

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2024년 10월 3일 (03.10.2024)



(10) 국제공개번호

WO 2024/205260 A1

(51) 국제특허분류:

C12N 15/77 (2006.01)

C12P 7/18 (2006.01)

C12N 15/52 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2024/003936

(22) 국제출원일:

2024년 3월 28일 (28.03.2024)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2023-0043218 2023년 3월 31일 (31.03.2023) KR

(71) 출원인: 이화여자대학교 산학협력단 (EWhA UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION) [KR/KR]; 03760 서울특별시 서대문구 이화여대길 52, Seoul (KR).

(72) 발명자: 박시재 (PARK, Si Jae); 10234 경기도 고양시 일산서구 하이파크3로 62, 501동 1002호, Gyeonggi-do (KR). 손유정 (SOHN, Yu-Jung); 03780 서울특별시 서대문구 신촌역로 7, 1201호, Seoul (KR). 정선아

(JEONG, Seona); 44603 울산광역시 남구 신복로46번길 35-37, 1107호, Ulsan (KR). 주정찬 (JOO, Jeong Chan); 04076 서울특별시 마포구 독막로20나길 22, 102동 1301호, Seoul (KR).

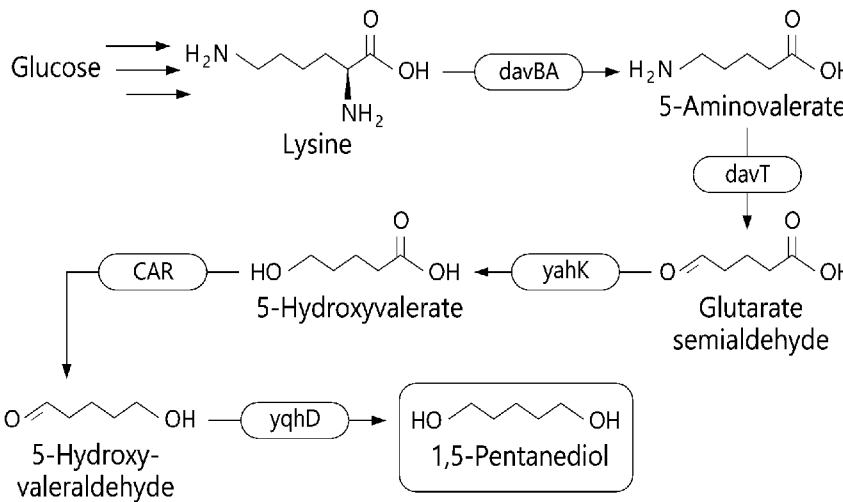
(74) 대리인: 특허법인 천지 (IPCJ PATENT & LAW FIRM); 06224 서울특별시 강남구 논현로76길 24, 2층(역삼동, 신한빌딩), Seoul (KR).

(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,

(54) Title: RECOMBINANT CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM STRAIN FOR PRODUCING 1,5-PENTANEDIOL, AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 1,5-펜탄디올 생산용 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주 및 이의 용도



(57) Abstract: The present invention relates to a recombinant *Corynebacterium glutamicum* strain for producing 1,5-pentanediol from glucose, and use thereof. Specifically, the recombinant strain according to the present invention has excellent production efficiency and production capability for 1,5-pentanediol and excellent production capability for 5-hydroxyvalerate, which is a key precursor for 1,5-pentanediol production. In addition, by-products are not generated during production, and thus the problem of low yield due to side-reaction products can be solved.

(57) 요약서: 본 발명은 글루코스에서 1,5-펜탄디올을 생산하는 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) 균주 및 이의 용도에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명에 따른 재조합 균주는 1,5-펜탄디올의 생산 효율과 생산 능력 뿐만 아니라 1,5-펜탄디올 생산의 핵심 전구체인 5-하이드록시발레이트의 생산 능력도 우수하다는 이점이 있다. 또한, 생산 과정에서 부산물 발생이 없으므로, 부반응 생성물로 인한 수율 저하의 문제를 해결할 수 있다.

[다음 쪽 계속]

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))

발명의 설명

발명의 명칭: 1,5-펜탄디올 생산용 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 출원은 2023년 3월 31일자로 한국 특허청에 출원되었으며, 여기에 인용하는 것에 의해 그 내용이 전체적으로 본 출원에 포함되는 한국 특허 출원 제10-2023-0043218호에 기초하여, 그 우선권을 주장한다.
- [2] 본 발명은 1,5-펜탄디올을 생산하는 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경기술

- [3] 1,5-펜탄디올(1,5-pentanediol)은 화장품과 같은 일반 상품의 첨가제로 사용되거나, 정밀 화학 분야의 각종 화학 물질을 생산하기 위한 중간체나 단량체로도 활용될 수 있기 때문에 전세계적으로 수요가 높다.
- [4] 1,5-펜탄디올 (1,5-PDO)은 석유 제품으로부터 공업적으로 제조될 수 있으나, C5 석유계 공급원료 수급 제한의 문제가 있으며, 화학반응으로 생산할 경우 부반응 생성물로 인한 수율 저하, 높은 에너지 소비와 고온, 고압 조건 등의 문제가 있다. 이에 따라, 생명공학적 1,5-펜탄디올의 제조가 화학 합성에 대한 유망한 저비용의 지속가능한 대안으로 등장하였다.
- [5] 최근 대장균을 이용하여 5-aminovalerate (5-AVA)를 경유한 1,5-PDO 생산이 보고된 바 있다 (Wang et al., 2020; Cen et al., 2021). 여기서 보고된 1,5-PDO 생합성 대사경로는 총 2가지이며, 이는 라이신(lysine)으로부터 핵심 전구체인 5-hydroxyvaleric acid (이하 5HV)를 거치는 CoA-dependent 대사경로와 CoA-independent 대사경로이다. 그러나 상기 대사경로를 이용한 생산은 그 생산량이 1 g/L를 넘지 못하는 수준에 머물러 있으며, 라이신, 5-AVA, 글루타르산과 같은 부산물이 과량으로 축적되는 문제가 있었다. 더불어, 1,5-PDO 생산의 핵심 전구체인 5HV 또한 그 생산량이 1.04 g/L (Cen et al., 2021)로 그 수준이 낮다고 평가되고 있다.
- [6] [선행기술문헌]
- [7] [비특허문헌]
- [8] (비특허문헌 1) Wang et al., PNAS, 2020, 117, 32, 19159-19167
- [9] (비특허문헌 2) Cen et al., ACS Synth. Biol. 2021, 10, 1, 192-203
- [10] (비특허문헌 3) Sohn et al., ACS Sustainable Chem. Eng. 2021, 9, 6, 2523-2533

발명의 내용

기술적 과제

- [11] 본 발명의 목적은, 1,5-펜탄디올 생산 능력과 효율이 우수하면서도 부산물 발생이 적은, 1,5-펜탄디올 생산용 재조합 균주를 제공하는 것이다.

- [12] 본 발명의 다른 일 목적은 상기 재조합 균주를 이용하여 글루코스에서 1,5-펜탄디올을 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [13] 본 발명의 일 양태에 따르면 라이신(lysine)을 5-아미노발레레이트(5-aminovalerate)로 전환하는 유전자, 및 5-아미노발레레이트를 5-히드록시발레레이트(5-hydroxyvalerate)로 전환하는 유전자가 도입되고, 5-히드록시발레레이트를 5-히드록시발레르알데히드로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자 및/또는 5-히드록시발레르알데히드를 1,5-펜탄디올로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터로 형질 전환된, 1,5-펜탄디올 생산용 재조합 균주가 제공된다.
- [14] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 재조합 균주는 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*)일 수 있으며, 예를 들어 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주 PKC 일 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 재조합 균주는 수탁번호 KCTC 19163P로 기탁된 코리네박테리움 글루타미쿰 균주 (이하, “5HV-PKC” 또는 “PKC-5HV”라 지칭함) 일 수 있다.
- [15] 본 발명에 따른 재조합 균주는 라이신을 이용한 대사 경로 (도 1 참조)에 따라 1,5-펜탄디올을 생산하도록 설계되었다. 다만 종래 기술에 따르면 미생물을 이용한 1,5-펜탄디올의 생산에서 라이신이 부산물로 다량 관찰되는 문제가 있었다. 본 발명에서는 생성된 라이신의 유출을 막고 5AVA(5-아미노발레레이트)로의 효율적인 전환을 위하여 균주 내에 라이신(lysine)을 5-아미노발레레이트(5-aminovalerate)로 전환하는 유전자를 삽입한 것이다. 바람직하게는 균주 내의 *lysE* 유전자를 삭제하고, 해당 사이트에 라이신(lysine)을 5AVA로 전환하는 유전자를 삽입한 것일 수 있다.
- [16] 이에, 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 재조합 균주는 *gabD* 유전자 및 *lysE* 유전자가 결손된 것일 수 있다. 일 구현예에 따르면, 상기 *gabD* 유전자는 서열번호 1의 서열을 포함하는 것일 수 있다. 유전자 코드의 디제너러시를 고려하여 상기 유전자는 상기 서열번호 1에 기재된 염기 서열과 80%의 상동성, 바람직하게는 85%의 상동성, 더욱 바람직하게는 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 95%, 98%, 또는 99%의 상동성을 가지는 유전자일 수도 있다. 일 구현예에 따르면, 상기 *lysE* 유전자는 서열번호 2의 서열을 포함하는 것일 수 있다. 유전자 코드의 디제너러시를 고려하여 상기 유전자는 상기 서열번호 2에 기재된 염기 서열과 80%의 상동성, 바람직하게는 85%의 상동성, 더욱 바람직하게는 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 95%, 98%, 또는 99%의 상동성을 가지는 유전자일 수도 있다.
- [17] 상기 상동성은 두 개의 주어진 아미노산 서열 또는 염기서열과 관련된 정도를 의미하며, 공지된 컴퓨터 알고리즘을 이용하는 방법, 써던 혼성화화 실험에 의해 서열을 비교하는 방법 등의 공지된 방법으로 결정할 수 있다.

- [18] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 라이신을 5-아미노발레레이트로 전환하는 유전자는 *Pseudomonas putida* 유래의 유전자일 수 있다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 라이신을 5-아미노발레레이트로 전환하는 유전자는 서열번호 3의 서열을 포함하는 것일 수 있다. 유전자 코드의 디제너러시를 고려하여 상기 유전자는 상기 서열번호 3에 기재된 염기 서열과 80%의 상동성, 바람직하게는 85%의 상동성, 더욱 바람직하게는 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 95%, 98%, 또는 99%의 상동성을 가지는 유전자일 수도 있다.
- [19]
- [20] 또한, 본 발명에 따르면 부산물로서 생성되는 글루타르산의 생성을 막고 5AVA의 5HV (5-히드록시발레레이트)로의 효율적인 전환을 위해 5-아미노발레레이트를 5-히드록시발레레이트(5-hydroxyvalerate, 5HV)로 전환하는 유전자를 균주 내에 삽입한 것이다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 재조합 균주는 바람직하게는 균주 내의 *gabD3* 유전자를 삭제하고 5AVA를 5HV로 전환하는 유전자를 삽입한 것일 수 있다. 이에, 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 재조합 균주는 *gabD3* 유전자가 결손된 것일 수 있다.
- [21] 일 구현예에 따르면, 5AVA를 5HV로 전환하는 상기 유전자는 *Pseudomonas putida* 유래의 유전자 및 대장균 *YahK* 유래의 유전자를 포함하는 것일 수 있다. 다른 일 구현예에 따르면, 5AVA를 5HV로 전환하는 상기 유전자는 서열번호 5의 서열을 포함하는 것일 수 있다. 유전자 코드의 디제너러시를 고려하여 상기 유전자는 상기 서열번호 5에 기재된 염기 서열과 80%의 상동성, 바람직하게는 85%의 상동성, 더욱 바람직하게는 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 95%, 98%, 또는 99%의 상동성을 가지는 유전자일 수도 있다.
- [22]
- [23] 본 발명에 따르면 1,5-펜탄디올 생산용 재조합 균주는 전술한 바와 같은 유전자들의 도입에 추가하여, 5-히드록시발레레이트를 5-히드록시발레르알데히드로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자 및/또는 5-히드록시발레르알데히드를 1,5-펜탄디올로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터로 형질 전환된 것일 수 있다.
- [24] 본 발명에서 용어 "벡터"란 발현 벡터를 의미하며, 이는 적당한 숙주세포에서 목적 유전자가 발현할 수 있도록 프로모터 등의 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 의미한다. 상기 벡터의 예로는 상기 벡터로는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파지 벡터 등이 있다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 벡터는 플라스미드 벡터일 수 있다.
- [25] 일 구현예에 따르면, 5-히드록시발레레이트를 5-히드록시발레르알데히드로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자 및/또는 5-히드록시발레르알데히드를 1,5-펜탄디올로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터는 5-히드록시발레레이트를 5-히드록시발레르알데히드로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 제1 벡터 및 5-히드록시발레르알데히드를 1,5-펜탄디올로

- 전환하는 효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 제2 벡터로 이루어지는 것일 수 있다.
- [26] 다른 일 구현예에 따르면, 상기 재조합 균주는 전술한 형질 전환에 추가하여, 라이신을 5-아미노발레레이트로 전환하는 유전자 및/또는 5-아미노발레레이트를 5-히드록시발레레이트로 전환하는 유전자를 포함하는 제 3 벡터로 더 형질 전환된 것일 수 있다.
- [27] 일 구현예에 따르면, 상기 5-히드록시발레레이트를 5-히드록시발레르알데히드로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자는 카르복실산 리덕타아제(Carboxylic Acid Reductase, CAR)를 코딩하는 유전자일 수 있다. 일 구현예에 따르면 상기 CAR 를 코딩하는 유전자는 서열번호 16의 서열을 포함하는 것일 수 있다. 유전자 코드의 디제너러시를 고려하여 상기 유전자는 상기 서열번호 16 에 기재된 염기 서열과 80%의 상동성, 바람직하게는 85%의 상동성, 더욱 바람직하게는 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 95%, 98%, 또는 99%의 상동성을 가지는 유전자일 수도 있다.
- [28] 일 구현예에 따르면, 상기 5-히드록시발레르알데히드를 1,5-펜탄디올로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자는 YahD 유전자, 구체적으로 대장균 YahD 유전자일 수 있다. 상기 5-히드록시발레르알데히드를 1,5-펜탄디올로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자는 서열번호 21의 서열을 포함하는 것일 수 있다. 유전자 코드의 디제너러시를 고려하여 상기 유전자는 상기 서열번호 21 에 기재된 염기 서열과 80%의 상동성, 바람직하게는 85%의 상동성, 더욱 바람직하게는 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 95%, 98%, 또는 99%의 상동성을 가지는 유전자일 수도 있다.
- [29] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 재조합 균주는 수탁번호 KCTC 19163P 일 수 있다.
- [30]
- [31] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 전술한 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주를 배양하여 배양물을 수득하는 단계를 포함하는, 1,5-펜탄디올의 생산 방법이 제공된다.
- [32] 본 발명의 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주를 배양하는 방법은, 숙주의 배양에 사용되는 통상의 방법을 사용하면 된다. 배양방법은, 회분(batch)식, 유동회분식, 연속배양, 리액터형식 등, 통상의 미생물의 배양에 사용하는 어떠한 방법도 사용할 수 있다. 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주를 배양하는 배지로서는, 완전배지 또는 합성배지, 예를 들면 LB배지, NB배지 등을 들 수 있다.
- [33] 탄소원은 미생물의 증식에 필요하고, 예를 들면 글루코스, 프럭토스, 슈크로스, 말토스, 갈락토스, 전분 등의 당류; 에탄올, 프로판올, 부탄올 등의 저급알콜류; 글리세롤 등의 다가알콜류; 아세트산, 시트르산, 숙신산, 타르타르산, 락트산, 글루콘산 등의 유기산; 프로피온산, 부탄산, 펜탄산, 헥산산, 헵탄산, 옥탄산,

노난산, 데칸산, 운데칸산, 도데칸산 등의 지방산 등을 이용할 수 있다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 1,5-펜탄디올의 새안 방법에서 배양은 당류, 구체적으로 글루코스를 함유하는 기질에서 수행될 수 있다.

- [34] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명의 재조합 균주를 포함하는 1,5-부탄디올 생성용 조성물이 제공된다. 본 발명의 상기 조성물은 예를 들어 상기 균주를 배양하여 1,5-펜탄디올을 생성하는데 적합한 폴리펩타이드, 브로쓰, 세포 용해물 등을 포함할 수 있다.

발명의 효과

- [35] 본 발명에 따른 1,5-펜탄디올 생산용 재조합 균주는 1,5-펜탄디올 생산의 핵심 전구체인 5-히드록시발레레이트의 생산능이 우수하다는 이점이 있다. 또한, 본 발명의 재조합 균주는 전구체 뿐만 아니라 1,5-펜탄디올의 생산 효율과 생산 능력도 우수하며, 생산 과정에서 부산물 발생이 적으므로, 부산물 생성물로 인한 수율 저하의 문제를 해결할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [36] 도 1 은 본 발명에 따른 1,5-펜탄디올 생산 대사경로이다.
- [37] 도 2 는 본 발명의 실험예 1 에 따라 전구체 5HV의 생산능을 측정한 결과를 보여주는 그래프이다.
- [38] 도 3 (a)는 5HVx1 균주의 5HV 및 15PDO 생산을 위한 CAR 스크리닝 결과를 보여주는 그래프이다.
- [39] 도 3 (b)는 5HVx2 균주의 5HV 및 15PDO 생산을 위한 CAR 스크리닝 결과를 보여주는 그래프이다.
- [40] 도 4 는 5HVx1-CAR11의 회분식 발효에 의한 시간에 따른 1,5-PDO 생산력을 보여주는 그래프이다.
- [41] 도 5 는 5HVx2-CAR11의 회분식 발효에 의한 시간에 따른 1,5-PDO 생산력을 보여주는 그래프이다.
- [42] 도 6 은 5HVx1-CAR11의 유가식 배양에 의한 시간에 따른 1,5-PDO 생산력을 보여주는 그래프이다.
- [43] 도 7 은 5HVx2-CAR11의 유가식 배양에 의한 시간에 따른 1,5-PDO 생산력을 보여주는 그래프이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [44] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 본 발명의 목적, 특징, 장점은 이하의 실시예를 통하여 쉽게 이해될 것이다. 본 발명은 여기서 설명하는 실시예에 한정되지 않고, 다른 형태로 구체화될 수도 있다. 여기서 소개되는 실시예는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 본 발명의 사상이 충분히 전달될 수 있도록 하기 위해 제공되는 것이다. 따라서 이하의 실시예에 의해 본 발명이 제한되어서는 안 된다.

[45]

[46] [제조예] 1,5-펜탄디올 생산용 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주의 제조
[47] (1) *Corynebacterium glutamicum* PKC Δ gabD 의 제조

[48] 균주로서 코리네박테리움 글루타미쿰 PKC (*Corynebacterium glutamicum* PKC)을 준비하였다. 상기 (비특허문헌 3: Sohn et al., 2021)에 기재된 바에 따라 상기 균주로부터 gabD 유전자 (서열번호 1)를 삭제하였다 (*Corynebacterium glutamicum* PKC Δ gabD 의 제조).

[49]

[50] (2) PKC-5AVA 균주의 제조

[51] 상기 *Corynebacterium glutamicum* PKC Δ gabD 내에서 라이신 유출을 담당하는 코리네박테리움 내의 lysE 유전자를 삭제하면서 해당 사이트에 H30DavBHisA (라이신 5-AVA 전환 모듈; H30프로모터-*Pseudomonas putida* davB_{hisA} 유전자-터미네이터)를 삽입하여 *Corynebacterium glutamicum* PKC Δ gabD Δ lysE::H30DavB_{hisA} 균주 (PKC-5AVA 균주)를 제작하였다.

[52] 구체적으로, *C. glutamicum* 의 유전자 조작은 염색체 삽입용 벡터 pK19mobsacB (제조사 NEB)를 이용하여 수행되었으며, LysE 유전자 삭제 및 H30DavBHisA 삽입용 pK19mobsacB 기반 벡터를 제작하기 위하여 먼저 lysE 유전자 upstream 및 downstream의 homologous region 500bp를 각각 HindIII/PstI과 BamHI/EcoRI 사이트에 클로닝 하였다: pK19mobsacBLysE. 이 때 사용한 프라이머 서열은 하기 표 1에 기재한다.

[53]

[54] [표1]

	Sequence (5'-3')
pK19mobsacBLysEf-F (서열번호 22)	aagcttagaggggtccccgcgcc
pK19mobsacBLysEf-R (서열번호 23)	ctgcaggtggattttcgccgctg
pK19mobsacBLysEb-F (서열번호 24)	ggatccgacctgtaatgaagatttccat
pK19mobsacBLysEb-R (서열번호 25)	gaattctagcttcacgggttaccgc

[55]

[56] 이후 H30DavBHisA 오페론 삽입을 위하여 lysE upstream (500bp)와 lysE downstream (500 bp) 사이의 XbaI site에 H30DavBHisA를 하기 표에 기재한 프라이머를 이용해 클로닝하였다.

[57]

[58] [표2]

	Sequence
pCES208H30-F (서열번호 26)	tctagacacctgcagactaaaggaacaaaagctg
pCES208H30-R (서열번호 27)	tctagagtcggatccggtccacctacaacaaagct

[59]

- [60] 클로닝을 위한 작업으로 PCR은 Thermocycler (TP600, TAKARA BIO Inc., 일본)를 이용하여 각각의 데옥시뉴클레오티드 트리포스페이트 (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 100 μ M가 첨가된 반응액에 올리고뉴클레오티드 1 pM 및 주형 (template) DNA 10 ng을 첨가하고 PrimeSTAR Max DNA Polymerase (Takara, 일본) 1 유닛의 존재 하에서 94°C에서 30초, 55°C에서 30초, 및 72°C에서 1분의 조건으로 25 ~ 30 주기(cycle)를 실시하였다.
- [61] 클로닝된 벡터를 *E. coli* DH5a (HIT Competent cellsTM, Cat No. RH618)에 형질전환시키고, 50 μ g/ml의 카나마이신을 함유하는 LB-한천 플레이트 상에 도말하여, 37°C 에서 24시간 배양하였다. 최종 형성되는 콜로니를 분리하여 삽입물(insert)이 정확히 벡터에 존재하는지 확인한 후, 이 벡터를 분리하였으며 이 때 Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, 미국)를 사용하였다. 이후의 연구에서도 동일한 조건을 사용하였다.
- [62]
- [63] **(3) PKC-5HA 균주의 제조**
- [64] 글루타르산(Glutaric acid)의 생성을 막고 5-아미노발레레이트(5AVA)의 5-(히드록시발레레이트(5HV)로의 효율적인 전환을 위해 코리네박테리움 내에 존재하는 *gabD* 유전자와 같은 반응을 매개하는 *gabD3* 유전자를 타겟으로 해당 유전자를 삭제하면서 H30DavTYahK (5AVA → 5HV 전환 모듈; H30프로모터-*P. putida* *DavT* & *E. coli* *YahK*-터미네이터) 오페론을 삽입하여 *C. glutamicum* PKC Δ *gabD* Δ *lysE::H30DavBHisA* Δ *gabD3::H30DavTYahK* 균주 (PKC-5HV 균주)를 개발하였다. *C. glutamicum*의 유전자 조작은 염색체 삽입용 벡터 pK19mobsacB (제조사 NEB)를 이용하여 수행되었다.
- [65] GabD3 유전자 삭제 및 H30DavTYahK 삽입용 pK19mobsacB 기반 벡터를 제작하기 위하여 먼저 *gabD3* 유전자 upstream 및 downstream의 homologous region 500bp를 overlap PCR을 통해 증폭하여 1000 bp의 PCR product를 제작한 뒤 HindIII/EcoRI 사이트에 클로닝하였다: pK19mobsacBcg0067. 이때 사용한 프라이머 서열은 하기 표에 기재하였다.

[66]

[67] [표3]

	Sequence
pK19mobsacBCg0067f-F (서열번호 28)	aagcttagtgaccatcggcgaggagtgttcg
pK19mobsacBCg0067f-R (서열번호 29)	ggggcagatgtctagagatgcgttattttccttcac
pK19mobsacBCg0067b-F (서열번호 30)	cgcattcttagacatctgccccctttacaaatcc

pK19mobsacBCg0067b-R (서열번호 31)	gaattccctgccatccagtcggcatac
--------------------------------	-----------------------------

[68]

[69] 이후 H30DavTYahK 오페론 삽입을 위하여 *gabD3*upstream (500bp)와 *gabD3* downstream (500bp) 사이의 XbaI site에 H30DavTYahK를 하기 표에 기재한 프라이머를 이용해 클로닝하였다.

[70]

[71] [표4]

	Sequence
pCES208H30-F (서열번호 32)	tctagacacctgcagactaaaggaacaaaagctg
pCES208H30-R (서열번호 33)	tctagagtcggatccggtccacctacaacaaagct

[72]

[73] **(4) 5HV의 15PDO로의 전환을 위한 다양한 Carboxylic Acid Reductase (CAR) 스크리닝 및 15PDO 생산용 제조합 균주의 제작**

[74] 5-hydroxyvalerate → 5-hydroxyvaleraldehyde 전환을 위하여 총 14가지의 CAR (서열번호 6 내지 19)를 스크리닝하였다. 5-Hydroxyvaleraldehyhde → 15PDO의 전환은 대장균 유래 *yqhD* 유전자 (서열번호 21)를 통해 이루어졌다.

[75] 14개의 CAR와 Sfp [*Bacillus subtilis*pptase, 포스포판테테이닐 트랜스퍼라아제 (phosphopantetheinyl transferase)로써 작동하여 phosphopantetheinylation 을 통해 apoenzyme인 CAR를 활성화시키기 위해 발현, 서열번호 20] 및 *YqhD* (*E. coli*, *alcohol dehydrogenase*, 서열번호 21)의 발현을 위하여 아래와 같이 플라스미드를 제작하였다.

[76]

[77] [표5]

플라스미드	관련 정보
pCES208H30-MCS	Sohn et al., ACS Sustainable Chem. Eng. 2021, 9, 6, 2 523-2533
pBL712H30-MCS	Sohn et al., ACS Sustainable Chem. Eng. 2021, 9, 6, 2 523-2533
pCES208H30DavTYahKB _{HisA}	pCES208 derivative; P _{H30} , <i>P. putida</i> KT2440 <i>davTB</i> _{HisA} , <i>E. coli</i> <i>yahK</i> ; Km ^r
pCES208H30CAR1pptase	pCES208 derivative; P _{H30} , <i>Mycobacterium smegmatis</i> <i>CAR</i> (<i>I7FIG7</i>), <i>B. subtilis</i> <i>pptase</i> ; Km ^r
pCES208H30CAR2pptase	pCES208 derivative; P _{H30} , <i>Mycobacterium abscessus</i> <i>CAR</i> (<i>BIMCR9</i>), <i>B. subtilis</i> <i>pptase</i> ; Km ^r

pCES208H30CAR3pptase	pCES208 derivative; P _{H30} , <i>Mycobacterium abscessus</i> CAR (B1MLD7), <i>B. subtilis</i> pptase; Km ^r
pCES208H30CAR4pptase	pCES208 derivative; P _{H30} , <i>Mycobacterium smegmatis</i> CAR (A0R484), <i>B. subtilis</i> pptase; Km ^r
pCES208H30CAR5pptase	pCES208 derivative; P _{H30} , <i>Mycobacterium smegmatis</i> CAR (B1MDX4), <i>B. subtilis</i> pptase; Km ^r
pCES208H30CAR6pptase	pCES208 derivative; P _{H30} , <i>Mycobacterium smegmatis</i> CAR (A0QWI7), <i>B. subtilis</i> pptase; Km ^r
pCES208H30CAR7pptase	pCES208 derivative; P _{H30} , <i>Mycobacterium smegmatis</i> CAR (B1MCS0), <i>B. subtilis</i> pptase; Km ^r
pCES208H30CAR8pptase	pCES208 derivative; P _{H30} , <i>Mycobacterium smegmatis</i> CAR (I7GER2), <i>B. subtilis</i> pptase; Km ^r
pCES208H30CAR9pptase	pCES208 derivative; P _{H30} , <i>Mycobacterium marinum</i> CAR (B2HN69), <i>B. subtilis</i> pptase; Km ^r
pCES208H30CAR10pptase	pCES208 derivative; P _{H30} , <i>Mycobacterium marinum</i> CAR (B2HE95), <i>B. subtilis</i> pptase; Km ^r
pCES208H30CAR11pptase	pCES208 derivative; P _{H30} , <i>Mycobacterium paratuberculosis</i> K-10 CAR (Q741P9), <i>B. subtilis</i> pptase; Km ^r
pCES208H30CAR12pptase	pCES208 derivative; P _{H30} , <i>Nocardia brasiliensis</i> ATCC 19296 CAR (A0A034UK40), <i>B. subtilis</i> pptase; Km ^r
pCES208H30CAR13pptase	pCES208 derivative; P _{H30} , <i>Nocardia brasiliensis</i> ATCC 19296 CAR (A0A034UFC8), <i>B. subtilis</i> pptase; Km ^r
pCES208H30CAR14pptase	pCES208 derivative; P _{H30} , <i>Mycobacterium phlei</i> CAR, <i>B. subtilis</i> pptase; Km ^r
pBL712H30YqhD	pBL712 derivative; P _{H30} , <i>E. coli</i> yqhD; Sp ^r
pBL712H30CAR1pptaseyqhD	pBL712 derivative; P _{H30} , <i>Mycobacterium smegmatis</i> CAR (I7FIG7), <i>B. subtilis</i> pptase, <i>E. coli</i> yqhD; Sp ^r
pBL712H30CAR2pptaseyqhD	pBL712 derivative; P _{H30} , <i>Mycobacterium abscessus</i> CAR (B1MCR9), <i>B. subtilis</i> pptase, <i>E. coli</i> yqhD; Sp ^r
pBL712H30CAR3pptaseyqhD	pBL712 derivative; P _{H30} , <i>Mycobacterium abscessus</i> CAR (B1MLD7), <i>B. subtilis</i> pptase, <i>E. coli</i> yqhD; Sp ^r

pBL712H30CAR4pptaseyqhD	pBL712 derivative; P _{H30} , <i>Mycobacterium smegmatis</i> CAR (A0R484), <i>B. subtilis</i> pptase, <i>E. coli</i> yqhD; Sp ^r
pBL712H30CAR5pptaseyqhD	pBL712 derivative; P _{H30} , <i>Mycobacterium smegmatis</i> CAR (B1MDX4), <i>B. subtilis</i> pptase, <i>E. coli</i> yqhD; Sp ^r
pBL712H30CAR6pptaseyqhD	pBL712 derivative; P _{H30} , <i>Mycobacterium smegmatis</i> CAR (A0QWI7), <i>B. subtilis</i> pptase, <i>E. coli</i> yqhD; Sp ^r
pBL712H30CAR7pptaseyqhD	pBL712 derivative; P _{H30} , <i>Mycobacterium smegmatis</i> CAR (B1MCS0), <i>B. subtilis</i> pptase, <i>E. coli</i> yqhD; Sp ^r
pBL712H30CAR8pptaseyqhD	pBL712 derivative; P _{H30} , <i>Mycobacterium smegmatis</i> CAR (I7GER2), <i>B. subtilis</i> pptase, <i>E. coli</i> yqhD; Sp ^r
pBL712H30CAR9pptaseyqhD	pBL712 derivative; P _{H30} , <i>Mycobacterium marinum</i> CAR (B2HN69), <i>B. subtilis</i> pptase, <i>E. coli</i> yqhD; Sp ^r
pBL712H30CAR10pptaseyqhD	pBL712 derivative; P _{H30} , <i>Mycobacterium marinum</i> CAR (B2HE95), <i>B. subtilis</i> pptase, <i>E. coli</i> yqhD; Sp ^r
pBL712H30CAR11pptaseyqhD	pBL712 derivative; P _{H30} , <i>Mycobacterium paratuberculosis</i> K-10 CAR (Q741P9), <i>B. subtilis</i> pptase, <i>E. coli</i> yqhD; Sp ^r
pBL712H30CAR12pptaseyqhD	pBL712 derivative; P _{H30} , <i>Nocardia brasiliensis</i> ATCC19296 CAR (A0A034UK40), <i>B. subtilis</i> pptase, <i>E. coli</i> yqhD; Sp ^r
pBL712H30CAR13pptaseyqhD	pBL712 derivative; P _{H30} , <i>Nocardia brasiliensis</i> ATCC19296 CAR (A0A034UFC8), <i>B. subtilis</i> pptase, <i>E. coli</i> yqhD; Sp ^r
pBL712H30CAR14pptaseyhhD	pBL712 derivative; P _{H30} , <i>Mycobacterium phlei</i> CAR, <i>B. subtilis</i> pptase, <i>E. coli</i> yqhD; Sp ^r

[78]

[79] [𐄂6]

CAR1-F-BamHI	aaaaaggatccatgtgggacatgctcttc	CAR1 (I7FIG7)
CAR1-R-SpeI	aaaaaactagtttacaacaggccgaccttc	
CAR1-F-Gibson	gcaggagtatttggaattcatgtgggacatgctcttc	
CAR1-R-Gibson	cgggtaccgagctegaattcttacaacaggccgaccttc	
CAR2-F-SpeI	aaaaaactagtatgaccgtgaccaacgaaa	CAR2

CAR2-R-SbfI	aaaaac <u>ctgcagg</u> ttataggagtcaggagctg	(B1M CR9)
CAR2-F-Gibson	gcaggagtatattggaattcatgaccgtgaccaacgaaa	
CAR2-R-Gibson	cgggtaccgagctcgaattcttataggagtcaggagctg	
CAR3-F-BamHI	aaaaag <u>gatcc</u> atgactgaaacgatctcc	CAR3 (B1M LD7)
CAR3-R-SpeI	aaaaa <u>actag</u> tttacaccaggcccaacag	
CAR3-F-Gibson	gcaggagtatattggaattcatgactgaaacgatctcc	
CAR3-R-Gibson	cgggtaccgagctcgaattcttacaccaggcccaacag	CAR4 (A0R 484)
CAR4-F-SpeI	aaaaa <u>actag</u> tatgaccagcgatgttcac	
CAR4-R-SbfI	aaaaac <u>ctgcagg</u> ttagatcagaccgaactc	
CAR4-F-Gibson	gcaggagtatattggaattcatgaccagcgatgttcac	CAR5 (B1M DX4)
CAR4-R-Gibson	cgggtaccaggctcgaattcttagatcagaccgaactc	
CAR5-F-SpeI	aaaaa <u>actag</u> tatgacggctggtgcggcg	
CAR5-R-SbfI	aaaaac <u>ctgcagg</u> ttacagcagcctgtgtgc	CAR6 (A0Q WI7)
CAR5-F-Gibson	gcaggagtatattggaattcatgacggctggtgcggcg	
CAR5-R-Gibson	cgggtaccgagctcgaattcttacagcagcctgtgtgc	
CAR6-F-SpeI	aaaaa <u>actag</u> tatgacgatcgaaacgcgc	CAR7 (B1M CS0)
CAR6-R-SbfI	aaaaac <u>ctgcagg</u> ttacagcaatccgagcatc	
CAR6-F-Gibson	gcaggagtatattggaattcatgacgatcgaaacgcgc	
CAR6-R-Gibson	cgggtaccgagctcgaattcttacagcaatccgagcatc	CAR7 (B1M CS0)
CAR7-F-BamHI	aaaaag <u>gatcc</u> atgacgatcgacgccacc	
CAR7-R-SpeI	aaaaa <u>actag</u> ttagagtaacccgagctg	

CAR7-F-Gibson	gcaggagtatatattggaattcatgacgatcgacgccacc	
CAR7-R-Gibson	cgggtaccgagctcgaattcttagagtaacccgagctg	
CAR8-F-SpeI	aaaaa <u>actag</u> tatgcaccagctcacggtc	CAR8 (I7G ER2)
CAR8-R-SbfI	aaaaa <u>cctgcagg</u> ttagatcagaccgaactc	
CAR8-F-Gibson	gcaggagtatatattggaattcatgcaccagctcacggtc	
CAR8-R-Gibson	cgggtaccgagctcgaattcttagatcagaccgaactc	
CAR9-F-BamHI	aaaaa <u>ggatcc</u> atgtcgccaatcacgcgtg	CAR9 (B2H N69)
CAR9-R-SpeI	aaaaa <u>actag</u> ttagagcaggccgagtag	
CAR9-F-Gibson	gcaggagtatatattggaattcatgtcgccaatcacgcgtg	
CAR9-R-Gibson	cgggtaccgagctcgaattcttagagcaggccgagtag	
CAR10-F-BamHI	aaaaa <u>ggatcc</u> atgtcaattacgtgtg	CAR10 (B2H E95)
CAR10-R-SpeI	aaaaa <u>actag</u> ttaagccaggccgagaag	

CAR10-F-Gibson	gcaggagtatatattggaattcatgtcaattacctgtgtg	
CAR10-R-Gibson	cgggtaccgagctcgaattcttaagccaggccgagaag	
CAR11-F-SpeI	aaaaa <u>actag</u> tatgtcgactgccacccatg	CAR11 (Q74 1P9)
CAR11-R-SbfI	aaaaa <u>cctgcag</u> gttagagcagcccgagcag	
CAR11-F-Gibson	gcaggagtatatattggaattcatgtcgactgccacccatg	
CAR11-R-Gibson	cgggtaccgagctcgaattcttagagcagcccgagcag	
CAR12-F-SpeI	aaaaa <u>actag</u> tatggagcgcgaaggcggaag	CAR12 (A0A03 4UK40)
CAR12-R-SbfI	aaaaa <u>cctgcag</u> gttacagcaggtttcgcaat	
CAR12-F-Gibson	gcaggagtatatattggaattcatggagcgcgaaggcggaag	
CAR12-R-Gibson	cgggtaccgagctcgaattcttacagcaggtttcgcaat	
CAR13-F-BamHI	aaaaaggatccatgacagatgtagaggtag	CAR13 (A0A03 4UFC8)
CAR13-R-SpeI	aaaaa <u>actag</u> tttacagtccgaggtgctccag	
CAR13-F-Gibson	gcaggagtatatattggaattcatgacagatgtagaggtag	

CAR13-R-Gibson	cgggtaccgagctcgaattcttacagtcagggtgctccag	
CAR14-F-SpeI	aaaaaactagtatggcatcagaatcccgtg	CAR 14 (WP_03889896.1)
CAR14-R-SbfI	aaaaacctgcagggttacagcccagcagccgcagatcg	
CAR14-F-Gibson	gcaggagtatattggaattcatggcatcagaattccgtg	
CAR14-R-Gibson	cgggtaccgagctcgaattcttacagcccagcagccgcagatcg	
Pptase-F-SbfI	aaaaacctgcagggtctagataactttaagaaggagatatacatgaagatttacggaattt	Pptase
Pptase-R-NdeI	aaaaacatatgttataaaagctcttcgtac	
Pptase-F-Gibson	taaagaggagatatacatatgaagatttacggaatt	
Pptase-R-Gibson	ttcatatgtatatctcctttataaaagctcttcgtac	
YqhD-F-EcoRI	aaaaaggatccaggagatatacatatgaacaactttaatctgcacaccc	YqhD
YqhD-R-KpnI	aaaaaagatctatgtatatctcctttagcgggcggttcgtatatac	
YqhD-F-Gibson	tataaaggagatatacatatgaacaactttaatctgc	
YqhD-R-Gibson	tagaggatccccgggtaccttagcgggcggttcgtatatac	

[81] 위에서 제작한 플라스미드를 각각 pKC-5HV 균주 (*C. glutamicum* PKC Δ *gabD* Δ *lysE*::H30DavBHisA Δ *gabD3*::H30DavTYahK)에 트랜스포메이션을 하여 아래 표 7과 같은 균주를 제작하였다.

[82]

[83] [표7]

균주	정보
PKC-5HV(수 탁번호: KCTC 19163 P)	<i>C. glutamicum</i> PKC Δ <i>gabD</i> Δ <i>lysE</i> ::H30DavBHisA Δ <i>gabD3</i> ::H30DavTYahK
5HVx1-CAR 1	<i>C. glutamicum</i> PKC Δ <i>gabD</i> Δ <i>lysE</i> ::H30DavBHisA Δ <i>gabD3</i> ::H30DavTYahK harboring pCES208H30CAR1pptase + pBL172H30YqhD
5HVx1-CAR 2	<i>C. glutamicum</i> PKC Δ <i>gabD</i> Δ <i>lysE</i> ::H30DavBHisA Δ <i>gabD3</i> ::H30DavTYahK harboring pCES208H30CAR2pptase + pBL172H30YqhD
5HVx1-CAR 3	<i>C. glutamicum</i> PKC Δ <i>gabD</i> Δ <i>lysE</i> ::H30DavBHisA Δ <i>gabD3</i> ::H30DavTYahK harboring pCES208H30CAR3pptase + pBL172H30YqhD
5HVx1-CAR 4	<i>C. glutamicum</i> PKC Δ <i>gabD</i> Δ <i>lysE</i> ::H30DavBHisA Δ <i>gabD3</i> ::H30DavTYahK harboring pCES208H30CAR4pptase + pBL172H30YqhD
5HVx1-CAR 5	<i>C. glutamicum</i> PKC Δ <i>gabD</i> Δ <i>lysE</i> ::H30DavBHisA Δ <i>gabD3</i> ::H30DavTYahK harboring pCES208H30CAR5pptase + pBL172H30YqhD
5HVx1-CAR 6	<i>C. glutamicum</i> PKC Δ <i>gabD</i> Δ <i>lysE</i> ::H30DavBHisA Δ <i>gabD3</i> ::H30DavTYahK harboring pCES208H30CAR6pptase + pBL172H30YqhD
5HVx1-CAR 7	<i>C. glutamicum</i> PKC Δ <i>gabD</i> Δ <i>lysE</i> ::H30DavBHisA Δ <i>gabD3</i> ::H30DavTYahK harboring pCES208H30CAR7pptase + pBL172H30YqhD
5HVx1-CAR 8	<i>C. glutamicum</i> PKC Δ <i>gabD</i> Δ <i>lysE</i> ::H30DavBHisA Δ <i>gabD3</i> ::H30DavTYahK harboring pCES208H30CAR8pptase + pBL172H30YqhD
5HVx1-CAR 9	<i>C. glutamicum</i> PKC Δ <i>gabD</i> Δ <i>lysE</i> ::H30DavBHisA Δ <i>gabD3</i> ::H30DavTYahK harboring pCES208H30CAR9pptase + pBL172H30YqhD
5HVx1-CAR 10	<i>C. glutamicum</i> PKC Δ <i>gabD</i> Δ <i>lysE</i> ::H30DavBHisA Δ <i>gabD3</i> ::H30DavTYahK harboring pCES208H30CAR10pptase + pBL172H30YqhD
5HVx1-CAR 11	<i>C. glutamicum</i> PKC Δ <i>gabD</i> Δ <i>lysE</i> ::H30DavBHisA Δ <i>gabD3</i> ::H30DavTYahK harboring pCES208H30CAR11pptase + pBL172H30YqhD
5HVx1-CAR 12	<i>C. glutamicum</i> PKC Δ <i>gabD</i> Δ <i>lysE</i> ::H30DavBHisA Δ <i>gabD3</i> ::H30DavTYahK harboring pCES208H30CAR12pptase + pBL172H30YqhD

5HVx1-CAR 13	<i>C. glutamicum</i> PKC Δ <i>gabD</i> Δ <i>lysE</i> ::H30DavBHisA Δ <i>gabD3</i> ::H30DavTYahK harboring pCES208H30CAR13pptase + pBL172H30YqhD
5HVx1-CAR 14	<i>C. glutamicum</i> PKC Δ <i>gabD</i> Δ <i>lysE</i> ::H30DavBHisA Δ <i>gabD3</i> ::H30DavTYahK harboring pCES208H30CAR14pptase + pBL172H30YqhD
5HVx2-CAR 1	<i>C. glutamicum</i> PKC Δ <i>gabD</i> Δ <i>lysE</i> ::H30DavBHisA Δ <i>gabD3</i> ::H30DavTYahK harboring pCES208H30DavTYahKDavBHisA + pBL172H30CAR1pptaseYqhD
5HVx2-CAR 2	<i>C. glutamicum</i> PKC Δ <i>gabD</i> Δ <i>lysE</i> ::H30DavBHisA Δ <i>gabD3</i> ::H30DavTYahK harboring pCES208H30DavTYahKDavBHisA + pBL172H30CAR2pptaseYqhD
5HVx2-CAR 3	<i>C. glutamicum</i> PKC Δ <i>gabD</i> Δ <i>lysE</i> ::H30DavBHisA Δ <i>gabD3</i> ::H30DavTYahK harboring pCES208H30DavTYahKDavBHisA + pBL172H30CAR3pptaseYqhD
5HVx2-CAR 4	<i>C. glutamicum</i> PKC Δ <i>gabD</i> Δ <i>lysE</i> ::H30DavBHisA Δ <i>gabD3</i> ::H30DavTYahK harboring pCES208H30DavTYahKDavBHisA + pBL172H30CAR4pptaseYqhD
5HVx2-CAR 5	<i>C. glutamicum</i> PKC Δ <i>gabD</i> Δ <i>lysE</i> ::H30DavBHisA Δ <i>gabD3</i> ::H30DavTYahK harboring pCES208H30DavTYahKDavBHisA + pBL172H30CAR5pptaseYqhD
5HVx2-CAR 6	<i>C. glutamicum</i> PKC Δ <i>gabD</i> Δ <i>lysE</i> ::H30DavBHisA Δ <i>gabD3</i> ::H30DavTYahK harboring pCES208H30DavTYahKDavBHisA + pBL172H30CAR6pptaseYqhD
5HVx2-CAR 7	<i>C. glutamicum</i> PKC Δ <i>gabD</i> Δ <i>lysE</i> ::H30DavBHisA Δ <i>gabD3</i> ::H30DavTYahK harboring pCES208H30DavTYahKDavBHisA + pBL172H30CAR7pptaseYqhD
5HVx2-CAR 8	<i>C. glutamicum</i> PKC Δ <i>gabD</i> Δ <i>lysE</i> ::H30DavBHisA Δ <i>gabD3</i> ::H30DavTYahK harboring pCES208H30DavTYahKDavBHisA + pBL172H30CAR8pptaseYqhD
5HVx2-CAR 9	<i>C. glutamicum</i> PKC Δ <i>gabD</i> Δ <i>lysE</i> ::H30DavBHisA Δ <i>gabD3</i> ::H30DavTYahK harboring pCES208H30DavTYahKDavBHisA + pBL172H30CAR9pptaseYqhD
5HVx2-CAR 10	<i>C. glutamicum</i> PKC Δ <i>gabD</i> Δ <i>lysE</i> ::H30DavBHisA Δ <i>gabD3</i> ::H30DavTYahK harboring pCES208H30DavTYahKDavBHisA + pBL172H30CAR10pptaseYqhD

5HVx2-CAR 11	<i>C. glutamicum</i> PKC $\Delta gabD$ $\Delta lysE::H30DavBHisA$ $\Delta gabD3::H30DavTYahK$ harboring pCES208H30DavTYahKDavBHisA + pBL172H30CAR11pptaseYqhD
5HVx2-CAR 12	<i>C. glutamicum</i> PKC $\Delta gabD$ $\Delta lysE::H30DavBHisA$ $\Delta gabD3::H30DavTYahK$ harboring pCES208H30DavTYahKDavBHisA + pBL172H30CAR12pptaseYqhD
5HVx2-CAR 13	<i>C. glutamicum</i> PKC $\Delta gabD$ $\Delta lysE::H30DavBHisA$ $\Delta gabD3::H30DavTYahK$ harboring pCES208H30DavTYahKDavBHisA + pBL172H30CAR13pptaseYqhD
5HVx2-CAR 14	<i>C. glutamicum</i> PKC $\Delta gabD$ $\Delta lysE::H30DavBHisA$ $\Delta gabD3::H30DavTYahK$ harboring pCES208H30DavTYahKDavBHisA + pBL172H30CAR14pptaseYqhD

[84]

[85] [실험예 1] PKC-5HA 균주의 5HV 생산력 측정

[86] 상기 제조예의 (3) 단계에서 제조한 PKC-5HV 균주(수탁번호: KCTC 19163P)를 사용하여 1,5-펜탄디올 생산의 핵심 전구체인 5-히드록시발레레이트의 생산 능력을 측정해보았다.

[87] 상기 비특허문헌 3 (Sohn et al., 2021)에 기재된 배양 조건과 동일한 조건 하에서, 본 발명의 제조예 (3)에서 제조한 PKC-5HV 균주를 120 시간 플라스크 배양하였다. 그 결과, 본 발명의 균주는 플라스미드 기반의 5HV 생산 시스템 (pCES208H30DavTBHisA + pBL712H30YahK; Sohn et al., 2021)의 추가적인 도입 없이도 5HV-7 균주와 비슷한 정도의 5HV 생산능을 보였다 (도 2 참조). 특히, 본 발명의 균주는 라이신, 5AVA, glutaric acid 등의 부산물 생성을 보이지 않았다.

[88]

[89] [실험예 2] 1,5-펜탄디올 생산력 측정을 통한 CAR 스크리닝

[90] PKC-5HA 균주를 이용하여 제작한 [표 7]의 재조합 균주 각각을 120 시간 플라스크 배양 (Sohn et al., 2021과 같은 배양조건)을 통해 15PDO 생산량을 비교하였다 (도 3). 결과적으로, CAR11을 발현한 *C. glutamicum* 5HVx1-CAR11 균주와 *C. glutamicum* 5HVx2-CAR11 균주에서 각각 1.2 g/L와 1.8 g/L의 1,5-PDO를 생산할 수 있었다.

[91]

[92] [실험예 3] 개발한 재조합 코리네박테리움을 이용한 1,5-펜탄디올 생산(1)

[93] 더 높은 양의 1,5-PDO 생산량을 지원하기 위하여 5HVx1-11균주와 5HVx2-11균주의 회분식 발효 (Batch fermentation, 5 L CNS 발효기에 working volume 1.5 L, 나머지 조건은 Sohn et al., 2021과 같음)를 수행하였다. 5HVx1-CAR11 균주의 경우 7 g/L 의 15PDO를 (도 4), 5HVx2-CAR11 균주의 경우 9.97 g/L의 15PDO를 생산하였다 (도 5).

- [94]
- [95] [실례예 4] 개발한 재조합 코리네박테리움을 이용한 1,5-펜탄디올 생산(2)
- [96] 5HVx1-CAR11 균주와 5HVx2-CAR11 균주에 대해 각각 유가식 배양(fed batch culture)을 수행하였다. 구체적으로, 발효기(bioCNS 5L)에서 GC100 미디엄 (리터당 yeast extract 30 g, (NH₄)₂SO₄ 30 g, glucose 100 g, KH₂PO₄ 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.01 g, MnSO₄·H₂O 0.01 g, biotin 0.5 mg, thiamine-HCl 0.3 mg) 1.5L를 사용하고 30°C에서 600 rpm, DO(Dissolved Oxygen Level) 30%, pH 6.9를 유지하며 배양하였다. 글루코스 농도를 10 내지 20 g/L로 유지하기 위해 펌프 유속을 조절해가면서 글루코스, (NH₄)₂SO₄, MgSO₄·7H₂O를 연속적으로 공급하였다.
- [97] 5HVx1-CAR11 균주의 경우 17.83 g/L 의 15PDO(수율은 0.13 mol/mol)를 (도 6), 5HVx2-CAR11 균주의 경우 17.52 g/L의 15PDO(t수율은 0.13 mol/mol)를 생산하였다 (도 7).
- [98]
- [99] 상기에서는 본 발명의 바람직한 실시예를 참조하여 설명하였지만, 해당 기술 분야의 숙련된 당업자는 하기의 특허 청구 범위에 기재된 본 발명의 사상 및 영역으로부터 벗어나지 않는 범위 내에서 본 발명을 다양하게 수정 및 변경시킬 수 있음을 이해할 수 있을 것이다.
- [100]
- [101] [수탁번호]
- [102] 기탁기관명 : 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)
- [103] 수탁번호 : KCTC19163P
- [104] 수탁일자 : 20240213

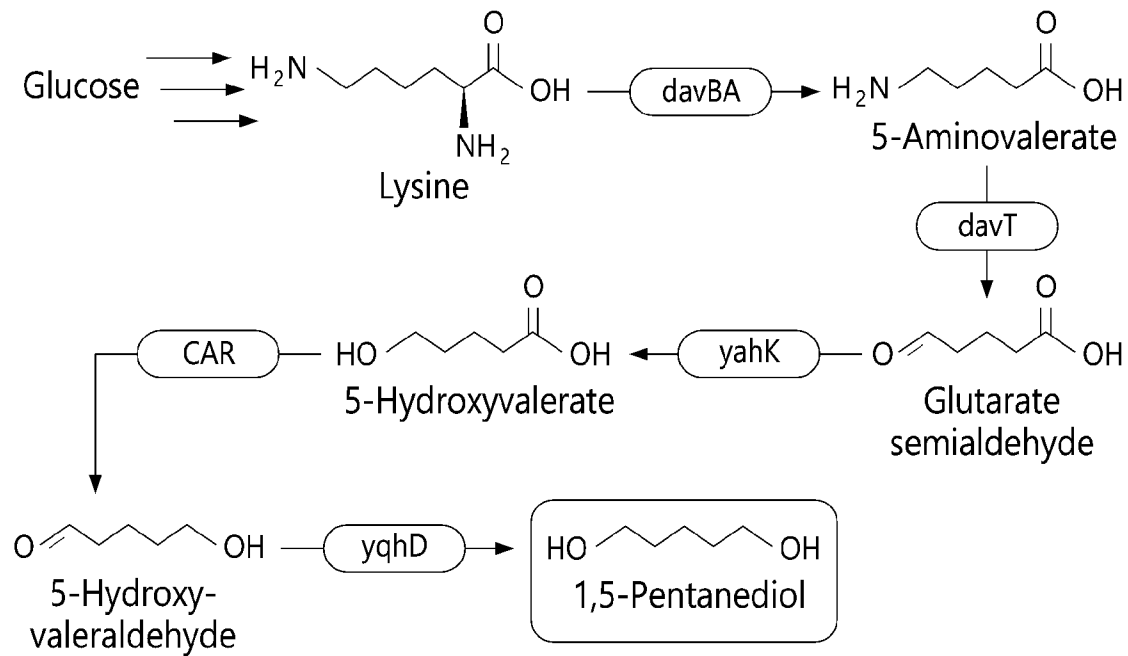
0-1	Form PCT/RO/134 기탁된 미생물 또는 기타 생물학적 물질에 관한 표시사항(PCT 규칙 13의 2)	ePCT-Filing Version 4.12.010 MT/FOP 20240229/1.1
0-1-1	우측에 기재된 바와 같이 작성되었다.	
0-2	국제출원번호	PCT/KR2024/003936
0-3	출원인 또는 대리인의 서류참조기호	CPCT2024-0016
1	아래 표시된 사항은 발명의 설명 내의 아 래 부분에서 언급된 기탁된 미생물 또는 기타 생물학적 물질에 관한 것이다.	14
1-1	단락번호	
1-3	기탁표시	KCTC 한국생명공학연구원 생물자원센터 대한민국 한국생명공학연구원 생물자원센터 56212 전라북도 정읍시 입신길 181(신정동) 2024년 02월 13일 (13.02.2024) KCTC 19163P
1-3-1	기탁기관명	
1-3-2	기탁기관 주소	
1-3-3	기탁 일자	
1-3-4	기탁 번호	
1-4	추가 표시 사항	없음
1-5	표시사항은 다음 지정국을 위한 것이다.	모든 지정국
1-6	추가 표시 사항 이러한 표시는 추후 국제 사무국(IG)에 제 출된다.	없음

청구범위

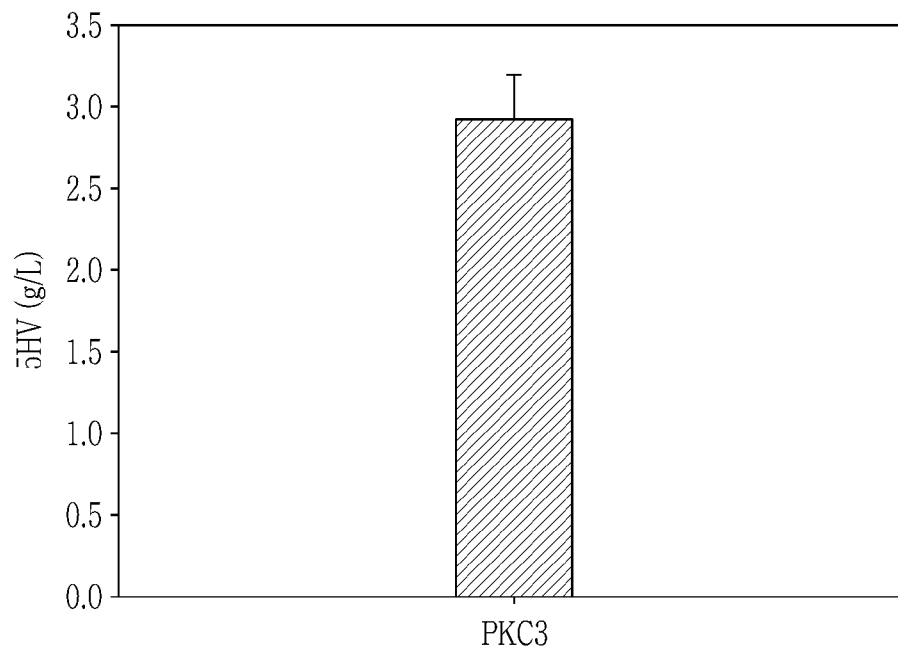
- [청구항 1] 라이신(lysine)을 5-아미노발레레이트(5-aminovalerate)로 전환하는 유전자 및 5-아미노발레레이트를 5-히드록시발레레이트(5-hydroxyvalerate)로 전환하는 유전자가 도입되고,
5-히드록시발레레이트를 5-히드록시발레르알데히드로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자 및/또는 5-히드록시발레르알데히드를 1,5-펜탄디올로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터로 형질 전환된,
1,5-펜탄디올 생산용 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*) 균주.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 벡터는 5-히드록시발레레이트를 5-히드록시발레르알데히드로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 제1 벡터 및
5-히드록시발레르알데히드를 1,5-펜탄디올로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 제2 벡터로 이루어지는,
1,5-펜탄디올 생산용 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 균주는 라이신을 5-아미노발레레이트로 전환하는 유전자 및/또는 5-아미노발레레이트를 5-히드록시발레레이트로 전환하는 유전자를 포함하는 제3 벡터로 더 형질 전환된 것인,
1,5-펜탄디올 생산용 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
gabD 유전자 및 lysE 유전자가 결손된,
1,5-펜탄디올 생산용 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
gabD3 유전자가 결손된,
1,5-펜탄디올 생산용 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주.
- [청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 라이신을 5-아미노발레레이트로 전환하는 유전자는 *Pseudomonas putida* 유래의 유전자인,
1,5-펜탄디올 생산용 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주.
- [청구항 7] 제6항에 있어서,
상기 라이신을 5-아미노발레레이트로 전환하는 유전자는 서열번호 3의 서열을 포함하는,
1,5-펜탄디올 생산용 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주.
- [청구항 8] 제1항에 있어서,

- 상기 5-아미노발레레이트를 5-히드록시발레레이트로 전환하는 유전자는 *Pseudomonas putida* 유래의 유전자 및 대장균 YahK 유래의 유전자를 포함하는,
- 1,5-펜탄디올 생산용 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주.
- [청구항 9] 제8항에 있어서,
상기 5-아미노발레레이트를 5-히드록시발레레이트로 전환하는 유전자는 서열번호 5의 서열을 포함하는,
1,5-펜탄디올 생산용 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주.
- [청구항 10] 제1항에 있어서,
상기 5-히드록시발레레이트를 5-히드록시발레르알데히드로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자는 카르복실산 리덕타아제(Carboxylic Acid Reductase, CAR)를 코딩하는 유전자인,
1,5-펜탄디올 생산용 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주.
- [청구항 11] 제10항에 있어서,
상기 5-히드록시발레레이트를 5-히드록시발레르알데히드로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자는 서열번호 16의 서열을 포함하는,
1,5-펜탄디올 생산용 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주.
- [청구항 12] 제1항에 있어서,
상기 5-히드록시발레르알데히드를 1,5-펜탄디올로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자는 YahD 유전자인,
1,5-펜탄디올 생산용 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주.
- [청구항 13] 제12항에 있어서,
상기 5-히드록시발레르알데히드를 1,5-펜탄디올로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자는 서열번호 21의 서열을 포함하는,
1,5-펜탄디올 생산용 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주.
- [청구항 14] 제4항에 있어서,
상기 내생의 gabD 유전자는 서열번호 1의 서열을 포함하고, 상기 내생의 lysE 유전자는 서열번호 2의 서열을 포함하는,
1,5-펜탄디올 생산용 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주.
- [청구항 15] 제5항에 있어서,
상기 내생의 gabD3 유전자는 서열번호 4의 서열을 포함하는,
1,5-펜탄디올 생산용 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주.
- [청구항 16] 제1항에 있어서,
수탁번호 KCTC 19163P로 기탁된,
1,5-펜탄디올 생산용 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주.
- [청구항 17] 제1항 내지 제16항 중 어느 한 항의 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주를 배양하여 배양물을 수득하는 단계를 포함하는, 1,5-펜탄디올의 생산 방법.

[도1]

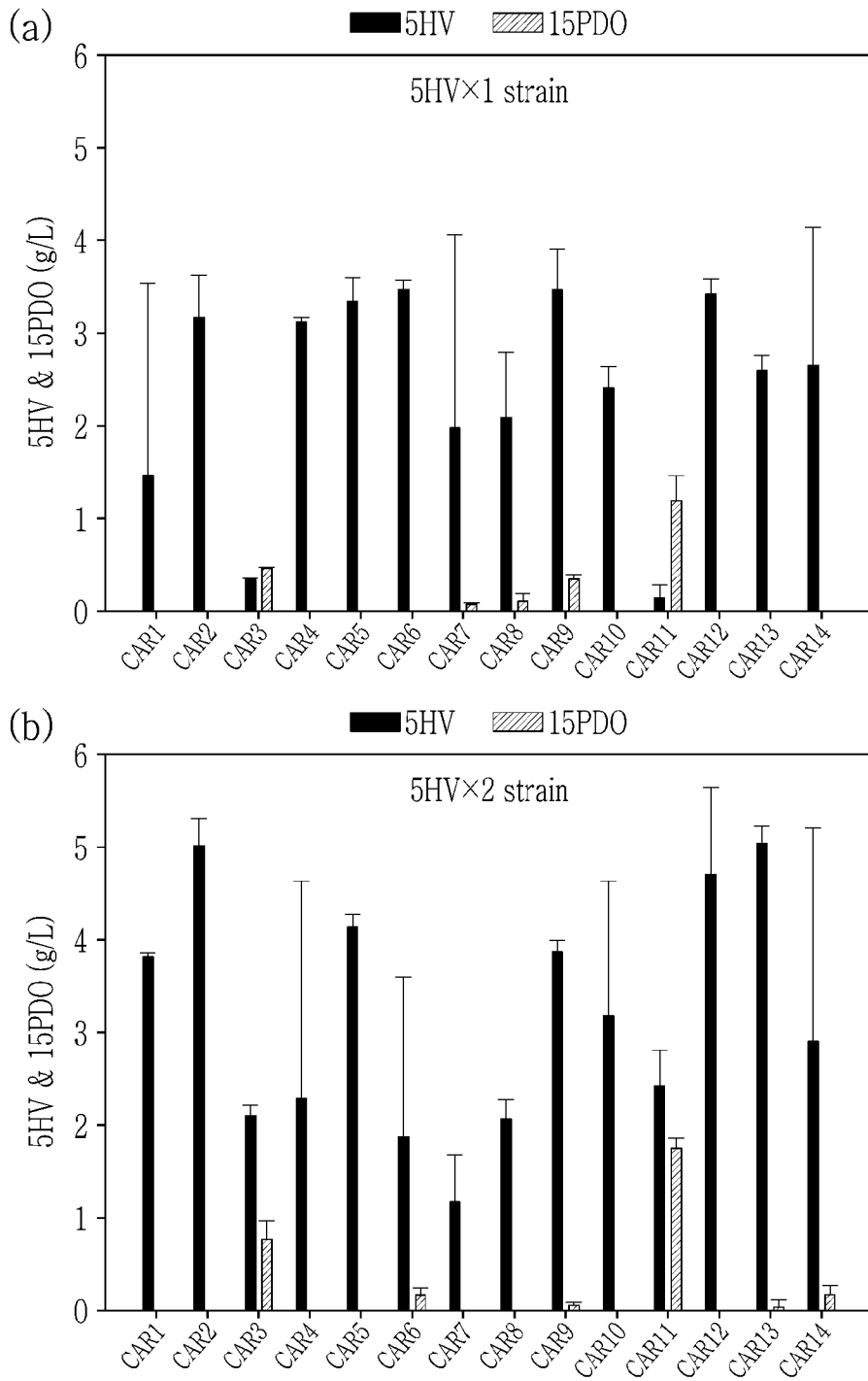


[도2]

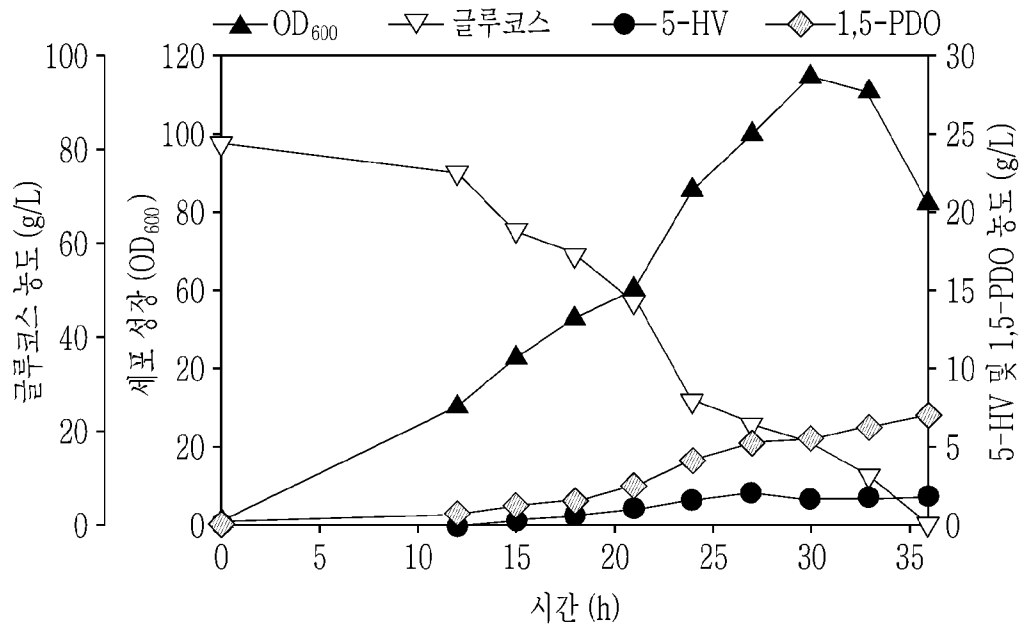


C. glutamicum PKC-5HV 균주의 플라스크 배양 결과 5HV 생산량

[도3]

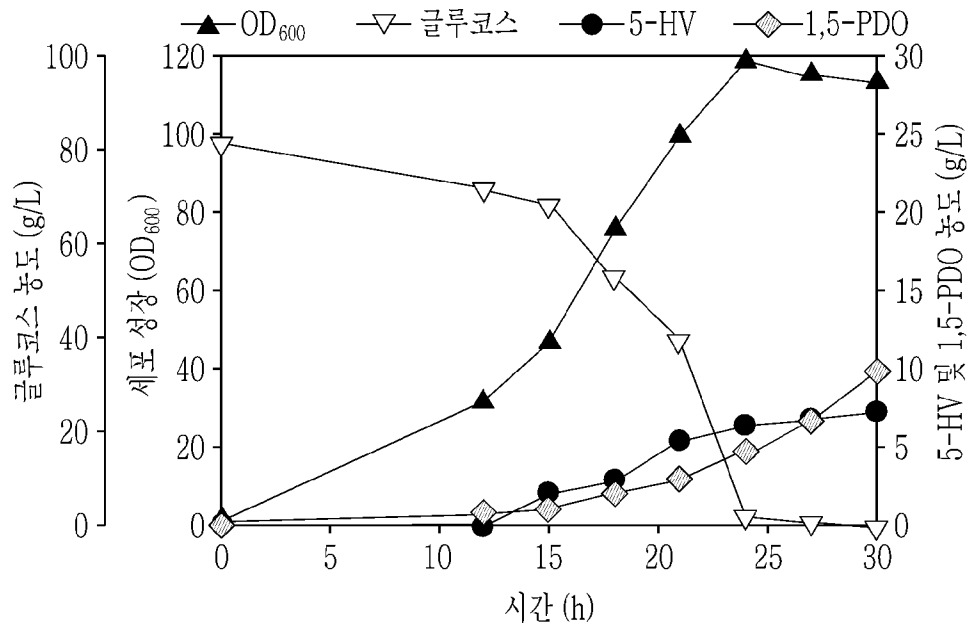


[도4]



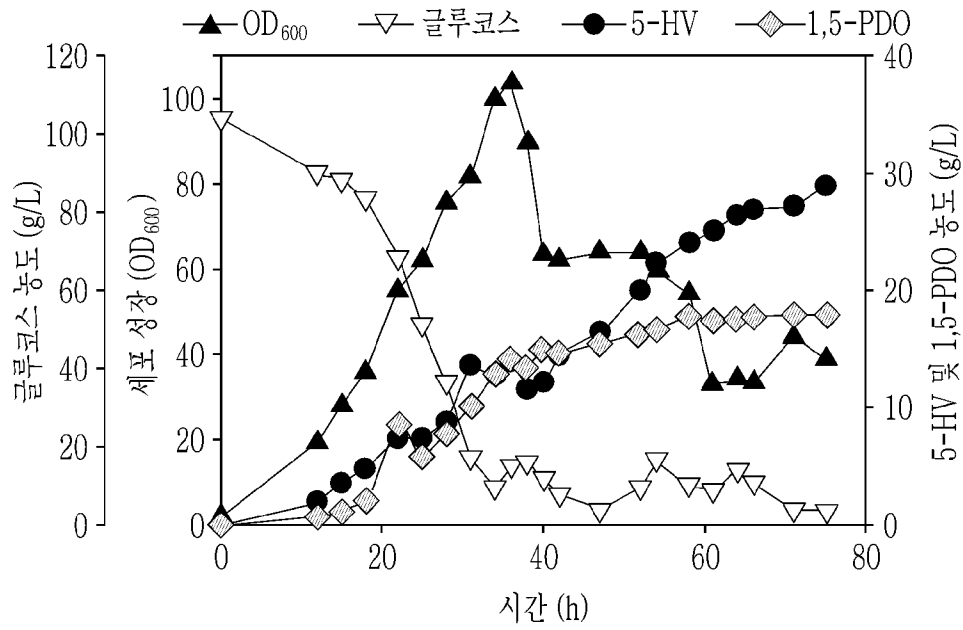
5HVx1-CAR11 회분식 발효

[도5]



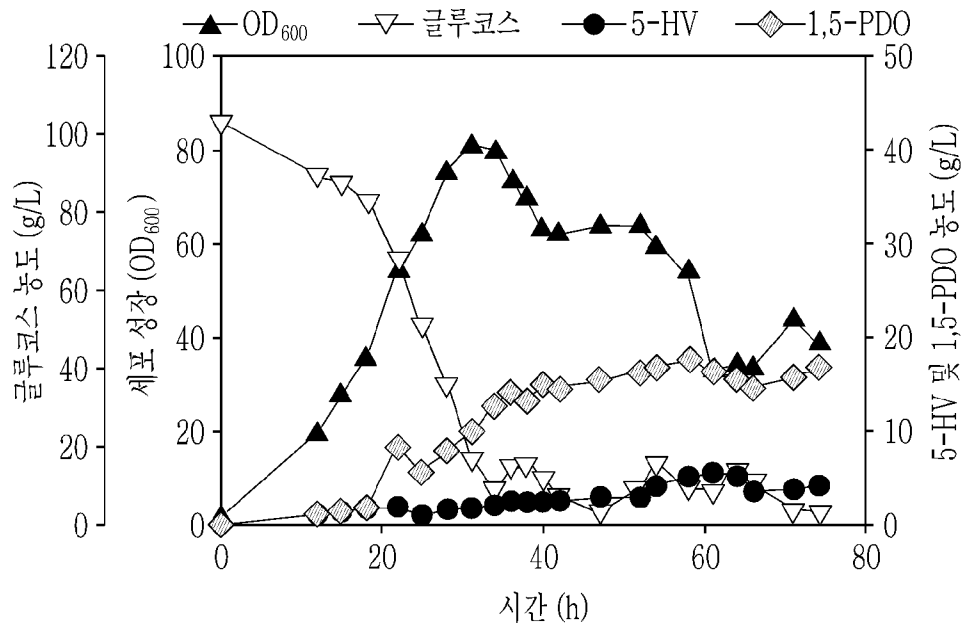
5HVx2-CAR11 회분식 발효

[도6]



5HV×1-CAR11 유가식 배양

[도7]



5HV×2-CAR11 유가식 배양

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/003936

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/77(2006.01)i; C12N 15/52(2006.01)i; C12P 7/18(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 15/77(2006.01); C07K 14/21(2006.01); C12N 15/52(2006.01); C12N 15/55(2006.01); C12N 15/70(2006.01);
C12N 9/02(2006.01); C12Q 1/02(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: 라이신(lysine), 5-아미노발레레이트(5-aminovaleate), 5-히드록시발레레이트(5-hydroxyvalerate), 유전자 도입(gene introduction), 5-히드록시발레르알데히드(5-hydroxyvaleraldehyde), 1,5-펜탄디올(1,5-pentandiol), 전환(conversion), 효소(enzyme), 벡터(vector), 형질전환(transformation), 코리네박테리움 글루타미쿰(corynebacterium glutamicum), 균주(strain)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2022-0043918 A (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF CHEMICAL TECHNOLOGY et al.) 05 April 2022 (2022-04-05) See abstract, claims 1, 3-4, 7-9, 12-13 and 17, paragraphs [0001], [0006], [0009], [0014], [0016], [0028]-[0036], [0040], [0054]-[0061], [0071], [0130], [0166] and [0174], figure 1, and SEQ ID NOs: 1-3 and 6.	1-17
Y	CEN, X. et al. Metabolic engineering of Escherichia coli for high production of 1,5-pentandiol via a cadaverine-derived pathway. Metabolic Engineering. 2022, vol. 74, pp. 168-177. See abstract, and figure 1.	1-17
Y	KR 10-2011-0090964 A (LS9, INC.) 10 August 2011 (2011-08-10) See paragraph [0040], and SEQ ID NO: 81.	11



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

02 July 2024

Date of mailing of the international search report

03 July 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	KR 10-2020-0145981 A (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF CHEMICAL TECHNOLOGY) 31 December 2020 (2020-12-31) See entire document.	1-17
A	KR 10-2022-0086450 A (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF CHEMICAL TECHNOLOGY et al.) 23 June 2022 (2022-06-23) See entire document.	1-17
A	KR 10-2020-0022605 A (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF CHEMICAL TECHNOLOGY) 04 March 2020 (2020-03-04) See entire document.	1-17
A	KR 10-2011-0104492 A (METABOLIX, INC.) 22 September 2011 (2011-09-22) See entire document.	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/003936

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/KR2024/003936

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-2022-0043918	A	05 April 2022	None			
KR	10-2011-0090964	A	10 August 2011	CN	102264910	A	30 November 2011
				CN	102264910	B	26 August 2015
				CN	105154380	A	16 December 2015
				CN	105154380	B	09 November 2018
				EP	2367947	A2	28 September 2011
				EP	2367947	B1	16 July 2014
				EP	2796559	A1	29 October 2014
				EP	2796559	B1	12 September 2018
				JP	2012-506715	A	22 March 2012
				KR	10-1700296	B1	26 January 2017
				KR	10-2016-0083135	A	11 July 2016
				US	10961553	B2	30 March 2021
				US	2010-0105963	A1	29 April 2010
				US	2013-0115665	A1	09 May 2013
				US	2016-0102327	A1	14 April 2016
				US	2019-0017081	A1	17 January 2019
				US	2021-0324430	A1	21 October 2021
				US	8999686	B2	07 April 2015
				US	9068201	B2	30 June 2015
				US	9890401	B2	13 February 2018
				WO	2010-062480	A2	03 June 2010
				WO	2010-062480	A3	29 July 2010
KR	10-2020-0145981	A	31 December 2020	None			
KR	10-2022-0086450	A	23 June 2022	None			
KR	10-2020-0022605	A	04 March 2020	JP	2020-028292	A	27 February 2020
				JP	6913722	B2	04 August 2021
				KR	10-2108021	B1	07 May 2020
				US	11053520	B2	06 July 2021
				US	2020-0263211	A1	20 August 2020
KR	10-2011-0104492	A	22 September 2011	CN	102317437	A	11 January 2012
				CN	102317437	B	21 August 2013
				CN	103396978	A	20 November 2013
				EP	2376622	A2	19 October 2011
				EP	2376622	B1	07 June 2017
				EP	3260532	A1	27 December 2017
				JP	2012-511912	A	31 May 2012
				JP	2015-211681	A	26 November 2015
				JP	5770099	B2	26 August 2015
				JP	6223386	B2	01 November 2017
				KR	10-1886012	B1	06 August 2018
				KR	10-2016-0025043	A	07 March 2016
				KR	10-2017-0132896	A	04 December 2017
				US	2010-0168481	A1	01 July 2010
				US	9090898	B2	28 July 2015
				WO	2010-068953	A2	17 June 2010
				WO	2010-068953	A3	05 August 2010

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 15/77(2006.01)i; C12N 15/52(2006.01)i; C12P 7/18(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 15/77(2006.01); C07K 14/21(2006.01); C12N 15/52(2006.01); C12N 15/55(2006.01); C12N 15/70(2006.01); C12N 9/02(2006.01); C12Q 1/02(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: 라이신(lysine), 5-아미노발레레이트(5-aminovaleate), 5-히드록시발레레이트(5-hydroxyvalerate), 유전자 도입(gene introducion), 5-히드록시발레르알데히드(5-hydroxyvaleraldehyde), 1,5-펜탄디올(1,5-pentanediol), 전환(conversion), 효소(enzyme), 벡터(vector), 형질전환(transformation), 코리네박테리움 글루타미쿰(corynebacterium glutamicum), 균주(strain)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-2022-0043918 A (한국화학연구원 등) 2022.04.05 요약, 청구항 1, 3-4, 7-9, 12-13, 17, 단락 [0001], [0006], [0009], [0014], [0016], [0028]-[0036], [0040], [0054]-[0061], [0071], [0130], [0166], [0174], 도면 1, 서열번호 1-3, 6	1-17
Y	CEN, X. 등, "Metabolic engineering of Escherichia coli for high production of 1,5-pentanediol via a cadaverine-derived pathway", Metabolic Engineering, 2022, 제74권, 페이지 168-177 초록, 그림 1	1-17
Y	KR 10-2011-0090964 A (엘에스9, 인코포레이티드) 2011.08.10 단락 [0040], 서열번호 81	11
A	KR 10-2020-0145981 A (한국화학연구원) 2020.12.31 전체 문헌	1-17
A	KR 10-2022-0086450 A (한국화학연구원 등) 2022.06.23 전체 문헌	1-17
☒ 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 문헌과조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2024년07월02일(02.07.2024)		국제조사보고서 발송일 2024년07월03일(03.07.2024)
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	KR 10-2020-0022605 A (한국화학연구원) 2020.03.04 전체 문헌	1-17
A	KR 10-2011-0104492 A (메타블럭스 인코포레이티드) 2011.09.22 전체 문헌	1-17

제1기제란 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
KR 10-2022-0043918 A	2022/04/05	없음	
KR 10-2011-0090964 A	2011/08/10	CN 102264910 A	2011/11/30
		CN 102264910 B	2015/08/26
		CN 105154380 A	2015/12/16
		CN 105154380 B	2018/11/09
		EP 2367947 A2	2011/09/28
		EP 2367947 B1	2014/07/16
		EP 2796559 A1	2014/10/29
		EP 2796559 B1	2018/09/12
		JP 2012-506715 A	2012/03/22
		KR 10-1700296 B1	2017/01/26
		KR 10-2016-0083135 A	2016/07/11
		US 10961553 B2	2021/03/30
		US 2010-0105963 A1	2010/04/29
		US 2013-0115665 A1	2013/05/09
		US 2016-0102327 A1	2016/04/14
		US 2019-0017081 A1	2019/01/17
		US 2021-0324430 A1	2021/10/21
		US 8999686 B2	2015/04/07
		US 9068201 B2	2015/06/30
		US 9890401 B2	2018/02/13
		WO 2010-062480 A2	2010/06/03
		WO 2010-062480 A3	2010/07/29
KR 10-2020-0145981 A	2020/12/31	없음	
KR 10-2022-0086450 A	2022/06/23	없음	
KR 10-2020-0022605 A	2020/03/04	JP 2020-028292 A	2020/02/27
		JP 6913722 B2	2021/08/04
		KR 10-2108021 B1	2020/05/07
		US 11053520 B2	2021/07/06
		US 2020-0263211 A1	2020/08/20
KR 10-2011-0104492 A	2011/09/22	CN 102317437 A	2012/01/11
		CN 102317437 B	2013/08/21
		CN 103396978 A	2013/11/20
		EP 2376622 A2	2011/10/19
		EP 2376622 B1	2017/06/07
		EP 3260532 A1	2017/12/27
		JP 2012-511912 A	2012/05/31
		JP 2015-211681 A	2015/11/26
		JP 5770099 B2	2015/08/26
		JP 6223386 B2	2017/11/01
		KR 10-1886012 B1	2018/08/06
		KR 10-2016-0025043 A	2016/03/07
		KR 10-2017-0132896 A	2017/12/04
		US 2010-0168481 A1	2010/07/01
		US 9090898 B2	2015/07/28
		WO 2010-068953 A2	2010/06/17
		WO 2010-068953 A3	2010/08/05