(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2022 년 3 월 3 일 (03.03.2022)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2022/045481 A1

(51) 국제특허분류:
C12N 9/88 (2006.01) *C12N 15/70* (2006.01)
C12P 7/18 (2006.01) *C12N 9/04* (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2020/018314

(22) 국제출원일: 2020 년 12 월 15 일 (15.12.2020)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2020-0108063 2020 년 8 월 26 일 (26.08.2020) KR

(71) 출원인: 전남대학교산학협력단 (**INDUSTRY FOUNDATION OF CHONNAM NATIONAL UNIVERSITY**) [KR/KR]; 61186 광주시 북구 용봉로 77, Gwangju (KR). 이화여자대학교 산학협력단 (**EWHA UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION**) [KR/KR]; 03760 서울시 서대문구 이화여대길 52, Seoul (KR).

(72) 발명자: 김정선 (**KIM, Jeong Sun**); 61031 광주시 북구 우치로537번길 10, 106동 1602호, Gwangju (KR). 박진병 (**PARK, Jin Byung**); 07324 서울시 영등포구 여의동로3길 10, 401동 902호, Seoul (KR). 서필원 (**SEO, Pil Won**); 61189 광주시 북구 호동로 25-12, 4021호, Gwangju (KR). 김준홍 (**KIM, Jun Hong**); 61188 광주시 북구 우치로126번길 46-2, 206호, Gwangju (KR). 김지원 (**KIM, Ji Won**); 61188 광주시 북구 우치로126번길 46-2, 205호, Gwangju (KR). 조혜진 (**JO, Hye Jin**); 14539 경기도 부천시 중동로280번길 63, 608동 901호, Gyeonggi-do (KR). 김채윤 (**KIM, Chae Yun**); 03760 서울시 서대문구 이화여대길 52 신공학관 B163호, Seoul (KR). 김예나 (**KIM, Ye Na**); 24657 강원도 인제군 기린면 내린천로 3898, 13동 406호, Gangwon-do (KR). 백윤진 (**BAEG, Yoon Jin**); 08369 서울시 구로구 도림로22길 8, 101동 1606호, Seoul (KR).

(74) 대리인: 특허법인 아이엠 (**IAM PATENT & LAW FIRM**); 06135 서울시 강남구 봉은사로 224, 402호, Seoul (KR).

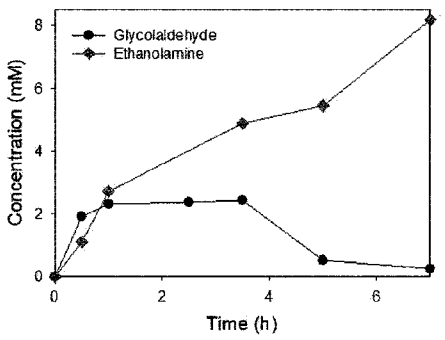
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, 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 (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))

(54) **Title:** COMPOSITION FOR PRODUCING GLYCOLALDEHYDE FROM FORMALDEHYDE, AND METHOD FOR PRODUCING GLYCOLIC ACID, ETHYLENE GLYCOL OR ETHANOLAMINE FROM FORMALDEHYDE USING COMPOSITION

(54) **발명의 명칭:** 포름알데히드로부터의 글리콜알데히드 생성용 조성물 및 상기 조성물을 이용한 포름알데히드로부터의 글리콜산, 에틸렌글리콜 또는 에탄올아민 제조방법



(57) **Abstract:** The present invention relates to technology for producing glycoaldehyde, glycolic acid, ethylene glycol and ethanolamine, and more specifically to a compound for producing glycoaldehyde from formaldehyde using an enzyme which is a biocatalyst and using formaldehyde as a starting material, and a method for producing glycolic acid, ethylene glycol and ethanolamine, from formaldehyde, using the composition.

(57) **요약서:** 본 발명은 글리콜알데히드, 글리콜산, 에틸렌글리콜 및 에탄올아민을 생산하는 기술에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 포름알데히드를 출발물질로 하면서 생체촉매인 효소를 활용하는 포름알데히드로부터의 글리콜알데히드 생성용 조성물 및 상기 조성물을 이용한 포름알데히드로부터의 글리콜산 에틸렌글리콜 또는 에탄올아민 제조방법에 관한 것이다.

WO 2022/045481 A1

명세서

발명의 명칭: 포름알데히드로부터의 글리콜알데히드 생성용 조성물 및 상기 조성물을 이용한 포름알데히드로부터의 글리콜산, 에틸렌글리콜 또는 에탄올 아민 제조방법

기술분야

[1] 본 발명은 글리콜알데히드, 글리콜산, 에틸렌글리콜 및 에탄올아민을 생산하는 기술에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 포름알데히드를 출발물질로 하면서 생체촉매인 효소를 활용하는 포름알데히드로부터의 글리콜알데히드 생성용 조성물 및 상기 조성물을 이용한 포름알데히드로부터의 글리콜산 에틸렌글리콜 또는 에탄올아민 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

[2] 글리콜알데히드, 글리콜산, 에틸렌글리콜 및 에탄올아민은 섬유산업에서 바이오플라스틱용 모노머, 염료 및 태닝제의 단량체, 식품산업에서 풍미제와 방부제, 유화제, 제약산업에서 피부관리제, 산업 및 가정에서 세정제와 접착제 등으로 널리 사용되고 있으나, 제조 공정 중 강산을 비롯한 유독물질들이 사용되고, 반응의 선택성 및 수율이 높지 않아 오염 물질 배출, 고에너지 사용 등의 다양한 문제가 야기되고 있다 (Appl Microbiol Biotechnol (2019) 103:2525-2535). 대안으로 오탄당과 같은 바이오매스로부터 다단계 효소반응을 통해 생합성하는 바이오공정이 연구개발되고 있으나 낮은 수율과 부산물의 생성 등의 문제를 안고 있다 (Appl Microbiol Biotechnol (2019) 103:2525-2535).

[3] 또 다른 방법으로 포름알데히드로부터 효소를 이용한 생합성 연구가 보고되고 있으나 (Nature Chemical Biology (2019) 15:900-906),
포르밀코에이(formyl-coenzyme A (CoA))를 기질로 필요로 하여 경제적인 고수율 생산이 어려운 것으로 판단된다.

[4] 따라서, 포름알데히드와 같은 대량 공급이 가능한 화합물로부터 (ACS Catal. 2019, 9, 9575-99588) 글리콜알데히드, 글리콜산, 에틸렌글리콜 및 에탄올아민과 같은 고부가 소재를 고수율로 생성하는 새로운 효소반응 시스템의 개발이 요구되고 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[5] 본 발명자들은 다수의 연구결과 포름알데히드로부터 글리콜알데히드 생성을 촉매 하는 글리옥실레이트 카르볼리가제(glyoxylate carboligase: GCL)의 새로운 용도 및 이를 이용하는 글리콜산, 에틸렌글리콜 및 에탄올아민 제조 기술을 개발함으로써 본 발명을 완성하였다

[6] 따라서, 본 발명의 목적은 GCL 및 이의 유도체를 포함하여 환경 친화적인

방식으로 포름알데히드로부터 글리콜알데히드를 생성할 수 있는 글리콜알데히드 조성물을 제공하는 것이다.

[7] 본 발명의 다른 목적은 보다 효과적으로 포름알데히드로부터 글리콜알데히드를 생성할 수 있도록 유전자 조작을 통해 변경된 서열을 갖는 신규 GCL, 이를 코딩하는 핵산분자, 그 핵산분자를 포함하는 벡터 및 상기 벡터를 포함하는 형질전환체를 제공하는 것이다.

[8] 본 발명의 또 다른 목적은 GCL 및 이의 유도체를 포함하는 글리콜알데히드조성물 또는 신규 GCL, 형질전환체 등을 활용하여 환경 친화적인 방식으로 포름알데히드로부터 글리콜알데히드, 글리콜산, 에틸렌글리콜 및 에탄올아민을 고수율로 생산하는 제조방법을 제공하는 것이다.

[9] 본 발명의 목적은 이상에서 언급한 목적으로 제한되지 않으며, 명시적으로 언급되지 않았더라도 후술되는 발명의 상세한 설명의 기재로부터 통상의 지식을 가진 자가 인식할 수 있는 발명의 목적 역시 당연히 포함될 수 있을 것이다.

기술적 해결방법

[10] 상술된 본 발명의 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 글리옥실레이트 카르볼리가제(glyoxylate carboligase: GCL) 및 이의 유도체를 포함하는 글리콜알데히드 생성용 조성물을 제공한다.

[11] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 GCL 및 이의 유도체는 두 분자의 포름알데히드가 글리콜알데히드 분자 내로 축합되는 반응을 촉매한다.

[12] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 GCL은 대장균에서 유래된 것이다.

[13] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 GCL의 K_M, k_{cat} 및 k_{cat}/K_M 값은 각각 62 mM, 1.00 s^{-1} 및 16.0 $M^{-1}\cdot s^{-1}$이다.

[14] 본 발명은 또한 서열목록 제1서열에 기재된 아미노산 서열로 구성되는 신규글리옥실레이트 카르볼리가제(glyoxylate carboligase: GCL)를 제공한다.

[15] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 신규 GCL은 두 분자의 포름알데히드가 글리콜알데히드 분자 내로 축합되는 반응을 촉매 하여 글리콜알데히드를 생성하는 것이다.

[16] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 신규 GCL의 K_M, k_{cat} 및 k_{cat}/K_M 값은 각각 24 mM, 0.8 s^{-1} 및 33.1 $M^{-1}\cdot s^{-1}$이다.

[17] 또한 본 발명은 상술된 신규 GCL을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산분자를 제공한다.

[18] 또한 본 발명은 상술된 신규 GCL를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터를 제공한다.

[19] 또한, 본 발명은 상술된 벡터를 포함하는 형질전환체를 제공한다.

[20] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 형질전환체는 대장균이다.

[21] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 대장균은 카베올린-1(CAV1)- 매개 엔도사이토싱 대장균(CAV1- mediated endocytosing *E. coli*)이다.

[22] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 형질전환체는 aminotransferase를 코딩하는 핵산분자를 포함하는 벡터를 더 포함한다.

[23] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 aminotransferase를 코딩하는 핵산분자는 루게리아 포메로이(*Ruegeria pomeroyi*)로부터 유래된 aminotransferase(3HMU)를 코딩하는 핵산분자 또는 아그로박테리움 파브럼(*Agrobacterium fabrum*)으로부터 유래된 aminotransferase(Af-AT)를 코딩하는 핵산분자이다.

[24] 또한, 본 발명은 포름알데히드와, 상술된 어느 하나의 조성물, 상술된 어느 하나의 신규 GCL, 상술된 형질전환체 중 하나 이상을 접촉시키는 단계를 포함하는 포름알데히드로부터의 글리콜알데히드 제조방법을 제공한다.

[25] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 단계는 30℃ 내지 65℃에서 수행된다.

[26] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 단계에서 두 분자의 포름알데히드가 글리콜알데히드 분자 내로 축합되는 반응을 촉매 하는 GCL의 K_M, k_{cat} 및 k_{cat}/K_M 값은 각각 62 mM, 1.00 s^{-1} 및 16.0 $M^{-1}\cdot s^{-1}$ 이하이다.

[27] 또한, 본 발명은 포름알데히드와, 상술된 어느 하나의 조성물, 상술된 어느 하나의 신규 GCL, 상술된 형질전환체 중 하나 이상을 접촉시켜 글리콜알데히드를 형성하는 제1단계; 및 상기 제1단계에서 얻어진 반응물에 α-ketoglutaric semialdehyde dehydrogenase (KGSADH) 또는 ALDH를 첨가하는 제2단계를 포함하는 글리콜산 제조방법을 제공한다.

[28] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 KGSADH는 *Azospirillum brasilense*로부터 유래된 것으로, K_M, k_{cat} 및 k_{cat}/K_M 값이 각각 4 mM, 24 s^{-1} 및 6.1 $mM^{-1}\cdot s^{-1}$이다.

[29] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 제2단계에서 KGSADH를 첨가하면 상기 포름알데히드의 70% 이상이 글리콜산으로 전환된다.

[30] 또한, 본 발명은 포름알데히드와, 상술된 어느 하나의 조성물, 상술된 어느 하나의 신규 GCL, 상술된 형질전환체 중 하나 이상을 접촉시켜 글리콜알데히드를 형성하는 제1단계 및 상기 제1단계에서 얻어진 반응물에 1,3-propanediol dehydrogenase (DhaT) 또는 ADH를 첨가하는 제2단계를 포함하는 에틸렌글리콜 제조방법을 제공한다.

[31] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 DhaT는 *Klebsiella pneumoniae*로부터 유래된 것으로, K_M, k_{cat} 및 k_{cat}/K_M 값이 각각 12.5 mM, 1.6 s^{-1} 및 0.13 $mM^{-1}\cdot s^{-1}$이다.

[32] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 제2단계에서 DhaT를 첨가하면 상기 포름알데히드의 70% 이상이 에틸렌글리콜로 전환된다.

[33] 또한, 본 발명은 포름알데히드와, 상술된 어느 하나의 조성물, 상술된 어느 하나의 신규 GCL, 상술된 형질전환체 중 하나 이상을 접촉시켜 글리콜알데히드를 형성하는 제1단계; 및 상기 제1단계에서 얻어진 반응물에 aminotransferase 및 아민공여체를 첨가하는 제2단계;를 포함하는 에탄올아민 제조방법을 제공한다.

[34] 바람직한 실시예에 있어서,상기 aminotransferase는 루게리아 포메로이(*Ruegeria pomeroyi*)로부터 유래된 aminotransferase(3HMU) 또는 아그로박테리움 파브럼(*Agrobacterium fabrum*)으로부터 유래된 aminotransferase(Af-AT)이다.

[35] 또한, 본 발명은 포름알데히드와, 상술된 어느 하나의 형질전환체 중 하나 이상 및 아민공여체를 접촉시키는 단계를 포함하는 포름알데히드로부터의 에탄올아민 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[36] 상술된 본 발명의 글리콜알데히드 조성물은 GCL 및 이의 유도체를 포함하여 환경 친화적인 방식으로 포름알데히드로부터 글리콜알데히드를 생성할 수 있다.

[37] 또한, 본 발명의 신규 GCL은 보다 효과적으로 포름알데히드로부터 글리콜알데히드를 생성할 수 있도록 유전자 조작을 통해 변경된 서열을 갖고, 이를 코딩하는 핵산분자, 그 핵산분자를 포함하는 벡터 및 상기 벡터를 포함하는 형질전환체를 제공할 수 있다.

[38] 또한, 본 발명의 제조방법은 GCL 및 이의 유도체를 포함하는 글리콜알데히드조성물 또는 신규 GCL, 형질전환체 등을 활용하여 환경 친화적인 방식으로 포름알데히드로부터 글리콜알데히드, 글리콜산, 에틸렌글리콜 및 에탄올아민 중 하나 이상을 고수율로 생산할 수 있다.

[39] 본 발명의 이러한 기술적 효과들은 이상에서 언급한 범위만으로 제한되지 않으며, 명시적으로 언급되지 않았더라도 후술되는 발명의 실시를 위한 구체적 내용의 기재로부터 통상의 지식을 가진 자가 인식할 수 있는 발명의 효과 역시 당연히 포함된다.

도면의 간단한 설명

[40] 도 1a는 대장균에서 발현된 EcGCL을 SDS-PAGE에서 단일 밴드로 정제한 결과사진이고, 도 1b는 *Hydrogenobacter thermophilus* 유래 acetolactate synthase (HtALS), *Vibrio vulnificus* 유래 acetolactate synthase (VvALS), *Escherichia coli* 유래 oxalyl-CoA decarboxylase (EcOCD), *Deinococcus metallilatus 유래 GCL* (DmGCL), *E. coli* 유래 GCL (EcGCL)의 탄화 활성 비교 결과그래프이다.

[41] 도 2는 EcGCL의 탄화 작용에 대한 반응 온도의 영향을 나타낸 그래프이다.

[42] 도 3은 대장균 유래 GCL의 열안정성을 보여주는 결과그래프이다.

[43] 도 4a는 FLS와 두 GCL 구조를 비교하여 나타낸 모식도이고, 도 4b는 대장균 GCL의 관찰된 전체 구조적 특징이 *D. metallilatus* GCL 구조에서 잘 보존되어 있음을 보여주는 모식도이다.

[44] 도 5는 GCL과 함께 카베올린-1(Cav1)이 공동 발현된 재조합 *E. coli* BL21 Star (DE3)에 의한 포름알데히드로부터 글리콜알데히드로의 전체 세포 생물 전환된 결과를 나타낸 그래프이다.

[45] 도 6a 및 도 6b는 각각 포름알데히드가 KGSADH 및 DhaT에 의해 글리콜산 및

에틸렌글리콜로 전환되는 시간경과에 따른 캐스케이드 반응을 보여주는 결과그래프이다.

[46] 도 7은 포름알데히드가 GCL과 Af-TA에 의해 에탄올아민으로 전환되는 시간경과에 따른 캐스케이드 반응을 보여주는 결과를 나타낸 그래프이다.

[47] 도 8은 본 발명에 따라 GCL 및 이의 유도체를 이용하여 포름알데히드로부터 글리콜알데히드를 생성한 후 글리콜산, 에틸렌글리콜 및 에탄올아민을 제조하는 반응식을 나타낸 것이다.

[48] 도 9a는 GCL에 의해 촉매되는 천연 기질, 글리옥실레이트의 반응식을 나타낸 것이고, 도 9b는 KGSADH, DhaT에 의해 촉매되는 천연 기질, 3-하이드록시프로판올의 반응식을 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 형태

[49] 본 발명에서 사용하는 용어는 단지 특정한 실시예들을 설명하기 위해 사용된 것으로, 본 발명을 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 출원에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 발명의 설명에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성 요소, 부분품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성 요소, 부분품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

[50] 제1, 제2 등의 용어는 다양한 구성 요소들을 설명하는데 사용될 수 있지만, 상기 구성 요소들은 상기 용어들에 의해 한정되어서는 안된다. 상기 용어들은 하나의 구성 요소를 다른 구성 요소로부터 구별하는 목적으로만 사용된다. 예를 들어, 본 발명의 권리 범위를 벗어나지 않으면서 제1 구성 요소는 제2 구성 요소로 명명될 수 있고, 유사하게 제2 구성 요소도 제1 구성 요소로 명명될 수 있다.

[51] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥상 가지는 의미와 일치하는 의미를 갖는 것으로 해석되어야 하며, 본 발명에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

[52] 구성 요소를 해석함에 있어서, 별도의 명시적 기재가 없더라도 오차 범위를 포함하는 것으로 해석한다. 특히, 정도의 용어 "약", "실질적으로" 등이 사용되는 경우 언급된 의미에 고유한 제조 및 물질 허용오차가 제시될 때 그 수치에서 또는 그 수치에 근접한 의미로 사용되는 것으로 해석될 수 있다.

[53] 시간 관계에 대한 설명일 경우, 예를 들어, '~후에', '~에 이어서', '~다음에', '~전에' 등으로 시간적 선후관계가 설명되는 경우, '바로' 또는 '직접'이 사용되지 않는 이상 연속적이지 않은 경우도 포함한다.

[54] 이하, 첨부한 도면 및 바람직한 실시예들을 참조하여 본 발명의 기술적 구성을

상세하게 설명한다.

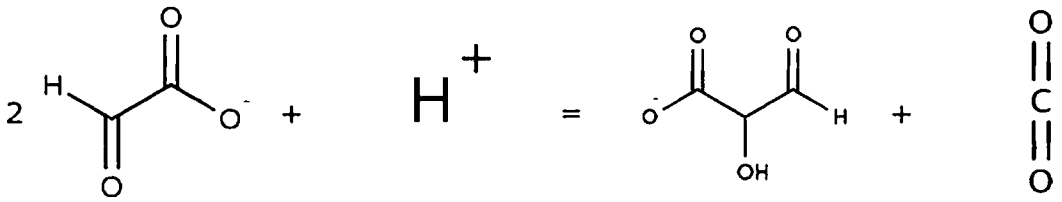
[55] 그러나, 본 발명은 여기서 설명되는 실시예에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화 될 수도 있다. 명세서 전체에 걸쳐 본 발명을 설명하기 위해 사용되는 동일한 참조번호는 동일한 구성요소를 나타낸다.

[56] 본 발명의 기술적 특징은 글리옥실레이트 카르볼리가제(glyoxylate carboligase: GCL)의 새로운 용도 즉 포름알데히드로부터 글리콜알데히드 생성을 촉매한다는 것을 최초로 발견하고, GCL 및 이의 유도체를 이용하여 친환경적으로 포름알데히드로부터 글리콜알데히드를 생성한 후 글리콜산, 에틸렌글리콜 및 에탄올아민을 제조하는 것에 있다.

[57] 따라서, 본 발명의 글리콜알데히드 생성용 조성물은 글리옥실레이트 카르볼리가제(glyoxylate carboligase: GCL) 및 이의 유도체를 포함한다.

[58] 즉, 글리옥실레이트 카르볼리가제는 하기 반응식과 같이 두 분자의 글리옥실레이트의 축합을 촉매하여 2-히드록시-3-옥소프로파노에이트(타르트론산 반 알데히드라고도 함)를 제공하는 효소로서,

[59]



[60] 다양한 미생물에서 얻을 수 있는데, 본 발명에서 최초로 GCL 및 이의 유도체가 두 분자의 포름알데히드를 글리콜알데히드 분자 내로 축합시키는 반응을 촉매하는 것을 밝히고 이를 이용하여 포름알데히드로부터 글리콜알데히드를 생성하는 방법을 개발하였기 때문이다.

[61] 여기서, 본 발명의 글리콜알데히드 생성용 조성물에 포함되는 GCL 및 이의 유도체는 상술된 반응을 촉매할 수 있기만 하면 제한되지 않는데, 일 구현예로서 대장균 유래 GCL 및 이의 유도체일 수 있다. 특히, 후술하는 바와 같이 대장균 K-12로부터 얻어진 야생형 효소 글리옥실레이트 카르볼리가제(GCL)가 포름알데히드로부터 가장 많은 양의 글리콜알데히드를 생성하는 것으로 밝혀졌다.

[62] 또한, 본 발명의 글리콜알데히드 생성용 조성물에 포함되는 GCL 및 이의 유도체의 K_M, k_{cat} 및 k_{cat}/K_M 값은 각각 62 mM, 1.00 s^{-1} 및 16.0 $M^{-1}s^{-1}$이다.

[63] 다음으로, 본 발명의 신규 글리옥실레이트 카르볼리가제(glyoxylate carboligase: GCL)는 서열목록 제1서열에 기재된 아미노산 서열로 구성될 수 있다.

[64] 신규 GCL은 야생형 효소인 대장균 유래 GCL 보다 우수한 운동 파라미터를 갖는 GCL 돌연변이체를 수득하기 위해, 입구 부분에서 하전된 표면을 활성 부위로 중화시키고 표면으로부터 활성 부위로 경로를 좁히는 구조-기반 전략에 따라 다수의 실험을 수행하여 얻어진 다수의 GCL돌연변이체 중 가장 우수한

운동 파라미터 특성을 나타낸 돌연변이체의 아미노산 서열이다. 서열목록 제1서열에 기재된 아미노산 서열로 구성되는 신규 GCL은 포인트 뮤테이션에 의해 야생형 효소와 비교하여 Arg484 및 Asn283이 각각 Met484 및 Gln283로 치환된 서열을 갖는다.

[65] 신규 GCL 또한 두 분자의 포름알데히드가 글리콜알데히드 분자 내로 축합되는 반응을 촉매 하여 글리콜알데히드를 생성하는데, 신규 GCL의 K_M, k_{cat} 및 k_{cat}/K_M 값은 각각 24 mM, 0.8 s^{-1} 및 33.1 $M^{-1}\cdot s^{-1}$이므로, 상술된 야생형 GCL과 비교하면 2배 정도의 우수한 특성을 갖는 것을 알 수 있다.

[66] 여기서, 신규 GCL에는 그의 기능적 동등물 및 기능적 유도체가 포함된다. 본 발명의 정의상 신규 GCL의 "기능적 동등물"이란 상기 서열목록 제1서열로 이루어진 효소와 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 단백질을 말한다. "동질의 생리활성"이란 도 8에 도시된 바와 같이 2분자의 포름알데히드의 축합을 촉매하여 글리콜알데히드로 전환시키는 반응을 수행할 수 있는 능력이 있으며, 적어도 50% 이상의, 바람직하게는 70%, 더욱 바람직하게는 90% 이상의 아미노산 서열 상동성을 갖는 것을 말한다.

[67] 또한 "기능적 동등물"에는 천연형 단백질 아미노산 중 일부 또는 전부가 치환되거나, 아미노산의 일부가 결실 또는 부가된 아미노산 서열 변형체가 포함된다. 아미노산의 치환은 바람직하게는 보존적 치환이다. 천연에 존재하는 아미노산의 보존적 치환의 예는 다음과 같다; 지방족 아미노산(Gly, Ala, Pro), 소수성 아미노산(Ile,Leu, Val), 방향족 아미노산(Phe,Tyr, Trp), 산성 아미노산(Asp, Glu), 염기성 아미노산(His, Lys, Arg, Gln,Asn) 및 황함유 아미노산(Cys, Met).

[68] "기능적 유도체" 는 신규 GCL의 단편, 상기 단편을 포함하는 단백질, 또는 단백질의 물리 화학적 성질을 증가 또는 감소시키기 위한 변형을 가한 단백질을 말한다. " 단편" 이란 용어는 단백질의 일부에 해당하는 아미노산 서열로서, 본 발명의 범위내에 속하는 공통의 기원 요소, 구조 및 작용 메카니즘을 가진 것을 말한다. GCL의 안정성, 저장성, 용해도 등을 변경시키기 위한 변형을 가한 유도체도 본 발명의 범위에 포함된다. 상기와 같은 단백질의 기능적 유도체를 만드는 방법은 공지되어 있다.

[69] 본 발명의 신규 GCL를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산분자는 DNA(gDNA 및 cDNA) 그리고 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미가 있으며, 핵산 분자에서 기본 구성 단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체(analogue)도 포함한다. 따라서, 바람직하게는 서열목록 제1서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 가지나 이에 제한되는 것은 아니며 실질적으로 동일한 활성을 갖는 단백질을 코드화하는 한 뉴클레오티드 서열의 일부가 치환 또는 삭제된 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 공지된 유전자 클로닝 방법으로 직접 써머스 써모필러스로부터 분리한 후 포인트 뮤테이션하거나 DNA 합성기를 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다.

[70] 따라서, 본 발명의 신규 GCL의 가장 큰 특징은 반응 수행시 K_M, k_{cat} 및 k_{cat}/K_M 값이 각각 24 mM, 0.8 s^{-1} 및 33.1 $M^{-1}\cdot s^{-1}$인 수행능력을 갖는다는 전제하에서, 본 발명의 신규 GCL은 첨부한 서열목록에 기재된 아미노산 서열에 한정되지 않는다는 것은 당업자에게 명확하다.

[71] 본 발명의 신규 GCL를 코드화하는 핵산분자는 당 분야에 잘 공지된 적당한 원핵 또는 진핵 발현시스템 중 어느 하나를 사용하여 이를 발현시킬 수 있다. 이와 같이 본 발명의 벡터 시스템은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있는데, 전형적으로 클로닝을 위한 벡터 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 또한, 본 발명의 벡터는 원핵 세포 또는 진핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다. 본 발명의 핵산 분자가 원핵세포 유래이고, 배양의 편의성 등을 고려하여, 원핵세포를 숙주로 하는 것이 바람직하다.

[72] 특히, 발현이 대장균 예를 들어, 대장균 MV1184, 대장균 BL21, 대장균 JM109(DE3), 대장균 NM522, 또는 효모, 예를 들어, 사카로 마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*), 사카로마이세스 다이아스타티커스(*Saccharomyces diastaticus*)등에서 수행되는 될 수 있으며, 대장균 BL21에서 수행하는 것이 바람직하다. 대장균 및 효모에서의 발현을 위해 사용될 수 있는 적당한 벡터들이 다수 공지되어 있는데, 본 발명에서는 신규한 GCL의 유전자를 헥사히스티딘이 표지된 발현 벡터pET-21a 유도체에 삽입하여 사용하였다.

[73] 또한, 본 발명에서는 신규한 GCL의 유전자 및 카베올린-1(CAV1) 유전자를 헥사히스티딘이 표지된 발현 벡터 pET-21a 유도체에 삽입하여 신규 GCL과 케베올린-1이 공동으로 발현된 CAV1-매개 엔도사이토싱 대장균(CAV1-mediated endocytosing *E. coli*)을 사용함으로써, 엔도사이토싱 *E. coli*가 우수한 생체촉매가 될 수 있음을 확인하였다.

[74] 필요한 경우, 본 발명에서는 신규 GCL를 코드화하는 핵산분자를 포함하는 벡터와 aminotransferase를 코딩하는 핵산분자를 포함하는 벡터를 같이 포함하는 형질전환체를 제조하여 신규 GCL과 aminotransferase를 공동으로 발현하는 생촉매로서 에탄올아민제조시 사용할 수 있다. 여기서, aminotransferase를 코딩하는 핵산분자는 루게리아 포메로이(*Ruegeria pomeroyi*)로부터 유래된 aminotransferase (3HMU)를 코딩하는 핵산분자 또는 아그로박테리움 파브럼(*Agrobacterium fabrum*)으로부터 유래된 aminotransferase(Af-AT)를 코딩하는 핵산분자일 수 있다.

[75] 본 발명에서는 후술하는 바와 같이 벡터에 의해 형질 전환된 미생물 형질전환체 즉 목적 발현 벡터를 함유하는 숙주 미생물은 발현시킬 유전자의 발현을 최대화하는 동시에 미생물의 최적 성장을 유지하는 조건에서 배양한 후, 배양물로부터 신규 GCL을 회수 및 정제하였다.

[76] 다음으로, 본 발명의 포름알데히드로부터의 글리콜알데히드 제조방법은 포름알데히드와, 상술된 어느 하나의 글리콜알데히드 생성용 조성물, 상술된 어느 하나의 신규 GCL, 상술된 어느 하나의 형질전환체 중 하나 이상을

접촉시키는 단계를 포함할 수 있는데, 일 구현예로서 상기 단계에서 두 분자의 포름알데히드가 글리콜알데히드 분자 내로 축합되는 반응을 촉매 하는 GCL의 K_M, k_{cat} 및 k_{cat}/K_M 값은 각각 62 mM, 1.00 s^{-1} 및 16.0 $M^{-1}\cdot s^{-1}$ 이하일 수 있으며, 상기 단계가 30℃ 내지 60℃에서 수행될 수 있다. 이것은 후술하는 실험예에서 알 수 있듯이 GCL 및 그의 유도체가 열적안정성이 우수하기 때문이다.

[77] 다음으로, 본 발명의 글리콜산 제조방법은 포름알데히드와, 상술된 어느 하나의 글리콜알데히드 생성용 조성물, 상술된 어느 하나의 신규 GCL, 상술된 어느 하나의 형질전환체 중 하나 이상을 접촉시켜 글리콜알데히드를 형성하는 제1단계 및 상기 제1단계에서 얻어진 반응물에 α-ketoglutaric semialdehyde dehydrogenase (KGSADH) 또는 Aldehyde dehydrogenase (예로 대장균 유래 AldA) 또는 Aldehyde oxidase (예로 *Gluconobacter oxydan*s 유래 Aldehyde oxidase)를 첨가하는 제2단계를 포함할 수 있는데, 일 구현예로서 상기 KGSADH는 *Azospirillum brasilense*로부터 유래된 것으로, K_M, k_{cat} 및 k_{cat}/K_M 값이 각각 4 mM, 24 s^{-1} 및 6.1 $mM^{-1}\cdot s^{-1}$이며, 상기 제2단계에서 KGSADH를 첨가하면 상기 포름알데히드의 70% 이상이 글리콜산으로 전환된다.

[78] 다음으로, 본 발명의 에틸렌글리콜 제조방법은 포름알데히드와, 상술된 어느 하나의 글리콜알데히드 생성용 조성물, 상술된 어느 하나의 신규 GCL, 상술된 어느 하나의 형질전환체 중 하나 이상을 접촉시켜 글리콜알데히드를 형성하는 제1단계; 및 상기 제1단계에서 얻어진 반응물에 1,3-propanediol dehydrogenase (DhaT) 또는 Alcohol dehydrogenase, 또는 glycolaldehyde reductase (예로 대장균 유래 FucO, YqhD)를 첨가하는 제2단계를 포함할 수 있는데, 일 구현예로서 상기 DhaT는 *Klebsiella pneumoniae*로부터 유래된 것으로, K_M, k_{cat} 및 k_{cat}/K_M 값이 각각 12.5 mM, 1.6 s^{-1} 및 0.13 $mM^{-1}\cdot s^{-1}$이며, 상기 제2단계에서 DhaT를 첨가하면 상기 포름알데히드의 70%이상이 에틸렌글리콜로 전환된다.

[79] 다음으로, 본 발명의 에탄올아민 제조방법은 포름알데히드와, 상술된 어느 하나의 글리콜알데히드 생성용 조성물, 상술된 어느 하나의 신규 GCL, 상술된 어느 하나의 형질전환체 중 하나 이상을 접촉시켜 글리콜알데히드를 형성하는 제1단계; 및 상기 제1단계에서 얻어진 반응물에 aminotransferase 및 아민공여체를 첨가하는 제2단계;를 포함할 수 있는데, 일 구현예로서 aminotransferase는 루게리아 포메로이(*Ruegeria pomeroyi*)로부터 유래된 aminotransferase(3HMU) 또는 아그로박테리움 파브럼(*Agrobacterium fabrum*)으로부터 유래된 aminotransferase(Af-AT)일 수 있으며, 아민공여체를 사용되는 aminotransferase의 종류에 따라 결정될 수 있는데, 제2단계가 수행되면 포름알데히드의 70% 이상이 에탄올아민으로 전환된다.

[80] 다른 구현예로서, 본 발명의 에탄올아민 제조방법은 포름알데히드와, 신규 GCL를 코드화하는 핵산분자를 포함하는 벡터 및 aminotransferase를 코딩하는 핵산분자를 포함하는 벡터를 같이 포함하는 형질전환체 중 하나 이상 및 아민공여체를 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다. 이와 같이 2개의 벡터를 모두

포함하는 형질전환체를 생촉매로 사용하게 되면 발현된 신규 GCL에 의해서 글리콜알데히드가 형성되고, 발현된 aminotransferase에 의해 아민공여체와 글리콜알데히드로부터 에탄올아민이 형성될 수 있는데, 이 경우에도 포름알데히드의 70% 이상이 에탄올아민으로 전환될 수 있다.

[81] 실시예 1

[82] 다음과 같은 카르볼리가제의 선별 전략을 통해 2 개의 GCL을 선택하였다.

[83] 도 8에 도시된 바와 같이 두 분자의 포름알데히드를 글리콜알데히드의 한 분자에 결찰(반응식 1)하기 위한 후보효소를 찾기 위해, DALI 서버(http://www.http://ekhidna2.biocenter.helsinki.fi/dali/) 및 단백질 3차원 구조 데이터 뱅크 (http://www.rcsb.org)에 열거된 단백질에 대한 참조 구조로서 합성 포름알데히드-전환 FLS (PDB ID 4qq8)를 사용하여 구조적 유사성 검색을 수행하였다.

[84] 이 검색은 아세토락테이트신타제(ALS), 옥살릴-CoA 데카르복실라제(OCD) 및 글리옥실레이트카르볼리가제 (GCL)를 포함하여 구조적으로 관련된 여러 효소(Z 점수 30 이상, 3 Å 이하 근사 제곱 편차)를 검색한 것이다. 포름알데히드 및 아세트알데히드에 대한 카르볼리가제의 상대 활성 결과를 나타낸 하기 표 1에 나타난 바와 같이 이들 효소의 대부분은 보고된 촉매활성을 위해 일부효소(예 : FAD)가 다른 보조 인자를 필요로 하지만 ThDP에 의존적이다. 활성 부위 및 기질 특이성에 대한 미세한 구조적 특징을 고려하여, *Hydrogenobacter thermophilus*와 *Vibrio vulnificus*에서 2 개의 ALS, *E. coli* 및 *Deinococcus metallilatus*에서 각각 2 개의 GCL을 선택했다.

[85]

[표1]

Name	Source	Activity for formaldehyde	Activity for acetaldehyde	비고
EcsucA	*E. coli*	-	++	본 발명
TtMend	*T. terrenum*	-	-	본 발명
MbsucA	*M. bovis*	-	+	본 발명
VvsucA	*V. vulnificus*	-	+++	본 발명
HtALS	*H. thermophilus*	+	-	본 발명
VvALS	*V. vulnificus*	+	-	본 발명
TtTKS	*T. thermophilus*	-	-	본 발명
HtTKS	*H. thermophilus*	-	-	본 발명
EcOCD	*E. coli*	+	-	본 발명
DmGCL	*D. metallilatus*	++	-	본 발명
EcGCL	***E. coli***	**++++**	**-**	**본 발명**
$EcGCL_{R484M/N283Q}$	***E. coli***	**++++++**	**-**	**본 발명**
GALS	*P. putida*	+++		Nat. Commun.(2019)*

[86] * Nat. Commun. (2019) 26:1378

[87] 실시예 2

[88] 야생형 효소보다 우수한 운동 파라미터를 갖는 GCL 돌연변이체를 수득하기 위해, 입구 부분에서 하전된 표면을 활성 부위로 중화시키고 표면으로부터 활성 부위로 경로를 좁히는 구조-기반 전략이 채택되었다. 2 개의 GCL이 아미노산 서열 수준뿐만 아니라 구조적 수준에서 고도로 보존되기 때문에, 포인트 뮤테이션의 도입에 의한 GCL 유도체의 생성이 *E. coli* GCL로 수행되었다.

[89] 구축된 몇몇 유도체들 중에서, Arg484 및 Asn283을 Met484 및 Gln283로 대체하는 이중 돌연변이체는 각각 24 mM, 0.8 s^{-1} 및 33.1 $M^{-1}\cdot s^{-1}$인 K_M, k_{cat} 및 k_{cat}/K_M 값을 가진 효소 활성을 나타냈다. 상기 이중 돌연변이체를 선택하여 서열목록 제1서열에 기재된 아미노산 서열로 구성된 신규 GCL을 완성하였다.

[90] 변이체인 신규 GCL은 야생형 효소인 *E. coli* GCL의 것보다 2배 정도의 기질 친화도를 가지므로, k_{cat} 값을 유지한 채, 포름알데히드에 대한 2배 정도의 활성을 보이게 되어, 포름알데히드로부터의 글리콜알데히드 생성시 보다 우수한 특성을 갖는 것을 알 수 있다.

[91] 실험예 1

[92] 2 분자의 포름알데히드를 1 분자의 글리콜알데히드로 결찰하기 위한 후보 효소의 촉매 활성을 추정하기 위해, 대장균에서 발현하고 Ni-NTA 겔 매트릭스에서 친화성 크로마토그래피로 정제하여 효소를 제조하고 그 결과를 도 1a에 나타내었으며, *Hydrogenobacter thermophilus* 유래 acetolactate synthase (HtALS), *Vibrio vulnificus* 유래 acetolactate synthase (VvALS), *Escherichia coli* 유래 oxalyl-CoA decarboxylase (EcOCA), *Deinococcus metallilatus* 유래 GCL (DmGCL), *E. coli* 유래 GCL (EcGCL)의 탄소-탄소 연결(탄화) 활성을 비교하기 위해 효소를 반응 매질에서 1 mg/mL에 첨가 하였고 그 결과를 도 1b에 나타내었다. 초기 생물 전환율은 HPLC에 확인된 생성물 농도에 기초하여 결정되었다.

[93] 도 1a에 도시된 바와 같이 대부분의 효소는 대장균에서 가용성 형태로 발현되었고 SDS-PAGE에서 단일 밴드로 정제되었다. 도 1b에 도시된 바와 같이 시험된 효소 중에서, *E. coli* K-12의 글리옥실 레이트카르볼리가제 (GCL)는 생물 변형 10 시간 후 포름알데히드로부터 가장 많은 양의 글리콜알데히드를 생성하였으며, GCL

[94] 이 포름알데히드의 탄화(carboligation : 탄소-탄소 연결)에 가장 강한 활성을 갖는 것을 나타냈다.

[95] 실험예 2

[96] 반응 온도는 생체 변형의 주요 매개 변수 중 하나이다. 따라서, *E. coli* GCL의 탄화 활성(carboligating activity)에 대한 반응 온도의 영향을 다음과 같이 조사하고 그 결과를 도 2에 나타냈다. 효소는 25 mM 포름알데히드 및 충분한 양의 마그네슘 (II) 이온, 티아민피로포스페이트 및 플라빈아데닌 디 뉴클레오티드를 함유하는 반응 매질에서 1 mg/mL의 농도로 첨가되었다. 초기 생물 전환율은 HPLC에 의한 생성물 농도에 기초하여 결정되었다.

[97] 도 2에 도시된 바와 같이, 특정 글리콜알데히드 형성 속도 및 최종 생성물 농도는 30에서 50℃의 반응 온도로 증가 하였다. 이 결과는 효소가 상당한 열안정성을 갖으며 최적의 반응 온도가 50℃를 초과할 수 있음을 나타낸다.

[98] 실험예 3

[99] 50℃ 이상의 온도에서도 *E. coli* GCL이 탄화 활성(carboligating activity)을 갖는지 여부를 다음과 같이 조사하고 그 결과를 도 3에 나타냈다.

[100] 도 3의 결과는 효소가 25 mM 포름알데히드 및 충분한 양의 마그네슘 (II) 이온, 티아민피로포스페이트 및 플라빈아데닌 디 뉴클레오티드를 함유하는 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6)로 된 반응 매질에 1 mg/mL의 농도로 첨가된 후 30℃에서 60℃로 유지하여 얻어진 결과이다.

[101] 이와 같이 도 3의 결과는 본 발명의 GCL 및 이의 유도체가 50℃에서도 활성을 유지하는 것을 보여주므로 고온에서도 사용할 수 있어 그 활용도가 높은 것을 보여준다.

[102] 실험예 4

[103] 포름알데히드의 결찰에 대한 GCL의 반응 특성을 이해하기 위해, 반응 동역학을 조사하고, 그 결과를 표 2에 나타냈다.

[104] [표2]

	GCL	$GCL_{R484M/N283Q}$	GALS*
K_M (mM)	62	24	170
K_{cat} (s^{-1})	1.00	0.8	1.6
K_{cat}/K_M ($M^{-1}\cdot s^{-1}$)	16.0	33.1	9.6

[105] * 데이터는 이전 연구 (Nat. Commun. (2019) 26:1378)에서 채택되었다.

[106] 표 2에 나타난 바와 같이, 정상 상태 동역학 연구에서 야생형 효소인 GCL은 각각 62 mM, 1.00 s^{-1} 및 16.0 $M^{-1}\cdot s^{-1}$의 K_M, k_{cat} 및 k_{cat}/K_M 값을 보여 주었고, 이는 종래 알려진 다른 글리콜알데히드 생성 효소(예를 들어, GALS (Nat. Commun. (2019) 26:1378))와 비교하여 매우 우수한 반응동력학을 보여주는 것을 알 수 있다. 또한 서열목록 제1서열에 기재된 아미노산 서열로 구성된 신규 GCL은 K_M, k_{cat} 및 k_{cat}/K_M 값이 각각 24 mM, 0.8 s^{-1} 및 33.1 $M^{-1}\cdot s^{-1}$인 것으로 나타났다.

[107] 이것은 포름알데히드가 효소 및 미생물 세포 모두에 매우 독성이 있기 때문에 매우 중요한 특징이다. 더욱이, 포름알데히드는 미생물 세포가 생체 촉매로서 사용될 때 배경 효소에 의해 포름산으로 전환 될 수 있다. 이러한 결과는 GCL 및 이의 유도체가 포름알데히드로부터 글리콜알데히드를 높은 전환 수율로 생산하기 위한 신규하고 유망한 카르볼리가제로 사용될 수 있음을 보여준다.

[108] 실험예 5

[109] GCL은 2개의 글리옥실레이트 분자의 축합 반응을 촉매하여 연속적인 탈카르복실화 및 환원 반응을 통해 타르트로네이트 세미알데히드 및 이산화탄소를 생성할 수 있다(도 9a 참조). 지금까지 단 하나의 GCL 구조만 보고되었으며 ThDP 효소의 전형적인 피루베이트 산화효소 계열과 구조적 특징을 공유한다(Nat. Chem. Biol. (2008) 15: 900-906). GCL에는 ThDP 부분의 질소 원자와 상호 작용하는 보존된 Glu 잔기가 없지만, 이의 부재가 촉매 작용을 방해하지는 않는다. 대장균 GCL보다 포름알데히드 축합에 대한 촉매 활성이 훨씬 적은 *D. metallilatus*로부터 GCL의 결정 구조를 측정하여, FLS와 대장균 및 *D. metallilatus* GCL 구조를 비교하고 그 모식도를 도 4a 및 도 4b에 나타내었다.

[110] 도 4a에 도시된 바와 같이 대장균 GCL의 관찰된 전체 구조적 특징은 D. *metallilatus* GCL 구조에서 잘 보존되어있다(정렬된 526 개의 잔류물 중 0.805Å의 제곱 평균 편차). α-헬릭스 (*E. coli* GCL의 Ala474-Leu494)는 *E. coli* GCL의 ThDP 및 마그네슘 이온과의 상호 작용을 위한 잔기를 제공하며, 이는 아마도 결정화를 위한 분자 패킹으로 인해 *D. metallilatus* GCL 구조의 활성 부위에서 완전히 다른 공간으로 이탈되어 있다. 이러한 구조적 특성으로 인하여 *D. metallilatus* GCL의

활성 부위에서 2 개의 보조 인자와 마그네슘 이온을 고갈시킨다.

[111] 도 4b의 B에 도시된 바와 같이, FLS와 2 개의 GCL 구조의 비교는 3 개의 효소의 극한 C- 말단에서 연장 된 영역에서 현저한 차이를 갖는 활성 부위에서의 변화를 나타낸다 (C-헬릭스). 이 C- 말단 영역은 GCL 및 FLS 효소의 활성 부위의 형성에 기여한다. 또한 도 4b의 B에 도시된 바와 같이, 세 개의 효소는 각각의 효소 이중합체 사이의 공간적 배향이 EcGCL과 DmGCL은 같으나, FLS 와는 차이가 크며, 이로 인하여 GCL, FLS가 보이는 효소활성의 차이성과 연관성은 분명하지 않다. 특히, 2 개의 GCL은 제 2 중간체의 환원을 위해 또 다른 보조 인자 FADH2를 필요로 한다. 그럼에도 불구하고, GCL은 ThDP- 의존성 카르볼리가제 효소의 구조적 특징을 정확하게 반영한다. 따라서, GCL의 2 개의 포름알데히드 분자를 축합하기 위한 촉매 메카니즘은 벤즈알데히드리아제(FEBS J 272 (23) : 6067-6076)의 포름알데히드 분자를 축합시키는 경향이 있는 것을 알 수 있다.

[112] 실험예 6

[113] GALS로 최근에 입증된 바와 같이, GCL은 합성 메틸 영양 세포 공장의 건설에 사용될 수 있다. 이에 의해, GCL-기반 전 세포 생물 전환 시스템이 다음과 같이 조사되었으며 그 결과는 도 5에 도시되었다. 첫 번째 방법은 대장균 BL21 Star (DE3)에서 GCL을 가용성 형태로 단순히 과발현하는 것이었다. 다른 접근법은 독성 및/또는 소수성 반응기질(예를 들어, 지방산)의 생물 변형에 유리한 것으로 보고된 생체 촉매로서 엔도사이토싱 대장균을 사용하는 것 이었다. 즉 GCL과 함께 카베올린 -1 (Cav1)의 공동 발현된 재조합 *E. coli* BL21 Star (DE3)에 의한 글리콜알데히드로의 포름알데히드의 전체 세포 생물 전환을 위해 25 mM 포름알데히드를 포타슘 포스페이트 완충액 (pH 6.0)에 첨가하여 정지 성장기 (세포 밀도 : 12g 건조 세포 / L)에서 생체 변형을 개시 하였다.

[114] 도 5에 도시된 바와 같이, *E. coli* BL21 Star (DE3) pET-EcGCL을 생 촉매로 사용했을 때, 25 mM 포름알데히드로부터 6 mM의 글리콜알데히드 만이 생성되었으며 전환 수율은 50 % 미만으로 유지되었다. 하지만, 놀랍게도, *E. coli* BL21 Star (DE3)에서 EcGCL과 함께 카베 올린-1 (CAV1)의 공동 발현은 CAV1-매개 엔도사이토싱 *E. coli*가 67%의 전환율로 약 8.4 mM의 글리콜알데히드를 생산하도록 했다. 또한 포름알데히드 응축 속도는 7.5 mM/h에 도달했는데, 이러한 실험결과는 엔도사이토싱 *E. coli*가 우수한 생체 촉매가 될 것이라는 것을 보여주었다.

[115] 실시예 3

[116] 글리콜알데히드의 화학적 구조는 3-하이드록시 프로판올과 유사하다. 이에 의해, 도 9b에 도시된 바와 같이, 3-하이드록시 프로판올을 3-하이드록시 프로피온산으로 산화시킬 수 있는 아조스피릴룸 브라질렌스(*Azospirillum brasilense*)로부터의 α- 케토글루타르산 세미알데히드 탈수소 효소 (KGSADH)가 후보로서 선택되었다.

[117] 따라서, 글리콜알데히드를 통한 포름알데히드의 글리콜산으로의 캐스케이드

반응은 대장균에서 발현되고 Ni-NTA 겔 매트릭스상의 친 화성 크로마토그래피에 의해 회수된 GCL 및 KGSADH에 의해 반응물에 25 mM 포름알데히드를 첨가하여 수행되었다. KGSADH는 효소가 또한 포름알데히드에 대한 산화 활성을 갖기 때문에 GCL에 의한 생물 전환을 1 시간 동안 수행한 후에 첨가되었다.

[118] 도 6a에 도시된 바와 같이 EcGCL에 의한 포름알데히드의 글리콜알데히드로의 축합은 t = 1h에서 글리콜알데히드가 9 mM로 형성되게 하였다.

[119] 이와 같이 반응 매질에 KGSADH를 첨가하면 글리콜산이 8.8mM까지 축적되어 포름알데히드의 70 %가 표적 생성물로 전환되었음을 나타냈다.

[120]

[121] 실시예 4

[122] 3-하이드록시 프로판올을 1,3- 프로판디올 로 환원시키는 것으로 알려진 클렙시 엘라뉴모니아에의 1,3- 프로판디올 탈수소 효소(DhaT)를 글리콜알데히드로부터 에틸렌글리콜을 생성시키는 후보로 선택하였다.

[123] 따라서, 글리콜알데히드를 통해 포름알데히드를 에틸렌글리콜로의 캐스케이드 반응은 대장균에서 발현되고 Ni-NTA 겔 매트릭스상의 친화성 크로마토그래피에 의해 회수된 GCL 및 DhaT에 의해 반응물에 25 mM 포름알데히드를 첨가하여 수행되었다. DhaT 효소도 포름알데히드에 대한 환원 활성을 갖기 때문에 GCL에 의한 생물 전환 개시 1시간 후 DhaT를 첨가 하였다.

[124] 도 6b에 도시된 바와 같이 반응 매질에 DhaT를 첨가하면 에틸렌글리콜이 8.8mM로 축적되어 포름알데히드의 70 %가 표적 생성물로 전환되었음을 나타냈다.

[125]

[126] 실험예 6

[127] 실시예3 및 실시예4에서 사용된 KGSADH 및 DhaT의 포름알데히드 및 글리콜알데히드에 대한 반응 동역학을 조사하고, 그 결과를 표 3에 나타냈다.

[128] [표3]

	KGSADH		DhaT	
Substrate	Formaldehyde	Glycolaldehyde	Formaldehyde	Glycolaldehyde
K_M(mM)	10.3	4.0	20.4	12.5
k_{cat}(s^{-1})	0.6	24.4	2.1	1.6
k_{cat}/K_M($mM^{-1}\cdot s^{-1}$)	0.06	6.1	0.1	0.13

[129] 표 3으로부터, KGSADH는 글리콜알데히드에 대해 각각 4 mM, 24 s^{-1} 및 6.1 $mM^{-1}\cdot s^{-1}$의 K_M, k_{cat} 및 k_{cat}/K_M 값을 나타내어 촉매 효율은 포름알데히드에 대한 GCL보다 실질적으로 더 큰 것을 알 수 있다. DhaT는 글리콜알데히드에 대해 각각 12.5 mM, 1.6 s^{-1} 및 0.13 $mM^{-1}\cdot s^{-1}$의 K_M, k_{cat} 및 k_{cat}/K_M 값을 나타냈다.

[130] 이상의 실험결과들은 GCL 및 이의 유도체가 두 분자의 포름알데히드를 한 분자의 글리콜알데히드로 선택적으로 축합시켜 포름알데히드로부터 글리콜알데히드를 생성할 수 있고, 또한 *A. brasilense*의 α-케토글루타르산 세미알데히드 탈수소효소 (KGSADH) 및 *K. pneumoniae*의 1,3-프로판디올 탈수소효소 (DhaT)와의 커플링에 의해 포름알데히드의 글리콜알데히드를 통한 글리콜산 및 에틸렌글리콜로의 2 단계 생물 변형에 연속적으로 사용될 수 있음을 보여준다. 따라서, 본 발명에 의하면 환경 친화적인 방식으로 포름알데히드로부터 글리콜알데히드를 통해 글리콜산 및 에틸렌글리콜을 효소 합성할 수 있다

[131]

[132] 실시예 5

[133] 글리콜알데히드로부터 에탄올아민 생산을 위해 *Agrobacterium fabrum* ATU3300 유래 aminotransferase (Af-AT)와 *Ruegeria pomeroyi* 유래 3HMU를 후보 효소로 선택하였다.

[134] 따라서, 포름알데히드로부터 글리콜알데히드를 통해 에탄올아민으로의 캐스케이드 반응은 GCL과 Af-AT를 공동으로 발현한 대장균 형질전환체에 25 mM 포름알데히드를 첨가하여 수행되었다. 즉, GCL과 함께 Af-AT를 공동 발현하는 재조합 *E. coli* BL21 Star (DE3) 배양액에 포름알데히드를 25 mM로 첨가하여 생물전환을 수행 하였다. 아민 공여체로 알라닌을 25 mM로 첨가하여 Af-AT에 의한 아민화 반응을 동시에 수행하였다. 도 7에 도시된 바와 같이 t = 7 h에서 에탄올아민이 8.5 mM까지 축적되어 포름알데히드의 70 %가 표적 생성물로 전환되었다.

[135] 구체적으로 제시하지는 않았지만 GCL과 함께 Af-AT를 공동 발현하는 재조합 *E. coli* BL21 Star (DE3) 대신 GCL과 3HMU를 공동으로 발현한 대장균 형질전환체를 사용할 수 있는데, Af-AT 대신 3HMU를 발현한 대장균 형질전환체을 생촉매로 이용했을 경우 에탄올아민이 8.1 mM까지 축적되었다.

[136] 또한, 글리콜알데히드를 형성하기 위해 GCL만을 발현하는 대장균 형질전환체에 포름알데히드를 첨가하여 수행하는 제1단계 및 제1단계에서 얻어진 반응물에 aminotransferase 즉 Af-AT 또는 3HMU 및 아민공여체를 첨가하는 제2단계가 수행되어도 포름알데히드의 70% 이상을 에탄올아민으로 전환시킬 수 있다.

[137]

[138] 본 발명은 이상에서 살펴본 바와 같이 바람직한 실시 예를 들어 도시하고 설명하였으나, 상기한 실시 예에 한정되지 아니하며 본 발명의 정신을 벗어나지 않는 범위 내에서 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 다양한 변경과 수정이 가능할 것이다.

[139]

서열목록 Free Text

[140] MSVASRSAERVFLTKFESWKNFPINRGRNKMAKMRAVDAAMYVLEKEGIT TAFGVPGAAINPFYSAMRKH

[141] GGIRHILARHVEGASHMAEGYTRATAGNIGVCLGTSGPAGTDMITALYSASA DSIPILCITGQAPRARLH

[142] KEDFQAVDIEAIAKPVSKMAVTVREAALVPRVLQQAFHLMRSGRPGPVLVD LPFDVQVAEIEFDPDMYEP

[143] LPVYKPAASRMQIEKAVEMLIQAERPVIVAGGGVINADAAALLQQFAELTSV PVIPTLMGWGCIPDDHEL

[144] MAGMVGLQTAHRYGNATLLASDMVFGIGNRFAQRHTGSVEKYTEGRKIVHI DIEPTQIGRVLCPDLGIVS

[145] DAKAALTLLVEVAQEMQKAGRLPCRKEWVADCQQRKRTLLRKTHFDNVPV KPQRVYEEMNKAFGRDVCYV

[146] TTIGLSQIAAAQMLHVFKDRHWINCGQAGPLGWTIPAALGVCAADPKRNVV AISGDFDFQFLIEELAVGA

[147] QFNIPYIHVLVNNAYLGLIRQSQMAFDMDYCVQLAFENINSSEVNGYGVDH VKVAEGLGCKAIRVFKPED

[148] IAPAFEQAKALMAQYRVPVVVEVILERVTNISMGSELDNVMEFEDIADNAAD APTETCFMHYE

청구범위

[청구항 1] 글리옥실레이트 카르볼리가제(glyoxylate carboligase: GCL) 및 이의 유도체를 포함하는 글리콜알데히드 생성용 조성물.

[청구항 2] 제 1 항에 있어서,
상기 GCL 및 이의 유도체는 두 분자의 포름알데히드가 글리콜알데히드 분자 내로 축합되는 반응을 촉매 하는 것을 특징으로 하는 글리콜알데히드 생성용 조성물.

[청구항 3] 제 2 항에 있어서,
상기 GCL은 대장균에서 유래된 것을 특징으로 하는 글리콜알데히드 생성용 조성물.

[청구항 4] 제 3 항에 있어서,
상기 GCL의 K_M, k_{cat} 및 k_{cat}/K_M 값은 각각 62 mM, 1 s^{-1} 및 16.0 $M^{-1}\cdot s^{-1}$인 것을 특징으로 하는 글리콜알데히드 생성용 조성물.

[청구항 5] 서열목록 제1서열에 기재된 아미노산 서열로 구성되는 신규 글리옥실레이트 카르볼리가제(glyoxylate carboligase: GCL).

[청구항 6] 제 5 항에 있어서,
상기 신규 GCL은 두 분자의 포름알데히드가 글리콜알데히드 분자 내로 축합되는 반응을 촉매 하여 글리콜알데히드를 생성하는 것을 특징으로 하는 신규 글리옥실레이트 카르볼리가제.

[청구항 7] 제 6 항에 있어서,
상기 신규 GCL의 K_M, k_{cat} 및 k_{cat}/K_M 값은 각각 24 mM, 0.8 s^{-1} 및 33.1 $M^{-1}\cdot s^{-1}$인 것을 특징으로 하는 신규 글리옥실레이트 카르볼리가제.

[청구항 8] 제 5 항의 신규 GCL을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산분자.

[청구항 9] 제 8 항의 신규 GCL를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터.

[청구항 10] 제 9 항의 벡터를 포함하는 형질전환체.

[청구항 11] 제 10 항에 있어서,
상기 형질전환체는 대장균인 것을 특징으로 하는 형질전환체.

[청구항 12] 제 11 항에 있어서,
상기 대장균은 카베올린-1(CAV1)- 매개 엔도사이토싱 대장균(CAV1-mediated endocytosing *E. coli*)인 것을 특징으로 하는 형질전환체.

[청구항 13] 제 10 항에 있어서,
상기 형질전환체는 aminotransferase를 코딩하는 핵산분자를 포함하는 벡터를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 형질전환체.

[청구항 14] 제 13 항에 있어서,
상기 aminotransferase를 코딩하는 핵산분자는 루게리아 포메로이(*Ruegeria pomeroyi*)로부터 유래된 aminotransferase(3HMU)를 코딩하는 핵산분자 또는 아그로박테리움 파브럼(*Agrobacterium fabrum*)으로부터

유래된 aminotransferase(Af-AT)를 코딩하는 핵산분자인 것을 특징으로 하는 형질전환체.

[청구항 15] 포름알데히드와, 제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항의 조성물, 제 5 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항의 신규 GCL, 제 10 항 또는 제 11 항의 형질전환체 중 하나 이상을 접촉시키는 단계를 포함하는 포름알데히드로부터의 글리콜알데히드 제조방법.

[청구항 16] 제 15 항에 있어서,
상기 단계는 30℃ 내지 60℃에서 수행되는 것을 특징으로 하는 글리콜알데히드 제조방법.

[청구항 17] 제 16 항에 있어서,
상기 단계에서 두 분자의 포름알데히드가 글리콜알데히드 분자 내로 축합되는 반응을 촉매 하는 GCL의 K_M, k_{cat} 및 k_{cat}/K_M 값은 각각 62 mM, 1.00 s^{-1} 및 16.0 $M^{-1}\cdot s^{-1}$ 이하인 것을 특징으로 하는 글리콜알데히드 제조방법.

[청구항 18] 포름알데히드와, 제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항의 조성물, 제 5 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항의 신규 GCL, 제 10 항 또는 제 11 항의 형질전환체 중 하나 이상을 접촉시켜 글리콜알데히드를 형성하는 제1단계; 및
상기 제1단계에서 얻어진 반응물에 α-ketoglutaric semialdehyde dehydrogenase (KGSADH) 또는 ALDH를 첨가하는 제2단계;를 포함하는 글리콜산 제조방법.

[청구항 19] 제 18 항에 있어서,
상기 KGSADH는 *Azospirillum brasilense*로부터 유래된 것으로, K_M, k_{cat} 및 k_{cat}/K_M 값이 각각 4 mM, 24 s^{-1} 및 6.1 $mM^{-1}\cdot s^{-1}$인 것을 특징으로 하는 글리콜산 제조방법.

[청구항 20] 제 18 항에 있어서,
상기 제2단계에서 KGSADH를 첨가하면 상기 포름알데히드의 70%이상이 글리콜산으로 전환되는 것을 특징으로 하는 글리콜산 제조방법.

[청구항 21] 포름알데히드와, 제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항의 조성물, 제 5 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항의 신규 GCL, 제 10 항 또는 제 11 항의 형질전환체 중 하나 이상을 접촉시켜 글리콜알데히드를 형성하는 제1단계; 및
상기 제1단계에서 얻어진 반응물에 1,3-propanediol dehydrogenase (DhaT) 또는 ADH를 첨가하는 제2단계;를 포함하는 에틸렌글리콜 제조방법.

[청구항 22] 제 21 항에 있어서,
상기 DhaT는 *Klebsiella pneumoniae*로부터 유래된 것으로, K_M, k_{cat} 및 k_{cat}/K_M 값이 각각 12.5 mM, 1.6 s^{-1} 및 0.13 $mM^{-1}\cdot s^{-1}$인 것을 특징으로 하는

에틸렌글리콜 제조방법.

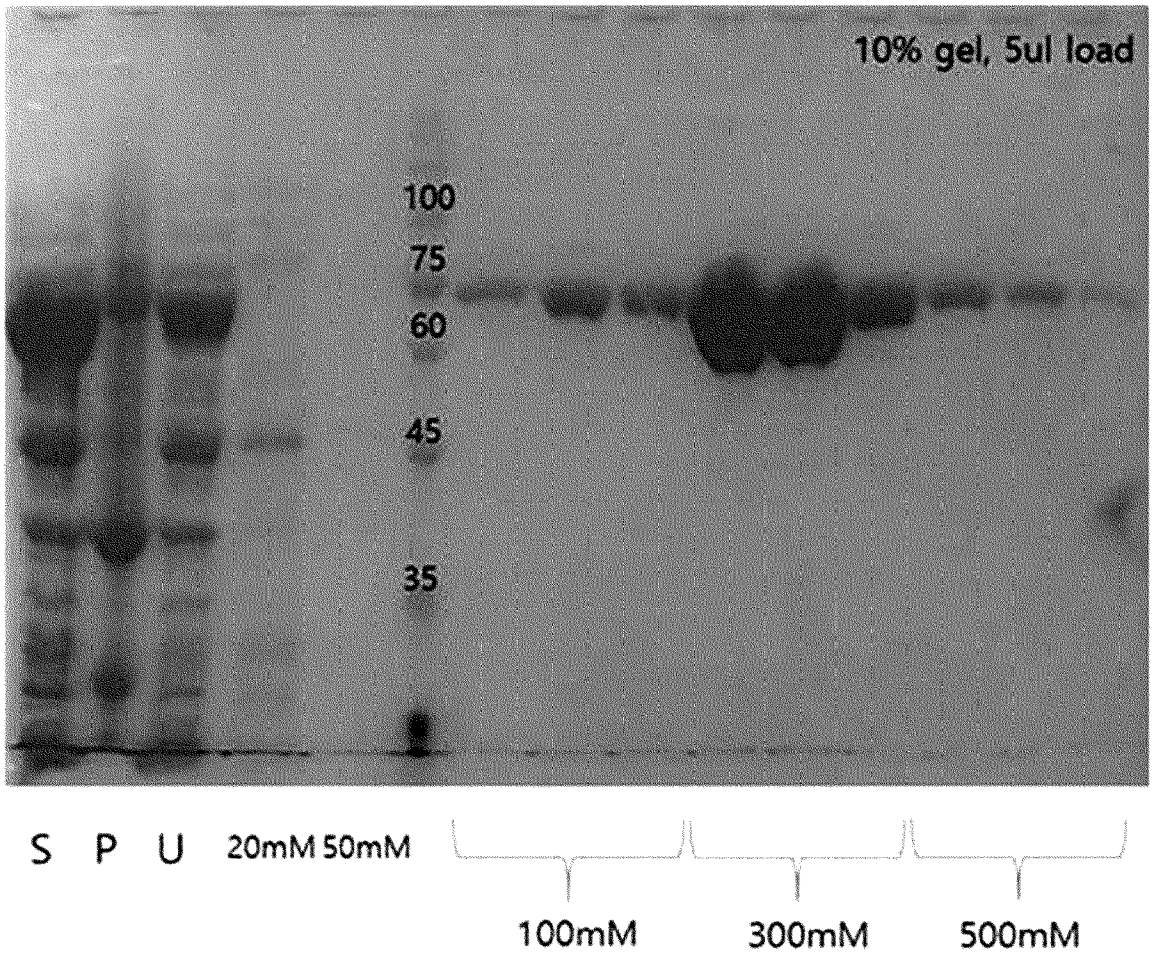
[청구항 23] 제 22 항에 있어서,
상기 제2단계에서 DhaT를 첨가하면 상기 포름알데히드의 70% 이상이 에틸렌글리콜로 전환되는 것을 특징으로 하는 에틸렌글리콜 제조방법.

[청구항 24] 포름알데히드와, 제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항의 조성물, 제 5 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항의 신규 GCL, 제 10 항 또는 제 11 항의 형질전환체 중 하나 이상을 접촉시켜 글리콜알데히드를 형성하는 제1단계; 및
상기 제1단계에서 얻어진 반응물에 aminotransferase 및 아민공여체를 첨가하는 제2단계;를 포함하는 에탄올아민 제조방법.

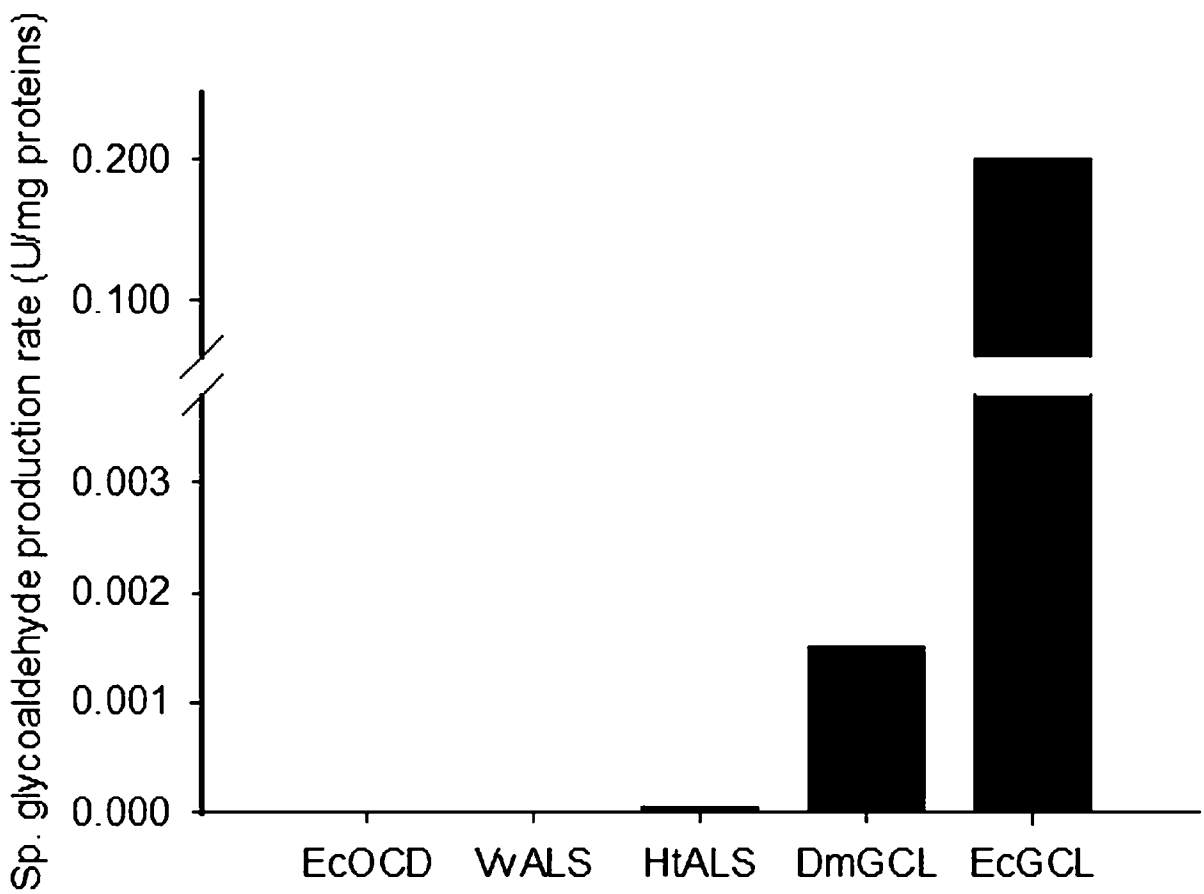
[청구항 25] 제 24 항에 있어서,
상기 aminotransferase는 루게리아 포메로이(*Ruegeria pomeroyi*)로부터 유래된 aminotransferase(3HMU) 또는 아그로박테리움 파브럼(*Agrobacterium fabrum*)으로부터 유래된 aminotransferase(Af-AT)인 것을 특징으로 하는 에탄올아민 제조방법.

[청구항 26] 포름알데히드와, 제 13 항 또는 제 14 항의 형질전환체 중 하나 이상 및 아민공여체를 접촉시키는 단계를 포함하는 포름알데히드로부터의 에탄올아민 제조방법.

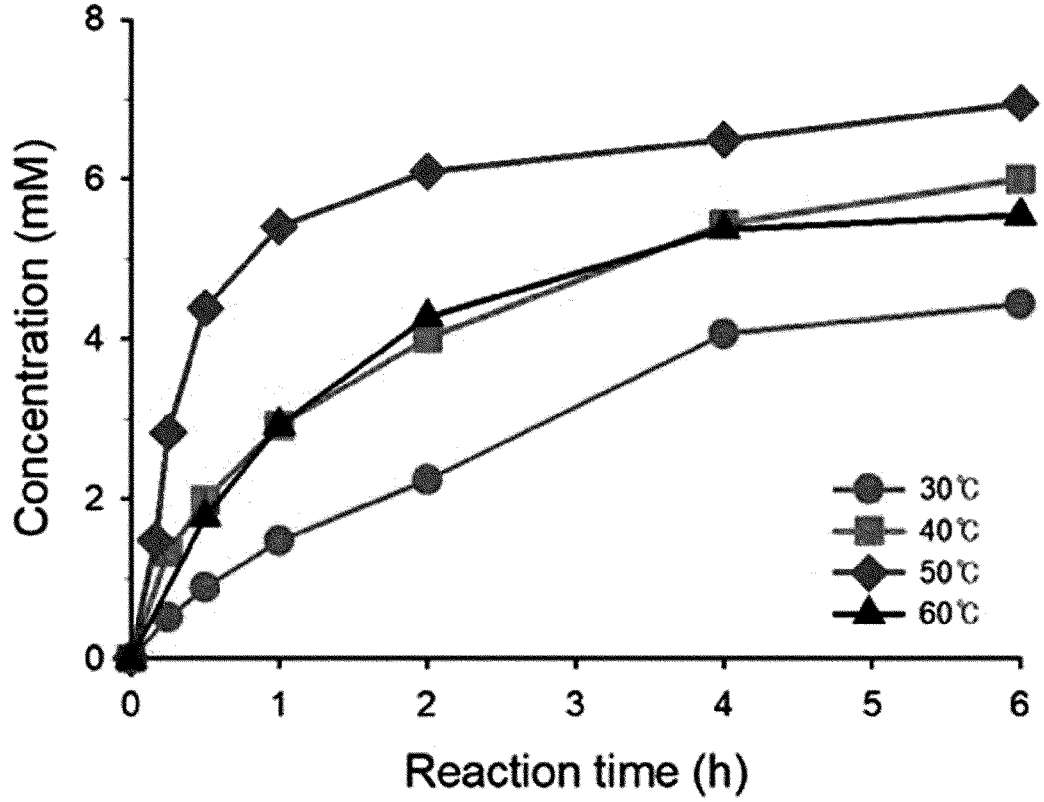
[도1a]



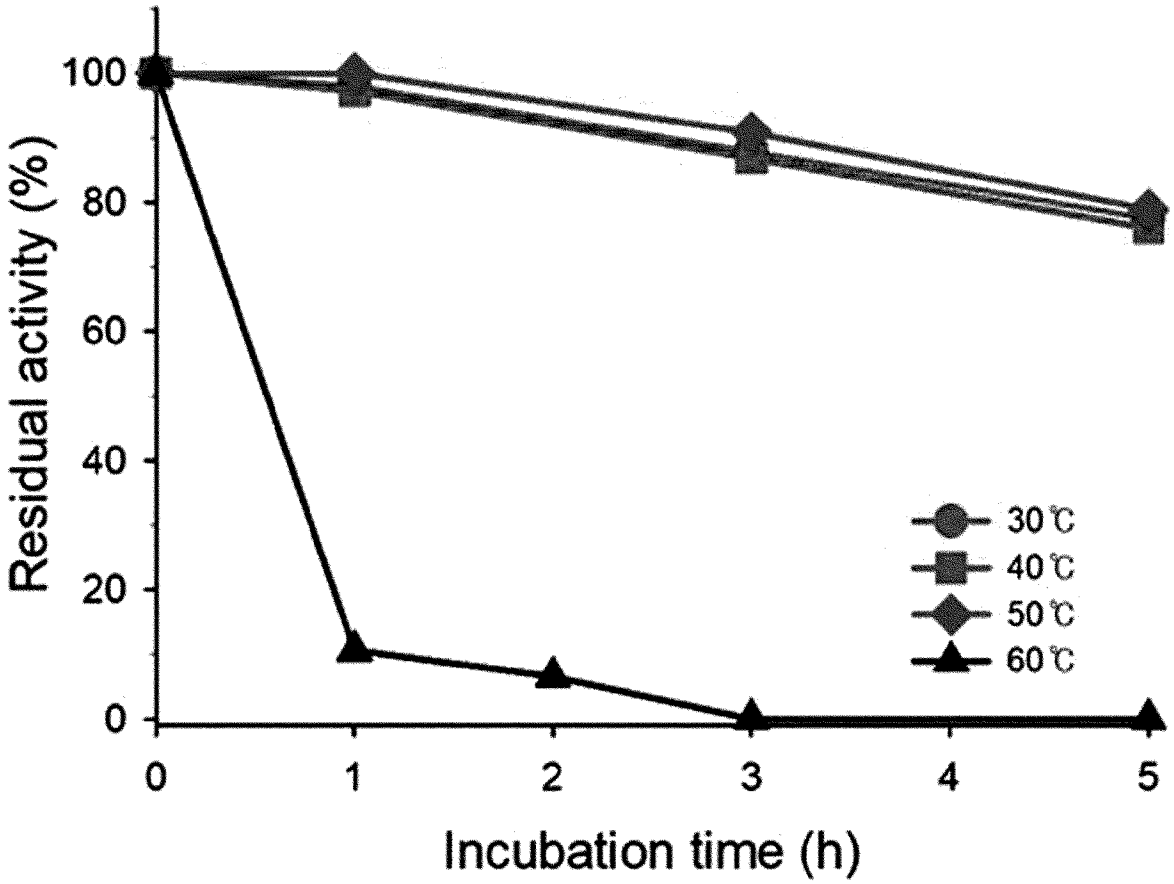
[도1b]


Sp. glycoaldehyde production rate (U/mg proteins)
0.200
0.100
0.003
0.002
0.001
0.000
EcOCD
VvALS
HtALS
DmGCL
EcGCL

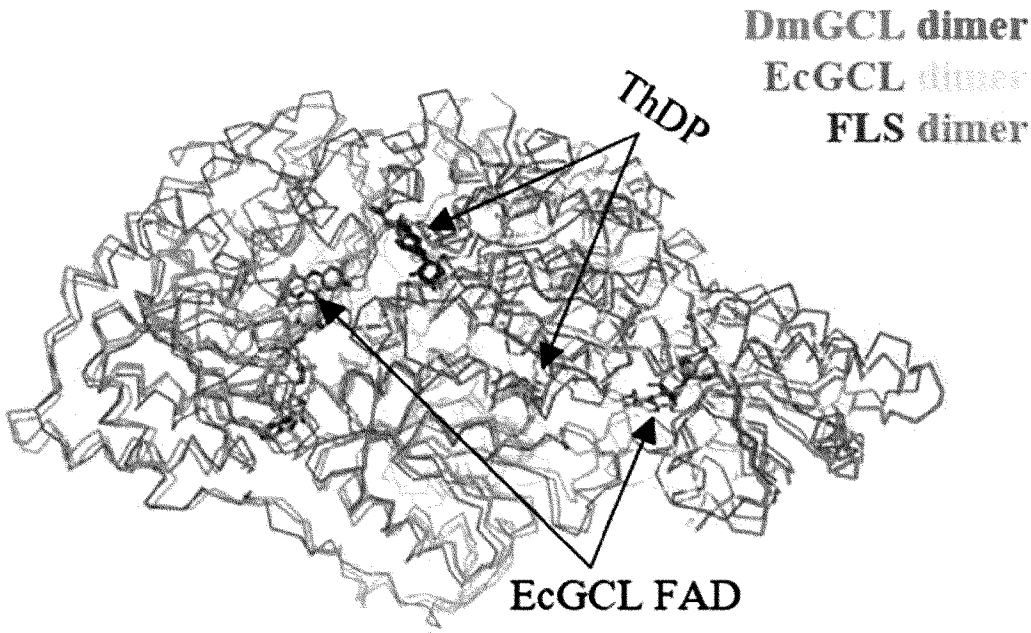
[도2]


Concentration (mM)
8
6
4
2
0
0
1
2
3
4
5
6
Reaction time (h)
30℃
40℃
50℃
60℃

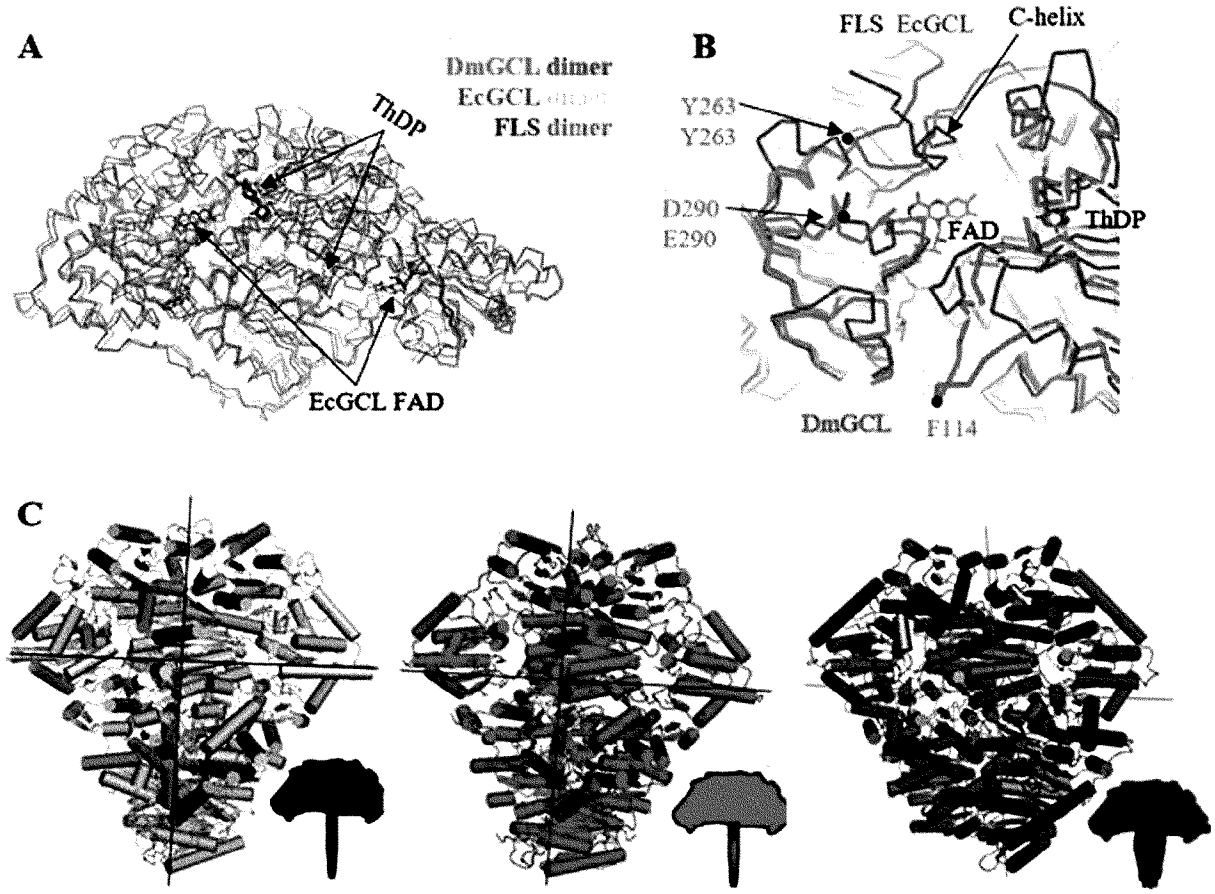
[도3]


Residual activity (%)
100
80
60
40
20
0
0
1
2
3
4
5
Incubation time (h)
30℃
40℃
50℃
60℃

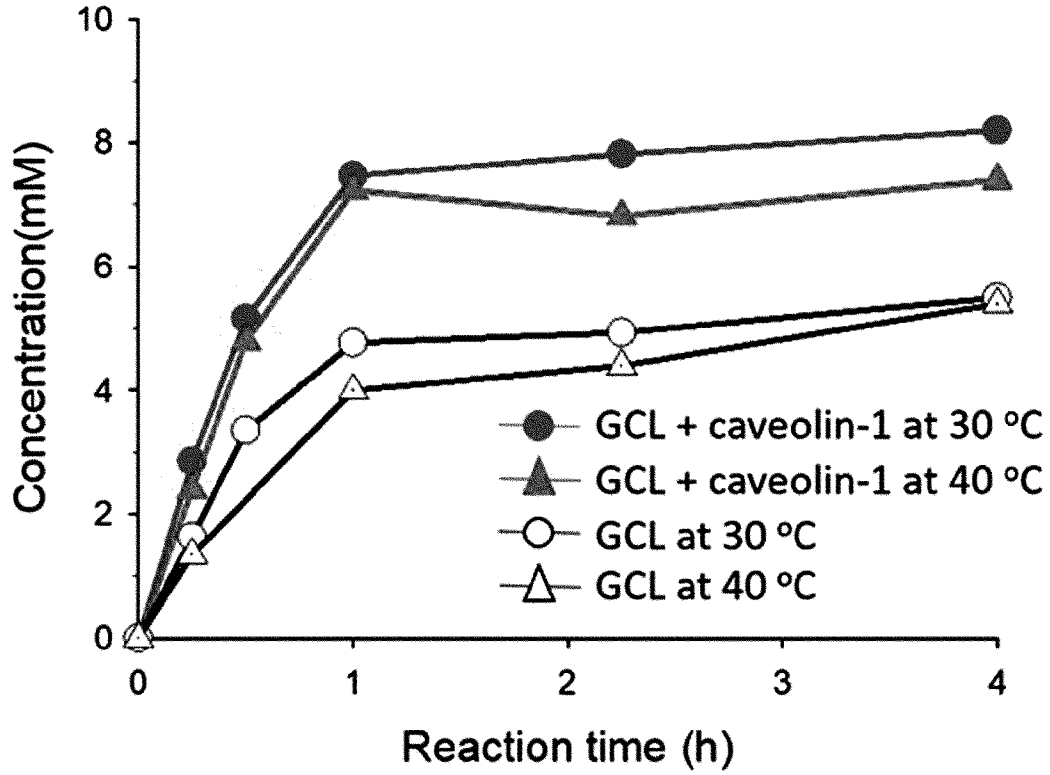
[도4a]


DmGCL dimer
EcGCL dimer
FLS dimer
ThDP
EcGCL FAD

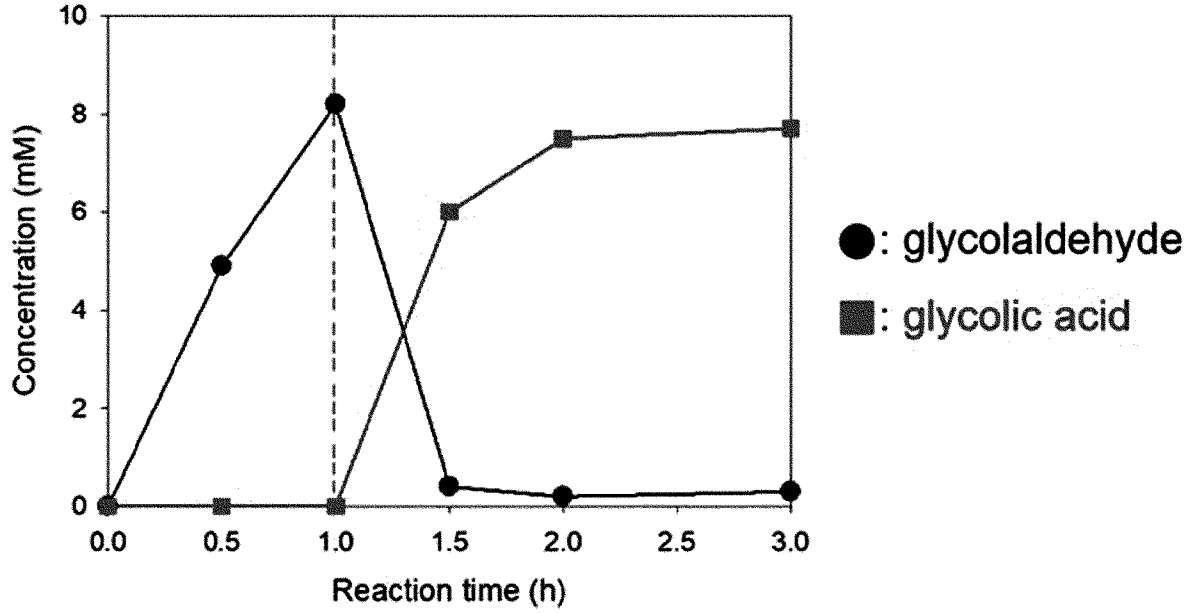
[도4b]


A
DmGCL dimer
EcGCL
FLS dimer
ThDP
EcGCL FAD
B
FLS EcGCL
C-helix
Y263
Y263
D290
E290
FAD
ThDP
DmGCL
F114
C

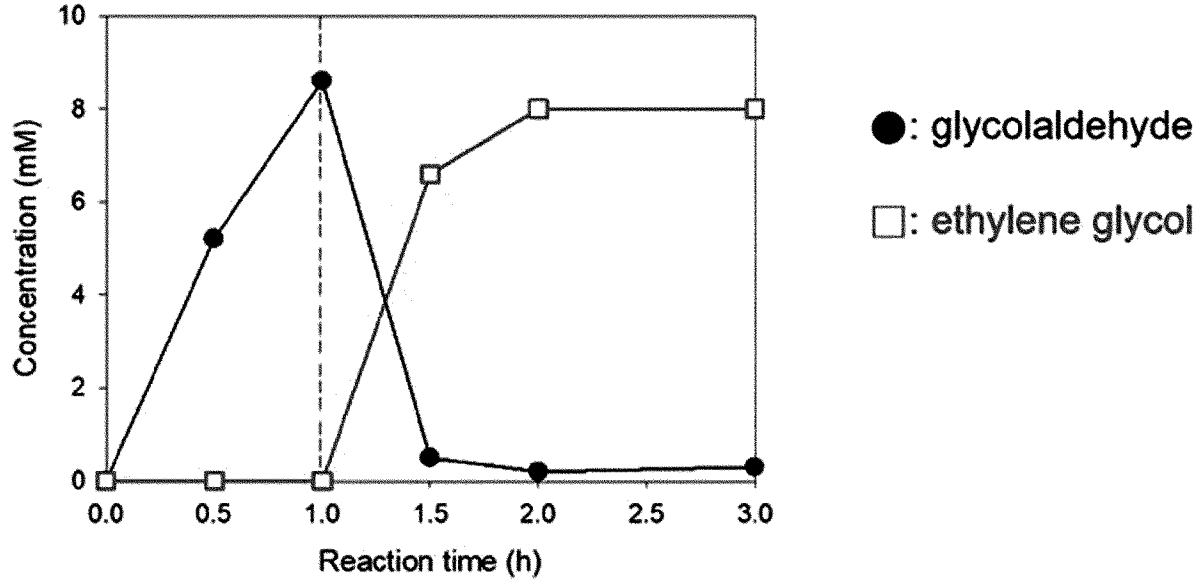
[도5]


Concentration(mM)
Reaction time (h)
0
2
4
6
8
10
0
1
2
3
4
GCL + caveolin-1 at 30 °C
GCL + caveolin-1 at 40 °C
GCL at 30 °C
GCL at 40 °C

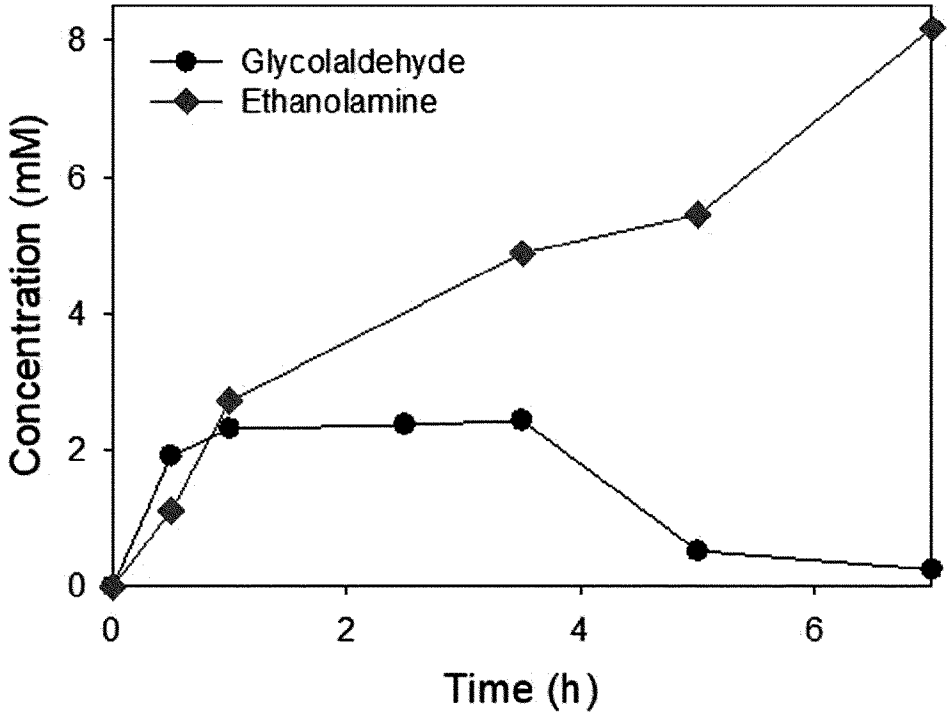
[도6a]


Concentration (mM)
Reaction time (h)
●: glycolaldehyde
■: glycolic acid

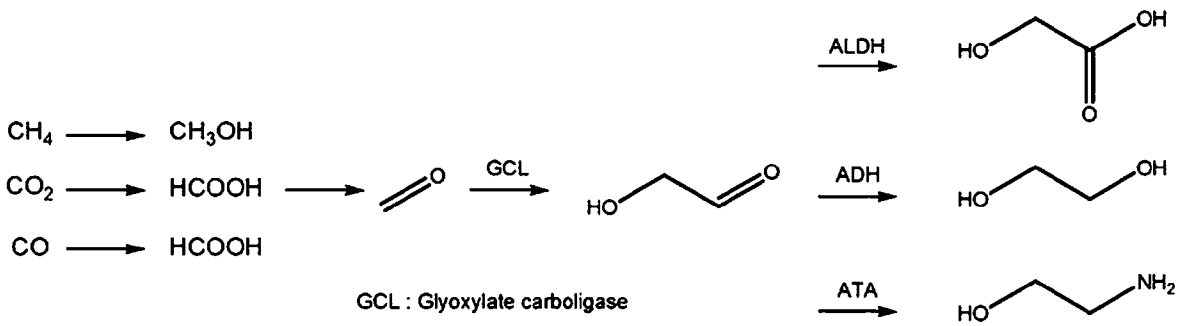
[도6b]


Concentration (mM)
Reaction time (h)
●: glycolaldehyde
□: ethylene glycol

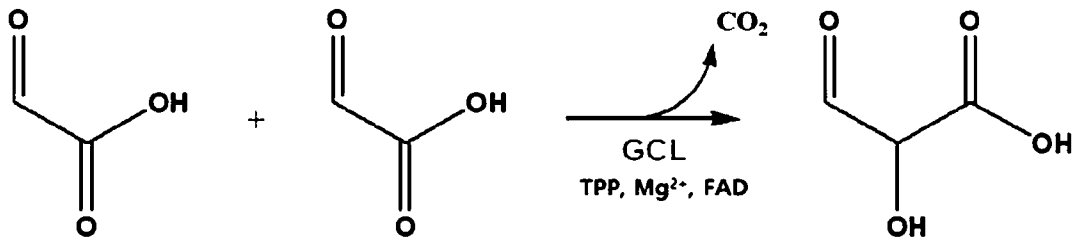
[도7]


Glycolaldehyde
Ethanolamine
Concentration (mM)
Time (h)
0
2
4
6
8

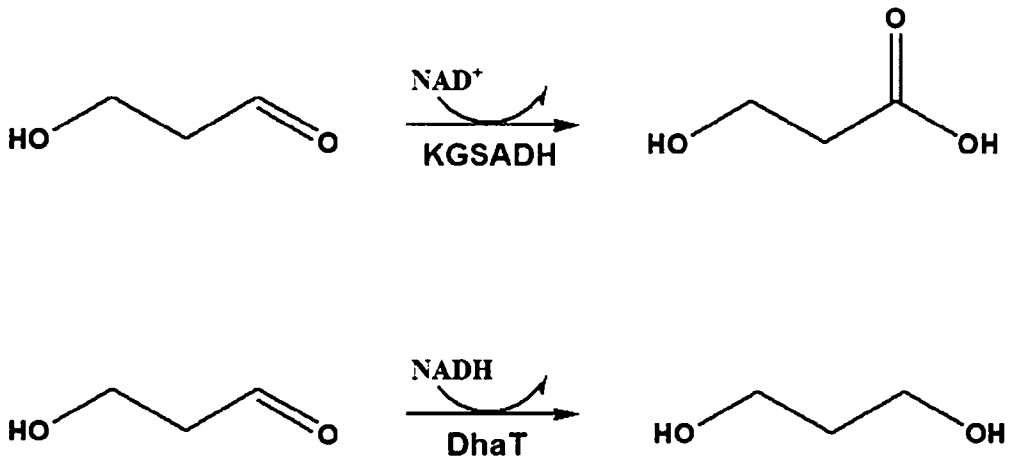
[도8]


CH4 → CH3OH
CO2 → HCOOH
CO → HCOOH
GCL
ALDH
ADH
ATA
HO
OH
NH2
GCL : Glyoxylate carboligase

[도9a]


O
OH
+
CO2
GCL
TPP, Mg2+, FAD

[도9b]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2020/018314

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 9/88(2006.01)i; **C12P 7/18**(2006.01)i; **C12N 15/52**(2006.01)i; **C12N 15/70**(2006.01)i; **C12N 9/04**(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 9/88(2006.01); C12N 1/21(2006.01); C12N 15/53(2006.01); C12P 7/04(2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 글리옥실레이트 카르볼리가제(glyoxylate carboligase), 글리콜알데히드(glycolaldehyde), 포름알데히드(formaldehyde), 글리콜산(glycolic acid), 에틸렌글리콜(ethylene glycol)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SALUSJARVI, Laura et al. Biotechnological production of glycolic acid and ethylene glycol: current state and perspectives. Applied Microbiology and Biotechnology. 2019, vol. 103, pp. 2525-2535. See abstract; page 2525; and figure 1.	1-26
A	FRANDEN, Mary Ann et al. Engineering Pseudomonas putida KT2440 for efficient ethylene glycol utilization. Metabolic Engineering. 2018, vol. 48, pp. 197-207. See entire document.	1-26
A	KR 10-2013-0093481 A (GENOMATICA, INC.) 22 August 2013 (2013-08-22) See entire document.	1-26
A	WO 2014-004625 A1 (GENOMATICA, INC.) 03 January 2014 (2014-01-03) See entire document.	1-26
A	BOER, Harry et al. In vitro reconstitution and characterisation of the oxidative D-xylose pathway for production of organic acids and alcohols. AMB Express. 2019, vol. 9, article no. 48, pp. 1-13. See entire document.	1-26

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

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
06 September 2021	**06 September 2021**

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2020/018314

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/KR2020/018314

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
KR 10-2013-0093481 A	22 August 2013	EP 2558582 A1	20 February 2013
		US 2011-0312049 A1	22 December 2011
		WO 2011-130378 A1	20 October 2011
WO 2014-004625 A1	03 January 2014	None	

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2020/018314

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 9/88(2006.01)i; **C12P 7/18**(2006.01)i; **C12N 15/52**(2006.01)i; **C12N 15/70**(2006.01)i; **C12N 9/04**(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 9/88(2006.01); C12N 1/21(2006.01); C12N 15/53(2006.01); C12P 7/04(2006.01)

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 글리옥실레이트 카르볼리가제(glyoxylate carboligase), 글리콜알데히드(glycolaldehyde), 포름알데히드(formaldehyde), 글리콜산(glycolic acid), 에틸렌글리콜(ethylene glycol)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	SALUSJARVI, LAURA 등, 'Biotechnological production of glycolic acid and ethylene glycol: current state and perspectives', Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103권, 페이지 2525-2535 요약; 페이지 2525; 도면 1 참조.	1-26
A	FRANDEN, MARY ANN 등, 'Engineering Pseudomonas putida KT2440 for efficient ethylene glycol utilization', Metabolic Engineering, 2018, 48권, 페이지 197-207 전체 문헌 참조.	1-26
A	KR 10-2013-0093481 A (게노마티카 인코포레이티드) 2013.08.22 전체 문헌 참조.	1-26
A	WO 2014-004625 A1 (GENOMATICA, INC.) 2014.01.03 전체 문헌 참조.	1-26
A	BOER, HARRY 등, 'In vitro reconstitution and characterisation of the oxidative D-xylose pathway for production of organic acids and alcohols', AMB Express, 2019, 9권, article no. 48, 페이지 1-13 전체 문헌 참조.	1-26

☐ 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	국제조사보고서 발송일
2021년09월06일(06.09.2021)	**2021년09월06일(06.09.2021)**

ISA/KR의 명칭 및 우편주소	심사관
대한민국 특허청 **(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)**	정다원
팩스 번호 **+82-42-481-8578**	전화번호 **+82-42-481-5373**

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2020/018314

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:

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2020/018314

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2013-0093481 A	2013/08/22	EP 2558582 A1	2013/02/20
		US 2011-0312049 A1	2011/12/22
		WO 2011-130378 A1	2011/10/20
WO 2014-004625 A1	2014/01/03	없음	