

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

(43) 국제공개일

2025 년 1 월 23 일 (23.01.2025)

WIPO | PCT

WO 2025/018563 A1

(51) 국제특허분류:

C12N 15/70 (2006.01)

C12N 9/00 (2006.01)

C12P 7/625 (2022.01)

C12N 9/04 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2024/007077

(22) 국제출원일:

2024 년 5 월 24 일 (24.05.2024)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2023-0091527 2023 년 7 월 14 일 (14.07.2023) KR

(71) 출원인: 삼성전자주식회사 (SAMSUNG ELECTRONICS CO., LTD.) [KR/KR]; 16677 경기도 수원시 영통구 삼성로 129, Gyeonggi-do (KR). 이화여자대학교 산학협력단 (EWHHA UNIVERSITY INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION) [KR/KR]; 03760 서울특별시 서대문구 이화여대길 52, Seoul (KR).

(72) 발명자: 황창훈 (HWANG, Changhun); 16677 경기도 수원시 영통구 삼성로 129, Gyeonggi-do (KR). 박시재 (PARK, Sijae); 10234 경기도 고양시 일산서구 하이파크 3로 62, 501-1002, Gyeonggi-do (KR). 임서현 (LIM, Seohyun); 03766 서울특별시 서대문구 이화여대1안길 17, 401, Seoul (KR). 이송은 (LEE, Songeun); 16677 경기도 수원시 영통구 삼성로 129, Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: 특허법인 세림 (SELIM INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM); 06729 서울특별시 서초구 강남대로 285 태우빌딩 10층,11층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW,

SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

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

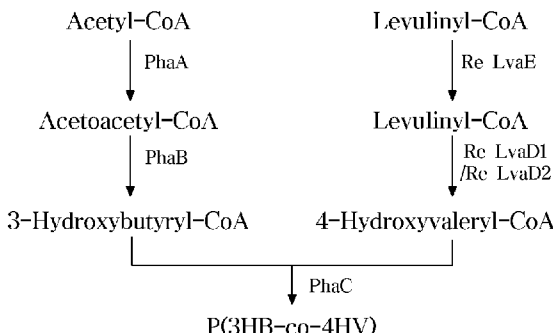
공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: GENE RECOMBINANT MICROORGANISM PRODUCING POLYHYDROXYALKANOATE AND METHOD FOR MANUFACTURING SAME

(54) 발명의 명칭: 폴리하이드록시알카노에이트를 생산하는 유전자 재조합 미생물 및 이의 제조방법



(57) Abstract: A gene recombinant microorganism according to the present disclosure comprises at least one exogenous gene including a gene having a base sequence encoding 4-hydroxyvalerate, and a gene having a base sequence derived from any one strain selected from the genus *Ralstonia* is introduced into the microorganism.

(57) 요약서: 본 개시의 사상에 따른 유전자 재조합 미생물은 적어도 하나의 외부 유전자를 포함하고, 상기 외부 유전자는 4-하이드록시발러레이트를 코딩하는 염기서열을 가지는 유전자를 포함하고, 랄스토니아(*Ralstonia*) 속에서 선택되는 어느 하나인 균주로부터 유래하는 상기 염기서열을 가지는 유전자가 미생물에 도입된다.

WO 2025/018563 A1

발명의 설명

발명의 명칭: 폴리하이드록시알카노에이트를 생산하는 유전자 재조합 미생물 및 이의 제조방법

기술분야

- [1] 본 발명은 폴리하이드록시알카노에이트를 생산하는 유전자 재조합 미생물 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 전 세계적으로 플라스틱으로 인한 환경오염이 발생함에 따라 플라스틱 폐기물 저감 방안 구축을 위해 생분해성 플라스틱 제조를 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. 생분해성 플라스틱이란 자연계에서 박테리아 등의 유기물에 의해 그 물리적 화학적 구조가 변화되는 소위 썩는 플라스틱을 말한다. 생분해성 플라스틱의 종류로는 폴리하이드록시알카노에이트(polyhydroxyalkanoate, PHA), 폴리락트산(poly lactic acid, PLA), 폴리글리콜라이드(polyglycolic acid, PG) 등이 있으며, 식품 및 화학제품 첨가제, 의약품 재료, 분해성 포장재에 사용될 수 있다.
- [3] 이 중 폴리하이드록시알카노에이트는 미생물 유래의 생분해성 플라스틱으로 기존 타 생분해성 플라스틱 대비 높은 친환경성을 보유하고 다양한 물성 조절이 가능하여 이와 관련된 연구가 활발히 진행되고 있다.

발명의 내용

기술적 과제

- [4] 본 개시의 일 측면은 *칼스토니아 유트로파* 균주의 레불린산 대사 경로와 그에 따른 4-하이드록시발러레이트의 생산 기전을 파악함으로써 *칼스토니아 유트로파* 균주 유래 유전자가 도입된 유전자 재조합 미생물 및 이의 제조방법을 제공한다.
- [5] 본 개시의 또 다른 일 측면은 상기 유전자 재조합 미생물을 이용함으로써 가공 및 응용이 용이한 4-하이드록시발러레이트를 단량체로 포함하는 폴리하이드록시알카노에이트를 합성하는 방법을 제공한다.
- [6] 본 문서에서 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 기술적 과제로 제한하지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 기술적 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

- [7] 본 개시의 사상에 따른 유전자 재조합 미생물은 적어도 하나의 외부 유전자를 포함하고, 상기 외부 유전자는 4-하이드록시발러레이트를 코딩하는 염기서열을 가지는 유전자를 포함하고, *칼스토니아(Ralstonia)* 속에서 선택되는 어느 하나인 균주로부터 유래하는 상기 염기서열을 가지는 유전자가 미생물에 도입된다.

- [8] 본 개시의 사상에 따른 유전자 재조합 미생물을 제조하는 방법은 슈도모나스 속에서 선택되는 균주로부터 *LvaED* 유전자를 분리하는 단계; 상기 분리된 *LvaED* 유전자와 랄스토니아 속에서 선택되는 균주의 유전자의 동일성을 비교하는 단계; 상기 랄스토니아 속에서 선택되는 균주의 유전자 중에서 *LvaED* 유전자와 동일성이 30% 이상인 유전자를 분리하는 단계; 및 상기 분리된 랄스토니아 속에서 선택된 균주 유래 유전자를 미생물에 도입하는 단계를 포함한다.
- [9] 본 개시의 사상에 따른 폴리하이드록시알카노에이트의 생산방법은 유전자 재조합 미생물을 배양하는 단계; 및 상기 유전자 재조합 미생물로부터 생산되는 폴리하이드록시알카노에이트를 수득하는 단계를 포함한다.

발명의 효과

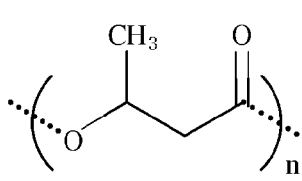
- [10] 본 개시의 사상에 따르면, 랄스토니아 유티로파 균주의 레불린산 대사 경로와 그에 따른 4-하이드록시발러레이트의 생산 기전을 파악함으로써 랄스토니아 유티로파 균주 유래 유전자가 도입된 유전자 재조합 미생물 및 이의 제조방법을 제공하며, 이를 통해 가공 및 응용이 용이한 4-하이드록시발러레이트를 단량체로 포함하는 폴리하이드록시알카노에이트를 합성하는 방법을 제공한다.
- [11] 본 개시에서 얻을 수 있는 효과는 이상에서 언급한 효과들로 제한되지 않으며, 언급하지 않은 또 다른 효과들은 아래의 기재로부터 본 개시가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [12] 도 1은 미생물에 슈도모나스 푸티다 균주의 유전자를 도입하였을 경우의 폴리하이드록시알카노에이트 생산 대사 회로를 나타낸 도이다.
- [13] 도 2는 미생물에 랄스토니아 유티로파 균주의 유전자를 도입하였을 경우의 폴리하이드록시알카노에이트 생산 대사 회로를 나타낸 도이다.
- [14] 도 3은 랄스토니아 유티로파 균주의 *Re LvaED1* 유전자가 도입된 플라스미드를 나타낸 도이다.
- [15] 도 4는 랄스토니아 유티로파 균주의 *Re LvaED2* 유전자가 도입된 플라스미드를 나타낸 도이다.
- [16] 도 5는 아에로모나스 살모니시다 균주의 *PhaC* 유전자가 도입된 플라스미드를 나타낸 도이다.
- [17] 도 6은 레불린산을 기질로 이용하는 경우의 슈도모나스 푸티다 균주의 대사 경로를 나타낸 도이다.

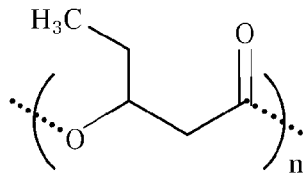
발명의 실시를 위한 형태

- [18] 명세서 전체에 걸쳐 동일 참조 부호는 동일 구성요소를 지칭한다. 본 명세서가 실시예들의 모든 요소들을 설명하는 것은 아니며, 본 발명이 속하는 기술분야에서 일반적인 내용 또는 실시예들 간에 중복되는 내용은 생략한다.

- [19] 또한 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.
- [20] 명세서 전체에서, 어떤 부재가 다른 부재 "상에" 위치하고 있다고 할 때, 이는 어떤 부재가 다른 부재에 접해 있는 경우뿐 아니라 두 부재 사이에 또 다른 부재가 존재하는 경우도 포함한다.
- [21] 제 1, 제 2 등의 용어는 하나의 구성요소를 다른 구성요소로부터 구별하기 위해 사용되는 것으로, 구성요소가 전술된 용어들에 의해 제한되는 것은 아니다.
- [22] 단수의 표현은 문맥상 명백하게 예외가 있지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다.
- [23] 각 단계들에 있어 식별 부호는 설명의 편의를 위하여 사용되는 것으로 식별 부호는 각 단계들의 순서를 설명하는 것이 아니며, 각 단계들은 문맥상 명백하게 특정 순서를 기재하지 않는 이상 명기된 순서와 다르게 실시될 수 있다.
- [24] 이하 첨부된 도면 및 서열목록을 참조하여 유전자 재조합 미생물에 대해 상세하게 설명한다.
- [25] 본 개시의 사상에 따른 유전자 재조합 미생물은 적어도 하나의 외부 유전자를 포함하고, 상기 외부 유전자는 4-하이드록시발러레이트를 코딩하는 염기서열을 가지는 유전자를 포함하고, *랄스토니아(Ralstonia)* 속에서 선택되는 어느 하나인 균주로부터 유래하는 상기 염기서열을 가지는 유전자가 미생물에 도입된다. 이를 통해 재조합된 미생물은 4-하이드록시발러레이트를 포함하는 폴리하이드록시알카노에이트를 생산할 수 있다.
- [26] 폴리하이드록시알카노에이트는 미생물 유래의 생분해성 플라스틱으로 기존 타 생분해성 플라스틱 대비 높은 친환경성을 보유하고 있으며, 상기 폴리하이드록시알카노에이트는 폴리(3-하이드록시부티레이트), 폴리(3-하이드록시발러레이트), 폴리(4-하이드록시발러레이트), 폴리(3-하이드록시부티레이트-co-3-하이드록시발러레이트), 폴리(3-하이드록시부티레이트-co-4-하이드록시발러레이트), 폴리(3-하이드록시발러레이트-co-4-하이드록시발러레이트) 및 폴리(3-하이드록시부티레이트-co-4-하이드록시발러레이트-co-4-하이드록시발러레이트)으로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나일 수 있다.
- [27] 상기 폴리(3-하이드록시부티레이트)은 하기 화학식 1와 같은 구조를 가질 수 있다.
- [28] [화학식 1]
- [29]
- 
- [30] 상기 폴리(3-하이드록시발러레이트)은 하기 화학식 2와 같은 구조를 가질 수 있다.

[31] [화학식 2]

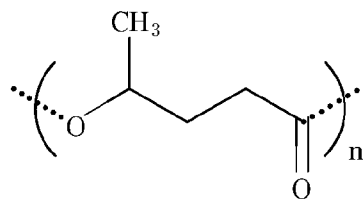
[32]



[33] 상기 폴리(4-하이드록시발러레이트)은 하기 화학식 3과 같은 구조를 가질 수 있다.

[34] [화학식 3]

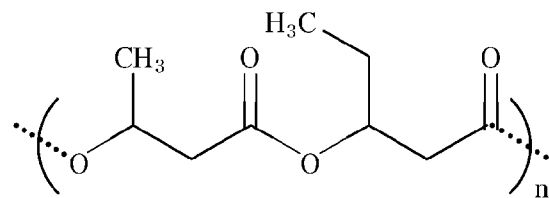
[35]



[36] 상기 폴리(3-하이드록시부티레이트-co-3-하이드록시발러레이트)은 하기 화학식 4과 같은 구조를 가질 수 있다.

[37] [화학식 4]

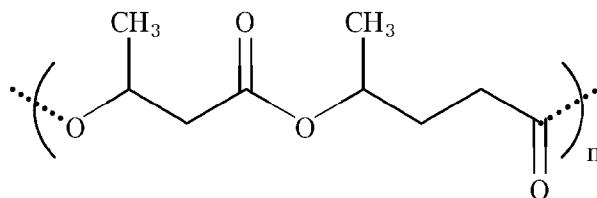
[38]



[39] 상기 폴리(3-하이드록시부티레이트-co-4-하이드록시발러레이트)은 하기 화학식 5과 같은 구조를 가질 수 있다.

[40] [화학식 5]

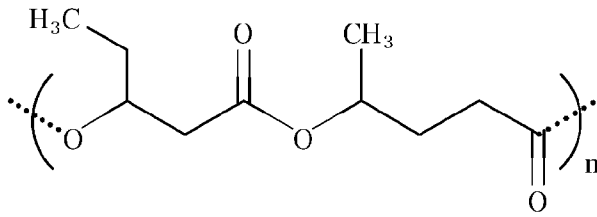
[41]



[42] 상기 폴리(3-하이드록시발러레이트-co-4-하이드록시발러레이트)은 하기 화학식 6과 같은 구조를 가질 수 있다.

[43] [화학식 6]

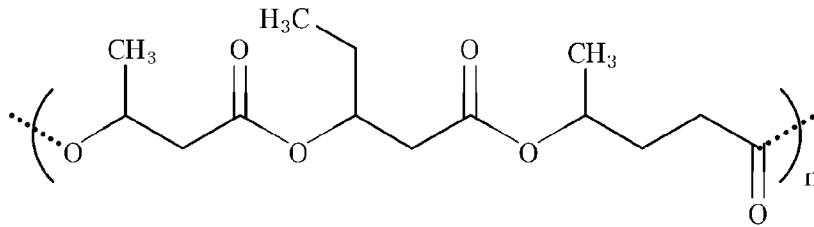
[44]



[45] 상기 폴리(3-하이드록시부티레이트-co-4-하이드록시발러레이트-co-4-하이드록시발러레이트)은 하기 화학식 7과 같은 구조를 가질 수 있다.

[46] [화학식 7]

[47]



[48] 폴리(3-하이드록시부티레이트)는 딱딱한 물성과 높은 녹는점으로 인해 활용에 어려움이 있어 추가적인 단량체의 중합이 요구되는데, 이에 3-하이드록시발러레이트, 4-하이드록시발러레이트가 단량체로 포함될 수 있다. 특히, 4-하이드록시발러레이트가 포함되는 경우 폴리하이드록시알카노에이트는 무정형, 탄성체의 특징을 가질 수 있다.

[49] 3-하이드록시발러레이트, 4-하이드록시발러레이트는 미생물을 통하여 레블린산으로부터 합성될 수 있는데, 레블린산은 다양한 바이오매스에서 생산될 수 있는 여러 고부가가치 물질의 전구체로서 상당한 잠재력을 가진 탄소원이다. 재생 가능한 자원에서 얻은 레블린산으로부터 3-하이드록시발러레이트, 4-하이드록시발러레이트를 포함하는 폴리하이드록시알카노에이트를 야생형에서 생산할 수 있는 균주에는 *슈도모나스 푸티다*, *칼스토니아 유티로파* 등이 있다. *슈도모나스 푸티다* 균주의 레블린산 대사 경로는 *LvaED* 유전자를 통해 4-하이드록시발러레이트-CoA(4HV-CoA), *LvaABC* 유전자를 통해 3-하이드록시발러레이트-CoA(3HV-CoA)가 생산되는 것으로 밝혀졌으나, *칼스토니아 유티로파* 균주의 4-하이드록시발러레이트 합성 관련 기전은 아직 밝혀지지 않았다. 도 6와 같이 *슈도모나스 푸티다* 균주의 레블린산 대사 경로가 밝혀짐으로써, 균주 개놈내의 대사 경로 제거 및 유전자 도입 등 여러 대사공학적 방법을 통해 다양한 단량체를 가지는 폴리하이드록시알카노에이트의 생산이 가능해졌다. 이에 따라 본 발명에서는 기전이 밝혀진 *슈도모나스 푸티다* 균주를 활용하여 *칼스토니아 유티로파* 균주 유래의 4-하이드록시발러레이트 합성 유전자를 미생물에 도입한 유전자 재조합 미생물을 제공한다.

[50] 본 개시의 사상에 따른 유전자 재조합 미생물은, 상기 4-하이드록시발러레이트를 코딩하는 염기서열을 가지는 유전자가 *Re LvaE*, *Re LvaD1*, 및 *Re LvaD2* 유

전자를 포함할 수 있다. 상기 *Re LvaE*, *Re LvaD1*, 및 *Re LvaD2* 유전자는 랄스토니아 유트로파 균주의 유전자 중 슈도모나스 푸티다 균주의 *LvaE*, *LvaD* 유전자와 동일성이 가장 높은 유전자를 의미한다. 유전자 동일성은 염기서열의 시퀀스가 일치하는 영역을 백분율로 계산한 것이며, 백분율이 높을수록 유전자간 동일성이 높은 것으로 판단되고, 상기 *Re LvaE*, *Re LvaD1*, 및 *Re LvaD2* 유전자와 *LvaE*, *LvaD* 유전자의 동일성은 30% 이상일 수 있고, 바람직하게는 40% 이상일 수 있으며, 더 바람직하게는 50% 이상일 수 있다. 상기 *Re LvaE* 유전자, *Re LvaD1*, 및 *Re LvaD2* 유전자는 각각 서열번호 1 내지 3의 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드일 수 있고, 상기 각 염기서열로 코딩되는 *Re LvaE* 효소, *Re LvaD1* 및 *Re LvaD2* 효소는 폴리펩타이드일 수 있다. 상기 *Re LvaE* 효소는 단쇄 아실-CoA 신테타제로서, 레불린산을 레불린산-CoA로 촉매하여 활성화시킬 수 있다. *Re LvaD1*, 및 *Re LvaD2* 효소는 4-옥소펜타노일-CoA-4-데하이드로게나제로서, 레불린산-CoA를 4-하이드록시발레르산-CoA로의 전환을 촉매할 수 있다.

- [51] 본 개시의 사상에 따른 유전자 재조합 미생물은, 상기 균주가 랄스토니아 유트로파(*Ralstonia eutropha*) 균주일 수 있다.
- [52] 본 개시의 사상에 따른 유전자 재조합 미생물은, 유전자가 도입되는 미생물이 에스체르키아(*Escherichia*) 속, 맨하이미아(*Mannheimia*) 속, 로도박터(*Rhodobacter*) 속 및 메틸로박테리움(*Methylobacterium*) 속으로 이루어지는 군에서 선택될 수 있고, 바람직하게는 에스체르키아 속에서 선택될 수 있다.
- [53] 본 개시의 사상에 따른 유전자 재조합 미생물은, 서열번호 4의 염기서열을 가지는 *PhaA*, 서열번호 5의 염기서열을 가지는 *PhaB*, 서열번호 6의 염기서열을 가지는 *PhaC*로 이루어진 군에서 선택되는 유전자를 더 포함할 수 있다. 본 발명에서 사용하는 용어 "*PhaABC*"는 *PhaA*, *PhaB* 및 *PhaC* 유전자이다. 상기 *PhaA* 유전자는 서열번호 4의 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드일 수 있고, 상기 염기서열로 코딩되는 *PhaA* 효소는 폴리펩타이드일 수 있다. 또한, 상기 *PhaB* 유전자는 서열번호 5의 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드일 수 있고, 상기 염기서열로 코딩되는 *PhaB* 효소는 폴리펩타이드일 수 있다. 상기 *PhaA* 효소는 아세틸-CoA 아세틸 트랜스퍼라제로서, 아세토아세틸-CoA를 형성하기 위해 두 개의 아세틸-coA 단위의 축합을 촉매할 수 있다. 또한, 상기 *PhaB* 효소는 아세토아세틸-CoA 환원효소로서, 아세토아세틸-CoA의 (R)-3-하이드록시부티릴-CoA로의 키랄 환원을 촉매할 수 있다. 상기 *PhaC* 유전자는 서열번호 6의 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드일 수 있고, 상기 염기서열로 코딩되는 *PhaC* 효소는 폴리펩타이드일 수 있다. *PhaC* 효소는 단량체인 하이드록시알카노에이트를 중합하여 폴리하이드록시알카노에이트를 생합성시키는 효소이다.
- [54] 본 개시의 사상에 따른 유전자 재조합 미생물은, 4-하이드록시발러레이트 물질(%)이 증가된 폴리하이드록시알카노에이트를 생산할 수 있다. 4-하이드록시발러레이트가 포함되는 경우 폴리하이드록시알카노에이트는 무정형, 탄성체의 특징을 가질 수 있어 다양한 범위로 사용될 수 있다.

- [55] 다음은 상기 유전자 재조합 미생물을 제조하는 방법에 대하여 설명한다.
- [56] 본 개시의 사상에 따른 유전자 재조합 미생물은, 슈도모나스 속에서 선택되는 균주로부터 *LvaED* 유전자를 분리하는 단계; 상기 분리된 *LvaED* 유전자와 랄스토니아 속에서 선택되는 균주의 유전자의 동일성을 비교하는 단계; 상기 랄스토니아 속에서 선택되는 균주의 유전자 중에서 *LvaED* 유전자와 동일성이 30% 이상인 유전자를 분리하는 단계; 및 상기 분리된 랄스토니아 속에서 선택된 균주 유래 유전자를 미생물에 도입하는 단계;를 포함할 수 있다.
- [57] 랄스토니아 유티로파 균주는 야생형에서 레블린산으로부터 4-하이드록시발러레이트와 3-하이드록시발러레이트를 포함하는 폴리하이드록시알카노에이트를 생산하지만, 이러한 레블린산 대사 경로와 4-하이드록시발러레이트, 3-하이드록시발러레이트의 생성 기전은 아직 밝혀지지 않고 있다. 따라서, 생성기전을 규명하기 위해 기존에 레블린산 대사 회로가 명확히 밝혀진 슈도모나스 푸티다 균주와 비슷한 대사 회로를 가진다고 가정하여, 슈도모나스 푸티다 균주의 *LvaED* 유전자와 비교하였을 때, 높은 퍼센트 동일성(아이덴티티)를 가지는 랄스토니아 유티로파 균주 내 유전자를 선별하였다. 이 때, 슈도모나스 푸티다 균주의 레블린산 대사 회로는 도 6과 같고, 가장 높은 동일성을 가지는 유전자를 각각 *Re LvaE*, *Re LvaD1*, *Re LvaD2*로 명명하였으며, 유전자 간 동일성은 바람직하게는 30% 이상일 수 있다.
- [58] 랄스토니아 유티로파 균주 유래의 *Re LvaED1* 유전자가 삽입된 플라스미드인 pKM212 *Re LvaE Re LvaD1*를 도 3과 같이 구축하고, *Re LvaED2* 유전자가 삽입된 플라스미드인 pKM212 *Re LvaE Re LvaD2*를 도 4와 같이 구축할 수 있다. 도 5를 참조하면, p3AZ2C-ReAB와 pKM212 *Re LvaE Re LvaD1* 플라스미드를 도입할 수 있다. *에스체르키아*(*Escherichia*) 속, *맨하이미아*(*Mannheimia*) 속, *로도박터*(*Rhodobacter*) 속 및 *메틸로박테리움*(*Methylobacterium*) 속으로 이루어지는 군에서 선택되는 미생물에 클로닝(형질전환)의 방법을 사용하여 상기 플라스미드를 도입한 후 레블린산과 글루코스를 탄소원으로 사용하여 배양하면, 이전보다 더 높은 4-하이드록시발러레이트 몰 분율을 갖는 고분자를 생산할 수 있다.
- [59] 슈도모나스 속 미생물은 슈도모나스 테아(*Pseudomonas theae*), 슈도모나스 톨라시(*Pseudomonas tolaasii*), 슈도모나스 플루오레센스(*Pseudomonas fluorescens*), 슈도모나스 트레메(*Pseudomonas tremae*), 슈도모나스 비리디플라바(*Pseudomonas viridiflava*), 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*), 슈도모나스 카리카파파야(*Pseudomonas caricapapayae*), 슈도모나스 코루가타(*Pseudomonas corrugata*), 슈도모나스 코스탄티니(*Pseudomonas costantinii*), 슈도모나스 피쿠세렉타(*Pseudomonas ficuserectae*), 슈도모나스 푸스코바지나(*Pseudomonas fuscovaginae*), 슈도모나스 마지날리스(*Pseudomonas marginalis*), 슈도모나스 메디테라나(*Pseudomonas mediterranea*), 슈도모나스 시린개 pv. 액티니디에(*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*), 슈도모나스 멜리아(*Pseudomonas meliae*), 슈도모나스 팔레로니아나(*Pseudomonas palleroniana*), 슈도모나스 살로모니(*Pseudomonas salomonii*), 슈도모나스 아

가리시(*Pseudomonas agarici*), 슈도모나스 아미그달리(*Pseudomonas amygdali*), 슈도모나스 아스플레니(*Pseudomonas asplenii*), 슈도모나스 아시아티카(*Pseudomonas asiatica*), 슈도모나스 시트로넬로리스(*Pseudomonas citronellolis*), 슈도모나스 타이와넨시스(*Pseudomonas taiwanensis*), 슈도모나스 아벨라니(*Pseudomonas avellanae*), 슈도모나스 플레코글로시시다(*Pseudomonas plecoglossicida*), 슈도모나스 칸나비나(*Pseudomonas cannabina*), 슈도모나스 이네피카스(*Pseudomonas inefficax*), 슈도모나스 몬테일리(*Pseudomonas monteilii*) 등일 수 있고, 특히 슈도모나스 플루오레센스, 슈도모나스 푸티다, 슈도모나스 시린개 pv. 액티니디에, 슈도모나스 아시아티카, 슈도모나스 시트로넬로리스, 슈도모나스 타이와넨시스, 슈도모나스 플레코글로시시다, 슈도모나스 이네피카스, 슈도모나스 몬테일리 등일 수 있으며, 특히 슈도모나스 플루오레센스, 슈도모나스 푸티다, 슈도모나스 시린개 pv. 액티니디에, 슈도모나스 아시아티카, 슈도모나스 시트로넬로리스, 슈도모나스 플레코글로시시다 등일 수 있고, 바람직하게는 슈도모나스 푸티다 KT2440 균주일 수 있다.

- [60] 본 발명에서 용어 "*LvaED*"는 *LvaD* 유전자 및 *LvaE* 유전자를 의미한다. 상기 *LvaD* 유전자 및 *LvaE* 유전자는 각각 서열번호 7 및 8의 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드일 수 있고, 상기 각 염기서열로 코딩되는 *LvaD* 효소 및 *LvaE* 효소는 폴리펩타이드일 수 있다. 상기 *LvaE* 효소는 단쇄 아실-CoA 신테타제로서, 레블린산을 레블린산-CoA로 촉매하여 활성화시킬 수 있다. *LvaD* 효소는 4-옥소펜타노일-CoA-4-데하이드로게나제로서, 레블린산-CoA를 4-하이드록실발레르산-CoA로의 전환을 촉매할 수 있다.
- [61] 본 개시의 사상에 따른 유전자 제조합 미생물의 제조방법에 있어서, 상기 *LvaED* 유전자와 동일성이 30% 이상인 유전자는 서열번호 1의 염기서열을 가지는 *Re LvaE*, 서열번호 2의 염기서열을 가지는 *Re LvaD1*, 및 서열번호 3의 염기서열을 가지는 *Re LvaD2* 유전자를 포함할 수 있다.
- [62] 본 개시의 사상에 따른 유전자 제조합 미생물의 제조방법에 있어서, 서열번호 4의 염기서열을 가지는 *PhaA*, 서열번호 5의 염기서열을 가지는 *PhaB*, 및 서열번호 6의 염기서열을 가지는 *PhaC*로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 유전자를 미생물에 도입하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 *PhaA* 및 *PhaB* 유전자는 *칼스토니아 유티로파* 균주로부터 유래할 수 있고, *PhaC* 유전자는 *아에로모나스 살모니시다* 균주로부터 유래할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [63] 도 1 및 6에서, "*LvaABC*"는 *LvaA*, *LvaB* 및 *LvaC* 유전자를 의미한다. 상기 *LvaA* 유전자는 서열번호 9로 표시되는 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드일 수 있고, 상기 염기서열로 코딩되는 *LvaA* 효소는 폴리펩타이드일 수 있다. 상기 *LvaB* 유전자는 서열번호 10으로 표시되는 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드일 수 있고, 상기 염기서열로 코딩되는 *LvaB* 효소는 폴리펩타이드일 수 있다. 또한, 상기 *LvaC* 유전자는 서열번호 11의 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드일 수 있고, *LvaC* 효소는 폴리펩타이드일 수 있다.

- [64] 본 발명에서 사용한 용어, "형질전환" 또는 "유전자 재조합"은 목적 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 포함된 벡터를 숙주세포 내에 도입하여 숙주세포 내에서 상기 목적 단백질이 발현할 수 있도록 하는 것을 의미한다.
- [65] 다음은 폴리하이드록시알카노에이트의 생산방법에 대하여 설명한다.
- [66] 본 개시의 사상에 따른 폴리하이드록시알카노에이트의 생산방법은 상술한 유전자 재조합 미생물을 배양하는 단계; 및 상기 유전자 재조합 미생물로부터 생산되는 폴리하이드록시알카노에이트를 수득하는 단계를 포함한다. p3AZ2C-ReAB와 pKM212 Re LvaE Re LvaD1 플라스미드를 도입할 수 있다. *에스체르키아*(*Escherichia*) 속, *맨하이미아*(*Mannheimia*) 속, *로도박터*(*Rhodobacter*) 속 및 *메틸로박테리움*(*Methylobacterium*) 속으로 이루어지는 군에서 선택되는 미생물에 클로닝(형질전환)의 방법을 사용하여 상기 플라스미드를 도입한 후 레불린산과 글루코스를 탄소원으로 사용하여 배양하면, 이전보다 더 높은 4-하이드록시발러레이트 물 분율을 갖는 고분자를 생산할 수 있다. *왈스토니아 유트로파* 군주 유래의 *Re LvaED1D2* 유전자를 도입한 고분자 생산 대사 경로는 도 2와 같다.
- [67] 본 개시의 사상에 따른 폴리하이드록시알카노에이트의 생산방법은, 상기 배양하는 단계는 레불린산을 주요 기질로 활용하여 질소가 제한된 환경 내에서 계대배양하는 것일 수 있다.
- [68] 폴리하이드록시알카노에이트는 미생물이 영양분이 제한된 환경에서 에너지를 보존하기 위해 만드는 것으로 추측되는데, 제한된 환경에서는 미생물이 잘 자라지 못하기 때문에 일정 수준 이상 성장한 미생물을 처음에 만들어주는 과정이 필요하다. 따라서, 1차적으로 영양분이 풍부한 Complex media에서 미생물이 일정 수준 이상 클 수 있도록 배양한 후 이를 질소가 제한된 Defined media에 계대하여 폴리하이드록시알카노에이트 고분자 생산을 유도한다.
- [69] 본 발명의 미생물의 배양에 사용되는 배지 및 기타 배양 조건은 통상의 배양에 사용되는 배지라면 특별한 제한 없이 어느 것이나 사용할 수 있다. 구체적으로는 본 발명의 미생물을 적당한 탄소원, 질소원, 인원, 무기화합물, 아미노산 및/또는 비타민 등을 함유한 통상의 배지 내에서 호기성 조건 하에서 온도, pH 등을 조절하면서 배양할 수 있다.
- [70] 상기 배지에는 인원으로서 인산이수소칼륨, 인산수소이칼륨 또는 소듐-함유염이 포함될 수 있다. 또한, 황산마그네슘 또는 황산 철과 같은 금속염을 포함할 수 있다. 그 외에 아미노산, 비타민 및 적절한 전구체 등이 포함될 수 있다.
- [71] 또한, 배양 중에 수산화암모늄, 수산화칼륨, 암모니아, 인산 및 황산과 같은 화합물을 배양물에 적절한 방식으로 첨가하여, 배양물의 pH를 조정할 수 있다. 또한, 배양물의 호기 상태를 유지하기 위하여, 배양물 내로 산소 또는 산소 함유 기체를 주입하거나 혐기 및 미호기 상태를 유지하기 위해 기체의 주입 없이 혹은 질소, 수소 또는 이산화탄소 가스를 주입할 수 있다.
- [72] 배양물의 온도는 일반적으로 20°C 내지 40°C, 구체적으로는 25°C 내지 37°C, 더욱 구체적으로는 30°C일 수 있으나, 목적하는 목적에 따라 제한 없이 변경될 수

있다. 배양 기간은 원하는 유용 물질의 생산량에 도달할 때까지 계속 할 수 있으며, 구체적으로는 10 시간 내지 100 시간일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[73] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

[74] [실시예]

[75] 아래 표 1에 따른 균주를 이용하여 유전자 재조합 미생물을 제조하였다.

[76] [표1]

명칭	특성
랄스토니아 유티로파(<i>Ralstonia eutropha</i>) KCTC2649	야생형
슈도모나스 푸티다(<i>Pseudomonas putida</i>) KT2440	야생형
<i>Escherichia coli</i> XL1- Blue	야생형, 재조합 균주

[77] 구체적으로, 4-하이드록시발러레이트의 생산 기전이 밝혀진 슈도모나스 푸티다의 *LvaED* 유전자와 랄스토니아 유티로파의 유전자의 동일성을 비교하였고, 그 중 유전적 동일성이 가장 높은 유전자 *Re LvaE*, *Re LvaD1*, *Re LvaD2*를 아래 표 2에 나타내었다.

[78] [표2]

랄스토니아 유티로파	슈도모나스 푸티다	동일성 (%)
Re LvaE	LvaE	54.51
Re LvaD1	LvaD	51.17
Re LvaD2	LvaD	51.81

[79] 플라스미드 제작을 위해 사용된 프라이머는 하기와 같다.

[80] [표3]

프라이머 명	서열 정보
Re_LvaE55_F_EcoRI	aaaagaattcatgctgcccgccgctgccac
Re_LvaE55_R_XbaI	aaaatctagatcatgggtgggtgccggaattg
Re_LvaD52_1_F_SbfI_rbs	aaaaacctgcaggtttcacacaggaaacagaccatgaaccagcaagaa cgcaa
Re_LvaD52_1_R_HindIII	aaaaaaagctttcagagcgagctgaccgcgt
Re_LvaD52_2_F_SbfI_rbs	aaaaacctgcaggtttcacacaggaaacagaccatggcttccccacctcgt ccacaa
Re_LvaD52_2_R_HindIII	aaaaaaagctttcagagcgagctgaccagatgcc

- [81] 사용된 플라스미드는 pKM212로, pBBR1 오리진, tac 프로모터, 카나마이신 저항성을 포함한 플라스미드이다. 구체적으로 사용하기 위한 플라스미드를 제작하기 위해서 pKM212 플라스미드를 EcoRI과 XbaI으로 절단하였다. *칼스토니아 유트로파* 균주의 게놈에서 Re LvaE 유전자를 Re_LvaE55_F_EcoRI, Re_LvaE55_R_XbaI 프라이머를 사용하여 PCR 함으로써 증폭하였다. 증폭한 유전자를 EcoRI과 XbaI으로 절단하고, 절단된 pKM212 플라스미드와 라이게이션을 통해 연결하였다. 이후 제작된 플라스미드는 대장균 XL1-Blue 균주에 형질도입시킨 후, 카나마이신 항생제가 첨가된 배지에서 콜로니를 선별하였다.
- [82] 제작된 pKM212 Re LvaE 플라스미드를 SbfI과 HindIII으로 절단하였다. *칼스토니아 유트로파* 균주의 게놈에서 Re LvaD1, Re LvaD2 유전자를 각각 Re_LvaD52_1_F_SbfI_rbs, Re_LvaD52_1_R_HindIII과 Re_LvaD52_2_F_SbfI_rbs, Re_LvaD52_2_R_HindIII 프라이머를 사용하여 PCR 함으로써 증폭하였다. 증폭한 유전자를 SbfI과 HindIII으로 절단하고, 절단된 pKM212 Re LvaE 플라스미드와 라이게이션을 통해 연결하였다. 이후 *Escherichia coli* XL1-Blue 균주에 형질도입시킨 후, 카나마이신 항생제가 첨가된 배지에서 콜로니를 선별함으로써 pKM212 Re LvaE Re LvaD1, pKM212 Re LvaE Re LvaD2 플라스미드를 제작하였다. 제작된 pKM212 Re LvaE Re LvaD1, pKM212 Re LvaE Re LvaD2 플라스미드는 형질전환을 방법을 통해 *칼스토니아 유트로파* 균주에 도입되었다. 형질전환 방법은 다음과 같다.
- [83] *Escherichia coli* XL1-Blue 균주의 컴피턴트 셀을 만들고 플라스미드를 삽입한 후 42°C에서 1분 30초간 히트락을 주었다. 그 후 1 mL의 LB 액체 배지를 첨가하여 37°C 웨이커에서 1시간 리커버리 시켰다. 그 후 원심분리를 진행하고, 상층액을 따라버린 후 재현탁시켜 카나마이신 항생제가 포함된 LB 고체 배지에 스프레딩하였다. 이 때 3-하이드록시부티레이트와 4-하이드록시발러레이트를 포함하는 폴리하이드록시알카노에이트를 생산하기 위해 *칼스토니아 유트로파* 균주의 *PhaA*, *PhaB* 유전자, *아에로모나스 살모니시다* 균주의 *PhaC* 유전자가 포함된 플라스미드 p3AZ2CReAB를 함께 도입하였다.
- [84] pKM212 Re LvaE Re LvaD1과 p3AZ2CReAB, pKM212 Re LvaE Re LvaD2과 p3AZ2CReAB 플라스미드가 포함된 *Escherichia coli* XL1-Blue 균주를 카나마이신과 암피실린 항생제가 포함된 LB 액체 배지 10 ml에 접종하여, 37 °C에서 하루 동안 배양하였다. 그 후 카나마이신과 암피실린 항생제가 포함된 MR (per liter: 6.67 g KH₂PO₄, 4 g (NH₄)₂HPO₄, 0.8 g MgSO₄·7H₂O, 0.8 g citric acid, 5 ml trace metal solution, Trace metal solution per liter of 0.5M HCl: 10 g FeSO₄·7H₂O, 2 g CaCl₂, 2.2 g ZnSO₄·7H₂O, 0.5 g MnSO₄·4H₂O, 1 g CuSO₄·5H₂O, 0.1 g (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, 0.02 g Na₂B₄O₇·10H₂O) 액체 배지 100 mL가 들어있는 250 mL 플라스크에 배양액 1 mL를 접종하여 30°C에서 72시간 배양하였다. 탄소원으로 글루코스 20 g/L와 레불린산 1 g/L를 포함하였다. 모든 실험은 세 번씩 수행되었다.

[85] 배양을 완료한 후 배양액을 4°C에서 20분동안 4,000rpm으로 원심분리하여 펠렛을 수집해 2번 세척한 후, 65°C에서 하루 동안 건조시켰다. 건조시킨 펠렛은 PHA 분석을 위해 클로로포름 2 mL와 PHA solution 1 mL와 함께 95°C에서 하루 동안 반응시켰고, 온도를 상온까지 식힌 후 1 mL의 3차수를 넣고 볼텍싱을 진행하였다. 이후 분리된 반응물(유기 용매 층)을 GC를 통해 분석하였다.

[86] 아래 표 4에, p3AZ2C-ReAB와 pKM212 Re LvaE Re LvaD1 플라스미드를 도입한 대장균을 배양한 결과를 실시예 1로 나타내고, p3AZ2C-ReAB와 pKM212 Re LvaE Re LvaD2 플라스미드를 도입한 대장균을 배양한 결과를 실시예 2로 나타내었다.

[87] [표4]

	PHA content (%)	PHA conc. (g/L)	3HB mol%	4HV mol%
실시예 1	64.00	0.70	98.48	1.52
실시예 2	68.25	1.41	99.72	0.28

[88] PHA: 폴리하이드록시알카노에이트3HB: 3-하이드록시부티레이트4HV: 4-하이드록시발러레이트

[89] 상기 표 4에 따르면, 슈도모나스 푸티다균주의 *LvaED* 유전자와 같은 역할을 할 것이라고 생각되는 칼스토니아 유티로파균주의 유전자를 도입함으로써 대장균에서 4-하이드록시발러레이트를 포함하는 폴리하이드록시알카노에이트를 생산할 수 있음을 확인하였고, 이를 통해 칼스토니아 유티로파균주의 *Re LvaE*, *Re LvaD1*, *Re LvaD2*가 슈도모나스 푸티다균주의 *LvaED* 유전자와 비슷한 역할을 함을 확인할 수 있었고, 이러한 유전자를 도입하여 4-하이드록시발러레이트를 포함하는 폴리하이드록시알카노에이트를 대장균에서 생산함으로써 더 유용한 물성을 가지는 폴리하이드록시알카노에이트를 생산할 수 있음을 설명한다.

[90] 일 실시예에 따른 유전자 재조합 미생물은 적어도 하나의 외부 유전자를 포함하고, 상기 외부 유전자는 4-하이드록시발러레이트를 코딩하는 염기서열을 가지는 유전자를 포함하고, 칼스토니아(*Ralstonia*) 속에서 선택되는 어느 하나인 균주로부터 유래하는 상기 염기서열을 가지는 유전자가 미생물에 도입된다.

[91] 또한, 상기 4-하이드록시발러레이트를 코딩하는 염기서열을 가지는 유전자는 *Re LvaE*, *Re LvaD1*, 및 *Re LvaD2* 유전자를 포함할 수 있다.

[92] 또한, 상기 *Re LvaE* 유전자는 서열번호 1의 염기서열을 가질 수 있다.

[93] 또한, 상기 *Re LvaD1* 유전자는 서열번호 2의 염기서열을 가질 수 있다.

[94] 또한, 상기 *Re LvaD2* 유전자는 서열번호 3의 염기서열을 가질 수 있다.

[95] 또한, 상기 균주는 칼스토니아 유티로파(*Ralstonia eutropha*) 균주일 수 있다.

[96] 또한, 상기 미생물은 에스체르키아(*Escherichia*) 속, 맨하이미아(*Mannheimia*) 속, 로도박터(*Rhodobacter*) 속 및 메틸로박테리움(*Methylobacterium*) 속으로 이루어지는 균에서 선택될 수 있다.

- [97] 또한, 상기 유전자 재조합 미생물은 서열번호 4의 염기서열을 가지는 *PhaA*, 서열번호 5의 염기서열을 가지는 *PhaB*, 서열번호 6의 염기서열을 가지는 *PhaC*로 이루어진 군에서 선택되는 유전자를 더 포함할 수 있다.
- [98] 또한, 상기 유전자 재조합 미생물은 4-하이드록시발러레이트 물분율(%)이 증가된 폴리하이드록시알카노에이트를 생산할 수 있다.
- [99] 일 실시예에 따른 유전자 재조합 미생물을 제조하는 방법은, 슈도모나스 속에서 선택되는 균주로부터 *LvaED* 유전자를 분리하는 단계; 상기 분리된 *LvaED* 유전자와 랄스토니아 속에서 선택되는 균주의 유전자의 동일성을 비교하는 단계; 상기 랄스토니아 속에서 선택되는 균주의 유전자 중에서 *LvaED* 유전자와 동일성이 30% 이상인 유전자를 분리하는 단계; 및 상기 분리된 랄스토니아 속에서 선택된 균주 유래 유전자를 미생물에 도입하는 단계;를 포함한다.
- [100] 또한, *LvaE* 유전자는 서열번호 7의 염기서열을 가질 수 있다.
- [101] 또한, *LvaD* 유전자는 서열번호 8의 염기서열을 가질 수 있다.
- [102] 또한, 상기 *LvaED* 유전자와 동일성이 30% 이상인 유전자는 서열번호 1의 염기서열을 가지는 *Re LvaE*, 서열번호 2의 염기서열을 가지는 *Re LvaD1*, 및 서열번호 3의 염기서열을 가지는 *Re LvaD2* 유전자를 포함할 수 있다.
- [103] 또한, 서열번호 4의 염기서열을 가지는 *PhaA*, 서열번호 5의 염기서열을 가지는 *PhaB*, 및 서열번호 6의 염기서열을 가지는 *PhaC*로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 유전자를 미생물에 도입하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [104] 또한, 상기 미생물은 *에스체르키아(Escherichia)* 속, *맨하이미아(Mannheimia)* 속, *로도박터(Rhodobacter)* 속 및 *메틸로박테리움(Methylobacterium)* 속으로 이루어지는 군에서 선택될 수 있다.
- [105] 일 실시예에 따른 폴리하이드록시알카노에이트의 생산방법은, 유전자 재조합 미생물을 배양하는 단계; 및 상기 유전자 재조합 미생물로부터 생산되는 폴리하이드록시알카노에이트를 수득하는 단계를 포함한다.
- [106] 또한, 폴리하이드록시알카노에이트의 생산방법은, 상기 배양하는 단계는 레블린산을 주요 기질로 활용하여 질소가 제한된 환경 내에서 계대배양하는 것일 수 있다.
- [107] 또한, 폴리하이드록시알카노에이트의 생산방법은, 상기 수득된 폴리하이드록시알카노에이트는 4-하이드록시발러레이트 물분율(%)이 증가된 것일 수 있다.
- [108] 또한, 폴리하이드록시알카노에이트의 생산방법은, 상기 폴리하이드록시알카노에이트는 폴리(3-하이드록시부티레이트), 폴리(3-하이드록시발러레이트), 폴리(4-하이드록시발러레이트), 폴리(3-하이드록시부티레이트-co-3-하이드록시발러레이트), 폴리(3-하이드록시부티레이트-co-4-하이드록시발러레이트), 폴리(3-하이드록시발러레이트-co-4-하이드록시발러레이트) 및 폴리(3-하이드록시부티레이트-co-4-하이드록시발러레이트-co-4-하이드록시발러레이트)으로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나일 수 있다.

- [109] 이상으로, 일 실시예에 따른 유전자 재조합 미생물 및 폴리하이드록시알카노에이트의 생산방법에 대해 설명하였다.
- [110] 이상으로 개시된 발명의 실시예에 대하여 도시하고 설명하였지만, 개시된 발명은 상술한 특정의 실시예에 한정되지 아니하며 청구범위에서 청구하는 요지를 벗어남 없이 개시된 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 다양한 변형실시가 가능할 수 있다.

서열목록

- [111] 서열목록 전자파일 첨부(D:/Auto Backup/Desktop/0524/폴리하이드록시알카노에이트를 생산하는 유전자 재조합 미생물 및 이의 제조방법.xml)

청구범위

- [청구항 1] 적어도 하나의 외부 유전자를 포함하고,
상기 외부 유전자는 4-하이드록시발러레이트를 코딩하는 염기서열을 가지는 유전자를 포함하고,
랄스토니아(*Ralstonia*) 속에서 선택되는 어느 하나인 균주로부터 유래하는 상기 염기서열을 가지는 유전자가 미생물에 도입되는, 유전자 재조합 미생물.
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서,
상기 4-하이드록시발러레이트를 코딩하는 염기서열을 가지는 유전자는 *Re LvaE*, *Re LvaD1*, 및 *Re LvaD2* 유전자를 포함하는, 유전자 재조합 미생물.
- [청구항 3] 청구항 2에 있어서,
상기 *Re LvaE* 유전자는 서열번호 1의 염기서열을 갖는, 유전자 재조합 미생물.
- [청구항 4] 청구항 2에 있어서,
상기 *Re LvaD1* 유전자는 서열번호 2의 염기서열을 갖는, 유전자 재조합 미생물.
- [청구항 5] 청구항 2에 있어서,
상기 *Re LvaD2* 유전자는 서열번호 3의 염기서열을 갖는, 유전자 재조합 미생물.
- [청구항 6] 청구항 1에 있어서,
상기 균주는 랄스토니아 유티로파(*Ralstonia eutropha*) 균주인, 유전자 재조합 미생물.
- [청구항 7] 청구항 1에 있어서,
상기 미생물은 에스체르키아(*Escherichia*) 속, 맨하이미아(*Mannheimia*) 속, 로도박터(*Rhodobacter*) 속 및 메틸로박테리움(*Methylobacterium*) 속으로 이루어지는 군에서 선택되는, 유전자 재조합 미생물.
- [청구항 8] 청구항 1에 있어서,
상기 유전자 재조합 미생물은 서열번호 4의 염기서열을 가지는 *PhaA*, 서열번호 5의 염기서열을 가지는 *PhaB*, 서열번호 6의 염기서열을 가지는 *PhaC*로 이루어진 군에서 선택되는 유전자를 더 포함하는, 유전자 재조합 미생물.
- [청구항 9] 청구항 1에 있어서,
상기 유전자 재조합 미생물은 4-하이드록시발러레이트 물분율(%)이 증가된 폴리하이드록시알카노에이트를 생산하는, 유전자 재조합 미생물.
- [청구항 10] 슈도모나스 속에서 선택되는 균주로부터 *LvaED* 유전자를 분리하는 단계;

상기 분리된 *LvaED* 유전자와 랄스토니아 속에서 선택되는 균주의 유전자의 동일성을 비교하는 단계;

상기 랄스토니아 속에서 선택되는 균주의 유전자 중에서 *LvaED* 유전자와 동일성이 가장 높은 유전자를 분리하는 단계; 및

상기 분리된 랄스토니아 속에서 선택된 균주 유래 유전자를 미생물에 도입하는 단계;

를 포함하는, 유전자 재조합 미생물을 제조하는 방법.

[청구항 11] 청구항 10에 있어서,

LvaE 유전자는 서열번호 7의 염기서열을 갖는, 유전자 재조합 미생물을 제조하는 방법.

[청구항 12] 청구항 10에 있어서,

LvaD 유전자는 서열번호 8의 염기서열을 갖는, 유전자 재조합 미생물을 제조하는 방법.

[청구항 13] 청구항 10에 있어서,

상기 *LvaED* 유전자와 동일성이 가장 높은 유전자는 서열번호 1의 염기서열을 가지는 *Re LvaE*, 서열번호 2의 염기서열을 가지는 *Re LvaD1*, 및 서열번호 3의 염기서열을 가지는 *Re LvaD2* 유전자를 포함하는, 유전자 재조합 미생물을 제조하는 방법.

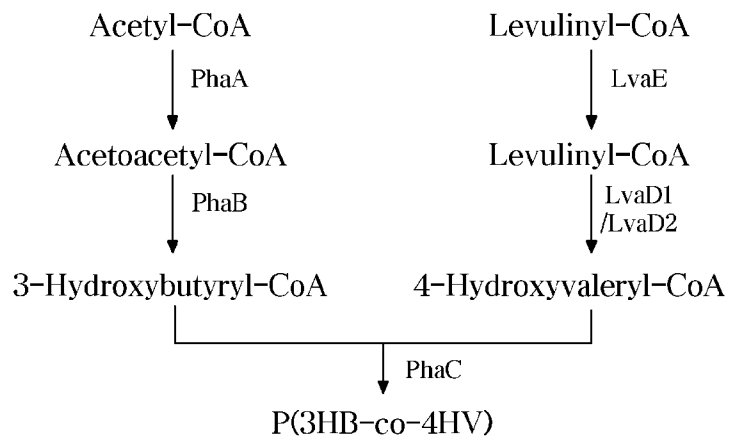
[청구항 14] 청구항 10에 있어서,

서열번호 4의 염기서열을 가지는 *PhaA*, 서열번호 5의 염기서열을 가지는 *PhaB*, 및 서열번호 6의 염기서열을 가지는 *PhaC*로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 유전자를 미생물에 도입하는 단계를 더 포함하는, 유전자 재조합 미생물을 제조하는 방법.

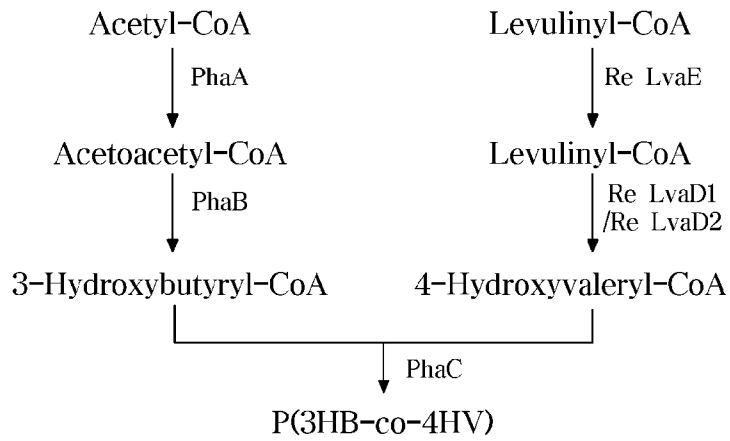
[청구항 15] 청구항 10에 있어서,

상기 미생물은 *에스체르키아*(*Escherichia*) 속, *맨하이미아*(*Mannheimia*) 속, *로도박터*(*Rhodobacter*) 속 및 *메틸로박테리움*(*Methylobacterium*) 속으로 이루어지는 군에서 선택되는, 유전자 재조합 미생물을 제조하는 방법.

[도1]



[도2]



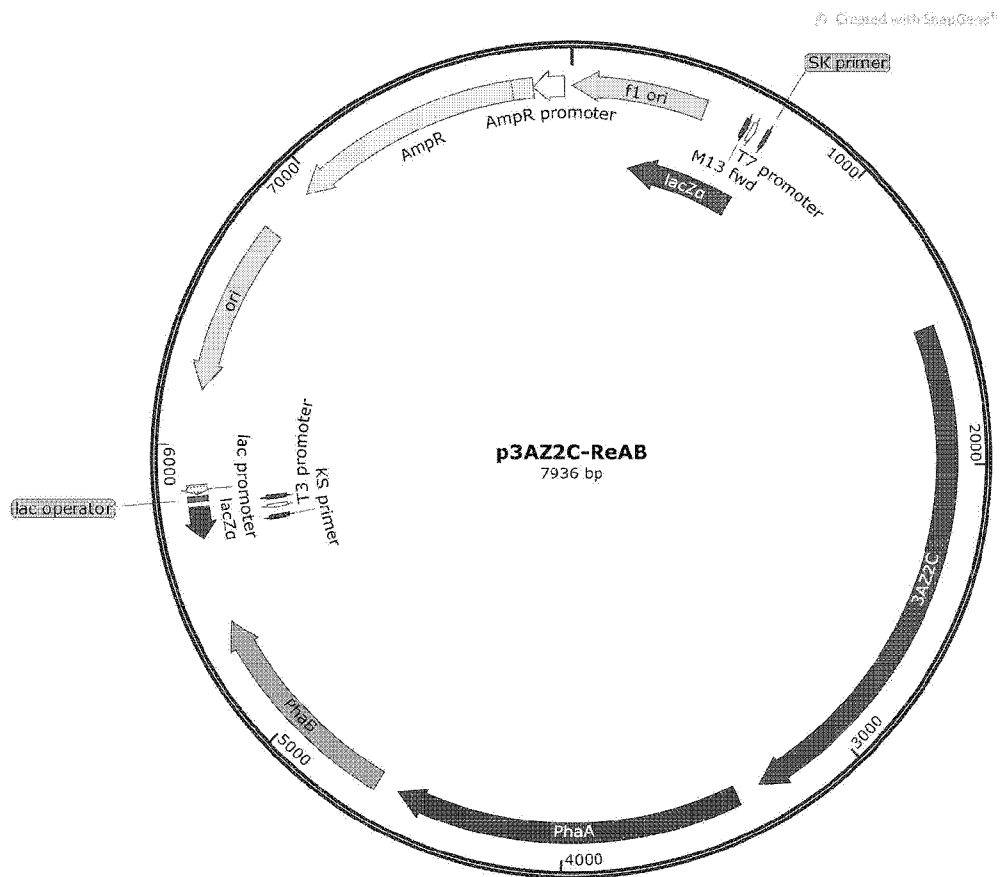
[도3]

규칙 91,
05.08.2024

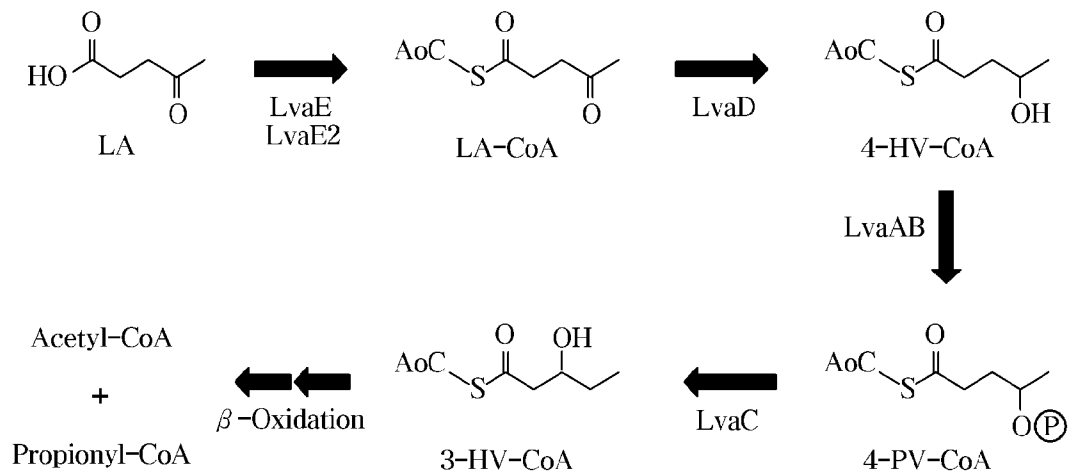
[도4]

규칙 91,
05.08.2024

[도5]

규칙 91,
05.08.2024

[도6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/007077

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/70(2006.01)i; C12P 7/625(2022.01)i; C12N 9/00(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 15/70(2006.01); C07K 14/245(2006.01); C08G 63/06(2006.01); C12N 1/21(2006.01); C12N 15/31(2006.01);
C12N 15/63(2006.01); C12N 9/02(2006.01); C12N 9/10(2006.01); C12P 7/62(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: 유전자 재조합(genetic recombination), 미생물(microorganism),
4-하이드록시발레레이트(4-hydroxyvalerate), 랄스토니아 유티로파(Ralstonia eutropha), 슈도모나스 속
(Pseudomonas), 형질전환(transformation), 폴리하이드록시알카노에이트(polyhydroxyalkanoate)**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 3594350 A1 (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 15 January 2020 (2020-01-15) See abstract; and claims 1 and 2.	1-15
A	KR 10-1293886 B1 (LG CHEM, LTD.) 07 August 2013 (2013-08-07) See abstract; and claims 1, 2, 8 and 13.	1-15
A	KR 10-2016-0083470 A (KONKUK UNIVERSITY INDUSTRIAL COOPERATION CORP.) 12 July 2016 (2016-07-12) See abstract; claims 1-3 and 5; and paragraphs [0004], [0006]-[0008] and [0027].	1-15
A	KR 10-2177736 B1 (UNIST(ULSAN NATIONAL INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY)) 11 November 2020 (2020-11-11) See abstract; and claims 1, 4, 8-10, 12, 26 and 28.	1-15



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

13 September 2024

Date of mailing of the international search report

19 September 2024

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	DENNIS, D. et al. Formation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by PHA synthase from Ralstonia eutropha. Journal of Biotechnology. 1998, vol. 64, pp. 177-186. See abstract.	1-15
A	KIM, J. et al. Crystal structure of Ralstonia eutropha polyhydroxyalkanoate synthase C-terminal domain and reaction mechanisms. Biotechnol. J. 2017, vol. 12, document no. 1600648, pp. 1-12. See abstract.	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/007077

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2024/007077

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
EP	3594350	A1	15 January 2020	CN	110382699	A	25 October 2019
				CN	110382699	B	05 April 2024
				EP	3594350	A4	09 December 2020
				JP	2020-508665	A	26 March 2020
				JP	6854909	B2	07 April 2021
				KR	10-2018-0099447	A	05 September 2018
				KR	10-2036828	B1	25 October 2019
				US	10961521	B2	30 March 2021
				US	2019-0352622	A1	21 November 2019
				WO	2018-159965	A1	07 September 2018
KR	10-1293886	B1	07 August 2013	CN	102307988	A	04 January 2012
				EP	2395075	A2	14 December 2011
				EP	2395075	A4	29 August 2012
				EP	2395075	B1	25 December 2013
				JP	2012-516695	A	26 July 2012
				JP	5626735	B2	19 November 2014
				KR	10-2010-0090019	A	13 August 2010
				US	2012-0045801	A1	23 February 2012
				US	2014-0242650	A1	28 August 2014
				US	2016-0177348	A1	23 June 2016
				US	8685701	B2	01 April 2014
				US	9243265	B2	26 January 2016
				US	9920338	B2	20 March 2018
				WO	2010-090436	A2	12 August 2010
				WO	2010-090436	A3	25 November 2010
KR	10-2016-0083470	A	12 July 2016	KR	10-1720933	B1	30 March 2017
KR	10-2177736	B1	11 November 2020	None			

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 15/70(2006.01)i; C12P 7/625(2022.01)i; C12N 9/00(2006.01)i; C12N 9/04(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 15/70(2006.01); C07K 14/245(2006.01); C08G 63/06(2006.01); C12N 1/21(2006.01); C12N 15/31(2006.01); C12N 15/63(2006.01); C12N 9/02(2006.01); C12N 9/10(2006.01); C12P 7/62(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: 유전자 재조합(genetic recombination), 미생물(microorganism), 4-하이드록시발레레이트(4-hydroxyvalerate), 랄스토니아 유티로파(Ralstonia eutropha), 슈도모나스 속(Pseudomonas), 형질전환(transformation), 폴리하이드록시알카노에이트(polyhydroxyalkanoate)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	EP 3594350 A1 (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 2020.01.15 요약; 청구항 1, 2	1-15
A	KR 10-1293886 B1 (주식회사 엔지화학) 2013.08.07 요약; 청구항 1, 2, 8, 13	1-15
A	KR 10-2016-0083470 A (건국대학교 산학협력단) 2016.07.12 요약; 청구항 1-3, 5; 단락 [0004], [0006]-[0008], [0027]	1-15
A	KR 10-2177736 B1 (울산과학기술원) 2020.11.11 요약; 청구항 1, 4, 8-10, 12, 26, 28	1-15
A	DENNIS, D. 등, "Formation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by PHA synthase from Ralstonia eutropha", Journal of Biotechnology, 1998, 64권, 페이지 177-186 초록	1-15
☒ 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 2024년09월13일(13.09.2024)		국제조사보고서 발송일 2024년09월19일(19.09.2024)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KIM, J. 등, "Crystal structure of Ralstonia eutropha polyhydroxyalkanoate synthase C-terminal domain and reaction mechanisms", Biotechnol. J., 2017, 12권, 문헌번호 1600648, 페이지 1-12 초록	1-15

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

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.
 - a. ☒ 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - b. ☐ 국제조사를 목적으로 국제출원일 이후에 제출된 서열목록(규칙 13의3.1(a))

☐ 서열목록이 출원시 국제출원의 개시 범위를 넘지 않는다는 취지의 진술서를 첨부
2. ☐ 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열에 대해, 본 보고서는 WIPO 표준 ST.26을 준수하는 서열목록이 없이 유효한 조사를 할 수 있는 범위에서 작성되었습니다
3. 추가 의견:

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
EP 3594350 A1	2020/01/15	CN 110382699 A	2019/10/25
		CN 110382699 B	2024/04/05
		EP 3594350 A4	2020/12/09
		JP 2020-508665 A	2020/03/26
		JP 6854909 B2	2021/04/07
		KR 10-2018-0099447 A	2018/09/05
		KR 10-2036828 B1	2019/10/25
		US 10961521 B2	2021/03/30
		US 2019-0352622 A1	2019/11/21
		WO 2018-159965 A1	2018/09/07
KR 10-1293886 B1	2013/08/07	CN 102307988 A	2012/01/04
		EP 2395075 A2	2011/12/14
		EP 2395075 A4	2012/08/29
		EP 2395075 B1	2013/12/25
		JP 2012-516695 A	2012/07/26
		JP 5626735 B2	2014/11/19
		KR 10-2010-0090019 A	2010/08/13
		US 2012-0045801 A1	2012/02/23
		US 2014-0242650 A1	2014/08/28
		US 2016-0177348 A1	2016/06/23
		US 8685701 B2	2014/04/01
		US 9243265 B2	2016/01/26
		US 9920338 B2	2018/03/20
		WO 2010-090436 A2	2010/08/12
		WO 2010-090436 A3	2010/11/25
KR 10-2016-0083470 A	2016/07/12	KR 10-1720933 B1	2017/03/30
KR 10-2177736 B1	2020/11/11	없음	