:541-545에 개시된 형질전환법을 이용하여, 실시예 1에서 제작한 pCR-1090 플라스미드를 L-라이신 생산 균주인 코리네박테리움 글루타미쿰 KFCC10881에 전기펄스법으로 형질전환하였다. 배양 2일째 획득한 형질전환주들로부터 NCgl1090 유전자의 파괴 여부를 확인하기 위하여 PCR을 수행하였다. PCR은 형질전환주 염색체 DNA를 주형으로 서열번호 6과 7의 올리고뉴클레오티드를 프라이머로 사용하였고 pCR-1090 플라스미드를 포함하는 약 5030bp (서열번호 1의 1 내지 804번 뉴클레오티드) 의 NCgl1090 유전자 단편을 증폭하였다. 그 결과 상동 재조합에 의한 교차 (cross-over)에 의하여 pCR-1090 플라스미드가 염색체 DNA 상의 내재적 NCgl1090 유전자 중간부분에 삽입됨으로서 당 유전자가 파괴되었음이 확인되었다. 상기 방법에 의해 획득된 균주를 코리네박테리움 글루타미쿰 KFCC10881-CO01-0018로 명명하고, 2006년 12월 7일자로 대한민국 서울특별시 서대문구 홍제 1동 361-221번지에 소재하는 국제기탁기관인 한국종균협회 부설 한국미생물보존센터에 수탁번호 KCCM 10810P로 기탁하였다.

<38> <u>실시예 3: 코리네박테리움 글루타미쿰 FCC10881-CO01-0018을 이용한 라이신 생산</u>

<39> 실시예 2에서 얻어진 코리네박테리아 글루타미쿰 KFCC10881-CO01-0018(KCCM 10810P) 균주를 배양하여 L-라이신을 생산하였다.

<40> 먼저, 하기의 종 배지 25 ml을 함유하는 250 ml 코너-바플 플라스크에 코리네박테리움 글루타미쿰 모균주 KFCC10881과 KFCC10881-CO01-0018(KCCM 10810P)를 접종하고, 30 ℃에서 20 시간 동안 200 rpm으로 교반하면서 배양하였다. 얻어진 종 배양액 1 mL를 하기의 생산 배지 24 ml을 함유하는 250 ml 코너-바플 플라스크에 접종하고 30 ℃에서 120 시간 동안 200 rpm으로 교반하면서 배양하였다. 배양 종료 후 HPLC (Waters 2457)에 의해 L-라이신의 생산량을 측정하였다. 그 결과, 코리네박테리움 글루타미쿰 KFCC10881 및 KFCC10881-CO01-0018(KCCM

10810P) 균주는 각각 배양물 중의 L-라이신의 염산염으로 나타내어 각각 45 g/l 및 50 g/l의 L-라이신을 생산하였다.

<41> 종 배지 (pH 7.0):

<42> 원당 20 g, 펩톤 10 g, 효모추출물 5 g, 요소 1.5 g, KH_2PO_4 4 g, K_2HPO_4 8 g, $MgSO_47H_2O$ 0.5 g, 바이오틴 100㎍, 티아민 HCl 1000 ㎍, 칼슘-판토텐산 2000 ㎍, 니코틴아미드 2000 ㎍ (공정수 1 리터 기준)

<43> 생산 배지 (pH 7.0):

<44> 원당 100 g, $(NH_4)_2SO_4$ 40 g, 대두 단백질 2.5g, 콘스팁 고체 (Corn Steep Solids) 5 g, 요소 3 g, KH_2PO_4 1 g, $MgSO_47$ H_2O 0.5 g, 바이오틴 100 ㎍, 티아민 염산염 1000 ㎍, 칼슘-판토텐산 2000 ㎍, 니코틴아미드 3000 ㎍, $CaCO_3$ 30 g (공정수 1리터 기준)

<45> 실시예 4: 코리네박테리아 글루타니쿰 KFCC10881-C001-0018 균주의 배양물로부터 L-라이신의 회수

<46> 당밀 및 원당 함유 배지 중에서 코리네박테리아 글루타미쿰 KFCC10881-C001-0018(KCCM 10810P) 균주를 배양하여 얻은 라이신 발효액 1L에 염산을 사용하여 pH를 2.0으로 조절하여 Ca이온을 $CaSO_4$, $CaCl_2$ 형태로 변형시켰다. 다음으로, 상기 배양물을 암모늄 이온 형태로 재생된 양이온 교환 수지 (Diaion SK-L10)에 상류 방향으로 흘려주어 흡착시켰다. 이어서 탈염수로 세척하여 수지층 내에 잔존하는 균체 등을 제거한 후 2N 수산화 암모늄으로 용리하여 고농도의 라이신을 회수하였다. 회수된 액을 농축한 후, 염산으로 pH 5.0으로 조절하면서 20℃로 냉각 결정화하였다. 결정화가 완료된 슬러리를 원심분리하여 1차 습제품을 얻고, 모액은 재차 회분식으로 농축하면서 결정화한 후 2차 습제품을 얻었다. 1차 및 2차 습제품을 모두 합하여 건조한 결과 함량 98.5%의 라이신 건제품 47.5 g을 얻을 수 있었다.

발명의 효과

<47> 본 발명에 따르면, 코리네박테리움 글루타미쿰 KFCC10881-C001-0018(KCCM 10810P) 균주의 내재적 NCgl1090 유전자를 불활성화시킴으로써, L-라이신의 생산능을 증가시킬 수 있음을 확인하였다. 본 발명의 방법에 의하면, L-라이신을 고농도로 생산하여 그 생산성을 증가시킬 수 있다.

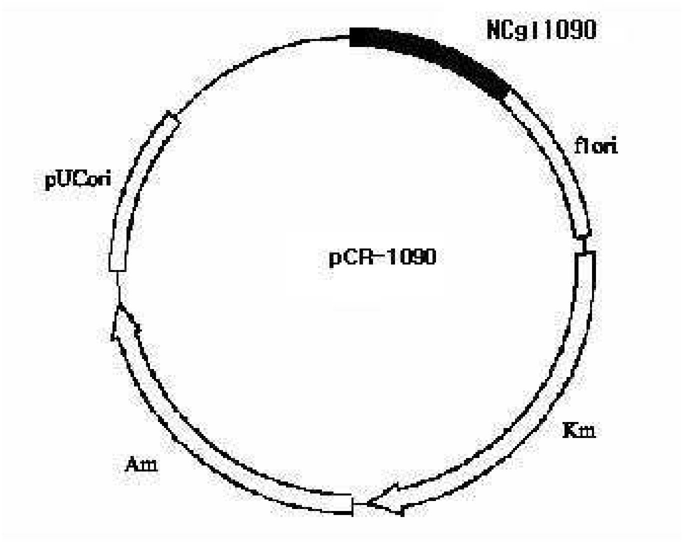
<48>

도면의 간단한 설명

<1> 도 1은 401bp의 NCgl1090 유전자 단편이 클로닝된 pCR-1090 벡터를 나타내는 도면이다.

도면

도면1



서 열 목 록

서열목록 전자파일 첨부