

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

(43) 국제공개일
2022년 5월 12일 (12.05.2022) WIPO | PCT

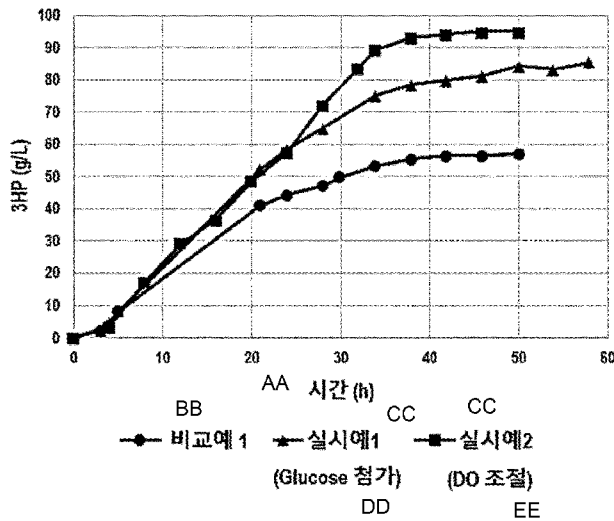
WO 2022/098162 A1

- (51) 국제특허분류: C12P 7/52 (2006.01) C12N 9/88 (2006.01) 188 LG화학 기술연구원, Daejeon (KR). 허인영 (HUH, In Young); 34122 대전시 유성구 문지로 188 LG화학 기술연구원, Daejeon (KR).
C12P 7/42 (2006.01) C12N 9/02 (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2021/016057
- (22) 국제출원일: 2021년 11월 5일 (05.11.2021)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2020-0147146 2020년 11월 5일 (05.11.2020) KR
10-2020-0147147 2020년 11월 5일 (05.11.2020) KR
- (71) 출원인: 주식회사 엘지화학 (LG CHEM, LTD.) [KR/KR]; 07336 서울시 영등포구 여의대로 128, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 이경목 (LEE, Kyung Muk); 34122 대전시 유성구 문지로 188 LG화학 기술연구원, Daejeon (KR). 김재형 (KIM, Jae Hyung); 34122 대전시 유성구 문지로
- (74) 대리인: 유미특허법인 (YOU ME PATENT AND LAW FIRM); 06134 서울시 강남구 테헤란로 115, 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,

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING 3-HYDROXYPROPIONIC ACID

(54) 발명의 명칭: 3-하이드록시프로피온산의 생산 방법

[도2]



AA ... Time (h)
BB ... Comparative Example
CC ... Example
DD ... Glucose addition
EE ... DO control

(57) Abstract: The present invention relates to a two-step production method for 3-HP, comprising: a first step of culturing cells at a high concentration; and a second step of producing 3-HP using the high concentration-cultured cells as a catalyst, in which during the two-step culture, the energy and/or coenzyme balance are adjusted to produce 3-HP and/or improve the productivity of 3-HP. The productivity and yield of 3-HP can be improved.

(57) 요약서: 본 발명은 세포를 고농도로 배양하는 제1단계 및 상기 고농도 배양된 세포를 촉매로 이용하여 3-HP를 생산하는 제2단계를 포함하는 3-HP의 2단계 제조 방법에 있어서 2단계 배양시 에너지 및/또는 조효소 균형을 조절하여 3-HP를 제조 및/또는 3-HP의 생산성을 향상하는 방법에 관한 것으로, 3-HP의 생산성과 수율을 향상시킬 수 있다.

[다음 쪽 계속]



WO 2022/098162 A1

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).

공개:

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

명세서

발명의 명칭: 3-하이드록시프로피온산의 생산 방법

기술분야

- [1] 관련 출원들과의 상호 인용
- [2] 본 출원은 2020년 11월 05일자 대한민국 특허출원 제10-2020-0147146호 및 제10-2020-0147147호에 기초한 우선권의 이익을 주장하며, 해당 한국 특허출원의 문헌에 개시된 모든 내용은 본 명세서의 일부로서 포함된다.
- [3] 본 출원은 3-하이드록시프로피온산(3-hydroxypropionic acid; 3-HP)을 제조하는 방법 및/또는 3-HP의 생산성을 향상하는 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는, 3-HP 생산능을 가지는 세포를 촉매로 이용하여 3-HP를 생산하는 배양시 에너지 및/또는 조효소 균형을 조절하여 3-HP를 제조 및/또는 3-HP의 생산성을 향상하는 방법에 관한 것이다.

[4]

배경기술

- [5] 3-하이드록시프로피온산은 아크릴산(acrylic acid), 아크릴산메틸(methyl acrylate), 아크릴아마이드(acrylamide) 등의 다양한 화학 물질로 전환 가능한 플랫폼 화합물이다. 2004년 미국 Department of Energy(DOE)로부터 Top 12 value-added bio-chemical로 선정된 이후 학계와 산업계에서 활발히 연구되고 있다.
- [6] 3-HP의 생산은 크게 화학적 방법과 생물학적 방법의 두 가지 방법으로 이루어지나, 화학적 방법의 경우 초기 물질이 고가인 점, 생산 과정 중 독성 물질이 생성되는 점 등에 의해 비친환경적이라는 지적이 있어, 친환경적인 바이오 공정이 각광받고 있다.
- [7] 미생물을 이용한 3-HP 생합성을 위한 기질로는 포도당(glucose)과 글리세롤(glycerol)이 주로 이용되고 있으나, 낮은 수율 및 생산성으로 인해 3-HP의 가능성에도 불구하고 아직 상업화에는 이르지 못한 실정이다.

[8]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [9] 이에 본 발명자들은 3-HP의 상업화를 위해 높은 수율 및 생산성을 유지하면서 3-HP 생산 농도를 높일 수 있는 발효 기술을 개발하였다.
- [10] 본 출원의 일 예는 글리세롤(Glycerol)을 탄소원으로 포함하는 배지에 3-하이드록시프로피온산(3-hydroxypropionic acid, 3-HP) 생산능을 가지는 세포를 접종하고, 전자전달계를 활성화하는 조건에서 3-HP를 생산하는 단계를 포함하는, 3-하이드록시프로피온산(3-hydroxypropionic acid; 3-HP)의 제조 방법 및/또는 3-HP의 생산성 향상 방법을 제공한다.

[11]

과제 해결 수단

[12] 본 출원은, 글리세롤(Glycerol)을 탄소원으로 포함하는 배지에 3-하이드록시프로피온산(3-hydroxypropionic acid, 3-HP) 생산능을 가지는 세포를 접종하고, 전자전달계를 활성화하는 조건에서 3-HP를 생산하는 단계를 포함하는, 3-하이드록시프로피온산(3-hydroxypropionic acid; 3-HP)의 제조 방법 및/또는 3-HP의 생산성 향상 방법을 제공한다.

[13] 보다 구체적으로, 상기 방법은,

[14] (1) 3-하이드록시프로피온산(3-hydroxypropionic acid, 3-HP) 생산능을 가지는 세포를 생산 배지에 접종하는 단계; 및

[15] (2) 상기 접종된 세포를 배양하여 3-HP를 생산하는 단계

[16] 를 포함하는 것일 수 있다.

[17] 상기 생산 배지는 탄소원으로 글리세롤을 포함하는 것일 수 있고, 상기 세포 접종시의 생산 배지는 탄소원으로 포도당을 포함하지 않는 것일 수 있다.

[18] 상기 배양은 (i) 상기 생산 배지 또는 배양물 내 용존산소량(DO)을 50% 이하 수준으로 유지하는 조건, (ii) 상기 생산 배지 또는 배양물 내 용존산소량(DO)이 0.1% 이상일 때 포도당을 첨가하는 조건, 또는 (iii) 이들 모두에서 수행되는 것일 수 있다.

[19] 상기 3-HP를 생산하는 단계 (2)는 세포 증식이 일어나지 않는 것일 수 있다.

[20] 다른 예에서, 상기 방법은 앞서 설명한 세포를 생산 배지에 접종하고 배양하여 3-HP를 생산하는 ‘생산 단계’ 이전에, 상기 세포를 고농도 배양 후 배지에서 분리하는 ‘성장/증식 단계’를 추가로 포함하는 2-단계 방법일 수 있다.

[21] 보다 구체적으로, 상기 방법은, 상기 접종하는 단계 (1) 이전에,

[22] (a) 3-하이드록시프로피온산(3-hydroxypropionic acid, 3-HP) 생산능을 가지는 세포를 성장 배지에서 고농도 배양하는 단계; 및

[23] (b) 상기 배양된 세포를 상기 성장 배지로부터 분리하는 단계

[24] 를 추가로 포함할 수 있다.

[25] 상기 성장 배지로부터 분리된 세포를 상기 단계 (1)의 생산 배지에 접종할 수 있다. 상기 성장 배지는 탄소원으로 글리세롤을 포함하지 않는 것일 수 있다.

[26] 이하 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

[27] 본 명세서에서 제공되는 3-HP의 제조 방법 및/또는 3-HP의 생산성 향상 방법은 글리세롤(Glycerol)을 탄소원으로 포함하는 배지 (3-하이드록시프로피온산 생산 배지)에 3-하이드록시프로피온산(3-hydroxypropionic acid, 3-HP) 생산능을 가지는 세포를 접종하고, 전자전달계를 활성화하는 조건, (예를 들어, 용존 산소량을 일정한 수준으로 유지하는 조건 및/또는 포도당을 첨가하는 조건)에서 3-HP를 생산하는 단계를 포함한다.

[28] 상기 3-하이드록시프로피온산 생산 배지는 3-HP 생산 세포의 증식(세포 분열,

성장, 또는 생장)이 일어나지 않으면서 상기 세포가 3-HP를 생산할 수 있도록 하기 위한 목적 범위에서 제한 없이 사용될 수 있다.

- [29] 일 예에서, 상기 생산 배지의 탄소원은 글리세롤일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 일 예에서, 상기 생산용 배지는 비타민 B12를 추가로 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 상기 생산 배지는 세포 접종시에 포도당(glucose)을 포함하지 않는 것일 수 있다.
- [30] 일 예에서 상기 배지는 합성 배지(synthetic media) 또는 반합성배지(semisynthetic media)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [31] 상기 접종용 세포는 상기 3-하이드록시프로피온산(3-hydroxypropionic acid, 3-HP) 생산능을 가지는 세포를 고농도 배양 후 분리하는 단계를 수행하여 준비된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [32] 상기 고농도 배양된 세포의 접종 농도(접종시 세포 농도)는 3-HP 생산 목적 범위에서 통상의 기술자가 적절히 조절 또는 결정할 수 있다. 일 예에서, 상기 접종 농도(건조 세포 중량(Dry cell weight, DCW)/배지 부피(L) 기준)는 1 내지 20 g/L, 1 내지 16 g/L, 1 내지 12 g/L, 1 내지 9 g/L, 2 내지 20g/L, 2 내지 16 g/L, 2 내지 12g/L, 2 내지 9 g/L, 4 내지 20 g/L, 4 내지 16 g/L, 4 내지 12 g/L, 또는 4 내지 9 g/L 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [33] 상기 3-하이드록시프로피온산을 생산하는 단계는, 3-HP를 생산하기 위한 목적 범위에서 당업계에 알려진 배양 방법을 제한 없이 선택하여 사용될 수 있으며, 일 예에서, 상기 배양 단계는 발효 배양(fermentation)으로 수행되는 것일 수 있다.
- [34] 상기 3-HP 생산 단계에서는 접종된 세포의 증식이 일어나지 않는 것일 수 있다. 일 예에서, 상기 생산 단계 종료시 세포의 수는 접종된 세포의 수의 150% 이하, 130% 이하, 100% 이하, 90% 이하, 또는 80% 이하, 예컨대, 50 내지 150%, 50 내지 130%, 50 내지 100%, 50 내지 90%, 50 내지 80%, 70 내지 150%, 70 내지 130%, 70 내지 100%, 70 내지 90%, 또는 70 내지 80%일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [35]
- [36] 상기 전자전달계를 활성화하는 조건(예를 들어, 용존 산소량을 일정한 수준으로 유지하는 조건 및/또는 포도당을 첨가하는 조건)은, 예를 들어, NAD⁺ 조효소의 재생산을 활성화 및/또는 ATP 생산을 활성화하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [37] 상기 전자전달계를 활성화하는 조건은,
- [38] (i) 배지(예를 들어, 3-HP 생산용 배지 및/또는 배양액)에 포도당을 첨가;
- [39] (ii) 배지(예를 들어, 3-HP 생산용 배지 및/또는 배양액) 내 용존산소량(DO)을 일정 수준으로 유지(조절); 또는
- [40] (iii) (i) 및 (ii)의 조합
- [41] 일 수 있다.
- [42] 일 예에서, 상기 전자전달계를 활성화하는 조건은, 배지(예를 들어, 3-HP 생산용 배지 및/또는 배양액)에 포도당을 첨가하여 수행되는 것일 수 있다. 상기

포도당 첨가는 상기 배지 내 용존산소량(DO)이 일정 수준 이상일 때 수행하거나, 배지 내 용존산소량과 무관하게 (예컨대, 배양 후 배지 내 용존산소량이 일정 수준 이상이 되기 전) 수행할 수 있다. 상기 포도당은 세포 성장 목적이 아닌 에너지 공급 목적으로 첨가되는 것일 수 있다.

- [43] 글리세롤을 이용해 3-HP를 생합성을 수행할 때 일정 시점이 되면 NAD⁺와 에너지가 부족해지며 반응 속도가 감소하며 3-HP의 생합성이 중단될 수 있다. 이때 배양(발효) 시작시 0%였던 DO가 상승한다. DO 상승 시점에 포도당을 에너지원으로 첨가함으로써 세포 NAD⁺ 및 ATP를 재공급함으로써 3-HP 생산을 지속시킬 수 있다. 상기 포도당은 배지 내 DO가 일정 수준 이상으로 상승하기 전 및/또는 후에 배지에 첨가할 수 있다.
- [44] 상기 포도당 첨가의 기준이 되는 용존산소량은 3-HP 생산 목적 범위에서 필요에 따라 적절히 선택될 수 있으며, 일 예에서, 포도당 첨가 시점은 배지 내 용존산소량이 배양 개시시보다 상승하기 시작하는 시점일 수 있고, 포도당 첨가의 기준이 되는 배지내 용존산소량은, 예컨대, 0.1% 이상, 0.5% 이상, 1% 이상, 3% 이상, 5% 이상, 10% 이상, 15% 이상, 20% 이상, 25% 이상, 또는 30% 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다 (상한값은 100%, 75%, 또는 50%일 수 있으나 이에 제한되지 않음).
- [45] 일 예에서 상기 첨가되는 포도당의 양(농도; 첨가되는 포도당 중량(g)/배지 부피(L))은 0.01 내지 3g/L, 0.05 내지 3g/L, 0.1 내지 3g/L, 0.3 내지 3 g/L, 0.01 내지 2g/L, 0.05 내지 2 g/L, 0.1 내지 2 g/L, 0.3 내지 2 g/L, 0.01 내지 1 g/L, 0.05 내지 1 g/L, 0.1 내지 1 g/L, 0.3 내지 1 g/L, 0.01 내지 0.7 g/L, 0.05 내지 0.7 g/L, 0.1 내지 0.7 g/L, 0.3 내지 0.7 g/L, 0.01 내지 0.3 g/L, 0.05 내지 0.3 g/L, 또는 0.1 내지 0.3 g/L일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [46] 일 예에서, 상기와 같이 생산용 배지에 포도당을 첨가하여 전자전달계를 활성화시키는 조건에서 3-HP를 생산하는 방법은 포도당을 첨가하지 않는 대조군에 비해 3-HP 생산량이 30% 이상, 40% 이상, 또는 50% 이상, 예컨대, 30 내지 1000%, 30 내지 500%, 30 내지 300%, 30 내지 100%, 40 내지 1000%, 40 내지 500%, 40 내지 300%, 40 내지 100%, 50 내지 1000%, 50 내지 500%, 50 내지 300%, 또는 50 내지 100% 증가하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [47] 다른 예에서, 상기 전자전달계를 활성화하는 조건은, 용존산소량(DO)을 일정 수준으로 유지(조절)하여 수행되는 것일 수 있다.
- [48] 상기 DO의 “일정 수준”은 3-HP 생산 목적 범위에서 제한 없이 결정될 수 있으며, 예를 들어, 50% 이하, 30% 이하, 20% 이하, 10% 이하, 1 내지 50%, 1 내지 30%, 1 내지 20%, 1 내지 10%, 3 내지 50%, 3 내지 30%, 3 내지 20%, 3 내지 10%, 5 내지 50%, 5 내지 30%, 5 내지 20%, 또는 5 내지 10% 수준일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [49] 일 구현예에서 상기 용존산소량의 유지는 배양시 교반 속도 조절, 공기 공급량 조절, 및 압력 조절 등으로 이루어진 균에서 선택된 하나 이상에 의하여

수행되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, 배지 또는 배양물 내 용존산소량이, (1) 상기 범위보다 낮아지면 교반속도, 공기 공급량, 압력 중 하나 이상을 증가시키고, (2) 상기 범위보다 높아지면 교반속도, 공기 공급량, 압력 중 하나 이상을 감소시킴으로써, 배지 또는 배양물 내 용존산소량을 소정의 범위로 유지할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[50] 일 예에서, 상기 용존산소량을 유지(조절)하여 전자전달계를 활성화시키는 조건에서 3-HP를 생산하는 방법은 용존산소량 유지 조건을 포함하지 않는 대조군에 비해 3-HP 생산량이 30% 이상, 50% 이상, 70% 이상, 30 내지 1000%, 30 내지 500%, 30 내지 300%, 30 내지 100%, 50 내지 1000%, 50 내지 500%, 50 내지 300%, 50 내지 100%, 70 내지 1000%, 70 내지 500%, 70 내지 300%, 또는 70 내지 100% 증가하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[51]

[52] 본 명세서에서 제공되는 3-HP의 제조 방법 및/또는 3-HP의 생산성 향상 방법에서, 상기 단계 (1)의 생산 배지에 접종되는 3-하이드록시프로피온산 생산능을 가지는 세포는 성장 배지에서 고농도 배양 후 상기 성장 배지로부터 분리된 세포일 수 있다.

[53] 이를 위하여, 상기 방법은, 상기 3-HP 생산 단계 이전에, 상기 생산 배지에 접종하기 위한 3-하이드록시프로피온산 생산 세포를 고농도 배양 후 분리하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[54] 보다 구체적으로, 상기 방법은, 상기 접종하는 단계(1) 이전에,

[55] (a) 3-하이드록시프로피온산(3-hydroxypropionic acid, 3-HP) 생산능을 가지는 세포를 성장 배지에서 고농도 배양하는 단계; 및

[56] (b) 상기 배양된 세포를 상기 성장배지로부터 분리하는 단계

[57] 를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[58] 이 때, 상기 성장배지로부터 분리된 세포는 상기 단계 (1)의 생산 배지에 접종되는 3-하이드록시프로피온산 생산능을 가지는 세포로 사용될 수 있다. 상기 성장배지는 탄소원으로 글리세롤을 포함하지 않는 것일 수 있다.

[59] 본 명세서에서, 상기 3-하이드록시프로피온산 생산 세포 ('3-하이드록시프로피온산 생산능을 가지는 세포'와 동등한 의미로 혼용 가능)는 생산 배지 내의 탄소원 (예컨대, 글리세롤)으로부터 3-HP를 생산할 수 있는 미생물, 예컨대, *Escherichia* 속 균주 (*E. coli* 등), 슈도모나스 (*Pseudomonas*) 속, 엔테로박테리아 (*Enterobacteria*) 속, 브레비박테리움 (*Brevibacterium*) 속, 코리네박테리움 (*Corynebacterium*) 속, 크렙시엘라 (*Klebsiella*) 속, 시트로박터 (*Citrobacter*) 속, 클로스트리디움 (*Clostridium*) 속, 스트렙토마이세스 (*Streptomyces*) 속, 바실러스 (*Bacillus*) 속, 락토바실러스 (*Lactobacillus*) 속, 슈도모나스 (*Pseudomonas*) 속, 사카로마이세스 (*Saccharomyces*) 속 및 아스퍼질러스 (*Aspergillus*) 속으로 이루어진 미생물에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 일 구체예에서, 상기 3-하이드록시프로피온산 생산 균주는

- 대장균일 수 있다.
- [60] 일 예에서, 상기 3-하이드록시프로피온산 생산 세포는 글리세롤 탈수효소(glycerol dehydratase) 및 알데하이드 탈수소효소(aldehyde dehydrogenase)로 이루어지는 균에서 선택되는 하나 이상 (예컨대, 1개 또는 2개 모두)의 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 것일 수 있다. 일 예에서, 상기 3-HP 생산 세포는 추가로 글리세롤 탈수효소 재활성효소(GdrAB)를 암호화하는 유전자(gdrAB)를 추가로 포함할 수 있다. 일 예에서, 상기 3-HP 생산 세포는 추가로 비타민 B12를 생합성할 수 있는 세포일 수 있다.
- [61] 상기 글리세롤 탈수효소(glycerol dehydratase)는 dhaB(GenBank accession no. U30903.1) 유전자에 의해 암호화되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 dhaB 유전자는 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumonia*)에서 유래한 효소일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 글리세롤 탈수효소를 암호화하는 유전자는 dhaB1, dhaB2 및/또는 dhaB3를 암호화하는 유전자를 포함할 수 있다. 상기 글리세롤 탈수효소 단백질 및 이를 암호화하는 유전자는 글리세롤을 3-하이드록시프로판알(3-hydroxypropanal, 3-HPA)과 물(H₂O)로 분해하는 효소 활성을 유지하는 범위 내에서 유전자 및/또는 아미노산 서열의 변이를 포함할 수 있다.
- [62] 상기 알데하이드 탈수소효소(aldehyde dehydrogenase; ALDH)를 암호화하는 유전자(aldH)는, 예를 들어, 대장균(*Escherichia coli*) 또는 *E. coli* K12 MG1655 세포주에서 유래한 aldH(GenBank Accession no. U00096.3; EaldH) 유전자, 클렙시엘라 뉴모니아(*K. pneumonia*)에서 유래한 puuC 유전자, 및/또는 아조스피릴룸 브라질렌스(*Azospirillum brasilense*) 유래의 KGSADH 유전자일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 알데하이드 탈수소효소 단백질 및 이를 암호화하는 유전자는 3-HPA로부터 3-HP를 생산하기 위한 활성을 유지하는 범위 내에서 유전자 및/또는 아미노산 서열의 변이를 포함할 수 있다.
- [63] 상기 3-HP 생산 세포는 글리세롤 탈수효소, 알데하이드 탈수소효소, 및 글리세롤 탈수효소 재활성효소로 이루어지는 균에서 선택되는 하나 이상, 둘 이상 또는 3종 모두의 단백질을 암호화하는 유전자 또는 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 포함할 수 있다.
- [64] 상기 재조합 벡터는 글리세롤 탈수효소, 알데하이드 탈수소효소, 및 글리세롤 탈수효소 재활성효소로 이루어지는 균에서 선택되는 하나 이상, 둘 이상 또는 3종 모두의 단백질을 암호화하는 유전자를 세포 내에서 발현하기 위한 목적 범위에서 프로모터, 조절 부위를 당업계에 알려진 방법으로 치환하여 사용할 수 있다.
- [65] 상기 고농도 배양은 3-HP 생산 세포를 대량으로 확보하기 위한 목적 범위에서 당업계에 알려진 방법을 제한 없이 사용하여 수행될 수 있으며, 일 예에서, 상기 배양은 유가 배양(fed-batch culture)으로 수행되는 것일 수 있다.
- [66] 일 예에서 상기 유가 배양은 pH-stat 방식, 정속(continuous feeding) 배양 방식,

또는 이들의 조합으로 수행될 수 있다. 일 구현예에서 pH-stat 방식의 유가 배양이 수행되는 경우, 포도당이 1 내지 5g/L 농도로 첨가될 수 있다. 일 구현예에서 정속 배양 방식의 유가 배양이 수행되는 경우 포도당이 10 내지 20g/L/h 속도로 주입될 수 있다.

[67] 일 예에서, 상기 고농도 배양시 pH는 5 내지 7.5, 5 내지 7, 5.5 내지 7.5, 5.5 내지 7, 6 내지 7.5 또는 6.5 내지 6으로 유지될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[68] 일 예에서 상기 고농도 배양시 성장 배지에 포함되는 탄소원은 고농도 배양을 위한 목적 범위에서 단당류, 이당류 및/또는 다당류를 제한 없이 선택하여 사용될 수 있다. 예를 들어, 상기 탄소원은 포도당(glucose), 과당(fructose), 갈락토스(galactose), 만노스(mannose), 아라비노스(arabinose), 자일로스(xylose), 리보스(ribose), 자당(sucrose), 엿당(maltose), 젖당(lactose), 및 셀로비오스(cellobiose)로 이루어지는 군에서 선택되는 하나 이상, 둘 이상, 셋 이상, 넷 이상, 다섯 이상, 열 이상, 또는 상기 11종 모두의 조합일 수 있다. 상기 성장 배지는 탄소원으로 글리세롤을 포함하지 않는 것일 수 있다.

[69] 일 예에서 상기 고농도 배양후 세포 농도는 OD600 (600nm에서 측정된 흡광도(O.D.)) 10 이상, 50 이상, 100 이상, 150 이상, 200 이상, 10 내지 500, 10 내지 400, 10 내지 300, 10 내지 250, 50 내지 500, 50 내지 400, 50 내지 300, 50 내지 250, 100 내지 500, 100 내지 400, 100 내지 300, 100 내지 250, 150 내지 500, 150 내지 400, 150 내지 300, 150 내지 250, 200 내지 500, 200 내지 400, 200 내지 300, 또는 200 내지 250일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[70] 상기 고농도 배양된 세포의 분리는, 세포를 원심분리하는 단계, 상층액을 제거하는 단계, 및 펠렛(pellet)을 버퍼로 재현탁하는 단계로 이루어지는 군에서 선택되는 하나 이상, 둘 이상 또는 상기 단계 모두를 포함할 수 있다. 일 예에서 상기 버퍼는 PBS(Phosphate buffered saline)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[71] 본 명세서에서 제공되는 3-HP의 제조 방법 및/또는 3-HP의 생산성 향상 방법의 3-HP 수율은 예를 들어, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 93% 이상, 또는 95% 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 3-HP 수율은 상기 3-HP를 생산하는 단계에서 배지(생산 배지) 내 글리세롤 사용량(몰수) 대비 배지(배양물) 내 3-HP 생산량으로 계산될 수 있으며, 일 예에서 하기 수학적 1과 같이 계산될 수 있다.

[72] [수학적 1]

[73] 수율 (yield, %) = [(최종 3-HP(g)) / {(배양 전 Glycerol(g)) - (배양 후 남은 Glycerol(g))}] * 100

[74] 본 발명이 제공하는 3-HP 제조 방법 및/또는 3-HP의 생산성 향상 방법의 3-HP 생산능은 2.0 g/L/h 이상, 2.5 g/L/h 이상, 2.0 내지 60 g/L/h, 2.0 내지 40 g/L/h, 2.0 내지 20 g/L/h, 2.0 내지 10 g/L/h, 2.5 내지 60 g/L/h, 2.5 내지 40 g/L/h, 2.5 내지 20 g/L/h, 또는 2.5 내지 10 g/L/h일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[75] 글리세롤은 3-HPA로 전환된 후, 1,3-프로판디올(1,3-propanediol; 1,3-PDO) 로

환원되거나 3-HP로 산화될 수 있다. 본 명세서에서 제공하는 3-HP 제조 방법 및/또는 3-HP의 생산성 향상 방법은 1,3-PDO를 생산하지 않는 것일 수 있다. 따라서 1,3-PDO를 생산하지 않음으로써 3-HP의 수율을 향상시킬 수 있다.

[76] 또한, 본 명세서에서 제공하는 제공하는 3-HP 제조 방법 및/또는 3-HP의 생산성 향상 방법은 3-HP 생산 중 발생하는 부산물인 아세테이트, 락테이트 등과 잔류 글리세롤 함량이 현저히 감소된 것일 수 있다.

[77]

[78] 다른 예는 3-하이드록시프로피온산 함량이 높고 부산물 함량이 낮은 3-하이드록시프로피온산 생산 균주의 배양물을 제공한다.

[79] 상기 배양물은 3-하이드록시프로피온산을, 전체 배양물 기준으로, 60g/L 이상, 62g/L 이상, 65g/L 이상, 67g/L 이상, 70g/L 이상, 72g/L 이상, 75g/L 이상, 77g/L 이상, 78g/L, 79g/L 이상, 80g/L 이상, 81g/L 이상, 82g/L 이상, 83g/L 이상, 84g/L 이상, 85g/L 이상, 86g/L 이상, 87g/L 이상, 88g/L 이상, 89g/L 이상, 또는 90g/L 이상일 수 있다 (상한값은 85 내지 1000g/L 중에서 특별한 제한은 없이 선택될 수 있으며, 예컨대, 1000g/L, 500g/L, 200g/L, 100g/L, 또는 95g/L일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다).

[80] 또한, 상기 배양물은, 전체 배양물 기준으로, 다음 중 선택된 하나 이상의 특징을 가지는 것일 수 있다:

[81] 아세테이트 농도가 0.25%(w/v) 이하, 0.2%(w/v) 이하, 0.15(w/v) 이하, 또는 0.1%(w/v) 이하;

[82] 락테이트 농도가 0.15%(w/v) 이하, 0.1%(w/v) 이하, 0.05%(w/v) 이하, 0.03%(w/v) 이하, 0.01%(w/v) 이하, 또는 존재하지 않음;

[83] PDO (1,3-propanediol) 농도가 0.25%(w/v) 이하, 0.2%(w/v) 이하, 0.15(w/v) 이하, 0.1%(w/v) 이하, 0.07%(w/v)이하, 또는 0.05%(w/v)이하; 및

[84] 글리세롤 농도가 0.45%(w/v) 이하, 0.4%(w/v) 이하, 0.35%(w/v) 이하, 0.3%(w/v) 이하, 0.25%(w/v) 이하, 0.2%(w/v) 이하, 0.15(w/v) 이하, 또는 0.1%(w/v)이하. 이 때, 각 범위의 하한값은 0을 포함하거나 (존재하지 않는 경우), 0.000001%(w/v), 0.00001%(w/v), 0.0001%(w/v), 0.001%(w/v), 또는 0.005%(w/v)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[85] 일 구체예에서, 상기 배양물은 앞서 설명한 3-HP 제조 방법 및/또는 3-HP의 생산성 향상 방법, 즉,

[86] (1) 3-하이드록시프로피온산(3-hydroxypropionic acid, 3-HP) 생산능을 가지는 세포를 생산 배지에 접종하는 단계; 및

[87] (2) 상기 접종된 세포를 배양하여 3-HP를 생산하는 단계

[88] 에 의하여 얻어진 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[89] 이 때, 상기 단계 (1)에서 생산 배지에 접종되는 3-하이드록시프로피온산 생산능을 가지는 세포는 성장 배지에서 고농도 배양 후 성장 배지로부터 분리된 것일 수 있다. 따라서, 일 구체예에서, 상기 배양물은,

- [90] (1') 성장 배지에서 고농도 배양 후 성장 배지로부터 분리된 3-하이드록시프로피온산 생산능을 가지는 세포를 생산 배지에 접종하는 단계; 및
- [91] (2') 상기 접종된 세포를 배양하여 3-HP를 생산하는 단계
- [92] 에 의하여 얻어진 분리된 3-하이드록시프로피온산 생산 균주의 배양에 의하여 얻어진 것일 수 있다.
- [93] 상기 배양물은 3-하이드록시프로피온산 생산 용도로 사용될 수 있다.
- [94] 이에, 다른 예는 상기 배양물을 포함하는 3-하이드록시프로피온산 생산용 조성물을 제공한다.
- [95] 다른 예는 상기 3-하이드록시프로피온산 생산용 조성물로부터 3-하이드록시프로피온산을 분리, 회수, 및/또는 정제하는 단계를 포함하는 3-하이드록시프로피온산 생산 방법을 제공한다.

[96]

발명의 효과

- [97] 본 발명이 제공하는 3-HP 생산방법 및/또는 생산성 향상 방법은 3-HP 생산성과 수율을 현저히 향상시킬 수 있어 3-HP의 상업화에 유용하게 사용될 수 있다.
- [98]

도면의 간단한 설명

- [99] 도 1은 글리세롤로부터 3-HP를 생합성하기 위한 생합성 경로를 간략히 도식화한 것이다.
- [100] 도 2는 대조군(비교예)과 실시예 1 및 실시예 2의 조건에서 2단계 배양시 3-HP의 생산량을 측정된 결과 그래프이다.

[101]

발명의 실시를 위한 형태

- [102] 이하 본 발명을 실시예에 의해 보다 상세히 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명의 내용을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에 의해 제한되지 아니한다.
- [103] 본 명세서에서 특별한 언급이 없는 한 온도는 모두 섭씨 온도를 기준으로 하며, 핵산 서열은 특별한 사정이 없는 한 5' 말단에서 3' 말단 방향으로 기재되었다.

[104]

실시예 1. 3-HP 생산 균주의 제조

- [105]
- [106] 글리세롤을 기질로 사용하여 3-하이드록시프로피온산(3-hydroxypropionic acid, 3-HP)을 생산하는 것으로 알려져 있는 글리세롤 탈수효소(Glycerol dehydratase) 및 알데하이드 탈수소효소(Aldehyde dehydrogenase)를 암호화하는 유전자를 도입한 재조합 벡터를 제조하였다. 상기 제조된 재조합벡터를 대장균(*E. coli*) W3110 균주에 도입하여 3-HP 생산균주를 제작하였다.

- [107] 구체적으로, 글리세롤 디하이드라타제를 코딩하는 유전자(dhaB), 알데히드

디하이드로게나제를 코딩하는 유전자(aldH) 및 글리세롤 디하이드라타제 리액티바제를 코딩하는 유전자(gdrAB)를 플라스미드 pCDF 에 클로닝하여 3HP 생산용 재조합 벡터(pCDF_J23101_dhaB_gdrAB_J23100_aldH)를 제작 하였다.

- [108] 상기 재조합 벡터 제작에 사용된 pCDFDuetJ23 벡터는 pCDFDuet-1 벡터(Novagen, USA)의 프로모터 부분을 J23101과 J23100 프로모터로 치환한 벡터이다. 상기 벡터에 삽입되는 dhaB (U30903.1; 약 2.7 kb; dhaB1, dhaB2 및 dhaB3 포함)와 gdrAB 유전자 (약 2.2 kb; gdrA, gdrB)는 크렙시엘라 뉴모니아 (ATCC 25955)의 염색체에서 하기 표 1의 프라이머를 사용하여 증폭하였다. 크렙시엘라 뉴모니아의 염색체 상에 dhaB123와 gdrA 유전자가 나란히 위치해 있어 같이 증폭하였고, gdrB는 dhaB123, gdrA와 반대 방향으로 위치해 있기 때문에 gdrB만 따로 증폭하였다.
- [109] aldH 유전자는 하기 표 1의 서열번호 5 및 서열번호 6의 핵산 서열로 이루어지는 프로모터쌍을 이용하여 E. coli K12 MG1655 균주의 유전체로부터 증폭하여 분리하였다. 하기 표 1에 각 유전자 증폭에 사용된 프라이머의 핵산 서열을 나타내었으며, 명칭 중 '-F'는 정방향 프로모터를, '-R'은 역방향 프로모터를 의미한다.

[110] [표1]

서열번호	이름	핵산 서열(5'>3')
1	dhaB-gdrA-F	GAATTCATGAAAAGATCAAAACGATTTGCAGTCC T
2	dhaB-gdrA-R	AAGCTTGATCTCCCACTGACCAAAGCTGG
3	gdrB-F	AAGCTTAGAGGGGGCCGTCATGTCGCTTTCACCG CCAG
4	gdrB-R	CTTAAGTCAGTTTCTCTCACTTAACGGC
5	aldH-F	ggtaccatgaattttcatcatctggc
6	aldH-R	catatgtcaggcctccaggcttat

- [111] 각 유전자의 증폭 후 dhaB123, gdrA 유전자는 제한 효소 EcoRI과 HindIII을, gdrB 유전자는 제한 효소 HindIII와 AflIII을 이용하여 상기 pCDFDuetJ23 벡터의 J23101 프로모터 하류에 클로닝하였다. aldH는 제한효소 KpnI과 NdeI을 이용하여 J23108 프로모터 아래에 클로닝하였다. 각 유전자의 클로닝 방법은 당업계에 알려진 방법으로 수행되었다.상기 플라스미드를 E. coli W3110 (KCCM 40219)에 전기천공법으로 도입하여, 3HP 생산 균주를 제조하였다.

[112]

- [113] 준비예 1. 3-HP 생산을 위한 2단계 세포 배양

[114] **1-1. 세포의 고농도 배양 (1단계 배양)**

[115] 상기 제조된 3-HP 생산 균주는 유가 배양(fed-batch culture) 방법으로 5L 발효기(Working volume 2L)로 고농도 세포배양을 수행하였다.

[116] 구체적으로, MR 배지 (1L 당 KH_2PO_4 6.67g, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 4g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.8g, citric acid 0.8g, 및 trace metal solution 5mL; 여기에서, Trace metal solution은 1L 당 5M HCl 5mL, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10g, CaCl_2 2g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.2g, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1g, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.1g, 및 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 0.02g)에 포도당(Glucose) 20g/L, 선별을 위한 항생제(스트렙토마이신) 25mg/L를 첨가하여 세포 배양 배지로 사용하였으며, 섭씨 35도의 온도를 유지하였다. pH는 암모니아수를 이용하여 6.95로 유지하였고, 용존산소량(DO)은 교반 속도를 단계적으로 900rpm까지 높이면서 20%를 유지하였으며, aeration은 1vvm을 유지하였다.

[117] 유가 배양은 pH-stat feeding 방식을 이용하였으며, 포도당을 3g/L로 첨가하였다.

[118] 배양 시간의 경과에 따라 UV-Spectrometer를 이용하여 흡광도(Optical Density, OD)를 측정하여 세포 농도를 측정하였다. 배양 시작 후 20시간째에 OD600은 약 120(건조세포중량 30g/L)을 나타내었다.

[119] 상기 고농도 세포배양을 마친 후 세포 배양액을 6,000rpm으로 섭씨 4도에서 10분간 원심분리하여 세포를 회수하였다. 회수된 세포는 PBS(phosphate-buffered saline)으로 현탁하여 이후 단계에 사용하였다.

[120]

[121] **1-2. 고농도 배양된 세포를 이용한 3-HP 생산 (2단계 배양)**

[122] 3-HP 생산용 배지는 포도당(Glucose)을 포함하지 않는 M9 배지에 글리세롤(Glycerol) 70g/L, 비타민 B12 50uM를 첨가하여 준비하였다. 3-HP 생산용 배지에 상기 준비예 1-1에서 준비한 세포 현탁액을 세포 접종량 5g/L(건조세포중량 기준)가 되도록 접종하고, 5L 발효기 (Working volume 2L)에서 3-HP 생산 단계를 수행하였다.

[123] 3-HP 생산을 위한 배양 조건은, 온도 섭씨 35°C, 교반 속도 300rpm, aeration은 1 vvm을 유지하였으며, pH는 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 를 이용해 7.0으로 유지하였다.

[124]

[125] **실시예 2. 전자전달계 활성화를 위한 포도당 공급 조건 (2단계 배양 + 포도당 첨가)**

[126] 세포 내에서 합성된 3-HP를 세포 밖으로 수송하기 위해서는 ATP가 소모되는 것으로 알려져 있다. 이러한 ATP 합성은 전자전달계에서 주로 이루어지며, 포도당(glucose)의 기질 수준의 인산화를 통해서도 ATP의 합성이 가능하다. 이에 포도당을 소량 첨가하여 ATP를 지속적으로 공급하는 경우 3-HP의 생산성 향상 효과를 확인하였다.

[127] 구체적으로 상기 준비예 1-1의 방법으로 1단계 고농도 배양 후 분리된 3-HP

생산용 균주(준비에 1에서 제조된 균주)를, 상기 준비예 1-2의 2단계 배양과 동일한 조건에 접종하여 배양을 수행하였다. 다만 2단계 배양시(배지내) 용존 산소량(DO)을 측정하여 DO 20% 이상이 되면 700g/L 농도의 포도당 용액을 0.3g/L로 첨가하도록 배양 조건을 설정하였다.

[128] 대조군(비교예)으로는 상기 준비예 1-1 내지 1-2의 단계만을 수행하여 세포 배양 및 3-HP 생산을 수행하였다.

[129]

[130] 실시예 3. 전자전달계 활성화를 위한 공기 공급 조절 조건 (2단계 배양 + DO 조절)

[131] 글리세롤을 이용한 3-HP의 생합성은 글리세롤 탈수효소(glycerol dehydratase)이 글리세롤을 3-HPA로 변환하고, 다시 3-HPA를 알데하이드 탈수소효소(aldehyde dehydrogenase)가 3-HP로 전환하여 이루어진다 (도 1). 3-HPA를 3-HP로 전환하기 위해서는 산화력을 가지는 조효소인 NAD⁺가 필요하며, 3-HP를 지속적으로 생산하기 위해서는 NADH로 전환된 NAD⁺의 재생산이 이루어져야 한다. 이러한 NAD⁺의 재생산 과정은 전자전달계에서 주로 이루어진다. 따라서 산소를 충분히 공급하여 전자전달계를 활성화하는 경우 3-HP의 생산성 향상 효과를 확인하였다.

[132] 구체적으로 상기 준비예 1-1의 방법으로 1단계 배양 후 분리된 3-HP 생산용 균주(준비에 1에서 제조된 균주)를, 상기 준비예 1-2의 2단계 배양과 동일한 조건에 접종하여 배양을 수행하였다. 다만 2단계 배양에서의 접종 2시간 후부터 용존산소량(DO)이 5%로 유지되도록 교반 속도(rpm)를 조정하여 배양 조건을 설정하였다. 본 실시예에서, 초기 교반속도를 300 rpm으로 시작하여 2시간 이후부터 DO 5%가 되도록 교반속도를 조금씩 높여서 DO를 조절하였다. 즉 DO가 5% 이하면 교반속도를 1~2 RPM씩 높여주고, 5% 이상이 되면 1~2 RPM씩 낮춰주면서 DO 5%를 유지하였다.

[133] 대조군(비교예 1)으로는 상기 준비예 1-1 내지 1-2의 단계만을 수행하여 세포 배양 및 3-HP 생산을 수행하였다. 대조군의 경우 접종 직후 초기 DO는 0%이고 2단계 배양 종료시(40시간) 산소 소모가 중단되면서 DO가 100%로 상승하였다.

[134]

[135] 실시예 4. 각 배양 조건별 3-HP 생산량의 비교

[136] 상기 실시예 2 내지 3의 방법과 준비예 1-1 내지 1-2의 방법(비교예 1)으로 3-HP를 생산하면서 2단계 배양 시간의 경과에 따른 3-HP의 생산량 (g/L)을 측정하여 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[137] 도 2에서 확인할 수 있는 바와 같이, 2단계 배양(3-HP생산)을 위한 접종 후 50시간 경과시 비교예의 배양 방법에서는 약 56g/L의 3-HP가 생산됨에 그쳤다. 실시예 2와 같이 포도당을 소량 첨가하여 ATP 균형을 유지한 결과 85g/L의 3-HP가 생산되어 비교예에 비해 약 1.5배 이상의 3-HP 생산량 증가가 확인되었다 (3-HP 생산량 약 52% 상승). 실시예 3과 같이 용존 산소량을 일정

수준으로 유지하여 전자전달계를 활성화시킨 경우에는 배양 방법으로는 95g/L의 3-HP가 생산되었다(3-HP 생산량 약 70% 상승). 따라서 본 발명이 제공하는 3-HP의 생산 방법을 적용함으로써 3-HP 생산성을 향상시킬 수 있음이 실험적으로 확인되었다.

[138]

[139] 실시예 5. 1단계 배양 및 2단계 배양에서의 포도당 첨가에 따른 3-HP 생산량의 비교

[140] 상기 실시예 2와 같이 2단계 배양 및 2단계 배양시 DO 20% 이상이 되면 포도당을 추가하도록 설정한 경우와 1단계 배양 및 포도당 첨가한 경우(비교예 2)의 3-HP 생산을 비교하였다.

[141] 상기 비교예 2는 다음과 같이 준비하였다: 우선, 배지에 세포 성장에 필요한 포도당과 기질인 글리세롤을 동시에 첨가하여 세포 성장과 3HP 생산을 동시에 진행 하였다. 실시예 1에서 준비된 재조합 균주를 사용하였으며, 포도당과 글리세롤을 동시에 첨가한 것을 제외하고 준비예 1-1과 동일하게 진행되었다 (포도당은 Fed-batch 방식으로 첨가하고, 글리세롤은 배양 중 한번에 첨가함). 포도당은 초기 첨가된 포도당이 모두 소모되면 pH가 7.0 이상 될 때마다 1 g/L씩 추가로 첨가하고, 글리세롤은 배양 20, 48시간에 각각 70g/L씩 2번 첨가하였다.

[142] 비교예 2의 배양조건: 온도 35°C, pH는 암모니아수를 이용하여 6.95로 유지, 교반속도 500 rpm, Air 1 vvm 투입

[143] 실시예 2 및 비교예 2에서의 2단계 배양(실시예 2) 또는 1단계 배양(비교예 2)의 3-HP 생산량(g/L) 및 생산성(g/L/h)을 측정하여 아래의 표 2에 나타내었다:

[144] [표2]

발효 방식	3-HP 생산량 (g/L)	생산성 (g/L/h)
1단계 + 포도당 첨가	56	1.5
2단계 + 포도당 첨가	80	2.1

[145] (상기 표 2의 결과는, 실시예 2는 2단계(생산단계) 배양 38시간 시점, 비교예 2는 1단계 배양 48시간 시점에서 각각 측정한 결과임)

[146] 표 2에서 보여지는 바와 같이, 실시예 2의 경우, 비교예 2와 비교하여, 3-HP 생산량 및 생산성이 증가하였다. 이러한 결과는 2단계 배양에서 포도당 첨가에 따른 3-HP 생산 증가 효과가 보다 높게 나타남을 보여준다.

[147]

[148] 실시예 6. 배양물 내 불순물 생성 비교

[149] 상기 실시예 2 (2단계 배양 + 포도당 첨가) 및 실시예 3 (3단계 배양 + DO 조절)에서 얻어진 배양물 내의 불순물 (아세트이트, 락테이트, PDO (1,3-propanediol), 및 잔류 글리세롤) 함량을 측정하여, 준비예 1-1만 수행하여 3-HP를 생산한 경우 (1단계 생산)와 비교하였다.

[150] 상기 얻어진 결과를 하기의 표 3에 나타내었다:

[151] [표3]

불순물	1단계 생산	실시예 2	실시예 3
Acetate	3 g/L	1 g/L 이하	1 g/L 이하
Lactate	2 g/L	없음	없음
PDO	3 g/L	0.5 g/L 이하	0.5 g/L 이하
잔류 Glycerol	5 g/L 이상	1 g/L 이하	1 g/L 이하

[152] (상기 표 3의 결과는, 실시예 2 및 실시예 3은 2단계(생산단계) 배양 38시간 시점, 1단계 생산은 1단계 배양 48시간 시점에서 각각 측정된 결과임)

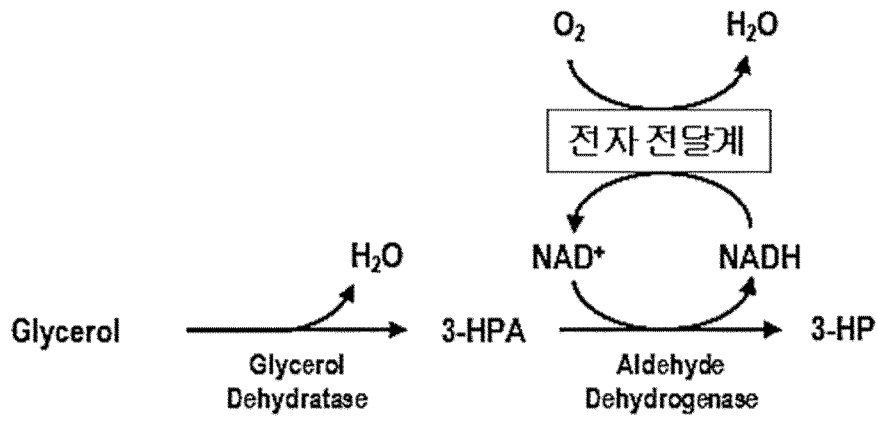
[153] 표 3에 나타난 바와 같이, 실시예 2 및 3의 경우, 1단계 생산한 경우와 비교하여, 불순물인 아세테이트, 락테이트, PDO, 잔류 글리세롤 함량이 현저히 낮거나 존재하지 않음을 확인할 수 있다.

청구범위

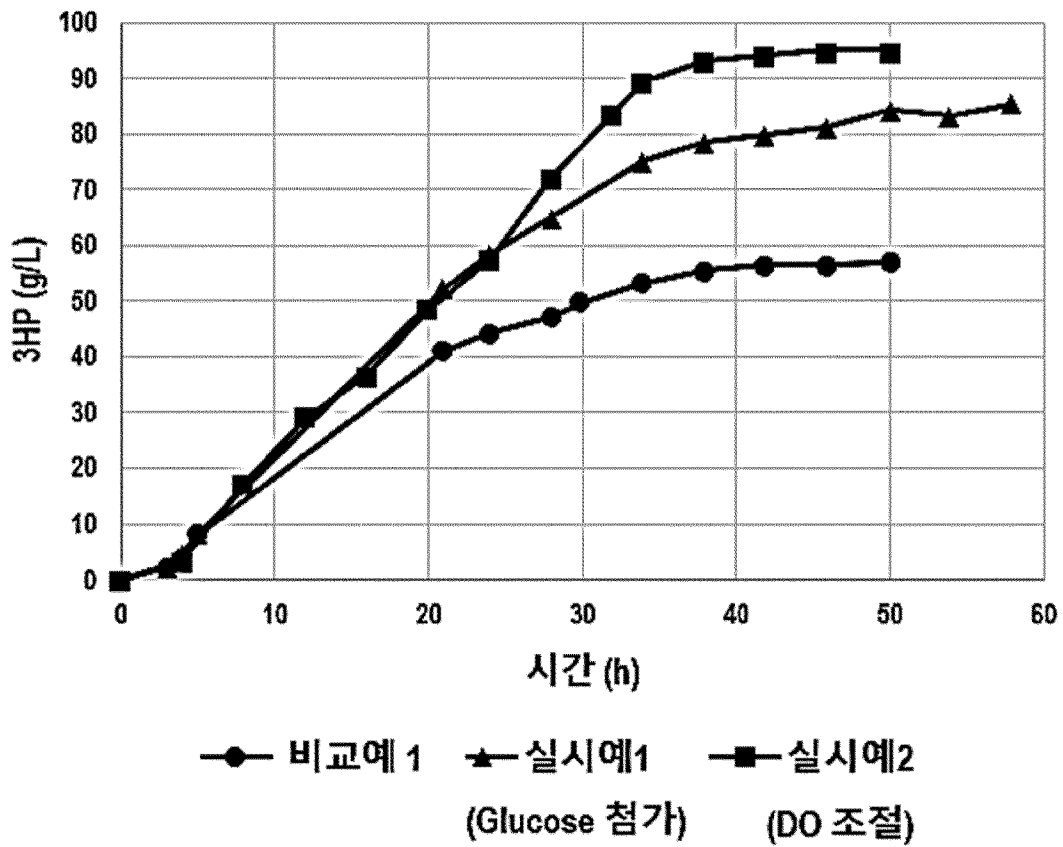
- [청구항 1] (1) 3-하이드록시프로피온산(3-hydroxypropionic acid, 3-HP) 생산능을 가지는 세포를 생산 배지에 접종하는 단계; 및
(2) 상기 접종된 세포를 배양하여 3-HP를 생산하는 단계를 포함하고,
상기 생산 배지는 탄소원으로 글리세롤을 포함하고,
상기 배양은 (i) 상기 생산 배지 내 용존산소량(DO)을 50% 이하 수준으로 유지하는 조건, (ii) 상기 배지 내 용존산소량이 0.1% 이상일 때 포도당을 첨가하는 조건, 또는 (iii) 이들 모두에서 수행되는 것인,
3-하이드록시프로피온산(3-hydroxypropionic acid, 3-HP)의 생산 방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 3-HP를 생산하는 단계 (2)는 세포의 증식이 일어나지 않는 것인, 방법.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 단계 (1)에서 세포가 접종되는 생산 배지는 탄소원으로 포도당을 포함하지 않는 것인, 방법.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 조건 (i)의 용존산소량 유지는 교반 속도를 조절함으로써 수행되는 것인, 방법.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 조건 (ii)의 첨가되는 포도당의 농도는 0.01 내지 3g/L 인, 방법.
- [청구항 6] 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단계 (1)에서 생산 배지에 접종되는 3-하이드록시프로피온산 생산능을 가지는 세포는 성장 배지에서 고농도 배양 후 성장 배지로부터 분리된 것인, 방법.
- [청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 3-HP 생산능을 가지는 세포는 글리세롤 탈수효소(glycerol dehydratase) 및 알데하이드 탈수소효소(aldehyde dehydrogenase)로 이루어지는 균에서 선택되는 하나 이상의 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 것인, 방법.
- [청구항 8] 제6항에 있어서, 상기 성장 배지는 탄소원으로 글리세롤을 포함하지 않는 것인, 방법.
- [청구항 9] 제6항에 있어서, 상기 고농도 배양 후의 OD600 값으로 측정된 세포 농도가 50 이상인, 방법.
- [청구항 10] 3-하이드록시프로피온산을 60g/L 이상의 농도로 포함하는, 3-하이드록시프로피온산(3-hydroxypropionic acid, 3-HP) 생산 균주의 배양물.
- [청구항 11] 제11항에 있어서, 다음 중 선택된 하나 이상의 특징을 가지는, 배양물: 아세테이트 농도가 0.2%(w/v) 이하,
락테이트 농도가 0.1%(w/v) 이하,
PDO (1,3-propanediol) 농도가 0.2%(w/v) 이하, 및
글리세롤 농도가 0.3%(w/v) 이하.

[청구항 12] 제10항 또는 제11항의 배양물을 포함하는 3-하이드록시프로피온산
제조용 조성물.

[도1]



[도2]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/016057

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C12P 7/52(2006.01)i; C12P 7/42(2006.01)i; C12N 15/70(2006.01)i; C12N 9/88(2006.01)i; C12N 9/02(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) C12P 7/52(2006.01); C12N 1/21(2006.01); C12P 7/00(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: 3-하이드록시프로피온산 (3-hydroxypropionic acid), 용존산소량 (dissolved oxygen), 글리세롤 (glycerol), 배지 (medium), 포도당 (glucose), 탈수효소 (dehydrogenase)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	LI, Y. et al. High production of 3-hydroxypropionic acid in Klebsiella pneumoniae by systematic optimization of glycerol metabolism. Scientific reports. 2016, vol. 6, thesis no. 26932, pp. 1-10. See abstract; and pages 1 and 5-8.	10-12 1-4,6-9 5
Y	WO 2014-145297 A1 (OPX BIOTECHNOLOGIES, INC.) 18 September 2014 (2014-09-18) See abstract; and paragraphs [0069] and [0087].	1-4,6-9
A	KWAK, S. et al. Biosynthesis of 3-hydroxypropionic acid from glycerol in recombinant Escherichia coli expressing Lactobacillus brevis dhaB and dhaR gene clusters and E. coli K-12 aldH. Bioresource technology. 2013, vol. 135, pp. 432-439. See entire document.	1-12
A	WO 2011-094457 A1 (OPX BIOTECHNOLOGIES, INC. et al.) 04 August 2011 (2011-08-04) See entire document.	1-12
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 11 February 2022		Date of mailing of the international search report 14 February 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.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MATSAKAS, L. et al. Biological production of 3-hydroxypropionic acid: an update on the current status. Fermentation. 2018, vol. 4, thesis no. 13, pp. 1-21. See entire document.	1-12
.....		

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/KR2021/016057

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2014-145297	A1	18 September 2014	US	2015-0044746	A1	12 February 2015
				US	2016-0130614	A1	12 May 2016
WO	2011-094457	A1	04 August 2011	AU	2010-298004	A1	26 April 2012
				AU	2010-298004	B2	25 February 2016
				AU	2011-210852	A1	23 August 2012
				AU	2011-210852	B2	24 December 2015
				BR	112012006801	A2	10 April 2018
				CA	2775390	A1	31 March 2011
				CA	2775390	C	29 June 2021
				CA	2788045	A1	04 August 2011
				CN	102695799	A	26 September 2012
				CN	102822347	A	12 December 2012
				EP	2480673	A1	01 August 2012
				EP	2480673	B1	23 May 2018
				EP	2529023	A1	05 December 2012
				GB	2473755	A	23 March 2011
				GB	2473755	B	07 September 2011
				GB	2487866	A	08 August 2012
				GB	2492256	A	26 December 2012
				IN	6617DEN2012	A	23 October 2015
				JP	2013-128494	A	04 July 2013
				JP	2013-505727	A	21 February 2013
				JP	2016-036346	A	22 March 2016
				JP	2016-039825	A	24 March 2016
				JP	6271494	B2	31 January 2018
				KR	10-2012-0136349	A	18 December 2012
				KR	10-2014-0015136	A	06 February 2014
				MX	2012003604	A	12 September 2012
				MX	2012008700	A	05 October 2012
				US	10100342	B2	16 October 2018
				US	2013-0071893	A1	21 March 2013
				US	2013-0122541	A1	16 May 2013
				US	2014-0045231	A1	13 February 2014
US	2015-0056651	A1	26 February 2015				
US	2015-0344916	A1	03 December 2015				
US	2017-0114377	A1	27 April 2017				
US	2019-0119708	A1	25 April 2019				
US	8883464	B2	11 November 2014				
US	9388419	B2	12 July 2016				
US	9428778	B2	30 August 2016				
WO	2011-038364	A1	31 March 2011				
WO	2011-094457	A8	04 August 2011				

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12P 7/52(2006.01)i; C12P 7/42(2006.01)i; C12N 15/70(2006.01)i; C12N 9/88(2006.01)i; C12N 9/02(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12P 7/52(2006.01); C12N 1/21(2006.01); C12P 7/00(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: 3-하이드록시프로피온산 (3-hydroxypropionic acid), 용존산소량 (dissolved oxygen), 글리세롤 (glycerol), 배지 (medium), 포도당 (glucose), 탈수효소 (dehydrogenase)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X Y A	LI, Y. 등, 'High production of 3-hydroxypropionic acid in Klebsiella pneumoniae by systematic optimization of glycerol metabolism', Scientific reports, 2016, 6권, 논문번호 26932, 페이지 1-10 초록; 페이지 1, 5-8	10-12 1-4,6-9 5
Y	WO 2014-145297 A1 (OPX BIOTECHNOLOGIES, INC.) 2014.09.18 요약; 단락 [0069], [0087]	1-4,6-9
A	KWAK, S. 등, 'Biosynthesis of 3-hydroxypropionic acid from glycerol in recombinant Escherichia coli expressing Lactobacillus brevis dhaB and dhaR gene clusters and E. coli K-12 aldH', Bioresource technology, 2013, 135권, 페이지 432-439 전체 문헌	1-12
A	WO 2011-094457 A1 (OPX BIOTECHNOLOGIES, INC. 등) 2011.08.04 전체 문헌	1-12
<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 2022년02월11일(11.02.2022)		국제조사보고서 발송일 2022년02월14일(14.02.2022)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대 전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373

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

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

- a. 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:

C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	MATSAKAS, L. 등, 'Biological production of 3-hydroxypropionic acid: an update on the current status', Fermentation, 2018, 4권, 논문번호 13, 페이지 1-21 전체 문헌	1-12

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2014-145297 A1	2014/09/18	US 2015-0044746 A1	2015/02/12
		US 2016-0130614 A1	2016/05/12
WO 2011-094457 A1	2011/08/04	AU 2010-298004 A1	2012/04/26
		AU 2010-298004 B2	2016/02/25
		AU 2011-210852 A1	2012/08/23
		AU 2011-210852 B2	2015/12/24
		BR 112012006801 A2	2018/04/10
		CA 2775390 A1	2011/03/31
		CA 2775390 C	2021/06/29
		CA 2788045 A1	2011/08/04
		CN 102695799 A	2012/09/26
		CN 102822347 A	2012/12/12
		EP 2480673 A1	2012/08/01
		EP 2480673 B1	2018/05/23
		EP 2529023 A1	2012/12/05
		GB 2473755 A	2011/03/23
		GB 2473755 B	2011/09/07
		GB 2487866 A	2012/08/08
		GB 2492256 A	2012/12/26
		IN 6617DEN2012 A	2015/10/23
		JP 2013-128494 A	2013/07/04
		JP 2013-505727 A	2013/02/21
		JP 2016-036346 A	2016/03/22
		JP 2016-039825 A	2016/03/24
		JP 6271494 B2	2018/01/31
		KR 10-2012-0136349 A	2012/12/18
		KR 10-2014-0015136 A	2014/02/06
		MX 2012003604 A	2012/09/12
		MX 2012008700 A	2012/10/05
		US 10100342 B2	2018/10/16
		US 2013-0071893 A1	2013/03/21
		US 2013-0122541 A1	2013/05/16
		US 2014-0045231 A1	2014/02/13
US 2015-0056651 A1	2015/02/26		
US 2015-0344916 A1	2015/12/03		
US 2017-0114377 A1	2017/04/27		
US 2019-0119708 A1	2019/04/25		
US 8883464 B2	2014/11/11		
US 9388419 B2	2016/07/12		
US 9428778 B2	2016/08/30		
WO 2011-038364 A1	2011/03/31		
WO 2011-094457 A8	2011/08/04		