

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2024년 6월 13일 (13.06.2024)



(10) 국제공개번호

WO 2024/123109 A1

(51) 국제특허분류:

C12N 15/77 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

C12N 9/88 (2006.01)

C12P 19/32 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2023/020106

(22) 국제출원일:

2023년 12월 7일 (07.12.2023)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2022-0170771 2022년 12월 8일 (08.12.2022) KR

(71) 출원인: 씨제이제일제당 (주) (CJ CHEILJEDANG CORPORATION) [KR/KR]; 04560 서울특별시 중구 동호로 330, Seoul (KR).

(72) 발명자: 김대영 (KIM, Dae Young); 04560 서울특별시 중구 동호로 330, Seoul (KR). 이지혜 (LEE, Ji Hye); 04560 서울특별시 중구 동호로 330, Seoul (KR). 권희수 (KWON, Hee Su); 04560 서울특별시 중구 동호로 330, Seoul (KR). 이지현 (LEE, Ji Hyun); 04560 서울특별시 중구 동호로 330, Seoul (KR). 봉현주 (BONG, Hyun-ju); 04560 서울특별시 중구 동호로 330, Seoul (KR). 김도연 (KIM, Doyeon); 04560 서울특별시 중구 동호로 330, Seoul (KR). 배현정 (BAE, Hyun-jung); 04560 서울특별시 중구 동호로 330, Seoul (KR).

(74) 대리인: 특허법인한얼 (HANOL INTELLECTUAL PROPERTY AND LAW); 05836 서울특별시 송파구 법원로 135, 6층, 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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, 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, CV, GH, GM,

KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, 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))

(54) Title: MICROORGANISM PRODUCING PURINE NUCLEOTIDES AND METHOD FOR PRODUCING PURINE NUCLEOTIDES USING SAME

(54) 발명의 명칭: 퓨린 뉴클레오티드를 생산하는 미생물 및 이를 이용한 퓨린 뉴클레오티드의 생산방법

(57) Abstract: The present application pertains to: a microorganism in which serine dehydratase protein activity is weakened compared to the intrinsic activity thereof; a method for producing purine nucleotides, the method comprising culturing the microorganism in a medium; a composition for producing purine nucleotides, the composition containing the microorganism, a culture of the microorganism, a fermented product of the microorganism, or a combination of two or more thereof; and a use of the microorganism for producing purine nucleotides.

(57) 요약서: 본 출원은 세린 탈수화효소 단백질 활성이 내재적 활성에 비하여 약화된 미생물; 상기 미생물을 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 퓨린 뉴클레오티드의 생산 방법; 상기 미생물, 상기 미생물의 배양물, 상기 미생물의 발효물 또는 이들 중 2 이상의 조합을 포함하는 퓨린 뉴클레오티드 생산용 조성물; 및 상기 미생물의 퓨린 뉴클레오티드 생산 용도에 관한 것이다.



WO 2024/123109 A1

명세서

발명의 명칭: 퓨린 뉴클레오티드를 생산하는 미생물 및 이를 이용한 퓨린 뉴클레오티드의 생산방법

기술분야

- [1] 본 출원은 세린 탈수화효소 단백질 활성이 내재적 활성에 비하여 약화된 미생물; 상기 미생물을 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 퓨린 뉴클레오티드의 생산 방법; 상기 미생물, 상기 미생물의 배양물, 상기 미생물의 발효물 또는 이들 중 2 이상의 조합을 포함하는 퓨린 뉴클레오티드 생산용 조성물; 및 상기 미생물의 퓨린 뉴클레오티드 생산 용도에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 퓨린 뉴클레오티드, 예를 들어, 5'-이노신산 (5'-inosine monophosphate; 이하 IMP), 5'-크산틸산 (5'-xanthosine monophosphate; 이하 XMP) 및 5'-구아닌산 (5'-guanosine monophosphate; 이하 GMP)은 핵산 생합성 대사계의 중간 물질로서, 체내에서 생리적으로 중요한 역할을 수행하고, 식품, 의약품 등에 널리 이용되고 있다. 구체적으로, IMP는 자체로 소고기 맛을 내며, XMP에서 유래되는 GMP는 버섯 맛을 내는 것으로 알려져 있으며, 두 물질 모두 모노소듐 글루탐산 (MSG)의 풍미를 강화하는 것으로 알려져 정미성 핵산계 조미료로 각광 받고 있다.
- [4] 한편, 상기의 퓨린 뉴클레오티드를 생산하는 방법으로는 (1) 효모세포로부터 추출한 리보핵산(RNA)을 효소적으로 분해하는 방법, (2) 이를 생산하는 미생물을 배양하고 배양액 내의 퓨린 뉴클레오티드를 직접 회수하는 발효 제조 방법, (3) 발효에 의해 생산된 뉴클레오사이드를 화학적으로 인산화 하는 방법, (4) 발효에 의해 생산된 뉴클레오사이드를 효소적으로 인산화 하는 방법 등이 있다(대한민국 특허 등록 번호 제10-1049023호, 일본 등록특허공보 제4363042호, 대한민국 특허 등록 번호 제10-1210704호, Agri. Biol. Chem., 36(9),1511-1522). 이 중에서도, (1)의 방법은 원료 수급 및 경제성에 문제가 있으며, (2)의 방법이 경제적으로도 환경적으로도 유리하여 널리 사용되고 있다. 한편, 퓨린 뉴클레오티드 중 하나인 GMP생산의 경우 세포막 투과성의 문제로 인하여 수율이 낮다는 단점이 있어 미생물 발효를 통해 생산된 XMP를 효소적으로 전환하여 GMP를 생산하는 방법도 활용되고 있다.
- [5] 그러나, 미생물을 이용한 퓨린 뉴클레오티드의 발효 생산 동안, 미생물은 온도, pH, 삼투압, 영양 결핍, 산화적 요인으로 인한 스트레스를 겪게 된다. 이 가운데 특히 산화적 스트레스는 발효 생산 중에 생성되는 피해갈 수 없는 요소인 활성 산소(reactive oxygen species; ROS)가 주된 원인이 되며, 이로 인한 미생물의 비정상적 생장이 야기될 수 있다.

[6] 따라서, 효과적인 퓨린 뉴클레오티드 생산을 위한 연구가 여전히 필요한 실정이다.

[7]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[8] 본 발명자들은 세린 탈수화효소 단백질 활성이 내재적 활성에 비하여 약화된, 미생물, 상기 미생물을 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 퓨린 뉴클레오티드의 생산 방법, 상기 미생물, 상기 미생물의 배양물, 상기 미생물의 발효물 또는 이들 중 2 이상의 조합을 포함하는 퓨린 뉴클레오티드 생산용 조성물 및 상기 미생물의 퓨린 뉴클레오티드 생산 용도를 개발하여 본 출원을 완성하였다.

[9]

과제 해결 수단

[10] 본 출원의 하나의 양태는 세린 탈수화효소 단백질 활성이 내재적 활성에 비하여 약화된, 퓨린 뉴클레오티드 생산능을 가지는 미생물을 제공한다.

[11] 하나의 구체예에서, 상기 세린 탈수화효소는 서열번호 66의 아미노산 서열로 이루어지는 것일 수 있다.

[12] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 미생물로서, 상기 미생물은 추가로 하기 (a) 내지 (d)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 단백질 활성이 조절된 것일 수 있다:

[13] (a) 포름산 탈수소효소 단백질 활성이 내재적 활성에 비하여 약화;

[14] (b) 글리신 분해 효소 단백질 활성이 내재적 활성에 비하여 강화;

[15] (c) 세린 하이드록시메틸트랜스퍼라제 단백질 활성이 내재적 활성에 비하여 강화; 및

[16] (d) 포르메이트 의존성 포스포리보실글리신아미드 포밀 전이효소 단백질 활성이 내재적 활성에 비하여 강화.

[17] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 미생물로서, 상기 미생물은 코리네박테리움 속 미생물인 것일 수 있다.

[18] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 미생물로서, 상기 코리네박테리움 속 미생물은 코리네박테리움 스테이셔니스인 것일 수 있다.

[19] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 미생물로서, 상기 미생물은 비변형 미생물과 비교하여 퓨린 뉴클레오티드 생산능이 증가된 것일 수 있다.

[20] 본 출원의 다른 하나의 양태는 세린 탈수화효소 단백질 활성이 내재적 활성에 비하여 약화된 미생물을 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, 퓨린 뉴클레오티드의 생산 방법을 제공한다.

[21] 하나의 구체예에서, 상기 방법은 상기 배양된 미생물, 상기 미생물의 배양물, 상기 미생물의 발효물 또는 상기 배양 배지에서 목적 물질을 회수하는 단계를 추가적으로 포함하는 것일 수 있다.

[22] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 세린 탈수화효소 단백질 활성이 내재적 활성에 비하여 약화된 미생물, 상기 미생물의 배양물, 상기 미생물의 발효물 또는 이들 중 2 이상의 조합을 포함하는 퓨린 뉴클레오티드 생산용 조성물을 제공한다.

[23] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 세린 탈수화효소 단백질 활성이 내재적 활성에 비하여 약화된 미생물의 퓨린 뉴클레오티드 생산 용도를 제공한다.

[24]

발명의 효과

[25] 본 출원의 세린 탈수화효소 단백질 활성이 내재적 활성에 비하여 약화된 미생물은 퓨린 뉴클레오티드를 고수율로 생산할 수 있어, 퓨린 뉴클레오티드의 공업적 생산에 유용하게 활용될 수 있다.

[26]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[27] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 출원에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 출원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 출원의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 출원의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[28] 또한, 당해 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 통상의 실험만을 사용하여 본 출원에 기재된 본 출원의 특정 양태에 대한 다수의 등가물을 인지하거나 확인할 수 있다. 또한, 이러한 등가물은 본 출원에 포함되는 것으로 의도된다.

[29] 본 출원의 명세서 및 첨부된 청구범위에서 사용되는 바와 같이, 단수형 관사 ("a", "an", 및 "the")에는 문맥상 명백하게 다르게 언급되지 않는 한 복수의 참조 대상이 포함된다. 문맥상 달리 언급되지 않는 한, 단수형 용어는 복수형을 포함하고 복수형 용어는 단수형을 포함한다. 본 출원의 명세서 및 첨부된 청구범위에서, 달리 언급되지 않는 한, "또는"의 사용은 "및/또는"을 포함하는 의미로 사용될 수 있다.

[30]

[31] 본 출원에서, 용어 "약(about)"은 특정 숫자 값 앞에 제시될 수 있다. 본 출원에서 사용되는 용어 "약"은 용어 뒤에 기재되는 정확한 숫자뿐만 아니라, 거의 그 숫자이거나 그 숫자에 가까운 범위까지 포함한다. 그 숫자가 제시된 문맥을 고려하여, 언급된 구체적인 숫자와 가깝거나 거의 그 숫자인지 여부를 결정할 수 있다. 일 예로, 용어 "약"은 숫자 값의 -10% 내지 +10% 범위를 지칭할 수 있다. 다른 예로, 용어 "약"은 주어진 숫자 값의 -5% 내지 +5% 범위를 지칭할 수 있다. 그러나 이에 제한되지 않는다.

[32] 본 출원에서, 용어 "제1, 제2, 제3,," "i, ii, iii)..." 또는 "(a), (b), (c), (d)..."와 같은 기재는 유사한 구성을 구별하기 위해 사용되었으며, 이들 용어는 연속적이거나 순서대로 수행되는 것을 의미하는 것이 아니다. 예를 들어, 상기 용어가 방법, 용도 또는 분석의 단계(step)와 관련하여 사용되었을 경우, 이들 단계 사이에는 시

간적인 간격이 없거나, 동시에 수행되거나, 수 초, 수 분, 수 시간, 수 일, 또는 수 개월 간격을 두고 수행될 수 있다.

- [33] 본 출원에서, 용어 "본질적으로 이루어지는(consisting essentially of)"은 본 출원에서 청구하는 대상의 특징이 불특정 성분의 존재에 실질적으로 영향을 받지 않는 경우, 상기 불특정 성분이 존재할 수 있음을 의미한다.
- [34] 본 출원에서, 용어 "이루어지는(consisting of)"은 특정 성분(들)의 비율이 총 100%인 것을 의미한다. 용어 "이루어지는" 이하에 오는 성분 또는 특징은 필수적이거나 의무적인 것일 수 있다. 일부 구체예에서, "이루어지는" 이하에 오는 성분 또는 특징 외에, 다른 임의의 성분 또는 필수적이지 않은 성분은 배제될 수 있다.
- [35] 본 출원에서, 용어 "포함하는(comprising)"은 상기 용어 이하에 기재되는 특징, 단계 또는 구성 요소의 존재를 의미하며, 하나 이상의 특징, 단계 또는 구성 요소의 존재 또는 추가를 배제하지 않는다. 본 출원에서 "포함하는" 이하에 기재되는 성분 또는 특징은 필수적이거나 의무적인 것일 수 있으나, 일부 구체예에서는 다른 임의의 혹은 필수적이지 않은 성분 또는 특징을 더 포함할 수 있다.
- [36]
- [37] 본 출원의 하나의 양태는 세린 탈수화효소 단백질 활성이 내재적 활성에 비하여 약화된, 퓨린 뉴클레오티드 생산능을 가지는 미생물을 제공한다.
- [38] 상기 약화된 세린 탈수화효소 단백질 활성은, 천연의 야생형 미생물 또는 비변형 미생물(예를 들어, 야생형 세린 탈수화효소 단백질 활성을 갖는 폴리펩티드(예를 들어, 서열번호 66의 폴리펩티드)를 발현하는 미생물 또는 본 출원의 세린 탈수화효소 단백질 활성이 내재적 활성에 비하여 약화되지 않거나, 약화되기 전의 균주)의 생산능에 비하여, 본 출원의 미생물의 증가된 퓨린 뉴클레오티드 생산능으로 정의될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [39] 예를 들어, 상기 세린 탈수화효소 단백질 활성은 퓨린 뉴클레오티드 생산능 또는 수율을 측정함으로써 측정될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [40]
- [41] 본 출원에서 용어, "세린 탈수화효소(L-serine dehydratase)"는 $L\text{-serine} \leftrightarrow \text{pyruvate} + \text{NH}_3$ 의 화학 반응을 촉매하는 효소이다. 본 출원의 세린 탈수화효소는 SdaA 또는 L-세린 암모니아 분해 효소로 혼용하여 사용할 수 있다. 구체적으로, 본 출원의 세린 탈수화효소는 *sdaA* 유전자에 의해 코딩되는 세린 탈수화효소 활성을 갖는 단백질일 수 있으나, 세린 탈수화효소에 상응하는 활성을 가지는 것이라면, 그 종류에 특별히 제한되지 않는다. 상기 *sdaA* 유전자에 의해 코딩되는 세린 탈수화효소는 당업계에서 공지되어 있으며, 상기 세린 탈수화효소의 아미노산 및 폴리뉴클레오티드 서열은 공지의 데이터베이스에서 얻을 수 있으며, 그 예로 NCBI의 GenBank 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [42] 일 예로, 상기 세린 탈수화효소 단백질은 서열번호 66의 아미노산 서열 또는 이와 60% 이상의 상동성(homology) 또는 동일성(identity)을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 세린 탈수화효소 단백질 활성을 갖는 한, 이에 제한되는 것은

아니다. 구체적으로 상기 세린 탈수화효소 단백질 활성을 갖는 폴리펩티드는 서열번호 66 또는 상기 서열번호 66과 적어도 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 가지는 아미노산 서열을 가지거나, 포함하거나, 상기 아미노산 서열로 이루어지거나, 상기 아미노산 서열로 필수적으로 이루어질(essentially consisting of) 수 있다. 일 예로, 상기 세린 탈수화효소 단백질은 코리네박테리움 속 미생물 또는 코리네박테리움 스테이셔니스에 내재적으로 존재하는 단백질을 의미할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 구체적으로는 코리네박테리움 속 미생물 또는 코리네박테리움 스테이셔니스에 내재적으로 존재하는 서열번호 66의 아미노산 서열로 이루어진 세린 탈수화효소 단백질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [43] 본 출원에서 아미노산 서열과 관련하여, 특정 서열번호로 기재된 아미노산 서열을 "포함하는" 폴리펩티드, 특정 서열번호로 기재된 아미노산 서열로 "이루어진" 폴리펩티드, 또는 특정 서열번호로 기재된 아미노산 서열을 "갖는" 폴리펩티드 또는 단백질이라고 기재되어 있더라도, 해당 서열번호의 아미노산 서열로 이루어진 단백질과 동일 혹은 상응하는 활성을 가지는 경우라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환, 보존적 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 단백질도 본 출원의 범위 내에 포함됨은 자명하다. 예를 들어, 상기 변이형 단백질과 동일 혹은 상응하는 활성을 가지는 경우라면 상기 아미노산 서열 앞뒤에 단백질의 기능을 변경하지 않는 서열 추가, 자연적으로 발생할 수 있는 돌연변이, 이의 잠재성 돌연변이 (silent mutation) 또는 보존적 치환을 제외하는 것이 아니며, 이러한 서열 추가 혹은 돌연변이를 가지는 경우에도 본원의 범위 내에 속하는 것이 자명하다.
- [44] 예를 들어, 상기 아미노산 서열 N-말단, C-말단 그리고/또는 내부에 본 출원의 변이체 폴리펩티드의 기능을 변경하지 않는 서열 추가, 자연적으로 발생할 수 있는 돌연변이, 잠재성 돌연변이 (silent mutation) 또는 보존적 치환을 가지는 경우이다. 예를 들어, 폴리펩티드는 번역-동시에(co-translationally) 또는 번역-후에(post-translationally) 단백질의 이전(transfer)에 관여하는 단백질 N-말단의 시그널(또는 리더)서열과 컨주게이트 할 수 있다. 또한 상기 폴리펩티드는 폴리펩티드를 확인, 정제, 또는 합성할 수 있도록 다른 서열 또는 링커와 컨주게이트 될 수 있다.
- [45] 본 출원에서, 용어 "보존적 치환(conservative substitution)"은 한 아미노산을 유사한 구조적 및/또는 화학적 성질을 갖는 또 다른 아미노산으로 치환시키는 것을 의미한다. 이러한 아미노산 치환은 일반적으로 잔기의 극성, 전하, 용해도, 소수성, 친수성 및/또는 양친매성(amphipathic nature)에서의 유사성에 근거하여 발생할 수 있다. 예를 들어, 양으로 하전된(염기성) 아미노산은 아르기닌, 리신, 및 히스티딘; 음으로 하전된(산성) 아미노산은 글루탐산 및 아스파르트산; 비극성 곁사슬(nonpolar side chain)을 갖는 아미노산(비극성 아미노산)은 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 트립토판 및 프롤린; 극성(polar) 또는 친수성(hydrophilic) 곁사슬을 갖는 아미노산(극성 아미노산)은 세린, 쓰레오

닌, 시스테인, 타이로신, 아스파라긴 및 글루타민이 속하는 것으로 분류할 수 있다. 다른 일 예로, 전하를 띠는 결사슬을 가지는 아미노산인(electrically charged amino acid) 아르기닌, 리신, 히스티딘, 글루탐산, 아스파르트산과, 전하를 띠지 않는 결사슬을 갖는 아미노산(uncharged amino acid; neutral amino acid)로도 지칭인 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 트립토판, 프롤린, 세린, 쓰레오닌, 시스테인, 타이로신, 아스파라긴 및 글루타민으로 분류할 수 있다. 다른 일 예로, 페닐알라닌, 트립토판 및 타이로신은 방향족 아미노산(aromatic amino acid)으로 분류할 수 있다. 다른 일 예로, 발린, 류신, 이소류신은 분지쇄 아미노산(branched amino acid)으로 분류할 수 있다. 다른 일 예로, 20종 아미노산을 크기에 따라 분류하여 상대적으로 부피(volume)가 작은 아미노산 그룹부터 글리신, 알라닌, 세린; 시스테인, 프롤린, 쓰레오닌, 아스파르트산, 아스파라긴; 발린, 히스티딘, 글루탐산, 글루타민; 이소류신, 류신, 메티오닌, 리신, 아르기닌; 및 페닐알라닌, 트립토판, 타이로신의 5군으로 분류할 수 있다. 그러나 반드시 이에 제한되는 것은 아니다. 통상적으로, 보존적 치환은 폴리펩티드의 활성에 거의 영향을 미치지 않거나 또는 영향을 미치지 않을 수 있다.

[46]

[47] 또한, 상기 세린 탈수화효소를 암호화하는 염기 서열은 세린 탈수화효소의 활성을 나타내는 단백질을 코딩하는 염기 서열일 수 있다.

[48] 예를 들어, 상기 서열번호 66의 아미노산 서열을 갖는 세린 탈수화효소 단백질은 서열번호 67의 서열 또는 서열번호 67의 서열과 상동성 또는 동일성이 60% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 및 100% 미만인 염기 서열을 가지거나 포함하거나, 상기 염기 서열로 이루어지거나, 필수적으로 이루어질 수 있는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 서열번호 67의 염기 서열은 공지의 데이터베이스에서 얻을 수 있으며, 그 예로 NCBI의 GenBank 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[49] 본 출원에서, 상기 서열번호 67의 염기 서열을 포함하는 유전자는 서열번호 67의 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드, 서열번호 67의 염기 서열을 가지는 유전자 또는 폴리뉴클레오티드, 서열번호 67의 염기 서열로 이루어지는 유전자 또는 폴리뉴클레오티드와 혼용하여 사용될 수 있다.

[50] 본 출원의 폴리뉴클레오티드는 코돈의 축퇴성(degeneracy)으로 인하여 또는 본 출원의 세린 탈수화효소를 발현시키고자 하는 생물에서 선호되는 코돈을 고려하여, 본 출원의 세린 탈수화효소의 아미노산 서열을 변화시키지 않는 범위 내에서 코딩 영역에 다양한 변형이 이루어질 수 있다. 따라서, 코돈 축퇴성(codon degeneracy)에 의해 본 출원의 세린 탈수화효소의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드 또는 이와 상동성 또는 동일성을 가지는 폴리펩티드로 번역될 수 있는 폴리뉴클레오티드 역시 포함될 수 있음은 자명하다. 예를 들어, 본 출원의 폴리

뉴클레오티드는 서열번호 67 또는 이의 축퇴성 서열(degenerated sequence)일 수 있다.

- [51] 다른 예시로, 본 출원의 폴리뉴클레오티드는 서열번호 67과 상동성 또는 동일성이 60% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 및 100% 미만인 염기 서열을 가지거나 포함하거나, 또는 서열번호 67과 상동성 또는 동일성이 60% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 및 100% 미만인 염기 서열로 이루어지거나 필수적으로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [52] 또한, 본 출원의 폴리뉴클레오티드는 공지의 유전자 서열로부터 제조될 수 있는 프로브, 예를 들면, 본 출원의 폴리뉴클레오티드 서열의 전체 또는 일부에 대한 상보 서열과 엄격한 조건 하에 하이브리드화하여, 본 출원의 세린 탈수화효소를 코딩하는 서열이라면 제한없이 포함될 수 있다.
- [53] 본 출원에서 용어, "상동성 (homology)" 또는 "동일성 (identity)"은 두 개의 주어진 아미노산 서열 또는 염기 서열과 관련된 정도를 의미하며 백분율로 표시될 수 있다. 용어 상동성 및 동일성은 종종 상호교환적으로 이용될 수 있다.
- [54] 보존된(conserved) 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 서열 상동성 또는 동일성은 표준 배열 알고리즘에 의해 결정되며, 사용되는 프로그램에 의해 확립된 디폴트 갭 페널티가 함께 이용될 수 있다. 실질적으로, 상동성을 갖거나 (homologous) 또는 동일한(identical) 서열은 일반적으로 서열 전체 또는 전체-길이의 적어도 약 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%를 따라 중간 또는 높은 엄격한 조건(stringent conditions)에서 하이브리드할 수 있다. 하이브리드화는 폴리뉴클레오티드에서 일반 코돈 또는 코돈 축퇴성을 고려한 코돈을 함유하는 폴리뉴클레오티드 역시 포함됨이 자명하다.
- [55] 임의의 두 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열이 상동성, 유사성 또는 동일성을 갖는지 여부는, 예를 들어, Pearson et al (1988) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85]: 2444에서와 같은 디폴트 파라미터를 이용하여 "FASTA" 프로그램과 같은 공지의 컴퓨터 알고리즘을 이용하여 결정될 수 있다. 또는, EMBOSS 패키지의 니들만 프로그램(EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277)(버전 5.0.0 또는 이후 버전)에서 수행되는 바와 같은, 니들만-운치(Needleman-Wunsch) 알고리즘(Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453)이 사용되어 결정될 수 있다(GCG 프로그램 패키지 (Devereux, J., et al, Nucleic Acids Research 12: 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, [S.] [F.,] [ET AL, J MOLEC BIOL 215]: 403 (1990); Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, [ED.,] Academic Press, San Diego, 1994, 및 [CARILLO et al.](1988) SIAM J Applied Math 48: 1073을 포함한다). 예를 들어, 국립 생물공학 정보 데이터베이스 센터의 BLAST, 또는 ClustalW를 이용하여 상동성, 유사성 또는 동일성을 결정할 수 있다.

- [56] 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 상동성, 유사성 또는 동일성은, 예를 들어, Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math* (1981) 2:482 에 공지된 대로, 예를 들면, Needleman et al. (1970), *J Mol Biol.* 48:443과 같은 GAP 컴퓨터 프로그램을 이용하여 서열 정보를 비교함으로써 결정될 수 있다. 요약하면, GAP 프로그램은 두 서열 중 더 짧은 것에서의 기호의 전체 수로, 유사한 배열된 기호(즉, 뉴클레오티드 또는 아미노산)의 수를 나눈 값으로 정의할 수 있다. GAP 프로그램을 위한 디폴트 파라미터는 (1) 유니타리 매트릭스(unitary matrices)(동일성을 위해 1 그리고 비-동일성을 위해 0의 값을 함유함), PAM Matrix (Schwartz and Dayhoff, eds., *Atlas Of Protein Sequence And Structure*, National Biomedical Research Foundation (1978)에 의해 개시된 내용 참조), Gribskov et al.(1986) *Nucl. Acids Res.* 14: 6745 의 가중된 비교 매트릭스 (또는 EDNAFULL (NCBI NUC4.4의 EMBOSS 버전) 치환 매트릭스); (2) 각 갭을 위한 3.0의 페널티 및 각 갭에서 각 기호를 위한 추가의 0.10 페널티 (또는 갭 개방 페널티 10, 갭 연장 페널티 0.5); 및 (3) 말단 갭을 위한 무 페널티를 포함할 수 있다.
- [57] 또한, 임의의 두 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열이 상동성, 유사성 또는 동일성을 갖는지 여부는 정의된 엄격한 조건하에서 써던 혼성화 실험에 의해 서열을 비교함으로써 확인할 수 있으며, 정의되는 적절한 혼성화 조건은 해당 기술 범위 내이고, 당업자에게 잘 알려진 방법(예컨대, J. Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*; F.M. Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., New York)으로 결정될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [58] 본 출원에서, 용어 "엄격한 조건(stringent condition)"이란 폴리뉴클레오티드 간의 특이적 혼성화를 가능하게 하는 조건을 의미한다. 이러한 조건은 문헌 (Sambrook et al., *supra*, 9.50-9.51, 11.7-11.8 참조)에 구체적으로 기재되어 있다. 예를 들어, 상동성 또는 동일성이 높은 폴리뉴클레오티드끼리, 60% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 갖는 폴리뉴클레오티드끼리 하이브리드화하고, 그보다 상동성 또는 동일성이 낮은 폴리뉴클레오티드끼리 하이브리드화하지 않는 조건, 또는 통상의 써던 하이브리드화(southern hybridization)의 세척 조건인 60°C, 1×SSC, 0.1% SDS, 구체적으로 60°C, 0.1×SSC, 0.1% SDS, 보다 구체적으로 68°C, 0.1×SSC, 0.1% SDS에 상당하는 염 농도 및 온도에서, 1회, 구체적으로 2회 내지 3회 세정하는 조건을 열거할 수 있다.
- [59] 상기 혼성화는 비록 혼성화의 엄격도에 따라 염기 간의 미스매치(mismatch)가 가능할지라도, 두 개의 뉴클레오티드가 상보적 서열을 가질 것을 요구한다. 용어, "상보적"은 서로 혼성화가 가능한 뉴클레오티드 염기 간의 관계를 기술하는데 사용된다. 예를 들면, DNA에 관하여, 아데노신은 티민에 상보적이며 시토신은 구아닌에 상보적이다. 따라서, 본 출원의 폴리뉴클레오티드는 또한 실질적으로

로 유사한 염기 서열뿐만 아니라 전체 서열에 상보적인 단리된 핵산 단편을 포함할 수 있다.

- [60] 예를 들어, 본 출원의 폴리뉴클레오티드와 상동성 또는 동일성을 가지는 폴리뉴클레오티드는 55°C의 T_m 값에서 혼성화 단계를 포함하는 혼성화 조건을 사용하고 상술한 조건을 사용하여 탐지할 수 있다. 또한, 상기 T_m 값은 60°C, 63°C 또는 65°C일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니고 그 목적에 따라 당업자에 의해 적절히 조절될 수 있다.
- [61] 상기 폴리뉴클레오티드를 혼성화하는 적절한 엄격도는 폴리뉴클레오티드의 길이 및 상보성 정도에 의존하고 변수는 해당기술분야에 잘 알려져 있다(예컨대, J. Sambrook et al., 상동).
- [62]
- [63] 본 출원에서 용어, "퓨린 뉴클레오티드"는 구체적으로 5'-이노신산 (5'-inosine monophosphate; 이하 IMP), 5'-크산틸산 (5'-xanthosine monophosphate; 이하 XMP) 및 5'-구아닌산 (5'-guanosine monophosphate; 이하 GMP)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 뉴클레오티드일 수 있다. 상기 IMP는 아데닌이 탈아미노된 화합물로 히포잔틴·리보스·인산 각 1분자로 구성된 뉴클레오타이드를 의미한다. 5'-포스포라이보실-1-파이로포스페이트 (5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate; PRPP)로부터 생합성될 수 있으며, 구체적으로 PRPP의 1번 탄소에 결합되어 있던 피로인산기가 질소 원자로 치환되고, 9단계에 걸쳐 이미다졸 고리와 피리미딘 고리를 구성하여 형성될 수 있다. 상기 XMP는 IMP에서 탈수소화된 뉴클레오타이드를 의미한다. 5'-이노신산 탈수소효소 (inosine-5'-monophosphate dehydrogenase)에 의해 IMP로부터 합성될 수 있다. 상기 GMP는 구아노신 분자 내의 리보오스 부분에 인산기가 에스테르 결합을 이루고 있는 구조를 갖는 뉴클레오타이드를 의미한다. 상기 GMP는 5'-구아닌산 생합성효소 (GMP synthase)에 의해 XMP에 암모니아 분자가 추가되어 합성될 수 있다. XMP로부터 GMP를 제조하는 방법 및/또는 상기 방법에 사용되는 수단은 공지되어 있는 기술 중에서 선택될 수 있다.
- [64]
- [65] 본 출원에서 용어, "미생물(또는, 균주)"는 야생형 미생물이나 자연적 또는 인위적으로 유전적 변형이 일어난 미생물을 모두 포함하며, 외부 유전자가 삽입되거나 내재적 유전자의 활성이 증가되거나 불활성화되는 등의 원인으로 인해서 특정 기작이 약화되거나 증가된 미생물로서, 목적하는 폴리펩티드, 단백질 또는 산물의 생산을 위하여 유전적 변형(modification)을 포함하는 미생물일 수 있다. 본 출원에서 "미생물", "균주"는 동일한 의미로서 제한 없이 혼용되어 사용될 수 있다.
- [66] 예를 들어, 본 출원의 미생물은 세린 탈수소효소 단백질 활성이 내재적 활성에 비하여 약화된 미생물(예컨대, 재조합 균주)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [67] 본 출원에서 용어, "퓨린 뉴클레오티드 생산능을 가지는 미생물"은 퓨린 뉴클레오티드를 생물체 내에서 생산할 수 있는 원핵 또는 진핵 미생물 균주로서, 퓨린 뉴클레오티드 생산능이 없는 모균주에 퓨린 뉴클레오티드의 생산능이 부여된 미생물, 또는 내재적으로 퓨린 뉴클레오티드 생산능을 갖는 미생물을 모두 포함할 수 있다. 퓨린 뉴클레오티드 생산 능력은 종 개량에 의해 부여되거나 증진될 수 있다.
- [68] 본 출원에서 용어, "비변형 미생물"은 미생물에 자연적으로 발생할 수 있는 돌연변이를 포함하는 균주를 제외하는 것이 아니며, 야생형 균주 또는 천연형 균주 자체이거나, 자연적 또는 인위적 요인에 의한 유전적 변이로 형질이 변화되기 전 균주를 의미할 수 있다. 상기 "비변형 미생물"은 "변형 전 균주", "변형 전 미생물", "비변이 균주", "비변형 균주", "비변이 미생물", "변이 전 모균주", "야생형 미생물", "참조 미생물" 또는 "기준 미생물"과 혼용될 수 있다. 본 출원에서 비변형 미생물은 본 출원의 세린 탈수화효소 단백질 활성이 내재적 활성에 비하여 약화되지 않거나, 약화되기 전의 균주를 의미할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 본 출원에서 비변형 미생물은 서열번호 66으로 이루어진 아미노산 서열 또는 서열번호 67로 이루어진 폴리뉴클레오티드를 포함하는 미생물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [69]
- [70] 본 출원의 목적상, 본 출원의 미생물은 세린 탈수화효소 단백질 활성이 내재적 활성에 비하여 약화되어, 목적하는 퓨린 뉴클레오티드를 생산할 수 있는 미생물을 모두 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 출원의 미생물은 세린 탈수화효소 단백질 활성이 내재적 활성에 비하여 약화됨으로써, 퓨린 뉴클레오티드 생산능이 증가된 것을 특징으로 하며, 유전적으로 변형된 미생물 또는 재조합 미생물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로, 상기 퓨린 뉴클레오티드 생산능이 증가된 재조합 균주는, 천연의 야생형 미생물 또는 세린 탈수화효소 단백질의 내재적 활성을 가지는 비변형 미생물에 비하여 퓨린 뉴클레오티드 생산능이 증가된 미생물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [71] 일 예로, 퓨린 뉴클레오티드 생산능을 가지는 미생물은 퓨린 뉴클레오티드를 생물체 내에서 생산할 수 있는 원핵 또는 진핵 미생물 균주로서, 내재적으로 퓨린 뉴클레오티드 생산능을 갖는 미생물 또는 퓨린 뉴클레오티드 생산능이 없는 모균주에 본 출원의 약화된 세린 탈수화효소 단백질 활성으로 인해 퓨린 뉴클레오티드의 생산능이 부여된 미생물을 모두 포함할 수 있다. 퓨린 뉴클레오티드 생산 능력은 종 개량에 의해 부여되거나 증진될 수 있다.
- [72]
- [73] 상기 "내재적 활성"은 자연적 또는 인위적 요인에 의한 유전적 변이로 형질이 변화하는 경우, 형질 변화 전 모균주 또는 비변형 미생물이 본래 가지고 있던 특정 폴리펩티드의 활성을 의미한다. 이는 "변형 전 활성"과 혼용되어 사용될 수 있다.

- [74] 본 출원에서 용어, 폴리펩티드 활성의 "약화(weakening)"는 내재적 활성에 비하여 활성이 약화되거나 또는 활성이 없는 것을 모두 포함하는 개념이다. 상기 약화는 불활성화(deficiency, inactivation), 결실(deletion), 파괴(disruption), 하향 조절(down-regulation), 저하(decrease), 감쇠(attenuation), 억압(repression), 감소(reducion) 등의 용어와 혼용될 수 있다.
- [75] 예를 들어, 상기 약화는 단백질이 활성을 나타내지만 결실에 의해 완전히 불활성화되지 않은 상태로서, 단백질의 활성이 비변형 미생물, 야생형 균주 또는 모균주에 비하여 약화된 경우를 의미할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [76] 예를 들어, 상기 약화는 불활성화될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 불활성화는 단백질의 발현이 모균주 또는 서열번호 66의 아미노산 서열로 이루어진 단백질이 비변형된 균주에 비하여 전혀 발현이 되지 않거나 또는 발현이 되더라도 그 활성이 없거나 약화된 것을 의미할 수 있다.
- [77] 상기 약화는 상기 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 변이 등으로 폴리펩티드 자체의 활성이 본래 미생물이 가지고 있는 폴리펩티드의 활성에 비해 약화 또는 제거된 경우, 이를 코딩하는 유전자의 발현 저해 또는 폴리펩티드로의 번역(translation) 저해 등으로 세포 내에서 전체적인 폴리펩티드 활성 정도가 천연 균주에 비하여 낮은 경우, 상기 유전자의 발현이 전혀 이루어지지 않은 경우, 및 유전자의 발현이 되더라도 폴리펩티드의 활성이 없는 경우 역시 포함할 수 있다.
- [78] 폴리펩티드의 활성이 내재적 활성에 비하여 약화한다는 것은, 형질 변화 전 모균주 또는 비변형 미생물이 본래 가지고 있던 특정 폴리펩티드의 활성에 비하여 낮아진 것을 의미한다. 상기 폴리펩티드의 활성의 약화 여부는 해당 폴리펩티드의 활성 정도, 발현량 또는 해당 폴리펩티드로부터 배출되는 산물의 양의 약화로 부터 확인할 수 있다.
- [79] 일 예로, 상기 약화는 세린 탈수화효소 단백질의 활성이 형질 변화 전 모균주 또는 비변형 미생물의 세린 탈수화효소 단백질의 활성의 약 100% 미만, 약 90% 이하, 약 80% 이하, 약 70% 이하, 약 60% 이하, 약 50% 이하, 약 40% 이하, 약 30% 이하, 약 20% 이하, 약 10% 이하, 약 5% 이하이거나 또는 0%인 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [80] 예를 들어, 상기 불활성화는 세린 탈수화효소 단백질의 발현이 비변형 미생물에 비하여 전혀 발현이 되지 않거나 또는 발현이 되더라도 그 활성이 없거나 약화된 것을 의미할 수 있다.
- [81] 이러한 폴리펩티드의 활성의 약화는, 당업계에서 알려진 임의의 방법에 의하여 수행될 수 있으나 이로 제한되는 것은 아니며, 당해 분야에 잘 알려진 다양한 방법의 적용으로 달성될 수 있다(예컨대, Nakashima N et al., *Bacterial cellular engineering by genome editing and gene silencing*. *Int J Mol Sci*. 2014;15(2):2773-2793, Sambrook et al. *Molecular Cloning* 2012 등).
- [82] 구체적으로, 본 출원의 폴리펩티드 활성의 약화는

- [83] 1) 폴리펩티드를 코딩하는 유전자 전체 또는 일부의 결손;
- [84] 2) 폴리펩티드를 코딩하는 유전자의 발현이 약화하도록 발현조절영역(또는 발현조절서열)의 변형;
- [85] 3) 폴리펩티드의 활성이 제거 또는 약화되도록 상기 폴리펩티드를 구성하는 아미노산 서열의 변형(예를 들어, 아미노산 서열 상의 1 이상의 아미노산의 삭제/치환/부가);
- [86] 4) 폴리펩티드의 활성이 제거 또는 약화되도록 상기 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열의 변형(예를 들어, 폴리펩티드의 활성이 제거 또는 약화되도록 변형된 폴리펩티드를 코딩하도록 상기 폴리펩티드 유전자의 핵산염기 서열 상의 1 이상의 핵산염기의 삭제/치환/부가);
- [87] 5) 폴리펩티드를 코딩하는 유전자의 개시코돈 또는 5'-UTR 지역 염기서열의 변형;
- [88] 6) 폴리펩티드를 코딩하는 상기 유전자의 전사체에 상보적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오티드(예컨대, 안티센스 RNA)의 도입;
- [89] 7) 리보솜(ribosome)의 부착이 불가능하도록 2차 구조물을 형성하기 위하여 폴리펩티드를 코딩하는 유전자의 사인-달가르노(Shine-Dalgarno) 서열 앞단에 사인-달가르노 서열과 상보적인 서열의 부가;
- [90] 8) 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열의 ORF(open reading frame)의 3' 말단에 반대 방향으로 전사되는 프로모터의 부가(Reverse transcription engineering, RTE); 또는
- [91] 9) 상기 1) 내지 8) 중 선택된 2 이상의 조합일 수 있으나, 이에, 특별히 제한되는 것은 아니다.
- [92] 예를 들어,
- [93] 상기 1) 폴리펩티드를 코딩하는 상기 유전자 일부 또는 전체의 결손은, 염색체 내 내재적 목적 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 전체의 제거, 일부 뉴클레오티드 서열이 결실된 폴리뉴클레오티드로의 교체 또는 마커 유전자로 교체될 수 있다.
- [94] 이러한 폴리뉴클레오티드의 일부 또는 전체를 결손하는 방법은 미생물 내 염색체 삽입용 벡터를 통해 상동 재조합에 의하여 폴리뉴클레오티드를 결실시키는 방법, 자외선과 같은 빛 또는 화학물질을 이용하여 돌연변이를 유발하고, 얻어진 돌연변이체로부터 목적 유전자가 결손된 균주를 선별하여 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 유전자 일부 또는 전체의 결손 방법에는 DNA 재조합 기술에 의한 방법이 포함될 수 있다. 예를 들면, 목적 유전자와 상동성이 있는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열 또는 벡터를 상기 미생물에 주입하여 상동 재조합(homologous recombination)이 일어나게 함으로써 유전자 일부 또는 전체의 결손이 이루어질 수 있다. 상기 주입되는 뉴클레오티드 서열 또는 벡터는 우성 선별 마커를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [95] 또한, 상기 2) 발현 조절 서열의 변형은, 결실, 삽입, 비보존적 또는 보존적 치환 또는 이들의 조합으로 발현조절영역(또는 발현조절서열) 상의 변이 발생, 또는 더욱 약한 활성을 갖는 서열로의 교체일 수 있다. 상기 발현조절영역에는 프로모터, 오퍼레이터 서열, 리보솜 결합부위를 코딩하는 서열, 및 전사와 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [96] 또한, 상기 3) 및 4)의 아미노산 서열 또는 폴리뉴클레오티드 서열의 변형은 폴리펩티드의 활성을 약화하도록 상기 폴리펩티드의 아미노산 서열 또는 상기 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 결실, 삽입, 비보존적 또는 보존적 치환 또는 이들의 조합으로 서열상의 변이 발생, 또는 더욱 약한 활성을 갖도록 개량된 아미노산 서열 또는 폴리뉴클레오티드 서열 또는 활성이 없도록 개량된 아미노산 서열 또는 폴리뉴클레오티드 서열로의 교체일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 예를 들면, 폴리뉴클레오티드 서열 내 변이를 도입하여 종결 코돈을 형성시킴으로써, 유전자의 발현을 저해하거나 약화시킬 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [97] 또한, 상기 5) 폴리펩티드를 코딩하는 유전자의 개시코돈 또는 5'-UTR 지역의 염기서열 변형은, 예를 들면, 내재적 개시코돈에 비해 폴리펩티드 발현율이 더 낮은 다른 개시코돈으로 치환하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [98] 상기 6) 폴리펩티드를 코딩하는 상기 유전자의 전사체에 상보적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오티드(예컨대, 안티센스 RNA)의 도입은 예를 들어 문헌 [Weintraub, H. et al., Antisense-RNA as a molecular tool for genetic analysis, Reviews - Trends in Genetics, Vol. 1(1) 1986]을 참고할 수 있다.
- [99] 상기 7) 리보솜(ribosome)의 부착이 불가능하도록 2차 구조물을 형성하기 위하여 폴리펩티드를 코딩하는 유전자의 사인-달가르노(Shine-Dalgarno) 서열 앞단에 사인-달가르노 서열과 상보적인 서열의 부가는 mRNA 번역을 불가능하게 하거나 속도를 저하시키는 것일 수 있다.
- [100] 상기 8) 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열의 ORF(open reading frame)의 3' 말단에 반대 방향으로 전사되는 프로모터의 부가(Reverse transcription engineering, RTE)는 상기 폴리펩티드를 코딩하는 유전자의 전사체에 상보적인 안티센스 뉴클레오티드를 만들어 활성을 약화하는 것일 수 있다.
- [101]
- [102] 본 출원의 미생물에서 폴리뉴클레오티드의 일부 또는 전체의 변형은 (a) 미생물 내 염색체 삽입용 벡터를 이용한 상동 재조합 또는 유전자가위 (engineered nuclease, e.g., CRISPR-Cas9)을 이용한 유전체 교정 및/또는 (b) 자외선 및 방사선 등과 같은 빛 및/또는 화학물질 처리에 의해 유도될 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 상기 유전자 일부 또는 전체의 변형 방법에는 DNA 재조합 기술에 의한 방법이 포함될 수 있다. 예를 들면, 목적 유전자와 상동성이 있는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열 또는 벡터를 상기 미생물에 주입하여 상동 재조합(homologous recombination)이 일어나게 함으로써 유전자 일부 또는 전체의

결손이 이루어질 수 있다. 상기 주입되는 뉴클레오티드 서열 또는 벡터는 우성 선별 마커를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[103]

[104] 일 예로, 본 출원의 퓨린 뉴클레오티드 생산능을 가지는 재조합 미생물은 벡터를 통해 형질전환되어 본 출원의 세린 탈수화효소 단백질 활성이 약화되어 퓨린 뉴클레오티드를 생산할 수 있는 모든 미생물을 포함할 수 있다.

[105] 본 출원의 벡터는 적합한 숙주 내에서 목적 폴리펩티드를 발현시킬 수 있도록 적합한 발현조절영역(또는 발현조절서열)에 작동 가능하게 연결된 상기 목적 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 염기서열을 포함하는 DNA 제조물을 포함할 수 있다. 상기 발현조절영역은 전사를 개시할 수 있는 프로모터, 그러한 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합부위를 코딩하는 서열, 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함할 수 있다. 벡터는 적당한 숙주세포 내로 형질전환된 후, 숙주 게놈과 무관하게 복제되거나 기능할 수 있으며, 게놈 그 자체에 통합될 수 있다.

[106] 본 출원에서 사용되는 벡터는 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 있다. 예를 들어, 파지 벡터 또는 코스미드 벡터로서 pWE15, M13, MBL3, MBL4, IXII, ASHII, APII, t10, t11, Charon4A, 및 Charon21A 등을 사용할 수 있으며, 플라스미드 벡터로서 pDZ계, pBR계, pUC계, pBluescriptII계, pGEM계, pTZ계, pCL계, pSK계, pSKH계 및 pET계 등을 사용할 수 있다. 구체적으로는 pDZ, pDC, pDCM2, pACYC177, pACYC184, pCL, pSK, pSKH130, pECCG117, pUC19, pBR322, pMW118, pCC1BAC 벡터 등을 사용할 수 있다.

[107] 일례로 세포 내 염색체 삽입용 벡터를 통해 목적 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 염색체 내로 삽입할 수 있다. 상기 폴리뉴클레오티드의 염색체 내로의 삽입은 당업계에 알려진 임의의 방법, 예를 들면, 상동재조합(homologous recombination)에 의하여 이루어질 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다. 상기 염색체 삽입 여부를 확인하기 위한 선별 마커(selection marker)를 추가로 포함할 수 있다. 상기 선별 마커는 벡터로 형질전환된 세포를 선별, 즉 목적 핵산 분자의 삽입 여부를 확인하기 위한 것으로, 약물 내성, 영양 요구성, 세포 독성제에 대한 내성 또는 표면 폴리펩티드의 발현과 같은 선택가능 표현형을 부여하는 마커들이 사용될 수 있다. 선택제(selective agent)가 처리된 환경에서는 선별 마커를 발현하는 세포만 생존하거나 다른 표현 형질을 나타내므로, 형질전환된 세포를 선별할 수 있다.

[108] 본 출원에서 용어 "형질전환"은 표적 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 숙주세포 혹은 미생물 내에 도입하여 숙주세포 내에서 상기 폴리뉴클레오티드가 코딩하는 폴리펩티드가 발현할 수 있도록 하는 것을 의미한다. 형질전환된 폴리뉴클레오티드는 숙주세포 내에서 발현될 수 있지만 한

다면, 숙주세포의 염색체 내에 삽입되어 위치하거나 염색체 외에 위치하거나 상관없이 이들 모두를 포함할 수 있다. 또한, 상기 폴리뉴클레오티드는 목적 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 및/또는 RNA를 포함한다. 상기 폴리뉴클레오티드는 숙주세포 내로 도입되어 발현될 수 있는 것이면, 어떠한 형태로도 도입될 수 있다. 예를 들면, 상기 폴리뉴클레오티드는 자체적으로 발현되는데 필요한 모든 요소를 포함하는 유전자 구조체인 발현 카세트(expression cassette)의 형태로 숙주세포에 도입될 수 있다. 상기 발현 카세트는 통상 상기 폴리뉴클레오티드에 작동 가능하게 연결되어 있는 프로모터(promoter), 전사 종결신호, 리보솜 결합부위 및 번역 종결신호를 포함할 수 있다. 상기 발현 카세트는 자체 복제가 가능한 발현 벡터 형태일 수 있다. 또한, 상기 폴리뉴클레오티드는 그 자체의 형태로 숙주세포에 도입되어 숙주세포에서 발현에 필요한 서열과 작동 가능하게 연결되어 있는 것일 수도 있으며, 이에 제한되지 않는다.

- [109] 본 출원에서 용어, "작동가능하게 연결된"은 조절 서열이 코딩 서열의 발현을 지시하도록 조절 서열이 적절한 위치에 배치되는 구성을 의미한다. 따라서 "작동가능하게 연결된"은, 프로모터, 종결자, 신호 서열 또는 인핸서 영역과 같이 알려진 혹은 원하는 활성을 가진 기능적 도메인의 조절 영역이 타겟(유전자 또는 폴리펩티드)의 발현, 분비 또는 기능을 상기의 알려진 혹은 원하는 활성에 따라 조절할 수 있도록 그 타겟에 부착되거나 연결된 것을 포함한다. 예를 들어, 본 출원의 목적 변이체 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 전사를 개시 및 매개하도록 하는 프로모터 서열과 상기 폴리뉴클레오티드 서열이 기능적으로 연결되어 있는 것을 의미한다.
- [110] 본 출원에서 용어, "발현"은 폴리펩티드의 생성에 관여하는 임의의 단계, 예를 들어 전사, 전사 후 변형, 번역, 번역후 변형, 및 분비 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [111] 본 출원에서 용어, "발현 벡터"는 코딩 서열 및 이의 발현을 위해 작동가능하게 연결된 조절 서열을 포함하는 선형 혹은 환형 핵산 분자를 의미한다.
- [112] 본 출원에서 용어, "조절 서열(regulatory sequence)"은 코딩 서열의 발현에 필요한 폴리뉴클레오티드 서열을 의미한다. 각각의 조절 서열은 코딩 서열에 대해 천연 연형이거나(기원이 동일함) 또는 외래(foreign; 다른 유전자에서 유래함) 서열일 수 있다. 상기 조절 서열의 예시는 리더 서열(leader sequence), 폴리아데닐레이션 서열(polyadenylation sequence), 프로펩티드 서열, 프로모터, 신호 펩티드 서열, 오피레이터 서열, 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열, 전사 및 번역 종결을 조절하는 서열을 포함한다. 상기 조절 서열의 최소 단위는 프로모터, 전사 및 번역 종결 서열을 포함할 수 있다.
- [113] 세포, 폴리뉴클레오티드, 폴리펩티드, 또는 벡터와 관련하여, 본 출원에서 용어 "재조합"은 세포, 폴리뉴클레오티드, 폴리펩티드 또는 벡터가 이종(heterologous) 핵산 또는 폴리펩티드의 도입 또는 천연 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 변경에 의해 변형된 것, 또는 세포가 그렇게 변형된 세포로부터 유도되는 것을

의미한다. 따라서, 예를 들어, 재조합 세포는 세포의 천연(비-재조합) 형태 내에서 발견되지 않는 유전자를 발현하거나, 또는 발견되거나 전혀 발견되지 않는, 다르게는 비정상적으로 발현되는 천연 유전자를 발현할 수 있다.

[114]

[115] 예를 들어, 상기 퓨린 뉴클레오티드를 생산하는 미생물은 서열번호 66의 아미노산 서열로 이루어지는 단백질, 또는 서열번호 66과 적어도 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.7% 또는 99.9% 이상의 상동성 또는 동일성을 가지는 아미노산 서열로 이루어지는 단백질을 내재적으로 포함하는 미생물일 수 있다.

[116]

예를 들어, 상기 퓨린 뉴클레오티드를 생산하는 미생물은 상기 서열번호 66과 적어도 80% 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 단백질을 암호화할 수 있는 폴리뉴클레오티드 서열, 서열번호 67의 염기서열, 또는 서열번호 67의 염기서열과 상동성 또는 동일성이 60% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 및 100% 미만인 염기서열을 내재적으로 포함하는 미생물일 수 있다.

[117]

[118] 본 출원의 미생물은 다양한 공지의 방법에 의해 세린 탈수화효소 단백질 활성이 내재적 활성에 비하여 약화된 미생물을 모두 포함할 수 있다.

[119]

하나의 구체예로, 본 출원의 세린 탈수화효소 단백질 활성이 내재적 활성에 비하여 약화된 미생물은 세린 탈수화효소 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 결손되거나 변형된 미생물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 구체적으로, 서열번호 67의 염기서열이 결손되어 세린 탈수화효소 단백질의 활성이 없는 미생물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[120]

[121] 일 예로, 본 출원의 퓨린 뉴클레오티드 생산능이 증가된 미생물은 비변형 미생물과 비교하여 퓨린 뉴클레오티드 생산능이 증가된 미생물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 일 예로, 상기 퓨린 뉴클레오티드 생산능의 증가 여부를 비교하는 대상 균주인, 비변형 미생물은 CJX1664 균주 또는 KCCM12151P 균주일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[122]

일 예로, 상기 퓨린 뉴클레오티드 생산능이 증가된 미생물은 변이 전 모균주 또는 비변형 미생물의 퓨린 뉴클레오티드 생산능에 비하여 약 1% 이상, 구체적으로는 약 1% 이상, 약 2.5% 이상, 약 5% 이상, 약 6% 이상, 약 7% 이상, 약 8% 이상, 약 9% 이상, 약 10% 이상, 약 15% 이상, 약 20% 이상, 약 25% 이상, 약 30% 이상, 또는 약 35% 이상 (상한값은 특별한 제한은 없으며, 예컨대, 약 200% 이하, 약 150% 이하, 약 100% 이하, 약 50% 이하, 약 45% 이하 또는 약 40% 이하일 수 있음) 증가된 것일 수 있으나, 변이 전 모균주 또는 비변형 미생물의 생산능에 비해 +값의 증가량을 갖는 한, 이에 제한되지 않는다. 다른 예에서, 상기 퓨린 뉴클레오티드 생산능이 증가된 재조합 균주는 변이 전 모균주 또는 비변형 미생물에 비

하여, 퓨린 뉴클레오티드 생산능이 약 1.1배 이상, 약 1.15배 이상, 약 1.2배 이상, 약 1.25배 이상, 약 1.3배 이상 또는 약 1.35배 이상 (상한값은 특별한 제한은 없으며, 예컨대, 약 10배 이하, 약 5배 이하, 약 3배 이하, 약 2배 이하, 약 1.5배 이하 또는 약 1.4배 이하일 수 있음) 증가된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[123]

[124] 일 예로, 상기 퓨린 뉴클레오티드 생산능을 갖는 미생물은, 원핵세포 또는 진핵세포 모두 가능하나, 구체적으로 원핵세포일 수 있다. 상기 원핵세포는, 일 예로 에스케리치아 속(*Escherichiasp.*), 어위니아 속(*Erwiniasp.*), 세라티아 속(*Serratiasp.*), 프로비덴시아 속(*Providenciasp.*), 코리네박테리움 속(*Corynebacteriasp.*), 슈도모나스 속(*Pseudomonassp.*), 렙토스피라 속(*Leptospira*), 살모넬라 속(*Salmonellasp.*), 브레비박테리아 속(*Brevibacteriasp.*), 하이포모나스 속(*Hypomononassp.*), 크로모박테리움 속(*Chromobacteriumsp.*) 및 노카디아 속(*Norcardiasp.*), 또는 곰팡이류(*fungi*) 또는 효모류(*yeast*)에 속하는 미생물 균주가 포함될 수 있다. 구체적으로는, 에스케리치아 속, 코리네박테리움 속, 렙토스피라 속의 미생물 균주와 효모이다. 더욱 구체적으로는, 코리네박테리움(*Corynebacterium*) 속 미생물 균주일 수 있다.

[125] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 미생물로서, 본 출원의 미생물은 코리네박테리움 속 미생물일 수 있다.

[126] 본 출원의 일 예로, 본 출원의 미생물은 코리네박테리움 스테셔니스(*Corynebacterium stationis*), 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*), 코리네박테리움 크루디락티스(*Corynebacterium crudilactis*), 코리네박테리움 데세르티(*Corynebacterium deserti*), 코리네박테리움 이피시엔스(*Corynebacterium efficiens*), 코리네박테리움 칼루내(*Corynebacterium callunae*), 코리네박테리움 싱굴라레(*Corynebacterium singulare*), 코리네박테리움 할로톨레란스(*Corynebacterium halotolerans*), 코리네박테리움 스트리아툼(*Corynebacterium striatum*), 코리네박테리움 암모니아게네스(*Corynebacterium ammoniagenes*), 코리네박테리움 폴루티솔리(*Corynebacterium pollutisoli*), 코리네박테리움 이미탄스(*Corynebacterium imitans*), 코리네박테리움 테스트디노리스(*Corynebacterium testudinoris*) 또는 코리네박테리움 플라베스센스(*Corynebacterium flavescens*)일 수 있다. 구체적으로, 본 출원의 미생물은 코리네박테리움 속 미생물, 보다 구체적으로 코리네박테리움 스테셔니스(*Corynebacterium stationis*) 또는 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[127]

[128] 본 출원의 퓨린 뉴클레오티드 생산능을 갖는 미생물은 추가로 하기 (a) 내지 (d)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 단백질 활성이 조절되어, 퓨린 뉴클레오티드 생산능이 향상된 미생물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다:

- [129] (a) 포름산 탈수소효소 단백질 활성이 내재적 활성에 비하여 약화;
- [130] (b) 글리신 분해 효소 단백질 활성이 내재적 활성에 비하여 강화;
- [131] (c) 세린 하이드록시메틸트랜스퍼라제 단백질 활성이 내재적 활성에 비하여 강화; 및
- [132] (d) 포르메이트 의존성 포스포리보실글리신아미드 포빌 전이효소 단백질 활성이 내재적 활성에 비하여 강화.
- [133]
- [134] 본 출원에서 용어, 폴리펩티드 활성의 "강화(increase)"는, 폴리펩티드의 활성이 내재적 활성에 비하여 강화되는 것을 의미한다. 상기 강화는 활성화(activation), 상향조절(up-regulation), 과발현(overexpression), 증가(enhancement) 등의 용어와 혼용될 수 있다.
- [135] 상기 강화는 본래 가지고 있지 않았던 활성을 나타내게 되는 것, 또는 내재적 활성 또는 변형 전 활성에 비하여 향상된 활성을 나타내게 되는 것을 모두 포함할 수 있다.
- [136] 예를 들어, 상기 "본래 가지고 있지 않았던 활성을 나타내게 되는 것"은 "단백질의 도입"일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 단백질의 도입은, 미생물이 본래 가지고 있지 않았던 유전자가 그 미생물내에서 발현됨에 따라 특정 단백질의 활성을 나타나게 되는 것 또는 해당 단백질의 내재적 활성 또는 변형 전 활성에 비하여 강화 또는 향상된 활성을 나타나게 되는 것을 의미한다. 예를 들어, 특정 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 미생물 내 염색체로 도입되거나, 특정 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터가 미생물 내로 도입되어 이의 활성이 나타나는 것일 수 있다.
- [137] 상기 "내재적 활성"은 자연적 또는 인위적 요인에 의한 유전적 변이로 형질이 변화하는 경우, 형질 변화 전 모균주 또는 비변형 미생물이 본래 가지고 있던 특정 폴리펩티드의 활성을 의미한다. 이는 "변형 전 활성"과 혼용되어 사용될 수 있다.
- [138] 폴리펩티드의 활성이 내재적 활성에 비하여 강화한다는 것은, 형질 변화 전 모균주 또는 비변형 미생물이 본래 가지고 있던 특정 폴리펩티드의 활성 및/또는 농도(발현량)에 비하여 향상된 것을 의미한다.
- [139] 일 예로, 상기 강화는 상응하는 단백질의 활성이 없던 것이 나타나거나, 또는 이의 활성 또는 농도가 야생형 단백질이나 초기의 미생물 균주에서의 활성 또는 농도를 기준으로 하여 일반적으로 약 1%, 약 10%, 약 25%, 약 50%, 약 75%, 약 100%, 약 150%, 약 200%, 약 300%, 약 400% 또는 약 500%, 최대 약 1000% 또는 약 2000% 이상까지 강화되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [140] 상기 폴리펩티드의 활성의 강화는 외래의 폴리펩티드를 도입하거나, 내재적인 폴리펩티드의 활성 강화를 통해 달성할 수 있다. 상기 폴리펩티드의 활성의 강화 여부는 해당 폴리펩티드의 활성 정도, 발현량 또는 해당 폴리펩티드로부터 배출되는 산물의 양의 강화로부터 확인할 수 있다.

- [141] 상기 폴리펩티드의 활성의 강화는 당해 분야에 잘 알려진 다양한 방법의 적용이 가능하며, 목적 폴리펩티드의 활성을 변형전 미생물보다 강화시킬 수 있는 한, 제한되지 않는다. 구체적으로, 분자생물학의 일상적 방법인 당업계의 통상의 기술자에게 잘 알려진 유전자 공학 및/또는 단백질 공학을 이용한 것일 수 있으나, 이로 제한되지 않는다(예컨대, Sitnicka et al. *Functional Analysis of Genes. Advances in Cell Biology*. 2010, Vol. 2. 1-16, Sambrook et al. *Molecular Cloning* 2012 등).
- [142] 구체적으로, 본 출원의 폴리펩티드의 활성의 강화는
- [143] 1) 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 세포 내 카피수 강화;
- [144] 2) 폴리펩티드를 코딩하는 염색체상의 유전자 발현조절영역의 변형(예를 들어, 발현조절영역 내 변이 발생, 더욱 강한 활성을 갖는 서열로의 교체, 또는 더욱 강한 활성을 갖는 서열 삽입);
- [145] 3) 폴리펩티드를 코딩하는 유전자 전사체의 개시코돈 또는 5'-UTR 지역을 코딩하는 염기서열의 변형;
- [146] 4) 폴리펩티드 활성이 강화되도록 상기 폴리펩티드의 아미노산 서열의 변형;
- [147] 5) 폴리펩티드 활성이 강화되도록 상기 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열의 변형 (예를 들어, 폴리펩티드의 활성이 강화되도록 변형된 폴리펩티드를 코딩하도록 상기 폴리펩티드 유전자의 폴리뉴클레오티드 서열의 변형);
- [148] 6) 폴리펩티드의 활성을 나타내는 외래 폴리펩티드 또는 이를 코딩하는 외래 폴리뉴클레오티드의 도입;
- [149] 7) 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 코돈 최적화;
- [150] 8) 폴리펩티드의 삼차구조를 분석하여 노출 부위를 선택하여 변형하거나 화학적으로 수식; 또는
- [151] 9) 상기 1) 내지 8) 중 선택된 2 이상의 조합일 수 있으나, 이에, 특별히 제한되는 것은 아니다.
- [152] 예를 들어,
- [153] 상기 1) 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 세포 내 카피수 강화는, 해당 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 작동가능하게 연결된, 숙주와 무관하게 복제되고 기능할 수 있는 벡터가 숙주세포 내 도입된 것일 수 있다. 또는, 해당 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 숙주세포 내의 염색체 내에 1 카피 또는 2 카피 이상 도입된 것일 수 있다. 상기 염색체 내에 도입은 숙주세포 내의 염색체 내로 상기 폴리뉴클레오티드를 삽입시킬 수 있는 벡터가 숙주세포 내에 도입됨으로써 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 벡터는 전술한 바와 같다.
- [154] 상기 2) 폴리펩티드를 코딩하는 염색체상의 유전자 발현조절영역(또는 발현조절서열)을 활성이 강력한 서열로 교체는, 예를 들면, 상기 발현조절영역의 활성을 더욱 강화하도록 결실, 삽입, 비보존적 또는 보존적 치환 또는 이들의 조합으로 서열상의 변이 발생, 또는 더욱 강한 활성을 가지는 서열로의 교체일 수 있다.

상기 발현조절영역은, 특별히 이에 제한되지 않으나 프로모터, 오퍼레이터 서열, 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열, 그리고 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열 등을 포함할 수 있다. 일 예로, 본래의 프로모터를 강력한 프로모터로 교체시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [155] 공지된 강력한 프로모터의 예에는 cj1 내지 cj7 프로모터(미국등록특허 US 7662943 B2), lac 프로모터, trp 프로모터, trc 프로모터, tac 프로모터, 람다 파아지 PR 프로모터, PL 프로모터, tet 프로모터, gapA 프로모터, SPL7 프로모터, SPL13(sm3) 프로모터(미국등록특허 US 10584338 B2), O2 프로모터(미국등록특허 US 10273491 B2), tkt 프로모터 및 yccA 프로모터 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [156] 상기 3) 폴리펩티드를 코딩하는 유전자의 개시코돈 또는 5'-UTR 지역의 염기서열 변형은, 예를 들면, 내재적 개시코돈에 비해 폴리펩티드 발현율이 더 높은 다른 개시코돈으로 치환하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [157] 상기 4) 및 5)의 아미노산 서열 또는 폴리뉴클레오티드 서열의 변형은, 폴리펩티드의 활성을 강화하도록 상기 폴리펩티드의 아미노산 서열 또는 상기 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 결실, 삽입, 비보존적 또는 보존적 치환 또는 이들의 조합으로 서열상의 변이 발생, 또는 더욱 강한 활성을 갖도록 개량된 아미노산 서열 또는 폴리뉴클레오티드 서열 또는 활성이 강화하도록 개량된 아미노산 서열 또는 폴리뉴클레오티드 서열로의 교체일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 교체는 구체적으로 상동재조합에 의하여 폴리뉴클레오티드를 염색체내로 삽입함으로써 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 이때 사용되는 벡터는 염색체 삽입 여부를 확인하기 위한 선별 마커 (selection marker) 를 추가로 포함할 수 있다. 상기 선별 마커는 전술한 바와 같다.
- [158] 상기 6) 폴리펩티드의 활성을 나타내는 외래 폴리뉴클레오티드의 도입은, 상기 폴리펩티드와 동일/유사한 활성을 나타내는 폴리펩티드를 코딩하는 외래 폴리뉴클레오티드의 숙주세포 내 도입일 수 있다. 상기 외래 폴리뉴클레오티드는 상기 폴리펩티드와 동일/유사한 활성을 나타내는 한 그 유래나 서열에 제한이 없다. 상기 도입에 이용되는 방법은 공지된 형질전환 방법을 당업자가 적절히 선택하여 수행될 수 있으며, 숙주 세포 내에서 상기 도입된 폴리뉴클레오티드가 발현됨으로써 폴리펩티드가 생성되어 그 활성이 강화될 수 있다.
- [159] 상기 7) 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 코돈 최적화는, 내재 폴리뉴클레오티드가 숙주세포 내에서 전사 또는 번역이 강화하도록 코돈 최적화한 것이거나, 또는 외래 폴리뉴클레오티드가 숙주세포 내에서 최적화된 전사, 번역이 이루어지도록 이의 코돈을 최적화한 것일 수 있다.
- [160] 상기 8) 폴리펩티드의 삼차구조를 분석하여 노출 부위를 선택하여 변형하거나 화학적으로 수식하는 것은, 예를 들어 분석하고자 하는 폴리펩티드의 서열정보를 기지 단백질들의 서열정보가 저장된 데이터베이스와 비교함으로써 서열의 유사성 정도에 따라 주형 단백질 후보를 결정하고 이를 토대로 구조를 확인하여,

변형하거나 화학적으로 수식할 노출 부위를 선택하여 변형 또는 수식하는 것일 수 있다.

- [161] 이와 같은 폴리펩티드 활성의 강화는, 상응하는 폴리펩티드의 활성 또는 농도가 야생형이나 변형 전 미생물 균주에서 발현된 폴리펩티드의 활성 또는 농도를 기준으로 하여 강화되거나, 해당 폴리펩티드로부터 생산되는 산물의 양이 증가되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [162]
- [163] 본 출원의 일 예로, 본 출원의 퓨린 뉴클레오티드 생산능을 갖는 미생물은 추가로 포름산 탈수소효소 단백질 활성이 내재적 활성에 비하여 약화되어, 퓨린 뉴클레오티드 생산능이 향상된 미생물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [164]
- [165] 본 출원에서 용어, “포름산 탈수소효소 (formate dehydrogenase)”는 포름산 탈수소효소 서브유닛 1(Fdh subunit 1), 포름산 탈수소효소 서브유닛 2(Fdh subunit 2) 및 포름산 탈수소효소 서브유닛 3(Fdh subunit 3)로 구성되어, 포름산을 기질로 하여, 산화반응을 촉매시켜 NAD^+ 를 환원시키고 NADH 및 CO_2 를 생성하는 효소이다. 구체적으로, 본 출원의 포름산 탈수소효소는 포름산 탈수소효소 서브유닛 1(Fdh subunit 1), 포름산 탈수소효소 서브유닛 2(Fdh subunit 2) 및 포름산 탈수소효소 서브유닛 3(Fdh subunit 3)으로 이루어진 균으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 단백질인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 출원의 포름산 탈수소효소는 포름산 탈수소효소 서브유닛 1(Fdh subunit 1), 포름산 탈수소효소 서브유닛 2(Fdh subunit 2) 및 포름산 탈수소효소 서브유닛 3(Fdh subunit 3) 복합체 (complex)를 의미하는 것으로 사용될 수 있고, Fdh로 혼용하여 사용할 수 있다.
- [166] 본 출원의 "*fdh* 유전자"는 *fdh 1*, *fdh 2*, 및 *fdh 3* 유전자로 구성되어, 본 출원의 포름산 탈수소효소를 암호화하는 유전자를 의미하는 것으로 사용될 수 있다. 구체적으로, 본 출원의 *fdh* 유전자는 본 출원의 포름산 탈수소효소 서브유닛 1(Fdh subunit 1), 포름산 탈수소효소 서브유닛 2(Fdh subunit 2) 및 포름산 탈수소효소 서브유닛 3(Fdh subunit 3) 복합체(complex)를 암호화하는 유전자를 의미하는 것으로 사용될 수 있다.
- [167] 구체적으로, 본 출원의 포름산 탈수소효소는 *fdh 1*, *fdh 2*, 및 *fdh 3* 유전자 각각에 의해 코딩되는 포름산 탈수소효소 서브유닛 1(Fdh subunit 1), 포름산 탈수소효소 서브유닛 2(Fdh subunit 2) 및 포름산 탈수소효소 서브유닛 3(Fdh subunit 3) 활성을 갖는 단백질일 수 있으나, 포름산 탈수소효소에 상응하는 활성을 가지는 것이라면, 그 종류에 특별히 제한되지 않는다. 상기 *fdh 1*, *fdh 2*, 및 *fdh 3* 유전자 각각에 의해 코딩되는 포름산 탈수소효소 서브유닛 1(Fdh subunit 1), 포름산 탈수소효소 서브유닛 2(Fdh subunit 2) 및 포름산 탈수소효소 서브유닛 3(Fdh subunit 3)는 각각 당업계에 공지되어 있으며, 상기 포름산 탈수소효소 서브유닛 1(Fdh subunit 1), 포름산 탈수소효소 서브유닛 2(Fdh subunit 2) 및 포름산 탈수소효소 서브유닛 3(Fdh subunit 3) 각각의 아미노산 및 폴리뉴클레오티드 서열은 공지된 데

이터베이스에서 얻을 수 있으며, 그 예로 NCBI의 GenBank 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [168] 일 예로, 상기 포름산 탈수소효소 서브유닛 1(Fdh subunit 1), 포름산 탈수소효소 서브유닛 2(Fdh subunit 2) 및 포름산 탈수소효소 서브유닛 3(Fdh subunit 3)는 각각 서열번호 68, 서열번호 70, 및 서열번호 72의 아미노산 서열 또는 이와 60% 이상의 상동성(homology) 또는 동일성(identity)을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 포름산 탈수소효소 단백질 활성을 갖는 한, 이에 제한되는 것은 아니다. 구체적으로 상기 포름산 탈수소효소 서브유닛 1(Fdh subunit 1), 포름산 탈수소효소 서브유닛 2(Fdh subunit 2) 및 포름산 탈수소효소 서브유닛 3(Fdh subunit 3) 활성을 갖는 폴리펩티드는 각각 서열번호 68, 서열번호 70, 및 서열번호 72 또는 각각 상기 서열번호 68, 서열번호 70, 및 서열번호 72과 적어도 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 가지는 아미노산 서열을 가지거나, 포함하거나, 상기 아미노산 서열로 이루어지거나, 상기 아미노산 서열로 필수적으로 이루어질(essentially consisting of) 수 있다. 일 예로, 상기 포름산 탈수소효소 서브유닛 1(Fdh subunit 1), 포름산 탈수소효소 서브유닛 2(Fdh subunit 2) 및 포름산 탈수소효소 서브유닛 3(Fdh subunit 3) 단백질은 코리네박테리움 속 미생물 또는 코리네박테리움 스테이셔니스에 내재적으로 존재하는 단백질을 의미할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 구체적으로는 코리네박테리움 속 미생물 또는 코리네박테리움 스테이셔니스에 내재적으로 존재하는 서열번호 68의 아미노산 서열로 이루어진 포름산 탈수소효소 서브유닛 1(Fdh subunit 1) 단백질, 서열번호 70의 아미노산 서열로 이루어진 포름산 탈수소효소 서브유닛 2(Fdh subunit 2) 단백질, 서열번호 72의 아미노산 서열로 이루어진 포름산 탈수소효소 서브유닛 3(Fdh subunit 3) 단백질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [169] 또한, 상기 포름산 탈수소효소를 암호화하는 염기 서열은 포름산 탈수소효소의 활성을 나타내는 단백질을 코딩하는 염기 서열일 수 있다.
- [170] 예를 들어, 상기 포름산 탈수소효소 서브유닛 1(Fdh subunit 1), 포름산 탈수소효소 서브유닛 2(Fdh subunit 2) 및 포름산 탈수소효소 서브유닛 3(Fdh subunit 3)를 암호화하는 염기 서열은 포름산 탈수소효소 활성을 나타내는 단백질을 코딩하는 염기 서열일 수 있다.
- [171] 상기 각각 서열번호 68, 서열번호 70, 및 서열번호 72의 아미노산 서열을 갖는 포름산 탈수소효소 서브유닛 1(Fdh subunit 1), 포름산 탈수소효소 서브유닛 2(Fdh subunit 2) 및 포름산 탈수소효소 서브유닛 3(Fdh subunit 3)는 각각 서열번호 69, 서열번호 71, 및 서열번호 73의 서열 또는 각각 서열번호 69, 서열번호 71, 및 서열번호 73의 서열과 상동성 또는 동일성이 60% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 및 100% 미만인 염기 서열을 가지거나 포함하거나, 상기 염기 서열로 이루어지거나, 필수적으로 이루어질 수 있는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 것일 수 있다.

으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 각각 서열번호 69, 서열번호 71, 및 서열번호 73의 염기 서열은 공지의 데이터베이스에서 얻을 수 있으며, 그 예로 NCBI의 GenBank 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[172]

[173] 본 출원의 일 예로, 본 출원의 퓨린 뉴클레오티드 생산능을 갖는 미생물은 추가로 글리신 분해 효소 단백질 활성이 내재적 활성에 비하여 강화되어, 퓨린 뉴클레오티드 생산능이 향상된 미생물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[174] 본 출원에서 용어, “글리신 분해 효소 단백질”은 글리신 분해 경로에 직접 또는 간접적으로 관여하는 단백질로, 글리신 분해 시스템을 구성하는 각각의 단백질, 또는 상기 단백질의 복합체(complex) 또는 상기 글리신 분해 시스템 자체를 의미하는 것으로 사용될 수 있다. 구체적으로, 상기 글리신 분해 효소 단백질은 글리신 분해 시스템을 구성하는 T-단백질(GcvT), P-단백질(GcvP), L-단백질(GcvL), H-단백질(GcvH) 및 상기 글리신 분해 시스템의 조효소인 LipB, LipA로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 단백질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다 (John E. Cronan, *Microbiology and Molecular Biology Reviews.*, 13 April 2016). 본 출원의 글리신 분해 효소 단백질은 GcvPTH 또는 글리신 절단 시스템으로 혼용하여 사용할 수 있다.

[175] 본 출원에서 용어, “글리신 절단 시스템(glycine cleavage system, GCV)”은 2 개 이상의 서브 유닛, 즉 서브 유닛 GcvP, GcvT 및 GcvH 로 구성되어, 글리신의 이산화탄소, 암모늄 이온 및 N⁵⁻¹⁰-메틸렌 테트라히드로폴레이트로의 산화적 탈카르복실화 및 탈아민화를 촉매하는 다중-효소 복합체이다. 본 출원의 글리신 절단 시스템은 글리신 분해 시스템으로 혼용하여 사용할 수 있다.

[176] 구체적으로, 본 출원의 글리신 분해 효소 단백질은 *gcvP*, *gcvT* 및 *gcvH* 유전자 각각에 의해 코딩되는 GcvP, GcvT 및 GcvH 단백질 활성을 갖는 단백질일 수 있으나, 글리신 분해 효소 단백질에 상응하는 활성을 가지는 것이라면, 그 종류에 특별히 제한되지 않는다. 상기 *gcvP*, *gcvT* 및 *gcvH* 유전자 각각에 의해 코딩되는 GcvP, GcvT 및 GcvH 단백질은 각각 당업계에 공지되어 있으며, 상기 GcvP, GcvT 및 GcvH 단백질 각각의 아미노산 및 폴리뉴클레오티드 서열은 공지의 데이터베이스에서 얻을 수 있으며, 그 예로 NCBI의 GenBank 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[177] 일 예로, 상기 GcvP, GcvT 및 GcvH 단백질은 각각 서열번호 74, 서열번호 76 및 서열번호 78의 아미노산 서열 또는 이와 60% 이상의 상동성(homology) 또는 동일성(identity)을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 글리신 분해 효소 단백질 활성을 갖는 한, 이에 제한되는 것은 아니다. 구체적으로 상기 GcvP, GcvT 및 GcvH 단백질 활성을 갖는 폴리펩티드는 각각 서열번호 74, 서열번호 76 및 서열번호 78 또는 상기 서열번호 74, 서열번호 76 및 서열번호 78과 적어도 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 가지는 아미노산 서열을 가지거나, 포함하거나, 상기 아미노산 서열로 이루어지거나

나, 상기 아미노산 서열로 필수적으로 이루어질(essentially consisting of) 수 있다. 일 예로, 상기 GcvP, GcvT 및 GcvH 단백질은 코리네박테리움 속 미생물 또는 코리네박테리움 스테이셔니스에 내재적으로 존재하는 단백질을 의미할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 구체적으로는 코리네박테리움 속 미생물 또는 코리네박테리움 스테이셔니스에 내재적으로 존재하는 서열번호 74의 아미노산 서열로 이루어진 GcvP 단백질, 서열번호 76의 아미노산 서열로 이루어진 GcvT 단백질, 서열번호 78의 아미노산 서열로 이루어진 GcvH 단백질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[178] 또한, 상기 GcvP, GcvT 및 GcvH 단백질을 암호화하는 염기 서열은 글리신 분해 효소 단백질의 활성을 나타내는 단백질을 코딩하는 염기 서열일 수 있다.

[179] 예를 들어, 상기 각각 서열번호 74, 서열번호 76 및 서열번호 78의 아미노산 서열을 갖는 GcvP, GcvT 및 GcvH 단백질은 각각 서열번호 75, 서열번호 77 및 서열번호 79의 서열 또는 각각 서열번호 75, 서열번호 77 및 서열번호 79의 서열과 상동성 또는 동일성이 60% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 및 100% 미만인 염기 서열을 가지거나 포함하거나, 상기 염기 서열로 이루어지거나, 필수적으로 이루어질 수 있는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 각각 서열번호 75, 서열번호 77 및 서열번호 79의 염기 서열은 공지의 데이터베이스에서 얻을 수 있으며, 그 예로 NCBI의 GenBank 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[180]

[181] 본 출원의 일 예로, 본 출원의 퓨린 뉴클레오티드 생산능을 갖는 미생물은 추가로 세린 하이드록시메틸트랜스퍼라제 단백질 활성이 내재적 활성에 비하여 강화되어, 퓨린 뉴클레오티드 생산능이 향상된 미생물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[182] 본 출원에서 용어, “세린 하이드록시메틸트랜스퍼라제 (Serine Hydroxymethyltransferase)”는 세린에서 글리신으로의 전환을 촉매하는 효소이다. 본 출원의 세린 하이드록시메틸트랜스퍼라제는 GlyA로 혼용하여 사용할 수 있다. 구체적으로, 본 출원의 세린 하이드록시메틸트랜스퍼라제는 *glyA* 유전자에 의해 코딩되는 세린 하이드록시메틸트랜스퍼라제 활성을 갖는 단백질일 수 있으나, 세린 하이드록시메틸트랜스퍼라제에 상응하는 활성을 가지는 것이라면, 그 종류에 특별히 제한되지 않는다. 상기 *glyA* 유전자에 의해 코딩되는 세린 하이드록시메틸트랜스퍼라제는 당업계에 공지되어 있으며, 상기 세린 하이드록시메틸트랜스퍼라제의 아미노산 및 폴리뉴클레오티드 서열은 공지의 데이터베이스에서 얻을 수 있으며, 그 예로 NCBI의 GenBank 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[183] 일 예로, 상기 세린 하이드록시메틸트랜스퍼라제 단백질은 서열번호 80의 아미노산 서열 또는 이와 60% 이상의 상동성(homology) 또는 동일성(identity)을 갖

는 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 세린 하이드록시메틸트랜스퍼라제 단백질 활성을 갖는 한, 이에 제한되는 것은 아니다. 구체적으로 상기 세린 하이드록시메틸트랜스퍼라제 단백질 활성을 갖는 폴리펩티드는 서열번호 80 또는 상기 서열번호 80과 적어도 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 가지는 아미노산 서열을 가지거나, 포함하거나, 상기 아미노산 서열로 이루어지거나, 상기 아미노산 서열로 필수적으로 이루어질 (essentially consisting of) 수 있다. 일 예로, 상기 세린 하이드록시메틸트랜스퍼라제 단백질은 코리네박테리움 속 미생물 또는 코리네박테리움 스테이셔니스에 내재적으로 존재하는 단백질을 의미할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 구체적으로는 코리네박테리움 속 미생물 또는 코리네박테리움 스테이셔니스에 내재적으로 존재하는 서열번호 80의 아미노산 서열로 이루어진 세린 하이드록시메틸트랜스퍼라제 단백질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[184] 또한, 상기 세린 하이드록시메틸트랜스퍼라제를 암호화하는 염기 서열은 세린 하이드록시메틸트랜스퍼라제의 활성을 나타내는 단백질을 코딩하는 염기 서열일 수 있다.

[185] 예를 들어, 상기 서열번호 80의 아미노산 서열을 갖는 세린 하이드록시메틸트랜스퍼라제 단백질은 서열번호 81의 서열 또는 서열번호 81의 서열과 상동성 또는 동일성이 60% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 및 100% 미만인 염기 서열을 가지거나 포함하거나, 상기 염기 서열로 이루어지거나, 필수적으로 이루어질 수 있는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 서열번호 81의 염기 서열은 공지의 데이터베이스에서 얻을 수 있으며, 그 예로 NCBI의 GenBank 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[186]

[187] 본 출원의 일 예로, 본 출원의 퓨린 뉴클레오티드 생산능을 갖는 미생물은 추가로 포르메이트 의존성 포스포리보실글리신아미드 포밀 전이효소 단백질 활성이 내재적 활성에 비하여 강화되어, 퓨린 뉴클레오티드 생산능이 향상된 미생물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[188] 본 출원에서 용어, “포르메이트 의존성 포스포리보실글리신아미드 포밀 전이효소 (formate-dependent phosphoribosylglycinamide formyltransferase)”는 $10\text{-formyltetrahydrofolate} + \text{N1-(5-phospho-D-ribose)glycinamide} \rightleftharpoons \text{tetrahydrofolate} + \text{N2-formyl-N1-(5-phospho-D-ribose)glycinamide}$ 화학 반응을 촉매하는 활성을 갖는다. 본 출원의 포르메이트 의존성 포스포리보실글리신아미드 포밀 전이효소는 PurT로 혼용하여 사용할 수 있다. 구체적으로, 본 출원의 포르메이트 의존성 포스포리보실글리신아미드 포밀 전이효소는 *purT* 유전자에 의해 코딩되는 포르메이트 의존성 포스포리보실글리신아미드 포밀 전이효소 활성을 갖는 단백질일 수 있으나, 포르메이트 의존성 포스포리보실글리신아미드 포밀 전이효소에 상응하는 활성을 가지는 것이라면, 그 종류에 특별히 제한되지 않는다. 상기 *purT*

유전자에 의해 코딩되는 포르메이트 의존성 포스포리보실글리신아미드 포밀 전이효소는 당업계에 공지되어 있으며, 상기 포르메이트 의존성 포스포리보실글리신아미드 포밀 전이효소의 아미노산 및 폴리뉴클레오티드 서열은 공지의 데이터베이스에서 얻을 수 있으며, 그 예로 NCBI의 GenBank 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [189] 일 예로, 상기 포르메이트 의존성 포스포리보실글리신아미드 포밀 전이효소 단백질은 서열번호 82의 아미노산 서열 또는 이와 60% 이상의 상동성(homology) 또는 동일성(identity)을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 포르메이트 의존성 포스포리보실글리신아미드 포밀 전이효소 단백질 활성을 갖는 한, 이에 제한되는 것은 아니다. 구체적으로 상기 포르메이트 의존성 포스포리보실글리신아미드 포밀 전이효소 단백질 활성을 갖는 폴리펩티드는 서열번호 82 또는 상기 서열번호 82와 적어도 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 가지는 아미노산 서열을 가지거나, 포함하거나, 상기 아미노산 서열로 이루어지거나, 상기 아미노산 서열로 필수적으로 이루어질 (essentially consisting of) 수 있다. 일 예로, 상기 포르메이트 의존성 포스포리보실글리신아미드 포밀 전이효소 단백질은 코리네박테리움 속 미생물 또는 코리네박테리움 스테이셔니스에 내재적으로 존재하는 단백질을 의미할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 구체적으로는 코리네박테리움 속 미생물 또는 코리네박테리움 스테이셔니스에 내재적으로 존재하는 서열번호 82의 아미노산 서열로 이루어진 포르메이트 의존성 포스포리보실글리신아미드 포밀 전이효소 단백질 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [190] 또한, 상기 포르메이트 의존성 포스포리보실글리신아미드 포밀 전이효소를 암호화하는 염기 서열은 포르메이트 의존성 포스포리보실글리신아미드 포밀 전이효소의 활성을 나타내는 단백질을 코딩하는 염기 서열일 수 있다.
- [191] 예를 들어, 상기 서열번호 82의 아미노산 서열을 갖는 포르메이트 의존성 포스포리보실글리신아미드 포밀 전이효소 단백질은 서열번호 83의 서열 또는 서열번호 83의 서열과 상동성 또는 동일성이 60% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 및 100% 미만인 염기 서열을 가지거나 포함하거나, 상기 염기 서열로 이루어지거나, 필수적으로 이루어질 수 있는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 서열번호 83의 염기 서열은 공지의 데이터베이스에서 얻을 수 있으며, 그 예로 NCBI의 GenBank 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [192]
- [193] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 미생물로서, 본 출원의 퓨린 뉴클레오티드 생산능을 갖는 미생물은 세린 탈수화효소 단백질 활성이 내재적 활성에 비하여 약화되고, 세린 하이드록시메틸트랜스퍼라제 단백질 활성이 내재적 활성에

비하여 강화되어, 퓨린 뉴클레오티드 생산능이 향상된 미생물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[194]

[195] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 미생물로서, 본 출원의 퓨린 뉴클레오티드 생산능을 갖는 미생물은 세린 탈수화효소 단백질 활성이 내재적 활성에 비하여 약화되고, 세린 하이드록시메틸트랜스퍼라제 단백질 활성이 내재적 활성에 비하여 강화되고, 글리신 분해 효소 단백질 활성이 내재적 활성에 비하여 강화되어, 퓨린 뉴클레오티드 생산능이 향상된 미생물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[196]

[197] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 미생물로서, 본 출원의 퓨린 뉴클레오티드 생산능을 갖는 미생물은 세린 탈수화효소 단백질 활성이 내재적 활성에 비하여 약화되고, 세린 하이드록시메틸트랜스퍼라제 단백질 활성이 내재적 활성에 비하여 강화되고, 글리신 분해 효소 단백질 활성이 내재적 활성에 비하여 강화되고, 포름산 탈수소효소 단백질 활성이 내재적 활성에 비하여 약화되고, 포르메이트 의존성 포스포리보실글리신아미드 포밀 전이효소 단백질 활성이 내재적 활성에 비하여 강화되어, 퓨린 뉴클레오티드 생산능이 향상된 미생물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[198]

[199] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 본 출원의 세린 탈수화효소 단백질 활성이 내재적 활성에 비하여 약화된 미생물을 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, 퓨린 뉴클레오티드의 생산 방법을 제공한다.

[200] 본 출원에서, 용어 "배양"은 본 출원의 균주를 적당히 조절된 환경 조건에서 생육시키는 것을 의미한다. 본 출원의 배양과정은 당업계에 알려진 적당한 배지와 배양조건에 따라 이루어질 수 있다. 이러한 배양 과정은 선택되는 균주에 따라 당업자가 용이하게 조정하여 사용할 수 있다. 구체적으로 상기 배양은 회분식, 연속식 및/또는 유가식일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[201] 본 출원에서 용어, "배지"는 본 출원의 미생물을 배양하기 위해 필요로 하는 영양물질을 주성분으로 혼합한 물질을 의미하며, 생존 및 발육에 불가결한 물을 비롯하여 영양물질 및 발육인자 등을 공급한다. 구체적으로, 본 출원의 균주의 배양에 사용되는 배지 및 기타 배양 조건은 통상의 미생물의 배양에 사용되는 배지라면 특별한 제한 없이 어느 것이나 사용할 수 있으나, 본 출원의 미생물을 적당한 탄소원, 질소원, 인원, 무기화합물, 아미노산 및/또는 비타민 등을 함유한 통상의 배지 내에서 호기성 조건 하에서 온도, pH 등을 조절하면서 배양할 수 있다. 예를 들어, 코리네박테리움 속 균주에 대한 배양 배지는 문헌["Manual of Methods for General Bacteriology" by the American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981)]에서 찾아 볼 수 있다.

- [202] 본 출원에서 상기 탄소원으로는 글루코오스, 사카로오스, 락토오스, 프룩토오스, 수크로오스, 말토오스 등과 같은 탄수화물; 만니톨, 소르비톨 등과 같은 당 알코올, 피루브산, 락트산, 시트르산 등과 같은 유기산; 글루탐산, 메티오닌, 리신 등과 같은 아미노산 등이 포함될 수 있다. 또한, 전분 가수분해물, 당밀, 블랙스트랩 당밀, 쌀겨울, 카사버, 사탕수수 찌꺼기 및 옥수수 침지액 같은 천연의 유기 영양원을 사용할 수 있으며, 구체적으로는 글루코오스 및 살균된 전처리 당밀(즉, 환원당으로 전환된 당밀) 등과 같은 탄수화물이 사용될 수 있으며, 그 외의 적정량의 탄소원을 제한 없이 다양하게 이용할 수 있다. 이들 탄소원은 단독으로 사용되거나 2종 이상이 조합되어 사용될 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [203] 상기 질소원으로는 암모니아, 황산암모늄, 염화암모늄, 초산암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄, 질산암모늄 등과 같은 무기질소원; 글루탐산, 메티오닌, 글루타민 등과 같은 아미노산, 펩톤, NZ-아민, 육류 추출물, 효모 추출물, 맥아 추출물, 옥수수 침지액, 카세인 가수분해물, 어류 또는 그의 분해생성물, 탈지 대두 케이크 또는 그의 분해 생성물 등과 같은 유기 질소원이 사용될 수 있다. 이들 질소원은 단독으로 사용되거나 2종 이상이 조합되어 사용될 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [204] 상기 인원으로는 인산 제1칼륨, 인산 제2칼륨, 또는 이에 대응되는 소듐-함유 염 등이 포함될 수 있다. 무기화합물로는 염화나트륨, 염화칼슘, 염화철, 황산마그네슘, 황산철, 황산망간, 탄산칼슘 등이 사용될 수 있으며, 그 외에 아미노산, 비타민 및/또는 적절한 전구체 등이 포함될 수 있다. 이들 구성성분 또는 전구체는 배지에 회분식 또는 연속식으로 첨가될 수 있다. 그러나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [205] 또한, 본 출원의 미생물의 배양 중에 수산화암모늄, 수산화칼륨, 암모니아, 인산, 황산 등과 같은 화합물을 배지에 적절한 방식으로 첨가하여, 배지의 pH를 조정할 수 있다. 또한, 배양 중에는 지방산 폴리글리콜 에스테르와 같은 소포제를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다. 또한, 배지의 호기 상태를 유지하기 위하여, 배지 내로 산소 또는 산소 함유 기체를 주입하거나 혐기 및 미호기 상태를 유지하기 위해 기체의 주입 없이 혹은 질소, 수소 또는 이산화탄소 가스를 주입할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [206] 본 출원의 배양에서 배양온도는 27 내지 37°C 구체적으로는 30 내지 33°C를 유지할 수 있고, 약 20 내지 120 시간 동안 배양할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [207] 본 출원에서, 용어 "배양물"이란 특정 미생물을 배양 배지에서 배양하여 수득한 배양액, 농축 배양액, 배양액의 건조물, 배양 여과액, 농축 배양 여과액, 또는 배양 여과액의 건조물을 의미하며, 상기 배양액은 특정 미생물을 포함하는 것을 의미하고, 상기 배양 여과액은 특정 미생물을 실질적으로(여기서, 실질적으로는 여과등에 의해 분리되는 특정 미생물을 배제한다는 것을 의미하는 것으로서 여과액에 미생물이 완전히 배제된다는 것을 의미하지는 않는다.) 포함하지 않는 것

을 의미한다. 상기 배양물은 그 제형이 한정되지 아니하고, 일 예로 액체, 에멀전, 또는 고체일 수 있다. 구체적으로, 본 출원의 목적상 상기 배양물은 퓨린 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

- [208] 본 출원에서, 용어 "발효"는 미생물이 자신이 가지고 있는 효소를 이용하여 유기물을 분해시키는 과정 중 부패반응이 아닌 것을 의미한다. 발효 반응과 부패 반응은 비슷한 과정에 의해 진행되지만, 분해 결과 유용한 물질이 만들어지면 발효라 하고 악취가 나거나 유해한 물질이 만들어지면 부패라고 한다.
- [209] 본 출원에서 상기 균주로부터 발효물을 수득하는 방법은 특별히 제한되지 않으며, 당해 기술분야 또는 유사 분야에서 통상적으로 사용하는 방법에 따라 수득할 수 있다.
- [210] 본 출원에서, 용어 "발효물"은 발효된 물질 자체뿐만 아니라, 균주 및 배양물이 공존하는 균주의 배양 배지, 상기 배양 배지로부터 균주를 여과시킨 발효물, 상기 배양 배지로부터 균주를 멸균처리하고 이를 여과시킨 발효물, 상기 발효물 또는 이를 포함하는 배양 배지를 추출한 추출물, 상기 발효물 또는 이의 추출물을 희석시킨 희석액, 농축액, 상기 발효물 또는 이의 추출물을 건조시킨 건조물, 상기 균주의 균체를 포집해서 파쇄시킨 용해물 등, 상기 균주로부터 발생한 발효물을 포함하는 모든 종류의 물질을 포함한다.
- [211] 본 출원의 방법에 있어서, 미생물의 배양은 당업계에서 알려진 임의의 배양 조건 및 배양 방법이 사용될 수 있다. 이러한 배양 과정은 당업자라면 선택되는 균주에 따라 용이하게 조정하여 사용할 수 있다.
- [212] 본 출원의 배양에 의하여 생산된 퓨린 뉴클레오티드는 배지 중으로 분비되거나 세포 내에 잔류할 수 있다.
- [213]
- [214] 하나의 구체예에서, 본 출원의 퓨린 뉴클레오티드 생산 방법은 본 출원의 미생물을 준비하는 단계, 상기 균주를 배양하기 위한 배지를 준비하는 단계, 또는 이들의 조합(순서에 무관, in any order)을, 예를 들어, 상기 배양하는 단계 이전에, 추가로 포함할 수 있다.
- [215] 본 출원의 퓨린 뉴클레오티드 생산방법은, 상기 배양된 미생물, 상기 미생물의 배양물, 상기 미생물의 발효물 또는 상기 배양 배지에서 목적 물질, 구체적으로는 퓨린 뉴클레오티드를 회수하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 회수하는 단계는 상기 배양하는 단계 이후에 추가로 포함될 수 있다.
- [216] 상기 회수는 본 출원의 미생물의 배양 방법, 예를 들어 회분식, 연속식 또는 유가식 배양 방법 등에 따라 당해 기술 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 목적하는 퓨린 뉴클레오티드를 수집(collect)하는 것일 수 있다. 예를 들어, 원심분리, 여과, 결정화 단백질 침전제에 의한 처리(염석법), 추출, 초음파 파쇄, 한외여과, 투석법, 분자체 크로마토그래피(겔여과), 흡착크로마토그래피, 이온교환 크로마토그래피, 친화도 크로마토그래피 등의 각종 크로마토그래피, HPLC 또는 이들의 방법을 조합하여 사용될 수 있으며, 당해 분야에 공지된 적합한 방법을

이용하여 배지 또는 미생물로부터 목적물질, 구체적으로는 퓨린 뉴클레오티드를 회수할 수 있다.

[217] 또한, 본 출원의 퓨린 뉴클레오티드 생산 방법은, 추가적으로 정제 단계를 포함할 수 있다. 상기 정제는 당해 기술분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여, 수행할 수 있다. 일 예에서, 본 출원의 퓨린 뉴클레오티드 생산 방법이 회수 단계와 정제 단계를 모두 포함하는 경우, 상기 회수 단계와 정제 단계는 순서에 상관없이 연속적 또는 비연속적으로 수행되거나, 동시에 또는 하나의 단계로 통합되어 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[218] 본 출원의 방법에서, 세린 탈수화효소 단백질 활성의 약화 및 퓨린 뉴클레오티드 등은 상기 다른 양태에서 기재한 바와 같다.

[219]

[220] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 본 출원의 세린 탈수화효소 단백질 활성이 내재적 활성에 비하여 약화된 미생물, 상기 미생물의 배양물, 상기 미생물의 발효물 또는 이들 중 2 이상의 조합을 포함하는 퓨린 뉴클레오티드 생산용 조성물을 제공한다.

[221] 본 출원의 조성물은 퓨린 뉴클레오티드 생산용 조성물에 통상 사용되는 임의의 적합한 부형제를 추가로 포함할 수 있으며, 이러한 부형제는, 예를 들어 보존제, 습윤제, 분산제, 현탁화제, 완충제, 안정화제 또는 등장화제 등일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[222] 하나의 구체예로, 본 출원의 조성물에 존재하는 각 구성요소는 미생물학적으로 유효한 양, 또는 생산용 조성물에서 적절하게 존재할 수 있는 양으로 포함할 수 있다.

[223] 본 출원의 조성물에서, 세린 탈수화효소 단백질 활성의 약화 및 퓨린 뉴클레오티드 등은 상기 다른 양태에서 기재한 바와 같다.

[224]

[225] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 본 출원의 세린 탈수화효소 단백질 활성이 내재적 활성에 비하여 약화된 미생물의 퓨린 뉴클레오티드 생산 용도를 제공한다.

[226] 본 출원의 용도에서, 세린 탈수화효소 단백질 활성의 약화 및 퓨린 뉴클레오티드 등은 상기 다른 양태에서 기재한 바와 같다.

[227]

발명의 실시를 위한 형태

[228] 이하 본 출원을 실시예에 의해 보다 상세하게 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 출원을 예시하기 위한 바람직한 실시양태에 불과한 것이며 따라서, 본 출원의 권리범위를 이에 한정하는 것으로 의도되지는 않는다. 한편, 본 명세서에 기재되지 않은 기술적인 사항들은 본 출원의 기술 분야 또는 유사 기술 분야에서 숙련된 통상의 기술자이면 충분히 이해하고 용이하게 실시할 수 있다.

[229]

[230] 실시예 1. *sdaA* 결손 미생물 제작 및 XMP 생산능 확인

[231]

[232] 실시예 1-1. *sdaA* 결손 및 *glyA* 추가 강화 재조합 벡터 제작

[233]

[234] 코리네박테리움 스테이셔니스의 내재적 유전자 *sdaA*를 결손한 균주를 제작하고, 또한 *sdaA* 유전자 위치에 *glyA* 유전자의 copy수를 추가하는 균주를 제작하여 XMP 생산주에서 *sdaA* 결손과 *glyA* 추가 강화의 효과를 함께 확인하고자 하였다. 이를 위한 벡터를 코리네박테리움 염색체 내 유전자의 삽입 및 교체를 위한 플라스미드 pDCM2 (대한민국 공개번호 제 10-2020-0136813호)를 이용하여 하기와 같이 제작하였다.

[235] 야생형 코리네박테리움 스테이셔니스 ATCC6872의 gDNA(genomic DNA)를 주형으로 서열번호 1 및 2의 서열의 프라이머 쌍과 서열번호 3 및 4의 서열의 프라이머 쌍을 이용하여 각각 PCR을 수행하였다. PCR은 94°C에서 5분간 변성 후, 94°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 1분 30초를 30회 반복한 후, 72°C에서 5분간 수행하였다. pDCM2 벡터는 *Xba*I를 처리하고 상기에서 수득한 PCR 산물을 퓨전 클로닝하였다. 퓨전 클로닝은 In-Fusion® HD 클로닝 키트(Clontech)를 사용하였다. 결과로 얻은 플라스미드를 pDCM2-del *sdaA*라 명명하였다.

[236] 또한 서열번호 1 및 5의 서열의 프라이머 쌍, 서열번호 6 및 7의 서열의 프라이머 쌍과 서열번호 8 및 4의 서열의 프라이머 쌍을 이용하여 동일한 방법으로 PCR 및 클로닝을 진행하였다. 결과로 얻은 플라스미드를 pDCM2-del *sdaA*-Pn-*glyA*라 명명하였다.

[237] 벡터제작을 위해 사용된 프라이머의 서열들은 각각 다음과 같다.

[238]

[239] [표1]

서열번호	명칭	서열
1	primer	5'- acccggggatcctctctagaGTGCCGTTACCTCCCGC-3'
2	primer	5'- TGGAGTGCGTAGCGTGCGAAATGACTCCTTTCTAAA-3'
3	primer	5'- TTAGAAAGGAGTCATTTTCGCACGCTACGCACTCCA-3'
4	primer	5'- AAGCTTGCATGCCTGCAGCGTCACCGCGCGGAGATA-3'
5	primer	5'- GAAATGACTCCTTTCTAAAAAGGGG -3'
6	primer	5'- TTAGAAAGGAGTCATTTTCGAACTTGCAGCAAACGTGCTG -3'

7	primer	5'- CCTTGGTGAGGCACTTTGTG -3'
8	primer	5'- CAAAGTGCCTCACCAAGGGGCACGCTACGCACTCCATATA -3'

[240] 실시예 1-2. **sdaA** 결손 및 **glyA** 추가 강화 균주 제작

[241]

[242] 상기 실시예 1-1에서 제작한 벡터 2종을 각각 코리네박테리움 스테이셔니스 CJX1664 균주 (KR 10-1950141 B1) 에 일렉트로포레이션법으로 형질전환 한 후, 카나마이신 25mg/L를 함유한 선별 배지에서 염색체상에 벡터가 삽입된 균주를 1차 후보균으로 선별하였다. 이후 상동성 재조합이 일어난 균주에서 서열번호 1와 서열번호 4의 프라이머 쌍을 이용하여 **sdaA** 유전자가 결손된 균주를 선별하고 서열번호 9와 서열번호 7의 프라이머 쌍을 이용하여 **sdaA** 유전자가 결손되고 해당 위치에 자가 프로모터와 연결된 **glyA** 유전자가 삽입된 균주를 선별하였다.

[243]

[244] [표2]

서열번호	명칭	서열
9	primer	5'- GTCAACGCGCACTTGGATCT-3'

[245] 실시예 1-3. **sdaA** 결손 및 **glyA** 추가 강화 균주의 XMP 생산능 평가

[246]

[247] 상기 실시예 1-2에서 제작된 균주 및 모균주에 대해 플라스크 발효역가 평가를 통해 XMP 생산능을 평가하였다. 먼저, 종배지 2ml을 함유하는 지름 18mm 시험관에 각 균주를 접종하고, 30°C에서 24시간 동안, 진탕 배양하여 종 배양액으로 사용하였다. 하기의 생산배지 32 ml (본배지 24 ml + 별도살균배지 8 ml)을 포함하고 있는 250 ml 코너-바플 플라스크에 0.7 ml의 종 배양액을 접종하고 30°C에서 75시간동안 170 rpm으로 배양하였다. 배양 종료 후 HPLC로 XMP의 생산능을 측정하였다.

[248]

[249] <종배지 (pH7.5)>

[250] 포도당 1%, 펩톤 1%, 육즙 1%, 효모엑기스 1%, 염화나트륨 0.25%, 아테닌 100mg/l, 구아닌 100mg/l (증류수 1 리터 기준)

[251]

[252] <XMP 플라스크 생산배지 (본배지)>

[253] 포도당 40 g/L, 황산마그네슘 10 g/L, 염화칼슘 100 mg/L, 황산철 20 mg/L, 황산망간 10 mg/L, 황산아연 10 mg/L, 황산구리 0.8 mg/L, 히스티딘 20 mg/L, 시스틴 15 mg/L, 베타-알라닌 15 mg/L, 비오틴 100 ug/L, 티아민 5 mg/L, 아테닌 50 mg/L, 구아닌 25 mg/L, 니아신 15 mg/L, pH 7.0

[254]

[255] <XMP 플라스크 생산배지 (별도 살균 배지)>

[256] 인산 제1칼륨 18 g/L, 인산 제2칼륨 42 g/L, 우레아 7 g/L, 황산암모늄 5 g/L (증류수 1리터 기준)

[257]

[258] 상기 실험은 3번 반복하였으며, 그 분석 결과의 평균값을 하기 표 3에 나타내었다.

[259]

[260] [표3]

sdaA 결손 및 glyA의 copy 추가 균주의 XMP 생산능 비교

균주번호	도입형태	XMP(g/L)	농도증가율 (%)
CJX1664	Control	4.32	-
	CJX1664-del_sdaA	4.42	2.32
	CJX1664-del_sdaA-Pn-glyA	4.64	7.47

[261] 상기 표 3과 같이, sdaA 결손 균주는 대조균에 비해 2.32% 증가된 XMP 생산능을 나타내었고, sdaA 결손과 glyA 카피수를 증가한 균주는 대조균 대비 7.47% 증가된 XMP 생산능을 나타냈다. sdaA 결손이 XMP 생산능 향상에 효과가 있고, 동시에 glyA 발현을 강화하면 XMP 생산능이 추가적으로 향상되는 것을 확인할 수 있다. 이를 통해 sdaA를 결손하고 glyA를 강화하는 것이 XMP 생산에 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

[262]

[263] 실시예 2. sdaA 결손 및 glyA 추가 강화 균주 기반 gcvPTH 강화주 제작

[264]

[265] 실시예 2-1. gcvPTH copy 추가 재조합 벡터 및 5'-크산틸산 생산 균주 제작

[266]

[267] gcvPTH 유전자의 강화가 XMP 생산량 증가로 이어질 수 있는지 확인하기 위하여 코리네박테리움 스테이셔니스 균주의 gcvPTH 유전자를 native 프로모터 형태로 copy 추가하는 벡터를 제작하였다. 코리네박테리움 염색체 내 유전자의 삽입 및 교체를 위한 플라스미드 pDCM2 (대한민국 공개번호 제 10-2020-0136813호)를 이용하여 하기와 같이 제작하였다.

[268] 코리네박테리움 스테이셔니스 야생형인 ATCC6872 균주의 염색체 유전자를 Intron사의 G-spin Total DNA extraction mini kit (Cat. No 17045)를 이용하여 kit에 제공된 protocol에 따라 분리하고 서열번호 10과 서열번호 11의 프라이머 쌍 및 서열번호 12와 서열번호 13의 프라이머 쌍 및 서열번호 14와 서열번호 15의 프라이머 쌍, 서열번호 16와 서열번호 17의 프라이머 쌍을 이용하여 중합효소 연쇄반응을 통하여 유전자 단편(Pn/gcvPTH-A, Pn/gcvPTH -B, Pn/gcvPTH -C, Pn/gcvPTH-D)을 각각 얻었다. PCR법의 조건은 94°C에서 5분간 변성 후, 94°C 30초

변성, 55°C 30초 어닐링, 72°C 1분 중합을 20회 반복한 후, 72°C에서 7분간 중합반응을 수행하였다.

[269] 상기에서 수득한 유전자의 단편을 제한효소 XbaI (New England Biolabs, Beverly, MA)으로 절단하였다. T4 리가아제 (New England Biolabs, Beverly, MA)를 이용하여 상기 유전자 단편으로 XbaI 제한효소로 절단시킨 선상의 pDCM2(대한민국 공개번호 제 10-2020-0136813호)에 접합 하였다. 제조된 벡터를 pDCM2-gcvPTH로 명명하였다.

[270] 벡터제작을 위해 사용된 프라이머의 서열들은 각각 다음과 같다.

[271]

[272] [표4]

서열번호	명칭	서열
10	primer	5'- AATTCGAGCTCGGTACCCAGGCACAGCCGAC ATTACGG -3'
11	primer	5'- GTAGCACATCTGACGAATGTCCAAGTCTAAG GAAA -3'
12	primer	5'- TTAGACTTGGACATTCGTCAGATGTGCTACT TGCC -3'
13	primer	5'- TGCGCCATTAGCGTGTTACTTCTCGCGGCTA TAGA -3'
14	primer	5'- AGCCGCGAGAAGTAACACGCTAATGGCGCA TTGAA -3'
15	primer	5'- TGAATTATCCGCGTCTTAGATGCCGTTTCTG CCG-3'
16	primer	5'- GAAAACGGCATCTAAGACGCGGATAATTCA GCTGT -3'
17	primer	5'- CGACTCTAGAGGATCCCCGATGAAGCGAAC ACTTAAAT -3'

[273] gcvPTH 유전자의 추가 강화가 XMP 생산량 증가로 이어질 수 있는지 확인하기 위하여 sdaA 결손 및 glyA 추가 강화 균주에 gcvPTH를 강화하는 실험을 진행하였다.

[274] 상기에서 제작한 pDCM2-gcvPTH 벡터를 sdaA 결손 및 glyA 추가 강화 균주에 일렉트로포레이션법으로 형질 전환한 후, 카나마이신 25mg/L를 함유한 선별 배지에서 서열번호 18 서열번호 19 프라이머 쌍을 이용한 PCR을 통하여 1차 확인 후 유전자 서열분석을 통해 최종 확인하였다.

[275] 균주 제작을 위해 사용된 프라이머의 서열들은 각각 다음과 같다.

[276]

[277] [표5]

서열번호	명칭	서열
18	primer	5'- CCAGTACATTGTCATGGGAT -3'
19	primer	5'- GATTGGCATATCGCACCGAG -3'

[278] 실시예 3. glyA 강화 및 sda 결손 균주 기반 gcvPTH 강화주의 5'-크산틸산 생산능 평가

[279]

[280] 상기 실시예 2에서 제작된 균주 및 모균주의 5'-크산틸산 생산능을 측정하기 위하여 플라스크 역가 평가를 실시하였다. 하기 종배지 2.5 ml을 함유하는 14 ml tube에 균주를 접종하고 30°C에서 24시간 동안 170 rpm으로 진탕 배양하였다. 하기의 생산배지 29 ml (본배지 24 ml + 별살배지 5 ml)을 포함하고 있는 250 ml 코너-바플 플라스크에 2ml의 종 배양액을 접종하고 30°C에서 72시간동안 170 rpm으로 진탕 배양하였다. 배양 종료 후 HPLC를 이용한 방법에 의해 XMP 생산량을 측정하였다.

[281]

[282] 상기 종배지 및 발효배지의 조성은 상기 실시예 1-3과 동일하다.

[283]

[284] XMP 생산균주인 코리네박테리움 스테이셔니스 KCCM12151P에서의 glyA 강화, sdaA 결손 통합 및 gcvPTH 강화에 따른 배양 결과는 하기 표 6에 나타내었다.

[285]

[286] [표6]

glyA 강화, sdaA 결손 및 gcvPTH 강화 통합에 따른 5'-크산틸산 생산량 확인

균주번호	도입형태	XMP(g/L)	농도증가율 (%)
CJX1664	Control	4.51	-
	CJX1664-del_sdaA-Pn-glyA	4.85	7.45
	CJX1664-del_sdaA-Pn-glyA- Pn/gcvPTH	5.48	21.5

[287] XMP 생산균주에서의 sdaA 결손 및 glyA 강화는 5'-크산틸산 생산량 증가로 이어질 수 있으며, 추가적으로 gcvPTH를 함께 강화해주었을 때 5'-크산틸산의 농도가 추가적으로 증가함을 확인하였다.

[288]

[289] 실시예 4. sdaA 결손 및 glyA 추가 강화 균주 기반, gcvPTH 강화, fdh 결손 및 purT 추가 강화 균주 제작

[290]

[291] 실시예 4-1. *fdh* 결손 및 *purT* 추가 강화 재조합 벡터 및 5'-크산틸산 생산 균주 제작

[292]

[293] 코리네박테리움 스테이셔니스 유래 포름산 탈수소효소는 포름산 탈수소효소 서브유닛 1(Fdh subunit 1), 포름산 탈수소효소 서브유닛 2(Fdh subunit 2) 및 포름산 탈수소효소 서브유닛 3(Fdh subunit 3)로 이루어질 수 있다.

[294]

포름산 탈수소효소 서브유닛 1, 포름산 탈수소효소 서브유닛 2 및 포름산 탈수소효소 서브유닛 3(이하, 포름산 탈수소효소로 표기)의 결손을 위하여, 상기 포름산 탈수소효소 서브유닛 1(Fdh subunit 1), 포름산 탈수소효소 서브유닛 2(Fdh subunit 2) 및 포름산 탈수소효소 서브유닛 3(Fdh subunit 3)을 각각 암호화하는 코리네박테리움 스테이셔니스의 내재적 유전자인 *fdh 1*, *fdh 2*, 및 *fdh 3* 유전자(이하, *fdh* 유전자로 표기)를 결손하고, 해당 유전자 위치에 *purT* 유전자의 copy 수를 추가하는 형태로 벡터를 제작하여, 최종적으로 XMP 생산주에서 *gcvPTH* 강화와의 시너지 효과를 확인하고자 하였다. 따라서, *fdh*를 결손하고, 해당 유전자 위치에 *purT*의 copy 수를 추가하는 실험을 진행하였다.

[295]

코리네박테리움 스테이셔니스 야생형인 ATCC6872 균주의 염색체 유전자를 Intron사의 G-spin Total DNA extraction mini kit (Cat. No 17045)를 이용하여 kit에 제공된 protocol에 따라 분리하고 서열번호 20과 서열번호 21의 프라이머 쌍 및 서열번호 22와 서열번호 23의 프라이머 쌍 및 서열번호 24와 서열번호 25의 프라이머 쌍, 서열번호 26와 서열번호 27의 프라이머 쌍을 이용하여 중합효소 연쇄반응을 통하여 유전자 단편(*del_fdh::Pcj7/purT-A*, *del_fdh::Pcj7/purT-B*, *del_fdh::Pcj7/purT-C*, *del_fdh::Pcj7/purT-D*)을 각각 얻었다. PCR법의 조건은 94°C에서 5분간 변성 후, 94°C 30초 변성, 55°C 30초 어닐링, 72°C 1분 30초 중합을 20회 반복한 후, 72°C에서 7분간 중합반응을 수행하였다.

[296]

상기에서 수득한 네 단편을 주형으로 2nd PCR을 실시하여 얻어진 유전자의 단편을 제한효소 *XbaI* (New England Biolabs, Beverly, MA)으로 절단하였다. T4 리가아제 (New England Biolabs, Beverly, MA)를 이용하여 상기 유전자 단편으로 *XbaI* 제한효소로 절단시킨 선상의 pDCM2 (대한민국 공개번호 제 10-2020-0136813호)에 접합 하였다. 결과로 얻은 플라스미드를 pDCM2-*del_fdh-Pcj7/purT*라 명명하였다.

[297]

벡터 제작을 위해 사용된 프라이머의 서열들은 각각 다음과 같다.

[298]

[299]

[표7]

서열번호	명칭	서열

20	primer	5'- TCGAGCTCGGTACCCGTTGCCGTATCAGACA TGCTCAG -3'
21	primer	5'- GATTAGCCTGAAGGAATTGATTTATCTCGAC CAAACAG -3'
22	primer	5'- GGTCGAGATAAATCAATTCCTTCAGGCTAAT CTTTTCC -3'
23	primer	5'- CGATATAAGACTCCATCATATGTGTTTCCTT TCGTTGG-3'
24	primer	5'- AAAGGAAACACATATGATGGAGTCTTATAT CGGTAGCC -3'
25	primer	5'- CTCATAGGTGCCGAACCTTACTCGGAGATTTC GACCTCA-3'
26	primer	5'- CGAAATCTCCGAGTAAGTTCGGCACCTATGA GAATATG -3'
27	primer	5'- CTCTAGAGGATCCCCGGCAAGTGTTTCTTGG CGCCATTC-3'

[300] 상기 pDCM2-del_fdh-Pcj7/purT 벡터를 상기 실시예 2에서 제작된 균주 (CJX1664-del_sdaA-Pn-glyA- Pn/gcvPTH)에 일렉트로포레이션법으로 형질 전환한 후, 카나마이신 25mg/L를 함유한 선별 배지에서 염색체상에 변이 유전자와 벡터가 함께 삽입된 균주를 1차 후보균으로 선별하였다. 이후 상동성 재조합이 일어난 균주에서 서열번호 28와 서열번호 29의 프라이머 쌍을 이용하여 fdh 유전자가 결손되고, 해당 위치에 Pcj7 프로모터와 연결된 purT 유전자가 삽입된 균주를 선별하였다.

[301] 균주 제작을 위해 사용된 프라이머의 서열들은 각각 다음과 같다.

[302]

[303] [표8]

서열번호	명칭	서열
28	primer	5'-TAATCCCCCAGCTCACCGGC-3'
29	primer	5'- TTTGGATGCCGAGGTCGTAG-3'

[304] 실시예 5. sdaA 결손 및 glyA 강화주 기반, gcvPTH 강화, purT 강화 및 fdh 결손 통합주 5'-크산틸산 생산능 평가

[305]

[306] 상기 실시예 2 및 실시예 4에서 제작된 균주 및 모균주의 XMP 생산능을 측정하기 위하여 플라스크 역가 평가를 실시하였다. 하기 종배지 2.5 ml을 함유하는

14 ml tube에 각 균주들을 접종하고 30°C에서 24시간 동안 170 rpm으로 진탕 배양하였다. 하기의 생산배지 29 ml (본배지 24 ml + 별살배지 5 ml)을 포함하고 있는 250 ml 코너-바플 플라스크에 2ml의 종 배양액을 접종하고 30°C에서 72시간동안 170 rpm으로 진탕 배양하였다. 배양 종료 후 HPLC를 이용한 방법에 의해 XMP 생산량을 측정하였다

[307]

[308] 상기 종배지 및 발효배지의 조성은 실시예 1-3과 동일하다.

[309]

[310] XMP 생산 균주에서의 *sdaA* 결손 및 *glyA* 강화 균주 기반, *gcvPTH* 강화, *purT* 강화 및 *fdh* 결손 통합에 따른 배양 결과는 하기 표 9에 나타내었다.

[311]

[312] [표9]

gcvPTH 강화, *sdaA* 결손 및 *glyA* 강화 및 *purT* 강화, *fdh* 결손 통합에 따른 5'-크산틸산 생산량 확인

균주번호	도입형태	XMP(g/L)	농도증가율 (%)
CJX1664	Control	4.48	-
	CJX1664-del_ <i>sdaA</i> -Pn- <i>glyA</i>	4.81	7.39
	CJX1664-del_ <i>sdaA</i> -Pn- <i>glyA</i> - Pn/g <i>cvPTH</i>	5.47	22.2
	CJX1664-del_ <i>sdaA</i> -Pn- <i>glyA</i> - Pn/g <i>cvPTH</i> -del_ <i>fdh</i> -Pcj7/ <i>purT</i>	5.59	24.8

[313] XMP 생산균주에서의 *sdaA* 결손, *glyA* 강화 및 *gcvPTH* 강화를 통합해주었을 때, XMP 생산량 증가로 이어질 수 있으며, 추가적으로 *fdh*를 결손해주면서 해당 위치에 *purT*를 copy 수 증가의 방법으로 강화해주었을 때 XMP 농도가 추가적으로 증가함을 확인하였다.

[314]

[315] 실시예 6. *sdaA* 결손 및 *glyA* 강화주 기반, *gcvPTH* 강화, *purT* 강화 및 *fdh* 결손 통합주 GMP 생산능 확인

[316]

[317] 상기 실시예 1, 실시예 2 및 실시예 4에서 제작된 균주 및 대조군 모균주의 XMP 배양액을 이용하여 아래와 같은 방법으로 GMP 생산을 확인하기 위해 먼저 플라스크 발효역가 평가를 통해 XMP 생산능을 분석하였다. (한국특허공개번호 10-2011-0105662 A 참고).

[318] 구체적으로, 상기 실시예 1-3의 발효역가 평가 방법으로 균주를 배양하였다. 배양 종료 후 HPLC를 이용한 방법에 의해 XMP(5'-크산틸산)의 생산량을 측정하였다.

[319] 이어서, GMP 생산능을 분석하였다. 구체적으로, 생성된 XMP를 GMP로 전환하기 위하여 상기 플라스크 발효액에 하기의 전환 반응 첨가물과 대장균의 XMP 아미나아제(XMP aminase)를 첨가하여 40°C에서 2.5시간 동안 전환반응을 수행하였다. 상기 실험 수행의 결과, XMP 소모량 대비 GMP의 생성량을 의미하는 전환율 결과를 하기 표 10에 나타내었다.

[320]

[321] [표10]

sdaA 결손 및 glyA의 copy 추가 균주의 GMP 생산능 확인

균주번호	도입형태	XMP(g/L)	GMP(g/L)	전환율(%) (GMP생성량/XMP 소모량)
CJX1664	Control	4.43	3.23	72.9
	CJX1664-del_sdaA	4.53	3.31	73.0
	CJX1664-del_sdaA-Pn-glyA	4.76	3.48	73.1
	CJX1664-del_sdaA-Pn-glyA-Pn/gcvPTH	5.42	3.96	73.0
	CJX1664-del_sdaA-Pn-glyA-Pn/gcvPTH-del_fdh-Pcj7/purT	5.54	4.06	73.2

[322] 상기 표 10에서 나타낸 바와 같이, 균주에 의해 생성된 XMP로부터 전환반응을 통해 GMP가 생성되는 것을 확인하였다.

[323]

[324] <전환반응 첨가물>

[325] 피틱산(phytic acid) 1.8g/L, 황산마그네슘 4.8g/L, 니민(nymeen) 3ml/L, 자이렌(xylene) 2%, 아데닌 100mg/L, 인산수소나트륨(Na₂HPO₄) 7.7g/L, 글루타민 2g/L, 포도당 46g/L

[326]

[327] 실시예 7. sdaA 결손 미생물 제작 및 IMP 생산능 확인

[328]

[329] 실시예 7-1. sdaA 유전자 결손 벡터 제작

[330]

[331] 코리네박테리움 스테이셔니스의 내재적 유전자 sdaA를 결손하기 위해 플라스미드 pDCM2 (대한민국 공개번호 제 10-2020-0136813호)를 이용하여 하기와 같이 제작하였다.

[332] 야생형 코리네박테리움 스테이셔니스 ATCC6872의 gDNA(genomic DNA)를 주형으로 서열번호 30 및 31의 서열의 프라이머 쌍과 서열번호 32 및 33의 서열의 프라이머 쌍을 이용하여 각각 PCR을 수행하였다. PCR은 94°C에서 5분간 변성 후, 94°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 1 분를 30회 반복한 후, 72°C에서 5분간 수행하였다. pDCM2 벡터는 XbaI을 처리하고 상기에서 수득한 PCR 산물을 퓨전 클로닝하였다. 퓨전 클로닝은 In-Fusion® HD 클로닝 키트(Clontech)를 사용하였다. 결과로 얻은 플라스미드를 pDCM2-del sdaA(I)라 명명하였다.

[333] 벡터제작을 위해 사용된 프라이머의 서열들은 각각 다음과 같다.

[334]

[335] [표11]

서열번호	명칭	서열
30	primer	5'- AATTCGAGCTCGGTACCCCATTTCGTGACCA TTAGCGT-3'
31	primer	5'- CTTTGTACTTGGTGAGATCATGCCAATAGCG CCAG-3'
32	primer	5'- GCTATTGGCATGATCTCACCAAGTACAAAGA GACT-3'
33	primer	5'- CGACTCTAGAGGATCCCCGGTTACCGCGCAT TAGGACT-3'

[336] 실시예 7-2. sdaA 유전자 결손 균주 제작

[337]

[338] 상기 실시예 7-1에서 제작한 벡터를 코리네박테리움 스테이셔니스 KCCM12151P에 일렉트로포레이션법으로 형질전환 한 후, 카나마이신 25mg/L를 함유한 선별 배지에서 염색체상에 벡터가 삽입된 균주를 1차 후보균으로 선별하였다. 이후 상동성 재조합이 일어난 균주에서 서열번호 34와 서열번호 35의 프라이머 쌍을 이용하여 sdaA 유전자가 결손된 균주를 선별하였다. 위와 같은 방법으로 획득된 세린 탈수화효소가 결손된 균주를 CJI-3176(KCCM12151P_sda_deletion)라 명명하였다.

[339]

[340] [표12]

서열번호	명칭	서열
34	primer	5'- TAATCCCCCAGCTCACCGGC -3'
35	primer	5'- TTTGGATGCCGAGGTCGTAG -3'

[341] 실시예 7-3. sdaA 유전자 결손 균주의 IMP 생산능 평가

[342]

[343]

상기 실시예 7-2에서 제작된 균주 및 모균주에 대해 플라스크 발효역가 평가를 통해 IMP 생산능을 평가하였다. 하기 종배지 2.5 ml을 함유하는 14 ml tube에 코리네박테리움 스테이셔니스 KCCM12151P, CJI-3176을 접종하고 30°C에서 24시간 동안 170 rpm으로 진탕 배양하였다. 하기의 생산배지 29 ml (본배지 24 ml + 별 살배지 5 ml)을 포함하고 있는 250 ml 코너-바플 플라스크에 2ml의 종 배양액을 접종하고 30°C에서 72시간동안 170 rp으로 진탕 배양하였다. 배양 종료 후 HPLC를 이용한 방법에 의해 5'-이노신산의 생산량을 측정하였다.

[344]

[345]

상기 종배지 및 발효배지의 조성은 다음과 같다.

[346]

[347]

<IMP종배지>

[348]

포도당 1%, 펩톤1%, 육즙 1%, 효모엑기스 1%, 염화나트륨 0.25%, 아데닌 100 mg/L, 구아닌100mg/L, pH7.2

[349]

[350]

<IMP 플라스크 발효배지>

[351]

글루타민산 나트륨 0.1%, 암모늄클로라이드 1%, 황산마그네슘 1.2%, 염화칼슘 0.01%, 황산철 20mg/L, 황산망간 20mg/L, 황산아연 20mg/L, 황산구리 5mg/L, L-시스테인 23mg/L, 베타알라닌 24mg/L, 니코틴산 8mg/L, 비오틴 45µg/L, 티아민염산 5 mg/L, 아데닌 30mg/L, 인산(85%) 1.9%, 포도당4.2%, 과당 2.4% 첨가

[352]

[353]

코리네박테리움 스테이셔니스의 세린 탈수화효소 결손에 따른 배양 결과는 하기 표 13에 나타내었다.

[354]

[355]

[표13]

세린 탈수화효소 결손에 따른 5'-이노신산 생산량 확인

균주번호	도입형태	OD	5'-이노신산(g/L)	농도증가율 (%)
KCCM12151P	Control	41.3	5.2	-
CJI-3176	Δsda	40.8	5.5	5.7

[356]

IMP 생산균주 내부의 세린 탈수화효소의 결손으로 인한 세린 풀의 증가는 5'-이노신산 생산량 증가로 이어질 수 있음을 확인하였다.

[357]

[358]

실시예 8. sdaA 결손 및 glyA 추가 강화 균주 제작 및 IMP 생산능 평가

[359]

- [360] 실시예 8-1. *sdaA* 결손 및 *glyA* 추가 강화 재조합 벡터 및 5'-이노신산 생산 균주 제작
- [361]
- [362] 코리네박테리움 스테이셔니스의 내재적 유전자인 *sdaA*를 결손하고, 해당 유전자 위치에 *glyA* 유전자의 copy 수를 추가하는 형태로 시너지 효과를 확인하고자 하였다. 따라서, 상기 실시예 7-2에서 제조한 CJI-3176에 *sdaA*를 결손하고, 해당 유전자 위치에 *glyA*의 copy 수를 추가하는 실험을 진행하였다.
- [363] 코리네박테리움 스테이셔니스 야생형인 ATCC6872 균주의 염색체 유전자를 Intron사의 G-spin Total DNA extraction mini kit (Cat. No 17045)를 이용하여 kit에 제공된 protocol에 따라 분리하고 서열번호 36과 서열번호 37의 프라이머 쌍 및 서열번호 38과 서열번호 39의 프라이머 쌍 및 서열번호 40와 서열번호 41의 프라이머 쌍, 서열번호 42와 서열번호 43의 프라이머 쌍을 이용하여 중합효소 연쇄반응을 통하여 유전자 단편(*del_sda::Pcj7/glyA-A*, *del_sda::Pcj7/glyA -B*, *del_sda::Pcj7/glyA -C*, *del_sda::Pcj7/glyA -D*)을 각각 얻었다. PCR법의 조건은 94°C에서 5분간 변성 후, 94°C 30초 변성, 55°C 30초 어닐링, 72°C 1분 중합을 20회 반복한 후, 72°C에서 7분간 중합반응을 수행하였다.
- [364] 상기에서 수득한 네 단편을 주형으로 2nd PCR을 실시하여 얻어진 유전자의 단편을 제한효소 *XbaI* (New England Biolabs, Beverly, MA)으로 절단하였다. T4 리가아제 (New England Biolabs, Beverly, MA)를 이용하여 상기 유전자 단편으로 *XbaI* 제한효소로 절단시킨 선상의 pDCM2 (대한민국 공개번호 제 10-2020-0136813호)에 접합 하였다. 결과로 얻은 플라스미드를 pDCM2-*del_sdaA-Pn/glyA*라 명명하였다.
- [365] 벡터제작을 위해 사용된 프라이머의 서열들은 각각 다음과 같다.

[366]

[367] [표14]

서열번호	명칭	서열
36	primer	5'- AATTCGAGCTCGGTACCCCATTTTCGTGACCA TTAGCGT -3'
37	primer	5'- ATTAGCCTGAAGGAAGATCATGCCAATAGC GCCAG -3'
38	primer	5'- GCTATTGGCATGATCTTCCTTCAGGCTAATC TTTT -3'
39	primer	5'-ATTCTGGGTAGTCATCATATGTGTTTCCTTTC GTT-3'

40	primer	5'- AAGGAAACACATATGATGACTACCCAGAAT TCTTC -3'
41	primer	5'- CTTTGTACTTGGTGACCAAGAGTCAGGATGC CGAA-3'
42	primer	5'- CATCCTGACTCTTGGTCACCAAGTACAAAGA GACT -3'
43	primer	5'- CGACTCTAGAGGATCCCCGGTTACCGCGCAT TAGGACT-3'

[368] 상기 pDCM2-del_sdaA-Pcj7/glyA 벡터를 상기 실시예 7-2에서 제작된 CJI-3176 균주에 일렉트로포레이션법으로 형질 전환한 후, 카나마이신 25mg/L를 함유한 선별 배지에서 염색체상에 변이 유전자와 벡터가 함께 삽입된 균주를 1차 후보 균으로 선별하였다. 이후 상동성 재조합이 일어난 균주에서 서열번호 44와 서열번호 45의 프라이머 쌍을 이용하여 sdaA 유전자가 결손되고, 해당 위치에 Pcj7 프로모터와 연결된 glyA 유전자가 삽입된 균주를 선별하였다. 위와 같은 방법으로 획득된 균주를 CJI-3177(CJI-3176_del_sdaA-Pn/glyA)으로 명명하였다.

[369] 균주 제작을 위해 사용된 프라이머의 서열들은 각각 다음과 같다.

[370]

[371] [표15]

서열번호	명칭	서열
44	primer	5'-TAATCCCCCAGCTCACCGGC-3'
45	primer	5'- TTTGGATGCCGAGGTCGTAG-3'

[372] 실시예 8-2. sdaA 결손 및 glyA 추가 강화 균주 제작 균주의 IMP 생산능 평가

[373]

[374] 상기 실시예 7-2 및 상기 실시예 8-1에서 제작된 균주 및 모균주에 대해 플라스크 발효역가 평가를 통해 IMP 생산능을 평가하였다. 하기 종배지 2.5 ml을 함유하는 14 ml tube에 코리네박테리움 스테이셔니스 KCCM12151P, CJI-3176, CJI-3177을 접종하고 30°C에서 24시간 동안 170 rpm으로 진탕 배양하였다. 하기의 생산배지 29 ml (본배지 24 ml + 별살배지 5 ml)을 포함하고 있는 250 ml 코너바플 플라스크에 2ml의 종 배양액을 접종하고 30°C에서 72시간동안 170 rp으로 진탕 배양하였다. 배양 종료 후 HPLC를 이용한 방법에 의해 5'-이노신산의 생산량을 측정하였다

[375]

[376] 상기 종배지 및 발효배지의 조성은 다음과 같다.

[377]

[378] <IMP종배지>

[379] 포도당 1%, 펩톤1%, 육즙 1%, 효모엑기스 1%, 염화나트륨 0.25%, 아데닌 100 mg/L, 구아닌100mg/L, pH7.2

[380]

[381] <IMP 플라스크 발효배지>

[382] 글루타민산 나트륨 0.1%, 암모늄클로라이드 1%, 황산마그네슘 1.2%, 염화칼슘 0.01%, 황산철 20mg/L, 황산망간 20mg/L, 황산아연 20mg/L, 황산구리 5mg/L, L-시스테인 23mg/L, 베타알라닌 24mg/L, 니코틴산 8mg/L, 비오틴 45 μ g/L, 티아민염산 5 mg/L, 아데닌 30mg/L, 인산(85%) 1.9%, 포도당4.2%, 과당 2.4% 첨가

[383]

[384] 코리네박테리움 스테이셔니스의 세린 탈수화효소 결손에 따른 배양 결과는 하기 표 16에 나타내었다.

[385]

[386] [표16]

세린 탈수화효소 결손에 따른 5'-이노신산 생산량 확인

균주번호	도입형태	OD	5'-이노신산(g/L)	농도증가율 (%)
KCCM1215 1P	Control	41.3	5.2	-
CJI-3176	Δ sda	40.8	5.5	5.7
CJI-3177	CJI-3176 -del_sdaA- Pcj 7/glyA	39.2	5.9	13.4

[387] IMP 생산균주 내부의 세린 탈수화효소의 결손으로 인한 세린 풀의 증가와 더불어 glyA의 copy 추가로의 강화는 5'-이노신산 생산량 증가에 시너지 효과가 있음을 확인하였다.

[388]

[389] 실시예 9. sdaA 결손 및 glyA 추가 강화 균주 기반 gcvPTH 강화, fdh결손, purT 강화 균주 제작 및 평가 (IMP)

[390]

[391] 실시예 9-1. gcvPTH 추가 강화 재조합 벡터 및 5'-이노신산 균주 제작

[392]

[393] 코리네박테리움 스테이셔니스 균주의 내재적 gcvPTH 유전자를 native 프로모터 형태로 copy 추가하는 벡터를 제작하였다. 코리네박테리움 염색체 내 유전자의 삽입 및 교체를 위한 플라스미드 pDCM2 (대한민국 공개번호 제 10-2020-0136813호)를 이용하여 하기와 같이 제작하였다.

[394] 코리네박테리움 스테이셔니스 야생형인 ATCC6872 균주의 염색체 유전자를 Intron사의 G-spin Total DNA extraction mini kit (Cat. No 17045)를 이용하여 kit에

제공된 protocol에 따라 분리하고, 서열번호 46과 서열번호 47의 프라이머 쌍 및 서열번호48 과 서열번호49 의 프라이머 쌍 및 서열번호 50와 서열번호 51의 프라이머 쌍, 서열번호 52와 서열번호 53의 프라이머 쌍을 이용하여 중합효소 연쇄반응을 통하여 유전자 단편(Pn/gcvPTH-A, Pn/gcvPTH -B, Pn/gcvPTH -C, Pn/gcvPTH-D)을 각각 얻었다. PCR법의 조건은 94°C에서 5분간 변성 후, 94°C 30초 변성, 55°C 30초 어닐링, 72°C 1분 중합을 20회 반복한 후, 72°C에서 7분간 중합반응을 수행하였다.

[395] 상기에서 수득한 유전자의 단편을 제한효소 XbaI (New England Biolabs, Beverly, MA)으로 절단하였다. T4 리가아제 (New England Biolabs, Beverly, MA)를 이용하여 상기 유전자 단편으로 XbaI 제한효소로 절단시킨 선상의 pDCM2(대한민국 공개번호 제 10-2020-0136813호)에 접합 하였다. 제조된 벡터를 pDCM2-Pn/gcvPTH로 명명하였다.

[396] 벡터제작을 위해 사용된 프라이머의 서열들은 각각 다음과 같다.

[397]

[398] [표17]

서열번호	명칭	서열
46	Pn/gcvPTH-A-F	5'- AATTCGAGCTCGGTACCCAGGCACAGCCGACATTACGG -3'
47	Pn/gcvPTH-A-R	5'- GTAGCACATCTGACGAATGTCCAAGTCTAAGGAAA -3'
48	Pn/gcvPTH-B-F	5'- TTAGACTTGGACATTCGTCAGATGTGCTACTTGCC -3'
49	Pn/gcvPTH-B-R	5'- TGCGCCATTAGCGTGTTACTTCTCGCGGCTATAGA -3'
50	Pn/gcvPTH-C-F	5'- AGCCGCGAGAAGTAACACGCTAATGGCGCATTGAA -3'
51	Pn/gcvPTH-C-R	5'- TGAATTATCCGCGTCTTAGATGCCGTTTTCTGCCG-3'
52	Pn/gcvPTH-D-F	5'- GAAAACGGCATCTAAGACGCGGATAATTCA GCTGT -3'
53	Pn/gcvPTH-D-R	5'- CGACTCTAGAGGATCCCCGATGAAGCGAACACTTAAAT -3'

[399] 실시예 9-2. gcvPTH 유전자가 강화된 5'-이노신산 생산 균주 제작

[400]

[401] 상기 실시예 8-1에서 제작한 CJI-3177 (CJI-3176_del_sdaA-Pn/glyA) 균주에 gcvPTH를 강화하는 실험을 진행하였다. 상기 실시예 9-1에서 제작한 pDCM2-Pn/gcvPTH 벡터를 상기 실시예 8-1에서 제작한 CJI-3177 (CJI-3176_del_sdaA-Pn/glyA) 균주에 일렉트로포레이션법으로 형질 전환한 후, 카나마이신 25mg/L를 함유한 선별 배지에서 염색체상에 변이 유전자와 벡터가 함께 삽입된 균주를 1차 후보균으로 선별하였다. 이후 상동성 재조합이 일어난 균주에서 서열번호 54 서열번호 55 프라이머 쌍을 이용한 PCR을 통하여 1차 확인 후 유전자 서열분석을 통해 최종 확인하였다. 선별된 균주를 각각 CJI-3192(CJI-3177_Pn/gcvPTH)로 명명하였다.

[402]

[403] [표18]

서열번호	명칭	서열
54	primer	5'- CCAGTACATTGTCATGGGAT-3'
55	primer	5'- GATTGGCATATCGCACCGAG -3'

[404] 실시예 9-3. fdh 결손 및 purT 추가 강화 재조합 벡터 및 5'-이노신산 생산 균주 제작

[405]

[406] 코리네박테리움 스테이셔니스의 내재적 유전자인 fdh를 결손하고, 해당 유전자 위치에 purT 유전자의 copy 수를 추가하는 형태로 벡터를 제작하여, 최종적으로 IMP 생산주에서 gcvPTH 강화와의 시너지 효과를 확인하고자 하였다. 따라서, 상기 실시예 9-2에서 제작한 CJI-3192에 fdh를 결손하고, 해당 유전자 위치에 purT의 copy 수를 추가하는 실험을 진행하였다.

[407] 코리네박테리움 스테이셔니스 야생형인 ATCC6872 균주의 염색체 유전자를 Intron사의 G-spin Total DNA extraction mini kit (Cat. No 17045)를 이용하여 kit에 제공된 protocol에 따라 분리하고 서열번호 56과 서열번호 57의 프라이머 쌍 및 서열번호 58과 서열번호 59의 프라이머 쌍 및 서열번호 60와 서열번호 61의 프라이머 쌍, 서열번호 62와 서열번호 63의 프라이머 쌍을 이용하여 중합효소 연쇄반응을 통하여 유전자 단편(del_fdh::Pcj7/purT-A, del_fdh::Pcj7/purT-B, del_fdh::Pcj7/purT-C, del_fdh::Pcj7/purT-D)을 각각 얻었다. PCR법의 조건은 94°C에서 5분간 변성 후, 94°C 30초 변성, 55°C 30초 어닐링, 72°C 1분 30초 중합을 20회 반복한 후, 72°C에서 7분간 중합반응을 수행하였다.

[408] 상기에서 수득한 네 단편을 주형으로 2nd PCR을 실시하여 얻어진 유전자의 단편을 제한효소 XbaI (New England Biolabs, Beverly, MA)으로 절단하였다. T4 리가아제 (New England Biolabs, Beverly, MA)를 이용하여 상기 유전자 단편으로 XbaI 제한효소로 절단시킨 선상의 pDCM2 (대한민국 공개번호 제

10-2020-0136813호)에 접합 하였다. 결과로 얻은 플라스미드를 pDCM2-del_fdh-Pcj7/purT라 명명하였다.

[409] 벡터제작을 위해 사용된 프라이머의 서열들은 각각 다음과 같다.

[410]

[411] [표19]

서열번호	명칭	서열
56	primer	5'- TCGAGCTCGGTACCCGTTGCCGTATCAGACA TGCTCAG -3'
57	primer	5'- GATTAGCCTGAAGGAATTGATTTATCTCGAC CAAACAG -3'
58	primer	5'- GGTCGAGATAAATCAATTCCTTCAGGCTAAT CTTTTCC -3'
59	primer	5'- CGATATAAGACTCCATCATATGTGTTTCCTT TCGTTGG-3'
60	primer	5'- AAAGGAAACACATATGATGGAGTCTTATAT CGGTAGCC -3'
61	primer	5'- CTCATAGGTGCCGAACTTACTCGGAGATTTC GACCTCA-3'
62	primer	5'- CGAAATCTCCGAGTAAGTTCGGCACCTATGA GAATATG -3'
63	primer	5'- CTCTAGAGGATCCCCGGCAAGTGTTTCTTGG CGCCATTC-3'

[412] 상기 pDCM2-del_fdh-Pcj7/purT 벡터를 상기 실시예 9-2에서 제작된 CJI-3192 균주(IMP 생산균주)에 일렉트로포레이션법으로 형질 전환한 후, 카나마이신 25mg/L를 함유한 선별 배지에서 염색체상에 변이 유전자와 벡터가 함께 삽입된 균주를 1차 후보균으로 선별하였다. 이후 상동성 재조합이 일어난 균주에서 서열번호 64와 서열번호 65의 프라이머 쌍을 이용하여 fdh 유전자가 결손되고, 해당 위치에 Pcj7 프로모터와 연결된 purT 유전자가 삽입된 균주를 선별하였다. 위와 같은 방법으로 획득된 균주를 CJI-3193(CJI-3192-del_fdh-Pcj7/purT)으로 명명하였다.

[413] 균주 제작을 위해 사용된 프라이머의 서열들은 각각 다음과 같다.

[414]

[415] [표20]

서열번호	명칭	서열
64	primer	5'-GCGAGGGGGAAGAAAAGTA -3'
65	primer	5'- CGTTGCCCTTTTTCTTCT -3'

[416] 실시예 10. glyA 강화 및 sda 결손 균주 기반 gcvPTH 강화, fdh결손, purT 강화 균주의 5'-이노신산 생산능 확인

[417]

[418] 상기 실시예 9-2 및 실시예 9-3에서 제작된 균주 및 모균주의 5'-이노신산 생산능을 측정하기 위하여 플라스크 역가 평가를 실시하였다. 하기 종배지 2.5 ml을 함유하는 14 ml tube에 코리네박테리움 스테이셔니스 KCCM12151P, CJI-3192, CJI-3193을 접종하고 30°C에서 24시간 동안 170 rpm으로 진탕 배양하였다. 하기의 생산배지 29 ml (본배지 24 ml + 별살배지 5 ml)을 포함하고 있는 250 ml 코너-바플 플라스크에 2ml의 종 배양액을 접종하고 30°C에서 72시간동안 170 rpm으로 진탕 배양하였다. 배양 종료 후 HPLC를 이용한 방법에 의해 5'-이노신산의 생산량을 측정하였다.

[419]

[420] 상기 종배지 및 발효배지의 조성은 실시예 8-2와 동일하다.

[421]

[422] 코리네박테리움 스테이셔니스의 포름산 탈수소효소 결손 및 포르메이트 의존성 포스포리보실글리신아미드 포밀 전이효소 강화와 gcvPTH강화, glyA 강화 및 sda결손 조합에 따른 배양 결과는 하기 표 21에 나타내었다.

[423]

[424] [표21]

포름산 탈수소효소 결손 및 포르메이트 의존성 포스포리보실글리신아미드 포밀 전이효소 강화 및 gcvPTH강화, glyA 강화 및 sda 결손 조합에 따른 5'-이노신산 생산량 확인

균주번호	도입형태	OD	5'-이노신산(g/L)	농도증가율 (%)
KCCM12151P	Control	40.1	5.3	-
CJI-3192	CJI-3177_Pn/gcvPTH	39.1	6.2	16.9
CJI-3193	CJI-3192_del_fdh-Pcj7/PurT	39.4	6.9	30.1

[425] IMP 생산균주에서의 sdaA 결손, glyA 강화 및 gcvPTH 강화를 통합해주었을 때, IMP 생산량 증가로 이어질 수 있으며, 추가적으로 fdh를 결손해주면서 해당 위치에 purT를 copy 수 증가의 방법으로 강화해주었을 때 IMP 농도가 추가적으로 증가함을 확인하였다.

[426]

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

청구범위

- [청구항 1] 세린 탈수화효소 단백질 활성이 내재적 활성에 비하여 약화된, 퓨린 뉴클레오티드 생산능을 가지는 미생물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 세린 탈수화효소는 서열번호 66의 아미노산 서열로 이루어지는 것인, 퓨린 뉴클레오티드 생산능을 가지는 미생물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 미생물은 추가로 하기 (a) 내지 (d)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 단백질 활성이 조절된 것인, 퓨린 뉴클레오티드 생산능을 가지는 미생물:
- (a) 포름산 탈수소효소 단백질 활성이 내재적 활성에 비하여 약화;
 - (b) 글리신 분해 효소 단백질 활성이 내재적 활성에 비하여 강화;
 - (c) 세린 하이드록시메틸트랜스퍼라제 단백질 활성이 내재적 활성에 비하여 강화; 및
 - (d) 포르메이트 의존성 포스포리보실글리신아미드 포밀 전이효소 단백질 활성이 내재적 활성에 비하여 강화.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 미생물은 코리네박테리움 속 미생물인 것인, 퓨린 뉴클레오티드 생산능을 가지는 미생물.
- [청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 코리네박테리움 속 미생물은 코리네박테리움 스테이셔니스인 것인, 퓨린 뉴클레오티드 생산능을 가지는 미생물.
- [청구항 6] 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 미생물은 비변형 미생물과 비교하여 퓨린 뉴클레오티드 생산능이 증가된 것인, 퓨린 뉴클레오티드 생산능을 가지는 미생물.
- [청구항 7] 세린 탈수화효소 단백질 활성이 내재적 활성에 비하여 약화된 미생물을 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, 퓨린 뉴클레오티드의 생산 방법.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 배양된 미생물, 상기 미생물의 배양물, 상기 미생물의 발효물 또는 상기 배양 배지에서 목적 물질을 회수하는 단계를 추가적으로 포함하는 것인, 방법.
- [청구항 9] 세린 탈수화효소 단백질 활성이 내재적 활성에 비하여 약화된 미생물, 상기 미생물의 배양물, 상기 미생물의 발효물 또는 이들 중 2 이상의 조합을 포함하는 퓨린 뉴클레오티드 생산용 조성물.
- [청구항 10] 세린 탈수화효소 단백질 활성이 내재적 활성에 비하여 약화된 미생물의 퓨린 뉴클레오티드 생산 용도.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/020106

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C12N 15/77(2006.01)i; C12N 1/20(2006.01)i; C12N 9/88(2006.01)i; C12P 19/32(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); C07K 14/365(2006.01); C12N 1/00(2006.01); C12N 1/21(2006.01); C12N 15/11(2006.01); C12N 9/10(2006.01); C12P 13/12(2006.01); C12P 19/32(2006.01); C12P 7/24(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: 세린 탈수소화효소(serine dehydratase), 퓨린 뉴클레오티드(purine nucleotide), 코리네박테리움 스테이셔스(corynebacterium stationis), 포스포리보실 글리신아미드 포밀 전이효소 (Phosphoribosylglycinamide formyltransferase), 5'-이노신산(5'-inosine monophosphate), 5'-크산틴산(5'-xanthosine monophosphate), 5'-구아닌산(5'-guanine monophosphate), sdaA, glyA		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2019-0161776 A1 (AJINOMOTO CO., INC.) 30 May 2019 (2019-05-30) See claim 29.	1-10
A	JP 2019-022479 A (AJINOMOTO CO., INC.) 14 February 2019 (2019-02-14) See entire document.	1-10
A	WO 2012-016960 A1 (BAYER PHARMA AKTIENGESELLSCHAFT et al.) 09 February 2012 (2012-02-09) See entire document.	1-10
A	KR 10-2009-0079567 A (CJ CHEILJEDANG CORPORATION) 22 July 2009 (2009-07-22) See entire document.	1-10
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 12 March 2024		Date of mailing of the international search report 13 March 2024
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/020106

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-1904675 B1 (CJ CHEILJEDANG CORPORATION) 04 October 2018 (2018-10-04) See entire document.	1-10
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>		

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.
 - b. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
 accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2023/020106

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	2019-0161776	A1	30 May 2019	CN	109837315	A	04 June 2019
				EP	3502263	A2	26 June 2019
				EP	3502263	A3	16 October 2019
				EP	3502263	B1	21 April 2021
				JP	2019-134700	A	15 August 2019
				JP	7318199	B2	01 August 2023
				US	11680279	B2	20 June 2023
JP	2019-022479	A	14 February 2019	CN	108929886	A	04 December 2018
				CN	108929886	B	03 June 2022
				EP	3406727	A1	28 November 2018
				EP	3406727	B1	04 August 2021
				JP	6838584	B2	03 March 2021
				US	10858676	B2	08 December 2020
				US	2018-0334693	A1	22 November 2018
WO	2012-016960	A1	09 February 2012	CN	103298828	A	11 September 2013
				CN	103298828	B	03 August 2016
				EP	2601209	A1	12 June 2013
				EP	2601209	B1	01 March 2017
				JP	2013-535206	A	12 September 2013
				JP	2017-060500	A	30 March 2017
				JP	2019-030317	A	28 February 2019
				JP	6332966	B2	06 June 2018
				JP	6449214	B2	09 January 2019
				JP	6700365	B2	27 May 2020
				KR	10-2016-0073433	A	27 June 2016
				US	2013-0302855	A1	14 November 2013
				US	9719064	B2	01 August 2017
				KR	10-2009-0079567	A	22 July 2009
WO	2009-091206	A2	23 July 2009				
WO	2009-091206	A3	24 September 2009				
KR	10-1904675	B1	04 October 2018	CN	109929787	A	25 June 2019
				CN	110249054	A	17 September 2019
				CN	110249054	B	13 October 2020
				EP	3608410	A1	12 February 2020
				EP	3608410	A4	22 April 2020
				JP	2020-505005	A	20 February 2020
				JP	6652687	B2	26 February 2020
				US	11155849	B2	26 October 2021
				US	2020-0377917	A1	03 December 2020
				WO	2019-117398	A1	20 June 2019
				WO	2019-117671	A1	20 June 2019

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 15/77(2006.01)i; C12N 1/20(2006.01)i; C12N 9/88(2006.01)i; C12P 19/32(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 15/77(2006.01); C07K 14/365(2006.01); C12N 1/00(2006.01); C12N 1/21(2006.01); C12N 15/11(2006.01); C12N 9/10(2006.01); C12P 13/12(2006.01); C12P 19/32(2006.01); C12P 7/24(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: 세린 탈수소화효소(serine dehydratase), 퓨린 뉴클레오티드(purine nucleotide), 코리네박테리움 스테이셔스(corynebacterium stationis), 포스포리보실 글리신아미드 포밀전이효소(Phosphoribosylglycinamide formyltransferase), 5'-이노신산(5'-inosine monophosphate), 5'-크산틴산(5'-xanthosine monophosphate), 5'-구아닌산(5'-guanine monophosphate), sdaA, glyA		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	US 2019-0161776 A1 (AJINOMOTO CO., INC.) 2019.05.30 청구항 29	1-10
A	JP 2019-022479 A (AJINOMOTO CO., INC.) 2019.02.14 전문	1-10
A	WO 2012-016960 A1 (BAYER PHARMA AKTIENGESELLSCHAFT 등) 2012.02.09 전문	1-10
A	KR 10-2009-0079567 A (씨제이제일제당 (주)) 2009.07.22 전문	1-10
A	KR 10-1904675 B1 (씨제이제일제당 (주)) 2018.10.04 전문	1-10
<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 "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	
2024년03월12일 (12.03.2024)	2024년03월13일 (13.03.2024)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소	심사관	
대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)	허주형	
팩스 번호 +82-42-481-8578	전화번호 +82-42-481-5373	

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. 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - b. 국제조사를 목적으로 국제출원일 이후에 제출된 서열목록(규칙 13의3.1(a))
 서열목록이 출원시 국제출원의 개시 범위를 넘지 않는다는 취지의 진술서를 첨부

2. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열에 대해, 본 보고서는 WIPO 표준 ST.26을 준수하는 서열목록이 없이 유효한 조사를 할 수 있는 범위에서 작성되었습니다

3. 추가 의견:

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2019-0161776 A1	2019/05/30	CN 109837315 A	2019/06/04
		EP 3502263 A2	2019/06/26
		EP 3502263 A3	2019/10/16
		EP 3502263 B1	2021/04/21
		JP 2019-134700 A	2019/08/15
		JP 7318199 B2	2023/08/01
		US 11680279 B2	2023/06/20
JP 2019-022479 A	2019/02/14	CN 108929886 A	2018/12/04
		CN 108929886 B	2022/06/03
		EP 3406727 A1	2018/11/28
		EP 3406727 B1	2021/08/04
		JP 6838584 B2	2021/03/03
		US 10858676 B2	2020/12/08
		US 2018-0334693 A1	2018/11/22
WO 2012-016960 A1	2012/02/09	CN 103298828 A	2013/09/11
		CN 103298828 B	2016/08/03
		EP 2601209 A1	2013/06/12
		EP 2601209 B1	2017/03/01
		JP 2013-535206 A	2013/09/12
		JP 2017-060500 A	2017/03/30
		JP 2019-030317 A	2019/02/28
		JP 6332966 B2	2018/06/06
		JP 6449214 B2	2019/01/09
		JP 6700365 B2	2020/05/27
		KR 10-2016-0073433 A	2016/06/27
		US 2013-0302855 A1	2013/11/14
		US 9719064 B2	2017/08/01
KR 10-2009-0079567 A	2009/07/22	KR 10-0957689 B1	2010/05/12
		WO 2009-091206 A2	2009/07/23
		WO 2009-091206 A3	2009/09/24
KR 10-1904675 B1	2018/10/04	CN 109929787 A	2019/06/25
		CN 110249054 A	2019/09/17
		CN 110249054 B	2020/10/13
		EP 3608410 A1	2020/02/12
		EP 3608410 A4	2020/04/22
		JP 2020-505005 A	2020/02/20
		JP 6652687 B2	2020/02/26
		US 11155849 B2	2021/10/26
		US 2020-0377917 A1	2020/12/03
		WO 2019-117398 A1	2019/06/20
WO 2019-117671 A1	2019/06/20		