

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2017년 1월 5일 (05.01.2017)



(10) 국제공개번호
WO 2017/003103 A1

- (51) 국제특허분류:
C12N 1/20 (2006.01) *C12R 1/38* (2006.01)
C12P 1/04 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/005869
- (22) 국제출원일: 2016년 6월 3일 (03.06.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2015-0094944 2015년 7월 2일 (02.07.2015) KR
- (71) 출원인: 씨제이제일제당 (주) (CJ CHEILJEDANG CORP.) [KR/KR]; 04560 서울시 중구 동호로 330 (쌍림동), Seoul (KR).
- (72) 발명자: 이재현 (LEE, Jae Hun); 08741 서울시 관악구 솔밭로 7길 16, 301-805, Seoul (KR). 양영렬 (YANG, Young Lyeol); 06317 서울시 강남구 언주로 110, 1-702, Seoul (KR). 오린석 (OH, In Seok); 07565 서울시 강서구 공항대로 55길 55-15, 1101호, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 리앤목 특허법인 (Y.P.LEE, MOCK & PARTNERS); 06292 서울시 강남구 언주로 30길 13 대림아크로텔 12층, Seoul (KR).

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

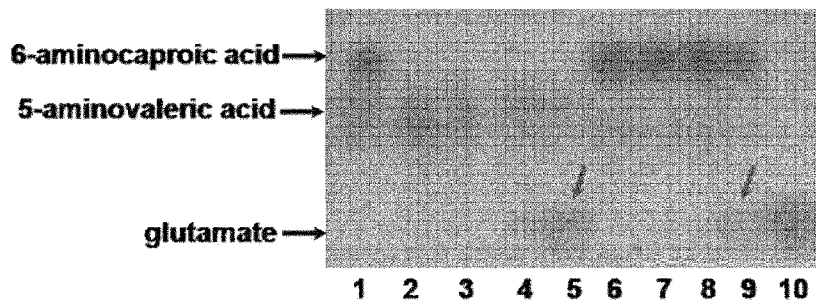
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS,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

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: NOVEL PSEUDOMONAS SP. STRAIN AND METHOD, FOR DEAMIDATING 6-AMINOCAPROIC ACID, USING SAME

(54) 발명의 명칭: 신규 슈도모나스 종 균주 및 이를 이용한 6-아미노카프로산의 탈아민 방법



(57) Abstract: The present invention relates to novel separated *Pseudomonas stutzeri*, which enables deamidation of an amino compound, and a method, for deamidating an amino compound, using same.

(57) 요약서: 본 발명은 아미노 화합물을 탈아민화시킬 수 있는 신규 분리한 슈도모나스 스투체리 (*Pseudomonas stutzeri*) 및 이를 이용한 아미노 화합물을 탈아민화시키는 방법에 관한 것이다.

WO 2017/003103 A1

명세서

발명의 명칭: 신규 슈도모나스 종 균주 및 이를 이용한 6-아미노카프로산의 탈아민 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 아미노 화합물을 탈아민화시킬 수 있는 신규 슈도모나스 스투체리(*Pseudomonas stutzeri*) 및 이를 이용하여 아미노 화합물을 탈아민화시키는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 아디프산(adipic acid)은 $(CH_2)_4(COOH)_2$ 의 분자식을 갖는 디카르복실산(dicarboxylic acid) 화합물이다. 아디프산은 나일론 수지원료, 플라스틱 가소제, 염료, 의약품 등의 원료로서 널리 사용되고 있으며, 특히 나일론 6,6과 같은 폴리아미드의 제조에 중요한 중간 생성물로서, 상업적 가치가 매우 높다.
- [3] 아디프산은 주로 석유화합물을 원료물질로 시작하여, 두 단계의 공정을 거치는 화학적 방법에 의해 생산된다. 구체적으로 시작물질인 페놀, 사이클로헥산, 사이클로헥센, 벤젠 등의 고리형 화합물을 사이클로헥사논 또는 사이클로헥사놀로 명명되는 케톤-알콜 오일(ketone-alcohol oil, KA oil)로 전환시킨 다음, 이 후 질산을 이용한 산화공정을 통해 아디프산을 생산한다. 이 화학적 공정은 고효율성 및 경제성을 지녔으나, 벤젠을 원료로 사용하고 막대한 양의 질소 산화물을 부산물로 발생시키는 문제점이 있다. 이러한 문제점과 더불어 최근 강화되는 환경규제로 인해 아디프산의 생산에 있어서 친환경적 공정의 필요성이 대두되었고, 이에 따라 아디프산을 미생물을 통해 생산하려는 노력이 시작되고 있다. 그러나 아디프산 생산의 중간체로 사용될 수 있는 6-아미노카프로산의 정확한 생합성 또는 생분해 경로는 아직까지 알려져 있지 않다. 6-아미노카프로산의 6-아민 그룹을 제거하고 케톤기가 도입되면 아디페이트 세미알데하이드(adipate semialdehyde)가 되며, 알데하이드 디하이드로게나제(aldehyde dehydrogenase)의 반응을 통해 아디프산을 합성할 수 있을 것으로 예상된다(Guerrillot L. et al., Eur J Biochem., 1977, 81(1):185-92; Vandecasteele, J.P. et al., Methods Enzymol., 1982, 89: 484-490). 같은 수의 탄소로 이루어진 6-아미노카프로산으로부터 아디프산으로의 효소 전환 반응은 상업적 가치뿐만 아니라 신규 기술로서 가능성이 높게 평가되나, 실제 반응에 관여할 수 있는 효소 또는 미생물 역시 공지되지 않았다.
- [4] 이에, 본 발명자들은 6-아미노카프로산을 탈아민하는 방법을 연구하던 중 탈아민 활성을 가지는 신규 미생물을 분리함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[5] 본 발명의 일 목적은 아미노 화합물을 탈아민화시키는 신규 미생물을 제공하는 것이다.

[6] 본 발명의 다른 목적은 상기 미생물을 이용하여 아미노 화합물의 탈아민 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

[7] 본 발명의 일 양태에서, 아미노 화합물을 탈아민화시키는 신규 분리된 슈도모나스 스투체리(*Pseudomonas stutzeri*) KCCM11587P 균주를 제공한다.

[8] 본 발명에서 사용된 용어 "아미노 화합물 (amino compound)"은 아미노기(-NH₂)가 있는 유기 화합물을 의미하는 것으로, 구체적으로는 탄화수소의 수소가 아미노기로 치환된 화합물로서, 1차 아민이라고도 한다. 상기 아미노 화합물은, 예를 들면, N-아세틸 오르니틴, 감마아미노부티르산, 5-아미노발레르산 및 6-아미노카프로산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 구체적으로 상기 아미노 화합물은 5-아미노발레르산, 또는 6-아미노카프로산일 수 있다.

[9] 본 발명에서 사용된 용어 "탈아민화 (deamination)"는 아미노기를 갖는 화합물로부터 아미노기를 이탈시키는 것을 의미한다.

[10] 본 발명에서 사용된 용어 "슈도모나스 스투체리 (*Pseudomonas stutzeri*)"는 그람-양성(Gram-positive)이고 간균(rod-shaped)이며, 단일극성 편모를 갖는(single polar flagellated) 토양성 박테리아다. 지금까지 슈도모나스 스투체리 균주가 아미노 화합물, 특히 6-아미노카프로산을 탈아민화시키는 특성을 갖는다는 것은 알려지지 않았다. 그러나 본 발명자들에 의해 6-아미노카프로산을 포함하는 아미노 화합물을 탈아민화시킬 수 있는 슈도모나스 스투체리 균주가 새롭게 분리되고 동정되었다.

[11] 본 발명의 슈도모나스 스투체리 KCCM11587P 균주는 아미노 화합물을 질소원으로 사용할 수 있다. 일 구체예에서 본 발명에 따른 슈도모나스 스투체리 CJ-MKB(KCCM11587P)가 단일 질소원인 6-아미노카프로산의 아민 그룹을 이용하여 세포 내에서 고정화시키는 것을 확인하였다. 6-아미노카프로산의 경우 하나의 아민 그룹을 가지고 있으며, 이를 질소원으로 사용하기 위해서는 탈아민화 과정이 필요하다.

[12] 본 발명의 슈도모나스 스투체리 균주는 아미노 화합물을 탈아민화시킬 수 있으며, 이에 따라 아미노기가 제거된 화합물을 생산할 수 있다.

[13] 상기 슈도모나스 스투체리 균주의 아미노 화합물을 탈아민화시키는 능력은 미생물이 가지고 있는 트랜스아미나제(transaminase)에 의한 것일 수 있다. 자연계 상에 존재하는 탈아민화 반응 효소는 크게 암모니아 리아제(ammonia lyase) 효소 계열(EC 4.3.-.-) 및 트랜스아미나제(transaminase) 효소 계열(EC 2.6.-.-)로 나누어진다. 암모니아 리아제의 경우 아민 그룹을 포함하는 기질이 전자를 보유할 수 있는 전자 끄는 기(electron withdrawing group)를 가지고

있으나, 6-아미노카프로산의 경우 아민 그룹 주변에 전자를 보유할 수 있는 작용기를 가지고 있지 않아 암모니아 리아제 반응은 어려울 것으로 판단된다. 반면 트랜스아미나제의 경우 공동 기질 (co-substrate)에 전자 보유 작용기를 이용한 반응이 가능하기 때문에 6-아미노카프로산의 탈아민화 반응을 일으킬 수 있다. 따라서 본 발명의 슈도모나스 스투체리 KCCM11587P는 균주의 트랜스아미나제에 의해 아민 그룹 주변에 전자 보유 작용기를 보유하지 않은 5-아미노발레르산 또는 6-아미노카프로산 등을 탈아민화시킬 수 있다.

- [14] 상기 아미노기가 제거된 화합물은 예를 들면 N-아세틸글루타메이트 5-세미알데하이드, 숙시네이트 세미알데하이드, 글루타레이트 세미알데하이드 및 아디페이트 세미알데하이드로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 구체적으로 상기 아미노기가 제거된 화합물은 글루타레이트 세미알데하이드 또는 아디페이트 세미알데하이드일 수 있다.
- [15] 본 발명의 슈도모나스 스투체리 KCCM11587P 균주는 서열번호 1의 16s rRNA의 서열을 가지는 것일 수 있다. 또한 상기 슈도모나스 스투체리 균주는 구체적으로 상기 서열번호 1의 16s rRNA의 서열의 특징 이외에 추가적으로 앰피실린에 대한 저항성 및/또는 바이오 필름을 형성하는 특성을 갖는 것일 수 있다.
- [16] 또한 상기 슈도모나스 스투체리는 구체적으로 서열번호 4의 염기서열을 포함하는 N-아세틸오르니틴 트랜스아미나제 유전자 및/또는 서열번호 6의 염기서열을 포함하는 4-아미노부티레이트 아미노트랜스퍼라제 유전자를 함유하는 것일 수 있다.
- [17] 본 발명에서 사용된 용어, "4-아미노부티레이트 트랜스아미나제(4-aminobutyrate transaminase)"는 '4-아미노부타노에이트 + 2-옥소글루타레이트 $\leftrightarrow$ 숙시네이트 세미알데하이드 + L-글루타메이트'의 반응을 촉매하는 효소를 의미는 것으로, '4-아미노부티레이트 아미노트랜스퍼라제' 또는 'GABA 트랜스아미나제'라고도 명명된다.
- [18] 본 발명에서 사용된 용어, "N-아세틸오르니틴 트랜스아미나제 (N-acetylornithine aminotransferase)"는 'N₂-아세틸-L-오르니틴 + 2-옥소글루타레이트 $\leftrightarrow$ N-아세틸-L-글루타메이트 5-세미알데하이드 + L-글루타메이트'의 반응을 촉매하는 효소를 의미는 것으로, '아세틸오르니틴 아미노 트랜스퍼라아제'라고도 명명된다.
- [19] 일 실시예에서 새롭게 분리 및 동정된 슈도모나스 스투체리 KCCM11587P가 5-아미노발레르산 및 6-아미노카프로산을 각각 탈아민화시키는 능력이 있음을 확인하였다 (도 2a 내지 f 참조). 또한 일 실시예에서 상기 슈도모나스 스투체리 KCCM11587P가 종래 공지된 균주들과 달리 아미노 화합물을 탈아민화시키는 능력을 가진 신규 미생물임을 확인하였다 (도 3 참조).

[20]

- [21] 본 발명의 다른 양태는 상기 슈도모나스 스투체리 균주를 아미노 화합물을 포함한 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 아미노 화합물을 탈아민화시키는 방법을 제공한다.
- [22] 상기 슈도모나스 스투체리 균주에 대해서는 상기한 바와 같다.
- [23] 상기 배양은 당업계에 알려진 적절한 배지와 배양조건에 따라 이루어질 수 있다. 또한 통상의 기술자라면 배지 및 배양 조건을 용이하게 조정하여 사용할 수 있다. 구체적으로, 상기 배지는 액체 배지일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 배양 방법은 예를 들면, 회분식 배양 (batch culture), 연속식 배양 (continuous culture), 유가식 배양 (fed-batch culture) 또는 이들의 조합 배양을 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [24] 상기 배지는 적절한 방식으로 특정 균주의 요건을 충족해야 하며, 통상의 기술자에 의해 적절하게 변형될 수 있다. 또한 배지에 다양한 질소원, 탄소원 및 미량원소 성분 등을 포함할 수 있다.
- [25] 상기 배지에 포함되는 질소원은 탈아민화의 대상이 되는 아미노 화합물을 포함할 수 있다. 상기 질소원은 구체적으로 N-아세틸 오르니틴, 감마아미노부티르산, 5-아미노발레르산 및 6-아미노카프로산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노 화합물일 수 있다. 다만 이에 한정되는 것은 아니며, 상기 아미노 화합물 이외의 펩톤, 효모 추출물, 육즙, 맥아 추출물, 옥수수 침지액, 대두밀 및 요소 또는 무기 화합물, 예를 들면 황산 암모늄, 염화암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄 및 질산암모늄 등으로 구성되는 질소원이 더 포함될 수 있다.
- [26] 사용될 수 있는 탄소원으로는 글루코스, 수크로스, 락토스, 프락토스, 말토스, 전분, 셀룰로스와 같은 당 및 탄수화물, 대두유, 해바라기유, 피마자유, 코코넛유 등과 같은 오일 및 지방, 팔미트산, 스테아린산, 리놀레산과 같은 지방산, 글리세롤, 에탄올과 같은 알코올, 아세트산과 같은 유기산이 포함될 수 있다. 이들 물질은 개별적으로 또는 혼합물로서 사용될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [27] 사용될 수 있는 인의 공급원으로는 인산이수소칼륨 또는 인산수소이칼륨 또는 상응하는 나트륨-함유 염이 포함될 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 배양 배지는 성장에 필요한 황산마그네슘 또는 황산철과 같은 금속염을 함유할 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다. 그 외에, 아미노산 및 비타민과 같은 필수 성장 물질이 포함될 수 있다.
- [28] 또한 배양 배지에 적절한 전구체들이 사용될 수 있다. 구체적으로, 상기 배지는 파이루베이트, 옥살로아세테이트, 및 α -케토글루타레이트로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상 및/또는 피리독살포스페이트를 더 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 배지 또는 개별 성분은 배양과정에서 배양액에 적절한 방식에 의해 회분식으로 또는 연속식으로 첨가될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [29] 또한, 배양 중에 수산화암모늄, 수산화칼륨, 암모니아, 인산 및 황산과 같은 화합물을 미생물 배양액에 적절한 방식으로 첨가하여 배양액의 pH를 조정할 수 있다. 또한, 배양 중에 지방산 폴리글리콜 에스테르와 같은 소포제를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다. 추가적으로, 배양액의 호기 상태를 유지하기 위하여, 배양액 내로 산소 또는 산소-함유 기체 (예, 공기)를 주입할 수 있다. 배양액의 온도는 통상 20°C 내지 45°C, 예를 들면 25°C 내지 40°C일 수 있다. 배양기간은 원하는 아미노기가 제거된 화합물의 양이 얻어질 때까지 지속될 수 있으며, 예를 들면 10 내지 160 시간일 수 있다.
- [30] 또한 상기 아미노 화합물을 탈아미노시키는 방법은 상기 배지로부터 아미노기가 제거된 화합물을 회수하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 아미노기가 제거된 화합물은 구체적으로는 N-아세틸글루타메이트 5-세미알데하이드, 숙시네이트 세미알데하이드, 글루타레이트 세미알데하이드 및 아디페이트 세미알데하이드로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 세포 또는 배양물로부터 아미노기가 제거된 화합물을 회수하는 방법은 배양방법에 따라 당해 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 배양물로부터 생산된 아미노기가 제거된 화합물을 수집 또는 회수할 수 있다. 예를 들면 원심분리, 여과, 음이온 교환 크로마토그래피, 결정화 및 HPLC 등이 사용될 수 있으나, 이들 예에 한정되지 않는다.
- [31]
- [32] 본 발명의 또 다른 양태는 상기 슈도모나스 스투체리 세포의 분쇄물(cell lysate)과 아미노 화합물을 반응시키는 단계를 포함하는 아미노 화합물을 탈아민화시키는 방법을 제공한다. 상기 슈도모나스 스투체리 균주 및 반응가능한 아미노 화합물에 대해서는 상기한 바와 같다.
- [33] 본 발명에서 용어 "슈도모나스 스투체리 세포의 분쇄물(cell lysate)"은 슈도모나스 스투체리 KCCM11587P 세포의 막이 소실 또는 파괴되어, 이로 인해 생성된 슈도모나스 스투체리 KCCM11587P의 세포 파편 및 세포 내용물 예를 들면 세포 내 단백질 또는 핵산 등을 포함하는 액체상을 의미한다.
- [34] 상기 슈도모나스 스투체리 세포의 분쇄물과 아미노 화합물을 반응시키는 용액은 파이루베이트, 옥살로아세테이트, 및 α -케토글루타레이트로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상 및/또는 피리독살포스페이트를 포함할 수 있다. 본 발명의 구체적인 일 실시예에서 6-아미노발레르산 또는 6-아미노카프로산, 알파-케토 글루타레이트 및 피리독살포스페이트를 포함하는 용액에 슈도모나스 스투체리 CJ-MKB의 세포 분쇄물을 가한 결과 글루타메이트가 생성되는 것을 확인할 수 있었다. 상기 반응의 온도는 25°C 내지 35°C, 구체적으로는 25°C 내지 30°C일 수 있다. 상기 반응시간은 0.5 내지 6시간, 1 내지 5시간, 2 내지 4.5 시간 또는 3 내지 4시간일 수 있다. 상기 탈아민화 방법은 반응 결과물로부터 아미노기가 제거된 화합물을 회수하는 단계를 더 포함할 수 있다.

- [35] 상기 아미노 화합물을 탈아민화시키는 방법은 아디프산의 생산에 이용할 수 있다. 아디프산의 생산에서 아미노 화합물로서 6-아미노카프로산을 본 발명의 슈도모나스 스투체리 균주의 배양액에 질소원으로 넣어주거나 또는 슈도모나스 스투체리 균주의 세포 분쇄물과 반응시켜 아디페이트 세미알데하이드로 전환시킬 수 있다. 그 다음 상기 전환된 아디페이트 세미알데하이드로부터 통상의 기술자에게 알려진 방법을 이용하여 아디프산을 합성할 수 있다. 상기 아디페이트 세미알데하이드로부터 아디프산의 합성은 구체적으로는 알데하이드 디하이드로게나제 (aldehyde dehydrogenase) 반응에 의한 것일 수 있다.

발명의 효과

- [36] 본 발명의 신규 분리한 슈도모나스 스투체리 균주 KCCM11587P를 이용하여 아미노 화합물을 용이하게 탈아민화시킬 수 있으며, 이와 함께 아미노기가 제거된 화합물을 산업적으로 생산 가능하다. 나아가 본 발명의 신규 슈도모나스 스투체리 균주를 이용하여 6-아미노카프로산을 탈아민화시켜 아디프산을 생산하는 공정에 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [37] 도 1은 6-아미노카프로산을 질소원으로 사용한 최소 배지를 이용하여 선별된 균주가 바이오 필름을 형성하는 것을 보여주는 사진이다. 구체적으로 단일 콜로니를 배양한 후 이를 원심분리하여 수득한 결과물 및 이 결과물을 증류수를 이용하여 바이오필름과 균주로 분리시킨 것이다.
- [38] 도 2a 내지 f는 5-아미노발레르산, 6-아미노카프로산, 알파-케토글루타르산, 피리독살 포스페이트의 다양한 농도 및 각각의 기질의 유무에 따른 글루타메이트의 생성 및 기질의 분해 정도를 TLC 상에서 비교한 결과를 나타낸다.
- [39] [5AVA: 10mM 5-아미노발레르산 (standard); 1: 20mM 6-아미노카프로산 (standard); 2: 슈도모나스 스투체리 CJ-MKB + 20mM 6-아미노카프로산; 3: 슈도모나스 스투체리 CJ-MKB + 10mM 6-아미노카프로산 및 20mM 5-아미노발레르산; 4: 슈도모나스 스투체리 CJ-MKB + 20mM 6-아미노카프로산, 10mM 알파-케토글루타레이트 및 0.1mM 피리독살-포스페이트; 4-1: 슈도모나스 스투체리 CJ-MKB + 20mM 6-아미노카프로산 및 10mM 알파-케토글루타레이트; 5: 슈도모나스 스투체리 CJ-MKB + 10mM 6-아미노카프로산, 20mM 5-아미노발레르산, 10mM 알파-케토글루타레이트 및 0.1mM 피리독살-포스페이트; 5-1: 슈도모나스 스투체리 CJ-MKB + 10mM 6-아미노카프로산, 20mM 5-아미노발레르산 및 10mM 알파-케토글루타레이트; 6: 슈도모나스 스투체리 CJ-MKB + 20mM 6-아미노카프로산 및 20mM 글루타메이트; E: 10mM 글루타메이트 (standard)]
- [40] 도 3은 여러 미생물의 세포 분쇄물과 5-아미노발레르산 및 6-아미노카프로산을

각각 반응시켜 탈아민 반응을 진행한 결과물을 TLC 상에서 나타낸 것이다. 구체적으로 10 mM 5-아미노발레르산 또는 6-아미노카프로산, 10 mM 알파-케토 글루타레이트, 0.1 mM의 피리독살포스페이트를 각 균주들의 세포 분쇄물에 첨가하여 반응을 진행하였다.

- [41] [1: 10mM 5-아미노발레르산, 10mM 6-아미노카프로산 (standard); 2: 클로스트리디움 아미노발레리쿰 + 10mM 5-아미노발레르산; 3: 슈도모나스 플루오레센스 + 10mM 5-아미노발레르산; 4: 슈도모나스 멘도시나 + 10mM 5-아미노발레르산; 5: 슈도모나스 스투체리 CJ-MKB + 10mM 5-아미노발레르산; 6: 클로스트리디움 아미노발레리쿰 + 10mM 6-아미노카프로산; 7: 슈도모나스 플루오레센스 + 10mM 6-아미노카프로산; 8: 슈도모나스 멘도시나 + 10mM 6-아미노카프로산; 9: 슈도모나스 스투체리 CJ-MKB + 10mM 6-아미노카프로산; 10: 10mM 글루타메이트 (standard)]

[42]

발명의 실시를 위한 형태

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

[44]

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

[46] 1) 6-아미노카프로산을 질소원으로 사용하는 미생물 선별 및 16S rRNA 분석

[47] 질소원을 6-아미노카프로산(6-ACA)으로 고정시키고 계대배양 방법을 통해서 6-아미노카프로산을 탈아민화시킬 수 있는 신규 균주 슈도모나스 스투체리(*Pseudomonas stutzeri*) CJ-MKB를 선별하였다.

[48] 선별을 위해 미생물이 배양될 수 있는 최소 배지를 하기 표 1의 조성과 같이 제조하였고, 균주 배양에 필요한 질소원으로 6-아미노카프로산을 사용하였다.

[49] [표1]

배지 조성	최종 농도
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	15.1 mM
KH_2PO_4	22 mM
NaCl	8.6 mM
6-아미노카프로산	20 mM
MgSO_4	1 mM
CaCl_2	100 mM
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot \text{H}_2\text{O}$	3 nM
H_3BO_3	400 nM
$\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	30 nM
$\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	10 nM
$\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	80 nM
$\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	10 nM
$\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1 mM
글루코스	11.1 mM

[50]

[51] 구체적으로, 서울특별시 가양동에 소재한 씨제이제일제당(주) 김포공장의 토양샘플을 상기 표1의 조성을 갖는 배지를 이용하여 37°C, 200rpm 조건에서 배양하였다. 배양된 후보 균주들은 초기 접종 광학밀도 (OD600)를 0.05로 맞춰 상기와 동일한 배양 조건에서 광학밀도가 0.5에 도달할 때까지 배양하였다. 5차례의 계대 배양을 통해 표 1의 조성을 갖는 배지에서 배양되는 미생물을 선별할 수 있었다. 선별된 미생물을 일차적으로 'CJ-MKB'라 명명하고, 신규 미생물임을 확인하기 위해 다음의 실험을 진행하였다.

[52]

[53] 상기 배지에서 배양된 CJ-MKB 균주를 M9 아가 플레이트에 도말하여 콜로니들을 확보하였다. 얻어진 콜로니는 유사한 형태를 가지며, 25 mg/ml 농도의 앰피실린에 대하여 저항성을 가졌다. 그리고 콜로니 주변으로 옅은 색의 바이오 필름 (biofilm)이 형성되는 것을 확인하였다. 두 개의 콜로니를 선택하여 M9 액체 배지에 재배양하고 상용화된 genomic DNA prep kit를 이용하여 유전체(genomic DNA)를 각각 추출하였다. 얻어진 유전체의 동정을 위해 16S ribosomal RNA (16S rRNA)의 서열을 분석하였다. 미생물 16S rRNA의 서열 분석에서 보편적으로 사용되는 프라이머 27F (AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG; 서열번호 7) 및 프라이머 1492R (GGT TAC CTT GTT ACG ACT T; 서열번호

8)를 이용하여, CJ-MKB 유전체의 16S rRNA가 서열 번호 1의 염기 서열을 가지는 것을 확인하였다.

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

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

[56] **2) 산화환원효소의 염기서열 분석**

- [57] 선별된 균주가 슈도모나스 속 미생물인지 여부를 확인하기 위해 슈도모나스 종에 존재하는 산화환원효소(oxidoreductase)의 염기서열을 신규 균주 CJ-MKB가 갖고 있는지 분석하였다. 이를 위해 새롭게 디자인한 프라이머 NCPPB 5P (ATGAGCAAGACTAACGAATCCC; 서열번호 9) 및 프라이머 NCPPB 3P (TCCAGAATGGCCAGCCCGCG; 서열번호 10)를 이용하여 서열 분석을 진행하였다. 그 결과 서열번호 2의 염기서열을 가지는 것을 확인하였다.

- [58] 서열번호 2의 염기서열을 NCBI BLAST로 분석해본 결과, 서열번호 2가 공지된 슈도모나스 스투체리 A1501 균주의 산화환원효소의 몰리브도프테린-결합(molybdopterin-binding) 서열과 동일한 서열을 가지는 것을 확인함으로써, 선별된 신규 균주 CJ-MKB는 슈도모나스속 미생물임을 확인하였다.

[59] **3) 트랜스아미나아제의 염기서열 분석**

- [60] 상동성이 확인된 핵산 서열은 714개의 짧은 서열이므로, 미생물의 종속을 정확히 분류할 수 없었다. 이에 추가적인 단백질 핵산 서열을 분석하여 종속을 확인하였다. 미생물이 6-ACA를 질소원으로 사용하는 경우, 이의 효소

전환반응에 관여할 것으로 예상되는 트랜스아미나아제 중 N-아세틸오르니틴 트랜스아미나제 또는 4-아미노부티레이트 트랜스아미나제가 특이적일 것으로 예상하고, 상기 두 효소의 염기서열을 확인하였다.

- [61] 구체적으로, 슈도모나스 스투체리 A1501과 선별된 균주 CJ-MKB의 게놈(genome)에 존재하는 N-아세틸오르니틴 트랜스아미나제의 염기 서열을 비교 분석하기 위하여 argD_F2 (5' 프라이머: ATTTAAGGATCCGTCCGCCCCGCACACCCCGG; 서열번호 11) 및 argD_R2 (3' 프라이머: ATTTAAGAGCTCTCAGGCCTGGGTCAGCGTC; 서열번호 12)를 사용하여 PCR 수행에 의해 핵산 서열을 분석하였다. 그 결과 슈도모나스 스투체리 A1501과 신규 미생물의 N-아세틸오르니틴 트랜스아미나제가 각각 서열번호 3 및 서열번호 4의 염기 서열을 가지는 것을 확인하였다.
- [62] 또한 동일한 방법으로 슈도모나스 스투체리 A1501과 선별된 균주의 4-아미노부티레이트 트랜스아미나제의 염기서열을 비교분석하기 위하여 gabT_F (5' 프라이머: ATTTAACATATGCAACGCCGTGTGCGCCGCGTTCC; 서열번호 13)와 gabT_R (3' 프라이머: ATTTAAGAATTCTCAGGTCAGCTCGTCGAAACACT; 서열번호 14)를 이용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과 각각 서열번호 5 및 서열번호 6의 염기 서열을 가지는 것을 확인하였다.
- [63] 슈도모나스 스투체리 A1501과 선별된 균주의 N-아세틸오르니틴 트랜스아미나제 염기 서열을 비교 분석하기 위해 다중서열정렬(Multiple sequence alignment)을 이용하였다. 그 결과, 1,221개의 핵산 서열 중 13개의 핵산이 다른 것으로 확인되었다 (핵산 상동성: 98.9353%). 또한 동일한 방법으로 슈도모나스 스투체리 A1501과 신규 균주의 4-아미노부티레이트 트랜스아미나제의 핵산 서열을 비교 분석한 결과 1,257개의 핵산 서열 중 21개의 핵산이 다른 것으로 확인되었다 (핵산 상동성: 98.3294%)
- [64] 결론적으로 선별된 균주 슈도모나스 스투체리 CJ-MKB (*Pseudomonas stutzeri* CJ-MKB)는 현재까지 알려진 미생물 유전체 서열 중에 슈도모나스 스투체리 A1501와 가장 높은 상동성을 가지며, 새로운 균주임이 확인되었다. 이에 따라 선별된 슈도모나스 스투체리 CJ-MKB 균주를 2014년 10월 22일자로 한국미생물보존센터에 기탁하여 수탁번호 KCCM11587P를 부여받았다.

[65]

[66] **실시예 2: 탈아민 반응성 확인**

[67] **1) 슈도모나스 스투체리 CJ-MKB의 탈아민 반응성 확인**

- [68] 슈도모나스 스투체리 CJ-MKB의 5-아미노발레르산 및 6-아미노카프로산 탈아민화 반응성 평가를 수행하였다. 트랜스아미나제의 반응은 아민기와 케톤기의 치환 반응이므로, 반응 결과물은 박층 크로마토그래피 (TLC) 를 이용한 물질 분리 후, 닐하이드린 (ninhydrin)의 아민기 발색 반응을 통해서 기질 및 생성물을 쉽게 확인할 수 있다. 슈도모나스 스투체리 CJ-MKB의

트랜스아미나제 활성 확인을 위해 전세포 반응을 진행하였다. 슈도모나스 스투체리 CJ-MKB를 배양하여 광학밀도가 0.7에 도달하였을 때, 새로운 M9 배지에 계대 배양하였으며, 6-아미노카프로산과 5-아미노발레르산을 질소원으로 고정시키고 배양을 진행하였다. 상기 배지에 필요한 알파-케토글루타레이트와 피리독살-포스페이트를 넣어주고, 5-아미노발레르산 및 6-아미노카프로산의 탈아민화 정도 확인을 위해 TLC를 수행하였다. 반응 부피는 100 μ l 였으며, 5-아미노발레르산, 6-아미노카프로산, 알파-케토글루타레이트, 피리독살-포스페이트의 다양한 농도 및 각각의 기질 유무에 따른 글루타메이트 (glutamate) 의 생성 및 기질의 분해 정도를 TLC 상에서 비교하였다. TLC 전개가 끝나고, 3% 닌하이드린 용액으로 아민기가 존재하는 물질을 발색시켰다. TLC 결과를 통해서 5-아미노발레르산, 6-아미노카프로산이 소멸되고, 글루타메이트가 생성되는 것을 확인할 수 있었다 (도 2a 내지 f 참조).

- [69] 도 2f의 97 h reaction, lane 4에서 나타난 바와 같이, 배지에 20 mM 6-아미노카프로산, 10 mM 알파-케토 글루타레이트, 0.1 mM의 피리독살포스페이트를 첨가해준 균주가 97 시간 이전에 6-아미노카프로산을 모두 반응시키는 것을 확인할 수 있었다. 트랜스아미나제 반응이 충족되었을 때와 비교하면 반응 속도가 느리지만, 피리독살포스페이트가 없는 조건에서도 6-아미노카프로산이 감소하는 것이 TLC 상에서 확인되었다 (도 2f의 97 h reaction lane 4-1). 5-아미노발레르산 및 6-아미노카프로산이 동시에 존재하는 경우에는 6-아미노카프로산의 감소가 확인되지 않았다 (도 2f의 97 h reaction, lane 5, 및 5-1). 이를 통해 슈도모나스 스투체리 CJ-MKB는 최소배지 조건에서 배양할 때, 6-아미노카프로산과 5-아미노발레르산은 질소원으로 경쟁 반응하는 것으로 평가되었다.
- [70] 이 실험 결과로부터 슈도모나스 스투체리 CJ-MKB가 6-아미노카프로산을 단일 질소원으로 사용할 수 있으며, 알파-케토글루타레이트 및 피리독살포스페이트 존재 하에서 5-아미노발레르산 및 6-아미노카프로산 탈아민화 반응을 가속화시키는 것을 확인할 수 있었다 (도 2a 내지 f). 한편 도 2d 및 도 2e의 24h reaction, lane5와 72h reaction, lane 4에서 적은 양의 글루타메이트가 확인되었지만, 지속적으로 축적되지는 않는 것을 나타냈다. 이는 6-아미노카프로산의 반응과 더불어 글루타메이트가 생성되지만, 글루타메이트 대부분이 아민 공급원으로 사용되기 때문에 세포 내에서 축적되지 않고 빠르게 전환되는 것으로 평가된다.
- [71] 2) 다른 균주들과 슈도모나스 스투체리 CJ-MKB의 탈아민화 반응성 비교
- [72] 슈도모나스 스투체리 CJ-MKB의 탈아민화 반응성을 추가적으로 검증하기 위해서 세포분쇄액의 농도를 높여서 5-아미노발레르산 및 6-아미노카프로산을 각각 아민 기질로 사용하여 탈아민화반응을 진행하였다. 10 mM 5-아미노발레르산과 6-아미노카프로산, 10 mM 알파-케토 글루타레이트, 0.1

mM의 피리독살포스페이트를 슈도모나스 스투체리 CJ-MKB 세포 분쇄물에 넣고 28°C에서 4시간 반응을 시행하였다 (도 3).

[73] 또한 비교예로서 클로스트리디움 아미노발레리쿰(*Clostridium aminovalericum*), 슈도모나스 플루오레센스(*Pseudomonas fluorescens*), 슈도모나스 멘도시나(*Pseudomonas mendocina*)를 각각 배양하여, 각 미생물의 세포분쇄물로 5-아미노발레르산 및 6-아미노카프로산에 대한 반응 결과를 TLC를 통해 비교하였다. 도 3의 lane 5 및 9에서 나타난 바와 같이, 슈도모나스 스투체리 CJ-MKB 세포 분쇄물에서 글루타메이트의 생성을 확인할 수 있었다. 반면 다른 균주들의 경우 글루타메이트의 생성이 확인되지 않았다.

[74] 이에 따라 종래 공지된 균주들과 달리 신규 균주 슈도모나스 스투체리 CJ-MKB는 아미노 화합물을 탈아민화시키는 능력을 가지는 것을 확인하였다.

[75]

[76] 기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

[77] 수탁번호 : KCCM11587P

[78] 수탁일자 : 20141022

[79]

출원인 또는 대리인 파일 참조번호	국제출원번호
-----------------------	--------

기탁된 미생물 또는 기타 생물학적 물질의 표시사항

(특허협력조약 규칙 제13조의2)

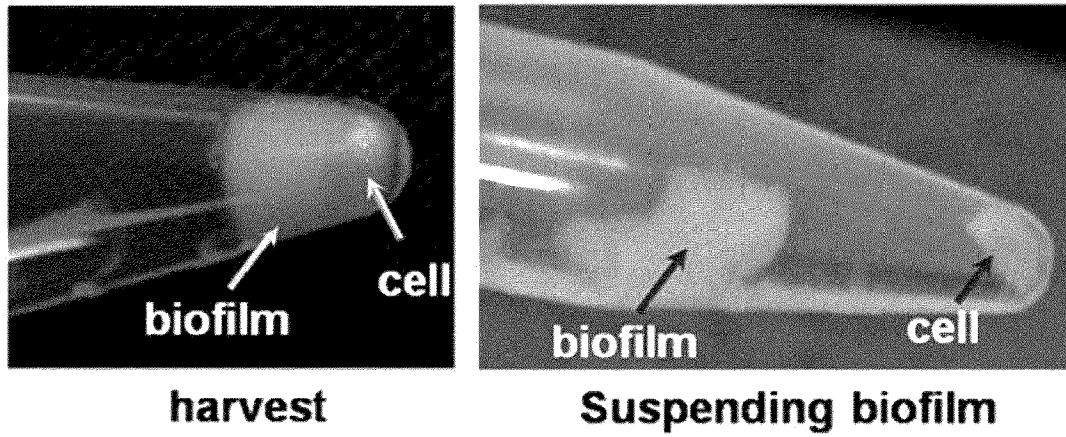
A. 하기의 표시사항은 명세서 _____16_____ 쪽, _____18_____ 줄에 기재된 기탁된 미생물 또는 기타 생물학적 물질에 관한 것임.	
B. 기탁물의 확인 이외의 추가적 기탁물은 다음 별도의 페이지에 기재 ☐	
기탁기관의 명칭 한국 미생물 보존센터(KCCM)	
기탁기관의 주소(우편번호 및 국명 포함) 120-861, 유림 B/D 45, 홍제내-2가-길, 서대문구, 서울, 대한민국	
기탁일자 2014.10.22	기탁번호 KCCM11587P
C. 추가적 표시사항(기재사항이 없으면 공란으로 제출) 별도의 추가 페이지 계속 ☐	
미생물 명칭: <i>Pseudomonas stutzeri</i> CJ-MKB	
D. 표시사항이 지정하고 있는 지정국(표시사항이 모든 지정국을 위한 사항이 아닌 경우)	
E. 표시사항의 별도 제출(기재사항이 없으면 공란으로 제출)	
하기의 표시사항은 후에 국제사무국에 제출된 것임(표시사항의 일반적 성질을 특징한 것)	

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

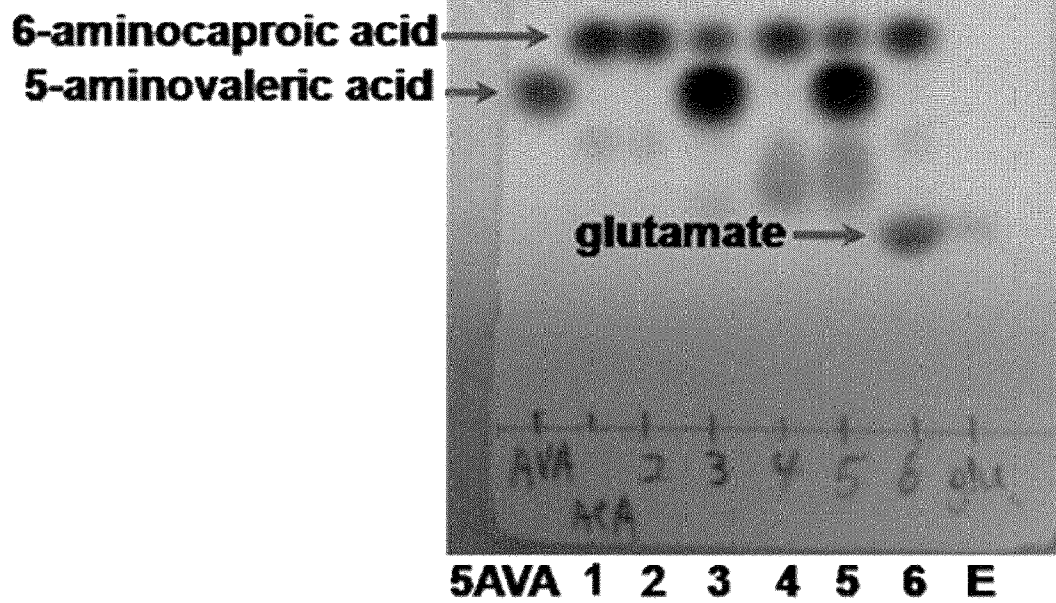
청구범위

- [청구항 1] 아미노 화합물을 탈아민화시키는 신규 분리된 슈도모나스 스투체리(*Pseudomonas stutzeri*) KCCM11587P.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 아미노 화합물은 N-아세틸 오르니틴, 감마아미노부티르산, 5-아미노발레르산 및 6-아미노카프로산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것인 슈도모나스 스투체리 KCCM11587P.
- [청구항 3] 제1항 또는 제2항의 슈도모나스 스투체리 KCCM11587P를 아미노 화합물을 포함한 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, 아미노 화합물을 탈아민화시키는 방법.
- [청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 아미노화합물은 N-아세틸 오르니틴, 감마아미노부티르산, 5-아미노발레르산 및 6-아미노카프로산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것인 아미노 화합물을 탈아민화시키는 방법.
- [청구항 5] 제3항에 있어서, 상기 배지는 파이루베이트, 옥살로아세테이트 및 α -케토글루타레이트로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상, 및 피리독살포스페이트를 추가적으로 포함하는 것인 아미노 화합물을 탈아민화시키는 방법.
- [청구항 6] 제1항의 슈도모나스 스투체리 KCCM11587P의 분쇄물(cell lysate)과 아미노 화합물을 반응시키는 단계를 포함하는 아미노 화합물을 탈아민화시키는 방법.
- [청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 아미노 화합물은 N-아세틸 오르니틴, 감마아미노부티르산, 5-아미노발레르산 및 6-아미노카프로산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것인 아미노 화합물을 탈아민화시키는 방법.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 슈도모나스 스투체리 KCCM11587P의 분쇄물과 아미노 화합물을 반응시키는 단계는 파이루베이트, 옥살로아세테이트 및 α -케토글루타레이트로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상, 및 피리독살포스페이트를 추가적으로 포함하여 반응시키는 것인 아미노 화합물을 탈아민화시키는 방법.

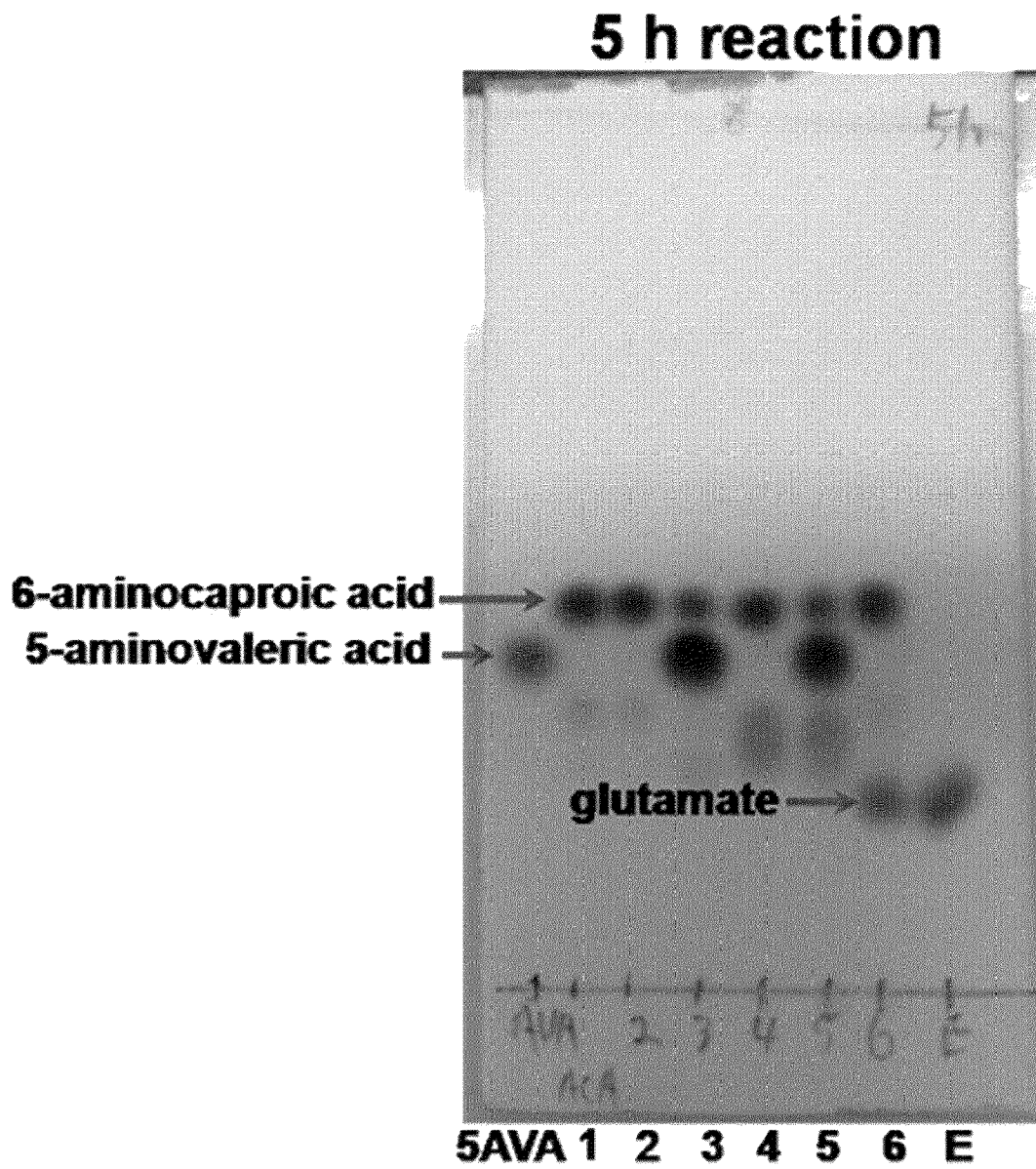
[도1]



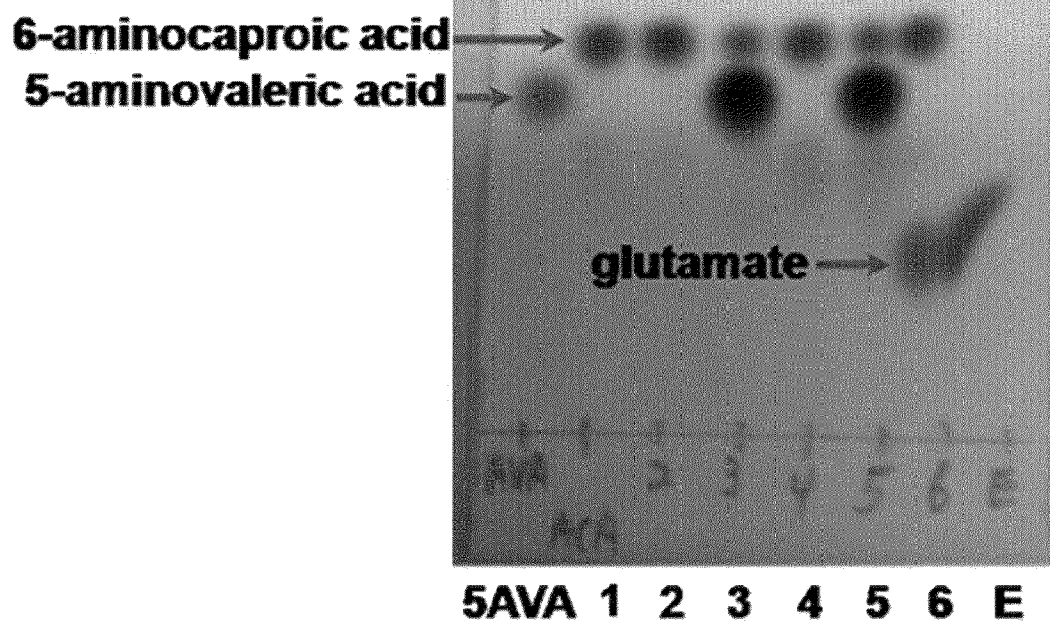
[도2a]

1 h reaction

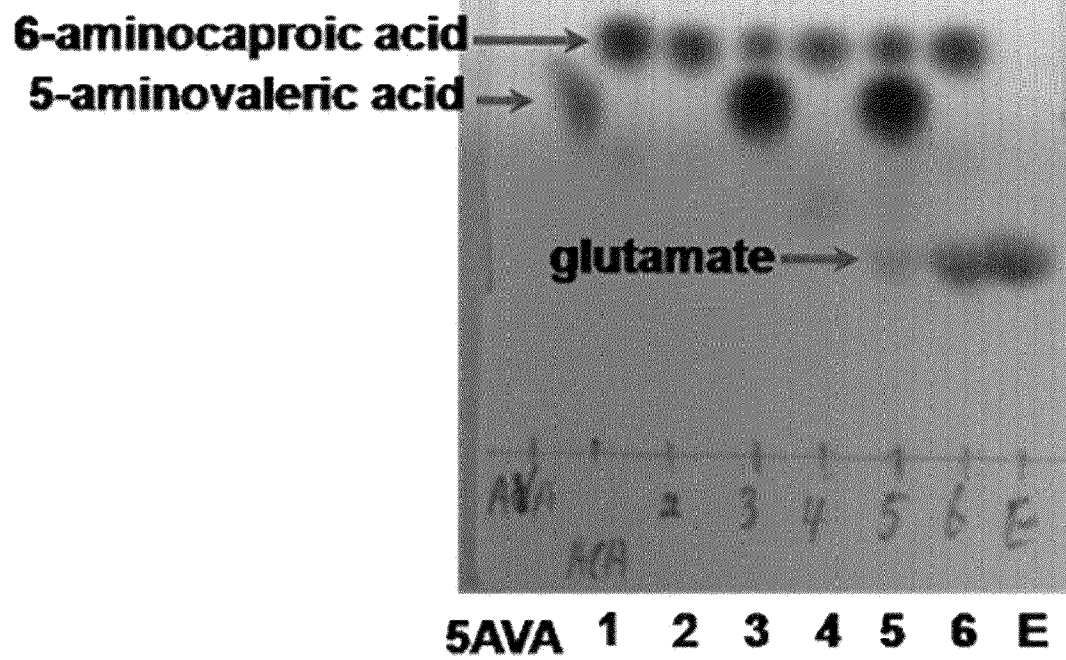
[도2b]



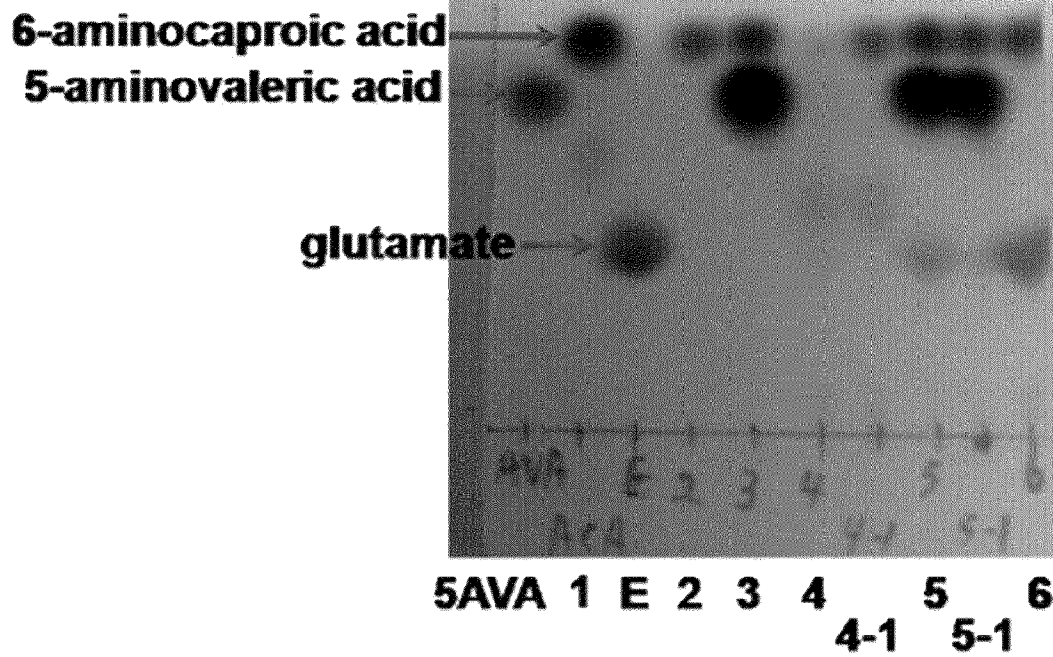
[도2c]

11 h reaction

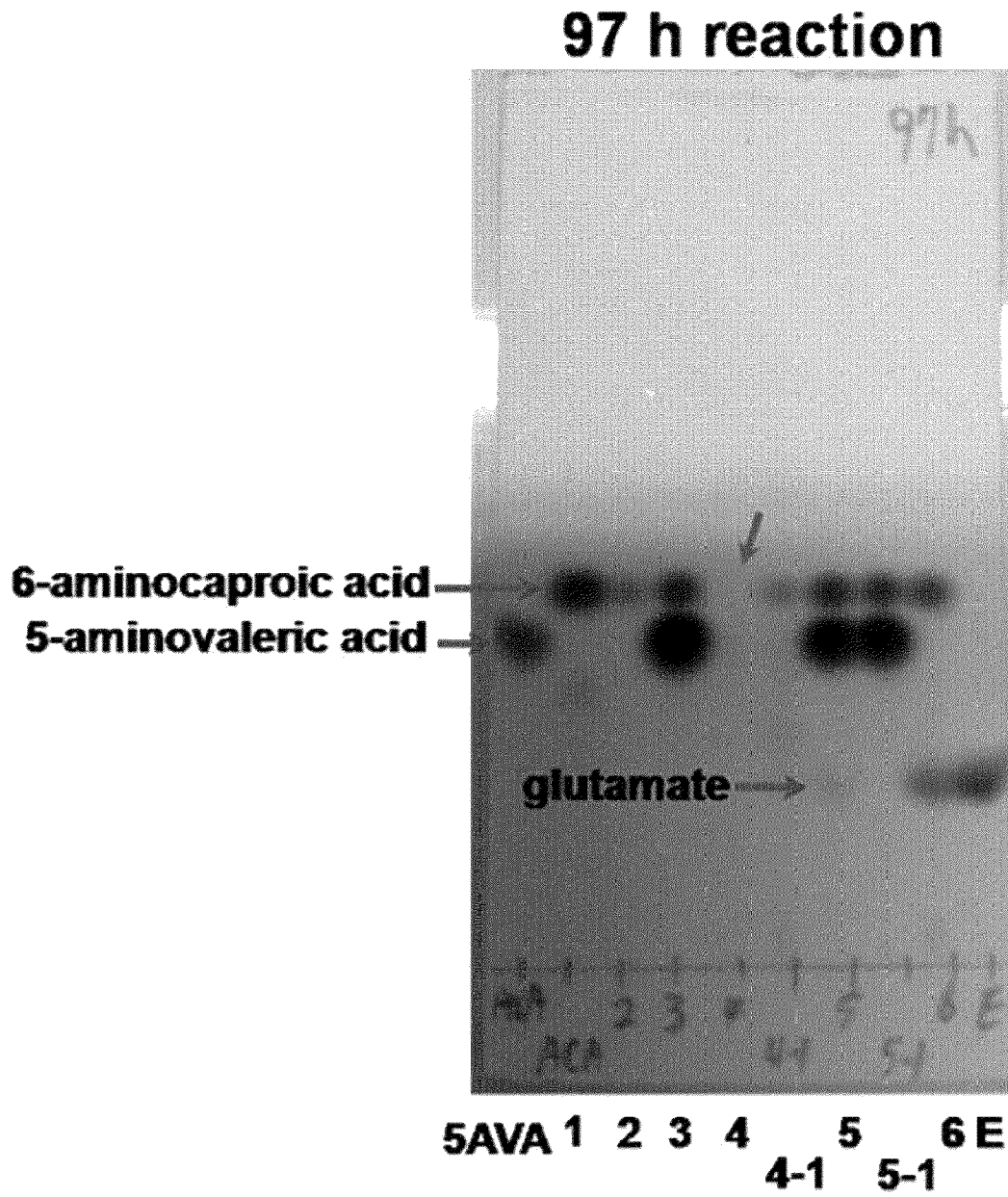
[도2d]

24 h reaction

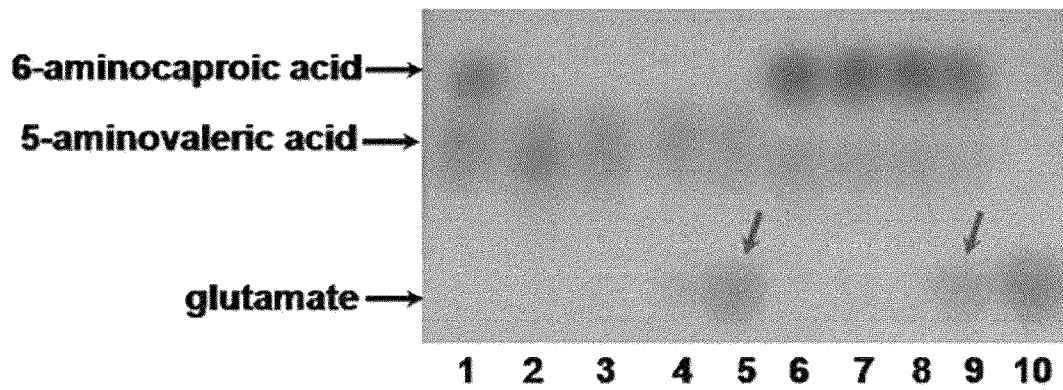
[도2e]

72 h reaction

[도2f]



[도3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/005869

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 1/20(2006.01)i, C12P 1/04(2006.01)i, C12R 1/38(2006.01)n

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 1/20; C12N 1/21; C12N 15/70; C12N 15/52; C12P 1/04; C12R 1/38

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: Pseudomonas stutzeri, amino compound, deamination, medium, N-acetylornithine, gamma aminobutyric acid, 5-aminovaleric acid, 6-aminocaproic acid

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HAN, Y. et al., "1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Deaminase from Pseudomonas Stutzeri A1501 Facilitates the Growth of Rice in the Presence of Salt or Heavy Metals", J. Microbiol. Biotechnol., July 2015 (Published Online 12 February 2015), vol. 25, no. 7, pages 1119-1128 See abstract; page 1120, left column line 27-right column line 3; page 1121, "Enzymatic Assays" section; "Properties of the acdS Mutant" section on page 1123; table 1; figure 2.	1,3,6
Y		2,4-5,7-8
Y	WO 2014-099725 A1 (GENOMATICA, INC.) 26 June 2014 See abstract; paragraphs [0005]-[0008], [0256], [0393], [0411]-[0412], [0420]-[0430].	2,4-5,7-8
A	PENROSE, D. M. et al., "Methods for Isolating and Characterizing ACC Deaminase-containing Plant Growth-promoting Rhizobacteria", Physiol. Plant., May 2003, vol. 118, no. 1, pages 10-15 See the entire document.	1-8
A	KR 10-2012-0034640 A (GENOMATICA, INC.) 12 April 2012 See the entire document.	1-8
A	US 2013-0109064 A1 (OSTERHOUT, Robin E. et al.) 02 May 2013 See the entire document.	1-8



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 AUGUST 2016 (30.08.2016)

Date of mailing of the international search report

02 SEPTEMBER 2016 (02.09.2016)

Name and mailing address of the ISA/KR

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

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/005869

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2014-099725 A1	26/06/2014	CA 2894687 A1 CN 104995293 A EP 2931874 A1 US 2014-0329916 A1 US 2015-0329885 A1	26/06/2014 21/10/2015 21/10/2015 06/11/2014 19/11/2015
KR 10-2012-0034640 A	12/04/2012	AU 2010-245687 A1 EP 2427544 A1 JP 2012-525856 A JP 2015-146810 A JP 5773990 B2 US 2010-0317069 A1 US 8377680 B2 WO 2010-129936 A1	11/11/2010 14/03/2012 25/10/2012 20/08/2015 02/09/2015 16/12/2010 19/02/2013 11/11/2010
US 2013-0109064 A1	02/05/2013	AU 2012-299191 A1 AU 2012-299191 B2 CA 2845681 A1 CN 103890185 A CO 7020858 A2 EP 2744906 A1 EP 2744906 A4 JP 2014-521365 A KR 10-2014-0057346 A MX 2014001988 A NZ 621318 A WO 2013-028519 A1	02/05/2013 03/03/2016 28/02/2013 25/06/2014 11/08/2014 25/06/2014 22/07/2015 28/08/2014 12/05/2014 22/07/2014 27/05/2016 28/02/2013

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 1/20(2006.01)I, C12P 1/04(2006.01)I, C12R 1/38(2006.01)N

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 1/20; C12N 1/21; C12N 15/70; C12N 15/52; C12P 1/04; C12R 1/38

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: 슈도모나스 스투체리, 아미노 화합물, 탈아민화, 배지, N-아세틸 오르니틴, 감마아미노부티르산, 5-아미노발레르산, 6-아미노카프로산

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	HAN, Y. 등, `1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Deaminase from Pseudomonas stutzeri A1501 Facilitates the Growth of Rice in the Presence of Salt or Heavy Metals`, J. Microbiol. Biotechnol., 2015.07(온라인 공개 2015.02.12), 25권, 7호, 페이지 1119-1128 초록; 페이지 1120, 좌컬럼 27줄 - 우컬럼 3줄; 페이지 1121, "Enzymatic Assays" 섹션; 1123의 "Properties of the acdS Mutant" 섹션; 표 1; 도면 2 참조.	1,3,6
Y		2,4-5,7-8
Y	WO 2014-099725 A1 (GENOMATICA, INC.) 2014.06.26 요약; 단락 [0005]-[0008], [0256], [0393], [0411]-[0412], [0420]-[0430] 참조.	2,4-5,7-8
A	PENROSE, D. M. 등, `Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria`, Physiol. Plant., 2003.05, 118권, 1호, 페이지 10-15 전체 문헌 참조.	1-8
A	KR 10-2012-0034640 A (게노마티카 인코포레이티드) 2012.04.12 전체 문헌 참조.	1-8
A	US 2013-0109064 A1 (OSTERHOUT, ROBIN E. 등) 2013.05.02 전체 문헌 참조.	1-8

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

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

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

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

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

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

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

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2016년 08월 30일 (30.08.2016)

국제조사보고서 발송일

2016년 09월 02일 (02.09.2016)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



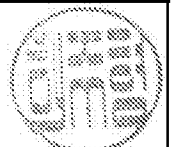
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2014-099725 A1	2014/06/26	CA 2894687 A1 CN 104995293 A EP 2931874 A1 US 2014-0329916 A1 US 2015-0329885 A1	2014/06/26 2015/10/21 2015/10/21 2014/11/06 2015/11/19
KR 10-2012-0034640 A	2012/04/12	AU 2010-245687 A1 EP 2427544 A1 JP 2012-525856 A JP 2015-146810 A JP 5773990 B2 US 2010-0317069 A1 US 8377680 B2 WO 2010-129936 A1	2010/11/11 2012/03/14 2012/10/25 2015/08/20 2015/09/02 2010/12/16 2013/02/19 2010/11/11
US 2013-0109064 A1	2013/05/02	AU 2012-299191 A1 AU 2012-299191 B2 CA 2845681 A1 CN 103890185 A CO 7020858 A2 EP 2744906 A1 EP 2744906 A4 JP 2014-521365 A KR 10-2014-0057346 A MX 2014001988 A NZ 621318 A WO 2013-028519 A1	2013/05/02 2016/03/03 2013/02/28 2014/06/25 2014/08/11 2014/06/25 2015/07/22 2014/08/28 2014/05/12 2014/07/22 2016/05/27 2013/02/28