

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

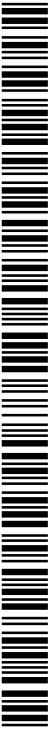
(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국

(43) 국제공개일  
2016년 3월 10일 (10.03.2016)



(10) 국제공개번호  
WO 2016/036191 A1

- (51) 국제특허분류: C12N 9/12 (2006.01) C12R 1/15 (2006.01)  
C12N 15/54 (2006.01) C12P 13/08 (2006.01)
  - (21) 국제출원번호: PCT/KR2015/009353
  - (22) 국제출원일: 2015년 9월 4일 (04.09.2015)
  - (25) 출원언어: 한국어
  - (26) 공개언어: 한국어
  - (30) 우선권정보: 10-2014-0119137 2014년 9월 5일 (05.09.2014) KR
  - (71) 출원인: 씨제이제일제당 주식회사 (CJ CHEILJEDANG CORPORATION) [KR/KR]; 04560 서울시 중구 동호로 330, Seoul (KR).
  - (72) 발명자: 허란 (HUH, Lan); 13914 경기도 안양시 만안구 예술공원로 118 번길 18 35 1 층, Gyeonggi-do (KR). 이광호 (LEE, Kwang Ho); 34140 대전시 유성구 어은로 57, 116 동 205 호, Daejeon (KR). 김형준 (KIM, Hyung Joon); 08226 서울시 구로구 경인로 343, 106 동 2104 호, Seoul (KR). 문준옥 (MOON, Jun Ok); 07929 서울시 양천구 월정로 9길 17, 102 동 807 호, Seoul (KR). 유송기 (RYU, Song Gi); 07550 서울시 강서구 양천로 62길 22 510 호, Seoul (KR).
  - (74) 대리인: 손민 (SON, Min); 06302 서울시 강남구 양재천로 163 STX R&D 센터 6 층 한얼국제특허사무소, 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))
  - 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))
  - 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))



WO 2016/036191 A1

(54) Title: MICROORGANISM WITH IMPROVED L-LYSINE PRODUCTIVITY, AND METHOD FOR PRODUCING L-LYSINE BY USING SAME

(54) 발명의 명칭 : L-라이신 생산능이 향상된 미생물 및 이를 이용한 L-라이신 생산방법

(57) Abstract: The present invention relates to: a novel variant RNA polymerase sigma factor A (SigA) polypeptide; a polynucleotide encoding the same; a microorganism containing the polypeptide; and a method for producing L-lysine by using the microorganism.

(57) 요약서: 본 발명은 신규한 변이형 RNA 중합효소 시그마인자 A(SigA) 폴리펩티드, 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리펩티드를 포함하는 미생물 및 상기 미생물을 이용한 L-라이신의 생산 방법에 관한 것이다.

## 명세서

### 발명의 명칭: L-라이신 생산능이 향상된 미생물 및 이를 이용한 L-라이신 생산방법

#### 기술분야

- [1] 본 발명은 신규한 변이형 RNA 중합효소 시그마인자 A(SigA) 폴리펩티드, 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리펩티드를 포함하는 미생물 및 상기 미생물을 이용한 L-라이신의 생산 방법에 관한 것이다.

[2]

#### 배경기술

- [3] 아미노산 등 유용산물의 대량생산을 위한 균주의 개발을 위해 해당경로(glycolysis) 상의 상위 단계에서 직·간접적으로 관여하는 유전적 요인들을 찾아내어 적절히 이용한다면 보다 높은 생산수율을 가진 균주를 개발할 수 있다. 대표적인 기술로는 RNA 중합효소의 리쿠르팅 단백질(recruiting protein)에 무작위 돌연변이를 일으킴으로써 세포 내 모든 유전자의 발현을 조절하는 gTME(global transcription machinery engineering) 기술이 있다. 일례로 메사추세츠 공과대학(Massachusetts Institute of Technology)의 연구그룹은 gTME 기술을 이용하여 대장균에서 타이로신의 생산량을 크게 증가시키는 데에도 성공한 바 있다(미국등록특허 제8735132호).
- [4] 미생물의 전사단계에서 쓰여지는 RNA 중합효소(RNA polymerase)는 5개의 소단위체(subunit)로 구성된 거대분자로서, 2개의 알파 인자( $\alpha$ ), 베타( $\beta$ ), 베타 프라임( $\beta'$ ) 및 오메가 인자( $\omega$ )로 구성되어 있으며, 완전효소(holoenzyme)는  $\alpha_2\beta\beta'\omega$ 로 표시된다. 이들 완전효소와 함께 시그마 인자( $\sigma$ )는 RNA 중합효소의 프로모터 결합 특이성을 부여하는 전사의 개시 단계에 필수적인 요소이다. 코리네박테리움 속 균주는 7종의 시그마 인자(SigA, SigB, SigC, SigD, SigE, SigH, SigM)를 갖고 있으며 외부 환경 변화에 따라 특정 유전자 그룹들의 전사를 조절한다(Journal of Biotechnology 154. 2011. 101-113). 특히, SigA는 7종의 시그마 인자 중 대부분의 house keeping 유전자들 및 핵심 유전자들을 조절하는 주된 조절자로서, SigA에 무작위로 변이를 주어 목적 물질의 생산성을 높이는 연구들이 보고되었으며(Metabolic Engineering 9. 2007. 258-267), 코리네박테리움 속 균주를 이용하여 L-라이신 생산성을 증가시킨 연구도 보고된 바 있다(국제공개특허 제WO2003-054179호).

[5]

#### 발명의 상세한 설명

##### 기술적 과제

- [6] 본 발명자들은 숙주 세포의 성장 저해 없이 보다 높은 농도의 L-라이신을 생산하는 미생물을 개발하고자 예의 노력한 결과, 신규한 변이형 RNA

중합효소의 시그마인자 A(SigA) 폴리펩티드를 개발하여 L-라이신 생산능을 갖는 코리네박테리움 속에 도입함으로써 L-라이신의 생산능이 향상된 균주를 개발할 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[7]

### 과제 해결 수단

[8] 본 발명의 목적은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 RNA 중합효소 시그마인자 A 활성을 가지는 폴리펩티드의 일부 아미노산을 치환한 변이형 폴리펩티드를 제공하는 것이다.

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

[10] 본 발명의 다른 목적은 상기 폴리펩티드를 포함하도록 형질전환된 미생물을 제공하는 것이다.

[11] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 미생물을 배양하여 배양물을 수득하는 단계; 및 상기 배양물 또는 미생물로부터 L-라이신을 회수하는 단계를 포함하는 L-라이신의 생산방법을 제공하는 것이다.

[12]

### 발명의 효과

[13] 본 발명으로 L-라이신 생산 능력을 상향 조절할 수 있는 변이체 RNA 중합효소 시그마인자 A의 변이형 폴리펩티드를 확인할 수 있다. 또한 이를 바탕으로 당해 변이형 폴리펩티드를 발현하는 미생물은 L-라이신의 생산수율이 현저히 우수하므로, 산업적인 면에서 생산의 편의성과 함께 제조원가 절감 등의 효과를 기대할 수 있다.

[14]

### 발명의 실시를 위한 최선의 형태

[15] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 신규한 RNA 중합효소 시그마인자 A 활성을 갖는 변이형 폴리펩티드를 제공한다.

[16]

[17] 본 발명에서 용어, "RNA 중합효소 시그마인자 A(SigA)"는 RNA 중합효소와 함께 작용하는 전사시작인자로서 시그마인자(sigma factor) 중의 하나에 해당하는 단백질(SigA)이다. 시그마인자는 특정 프로모터의 상류에 존재하는 upstream DNA(UP element)와 여러 가지 전사조절인자와 상호작용하여 전사조절에 관여한다. 특히 시그마인자 A(SigA)는 핵심 유전자의 대부분을 조절하는 주된 조절자(regulator)로 알려져 있다. 상기 SigA 단백질에 대한 정보는 NCBI GenBank와 같은 공지의 데이터베이스로부터 얻을 수 있으며, 그 예로 Accession number가 NP\_601117인 단백질일 수 있다. 구체적으로, SigA 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함할 수 있으며, 본 발명의 SigA와 동일한 활성을 갖는 한 이에 한정되지 않는다.

- [18] 본 발명에서 용어, "변이형 폴리펩티드"는 야생형 폴리펩티드의 아미노산 서열 일부 또는 전체가 치환된 것으로, 본 발명에서는 RNA 중합효소 시그마인자 A(SigA) 활성을 가지는 폴리펩티드의 아미노산 서열 일부가 치환됨으로써 야생형(wild-type)의 아미노산 서열과 일부 다른 서열을 가진 RNA 중합효소 시그마인자 A(SigA) 활성을 가지는 폴리펩티드이다. 즉, 야생형인 SigA 폴리펩티드가 아닌, L-라이신 생산능 향상에 기여하는 SigA 변이형 폴리펩티드를 제시하는 것이다.
- [19] 구체적으로, 상기 변이형 폴리펩티드는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드에서 하기 위치의 아미노산 중 1 이상의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, RNA 중합효소 시그마인자 A 활성을 가지는 변이형 폴리펩티드로서, 상기 변이 위치는 시작 메치오닌을 1번째 아미노산으로 하여 이로부터 136번째 아미노산; 254번째 아미노산; 268번째 아미노산; 281번째 아미노산; 381번째 아미노산; 429번째 아미노산; 및 445번째 내지 495번째 아미노산일 수 있다. 즉 상기 변이형 폴리펩티드는 상기 57개의 변이 위치(136번, 254번, 268번, 281번, 381번, 429번, 445-495번) 중에서 1 이상의 위치가 다른 아미노산으로 치환된 폴리펩티드일 수 있다.
- [20] 보다 구체적으로 상기 445번째 내지 495번째 아미노산 중에서, 447번째 아미노산; 451번째 아미노산; 455번째 아미노산; 479번째 아미노산; 483번째 아미노산; 488번째 아미노산; 및 491번째 아미노산으로 이루어진 아미노산 중 1종 이상의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환될 수 있으나 이에 한정되지 않는다.
- [21] 구체적인 아미노산 치환은 하기 13종의 아미노산 치환 중 1종 이상이 조합된 것일 수 있으며, 시작 메치오닌으로부터 136번째 아미노산이 글리신으로 치환(D136G); 254번째 아미노산이 아스파라진으로 치환(I254N); 268번째 아미노산이 세린으로 치환(A268S); 281번째 아미노산이 세린으로 치환(T281S); 381번째 아미노산 알지닌으로 치환(L381R); 429번째 아미노산이 알지닌으로 치환(Q429R); 447번째 아미노산이 히스티딘으로 치환(L447H); 451번째 아미노산이 이소류신으로 치환(L451I); 455번째 아미노산이 발린으로 치환(M455V); 479번째 아미노산이 알지닌으로 치환(K479R); 483번째 아미노산이 알지닌으로 치환(K483R); 488번째 아미노산이 쓰레오닌으로 치환(S488T); 및 491번째 아미노산이 알지닌으로 치환(Q491R)으로 이루어진 것일 수 있다.
- [22] 더욱 구체적으로 상기 폴리펩티드는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드의 시작 메치오닌으로부터 136번째 및 281번째 아미노산이 각각 글리신 및 세린으로 치환(D136G, T281S); 254번째 아미노산이 아스파라진으로 치환(I254N); 268번째 아미노산이 세린으로 치환(A268S); 381번째 아미노산 알지닌으로 치환(L381R); 429번째 아미노산이 알지닌으로 치환(Q429R); 447번째 아미노산이 히스티딘으로 치환(L447H); 451번째 및 491번째

아미노산이 각각 이소류신 및 알지닌으로 치환(L451I, Q491R); 455번째 아미노산이 발린으로 치환(M455V); 479번째 아미노산이 알지닌으로 치환(K479R); 483번째 아미노산이 알지닌으로 치환(K483R); 488번째 아미노산이 쓰레오닌으로 치환(S488T); 또는 상기 11종의 아미노산 치환 중 1종 이상이 조합된 것인 변이형 폴리펩티드일 수 있다.

- [23] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 변이형 폴리펩티드는 서열번호 12 내지 22의 아미노산 서열 중 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드일 수 있다.
- [24]
- [25] 본 발명의 변이형 폴리펩티드는 상기 서열번호 12 내지 22로 기재한 아미노산 서열뿐만 아니라, 상기 서열과 70% 이상, 구체적으로는 80% 이상, 보다 구체적으로는 90% 이상, 더욱 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 나타내는 아미노산 서열로서, 야생형 SigA 단백질에 비하여 L-라이신의 생산능 향상에 기여한 단백질이라면 제한없이 포함하며, 이러한 상동성을 갖는 서열로서 실질적으로 변이형 SigA 단백질과 동일하거나 상응하는 생물학적 활성을 갖는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 경우도 본 발명의 범위에 포함됨은 자명하다.
- [26] 본 발명에서 용어, "상동성"은 단백질을 코딩하는 유전자의 아미노산 또는 염기서열에 있어서, 특정 비교 영역에서 양 서열을 최대한 일치되도록 정렬 (align)시킨 후 서열 간의 염기 또는 아미노산 잔기의 동일한 정도를 의미한다. 상동성이 충분히 높은 경우 해당 유전자의 발현 산물은 동일하거나 유사한 활성을 가질 수 있다. 상기 서열 동일성의 퍼센트는 공지 서열 비교 프로그램을 사용하여 결정될 수 있으며, 일례로 BLAST(NCBI), CLC Main Workbench (CLC bio), MegAlign™(DNASTAR Inc) 등을 들 수 있다.
- [27]
- [28] 본 발명의 다른 하나의 양태는 상기 변이형 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 포함한다.
- [29] 본 발명에서 용어, "폴리뉴클레오티드"는 뉴클레오티드 단위체(monomer)가 공유결합에 의해 길게 사슬모양으로 이어진 뉴클레오티드의 중합체(polymer)로 일정한 길이 이상의 DNA 또는 RNA 가닥으로서, 보다 구체적으로는 상기 변이형 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 단편을 의미한다.
- [30] 본 발명에서 RNA 중합효소 시그마인자 A(SigA)의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자는 *rpoD* 유전자이며, 구체적으로 코리네박테리움 글루타미쿰 유래일 수 있다. 유전 암호의 축퇴성(genetic code degeneracy)에 기인하여 동일 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열 및 이의 변이체 또한 본 발명에 포함되며, 구체적으로 서열번호 1로 표시될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [31] 또한 변이형 폴리뉴클레오티드 역시 유전 암호의 축퇴성(genetic code degeneracy)에 기인하여 동일 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열 및 이의

변이체 또한 본 발명에 포함된다. 구체적으로 상기 아미노산 서열 12 내지 22의 아미노산 서열 중 어느 하나의 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열 및 이의 변이체가 포함될 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[32]

[33] 본 발명의 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 변이형 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주세포 및 상기 변이형 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터로 형질전환된 미생물을 제공한다. 구체적으로 상기 도입은 형질전환에 의해 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[34] 구체적으로 SigA 변이형 폴리펩티드를 포함하는 미생물은 야생형 SigA 폴리펩티드를 포함하는 미생물에 비하여 숙주세포의 성장을 저해함이 없이 L-라이신의 생산능이 향상되므로, 이들 미생물로부터 L-라이신을 고수율로 수득할 수 있다.

[35] 본 발명에서 용어, "벡터"는 숙주 세포로 염기의 클로닝 및/또는 전이를 위한 임의의 매개물을 말한다. 벡터는 다른 DNA 단편이 결합하여 결합된 단편의 복제를 가져올 수 있는 복제단위(replicon)일 수 있다. "복제단위"란 생체 내에서 DNA 복제의 자가 유닛으로서 기능하는, 즉, 스스로의 조절에 의해 복제가 가능한, 임의의 유전적 단위(예를 들면, 플라스미드, 파지, 코스미드, 염색체, 바이러스)를 말한다. 상기 "벡터"는 시험관 내, 생체 외 또는 생체 내에서 숙주 세포로 염기를 도입하기 위한 바이러스 및 비 바이러스 매개물을 포함하며, 또한 미니구형 DNA를 포함할 수 있다. 예를 들면, 상기 벡터는 박테리아 DNA 서열을 갖지 않는 플라스미드일 수 있다. 또한, 상기 벡터는 트랜스포존(Ann Rev Genet. 2003; 37:3-29.), 또는 인공 염색체를 포함할 수 있다. 구체적으로는 pACYC177, pACYC184, pCL1920, pECCG117, pUC19, pBR322, pDZ 및 pMW118 벡터 등을 사용할 수 있으며 이에 제한되지 않는다.

[36] 본 발명에서 용어, "형질전환"은 유전자를 숙주세포 내에 도입하여 숙주세포 내에서 발현시킬 수 있도록 하는 것이며, 형질전환된 유전자는 숙주세포 내에서 발현될 수 있으면 숙주세포의 염색체 내 삽입 또는 염색체 외에 위치하고 있는 것이든 제한하지 않고 포함된다.

[37] 상기 유전자는 자체적으로 발현되는데 필요한 모든 요소를 포함하는 폴리뉴클레오티드 구조체인 발현 카세트(expression cassette)의 형태로 숙주세포에 도입될 수 있다. 상기 발현 카세트는 통상 상기 유전자에 작동 가능하게 연결되어 있는 프로모터, 전사종결신호, 리보솜 결합부위 및 번역종결신호를 포함한다. 상기 발현 카세트는 자체 복제가 가능한 발현 벡터 형태일 수 있다. 또한, 상기 유전자는 그 자체 또는 폴리뉴클레오티드 구조체의 형태로 숙주세포에 도입되어 숙주세포에서 발현에 필요한 서열과 작동 가능하게 연결되어 있는 것일 수도 있으나 이에 제한되지 않는다.

[38] 상기 숙주세포 또는 미생물은 변이형 폴리펩티드를 코딩하는

폴리뉴클레오티드를 포함하거나, 또는 변이형 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터로 형질전환되어 변이형 폴리펩티드를 발현할 수 있는 세포 또는 미생물로서, 본 발명의 목적상 상기 숙주세포 또는 미생물은 SigA 변이형 폴리펩티드를 포함하여 L-라이신을 생산할 수 있는 미생물이라면 모두 가능하다. 구체적 예로, 에스케리키아(*Escherichia*) 속, 세라티아(*Serratia*) 속, 어위니아(*Erwinia*) 속, 엔테로박테리아(*Enterobacteria*) 속, 살모넬라(*Salmonella*) 속, 스트렙토마이세스(*Streptomyces*) 속, 슈도모나스(*Pseudomonas*) 속, 브레비박테리움(*Brevibacterium*) 속 또는 코리네박테리움(*Corynebacterium*) 속 등의 미생물 균주가 포함될 수 있으며, 구체적으로 코리네박테리움 속 미생물일 수 있고, 보다 구체적인 예로는 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)일 수 있으나 이에 한정되지 않는다.

[39] 본 발명의 일 구체예에서는, L-라이신의 생산능을 가진 코리네박테리움 글루타미쿰의 여러 균주(KCCM11016P, KFCC10750, KCCM10770P 및 CJ3P)에 서열번호 12 내지 22의 아미노산 서열 중 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 변이형 폴리펩티드를 도입하여 상기 균주의 L-라이신 생산능을 비교한 결과, 상기 변이형 폴리펩티드를 도입한 모든 균주에서 야생형 SigA 폴리펩티드를 포함한 균주보다 더 많은 L-라이신을 생산함을 확인하였다(실시예 7 내지 10 및 표 8 내지 11). 이와 같은 결과는 본 발명의 변이형 폴리펩티드를 포함하는 미생물은 L-라이신의 생산능이 향상된 균주로서, 상기 미생물을 배양함으로써 높은 수율의 L-라이신을 수득할 수 있는 경제적 이점을 시사하는 것이다.

[40] 이에, 본 발명자들은 상기 L-라이신 생산능이 향상된 균주인 KCCM11016P::SigA(L447H)를 코리네박테리움 글루타미쿰 "CA01-2277"이라 명명하였고, 2013년 11월 22일자로 부다페스트 조약 하의 국제기탁기관인 한국미생물보존센터(KCCM)에 기탁하여 수탁번호 KCCM11479P를 부여받았다.

[41]

[42] 본 발명의 또 하나의 양태로서, 본 발명은 기술된 미생물을 배양하는 단계 및 배양된 미생물 또는 배양 배지로부터 L-라이신을 회수하는 단계를 포함하는, L-라이신을 생산하는 방법을 제공한다.

[43] 본 발명에서 용어, "배양"은 상기 미생물을 적당히 인공적으로 조절된 환경조건에서 생육시키는 것을 의미한다. 본 발명의 배양과정은 당업계에 알려진 적당한 배지와 배양조건에 따라 이루어질 수 있다. 구체적인 배양 온도, 배양 시간 및 배지의 pH 등의 조건은 당업자의 일반적인 지식 또는 종래에 공지된 방법에 따라서 수행될 수 있으며, 이에 따라 적절하게 조절될 수 있다. 구체적으로는 이들 공지된 배양 방법은 문헌[Chmiel; Bioprozesstechnik 1. Einführung indie Bioverfahrenstechnik(Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991), 및 Storhas; Bioreaktoren und periphere Einrichtungen(Vieweg Verlag, Braunschweig / Wiesbaden, 1994)]에 상세히 기술되어 있다. 또한, 배양 방법에는 회분식 배양(batch culture), 연속식 배양(cintinuous culture) 및 유가식 배양(fed-batch

culture)이 포함되며, 구체적으로는 배치 공정 또는 주입 배치 또는 반복 주입 배치 공정(fed batch or repeated fed batch process)에서 연속식으로 배양할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[44]

[45] 배양에 사용되는 배지는 적절한 방식으로 특정 균주의 요건을 충족해야 하며, 상기 배지에서 사용될 수 있는 탄소원으로는 글루코즈, 사카로즈, 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 유기산 등이 포함될 수 있다. 이들 물질은 개별적으로 또는 혼합물로서 사용될 수 있으며, 이에 한정되지 않는다. 사용될 수 있는 질소원으로는 펩톤, 효모 추출물, 육즙, 맥아 추출물, 옥수수 침지액, 대두밀 및 요소 또는 무기 화합물, 예를 들면 황산암모늄, 염화암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄 및 질산암모늄 등이 포함될 수 있고, 질소원 또한 개별적으로 또는 혼합물로서 사용할 수 있으며, 이에 한정되지 않는다. 사용될 수 있는 인원으로는 인산이수소칼륨 또는 인산수소이칼륨 또는 상응하는 나트륨-함유 염 등이 포함될 수 있다. 또한, 배양 배지는 성장에 필요한 황산마그네슘 또는 황산철과 같은 금속염을 함유할 수 있다. 마지막으로, 상기 물질에 더하여 아미노산 및 비타민과 같은 필수 성장 물질이 사용될 수 있다. 또한, 배양 배지에 적절한 전구체들이 사용될 수 있다. 상기된 원료들은 배양과정에서 배양물에 적절한 방식에 의해 회분식으로 또는 연속식으로 첨가될 수 있으나 이에 한정되지 않는다.

[46] 또한, 배양 중에 수산화암모늄, 수산화칼륨, 암모니아, 인산 및 황산과 같은 화합물을 배양물에 적절한 방식으로 첨가하여, 배양물의 pH를 조정할 수 있다. 배양 중에는 지방산 폴리클리콜 에스테르와 같은 소포제를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다. 또한 배양물의 호기 상태를 유지하기 위하여, 배양물 내로 산소 또는 산소 함유 기체를 주입하거나 혐기 및 미호기 상태를 유지하기 위해 기체의 주입 없이 혹은 질소, 수소 또는 이산화탄소 가스를 주입할 수 있다. 배양물의 온도는 보통 27°C 내지 37°C, 구체적으로는 30°C 내지 35°C이다. 배양기간은 원하는 유용 물질의 생성량이 수득될 때까지 계속 될 수 있으며, 구체적으로는 10 내지 100시간일 수 있다. L-라이신은 배양 배지 중으로 배출되거나, 미생물 중에 포함되어 있을 수 있다.

[47] 또한, 본 발명의 L-라이신을 생산하는 방법에는 배양된 미생물 또는 배양 배지로부터 L-라이신을 회수하는 방법은 당업계에 널리 알려져 있다. 상기 L-라이신 회수 방법에는, 여과, 음이온 교환 크로마토그래피, 결정화 및 HPLC 등이 사용될 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.

[48]

**발명의 실시를 위한 형태**

[49] 이하, 본 발명을 하기 예에서 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 이들 예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 이들에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[50]

[51] 실시예 1: 인공 돌연변이법을 이용한 SigA 변이형 폴리펩티드 확보

[52] 본 실시예에서는 변이형 SigA를 획득하기 위하여 하기의 방법으로 염색체 내 1차 교차삽입용 벡터 라이브러리를 제작하였다. 코리네박테리움 SigA(서열번호 2)를 암호화하는 *rpoD* 유전자(서열번호 1)를 대상으로 Error-prone PCR 법을 수행하여 염기 치환변이가 무작위적으로 도입된 *rpoD* 유전자 변이체 단편(1497bp)들을 획득하였다. 상기 Error-prone PCR은 GenemorphII Random Mutagenesis Kit (Stratagene)을 사용하여 수행하였으며, 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032 게놈 DNA를 주형으로 프라이머 1(서열번호 3) 및 프라이머 2(서열번호 4)를 사용하였다. 증폭된 유전자 단편 내에 변이가 1kb 당 0 내지 4.5 개가 도입되도록 하였으며, PCR 조건은 변성 96°C, 30초; 어닐링 53°C, 30초; 및 중합반응 72°C, 2분을 30회 반복하였다.

[53] [Table 1]

프라이머 번호	염기 서열	서열번호
1	GTGGAGAGCAGCATGGTAG	3
2	CGCAGAGGAAAACAGTGGC	4

[54] 상기 증폭된 유전자 단편을 pCR2.1-TOPO TA Cloning Kit(Invitrogen)을 이용하여 pCR2.1-TOPO 벡터(이하 'pCR2.1')에 연결하였고, 대장균 DH5α에 형질전환하여 카나마이신(25 mg/l)이 포함된 LB 고체배지에 도말하였다. 형질전환된 콜로니 20종을 선별한 후 플라스미드를 획득하여 염기서열을 분석한 결과, 1.5 mutations/kb 빈도로 서로 다른 위치에 변이가 도입된 것을 확인하였다. 약 20,000 개의 형질전환된 대장균 콜로니를 취하여 플라스미드를 추출하였고, 이를 pCR2.1-rpoD(mt) 라이브러리로 명명하였다.

[55] 이후 대조군으로 사용하기 위한 야생형의 *rpoD* 유전자를 갖는 플라스미드를 제작하였다. 프라이머 1(서열번호 3) 및 프라이머 2(서열번호 4)를 이용하여 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032 게놈 DNA를 주형으로 상기와 같은 조건으로 PCR하였다. 중합효소는 PfuUltra™ 고-신뢰 DNA 폴리머라제(Stratagene)를 사용하였고, 이에 따라 제작된 플라스미드를 pCR2.1-rpoD(WT)으로 명명하였다.

[56]

[57] 실시예 2: L-라이신 생산능이 증가된 SigA 변이주 라이브러리 제작

[58] KCCM11016P(대한민국 등록특허 제10-0159812호) 균주를 모균주로 하여 상기 제작된 pCR2.1-rpoD(mt) 라이브러리를 상동염색체 재조합에 의해 형질전환하고 카나마이신(25 mg/l) 및 하기와 같은 성분이 포함된 복합평판배지에 도말하여 약

25,000개의 콜로니를 확보하였으며, 이를 KCCM11016P/pCR2.1-rpoD(mt)-1 내지 KCCM11016P/pCR2.1-rpoD(mt)-25000으로 명명하였다. 또한, 상기 제작된 pCR2.1-rpoD(WT) 벡터를 KCCM11016P 균주에 형질전환하여 대조군 균주를 제작하였으며, KCCM11016P/pCR2.1-rpoD(WT)으로 명명하였다.

[59] 상기 확보된 형질전환체들은 염색체 상에 2 카피의 *rpoD* 유전자를 보유하게 되나, pCR2.1-rpoD(mt) 라이브러리 및 pCR2.1-rpoD(WT) 벡터는 프로모터가 없는 *rpoD* 유전자 단편이 삽입되어 있기 때문에 균주의 염색체 내로 상동재조합에 의해 삽입될 경우 2 카피의 *rpoD* 유전자들 중 1 카피만이 발현되어 변이형 또는 야생형의 SigA 단백질을 발현시킬 수 있다.

[60]

[61] <복합평판배지 (pH 7.0)>

[62] 포도당 10 g, 펩톤 10 g, Beef extract 5 g, 효모추출물 5 g, Brain Heart Infusion 18.5 g, NaCl 2.5 g, 요소 2 g, Sorbitol 91 g, 한천 20 g (증류수 1 리터 기준)

[63]

[64] 실시예 3: L-라이신 생산능이 증가된 SigA 변이주 라이브러리 스크리닝

[65] 상기 실시예 2에서 확보된 약 25,000개의 콜로니를 각각 하기와 같은 성분이 포함된 300  $\mu$ l의 선별배지에 접종하여 96-deep well plate 에서 32°C, 1000 rpm 으로 약 24시간 동안 배양하였다. 배양 중 생산된 L-라이신의 생산량을 분석하기 위하여 닌하이드린 방법을 이용하였다(J. Biol. Chem. 1948. 176:367-388). 배양이 완료된 후 배양 상층액 10  $\mu$ l 와 닌하이드린 반응용액 190  $\mu$ l(63% 글리세롤, 27% 닌하이드린용액(7.1 g/L in 0.5M citrate buffer pH 5.5))를 65°C에서 30분간 반응시킨 후, 570 nm의 파장에서 spectrophotometer로 흡광도를 측정하고 대조군인 KCCM11016P/pCR2.1-rpoD(WT) 균주의 흡광도와 비교해 10% 이상 증가된 흡광도를 보이는 약 935개의 변이균주 콜로니를 선별하였다. 그 외 콜로니들은 대조구 대비 유사하거나 감소한 흡광도를 나타내었다.

[66]

[67] <선별배지 (pH 8.0)>

[68] 포도당 10 g, 5.5 g ammonium sulfate, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.2 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.8 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 16.4 g, 바이오틴 100  $\mu$ g, 티아민 HCl 1000  $\mu$ g, 칼슘-판토텐산 2000  $\mu$ g, 니코틴아미드 2000  $\mu$ g (증류수 1 리터 기준)

[69]

[70] 상기에서 선별된 935종의 균주를 대상으로 상기의 방법을 반복수행하여 KCCM11016P/pCR2.1-rpoD(WT) 균주 대비 L-라이신 생산능이 15% 이상 향상된 변이균주 중 상위 231종을 선별하였다.

[71]

[72] 실시예 4: KCCM11016P/pCR2.1-rpoD(mt) L-라이신 생산능 분석

[73] 상기 실시예 3에서 선별한 231종의 균주들의 L-라이신 생산능을 다음과 같은 방법으로 배양하여 분석하였다.

- [74] 하기 성분이 포함된 종 배지 25 ml을 함유하는 250 ml 코너-바플 플라스크에 각 균주들을 접종하고, 30°C에서 20 시간 동안, 200 rpm으로 진탕 배양하였다. 이후, 하기 성분이 포함된 생산 배지 24 ml을 함유하는 250 ml 코너-바플 플라스크에 1 ml의 종 배양액을 접종하고 30°C에서 72시간 동안, 200 rpm에서 진탕 배양하였다. HPLC(고성능 액체크로마토그래피)를 이용하여 L-라이신의 농도를 분석하였다.
- [75]
- [76] <종배지 (pH 7.0)>
- [77] 포도당 20 g, 펙톤 10 g, 효모추출물 5 g, 요소 1.5 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8 g, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.5 g, 바이오틴 100 μg, 티아민 HCl 1000 μg, 칼슘-판토텐산 2000 μg, 니코틴아미드 2000 μg (증류수 1 리터 기준)
- [78]
- [79] <생산배지 (pH 7.0)>
- [80] 포도당 100 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 40 g, 대두 단백질 2.5 g, 옥수수 침지 고형분(Corn Steep Solids) 5 g, 요소 3 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g, 바이오틴 100 μg, 티아민 염산염 1000 μg, 칼슘-판토텐산 2000 μg, 니코틴아미드 3000 μg, CaCO<sub>3</sub> 30 g (증류수 1리터 기준).
- [81]
- [82] 상기에서 선별된 231종의 변이균주 중 대조군 대비 L-라이신 농도가 재현성 있게 증가한 17종의 균주를 선별하여 상기 배양 및 분석을 반복수행 하였으며, 분석된 L-라이신의 농도는 하기 표 2와 같다.

[83] [Table 2]

	균주	L-라이신(g/L)			
		배치 1	배치 2	배치 3	평균
대조균	KCCM11016P/pCR2.1-rpoD(WT)	41.5	42.1	41.8	41.8
1	KCCM11016P/pCR2.1-rpoD(mt)-158	45.7	45.2	48.1	46.3
2	KCCM11016P/pCR2.1-rpoD(mt)-1494	44.8	46.2	45.7	45.6
3	KCCM11016P/pCR2.1-rpoD(mt)-1846	46.8	45.9	47.1	46.6
4	KCCM11016P/pCR2.1-rpoD(mt)-2198	49.8	47.8	47.9	48.5
5	KCCM11016P/pCR2.1-rpoD(mt)-2513	45.2	47.3	45.6	46.0
6	KCCM11016P/pCR2.1-rpoD(mt)-3777	45.8	47.6	45.9	46.4
7	KCCM11016P/pCR2.1-rpoD(mt)-4065	50.7	49.8	49.5	50.0
8	KCCM11016P/pCR2.1-rpoD(mt)-5329	44.5	42.5	42.8	43.3
9	KCCM11016P/pCR2.1-rpoD(mt)-6589	41.8	42.3	41.8	42.0
10	KCCM11016P/pCR2.1-rpoD(mt)-9823	47.3	46.8	47.0	47.0
11	KCCM11016P/pCR2.1-rpoD(mt)-1126 7	45.5	45.3	45.1	45.3
12	KCCM11016P/pCR2.1-rpoD(mt)-1330 6	48.5	46.5	46.6	47.2
13	KCCM11016P/pCR2.1-rpoD(mt)-1453 5	48.2	49.3	47.5	48.3
14	KCCM11016P/pCR2.1-rpoD(mt)-1632 3	44.2	44.6	45.8	44.9
15	KCCM11016P/pCR2.1-rpoD(mt)-1793 5	46.5	47.2	44.5	46.1

16	KCCM11016P/pCR2.1-rpoD(mt)-1890 4	42.3	41.5	42.6	42.1
17	KCCM11016P/pCR2.1-rpoD(mt)-1980 3	47.2	45.3	46.3	46.3

[84] 상기 선별된 17종 균주의 L-라이신 농도 분석 결과, 17종의 선별주 중 2종(KCCM11016P/pCR2.1-rpoD(mt)-6589, KCCM11016P/pCR2.1-rpoD(mt)-18904)을 제외한 15종 선별주의 L-라이신 생산능이 대조균 KCCM11016P/pCR2.1-rpoD(WT) 균주 대비 최대 20% 증가함을 확인하였다.

[85]

[86] 실시예 5: SigA 인공돌연변이 라이브러리 선별주의 *rpoD* 유전자 변이 확인

[87] 상기 실시예 4에서 선별된 17종 중 대조균에 비해 L-라이신 생산능이 증가된 15종 균주들의 SigA에 도입된 변이를 확인하기 위하여, *rpoD* 변이체의 염기서열을 분석하였다. 염기서열을 결정하기 위해 프라이머 1(서열번호 3) 및 프라이머 3(서열번호 5)를 사용하여 PCR을 수행하였다.

[88] [Table 3]

프라이머 번호	염기 서열	서열번호
1	GTGGAGAGCAGCATGGTAG	3
3	AACAGCTATGACCATG	5

[89] 확보된 15종 균주 각각의 변이형 *rpoD* 유전자 단편들의 염기서열 분석을 통하여 미국 국립 보건원 유전자 은행(NIH GenBank)을 근거로 변이형 *rpoD* 유전자의 염기서열을 확인하였으며, 변이형 SigA의 아미노산 서열을 확인하였다. 선별된 15종 균주의 변이형 SigA 아미노산 서열 분석 결과는 하기 표 4와 같다.

[90] [Table 4]

균주	SigA 아미노산 변이
KCCM11016P/pCR2.1-rpoD(mt)-158	D136G, T281S
KCCM11016P/pCR2.1-rpoD(mt)-1494	L381R
KCCM11016P/pCR2.1-rpoD(mt)-1846	M230T
KCCM11016P/pCR2.1-rpoD(mt)-2198	M455V
KCCM11016P/pCR2.1-rpoD(mt)-2513	S488T
KCCM11016P/pCR2.1-rpoD(mt)-3777	R279L
KCCM11016P/pCR2.1-rpoD(mt)-4065	L447H
KCCM11016P/pCR2.1-rpoD(mt)-5329	A268S
KCCM11016P/pCR2.1-rpoD(mt)-9823	L451I, Q491R
KCCM11016P/pCR2.1-rpoD(mt)-11267	Q429R
KCCM11016P/pCR2.1-rpoD(mt)-13306	K90E, K105Y, D250G, I254L
KCCM11016P/pCR2.1-rpoD(mt)-14535	I254N
KCCM11016P/pCR2.1-rpoD(mt)-16323	K483R
KCCM11016P/pCR2.1-rpoD(mt)-17935	K479R
KCCM11016P/pCR2.1-rpoD(mt)-19803	D238V, N263S, E358D

[91] 그 결과, 적게는 1개의 아미노산부터 많게는 4개의 아미노산이 치환되었음을 확인하였다. 상기 표 4의 표기에서 숫자는 SigA의 아미노산 번호를 의미하고, 숫자 앞의 알파벳은 치환 전의 아미노산을, 숫자 뒤의 알파벳은 치환된 아미노산을 의미한다.

[92]

[93] 실시예 6: 고농도 L-라이신 생산주를 위한 *rpoD* 변이 염색체 도입용 벡터 제작

[94] 상기 실시예 4에서 확인된 SigA 변이 적용 효과를 확인하기 위하여 이를 염색체상에 도입할 수 있는 벡터를 제작하였다.

[95] 보고된 염기서열에 근거하여 5' 말단에 EcoRI 제한효소 부위를 삽입한 프라이머 4(서열번호 6)와 3' 말단에 SalI 제한효소 부위를 삽입한 프라이머 5(서열번호 7)를 합성하였다. 이 프라이머 쌍을 이용하여, 상기 선별된 15종의 염색체를 각각 주형으로 PCR을 수행하여 15종의 변이형 *rpoD*(mt) 유전자 단편을 증폭하였다. PCR 조건은 94 °C에서 5분간 변성 후, 94 °C 30초 변성, 56 °C 30초 어닐링, 72 °C 2분 중합을 30회 반복한 후, 72 °C에서 7분간 중합반응을 수행하였다.

[96] [Table 5]

프라이머 번호	염기 서열	서열번호
4	AAGAATTCGTGGAGAGCAGCATGGTAG	6
5	AAGTCGACCGCAGAGGAAAACAGTGGC	7

[97] PCR로 증폭된 15종의 유전자 단편을 제한효소 EcoRI과 SalI으로 처리하여 각각의 DNA 절편을 획득한 후, 이를 제한효소 EcoRI 및 SalI말단을 가지는 염색체 도입용 pDZ 벡터(대한민국 등록특허 제10-0924065호)에 연결한 후 대장균 DH5 $\alpha$ 에 형질전환하고 카나마이신(25mg/l)이 포함된 LB 고체배지에 도말하였다. PCR을 통해 목적인 유전자가 삽입된 벡터로 형질전환된 콜로니를 선별한 후 통상적으로 알려진 플라스미드 추출법을 이용하여 플라스미드를 획득하였고 이 플라스미드의 SigA에 삽입된 변이에 따라 각각 pDZ-SigA(D136G, T281S), pDZ-SigA(L381R), pDZ-SigA(M230T), pDZ-SigA(M455V), pDZ-SigA(S488T), pDZ-SigA(R279L), pDZ-SigA(I254N), pDZ-SigA(A268S), pDZ-SigA(L451I, Q491R), pDZ-SigA(Q429R), pDZ-SigA(K90E, K105Y, D250G, I254L), pDZ-SigA(L447H), pDZ-SigA(K483R), pDZ-SigA(K479R), pDZ-SigA(D238V, N263S, E358D)으로 명명하였다. 또한 상기 변이체들에 대한 또다른 대조군으로써, L-라이신 생산성 증가에 효과가 있다고 기 보고된(국제공개특허 제WO2003-054179호) SigA 변이 A414V를 염색체상에 삽입하기 위한 벡터를 제작하기 위해 프라이머 6 내지 9(서열번호 8 내지 11)를 제작하였다. 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032 계놈 DNA를 주형으로 하여 프라이머 6 및 프라이머 9 쌍과 프라이머 7 및 프라이머 8 쌍으로 각각 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 94 °C에서 5분간 변성 후, 94 °C 30초 변성, 56 °C 30초 어닐링, 72 °C 1분 중합을 30회 반복한 후, 72 °C에서 7분간 중합반응을 수행하였다.

[98] [Table 6]

프라이머 번호	염기 서열	서열번호
6	GCAGGTCGACTCTAGACTCACCCCAGC CGTCAAGCGT	8
7	CCGGGGATCCTCTAGATCAAGGCGATG TCGAAAATG	9
8	AAGACTCCGAAGTCGTCGTCGAGT	10
9	ACTGCGACGACGACTTCGGAGTCTT	11

[99] 그 결과, 약 500bp 유전자 단편 2개를 획득하였으며, 증폭된 산물은 Infusion

cloning kit(Invitrogen)을 사용하여 pDZ벡터에 접합하였고 제작된 벡터를 pDZ-SigA(A414V)으로 명명하였다.

[100]

[101] 실시예 7: 고농도 L-라이신 생산주를 위하여 SigA 변이형 폴리펩티드가 도입된 KCCM11016P 균주 제작 및 L-라이신 생산능 비교

[102] 상기 실시예 6에서 제조한 신규변이 도입 벡터 15종 및 기 보고변이 도입 벡터 1종을 2단계 상동염색체 재조합에 의해 L-라이신 생산균주인 코리네박테리움 글루타미쿰 KCCM11016P에 형질전환시켰다. 그 후 염색체 상의 SigA 변이가 도입된 균주를 염기서열 분석에 의하여 선별하였으며, 상기 SigA 변이가 도입된 균주를 KCCM11016P::SigA(D136G, T281S), KCCM11016P::SigA(L381R), KCCM11016P::SigA(M230T), KCCM11016P::SigA(M455V), KCCM11016P::SigA(S488T), KCCM11016P::SigA(R279L), KCCM11016P::SigA(I254N), KCCM11016P::SigA(A268S), KCCM11016P::SigA(L451I, Q491R), KCCM11016P::SigA(Q429R), KCCM11016P::SigA(K90E, K105Y, D250G, I254L), KCCM11016P::SigA(L447H), KCCM11016P::SigA(K483R), KCCM11016P::SigA(K479R), KCCM11016P::SigA(D238V, N263S, E358D), KCCM11016P::SigA(A414V)으로 명명하였다.

[103] 상기 실시예 4과 동일한 방법으로 배양하여, 이로부터 L-라이신의 농도를 분석하였고, 그 결과는 하기 표 7과 같다.

[104] [Table 7]

	균주	L-라이신(g/L)			
		배치 1	배치 2	배치 3	평균
대조 균	KCCM11016P	42.8	41.6	43.1	42.5
1	KCCM11016P::SigA(D136G, T281S)	46.2	45.8	45.2	45.7
2	KCCM11016P::SigA(L381R)	45.2	45.8	46.7	45.9
3	KCCM11016P::SigA(M230T)	41.8	42.1	41.9	41.9
4	KCCM11016P::SigA(M455V)	50.1	48.1	49.2	49.1
5	KCCM11016P::SigA(S488T),	45.1	44.9	45.8	45.3
6	KCCM11016P::SigA(R279L)	42.5	43.2	40.9	42.2
7	<b>KCCM11016P::SigA(L447H)</b>	<b>51.2</b>	<b>49.9</b>	<b>50.8</b>	<b>50.6</b>
8	KCCM11016P::SigA(A268S)	43.2	44.1	45.5	44.3
9	KCCM11016P::SigA(L451I, Q491R)	47.5	47.1	49.8	48.1
10	KCCM11016P::SigA(Q429R)	44.9	45.2	45.1	45.1
11	KCCM11016P::SigA(K90E, K105Y, D250G, I254L)	31.5	28.6	40.5	33.5
12	KCCM11016P::SigA (I254N)	49.1	48.5	47.8	48.5
13	KCCM11016P::SigA(K483R)	45.1	44.1	45.6	44.9
14	KCCM11016P::SigA(K479R)	44.7	45.6	45.8	45.4
15	KCCM11016P::SigA(D238V,N263S,E3 58D)	21.5	22.9	19.2	21.2
대조 균	KCCM11016P::SigA(A414V)	43.2	44	43.5	43.6

[105] 그 결과, 2종의 신규 변이 도입주(KCCM11016P::SigA(M230T), KCCM11016P::SigA(R279L))는 모균주 대비 동등한 L-라이신 생산능을 나타내었으며, 다른 2종의 신규 변이 도입주(KCCM11016P::SigA(K90E, K105Y, D250G, I254L), KCCM11016P::SigA(D238V, N263S, E358D))는 성장속도가 현저히 느려지고 L-라이신 생산량이 크게 감소하였다. 그러나 나머지 신규 변이주 11종은 모균주 대비 L-라이신 생산능이 최대 19% 증가하였으며, 기 보고변이(SigA(A414V)) 도입주 KCCM11016P::SigA(A414V)에 비해서도 L-라이신 생산능이 16% 증가된 것을 확인하였다. 이에, 본 발명자들은 상기 L-라이신 생산능이 향상된 균주인 KCCM11016P::SigA(L447H)를

코리네박테리움 글루타미쿰 "CA01-2277"이라 명명하였고, 2013년 11월 22일자로 부다페스트 조약 하의 국제기탁기관인 한국미생물보존센터(KCCM)에 기탁하여 수탁번호 KCCM11479P 를 부여받았다.

- [106] 이와 같은 결과는 신규한 11종의 SigA 변이형 폴리펩티드가 L-라이신 생산능이 우수함을 시사하는 것이다.
- [107]
- [108] 실시예 8: 고농도 L-라이신 생산주를 위하여 SigA 변이형 폴리펩티드가 도입된 KFCC10750 균주 제작 및 L-라이신 생산능 비교
- [109] 코리네박테리움 글루타미쿰에 속하는 다른 균주들에서 상기 실시예 7에서 선별된 SigA 변이 11종의 도입효과를 확인하기 위해, 상기 실시예 7과 같은 방법으로 L-라이신 생산균주인 코리네박테리움 글루타미쿰 KFCC10750(KCCM11347P, 대한민국등록특허 제10-0073610호) 11종의 SigA 변이가 각각 도입된 균주들을 제작하고 KFCC10750::SigA(D136G, T281S), KFCC10750::SigA(L381R), KFCC10750::SigA(M455V), KFCC10750::SigA(S488T), KFCC10750::SigA(I254N), KFCC10750::SigA(A268S), KFCC10750::SigA(L451I, Q491R), KFCC10750::SigA(Q429R), KFCC10750::SigA(L447H), KFCC10750::SigA(K483R), KFCC10750::SigA(K479R)으로 명명하였다. 또한, 기보고 된 변이 SigA(A414V)를 도입한 균주도 제작하였으며, 이를 KFCC10750::SigA(A414V)으로 명명하였다.
- [110] 상기 실시예 4과 동일한 방법으로 배양하여, 이로부터 L-라이신의 농도를 분석하였고, 그 결과는 하기 표 8과 같다.

[111] [Table 8]

	균주	L-라이신(g/L)			
		배치 1	배치 2	배치 3	평균
대조군	KFCC10750	38.8	38.1	37.9	38.3
1	KFCC10750::SigA(D136G, T281S)	41.1	41.2	40.9	41.1
2	KFCC10750::SigA(L381R)	42.1	41.8	41.1	41.7
3	KFCC10750::SigA(M455V)	43.2	43.8	44.2	43.7
4	KFCC10750::SigA(S488T)	42.1	40.8	41.9	41.6
5	KFCC10750::SigA (L447H)	44.5	45.1	44.9	44.8
6	KFCC10750::SigA(A268S)	39.9	41.1	39.7	40.2
7	KFCC10750::SigA(L451I, Q491R)	42.9	44.1	43.8	43.6
8	KFCC10750::SigA(Q429R)	40.2	41.2	42.1	41.2
9	KFCC10750::SigA(I254N)	44.9	44.5	43.8	44.4
10	KFCC10750::SigA(K483R)	40.5	41	40.9	40.8
11	KFCC10750::SigA(K479R)	39.9	41.5	41.1	40.8
대조군	KFCC10750::SigA(A414V)	39.6	39.1	39.5	39.4

[112] 그 결과, 신규 변이 도입주 11종은 모균주 대비 L-라이신 생산능이 최대 17% 증가하였으며, 기 보고변이(SigAA414V) 도입주 KFCC10750::SigA(A414V)에 비해서도 L-라이신 생산능이 약 14% 증가된 것을 확인하였다.

[113]

[114] 실시예 9: 고농도 L-라이신 생산주를 위하여 SigA 변이형 폴리펩티드가 도입된 KCCM10770P 균주 제작 및 L-라이신 생산능 비교

[115] 코리네박테리움 글루타미쿰에 속하는 다른 균주들에서 상기 실시예 7에서 선별된 SigA 변이 11종의 효과를 확인하기 위해 상기 실시예 7와 같은 방법으로 L-라이신 생산균주인 코리네박테리움 글루타미쿰 KCCM10770P(대한민국등록특허 제10-0924065호)에 SigA 변이가 도입된 균주를 제작하고 KCCM10770P::SigA(D136G, T281S), KCCM10770P::SigA(L381R), KCCM10770P::SigA(M455V), KCCM10770P::SigA(S488T), KCCM10770P::SigA(I254N), KCCM10770P::SigA(A268S), KCCM10770P::SigA(L451I, Q491R), KCCM10770P::SigA(Q429R), KCCM10770P::SigA(L447H), KCCM10770P::SigA(K483R), KCCM10770P::SigA(K479R)으로 명명하였다. 또한, 기보고된 변이

SigA(A414V)를 도입한 균주도 제작하였으며, KCCM10770P::SigA(A414V)으로 명명하였다.

[116] 상기 실시예 4과 동일한 방법으로 배양하여, 이로부터 L-라이신의 농도를 분석하였고, 그 결과는 하기 표 9와 같다.

[117] [Table 9]

	균주	L-라이신(g/L)			
		배치 1	배치 2	배치 3	평균
대조균	KCCM10770P	47.5	48.1	47.9	47.8
1	KCCM10770P::SigA(D136G, T281S)	51.1	51.6	52.1	51.6
2	KCCM10770P::SigA(L381R)	52.6	50.9	52.1	51.9
3	KCCM10770P::SigA(M455V)	55.1	54.3	54.8	54.7
4	KCCM10770P::SigA(S488T)	52.1	52.4	51.9	52.1
5	KCCM10770P::SigA(L447H)	56.9	57.6	57.1	57.2
6	KCCM10770P::SigA(A268S)	50.5	50.1	49.9	50.2
7	KCCM10770P::SigA(L451I, Q491R)	55.3	54.9	54.1	54.8
8	KCCM10770P::SigA(Q429R)	52.4	52.3	50.9	51.9
9	KCCM10770P::SigA(I254N)	55.9	55.4	54.1	55.1
10	KCCM10770P::SigA(K483R)	51.9	51.3	51.5	51.6
11	KCCM10770P::SigA(K479R)	51	51.7	52.1	51.6
대조균	KCCM10770P::SigA(A414V)	48.9	49.5	50.1	49.5

[118] 그 결과, 신규 변이 도입주 11종은 모균주 대비 L-라이신 생산능이 최대 20% 증가하였으며, 기 보고변이(SigAA414V) 도입주 KCCM10770P::SigA(A414V)에 비해서도 L-라이신 생산능이 약 16% 증가된 것을 확인하였다.

[119]

[120] 실시예 10: 고농도 L-라이신 생산주를 위하여 SigA 변이형 폴리펩티드가 도입된 CJ3P 균주 제작 및 L-라이신 생산능 비교

[121] 코리네박테리움 글루타미쿰에 속하는 다른 균주들에서의 효과도 확인하기 위해 상기 실시예 7와 같은 방법으로 L-라이신 생산균주인 코리네박테리움 글루타미쿰 CJ3P(Binder et al. Genome Biology 2012, 13:R40)에 SigA 변이가 도입된 균주를 제작하고 CJ3P::SigA(D136G, T281S), CJ3P::SigA(L381R), CJ3P::SigA(M455V), CJ3P::SigA(S488T), CJ3P::SigA(I254N), CJ3P::SigA(A268S), CJ3P::SigA(L451I, Q491R), CJ3P::SigA(Q429R), CJ3P::SigA(L447H),

CJ3P::SigA(K483R), CJ3P::SigA(K479R)으로 명명하였다. 또한, 기보고된 변이 SigA(A414V)를 도입한 균주도 제작하였으며, CJ3P::SigA(A414V)으로 명명하였다. CJ3P 균주는 공지된 기술을 바탕으로 야생주에 3종의 변이를 도입하여 L-라이신 생산능을 갖게된 코리네박테리움 글루타미쿰 균주이다.

[122] 상기 실시예 4과 동일한 방법으로 배양하여, 이로부터 L-라이신의 농도를 분석하였고, 그 결과는 하기 표 10과 같다.

[123] [Table 10]

	균주	L-라이신(g/L)			
		배치 1	배치 2	배치 3	평균
대조균	CJ3P	8.2	8.3	8.0	8.2
1	CJ3P::SigA(D136G, T281S)	9.0	8.8	8.9	8.9
2	CJ3P::SigA(L381R)	8.7	8.9	8.5	8.7
3	CJ3P::SigA(M455V)	9.3	9.5	9.1	9.3
4	CJ3P::SigA(S488T)	9.0	9.1	8.8	9.0
5	CJ3P::SigA(L447H)	9.8	10.1	9.5	9.8
6	CJ3P::SigA(A268S)	8.5	8.7	8.9	8.7
7	CJ3P::SigA(L451I, Q491R)	9.1	9.0	8.8	9.0
8	CJ3P::SigA(Q429R)	8.9	8.8	9.0	8.9
9	CJ3P::SigA (I254N)	9.1	9.7	9.5	9.4
10	CJ3P::SigA(K483R)	8.8	9.1	8.5	8.8
11	CJ3P::SigA(K479R)	8.6	8.9	8.8	8.8
대조균	CJ3P::SigA(A414V)	8.5	8.4	8.6	8.5

[124] 그 결과, 신규 변이 도입주 11종은 모균주 대비 L-라이신 생산능이 최대 20% 증가하였으며 기보고변이(SigAA414V) 도입주 CJ3P::SigA(A414V)에 비해서도 L-라이신 생산능이 약 15% 증가된 것을 확인하였다.

[125]

[126] 상기 결과를 종합해보건대, 본 발명에서 신규 확보된 11종의 SigA 활성을 갖는 변이형 폴리펩티드(SigA(D136G, T281S), SigA(L381R), SigA(M455V), SigA(S488T), SigA(I254N), SigA(A268S), SigA(L451I, Q491R), SigA(Q429R), SigA(L447H), SigA(K483R), SigA(K479R))들이 다양한 코리네박테리움 속 미생물에서 각각 L-라이신 생산능 증가에 우수한 효과가 있고, 이는 기 보고된 변이 SigA(A414V)보다 L-라이신 생산능 증대 효과가 뛰어난 것을 시사하는 것이다.

[127]

[128] 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 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며, 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구범위의 의미 및 범위, 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

[129]

[130]

## 국 제 양 식

특허출원을 위한 부다페스트 국제 조약 하의 미생물 수탁 증명

국제기탁기관에 의해 규칙 7.1에 따라 발행된 원기탁에 대한 수탁증

수신: 씨제이제일제당 주식회사,  
대한민국 서울시 중구 동호로 330 CJ 제일제당 센터  
(우편번호 100-400)

<b>I. 미생물의 표시</b>	
기탁자가 첨부한 미생물 식별에 대한 표시: <i>Corynebacterium glutamicum</i> CA01-2277	국제 기탁기관이 부여한 수탁번호: KCCM11479P
<b>II. 과학적 성질의 설명 및/또는 분류학상의 위치</b>	
항목 I에 표시된 미생물에 대하여 다음 사항이 포함되어 있다: <input type="checkbox"/> 과학적 성질의 설명 <input type="checkbox"/> 제안된 분류학상의 위치 (적용시 <input checked="" type="checkbox"/> 표시)	
<b>III. 기탁 및 수탁</b>	
본 국제기탁기관은 2013년 11월 22일에 기탁된 항목 I에 표시된 미생물을 수탁하였다.	
<b>IV. 국제기탁기관</b>	
명칭: 한국미생물보존센터 주소: 대한민국 서울시 서대문구 홍제내 2가길 45 유럽빌딩 (우편번호 120-861)	국제기탁기관을 대표하는 권한을 가진 자 또는 권한을 부여받은 공무원 서명:  서명일: 2013. 11. 22.

상기 번역은 원문의 내용과 상위 없음을 증명함.

2014 년 9 월 5 일

변리사 손민



## 청구범위

- [청구항 1] 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드에서 하기 위치의 아미노산 중 1 이상의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, RNA 중합효소 시그마인자 A 활성을 가지는 변이형 폴리펩티드;  
시작 메치오닌을 1번째 아미노산으로 하여 이로부터 136번째 아미노산; 254번째 아미노산; 268번째 아미노산; 281번째 아미노산; 381번째 아미노산; 429번째 아미노산; 및 445번째 내지 495번째 아미노산.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 아미노산 치환은 136번째 아미노산; 254번째 아미노산; 268번째 아미노산; 281번째 아미노산; 381번째 아미노산; 429번째 아미노산; 447번째 아미노산; 451번째 아미노산; 455번째 아미노산; 479번째 아미노산; 483번째 아미노산; 488번째 아미노산; 및 491번째 아미노산으로 이루어진 아미노산 중 1종 이상의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 변이형 폴리펩티드.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 하기의 아미노산 치환 중 1종 이상이 조합된 것인 변이형 폴리펩티드;  
136번째 아미노산이 글리신으로 치환; 254번째 아미노산이 아스파라진으로 치환; 268번째 아미노산이 세린으로 치환; 281번째 아미노산이 세린으로 치환; 381번째 아미노산 알지닌으로 치환; 429번째 아미노산이 알지닌으로 치환; 447번째 아미노산이 히스티딘으로 치환; 451번째 아미노산이 이소류신으로 치환; 455번째 아미노산이 발린으로 치환; 479번째 아미노산이 알지닌으로 치환; 483번째 아미노산이 알지닌으로 치환; 488번째 아미노산이 쓰레오닌으로 치환; 및 491번째 아미노산이 알지닌으로 치환.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 변이형 폴리펩티드는 서열번호 12 내지 22의 아미노산 서열 중 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 것인 변이형 폴리펩티드.
- [청구항 5] 제1항의 변이형 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 6] 제5항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주 세포.
- [청구항 7] 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드에서 하기 위치의 아미노산 중 1 이상의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, RNA 중합효소 시그마인자 A 활성을 가지는 변이형 폴리펩티드를 포함하도록 형질전환된 L-라이신 생산능이 향상된 코리네 박테리움속 미생물;

시작 메치오닌을 1번째 아미노산으로 하여 이로부터 136번째 아미노산; 254번째 아미노산; 268번째 아미노산; 281번째 아미노산; 381번째 아미노산; 429번째 아미노산; 및 445번째 내지 495번째 아미노산.

[청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 아미노산 치환은 136번째 아미노산; 254번째 아미노산; 268번째 아미노산; 281번째 아미노산; 381번째 아미노산; 429번째 아미노산; 447번째 아미노산; 451번째 아미노산; 455번째 아미노산; 479번째 아미노산; 483번째 아미노산; 488번째 아미노산; 및 491번째 아미노산으로 이루어진 아미노산 중 1종 이상의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 L-라이신 생산능이 향상된 코리네 박테리움속 미생물.

[청구항 9] 제7항에 있어서, 하기의 아미노산 치환 중 1종 이상이 조합된 것인 L-라이신 생산능이 향상된 코리네 박테리움속 미생물;  
136번째 아미노산이 글리신으로 치환; 254번째 아미노산이 아스파라진으로 치환; 268번째 아미노산이 세린으로 치환; 281번째 아미노산이 세린으로 치환; 381번째 아미노산 알지닌으로 치환; 429번째 아미노산이 알지닌으로 치환; 447번째 아미노산이 히스티딘으로 치환; 451번째 아미노산이 이소류신으로 치환; 455번째 아미노산이 발린으로 치환; 479번째 아미노산이 알지닌으로 치환; 483번째 아미노산이 알지닌으로 치환; 488번째 아미노산이 쓰레오닌으로 치환; 및 491번째 아미노산이 알지닌으로 치환.

[청구항 10] 제7항에 있어서, 상기 미생물은 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)인 L-라이신 생산능이 향상된 코리네 박테리움속 미생물.

[청구항 11] 제7항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 미생물을 배양하는 단계; 및 상기 배양된 미생물 또는 배양 배지로부터 L-라이신을 회수하는 단계를 포함하는, L-라이신을 생산하는 방법.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/KR2015/009353**

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

*C12N 9/12(2006.01)i, C12N 15/54(2006.01)i, C12R 1/15(2006.01)n, C12P 13/08(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 9/12; C12P 21/00; C12P 13/22; C07H 21/00; C12N 1/21; C12N 15/31; C12N 15/54; C12R 1/15; C12P 13/08

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: RNA polymerase sigma factor A, substitution, corynebacterium, lysine

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 03-054179 A1 (DEGUSSA AG.) 03 July 2003 See abstract; claims 1-11; and pages 7-8.	1-11
A	US 2011-0300588 A1 (SANTOS, Christine et al.) 08 December 2011 See abstract; and claims 1-4, 7, 10.	1-11
A	US 2009-0170154 A1 (ENDO, Keiji et al.) 02 July 2009 See the entire document.	1-11
A	NCBI, NCBI reference sequence no. WP_011014748.1 (15 May 2013) See the entire sequence.	1-11
A	OGUIZA, JOSE A. et al., "Multiple sigma factor genes in Brevibacterium lactofermentum: characterization of sigA and sigB", Journal of Bacteriology, 1996, vol. 178, no. 2, pages 550-553 See the entire document.	1-11

 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

"I" 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

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 DECEMBER 2015 (28.12.2015)

Date of mailing of the international search report

**29 DECEMBER 2015 (29.12.2015)**

Name and mailing address of the ISA/KR



Korean Intellectual Property Office  
 Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,  
 Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

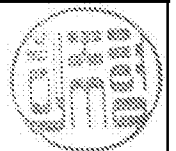
**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

**PCT/KR2015/009353**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 03-054179 A1	03/07/2003	AU 2002-337163 A1	09/07/2003
		CN 1606617 A	13/04/2005
		DE 10162729 A1	03/07/2003
		DE 60218215 D1	29/03/2007
		DE 60218215 T2	31/10/2007
		EP 1456363 A1	15/09/2004
		EP 1456363 B1	14/02/2007
		US 2005-0043526 A1	24/02/2005
		US 7524657 B2	28/04/2009
		US 2011-0300588 A1	08/12/2011
WO 2011-140342 A1	10/11/2011		
US 2009-0170154 A1	02/07/2009	CN 1930289 A	14/03/2007
		CN 1930289 B	05/09/2012
		DE 602005021757 D1	22/07/2010
		DK 1721973 T3	13/09/2010
		EP 1721973 A1	15/11/2006
		EP 1721973 A4	18/07/2007
		EP 1721973 B1	09/06/2010
		JP 2005-278645 A	13/10/2005
		JP 4820101 B2	24/11/2011
		US 7855065 B2	21/12/2010
		WO 2005-085437 A1	15/09/2005

<b>A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))</b> C12N 9/12(2006.01)i, C12N 15/54(2006.01)i, C12R 1/15(2006.01)n, C12P 13/08(2006.01)i		
<b>B. 조사된 분야</b> 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 9/12; C12P 21/00; C12P 13/22; C07H 21/00; C12N 1/21; C12N 15/31; C12N 15/54; C12R 1/15; C12P 13/08 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: RNA 중합효소 시그마인자 A, 치환, 코리네박테리움, 라이신		
<b>C. 관련 문헌</b>		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	WO 03-054179 A1 (DEGUSSA AG) 2003.07.03 요약; 청구항 1-11; 및 페이지 7-8 참조.	1-11
A	US 2011-0300588 A1 (SANTOS, CHRISTINE 등) 2011.12.08 요약; 및 청구항 1-4, 7, 10 참조.	1-11
A	US 2009-0170154 A1 (ENDO, KEIJI 등) 2009.07.02 전체 문헌 참조.	1-11
A	NCBI, NCBI reference sequence no. WP_011014748.1 (2013.05.15) 전체 서열 참조.	1-11
A	OGUIZA, JOSE A. 등, 'Multiple sigma factor genes in Brevibacterium lactofermentum: characterization of sigA and sigB', Journal of Bacteriology, 1996, 178권, 2호, 페이지 550-553 전체 문헌 참조.	1-11
<input type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 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 2015년 12월 28일 (28.12.2015)		국제조사보고서 발송일 2015년 12월 29일 (29.12.2015)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-472-7140		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-8150



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 03-054179 A1	2003/07/03	AU 2002-337163 A1 CN 1606617 A DE 10162729 A1 DE 60218215 D1 DE 60218215 T2 EP 1456363 A1 EP 1456363 B1 US 2005-0043526 A1 US 7524657 B2	2003/07/09 2005/04/13 2003/07/03 2007/03/29 2007/10/31 2004/09/15 2007/02/14 2005/02/24 2009/04/28
US 2011-0300588 A1	2011/12/08	US 8735132 B2 WO 2011-140342 A1	2014/05/27 2011/11/10
US 2009-0170154 A1	2009/07/02	CN 1930289 A CN 1930289 B DE 602005021757 D1 DK 1721973 T3 EP 1721973 A1 EP 1721973 A4 EP 1721973 B1 JP 2005-278645 A JP 4820101 B2 US 7855065 B2 WO 2005-085437 A1	2007/03/14 2012/09/05 2010/07/22 2010/09/13 2006/11/15 2007/07/18 2010/06/09 2005/10/13 2011/11/24 2010/12/21 2005/09/15