

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

(43) 국제공개일
2024년 10월 24일 (24.10.2024) WIPO | PCT

WO 2024/219688 A1

- (51) 국제특허분류: *C12N 15/77* (2006.01) *C12P 13/22* (2006.01) *C12N 9/12* (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/KR2024/003775
- (22) 국제출원일: 2024년 3월 26일 (26.03.2024) 공개:
- (25) 출원언어: 한국어 — 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- (26) 공개언어: 한국어 — 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))
- (30) 우선권정보: 10-2023-0051258 2023년 4월 19일 (19.04.2023) KR
- (71) 출원인: 씨제이제일제당 (주) (CJ CHEILJEDANG CORPORATION) [KR/KR]; 04560 서울특별시 중구 동호로 330, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 박슬기 (PARK, Seul-Gi); 04560 서울특별시 중구 동호로 330, Seoul (KR). 정무영 (JUNG, Moo Young); 04560 서울특별시 중구 동호로 330, Seoul (KR). 박소희 (PARK, Soe-hee); 04560 서울특별시 중구 동호로 330, Seoul (KR). 이수민 (LEE, Sumin); 04560 서울특별시 중구 동호로 330, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 특허법인한얼 (HANOL INTELLECTUAL PROPERTY AND LAW); 05836 서울특별시 송파구 법원로 135, 6층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,

(54) Title: MICROORGANISM FOR PRODUCING L-TRYPTOPHAN AND METHOD FOR PRODUCING L-TRYPTOPHAN USING SAME

(54) 발명의 명칭: L-트립토판 생산 미생물 및 이를 이용한 L-트립토판 생산 방법

(57) Abstract: The present application relates to: a microorganism of the genus *Corynebacterium* for producing L-tryptophan, the microorganism having a *Komagataeibacter xylinus*-derived pyruvate, a phosphate dikinase protein, or a polynucleotide coding same introduced therein; a method for producing L-tryptophan comprising a step of culturing the microorganism in a medium; a composition for producing L-tryptophan, the composition comprising the microorganism, a culture of the microorganism, a fermented product of the microorganism, or a combination of two or more of same; and a use of the microorganism for producing L-tryptophan.

(57) 요약서: 본 출원은 코마가테이박터 자일리너스 유래의 피루베이트, 포스페이트 디키나제 단백질 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 도입된, L-트립토판 생산능을 가지는 코리네박테리움 속 미생물; 상기 미생물을 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 L-트립토판의 생산 방법; 상기 미생물, 상기 미생물의 배양물, 상기 미생물의 발효물 또는 이들 중 2 이상의 조합을 포함하는 L-트립토판 생산용 조성물; 및 상기 미생물의 L-트립토판 생산 용도에 관한 것이다.



WO 2024/219688 A1

명세서

발명의 명칭: L-트립토판 생산 미생 물 및 이를 이용한 L-트립토판 생산 방법

기술분야

- [1] 본 출원은 코마가테이박터 자일리너스 유래의 피루베이트, 포스페이트 디키나제 단백질 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 도입된, L-트립토판 생산능을 가지는 코리네박테리움 속 미생물; 상기 미생물을 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 L-트립토판의 생산 방법; 상기 미생물, 상기 미생물의 배양물, 상기 미생물의 발효물 또는 이들 중 2 이상의 조합을 포함하는 L-트립토판 생산용 조성물; 및 상기 미생물의 L-트립토판 생산 용도에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 미생물에서 목적 물질(예를 들어, 아미노산)을 생산하는 공정은 친환경적이고 안전한 생산 방법으로 다양한 연구가 진행되어 왔으며, 그 중 코리네박테리움 속 미생물에서 목적 물질을 다량으로 생산하기 위한 연구가 지속적으로 이루어져 왔다. 코리네박테리움(*Corynebacterium* sp.) 속 미생물, 특히 코리네박테리움 글루탐미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)은 L-아미노산 및 기타 유용물질 생산에 많이 이용되고 있는 그람 양성 미생물이다. 상기 L-아미노산 및 기타 유용물질을 생산하기 위하여, 고효율 생산 미생물 및 발효공정기술 개발을 위한 다양한 연구들이 수행되고 있다.
- [4] L-트립토판(L-tryptophan)은 필수 아미노산의 하나로 사료 첨가제, 수액제 등의 의약품 원료 및 건강식품소재 등으로 널리 사용되어 왔다. 이와 같은, L-트립토판은 화학 합성법, 효소 반응법, 발효법 등을 통해 생산될 수 있으나, 현재에는 미생물을 이용한 직접 발효법이 주로 이용되고 있다.
- [5] 미생물은 L-트립토판 생합성 시 해당과정 (glycolysis)의 중간 물질인 포스포에놀 피루베이트(phosphoenol pyruvate, PEP)와 5탄당 인산 경로 (pentose phosphate pathway)의 생성물인 E4P (erythrose-4-phosphate)가 DAHP 신타제 (3-Deoxy-D-arabinoheptulosonate 7-phosphate synthase, EC 2.5.1.54)에 의해 중합반응을 시작하는 방향족 생합성 경로를 가지고 있다. 선행 연구들에 따르면, 20개 아미노산 중 트립토판 생합성시 가장 높은 수준의 에너지를 필요로 하는 것이 세포내 실제 정량 분석으로 증명된 바 있다 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (2002) V99, pp3695-3700).
- [6] 이에, 전구체인 E4P를 안정적으로 공급하기 위하여 트랜스케톨라제 (transketolase, EC 2.2.1.1)를 코딩하는 tktA 유전자(NCBI gene ID: 12931960)의 발현을 강화시켜 생합성을 증가시키는 방법이 연구된 바 있으며(Current Opinion in Biotechnology, (2009) V20, pp651-658), 세포내 에너지 수준을 유지시키기 위하

여 고 에너지 물질인 ATP를 적게 사용하도록 하는 방향의 연구(FEMS Microbiol Lett, (2009)V297, pp217-224)가 진행된 바 있다.

- [7] 그러나, 포도당신생합성(gluconeogenesis)은 일반적으로 영양소가 풍부한 배양환경에서는 활성이 매우 낮다고 알려져 있으며(J Bacteriol. 2013 Sep, 195(18), 4283-4296.; Nature Communications volume 8, Article number: 14316, 2017), 더욱이, L-트립토판의 생산 과정 중 아세트산과 같은 부산물의 생성으로 인해 트립토판 전구체인 포스포에놀 피루베이트의 양이 감소하여 L-트립토판의 생산이 감소한다는 문제점이 있다.
- [8] 따라서, 효과적인 L-트립토판 생산능 증가를 위한 연구가 여전히 필요한 실정이다.

[9]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [10] 본 발명자들은 코마가테이박터 자일리너스 유래의 피루베이트, 포스페이트 디키나제 단백질(pyruvate, phosphate dikinase, PPDK) 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 도입된 코리네박테리움 속 미생물의 L-트립토판 생산능이 증가함을 확인함으로써 본 출원을 완성하였다.

[11]

과제 해결 수단

- [12] 본 출원의 하나의 양태는 코마가테이박터 자일리너스 유래의 피루베이트, 포스페이트 디키나제 단백질 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 도입된, L-트립토판 생산능을 가지는 코리네박테리움 속 미생물을 제공한다.
- [13] 하나의 구체예에서, 상기 코마가테이박터 자일리너스 유래의 피루베이트, 포스페이트 디키나제는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다.
- [14] 다른 하나의 구체예에서, 상기 코마가테이박터 자일리너스 유래의 피루베이트, 포스페이트 디키나제는 ppdK 유전자에 의해 코딩되는 것일 수 있다.
- [15] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 미생물로서, 상기 코리네박테리움 속 미생물은 코리네박테리움 글루타미쿰인 것일 수 있다.
- [16] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 미생물로서, 상기 코리네박테리움 속 미생물은 비변형 미생물과 비교하여 L-트립토판 생산능이 증가된 것일 수 있다.
- [17] 본 출원의 다른 하나의 양태는 코마가테이박터 자일리너스 유래의 피루베이트, 포스페이트 디키나제 단백질 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 도입된, L-트립토판 생산능을 가지는 코리네박테리움 속 미생물을 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, L-트립토판의 생산 방법을 제공한다.
- [18] 하나의 구체예에서, 상기 방법은 상기 배양된 미생물, 상기 미생물의 배양물, 상기 미생물의 발효물 또는 상기 배양 배지에서 L-트립토판을 회수하는 단계를 추가적으로 포함하는 것일 수 있다.

[19] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 코마가테이박터 자일리너스 유래의 피루베이트, 포스페이트 디키나제 단백질 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 도입된, L-트립토판 생산능을 가지는 코리네박테리움 속 미생물; 상기 미생물의 배양물, 상기 미생물의 발효물 또는 이들 중 2 이상의 조합을 포함하는 L-트립토판 생산용 조성물을 제공한다.

[20] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 코마가테이박터 자일리너스 유래의 피루베이트, 포스페이트 디키나제 단백질 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 도입된, L-트립토판 생산능을 가지는 코리네박테리움 속 미생물; 상기 미생물의 배양물, 상기 미생물의 발효물 또는 이들 중 2 이상의 조합을 포함하는 조성물의 L-트립토판 생산 용도를 제공한다.

[21]

발명의 효과

[22] 본 출원의 코마가테이박터 자일리너스 유래의 피루베이트, 포스페이트 디키나제 단백질 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 도입된, L-트립토판 생산능을 가지는 코리네박테리움 속 미생물은, 고수율로 L-트립토판을 생산할 수 있어 L-트립토판의 공업적 생산에 유용하게 활용될 수 있다.

[23]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[24] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 출원에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 출원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 출원의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 출원의 범주가 제한된다고 볼 수 없다. 또한, 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 출원이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 출원의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

[25]

[26] 정의

[27]

[28] 본 출원의 명세서 및 첨부된 청구범위에서 사용되는 바와 같이, 단수형 관사 ("a", "an", 및 "the")는 달리 언급되지 않는 한 복수의 대상을 포함할 수 있다. 또한 달리 언급되지 않는 한, 단수형 용어는 복수형을 포함하고 복수형 용어는 단수형을 포함할 수 있다. 또한 본 출원의 명세서 및 첨부된 청구범위에서, 달리 언급되지 않는 한, "또는"의 사용은 "및/또는"을 포함하는 의미로 사용될 수 있다.

[29]

[30] 본 출원에서, 용어 "약(about)"은 특정 숫자 값 앞에 제시될 수 있다. 본 출원에서 사용되는 용어 "약"은 용어 뒤에 기재되는 정확한 숫자뿐만 아니라, 거의 그 숫

자이거나 그 숫자에 가까운 범위까지 포함한다. 그 숫자가 제시된 문맥을 고려하여, 언급된 구체적인 숫자와 가깝거나 거의 그 숫자인지 여부를 결정할 수 있다. 일 예로, 용어 "약"은 숫자 값의 -10% 내지 +10% 범위를 지칭할 수 있다. 다른 예로, 용어 "약"은 주어진 숫자 값의 -5% 내지 +5% 범위를 지칭할 수 있다. 그러나 이에 제한되지 않는다.

[31]

[32] 본 출원에서, 용어 "제1, 제2, 제3,," "i), ii), iii),," 또는 "(a), (b), (c), (d),,"와 같은 기제는 각각의 구성을 구별하기 위해 사용될 수 있다. 상기 용어가 방법, 용도 또는 분석의 단계(step)와 관련하여 사용되었을 경우 이들 용어는 연속적이거나 순서대로 수행되는 것을 의미하는 것이 아니며, 예를 들어, 이들 단계 사이에는 시간적인 간격이 없거나, 동시에 수행되거나, 수 초, 수 분, 수 시간, 수 일, 또는 수 개월 간격을 두고 순차적, 역순, 또는 무작위적으로 수행될 수 있다.

[33]

[34] 본 출원에서, 용어 "이루어지는(consisting of)"은 상기 용어 이하에 기재되는 특정한 특징, 단계, 성분 또는 그 외의 구성 요소(들)의 비율이 총 100%인 것을 의미한다. 용어 "이루어지는" 이하에 기재되는 특징, 단계, 성분 또는 그 외의 구성 요소는 필수적이거나 의무적인 것일 수 있다. 예를 들어, "이루어지는" 이하에 오는 특징, 단계, 성분 또는 그 외의 구성 요소 외에, 다른 임의의 특징, 단계, 성분 또는 그 외의 구성 요소, 또는 필수적이지 않은 특징, 단계, 성분 또는 그 외의 구성 요소는 배제될 수 있다.

[35]

본 출원에서, 용어 "본질적으로 이루어지는(consisting essentially of)"은 본 출원에서 청구하는 대상의 특징, 단계, 성분 또는 그 외의 구성 요소가 불특정한 하나 이상의 특징, 단계, 성분 또는 그 외의 구성 요소의 존재에 실질적으로 영향을 받지 않는 경우, 상기 불특정한 하나 이상의 특징, 단계, 성분 또는 그 외의 구성 요소가 존재할 수 있음을 의미한다.

[36]

본 출원에서, 용어 "포함하는(comprising)"은 상기 용어 이하에 기재되는 특징, 단계, 성분 또는 그 외의 구성 요소의 존재를 의미하며, 추가적인 하나 이상의 특징, 단계, 성분 또는 그 외의 구성 요소의 존재를 배제하지 않는다. 본 출원에서 "포함하는" 이하에 기재되는 특징, 단계, 성분 또는 그 외의 구성 요소는 필수적이거나 의무적인 것일 수 있으나, 일부 구체예에서는 다른 임의의 혹은 필수적이지 않은 특징, 단계, 성분 또는 그 외의 구성 요소를 더 포함할 수 있다.

[37]

[38] 단백질, 폴리펩티드

[39]

[40] 본 출원에서, 용어 "단백질" 또는 "폴리펩티드"는 연속적인 아미노산 잔기의 폴리머 또는 올리고머를 의미한다. 본 출원에서, "폴리펩티드", "단백질" 및 "펩티드"는 상호 교환적으로 사용될 수 있다.

- [41] 또한, 경우에 따라, "활성을 나타내는 아미노산 서열"은 상기 "폴리펩티드", "단백질" 또는 "펩티드"를 의미할 수 있으며,
- [42] 상기 "폴리펩티드", "단백질", "펩티드" 및 "활성을 나타내는 아미노산 서열"이 촉매 활성을 가지는 경우, "효소"로 지칭할 수 있다.
- [43] 본 출원에서, 용어 "성숙 폴리펩티드(mature polypeptide) 또는 성숙 단백질(mature protein)"은 신호 서열(signal sequence) 또는 프로펩티드 서열(propeptide sequence)이 없는 형태의 폴리펩티드 또는 단백질을 의미한다. 성숙 폴리펩티드 또는 성숙 단백질은, 폴리펩티드 또는 단백질의 기능적 형태일 수 있다. 성숙 폴리펩티드 또는 성숙 단백질은 번역 후; 및/또는 번역 후 변형(posttranslational modification) 후;의 최종 형태(final form)의 폴리펩티드를 의미한다. 예를 들어, 상기 번역 후 변형의 예시로는 N-말단 처리(N-terminal processing), C-말단 절단(C-terminal truncation), 글리코실화(glycosylation), 인산화(phosphorylation), 리더 서열(leader sequence) 제거 등이 있을 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [44]
- [45] 본 출원에서 아미노산 서열은 달리 표시되지 않는 한, N-말단 → C-말단 배향으로 기재된다.
- [46] 본 출원에서 아미노산 서열과 관련하여, 특정 서열번호로 기재된 아미노산 서열을 "포함하는" 폴리펩티드 또는 단백질, 특정 서열번호로 기재된 아미노산 서열로 "이루어진" 폴리펩티드 또는 단백질, 또는 특정 서열번호로 기재된 아미노산 서열을 "갖는" 폴리펩티드 또는 단백질에는 해당 서열번호의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드 또는 단백질과 동일 혹은 상응하는 활성을 가지는 경우라면, 일부 아미노산(들)이 결실, 변형, 치환, 보존적 치환 또는 부가된 폴리펩티드 또는 단백질도 포함될 수 있음은 자명하다. 예를 들어, 상기 폴리펩티드 또는 단백질에는 동일 혹은 상응하는 활성을 가지는 경우라면 상기 폴리펩티드 또는 단백질 서열 내부나 앞뒤(N-말단 또는 C-말단)에 단백질의 기능을 변경하지 않는 서열 부가나 결실, 자연적으로 발생할 수 있는 돌연변이, 이의 잠재성 돌연변이(silent mutation) 또는 보존적 치환을 가지는 폴리펩티드 또는 단백질도 포함될 수 있다.
- [47] 예를 들어, 번역-동시에(co-translationally) 또는 번역-후에(post-translationally) 단백질(폴리펩티드)의 이동(translocation)에 관여하는 N-말단의 시그널(또는 리더) 서열과 컨쥬게이트된 폴리펩티드 또는 단백질이나, 폴리펩티드 또는 단백질을 확인, 정제, 또는 합성할 수 있도록 다른 서열 또는 링커와 컨쥬게이트된 폴리펩티드 또는 단백질 또한 상기 특정 서열번호로 기재된 아미노산 서열의 폴리펩티드 또는 단백질의 범위에 포함될 수 있다.
- [48] 본 출원에서, 용어 "보존적 치환(conservative substitution)"은 아미노산을 유사한 구조적 및/또는 화학적 성질을 갖는 다른 아미노산으로 치환시키는 것을 의미한다. 이러한 아미노산 치환은 일반적으로 잔기의 극성, 전하, 용해도, 소수성, 친수성 및/또는 양친매성(amphipathic nature)에서의 유사성에 근거하여 발생할 수

있다. 예를 들어, 양으로 하전된(염기성) 아미노산은 아르기닌, 리신, 및 히스티딘; 음으로 하전된(산성) 아미노산은 글루탐산 및 아스파르트산; 비극성 곁사슬(nonpolar side chain)을 갖는 아미노산(비극성 아미노산)은 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 트립토판 및 프롤린; 극성(polar) 또는 친수성(hydrophilic) 곁사슬을 갖는 아미노산(극성 아미노산)은 세린, 쓰레오닌, 시스테인, 타이로신, 아스파라긴 및 글루타민이 속하는 것으로 분류할 수 있다. 다른 일 예로, 전하를 띠는 곁사슬을 가지는 아미노산인(electrically charged amino acid) 아르기닌, 리신, 히스티딘, 글루탐산, 아스파르트산과, 전하를 띠지 않는 곁사슬을 갖는 아미노산(uncharged amino acid; neutral amino acid로도 지칭)인 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 트립토판, 프롤린, 세린, 쓰레오닌, 시스테인, 타이로신, 아스파라긴 및 글루타민으로 분류할 수 있다. 다른 일 예로, 페닐알라닌, 트립토판 및 타이로신은 방향족 아미노산(aromatic amino acid)으로 분류할 수 있다. 다른 일 예로, 발린, 류신, 이소류신은 분지쇄 아미노산(branched amino acid)으로 분류할 수 있다. 다른 일 예로, 20종 아미노산을 크기에 따라 분류하여 상대적으로 부피(volume)가 작은 아미노산 그룹부터 글리신, 알라닌, 세린; 시스테인, 프롤린, 쓰레오닌, 아스파르트산, 아스파라긴; 발린, 히스티딘, 글루탐산, 글루타민; 이소류신, 류신, 메티오닌, 리신, 아르기닌; 및 페닐알라닌, 트립토판, 타이로신의 5군으로 분류할 수 있다. 그러나 반드시 이에 제한되는 것은 아니다. 통상적으로, 보존적 치환은 폴리펩티드 또는 단백질의 활성에 거의 영향을 미치지 않거나 또는 영향을 미치지 않을 수 있다.

[49]

[50] 유전자, 폴리뉴클레오티드

[51]

[52] 본 출원에서 용어, "유전자(gene)"는 기능적 분자(functional molecule)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드와 상기 폴리뉴클레오티드의 앞뒤의 영역을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 의미하거나, 또는 기능적 RNA (functional RNA)를 의미한다. 일부 구체예에서, 유전자는 각각의 코딩 영역(엑손; exon) 사이에 삽입되는 서열(인트론; intron)을 가질 수 있다.

[53]

[54] 본 출원에서 용어, "폴리뉴클레오티드", "핵산" 또는 "핵산분자"는 뉴클레오티드 단위체(monomer)가 공유결합에 의해 길게 사슬모양으로 이어진 뉴클레오티드의 중합체(polymer)로 일정한 길이 이상의 DNA(예를 들어, cDNA 또는 게놈 DNA) 또는 RNA(예를 들어, mRNA) 가닥을 의미한다. 본 출원에서, "폴리뉴클레오티드", "핵산", 및 "핵산분자"는 상호 교환적으로 사용될 수 있다.

[55]

[56] 동일성, 상동성

[57]

- [58] 본 출원에서 용어, "동일성 (identity)" 또는 "상동성 (homology)" 은 두 개의 주어진 아미노산 또는 염기 서열간의 유사한 정도를 의미하며 백분율로 표시될 수 있다. 본 출원에서, "상동성" 및 "동일성"은 종종 상호 교환적으로 사용될 수 있다.
- [59] 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.
- [60] 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 사용되거나 또는 Smith-Waterman 알고리즘(Smith and Waterman, Adv. Appl. Math (1981) 2:482)과 같은 GAP 컴퓨터 프로그램을 이용하여 서열 정보를 비교함으로써 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 et al.](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.
- [61]
- [62] 또한, 임의의 두 폴리뉴클레오티드 서열이 상동성, 유사성 또는 동일성을 갖는지 여부는 정의된 적절한 혼성화 조건하에서 써던 혼성화(hybridization) 실험에 의해 확인할 수 있으며, 정의되는 적절한 혼성화 조건은 해당 기술 범위 내의 당업자에게 잘 알려진 방법(예컨대, J. Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual; F.M. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., New York)으로 결정될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 실질적으로, 상동성을 갖거나(homologous) 또는 동일한(identical) 폴리뉴클레오티드 서열은 엄격한 조건(stringent conditions)에서 일반적으로 서열 전체 또는 전체-길이의 적어도 약 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%를 따라 혼성화(hybridization) 할 수 있다.
- [63] 본 출원에서, 용어 "엄격한 조건(stringent condition)"이란 폴리뉴클레오티드 간의 특이적 혼성화를 가능하게 하는 조건을 의미한다. 이러한 조건은 문헌(Sambrook et al., supra, 9.50-9.51, 11.7-11.8 참조)에 구체적으로 기재되어 있다. 예를 들어, 상동성 또는 동일성이 높은 폴리뉴클레오티드끼리, 60% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상,

98% 이상, 또는 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 갖는 폴리뉴클레오티드끼리 혼성화하고, 그보다 상동성 또는 동일성이 낮은 폴리뉴클레오티드끼리 혼성화하지 않는 조건, 또는 통상의 써던 혼성화(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 조건일 수 있다.

[64] 상기 혼성화는 두 개의 뉴클레오티드가 상보적 서열일 것을 요구하나, 혼성화된 폴리뉴클레오티드들은 혼성화의 엄격도에 따라 염기 간의 일부 미스매치(mismatch)를 포함할 수 있다. 용어, "상보적"은 서로 혼성화가 가능한 뉴클레오티드 염기 간의 관계를 기술하는데 사용된다. 예를 들면, DNA에 관하여, 아데노신은 티민에 상보적이며 시토신은 구아닌에 상보적이다. 따라서, 본 출원의 폴리뉴클레오티드는 실질적으로 유사한 염기 서열뿐만 아니라 전체 서열에 상보적인 단리된 핵산 단편을 포함할 수 있다.

[65] 예를 들어, 본 출원의 폴리뉴클레오티드와 상동성 또는 동일성을 가지는 폴리뉴클레오티드는 55°C의 T_m 값에서 혼성화하여 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.

[66] 상기 폴리뉴클레오티드를 혼성화하는 적절한 엄격도는 폴리뉴클레오티드의 길이 및 상보성 정도에 의존하고 변수는 해당기술분야에 잘 알려져 있다(예컨대, J. Sambrook et al., 상동).

[67]

[68] 핵산 구조체, 벡터, 형질전환

[69]

[70] 본 출원에서 용어, "핵산 구조체(nucleic acid construct)"는, 하나 이상의 조절 서열(regulatory sequence)을 포함하고, 인위적으로 합성되거나, 자연계에 존재하지 않는 방법으로 특정 서열을 포함하도록 조작되거나, 자연으로부터 분리된 단일 혹은 이중가닥 핵산 분자를 의미한다.

[71]

[72] 본 출원에서 사용된 용어 "벡터"는 적합한 숙주 또는 숙주세포 내로 목적 폴리뉴클레오티드를 전달하기 위한 DNA 제조물을 의미한다. 일 예로 적합한 숙주 내에서 목적 폴리펩티드를 발현시킬 수 있도록 적합한 발현조절영역(또는 발현조절서열)에 작동 가능하게 연결된 목적 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 염기 서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[73] 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(미생물) 내로 형질전환된 후, 숙주 계통과 무관하게 복제되거나 기능할 수 있으며, 계통 그 자체에 통합될 수 있다.

- [74] 본 출원에서 사용되는 벡터는 특별히 제한되지 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.
- [75] 일 예로, 세포 내 염색체 삽입용 벡터를 통해 염색체 내에 목적 폴리뉴클레오티드를 염색체 내로 삽입할 수 있다. 상기 폴리뉴클레오티드의 염색체 내로의 삽입은 당업계에 알려진 임의의 방법, 예를 들면, 상동재조합(homologous recombination)에 의하여 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지는 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 폴리뉴클레오티드의 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.
- [76] 본 출원에서 용어 "형질전환"은 목적 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 숙주세포(미생물) 내에 도입하여 숙주세포(미생물)의 유전 형질을 변화시키는 것을 의미한다. 형질전환된 폴리뉴클레오티드는 숙주세포(미생물)의 염색체 내에 삽입되어 위치하거나 염색체 외에 위치할 수 있다. 또한, 상기 폴리뉴클레오티드는 DNA 또는 RNA를 포함할 수 있다. 상기 폴리뉴클레오티드는 도입 목적에 따라 적절한 형태로 도입될 수 있다. 예를 들면, 목적 폴리펩티드를 발현시키기 위한 폴리뉴클레오티드는 자체적으로 발현되는데 필요한 모든 요소를 포함하는 유전자 구조체인 발현 카세트(expression cassette)의 형태로 숙주세포(미생물)에 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 숙주세포(미생물)에 도입되어 숙주세포(미생물)에서 발현에 필요한 서열과 작동 가능하게 연결되어 있는 것일 수도 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [77] 본 출원에서 용어, "작동가능하게 연결된"은 조절 서열이 코딩 서열의 발현을 제어하도록 조절 서열이 적절한 위치에 배치되는 구성을 의미한다. 따라서 "작동가능하게 연결된"은, 프로모터, 종결자, 신호 서열 또는 인핸서 영역과 같이 알려진 혹은 원하는 활성을 가진 기능적 도메인의 조절 영역이 타겟(유전자 또는 폴리펩티드)의 발현, 분비 또는 기능을 상기의 알려진 혹은 원하는 활성에 따라 조

절할 수 있도록 그 타겟에 부착되거나 연결된 것을 포함한다. 예를 들어, 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 전사를 개시 및 매개하도록 하는 프로모터 서열과 상기 폴리뉴클레오티드 서열이 기능적으로 연결되어 있는 것을 의미할 수 있다.

[78] 본 출원에서 용어, "발현"은 폴리펩티드의 생성에 관여하는 임의의 단계, 예를 들어 전사, 전사 후 변형, 번역, 번역 후 변형, 및 분비 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[79] 본 출원에서 용어, "발현 벡터"는 목적 폴리뉴클레오티드 서열 및 이의 발현을 위해 작동가능하게 연결된 조절 서열을 포함하는 선형 혹은 환형 핵산 분자를 의미한다. 예를 들어, 적합한 숙주 내에서 목적 폴리펩티드를 발현시킬 수 있도록 적합한 발현조절영역(또는 발현조절서열)에 작동 가능하게 연결된 목적 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 염기 서열을 포함하는 것일 수 있다.

[80] 본 출원에서 용어, "조절 서열(regulatory sequence)"은 목적 폴리뉴클레오티드 서열의 발현의 조절에 필요한 폴리뉴클레오티드 서열을 의미한다. 각각의 조절 서열은 코딩 서열에 대해 천연형이거나(기원이 동일함) 또는 외래(foreign; 다른 유전자에서 유래함) 서열, 또는 이들의 변이 서열이거나 다른 인공적 서열일 수 있다. 상기 조절 서열의 예시는 리더 서열(leader sequence), 폴리아데닐레이션 서열(polyadenylation sequence), 프로펩티드 서열, 프로모터, 신호 펩티드 서열, 오퍼레이터 서열, 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열, 전사 및 번역 종결을 조절하는 서열을 포함한다. 상기 조절 서열의 최소 단위는 프로모터, 전사 및 번역 종결 서열을 포함할 수 있다.

[81]

[82] 본 출원에서 용어 "유전자 재조합"은 DNA나 RNA와 같이 유전자를 이루는 요소가 해체와 제조립 과정에서 원래의 서열과는 다르게 뒤바뀌는 자연적 또는 인위적 과정을 의미한다.

[83] 본 출원에서 용어, "재조합 유전자"는 화학적 합성 또는 유전 공학 기술 등 유전자 재조합의 결과로 발생하는 새로운 유전체 구성을 갖는 유전자를 의미한다. 본 출원에서 용어, "재조합 유전자", "재조합 DNA" 및 "재조합 폴리뉴클레오티드"는 상호 교환적으로 사용될 수 있다. 일 예로, 상기 재조합 유전자는 천연에서 함께 발견되지 않는 조절 서열과 같은 핵산 단편의 인위적인 조합을 포함할 수 있다.

[84] 본 출원에서 용어, "재조합 단백질"은 유전자 재조합의 결과로 생산된 단백질을 의미한다.

[85]

[86] 미생물

[87]

[88] 본 출원에서 용어, "미생물(또는, 균주)"는 야생형 미생물이나 자연적 또는 인위적으로 유전적 변형이 일어난 원핵 또는 진핵 미생물을 모두 포함하며, 외부 유

전자가 삽입되거나 내재적 유전자의 활성이 증가되거나 불활성화되는 등의 원인으로 인해서 특정 기작이 약화되거나 증가된 미생물로서, 목적하는 폴리펩티드, 단백질 또는 산물의 생산을 위하여 유전적 변형(modification)을 포함하는 미생물일 수 있다. 본 출원에서 용어, "미생물", "균주", "숙주", 및 "숙주세포"는 상호 교환적으로 사용될 수 있다.

- [89] 본 출원에서 용어, "재조합 미생물"은 유전적으로 변형되어, 자연 발생 미생물과 비교하여 상이한 유전자형 및/또는 표현형을 나타내는(예를 들어, 유전자 변형이 미생물의 핵산 서열 코딩에 영향을 미칠 때) 미생물로서, 상기 미생물의 자손 또는 잠재적 자손을 모두 포함할 수 있다. 본 출원에서 용어, "재조합 미생물", "유전자 변형된 미생물", "재조합 숙주세포", "재조합 세포" 및 "재조합 균주"는 상호 교환적으로 사용될 수 있다. 상기 재조합 미생물은 예를 들어, 천연(비-재조합) 형태 내에서 발견되지 않는 유전자를 발현하거나; 천연 형태 내에서 발현되는 유전자를 발현하지 않거나 또는 천연 형태 내에서 발현되는 것과는 다른 양상으로 천연 유전자를 발현할 수 있다.
- [90] 예를 들어, 본 출원의 미생물은 피루베이트, 포스페이트 디키나제 단백질 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 도입된 미생물(예컨대, 재조합 미생물)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [91] 본 출원에서 용어, "L-트리토판 생산능을 가지는 미생물"은 L-트리토판을 생체 내에서 생산할 수 있는 미생물로서, 내재적으로 L-트리토판 생산능이 없으나 L-트리토판의 생산능이 부여된 미생물, 또는 내재적으로 L-트리토판 생산능을 갖는 미생물을 모두 포함할 수 있다. L-트리토판 생산 능력은 종 개량에 의해 부여되거나 증진될 수 있다.
- [92] 본 출원에서 용어, "비변형 미생물(균주)"은 자연적으로 발생할 수 있는 돌연변이를 포함하는 미생물(균주)을 제외하는 것이 아니며, 야생형 미생물(균주) 또는 천연형 미생물(균주) 자체이거나, 자연적 또는 인위적 요인에 의한 유전적 변이로 형질이 변화되기 전 미생물(균주)을 의미할 수 있다. 본 출원에서, 용어 "비변형 미생물(균주)"은 "변형 전 미생물(균주)", "비변이 미생물(균주)", "모미생물", "모균주", "야생형 미생물(균주)", "참조 미생물(균주)" 또는 "기준 미생물(균주)"과 상호 교환적으로 사용될 수 있다. 본 출원에서 비변형 미생물은 본 출원의 피루베이트, 포스페이트 디키나제 단백질 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 도입되지 않거나, 도입되기 전의 미생물(균주)을 의미할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 본 출원에서 비변형 미생물은 서열번호 1로 이루어진 폴리펩티드 또는 서열번호 2로 이루어진 폴리뉴클레오티드를 포함하지 않는 미생물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[93]

[94] 단백질(폴리펩티드) 활성의 증가

[95]

- [96] 본 출원에서 용어, 단백질(폴리펩티드) 활성화의 "증가(increase)"는, 숙주세포(미생물)내에서 단백질(폴리펩티드)의 활성이 내재적 활성화에 비하여 증가되는 것을 의미한다. 상기 증가는 활성화(activation), 상향조절(up-regulation), 과발현(overexpression), 강화(enhancement) 등의 용어와 혼용될 수 있다. 상기 숙주세포(미생물)는 원핵 또는 진핵 미생물일 수 있다.
- [97] 상기 단백질(폴리펩티드) 활성화의 증가는 숙주세포(미생물)가 내재적으로 가지고 있지 않았던 단백질(폴리펩티드) 활성을 나타내게 되는 것, 또는 내재적 활성화 또는 변형 전 활성화에 비하여 향상된 단백질(폴리펩티드) 활성을 나타내게 되는 것을 모두 포함할 수 있다.
- [98] 예를 들어, 상기 "내재적으로 가지고 있지 않았던 단백질(폴리펩티드) 활성을 나타내게 되는 것" 또는 향상된 단백질(폴리펩티드) 활성을 나타내게 되는 것은 "단백질(폴리펩티드)의 도입"에 의한 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [99] 본 출원에서 용어, 단백질(폴리펩티드)의 "도입"은, 미생물이 본래 가지고 있지 않았던 유전자가 그 미생물내에서 발현됨에 따라 특정 단백질의 활성을 나타내게 되는 것 또는 해당 단백질의 내재적 활성화 또는 변형 전 활성화에 비하여 폴리펩티드 활성이 강화, 증가 또는 향상되는 것을 의미한다. 예를 들어, 숙주세포(미생물)내로의 상기 단백질(폴리펩티드)을 코딩하는 유전자의 도입에 의한 것일 수 있다. 예를 들어, 특정 단백질(폴리펩티드)을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 숙주세포(미생물) 내 염색체로 도입되거나, 특정 단백질(폴리펩티드)을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터가 숙주세포(미생물) 내로 도입되어 이의 활성이 나타나거나 향상되는 것일 수 있다.
- [100] 상기 "내재적 활성화"는 자연적 또는 인위적 요인에 의한 유전적 변이로 형질이 변화하는 경우, 형질 변환 전 숙주세포(미생물) 또는 비변형 숙주세포(미생물)가 본래 가지고 있던 특정 단백질(폴리펩티드)의 활성을 의미한다. 이는 "변형 전 활성화"와 혼용되어 사용될 수 있다.
- [101] 단백질(폴리펩티드)의 활성이 내재적 활성화에 비하여 증가한다는 것은, 숙주세포(미생물)의 단백질(폴리펩티드)의 활성 및/또는 농도(발현량)가 형질 변환 전 숙주세포(미생물) 또는 비변형 숙주세포(미생물)가 본래 가지고 있던 상기 단백질(폴리펩티드)의 활성 및/또는 농도(발현량)에 비하여 향상된 것을 의미한다.
- [102] 일 예로, 상기 증가는 상응하는 단백질(폴리펩티드)의 활성이 없던 것이 나타나거나, 또는 이의 활성 또는 농도가 형질 변환 전 숙주세포(미생물) 또는 비변형 숙주세포(미생물)에서의 활성 또는 농도를 기준으로 하여 일반적으로 약 1% 이상, 약 10% 이상, 약 25% 이상, 약 50% 이상, 약 75% 이상, 약 100% 이상, 약 150% 이상, 약 200% 이상, 약 300% 이상, 약 400% 이상 또는 약 500% 이상, 최대 약 1000% 또는 약 2000% 이상까지 증가되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [103] 상기 단백질(폴리펩티드)의 활성의 증가는 외래의 단백질(폴리펩티드)을 도입하거나, 내재적인 단백질(폴리펩티드)의 활성 증가를 통해 달성할 수 있다. 상기 단백질(폴리펩티드)의 활성의 증가 여부는 해당 단백질(폴리펩티드)의 활성 정도, 발현량 또는 해당 단백질(폴리펩티드) 활성에 기인한 산물의 양의 증가로부터 확인할 수 있다.
- [104] 상기 단백질(폴리펩티드)의 활성의 증가는 당해 분야에 잘 알려진 다양한 방법에 의해 달성될 수 있으며, 목적 단백질(폴리펩티드)의 활성을 변형전 숙주세포(미생물)보다 증가시킬 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).
- [105] 구체적으로, 본 출원의 단백질(폴리펩티드)의 활성의 증가는
- [106] 1) 단백질(폴리펩티드)을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 세포 내 카피수 증가;
- [107] 2) 단백질(폴리펩티드)을 코딩하는 염색체상의 유전자 발현조절영역의 변형(예를 들어, 발현조절영역 내 변이 도입, 더욱 강한 활성을 갖는 서열로의 교체, 또는 더욱 강한 활성을 갖는 서열 삽입);
- [108] 3) 단백질(폴리펩티드)을 코딩하는 유전자 전사체의 개시코돈 또는 5'-UTR 영역을 코딩하는 염기서열의 변형;
- [109] 4) 단백질(폴리펩티드) 활성이 증가되도록 상기 단백질(폴리펩티드)의 아미노산 서열의 변형;
- [110] 5) 단백질(폴리펩티드) 활성이 증가되도록 상기 단백질(폴리펩티드)을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열의 변형(예를 들어, 단백질(폴리펩티드)의 활성이 증가되도록 변형된 단백질(폴리펩티드)을 코딩하도록 상기 단백질(폴리펩티드) 코딩 유전자의 폴리뉴클레오티드 서열의 변형);
- [111] 6) 단백질(폴리펩티드)의 활성을 나타내는 외래 단백질(폴리펩티드) 또는 이를 코딩하는 외래 폴리뉴클레오티드의 도입;
- [112] 7) 단백질(폴리펩티드)을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 코돈 최적화;
- [113] 8) 단백질(폴리펩티드)의 삼차구조를 분석하여 노출 부위를 선택하여 변형하거나 화학적으로 수식; 또는
- [114] 9) 상기 1) 내지 8) 중 선택된 2 이상의 조합에 의한 것일 수 있으나, 이에, 특별히 제한되는 것은 아니다.
- [115] 예를 들어,
- [116] 상기 1) 단백질(폴리펩티드)을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 세포 내 카피수 증가는, 적절한 조절 서열에 작동가능하게 연결된 상기 단백질(폴리펩티드)을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터가 숙주세포(미생물) 내로 도입된 것일 수 있다. 또는, 적절한 조절 서열에 작동가능하게 연결된 상기 단백질(폴리펩티드)을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 숙주세포(미생물) 내의 염색체 내에 1 카

피 또는 2 카피 이상 도입된 것일 수 있다. 상기 염색체 내에 도입은 숙주세포(미생물) 내의 염색체 내로 상기 폴리뉴클레오티드를 삽입시킬 수 있는 벡터가 숙주세포(미생물) 내에 도입됨으로써 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 벡터는 전술한 바와 같다. 상기 조절 서열은 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열에 대해 천연형이거나(기원이 동일함) 또는 외래(foreign; 다른 유전자에서 유래함) 서열, 또는 이들의 변이 서열이거나 다른 인공적 서열 일 수 있으며 숙주세포(미생물) 내에서 상기 폴리뉴클레오티드의 발현을 유도할 수 있다.

- [117] 상기 2) 단백질(폴리펩티드)을 코딩하는 염색체상의 유전자 발현조절영역(또는 발현조절서열)을 활성이 강력한 서열로의 교체는, 예를 들면, 상기 발현조절영역의 활성을 더욱 증가하도록 결실, 삽입, 치환 또는 이들의 조합으로 서열상의 변이 도입, 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.
- [118] 공지된 강력한 프로모터의 예에는 cj1 내지 cj7 프로모터(미국등록특허 US 7662943 B2), lac 프로모터, trp 프로모터, trc 프로모터, tac 프로모터, 람다 파아지 PR 프로모터, PL 프로모터, tet 프로모터, gapA 프로모터, SPL7 프로모터, SPL13(sm3) 프로모터(미국등록특허 US 10584338 B2), O2 프로모터(미국등록특허 US 10273491 B2), tkt 프로모터 및 yccA 프로모터 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [119] 상기 3) 단백질(폴리펩티드)을 코딩하는 유전자의 개시코돈 또는 5'-UTR을 코딩하는 영역의 염기서열 변형은, 예를 들면, 내재적 개시코돈에 비해 단백질(폴리펩티드) 발현율이 더 높은 다른 개시코돈이나, 내재적 RBS(ribosome binding site) 서열에 비해 단백질(폴리펩티드)의 발현율이 더 높은 RBS 서열을 코딩하도록 하는 변형일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [120] 상기 4) 및 5)의 단백질(폴리펩티드)의 아미노산 서열 또는 폴리뉴클레오티드 서열의 변형은, 단백질(폴리펩티드)의 활성이 증가하도록 상기 단백질(폴리펩티드)의 아미노산 서열 또는 상기 단백질(폴리펩티드)을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 결실, 삽입, 치환 또는 이들의 조합으로 서열상의 변이 도입, 또는 활성이 증가하도록 변형된 아미노산 서열 또는 폴리뉴클레오티드 서열로의 교체일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 교체는 예를 들어 상동재조합에 의하여 폴리뉴클레오티드를 염색체 내로 삽입함으로써 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [121] 상기 6) 단백질(폴리펩티드)의 활성을 나타내는 외래 폴리뉴클레오티드의 도입은, 상기 단백질(폴리펩티드)과 동일/유사한 활성을 나타내는 단백질(폴리펩티드)을 코딩하는 외래 폴리뉴클레오티드의 숙주세포(미생물) 내 도입일 수 있다. 상기 외래 폴리뉴클레오티드는 상기 단백질(폴리펩티드)과 동일/유사한 활성을

나타내는 한 그 유래나 서열에 제한이 없다. 상기 도입에 이용되는 방법은 공지된 형질전환 방법을 당업자가 적절히 선택하여 수행될 수 있으며, 숙주세포 내에서 상기 도입된 폴리뉴클레오티드가 발현됨으로써 단백질(폴리펩티드)이 생성되어 그 활성이 증가될 수 있다.

[122] 상기 7) 단백질(폴리펩티드)을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 코돈 최적화는, 내재 폴리뉴클레오티드가 숙주세포(미생물) 내에서 전사 또는 번역이 증가하도록 코돈 최적화한 것이거나, 또는 외재 폴리뉴클레오티드가 숙주세포(미생물) 내에서 최적화된 전사, 번역이 이루어지도록 이의 코돈을 최적화한 것일 수 있다.

[123] 상기 8) 단백질(폴리펩티드)의 삼차구조를 분석하여 노출 부위를 선택하여 변형하거나 화학적으로 수식하는 것은, 예를 들어 분석하고자 하는 단백질(폴리펩티드)의 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.

[124] 이와 같은 단백질(폴리펩티드) 활성의 증가는, 상응하는 단백질(폴리펩티드)의 활성 또는 농도가 야생형이나 변형 전 숙주세포(미생물)에서 발현된 단백질(폴리펩티드)의 활성 또는 농도를 기준으로 하여 증가되거나, 해당 단백질(폴리펩티드) 활성에 기인한 산물의 양이 증가되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[125]

[126] 본 출원의 미생물에서 폴리뉴클레오티드의 일부 또는 전체의 변형은 (a) 미생물 내 염색체 삽입용 벡터를 이용한 상동 재조합(homologous recombination)을 이용한 방법이나 또는 유전자가위 (engineered nuclease, e.g., CRISPR-Cas9)를 이용한 유전체 교정 및/또는 (b) 자외선 및 방사선 등과 같은 빛 및/또는 화학물질 처리에 의해 유도될 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[127]

[128] 배양

[129]

[130] 본 출원에서, 용어 "배양"은 미생물을 적당히 조절된 환경 조건에서 생육시키는 것을 의미한다. 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.

[131] 본 출원에서 용어, "배지"는 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 있다. 예를 들어, 본 출원의

미생물은 적당한 탄소원, 질소원, 인원, 무기화합물, 아미노산 및/또는 비타민 등을 함유한 통상의 배지 내에서 호기성 조건 하에서 온도, pH 등을 조절하면서 배양할 수 있다. 예를 들어, 코리네박테리움 속 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.

- [132] 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 2종 이상이 조합되어 사용될 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [133] 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 제한되는 것은 아니다.
- [134] 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 제한되는 것은 아니다.
- [135] 또한, 본 출원의 미생물의 배양 중에 수산화암모늄, 수산화칼륨, 암모니아, 인산, 황산 등과 같은 화합물을 배지에 적절한 방식으로 첨가하여, 배지의 pH를 조정할 수 있다. 또한, 배양 중에는 지방산 폴리글리콜 에스테르와 같은 소포제를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다. 또한, 배지의 호기 상태를 유지하기 위하여, 배지 내로 산소 또는 산소 함유 기체를 주입하거나 혐기 및 미호기 상태를 유지하기 위해 기체의 주입 없이 혹은 질소, 수소 또는 이산화탄소 가스를 주입할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [136] 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 제한되는 것은 아니다.

- [137] 본 출원에서, 용어 "배양물"이란 특정 미생물을 배양 배지에서 배양하여 수득한 배양액, 농축 배양액, 배양액의 건조물, 배양 여과액, 농축 배양 여과액, 또는 배양 여과액의 건조물을 의미하며, 상기 배양액은 특정 미생물을 포함하는 것을 의미하고, 상기 배양 여과액은 특정 미생물을 실질적으로(여기서, 실질적으로는 여과등에 의해 분리되는 특정 미생물을 배제한다는 것을 의미하는 것으로서 여과액에 미생물이 완전히 배제된다는 것을 의미하지는 않는다.) 포함하지 않는 것을 의미한다. 상기 배양물은 그 제형이 제한되지 아니하고, 일 예로 액체, 에멀전, 또는 고체일 수 있다.
- [138] 본 출원에서, 용어 "발효"는 미생물이 자신이 가지고 있는 효소를 이용하여 유기물을 분해시키는 과정 중 부패반응이 아닌 것을 의미한다. 발효 반응과 부패 반응은 비슷한 과정에 의해 진행되지만, 분해 결과 유용한 물질이 만들어지면 발효라 하고 악취가 나거나 유해한 물질이 만들어지면 부패라고 한다.
- [139] 본 출원에서 상기 미생물로부터 발효물을 수득하는 방법은 특별히 제한되지 않으며, 당해 기술분야 또는 유사 분야에서 통상적으로 사용하는 방법에 따라 수득할 수 있다.
- [140] 본 출원에서, 용어 "발효물"은 발효된 물질 자체뿐만 아니라, 발효된 미생물을 포함하는 물질, 발효된 미생물로부터 발생한 배양물, 배양물의 발효물, 농축 발효물, 발효물의 건조물, 발효물 여과액, 농축 발효물 여과액, 또는 발효물 여과액의 건조물, 발효물의 추출물 또는 발효물의 희석액 등, 상기 미생물로부터 발생한 발효물을 포함하는 모든 종류의 물질을 포함한다.
- [141]
- [142] **본 출원의 구체적 설명**
- [143]
- [144] 이하, 본 출원의 구체예를 보다 상세하게 설명하면 다음과 같다.
- [145]
- [146] 본 출원의 하나의 양태는 코마가테이박터 자일리너스 유래의 피루베이트, 포스페이트 디키나제 단백질 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 도입된, L-립토판 생산능을 가지는 코리네박테리움 속 미생물을 제공한다.
- [147]
- [148]
- [149] 본 출원에서 용어, "피루베이트, 포스페이트 디키나제(pyruvate, phosphate dikinase, PPK)"는 $[ATP + \text{피루베이트} + \text{포스페이트} \leftrightarrow \text{포스포에놀피루베이트 (PEP)} + \text{디포스페이트}]$ 반응을 촉매하는 트랜스퍼라제의 패밀리 중의 한 효소를 의미한다. 본 출원의 피루베이트, 포스페이트 디키나제는 PPK로 혼용하여 사용할 수 있다. 구체적으로, 본 출원의 피루베이트, 포스페이트 디키나제는 *ppdk* 유전자에 의해 코딩되는 피루베이트, 포스페이트 디키나제 활성을 갖는 단백질일 수 있으나, 피루베이트, 포스페이트 디키나제에 상응하는 활성을 가지는 것이라면, 그 종류에 특별히 제한되지 않는다. 상기 *ppdk* 유전자에 의해 코딩되는 피

루베이트, 포스페이트 디키나제는 당업계에 공지되어 있으며, 상기 피루베이트, 포스페이트 디키나제의 아미노산 및 폴리뉴클레오티드 서열은 공지의 데이터베이스에서 얻을 수 있으며, 그 예로 NCBI의 GenBank 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[150] 일 예로, 상기 코마가테이박터 자일리너스(*Komagataeibacter xylinus*) 유래의 피루베이트, 포스페이트 디키나제 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 이와 60% 이상의 상동성(homology) 또는 동일성(identity)을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 피루베이트, 포스페이트 디키나제 단백질 활성을 갖는 한, 이에 제한되는 것은 아니다. 구체적으로 서열번호 1의 아미노산 서열에서 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 서열을 포함하더라도 상기 피루베이트, 포스페이트 디키나제 단백질에 상응하는 효능을 나타내는 단백질이라면 상기 피루베이트, 포스페이트 디키나제 단백질에 포함될 수 있다. 또한 상기 서열번호 1의 아미노산 서열과 적어도 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 가지는 아미노산 서열을 가지거나, 포함하거나, 상기 아미노산 서열로 이루어지거나, 상기 아미노산 서열로 본질적으로 이루어지며(essentially consisting of) 상기 피루베이트, 포스페이트 디키나제 단백질에 상응하는 효능을 나타내는 단백질이라면 상기 피루베이트, 포스페이트 디키나제 단백질에 포함될 수 있다.

[151]

[152] 또한, 상기 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 이와 60% 이상의 상동성(homology) 또는 동일성(identity)을 갖는 아미노산 서열을 갖는 코마가테이박터 자일리너스 유래의 피루베이트, 포스페이트 디키나제 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 서열은, 예를 들어, 당업계에 공지된 코돈 정보에 기초하여 수득할 수 있다. 일 예로 상기 피루베이트, 포스페이트 디키나제 단백질은 서열번호 2의 서열 또는 서열번호 2의 서열과 상동성 또는 동일성이 60% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상인 염기 서열을 가지거나 포함하거나, 상기 염기 서열로 이루어지거나, 본질적으로 이루어질 수 있는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 서열번호 2의 염기 서열은 공지의 데이터베이스에서 얻을 수 있으며, 그 예로 NCBI의 GenBank 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[153] 본 출원에서, 본 출원에서, 상기 서열번호 2의 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드(유전자)는 서열번호 2의 염기 서열을 가지는 폴리뉴클레오티드(유전자), 서열번호 2의 염기 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오티드(유전자) 또는 *ppdk*와 혼용하여 사용될 수 있다.

[154] 본 출원의 폴리뉴클레오티드는 코돈의 축퇴성(degeneracy)으로 인하여 또는 본 출원의 피루베이트, 포스페이트 디키나제 단백질을 발현시키고자 하는 생물에서 선호되는 코돈을 고려하여, 본 출원의 피루베이트, 포스페이트 디키나제 단

백질의 아미노산 서열을 변화시키지 않는 범위 내에서 코딩 영역에 다양한 변형이 이루어질 수 있다. 따라서, 코돈 축퇴성 (codon degeneracy)에 의해 본 출원의 피루베이트, 포스페이트 디키나제 단백질의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드 또는 이와 상동성 또는 동일성을 가지는 폴리펩티드로 번역될 수 있는 폴리뉴클레오티드 역시 본 출원의 폴리뉴클레오티드에 포함될 수 있음은 자명하다. 예를 들어, 본 출원의 폴리뉴클레오티드는 서열번호 2 또는 이의 축퇴성 서열 (degenerated sequence)일 수 있다.

[155] 다른 예시로, 본 출원의 폴리뉴클레오티드는 서열번호 2와 상동성 또는 동일성이 60% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상인 염기 서열을 가지거나 포함하거나, 또는 서열번호 2와 상동성 또는 동일성이 60% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상인 염기 서열로 이루어지거나 본질적으로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[156] 또한, 본 출원의 폴리뉴클레오티드에는 공지의 유전자 서열로부터 제조될 수 있는 프로브, 예를 들면, 본 출원의 폴리뉴클레오티드 서열의 전체 또는 일부에 대한 상보 서열과 엄격한 조건 하에 혼성화하여, 본 출원의 피루베이트, 포스페이트 디키나제 단백질을 코딩하는 서열이라면 제한 없이 포함될 수 있다.

[157]

[158] 본 출원의 목적상, 본 출원의 미생물은 피루베이트, 포스페이트 디키나제 단백질 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 도입되어, 목적하는 L-트립토판을 생산할 수 있는 미생물을 모두 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 출원의 미생물은 피루베이트, 포스페이트 디키나제 단백질 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 도입됨으로써, L-트립토판 생산능이 증가된 것을 특징으로 하며, 유전적으로 변형된 미생물 또는 재조합 미생물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로, 상기 L-트립토판 생산능이 증가된 재조합 균주는, 천연의 야생형 미생물 또는 피루베이트, 포스페이트 디키나제의 내재적 활성을 가지거나, 피루베이트, 포스페이트 디키나제의 내재적 활성이 없는 비변형 미생물에 비하여 L-트립토판 생산능이 증가된 미생물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[159] 일 예로, L-트립토판 생산능을 가지는 미생물은 L-트립토판을 생물체 내에서 생산할 수 있는 원핵 또는 진핵 미생물 균주로서, 내재적으로 L-트립토판 생산능을 갖는 미생물 또는 L-트립토판 생산능이 없는 모균주에 본 출원의 도입된 피루베이트, 포스페이트 디키나제 단백질의 활성으로 인해 L-트립토판의 생산능이 부여된 미생물을 모두 포함할 수 있다. L-트립토판 생산 능력은 종 개량에 의해 부여되거나 증진될 수 있다.

[160] 본 출원의 미생물은 다양한 공지의 방법에 의해 피루베이트, 포스페이트 디키나제 단백질 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 도입된 미생물을 모두 포함할 수 있다.

[161]

[162] 일 예로, 본 출원의 L-트립토판 생산능을 가지는 재조합 미생물은 벡터를 통해 형질전환되어 본 출원의 피루베이트, 포스페이트 디키나제를 코딩하는 외래 유전자, 구체적으로, 코마가테이박터 자일리너스 유래의 피루베이트, 포스페이트 디키나제를 코딩하는 외래 유전자가 도입되어 L-트립토판을 생산할 수 있는 모든 미생물을 포함할 수 있다.

[163]

[164] 예를 들어, 상기 L-트립토판을 생산하는 미생물은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 단백질, 또는 서열번호 1의 아미노산 서열과 적어도 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.7% 또는 99.9% 이상의 상동성 또는 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열이 도입된 미생물일 수 있다.

[165] 예를 들어, 상기 L-트립토판을 생산하는 미생물은 상기 서열번호 1의 아미노산 서열과 적어도 80% 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 단백질을 코딩할 수 있는 폴리뉴클레오티드; 또는 서열번호 2의 염기서열, 또는 서열번호 2의 염기서열과 상동성 또는 동일성이 60% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상인 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드;가 도입된 미생물일 수 있다.

[166]

[167] 일 예로, 본 출원의 L-트립토판 생산능이 증가된 미생물은 비변형 미생물과 비교하여 L-트립토판 생산능이 증가된 미생물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 일 예로, 상기 L-트립토판 생산능의 증가 여부를 비교하는 대상 균주인, 비변형 미생물은 CM05-9157 균주일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[168] 일 예로, 상기 L-트립토판 생산능이 증가된 미생물은 변이 전 모미생물(모균주) 또는 비변형 미생물의 L-트립토판 생산능에 비하여 약 1% 이상, 구체적으로는 약 1% 이상, 약 2.5% 이상, 약 5% 이상, 약 6% 이상, 약 7% 이상, 약 8% 이상, 약 9% 이상, 약 10% 이상, 약 15% 이상, 약 16% 이상, 약 17% 이상 또는 약 18% 이상 (상한값은 특별한 제한은 없으며, 예컨대, 약 200% 이하, 약 150% 이하, 약 100% 이하, 약 50% 이하, 약 45% 이하, 약 40% 이하, 약 35% 이하, 약 30% 이하, 약 25% 이하 또는 약 20% 이하일 수 있음) 증가된 것일 수 있으나, 변이 전 모미생물(모균주) 또는 비변형 미생물의 생산능에 비해 +값의 증가량을 갖는 한, 이에 제한되지 않는다. 다른 예에서, 상기 L-트립토판 생산능이 증가된 재조합 균주는 변이 전 모미생물(모균주) 또는 비변형 미생물에 비하여, L-트립토판 생산능이 약 1.1 배 이상, 약 1.15배 이상, 약 1.16배 이상, 약 1.17배 이상 또는 약 1.18배 이상 (상한값은 특별한 제한은 없으며, 예컨대, 약 10배 이하, 약 5배 이하, 약 3배 이하, 약 2배 이하, 약 1.5배 이하, 약 1.4배 이하, 약 1.3배 이하 또는 약 1.2배 이하일 수 있음) 증가된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[169]

- [170] 일 예로, 본 출원의 L-트립토판 생산능을 갖는 미생물은 원핵세포 또는 진핵세포 모두 가능하나, 구체적으로 원핵세포일 수 있다. 상기 원핵세포는, 일 예로 에스케리치아 속(*Escherichia* sp.), 어위니아 속(*Erwinia* sp.), 세라티아 속(*Serratia* sp.), 프로비덴시아 속(*Providencia* sp.), 코리네박테리움 속(*Corynebacteria* sp.), 슈도모나스 속(*Pseudomonas* sp.), 렙토스피라 속(*Leptospira* sp.), 살모넬라 속(*Salmonella* sp.), 브레비박테리아 속(*Brevibacteria* sp.), 하이포모나스 속(*Hypomononas* sp.), 크로모박테리움 속(*Chromobacterium* sp.) 및 노카디아 속(*Nocardia* sp.), 또는 곰팡이류(fungi) 또는 효모류(yeast)에 속하는 미생물이 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로는, 에스케리치아 속, 코리네박테리움 속, 렙토스피라 속의 미생물과 효모일 수 있다. 더욱 구체적으로는, 코리네박테리움(*Corynebacterium*) 속 미생물일 수 있다.
- [171] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 미생물로서, 본 출원의 미생물은 코리네박테리움(*Corynebacterium*) 속 미생물일 수 있다.
- [172] 본 출원의 일 예로, 본 출원의 미생물은 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*), 코리네박테리움 크루디락티스(*Corynebacterium crudilactis*), 코리네박테리움 데세르티(*Corynebacterium deserti*), 코리네박테리움 이피시엔스(*Corynebacterium efficiens*), 코리네박테리움 칼루내(*Corynebacterium callunae*), 코리네박테리움 스테셔널리스(*Corynebacterium stationis*), 코리네박테리움 싱굴라레(*Corynebacterium singulare*), 코리네박테리움 할로톨레란스(*Corynebacterium halotolerans*), 코리네박테리움 스트리아툼(*Corynebacterium striatum*), 코리네박테리움 암모니아게네스(*Corynebacterium ammoniagenes*), 코리네박테리움 폴루티솔리(*Corynebacterium pollutisoli*), 코리네박테리움 이미탄스(*Corynebacterium imitans*), 코리네박테리움 테스트디노리스(*Corynebacterium testudinoris*) 또는 코리네박테리움 플라베스센스(*Corynebacterium flavescens*)일 수 있다. 구체적으로, 본 출원의 미생물은 코리네박테리움 속 미생물, 보다 구체적으로 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [173] 구체적으로, 본 출원의 미생물은 코리네박테리움 속 미생물, 보다 구체적으로 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [174] 한편, 본 출원의 L-트립토판 생산능을 가지는 코리네박테리움 속 미생물은 천연의 야생형 미생물 자체, L-트립토판 생산 기작과 관련된 유전자의 활성을 증가시키거나 감소시켜 향상된 L-트립토판 생산능을 가지게 된 코리네박테리움 속 미생물, 또는 외부 유전자의 활성을 도입 또는 증가시켜 향상된 L-트립토판 생산능을 가지게 된 코리네박테리움 속 미생물을 모두 포함할 수 있다.
- [175]
- [176] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 본 출원의 코마가테이박터 자일리너스 유래의 피루베이트, 포스페이트 디키나제 단백질 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오

티드가 도입된, L-트립토판 생산능을 가지는 코리네박테리움 속 미생물을 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, L-트립토판의 생산 방법을 제공한다.

[177] 본 출원의 방법에 있어서, 미생물의 배양은 당업계에 알려진 임의의 배양 조건 및 배양 방법이 사용될 수 있다. 이러한 배양 과정은 당업자라면 선택되는 미생물에 따라 용이하게 조정하여 사용할 수 있다.

[178] 본 출원의 배양에 의하여 생산된 L-트립토판은 배지 중으로 분비되거나 세포 내에 잔류할 수 있다.

[179]

[180] 하나의 구체예에서, 본 출원의 L-트립토판 생산 방법은 본 출원의 미생물을 준비하는 단계, 상기 균주를 배양하기 위한 배지를 준비하는 단계, 또는 이들의 조합(순서에 무관, in any order)을, 예를 들어, 상기 배양하는 단계 이전에, 추가로 포함할 수 있다.

[181] 본 출원의 L-트립토판 생산방법은, 상기 배양된 미생물, 상기 미생물의 배양물, 상기 미생물의 발효물 또는 상기 배양 배지에서 목적 물질, 구체적으로는 L-트립토판을 회수하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 회수하는 단계는 상기 배양하는 단계 이후에 추가로 포함될 수 있다.

[182] 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-트립토판을 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 목적물질, 구체적으로는 L-트립토판을 회수할 수 있다.

[183] 또한, 본 출원의 L-트립토판 생산 방법은, 추가적으로 정제 단계를 포함할 수 있다. 상기 정제는 당해 기술분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여, 수행할 수 있다. 일 예에서, 본 출원의 L-트립토판 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.

[184] 본 출원의 방법에서, 피루베이트, 포스페이트 디키나제, 도입 및 L-트립토판 등은 상기 다른 양태에서 기재한 바와 같다.

[185]

[186] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 본 출원의 코마가테이박터 자일리너스 유래의 피루베이트, 포스페이트 디키나제 단백질 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 도입된, L-트립토판 생산능을 가지는 코리네박테리움 속 미생물; 상기 미생물의 배양물, 상기 미생물의 발효물 또는 이들 중 2 이상의 조합을 포함하는 L-트립토판 생산용 조성물을 제공한다.

- [187] 본 출원의 조성물은 L-트립토판 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 한정되는 것은 아니다.
- [188] 하나의 구체예로, 본 출원의 조성물에 존재하는 각 구성요소는 미생물학적으로 유효한 양, 또는 생산용 조성물에서 적절하게 존재할 수 있는 양으로 포함할 수 있다.
- [189] 본 출원의 조성물에서, 피루베이트, 포스페이트 디키나제, 도입 및 L-트립토판 등은 상기 다른 양태에서 기재한 바와 같다.
- [190]
- [191] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 본 출원의 코마가테이박터 자일리너스 유래의 피루베이트, 포스페이트 디키나제 단백질 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 도입된, L-트립토판 생산능을 가지는 코리네박테리움 속 미생물의 L-트립토판 생산 용도를 제공한다.
- [192] 본 출원의 용도에서, 피루베이트, 포스페이트 디키나제, 도입 및 L-트립토판 등은 상기 다른 양태에서 기재한 바와 같다.

[193]

발명의 실시를 위한 형태

- [194] 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.

[195]

- [196] 실시예 1. 포스포에놀피루베이트 신타아제(**Phosphoenolpyruvate synthase, ppsA**) 또는 피루베이트, 포스페이트 디키나제(**Pyruvate, phosphate dikinase, ppdK**) 유전자 탐색 및 선별

[197]

- [198] gluconeogenesis 활성이 높은 포스포에놀피루베이트 신타아제 또는 피루베이트, 포스페이트 디키나제를 선별하기 위해 문헌 조사 결과를 기반으로 1~3개의 carbon으로 구성된 탄소원을 이용하는 acetic acid bacteria, methanogen 유래의 생물들을 탐색하였다. 그 중 생산 균주에 적용 가능한 생물 안전도 (Biosafety level) 와 확보 가능성을 고려하여 하기 표 1 과 같이 포스포에놀피루베이트 신타아제 또는 피루베이트, 포스페이트 디키나제를 보유 하고 있는 것으로 예상되는 4종의 미생물을 선정하였다.

[199]

- [200] [표1]

순서	균주	단백질 등록 번호	계놈 등록 번호	생물 안전도
1	<i>Komagataeibacter xylinus</i>	WP_007399515 .1	NZ_CP02464 4.1	1
2	<i>Acetobacter pasteurianus</i> subsp.	ASC06387.1	NZ_CP02192 2.1	1
3	<i>Methanosarcina acetivorans</i> str. C2A	WP_011023333 .1	NZ_AE01029 9.1	1
4	<i>Escherichia coli</i>	WP_000069375 .1	NZ_CP08489 9.1	1
5	<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC C13869	WP_011013725 .1	NZ_CP01633 5.1	1

[201] 실시예 2. 외래 피루베이트, 포스페이트 디키나제를 도입한 L-트립토판 생산 미생물의 제작

[202]

[203] 실시예 2-1. 유전자 삽입을 위한 플라스미드의 제작

[204]

[205] 코리네박테리움 글루타미쿰의 염색체 내 트랜스포존 유전자 부위로, 상동성 재조합(Homologous recombination)에 의해 피루베이트, 포스페이트 디키나제 또는 포스포에놀피루베이트 신타아제의 유전자를 도입하기 위한 플라스미드를 제작하였다.

[206] 구체적으로, 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13869 염색체 DNA를 주형으로 서열번호 11 및 서열번호 12의 프라이머 쌍, 및 서열번호 13 및 서열번호 14의 프라이머 쌍을 이용하여 PCR을 수행, 각각의 단편을 수득하였다. PCR은 Solg™ Pfu-X DNA 폴리머라제를 이용하여, 95°C에서 4분간 변성 후, 95°C 30초 변성, 60°C 30초 어닐링, 72°C 50초 중합을 27회 반복한 후, 72°C에서 5분간 중합 반응하는 조건으로 수행하였다. 사용된 프라이머 서열은 하기 표 2에 나타내었다.

[207]

[208] [표2]

서열번호	명칭	서열(5'→3')
서열번호 11	HR1 F	AATTCGAGCTCGGTACCCGATGGA ACTACGAGACTG
서열번호 12	HR1 R	TGACAATCACCGCATCCag tactGGATATTCGAGACAGCTT

서열번호 13	HR2 F	GCTGTCTCGAATATCCagtagactGGATGCGGTGAT TGTCAG
서열번호 14	HR2 R	GGTCGACTCTAGAGGATCCCCTAACCACGAC GACTGCAA

[209] 상기의 PCR을 통해 증폭된 두 단편과 SmaI 제한효소로 절단된 형질전환용 벡터 pDCM2(대한민국 등록특허 제 10-2278000호)를 김슨 어셈블리 방법(DG Gibson et al., NATURE METHODS, VOL.6 NO.5, MAY 2009, NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix)을 이용하여 클로닝함으로써 재조합 플라스미드를 획득하였으며, 이를 pDCM2- Δ Tn로 명명하였다.

[210]

[211] 실시예 2-2. 코마가테이박터 자일리너스(*Komagataeibacter xylinus*) 유래 피루베이트, 포스페이트 디키나제를 도입한 코리네박테리움 속 미생물의 제작

[212]

[213] 코리네박테리움 글루타미쿰에 코마가테이박터 자일리너스(*Komagataeibacter xylinus*, *K.xylinus*) 유래 피루베이트, 포스페이트 디키나제(서열번호 1)를 코딩하는 유전자 *ppdK*(NZ_CP024644.1, 서열번호 2)를 도입하기 위해 먼저 바이오닉스(주)의 유전자 합성 서비스를 이용하여 합성한 *K.xylinus*의 *ppdK* 유전자(서열번호 2)를 주형으로 서열번호 15 및 서열번호 16의 프라이머 쌍을 이용한 PCR을 수행하여 *ppdK* 유전자를 증폭하였다.

[214] 중합효소는 Solg™ Pfu-X DNA 폴리머라제를 사용하였으며, PCR증폭 조건은 95 °C에서 2분간 변성 후, 95°C 20초 변성, 60°C 40초 어닐링, 72°C 1분 중합을 27회 반복한 후, 72°C에서 5분간 중합 반응하는 조건으로 수행하였다.

[215]

[216] [표3]

서열번호	명칭	서열(5'→3')
서열번호 15	ppdK(K.xy)-F	cgaaaggaaacactcATGACCAAATGGGTTTA CAGC
서열번호 16	ppdK(K.xy)-R	AATCACCGCATCCagtTCAGGCCGGGCT GGC

[217] 또한, Pcj7 프로모터를 확보하기 위하여, p117-cj7-gfp (US 7662943 B2)를 주형으로 하여 서열번호 17과 서열번호 18의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 중합효소는 Solg™ Pfu-X DNA 폴리머라제 (SolGent co.)를 사용하였으며, PCR증폭 조건은 95 °C에서 2분간 변성 후, 95°C 20초 변성, 60°C 40초 어닐링, 72°C 30초 중합을 27회 반복한 후, 72°C에서 5분간 중합반응을 수행하였다.

[218]

[219] [표4]

서열번호	명칭	서열(5'→3')
서열번호 17	Pcj7-F	TCTCGAATATCCagtagaaacatcccagcgctact
서열번호 18	Pcj7(K.xy)-R	AACCCATTTGGTCATgagtgtttccttctggtggg

[220] 이어서, 상기로부터 증폭된 *K.xylinus* 의 *ppdK* 유전자, Pcj7 프로모터 부위 및 ScaI 제한효소로 절단된 상기 실시예 2-1에서 제작한 pDCM2-ΔTn를 깃슨 어셈블리 (DG Gibson et al., NATURE METHODS, VOL.6 NO.5, MAY 2009, NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix) 방법을 이용하여 클로닝함으로써 재조합 플라스미드를 획득하였으며, pDCM2-ΔTn:: Pcj7-ppdK(K.xy)로 명명하였다. 클로닝은 깃슨 어셈블리 시약과 각 단편들을 계산된 몰수로 혼합 후 50°C에 1시간 보존함으로써 수행하였다.

[221]

[222] 상기 제작된 pDCM2-ΔTn:: Pcj7-ppdK(K.xy)백터를 트립토판 생산 균주인 CM05-9157 균주(대한민국 등록특허 제10-2278000호)에 전기천공법(Appl. Microbiol.Biotechnol. (1999) 52:541-545)으로 형질 전환 후, 2차 교차 과정을 거쳐 염색체 상에서 트랜스포존 유전자의 사이에 1 카피의 Pcj7-ppdK(K.xy) 유전자가 삽입된 균주를 얻었다. 해당 균주는 유전자가 삽입된 위치의 업스트림 지역과 다운스트림 지역의 외부 부위를 각각 증폭할 수 있는 서열번호 19와 서열번호 20의 프라이머를 이용한 PCR 법과 시퀀싱을 통해 동정하였다.

[223]

[224] [표5]

서열번호	명칭	서열(5'→3')
서열번호 19	Confirm-Pcj7-ppsA/ppdK-F	AACAACACCACATCTACATC
서열번호 20	Confirm-Pcj7-ppsA/ppdK-R	CAGCCTTTTCCAGCACCA

[225] 위와 같은 방법으로 수득한 균주를 CM05-9157 :: Pcj7-ppdK(K.xy) 로 명명하였다.

[226]

[227] 실시예 2-3. *Acetobacter pasteurianus subsp.* 유래 피루베이트, 포스페이트 디키나제를 도입한 코리네박테리움 속 미생물의 제작

[228]

[229] 코리네박테리움 글루타미쿰에 *Acetobacter pasteurianus subsp.* 유래 피루베이트, 포스페이트 디키나제(서열번호 3)를 코딩하는 유전자(NZ_CP021922.1, 서열번호 4)를 도입하기 위해 먼저 바이오닉스(주)의 유전자 합성 서비스를 이용하여 합성한 *Acetobacter pasteurianus subsp.* 의 *pddK* 유전자(서열번호 4)를 주형으로 서열번호 21 및 서열번호 22의 프라이머 쌍을 이용한 PCR을 수행하여 *ppdK* 유전자

를 증폭하였다. 증합효소는 Solg™ Pfu-X DNA 폴리머라제를 사용하였으며, PCR 증폭 조건은 95 °C에서 2분간 변성 후, 95°C 20초 변성, 60°C 40초 어닐링, 72°C 1 분 중합을 27회 반복한 후, 72°C에서 5분간 중합 반응하는 조건으로 수행하였다.

[230]

[231] [표6]

서열번호	명칭	서열(5'→3')
서열번호 21	ppdK(A.pa)-F	cgaaaggaaacactcATGCGCAATCTCCTCGGC
서열번호 22	ppdK(A.pa)-R	GCTGACAATCACCGCATCCagtTCAGGCT TTTACGGCCTTG

[232] 또한, Pcj7 프로모터를 확보하기 위하여, p117-cj7-gfp (US 7662943 B2)를 주형으로 하여 서열번호 17과 서열번호 23의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 증합효소는 Solg™ Pfu-X DNA 폴리머라제 (SolGent co.)를 사용하였으며, PCR 증폭 조건은 95 °C에서 2분간 변성 후, 95°C 20초 변성, 60°C 40초 어닐링, 72°C 30초 중합을 27회 반복한 후, 72°C에서 5분간 증합반응을 수행하였다.

[233]

[234] [표7]

서열번호	명칭	서열(5'→3')
서열번호 23	Pcj7(A.pa)-R	GAGGAGATTGCGCATgagtgttcttctggtggg

[235] 이어서, 상기로부터 증폭된 *Acetobacter pasteurianus subsp.*의 *ppdK* 유전자, Pcj7 프로모터 부위 및 ScaI 제한효소로 절단된 상기 실시예 2-1에서 제작한 pDCM2- Δ Tn를 김슨 어셈블리 (DG Gibson et al., NATURE METHODS, VOL.6 NO.5, MAY 2009, NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix) 방법을 이용하여 클로닝함으로써 재조합 플라스미드를 획득하였으며, pDCM2- Δ Tn:: Pcj7-ppdK(A.pa)로 명명하였다. 클로닝은 김슨 어셈블리 시약과 각 단편들을 계산된 몰수로 혼합 후 50°C에 1시간 보존함으로써 수행하였다.

[236]

[237] 이어서, 상기 제작된 pDCM2- Δ Tn:: Pcj7-ppdK(A.pa)백터를 트립토판 생산 균주인 CM05-9157 균주(대한민국 등록특허 제10-2278000호)에 전기천공법(Appl. Microbiol.Biotechnol. (1999) 52:541-545)으로 형질 전환 후, 2차 교차 과정을 거쳐 염색체 상에서 트랜스포존 유전자의 사이에 1 카피의 Pcj7-ppdK(A.pa)유전자가 삽입된 균주를 얻었다. 해당 균주는 유전자가 삽입된 위치의 업스트림 지역과 다운스트림 지역의 외부 부위를 각각 증폭할 수 있는 서열번호 19와 서열번호 20의 프라이머를 이용한 PCR 법과 시퀀싱을 통해 동정하였다.

[238]

[239] 위와 같은 방법으로 수득한 균주를 CM05-9157 :: Pcj7-ppdK(A.pa)로 명명하였다.

[240]

[241] 실시예 2-4. *Methanosarcina acetivorans str. C2 A* 유래 피루베이트, 포스페이트 디키나제를 도입한 코리네박테리움 속 미생물 제작

[242]

[243] 코리네박테리움 글루타미쿰에 *Methanosarcina acetivorans str. C2A* 유래의 피루베이트, 포스페이트 디키나제(서열번호 5)를 코딩하는 유전자(NZ_AE010299.1, 서열번호 6)를 도입하기 위해 먼저 바이오닉스(주)의 유전자 합성 서비스를 이용하여 합성한 *Methanosarcina acetivorans str. C2A*의 *ppdK* 유전자(서열번호 6)를 주형으로 서열번호 24 및 서열번호 25의 프라이머 쌍을 이용한 PCR을 수행하여 *ppdK* 유전자를 증폭하였다.

[244] 중합효소는 Solg™ Pfu-X DNA 폴리머라제를 사용하였으며, PCR증폭 조건은 95 °C에서 2분간 변성 후, 95°C 20초 변성, 60°C 40초 어닐링, 72°C 1분 중합을 27회 반복한 후, 72°C에서 5분간 중합 반응하는 조건으로 수행하였다.

[245]

[246] [표8]

서열번호	명칭	서열(5'→3')
서열번호 24	ppdK(M.ac)-F	acgaaaggaaacactcATGCCTGGAGATAAAAA CAAATACATC
서열번호 25	ppdK(M.ac)-R	AATCACCGCATCCagtTCAGAGCTCCTTTT CAGTTTC

[247] 또한, Pcj7 프로모터를 확보하기 위하여, p117-cj7-gfp (US 7662943 B2)를 주형으로 하여 서열번호 17과 서열번호 26의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 중합효소는 Solg™ Pfu-X DNA 폴리머라제 (SolGent co.)를 사용하였으며, PCR증폭 조건은 95 °C에서 2분간 변성 후, 95°C 20초 변성, 60°C 40초 어닐링, 72°C 30초 중합을 27회 반복한 후, 72°C에서 5분간 중합반응을 수행하였다.

[248]

[249] [표9]

서열번호	명칭	서열(5'→3')
서열번호 26	Pcj7(M.ac)-R	TTTATCTCCAGGCATgagtgtttccttcgttggg

[250] 이어서, 상기로부터 증폭된 *Methanosarcina acetivorans str. C2A*의 *ppdK* 유전자, Pcj7 프로모터 부위 및 상기 실시예 2-1에서 제작한 ScaI 제한효소로 절단된 상기 실시예 2-1에서 제작한 pDCM2-ΔTn를 김슨 어셈블리 (DG Gibson et al., NATURE METHODS, VOL.6 NO.5, MAY 2009, NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix) 방법을 이용하여 클로닝함으로써 재조합 플라스미드를 획득하였으며, pDCM2-ΔTn:: Pcj7-ppdK(M.ac)로 명명하였다. 클로닝은 김슨 어셈블리 시약과 각 단편들을 계산된 몰수로 혼합 후 50°C에 1시간 보존함으로써 수행하였다.

[251]

[252] 이어서, 상기 제작된 pDCM2- Δ Tn:: Pcj7-ppdK(M.ac)백터를 트립토판 생산 균주인 CM05-9157 균주(대한민국 등록특허 제10-2278000호)에 전기천공법(Appl. Microbiol.Biotechnol. (1999) 52:541-545)으로 형질 전환 후, 2차 교차 과정을 거쳐 염색체 상에서 트랜스포존 유전자의 사이에 1 카피의 Pcj7-ppdK(M.ac)유전자가 삽입된 균주를 얻었다. 해당 균주는 유전자가 삽입된 위치의 업스트림 지역과 다운스트림 지역의 외부 부위를 각각 증폭할 수 있는 서열번호 19와 서열번호 20의 프라이머를 이용한 PCR 법과 시퀀싱을 통해 동정하였다.

[253]

[254] 위와 같은 방법으로 수득한 균주를 CM05-9157 :: Pcj7-ppdK(M.ac) 로 명명하였다.

[255]

[256] 실시예 2-5. *Escherichia coli* 유래 피루베이트, 포스페이트 디키나제를 도입한 코리네박테리움 속 미생물 제작

[257]

[258] 코리네박테리움 글루타미쿰에 피루베이트 포스페이트 디키나제 유전자(*ppdk*)의 상동 유전자(ortholog)인 *Escherichia coli* 유래의 포스포에놀피루베이트 신타아제(서열번호 7)를 코딩하는 유전자 *ppsA*(NZ_CP084899.1, 서열번호 8)를 도입하기 위해

[259]

먼저 *Escherichia coli* W3110 염색체 DNA를 주형으로 서열번호 27과 서열번호 28의 프라이머 쌍을 이용하여 PCR을 수행하여 *ppsA* 유전자를 증폭하였다. 중합효소는 Solg™ Pfu-X DNA 폴리머라제를 사용하였으며, PCR증폭 조건은 95 °C에서 2분간 변성 후, 95°C 20초 변성, 60°C 40초 어닐링, 72°C 1분 중합을 27회 반복한 후, 72°C에서 5분간 중합 반응하는 조건으로 수행하였다.

[260]

[261] [표10]

서열번호	명칭	서열(5'→3')
서열번호 27	ppsA(E.co)-F	aacgaaaggaaacactcATGTCCAACAATGGCTC G
서열번호 28	ppsA(E.co)-R	AATCACCGCATCCagtTTATTTCTTCAGTT CAGCCAGG

[262]

또한, Pcj7 프로모터를 확보하기 위하여, p117-cj7-gfp (US 7662943 B2)를 주형으로 하여 서열번호 17과 서열번호 29의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 중합효소는 Solg™ Pfu-X DNA 폴리머라제 (SolGent co.)를 사용하였으며, PCR증폭 조건은 95 °C에서 2분간 변성 후, 95°C 20초 변성, 60°C 40초 어닐링, 72°C 30초 중합을 27회 반복한 후, 72°C에서 5분간 중합반응을 수행하였다.

[263]

[264] [표11]

서열번호	명칭	서열(5'→3')
서열번호 29	Pcj7(E.co)-R	GCCATTGTTGGACATgagtgtttccttctggtggg

[265] 이어서, 상기로부터 증폭된 *Escherichia coli*의 *ppsA* 유전자, Pcj7 프로모터 부위 및 ScaI 제한효소로 절단된 상기 실시예 2-1에서 제작한 pDCM2-ΔTn를 김슨 어셈블리 (DG Gibson et al., NATURE METHODS, VOL.6 NO.5, MAY 2009, NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix) 방법을 이용하여 클로닝함으로써 재조합 플라스미드를 획득하였으며, pDCM2-ΔTn:: Pcj7-ppsA(E.co)로 명명하였다. 클로닝은 김슨 어셈블리 시약과 각 단편들을 계산된 몰수로 혼합 후 50°C에 1시간 보존함으로써 수행하였다.

[266]

[267] 이어서, 상기 제작된 pDCM2-ΔTn:: Pcj7-ppsA(E.co)백터를 트립토판 생산 균주인 CM05-9157 균주(대한민국 등록특허 제10-2278000호)에 전기천공법(Appl. Microbiol.Biotechnol. (1999) 52:541-545)으로 형질 전환 후, 2차 교차 과정을 거쳐 염색체 상에서 트랜스포존 유전자의 사이에 1 카피의 Pcj7-ppsA(E.co) 유전자가 삽입된 균주를 얻었다. 해당 균주는 유전자가 삽입된 위치의 업스트림 지역과 다운스트림 지역의 외부 부위를 각각 증폭할 수 있는 서열번호 19와 서열번호 20의 프라이머를 이용한 PCR 법과 시퀀싱을 통해 동정하였다.

[268]

[269] 위와 같은 방법으로 수득한 균주를 CM05-9157 :: Pcj7-ppsA(E.co) 으로 명명하였다.

[270]

[271] 실시예 2-6. *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869 유래 피루베이트, 포스페이트 디키나제를 도입한 도입된 코리네박테리움 속 미생물 제작

[272]

[273] 코리네박테리움 글루타미쿰에 피루베이트 포스페이트 디키나제 유전자 (*ppdk*)의 상동 유전자(ortholog)인 *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869 유래의 포스포에놀피루베이트 신타아제(서열번호 9)를 코딩하는 유전자 *ppsA* (NZ_CP016335.1, 서열번호 10)를 도입하기 위해 피루베이트

[274] 먼저, 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13869 염색체 DNA를 주형으로 서열번호 30과 서열번호 31의 프라이머 쌍을 이용하여 PCR을 수행하여 *ppsA* 유전자를 증폭하였다. 중합효소는 Solg™ Pfu-X DNA 폴리머라제를 사용하였으며, PCR 증폭 조건은 95 °C에서 2분간 변성 후, 95°C 20초 변성, 60°C 40초 어닐링, 72°C 1분 중합을 27회 반복한 후, 72°C에서 5분간 중합 반응하는 조건으로 수행하였다.

[275]

[276] [표12]

서열번호	명칭	서열(5'→3')
------	----	-----------

서열번호 30	ppsA(C.gl)-F	caacgaaaggaacactcATGACCAACAGTTTGA ACATCC
서열번호 31	ppsA(C.gl)-R	ACAATCACCGCATCCagtTTACTTCGTGC CGGTCATTG

[277] 또한, Pcj7 프로모터를 확보하기 위하여, p117-cj7-gfp (US 7662943 B2)를 주형으로 하여 서열번호 17과 서열번호 32의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 증합효소는 Solg™ Pfu-X DNA 폴리머라제 (SolGent co.)를 사용하였으며, PCR증폭 조건은 95 °C에서 2분간 변성 후, 95°C 20초 변성, 60°C 40초 어닐링, 72°C 30초 증합을 27회 반복한 후, 72°C에서 5분간 증합반응을 수행하였다.

[278]

[279] [표13]

서열번호	명칭	서열(5'→3')
서열번호 32	Pcj7(C.gl)-R	CAAACCTGTTGGTCATgagtgttcccttcgttggg

[280] 이어서, 증폭된 *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869의 *ppsA* 유전자, Pcj7 프로모터 부위 및 ScaI 제한효소로 절단된 상기 실시예 2-1에서 제작한 pDCM2-ΔTn를 김슨 어셈블리 (DG Gibson et al., NATURE METHODS, VOL.6 NO.5, MAY 2009, NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix) 방법을 이용하여 클로닝함으로써 재조합 플라스미드를 획득하였으며, pDCM2-ΔTn:: Pcj7-ppsA(C.gl)로 명명하였다. 클로닝은 김슨 어셈블리 시약과 각 유전자 단편들을 계산된 몰수로 혼합 후 50°C에 1시간 보존함으로써 수행하였다.

[281]

[282] 이어서, 상기 제작된 pDCM2-ΔTn:: Pcj7-ppsA(C.gl)백터를 트립토판 생산 균주인 CM05-9157 균주(대한민국 등록특허 제10-2278000호)에 전기천공법(Appl. Microbiol.Biotechnol. (1999) 52:541-545)으로 형질 전환 후, 2차 교차 과정을 거쳐 염색체 상에서 트랜스포존 유전자의 사이에 1 카피의 Pcj7-ppsA(C.gl) 유전자가 삽입된 균주를 얻었다. 해당 균주는 유전자가 삽입된 위치의 업스트림 지역과 다운스트림 지역의 외부 부위를 각각 증폭할 수 있는 서열번호 19와 서열번호 20의 프라이머를 이용한 PCR 법과 시퀀싱을 통해 동정하였다.

[283]

[284] 위와 같은 방법으로 수득한 균주를 CM05-9157 :: Pcj7-ppsA(C.gl) 로 명명하였다.

[285]

[286] 실시예 3. 외래 피루베이트, 포스페이트 디키나제 유전자 또는 이의 상동 유전자(ortholog)를 도입한 L-트립토판 생산 미생물의 L-트립토판 생산능 평가

[287]

[288] 상기 실시예 2-2, 2-3, 2-4, 2-5 에서 각각 제작한 CM05-9157 :: Pcj7-ppdK(K.xy), CM05-9157 :: Pcj7-ppdK(A.pa), CM05-9157 :: Pcj7-ppdK(M.ac), CM05-9157 :: Pcj7-

ppsA(E.co) 균주;와 외래 유전자가 도입되지 않은 모균주 CM05-9157 및 실시예 1-6에서 제작한 CM05-9157 :: Pcj7-ppsA(C.gl) 균주;의 L-트립토판 생산능을 확인하기 위하여 하기와 같은 방법으로 배양하였다.

[289] 종 배지 25 ml을 함유하는 250 ml 코너-바플 플라스크에 각 균주들을 접종하고, 30 °C에서 20 시간 동안, 200 rpm으로 진탕 배양하였다. 그런 다음, 생산 배지 25 ml을 함유하는 250 ml 코너-바플 플라스크에 1 ml의 종 배양액을 접종하고 30 °C에서 24시간 동안, 200 rpm에서 진탕 배양하였다. 배양 종료 후 HPLC에 의해 L-트립토판의 생산량을 측정하였다. 상기 종배지 및 생산배지의 조성은 다음과 같으며, 실험한 각 균주에 대한 배양액 중의 L-트립토판 농도는 하기 표 14에 나타내었다.

[290]

[291] <종배지 (pH 7.0)>

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

[293]

[294] <생산배지 (pH 7.0)>

[295] 포도당 30g, (NH₄)₂SO₄ 15 g, MgSO₄ 7H₂O 1.2 g, KH₂PO₄ 1 g, 효모추출물 5 g, 바이오틴 900 μg, 티아민 염산염 4500 μg, 칼슘-판토텐산 4500 μg, CaCO₃ 30 g (증류수 1리터 기준).

[296]

[297] [표14]

	OD562	트립토판 생산량 (g/L)	트립토판 수율 (*100 g/g, %)
CM05-9157	56.5	1.88	6.37
CM05-9157 :: Pcj7-ppsA(C.g l)	56.3	1.89	6.38
CM05-9157 :: Pcj7ppsA(E.co)	56.1	1.9	6.40
CM05-9157 :: Pcj7-ppdK(A. pa)	56.8	1.85	6.34
CM05-9157 :: Pcj7-ppdK(K. xy)	52.1	2.35	7.52
CM05-9157 :: Pcj7-ppdK(M. ac)	57.8	1.64	5.51

- [298] 그 결과, 상기 표 14에 나타난 바와 같이, 코리네박테리움 글루타미쿰 유래 포스포에놀피루베이트 신타아제 유전자가 도입된 CM05-9157 :: Pcj7-ppsA(C.gl) 균주의 트립토판 생산량은 1.89 g/L로 모균주인 CM05-9157 균주의 트립토판 생산량과 거의 동일함을 확인하였다.
- [299] 또한, 다양한 미생물 유래의 피루베이트, 포스페이트 디키나제 유전자 또는 이의 상동 유전자(ortholog)인 포스포에놀피루베이트 신타아제 유전자 중에서 코마가테이박터 자일리너스 유래의 피루베이트, 포스페이트 디키나제 유전자가 도입된 CM05-9157 :: Pcj7-ppdK(K.xy) 균주에서만 플라스크 배양에서 최종 2.35 g/L 의 L-트립토판을 생산하여, 모균주 CM05-9157 및/또는 CM05-9157 :: Pcj7-ppsA(C.gl) 균주에 비해 약 18% L-트립토판 생산능이 증가한 것을 확인하였다.
- [300] 반면, 코마가테이박터 자일리너스 유래 외의 외래 포스포에놀피루베이트 신타아제 또는 피루베이트, 포스페이트 디키나제가 도입된 3종의 균주(CM05-9157 :: Pcj7-ppdK(A.pa), CM05-9157 :: Pcj7-ppdK(M.ac), CM05-9157 :: Pcj7-ppsA(E.co))는 대조균인 CM05-9157에 대비하여 오히려 소폭 트립토판 생산이 감소하거나 증가폭이 상대적으로 미미함을 확인하였다.
- [301] 이와 같은 결과는, 코리테박테리움 속 미생물에 특정 코마가테이박터 자일리너스 유래의 피루베이트, 포스페이트 디키나제 유전자가 도입된 경우만이 특이적으로 L-트립토판 생산능을 증가시킬 수 있음을 의미한다.
- [302]
- [303] 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] 코마가테이박터 자일리너스 유래의 피루베이트, 포스페이트 디키나제 단백질 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 도입된, L-트립토판 생산능을 가지는 코리네박테리움 속 미생물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 코마가테이박터 자일리너스 유래의 피루베이트, 포스페이트 디키나제는 서열번호 1 또는 이와 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것인, 코리네박테리움 속 미생물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 코마가테이박터 자일리너스 유래의 피루베이트, 포스페이트 디키나제는 ppdK 유전자에 의해 코딩되는 것인, 코리네박테리움 속 미생물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 코리네박테리움 속 미생물은 코리네박테리움 글루타미쿰인 것인, 코리네박테리움 속 미생물.
- [청구항 5] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 코리네박테리움 속 미생물은 비변형 미생물과 비교하여 L-트립토판 생산능이 증가된 것인, 코리네박테리움 속 미생물.
- [청구항 6] 코마가테이박터 자일리너스 유래의 피루베이트, 포스페이트 디키나제 단백질 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 도입된, L-트립토판 생산능을 가지는 코리네박테리움 속 미생물을 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 L-트립토판의 생산 방법.
- [청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 배양된 미생물, 상기 미생물의 배양물, 상기 미생물의 발효물 또는 상기 배양 배지에서 L-트립토판을 회수하는 단계를 추가적으로 포함하는 것인, 방법.
- [청구항 8] 코마가테이박터 자일리너스 유래의 피루베이트, 포스페이트 디키나제 단백질 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 도입된, L-트립토판 생산능을 가지는 코리네박테리움 속 미생물; 상기 미생물의 배양물, 상기 미생물의 발효물 또는 이들 중 2 이상의 조합을 포함하는 L-트립토판 생산용 조성물.
- [청구항 9] 코마가테이박터 자일리너스 유래의 피루베이트, 포스페이트 디키나제 단백질 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 도입된, L-트립토판 생산능을 가지는 코리네박테리움 속 미생물; 상기 미생물의 배양물, 상기 미생물의 발효물 또는 이들 중 2 이상의 조합을 포함하는 조성물의 L-트립토판 생산 용도.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/003775

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N 15/77(2006.01)i; C12N 9/12(2006.01)i; C12P 13/22(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); C07K 14/195(2006.01); C12N 15/52(2006.01); C12N 15/63(2006.01); C12N 15/67(2006.01); C12N 15/69(2006.01); C12N 15/70(2006.01); C12N 9/04(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: L-트립토판(L-tryptophan), 코리네박테리움(corynebacterium), 코마가테이박터 자일리너스(Komagataeibacter xylinus), 피루베이트 포스페이트 디키나제(pyruvate phosphate dikinase; PPDk), 배양(cultivation)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2022-0126029 A (CJ CHEILJEDANG CORPORATION) 15 September 2022 (2022-09-15) See claims 1 and 4; and paragraphs [0065] and [0071].	1-9
A	KR 10-2018-0045617 A (SAMSUNG ELECTRONICS CO., LTD.) 04 May 2018 (2018-05-04) See paragraphs [0027] and [0029].	1-9
A	KR 10-1968317 B1 (CJ CHEILJEDANG CORPORATION) 11 April 2019 (2019-04-11) See paragraphs [0034] and [0035].	1-9
A	KR 10-2018-0089329 A (CJ CHEILJEDANG CORPORATION) 08 August 2018 (2018-08-08) See paragraphs [0045] and [0060].	1-9
A	KR 10-1997-0001238 B1 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.) 04 February 1997 (1997-02-04) See pages 2 and 3.	1-9
<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 26 June 2024		Date of mailing of the international search report 01 July 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.

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/KR2024/003775

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
KR 10-2022-0126029 A	15 September 2022	AU 2022-235362 A1	17 August 2023
		CA 3211373 A1	15 September 2022
		CN 117460831 A	26 January 2024
		EP 4269598 A1	01 November 2023
		JP 2024-505267 A	05 February 2024
		KR 10-2649245 B1	21 March 2024
		US 2024-0043886 A1	08 February 2024
		WO 2022-191467 A1	15 September 2022
KR 10-2018-0045617 A	04 May 2018	CN 107988126 A	04 May 2018
		EP 3315598 A1	02 May 2018
		US 10465175 B2	05 November 2019
		US 2018-0112197 A1	26 April 2018
KR 10-1968317 B1	11 April 2019	CA 3091331 A1	29 August 2019
		CA 3091331 C	24 January 2023
		CN 110418843 A	05 November 2019
		CN 110418843 B	20 April 2021
		EP 3561061 A1	30 October 2019
		EP 3561061 B1	09 June 2021
		JP 2021-509808 A	08 April 2021
		JP 7098731 B2	11 July 2022
		US 10995378 B2	04 May 2021
		US 2020-0063219 A1	27 February 2020
		WO 2019-164348 A1	29 August 2019
		KR 10-2018-0089329 A	08 August 2018
WO 2019-164346 A1	29 August 2019		
WO 2019-164346 A8	24 September 2020		
KR 10-1997-0001238 B1	04 February 1997	EP 0401735 A1	12 December 1990
		EP 0401735 B1	27 September 1995
		JP 037591 A	14 January 1991
		JP 2967996 B2	25 October 1999
		JP 3007591 A	14 January 1991
		US 05407824 A	18 April 1995
		US 05447857 A	05 September 1995

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 15/77(2006.01)i; C12N 9/12(2006.01)i; C12P 13/22(2006.01)i		
B. 조사된 분야		
조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 15/77(2006.01); C07K 14/195(2006.01); C12N 15/52(2006.01); C12N 15/63(2006.01); C12N 15/67(2006.01); C12N 15/69(2006.01); C12N 15/70(2006.01); C12N 9/04(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: L-트립토판(L-tryptophan), 코리네박테리움(corynebacterium), 코마가테이박터 자일리너스(Komagataeibacter xylinus), 피루베이트 포스페이트 디키나제(pyruvate phosphate dikinase; PPDk), 배양(cultivation)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2022-0126029 A (씨제이제일제당 (주)) 2022.09.15 청구항 1, 4; 단락 [0065], [0071]	1-9
A	KR 10-2018-0045617 A (삼성전자주식회사) 2018.05.04 단락 [0027], [0029]	1-9
A	KR 10-1968317 B1 (씨제이제일제당 주식회사) 2019.04.11 단락 [0034], [0035]	1-9
A	KR 10-2018-0089329 A (씨제이제일제당 (주)) 2018.08.08 단락 [0045], [0060]	1-9
A	KR 10-1997-0001238 B1 (교와화학공업고교오교 가부시킴가이사) 1997.02.04 페이지 2, 3	1-9
<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 2024년06월26일(26.06.2024)	국제조사보고서 발송일 2024년07월01일(01.07.2024)	
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	

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

- 1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.
 - a. 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - b. 국제조사를 목적으로 국제출원일 이후에 제출된 서열목록(규칙 13의3.1(a))
 - 서열목록이 출원시 국제출원의 개시 범위를 넘지 않는다는 취지의 진술서를 첨부

- 2. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열에 대해, 본 보고서는 WIPO 표준 ST.26을 준수하는 서열목록이 없이 유효한 조사를 할 수 있는 범위에서 작성되었습니다

- 3. 추가 의견:

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2022-0126029 A	2022/09/15	AU 2022-235362 A1	2023/08/17
		CA 3211373 A1	2022/09/15
		CN 117460831 A	2024/01/26
		EP 4269598 A1	2023/11/01
		JP 2024-505267 A	2024/02/05
		KR 10-2649245 B1	2024/03/21
		US 2024-0043886 A1	2024/02/08
		WO 2022-191467 A1	2022/09/15
KR 10-2018-0045617 A	2018/05/04	CN 107988126 A	2018/05/04
		EP 3315598 A1	2018/05/02
		US 10465175 B2	2019/11/05
		US 2018-0112197 A1	2018/04/26
KR 10-1968317 B1	2019/04/11	CA 3091331 A1	2019/08/29
		CA 3091331 C	2023/01/24
		CN 110418843 A	2019/11/05
		CN 110418843 B	2021/04/20
		EP 3561061 A1	2019/10/30
		EP 3561061 B1	2021/06/09
		JP 2021-509808 A	2021/04/08
		JP 7098731 B2	2022/07/11
		US 10995378 B2	2021/05/04
		US 2020-0063219 A1	2020/02/27
KR 10-2018-0089329 A	2018/08/08	KR 10-2035844 B1	2019/10/23
		WO 2019-164346 A1	2019/08/29
		WO 2019-164346 A8	2020/09/24
KR 10-1997-0001238 B1	1997/02/04	EP 0401735 A1	1990/12/12
		EP 0401735 B1	1995/09/27
		JP 037591 A	1991/01/14
		JP 2967996 B2	1999/10/25
		JP 3007591 A	1991/01/14
		US 05407824 A	1995/04/18
		US 05447857 A	1995/09/05