

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2024년 7월 4일 (04.07.2024)



(10) 국제공개번호
WO 2024/144060 A1

- (51) 국제특허분류: *C12N 9/10* (2006.01) *C12P 13/14* (2006.01) *C12N 15/77* (2006.01) 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).
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2023/020974
- (22) 국제출원일: 2023년 12월 19일 (19.12.2023) 공개:
- (25) 출원언어: 한국어 — 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- (26) 공개언어: 한국어 — 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))
- (30) 우선권정보: 10-2022-0186659 2022년 12월 28일 (28.12.2022)KR
- (71) 출원인: 씨제이제일제당 (주) (CJ CHEILJEDANG CORPORATION) [KR/KR]; 04560 서울특별시 중구 동호로 330, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 이희석 (LEE, Heeseok); 04560 서울특별시 중구 동호로 330, Seoul (KR). 최선형 (CHOI, Sun Hyoung); 04560 서울특별시 중구 동호로 330, Seoul (KR). 강태구 (KANG, Tae-Gu); 04560 서울특별시 중구 동호로 330, Seoul (KR). 윤병훈 (YOON, Byoung Hoon); 04560 서울특별시 중구 동호로 330, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 특허법인한얼 (HANOL INTELLECTUAL PROPERTY & 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,

(54) Title: NOVEL VARIANT POLYPEPTIDE WITH ACETOLACTATE SYNTHASE ACTIVITY, AND METHOD FOR PRODUCING L-GLUTAMIC ACID BY USING SAME

(54) 발명의 명칭: 신규한 아세토락테이트 합성효소 활성을 갖는 변이체 폴리펩티드 및 이를 이용한 L-글루탐산 생산 방법

(57) Abstract: The present application relates to a novel variant polypeptide with acetolactate synthase activity; a polynucleotide encoding the variant polypeptide; a microorganism comprising the variant polypeptide, a polynucleotide encoding the variant polypeptide, or a vector containing the polynucleotide; a method for producing L-glutamic acid comprising the step of culturing the microorganism in a medium; and a use of the microorganism for producing L-glutamic acid.

(57) 요약서: 본 출원은 신규한 아세토락테이트 합성효소 활성을 갖는 변이체 폴리펩티드; 상기 변이체 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 상기 변이체 폴리펩티드, 상기 변이체 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 포함하는 미생물; 상기 미생물을 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 L-글루탐산 생산 방법; 및 상기 미생물의 L-글루탐산 생산 용도에 관한 것이다.



WO 2024/144060 A1

명세서

발명의 명칭: 신규한 아세트락테이트 합성효소 활성을 갖는 변이체 폴리펩티드 및 이를 이용한 L-글루탐산 생산 방법 기술분야

[1] 본 출원은 신규한 아세트락테이트 합성효소 활성을 갖는 변이체 폴리펩티드; 상기 변이체 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 상기 변이체 폴리펩티드, 상기 변이체 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 포함하는 미생물; 상기 미생물을 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 L-글루탐산 생산 방법; 및 상기 미생물의 L-글루탐산 생산 용도에 관한 것이다.

[2]

배경기술

[3] 글루탐산은 발효에 의하여 생산되는 대표적인 아미노산으로, 특유의 독특한 맛을 지니고 있어 식품 분야에서는 물론 의약품 분야, 기타 동물 사료 분야 등에 널리 이용되고 있는 중요한 아미노산 중의 하나이다.

[4]

글루탐산을 생산하는 통상적인 방법으로는 주로 브레비박테리움 (*Brevibacterium*)이나 코리네박테리움 속 및 그 변이주를 포함한 코리네형 박테리아(*Coryneform bacteria*)를 이용해 발효를 통해 생산하며(Amino Acid Fermentation, Gakkai Shuppan Center: 195-215, 1986), 그 외에도 대장균 (*Escherichia coli*), 고초균(*Bacillus*), 방선균(*Streptomyces*), 페니실리움(*Penicillium*) 속, 크렙시엘라(*Klebsiella*), 어위니아(*Erwinia*), 판토에아(*Pantoea*) 속 등의 미생물을 이용하는 방법 등이 알려져 있다(미국 공개특허공보 제3220929호, 미국 등록특허공보 제6682912호).

[5]

또한, 아미노산을 효율적으로 생산하기 위한 다양한 연구, 예를 들어, 아미노산 고효율 생산 미생물이나 발효공정 기술을 개발하기 위한 노력이 이루어지고 있다. 구체적으로, 코리네박테리움 속 균주에서 아미노산 생합성에 관여하는 효소를 암호화하는 유전자의 발현을 증가시키거나 또는 아미노산 생합성에 불필요한 유전자를 제거하는 것과 같은 목적 물질 특이적인 접근 방법이 개발되었고(한국 등록특허공보 제10-0924065호, 한국 등록특허공보 제10-1208480호), 이러한 방법 이외에 아미노산 생산에 관여하지 않는 유전자를 제거하는 방법, 아미노산 생산에 있어 구체적으로 기능이 알려지지 않은 유전자를 제거하는 방법 또한 활용되고 있다. 그러나, 여전히 효율적이고 높은 수율로 L-글루탐산을 생산할 수 있는 방법에 대한 연구의 필요성이 대두되고 있다.

[6]

발명의 상세한 설명 기술적 과제

[7] 본 출원의 과제는 아세트락테이트 합성효소 활성을 갖는 변이체 폴리펩티드를 포함하는 미생물을 배양하여, 기존 비변형 폴리펩티드를 갖는 미생물에 비해 고수율의 L-글루탐산 생산이 가능한 미생물 및 이를 이용한 L-글루탐산 생산방법을 제공하는 것이다.

[8]

과제 해결 수단

- [9] 본 출원의 하나의 양태는 서열번호 1의 298번째 위치에 상응하는 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 아세트락테이트 합성효소 활성을 갖는 변이체 폴리펩티드를 제공한다.
- [10] 하나의 구체예에서, 상기 변이체 폴리펩티드는 서열번호 1의 298번째 위치에 상응하는 아미노산이 말린으로 치환된 것일 수 있다.
- [11] 다른 하나의 구체예에서, 상기 변이체 폴리펩티드는 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어지는 것일 수 있다.
- [12] 본 출원의 다른 하나의 양태는 상기 변이체 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [13] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 상기 변이체 폴리펩티드, 상기 변이체 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 포함하는 미생물을 제공한다.
- [14] 하나의 구체예에서, 상기 미생물은 서열번호 1의 폴리펩티드 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 미생물과 비교하여 L-글루탐산 생산능이 증가된 것일 수 있다.
- [15] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 미생물로서, 상기 미생물은 코리네박테리움 속 미생물인 것일 수 있다.
- [16] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 미생물로서, 상기 코리네박테리움 속 미생물은 코리네박테리움 글루타미쿰인 것일 수 있다.
- [17] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 상기 미생물을 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, L-글루탐산의 생산 방법을 제공한다.
- [18] 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.
- [19] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 상기 변이체 폴리펩티드; 상기 변이체 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터; 또는 상기 변이체 폴리펩티드, 상기 변이체 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 포함하는 미생물; 상기 미생물의 배양물; 또는 이들 중 2 이상의 조합을 포함하는 L-글루탐산 생산용 조성물을 제공한다.

[20] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 상기 미생물의 L-글루탐산 생산 용도를 제공한다.

[21]

발명의 효과

[22] 본 출원의 아세토락테이트 합성효소 활성을 갖는 변이체 폴리펩티드를 포함하는 미생물을 배양하는 경우, 기존 비변형 폴리펩티드를 갖는 미생물에 비해 고수율의 L-글루탐산 생산이 가능하다.

[23]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[24] 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. 또한, 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 출원이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 출원의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

[25]

[26] 본 출원의 하나의 양태는 서열번호 1의 298번째 위치에 상응하는 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 아세토락테이트 합성효소 활성을 갖는 변이체 폴리펩티드를 제공한다.

[27]

[28] 본 출원에서 용어, "아세토락테이트 합성효소 활성을 갖는 변이체 폴리펩티드"는 아세토락테이트 합성효소 활성을 갖는 폴리펩티드의 아미노산 서열에서 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 아세토락테이트 합성효소 활성을 갖는 변이체 폴리펩티드; 또는 아세토락테이트 합성효소 활성을 갖는 폴리펩티드의 아미노산 서열인 모서열(parent sequence)에서 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 아세토락테이트 합성효소 활성을 갖는 폴리펩티드의 변이체를 의미한다.

[29]

[30] 본 출원에서 용어, "아세토락테이트 합성효소(Acetolactate synthase, *ilvB*)"는 피루베이트를 기질로 하여 아세토락테이트를 생성하는 효소이며, "아세토하이드록시산 신타아제(Acetohydroxy acid synthase)" 및 "아세토하이드록시산 신타아제 큰 소단위체(Acetohydroxy acid synthase large subunit)" 등의 용어와 혼용될 수 있으며, 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 *ilvB* 유전자에 의해 코딩되는 아세토락테이트 합성효소(*ilvB*) 일 수 있다.

- [31] 상기 아세트락테이트 합성효소를 코딩하는 유전자는 코리네박테리움 속 미생물 유래일 수 있고, 구체적으로 코리네박테리움 글루타미쿰 유래의 *ilvB* 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [32] 구체적으로, 상기 아세트락테이트 합성효소 단백질은 그 예로 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 이와 60% 이상의 상동성(homology) 또는 동일성(identity)을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 아세트락테이트 합성효소 활성을 갖는 한, 이에 제한되는 것은 아니다. 구체적으로 상기 아미노산 서열은 서열번호 1 또는 상기 서열번호 1과 적어도 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 상기 서열번호 1은 공지 데이터 베이스인 NCBI의 GenBank 또는 KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)에서 그 서열을 얻을 수 있다. 일 예로, 코리네박테리움 속 유래 또는 코리네박테리움 글루타미쿰 유래일 수 있으며, 더욱 구체적으로는 서열번호 1로 기재된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드/단백질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 이러한 상동성 또는 동일성을 가지며 상기 단백질에 상응하는 효능을 나타내는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질도 본 출원의 범위 내에 포함됨은 자명하다.
- [33] 또한, 상기 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 아세트락테이트 합성효소 단백질은 서열번호 2의 서열 또는 서열번호 2의 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 염기서열을 가지거나 포함하거나, 또는 서열번호 2의 서열 또는 서열번호 2의 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 염기서열로 이루어지거나 필수적으로 이루어질 수 있는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [34]
- [35] 본 출원에서 용어, "변이체(variant)"는 하나 이상의 아미노산이 보존적 치환(conservative substitution) 및/또는 변형(modification)되어 상기 변이체의 변이 전 아미노산 서열과 상이하나 기능(functions) 또는 특성(properties)이 유지되는 폴리펩티드를 지칭한다. 이러한 변이체는 일반적으로 상기 폴리펩티드의 아미노산 서열 중 하나 이상의 아미노산을 변형하고, 상기 변형된 폴리펩티드의 특성을 평가하여 동정(identify)될 수 있다. 즉, 변이체의 능력은 변이 전 폴리펩티드에 비하여 증가되거나, 변하지 않거나, 또는 감소될 수 있다. 또한, 일부 변이체는 N-말단 리더 서열 또는 막전이 도메인(transmembrane domain)과 같은 하나 이상의 부분이 제거된 변이체를 포함할 수 있다. 다른 변이체는 성숙 단백질(mature protein)의 N- 및/또는 C-말단으로부터 일부분이 제거된 변이체를 포함할 수 있다. 상기 용어 "변이체"는 변이형, 변형, 변이형 폴리펩티드, 변이된 단백질, 변이 및 변이체 등의 용어(영문 표현으로는 modification, modified polypeptide, modified protein,

mutant, mutein, divergent 등)가 혼용되어 사용될 수 있으며, 변이된 의미로 사용되는 용어라면 이에 제한되지 않는다.

- [36] 또한, 변이체는 폴리펩티드의 특성과 2차 구조에 최소한의 영향을 갖는 아미노산들의 결실 또는 부가를 포함할 수 있다. 예를 들면 폴리펩티드는 번역-동시에 (co-translationally) 또는 번역-후에(post-translationally) 단백질의 이전(transfer)에 관여하는 단백질 N-말단의 시그널 (또는 리더) 서열과 컨쥬게이트 할 수 있다. 또한 상기 폴리펩티드는 폴리펩티드를 확인, 정제, 또는 합성할 수 있도록 다른 서열 또는 링커와 컨쥬게이트 될 수 있다.
- [37]
- [38] 본 출원의 아세트락테이트 합성효소 활성을 갖는 변이체 폴리펩티드는 서열번호 1의 298번째 위치에 상응하는 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 아세트락테이트 합성효소 활성을 갖는 변이체 폴리펩티드일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [39] 일 구현예로, 본 출원의 아세트락테이트 합성효소 활성을 갖는 변이체 폴리펩티드는 서열번호 1의 아미노산 서열과 60% 이상 및 100% 미만의 서열 상동성, 구체적으로는 80% 이상 및 100% 미만의 서열 상동성을 가지는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [40] 구체적으로, 본 출원의 변이체는 상기 서열번호 1로 기재된 아미노산 서열과 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 서열에서, 서열번호 1의 N-말단으로부터 298번째 위치의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 것을 포함할 수 있다. 또한, 이러한 상동성 또는 동일성을 가지며 본 출원의 변이체에 상응하는 효능을 나타내는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환, 보존적 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 변이체도 본 출원의 범위 내에 포함됨은 자명하다.
- [41]
- [42] 상기 "다른 아미노산"은 치환 전의 아미노산과 다른 아미노산이면 제한되지 않는다. 한편, 본 출원에서 '특정 아미노산이 치환되었다'고 표현하는 경우, 다른 아미노산으로 치환되었다고 별도로 표기하지 않더라도 치환 전의 아미노산과 다른 아미노산으로 치환되는 것임은 자명하다.
- [43] 아미노산은 일반적으로 잔기의 극성, 전하, 용해도, 소수성, 친수성 및/또는 양친매성(amphipathic nature)에서의 유사성에 근거하여 분류할 수 있다.
- [44] 이러한 분류의 예로, 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 글라이신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 트립토판 및 프롤린; 극성(polar) 또는 친수성(hydrophilic) 곁사슬을 갖는 아미노산(극성 아미노산)은 세린, 트레오닌, 시스테인, 타이로신, 아스파라긴 및 글루타민이 속하는 것으로 분류할 수 있

다. 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 acid로도 지칭)인 글라이신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 트립토판, 프롤린, 세린, 트레오닌, 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 글라이신, 알라닌, 세린; 시스테인, 프롤린, 트레오닌, 아스파르트산, 아스파라긴; 발린, 히스티딘, 글루탐산, 글루타민; 이소류신, 류신, 메치오닌, 리신, 아르기닌; 및 페닐알라닌, 트립토판, 타이로신의 5군으로 분류할 수 있다. 그러나 반드시 이에 제한되는 것은 아니다.

[45] 예를 들어, "서열번호 1에서 298번째 위치에 상응하는 아미노산이 다른 아미노산으로 치환되었다"고 기재하는 경우, 알라닌(alanine)을 제외한, 발린(valine), 글라이신(glycine), 이소류신(isoleucine), 글루탐산(glutamate), 페닐알라닌(phenylalanine), 아르기닌(arginine), 아스파테이트(aspartate), 시스테인(cysteine), 아스파라긴(asparagine), 글루타민(glutamine), 히스티딘(histidine), 프롤린(proline), 세린(serine), 타이로신(tyrosine), 라이신(lysine), 트립토판(tryptophan), 메티오닌(methionine), 트레오닌(threonine) 또는 류신(leucine)으로 치환되는 것을 의미할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[46]

[47] 본 출원에서 "특정 서열번호로 기재된 아미노산 서열을 갖는 단백질"이라고 기재되어 있다 하더라도, 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 출원에서 사용될 수 있음은 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.

[48] 본 출원의 "N번 위치"는 N번 위치 및 N번 위치와 상응(Corresponding)하는 아미노산 위치를 포함할 수 있다. 구체적으로 특정 아미노산 서열에 개시된 성숙 폴리펩티드(mature polypeptide)에서 임의의 아미노산 잔기에 상응하는 아미노산 위치를 포함할 수 있다. 상기 특정 아미노산 서열은 서열번호 1의 아미노산 서열일 수 있다.

[49] 본 출원에서, 용어 "상응하는(corresponding to)"은, 폴리펩티드에서 열거되는 위치의 아미노산 잔기이거나, 또는 폴리펩티드에서 열거되는 잔기와 유사하게

나 동일하거나 상동한 아미노산 잔기를 지칭한다. 상응하는 위치의 아미노산을 확인하는 것은 특정 서열을 참조하는 서열의 특정 아미노산을 결정하는 것일 수 있다. 본 출원에 사용된 "상응 영역"은 일반적으로 관련 단백질 또는 참조(reference) 단백질에서의 유사하거나 대응되는 위치를 지칭한다.

- [50] 예를 들어, 임의의 아미노산 서열을 서열번호 1과 정렬(align)하고, 이를 토대로 상기 아미노산 서열의 각 아미노산 잔기는 서열번호 1의 아미노산 잔기와 상응하는 아미노산 잔기의 숫자 위치를 참조하여 넘버링 할 수 있다. 예를 들어, 본 출원에 기재된 것과 같은 서열 정렬 알고리즘은, 퀴리 시퀀스("참조 서열"이라고도 함)와 비교하여 아미노산의 위치, 또는 치환, 삽입 또는 결실 등의 변형이 발생하는 위치를 확인할 수 있다.
- [51] 이러한 정렬에는 예를 들어 Needleman-Wunsch 알고리즘(Needleman 및 Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48: 443-453), EMBOSS 패키지의 Needleman 프로그램(EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000), *Trends Genet.* 16: 276-277) 등을 이용할 수 있으나, 이에 제한되지 않고 당업계에 알려진 서열 정렬 프로그램, 쌍 서열(pairwise sequence) 비교 알고리즘 등을 적절히 사용할 수 있다.
- [52]
- [53] 하나의 구체예에서, 상기 변이체 폴리펩티드는 서열번호 1의 298번째 위치에 상응하는 아미노산이 발린, 글라이신, 이소류신, 아르기닌, 류신, 메티오닌, 트레오닌, 아스파라긴, 글루타민, 프롤린, 세린, 트립토판, 페닐알라닌, 히스티딘, 시스테인, 티로신, 라이신, 아스파테이트, 및 글루탐산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것으로 치환된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [54] 전술한 구체예 중 어느 하나의 구체예로, 본 출원에서 제공하는 변이체 폴리펩티드는 서열번호 1의 N-말단으로부터 298번째 위치에 상응하는 아미노산이 비극성 곁사슬(nonpolar side chain)을 갖는 아미노산(비극성 아미노산)인 글라이신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 트립토판 및 프롤린 중 선택되는 아미노산으로 치환된 것일 수 있다.
- [55] 전술한 구체예 중 어느 하나의 구체예로, 본 출원에서 제공하는 변이체 폴리펩티드는 서열번호 1의 N-말단으로부터 298번째 위치에 상응하는 아미노산이 전하를 띠지 않는 곁사슬을 갖는 아미노산(uncharged amino acid; neutral amino acid로도 지칭)인 글라이신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 트립토판, 프롤린, 세린, 트레오닌, 시스테인, 타이로신, 아스파라긴 및 글루타민 중 선택되는 아미노산으로 치환된 것일 수 있다.
- [56] 전술한 구체예 중 어느 하나의 구체예로, 본 출원에서 제공하는 변이체 폴리펩티드는 서열번호 1의 N-말단으로부터 298번째 위치에 상응하는 아미노산이 분지쇄 아미노산(branched amino acid)인 발린, 류신, 이소류신 중 선택되는 아미노산으로 치환된 것일 수 있다.

- [57] 전술한 구현예 중 어느 하나의 구현예로, 본 출원에서 제공하는 변이체 폴리펩티드는 서열번호 1의 N-말단으로부터 298번째 위치에 상응하는 아미노산이 발린, 히스티딘, 글루탐산, 글루타민 중 선택되는 아미노산으로 치환된 것일 수 있다.
- [58]
- [59] 전술한 구현예 중 어느 하나의 구현예로, 본 출원의 아세트락테이트 합성효소 활성을 갖는 변이체 폴리펩티드는 서열번호 1의 298번째 위치에 상응하는 아미노산이 발린으로 치환된 폴리펩티드일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [60] 예를 들어, 본 출원의 변이체 폴리펩티드는 상기 서열번호 1로 기재된 아미노산 서열에서 298번째 위치에 상응하는 아미노산인 발린은 고정되고, 서열번호 1과 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 서열을 포함할 수 있다. 또한, 이러한 상동성 또는 동일성을 가지며 본 출원의 변이체 폴리펩티드에 상응하는 효능을 나타내는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환, 보존적 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 변이체 폴리펩티드도 본 출원의 범위 내에 포함됨은 자명하다.
- [61] 한편, 당업자라면 당업계에 알려진 서열 얼라인먼트를 통해 임의의 아미노산 서열에서 본 출원의 서열번호 1의 아미노산 서열의 298번째 위치에 상응하는 아미노산을 파악할 수 있으며, 본 출원에서 별도로 기재하지 않더라도 "특정 서열 번호에서 특이적 위치의 아미노산"를 기재하는 경우, 임의의 아미노산 서열에서 그와 "상응하는 위치의 아미노산"까지 포함하는 의미임은 자명하다.
- [62]
- [63] 다른 하나의 구체예에서, 상기 변이체 폴리펩티드는 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어지는 것일 수 있다.
- [64] 구체적으로, 본 출원의 변이체 폴리펩티드는 서열번호 3 또는 상기 서열번호 3과 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.
- [65] 예를 들어, 상기 아미노산 서열 N-말단, C-말단 그리고/또는 내부에 본 출원의 변이체의 기능을 변경하지 않는 서열 추가 또는 결실, 자연적으로 발생할 수 있는 돌연변이, 잠재성 돌연변이(silent mutation) 또는 보존적 치환을 가지는 경우이다.
- [66] 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 들면, 양으로 하전된 (염기성) 아미노산은 아르기닌, 라이신,

및 히스티딘을 포함하고; 음으로 하전된 (산성) 아미노산은 글루탐산 및 아스파테이트를 포함하고; 방향족 아미노산은 페닐알라닌, 트립토판 및 타이로신을 포함하고, 소수성 아미노산은 알라닌, 발린, 이소류신, 류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 타이로신 및 트립토판을 포함한다. 또한, 아미노산은 전하를 띠는(electrically charged) 곁사슬을 갖는 아미노산과 전하를 띠지 않는(uncharged) 곁사슬을 갖는 아미노산으로 분류할 수 있으며, 전하를 띠는 곁사슬을 갖는 아미노산은 아스파르트산, 글루탐산, 라이신, 아르기닌, 히스티딘을 포함하고, 전하를 띠지 않는 곁사슬을 갖는 아미노산은 다시 비극성(nonpolar) 아미노산 또는 극성 아미노산(polar)으로 분류할 수 있으며, 비극성 아미노산은 글라이신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 트립토판, 프롤린, 극성 아미노산은 세린, 트레오닌, 시스테인, 타이로신, 아스파라긴, 글루타민을 포함하는 것으로 분류할 수 있다. 통상적으로, 보존성 치환은 생성된 폴리펩티드의 활성에 거의 영향을 미치지 않거나 또는 영향을 미치지 않는다. 통상적으로, 보존적 치환은 단백질 또는 폴리펩티드의 활성에 거의 영향을 미치지 않거나 또는 영향을 미치지 않을 수 있다.

[67]

[68] 본 출원의 다른 하나의 양태는 상기 변이체 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[69]

본 출원에서 용어, "폴리뉴클레오티드"는 뉴클레오티드 단위체(monomer)가 공유결합에 의해 길게 사슬모양으로 이어진 뉴클레오티드의 중합체(polymer)로 일정한 길이 이상의 DNA 또는 RNA 가닥으로서, 보다 구체적으로는 상기 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 단편을 의미한다.

[70]

본 출원의 아세트락테이트 합성효소 활성을 갖는 변이체 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 본 출원의 아세트락테이트 합성효소 활성을 갖는 변이체 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열이라면 제한없이 포함될 수 있다. 예를 들어, 본 출원의 아세트락테이트 합성효소 활성을 갖는 변이체 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 본 출원의 아세트락테이트 합성효소 활성을 갖는 변이체 폴리펩티드의 아미노산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[71]

예를 들어, 서열번호 3으로 기재된 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 본 출원의 일 예로, 본 출원의 폴리뉴클레오티드는 서열번호 4를 가지거나 포함할 수 있다. 또한, 본 출원의 폴리뉴클레오티드는 서열번호 4로 이루어지거나, 필수적으로 구성될 수 있다.

[72]

본 출원의 폴리뉴클레오티드는 코돈의 축퇴성(degeneracy) 또는 본 출원의 변이체를 발현시키고자 하는 생물에서 선호되는 코돈을 고려하여, 본 출원의 변이체의 아미노산 서열을 변화시키지 않는 범위 내에서 코딩 영역에 다양한 변형이 이루어질 수 있다. 따라서, 코돈 축퇴성(codon degeneracy)에 의해 본 출원의 변이체의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩타이드 또는 이와 상동성 또는 동일성을 가지는 폴리펩타이드로 번역될 수 있는 폴리뉴클레오티드 역시 포함될 수 있음은

자명하다. 예를 들어, 본 출원의 폴리뉴클레오티드는 서열번호 4 또는 이의 축퇴성 서열(degenerated sequence)일 수 있다.

- [73] 예를 들어, 본 출원의 폴리뉴클레오티드는 서열번호 2의 서열과 상동성 또는 동일성이 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.7% 또는 99.9% 이상의 상동성 또는 동일성을 가지는 염기 서열에서, 서열번호 2의 893번째 위치에 상응하는 아미노산인 알라닌을 코딩하는 코돈이 알라닌 외의 다른 아미노산, 예를 들어, 발린을 코딩하는 코돈으로 치환된 것을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 이러한 상동성 또는 동일성을 가지며 본 출원의 아세트락테이트 합성효소 활성을 갖는 변이체 폴리펩티드의 아미노산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환, 보존적 치환 또는 부가된 폴리뉴클레오티드 서열을 갖는 변이체도 본 출원의 범위 내에 포함됨은 자명하다.
- [74] 다른 예시로, 본 출원의 폴리뉴클레오티드는 서열번호 4와 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 핵산 서열을 가지거나 포함하거나, 또는 서열번호 4와 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 핵산 서열로 이루어지거나 필수적으로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또는, 상기 상동성 또는 동일성을 갖는 서열은 서열번호 4가 코딩하는 서열번호 3의 298번째 위치에 상응하는 코돈이 발린을 코딩하는 코돈으로 고정된 것일 수 있다.
- [75] 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 하이브리드화할 수 있는 서열이라면 제한없이 포함될 수 있다.
- [76] 상기 "엄격한 조건(stringent condition)"이란 폴리뉴클레오티드 간의 특이적 혼성화를 가능하게 하는 조건을 의미한다. 이러한 조건은 문헌(J. Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, 1989; F.M. Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 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, 1XSSC, 0.1% SDS, 구체적으로 60°C, 0.1XSSC, 0.1% SDS, 보다 구체적으로 68°C,

0.1XSSC, 0.1% SDS에 상당하는 염 농도 및 온도에서, 1회, 구체적으로 2회 내지 3회 세정하는 조건을 열거할 수 있다.

- [77] 혼성화는 비록 혼성화의 엄격도에 따라 염기 간의 미스매치(mismatch)가 가능할지라도, 두 개의 핵산이 상보적 서열을 가질 것을 요구한다. 용어, "상보적"은 서로 혼성화가 가능한 뉴클레오티드 염기 간의 관계를 기술하는데 사용된다. 예를 들면, DNA에 관하여, 아데닌은 티민에 상보적이며 시토신은 구아닌에 상보적이다. 따라서, 본 출원의 폴리뉴클레오티드는 또한 실질적으로 유사한 핵산 서열 뿐만 아니라 전체 서열에 상보적인 단리된 핵산 단편을 포함할 수 있다.
- [78] 구체적으로, 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.
- [79] 상기 폴리뉴클레오티드를 혼성화하는 적절한 엄격도는 폴리뉴클레오티드의 길이 및 상보성 정도에 의존하고 변수는 해당기술분야에 잘 알려져 있다(예컨대, J. Sambrook et al., 상동).
- [80] 본 출원에서 용어, "상동성(homology)" 또는 "동일성(identity)"은 두 개의 주어진 아미노산 서열 또는 염기 서열 상호간 유사한 정도를 의미하며 백분율로 표시될 수 있다. 용어 상동성 및 동일성은 종종 상호교환적으로 이용될 수 있다.
- [81] 보존된(conserved) 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 서열 상동성 또는 동일성은 표준 배열 알고리즘에 의해 결정되며, 사용되는 프로그램에 의해 확립된 디폴트 값 페널티가 함께 이용될 수 있다. 실질적으로, 상동성을 갖거나(homologous) 또는 동일한(identical) 서열은 일반적으로 서열 전체 또는 일부분과 중간 또는 높은 엄격한 조건(stringent conditions)에서 하이브리드할 수 있다. 하이브리드화는 폴리뉴클레오티드에서 일반 코돈 또는 코돈 축퇴성을 고려한 코돈을 함유하는 폴리뉴클레오티드와의 하이브리드화 역시 포함됨이 자명하다.
- [82] 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 ETA/](1988) SIAM J Applied Math 48: 1073을 포함한다). 예를 들

어, 국립 생물공학 정보 데이터베이스 센터의 BLAST, 또는 ClustalW를 이용하여 상동성, 유사성 또는 동일성을 결정할 수 있다.

- [83] 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) 이진법 비교 매트릭스(동일성을 위해 1 그리고 비-동일성을 위해 0의 값을 함유함) 및 Schwartz and Dayhoff, eds., *Atlas Of Protein Sequence And Structure*, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358(1979)에 의해 개시된 대로, Gribskov et al(1986) *Nucl. Acids Res.* 14: 6745의 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. 따라서, 본 출원에서 사용된 용어 "상동성" 또는 "동일성"은 서열들간의 관련성(relevance)을 나타낸다.
- [84]
- [85] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 본 출원의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공한다. 상기 벡터는 상기 폴리뉴클레오티드를 미생물에서 발현시키기 위한 발현 벡터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [86] 본 출원에서 용어 "벡터"는 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 미생물 내로 형질전환된 후, 숙주 게놈과 무관하게 복제되거나 기능할 수 있으며, 게놈 그 자체에 통합될 수 있다.
- [87] 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 및 pET계 등을 사용할 수 있다. 구체적으로는 pDZ, pDC, pDCM2, pACYC177, pACYC184, pCL, pECCG117, pUC19, pBR322, pMW118, pCC1BAC 벡터 등을 사용할 수 있다.

- [88] 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.
- [89] 본 출원에서 용어 "형질전환"은 표적 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 미생물 혹은 미생물 내에 도입하여 미생물 내에서 상기 폴리뉴클레오티드가 코딩하는 폴리펩티드가 발현할 수 있도록 하는 것을 의미한다. 형질전환된 폴리뉴클레오티드는 미생물 내에서 발현될 수 있기만 한다면, 미생물의 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 미생물 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 미생물에 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 미생물에 도입되어 미생물에서 발현에 필요한 서열과 작동 가능하게 연결되어 있는 것일 수도 있으며, 이에 제한되지 않는다.
- [90] 또한, 상기에서 용어 "작동 가능하게 연결"된 것이란 본 출원의 목적 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 전사를 개시 및 매개하도록 하는 프로모터 서열과 상기 폴리뉴클레오티드 서열이 기능적으로 연결되어 있는 것을 의미한다.
- [91]
- [92] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 상기 변이체 폴리펩티드, 상기 변이체 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 포함하는 미생물을 제공한다.
- [93] 하나의 구체예에서, 본 출원의 미생물은 L-글루탐산 생산능을 가지는 미생물일 수 있다.
- [94]

- [95] 본 출원에서 용어, "미생물(또는, 균주)"은 야생형 미생물이나 자연적 또는 인위적으로 유전적 변형이 일어난 미생물을 모두 포함하며, 외부 유전자가 삽입되거나 내재적 유전자의 활성이 강화되거나 불활성화되는 등의 원인으로 인해서 특정 기작이 약화되거나 강화된 미생물로서, 목적하는 폴리펩티드, 단백질 또는 산물의 생산을 위하여 유전적 변형(modification)을 포함하는 미생물일 수 있다. 본 출원에서 "미생물", "균주", "미생물"은 동일한 의미로서 제한 없이 혼용되어 사용될 수 있다.
- [96] 본 출원에서 용어, "L-글루탐산을 생산하는 미생물"은 L-글루탐산을 생물체 내에서 생산할 수 있는 원핵 또는 진핵 미생물 균주로서, L-글루탐산 생산능이 없는 모균주에 L-글루탐산의 생산능이 부여된 미생물, 또는 내재적으로 L-글루탐산 생산능을 갖는 미생물을 모두 포함할 수 있다. L-글루탐산 생산 능력은 종 개량에 의해 부여되거나 증진될 수 있다.
- [97] 일 구현예로, 본 출원의 미생물은 자연적으로 아세토락테이트 합성효소 활성을 갖는 변이체 폴리펩티드 또는 L-글루탐산 생산능을 가지고 있는 미생물; 또는 아세토락테이트 합성효소 활성을 갖는 변이체 폴리펩티드 또는 L-글루탐산 생산능이 없는 모균주에 본 출원의 변이체 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드(또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터)가 도입되거나 및/또는 L-글루탐산 생산능이 부여된 미생물일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [98] 일 구현예로, 본 출원의 미생물은 아세토락테이트 합성효소 활성을 갖는 변이체 폴리펩티드를 암호화하는 염색체상의 유전자가 돌연변이되어 본 출원의 아세토락테이트 합성효소 활성을 갖는 변이체 폴리펩티드 서열을 포함하는 미생물 및/또는 본 출원의 아세토락테이트 합성효소 활성을 갖는 변이체 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 도입시켜 본 출원의 아세토락테이트 합성효소 활성을 갖는 변이체 폴리펩티드를 포함하는 미생물을 모두 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [99] 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. 예를 들어, 상기 비변형 미생물은 본 명세서에 기재된 아세토락테이트 합성효소 활성을 갖는 변이체 폴리펩티드가 도입되지 않거나 도입되기 전의 균주를 의미할 수 있다. 상기 "비변형 미생물"은 "변형 전 균주", "변형 전 미생물", "비변이 균주", "비변형 균주", "비변이 미생물" 또는 "기준 미생물"과 혼용될 수 있다.
- [100]
- [101] 본 출원의 L-글루탐산 생산능을 가지는 미생물은 본 출원의 변이체, 본 출원의 폴리뉴클레오티드 및 본 출원의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 중 어느 하나 이상을 포함하는 미생물; 본 출원의 변이체 또는 본 출원의 폴리뉴클레오티드를 발현하도록 변형된 미생물; 본 출원의 변이체, 또는 본 출원의 폴리뉴클레오

티드를 발현하는 미생물(예컨대, 재조합 균주); 또는 본 출원의 변이체 활성을 갖는 미생물(예컨대, 재조합 균주)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [102] 일 예로, 본 출원의 균주는 본 출원의 폴리뉴클레오티드 또는 본 출원의 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터로 형질전환되어, 본 출원의 변이체를 발현하는 세포 또는 미생물로서, 본 출원의 균주는 본 출원의 변이체를 포함하여 L-글루탐산을 생산할 수 있는 미생물을 모두 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 출원의 미생물은 천연의 야생형 미생물 또는 L-글루탐산 생산능을 가지는 미생물에 본 출원의 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 도입됨으로써 아세트락테이트 합성효소 활성을 갖는 변이체 폴리펩티드가 발현되어, L-글루탐산 생산능이 증가된 재조합 균주일 수 있다. 상기 L-글루탐산 생산능이 증가된 재조합 균주는, 천연의 야생형 미생물 또는 아세트락테이트 합성효소 비변형 미생물(예를 들어, 야생형 아세트락테이트 합성효소를 발현하는 미생물 또는 본 출원의 변이체를 발현하지 않는 미생물)에 비하여 L-글루탐산 생산능이 증가된 미생물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 일 예로, 본 출원의 L-글루탐산 생산능이 증가된 미생물은 서열번호 1의 폴리펩티드 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 미생물과 비교하여 L-글루탐산 생산능이 증가된 미생물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 일 예로, 상기 L-글루탐산 생산능의 증가 여부를 비교하는 대상 균주인, 비변형 미생물은 야생형 코리네박테리움 글루타미쿰 균주인 ATCC13869 또는 ATCC13032 균주; 또는 글루탐산 생산 균주인 KFCC11074 균주(KR 10-0292299 B1)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[103]

- [104] 본 출원의 미생물은 상기 핵산 또는 벡터 도입 이외에도 다양한 공지의 방법의 의해 본 출원의 아세트락테이트 합성효소 활성을 갖는 변이체 폴리펩티드를 발현할 수 있는 미생물을 모두 포함할 수 있다.

- [105] 일 예로, 상기 L-글루탐산 생산능이 증가된 미생물은 변이 전 모균주 또는 비변형 미생물의 L-글루탐산 생산능에 비하여 약 1% 이상, 구체적으로는 약 1% 이상, 약 2% 이상, 약 3% 이상, 약 5% 이상, 약 10% 이상, 약 15% 이상, 약 20% 이상, 약 25% 이상, 약 30% 이상, 약 35% 이상, 약 40% 이상, 약 45% 이상, 또는 약 46% 이상 (상한값은 특별한 제한은 없으며, 예컨대, 약 200% 이하, 약 150% 이하, 약 100% 이하, 약 90% 이하, 약 80% 이하, 약 70% 이하, 약 65% 이하, 약 60% 이하, 약 55% 이하, 또는 약 50% 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 L-글루탐산 생산능이 증가된 재조합 균주는 변이 전 모균주 또는 비변형 미생물에 비하여, L-글루탐산 생산능이 약 1.01배 이상, 약 1.02배 이상, 약 1.03배 이상, 약 1.05배 이상, 약 1.1배 이상, 약 1.15배 이상, 약 1.20배 이상, 약 1.25배 이상, 약 1.30배 이상, 약 1.35배 이상, 약 1.40배 이상, 약 1.45배 이상, 또는 약 1.46배 이상 (상한값은 특별한 제한은 없으며, 예컨대, 약 10배 이하, 약 5배 이하, 약 3배 이하, 약 2배 이하, 또는 약 1.5배 이하일 수 있음) 증

가된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 용어 “약(about)”은 ± 0.5 , ± 0.4 , ± 0.3 , ± 0.2 , ± 0.1 등을 모두 포함하는 범위로, 약 이란 용어 뒤에 나오는 수치와 동등하거나 유사한 범위의 수치를 모두 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[106]

[107] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 미생물로서, 본 출원의 미생물은 코리네박테리움 속(*Corynebacteria sp.*), 에스케리치아 속(*Escherichia sp.*), 어위니아 속(*Erwinia sp.*), 세라티아 속(*Serratia sp.*), 프로비덴시아 속(*Providencia sp.*), 슈도모나스 속(*Pseudomonas sp.*), 렙토스피라 속(*Leptospira sp.*), 살모넬라 속(*Salmonella sp.*), 브레비박테리아 속(*Brevibacteria sp.*), 하이포모나스 속(*Hypomononas sp.*), 크로모박테리움 속(*Chromobacterium sp.*) 및 노카디아 속(*Nocardia sp.*), 또는 곰팡이류(fungi) 또는 효모류(yeast)에 속하는 미생물, 구체적으로는 코리네박테리움 속 미생물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[108]

본 출원의 일 예로, 본 출원의 미생물은 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*), 코리네박테리움 크루디락티스(*Corynebacterium crudilactis*), 코리네박테리움 데세르티(*Corynebacterium deserti*), 코리네박테리움 이피시엔스(*Corynebacterium efficiens*), 코리네박테리움 칼루내(*Corynebacterium callunae*), 코리네박테리움 스테셔널리스(*Corynebacterium stationis*), 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 테스투디노리스(*Corynebacterium testudinoris*) 또는 코리네박테리움 플라베스센스(*Corynebacterium flavescens*)일 수 있다. 구체적으로, 본 출원의 미생물은 코리네박테리움 속 미생물, 보다 구체적으로 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[109]

한편, 본 출원의 L-글루탐산 생산능을 가지는 미생물은 천연의 야생형 미생물 자체, L-글루탐산 생산 기작과 관련된 폴리펩티드의 활성을 강화시키거나 약화시켜 향상된 L-글루탐산 생산능을 가지게 된 미생물, 또는 외부 폴리펩티드의 활성을 도입 또는 강화시켜 향상된 L-글루탐산 생산능을 가지게 된 미생물을 모두 포함한다.

[110]

한편, 코리네박테리움 속 미생물이 L-글루탐산을 생산할 수 있음은 이미 알려져 있었으나, 이의 생산능이 현저히 낮으며 생산 기작에 작용하는 유전자나 기작 원리가 모두 밝혀지지 않는 상태이다. 따라서, 본 출원의 L-글루탐산 생산능을 가지는 코리네박테리움 속 미생물은 천연의 야생형 미생물 자체, L-글루탐산 생산 기작과 관련된 폴리펩티드의 활성을 강화시키거나 약화시켜 향상된 L-글루탐산 생산능을 가지게 된 코리네박테리움 속 미생물, 또는 외부 폴리펩티드의 활성

을 도입 또는 강화시켜 향상된 L-글루탐산 생산능을 가지게 된 코리네박테리움 속 미생물을 모두 포함할 수 있다.

- [111] 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.
- [112] 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.
- [113] 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 나타내게 되는 것 또는 해당 단백질의 내재적 활성 또는 변형 전 활성에 비하여 강화 또는 향상된 활성을 나타내게 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.
- [114] 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.
- [115] 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.
- [116] 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.
- [117] 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.
- [118] 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).

- [119] 구체적으로, 본 출원의 폴리펩티드의 활성의 강화는
- [120] 1) 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 세포 내 카피수 강화;
- [121] 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);
- [122] 3) 폴리펩티드를 코딩하는 유전자 전사체의 개시코돈 또는 5'-UTR 지역을 코딩하는 염기서열의 변형;
- [123] 4) 폴리펩티드 활성이 강화되도록 상기 폴리펩티드의 아미노산 서열의 변형;
- [124] 5) 폴리펩티드 활성이 강화되도록 상기 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열의 변형(예를 들어, 폴리펩티드의 활성이 강화되도록 변형된 폴리펩티드를 코딩하도록 상기 폴리펩티드 유전자의 폴리뉴클레오티드 서열의 변형);
- [125] 6) 폴리펩티드의 활성을 나타내는 외래 폴리펩티드 또는 이를 코딩하는 외래 폴리뉴클레오티드의 도입;
- [126] 7) 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 코돈 최적화;
- [127] 8) 폴리펩티드의 삼차구조를 분석하여 노출 부위를 선택하여 변형하거나 화학적으로 수식; 또는
- [128] 9) 상기 1) 내지 8) 중 선택된 2 이상의 조합일 수 있으나, 이에, 특별히 제한되는 것은 아니다.
- [129] 예를 들어,
- [130] 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.
- [131] 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.

- [132] 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.
- [133] 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.
- [134] 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.
- [135] 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.
- [136] 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.
- [137] 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.
- [138] 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 증가 되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[139]

[140] 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(reduction) 등의 용어와 혼용될 수 있다.

[141] 예를 들어, 상기 약화는 단백질이 활성을 나타내지만 결실에 의해 완전히 불활성화되지 않은 상태로서, 단백질의 활성이 비변형 미생물, 야생형 균주 또는 모 균주에 비하여 약화된 경우를 의미할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[142] 예를 들어, 상기 약화는 불활성화될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 불활성화는 단백질의 발현이 모균주 또는 비변형된 균주에 비하여 전혀 발현이 되지 않거나 또는 발현이 되더라도 그 활성이 없거나 약화된 것을 의미할 수 있다.

[143] 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 천연형 균주에 비하여 낮은 경우, 상기 유전자의 발현이 전혀 이루어지지 않은 경우, 및 유전자의 발현이 되더라도 폴리펩티드의 활성이 없는 경우 역시 포함할 수 있다.

[144] 폴리펩티드의 활성이 내재적 활성에 비하여 약화된다는 것은, 형질 변화 전 모 균주 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.

[145] 일 예로, 상기 약화는 단백질의 활성이 형질 변화 전 모균주 또는 비변형 미생물의 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.

[146] 예를 들어, 상기 불활성화는 단백질의 발현이 비변형 미생물에 비하여 전혀 발현이 되지 않거나 또는 발현이 되더라도 그 활성이 없거나 약화된 것을 의미할 수 있다.

[147] 이러한 폴리펩티드의 활성의 약화는, 당업계에 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).

- [148] 구체적으로, 본 출원의 폴리펩티드 활성의 약화는
- [149] 1) 폴리펩티드를 코딩하는 유전자 전체 또는 일부의 결손;
- [150] 2) 폴리펩티드를 코딩하는 유전자의 발현이 약화하도록 발현조절영역(또는 발현조절서열)의 변형;
- [151] 3) 폴리펩티드의 활성이 제거 또는 약화되도록 상기 폴리펩티드를 구성하는 아미노산 서열의 변형(예를 들어, 아미노산 서열 상의 1 이상의 아미노산의 삭제/치환/부가);
- [152] 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);
- [153] 5) 폴리펩티드를 코딩하는 유전자의 개시코돈 또는 5'-UTR 지역 염기서열의 변형;
- [154] 6) 폴리펩티드를 코딩하는 상기 유전자의 전사체에 상보적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오티드(예컨대, 안티센스 RNA)의 도입;
- [155] 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;
- [156] 8) 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열의 ORF(open reading frame)의 3' 말단에 반대 방향으로 전사되는 프로모터의 부가(Reverse transcription engineering, RTE); 또는
- [157] 9) 상기 1) 내지 8) 중 선택된 2 이상의 조합일 수 있으나, 이에, 특별히 제한되는 것은 아니다.
- [158] 예를 들어,
- [159] 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.
- [160] 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 일

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

- [161] 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.
- [162] 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.
- [163] 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.
- [164] 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.
- [165] 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.
- [166] 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.
- [167]
- [168] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 본 출원의 미생물을 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, L-글루탐산 생산방법을 제공한다.
- [169] 구체적으로, 본 출원의 L-글루탐산 생산방법은 본 출원의 변이체 또는 본 출원의 폴리뉴클레오티드 또는 본 출원의 벡터를 포함하는 미생물을 배지에서 배양하는 단계를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [170] 본 출원에서, 용어 "배양"은 본 출원의 미생물을 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.
- [171] 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 미생물의 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.
- [172] 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; 글리세롤, 프로판디올 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 2 종 이상이 조합되어 사용될 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [173] 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 2 종 이상이 조합되어 사용될 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [174] 상기 인원으로는 인산 제1칼륨, 인산 제2칼륨, 또는 이에 대응되는 소듐-함유 염 등이 포함될 수 있다. 무기화합물로는 염화나트륨, 염화칼슘, 염화철, 황산 마그네슘, 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.

- [175] 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 한정되는 것은 아니다.
- [176] 본 출원의 배양에서 배양온도는 20 내지 45°C, 구체적으로는 25 내지 40°C 를 유지할 수 있고, 약 10 내지 160 시간 동안 배양할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [177] 본 출원의 배양에 의하여 생산된 L-글루탐산은 배지 중으로 분비되거나 세포 내에 잔류할 수 있다.
- [178]
- [179] 하나의 구체예에서, 본 출원의 L-글루탐산 생산방법은, 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.
- [180] 하나의 구체예에서, 본 출원의 L-글루탐산 생산방법은, 상기 배양에 따른 배지 (배양이 수행된 배지) 또는 본 출원의 미생물로부터 L-글루탐산을 회수하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 회수하는 단계는 상기 배양하는 단계 이후에 추가로 포함될 수 있다.
- [181] 상기 회수는 본 출원의 미생물의 배양 방법, 예를 들어 회분식, 연속식 또는 유가식 배양 방법 등에 따라 당해 기술 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 L-글루탐산을 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 L-글루탐산을 회수할 수 있다.
- [182] 또한, 본 출원의 L-글루탐산 생산방법은, 추가적으로 정제 단계를 포함할 수 있다. 상기 정제는 당해 기술 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여, 수행할 수 있다. 일 예에서, 본 출원의 L-글루탐산 생산방법이 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.
- [183] 본 출원의 방법에서, 변이체 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드 및 L-글루탐산 등은 상기 다른 양태에서 기재한 바와 같다.
- [184]

- [185] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 본 출원의 변이체 폴리펩티드; 상기 변이체 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터; 또는 본 출원의 변이체 폴리펩티드, 상기 변이체 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 포함하는 미생물; 상기 미생물의 배양물; 또는 이들 중 2 이상의 조합을 포함하는 L-글루탐산 생산용 조성물을 제공한다.
- [186] 본 출원의 조성물은 L-글루탐산 생산용 조성물에 통상 사용되는 임의의 적합한 부형제를 추가로 포함할 수 있으며, 이러한 부형제는, 예를 들어 보존제, 습윤제, 분산제, 현탁화제, 완충제, 안정화제 또는 등장화제 동일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [187] 하나의 구체예로, 본 출원의 조성물에 존재하는 각 구성요소는 미생물학적으로 유효한 양, 또는 생산용 조성물에서 적절하게 존재할 수 있는 양으로 포함할 수 있다.
- [188] 본 출원의 조성물에서, 변이체 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드 및 L-글루탐산 등은 상기 다른 양태에서 기재한 바와 같다.
- [189]
- [190] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 본 출원의 변이체 폴리펩티드, 상기 변이체 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 포함하는 미생물의 L-글루탐산 생산 용도를 제공한다.
- [191] 본 출원의 변이체 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드, 벡터, 미생물 및 L-글루탐산 등은 상기 다른 양태에서 기재한 바와 같다.
- [192]

발명의 실시를 위한 형태

- [193] 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.
- [194]
- [195] 실시예 1. 인공변이법을 통한 글루탐산 생산능 증가 변이주 선별
- [196]
- [197] 실시예 1-1. UV조사를 통한 인공 돌연변이 유발
- [198]
- [199] 발효의 목적 산물인 글루탐산의 생산능이 향상된 변이 균주를 선별하기 위하여, 먼저 야생형 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*, ATCC13869)을 한천을 포함하는 영양배지에 도말하여 30°C에서 16시간 동안 배

양하였다. 이렇게 획득한 수백 개의 콜로니를 실온에서 UV를 조사하여 균주 내 계놈상에 무작위 돌연변이를 유발시켰다.

[200]

[201] 실시예 1-2. 돌연변이 유발 균주 발효역가 실험 및 균주 선별

[202]

[203] 상기 실시예 1-1에서 무작위 돌연변이가 유발된 돌연변이 균주들을 대상으로 발효 역가 실험을 실시하였다.

[204] 각각의 콜로니를 영양배지에서 계대 배양한 후, 발효배지에서 5시간 배양하였다. 그런 다음, 각각의 배지에 25% 트윈40(tween40)를 0.4% 농도로 추가하였으며, 각각의 콜로니를 다시 32시간 동안 배양하였다.

[205]

[206] <영양배지>

[207] 포도당 1%, 육즙 0.5%, 폴리펩톤 1%, 염화나트륨 0.25%, 효모엑기스 0.5%, 한천 2%, 유레아 0.2%, pH 7.2

[208]

[209] <발효배지>

[210] 포도당 6%, 탄산칼슘 5%, 황산암모늄 2.25%, 일인산칼륨 0.1%, 황산마그네슘 0.04%, 황산철 10 mg/L, 바이오틴 0.3 mg/L, 티아민 염산염 0.2 mg/L

[211]

[212] 상기 조건에서 각각의 콜로니를 배양하여, 야생형 코리네박테리움 글루탐티쿰(ATCC13869)과 동등하거나 그 이상의 L-글루탐산을 생산하는 돌연변이 균주들을 선별하였다. 이후, 선별한 돌연변이 균주들에 대하여, HPLC를 이용하여 L-글루탐산 농도를 측정하였다. 측정된 L-글루탐산의 농도는 하기 표 1에 나타내었다.

[213]

[214] [표1]

균주명	L-글루탐산(g/L)
ATCC13869	7.4
ATCC13869-a1	8.1
ATCC13869-a2	7.0
ATCC13869-a3	9.0
ATCC13869-a4	7.6
ATCC13869-a5	8.7
ATCC13869-a6	7.3
ATCC13869-a7	6.9

ATCC13869-a8	8.8
ATCC13869-a9	7.4
ATCC13869-a10	6.8
ATCC13869-a11	7.9
ATCC13869-a12	8.3
ATCC13869-a13	7.2
ATCC13869-a14	7.7
ATCC13869-a15	7.5

[215] 상기 표 1을 참고하여, 야생형 균주에 비하여 글루탐산의 생산량이 증가한 돌연변이 균주로서 "ATCC13869-a3" 및 "ATCC13869-a8"을 선별하였다.

[216]

[217] 실시예 2. 유전자 시퀀싱을 통한 변이 확인

[218]

[219] 상기 돌연변이 균주의 유전자 변이를 확인하기 위하여, 상기 실시예 1-2에서 선별한 ATCC13869-a3 및 ATCC13869-a8 균주의 유전자들을 야생형 균주와 비교하였다.

[220] 그 결과, 상기 ATCC13869-a3 및 ATCC13869-a8 균주는 아세토락테이트 합성효소(Acetolacate synthase)를 코딩하는 유전자 *ilvB* (서열번호 2)의 특정 위치에 동일한 변이(서열번호 2로 표시되는 폴리뉴클레오티드 서열의 893번째 뉴클레오티드가 T로 치환)를 포함하고 있다는 것을 확인하였다.

[221] 따라서, 이하 실시예 3 및 4에서는, 상기 변이가 코리네박테리움 속 미생물의 글루탐산 생성량에 영향을 미치는지 확인하고자 하였다.

[222]

[223] 실시예 3. 변이가 도입된 균주 제작 및 글루탐산 생성량 확인

[224]

[225] 실시예 3-1. 변이가 도입된 균주 제작

[226]

[227] 상기 실시예 2를 통해 확인한 변이가 도입된, 변이 균주를 제작하고자 하였다. 구체적으로, 상기 변이(서열번호 2로 표시되는 폴리뉴클레오티드 서열의 893번째 뉴클레오티드가 T로 치환)를 야생형 코리네박테리움 글루타미쿰(ATCC13869 및 ATCC13032)에 도입하기 위해 상기 균주가 포함하는 서열번호 1로 표시되는 아세토락테이트 합성효소의 298번째 알라닌을 발린으로 치환하기 위하여 유전자 치환 벡터를 제작하였다. 벡터를 제작하기 위한 유전자 단편은 ATCC13869 게놈 DNA를 주형으로 PCR을 통하여 획득하였다. 미국 국립보건원 진뱅크(NIH GenBank)에 등록되어 있는 코리네박테리움 글루타미쿰(ATCC13869) 유전자 및

주변 염기서열에 대한 정보를 바탕으로, 서열번호 5 내지 8의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 프라이머를 제작하였다.

- [228] PCR은 95°C에서 5분간 변성 후, 95°C 20초 변성, 55°C 20초 어닐링, 72°C 30초 중합을 30회 반복한 후, 72°C에서 5분간 중합반응으로 수행하였다. 보다 구체적으로, 서열번호 5 및 6의 프라이머를 이용하여 증폭한 500 bp의 폴리뉴클레오티드와 서열번호 7 및 8의 프라이머를 이용하여 증폭한 500 bp의 폴리뉴클레오티드를 얻었다. 상기 수득한 두 유전자 단편을 제한효소 BamHI, SalI으로 절단한 pDZ 벡터(대한민국 등록특허 제10-0924065호 및 국제 공개특허 제2008-033001호)에 인퓨전 효소를 이용하여 연결함으로써 유전자 치환 벡터를 제작하였고, 이를 "pDZ-ilvB(A298V)"로 명명하였다. 상기의 벡터 제작을 위해 사용된 프라이머 서열 정보는 하기 표 2에 나타내었다.

[229]

[230] [표2]

서열번호	프라이머 명	5'서열3'
5	ilvB(A298V)-AF	CGGTACCCGGGGATCCAGGCATTGGC TGAGGC
6	ilvB(A298V)-AR	GGCAGGATCAATGTTCGACGTGAATGA TCTTGGCATC
7	ilvB(A298V)-BF	TCGACATTGATCCTGCCGAAATCGGC AAGATCAAG
8	ilvB(A298V)-BR	ATGCCTGCAGGTCGAC GATCTTAATG GGGAAAC

- [231] 이어서, 상기 유전자 치환 벡터를 염색체 상에서의 상동재조합에 의해 야생형 균주에 형질전환시켰다(van der Rest et al., Appl Microbiol Biotechnol 52:541-545, 1999). 상동성 서열의 재조합에 의해 염색체 상에 벡터가 삽입된 균주는 카나마이신(Kanamycin) 25mg/l를 함유한 배지에서 선별하였다. 이후 2차 재조합이 완료된 상기 코리네박테리움 글루타미쿰 형질 전환주를 대상으로 유전자 서열 분석을 수행한 결과, 균주에 상기의 타겟 변이가 도입된 것을 확인하였으며, 변이가 도입된 상기 균주를 "ATCC13869::ilvB(A298V)" 및 "ATCC13032::ilvB(A298V)"로 명명하였다.

[232]

[233] 실시예 3-2. 글루탐산 생산량 확인

[234]

- [235] 상기 실시예 3-1을 통해 제작한 변이 균주 ATCC13869::ilvB(A298V) 및 ATCC13032::ilvB(A298V)와 이들의 각 야생형 코리네박테리움 글루타미쿰(ATCC13869 및 ATCC13032)은 각각 실시예 1-2와 동일한 방법으로 배양하였다.

[236] 배양이 완료된 후, 각 배지 내 L-글루탐산 농도를 측정하였다. 측정된 L-글루탐산 농도는 하기 표 3에 나타내었다.

[237]

[238] [표3]

균주명	L-글루탐산(g/L)
ATCC13869	7.4
ATCC13869:: ilvB(A298V)	9.5
ATCC13032	3.6
ATCC13032:: ilvB(A298V)	4.5

[239] 상기 표 3에 나타낸 바와 같이, 변이가 도입된 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13869::ilvB(A298V) 균주가 생산한 L-글루탐산의 농도는, 야생형 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13869이 생산한 L-글루탐산 농도 대비 약 2.1 g/L(약 28%) 더 높음을 확인하였다.

[240] 또한, 변이가 도입된 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032::ilvB(A298V) 균주가 생산한 L-글루탐산의 농도는, 야생형 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032이 생산한 L-글루탐산 농도 대비 약 0.9 g/L(약 25%) 더 높음을 확인하였다.

[241] 즉, 본 출원의 변이체가 미생물의 L-글루탐산 생산능을 증가시킨다는 것을 확인하였다.

[242]

[243] 실시예 4. 변이가 도입된 KFCC11074 균주의 글루탐산 생성량 확인

[244]

[245] 실시예 4-1. 변이가 도입된 균주 제작

[246]

[247] 야생형 균주 이외에, 글루탐산 생산능이 증가된 균주에서도 상기 변이가 동일한 효과를 나타내는지 확인하기 위하여, 글루탐산 생산 균주로 알려진 KFCC11074 균주(한국 등록특허공보 제10-0292299호)에 상기 변이를 도입하고자 하였다.

[248] 상기 실시예 3-1을 통해 제작한 pDZ-ilvB(A298V) 벡터를 염색체 상에서의 상동재조합에 의해 KFCC11074 균주에 형질전환시켰다(van der Rest et al., Appl Microbiol Biotechnol 52:541-545, 1999). 상동성 서열의 재조합에 의해 염색체 상에 벡터가 삽입된 균주는 카나마이신(Kanamycin) 25mg/l를 함유한 배지에서 선별하였다. 이후 2차 재조합이 완료된 상기 코리네박테리움 글루타미쿰 형질 전환주를 대상으로 유전자 서열 분석을 수행한 결과, 균주에 상기의 타겟 변이가 도입된 것을 확인하였으며, 변이가 도입된 상기 균주를 "KFCC11074_ilvB(A298V)"로 명명하였다.

[249]

[250] 실시예 4-2. 글루탐산 생산량 확인

[251]

[252] 변이가 도입되지 않은 코리네박테리움 글루타미쿰 KFCC11074 및 상기 실시예 4-1을 통해 변이가 도입된 KFCC11074_ilvB(A298V) 균주는 각각 실시예 1-2와 동일한 방법으로 배양하였다.

[253] 배양이 완료된 후, 각 배지 내 L-글루탐산 농도를 측정하였다. 측정된 L-글루탐산 농도는 하기 표 4에 나타내었다.

[254]

[255] [표4]

균주명	L-글루탐산(g/L)
KFCC11074	5.7
KFCC11074_ilvB(A298V)	8.3

[256] 상기 표 4에 나타낸 바와 같이, 변이가 도입된 코리네박테리움 글루타미쿰 KFCC11074_ilvB(A298V) 균주가 생산한 L-글루탐산의 농도는, 변이가 도입되지 않은 코리네박테리움 글루타미쿰 KFCC11074이 생산한 L-글루탐산 농도 대비 약 2.6 g/L(약 46%) 더 높음을 확인하였다.

[257] 즉, 본 출원의 변이는 글루탐산 생산능이 증가된 균주에서도 미생물의 L-글루탐산 생산능을 증가시킨다는 것을 확인하였다.

[258]

[259] 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] 서열번호 1의 298번째 위치에 상응하는 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 아세토락테이트 합성효소 활성을 갖는 변이체 폴리펩티드.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 변이체 폴리펩티드는 서열번호 1의 298번째 위치에 상응하는 아미노산이 발린으로 치환된 것인, 변이체 폴리펩티드.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 변이체 폴리펩티드는 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어지는 것인, 변이체 폴리펩티드.
- [청구항 4] 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 변이체 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 5] 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 변이체 폴리펩티드, 상기 변이체 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 포함하는 미생물.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 미생물은 서열번호 1의 폴리펩티드 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 미생물과 비교하여 L-글루탐산 생산능이 증가된 것인, 미생물.
- [청구항 7] 제5항에 있어서, 상기 미생물은 코리네박테리움 속 미생물인 것인, 미생물.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 코리네박테리움 속 미생물은 코리네박테리움 글루타미쿰인 것인, 미생물.
- [청구항 9] 제5항의 미생물을 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, L-글루탐산의 생산 방법.
- [청구항 10] 제9항에 있어서, 상기 배양된 미생물, 상기 미생물의 배양물, 상기 미생물의 발효물 또는 상기 배양 배지에서 L-글루탐산을 회수하는 단계를 추가적으로 포함하는 것인, 방법.
- [청구항 11] 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 변이체 폴리펩티드; 상기 변이체 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터; 또는 상기 변이체 폴리펩티드, 상기 변이체 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 포함하는 미생물; 상기 미생물의 배양물; 또는 이들 중 2 이상의 조합을 포함하는 L-글루탐산 생산용 조성물.
- [청구항 12] 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 변이체 폴리펩티드, 상기 변이체 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 포함하는 미생물의 L-글루탐산 생산 용도.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/020974

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C12N 9/10(2006.01)i; C12N 15/77(2006.01)i; C12P 13/14(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N 9/10(2006.01); A01H 5/00(2006.01); C07K 14/34(2006.01); C12N 15/09(2006.01); C12N 15/77(2006.01); C12P 13/06(2006.01); C12P 13/12(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: 아세트락테이트 합성효소/아세트하이드록시산 합성효소(acetolactate synthase/acetohydroxy acid synthase), ilvB(acetolactate synthase large subunit), L-글루탐산(L-glutamic acid), 코리네박테리움 글루타미쿰(Corynebacterium glutamicum), 변이체(variant), 치환(substitution)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2019-0037224 A (CJ CHEILJEDANG CORPORATION) 05 April 2019 (2019-04-05) See claims 1-12; and SEQ ID NO: 1.	1-12
A	KR 10-2016-0015298 A (EVONIK OPERATIONS GMBH) 12 February 2016 (2016-02-12) See paragraphs [0023] and [0030]; and SEQ ID NO: 9.	1-12
A	KR 10-2147381 B1 (CJ CHEILJEDANG CORPORATION) 24 August 2020 (2020-08-24) See claims 1-10.	1-12
A	KR 10-2016-0148006 A (EVONIK OPERATIONS GMBH) 23 December 2016 (2016-12-23) See paragraph [0089]; and SEQ ID NO: 98.	1-12
A	JP 2017-140024 A (CIBUS EUROP B V et al.) 17 August 2017 (2017-08-17) See abstract.	1-12
<input 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 April 2024		Date of mailing of the international search report 15 April 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/KR2023/020974

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/KR2023/020974

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-2019-0037224	A	05 April 2019	AU	2018-301879	A1	17 January 2019
				CA	3064569	A1	17 January 2019
				CN	110506112	A	26 November 2019
				CN	110724679	A	24 January 2020
				EP	3553171	A2	16 October 2019
				JP	2020-505023	A	20 February 2020
				JP	6794555	B2	02 December 2020
				KR	10-1996129	B1	04 July 2019
				US	10844359	B2	24 November 2020
				US	11021697	B2	01 June 2021
				WO	2019-013532	A3	04 April 2019
KR	10-2016-0015298	A	12 February 2016	CN	105492616	A	13 April 2016
				DK	2811028	T3	01 May 2017
				EP	2811028	A1	10 December 2014
				EP	2811028	B1	01 February 2017
				RU	2015-156852	A	17 July 2017
				RU	2675506	C2	20 December 2018
				US	10113190	B2	30 October 2018
				US	2016-0115506	A1	28 April 2016
				WO	2014-195154	A1	11 December 2014
KR	10-2147381	B1	24 August 2020	AU	2020-388499	A1	28 April 2022
				AU	2020-388499	A1	27 May 2021
				CN	115052976	A	13 September 2022
				CN	115052976	B	19 December 2023
				EP	4023751	A1	06 July 2022
				JP	2023-503218	A	27 January 2023
				MX	2022-004303	A	10 May 2022
				US	2023-0203106	A1	29 June 2023
				WO	2021-101000	A1	27 May 2021
KR	10-2016-0148006	A	23 December 2016	BR	11-2016-025069	A2	17 October 2017
				CN	106536724	A	22 March 2017
				EP	2940039	A1	04 November 2015
				ES	2705405	T3	25 March 2019
				JP	2017-518034	A	06 July 2017
				MX	2016-013953	A	09 November 2016
				SG	11-2016-08281	A	29 November 2016
				US	2017-0051324	A1	23 February 2017
				WO	2015-165740	A2	05 November 2015
JP	2017-140024	A	17 August 2017	AU	2008-308530	A1	09 April 2009
				CA	2701624	A1	09 April 2009
				CA	2701624	C	20 August 2019
				CN	101883868	A	10 November 2010
				EP	2203565	A1	07 July 2010
				JP	5745849	B2	08 July 2015
				JP	6092930	B2	08 March 2017
				US	8720389	B2	13 May 2014
				WO	2009-046334	A1	09 April 2009

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 9/10(2006.01)i; C12N 15/77(2006.01)i; C12P 13/14(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 9/10(2006.01); A01H 5/00(2006.01); C07K 14/34(2006.01); C12N 15/09(2006.01); C12N 15/77(2006.01); C12P 13/06(2006.01); C12P 13/12(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: 아세토락테이트 합성효소/아세트하이드록시산 합성효소 (acetolactate synthase/acetohydroxy acid synthase), ilvB(acetolactate synthase large subunit), L-글루탐산(L-glutamic acid), 코리네박테리움 글루타미쿰(Corynebacterium glutamicum), 변이체(variant), 치환(substitution)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2019-0037224 A (씨제이제일제당 (주)) 2019.04.05 청구항 1-12; 및 서열번호 1	1-12
A	KR 10-2016-0015298 A (에보닉 오퍼레이션스 게임베하) 2016.02.12 단락 [0023], [0030]; 및 서열번호 9	1-12
A	KR 10-2147381 B1 (씨제이제일제당 (주)) 2020.08.24 청구항 1-10	1-12
A	KR 10-2016-0148006 A (에보닉 오퍼레이션스 게임베하) 2016.12.23 단락 [0089]; 및 서열번호 98	1-12
A	JP 2017-140024 A (CIBUS EUROP B V 등) 2017.08.17 요약	1-12
<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	
2024년04월12일 (12.04.2024)	2024년04월15일 (15.04.2024)	
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
KR 10-2019-0037224 A	2019/04/05	AU 2018-301879 A1	2019/01/17
		CA 3064569 A1	2019/01/17
		CN 110506112 A	2019/11/26
		CN 110724679 A	2020/01/24
		EP 3553171 A2	2019/10/16
		JP 2020-505023 A	2020/02/20
		JP 6794555 B2	2020/12/02
		KR 10-1996129 B1	2019/07/04
		US 10844359 B2	2020/11/24
		US 11021697 B2	2021/06/01
		WO 2019-013532 A3	2019/04/04
KR 10-2016-0015298 A	2016/02/12	CN 105492616 A	2016/04/13
		DK 2811028 T3	2017/05/01
		EP 2811028 A1	2014/12/10
		EP 2811028 B1	2017/02/01
		RU 2015-156852 A	2017/07/17
		RU 2675506 C2	2018/12/20
		US 10113190 B2	2018/10/30
		US 2016-0115506 A1	2016/04/28
		WO 2014-195154 A1	2014/12/11
KR 10-2147381 B1	2020/08/24	AU 2020-388499 A1	2022/04/28
		AU 2020-388499 A1	2021/05/27
		CN 115052976 A	2022/09/13
		CN 115052976 B	2023/12/19
		EP 4023751 A1	2022/07/06
		JP 2023-503218 A	2023/01/27
		MX 2022-004303 A	2022/05/10
		US 2023-0203106 A1	2023/06/29
		WO 2021-101000 A1	2021/05/27
KR 10-2016-0148006 A	2016/12/23	BR 11-2016-025069 A2	2017/10/17
		CN 106536724 A	2017/03/22
		EP 2940039 A1	2015/11/04
		ES 2705405 T3	2019/03/25
		JP 2017-518034 A	2017/07/06
		MX 2016-013953 A	2016/11/09
		SG 11-2016-08281 A	2016/11/29
		US 2017-0051324 A1	2017/02/23
		WO 2015-165740 A2	2015/11/05
JP 2017-140024 A	2017/08/17	AU 2008-308530 A1	2009/04/09
		CA 2701624 A1	2009/04/09
		CA 2701624 C	2019/08/20
		CN 101883868 A	2010/11/10
		EP 2203565 A1	2010/07/07
		JP 5745849 B2	2015/07/08
		JP 6092930 B2	2017/03/08
		US 8720389 B2	2014/05/13
		WO 2009-046334 A1	2009/04/09