

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2024년 8월 2일 (02.08.2024)



WIPO PCT



(10) 국제공개번호

WO 2024/158257 A1

(51) 국제특허분류:

C12N 15/77 (2006.01)

C12P 13/02 (2006.01)

C12N 9/00 (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/KR2024/001306

(22) 국제출원일:

2024년 1월 26일 (26.01.2024)

공개:

(25) 출원언어:

한국어

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

(26) 공개언어:

한국어

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(30) 우선권정보:

10-2023-0010758 2023년 1월 27일 (27.01.2023) KR

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

(72) 발명자: 김희주 (KIM, Hee Ju); 04560 서울특별시 중구 동호로 330, Seoul (KR). 신광수 (SHIN, Kwang Soo); 04560 서울특별시 중구 동호로 330, Seoul (KR). 김상준 (KIM, Sang Jun); 04560 서울특별시 중구 동호로 330, Seoul (KR). 주시연 (JU, Siyeon); 04560 서울특별시 중구 동호로 330, Seoul (KR). 김희영 (KIM, Heeyeong); 04560 서울특별시 중구 동호로 330, Seoul (KR). 김비나 (KIM, Bina); 04560 서울특별시 중구 동호로 330, Seoul (KR).

(74) 대리인: 유미특허법인 (YOU ME PATENT AND LAW FIRM); 06134 서울특별시 강남구 테헤란로 115, 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: MICROORGANISM WITH ENHANCED ACTIVITY OF PANTOATE-BETA-ALANINE LIGASE ORIGINATING FROM GLUTAMICIBACTER HALOPHYTOCOLA AND USES THEREOF

(54) 발명의 명칭: 글루타미시박터 할로피토콜라 유래 판토에이트- 베타- 알라닌 리가아제의 활성이 강화된 미생물 및 이의 용도

(57) Abstract: The present application provides a microorganism with the enhanced activity of a pantoate-beta-alanine ligase originating from Glutamicibacter halophytocola, a panthenol production composition comprising the microorganism, and a panthenol production method comprising a step of cultivating the microorganism, and the production capacity of panthenol is excellent.

(57) 요약서: 본 출원은 글루타미시박터 할로피토콜라 유래 판토에이트- 베타- 알라닌 리가아제의 활성이 강화된 미생물, 상기 미생물을 포함하는 판테놀 생산용 조성물, 및 상기 미생물을 배양하는 단계를 포함하는 판테놀 생산방법을 제공하며, 판테놀의 생산능이 우수하다.



WO 2024/158257 A1

명세서

발명의 명칭: 글루타미시박터 할로피토콜라 유래 판토에이트-베타-알라닌 리가아제의 활성이 강화된 미생물 및 이의 용도 기술분야

- [1] 관련 출원(들)과의 상호 인용
[2] 본 출원은 2023년 1월 27일자 대한민국 특허출원 제10-2023-0010758호에 기초한 우선권의 이익을 주장하며, 해당 대한민국 특허출원의 문헌에 개시된 모든 내용은 본 명세서의 일부로서 포함된다.

- [3]
[4] 글루타미시박터 할로피토콜라 유래 판토에이트-베타-알라닌 리가아제의 활성이 강화된 미생물, 상기 미생물을 포함하는 판테놀 생산용 조성물, 및 상기 미생물을 배양하는 단계를 포함하는 판테놀의 생산 방법이 제공된다.

[5]

배경기술

- [6] 판테놀(Panthenol)은 비타민 B5의 프로비타민 형태의 물질로 화장품, 식품 및 음료 등에 다양하게 응용되고 있는 상업적으로 중요한 물질 중 하나이다. 판테놀은 보습력이 우수하여 화장품, 퍼스널케어 제품 등 스킨케어 제품에 사용되고 있고 화학적으로 합성하여 주로 제조하고 있다.
- [7] 판테놀을 화학적으로 제조하는 공정 중 DL-판토락톤을 제조하고 D-형태를 분리하는 과정에서 포름알데히드와 시아나이드와 같은 폐수가 발생하며, 또한 D-형태의 판토락톤과 3-아미노프로판올을 축합하는 단계에서 메탄 및 디클로로메탄 등 다량의 유기용매를 사용하고 폐수가 발생하여 환경적으로 문제가 발생한다.
- [8] 화학 합성법으로 생산되는 D-형태의 판테놀 물질을 미생물을 활용하여 발효 생산을 할 경우 DL-판토락톤을 분리하는 과정이 없이 생체 활성을 갖는 D-형태의 panthenol을 생산할 수 있으므로 화학 합성법에서 필요한 다량의 유기용매를 사용하지 않아 폐수처리 문제가 발생되지 않는 이점이 있다.
- [9] 이에 생물공학적으로 판테놀을 제조하는데 유리한 효과를 갖는 미생물 및 이를 이용하여 판테놀을 고효율로 제조하는 기술의 개발이 요구된다.

[10]

[11] 선행기술문헌

[12] (특허문헌 1) WO 2001-021772 A2

[13]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [14] 본 출원의 일 예는 판토에이트-베타-알라닌 리가아제의 활성이 강화되고, 판테놀의 생산능이 향상된 미생물을 제공한다.
- [15] 본 출원의 다른 예는 상기 미생물을 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, 판테놀의 제조방법을 제공한다.
- [16] 본 출원의 또 다른 예는 상기 미생물을 포함하는 판테놀 생산용 조성물을 제공한다.
- [17] 본 출원의 또 다른 예는 상기 미생물을 판테놀 생산에 사용하기 위한 용도를 제공한다.
- [18] 본 출원의 또 다른 예는 상기 미생물을 판테놀 생산용 조성물의 제조에 사용하기 위한 용도를 제공한다.

[19]

과제 해결 수단

- [20] 본 출원은 판토에이트-베타-알라닌 리가아제 (pantoate-beta-alanine ligase), 예컨대, 글루타미시박터 할로피토콜라 (*Glutamicibacter halophytocola*) 유래 판토에이트-베타-알라닌 리가아제의 판테놀 생산 및/또는 생산능 향상을 위한 용도에 관한 것이다.
- [21] 본 출원의 일 양상은 판토에이트-베타-알라닌 리가아제의 활성이 강화된 미생물 (균주, 또는 재조합 세포)을 제공한다.
- [22] 본 출원에서 판토에이트-베타-알라닌 리가아제 (pantoate-beta-alanine ligase, 또는 PanC 단백질)는 판토에이트-베타-알라닌 리가아제 활성 (pantoate-beta-alanine ligase activity)을 갖는 단백질이라면 제한 없이 포함할 수 있다. 상기 판토에이트-베타-알라닌 리가아제는 코리네박테리움 속 미생물 (예컨대, 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*)), 에스케리키아 속 미생물 (예컨대, 에스케리키아 콜리 (*Escherichia coli*)), 코랄리오마르가리타 속 미생물 (예컨대, 코랄리오마르가리타 아카지멘시스 (*Coralimargarita akajimensis*)), 액티노박테리아 속 미생물 (예컨대, 액티노박테리아 박테리움 (*Actinobacteria bacterium*)), 니트로소스피라 속 미생물 (예컨대, 니트로소스피라 라쿠스 (*Nitrosospora lacus*)), 니트로소코커스 속 미생물 (예컨대, 니트로소코커스 왓소니 (*Nitrosococcus watsonii*)), 또는 글루타미시박터 속 미생물 (예컨대, 글루타미시박터 할로피토콜라 (*Glutamicibacter halophytocola*)) 유래의 것일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [23] 일 예에서, 상기 판토에이트-베타-알라닌 리가아제는 글루타미시박터 할로피토콜라 유래의 것일 수 있다. 상기 글루타미시박터 할로피토콜라 유래의 판토에이트-베타-알라닌 리가아제는 공지의 데이터 베이스인 NCBI에서 그 서열을 얻을 수 있다 (NCBI Reference Sequence: WP_060700217.1).
- [24] 일 예에서, 상기 글루타미시박터 할로피토콜라 유래의 판토에이트-베타-알라닌 리가아제는 서열번호 43의 아미노산 서열을 가지거나, 포함하거나, 상기 아

미노산 서열로 이루어지거나, 또는 상기 아미노산 서열로 필수적으로 이루어질 (essentially consisting of) 수 있다.

- [25] 일 예에서, 상기 글루타미시박터 할로피토콜라 유래의 판토에이트-베타-알라닌 리가아제는 서열번호 43의 아미노산 서열과 적어도 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 94.44% 이상, 94.79% 이상, 95% 이상, 95.14% 이상, 95.49% 이상, 95.83% 이상, 96% 이상, 96.18% 이상, 96.53% 이상, 96.88% 이상, 97% 이상, 97.22% 이상, 97.57% 이상, 97.92% 이상, 98% 이상, 98.26% 이상, 98.61% 이상, 98.96% 이상, 99% 이상, 99.31% 이상, 99.5% 이상, 99.65% 이상, 99.7% 이상 또는 99.9% 이상의 상동성 또는 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하거나 상기 서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [26] 또한, 이러한 상동성 또는 동일성을 가지며 판토에이트-베타-알라닌 리가아제에 상응하는 효능을 나타내는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환, 보존적 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 변이체도 상기 판토에이트-베타-알라닌 리가아제에 포함될 수 있다. 예를 들어, 상기 아미노산 서열 N-말단, C-말단 및/또는 내부에 판토에이트-베타-알라닌 리가아제 활성 (pantoate-beta-alanine ligase activity)을 변경하지 않는 서열 추가 또는 결실, 자연적으로 발생할 수 있는 돌연변이, 잠재성 돌연변이(silent mutation) 또는 보존적 치환을 가지는 경우일 수 있다.
- [27] 상기 “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. 통상적으로, 보존적 치환은 단백질 또는 폴리펩타이드의 활성에 거의 영향을 미치지 않거나 또는 영향을 미치지 않을 수 있다.
- [28]
- [29] 본 출원에서, 상기 판토에이트-베타-알라닌 리가아제는 판토에이트-베타-알라닌 리가아제 유전자에 의하여 코딩되는 판토에이트-베타-알라닌 리가아제 활성을 갖는 폴리펩타이드일 수 있다. 상기 판토에이트-베타-알라닌 리가아제 유전자는 코리네박테리움 속 미생물 (예컨대, 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*)), 에스케리키아 속 미생물 (예컨대, 에스케리키아 콜리 (*Escherichia coli*)), 코랄리오마르가리타 속 미생물 (예컨대, 코랄리오마르가리타 아카지멘시스 (*Coralimargarita akajimensis*)), 액티노박테리아 속 미생물 (예컨대, 액티노박테리아 박테리움 (*Actinobacteria bacterium*)), 니트로소스피라 속 미생물 (예컨대, 니트로소스피라 라쿠스 (*Nitrosospira lacus*)), 니트로소코커스 속 미생물 (예컨대, 니트로소코커스 왓소니 (*Nitrosococcus watsonii*)) 또는 글루타미시박터 속 미생물 (예컨대, 글루타미시박터 할로피토콜라 (*Glutamicibacter halophytocola*)) 유래의 것일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

- [30] 일 예에서, 상기 판토에이트-베타-알라닌 리가아제 유전자는 글루타미시박터 할로피토콜라 유래의 것일 수 있다. 상기 판토에이트-베타-알라닌 리가아제 유전자는 공지의 데이터 베이스인 NCBI에서 그 서열을 얻을 수 있다 (NCBI Reference Sequence: CP012750.1).
- [31] 일 예에서, 상기 판토에이트-베타-알라닌 리가아제 유전자는 서열번호 42의 핵산 서열을 가지거나, 포함하거나, 상기 핵산 서열로 이루어지거나, 또는 상기 핵산 서열로 필수적으로 이루어질(essentially consisting of) 수 있다.
- [32] 일 예에서, 상기 판토에이트-베타-알라닌 리가아제 유전자는 서열번호 42의 핵산 서열과 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.7% 또는 99.9% 이상의 상동성 또는 동일성을 가지는 핵산 서열을 포함하거나 상기 서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [33]
- [34] 본 출원에서, 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드가 "특정 핵산 서열(염기 서열) 또는 아미노산 서열을 가진다, 포함한다, 상기 서열로 이루어진다, 또는 상기 서열로 필수적으로 이루어진다(essentially consisting of)" 라 함은 상기 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드가 상기 특정 핵산 서열(염기서열) 또는 아미노산 서열을 필수적으로 포함하는 것을 의미할 수 있으며, 상기 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드의 본래의 기능 및/또는 목적하는 기능을 유지하는 범위에서 상기 특정 핵산 서열(염기서열) 또는 아미노산 서열에 변이(결실, 치환, 변형, 및/또는 부가)가 가해진 "실질적으로 동등한 서열"을 포함하는 것(또는 상기 변이를 배제하지 않는 것)으로 해석될 수 있다. 일 예에서, 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드가 "특정 핵산 서열(염기서열) 또는 아미노산 서열을 가진다, 포함한다, 상기 서열로 이루어진다, 또는 상기 서열로 필수적으로 이루어진다" 라 함은 상기 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드가 (i) 상기 특정 핵산 서열(염기서열) 또는 아미노산 서열을 필수적으로 포함하거나, 또는 (ii) 상기 특정 핵산 서열(염기서열) 또는 아미노산 서열과 70% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 98% 이상, 99% 이상, 99.5% 이상, 또는 99.9% 이상의 상동성 또는 동일성을 갖는 핵산 서열 또는 아미노산 서열로 이루어지거나 이를 필수적으로 포함하고 본래의 기능 및/또는 목적하는 기능을 유지하는 것을 의미할 수 있다.
- [35] 일 예에서, 상기 목적하는 기능은 미생물의 판테놀 생산능을 부여하거나, 이를 증가(향상)시키는 기능을 의미할 수 있다.
- [36] 본 출원에서, '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.
- [37] 보존된(conserved) 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드의 서열 상동성 또는 동일성은 표준 배열 알고리즘에 의해 결정되며, 사용되는 프로그램에 의해 확립된 디폴트 갭 페널티가 함께 이용될 수 있다. 실질적으로, 상동성을 갖거나

(homologous) 또는 동일한(identical) 서열은 일반적으로 서열 전체 또는 일부분과 중간 또는 높은 엄격한 조건(stringent conditions)에서 하이브리드할 수 있다. 하이브리드화는 폴리뉴클레오타이드에서 일반 코돈 또는 코돈 축퇴성을 고려한 코돈을 함유하는 폴리뉴클레오타이드와의 하이브리드화 역시 포함됨이 자명하다.

- [38] 임의의 두 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드 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 들어, 국립 생물공학 정보 데이터베이스 센터의 BLAST, 또는 ClustalW를 이용하여 상동성, 유사성 또는 동일성을 결정할 수 있다.

- [39] 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드의 상동성, 유사성 또는 동일성은, 예를 들어, Smith and Waterman, Adv. Appl. Math (1981) 2:482에 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, 뉴클레오타이드 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.

- [40] 상기 판토에이트-베타-알라닌 리가아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 제조합 벡터를 사용하여 미생물에 도입될 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 상기 제조합 벡터는 삽입 벡터 또는 발현 벡터로 사용될 수 있다. 상기 판토에이트-베타-알라닌 리가아제를 미생물에서 발현시키는 것은, 상기 판토에이트-베타-알라닌 리가아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 또는 이를 포함하는 제조합 벡터를 포함하는 제조합 미생물을 배양하는 것에 의하여 수행될 수 있다.

- [41] 상기 판토에이트-베타-알라닌 리가아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 또는 이를 포함하는 재조합 벡터의 미생물로의 도입은 공지된 형질전환 방법을 당업자가 적절히 선택하여 수행될 수 있다. 상기 형질전환 방법은 핵산을 숙주 세포(미생물) 내로 도입하는 어떠한 방법으로도 수행 가능하며, 숙주 세포에 따라 당 분야에서 공지된 형질전환 기술을 적절히 선택하여 수행할 수 있다. 상기 공지된 형질전환 방법으로 전기천공법 (electroporation), 인산칼슘 (CaPO₄) 침전법, 염화칼슘 (CaCl₂) 침전법, 미세주입법 (microinjection), 폴리에틸렌글리콜 (PEG) 침전법 (polyethylene glycol-mediated uptake), DEAE-덱스트란법, 양이온 리포솜법, 리포펙션 (lipofection), 초산 리튬-DMSO법 등이 예시될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [42] 상기 형질전환된 폴리뉴클레오타이드는 숙주 세포 내에서 발현될 수 있지만 한다면, 숙주 세포의 염색체 내에 삽입되어 위치하거나 염색체 외에 위치할 수 있다. 상기 폴리뉴클레오타이드는 숙주 세포 내로 도입되어 발현될 수 있는 것이면, 그 도입되는 형태는 제한이 없다. 예를 들면, 상기 폴리뉴클레오타이드는 자체적으로 발현되는데 필요한 모든 요소를 포함하는 유전자 구조체인 발현 카세트 (expression cassette)의 형태로 숙주 세포에 도입될 수 있다. 상기 발현 카세트는 통상 상기 폴리뉴클레오타이드에 작동 가능하게 연결되어 있는 프로모터 (promoter), 전사 종결신호, 리보솜 결합부위 및/또는 번역 종결신호 등의 발현 조절 요소를 포함할 수 있다. 상기 발현 카세트는 자체 복제가 가능한 발현 벡터 형태일 수 있다. 또한, 상기 폴리뉴클레오타이드는 그 자체의 형태로 숙주세포에 도입되어 숙주세포에서 발현에 필요한 서열과 작동 가능하게 연결되어 있는 것일 수도 있다. 상기에서 용어 "작동 가능하게 연결"된 것이라는 상기 폴리뉴클레오타이드의 전사 조절 (예, 전사 개시)을 수행할 수 있도록 발현조절 요소 (예, 프로모터)와 폴리뉴클레오타이드가 기능적으로 연결되어 있는 것을 의미할 수 있다. 작동 가능한 연결은 당업계의 공지된 유전자 재조합 기술을 이용하여 수행할 수 있다.
- [43] 본 출원에서 사용된 용어 "벡터"는 적합한 숙주 또는 숙주 세포내로 목적 폴리뉴클레오타이드를 전달하기 위한 DNA 제조물을 의미한다. 일 예로 적합한 숙주 내에서 목적 폴리펩타이드를 발현시킬 수 있도록 적합한 발현조절영역(또는 발현조절서열)에 작동 가능하게 연결된 상기 목적 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드의 염기 서열을 포함하는 것일 수 있다. 상기 발현조절영역은 전사를 개시할 수 있는 프로모터, 그러한 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합부위를 코딩하는 서열, 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함할 수 있다. 벡터는 적당한 숙주세포 내로 형질전환된 후, 숙주 계통과 무관하게 복제되거나 기능할 수 있으며, 계통 그 자체에 통합될 수 있다. 일례로 목적 폴리뉴클레오타이드는 염색체 삽입용 벡터를 통해 염색체 내로 삽입될 수 있다. 상기 폴리뉴클레오타이드의 염색체 내로의 삽입은 당업계에 알려진 임의의 방법, 예를 들면, 상동재조합 (homologous recombination)에 의하여 이

루어질 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 폴리펩타이드의 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.

- [44] 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, pDC계, pBR계, pUC계, pBluescriptII계, pGEM계, pTZ계, pCL계 및 pET계 등을 사용할 수 있다. 일 예로, pDZ, pDC, pACYC177, pACYC184, pCL, pECCG117, pUC19, pBR322, pMW118, pCC1BAC 벡터 등을 사용할 수 있다.

[45]

- [46] 본 출원에서 용어, 폴리펩타이드 활성의 “강화”는, 폴리펩타이드의 활성이 내재적 활성에 비하여 증가되는 것을 의미한다. 상기 강화는 활성화(activation), 상향조절(up-regulation), 과발현(overexpression), 증가(increase) 등의 용어와 혼용될 수 있다. 여기서 활성화, 강화, 상향조절, 과발현, 증가는 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. 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 폴리펩타이드의 활성을 의미한다. 이는 “변형 전 활성”과 혼용되어 사용될 수 있다. 폴리펩타이드의 활성이 내재적 활성에 비하여 “강화”, “상향조절”, “과발현” 또는 “증가”한다는 것은, 형질 변화 전 모균주 또는 비변형 미생물이 본래 가지고 있던 특정 폴리펩타이드의 활성 및/또는 농도(발현량)에 비하여 향상된 것을 의미한다.

- [47] 상기 강화는 외래의 폴리펩타이드를 도입하거나, 내재적인 폴리펩타이드의 활성 강화 및/또는 농도(발현량) 증가를 통해 달성할 수 있다. 상기 폴리펩타이드의 활성의 강화 여부는 해당 폴리펩타이드의 활성 정도, 발현량 또는 해당 폴리펩타이드 활성에 의한 산물의 양의 증가로부터 확인할 수 있다.

- [48] 상기 폴리펩타이드의 활성의 강화는 당해 분야에 잘 알려진 다양한 방법의 적용이 가능하며, 목적 폴리펩타이드의 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).

- [49] 구체적으로, 본 출원의 폴리펩타이드의 강화는
- [50] 1) 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 세포 내 카피수 증가;
- [51] 2) 폴리펩타이드를 코딩하는 염색체상의 유전자 발현조절영역을 활성이 강력한 서열로 교체;
- [52] 3) 폴리펩타이드를 코딩하는 유전자 전사체의 개시코돈 또는 5'-UTR 지역을 코딩하는 염기서열의 변형;
- [53] 4) 폴리펩타이드 활성이 강화되도록 상기 폴리펩타이드의 아미노산 서열의 변형;
- [54] 5) 폴리펩타이드 활성이 강화되도록 상기 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열의 변형 (예를 들어, 폴리펩타이드의 활성이 강화되도록 변형된 폴리펩타이드를 코딩하도록 상기 폴리펩타이드 유전자의 폴리뉴클레오티드 서열의 변형);
- [55] 6) 폴리펩타이드의 활성을 나타내는 외래 폴리펩타이드 또는 이를 코딩하는 외래 폴리뉴클레오티드의 도입;
- [56] 7) 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 코돈 최적화;
- [57] 8) 폴리펩타이드의 삼차구조를 분석하여 노출 부위를 선택하여 변형하거나 화학적으로 수식; 또는
- [58] 9) 상기 1) 내지 8) 중 선택된 2 이상의 조합일 수 있으나, 이에, 특별히 제한되는 것은 아니다.
- [59] 보다 구체적으로,
- [60] 상기 1) 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 세포 내 카피수 증가는, 해당 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 작동가능하게 연결된, 숙주와 무관하게 복제되고 기능할 수 있는 벡터의 숙주세포 내로의 도입에 의해 달성되는 것일 수 있다. 또는, 해당 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 숙주세포 내의 염색체 내에 1 카피 또는 2 카피 이상 도입에 의해 달성되는 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.
- [61] 상기 2) 폴리펩타이드를 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.

- [62] 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, yccA 프로모터 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [63] 상기 3) 폴리펩타이드를 코딩하는 유전자 전사체의 개시코돈 또는 5'-UTR 지역을 코딩하는 염기서열 변형은, 예를 들면, 내재적 개시코돈에 비해 폴리펩타이드 발현율이 더 높은 다른 개시코돈을 코딩하는 염기 서열로 치환하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [64] 상기 4) 및 5)의 아미노산 서열 또는 폴리뉴클레오티드 서열의 변형은, 폴리펩타이드의 활성을 강화하도록 상기 폴리펩타이드의 아미노산 서열 또는 상기 폴리펩타이드를 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 증가하도록 개량된 아미노산 서열 또는 폴리뉴클레오티드 서열로의 교체일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 교체는 구체적으로 상동제조합에 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.
- [65] 상기 6) 폴리펩타이드의 활성을 나타내는 외래 폴리뉴클레오티드의 도입은, 상기 폴리펩타이드와 동일/유사한 활성을 나타내는 폴리펩타이드를 코딩하는 외래 폴리뉴클레오티드의 숙주세포 내 도입일 수 있다. 상기 외래 폴리뉴클레오티드는 상기 폴리펩타이드와 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 폴리펩타이드가 생성되어 그 활성이 증가될 수 있다.
- [66] 상기 7) 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 코돈 최적화는, 내재 폴리뉴클레오티드가 숙주세포 내에서 전사 또는 번역이 증가하도록 코돈 최적화한 것이거나, 또는 외래 폴리뉴클레오티드가 숙주세포 내에서 최적화된 전사, 번역이 이루어지도록 이의 코돈을 최적화한 것일 수 있다.
- [67] 상기 8) 폴리펩타이드의 삼차구조를 분석하여 노출 부위를 선택하여 변형하거나 화학적으로 수식하는 것은, 예를 들어 분석하고자 하는 폴리펩타이드의 서열 정보를 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.

- [68] 이와 같은 폴리펩타이드 활성의 강화는, 상응하는 폴리펩타이드의 활성 또는 농도 발현량이 야생형이나 변형 전 미생물 균주에서 발현된 폴리펩타이드의 활성 또는 농도를 기준으로 하여 증가되거나, 해당 폴리펩타이드로부터 생산되는 산물의 양의 증가되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [69]
- [70] 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 약화되는 등의 원인으로 인해서 특정 기작이 강화되거나 약화된 미생물로서, 목적하는 폴리펩타이드, 단백질 또는 산물(예컨대, 판테놀)의 생산을 위하여 유전적 변형(modification)을 포함하는 미생물일 수 있다.
- [71] 본 출원의 미생물은 판토에이트-베타-알라닌 리가아제 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 활성이 강화되도록 유전적으로 변형된 미생물(예컨대, 재조합 미생물)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [72] 본 출원의 미생물(또는 균주, 재조합 세포)은 판테놀 생산능을 가지거나 판테놀 생산능(또는 생산량)이 향상된 미생물일 수 있다.
- [73] 본 출원의 미생물은 자연적으로 판테놀 생산능이 없는 미생물, 또는 판테놀 생산능을 가지고 있는 미생물에 판토에이트-베타-알라닌 리가아제의 활성이 도입 또는 강화되어 판테놀 생산능이 부여되거나 향상된 미생물일 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 상기 판테놀 생산능이 부여되거나 향상된 미생물은 글루탐시 박터 할로피토콜라 유래의 판토에이트-베타-알라닌 리가아제가 도입된 미생물일 수 있다.
- [74] 상기 미생물(또는 균주, 재조합 세포)이 판테놀 생산능(또는 생산량)이 향상되거나 베타-알라닌 또는 판테놀 생산능을 갖는다는 것은 상기 미생물(또는 균주, 재조합 세포)이 비변형 미생물, 재조합 전의 세포, 모균주, 야생형 균주, 및/또는 다른 미생물 유래의 판토에이트-베타-알라닌 리가아제가 도입된 미생물보다 판테놀 생산능이 향상되거나, 판테놀 생산능이 없는 비변형 미생물, 재조합 전의 세포, 모균주 및/또는 야생형 균주와는 달리 판테놀 생산능이 부여된 것을 의미할 수 있다.
- [75] 일 예에 따른 판토에이트-베타-알라닌 리가아제의 활성이 강화된 미생물은 강화 전 미생물, 즉 동종의 비변형 미생물과 비교하여, 판테놀 생산능이 향상(증가)된 것일 수 있다. 본 출원에서, "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 일 예에 따라 판토에이트-베타-알라닌 리가아제의 활성이 강화되지 않거나 강화되기 전의 균주(또는 판토에이트-베타-알라닌 리가아제의 활성의 강화를 유도하는 변이가 도입되지 않거나 도입되기 전의 균주)를 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. 상기 판토에이트-베타-알라닌 리가아제의 활성이 강화된다는 것은 전술한 바와 같다. 일 예에서 상기 판테놀 생산능의 증가 여부를 비교하는 대상 균주인, 비변형 미생물은 야생형 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032 균주일 수 있다.

- [76] 일 예에 따른 판토에이트-베타-알라닌 리가아제의 활성이 강화된 미생물은 글루타미시박터 할로피토콜라 유래의 판토에이트-베타-알라닌 리가아제가 도입된 미생물일 수 있으며, 상기 미생물은 다른 미생물 유래의 판토에이트-베타-알라닌 리가아제가 도입된 미생물과 비교하여, 판테놀 생산능이 더욱 향상(증가)된 것일 수 있다. 상기 다른 미생물 유래의 판토에이트-베타-알라닌 리가아제는 코리네박테리움 속 미생물 (예컨대, 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*)), 에스케리키아 속 미생물 (예컨대, 에스케리키아 콜리 (*Escherichia coli*)), 코랄리오마르가리타 속 미생물 (예컨대, 코랄리오마르가리타 아카지멘시스 (*Coralimargarita akajimensis*)), 또는 액티노박테리아 속 미생물 (예컨대, 액티노박테리아 박테리움 (*Actinobacteria bacterium*)), 니트로소스피라 속 미생물 (예컨대, 니트로소스피라 라쿠스 (*Nitrosospira lacus*), 또는 니트로소코커스 속 미생물 (예컨대, 니트로소코커스 왓소니 (*Nitrosococcus watsonii*) 유래의 것일 수 있다.
- [77] 상기 미생물(또는 균주, 재조합 세포)은 추가적으로 판테놀 생산이 증가되도록 하는 변이를 포함할 수 있고, 상기 변이의 위치 및/또는 변이 대상이 되는 유전자 및/또는 단백질의 종류는 판테놀 생산이 증가되도록 하는 것이면 제한 없이 포함될 수 있다. 상기 재조합 세포는 형질전환이 가능한 세포라면 제한 없이 사용 가능할 수 있다.
- [78] 상기 판테놀은 DL-판테놀 (CAS No. 16485-10-2) 또는 D-판테놀 (CAS No. 81-13-0)일 수 있으며, 일 예에서 D-판테놀일 수 있다.
- [79] 일 예에서, 상기 판테놀 생산능이 향상된 미생물은 변이 전 모균주, 비변형 미생물, 또는 다른 미생물 유래의 판토에이트-베타-알라닌 리가아제가 도입된 미생물과 비교하여, 판테놀 생산능이 약 10% 이상, 약 20% 이상, 약 30% 이상, 약 50% 이상, 약 100% 이상, 약 150% 이상, 약 200% 이상, 약 250% 이상, 약 300% 이상, 약 350% 이상, 약 400% 이상, 약 450% 이상, 약 500% 이상, 약 600% 이상, 약 700% 이상, 약 800% 이상, 약 900% 이상, 또는 약 1000% 이상 증가된 것일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [80] 다른 예에서, 상기 판테놀 생산능이 향상된 미생물은 변이 전 모균주, 비변형 미생물, 또는 다른 미생물 유래의 판토에이트-베타-알라닌 리가아제가 도입된 미생물과 비교하여, 판테놀 생산능이 약 1.1배 이상, 약 1.2배 이상, 약 1.3배 이상, 약 1.5배 이상, 약 2배 이상, 약 2.5배 이상, 약 3배 이상, 약 3.5배 이상, 약 4배 이상, 약 4.5배 이상, 약 5배 이상, 약 6배 이상, 약 7배 이상, 약 8배 이상, 약 9배 이상, 약 10배 이상 증가한 것일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

- [81] 다른 예에서, 상기 판테놀 생산능이 향상된 미생물은 변이 전 모균주, 비변형 미생물, 또는 다른 미생물 유래의 판토에이트-베타-알라닌 리가아제가 도입된 미생물과 비교하여, 판테놀 생산능이 약 0.1 g/l 이상, 약 0.2 g/l 이상, 약 0.3 g/l 이상, 약 0.4 g/l 이상, 약 0.5 g/l 이상, 약 0.6 g/l 이상, 약 0.7 g/l 이상, 약 0.8 g/l 이상, 약 0.9 g/l 이상, 약 1.0 g/l 이상, 약 1.1 g/l 이상, 약 1.2 g/l 이상, 약 1.3 g/l 이상, 약 1.4 g/l 이상, 약 1.5 g/l 이상, 약 1.6 g/l 이상, 약 1.7 g/l 이상, 약 1.8 g/l 이상, 약 1.9 g/l 이상, 약 2.0 g/l 이상, 약 2.5 g/l 이상, 또는 약 3.0 g/l 이상 증가한 것일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [82] 상기 용어 “약(about)”은 ± 0.5 , ± 0.4 , ± 0.3 , ± 0.2 , ± 0.1 등을 모두 포함하는 범위로, 약이란 용어 뒤에 나오는 수치와 동등하거나 유사한 범위의 수치를 모두 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [83] 일 예에서, 상기 판토에이트-베타-알라닌 리가아제의 활성이 강화된 미생물은 코리네박테리움 속(*Corynebacterium* sp.) 미생물일 수 있다. 상기 코리네박테리움 속 미생물은 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*), 코리네박테리움 크루디락티스 (*Corynebacterium crudilactis*), 코리네박테리움 데세르티 (*Corynebacterium deserti*), 코리네박테리움 이피시엔스 (*Corynebacterium efficiens*), 코리네박테리움 칼루네 (*Corynebacterium callunae*), 코리네박테리움 스테이션리스 (*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 테스트디노리스 (*Corynebacterium testudinoris*), 및 코리네박테리움 플라베스센스 (*Corynebacterium flavescens*)로 이루어지는 미생물 중에서 선택되는 1종 이상일 수 있다.
- [84]
- [85] 본 출원의 또 다른 하나의 양상은 본 출원의 미생물을 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, 판테놀 생산방법 (또는 제조방법)을 제공한다.
- [86] 본 출원의 판테놀 생산방법은 본 출원의 미생물을 배지에서 배양하는 단계를 포함할 수 있다. 본 출원의 미생물, 판테놀 등에 대해서는 전술한 바와 같다.
- [87] 본 출원에서, “배양”은 본 출원의 판토에이트-베타-알라닌 리가아제의 활성이 강화된 미생물, 예컨대 코리네박테리움 글루타미쿰 균주를 적당히 조절된 환경 조건에서 생육시키는 것을 의미한다. 본 출원의 배양과정은 당업계에 알려진 적당한 배지와 배양조건에 따라 이루어질 수 있다. 이러한 배양 과정은 선택되는 균주에 따라 당업자가 용이하게 조정하여 사용할 수 있다. 구체적으로 상기 배양은 회분식, 연속식 및/또는 유가식일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [88] 본 출원에서, “배지”는 본 출원의 판토에이트-베타-알라닌 리가아제의 활성이 강화된 미생물, 예컨대 코리네박테리움 글루타미쿰 균주를 배양하기 위해 필요

로 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.

- [89] 구체적으로, 본 출원의 미생물, 예컨대 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 찾아볼 수 있다.
- [90] 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, 라이신 등과 같은 아미노산 등이 포함될 수 있다. 또한, 전분 가수분해물, 당밀, 블랙스트랩 당밀, 쌀겨울, 카사버, 사탕수수 찌꺼기 및 옥수수 침지액 같은 천연의 유기 영양원을 사용할 수 있으며, 구체적으로는 글루코오스 및 살균된 전처리 당밀(즉, 환원당으로 전환된 당밀) 등과 같은 탄수화물이 사용될 수 있으며, 그 외의 적정량의 탄소원을 제한 없이 다양하게 이용할 수 있다. 이들 탄소원은 단독으로 사용되거나 2종 이상이 조합되어 사용될 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [91] 상기 질소원으로는 암모니아, 황산암모늄, 염화암모늄, 초산암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄, 질산암모늄 등과 같은 무기질소원; 글루탐산, 메티오닌, 글루타민 등과 같은 아미노산, 펩톤, NZ-아민, 육류 추출물, 효모 추출물, 맥아 추출물, 옥수수 침지액, 카세인 가수분해물, 어류 또는 그의 분해생성물, 탈지 대두 케이크 또는 그의 분해 생성물 등과 같은 유기 질소원이 사용될 수 있다. 이들 질소원은 단독으로 사용되거나 2종 이상이 조합되어 사용될 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [92] 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.
- [93] 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 유

지하기 위해 기체의 주입 없이 혹은 질소, 수소 또는 이산화탄소 가스를 주입할 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [94] 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.
- [95] 본 출원의 배양에 의하여 생산된 판테놀은 배지 중으로 분리되거나 세포 내에 잔류할 수 있다.
- [96] 본 출원의 판테놀 생산방법은, 본 출원의 미생물(균주)을 준비하는 단계, 상기 미생물을 배양하기 위한 배지를 준비하는 단계, 또는 이들의 조합(순서에 무관, in any order)을, 예를 들어, 상기 배양하는 단계 이전에, 추가로 포함할 수 있다.
- [97] 본 출원의 판테놀 생산방법은, 상기 배양에 따른 배지(배양이 수행된 배지) 또는 미생물(예컨대, 코리네박테리움 속 균주)로부터 판테놀을 회수하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 회수하는 단계는 상기 배양하는 단계 이후에 추가로 포함될 수 있다.
- [98] 상기 회수는 본 출원의 미생물의 배양 방법, 예를 들어 회분식, 연속식 또는 유가식 배양 방법 등에 따라 당해 기술 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 목적하는 판테놀을 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 목적하는 판테놀을 회수할 수 있다.
- [99] 또한, 본 출원의 판테놀 생산방법은, 추가적으로 정제 단계를 포함할 수 있다. 상기 정제는 당해 기술분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여, 수행할 수 있다. 일 예에서, 본 출원의 판테놀 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.
- [100]
- [101] 본 출원의 또 다른 하나의 양상은 본 출원의 미생물, 상기 미생물을 배양한 배지, 또는 이들의 조합을 포함하는 판테놀 생산용 조성물을 제공하는 것이다.
- [102] 본 출원의 또 다른 하나의 양상은 상기 미생물을 판테놀 생산에 사용하기 위한 용도를 제공하는 것이다.
- [103] 본 출원의 또 다른 하나의 양상은 상기 미생물을 판테놀 생산용 조성물의 제조에 사용하기 위한 용도를 제공하는 것이다.
- [104] 본 출원의 조성물은 판테놀 생산용 조성물에 통상 사용되는 임의의 적합한 부형제를 추가로 포함할 수 있으며, 이러한 부형제는, 예를 들어 보존제, 습윤제, 분

산제, 현탁화제, 완충제, 안정화제 또는 등장화제 등일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[105] 본 출원의 조성물에서, 미생물(균주), 배지, 판테놀 등은 상기 다른 양상에서 기재한 바와 같다.

[106]

발명의 효과

[107] 본 출원은 글루타미시박터 할로피토콜라 유래 판토에이트-베타-알라닌 리가아제의 활성이 강화된 미생물을 제공하며, 상기 미생물은 판테놀의 생산능이 우수하다.

[108]

발명의 실시를 위한 형태

[109] 이하 본 출원을 실시예에 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 출원을 예시적으로 설명하기 위한 것으로, 본 출원의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니며, 본 출원이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 명백할 것이다.

[110]

[111] 실시예 1. **panC** 유전자 발현 강화를 위한 벡터 제작

[112] 본 실시예에서는 판테놀의 생합성 유전자 중 하나로 알려진 **panC** 유전자의 발현이 강화되었을 때 판테놀의 생산능을 비교하기 위한 강화 벡터를 제작하였다.

[113]

[114] 구체적으로, 코리네박테리움 글루타미쿰 유래 및 외래 6종의 **panC** 유전자를 각각 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032 염색체 상에서 추가 삽입시키기 위하여 하기의 방법으로 재조합 플라스미드 벡터를 제작하였다.

[115] 먼저 염색체상에 **panC** 유전자 삽입을 위해 NCgl2284 (Transposase) 유전자를 제거하기 위한 벡터를 제작하였다. 미국 국립생물공학정보센터(NCBI)에서 제공하는 코리네박테리움 글루타미쿰 NCgl2284 유전자 및 주변 서열(서열번호 1)에 근거, 염색체 상에서 NCgl2284 유전자를 결손시키기 위한 벡터를 제작하기 위해 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032의 염색체 DNA를 주형으로 하여 서열번호 2 및 서열번호 3, 서열번호 4 및 서열번호 5의 프라이머를 이용하여 각각 PCR을 수행하였다. 상기 PCR은 PfuUltra™ 고-신뢰 DNA 폴리머라제(Stratagene)를 사용하여 수행하였으며, PCR 조건은 95 °C에서 5분간 변성 후, 95 °C 30초 변성, 55 °C 30초 어닐링, 72 °C 1분 중합을 30회 반복한 후, 72 °C에서 5분간 중합반응을 수행하였다. 그 결과 각각 1 Kb의 DNA 단편들을 수득하였다. 제한효소 *smaI*으로 처리한 코리네박테리움 글루타미쿰 내에서 복제가 불가능한 pDCM2 벡터(대한민국 등록특허 제10-2278000호)와 상기 증폭한 NCgl2284 유전자 단편들을 몰농도 (M) 2:1:1 (pDCM2 벡터 : NCgl2284 단편 1 : NCgl2284 단편 2)이 되도록 하여

다카라(TaKaRa)의 Infusion Cloning Kit를 사용하여 제공된 매뉴얼에 따라 클로닝함으로써 플라스미드를 획득하였고, pDCM2- Δ NCgl2284 으로 명명하였다.

[116]

[117] 다음 코리네박테리움 글루타미쿰 유래 및 외래 6종의 panC 유전자를 획득하였다. 구체적으로 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*) 또는 에스케리키아 콜리 (*Escherichia coli*) 유래의 panC 유전자는 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032 균주 또는 에스케리키아 콜리 K-12 substr MG1655 균주로부터 추출된 게놈 DNA를 주형으로 각각 서열번호 8 및 서열번호 9, 서열번호 12 및 서열번호 13의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하여 획득하였다. 코랄리오마르가리타 아카지멘시스 (*Coralimargarita akajimensis*), 액티노박테리아 박테리움 (*Actinobacteria bacterium*), 니트로소스피라 라쿠스 (*Nitrosospora lacus*), 니트로소코커스 왓소니 (*Nitrosococcus watsonii*) 및 글루타미시박터 할로피토클라 (*Glutamicibacter halophytocola*) 유래의 panC 유전자는 NCBI의 Genbank 데이터베이스상의 서열(Accession: CP001998.1, CP011489.1, CP021106.3, CP002086.1 및 CP012750.1)에 기초하여 PanC 단백질 코딩 서열을 합성한 후 이를 주형으로 하여 각각 서열번호 16 및 서열번호 17, 서열번호 20 및 서열번호 21, 서열번호 24 및 서열번호 25, 서열번호 28 및 서열번호 29, 서열번호 32 및 서열번호 33의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하여 획득하였다. PCR은 PfuUltraTM 고-신뢰 DNA 폴리머라제(Stratagene)를 사용하여 수행하였으며, PCR 조건은 95 °C에서 5분간 변성 후, 95 °C 30초 변성, 55 °C 30초 어닐링, 72 °C 1분 중합을 30회 반복한 후, 72 °C에서 5분간 중합반응을 수행하였다. 또한 코리네박테리움 글루타미쿰 유래 및 외래 6종의 panC 발현을 유도하기 위한 프로모터로 코리네박테리움 암모니아게네스 유래의 CJ7 프로모터(대한민국 등록특허 제10-0620092호)를 사용하고자, 코리네박테리움 암모니아게네스 ATCC6872의 염색체 DNA 서열을 주형으로 각각 서열번호 6 및 서열번호 7, 서열번호 10 및 서열번호 11, 서열번호 14 및 서열번호 15, 서열번호 18 및 서열번호 19, 서열번호 22 및 서열번호 23, 서열번호 26 및 서열번호 27, 서열번호 30 및 서열번호 31의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR은 PfuUltraTM 고-신뢰 DNA 폴리머라제(Stratagene)를 사용하여 수행하였으며, PCR 조건은 95 °C에서 5분간 변성 후, 95 °C 30초 변성, 55 °C 30초 어닐링, 72 °C 30초 중합을 30회 반복한 후, 72 °C에서 5분간 중합반응을 수행하였다. 그 결과 코리네박테리움 글루타미쿰 1종 및 외래 6종의 panC 유전자 단편 및 상기 7종의 panC 유전자를 발현하기 위한 각각의 CJ7 프로모터를 획득할 수 있었다.

[118]

[119] 제한효소 SmaI으로 처리한 pDCM2- Δ NCgl2284 벡터 상기 증폭된 CJ7 프로모터 및 panC 유전자 단편을 각각 물농도 (M) 2:1:1 (pDCM2- Δ NCgl2284 벡터 : CJ7 promoter: panC)이 되도록 하여 다카라(TaKaRa)의 Infusion Cloning Kit를 사용하여 제공된 매뉴얼에 따라 반응 후, 대장균 DH5 α 에 형질전환하고 카나마이신(25

mg/l)이 포함된 LB 고체배지에 도말하였다. 서열번호 34 및 서열번호 35의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하여 목적인 유전자가 삽입된 벡터로 형질 전환된 콜로니를 선별한 후 플라스미드 추출법을 이용하여 총 7종의 플라스미드를 추출하고 아래와 같이 명명하였다:

- [120] pDCM2_ΔNCgl2284::Pcj7-panC(Cgl) (코리네박테리움 글루타미쿰 유래 panC 도입 벡터)
- [121] pDCM2_ΔNCgl2284::Pcj7-panC(Eco) (에스케리키아 콜리 유래 panC 도입 벡터)
- [122] pDCM2_ΔNCgl2284::Pcj7-panC(Cak) (코랄리오마르가리타 아카지멘시스 유래 panC 도입 벡터)
- [123] pDCM2_ΔNCgl2284::Pcj7-panC(Aba) (액티노박테리아 박테리움 유래 panC 도입 벡터)
- [124] pDCM2_ΔNCgl2284::Pcj7-panC(Nla) (니트로소스피라 라쿠스 유래 panC 도입 벡터),
- [125] pDCM2_ΔNCgl2284::Pcj7-panC(Nwa) (니트로소코커스 왓소니 유래 panC 도입 벡터)
- [126] pDCM2_ΔNCgl2284::Pcj7-panC(Gha) (글루타미시박터 할로피토콜라 유래 panC 도입 벡터).
- [127] 상기 획득된 7종의 플라스미드의 이름과 도입된 유전자 정보 및 서열정보를 아래 표 1에 표기하였다.
- [128] [표1]

코리네박테리움 글루타미쿰 및 외래 6종 panC 유전자 강화 벡터 제작을 위한 유전자 및 서열정보

PanC 유래	플라스미드	프라이머 서열번호
코리네박테리움 글루타미쿰 (<i>Corynebacterium glutamicum</i>) * 유전자 서열: 서열번호 36	pDCM2_ΔNCgl2284::Pcj7-panC(Cgl)	서열번호 6, 7 / 8, 9
에스케리키아 콜리 (<i>Escherichia coli</i>)* 유전자 서열: 서열번호 37	pDCM2_ΔNCgl2284::Pcj7-panC(Eco)	서열번호 10, 11 / 12, 13
코랄리오마르가리타 아카지멘시스 (<i>Coralimargarita akajimensis</i>)* 유전자 서열: 서열번호 38	pDCM2_ΔNCgl2284::Pcj7-panC(Cak)	서열번호 14, 15 / 16, 17

액티노박테리아 박테리움 (<i>Actinobacteria bacterium</i>)* 유전자 서열: 서열번호 39	pDCM2_ΔNCgl2284 ::Pcj7-panC(Aba)	서열번호 18, 19 / 20, 21
니트로소스피라 라쿠스 (<i>Nitrosospora lacus</i>)* 유전자 서열: 서열번호 40	pDCM2_ΔNCgl2284 ::Pcj7-panC(Nla)	서열번호 22, 23 / 24, 25
니트로소코커스 왓소니 (<i>Nitrosococcus watsonii</i>)* 유전자 서열: 서열번호 41	pDCM2_ΔNCgl2284 ::Pcj7-panC(Nwa)	서열번호 26, 27 / 28, 29
글루타미시박터 할로피토콜라 (<i>Glutamicibacter halophytocola</i>)* 유전자 서열: 서열번호 42	pDCM2_ΔNCgl2284 ::Pcj7-panC(Gha)	서열번호 30, 31 / 32, 33

[129] 실시예 2. 판토에이트-베타-알라닌-리가아제 강화 균주의 판테놀 생산능 평가
[130] 실시예 1에서 제작된 pDCM2-ΔNCgl2284, pDCM2-ΔNCgl2284::Pcj7-panC(Cgl),

pDCM2-ΔNCgl2284::Pcj7-panC(Eco), pDCM2-ΔNCgl2284::Pcj7-panC(Cak),
pDCM2-ΔNCgl2284::Pcj7-panC(Aba), pDCM2_ΔNCgl2284::Pcj7-panC(Nla),
pDCM2_ΔNCgl2284::Pcj7-panC(Nwa) 및 pDCM2-ΔNCgl2284::Pcj7-panC(Gha)
백터를 염색체 상에서의 상동 재조합에 의해 야생형 코리네박테리움 글루타미
쿰 ATCC13032 균주에 각각 전기천공법으로 형질전환시켰다. (van der Rest et
al., Appl Microbiol Biotechnol 52:541-545, 1999). 그 후, 수크로오스를 포함하고
있는 고체배지에서 2차 재조합을 하였다. 2차 재조합이 완료된 상기 코리네박
테리움 글루타미쿰 형질전환주를 대상으로 서열번호 34 및 서열번호 35의 프
라이머를 이용하여 PCR법을 통하여 NCgl2284이 결손된 균주 및 NCgl2284가
결손되면서 panC 유전자가 삽입된 균주를 확인하였고, 각 재조합 균주를 각각
13032_ΔNCgl2284, CJPTN-01 (13032_ΔNCgl2284::Pcj7-panC(Cgl)), CJPTN-02
(13032_ΔNCgl2284::Pcj7-panC(Eco)), CJPTN-03 (13032_ΔNCgl2284::Pcj7-
panC(Cak)), CJPTN-04 (13032_ΔNCgl2284::Pcj7-panC(Aba)), CJPTN-05
(13032_ΔNCgl2284::Pcj7-panC(Nla)), CJPTN-06 (13032_ΔNCgl2284::Pcj7-
panC(Nwa)) 및 CJPTN-07 (13032_ΔNCgl2284::Pcj7-panC(Gha))라 명명하였다.

[131]

[132] 상기 균주들의 판테놀 생산능을 분석하기 위해 아래와 같은 방법으로 배양하였
다.

[133]

[134] 하기의 생산배지 25 ml을 함유하는 250 ml 코너-바플 플라스크에
13032_ΔNCgl2284, CJPTN-01, CJPTN-02, CJPTN-03, CJPTN-04, CJPTN-05,
CJPTN-06 및 CJPTN-07를 접종하고, 33 °C에서 40시간동안 200 rpm으로 진

탕 배양하여 얻어진 배양액을 20,000 rcf에서 10분동안 원심분리 후 상등액을 TDW(triple distilled water)로 1/5 희석한 후 HPLC 분석을 수행하여 판테놀 농도를 측정하고, 그 결과를 하기의 표 2에 나타내었다.

[135] <판테놀 생산배지>

[136] 포도당 10%(w/v), 효모추출물 0.4%(w/v), 황산암모늄 1.5%(w/w), 제1인산칼륨 0.1%(w/v), 황산마그네슘 7수염 0.05%(w/v), 황산철 7수염 10 mg/l, 황산망간 1수염 6.7 mg/l, 비오틴 50 µg/l, 티아민·HCl 100 µg/l, 3-아미노프로판올 0.3%, 판토에이트 0.3%, pH 7.0

[137]

[138] [표2]

panC 발현이 증가된 균주의 판테놀 생산능

	판테놀 농도 (g/L)
13032_ΔNCgl2284	0.0
CJPTN-01	0.0
CJPTN-02	0.2
CJPTN-03	0.0
CJPTN-04	0.0
CJPTN-05	0.0
CJPTN-06	0.0
CJPTN-07	0.9

[139] 상기 표 2에서 확인할 수 있는 바와 같이, 내재의 판토에이트-베타-알라닌-리가아제 과발현 균주 CJPTN-01은 판테놀을 생성하지 못하였고, 에스케리키아 콜리 (*Escherichia coli*) 유래 판토에이트-베타-알라닌-리가아제 과발현 균주 CJPTN-02은 판테놀 0.2 g/L을 생성하였다.

[140] 코랄리오마르가리타 아카지멘시스 (*Coralimargarita akajimensis*), 액티노박테리아 박테리움 (*Actinobacteria bacterium*), 니트로소스피라 라쿠스 (*Nitrosospira lacus*), 니트로소코커스 왓소니 (*Nitrosococcus watsonii*) 유래의 판토에이트-베타-알라닌-리가아제 과발현 균주 CJPTN-03, CJPTN-04, CJPTN-05 및 CJPTN-06은 판테놀을 생산하지 못하였고, 글루타미시박터 할로피토콜라 (*Glutamicibacter halophytocola*) 유래의 판토에이트-베타-알라닌-리가아제 과발현 균주 CJPTN-07은 0.9 g/L 판테놀을 생산하였고, 이는 에스케리키아 콜리 (*Escherichia coli*) 유래의 PanC가 도입된 균주와 비교하여 4.5배 높은 결과이다.

[141] 상기 결과를 통해 글루타미시박터 할로피토콜라 (*Glutamicibacter halophytocola*) 유래의 판토에이트-베타-알라닌-리가아제에 의하여 판테놀 생산이 대폭 증가되었음을 확인할 수 있었다.

[142]

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

청구범위

- [청구항 1] 글루타미시박터 할로피토콜라 (*Glutamicibacter halophytocola*) 유래의 판토에이트-베타-알라닌 리가아제 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드가 도입된, 판테놀을 생산하는 미생물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 판토에이트-베타-알라닌 리가아제는 PanC 단백질을 인, 미생물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 판토에이트-베타-알라닌 리가아제는 서열번호 43의 아미노산 서열 또는 이와 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것인, 미생물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 판토에이트-베타-알라닌 리가아제는 서열번호 42의 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드에 의해 코딩되는 것인, 미생물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 미생물은 코리네박테리움 속 미생물인, 미생물.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 코리네박테리움 속 미생물은 코리네박테리움 글루타미쿰인, 미생물.
- [청구항 7] 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 미생물은 상기 판토에이트-베타-알라닌 리가아제 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드가 도입되지 않은 모균주에 비하여 판테놀의 생산능이 증가된, 미생물.
- [청구항 8] 글루타미시박터 할로피토콜라 유래의 판토에이트-베타-알라닌 리가아제 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드가 도입된 미생물을 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, 판테놀의 생산방법.
- [청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 미생물은 코리네박테리움 속 미생물인, 판테놀의 생산방법.
- [청구항 10] 제8항에 있어서, 상기 배양에 따른 배지 또는 미생물로부터 판테놀을 회수하는 단계를 추가로 포함하는, 판테놀의 생산방법.
- [청구항 11] 글루타미시박터 할로피토콜라 유래의 판토에이트-베타-알라닌 리가아제 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드가 도입된 미생물을 포함하는 판테놀 생산용 조성물.
- [청구항 12] 제11항에 있어서, 상기 미생물은 코리네박테리움 속 미생물인, 판테놀 생산용 조성물.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/001306

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/77(2006.01)i; C12N 9/00(2006.01)i; C12P 13/02(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 15/77(2006.01); C12N 1/21(2006.01); C12N 15/09(2006.01); C12N 15/10(2006.01); C12N 9/10(2006.01);
C12P 13/02(2006.01); C12P 7/42(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: 글루타미시박터 할로피토콜라(glutamicibacter halophytocola), 판토에이트-베타-알라닌 리가아제(pantoate-beta-alanine ligase), PanC, 코리네박테리움 글루타미쿰(corynebacterium glutamicum), 판테놀(panthenol)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2007-131750 A1 (DSM IP ASSETS B.V. et al.) 22 November 2007 (2007-11-22) See claims 1 and 4.	1-12
A	KR 10-2001-0050399 A (DEGUSSA-HULS AKTIENGESELLSCHAFT et al.) 15 June 2001 (2001-06-15) See entire document.	1-12
A	KR 10-2000-0047833 A (DEGUSSA-HULS AKTIENGESELLSCHAFT et al.) 25 July 2000 (2000-07-25) See entire document.	1-12
A	KR 10-2003-0074597 A (BASF AKTIENGESELLSCHAFT) 19 September 2003 (2003-09-19) See entire document.	1-12
A	KR 10-2022-0003411 A (CJ CHEILJEDANG CORPORATION) 10 January 2022 (2022-01-10) See entire document.	1-12



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
“D” document cited by the applicant in the international application
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 April 2024

Date of mailing of the international search report

01 May 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/KR2024/001306

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2000-116387 A (DEGUSSA HUELS AG) 25 April 2000 (2000-04-25) See entire document.	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/001306

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/KR2024/001306

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2007-131750	A1	22 November 2007	CN	101448950	A	03 June 2009
				CN	101448950	B	12 February 2014
KR	10-2001-0050399	A	15 June 2001	CN	100288061	A	21 March 2001
				EP	1083225	A1	14 March 2001
				JP	2001-112489	A	24 April 2001
KR	10-2000-0047833	A	25 July 2000	CN	100256313	A	14 June 2000
				EP	1006189	A2	07 June 2000
				EP	1006189	A3	17 September 2003
				JP	2000-166580	A	20 June 2000
				US	6177264	B1	23 January 2001
KR	10-2003-0074597	A	19 September 2003	EP	1322766	A2	02 July 2003
				EP	1921151	A1	14 May 2008
				JP	2004-509625	A	02 April 2004
				US	2003-0170775	A1	11 September 2003
				US	2008-0131942	A1	05 June 2008
				WO	02-24917	A2	28 March 2002
				WO	02-24917	A3	27 June 2002
KR	10-2022-0003411	A	10 January 2022	CN	114096663	A	25 February 2022
				CN	114096663	B	26 September 2023
				CN	115960809	A	14 April 2023
				EP	4032977	A1	27 July 2022
				EP	4032977	A4	06 March 2024
				KR	10-2022-0003476	A	10 January 2022
				KR	10-2389327	B1	20 April 2022
				KR	10-2434925	B1	19 August 2022
JP	2000-116387	A	25 April 2000	WO	2022-005225	A1	06 January 2022
				CN	100254758	A	31 May 2000
				EP	1001027	A2	17 May 2000
				EP	1001027	A3	16 August 2001
				EP	1001027	B1	06 May 2004
				EP	1001027	B2	24 June 2009
				KR	10-2000-0028952	A	25 May 2000
				US	6171845	B1	09 January 2001

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 15/77(2006.01)i; C12N 9/00(2006.01)i; C12P 13/02(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 15/77(2006.01); C12N 1/21(2006.01); C12N 15/09(2006.01); C12N 15/10(2006.01); C12N 9/10(2006.01); C12P 13/02(2006.01); C12P 7/42(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: 글루타미시박터 할로피토콜라(glutamicibacter halophytocola), 판토에이트-베타-알라닌 리가아제(pantoate-beta-alanine ligase), PanC, 코리네박테리움 글루타미쿰(corynebacterium glutamicum), 판테놀(panthenol)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	WO 2007-131750 A1 (DSM IP ASSETS B.V. 등) 2007.11.22 청구항 1, 4	1-12
A	KR 10-2001-0050399 A (테구사-웰스 악티엔게젤샤프트 등) 2001.06.15 전문	1-12
A	KR 10-2000-0047833 A (테구사-웰스 악티엔게젤샤프트 등) 2000.07.25 전문	1-12
A	KR 10-2003-0074597 A (바스프 악티엔게젤샤프트) 2003.09.19 전문	1-12
A	KR 10-2022-0003411 A (씨제이제일제당 (주)) 2022.01.10 전문	1-12
☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2024년04월30일(30.04.2024)	국제조사보고서 발송일 2024년05월01일(01.05.2024)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578	심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373	

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	JP 2000-116387 A (DEGUSSA HUELS AG) 2000.04.25 전문	1-12

제1기제란 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
WO 2007-131750 A1	2007/11/22	CN 101448950 A	2009/06/03
		CN 101448950 B	2014/02/12
KR 10-2001-0050399 A	2001/06/15	CN 100288061 A	2001/03/21
		EP 1083225 A1	2001/03/14
		JP 2001-112489 A	2001/04/24
KR 10-2000-0047833 A	2000/07/25	CN 100256313 A	2000/06/14
		EP 1006189 A2	2000/06/07
		EP 1006189 A3	2003/09/17
		JP 2000-166580 A	2000/06/20
		US 6177264 B1	2001/01/23
KR 10-2003-0074597 A	2003/09/19	EP 1322766 A2	2003/07/02
		EP 1921151 A1	2008/05/14
		JP 2004-509625 A	2004/04/02
		US 2003-0170775 A1	2003/09/11
		US 2008-0131942 A1	2008/06/05
		WO 02-24917 A2	2002/03/28
		WO 02-24917 A3	2002/06/27
KR 10-2022-0003411 A	2022/01/10	CN 114096663 A	2022/02/25
		CN 114096663 B	2023/09/26
		CN 115960809 A	2023/04/14
		EP 4032977 A1	2022/07/27
		EP 4032977 A4	2024/03/06
		KR 10-2022-0003476 A	2022/01/10
		KR 10-2389327 B1	2022/04/20
		KR 10-2434925 B1	2022/08/19
JP 2000-116387 A	2000/04/25	WO 2022-005225 A1	2022/01/06
		CN 100254758 A	2000/05/31
		EP 1001027 A2	2000/05/17
		EP 1001027 A3	2001/08/16
		EP 1001027 B1	2004/05/06
		EP 1001027 B2	2009/06/24
		KR 10-2000-0028952 A	2000/05/25
		US 6171845 B1	2001/01/09