



2022년 9월 1일 (01.09.2022)

(51) 국제특허분류:

C08J 11/10 (2006.01)

B29B 17/04 (2006.01)

B09B 5/00 (2006.01)

C12P 7/40 (2006.01)

B29B 17/02 (2006.01)

B29K 67/00 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2022/002784

(22) 국제출원일:

2022년 2월 25일 (25.02.2022)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2021-0026729 2021년 2월 26일 (26.02.2021) KR

(71) 출원인: 고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION)

[KR/KR]: 02841 서울특별시 성북구 안암로 145, Seoul (KR).

(72) 발명자: 김경현 (KIM, Kyoung Heon); 02841 서울특별시 성북구 고려대로 73 고려대학교 생명과학대학 CJ식품안전관, Seoul (KR). 김동현 (KIM, Dong Hyon); 02841 서울특별시 성북구 고려대로 73 고려대학교 생명과학대학 CJ식품안전관, Seoul (KR). 김재균 (KIM, Jae Kyun); 02841 서울특별시 성북구 고려대로 73 고려대학교 생명과학대학 CJ식품안전관, Seoul (KR). 한동오 (HAN, Dong Oh); 02841 서울특별시 성북구 고려대로 73 고려대학교 생명과학대학 CJ식품안전관, Seoul (KR).

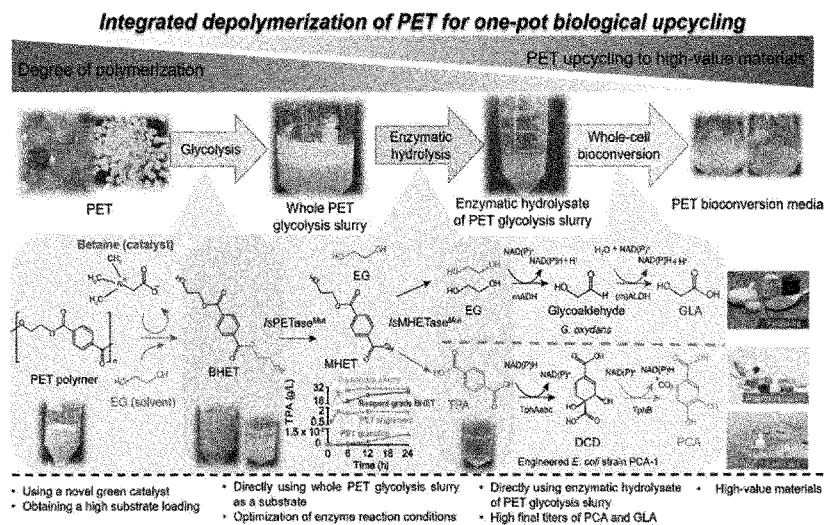
(74) 대리인: 특허법인 다나 (DANA PATENT LAW FIRM); 06242 서울특별시 강남구 역삼로 3길 11 광성빌딩 신관 5층, Seoul (KR).

(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, JM, 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 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(54) Title: CHEMICAL AND BIOLOGICAL INTEGRATED DEGRADATION PROCESS FOR POLYETHYLENE TEREPHTHALATE (PET), FOR RECYCLING PET

(54) 발명의 명칭: 폴리에틸렌테레프탈레이트 재활용을 위한 PET의 화학적 및 생물학적 통합 분해공정



(57) Abstract: The present invention relates to a chemical and biological integrated degradation process for PET, for recycling PET, and, more specifically, the present invention provides a PET upcycling technique for producing a high value-added product via a chemical pretreatment process of PET, a TPA and EG production process using an enzyme, and a process for converting TPA and EG to PCA and GLA, respectively.

(57) 요약서: 본 발명은 PET 재활용을 위한 PET의 화학적 및 생물학적 통합 분해공정에 관한 것으로, 보다 상세하게는, 본 발명은 PET의 화학적 전처리 공정, 효소를 이용한 TPA 및 EG 생산 공정, 및 TPA 및 EG를 각각 PCA 및 GLA로 전환하는 공정을 통해 고부가가치 산물을 생산하는 PET 업사이클링 기술을 제공한다.

[다음 쪽 계속]

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 폴리에틸렌테레프탈레이트 재활용을 위한 PET의 화학적 및 생물학적 통합 분해공정

기술분야

- [1] 본 발명은 폴리에틸렌테레프탈레이트(Poly(ethylene terephthalate), PET) 재활용을 위한 PET의 화학적 및 생물학적 통합 분해공정에 관한 것이다.

배경기술

- [2] halic acid, TPA) 및 에틸렌글리콜(ethylene glycol, EG)이며, 이들은 에스터 결합을 통해 교차적 연결되어 있다. PET을 재활용하는 방법에는 크게 3가지가 알려져 있다. 첫째는 소각과 열분해를 통한 에너지 회수방법으로 일반적으로 사용되지만, 원하지 않는 부산물인 이산화탄소와 화학물질이 생성되고, 효율이 낮다는 단점이 있다. 둘째는 파쇄와 재용융을 통한 이차 플라스틱을 생산하는 물리적 재활용으로 그 품질이 떨어지는 단점이 있다. 앞선 두 가지 방법은 저활용 방식으로 그 결과의 가치가 낮다. 셋째는 화학적 재활용으로 그 용매에 따라 다른데, 물을 사용했을 때 하이드롤리시스(hydrolysis), 아민(amine)을 사용했을 때 아미놀리시스(aminolysis), 알코올(alcohol)을 사용했을 때 알코올리시스(alcoholysis), 글라이콜(glycol)을 사용했을 때 글라이콜리시스(glycolysis)로 나뉜다. 그러나 이런 방식 역시, 가혹한 조건을 요구하여 산업적 규모로 적용하기 어렵다. 또한 화학적 재활용의 본래 목적은 높은 순도의 단량체를 얻어 다시 버진(virgin) 플라스틱을 만드는 것이기 때문에, 단량체를 얻기 위한 분리와 정제공정이 필요하다. 이는 기존 플라스틱 생산공정보다 경제적으로 효율이 낮은 단점이 있다.
- [3] PET의 생물학적 재활용은 아직 초기 단계이다. 이 방법은 생물학적 전환을 통해 고부가가치의 산물로 전환할 수 있어서 PET 업사이클링이 가능하다는 장점이 있다. 하지만 효소만을 이용하여 PET를 가수분해하는 것은 어려워 실제 적용이 어렵다. 그러므로 효소의 가수분해 반응을 쉽게 하기 위해 PET에 대한 화학적 전처리 공정을 도입하여 효소가 선호하는 기질을 만들어주는 것이 필요하다. 그러므로 생물학적 공정에 알맞은 화학적 전처리 공정을 찾는 것이 중요하다. 뿐만 아니라 효소 가수분해산물을 고부가가치 플랫폼 화학물질로 전환하기 위해 알맞은 균주를 사용해야 한다.

[4] [선행기술문헌]

[5] [특허문헌]

[6] 한국공개특허10-2020-0119213

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명의 목적은 폴리에틸렌테레프탈레이트(poly(ethylene)terephthalate,

PET)를 효과적으로 업사이클링하기 위해 PET의 구성성분을 자원으로 사용하여 고부가가치 산물들을 생산할 수 있는 효과적인 화학-생물학적 통합공정을 제공하는 것이다.

- [8] 상기 통합공정을 구축하기 위해 3가지가 필요하다. 첫 번째는 PET에 대한 화학적 전처리 공정을 도입하여 효소가 선호하는 기질을 생산해야 하고, 두 번째로 효소를 이용하여 생물학적 전환에 사용될 기질인 테레프탈산 및 에틸렌글리콜을 효과적으로 생산해야 한다. 세 번째로 생산된 테레프탈산 및 에틸렌글리콜을 각각 고부가가치 산물인 프로토크테추산(protocatechuic acid, PCA) 및 글리콜산(glycolic acid, GLA) 등으로 잘 전환해야 한다.
- [9] 우선 첫 번째 PET에 대한 화학적 전처리 공정으로 글라이콜을 이용한 글라이콜리시스가 이용되고, 글라이콜리시스는 통상적으로 에틸렌글리콜 용매 및 금속 촉매를 사용한다. 그러나, 금속 촉매의 사용은 환경뿐만 아니라, 이후 생물학적 공정에 부정적인 영향을 줄 수 있다. 두 번째 글라이콜리시스에 의해 저중합체가 된 PET를 가수분해 효소를 이용하여 테레프탈산 및 에틸렌글리콜로 분해한다. 이 때 생성되는 테레프탈산은 다이카복실산(dicarboxylic acid)으로 효소 가수분해반응 조건의 pH를 낮추게 되고 그로인해 상기 효소활성이 저해되고 이는 고농도의 산물을 만드는데 방해요소다.
- [10] 따라서, 본 발명은 상기 문제를 해결하기 위하여 PET를 저중합체로 분해하는 화학적 전처리 공정은 에틸렌글리콜(ethylene glycol, EG)을 용매로 하며, 친환경 촉매인 베타인을 사용하고, 그 다음 효소 가수분해반응에서 알맞은 버퍼의 농도와 pH를 선택하여 TPA의 영향으로 효소 가수분해반응 조건의 pH가 낮아지는 것을 방지한다. 그리고 TPA를 PCA로 전환하기 위해 전환관련 유전자가 있는 재조합 플라스미드를 삽입한 재조합 대장균을 이용하고, EG을 GLA으로 전환하기 위해 전환경로를 가지고 있는 글루코노박터 옥시단스(*G. oxydans*) KCCM 40109를 이용했다. 균을 이용한 전환방법으로 전세포전환(whole-cell conversion)을 사용하여 빠르게 고농도 및 고수율의 산물을 얻었다. 또한 모든 공정의 기질은 이전 공정의 산물을 그대로 사용하기 때문에 부가적인 정제공정이 없다.

과제 해결 수단

- [11] 본 발명자들은 상기 문제를 해결하기 위하여 PET를 저중합체로 분해하는 화학적 전처리 공정은 에틸렌글리콜(ethylene glycol, EG)을 용매로 하며, 친환경 촉매인 베타인을 사용하였고, 그 다음, 폴리에틸렌테레프탈레이트 가수분해효소(*IsPETase*)와 모노-2-히드록시에틸테레프탈레이트 가수분해효소(*IsMHETase*)를 사용하여 PET 저중합체를 TPA 및 EG로 가수분해하였다. 그 다음, TPA를 PCA로 전환하기 위해 전환관련 유전자가 있는 재조합 플라스미드를 삽입한 재조합 대장균을 이용하고, EG을 GLA으로 전환하기 위해 전환경로를 가지고 있는 글루코노박터 옥시단스(*G. oxydans*) KCCM 40109를 이용했다. 이는

균을 이용한 전환방법으로 전세포전환(whole-cell conversion)을 사용하여 빠르게 고농도 및 고수율의 산물을 얻었다. 또한 모든 공정의 기질은 이전 공정의 산물을 그대로 사용하기 때문에 부가적인 정제공정이 없다.

- [12] PET는 작은 분자 단위인 '단량체' 수백~수만 개가 사슬처럼 엮인 고분자다. 자연 분해가 어려워 소각하거나 땅에 파묻기 때문에 다양한 환경 문제를 일으킨다. 페타아제같은 효소로 단량체로 분해하는 방법이 개발됐지만 이들 효소는 분해 시간이 오래 걸리고 분해하는 양이 적은 단점이 있다. 효소로 PET를 분해하기 전 에틸렌글리콜을 이용해 PET를 저중합체로 분해해 놓으면 같은 양의 PET를 더 많은 단량체로 분해할 수 있다. 또한, PET를 에틸렌글리콜을 사용하여 저중합체로 글라이콜리시스할 때 '베테인'이 촉매로 사용될 수 있음을 확인하였다. 베테인은 양이온과 음이온을 동시에 가진 '양쪽성 이온'으로 동물, 식물, 미생물이 삼투압, 고온, 탈수 같은 환경적 스트레스에 노출됐을 때 만들어진다. 베테인은 에틸렌글리콜이 PET의 결합 사슬을 쉽게 끊을 수 있도록 하는 역할을 해 저중합체 분리에 도움을 줌을 확인하였다.
- [13] 또한, 효과면에서, 에틸렌글리콜과 베테인을 활용해 PET를 저중합체로 만드는 과정을 거치지 않았을 때와 거쳤을 때 생성되는 단량체의 양을 비교한 결과 저중합체로 만드는 과정을 거쳤을 때 생성되는 단량체의 양이 처음부터 효소로 분해했을 때 생성되는 단량체 양보다 많음을 확인하였다. 게다가 베테인은 저중합체를 단량체로 만들 때 쓰이는 효소에 영향을 주지 않아 매번 중간 부산물을 분리하는 과정을 거치지 않아도 되는 장점이 있다.
- [14] 이에, 본 발명은 베테인을 촉매로 사용하여 폴리에틸렌 테레프탈레이트를 저중합체로 글라이콜리시스(glycolysis)하는 방법을 제공한다.
- [15] 또한, 본 발명은,
- [16] 베테인 촉매하에서 폴리에틸렌 테레프탈레이트의 글라이콜리시스(glycolysis)를 통해 비스-2-히드록시에틸테레프탈레이트(bis(2-hydroxyethyl) terephthalate, BHET)를 생산하는 단계;
- [17] 생산된 BHET는 효소 가수분해를 통해 모노-2-히드록시에틸테레프탈레이트(mono(2-hydroxyethyl) terephthalate, MHET) 중간체를 거쳐 테레프탈산 및 에틸렌 글리콜로 분해되는 단계; 및
- [18] 생체촉매 하에서 상기 테레프탈산은 생물변환을 통해 프로토크테추산(protocatechuic acid)으로 전환되거나,
- [19] 에틸렌 글리콜은 발효를 통해 글리콜산으로 전환되는 단계를 포함하는 폴리에틸렌 테레프탈레이트로부터 고부가가치 화합물의 생산방법을 제공한다(도 1).
- [20] 상기 방법에서, 폴리에틸렌테레프탈레이트를 저중합체로 분해하는 글라이콜리시스는 베테인을 촉매로 사용하여 에틸렌글리콜 용매하에서 마이크로파를 인가하여 수행될 수 있다. 구체적으로, 상기 글라이콜리시스는

- 폴리에틸렌테레프탈레이트:에틸렌글리콜이 1:3 내지 20 (PET:EG, molar ratio) 몰비로, 베테인은 PET 기질에 대하여 0.1 내지 1중량% (촉매/PET, w/w ratio)로, 190°C에서 10분 내지 2시간 동안 수행될 수 있다. 구체적인 일실시예에서, 폴리에틸렌테레프탈레이트:에틸렌글리콜이 1:4(PET:EG, molar ratio) 몰비로, 베테인은 PET 기질에 대하여 0.5중량% (촉매/PET, w/w ratio)로, 190°C에서 1시간 동안 글라이콜리시스를 수행하였을 때, BHET의 수율이 가장 우수하였다.
- [21] 폴리에틸렌테레프탈레이트의 글라이콜리시스를 통해 생산된 BHET는 폴리에틸렌테레프탈레이트 가수분해효소(*IsPETase*)에 의해서 MHET로 가수분해되고, 상기 MHET는 모노-2-히드록시에틸테레프탈레이트 가수분해효소(*IsMHETase*)에 의해서 테레프탈산 및 에틸렌 글리콜로 가수분해될 수 있다.
- [22] 폴리에틸렌테레프탈레이트의 저중합체인 BHET 및 MHET를 각각 가수분해하는 *IsPETase* 및 *IsMHETase*는 야생형 또는 돌연변이형일 수 있다. 상기 *IsPETase* 및 *IsMHETase*의 야생형은 각각 서열번호 3 및 서열번호 4로 표시되는 염기서열로 이루어질 수 있다. 본 발명의 구체적인 실시예에서, 상기 효소들은 *IsPETase* 및 *IsMHETase*의 돌연변이형이 사용되었으며, 돌연변이형 *IsPETase*(*IsPETase^{Mut}*)는 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어지고, 상기 돌연변이형 *IsMHETase*(*IsMHETase^{Mut}*)는 서열번호 2로 표시되는 염기서열로 이루어질 수 있다.
- [23] 테레프탈산의 프로토키네추산으로의 생물변환은 테레프탈산 1,2-디옥시게네이즈 및 1,2-디히드록시-3,5-사이클로헥사디엔-1,4-디카르복실레이트 디히드로게네이즈를 발현하는 미생물을 생체촉매로 사용하여 수행될 수 있다. 테레프탈산 1,2-디옥시게네이즈는 TPA를 DCD로 전환하고, DCD 디히드로게네이즈는 DCD를 PCA로 전환한다. TPA 1,2-디옥시게네이즈 및 DCD 디히드로게네이즈는 코마노나스 에스피(*Comamonas sp.*) E6 유래일 수 있으며, 코딩 유전자 명칭은 각각 *TphAabc* 및 *TphB*이다. 상기 효소들은 NADH 및 NADPH를 보조인자로 사용할 수 있다. 본 발명의 일 구체예에 따르면, PET 가수분해물인 TPA로부터 PCA를 얻기 위해 *TphAabc* 및 *TphB*를 발현하는 미생물을 생체촉매로 사용할 수 있다.
- [24] 본 명세서에서, 용어 "생체촉매"는 테레프탈산의 생물변환에 관여하는 효소를 지칭하는 것으로, 상기 효소를 발현하는 미생물과 혼용하여 사용된다. 상기 효소는 코딩 유전자를 포함하는 재조합 벡터의 형태로 숙주세포에 도입되어 발현될 수 있다.
- [25] 에틸렌 글리콜의 발효는 글루코노박터 옥시단스(*G. oxydans*) KCCM 40109, 클로스트리디움 글리콜리쿰(*Clostridium glycolicum*) 및 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 에틸렌 글리콜 발효 미생물을 사용하여 수행될 수 있다.

- [26] 최종 산물인 프로토카테추산은 이후 생물 변환을 통해서 갈산, 피로갈롤, 카테콜, 뮌콘산 및 바닐산으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 고부가가치 화합물로 전환될 수 있다. 이와 관련한 구체적인 생물 변환 방법은 한국공개특허10-2020-0119213A에 개시된 바와 같다.

발명의 효과

- [27] 본 발명의 기술을 통해 PET 업사이클링을 위한 새로운 효율적이고 경제적인 화학적-생물학적 통합공정을 제시한다. 이 때, 본 발명의 공정을 이용하면 화학적 공정과 생물학적 공정 사이에 부가적인 분리 및 정제공정이 필요 없고, PET로부터 최종적으로 플랫폼 화합물질인 PCA와 GLA를 고농도 및 고수율로 생산할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [28] 도 1은 PET 업사이클링에 사용되는 플랫폼 화합물질 생산을 위한 화학적-생물학적 통합공정의 전체적인 모식도이다.
- [29] 도 2는 베테인을 촉매로 이용한 PET 글라이콜리시스 산물 확인 결과이다. (a)는 베테인을 이용한 PET 글라이콜리시스 모식도이다. (b)는 베테인을 촉매로 이용한 PET 글라이콜리시스 산물을 푸리에 변환 적외선 분광학(Fourier-transform infrared spectroscopy, FT-IR)을 이용해 측정한 결과이다. 대조군으로 반응 전 PET 글라이콜리시스 혼합물을 측정하였고, 반응 후 PET 글라이콜리시스 산물로부터 얻은 정제물질 및 BHET 표준물질을 측정하였다. (c)는 반응 후 PET 글라이콜리시스 혼합물로부터 얻은 올리고머(oligomer)를 푸리에 변환 적외선 분광학을 이용해 측정한 결과이다. 대조군으로 반응 전 PET 플라스틱 과립(granule)을 이용했다. (d)는 PET 글라이콜리시스 산물과 BHET 표준물질을 가스크로마토그래피-질량 분석기(gas chromatography-mass spectrum, GC/MS)를 이용하여 측정한 전체 이온 크로마토그래피(total ion chromatogram, TIC) 결과이다. (e)는 PET 글라이콜리시스 산물의 mass spectrum이다. (f)는 BHET 표준물질의 mass spectrum이다. (g)는 반응 후 PET 글라이콜리시스 혼합물로부터 얻은 정제물질과 BHET 표준물질을 핵자기 공명 분광법(nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR)을 이용해서 측정한 1D ^1H spectrum 결과이다. (h)는 반응 후 PET 글라이콜리시스 혼합물로부터 얻은 정제물질과 BHET 표준물질을 핵자기 공명 분광법(nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR)을 이용해서 측정한 1D ^{13}C spectrum 결과이다.
- [30] 도 3은 PET 중합체와 EG, 그리고 베테인 간의 상호작용 예상 구조를 나타내고, 밀도범함수 이론(density functional theory, DFT) 분석을 통해 상호작용 에너지 수준을 비교한 결과이다.
- [31] 도 4는 베테인을 촉매로 이용한 PET 글라이콜리시스의 예상 기작이다. (A)는 DFT 분석을 통해 확인한 PET 중합체와 EG, 그리고 베테인 간의 가장 안정한 상호작용 구조이다. (B)는 이를 토대로 베테인이 촉매로 작용할 때 PET

글라이콜리시스 예상 기작에 대한 모식도이다.

- [32] 도 5는 야생형(wild type) 효소와 돌연변이(mutant) 효소의 효소활성 비교이다. (A)는 야생형(wild type) 폴리에틸렌테레프탈레이트 가수분해효소(*IsPETase*^{Wild})와 돌연변이(mutant) 폴리에틸렌테레프탈레이트 가수분해효소(*IsPETase*^{Mut})의 PET 과립(granule)에 대한 온도별 효소 활성 비교 결과이다. (B)는 야생형(wild type) 모노-2-히드록시에틸테레프탈레이트 가수분해효소(*IsMHETase*^{Wild})와 돌연변이(mutant) 모노-2-히드록시에틸테레프탈레이트 가수분해효소(*IsMHETase*^{Mut})의 모노-2-히드록시에틸테레프탈레이트(mono(2-hydroxyethyl) terephthalate, MHET)에 대한 온도별 효소 활성 비교 결과이다.
- [33] 도 6은 PET 글라이콜리시스 산물을 기질로 이용한 효소 가수분해반응의 조건 최적화에 대한 결과이다. (a)는 *IsPETase*^{Mut}와 *IsMHETase*^{Mut}에 대한 베타인을 포함한 다양한 중금속 이온의 저해 효과 비교 결과이다. (b)는 *IsPETase*^{Mut}와 *IsMHETase*^{Mut}의 기질대비 효소량에 따른 초기속도 결과이다. (c)는 효소 가수분해반응 조건에서 50 mM 소듐 포스페이트 버퍼(Sodium phosphate buffer) pH 8 및 PET 글라이콜리시스 산물을 기질로 이용하고, *IsPETase*^{Mut}와 *IsMHETase*^{Mut}의 접종량을 달리하여 얻은 산물인 TPA를 시간별로 측정된 결과이다. (d)는 50 mM Sodium phosphate buffer pH 8에서 TPA 농도를 달리하여 첨가했을 때 pH 값을 pH 종이를 이용해 시각적으로 나타내어 50 mM Sodium phosphate buffer의 완충력을 확인한 결과이다. (e)는 pH 별 *IsPETase*^{Mut}의 상대적 활성 측정 결과이다. (f)는 (c)의 결과 중 효소접종량을 9.0 U/L로 했을 때의 pH 변화를 pH 종이를 이용해 확인한 결과이다. (g)는 효소 가수분해반응 조건에서 Bicine-NaOH buffer pH 8을 50 mM부터 1 M까지 달리하고, *IsPETase*^{Mut}와 *IsMHETase*^{Mut}의 접종량을 각각 2.3 U/L로 했을 때 산물인 TPA를 시간별로 측정된 결과이다. (h)는 효소 가수분해반응 조건에서 1 M Bicine-NaOH buffer pH 8을 이용하고, BHET를 기질로 이용했을 때, 반응 전 후 산물을 HPLC 분석한 결과이다. 표준물질로 BHET, MHET 및 TPA를 이용했다. (i)는 효소 가수분해반응 조건에서 1 M Tris-HCl buffer pH 8을 이용하고, BHET를 기질로 이용했을 때, 반응 전 후 산물을 HPLC 분석한 결과이다. 표준물질로 BHET, MHET 및 TPA를 이용했다. (j)는 효소 가수분해반응 조건에서 1 M Bicine-NaOH buffer pH 8을 이용하고, PET 글라이콜리시스 산물을 기질로 이용하고, *IsPETase*^{Mut}와 *IsMHETase*^{Mut}의 접종량을 달리하여 얻은 산물인 TPA를 시간별로 측정된 결과이다. (k)는 효소 가수분해반응 조건에서 1 M Bicine-NaOH buffer pH 8을 이용하고, 기질로 사용한 PET 글라이콜리시스 산물의 농도를 달리하고, 이에 상응하는 효소접종량은 2.3 U/L로 하여 산물이 TPA를 시간별로 측정된 결과이다. (l)은 (k) 결과 중 12시간 지점에서 넣어준 기질의 PET 및 BHET에 대한 수율을 나타낸 것이다. (m)은 기질을 PET 과립(granule), PET 글라이콜리시스로부터 얻은 올리고머(oligomer), PET 글라이콜리시스 산물, 그리고 BHET로 하여 효소활성을 비교한 것이다.
- [34] 도 7은 효소 가수분해반응물을 기질로 이용한 전세포전환에 대한 결과이다.

(a)는 TPA를 PCA으로 생합성하는 경로의 모식도이다. (b)는 기질로 TPA 표준물질과 효소 가수분해반응물을 이용하고, 재조합 대장균을 균주로 이용하여 전세포전환을 했을 때, 산물인 PCA과 기질인 TPA를 시간별로 측정된 결과이다. (c)는 소모된 TPA 대비 생성된 PCA의 수율이다. (d)는 EG를 GLA으로 생합성하는 경로의 모식도이다. (e)는 기질로 EG 표준물질과 효소 가수분해반응물을 이용하고, 글루코노박터 옥시단스를 균주로 이용하여 전세포전환을 했을 때, 산물인 GLA과 기질인 EG를 시간별로 측정된 결과이다. (f)는 소모된 EG 대비 생성된 GLA의 수율이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [35] 이하, 본 발명에 따르는 실시예 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하나, 본 발명의 범위가 하기 제시된 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.
- [36] <실시예 1> 베테인을 촉매로 이용한 PET 글라이콜리시스
- [37] 경제적이고 효율적인 PET 업사이클링 공정을 구축하기 위해서 화학적 PET 분해공정이 필요하다. 하지만 친환경적이고 지속가능한 PET 업사이클링을 위한 화학적-생물학적 통합공정을 고려할 때, 화학적 공정의 결과가 이후 생물학적 공정에 부정적인 영향을 주지 않도록 하는 것이 중요하다. 기존 PET 글라이콜리시스 방법은 주로 금속속 촉매를 이용했다. 금속촉매의 사용은 본 통합공정 중 생물학적 공정에 부정적 영향을 줄 수 있고, 환경적으로 좋지 못한 영향을 미칠 수 있기 때문에 금속속 촉매 대신 베테인을 이용하여 마이크로웨이브 다이제스트 시스템(microwave digestion system)에서 글라이콜리시스를 수행하였다. 구체적으로, 3.5-11.5g의 과립형 PET 및 특정량의 EG를 베테인을 촉매로 사용하여 190°C 온도에서 30-120분 동안 반응시켰다. 반응 조건을 유지해 주기위해 thermocouple과 magnetic stirrer기능을 가진 microwave digester (Milestone, Shelton, CT)가 사용되었으며, 100mL용량의 microwave digester 전용 반응 용기에서 반응을 수행했다.
- [38] 베테인의 글라이콜리시스 효과를 알아보기 위해, 먼저, 기질 투입량 최적화를 실시하였다. 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:10, 1:20 (PET:EG, molar ratio)에 해당하는 PET 기질과 EG 용매에 0.5% (촉매/PET, w/w ratio) 베테인을 넣어 190°C, 30분 동안 글라이콜리시스시켰다. 이 때 주요 산물인 BHET과 부산물인 MHET가 생성되었다. BHET와 MHET 농도는 액체크로마토그래피로 측정했다. 그 결과, 1:5 (PET:EG, molar ratio)에 해당하는 기질 투입량 조건에서 수율이 가장 높은 것을 확인했다. 하지만 최종산물의 농도를 고려했을 때 오히려 1:4 (PET:EG, molar ratio)에 해당하는 기질 투입량 조건이 가장 높은 것을 확인했다. 이는 공정적인 효율성과 경제성을 고려할 때, 고농도의 산물을 얻을 수 있는 1:4 (PET:EG, molar ratio)에 해당하는 기질 투입량 조건이 최적이라고 판단했다. 따라서 1:4 (PET:EG, molar ratio)에 해당하는 기질 투입량 조건을 선정하여 추후 조건을 확립하였다. (표 2)

- [39] 베테인의 투입량에 대한 촉매 효과를 확인하기 위해 0, 0.1, 0.5, 1% (촉매/PET, w/w ration)에 해당하는 베테인을 넣어 190°C, 30분 동안 글라이콜리시스 시켰다. 그 결과 0.5% (촉매/PET, w/w ration)에 해당하는 베테인을 넣은 조건이 최적임을 확인했다. 따라서 본 조건을 선정하여 추후 조건을 확립하였다. (표 2)
- [40] 다음으로 글라이콜리시스 반응 시간별 효과를 확인하기 위해 반응 시간을 30, 60, 90, 120분으로 하여 190°C로 반응시켰다. 그 결과, 60분 조건이 최적임을 확인했다. 최종적으로 1:4 (PET:EG, molar ratio)에 해당하는 기질 투입량 조건, 0.5% (촉매/PET, w/w ration)에 해당하는 베테인을 넣은 조건, 그리고 60분 반응 조건으로 190°C 가열시킨 글라이콜리시스 조건에서 58.7%의 수율과 BHET 368.6 g/L, MHET 32.8 g/L 농도를 얻었다. 이후 생물학적 공정에서 위 조건으로 진행된 PET 글라이콜리시스 산물을 기질로 이용했다. (표 2)
- [41] 추가적으로, 기존 PET의 글라이콜리시스에 사용되는 공지된 대표적인 유기 촉매인 1,5,7-트리아자바이사이클로[4.4.0]데-5-켄(1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]dec-5-ene, TBD)를 사용하였을 때와 비교한 결과, 동일한 조건에서 베테인 및 TBD를 촉매로 사용한 결과 베테인을 사용한 경우보다 높은 수율로 BHET를 얻을 수 있음을 확인하였다(표 2).
- [42] 베테인을 촉매로 이용한 PET 글라이콜리시스 산물을 분석하기 위해 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography, HPLC) 분석을 하였다. HPLC 분석 조건은 다음과 같다. 컬럼은 C18 column (OpitmaPak C18-51001546, 5 μ m, 150 mm X 4.6 mm)을 사용하였으며, 분석하는 동안 컬럼 온도는 25°C로 유지했다. 이동상은 A, B 두가지를 사용했으며, A는 0.1% trifluoroacetic acid가 녹아있는 증류수이고, B는 메탄올이다. 유속은 1 mL/min으로 27분간 분석하는 동안 0~2분은 이동상 B의 비율이 5%로 유지하고, 2~18분은 이동상 B의 비율을 5-57%로 변화를 주었다. 18~22분은 이동상 B의 비율을 57-5%로 변화를 주었다. 마지막, 22-27분은 이동상 B의 비율을 5%로 유지했다. UV/Vis 검출기(detector)를 이용하여 254 nm 파장에서 크로마토그래피를 측정했다.
- [43] 그 결과, 도 2a에서 베테인을 촉매로 이용한 PET 글라이콜리시스 반응 모식도를 나타내고, 실제 분석 전 후의 변화를 시각적으로 확인했다. 도 2b에서 PET 글라이콜리시스 반응 전 혼합물, PET 글라이콜리시스 산물, PET 글라이콜리시스 산물로부터 얻은 수용성 물질 및 BHET 표준물질을 푸리에 변환 적외선 분광학 분석했다. PET 글라이콜리시스 반응 전 혼합물에서 용매로 사용된 EG의 하이드록시기(hydroxyl group)으로 인해 3050~3600 cm^{-1} 파수 사이 넓게 퍼진 피크를 확인할 수 있다. PET 글라이콜리시스 산물에서 3436 cm^{-1} 파수에 새로운 하이드록시기 피크를 확인할 수 있다. 이는 PET 글라이콜리시스 반응으로 새로 형성된 하이드록시기에 의한 것이다. PET 글라이콜리시스 산물로부터 얻은 정제물질과 BHET 표준물질에서도 3436 cm^{-1} 파수에 뾰족한

피크를 확인했다. 각 샘플의 분석 결과를 비교했을 때, PET 글라이콜리시스 산물에서 3436 cm^{-1} 파수에 뾰족한 피크가 생기는 것을 보아 베테인을 이용한 PET 글라이콜리시스를 통해 BHET가 생성된 것을 알 수 있다. 도 2c에서 PET 과립(granule)과 PET 글라이콜리시스 산물을 증류수로 세척하여 얻은 침전물(oligomer)을 푸리에 변환 적외선 분광학 분석했다. 침전물 샘플의 3387 cm^{-1} 파수 부근에서 넓게 퍼진 피크를 확인할 수 있다. 이는 하이드록시기로, PET 과립(granule) 샘플의 경우 분자 길이에 비해 말단의 존재 비율이 낮아 하이드록시기 피크를 확인할 수 없다. 그러므로 베테인을 이용한 PET 글라이콜리시스를 통해 PET이 분해된다는 것을 알 수 있다. 실제로 PET 글라이콜리시스 주요 산물이 BHET인지 확인하기 위해 GC/MS를 이용하여 PET 글라이콜리시스 산물과 BHET 표준 물질을 측정하였다. 우선 GC/MS 분석을 위해 유도체화 과정은 다음과 같다. PET 글라이콜리시스 산물과 메탄올에 녹인 BHET 표준 물질을 10분간 원심분리한다. 그 후 상층액 $20\text{ }\mu\text{l}$ 를 스피드 백으로 건조시켰다. 유도체화를 위해 건조된 샘플에 $10\text{ }\mu\text{l}$ 의 4%(w/v) *O*-methylhydroxylamine hydrochloride in pyridine을 넣고 30°C 에서 90분간 반응시켰다. 그 후, $45\text{ }\mu\text{l}$ 의 *N*-methyl-*N*-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide를 넣고 37°C 에서 30분간 반응시켰다. 이때 분석을 위한 기기 RTX-5Sil MS($30\text{ m} \times 0.25\text{ mm i.d.}$, $25\text{ }\mu\text{m}$ film thickness, Resteck)컬럼을 부착한 Agilent 7890A GC/5975C MSD 시스템을 사용하였다. 컬럼 온도는 먼저 150°C 에서 1분간 유지하고 330°C 까지 $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 으로 승온 시킨 후 5분간 유지하였다. $1\text{ }\mu\text{l}$ 의 샘플을 splitless 방식으로 분석하였다. 도 2d의 TIC(total ion chromatography) 결과 PET 글라이콜리시스 산물의 피크가 BHET의 피크와 일치하는 것을 확인했다. 도 2e와 도 2f는 각각 PET 글라이콜리시스 산물과 BHET의 질량 스펙트럼(mass spectrum)이다. 그리고 PET 글라이콜리시스 산물과 BHET 표준 물질을 핵자기 공명(nuclear magnetic resonance, NMR)분석을 진행했다. 샘플들 모두 다이메틸 설펡사이드(dimethyl sulfoxide)에 녹여 준비했다. 분석은 298K, 900 MHz에서 Bruker Avance II 분광기(spectrometer)를 이용해 실험 및 측정을 진행했다. 그 결과 도 2g에서 1D ^1H spectrum과 도 2h에서 1D ^{13}C spectrum으로 PET 글라이콜리시스 산물과 BHET 표준 물질이 같음을 확인했다.

[44] <실시예 2> 베테인을 촉매로 이용한 PET 글라이콜리시스의 밀도범함수이론 분석과 베테인 촉매 기작

[45] 베테인, EG, 그리고 PET 중합체가 혼합된 PET 글라이콜리시스 상황에서 3가지 물질이 어떤 식으로 상호작용하는지 알아보고, 이를 통한 베테인의 촉매기작을 밝히고자 했다. 도 3에서 베테인, EG, 그리고 PET 중합체가 어떻게 위치할 것인지 예상 가능한 6가지 모델을 제시하고, 모델들 간의 가장 안정적인 상호작용이 어떤 것인지 밀도범함수이론 분석을 통해 확인했다. 자구어(가우시안) 소프트웨어를 이용하여 예상 모델들의 기체상 에너지(gas phase energy)를 도출한 뒤, 가장 안정적인 모델인 도 3의 f 모델을 선정했다.

나머지 5가지 모델은 f에 대비하여 상대 에너지가 높은 것을 확인했다. 이를 통해 도 3의 f 모델이 가장 선호되고, 베테인, EG, 그리고 PET 중합체 간의 위치를 알 수 있다.

- [46] 다음으로 도 4A를 통해 도 3의 f 모델의 베테인-EG, EG-PET 중합체, PET 중합체-베테인 간의 상호작용 결합과 거리를 확인했다. f의 상호작용 구조가 다른 상호작용 구조들보다 PET 중합체, 베테인 및 EG가 수소결합에 의해 긴밀하게 연결되어 서로가 밀집하게 된다. 베테인에 의한 PET 분해 기작은 도 4B를 통해 나타냈다. 베테인의 양이온 부분이 PET 중합체의 에스터 그룹(ester group)의 카보닐 산소(carbonyl oxygen)와 상호작용한다. 그러므로 PET 중합체의 에스터 그룹 탄소는 양이온이 된다. 다음으로 EG의 하이드록시 그룹(hydroxyl group) 산소가 PET 중합체의 에스터 그룹의 양이온 탄소를 공격한다. 그러므로 베테인, EG, 그리고 PET 중합체는 사면체 중간체(tetrahedral intermediate)를 형성한다. 이 때 베테인의 카복실 그룹(carboxyl group)이 PET 중합체의 에스터 그룹의 양이온 탄소를 공격하는 EG의 하이드록시 그룹(hydroxyl group)의 수소와 상호작용하여 당긴다. 이를 통해 EG의 하이드록시 그룹(hydroxyl group)의 수소는 좀 더 쉽게 떨어진다. EG의 하이드록시 그룹(hydroxyl group)의 수소가 떨어지고, 베테인의 양이온 부분과 PET 중합체의 에스터 그룹(ester group)의 카보닐 산소(carbonyl oxygen)의 결합이 끊어지고 다시 카보닐 그룹(carbonyl group)을 형성한다. 다음으로 아실-산소(acyl-oxygen)의 결합이 끊어져 PET 중합체의 한쪽 사슬이 떨어져 나간다. 최종적으로 PET 중합체의 에스터 그룹(ester group)의 한쪽이 용매로 사용된 EG로 교체된다. 이 반응이 무수히 진행되어 최종 산물인 BHET가 생성된다.

- [47] <실시예 3> PET 글라이콜리시스 산물을 분해할 수 있는 효소 준비

- [48] PET을 분해하는 효소들은 표 1과 같이 확인할 수 있다. 2016년 PET를 분해할 수 있는 *Ideonella sakaiensis* 유래부터 *IsPETase* 및 *IsMHETase*가 발견되기 전까지 라이페이스(lipase), 큐티나아제(cutinase)가 PET을 분해하는 효소로 알려졌다. 이 효소들은 PET을 특이적으로 분해하지 못하기 때문에, 그 활성이 낮았다. 하지만 *IsPETase*와 *IsMHETase*는 PET을 특이적으로 분해하는 활성을 가진다. 그러나, 그 야생형은 기존에 알려진 효소들에 비해 활성이 높은 것일 뿐, 여전히 다른 재활용 방법들에 비교했을 때 낮은 편으로 공정상에 적용하기 어려웠다. 최근 *IsPETase*와 *IsMHETase*의 구조가 밝혀지고, 활성을 증가시키기 위한 돌연변이형 *IsPETase* 및 *IsMHETase*가 연구되었다. 그러므로, 본 연구에서 야생형 효소가 아닌 돌연변이형 *IsPETase^{Mut}*와 *IsMHETase^{Mut}*(표 2)를 사용했다. 각각의 유전자 서열은 코돈옵티마이징이 되어 pET28a 벡터의 NdeI 및 XhoI 부위에 라이게이션하여 pET28a_*IsPETase^{Mut}*와 pET28a_*IsMHETase^{Mut}* 플라스미드를 구축하였다. 이 플라스미드를 대장균 DH5α에 형질전환 시켰다.

- [49] 이렇게 확보한 유전자들을 과발현하기 위해 단백질 발현용 숙주인 대장균 BL21(DE3)에 형질전환하였다. BL21(DE3)_pET28a_*IsPETase^{Mut}*는 40 mg/L

카나마이신이 포함되어 있는 Luria-Bertani(LB) 배지를 이용하여 37°C에서 600 nm 흡광도가 0.5에 도달할 때까지 배양하였다. 단백질의 발현을 유도하기 위해 0.5 mM IPTG를 첨가하였고 유도 온도는 16°C로 설정하여 18시간 동안 수용성 형태로 단백질을 과발현하였다. 배양이 끝난 후, 원심분리하여 세포를 회수하고, 이를 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)를 이용하여 풀고 난 후, 초음파파쇄기를 이용하여 세포를 파쇄하였다. 이를 다시 8,000 g로 원심분리하여 상층액을 획득하였다. 이 재조합 단백질을 HisTrap 컬럼(GE Healthcare, Piscataway, USA)을 이용하여 정제하였다. 정제의 순서는 바인딩 버퍼(20 mM Sodium phosphate buffer, 500 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 7.4)를 컬럼에 흘려준다. 다음으로 원심분리하여 얻은 상층액을 흘려준다. 마지막으로 일루션 버퍼(20 mM Sodium phosphate buffer, 500 mM NaCl, 300 mM imidazole, pH 7.4)를 흘려주어, 일루션 버퍼 상에 정제된 *IsPETase^{Mut}*를 얻었다. 정제된 단백질은 Amicon Ultra Centrifugal filter(10,000 분자량 컷오프; Millipore, Billerica, MA, USA)로 농축하였으며, bicinchoninic acid(BCA) protein assay kit(Thermo Fisher Scientific, San Hose, CA, USA)로 단백질 농도를 측정하였다. 발현된 *IsPETase^{Mut}*는 8% SDS-PAGE를 이용하여 28.6 kDa으로 확인되었다.

- [50] BL21(DE3)_pET28a_*IsMHETase^{Mut}*는 40 mg/L 카나마이신이 포함되어 있는 Luria-Bertani(LB) 배지를 이용하여 37°C에서 600 nm 흡광도가 0.5에 도달할 때까지 배양하였다. 단백질의 발현을 유도하기 위해 0.5 mM IPTG를 첨가하였고 유도 온도는 16°C로 설정하여 16시간 동안 단백질을 과발현하였다. 이때 재조합 단백질은 불용성 단백질로 과발현이 되었다. 배양이 끝난 후, 원심분리하여 세포를 회수하고, 이를 8 M 요소(Urea), 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)를 이용하여 풀고 난 후, 초음파파쇄기를 이용하여 세포를 파쇄하였다. 응집(aggregation)된 형태의 단백질은 8 M 요소(Urea)의 영향으로 액체 부분에 녹는다. 이를 다시 8,000 g로 원심분리하여 상층액을 획득하였다. 이 재조합 단백질을 HisTrap 컬럼(GE Healthcare, Piscataway, USA)을 이용하여 정제하였다. 정제의 순서는 바인딩 버퍼(8 M Urea, 20 mM Sodium phosphate buffer, 500 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 7.4)를 컬럼에 흘려준다. 다음으로 원심분리하여 얻은 상층액을 흘려준다. 마지막으로 일루션 버퍼(8 M Urea, 20 mM Sodium phosphate buffer, 500 mM NaCl, 300 mM imidazole, pH 7.4)를 흘려주어, 일루션 버퍼 상에 정제된 *IsMHETase^{Mut}*를 얻었다. 투석을 통해 일루션 버퍼의 8 M urea를 없애주어 응집된 *IsMHETase^{Mut}*를 재접힘(refolding)시켜 활성을 가지는 *IsMHETase^{Mut}*를 얻었다. 이는 bicinchoninic acid(BCA) protein assay kit(Thermo Fisher Scientific, San Hose, CA, USA)로 단백질 농도를 측정하였다. 발현된 *IsMHETase^{Mut}*는 8% SDS-PAGE를 이용하여 62.8 kDa으로 확인되었다.

- [51] <실시예 4> PET 글라이콜리시스 산물을 기질로 가수분해효소반응을 통한 고농도의 TPA과 EG 생산 최적화

- [52] 이 발명에서 사용한 *IsPETase^{Mut}*와 *IsMHETase^{Mut}*이 전에 보고된 것과 같이 *Is*

PETase^{Wild}와 *Is*MHETase^{Wild}보다 활성 및 내열성이 높은지 확인하기 위해 효소실험을 진행하였다. *Is*PETase에 대한 실험은 기질을 PET 과립(granule) 10 mg 및 효소 500 nM을 사용하였고, *Is*MHETase에 대한 실험은 기질인 MHET를 5 g/L로 하여 효소 1500 nM을 사용하여 모두 50mM Sodium phosphate buffer (pH 8) 및 최종 부피 500 µl로 하였다. 반응 온도는 35, 40, 45, 50°C로 하였다. 반응시간은 각각 48시간 및 30분 후, 효소 반응물을 메탄올에 희석하고 25,188 g, 10분 원심분리하여 상층액을 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography, HPLC) 분석을 하였다. 그 결과 도 5A, 그리고 5B에서와 같이 더 높은 온도조건에서 더 높은 활성을 나타내었다. 그중, 40°C 조건에서 *Is*PETase^{Mut}가 활성이 가장 좋은 것을 확인했다. 또한 40°C 및 45°C 조건에서 *Is*MHETase^{Mut}가 활성이 가장 좋은 것을 확인했다.

- [53] 기존 PET 글라이콜리시스에 사용되는 금속 촉매들과 본 연구에서 선정한 친환경 촉매인 베테인이 효소 가수분해반응에 저해 효과를 줄 수 있는지 확인하기 위해, 베테인, Ca²⁺, Co²⁺, Cu²⁺, Fe²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Ni²⁺, pb²⁺, Zn²⁺, 그리고 Li⁺를 1 mM 농도로 하여 *Is*PETase^{Mut} 및 *Is*MHETase^{Mut} 효소 실험을 각각 진행했다. 각각 효소 농도는 2.3 U/L, 기질은 BHET와 MHET를 2.5 mg, 50 mM Sodium phosphate buffer (pH 8), 그리고 부피는 500 µl로 하였다. 40°C에서 15분 반응시켜 모든 샘플은 메탄올에 희석하고 25,188 g, 10분 원심분리하여 상층액을 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography, HPLC) 분석을 하였다. 그 결과, 도 6a에서 다른 금속 촉매들과 다르게 베테인은 *Is*PETase^{Mut} 및 *Is*MHETase^{Mut} 효소반응에 저해 효과가 없는 것을 확인하였다. 그러므로 베테인을 사용한 PET 글라이콜리시스 산물은 효소 가수분해반응에 사용할 수 있다.
- [54] 효소 가수분해반응 조건에서 기질 대비 효소의 최적 투입량을 결정하기 위해 여러 효소 투입량 조건으로 효소 가수분해반응을 진행하고, 초기 속도를 확인했다. *Is*PETase^{Mut} 및 *Is*MHETase^{Mut} 효소반응 조건으로 각각 기질은 BHET 10 g/L, MHET 5 g/L로 하여 50 mM Sodium phosphate buffer (pH 8), 그리고 부피는 500 µl로 하였다. *Is*PETase^{Mut} 효소 투입량은 50~400 nmol/g BHET로 하였고, *Is*MHETase^{Mut} 효소 투입량은 300~900 nmol/g MHET로 하였다. 40°C에서 10분 반응시켜 모든 샘플은 메탄올에 희석하고 25,188 g, 10분 원심분리하여 상층액을 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography, HPLC) 분석을 하였다. 그 결과, 도 6b에서 각각 효소 별 초기 속도를 확인했다. 이를 토대로 *Is*PETase^{Mut}의 1 유닛(unit, U)은 40°C, pH 8 조건에서 분당 BHET를 MHET 100 µmole 생성하는 효소량으로 정의했고, *Is*MHETase^{Mut}의 1 유닛(unit, U)은 40°C, pH 8 조건에서 분당 MHET를 TPA 100 µmole 생성하는 효소 투입량으로 정의했다.
- [55] 정의한 효소 투입량을 토대로 베테인을 사용한 PET 글라이콜리시스 산물을 기질로 하여 가수분해효소반응을 진행했다. 이를 통해 *Is*PETase^{Mut} 및 *Is*MHETase^{Mut} 효소를 각각 기질에 대비하여 낭비하지 않고 효율적인 투입량을 확인하고자

했다. 반응 조건은 10 g/L의 BHET를 포함하는 PET 글라이콜리시스 산물을 기질로 하여, 50 mM Sodium phosphate buffer (pH 8), 그리고 부피는 500 μ L로 하였다. 40°C에서 6시간동안 반응시켜 30분, 1시간, 3시간, 6시간 샘플을 메탄올에 희석하고 25,188 g, 10분 원심분리하여 상층액을 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography, HPLC) 분석을 하였다. 그 결과, 도 6c에서 효소 투입량이 2.3 U/L, 4.5 U/L 일 때, 9.0 U/L와 비교하여 산물인 TPA의 양이 적은 것을 확인했다. 이는 반응이 진행됨에 따라, 산물인 TPA의 영향으로 pH가 낮아지고 효소의 활성을 잃는 것으로 예상했다. 우선 TPA의 영향으로 효소 가수분해반응 조건에서 pH가 얼마나 낮아지는지 확인하기 위해 50 mM Sodium phosphate buffer (pH 8) 조건에서 TPA를 0~10 g/L 농도가 되도록 투입했다. 그 결과, 도 6d에서 샘플들은 모두 pH 미터기(meter)를 통해 pH를 측정했고, pH 종이를 통해 시각적으로 확인했다. TPA 0~4 g/L 농도까지 pH는 8.00에서 5.47까지 감소했다. 이후 10 g/L 농도까지 pH는 5.35-5.39로 유지되었다. 이를 통해 효소 가수분해반응 조건에서 생성되는 TPA으로 pH가 얼마나 낮아지는지 확인하였다.

- [56] 다음으로 pH 별로 *IsPETase^{Mut}* 효소 활성을 알아보기 위해 Sodium acetate, Sodium phosphate, Bicine-NaOH, Tris-HCl, 그리고 Glycine-NaOH를 50 mM 농도로 pH 5~9로 *IsPETase^{Mut}* 효소반응을 진행했다. 효소반응 조건은 BHET 10 g/L, 2.3 U/L의 효소 및 반응 부피는 500 μ L로 하였다. 40°C에서 1시간동안 반응시켜 샘플을 메탄올에 희석하고 25,188 g, 10분 원심분리하여 상층액을 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography, HPLC) 분석을 하였다. 그 결과, 도 6c에서 pH 5.5 조건에서 pH 7.0에 대비하여 상대활성이 19.5%까지 감소한 것을 확인했다. 도 6d와 도 6e의 결과를 바탕으로 효소 가수분해반응 시, 산물인 TPA이 증가함에 따라 효소 가수분해반응 조건의 pH가 감소하고, 낮은 pH의 영향으로 *IsPETase^{Mut}* 효소의 활성이 급격히 낮아지는 것을 확인했다.

- [57] 다시 도 6c에서 9.0 U/L 실험 조건의 시간 별 pH 변화를 pH 종이를 통해 시각적으로, 도 6f에 pH 종이의 pH별 표준 색상과 함께 나타냈다. 반응 30분에서 TPA이 5.5 g/L 생성된 것을 확인했고, 도 6d와 도 6e를 통해 *IsPETase^{Mut}* 효소의 활성이 감소하는 것을 알 수 있다. 2.3 U/L, 4.5 U/L 실험 조건에서 산물인 TPA의 양이 적은 것은 효소 활성의 감소에 따른 결과이다. 이를 통해 효소 가수분해반응 조건에서 pH 수용력이 중요한 요인인 것을 확인했다.

- [58] 다음으로 Bicine-NaOH buffer (pH 8)를 50~1,000 mM 조건으로 하여, 10 g/L의 BHET를 포함하는 PET 글라이콜리시스 산물을 기질로 하고, 부피는 500 μ L로 효소 가수분해반응을 진행하였다. *IsPETase^{Mut}* 효소와 *IsMHETase^{Mut}* 효소 투입량은 각각 2.3 U/L로 하였다. 그 결과, 도 6g에서 Bicine-NaOH buffer (pH 8)의 농도가 증가함에 따라 산물인 TPA이 시간 별로 증가하는 것을 확인할 수 있다. 이는 효소 가수분해반응 조건의 pH 수용력이 높아질수록 산물인 TPA에 의한 pH 감소 효과가 적어지고, 이를 통해 유지된 pH로 효소의 활성이 유지됨을 알 수

있다.

- [59] 또한 높은 농도의 pH 조건에서 효소의 활성 저해 효과가 없는 것을 확인하여, 효소 가수분해반응 조건에 높은 농도의 버퍼가 필수적임을 알 수 있다. 본 연구에서 실험적으로 가수분해효소반응 조건에 Sodium phosphate buffer의 경우 600 mM, Bicine-NaOH buffer의 경우 1 M, Tris-HCl 버퍼의 경우 1 M을 만들 수 있다. pH 수용력을 위해 높은 농도의 pH 조건을 만족시킬 수 있는 Bicine-NaOH buffer와 Tris-HCl buffer를 사용하고자 했다. 따라서 반응 조건을 10 g/L의 BHET를 기질로 하여, *IsPETase^{Mut}* 효소와 *IsMHETase^{Mut}* 효소 투입량은 각각 2.3 U/L로 하고, 부피는 500 μ l로, buffer를 1 M Bicine-NaOH buffer (pH 8)와 1 M Tris-HCl buffer (pH 8)로 달리한 효소 가수분해반응을 진행했다. 40°C에서 6시간동안 반응시켜 샘플을 메탄올에 희석하고 25,188 g, 10분 원심분리하여 상층액을 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography, HPLC) 분석을 하였다. 그 결과, 도 6h에서 1 M Bicine-NaOH buffer (pH 8) 조건에서 반응 결과를 크로마토그래피로 확인했고, 도 6i에서 1 M Tris-HCl buffer (pH 8) 조건에서 반응 결과를 크로마토그래피로 확인했다. 도 6h의 반응 후 샘플에서 기질인 BHET이 TPA으로 100% 전환된 것을 확인할 수 있다. 하지만 도 6i의 반응 후 샘플에서 BHET가 TPA으로 100% 전환되는 것이 아닌 미지의 피크가 생겨나는 것을 확인했다. 그러므로 효소 가수분해반응에 사용할 버퍼는 1 M Bicine-NaOH buffer (pH 8)로 확립하였다.
- [60] 다음으로 도 6c와 동일 조건에서 버퍼만 1 M Bicine-NaOH buffer (pH 8)로 바꾸어 효소 가수분해반응을 진행했다. 그 결과, 도 6j에서 반응 3시간 지점부터 2.3 U/L, 4.5 U/L, 그리고 9.0 U/L 효소 투입량 조건의 산물인 TPA의 양이 비슷해지는 것을 확인했다. 이를 통해 기질 대비 효소 투입량을 9.0 U/L이 아닌, 2.3 U/L로 하여도 충분히 효소 가수분해반응이 원활히 진행되는 것을 알 수 있고, 이는 효소를 적정량 사용하여 낭비되는 효소를 줄일 수 있다. 그러므로 효소 투입량은 2.3 U/L로 하여 추후 효소 가수분해반응의 조건을 확립하였다.
- [61] 효율적이고 경제적인 공정을 구축하기 위해서는 한 번의 효소 가수분해반응을 통해 고농도 및 고수율의 산물을 얻는 것이 유리하다. 그러므로 기질의 농도를 최대한 높여 빠른 시간내에 효소 가수분해반응의 산물인 TPA을 고농도로 얻고자 했다. 반응 조건에서, 10~50 g/L의 BHET를 포함하는 PET 글라이콜리시스 산물을 기질로 하고, 부피는 500 μ l로, *IsPETase^{Mut}* 효소와 *IsMHETase^{Mut}* 효소 투입량은 각각 2.3 U/L로, 1 M Bicine-NaOH buffer (pH 8)로 하였다. 40°C에서 12시간동안 반응시켜 샘플을 메탄올에 희석하고 25,188 g, 10분 원심분리하여 상층액을 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography, HPLC) 분석을 하였다. 그 결과, 도 6k에서 10~40 g/L의 BHET를 포함하는 PET 글라이콜리시스 산물을 기질로 하였을 때, 산물인 TPA의 생성량이 증가하였지만, 50 g/L의 BHET를 포함하는 PET 글라이콜리시스 산물을 기질로 하였을 때, 산물인 TPA의 생성량이 반응 12시간 지점 기준으로 40

g/L의 BHET를 포함하는 PET 글라이콜리시스 산물을 기질의 조건과 큰 차이가 없는 것을 확인했다. 이를 통해, 본 연구의 효소 가수분해반응의 1 M Bicine-NaOH buffer (pH 8) 조건이 50 g/L의 BHET를 포함하는 PET 글라이콜리시스 산물을 기질로 하였을 때, 생성되는 TPA의 산성도를 완충하지 못 하고, pH가 떨어지며 효소 활성을 저해하는 것을 알 수 있다.

[62] 도 6l에서, 도 6k의 각 기질 투입량 조건별 12시간 샘플의 수율을 계산했다. 좌측 Y 축은 넣어준 초기 PET 대비 이론적 TPA의 수득량에 대한 실제 얻은 TPA의 수율이다. 우측 Y 축은 넣어준 초기 BHET 대비 이론적 TPA의 수득량에 대한 실제 얻은 TPA의 수율이다. 그 결과, 50 g/L의 BHET를 포함하는 PET 글라이콜리시스 산물을 기질로 하였을 때, 수율이 다른 기질 투입량에 비해 현저히 감소하는 것을 확인했다. 도 6k의 기질 투입량별 TPA의 농도와 도 6l의 기질 투입량별 TPA의 수율을 고려했을 때, 효소 가수분해반응은 기질투입량이 40 g/L의 BHET를 포함하는 PET 글라이콜리시스 산물일 경우 가장 효율적인 조건으로 확립하였다. 이후 생물학적 공정인 전세포전환의 기질로 본 조건으로 진행된 효소 가수분해반응물을 기질로 사용했다.

[63] 도 6l의 좌측 및 우측 Y 축을 비교 확인하면, 투입해준 BHET의 양보다 많은 TPA이 산물로 생성되는 것을 알 수 있다. 이를 통해 베타인을 촉매로 이용한 PET 글라이콜리시스의 주요 산물이 BHET이지만, 액체 크로마토그래피 상으로 측정할 수 없는 부분이 중합체(polymer)로 존재하는 것이 아니라 사슬 길이가 상대적으로 짧은 올리고머로 예상했다. 이를 확인하기 위하여 여러가지 기질로 하여 효소 가수분해반응을 진행했다. 기질로 PET 과립(granule) 20 mg, PET 글라이콜리시스 산물을 증류수로 세척하여 얻은 침전물(oligomer) 20 mg, BHET 40 g/L, 그리고 40 g/L의 BHET를 포함하는 PET 글라이콜리시스 산물을 사용했다. 부피는 500 μ l로, *IsPETase*^{Mut} 효소와 *IsMHETase*^{Mut} 효소 투입량은 각각 2.3 U/L로, 1 M Bicine-NaOH buffer (pH 8)로 하였다. 40°C에서 24시간동안 반응시켜 샘플을 메탄올에 희석하고 25,188g, 10분 원심분리하여 상층액을 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography, HPLC) 분석을 하였다. 그 결과, 도 6m에서 중합도가 높은 PET 과립(granule) > PET 글라이콜리시스 산물을 증류수로 세척하여 얻은 침전물(oligomer) > BHET > PET 글라이콜리시스 산물 순으로 산물인 TPA의 농도가 낮아지는 것을 확인했다. 이를 통해 중합체보다 사슬의 길이가 짧을수록 반응의 속도가 빠른 것을 알 수 있다. 그리고 PET 글라이콜리시스 산물을 증류수로 세척하여 얻은 침전물(oligomer)의 경우, TPA의 생성 속도가 PET 과립(granule)과 PET 글라이콜리시스 산물 및 BHET 사이인 것을 통해, 베타인을 촉매로 이용한 PET 글라이콜리시스 산물에서 액체 크로마토그래피 상으로 측정할 수 없는 부분이 중합체(polymer)로 존재하는 것이 아니라 사슬 길이가 상대적으로 짧은 올리고머라는 것을 실험적으로 확인했다.

[64] <실시예 5> 효소 가수분해반응물을 기질로 하여 플랫폼 화합물질로 전환

가능한 균주 준비

- [65] 도 7a에 TPA를 PCA으로 전환하기 위해 효소 가수분해반응물을 기질로 하여 플랫폼 화합물질로 전환 가능한 균주 모식도를 나타냈다. TPA의 PCA으로 전환은 2단계로 진행된다. TPA이 우선 TphAabc 효소를 통해 1,2-dihydroxy-3,5-cyclo-hexadiene-1,4-dicarboxylate (DCD)로 전환된다. 이 때 NAD(P)H가 같이 작용하여 NAD(P)⁺가 생성된다. 1,2-dihydroxy-3,5-cyclo-hexadiene-1,4-dicarboxylate (DCD)는 TphB 효소를 통해 PCA으로 전환된다. 이 때 NAD(P)⁺가 같이 작용하여 NAD(P)H와 CO₂가 생성된다. 그러므로 TPA를 PCA으로 전환하기 위해서 TphAabc 유전자와 TphB 유전자가 삽입된 재조합 플라스미드를 발현균주에 형질전환해야한다. TphAabc 유전자를 pKE112 플라스미드에 클로닝하였다. TphAabc 유전자와 pKE112 플라스미드를 제한효소 KpnI 및 HindIII로 자른 후, pKE112-TphAabc를 구축하기 위해 라이게이션을 시켰다. 마찬가지로 TphB 유전자를 pKM212 플라스미드에 클로닝하였다. TphB 유전자와 pKM212 플라스미드를 제한효소 EcorI 및 KpnI로 자른 후, pKM212-TphB를 구축하기 위해 라이게이션을 시켰다. 이 플라스미드 2개를 대장균 XL1-Blue에 형질전환 시켰다. 제작된 균주가 도 7a의 Engineered *E. coli* strain PCA-1이다.
- [66] 도 7d에 EG를 GLA로 전환 모식도를 나타냈다. EG의 GLA로 전환은 2단계로 진행된다. EG가 우선 mADH 효소를 통해 글리콜알데하이드(glycolaldehyde)로 전환된다. 이 때 NAD(P)⁺가 같이 작용하여 NAD(P)H와 H⁺가 생성된다. 글리콜알데하이드(glycolaldehyde)는 (m)ALDH 효소를 통해 GLA으로 전환된다. 이때 NAD(P)⁺와 H₂O가 같이 작용하여 NAD(P)H와 H⁺가 생성된다. 글루코노박터 옥시단스의 경우 다양한 종류의 폴리올(polyol) 수소이탈효소(dehydrogenase)를 가지고 있어 넓은 범위의 당과 당알코올을 산화시킬 수 있다. 그러므로 EG를 GLA로 전환하기 위해 글루코노박터 옥시단스(KCCM 40109) 균주를 이용했다. 이 균주가 도 7d의 *G. oxydans*이다.
- [67] <실시예 6> 효소 가수분해반응물을 기질로 하여 플랫폼 화합물질로 고농도 및 고수율 전세포전환
- [68] 이렇게 구축된 균주인 Engineered *E. coli* strain PCA-1을 이용해 효소 가수분해반응물을 전세포전환하여 PCA의 생성 및 글루코노박터 옥시단스를 이용해 효소 가수분해반응물을 전세포전환하여 GLA을 생성하고자 하였다.
- [69] 우선 PCA의 생성을 위해 Engineered *E. coli* strain PCA-1을 준비했다. 준비 과정은 다음과 같다. 50 µg/mL의 암피실린과 40 µg/mL의 카나마이신이 포함된 5 mL의 Luria-Bertani(LB)배지에 전배양하였다. 이를 37°C, 그리고 200 rpm 조건에서 밤새 배양했다. 전배양체를 2.8 L 플라스크에서 50 mg/L의 암피실린과 40 mg/L의 카나마이신이 포함된 1 L의 Luria-Bertani(LB)배지에 본 접종 하였다. 이를 37°C, 그리고 200 rpm 조건에서 600 nm 흡광도가 0.5에 도달할 때까지 배양했다. 이 시점에서 IPTG를 0.5 mM 농도로 접종하고, 16°C, 200 rpm, 그리고

18시간 배양하여, 재조합 플라스미드의 유전자 과발현을 유도했다. 유전자가 과발현된 세포를 4,000 g, 20분, 4°C 조건에서 원심분리하여 회수하였다. 회수된 세포는 100 mM Sodium phosphate buffer (pH 6.5)로 세척하였다. 회수된 세포는 100 mL 플라스크에 20 g/L 글라이세롤이 포함된 MR 배지 8 mL에 접종하여 전세포전환 하였다. MR 배지의 조성은 KH_2PO_4 6.7 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 4.0 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.8 g/L, 시트르산(citric acid) 0.8 g/L, Thiamine-HCl 10 mg/L, 그리고 미량 금속 용액 5 mL으로 구성되어있다. 미량 금속 용액의 조성은 FeSO_4 5.46 g/L, CaCl_2 1.51 g/L, ZnSO_4 1.23 g/L, MnSO_4 0.34 g/L, CuSO_4 0.64 g/L, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ 0.09 g/L, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 0.01 g/L로 구성되어있다. 반응 배지에 효소 가수분해반응물을 첨가하여 TPA의 농도가 4.5 g/L가 되도록 하였다. 그리고 양성대조군으로 같은 조건에 TPA 표준물질의 농도가 5.7 g/L가 되도록 첨가하였다. 그 결과, 도 7b에서 TPA의 감소와 PCA의 생성에 대한 시간별 경향을 확인했다. 전세포전환 32시간 지점에서 효소 가수분해반응물을 기질로 한 전세포전환, 그리고 TPA 표준물질을 기질로 한 전세포전환이 모두 반응이 종결된 것을 확인했다. 최종적으로, 효소 가수분해반응물을 기질로 한 전세포전환에서 3.8 g/L의 PCA가 생성되었다. 도 7c에서 감소한 TPA 몰수 대비 생성된 PCA의 몰수로 수율을 나타냈다. 대장균 PCA-1균주는 PET 가수분해물에 포함된 4.5g/L TPA를 3.8g/L PCA로 전환시켜 90.4%(mol/mol)의 몰 수율을 나타냈고 이는 시약 등급 TPA를 사용하여 PCA로 전환한 경우의 결과보다 우수하였다.

- [70] 다음으로 GLA의 생성을 위해 글루코노박터 옥시단스(KCCM 40109)를 준비했다. 준비 과정은 다음과 같다. 솔비톨(sorbitol) 20 g/L, 효모 추출물(yeast extract) 20 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5 g/L, KH_2PO_4 2 g/L, 그리고 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 g/L로 구성된 배지 5 mL에 전배양하였다. 이를 30°C, 그리고 200 rpm 조건에서 밤새 배양했다. 전배양체를 2.8 L 플라스크에서 같은 조건의 배지 1 L에 본 접종 하였다. 이를 30°C, 그리고 200 rpm, 24시간 배양했다. 이후 세포를 4,000 g, 20분, 4°C 조건에서 원심분리하여 회수하였다. 회수된 세포는 100 mL 플라스크에 같은 조건의 배지 10 mL에 접종하여 전세포전환 하였다. 반응 배지에 효소 가수분해반응물을 첨가하여 EG의 농도가 30.6 g/L가 되도록 하였다. 그리고 양성대조군으로 같은 조건에 EG 표준물질의 농도가 34.4 g/L가 되도록 첨가하였다. 그 결과, 도 7b에서 EG의 감소와 GLA의 생성에 대한 시간별 경향을 확인했다. 전세포전환 21시간 지점에서 효소 가수분해반응물을 기질 및 EG 표준물질을 기질로 한 전세포전환이 모두 반응이 종결된 것을 확인했다. 최종적으로, 효소 가수분해반응물을 기질로 한 전세포전환에서 31.4 g/L의 GLA이 생성되었다. 도 7c에서 감소한 EG 몰수 대비 생성된 GLA의 몰수로 수율을 나타냈다. 글루코노박터 옥시단스를 전세포 촉매로 사용한 경우 PET 가수분해물에 있는 30.6g/L의 EG를 31.4g/L의 GLA로 전환시켜 91.6%(mol/mol)의 몰 수율을 나타냈고, 이는 시약 등급 EG를 사용하여 GLA로

전환한 결과인 90.1%(mol/mol)보다 우수하였다. 이를 통해 본 화학적-생물학적 통합공정에서 PET 중합체로 부터 고농도 및 고수율의 PCA과 GLA의 생성이 가능함을 확인했다.

[71] [표1]

PET 유래 기질에 대한 다양한 PET 분해 효소의 활성 비교							
기질	효소	미생물	pH	온도 (°C)	시간 (h)	TPA의 역가 또는 (sum of TPA, MHET and BHET)	참고문헌
Whole slurry of PET glycolysis	<i>IsPETase</i> ^{S121E/D186H/R280A} , <i>IsMHETase</i> ^{V397A}	<i>Ideonella sakaiensis</i>	8.0	40	12	186.7 mM	본 발명
Oligomers of PET glycolysis oligomers	<i>IsPETase</i> ^{S121E/D186H/R280A} , <i>IsMHETase</i> ^{V397A}	<i>I. sakaiensis</i>	8.0	40	3	9.9 mM	본 발명
PET granule	<i>IsPETase</i> ^{S121E/D186H/R280A} , <i>IsMHETase</i> ^{V397A}	<i>I. sakaiensis</i>	8.0	40	24	61.7 μM	본 발명
PET film	<i>IsPETase</i> ^{Wild}	<i>I. sakaiensis</i>	7.0	30	18	(0.3 mM)	Yoshida <i>et al.</i>
PET (drinking bottle fabrics)	<i>IsPETase</i> ^{Y58A}	<i>I. sakaiensis</i>	9.0	30	20	21 nM (54.0 nM)	Liu <i>et al.</i>
PET film	<i>IsPETase</i> ^{R280A}	<i>I. sakaiensis</i>	9.0	30	36	15.7 μM (31.9 μM)	Joo <i>et al.</i>
PET film	<i>IsPETase</i> ^{S121E/D186H/R280A}	<i>I. sakaiensis</i>	9.0	40	72	37.6 μM (120.9 μM)	Son <i>et al.</i>
PET coupon	<i>IsPETase</i> ^{W159L/S238F}	<i>I. sakaiensis</i>	7.2	30	96	0.8 mM (1.2 mM)	Austin <i>et al.</i>
PET film	<i>IsPETase</i> ^{S214H/I168R/W159H/S188Q/R280A/A180I/G185A/Q119T/L117F/T140D}	<i>I. sakaiensis</i>	9.0	40	240	(3.4 mM)	Cui <i>et al.</i>
PET film	<i>IsPETase</i> ^{I179F}	<i>I. sakaiensis</i>	8.5	30	48	6.4 mM	Ma <i>et al.</i>
PET film	Hydrolase (TfH)	<i>Thermobifida fusca</i>	7.0	30	18	(< 0.1 mM)	Yoshida <i>et al.</i>
PET film	Cutinase (LOC)	Leaf-branch compost	7.0	30	18	(< 0.1 mM)	Yoshida <i>et al.</i>
PET film	Cutinase (Fsc)	<i>Fusarium solani</i>				(< 0.1 mM)	Yoshida <i>et al.</i>
Amorphous PET	Cutinase (Fsc)	<i>F. solani</i>	8.0	30	96	0.9 mM	Vertomme <i>et al.</i>
PET fabric	Hydrolase (Tfu _{Q132A/T101A})	<i>T. fusca</i>	7.5	60	48	19.3 mM	Silva <i>et al.</i>
PET flake from a recycling plant	Cutinase (HiC), lipase (CALB)	<i>Humicola insolens</i> , <i>Candida antarctica</i>	7.0	60 to 37 ¹	24	13.6 mM	de Castro <i>et al.</i>
Amorphous PET	Cutinase (HiC), lipase (CALB)	<i>H. insolens</i> , <i>C. antarctica</i>	7.0	60 to 37 ¹	24	60.0 mM	de Castro <i>et al.</i>

¹ 효소 가수분해반응은 60°C에서 HiC 효소로 3시간 반응 후, 37°C에서 CALB 효소로 21시간 반응했다.

[72] [32]

catalyst	input PET (g)	temp. (°C)	EG (g) (or PET/ EG, mol/mol)	catalyst (mg) (or catalyst/PET, wt %)	reaction time (min)	collective yield of of BHET and MHET (%) ^a	titer of BHET (g/L)	titer of MHET (g/L)
betaine	11.5	190	11.14 (1:3)	57.5 (0.5)	30	34.6	256.8	24.9
	10.0	190	12.92 (1:4)	none ^b	30	16.8	117.1	N.D. ^c
	10.0	190	12.92 (1:4)	10.0 (0.1)	30	26.6	185.3	N.D.
	10.0	190	12.92 (1:4)	50.0 (0.5)	30	52.3	330.6	27.6
	10.0	190	12.92 (1:4)	100.0 (1)	30	42.4	286.9	6.8
	10.0	190	12.92 (1:4)	50.0 (0.5)	60	58.7	368.6	32.8
	10.0	190	12.92 (1:4)	50.0 (0.5)	90	55.1	341.2	35.1
	10.0	190	12.92 (1:4)	50.0 (0.5)	120	53.8	313.8	50.4
	9.0	190	14.54 (1:5)	45.0 (0.5)	30	52.7	307.6	21.6
	8.0	190	15.50 (1:6)	40.0 (0.5)	30	51.6	268.3	19.1
	6.0	190	19.37 (1:10)	30.0 (0.5)	30	49.8	189.8	6.7
	3.5	190	22.60 (1:20)	17.5 (0.5)	30	37.2	81.3	2.9
TBD	10.0	190	12.92 (1:4)	50.0 (0.5) ^d	60	55.1	328.4	45.9

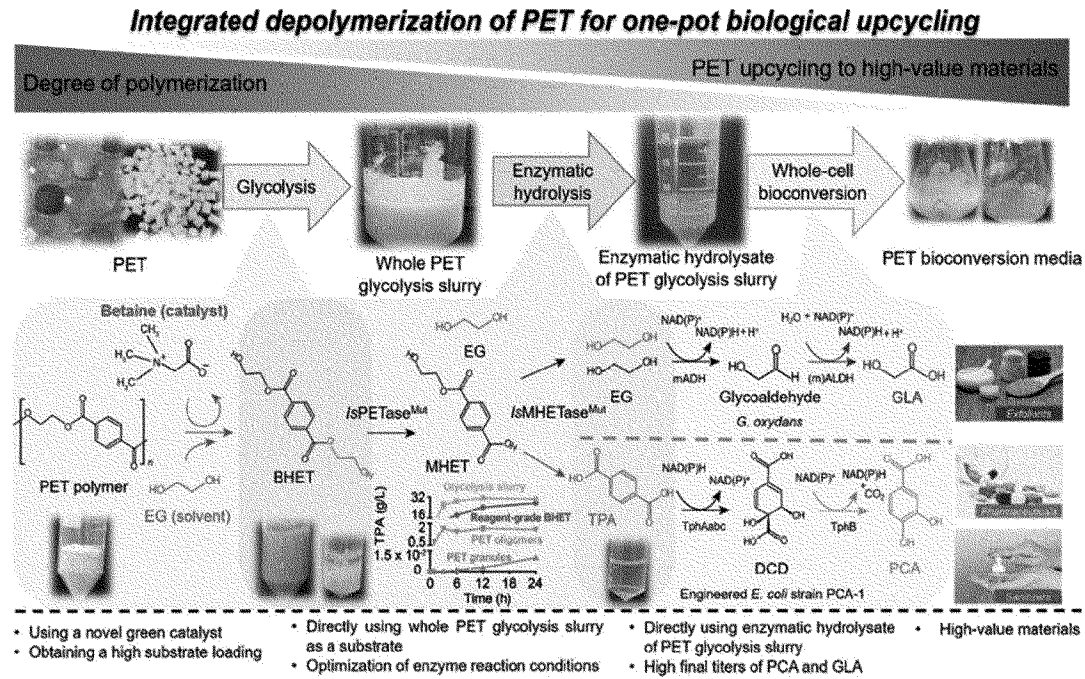
^aYield of BHET and MHET = (concentration (g/L) of BHET and MHET) × (total reaction volume (L))/(theoretical maximal content (g) of BHET and MHET from input PET). ^bNo catalyst was used. ^cNot detected. ^dTBD was used as a catalyst for glycolysis to compare the catalyst performance of betaine and organic catalysts.

청구범위

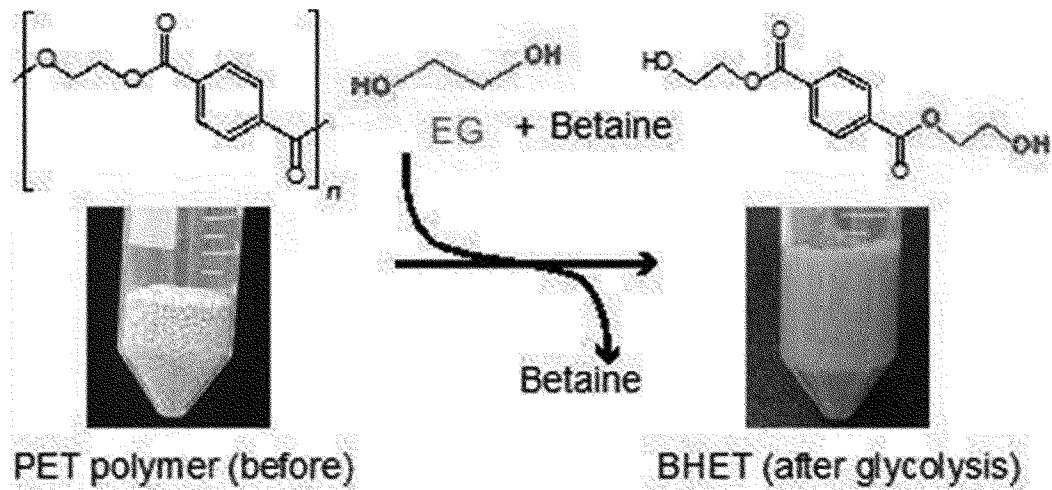
- [청구항 1] 베테인(betaine)을 촉매로 사용하여 글라이콜리시스(glycolysis)를 통해 폴리에틸렌테레프탈레이트(Poly(ethylene terephthalate), PET)를 저중합체로 분해하는 방법.
- [청구항 2] 베테인(betaine) 촉매하에서 폴리에틸렌테레프탈레이트(Poly(ethylene terephthalate), PET)의 글라이콜리시스(glycolysis)를 통해 비스-2-히드록시에틸테레프탈레이트(bis(2-hydroxyethyl) terephthalate, BHET)를 생산하는 단계;
생산된 BHET는 효소 가수분해를 통해 모노-2-히드록시에틸테레프탈레이트(mono(2-hydroxyethyl) terephthalate, MHET)를 거쳐 테레프탈산 및 에틸렌글리콜로 분해되는 단계; 및 생체촉매 하에서 상기 테레프탈산은 생물변환을 통해 프로토크테추산(protocatechuic acid, PCA)으로 전환되거나, 에틸렌 글리콜은 발효를 통해 글리콜산(glycolic acid, GLA)으로 전환되는 단계를 포함하는 폴리에틸렌테레프탈레이트로부터 고부가가치 화합물의 생산방법.
- [청구항 3] 제 1항 또는 제 2항에 있어서,
폴리에틸렌테레프탈레이트의 글라이콜리시스는 에틸렌글리콜 용매하에서 마이크로파를 인가하여 수행되는 방법.
- [청구항 4] 제 2항에 있어서,
상기 BHET는 *Is*PETase에 의해서 MHET로 가수분해되고, 상기 MHET는 *Is*MHETase에 의해서 테레프탈산 및 에틸렌글리콜로 가수분해되는 것인 폴리에틸렌 테레프탈레이트로부터 고부가가치 화합물의 생산방법.
- [청구항 5] 제 4항에 있어서,
상기 *Is*PETase는 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어지고, 상기 *Is* MHETase는 서열번호 2로 표시되는 염기서열로 이루어지는 것인 폴리에틸렌 테레프탈레이트로부터 고부가가치 화합물의 생산방법.
- [청구항 6] 제2항에 있어서,
테레프탈산의 프로토크테추산으로의 생물변환은 테레프탈산 1,2-디옥시게네이즈 및 1,2-디히드록시-3,5-사이클로헥사디엔-1,4-디카르복실레이트 디히드로게네이즈를 발현하는 미생물을 생체촉매로 사용하여 수행되는, 폴리에틸렌 테레프탈레이트로부터 고부가가치 화합물의 생산방법.
- [청구항 7] 제2항에 있어서,
에틸렌 글리콜의 발효는 글루코노박터 옥시단스(*G. oxydans*) KCCM 40109, 클로스트리디움 글리콜리쿰(*Clostridium glycolicum*) 및 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*)로 이루어진 군에서 선택된 하나

이상을 포함하는 에틸렌 글리콜 발효 미생물을 사용하여 수행되는,
폴리에틸렌 테레프탈레이트로부터 고부가가치 화합물의 생산방법.

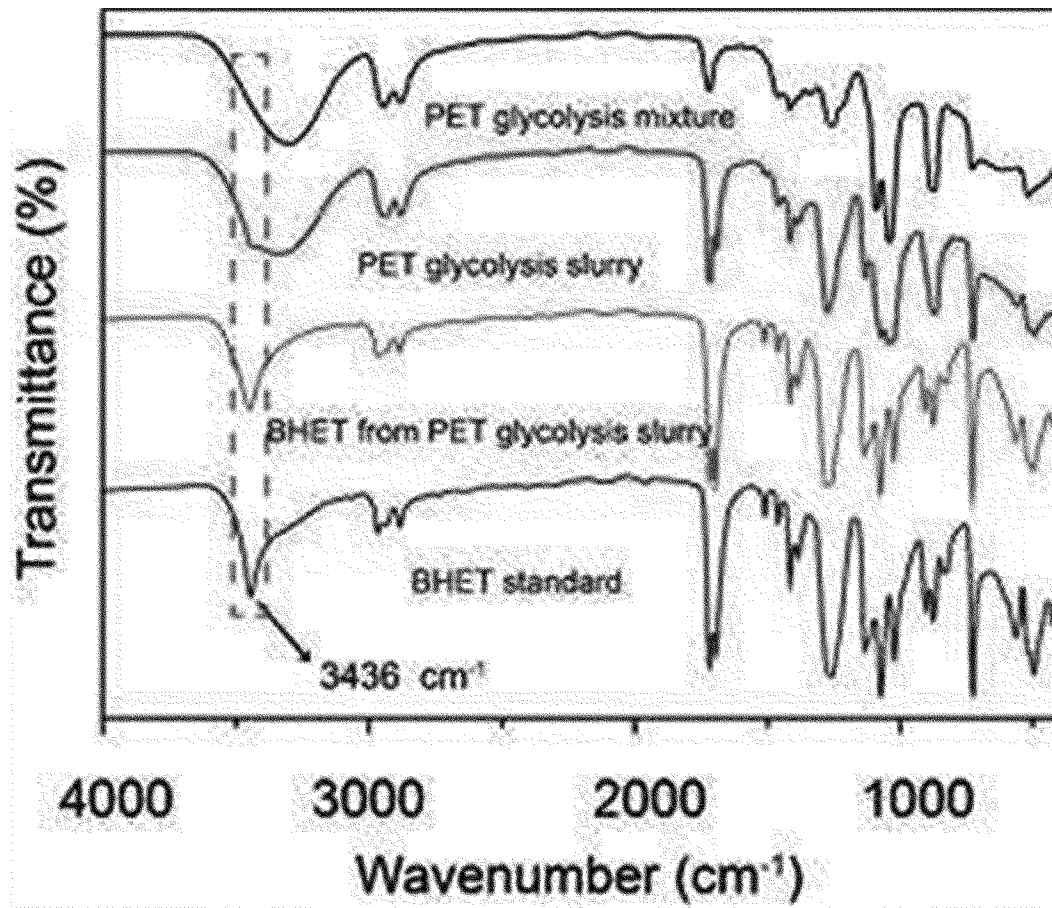
[도1]



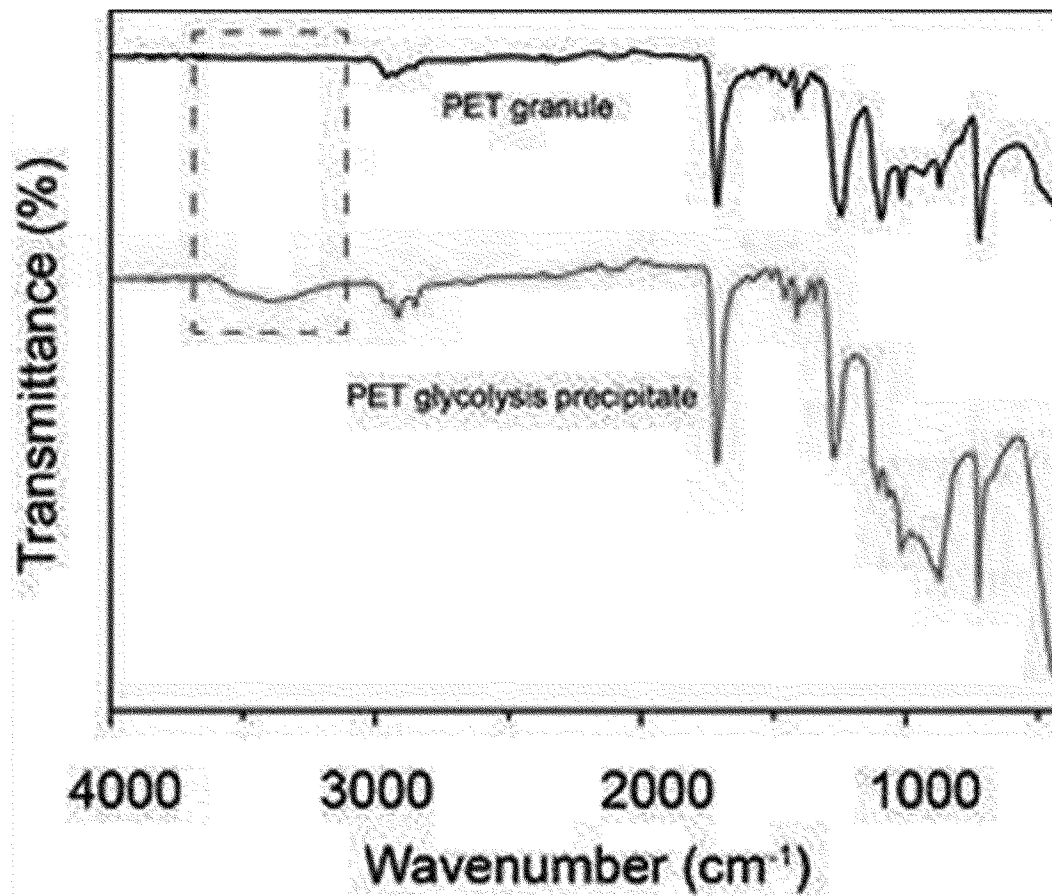
[도2a]



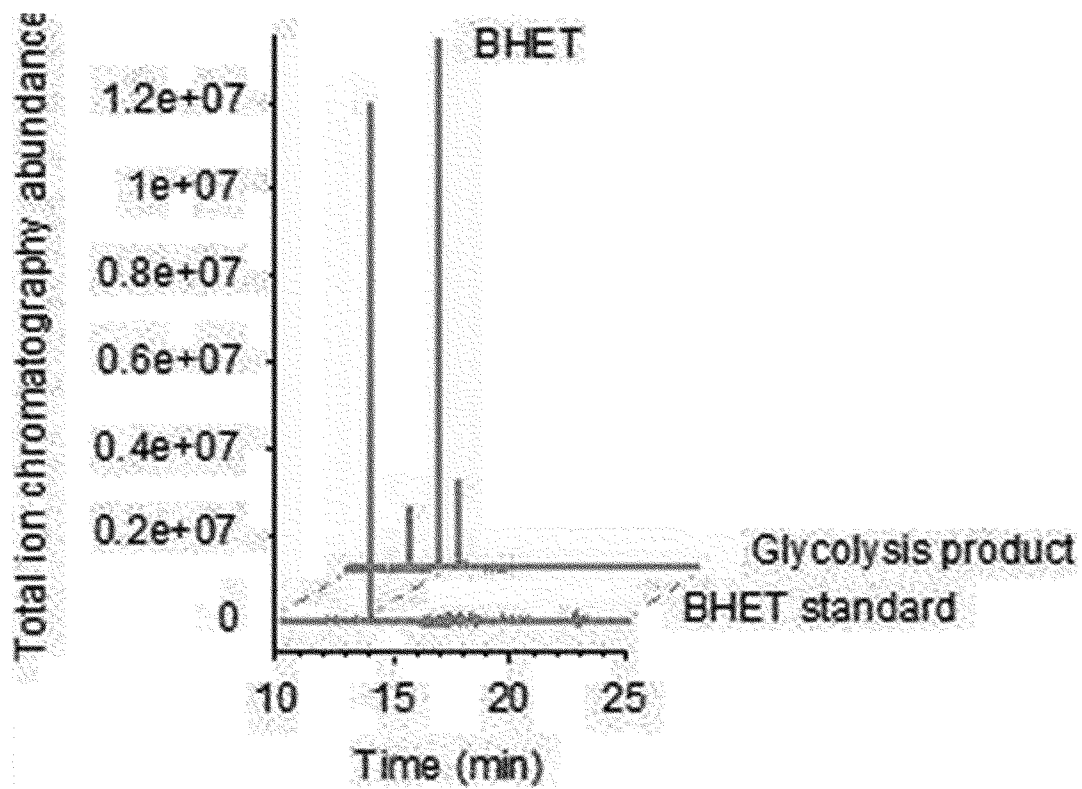
[도2b]



[도2c]

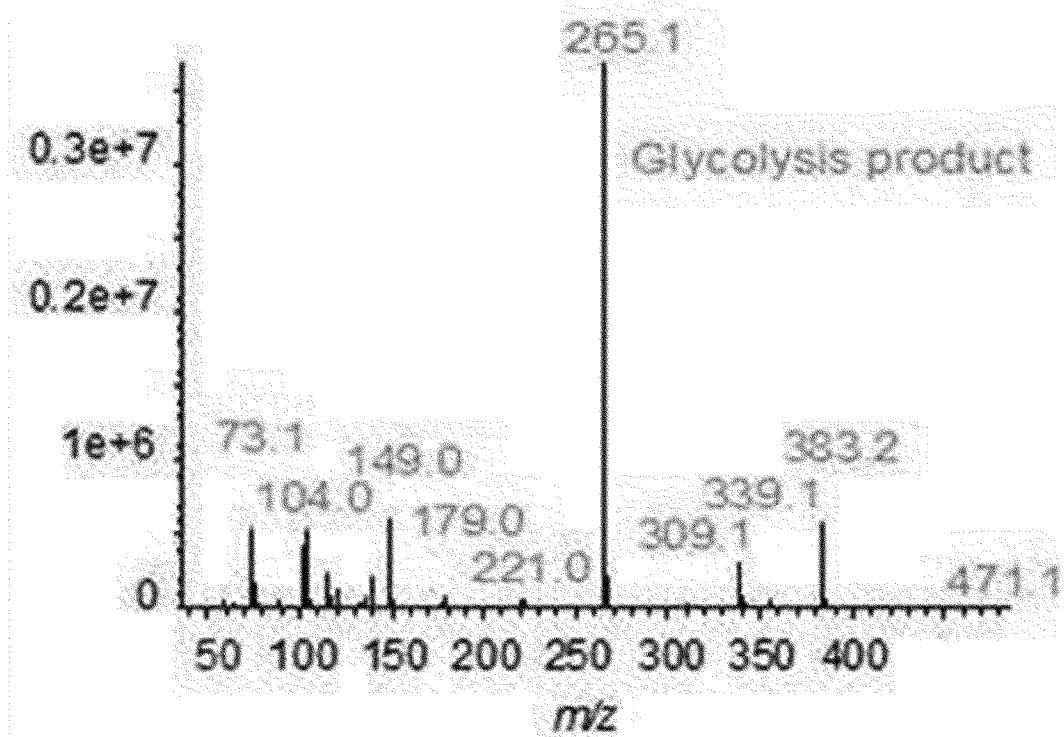


[도2d]

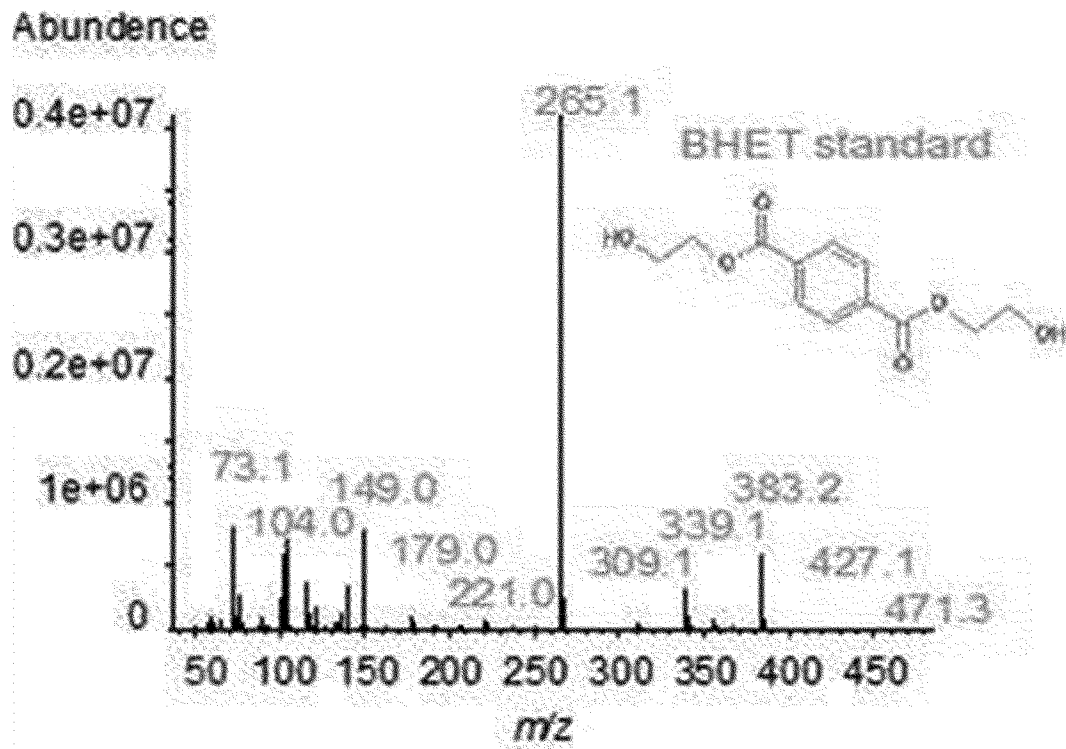


[도2e]

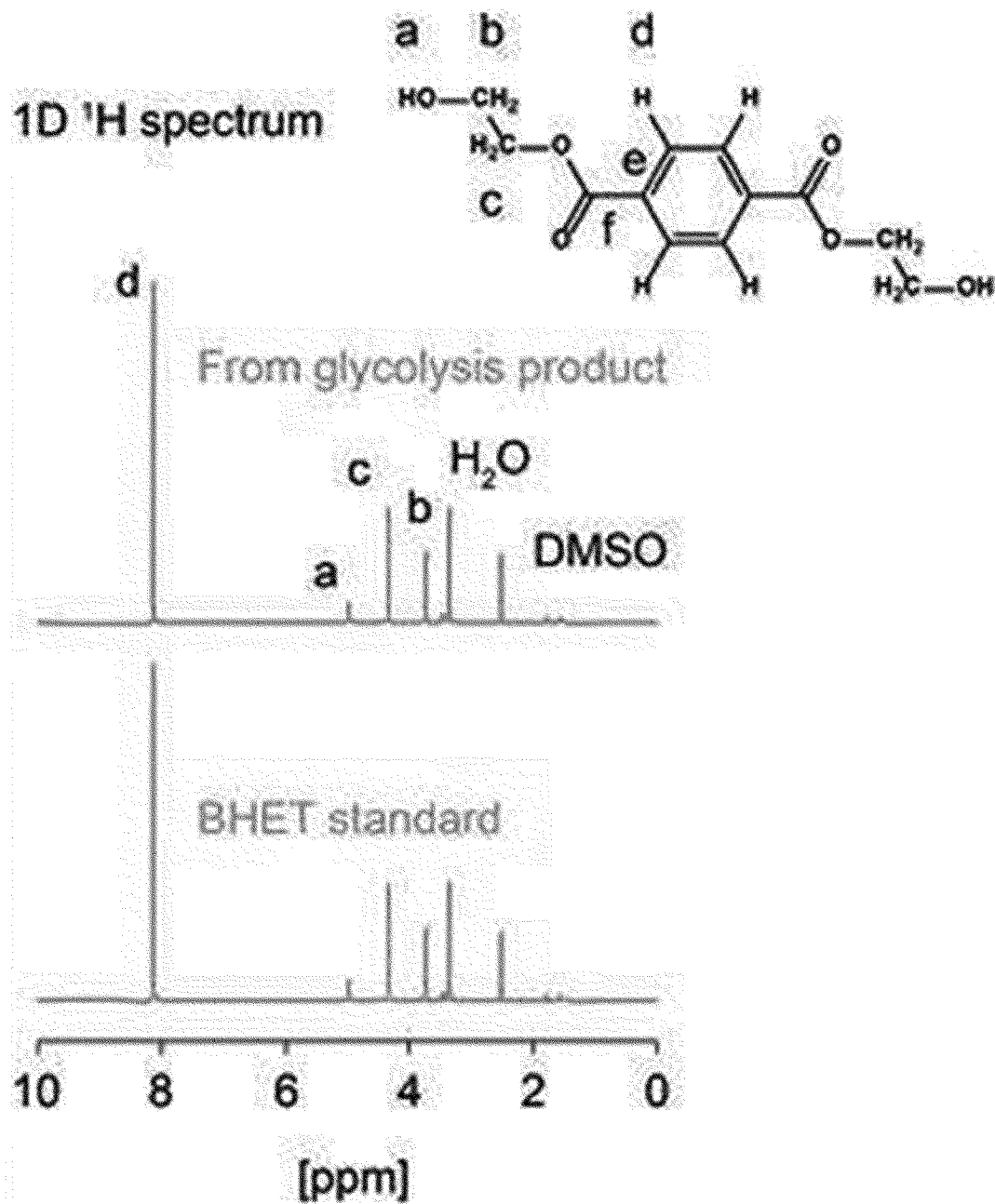
Abundance



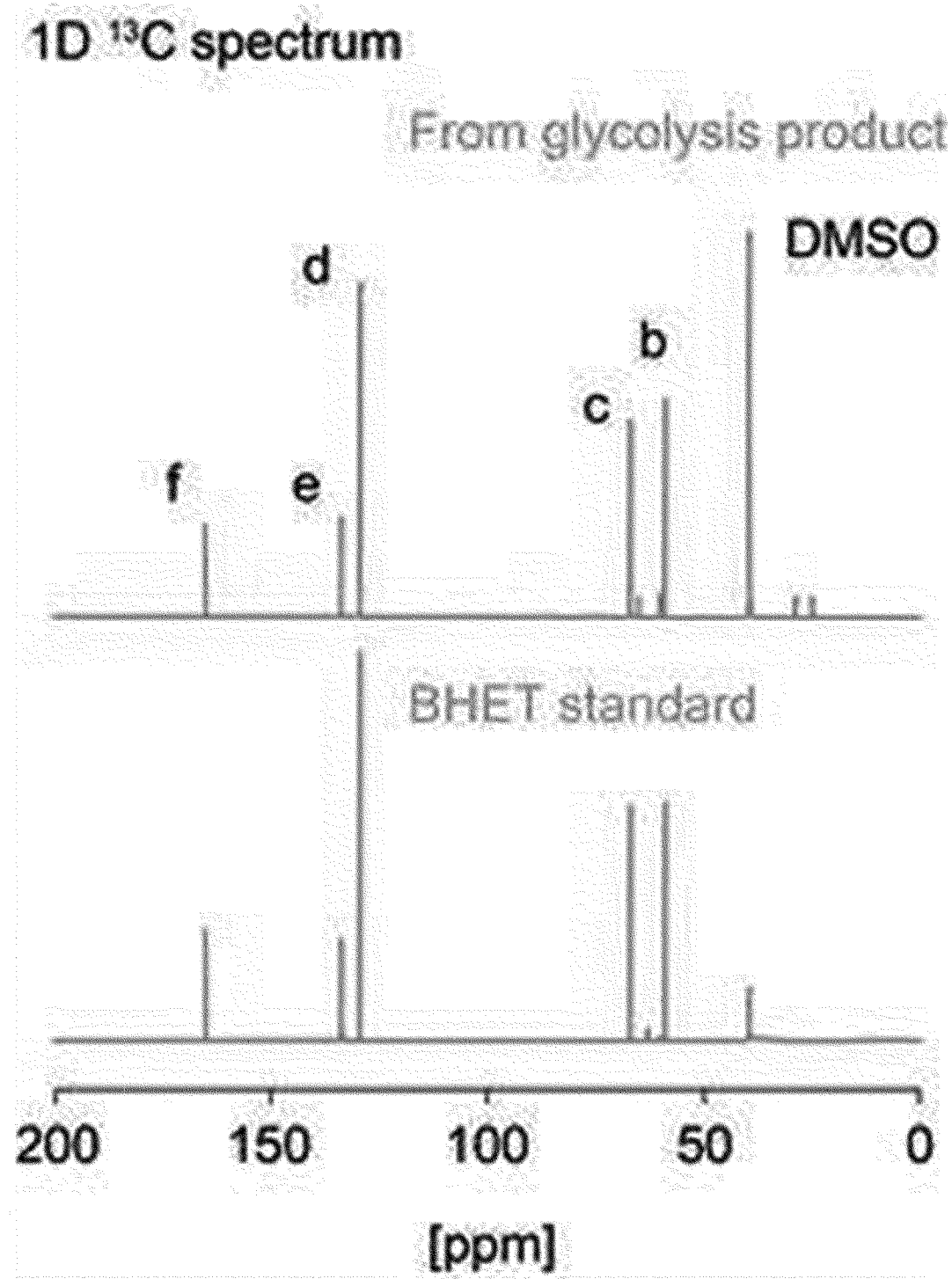
[도2f]



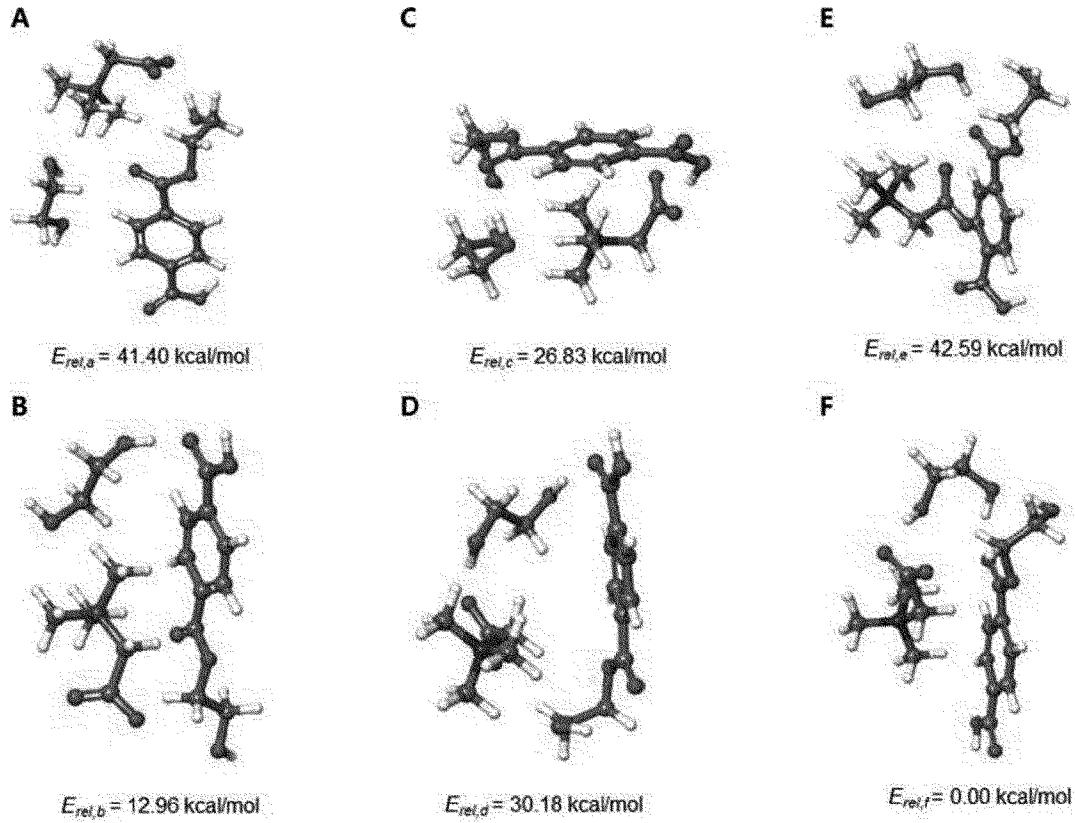
[도2g]



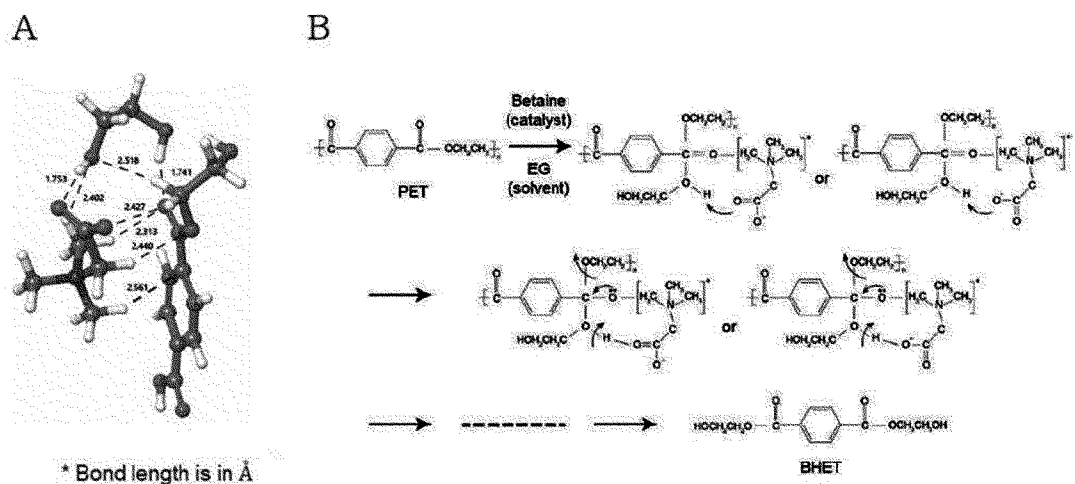
[도2h]



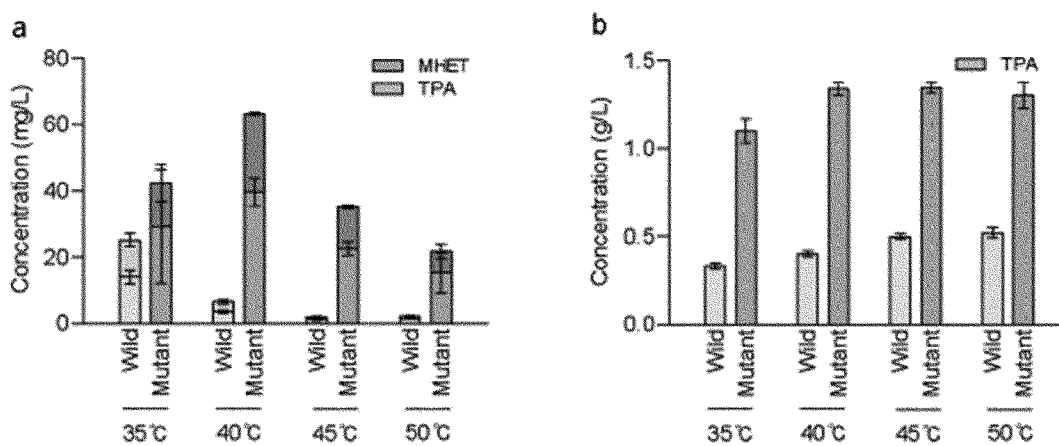
[도3]



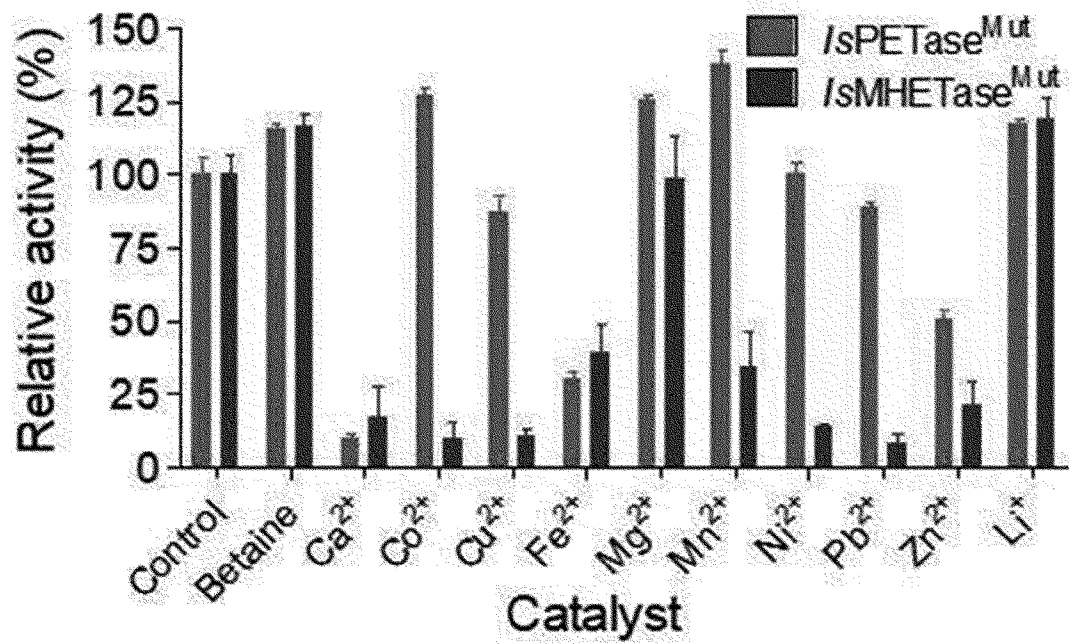
[도4]



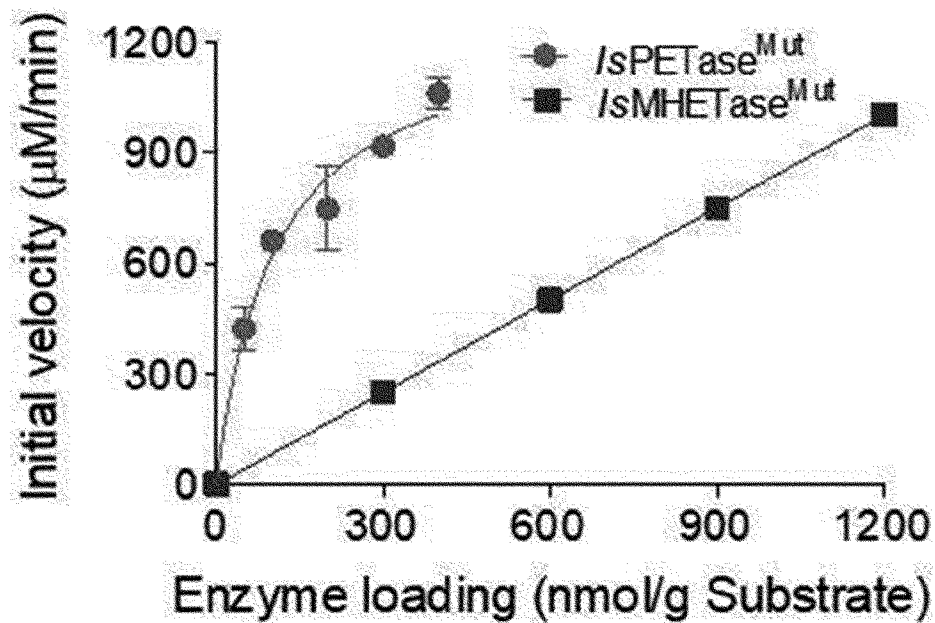
[도5]



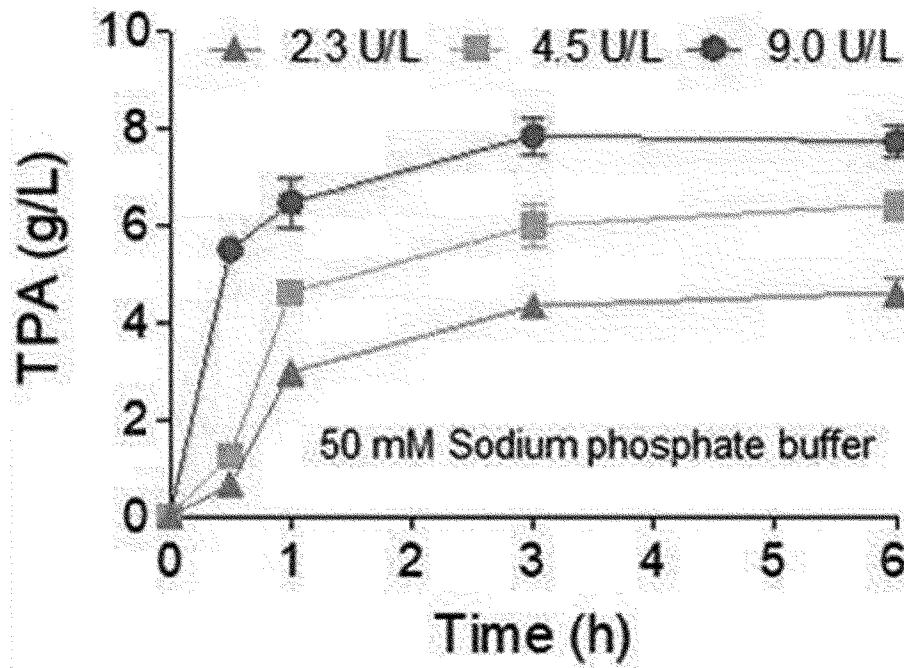
[도6a]



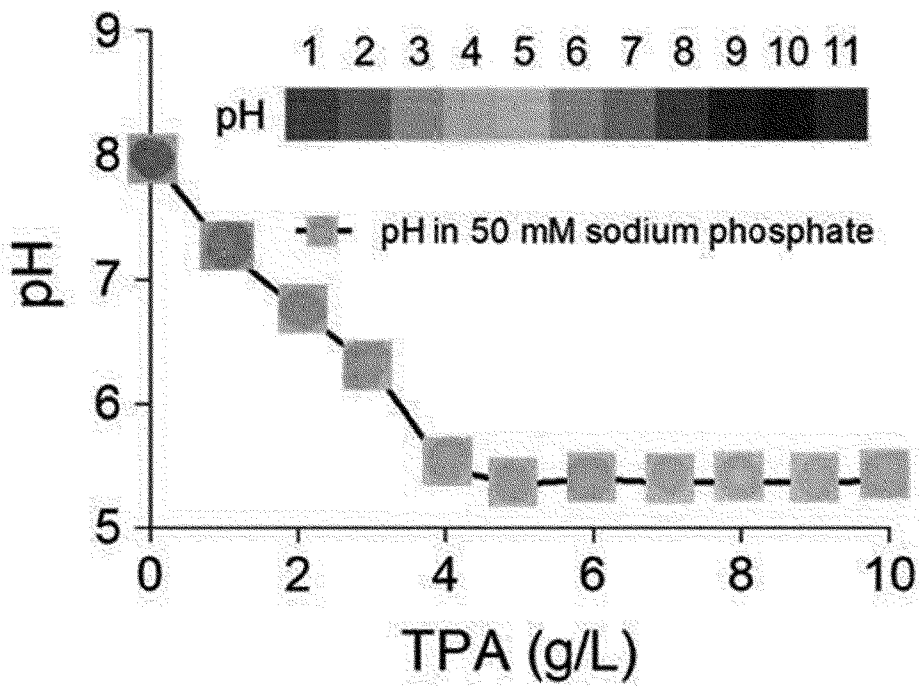
[도6b]



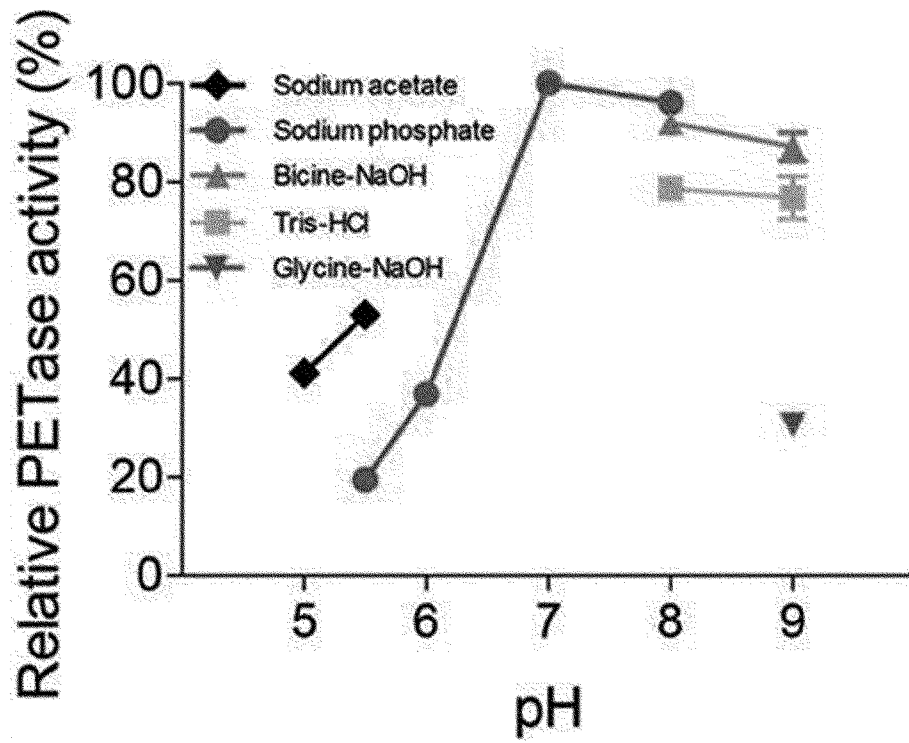
[도6c]



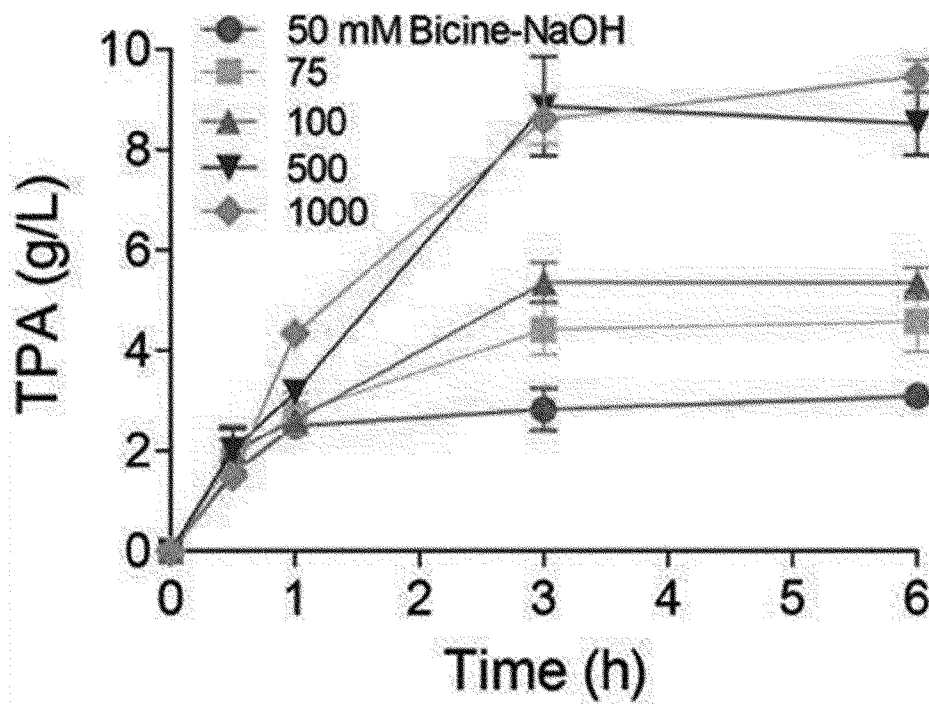
[도6d]



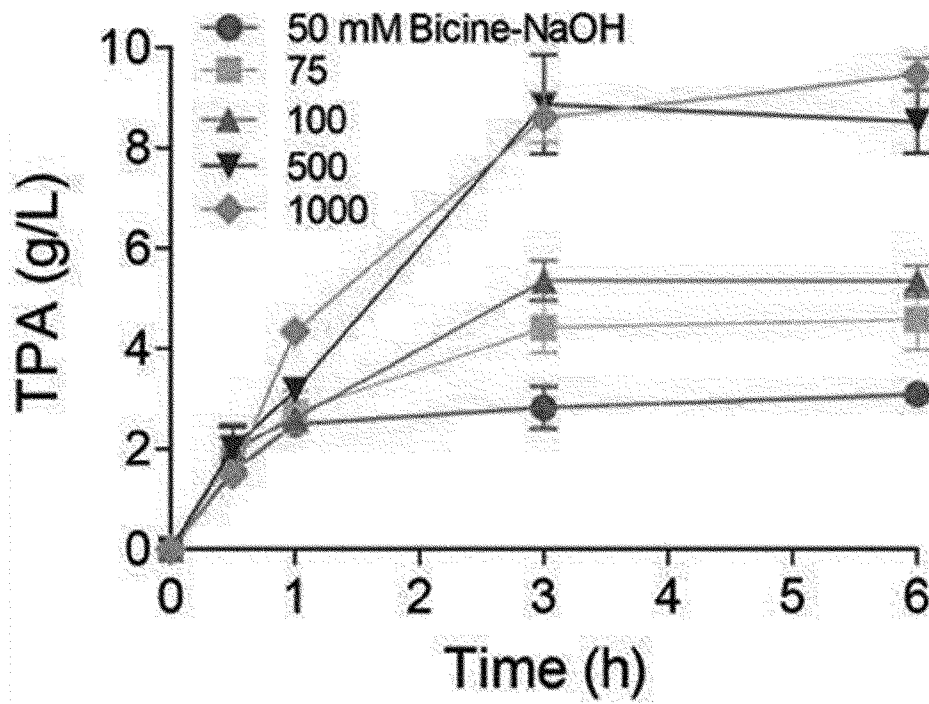
[도6e]



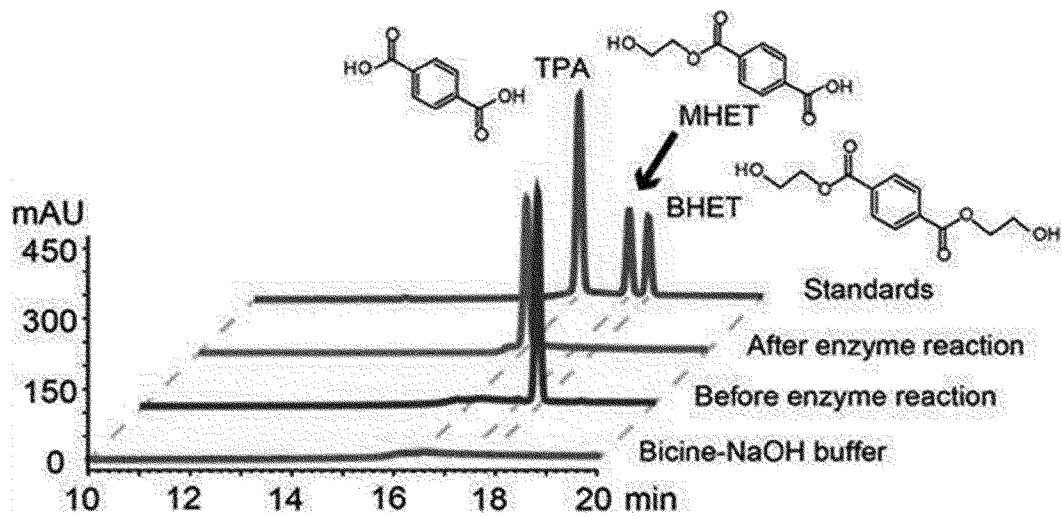
[도6f]



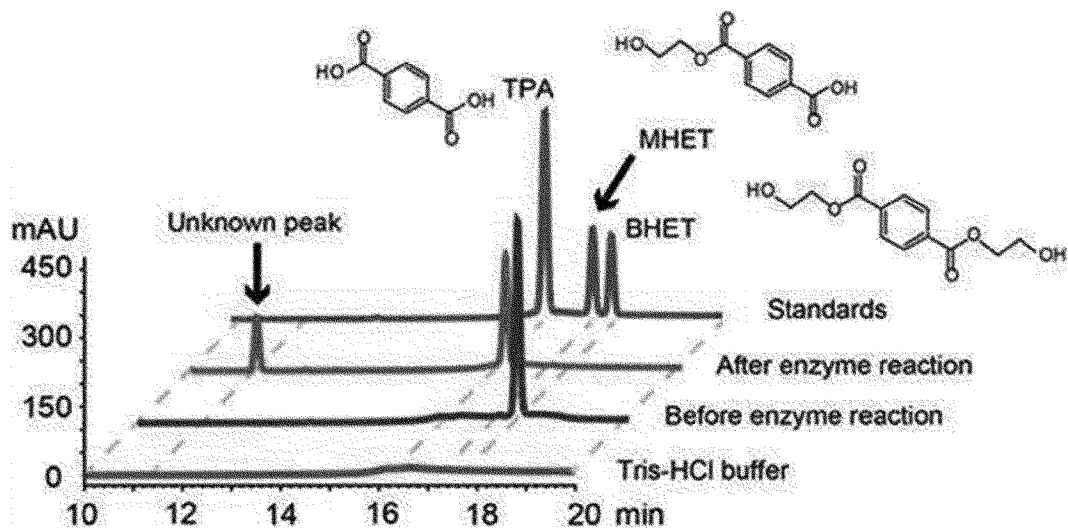
[도6g]



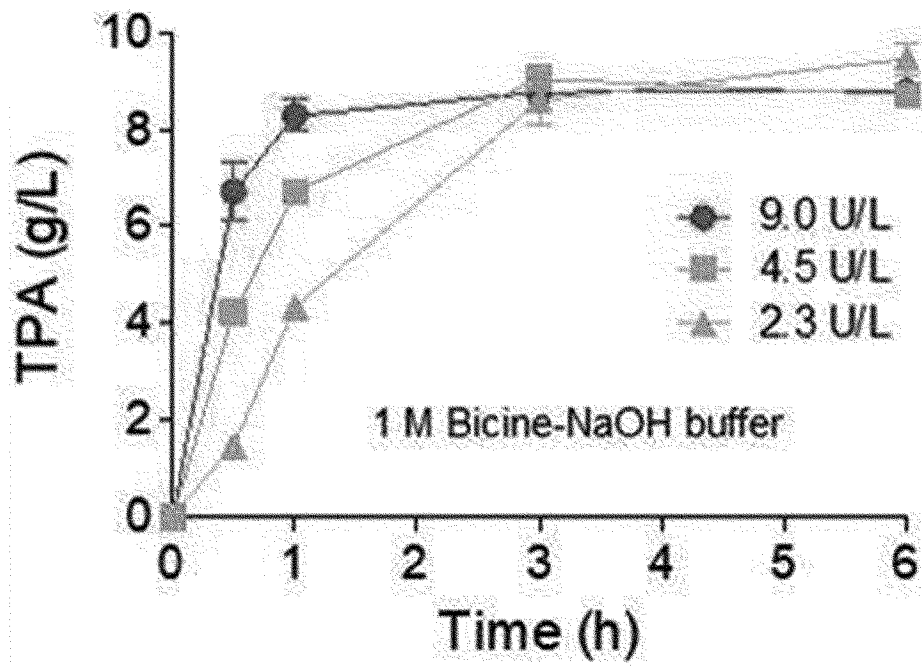
[도6h]



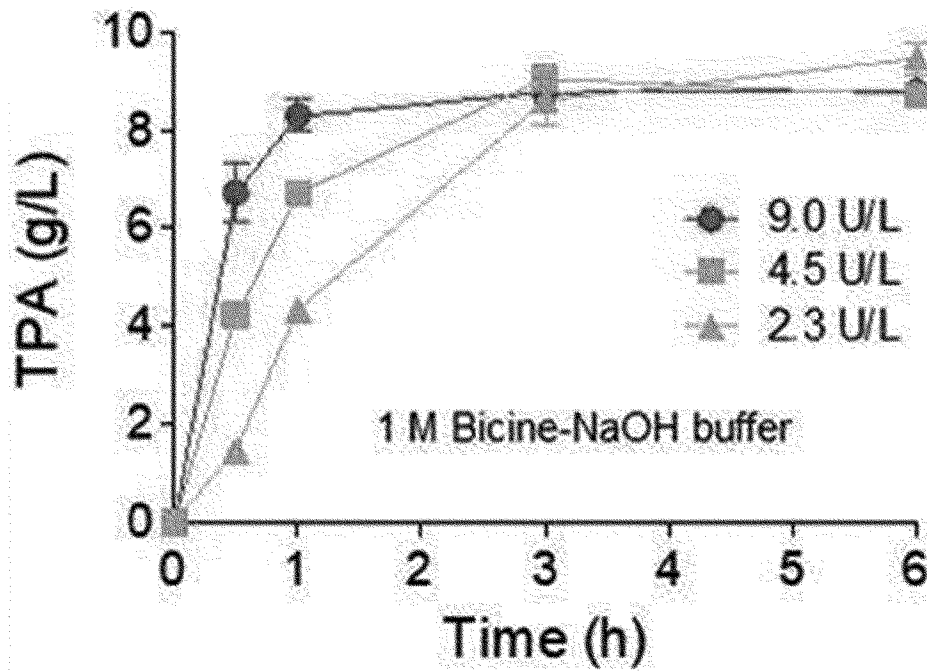
[도6i]



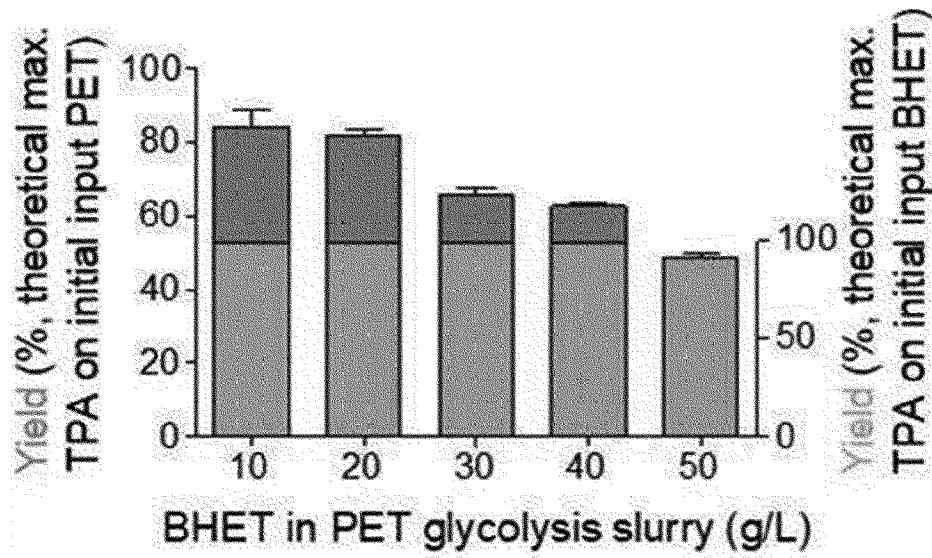
[도6j]



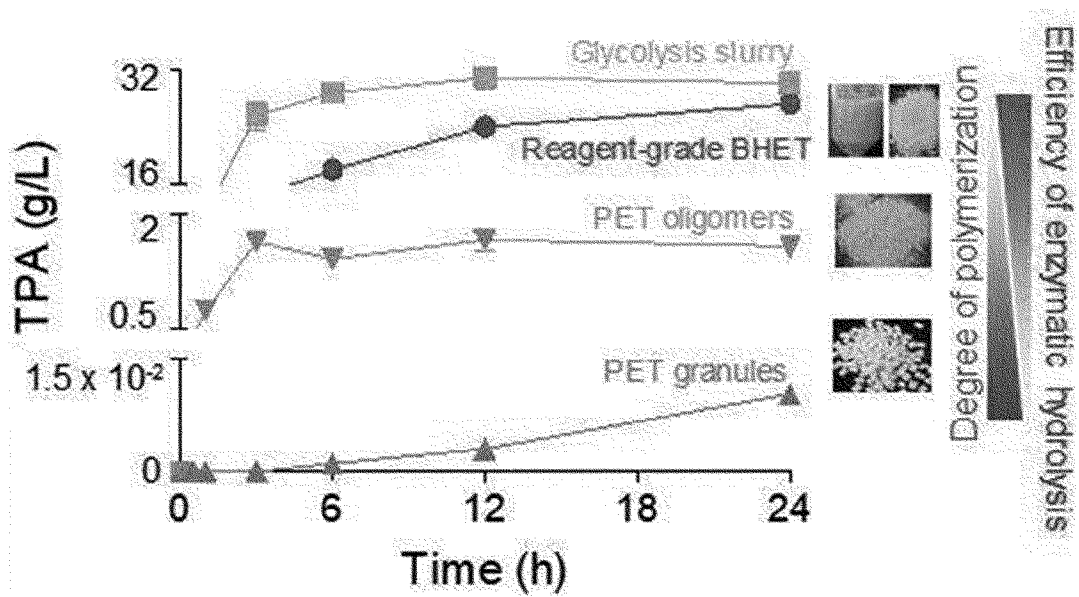
[도6k]



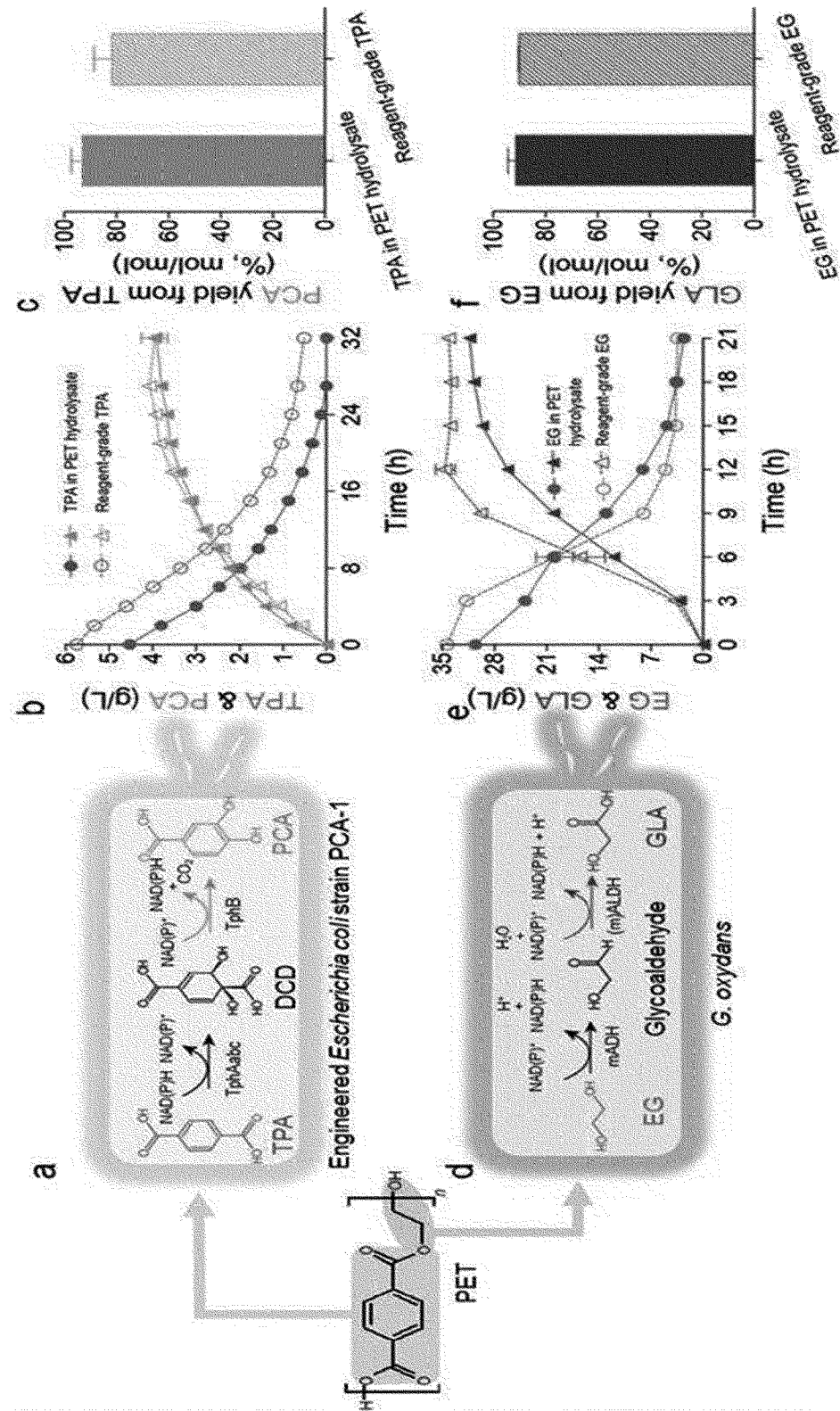
[도6]



[도6m]



[도7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/002784

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C08J 11/10(2006.01)i; B29B 17/04(2006.01)i; B09B 5/00(2006.01)i; C12P 7/40(2006.01)i; B29B 17/02(2006.01)i; B29K 67/00(2006.01)n 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) C08J 11/10(2006.01); C07C 67/48(2006.01); C08J 11/16(2006.01); C08J 11/18(2006.01); C08J 11/24(2006.01); C12N 15/56(2006.01); C12P 7/22(2006.01); C12P 7/40(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: 베타인(betaine), 폴리에틸렌테레프탈레이트(polyethylene terephthalate, PET), 글라이콜리시스(glycolysis)																	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>WO 2019-053392 A1 (PETRÓLEO BRASILEIRO S.A. - PETROBRAS et al.) 21 March 2019 (2019-03-21) See abstract; and claims 1-8.</td> <td>1-7</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 10508186 B2 (THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT CHAPEL HILL) 17 December 2019 (2019-12-17) See abstract; and claims 1-15.</td> <td>1-7</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>KNOTT, B. C. et al. Characterization and engineering of a two-enzyme system for plastics depolymerization. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2020, vol. 117, no. 41, pp. 25476-25485. See abstract; figure 2; and pages 25476-25477 and 25483.</td> <td>1-7</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>KR 10-2020-0119213 A (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION et al.) 19 October 2020 (2020-10-19) See abstract; and claims 1-8.</td> <td>1-7</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	A	WO 2019-053392 A1 (PETRÓLEO BRASILEIRO S.A. - PETROBRAS et al.) 21 March 2019 (2019-03-21) See abstract; and claims 1-8.	1-7	A	US 10508186 B2 (THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT CHAPEL HILL) 17 December 2019 (2019-12-17) See abstract; and claims 1-15.	1-7	A	KNOTT, B. C. et al. Characterization and engineering of a two-enzyme system for plastics depolymerization. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2020, vol. 117, no. 41, pp. 25476-25485. See abstract; figure 2; and pages 25476-25477 and 25483.	1-7	A	KR 10-2020-0119213 A (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION et al.) 19 October 2020 (2020-10-19) See abstract; and claims 1-8.	1-7
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.															
A	WO 2019-053392 A1 (PETRÓLEO BRASILEIRO S.A. - PETROBRAS et al.) 21 March 2019 (2019-03-21) See abstract; and claims 1-8.	1-7															
A	US 10508186 B2 (THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT CHAPEL HILL) 17 December 2019 (2019-12-17) See abstract; and claims 1-15.	1-7															
A	KNOTT, B. C. et al. Characterization and engineering of a two-enzyme system for plastics depolymerization. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2020, vol. 117, no. 41, pp. 25476-25485. See abstract; figure 2; and pages 25476-25477 and 25483.	1-7															
A	KR 10-2020-0119213 A (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION et al.) 19 October 2020 (2020-10-19) See abstract; and claims 1-8.	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 08 June 2022		Date of mailing of the international search report 09 June 2022															
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.															

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/002784**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2018-168679 A1 (KEIO UNIVERSITY) 20 September 2018 (2018-09-20) See abstract; and claims 1-12.	1-7
PX	KIM, D. H. et al. One-pot chemo-bioprocess of PET depolymerization and recycling enabled by a biocompatible catalyst, betaine. ACS Catalysis. 23 March 2021, vol. 11, pp. 3996-4008. See abstract; figures 1-2 and 4; table 1; and pages 3999-4000 and 4006.	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/002784

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 13*ter*.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 13*ter*.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.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/KR2022/002784

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2019-053392	A1	21 March 2019	AU	2017-431676	A1	13 June 2019
				CA	3038610	A1	21 March 2019
				CN	109952344	A	28 June 2019
				JP	2021-503035	A	04 February 2021
				US	2020-255621	A1	13 August 2020
US	10508186	B2	17 December 2019	BR	112018009561	A2	06 November 2018
				CA	3004759	A1	26 May 2017
				CN	108602974	A	28 September 2018
				CN	108602974	B	04 May 2021
				CN	112940344	A	11 June 2021
				EP	3377569	A1	26 September 2018
				EP	3377569	B1	11 September 2019
				ES	2749736	T3	23 March 2020
				MX	2018006023	A	01 August 2018
				PL	3377569	T3	31 January 2020
				US	10858493	B2	08 December 2020
				US	2018-0319950	A1	08 November 2018
				US	2020-0056009	A1	20 February 2020
				US	2021-0047495	A1	18 February 2021
				WO	2017-087752	A1	26 May 2017
KR	10-2020-0119213	A	19 October 2020	CN	114008211	A	01 February 2022
				WO	2020-209607	A1	15 October 2020
WO	2018-168679	A1	20 September 2018	EP	3597753	A1	22 January 2020
				EP	3597753	A4	02 December 2020
				JP	2020-168679	A1	06 February 2020
				US	2020-0283742	A1	10 September 2020

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C08J 11/10(2006.01)i; B29B 17/04(2006.01)i; B09B 5/00(2006.01)i; C12P 7/40(2006.01)i; B29B 17/02(2006.01)i; B29K 67/00(2006.01)n		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C08J 11/10(2006.01); C07C 67/48(2006.01); C08J 11/16(2006.01); C08J 11/18(2006.01); C08J 11/24(2006.01); C12N 15/56(2006.01); C12P 7/22(2006.01); C12P 7/40(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: 베타인(betaine), 폴리에틸렌테레프탈레이트(poly(ethylene terephthalate, PET), 글라이콜리시스(glycolysis)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	WO 2019-053392 A1 (PETRÓLEO BRASILEIRO S.A. - PETROBRAS 등) 2019.03.21 요약; 청구항 1-8	1-7
A	US 10508186 B2 (THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT CHAPEL HILL) 2019.12.17 요약; 청구항 1-15	1-7
A	KNOTT, B. C. 등, 'Characterization and engineering of a two-enzyme system for plastics depolymerization', Proceedings of the National Academy of Sciences, 2020, 117권, 41호, 페이지 25476-25485 초록; 도면2; 페이지 25476-25477, 25483	1-7
A	KR 10-2020-0119213 A (고려대학교 산학협력단 등) 2020.10.19 요약; 청구항 1-8	1-7
A	WO 2018-168679 A1 (KEIO UNIVERSITY) 2018.09.20 요약; 청구항 1-12	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 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2022년06월08일(08.06.2022)		국제조사보고서 발송일 2022년06월09일(09.06.2022)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
PX	KIM, D. H. 등, 'One-pot chemo-bioprocess of PET depolymerization and recycling enabled by a biocompatible catalyst, betaine', ACS Catalysis, 2021.03.23, 11권, 페이지 3996-4008 초록; 도면 1-2, 4; 표 1; 페이지 3999-4000, 4006	1-7

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
WO 2019-053392 A1	2019/03/21	AU 2017-431676 A1	2019/06/13
		CA 3038610 A1	2019/03/21
		CN 109952344 A	2019/06/28
		JP 2021-503035 A	2021/02/04
		US 2020-255621 A1	2020/08/13
US 10508186 B2	2019/12/17	BR 112018009561 A2	2018/11/06
		CA 3004759 A1	2017/05/26
		CN 108602974 A	2018/09/28
		CN 108602974 B	2021/05/04
		CN 112940344 A	2021/06/11
		EP 3377569 A1	2018/09/26
		EP 3377569 B1	2019/09/11
		ES 2749736 T3	2020/03/23
		MX 2018006023 A	2018/08/01
		PL 3377569 T3	2020/01/31
		US 10858493 B2	2020/12/08
		US 2018-0319950 A1	2018/11/08
		US 2020-0056009 A1	2020/02/20
		US 2021-0047495 A1	2021/02/18
		WO 2017-087752 A1	2017/05/26
KR 10-2020-0119213 A	2020/10/19	CN 114008211 A	2022/02/01
		WO 2020-209607 A1	2020/10/15
WO 2018-168679 A1	2018/09/20	EP 3597753 A1	2020/01/22
		EP 3597753 A4	2020/12/02
		JP 2020-168679 A1	2020/02/06
		US 2020-0283742 A1	2020/09/10