(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2024 년 10 월 10 일 (10.10.2024)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2024/210280 A1

(51) 국제특허분류:
C12N 9/88 (2006.01) *C12P 19/32* (2006.01)
C12N 15/77 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2023/012968

(22) 국제출원일: 2023 년 8 월 31 일 (31.08.2023)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2023-0045160 2023 년 4 월 6 일 (06.04.2023) KR

(71) 출원인: 대상 주식회사 (**DAESANG CORPORATION**) [KR/KR]; 02586 서울특별시 동대문구 천호대로 26, Seoul (KR).

(72) 발명자: **이선희 (LEE, Sun Hee)**; 07789 서울특별시 강서구 마곡중앙로 178, Seoul (KR). **최태열 (CHOI, Tae Yeol)**; 07789 서울특별시 강서구 마곡중앙로 178, Seoul (KR). **김현호 (KIM, Hyun Ho)**; 07789 서울특별시 강서구 마곡중앙로 178, Seoul (KR). **김동현 (KIM, Dong Hyun)**; 07789 서울특별시 강서구 마곡중앙로 178, Seoul (KR). **김현숙 (KIM, Hyun Sook)**; 07789 서울특별시 강서구 마곡중앙로 178, Seoul (KR). **신종환 (SHIN, Jong Hwan)**; 07789 서울특별시 강서구 마곡중앙로 178, Seoul (KR).

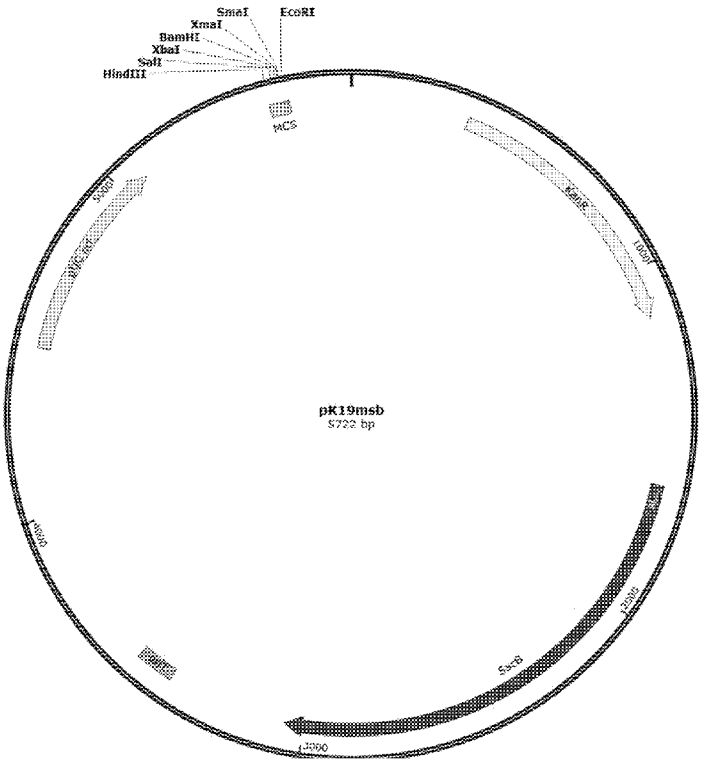
(74) 대리인: **박혁 (PARK, Hyuk)**; 06158 서울특별시 강남구 테헤란로 441, 10층, Seoul (KR).

(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,

WO 2024/210280 A1

(54) **Title:** NOVEL PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYLASE VARIANT AND METHOD FOR PRODUCING 5'-INOSINIC ACID USING SAME

(54) **발명의 명칭:** 포스포에놀피루베이트 카르복실라아제 신규 변이체 및 이를 이용한 5'-이노신산 생산 방법



(57) **Abstract:** The present invention relates to a novel phosphoenolpyruvate carboxylase variant and a method for producing 5'-inosinic acid using same. The phosphoenolpyruvate carboxylase variant has modified protein activity due to the substitution of one or more amino acids in the amino acid sequence constituting phosphoenolpyruvate carboxylase, and thus recombinant microorganisms comprising same can efficiently produce 5'-inosinic acid.

(57) **요약서:** 본 발명은 포스포에놀피루베이트 카르복실라아제 신규 변이체 및 이를 이용한 5'- 이노신산 생산 방법에 관한 것으로, 상기 포스포에놀피루베이트 카르복실라아제 변이체는 포스포에놀피루베이트 카르복실라아제를 구성하는 아미노산 서열 중 하나 이상의 아미노산이 치환됨으로써 단백질 활성이 변화되어, 이를 포함하는 재조합 미생물은 5'-이노신산을 효율적으로 생산할 수 있다.

[다음 쪽 계속]

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, 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).

공개:

— 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))

명세서

발명의 명칭: 포스포에놀피루베이트 카르복실라아제 신규 변이체 및 이를 이용한 5'-이노신산 생산 방법

기술분야

[1] 본 발명은 포스포에놀피루베이트 카르복실라아제 신규 변이체 및 이를 이용한 5'-이노신산 생산 방법에 관한 것이다.

배경기술

[2] 5'-이노신산(5'-inosinic acid 또는 inosine monophosphate, IMP)은 핵산 생합성 대사계의 중간물질로서 동식물의 체내에서 생리적으로 중요한 역할을 수행할 뿐 아니라 식품, 의약품 및 각종 의료적 이용 등 다방면에 이용되고 있으며. 특히 글루탐산 나트륨(monosodium glutamate, MSG)과 같이 사용하면 맛의 상승효과가 커서 정미성 조미료로 각광을 받고 있는 핵산계 조미료 중 하나이다.

[3] 5'-이노신산의 생산 방법으로는 효모 세포로부터 추출한 리보핵산을 효소적으로 분해하는 방법, 발효에 의해 생산된 이노신을 화학적으로 인산화하는 방법 등이 있으며, 최근에는 5'-이노신산을 생산하는 미생물을 배양하여 배지에 축적된 5'-이노신산을 회수하는 방법이 주로 이용되고 있다.

[4] 미생물을 이용한 5'-이노신산 생산에서는 5'-이노신산의 생산 효율을 개선하기 위해 핵산이나 L-아미노산 등 유용물질 생산에 많이 이용되는 대장균, 코리네박테리움 등의 미생물을 대상으로 유전자 재조합 기술을 적용하여 우수한 5'-이노신산 생산능을 갖는 다양한 재조합 균주 또는 변이주 및 이를 이용한 5'-이노신산 생산 방법이 개발되고 있다. 특히 5'-이노신산의 생합성 경로에 관여하는 효소, 전사인자, 수송 단백질 등의 유전자를 대상으로 하거나, 또는 이들의 발현을 조절하는 프로모터에 변이를 유도하여 5'-이노신산의 생산량을 증대시키려는 시도가 있었다. 그러나 5'-이노신산 생산에 직간접적으로 연관된 효소, 전사인자, 수송 단백질 등 단백질의 종류가 수십 ~ 수백여 종에 이르기 때문에 이러한 단백질의 활성 변화에 따른 5'-이노신산 생산능 증가 여부에 관해 여전히 많은 연구가 필요한 실정이다.

[5] [선행기술문헌]

[6] [특허문헌]

[7] 한국등록특허 제10-116602호

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[8] 본 발명은 신규한 포스포에놀피루베이트 카르복실라아제 변이체를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[9] 또한, 본 발명은 상기 변이체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[10] 또한, 본 발명은 상기 변이체 또는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 형질전환체를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[11] 또한, 본 발명은 상기 형질전환체를 이용한 5'-이노신산의 생산 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제 해결 수단

[12] 본 발명의 일 양상은 서열번호 4의 아미노산 서열에서 472번째 및 673번째 아미노산 중 하나 이상이 다른 아미노산으로 치환된, 포스포에놀피루베이트 카르복실라아제 변이체를 제공한다.

[13] 본 발명에서 사용된 "포스포에놀피루베이트 카르복실라아제 (phosphoenolpyruvate caboxylase)"는 포스포에놀피루베이트에서 이산화탄소를 제거하는 반응을 촉매하는 것으로, 서열번호 4의 아미노산 서열로 구성되어 포스포에놀피루베이트 카르복실라아제 활성을 가지는 폴리펩티드 또는 단백질일 수 있다.

[14] 상기 포스포에놀피루베이트 카르복실라아제의 핵산 및 단백질 서열 정보는 공지된 서열 데이터베이스 (예컨대, GenBank, UniProt)를 통해 얻을 수 있다.

[15] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 포스포에놀피루베이트 카르복실라아제는 서열번호 3의 염기서열에 의해 암호화된 것일 수 있다.

[16] 본 발명에 따른 포스포에놀피루베이트 카르복실라아제의 아미노산 서열 또는 이를 암호화하는 염기서열은 각 서열과 비교하여 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 상동성 또는 동일성을 가지는 염기서열 또는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 여기서 "상동성" 또는 "동일성"이란 기준이 되는 염기서열 또는 아미노산 서열과 임의의 다른 염기서열 또는 아미노산 서열을 최대한 대응되도록 정렬하여 분석하였을 때 두 서열 간의 일치율(%)을 의미한다.

[17] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 포스포에놀피루베이트 카르복실라아제는 야생형 코리네박테리움 스테셔니스(*Corynebacterium stationis*)에서 유래한 것일 수 있다.

[18] 본 발명에서 사용된 "변이체"는 단백질을 암호화하는 유전자의 염기서열 상 변이로 인해 아미노산 서열 중 N-말단, C-말단 및/또는 내부에서 하나 이상의 아미노산이 보존적 치환(conservative substitution) 및/또는 변형(modification)되어 변이 전 아미노산 서열과 상이하나, 기능(functions) 또는 특성(properties)이 유지되는 것을 의미한다. 여기서 "보존적 치환"이란 하나의 아미노산을 구조적 및/또는 화학적 성질이 유사한 다른 아미노산으로 치환시키는 것을 의미하며, 단백질 또는 폴리펩티드의 활성에 거의 영향을 미치지 않거나, 또는 전혀 영향을 미치지 않을 수 있다. 또한, "변형"이란 아미노산의 치환(substitution), 삽입(insertion), 결실(deletion) 등을 의미한다. 상기 아미노산으로는 알라닌(Ala, A), 이소류신(Ile, I), 발린(Val, V), 류신(Leu, L), 메티오닌(Met, M), 아스파라긴(Asn, N), 시스테인(Cys,

C), 글루타민(Gln, Q), 세린(Ser, S), 트레오닌(Thr, T), 페닐알라닌(Phe, F), 트립토판(Trp, W), 티로신(Tyr, Y), 아스파트산(Asp, D), 글루탐산(Glu, E), 아르기닌(Arg, R), 히스티딘(His, H), 라이신(Lys, K), 글리신(Gly, G) 및 프롤린(Pro, P)으로부터 선택된 것이다.

[19] 또한, 변이체는 N-말단 리더 서열 또는 막전이 도메인(transmembrane domain)과 같은 하나 이상의 부분이 제거되거나, 또는 성숙 단백질(mature protein)의 N- 및/또는 C-말단으로부터 일부분이 제거된 것을 포함한다.

[20] 이러한 변이체는 그 능력이 변이 전 단백질에 비하여 증가 (강화)되거나, 변하지 않거나, 또는 감소 (약화)될 수 있다. 여기서 "증가 또는 강화"는 단백질 자체의 활성이 변이 전 단백질에 비하여 증가한 경우, 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 증가 또는 번역 증가 등으로 세포 내에서 전체적인 단백질 활성 정도가 야생형 균주 또는 변이 전 단백질을 발현하는 균주에 비하여 높은 경우, 및 이들의 조합을 포함한다. 또한 "감소 또는 약화"는 단백질 자체의 활성이 변이 전 단백질에 비해 감소한 경우, 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 저해 또는 번역 저해 등으로 세포 내에서 전체적인 단백질 활성 정도가 야생형 균주 또는 변이 전 단백질을 발현하는 균주에 비하여 낮은 경우, 및 이들의 조합을 포함한다. 본 발명에서는 변이체가 변이형, 변형, 변이형 폴리펩티드, 변이된 단백질, 변이 등과 혼용될 수 있다.

[21] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 변이체는 서열번호 4의 아미노산 서열에서 472번째 프롤린이 세린으로 치환되고, 673번째 글리신이 아스파트산으로 치환된, 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성된 것일 수 있다.

[22] 보다 구체적으로, 상기 포스포에놀피루베이트 카르복실라아제 변이체는 서열번호 2의 아미노산 서열과 비교하여 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 상동성 또는 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[23]

[24] 본 발명의 다른 양상은 상기 포스포에놀피루베이트 카르복실라아제 변이체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[25] 본 발명에서 사용된 “폴리뉴클레오티드(polynucleotide)”는 뉴클레오티드 단위체(monomer)가 공유결합에 의해 길게 사슬모양으로 이어진 뉴클레오티드의 중합체(polymer)로 일정한 길이 이상의 DNA 또는 RNA 가닥으로서, 보다 구체적으로는 상기 변이체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 단편을 의미한다.

[26] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 염기서열을 포함하는 것일 수 있다.

[27] 보다 구체적으로, 상기 폴리뉴클레오티드는 포스포에놀피루베이트 카르복실라아제를 암호화하는 서열번호 3의 염기서열에서 1414번째 염기 c가 t로, 그리고 2018번째 염기 g가 a로 치환된, 서열번호 1의 염기서열을 포함할 수 있다.

[28]

[29] 본 발명의 다른 양상은 상기 포스포에놀피루베이트 카르복실라아제 변이체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공한다.

[30] 또한, 본 발명의 다른 양상은 상기 포스포에놀피루베이트 카르복실라아제 변이체 또는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 형질전환체를 제공한다.

[31] 본 발명에서 사용된 "벡터(vector)"는 숙주세포에 목적 유전자를 전달하여 발현시키기 위한 수단으로 사용되는 모든 유형의 핵산 서열 운반 구조체를 의미한다. 상기 벡터는 특별한 언급이 없는 한, 담지된 핵산 서열이 숙주세포 유전체 내 삽입되어 발현되도록 하는 것 및/또는 독자적으로 발현되도록 하는 것을 의미할 수 있다. 이러한 벡터는 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절요소를 포함하며, "작동가능하게 연결된(operably linked)"이란 목적 유전자와 이의 조절 서열이 서로 기능적으로 결합되어 유전자 발현을 가능케 하는 방식으로 연결된 것을 의미하고, "조절요소"는 전사를 수행하기 위한 프로모터, 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보좀 결합 부위를 암호화하는 서열, 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다.

[32] 본 발명에서 사용되는 벡터는 숙주세포 내에서 복제 가능한 것이라면 특별히 한정되지 않으며, 당업계에 알려진 임의의 벡터를 이용할 수 있다. 상기 벡터의 일례로는 천연 상태이거나 재조합된 상태의 플라스미드, 코스미드, 바이러스 및 박테리오파지를 들 수 있다. 예를 들면, 파지 벡터 또는 코스미드 벡터로는 pWE15, M13, λMBL3, λMBL4, λIXII, λASHII, λAPII, λt10, λt11, Charon4A, Charon21A 등이 있으며, 플라스미드 벡터로는 pBR계, pUC계, pBluescriptII계, pGEM계, pTZ계, pCL계 및 pET계 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[33] 상기 벡터는 전형적으로 클로닝을 위한 벡터 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 발현을 위한 벡터는 당업계에서 식물, 동물 또는 미생물에서 외래의 유전자 또는 단백질을 발현하는데 사용되는 통상의 것을 사용할 수 있으며, 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있다.

[34] 본 발명에서 사용된 "재조합 벡터"는 적합한 숙주세포 내로 형질전환된 후, 숙주세포의 게놈과 무관하게 복제 가능하거나 게놈 그 자체에 봉합될 수 있다. 이때, 상기 "적합한 숙주세포"는 벡터가 복제 가능한 것으로서 복제가 개시되는 특정 염기서열인 복제 원점을 포함할 수 있다. 예를 들어, 사용되는 벡터가 발현 벡터이고 원핵세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터 (예컨대, pLλ 프로모터, CMV 프로모터, trp 프로모터, lac 프로모터, tac 프로모터, T7 프로모터), 해독의 개시를 위한 라이보좀 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 진핵세포를 숙주로 하는 경우에는, 벡터에 포함되는 진핵세포에서 작동하는 복제원점은 f1 복제원점, SV40 복제원점, pMB1 복제원점, 아데노 복제원점, AAV 복제원점 및 BBV 복제원점 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 포유동물 세포의 게놈으로부터 유래된 프로모터 (예컨대, 메탈로 티오닌 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터 (예컨대, 아데노 바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터,

SV40 프로모터, 사이토 메갈로 바이러스 프로모터, HSV의 tk 프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 일반적으로 가진다.

[35] 상기 재조합 벡터는 선택 마커(selection marker)를 포함할 수 있는데, 상기 선택 마커는 벡터로 형질전환된 형질전환체 (숙주세포)를 선별하기 위한 것으로 상기 선택 마커가 처리된 배지에서 선택 마커를 발현하는 세포만 생존할 수 있기 때문에, 형질전환된 세포의 선별이 가능하다. 상기 선택 마커는 대표적인 예로 카나마이신, 스트렙토마이신, 클로람페니콜 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[36] 재조합 벡터를 숙주세포에 삽입함으로써 형질전환체를 만들 수 있으며, 상기 형질전환체는 재조합 벡터를 적절한 숙주세포에 도입시킴으로써 얻어진 것일 수 있다. 숙주세포는 상기 발현벡터를 안정되면서 연속적으로 클로닝 또는 발현시킬 수 있는 세포로서 당업계에 공지된 어떠한 숙주세포도 이용할 수 있다.

[37] 재조합 미생물을 제작하기 위하여 원핵세포에 형질전환시키는 경우에는 숙주세포로서 *E. coli* DH5α, *E. coli* JM109, *E. coli* BL21, *E. coli* RR1, *E. coli* LE392, *E. coli* B, *E. coli* X 1776, *E. coli* W3110, *E. coli* XL1-Blue와 같은 대장균 속 균주, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 츄린겐시스와 같은 바실러스 속 균주, 코리네박테리움 글루타미쿰, 코리네박테리움 스테셔니스와 같은 코리네박테리움 속 균주, 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세슨스 및 슈도모나스 종과 같은 다양한 장내균과 균주 등이 이용되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[38] 재조합 미생물을 제작하기 위하여 진핵세포에 형질전환을 하는 경우에는 숙주세포로서 효모 (예컨대, 사카로마이세스 세레비지에), 곤충 세포, 식물 세포 및 동물 세포, 예를 들어, Sp2/0, CHO K1, CHO DG44, PER.C6, W138, BHK, COS7, 293, HepG2, Huh7, 3T3, RIN, MDCK 세포주 등이 이용될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[39] 본 발명에서 사용된 "형질전환(transformation)"은 외부 DNA를 숙주세포 내로 도입하여 인위적으로 유전적인 변화를 일으키는 현상을 의미하며, "형질전환체(transformat)"는 외부 DNA가 도입되어 목적 유전자의 발현을 안정적으로 유지하는 숙주세포를 의미한다.

[40] 상기 형질전환은 숙주세포에 따라 적합한 벡터 도입 기술이 선택되어 목적 유전자 또는 이를 포함하는 재조합 벡터를 숙주세포 내에서 발현시킬 수 있다. 예를 들면, 벡터 도입은 전기천공법(electroporation), 열 충격(heat-shock), 인산칼슘($CaPO_4$) 침전, 염화칼슘($CaCl_2$) 침전, 미세주입법(microinjection), 폴리에틸렌글리콜(PEG)법, DEAE-덱스트란법, 양이온 리포좀법, 초산 리튬-DMSO법, 또는 이들의 조합에 의해 수행될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 형질전환된 유전자는 숙주세포 내에서 발현될 수 있으면 숙주세포의 염색체 내 삽입 또는 염색체 외에 위치하고 있는 것이든 제한하지 않고 포함될 수 있다.

[41] 상기 형질전환체는 생체내 또는 시험관내에서 본 발명에 따른 재조합 벡터로 형질감염, 형질전환, 또는 감염된 세포를 포함하며, 재조합 숙주세포, 재조합 세포 또는 재조합 미생물과 동일한 용어로 사용될 수 있다.

[42] 본 발명의 재조합 벡터 내에 삽입된 유전자들은 상동 재조합 교차로 인하여 코리네박테리움 속 균주와 같은 숙주세포 내로 치환될 수 있다.

[43] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 형질전환체는 코리네박테리움(*Corynebacterium*) 속 미생물인 것일 수 있다.

[44] 상기 코리네박테리움 속 미생물로는 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*), 코리네박테리움 크루디락티스(*Corynebacterium crudilactis*), 코리네박테리움 데저티(*Corynebacterium deserti*), 코리네박테리움 칼루나에(*Corynebacterium callunae*), 코리네박테리움 수라나래에(*Corynebacterium suranareeae*), 코리네박테리움 루브리칸티스(*Corynebacterium lubricantis*), 코리네박테리움 두사넨세(*Corynebacterium doosanense*), 코리네박테리움 이피시엔스(*Corynebacterium efficiens*), 코리네박테리움 우테레키(*Corynebacterium uterequi*), 코리네박테리움 스테셔니스(*Corynebacterium stationis*), 코리네박테리움 파캔세(*Corynebacterium pacaense*), 코리네박테리움 싱귤라레(*Corynebacterium singulare*), 코리네박테리움 휴미레듀센스(*Corynebacterium humireducens*), 코리네박테리움 마리눔(*Corynebacterium marinum*), 코리네박테리움 할로톨레란스(*Corynebacterium halotolerans*), 코리네박테리움 스페니스코룸(*Corynebacterium spheniscorum*), 코리네박테리움 프레이부르겐세(*Corynebacterium freiburgense*), 코리네박테리움 스트리아툼(*Corynebacterium striatum*), 코리네박테리움 카니스(*Corynebacterium canis*), 코리네박테리움 암모니아게네스(*Corynebacterium ammoniagenes*), 코리네박테리움 레날레(*Corynebacterium renale*), 코리네박테리움 폴루티솔리(*Corynebacterium pollutisoli*), 코리네박테리움 이미탄스(*Corynebacterium imitans*), 코리네박테리움 카스피움(*Corynebacterium caspium*), 코리네박테리움 테스투디노리스(*Corynebacterium testudinoris*), 코리네박테리움 슈도펠라지(*Corynebacaterium pseudopelargi*) 또는 코리네박테리움 플라베스센스(*Corynebacterium flavescens*)일 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.

[45] 본 발명에서의 형질전환체는 전술한 포스포에놀피루베이트 카르복실라아제 변이체 또는 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하거나, 또는 이를 포함하는 벡터를 포함하는 균주, 상기 포스포에놀피루베이트 카르복실라아제 변이체 또는 폴리뉴클레오티드를 발현하는 균주, 또는 상기 포스포에놀피루베이트 카르복실라아제 변이체에 대한 활성을 가지는 균주일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[46] 본 발명에서의 형질전환체는 상기 포스포에놀피루베이트 카르복실라아제 변이체 외에도 다른 단백질 변이체 또는 유전자 변이를 포함할 수 있다.

[47] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 형질전환체는 5'-이노신산 생산능을 가지는 것일 수 있다.

[48] 상기 5'-이노신산(5'-inosinic acid)은 식품의 향미, 특히 감칠맛을 내는 핵산계 화합물로, 이노신 모노포스페이트(inosine monophosphate, IMP)와 동일한 의미로 사용된다.

[49] 상기 형질전환체는 자연적으로 5'-이노신산 생산능을 가지고 있거나, 또는 인위적으로 5'-이노신산 생산능이 부여된 것일 수 있다.

[50] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 형질전환체는 포스포에놀피루베이트 카르복실라아제 활성이 변화되어 5'-이노신산 생산능이 향상된 것일 수 있다.

[51] 본 발명에서 사용된 "생산능이 향상된"은 모균주에 비해 5'-이노신산의 생산성이 증가된 것을 의미한다. 상기 모균주는 변이의 대상이 되는 야생형 또는 변이주를 의미하며, 직접 변이의 대상이 되거나 재조합된 벡터 등으로 형질전환되는 대상을 포함한다. 본 발명에 있어서, 모균주는 야생형 코리네박테리움 속 균주이거나 야생형으로부터 변이된 코리네박테리움 속 균주일 수 있다.

[52] 본 발명에 따른 형질전환체는 포스포에놀피루베이트 카르복실라아제 변이체가 도입됨으로써 포스포에놀피루베이트 카르복실라아제의 활성이 변화하여 모균주에 비해 증가된 5'-이노신산 생산능을 나타낸다. 보다 구체적으로, 상기 형질전환체는 모균주에 비해 5'-이노신산 생산량이 적어도 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100% 증가하거나, 또는 1.1배, 1.5배, 2배, 2.5배, 3배, 3.5배, 4배, 4.5배, 5배, 5.5배, 6배, 6.5배, 7배, 7.5배, 8배, 8.5배, 9배, 9.5배 또는 10배 증가된 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 일례로, 상기 포스포에놀피루베이트 카르복실라아제 변이체를 포함한 형질전환체는 모균주에 비해 5'-이노신산 생산량이 5% 이상, 구체적으로는 5 내지 50% (바람직하게는 10 내지 40%) 증가된 것일 수 있다.

[53]

[54] 본 발명의 다른 양상은 상기 형질전환체를 배지에서 배양하는 단계; 및 상기 형질전환체 또는 형질전환체가 배양된 배지로부터 5'-이노신산을 회수하는 단계를 포함하는 5'-이노신산의 생산 방법을 제공한다.

[55] 상기 배양은 당업계에 알려진 적절한 배지와 배양 조건에 따라 이루어질 수 있으며, 통상의 기술자라면 배지 및 배양 조건을 용이하게 조정하여 사용할 수 있다. 구체적으로, 상기 배지는 액체 배지일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 배양 방법은 예를 들면, 회분식 배양(batch culture), 연속식 배양(continuous culture), 유가식 배양(fed-batch culture) 또는 이들의 조합 배양을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[56] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 배지는 적절한 방식으로 특정 균주의 요건을 충족해야 하며, 통상의 기술자에 의해 적절하게 변형될 수 있다. 에스케리치아 속 균주에 대한 배양 배지는 공지된 문헌 (Manual of Methods for General Bacteriology. American Society for Bacteriology. Washington D.C., USA, 1981)을 참조할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[57] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 배지에 다양한 탄소원, 질소원 및 미량원소 성분을 포함할 수 있다. 사용될 수 있는 탄소원으로는 글루코스, 수크로스, 락토스, 프락토스, 말토스, 전분, 셀룰로스와 같은 당 및 탄수화물, 대두유, 해바라기유, 피마자유, 코코넛유 등과 같은 오일 및 지방, 팔미트산, 스테아린산, 리놀레산과 같은 지방산, 글리세롤, 에탄올과 같은 알코올, 아세트산과 같은 유기산이 포함된다. 이들 물질은 개별적으로 또는 혼합물로서 사용될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 사용될 수 있는 질소원으로는 펩톤, 효모 추출물, 육즙, 맥아 추출물, 옥수수 침지액, 대두밀 및 요소 또는 무기 화합물, 예를 들면 황산 암모늄, 염화암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄 및 질산암모늄이 포함될 수 있다. 질소원 또한 개별적으로 또는 혼합물로서 사용할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 사용될 수 있는 인의 공급원으로는 인산이수소칼륨 또는 인산수소이칼륨 또는 상응하는 나트륨-함유 염이 포함될 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 배양 배지는 성장에 필요한 황산마그네슘 또는 황산철과 같은 금속염을 함유할 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다. 그 외에, 아미노산 및 비타민과 같은 필수 성장 물질이 포함될 수 있다. 또한 배양 배지에 적절한 전구체들이 사용될 수 있다. 상기 배지 또는 개별 성분은 배양과정에서 배양액에 적절한 방식에 의해 회분식으로 또는 연속식으로 첨가될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[58] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 배양 중에 수산화암모늄, 수산화칼륨, 암모니아, 인산 및 황산과 같은 화합물을 미생물 배양액에 적절한 방식으로 첨가하여 배양액의 pH를 조정할 수 있다. 또한, 배양 중에 지방산 폴리글리콜 에스테르와 같은 소포제를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다. 추가적으로, 배양액의 호기 상태를 유지하기 위하여, 배양액 내로 산소 또는 산소-함유 기체 (예, 공기)를 주입할 수 있다. 배양액의 온도는 통상 20 내지 45℃, 예를 들면 25 내지 40℃일 수 있다. 배양기간은 유용물질이 원하는 생산량으로 수득될 때까지 계속될 수 있으며, 예를 들면 10 내지 160시간일 수 있다.

[59] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 배양된 형질전환체 또는 형질전환체가 배양된 배지에서 5'-이노신산을 회수하는 단계는 배양 방법에 따라 당해 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 배지로부터 생산된 5'-이노신산을 수집 또는 회수할 수 있다. 예를 들면 원심분리, 여과, 추출, 분무, 건조, 증발, 침전, 결정화, 전기영동, 분별용해 (예를 들면, 암모늄 설페이트 침전), 크로마토그래피 (예를 들면, 이온 교환, 친화성, 소수성 및 크기배제) 등의 방법을 사용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 않는다.

[60] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 5'-이노신산을 회수하는 단계는 배양 배지를 저속 원심분리하여 바이오매스를 제거하고 얻어진 상등액을 이온교환 크로마토그래피를 통하여 분리할 수 있다.

[61] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 5'-이노신산을 회수하는 단계는 5'-이노신산을 정제하는 공정을 포함할 수 있다.

발명의 효과

[62] 본 발명에 따른 포스포에놀피루베이트 카르복실라아제 변이체는 포스포에놀피루베이트 카르복실라아제를 구성하는 아미노산 서열 중 하나 이상의 아미노산이 치환됨으로써 단백질 활성이 변화되어, 이를 포함하는 재조합 미생물은 5'-이노신산을 효율적으로 생산할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[63] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 pK19msb 플라스미드의 구조이다.

발명의 실시를 위한 형태

[64] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이러한 설명은 본 발명의 이해를 돕기 위하여 예시적으로 제시된 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이러한 예시적인 설명에 의하여 제한되는 것은 아니다.

[65]

[66] **실시예 1. 포스포에놀피루베이트 카르복실라아제 변이체를 발현하는 균주 제작**

[67] 포스포에놀피루베이트 카르복실라아제의 아미노산 서열 (서열번호 4)에서 472번째 프롤린(P)이 세린(S)으로 치환되고, 673번째 글리신(G)이 아스파트산(D)으로 치환된 변이체 (서열번호 2)가 5'-이노신산의 생산에 미치는 영향을 확인하기 위해, 상기 포스포에놀피루베이트 카르복실라아제 변이체를 발현하는 벡터 및 상기 벡터가 도입된 균주를 제작하였다.

[68]

[69] **1-1. 포스포에놀피루베이트 카르복실라아제 변이체 발현을 위한 벡터 제작**

[70] 야생형 코리네박테리움 스테셔니스 ATCC6872의 genomic DNA를 주형으로 프라이머 1 및 2의 프라이머 쌍을 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 단편과 pK19msb 플라스미드 (서열번호 5)에 제한효소 smaI (NEB)을 처리하고 T4 리가아제(ligase)를 사용하여 클로닝하였다. 구축된 플라스미드를 pK_PC라 명명하였다.

[71] PCR 증폭에서는 pfu premix (bioneer)를 사용하였고, 95℃에서 5분 변성한 후 95℃에서 30초, 58℃에서 30초, 72℃에서 1분 30초를 30회 반복하고, 72℃에서 5분간 반응시켰다.

[72] 플라스미드 제작에 사용된 프라이머 서열은 하기 표 1과 같다.

[73] [표1]

프라이머 명칭	서열번호	프라이머 서열 (5'-3')
프라이머 1	6	CTCTGCTCGCTCACTGGTCT
프라이머 2	7	TACTCGCTGTGTCGTAGCGGG

[74]

[75] **1-2. 포스포에놀피루베이트 카르복실라아제 변이체가 도입된 변이주 제작**

[76] 코리네박테리움 스테셔니스 KCCM13339P의 형질전환을 위한 방법으로 van der Rest 등의 방법을 기본으로 수식한 일렉트로컴피턴트 셀(electrocompetent cell) 제조법을 사용하였다.

[77] 먼저, 2% 포도당이 첨가된 2YT 배지 (트립톤 16 g/ℓ, 효모추출물 10 g/ℓ 및 염화나트륨 5 g/ℓ 함유) 10 ㎖에서 코리네박테리움 스테셔니스 KCCM13339P를 1차 배양하여 종배양액을 준비하였다, 포도당을 제외한 2YT 배지 100 ㎖에 1 mg/㎖ 농도의 이소니코틴산 히드라진(isonicotinic acid hydrazine) 및 2.5% 글라이신(glycine)을 첨가하였다. 그 다음, OD_{610} 값이 0.3이 되도록 종배양액을 접종한 후, 30℃, 180 rpm으로 5 ~ 8시간 배양하여 OD_{610} 값이 0.6 ~ 0.7가 되도록 하였다. 배양액을 얼음에서 30분간 방치한 후, 4℃, 3500 rpm으로 10분간 원심분리하였다. 그 뒤 상등액을 버리고 침전된 코리네박테리움 스테셔니스 KCCM13339P를 10% 글리세롤 용액으로 4회 세척하고, 최종적으로 10% 글리세롤 용액 0.5 ㎖에 재현탁하여 컴피턴트 셀(competent cell)을 준비하였다. 전기천공(Electroporation)은 바이오-라드(Bio-Rad)사의 전기천공기(electroporator)를 사용하였다. 전기천공 큐벳 (0.2 mm)에 준비된 컴피턴트 셀과 제조된 pK_PC 벡터를 첨가한 후, 2.5 kV, 200 Ω 및 12.5 ㎌의 조건으로 전기충격을 가하였다. 전기충격이 끝난 즉시 RG 배지(Brain Heart infusion 18.5 g/ℓ 및 소비톨 0.5 M 함유) 1 ㎖을 첨가하고 46℃에서 6분간 열처리하였다. 그 후 실온에서 식힌 뒤 15 ㎖ 캡 튜브로 옮겨 30℃에서 2시간 배양하고 선별 배지 (트립톤 5 g/ℓ, NaCl 5 g/ℓ, 효모추출물 2.5 g/ℓ, Brain Heart infusion powder 18.5 g/ℓ, 아가(agar) 15 g/ℓ, 소비톨 91 g/ℓ 및 카나마이신(kanamycine) 20 ㎍/ℓ 함유)에 도말하였다. 30℃에서 72시간 배양해 생성된 콜로니는 배지에서 정지기까지 배양하여 2차 재조합을 유도했으며, 10^{-5} ~ 10^{-7}까지 희석하여 항생제가 없는 평판배지 (10% sucrose 함유)에 도말하여 카나마이신 내성도가 없고 10% 수크로오스가 포함된 배지에서 성장성이 있는 균주를 선별하였으며, 이를 IPC-1이라 명명하였다.

[78]

[79] **실험예 1. 포스포에놀피루베이트 카르복실라아제 변이체를 발현하는 균주의 5'-이노신산 생산능 평가**

[80] 모균주 KCCM13339P과 포스포에놀피루베이트 카르복실라아제 변이체가 도입된 변이주 IPC-1의 5'-이노신산 생산능을 비교하였다.

[81] 하기 표 2의 5'-이노신산 생산용 배지 10 mL가 담긴 100 mL 플라스크에 각 균주(모균주 또는 변이주)를 부피 기준으로 1%씩 접종하여 34℃, 200 rpm의 조건으로 45시간 진탕 배양하였다. 배양 종료 후 HPLC (Agilent)를 사용하여 배지 내 5'-이노신산의 농도를 측정하였고, 그 결과를 하기 표 3에 나타내었다.

[82] [표2]

성분	함량
Glucose	70 g/L

$(NH_4)_2SO_4$	2 g/L
$MgSO_4$	1 g/L
Urea	2 g/L
Yeast extract	20 g/L
KH_2PO_4	2 g/L
$FeSO_4$	10 mg/L
$MnSO_4$	10 mg/L
Thiamine_HCl	5 mg/L
biotin	20 ug/L
Cystein	20 mg/L
Bata-alanine	20 mg/L
Adenine	30 mg/L

[83] [표3]

균주	5'-이노신산 생산량 (g/L)
KCCM13339P	20.0
IPC-1	23.2

[84]

[85] 상기 표 3에 나타낸 바와 같이, 포스포에놀피루베이트 카르복실라아제 변이체가 도입된 변이주는 472번째 및 673번째 아미노산이 다른 아미노산으로 치환됨으로써 모균주에 비해 5'-이노신산 생산량이 약 16% 향상된 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 포스포에놀피루베이트 카르복실라아제의 점 돌연변이 도입이 5'-이노신산 생산성에 대한 유효한 효과를 제공함을 시사한다.

[86]

[87] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

[88] [수탁번호]

[89] 기탁기관명 : 한국미생물보존센터(KCCM)

[90] 수탁번호 : KCCM13339P

[91] 수탁일자 : 20230329

[92]

특허 출원을 위한 미생물 기탁의
국제적 승인에 대한 부다페스트 조약

국제적 양식

To: 대상
178 마곡중앙로,
강서구,
서울, 07789,
대한민국

본 페이지의 하단에 표시된
국제 기탁 기관에 의해
규칙 7.1에 의거 발행된 수탁증 원본

Ⅰ. 미생물의 표시	
기탁자에 의해 주어진 참조 표시:	국제 기탁 기관에 의해 주어진 수탁번호:
Corynebacterium stationis MW 5520	KCCM13339P
Ⅱ. 과학적 설명 및/또는 제안된 분류학적 명칭	
상기 Ⅰ에 표시된 미생물은 다음과 같이 수반되었다: ☐ 과학적 설명 ☐ 제안된 분류학적 명칭 (해당되는 곳에 x 표시함)	
Ⅲ. 수령 및 수락	
본 국제 기탁 기관은 1993. 04. 01. (최초 기탁일)에 본 국제 기탁 기관에 의해 접수된 상기 Ⅰ에 표시된 미생물을 수락한다.[1] (KFCC-11786)	
Ⅳ. 전환 요청 접수	
상기 Ⅰ에 표시된 미생물은 1993. 04. 01 (최초 기탁일)에 본 국제 기탁 기관에 의해 접수되었고, 최초 기탁을 부다페스트 조약에 따른 기탁으로 전환하는 요청은 2023. 03. 29. (전환 요청 접수일)에 본 국제 기탁 기관에 의해 접수되었다.	
Ⅴ. 국제 기탁 기관	
명칭: 한국미생물보존센터 주소: 유림빌딩 45, 홍제내2가길 서대문구 서울 03641 대한민국	국제 기탁 기관의 대표자의 사인 한국미생물보존센터 수탁업인 International depositary 일자: 2023. 03. 29.

[1] 규칙 6.4(d)가 적용되어, 해당 날짜는 국제 기탁 기관의 지위를 취득한 날짜이다.

양식 BP/4 (단일 페이지)

상기 번역은 원문의 내용과 상위 없음을 증명함.

2023년 8월 31일

변리사 박혁

청구범위

[청구항 1] 서열번호 4의 아미노산 서열에서 472번째 및 673번째 아미노산 중 하나 이상이 다른 아미노산으로 치환된, 포스포에놀피루베이트 카르복실라아제 변이체.

[청구항 2] 청구항 1에 있어서,
상기 변이체는 서열번호 4의 아미노산 서열에서 472번째 프롤린이 세린으로 치환되고, 673번째 글리신이 아스파트산으로 치환된, 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성된 것인 포스포에놀피루베이트 카르복실라아제 변이체.

[청구항 3] 청구항 1의 변이체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드.

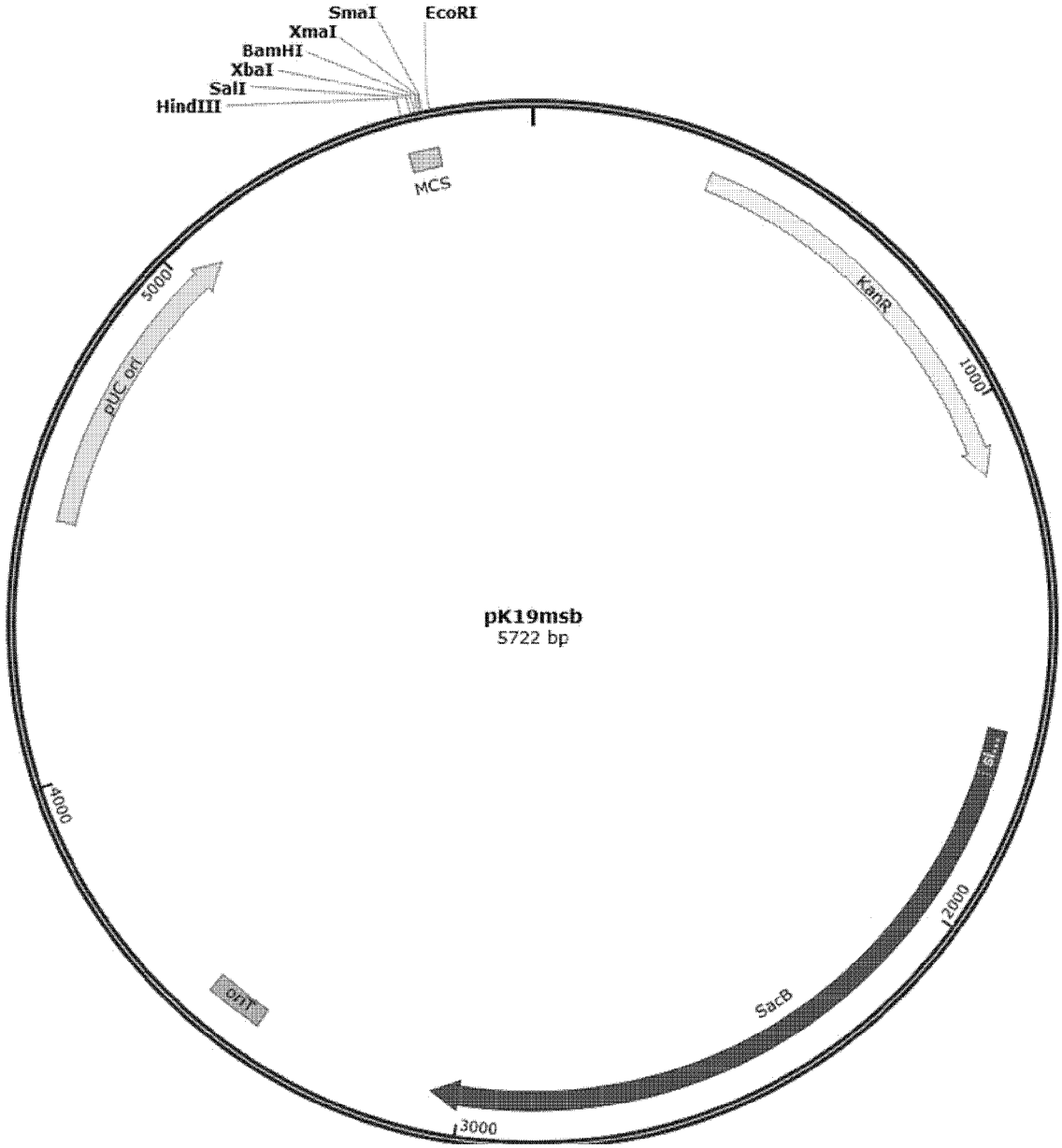
[청구항 4] 청구항 1의 변이체 또는 청구항 3의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 형질전환체.

[청구항 5] 청구항 4에 있어서,
상기 형질전환체는 코리네박테리움(*Corynebacterium*) 속 미생물인 것인 형질전환체.

[청구항 6] 청구항 4에 있어서,
상기 형질전환체는 5'-이노신산 생산능을 가지는 것인 형질전환체.

[청구항 7] 청구항 4의 형질전환체를 배지에서 배양하는 단계; 및
상기 형질전환체 또는 형질전환체가 배양된 배지로부터 5'-이노신산을 회수하는 단계를 포함하는 5'-이노신산의 생산 방법.

[도1]


SmaI
EcoRI
XmaI
BamHI
XbaI
SalI
HindIII
MCS
5000
pUC ori
KanR
1000
pK19msb
5722 bp
4000
ori
SacB
2000
3000

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2023/012968

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 9/88(2006.01)i; **C12N 15/77**(2006.01)i; **C12P 19/32**(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 9/88(2006.01); C07K 14/34(2006.01); C12N 1/20(2006.01); C12N 1/21(2006.01); C12N 15/52(2006.01); C12N 15/61(2006.01); C12N 15/77(2006.01); C12P 19/32(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 카르복실라아제(phosphoenolpyruvate carboxylase), 변이체(variant), 5'-이노신산(5'-inosinic acid), 치환(substitution)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2016-0125170 A (THE CATHOLIC UNIVERSITY OF KOREA INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 31 October 2016 (2016-10-31) See entire document.	1-7
A	KR 10-2016-0078694 A (DAESANG CORPORATION) 05 July 2016 (2016-07-05) See entire document.	1-7
A	KR 10-1916622 B1 (CJ CHEILJEDANG CORPORATION) 07 November 2018 (2018-11-07) See entire document.	1-7
A	KR 10-1904675 B1 (CJ CHEILJEDANG CORPORATION) 04 October 2018 (2018-10-04) See entire document.	1-7
A	KR 10-1166027 B1 (CJ CHEILJEDANG CORPORATION) 19 July 2012 (2012-07-19) See entire document.	1-7

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

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
17 January 2024	**19 January 2024**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office **Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 35208**	
Facsimile No. **+82-42-481-8578**	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2023/012968

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 13*ter*.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/KR2023/012968

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
KR 10-2016-0125170 A	31 October 2016	KR 10-1694461 B1	23 January 2017
KR 10-2016-0078694 A	05 July 2016	KR 10-1744958 B1	12 June 2017
KR 10-1916622 B1	07 November 2018	AU 2019-204119 A1	18 July 2019
		BR 112019014101 A2	03 March 2020
		BR 112019014101 B1	10 May 2022
		CN 110003315 A	12 July 2019
		CN 110831959 A	21 February 2020
		CN 110831959 B	29 December 2020
		EP 3674313 A1	01 July 2020
		EP 3674313 A4	07 October 2020
		EP 3674313 A8	09 September 2020
		JP 2020-505914 A	27 February 2020
		JP 6648345 B1	14 February 2020
		MX 2019007995 A	29 August 2019
		RU 2733422 C1	01 October 2020
		SG 11201904692 QA	27 August 2019
		US 11384124 B2	12 July 2022
		US 11746130 B2	05 September 2023
		US 2020-0377558 A1	03 December 2020
		US 2022-0348616 A1	03 November 2022
		US 2023-0192780 A1	22 June 2023
		WO 2019-135445 A1	11 July 2019
		WO 2019-135639 A1	11 July 2019
		ZA 201903357 B	26 February 2020
KR 10-1904675 B1	04 October 2018	AU 2018-378011 A1	04 July 2019
		BR 112019013003 A2	21 July 2020
		BR 112019013003 B1	09 May 2023
		CN 109929787 A	25 June 2019
		CN 110249054 A	17 September 2019
		CN 110249054 B	13 October 2020
		EP 3608410 A1	12 February 2020
		EP 3608410 A4	22 April 2020
		JP 2020-505005 A	20 February 2020
		JP 6652687 B2	26 February 2020
		MX 2019008018 A	29 August 2019
		RU 2723038 C1	08 June 2020
		US 11155849 B2	26 October 2021
		US 2020-0377917 A1	03 December 2020
		WO 2019-117398 A1	20 June 2019
		WO 2019-117671 A1	20 June 2019
		ZA 201903518 B	26 February 2020
KR 10-1166027 B1	19 July 2012	CN 102549144 A	04 July 2012
		CN 102549144 B	18 June 2014
		DK 2415861 T3	22 January 2018
		EP 2415861 A2	08 February 2012
		EP 2415861 A4	12 September 2012
		EP 2415861 B1	29 November 2017
		EP 3219789 A1	20 September 2017
		ES 2657837 T3	07 March 2018
		JP 2012-522503 A	27 September 2012

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2023/012968

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		KR 10-2010-0109732 A	11 October 2010
		MX 2011010250 A	29 November 2011
		PL 2415861 T3	31 July 2018
		RU 2482178 C1	20 May 2013
		US 2012-0021466 A1	26 January 2012
		US 8993272 B2	31 March 2015
		WO 2010-114245 A2	07 October 2010
		WO 2010-114245 A3	23 June 2011

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2023/012968

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 9/88(2006.01)i; **C12N 15/77**(2006.01)i; **C12P 19/32**(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 9/88(2006.01); C07K 14/34(2006.01); C12N 1/20(2006.01); C12N 1/21(2006.01); C12N 15/52(2006.01); C12N 15/61(2006.01); C12N 15/77(2006.01); C12P 19/32(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 카르복실라아제(phosphoenolpyruvate caboxylase), 변이체(variant), 5'-이노신산(5'-inosinic acid), 치환(substitution)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2016-0125170 A (가톨릭대학교 산학협력단) 2016.10.31 전체 문헌	1-7
A	KR 10-2016-0078694 A (대상 주식회사) 2016.07.05 전체 문헌	1-7
A	KR 10-1916622 B1 (씨제이제일제당 (주)) 2018.11.07 전체 문헌	1-7
A	KR 10-1904675 B1 (씨제이제일제당 (주)) 2018.10.04 전체 문헌	1-7
A	KR 10-1166027 B1 (씨제이제일제당 (주)) 2012.07.19 전체 문헌	1-7

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☑ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌
"D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌
"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌
"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌
"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌
"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌
"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌
"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.
"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2024년01월17일(17.01.2024)	**2024년01월19일(19.01.2024)**

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**

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2023/012968

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:

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2023/012968

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2016-0125170 A	2016/10/31	KR 10-1694461 B1	2017/01/23
KR 10-2016-0078694 A	2016/07/05	KR 10-1744958 B1	2017/06/12
KR 10-1916622 B1	2018/11/07	AU 2019-204119 A1	2019/07/18
		BR 112019014101 A2	2020/03/03
		BR 112019014101 B1	2022/05/10
		CN 110003315 A	2019/07/12
		CN 110831959 A	2020/02/21
		CN 110831959 B	2020/12/29
		EP 3674313 A1	2020/07/01
		EP 3674313 A4	2020/10/07
		EP 3674313 A8	2020/09/09
		JP 2020-505914 A	2020/02/27
		JP 6648345 B1	2020/02/14
		MX 2019007995 A	2019/08/29
		RU 2733422 C1	2020/10/01
		SG 11201904692 QA	2019/08/27
		US 11384124 B2	2022/07/12
		US 11746130 B2	2023/09/05
		US 2020-0377558 A1	2020/12/03
		US 2022-0348616 A1	2022/11/03
		US 2023-0192780 A1	2023/06/22
		WO 2019-135445 A1	2019/07/11
		WO 2019-135639 A1	2019/07/11
		ZA 201903357 B	2020/02/26
KR 10-1904675 B1	2018/10/04	AU 2018-378011 A1	2019/07/04
		BR 112019013003 A2	2020/07/21
		BR 112019013003 B1	2023/05/09
		CN 109929787 A	2019/06/25
		CN 110249054 A	2019/09/17
		CN 110249054 B	2020/10/13
		EP 3608410 A1	2020/02/12
		EP 3608410 A4	2020/04/22
		JP 2020-505005 A	2020/02/20
		JP 6652687 B2	2020/02/26
		MX 2019008018 A	2019/08/29
		RU 2723038 C1	2020/06/08
		US 11155849 B2	2021/10/26
		US 2020-0377917 A1	2020/12/03
		WO 2019-117398 A1	2019/06/20
		WO 2019-117671 A1	2019/06/20
		ZA 201903518 B	2020/02/26
KR 10-1166027 B1	2012/07/19	CN 102549144 A	2012/07/04
		CN 102549144 B	2014/06/18
		DK 2415861 T3	2018/01/22
		EP 2415861 A2	2012/02/08
		EP 2415861 A4	2012/09/12
		EP 2415861 B1	2017/11/29
		EP 3219789 A1	2017/09/20
		ES 2657837 T3	2018/03/07

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2023/012968

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		JP 2012-522503 A	2012/09/27
		KR 10-2010-0109732 A	2010/10/11
		MX 2011010250 A	2011/11/29
		PL 2415861 T3	2018/07/31
		RU 2482178 C1	2013/05/20
		US 2012-0021466 A1	2012/01/26
		US 8993272 B2	2015/03/31
		WO 2010-114245 A2	2010/10/07
		WO 2010-114245 A3	2011/06/23