(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2022 년 2 월 3 일 (03.02.2022)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2022/025710 A1

(51) 국제특허분류:
C12P 7/52 (2006.01) *C12N 9/04* (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01) *C12N 9/02* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2021/009988

(22) 국제출원일: 2021 년 7 월 30 일 (30.07.2021)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2020-0096238 2020 년 7 월 31 일 (31.07.2020) KR

(71) 출원인: 주식회사 엘지화학 (**LG CHEM, LTD.**) [KR/KR]; 07336 서울시 영등포구 여의대로 128, Seoul (KR).

(72) 발명자: 김재형 (**KIM, Jae Hyung**); 34122 대전시 유성구 문지로 188 LG화학 기술연구원, Daejeon (KR). 강동균 (**KANG, Donggyun**); 34122 대전시 유성구 문지로 188 LG화학 기술연구원, Daejeon (KR). 이경묵 (**LEE, Kyung Muk**); 34122 대전시 유성구 문지로 188 LG화학 기술연구원, Daejeon (KR).

(74) 대리인: 유미특허법인 (**YOU ME PATENT AND LAW FIRM**); 06134 서울시 강남구 테헤란로 115, Seoul (KR).

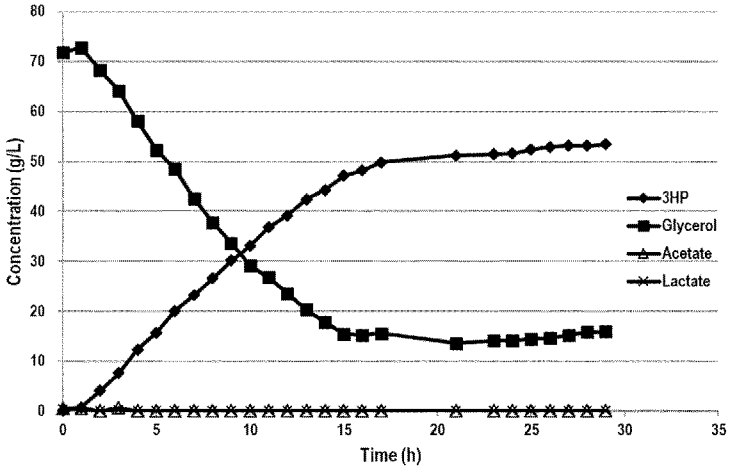
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, 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:** METHOD FOR PREPARING 3-HYDROXYPROPIONIC ACID THROUGH TWO STEPS

(54) **발명의 명칭:** 3-하이드록시프로피온산의 2단계 제조 방법



(57) **Abstract:** The present invention relates to a method for preparing 3-hydroxypropionic acid (3-HP) and/or a method for improving the productivity of 3-HP, the methods comprising the steps of: performing high-concentration cell culturing of a 3-HP-producing strain; and (2) isolating high-concentration-cultured cells to inoculate a medium for 3-HP production with same, thereby producing 3-HP, and thus the present invention can improve the productivity and yield of 3-HP.

(57) 요약서: 본 발명은 (1) 3-하이드록시프로피온산(3-hydroxypropionic acid; 3-HP) 생산 균주를 고농도 세포 배양하는 단계; 및 (2) 상기 고농도 배양된 세포를 분리하여 3-하이드록시프로피온산 생산용 배지에 접종하여 3-하이드록시프로피온산을 생산하는 단계; 를 포함하는, 3-하이드록시프로피온산(3-hydroxypropionic acid; 3-HP) 의 제조 방법 및/또는 3-HP 의 생산능 향상 방법에 관한 것으로, 3-HP의 생산능과 수율을 향상시킬 수 있다.

WO 2022/025710 A1

명세서

발명의 명칭: 3-하이드록시프로피온산의 2단계 제조 방법

기술분야

[1] 관련 출원들과의 상호 인용

[2] 본 출원은 2020년 7월 31일자 대한민국 특허출원 제 10-2020-0096238 호에 기초한 우선권의 이익을 주장하며, 해당 대한민국 특허출원의 문헌에 개시된 모든 내용은 본 명세서에 일부로서 포함된다.

[3] 본 발명은 3-하이드록시프로피온산(3-hydroxypropionic acid; 3-HP)을 제조하는 방법 및/또는 3-HP의 생산능을 향상하는 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 세포를 고농도로 배양하는 제1단계 및 상기 고농도 배양된 세포를 촉매로 이용하여 3-HP를 생산하는 제2단계의 2단계 제조 방법에 관한 것이다.

[4]

배경기술

[5] 3-하이드록시프로피온산은 아크릴산(acrylic acid), 아크릴산메틸(methyl acrylate), 아크릴아마이드(acrylamide) 등의 다양한 화학 물질로 전환 가능한 플랫폼 화합물이다. 2004년 미국 Department of Energy(DOE)로부터 Top 12 value-added bio-chemical로 선정된 이후 학계와 산업계에서 활발히 연구되고 있다.

[6] 3-HP의 생산은 크게 화학적 방법과 생물학적 방법의 두 가지 방법으로 이루어지나, 화학적 방법의 경우 초기 물질이 고가인 점, 생산 과정 중 독성 물질이 생성되는 점 등에 의해 비친환경적이라는 지적이 있어, 친환경적인 바이오 공정이 각광받고 있다.

[7] 미생물을 이용한 3-HP 생합성을 위한 기질로는 포도당(glucose)과 글리세롤(glycerol)이 주로 이용되고 있으며, 현재 3-HP 생산과 세포의 성장이 동시에 일어나는 1단계 발효 방식의 연구가 주로 진행되고 있다.

[8] 그러나 위와 같은 1단계 생산시 3-HP 생산용 기질이 세포의 성장에도 사용되어, 아세테이트(acetate)나 젖산(lactate)과 같은 부산물이 발생하며, 이로 인해 3-HP의 수율 및 생산능이 저하되는 문제점이 있다. 이러한 낮은 수율 및 생산능으로 인해 3-HP의 가능성에도 불구하고 아직 상업화에는 이르지 못한 실정이다.

[9]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[10] 본 출원의 일 예는 (1) 3-하이드록시프로피온산(3-hydroxypropionic acid; 3-HP) 생산 균주를 고농도 세포 배양하는 단계; 및 (2) 상기 고농도 배양된 세포를 분리하고 3-하이드록시프로피온산 생산용 배지에 접종 및/또는 배양하여

3-하이드록시프로피온산을 생산하는 단계;를 포함하는,
3-하이드록시프로피온산(3-hydroxypropionic acid; 3-HP)의 제조 방법 및/또는 3-HP의 생산능 향상 방법을 제공하는 것이다.

[11] 상기 2단계 제조 방법을 통해 세포의 성장 또는 부산물 발생에 의한 3-HP 생산능 저하를 개선할 수 있다.

[12] 다른 예는 3-하이드록시프로피온산을 고농도로 포함하는 3-하이드록시프로피온산 생산 균주의 배양액을 제공한다. 일 예에서, 상기 배양액은 앞서 설명한 2단계 제조 방법에 의하여 생산된 것일 수 있다. 상기 배양액은 3-하이드록시프로피온산 생산 용도로 사용될 수 있다.

[13]

과제 해결 수단

[14] 일 예는,

[15] (1) 3-하이드록시프로피온산(3-hydroxypropionic acid; 3-HP) 생산 균주를 고농도 세포 배양하는 단계; 및

[16] (2) 상기 고농도 배양된 세포를 분리하고 3-하이드록시프로피온산 생산용 배지에 접종 및/또는 배양하여 3-하이드록시프로피온산을 생산하는 단계

[17] 를 포함하는, 3-하이드록시프로피온산(3-hydroxypropionic acid; 3-HP)의 제조 방법 및/또는 3-HP의 생산능 향상 방법을 제공한다.

[18] 다른 예는 3-하이드록시프로피온산을 고농도로 포함하는 3-하이드록시프로피온산 생산 균주의 배양액을 제공한다. 상기 배양액은 3-하이드록시프로피온산 생산 용도로 사용될 수 있다. 상기 배양액은 상기의 제조 방법에 의하여 생산된 것일 수 있다.

[19]

[20] 이하 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

[21]

[22] <u>2-단계 3-HP 생산</u>

[23] (1) 3-HP 생산 균주의 고농도 배양 단계

[24] 본 명세서에서 제공되는 3-HP의 제조 방법 및/또는 3-HP의 생산능 향상 방법은 (1) 3-하이드록시프로피온산 생산 균주를 고농도 배양하는 단계를 포함한다.

[25] 상기 3-하이드록시프로피온산 생산 균주는 3-하이드록시프로피온산 생산이 가능한 모든 천연 또는 유전자 조작된 재조합 미생물 중에서 선택될 수 있다. 일 예에서 상기 미생물은 에스케리키아 (Escherichia) 속 (예컨대, 대장균 등), 슈도모나스 (Pseudomonas) 속, 엔테로박테리아 (Enterobacteria) 속, 브레비박테리움 (Brevibacterium) 속, 코리네박테리움 (Corynebacterium) 속, 크렙시엘라 (Klebsiella) 속, 시트로박터 (Citrobacter) 속, 클로스트리디움 (Clostridium) 속, 스트렙토마이세스 (Streptomyces) 속, 바실러스 (Bacillus) 속, 락토바실러스 (Lactobacillus) 속, 슈도모나스 (Pseudomonas) 속, 사카로마이세스

(Saccharomyces) 속 및 아스퍼질러스 (Aspergillus) 속으로 이루어진 미생물에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 일 구체예에서, 상기 3-하이드록시프로피온산 생산 균주는 대장균일 수 있다.

[26] 상기 3-하이드록시프로피온산 생산 균주는 글리세롤 탈수효소(glycerol dehydratase) 및 알데하이드 탈수소효소(aldehyde dehydrogenase)로 이루어지는 군에서 선택되는 하나 이상 또는 상기 2종의 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 것일 수 있다. 일 예에서, 상기 3-HP 생산 균주는 글리세롤 탈수효소 재활성효소(GdrAB)를 암호화하는 유전자(gdrAB)를 추가로 포함할 수 있다. 일 예에서, 상기 3-HP 생산 균주는 추가로 비타민 B_{12}를 생합성할 수 있는 균주일 수 있다.

[27] 상기 글리세롤 탈수효소(glycerol dehydratase)는 dhaB(GenBank accession no. U30903.1) 유전자에 의해 암호화되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 dhaB 유전자는 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumonia*)에서 유래한 효소일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 글리세롤 탈수효소를 암호화하는 유전자는 dhaB1, dhaB2 및/또는 dhaB3를 암호화하는 유전자를 포함할 수 있다. 상기 글리세롤 탈수효소 단백질 및 이를 암호화하는 유전자는 글리세롤을 3-하이드록시프로판알(3-hydroxypropanal, 3-HPA)과 물(H_2O)로 분해하는 효소 활성을 유지하는 범위 내에서 유전자 및/또는 아미노산 서열의 변이를 포함할 수 있다.

[28] 상기 알데하이드 탈수소효소(aldehyde dehydrogenase; ALDH)를 암호화하는 유전자(aldH)는, 예를 들어, 대장균(Escherichia coli) 또는 *E. coli* K12 MG1655 세포주에서 유래한 aldH(GenBank Accession no. U00096.3; EaldH) 유전자, 클렙시엘라 뉴모니아(*K. pneumonia*)에서 유래한 puuC 유전자, 및/또는 아조스피릴룸 브라실렌스(*Azospirillum brasilense*) 유래의 KGSADH 유전자일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 알데하이드 탈수소효소 단백질 및 이를 암호화하는 유전자는 3-HPA로부터 3-HP를 생산하기 위한 활성을 유지하는 범위 내에서 유전자 및/또는 아미노산 서열의 변이를 포함할 수 있다.

[29] 상기 글리세롤 탈수효소 재활성효소 (GdrAB)를 암호화하는 유전자는 클렙시엘라 뉴모니아 (*K. pneumonia*) 유래의 gdrAB 유전자일 수 있다.

[30] 상기 3-HP 생산 균주는 글리세롤 탈수효소, 알데하이드 탈수소효소, 및 글리세롤 탈수효소 재활성효소로 이루어지는 군에서 선택되는 하나 이상, 둘 이상 또는 3종 모두의 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 포함할 수 있다.

[31] 상기 재조합벡터는 글리세롤 탈수효소, 알데하이드 탈수소효소, 및 글리세롤 탈수효소 재활성효소로 이루어지는 군에서 선택되는 하나 이상, 둘 이상 또는 3종 모두의 단백질을 암호화하는 유전자를 세포 내에서 발현하기 위한 목적 범위에서 프로모터, 조절 부위를 당업계에 알려진 방법으로 치환하여 사용할 수 있다.

[32] 상기 고농도 배양은 3-HP 생산 균주를 대량으로 확보하기 위한 목적 범위에서 당업계에 알려진 방법을 제한 없이 사용하여 수행될 수 있으며, 일 예에서, 상기 배양은 유가 배양(fed-batch culture)으로 수행되는 것일 수 있다.

[33] 일 예에서 상기 유가 배양은 pH-stat 방식, 정속(continuous feeding) 배양 방식, 또는 이들의 조합으로 수행될 수 있다. 일 구현예에서 pH-stat 방식의 유가 배양이 수행되는 경우, 포도당이 1 내지 5g/L 농도로 첨가될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 일 구현예에서 정속 배양 방식의 유가 배양이 수행되는 경우 포도당이 10 내지 20g/L/h 속도로 주입될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

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

[35] 일 예에서 상기 고농도 배양시 탄소원은 고농도 배양을 위한 목적 범위에서 단당류, 이당류 및/또는 다당류를 제한 없이 선택하여 사용될 수 있다. 예를 들어, 상기 탄소원은 포도당(glucose), 과당(fructose), 갈락토스(galactose), 만노스(mannose), 아라비노스(arabinose), 자일로스(xylose), 리보스(riboase), 자당(sucrose), 엿당(maltose), 젖당(lactose), 및 셀로비오스(cellobiose)로 이루어지는 군에서 선택되는 하나 이상, 둘 이상, 셋 이상, 넷 이상, 다섯 이상, 열 이상, 또는 상기 11종 모두의 조합일 수 있다. 상기 고농도 배양시에 사용되는 배지는 탄소원으로 글리세롤을 포함하지 않는 것일 수 있다. 이와 같이 고농도 배양시 사용되는 배지가 글리세롤을 포함하지 않음으로써 고농도 배양 단계에서 3-HP 생산이 일어나지 않을 수 있다.

[36] 일 예에서 상기 고농도 배양후 세포 농도는 OD_{600} 값 기준으로 10 이상, 30 이상, 50 이상, 70 이상, 100 이상, 또는 110 이상일 수 있으며, 예를 들어, 10 이상, 50 이상, 100 이상, 150 이상, 200 이상, 20시간 배양시, OD_{600} 값이 10 내지 500, 10 내지 400, 10 내지 300, 10 내지 250, 10 내지 200, 10 내지 150, 30 내지 500, 30 내지 400, 30 내지 300, 30 내지 250, 30 내지 200, 30 내지 150, 50 내지 500, 50 내지 400, 50 내지 300, 50 내지 250, 50 내지 200, 50 내지 150, 70 내지 500, 70 내지 400, 70 내지 300, 70 내지 250, 70 내지 200, 70 내지 150, 100 내지 500, 100 내지 400, 100 내지 300, 100 내지 250, 100 내지 200, 100 내지 150, 110 내지 500, 110 내지 400, 110 내지 300, 110 내지 250, 110 내지 200, 또는 110 내지 150일 수 있고, 예컨대, 120일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다

[37] 일 예에서 상기 고농도 배양후 세포 농도는 배지 1L당 세포건조중량(g) 기준으로 10 내지 100g/L, 10 내지 80g/L, 10 내지 50g/L, 10 내지 40g/L, 10 내지 35g/L, 15 내지 100g/L, 15 내지 80g/L, 15 내지 50g/L, 15 내지 40g/L, 15 내지 35g/L, 20 내지 100g/L, 20 내지 80g/L, 20 내지 50g/L, 20 내지 40g/L, 20 내지 35g/L, 25 내지 100g/L, 25 내지 80g/L, 25 내지 50g/L, 25 내지 40g/L, 또는 25 내지 35g/L일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[38]

[39] (2) 3-HP 생산 단계

[40] 본 명세서에서 제공되는 3-HP의 제조 방법 및/또는 3-HP의 생산능 향상 방법은 (2) 상기 고농도 배양된 세포를 분리하고 3-하이드록시프로피온산 생산용 배지에 접종 및/또는 배양하여 3-하이드록시프로피온산을 생산하는 단계를 포함한다.

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

[42] 상기 3-하이드록시프로피온산 생산용 배지는 3-HP 생산 균주의 추가 증식이 일어나지 않으면서 상기 균주가 3-HP를 생산할 수 있도록 하기 위한 목적 범위에서 제한 없이 사용될 수 있다.

[43] 일 예에서, 상기 3-하이드록시프로피온산 생산용 배지의 탄소원은 글리세롤일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 일 예에서, 상기 생산용 배지는 비타민 B_{12}를 추가로 포함할 수 있다. 상기 3-하이드록시프로피온산 생산용 배지는 탄소원으로 포도당을 포함하지 않는 것일 수 있다.

[44] 일 예에서 상기 배지는 합성 배지(synthetic media) 또는 반합성배지(semisynthetic media)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[45] 상기 고농도 배양된 세포의 접종은 3-HP 생산 목적 범위에서 통상의 기술자가 적절히 세포 접종 농도를 변경할 수 있다. 일 예에서, 상기 접종시 세포 농도(배지 1L 당 건조 세포 중량(Dry cell weight, DCW) 기준)는 1 내지 20 g/L, 1 내지 16 g/L, 1 내지 12 g/L, 1 내지 9 g/L, 2 내지 20g/L, 2 내지 16 g/L, 2 내지 12g/L, 2 내지 9 g/L, 4 내지 20 g/L, 4 내지 16 g/L, 4 내지 12 g/L, 또는 4 내지 9 g/L 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[46] 상기 3-하이드록시프로피온산을 생산하는 단계는, 3-HP를 생산하기 위한 목적 범위에서 당업계에 알려진 배양 방법을 제한 없이 선택하여 사용될 수 있으며, 일 예에서, 상기 배양 단계는 발효 배양(fermentation)으로 수행되는 것일 수 있다.

[47] 상기 3-HP 생산 단계에서는 접종된 세포의 증식이 일어나지 않는 것일 수 있다. 일 예에서, 상기 생산 단계의 종료시 세포의 수는 생산 단계 개시 시 접종된 세포의 수의 150% 이하, 130% 이하, 100% 이하, 90% 이하, 80% 이하, 50 내지 150%, 50 내지 130%, 50 내지 100%, 50 내지 90%, 50 내지 80%, 70 내지 150%, 70 내지 130%, 70 내지 100%, 70 내지 90%, 또는 70 내지 80%일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[48]

[49] 본 명세서에서 제공되는 3-HP의 제조 방법 및/또는 3-HP의 생산능 향상 방법의 3-HP 수율은, 예를 들어, 29시간 배양(3-HP 생산) 기준으로, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 93% 이상, 또는 95% 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 3-HP 수율은 상기 (2)단계에서 배지 내 글리세롤 사용량(몰수) 대비 배지 내 3-HP

생산량으로 계산될 수 있으며, 일 예에서 하기 수학식 1과 같이 계산될 수 있다.

[50] [수학식 1]

[51] 수율 (yield, %) = (최종 3-HP(g))/{(발효 전 Glycerol(g)) - (발효 후 남은 Glycerol(g))}

[52]

[53] 본 명세서에서 제공되는 3-HP 제조 방법 및/또는 3-HP의 생산능 향상 방법의 3-HP 생산능(1시간 및 배지 1L당 3-HP 생산량(g))은 2.0 g/L/h 이상, 2.5 g/L/h 이상, 2.0 내지 30 g/L/h, 2.0 내지 20 g/L/h, 2.0 내지 10 g/L/h, 2.0 내지 5 g/L/h, 2.5 내지 30 g/L/h, 2.5 내지 20 g/L/h, 2.5 내지 10 g/L/h, 또는 2.5 내지 5 g/L/h일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[54] 일 구현예에서, 본 발명의 2단계 3-HP 제조 방법으로 3-HP를 제조한 결과, 생산능은 2.94g/L/h로 측정되었으며, 이는 현재까지 문헌에 보고된 수치 중 가장 높았다.

[55]

[56] 본 명세서에서 제공되는 3-HP 제조 방법 및/또는 3-HP의 생산능 향상 방법의 3-HP 생산량은, 예를 들어, 20 내지 30시간 (예컨대, 20시간, 21시간, 22시간, 23시간, 24시간, 25시간, 26시간, 27시간, 28시간, 29시간, 또는 30시간) 배양(3-HP 생산)시 배지 1L당 3-HP 함량(g) 기준으로, 40g/L 이상, 41g/L 이상, 42g/L 이상, 43g/L 이상, 44g/L 이상, 45g/L 이상, 46g/L 이상, 47g/L 이상, 48g/L, 49g/L 이상, 50g/L 이상, 51g/L 이상, 52g/L 이상, 또는 53g/L 이상일 수 있다 (상한값은 60 내지 1000g/L 중에서 특별한 제한은 없이 선택될 수 있으며, 예컨대, 1000g/L, 500g/L, 100g/L, 90g/L, 80g/L, 70g/L, 또는 60g/L일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다).

[57] 본 발명이 제공하는 3-HP 제조 방법 및/또는 3-HP의 생산능 향상 방법은 3-HP 생산에 따른 부산물을 생산하지 않는 것일 수 있다. 상기 부산물은 아세테이트(acetate) 및/또는 젖산(lactate)일 수 있다. 일 예에서 상기 부산물은 전체 배양액 내 농도가 1%(w/v) 이하, 0.5%(w/v) 이하, 0.1%(w/v) 이하, 0.01%(w/v) 이하, 0.001%(w/v) 이하, 0.0001%(w/v), 또는 0.00001%(w/v) 이하로 생산되거나 (이때, 부산물 농도의 하한값은 0 내지 0.000001(w/v)에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다), 0%(w/v)의 농도로 생산(부산물이 검출 가능한 농도로 생성되지 않음)될 수 있다.

[58] 본 명세서에서 제공되는 2단계 3-HP 제조 방법은, 세포 성장 및 3-HP 생산이 동시에 일어나는 1단계 발효 방식에 비해, 3-HP 수율 (%)이 1.05배 이상 또는 1.1배 이상 높을 수 있으며, 예컨대, 1.05 내지 10배, 1.05 내지 5배, 1.05 내지 2배, 1.05 내지 1.7배, 1.05 내지 1.5배, 1.05 내지 1.2배, 1.1 내지 10배, 1.1 내지 5배, 1.1 내지 2배, 1.1 내지 1.7배, 1.1 내지 1.5배 또는 1.1 내지 1.2배 높을 수 있고, 예컨대 약 1.13배 높을 수 있다.

[59] 본 발명이 제공하는 2단계 3-HP 제조 방법은 상기 1단계 발효 방식에 비해 3-HP 생산능 (g/L/h)이 1.1배 이상, 1.3배 이상, 또는 1.5배 이상 높을 수 있으며, 예컨대,

1.1 내지 10배, 1.1 내지 5배, 1.1 내지 3배, 1.1 내지 2.5배, 1.1 내지 2배, 1.3 내지 10배, 1.3 내지 5배, 1.3 내지 3배, 1.3 내지 2.5배, 1.3 내지 2배, 1.5 내지 10배, 1.5 내지 5배, 1.5 내지 3배, 1.5 내지 2.5배, 1.5 내지 2배, 1.9 내지 3배, 1.9 내지 2.5배 또는 1.9 내지 2배 높을 수 있고, 예컨대, 약 1.96배 높을 수 있다.

[60]

[61] 본 발명이 제공하는 2단계 3-HP 제조 방법은 (2) 상기 고농도 배양된 세포를 분리하고 3-하이드록시프로피온산 생산용 배지에 접종 및/또는 배양하여 3-하이드록시프로피온산을 생산하는 단계 이후에, 상기 배양액으로부터 3-하이드록시프로피온산을 분리, 회수, 및/또는 정제하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[62]

[63] 3-HP를 포함하는 배양액

[64] 본 출원의 다른 예는 3-하이드록시프로피온산을 고농도로 포함하는 3-하이드록시프로피온산 생산 균주의 배양액을 제공한다. 상기 배양액은 세포(3-하이드록시프로피온산 생산 균주)를 포함하지 않거나 포함하는 것일 수 있다. 상기 배양액은 포도당을 포함하지 않는 것일 수 있다.

[65] 상기 3-하이드록시프로피온산 생산 균주는 앞서 설명한 바와 같다.

[66] 상기 배양액은 고농도 세포 배양된 3-하이드록시프로피온산 생산 균주를 3-하이드록시프로피온산 생산용 배지에 접종하여 얻어진 세포 (균주) 포함 또는 세포 불포함 배양액일 수 있으며, 상기 3-하이드록시프로피온산 생산용 배지 및/또는 배양액은 포도당을 포함하지 않는 것일 수 있다. 상기 고농도 세포 배양은 앞서 (1) 단계에서 설명한 바와 같다.

[67] 일 예에서, 상기 배양액은 앞서 설명한 (1) 단계 및 (2) 단계에 의하여 얻어지는 것일 수 있다.

[68] 상기 배양액은 3-하이드록시프로피온산을 41g/L 이상, 42g/L 이상, 43g/L 이상, 44g/L 이상, 45g/L 이상, 46g/L 이상, 47g/L 이상, 48g/L, 49g/L 이상, 50g/L 이상, 51g/L 이상, 52g/L 이상, 또는 53g/L 이상일 수 있다 (상한값은 60 내지 1000g/L 중에서 특별한 제한은 없이 선택될 수 있으며, 예컨대, 1000g/L, 500g/L, 100g/L, 90g/L, 80g/L, 70g/L, 또는 60g/L일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다). 상기 배양액은 아세테이트 및 젖산으로 이루어진 군에서 선택된 부산물의 농도가 1%(w/v) 이하, 0.5%(w/v) 이하, 0.1%(w/v) 이하, 0.01%(w/v) 이하, 0.001%(w/v), 0.0001%(w/v), 또는 0.00001%(w/v) 이하 (이 때, 부산물 농도의 하한값은 0 내지 0.000001(w/v)에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다)이거나, 0%(w/v)일 수 있다.

[69] 상기 배양액은 3-하이드록시프로피온산 생산 용도로 사용될 수 있다.

[70] 다른 예는 상기 배양액을 포함하는 3-하이드록시프로피온산 생산용 조성물을 제공한다.

[71] 다른 예는 상기 3-하이드록시프로피온산 생산용 조성물로부터

3-하이드록시프로피온산을 분리, 회수, 및/또는 정제하는 단계를 포함하는 3-하이드록시프로피온산 생산 방법을 제공한다.

[72]

발명의 효과

[73] 본 발명이 제공하는 2단계 3-HP 생산방법은 1단계 배양에 비해 3-HP 생산능과 수율이 현저히 향상되어 3-HP의 상업화에 유용하게 사용될 수 있다.

[74]

도면의 간단한 설명

[75] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따라 3-HP 생산 균주를 고농도 세포배양을 수행한 결과 시간의 변화에 따른 OD 변화를 보여주는 그래프이다.

[76] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따라 고농도 배양된 3-HP 생산 균주를 3-HP 생산용 배지에 접종한 이후 (0h) 시간의 경과에 따라 3-HP(3HP), 글리세롤(Glycerol), 아세테이트(Acetate), 및 젖산(Lactate)의 농도를 측정한 결과를 보여주는 그래프이다.

[77]

발명의 실시를 위한 형태

[78] 이하 본 발명을 실시예에 의해 보다 상세히 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명의 내용을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에 의해 제한되지 아니한다.

[79] 본 명세서에서 특별한 언급이 없는 한 온도는 모두 섭씨 온도를 기준으로 하며, 핵산 서열은 특별한 사정이 없는 한 5' 말단에서 3' 말단 방향으로 기재되었다.

[80]

[81] **실시예 1. 3-HP 생산 균주의 고농도 세포배양**

[82] **1-1. 3-HP 생산 균주의 제조**

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

[84]

[85] 구체적으로, 글리세롤 디하이드라타제를 코딩하는 유전자(dhaB), 알데히드 디하이드로게나제를 코딩하는 유전자(aldH) 및 글리세롤 디하이드라타제 리액티바제를 코딩하는 유전자(gdrAB)를 플라스미드 pCDF 에 클로닝하여 3HP 생산용 재조합 벡터(pCDF_J23101_dhaB_gdrAB_J23100_aldH)를 제작 하였다.

[86] 상기 재조합 벡터 제작에 사용된 pCDFDuetJ23 벡터는 pCDFDuet-1 벡터의 프로모터 부분을 J23101과 J23100 프로모터로 치환한 벡터이다. 상기 벡터에 삽입되는 dhaB (U30903.1; 약 2.7 kb; dhaB1, dhaB2 및 dhaB3 포함)와 gdrAB

유전자 (약 2.2 kb; gdrA, gdrB)는 크렙시엘라 뉴모니아 (ATCC 25955)의 염색체에서 하기 표 1의 프라이머를 사용하여 증폭하였다. 크렙시엘라 뉴모니아의 염색체 상에 dhaB123와 gdrA 유전자가 나란히 위치해 있어 같이 증폭하였고, gdrB는 dhaB123, gdrA와 반대 방향으로 위치해 있기 때문에 gdrB만 따로 증폭하였다.

[87] aldH 유전자는 하기 표 1의 서열번호 5 및 서열번호 6의 핵산 서열로 이루어지는 프로모터쌍을 이용하여 *E. coli* K12 MG1655 균주의 유전체로부터 증폭하여 분리하였다. 하기 표 1에 각 유전자 증폭에 사용된 프라이머의 핵산 서열을 나타내었으며, 명칭 중 '-F'는 정방향 프로모터를, '-R'은 역방향 프로모터를 의미한다.

[88] [표1]

서열번호	이름	핵산 서열(5'>3')
1	dhaB-gdrA-F	GAATTCATGAAAAGATCAAAACGATTTGCAGTCCT
2	dhaB-gdrA-R	AAGCTTGATCTCCCACTGACCAAAGCTGG
3	gdrB-F	AAGCTTAGAGGGGGCCGTCATGTCGCTTTCACCGCCAG
4	gdrB-R	CTTAAGTCAGTTTCTCTCACTTAACGGC
5	aldH-F	ggtaccatgaattttcatcatctggc
6	aldH-R	catatgtcaggcctccaggcttat

[89] 각 유전자의 증폭 후 dhaB123, gdrA 유전자는 제한 효소 EcoRI과 HindIII을, gdrB 유전자는 제한 효소 HindIII와 AflII을 이용하여 상기 pCDFDuetaJ23 벡터의 J23101 프로모터 하류에 클로닝하였다. aldH는 제한효소 KpnI과 NdeI을 이용하여 J23108 프로모터 아래에 클로닝하였다. 각 유전자의 클로닝 방법은 당업계에 알려진 방법으로 수행되었다.

[90] 상기 플라스미드를 *E. coli* W3110 (KCCM 40219)에 전기천공법으로 도입하여, 3HP 생산 균주를 제조하였다.

[91]

[92] **1-2. 세포의 고농도 배양**

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

[94] 구체적으로, MR 배지 (1L 당 KH_2PO_4 6.67g, $(NH_4)_2HPO_4$ 4g, MgSO4·$7H_2O$ 0.8g, citric acid 0.8g, 및 trace metal solution 5mL; 여기에서, Trace metal solution은 1L 당 5M HCl 5mL, $FeSO_4·7H_2O$ 10g, $CaCl_2$ 2g, $ZnSO_4·7H_2O$ 2.2g, $MnSO_4·4H_2O$ 0.5g,

$CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 1g, $(NH_4)_6Mo_7O_2 \cdot 4H_2O$ 0.1g, 및 $Na_2B_4O_2 \cdot 10H_2O$ 0.02g)에 포도당(Glucose) 20g/L, 선별을 위한 항생제(스트렙토마이신) 25mg/L를 첨가하여 세포 배양 배지로 사용하였으며, 섭씨 35도의 온도를 유지하였다. pH는 암모니아수를 이용하여 6.95로 유지하였고, 용존산소량(DO)은 교반 속도를 단계적으로 900rpm까지 높이면서 20%를 유지하였으며, aeration은 1vvm을 유지하였다.

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

[96] 배양 시간의 경과에 따라 UV-Spectrometer를 이용하여 흡광도(Optical Density, OD)를 측정하여 세포 농도를 측정하였다. 도 1에 시간 경과에 따른 OD_{600} 수치의 변화 그래프를 나타내었다. 배양 시작 후 20시간째에 OD_{600}은 약 120(건조세포중량 30g/L)을 나타내었다.

[97] 상기 20시간의 고농도 세포배양을 마친 후 세포 배양액을 6,000rpm으로 섭씨 4도에서 10분간 원심분리하여 세포를 회수하였다. 회수된 세포는 PBS(phosphate-buffered saline)으로 현탁하여 이후 단계에 사용하였다.

[98]

[99] **실시예 2. 3-HP 생산 단계**

[100] 3-HP 생산용 배지는 포도당(Glucose)을 포함하지 않는 M9 배지에 글리세롤(Glycerol) 70g/L, 비타민 B_{12} 50uM를 첨가하여 준비하였다. 3-HP 생산용 배지에 상기 실시예 1-2에서 준비한 세포 현탁액을 세포 접종량 5g/L(건조세포중량 기준)가 되도록 접종하고, 5L 발효기 (Working volume 2L)에서 3-HP 생산 단계를 수행하였다.

[101] 3-HP 생산을 위한 배양 조건은, 온도 섭씨 35℃, 교반 속도 300rpm, aeration은 1 vvm을 유지하였으며, pH는 $Ca(OH)_2$를 이용해 7.0으로 유지하였다.

[102] 상기 3-HP 생산 과정에서 시간의 경과에 따른 3-HP, 글리세롤(Glycerol), 아세테이트(acetate), 및 젖산(lactate)의 농도를 고압 액체 크로마토그래피(High Pressure; HPLC)로 측정하여, 그 결과를 하기 표 2 및 도 2에 나타내었다. 표 2는 3-HP 생산용 배양 단계(2단계 배양)에서 접종 후 발효 시간 경과에 따른 3-HP, 글리세롤(Glycerol), 아세테이트(Acetate), 및 젖산(Lactate)의 농도(g/L)를 측정한 결과이다.

[103] [표2]

	3-HP	**Glycerol**	**Acetate**	**Lactate**
접종 전 농도(g/L)	0	71.68	0.47	0.31
29시간 발효 후 농도 (g/L)	53.34	15.93	0	0
3-HP 수율(%)	95.7	-	-	-
3-HP 생산능(g/L/h)	2.94	-	-	-

[104] 도 2에서 확인되는 바와 같이 3-HP 생산용 배지에 균주 접종 후 17시간 경과시 3-HP 농도가 50.0g/L 이상으로 나타났으며, 생산능은 2.94g/L/h로 확인되어, 현재까지 문헌에 보고된 수치 중 가장 높은 3-HP 생산능을 확인하였다.

[105] 접종 후 29시간이 경과하였을 때 최종 3-HP 농도는 53.3g/L로 확인되었으며, 수율(yield)은 약 95.7%로 매우 우수한 수율 및 3-HP 생산능을 보인 반면, 3-HP 생산에 따른 부산물인 젖산과 아세테이트는 29시간이 경과하도록 거의 생성되지 않았다.

[106]

[107] **비교예 1. 1단계 3-HP 생산 방식과 비교**

[108] 본 출원에서 제공되는 포도당을 포함하지 않는 3-HP 생산용 배지를 사용하는 2단계 생산 방식의 3-HP 생산능을 기존의 1단계 생산 방식과 비교하기 위해, 상기 실시예 1-1에서 제조된 3-HP 생산 균주를 유가 배양(fed-batch culture) 방법으로 배양하였고, 배양 배지에 세포 성장에 필요한 포도당과 기질인 글리세롤을 동시에 첨가하여 세포 성장과 3-HP 생산을 동시에 진행하였다 (1단계 생산 방식).

[109] 상기 비교를 위하여 수행된 1단계 생산 과정을 보다 구체적으로 설명하면 다음과 같다: 상기 배양 배지는 상기 실시예 1-2의 MR배지에 포도당(Glucose) 20g/L 및 선별을 위한 항생제(스트렙토마이신, streptomycin) 25mg/L를 첨가하여 사용하였으며, 섭씨 35도의 온도를 유지하였다. pH는 암모니아수를 이용하여 6.95로 유지하였고, 용존산소량(DO)은 교반 속도를 단계적으로 900rpm까지 높이면서 20%를 유지하였으며, aeration은 1vvm을 유지하였다.

[110] 상기 배양 배지 내의 초기에 첨가된 포도당이 모두 소모되면 continuous feeding 방식으로 포도당을 3g/L를 첨가하고, 글리세롤은 배양 후 20시간 후에 70g/L로 첨가하였다. 이후 과정은 실시예 2와 동일하게 수행하였다.

[111] 상기 3-HP 생산 과정을 통해 제조된 3-HP 수율 및 생산능을 고압 액체 크로마토그래피(High Pressure; HPLC)로 측정하였다. 이와 같이 얻어진 3-HP 수율 및 생산능 결과를 실시예 1 및 2를 실시한 2단계 3-HP 생산 과정을 통한 3-HP 수율 및 생산능과 비교하여 하기 표 3에 나타내었다.

[112] [표3]

	1단계 생산 방식	2단계 생산 방식
3-HP 수율(%)	85	95.7
3-HP 생산능(g/L/h)	1.5	2.94
부산물	Acetate 3 g/L Lactate 2 g/L	-

[113] 상기 표 3에서 확인되는 바와 같이 2단계 3-HP 생산 방식이 기존의 1단계 생산 방식에 비해 3-HP 수율 및 생산능이 우수하였다. 또한, 2단계 3-HP 생산

방식에서는 1단계 생산 방식과는 달리 부산물인 acetate 및 lactate가 생산되지 않아, 3-HP의 2단계 생산 방식의 우수함을 확인하였다.

청구범위

[청구항 1] (1) 3-하이드록시프로피온산(3-hydroxypropionic acid; 3-HP) 생산 균주를 고농도 세포 배양하는 단계; 및
(2) 상기 고농도 배양된 세포를 분리하여 3-하이드록시프로피온산 생산용 배지에 접종하여 3-하이드록시프로피온산을 생산하는 단계;를 포함하고,
상기 (2) 단계는 세포의 증식이 일어나지 않는 것인,
3-하이드록시프로피온산(3-hydroxypropionic acid; 3-HP)의 제조 방법.

[청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 (1) 단계는 유가 배양(fed-batch culture) 방법으로 수행되고, 상기 (2) 단계는 발효 배양(fermentation)으로 수행되는 것인, 방법.

[청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 (1) 단계는 포도당(glucose)을 탄소원으로 포함하는 배지에서 수행되는 것인, 방법.

[청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 (1) 단계는 글리세롤을 탄소원으로 포함하지 않는 배지에서 수행되는 것인, 방법.

[청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 (2) 단계는 글리세롤(glycerol)을 탄소원으로 포함하는 배지에서 수행되는 것인, 방법.

[청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 (2) 단계는 포도당을 탄소원으로 포함하지 않는 배지에서 수행되는 것인, 방법.

[청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 3-HP 생산 균주는, 글리세롤 탈수효소(glycerol dehydratase) 및 알데하이드 탈수소효소(aldehyde dehydrogenase)로 이루어지는 군에서 선택되는 하나 이상의 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 것인, 방법.

[청구항 8] 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 3-하이드록시프로피온산 수율은 80% 이상인, 방법.

[청구항 9] 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 3-하이드록시프로피온산 생산능은 2 g/L/h 이상인, 방법.

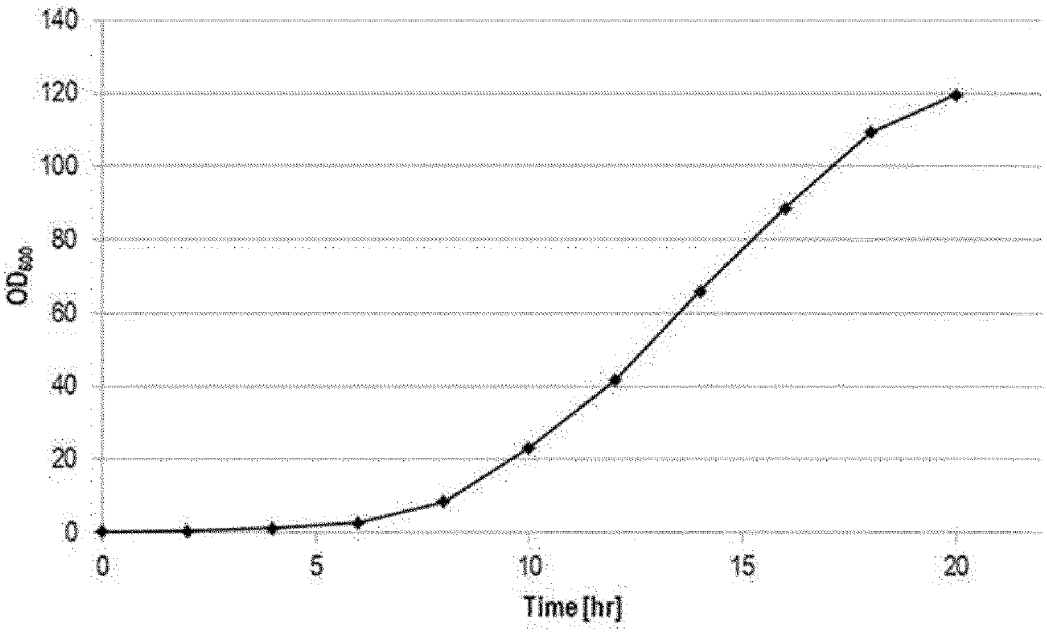
[청구항 10] 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 (2) 단계를 29시간 수행시의 3-하이드록시프로피온산 생산량이 41g/L 이상인, 방법.

[청구항 11] 3-하이드록시프로피온산을 45g/L 이상의 농도로 포함하는 3-하이드록시프로피온산 생산 균주의 배양액.

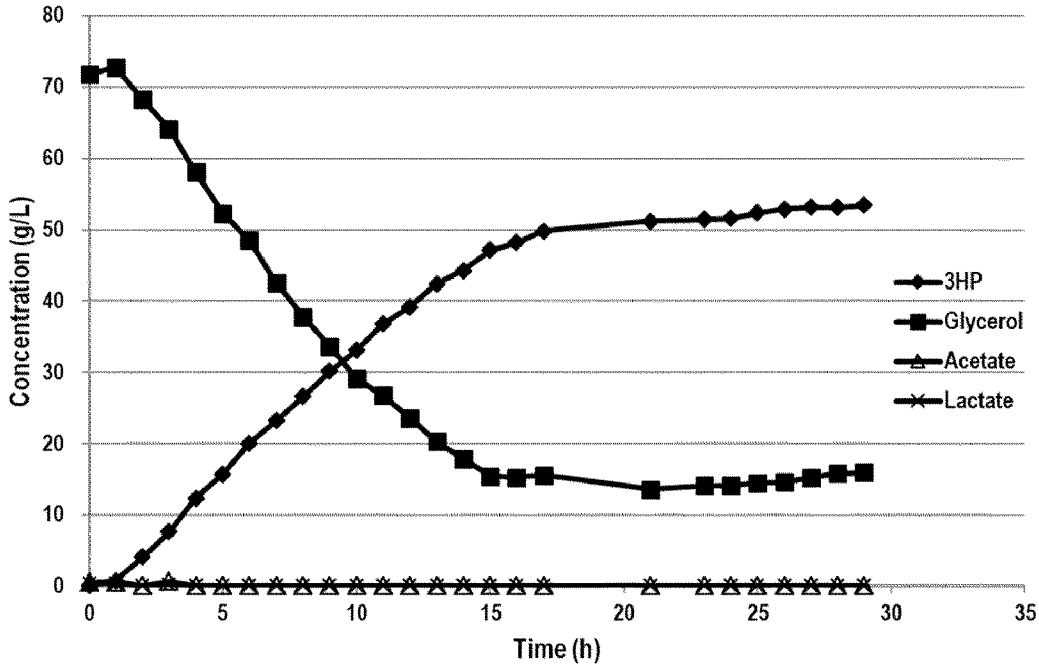
[청구항 12] 제11항에 있어서, 아세테이트 및 젖산으로 이루어진 군에서 선택된 부산물의 농도가 0.1%(w/v) 이하인, 배양액.

[청구항 13] 제11항 또는 제12항의 배양액을 포함하는 3-하이드록시프로피온산 제조용 조성물.

[도1]


140
120
100
80
60
40
20
0
OD600
0
5
10
15
20
Time [hr]

[도2]


80
70
60
50
40
30
20
10
0
Concentration (g/L)
0
5
10
15
20
25
30
35
Time (h)
3HP
Glycerol
Acetate
Lactate

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2021/009988

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P 7/52(2006.01)i; **C12N 15/70**(2006.01)i; **C12N 9/04**(2006.01)i; **C12N 9/02**(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12P 7/52(2006.01); C12N 15/52(2006.01); C12N 15/63(2006.01); C12P 7/42(2006.01)

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

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

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

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 3-하이드록시프로피온산 (3-hydroxypropionic acid), 탄소원 (carbon source), 배지 (medium), 포도당 (glucose), 글리세롤 (glycerol), 발효배양 (fermentation), 유가배양 (fed-batch culture)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KWAK, S. et al. Biosynthesis of 3-hydroxypropionic acid from glycerol in recombinant Escherichia coli expressing Lactobacillus brevis dhaB and dhaR gene clusters and E. coli K-12 aldH. Bioresource technology. 2013, vol. 135, pp. 432-439. See abstract; and pages 433 and 438.	11-13
Y		1-10
Y	KR 10-2010-0102928 A (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) 27 September 2010 (2010-09-27) See abstract; paragraphs [0028] and [0082]; and claim 1.	1-10
A	US 2014-0065681 A1 (JESSEN, H. et al.) 06 March 2014 (2014-03-06) See abstract; paragraphs [0009] and [0141]; and claims 1 and 16-20.	1-13
A	KIM, M.-D. et al. Two-step fed-batch culture of recombinant Escherichia coli for production of Bacillus licheniformis maltogenic amylase. Journal of microbiology and biotechnology. 2002, vol. 12, no. 2, pp. 273-278. See entire document.	1-13

☑ 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
01 November 2021	**01 November 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/KR2021/009988

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2021/009988

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
KR 10-2010-0102928 A	27 September 2010	KR 10-1189187 B1	10 October 2012
US 2014-0065681 A1	06 March 2014	AU 2011-336923 A1	30 May 2013
		AU 2011-336923 B2	16 February 2017
		BR 112013012630 A2	24 September 2020
		CA 2818499 A1	07 June 2012
		CN 103502432 A	08 January 2014
		CN 107828671 A	23 March 2018
		EP 2643450 A2	02 October 2013
		EP 3287519 A1	28 February 2018
		EP 3287519 B1	18 March 2020
		JP 2013-542747 A	28 November 2013
		JP 6061862 B2	18 January 2017
		KR 10-2013-0119945 A	01 November 2013
		MX 2013005654 A	17 July 2013
		US 10260072 B2	16 April 2019
		US 10633664 B2	28 April 2020
		US 11118187 B2	14 September 2021
		US 2012-0135481 A1	31 May 2012
		US 2016-0177317 A1	23 June 2016
		US 2018-0044684 A1	15 February 2018
		US 2019-0249181 A1	15 August 2019
		US 2020-0291408 A1	17 September 2020
		US 9090918 B2	28 July 2015
		US 9777280 B2	03 October 2017
		WO 2012-074818 A2	07 June 2012
		WO 2012-074818 A3	27 September 2012
		ZA 201303544 B	26 November 2014

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2021/009988

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12P 7/52(2006.01)i; **C12N 15/70**(2006.01)i; **C12N 9/04**(2006.01)i; **C12N 9/02**(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12P 7/52(2006.01); C12N 15/52(2006.01); C12N 15/63(2006.01); C12P 7/42(2006.01)

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

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

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

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 3-하이드록시프로피온산 (3-hydroxypropionic acid), 탄소원(carbon source), 배지 (medium), 포도당 (glucose), 글리세롤 (glycerol), 발효배양(fermentation), 유가배양 (fed-batch culture)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KWAK, S. 등, 'Biosynthesis of 3-hydroxypropionic acid from glycerol in recombinant Escherichia coli expressing Lactobacillus brevis dhaB and dhaR gene clusters and E. coli K-12 aldH', Bioresource technology, 2013, 135권, 페이지 432-439 초록; 페이지 433, 438	11-13
Y		1-10
Y	KR 10-2010-0102928 A (한국생명공학연구원) 2010.09.27 요약; 단락 [0028], [0082]; 청구항 1	1-10
A	US 2014-0065681 A1 (JESSEN, H. 등) 2014.03.06 요약; 단락 [0009], [0141]; 청구항 1, 16-20	1-13
A	KIM, M.-D. 등, 'Two-step fed-batch culture of recombinant Escherichia coli for production of Bacillus licheniformis maltogenic amylase', Journal of microbiology and biotechnology, 2002, 12권, 2호, 페이지 273-278 전체 문헌	1-13

☑ 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
2021년11월01일(01.11.2021)	**2021년11월01일(01.11.2021)**

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 **+82-42-481-8578**

심사관

정다원

전화번호 **+82-42-481-5373**

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호

PCT/KR2021/009988

C. 관련 문헌

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

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2021/009988

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2010-0102928 A	2010/09/27	KR 10-1189187 B1	2012/10/10
US 2014-0065681 A1	2014/03/06	AU 2011-336923 A1	2013/05/30
		AU 2011-336923 B2	2017/02/16
		BR 112013012630 A2	2020/09/24
		CA 2818499 A1	2012/06/07
		CN 103502432 A	2014/01/08
		CN 107828671 A	2018/03/23
		EP 2643450 A2	2013/10/02
		EP 3287519 A1	2018/02/28
		EP 3287519 B1	2020/03/18
		JP 2013-542747 A	2013/11/28
		JP 6061862 B2	2017/01/18
		KR 10-2013-0119945 A	2013/11/01
		MX 2013005654 A	2013/07/17
		US 10260072 B2	2019/04/16
		US 10633664 B2	2020/04/28
		US 11118187 B2	2021/09/14
		US 2012-0135481 A1	2012/05/31
		US 2016-0177317 A1	2016/06/23
		US 2018-0044684 A1	2018/02/15
		US 2019-0249181 A1	2019/08/15
		US 2020-0291408 A1	2020/09/17
		US 9090918 B2	2015/07/28
		US 9777280 B2	2017/10/03
		WO 2012-074818 A2	2012/06/07
		WO 2012-074818 A3	2012/09/27
		ZA 201303544 B	2014/11/26