

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0043918

(43) 공개일자 2022년04월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/77 (2006.01) C07K 14/21 (2006.01)

C12N 9/02 (2006.01) C12N 9/04 (2006.01)

C12P 7/42 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 15/77 (2013.01)

C07K 14/21 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0129230

(22) 출원일자 2021년09월29일

심사청구일자 2021년09월29일

(30) 우선권주장

1020200126927 2020년09월29일 대한민국(KR)

(71) 출원인

한국화학연구원

대전광역시 유성구 가정로 141 (장동)

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

가톨릭대학교 산학협력단

서울특별시 서초구 반포대로 222, 가톨릭대학교
성의교정내 (반포동)

(72) 발명자

김희택

대전광역시 유성구 가정로 141 (장동)

류미희

대전광역시 유성구 가정로 141 (장동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인한얼

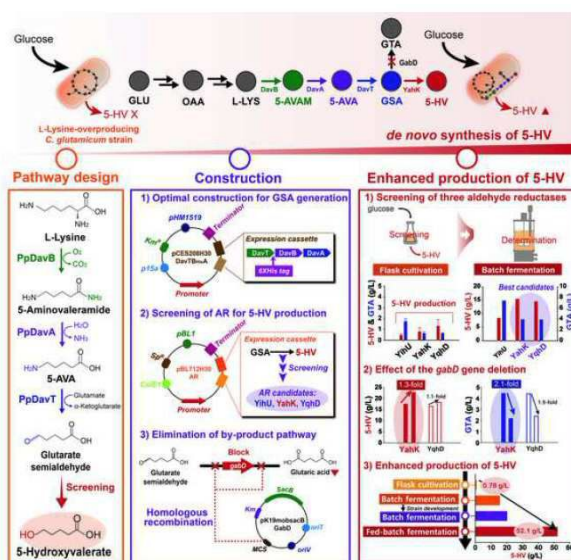
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 5-하이드록시발레르산 생산용 재조합 코리네박테리움 글루탐미쿰 균주 및 이를 이용한 5-하이드록시발레르산 생산방법

(57) 요약

본 발명은 5-하이드록시발레르산 생산용 재조합 코리네박테리움 글루탐미쿰 균주 및 이를 이용한 5-하이드록시발레르산 생산방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 9/0006 (2013.01)
C12N 9/0008 (2013.01)
C12P 7/42 (2013.01)
C12Y 101/01002 (2013.01)
C12Y 102/01016 (2013.01)

(72) 발명자

강경희

대전광역시 유성구 가정로 141 (장동)

박시재

대전광역시 유성구 어은로 57, 어은동 한빛아파트
 129동 906호

손유정

서울특별시 서초구 서초대로 33길 84-8 (방배동,
 상지리츠빌) 302호

주정찬

서울특별시 마포구 독막로20나길 22, 102동 1301호
 (상수동, 레미안밤섬리베뉴 1)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711115588
과제번호	2020R1C1C1005719
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	연구재단
연구사업명	신진연구
연구과제명	C5-C7 diacid 및 diamine의 선택적 생산을 위한 programmable 미생물 플랫폼 개발
기 여 율	45/100
과제수행기관명	한국화학연구원
연구기간	2020.03.01 ~ 2024.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711119809
과제번호	2020M3A9I5037888
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	연구재단
연구사업명	친환경바이오기반기술개발
연구과제명	차세대 바이오 폴리에스터 합성을 위한 C4-C6 다이올 생산 코리네박테리움 균주 시

스텝 개발

기 여 율	35/100
과제수행기관명	이화여자대학교 산학협력단
연구기간	2020.06.01 ~ 2024.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711106453
과제번호	2017M1A2A2087634
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	연구재단
연구사업명	기후변화대응 기초원천기술개발과제
연구과제명	리그닌 해중합 단량체를 활용한 플랫폼화합물의 생물전환 원천기술 개발
기 여 율	20/100
과제수행기관명	카톨릭대학교 산학협력단
연구기간	2017.12.20 ~ 2022.01.19

명세서

청구범위

청구항 1

5-아미노발레이트 아미노트랜스퍼라제(5-aminovalerate aminotransferase; DavT)를 코딩하는 DavT 유전자, 라이신-2-모노옥시게나아제(lysine 2-monooxygenase; DavB)를 코딩하는 DavB 유전자, 델타-아미노발레르아미다아제(deltaaminovaleramidase; DavA)를 코딩하는 DavA 유전자 및 알데하이드 리덕테아제를 코딩하는 유전자가 도입된, 5-하이드록시발레르산 생산용 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주는 숙시네이트 세미알데하이드 디하이드로게나제를 코딩하는 내생의 유전자 gabD가 결손 또는 약화된, 5-하이드록시발레르산 생산용 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 5-아미노발레이트 아미노트랜스퍼라제(5-aminovalerate aminotransferase; DavT), 상기 라이신-2-모노옥시게나아제(lysine 2-monooxygenase; DavB) 및 상기 델타-아미노발레르아미다아제(deltaaminovaleramidase; DavA)를 코딩하는 뉴클레오티드를 포함하는 제1벡터; 및 상기 알데하이드 리덕테아제를 코딩하는 뉴클레오티드를 포함하는 제2벡터로 형질전환된 5-하이드록시발레르산 생산용 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주로서,

상기 코리네박테리움 글루타미쿰 균주는 내생의 gabD 유전자가 결손 또는 약화된, 5-하이드록시발레르산 생산용 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 알데하이드 리덕테아제는 알데하이드 리덕테아제 YihU, 알데하이드 리덕테아제 YahK, 및 알데하이드 리덕테아제 YqhD로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인, 5-하이드록시발레르산 생산용 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 발현벡터는 히스티딘-태그(polyhistidine-tag, His-tag)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 추가로 포함하는 것인, 5-하이드록시발레르산 생산용 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 히스티딘-태그는 DavB를 코딩하는 뉴클레오티드 서열(davB)의 N-말단에 위치하는 것인, 5-하이드록시발레르산 생산용 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 davT 를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열번호 1의 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 5-

하이드록시발레르산 생산용 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 *davB*를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 5-하이드록시발레르산 생산용 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 *davA*를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열번호 3의 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 5-하이드록시발레르산 생산용 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 코리네박테리움 글루타미쿰 균주는 코리네박테리움 글루타미쿰 PKC인 것인, 5-하이드록시발레르산 생산용 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 알데하이드 리덕테아제는 알데하이드 리덕테아제 YihU이고, 상기 알데하이드 리덕테아제 YihU를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열번호 4의 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 5-하이드록시발레르산 생산용 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 알데하이드 리덕테아제는 알데하이드 리덕테아제 YahK이고, 상기 알데하이드 리덕테아제 YahK를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열번호 5의 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 5-하이드록시발레르산 생산용 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 알데하이드 리덕테아제는 알데하이드 리덕테아제 YqhD이고, 상기 알데하이드 리덕테아제 YqhD를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열번호 6의 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 5-하이드록시발레르산 생산용 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주.

청구항 14

제3항에 있어서, 상기 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주는 *davT*, *davB* 및 *davA*를 포함하는 pCES208 발현 벡터; 및 YahK가 포함된 pBL712 발현벡터로 형질전환된 것인, 5-하이드록시발레르산 생산용 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주.

청구항 15

5-아미노발레이트 아미노트랜스퍼라제(5-aminovalerate aminotransferase; *DavT*), 라이신-2-모노옥시게나아제(lysine 2-monooxygenase; *DavB*), 델타-아미노발레르아미다아제(deltaaminovaleramidase; *DavA*) 및 알데하이드 리덕테아제의 활성이 강화된, 5-하이드록시발레르산 생산용 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주는 숙시네이트 세미알데하이드 디하이드로게나제의 활성이 감소 또는 불활성화된, 5-하이드록시발레르산 생산용 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항의 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주를 배양하여 배양물을 수득하는 단계를 포함하는, 5-하이드록시발레르산 생산방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 수득한 배양물로부터 5-하이드록시발레르산을 회수하는 단계를 더 포함하는, 5-하이드록시발레르산 생산방법.

청구항 19

제17항에 있어서, 상기 배양은 유가식 배양인, 5-하이드록시발레르산 생산방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주의 대사 조작을 통한 5-하이드록시발레르산 생산방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로 본 발명은 5-아미노발레이트 아미노트랜스퍼라제(5-aminovaleerate aminotransferase; DavT), 라이신-2-모노옥시게나아제(lysine 2-monooxygenase; DavB), 델타-아미노발레르아미다아제(deltaaminovaleeramidase; DavA) 및 알데하이드 리덕테아제의 활성이 강화되고, 숙시네이트 세미알데하이드 디하이드로게나제의 활성이 감소 또는 불활성화된, 5-하이드록시발레르산 생산용 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주 및 상기 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주를 배양하는 단계를 포함하는 5-하이드록시발레르산 생산방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 전 세계적인 석유수급 불안과 석유자원 고갈, 지구 온난화에 대한 위기의식으로 최근 산업 바이오 기술을 이용하여 바이오매스에서 유래한 대체 생산 방법이나 대체 화합물을 생산하기 위한 전 인류적인 노력이 바이오 에너지, 바이오 플라스틱, 바이오 화합물 등의 다양한 분야에서 가시화되고 있다.

[0004] 이와 같은 지속 가능한 산업 구축에 대한 사회적 요구를 반영하기 위한 전략 중 하나로, 수많은 미생물들의 신진대사를 통해, 재생 가능한 자원으로부터의 다양한 생산물의 탄소 중립적 생산이 연구되고 있다. 그러한 연구의 결과로, 다양한 아미노산, 바이오 기반 플랫폼 화합물질, 바이오 폴리머 및 폴리하이드록시알카노에이트 등의 생분해성 고분자들이 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) 혹은 대장균(*Escherichia coli*)과 같은 재조합 박테리아를 이용하여 성공적으로 개발되고 있다.

[0005] 특히, 카다베린(cadaverine), 5-아미노발레르산(5-AVA), 글루타르산(glutaric acid)과 같은 여러 C5 플랫폼 화학 물질의 바이오 기반 생산은 여러 화학 물질의 추가적인 합성을 위해 중요한 중간 화학체의 역할 및 고분자 단량체의 역할을 수행하여 광범위한 산업 분야에서 적용가능하기 때문에 활발히 연구되고 있다. 종래 연구들을 통해, L-라이신을 통한 대사 경로는 미생물 발효에서 C5 플랫폼 화학 물질을 생성하는 데 선호되는 경로로 알려진 바 있다. 따라서, GRAS(Generally Recognized as Safe) 상태의 L-라이신의 산업적 생산에 널리 사용되는 코리네박테리움 글루타미쿰의 대사 공학은 L-라이신 유래 제품의 생산을 위한 유용한 전략을 제공할 수 있을 것이

다.

- [0006] 한편, 5-히드록시발레르산(5-HV: 5-hydroxyvaleric acid)은 그의 이중-기능적 특성으로 인해 1,5-판탄디올, 8-발레로락톤 또는 테트라히드로피렌과 같은 다양한 화학 물질의 추가 합성에 사용할 수 있는 중요한 C5 부산물 중 하나로 여겨진다. 일 예로, 5-HV 단량체를 포함하는 PHA의 생산은 생분해성과 더불어 우수한 재료 성능으로 인해 관심이 높아지고 있다.
- [0007] 그러나, 여러 C5 플랫폼 화학물질들의 미생물 발효 생산에 성공하였음에도 불구하고, 현재까지 5-HV 생산을 위한 코리네박테리움 글루타미쿰 균주의 대사 공학에 대한 연구는 활발하게 이루어지지 않고 있는 실정이다. 종래 연구에서 L-라이신을 주요 전구체로 사용하여 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰에서 *Pseudomonas putida* davB 및 davA 유전자에 의해 암호화된 L-라이신 이화 경로를 구성함으로써 글루타르산 및 5-AVA가 성공적으로 생성되었음이 보고된 바 있다(Rohles et al., 2016; Shin et al., 2016). 또한 5-aminovalerate transaminase와 glutarate semialdehyde dehydrogenase를 코딩하는 *P. putida* davT 및 davD 유전자의 추가적인 발현은 글루타르산의 효율적인 생산을 가능하게 함이 보고된 바 있다(Rohles et al., 2018; Kim et al., 2019). 다만, 5-AVA 및/또는 글루타르산을 생산하는 코리네박테리움 글루타미쿰 균주의 배양 중에는 5-HV와 같은 추정상의 부산물의 생성은 여전히 보고된 바가 없다.
- [0008] 이러한 배경하에서, 본 발명자들은 인공 5-HV 생합성 경로는 글루타레이트 세미알데히드의 세포내 환원을 매개하는 적절한 알데히드 환원효소의 추가 도입과 함께 L-라이신 이화작용 경로를 조작함으로써 설계될 수 있을 것이라는 가설을 수립하였다.
- [0009] 그에 따라 본 발명자들은 설계된 경로를 도입한 후 부산물 경로를 제거하여 5-HV 생산을 위한 *Corynebacterium glutamicum*의 대사 공학을 완성하였다(도 1). 본 발명자들은 글루타레이트 세미알데히드를 5-HV로 전환할 수 있는 다양한 알데히드 환원효소 중에서 대장균의 YihU, YahK 및 YqhD를 포함한 잠재적 알데히드 환원효소 후보를 조사하였으며, 추가적으로 *Corynebacterium glutamicum*에서 gabD 유전자의 염색체 결실에 의해 부산물인 글루타르산 형성을 담당하는 고유 경로를 제거하였다. 그 결과, 재조합된 *Corynebacterium glutamicum* 균주에서의 현저히 향상된 5-HV 생산 및 감소된 글루타르산 축적을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0011] (비특허문헌 0001) Rohles, C.M., Giebelmann, G., Kohlstedt, M., Wittmann, C., Becker, J., 2016. Systems metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for the production of the carbon-5 platform chemicals 5-aminovalerate and glutarate. *Microb. Cell Fact.* 15(1), 154.
- (비특허문헌 0002) Shin, J.H., Park, S.H., Oh, Y.H., Choi, J.W., Lee, M.H., Cho, J.S., Jeong, K.J., Joo, J.C., Yu, J., Park, S.J., Lee, S.Y., 2016. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for enhanced production of 5-aminovaleric acid. *Microb. Cell Fact.* 15(1), 1-13.
- (비특허문헌 0003) Rohles, C.M., Glöser, L., Kohlstedt, M., Giebelmann, G., Pearson, S., del Campo, A., Becker, J., Wittmann, C., 2018. A bio-based route to the carbon-5 chemical glutaric acid and to bionylon-6, 5 using metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum*. *Green Chem.* 20(20), 4662-4674.
- (비특허문헌 0004) Kim, J.W., Ko, Y.S., Chae, T.U., Lee, S.Y., 2020. High-level production of 3-hydroxypropionic acid from glycerol as a sole carbon source using metabolically engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* <https://doi.org/10.1002/bit.27344>

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0012] 본 발명의 주된 목적은 5-아미노발레이트 아미노트랜스퍼라제(5-aminovalerate aminotransferase; DavT), 라이

신-2-모노옥시게나아제(lysine 2-monooxygenase; DavB), 델타-아미노발레르아미다아제(deltaaminovalelramidase; DavA) 및 알데하이드 리덕테아제의 활성이 강화된, 5-하이드록시발레르산 생산용 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주를 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 다른 목적은 5-아미노발레이트 아미노트랜스퍼라제(5-aminovalerate aminotransferase; DavT)를 코딩하는 DavT 유전자, 라이신-2-모노옥시게나아제(lysine 2-monooxygenase; DavB)를 코딩하는 DavB 유전자, 델타-아미노발레르아미다아제(deltaaminovalelramidase; DavA)를 코딩하는 DavA 유전자 및 알데하이드 리덕테아제를 코딩하는 유전자가 도입된, 5-하이드록시발레르산 생산용 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주를 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 다른 목적은 5-아미노발레이트 아미노트랜스퍼라제(5-aminovalerate aminotransferase; DavT), 라이신-2-모노옥시게나아제(lysine 2-monooxygenase; DavB) 및 델타-아미노발레르아미다아제(deltaaminovalelramidase; DavA)를 코딩하는 뉴클레오티드를 포함하는 제1벡터; 및 알데하이드 리덕테아제를 코딩하는 뉴클레오티드를 포함하는 제2벡터로 형질전환된 5-하이드록시발레르산 생산용 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주로서, 내생의 gabD 유전자가 결손된, 5-하이드록시발레르산 생산용 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주를 제공하는 것이다.

[0018] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주를 배양하는 단계를 포함하는 5-하이드록시발레르산 생산방법에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

[0020] 본 발명에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[0022] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 하나의 양태로 5-아미노발레이트 아미노트랜스퍼라제(5-aminovalerate aminotransferase; DavT), 라이신-2-모노옥시게나아제(lysine 2-monooxygenase; DavB), 델타-아미노발레르아미다아제(deltaaminovalelramidase; DavA) 및 알데하이드 리덕테아제의 활성이 강화된, 5-하이드록시발레르산 생산용 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주를 제공한다.

[0024] 본 발명에서 용어 "5-하이드록시발레르산(5-HV: 5-hydroxyvaleric acid)"은 5-히드록시발레르산이라고도 불리며, 화학식 $C_5H_{10}O_3$, 분자량 118의 탄소화합물이다. 불안정하고 락톤화되기 쉽다는 특징이 있으며, 다양한 화합물의 합성에 이용되어 그 활용도가 높다.

[0026] 상기 코리네박테리움 글루타미쿰 균주는 C.글루타미쿰 또는 *C.glutamicum*으로 명명될 수 있다. 상기 코리네박테리움 균주는 코리네박테리움 글루타미쿰 KCTC 1857 또는 코리네박테리움 글루타미쿰 PKC일 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 바람직한 일 구현예에서, 상기 코리네박테리움 글루타미쿰 균주는 코리네박테리움 글루타미쿰 PKC일 수 있다.

[0028] 본 발명에서 용어 "5-아미노발레이트 아미노트랜스퍼라제(5-aminovalerate aminotransferase; DavT)"는 5-아미노발레르산의 글루타레이트 세미알데하이드(glutarate semialdehyde)로의 전환을 매개하는 효소이다. 상기 5-아미노발레이트 아미노트랜스퍼라제는 구체적으로, 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 단백질일 수 있다.

- [0030] 본 발명에서 용어 "라이신-2-모노옥시게나아제(lysine 2-monooxygenase; DavB)"는 L-라이신(L-lysine)의 5-아미노발레르아미드(5-aminovaleramide)로의 전환을 매개하는 효소이다. 상기 라이신-2-모노옥시게나아제는 구체적으로, 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 단백질일 수 있다.
- [0032] 본 발명에서 용어 "델타-아미노발레르아미다아제(deltaaminovaleramidase; DavA)" 5-아미노발레르아미드의 5-아미노발레르산(5-aminovaleric acid, 5-AVA)로의 전환을 매개하는 효소이다. 상기 델타-아미노발레르아미다아제는 구체적으로, 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 단백질일 수 있다.
- [0034] 본 발명에서 용어 알데하이드 리덕테아제(aldehyde reductase)는 알데하이드 탈수소효소라고도 불리며, 알데하이드의 산화를 촉매하는 효소군이다.
- [0035] 상기 알데하이드 리덕테아제(aldehyde reductase)는 *E. coli*의 알데하이드 리덕테아제 YihU, 알데하이드 리덕테아제 YahK, 및 알데하이드 리덕테아제 YqhD로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다. 본 발명의 바람직한 일 구체예에서, 상기 알데하이드 리덕테아제는 알데하이드 리덕테아제 YahK일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0036] 상기 알데하이드 리덕테아제 YihU는 구체적으로 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 단백질일 수 있고, 상기 알데하이드 리덕테아제 YahK는 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 단백질일 수 있으며, 상기 알데하이드 리덕테아제 YqhD는 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 단백질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0038] 본 발명에서 용어, "단백질 활성의 강화"는 상기 미생물이 내재적 또는 변형 전에 나타내는 단백질의 활성과 비교하였을 때, 그 활성이 내재적 활성에 비하여 증가 또는 향상된 것을 모두 포함하는 개념이다. 상기 강화는 단백질이 미생물 내에 도입되거나, 미생물 내에서 발현되도록 변형된 상태를 의미하는 것일 수 있고, 상기 단백질이 미생물 내 존재하는 유전자 또는 단백질인 경우 내재적 또는 변형 전에 비하여 그 활성이 증가된 상태를 의미한다. 이 때 상기 "단백질의 도입"은, 미생물이 본래 가지고 있지 않았던 특정 단백질의 활성을 나타나게 되는 것 또는 해당 단백질의 내재적 활성 또는 변형 전 활성에 비하여 향상된 활성을 나타나게 되는 것을 의미한다. 예를 들면, 특정 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 미생물 내 염색체로 도입되거나, 특정 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터가 미생물 내로 도입되어 이의 활성이 나타나는 것일 수 있다. 상기 "내재적 활성"은 자연적, 또는 인위적 요인에 의한 유전적 변이로 미생물의 형질이 변화하는 경우, 형질 변화 전의 모균주가 본래 가지고 있던 특정 단백질의 활성을 의미한다.
- [0039] 구체적으로, 본 발명에 따른 단백질의 활성 강화는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 세포 내 카피수 증가; 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 조절 서열에 변이를 도입하는 방법; 상기 단백질을 코딩하는 유전자 발현 조절 서열을 활성이 강력한 서열로 교체하는 방법; 상기 단백질의 활성이 강화되도록 상기 단백질을 코딩하는 유전자에 변이를 추가적으로 도입시키는 방법; 및 미생물에 단백질을 도입하는 방법으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 방법으로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 단백질 활성을 강화시키는 방법이라면 어떠한 것이라도 적용될 수 있음은 당업자에게 자명하다.
- [0040] 상기에서 유전자의 카피수 증가는, 특별히 이에 제한되지 않으나, 벡터에 작동 가능하게 연결된 형태로 수행되거나, 숙주세포 내의 염색체 내로 삽입됨으로써 수행될 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 작동 가능하게 연결된, 숙주와 무관하게 복제되고 기능할 수 있는 벡터가 숙주세포 내에 도입되는 것일 수 있다. 또는, 상기 폴리뉴클레오티드가 작동 가능하게 연결된, 숙주세포 내의 염색체 내로 상기 폴리뉴클레오티드를 삽입시킬 수 있는 벡터가 숙주세포의 염색체 내에 도입되는 것일 수 있다. 상기 폴리뉴클레오티드의 염색체 내로의 삽입은 당업계에 알려진 임의의 방법, 예를 들면, 상동재조합에 의하여 이루어질 수 있다.
- [0041] 다음으로, 폴리뉴클레오티드의 발현이 증가하도록 발현 조절서열을 변형하는 것은, 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 발현 조절서열의 활성을 더욱 강화하도록 핵산 서열을 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합으로 서열상의 변이를 유도하여 수행하거나, 더욱 강한 활성을 갖는 핵산 서열로 교체함에 의하여

수행될 수 있다. 상기 발현 조절서열은, 특별히 이에 제한되지 않으나, 프로모터, 오퍼레이터 서열, 리보솜 결합부위를 코딩하는 서열, 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열 등을 포함할 수 있다.

[0042] 아울러, 염색체상의 폴리뉴클레오티드 서열의 변형은, 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 폴리뉴클레오티드 서열의 활성을 더욱 강화하도록 핵산 서열을 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합으로 발현 조절서열상의 변이를 유도하여 수행하거나, 더욱 강한 활성을 갖도록 개량된 폴리뉴클레오티드 서열로 교체함에 의하여 수행될 수 있다.

[0043] 이와 같은 단백질 활성의 도입 및 강화는, 상응하는 단백질의 활성 또는 농도가 야생형 혹은 조작되지 않은 코리네박테리움 글루타미쿰 균주에서의 단백질의 활성 또는 농도를 기준으로 하여 일반적으로 최소 1%, 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400% 또는 500%, 최대 1000% 또는 2000%까지 증가되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0045] 본 발명의 다른 양태로, 5-아미노발레이트 아미노트랜스퍼라제(5-aminovalerate aminotransferase; DavT), 라이신-2-모노옥시게나아제(lysine 2-monooxygenase; DavB), 델타-아미노발레이트아미다아제(deltaaminovaleramidase; DavA) 및 알데하이드 리덕테아제의 활성이 강화되고, 숙시네이트 세미알데하이드 디하이드로게나제의 활성이 감소 또는 불활성화된, 5-하이드록시발레이트산 생산용 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주가 제공된다.

[0047] 본 발명에서 용어 "숙시네이트 세미알데하이드 디하이드로게나제 (SSD: Succinate Semialdehyde Dehydrogenase)"은 숙시네이트 세미알데하이드를 숙시네이트로 전환하는데 관여하는 효소로, 글루타레이트 세미알데하이드의 글루타르산으로의 전환을 매개할 수 있는 것으로도 알려져 있다. 상기 숙시네이트 세미알데하이드 디하이드로게나제는 NAD⁻ 또는 NADP⁻ 의존적 숙시네이트 세미알데하이드 디하이드로게나제일 수 있다. 상기 숙시네이트 세미알데하이드 디하이드로게나제는 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 단백질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0049] 본 발명의 일 구현예로, 상기 davT,B,A 단백질 서열정보 및 상기 알데하이드 리덕테아제 단백질의 서열정보는 미국생물공학정보센터(NCBI) 등 공지의 데이터베이스로부터 얻을 수 있다. 또한 본 발명에서 '특정 서열번호의 아미노산 서열을 포함하는 단백질'이라고 기재되어 있다 하더라도, 해당 서열번호의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드와 동일 혹은 상응하는 활성을 가지는 경우라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 단백질도 본 발명에서 사용될 수 있음은 자명하다.

[0051] 본 발명에서 용어, "단백질 활성의 감소 또는 불활성화"는 상기 코리네박테리움 글루타미쿰이 내재적 또는 변형 전에 나타내는 단백질의 활성과 비교하였을 때, 그 활성이 내재적 활성에 비하여 약화되거나, 감소되거나, 없는 것을 모두 포함하는 개념이다. 상기 감소 또는 불활성화는 단백질의 활성이 약화되도록 변이된 것일 수 있고, 상기 변이는 비자연적으로 발생된 것일 수 있고, 유전적 변이를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 목적상, 상기 단백질은 숙시네이트 세미알데하이드 디하이드로게나제일 수 있다.

[0052] 구체적으로, 본 발명에서 단백질 활성의 감소 또는 불활성화는 상기 단백질을 코딩하는 염색체상의 유전자의 전체 또는 일부를 결실시키는 방법; 상기 단백질의 활성이 감소되도록 돌연변이된 유전자로, 염색체상의 상기 단백질을 코딩하는 유전자를 대체하는 방법; 상기 단백질을 코딩하는 염색체상의 유전자의 발현 조절 서열에 변이를 도입하는 방법; 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 조절 서열을 활성이 약하거나 없는 서열로 교체하는 방법; 상기 염색체상의 유전자의 전사체에 상보적으로 결합하여 상기 mRNA로부터 단백질로의 번역을 저해하는 안티센스 올리고뉴클레오티드를 도입하는 방법; 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 SD 서열 앞단에 SD 서열과 상보적인 서열을 인위적으로 부가하여 2차 구조물을 형성시켜 리보솜(ribosome)의 부착이 불가능하게 만드는 법 및 해당 서열의 ORF(open reading frame)의 3' 말단에 역전사되도록 프로모터를 부가하는 RTE(Reverse transcription engineering) 방법으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 방법으로 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 단백질 활성을 감소 또는 불활성화시키는 방법이라면 어떠한 것이라도 적용될 수 있음은 당업자에게 자명하다.

- [0054] 본 발명의 다른 일 양태로 5-아미노발레이트 아미노트랜스퍼라제(5-aminovalerate aminotransferase; DavT)를 코딩하는 DavT 유전자, 라이신-2-모노옥시게나아제(lysine 2-monooxygenase; DavB)를 코딩하는 DavB 유전자, 델타-아미노발레이트아미다아제(deltaaminovaleramidase; DavA)를 코딩하는 DavA 유전자 및 알데하이드 리덕테아제(aldehyde reductase)를 코딩하는 유전자가 도입된, 5-하이드록시발레르산 생산용 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주를 제공한다.
- [0056] 본 발명에서의 용어, 유전자의 "도입"은 벡터 상에 자가 프로모터 또는 강화된 별개의 프로모터와 함께 상기 유전자들을 클로닝하여 코리네박테리움 글루타미쿰에 형질전환시키거나 상기 유전자가 염색체상에 삽입되도록 함으로써 수행되는 것일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0058] 상기 DavT 효소를 코딩하는 뉴클레오티드 서열(davT)은 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서 서열번호 1의 뉴클레오티드 서열로 이루어진 것일 수 있고, 상기 DavB 효소를 코딩하는 뉴클레오티드 서열(davB)은 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열로 이루어진 것일 수 있고, 상기 DavA 효소를 코딩하는 뉴클레오티드 서열(davA)은 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서 서열번호 3의 뉴클레오티드 서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [0059] 상기 알데하이드 리덕테아제(aldehyde reductase)는 *E. coli*의 알데하이드 리덕테아제 YihU, 알데하이드 리덕테아제 YahK, 및 알데하이드 리덕테아제 YqhD 로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다. 상기 알데하이드 리덕테아제 YihU를 코딩하는 뉴클레오티드 서열(YihU)은 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서 서열번호 4의 뉴클레오티드 서열로 이루어진 것일 수 있고, 상기 알데하이드 리덕테아제 YahK를 코딩하는 뉴클레오티드 서열(YahK)은 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서 서열번호 5의 뉴클레오티드 서열로 이루어진 것일 수 있고, 상기 알데하이드 리덕테아제 YqhD를 코딩하는 뉴클레오티드 서열(YqhD)은 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서 서열번호 6의 뉴클레오티드 서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [0061] 본 발명의 일 구현예로, 상기 davT,B,A 유전자의 서열정보 및 상기 알데하이드 리덕테아제 유전자의 서열정보는 미국생물공학정보센터(NCBI) 등 공지의 데이터베이스로부터 얻을 수 있다. 또한 본 발명에서 '특정 서열번호의 뉴클레오티드 서열'이라고 기재되어 있다 하더라도, 해당 서열번호의 뉴클레오티드로 이루어진 유전자와 동일 혹은 상응하는 기능 및 활성을 가지는 경우라면, 일부 서열이 결실, 치환, 변형 또는 부가된 염기 서열을 갖는 유전자도 본 발명에서 사용될 수 있음은 자명하다.
- [0063] 즉, 본 발명에서 '특정 서열번호의 아미노산 서열을 포함하는 단백질', '특정 서열번호의 뉴클레오티드 서열'이라고 기재되어 있다 하더라도, 각각 해당 서열번호의 아미노산 서열 혹은 뉴클레오티드로 이루어진 단백질 혹은 유전자와 동일 혹은 상응하는 기능 및 활성을 가지는 경우라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 서열을 갖는 단백질 혹은 유전자도 본 발명에서 사용될 수 있음은 자명하다. 예를 들면, '서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 단백질'은, 이와 동일 혹은 상응하는 활성을 가지는 경우라면 '서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 단백질'에 속할 수 있음은 자명하다.
- [0065] 본 발명에서 용어 '상동성(homology)' 또는 '동일성(identity)'은 두 개의 주어진 아미노산 서열 또는 염기서열과 관련된 정도를 의미하며 백분율로 표시될 수 있다. 용어, 상동성 및 동일성은 종종 상호교환적으로 이용될 수 있다.
- [0066] 보존된 (conserved) 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 서열 상동성 또는 동일성은 표준 배열 알고리즘에 의해 결정되며, 사용되는 프로그램에 의해 확립된 디폴트 갭 페널티가 함께 이용될 수 있다. 실질적으로, 상동성을 갖거나 (homologous) 또는 동일한 (identical) 서열은 일반적으로 서열 전체 또는 전체-길이의 적어도 약 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%를 따라 중간 또는 높은 엄격한 조건(stringent conditions)에서 하이브리드할 수 있다. 하이브리드화는 폴리뉴클레오티드에서 코돈 대신 축퇴 코돈을 함유하는 폴리뉴클레오티드 또한 고려된다.

- [0067] 임의의 두 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열이 상동성, 유사성 또는 동일성을 갖는지 여부는, 예를 들면, Pearson et al (1988)[Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85]: 2444에서와 같은 디폴트 파라미터를 이용하여 "FASTA" 프로그램과 같은 공지의 컴퓨터 알고리즘을 이용하여 결정될 수 있다. 또는, EMBOSS 패키지의 니들만 프로그램(EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277)(버전 5.0.0 또는 이후 버전)에서 수행되는 바와 같은, 니들만-운치(Needleman-Wunsch) 알고리즘(Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453)이 사용되어 결정될 수 있다(GCG 프로그램 패키지(Devereux, J., et al, Nucleic Acids Research 12: 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, [S.] [F.,] [ET AL, J MOLEC BIOL 215]: 403 (1990); Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, [ED.,] Academic Press, San Diego, 1994, 및 [CARILLO ETA/.](1988) SIAM J Applied Math 48: 1073을 포함한다). 예를 들면, 국립 생물공학 정보 데이터베이스 센터의 BLAST, 또는 ClustalW를 이용하여 상동성, 유사성 또는 동일성을 결정할 수 있다.
- [0068] 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 상동성, 유사성 또는 동일성은, 예를 들면, Smith and Waterman, Adv. Appl. Math (1981) 2:482 에 공지된 대로, 예를 들면, Needleman et al. (1970), J Mol Biol. 48:443과 같은 GAP 컴퓨터 프로그램을 이용하여 서열 정보를 비교함으로써 결정될 수 있다. 요약하면, GAP 프로그램은 두 서열 중 더 짧은 것에서의 기호의 전체 수로, 유사한 배열된 기호(즉, 뉴클레오티드 또는 아미노산)의 수를 나눈 값으로 정의한다. GAP 프로그램을 위한 디폴트 파라미터는 (1) 일진법 비교 매트릭스(동일성을 위해 1 그리고 비-동일성을 위해 0의 값을 함유함) 및 Schwartz and Dayhoff, eds., Atlas Of Protein Sequence And Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358 (1979)에 의해 개시된 대로, Gribskov et al(1986) Nucl. Acids Res. 14: 6745의 가중된 비교 매트릭스 (또는 EDNAFULL(NCBI NUC4.4의 EMBOSS 버전) 치환 매트릭스); (2) 각 갭을 위한 3.0의 페널티 및 각 갭에서 각 기호를 위한 추가의 0.10 페널티 (또는 갭 개방 페널티 10, 갭 연장 페널티 0.5); 및 (3) 말단 갭을 위한 무 페널티를 포함할 수 있다.
- [0069] 또한, 임의의 두 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열이 상동성, 유사성 또는 동일성을 갖는지 여부는 정의된 엄격한 조건하에서 써던 혼성화 실험에 의해 서열을 비교함으로써 확인할 수 있으며, 정의되는 적절한 혼성화 조건은 해당 기술 범위 내이고, 당업자에게 잘 알려진 방법(예컨대, J. Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, 1989; F.M. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., New York)으로 결정될 수 있다.
- [0071] 본 발명의 구체적인 일 양태에서, 상기 5-아미노발레이트 아미노트랜스퍼라제(5-aminovaleate aminotransferase; DavT)를 코딩하는 DavT 유전자, 라이신-2-모노옥시게나아제(lysine 2-monooxygenase; DavB)를 코딩하는 DavB 유전자, 델타-아미노발레르아미다아제(deltaaminovaleramidase; DavA)를 코딩하는 DavA 유전자 및 알데하이드 리덕테아제(aldehyde reductase)를 코딩하는 유전자를 코리네박테리움 글루타미쿰 균주에 도입하여 형질전환시키는 것은 하나 이상의 발현백터를 이용하여 이루어지는 것일 수 있다.
- [0073] 상기 용어 "발현백터"란 적당한 숙주세포에서 목적 단백질 또는 목적 RNA를 발현할 수 있는 백터로서, 유전자 삽입물(상기 폴리뉴클레오티드)이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 의미한다. 발현백터는 일단 숙주 세포 내에 있으면 숙주 염색체 DNA와 무관하게 복제할 수 있으며 삽입된 외래 DNA가 발현될 수 있다. 플라스미드가 현재 백터의 가장 통상적으로 사용되는 형태이므로, 본 발명의 명세서에서 "플라스미드(plasmid)" 및 "백터(vector)"는 때로 상호 교환적으로 사용된다.
- [0074] 상기 백터는 플라스미드 백터, 코즈미드 백터, 박테리오파아지 백터 및 바이러스 백터 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 적합한 발현백터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서 같은 발현 조절 엘리먼트 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 시그널 서열 또는 리더 서열을 포함하며 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 백터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 또한 발현백터는 백터를 함유하는 숙주 세포를 선택하기 위한 선택 마커를 포함하고, 복제 가능한 발현백터인 경우 복제 기원을 포함할 수 있다.
- [0076] 상기 용어 "형질전환"은 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체의 인자로서 또는 염색체 통합완성에 의해 복제가

능하게 되는 것을 의미한다. 본 발명에 따른 형질전환에 사용될 수 있는 숙주 세포는 원핵 또는 진핵 세포 모두를 포함할 수 있으며, DNA의 도입효율이 높고, 도입된 DNA의 발현효율이 높은 숙주가 사용될 수 있다. 예를 들어, 에스케리키아, 슈도모나스, 바실러스, 스트렙토마이세스, 진균, 효모와 같은 주지의 진핵 및 원핵숙주들, 스포도프테라 프루기페르다(SF9)와 같은 곤충 세포, CHO, COS 1, COS 7, BSC 1, BSC 40, BMT 10 등의 동물 세포 등이 사용될 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0077] 형질전환은 폴리뉴클레오티드를 도입하는 어떤 방법도 포함되며, 당 분야에서 공지된 바와 같이 숙주세포에 따라 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 이런 방법에는 전기충격유전자전달법(electroporation), 원형질 융합, 인산 칼슘(CaPO₄) 침전, 염화 칼슘(CaCl₂) 침전, 실리콘 카바이드 섬유 이용한 교반, 아그로박테리아-매개 형질전환, PEG(polyethylene glycol), 텍스트란 셀페이트, 리포펙타민, 입자 충격법(particle bombardment) 등이 포함되나 이로 제한되지 않는다.

[0079] 상기 발현백터는 히스티딘-태그(polyhistidine-tag, His-tag)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 추가로 포함할 수 있다. 상기 히스티딘-태그는 6개 이상의 히스티딘(histidine) 잔기(residue)로 구성된 아미노산 모티프로, 본 발명에서는 6개의 히스티딘-태그를 사용한다. 본 발명의 바람직한 일 구현예에서, 상기 히스티딘-태그는 DavB를 코딩하는 뉴클레오티드 서열(davB)의 N-말단에 위치할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0081] 상기 발현백터에 포함된 프로모터는 전사를 시작하는데 필요한 서열로, pL프로모터, trp 프로모터, lac 프로모터, T7 프로모터, tac 프로모터, 합성 프로모터 등을 사용하는 것이 일반적이나, 최적의 발현세기를 나타내기 위해 구체적으로 합성 프로모터인 H30 프로모터를 사용할 수 있다.

[0083] 본 발명의 또 다른 일 양태로 5-아미노발레이트 아미노트랜스퍼라제(5-aminovalerate aminotransferase; DavT)를 코딩하는 DavT 유전자, 라이신-2-모노옥시게나아제(lysine 2-monooxygenase; DavB)를 코딩하는 DavB 유전자, 델타-아미노발레르아미다아제(deltaaminovaleramidase; DavA)를 코딩하는 DavA 유전자 및 알데하이드 리덕테아제(aldehyde reductase)를 코딩하는 유전자가 도입되고, 숙시네이트 세미알데하이드 디하이드로게나제(succinate semialdehyde dehydrogenase)를 코딩하는 내생의 유전자 gabD가 결손 또는 약화된, 5-하이드록시발레르산 생산용 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주를 제공한다.

[0085] 본 발명에서의 용어, 유전자의 "결손"은, 예를 들어 유전체 상에서 상기 유전자 부위를 결실시키거나 특정 유전자 서열을 삽입하여 단백질 서열을 변형시켜 수행되는 것일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 특정 유전자 서열의 삽입은 당업계에서 알려진 임의의 방법, 예를 들면, 상동 재조합에 의하여 이루어질 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0086] 또한 본 발명에서의 용어, 유전자의 "약화"는 예를 들어, 상기 유전자의 프로모터 부위 및 5'-UTR 부위의 염기서열을 변형시킴으로써 단백질의 발현을 약화시키거나 또는 해당 유전자의 코딩 영역(open reading frame) 부위에 변이를 도입하여 효소의 활성을 약화시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다

[0088] 상기 내생의 gabD 유전자란 숙시네이트 세미알데하이드 디하이드로게나제(succinate semialdehyde dehydrogenase)를 코딩하는 유전자로, 코리네박테리움 글루타미쿰 균주가 천연적으로 가지고 있는 gabD 유전자를 의미한다.

[0090] 본 발명에서의 일 구현예로, 코리네박테리움 글루타미쿰 균주의 gabD 유전자의 서열정보는 미국생물공학정보센터(NCBI) 등의 공지된 데이터베이스로부터 얻을 수 있다. 본원의 구체적인 실시예에서는, 코리네박테리움 글루타미쿰 균주에서 내생의 gabD 유전자를 결손시켜 이용하였다. 이 때 상기 코리네박테리움 글루타미쿰 균주 내생의 gabD 유전자의 염기서열은 서열번호 7에 나타내었다.

- [0092] 본 발명의 비제한적인 구체적 일 양태로, 상기 5-아미노발레이트 아미노트랜스퍼라제(5-aminovalerate aminotransferase; DavT), 상기 라이신-2-모노옥시게나아제(lysine 2-monooxygenase; DavB) 및 상기 델타-아미노발레이트아미다아제(deltaaminovaleramidase; DavA)를 코딩하는 뉴클레오티드를 포함하는 제1벡터; 및 상기 알데하이드 리덕테아제를 코딩하는 뉴클레오티드를 포함하는 제2벡터로 형질전환된 5-하이드록시발레르산 생산용 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주로서, 상기 코리네박테리움 글루타미쿰 균주는 내생의 gabD 유전자가 결손된, 5-하이드록시발레르산 생산용 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주를 제공한다.
- [0094] 본 발명의 비제한적인 구체적 또 다른 일 양태로, davT, davB 및 davA 를 포함하는 pCES208 발현벡터; 및 YahK 가 포함된 pBL712 발현벡터로 형질전환된 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주로, 상기 코리네박테리움 글루타미쿰 균주는 내생의 gabD 유전자가 결손된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0096] 본 발명의 또 다른 양태로, 상기 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주를 이용하여, 5-하이드록시발레르산을 생산하는 방법을 제공한다.
- [0097] 상기 5-하이드록시발레르산 생산방법은 구체적으로 상기 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주를 배양하여 배양물을 수득하는 단계를 포함할 수 있다. 본 발명의 일 양태에서 상기 방법은 상기 수득한 배양물로부터 5-하이드록시발레르산을 회수하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0099] 상기 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주는 전술한 바와 동일하게 이해될 수 있다. 상기 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주는 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서, davT, davB 및 davA 를 포함하는 pCES208 발현벡터; 및 YahK가 포함된 pBL712 발현벡터로 형질전환된 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주로, 상기 코리네박테리움 글루타미쿰 균주는 내생의 gabD 유전자가 결손된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0101] 상기 용어 "배양"은 미생물을 적당히 인공적으로 조절한 환경조건에서 생육시키는 것을 의미하며 플라스크배양(flask culture), 회분식 배양(batch culture), 유가식 배양(fed-batch culture)등이 포함될 수 있다. 본 발명의 바람직한 일 구현예에서, 상기 배양은 유가식 배양 일수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0102] 구체적으로 미생물의 발효 개시 전에 질소원이 포함된 배지를 첨가하는 것은 회분식 배양(batch culture)으로 균체증식 또는 물질생산에 필요한 모든 영양소를 함유한 배지를 접종하여 미생물 배양을 하는 것으로, 배양 중에는 새로운 배지의 첨가가 어렵다.
- [0103] 또한, 미생물의 발효시에 질소원이 포함된 배지를 첨가하는 것은 유가식 배양(fed-batch culture)으로 하나 이상의 영양소가 포함된 배지를 발효 개시 직후 또는 배양물이 어떤 단계에 도달한 후에, 또는 공급된 영양소가 배양물로부터 고갈되는 경우, 배양물에 연속적으로 공급하는 방식의 배양을 의미한다. 유가식 배양에서는 일반적으로 단일 영양소, 탄소원이 성장의 제한인자가 된다. 다른 종류의 영양소 제한을 이용할 수도 있는데, 예를 들면 질소원에 의한 제한, 산소에 의한 제한, 황에 의한 제한 및 인에 의한 제한 등이 있다. 본 발명의 목적상 재조합 벡터가 포함된 미생물의 발효시 질소원이 포함된 배지를 연속적으로 공급하는 것을 포함할 수 있다.
- [0104] 배양조건은 특별히 이에 제한되지 않으나, 탄산 칼슘을 사용하여 적정 pH 를 유지할 수 있고, шей킹 속도를 조절하여 호기성 조건을 유지할 수 있다.
- [0106] 본 발명의 목적상 배지는 세포를 배양하는데 사용되는 배지, 목적하는 물질의 생산을 극대화하는데 사용되는 배지 등을 모두 포함한다.
- [0107] 구체적으로 "세포 배양 배지" 또는 "배양 배지" 는 다세포 유기체 또는 조직의 외측인 인공적인 시험관 내 환경에서 세포의 유지, 성장, 증식 또는 팽창을 위한 영양소 용액을 의미한다. 세포 배양 배지는 특정 세포 배양용으로 최적화될 수 있으며, 그 예로는 세포 성장의 지지를 위해 조제된 기본 배양 배지, 또는 목적 물질의 생산을 촉진하도록 조제된 세포 배양 생산 배지, 영양소들을 고농도로 농축시켜 만든 농축 배지일 수 있다. 영양소, 배지 성분이란 용어들은 배지를 구성하는 구성성분을 의미하는 것으로, 본 명세서에서 호환 사용되고 있다.

- [0108] 배양에 사용되는 배지는 적절한 방식으로 특정 균주의 요건을 충족해야 하며, 코리네박테리움 글루타미쿰 균주에 대한 배양 배지는 공지되어 있다(예를 들면, Manual of Methods for General Bacteriology. American Society for Bacteriology. Washington D.C., USA, 1981). 사용될 수 있는 당 원으로는 글루코스, 수크로즈, 락토즈, 프락토즈, 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. 사용될 수 있는 질소원으로는 펩톤, 효모 추출물, 육추출물, 맥아 추출물, 옥수수 침지액, 대두밀 및 요소 또는 무기 화합물, 예를 들면 황산암모늄, 염화암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄 및 질산암모늄이 포함될 수 있다. 질소원 또한 개별적으로 또는 혼합물로서 사용할 수 있다. 사용될 수 있는 인의 원료로는 인산이수소칼륨 또는 인산수소이칼륨 또는 상응하는 나트륨-함유 염이 포함될 수 있다. 또한, 배양 배지는 성장에 필요한 황산마그네슘 또는 황산철과 같은 금속염을 함유할 수 있다.
- [0109] 구체적으로, "기본 배양 배지" 또는 "기본 배지"란 용어는 최소한의 세포의 성장을 지지할 수 있는 배지를 의미한다. 기본 배지는 탄소원, 질소원 이외에 비타민, 무기염류를 공급하는 배지를 의미한다.
- [0110] 또한 구체적으로, "세포 배양 생산 배지" 또는 "생산 배지"란 용어는 생물반응기에서 목적 물질의 발현을 극대화할 목적으로 사용되는 배지를 말한다. 생산배지는 기본배지와 동일하거나 달라질 수 있고, 만약 달라질 경우 기본배지 자체를 농축하거나 기본배지에 특정 성분들을 추가하는 방법으로 제작할 수 있다.
- [0111] 또한, "피딩(feeding) 배지" 및 "추가 배양배지"는 특정 영양소 또는 복수의 영양소로 구성된 배지로서 전부 기본배지의 농축 산물일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니며, 당업자가 배양하는 세포에 따라 피딩 배지의 구성 성분과 농도를 다양하게 제작할 수 있다.

발명의 효과

- [0113] 본 발명은 코리네박테리움 글루타미쿰의 대사경로 엔지니어링을 통해, 기존에는 코리네박테리움 글루타미쿰 균주의 L-라이신 이화경로로부터 거의 생성되지 않던 추정상의 부산물인, 5-HV를 생산하는 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주 및 이를 이용한 5-HV의 생산방법에 관한 것이다.
- [0114] 본 발명에서 제공하는 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰을 사용할 경우 5-HV의 경쟁적 산물인 글루타르산의 축적이 감소하며 5-HV 생산량이 현저히 증가되어 효율적인 5-HV의 생산이 가능하다. 아울러, 본 발명에서 제공하는 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주를 사용하여 유가식 발효를 수행할 경우, 5-HV 생산이 현저히 증가됨을 확인하여, 보다 효율적인 5-HV의 생산을 가능케 한다.

도면의 간단한 설명

- [0116] 도 1은 C. 글루타미쿰에서의 5-HV 생산을 위한 엔지니어링 전략의 개략도를 모식화한 도면이다. 이 때, 표시된 약어의 의미는 다음과 같다: GLU, glucose; OAA, oxaloacetate; L-LYS, L-lysine; 5-AVAM, 5-aminovaleramide; 5-AVA, 5-aminovaleric acid; GSA, glutarate semialdehyde; GTA, glutaric acid; 5-HV, 5-hydroxyvaleric acid; AR, aldehyde reductase.
- 도 2는 플라스크 배양에서의 재조합 C. 글루타미쿰 균주에 의한 L-라이신, 5-AVA, 글루타르산 및 5-HV의 생산을 나타낸 도면이다.
- 도 3은 재조합 C.글루타미쿰 균주에 의한 L-라이신, 5-AVA, 글루타르산 및 5-HV 생산량, glucose 농도, 및 세포 성장(OD₆₀₀)의 시간에 따른 변화를 나타낸다. 구체적으로, 도 3a는 C. glutamicum 5HV-1, 도 3b는 C. glutamicum 5HV-2, 도 3c는 C. glutamicum 5HV-3 균주를 이용한 경우를 나타낸다.
- 도 4는 플라스크 배양에서의 재조합 C. 글루타미쿰 ΔgabD 균주에 의한 L-라이신, 5-AVA, 글루타르산 및 5-HV의 생산을 나타낸 도면이다.
- 도 5는 회분식 발효에서의 재조합 C. 글루타미쿰 ΔgabD 균주에 의한 L-라이신, 5-AVA, 글루타르산 및 5-HV 생산량, glucose 농도, 및 세포 성장(OD₆₀₀)의 시간에 따른 변화를 나타낸다. 구체적으로 도 5a는 C. glutamicum

5HV-4 균주를, 도 5b는 *C. glutamicum* 5HV-5 균주를 이용한 경우를 나타낸다.

도 6은 유가식 발효에서의 재조합 글루타미쿰 5HV-4에 의한 L-라이신, 5-AVA, 글루타르산 및 5-HV 생산량, glucose 농도, 및 세포 성장(OD₆₀₀)의 시간에 따른 변화를 나타낸다.

도 7은 *C. glutamicum* KCTC 1857 및 *C. glutamicum* PKC 균주 각각의 L-라이신, 5-AVA, 글루타르산 및 5-HV 생산량을 나타낸다.

도 8은 pCES208H30eGFP 및 pBL712H30mCherry를 포함하는 *C. glutamicum* PKC의 FACS 분석결과를 나타낸다. 이때, 균주의 형광 강도는 24시간 배양 후 측정되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0117] 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.

[0119] 실시예 1-1. 플라스미드 및 박테리아 균주의 준비

[0121] 본 연구에 사용된 모든 화학물질은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 사용된 모든 박테리아 균주 및 플라스미드는 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0122]

Strains and plasmids	Relevant characteristics	Reference or source
Strains		
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [FA1 <i>proAB lacI</i> ^q <i>ZΔM15 Tn10</i> (Tet ^R)]	Stratagene
<i>C. glutamicum</i> PKC	An expired industrial l-lysine-producing strain	Kim et al. 2018
<i>C. glutamicum</i> KCTC 1857	An expired industrial l-lysine-producing strain	KCTC; Kim et al. 2019
<i>C. glutamicum</i> 5HV-1	<i>C. glutamicum</i> PKC harboring pCES208H30DavTB _{HisA} and pBL712H30YihU	This study
<i>C. glutamicum</i> 5HV-2	<i>C. glutamicum</i> PKC harboring pCES208H30DavTB _{HisA} and pBL712H30YahK	This study
<i>C. glutamicum</i> 5HV-3	<i>C. glutamicum</i> PKC harboring pCES208H30DavTB _{HisA} and pBL712H30YqhD	This study
<i>C. glutamicum</i> Δ <i>gabD</i>	<i>C. glutamicum</i> PKC Δ <i>gabD</i>	This study
<i>C. glutamicum</i> 5HV-4	<i>C. glutamicum</i> PKC Δ <i>gabD</i> harboring pCES208H30DavTB _{HisA} and pBL712H30YahK	This study
<i>C. glutamicum</i> 5HV-5	<i>C. glutamicum</i> PKC Δ <i>gabD</i> harboring pCES208H30DavTB _{HisA} and pBL712H30YqhD	This study
Plasmids		
pCES208H30DavTB _{HisA}	pCES208 derivative; P _{H30} , <i>P. putida</i> KT2440 <i>davTB</i> _{HisA} ; Km ^r	This study
pCES208H30eGFP	pCES208 derivative; P _{H30} , eGFP; Km ^r	This study
pBL712H30-MCS	Expression vector; P _{H30} , <i>Ralstonia eutropha</i> PHA biosynthesis genes transcription terminator; Sp ^r	This study
pBL712H30mCherry	pBL712 derivative; P _{H30} , mCherry; Sp ^r	This study
pBL712H30YihU	pBL712 derivative; P _{H30} , <i>E. coli yihU</i> ; Sp ^r	This study
pBL712H30YahK	pBL712 derivative; P _{H30} , <i>E. coli yahK</i> ; Sp ^r	This study
pBL712H30YqhD	pBL712 derivative; P _{H30} , <i>E. coli yqhD</i> ; Sp ^r	This study

pK19mobSacBGabD	pK19mobSacB derivative; <i>gabD</i> deletion vector; designed to delete 500 nt in-frame	This study
-----------------	---	------------

[0123] *E. coli* XL1-Blue(Stratagene, La Jolla, CA, USA)를 유전자 클로닝 작업에 사용하였으며 모든 DNA의 조작은 표준 절차(Sambrook 및 Russell, 2001)를 준수하여 수행하였다. 중합 효소 연쇄 반응 (PCR)은 C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 수행되었다. 5-HV 생산을 위한 숙주 균주로는 expired 산업용 L-라이신 생산 *C. glutamicum* PKC 균주(Kim et al., 2018) 및 그의 변이체를 이용하였다.

[0124] 또한, 사용된 프라이머는 하기 표 2에 나타낸 바와 같다.

표 2

서열번호	Primer	Sequence (5'-3')	Purpose
15	DavBhis-F	GGATCCATGCACCATCATCACCATCACATGAACAAGAAGACCGCCACCC	DavB _{His}
16	DavBhis-R	GCGGCCGCTTAATCTGCCAGGGCGATCGGG	
17	DavA-F	GCGGCCGAGAGATATACATATGCGCATCGCACTGTACCAAG	DavA
18	DavA-R	GCGGCCGCTTAGCCTTTACGAGGTGCAG	
19	DavT-F	GGATCCAGGAGATATACATATGAGCAAAACCAACGAATCCTTG	DavT
20	DavT-R	AGATCTATGTATATCTCCTTTAGGCGATTTCAGCGAAGCAC	
21	H30-F	GCGCTCGAGAAAGTAACTTTTCGGTTAAGGTAGC	H30 promoter
22	H30-R	GCGGAATCCAATATACTCTGCCCAACCAAC	
23	pBL1-F	GACGTCATTCGGGGTCGTTCACTGG	pBL1 origin
24	pBL1-R	CTCGAGCAACAACAAGACCCATCATAGTTTG	
25	Sp-F	GACGTCGGTTTTTTGCTGAAACCTCAGGC	Spectinomycin resistant gene
26	Sp-R	ACTAGTCTACGCCCGGAGCGTAGCGAC	
27	eGFP-F	GGATCCAGGAGATATACATATGGTGAGCAAGGGCGAGG	eGFP
28	eGFP-R	GCGGCCGCTTACTTGTACAGCTCGTCCATG	
29	mCherry-F	GAATTCATGGTGAGCAAGGGCGAGG	mCherry
30	mCherry-R	GGTACCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGC	
31	YihU-F	GAATTCATGGCAGCGATAGCATTTCATTGGTCTTG	YihU
32	YihU-R	GGTACCTTACATTTTACCTTTGCGGTCATTCCAGC	
33	YahK-F	GGATCCAGGAGATATACATATGAAGATCAAAGCTGTTGGTGC	YahK
34	YahK-R	AGATCTATGTATATCTCCTTCAGTCTGTAGTGTGCGATTATC	
35	YqhD-F	GGATCCAGGAGATATACATATGAACAACCTTAACTCTGCACACCC	YqhD
36	YqhD-R	AGATCTATGTATATCTCCTTTAGCGGGCGGCTTCGTATATAC	
37	GabD1-F	CGATCTCCGTGATCGAATCC	500-bp of upstream region of <i>gabD</i> gene
38	GabD1-R	GCTCATGTGTTCTAGATTTAGCCACCTTCTGGTG	
39	GabD2-F	TGGGCTAAAATCTAGA ACACATGAGCTGTCCGGTGA	500-bp of downstream region of <i>gabD</i> gene
40	GabD2-R	CGGGGTGGCAGGGTTAACTC	
41	GabD-F	CCTGCAGGCATCTCCGTGATCGAATCC	1000-bp DNA fragment of upstream and downstream of <i>gabD</i> gene
42	GabD-R	GAATTCGGGGTGGCAGGGTTAACTC	

[0126] 모든 프라이머는 바이오니아(대전, 한국)에서 합성하였다. 글루타레이트 세미알데하이드(glutarate semialdehyde) 생성에 관여하는 유전자는 플라스미드 pCES208H30DavTDBHisA에서 증폭하였다(Kim et al., 2019). 먼저, DavB의 N-말단 영역에 His6-tag를 포함하는 davBHis 유전자를 프라이머 DavBhis-F 및 DavB-R을 사용하여 PCR로 증폭하였다. PCR 산물을 BamHI 및 NotI로 분해하고 BamHI-NotI로 분해된 pCES208H30 플라스미드와 연결하여 pCES208H30DavBHis를 제조하였다. 다음으로, 프라이머 DavA-F 및 DavA-R을 사용하여 PCR에 의해 davA 유전자를 증폭시켰다. 증폭된 단편을 pCES208H30DavBHis의 NotI 부위에 삽입하였다. 유사하게, 프라이머 DavT-F 및 DavT-R을 사용하여 PCR에 의해 증폭된 davT 유전자를 BamHI 및 BglII로 분해하고 BamHI 부위에서 pCES208H30DavBHisA로 클로닝하여 pCES208H30DavTBHisA를 제조하였다.

[0127] 발현 벡터, pKE112-MCS(Park et al., 2013)를 H30 프로모터, pBL1 원점 및 스펙티노마이신(spectinomycin) 내

성 유전자를 갖도록 변형하였다. 먼저, pKE112-MCS의 tac 프로모터를 XhoI/EcoRI 사이트에서 프라이머 H30-F 및 H30-R을 사용하여 pCES208H30에서 증폭된, H30 프로모터로 교체하여 pKE112H30-MCS를 제조하였다. 다음으로, 프라이머 pBL1-F 및 pBL1-R을 사용하여 PCR에 의해 증폭된 pBL1 원점을 AatII 및 XhoI로 분해하고 pKE112H30-MCS의 동일한 제한 효소 부위에 클로닝하여 pBL112H30-MCS를 제조하였다. 합성된 스펙티노마이신 내성 유전자를 AatII 및 SpeI로 분해하고 AatII/SpeI로 분해된 pBL112H30-MCS에 클로닝하여 pBL712H30-MCS를 제조하였다.

[0128] 하기FACS(fluorescence-activated cell sorting) 분석을 위해, 형광 단백질의 발현을 위한 벡터를 구축하기 위해 플라스미드 pCES208V:eGFP(Baritugo et al., 2018b) 및 플라스미드 pFA-Frm-GESS(Lee et al., 2019)로부터 각각 eGFP-F, eGFP-R 및 mCherry-F, mCherry-R 프라이머를 사용하여 PCR로 egfp 유전자와 mcherry 유전자를 증폭하였다. 그런 다음, 각 PCR 산물을 pCES208H30과 pBL712H30-MCS에 각각 클로닝하여 pCES208H30eGFP와 pBL712H30mCherry를 제조하였다.

[0129] 또한, *E. coli*의 3가지 aldehyde reductase 인코딩 유전자인 yihU, yahK 및 yqhD를 *E. coli* XL1-Blue의 염색체 DNA에서 상응하는 프라이머를 이용하여 PCR로 증폭하였다. 각 PCR 산물을 pBL712H30-MCS에 클로닝하여 pBL712H30YihU, pBL712H30YahK 및 pBL712H30YqhD를 각각 제조하였다.

[0130] 다음으로, *C. glutamicum* PKC 염색체에서의 gabD 유전자 결손을 위해, 플라스미드 pK19mobSacBGabD를 제조하였다. 먼저, GabD1-F 및 GabD1-R 프라이머를 사용하여 *C. glutamicum* PKC 염색체의 DNA로부터 gabD 유전자의 업스트림 영역 500bp를 PCR로 증폭하였다. 다음으로, 프라이머 GabD2-F 및 GabD2-R을 사용하여 *C. glutamicum* PKC 염색체의 DNA로부터 gabD 유전자의 다운스트림 영역 500-bp를 증폭하였다. 그런 다음, gabD 유전자 업스트림 및 다운스트림의 완전한 1000-bp DNA 단편을, 프라이머 GabD-F 및 GabD-R를 사용하여 2개의 500-bp 단편을 주형으로 중첩 PCR에 의해 증폭시켰다. PCR 생성물을 SbfI 및 EcoRI로 분해하고 SbfI-EcoRI로 분해된 pK19mobSacB와 결합시켜 pK19mobSacBGabD를 제조하였다. 플라스미드 pK19mobSacBGabD를 사용하여 염색체에서 gabD 유전자를 결실시켜 상동 재조합을 통해 *C. 글루타미쿰* Δ gabD 균주를 구축하였다.

[0132] 실시예1-2. 배양 조건

[0134] DNA 조작을 위해 kanamycin(Km, 30 μ g/ mL) 및 스펙티노마이신(Sp, 40 μ g/mL)이 플라스미드의 내성 마커에 따라 첨가된, Luria-Bertani(LB) 배지(리터당 10g 트립톤, 5g 효모 추출물 및 10g NaCl 함유)를 배양에 사용하였다.

[0135] 플라스크에서 재조합 *C. glutamicum* 균주를 배양하여 5-HV를 생산하기 위해 CG50 배지를 사용하였다(Kim et al., 2018). CG₅₀ 배지는 리터당: 포도당 50g, 효모 추출물 30g, 30 g (NH₄)₂SO₄ · 7H₂O, 0.5 g KH₂PO₄, 0.5 g MgSO₄ · 7H₂O, 0.01 g MnSO₄ · H₂O, 0.01 g FeSO₄ · 7H₂O, 0.5 mg biotin, 0.3 mg thiamine-HCl, 및 15 g/L CaCO₃을 함유한다. 종자 배양물은 RG(Recovery Growth) 배지가 함유된 14mL 둥근 바닥 튜브에서 250rpm의 회전식 진탕기로 오버나이트(overnight)로 30° C에서 준비되었다(Baritugo et al., 2018b). 다음으로, 2mL의 오버나이트로 배양한 배양물을 250rpm의 회전식 진탕기에서 30° C의 CG50 배지 20mL를 포함하는 250mL 진탕 플라스크로 옮겼다. 재조합 *C. glutamicum* 균주에 대해 각각 20 μ g/mL 및 200 μ g/mL의 Km 및 Sp를 배양 배지에 첨가하였다. 모든 플라스크 배양은 삼중으로 수행하였다.

[0136] 회분식 발효는 30° C 및 600rpm에서 500mL의 CG100 배지를 포함하는 2.5L jar 발효기(BioCNS, Korea)에서 수행되었다. CG100 배지는 리터당: 효모 추출물 30g, (NH₄)₂SO₄30g, 포도당 100g, 0.5 g KH₂PO₄, 0.5 g MgSO₄ · 7H₂O, 0.01 g FeSO₄ · 7H₂O, 0.01 g MnSO₄ · 1H₂O, 0.5 mg biotin, 및 0.3 mg thiamine-HCl을 함유한다. 배양 pH는 28%(v/v) 암모니아 용액에 의해 6.9로 조절되었다. 회분식 배양 동안 Antifoam 289를 첨가하여 거품 형성을 억제하였다. 250 rpm 및 30 °C에서 12시간 동안 50 mL의 CG50 배지를 함유하는 500 mL 진탕 플라스크에 2 mL의 오버나이트로 배양한 배양물을 접종하여 종자 배양물을 제조하였다.

[0137] 유가식 발효는 30 ° C 및 1000 rpm에서 1 L의 CG100 배지를 포함하는 5 L jar 발효기(Satorius, USA)에서 수행되었다. 배양 pH는 28%(v/v) 암모니아 용액에 의해 6.9로 조절되었다. 유가식 발효 동안 Antifoam 289를 첨가하여 거품 형성을 억제하였다. 유가식 발효는 10-20g/L를 유지하기 위해 포도당 수준에 따라 공급 용액을 첨가하는 연속식 공급에 의해 수행되었다. 포도당 농도를 10-20g/L로 유지하기 위해 공급 용액을 첨가하였다. 공급 용액에는 리터당: 850g 포도당, 270 g (NH₄)₂SO₄ · 7H₂O, 및 500 mg MgSO₄ · 7H₂O 이 포함하였다

[0139] 실시예1-3. FACS(fluorescence-activated cell sorting) 분석

[0141] FACS 분석이 *C. glutamicum*에서 구성된 이중 벡터 시스템의 기능과 적용 가능성을 조사하는 데 사용되었다. pCES208H30eGFP 및 pBL712H30mCherry 플라스미드를 모두 포함하는 재조합 *C. glutamicum* PKC를 CG50 배지에서 각각 30° C 및 250rpm에서 배양하였다. 다음으로, 세포를 24시간 후에 수확하고 인산완충식염수(PBS) 완충액을 사용하여 희석하였다. FACS 분석(BD Bioscience, San Jose, CA, USA)은 아르곤 이온 레이저(blue, 488nm)와 대역 통과 필터(green, FITC, 530 nm ± 15 nm; red, PE, 585 nm ± 42 nm)를 사용하여 각 샘플의 100,000개 클론에 대해 수행하였다.

[0143] 실시예1-4. 분석 절차

[0145] UV-1700 분광광도계(Shimadzu, Japan)를 사용하여 600 nm(OD₆₀₀)에서 흡광도를 측정하여 세포 성장을 모니터링하였다. 포도당, 5-HV 및 글루타르산의 농도는 굴절률 검출기(RID) 및 Bio-RAD Aminex HPX-87H컬럼이 장착된 고성능 액체 크로마토그래피[HPLC, Infinity 1260(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)]로 분석되었다. 용출(elution)은 5mM의 H₂SO₄에서 50° C, 0.8mL/min의 유속으로 수행되었다. 5-AVA와 L-라이신의 농도는 VWD(Variable Wavelength Detector)와 C18 column(RStech, DaeJeon, Korea)이 장착된 HPLC로 DEEMM 방법(Kim et al., 2015)에 따라 분석하였다. 이동상 A(아세트오닐리드) 및 이동상 B(25mM 아세트산나트륨 완충액, pH 4.8)를 사용하여 용출을 수행하였다. 유속은 1mL/min이었고 분석물은 284nm에서 다음과 같은 농도구배 프로그램으로 검출되었다: 0-2분, 20-25% A; 2-32분, 25-60% A; 32-40분, 60-20%.

[0147] 실시예 2-1. 각 C. 글루타미쿰 균주에서의 5-HV 생합성 능력의 조사

[0148]

[0149] 5-HV는 *Clostridium aminovalericum*에 의해 5-AVA가 아세테이트(acetate), 프로피오네이트(propionate), 발레레이트(valerate) 및 암모니아로 분해되는 대사 경로에서 발견되는 중간체이며, 여기서 5-AVA는 글루타레이트 세미알데히드로 전환된 다음 5-HV로 환원된다(Barker et al., 1987). *C. aminovalericum*의 5-AVA 분해 경로와 *P. putida*의 L-lysine 이화 경로가 5-AVA 및 glutarate semialdehyde와 같은 특정 대사산물을 공유한다는 점을 감안할 때, 5-HV 생산을 위한 인공적 경로는 적절한 알데히드 환원효소를 추가로 도입하여 L-라이신 이화작용 경로를 재구성함으로써 L-라이신으로부터 합리적으로 설계될 수 있다. 본 발명자들의 이전 연구에서, 5-AVA 및 글루타르산의 생산을 위한 이중성 *P. putida* L-lysine 이화 경로는 *C. glutamicum*에서 각각 davBA 유전자 및 davTDBA 유전자를 발현시킴으로써 성공적으로 설계되었다(Joo et al., 2017; Kim et al., 2019; Shin et al., 2016). L-라이신 이화 경로의 중간체인 글루타레이트 세미알데하이드는 글루타르산과 5-HV 모두로 전환될 수 있으나, davTDBA를 발현하는 *C. 글루타미쿰* KCTC 1857의 배양 동안에는 글루타르산의 고수준 생산을 위해 5-HV는 생성되지 않았다(Kim et al., 2019). 따라서 플라스미드에서 davD 유전자의 발현이 글루타르산에 대한 더 높은 대사 플럭스를 지원하여 검출 가능한 수준의 5-HV 없이 글루타르산의 생산을 초래하는 것으로 가정하였다. 그리하여, 본 발명자들은 먼저 davD 유전자 없이 davTBA 유전자만을 발현하는 *C. 글루타미쿰*에 의해 5-HV가 생성될 수 있는지 여부를 실험하였다.

[0150] *C. glutamicum* KCTC 1857 및 PKC 두 균주는 모두 L-lysine을 주요 전구체로 사용하여 글루타르산 및 카다베린(cadaverine) 생산에 성공적으로 사용되었기 때문에 5-HV 생산을 위한 숙주 균주로 평가되었다(Kim et al., 2019, 2020). 또한 davB의 N-말단 영역에 His₆-태그를 도입하면 재조합 *C. 글루타미쿰* 균주에서 글루타르산의 생산 증가를 지원하는 것으로 보고된 바 있다(Kim et al., 2019). 따라서, L-라이신을 글루타레이트 세미알데히드로 전환시키기 위해 N-말단에 His₆-tag가 융합된 davB와 함께 davTA 유전자를 발현하는 pCES208H30DavTBHisA를 제작하였고, *C. 글루타미쿰* KCTC 1857 및 PKC 두 균주에 형질 전환시켰다. 두 균주 각각 0.21 ± 0.05 g/L 및 0.29 ± 0.12 g/L 농도의 5-HV를 생성할 수 있으며, 이는 이러한 재조합 *C. 글루타미쿰* 균주에서 알려지지 않은 내인성 알데히드 환원효소에 의해 글루타레이트 세미알데히드가 5HV로 환원될 수 있음을 시사한다. 5-HV가

L-라이신 이화작용 경로를 통해 생산될 수 있음이 확인되었으나, 재조합 *C. 글루타미쿰* KCTC 1857 및 PKC 균주에 의해 각각 0.79 ± 0.31 g/L 및 0.88 ± 0.16 g/L의 더 높은 농도의 글루타르산이 수득되었다. 이러한 결과는 글루타레이트 세미알데하이드의 글루타르산으로의 전환을 매개하는 내인성 숙신산(succinate) 세미알데하이드 디하이드로게나제 (*gabD*)에 의해 암호화됨; Shin et al., 2016; Kim et al., 2019)의 존재로 인해 *davD* 유전자의 발현 없이도 글루타르산으로의 대사 플럭스가 5-HV으로의 플럭스보다 여전히 선호됨을 시사한다. 두 균주 모두 5-HV 생산 및 글루타르산 형성에 대한 비슷한 능력을 보여주었기 때문에, L-라이신 이화 경로에 대한 더 높은 흐름을 갖는 균주를 확인하기 위해 *davTBhisA* 유전자를 도입하여 생성된 다른 대사산물을 모니터링 하였다. 그 결과 *C. glutamicum* PKC는 *C. glutamicum* KCTC 1857(L-lysine, 2.99 ± 0.42 g/L, 5-AVA, 0.44 ± 0.11 g/L)보다 L-라이신 및 5-AVA의 더 높은 생산을 나타내었다(6.98 ± 1.47 g/L). 따라서, *C. 글루타미쿰* PKC 균주를 사용하여 하기와 같은 추가적 조작을 수행하였다.

[0152] 실시예2-2. *C. 글루타미쿰*에서 구성된 듀얼 벡터 시스템의 기능 검증

[0154] 제어된 방식에서의 다중 유전자의 동시 발현은 외래 대사 산물을 생산하는 대사 경로의 효율적인 작동에 있어 중요하다. 그러나, 단일 폴리시스트론 벡터를 기반으로 하는 이중 대사 경로를 코딩하는 다중 유전자의 발현 시스템은 종종 플라스미드 상의 다운스트림 유전자의 낮은 전사 효율을 초래한다. 목적 유전자의 안정적인 발현을 위해 다양한 선택 마커 및 호환 가능한 레플리콘을 보유하는 다중 플라스미드 기반의 발현 시스템이 사용되었다 (Akiba 및 Tsumoto, 2016; Sørensen 및 Mortensen, 2005). 최근, *C. 글루타미쿰*에 대한 호환 가능하고 이중 유도성의 서틀 발현 벡터가 여러 유전자의 동시 발현을 엄격하게 조절하는 것으로 입증된 바 있다(Gauttam et al., 2019). *C. 글루타미쿰*에서 5-HV 생합성 경로에 관여하는 다중 표적 유전자의 공동 발현을 위한 대사 공학적 접근을 확장하기 위해, 본 발명자들은 pHM1519/p15a 및 pBL1/ColE1 레플리콘을 수반하는 pCES208H30 및 pBL712H30-MCS를 포함하는 듀얼 벡터 시스템을 구축하였다

[0155] *C. glutamicum* PKC에서의 듀얼 벡터 시스템의 기능성과 적용 가능성은 두 형광 단백질 eGFP 및 mCherry를 발현 시키고, FACS를 통해 형광 수준을 측정하여 검증하였다. *C. 글루타미쿰* PKC에서 *egfp* 및 *mcherry* 유전자를 발현 시키기 위해, 각각 eGFP 및 mCherry를 함유하는 플라스미드 pCES208H30eGFP 및 pBL712H30mCherry를 구축하고 두 플라스미드를 동시에 *C. 글루타미쿰* PKC에 도입하였다. 도 8에서 볼 수 있듯이 pCES208H30eGFP와 pBL712H30mCherry를 포함하는 *C. glutamicum* PKC는 두 형광 단백질을 안정적으로 동시 발현하고 발현 수준을 유지할 수 있었다. *C. glutamicum*에서 듀얼 벡터 시스템이 잘 작동함을 확인하여, 따라서, 개발된 듀얼 벡터 시스템을 기반으로 5-HV 생합성 경로를 구축하였다.

[0157] 실시예2-3. *C. 글루타미쿰*의 5-HV 생합성 경로 설계 및 5-HV 생산의 검증

[0159] 5-HV는 pCES208H30DavTBHisA를 포함하는 재조합 *C. 글루타미쿰* 균주에 의해 생산될 수 있지만, 그 생산 수준은 다소 낮았고 훨씬 더 많은 글루타르산이 부산물로 축적되었다. 알데히드 환원효소는 5-HV 생합성에서 중요한 반응 단계를 촉매하기 때문에 우리는 5-HV 생산을 위한 보다 효율적인 효소를 찾기 위해 대장균에서 YihU, YahK 및 YqhD와 같은 세 가지 알데히드 환원효소를 조사하였다(Saito et al., 2009 ; Pick et al., 2012). 글루타레이트 세미알데하이드를 5-HV로 전환시키는 알데히드 환원효소 유전자의 발현을 위해, 각각 *yihU*, *yahK* 및 *yqhD* 유전자를 발현하는 3개의 상이한 플라스미드를 pBL712H30-MCS를 기반으로 제작하였다. 이어서, 생성된 각각의 플라스미드 및 pCES208H30DavTBHisA를 *C. 글루타미쿰* PKC 균주에 동시에 형질전환시켰다. 5-HV 생합성을 위한 세 가지 재조합 *C. 글루타미쿰* PKC 균주를 개발하였으며, 다음과 같이 명명하였다: *C. 글루타미쿰* 5HV-1(pCES208H30DavTBHisA 및 pBL712H30YihU를 보유하는 *C. glutamicum* PKC), *C. glutamicum* 5HV-2(pCES208H30DavTBHisA 및 pBL712H30YahK를 보유하는 *C. glutamicum* PKC), 및 *C. glutamicum* 5HV-3(pCES208H30DavTBHisA 및 pBL712H30YqhD를 보유하는 *C. glutamicum* PKC).

[0160] 다음으로, 본 발명자들은 상기 세 가지 재조합 *C. 글루타미쿰* 5HV-1, 5HV-2 및 5HV-3의 50g/L의 포도당으로부터 5-HV를 생산하는 능력을 플라스크 배양 하에서 조사하였다. 5-HV 생산 역가가 *davTBhisA* 유전자를 발현하는 *C. 글루타미쿰* PKC에 의해 얻어진 것과 비교하여 증가되었음에도 불구하고, 여전히 모든 균주에서 부산물로 축적되는 상대적으로 높은 농도의 글루타르산이 관찰되었다(도 2). 이들 균주의 120시간 배양 후, 5-HV의 농도는 각각

0.44 ± 0.12(*C. glutamicum* 5HV-1), 0.78 ± 0.38 g/L(*C. glutamicum* 5HV-2) 및 1.30 ± 0.63 g/L(*C. glutamicum* 5HV-3)로 나타났으며, 글루타르산의 농도는 각각 1.72 ± 0.25 g/L(*C. glutamicum* 5HV-1), 0.62 ± 0.16 g/L(*C. glutamicum* 5HV-2) 및 0.62 ± 0.06 g/L(*C. glutamicum* 5HV-3)로 나타났다.

[0161] pH, 용존산소량 등의 발효조건을 철저하게 관리하여 *C. glutamicum*의 5-HV 생산능력을 극대화하기 위해 각 균주에 대해 2.5L 회분식(batch) 발효를 수행하였다(도 3). *C. glutamicum* 5HV-1, 5HV-2 및 5HV-3 균주의 회분식 발효시의 시간에 따른 5-HV 생산량은 각각 도 3a, 도 3b, 및 도 3c에 나타내었다. 발효 말기의 5-HV 농도는 각각 8.38g/L(*C. glutamicum* 5HV-1), 15.45g/L(*C. glutamicum* 5HV-2), 14.57g/L(*C. glutamicum* 5HV-3)이었다. 주요 부산물인 글루타르산은 최종 농도 7.42g/L(*C. glutamicum* 5HV-1), 3.92g/L(*C. glutamicum* 5HV-2) 및 3.89g/L(*C. glutamicum*, 5HV-3)로 축적되었다. 플라스크 배양 결과, *C. glutamicum* 5HV-2 및 5HV-3 균주가 *C. glutamicum* 5HV-1보다 5-HV 생산에서 더 우수한 성능을 보였다. *C. glutamicum* 5HV-3가 가장 높은 5-HV 생산을 기록하였던 플라스크 배양에서의 결과와는 달리, 회분식 발효에서는 *C. glutamicum* 5HV-2에 의해 5-HV의 높은 생산율이 달성되었다. 본 연구에서의 플라스크 배양 및 회분식 발효에서 생산되는 표적 생화학물질의 농도 차이는 이전 연구에서도 관찰되었던 바 있다(Kim et al., 2019). *C. glutamicum* 5HV-2 및 *C. glutamicum* 5HV-3 균주는 비교적 높은 농도로 유사한 수준의 5-HV 생산을 나타내므로, 본 발명자들은 두 균주 모두를 5-HV 생산을 향상시키기 위한 추가적인 대사 조작의 균주로 선택하였다.

[0163] 실시예2-4. 5-HV의 생산 증진을 위해 부산물 경로를 제거한 재조합 *C. glutamicum* 균주의 구축

[0165] gabD 유전자에 의해 암호화된 내인성 *C. glutamicum* 숙시네이트 세미알데하이드 탈수소효소는 글루타레이트 세미알데하이드에 대해서도 활성인 것으로 알려졌다(Rohles et al., 2016; Shin et al., 2016). 5-HV 생합성 경로는 동일한 중간체인 글루타레이트 세미알데하이드에 대해 글루타르산 생합성 경로와 경쟁하기 때문에, 결과적으로 배양 배지에서 상당한 양의 글루타르산 부산물이 발생하여 5-HV의 생산을 감소시켰다.

[0166] 따라서, 재조합 *C. glutamicum* PKC 균주에서 5-HV의 생산과정 동안 글루타르산 생합성을 감소시키기 위해, *C. glutamicum*의 염색체에서 내생의 gabD 유전자를 제거하였다. 이를 위해 *C. glutamicum* PKC의 염색체에 있는 gabD 유전자를 녹아웃시킨 균주를 제작하였으며 이를 *C. glutamicum* ΔgabD 균주로 명명한다. 이 때, 5-HV 생합성을 위한 다음의 두 가지 다른 재조합 *C. glutamicum* 균주를 개발하였으며, 다음과 같이 명명하였다: *C. glutamicum* 5HV-4(pCES208H30DavTBHisA 및 pBL712HH30YahK를 보유하는 *C. glutamicum* ΔgabD) 및 *C. glutamicum* 5HV-5(pCES208H30DavTBHisA 및 pBL712H30YqhD를 보유하는 *C. glutamicum* ΔgabD).

[0167] 그런 다음, 120시간 플라스크 배양에 의해 이 두 *C. glutamicum* 균주를 통해 5-HV 생산에 대한 부산물 경로 제거의 효과를 검증하였다(도 4). 120시간 배양 후의 5-HV의 농도는 0.97 ± 0.38 g/L(*C. glutamicum* 5HV-4), 1.16 ± 0.64 g/L(*C. glutamicum* 5HV-5)로 나타났으며, 이는 gabD 유전자 결손이 없는 재조합 *C. glutamicum* 5HV-1, -2 및 -3 균주와 비교하여 개선된 5-HV의 생산을 나타낸다. 글루타르산의 축적 또한 0.54±0.21g/L(*C. glutamicum* 5HV-4), 0.47±0.10g/L(*C. glutamicum* 5HV-5) 수준으로 크게 감소하였다.

[0168] 다음으로, 5-HV 생산 향상을 위해 *C. glutamicum* 5HV-4 및 5HV-5 균주의 회분식 발효를 수행하였다. *C. glutamicum* 5HV-4 및 5HV-5 균주의 회분식 발효의 시간에 따른 결과는 각각 도 5a 및 도 5b에 개시하였다. *C. glutamicum* 5HV-4는 114.1의 최종 OD₆₀₀으로 20.1g/L의 5-HV를 생산한 반면, *C. glutamicum* 5HV-5는 113.7의 최종 OD₆₀₀으로 16.1g/L의 5-HV를 생산하였다. 이러한 역가는 *C. glutamicum* 5HV-2 및 5HV-3 균주에 의해 달성된 것보다 각각 약 30% 및 약 10% 더 높았다. 발효 완료시의 글루타르산 농도 또한 두 균주에서 각각 1.9g/L 및 2.1g/L로 감소하였다. 내인성 gabD 유전자를 포함하는 5-HV 생산 균주의 5-HV 생산은 상기 도 4에서의 발효 결과와 같이, yqhD 유전자보다 yahK 유전자의 과발현에 의해 더 높게 달성되었다. 상기 회분식 발효의 결과에 기반하여, 부산물 축적이 훨씬 감소되면서 가장 높은 5-HV 생산을 나타낸 *C. glutamicum* 5HV-4 균주(yahK 유전자 발현)를 추가적 유가식 발효를 위해 선택하였다.

[0170] 실시예2-5. 5-HV 생산을 위해 조작된 *C. glutamicum* 균주의 유가식 발효

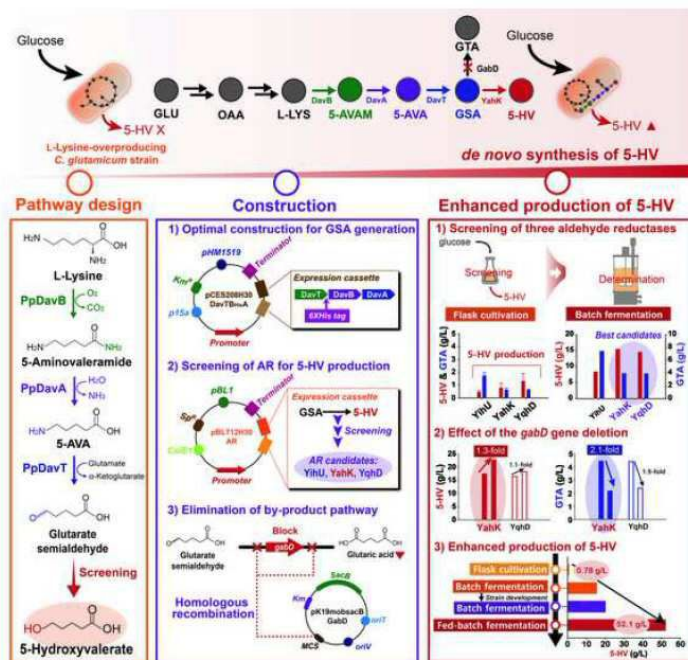
[0172] 포도당 농도를 10-20g/L 부근으로 유지하여 높은 수준의 5-HV를 생산하기 위해 *C. glutamicum* 5HV-4 균주의 유가식 발효가 수행되었다. *C. 글루타미쿰* 5HV-4 균주의 유가식 발효의 시간에 따른 경과를 도 6에 나타내었다. 유가식 발효 81시간 후 *C. 글루타미쿰* 5HV-4 균주는 포도당에 대해 0.33g의 수율 및 $0.64\text{g L}^{-1}\text{h}^{-1}$ 의 생산율로 52.1g/L의 5-HV를 생산하였으며, 부산물인 글루타르산의 농도는 7.8g/L로, 비교적 적은 양으로 축적되었다. 57시간의 유가식 발효 후에 128.4의 최대 OD₆₀₀에 도달하였으며, 21시간 동안 유지되었다. 발효 말기 배양 배지에서 L-라이신 및 5-AVA와 같은 미전환 중간체의 농도는 각각 15.2g/L 및 1.35g/L로 관찰되었으며, 최종 5-AVA 농도 또한 현저히 감소하였음을 확인하였다.

[0174] 위와 같은 실시예들을 통해, *P. putida* davTBA 유전자에 의해 암호화된 L-라이신 이화 경로를 통해 L-라이신에서 글루타레이트 세미알데하이드의 생성으로부터 시작되는 *C. 글루타미쿰*에서의 인공 5-HV 생합성 경로를 성공적으로 확립하였다. 5-HV 생합성 경로의 다운스트림을 완성하기 위해 글루타레이트 세미알데하이드의 5-HV로의 세포내 환원을 담당할 수 있는 다양한 알데하이드 환원효소를 조사하였다. 뿐만 아니라 조작된 *C. 글루타미쿰* 균주는 주요 부산물인 글루타르산 생산을 주로 담당하는 숙시네이트 세미알데히드 탈수소효소를 암호화하는 gabD 유전자를 염색체에서 제거하도록 추가적으로 개발되었으며, 궁극적으로 글루타르산 축적이 훨씬 감소하면서 5-HV 생산이 향상되었다. 더 나아가, 염색체에서 gabD 결실과 함께 *P. putida* davTBA 유전자 및 *E. coli* yahK 유전자를 발현하는 최종 조작된 *C. 글루타미쿰* PKC 균주를 사용한 유가식 발효는 52.1g/L의 현저히 향상된 5-HV 생산을 나타냄을 확인하였다.

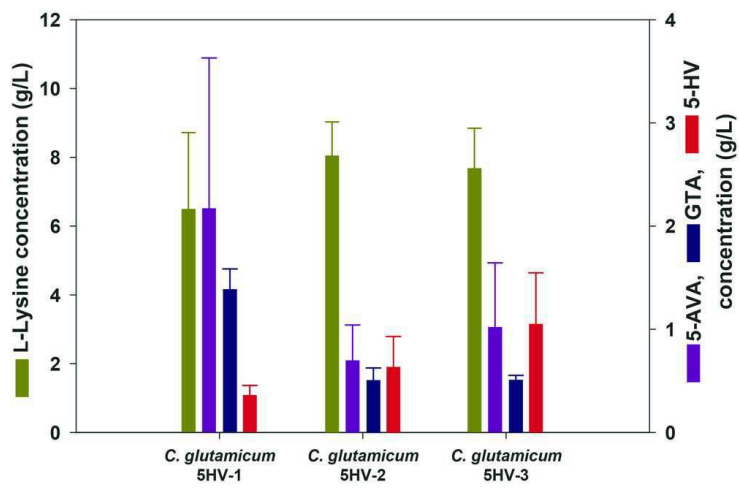
[0176] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

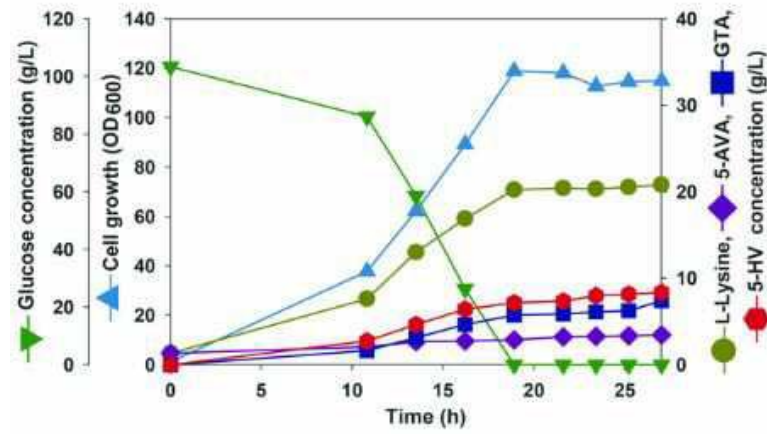
도면1



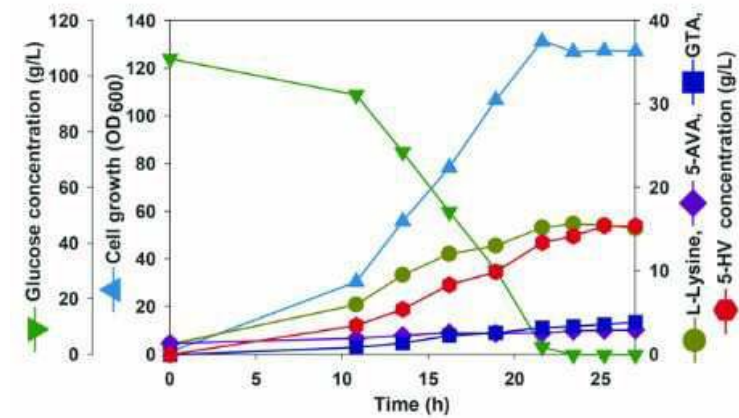
도면2



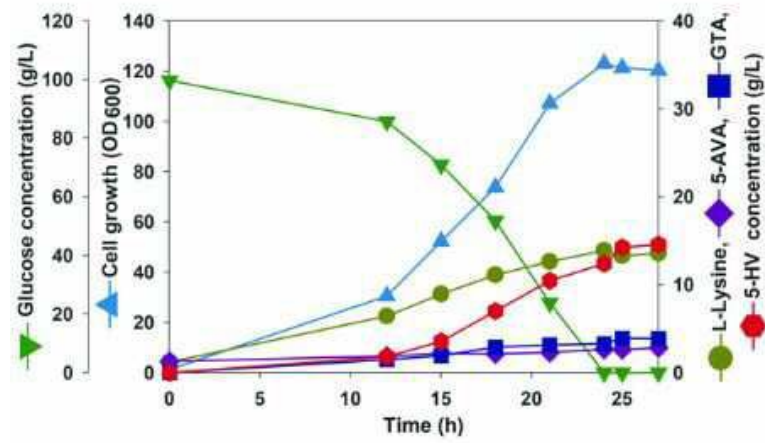
도면3a



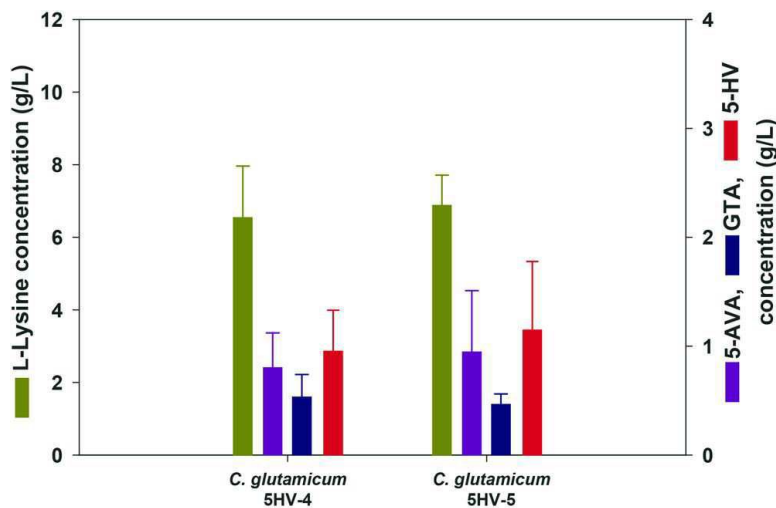
도면3b



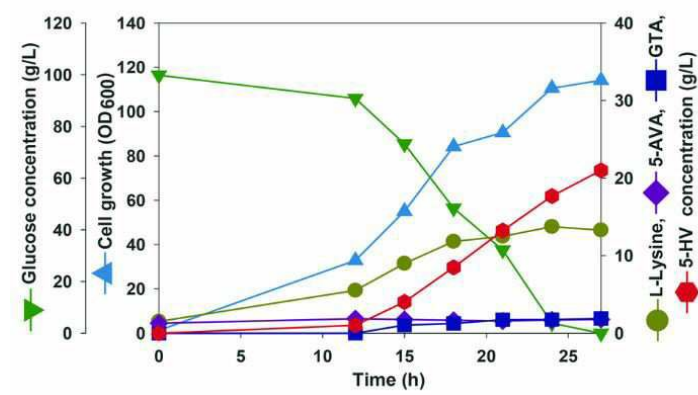
도면3c



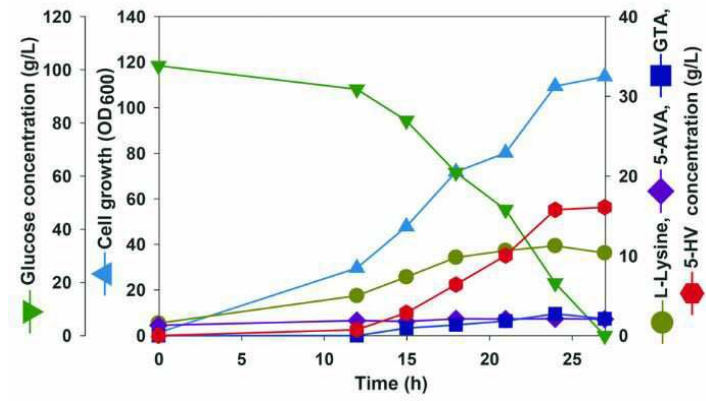
도면4



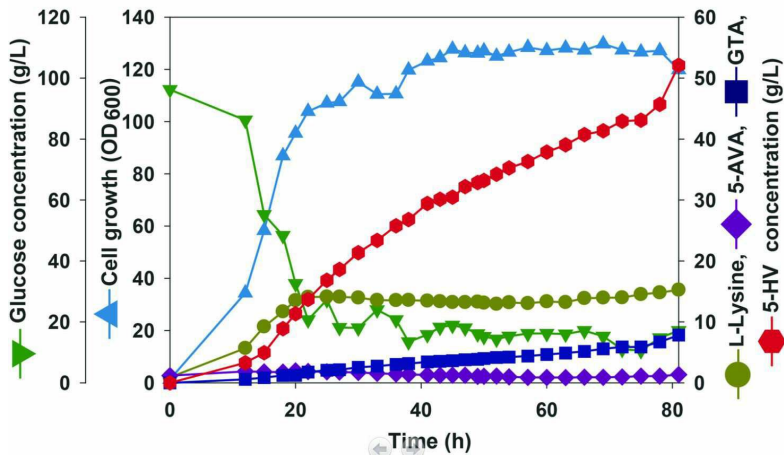
도면5a



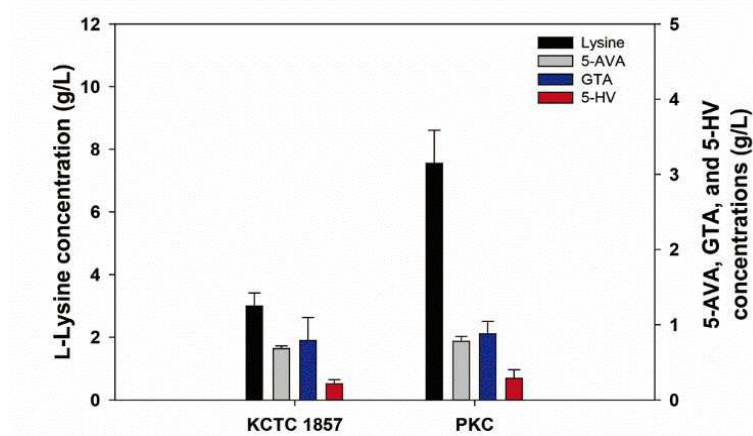
도면5b



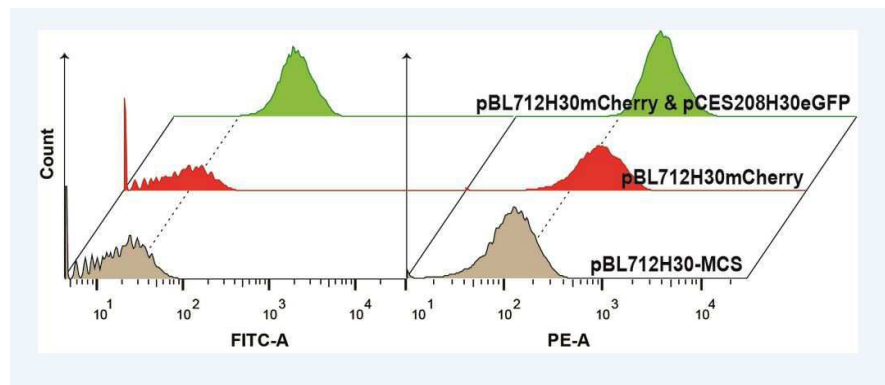
도면6



도면7



도면8



서열 목록

- <110> KOREA RESEARCH INSTITUTE OF CHEMICAL TECHNOLOGY
Ewha University - Industry Collaboration Foundation
THE CATHOLIC UNIVERSITY OF KOREA INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION
- <120> Recombinant *Corynebacterium glutamicum* strain for producing
5-hydroxyvaleric acid and a method of producing glutaric acid
using the same
- <130> KPA201225-KR
- <150> KR 10-2020-0126927
- <151> 2020-09-29
- <160> 42
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 1278
- <212> DNA
- <213> *Pseudomonas putida*
- <220><221> gene
- <222> (1)..(1278)
- <223> recombinant *davT*
- <400> 1
- | | |
|---|-----|
| atgagcaaaa ccaacgaatc cttgatgcaa cgtcgtgtag ctgccgtccc acgtggcgtc | 60 |
| ggccagatcc acccgatctt cgtcgacacc gcgaagaact cgaccgtgat cgacgttgaa | 120 |
| ggccgcgaac tgatcgactt cgccggcggc atcgcagtac tgaacaccgg ccacctgcac | 180 |
| ccgaaagtag ttgcagccgt gcaagagcag ctgaccaagg tcagccacac ctgcttcag | 240 |

gtgctggctt acgagcccta ttagagctg tgcgaaaaga tcaacaagct ggtcccaggc 300

gacttcgaca agaagaccct gctgttcacc accggctccg aagccgttga aaacgccgtc 360

aagatcgccc gtgctgccac tggccgcgct gggtcatcg cttcaccgg cggttatcac 420

ggccgtacca tgatgacctt gggcctgacc ggcaaggtcg tgccgtactc cgctggcatg 480

ggcctgatgc caggcggcat cttccgcgcc ctgttcccga gcgaactgca cggtatcagc 540

gttgacgacg ccacgcctc ggtcgagcgc atcttcaaga acgacgccga gccgcgcgac 600

atcgccgcaa tcacctcga gccagtacaa ggcaaggcg gcttcctgcc agcgccgaaa 660

gagctgatga agcgctcgc cgccctgtgc gaccagcacg gcacctgct gatcgccgac 720

gaagtacaaa ctggcgctgg ccgtaccggc accttcttcg ccatggaaca gatgggcgtt 780

gcgcctgacc tgaccacctt cgccaaatcc atcgctggcg gcttcccgt ggccggtgtg 840

tgccgcaagg ccgaatacat ggacgccatc gcgcctggcg gctgggaggg tacctacgcc 900

ggttcgccga tcgcttgccg cgcgccctg gccgtgatcg aagtgttcga agaagaaaa 960

ctgctggacc gcagcaaggc tgtgggtgag cgctgaccg ccggcctgcg cgaaatccag 1020

aagaagtacc cgatcatcg gcagctccgt ggtctgggct cgatgattgc cgtcgaagtc 1080

ttcgagaagg gcactcacac cccgaacgct gctgctgttg gccaggttgt cgccaaggct 1140

cgtagaaagg gtcgatcct gctgtcttgc ggacactacg gcaacgtcct gcgtatcctg 1200

gttccgctga ccgccgaaga cgcgctgctg gacaaaggcc tggccatcat cgaagagtgc 1260

ttcgctgaaa tcgcctga 1278

<210> 2

<211> 1683

<212> DNA

<213> Pseudomonas putida

<220><221> gene

<222> (1)..(1683)

<223> recombinant davB

<400> 2

atgaacaaga agaaccgcca ccccgccgac ggcaagaagc cgatcaccat ttccggcccc 60

gacttccctt ttgctttcga cgactggctg gaacacccgg caggcctggg cagcattccg 120

gctgagcgcc atggggaaga ggtggccatt gtcggtgccg gtatcgccgg cctggtagcg 180

gcctacgagc tgatgaagct gggcctcaag ccggtggtgt acgaggttc caagctgggc 240

ggccggctgc gctcgcaagc cttcaatggc actgacggga tcgttgccga actgggtggc 300

atgcgcttcc cggtgtcgtc caccgccttc taccactacg tcgacaagct gggcctggaa 360
 accaagccct tcccaaccc gctgaccccg gcttcgggca gcacggtgat cgacctggaa 420
 ggccagacct actacgccga gaagcccacc gacctgccac aactgtttca tgaggtagcc 480
 gacgcctggg ccgatgcgtt ggagagcggg gcgcagttcg ccgatatcca gcaggccatc 540

cgcgaccgtg atgtaccgcg cctgaaggaa ctttggaaaca agctgggtgcc gctgtgggac 600
 gaccgcacct tctacgactt cgtcgccacc tcgcgtcttt ttgccaagct gagcttccag 660
 caccgcaag tggtcggcca ggctcggtttc ggccaccggcg gttgggactc ggacttcccc 720
 aactcgatgc tggaaatctt ccgcgtgggtg atgaccaact gcgacgacca ccagcacctg 780
 gtggtcgggg gcgtggaaca agtgccacaa ggcatctggc gccacgtacc ggaacgtgc 840
 gtgcattggc cagagggcac cagcctgagc acgtgcatg gcggcgcacc gcgtaccggt 900
 gtcaagcgca ttccccgcgc ctccgatggc cgcctggcgg tcaccgacaa ctggggcgat 960

acccgccact acagcgcagt actcgccacc tgccagacct ggttgctgac caccagatc 1020
 gactgcgaag aatcgtgtt ctgcaaaag atgtggatgg ccctggaccg taccgctac 1080
 atgcagtcgt cgaaaacctt cgtcatggtc gaccgcccgt tctggaagga caaggaccg 1140
 gaaacggcc gtgacctgct gagcatgacc ctaccgatc gcctcaccg cggcacttac 1200
 ctgttcgaca acggcaacga caagcccggg gtgatctgcc tgtcatactc gtggatgagc 1260
 gacgcgtga agatgctgcc gacccgggtg gagaagcgcg tacaactggc cctggatgag 1320
 ctgaagaaga tctaccgaa gaccgatatc gccggccaca tcatcggcga cccgatcacg 1380

gtttcctggg aggccgacc gtacttctc ggcgcttca aaggcgcgt tccgggcat 1440
 taccgtaca accagcgcgt gtacgcgcac ttcatgcagc aggacatgcc ggcagagcag 1500
 cgcggtatct tcattgtcgg tgacgacgtg tcattggacc ccgcctgggt tgaaggcgcg 1560
 gtgcagacgt cgctgaatgc agtgtggggg atcatgaacc actttggtgg ccacaccac 1620
 cccgacaacc cgggcccggg cgatgtgttc aacgaaatcg gccgatcgc cctggcggat 1680
 tga 1683

<210> 3
 <211> 795
 <212> DNA

<213> *Pseudomonas putida*
 <220><221> gene
 <222> (1)..(795)
 <223> recombinant davA

<400> 3

atgcgcatcg ctctgtacca gggcgacccc aagccactgg atgtgcccgg caacctgcaa	60
cggctgcgcc accaggcgca gctggcagcc gaacgcggcg cacagtgtct ggtgtgcccg	120
gagatgttcc tgaccggcta caacatcggc ctggcccagg tcgagcgctt ggccgaggcc	180
gccgatggcc cggcagccat gaccgtggtg gagatcgccc aggcgcaccg catcgccatt	240
gtctatggct acccggagcg cggtagcgac ggggcatctt acaacagcgt gcagttgatc	300
gatgcgcatg gccgcagcct gagcaattac cgcaagacgc acctgttcgg tgaactggac	360

cgctcgatgt tcagccctgg tgcggaccac ttcccgttgg tggaactgga aggctggaag	420
gttggcctgc tgatctgcta cgacatcgag ttcccggaga acgcccgcgc ctagcgctg	480
gacggcgccg agctgatcct ggtgccgacg gcgaacatga cgccgtacga ctttacctgc	540
caggtgaccg tgagagcgag ggcacaggaa aaccagtgtt acctggtata tgccaactac	600
tgcggtgcgg aagacgagat tgagtattgc gggcagagca gcatcatcgg cccggatggc	660
agcttgcttg ccatggccgg gcgggatgag tgccagtgtt tggcagagct tgaacatgag	720
cgggtggtgc aggggcgcac ggcggtttccc tacctgaccg atttgcgcca ggagctgcac	780

ctgcgtaaag gctga	795
------------------	-----

<210> 4

<211> 897

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220><221> gene

<222> (1)..(897)

<223> yihU-3-sulfolactaldehyde reductase

<400> 4

atggcagcaa tcgcgtttat cggtttagga caaatgggtt cgccaatggc gagcaattta	60
ttgcagcaag ggcataact tcgcgtcttt gatgtgaacg ccgaagctgt gcggcatctg	120
gtagacaaag gtgcgactcc cgccgccaac ccggcgagg cgcgtaaaga tgccgaattt	180
atcattacca tgttgccgaa tggcgatctg gtgcgcaacg tgtgttcgg tgaacacggc	240
gtttgcgaag gcttatctac cgatgcgctg gtcattgata tgtccacat ccatccgctg	300
caaaccgata aattgattgc cgatatgcaa gccaaaggct tcagcatgat ggatgttccg	360
gtaggccgta ctctgcaaa tgccattacc ggtactctgt tactgctggc tggcggcacc	420
gctgaacaag ttgaacgtgc cacaccgatc ctgatggcga tgggcagtgat gttgatcaac	480
gctggcggtc cgggcatggg gatccgcgtt aagctcatca acaactacat gagcatcgcg	540

ctcaatgcgc tticggcaga agccgccgtt ttgtgcgaag ccctgaatct tcccttcgat 600
gttgccgtca aagtgatgag cggtagccgcc gccggtaaag gtcacttcac cacttcctgg 660

ccaaacaaag tectcagcgg agatctttct cccgccttca tgatcgatct tgcccataag 720
gatcttggca tcgcccttga tgtcgccaac cagctgcatg tgccaatgcc gctggggggcc 780
gcctcacggg aggtttatag ccaggcgcgc gcagcgggtc gcggtcgcca ggactggtec 840
gccattctgg aacaggtccg tgtcagtgcc gggatgactg ccaaagtaaa aatgtaa 897

<210> 5
<211> 1050
<212> DNA
<213> Escherichia coli
<220><221> gene
<222> (1)..(1050)
<223> yahK-aldehyde reductase, NADPH-dependent
<400> 5

atgaagatca aagctgttgg tgcatattcc gctaaacaac cacttgaacc gatggatgc 60

acccggcgtg aaccgggacc gaatgatgtc aaaatcgaac tcgcttactg tggcgtttgc 120
cattccgac tcaccaggt ccgttccgag tggcggggga cggtttacc ctgcgtgccg 180
ggtcatgaaa ttgtggggcg tgtggtagcc gttggtgatc aggtagaaaa atatgcgccg 240
ggcgatctgg tcggtgtcgg ctgcattgtc gacagtgtga aacattgcga agagtgtgaa 300
gacgggttgg aaaactactg tgatcacatg accggcacct ataactcgcc gacgccggac 360
gaaccgggcc atactctggg cggctactca caacagatcg tcgttcatga gcgatatgtt 420
ctgcgtattc gtcaccgcga agagcagctg gcggcggtgg ctcttttgtt gtgtgcaggg 480

atcaccacgt attcgccgct acgtcactgg caggccgggc cgggtaaaaa agtgggcgtg 540
gtcggcatcg gcggtctggg acatatgggg attaagctgg ccacgcgat gggggcacat 600
gtggtggcat ttaccacttc tgaggcaaaa cgcgaagcgg caaaagccct gggggccgat 660
gaagtgtta actcacgcaa tgccgatgag atggcggtc atctgaagag tttcgatttc 720
attttgaata cagtagctgc gccacataat ctgcagatt ttaccacctt gctgaagcgt 780
gatggcacca tgacgttgtt tggtagcgtc gcgacaccgc ataaatcgcc ggaagttttc 840
aacctgatca tgaacgccg tcgcatagcc ggttctatga ttggcggcat tccagaaact 900

caggagatgc tcgatttttg cgccgaacat ggcatctgg ctgatataga gatgattcgg 960
gccgatcaaa ttaatgaagc ctatgagcga atgctgcgcg gtgatgtgaa atatcgtttt 1020

gttatcgata atcgcacact aacagactga 1050

<210> 6

<211> 1164

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220><221> gene

<222> (1)..(1164)

<223> yqhD-NADPH-dependent aldehyde reductase YqhD

<400> 6

atgaacaact ttaatctgca caccccaacc cgcattctgt ttggtaaagg cgcaatcgct 60

ggtttacgcg aacaaattcc tcacgatgct cgcgtattga ttacctacgg cggcggcagc 120

gtgaaaaaaaa cggcggttct cgatcaagtt ctggatgccc tgaaaggcat ggacgtgctg 180

gaatttggcg gtattgagcc aaaccggct tatgaaacgc tgatgaacgc cgtgaaactg 240

gttcgcgaac agaaagtac tttctgctg gcggttggcg gcggttctgt actggacggc 300

accaaattta tcgccgcagc ggctaactat ccgaaaaata tcgatccgtg gcacattctg 360

caaacggcg gtaaagagat taaaagcgcc atcccgatgg gctgtgtgct gacgctgcca 420

gcaaccggtt cagaatccaa cgcaggcgcg gtgatctccc gtaaaaccac aggcgacaag 480

caggcgttcc attctgcccc tgttcagccg gtatttgccg tgctcgatcc ggtttatacc 540

tacaccctgc cggcgctca ggtggctaac ggcgtagtgg acgcctttgt acacaccgtg 600

gaacagtatg ttaccaaac ggttgatgcc aaaattcagg accgtttcgc agaaggcatt 660

ttgctgacgc taatcgaaga tggctcgaaa gccctgaaag agccagaaaa ctacgatgtg 720

cgcgccaacg tcatgtgggc ggcgactcag gcgctgaacg gtttgattgg cgctggcgta 780

ccgcaggact gggcaacgca tatgctgggc cagcaactga ctgcgatgca cggctctggat 840

cacgcgcaaa cactggctat cgctctgcct gcactgtgga atgaaaaacg cgataccaag 900

cgcgctaagc tgctgcaata tgctgaacgc gtctggaaca tcaactgaagg ttccgatgat 960

gagcgtattg acgccgcgat tgccgcaacc cgcaatttct ttgagcaatt aggcgtgccg 1020

accacctct cgcactacgg tctggacggc agtccatcc cggctttgct gaaaaaactg 1080

gaagagcacg gcatgacca actgggcgaa aatcatgaca ttacgttga tgtagccgc 1140

cgtatatacg aagccgcccc ctaa 1164

<210> 7

<211> 1362

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<220><221> gene

<222> (1)..(1362)

<223> gabD

<400> 7

atgtctttga ctttccagc aatcaacccc agcgtggct ccaccatcac cgagctagaa 60

aaccacgatt ccaccagtg gatgtccgcg ctctctgatg cagttgcagc tggctcttca 120

tgggtgcga aaactccccg cgaaagatcc gtggtactca ccgcaatctt cgaagcactg 180

accgaacgcg cccaagaact tgcagagatc atccacctgg aagctggaaa atccgttgca 240

gaagctcttg gtgaagtgcg ttatggtgca gaatacttcc gttggtttgc ggaagaagca 300

gtgcgcctgc ccggccgcta cggacagtca ctttccggaa tgggtcacat cgccgtcacc 360

cgcgcacccc tgggaccagt gctggcgatc acccatgga atttcccat cgccatggcc 420

acccgcaaaa tgcctccagc cctggccgct ggttgccccg tgttggtgaa acctgcttcc 480

gaaacccac tgaccatggt caaagtgggg gagatcatcg cctccgtctt tgataccttt 540

aacatccgc agggcttggc ctcaatcatc accaccactc gagatgcaga gctatcggca 600

gaactcatgg ctgacctcg cttggctaaa gtcaccttca ctggatcaac caacgtggga 660

cgcatcctgg tccgccaatc cgccggaccga ctgctgcgca cctccatgga actcggcgga 720

aatgcagctt ttgttatcga cgaagccgca gacctcgacg aagccgtatc cgggtccatc 780

gccgcaaac tccgcaacgc cggccaagta tgcacgcag ctaaccgttt ctgtgttcat 840

gaatcccgcg ctgccgaatt cactcacaag ctggcgacag ccatgcagaa cactccatt 900

gggcccgtga tttctgcccc ccaacgcgac cggatcgag cactagtgga tgaagccatc 960

accgacggcg cccgccttat catcgggtggg gaggtccccg acggtccgg cttcttctat 1020

ccagccacca tcttggccga tgtccctgca cagtctcgga ttttgcata ggaatcttc 1080

ggacctgtgg ccaccattgc cactttcacc gacttggtcg aaggcgttgc acaagcaaat 1140

tccaccgaat tggcctcgc agcctacgga ttcagcaaca atgtgaaagc aacacagtac 1200

atggcggaac acttgaagc cggaatggtc ggaatcaaca gaggcgcat ctctgacca 1260

gcagcacctt ttggcgcat cggacaatcc ggcttcggca gagaaggcgg aaccgaagga 1320

atcgaagaat atctctccgt gcgttacctc gctttgccgt ga 1362

<210> 8

<211> 425

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> 5-aminovalerate aminotransferase DavT

<400> 8

Met Ser Lys Thr Asn Glu Ser Leu Met Gln Arg Arg Val Ala Ala Val

1 5 10 15

Pro Arg Gly Val Gly Gln Ile His Pro Ile Phe Val Asp Thr Ala Lys

20 25 30

Asn Ser Thr Val Ile Asp Val Glu Gly Arg Glu Leu Ile Asp Phe Ala

35 40 45

Gly Gly Ile Ala Val Leu Asn Thr Gly His Leu His Pro Lys Val Val

50 55 60

Ala Ala Val Gln Glu Gln Leu Thr Lys Val Ser His Thr Cys Phe Gln

65 70 75 80

Val Leu Ala Tyr Glu Pro Tyr Val Glu Leu Cys Glu Lys Ile Asn Lys

85 90 95

Leu Val Pro Gly Asp Phe Asp Lys Lys Thr Leu Leu Val Thr Thr Gly

100 105 110

Ser Glu Ala Val Glu Asn Ala Val Lys Ile Ala Arg Ala Ala Thr Gly

115 120 125

Arg Ala Gly Val Ile Ala Phe Thr Gly Gly Tyr His Gly Arg Thr Met

130 135 140

Met Thr Leu Gly Leu Thr Gly Lys Val Val Pro Tyr Ser Ala Gly Met

145 150 155 160

Gly Leu Met Pro Gly Gly Ile Phe Arg Ala Leu Phe Pro Ser Glu Leu

165 170 175

His Gly Ile Ser Val Asp Asp Ala Ile Ala Ser Val Glu Arg Ile Phe

180 185 190

Lys Asn Asp Ala Glu Pro Arg Asp Ile Ala Ala Ile Ile Leu Glu Pro

195 200 205

Val Gln Gly Glu Gly Gly Phe Leu Pro Ala Pro Lys Glu Leu Met Lys

210 215 220

Arg Leu Arg Ala Leu Cys Asp Gln His Gly Ile Leu Leu Ile Ala Asp

225 230 235 240
 Glu Val Gln Thr Gly Ala Gly Arg Thr Gly Thr Phe Phe Ala Met Glu
 245 250 255

 Gln Met Gly Val Ala Pro Asp Leu Thr Thr Phe Ala Lys Ser Ile Ala
 260 265 270
 Gly Gly Phe Pro Leu Ala Gly Val Cys Gly Lys Ala Glu Tyr Met Asp
 275 280 285
 Ala Ile Ala Pro Gly Gly Leu Gly Gly Thr Tyr Ala Gly Ser Pro Ile
 290 295 300
 Ala Cys Ala Ala Ala Leu Ala Val Ile Glu Val Phe Glu Glu Glu Lys
 305 310 315 320
 Leu Leu Asp Arg Ser Lys Ala Val Gly Glu Arg Leu Thr Ala Gly Leu

 325 330 335
 Arg Glu Ile Gln Lys Lys Tyr Pro Ile Ile Gly Asp Val Arg Gly Leu
 340 345 350
 Gly Ser Met Ile Ala Val Glu Val Phe Glu Lys Gly Thr His Thr Pro
 355 360 365
 Asn Ala Ala Ala Val Gly Gln Val Val Ala Lys Ala Arg Glu Lys Gly
 370 375 380
 Leu Ile Leu Leu Ser Cys Gly Thr Tyr Gly Asn Val Leu Arg Ile Leu
 385 390 395 400

 Val Pro Leu Thr Ala Glu Asp Ala Leu Leu Asp Lys Gly Leu Ala Ile
 405 410 415
 Ile Glu Glu Cys Phe Ala Glu Ile Ala
 420 425

 <210> 9
 <211> 560
 <212> PRT
 <213> Unknown

 <220><223> lysine 2-monooxygenase; DavB amino acid sequence

 <400> 9
 Met Asn Lys Lys Asn Arg His Pro Ala Asp Gly Lys Lys Pro Ile Thr

1 5 10 15
 Ile Phe Gly Pro Asp Phe Pro Phe Ala Phe Asp Asp Trp Leu Glu His

 20 25 30
 Pro Ala Gly Leu Gly Ser Ile Pro Ala Glu Arg His Gly Glu Glu Val
 35 40 45
 Ala Ile Val Gly Ala Gly Ile Ala Gly Leu Val Ala Ala Tyr Glu Leu
 50 55 60
 Met Lys Leu Gly Leu Lys Pro Val Val Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Gly
 65 70 75 80
 Gly Arg Leu Arg Ser Gln Ala Phe Asn Gly Thr Asp Gly Ile Val Ala
 85 90 95

 Glu Leu Gly Gly Met Arg Phe Pro Val Ser Ser Thr Ala Phe Tyr His
 100 105 110
 Tyr Val Asp Lys Leu Gly Leu Glu Thr Lys Pro Phe Pro Asn Pro Leu
 115 120 125
 Thr Pro Ala Ser Gly Ser Thr Val Ile Asp Leu Glu Gly Gln Thr Tyr
 130 135 140
 Tyr Ala Glu Lys Pro Thr Asp Leu Pro Gln Leu Phe His Glu Val Ala
 145 150 155 160
 Asp Ala Trp Ala Asp Ala Leu Glu Ser Gly Ala Gln Phe Ala Asp Ile

 165 170 175
 Gln Gln Ala Ile Arg Asp Arg Asp Val Pro Arg Leu Lys Glu Leu Trp
 180 185 190
 Asn Lys Leu Val Pro Leu Trp Asp Asp Arg Thr Phe Tyr Asp Phe Val
 195 200 205
 Ala Thr Ser Arg Ser Phe Ala Lys Leu Ser Phe Gln His Arg Glu Val
 210 215 220
 Phe Gly Gln Val Gly Phe Gly Thr Gly Gly Trp Asp Ser Asp Phe Pro
 225 230 235 240

 Asn Ser Met Leu Glu Ile Phe Arg Val Val Met Thr Asn Cys Asp Asp
 245 250 255

His Gln His Leu Val Val Gly Gly Val Glu Gln Val Pro Gln Gly Ile
 260 265 270
 Trp Arg His Val Pro Glu Arg Cys Val His Trp Pro Glu Gly Thr Ser
 275 280 285
 Leu Ser Thr Leu His Gly Gly Ala Pro Arg Thr Gly Val Lys Arg Ile
 290 295 300
 Ala Arg Ala Ser Asp Gly Arg Leu Ala Val Thr Asp Asn Trp Gly Asp

 305 310 315 320
 Thr Arg His Tyr Ser Ala Val Leu Ala Thr Cys Gln Thr Trp Leu Leu
 325 330 335
 Thr Thr Gln Ile Asp Cys Glu Glu Ser Leu Phe Ser Gln Lys Met Trp
 340 345 350
 Met Ala Leu Asp Arg Thr Arg Tyr Met Gln Ser Ser Lys Thr Phe Val
 355 360 365
 Met Val Asp Arg Pro Phe Trp Lys Asp Lys Asp Pro Glu Thr Gly Arg
 370 375 380

 Asp Leu Leu Ser Met Thr Leu Thr Asp Arg Leu Thr Arg Gly Thr Tyr
 385 390 395 400
 Leu Phe Asp Asn Gly Asn Asp Lys Pro Gly Val Ile Cys Leu Ser Tyr
 405 410 415
 Ser Trp Met Ser Asp Ala Leu Lys Met Leu Pro His Pro Val Glu Lys
 420 425 430
 Arg Val Gln Leu Ala Leu Asp Ala Leu Lys Lys Ile Tyr Pro Lys Thr
 435 440 445
 Asp Ile Ala Gly His Ile Ile Gly Asp Pro Ile Thr Val Ser Trp Glu

 450 455 460
 Ala Asp Pro Tyr Phe Leu Gly Ala Phe Lys Gly Ala Leu Pro Gly His
 465 470 475 480
 Tyr Arg Tyr Asn Gln Arg Met Tyr Ala His Phe Met Gln Gln Asp Met
 485 490 495
 Pro Ala Glu Gln Arg Gly Ile Phe Ile Ala Gly Asp Asp Val Ser Trp
 500 505 510

Thr Pro Ala Trp Val Glu Gly Ala Val Gln Thr Ser Leu Asn Ala Val
515 520 525

Trp Gly Ile Met Asn His Phe Gly Gly His Thr His Pro Asp Asn Pro
530 535 540

Gly Pro Gly Asp Val Phe Asn Glu Ile Gly Pro Ile Ala Leu Ala Asp
545 550 555 560

<210> 10
<211> 444
<212> PRT
<213> Unknown
<220><223> delta-aminovaleramidase davA aminoacid sequence
<400> 10

Met Asn Lys Lys Asn Arg His Pro Ala Asp Gly Lys Lys Pro Ile Thr
1 5 10 15

Ile Phe Gly Pro Asp Phe Pro Phe Ala Phe Asp Asp Trp Leu Glu His
20 25 30

Pro Ala Gly Leu Gly Ser Ile Pro Ala Glu Arg His Gly Glu Glu Val
35 40 45

Ala Ile Val Gly Ala Gly Ile Ala Gly Leu Val Ala Ala Tyr Glu Leu
50 55 60

Met Lys Leu Gly Leu Lys Pro Val Val Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Gly
65 70 75 80

Gly Arg Leu Arg Ser Gln Ala Phe Asn Gly Thr Asp Gly Ile Val Ala
85 90 95

Glu Leu Gly Gly Met Arg Phe Pro Val Ser Ser Thr Ala Phe Tyr His
100 105 110

Tyr Val Asp Lys Leu Gly Leu Glu Thr Lys Pro Phe Pro Asn Pro Leu
115 120 125

Thr Pro Ala Ser Gly Ser Thr Val Ile Asp Leu Glu Gly Gln Thr Tyr
130 135 140

Tyr Ala Glu Lys Pro Thr Asp Leu Pro Gln Leu Phe His Glu Val Ala

145 150 155 160
 Asp Ala Trp Ala Asp Ala Leu Glu Ser Gly Ala Gln Phe Ala Asp Ile
 165 170 175
 Gln Gln Ala Ile Met Arg Ile Ala Leu Tyr Gln Gly Ala Pro Lys Pro
 180 185 190
 Leu Asp Val Pro Gly Asn Leu Gln Arg Leu Arg His Gln Ala Gln Leu
 195 200 205
 Ala Ala Glu Arg Gly Ala Gln Leu Leu Val Cys Pro Glu Met Phe Leu
 210 215 220
 Thr Gly Tyr Asn Ile Gly Leu Ala Gln Val Glu Arg Leu Ala Glu Ala

 225 230 235 240
 Ala Asp Gly Pro Ala Ala Met Thr Val Val Glu Ile Ala Gln Ala His
 245 250 255
 Arg Ile Ala Ile Val Tyr Gly Tyr Pro Glu Arg Gly Asp Asp Gly Ala
 260 265 270
 Ile Tyr Asn Ser Val Gln Leu Ile Asp Ala His Gly Arg Ser Leu Ser
 275 280 285
 Asn Tyr Arg Lys Thr His Leu Phe Gly Glu Leu Asp Arg Ser Met Phe
 290 295 300

 Ser Pro Gly Ala Asp His Phe Pro Val Val Glu Leu Glu Gly Trp Lys
 305 310 315 320
 Val Gly Leu Leu Ile Cys Tyr Asp Ile Glu Phe Pro Glu Asn Ala Arg
 325 330 335
 Arg Leu Ala Leu Asp Gly Ala Glu Leu Ile Leu Val Pro Thr Ala Asn
 340 345 350
 Met Thr Pro Tyr Asp Phe Thr Cys Gln Val Thr Val Arg Ala Arg Ala
 355 360 365
 Gln Glu Asn Gln Cys Tyr Leu Val Tyr Ala Asn Tyr Cys Gly Ala Glu

 370 375 380
 Asp Glu Ile Glu Tyr Cys Gly Gln Ser Ser Ile Ile Gly Pro Asp Gly
 385 390 395 400

Ser Leu Leu Ala Met Ala Gly Arg Asp Glu Cys Gln Leu Leu Ala Glu
405 410 415
Leu Glu His Glu Arg Val Val Gln Gly Arg Thr Ala Phe Pro Tyr Leu
420 425 430
Thr Asp Leu Arg Gln Glu Leu His Leu Arg Lys Gly
435 440

<210> 11
<211> 292
<212> PRT
<213> Unknown
<220><223> yihU-3-sulfolactaldehyde reductase amino acid sequence
<400> 11

Met Ala Thr Ile Ala Phe Leu Gly Leu Gly Gln Met Gly Ser Pro Met
1 5 10 15
Ala Asn Asn Leu Leu Gln Lys Gly His Ser Leu Gln Val Phe Asp Val
20 25 30
Asn Thr Gln Ala Val Asp Ala Leu Val Thr Gln Gly Ala Thr Ala Ala
35 40 45

Gln Thr Pro Ala Glu Ala Ala Ala Ser Ala Glu Phe Ile Ile Thr Met
50 55 60
Leu Pro Asn Gly Asp Ile Val Arg Gln Val Leu Leu Gly Glu Lys Gly
65 70 75 80
Val Cys Glu Thr Val Ser Ser Asp Ala Leu Val Ile Asp Met Ser Thr
85 90 95
Ile His Pro Leu Gln Thr Asp Ala Leu Ile Arg Glu Leu Gln Glu Lys
100 105 110
Gly Ile Asn Met Met Asp Ala Pro Val Gly Arg Thr Ser Val Asn Ala

115 120 125
Ile Asp Gly Thr Leu Leu Ile Leu Ala Gly Gly Thr Asp Glu Gln Ile
130 135 140
Ala Arg Ala Arg Pro Ile Leu Met Cys Met Gly Asn Glu Leu Val Glu
145 150 155 160

Ala Gly Gly Pro Gly Met Gly Ile Arg Val Lys Leu Ile Asn Asn Tyr
165 170 175
Met Ser Ile Ala Leu Asn Ala Leu Ser Ser Glu Ala Ala Val Leu Cys
180 185 190
Glu Ser Leu Gly Leu Asn Leu Asp Val Ala Ile Lys Val Met Ser Gly
195 200 205
Thr Ala Ala Gly Lys Gly His Phe Thr Thr Thr Trp Pro Gly Lys Val
210 215 220
Leu Lys Gly Asp Leu Ser Pro Ala Phe Met Val Asp Leu Ala Leu Lys
225 230 235 240
Asp Leu Arg Ile Ala Val Asp Val Ala Arg Lys Thr Gly Ala Pro Leu
245 250 255
Asn Met Gly Ile Ala Ala Glu Ser Tyr Tyr Ala Ala Ala Ser Gln Asp
260 265 270
Gly Lys Gly Arg Gln Asp Trp Ser Ala Leu Leu Asn Gln Val Arg Gln
275 280 285
Gln Ala Gly Leu
290
<210> 12
<211> 349
<212> PRT
<213> Unknown
<220><223> yahK-aldehyde reductase amino acid sequence
<400> 12
Met Lys Ile Lys Ala Val Gly Ala Tyr Ser Ala Lys Gln Pro Leu Glu
1 5 10 15
Pro Met Asp Ile Thr Arg Arg Glu Pro Gly Pro Asn Asp Val Lys Ile
20 25 30
Glu Ile Ala Tyr Cys Gly Val Cys His Ser Asp Leu His Gln Val Arg
35 40 45
Ser Glu Trp Ala Gly Thr Val Tyr Pro Cys Val Pro Gly His Glu Ile
50 55 60

Val Gly Arg Val Val Ala Val Gly Asp Gln Val Glu Lys Tyr Ala Pro
65 70 75 80
Gly Asp Leu Val Gly Val Gly Cys Ile Val Asp Ser Cys Lys His Cys
85 90 95
Glu Glu Cys Glu Asp Gly Leu Glu Asn Tyr Cys Asp His Met Thr Gly
100 105 110
Thr Tyr Asn Ser Pro Met Pro Asp Glu Pro Gly His Thr Leu Gly Gly
115 120 125
Tyr Ser Gln Gln Ile Val Val His Glu Arg Tyr Val Leu Arg Ile Arg
130 135 140
His Pro Gln Glu Gln Leu Ala Ala Val Ala Pro Leu Leu Cys Ala Gly
145 150 155 160
Ile Thr Thr Tyr Ser Pro Leu Arg His Trp Gln Ala Gly Pro Gly Lys
165 170 175
Lys Val Gly Val Val Gly Ile Gly Gly Leu Gly His Met Gly Ile Lys
180 185 190
Leu Ala His Ala Met Glu Ala His Val Val Ala Phe Thr Thr Ser Glu
195 200 205
Ala Lys Arg Glu Ala Ala Lys Ala Leu Gly Ala Asp Glu Val Val Asn
210 215 220
Ser Arg Asn Ala Asp Glu Met Ala Ala His Leu Lys Ser Phe Asp Phe
225 230 235 240
Ile Leu Asn Thr Val Ala Ala Pro His Asn Leu Asp Asp Phe Thr Thr
245 250 255
Leu Leu Lys Arg Asp Gly Thr Met Thr Leu Val Gly Ala Pro Ala Thr
260 265 270
Pro His Lys Ser Pro Glu Val Phe Asn Leu Ile Met Lys Arg Arg Ala
275 280 285
Ile Ala Gly Ser Met Ile Gly Gly Ile Pro Glu Thr Gln Glu Met Leu
290 295 300
Asp Phe Cys Ala Glu His Gly Ile Val Ala Asp Ile Glu Met Ile Arg

305					310				315				320			
Ala	Asp	Gln	Ile	Asn	Glu	Ala	Tyr	Glu	Arg	Met	Leu	Arg	Gly	Asp	Val	
				325				330				335				
Lys	Tyr	Arg	Phe	Val	Ile	Asp	Asn	Arg	Thr	Leu	Thr	Asp				
				340				345								
<210>	13															
<211>	387															
<212>	PRT															
<213>	Unknown															
<220><223>	YqhD-				aldehyde reductase, aminoacid sequene											
<400>	13															
Met	Asn	Asn	Phe	Asn	Leu	His	Thr	Pro	Thr	Arg	Ile	Leu	Phe	Gly	Lys	
1					5					10					15	
Gly	Ala	Ile	Ala	Gly	Leu	Arg	Glu	Gln	Ile	Pro	His	Asp	Ala	Arg	Val	
				20				25				30				
Leu	Ile	Thr	Tyr	Gly	Gly	Gly	Ser	Val	Lys	Lys	Thr	Gly	Val	Leu	Asp	
				35				40				45				
Gln	Val	Leu	Asp	Ala	Leu	Lys	Gly	Met	Asp	Val	Leu	Glu	Phe	Gly	Gly	
				50				55				60				
Ile	Glu	Pro	Asn	Pro	Ala	Tyr	Glu	Thr	Leu	Met	Asn	Ala	Val	Lys	Leu	
65					70				75				80			
Val	Arg	Glu	Gln	Lys	Val	Thr	Phe	Leu	Leu	Ala	Val	Gly	Gly	Gly	Ser	
				85				90				95				
Val	Leu	Asp	Gly	Thr	Lys	Phe	Ile	Ala	Ala	Ala	Ala	Asn	Tyr	Pro	Glu	
				100				105				110				
Asn	Ile	Asp	Pro	Trp	His	Ile	Leu	Gln	Thr	Gly	Gly	Lys	Glu	Ile	Lys	
				115				120				125				
Ser	Ala	Ile	Pro	Met	Gly	Cys	Val	Leu	Thr	Leu	Pro	Ala	Thr	Gly	Ser	
				130				135				140				
Glu	Ser	Asn	Ala	Gly	Ala	Val	Ile	Ser	Arg	Lys	Thr	Thr	Gly	Asp	Lys	
145					150				155				160			
Gln	Ala	Phe	His	Ser	Ala	His	Val	Gln	Pro	Val	Phe	Ala	Val	Leu	Asp	

165 170 175
 Pro Val Tyr Thr Tyr Thr Leu Pro Pro Arg Gln Val Ala Asn Gly Val
 180 185 190
 Val Asp Ala Phe Val His Thr Val Glu Gln Tyr Val Thr Lys Pro Val
 195 200 205
 Asp Ala Lys Ile Gln Asp Arg Phe Ala Glu Gly Ile Leu Leu Thr Leu
 210 215 220
 Ile Glu Asp Gly Pro Lys Ala Leu Lys Glu Pro Glu Asn Tyr Asp Val

 225 230 235 240
 Arg Ala Asn Val Met Trp Gly Ala Thr Gln Ala Leu Asn Gly Leu Ile
 245 250 255
 Gly Ala Gly Val Pro Gln Asp Trp Ala Thr His Met Leu Gly His Glu
 260 265 270
 Leu Thr Ala Met His Gly Leu Asp His Ala Gln Thr Leu Ala Ile Val
 275 280 285
 Leu Pro Ala Leu Trp Asn Glu Lys Arg Glu Thr Lys Arg Ala Lys Leu
 290 295 300

 Leu Gln Tyr Ala Glu Arg Val Trp Asn Ile Thr Glu Gly Ser Asp Asp
 305 310 315 320
 Glu Arg Ile Asp Ala Ala Ile Ala Ala Thr Arg Asn Phe Phe Glu Gln
 325 330 335
 Leu Gly Val Pro Thr His Leu Ser Asp Tyr Gly Leu Asp Gly Ser Ser
 340 345 350
 Ile Pro Ala Leu Leu Lys Lys Leu Glu Glu His Gly Met Thr Gln Leu
 355 360 365
 Gly Glu Asn His Asp Ile Thr Leu Asp Val Ser Arg Arg Ile Tyr Glu

 370 375 380
 Ala Ala Arg
 385
 <210> 14
 <211> 490
 <212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(490)

<223> succinate-semialdehyde dehydrogenase amino acid sequence

<400> 14

Met Thr Ile Asn Val Ser Glu Leu Leu Ala Lys Val Pro Thr Gly Leu

1 5 10 15

Leu Ile Gly Asp Ser Trp Val Glu Ala Ser Glu Gly Gly Thr Phe Asp

20 25 30

Val Glu Asn Pro Ala Thr Gly Glu Thr Ile Ala Thr Leu Ala Ser Ala

35 40 45

Thr Ser Glu Asp Ala Leu Ala Ala Leu Asp Ala Ala Cys Ala Val Gln

50 55 60

Ala Glu Trp Ala Arg Thr Pro Ala Arg Glu Arg Ser Asn Ile Leu Arg

65 70 75 80

Arg Gly Phe Glu Leu Val Ala Glu Arg Ala Glu Glu Phe Ala Thr Leu

85 90 95

Met Thr Leu Glu Met Gly Lys Pro Leu Ala Glu Ala Arg Gly Glu Val

100 105 110

Thr Tyr Gly Asn Glu Phe Leu Arg Trp Phe Ser Glu Glu Ala Val Arg

115 120 125

Leu Tyr Gly Arg Tyr Gly Ala Thr Pro Glu Gly Asn Leu Arg Met Met

130 135 140

Thr Thr Arg Lys Pro Val Gly Pro Cys Leu Leu Ile Thr Pro Trp Asn

145 150 155 160

Phe Pro Leu Ala Met Ala Thr Arg Lys Val Ala Pro Ala Ile Ala Ala

165 170 175

Gly Cys Val Met Val Leu Lys Pro Ala Arg Leu Thr Pro Leu Thr Ser

180 185 190

Gln Tyr Phe Ala Gln Thr Met Leu Asp Ala Gly Leu Pro Ala Gly Val

195 200 205

Leu Asn Val Val Ser Gly Ala Ser Ala Ser Ala Ile Ser Asn Pro Ile

210 215 220
 Met Glu Asp Asp Arg Leu Arg Lys Val Ser Phe Thr Gly Ser Thr Pro
 225 230 235 240
 Val Gly Gln Gln Leu Leu Lys Lys Ala Ala Asp Lys Val Leu Arg Thr

 245 250 255
 Ser Met Glu Leu Gly Gly Asn Ala Pro Phe Ile Val Phe Glu Asp Ala
 260 265 270
 Asp Leu Asp Leu Ala Ile Glu Gly Ala Met Gly Ala Lys Met Arg Asn
 275 280 285
 Ile Gly Glu Ala Cys Thr Ala Ala Asn Arg Phe Leu Val His Glu Ser
 290 295 300
 Val Ala Asp Glu Phe Gly Arg Arg Phe Ala Ala Arg Leu Glu Glu Gln
 305 310 315 320

 Val Leu Gly Asn Gly Leu Asp Glu Gly Val Thr Val Gly Pro Leu Val
 325 330 335
 Glu Glu Lys Ala Arg Asn Ser Val Ala Ser Leu Val Asp Ala Ala Val
 340 345 350
 Ser Glu Gly Ala Thr Val Leu Thr Gly Gly Lys Ala Gly Thr Gly Ala
 355 360 365
 Gly Tyr Phe Tyr Glu Pro Thr Val Leu Thr Gly Val Ser Thr Asp Ala
 370 375 380
 Ala Ile Leu Asn Glu Glu Ile Phe Gly Pro Val Ala Pro Ile Val Thr

 385 390 395 400
 Phe Ser Asp Glu Ala Glu Ala Leu Arg Leu Ala Asn Ser Thr Glu Tyr
 405 410 415
 Gly Leu Ala Ser Tyr Val Phe Thr Gln Asp Thr Ser Arg Ile Phe Arg
 420 425 430
 Val Ser Asp Gly Leu Glu Phe Gly Leu Val Gly Val Asn Ser Gly Val
 435 440 445
 Ile Ser Asn Ala Ala Ala Pro Phe Gly Gly Val Lys Gln Ser Gly Met
 450 455 460

Gly Arg Glu Gly Gly Leu Glu Gly Ile Glu Glu Tyr Thr Ser Val Gln
465 470 475 480

Tyr Ile Gly Ile Arg Asp Pro Tyr Ala Gly
485 490

<210> 15

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer - DavBhis-F

<400> 15

ggatccatgc accatcatca ccatcacatg aacaagaaga accgccaccc 50

<210> 16

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer - DavBhis-R

<400> 16

gcggccgctt aatctgccag ggcgatcggg 30

<210> 17

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer - DavA-F

<400> 17

gcggccgcag gagatataca tatgcgcac gcactgtacc aag 43

<210> 18

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer - DavA-R

<400> 18

gcggccgctt agcctttacg caggtgcag 29

<210> 19

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer - DavT-F

<400> 19

ggatccagga gatatacata tgagcaaaac caacgaatcc ttg 43

<210> 20

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer - DavT-R

<400> 20

agatctatgt atatctcctt taggcgattt cagcgaagca c 41

<210> 21

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer - H30-F

<400> 21

gcgctcgaga aagtaacttt tcggtaagg tagc 34

<210> 22

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer - H30-R

<400> 22

gcggaattcc aatatactcc tgcccaacca ac 32

<210> 23

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer - pBL1-F

<400> 23

gacgtcattc ggggtcgttc actgg	25
<210> 24	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer - pBL1-R	
<400> 24	
ctcgagcaac aacaagaccc atcatagttt g	31
<210> 25	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer -Sp-F	
<400> 25	
gacgtcggtt ttttgctgaa acctcaggc	29
<210> 26	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer -Sp-R	
<400> 26	
actagtctca cgcccggagc gtagcgac	28
<210> 27	
<211> 38	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer -eGFP-F	
<400> 27	
ggatccagga gatatacata tggtagcaa gggcgagg	38
<210> 28	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> primer -eGFP-R
 <400> 28
 gcggccgctt acttgtacag ctgcgccatg 30
 <210> 29
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer -mCherry-F
 <400> 29
 gaattcatgg tgagcaaggg cgagg 25
 <210> 30
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer -mCherry-R
 <400> 30
 ggtaccttac ttgtacagct cgtccatgc 29
 <210> 31
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer -YihU-F
 <400> 31
 gaattcatgg cagcgatagc attcattggt ctg 34
 <210> 32
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer -YihU-R
 <400> 32
 ggtaccttac atttttacct ttgcggatcat tccagc 36
 <210> 33
 <211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer -YahK-F

<400> 33

ggatccagga gatatacata tgaagatcaa agctgttggt gc 42

<210> 34

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer -YahK-R

<400> 34

agatctatgt atatctcctt cagtctgtta gtgtgcgatt atc 43

<210> 35

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer -YqhD-F

<400> 35

ggatccagga gatatacata tgaacaactt taatctgcac accc 44

<210> 36

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer -YqhD-R

<400> 36

agatctatgt atatctcctt tagcggcgcg cttcgatat ac 42

<210> 37

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer -GabD1-F

<400> 37

cgatctccgt gatcgaatcc 20

<210> 38
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer -GabD1-R
 <400> 38
 gctcatgtgt tctagatttt agcccacctt ctggtg 36
 <210> 39
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer -GabD2-F
 <400> 39
 tgggctaaaa tctagaacac atgagctgtc cggatga 36
 <210> 40
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer -GabD2-R
 <400> 40

 cgggggtggca ggggttaactc 20
 <210> 41
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer -GabD-F
 <400> 41
 cctgcaggcg atctccgtga tcgaatcc 28
 <210> 42
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer -GabD-R
 <400> 42

gaattccggg gtggcagggt taactc

26