(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2017 년 1 월 5 일 (05.01.2017)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2017/003105 A1

(51) 국제특허분류:
C12N 9/10 (2006.01) *C12N 15/70* (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2016/005871

(22) 국제출원일: 2016 년 6 월 3 일 (03.06.2016)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2015-0094942 2015 년 7 월 2 일 (02.07.2015) KR

(71) 출원인: **씨제이제일제당 (주) (CJ CHEILJEDANG CORP.)** [KR/KR]; 04560 서울시 중구 동호로 330 (쌍림동), Seoul (KR).

(72) 발명자: **이재헌 (LEE, Jae Hun)**; 08741 서울시 관악구 솔밭로 7 길 16, 301-805, Seoul (KR). **양영렬 (YANG, Young Lyeol)**; 06317 서울시 강남구 언주로 110, 1-702, Seoul (KR). **오린석 (OH, In Seok)**; 07565 서울시 강서구 공항대로 55 길 55-15, 1101 호, Seoul (KR).

(74) 대리인: **리앤목 특허법인 (Y.P.LEE, MOCK & PARTNERS)**; 06292 서울시 강남구 언주로 30 길 13 대림아크로텔 12 층, Seoul (KR).

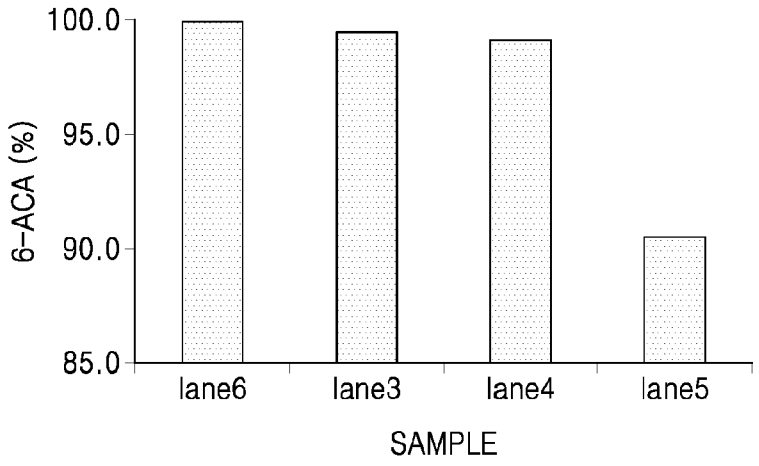
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:
— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) **Title**: NOVEL TRANSAMINASE AND METHOD, FOR DEAMIDATING AMINO COMPOUND, USING SAME

(54) **발명의 명칭** : 신규 트랜스아미나제 및 이를 이용한 아미노 화합물의 탈아민 방법



(57) **Abstract**: The present invention relates to novel separated polypeptide, which has transaminase activity, polynucleotide, which codes same, a microorganism, which comprises the polynucleotide, and a method, for deamidating an amino compound, using the polypeptide or the microorganism.

(57) **요약서**: 본 발명은 트랜스아미나제 활성을 가지는 신규 분리된 폴리펩티드 및 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 미생물, 및 상기 폴리펩티드 또는 상기 미생물을 이용하여 아미노 화합물을 탈아민화시키는 방법에 관한 것이다.

WO 2017/003105 A1

명세서

발명의 명칭: 신규 트랜스아미나제 및 이를 이용한 아미노 화합물의 탈아민 방법

기술분야

[1] 본 발명은 트랜스아미나제 활성을 가지는 신규 분리된 폴리펩티드 및 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 미생물, 및 상기 폴리펩티드 또는 상기 미생물을 이용하여 아미노 화합물을 탈아민화시키는 방법에 대한 것이다.

배경기술

[2] 아디프산(adipic acid)은 $(CH_2)_4(COOH)_2$의 분자식을 갖는 디카르복실산(dicarboxylic acid) 화합물이다. 아디프산은 나일론 수지원료, 플라스틱 가소제, 염료 의약품 등의 원료로서 널리 사용되고 있으며, 특히 나일론 6,6과 같은 폴리아미드의 제조에 중요한 중간 생성물로서, 상업적 가치가 매우 높다.

[3] 아디프산은 주로 석유화합물을 원료물질로 두 단계의 공정을 거치는 화학적 방법으로 생산한다. 구체적으로 시작물질인 페놀, 싸이클로헥산, 싸이클로헥센, 벤젠 등의 고리형 화합물을 싸이클로헥사논 또는 싸이크로헥사놀로 명명되는 케톤-알콜 오일 (ketone-alcohol oil, KA oil)로 전환시킨 다음, 이 후 질산을 이용한 산화공정을 통해 아디프산을 생산한다. 이 화학적 공정은 고효율성 및 경제성을 지녔으나, 벤젠을 원료로 사용하고 막대한 양의 질소 산화물을 부산물로 발생시킨다는 문제점이 있다. 이러한 문제점과 더불어 최근 강화되는 환경규제로 인해 아디프산의 생산에 있어서 친환경적 공정의 필요성이 대두되었으며, 이에 따라 아디프산을 미생물을 통해 생산하려는 노력이 시작되고 있다. 그러나 아디프산 생산의 중간체로 사용될 수 있는 6-아미노카프로산의 정확한 생합성 또는 생분해 경로는 아직까지 알려져 있지 않다. 6-아미노카프로산의 6-아민 그룹을 제거하고 케톤기가 도입되면 아디페이트 세미알데하이드 (adipate semialdehyde)가 되며, 알데하이드 디하이드로게나제 (aldehyde dehydrogenase)의 반응을 통해 아디프산을 합성할 수 있을 것으로 예상된다 (Guerrillot L. et al., Eur J Biochem., 1977, 81(1):185-92; Vandecasteele, J.P. et al., Methods Enzymol., 1982, 89: 484-490). 같은 수의 탄소로 이루어진 6-아미노카프로산으로부터 아디프산으로의 효소 전환 반응은 상업적 가치뿐만 아니라 신규 기술로서 가능성이 높게 평가되나, 실제 반응에 관여할 수 있는 효소 또는 미생물 역시 공지되지 않았다.

[4] 이에, 본 발명자들은 6-아미노카프로산을 탈아민하는 방법을 연구하던 중 탈아민 활성을 가지는 신규 미생물을 분리하고, 이로부터 신규 효소를 발견함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[5] 본 발명의 일 목적은 트랜스아미나제 활성을 갖는 신규 분리된 폴리펩티드를 제공하는 것이다.

[6] 본 발명의 다른 목적은 상기 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공하는 것이다.

[7] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 폴리펩티드를 발현하도록 형질전환된 미생물을 제공하는 것이다.

[8] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 폴리펩티드를 이용하여 아미노 화합물을 탈아민화시키는 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

[9] 본 발명의 일 양태는 서열번호 7의 폴리펩티드를 포함하며, 트랜스아미나제 활성을 가지는, 분리된 신규 폴리펩티드를 제공한다.

[10] 본 발명에서 용어, "트랜스아미나제(transaminase) 활성을 가지는 폴리펩티드"는 아미노산과 α-케토산 사이의 가역적인 아미노기 전이 반응을 촉매하는 활성을 갖는 폴리펩티드를 의미하는 것으로, 상기 트랜스아미나제는 아미노트랜스퍼라제(aminotransferase)'라고도 부른다.

[11] 본 발명에서 용어, "폴리펩티드"는 아미노산의 중합체를 의미하며, 보통 소수의 아미노산이 연결된 형태를 펩티드라 부르고, 많은 아미노산이 연결되면 단백질로 부른다. 단백질을 이루고 있는 약 20 종류의 아미노산들이 화학결합을 통해 서로 연결되어 폴리펩티드를 만든다.

[12] 본 발명의 트랜스아미나제 활성을 가지는 폴리펩티드는 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 또한 상기 폴리펩티드는 서열번호 7의 아미노산 서열과 75% 이상, 80% 이상, 구체적으로는 90% 이상, 보다 구체적으로는 95% 이상, 보다 더욱 구체적으로는 99% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열로서, 본 발명의 트랜스아미나제의 아미노기 전이 반응을 촉매하는 활성을 갖는 폴리펩티드의 아미노산 서열이라면 제한 없이 포함할 수 있다. 또한, 상기 폴리펩티드와 생물학적으로 동일하거나 상응하는 활성을 지니는 한, 그의 변이체 또는 유사체 등을 모두 포함할 수 있다.

[13] 본 발명에서 용어, "상동성"은 주어진 폴리펩티드 서열 또는 폴리뉴클레오티드 서열과 일치하는 정도를 의미하며 백분율로 표시될 수 있다. 본 명세서에서, 주어진 폴리펩티드 서열 또는 폴리뉴클레오티드 서열과 동일하거나 유사한 활성을 갖는 그의 상동성 서열이 "% 상동성"으로 표시된다. 예를 들면, 점수(score), 동일성(identity) 및 유사도(similarity) 등의 매개 변수(parameter)들을 계산하는 표준 소프트웨어, 구체적으로 BLAST 2.0를 이용하거나, 정의된 엄격한 조건하에서 써던 혼성화 실험에 의해 서열을 비교함으로써 확인할 수 있으며, 정의되는 적절한 혼성화 조건은 당업자에게 잘 알려진 방법으로 결정될 수 있다.

[14] 상기 트랜스아미나제 활성을 가지는 폴리펩티드는 슈도모나스 스투체리(Pseudomonas stutzeri)로부터 유래된 것일 수 있다. 또한 구체적으로는 상기 폴리펩티드는 슈도모나스 스투체리(Pseudomonas stutzeri) CJ-MKB (KCCM11587P)로부터 유래된 것일 수 있다. 일 실시예에서 6-아미노카프로산을 질소원으로 고정화시키는 신규 균주인 슈도모나스 스투체리 CJ-MKB를 분리하고, 이로부터 신규한 트랜스아미나제 활성을 갖는 폴리펩티드를 수득하였다.

[15] 본 발명의 트랜스아미나제 활성을 가지는 폴리펩티드는 아미노 화합물을 탈아민화시킬 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드가 탈아민화시킬 수 있는 아미노 화합물은 구체적으로 N-아세틸 오르니틴, 감마아미노부티르산, 5-아미노발레르산 및 6-아미노카프로산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 보다 구체적으로 상기 아미노 화합물은 5-아미노발레르산 또는 6-아미노카프로산일 수 있다. 종래 공지된 4-아미노부티레이트 트랜스아미나제의 경우, 기질로서 4-아미노부티르산(감마아미노부티르산)을 사용하는 것은 알려져 있었으나, 4-아미노부티르산 이외에 다른 아미노 화합물에 대한 탈아민 반응성에 대해서는 알려진 바 없다. 또한 슈도모나스 플루오레센스 (Pseudomonas fluorescens) 유래의 4-아미노부티레이트 트랜스아미나제는 5-아미노발레르산 및 6-아미노카프로산에 대한 반응성이 없는 것으로 보고되었다 (Scott, E.M.; Jacoby, W.B., Soluble gamma-aminobutyric-glutamic transaminase from Pseudomonas fluorescens, J. Biol. Chem., 1959, 234, 932-936). 그러나 본 발명의 트랜스아미나제 활성을 가지는 폴리펩티드는 4-아미노부티르산 이외에 5-아미노발레르산 또는 6-아미노카프로산을 기질로 사용하여 이들의 탈아민화 반응을 촉매할 수 있다. 일 실시예에서 본 발명의 폴리펩티드에 의해 5-아미노발레르산 또는 6-아미노카프로산이 탈아민화되어 글루타메이트가 생성되는 것을 확인할 수 있다.

[16]

[17] 본 발명의 다른 양태는 상기 트랜스아미나제 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[18] 본 발명에서 용어, "폴리뉴클레오티드"란 뉴클레오티드 단위체(monomer)가 공유결합에 의해 길게 사슬모양으로 이어진 뉴클레오티드의 중합체(polymer)로 일반적으로 일정한 길이 이상의 DNA(deoxyribonucleic acid)나 RNA(ribonucleic acid) 가닥을 의미한다.

[19] 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 7의 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것일 수 있다. 구체적으로 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 6의 염기서열을 포함하는 것일 수 있다. 또한 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 6의 염기서열과 80%이상, 구체적으로는 90%이상, 보다 구체적으로는 95%이상, 보다 더욱 구체적으로는 99% 이상의

상동성을 나타내는 서열로서 본 발명의 트랜스아미나제 활성을 갖는 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열이라면 제한없이 포함할 수 있다. 또한, 유전 암호의 축퇴성(genetic code degeneracy)에 기인하여 동일 아미노산 서열을 코딩하는 상기 뉴클레오티드 서열들의 변이체 또한 본 발명에 포함할 수 있다.

[20]

[21] 본 발명의 또 다른 양태는 상기 트랜스아미나제 활성을 가지는 폴리펩티드를 발현하도록 형질전환된 미생물을 제공한다. 구체적으로, 상기 미생물은 상기 트랜스아미나제 활성을 가지는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 발현되도록 형질전환된 미생물, 더욱 구체적으로 상기 폴리뉴클레오티드가 발현 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 벡터에 의해 형질전환된 미생물일 수 있다.

[22] 상기 폴리펩티드 및 상기 폴리뉴클레오티드는 각각 상기한 바와 같다.

[23] 본 발명에서 용어, "작동 가능하게 연결"이란 본 발명의 트랜스아미나제 활성을 가지는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 전사를 개시 및 매개하도록 하는 프로모터 서열과 상기 유전자 서열이 기능적으로 연결되어 있는 것을 의미한다. 발현 벡터와의 작동가능한 연결은 당업계의 공지된 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당업계의 절단 및 연결 효소 등을 사용하여 제작할 수 있다.

[24] 본 발명에서 용어 "발현 벡터"는 적합한 숙주 내에서 목적 단백질을 발현시킬 수 있도록 적합한 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 상기 목적 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 염기서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다. 상기 조절 서열은 전사를 개시할 수 있는 프로모터, 그러한 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보좀 결합 부위를 코딩하는 서열, 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다. 벡터는 적당한 숙주 내로 형질전환된 후, 숙주 게놈과 무관하게 복제되거나 기능할 수 있으며, 게놈 그 자체에 통합될 수 있다. 본 발명에서 사용되는 벡터는 숙주 중에서 복제 가능한 것이면 특별히 한정되지 않으며 당업계에 알려진 임의의 벡터를 이용할 수 있다. 통상 사용되는 벡터의 예로는 천연 상태이거나 재조합된 상태의 플라스미드, 코스미드, 바이러스 및 박테리오파지를 들 수 있으며, 이에 한정되지 않는다. 상기 제조된 트랜스아미나제 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터를 숙주 세포에 형질전환(transformation) 또는 형질감염(transfection) 시킴으로써, 목적하는 트랜스아미나제 활성을 갖는 폴리펩티드를 당해 숙주 세포에서 발현시킬 수 있게 된다.

[25] 본 발명에서 용어, "형질전환"은 표적 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 숙주 세포 내에 도입하여 숙주 세포 내에서 상기 폴리뉴클레오티드가 암호화하는 단백질이 발현할 수 있도록 하는 것을 의미한다. 형질전환된 폴리뉴클레오티드는 숙주 세포 내에 발현될 수

있기만 한다면, 숙주세포의 염색체 내에 삽입되어 위치하거나 염색체 외에 위치하든지 상관없이 이들 모두를 포함한다. 상기 세포 내로 본 발명의 벡터를 형질전환시키는 방법은 염기를 세포 내로 도입하는 어떤 방법도 포함되며, 당 분야에서 공지된 바와 같이 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 일렉트로포레이션(electroporation), 칼슘 포스페이트 공동-침전(calcium phosphate co-precipitation), 레트로바이러스 감염(retroviral infection), 미세주입법(microinjection), DEAE-덱스트란(DEAE-dextran), 양이온 리포좀(cationic liposome) 법 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[26] 본 발명에서 용어, "형질전환된 미생물"은 상기 트랜스아미나제 활성을 가지는 폴리펩티드를 발현할 수 있는 미생물이라면, 원핵 미생물 및 진핵 미생물 어느 것이나 포함된다. 상기 미생물은 예를 들면 에스케리키아(Escherichia) 속, 어위니아(Erwinia) 속, 세라티아(Serratia) 속, 프로비덴시아(Providencia) 속, 코리네박테리움(Corynebacterium) 속 또는 브레비박테리움(Brevibacterium) 속에 속하는 미생물 균주일 수 있다. 상기 미생물은 구체적으로 에스케리키아(Escherichia) 속 미생물일 수 있으며, 더욱 구체적으로는 대장균일 수 있다.

[27]

[28] 본 발명의 또 다른 양태는 본 발명의 트랜스아미나제 활성을 가지는 폴리펩티드 또는 이를 발현하는 미생물을 아미노 화합물이 함유된 용액에 첨가하는 단계를 포함하는, 아미노 화합물을 탈아민화시키는 방법을 제공한다.

[29] 상기 방법에 있어서, 상기 트랜스아미나제 활성을 가지는 폴리펩티드는 상기한 바와 같다.

[30] 상기 방법에 있어서, 상기 트랜스아미나제 활성을 갖는 폴리펩티드를 발현하는 미생물은 본 발명의 트랜스아미나제 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 미생물일 수 있다. 상기 형질전환된 미생물은 상기한 바와 같다. 상기 미생물은 미생물의 배양물 또는 미생물의 분쇄액(lysate)의 형태로 아미노 화합물이 함유된 용액에 가해질 수 있다.

[31] 상기 아미노 화합물은 예를 들면 N-아세틸 오르니틴, 감마아미노부티르산, 5-아미노발레르산 및 6-아미노카프로산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한 상기 아미노 화합물은 구체적으로는 5-아미노발레르산, 또는 6-아미노카프로산일 수 있다.

[32] 상기 아미노 화합물이 함유된 용액은 파이루베이트(pyruvate), 옥살로아세테이트(oxaloacetate) 및 α-케토글루타레이트(α-ketoglutarate)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상, 및 피리독살포스페이트를 포함할 수 있다. 상기 피리독살 포스페이트는 본 발명의 폴리펩티드의 트랜스아미나제의 반응에서 조효소로서 요구될 수 있다 또한 상기 파이루베이트, 옥살로아세테이트 및 α-케토글루타레이트는 반응에서 아미노기로부터 이탈된

아미노기를 받아들이는 아민 받개(amine acceptor)로서 이용될 수 있다.

[33] 또한 상기 아미노 화합물을 탈아민화시키는 방법은 상기 반응물로부터 아미노기가 제거된 화합물을 회수하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 아미노기가 제거된 화합물은 바람직하게는 N-아세틸글루타메이트5-세미알데하이드, 숙시네이트 세미알데하이드, 글루타레이트 세미알데하이드 및 아디페이트 세미알데하이드로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 세포 또는 배양물로부터 아미노기가 제거된 화합물을 회수하는 방법은 배양방법에 따라 당해 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여, 배양물로부터 생산된 아미노기가 제거된 화합물을 수집 또는 회수할 수 있다. 예를 들면 원심분리, 여과, 음이온 교환 크로마토그래피, 결정화 및 HPLC 등이 사용될 수 있으나, 이들 예에 한정되지 않는다.

[34] 상기 아미노 화합물을 탈아민화시키는 방법은 아디프산의 생산 방법에 이용될 수 있다. 상기 아디프산의 생산 방법은 아미노 화합물로서 6-아미노카프로산을 포함하는 용액에 본 발명의 트랜스아미나제 또는 이를 포함하는 미생물의 분쇄액을 가하여 반응시킨 다음, 상기 6-아미노카프로산으로에서 전환된 아디페이트 세미알데하이드로부터 적합한 통상의 기술자에게 공지의 방법을 이용하여 아디프산을 합성할 수 있다. 상기 아디페이트 세미알데하이드로부터 아디프산의 합성은 바람직하게는 알데하이드 디하이드로게나제 (aldehyde dehydrogenase) 반응에 의한 것일 수 있다.

[35]

발명의 효과

[36] 본 발명의 트랜스아미나제 활성을 갖는 폴리펩티드를 최초로 발굴하였다. 또한, 상기 펩티드를 이용하여 아미노 화합물을 탈아민화시키는 방법은 아디프산의 바이오 기반의 생산 방법에서 이용할 수 있다. 이는 종래에 화학적 방법으로 생산하던 아디프산 생산에 있어서, 신규한 경로를 이용하여 바이오 기반으로 아디프산을 생산할 수 있는 기반을 마련해준 것에 의의가 있다.

도면의 간단한 설명

[37] 도 1은 6-아미노카프로산을 질소원으로 사용한 최소 배지를 이용하여 선별된 균주가 바이오 필름을 형성하는 것을 보여주는 사진이다. 구체적으로 단일 콜로니를 배양한 후 이를 원심분리하여 수득한 결과물 및 이 결과물을 증류수를 이용하여 바이오필름과 균주로 분리시킨 것이다.

[38] 도 2a 내지 f는 5-아미노발레르산, 6-아미노카프로산, 알파-케토글루타르산, 피리독살 포스페이트의 다양한 농도 및 각각의 기질의 유무에 따른 글루타메이트의 생성 및 기질의 분해 정도를 TLC 상에서 비교한 결과를 나타낸다.

[39] [5AVA: 10mM 5-아미노발레르산 (standard); 1: 20mM 6-아미노카프로산

(standard); 2: 슈도모나스 스투체리 CJ-MKB + 20mM 6-아미노카프로산; 3: 슈도모나스 스투체리 CJ-MKB + 10mM 6-아미노카프로산 및 20mM 5-아미노발레르산; 4: 슈도모나스 스투체리 CJ-MKB + 20mM 6-아미노카프로산, 10mM 알파-케토글루타레이트 및 0.1mM 피리독살-포스페이트; 4-1: 슈도모나스 스투체리 CJ-MKB + 20mM 6-아미노카프로산 및 10mM 알파-케토글루타레이트; 5: 슈도모나스 스투체리 CJ-MKB + 10mM 6-아미노카프로산, 20mM 5-아미노발레르산, 10mM 알파-케토글루타레이트 및 0.1mM 피리독살-포스페이트; 5-1: 슈도모나스 스투체리 CJ-MKB + 10mM 6-아미노카프로산, 20mM 5-아미노발레르산 및 10mM 알파-케토글루타레이트; 6: 슈도모나스 스투체리 CJ-MKB + 20mM 6-아미노카프로산 및 20mM 글루타메이트; E: 10mM 글루타메이트 (standard)]

[40] 도 3은 본 발명의 트랜스아미나제의 유전자로 형질전환된 대장균 균주로부터 가용성 단백질로 과발현되는 것을 보여주는 SDS-PAGE 젤 사진이다.

[41] 도 4는 본 발명의 트랜스아미나제의 과발현이 유도된 대장균 분쇄액과 4-아미노부티르산, 5-아미노발레르산, 및 6-아미노카프로산을 각각 반응시킨 결과를 TLC로 나타낸 것이다.

[42] [1: 과발현된 pETDuet1(공벡터)과 GABA(gamma-aminobutyric acid)의 반응; 2: 과발현된 본 발명의트랜스아미나제와 GABA의 반응; 3: 과발현된 pETDuet1과 5-AVA(5-aminovaleric acid)의 반응; 4: 과발현된 본 발명의 트랜스아미나제와 5-AVA의 반응; 5: 과발현된 pETDuet1과 6-ACA(6-aminocaproic acid)의 반응; 6: 과발현된 본 발명의 트랜스아미나제와 6-ACA의 반응; 7: 과발현된 pETDuet1; 8: 과발현된 본 발명의 트랜스아미나제; 9: 10mM 글루타메이트(standard)]

[43] 도 5는 본 발명의 트랜스아미나제 발현 세포 분쇄액과 기질과의 반응시간 증가시킨 결과를 TLC로 나타낸 것이다.

[44] [1: 5-AVA(standard); 2: 5-AVA와 과발현된 본 발명의 트랜스아미나제의 반응; 3: 6-ACA와 과발현된 pETDuet1와의 반응; 3: PLP(피리독살 포스페이트) 및 알파-케토글루타레이트가 결여된 6-ACA와 과발현된 본 발명의 트랜스아미나제의 반응; 5: 6-ACA와 과발현된 본 발명의 트랜스아미나제와의 반응; 6: 10mM 6-ACA(standard); 7: 글루타메이트 (standard)]

[45] 도 6은 도 5에서 6-아미노카프로산과 반응시킨 샘플들에 대한 LC-MASS 분석 결과를 나타낸다.

[46]

발명의 실시를 위한 형태

[47] 이하 본 발명을 실시예에 의해 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[48]

[49] 실시예 1: 6-아미노카프로산을 질소원으로 사용하는 미생물 동정

[50] **1) 6-**아미노카프로산을 질소원으로 사용하는 미생물 선별 및 16S rRNA 분석

[51] 질소원을 6-아미노카프로산(6-ACA)으로 고정시키고 계대배양 방법을 통해서 6-아미노카프로산을 탈아민시킬 수 있는 신규 균주 슈도모나스 스투체리(*Pseudomonas* stutzeri) CJ-MKB를 선별하였다. 선별을 위해 미생물이 배양될 수 있는 최소 배지를 하기 표 1의 조성과 같이 제조하였고, 균주 배양에 필요한 질소원으로 6-아미노카프로산을 사용하였다.

[52] [표1]

배지 조성	최종 농도
$Na_2HPO_4 \cdot H_2O$	15.1 mM
KH_2PO_4	22 mM
NaCl	8.6 mM
6-아미노카프로산	20 mM
$MgSO_4$	1 mM
$CaCl_2$	100 mM
$(NH_4)6Mo_7O_{24} \cdot H_2O$	3 nM
H_3BO_3	400 nM
$CoCl_2 \cdot H_2O$	30 nM
$CuSo_4 \cdot H_2O$	10 nM
$MnCl_2 \cdot H_2O$	80 nM
$ZnSO_4 \cdot H_2O$	10 nM
$FeSO_4 \cdot H_2O$	1 mM
글루코스	11.1 mM

[53]

[54] 구체적으로, 서울특별시 가양동에 소재한 씨제이제일제당㈜ 김포공장의 토양샘플을 표 1의 조성을 갖는 배지를 이용하여 37℃, 200rpm 조건에서 배양하였다. 배양된 후보 균주들은 초기 접종 광학밀도 (OD600)를 0.05로 맞춰 동일한 배지, 37℃, 200rpm 조건에서 광학밀도가 0.5에 도달할 때까지 배양하였다. 5 차례의 계대 배양을 통해 표 1의 조성을 갖는 배지에서 배양되는 미생물을 선별할 수 있었다. 선별된 미생물을 일차적으로 'CJ-MKB'라 명명하고, 신규 미생물임을 확인하기 위해 다음의 실험을 진행하였다.

[55] 상기 배지에서 배양된 CJ-MKB 균주를 M9 아가 플레이트에 도말하여 콜로니들을 확보하였다. 얻어진 콜로니는 유사한 형태를 가졌으며, 25 mg/ml 농도의 앰피실린에 대하여 저항성을 가졌다. 그리고 콜로니 주변으로 옅은 색의

바이오 필름 (biofilm)이 형성되는 것을 확인하였다. 두 개의 콜로니를 선택하여 M9 액체 배지에 재배양하고, 상용화된 genomic DNA prep kit를 이용하여 유전체(genomic DNA)를 각각 추출하였다. 얻어진 유전체의 동정을 위해 16S ribosomal RNA (16S rRNA)의 서열을 분석하였다. 미생물 16S rRNA의 서열 분석에서 보편적으로 사용되는 프라이머 27F (AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG; 서열번호 8) 및 프라이머 1492R (GGT TAC CTT GTT ACG ACT T; 서열번호 9)를 이용하여, CJ-MKB 유전체의 16S rRNA가 서열 번호 1의 염기 서열을 가지는 것을 확인하였다.

[56] 미국국립생물정보센터(National Center for Biotechnology Information, NCBI)에서 제공되는 BLAST 프로그램을 이용하여 서열 번호 1과 높은 핵산 상동성을 가지는 균주를 검색하였다. (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi°CPROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome). 그 결과, 슈도모나스 스투체리 NBRIS11 균주 (Pseudomonas stutzeri strain NBRIS11), 감마 프로테오박테리움 BP44-iso8 (Gamma proteobacterium BP44-iso8), 언컬처드 박테리움 클론 9(Uncultured bacterium clone 9), 에스케리키아 콜리 BM0446 균주(Escherichia coli strain BM0446), 및 엔테로박테리아세애 박테리움 BM005 (Enterobacteriaceae bacterium BM005)와 16S rRNA 와 각각 동일한 서열을 가지는 것으로 확인되었다.

[57] 확인된 미생물들 중 여러 슈도모나스 종 미생물들이 엑소폴리사카라이드(exopolysaccharide)를 만들어 바이오-필름(bio-flim)을 형성하는 것으로 알려져 있으며, 또한 슈도모나스 종 미생물은 페니실린과 같은 베타-락탐 계열의 항생제에 대한 저항성을 가지고 있다. CJ-MKB 균주의 16S rRNA의 서열 정보와 배양 중에 보여지는 바이오필름, 앰피실린에 대한 저항성을 가지는 것을 고려해 볼 때, 선별된 균주가 슈도모나스 계열의 미생물일 확률이 높을 것으로 예상되었다. 25mg/ml 농도의 앰피실린을 함유한 M9 배지 아가 플레이트에서 얻어진 단일 콜로니를 LB 브로스로 배양하고, 13,000rpm으로 1분 동안 원심분리하여 배양된 균주를 수득할 수 있었다 (도 1). 수득한 균주에 증류수를 넣고 가볍게 흔들어 주면, 바이오필름과 균주가 쉽게 분리된다.

[58] **2) 산화환원효소의 염기서열 분석**

[59] 선별된 균주가 슈도모나스 속 미생물인지 여부를 확인하기 위해 슈도모나스 종에 존재하는 산화환원효소(oxidoreductase)의 염기서열을 신규 균주 CJ-MKB가 갖고 있는지 분석하였다. 이를 위해 새롭게 디자인한 프라이머 NCPPB 5P (ATGAGCAAGACTAACGAATCCC; 서열번호 10) 및 프라이머 NCPPB 3P (TCCAGAATGGCCAGCCCGCG; 서열번호 11)를 이용하여 서열 분석을 진행하였다. 그 결과 서열번호 2의 염기서열을 가지는 것을 확인하였다.

[60] 서열번호 2의 염기서열을 NCBI BLAST로 분석해본 결과, 서열번호 2가 공지된 슈도모나스 스투체리 A1501 균주의 산화환원효소의 몰리브도프테린-결합 (molybdopterin-binding) 서열과 동일한 서열을 가지는 것을 확인함으로써, 선별된

신규 균주 CJ-MKB는 슈도모나스 속 미생물임을 확인하였다.

[61] **3) 트랜스아미나아제의 염기서열 분석**

[62] 상동성이 확인된 핵산 서열은 714개의 짧은 서열이므로, 미생물의 종속을 정확히 분류할 수 없었다. 이에 추가적인 단백질 핵산 서열을 분석하여 종속을 확인하였다. 미생물이 6-ACA를 질소원으로 사용하는 경우, 이의 효소 전환반응에 관여할 것으로 예상되는 트랜스아미나제 중 N-아세틸오르니틴 트랜스아미나제 또는 4-아미노부티레이트 트랜스아미나제 활성에 특이적일 것으로 예상하고, 상기 두 효소 활성을 코딩하는 염기서열을 확인하였다.

[63] 구체적으로, 슈도모나스 스투체리 A1501과 선별된 균주 CJ-MKB의 게놈(genome)에 존재하는 N-아세틸오르니틴 트랜스아미나제 활성을 코딩하는 염기 서열을 비교 분석하기 위하여, argD_F2 (5' 프라이머: ATTTAAGGA TCCGTCCGCCCCGCACACCCCGG; 서열번호 12) 및 argD_R2 (3' 프라이머: ATTTAAGAGCTC TCAGGCCTGGGTCAGCGTC; 서열번호 13)를 사용하여 PCR 수행에 의해 핵산 서열을 분석하였다. 그 결과 슈도모나스 스투체리 A1501과 신규 미생물의 N-아세틸오르니틴 트랜스아미나제 활성을 코딩하는 염기서열이 각각 서열번호 3 및 서열번호 4의 염기 서열을 가지는 것을 확인하였다.

[64] 또한 동일한 방법으로 슈도모나스 스투체리 A1501과 선별된 균주의 4-아미노부티레이트 트랜스아미나제 활성을 코딩하는 염기 서열을 비교분석하기 위하여 gabT_F (5' 프라이머: ATTTAACATATGCAACGCCGTGTCGCCGCCGTTCC; 서열번호 14)와 gabT_R (3' 프라이머: ATTTAAGAATTCTCAGGTCAGCTCGTCGAAACACT; 서열번호 15)를 이용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과 각각 서열번호 5 및 서열번호 6의 염기 서열을 가지는 것을 확인하였다.

[65] 슈도모나스 스투체리 A1501과 선별된 신규 균주의 N-아세틸오르니틴 트랜스아미나제 염기 서열을 비교 분석하기 위해 다중서열정렬(Multiple sequence alignment)을 이용하였다. 그 결과, 1,221개의 핵산 서열 중 13개의 핵산이 다른 것으로 확인되었다 (핵산 상동성: 98.9353%). 또한 동일한 방법으로 슈도모나스 스투체리 A1501과 신규 균주의 4-아미노부티레이트 트랜스아미나제로 추정되는 핵산 서열을 비교 분석한 결과 1,257개의 핵산 서열 중 21개의 핵산이 다른 것으로 확인되었다 (핵산 상동성: 98.3294%)

[66] 결론적으로 선별된 균주 슈도모나스 스투체리 CJ-MKB (Pseudomonas stutzeri CJ-MKB)는 현재까지 알려진 미생물 유전체 서열 중에 슈도모나스 스투체리 A1501와 가장 높은 상동성을 가지며, 새로운 균주임이 확인되었다. 이에 따라 선별된 균주를 2014년 10월 22일자로 한국미생물보존센터에 기탁하여 수탁번호 KCCM11587P를 부여받았다.

[67]

[68] <u>실시예 2: 슈도모나스 스투체리 CJ-MKB의 탈아민 반응성 확인</u>

[69] 슈도모나스 스투체리 CJ-MKB의 5-아미노발레르산 및 6-아미노카프로산

탈아민화 반응성 평가를 수행하였다. 트랜스아미나제의 반응은 아민기와 케톤기의 치환 반응이므로, 반응 결과물은 박층 크로마토그래피 (TLC)를 이용한 물질 분리 후, 닌하이드린 (ninhydrin)의 아민기 발색 반응을 통해서 기질 및 생성물을 쉽게 확인할 수 있다. 슈도모나스 스투체리 CJ-MKB의 트랜스아미나제 활성 확인을 위해 전세포 반응을 진행하였다. 슈도모나스 스투체리 CJ-MKB를 배양하여 광학밀도가 0.7에 도달하였을 때, 새로운 M9 배지에 계대 배양하였으며, 6-아미노카프로산과 5-아미노발레르산을 질소원으로 고정시키고 배양을 진행하였다. 상기 배지에 필요한 알파-케토글루타레이트와 피리독살-포스페이트를 넣어주고, 5-아미노발레르산 및 6-아미노카프로산의 탈아민 정도 확인을 위해 TLC를 수행하였다. 반응 부피는 100㎕ 였으며, 5-아미노발레르산, 6-아미노카프로산, 알파-케토글루타레이트, 및 피리독살-포스페이트의 다양한 농도 및 각각의 기질 유무에 따른 글루타메이트 (glutamate) 의 생성 및 기질의 분해 정도를 TLC 상에서 비교하였다. TLC 전개가 끝나고, 3% 닌하이드린 용액으로 아민기가 존재하는 물질을 발색시켰다. TLC 결과를 통해서 5-아미노발레르산, 6-아미노카프로산이 소멸되고, 글루타메이트가 생성되는 것을 확인할 수 있었다 (도 2a내지 f 참조).

[70] 도 2f의 97h reaction, lane 4에서 나타난 바와 같이, 배지에 20 mM 6-아미노카프로산, 10 mM 알파-케토글루타레이트, 0.1 mM의 피리독살포스페이트를 첨가해준 균주가 97 시간 이전에 6-아미노카프로산을 모두 반응시키는 것을 확인할 수 있었다. 트랜스아미나제 반응이 충족되었을 때와 비교하면 반응 속도가 느리지만, 피리독살포스페이트가 없는 조건에서도 6-아미노카프로산이 감소하는 것이 TLC 상에서 확인되었다 (도 2f의 97 h reaction lane 4-1). 5-아미노발레르산 및 6-아미노카프로산이 동시에 존재하는 경우에는 6-아미노카프로산의 감소가 확인되지 않았다 (도 2f의 97 h reaction, lane 5, 및 5-1). 이를 통해 슈도모나스 스투체리 CJ-MKB를 최소배지 조건에서 배양할 때, 6-아미노카프로산과 5-아미노발레르산은 질소원으로 경쟁 반응하는 것으로 평가되었다.

[71] 이 실험 결과로부터 슈도모나스 스투체리 CJ-MKB가 6-아미노카프로산을 단일 질소원으로 사용할 수 있으며, 알파-케토글루타레이트 및 피리독살포스페이트 존재 하에서 5-아미노발레르산 및 6-아미노카프로산 탈아민화 반응을 가속화시키는 것을 확인할 수 있었다 (도 2a 내지 f). 한편 도 2d 및 도 2e의 24h reaction, lane5와 72h reaction, lane 4에서 적은 양의 글루타메이트가 확인되었지만, 지속적으로 축적되지는 않는 것을 나타났다. 이는 6-아미노카프로산의 반응과 더불어 글루타메이트가 생성되지만, 글루타메이트 대부분이 아민 공급원으로 사용되기 때문에 세포 내에서 축적되지 않고 빠르게 전환되는 것으로 평가된다.

[72]

[73] **실시예 3: 대장균 균주에서 본 발명의** 트랜스아미나제 과발현 유도 및 반응성

평가

[74] **1)** 대장균에서의 본 발명의 트랜스아미나제의 과발현 유도

[75] 실시예 1에서 수득한 슈도모나스 스투체리 CJ-MKB 균주의 탈아민 반응에 관여할 것으로 예상된 트랜스아미나제로 추정되는 효소의 활성을 확인하기 위해 하기의 실험을 진행하였다.

[76] 구체적으로, 슈도모나스 스투체리 CJ-MKB의 트랜스아미나제 유전자인 서열번호 6의 염기 서열(이하, "gabT"로 지칭함)을 PCR로 증폭시킨 후 대장균 과발현 벡터인 pETDuet1 벡터에 클로닝하였다. gabT를 pETDuet1 벡터에 클로닝하는 과정에서 DNA 서열 앞부분에 His-tag이 위치하도록 제조합하였다. 대장균 로제타 (E.coli Rosetta) 수용균주를 열 충격(heat shock) 방법으로 상기 클로닝된 벡터를 삽입하여 형질전환시켰다. 형질전환 균주를 3 mL의 LB 용액 배지에 50 mg/ml 농도의 앰피실린을 넣고 37 ℃에서 12시간 배양하였다. 다음으로 배양된 균주를 앰피실린을 포함한 50 mL LB에 넣어 37 ℃에서 배양하여 광학광도 (600 nm 파장)가 0.8이 되면, 0.2mM IPTG를 이용하여 발현유도시키고, 18 ℃에서 48시간 발현시켰다. 배양된 균주를 세척한 다음, 소니케이터를 이용하여 세포를 분쇄하였다. 분쇄 후 가용성 단백질로 과발현되는 것을 SDS-PAGE 젤 결과를 통해서 확인하였다 (도 3).

[77] 또한 상기 슈도모나스 스투체리 CJ-MKB의 트랜스아미나제로 형질전환된 대장균 로제타 균주를 '대장균 로제타 CC04-0058'로 명명하고, 이를 2014년 10월 22일자로 한국미생물보존센터에 기탁하여 수탁번호 KCCM11589P를 부여받았다.

[78] **2) 본 발명의** 트랜스아미나제가 과발현된 대장균 분쇄액의 탈아민 반응성 1차 평가

[79] 상기 실시예 3-1)에서 본 발명의 트랜스아미나제의 과발현이 유도된 대장균의 분쇄액 (cell lysate) 50 ㎕, 10 mM의 기질 (4-아미노부티르산, 5-아미노발레르산, 또는 6-아미노카프로산), 10 mM의 알파-케토글루타레이트 0.1 mM 피리독살-포스페이트를 넣고, 50 mM HEPES 완충액 (pH 8.0)으로 채워 100 ㎕의 부피로 반응을 진행하였다. 37 ℃에서 30분 반응시킨 후, 본 발명의 트랜스아미나제에 의한 각 기질로부터 글루타메이트의 생성을 TLC를 통해 확인하였다 (도 4).

[80] 도 4에서 볼 수 있는 바와 같이, 본 발명의 트랜스아미나제 유전자 (lane 2, 4, 6, 8)를 과발현시킨 대장균 세포 파쇄액과 공벡터를 발현시킨 세포 파쇄액 (lane 1, 3, 5, 7)의 반응에 따라 생성되는 글루타메이트 스팟 (spot) 을 비교하였다. TLC 상으로는 정량 분석에 어려움이 있지만, 1~5 mM 농도의 글루타메이트는 대략적인 경향성을 파악할 수 있다. 결과적으로 4-아미노부티르산, 5-아미노발레르산, 6-아미노카프로산에 대해서 글루타메이트의 생성이 확인되었으며, 각각의 기질에 대한 탈아민 반응이 진행되었음을 확인할 수 있었다. 공벡터를 발현시킨 세포 파쇄액을 4-아미노부티르산과 반응시켰을

때에도 본 발명의 트랜스아미나제 과발현 세포 분쇄액과 비교하여 적지만 글루타메이트의 생성이 확인되었다 (도 4의 lane 1). 이것은 대장균 내에 자체적으로 존재하는 트랜스아미나제 반응의 결과물로 예측된다.
5-아미노발레르산 반응에서는 본 발명의 트랜스아미나제 발현 여부에 따라서 글루타메이트 생성 정도가 현저하게 차이나는 것을 육안으로 확인할 수 있었다 (도 4의 lane 3 및 4). 본 발명의 트랜스아미나제 과발현 세포 분쇄액과 6-아미노카프로산이 반응에서도 글루타메이트가 생성되는 것이 TLC 상에서 확인되었다 (도 4의 lane 6).

[81] **3) 본 발명의** 트랜스아미나제가 과발현된 대장균 분쇄액의 탈아민 반응성 2차 평가

[82] 본 발명의 트랜스아미나제를 재발현시켜 6-아미노카프로산 및 5-아미노발레르산에 대한 반응성을 한번 더 평가하였다 (도 5). 반응 조건은 반응 시간을 30분에서 1.5 시간으로 3배 증가시킨 점에서만 차이가 있고, 그 밖의 다른 조건은 상기 실시예 3-2)와 동일하다.

[83] 5-아미노발레르산과 6-아미노카프로산을 각각 기질로 하여 본 발명의 트랜스아미나제와의 반응을 TLC를 통해 확인한 결과, 5-아미노발레르산의 경우 상대적으로 높은 기질 감소와 글루타메이트의 생성을 확인할 수 있었다. 또한 6-아미노카프로산의 경우 공벡터 (pET-Duet1)만 발현시킨 세포 분쇄액 반응 (도 5의 lane 3)과 피리독살포스페이트(Pyridoxal phosphate, PLP)와 알파-케토글루타레이트가 결여된 반응(도 5의 lane 4)에서는 글루타메이트의 생성이 확인되지 않았다. 반면 정상적인 본 발명의 트랜스아미나제의 반응에서는 글루타메이트의 생성이 확인되었다 (도 5의 lane 5).

[84] **4) 본 발명의** 트랜스아미나제와 6-아미노카프로산의 반응물에 대한 LC-MASS 분석

[85] 도 5의 6-아미노카프로산에 대해 반응한 샘플들에 대하여 LC-MASS 분석을 진행하였다. 실시예 3-3)과 동일한 조건으로 재현실험을 진행하였다.
6-아미노카프로산의 경우 공벡터 (pET-Duet1)만 발현시킨 세포 분쇄액 반응 (도 5의 lane 3), 피리독살포스페이트(Pyridoxal phosphate, PLP)와 알파-케토글루타레이트가 결여된 반응(도 5의 lane 4), 본 발명의 트랜스아미나제의 반응 (도 5의 lane 5), 그리고 10 mM의 6-아미노카프로산 (도 5의 lane 6)을 TLC로 확인하였다. 반응 분석 결과는 아래 표 2와 같다(도 6 참조).

[86] [표2]

시료	**6-**ACA (%)
Lane6	100.0
Lane3	99.5
Lane4	99.1
Lane5	**90.6**

[87]

[88] LC-MASS 분석 결과, 37℃, 1.5시간 반응 조건에서 10mM의 6-아미노카프로산이 본 발명의 트랜스아미나제 반응에 의해 9.4% (0.94mM)가 탈아민 되는 것을 확인하였다.

[89] 이러한 실험 결과로부터 슈도모나스 스투체리 CJ-MKB 유래의 본 발명의 신규 트랜스아미나제는 본래 기질로 알려진 감마아미노부티르산 이외에 5-아미노발레르산, 6-아미노카프로산을 기질로 사용하여 이들의 탈아민화 반응을 보이는 것을 확인할 수 있었다.

[90]

[91] 기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

[92] 수탁번호 : KCCM11587P

[93] 수탁일자 : 20141022

[94]

출원인 또는 대리인 파일 참조번호	국제출원번호

기탁된 미생물 또는 기타 생물학적 물질의 표시사항

(특허협력조약 규칙 제13조의2)

A. 하기의 표시사항은 명세서 _____17_____ 쪽, _____10_____ 줄에 기재된 기탁된 미생물 또는 기타 생물학적 물질에 관한 것임.	
B. **기탁물의 확인** 이외의 추가적 기탁물은 다음 별도의 페이지에 기재 ☐	
기탁기관의 명칭 한국 미생물 보존센터(KCCM)	
기탁기관의 주소(우편번호 및 국명 포함) 120-861, 유림 B/D 45, 홍제내-2가-길, 서대문구, 서울, 대한민국	
기탁일자 2014.10.22	기탁번호 KCCM11587P
C. **추가적 표시사항**(기재사항이 없으면 공란으로 제출) 별도의 추가 페이지 계속 ☐	
미생물 명칭: *Pseudomonas stutzeri* CJ-MKB	
D. **표시사항이 지정하고 있는 지정국**(표시사항이 모든 지정국을 위한 사항이 아닌 경우)	
E. **표시사항의 별도 제출**(기재사항이 없으면 공란으로 제출)	
하기의 표시사항은 후에 국제사무국에 제출될 것임(표시사항의 일반적 성질을 특정할 것)	

수리관청 사용란	**국제사무국 사용란**
☐ 당해 용지는 국제출원과 함께 접수되었음	☐ 당해 용지는 국제출원과 함께 접수되었음:
담당관	담당관

Form PCT/RO/134 (July 1998; reprint January 2004)

[95]

[96] 기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

[97] 수탁번호 : KCCM11589P

[98] 수탁일자 : 20141022

[99]

출원인 또는 대리인 파일 참조번호	국제출원번호

기탁된 미생물 또는 기타 생물학적 물질의 표시사항

(특허협력조약 규칙 제13조의2)

A. 하기의 표시사항은 명세서 _____20_____ 쪽, _____5_____ 줄에 기재된 기탁된 미생물 또는 기타 생물학적 물질에 관한 것임.	
B. **기탁물의 확인** 이외의 추가적 기탁물은 다음 별도의 페이지에 기재 ☐	
기탁기관의 명칭 한국 미생물 보존센터(KCCM)	
기탁기관의 주소(우편번호 및 국명 포함) 120-861, 유림 B/D 45, 홍제내-2가-길, 서대문구, 서울, 대한민국	
기탁일자 2014.10.22	기탁번호 KCCM11589P
C. **추가적 표시사항**(기재사항이 없으면 공란으로 제출) 별도의 추가 페이지 계속 ☐	
미생물 명칭: *Escherichia coli* Rosetta CC04-0058	
D. **표시사항이 지정하고 있는 지정국**(표시사항이 모든 지정국을 위한 사항이 아닌 경우)	
E. **표시사항의 별도 제출**(기재사항이 없으면 공란으로 제출)	
하기의 표시사항은 후에 국제사무국에 제출될 것임(표시사항의 일반적 성질을 특정할 것)	

수리관청 사용란	국제사무국 사용란
☐ 당해 용지는 국제출원과 함께 접수되었음	☐ 당해 용지는 국제출원과 함께 접수되었음:
담당관	담당관

Form PCT/RO/134 (July 1998; reprint January 2004)

청구범위

[청구항 1] 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하며 아미노 화합물에 대한 트랜스아미나제 활성을 가지는 분리된 폴리펩티드.

[청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 아미노 화합물은 5-아미노발레르산 또는 6-아미노카프로산인 폴리펩티드.

[청구항 3] 제1항의 트랜스아미나제 활성을 가지는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

[청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 6의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

[청구항 5] 제1항의 폴리펩티드를 발현하도록 형질전환된 미생물.

[청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 미생물은 에스케리키아 속(genus *Escherichia*)인 미생물.

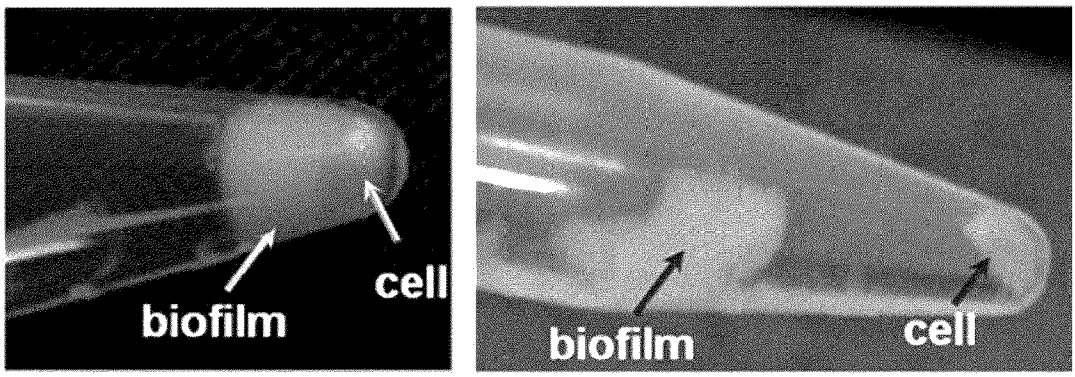
[청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 미생물은 대장균(*Escherichia coli*)인 미생물.

[청구항 8] 제1항의 폴리펩티드, 또는 제5항의 미생물을 아미노 화합물이 함유된 용액에 가하는 단계를 포함하는 아미노 화합물을 탈아민화시키는 방법.

[청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 아미노 화합물은 N-아세틸 오르니틴, 감마아미노부티르산, 5-아미노발레르산 및 6-아미노카프로산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 아미노 화합물을 탈아민화시키는 방법.

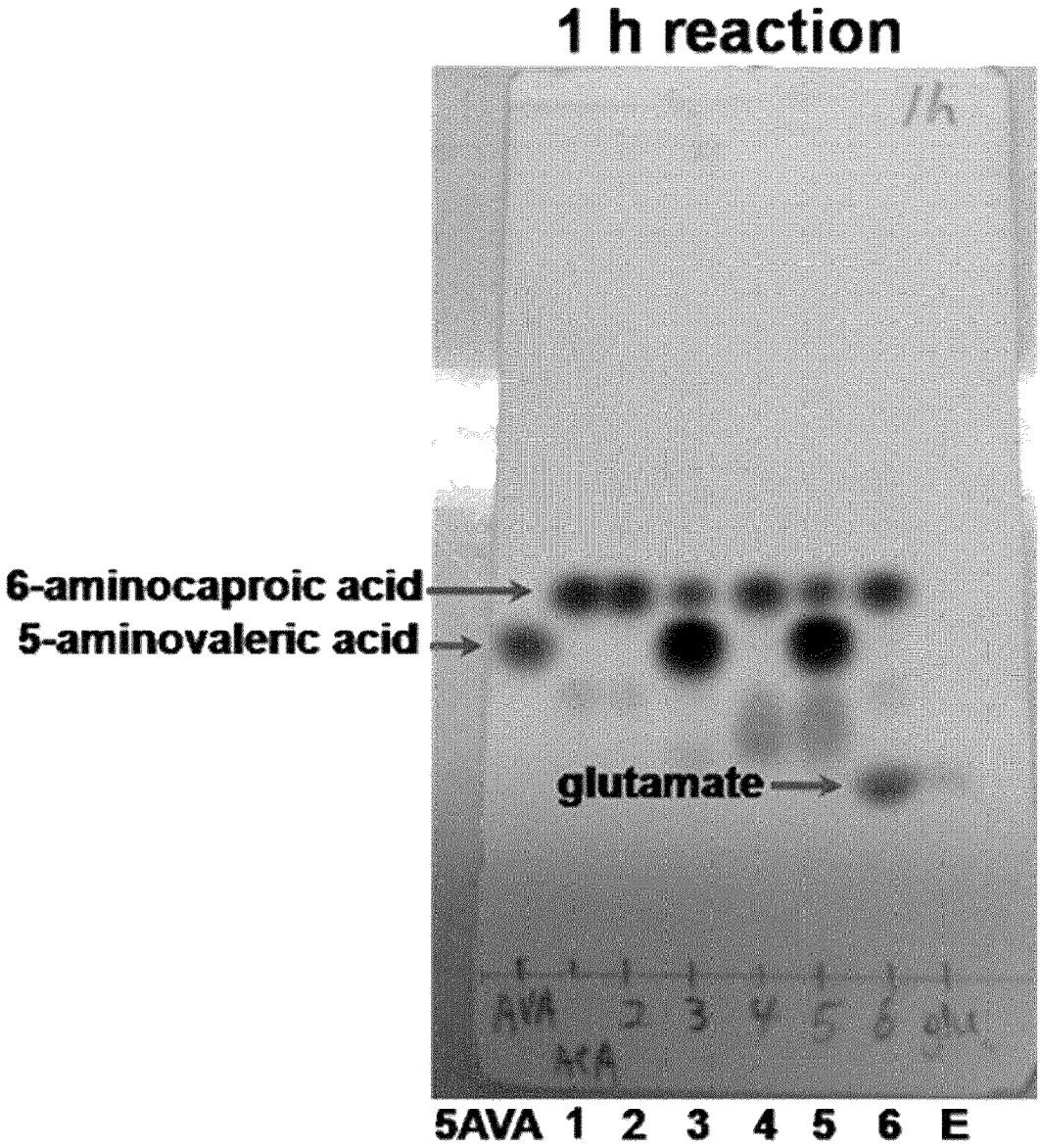
[청구항 10] 제8항에 있어서, 상기 용액은 파이루베이트, 옥살로아세테이트 및 α-케토글루타레이트로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상, 및 피리독살포스페이트를 추가로 포함하는 아미노 화합물을 탈아민화시키는 방법.

[도1]

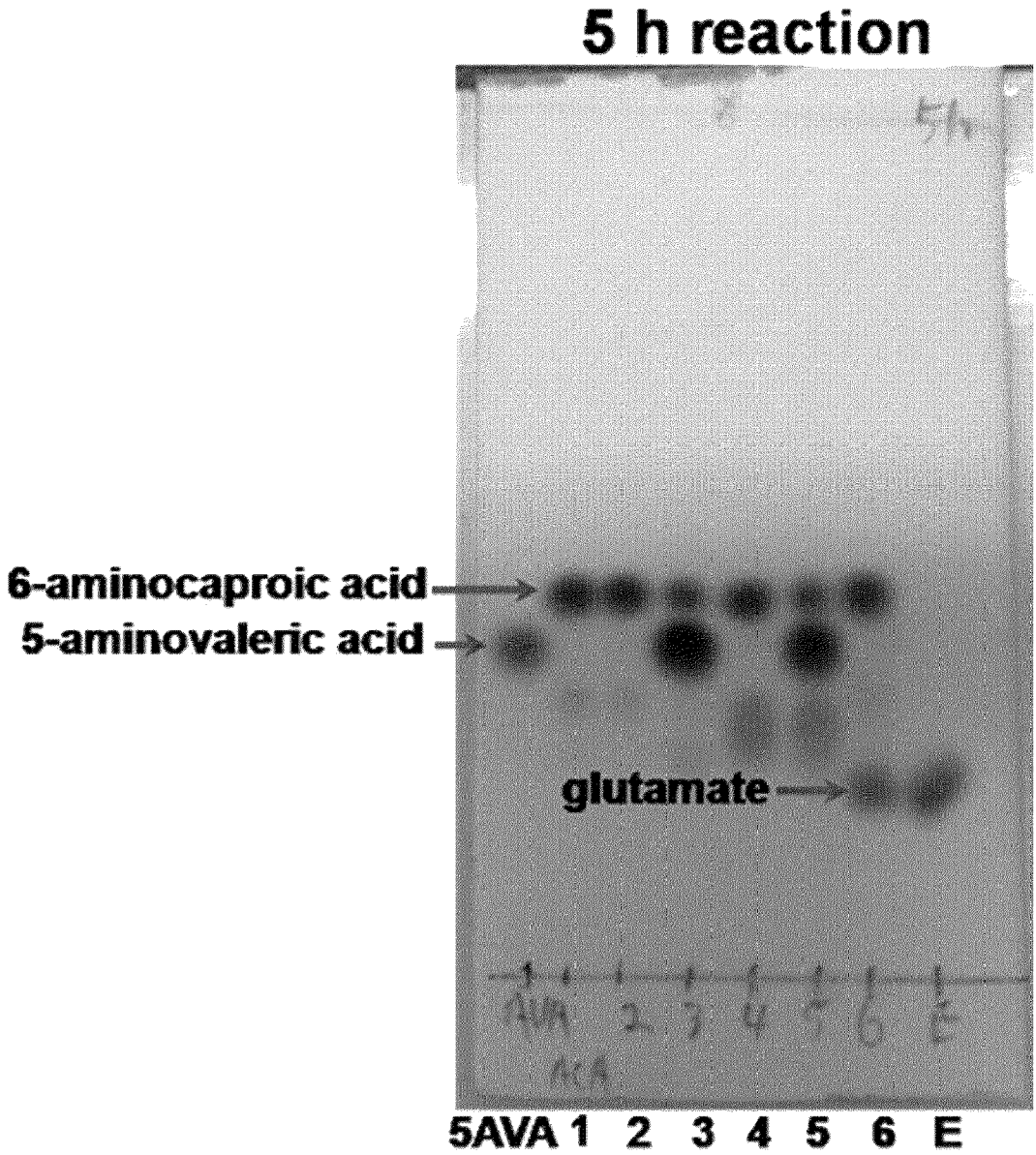


harvest Suspending biofilm

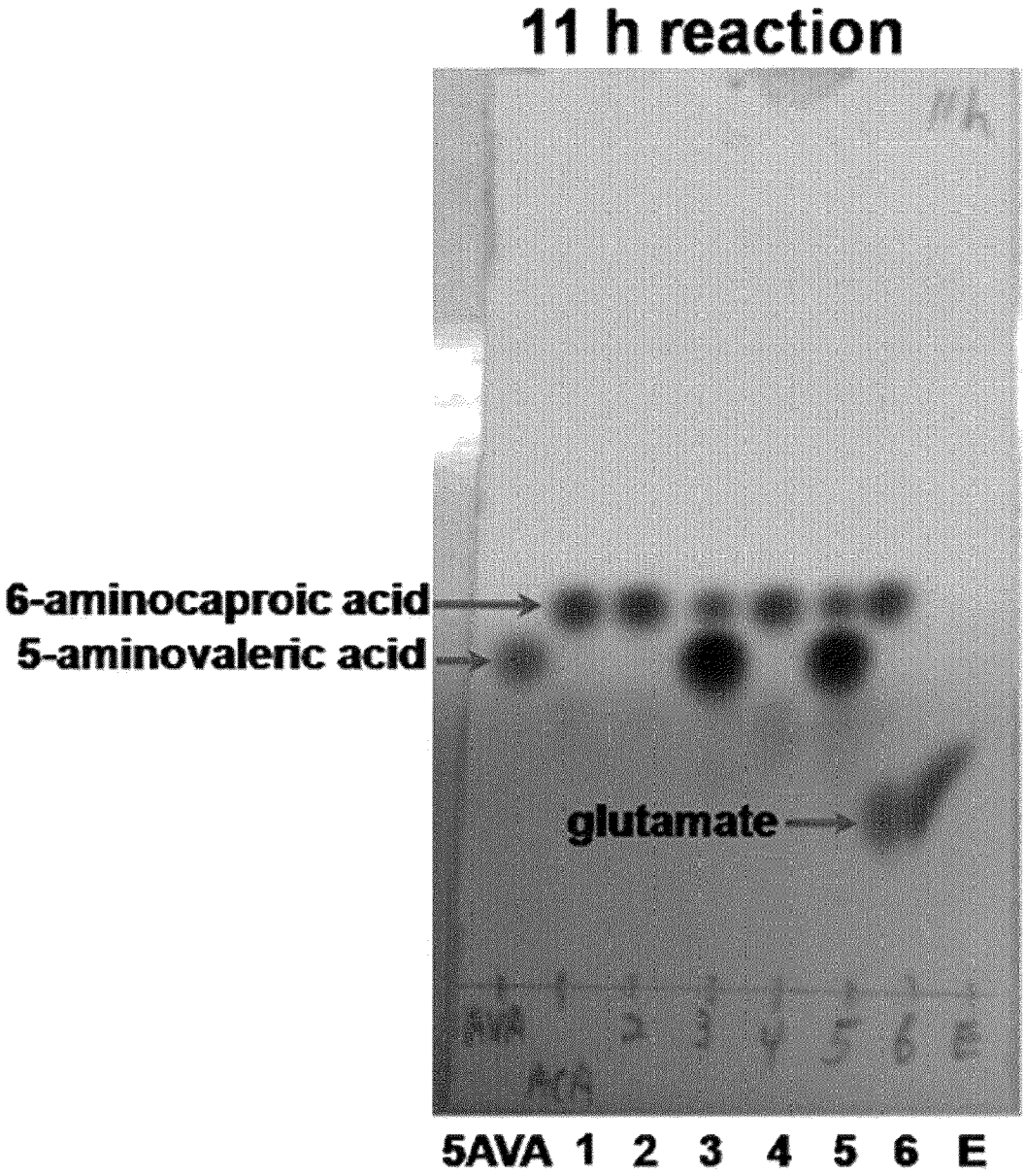
[도2a]



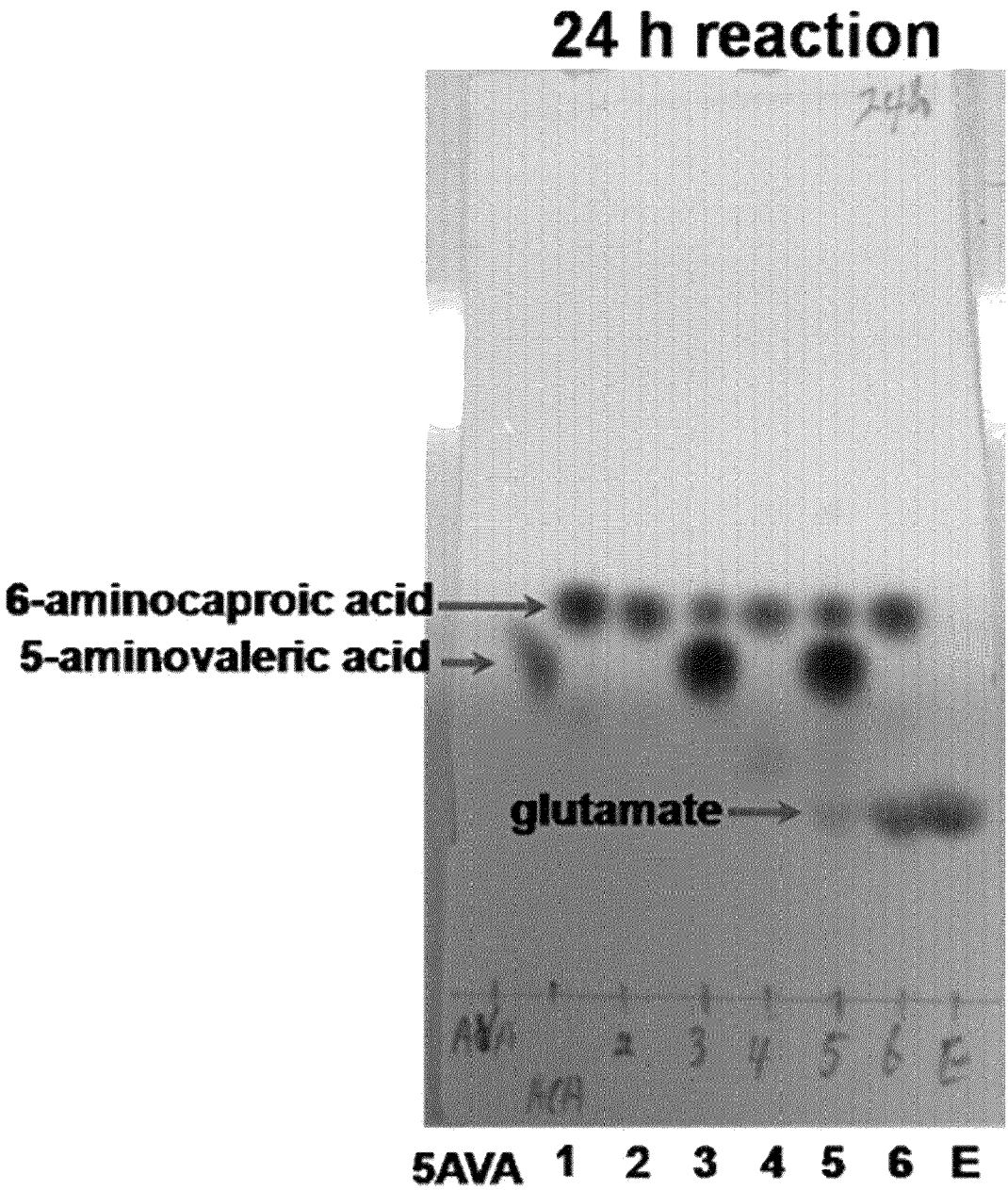
[도2b]


5 h reaction
6-aminocaproic acid
5-aminovaleric acid
glutamate
5AVA 1 2 3 4 5 6 E

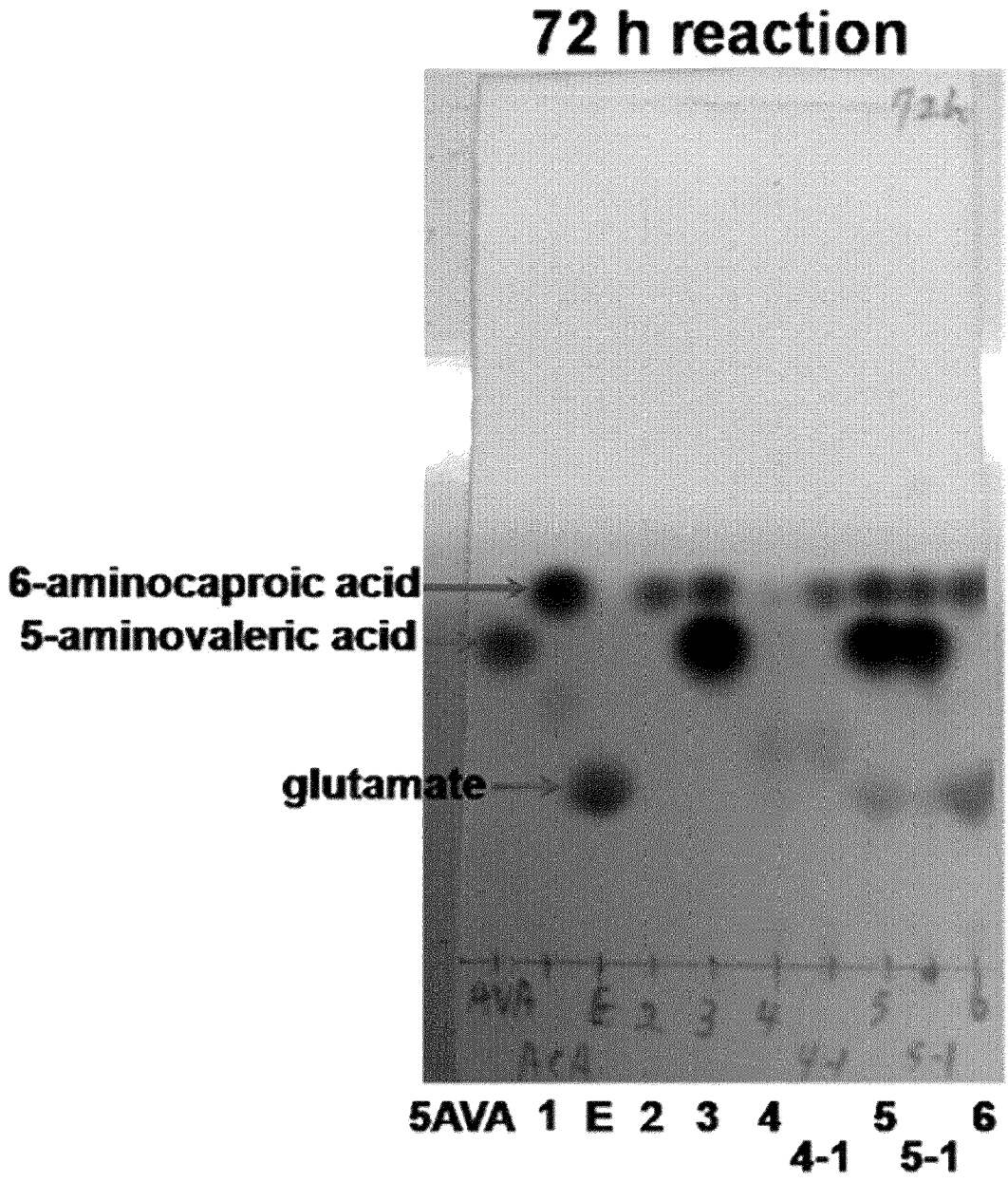
[도2c]


11 h reaction
6-aminocaproic acid
5-aminovaleric acid
glutamate
5AVA 1 2 3 4 5 6 E

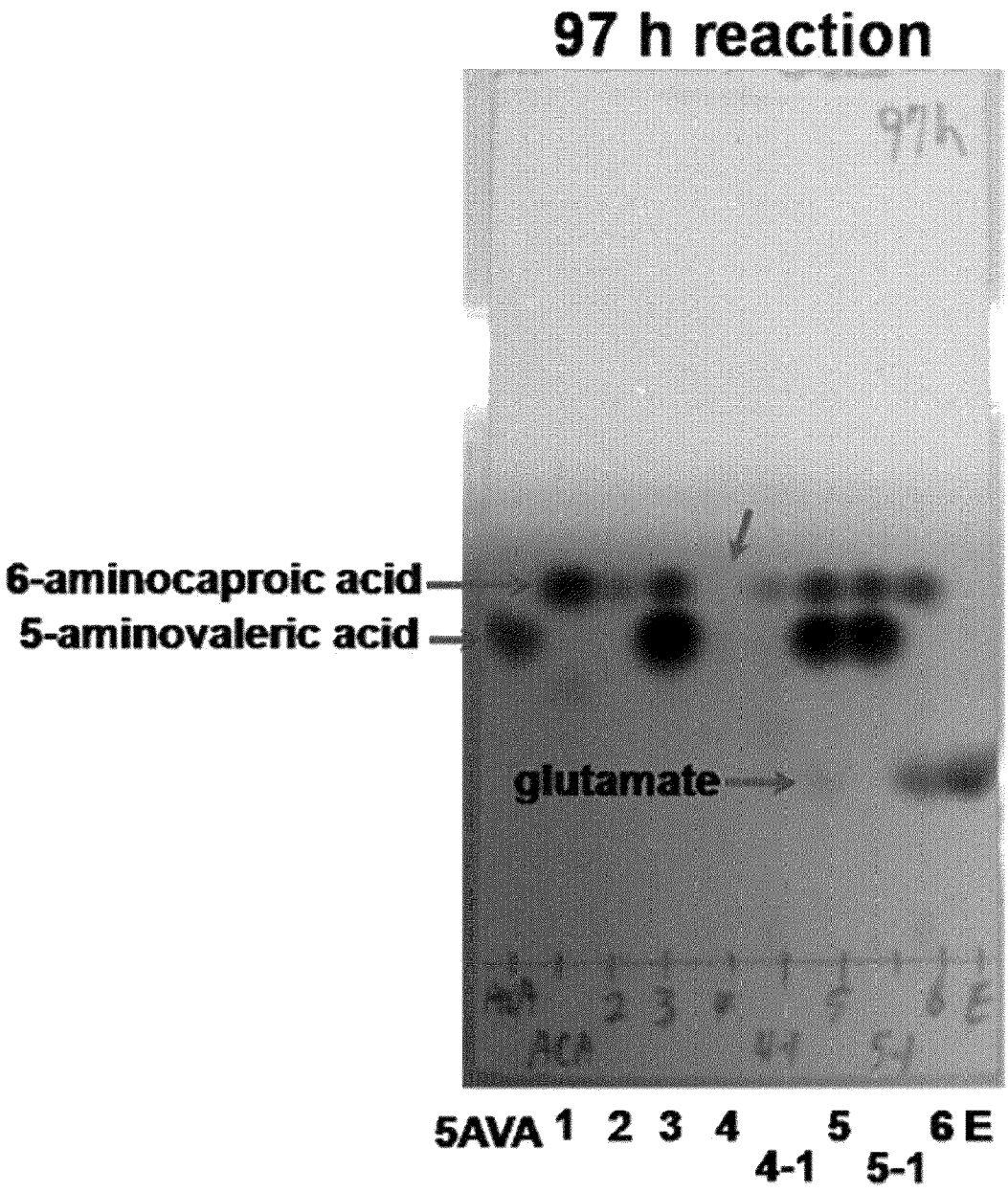
[도2d]


24 h reaction
6-aminocaproic acid
5-aminovaleric acid
glutamate
5AVA 1 2 3 4 5 6 E

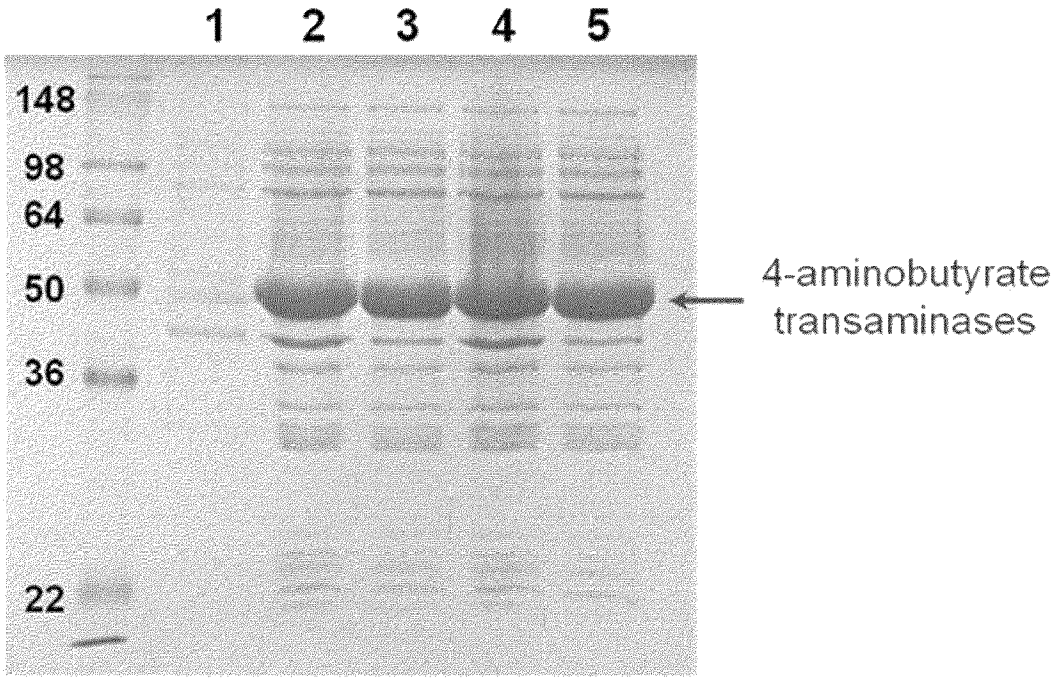
[도2e]


72 h reaction
6-aminocaproic acid
5-aminovaleric acid
glutamate
5AVA 1 E 2 3 4 5 6
4-1 5-1

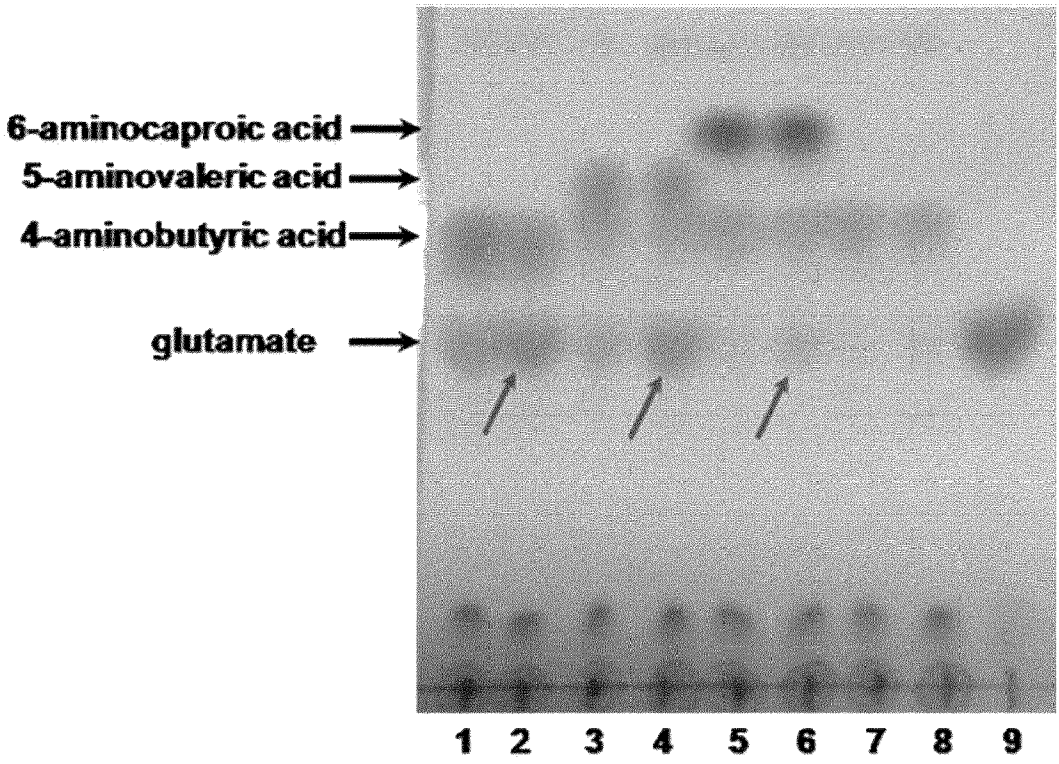
[도2f]


97 h reaction
97h
6-aminocaproic acid
5-aminovaleric acid
glutamate
5AVA 1 2 3 4 4-1 5 5-1 6 E

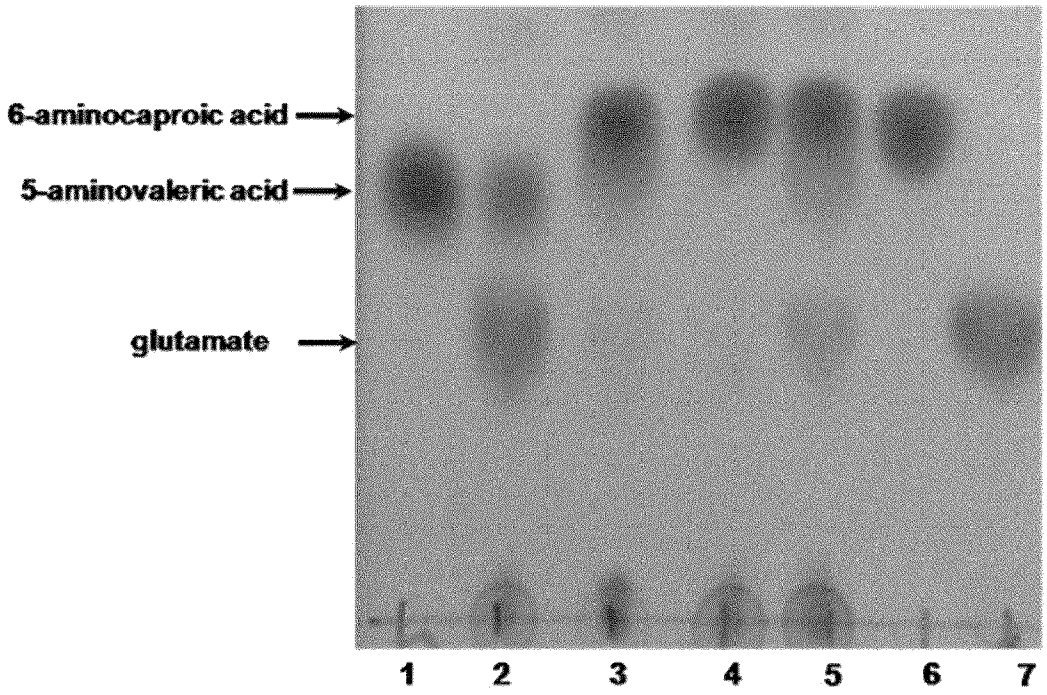
[도3]


1 2 3 4 5
148
98
64
50
36
22
4-aminobutyrate transaminases

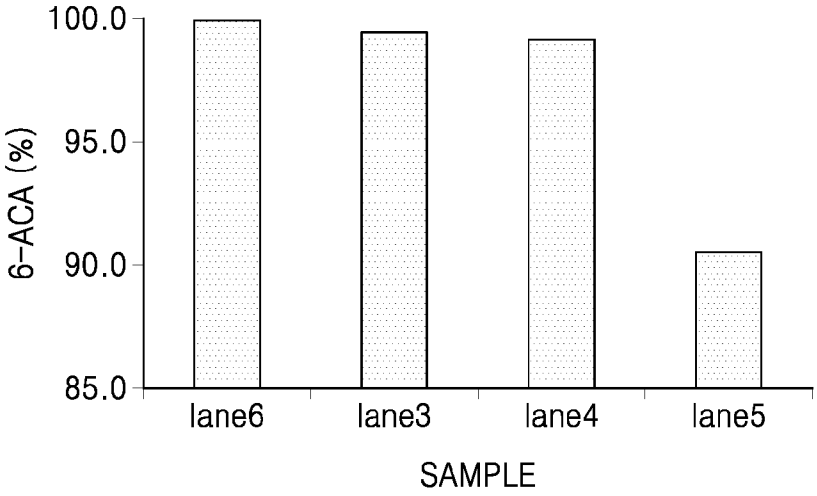
[도4]


6-aminocaproic acid
5-aminovaleric acid
4-aminobutyric acid
glutamate
1 2 3 4 5 6 7 8 9

[도5]


6-aminocaproic acid
5-aminovaleric acid
glutamate
1
2
3
4
5
6
7

[도6]


100.0
95.0
90.0
85.0
6-ACA (%)
lane6
lane3
lane4
lane5
SAMPLE

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2016/005871

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 9/10(2006.01)i, C12N 15/52(2006.01)i, C12N 15/70(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 9/10; C07K 14/21; C12N 1/15; C12N 15/09; C12P 7/44; C12N 15/52; C12N 15/70

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above
Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: transaminase, Escherichia, deamination, polypeptide

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2014-197941 A1 (COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH ORGANISATION) 18 December 2014 See claims 1-3, 14-15, 17, 25; pages 3-4, 7, 23, 25, 34.	1-10
A	NCBI, GenBank accession no. WP_020307792.1 (03 July 2013) See sequence.	1-10
A	NCBI, GenBank accession no. CP000304.1 (31 January 2014) See sequence.	1-10
A	JP 2012-519004 A (CODEXIS INC.) 23 August 2012 See the entire document.	1-10
A	JP 2003-000289 A (DIVERSA CORP.) 07 January 2003 See the entire document.	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
13 SEPTEMBER 2016 (13.09.2016)	**13 SEPTEMBER 2016 (13.09.2016)**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2016/005871

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2014-197941 A1	18/12/2014	AU 2014-280850 A1	24/12/2015
		CN 105452475 A	30/03/2016
		EP 3008199 A1	20/04/2016
		KR 10-2016-0026977 A	09/03/2016
JP 2012-519004 A	23/08/2012	CN 102405281 A	04/04/2012
		CN 102405281 B	13/05/2015
		EP 2401366 A2	04/01/2012
		EP 2401366 A4	05/09/2012
		EP 2401366 B1	18/12/2013
		JP 2014-230550 A	11/12/2014
		JP 5707344 B2	30/04/2015
		US 2010-0285541 A1	11/11/2010
		US 2012-0329108 A1	27/12/2012
		US 2015-0037869 A1	05/02/2015
		US 2015-0329838 A1	19/11/2015
		US 8293507 B2	23/10/2012
		US 8889380 B2	18/11/2014
		US 9133445 B2	15/09/2015
		WO 2010-099501 A2	02/09/2010
		WO 2010-099501 A3	24/02/2011
JP 2003-000289 A	07/01/2003	CA 2246243 A1	14/08/1997
		EP 1015563 A1	05/07/2000
		EP 1015563 A4	16/08/2000
		JP 2000-505291 A	09/05/2000
		JP 2003-000288 A	07/01/2003
		JP 3414405 B2	09/06/2003
		US 2002-0132295 A1	19/09/2002
		US 2003-0040092 A1	27/02/2003
		US 5814473 A	29/09/1998
		US 5962283 A	05/10/1999
		US 6013509 A	11/01/2000
		US 6268188 B1	31/07/2001
		WO 2003-068909 A2	21/08/2003
		WO 2003-068909 A3	21/10/2004
		WO 97-29187 A1	14/08/1997

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2016/005871

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 9/10(2006.01)I, C12N 15/52(2006.01)I, C12N 15/70(2006.01)I

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
C12N 9/10; C07K 14/21; C12N 1/15; C12N 15/09; C12P 7/44; C12N 15/52; C12N 15/70

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 트랜스아미나제, Escherichia, 탈아민, 폴리펩티드

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	WO 2014-197941 A1 (COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH ORGANISATION) 2014.12.18 청구항 제1-3, 14-15, 17, 25항; 페이지 3-4, 7, 23, 25, 34 참조.	1-10
A	NCBI, GenBank accession no. WP_020307792.1 (2013.07.03.) 서열 참조.	1-10
A	NCBI, GenBank accession no. CP000304.1 (2014.01.31.) 서열 참조.	1-10
A	JP 2012-519004 A (CODEXIS INC.) 2012.08.23 전체 문헌 참조.	1-10
A	JP 2003-000289 A (DIVERSA CORP.) 2003.01.07 전체 문헌 참조.	1-10

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2016년 09월 13일 (13.09.2016)	2016년 09월 13일 (13.09.2016)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관
허주형
전화번호 +82-42-481-8150

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2016/005871

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2014-197941 A1	2014/12/18	AU 2014-280850 A1	2015/12/24
		CN 105452475 A	2016/03/30
		EP 3008199 A1	2016/04/20
		KR 10-2016-0026977 A	2016/03/09
JP 2012-519004 A	2012/08/23	CN 102405281 A	2012/04/04
		CN 102405281 B	2015/05/13
		EP 2401366 A2	2012/01/04
		EP 2401366 A4	2012/09/05
		EP 2401366 B1	2013/12/18
		JP 2014-230550 A	2014/12/11
		JP 5707344 B2	2015/04/30
		US 2010-00285541 A1	2010/11/11
		US 2012-0329108 A1	2012/12/27
		US 2015-0037869 A1	2015/02/05
		US 2015-0329838 A1	2015/11/19
		US 8293507 B2	2012/10/23
		US 8889380 B2	2014/11/18
		US 9133445 B2	2015/09/15
		WO 2010-099501 A2	2010/09/02
		WO 2010-099501 A3	2011/02/24
JP 2003-000289 A	2003/01/07	CA 2246243 A1	1997/08/14
		EP 1015563 A1	2000/07/05
		EP 1015563 A4	2000/08/16
		JP 2000-505291 A	2000/05/09
		JP 2003-000288 A	2003/01/07
		JP 3414405 B2	2003/06/09
		US 2002-0132295 A1	2002/09/19
		US 2003-0040092 A1	2003/02/27
		US 5814473 A	1998/09/29
		US 5962283 A	1999/10/05
		US 6013509 A	2000/01/11
		US 6268188 B1	2001/07/31
		WO 2003-068909 A2	2003/08/21
		WO 2003-068909 A3	2004/10/21
		WO 97-29187 A1	1997/08/14