



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0128705
(43) 공개일자 2024년08월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 7/18 (2006.01) C12N 1/14 (2018.01)
C12N 9/04 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12P 7/18 (2013.01)
C12N 1/14 (2021.05)
(21) 출원번호 10-2024-7024511
(22) 출원일자(국제) 2022년12월15일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년07월19일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2022/086137
(87) 국제공개번호 WO 2023/117685
국제공개일자 2023년06월29일
(30) 우선권주장
21216448.7 2021년12월21일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
콘질 이스테이트 게엠베하
독일 보트만-루트빅샤펜 78351 술로슈트라쎄 11
(72) 발명자
마하-아이그너, 아스트리드
오스트리아 비엔나 1060 굼펜도르퍼 슈트라쎄. 1
아 인스티튜트 퀴르 베르파렌슈테크니크 움벨트테
크니크 운트 테크니셰 바이오위센샤프텐 테크니셰
유니베르시테트 빈
마하, 로버트
오스트리아 비엔나 1060 굼펜도르퍼 슈트라쎄. 1
아 인스티튜트 퀴르 베르파렌슈테크니크 움벨트테
크니크 운트 테크니셰 바이오위센샤프텐 테크니셰
유니베르시테트 빈
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인한성

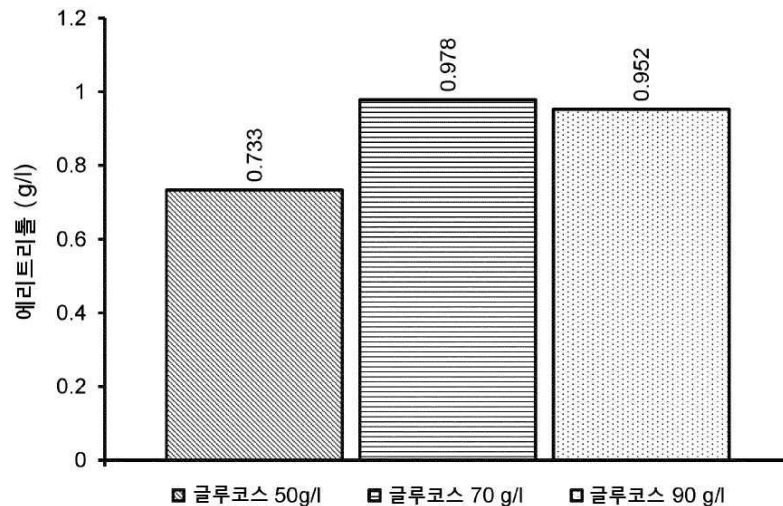
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 에리트리톨의 생명공학적인 생산 방법

(57) 요약

본 발명은 에리트리톨의 생명공학적인 생산 방법, 특히 질소원 및 고농도의 탄소원을 포함하는 배양 배지에서 적어도 하나의 부생 생물(saprotroph)을 배양함으로써 에리트리톨을 생명공학적으로 생산하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 9/0006 (2013.01)

C12Y 202/01001 (2013.01)

C12P 2201/00 (2013.01)

(72) 발명자

마시, 오드리

오스트리아 비엔나 1060 굼펜도르퍼 슈트라쎈. 1아
인스티튜트 쾰르 배르파렌슈테크니크 움벨트테크니
크 운트 테크니셰 바이오위센샤프텐 테크니셰 유니
베르시태트 빈

다자 세르나, 로라 바네사

오스트리아 비엔나 1060 굼펜도르퍼 슈트라쎈. 1아
인스티튜트 쾰르 배르파렌슈테크니크 움벨트테크니
크 운트 테크니셰 바이오위센샤프텐 테크니셰 유니
베르시태트 빈

프리들, 안톤

오스트리아 비엔나 1060 굼펜도르퍼 슈트라쎈. 1아
인스티튜트 쾰르 배르파렌슈테크니크 움벨트테크니
크 운트 테크니셰 바이오위센샤프텐 테크니셰 유니
베르시태트 빈

스타크, 게오르크

오스트리아 비엔나 1060 굼펜도르퍼 슈트라쎈. 1아
인스티튜트 쾰르 배르파렌슈테크니크 움벨트테크니
크 운트 테크니셰 바이오위센샤프텐 테크니셰 유니
베르시태트 빈

명세서

청구범위

청구항 1

에리트리트의 생산 방법으로서,

- a) 적어도 40 g/L 농도의 탄소원 및 질소원을 포함하는 배양 배지에서 적어도 하나의 부생 생물(saprotroph)을 배양하여 배양 배지에서 에리트리톨을 얻는 단계,
- b) 상기 배양 배지로부터 에리트리톨을 회수하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 배양 배지는 탄소원을 40 내지 200 g/L, 바람직하게는 70 내지 90 g/L의 농도로 포함하는 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 배양 배지는 질소원을 적어도 50 mM, 바람직하게는 적어도 60 mM, 바람직하게는 적어도 70 mM의 농도로 포함하는 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 배양 배지는 리그노셀룰로오스를 포함하는 가수분해물을 포함하는 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 탄소원은 글루코스 또는 자일로스인 방법.

청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 탄소원은 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스 및/또는 전분 함유 원료의 열수 처리에 의해 얻어지는 가수분해물을 포함하는 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 질소원은 우레아인 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 부생 생물은 히포크레아(*Hypocrea*), 트리코더마(*Trichoderma*), 지베렐라(*Gibberella*), 푸사륨(*Fusarium*), 아스페길루스(*Aspergillus*) 및 페니실륨(*Penicillium*) 속으로부터의 사상균인 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 부생 생물은 *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*), *Gibberella zeae*, *Fusarium graminearum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus oryzae* 및 *Penicillium chrysogenum*로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 부생 생물은 *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*)인 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 a)에서 적어도 하나의 부생 생물은 배양 배지가 에리트리톨을

적어도 250 mg/L, 바람직하게는 적어도 500 mg/L, 바람직하게는 적어도 1 g/L의 농도로 함유할 때까지 배양 배지에서 배양되는 방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 a)에서 적어도 하나의 부생 생물은 2 내지 7, 바람직하게는 3 내지 5.5 범위의 pH의 배양 배지에서 배양되는 방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 에리트리톨은 단계 b)에서 결정화에 의해 회수되는 방법.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 b)에서 에리트리톨의 회수는 다음 단계를 포함하는 방법:

- i) 바이오매스 제거, 바람직하게는 원심분리 및 막 여과에 의한 바이오매스의 제거,
- ii) 배양 배지의 탈색, 바람직하게는 활성탄에 의한 배양 배지의 탈색,
- iii) 배양 배지의 탈염, 바람직하게는 전기투석에 의한 배양 배지의 탈염 및 탈색,
- iv) 제조용 크로마토그래피, 바람직하게는 이온 배제 및 크기 배제 메커니즘을 사용한 역상 크로마토그래피, 및
- v) 에리트리톨의 농축 및 결정화.

청구항 15

제14항에 있어서, 열 변성 단계는 단계 i) 이전, 도중 또는 이후에 수행되는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 에리트리톨의 생명공학적인 생산 방법, 특히 질소원 및 고농도의 탄소원을 포함하는 배양 배지에서 적어도 하나의 부생 생물(saprotroph)을 배양함으로써 에리트리톨을 생명공학적으로 생산하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 최근들어 사람들의 라이프스타일과 당 함량이 높은 식품의 소비 증가로 인해 2형 당뇨병(DMT2)과 같은 혈당 관련 질환 및 장애가 엄청나게 증가했다. 요즘에는 저혈당 영양과 혈당 수치의 과도한 피크를 피하는 것이 특정 만성 질환의 발병 위험을 줄이고 건강 유지 및 개선과 많은 혈당 관련 질환 및 장애의 치료 및/또는 예방에 도움이 되는 것으로 여겨지고 있다.

[0003] 에리트리톨은 자연적으로 발생하는 4탄당 당알코올로, 그의 특정 특성과 다양한 적용 분야로 인해 식품 산업에서 점점 더 중요해지고 있다. 이것은 배, 포도 및 멜론 등의 여러 과일, 버섯, 알콜올성 음료(맥주, 포도주, 사케), 및 간장, 된장 등의 발효 식품에서 발견할 수 있지만, 천연적으로 눈 수정체 조직, 혈청, 혈장, 태수 및 소변과 같은 인간 및 동물의 생체액에서도 발생한다. 에리트리톨은 분자량이 작아 상장(upper intestine)에서 이미 쉽게 흡수되기 때문에 식품 산업에서 사용되는 다른 당 알코올보다 소화 장애를 덜 유발한다. 섭취된 에리트리톨의 대부분은 인체에서 대사되지 않고 혈당과 인슐린 수치의 변화 없이 소변으로 배설된다(Regnat et al., Erythritol as sweetener—wherefrom and whereto?, 2018, Applied Microbiology and Biotechnology, Vol. 102). 또한, 에리트리톨은 우식을 유발하지 않고 열적으로 안정적이며 잘 결정화되고 수크로스보다 흡습성이 적다. 음의 용해 엔탈피로 인해, 에리트리톨을 섭취하면 구강에서 냉감이 유발된다. 10%(w/v) 에리트리톨 용액은 동일 농도에서 수크로스 단맛의 60-80%를 가진다.

[0004] 그러나, 수년 동안 설탕 대체물로 잘 확립된 소르비톨, 자일리톨, 만니톨, 락티톨 및 말티톨과 같은 다른 당 알코올과 달리 에리트리톨은 지금까지 상업적으로 가치있는 방식으로 화학적으로 생산할 수 없었다. 고온에서 니켈 촉매를 사용하여 디알데히드 전분으로부터 에리트리톨을 생산하는 것은 만족스럽지 못한 낮은 수율을 초래한다(Moon et al. Biotechnological production of erythritol and its applications, 2010, Appl. Microbiol.

Biotechnol., Vol. 86).

[0005] 효모 및 곰팡이 종에서, 에리트리톨은 소위 펜토오스 인산염 경로를 통해 생산된다. 이것은 D-에리트로스-4-포스페이트로부터 탈인산화 및 후속하는 에리트로스의 환원을 통해 합성된다. 이를 바탕으로, 에리트리톨의 생명공학적인 생산을 위한 *Aureobasidium* sp., *Trichosporonoides* sp. 및 *Candida magnoliae*와 같은 고삼투성 효모의 적합성이 여러 연구에서 조사되었다(Ishizuka et al., Breeding of a mutant of *Aureobasidium* sp. with high erythritol production, 1989, J. Ferm. Bioeng., Vol. 68(5); US4939091A; US5962287 A; Oh et al., Increased erythritol production in fedbatch cultures of *Torula* sp. by controlling glucose concentration, 2001, JIM&B, Vol. 26; Koh et al., Scale-up of erythritol production by an osmophilic mutant of *Candida magnoliae*, 2003, Biotechnol. Lett., Vol. 25; Ryu et al., Optimization of erythritol production by *Candida magnoliae* in fed-batch culture, 2000, JIM&B, Vol. 25). 보다 최근의 연구에서는 사상균이 에리트리톨을 생산할 가능성이 조사되었다(Jovanovic et al., 2013). 그러나, 상이한 균주로부터 얻은 에리트리톨의 수율은 산업적 규모의 생산에 만족스럽지 못하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 따라서, 증가된 수율로 에리트리톨을 생산하기 위한 생명공학적인 방법이 필요하다. 본 발명은 독립항의 대상, 특히 본 발명에 따른 에리트리톨의 생산 방법에 의해 선행 기술 방법의 단점을 극복한다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명은 특히 다음 단계를 포함하는 에리트리톨의 생산 방법에 관한 것이다:

[0008] a) 적어도 40 g/L 농도의 탄소원 및 질소원을 포함하는 배양 배지에서 적어도 하나의 부생 생물을 배양하여 배양 배지에서 에리트리톨을 얻는 단계,

[0009] b) 배양 배지로부터 에리트리톨을 회수하는 단계.

[0010] 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 배양 배지는 탄소원을 적어도 50 g/L, 바람직하게는 적어도 60 g/L, 바람직하게는 적어도 70 g/L의 농도로 포함한다.

[0011] 본 발명의 추가의 바람직한 실시양태에서, 배양 배지는 탄소원을 최대 150 g/L, 바람직하게는 최대 125 g/L, 바람직하게는 최대 100 g/L, 바람직하게는 최대 95 g/L, 바람직하게는 최대 90 g/L의 농도로 포함한다.

[0012] 본 발명의 바람직한 실시양태에 따르면, 배양 배지는 탄소원을 40 내지 200 g/L, 바람직하게는 45 내지 175 g/L, 바람직하게는 50 내지 150 g/L, 바람직하게는 55 내지 125 g/L, 바람직하게는 60 내지 100 g/L, 바람직하게는 65 내지 95 g/L, 바람직하게는 70 내지 90 g/L의 농도로 포함한다.

[0013] 바람직하게는, 배양 배지는 탄소원을 40 내지 160 g/L, 바람직하게는 40 내지 150 g/L, 바람직하게는 40 내지 140 g/L, 바람직하게는 45 내지 130 g/L, 바람직하게는 45 내지 120 g/L, 바람직하게는 45 내지 110 g/L, 바람직하게는 50 내지 100 g/L, 바람직하게는 50 내지 95 g/L, 바람직하게는 50 내지 90 g/L, 바람직하게는 60 내지 90 g/L, 바람직하게는 65 내지 90 g/L, 바람직하게는 70 내지 90 g/L의 농도로 포함한다.

[0014] 본 발명의 추가의 바람직한 실시양태에서, 배양 배지는 질소원을 적어도 50 mM, 바람직하게는 적어도 55 mM, 바람직하게는 적어도 60 mM, 바람직하게는 적어도 65 mM, 바람직하게는 적어도 70 mM의 농도로 포함한다.

[0015] 바람직하게는, 배양 배지는 질소원을 최대 150 mM, 바람직하게는 최대 140 mM, 바람직하게는 최대 130 mM, 바람직하게는 최대 120 mM, 바람직하게는 최대 110 mM, 바람직하게는 최대 100 mM의 농도로 포함한다.

[0016] 특히 바람직하게는, 배양 배지는 질소원을 50 내지 140 mM, 바람직하게는 55 내지 130 mM, 바람직하게는 60 내지 120 mM, 바람직하게는 65 내지 110 mM, 바람직하게는 70 내지 100 mM의 농도로 포함한다.

[0017] 본 발명의 바람직한 실시양태에 따르면, 배양 배지는 합성 배지이다. 바람직하게는, 배양 배지는 합성 배지가 아니다.

[0018] 본 발명의 보다 바람직한 실시양태에서, 배양 배지는 셀룰로오스-, 헤미-셀룰로오스- 및/또는 전분 함유 원료를 열수 처리하여 얻은 가수분해물을 포함한다.

- [0019] 특히 바람직하게는, 배양 배지는 리그노셀룰로오스 함유 가수분해물을 포함한다.
- [0020] 본 발명의 추가의 바람직한 실시양태에서, 가수분해물, 바람직하게는 셀룰로오스-, 헤미-셀룰로오스- 및/또는 전분 함유 원료, 특히 리그노셀룰로오스 함유 가수분해물을 열수 처리하여 얻은 가수분해물은 농공 잔여물로부터 유래된다.
- [0021] 본 발명의 바람직한 실시양태에 따르면, 배양 배지는 짙 가수분해물, 특히 밀짚 가수분해물을 포함한다. 추가의 바람직한 실시양태에서, 배양 배지는 밀기울 가수분해물을 포함한다. 바람직하게는, 배양 배지는 감자 전분박 (potato pulp) 가수분해물을 포함한다.
- [0022] 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 탄소원은 단량체성 또는 올리고머성 C-5 및/또는 C-6 당 또는 이들의 혼합물이다. 바람직하게는, 탄소원은 아라비노스, 자일로스, 글루코스, 갈락토스, 만노스 및 프럭토스로부터 선택된 단량체성 또는 올리고머성 C-5 및/또는 C-6 당이다. 추가의 바람직한 실시양태에 따르면, 탄소원은 단량체 및 올리고머성 C-5 및/또는 C-6 당의 혼합물, 바람직하게는 아라비노스, 자일로스로, 글루코스, 갈락토스, 만노스 및 프럭토스로부터 선택된 단량체 및 올리고머성 C-5 및/또는 C-6 당의 혼합물이다.
- [0023] 추가의 바람직한 실시양태에서, 탄소원은 글루코스 또는 자일로스이다. 특히 바람직하게는 탄소원은 글루코스이다. 바람직하게는 탄소원은 자일로스이다.
- [0024] 바람직한 실시양태에 따르면, 배양 배지 중 C-5 당 함량은 적어도 5%, 바람직하게는 적어도 10%, 바람직하게는 적어도 15%, 바람직하게는 적어도 20%, 바람직하게는 적어도 25%, 바람직하게는 적어도 30%, 바람직하게는 적어도 40%, 바람직하게는 적어도 50%, 바람직하게는 적어도 60%, 바람직하게는 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95% (배양 배지 중의 총 탄수화물 기준)에 달한다.
- [0025] 바람직하게는, 배양 배지 중 C-6 당 함량은 적어도 10%, 바람직하게는 적어도 15%, 바람직하게는 적어도 20%, 바람직하게는 적어도 25%, 바람직하게는 적어도 30%, 바람직하게는 적어도 40%, 바람직하게는 적어도 50%, 바람직하게는 적어도 60%, 바람직하게는 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95% (배양 배지 중의 총 탄수화물 기준)에 달한다.
- [0026] 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 배양 배지 중 글루코스 함량은 적어도 10%, 바람직하게는 적어도 15%, 바람직하게는 적어도 20%, 바람직하게는 적어도 25%, 바람직하게는 적어도 30%, 바람직하게는 적어도 40%, 바람직하게는 적어도 50%, 바람직하게는 적어도 60%, 바람직하게는 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95% (배양 배지 중의 총 탄수화물 기준)에 달한다.
- [0027] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 배양 배지 중 자일로스 함량은 적어도 10%, 바람직하게는 적어도 15%, 바람직하게는 적어도 20%, 바람직하게는 적어도 25%, 바람직하게는 적어도 30%, 바람직하게는 적어도 40%, 바람직하게는 적어도 50%, 바람직하게는 적어도 60%, 바람직하게는 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95% (배양 배지 중의 총 탄수화물 기준)에 달한다.
- [0028] 바람직하게는, 배양 배지 중 단량체 C-5 및 C-6 당의 함량은 적어도 1%, 바람직하게는 적어도 2%, 바람직하게는 적어도 3%, 바람직하게는 4%, 바람직하게는 적어도 5%, 바람직하게는 적어도 6%, 바람직하게는 적어도 7%, 바람직하게는 적어도 8%, 바람직하게는 적어도 9%, 바람직하게는 적어도 10%, 바람직하게는 적어도 15%, 바람직하게는 적어도 20%, 바람직하게는 적어도 30%, 바람직하게는 적어도 40%, 바람직하게는 적어도 50%, 바람직하게는 적어도 60%, 바람직하게는 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 바람직하게는 적어도 96%, 바람직하게는 적어도 97%, 바람직하게는 적어도 98%, 바람직하게는 적어도 99% (배양 배지 중의 총 탄수화물 기준)에 달한다.
- [0029] 본 발명의 바람직한 실시양태에 따르면, 배양 배지 중 올리고머성 C-5 및 C-6 당의 함량은 적어도 10%, 바람직하게는 적어도 20%, 바람직하게는 적어도 30%, 바람직하게는 적어도 40%, 바람직하게는 적어도 50%, 바람직하게는 적어도 60%, 바람직하게는 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 75%, 바람직하게는 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 바람직하게는 적어도 96%, 바람직하게는 적어도 97%, 바람직하게는 적어도 98%, 바람직하게는 적어도 99% (배양 배지 중의 총 탄수화물 기준)에 달한다.
- [0030] 본 발명의 바람직한 실시양태에 따르면, 질소원은 암모늄염, 질산염, 효모 추출물 및 우레아로부터 선택된다. 특히 바람직하게는, 질소원은 암모늄염 또는 우레아이다. 바람직하게는, 암모늄염은 황산암모늄, 질산암모늄, 구연산암모늄, 숙신산암모늄, 탄산암모늄, 옥살산암모늄 및 말산암모늄으로부터 선택된다.

- [0031] 본 발명의 특히 바람직한 실시양태에서, 질소원은 우레아이다.
- [0032] 바람직하게는, 배양 배지는 우레아를 적어도 8 mM, 바람직하게는 적어도 10 mM, 바람직하게는 적어도 15 mM, 바람직하게는 적어도 20 mM, 바람직하게는 적어도 25 mM, 바람직하게는 적어도 30 mM, 바람직하게는 적어도 35 mM, 바람직하게는 적어도 40 mM, 바람직하게는 적어도 45 mM, 바람직하게는 적어도 50 mM, 바람직하게는 적어도 55 mM, 바람직하게는 적어도 60 mM, 바람직하게는 적어도 65 mM, 바람직하게는 적어도 70 mM, 바람직하게는 적어도 80 mM의 농도로 포함한다.
- [0033] 본 발명의 바람직한 실시양태에 따르면, 배양 배지는 우레아를 최대 160 mM, 바람직하게는 최대 150 mM, 바람직하게는 최대 140 mM, 바람직하게는 최대 130 mM, 바람직하게는 최대 120 mM, 바람직하게는 최대 110 mM, 바람직하게는 최대 100 mM, 바람직하게는 최대 90 mM의 농도로 포함한다.
- [0034] 바람직한 실시양태에서, 배양 배지는 우레아를 8 내지 160 mM, 바람직하게는 10 내지 150 mM, 바람직하게는 20 내지 140 mM, 바람직하게는 30 내지 130 mM, 바람직하게는 40 내지 120 mM, 바람직하게는 50 내지 110 mM, 바람직하게는 60 내지 100 mM, 바람직하게는 65 내지 100 mM, 바람직하게는 70 내지 100 mM, 가장 바람직하게는 70 내지 90 mM의 농도로 포함한다.
- [0035] 본 발명의 추가의 바람직한 실시양태에 따르면, 적어도 하나의 부생 생물은 사상균이다. 바람직하게는, 사상균은 히포크레아(*Hypocrea*), 트리코더마(*Trichoderma*), 지베렐라(*Gibberella*), 푸사륨(*Fusarium*), 아스페르길루스(*Aspergillus*) 및 페니실륨(*Penicillium*) 속으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0036] 바람직한 실시양태에서, 부생 생물은 *Hypocrea jecorina*(*Trichoderma reesei*), *Gibberella zeae*, *Fusarium graminearum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus oryzae* 및 *Penicillium chrysogenum*로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특히 바람직하게는 부생 생물은 *Hypocrea jecorina*(*Trichoderma reesei*)이다.
- [0037] 본 발명의 바람직한 실시양태에 따르면, 적어도 하나의 부생 생물은 자연 발생 부생 생물이고, 특히 유전적으로 변형된 부생 생물이 아니다.
- [0038] 본 발명의 또 다른 바람직한 실시양태에서, 적어도 하나의 부생 생물은 유전적으로 변형된 것이다.
- [0039] 본 발명의 특히 바람직한 실시양태에서, 유전적으로 변형된 부생 생물은 *Hypocrea jecorina*(*Trichoderma reesei*)이다. 바람직하게는, 유전적으로 변형된 부생 생물은 *Trichoderma reesei* 균주 QM6aΔ*tmus53*을 기반으로 한다.
- [0040] 바람직하게는, 적어도 하나의 유전적으로 변형된 부생 생물은 적어도 하나의 막 결합 알디톨 수송체를 인코딩하는 적어도 하나의 유전자, 적어도 하나의 에리트로스 리덕타제를 인코딩하는 적어도 하나의 유전자 및 만니톨 1-포스페이트 5-데하이드로게나제를 인코딩하는 적어도 하나의 불활성화된 유전자를 포함한다.
- [0041] 본 발명의 추가의 바람직한 실시양태에서, 적어도 하나의 막-결합 알디톨 수송체를 인코딩하는 유전적으로 변형된 부생 생물의 적어도 하나의 유전자는 *fps1*, 특히 코돈 최적화된 *fps1*이다. 바람직하게는, 적어도 하나의 막-결합 알디톨 수송체를 인코딩하는 유전적으로 변형된 부생 생물의 적어도 하나의 유전자는 *Saccharomyces cerevisiae*로부터의 *fps1*, 특히 *Saccharomyces cerevisiae*로부터의 코돈 최적화된 *fps1*이다.
- [0042] 추가의 바람직한 실시양태에서, 적어도 하나의 막 결합 알디톨 수송체를 인코딩하는 유전적으로 변형된 부생 생물의 적어도 하나의 유전자는 서열 번호 1의 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 특히 서열 번호 1의 뉴클레오티드 서열로 이루어진다.
- [0043] 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 적어도 하나의 막-결합 알디톨 수송체를 인코딩하는 유전적으로 변형된 부생 생물의 적어도 하나의 유전자는 서열 번호 1에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 바람직하게는 적어도 96%, 바람직하게는 적어도 97%, 바람직하게는 적어도 98%, 바람직하게는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 바람직하게는 적어도 하나의 막-결합 알디톨 수송체를 인코딩하는 유전적으로 변형된 부생 생물의 적어도 하나의 유전자는 서열 번호 1에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 바람직하게는 적어도 96%, 바람직하게는 적어도 97%, 바람직하게는 적어도 98%, 바람직하게는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열로 이루어진다.
- [0044] 바람직하게는, 유전적으로 변형된 부생 생물의 막-결합 알디톨 수송체는 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하고, 특히 서열 번호 2의 아미노산 서열로 이루어진다.

- [0045] 바람직하게는, 유전적으로 변형된 부생 생물의 막-결합 알디톨 수송체는 서열 번호 2에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 바람직하게는 적어도 96%, 바람직하게는 적어도 97%, 바람직하게는 적어도 98%, 바람직하게는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 바람직하게는 적어도 하나의 막-결합 알디톨 수송체를 인코딩하는 유전적으로 변형된 부생 생물의 적어도 하나의 유전자는 서열 번호 2에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 바람직하게는 적어도 96%, 바람직하게는 적어도 97%, 바람직하게는 적어도 98%, 바람직하게는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0046] 본 발명의 또 다른 바람직한 실시양태에서, 유전적으로 변형된 부생 생물의 막-결합 알디톨 수송체는 서열 번호 2에 정의된 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 1개, 바람직하게는 2개, 바람직하게는 3개, 바람직하게는 5개, 바람직하게는 6개, 바람직하게는 7개, 바람직하게는 8개, 바람직하게는 9개, 바람직하게는 10개의 아미노산은 다른 자연 발생 아미노산으로 교환된다. 특히 바람직한 실시양태에서, 유전적으로 변형된 부생 생물의 막-결합 알디톨 수송체는 서열 번호 2에 정의된 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 최대 10개, 바람직하게는 최대 9개, 바람직하게는 최대 8개, 바람직하게는 최대 7개, 바람직하게는 최대 6개, 바람직하게는 최대 5개, 바람직하게는 최대 4개, 바람직하게는 최대 3개, 바람직하게는 최대 2개, 바람직하게는 최대 1개의 아미노산은 다른 자연 발생 아미노산으로 교환된다.
- [0047] 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 적어도 하나의 에리트로스 리덕타제를 인코딩하는 유전적으로 변형된 부생 생물의 적어도 하나의 유전자는 *err1*, 특히 코돈 최적화된 *err1*이다. 바람직하게는, 적어도 하나의 에리트로스 리덕타제를 인코딩하는 유전적으로 변형된 부생 생물의 적어도 하나의 유전자는 *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger* 또는 *Fusarium graminearum*으로부터의 *err1*, 특히 코돈 최적화된 *err1*이다.
- [0048] 바람직한 실시양태에서, 적어도 하나의 에리트로스 리덕타제를 인코딩하는 유전적으로 변형된 부생 생물의 적어도 하나의 유전자는 서열 번호 3의 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 특히 서열 번호 3의 뉴클레오티드 서열로 이루어진다.
- [0049] 바람직하게는, 적어도 하나의 에리트로스 리덕타제를 인코딩하는 유전적으로 변형된 부생 생물의 적어도 하나의 유전자는 서열 번호 3에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 바람직하게는 적어도 96%, 바람직하게는 적어도 97%, 바람직하게는 적어도 98%, 바람직하게는 적어도 99%의 서열 동일성을 가지는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 본 발명의 또 다른 바람직한 실시양태에서, 적어도 하나의 에리트로스 리덕타제를 인코딩하는 적어도 하나의 유전자를 인코딩하는 적어도 하나의 유전자는 서열 번호 3에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 바람직하게는 적어도 96%, 바람직하게는 적어도 97%, 바람직하게는 적어도 98%, 바람직하게는 적어도 99%의 서열 동일성을 가지는 뉴클레오티드 서열로 이루어진다.
- [0050] 바람직하게는, 유전적으로 변형된 부생 생물의 에리트로스 리덕타제는 서열 번호 4의 아미노산 서열을 포함하고, 특히 서열 번호 4의 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0051] 바람직한 실시양태에서, 유전적으로 변형된 부생 생물의 에리트로스 리덕타제는 서열 번호 4에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 바람직하게는 적어도 96%, 바람직하게는 적어도 97%, 바람직하게는 적어도 98%, 바람직하게는 적어도 99%의 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함한다. 특히 바람직하게는, 유전적으로 변형된 부생 생물의 에리트로스 리덕타제는 서열 번호 4에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 바람직하게는 적어도 96%, 바람직하게는 적어도 97%, 바람직하게는 적어도 98%, 바람직하게는 적어도 99%의 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0052] 바람직하게는, 유전적으로 변형된 부생 생물의 에리트로스 리덕타제는 서열 번호 4에 정의된 아미노산 서열을 포함하고, 여기서 1개, 바람직하게는 2개, 바람직하게는 3개, 바람직하게는 5개, 바람직하게는 6개, 바람직하게는 7개, 바람직하게는 8개, 바람직하게는 9개, 바람직하게는 10개의 아미노산은 다른 자연 발생 아미노산으로 교환된다. 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 유전적으로 변형된 부생 생물의 에리트로스 리덕타제는 서열 번호 4에 정의된 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 최대 10개, 바람직하게는 최대 9개, 바람직하게는 최대 8개, 바람직하게는 최대 7개, 바람직하게는 최대 6개, 바람직하게는 최대 5개, 바람직하게는 최대 4개, 바람직하게는 최대 3개, 바람직하게는 최대 2개, 바람직하게는 최대 1개의 아미노산은 다른 자연 발생 아미노산으로 교환된다.

- [0053] 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 유전적으로 변형된 부생 생물의 만니톨 1-포스페이트 5-데하이드로게나제를 인코딩하는 적어도 하나의 비활성화된 유전자는 *mpdh*이다.
- [0054] 바람직하게는, 유전적으로 변형된 부생 생물의 만니톨 1-포스페이트 5-데하이드로게나제를 인코딩하는 적어도 하나의 유전자는 비활성화 전 서열 번호 9의 뉴클레오티드 서열을 포함하며, 특히 비활성화 전 서열 번호 9의 뉴클레오티드 서열로 이루어진다.
- [0055] 바람직하게는, 유전적으로 변형된 부생 생물의 만니톨 1-포스페이트 5-데하이드로게나제를 인코딩하는 적어도 하나의 유전자는 비활성화 전 서열 번호 9에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 바람직하게는 적어도 96%, 바람직하게는 적어도 97%, 바람직하게는 적어도 98%, 바람직하게는 적어도 99%의 서열 동일성을 가지는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 유전적으로 변형된 부생 생물의 만니톨 1-포스페이트 5-데하이드로게나제를 인코딩하는 적어도 하나의 유전자는 비활성화 전 서열 번호 9에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 바람직하게는 적어도 96%, 바람직하게는 적어도 97%, 바람직하게는 적어도 98%, 바람직하게는 적어도 99%의 서열 동일성을 가지는 뉴클레오티드 서열로 이루어진다.
- [0056] 바람직하게는, 비활성화 전 서열 번호 9의 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩된 만니톨 1-포스페이트 5-데하이드로게나제는 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하고, 특히 서열 번호 10의 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0057] 바람직한 실시양태에서, 비활성화 전 서열 번호 9의 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩된 만니톨 1-포스페이트 5-데하이드로게나제는 서열 번호 10에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 바람직하게는 적어도 96%, 바람직하게는 적어도 97%, 바람직하게는 적어도 98%, 바람직하게는 적어도 99%의 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함한다. 특히 바람직하게는, 비활성화 전 서열 번호 9의 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩된 만니톨 1-포스페이트 5-데하이드로게나제는 서열 번호 10에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 바람직하게는 적어도 96%, 바람직하게는 적어도 97%, 바람직하게는 적어도 98%, 바람직하게는 적어도 99%의 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0058] 바람직하게는, 비활성화 전 서열 번호 9의 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩된 만니톨 1-포스페이트 5-데하이드로게나제는 서열 번호 10에 정의된 아미노산 서열을 포함하고, 여기서 1개, 바람직하게는 2개, 바람직하게는 3개, 바람직하게는 5개, 바람직하게는 6개, 바람직하게는 7개, 바람직하게는 8개, 바람직하게는 9개, 바람직하게는 10개의 아미노산은 다른 자연 발생 아미노산으로 교환된다. 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 비활성화 전 서열 번호 9의 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩된 만니톨 1-포스페이트 5-데하이드로게나제는 서열 번호 10에 정의된 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 최대 10개, 바람직하게는 최대 9개, 바람직하게는 최대 8개, 바람직하게는 최대 7개, 바람직하게는 최대 6개, 바람직하게는 최대 5개, 바람직하게는 최대 4개, 바람직하게는 최대 3개, 바람직하게는 최대 2개, 바람직하게는 최대 1개의 아미노산은 다른 자연 발생 아미노산으로 교환된다.
- [0059] 본 발명의 또 다른 바람직한 실시양태에서, 유전적으로 변형된 부생 생물의 만니톨 1-포스페이트 5-데하이드로게나제를 인코딩하는 적어도 하나의 비활성화된 유전자가 결실된다.
- [0060] 본 발명의 또 다른 바람직한 실시양태에서, 유전적으로 변형된 부생 생물의 만니톨 1-포스페이트 5-데하이드로게나제를 인코딩하는 적어도 하나의 비활성화된 유전자는 비기능성이다.
- [0061] 특히 바람직한 실시양태에서, 유전적으로 변형된 부생 생물의 만니톨 1-포스페이트 5-데하이드로게나제를 인코딩하는 적어도 하나의 비활성화된 유전자는 유전자 녹아웃, 특히 유전자 치환에 의해 비활성화된다. 바람직하게는, 유전적으로 변형된 부생 생물의 만니톨 1-포스페이트 5-데하이드로게나제를 인코딩하는 적어도 하나의 비활성화 유전자는 결실 카세트를 사용한 유전자 치환에 의해 비활성화된다.
- [0062] 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 유전적으로 변형된 부생 생물의 만니톨 1-포스페이트 5-데하이드로게나제를 인코딩하는 적어도 하나의 유전자는 게놈 편집에 의해, 특히 메가뉴클레아제, 징크-핑거 뉴클레아제(ZFN), 전사 활성체 유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN) 또는 일정한 간격으로 놓인 군집화된 짧은 회문 반복(CRISPR: clustered regularly interspaced short palindromic repeat) 시스템에 의해 비활성화되고, 특히 비기능성으로 된다.
- [0063] 특히 바람직한 실시양태에서, 유전적으로 변형된 부생 생물은 적어도 하나, 바람직하게는 적어도 2개, 바람직하게는 적어도 3개, 바람직하게는 적어도 4개, 바람직하게는 적어도 5개의 추가 비활성화 유전자를 포함한다. 바람직하게는, 유전적으로 변형된 부생 생물의 적어도 하나의 추가 비활성화 유전자는 포스포-2-데하이드로-3-데

옥시헵토네이트 알돌라제 1(Dhps-1)을 인코딩하는 유전자, 에리트리톨 이용 인자(EUF)를 인코딩하는 유전자, 에리트룰로스 키나제(EYK1)를 인코딩하는 유전자, 에리트리톨 데하이드로게나제(EYD1)를 인코딩하는 유전자, 에리트리톨 이소머라제 1(EYI1)을 인코딩하는 유전자 및 에리트리톨 이소머라제 2(EYI2)를 인코딩하는 유전자로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0064] 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 유전적으로 변형된 부생 생물의 적어도 하나의 추가 비활성화 유전자는 포스포-2-데하이드로-3-데옥시헵토네이트 알돌라제 1(Dhps-1)을 인코딩하는 유전자이다. 바람직하게는, 유전적으로 변형된 부생 생물의 포스포-2-데하이드로-3-데옥시헵토네이트 알돌라제 1(Dhps1)을 인코딩하는 적어도 하나의 유전자는 비활성화 전 서열 번호 11의 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 특히 비활성화 전 서열 번호 11의 뉴클레오티드 서열로 이루어진다.

[0065] 바람직하게는, 유전적으로 변형된 부생 생물의 포스포-2-데하이드로-3-데옥시헵토네이트 알돌라제 1(Dhps1)을 인코딩하는 적어도 하나의 유전자는 비활성화 전 서열 번호 11에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 바람직하게는 적어도 96%, 바람직하게는 적어도 97%, 바람직하게는 적어도 98%, 바람직하게는 적어도 99%의 서열 동일성을 가지는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 추가의 바람직한 실시양태에서, 유전적으로 변형된 부생 생물의 포스포-2-데하이드로-3-데옥시헵토네이트 알돌라제 1(Dhps1)을 인코딩하는 적어도 하나의 유전자는 비활성화 전 서열 번호 11에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 바람직하게는 적어도 96%, 바람직하게는 적어도 97%, 바람직하게는 적어도 98%, 바람직하게는 적어도 99%의 서열 동일성을 가지는 뉴클레오티드 서열로 이루어진다.

[0066] 바람직하게는, 비활성화 전 서열 번호 11의 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩된 포스포-2-데하이드로-3-데옥시헵토네이트 알돌라제 1(Dhps1)은 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하고, 특히 서열 번호 12의 아미노산 서열로 이루어진다.

[0067] 바람직한 실시양태에서, 비활성화 전 서열 번호 11의 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩된 포스포-2-데하이드로-3-데옥시헵토네이트 알돌라제 1(Dhps1)은 서열 번호 12에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 바람직하게는 적어도 96%, 바람직하게는 적어도 97%, 바람직하게는 적어도 98%, 바람직하게는 적어도 99%의 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함한다. 특히 바람직하게는, 비활성화 전 서열 번호 11의 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩된 포스포-2-데하이드로-3-데옥시헵토네이트 알돌라제 1(Dhps1)은 서열 번호 12에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 바람직하게는 적어도 96%, 바람직하게는 적어도 97%, 바람직하게는 적어도 98%, 바람직하게는 적어도 99%의 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열로 이루어진다.

[0068] 바람직하게는, 비활성화 전 서열 번호 11의 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩된 포스포-2-데하이드로-3-데옥시헵토네이트 알돌라제 1(Dhps1)은 서열 번호 12에 정의된 아미노산 서열을 포함하고, 여기서 1개, 바람직하게는 2개, 바람직하게는 3개, 바람직하게는 5개, 바람직하게는 6개, 바람직하게는 7개, 바람직하게는 8개, 바람직하게는 9개, 바람직하게는 10개의 아미노산은 다른 자연 발생 아미노산으로 교환된다. 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 비활성화 전 서열 번호 11의 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩된 포스포-2-데하이드로-3-데옥시헵토네이트 알돌라제 1(Dhps1)은 서열 번호 12에 정의된 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 최대 10개, 바람직하게는 최대 9개, 바람직하게는 최대 8개, 바람직하게는 최대 7개, 바람직하게는 최대 6개, 바람직하게는 최대 5개, 바람직하게는 최대 4개, 바람직하게는 최대 3개, 바람직하게는 최대 2개, 바람직하게는 최대 1개의 아미노산은 다른 자연 발생 아미노산으로 교환된다.

[0069] 본 발명의 또 다른 실시예양태서, 유전적으로 변형된 부생 생물의 적어도 하나의 추가 비활성화 유전자는 에리트리톨 이용 인자(EUF)를 인코딩하는 유전자이다. 바람직하게는, 유전적으로 변형된 부생 생물의 에리트리톨 이용 인자(Euf1)를 인코딩하는 적어도 하나의 유전자는 비활성화 전 서열 번호 13의 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 특히 비활성화 전 서열 번호 13의 뉴클레오티드 서열로 이루어진다.

[0070] 바람직하게는, 유전적으로 변형된 부생 생물의 에리트리톨 이용 인자(Euf1)를 인코딩하는 적어도 하나의 유전자는 비활성화 전 서열 번호 13에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 바람직하게는 적어도 96%, 바람직하게는 적어도 97%, 바람직하게는 적어도 98%, 바람직하게는 적어도 99%의 서열 동일성을 가지는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 특히 바람직하게는, 유전적으로 변형된 부생 생물의 에리트리톨 이용 인자(Euf1)를 인코딩하는 적어도 하나의 유전자는 비활성화 전 서열 번호 13에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 바람직하게는

적어도 96%, 바람직하게는 적어도 97%, 바람직하게는 적어도 98%, 바람직하게는 적어도 99%의 서열 동일성을 가지는 뉴클레오티드 서열로 이루어진다.

[0071] 바람직하게는, 비활성화 전 서열 번호 13의 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩된 에리트리톨 이용 인자(Euf1)는 서열 번호 14의 아미노산 서열을 포함하고, 특히 서열 번호 14의 아미노산 서열로 이루어진다.

[0072] 바람직한 실시양태에서, 비활성화 전 서열 번호 13의 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩된 에리트리톨 이용 인자(Euf1)는 서열 번호 14에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 바람직하게는 적어도 96%, 바람직하게는 적어도 97%, 바람직하게는 적어도 98%, 바람직하게는 적어도 99%의 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함한다. 특히 바람직하게는, 비활성화 전 서열 번호 13의 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩된 에리트리톨 이용 인자(Euf1)는 서열 번호 14에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 바람직하게는 적어도 96%, 바람직하게는 적어도 97%, 바람직하게는 적어도 98%, 바람직하게는 적어도 99%의 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열로 이루어진다.

[0073] 바람직하게는, 비활성화 전 서열 번호 13의 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩된 에리트리톨 이용 인자(Euf1)는 서열 번호 14에 정의된 아미노산 서열을 포함하고, 여기서 1개, 바람직하게는 2개, 바람직하게는 3개, 바람직하게는 5개, 바람직하게는 6개, 바람직하게는 7개, 바람직하게는 8개, 바람직하게는 9개, 바람직하게는 10개의 아미노산은 다른 자연 발생 아미노산으로 교환된다. 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 비활성화 전 서열 번호 13의 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩된 에리트리톨 이용 인자(Euf1)는 서열 번호 14에 정의된 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 최대 10개, 바람직하게는 최대 9개, 바람직하게는 최대 8개, 바람직하게는 최대 7개, 바람직하게는 최대 6개, 바람직하게는 최대 5개, 바람직하게는 최대 4개, 바람직하게는 최대 3개, 바람직하게는 최대 2개, 바람직하게는 최대 1개의 아미노산은 다른 자연 발생 아미노산으로 교환된다.

[0074] 본 발명의 특히 바람직한 실시양태에서, 유전적으로 변형된 부생 생물의 적어도 하나의 추가 비활성화 유전자는 에리트룰로스 키나제(EYK1)를 인코딩하는 유전자이다. 바람직하게는, 유전적으로 변형된 부생 생물의 에리트룰로스 키나제(Eyk1)를 인코딩하는 적어도 하나의 유전자는 비활성화 전 서열 번호 15의 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 특히 비활성화 전 서열 번호 15의 뉴클레오티드 서열로 이루어진다.

[0075] 본 발명의 다른 바람직한 실시양태에 따르면, 유전적으로 변형된 부생 생물의 에리트룰로스 키나제(Eyk1)를 인코딩하는 적어도 하나의 유전자는 비활성화 전 서열 번호 15에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 바람직하게는 적어도 96%, 바람직하게는 적어도 97%, 바람직하게는 적어도 98%, 바람직하게는 적어도 99%의 서열 동일성을 가지는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 특히 바람직하게는, 유전적으로 변형된 부생 생물의 에리트룰로스 키나제(Eyk1)를 인코딩하는 적어도 하나의 유전자는 비활성화 전 서열 번호 15에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 바람직하게는 적어도 96%, 바람직하게는 적어도 97%, 바람직하게는 적어도 98%, 바람직하게는 적어도 99%의 서열 동일성을 가지는 뉴클레오티드 서열로 이루어진다.

[0076] 바람직하게는, 비활성화 전 서열 번호 15의 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩된 에리트룰로스 키나제(Eyk1)는 서열 번호 16의 아미노산 서열을 포함하고, 특히 서열 번호 16의 아미노산 서열로 이루어진다.

[0077] 바람직한 실시양태에서, 비활성화 전 서열 번호 15의 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩된 에리트룰로스 키나제(Eyk1)는 서열 번호 16에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 바람직하게는 적어도 96%, 바람직하게는 적어도 97%, 바람직하게는 적어도 98%, 바람직하게는 적어도 99%의 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함한다. 특히 바람직하게는, 비활성화 전 서열 번호 15의 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩된 에리트룰로스 키나제(Eyk1)는 서열 번호 16에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 바람직하게는 적어도 96%, 바람직하게는 적어도 97%, 바람직하게는 적어도 98%, 바람직하게는 적어도 99%의 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열로 이루어진다.

[0078] 바람직하게는, 비활성화 전 서열 번호 15의 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩된 에리트룰로스 키나제(Eyk1)는 서열 번호 16에 정의된 아미노산 서열을 포함하고, 여기서 1개, 바람직하게는 2개, 바람직하게는 3개, 바람직하게는 5개, 바람직하게는 6개, 바람직하게는 7개, 바람직하게는 8개, 바람직하게는 9개, 바람직하게는 10개의 아미노산은 다른 자연 발생 아미노산으로 교환된다. 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 비활성화 전 서열 번호 15의 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩된 에리트룰로스 키나제(Eyk1)는 서열 번호 16에 정의된 아미노산 서열을

포함하며, 여기서 최대 10개, 바람직하게는 최대 9개, 바람직하게는 최대 8개, 바람직하게는 최대 7개, 바람직하게는 최대 6개, 바람직하게는 최대 5개, 바람직하게는 최대 4개, 바람직하게는 최대 3개, 바람직하게는 최대 2개, 바람직하게는 최대 1개의 아미노산은 다른 자연 발생 아미노산으로 교환된다.

[0079] 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 유전적으로 변형된 부생 생물의 적어도 하나의 추가 비활성화 유전자는 에리트ρί톨 데하이드로게나제(EYD1)를 인코딩하는 유전자이다. 바람직하게는, 유전적으로 변형된 부생 생물의 에리트ρί톨 데하이드로게나제(Eyd1)를 인코딩하는 적어도 하나의 유전자는 비활성화 전 서열 번호 17의 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 특히 비활성화 전 서열 번호 17의 뉴클레오티드 서열로 이루어진다.

[0080] 바람직하게는, 유전적으로 변형된 부생 생물의 에리트ρί톨 데하이드로게나제(Eyd1)를 인코딩하는 적어도 하나의 유전자는 비활성화 전 서열 번호 17에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 바람직하게는 적어도 96%, 바람직하게는 적어도 97%, 바람직하게는 적어도 98%, 바람직하게는 적어도 99%의 서열 동일성을 가지는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 본 발명의 다른 바람직한 실시양태에서, 유전적으로 변형된 부생 생물의 에리트ρί톨 데하이드로게나제(Eyd1)를 인코딩하는 적어도 하나의 유전자는 비활성화 전 서열 번호 17에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 바람직하게는 적어도 96%, 바람직하게는 적어도 97%, 바람직하게는 적어도 98%, 바람직하게는 적어도 99%의 서열 동일성을 가지는 뉴클레오티드 서열로 이루어진다.

[0081] 바람직하게는, 비활성화 전 서열 번호 17의 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩된 에리트ρί톨 데하이드로게나제(Eyd1)는 서열 번호 18의 아미노산 서열을 포함하고, 특히 서열 번호 18의 아미노산 서열로 이루어진다.

[0082] 바람직한 실시양태에서, 비활성화 전 서열 번호 17의 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩된 에리트ρί톨 데하이드로게나제(Eyd1)는 서열 번호 18에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 바람직하게는 적어도 96%, 바람직하게는 적어도 97%, 바람직하게는 적어도 98%, 바람직하게는 적어도 99%의 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함한다. 특히 바람직하게는, 비활성화 전 서열 번호 17의 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩된 에리트ρί톨 데하이드로게나제(Eyd1)는 서열 번호 17에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 바람직하게는 적어도 96%, 바람직하게는 적어도 97%, 바람직하게는 적어도 98%, 바람직하게는 적어도 99%의 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열로 이루어진다.

[0083] 바람직하게는, 비활성화 전 서열 번호 17의 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩된 에리트ρί톨 데하이드로게나제(Eyd1)는 서열 번호 18에 정의된 아미노산 서열을 포함하고, 여기서 1개, 바람직하게는 2개, 바람직하게는 3개, 바람직하게는 5개, 바람직하게는 6개, 바람직하게는 7개, 바람직하게는 8개, 바람직하게는 9개, 바람직하게는 10개의 아미노산은 다른 자연 발생 아미노산으로 교환된다. 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 비활성화 전 서열 번호 17의 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩된 에리트ρί톨 데하이드로게나제(Eyd1)는 서열 번호 18에 정의된 아미노산 서열을 포함하고, 여기서 최대 10개, 바람직하게는 최대 9개, 바람직하게는 최대 8개, 바람직하게는 최대 7개, 바람직하게는 최대 6개, 바람직하게는 최대 5개, 바람직하게는 최대 4개, 바람직하게는 최대 3개, 바람직하게는 최대 2개, 바람직하게는 최대 1개의 아미노산은 다른 자연 발생 아미노산으로 교환된다.

[0084] 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 유전적으로 변형된 부생 생물의 적어도 하나의 추가 비활성화 유전자는 에리트ρί톨 이소머라제 1(EYI1)을 인코딩하는 유전자이다. 바람직하게는, 유전적으로 변형된 부생 생물의 에리트ρί톨 이소머라제 1(Eyi1)을 인코딩하는 적어도 하나의 유전자는 비활성화 전 서열 번호 19의 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 특히 비활성화 전 서열 번호 19의 뉴클레오티드 서열로 이루어진다.

[0085] 특히 바람직하게는, 유전적으로 변형된 부생 생물의 에리트ρί톨 이소머라제 1(Eyi1)을 인코딩하는 적어도 하나의 유전자는 비활성화 전 서열 번호 19에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 바람직하게는 적어도 96%, 바람직하게는 적어도 97%, 바람직하게는 적어도 98%, 바람직하게는 적어도 99%의 서열 동일성을 가지는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 본 발명의 또 다른 바람직한 실시양태에서, 유전적으로 변형된 부생 생물의 에리트ρί톨 이소머라제 1(Eyi1)을 인코딩하는 적어도 하나의 유전자는 비활성화 전 서열 번호 19에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 바람직하게는 적어도 96%, 바람직하게는 적어도 97%, 바람직하게는 적어도 98%, 바람직하게는 적어도 99%의 서열 동일성을 가지는 뉴클레오티드 서열로 이루어진다.

[0086] 바람직하게는, 비활성화 전 서열 번호 19의 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩된 에리트ρί톨 이소머라제 1(Eyi1)은 서열 번호 20의 아미노산 서열을 포함하고, 특히 서열 번호 20의 아미노산 서열로 이루어진다.

- [0087] 바람직한 실시양태에서, 비활성화 전 서열 번호 19의 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩된 에리트리톨 이소머라제 1(Eyi1)은 서열 번호 20에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 바람직하게는 적어도 96%, 바람직하게는 적어도 97%, 바람직하게는 적어도 98%, 바람직하게는 적어도 99%의 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함한다. 특히 바람직하게는, 비활성화 전 서열 번호 19의 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩된 에리트리톨 이소머라제 1(Eyi1)은 서열 번호 20에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 바람직하게는 적어도 96%, 바람직하게는 적어도 97%, 바람직하게는 적어도 98%, 바람직하게는 적어도 99%의 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0088] 바람직하게는, 비활성화 전 서열 번호 19의 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩된 에리트리톨 이소머라제 1(Eyi1)은 서열 번호 20에 정의된 아미노산 서열을 포함하고, 여기서 1개, 바람직하게는 2개, 바람직하게는 3개, 바람직하게는 5개, 바람직하게는 6개, 바람직하게는 7개, 바람직하게는 8개, 바람직하게는 9개, 바람직하게는 10개의 아미노산은 다른 자연 발생 아미노산으로 교환된다. 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 비활성화 전 서열 번호 19의 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩된 에리트리톨 이소머라제 1(Eyi1)은 서열 번호 20에 정의된 아미노산 서열을 포함하고, 여기서 최대 10개, 바람직하게는 최대 9개, 바람직하게는 최대 8개, 바람직하게는 최대 7개, 바람직하게는 최대 6개, 바람직하게는 최대 5개, 바람직하게는 최대 4개, 바람직하게는 최대 3개, 바람직하게는 최대 2개, 바람직하게는 최대 1개의 아미노산은 다른 자연 발생 아미노산으로 교환된다.
- [0089] 본 발명의 다른 바람직한 실시양태에서, 전적으로 변형된 부생 생물의 적어도 하나의 추가 비활성화 유전자는 에리트리톨 이소머라제 2(Eyi2)를 인코딩하는 유전자이다. 바람직하게는, 유전적으로 변형된 부생 생물의 에리트리톨 이소머라제 2(Eyi2)를 인코딩하는 적어도 하나의 유전자는 비활성화 전 서열 번호 21의 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 특히 비활성화 전 서열 번호 21의 뉴클레오티드 서열로 이루어진다.
- [0090] 바람직하게는, 유전적으로 변형된 부생 생물의 에리트리톨 이소머라제 2(Eyi2)를 인코딩하는 적어도 하나의 유전자는 비활성화 전 서열 번호 21에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 바람직하게는 적어도 96%, 바람직하게는 적어도 97%, 바람직하게는 적어도 98%, 바람직하게는 적어도 99%의 서열 동일성을 가지는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 유전적으로 변형된 부생 생물의 에리트리톨 이소머라제 2(Eyi2)를 인코딩하는 하나 이상의 유전자는 비활성화 전 서열 번호 21에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 바람직하게는 적어도 96%, 바람직하게는 적어도 97%, 바람직하게는 적어도 98%, 바람직하게는 적어도 99%의 서열 동일성을 가지는 뉴클레오티드 서열로 이루어진다.
- [0091] 바람직하게는, 비활성화 전 서열 번호 21의 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩된 에리트리톨 이소머라제 2(Eyi2)는 서열 번호 22의 아미노산 서열을 포함하고, 특히 서열 번호 22의 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0092] 바람직한 실시양태에서, 비활성화 전 서열 번호 21의 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩된 에리트리톨 이소머라제 2(Eyi2)는 서열 번호 22에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 바람직하게는 적어도 96%, 바람직하게는 적어도 97%, 바람직하게는 적어도 98%, 바람직하게는 적어도 99%의 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함한다. 특히 바람직하게는, 비활성화 전 서열 번호 21의 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩된 에리트리톨 이소머라제 2(Eyi2)는 서열 번호 22에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 바람직하게는 적어도 96%, 바람직하게는 적어도 97%, 바람직하게는 적어도 98%, 바람직하게는 적어도 99%의 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0093] 바람직하게는, 비활성화 전 서열 번호 21의 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩된 에리트리톨 이소머라제 2(Eyi2)는 서열 번호 22에 정의된 아미노산 서열을 포함하고, 여기서 1개, 바람직하게는 2개, 바람직하게는 3개, 바람직하게는 5개, 바람직하게는 6개, 바람직하게는 7개, 바람직하게는 8개, 바람직하게는 9개, 바람직하게는 10개의 아미노산은 다른 자연 발생 아미노산으로 교환된다. 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 비활성화 전 서열 번호 21의 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩된 에리트리톨 이소머라제 2(Eyi2)는 서열 번호 22에 정의된 아미노산 서열을 포함하고, 여기서 최대 10개, 바람직하게는 최대 9개, 바람직하게는 최대 8개, 바람직하게는 최대 7개, 바람직하게는 최대 6개, 바람직하게는 최대 5개, 바람직하게는 최대 4개, 바람직하게는 최대 3개, 바람직하게는 최대 2개, 바람직하게는 최대 1개의 아미노산은 다른 자연 발생 아미노산으로 교환된다.
- [0094] 본 발명의 다른 바람직한 실시양태에서, 유전적으로 변형된 부생 생물의 포스포-2-데하이드로-3-데옥시헥토페이트 알돌라제 1(Dhps-1)를 인코딩하는 유전자, 에리트리톨 이용 인자(EUF)를 인코딩하는 유전자, 에리트룰로스

키나제(EYK1)를 인코딩하는 유전자, 에리트리톨 데하이드로게나제(EYD1)를 인코딩하는 유전자, 에리트리톨 이소머라제(EYI1)를 인코딩하는 유전자 및 에리트리톨 이소머라제(EYI2)를 인코딩하는 유전자로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 추가 비활성화 유전자가 결실된다.

[0095] 바람직하게는, 유전적으로 변형된 부생 생물의 포스포-2-데하이드로-3-데옥시헥토네이트 알돌라제 1(Dhaps-1)을 인코딩하는 유전자, 에리트리톨 이용 인자(EUF)를 인코딩하는 유전자, 에리트룰로스 키나제(EYK1)를 인코딩하는 유전자, 에리트리톨 데하이드로게나제(EYD1)를 인코딩하는 유전자, 에리트리톨 이소머라제(EYI1)를 인코딩하는 유전자 및 에리트리톨 이소머라제(EYI2)를 인코딩하는 유전자로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 추가의 비활성화 유전자는 비기능성이다.

[0096] 특히 바람직한 실시양태에서, 유전적으로 변형된 부생 생물의 포스포-2-데하이드로-3-데옥시헥토네이트 알돌라제 1(Dhaps-1)을 인코딩하는 유전자, 에리트리톨 이용 인자(EUF)를 인코딩하는 유전자, 에리트룰로스 키나제(EYK1)를 인코딩하는 유전자, 에리트리톨 데하이드로게나제(EYD1)를 인코딩하는 유전자, 에리트리톨 이소머라제(EYI1)를 인코딩하는 유전자 및 에리트리톨 이소머라제(EYI2)를 인코딩하는 유전자로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 추가의 비활성화 유전자는 유전자 녹아웃, 특히 유전자 치환에 의해 비활성화된다. 바람직하게는, 유전적으로 변형된 부생 생물의 포스포-2-데하이드로-3-데옥시헥토네이트 알돌라제 1(Dhaps-1)을 인코딩하는 유전자, 에리트리톨 이용 인자(EUF)를 인코딩하는 유전자, 에리트룰로스 키나제(EYK1)를 인코딩하는 유전자, 에리트리톨 데하이드로게나제(EYD1)를 인코딩하는 유전자, 에리트리톨 이성화효소(EYI1)를 인코딩하는 유전자 및 에리트리톨 이소머라제(EYI2)를 인코딩하는 유전자로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 추가의 비활성화 유전자는 결실 카세트를 사용한 유전자 치환에 의해 비활성화된다.

[0097] 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 유전적으로 변형된 부생 생물의 포스포-2-데하이드로-3-데옥시헥토네이트 알돌라제 1(Dhaps-1)을 인코딩하는 유전자, 에리트리톨 이용 인자(EUF)를 인코딩하는 유전자, 에리트룰로스 키나제(EYK1)를 인코딩하는 유전자, 에리트리톨 데하이드로게나제(EYD1)를 인코딩하는 유전자, 에리트리톨 이소머라제(EYI1)를 인코딩하는 유전자 및 에리트리톨 이소머라제(EYI2)를 인코딩하는 유전자로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 추가 비활성화 유전자는 게놈 편집에 의해, 특히 메가뉴클레아제, 징크-핑거 뉴클레아제(ZFN), 전사 활성체 유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN) 또는 일정한 간격으로 놓인 군집화된 짧은 회문 반복(CRISPR) 시스템에 의해 비활성화되고, 특히 비기능성으로 된다.

[0098] 본 발명의 추가의 바람직한 실시양태에서, 유전적으로 변형된 부생 생물은 적어도 하나의 트랜스케톨라제를 인코딩하는 적어도 하나의 유전자를 추가로 포함한다. 바람직하게는, 적어도 하나의 트랜스케톨라제를 인코딩하는 적어도 하나의 유전자는 *tkl1*, 특히 코돈 최적화된 *tkl1*이다. 바람직하게는, 유전적으로 변형된 부생 생물은 *T. reesei*로부터의 *tkl1*, 특히 *T. reesei*로부터의 코돈 최적화된 *tkl1*을 인코딩하는 적어도 하나의 유전자를 추가로 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 적어도 하나의 트랜스케톨라제를 인코딩하는 적어도 하나의 유전자는 서열 번호 5의 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 특히 서열 번호 5의 뉴클레오티드 서열로 이루어진다.

[0099] 본 발명의 추가의 바람직한 실시양태에서, 적어도 하나의 트랜스케톨라제를 인코딩하는 적어도 하나의 유전자는 서열 번호 5에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 바람직하게는 적어도 96%, 바람직하게는 적어도 97%, 바람직하게는 적어도 98%, 바람직하게는 적어도 99%의 서열 동일성을 가지는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 바람직하게는, 적어도 하나의 트랜스케톨라제를 인코딩하는 적어도 하나의 유전자는 서열 번호 5에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 바람직하게는 적어도 96%, 바람직하게는 적어도 97%, 바람직하게는 적어도 98%, 바람직하게는 적어도 99%의 서열 동일성을 가지는 뉴클레오티드 서열로 이루어진다.

[0100] 바람직하게는, 적어도 하나의 트랜스케톨라제는 서열 번호 6의 아미노산 서열을 포함하고, 특히 서열 번호 6의 아미노산 서열로 이루어진다.

[0101] 본 발명의 또 다른 바람직한 실시양태에서, 적어도 하나의 트랜스케톨라제는 서열 번호 6에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 바람직하게는 적어도 96%, 바람직하게는 적어도 97%, 바람직하게는 적어도 98%, 바람직하게는 적어도 99%의 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함한다. 특히 바람직하게는, 적어도 하나의 트랜스케톨라제는 서열 번호 6에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 바람직하게는 적어도 96%, 바람직하게는 적어도 97%, 바람직하게는 적어도 98%, 바람직하게는 적어도 99%의 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열로 이루어진다.

- [0102] 본 발명의 추가의 바람직한 실시양태에서, 적어도 하나의 트랜스케툴라제는 서열 번호 6에 정의된 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 1개, 바람직하게는 2개, 바람직하게는 3개, 바람직하게는 5개, 바람직하게는 6개, 바람직하게는 7개, 바람직하게는 8개, 바람직하게는 9개, 바람직하게는 10개의 아미노산은 다른 자연 발생 아미노산으로 교환된다. 특히 바람직한 실시양태에서, 적어도 하나의 트랜스케툴라제는 서열 번호 6에 정의된 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 최대 10개, 바람직하게는 최대 9개, 바람직하게는 최대 8개, 바람직하게는 최대 7개, 바람직하게는 최대 6개, 바람직하게는 최대 5개, 바람직하게는 최대 4개, 바람직하게는 최대 3개, 바람직하게는 최대 2개, 바람직하게는 최대 1개의 아미노산은 다른 자연 발생 아미노산으로 교환된다.
- [0103] 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 유전적으로 변형된 부생 생물은 적어도 하나의 트랜스알돌라제를 인코딩하는 적어도 하나의 유전자를 추가로 포함한다. 바람직하게는, 적어도 하나의 트랜스알돌라제를 인코딩하는 적어도 하나의 유전자는 *tall*, 특히 코돈 최적화된 *tall*이다. 바람직하게는, 유전적으로 변형된 부생 생물은 *T. reesei*로부터의 *tall*, 특히 *T. reesei*로부터의 코돈 최적화된 *tall*을 인코딩하는 적어도 하나의 유전자를 추가로 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 적어도 하나의 트랜스알돌라제를 인코딩하는 적어도 하나의 유전자는 서열 번호 7의 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 특히 서열 번호 7의 뉴클레오티드 서열로 이루어진다.
- [0104] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 적어도 하나의 트랜스알돌라제를 인코딩하는 적어도 하나의 유전자는 서열 번호 7에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 바람직하게는 적어도 96%, 바람직하게는 적어도 97%, 바람직하게는 적어도 98%, 바람직하게는 적어도 99%의 서열 동일성을 가지는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 바람직하게는, 적어도 하나의 트랜스알돌라제를 인코딩하는 적어도 하나의 유전자는 서열 번호 7에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 바람직하게는 적어도 96%, 바람직하게는 적어도 97%, 바람직하게는 적어도 98%, 바람직하게는 적어도 99%의 서열 동일성을 가지는 뉴클레오티드 서열로 이루어진다.
- [0105] 바람직하게는, 적어도 하나의 트랜스알돌라제는 서열 번호 8의 아미노산 서열을 포함하고, 특히 서열 번호 8의 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0106] 특히 바람직하게는, 적어도 하나의 트랜스알돌라제는 서열 번호 8에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 바람직하게는 적어도 96%, 바람직하게는 적어도 97%, 바람직하게는 적어도 98%, 바람직하게는 적어도 99%의 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함한다. 바람직하게는, 적어도 하나의 트랜스알돌라제는 서열 번호 8에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 바람직하게는 적어도 96%, 바람직하게는 적어도 97%, 바람직하게는 적어도 98%, 바람직하게는 적어도 99%의 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0107] 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 적어도 하나의 트랜스알돌라제는 서열 번호 8에 정의된 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 1개, 바람직하게는 2개, 바람직하게는 3개, 바람직하게는 5개, 바람직하게는 6개, 바람직하게는 7개, 바람직하게는 8개, 바람직하게는 9개, 바람직하게는 10개의 아미노산은 다른 자연 발생 아미노산으로 교환된다. 특히 바람직한 실시양태에서, 적어도 하나의 트랜스알돌라제는 서열 번호 8에 정의된 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 최대 10개, 바람직하게는 최대 9개, 바람직하게는 최대 8개, 바람직하게는 최대 7개, 바람직하게는 최대 6개, 바람직하게는 최대 5개, 바람직하게는 최대 4개, 바람직하게는 최대 3개, 바람직하게는 최대 2개, 바람직하게는 최대 1개의 아미노산은 다른 자연 발생 아미노산으로 교환된다.
- [0108] 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 유전적으로 변형된 부생 생물은 적어도 하나의 에리트리톨 이용 인자(EUF)를 인코딩하는 적어도 하나의 유전자를 추가로 포함한다. 바람직하게는, 적어도 하나의 에리트리톨 이용 인자를 인코딩하는 적어도 하나의 유전자는 *euf1*, 특히 코돈 최적화된 *euf1*이다. 바람직하게는, 유전적으로 변형된 부생 생물은 *T. reesei*로부터의 *euf1*, 특히 *T. reesei*로부터의 코돈 최적화된 *euf1*을 인코딩하는 적어도 하나의 유전자를 추가로 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 적어도 하나의 에리트리톨 이용 인자(EUF)를 인코딩하는 적어도 하나의 유전자는 서열 번호 13의 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 특히 서열 번호 13의 뉴클레오티드 서열로 이루어진다.
- [0109] 바람직한 실시양태에서, 적어도 하나의 에리트리톨 이용 인자를 인코딩하는 적어도 하나의 유전자는 서열 번호 13에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 바람직하게는 적어도 96%, 바람직하게는 적어도 97%, 바람직하게는 적어도 98%, 바람직하게는 적어도 99%의 서열 동일성을 가지는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 바람직하게는, 적어도 하나의 에리트리톨 이용 인자를 인코딩하는 적어도 하나의 유전자는 서열 번호 13에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 바람직하게는 적어도 96%, 바람직하게는 적어도 97%, 바람직하게는 적어도 98%, 바람

직하게는 적어도 99%의 서열 동일성을 가지는 뉴클레오타이드 서열로 이루어진다.

- [0110] 바람직하게는, 적어도 하나의 에리트리트톨 이용 인자(EUF)는 서열 번호 14의 아미노산 서열을 포함하고, 특히 서열 번호 14의 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0111] 추가의 바람직한 실시양태에서, 적어도 하나의 에리트리트톨 이용 인자는 서열 번호 14에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 바람직하게는 적어도 96%, 바람직하게는 적어도 97%, 바람직하게는 적어도 98%, 바람직하게는 적어도 99%의 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함한다. 바람직하게는, 적어도 하나의 에리트리트톨 이용 인자는 서열 번호 14에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 바람직하게는 적어도 96%, 바람직하게는 적어도 97%, 바람직하게는 적어도 98%, 바람직하게는 적어도 99%의 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0112] 본 발명의 추가의 바람직한 실시양태에서, 적어도 하나의 에리트리트톨 이용 인자는 서열 번호 14에 정의된 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 1개, 바람직하게는 2개, 바람직하게는 3개, 바람직하게는 5개, 바람직하게는 6개, 바람직하게는 7개, 바람직하게는 8개, 바람직하게는 9개, 바람직하게는 10개의 아미노산은 다른 자연 발생 아미노산으로 교환된다. 특히 바람직한 실시양태에서, 적어도 하나의 트랜스알돌라제는 서열 번호 14에 정의된 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 최대 10개, 바람직하게는 최대 9개, 바람직하게는 최대 8개, 바람직하게는 최대 7개, 바람직하게는 최대 6개, 바람직하게는 최대 5개, 바람직하게는 최대 4개, 바람직하게는 최대 3개, 바람직하게는 최대 2개, 바람직하게는 최대 1개의 아미노산은 다른 자연 발생 아미노산으로 교환된다.
- [0113] 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 유전적으로 변형된 부생 생물의 적어도 하나의 막-결합 알디톨 수송체를 인코딩하는 적어도 하나의 유전자, 적어도 하나의 에리트로스 리덕타제를 인코딩하는 적어도 하나의 유전자, 적어도 하나의 트랜스케톨라제를 인코딩하는 적어도 하나의 유전자, 적어도 하나의 트랜스알돌라제를 인코딩하는 적어도 하나의 유전자 및/또는 적어도 하나의 에리트리트톨 이용 인자(EUF)를 인코딩하는 적어도 하나의 유전자는 외인성 폴리뉴클레오타이드 서열이다.
- [0114] 바람직하게는, 유전적으로 변형된 부생 생물의 적어도 하나의 막-결합 알디톨 수송체를 인코딩하는 적어도 하나의 유전자, 적어도 하나의 에리트로스 리덕타제를 인코딩하는 적어도 하나의 유전자, 적어도 하나의 트랜스케톨라제를 인코딩하는 적어도 하나의 유전자, 적어도 하나의 트랜스알돌라제를 인코딩하는 적어도 하나의 유전자 및/또는 적어도 하나의 에리트리트톨 이용 인자(EUF)를 인코딩하는 적어도 하나의 유전자는 내인성 폴리뉴클레오타이드 서열이다.
- [0115] 추가의 바람직한 실시양태에서, 유전적으로 변형된 부생 생물은 적어도 하나의 막 결합 알디톨 수송체를 인코딩하는 적어도 하나의 외인성 유전자를 포함한다. 바람직하게는, 유전적으로 변형된 부생 생물은 적어도 하나의 막 결합 알디톨 수송체를 인코딩하는 적어도 하나의 내인성 유전자를 포함한다.
- [0116] 바람직하게는, 유전적으로 변형된 부생 생물은 적어도 하나의 에리트로스 리덕타제를 인코딩하는 적어도 하나의 외인성 유전자를 포함한다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 유전적으로 변형된 부생 생물은 적어도 하나의 에리트로스 리덕타제를 인코딩하는 적어도 하나의 내인성 유전자를 포함한다.
- [0117] 추가로 바람직하게는, 유전적으로 변형된 부생 생물은 적어도 하나의 트랜스케톨라제를 인코딩하는 적어도 하나의 외인성 유전자를 포함한다. 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 유전적으로 변형된 부생 생물은 적어도 하나의 트랜스케톨라제를 인코딩하는 적어도 하나의 내인성 유전자를 포함한다.
- [0118] 바람직하게는, 유전적으로 변형된 부생 생물은 적어도 하나의 트랜스알돌라제를 인코딩하는 적어도 하나의 외인성 유전자를 포함한다. 바람직하게는, 유전적으로 변형된 부생 생물은 적어도 하나의 트랜스알돌라제를 인코딩하는 적어도 하나의 내인성 유전자를 포함한다.
- [0119] 바람직하게는, 유전적으로 변형된 부생 생물은 적어도 하나의 에리트리트톨 이용 인자(EUF)를 인코딩하는 적어도 하나의 외인성 유전자를 포함한다. 바람직하게는, 유전적으로 변형된 부생 생물은 적어도 하나의 에리트리트톨 이용 인자(EUF)를 인코딩하는 적어도 하나의 내인성 유전자를 포함한다.
- [0120] 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 적어도 하나의 막-결합 알디톨 수송체를 인코딩하는 적어도 하나의 유전자, 적어도 하나의 에리트로스 리덕타제를 인코딩하는 적어도 하나의 유전자, 적어도 하나의 트랜스케톨라제를 인코딩하는 적어도 하나의 유전자, 적어도 하나의 트랜스알돌라제를 인코딩하는 하나의 유전자 및/또는 적어도 하나의 에리트리트톨 이용 인자(EUF)를 인코딩하는 적어도 하나의 유전자는 유전적으로 변형된 부생 생물의 게놈에 안

정하게 또는 일시적으로 도입된다.

- [0121] 본 발명의 특히 바람직한 실시양태에서, 적어도 하나의 막-결합 알디톨 수송체를 인코딩하는 적어도 하나의 유전자, 적어도 하나의 에리트로스 리덕타제를 인코딩하는 적어도 하나의 유전자, 적어도 하나의 트랜스케톨라제를 인코딩하는 적어도 하나의 유전자, 적어도 하나의 트랜스알돌라제를 인코딩하는 적어도 하나의 유전자 및/또는 적어도 하나의 에리트리톨 이용 인자(EUF)를 인코딩하는 적어도 하나의 유전자는 과발현된다.
- [0122] 바람직하게는, 유전적으로 변형된 부생 생물의 적어도 하나의 막-결합 알디톨 수송체를 인코딩하는 적어도 하나의 유전자, 특히 적어도 하나의 막-결합 알디톨 수송체를 인코딩하는 적어도 하나의 외인성 또는 내인성 유전자는 과발현된다. 추가의 바람직한 실시양태에서, 유전적으로 변형된 부생 생물의 적어도 하나의 에리트로스 리덕타제를 인코딩하는 적어도 하나의 유전자, 특히 적어도 하나의 에리트로스 리덕타제를 인코딩하는 적어도 하나의 외인성 또는 내인성 유전자는 과발현된다. 바람직하게는, 유전적으로 변형된 부생 생물의 적어도 하나의 트랜스케톨라제를 인코딩하는 적어도 하나의 유전자, 특히 적어도 하나의 트랜스케톨라제를 인코딩하는 적어도 하나의 외인성 또는 내인성 유전자는 과발현된다. 추가로 바람직하게는, 유전적으로 변형된 부생 생물의 적어도 하나의 트랜스알돌라제를 인코딩하는 적어도 하나의 유전자, 특히 적어도 하나의 트랜스알돌라제를 인코딩하는 적어도 하나의 외인성 또는 내인성 유전자는 과발현된다. 바람직하게는, 유전적으로 변형된 부생 생물의 적어도 하나의 에리트리톨 이용 인자(EUF)를 인코딩하는 적어도 하나의 유전자, 특히 적어도 하나의 에리트리톨 이용 인자(EUF)를 인코딩하는 적어도 하나의 외인성 또는 내인성 유전자는 과발현된다.
- [0123] 본 발명의 추가의 바람직한 실시양태에서, 유전적으로 변형된 부생 생물의 적어도 하나의 막-결합 알디톨 수송체를 인코딩하는 적어도 하나의 유전자, 적어도 하나의 에리트로스 리덕타제를 인코딩하는 적어도 하나의 유전자, 적어도 하나의 트랜스케톨라제를 인코딩하는 적어도 하나의 유전자, 적어도 하나의 트랜스알돌라제를 인코딩하는 적어도 하나의 유전자 및/또는 적어도 하나의 에리트리톨 이용 인자(EUF)를 인코딩하는 적어도 하나의 유전자는 구성적 또는 유도성 프로모터의 조절 하에 있다. 바람직한 실시양태에서, 구성적 또는 유도성 프로모터는 자연적으로 발생하는 프로모터이다. 추가의 바람직한 실시양태에서, 구성적 또는 유도성 프로모터는 합성 프로모터이다. 바람직하게는 구성적 프로모터는 *pki*, *tef*, *gpd*로부터 선택된다. 유도성 프로모터는 바람직하게는 *bgal*, *bx11*, *cbh1*, *cbh2*, *xyn1*, *xyn2*로부터 선택된다. 바람직하게는, 적어도 하나의 막 결합 알디톨 수송체를 인코딩하는 유전적으로 변형된 부생 생물의 적어도 하나의 유전자는 *pki*, *tef*, *gpd*로부터 선택되는 프로모터의 조절 하에 있고, 바람직하게는 *pki* 프로모터의 조절 하에 있다. 바람직하게는, 적어도 하나의 에리트로스 리덕타제를 인코딩하는 유전적으로 변형된 부생 생물의 적어도 하나의 유전자는 *pki*, *tef*, *gpd*로부터 선택되는 프로모터의 조절 하에 있고, 바람직하게는 *tef* 프로모터의 조절 하에 있다. 바람직하게는, 적어도 하나의 트랜스케톨라제를 인코딩하는 유전적으로 변형된 부생 생물의 적어도 하나의 유전자는 *pki*, *tef*, *gpd*로부터 선택되는 프로모터의 조절 하에 있고, 바람직하게는 *tef* 프로모터의 조절 하에 있다. 바람직하게는, 적어도 하나의 트랜스알돌라제를 인코딩하는 유전적으로 변형된 부생 생물의 적어도 하나의 유전자는 *pki*, *tef*, *gpd*로부터 선택되는 프로모터의 조절 하에 있고, 바람직하게는 *tef* 프로모터의 조절 하에 있다. 바람직하게는, 적어도 하나의 에리트리톨 이용 인자(EUF)를 인코딩하는 유전적으로 변형된 부생 생물의 적어도 하나의 유전자는 *pki*, *tef*, *gpd*로부터 선택되는 프로모터의 조절 하에 있고, 바람직하게는 *tef* 프로모터의 조절 하에 있다.
- [0124] 본 발명의 추가의 바람직한 실시양태에서, 적어도 하나의 막-결합 알디톨 수송체를 인코딩하는 유전적으로 변형된 부생 생물의 적어도 하나의 유전자, 적어도 하나의 에리트로스 리덕타제를 인코딩하는 유전적으로 변형된 부생 생물의 적어도 하나의 유전자, 적어도 하나의 트랜스케톨라제를 인코딩하는 유전적으로 변형된 부생 생물의 적어도 하나의 유전자, 적어도 하나의 트랜스알돌라제를 인코딩하는 유전적으로 변형된 부생 생물의 적어도 하나의 유전자 및/또는 적어도 하나의 에리트리톨 이용 인자(EUF)를 유전적으로 변형된 부생 생물의 인코딩하는 적어도 하나의 유전자는 플라스미드 상에 존재한다. 바람직하게는, 적어도 하나의 막-결합 알디톨 수송체를 인코딩하는 유전적으로 변형된 부생 생물의 적어도 하나의 유전자, 적어도 하나의 에리트로스 리덕타제를 인코딩하는 유전적으로 변형된 부생 생물의 적어도 하나의 유전자, 적어도 하나의 트랜스케톨라제를 인코딩하는 유전적으로 변형된 부생 생물의 적어도 하나의 유전자, 적어도 하나의 트랜스알돌라제를 인코딩하는 유전적으로 변형된 부생 생물의 적어도 하나의 유전자 및/또는 적어도 하나의 에리트리톨 이용 인자(EUF)를 인코딩하는 유전적으로 변형된 부생 생물의 적어도 하나의 유전자는 각각 별도의 플라스미드 상에 존재한다.
- [0125] 본 발명의 특히 바람직한 실시양태에서, 유전적으로 변형된 부생 생물은 Westerdijk Fungal Biodiversity Institute에 CBS 번호 146708로 기탁된 트리코더마 레세이(*Trichoderma reesei*) 균주이다.
- [0126] 본 발명의 바람직한 실시양태에 따르면, 적어도 하나의 부생 생물은 단계 a)에서 적어도 5 L, 바람직하게는 적

어도 10 L, 바람직하게는, 적어도 25 L, 바람직하게는 적어도 50 L, 바람직하게는 적어도 100 L, 바람직하게는 적어도 250 L, 바람직하게는 적어도 500 L, 바람직하게는 적어도 1.000 L, 바람직하게는 적어도 2.500 L, 바람직하게는 적어도 7.500 L, 바람직하게는 적어도 10.000 L, 바람직하게는 적어도 25.000 L, 바람직하게는 적어도 50.000 L, 바람직하게는 적어도 75.000 L, 바람직하게는 적어도 100.000 L의 부피로 배양된다.

[0127] 본 발명의 추가의 바람직한 실시양태에서, 적어도 하나의 부생 생물은 단계 a)에서 배양 배지가 적어도 250 mg/L, 바람직하게는 적어도 300 mg/L, 바람직하게는 적어도 350 mg/L, 바람직하게는 적어도 400 mg/L, 바람직하게는 적어도 450 mg/L, 바람직하게는 적어도 500 mg/L, 바람직하게는 적어도 600 mg/L, 바람직하게는 적어도 700 mg/L, 바람직하게는 적어도 800 mg/L, 바람직하게는 적어도 900 mg/L, 바람직하게는 적어도 1 g/L, 바람직하게는 적어도 2 g/L, 바람직하게는 적어도 3 g/L, 바람직하게는 적어도 4 g/L, 바람직하게는 적어도 5 g/L, 바람직하게는 적어도 6 g/L, 바람직하게는 적어도 7 g/L, 바람직하게는 적어도 8 g/L, 바람직하게는 적어도 9 g/L, 바람직하게는 적어도 10 g/L, 바람직하게는 적어도 15 g/L, 바람직하게는 적어도 20 g/L, 바람직하게는 적어도 25 g/L, 바람직하게는 적어도 30 g/L, 바람직하게는 적어도 35 g/L, 바람직하게는 적어도 40 g/L의 농도로 에리트ρί톨을 함유할 때까지 배양 배지에서 배양된다.

[0128] 특히 바람직하게는, 적어도 하나의 부생 생물은 배양 배지가 250 mg/L 내지 40 g/L, 바람직하게는 500 mg/L 내지 40 g/L, 바람직하게는 750 mg/L 내지 40 g/L, 바람직하게는 1 g/L 내지 40 g/L의 농도로 에리트ρί톨을 함유할 때까지 배양 배지에서 배양된다.

[0129] 추가의 바람직한 실시양태에서, 적어도 하나의 부생 생물은 배양 배지가 5 g/L 내지 40 g/L, 바람직하게는 10 g/L 내지 40 g/L, 바람직하게는 15 g/L 내지 40 g/L, 바람직하게는 20 g/L 내지 40 g/L, 바람직하게는 25 g/L 내지 40 g/L, 바람직하게는 30 g/L 내지 40 g/L의 농도로 에리트ρί톨을 함유할 때까지 배양 배지에서 배양된다.

[0130] 본 발명의 바람직한 실시양태에 따르면, 에리트ρί톨의 수율은 적어도 3 mg/g, 바람직하게는 적어도 4 mg/g, 바람직하게는 적어도 5 mg/g, 바람직하게는 적어도 6 mg/g, 바람직하게는 적어도 7 mg/g, 바람직하게는 적어도 8 mg/g, 바람직하게는 적어도 9 mg/g, 바람직하게는 적어도 10 mg/g, 바람직하게는 적어도 11 mg/g, 바람직하게는 적어도 12 mg/g, 바람직하게는 적어도 13 mg/g, 바람직하게는 적어도 14 mg/g, 바람직하게는 적어도 15 mg/g, 바람직하게는 적어도 17.5 mg/g, 바람직하게는 적어도 20 mg/g, 바람직하게는 적어도 25 mg/g, 바람직하게는 적어도 30 mg/g, 바람직하게는 적어도 40 mg/g, 바람직하게는 적어도 50 mg/g, 바람직하게는 적어도 75 mg/g, 바람직하게는 적어도 100 mg/g이다(각각 에리트ρί톨 mg/소비된 탄소원 g, 특히 에리트ρί톨 mg/소비된 글루코스 g 기준).

[0131] 바람직한 실시양태에서, 에리트ρί톨의 수율은 3 내지 100 mg/g, 바람직하게는 4 내지 100 mg/g, 바람직하게는 5 내지 100 mg/g, 바람직하게는 6 내지 100 mg/g, 바람직하게는 7 내지 75 mg/g, 바람직하게는 8 내지 75 mg/g, 바람직하게는 9 내지 75 mg/g, 바람직하게는 10 내지 75 mg/g, 바람직하게는 15 내지 50 mg/g이다(각각 에리트ρί톨 mg/소비된 탄소원 g, 특히 에리트ρί톨 mg/소비된 글루코스 g 기준).

[0132] 본 발명의 특히 바람직한 실시양태에서, 적어도 하나의 부생 생물은 단계 a)에서 2 내지 7, 바람직하게는 2.5 내지 6.5, 바람직하게는 2.5 내지 6, 바람직하게는 3 내지 5.5 범위의 pH의 배양 배지에서 배양된다. 특히 바람직하게는 적어도 하나의 부생 생물은 최대 7, 바람직하게는 최대 6.5, 바람직하게는 최대 6, 바람직하게는 최대 5.5, 바람직하게는 최대 5의 pH에서 배양 배지에서 배양된다.

[0133] 본 발명의 바람직한 실시양태에 따르면, 적어도 하나의 부생 생물은 단계 a)에서 25 내지 35 °C, 바람직하게는 26 내지 34 °C, 바람직하게는 27 내지 33 °C, 바람직하게는 28 내지 32 °C, 바람직하게는 29 내지 31 °C, 바람직하게는 30 °C의 온도의 배양 배지에서 배양된다.

[0134] 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 적어도 하나의 부생 생물은 단계 a)에서 적어도 15 °C, 바람직하게는 적어도 20 °C, 바람직하게는 적어도 25 °C, 바람직하게는 적어도 26 °C, 바람직하게는 적어도 27 °C, 바람직하게는 적어도 28 °C의 온도의 배양 배지에서 배양된다.

[0135] 추가의 바람직한 실시양태에서, 적어도 하나의 부생 생물은 단계 a)에서 최대 35 °C, 바람직하게는 최대 34 °C, 바람직하게는 최대 33 °C, 바람직하게는 최대 32 °C, 바람직하게는 최대 31 °C의 온도의 배양 배지에서 배양된다.

[0136] 바람직하게는, 적어도 하나의 부생 생물은 단계 a)에서 적어도 24시간, 바람직하게는 적어도 36시간, 바람직하게는 적어도 48시간, 바람직하게는 적어도 60시간, 바람직하게는 적어도 72시간, 바람직하게는 적어도 84시간,

바람직하게는 적어도 96시간, 바람직하게는 적어도 108시간, 바람직하게는 적어도 120시간, 바람직하게는 적어도 132시간, 바람직하게는 적어도 144시간, 바람직하게는 적어도 156시간, 바람직하게는 적어도 168시간 동안 배양 배지에서 배양된다.

[0137] 본 발명의 추가의 바람직한 실시양태에서, 적어도 하나의 부생 생물은 단계 a)에서 최대 240시간, 바람직하게는 최대 216시간, 바람직하게는 최대 192시간, 바람직하게는 최대 180시간, 바람직하게는 최대 168시간, 바람직하게는 최대 156시간, 바람직하게는 최대 144시간, 바람직하게는 최대 132시간, 바람직하게는 최대 120시간, 바람직하게는 최대 108시간, 바람직하게는 최대 96시간, 바람직하게는 최대 84시간, 바람직하게는 최대 72시간 동안 배양 배지에서 배양된다.

[0138] 본 발명의 바람직한 실시양태에 따르면, 단계 a)에서 적어도 하나의 부생 생물의 배양은 배양 동안 삼투압 유효제제의 첨가 없이, 특히 배양 동안 적어도 하나의 염의 첨가 없이 수행된다. 특히 바람직하게는, 단계 a)에서 적어도 하나의 부생 생물의 배양은 배양 동안 염화나트륨(NaCl)의 첨가 없이 수행된다.

[0139] 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 단계 a)에서 적어도 하나의 부생 생물의 배양은 배치 방식으로 수행된다. 바람직하게는, 단계 a)에서 적어도 하나의 부생 생물의 배양은 유가(fed-batch) 방식으로 수행된다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 단계 a)에서 적어도 하나의 부생 생물의 배양은 연속 방식으로 수행된다.

[0140] 본 발명의 추가의 바람직한 실시양태에서, 에리트리트론은 단계 c)에서 결정화에 의해 회수된다.

[0141] 본 발명의 특히 바람직한 실시양태에서, 단계 b)에서 에리트리트론의 회수는 다음 단계를 포함한다:

[0142] i) 바이오매스 제거, 바람직하게는 원심분리 및 막 여과에 의한 바이오매스 제거,

[0143] ii) 배양 배지의 탈색, 바람직하게는 활성탄에 의한 배양 배지의 탈색,

[0144] iii) 배양 배지의 탈염, 바람직하게는 전기투석에 의한 배양 배지의 탈염 및 탈색,

[0145] iv) 제조용 크로마토그래피, 바람직하게는 이온 배제 및 크기 배제 메커니즘을 사용한 역상 크로마토그래피, 및

[0146] v) 에리트리트론의 농축 및 결정화.

[0147] 본 발명의 바람직한 실시양태에 따르면, 열 변성 단계는 단계 i) 이전, 도중 또는 이후에 수행된다. 바람직하게는, 열 변성 단계는 단계 i) 이전에 수행된다. 추가의 바람직한 실시양태에서, 열 변성 단계는 단계 i) 동안 수행된다. 바람직하게는, 열 변성 단계는 단계 i) 후에 수행된다.

[0148] 특히 바람직하게는, 열 변성 단계는 배양 배지를 적어도 45 °C, 바람직하게는 적어도 50 °C, 바람직하게는 적어도 55 °C, 바람직하게는 적어도 60 °C, 바람직하게는 적어도 65 °C, 바람직하게는 적어도 70 °C, 바람직하게는 적어도 75 °C, 바람직하게는 적어도 80 °C, 바람직하게는 적어도 85 °C, 바람직하게는 적어도 90 °C, 바람직하게는 적어도 95 °C의 온도로 가열하는 것을 포함한다.

[0149] 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 배양 배지는 적어도 10초, 바람직하게는 적어도 20초, 바람직하게는 적어도 30초, 바람직하게는 적어도 40초, 바람직하게는 적어도 50초, 바람직하게는 적어도 1분, 바람직하게는 적어도 2분, 바람직하게는 적어도 3분, 바람직하게는 적어도 4분, 바람직하게는 적어도 5분, 바람직하게는 적어도 6분, 바람직하게는 적어도 7분, 바람직하게는 적어도 8분, 바람직하게는 적어도 9분, 바람직하게는 적어도 10분 동안 열 변성된다.

[0150] 열 변성 단계는 주로 추가 회수 단계를 수행하기 전에 배양 배지에서 단백질과 효소를 열 불활성화도록 작용한다.

[0151] 본 발명의 특히 바람직한 실시양태에서, 단계 b)에서 회수된 에리트리트론, 특히 단계 v)에서 획득된 에리트리트론은 순도가 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 92%, 바람직하게는 적어도 94%, 바람직하게는 적어도 96%, 바람직하게는 적어도 97%, 바람직하게는 적어도 97.5%, 바람직하게는 적어도 98%, 바람직하게는 적어도 98.5%, 바람직하게는 적어도 99%, 바람직하게는 적어도 99.5%이다.

[0152] 본원에서 사용되는 용어 "유전적으로 변형된" 및 그의 문법적 등가어는 핵산, 예를 들어 유기체의 게놈 내, 특히 부생 생물의 게놈 내의 핵산의 하나 이상의 변경을 지칭한다. "유전적으로 변형된" 부생 생물은 첨가, 결실 및/또는 변경, 특히 비활성화된 유전자를 갖는 부생 생물을 지칭할 수 있다.

[0153] 본 발명의 맥락에서, 용어 "에리트로스 리덕타제"는 알도스의 알디톨로의 환원을 가역적으로 촉매하는 임의의 효소에 관한 것이며, 이 효소는 에리트로스에서 에리트리트론로의 환원에 대해 우세한 특이적 활성을 갖는다. 파

라서, 본 발명에 따른 "에리트로스 리덕타제"는 기질 에리트로스에 대해 높은 특이성과 친화성을 나타낸다. 특히, "에리트로스 리덕타제"는 글리세롤과 같은 다른 어떤 기질보다 에리트로스에 대한 특이성이 더 높다.

[0154] 본원에서 사용되는 용어 "막-결합 알디톨 수송체"는 외막을 가로질러 알디톨을 가역적으로 수송하고, 특히 세포 내에서 생산된 알디톨을 배양 배지로 수송하기에 적합한 막 단백질을 지칭한다. 본 발명에 따르면, "막-결합 알디톨 수송체"는 세포내에서 생산된 에리트리톨을 막을 가로질러 배양 배지로 수송하는데 적합하다.

[0155] 본 발명의 맥락에서, 용어 "트랜스케톨라제"는 케토스 공여체로부터 수용체 알도펜토스로의 C-2 단위의 티아민-의존성 가역적 전달을 촉매화하는 펜토스 인산염 경로의 효소를 지칭한다. 특히, "트랜스케톨라제"는 세도헥실로스-7-포스페이트 및 글리세르알데히드-3-포스페이트를 형성하는 자일룰로스-5-포스페이트에서 리보스-5-포스페이트로의 C-2 단위의 전달을 촉매화한다.

[0156] 용어 "트랜스알돌라제"는 케토스 공여자로부터 수용체 알도스로의 C-3 단위의 가역적 전달을 촉매화하는 펜토스 인산염 경로의 비산화 분지의 효소를 나타낸다. 특히, "트랜스케톨라제"는 에리트로스-4-포스페이트 및 프럭토스-6-포스페이트를 형성하는 세도헥실로오스-7-포스페이트에서 글리세르알데히드-3-포스페이트로의 C-3 단위 전달을 촉매화한다.

[0157] 본 발명의 맥락에서 "비활성화된" 유전자는 일시적으로 또는 영구적으로 전사될 수 없거나, 전사될 수는 있지만 전사체가 유전자 번역에 접근할 수 없는 유전자이다. 본 발명에 따른 유전자의 비활성화는 부분적 또는 완전한 유전자 결실, 부분적 또는 완전한 유전자 치환, 유전자 억제, 유전자 삽입 및 유전자 돌연변이에 의한 비활성화를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 맥락에서 "비활성화"는 추가로 특히 RNAi 또는 siRNA에 의한 임의의 전사후 유전자 조절을 포함하여, 전사체의 유전자 산물로의 번역을 억제한다.

[0158] 본 발명의 맥락에서 "비-기능성" 유전자는 유전자가 전사되지 않거나, 전사는 되지만 전사체가 유전자 산물로 번역되지 않는 유기체의 게놈 또는 유기체의 플라스미드에 존재하는 유전자이다.

[0159] 본 발명의 맥락에서 "결실된" 유전자는 이전에 유기체의 게놈 또는 유기체의 플라스미드에 존재했지만 유기체의 게놈 또는 유기체의 플라스미드로부터 완전히 제거된 유전자이다.

[0160] 본 발명의 문맥에서 "과발현한다"라는 동사는 증가된 양의 유전자의 인위적인 발현을 의미한다. 여기에는 유도성 프로모터를 사용하여 조절될 수 있는 유전자의 유도성 과발현 및 구성적 프로모터를 사용하는 유전자의 지속적인 과발현이 포함된다.

[0161] 용어 "올리고머 당" 또는 "올리고머성 C-5 및 C-6 당"은 본원에서 적어도 2개의 단량체로 구성되고, 바람직하게는 C-5 및 C-6 당류로부터 선택된 적어도 2개의 단량체로 구성된 이당류, 올리고당 및 다당류에 대해 사용된다.

[0162] 본 발명의 문맥에서 용어 "a"는 "하나" 또는 "하나 이상"의 의미를 포함하는 것을 의미한다.

[0163] 본 발명의 맥락에서, "포함하는"이라는 용어는 바람직하게는 "함유하는" 또는 "포함하는"의 의미를 가지며, 추가 요소의 존재를 배제하지 않고 구체적으로 식별된 요소를 포함하는 것을 의미한다. 그러나, 바람직한 실시양태에서, 용어 "포함하는"은 또한 "본질적으로 ~로 이루어진"의 의미를 갖는 것으로 이해되며, 추가의 바람직한 실시양태에서 "로 이루어진"의 의미를 갖는다.

[0164] "및/또는"이라는 용어는 본원에서 목록 내에서 연결되는 개별 요소의 임의의 조합에 대한 개시를 표현하기 위해 사용된다. 단지 설명의 목적으로 "A, B 및/또는 C"라는 표현은 개별적으로 A, 개별적으로 B, 개별적으로 C, (A 및 B), (B 및 C), (A 및 C) 및 (A, B 및 C)를 의미할 수 있다.

[0165] 본 발명의 추가의 바람직한 실시양태는 종속항의 대상이다.

[0166] 본 발명이 하기 실시예 및 첨부된 도면에 의해 추가로 설명된다.

도면의 간단한 설명

[0167] 도 1은 탄소원으로 50 g/L, 70 g/L 또는 90 g/L 글루코스 및 질소원으로 80 mM 우레아를 포함하는 배양 배지에서 168시간 배양한 후 배양 배지 내 탄소원 농도가 *Trichoderma reesei*에 의한 에리트리톨 생산에 미치는 영향을 나타낸다.

도 2는 탄소원으로 70 g/L 글루코스 및 질소원으로 20 mM, 60 mM 또는 80 mM 우레아를 포함하는 배양 배지에서 168시간 배양한 후 배양 배지 내 질소원 농도가 *Trichoderma reesei*에 의한 에리트리톨 생산에 미치는 영향을

나타낸다.

도 3은 탄소원으로 10 g/L, 50 g/L 또는 100 g/L 글루코스 및 질소원으로 20 mM 황산암모늄을 포함하는 배양 배지에서 24, 48, 72, 96 및 120시간 배양한 후 초기 탄소원 농도가 유전자 변형 균주 QM6aΔtmus53 fps1(Reas11) err1(Repyr4) Δmpdh("Mod. 균주")와 해당 모 균주 QM6aΔtmus53("PS")에 의한 에리트ريت올 생산에 미치는 영향을 나타낸다.

도 4는 탄소원으로 50 g/L 글루코스를 포함하는 배양 배지에서 96시간 동안 배양한 후 20 mM 또는 80 mM 농도의 상이한 질소원이 *Trichoderma reesei*(QM6aΔtmus53)의 에리트리트올 생산에 미치는 영향을 나타낸다.

도 5는 탄소원으로 50 g/L 글루코스 및 각각의 질소원을 20 mM 또는 80 mM 포함하는 배양 배지에서 96시간 동안 배양한 후 질소원이 *Trichoderma reesei*(QM6aΔtmus53)의 바이오매스 생성(건조 중량)에 미치는 영향을 나타낸다.

도 6은 70 g/L 글루코스 및 60 mM, 70 mM, 80 mM, 90 mM, 100 mM, 110 mM 또는 120 mM 우레아를 포함하는 배양 배지 또는 50 g/L 글루코스 및 80 mM 우레아를 포함하는 배양 배지(오른쪽 막대)에서 168시간 배양한 후 우레아 농도가 *Trichoderma reesei*(QM6aΔtmus53)의 에리트리트올 생산에 미치는 영향을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

실시예:

1. 에리트리트올의 생명공학적 생산

1.1 에리트리트올 생산에 대한 탄소원 농도의 영향

*Trichoderma reesei*를 탄소원으로 50 g/L, 70 g/L 또는 90 g/L 글루코스 및 질소원으로 80 mM 우레아를 함유하는 배양 배지 100 mL를 각각 포함하는 250 mL 플라스크에서 배양하였다.

168시간의 배양 후, 시료의 배양 배지에서 에리트리트올 농도를 측정하였다. 시료 내 에리트리트올의 평균 농도는 0.733 g/L(50 g/L 글루코스), 0.978 g/L(70 g/L 글루코스) 및 0.952 g/L(90 g/L 글루코스)였다(도 1 참조).

1.2 에리트리트올 생산에 대한 질소원 농도의 영향

유사한 실험으로, *Trichoderma reesei*를 탄소원으로 70 g/L 글루코스 및 질소원으로 20 mM, 60 mM 또는 80 mM 우레아를 함유하는 배양 배지 100 mL를 각각 포함하는 250 mL 플라스크에서 배양하였다.

168시간의 배양 후, 시료의 배양 배지에서 에리트리트올 농도를 측정하였다. 시료 내 에리트리트올의 평균 농도는 0.051 g/L(20 mM 우레아), 0.55 g/L(60 mM 우레아) 및 0.978 g/L(80 mM 우레아)였다(도 2 참조).

1.3 초기 글루코스 농도가 유전자 변형 균주 및 해당 모 균주에 의한 에리트리트올 생산에 미치는 영향

Trichoderma reesei 균주 QM6aΔtmus53 fps1(Reas11) err1(Repyr4) Δmpdh("Mod. 균주") 및 해당 모 균주 QM6aΔtmus53("PS")를 탄소원으로 10 g/L, 50 g/L 또는 100 g/L 글루코스 및 질소원으로 20 mM 황산암모늄을 함유하는 배양 배지 100 mL를 각각 포함하는 250 mL 플라스크에서 배양하였다.

24시간, 48시간, 72시간, 96시간, 120시간의 배양 후, 시료의 배양 배지에서 에리트리트올 농도를 측정하였다(표 1 및 도 3 참조). 10 g/L 글루코스만을 함유한 배양 배지에서는 에리트리트올이 검출되지 않았다.

표 1

에리트리트올 농도

인큐베이션 시간	에리트리트올 농도 [g/L]					
	Mod. 균주 10 g/L	모 균주 (PS) 10 g/L	Mod. 균주 50 g/L	모 균주 (PS) 50 g/L	Mod. 균주 100 g/L	모 균주 (PS) 100 g/L
24시간	0	0	0	0	0	0
48시간	0	0	0.0045	0.0025	0.0075	0.002
72시간	0	0	0.014	0.011	0.016	0.01
96시간	0	0	0.0255	0.023	0.018	0.012
120시간	0	0	0.0305	0.026	0.0225	0.016

- [0180] 1.4 상이한 질소원이 *Trichoderma reesei*에 의한 에리트리톨 생산에 미치는 영향
- [0181] 다양한 질소원이 *Trichoderma reesei*에 의한 에리트리톨 생산에 미치는 영향을 조사하기 위해, 균주 QM6a Δ tmus53를 탄소원으로 50 g/L 글루코스 및 질소원으로 20 mM 또는 80 mM 황산암모늄, 질산나트륨 또는 우레아를 함유하는 배양 배지 100 mL를 포함하는 250 mL 플라스크에서 배양하였다.
- [0182] 96시간의 배양 후, 시료의 배양 배지에서 에리트리톨 농도를 측정하였다. 시료 내 에리트리톨의 평균 농도는 0.018 g/L(50 g/L 글루코스, 20 mM NH_4^+), 0.028 g/L(50 g/L 글루코스, 80 mM NH_4^+), 0.03 g/L(50 g/L 글루코스, 20 mM 우레아), 0.301 g/L(50 g/L 글루코스, 80 mM 우레아)였다. 20 또는 80 mM NO_3^- 를 질소원으로 사용한 경우에는 96시간 후 배양 배지에서 에리트리톨이 검출되지 않았다(도 4 참조).
- [0183] 1.5 상이한 질소원이 *Trichoderma reesei*의 성장에 미치는 영향
- [0184] *Trichoderma reesei*(QM6a Δ tmus53)를 탄소원으로 50 g/L 글루코스 및 질소원으로 20 mM 또는 80 mM 황산암모늄, 질산나트륨 또는 우레아를 함유하는 배양 배지 100 mL를 포함하는 250 mL 플라스크에서 배양하였다.
- [0185] 96시간의 배양 후 *Trichoderma reesei*의 건조 중량을 상이한 샘플에서 측정하였다. 평균 중량은 0.384 g(50 g/L 글루코스, 20 mM NH_4^+), 0.417 g(50 g/L 글루코스, 80 mM NH_4^+), 0.107 g(50 g/L 글루코스, 20 mM NO_3^-), 0.117 g(50 g/L 글루코스, 80 mM NO_3^-), 0.557 g(50 g/L 글루코스, 20 mM 우레아), 및 1.007 g(50 g/L 글루코스, 80 mM 우레아)였다(도 5 참조).
- [0186] 1.6 배양 배지 내 우레아 농도가 에리트리톨의 수율에 미치는 영향
- [0187] 배양 동안 *Trichoderma reesei*(QM6a Δ tmus53)가 소비하는 글루코스의 양과 관련하여 배양 배지 내 우레아 농도가 에리트리톨의 수율에 미치는 영향을 조사하였다. 이를 위해, *Trichoderma reesei*를 탄소원으로 70 g/L 글루코스 및 질소원으로 60 mM, 70 mM, 80 mM, 90 mM, 100 mM, 110 mM 또는 120 mM 우레아를 함유하는 배양 배지 100 mL를 포함하는 250 mL 플라스크에서 배양하였다. 탄소원으로 50 g/L 글루코스 및 질소원으로 80 mM 우레아를 포함하는 100 mL 배양 배지의 존재 하에 *Trichoderma reesei* 배양에 대한 에리트리톨의 수율도 또한 측정하였다.
- [0188] 168시간의 배양 후, 상이한 시료에서 배양 배지 내 에리트리톨 농도 및 글루코스 농도의 감소를 측정하였다. 에리트리톨의 평균 수율(에리트리톨 mg/소비된 글루코스 g)은 3.03 mg/g(70 g/L 글루코스, 60 mM 우레아), 18.59 mg/g(70 g/L 글루코스, 70 mM 우레아), 15.2 mg/g(70 g/L 글루코스, 80 mM 우레아), 14.3 mg/g(70 g/L 글루코스, 90 mM 우레아), 9.92 mg/g(70 g/L 글루코스, 100 mM 우레아), 8.47 mg/g(50 g/L 글루코스, 110 mM 우레아), 5.23 mg/g(70 g/L 글루코스, 120 mM 우레아) 및 15.43 mg/g(50 g/L 글루코스, 80 mM 우레아)였다(도 6 참조).

수탁번호

[0189]

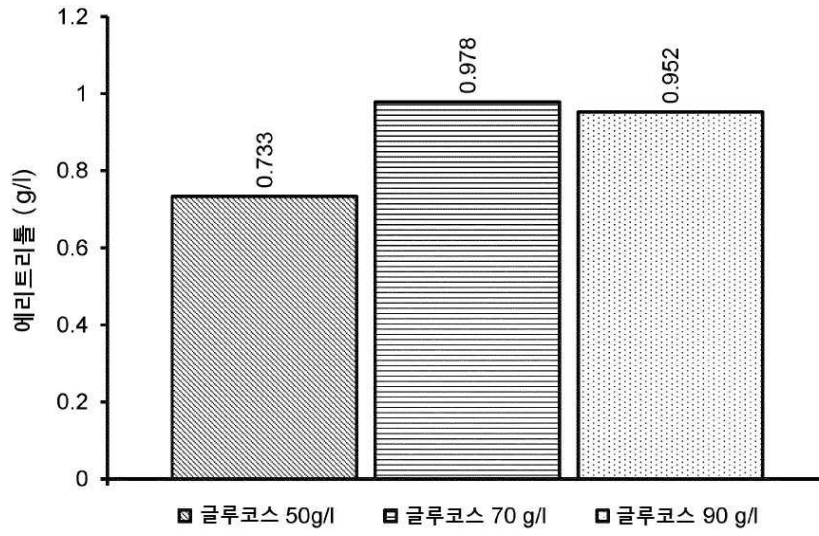
기탁기관명 : CBS

수탁번호 : 0000CBS146708

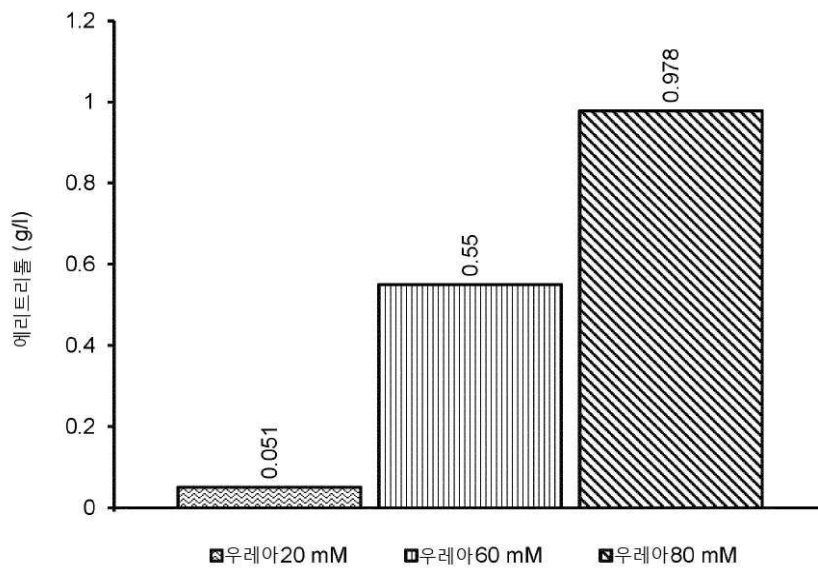
수탁일자 : 20200525

도면

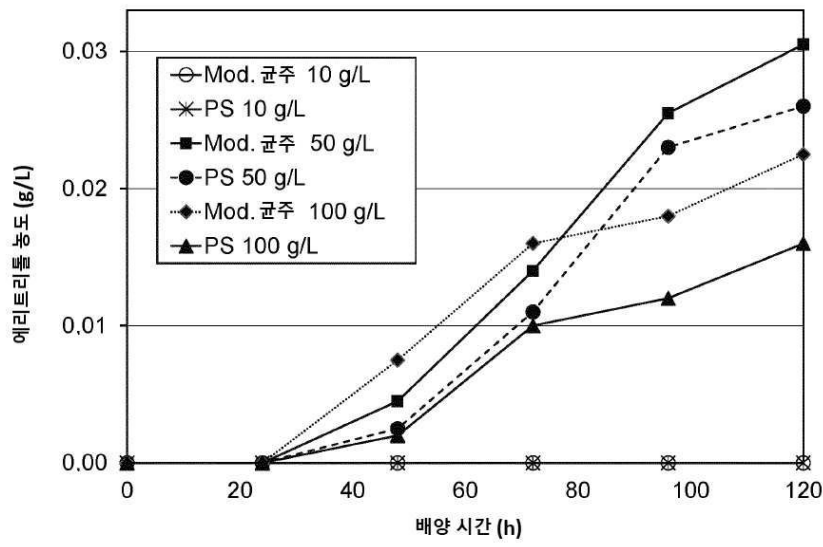
도면1



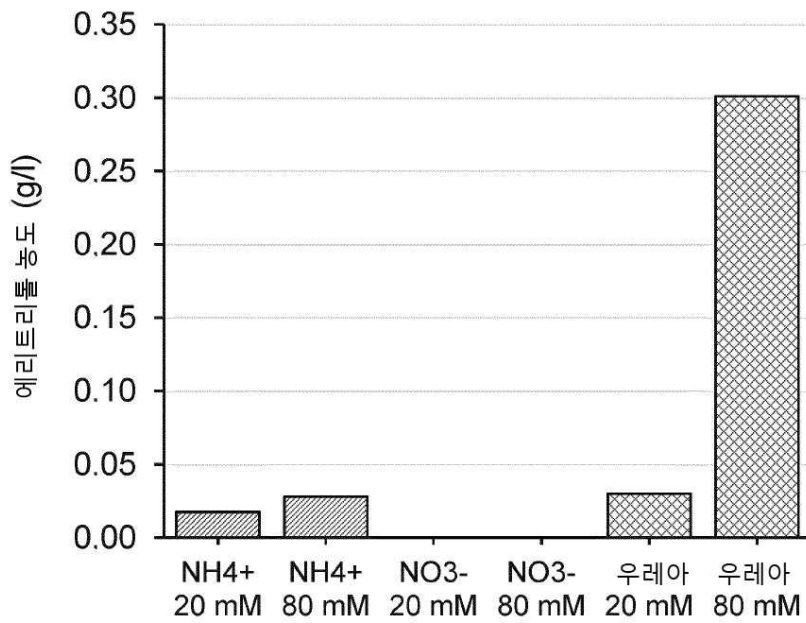
도면2



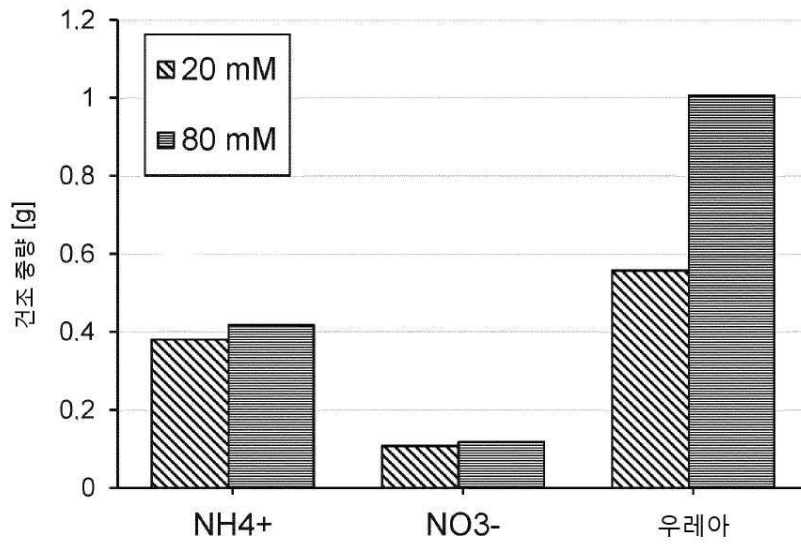
도면3



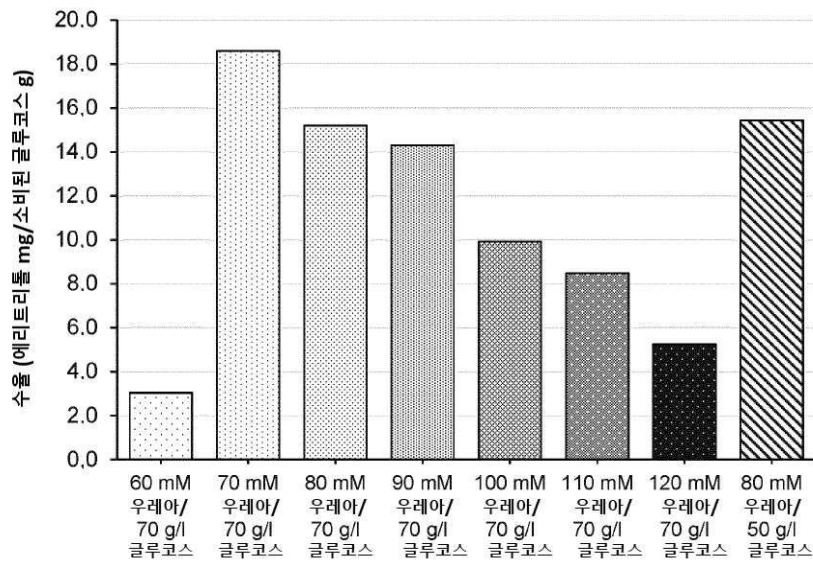
도면4



도면5



도면6



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.