

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

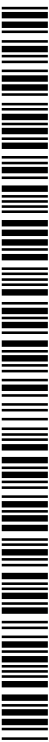
(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2016년 12월 8일 (08.12.2016)



(10) 국제공개번호
WO 2016/195439 A1

- (51) 국제특허분류: C07K 14/245 (2006.01) C12P 13/06 (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01) C12P 13/12 (2006.01)
 - (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/005951
 - (22) 국제출원일: 2016년 6월 3일 (03.06.2016)
 - (25) 출원언어: 한국어
 - (26) 공개언어: 한국어
 - (30) 우선권정보: 10-2015-0079358 2015년 6월 4일 (04.06.2015) KR
 - (71) 출원인: 씨제이제일제당 (주) (CJ CHEILJEDANG CORPORATION) [KR/KR]; 04560 서울시 중구 동호로 330, Seoul (KR).
 - (72) 발명자: 배지연 (BAE, Jee Yeon); 16496 경기도 수원시 팔달구 중부대로 223 번길 92, 208 동 605 호, Gyeonggi-do (KR). 심지현 (SHIM, Ji Hyun); 03446 서울시 은평구 은평터널로 5 길 42, Seoul (KR). 김현아 (KIM, Hyun Ah); 16508 경기도 수원시 영통구 도청로 10, B 동 920 호, Gyeonggi-do (KR). 서주희 (SEO, Ju Hee); 16509 경기도 수원시 영통구 에듀타운로 101, 106 동 901 호, Gyeonggi-do (KR). 신용욱 (SHIN, Yong Uk); 16898 경기도 용인시 수지구 죽전로 27 번길 14-30, 605 동 902 호, Gyeonggi-do (KR). 이재희 (LEE, Jae Hee); 07516 서울시 강서구 양천로 1 길 117, 201 동 1306 호, Seoul (KR). 김상겸 (KIM, Sang Kyoum); 15454 경기도 안산시 단원구 초지 1 로 78, 2012 동 902 호, Gyeonggi-do (KR). 김소영 (KIM, So Young); 13803 경기도 과천시 관문로 166, 1005 동 405 호, Gyeonggi-do (KR).
 - (74) 대리인: 손민 (SON, Min); 06302 서울시 강남구 양재천로 163 6 층 한얼국제특허사무소, Seoul (KR).
 - (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
 - (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 공개:
- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
 - 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))
 - 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))



WO 2016/195439 A1

(54) Title: MICROORGANISM PRODUCING O-ACETYL-HOMOSERINE, AND METHOD FOR PRODUCING O-ACETYL-HOMOSERINE BY USING SAME

(54) 발명의 명칭 : O-아세틸-호모세린을 생산하는 미생물 및 이를 이용하여 O-아세틸-호모세린을 생산하는 방법

(57) Abstract: The present disclosure relates to a protein capable of discharging O-acetyl-homoserine and a novel mutation thereof, a microorganism having an increased expression of the protein and the ability to produce an O-acetyl-homoserine, and a method for producing O-acetyl-homoserine by using same.

(57) 요약서: 본원은 O-아세틸 호모세린을 배출할 수 있는 단백질 및 이의 신규 변이체, 상기 단백질의 발현이 강화된 O-아세틸 호모세린 생산능을 가지는 미생물 및 이를 이용하여 O-아세틸 호모세린을 생산하는 방법에 관한 것이다.

명세서

발명의 명칭: O-아세틸-호모세린을 생산하는 미생물 및 이를 이용하여 O-아세틸-호모세린을 생산하는 방법

기술분야

- [1] 본원은 O-아세틸 호모세린을 배출할 수 있는 단백질 및 이의 신규 변이체, 상기 단백질의 발현이 강화된 O-아세틸 호모세린 생산능을 가지는 미생물 및 이를 이용하여 O-아세틸 호모세린을 생산하는 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 화학 합성과 생물학적 합성을 통해 생산될 수 있는 메치오닌은 사료 및 식품 첨가제뿐만 아니라 수액제, 의약품의 합성 원료로 사용된다. 최근에는, 발효를 통해 생산한 L-메치오닌 전구체로부터 효소전환 반응에 의하여 L-메치오닌을 생산하는 이단계 공법이 공지된 바 있다(국제특허 공개번호 WO2008/013432). 상기의 이단계 공법에서는 메치오닌 전구체로 O-숙시닐 호모세린 (O-succinyl homoserine)과 O-아세틸 호모세린 (O-acetyl homoserine)이 사용될 수 있다고 개시하였으며, 메치오닌의 경제적인 대량 생산을 위하여 메치오닌 전구체를 고수율로 생산하는 것이 매우 중요하다.

[4]

- [5] LeuE는 류신 배출 단백질(leucine export protein)로 공지되었으며, 호모세린/호모세린 락톤 배출 단백질(Homoserine/homoserine lactone efflux protein, RhtB) 패밀리의 하나로 내막에 존재하는 단백질이며, Putative uncharacterized transport protein으로 류신과 이의 아날로그(analogue)를 배출하는 것으로 알려져 있다.

- [6] LeuE와 관련된 종래 기술에서는 leuE(yeaS) 유전자의 아미노산 서열 또는 이의 변이체 강화를 통해 퓨린 뉴클레오시드(purine nucleoside) 또는 퓨린 뉴클레오티드(purine nucleotide)를 생산할 수 있고, 아미노산 생산량이 향상될 수 있음이 공지되었다. 또한, 시스테인의 배출기능을 갖는 leuE 변이체가 알려져 있다.

[7]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [8] 본원의 발명자들은 O-아세틸-호모세린의 생산을 증가시키기 위해 예의 노력한 결과, O-아세틸-호모세린을 배출하는 활성을 가지는 단백질 및 이의 변이체를 발굴함으로써 본원을 완성하였다.

[9]

과제 해결 수단

- [10] 본원의 하나의 목적은 O-아세틸 호모세린 배출능을 가지는 폴리펩티드를 제공하는 것이다.
- [11] 본원의 다른 목적은 상기 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공하는 것이다.
- [12] 본원의 또 다른 목적은 O-아세틸 호모세린 배출능을 가지는 폴리펩티드가 포함되거나 과발현된, O-아세틸 호모세린을 생산하는 에스케리키아(*Escherichia*) 속 미생물을 제공하는 것이다.
- [13] 본원의 또 다른 목적은 상기 O-아세틸 호모세린을 생산하는 에스케리키아 속 미생물을 배지에서 배양하는 단계; 및
- [14] 상기 배양단계에서 배양된 미생물 또는 배지에서 O-아세틸 호모세린을 회수하는 단계를 포함하는, O-아세틸 호모세린 생산방법을 제공하는 것이다.
- [15] 본원의 또 다른 목적은 상기 O-아세틸 호모세린을 생산하는 에스케리키아 속 미생물을 배지에서 배양하는 단계; 및
- [16] 상기 배양단계에서 배양된 미생물 또는 배지에, 또는 상기 배양단계에서 배양된 미생물 또는 배지에서 회수한 O-아세틸 호모세린에 메틸머캡탄과 메치오닌 전환 효소를 처리하여 O-아세틸 호모세린을 L-메치오닌으로 전환하는 단계를 포함하는, L-메치오닌의 생산방법을 제공하는 것이다.

[17]

발명의 효과

- [18] 본원의 내막 단백질 LeuE 또는 LeuE 변이체를 가지는 미생물은 O-아세틸 호모세린 배출능이 증진되어 O-아세틸 호모세린의 생산 효율이 향상되는 바, 본원의 미생물은 O-아세틸 호모세린을 생산하는데 효율적으로 사용될 수 있다. 또한 고효율로 생산된 O-아세틸 호모세린을 이용하면 L-메치오닌을 경제적으로 대량 생산할 수 있다.

[19]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [20] 상기 목적을 달성하기 위한, 본원의 일 양태는 서열번호 1의 아미노산 서열에서 1번째 아미노산 발린, 30번째 아미노산 류신, 95번째 아미노산 페닐알라닌 또는 165번째 아미노산 페닐알라닌으로 이루어진 그룹에서 선택되는 하나 이상의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, O-아세틸 호모세린 배출능을 가지는 폴리펩티드에 관한 것이다.

[21]

- [22] 본원에서 사용되는 용어, "O-아세틸 호모세린"은 미생물의 메치오닌 생합성 경로상의 특이적 중간체 물질로, L-호모세린의 아세틸 유도체를 의미한다. 이는 호모세린과 아세틸-CoA가 호모세린 아세틸 트랜스퍼라제에 의하여 반응이 촉매되어 생성되는 것으로 알려져 있으며, $C_6H_{11}NO_4$ 의 화학식을 갖는다.

[23]

- [24] 본원에서 사용되는 용어, "O-아세틸 호모세린 배출능을 가지는 폴리펩티드"는 미생물 세포내의 O-아세틸 호모세린을 세포외로 배출하는 기능을 가지는 폴리펩티드를 의미한다. 구체적으로 O-아세틸 호모세린 배출능을 가지는 LeuE 단백질 및 이의 변이체를 의미할 수 있으며, O-아세틸 호모세린 배출능을 가지는 한 특별히 제한되지 않는다.
- [25]
- [26] 본원에서 사용되는 용어, "LeuE"는 아미노산 전달체(amino acid transporter)에 대한 호모세린/호모세린 락톤 배출 단백질(Homoserine/homoserine lactone efflux protein, RhtB) 패밀리의 하나로 내막에 존재하는 단백질로 알려져 있으나, 정확한 기능은 알려져 있지 않다. 이에 본원의 발명자들은 최초로 LeuE가 O-아세틸 호모세린을 특이적으로 배출하는 것을 확인하였다.
- [27] 상기 LeuE는 에스케리키아 속 미생물로부터 유래한 것일 수 있으며, 구체적인 예로 대장균 유래 LeuE일 수 있으나, O-아세틸 호모세린을 배출할 수 있는 기능을 가지는 것이면 미생물 유래에 한정 없이 본원에 포함될 수 있다.
- [28] 구체적으로, O-아세틸 호모세린 배출능을 가지는 폴리펩티드는 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 단백질일 수 있다. 또한 서열번호 1의 아미노산 서열과 70% 이상, 구체적으로는 80% 이상, 보다 구체적으로는 90% 이상의 상동성을 가지며, 실질적으로 서열번호 1의 아미노산 서열과 동일하거나 상응하게 O-아세틸 호모세린을 배출하는 활성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 단백질일 수 있다. 또는 이러한 상동성을 갖는 서열로서 실질적으로 서열번호 1의 아미노산 서열과 동일하거나 상응하게 O-아세틸 호모세린을 배출하는 활성을 갖는 아미노산 서열에서, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열일 수 있으며, 이의 경우도 본원의 범주에 포함됨은 자명하다.
- [29] 본원에서 사용되는 용어, O-아세틸 호모세린 배출능을 가지는 폴리펩티드의 "변이체"는 천연의 자연 상태 또는 비변이 상태에서의 폴리펩티드가 가지는 배출능에 비하여 O-아세틸 호모세린을 배출하는 능력이 향상된 폴리펩티드를 지칭한다. 구체적으로, 서열번호 1의 아미노산 서열에 하나 이상의 아미노산 변이로 인하여 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드 보다 향상된 O-아세틸 호모세린 배출능을 가지는 폴리펩티드이다.
- [30] 그 예로, 서열번호 1의 아미노산 서열에서 첫번째 아미노산 발린, 30번째 아미노산 류신, 95번째 아미노산 페닐알라닌 또는 165번째 아미노산 페닐알라닌으로 이루어진 그룹에서 선택되는 하나 이상의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 폴리펩티드일 수 있다. 구체적으로 서열번호 1의 아미노산 서열에서 1번째 아미노산 발린이 메치오닌 으로 치환되거나; 30번째 아미노산 페닐알라닌이 알라닌, 트립토판, 류신, 발린, 글리신, 세린, 아스파라긴, 아스파르트산, 히스티딘, 이소류신, 프롤린, 타이로신, 글루타민, 라이신, 글루탐산, 시스테인, 쓰레오닌 및 알지닌으로 이루어진 군으로부터 선택된 것으로 치환되거나; 95번째 아미노산 류신이 발린, 페닐알라닌, 알라닌, 글리신,

트레오닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 히스티딘, 이소류신, 세린, 프롤린, 타이로신, 글루타민, 라이신, 글루탐산, 시스테인, 트립토판 및 알지닌으로 이루어진 군으로부터 선택된 것으로 치환되거나; 또는 165번째 아미노산 페닐알라닌이 알라닌, 트립토판, 류신, 발린, 글리신, 세린, 아스파라긴, 아스파르트산, 히스티딘, 이소류신, 프롤린, 타이로신, 글루타민, 라이신, 글루탐산, 시스테인, 트레오닌 및 알지닌으로 이루어진 군으로부터 선택된 것으로 치환된 것일 수 있다. 더욱 구체적으로 서열번호 1의 아미노산 서열에서 1번째 아미노산 발린이 메치오닌으로 치환되거나; 30번째 아미노산 페닐알라닌이 알라닌, 트립토판, 류신, 발린, 글리신, 세린, 아스파라긴, 아스파르트산 및 히스티딘으로 이루어진 군으로부터 선택된 것으로 치환되거나; 95번째 아미노산 류신이 발린, 페닐알라닌, 알라닌, 글리신, 트레오닌, 아스파라긴, 아스파르트산 및 히스티딘으로 이루어진 군으로부터 선택된 것으로 치환되거나; 또는 165번째 아미노산 페닐알라닌이 알라닌, 트립토판, 류신, 발린, 글리신, 세린, 아스파라긴, 아스파르트산 및 히스티딘으로 이루어진 군으로부터 선택된 것으로 치환된 것일 수 있다. 보다 구체적으로 서열번호 1의 아미노산 서열에서 1번째 아미노산 발린이 메치오닌으로 치환되고, 30번째 아미노산 페닐알라닌, 95번째 아미노산 류신 또는 165번째 아미노산 페닐알라닌이 다른 아미노산으로 치환된 것일 수 있다. 보다 더욱 구체적으로 서열번호 2, 133, 134, 137, 138, 141, 또는 142의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드일 수 있다. 구체적으로, 상기 서열과 70% 이상, 구체적으로는 80% 이상, 보다 구체적으로는 90% 이상의 상동성을 가지며, 실질적으로 상기 변이체의 아미노산 서열과 동일하거나 상응하게 O-아세틸 호모세린 배출능이 향상된 아미노산 서열을 갖는 단백질일 수 있다. 또는 이러한 상동성을 갖는 서열로서 실질적으로 상기 변이체의 아미노산 서열과 동일하거나 상응하게 O-아세틸 호모세린 배출능이 향상된 아미노산 서열에서, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열일 수 있다. 상기 폴리펩티드는 천연의 자연 상태 또는 비변이 상태에서의 폴리펩티드에 비하여 O-아세틸 호모세린을 배출하는 능력이 향상된 폴리펩티드의 변이체의 예이며, 이에 한정되는 것은 아니다. 본원에서 용어, "천연의 자연상태 또는 비변이 상태"는 본원에서 해당 폴리펩티드의 도입이나 활성의 변이를 도입하지 않은 상태를 의미한다.

[31]

[32] 본원에서 사용되는 용어, "상동성"이란, 단백질을 코딩하는 유전자의 아미노산 서열 또는 핵산 서열에 있어서, 특정 비교 영역에서 양 서열을 최대한 일치되도록 정렬 (align)시킨 후 서열 간의 염기 또는 아미노산 잔기의 동일한 정도를 의미한다. 상동성이 충분히 높은 경우 해당 유전자의 발현 산물은 동일하거나 유사한 활성을 가질 수 있다. 상기 서열 동일성의 퍼센트는 공지 서열 비교 프로그램을 사용하여 결정될 수 있으며, 일례로 BLAST(NCBI), CLC

Main Workbench (CLC bio), MegAlign™(DNASTAR Inc) 등을 들 수 있다.

[33]

[34] 본원의 일 양태는 상기 O-아세틸 호모세린 배출능을 가지는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다. 본원에서 상기 O-아세틸 호모세린 배출능을 가지는 폴리펩티드는 앞서 설명한 바와 같다.

[35] 예를 들어, 상기 폴리뉴클레오티드는 개시코돈이 ATG로 치환된 것일 수 있고, 서열번호 4, 135, 136, 139, 140 143, 또는 144의 염기 서열일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 폴리뉴클레오티드는 유전 암호의 축퇴성(genetic code degeneracy)에 기인하여 동일 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열 및 이의 변이체 또한 본원에 포함된다. 예를 들어, 사용되는 미생물에 따라 최적인 코돈을 갖도록 개변되어 있는 것일 수 있다.

[36] 구체적으로, 상기 염기 서열과 70 % 이상, 구체적으로는 80 % 이상, 보다 구체적으로는 90% 이상의 상동성을 가지며, 실질적으로 상기 염기서열과 동일하거나 상응하게 O-아세틸 호모세린을 배출하는 활성을 갖는 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열일 수 있다. 또는 공지의 유전자 서열로부터 조제될 수 있는 프로브, 예를 들면, 상기 염기 서열의 전체 또는 일부에 대한 상보 서열과 엄격한 조건 하에 하이브리드화하여, O-아세틸 호모세린을 배출 활성을 갖는 단백질을 암호화하는 서열이어도 좋다. 「엄격한 조건」이란, 소위 특이적인 하이브리드가 형성되고, 비특이적 하이브리드가 형성되지 않는 조건을 말한다. 일례를 나타내면, 상동성이 높은 유전자끼리, 예를 들면, 80% 이상, 구체적으로는 90% 이상, 보다 구체적으로는 95% 이상, 더욱 구체적으로는 97% 이상, 특히 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 갖는 유전자끼리 하이브리드화하고, 그보다 상동성이 낮은 유전자끼리 하이브리드화하지 않는 조건, 또는 통상의 써던 하이브리드화의 세척 조건인 60°C, 1xSSC, 0.1% SDS, 구체적으로는 60°C, 0.1xSSC, 0.1% SDS, 보다 구체적으로는 68°C, 0.1xSSC, 0.1% SDS에 상당하는 염 농도 및 온도에서, 1회, 구체적으로는 2회 내지 3회 세정하는 조건을 열거할 수 있다(Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001)).

[37] 상기 하이브리드화에 사용된 프로브는, 염기서열의 상보 서열의 일부이어도 좋다. 이러한 프로브는, 공지의 서열에 근거하여 작제된 올리고뉴클레오타이드를 프라이머로 하여, 이러한 염기 서열을 포함하는 유전자 단편을 주형으로 하는 PCR에 의해 작제될 수 있다. 예를 들면, 프로브로서는, 300bp 정도 길이의 유전자 단편을 사용할 수 있다. 보다 구체적으로는, 프로브로서, 300bp 정도 길이의 유전자 단편을 사용하는 경우에는, 하이브리드화의 세척 조건으로서는, 50°C, 2xSSC 및 0.1% SDS가 열거된다.

[38]

[39] 본원에서 사용되는 유전자, 이들이 코딩하는 단백질 서열 및 프로모터 서열

등은 공지의 데이터 베이스에서 얻을 수 있으며, 그 예로 NCBI의 GenBank 등에서 얻을 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[40]

[41] 본원의 일 양태는 상기 O-아세틸 호모세린 배출능을 가지는 폴리펩티드 또는 이의 변이체 폴리펩티드가 포함되거나 과발현된, O-아세틸 호모세린을 생산하는 미생물에 관한 것이다. 구체적으로, 상기 미생물은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드 또는 이의 변이체 폴리펩티드가 포함되거나 과발현된, O-아세틸 호모세린을 생산하는 미생물일 수 있다.

[42] 상기 O-아세틸 호모세린 배출능을 가지는 폴리펩티드 및 변이체 폴리펩티드는 앞서 설명한 바와 같다.

[43] 본원에서 사용되는 용어, "O-아세틸 호모세린을 생산하는 미생물"이란 미생물이 배지에서 배양되는 경우, 생물체 내에서 O-아세틸 호모세린을 생산하고 배지내에 이를 분비하는 능력을 갖는 미생물을 의미한다. O-아세틸 호모세린 생산 능력은 천연 또는 인위적 돌연변이 또는 종 개량에 의해 부여되거나 증진될 수 있다. 구체적으로는, O-아세틸 호모세린을 생산하는 미생물은 O-아세틸 호모세린 생산능을 가지는 한 미생물 유래에 상관없이 모두 포함될 수 있다. 일 예로 에스케리키아(*Escherichia*) 속일 수 있으며, 더욱 구체적으로는 대장균(*Escherichia coli*)일 수 있다.

[44] 한편, 본원에서 O-아세틸 호모세린을 생산하는 미생물은 상기 LeuE와 별개로 O-아세틸 호모세린 생산능을 증진시키기 위해 호모세린 생합성 관련 경로나 O-아세틸 호모세린 배출능력 관련 기작 등 관련 기작에 대해 기존 공지의 변이가 추가적으로 도입된 변이 미생물일 수 있다.

[45]

[46] 본원의 다른 구체적 일 양태는 상기 O-아세틸 호모세린을 생산하는 미생물에 추가적으로 시스타치오닌 신타아제(cystathionine synthase)의 활성이 불활성화된 것일 수 있다. 구체적으로는, 상기 시스타치오닌 신타아제를 코딩하는 유전자(*metB*)가 결손되거나 비변이 미생물에 비하여 발현이 약화된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 *metB*의 아미노산 서열은 공지의 데이터 베이스에서 얻을 수 있으며, 시스타치오닌 신타아제 활성을 갖는 아미노산 서열은 제한 없이 포함될 수 있으나, 그 예로 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 단백질일 수 있다. 상기 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 단백질은 서열번호 6의 염기서열이 코딩하는 단백질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[47]

또한, 본원의 다른 구체적 일 양태는 상기 O-아세틸 호모세린을 생산하는 미생물에 추가적으로 호모세린 키나아제(homoserine kinase)의 활성이 불활성화된 것일 수 있다. 구체적으로는, 상기 호모세린 키나아제의 활성이 비변이 미생물의 내재적 활성보다 감소 또는 제거되는 것일 수 있다. 예시적으로, 호모세린 키나아제를 코딩하는 유전자(*thrB*)가 천연 프로모터에 비하여 약한 프로모터에 연결되거나 약한 활성을 가지도록 변이되거나 결손된

것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 thrB의 아미노산 서열은 공지의 데이터 베이스에서 얻을 수 있으며, 호모세린 키나아제 활성을 갖는 아미노산 서열은 제한 없이 포함될 수 있으나, 그 예로 서열번호 7의 아미노산 서열을 갖는 단백질일 수 있다. 상기 서열번호 7의 아미노산 서열을 갖는 단백질은 서열번호 8의 염기서열이 코딩하는 단백질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[48] 본원에서 용어, 상기 단백질의 "불활성화"는 본래 미생물이 천연 또는 상기 단백질의 비변이 상태에서 가지고 있는 효소의 활성과 비교하였을 때, 그 활성이 감소되는 경우, 전혀 발현이 되지 않는 경우 및 발현이 되더라도 그 활성이 없는 경우를 의미한다. 상기 불활성화는 상기 효소를 코딩하는 유전자의 변이 등으로 효소 자체의 활성이 본래 미생물이 가지고 있는 효소의 활성에 비해 감소하거나 제거된 경우와, 이를 코딩하는 유전자의 발현 저해 또는 번역(translation) 저해 등으로 세포 내에서 전체적인 효소 활성 정도가 천연형 균주에 비하여 낮거나 제거된 경우, 상기 유전자가 일부 또는 전체 결실된 경우, 및 이들의 조합 역시 포함하는 개념으로, 이에 한정되지는 않는다.

[49] 이러한 효소 활성의 불활성화는, 당해 분야에 잘 알려진 다양한 방법의 적용으로 달성될 수 있다. 상기 방법의 예로, 상기 효소의 활성이 제거된 경우를 포함하여 상기 효소의 활성이 감소되도록 돌연변이된 유전자로, 염색체상의 상기 효소를 코딩하는 유전자를 대체하는 방법; 상기 효소를 코딩하는 염색체상의 유전자의 발현 조절 서열에 변이를 도입하는 방법; 상기 효소를 코딩하는 유전자의 발현 조절 서열을 활성이 약하거나 없는 서열로 교체하는 방법; 상기 효소를 코딩하는 염색체상의 유전자의 전체 또는 일부를 결실시키는 방법; 상기 염색체상의 유전자의 전사체에 상보적으로 결합하여 상기 mRNA로부터 효소로의 번역을 저해하는 안티센스 올리고뉴클레오티드(예컨대, 안티센스 RNA)를 도입하는 방법; 상기 효소를 코딩하는 유전자의 SD 서열 앞단에 SD 서열과 상보적인 서열을 인위적으로 부가하여 2차 구조물을 형성시켜 리보솜(ribosome)의 부착이 불가능하게 만드는 법 및 해당 서열의 ORF(open reading frame)의 3' 말단에 역전사되도록 프로모터를 부가하는 RTE(Reverse transcription engineering) 방법 등이 있으며, 이들의 조합으로도 달성할 수 있으나, 상기 예에 의해 특별히 제한되는 것은 아니다.

[50]

[51] 상기 발현 조절 서열을 변형하는 방법은 상기 발현 조절 서열의 활성을 더욱 약화하도록 핵산 서열을 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합으로 발현 조절 서열상의 변이를 유도하여 수행하거나, 더욱 약한 활성을 갖는 핵산 서열로 교체함으로써 수행할 수 있다. 상기 발현 조절서열에는 프로모터, 오퍼레이터 서열, 리보솜 결합부위를 코딩하는 서열, 및 전사와 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[52] 아울러, 염색체상의 유전자 서열을 변형하는 방법은 상기 효소의 활성을 더욱 약화하도록 유전자 서열을 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의

조합으로 서열상의 변이를 유도하여 수행하거나, 더욱 약한 활성을 갖도록 개량된 유전자 서열 또는 활성이 없도록 개량된 유전자 서열로 교체함으로써 수행할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[53] 또한, 효소를 코딩하는 유전자의 일부 또는 전체를 결실하는 방법은, 세균 내 염색체 삽입용 벡터를 통해 염색체 내 내재적 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 일부 핵산 서열이 결실된 폴리뉴클레오티드 또는 마커 유전자로 교체함으로써 수행될 수 있다. 이러한 유전자의 일부 또는 전체를 결실하는 방법의 일례로 상동 재조합에 의하여 유전자를 결실시키는 방법을 사용할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[54] 상기에서 "일부"란, 폴리뉴클레오티드의 종류에 따라서 상이하지만, 구체적으로는 1 내지 300개, 더욱 구체적으로는 1 내지 100개, 보다 더욱 구체적으로는 1 내지 50개일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[55] 상기에서 "상동 재조합(homologous recombination)"이란, 서로 상동성을 지닌 유전자 사슬의 좌위에서 연결 교환을 통해 일어나는 유전자 재조합을 의미한다.

[56]

[57] 아울러, 본원의 다른 구체적 일 양태는 상기 O-아세틸 호모세린을 생산하는 미생물에 추가적으로 호모세린 아세틸 트랜스퍼라제(homoserine acetyltransferase)의 활성이 비변이 미생물에 비하여 강화된 것일 수 있다. 구체적으로는, 상기 호모세린 아세틸 트랜스퍼라제의 활성이 비변이 미생물의 활성보다 증가되는 것일 수 있으며, 특히 활성이 강화된 호모세린 아세틸 트랜스퍼라제를 코딩하는 변이형 *metA* 유전자가 도입된 것일 수 있다. 상기 변이형 *metA* 유전자는 호모세린 아세틸 트랜스퍼라제의 111번 아미노산을 글루탐산으로 치환하고, 112번 아미노산을 히스티딘으로 치환한 것을 코딩하는 유전자일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 변이형 *metA*는 호모세린 아세틸 트랜스퍼라제의 활성이 야생형보다 활성이 강화된 아미노산 서열은 제한 없이 포함될 수 있으나, 그 예로 서열번호 10의 아미노산 서열을 갖는 단백질일 수 있다. 이와 같은 변이형 *metA* 유전자의 제조 및 이의 활용, 상기 호모세린 아세틸 트랜스퍼라제 강화 균주 등에 대한 내용의 일 예는 한국등록특허 제10-1335841에 개시되어 있으며, 상기 특허의 명세서 전체는 본원의 참고자료로 포함될 수 있다.

[58]

[59] 또한, 본원의 다른 일 양태는 상기 O-아세틸 호모세린을 생산하는 미생물에 추가적으로 아스파테이트 세미알데하이드 디하이드로게나아제 (aspartate semialdehyde dehydrogenase), 피리딘 뉴클레오티드 트랜스하이드로게나아제 (pyridine nucleotide transhydrogenase) 또는 이들의 조합의 활성이 비변이 미생물에 비하여 강화된, O-아세틸 호모세린을 생산하는 에스케리키아 속 미생물일 수 있다.

[60] 또한, 본원의 다른 구체적 양태는 상기 O-아세틸 호모세린을 생산하는

미생물에 추가적으로 포스포에놀피루베이트 카복실라아제(phosphoenolpyruvate carboxylase), 아스파테이트 아미노트랜스퍼라아제 또는 이들의 조합의 활성이 비변이 미생물에 비하여 강화된 것일 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 단백질 활성의 "강화"는, 미생물이 보유하고 있는 단백질의 활성 상태를 향상시키는 것을 의미한다. 단백질의 활성의 강화는 목적 단백질의 활성의 강화와 같이 각 단백질의 활성을 천연의 자연상태 또는 당해 단백질의 비변이 상태보다 강화시킬 수 있는 한, 제한되지 않는다. 그 예로, i) 각 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 카피수 증가, ii) 상기 폴리뉴클레오티드의 발현이 증가하도록 발현 조절 서열의 변형, iii) 각 단백질의 활성이 강화되도록 염색체 상의 상기 폴리뉴클레오티드 서열의 변형 및 iv) 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법에 의하여 수행될 수 있다. 구체적으로는 각 단백질을 코딩하는 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 염색체에 삽입하는 방법, 상기 폴리뉴클레오티드를 벡터 시스템에 도입하여 미생물에 도입하는 방법, 각 단백질을 코딩하는 염기서열의 상류에 개량된 활성을 나타내는 프로모터를 도입하거나 프로모터에 변이를 준 각 단백질을 도입하는 방법, 5'-UTR 지역의 염기서열을 변형시키는 방법 및 각 단백질을 코딩하는 염기서열의 변이체를 도입하는 방법으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법에 의하여 수행되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[61]

[62] 본원의 일 양태는 상기 O-아세틸 호모세린을 생산하는 에스케리키아 속 미생물을 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 O-아세틸 호모세린 생산방법에 관한 것이다.

[63] 구체적으로, 상기 O-아세틸 호모세린을 생산하는 에스케리키아 속 미생물을 배지에서 배양하는 단계; 및 상기 배양 단계에서 배양된 미생물 또는 배지에서 O-아세틸 호모세린을 회수하는 단계를 포함하는 생산방법에 관한 것이다.

[64] 본원에서 용어, "배양"은 상기 미생물을 적당히 조절된 환경 조건에서 생육시키는 것을 의미한다. 본원의 배양과정은 당업계에 알려진 적당한 배지와 배양조건에 따라 이루어질 수 있다. 이러한 배양 과정은 선택되는 균주에 따라 당업자가 용이하게 조정하여 사용할 수 있다. 상기 방법에 있어서, 상기 미생물을 배양하는 단계는, 특별히 이에 제한되지 않으나, 공지된 회분식 배양방법, 연속식 배양방법, 유가식 배양방법 등에 의해 수행될 수 있다. 본원의 미생물의 배양에 사용되는 배지 및 기타 배양 조건은 통상의 에스케리키아속 미생물의 배양에 사용되는 배지라면 특별한 제한 없이 어느 것이나 사용할 수 있으나, 구체적으로는 본원의 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.

[65] 본원에서 상기 탄소원으로는 글루코오스, 프룩토오스, 수크로오스, 말토오스,

만니톨, 소르비톨 등과 같은 탄수화물; 당 알코올, 글리세롤, 피루브산, 락트산, 시트르산 등과 같은 알코올; 유기산, 글루탐산, 메티오닌, 리신 등과 같은 아미노산 등이 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 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 있다.

- [66] 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 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [67] 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 있으나, 이에 제한되지 않는다. 이들 배지 또는 전구체는 배양물에 회분식 또는 연속식으로 첨가될 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.
- [68] 본원에서, 미생물의 배양 중에 수산화암모늄, 수산화칼륨, 암모니아, 인산, 황산 등과 같은 화합물을 배양물에 적절한 방식으로 첨가하여, 배양물의 pH를 조정할 수 있다. 또한, 배양 중에는 지방산 폴리글리콜 에스테르와 같은 소포체를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다. 또한, 배양물의 호기 상태를 유지하기 위하여, 배양물 내로 산소 또는 산소 함유 기체를 주입하거나 혐기 및 미호기 상태를 유지하기 위해 기체의 주입 없이 혹은 질소, 수소 또는 이산화탄소 가스를 주입할 수 있다.
- [69] 배양물의 온도는 27°C 내지 37°C일 수 있으며, 보다 구체적으로는 30°C 내지 35°C일 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 배양 기간은 원하는 유용 물질의 생성량이 수득될 때까지 계속될 수 있으며, 구체적으로는 10 시간 내지 100 시간일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [70] 상기 O-아세틸 호모세린을 회수하는 단계는 본원의 미생물의 배양 방법, 예를 들어 회분식, 연속식 또는 유가식 배양 방법 등에 따라 당해 기술 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 배양액으로부터 목적하는 O-아세틸 호모세린을 회수할 수 있다. 예를 들어, 원심분리, 여과, 음이온 교환 크로마토그래피, 결정화 및 HPLC 등이 사용될 수 있으며, 또한 당해 분야에 공지된 적합한 방법을 조합하여 사용될 수 있다.

- [71] 상기 회수 단계는 분리 공정 및/또는 정제 공정을 포함할 수 있다.
- [72]
- [73] 본원의 일 양태는 상기 본원의 O-아세틸 호모세린을 생산하는 에스케리키아 속 미생물을 배지에서 배양하는 단계; 및 상기 배양단계에서 배양된 미생물 또는 배지에, 또는 상기 배양단계에서 배양된 미생물 또는 배지에서 회수한 O-아세틸 호모세린에 메틸 머캅탄과 메치오닌 전환 효소를 처리하여 O-아세틸 호모세린을 L-메치오닌으로 전환하는 단계를 포함하는 L-메치오닌 생산방법에 관한 것이다.
- [74] 예를 들어, O-아세틸 호모세린을 생산하는 에스케리키아 속 미생물을 배지에서 배양하여 회수된 O-아세틸 호모세린을 2단계 공법(대한민국 등록특허 제10-0905381호)을 사용하여 메치오닌을 생산할 수 있다.
- [75] 상기 2단계 공법은 O-아세틸 호모세린과 메칠 머캅탄을 기질로 이용하여 O-아세틸 호모세린을 메치오닌으로 전환하는 활성을 갖는 효소 또는 상기 효소를 포함한 균주를 이용한 효소반응을 통하여 L-메치오닌 및 유기산을 생산하는 공정을 포함한다.
- [76] 상기 메치오닌 전환 효소는 O-아세틸 호모세린을 메치오닌으로 전환하는 모든 효소를 포함하며, 특히 O-아세틸 호모세린 설피드릴라제(Oacetylhomoserine sulfhydrylase)일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [77]
- [78] 구체적으로 상기 O-아세틸 호모세린 설피드릴라제는 렙토스피라속(*Leptospira* sp.), 크로모박테리움속(*Chromobacterium* sp.), 하이포모나스속(*Hyphomonas* sp.)에 속하는 미생물 균주, 보다 구체적으로는 렙토스피라 메에리(*Leptospira meyeri*), 슈도모나스 에루기노사 (*Pseudomonas aurogenosa*), 하이포모나스 넵투니움(*Hyphomonas Neptunium*), 크로모박테리움 비오라숨 (*Chromobacterium Violaceum*)에 속하는 미생물 균주로부터 유래된 O-아세틸 호모세린 설피드릴라아제가 사용될 수 있다.
- [79] 상기의 반응은 하기와 같다.
- [80]
- [81] $\text{CH}_3\text{SH} + \text{O-아세틸-L-호모세린} \rightleftharpoons \text{아세테이트} + \text{메치오닌}$
- [82]
- [83] 이와 같은 추가 메치오닌 생산 공정에 대해서는 대한민국 등록 특허 제10-0905381호에 개시되어 있으며, 상기 특허의 명세서 전체는 본원의 참고자료로서 포함될 수 있다.
- [84]
- 발명의 실시를 위한 형태**
- [85] 이하 실시예를 통하여 본원을 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본원을 예시적으로 설명하기 위한 것으로, 본원의 범위가 이들 실시예에

한정되는 것은 아니다.

[86]

[87] 참고예 1: O-아세틸 호모세린 생산능을 가지는 균주의 제작

[88]

[89] 1-1. 야생형 대장균에서의 metB 유전자 결손

[90]

O-아세틸 호모세린 생산 균주를 제작하기 위하여 에스케리키아 속 미생물 중에서 대표적인 미생물인 대장균을 사용하였다. 이를 위해, 야생형 대장균인 *E. coli* K12 W3110(ATCC27325)을 미국생물자원센터(American Type Culture Collection, ATCC)로부터 입수하여 사용하였다. 상기 대장균 W3110 균주에, 시스타치오닌 감마 신타아제를 코딩하는 유전자 metB(서열번호 6) 및 호모세린 키나아제를 코딩하는 유전자 thrB(서열번호 8)가 결손된 균주를 제작하였다. 이렇게 제작된 O-아세틸 호모세린 생산균주를 W3-BT로 명명하였다. 이와 같은 metB 및 thrB 유전자 결실 균주 등에 대한 내용의 일 예는 대한민국 등록특허 제10-0905381호 또는 국제공개 WO2008/013432호에 개시되어 있으며(특히, 대한민국 등록특허 제10-0905381호 실시예 1-1 및 1-2 참고), 상기 특허의 명세서 전체는 본원의 참고자료로서 포함될 수 있다.

[91]

[92] 1-2. 호모세린 아세틸 트랜스퍼라제 활성을 가지는 변이형 metA 유전자 도입 균주 제작

[93]

상기 참고예 1-1에서 수득한 균주에 호모세린 아세틸 트랜스퍼라제(homosericine acetyltransferase) 활성을 강화하기 위하여, 균주에 강화된 활성을 가지는 호모세린 아세틸 트랜스퍼라제를 코딩하는 변이형 metA 유전자(서열번호 10)를 도입하고자 하였다.

[94]

균주 제작은 대한민국 등록특허 제10-1335841호의 실시예 1 및 실시예 3에 개시된 방법으로 pCL_Pcj1_metA(EH) 플라스미드를 제작하였다.

[95]

다음으로, 상기 제작한 변이형 metA 유전자를 균주 내로 도입하여 치환하기 위한 방법으로 교체 카세트를 제작하기 위하여 pKD3 벡터를 주형으로, 서열번호 23 및 서열번호 24의 프라이머를 이용한 PCR을 통해 증폭 및 수득하였다. 구체적으로, 서열번호 23 및 24의 프라이머를 이용하여 변성(denaturation) 단계는 94°C에서 30초, 어닐링(annealing) 단계는 55°C에서 30초, 연장(extension) 단계는 72°C에서 2분 동안 실시하고, 이를 30 회 반복 수행하는 PCR 반응을 진행하였다.

[96]

교체 카세트의 metA(EH) 부분은 pCL-Pcj1-metA(EH)를 주형으로 서열번호 19 및 서열번호 20 프라이머를 이용하였고, metA 야생형 부분은 서열번호 21 및 서열번호 22 프라이머를 이용하여 각각의 PCR 산물을 얻었다. 3개의 PCR 산물을 서열번호 19 및 서열번호 22 프라이머를 이용하여 클로람페니콜 마커 부분을 포함하는 metA(EH) 교체 카세트를 제작하여, pKD46 벡터로 미리 형질 전환시킨 상기 참고예 1-1에서 제작된 W3-BT 균주에 전기천공을 이용하여 도입하였다.

- [97] 상기 과정을 통해 도입이 확인된 균주는 다시 pCP20 벡터로 형질전환시켜 LB 배지에서 배양하였으며 클로람페니콜 마커가 제거되고 *metA* 유전자가 *metA(EH)*로 교체된 균주를 W3-BTA라 명명하였다.
- [98] 이와 같은 호모세린 아세틸 트랜스퍼라제 강화 균주 등에 대한 내용의 일 예는 대한민국 등록특허 제10-1335841호 또는 국제공개 WO2012/087039호에 개시되어 있으며, 상기 특허의 명세서 전체는 본원의 참고자료로서 포함될 수 있다.
- [99]
- [100] 1-3. *ppc*, *aspC* 및 *asd* 유전자를 2 copy 포함하는 균주의 제작
- [101] 상기 참고예 1-2에서 제작한 W3-BTA 균주의 O-아세틸 호모세린 생산능을 증가시키기 위하여, 기존에 알려진 생합성 경로 강화 전략을 도입하였다. 포스포에놀피루베이트로부터 옥살로아세테이트의 생합성에 관여하는 포스포에놀피루베이트 카복실라아제(phosphoenolpyruvate carboxylase), 옥살로아세테이트로부터 아스파테이트의 생합성에 관여하는 아스파테이트 아미노트랜스퍼라아제 및 β -아스파틸 포스페이트로부터 호모세린의 생합성에 관여하는 아스파테이트 세미알데히드 디히드로게나아제(aspartate-semialdehyde dehydrogenase), 즉, *ppc* 유전자, *aspC* 유전자 및 *asd* 유전자를 2 copy로 증폭시킨 균주를 제작하고자 하였다.
- [102] 균주 제작은 대한민국 특허 등록번호 제10-1117012호의 실시예 1-1 내지 1-3에 개시된 방법으로 pSG-2ppc, pSG-2aspC, pSG-2asd 플라스미드를 제작하고, W3-BTA 균주에 상기의 플라스미드를 도입하고 상기 특허의 실시예 1-5의 방법으로 상기의 3가지 유전자를 순차적으로 2copy 증폭된 균주를 제작하였다. 이렇게 제작된 균주를 W3-BTA2PCD(=WCJM)라 명명하였다.
- [103] 이와 같은 포스포에놀피루베이트 카복실라아제, 아스파테이트 아미노트랜스퍼라아제 및 아스파테이트 세미알데히드 디히드로게나아제 강화 균주 등에 대한 내용의 일 예는 대한민국 등록특허 제 10-0905381호 또는 국제공개 WO2008/013432호에 개시되어 있으며, 상기 특허의 명세서 전체는 본원의 참고자료로서 포함될 수 있다.
- [104]
- [105] 1-4. 플라스크 배양 실험
- [106] 상기 참고예 1-2 및 1-3에서 제작된 균주의 O-아세틸 호모세린 생산량을 실험하기 위하여 삼각플라스크 배양을 실시하였다. LB 배지에 W3110, W3-BTA, WCJM 균주를 접종하여 33 °C에서 하룻밤 배양한 후, 단일 콜로니를 3 mL LB 배지에 접종한 후 33 °C에서 5시간 배양하고, 다시 25 mL O-아세틸 호모세린 생산 배지를 포함한 250 mL 삼각플라스크에 200배 희석하여 33 °C 200 rpm에서 30 시간 배양하여 HPLC 분석을 통하여 O-아세틸 호모세린 생산량을 확인하였다. 이에 사용한 배지조성은 하기 표 1에 정리하였다.
- [107]

[108] [표1]

O-아세틸 호모세린 생산 플라스크 배지 조성

조성	농도(리터당)
포도당	40 g
황산암모늄	17 g
KH ₂ PO ₄	1.0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	5 mg
MnSO ₄ ·8H ₂ O	5 mg
ZnSO ₄	5 mg
탄산칼슘	30 g
효모 엑기스	2 g
메치오닌	0.15 g
쓰레오닌	0.15 g

[109] 상기 배지를 이용하여 30 시간 배양한 HPLC 분석을 통하여 O-아세틸 호모세린 생산량을 확인한 결과는 하기 표 2에 정리하였다.

[110]

[111] [표2]

플라스크 배양을 통한 O-아세틸 호모세린 생산

	OD(562 nm)	포도당 소모(g/L)	O-AH(g/L)
W3110	14.2	40	0
W3-BTA	8.4	36	0.9
WCJM	9.6	35	1.2

[112] 상기 표 2에서 확인할 수 있듯이, 야생형 W3110에서는 O-아세틸 호모세린이 전혀 생성되지 않지만, W3-BTA 균주에서 O-아세틸 호모세린(O-AH)이 0.9 g/L 생성되었고, 생합성 경로가 강화된 WCJM 균주에서는 1.2 g/L가 생성되었다.

[113]

[114] 실시예 1: O-아세틸 호모세린 생산능을 증가시키는 막 단백질의 선별

[115]

[116] 본원의 발명자들은 막단백질로 개시되었으나 O-아세틸 호모세린 배출능 및 O-아세틸 호모세린 생산능과의 연관성이 개시된 바 없는 대장균 유래 leuE(서열번호 1)를 O-아세틸 호모세린 생산에 적용해보았다.

[117] 균주에서 leuE 유전자를 강화하기 위하여 leuE 유전자를 pCL 벡터의 smaI

제한효소 자리를 이용하여 클로닝을 진행하였다.

[118] 우선, *leuE* 유전자를 얻기 위하여 서열번호 11 및 12의 프라이머를 이용하여 변성(denaturation) 단계는 94°C에서 30초, 어닐링(annealing) 단계는 55°C에서 30초, 연장(extension) 단계는 68°C에서 1분 동안 실시하고, 이를 30회 수행하는 PCR 반응을 진행하였다. 그 결과 얻어진 PCR 산물을 1.0% 아가로스 겔에서 전기영동한 후, 800bp 크기의 밴드로부터 DNA를 정제하였다. 정제된 DNA를 제한효소 *SmaI*로 밤새 37°C에서 처리해 준 후, 한 번 더 정제 후, T4 리가아제(ligase)를 이용하여 *leuE* 와 pCL 벡터를 클로닝하였다. 클로닝된 플라스미드를 이용하여 대장균 DH5 α 를 형질전환 한 후, 스펙티노마이신 (spectinomycin) 50 μ g/mL를 포함하는 LB 평판 배지에서 형질전환된 대장균 DH5 α 를 선별하여 플라스미드를 획득하였다. 제작된 플라스미드를 O-아세틸 호모세린 생산주인 W3-BTA 및 WCJM에 균주를 도입하여, 각각 W3-BTA/pCL-*leuE* 및 WCJM/pCL-*leuE*라 명명하였고, O-아세틸 호모세린의 생산능에 대한 플라스크 평가를 진행하였다.

[119] 또한 대조군으로, W3-BTA 및 WCJM에 균주에 상기와 같은 방법으로 공벡터 pCL1920을 도입하여 각각 W3-BTA/pCL1920 및 WCJM/pCL1920로 명명하였고, 상기 O-아세틸 호모세린의 생산능에 대한 플라스크 평가를 진행하였다.

[120]

[121] 구체적으로, 각각의 균주를 LB 고체 배지에 도말 한 후 33 °C 배양기에서 밤새 배양하였다. LB 평판 배지에 밤새 배양한 균주의 단일 콜로니를 3 ml LB 배지에 접종한 후, 이를 33 °C에서 5시간 배양하고, 다시 25 ml O-아세틸 호모세린 생산배지를 포함한 250 ml 삼각 플라스크에서 200배 희석하여 33 °C, 200 rpm의 배양기에서 30시간 배양하였으며, HPLC 분석을 통하여 O-아세틸 호모세린 생산량을 확인하였다. 이의 결과를 정리하면 하기 표 3과 같다.

[122]

[123] [표3]

플라스크 배양을 통한 O-아세틸 호모세린 생산 측정

	OD(562nm)	포도당 소모(g/L)	O-AH(g/L)
W3-BTA/pCL1920	9.5	35	0.9
W3-BTA/pCL- <i>leuE</i>	8.2	36	1.0
WCJM/pCL1920	9.6	35	1.2
WCJM/pCL- <i>leuE</i>	8.4	36	1.5

[124] 상기 표 3에서 확인할 수 있듯이, WCJM에 *leuE* 플라스미드의 도입은 공벡터가 들어간 대조군 균주보다 OD가 더 낮았고, 포도당 소모도 향상하였다. 하지만 O-아세틸 호모세린은 1.5 g/L가 생산되어 *leuE*의 야생형 도입으로써 O-아세틸 호모세린은 생산능이 향상되었다는 결과는 얻기 힘들었으나, OD가 제어되고

당소모 속도가 향상됨으로 보아 배출능의 가능성을 확인하였고, 구조 모델링을 통해 야생형 보다 O-아세틸 호모세린의 배출능이 강화될 수 있는 변이를 선별하고자 하였다.

[125]

[126] 실시예 2 : leuE 개시코돈 변경 플라스미드 제작 및 O-아세틸 호모세린 생산능 평가

[127]

[128] 야생형의 leuE의 개시코돈은 gtg 로 발린 아미노산 코딩으로 알려져 있다. leuE 단백질의 강화효과를 확인하기 위하여 개시코돈을 atg 로 메치오닌 아미노산 코돈으로 변경하고자 실시예 1에서 제작한 플라스미드를 기본으로 하여 개시코돈을 변경하는 실험을 진행하였다. 구체적으로는, O-아세틸 호모세린 배출능을 강화시키기 위해 서열번호 1의 아미노산 서열에서 1번째 아미노산을 메치오닌으로 치환하였다.

[129] 더욱 구체적으로는 leuE(ATG) 변이를 제작하였다. leuE(ATG) 변이를 제작하기 위해 서열번호 145 및 서열번호 146 프라이머를 이용하였고 위치-특이적 돌연변이 키트(site-directed mutagenesis kit, stratagene, 미국)을 이용하여 변이형 leuE(ATG) 유전자를 제조하였다. 기존 야생형 플라스미드를 WT, 개시코돈 변이형 플라스미드는 WT_ATG 로 명명하고 제작된 플라스미드를 WCJM에 도입하여 플라스크에서 O-아세틸 호모세린의 생산능을 평가하였다.

[130] 구체적으로, 각각의 균주를 LB 평판 배지에 도달한 후 33 °C 배양기에서 밤새 배양하였다. LB 고체 배지에 밤새 배양한 균주를 상기에서 나타낸 25 ml 역가 배지에 접종한 다음, 이를 33 °C, 200 rpm의 배양기에서 40 시간 배양하였으며, 이의 결과를 표 4에 나타내었다.

[131]

[132] [표4]

플라스크 배양을 통한 O-아세틸 호모세린 생산 측정

	OD(562 nm)	포도당 소모(g/L)	O-AH(g/L)
WCJM/pCL-leuE WT	8.4	36	1.5
WCJM/pCL-leuE WT(ATG)	7.6	39	2.6

[133] 상기 표 4에서 확인할 수 있듯이, pCL-leuE WT(ATG) 개시코돈 변이 플라스미드가 도입된 균주가 야생형보다 OD가 감소하였으나, 빠른 당 소모 속도를 보였고, O-아세틸 호모세린이 2.6 g/L 생산되어 야생형 대비 무려 173% 생산능이 증가되었다.

[134]

[135] 실시예 3 : leuE 변이 플라스미드 제작 및 O-아세틸 호모세린 생산능 평가

[136]

[137] 3-1. leuE 변이 플라스미드 제작

[138] 실시예 1과 2에서 제작한 플라스미드 pCL-leuE WT 과 pCL-leuE WT(ATG) 2종을 기본으로 하여 leuE 야생형보다 배출능이 강할 것이라고 예상하는 3개의 변이를 각각 제작하는 실험을 진행하였다. 구체적으로는, O-아세틸 호모세린 배출능을 강화시키기 위해 구조 모델링을 통해 leuE 변이 위치를 선별하였으며, 서열번호 1과 2의 아미노산 서열에서 30번째 아미노산, 95번째 아미노산, 165번째 아미노산을 다른 아미노산으로 치환하였다.

[139] 더욱 구체적으로는, L95V, F30A 또는 F165A 변이를 제작하였다. L95V 변이를 제작하기 위해 서열번호 13 및 서열번호 14의 프라이머를 이용하였으며, F30A는 서열번호 25 및 서열번호 26 프라이머, F165A는 서열번호 27 및 서열번호 28 프라이머를 이용하였다. 상기 각각의 프라이머와 함께 위치-특이적 돌연변이 키트(site-directed mutagenesis kit, stratagene, 미국)을 이용하여 변이형 leuE 유전자를 제조하였다. 기존 야생형 플라스미드 WT를 기반으로 한 변이형 플라스미드 L95V는 WT_M3, F30A는 WT_M4, F165A는 WT_M6으로 명명하였다. 또한 개시코돈이 변경된 플라스미드 WT(ATG)를 기반으로 한 변이형 플라스미드 L95V는 WT(ATG)_M3, F30A는 WT(ATG)_M4, F165A는 WT(ATG)_M6으로 명명하였다. 제작된 변이형 플라스미드를 WCJM에 도입하여 플라스크에서 O-아세틸 호모세린의 생산능을 평가하였다.

[140] 구체적으로, 각각의 균주를 LB 평판 배지에 도말한 후 33 °C 배양기에서 밤새 배양하였다. LB 고체 배지에 밤새 배양한 균주를 상기에서 나타낸 25 ml 역가 배지에 접종한 다음, 이를 33 °C, 200 rpm의 배양기에서 40 시간 배양하였으며, 이의 결과를 표 5에 나타내었다.

[141]

[142] [표5]

플라스크 배양을 통한 O-아세틸 호모세린 생산 측정

	OD(562 nm)	포도당 소모(g/L)	O-AH(g/L)
WCJM/pCL1920	9.6	35	1.3
WCJM/pCL-leuE WT	8.4	36	1.5
WCJM/pCL-leuE WT_M3	8.2	38	2.3
WCJM/pCL-leuE WT_M4	7.9	38	3.7
WCJM/pCL-leuE WT_M6	8.0	39	4.8
WCJM/pCL-leuE WT(ATG)	7.6	39	2.6
WCJM/pCL-leuE WT(ATG)_M3	7.5	40	3.1
WCJM/pCL-leuE WT(ATG)_M4	7.3	39	3.6
WCJM/pCL-leuE WT(ATG)_M6	7.5	40	4.9

[143] 상기 표 5에서 확인할 수 있듯이, leuE 변이 플라스미드가 도입된 균주의 경우 3개 변이 모두 야생형보다 OD가 감소하였으나, 빠른 당 소모 속도를 보였고, 특히 leuE WT(ATG)_M6의 경우 O-아세틸 호모세린이 4.9 g/L 생산되어 생산능이 가장 높았다. 따라서 상기 본원의 변이형 3종 모두 O-아세틸 호모세린의 생산능이 증가됨을 확인하였고, 또한 leuE 개시코돈을 변경하여 단백질 발현량을 증가시켰을 시에 O-아세틸 호모세린 생산능이 더욱 증가될 수 있음을 확인하였다.

[144]

[145] 3-2. 생합성 경로 유전자 및 변이형 플라스미드 제작

[146] O-아세틸 호모세린의 생산능을 극대화시키기 위해 호모세린까지의 생합성 경로를 강화시키는 플라스미드를 제작하였다. 아스파테이트 세미알데하이드 디하이드로게나아제 (aspartate semialdehyde dehydrogenase)와 피리딘 뉴클레오타이드 트랜스하이드로게나아제 (pyridine nucleotide transhydrogenase)와 LeuE 야생형 및 변이체를 pCL 벡터에 클로닝하기 위해 우선 pCL 벡터에 유전자 asd와 pntAB를 도입하였다.

- [147] 먼저, *asd*와 *pntAB* 유전자를 수득하기 위하여, *asd*에 대해서는 서열번호 15 및 서열번호 16 프라이머, *pntAB*에 대해서는 서열번호 17 및 서열번호 18의 프라이머를 이용하여 변성(denaturation) 단계는 94°C에서 30초, 어닐링(annealing) 단계는 55°C에서 30초, 연장(extension) 단계는 68°C에서 3분 동안 실시하고, 이를 30 회 수행하는 PCR 반응을 진행하였다. 그 결과 얻어진 각각의 PCR 산물을 1.0% 아가로스 겔에서 전기영동한 후, 1.4kb(*asd*)와 3kb(*pntAB*) 크기의 밴드로부터 DNA를 정제하였다.
- [148] 상기 정제된 두 개의 유전자를 sewing PCR(첫 단계에서는 프라이머 없이 두 유전자의 overlap 부분을 이용하여 연결 후, 양 끝의 프라이머를 이용해 증폭하는 PCR 기법)을 통해 연결하였다. Sewing PCR 조건은 첫 단계에서 상기에서 설명한 PCR 반응을 10회 수행하고, 이후 서열번호 15 및 서열번호 18의 프라이머를 첨가한 후 PCR 반응 20회를 수행하였다. 이를 통해 *asd-pntAB* 유전자 조합 단편을 제작하였고, 이를 전기영동에서 정제 후, pCL 벡터와 함께 제한 효소 *samI*을 밤새 37 °C에서 처리해 준 후, 한 번 더 정제 후, T4 리가아제(ligase)를 이용하여 pCL-*asd-pntAB* 플라스미드를 제작하였다.
- [149] 이렇게 제작된 플라스미드에 *leuE* 유전자를 클로닝하였다. 상기 클로닝은 구체적으로, *leuE* 유전자를 얻기 위해서 서열번호 29 및 서열번호 30 프라이머를 이용하여 변성(denaturation) 단계는 94°C에서 30초, 어닐링(annealing) 단계는 55°C에서 30초, 연장(extension) 단계는 68°C에서 1분 동안 실시하고, 이를 30 회 수행하는 PCR 반응을 진행하였다.
- [150] 그 결과 얻어진 PCR 산물을 1.0% 아가로스 겔에서 전기영동한 후, 800bp 크기의 밴드로부터 DNA를 정제하였다. 정제된 DNA와 플라스미드를 제한효소 *kpnI*으로 밤새 37 °C에서 처리해 준 후, 한 번 더 정제 후, T4 리가아제(ligase)를 이용하여 *leuE*와 pCL-*asd-pntAB* 벡터를 클로닝 하였다. 클로닝된 플라스미드를 이용하여 대장균 DH5 α 에 형질전환 한 후, 스펙티노마이신 (spectinomycin) 50 μ g/mL를 포함하는 LB 평판 배지에서 형질전환 된 대장균 DH5 α 를 선별하여 플라스미드를 획득하였다. 제작된 플라스미드를 O-아세틸 호모세린 생산주인 WCJM 에 도입하여 O-아세틸 호모세린의 생산능에 대한 플라스크 평가를 진행하였다. 제작된 플라스미드는 모두 4종으로 실시예 2-1에서 제작된 야생형 및 변이 3종을 이용하였다. 4종 플라스미드는 WCJM 균주에 전기천공법을 이용하여 도입하였고, 실시예 3-1과 동일한 방법으로 플라스크 평가를 진행하였고, 그 결과는 다음 표 6과 같다.
- [151]

[152] [표6]

플라스크 배양을 통한 O-아세틸 호모세린 생산 측정

	OD(562 nm)	포도당 소모(g/L)	O-AH(g/L)
WCJM/pCL- <i>asd-pntAB</i>	9.8	36	1.8
WCJM/pCL- <i>asd-pntAB-leuE</i> WT	9.5	37	2.0
WCJM/pCL- <i>asd-pntAB-leuE</i> WT_M3	8.2	38	3.0
WCJM/pCL- <i>asd-pntAB-leuE</i> WT_M4	7.5	38	4.2
WCJM/pCL- <i>asd-pntAB-leuE</i> WT_M6	7.8	38	5.9

[153] 상기 표 6에서 확인할 수 있듯이, 생합성 경로와 *leuE* 변이를 동시에 강화시켜준 결과, O-아세틸 호모세린의 생산능이 더욱 향상되었다. 특히 pCL-*asd-pntAB-leuE* WT_M6 플라스미드가 도입된 균주의 경우, 야생형보다 OD가 감소하였으나, 빠른 당소모 속도를 보였고, O-아세틸 호모세린이 5.9 g/L 생산되어 생산능이 가장 높았다.

[154]

[155] 실시예 4 : saturated mutagenesis를 통한 *leuE* 변이 제작 및 O-아세틸 호모세린 생산능 평가

[156]

[157] 4-1. saturated mutagenesis를 통한 *leuE* 변이 균주 제작 및 평가

[158] O-아세틸 호모세린 생산능이 높았던 *leuE* 변이 3종의 다른 아미노산 치환형을 제작하기 위해 saturated mutagenesis를 통해 변이를 제작하였다. 치환되는 아미노산은 M3 변이, M4 변이, 및 M6 변이 각각 17종을 실시예 2에서 제작된 플라스미드를 주형으로 하여 제작하였다. 그 목록은 다음 표 7와 같다.

[159]

[160] [표7]

변이 플라즈미드	치환 아미노산	프라이머 서열번호
M3	L95F	서열번호 31, 32
	L95A	서열번호 33, 34
	L95G	서열번호 35, 36
	L95T	서열번호 37, 38
	L95N	서열번호 39, 40
	L95D	서열번호 41, 42
	L95H	서열번호 43, 44
	L95I	서열번호 45, 46
	L95S	서열번호 47, 48
	L95P	서열번호 49, 50
	L95Y	서열번호 51, 52
	L95Q	서열번호 53, 54
	L95K	서열번호 55, 56
	L95E	서열번호 57, 58
	L95C	서열번호 59, 60
	L95W	서열번호 61, 62
	L95R	서열번호 63, 64
M4	F30W	서열번호 65, 66
	F30L	서열번호 67, 68
	F30V	서열번호 69, 70
	F30G	서열번호 71, 72
	F30S	서열번호 73, 74
	F30N	서열번호 75, 76
	F30D	서열번호 77, 78
	F30H	서열번호 79, 80
	F30I	서열번호 81, 82
	F30P	서열번호 83, 84
	F30Y	서열번호 85, 86
	F30Q	서열번호 87, 88

	F30K	서열번호 89, 90
	F30E	서열번호 91, 92
	F30C	서열번호 93, 94
	F30T	서열번호 95, 96
	F30R	서열번호 97, 98
M6	F165W	서열번호 99, 100
	F165L	서열번호 101, 102
	F165V	서열번호 103, 104
	F165G	서열번호 105, 106
	F165S	서열번호 107, 108
	F165N	서열번호 109, 110
	F165D	서열번호 111, 112
	F165H	서열번호 113, 114
	F165I	서열번호 115, 116
	F165P	서열번호 117, 118
	F165Y	서열번호 119, 120
	F165Q	서열번호 121, 122
	F165K	서열번호 123, 124
	F165E	서열번호 125, 126
	F165C	서열번호 127, 128
	F165T	서열번호 129, 130
	F165R	서열번호 131, 132

[161] 구체적으로, 상기 표 7에서 제시한 프라이머를 이용하여 위치-특이적 돌연변이 키트(site-directed mutagenesis kit, Stratagene, 미국)을 실시하여 변이형 leuE 유전자를 제조하였다. 제작된 변이를 플라스미드는 WCJM 균주에 도입하고 실시예 3-1과 동일한 방법으로 플라스미드 평가를 진행하였다. 그 결과는 다음 표 8과 같다.

[162]

[163] [표8]

플라스크 배양을 통한 O-아세틸 호모세린 생산 측정

균주	플라스미드	변이위치	OD(562 nm)	포도당 소모(g/L)	O-AH(g/L)
WCJM	pCL1920		9.6	35	1.3

	pCL-leuE WT		8.4	36	1.5
	pCL-leuE WT_M3	L95V	8.2	38	2.3
	pCL-leuE WT_M4	F30A	7.9	38	3.7
	pCL-leuE WT_M6	F165A	8.0	39	4.8
	M3 변이	L95F	8.6	38	2.3
		L95A	8.3	38	2.2
		L95G	9.2	37	2.1
		L95T	9.4	37.5	2.3
		L95N	8.8	38	2.4
		L95D	8.7	36	2.2
		L95H	9.5	35	2.3
		L95I	9.5	37.5	2.2
		L95S	9.3	37	2.5
		L95P	9.2	36	2.5
		L95Y	8.9	35	2.2
		L95Q	9.4	38	3.1
		L95K	9.2	38.5	2.2
		L95E	8.6	37	2.6
		L95C	8.9	37.5	2.4
		L95W	9.9	38	2.1
		L95R	9.3	38	2.3
	M4 변이	F30W	7.5	38	3.2
		F30L	7.2	36	3.1
		F30V	7.3	35	2.6
		F30G	8.3	36	3.4
		F30S	7.9	35	3.6
		F30N	8.2	37	3.5
		F30D	8.6	38	3.0

	F30H	8.8	34	2.9
	F30I	8.3	35	3.5
	F30P	8.6	35.5	3.1
	F30Y	7.9	34	2.9
	F30Q	8.6	34	2.8
	F30K	8.8	35	3.1
	F30E	7.6	35.5	2.5
	F30C	7.9	35	2.4
	F30T	8.9	36	3.0
	F30R	8.6	38.5	2.9
M6 변이	F165W	8.2	39	4.2
	F165L	8.3	38	4.5
	F165V	8.4	38	4.1
	F165G	8.0	39	4.6
	F165S	7.9	37	4.7
	F165N	8.8	39	4.7
	F165D	7.8	38	4.5
	F165H	7.9	38	4.5
	F165I	7.8	37	4.1
	F165P	7.7	37.5	4.2
	F165Y	8.2	38	4.6
	F165Q	8.4	38	3.9
	F165K	7.6	39	4.0
	F165E	7.7	36.5	4.2
	F165C	7.6	36.5	4.3
	F165T	8.5	34	3.7
	F165R	8.3	38	3.9

- [164] 상기 표 8에서 알 수 있듯이 각각 변이체들을 평가 한 결과, OD나 당소모 속도에서 미세하게 차이를 보이긴 하였으나, 상기 모든 변이체는 대조군으로 사용된 균주 WCJM/pCL1920 및 WCJM/pCL-leuE WT보다 O-아세틸 호모세린의 생산량이 향상되었음을 확인하였다.

[165]

[166] 4-2. O-아세틸 호모세린 고수율 균주에서의 leuE 변이 강화 균주 제작 및 O-아세틸 호모세린 생산능 평가

[167] 기존에 야생형 W3110 유래의 NTG mutation을 통하여 쓰레오닌을 생산하는 능력을 가지는 균주를 이용하여 O-아세틸 호모세린을 생산하는 균주를 제작하는 방법이 알려져 있다(국제특허 공개번호 WO2012/087039). 이때 제작된 고수율의 O-아세틸 호모세린을 생산하는 균주는 한국 미생물 보존센터에 수탁번호 KCCM11146P로 기탁되어 있다.

[168] 상기 균주를 바탕으로 본원의 leuE 유전자와 그 변이들을 도입하여 O-아세틸 호모세린 생산능을 더욱 증진시킬 수 있을지 확인해보았다.

[169] 구체적으로, leuE 유전자와 변이체 3종을 플라스미드 형태로 전기천공법을 이용하여 도입하였다. 도입된 균주는 KCCM11146P/pCL1920, KCCM11146P/pCL-leuE WT, KCCM11146P- pCL-leuE M3, KCCM11146P-pCL-leuE M4 또는 KCCM11146P/pCL-leuE M6라고 명명하였다. 상기 leuE 유전자와 변이체의 O-아세틸 호모세린 생산능을 측정하기 위하여 플라스크 배양 평가를 진행하였다. 구체적으로는, LB 배지에 상기 균주 4종을 접종하여 33 °C에서 하룻밤 배양한 후, 단일 콜로니를 3 ml LB 배지에 접종한 후 33 °C에서 5 시간 배양하고, 다시 25 ml O-아세틸 호모세린 생산 배지가 첨가된 250 ml 삼각플라스크에 200배 희석하여 33 °C 200 rpm에서 30시간 배양하여 HPLC 분석을 통하여 O-아세틸 호모세린 생산량을 확인하였다. 상기 실험한 결과를 정리하면 하기 표 9와 같다.

[170]

[171] [표9]

플라스크 배양을 통한 O-아세틸 호모세린 생산 측정

	OD(562nm)	포도당 소모(g/L)	O-AH(g/L)
KCCM11146P/pCL1920	18.3	40	14.2
KCCM11146P/pCL-leuE WT	17.9	40	16.3
KCCM11146P/pCL-leuE M3	17.5	40	16.9
KCCM11146P/pCL-leuE M4	16.8	40	19.2
KCCM11146P/pCL-leuE M6	17.2	40	18.8

[172] 상기 표 9에서 확인할 수 있듯이, KCCM11146P 균주에 pCL1920만이 도입된 균주에서 O-아세틸 호모세린이 14.2 g/L 생성되었고, leuE WT의 경우도 본래

균주보다도 O-아세틸 호모세린의 생산량이 증가하였다. 또한 변이 3종은 모두 OD가 감소하였고, M4의 경우에는 19.2 g/L로 O-아세틸 호모세린의 생산량이 가장 높았으며, 나머지 M3, M6 변이의 경우에도 O-아세틸 호모세린의 생산량이 증가한 것을 확인하였다.

[173] 본원의 발명자들은 KCCM11146P 균주 기반 leuE 3종 변이 M3, M4, M6변이 강화 균주 'KCCM11146P/pCL-leuE M3, M4, M6' 에서 O-아세틸 호모세린 생산이 증가함을 확인하고, 상기 균주를 'CA05-4009, 'CA05-4010, 'CA05-4011'으로 명명한 후 부다페스트 조약 하에 2014년 12월 15일자로 한국미생물보존센터(KCCM)에 기탁하여 수탁번호 KCCM11645P, KCCM11646P, KCCM11647P를 부여받았다.

[174]

[175] 실시예 5 : 생산된 O-아세틸 호모세린 배양액과 전환효소를 이용한 L-메치오닌 생산

[176]

[177] 상기 실시예 4에서 수득한 O-아세틸 호모세린의 배양액과 이를 메치오닌으로 전환하는 활성을 가진 효소인 O-아세틸 호모세린 설피드릴라제를 이용하여 L-메치오닌 생산하는 실험을 진행하였다.

[178] 대한민국 등록특허 제10-1250651호의 실시예 1-2에 제시된 방법으로 전환효소 O-아세틸 호모세린 설피드릴라제를 제작하였으며, 상기 특허의 실시예 3에 제시된 방법으로 전환반응을 실시하여 생성된 L-메치오닌을 측정하였다. 기질로 사용한 O-아세틸 호모세린은 본원의 상기 실시예 4에서 수득한 KCCM11146P-pCL-leuE M4의 배양액(O-AH 농도 19.2 g/L)로 진행하였으며, 생성된 L-메치오닌의 농도는 하기 표 10과 같다.

[179]

[180] [표10]

		시간 (min)				
		2	4	6	8	10
MetZ-rsp	메치오닌(g/L)	3.21	4.34	4.52	4.78	5.04
	전환율(%)	50 %	68 %	71 %	75 %	79 %

[181] 상기 표 10에서 확인할 수 있듯이, 상기 실시예 4에서 수득한 KCCM11146P-pCL-leuE M4 균주의 배양액에 포함된 O-아세틸 호모세린이 10분 동안 79 %의 전환율로 메치오닌으로 전환되는 것을 확인하였다. 이를 통해, 본원의 균주를 이용하여 메치오닌을 성공적으로 생산할 수 있음을 확인하였다.

[182]

[183] 이상의 설명으로부터, 본원이 속하는 기술분야의 당업자는 본원이 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 것으로서 이해해야만 한다. 본원의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본원의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

[184]

[185]

특허출원을 위한 부나베스트 국제 조약 하의 미생물 수탁 증명

국 제 양 식

국제기탁기관에 의해 규칙 7.1에 따라 발행된 원기탁에 대한 수탁증

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

I. 미생물의 표시	
기탁자가 첨부한 미생물 식별에 대한 표시: <i>Escherichia coli</i> CA05-4009	국제 기탁기관이 부여한 수탁번호: KCCM11645P
II. 과학적 성질의 설명 및/또는 분류학상의 위치	
항목 I에 표시된 미생물에 대하여 다음 사항이 포함되어 있다: <input type="checkbox"/> 과학적 성질의 설명 <input type="checkbox"/> 제인된 분류학상의 위치 (적용시 <input checked="" type="checkbox"/> 표시)	
III. 기탁 및 수탁	
본 국제기탁기관은 2014년 12월 15일에 기탁된 항목 I에 표시된 미생물을 수탁하였다.	
IV. 국제기탁기관	
명칭: 한국미생물보존센터 주소: 대한민국 서울시 서대문구 홍제대 2가길 45 유림빌딩 (우편번호 120-861)	국제기탁기관을 대표하는 권한을 가진 자 또는 권한을 부여받은 공무원 서명: 서명일: 2014. 12. 15.

상기 번역은 원문의 내용과 상위 없음을 증명함.

2015 년 06월 03 일

변리사 손민



[186]

특허출원을 위한 부나베스트 국제 조약 하의 미생물 수탁 증명

국 제 양 식

국제기탁기관에 의해 규칙 7.1에 따라 발행된 원기탁에 대한 수탁증

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

I. 미생물의 표시	
기탁자가 첨부한 미생물 식별에 대한 표시: <i>Escherichia coli</i> CA05-4010	국제 기탁기관이 부여한 수탁번호: KCCCM11646P
II. 과학적 성질의 설명 및/또는 분류학상의 위치	
항목 I에 표시된 미생물에 대하여 다음 사항이 포함되어 있다: <input type="checkbox"/> 과학적 성질의 설명 <input type="checkbox"/> 제인된 분류학상의 위치 (적용시 <input checked="" type="checkbox"/> 표시)	
III. 기탁 및 수탁	
본 국제기탁기관은 2014년 12월 15일에 기탁된 항목 I에 표시된 미생물을 수탁하였다.	
IV. 국제기탁기관	
명칭: 한국미생물보존센터 주소: 대한민국 서울시 서대문구 홍제대 2가길 45 유림빌딩 (우편번호 120-861)	국제기탁기관을 대표하는 권한을 가진 자 또는 권한을 부여받은 공무원 서명: 서명일: 2014. 12. 15.

상기 번역은 원문의 내용과 상위 없음을 증명함.

2015 년 06월 03 일

변리사 손 민



[187]

특허출원을 위한 부나베스트 국제 조약 하의 미생물 수탁 증명

국 제 양 식

국제기탁기관에 의해 규칙 7.1에 따라 발행된 원기탁에 대한 수탁증

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

I. 미생물의 표시	
기탁자가 첨부한 미생물 식별에 대한 표시: <i>Escherichia coli</i> CA05-4011	국제 기탁기관이 부여한 수탁번호: KCCM11647P
II. 과학적 성질의 설명 및/또는 분류학상의 위치	
항목 I에 표시된 미생물에 대하여 다음 사항이 포함되어 있다: <input type="checkbox"/> 과학적 성질의 설명 <input type="checkbox"/> 제안된 분류학상의 위치 (적용시 <input checked="" type="checkbox"/> 표시)	
III. 기탁 및 수탁	
본 국제기탁기관은 2014년 12월 15일에 기탁된 항목 I에 표시된 미생물을 수탁하였다.	
IV. 국제기탁기관	
명칭: 한국미생물보존센터 주소: 대한민국 서울시 서대문구 홍제내 2가길 45 유림빌딩 (우편번호 120-861)	국제기탁기관을 대표하는 권한을 가진 자 또는 권한을 부여받은 공무원 서명: 서명일: 2014. 12. 15.

상기 번역은 원문의 내용과 상위 없음을 증명함.

2015 년 06월 03 일

변리사 손민



청구범위

- [청구항 1] 서열번호 1의 아미노산 서열에서 1번째 아미노산 발린, 30번째 아미노산 페닐알라닌, 95번째 아미노산 류신 또는 165번째 아미노산 페닐알라닌으로 이루어진 그룹에서 선택되는 하나 이상의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, O-아세틸 호모세린 배출능을 가지는 폴리펩티드.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 폴리펩티드는 서열번호 1의 아미노산 서열에서 1번째 아미노산 발린이 메치오닌으로 치환되거나; 30번째 아미노산 페닐알라닌이 알라닌, 트립토판, 류신, 발린, 글리신, 세린, 아스파라긴, 아스파르트산 및 히스티딘으로 이루어진 군으로부터 선택된 것으로 치환되거나; 95번째 아미노산 류신이 발린, 페닐알라닌, 알라닌, 글리신, 트레오닌, 아스파라긴, 아스파르트산 및 히스티딘으로 이루어진 군으로부터 선택된 것으로 치환되거나; 또는 165번째 아미노산 페닐알라닌이 알라닌, 트립토판, 류신, 발린, 글리신, 세린, 아스파라긴, 아스파르트산 및 히스티딘으로 이루어진 군으로부터 선택된 것으로 치환된, O-아세틸 호모세린 배출능을 가지는 폴리펩티드.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 폴리펩티드는 서열번호 1의 아미노산 서열에서 1번째 아미노산 발린이 메치오닌으로 치환되고, 30번째 아미노산 페닐알라닌, 95번째 아미노산 류신 또는 165번째 아미노산 페닐알라닌이 다른 아미노산으로 치환된, O-아세틸 호모세린 배출능을 가지는 폴리펩티드.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 폴리펩티드는 서열번호 2, 133, 134, 137, 138, 141 및 142의 아미노산 서열로 이루어진 그룹에서 선택된, O-아세틸 호모세린 배출능을 가지는 폴리펩티드.
- [청구항 5] 제1항의 O-아세틸 호모세린 배출능을 가지는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드의 개시코돈이 ATG로 추가로 치환된, 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 7] 제5항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 4, 135, 136, 139, 140, 143 및 144의 핵산 서열로 이루어진 그룹 중에서 선택된, 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 8] 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드 또는 이의 변이체 폴리펩티드가 포함되거나 과발현된, O-아세틸 호모세린을 생산하는 에스케리키아(*Escherichia*) 속 미생물.
- [청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 변이체 폴리펩티드는 서열번호 1의 아미노산 서열에서 1번째 아미노산 발린, 30번째 아미노산 류신, 95번째 아미노산 페닐알라닌 또는 165번째 아미노산 페닐알라닌으로 이루어진 그룹에서

- 선택되는 하나 이상의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, O-아세틸 호모세린을 생산하는 에스케리키아(*Escherichia*) 속 미생물.
- [청구항 10] 제8항에 있어서, 상기 변이체 폴리펩티드는 서열번호 1의 아미노산 서열에서 1번째 아미노산 발린이 메치오닌으로 치환되거나; 30번째 아미노산 페닐알라닌이 알라닌, 트립토판, 류신, 발린, 글리신, 세린, 아스파라긴, 아스파르트산 및 히스티딘으로 이루어진 군으로부터 선택된 것으로 치환되거나; 95번째 아미노산 류신이 발린, 페닐알라닌, 알라닌, 글리신, 트레오닌, 아스파라긴, 아스파르트산 및 히스티딘으로 이루어진 군으로부터 선택된 것으로 치환되거나; 또는 165번째 아미노산 페닐알라닌이 알라닌, 트립토판, 류신, 발린, 글리신, 세린, 아스파라긴, 아스파르트산 및 히스티딘으로 이루어진 군으로부터 선택된 것으로 치환된, O-아세틸 호모세린을 생산하는 에스케리키아 속 미생물.
- [청구항 11] 제9항에 있어서, 상기 변이체 폴리펩티드는 서열번호 1의 아미노산 서열에서 1번째 아미노산 발린이 메치오닌으로 치환되고, 30번째 아미노산 페닐알라닌, 95번째 아미노산 류신 또는 165번째 아미노산 페닐알라닌이 다른 아미노산으로 치환된, O-아세틸 호모세린 배출능을 가지는 폴리펩티드.
- [청구항 12] 제8항에 있어서, 상기 에스케리키아 속 미생물은 대장균(*Escherichia coli*)인, O-아세틸 호모세린을 생산하는 에스케리키아 속 미생물.
- [청구항 13] 제8항에 있어서, 상기 에스케리키아 속 미생물은 추가적으로 시스타치오닌 신타아제(cystathionine synthase)의 활성이 불활성화된, O-아세틸 호모세린을 생산하는 에스케리키아 속 미생물.
- [청구항 14] 제8항에 있어서, 상기 에스케리키아 속 미생물은 추가적으로 호모세린 키나아제(homoserine kinase)의 활성이 불활성화된, O-아세틸 호모세린을 생산하는 에스케리키아 속 미생물.
- [청구항 15] 제8항에 있어서, 상기 에스케리키아 속 미생물은 추가적으로 호모세린 아세틸 트랜스퍼라제(homoserine acetyltransferase)의 활성이 비변이 미생물에 비하여 강화된, O-아세틸 호모세린을 생산하는 에스케리키아 속 미생물.
- [청구항 16] 제8항에 있어서, 상기 에스케리키아 속 미생물은 추가적으로 아스파테이트 세미알데하이드 디하이드로게나아제 (aspartate semialdehyde dehydrogenase), 피리딘 뉴클레오티드 트랜스하이드로게나아제 (pyridine nucleotide transhydrogenase) 또는 이들의 조합의 활성이 비변이 미생물에 비하여 강화된, O-아세틸 호모세린을 생산하는 에스케리키아 속 미생물.
- [청구항 17] 제8항 내지 제16항 중 어느 한 항의 O-아세틸 호모세린을 생산하는 에스케리키아 속 미생물을 배지에서 배양하는 단계; 및 상기 배양단계에서 배양된 미생물 또는 배지에서 O-아세틸 호모세린을

- 회수하는 단계를 포함하는, O-아세틸 호모세린 생산방법.
- [청구항 18] 제8항 내지 제16항 중 어느 한 항의 O-아세틸 호모세린을 생산하는 에스케리키아 속 미생물을 배지에서 배양하는 단계; 및
상기 배양단계에서 배양된 미생물 또는 배지에, 또는 상기 배양단계에서 배양된 미생물 또는 배지에서 회수한 O-아세틸 호모세린에 메틸머캡탄과 메치오닌 전환 효소를 처리하여 O-아세틸 호모세린을 L-메치오닌으로 전환하는 단계를 포함하는, L-메치오닌 생산방법.
- [청구항 19] 제18항에 있어서, 상기 메치오닌 전환 효소는 O-아세틸 호모세린 설피드릴라제인, L-메치오닌 생산방법.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/005951

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 14/245(2006.01)i, C12N 15/70(2006.01)i, C12P 13/06(2006.01)i, C12P 13/12(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)

C07K 14/245; C12P 13/12; C12N 1/00; C12N 1/21; C12N 15/52; C12N 1/20; C12N 15/70; C12P 13/06

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: O-acetyl homoserine, Escherichia coli, mutation, L-methionine

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NCBI, NCBI Reference Sequence: WP_000457206.1 (20 October 2014) See DEFINITION; ORIGIN.	1-7
Y		8-19
Y	KR 10-0951766 B1 (CJ CHEILJEDANG CORPORATION) 08 April 2010 See abstract; examples 1-4; claims 17-24; figure 2.	8-19
Y	KUTUKOVA et al., "The yeaS (leuE) Gene of Escherichia Coli Encodes An Exporter of Leucine, and the Lrp Protein Regulates its Expression", FEBS Letters, Vol. 579, pp. 4629-4634 (2005) See abstract; pages 4630-4631.	8-19
Y	KR 10-1117012 B1 (CJ CHEILJEDANG CORPORATION) 20 March 2012 See abstract; claim 1.	16
A	US 2009-0298135 A1 (MAIER et al.) 03 December 2009 See the entire document.	1-19

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

04 OCTOBER 2016 (04.10.2016)

Date of mailing of the international search report

04 OCTOBER 2016 (04.10.2016)

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/KR2016/005951

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-0951766 B1	08/04/2010	CN 101356281 A	28/01/2009
		CN 101356281 B	19/08/2015
		CN 102943096 A	27/02/2013
		CN 102943096 B	27/08/2014
		CN 103397057 A	20/11/2013
		CN 103397057 B	23/03/2016
		EP 2046968 A1	15/04/2009
		EP 2046968 B1	11/09/2013
		EP 2657345 A1	30/10/2013
		JP 2009-544309 A	17/12/2009
		JP 2012-213401 A	08/11/2012
		JP 5078101 B2	21/11/2012
		JP 5371073 B2	18/12/2013
		KR 10-0905381 B1	30/06/2009
		US 2010-0184164 A1	22/07/2010
		US 2013-0231503 A1	05/09/2013
		US 2015-0211034 A1	30/07/2015
		US 8426171 B2	23/04/2013
		US 9029105 B2	12/05/2015
		WO 2008-013432 A1	31/01/2008
KR 10-1117012 B1	20/03/2012	CN 102002473 A	06/04/2011
		CN 104911136 A	16/09/2015
		EP 2290051 A1	02/03/2011
		JP 2011-045360 A	10/03/2011
		JP 5445243 B2	19/03/2014
		US 2011-0053253 A1	03/03/2011
		US 8283152 B2	09/10/2012
US 2009-0298135 A1	03/12/2009	CA 2456483 A1	06/08/2004
		CN 100510057 C	08/07/2009
		CN 1539983 A	27/10/2004
		EP 1445310 A1	11/08/2004
		EP 1445310 B1	17/05/2006
		EP 1445310 B2	29/06/2016
		JP 2004-236660 A	26/08/2004

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C07K 14/245(2006.01)I, C12N 15/70(2006.01)I, C12P 13/06(2006.01)I, C12P 13/12(2006.01)I		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C07K 14/245; C12P 13/12; C12N 1/00; C12N 1/21; C12N 15/52; C12N 1/20; C12N 15/70; C12P 13/06 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: O-아세틸 호모세린, 대장균, 변이, L-메치오닌		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	NCBI, NCBI Reference Sequence: WP_000457206.1 (2014.10.20) DEFINITION; ORIGIN 참조.	1-7
Y		8-19
Y	KR 10-0951766 B1 (씨제이제일제당 (주)) 2010.04.08 요약; 실시예 1-4; 청구항 17-24; 도면 2 참조.	8-19
Y	KUTUKOVA 등, 'The yeaS (leuE) gene of Escherichia coli encodes an exporter of leucine, and the Lrp protein regulates its expression' FEBS Letters, Vol.579, pp.4629-4634 (2005) 요약; 페이지 4630-4631 참조.	8-19
Y	KR 10-1117012 B1 (씨제이제일제당 (주)) 2012.03.20 요약; 청구항 1 참조.	16
A	US 2009-0298135 A1 (MATER 등) 2009.12.03 전체 문헌 참조.	1-19
<input type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2016년 10월 04일 (04.10.2016)		국제조사보고서 발송일 2016년 10월 04일 (04.10.2016)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 김승범 전화번호 +82-42-481-3371



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-0951766 B1	2010/04/08	CN 101356281 A	2009/01/28
		CN 101356281 B	2015/08/19
		CN 102943096 A	2013/02/27
		CN 102943096 B	2014/08/27
		CN 103397057 A	2013/11/20
		CN 103397057 B	2016/03/23
		EP 2046968 A1	2009/04/15
		EP 2046968 B1	2013/09/11
		EP 2657345 A1	2013/10/30
		JP 2009-544309 A	2009/12/17
		JP 2012-213401 A	2012/11/08
		JP 5078101 B2	2012/11/21
		JP 5371073 B2	2013/12/18
		KR 10-0905381 B1	2009/06/30
		US 2010-0184164 A1	2010/07/22
		US 2013-0231503 A1	2013/09/05
		US 2015-0211034 A1	2015/07/30
		US 8426171 B2	2013/04/23
		US 9029105 B2	2015/05/12
		WO 2008-013432 A1	2008/01/31
		KR 10-1117012 B1	2012/03/20
CN 104911136 A	2015/09/16		
EP 2290051 A1	2011/03/02		
JP 2011-045360 A	2011/03/10		
JP 5445243 B2	2014/03/19		
US 2011-0053253 A1	2011/03/03		
US 8283152 B2	2012/10/09		
US 2009-0298135 A1	2009/12/03	CA 2456483 A1	2004/08/06
		CN 100510057 C	2009/07/08
		CN 1539983 A	2004/10/27
		EP 1445310 A1	2004/08/11
		EP 1445310 B1	2006/05/17
		EP 1445310 B2	2016/06/29
		JP 2004-236660 A	2004/08/26