

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

(43) 국제공개일
2021년 9월 10일 (10.09.2021) WIPO | PCT

WO 2021/177731 A1

(51) 국제특허분류: C12N 9/00 (2006.01) C12P 13/14 (2006.01) (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
C12N 15/77 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2021/002652

공개:

(22) 국제출원일: 2021년 3월 4일 (04.03.2021)

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

(25) 출원언어: 한국어

— 명세서와 별도로 규칙 13의2에 의하여 제출한 기탁된 생물학적 물질에 관한 표시와 함께 (규칙 13의2.4(d)(i) 및 48.2(a)(viii))

(26) 공개언어: 한국어

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(30) 우선권정보: 10-2020-0027322 2020년 3월 4일 (04.03.2020) KR

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

(72) 발명자: 최수진 (CHOI, Su Jin); 04560 서울시 중구 동호로 330, Seoul (KR). 이임상 (LEE, Imsang); 04560 서울시 중구 동호로 330, Seoul (KR). 김희영 (KIM, Heeyong); 04560 서울시 중구 동호로 330, Seoul (KR). 김병수 (KIM, Byeong Soo); 04560 서울시 중구 동호로 330, Seoul (KR). 이광우 (LEE, Kwang Woo); 04560 서울시 중구 동호로 330, Seoul (KR).

(74) 대리인: 특허법인 한얼 (HANOL INTELLECTUAL PROPERTY AND LAW); 05836 서울시 송파구 법원로 135 6층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI



WO 2021/177731 A1

(54) Title: GLUTAMINE SYNTHETASE MUTANT-TYPE POLYPEPTIDE AND L-GLUTAMINE PRODUCTION METHOD USING SAME

(54) 발명의 명칭: 글루타민 신데타아제 변이형 폴리펩티드 및 이를 이용한 L-글루타민 생산 방법

(57) Abstract: The present application relates to an activity-enhanced glutamine synthetase mutant-type polypeptide, and a method of producing L-glutamine by using same. The use of the novel mutant-type polypeptide, compared to that of a strain having a wild-type glutamine synthetase activity, can increase the production of L-glutamine without delays in growth rate, and thus may be widely used in the mass-production of L-glutamine.

(57) 요약서: 본 출원은 활성이 강화된 글루타민 신데타아제 변이형 폴리펩티드 및 이를 이용하여 L-글루타민을 제조하는 방법에 관한 것으로, 상기 신규한 변이형 폴리펩티드를 이용할 경우 야생형 글루타민 신데타아제 활성을 가진 균주 대비 성장속도의 지연 없이 L-글루타민의 생산량을 증가시킬 수 있어 L-글루타민 대량 생산에 널리 활용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 글루타민 신테타아제 변이형 폴리펩티드 및 이를 이용한 L-글루타민 생산 방법

기술분야

[1] 본 출원은 활성이 강화된 글루타민 신테타아제 변이형 폴리펩티드 및 이를 이용하여 L-글루타민을 제조하는 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

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

[4] L-글루타민 생산을 위해서는 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*)과 대장균 (*Escherichia coli*)이 대표적인 미생물로 이용되고 있다. L-글루타민 생합성 경로를 살펴보면 해당과정 (Glycolysis)과 TCA 회로 (Tricarboxylic acid cycle)를 통해 생성되는 알파-케토글루탐산 (α -keto glutamic acid)을 전구체로 하여, 글루탐산 탈수소 효소 (Glutamate dehydrogenase)에 의해 L-글루탐산 (L-glutamate)이 생성되고, 글루타민 신테타아제 (Glutamine synthetase)의 반응을 통해 최종적으로 L-글루타민이 생성된다.

[5] L-글루타민을 고농도로 생산하기 위해서는 글루타민 신테타아제의 발현을 최적화하고, 활성을 강화하는 것이 매우 중요하다. 글루타민 신테타아제의 활성화를 위해 2가의 금속이온이 필요하며, 글리신, 알라닌, 트립토판, 히스티딘, 글루코사민-6인산, 시티딘-3인산 등에 의해 활성이 저해된다. 또한 405번째 아미노산의 아데닐화를 통해 활성이 저해된다. 선행 연구에 의하면, 405번째 아미노산을 타이로신에서 페닐알라닌으로 치환하여 아데닐화에 의한 저해를 해제하는 연구가 보고된바 있다 (EP 1229121 B1). 그러나, 여전히 고효율로 L-글루타민을 생산할 수 있는 방법의 개발이 요구되고 있다.

[6]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[7] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 L-글루타민 생산능이 증가된 미생물을 개발하기 위해 노력한 결과, L-글루타민의 생산을 증가시키는 글루타민 신테타아제 변이형 폴리펩티드를 확보함으로써 본 발명을 완성하였다.

[8]

과제 해결 수단

[9] 본 출원은 서열번호 1의 아미노산 서열의 401번째, 402번째 또는 404번째 위치에 상응하는 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 글루타민

- 신테타아제(Glutamine synthetase) 활성을 가지는 변이형 폴리펩티드를 제공한다.
- [10] 본 출원은 상기 변이형 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [11] 본 출원은 상기 변이형 폴리펩티드 또는 상기 변이형 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 미생물을 제공한다.
- [12] 본 출원은 본 출원의 미생물을 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, L-글루타민을 생산하는 방법을 제공한다.

[13]

발명의 효과

- [14] 본 출원의 글루타민 신테타아제 활성을 강화시킨 신규한 변이형 폴리펩티드를 이용할 경우 야생형 글루타민 신테타아제 활성을 가진 균주 대비 성장속도의 지연 없이 글루타민의 생산량을 증가시킬 수 있어 글루타민 대량 생산에 널리 활용될 수 있다.

[15]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [16] 이하, 본 출원을 더욱 상세히 설명한다. 그러나, 본 출원에 개시한 일 실시 양태의 설명 및 실시예는 공통된 사항에 대하여 다른 실시 양태의 설명 및 실시예에서도 적용될 수 있다. 또한, 본 출원의 상세한 설명에 개시된 다양한 요소들의 모든 조합은 본 출원의 권리범위에 속하는 것은 물론이다. 그뿐만 아니라, 하기 기술된 구체적인 설명에 의하여 본 발명출원의 권리범위가 제한되는 것이 아니다.
- [17] 또한, 당해 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 통상의 실험만을 사용하여 본 출원에 기재된 본 출원의 특정 양태에 대한 다수의 등가물을 인지하거나 확인할 수 있다. 또한, 이러한 등가물은 본 출원에 포함되는 것으로 의도된다.

[18]

- [19] 본 출원의 하나의 양태는 글루타민 신테타아제(Glutamine synthetase)의 아미노산 서열에서 401번째, 402번째 또는 404번째 위치에 상응하는 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 글루타민 신테타아제 변이체를 제공할 수 있다.

- [20] 구체적으로 본 출원의 하나의 양태는 서열번호 1의 아미노산 서열의 401번째, 402번째 또는 404번째 위치에 상응하는 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 글루타민 신테타아제(Glutamine synthetase) 활성을 가지는 변이형 폴리펩티드를 제공할 수 있다.

- [21] 본 출원에서 용어 "변이체" 또는 "변이형 폴리펩티드" 또는 "변이형 단백질(효소)"는 혼용되어 사용될 수 있다.

- [22] 본 출원에서 용어 "글루타민 신테타아제(Glutamine synthetase)"는 미생물에 있어 ATP 존재시, 글루탐산과 암모니아를 글루타민으로 전환하는 효소를 의미한다. 그 예로, glnA 유전자에 의해 코딩 될 수 있으나, 이제 제한되지 않는다. 본 출원의 목적상 글루탐산과 암모니아를 글루타민으로 전환하는

활성을 갖는 단백질이라면 유래에 상관없이 포함될 수 있으며, 임의의 유기체(식물 및 미생물 등)로부터 유래하는 효소를 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 글루타민 신테타아제는 코리네박테리움 속 미생물 유래 효소 또는 그 변이체일 수 있으며, 예를 들어 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*), 코리네박테리움 암모니아게네스(*Corynebacterium ammoniagenes*), 브레비박테리움 락토퍼멘텀(*Brevibacterium lactofermentum*), 브레비박테리움 플라범(*Brevibacterium flavum*), 코리네박테리움 써모아미노게네스(*Corynebacterium thermoaminogenes*), 코리네박테리움 에피션스(*Corynebacterium efficiens*), 코리네박테리움 스테이션니스(*Corynebacterium stationis*) 유래 효소 또는 그 변이체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [23] 구체적으로, 상기 글루타민 신테타아제는 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 이와 80% 이상, 100% 미만의 상동성 또는 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 글루타민 신테타아제 활성을 갖는 한, 이에 제한되지 않는다. 더욱 구체적으로, 본 출원의 글루타민 신테타아제는 서열번호 1의 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 상동성 또는 동일성을 가지는 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 또한, 이러한 상동성 또는 동일성을 가지며 상기 단백질에 상응하는 효능을 나타내는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질도 본 출원의 범위 내에 포함됨은 자명하다.

[24]

- [25] 본 출원에서 용어, "글루타민 신테타아제 활성을 가지는 변이형 폴리펩티드" 또는 "글루타민 신테타아제 변이체"는 글루타민 신테타아제 활성을 갖는 폴리펩티드의 아미노산 서열 일부가 다른 아미노산으로 치환되어 변화된 글루타민 신테타아제 활성을 가지는 폴리펩티드를 의미한다. 구체적으로 상기 변이형 폴리펩티드는 글루타민 신테타아제 활성을 갖는 다양한 서열의 폴리펩티드상에서 서열번호 1의 아미노산 서열의 401번째, 402번째 또는 404번째 위치에 상응하는 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 변이형 폴리펩티드일 수 있다.

[26]

- [27] 본 출원의 'N번 위치'는 N번 위치 및 N번 위치에 상응(Corresponding)하는 아미노산 위치를 포함할 수 있다. 구체적으로 대상단백질과 동일한 활성을 갖는 폴리펩티드의 상응하는 아미노산 위치를 포함할 수 있다. 더욱 구체적으로 상기 대상 단백질과 동일한 활성을 갖는 폴리펩티드의 아미노산 서열은 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 이와 98%이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열일 수 있으며 서열번호 1의 아미노산 서열에서 401번째, 402번째 또는 404번째 위치는 서열번호 1의 아미노산 서열에 80%이상, 100% 미만의 상동성 또는 동일성을 가지는 아미노산 서열에서 상기 401번째, 402번째 또는 404번째 위치에

상응하는 아미노산 위치를 포함할 수 있다.

- [28] 상기 N번 위치에 상응하는 아미노산 위치 또는 대상단백질과 동일한 활성을 갖는 폴리펩티드의 상응하는 아미노산 위치는 EMBOSS 패키지의 Needle 프로그램(EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, 문헌[Rice et al., 2000, Trends Genet. 16:276-277])에서 구현되는 바와 같이 Needleman-Wunsch 알고리즘(문헌[Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453]), 구체적으로 버전 5.0.0 또는 그 이후를 사용하여 결정될 수 있다. 사용되는 파라미터는 10의 갭 오픈 페널티, 0.5의 갭 연장 페널티 및 EBLOSUM62(BLOSUM62의 EMBOSS 버전) 치환 매트릭스일 수 있다.
- [29] 상기 N번 위치에 상응하는 아미노산 위치 또는 대상단백질과 동일한 활성을 갖는 폴리펩티드의 상응하는 아미노산 위치의 아미노산 잔기의 확인은 비제한적으로 그들 각각의 디폴트 파라미터를 사용하는 MUSCLE(multiple sequence comparison by log-expectation; 버전 3.5 또는 그 이후; 문헌[Edgar, 2004, Nucleic Acids Research 32: 1792-1797]), MAFFT(버전 6.857 또는 그 이후; 문헌[Katoh and Kuma, 2002, Nucleic Acids Research 30: 3059-3066]; 문헌[Katoh et al., 2005, Nucleic Acids Research 33: 511-518]; 문헌[Katoh and Toh, 2007, Bioinformatics 23: 372-374]; 문헌[Katoh et al., 2009, Methods in Molecular Biology 537: 39-64]; 문헌[Katoh and Toh, 2010, Bioinformatics 26: 1899-1900]) 및 ClustalW를 사용하는 EMBOSS EMMA(1.83 또는 그 이후; 문헌[Thompson et al., 1994, Nucleic Acids Research 22: 4673-4680])를 포함하는 몇몇 컴퓨터 프로그램을 사용한 다중 폴리펩티드 서열의 정렬에 의해 결정될 수 있다.
- [30] 그 밖의 폴리펩티드가 종래의 서열 기반의 비교로 그들의 관계를 검출하지 못하게 되는 경우(문헌[Lindahl and Elofsson, 2000, J. Mol. Biol. 295: 613-615]), 그 밖의 쌍별 서열 비교 알고리즘이 사용될 수 있다. 서열 기반의 검색에서 보다 높은 민감도는 데이터베이스를 검색하기 위한 폴리펩티드 패밀리(프로파일)의 확률론적 표시를 이용하는 검색 프로그램을 사용하여 얻어질 수 있다. 예를 들어, PSI-BLAST 프로그램은 반복적인 데이터베이스 검색 과정을 통하여 프로파일을 산출하고 원거리 상동체를 검출할 수 있다(문헌[Atschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402]). 폴리펩티드에 대한 패밀리 또는 슈퍼패밀리가 단백질 구조 데이터베이스에서 1개 이상의 표시를 가진다면 훨씬 더 큰 민감성이 달성될 수 있다. GenTHREADER(문헌[Jones, 1999, J. Mol. Biol. 287: 797-815]; 문헌[McGuffin and Jones, 2003, Bioinformatics 19: 874-881])와 같은 프로그램은 질의 서열(query sequence)에 대한 구조적 폴딩을 예측하는 신경망에 대한 입력으로서 다양한 공급원(PSI-BLAST, 2차 구조 예측, 구조정렬 프로파일 및 용매화 포텐셜)으로부터의 정보를 이용한다. 유사하게는 문헌[Gough et al., 2000, J. Mol. Biol. 313: 903-919]의 방법은 알려지지 않은 구조의 서열과 SCOP 데이터베이스에 존재 하는 슈퍼패밀리 모델을 정렬하기 위해 사용될 수 있다. 이들 정렬은 폴리펩티드에 대한 상동성, 유사성, 또는 동일성 모델을 생성하기

위해 차례로 사용될 수 있고, 이러한 모델은 그 목적을 위해 개발된 다양한 툴을 사용하여 정확성에 대해 평가될 수 있다.

[31]

[32] 상기 '다른 아미노산'은 각 위치에 해당되는 아미노산을 제외한 다른 아미노산이면 제한되지 않는다. 구체적으로, 상기 아미노산은 글리신, 알라닌, 아르기닌, 발린, 류신, 메티오닌, 이소류신, 쓰레오닌, 아스파라긴, 글루타민, 프롤린, 세린, 트립토판, 페닐알라닌, 히스티딘, 시스테인, 티로신, 라이신, 아스팔트산, 및 글루탐산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[33] '아미노산'은 결사슬의 성질에 따라 산성, 염기성, 극성(친수성), 비극성(소수성)의 네 가지 종류로 구분된다.

[34] 상기 변이체는 서열번호 1의 아미노산 서열에서 각 위치의 아미노산이 비극성 아미노산인 글리신(G), 알라닌(A), 발린(V), 류신(L), 이소류신(I), 메티오닌(M), 페닐알라닌(F), 트립토판(W), 및 프롤린(P); 극성 아미노산인 세린(S), 쓰레오닌(T), 시스테인(C), 티로신(Y), 아스팔트산(D), 및 글루타민(Q); 산성 아미노산인 아스파라긴(N), 및 글루탐산(E); 염기성 아미노산인 라이신(K), 아르기닌(R), 및 히스티딘(H)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산으로 치환된 단백질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[35] 구체적으로, 401번째 위치에 상응하는 아미노산은 산성아미노산 또는 극성 아미노산으로 치환된 것일 수 있으며, 402번째 위치에 상응하는 아미노산은 염기성 아미노산으로 치환된 것일 수 있으며, 404번째 위치에 상응하는 아미노산은 비극성 아미노산으로 치환된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[36] 보다 구체적으로, 401번째 위치에 상응하는 아미노산은 아스파라긴, 글루탐산 또는 세린으로 치환된 것일 수 있으며, 402번째 위치에 상응하는 아미노산은 히스티딘으로 치환된 것일 수 있으며, 404번째 위치에 상응하는 아미노산은 발린으로 치환된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[37] 본 출원에서 상기 서열번호 1의 아미노산 서열의 401번째, 402번째 또는 404번째 위치에 상응하는 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 변이형 폴리펩티드는 서열번호 2 내지 6 중 어느 하나의 서열일 수 있다.

[38] 구체적으로, 상기 401번째 위치에 상응하는 아미노산이 아스파라긴으로 치환된 변이형 폴리펩티드는 서열번호 2를 포함할 수 있으며, 상기 401번째 위치에 상응하는 아미노산이 글루탐산으로 치환된 변이형 폴리펩티드는 서열번호 3을 포함할 수 있고, 상기 401번째 위치에 상응하는 아미노산이 세린으로 치환된 변이형 폴리펩티드는 서열번호 4를 포함할 수 있다.

[39] 또한, 상기 402번째 위치에 상응하는 아미노산이 히스티딘으로 치환된 변이형 폴리펩티드는 서열번호 5를 포함할 수 있으며, 상기 404번째 위치에 상응하는 아미노산이 발린으로 치환된 변이형 폴리펩티드는 서열번호 6을 포함할 수 있다.

- [40] 상기 변이형 폴리펩티드는 서열번호 1의 아미노산 서열과 80% 이상, 100% 미만의 서열 상동성을 가지는, 글루타민 신테타아제(Glutamine synthetase) 활성을 가지는 변이형 폴리펩티드 일 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 구체적으로 본 출원의 상기 변이형 폴리펩티드는 서열번호 1의 아미노산 서열과 적어도 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 상동성을 가지는 것일 수 있으며 또한, 이러한 상동성을 가지며 상기 단백질에 상응하는 효능을 나타내는 아미노산 서열이라면 401번째, 402번째 또는 404번째 위치의 아미노산 서열 이외에, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 단백질도 본 출원의 범위 내에 포함됨은 자명하다.
- [41]
- [42] 본 출원에서 '특정 서열번호로 기재된 아미노산 서열을 갖는 단백질'이라고 기재되어 있다 하더라도, 해당 서열번호의 아미노산 서열로 이루어진 단백질과 동일 혹은 상응하는 활성을 가지는 경우라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환, 보존적 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 단백질도 본 출원에서 사용될 수 있음은 자명하다. 예를 들어, 상기 단백질과 동일 혹은 상응하는 활성을 가지는 경우라면 상기 아미노산 서열 앞뒤에 단백질의 기능을 변경하지 않는 서열 추가, 자연적으로 발생할 수 있는 돌연변이, 이의 잠재성 돌연변이 (silent mutation) 또는 보존적 치환을 제외하는 것이 아니며, 이러한 서열 추가 혹은 돌연변이를 가지는 경우에도 본원의 범위 내에 속하는 것이 자명하다.
- [43]
- [44] 상기 변이형 폴리펩티드는 특정 위치의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 것 이외의 하나 이상의 아미노산이 보존적 치환(conservative substitution) 및/또는 변형(modification)에 있어서 상기 열거된 서열 (the recited sequence)과 상이하나, 상기 단백질의 기능(functions) 또는 특성(properties)이 유지되는 폴리펩티드를 포함할 수 있다.
- [45] 본 출원에서 용어 "보존적 치환(conservative substitution)"은 한 아미노산을 유사한 구조적 및/또는 화학적 성질을 갖는 또 다른 아미노산으로 치환시키는 것을 의미한다. 이러한 아미노산 치환은 일반적으로 잔기의 극성, 전하, 용해도, 소수성, 친수성 및/또는 양친매성(amphipathic nature)에서의 유사성에 근거하여 발생할 수 있다. 통상적으로, 보존적 치환은 단백질 또는 폴리펩티드의 활성에 거의 영향을 미치지 않거나 또는 영향을 미치지 않을 수 있다.
- [46] 또한, 전술한 특정 위치의 아미노산 이외의 하나 이상의 아미노산이 변이된 변이형은 폴리펩티드의 특성과 2차 구조에 최소한의 영향을 갖는 아미노산들의 결실 또는 부가를 포함할 수 있다. 예를 들면 폴리펩티드는 번역-동시에(co-translationally) 또는 번역-후에(post-translationally) 단백질의 전이(transfer)에 관여하는 단백질 N-말단의 시그널 (또는 리더)서열과 컨주게이트 할 수 있다. 또한 상기 폴리펩티드는 폴리펩티드를 확인, 정제, 또는 합성할 수 있도록 다른 서열 또는 링커와 컨주게이트 될 수 있다.

[47]

[48] 또한 상기 변이형 폴리펩티드는 위에서 설명한 서열번호 1의 변이 및/또는 상기 서열번호 1의 변이와 변이 위치 외 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 가지는 아미노산을 포함할 수 있다. 즉, 서열번호 2 내지 6 중 어느 하나의 서열과 적어도 80% 이상 100% 미만의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 구체적으로 본 출원의 상기 변이형 폴리펩티드는 서열번호 2 내지 6의 어느 하나의 서열과 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 가지는 아미노산을 포함할 수 있다. 상기 서열번호 1의 변이는 전술한 바와 같으며, 이의 상동성 또는 동일성은 전술한 변이 외의 위치에서 상동성 또는 동일성을 가지는 것일 수 있다.

[49]

[50] 본 출원의 목적상 상기 글루타민 신테타아제 활성을 가지는 변이형 폴리펩티드는 활성이 야생형에 비하여 강화된 것일 수 있다. 구체적으로, 서열번호 1의 야생형에 비하여 글루타민 신테타아제 활성이 증가 및 강화된 것일 수 있다.

[51]

본 출원에서 용어, 폴리펩티드 활성의 "강화"는, 폴리펩티드의 활성이 내재적 활성에 비하여 증가되는 것을 의미한다. 상기 강화는 활성화(activation), 상향조절(up-regulation), 과발현(overexpression), 증가(increase) 등의 용어와 혼용될 수 있다. 여기서 활성화, 강화, 상향조절, 과발현, 증가는 본래 가지고 있지 않았던 활성을 나타내게 되는 것, 또는 내재적 활성 또는 변형 전 활성에 비하여 향상된 활성을 나타내게 되는 것을 모두 포함할 수 있다. 상기 "내재적 활성"은 자연적 또는 인위적 요인에 의한 유전적 변이로 형질이 변화하는 경우, 형질 변화 전 모균주 또는 비변형 미생물이 본래 가지고 있던 특정 폴리펩티드의 활성을 의미한다. 이는 "변형 전 활성"과 혼용되어 사용될 수 있다. 폴리펩티드의 활성이 내재적 활성에 비하여 "강화", "상향조절", "과발현" 또는 "증가"한다는 것은, 형질 변화 전 모균주 또는 비변형 미생물이 본래 가지고 있던 특정 폴리펩티드의 활성 및/또는 농도(발현량)에 비하여 향상된 것을 의미한다.

[52]

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

[53]

상기 폴리펩티드의 활성의 강화는 당해 분야에 잘 알려진 다양한 방법의 적용이 가능하며, 목적 폴리펩티드의 활성을 변형 전 미생물보다 강화시킬 수 있는 한, 제한되지 않는다. 구체적으로, 분자생물학의 일상적 방법인 당업계의 통상의 기술자에게 잘 알려진 유전자 공학 및/또는 단백질 공학을 이용한 것일 수 있으나, 이로 제한되지 않는다(예컨대, Sitnicka et al. Functional Analysis of Genes. *Advances in Cell Biology*. 2010, Vol. 2. 1-16, Sambrook et al. *Molecular*

Cloning 2012 등).

- [54] 구체적으로, 본 출원의 폴리펩티드의 강화는
- [55] 1) 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 세포 내 카피수 증가;
- [56] 2) 폴리펩티드를 코딩하는 염색체상의 유전자 발현조절영역을 활성이 강력한 서열로 교체;
- [57] 3) 폴리펩티드를 코딩하는 유전자 전사체의 개시코돈 또는 5'-UTR 지역을 코딩하는 염기서열의 변형;
- [58] 4) 폴리펩티드 활성이 강화되도록 상기 폴리펩티드의 아미노산 서열의 변형;
- [59] 5) 폴리펩티드 활성이 강화되도록 상기 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열의 변형 (예를 들어, 폴리펩티드의 활성이 강화되도록 변형된 폴리펩티드를 코딩하도록 상기 폴리펩티드 유전자의 폴리뉴클레오티드 서열의 변형);
- [60] 6) 폴리펩티드의 활성을 나타내는 외래 폴리펩티드 또는 이를 코딩하는 외래 폴리뉴클레오티드의 도입;
- [61] 7) 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 코돈 최적화;
- [62] 8) 폴리펩티드의 삼차구조를 분석하여 노출 부위를 선택하여 변형하거나 화학적으로 수식; 또는
- [63] 9) 상기 1) 내지 8) 중 선택된 2 이상의 조합일 수 있으나, 이에, 특별히 제한되는 것은 아니다.
- [64] 보다 구체적으로,
- [65] 상기 1) 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 세포 내 카피수 증가는, 해당 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 작동가능하게 연결된, 숙주와 무관하게 복제되고 기능할 수 있는 벡터의 숙주세포 내로의 도입에 의해 달성되는 것일 수 있다. 또는, 해당 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 숙주세포 내의 염색체 내에 1 카피 또는 2 카피 이상 도입에 의해 달성되는 것일 수 있다. 상기 염색체 내에 도입은 숙주세포 내의 염색체 내로 상기 폴리뉴클레오티드를 삽입시킬 수 있는 벡터가 숙주세포 내에 도입됨으로써 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 벡터는 전술한 바와 같다.
- [66] 상기 2) 폴리펩티드를 코딩하는 염색체상의 유전자 발현조절영역(또는 발현조절서열)을 활성이 강력한 서열로 교체는, 예를 들면, 상기 발현조절영역의 활성을 더욱 강화하도록 결실, 삽입, 비보존적 또는 보존적 치환 또는 이들의 조합으로 서열상의 변이 발생, 또는 더욱 강한 활성을 가지는 서열로의 교체일 수 있다. 상기 발현조절영역은, 특별히 이에 제한되지 않으나 프로모터, 오퍼레이터 서열, 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열, 그리고 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열 등을 포함할 수 있다. 일 예로, 본래의 프로모터를 강력한 프로모터로 교체시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [67] 공지된 강력한 프로모터의 예에는 CJ1 내지 CJ7 프로모터(미국등록특허 US 7662943 B2), lac 프로모터, trp 프로모터, trc 프로모터, tac 프로모터, 람다 파아지

PR 프로모터, PL 프로모터, tet 프로모터, gapA 프로모터, SPL7 프로모터, SPL13(sm3) 프로모터(미국등록특허 US 10584338 B2), O2 프로모터(미국등록특허 US 10273491 B2), tkt 프로모터, yccA 프로모터 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [68] 상기 3) 폴리펩티드를 코딩하는 유전자 전사체의 개시코돈 또는 5'-UTR 지역을 코딩하는 염기서열 변형은, 예를 들면, 내재적 개시코돈에 비해 폴리펩티드 발현율이 더 높은 다른 개시코돈을 코딩하는 염기 서열로 치환하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [69] 상기 4) 및 5)의 아미노산 서열 또는 폴리뉴클레오티드 서열의 변형은, 폴리펩티드의 활성을 강화하도록 상기 폴리펩티드의 아미노산 서열 또는 상기 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 결실, 삽입, 비보존적 또는 보존적 치환 또는 이들의 조합으로 서열상의 변이 발생, 또는 더욱 강한 활성을 갖도록 개량된 아미노산 서열 또는 폴리뉴클레오티드 서열 또는 활성이 증가하도록 개량된 아미노산 서열 또는 폴리뉴클레오티드 서열로의 교체일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 교체는 구체적으로 상동제조합에 의하여 폴리뉴클레오티드를 염색체내로 삽입함으로써 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 이때 사용되는 벡터는 염색체 삽입 여부를 확인하기 위한 선별 마커 (selection marker)를 추가로 포함할 수 있다. 상기 선별 마커는 전술한 바와 같다.
- [70] 상기 6) 폴리펩티드의 활성을 나타내는 외래 폴리뉴클레오티드의 도입은, 상기 폴리펩티드와 동일/유사한 활성을 나타내는 폴리펩티드를 코딩하는 외래 폴리뉴클레오티드의 숙주세포 내 도입일 수 있다. 상기 외래 폴리뉴클레오티드는 상기 폴리펩티드와 동일/유사한 활성을 나타내는 한 그 유래나 서열에 제한이 없다. 상기 도입에 이용되는 방법은 공지된 형질전환 방법을 당업자가 적절히 선택하여 수행될 수 있으며, 숙주 세포 내에서 상기 도입된 폴리뉴클레오티드가 발현됨으로써 폴리펩티드가 생성되어 그 활성이 증가될 수 있다.
- [71] 상기 7) 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 코돈 최적화는, 내재 폴리뉴클레오티드가 숙주세포 내에서 전사 또는 번역이 증가하도록 코돈 최적화한 것이거나, 또는 외래 폴리뉴클레오티드가 숙주세포 내에서 최적화된 전사, 번역이 이루어지도록 이의 코돈을 최적화한 것일 수 있다.
- [72] 상기 8) 폴리펩티드의 삼차구조를 분석하여 노출 부위를 선택하여 변형하거나 화학적으로 수식하는 것은, 예를 들어 분석하고자 하는 폴리펩티드의 서열정보를 기지 단백질들의 서열정보가 저장된 데이터베이스와 비교함으로써 서열의 유사성 정도에 따라 주형 단백질 후보를 결정하고 이를 토대로 구조를 확인하여, 변형하거나 화학적으로 수식할 노출 부위를 선택하여 변형 또는 수식하는 것일 수 있다.
- [73] 이와 같은 폴리펩티드 활성의 강화는, 상응하는 폴리펩티드의 활성 또는 농도

발현량이 야생형이나 변형 전 미생물 균주에서 발현된 폴리펩티드의 활성 또는 농도를 기준으로 하여 증가되거나, 해당 폴리펩티드로부터 생산되는 산물의 양의 증가되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[74]

[75] 일 예로, 본 출원의 변이형 폴리펩티드는 야생형에 비하여 글루타민 생산능이 증가된 것을 확인하여 글루타민 신테타아제 활성이 강화됨을 확인할 수 있었다(표 1 내지 3).

[76]

본 출원의 미생물에서 폴리뉴클레오티드의 일부 또는 전체의 변형은 (a) 미생물 내 염색체 삽입용 벡터를 이용한 상동 재조합 또는 유전자가위 (engineered nuclease, e.g., CRISPR-Cas9)을 이용한 유전체 교정 및/또는 (b) 자외선 및 방사선 등과 같은 빛 및/또는 화학물질 처리에 의해 유도될 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 상기 유전자 일부 또는 전체의 변형 방법에는 DNA 재조합 기술에 의한 방법이 포함될 수 있다. 예를 들면, 목적 유전자와 상동성이 있는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열 또는 벡터를 상기 미생물에 주입하여 상동 재조합(homologous recombination)이 일어나게 함으로써 유전자 일부 또는 전체의 결손이 이루어질 수 있다. 상기 주입되는 뉴클레오티드 서열 또는 벡터는 우성 선별 마커를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[77]

[78] 본 출원의 다른 하나의 양태는 상기 변이형 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공할 수 있다.

[79]

상기 서열번호 1의 아미노산 서열, 글루타민 신테타아제 및 글루타민 신테타아제 활성을 가지는 변이형 폴리펩티드에 대해서는 전술한 바와 같다.

[80]

본 출원에서 용어, "폴리뉴클레오티드"는 뉴클레오티드 단위체(monomer)가 공유결합에 의해 길게 사슬모양으로 이어진 뉴클레오티드의 중합체(polymer)로 일정한 길이 이상의 DNA 또는 RNA 가닥으로서, 보다 구체적으로는 상기 변이형 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 단편을 의미한다.

[81]

본 출원의 폴리뉴클레오티드에는, 본 출원의 글루타민 신테타아제 활성을 가지는 변이형 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열이라면 제한없이 포함될 수 있다. 구체적으로 본 출원의 폴리뉴클레오티드에는 서열번호 1의 아미노산 서열의 401번째, 402번째 또는 404번째 위치에 상응하는 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 글루타민 신테타아제(Glutamine synthetase) 활성을 가지는 변이형 폴리펩티드를 코딩하는 서열이라면 제한 없이 포함될 수 있다. 예를 들어 서열번호 2 내지 6의 아미노산 서열중 어느 하나를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 폴리뉴클레오티드는 코돈의 축퇴성(degeneracy)으로 인하여 또는 상기 단백질을 발현시키고자 하는 생물에서 선호되는 코돈을 고려하여, 단백질의 아미노산 서열을 변화시키지 않는 범위 내에서 코딩 영역에 다양한 변형이 이루어질 수

- 있다. 따라서, 코돈 축퇴성 (codon degeneracy)에 의해 상기 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드 또는 상동성 또는 동일성을 가지는 폴리펩티드, 더욱 구체적으로 80%이상, 100% 미만의 상동성 또는 동일성을 가지는 폴리펩티드로 번역될 수 있는 폴리뉴클레오티드 역시 포함될 수 있음은 자명하다.
- [82] 또한 공지의 유전자 서열로부터 조제될 수 있는 프로브, 예를 들면, 상기 염기 서열의 전체 또는 일부에 대한 상보 서열과 엄격한 조건 하에 하이브리드화하여, 상기 글루타민 신테타아제 활성을 가지는 변이형 폴리펩티드를 코딩하는 서열이라면 제한없이 포함될 수 있다.
- [83] 상기 "엄격한 조건(stringent condition)"이란 폴리뉴클레오티드 간의 특이적 혼성화를 가능하게 하는 조건을 의미한다. 이러한 조건은 문헌 (J. Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, 1989; F.M. Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., New York 9.50-9.51, 11.7-11.8 참조)에 구체적으로 기재되어 있다.
- [84] 예를 들어, 상동성 또는 동일성이 높은 폴리뉴클레오티드끼리, 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 하이브리드화하고, 그보다 상동성 또는 동일성이 낮은 폴리뉴클레오티드끼리 하이브리드화하지 않는 조건, 또는 통상의 써던 하이브리드화(southern hybridization)의 세척 조건인 60°C, 1XSSC, 0.1% SDS, 구체적으로 60°C, 0.1XSSC, 0.1% SDS, 보다 구체적으로 68°C, 0.1XSSC, 0.1% SDS에 상당하는 염 농도 및 온도에서, 1회, 구체적으로 2회 내지 3회 세정하는 조건을 열거할 수 있다.
- [85] 혼성화는 비록 혼성화의 엄격도에 따라 염기 간의 미스매치(mismatch)가 가능할지라도, 두 개의 핵산이 상보적 서열을 가질 것을 요구한다. 용어, "상보적"은 서로 혼성화가 가능한 뉴클레오티드 염기 간의 관계를 기술하는데 사용된다. 예를 들면, DNA에 관하여, 아데닌은 티민에 상보적이며 시토신은 구아닌에 상보적이다. 따라서, 본 출원의 폴리뉴클레오티드는 또한 실질적으로 유사한 핵산 서열뿐만 아니라 전체 서열에 상보적인 단리된 핵산 단편을 포함할 수 있다.
- [86] 구체적으로, 본 출원의 폴리뉴클레오티드와 상동성 또는 동일성을 가지는 폴리뉴클레오티드는 55°C의 T_m 값에서 혼성화 단계를 포함하는 혼성화 조건을 사용하고 상술한 조건을 사용하여 탐지할 수 있다. 또한, 상기 T_m 값은 60°C, 63°C 또는 65°C일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니고 그 목적에 따라 당업자에 의해 적절히 조절될 수 있다.
- [87] 상기 폴리뉴클레오티드를 혼성화하는 적절한 엄격도는 폴리뉴클레오티드의 길이 및 상보성 정도에 의존하고 변수는 해당기술분야에 잘 알려져 있다(예컨대, J. Sambrook et al., 상동).
- [88] 본 출원에서 용어, '상동성 (homology)' 또는 '동일성 (identity)'은 두 개의 주어진

아미노산 서열 또는 염기 서열 상호간 유사한 정도를 의미하며 백분율로 표시될 수 있다. 용어 상동성 및 동일성은 종종 상호교환적으로 이용될 수 있다.

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

[92]

[93] 본 출원의 다른 하나의 양태는 본 출원의 글루타민 신데타아제 활성을 갖는 변이형 폴리펩티드; 본 출원의 변이형 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 또는 본 출원의 벡터를 포함하는 미생물을 제공할 수 있다.

[94] 본 출원의 벡터는 상기 폴리뉴클레오티드를 숙주세포에서 발현시키기 위한 발현 벡터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

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

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

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

[98]

[99] 상기 미생물은 L-글루타민 생산능을 가지는 미생물일 수 있다.

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

삽입되거나 내재적 유전자의 활성이 강화되거나 불활성화되는 등의 원인으로 인해서 특정 기작이 약화되거나 강화된 미생물로서, 목적하는 폴리펩티드, 단백질 또는 산물의 생산을 위하여 유전적 변형(modification)을 포함하는 미생물일 수 있다.

[101] 구체적으로, 본 출원의 글루타민 신테타아제 활성을 갖는 변이형 폴리펩티드를 포함하는 미생물은 자연적으로 L-글루타민 생산능을 가지고 있는 미생물 또는 L-글루타민의 생산능이 없는 모균주에 L-글루타민의 생산능이 부여된 미생물을 의미할 수 있다.

[102] 본 출원에서 사용되는 용어, "글루타민 신테타아제 활성을 가지는 변이형 폴리펩티드를 포함하는 미생물"은, 본 출원의 변이형 폴리펩티드가 발현되도록 재조합된 미생물을 의미할 수 있다.

[103] 예를 들어 글루타민 신테타아제 활성을 갖는 변이형 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하거나, 또는 상기 변이형 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 이를 포함하는 벡터로 형질전환되어 상기 변이형 폴리펩티드를 발현할 수 있는 숙주세포 또는 미생물을 의미한다.

[104]

[105] 본 출원에서 용어 "글루타민"은 아미노산의 일종으로, 소화기질환치료, 간기능강화제, 뇌기능강화제, 면역증강제, 위궤양치료제, 알콜중독치료제, 화장품의 보습제, 그리고 운동 영양제, 환자 영양제등 의약품, 화장품, 건강식품 등에 널리 쓰이는 아미노산이다. 상기 글루타민은 ATP 존재 하에 글루타민 신테타아제에 의하여 글루탐산 및 암모니아로부터 전환되어 제조될 수 있다. 즉, 본 출원에서는 상기 글루타민 신테타아제 활성을 갖는 변이형 폴리펩티드를 포함함으로써, 글루타민 신테타아제의 활성이 강화되어 이를 포함하는 미생물의 글루타민 생산능을 증가시킬 수 있다.

[106] 구체적으로, 본 출원에서 상기 글루타민은 L-글루타민일 수 있으며, 본 출원에서 용어 "글루타민"과 "L-글루타민"은 혼용되어 사용될 수 있다.

[107] 본 출원에서 용어 "형질전환"은 표적 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 숙주세포 혹은 미생물 내에 도입하여 숙주세포 내에서 상기 폴리뉴클레오티드가 코딩하는 폴리펩티드가 발현할 수 있도록 하는 것을 의미한다. 형질전환된 폴리뉴클레오티드는 숙주세포 내에서 발현될 수 있지만 한다면, 숙주세포의 염색체 내에 삽입되어 위치하거나 염색체 외에 위치하거나 상관없이 이들 모두를 포함할 수 있다. 또한, 상기 폴리뉴클레오티드는 목적 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 및/또는 RNA를 포함한다. 상기 폴리뉴클레오티드는 숙주세포 내로 도입되어 발현될 수 있는 것이면, 어떠한 형태로도 도입될 수 있다. 예를 들면, 상기 폴리뉴클레오티드는 자체적으로 발현되는데 필요한 모든 요소를 포함하는 유전자 구조체인 발현 카세트(expression cassette)의 형태로 숙주세포에 도입될 수 있다. 상기 발현 카세트는 통상 상기 폴리뉴클레오티드에 작동 가능하게 연결되어 있는

프로모터(promoter), 전사 종결신호, 리보솜 결합부위 및 번역 종결신호를 포함할 수 있다. 상기 발현 카세트는 자체 복제가 가능한 발현 벡터 형태일 수 있다. 또한, 상기 폴리뉴클레오티드는 그 자체의 형태로 숙주세포에 도입되어 숙주세포에서 발현에 필요한 서열과 작동 가능하게 연결되어 있는 것일 수도 있으며, 이에 제한되지 않는다.

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

[109]

[110] 본 출원의 목적상 구체적으로 상기 미생물은 서열번호 1의 아미노산 서열에서 401번째, 402번째 또는 404번째 위치에 상응하는 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 글루타민 신테타아제 활성을 가지는 변이형 폴리펩티드를 발현하는 미생물일 수 있다. 구체적으로 서열번호 1의 N-말단으로부터 401번째 위치에 상응하는 아미노산이 아스파라긴, 글루탐산 또는 세린으로 치환되거나, 402번째 위치에 상응하는 아미노산이 히스티딘으로 치환되거나, 404번째 위치에 상응하는 아미노산이 발린으로 치환되어, 글루타민 신테타아제 활성을 갖는, 변이형 폴리펩티드를 발현하는 미생물일 수 있으며, 더욱 구체적으로 서열번호 1의 N-말단으로부터 401번째 위치의 아미노산이 아스파라긴, 글루탐산 또는 세린으로 치환되거나, 402번째 위치의 아미노산이 히스티딘으로 치환되거나, 404번째 위치의 아미노산이 발린으로 치환되어, 글루타민 신테타아제 활성을 갖는, 변이형 폴리펩티드를 발현하는 미생물일 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 예를 들어 상기 미생물은 상기 401번째, 402번째 또는 405번째 위치에서 변이를 포함하면서 서열번호 1의 서열과 80% 이상, 100% 미만의 동일성 또는 상동성을 가지는 변이형 폴리펩티드를 발현하거나, 서열번호 2 내지 6 중 어느 하나의 서열의 변이형 폴리펩티드를 발현하는 미생물일 수 있다. 상기 미생물은 상기 변이 위치에 아미노산이 치환된 글루타민 신테타아제 활성을 갖는 변이형 폴리펩티드를 포함함으로써, 글루타민 신테타아제의 활성이 강화되어 생장에 방해 없이 글루타민의 생산량을 증가시키는 것일 수 있다.

[111]

[112] 본 출원에서 상기 변이형 폴리펩티드를 포함하는 미생물은 그 종류가 특별히 제한되지 않으나, 엔테로박터(*Enterbacter*) 속, 에스케리키아(*Escherichia*) 속, 어위니아(*Erwinia*) 속, 세라티아(*Serratia*) 속, 슈도모나스(*Pseudomonas*) 속, 프로비덴시아(*Providencia*) 속, 코리네박테리움(*Corynebacterium*) 속 및 브레비박테리움(*Brevibacterium*) 속에 속하는 미생물 일 수 있다. 보다 구체적으로는 코리네박테리움(*Corynebacterium*) 속에 속하는 미생물일 수 있다.

[113] 본 출원에서 "코리네박테리움 속 (*The genus of Corynebacterium*) 미생물"은 구체적으로는 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*),

코리네박테리움 암모니아게네스(*Corynebacterium ammoniagenes*), 브레비박테리움 락토퍼멘텀 (*Brevibacterium lactofermentum*), 브레비박테리움 플라범 (*Brevibacterium flavum*), 코리네박테리움 써모아미노게네스 (*Corynebacterium thermoaminogenes*), 코리네박테리움 에피션스 (*Corynebacterium efficiens*) 등이나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다. 일 구체예로는, 본 출원에서 코리네박테리움 속 미생물은 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)일 수 있다.

[114] 본 출원의 미생물은 상기 폴리뉴클레오티드 또는 벡터 도입 이외에도 다양한 공지의 방법에 의해 본 출원의 글루타민 신테타아제 활성을 갖는 변이형 폴리펩티드를 발현할 수 있는 미생물을 모두 포함할 수 있다.

[115]

[116] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 서열번호 1의 아미노산 서열의 401번째, 402번째 또는 404번째 위치에 상응하는 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 글루타민 신테타아제 활성을 가지는 변이형 폴리펩티드 또는 상기 변이형 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 미생물(또는 본 출원의 미생물)을 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, L-글루타민을 생산하는 방법을 제공한다.

[117] 또한, 본 출원의 일 구체예로, 상기 미생물은 코리네박테리움 속 미생물 일 수 있으며, 상기 코리네박테리움 속 미생물은 코리네박테리움 글루타미쿰일 수 있다.

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

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

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

[121] 본 출원에서 상기 탄소원으로는 글루코오스, 사카로오스, 락토오스, 프룩토오스, 수크로오스, 말토오스 등과 같은 탄수화물; 만니톨, 소르비톨 등과

같은 당 알코올, 피루브산, 락트산, 시트르산 등과 같은 유기산; 글루탐산, 메티오닌, 리신 등과 같은 아미노산 등이 포함될 수 있다. 또한, 전분 가수분해물, 당밀, 블랙스트랩 당밀, 쌀겨울, 카사버, 사탕수수 찌꺼기 및 옥수수 침지액 같은 천연의 유기 영양원을 사용할 수 있으며, 구체적으로는 글루코오스 및 살균된 전처리 당밀(즉, 환원당으로 전환된 당밀) 등과 같은 탄수화물이 사용될 수 있으며, 그 외의 적정량의 탄소원을 제한 없이 다양하게 이용할 수 있다. 이들 탄소원은 단독으로 사용되거나 2 종 이상이 조합되어 사용될 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.

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

- 또는 본 출원의 미생물로부터 L-글루타민을 회수하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 회수하는 단계는 상기 배양하는 단계 이후에 추가로 포함될 수 있다.
- [130] 상기 회수는 본 출원의 미생물의 배양 방법, 예를 들어 회분식, 연속식 또는 유가식 배양 방법 등에 따라 당해 기술 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 목적하는 L-글루타민을 수집(collect)하는 것일 수 있다. 예를 들어, 원심분리, 여과, 결정화 단백질 침전제에 의한 처리(염석법), 추출, 초음파 파쇄, 한외여과, 투석법, 분자체 크로마토그래피(겔여과), 흡착크로마토그래피, 이온교환 크로마토그래피, 친화도 크로마토그래피 등의 각종 크로마토그래피, HPLC 또는 이들의 방법을 조합하여 사용될 수 있으며, 당해 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 배지 또는 미생물로부터 목적하는 L-글루타민을 회수할 수 있다.
- [131] 또한, 본 출원의 L-글루타민 생산방법은, 추가적으로 정제 단계를 포함할 수 있다. 상기 정제는 당해 기술분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여, 수행할 수 있다. 일 예에서, 본 출원의 L-글루타민 생산방법이 회수 단계와 정제 단계를 모두 포함하는 경우, 상기 회수 단계와 정제 단계는 순서에 상관없이 연속적 또는 비연속적으로 수행되거나, 동시에 또는 하나의 단계로 통합되어 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [132] 본 출원의 방법에서, 변이체, 폴리뉴클레오티드, 벡터, 미생물, L-글루타민 등은 상기 다른 양태에서 기재한 바와 같다.
- [133]
- [134] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 서열번호 1의 아미노산 서열에서 401번째 위치에 상응하는 아미노산, 402번째 위치에 상응하는 아미노산 또는 404번째 위치에 상응하는 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 글루타민 신테타아제 활성을 갖는 변이형 폴리펩티드가 발현되도록 미생물을 변형하는 것을 포함하는, L-글루타민 생산능을 증가시키는 방법을 제공한다.
- [135] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 상기 변이형 폴리펩티드; 상기 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터; 또는 이 중 어느 하나 이상을 발현하는 미생물의 L-글루타민 생산능 증가 용도를 제공한다.
- [136] 상기 변이형 폴리펩티드, 다른 아미노산, 폴리뉴클레오티드, 벡터, 미생물, L-글루타민 등에 관해서는 전술한 바와 같다.
- [137]
- [138] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 상기 글루타민 신테타아제 활성을 갖는 변이형 폴리펩티드; 상기 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터; 또는 이 중 어느 하나 이상을 발현하는, 미생물 또는 이의 배양액을 포함하는, L-글루타민 생산용 조성물을 제공한다.
- [139] 상기 변이형 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드, 벡터, 미생물, L-글루타민 등에 관해서는 전술한 바와 같다.
- [140] 상기 L-글루타민 생산용 조성물은 본 출원의 글루타민 신테타아제 활성을 갖는

변이형 폴리펩티드에 의해 L-글루타민을 생산할 수 있는 조성물을 의미할 수 있다. 상기 조성물은 상기 글루타민 신데타아제 활성을 갖는 변이형 폴리펩티드 또는 상기 글루타민 신데타아제 활성을 갖는 변이형 폴리펩티드를 작동시킬 수 있는 구성을 제한없이 포함할 수 있다. 상기 글루타민 신데타아제 활성을 갖는 변이형 폴리펩티드는 도입된 숙주 세포에서 작동가능하게 연결된 유전자를 발현시킬 수 있도록 벡터 내에 포함된 형태일 수 있다.

[141] 상기 조성물은 동결보호제 또는 부형제를 추가로 포함할 수 있다. 상기

[142] 동결보호제 또는 부형제는 비자연적으로 발생한(non-naturally occurring) 물질 또는 자연적으로 발생한 물질일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[143] 또 하나의 구체 예로, 상기 동결보호제 또는 부형제는 상기 미생물이 자연적으로 접촉하지 않는 물질, 또는 상기 미생물과 자연적으로 동시에 포함되지 않는 물질일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[144]

발명의 실시를 위한 형태

[145] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되는 것은 아니다.

[146]

[147] 실시예 1. *glnA* 유전자 ORF 내 변이 도입용 벡터 라이브러리 제작

[148]

[149] 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*)의 글루타민 신데타아제를 코딩하는 *glnA* 유전자의 발현량 또는 이의 활성이 강화된 변이체를 발굴하기 위한 목적으로 아래의 방법으로 라이브러리를 제작하였다.

[150] 먼저 *glnA* (1,434 bp) 유전자를 포함하는 DNA 단편 (1,434 bp)의 kb 당 0-4.5개의 변이를 도입하기 위한 목적으로 GenemorphII Random Mutagenesis Kit (Stratagene)을 사용하였다. 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032 (WT)의 염색체를 주형으로 하고 서열번호 7 및 8로 이루어진 프라이머 세트를 이용하여 Error-prone PCR을 수행하였다. 구체적으로, WT 균주의 염색체 (500 ng), 프라이머 7 및 8 (각각 125 ng), Mutazyme II reaction buffer (1 μ l), dNTP mix (40 mM), Mutazyme II DNA polymerase (2.5U)을 포함하는 반응액은 94°C에서 2분간 변성 후, 94°C에서 1분 변성, 56°C에서 1분 어닐링, 72°C에서 2분 중합을 25회 반복한 후, 72°C에서 10분간 중합반응을 수행하였다.

[151] 증폭된 유전자 단편은 TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen)을 이용하여 pCRII 벡터에 연결하였고, 대장균 DH5 α 에 형질전환하여 카나마이신 (25 mg/l)이 포함된 LB 고체배지에 도말하였다. 형질전환된 콜로니 20종을 선별한 후 플라스미드를 획득하였고, 염기서열을 분석한 결과 0.5 mutations/kb 빈도로 서로 다른 위치에 변이가 도입된 것을 확인하였다. 최종적으로 약 10,000 개의

형질전환 된 대장균 콜로니를 취하여 플라스미드를 추출하였고, 이를 pTOPO-glnA(mt) 라이브러리로 명명하였다.

[152]

[153] 실시예 2: glnA 결손주 제작 및 glnA 변이주 스크리닝

[154]

[155] 야생형 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032에서 glnA 유전자가 결손된 균주를 제작하기 위하여 아래와 같이 glnA 유전자가 결손된 벡터 pDZ- Δ glnA를 제조하였다. 구체적으로, glnA 유전자의 5' 및 3' 말단에 위치한 DNA 단편들이 (각 1000bp) pDZ 벡터(대한민국특허 제2009-0094433호)에 연결된 형태로 제작되었다.

[156] 서열번호 29의 glnA 유전자의 염기서열에 근거하여 5' 단편 및 3' 단편에 제한효소 SalI 인식 부위를 삽입한 프라이머 서열번호 10 및 11 와 이들로부터 각각 1000 bp 떨어진 위치에서 프라이머 서열번호 9 및 12 를 합성하였다.

[157] 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032의 염색체를 주형으로 5' 말단 유전자 단편은 서열번호 9 및 10으로 이루어진 프라이머 세트를 이용하여 PCR을 통해 제작하였다. 동일한 방법으로 glnA 유전자의 3' 말단에 위치한 유전자 단편은 서열번호 11 및 12를 이용하여 PCR을 통해 제작하였다. PCR 조건은 94°C에서 2분간 변성 후, 94°C에서 1분 변성, 56°C에서 1분 어닐링, 72°C에서 40초 중합을 30회 반복한 후, 72°C에서 10분간 중합반응을 수행하였다.

[158] 한편 제한효소 SalI으로 처리한 후, 65°C에서 20분간 열처리한 pDZ 벡터와 상기 PCR을 통하여 증폭한 삽입 DNA 단편을 Infusion Cloning Kit를 사용하여 연결한 후 대장균 DH5 α 에 형질전환하고 카나마이신(25 mg/l)이 포함된 LB 고체배지에 도말하였다. 서열번호 13 및 14로 이루어진 프라이머 세트를 이용한 PCR을 통해 목적인 유전자가 삽입된 벡터로 형질전환된 콜로니를 선별한 후 통상적으로 알려진 플라스미드 추출법을 이용하여 플라스미드를 획득하였고 이 플라스미드를 pDZ- Δ glnA라 명명하였다.

[159] 상기 제작된 벡터 pDZ- Δ glnA를 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032에 전기펄스법(Van der Rest et al., Appl. Microbial. Biotechnol. 52:541-545, 1999)으로 형질전환하여 상동염색체 재조합에 의해 glnA 유전자가 결손된 균주를 제작하였다. 이와 같이 glnA 유전자가 결손된 균주를 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032:: Δ glnA라고 명명하였다.

[160] 또한, ATCC13032:: Δ glnA 균주를 대상으로 pTOPO-glnA(mt) 라이브러리를 전기펄스법으로 형질전환하고 카나마이신(25mg/l)이 포함된 복합평판배지에 도말하여 약 100개의 콜로니를 확보하였다. 확보한 100주의 균주에 대하여 L-글루타민 생산능 테스트를 진행하였다. 글루타민 생산 배지 25 ml를 함유하는 250 ml 코너-바플 플라스크에 획득한 100주의 균주를 각각 접종한 후, 32°C에서 48 시간 동안 200 rpm으로 진탕 배양하였다. 하기의 L-글루타민 생산 배지 24 ml를 함유하는 250 ml 코너-바플 플라스크에 1 ml의 종 배양액을 접종하고

30°C에서 48 시간 동안 200 rpm으로 진탕 배양하였다.

- [161] 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032 및 ATCC13032:: Δ glnA 균주를 대조구로 이용하였다. 배양 종료 후, 세포를 제거한 배지를 상등액 중에 존재하는 L-글루타민을 YSI 7100 Multiparameter Bioanalytical System (YSI Inc.)를 사용하여 측정하였다. ATCC13032:: Δ glnA 균주 대비 L-글루타민이 생산능을 가질 뿐만 아니라, ATCC13032 보다 L-글루타민 농도가 높게 나오는 균주를 선별하고, 배양액 내 글루타민 농도를 표 1에 나타내었다. 선별된 종의 균주는 ATCC13032::glnA(mt)-1 내지 3로 명명하였다. 그 외 97종의 콜로니들은 대조구로 이용된 ATCC13032 보다 L-글루타민 농도가 낮았다.

- [162] [표1]

ATCC13032 유래 ATCC13032::glnA(mt)의 L-글루타민 생산능 분석

	균주	L-글루타민 (g/L)
대조군	ATCC13032	0.89
	ATCC13032:: Δ glnA	0.77
실험군	ATCC13032::glnA(mt)-1	1.25
	ATCC13032::glnA(mt)-2	0.99
	ATCC13032::glnA(mt)-3	1.05

- [163]

- [164] 상기 표 1에서 볼 수 있듯이, ATCC13032::glnA(mt)-1의 경우 대조군보다 약40% 생산능 증가를 확인할 수 있었으며, ATCC13032::glnA(mt)-2의 경우 약 11%, ATCC13032::glnA(mt)-3의 경우 약 18% 생산능 증가를 확인할 수 있었다.

- [165]

- [166] 실시예 3: glnA 변이주 3종 염기서열 확인

- [167]

- [168] 3종의 선별 균주 ATCC13032::glnA(mt)-1 내지 3의 glnA 유전자 염기서열을 확인하기 위하여 실시예 1의 서열번호 7 및 8의 프라이머 세트를 이용하여 염색체 내 glnA 유전자를 포함한 DNA 단편을 PCR 증폭하였다. PCR 조건은 94°C에서 2분간 변성 후, 94°C에서 1분 변성, 56°C에서 1분 어닐링, 72°C에서 40초 중합을 30회 반복한 후, 72°C에서 10분간 중합반응을 수행하였다.

- [169] 증폭된 유전자의 염기서열을 분석한 결과 3종의 균주 중 차례로 ATCC13032::glnA(mt)-1은 서열번호 5의 1201~1203번째 염기서열이 기존

GAC에서 AAC로 바뀐, N 말단에서부터 401번째 아미노산인 아스파르트산이 아스파라긴으로 치환된 형태의 변이체, ATCC13032::glnA(mt)-2는 서열번호 5의 1204~1206번째 염기서열이 기존 AAG에서 CAC로 바뀐, N 말단에서부터 402번째 아미노산인 라이신이 히스티딘으로 치환된 변이체, 그리고 ATCC13032::glnA(mt)-3은 서열번호 5의 1210~1212번째 염기서열이 기존 CTC에서 GTC로 바뀐, N 말단에서부터 404번째 아미노산인 류신이 발린으로 치환된 변이체가 발현되는 균주임을 확인하였다. 상기 3종의 균주들 중 L-글루타민 생산량이 ATCC13032 대비 증가하면서 성장속도는 유사한 ATCC13032::glnA(mt)-1 균주를 가장 우수한 글루타민 신테타아제 활성 강화 균주로 선별하였다.

[170]

[171] 실시예 4: glnA 유전자의 401번째 아미노산인 아스파르트산이 다른 아미노산으로 치환된 다양한 균주 제작

[172]

[173] 실시예 3으로부터 401번째 아미노산이 효소 활성화에 중요한 위치임을 확인한 바, 서열번호 1로 기재되는 단백질 서열의 401번째 아미노산의 위치에, 야생형이 가지는 아스파르트산을 제외한 타 아미노산으로의 치환을 시도하였다.

[174] 실시예 3에서 확인한 변이인 D401N을 포함한 4종의 이중성 염기 치환변이들을 도입하기 위하여 각각의 제조합 벡터를 아래와 같은 방법으로 제작하였다.

[175] 먼저, WT 균주로부터 추출한 게놈 DNA를 주형으로 glnA 유전자의 1201~1203번째 위치에서 앞뒤로 각각 약 600bp 떨어진 위치에 5' 단편 및 3' 단편에 제한효소 SalI 인식 부위를 삽입한 프라이머 서열번호 15 및 16을 합성하였다. 4종의 이중성 염기 치환변이들을 도입하기 위하여 glnA 유전자의 1201~1203번째 염기서열을 치환하기 위한 서열번호 17 내지 26의 프라이머를 합성하였다.

[176] 추가적으로 기존에 알려진 glnA의 아데닐화 해제 변이인 Y405F에 대하여 글루타민 생산능을 비교하기 위하여 서열번호 27 및 28의 프라이머를 합성하였다.

[177] 구체적으로, pDZ-glnA(D401N) 플라스미드는 glnA 유전자의 5' 및 3' 말단에 위치한 DNA 단편들이 (각 600bp) pDZ 벡터(대한민국특허 제2009-0094433호)에 연결된 형태로 제작되었다. WT균주의 염색체를 주형으로 5' 말단 유전자 단편은 서열번호 15 및 18로 이루어진 프라이머 세트를 이용하여 PCR을 통해 제작하였다. PCR 조건은 94°C에서 2분간 변성 후, 94°C에서 1분 변성, 56°C에서 1분 어닐링, 72°C에서 40초 중합을 30회 반복한 후, 72°C에서 10분간 중합반응을 수행하였다. 동일한 방법으로 glnA 유전자의 3' 말단에 위치한 유전자 단편은 서열번호 17 및 16로 이루어진 프라이머 세트를 이용하여 PCR을 통해 제작하였다. 증폭된 DNA 단편을 Quiagen사의 PCR Purification kit를 사용하여 정제한 후, 벡터 제작을 위한 삽입 DNA 단편으로 사용하였다.

- [178] 한편 제한효소 SalI으로 처리한 후 65°C에서 20분간 열처리한 pDZ 벡터와 상기 PCR을 통하여 증폭한 삽입 DNA 단편을 Infusion Cloning Kit를 사용하여 연결한 후 대장균 DH5 α 에 형질전환하였다. 상기 균주를 카나마이신 (25 mg/l)이 포함된 LB 고체배지에 도말하였다. 서열번호 13 및 14로 이루어진 프라이머 세트를 이용한 PCR을 통해 목적인 유전자가 삽입된 벡터로 형질전환된 콜로니를 선별한 후 통상적으로 알려진 플라스미드 추출법을 이용하여 플라스미드를 획득하였다. 상기 플라스미드는 pDZ-glnA(D401N)으로 명명하였다.
- [179] 동일한 방법으로 서열번호 15 및 20로 이루어진 프라이머 세트 및 서열번호 19 및 16로 이루어진 프라이머 세트를 이용하여 pDZ-glnA(D401E)를 제작하였으며, 또한, 서열번호 15 및 24로 이루어진 프라이머 세트 및 서열번호 23 및 16로 이루어진 프라이머 세트를 이용하여 pDZ-glnA(D401S)를 제작하였다. 뿐만 아니라, 서열번호 15 및 28로 이루어진 프라이머 세트 및 서열번호 27 및 16로 이루어진 프라이머 세트를 이용하여 pDZ-glnA(Y405F)를 제작하였다.
- [180] glnA 변이 도입에 따른 글루타민 농도 및 성장속도를 보다 명확히 하기 위하여 각각 제작된 벡터를 글루타민을 생산하는 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032 에 전기펄스법으로 형질전환하여 상동염색체 재조합에 의해 glnA 유전자에 이중성 염기치환변이들이 도입된 균주 4종, ATCC13032::glnA (D401N), ATCC13032::glnA (D401E), ATCC13032::glnA (D401S), ATCC13032::glnA (Y405F)를 제작하였다. 이 중 ATCC13032::glnA (D401N)는 CA11-4021로 명명한 후 부다페스트 조약 하의 국제기탁기관인 한국미생물보존센터(Korean CultureCenter of Microorganisms, KCCM)에 2019년 12월 19일자로 기탁하여 기탁번호 KCCM12645P를 부여 받았다.
- [181]
- [182] **실시예 5: glnA 변이주에 대한 글루타민 생산능 분석**
- [183]
- [184] ATCC13032 균주를 대조군으로 사용하여 상기 실시예 4에서 제작된 균주 4종을 아래와 같은 방법으로 배양하여 당소모 속도, 글루타민 생산능을 측정하였다.
- [185] 먼저, 종 배지 25 ml을 함유하는 250 ml 코너-바플 플라스크에 각 균주들을 접종하고, 30°C에서 20시간 동안, 200 rpm으로 진탕 배양하였다. 그런 다음, 생산 배지 24 ml을 함유하는 250 ml 코너-바플 플라스크에 1 ml의 종 배양액을 접종하고 32°C에서 48 시간 동안, 200 rpm에서 진탕 배양하였다. 상기 종 배지와 생산 배지의 조성은 각각 하기와 같다. 배양 종료 후 HPLC (Waters 2478)를 이용하여 L-글루타민의 농도를 측정하였다. 글루타민 생산능, 및 당 소모속도 측정 결과는 하기 표 2와 같다.
- [186]
- [187] 종 배지 (pH 7.0)
- [188] 포도당 20 g, 펩톤 10 g, 효모추출물 5 g, 요소 1.5 g, KH₂PO₄ 4 g, K₂HPO₄ 8g,

MgSO₄·7H₂O 0.5 g, 바이오틴 100 μg, 티아민 HCl 1000 μg, 칼슘-판토텐산 2000 μg, 니코틴아미드 2000 μg (증류수 1 리터 기준)

[189] 글루타민 생산 배지 (pH 8.0)

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

[191]

[192] [표2]

ATCC13032 유래 ATCC13032::glnA(mt)의 L-글루타민 생산능 및 당소모 속도 분석

	균주	L-글루타민 (g/L)	당 소모속도 (g/hr)
대조군	ATCC13032::ΔglnA	0.77	4.69
	ATCC13032	0.89	4.72
	ATCC13032::glnA (D401N)	1.25	4.76
	ATCC13032::glnA (D401E)	1.19	5.16
	ATCC13032::glnA (D401S)	0.88	6.50
아데닐화 해제변이	ATCC13032::glnA (Y405F)	1.20	4.45

[193]

[194] 서열번호 1의 401번째 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 변이형 폴리펩티드를 포함하는 균주의 경우, 치환된 아미노산이 아스파라긴(ATCC13032::glnA (D401N)), 글루탐산(ATCC13032::glnA (D401E))인 경우 글루타민의 생산능이 각각 약 40%, 33% 향상되는 것을 확인할 수 있었다. 이는 glnA의 아데닐화 해제 변이가 도입된 균주 ATCC13032::glnA (Y405F)와 비교했을 때 보다도 글루타민의 생산능이 향상되는 결과이었다.

[195]

[196] 실시예 6: 글루타민 생산 균주 기반 glnA 변이주 제작

[197]

[198] 종래의 글루타민 생산 균주인 코리네박테리움 글루타미쿰 KFCC-10680 (대한민국 등록특허 제10-0048440호) 균주를 대상으로 상기 실시예4와 동일한 방법으로 pDZ-glnA(D401N), pDZ-glnA(D401E), pDZ-glnA(Y405F)를 각각 전기펄스법으로 형질전환하였다. glnA 유전자에 이중성 염기치환변이들이

도입된 균주 3종은 KFCC-10680::glnA (D401N), KFCC-10680::glnA (D401E), KFCC-10680::glnA (Y405F)로 각각 명명하였다.

[199]

[200] 실시예 7: 글루타민 생산 균주 기반 glnA 변이주에 대한 글루타민 생산능 분석

[201] KFCC-10680 균주를 대조군으로 사용하여 선별균주 3종을 아래와 같은 방법으로 배양하여 당소모 속도, 글루타민 생산능을 측정하였다.

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

[203]

[204] 종 배지 (pH 7.0)

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

[206]

[207] 글루타민 생산 배지 (pH 8.0)

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

[209]

[210] [표3]

KFCC-10680 유래 KFCC-10680::glnA(mt)의 L-글루타민 생산능 및 당소모 속도 분석

	균주	L-글루타민(g/L)	당 소모속도(g/hr)
대조군	KFCC-10680	13.8	2.36
	KFCC-10680::glnA (D401N)	16.7	2.38
	KFCC-10680::glnA (D401E)	15.1	2.58
아데닐화 해제변이	KFCC-10680::glnA (Y405F)	14.1	2.21

[211]

[212] 서열번호 1의 401번째 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 변이형 폴리펩티드를 포함하는 균주의 경우, 치환된 아미노산이 아스파라긴(KFCC-10680::glnA (D401N)), 글루탐산(KFCC-10680::glnA (D401E))인 경우 글루타민의 생산능이 각각 약 21%, 9% 향상되는 것을 확인할 수 있었다.

[213] 이는 glnA의 아데닐화 해제 변이가 도입된 균주 KFCC-10680::glnA (Y405F)와 비교했을 때 보다도 글루타민의 생산능이 향상되는 결과를 보임을 확인할 수 있었다.

[214]

[215] 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 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 출원의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

[216]

[217] 기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

[218] 수탁번호 : KCCM12645P

[219] 수탁일자 : 20191219

[220]

[221]

특허출원을 위한 부다페스트 국제 조약 하의 미생물 수탁 증명

국제양식

수신: 씨제이제일제당 주식회사,
대한민국 서울시 중구
동호로 330 CJ 제일제당센터
(우) 100-400

국제기탁기관에 의해 규칙 7.1에
따라 발행된 원기탁에 대한 수탁증

I. 미생물의 표시	
기탁자가 첨부한 미생물 식별에 대한 표시: <i>Corynebacterium glutamicum</i> CAll-1001	국제 기탁기관이 부여한 수탁번호: KCCM12846F
II. 과학적 성질의 설명 및/또는 분류학상의 위치	
항목 I에 표시된 미생물에 대하여 다음 사항이 포함되어 있다: <input type="checkbox"/> 과학적 성질의 설명 <input type="checkbox"/> 제안된 분류학상의 위치 (표용시 : 표시)	
III. 기탁 및 수탁	
본 국제기탁기관은 2019년 12월 19일에 기탁된 항목 I에 표시된 미생물을 수탁하였다.	
IV. 전환 요청의 수령	
상기 항목 I에 표시된 미생물은 에 본 국제기탁기관에 수탁되었고, 원기탁을 부다페스트 조약 하의 기탁으로 전환하기 위한 요청을 에 받았다.	
V. 국제기탁기관	
명칭: 한국미생물보존센터 주소: 대한민국 서울시 서대문구 홍제동 2가길 48 유림빌딩 (우) 03631	국제기탁기관을 대표하는 직함을 가진 자 또는 직함을 부여받은 공무원 서명: 서명일: 2019. 12. 19.

상기 번역은 원문의 내용과 상위 없음을 증명함.

2020년 3월 4일

변리사 손민



청구범위

- [청구항 1] 서열번호 1의 아미노산 서열의 401번째, 402번째 또는 404번째 위치에 상응하는 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 글루타민 신테타아제(Glutamine synthetase) 활성을 가지는 변이형 폴리펩티드.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 401번째 위치에 상응하는 아미노산이 아스파라긴(Asparagine), 글루탐산(Glutamic acid) 또는 세린(Serine)으로 치환된, 변이형 폴리펩티드.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 402번째 위치에 상응하는 아미노산이 히스티딘(Histidine)으로 치환된, 변이형 폴리펩티드.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 404번째 위치에 상응하는 아미노산이 발린(Valine)으로 치환된, 변이형 폴리펩티드.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 변이형 폴리펩티드는 서열번호 1의 아미노산 서열과 80% 이상, 100% 미만의 서열 상동성을 가지는, 글루타민 신테타아제(Glutamine synthetase) 활성을 가지는 변이형 폴리펩티드.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 변이형 폴리펩티드는 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5 또는 서열번호 6으로 기재되는 아미노산 서열로 이루어진 것인, 변이형 폴리펩티드.
- [청구항 7] 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 변이형 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 8] 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 변이형 폴리펩티드 또는 상기 변이형 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 미생물.
- [청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 미생물은 L-글루타민 생산능을 가지는, 미생물.
- [청구항 10] 제8항에 있어서, 상기 미생물은 코리네박테리움 속 미생물.
- [청구항 11] 제10항에 있어서, 상기 코리네박테리움 속 미생물은, 코리네박테리움 글루타미쿰인, 미생물.
- [청구항 12] 서열번호 1의 아미노산 서열의 401번째, 402번째 또는 404번째 위치에 상응하는 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 글루타민 신테타아제(Glutamine synthetase) 활성을 가지는 변이형 폴리펩티드 또는 상기 변이형 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 미생물을 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, L-글루타민을 생산하는 방법.
- [청구항 13] 제12항에 있어서, L-글루타민을 상기의 배양된 배지 또는 미생물로부터 회수 또는 분리하는 단계를 추가로 포함하는, L-글루타민을 생산하는 방법.
- [청구항 14] 제12항에 있어서, 상기 미생물은 코리네박테리움 속 미생물인, L-글루타민을 생산하는 방법.
- [청구항 15] 제14항에 있어서, 상기 코리네박테리움 속 미생물은 코리네박테리움

글루타미콰인, L-글루타민을 생산하는 방법.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/002652

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N 9/00(2006.01)i; C12N 15/77(2006.01)i; C12P 13/14(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N 9/00(2006.01); C12N 1/21(2006.01); C12N 15/09(2006.01); C12N 15/52(2006.01); C12N 15/77(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: 글루타민 신테아제(Glutamine synthetase), 코리네박테리움 글루타미쿰 (Corynebacterium glutamicum), L-글루타민(L-glutamine), 변이체(mutation)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 100392075 C (TSINGHUA UNIVERSITY) 04 June 2008 (2008-06-04) See abstract; and claims 1-9.	1-15
A	NCBI, GenBank Accession No. AAD01244.2. glutamine synthetase [Corynebacterium glutamicum]. 14 June 1999. See entire document.	1-15
A	KR 10-2013-0105380 A (HANWHA CHEMICAL CORPORATION) 25 September 2013 (2013-09-25) See abstract; and claims 1-15.	1-15
A	JP 2003-164297 A (AJINOMOTO CO., INC.) 10 June 2003 (2003-06-10) See abstract; and claims 1-13.	1-15
A	JP 2002-300887 A (AJINOMOTO CO., INC.) 15 October 2002 (2002-10-15) See abstract; and claims 1-11.	1-15
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“D” document cited by the applicant in the international application</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“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)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 24 June 2021		Date of mailing of the international search report 24 June 2021
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/002652

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	KR 10-2198072 B1 (CJ CHEILJEDANG CORPORATION) 04 January 2021 (2021-01-04) See abstract; and claims 1-15. * Published patent of a priority application of the present PCT application.	1-15

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2021/002652

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	100392075	C	04 June 2008	CN	100884501	A	27 December 2006
KR	10-2013-0105380	A	25 September 2013	BR	112014022409	A2	25 September 2018
				EP	2825641	A1	21 January 2015
				JP	2015-513406	A	14 May 2015
				US	2015-0044753	A1	12 February 2015
				US	2017-0211057	A1	27 July 2017
				US	9567577	B2	14 February 2017
				WO	2013-137583	A1	19 September 2013
JP	2003-164297	A	10 June 2003	BR	0204882	A	15 June 2004
				CN	1250716	C	12 April 2006
				CN	1421527	A	04 June 2003
				RU	2230114	C2	10 June 2004
				US	2003-0148474	A1	07 August 2003
				US	2005-0255567	A1	17 November 2005
JP	2002-300887	A	15 October 2002	BR	0200320	A	29 October 2002
				BR	PI0200320	B1	26 July 2016
				CN	100384190	A	11 December 2002
				CN	100457894	C	04 February 2009
				DE	60208450	T2	24 August 2006
				EP	1229121	A2	07 August 2002
				EP	1229121	A3	12 March 2003
				EP	1229121	B1	04 January 2006
				EP	1424398	A2	02 June 2004
				EP	1424398	A3	22 September 2004
				JP	4560998	B2	13 October 2010
				US	2003-0003550	A1	02 January 2003
				US	2007-0092953	A1	26 April 2007
				US	7262035	B2	28 August 2007
KR	10-2198072	B1	04 January 2021	None			

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 9/00(2006.01)i; C12N 15/77(2006.01)i; C12P 13/14(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 9/00(2006.01); C12N 1/21(2006.01); C12N 15/09(2006.01); C12N 15/52(2006.01); C12N 15/77(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: 글루타민 신테타아제(Glutamine synthetase), 코리네박테리움 글루타미쿰 (Corynebacterium glutamicum), L-글루타민(L-glutamine), 변이체(mutation)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	CN 100392075 C (TSINGHUA UNIVERSITY) 2008.06.04 요약; 청구항 1-9	1-15
A	NCBI, GenBank Accession No. AAD01244.2, `glutamine synthetase [Corynebacterium glutamicum]', 1999.06.14 전체 문헌	1-15
A	KR 10-2013-0105380 A (한화케미칼 주식회사) 2013.09.25 요약; 청구항 1-15	1-15
A	JP 2003-164297 A (AJINOMOTO CO., INC.) 2003.06.10 요약; 청구항 1-13	1-15
A	JP 2002-300887 A (AJINOMOTO CO., INC.) 2002.10.15 요약; 청구항 1-11	1-15
<input checked="" 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		
국제조사의 실제 완료일 2021년06월24일(24.06.2021)		국제조사보고서 발송일 2021년06월24일(24.06.2021)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 정다원 전화번호 +82-42-481-5373

C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
PX	KR 10-2198072 B1 (씨제이제일제당 주식회사) 2021.01.04 요약: 청구항 1-15 * 본 PCT 출원의 우선권 출원의 등록 공보임.	1-15

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

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.
 - a. 아래의 형태로 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - 부록 C/ST.25 텍스트 파일
 - 서면 혹은 이미지 파일
 - b. PCT 규칙 13의3.1(a)에 따라 국제출원과 함께 국제조사만을 목적으로 부록 C/ST.25 텍스트 파일의 형태로 제출된 서열목록
 - c. 국제조사만을 목적으로 국제출원일 이후에 아래 형태로 제출된 서열목록
 - 부록 C/ST.25 텍스트 파일 (규칙 13의3.1(a))
 - 서면 혹은 이미지 파일 (규칙 제13의3.1(b) 및 시행세칙 713).
2. 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시 출원의 일부를 구성하는 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.
3. 추가 의견:

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
CN 100392075 C	2008/06/04	CN 100884501 A	2006/12/27
KR 10-2013-0105380 A	2013/09/25	BR 112014022409 A2	2018/09/25
		EP 2825641 A1	2015/01/21
		JP 2015-513406 A	2015/05/14
		US 2015-0044753 A1	2015/02/12
		US 2017-0211057 A1	2017/07/27
		US 9567577 B2	2017/02/14
		WO 2013-137583 A1	2013/09/19
JP 2003-164297 A	2003/06/10	BR 0204882 A	2004/06/15
		CN 1250716 C	2006/04/12
		CN 1421527 A	2003/06/04
		RU 2230114 C2	2004/06/10
		US 2003-0148474 A1	2003/08/07
		US 2005-0255567 A1	2005/11/17
JP 2002-300887 A	2002/10/15	BR 0200320 A	2002/10/29
		BR PI0200320 B1	2016/07/26
		CN 100384190 A	2002/12/11
		CN 100457894 C	2009/02/04
		DE 60208450 T2	2006/08/24
		EP 1229121 A2	2002/08/07
		EP 1229121 A3	2003/03/12
		EP 1229121 B1	2006/01/04
		EP 1424398 A2	2004/06/02
		EP 1424398 A3	2004/09/22
		JP 4560998 B2	2010/10/13
		US 2003-0003550 A1	2003/01/02
		US 2007-0092953 A1	2007/04/26
		US 7262035 B2	2007/08/28
KR 10-2198072 B1	2021/01/04	없음	