(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2022 년 9 월 15 일 (15.09.2022)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2022/191358 A1

(51) 국제특허분류:
C12N 15/77 (2006.01) *C12P 13/08* (2006.01)
C12N 9/88 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2021/005509

(22) 국제출원일: 2021 년 4 월 30 일 (30.04.2021)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2021-0030960 2021 년 3 월 9 일 (09.03.2021) KR
10-2021-0054313 2021 년 4 월 27 일 (27.04.2021) KR

(71) 출원인: 대상 주식회사 (**DAESANG CORPORATION**) [KR/KR]; 02586 서울시 동대문구 천호대로 26, Seoul (KR).

(72) 발명자: **유미 (RYU, Mi)**; 17384 경기도 이천시 마장면 중부대로 697, Gyeonggi-do (KR). **문민우 (MOON, Min Woo)**; 34150 대전시 유성구 갑동로25번길 78, 102동 402호., Daejeon (KR). **홍인표 (HONG, In Pyo)**; 17384 경기도 이천시 마장면 중부대로 697, Gyeonggi-do (KR). **박석현 (PARK, Seok Hyun)**; 12258 경기도 남양주시 경춘로 468-40, 108동 904호, Gyeonggi-do (KR). **박준현 (PARK, Joon Hyun)**; 13523 경기도 성남시 분당구 탄천로 95 408동 604호, Gyeonggi-do (KR).

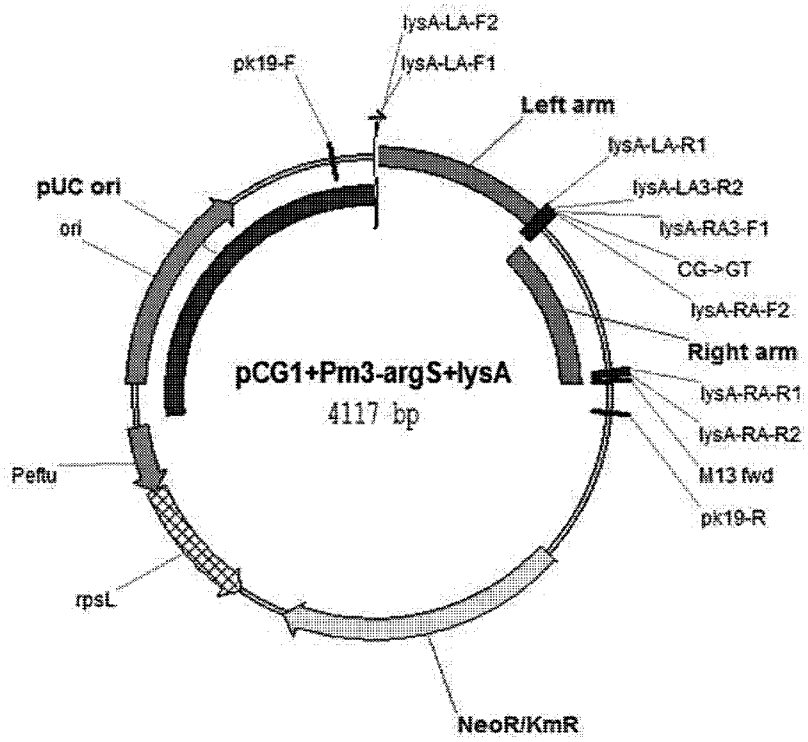
(74) 대리인: **박혁 (PARK, Hyuk)**; 06158 서울시 강남구 테헤란로 441, 10층, Seoul (KR).

(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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, 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,

WO 2022/191358 A1

(54) **Title:** CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM VARIANT HAVING IMPROVED L-LYSINE PRODUCTION ABILITY, AND METHOD FOR PRODUCING L-LYSINE BY USING SAME

(54) **발명의 명칭:** L-라이신 생산능이 향상된 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주 및 이를 이용한 L-라이신의 생산 방법



(57) **Abstract:** The present invention relates to a Corynebacterium glutamicum variant having an improved L-lysine production ability, and a method for producing L-lysine by using same. The Corynebacterium glutamicum variant increases or enhances the expression of a gene encoding diaminopimelate decarboxylase, and thus can have a L-lysine production yield superior to that of a parental strain.

(57) **요약서:** 본 발명은 L-라이신 생산능이 향상된 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주 및 이를 이용한 L-라이신의 생산 방법에 관한 것으로, 상기 변이주는 디아미노피멜레이트 디카르복실라제를 암호화하는 유전자의 발현을 증가 또는 강화시킴으로써 모균주에 비해 L-라이신의 생산 수율을 향상시킬 수 있다.

[다음 쪽 계속]

SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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 제21조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: L-라이신 생산능이 향상된 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주 및 이를 이용한 L-라이신의 생산 방법

기술분야

[1] 본 발명은 L-라이신 생산능이 향상된 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주 및 이를 이용한 L-라이신의 생산 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

[3] L-라이신은 사람이나 동물 체내에서 합성되지 않는 필수아미노산으로서 외부에서 공급되어야 하며, 일반적으로 세균이나 효모와 같은 미생물을 이용한 발효에 의해 생산된다. L-라이신 생산은 자연상태에서 수득된 야생형 균주나 이의 L-라이신 생산능이 향상되도록 변형된 변이주를 이용할 수 있다. 최근에는 L-라이신의 생산 효율을 개선시키기 위해 L-아미노산 및 기타 유용물질 생산에 많이 이용되는 대장균, 코리네박테리움 등의 미생물을 대상으로 유전자 재조합 기술을 적용하여 우수한 L-라이신 생산능을 갖는 다양한 재조합 균주 또는 변이주 및 이를 이용한 L-라이신 생산 방법이 개발되고 있다.

[4] 한국등록특허 제10-0838038호 및 제10-2139806호에 따르면, L-라이신 생산과 관련된 효소를 포함한 단백질을 암호화하는 유전자의 염기서열 또는 아미노산 서열을 변경하여 그 유전자의 발현을 증가시키거나 불필요한 유전자를 제거함으로써 L-라이신 생산능을 향상시킬 수 있다. 또한, 한국공개특허 제10-2020-0026881호에는 L-라이신 생산에 관여하는 효소를 암호화하는 유전자의 발현을 증가시키기 위하여 유전자의 기존 프로모터를 강한 활성을 가지는 프로모터로 변경하는 방법을 개시하고 있다.

[5] 이와 같이 L-라이신 생산능을 증가시키는 다양한 방법이 개발되고 있으나, L-라이신 생산에 직간접적으로 연관된 효소, 전사인자, 수송 단백질 등 단백질의 종류가 수십여 종에 이르기 때문에 이러한 단백질의 활성 변화에 따른 L-라이신 생산능 증가 여부에 관해 여전히 많은 연구가 필요한 실정이다.

[6] [선행기술문헌]

[7] [특허문헌]

[8] 한국등록특허 제10-0838038호

[9] 한국등록특허 제10-2139806호

[10] 한국공개특허 제10-2020-0026881호

[11]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[12] 본 발명은 L-라이신 생산능이 향상된 코리네박테리움 글루타미쿰(

Corynebacterium glutamicum) 변이주를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[13] 또한, 본 발명은 상기 변이주를 이용한 L-라이신의 생산 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[14]

기술적 해결방법

[15] 본 발명자들은 코리네박테리움 글루타미쿰 균주를 이용하여 L-라이신 생산능이 향상된 새로운 변이주를 개발하기 위해 연구한 결과, L-라이신 생합성 경로의 마지막 단계에 작용하는 디아미노피멜레이트 디카르복실라제를 암호화하는 lysA 유전자의 프로모터 내 특정 위치의 염기서열을 치환한 경우 L-라이신 생산량이 증가하는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[16]

[17] 본 발명의 일 양상은 디아미노피멜레이트 디카르복실라제의 활성이 강화되어 L-라이신 생산능이 향상된 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주를 제공한다.

[18] 본 발명에서 사용된 "디아미노피멜레이트 디카르복실라제(diaminopimelate decarboxylase)"는 L-라이신 생합성 경로의 마지막 단계에서 메조-디아미노헵탄디오에이트(meso-diaminoheptanedioate, mDAP)의 탄소 결합을 분해하여 이산화탄소와 L-라이신을 생성하는 반응을 촉매하는 효소를 의미한다.

[19] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 디아미노피멜레이트 디카르복실라제는 코리네박테리움(*Corynebacterium*) 속 균주에서 유래된 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 코리네박테리움 속 균주는 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*), 코리네박테리움 크루디락티스(*Corynebacterium crudilactis*), 코리네박테리움 데저티(*Corynebacterium deserti*), 코리네박테리움 칼루나에(*Corynebacterium callunae*), 코리네박테리움 수라나래에(*Corynebacterium suranareeae*), 코리네박테리움 루브리칸티스(*Corynebacterium lubricantis*), 코리네박테리움 두사넨세(*Corynebacterium doosanense*), 코리네박테리움 이피시엔스(*Corynebacterium efficiens*), 코리네박테리움 우테레키(*Corynebacterium uterequi*), 코리네박테리움 스테셔니스(*Corynebacterium stationis*), 코리네박테리움 파캔세(*Corynebacterium pacaense*), 코리네박테리움 싱귤라레(*Corynebacterium singulare*), 코리네박테리움 휴미레듀센스(*Corynebacterium humireducens*), 코리네박테리움 마리눔(*Corynebacterium marinum*), 코리네박테리움 할로톨레란스(*Corynebacterium halotolerans*), 코리네박테리움 스페니스코룸(*Corynebacterium spheniscorum*), 코리네박테리움 프레이부르겐세(*Corynebacterium freiburgense*), 코리네박테리움 스트리아툼(*Corynebacterium striatum*), 코리네박테리움 카니스(*Corynebacterium canis*), 코리네박테리움 암모니아게네스(*Corynebacterium ammoniagenes*), 코리네박테리움 레날레(*Corynebacterium renale*), 코리네박테리움 폴루티솔리(

Corynebacterium pollutisoli), 코리네박테리움 이미탄스(*Corynebacterium imitans*), 코리네박테리움 카스피움(*Corynebacterium caspium*), 코리네박테리움 테스투디노리스(*Corynebacterium testudinoris*), 코리네박테리움 슈도펠라지(*Corynebacaterium pseudopelargi*) 또는 코리네박테리움 플라베스센스(*Corynebacterium flavescens*)일 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.

[20] 본 발명에서 사용된 "활성이 강화"는 목적하는 효소, 전사 인자, 수송 단백질 등의 단백질을 암호화하는 유전자의 발현이 새로 도입되거나 증대되어 야생형 균주 또는 변형 전의 균주에 비하여 발현량이 증가되는 것을 의미한다. 이러한 활성의 강화는 유전자를 암호화하는 뉴클레오티드 치환, 삽입, 결실 또는 이들의 조합을 통하여 단백질 자체의 활성이 본래 미생물이 가지고 있는 단백질의 활성에 비해 증가한 경우와, 이를 암호화하는 유전자의 발현 증가 또는 번역 증가 등으로 세포 내에서 전체적인 효소 활성 정도가 야생형 균주 또는 변형 전의 균주에 비하여 높은 경우, 이들의 조합 역시 포함한다.

[21] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 디아미노피멜레이트 디카르복실라제의 활성 강화는 디아미노피멜레이트 디카르복실라제를 암호화하는 유전자의 프로모터에 위치 특이적 변이를 유발하는 것일 수 있다.

[22] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 디아미노피멜레이트 디카르복실라제를 암호화하는 유전자의 프로모터는 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 것일 수 있다.

[23] 본 발명에서 사용된 "프로모터"는 목적하는 유전자의 mRNA 전사를 개시하는 RNA 중합효소(polymerase)에 대한 결합부위를 포함하여 유전자의 전사를 조절하는 DNA의 특정 부위를 의미하며, 일반적으로 전사 개시점을 기준으로 상위(upstream)에 위치한다. 원핵생물에서의 프로모터는 RNA 중합효소가 결합하는 전사 개시점 주변의 부위로 정의되며, 일반적으로 전사 개시점으로부터 앞쪽으로 -10 영역과 -35 영역의 염기쌍이 떨어져 있는 두 개의 짧은 염기서열로 구성된다. 본 발명에서의 프로모터 변이는 야생형 프로모터에 비해 높은 활성을 가지도록 개량하는 것으로, 전사 개시점의 상위에 위치한 프로모터 영역 안에서 변이를 유발함으로써 하위(downstream)에 위치한 유전자의 발현을 증가시킬 수 있다.

[24] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 디아미노피멜레이트 디카르복실라제의 활성 강화는 디아미노피멜레이트 디카르복실라제를 암호화하는 유전자의 프로모터 서열 내 전사 개시점으로부터 앞쪽으로 -25 내지 -10 영역 중 하나 이상의 염기가 치환된 것일 수 있다.

[25] 보다 구체적으로, 본 발명에서의 프로모터 변이는 -25 내지 -10 영역 중 1개 이상의 염기, 바람직하게는 -20 내지 -15 영역, -19 내지 -16 영역, 또는 -18 및 -17 영역에서 1개, 2개, 3개, 4개, 또는 5개의 염기가 연속적으로 또는 비연속적으로 치환된 것일 수 있다.

[26] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 디아미노피멜레이트 디카르복실라제를

암호화하는 lysA 유전자는 아르기닐-tRNA 신타아제(arginyl-tRNA synthetase)를 암호화하는 argS 유전자와 오페론(operon)을 구성하고 있으며, argS-lysA 오페론은 하나의 프로모터에 의해 조절된다. 따라서, 코리네박테리움 글루타미쿰 균주의 argS-lysA 오페론의 프로모터 서열에서 -17 및 -18 영역의 염기서열을 CG에서 CT로 치환하여 lysA 유전자의 새로운 프로모터 서열을 가지는 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주를 획득하였다. 이러한 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주는 서열번호 2의 염기서열로 표시되는 lysA 유전자의 변이된 프로모터 서열을 포함하는 것일 수 있다.

[27] 또한, 본 발명의 일 실시예에 따르면, 코리네박테리움 글루타미쿰 균주의 argS-lysA 오페론의 프로모터 서열에서 -17 및 -18 영역의 염기서열을 CG에서 GA로 치환하여 lysA 유전자의 새로운 프로모터 서열을 가지는 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주를 획득하였다. 이러한 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주는 서열번호 3의 염기서열로 표시되는 lysA 유전자의 변이된 프로모터 서열을 포함하는 것일 수 있다.

[28] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 코리네박테리움 글루타미쿰 균주의 argS-lysA 오페론의 프로모터 서열에서 -17 및 -18 영역의 염기서열을 CG에서 GT로 치환하여 lysA 유전자의 새로운 프로모터 서열을 가지는 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주를 획득하였다. 이러한 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주는 서열번호 4의 염기서열로 표시되는 lysA 유전자의 변이된 프로모터 서열을 포함하는 것일 수 있다.

[29] 본 발명에서 사용된 "생산능이 향상된"은 모균주에 비해 L-라이신의 생산성이 증가된 것을 의미한다. 상기 모균주는 변이의 대상이 되는 야생형 또는 변이주를 의미하며, 직접 변이의 대상이 되거나 재조합된 벡터 등으로 형질전환되는 대상을 포함한다. 본 발명에 있어서, 모균주는 야생형 코리네박테리움 글루타미쿰 균주 또는 야생형으로부터 변이된 균주일 수 있다.

[30] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 모균주는 라이신 생산에 관여하는 유전자(예컨대, lysC, zwf 및 hom 유전자)의 서열에 변이가 유발된 변이주로서 한국미생물보존센터(Korean Culture Center of Microorganisms)에 2021년 4월 2일자 수탁번호 KCCM12969P로 기탁된 코리네박테리움 글루타미쿰 균주 (이하 '코리네박테리움 글루타미쿰 DS1 균주'라 함)인 것일 수 있다.

[31] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 L-라이신 생산능이 향상된 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주는 디아미노피멜레이트 디카르복실라제를 암호화하는 lysA 유전자의 프로모터 변이를 포함함으로써 모균주에 비해 증가된 L-라이신 생산능을 나타내며, 특히 모균주에 비해 L-라이신 생산량이 2% 이상, 구체적으로는 2 내지 40%, 더욱 구체적으로는 3 내지 30% 증가되어 균주 배양액 1 ℓ 당 60 ~ 80 g의 L-라이신을 생산할 수 있으며, 바람직하게는 65 ~ 75 g의 L-라이신을 생산할 수 있다.

[32]

[33] 본 발명의 일 구체예에 따른 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주는 모균주에 디아미노피멜레이트 디카르복실라제를 암호화하는 유전자의 프로모터 서열이 일부 치환된 변이체를 포함하는 재조합 벡터를 통해 구현될 수 있다.

[34] 본 발명에서 사용된 "일부"는 염기서열 또는 폴리뉴클레오티드 서열의 전부가 아닌 것을 의미하며, 1 내지 300개, 바람직하게는 1 내지 100개, 보다 바람직하게는 1 내지 50개일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[35] 본 발명에서 사용된 "변이체"는 L-라이신의 생합성에 관여하는 디아미노피멜레이트 디카르복실라제 유전자의 프로모터 서열 내 -25 내지 -10 영역 중 하나 이상의 염기가 치환된 프로모터 변이체를 의미한다.

[36] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 디아미노피멜레이트 디카르복실라제 유전자의 프로모터 서열 내 -17 및 -18 영역의 염기서열이 CT로 치환된 변이체는 서열번호 2의 염기서열을, GA로 치환된 변이체는 서열번호 3의 염기서열을, GT로 치환된 변이체는 서열번호 4의 염기서열을 가지는 것일 수 있다.

[37] 본 발명에서 사용된 "벡터"는 적당한 숙주세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있는 발현 벡터로서 유전자 삽입물이 발현되도록 작동 가능하게 연결된(operably linked) 필수적인 조절요소를 포함하는 유전자 제조물을 의미한다. 여기서, "작동 가능하게 연결된"은 발현이 필요한 유전자와 이의 조절 서열이 서로 기능적으로 결합되어 유전자 발현을 가능케 하는 방식으로 연결된 것을 의미하고, "조절요소"는 전사를 수행하기 위한 프로모터, 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보좀 결합 부위를 암호화하는 서열, 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다. 이러한 벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파아지 벡터, 바이러스 벡터 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[38] 본 발명에서 사용된 "재조합 벡터"는 적합한 숙주세포 내로 형질전환된 후, 숙주세포의 게놈과 무관하게 복제 가능하거나 게놈 그 자체에 봉합될 수 있다. 이때, 상기 "적합한 숙주세포"는 벡터가 복제 가능한 것으로서 복제가 개시되는 특정 염기서열인 복제 원점을 포함할 수 있다.

[39] 상기 형질전환은 숙주세포에 따라 적합한 벡터 도입 기술이 선택되어 목적하는 유전자를 숙주세포 내에서 발현시킬 수 있다. 예를 들면, 벡터 도입은 전기천공법(electroporation), 열 충격(heat-shock), 인산칼슘(CaPO4) 침전, 염화칼슘(CaCl2) 침전, 미세주입법(microinjection), 폴리에틸렌글리콜(PEG)법, DEAE-덱스트란법, 양이온 리포좀법, 초산 리튬-DMSO법, 또는 이들의 조합에 의해 수행될 수 있다. 형질전환된 유전자는 숙주세포 내에서 발현될 수 있으면 숙주세포의 염색체 내 삽입 또는 염색체 외에 위치하고 있는 것이든 제한하지 않고 포함될 수 있다.

[40] 상기 숙주세포는 생체내 또는 시험관내에서 본 발명의 재조합 벡터 또는 폴리뉴클레오티드로 형질감염, 형질전환, 또는 감염된 세포를 포함한다. 본 발명의 재조합 벡터를 포함하는 숙주 세포는 재조합 숙주 세포, 재조합 세포

또는 재조합 미생물이다.

[41] 또한, 본 발명에 의한 재조합 벡터는 선택 마커(selection marker)를 포함할 수 있는데, 상기 선택 마커는 벡터로 형질전환된 형질전환체 (숙주세포)를 선별하기 위한 것으로서 상기 선택 마커가 처리된 배지에서 선택 마커를 발현하는 세포만 생존할 수 있기 때문에, 형질전환 된 세포의 선별이 가능하다. 상기 선택 마커는 대표적인 예로 카나마이신, 스트렙토마이신, 클로람페니콜 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[42] 본 발명의 형질전환용 재조합 벡터 내에 삽입된 유전자들은 상동성 재조합 교차로 인하여 코리네박테리움 속 미생물과 같은 숙주세포 내로 치환될 수 있다.

[43] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 숙주세포는 코리네박테리움 속 균주일 수 있으며, 예를 들면 코리네박테리움 글루타미쿰 DS1 균주일 수 있다.

[44]

[45] 또한, 본 발명의 다른 일 양상은 a) 상기 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주를 배지에서 배양하는 단계; 및 b) 상기 변이주 또는 변이주가 배양된 배지로부터 L-라이신을 회수하는 단계를 포함하는 L-라이신의 생산 방법을 제공한다.

[46] 상기 배양은 당업계에 알려진 적절한 배지와 배양 조건에 따라 이루어질 수 있으며, 통상의 기술자라면 배지 및 배양 조건을 용이하게 조정하여 사용할 수 있다. 구체적으로, 상기 배지는 액체 배지일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 배양 방법은 예를 들면, 회분식 배양(batch culture), 연속식 배양(continuous culture), 유가식 배양(fed-batch culture) 또는 이들의 조합 배양을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[47] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 배지는 적절한 방식으로 특정 균주의 요건을 충족해야 하며, 통상의 기술자에 의해 적절하게 변형될 수 있다. 코리네박테리움 속 균주에 대한 배양 배지는 공지된 문헌 (Manual of Methods for General Bacteriology. American Society for Bacteriology. Washington D.C., USA, 1981)을 참조할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[48] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 배지에 다양한 탄소원, 질소원 및 미량원소 성분을 포함할 수 있다. 사용될 수 있는 탄소원으로는 글루코스, 수크로스, 락토스, 프락토스, 말토스, 전분, 셀룰로스와 같은 당 및 탄수화물, 대두유, 해바라기유, 피마자유, 코코넛유 등과 같은 오일 및 지방, 팔미트산, 스테아린산, 리놀레산과 같은 지방산, 글리세롤, 에탄올과 같은 알코올, 아세트산과 같은 유기산이 포함된다. 이들 물질은 개별적으로 또는 혼합물로서 사용될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 사용될 수 있는 질소원으로는 펩톤, 효모 추출물, 육즙, 맥아 추출물, 옥수수 침지액, 대두밀 및 요소 또는 무기 화합물, 예를 들면 황산 암모늄, 염화암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄 및 질산암모늄이 포함될 수 있다. 질소원 또한 개별적으로 또는 혼합물로서 사용할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 사용될 수 있는 인의 공급원으로는 인산이수소칼륨 또는 인산수소이칼륨 또는 상응하는 나트륨-함유 염이 포함될 수 있으며, 이에

한정되는 것은 아니다. 또한, 배양 배지는 성장에 필요한 황산마그네슘 또는 황산철과 같은 금속염을 함유할 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다. 그 외에, 아미노산 및 비타민과 같은 필수 성장 물질이 포함될 수 있다. 또한 배양 배지에 적절한 전구체들이 사용될 수 있다. 상기 배지 또는 개별 성분은 배양과정에서 배양액에 적절한 방식에 의해 회분식으로 또는 연속식으로 첨가될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[49] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 배양 중에 수산화암모늄, 수산화칼륨, 암모니아, 인산 및 황산과 같은 화합물을 미생물 배양액에 적절한 방식으로 첨가하여 배양액의 pH를 조정할 수 있다. 또한, 배양 중에 지방산 폴리글리콜 에스테르와 같은 소포제를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다. 추가적으로, 배양액의 호기 상태를 유지하기 위하여, 배양액 내로 산소 또는 산소-함유 기체 (예, 공기)를 주입할 수 있다. 배양액의 온도는 통상 20℃ 내지 45℃, 예를 들면 25℃ 내지 40℃일 수 있다. 배양기간은 유용물질이 원하는 생산량으로 수득될 때까지 계속될 수 있으며, 예를 들면 10 내지 160 시간일 수 있다.

[50] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 배양된 변이주 및 변이주가 배양된 배지에서 L-라이신을 회수하는 단계는 배양 방법에 따라 당해 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 배지로부터 생산된 L-라이신을 수집 또는 회수할 수 있다. 예를 들면 원심분리, 여과, 추출, 분무, 건조, 증발, 침전, 결정화, 전기영동, 분별용해 (예를 들면, 암모늄 설페이트 침전), 크로마토그래피 (예를 들면, 이온교환, 친화성, 소수성 및 크기배제) 등의 방법을 사용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 않는다.

[51] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 라이신을 회수하는 단계는 배양 배지를 저속 원심분리하여 바이오매스를 제거하고 얻어진 상등액을 이온교환 크로마토그래피를 통하여 분리할 수 있다.

[52] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 L-라이신을 회수하는 단계는 L-라이신을 정제하는 공정을 포함할 수 있다.

[53]

발명의 효과

[54] 본 발명에 따른 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주는 디아미노피멜레이트 디카르복실라제를 암호화하는 유전자의 발현을 증가 또는 강화시킴으로써 모균주에 비해 L-라이신의 생산 수율을 향상시킬 수 있다.

[55]

도면의 간단한 설명

[56] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따라 프로모터 -17 및 -18 위치가 CG에서 CT로 치환된 argS-lysA 오페론의 프로모터를 포함하는 pCGI(Pm1-argS+lysA) 벡터의 구조를 나타낸 것이다.

[57] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따라 프로모터 -17 및 -18 위치가 CG에서 GA로

치환된 argS-lysA 오페론의 프로모터를 포함하는 pCGI(Pm2-argS+lysA) 벡터의 구조를 나타낸 것이다.

[58] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따라 프로모터 -17 및 -18 위치가 CG에서 GT로 치환된 argS-lysA 오페론의 프로모터를 포함하는 pCGI(Pm3-argS+lysA) 벡터의 구조를 나타낸 것이다.

[59]

발명의 실시를 위한 형태

[60] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이러한 설명은 본 발명의 이해를 돕기 위하여 예시적으로 제시된 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이러한 예시적인 설명에 의하여 제한되는 것은 아니다.

[61]

[62] **실시예 1. 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주의 제조**

[63] 디아미노피멜레이트 디카르복실라제의 활성이 강화된 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주를 제조하기 위하여, 코리네박테리움 글루타미쿰 DS1 균주 및 *E. coli* DH5a (HIT Competent cells™, Cat No. RH618)를 사용하였다.

[64] 상기 코리네박테리움 글루타미쿰 DS1 균주는 증류수 1 L에 글루코오스 5 g, NaCl 2.5 g, 효모 추출물 5.0 g, 유레아(urea) 1.0 g, 폴리펩톤 10.0 g 및 비프(beef) 추출물 5.0 g 조성의 CM-broth 배지 (pH 6.8)에서 30℃의 온도로 배양하였다.

[65] 상기 *E. coli* DH5a는 증류수 1 L에 트립톤 10.0 g, NaCl 10.0 g 및 효모 추출물 5.0 g 조성의 LB 배지 상에서 37℃의 온도로 배양하였다.

[66] 항생제 카나마이신(kanamycin) 및 스트렙토마이신(streptomycin)은 시그마(Sigma)사의 제품을 사용하였다. tDNA 시퀀싱 분석은 마크로젠(주)에 의뢰하여 분석하였다.

[67]

[68] **1-1. 재조합 벡터의 제작**

[69] 균주에 라이신 생산성을 증가시키기 위해 라이신 생합성 경로의 마지막 단계에 작용하는 디아미노피멜레이트 디카르복실라제의 강화를 도입하였다. 본 실시예에서 이용한 방법은 디아미노피멜레이트 디카르복실라제를 암호화하는 lysA 유전자의 발현을 증가하기 위하여, argS-lysA 오페론의 프로모터에 특이적인 변이를 유발하였다. argS-lysA 오페론의 프로모터 -17 및 -18 위치의 염기서열을 CG에서 CT로 치환하였고, 코리네박테리움 글루타미쿰 게놈 상에서 argS-lysA 오페론 한 가운데를 중심으로 좌측암 510 bp 부분과 우측암 480 bp 부분을 PCR로 증폭하여, 오버랩 PCR(overlap PCR) 방법으로 연결한 후 재조합 벡터인 pCGI (문헌 [Kim et al., Journal of Microbiological Methods 84 (2011) 128-130] 참조)에 클로닝하였다. 상기 플라스미드를 pCGI(Pm1-argS+lysA)라고 명명하였다 (도 1 참조). 상기 플라스미드를 제작하기 위하여 각각의 유전자 단편을 증폭하는데 하기 표 1의 프라이머를 사용하였다.

[70] [표1]

프라이머(primer)			서열번호
lysA 좌측상동암 증폭 프라이머	lysA-LA-F1	5' - tgattacgcctccgcgaggctgcactgcaa - 3'	5
	lysA-LA-F2	5' - tccgcgaggctgcactgcaa - 3'	6
	lysA-LA-R1	5' - gtacacccgtcgcacagaat - 3'	7
	lysA-LA-R2	5' - tctagcagaggtacacccgt - 3'	8
lysA 우측상동암 증폭 프라이머	lysA-RA-F1	5' - ctctgctagaatttctccccatgacaccag - 3'	9
	lysA-RA-F2	5' - atttctccccatgacaccag - 3'	10
	lysA-RA-R1	5' - gcacacgacccaaagagtca - 3'	11
	lysA-RA-R2	5' - gaagcctccagcacacgacc - 3'	12

[71]

[72] 이상의 프라이머를 이용하여 아래의 조건 하에 PCR을 수행하였다. Thermocycler (TP600, TAKARA BIO Inc., 일본)를 이용하여 각각의 데옥시뉴클레오티드 트리포스페이트 (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 100 μM가 첨가된 반응액에 올리고뉴클레오티드 1 pM, 코리네박테리움 글루타미쿰 DS1 균주의 염색체 DNA 10 ng을 주형(template)으로 이용하여, pfu-X DNA 폴리머라제 혼합물 (Solgent) 1 유닛의 존재 하에서 25 ~ 30 주기(cycle)를 수행하였다. PCR 수행 조건은 (i) 변성(denaturation) 단계: 94℃에서 30초, (ii) 결합(annealing) 단계: 58℃에서 30초, 및 (iii) 확장(extension) 단계: 72℃에서 1 ~ 2분 (1 kb 당 2분의 중합시간 부여)의 조건에서 실시하였다.

[73] 이와 같이 제조된 유전자 단편을 self-assembly cloning을 이용하여, pCGI 벡터에 클로닝하였다. 상기 벡터를 *E. coli* DH5a에 형질전환시키고, 50 ㎍/㎖의 카나마이신을 함유하는 LB-한천 플레이트 상에 도말하여, 37℃에서 24시간 배양하였다. 최종 형성되는 콜로니를 분리하여 삽입물(insert)이 정확히 벡터에 존재하는지 확인한 후, 이 벡터를 분리하여 코리네박테리움 글루타미쿰 균주의 재조합에 사용하였다.

[74] 상기 방법에서 공통적으로 진행된 과정으로서, 해당 유전자들의 증폭은 코리네박테리움 글루타미쿰 DS1 균주 genomic DNA로부터 PCR 방법으로 증폭하여 전략에 따라 self-assembled cloning 방법으로 pCGI 벡터에 삽입하여 *E. coli* DH5a에서 선별하였다. 염색체의 유전자 염기 치환(Chromosomal base substitution)은 각각 단편의 유전자를 개별 증폭하여 오버랩 PCR로 목적 DNA 단편을 제조하였다. 유전자 조작 시 PCR 증폭 효소로는 Ex Taq 중합효소 (Takara), Pfu 중합효소 (Solgent)를 이용하였고, 각종 제한효소 및 DNA modifying 효소는 NEB 제품을 사용하였으며, 공급된 버퍼 및 프로토콜에 따라 사용하였다.

[75]

[76] **1-2. 변이주의 제조**

[77] 상기 pCGI(Pm1-argS+lysA) 벡터를 이용하여 변이 균주인 DS3 균주를 제조하였다. 상기 벡터의 최종 농도가 1 $\mu g/\mu \ell$ 이상 되도록 준비하여 코리네박테리움 글루타미쿰 DS1 균주에 전기천공법 (문헌 [Tauch et al., FEMS Microbiology letters 123 (1994) 343-347] 참조)을 사용하여 1차 재조합을 유도하였다. 이때, 전기 천공한 균주를 카나마이신이 20 $\mu g/\mu \ell$ 포함되는 CM-한천 플레이트에 도말하여 콜로니를 분리한 후 게놈상의 유도한 위치에 적절히 삽입되었는지 PCR 및 염기서열 분석을 통해 확인하였다. 이렇게 분리된 균주를 다시 2차 재조합을 유도하기 위하여 스트렙토마이신을 함유한 CM-한천 액체배지에 접종하고, 하룻밤 이상 배양하여 동일 농도의 스트렙토마이신을 함유한 한천배지에 도말하여 콜로니를 분리하였다. 최종 분리한 콜로니 중에서 카나마이신에 대한 내성 여부를 확인한 후, 항생제 내성이 없는 균주들 중 lysA 유전자에 변이가 도입되었는지 염기서열 분석을 통해 확인하였다 (문헌 [Schafer et al., Gene 145 (1994) 69-73] 참조). 최종적으로 변이 lysA 유전자가 도입된 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주 (DS3)를 획득하였다.

[78]

[79] **실시예 2. 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주의 제조**

[80] argS-lysA 오페론의 프로모터 -17 및 -18 위치의 염기서열을 CG에서 GA로 치환한 것을 제외하고는, 실시예 1과 동일한 방법으로 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주를 제조하였다.

[81] 여기서 플라스미드를 제작하기 위하여 각각의 유전자 단편을 증폭하는데 하기 표 2의 프라이머를 사용하였고, 제작된 플라스미드 pCGI(Pm2-argS+lysA) 벡터 (도 2 참조)를 이용하여 변이 균주인 DS3-1 균주를 제조하였다. 최종적으로 변이 lysA 유전자가 도입된 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주 (DS3-1)를 획득하였다.

[82]

[표2]

프라이머(primer)			서열번호
lysA 좌측상동암 증폭 프라이머	lysA-LA-F1	5' - tgattacgcctccgcgaggctgcactgcaa - 3'	5
	lysA-LA-F2	5' - tccgcgaggctgcactgcaa - 3'	6
	lysA-LA-R1	5' - gtacacccgtcgcacagaat - 3'	7
	lysA-LA2-R2	5' - tctagctcaggtacacccgt - 3'	13
lysA 우측상동암 증폭 프라이머	lysA-RA2-F1	5' - ctgagctagaatttctccccatgacaccag - 3'	14
	lysA-RA-F2	5' - atttctccccatgacaccag - 3'	10
	lysA-RA-R1	5' - gcacacgacccaaagagtca - 3'	11
	lysA-RA-R2	5' - gaagcctccagcacacgacc - 3'	12

[83]

[84] **실시예 3. 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주의 제조**

[85] argS-lysA 오페론의 프로모터 -17 및 -18 위치의 염기서열을 CG에서 GT로 치환한 것을 제외하고는, 실시예 1과 동일한 방법으로 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주를 제조하였다.

[86] 여기서 플라스미드를 제작하기 위하여 각각의 유전자 단편을 증폭하는데 하기 표 3의 프라이머를 사용하였고, 제작된 플라스미드 pCGI(Pm3-argS+lysA) 벡터를 이용하여 변이 균주인 DS3-2 균주를 제조하였다. 최종적으로 변이 lysA 유전자가 도입된 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주 (DS3-2)를 획득하였다.

[87]

[표3]

프라이머(primer)			서열번호
lysA 좌측상동암 증폭 프라이머	lysA-LA-F1	5' - tgattacgcctccgcgaggctgcactgcaa - 3'	5
	lysA-LA-F2	5' - tccgcgaggctgcactgcaa - 3'	6
	lysA-LA-R1	5' - gtacacccgtcgcacagaat - 3'	7
	lysA-LA3-R2	5' - tctagcacaggtacacccgt - 3'	15
lysA 우측상동암 증폭 프라이머	lysA-RA3-F1	5' - ctgtgctagaatttctccccatgacaccag - 3'	16
	lysA-RA-F2	5' - atttctccccatgacaccag - 3'	10
	lysA-RA-R1	5' - gcacacgacccaaagagtca - 3'	11
	lysA-RA-R2	5' - gaagcctccagcacacgacc - 3'	12

[88]

[89] **실험예 1. 변이주의 L-라이신 생산성 비교**

[90] 모균주 코리네박테리움 글루타미쿰 DS1 균주와 실시예 1 내지 3에서 제조된 라이신 생산 변이주인 DS2 균주, DS2-1 균주 및 DS2-2 균주의 L-라이신 생산성을 비교하였다.

[91] 하기 표 4와 같은 조성을 갖는 라이신 배지 10 ml를 함유한 100 ml 플라스크에 균주를 각각 접종하고, 30℃에서 48시간, 180 rpm의 조건으로 진탕 배양하였다. 배양 종료 후 라이신 분석은 HPLC (Shimazu, 일본)로 L-라이신의 생산량을 측정하였고, 그 결과를 표 5에 나타내었다.

[92]

[표4]

조성	함량 (증류수 1 L 기준)
Glucose	100 g
Ammonium sulfate	55 g
$(NH_4)_2SO_4$	35 g
KH_2PO_4	1.1 g
$MgSO_4 \cdot H_2O$	1.2 g
$MnSO_4 \cdot H_2O$	180 mg
$FeSO_4 \cdot H_2O$	180 mg
Thiamine · HCl	9 mg
Biotin	1.8 mg
$CaCO_3$	5%
pH	7.0

[93] [표5]

균주	OD610	L-라이신 (g/L)	단위 균체 당 L-라이신 생산량 (g/gDCW)
모균주 (DS1)	24.0	64.8	6.4
변이주 (DS3)	23.0	65.2	6.7
변이주 (DS3-1)	23.0	65.8	6.8
변이주 (DS3-2)	22.0	66.9	7.2

[94]

[95] 상기 표 5에 나타낸 바와 같이, 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주 DS3, DS3-1 및 DS3-2는 라이신 생합성 경로의 강화를 위해 argS-lysA 오페론의 프로모터 서열의 특정 위치 (-17 및 -18 영역)가 최적의 염기서열 (CT, GA 또는 GT)로 치환됨으로써 모균주 코리네박테리움 글루타미쿰 DS1 균주에 비해 L-라이신의 생산성이 각각 약 4.7%, 6.3%, 12.5% 증가한 것으로 확인되었다. 이러한 결과를 통해, lysA 유전자의 발현 강화가 라이신 전구체의 탄소 결합 분해를 촉진함으로써 균주의 L-라이신 생산능을 향상시킨다는 것을 알 수 있었다.

[96]

[97] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의

본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

청구범위

[청구항 1] 디아미노피멜레이트 디카르복실라제의 활성이 강화되어 L-라이신 생산능이 향상된 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) 변이주.

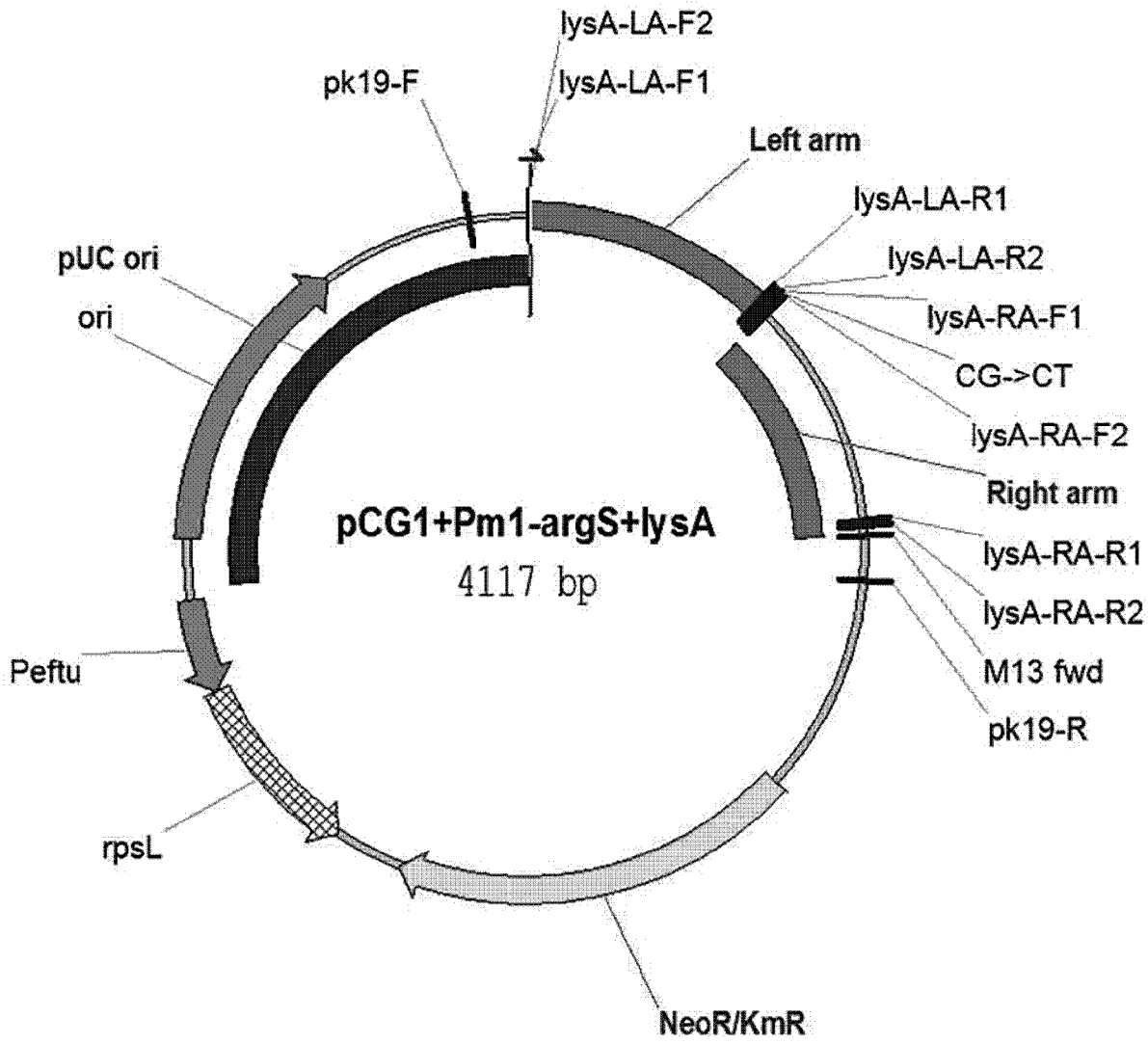
[청구항 2] 청구항 1에 있어서,
상기 디아미노피멜레이트 디카르복실라제의 활성 강화는 디아미노피멜레이트 디카르복실라제를 암호화하는 유전자의 프로모터에 위치 특이적 변이를 유발하는 것인 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주.

[청구항 3] 청구항 2에 있어서,
상기 디아미노피멜레이트 디카르복실라제를 암호화하는 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 것인 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주.

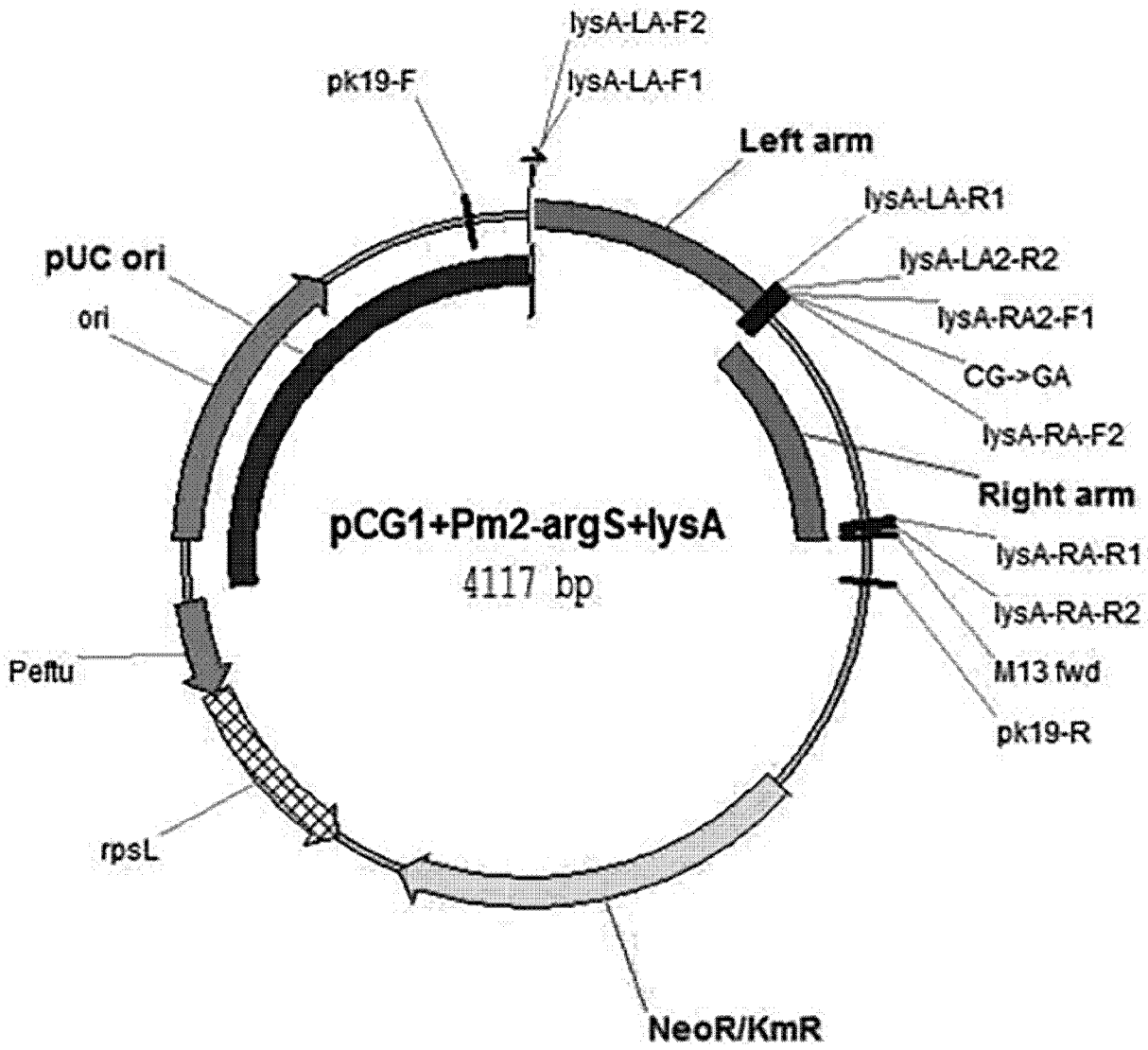
[청구항 4] 청구항 1에 있어서,
상기 변이주는 서열번호 2 내지 4로 표시되는 염기서열 중 어느 하나를 포함하는 것인 코리네박테리움 글루타미쿰 변이주.

[청구항 5] a) 청구항 1의 변이주를 배지에서 배양하는 단계; 및
b) 상기 변이주 또는 변이주가 배양된 배지로부터 L-라이신을 회수하는 단계를 포함하는 L-라이신의 생산 방법.

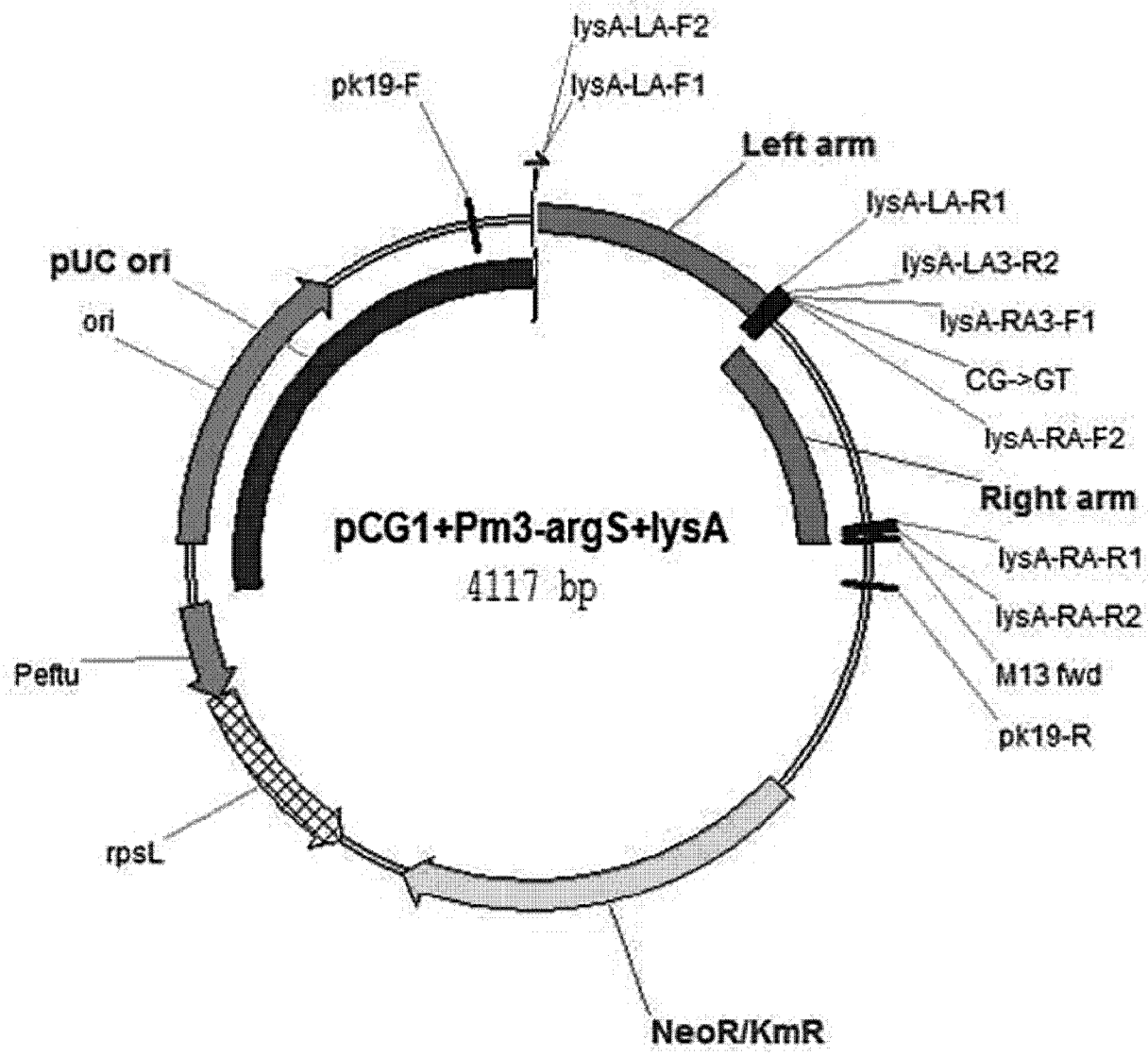
[도1]


lysA-LA-F2
pk19-F
lysA-LA-F1
Left arm
lysA-LA-R1
pUC ori
lysA-LA-R2
ori
lysA-RA-F1
CG->CT
lysA-RA-F2
Right arm
pCG1+Pm1-argS+lysA
4117 bp
lysA-RA-R1
lysA-RA-R2
M13 fwd
Peftu
pk19-R
rpsL
NeoR/KmR

[도2]


lysA-LA-F2
lysA-LA-F1
pk19-F
Left arm
lysA-LA-R1
lysA-LA2-R2
lysA-RA2-F1
CG->GA
lysA-RA-F2
Right arm
lysA-RA-R1
lysA-RA-R2
M13 fwd
pk19-R
pUC ori
ori
pCG1+Pm2-argS+lysA
4117 bp
Peftu
rpsL
NeoR/KmR

[도3]


lysA-LA-F2
lysA-LA-F1
pk19-F
Left arm
lysA-LA-R1
lysA-LA3-R2
lysA-RA3-F1
CG->GT
lysA-RA-F2
Right arm
lysA-RA-R1
lysA-RA-R2
M13 fwd
pk19-R
pUC ori
ori
pCG1+Pm3-argS+lysA
4117 bp
Peftu
rpsL
NeoR/KmR

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2021/005509

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/77(2006.01)i; **C12N 9/88**(2006.01)i; **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 15/77(2006.01); C12N 1/21(2006.01); C12N 15/11(2006.01); C12N 15/64(2006.01); C12N 15/74(2006.01); C12P 13/08(2006.01)

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: 디아미노피멜레이트 디카르복실라제(diaminopimelate decarboxylase), 코리네박테리움 글루타미쿰(corynebacterium glutamicum), 변이(variant), 프로모터(promoter), 치환(alternation)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2008-0025355 A (CJ CHEILJEDANG CORPORATION) 20 March 2008 (2008-03-20) See claims 1 and 15, and paragraphs [0001], [0005], [0010], [0019]-[0022], [0024] and [0030]-[0032].	1,5
A		2-4
A	CHERAGHI, S. et al. Improved production of l-lysine by over-expression of meso-diaminopimelate decarboxylase enzyme of corynebacterium glutamicum in escherichia coli. Pakistan Journal of Biological Sciences. 2010, vol. 13, no. 10, pp. 504-508. See entire document.	1-5
A	US 2020-0347419 A1 (NINGXIA EPPEN BIOTECH CO., LTD. et al.) 05 November 2020 (2020-11-05) See entire document.	1-5
A	NCBI. Genbank accession no. CP025534.1 (27 December 2017). See entire document.	1-5

☑ 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
"D" document cited by the applicant in the international application
"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
06 December 2021	**06 December 2021**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office **Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 35208**	
Facsimile No. **+82-42-481-8578**	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2021/005509

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2013-0130377 A (PAIK KWANG INDUSTRIAL CO., LTD. et al.) 02 December 2013 (2013-12-02) See entire document.	1-5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2021/005509

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed:
      ☑ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
      ☐ on paper or in the form of an image file.
   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2021/005509

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
KR 10-2008-0025355 A	20 March 2008	CN 101573438 A	04 November 2009
		CN 101573438 B	02 January 2013
		EP 2066782 A1	10 June 2009
		EP 3170889 A1	24 May 2017
		JP 2010-503395 A	04 February 2010
		JP 2015-171366 A	01 October 2015
		JP 2017-221202 A	21 December 2017
		JP 5756259 B2	29 July 2015
		JP 6695308 B2	20 May 2020
		US 2010-0143984 A1	10 June 2010
		US 9109242 B2	18 August 2015
		WO 2008-033001 A1	20 March 2008
US 2020-0347419 A1	05 November 2020	CN 109750069 A	14 May 2019
		EP 3690027 A1	05 August 2020
		EP 3690027 A4	11 November 2020
		JP 2021-500914 A	14 January 2021
		WO 2019-085445 A1	09 May 2019
KR 10-2013-0130377 A	02 December 2013	KR 10-1492134 B1	12 February 2015

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2021/005509

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 15/77(2006.01)i; **C12N 9/88**(2006.01)i; **C12P 13/08**(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 15/77(2006.01); C12N 1/21(2006.01); C12N 15/11(2006.01); C12N 15/64(2006.01); C12N 15/74(2006.01); C12P 13/08(2006.01)

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: 디아미노피멜레이트 디카르복실라제(diaminopimelate decarboxylase), 코리네박테리움 글루타미쿰(corynebacterium glutamicum), 변이(variant), 프로모터(promoter), 치환(alternation)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2008-0025355 A (씨제이제일제당(주)) 2008.03.20 청구항 1, 15, 단락 [0001], [0005], [0010], [0019]-[0022], [0024], [0030]-[0032]	1,5
A		2-4
A	CHERAGHI, S. 등, "Improved production of l-lysine by over-expression of meso-diaminopimelate decarboxylase enzyme of corynebacterium glutamicum in escherichia coli", Pakistan Journal of Biological Sciences, 2010, 제13권, 제10호, 페이지 504-508 전체 문헌	1-5
A	US 2020-0347419 A1 (NINGXIA EPPEN BIOTECH CO., LTD. 등) 2020.11.05 전체 문헌	1-5
A	NCBI, Genbank accession no. CP025534.1 (2017.12.27) 전체 문헌	1-5
A	KR 10-2013-0130377 A (백광산업 주식회사 등) 2013.12.02 전체 문헌	1-5

☐ 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
"D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 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
2021년12월06일(06.12.2021)	**2021년12월06일(06.12.2021)**

ISA/KR의 명칭 및 우편주소	심사관
대한민국 특허청 **(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)**	정다원
팩스 번호 **+82-42-481-8578**	전화번호 **+82-42-481-5373**

서식 PCT/ISA/210 (두 번째 용지) (2019년 7월)

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2021/005509

제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

   a. ☑ 아래의 형태로 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
      - ☑ 부록 C/ST.25 텍스트 파일
      - ☐ 서면 혹은 이미지 파일

   b. ☐ PCT 규칙 13의3.1(a)에 따라 국제출원과 함께 국제조사만을 목적으로 부록 C/ST.25 텍스트 파일의 형태로 제출된 서열목록

   c. ☐ 국제조사만을 목적으로 국제출원일 이후에 아래 형태로 제출된 서열목록
      - ☐ 부록 C/ST.25 텍스트 파일 (규칙 13의3.1(a))
      - ☐ 서면 혹은 이미지 파일 (규칙 제13의3.1(b) 및 시행세칙 713).

2. ☐ 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시 출원의 일부를 구성하는 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2021/005509

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2008-0025355 A	2008/03/20	CN 101573438 A	2009/11/04
		CN 101573438 B	2013/01/02
		EP 2066782 A1	2009/06/10
		EP 3170889 A1	2017/05/24
		JP 2010-503395 A	2010/02/04
		JP 2015-171366 A	2015/10/01
		JP 2017-221202 A	2017/12/21
		JP 5756259 B2	2015/07/29
		JP 6695308 B2	2020/05/20
		US 2010-0143984 A1	2010/06/10
		US 9109242 B2	2015/08/18
		WO 2008-033001 A1	2008/03/20
US 2020-0347419 A1	2020/11/05	CN 109750069 A	2019/05/14
		EP 3690027 A1	2020/08/05
		EP 3690027 A4	2020/11/11
		JP 2021-500914 A	2021/01/14
		WO 2019-085445 A1	2019/05/09
KR 10-2013-0130377 A	2013/12/02	KR 10-1492134 B1	2015/02/12