

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2022년 5월 27일 (27.05.2022)



(10) 국제공개번호

WO 2022/108383 A1

- (51) 국제특허분류: *C12N 15/77* (2006.01) *C12P 13/14* (2006.01) 공개:
C12N 9/88 (2006.01) — 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
— 명세서와 별도로 규칙 13의2에 의하여 제출한 기탁된 생물학적 물질에 관한 표시와 함께 (규칙 13의2.4(d)(i) 및 48.2(a)(viii))
— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2021/017074
- (22) 국제출원일: 2021년 11월 19일 (19.11.2021)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2020-0156903 2020년 11월 20일 (20.11.2020)KR
- (71) 출원인: 씨제이제일제당 (주) (CJ CHEILJEDANG CORPORATION) [KR/KR]; 04560 서울시 중구 동호로 330, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 최수진 (CHOI, Su Jin); 04560 서울시 중구 동호로 330, Seoul (KR). 양선영 (YANG, Sunyoung); 04560 서울시 중구 동호로 330, Seoul (KR). 이광우 (LEE, Kwang Woo); 04560 서울시 중구 동호로 330, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 특허법인한얼 (HANOL INTELLECTUAL PROPERTY AND LAW); 05836 서울시 송파구 법원로 135, 6층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, 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, 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, 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).



WO 2022/108383 A1

(54) Title: MICROORGANISM HAVING ENHANCED L-GLUTAMINE PRODUCING ABILITY, AND L-GLUTAMINE PRODUCING METHOD USING SAME

(54) 발명의 명칭: L-글루타민 생산능이 향상된 미생물 및 이를 이용한 L-글루타민 생산 방법

(57) Abstract: The present application relates to a microorganism having enhanced L-glutamine producing ability, and an L-glutamine producing method using same.

(57) 요약서: 본 출원은 L-글루타민 생산능이 향상된 미생물 및 이를 이용한 L-글루타민 생산 방법에 관한 것이다.

명세서

발명의 명칭: L-글루타민 생산능이 향상된 미생물 및 이를 이용한 L-글루타민 생산 방법

기술분야

[1] 본 출원은 L-글루타민 생산능이 향상된 미생물 및 이를 이용한 L-글루타민 생산 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

[3] L-글루타민은 소화기질환치료, 간기능강화제, 뇌기능강화제, 면역증강제, 위궤양치료제, 알콜중독치료제, 화장품의 보습제, 그리고 운동 영양제, 환자 영양제등 의약품, 화장품, 건강식품 등에 널리 쓰이는 아미노산이다.

[4] 미생물을 통한 L-글루타민 생산에는 대표적으로 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*)과 대장균 (*Escherichia coli*)이 이용되고 있다.

L-글루타민 생합성 경로를 살펴보면 해당과정 (Glycolysis)과 TCA 회로 (Tricarboxylic acid cycle)를 통해 생성되는 알파-케토글루탐산 (α -keto glutaric acid)을 전구체로 하여, 글루탐산 탈수소 효소 (Glutamate dehydrogenase)에 의해 L-글루탐산 (L-glutamate)이 생성되고, 글루타민 신테타아제 (Glutamine synthetase)의 반응을 통해 최종적으로 L-글루타민이 생성된다(Production of glutamate and glutamate-related aminoacids: Molecular Mechanism Analysis and Metabolic Engineering, Amino acid Biosynthesis-pathways, regulation and metabolic engineering pp1-38).

[5] 다만, L-글루타민의 수요 증가에 따라 효과적인 L-글루타민의 생산능 증가를 위한 연구가 여전히 필요한 실정이다.

[6]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[7] 본 발명자들은 L-글루타민 생산능 증가를 위해 예의 노력한 결과, 포스포에놀피루베이트 카르복시키나아제 (Phosphoenolpyruvate carboxykinase)를 포함하는 미생물에서 L-글루타민이 높은 효율로 생산되는 것을 확인하여 본 출원을 완성하였다.

[8]

과제 해결 수단

[9] 본 출원의 하나의 목적은 포스포에놀피루베이트 카르복시키나아제 (Phosphoenolpyruvate carboxykinase) 활성이 약화되고 L-글루타민 생산능을 가지는, 코리네박테리움 속 미생물을 제공하는 것이다.

[10] 본 출원의 다른 목적은 포스포에놀피루베이트 카르복시키나아제 활성이

약화되고 L-글루타민 생산능을 가지는 코리네박테리움 속 미생물을 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, L-글루타민 생산 방법을 제공하는 것이다.

[11] 본 출원의 또 하나의 목적은 포스포에놀피루베이트 카르복시키나아제를 약화하는 단계를 포함하는, L-글루타민 생산용 미생물의 제조방법을 제공하는 것이다.

[12] 본 출원의 또 하나의 목적은 포스포에놀피루베이트 카르복시키나아제가 약화된 미생물; 이를 배양한 배지; 또는 이들의 조합을 포함하는, L-글루타민 생산용 조성물을 제공하는 것이다.

[13] 본 출원의 또 하나의 목적은 포스포에놀피루베이트 카르복시키나아제가 약화된, 코리네박테리움 속 미생물의 L-글루타민 생산 용도를 제공하는 것이다.

[14]

발명의 효과

[15] 본 출원에 따른 약화된 포스포에놀피루베이트 카르복시키나아제 (Phosphoenolpyruvate carboxykinase)를 포함하는 미생물은 L-글루타민을 높은 효율로 생산할 수 있다. 제조된 L-글루타민은 동물 사료 또는 동물 사료 첨가제뿐만 아니라 인간의 식품 또는 식품 첨가제, 의약품 등 다양한 제품에 응용될 수 있다.

[16]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[17] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 출원에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 출원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 출원의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 출원의 범주가 제한된다고 볼 수 없다. 또한, 당해 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 통상의 실험만을 사용하여 본 출원에 기재된 본 출원의 특정 양태에 대한 다수의 등가물을 인지하거나 확인할 수 있다. 또한, 이러한 등가물은 본 출원에 포함되는 것으로 의도된다. 또한, 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 출원이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 출원의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

[18]

[19] 상기 목적을 달성하기 위한 본 출원의 하나의 양태는, 포스포에놀피루베이트 카르복시키나아제 (Phosphoenolpyruvate carboxykinase) 활성이 약화되고 L-글루타민 생산능을 가지는, 코리네박테리움 속 미생물을 제공한다.

[20]

[21] 본 출원에서 용어, "포스포에놀피루베이트 카르복시키나아제 (Phosphoenolpyruvate carboxykinase; PEPCK; EC 4.1.1.32)"는

- 글루코스신생합성(gluconeogenesis) 과정에 관여하여 GTP 존재시, 옥살로아세테이트 (Oxaloacetate)를 포스포에놀피루베이트 (Phosphoenolpyruvate)와 이산화탄소로 전환하는 효소를 의미한다. 본 출원의 포스포에놀피루베이트 카르복시키나아제는 PEPCK와 혼용될 수 있다.
- [22] 상기 PEPCK의 아미노산 서열은 공지의 데이터베이스인 NCBI의 Genbank 등에서 얻을 수 있다.
- [23] 일 예로, 본 출원의 PEPCK는 코리네박테리움 속 미생물 유래 단백질일 수 있다. 보다 구체적으로 본 출원의 PEPCK는 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*), 코리네박테리움 데세르티(*Corynebacterium deserti*), 코리네박테리움 크루디락티스(*Corynebacterium crudilactis*), 코리네박테리움 이피시엔스(*Corynebacterium efficiens*), 코리네박테리움 칼루네(*Corynebacterium callunae*) 등으로부터 유래하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [24] 본 출원의 PEPCK는 본 출원의 코리네박테리움 속 미생물의 내재 단백질일 수 있다.
- [25]
- [26] 본 출원에 있어서, 본 출원의 PEPCK는 서열번호 1로 기재된 아미노산 서열을 가지거나, 포함하거나, 이루어지거나, 상기 아미노산 서열로 필수적으로 이루어질(essentially consisting of) 수 있다.
- [27] 본 출원에 있어서, 상기 서열번호 1의 아미노산 서열은 이와 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.7% 또는 99.9% 이상의 상동성 또는 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 또한, 이러한 상동성 또는 동일성을 가지며 상기 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 단백질에 상응하는 효능을 나타내는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환, 보존적 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 단백질도 본 출원의 범위 내에 포함됨은 자명하다.
- [28] 예를 들어, 상기 아미노산 서열 N-말단, C-말단 그리고/또는 내부에 본 출원의 단백질의 기능을 변경하지 않는 서열 추가 또는 결실, 자연적으로 발생할 수 있는 돌연변이, 잠재성 돌연변이(silent mutation) 또는 보존적 치환을 가지는 경우이다.
- [29] 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 폴리펩티드의 활성에 거의 영향을 미치지 않거나 또는 영향을 미치지 않을 수 있다.
- [30]
- [31] 본 출원에서 용어, '상동성(homology)' 또는 '동일성(identity)'은 두 개의 주어진 아미노산 서열 또는 염기 서열 상호간 유사한 정도를 의미하며 백분율로 표시될

수 있다. 용어 상동성 및 동일성은 종종 상호교환적으로 이용될 수 있다.

- [32] 보존된(conserved) 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 서열 상동성 또는 동일성은 표준 배열 알고리즘에 의해 결정되며, 사용되는 프로그램에 의해 확립된 디폴트 갭 페널티가 함께 이용될 수 있다. 실질적으로, 상동성을 갖거나(homologous) 또는 동일한(identical) 서열은 일반적으로 서열 전체 또는 일부분과 중간 또는 높은 엄격한 조건(stringent conditions)에서 하이브리드할 수 있다. 하이브리드화는 폴리뉴클레오티드에서 일반 코돈 또는 코돈 축퇴성을 고려한 코돈을 함유하는 폴리뉴클레오티드와의 하이브리드화 역시 포함됨이 자명하다.
- [33] 임의의 두 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열이 상동성, 유사성 또는 동일성을 갖는지 여부는, 예를 들어, Pearson et al (1988)[Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85]: 2444에서와 같은 디폴트 파라미터를 이용하여 "FASTA" 프로그램과 같은 공지의 컴퓨터 알고리즘을 이용하여 결정될 수 있다. 또는, EMBOSS 패키지의 니들만 프로그램(EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277)(버전 5.0.0 또는 이후 버전)에서 수행되는 바와 같은, 니들만-운치(Needleman-Wunsch) 알고리즘(Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453)이 사용되어 결정될 수 있다(GCG 프로그램 패키지 (Devereux, J., et al, Nucleic Acids Research 12: 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, [S.] [F.] [ET AL, J MOLEC BIOL 215]: 403 (1990); Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, [ED.,] Academic Press, San Diego, 1994, 및 [CARILLO ETA/.](1988) SIAM J Applied Math 48: 1073을 포함한다). 예를 들어, 국립 생물공학 정보 데이터베이스 센터의 BLAST, 또는 ClustalW를 이용하여 상동성, 유사성 또는 동일성을 결정할 수 있다.
- [34] 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 상동성, 유사성 또는 동일성은, 예를 들어, Smith and Waterman, Adv. Appl. Math (1981) 2:482 에 공지된 대로, 예를 들면, Needleman et al. (1970), J Mol Biol. 48:443과 같은 GAP 컴퓨터 프로그램을 이용하여 서열 정보를 비교함으로써 결정될 수 있다. 요약하면, GAP 프로그램은 두 서열 중 더 짧은 것에서의 기호의 전체 수로, 유사한 배열된 기호(즉, 뉴클레오티드 또는 아미노산)의 수를 나눈 값으로 정의할 수 있다. GAP 프로그램을 위한 디폴트 파라미터는 (1) 이진법 비교 매트릭스(동일성을 위해 1 그리고 비-동일성을 위해 0의 값을 함유함) 및 Schwartz and Dayhoff, eds., Atlas Of Protein Sequence And Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358 (1979)에 의해 개시된 대로, Gribskov et al(1986) Nucl. Acids Res. 14: 6745의 가중된 비교 매트릭스(또는 EDNAFULL (NCBI NUC4.4의 EMBOSS 버전) 치환 매트릭스); (2) 각 갭을 위한 3.0의 페널티 및 각 갭에서 각 기호를 위한 추가의 0.10 페널티(또는 갭 개방 페널티 10, 갭 연장 페널티 0.5); 및 (3) 말단 갭을 위한 무 페널티를 포함할 수 있다.

[35]

- [36] 본 출원의 PEPCK는 pck 유전자에 의해 코딩되는 것일 수 있다. 본 출원의 pck 유전자는 PEPCK 활성을 갖는 단백질을 코딩하는 것으로 공지된 유전자를 모두 포함할 수 있다.
- [37] 구체적으로, 본 출원의 pck 유전자는 코리네박테리움 속 미생물 유래의 pck일 수 있다. 보다 구체적으로, 본 출원의 pck 유전자는 코리네박테리움 글루타미쿰 균주 유래의 pck일 수 있다. 일 예로, 본 출원의 pck 유전자는 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032 유래 WP_011015446.1을 코딩하는 폴리뉴클레오티드일 수 있다.
- [38] 본 출원에서 용어, "폴리뉴클레오티드"는 뉴클레오티드 단위체(monomer)가 공유결합에 의해 길게 사슬모양으로 이어진 뉴클레오티드의 중합체(polymer)로 일정한 길이 이상의 DNA 또는 RNA 가닥으로서, 보다 구체적으로는 상기 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 단편을 의미한다.
- [39] 본 출원의 PEPCK를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1로 기재된 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열을 포함할 수 있다. 본 출원의 일 예로, 본 출원의 폴리뉴클레오티드는 서열번호 2의 염기서열을 가지거나 포함할 수 있다. 또한, 본 출원의 폴리뉴클레오티드는 서열번호 2의 서열로 이루어지거나, 필수적으로 구성될 수 있다. 구체적으로, 상기 PEPCK는 서열번호 2의 염기서열로 기재된 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 것일 수 있다.
- [40] 본 출원의 폴리뉴클레오티드는 코돈의 축퇴성(degeneracy) 또는 본 출원의 PEPCK를 발현시키고자 하는 생물에서 선호되는 코돈을 고려하여, PEPCK의 아미노산 서열을 변화시키지 않는 범위 내에서 코딩 영역에 다양한 변형이 이루어질 수 있다. 구체적으로, 본 출원의 폴리뉴클레오티드는 서열번호 2의 서열과 상동성 또는 동일성이 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상인 염기서열을 가지거나 포함하거나, 또는 서열번호 2의 서열과 상동성 또는 동일성이 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상인 염기서열로 이루어지거나 필수적으로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [41] 또한, 본 출원의 폴리뉴클레오티드는 공지의 유전자 서열로부터 제조될 수 있는 프로브, 예를 들면, 본 출원의 폴리뉴클레오티드 서열의 전체 또는 일부에 대한 상보 서열과 엄격한 조건 하에 하이브리드화할 수 있는 서열이라면 제한 없이 포함될 수 있다. 상기 "엄격한 조건(stringent condition)"이란 폴리뉴클레오티드 간의 특이적 혼성화를 가능하게 하는 조건을 의미한다. 이러한 조건은 문헌(J. Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, 1989; F.M. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., New York, 9.50-9.51, 11.7-11.8 참조)에 구체적으로 기재되어 있다. 예를 들어, 상동성 또는 동일성이 높은 폴리뉴클레오티드끼리, 70% 이상, 75% 이상,

76% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 갖는 폴리뉴클레오티드끼리 하이브리드화하고, 그보다 상동성 또는 동일성이 낮은 폴리뉴클레오티드끼리 하이브리드화하지 않는 조건, 또는 통상의 써던 하이브리드화(southern hybridization)의 세척 조건인 60°C, 1XSSC, 0.1% SDS, 구체적으로 60°C, 0.1XSSC, 0.1% SDS, 보다 구체적으로 68°C, 0.1XSSC, 0.1% SDS에 상당하는 염 농도 및 온도에서, 1회, 구체적으로 2회 내지 3회 세정하는 조건을 열거할 수 있다.

- [42] 혼성화는 비록 혼성화의 엄격도에 따라 염기 간의 미스매치(mismatch)가 가능할지라도, 두 개의 핵산이 상보적 서열을 가질 것을 요구한다. 용어, "상보적"은 서로 혼성화가 가능한 뉴클레오티드 염기 간의 관계를 기술하는데 사용된다. 예를 들면, DNA에 관하여, 아데닌은 티민에 상보적이며 시토신은 구아닌에 상보적이다. 따라서, 본 출원의 폴리뉴클레오티드는 또한 실질적으로 유사한 핵산 서열뿐만 아니라 전체 서열에 상보적인 단리된 핵산 단편을 포함할 수 있다.
- [43] 구체적으로, 본 출원의 폴리뉴클레오티드와 상동성 또는 동일성을 가지는 폴리뉴클레오티드는 55°C의 T_m 값에서 혼성화 단계를 포함하는 혼성화 조건을 사용하고 상술한 조건을 사용하여 탐지할 수 있다. 또한, 상기 T_m 값은 60°C, 63°C 또는 65°C일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니고 그 목적에 따라 당업자에 의해 적절히 조절될 수 있다.
- [44] 상기 폴리뉴클레오티드를 혼성화하는 적절한 엄격도는 폴리뉴클레오티드의 길이 및 상보성 정도에 의존하고 변수는 해당기술분야에 잘 알려져 있다(예컨대, J. Sambrook et al., 상동).
- [45]
- [46] 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 약화되거나 강화된 미생물로서, 목적하는 폴리펩티드, 단백질 또는 산물의 생산을 위하여 유전적 변형(modification)을 포함하는 미생물일 수 있다.
- [47]
- [48] 본 출원에서 용어, 폴리펩티드(그 예로, 각 효소의 명칭으로 특정된 단백질을 포함한다.)의 활성의 "약화"는 내재적 활성에 비하여 활성이 감소되거나 또는 활성이 없는 것을 모두 포함하는 개념이다. 상기 약화는 불활성화(inactivation), 결핍(deficiency), 하향조절(down-regulation), 감소(decrease), 저하(reduce), 감쇠(attenuation) 등의 용어와 혼용될 수 있다.
- [49] 상기 약화는 상기 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 변이 등으로 폴리펩티드 자체의 활성이 본래 미생물이 가지고 있는 폴리펩티드의 활성에 비해 감소 또는 제거된 경우, 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 유전자의 발현

저해 또는 폴리펩티드로의 번역(translation) 저해 등으로 세포 내에서 전체적인 폴리펩티드 활성 정도 및/또는 농도(발현량)가 천연형 균주에 비하여 낮은 경우, 상기 폴리뉴클레오티드의 발현이 전혀 이루어지지 않은 경우, 및/또는 폴리뉴클레오티드의 발현이 되더라도 폴리펩티드의 활성이 없는 경우 역시 포함할 수 있다.

[50]

[51] 이러한 폴리펩티드의 활성의 약화는, 당업계에서 알려진 임의의 방법에 의하여 수행될 수 있으나 이로 제한되는 것은 아니며, 당해 분야에 잘 알려진 다양한 방법의 적용으로 달성될 수 있다(예컨대, Nakashima N et al., *Bacterial cellular engineering by genome editing and gene silencing*. *Int J Mol Sci*. 2014;15(2):2773-2793, Sambrook et al. *Molecular Cloning* 2012 등).

[52]

[53] 구체적으로, 본 출원의 폴리펩티드의 활성의 약화는

[54] 1) 폴리펩티드를 코딩하는 유전자 전체 또는 일부의 결손;

[55] 2) 폴리펩티드를 코딩하는 유전자의 발현이 감소하도록 발현조절영역(또는 발현조절서열)의 변형;

[56] 3) 폴리펩티드의 활성이 제거 또는 약화되도록 상기 폴리펩티드를 구성하는 아미노산 서열의 변형(예컨대, 아미노산 서열 상의 1 이상의 아미노산의 삭제/치환/부가);

[57] 4) 폴리펩티드의 활성이 제거 또는 약화되도록 상기 폴리펩티드를 코딩하는 핵산염기 서열의 변형(예를 들어, 폴리펩티드의 활성이 제거 또는 약화되도록 변형된 폴리펩티드를 코딩하도록 상기 폴리펩티드를 코딩하는 유전자의 핵산염기 서열 상의 1 이상의 핵산염기의 삭제/치환/부가);

[58] 5) 폴리펩티드를 코딩하는 유전자 전사체의 개시코돈 또는 5'-UTR 지역 염기서열의 변형;

[59] 6) 폴리펩티드를 코딩하는 상기 유전자의 전사체에 상보적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오티드(예컨대, 안티센스 RNA)의 도입;

[60] 7) 리보솜(ribosome)의 부착이 불가능한 2차 구조물을 형성시키기 위하여 폴리펩티드를 코딩하는 유전자의 사인-달가르노(Shine-Dalgarno) 서열 앞단에 사인-달가르노 서열과 상보적인 서열의 부가;

[61] 8) 폴리펩티드를 코딩하는 핵산염기 서열의 ORF(open reading frame)의 3' 말단에 반대 방향으로 전사되는 프로모터의 부가(Rreverse transcription engineering, RTE); 또는

[62] 9) 이들의 조합(예컨대, 상기 1) 내지 8) 중 선택된 2 이상의 조합)일 수 있으나, 이에, 특별히 제한되는 것은 아니다.

[63] 예컨대,

[64] 상기 1) 폴리펩티드를 코딩하는 상기 유전자 일부 또는 전체의 결손은, 염색체 내 내재적 목적 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 전체의 제거, 일부

뉴클레오티드가 결실된 폴리뉴클레오티드로의 교체 또는 마커 유전자로 교체일 수 있다.

- [65] 상기 2) 발현조절영역(또는 발현조절서열)의 변형은, 결실, 삽입, 비보존적 또는 보존적 치환 또는 이들의 조합으로 발현조절영역(또는 발현조절서열) 상의 변이 발생, 또는 더욱 약한 활성을 갖는 서열로의 교체일 수 있다. 상기 발현조절영역에는 프로모터, 오피레이터 서열, 리보솜 결합부위를 코딩하는 서열, 및 전사와 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [66] 상기 3) 및 4)의 아미노산 서열 또는 핵산염기 서열의 변형은 폴리펩티드의 활성을 약화하도록 상기 폴리펩티드의 아미노산 서열 또는 상기 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 결실, 삽입, 비보존적 또는 보존적 치환 또는 이들의 조합으로 서열상의 변이 발생, 또는 더욱 약한 활성을 갖도록 개량된 아미노산 서열 또는 폴리뉴클레오티드 서열 또는 활성이 없도록 개량된 아미노산 서열 또는 폴리뉴클레오티드 서열로의 교체일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 예를 들면, 폴리뉴클레오티드 서열 내 변이를 도입하여 종결 코돈을 형성시킴으로써, 유전자의 발현을 저해하거나 약화시킬 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [67] 상기 5) 폴리펩티드를 코딩하는 유전자 전사체의 개시코돈 또는 5'-UTR 지역을 코딩하는 염기서열 변형은, 예를 들면, 내재적 개시코돈에 비해 폴리펩티드 발현율이 더 낮은 다른 개시코돈을 코딩하는 염기서열로 치환하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [68] 상기 6) 폴리펩티드를 코딩하는 상기 유전자의 전사체에 상보적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오티드(예컨대, 안티센스 RNA)의 도입은 예를 들어 문헌 [Weintraub, H. et al., Antisense-RNA as a molecular tool for genetic analysis, Reviews - Trends in Genetics, Vol. 1(1) 1986]을 참고할 수 있다.
- [69] 상기 7) 리보솜의 부착이 불가능한 2차 구조물을 형성시키기 위하여 폴리펩티드를 코딩하는 유전자의 사인-달가르노 서열 앞단에 사인-달가르노 서열과 상보적인 서열의 부가는 mRNA 번역을 불가능하게 하거나 속도를 저하시키는 것일 수 있다.
- [70] 또한, 상기 8) 폴리펩티드를 코딩하는 핵산염기 서열의 ORF의 3' 말단에 반대 방향으로 전사되는 프로모터의 부가는 상기 폴리펩티드를 코딩하는 유전자의 전사체에 상보적인 안티센스 뉴클레오티드를 만들어 활성을 약화하는 것일 수 있다.
- [71]
- [72] 본 출원의 미생물에서 폴리뉴클레오티드의 일부 또는 전체의 변형은 (a) 미생물 내 염색체 삽입용 벡터를 이용한 상동 재조합 또는 유전자가위(engineered nuclease, e.g., CRISPR-Cas9)을 이용한 유전체 교정 및/또는 (b) 자외선 및 방사선 등과 같은 빛 및/또는 화학물질 처리에 의해 유도될

수 있으나 이에 제한되지 않는다. 상기 유전자 일부 또는 전체의 변형 방법에는 DNA 재조합 기술에 의한 방법이 포함될 수 있다. 예를 들면, 목적 유전자와 상동성이 있는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열 또는 벡터를 상기 미생물에 주입하여 상동 재조합(homologous recombination)이 일어나게 함으로써 유전자 일부 또는 전체의 결손이 이루어질 수 있다. 상기 주입되는 뉴클레오티드 서열 또는 벡터는 우성 선별 마커를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[73]

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

[75]

본 출원에서 사용되는 벡터는 특별히 한정되지 않으며, 당업계에 알려진 임의의 벡터를 이용할 수 있다. 통상 사용되는 벡터의 예로는 천연 상태이거나 재조합된 상태의 플라스미드, 코스미드, 바이러스 및 박테리오파지를 들 수 있다. 예를 들어, 파지 벡터 또는 코스미드 벡터로서 pWE15, M13, MBL3, MBL4, IXII, ASHII, APII, t10, t11, Charon4A, 및 Charon21A 등을 사용할 수 있으며, 플라스미드 벡터로서 pDZ계, pBR계, pUC계, pBluescriptII계, pGEM계, pTZ계, pCL계 및 pET계 등을 사용할 수 있다. 구체적으로는 pDZ, pDC, pDCM2, pACYC177, pACYC184, pCL, pECCG117, pUC19, pBR322, pMW118, pCC1BAC 벡터 등을 사용할 수 있다.

[76]

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

[77]

본 출원에서 용어 "형질전환"은 목적 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 숙주세포 혹은 미생물 내에 도입하여

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

[78] 또한, 상기에서 용어 "작동 가능하게 연결"된 것이란 본 출원의 목적 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 전사를 개시 및 매개하도록 하는 프로모터 서열과 상기 폴리뉴클레오티드 서열이 기능적으로 연결되어 있는 것을 의미한다.

[79]

[80] 본 출원의 미생물은 포스포에놀피루베이트 카르복시키나아제 활성이 약화되지 않은 모균주 또는 야생형 코리네박테리움 속 균주에 비하여 L-글루타민 생산능이 증가된 미생물일 수 있다. 즉, 본 출원의 미생물은 자연적으로 L-글루타민 생산능을 가지고 있는 미생물 또는 L-글루타민 생산능이 없는 모균주에, PEPCK 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 약화된 미생물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[81]

[82] 그 예로, 상기 L-글루타민 생산능의 증가 여부를 비교하는 대상 균주인, PEPCK가 약화되지 않은, PEPCK 비변형 미생물은 야생형 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032 균주, 글루타민 신테타아제 (Glutamine synthetase, GlnA, EC 6.3.1.2) 단백질의 활성이 강화된 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032 균주, 글루타민 신테타아제를 코딩하는 glnA 유전자에 변이(D401N)를 도입하여 미생물 내에서 해당 단백질의 활성을 강화시킨 미생물, 글루타민 생산 균주인 코리네박테리움 글루타미쿰 KCCM12645P(WO2021-177731 A1) 또는 글루타민 생산 균주인 코리네박테리움 글루타미쿰 KFCC-10680 (대한민국 등록특허 제10-0048440호) 균주일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[83] 일 예로, 상기 생산능이 증가된 재조합 균주는 변이 전 모균주, 비변형 미생물 또는 PEPCK 비변형 미생물의 L-글루타민 생산능에 비하여 약 1% 이상,

구체적으로는 약 2% 이상, 약 5% 이상, 약 6% 이상, 약 7% 이상, 약 7.2% 이상, 약 8% 이상, 약 9% 이상 또는 약 9.2% 이상 (상한값은 특별한 제한은 없으며, 예컨대, 약 200% 이하, 약 150% 이하, 약 100% 이하, 약 51% 이하, 약 40% 이하, 약 30% 이하, 약 20% 이하 또는 약 15% 이하일 수 있음) 증가된 것일 수 있으나, 변이 전 모균주, 비변형 미생물 또는 PEPCK 비변형 미생물의 생산능에 비해 +값의 증가량을 갖는 한, 이에 제한되지 않는다. 다른 예에서, 상기 L-글루타민 생산능이 증가된 미생물은 변이 전 모균주, 비변형 미생물 또는 PEPCK 비변형 미생물에 비하여, L-글루타민 생산능이 약 1.01배 이상, 약 1.02배 이상, 약 1.05배 이상, 약 1.06배 이상, 약 1.07배 이상, 약 1.072배 이상, 약 1.08배 이상, 약 1.09배 이상 또는 약 1.092배 이상 (상한값은 특별한 제한은 없으며, 예컨대, 약 10배 이하, 약 5배 이하, 약 3배 이하, 또는 약 2배 이하일 수 있음) 증가된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [84] 본 출원에서 용어, "비변형 미생물"은 미생물에 자연적으로 발생할 수 있는 돌연변이를 포함하는 균주를 제외하는 것이 아니며, 야생형 균주 또는 천연형 균주 자체이거나, 자연적 또는 인위적 요인에 의한 유전적 변이로 형질이 변화되기 전 균주를 의미할 수 있다. 또한, 본 출원의 용어 "PEPCK 비변형 미생물"은 본 명세서에 기재된 PEPCK 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 약화되지 않거나 약화되기 전의 균주를 의미할 수 있다. 본 출원의 PEPCK 비변형 미생물은 PEPCK 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 변형 외 다른 단백질 또는 다른 유전자의 변형을 포함하는 균주를 제외하는 것은 아니다.
- [85] 본 출원의 용어 "비변형 미생물"은 "변형 전 균주", "변형 전 미생물", "비변이 균주", "비변형 균주", "비변이 미생물" 또는 "기준 미생물"과 혼용될 수 있다.
- [86] 본 출원의 미생물은 내재적 활성에 비하여 약화된 PEPCK 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 미생물; 또는 내재적 활성에 비하여 약화된 PEPCK 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 포함되도록 유전적으로 변형된 미생물(예컨대, 재조합 미생물)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 "내재적 활성"은 자연적 또는 인위적 요인에 의한 유전적 변이로 형질이 변화하는 경우, 형질 변화 전 모균주, 야생형 또는 비변형 미생물이 본래 가지고 있던 특정 폴리펩티드의 활성을 의미한다. 이는 "변형 전 활성"과 혼용되어 사용될 수 있다. 폴리펩티드의 활성이 내재적 활성에 비하여 "약화, 불활성화, 결핍, 감소, 하향조절, 저하, 감쇠"한다는 것은, 형질 변화 전 모균주 또는 비변형 미생물이 본래 가지고 있던 특정 폴리펩티드의 활성에 비하여 낮아진 것을 의미한다.
- [87] 본 출원의 또 다른 일 예로, 본 출원의 미생물은 코리네박테리움 글루탐미쿰(*Corynebacterium glutamicum*), 코리네박테리움 스테이션니스(*Corynebacterium stationis*), 코리네박테리움 크루디락티스(*Corynebacterium crudilactis*), 코리네박테리움 데세르티(*Corynebacterium deserti*), 코리네박테리움 이피시엔스(*Corynebacterium*

efficiens), 코리네박테리움 칼루네(*Corynebacterium callunae*), 코리네박테리움 싱굴라레(*Corynebacterium singulare*), 코리네박테리움 할로톨레란스(*Corynebacterium halotolerans*), 코리네박테리움 스트리아툼(*Corynebacterium striatum*), 코리네박테리움 암모니아게네스(*Corynebacterium ammoniagenes*), 코리네박테리움 폴루티솔리(*Corynebacterium pollutisoli*), 코리네박테리움 이미탄스(*Corynebacterium imitans*), 코리네박테리움 테스트디노리스(*Corynebacterium testudinoris*) 또는 코리네박테리움 플라베스센스(*Corynebacterium flavescens*)일 수 있으며, 구체적으로 코리네박테리움 글루타미쿰일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[88]

[89] 다른 하나의 예로, 본 출원의 재조합 미생물은, L-글루타민 생합성 경로 내 단백질 일부의 활성이 추가적으로 강화되거나, L-글루타민 분해 경로 내 단백질 일부의 활성이 추가적으로 약화되어 L-글루타민 생산능이 강화된 미생물일 수 있다.

[90] 구체적으로, 본 출원에서 코리네박테리움 속 미생물은 상기 *glnA* 강화(예컨대, 카피수 증가, 프로모터 변경, 아데닐화에 의한 활성 조절 해제, *glnE* 약화 또는 PII단백질 활성 약화; US 7262035 B2)가 추가적으로 도입된 미생물, GDH(*glutamate dehydrogenase*) 강화(예컨대, 카피수 증가 또는 발현조절서열변형)가 추가적으로 도입된 미생물(US 7262035 B2), *glnA* 강화 변이가 추가적으로 도입된 미생물(WO2021-177731 A1) 일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[91]

[92] 본 출원에서 용어, 폴리펩티드의 활성의 "강화"는, 폴리펩티드의 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 폴리펩티드의 활성을 의미한다. 이는 "변형 전 활성"과 혼용되어 사용될 수 있다. 폴리펩티드의 활성이 내재적 활성에 비하여 "강화", "상향조절", "과발현" 또는 "증가"한다는 것은, 형질 변화 전 모균주 또는 비변형 미생물이 본래 가지고 있던 특정 폴리펩티드의 활성 및/또는 농도(발현량)에 비하여 향상된 것을 의미한다.

[93]

상기 강화는 외래의 폴리펩티드를 도입하거나, 내재적인 폴리펩티드의 활성 강화 및/또는 농도(발현량)를 통해 달성할 수 있다. 상기 폴리펩티드의 활성의 강화 여부는 해당 폴리펩티드의 활성 정도, 발현량 또는 해당 폴리펩티드로부터

배출되는 산물의 양의 증가로부터 확인할 수 있다.

- [94] 상기 폴리펩티드의 활성의 강화는 당해 분야에 잘 알려진 다양한 방법의 적용이 가능하며, 목적 폴리펩티드의 활성을 변형전 미생물보다 강화시킬 수 있는 한, 제한되지 않는다. 구체적으로, 분자생물학의 일상적 방법인 당업계의 통상의 기술자에게 잘 알려진 유전자 공학 및/또는 단백질 공학을 이용한 것일 수 있으나, 이로 제한되지 않는다(예컨대, Sitnicka et al. *Functional Analysis of Genes. Advances in Cell Biology*. 2010, Vol. 2. 1-16, Sambrook et al. *Molecular Cloning* 2012 등).
- [95] 구체적으로, 본 출원의 폴리펩티드의 활성의 강화는
- [96] 1) 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 세포 내 카피수 증가;
- [97] 2) 폴리펩티드를 코딩하는 염색체상의 유전자 발현조절영역을 활성이 강력한 서열로 교체;
- [98] 3) 폴리펩티드를 코딩하는 유전자 전사체의 개시코돈 또는 5'-UTR 지역을 코딩하는 염기서열의 변형;
- [99] 4) 폴리펩티드 활성이 강화되도록 상기 폴리펩티드의 아미노산 서열의 변형;
- [100] 5) 폴리펩티드 활성이 강화되도록 상기 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열의 변형 (예를 들어, 폴리펩티드의 활성이 강화되도록 변형된 폴리펩티드를 코딩하도록 상기 폴리펩티드 유전자의 폴리뉴클레오티드 서열의 변형);
- [101] 6) 폴리펩티드의 활성을 나타내는 외래 폴리펩티드 또는 이를 코딩하는 외래 폴리뉴클레오티드의 도입;
- [102] 7) 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 코돈 최적화;
- [103] 8) 폴리펩티드의 삼차구조를 분석하여 노출 부위를 선택하여 변형하거나 화학적으로 수식; 또는
- [104] 9) 상기 1) 내지 8) 중 선택된 2 이상의 조합일 수 있으나, 이에, 특별히 제한되는 것은 아니다.
- [105] 보다 구체적으로,
- [106] 상기 1) 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 세포 내 카피수 증가는, 해당 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 작동가능하게 연결된, 숙주와 무관하게 복제되고 기능할 수 있는 벡터의 숙주세포 내로의 도입에 의해 달성되는 것일 수 있다. 또는, 해당 폴리펩티드를 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. 상기 벡터는 전술한 바와 같다.
- [107] 상기 2) 폴리펩티드를 코딩하는 염색체상의 유전자 발현조절영역(또는 발현조절서열)을 활성이 강력한 서열로 교체는, 예를 들면, 상기 발현조절영역의 활성을 더욱 강화하도록 결실, 삽입, 비보존적 또는 보존적 치환 또는 이들의

조합으로 서열상의 변이 발생, 또는 더욱 강한 활성을 가지는 서열로의 교체일 수 있다. 상기 발현조절영역은, 특별히 이에 제한되지 않으나 프로모터, 오퍼레이터 서열, 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열, 그리고 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열 등을 포함할 수 있다. 일 예로, 본래의 프로모터를 강력한 프로모터로 교체시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [108] 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.
- [109] 상기 3) 폴리펩티드를 코딩하는 유전자 전사체의 개시코돈 또는 5'-UTR 지역을 코딩하는 염기서열 변형은, 예를 들면, 내재적 개시코돈에 비해 폴리펩티드 발현율이 더 높은 다른 개시코돈을 코딩하는 염기 서열로 치환하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [110] 상기 4) 및 5)의 아미노산 서열 또는 폴리뉴클레오티드 서열의 변형은, 폴리펩티드의 활성을 강화하도록 상기 폴리펩티드의 아미노산 서열 또는 상기 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 결실, 삽입, 비보존적 또는 보존적 치환 또는 이들의 조합으로 서열상의 변이 발생, 또는 더욱 강한 활성을 갖도록 개량된 아미노산 서열 또는 폴리뉴클레오티드 서열 또는 활성이 증가하도록 개량된 아미노산 서열 또는 폴리뉴클레오티드 서열로의 교체일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 교체는 구체적으로 상동재조합에 의하여 폴리뉴클레오티드를 염색체내로 삽입함으로써 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 이때 사용되는 벡터는 염색체 삽입 여부를 확인하기 위한 선별 마커 (selection marker)를 추가로 포함할 수 있다.
- [111] 상기 6) 폴리펩티드의 활성을 나타내는 외래 폴리뉴클레오티드의 도입은, 상기 폴리펩티드와 동일/유사한 활성을 나타내는 폴리펩티드를 코딩하는 외래 폴리뉴클레오티드의 숙주세포 내 도입일 수 있다. 상기 외래 폴리뉴클레오티드는 상기 폴리펩티드와 동일/유사한 활성을 나타내는 한 그 유래나 서열에 제한이 없다. 상기 도입에 이용되는 방법은 공지된 형질전환 방법을 당업자가 적절히 선택하여 수행될 수 있으며, 숙주 세포 내에서 상기 도입된 폴리뉴클레오티드가 발현됨으로써 폴리펩티드가 생성되어 그 활성이 증가될 수 있다.
- [112] 상기 7) 폴리펩티드를 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.
- [113] 상기 8) 폴리펩티드의 삼차구조를 분석하여 노출 부위를 선택하여 변형하거나

화학적으로 수식하는 것은, 예를 들어 분석하고자 하는 폴리펩티드의 서열정보를 기지 단백질들의 서열정보가 저장된 데이터베이스와 비교함으로써 서열의 유사성 정도에 따라 주형 단백질 후보를 결정하고 이를 토대로 구조를 확인하여, 변형하거나 화학적으로 수식할 노출 부위를 선택하여 변형 또는 수식하는 것일 수 있다.

[114] 이와 같은 폴리펩티드 활성의 강화는, 상응하는 폴리펩티드의 활성 또는 농도 발현량이 야생형이나 변형 전 미생물 균주에서 발현된 폴리펩티드의 활성 또는 농도를 기준으로 하여 증가되거나, 해당 폴리펩티드로부터 생산되는 산물의 양의 증가되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[115]

[116] 본 출원의 다른 하나의 양태는 포스포에놀피루베이트 카르복시키나아제 활성이 약화되고 L-글루타민 생산능을 가지는 코리네박테리움 속 미생물을 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, L-글루타민 생산 방법을 제공한다.

[117] 본 출원의 L-글루타민 생산 방법은 내재적 활성에 비하여 약화된 PEPCK 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 미생물; 또는 내재적 활성에 비하여 약화된 PEPCK 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 포함되도록 유전적으로 변형된 미생물을 배지에서 배양하는 단계를 포함할 수 있다.

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

[119] 본 출원에서 용어, "배지"는 본 출원의 미생물을 배양하기 위해 필요로 하는 영양물질을 주성분으로 혼합한 물질을 의미하며, 생존 및 발육에 불가결한 물을 비롯하여 영양물질 및 발육인자 등을 공급한다. 구체적으로, 본 출원의 미생물의 배양에 사용되는 배지 및 기타 배양 조건은 통상의 미생물의 배양에 사용되는 배지라면 특별한 제한 없이 어느 것이나 사용할 수 있으나, 본 출원의 미생물을 적당한 탄소원, 질소원, 인원, 무기화합물, 아미노산 및/또는 비타민 등을 함유한 통상의 배지 내에서 호기성 조건 하에서 온도, pH 등을 조절하면서 배양할 수 있다.

[120] 구체적으로, 코리네박테리움 속 미생물에 대한 배양 배지는 문헌["Manual of Methods for General Bacteriology" by the American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981)]에서 찾아 볼 수 있다.

[121] 본 출원에서 상기 탄소원으로는 글루코오스, 사카로오스, 락토오스, 프룩토오스, 수크로오스, 말토오스 등과 같은 탄수화물; 만니톨, 소르비톨 등과 같은 당 알코올, 피루브산, 락트산, 시트르산 등과 같은 유기산; 글루탐산, 메티오닌, 리신 등과 같은 아미노산 등이 포함될 수 있다. 또한, 전분 가수분해물, 당밀, 블랙스트랩 당밀, 쌀겨울, 카사버, 사탕수수 찌꺼기 및 옥수수 침지액 같은

천연의 유기 영양원을 사용할 수 있으며, 구체적으로는 글루코오스 및 살균된 전처리 당밀(즉, 환원당으로 전환된 당밀) 등과 같은 탄수화물이 사용될 수 있으며, 그 외의 적정량의 탄소원을 제한 없이 다양하게 이용할 수 있다. 이들 탄소원은 단독으로 사용되거나 2 종 이상이 조합되어 사용될 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [122] 상기 질소원으로는 암모니아, 황산암모늄, 염화암모늄, 초산암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄, 질산암모늄 등과 같은 무기질소원; 글루탐산, 메티오닌, 글루타민 등과 같은 아미노산, 펩톤, NZ-아민, 육류 추출물, 효모 추출물, 맥아 추출물, 옥수수 침지액, 카세인 가수분해물, 어류 또는 그의 분해생성물, 탈지 대두 케이크 또는 그의 분해 생성물 등과 같은 유기 질소원이 사용될 수 있다. 이들 질소원은 단독으로 사용되거나 2 종 이상이 조합되어 사용될 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [123] 상기 인원으로는 인산 제1칼륨, 인산 제2칼륨, 또는 이에 대응되는 소듐-함유 염 등이 포함될 수 있다. 무기화합물로는 염화나트륨, 염화칼슘, 염화철, 황산마그네슘, 황산철, 황산망간, 탄산칼슘 등이 사용될 수 있으며, 그 외에 아미노산, 비타민 및/또는 적절한 전구체 등이 포함될 수 있다. 이들 구성성분 또는 전구체는 배지에 회분식 또는 연속식으로 첨가될 수 있다. 그러나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [124] 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 소포체를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다. 또한, 배지의 호기 상태를 유지하기 위하여, 배지 내로 산소 또는 산소 함유 기체를 주입하거나 혐기 및 미호기 상태를 유지하기 위해 기체의 주입 없이 혹은 질소, 수소 또는 이산화탄소 가스를 주입할 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [125] 본 출원의 배양에서 배양온도는 20 내지 45°C, 구체적으로는 25 내지 40°C를 유지할 수 있고, 약 10 내지 160 시간 동안 배양할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [126] 본 출원의 배양에 의하여 생산된 L-글루타민은 배지 중으로 분비되거나 세포 내에 잔류할 수 있다.
- [127]
- [128] 본 출원의 L-글루타민 생산 방법은, 본 출원의 미생물을 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.
- [129] 본 출원의 L-글루타민 생산 방법은, 상기 배양에 따른 배지(배양이 수행된 배지) 또는 배양된 미생물로부터 L-글루타민을 회수하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 회수하는 단계는 상기 배양하는 단계 이후에 추가로 포함될 수 있다.

- [130] 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 L-글루타민을 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 L-글루타민을 회수할 수 있다.
- [131] 또한, 본 출원의 L-글루타민 생산 방법은, 추가적으로 정제 단계를 포함할 수 있다. 상기 정제는 당해 기술분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여, 수행할 수 있다. 일 예에서, 본 출원의 L-글루타민 생산 방법이 회수 단계와 정제 단계를 모두 포함하는 경우, 상기 회수 단계와 정제 단계는 순서에 상관없이 연속적 또는 비연속적으로 수행되거나, 동시에 또는 하나의 단계로 통합되어 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [132] 본 출원의 방법에서, PEPCK, 폴리뉴클레오티드, 벡터 및 미생물 등은 상기 다른 양태에서 기재한 바와 같다.
- [133]
- [134] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 PEPCK가 약화된 미생물; 이를 배양한 배지; 또는 이들의 조합을 포함하는, L-글루타민 생산용 조성물을 제공한다.
- [135] 본 출원의 조성물은 L-글루타민 생산용 조성물에 통상 사용되는 임의의 적합한 부형제를 추가로 포함할 수 있으며, 이러한 부형제는, 예를 들어 보존제, 습윤제, 분산제, 현탁화제, 완충제, 안정화제 또는 등장화제 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [136]
- [137] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 PEPCK를 약화하는 단계를 포함하는, L-글루타민 생산용 미생물의 제조방법을 제공한다.
- [138]
- [139] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 PEPCK가 약화된, 코리네박테리움 속 미생물의 L-글루타민 생산 용도를 제공한다.
- [140]
- [141] 상기 PEPCK, 약화, 코리네박테리움 속 미생물 등은 상기 다른 양태에서 기재한 바와 같다.
- [142]

발명의 실시를 위한 형태

- [143] 이하 본 출원을 실시예에 의해 보다 상세하게 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 출원을 예시하기 위한 바람직한 실시양태에 불과한 것이며 따라서, 본 출원의 권리범위를 이에 한정하는 것으로 의도되지는 않는다. 한편, 본 명세서에

기재되지 않은 기술적인 사항들은 본 출원의 기술 분야 또는 유사 기술 분야에서 숙련된 통상의 기술자이면 충분히 이해하고 용이하게 실시할 수 있다.

[144]

[145] 실시예 1: pck 유전자를 약화시키기 위한 벡터 제작

[146] 포스포에놀피루베이트 카르복시키나아제 (Phosphoenolpyruvate carboxykinase)를 코딩하는 pck 유전자를 약화시키기 위해 유전자를 결손하는 벡터를 제작하였다.

[147] 구체적으로, pck 유전자 부분이 결손된 균주를 제작하기 위해 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032의 염색체를 주형으로 하여 서열번호 3 및 서열번호 4, 서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머를 이용하여 PCR을 각각 수행하였다. 여기에서 사용된 프라이머 서열은 하기 표 1과 같다.

[148] [표1]

서열번호	명칭	서열
3	primer 1	ggggatcctctagagtcgacCTGCGACGACTGGAAAACCATG G
4	primer 2	GCAGTTCTTAAGCGTGAACtactagfTAAACTTTAGG TGAGACAAC
5	primer 3	GTTGTCTCACCTAAAGTTTTAactagtAGTTCACGCTTA AGAACTGC
6	primer 4	gcttgcattgctgcaggtcgacGGCTGGACCCTAGAATTCGG

[149]

[150] PCR 반응을 위한 중합효소로는 PfuUltra™ 고-신뢰 DNA 폴리머라제 (Stratagene)를 사용하였으며, PCR 조건은 변성 95°C, 30초; 어닐링 55°C, 30초; 및 중합반응 72°C, 1분을 28회 반복하였다. 그 결과 pck 유전자 시작코돈을 중심으로 5' 상단 부위의 929 bp DNA 단편과 pck 유전자 종결코돈을 중심으로 3' 하단 부위의 1000 bp의 DNA 단편을 각각 수득하였다. 증폭된 두 가지의 DNA 단편을 PCR 정제 키트(QUIAGEN)를 사용하여 정제하여 플라스미드 제작을 위한 삽입 DNA 단편으로 사용하였다. 한편 제한효소 salI으로 처리한 후, 65°C에서 20분간 열처리한 pDZ벡터(대한민국특허 제2009-0094433호)와 상기 PCR을 통하여 증폭한 삽입 DNA 단편의 몰농도 (M) 비율이 1:2가 되도록 하여 인퓨전 클로닝 키트 (Infusion Cloning Kit, TaKaRa)를 사용하여 제공된 매뉴얼에 따라 클로닝함으로써 pck 유전자 결손을 위한 벡터 pDZ-ΔPEPCK를 제작하였다.

[151]

[152] 실시예 2: 야생형 기반 L-글루타민 생산능을 갖는 코리네박테리움 속 균주 제작

[153] 야생형 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032로부터 L-글루타민 생산

균주를 개발하였다. 구체적으로, 생합성 경로 말단 효소인 글루타민 신테타아제 (Glutamine synthetase) 활성을 높여주기 위해 글루타민 신테타아제를 코딩하는 유전자인 *glnA*(D401N) 변이체 (서열번호 11)가 도입된 균주 (기탁번호 KCCM12645P)를 제작하였다.

[154] 구체적으로, *glnA*(D401N) 변이가 도입된 균주를 제작하기 위해 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032의 염색체를 주형으로 하여 서열번호 7 및 서열번호 8 혹은 서열번호 9 및 서열번호 10의 프라이머를 이용하여 PCR을 각각 수행하였다. 여기에서 사용한 프라이머 서열은 하기 표 2와 같다.

[155] [표2]

서열번호	서열명	서열
7	primer 5	ggggatcctctagagtcgacgtggcgtttgaacccccggaag
8	primer 6	catcgagccacacgctccagtgaacaaggacctctacgaac
9	primer 7	gttcgtagaggctctgttcactggagcgtgtggctc gatg
10	primer 8	gcttgc atgcctgcaggtcgacttagcagtcgaagtacaattcg

[156]

[157] PCR 반응을 위한 중합효소로는 PfuUltra™ 고-신뢰 DNA 폴리머라제를 사용하였으며, PCR 조건은 변성 95°C, 30초; 어닐링 55°C, 30초; 및 중합반응 72°C, 1분을 28회 반복하였다. 그 결과 *glnA* 유전자 D401N 변이를 중심으로 5' 상단 부위의 DNA 단편과 3' 하단 부위의 DNA 단편을 각각 수득하였다. 증폭된 두 가지의 DNA 단편을 PCR 정제 키트를 사용하여 정제하여 플라즈미드 제작을 위한 삽입 DNA 단편으로 사용하였다. 한편 제한효소 *speI*으로 처리한 후, 65°C에서 20분간 열처리한 pDZ벡터 (대한민국특허 제2009-0094433호)와 상기 PCR을 통하여 증폭한 삽입 DNA 단편의 몰농도 (M) 비율이 1:2가 되도록 하여 인퓨전 클로닝 키트를 사용하여 제공된 매뉴얼에 따라 클로닝함으로써 *glnA*(D401N) 유전자 변이형 삽입을 위한 pDZ-*glnA*(D401N)을 제작하였다.

[158] 제작된 벡터를 전기천공법으로 전기펄스법(Van der Rest et al., Appl. Microbial. Biotechnol. 52:541-545, 1999)으로 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032에 형질전환하여 상동염색체 재조합에 의해 염색체 상에서 *glnA*(D401N) 변이를 포함하는 균주를 얻었다. 상기 균주를 코리네박테리움 글루타미쿰 CA11-4021로 명명한 후 부다페스트 조약 하의 국제기탁기관인 한국미생물보존센터(Korean CultureCenter of Microorganisms, KCCM)에 2019년 12월 19일자로 기탁하여 기탁번호 KCCM12645P를 부여 받았다.

[159]

[160] 실시예 3: *pck* 유전자가 약화된 L-글루타민 생산 균주 제작 및 평가

[161] 상기 실시예 2에서 제작한 L-글루타민 생산 균주인 코리네박테리움

글루탐미쿰 CA11-4021에서 pck 유전자를 약화하였다. 더 구체적으로 실시예 1에서 제작된 벡터를 전기천공법으로 코리네박테리움 글루탐미쿰 CA11-4021에 형질전환하고, 2차 교차과정을 거쳐 염색체 상에서 pck 유전자가 결손된 L-글루타민 생산 균주를 얻었으며, 이를 코리네박테리움 글루탐미쿰 CA11-4023으로 명명하였다.

[162] 코리네박테리움 글루탐미쿰 CA11-4023을 아래와 같은 방법으로 배양하여 글루타민 생산능을 측정하였다.

[163] 먼저, 종 배지 25 ml을 함유하는 250 ml 코너-바플 플라스크에 각 균주들을 접종하고, 30°C에서 20시간 동안, 200 rpm으로 진탕 배양하였다. 그런 다음, 생산 배지 24 ml을 함유하는 250 ml 코너-바플 플라스크에 1 ml의 종 배양액을 접종하고 32°C에서 48 시간 동안, 200 rpm에서 진탕 배양하였다. 상기 종 배지와 생산 배지의 조성은 각각 하기와 같다. 배양 종료 후 HPLC (Waters 2478)를 이용하여 L-글루타민의 농도를 측정하였다. 글루타민 생산능, 및 당 소모속도 측정 결과는 하기 표 3과 같다.

[164]

[165] <종 배지 (pH 7.0)>

[166] 포도당 20 g, 펩톤 10 g, 효모추출물 5 g, 요소 1.5 g, KH₂PO₄ 4 g, K₂HPO₄ 8g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, 바이오틴 100 µg, 티아민 HCl 1000 µg, 칼슘-판토텐산 2000 µg, 니코틴아미드 2000 µg (증류수 1 리터 기준)

[167]

[168] <글루타민 생산 배지 (pH 8.0)>

[169] 원당 60 g, (NH₄)₂SO₄ 45 g, 대두 단백질 0.48 g, CaCO₃ 50 g, MgSO₄·7H₂O 0.4 g, KH₂PO₄ 1 g, 티아민염산염 0.2 mg, 바이오틴 0.3 mg, 니코틴아미드 60 mg, FeSO₄·7H₂O 10 mg 및 MnSO₄·H₂O 10 mg (증류수 1리터 기준)

[170]

[171] [표3]

균주	유전형질	L-글루타민 (g/L)
ATCC13032		0.89
CA11-4021	ATCC13032::glnA(D401N)	1.25
CA11-4023	CA11-4021ΔPEPCK	1.34

[172]

[173] 그 결과, pck 유전자가 약화된 CA11-4023의 경우, 모균주인 CA11-4021 대비 글루타민 생산능이 7.2% 향상되는 것을 확인할 수 있었다.

[174] 상기 CA11-4023 균주는 부다페스트 조약하의 국제기탁기관인 한국미생물보존센터(KCCM)에 2020년 12월 22일자로 기탁하여 수탁번호 KCCM 12916P를 부여받았다.

[175]

[176] 실시예 4: pck 유전자가 약화된 고농도 L-글루타민 생산 균주 제작 및 평가

[177] 공지의 글루타민 생산 균주인 코리네박테리움 글루타미쿰 KFCC-10680 (대한민국 등록특허 제10-0048440호) 균주를 대상으로 상기 실시예 3과 동일한 방법으로 pck 유전자를 약화하였다. 더 구체적으로 실시예 1에서 제작된 pDZ-ΔPEPCK 벡터를 전기천공법으로 코리네박테리움 글루타미쿰 KFCC-10680에 형질전환하고, 2차 교차과정을 거쳐 염색체 상에서 pck 유전자가 결손된 균주를 얻었으며, 이를 코리네박테리움 글루타미쿰 KFCC-10680Δpck로 명명하였고, 아래와 같은 방법으로 배양하여 글루타민 생산능을 측정하였다.

[178] 먼저, 종 배지 25 ml을 함유하는 250 ml 코너-바플 플라스크에 각 균주들을 접종하고, 30°C에서 20시간 동안, 200 rpm으로 진탕 배양하였다. 그런 다음, 생산 배지 24 ml을 함유하는 250 ml 코너-바플 플라스크에 1 ml의 종 배양액을 접종하고 32°C에서 48 시간 동안, 200 rpm에서 진탕 배양하였다. 상기 종 배지와 생산 배지의 조성은 각각 하기와 같다. 배양 종료 후 HPLC (Waters 2478)를 이용하여 L-글루타민의 농도를 측정하였다. 글루타민 생산능, 및 당 소모속도 측정 결과는 하기 표 4와 같다.

[179]

[180] <종 배지 (pH 7.0)>

[181] 포도당 20 g, 펩톤 10 g, 효모추출물 5 g, 요소 1.5 g, KH₂PO₄ 4 g, K₂HPO₄ 8g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, 바이오틴 100 μg, 티아민 HCl 1000 μg, 칼슘-판토텐산 2000 μg, 니코틴아미드 2000 μg (증류수 1 리터 기준)

[182]

[183] <글루타민 생산 배지 (pH 8.0)>

[184] 원당 60 g, (NH₄)₂SO₄ 45 g, 대두 단백질 0.48 g, CaCO₃ 50 g, MgSO₄·7H₂O 0.4 g, KH₂PO₄ 1 g, 티아민염산염 0.2 mg, 바이오틴 0.3 mg, 니코틴아미드 60 mg, FeSO₄·7H₂O 10 mg 및 MnSO₄·H₂O 10 mg (증류수 1리터 기준)

[185]

[186] [표4]

균주	L-글루타민 (g/L)
KFCC-10680	13.8
KFCC-10680Δpck	15.4

[187]

[188] 그 결과, pck 유전자가 결손된 KFCC-10680Δpck의 경우, 모균주인 KFCC-10680 대비 글루타민 생산능이 9.2% 향상되는 것을 확인할 수 있었다.

[189]

[190] 이상의 설명으로부터, 본 출원이 속하는 기술분야의 당업자는 본 출원이 그

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

청구범위

- [청구항 1] 포스포에놀피루베이트 카르복시키나아제 활성이 약화되고 L-글루타민 생산능을 가지는, 코리네박테리움 속 미생물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 미생물은 포스포에놀피루베이트 카르복시키나아제 활성이 약화되지 않은 모균주 또는 야생형 코리네박테리움 속 균주에 비하여 L-글루타민 생산능이 증가된, 미생물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 포스포에놀피루베이트 카르복시키나아제는 내재 단백질인, 미생물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 미생물은 코리네박테리움 글루탐미쿰인, 미생물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 포스포에놀피루베이트 카르복시키나아제는 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 이와 90% 이상의 동일성을 가지는 아미노산 서열로 이루어진, 미생물.
- [청구항 6] 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 미생물을 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, L-글루타민 생산 방법.
- [청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 배양하는 단계 이후 배지 또는 미생물로부터 L-글루타민을 회수하는 단계를 추가적으로 포함하는, L-글루타민 생산 방법.
- [청구항 8] 포스포에놀피루베이트 카르복시키나아제가 약화된, 코리네박테리움 속 미생물의 L-글루타민 생산 용도.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/017074

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N 15/77(2006.01)i; C12N 9/88(2006.01)i; C12P 13/14(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N 15/77(2006.01); C12N 1/20(2006.01); C12N 1/21(2006.01); C12N 9/12(2006.01); C12N 9/88(2006.01); C12P 13/14(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: 포스포에놀피루베이트 카르복시키나아제(Phosphoenolpyruvate carboxykinase), L-글루타민(L-glutamine), 코리네박테리움(Corynebacterium)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2002-0065403 A1 (EIKMANNNS, B. et al.) 30 May 2002 (2002-05-30) See claims 1 and 6-14; and paragraphs [0005]-[0007] and [0059].	1-8
A	KR 10-1869642 B1 (DAESANG CORPORATION) 20 June 2018 (2018-06-20) See abstract; and claims 1 and 3-8.	1-8
A	RIEDEL, C. et al. Characterization of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene from Corynebacterium glutamicum and significance of the enzyme for growth and amino acid production. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 2001, vol. 3, no. 4, pp. 573-583. See abstract; and page 578.	1-8
A	KR 10-2016-0041624 A (CJ CHEILJEDANG CORPORATION) 18 April 2016 (2016-04-18) See entire document.	1-8
A	KR 10-2016-0025884 A (CJ CHEILJEDANG CORPORATION) 09 March 2016 (2016-03-09) See entire document.	1-8
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 08 March 2022		Date of mailing of the international search report 08 March 2022
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.

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:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2021/017074

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	2002-0065403	A1	30 May 2002	AT	338133	T	15 September 2006
				AU	2000-64104	A1	26 April 2001
				CA	2322555	A1	20 April 2001
				CN	1308125	A	15 August 2001
				DE	19950409	A1	26 April 2001
				EP	1094111	A2	25 April 2001
				EP	1094111	A3	18 July 2001
				EP	1094111	B1	30 August 2006
				HU	0004115	A2	28 September 2002
				ID	27693	A	26 April 2001
				JP	2001-149086	A	05 June 2001
				KR	10-0815415	B1	20 March 2008
				KR	10-2001-0051134	A	25 June 2001
				MX	PA00009958	A	28 April 2005
				PL	343339	A1	23 April 2001
				SK	15292000	A3	03 December 2001
				US	2003-0003548	A1	02 January 2003
				US	6420151	B1	16 July 2002
				US	6872553	B2	29 March 2005
				ZA	200005843	B	17 May 2001
<hr/>							
KR	10-1869642	B1	20 June 2018	None			
<hr/>							
KR	10-2016-0041624	A	18 April 2016	AU	2015-328946	A1	25 May 2017
				AU	2015-328946	B2	18 October 2018
				CA	2963926	A1	14 April 2016
				CN	107208038	A	26 September 2017
				EP	3205714	A2	16 August 2017
				EP	3205714	B1	05 August 2020
				ES	2817933	T3	08 April 2021
				JP	2017-529858	A	12 October 2017
				US	10023888	B2	17 July 2018
				US	2017-0292135	A1	12 October 2017
				WO	2016-056773	A2	14 April 2016
				WO	2016-056773	A3	27 April 2017
<hr/>							
KR	10-2016-0025884	A	09 March 2016	KR	10-1621243	B1	16 May 2016
				WO	2016-032158	A1	03 March 2016
<hr/>							

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 15/77(2006.01)i; C12N 9/88(2006.01)i; C12P 13/14(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 15/77(2006.01); C12N 1/20(2006.01); C12N 1/21(2006.01); C12N 9/12(2006.01); C12N 9/88(2006.01); C12P 13/14(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: 포스포에놀피루베이트 카르복시키나아제(Phosphoenolpyruvate carboxykinase), L-글루타민(L-glutamine), 코리네박테리움(Corynebacterium)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	US 2002-0065403 A1 (EIKMANN, B. 등) 2002.05.30 청구항 1, 6-14; 단락 [0005]-[0007], [0059]	1-8
A	KR 10-1869642 B1 (대상 주식회사) 2018.06.20 요약; 청구항 1, 3-8	1-8
A	RIEDEL, C. 등, 'Characterization of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene from Corynebacterium glutamicum and significance of the enzyme for growth and amino acid production', J. Mol. Microbiol. Biotechnol., 2001, 3권, 4호, 페이지 573-583 초록; 페이지 578	1-8
A	KR 10-2016-0041624 A (씨제이제일제당 (주)) 2016.04.18 전체 문헌	1-8
A	KR 10-2016-0025884 A (씨제이제일제당 (주)) 2016.03.09 전체 문헌	1-8
<input type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일	
2022년03월08일 (08.03.2022)	2022년03월08일 (08.03.2022)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소	심사관	
대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)	허주형	
팩스 번호 +82-42-481-8578	전화번호 +82-42-481-5373	

제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

- a. 아래의 형태로 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - 부록 C/ST.25 텍스트 파일
 - 서면 혹은 이미지 파일
- b. PCT 규칙 13의3.1(a)에 따라 국제출원과 함께 국제조사만을 목적으로 부록 C/ST.25 텍스트 파일의 형태로 제출된 서열목록
- c. 국제조사만을 목적으로 국제출원일 이후에 아래 형태로 제출된 서열목록
 - 부록 C/ST.25 텍스트 파일 (규칙 13의3.1(a))
 - 서면 혹은 이미지 파일 (규칙 제13의3.1(b) 및 시행세칙 713).

2. 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시 출원의 일부를 구성하는 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2002-0065403 A1	2002/05/30	AT 338133 T	2006/09/15
		AU 2000-64104 A1	2001/04/26
		CA 2322555 A1	2001/04/20
		CN 1308125 A	2001/08/15
		DE 19950409 A1	2001/04/26
		EP 1094111 A2	2001/04/25
		EP 1094111 A3	2001/07/18
		EP 1094111 B1	2006/08/30
		HU 0004115 A2	2002/09/28
		ID 27693 A	2001/04/26
		JP 2001-149086 A	2001/06/05
		KR 10-0815415 B1	2008/03/20
		KR 10-2001-0051134 A	2001/06/25
		MX PA00009958 A	2005/04/28
		PL 343339 A1	2001/04/23
		SK 15292000 A3	2001/12/03
		US 2003-0003548 A1	2003/01/02
		US 6420151 B1	2002/07/16
		US 6872553 B2	2005/03/29
		ZA 200005843 B	2001/05/17
KR 10-1869642 B1	2018/06/20	없음	
KR 10-2016-0041624 A	2016/04/18	AU 2015-328946 A1	2017/05/25
		AU 2015-328946 B2	2018/10/18
		CA 2963926 A1	2016/04/14
		CN 107208038 A	2017/09/26
		EP 3205714 A2	2017/08/16
		EP 3205714 B1	2020/08/05
		ES 2817933 T3	2021/04/08
		JP 2017-529858 A	2017/10/12
		US 10023888 B2	2018/07/17
		US 2017-0292135 A1	2017/10/12
KR 10-2016-0025884 A	2016/03/09	WO 2016-056773 A2	2016/04/14
		WO 2016-056773 A3	2017/04/27
KR 10-2016-0025884 A	2016/03/09	KR 10-1621243 B1	2016/05/16
		WO 2016-032158 A1	2016/03/03