



- (51) 국제특허분류:
C12N 1/21 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01) C12P 7/62 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2012/004523
- (22) 국제출원일: 2012년 6월 8일 (08.06.2012)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2011-0055113 2011년 6월 8일 (08.06.2011) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 한국 과학기술원 (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 구성동 373-1, 305-701 Daejeon (KR). 한국화학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF CHEMICAL TECHNOLOGY) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 가정로 141, 305-343 Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 겸
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 이상엽 (LEE, Sang Yup) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 전민동 464-1 엑스포아파트 212 동 702 호, 305-761 Daejeon (KR). 박시제

(PARK, Si Jae) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 어은동 99 번지 한빛아파트 127-307, 305-755 Daejeon (KR). 이 승환 (LEE, Seung Hwan) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 장대동 305-12 202 호, 305-308 Daejeon (KR). 송봉근 (SONG, Bong Keun) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 신성동 160-1 한울아파트 103-1203, 305-345 Daejeon (KR). 이태우 (LEE, Tae Woo) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 구성동 한국과학기술원 응용공학동 3127, 305-701 Daejeon (KR).

(74) 대리인: 이처영 (LEE, Cheo Young); 서울특별시 강남구 역삼동 648-23 여삼빌딩 11 층, 135-080 Seoul (KR).

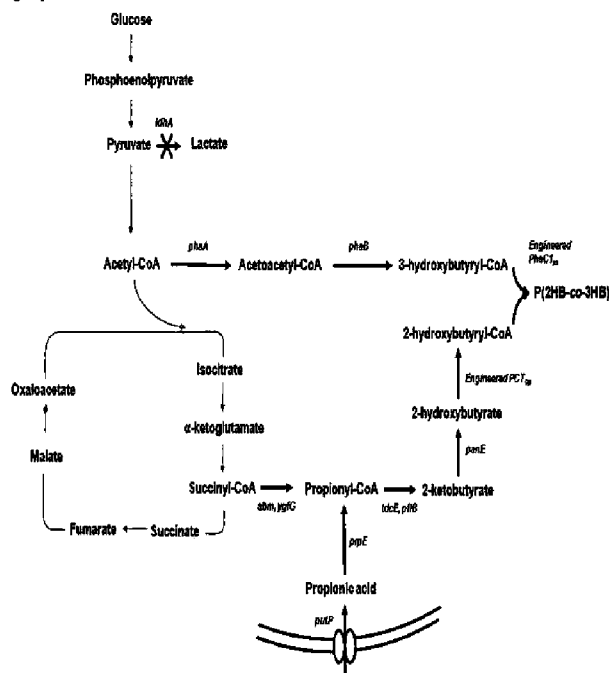
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA,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

[다음 쪽 계속]

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING POLYHYDROXYALKANOATE CONTAINING 2-HYDROXYBUTYRATE AS THE MONOMER

(54) 발명의 명칭 : 2-하이드록시부티레이트를 모노머로 함유하고 있는 폴리하이드록시알카노에이트의 제조방법

[Fig. 1]



(57) Abstract: The present invention relates to a method for producing a polyhydroxyalkanoate containing 2-hydroxybutyrate as the monomer, and more specifically, to a method for producing a polyhydroxyalkanoate containing 2-hydroxybutyrate from recombinant strains using metabolic engineering. The present invention provides a recombinant microorganism capable of producing a polyhydroxyalkanoate containing 2-hydroxybutyrate, a novel biodegradable polymer, as the monomer, and a method for producing a polyhydroxyalkanoate containing 2-hydroxybutyrate as the monomer by culturing recombinant microorganisms.

(57) 요약서: 본 발명은 2-하이드록시부티레이트를 모노머로 함유하고 있는 폴리하이드록시알카노에이트의 제조방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는, 2-하이드록시부티레이트를 함유하는 폴리하이드록시알카노에이트를 대사공학을 이용한 제조합 균주로부터 제조하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 생분해성 신규 폴리머인 2-하이드록시부티레이트를 모노머로 함유하고 있는 폴리하이드록시알카노에이트를 제조할 수 있는 제조합 미생물 및 상기 제조합 미생물을 배양하는 것을 특징으로 하는 2-하이드록시부티레이트를 모노머로 함유하고 있는 폴리하이드록시알카노에이트의 제조방법을 제공하는 효과가 있다.



(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, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 2-하이드록시부티레이트를 모노머로 함유하고 있는 폴리하이드록시알카노에이트의 제조방법

기술분야

- [1] 본 발명은 2-하이드록시부티레이트를 모노머로 함유하고 있는 폴리하이드록시알카노에이트의 제조방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는, 2-하이드록시부티레이트를 함유하는 폴리하이드록시알카노에이트를 대사공학을 이용한 재조합 균주로부터 제조하는 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] Polyhydroxyalkanoates (PHAs)는 세균에서 탄소원 및/또는 환원능 저장 물질로 사용되는 여러 종류의 하이드록시카복시산(hydroxy-carboxylic acid)으로 구성된 생분해성, 생체적합성 폴리에스테르이다. PHA는 여러 종류의 하이드록시아실-CoA를 기질로 사용하는 PHA synthase에 의하여 합성된다.
- [4] 하이드록시아실-CoA가 하이드록시기의 탄소위치에 비대칭 중심을 가지면, 이는 모두 (R)-configuration이 된다. 3-하이드록시아실-CoAs, 4-하이드록시아실-CoAs나 5-하이드록시아실-CoAs, 6-하이드록시아실-CoAs 등 여러 하이드록시아실-CoA 중에서 PHA synthase가 가장 선호하는 기질은 3-하이드록시아실-CoAs(3HA-CoAs)이다.
- [5] 그러나, PHA를 생산하는 미생물에서 2-하이드록시산을 모노머로 함유하는 PHA를 생산된 보고는 아직 없다. 천연 PHA synthase는 2-하이드록시아실-CoA에 대하여, 다른 하이드록시아실-CoA보다 매우 낮은 무시할 수 있는 정도의 활성을 가진다.
- [6] 최근, 본 발명자들은 글루코오스로부터 직접발효에 의해 폴리락틱산(PLA) 중합체 및 이의 폴리머를 생산할 수 있는 대사공학적으로 재조합된 대장균을 개발하였다 (WO08/062996; Yang *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.* 105:150, 2010; Jung *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.*, 105:161, 2010). 상기 재조합 대장균에서, PLA 생합성은 락틸-CoA 생성과 synthase에 의한 공중합이라는 2단계로 구성된다. (D)-락틸-CoA는 상기 재조합 대장균에 아세틸-CoA를 CoA 공여체로 사용하여, (D)-락테이트를 (D) 락틸-CoA로 전환하는 *Clostridium propionicum* 의프로피오닐-CoA 전이효소(propionyl-CoA transferase)를 채용하여 생성가능하게 하였다. 락틸-CoA로 락테이트 폴리머(PLA)를 생성하기 위하여는, 락틸-CoA를 기질로 사용할 수 있도록 유전자 조작된 *Pseudomonas* sp. 6-19의 PHA synthase (PhaC1_{ps6-19})를 채용하였다. 또한, PLA 합성의 효율을 높이기 위하여 *E. coli* XL1-Blue 에서 무작위 변성(randum mutagenesis)에 의해 *Clostridium propionicum*의 프로피오닐-CoA 전이효소(propionyl-CoA

transferase)의 활성을 향상시켜 락틸-CoA 생합성 능력을 강화시켰다(Yang *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.*, 105:150, 2010; Jung *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.*, 105:161, 2010).

- [7] 다른 연구에서, 유사한 시스템을 사용하여 (3-하이드록시부티레이트-co-락테이트) 폴리머[P(3HB-co-LA)]를 생합성한 보고도 있다(Taguchi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 105:17323, 2008, Yamada *et al.*, *Biomacromolecules* 10,:677, 2009). PhaC1_{ps6-19}가 매우 다양한 기질 특이성을 가지고, 락테이트가 2-하이드록시산의 한 종류이기 때문에, 다른 2-하이드록시아실-CoA가 PhaC1_{ps6-19}의 기질로 사용되어, 2-하이드록시산을 함유하는 새로운 PHA를 합성하는 것도 가능할 것이다. 이러한 여러 종류의 2-하이드록시산 중에서, 본 발명자들은 아미노산 합성 경로의 대사산물인, 2-하이드록시부티레이트(2HB)를 단량체로 하여, 폴리머 합성을 시도하였다.
- [8] 이에, 본 발명자들은 새로운 경로로 합성되는 PHA를 개발하기 위하여, PhaC1_{ps6-19}의 기질인 2-하이드록시부틸-CoA를 propionyl-CoA를 이용하여 생산하는 방법을 개발하고자 예의 노력한 결과, propionate를 propionyl-CoA로 전환하는 *Ralstonia eutropha* 유래의 propionyl-CoA synthetase (PrpE), propionyl-CoA를 2-ketobutyrate로 전환하는 pyruvate formate lyase (PflB) 및 2-ketobutyrate를 2HB로 전환하는 2-하이드록시부티레이트 디하이드로게나아제 유전자를 대장균에서 발현시켜, 배양하는 경우, 2-하이드록시부티레이트-co-3-하이드록시부티레이트 폴리머[P(2HB-co-3HB)]를 제조할 수 있다는 것을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.
- [9]
- [10] 발명의 요약
- [11] 본 발명의 목적은 생분해성 폴리머인 2-하이드록시부티레이트를 모노머로 함유하고 있는 폴리하이드록시알카노에이트를 제조하는 방법 및 상기 폴리머를 생산하는 재조합 미생물을 제공하는데 있다.
- [12] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 탄소원으로부터 아세틸-CoA를 생합성하는 경로를 가지고 있는 미생물에서, 락테이트디하이드로게나아제를 코딩하는 유전자가 결실되어 있고, 폴리하이드록시 알카노에이트 합성효소를 코딩하는 유전자 및 프로피오닐-CoA 전이효소를 코딩하는 유전자, D-2 하이드록시산 디하이드로게나아제를 코딩하는 유전자, propionyl-CoA synthetase를 코딩하는 유전자 및 pyruvate formate lyase를 코딩하는 유전자가 도입되어 있으며, 2-하이드록시부티레이트를 모노머로 함유하고 있는 폴리하이드록시알카노에이트 생성능을 가지는 재조합 미생물을 제공한다.
- [13] 본 발명은 또한, 탄소원으로부터 아세틸-CoA를 생합성하는 경로를 가지고 있는 미생물에서, 락테이트디하이드로게나아제를 코딩하는 유전자가 결실시키고, 폴리하이드록시 알카노에이트 합성효소를 코딩하는 유전자 및 프로피오닐-CoA 전이효소를 코딩하는 유전자, D-2 하이드록시산 디하이드로게나아제를 코딩하는 유전자, propionyl-CoA synthetase를 코딩하는

유전자 및 pyruvate formate lyase를 코딩하는 유전자를 도입시키는 것을 특징으로 하는 2-하이드록시부티레이트를 모노머로 함유하고 있는 폴리하이드록시알카노에이트 생성능을 가지는 재조합 미생물의 제조방법을 제공한다.

- [14] 본 발명은 또한, 상기 재조합 미생물을 글루코오스 및 프로피온산을 함유 배지에서 배양하여 2-하이드록시부티레이트를 모노머로 함유하고 있는 폴리하이드록시알카노에이트를 생산하는 단계; 및 상기 생산된 2-하이드록시부티레이트를 모노머로 함유하고 있는 폴리하이드록시알카노에이트를 수득하는 단계를 포함하는 2-하이드록시부티레이트를 모노머로 함유하고 있는 폴리하이드록시알카노에이트의 제조방법을 제공한다.

[15]

도면의 간단한 설명

- [16] 도 1은 글루코오스, 프로피온산 및 3HB로부터 2-하이드록시부티레이트를 모노머로 함유하고 있는 폴리하이드록시알카노에이트를 합성하는 생합성경로를 나타낸 것이다.

[17]

[18] 발명의 상세한 설명 및 구체적인 구현예

- [19] 일 관점에서, 본 발명은 탄소원으로부터 아세틸-CoA를 생합성하는 경로를 가지고 있는 미생물에서, 락테이트디하이드로게나아제를 코딩하는 유전자가 결실되어 있고, 폴리하이드록시 알카노에이트 합성효소를 코딩하는 유전자 및 프로피오닐-CoA 전이효소를 코딩하는 유전자, D-2 하이드록시산 디하이드로게나아제를 코딩하는 유전자, propionyl-CoA synthetase를 코딩하는 유전자 및 pyruvate formate lyase를 코딩하는 유전자가 도입되어 있으며, 2-하이드록시부티레이트를 모노머로 함유하고 있는 폴리하이드록시알카노에이트 생성능을 가지는 재조합 미생물에 관한 것이다.

- [20] 본 발명에 있어서, 상기 프로피오닐-CoA 전이효소는 *C. propionicum*의 프로피오닐-CoA 전이효소 또는 *C. propionicum*의 프로피오닐-CoA 전이효소의 변이효소인 Pct540인 것을 특징으로 할 수 있다.

- [21] 본 발명에 있어서, 상기 폴리하이드록시 알카노에이트 합성효소는 *Pseudomonas* sp. 6-19의 PHA synthase 또는 그 변이 효소인 것을 특징으로 할 수 있다.

- [22] 본 발명에 있어서, 상기 PHA synthase의 변이효소는 서열번호 14의 아미노산 서열에서 E130D, S325T, L412M, S477R, S477H, S477F, S477Y, S477G, Q481M, Q481K 및 Q481R로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 변이를 포함하는 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 PHA synthase의 변이효소는 서열번호 14의 아미노산 서열에서 E130D, S325T, L412M,

S477G 및 Q481M이 변이된 아미노산 서열(C1335); 서열번호 14의 아미노산 서열에서 E130D, S477F 및 Q481K가 변이된 아미노산 서열(C1310); 및 서열번호 14의 아미노산 서열에서 E130D, S477F 및 Q481R이 변이된 아미노산 서열(C1312)로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 할 수 있다.

- [23] 2-하이드록시부티레이트를 아세틸-CoA를 프리커서로 사용하는 시트라말레이트 경로(citramalate pathway)등을 거쳐 생산할 때에는 세포의 성장을 저해시킬 수 있다. 또한, 3-하이드록시부티릴-CoA, 락틸-CoA 등도 아세틸-CoA를 통해 생산되기 때문에 서로 경쟁하게 된다. 따라서 2-HB-CoA를 프로피온산을 통해 생산할 때에는 2HB-CoA를 acetyl-CoA를 사용하지 않고 독립적으로 생산할 수 있기 때문에 고분자내의 2HB의 몰분율을 조절하기 쉬운 장점이 있다.
- [24] 본 발명에 있어서, 상기 재조합 미생물은 β -케토티올레이즈를 코딩하는 유전자 및 아세토아세틸-CoA 리덕타아제를 코딩하는 유전자가 추가로 도입될 수 있으며, 상기 β -케토티올레이즈를 코딩하는 유전자는 *Ralstonia eutropha* 유래의 *phaA*이고, 아세토아세틸-CoA 리덕타아제를 코딩하는 유전자는 *Ralstonia eutropha* 유래의 *phaB*인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [25] 상기 도입된 β -케토티올레이즈를 코딩하는 유전자 및 아세토아세틸-CoA 리덕타아제를 코딩하는 유전자는 재조합 미생물내에서 발현되어 아세틸-CoA를 아세토아세틸-CoA로 전환시키고, 상기 전환된 아세토아세틸-CoA를 3-하이드록시부티릴-CoA로 전환시키는 역할을 하여, 상기 *phaA* 및 *phaB*가 추가로 도입된 재조합 미생물은 외부로부터의 3-하이드록시부티레이트의 첨가없이도, 글루코오스와 프로피온산으로부터 p(2HB-co-3HB)를 생산할 수 있다.
- [26] 본 발명자들은 변이된 $\text{PhaC1}_{\text{ps6-19}}$ 및 변이된 Pct_{cp} 를 발현하는 재조합 대장균을 이용하여 p(3HB-co-LA)의 생산성 향상시킨 바 있다.
- [27] 변이된 $\text{PhaC1}_{\text{ps6-19}}$ 가 다양한 기질특이성을 가지고, 락테이트 역시 2-하이드록시산의 한 종류이기 때문에, $\text{PhaC1}_{\text{ps6-19}}$ 에 의하여 2HB-CoA가 2HB 함유 폴리머에 공중합될 수 있다. 재조합 대장균에서 2HB 함유 폴리머의 합성을 용이하게 하기 위하여, 3-HB-CoA가 락테이트 함유 폴리머의 합성에서 시발자(initiator) 역할을 하기 때문에, 3HB를 두번째 단량체로 선택하였다.
- [28] 본 발명자들의 이전 연구에서, 변이된 $\text{PhaC1}_{\text{ps6-19}}$ 및 변이된 Pct_{cp} , Pct_{cp} 에서 V193A 변이와 뉴클레오티드 서열의 4개의 침묵변이(T78C, T669C, A1125G 및 T1158C)를 가지는 Pct540 및 $\text{PhaC1}_{\text{ps6-19d}}$ 에서 E130D, S325T, S477G 및 Q481K의 4개의 변이를 함유하는 PhaC1437 를 함유하는 재조합 대장균은 높은 락테이트 분해를 가지면서 P(3HB-co-LA) 공중합체를 효과적으로 생산하였다. 따라서, 상기 효소들을 2-하이드록시부티레이트를 모노머로 함유하고 있는 폴리하이드록시알카노에이트의 생합성에 사용하였다.

- [29] 본 발명에서는 락테이트 모노머가 2-하이드록시부티레이트를 모노머로 함유하고 있는 폴리하이드록시알카노에이트로 합입되는 것을 억제하기 위하여, *ldhA* 유전자가 결실된 숙주세포를 사용하였다.
- [30] 본 발명에 있어서, 상기 D-2 하이드록시산 디하이드로게나아제를 코딩하는 유전자는 *Lactobacillus lactis* 유래의 *panE* 인것을 특징으로 할 수 있고, 상기 propionyl-coA synthetase를 코딩하는 유전자는 *Ralstonia eutropha* 유래의 *prpE* 인것 특징으로 할 수 있으며, 상기 pyruvate formate lyase는 *Clostridium difficile* 유래의 *pflB* 인것을 특징으로 할 수 있다.
- [31] 본 발명에서는 D-2 하이드록시산 디하이드로게나아제를 코딩하는 유전자로 *Lactobacillus lactis* 유래의 *panE*을 사용하였으나, 도입된 숙주세포에서 발현되어 D-2 하이드록시산 디하이드로게나아제의 활성을 나타내는 한 제한없이 사용할 수 있다.
- [32] 아울러, 본 발명에서는 pyruvate formate lyase를 코딩하는 유전자로 *Clostridium difficile* 유래의 *pflB*을 사용하였으나, 도입된 숙주세포에서 발현되어 pyruvate formate lyase의 활성을 나타내는 한 제한없이 사용할 수 있다.
- [33] 아울러, 본 발명에서는 propionyl-CoA synthetase를 코딩하는 유전자로 *Ralstonia eutropha* 유래의 *prpE*를 사용하였으나 도입된 숙주세포에서 발현되어 pyruvate formate lyase의 활성을 나타내는 한 제한없이 사용할 수 있다.
- [34] 본 발명에 따라 propionate로부터 2-HB를 생성할 수 있는 재조합 미생물을 제조하기 위하여, 프로피오닐-CoA 전이효소 유전자를 발현하도록 대장균을 대사공학적으로 조작한 재조합 대장균에서 propionate를 propionyl-CoA로 전환하도록 *Ralstonia eutropha* 유래의 propionyl-CoA synthetase(PrpE)를 코딩하는 유전자를 발현시켰으며, propionyl-CoA를 2-ketobutyrate로 전환하는 효소인 pyruvate formate lyase (PflB)를 코딩하는 유전자와 2-ketobutyrate를 2HB로 전환하는 2-하이드록시부티레이트 디하이드로게나아제를 코딩하는 유전자를 발현시켰다. 상기 재조합 대장균을 글루코스와 프로피온산이 포함된 배지에서 발효시키는 경우, 새로운 폴리머인 2-하이드록시부티레이트-co-3-하이드록시부티레이트) 폴리머[P(2HB-co-3HB)]를 제조할 수 있다.
- [35] 본 발명의 일 양태에서, β -케토티올레이즈를 코딩하는 유전자인 *Ralstonia eutropha* 유래의 *phaA* 및 아세토아세틸-CoA 리덕타아제를 코딩하는 유전자인 *phaB*를 본 발명의 재조합 미생물에 추가로 도입시키는 것은 pCnCAB (Yang *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.* 105:150, 2010)을 SbfI/HindIII로 자른 후 수득한 *phaAB* 유전자를 아래에 사용한 pKM22-PanEHadAPflB 벡터를 SbfI/HindIII로 절단한 후 삽입하는 방법으로 수행될 수 있다.
- [36] 다른 관점에서, 본 발명은 탄소원으로부터 아세틸-CoA를 생합성하는 경로를 가지고 있는 미생물에서, 락테이트디하이드로게나아제를 코딩하는 유전자가 결실시키고, 폴리하이드록시 알카노에이트 합성효소를 코딩하는 유전자 및

프로피오닐-CoA 전이효소를 코딩하는 유전자, D-2 하이드록시산 디하이드로게나아제를 코딩하는 유전자, propionyl-CoA synthetase를 코딩하는 유전자 및 pyruvate formate lyase를 코딩하는 유전자를 도입시키는 것을 특징으로 하는 2-하이드록시부티레이트를 모노머로 함유하고 있는 폴리하이드록시알카노에이트 생성능을 가지는 재조합 미생물의 제조방법에 관한 것이다.

[37] 또다른 관점에서, 본 발명은 재조합 미생물을 글루코오스 및 프로피온산을 함유하는 배지에서 배양하여 2-하이드록시부티레이트를 모노머로 함유하고 있는 폴리하이드록시알카노에이트를 생산하는 단계; 및 상기 생산된 2-하이드록시부티레이트를 모노머로 함유하고 있는 폴리하이드록시알카노에이트를 수득하는 단계를 포함하는 2-하이드록시부티레이트를 모노머로 함유하고 있는 폴리하이드록시알카노에이트의 제조방법에 관한 것이다.

[38] 본 발명에 있어서 상기 2-하이드록시부티레이트를 모노머로 함유하고 있는 폴리하이드록시알카노에이트는 2-하이드록시부티레이트-co-3-하이드록시부티레이트-co-락테이트인 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 배지는 3-하이드록시부티레이트를 추가로 함유하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[39] 본 발명의 일 실시예에서는, *E.coli* XL1-Blue의 염색체에서 *ldhA* 유전자를 제거한 *E. coli* XLdh 균주를 P(2HB-co-3HB) 공중합체 합성을 위한 숙주세포로 사용하였다.

[40] 본 발명자들은 2-케토부티레이트가 2-HB의 전구체로 사용가능하기 때문에, 상기 2-케토부티레이트를 생산하기 위하여 propionyl-CoA로부터 2-케토부티레이트를 생성하는 경로를 채용하였다.

[41] 본 발명의 일 실시예에서는, 상기 2-케토부티레이트 합성 경로를 구축하기 위하여, 유전자 재조합을 통하여 숙주세포에서 *Clostridium difficile*의 pyruvate formate lyase를 코딩하는 유전자 및 *R. eutropha*의 propionyl-CoA synthetase를 코딩하는 유전자를 발현시켰다.

[42] 본 발명에서 글루코오스로부터 2HB를 함유하는 폴리머의 합성경로를 구축하기 위하여는 propionyl-CoA를 통하여 합성된 2-케토부티레이트를 2HB로 전환시켜야 한다.

[43] 몇몇 미생물의 D-2-하이드록시산 디하이드로게나아제는 광학이성질체에 대한 선택성을 가지고, NADH를 코팩터로 사용하여, 2-케토산(keto acid)를 D-2-하이드록시산으로 환원시킨다. 상기 D-2-하이드록시산 디하이드로게나아제는 2-케토이소카프로에이트(2-ketoisocaproate), 2-케토이소발러레이트(2-ketoisovalerate), 2-케토발러레이트, 2-케토부티레이트 및 만델레이트(mandelate)를 포함하여 넓은 범위의 기질 특이성을 가지고 있다.

[44] 본 발명의 일 실시예에서는, 여러 D-2-하이드록시산 디하이드로게나아제 중 *L.*

- lactissub sp. lactis*II1403의 *panE* 유전자가 코딩하는 D-2 하이드록시산 디하이드로 게나아제를 채용하여 2HB를 합성하였다.
- [45] *phaC437*, *pct540*, *prpE* 및 *pflB* 유전자를 발현하는 재조합 *E. coli* XLdh에 *L. lactis sub sp. lactis*II1403의 *panE* 유전자를 도입시키는 경우, 20 g/L 글루코오스, 2 g/L 프로피온산, 0.1 g/L 3HB로부터 6.2 중량%이상의 P(73mol%2HB-co-27mol%LA) 중합체를 제조할 수 있었다.
- [46] 본 발명의 일실시에에서, 재조합 대장균을 사용하여 p(2HB-co-3HB) 중합체를 합성하는 경우, 글루코오스로부터 세포내에서 2HB가 생성되어야 하고, 생성된 Pct540에 의하여 2HB는 2HB-CoA로 전환된다. 세포 내에서 3HB-CoA를 생성시키기 위하여, 3HB가 배지에 첨가되어야 하고, 배지 내의 3HB의 농도가 증가될 수록, 합성된 폴리머에서의 2HB 단량체 분획은 감소하였다.
- [47] 또다른 관점에서, 본 발명은 (2-하이드록시부티레이트-co-3-하이드록시부티레이트) 폴리머에 관한 것이다.
- [48] 본 발명에서, "벡터 (vector)"는 적합한 숙주 내에서 DNA를 발현시킬 수 있는 적합한 조절 서열에 작동가능하게 연결된 DNA 서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다. 벡터는 플라스미드, 파지 입자, 또는 간단하게 잠재적 게놈 삽입물일 수 있다. 적당한 숙주로 형질전환되면, 벡터는 숙주 게놈과 무관하게 복제하고 기능할 수 있거나, 또는 일부 경우에 게놈 그 자체에 통합될 수 있다. 플라스미드가 현재 벡터의 가장 통상적으로 사용되는 형태이므로, 본 발명의 명세서에서 "플라스미드 (plasmid)" 및 "벡터 (vector)"는 때로 상호 교환적으로 사용된다. 본 발명의 목적상, 플라스미드 벡터를 이용하는게 바람직하다. 이러한 목적에 사용될 수 있는 전형적인 플라스미드 벡터는 (a) 숙주세포당 수백 개의 플라스미드 벡터를 포함하도록 복제가 효율적으로 이루어지도록 하는 복제 개시점, (b) 플라스미드 벡터로 형질전환된 숙주세포가 선발될 수 있도록 하는 항생제 내성 유전자 및 (c) 외래 DNA 절편이 삽입될 수 있는 제한효소 절단부위를 포함하는 구조를 지니고 있다. 적절한 제한효소 절단부위가 존재하지 않을지라도, 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터(oligonucleotide adaptor) 또는 링커(linker)를 사용하면 벡터와 외래 DNA를 용이하게 라이게이션(ligation)할 수 있다.
- [49] 라이게이션 후에, 벡터는 적절한 숙주세포로 형질전환 되어야 한다. 본 발명에 있어서, 선호되는 숙주세포는 원핵세포이다. 적합한 원핵 숙주세포는 *E. coli* DH5 α , *E. coli* JM101, *E. coli* K12, *E. coli* W3110, *E. coli* X1776, *E. coli* XL-1Blue(Stratagene), *E. coli* B, *E. coli* B21등을 포함한다. 그러나 FMB101, NM522, NM538 및 NM539와 같은 *E. coli* 균주및다른원핵생물의종(species) 및 속(genera)등이 또한 사용될 수 있다. 전술한 *E. coli*에 덧붙여, 아그로박테리움 A4와 같은 아그로박테리움 속 균주, 바실루스 썩틸리스(*Bacillus subtilis*)와 같은 바실리(bacilli), 살모넬라 타이피뮤리움(*Salmonella typhimurium*) 또는 세라티아 마르게센스(*Serratia marcescens*)와 같은 또 다른 장내세균 및 다양한 슈도모나스(*Pseudomonas*)

Pseudomonas)속 균주가 숙주세포로서 이용될 수 있다.

- [50] 원핵세포의 형질전환은 Sambrook *et al.*, *supra*의 1.82 섹션에 기술된 칼슘 클로라이드 방법을 사용해서 용이하게 달성될 수 있다. 선택적으로, 전기천공법(electroporation)(Neumann *et al.*, *EMBO J.*, 1:841, 1982) 또한 이러한 세포들의 형질전환에 사용될 수 있다.
- [51] 본 발명에 따른 유전자의 과발현을 위하여 사용되는 벡터는 당업계에 공지된 발현 벡터가 사용될 수 있으며, pET 계열 벡터(Novagen)를 사용하는 것이 바람직하다. 상기 pET 계열 벡터를 사용하여 클로닝을 수행하면, 발현되는 단백질의 말단에 히스티딘기들이 결합되어 나오므로, 상기 단백질을 효과적으로 정제할 수 있다. 클로닝된 유전자로부터 발현된 단백질을 분리하기 위해서는 당업계에 공지된 일반적인 방법이 이용될 수 있으며, 구체적으로, Ni-NTA His-결합 레진(Novagen)을 사용하는 크로마토그래피 방법을 이용하여 분리할 수 있다. 본 발명에 있어서, 상기 재조합벡터는 pET-SLTI66인 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 숙주세포는 대장균 또는 아그로박테리움인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [52] 본 발명에서 "발현 조절 서열 (expression control sequence)"이라는 표현은 특정한 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열의 발현에 필수적인 DNA 서열을 의미한다. 이러한 조절 서열은 전사를 실시하기 위한 프로모터, 그러한 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다. 예를 들면, 원핵생물에 적합한 조절 서열은 프로모터, 임의로 오퍼레이터 서열 및 리보솜 결합 부위를 포함한다. 진핵세포는 프로모터, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서가 이에 포함된다. 플라스미드에서 유전자의 발현 양에 가장 영향을 미치는 인자는 프로모터이다. 고 발현용의 프로모터로서 SR α 프로모터와 사이토메가로바이러스 (cytomegalovirus) 유래 프로모터 등이 바람직하게 사용된다. 본 발명의 DNA 서열을 발현시키기 위하여, 매우 다양한 발현 조절 서열중 어느 것이라도 벡터에 사용될 수 있다. 유용한 발현 조절서열에는, 예를 들어, SV40 또는 아데노바이러스의 초기 및 후기 프로모터들, lac 시스템, trp 시스템, TAC 또는 TRC 시스템, T3 및 T7 프로모터들, 파지 람다의 주요 오퍼레이터 및 프로모터 영역, fd 코드 단백질의 조절 영역, 3-포스포글리세레이트 키나제 또는 다른 글리콜분해 효소에 대한 프로모터, 상기 포스파타제의 프로모터들, 예를 들어, Pho5, 효모 알파-교배 시스템의 프로모터 및 원핵세포 또는 진핵 세포 또는 바이러스의 유전자 발현을 조절하는 것으로 알려진 기타 다른 서열 및 이들의 여러 조합이 포함된다. T7 프로모터는 대장균에서 본 발명의 단백질을 발현시키는데 유용하게 사용될 수 있다.
- [53] 핵산은 다른 핵산 서열과 기능적 관계로 배치될 때 "작동가능하게 연결 (operably linked)" 된다. 이것은 적절한 분자 (예를 들면, 전사 활성화 단백질)은 조절 서열(들)에 결합될 때 유전자 발현을 가능하게 하는 방식으로 연결된

유전자 및 조절 서열(들)일 수 있다. 예를 들면, 전서열(pre-sequence) 또는 분비 리더 (leader)에 대한 DNA는 폴리펩타이드의 분비에 참여하는 전단백질로서 발현되는 경우 폴리펩타이드에 대한 DNA에 작동가능하게 연결되고; 프로모터 또는 인핸서는 서열의 전사에 영향을 끼치는 경우 코딩서열에 작동가능하게 연결되거나; 또는 리보솜 결합 부위는 서열의 전사에 영향을 끼치는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결되거나; 또는 리보솜 결합 부위는 번역을 용이하게 하도록 배치되는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로, "작동가능하게 연결된"은 연결된 DNA 서열이 접촉하고, 또한 분비 리더의 경우 접촉하고 리딩 프레임 내에 존재하는것을 의미한다. 그러나, 인핸서 (enhancer)는 접촉할 필요가 없다. 이들 서열의 연결은 편리한 제한 효소 부위에서 라이게이션(연결)에 의해 수행된다. 그러한 부위가 존재하지 않는 경우, 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오티드 어댑터 (oligonucleotide adaptor) 또는 링커(linker)를 사용한다.

- [54] 본원 명세서에 사용된 용어 "발현 벡터"는 통상 이중의 DNA의 단편이 삽입된 재조합 캐리어 (recombinant carrier)로서 일반적으로 이중 가닥의 DNA의 단편을 의미한다. 여기서, 이중 DNA는 숙주 세포에서 천연적으로 발견되지 않는 DNA인 이형 DNA를 의미한다. 발현 벡터는 일단 숙주 세포내에 있으면 숙주 염색체 DNA와 무관하게 복제할 수 있으며 벡터의 수 개의 카피 및 그의 삽입된 (이중) DNA가 생성될 수 있다.
- [55] 당업계에 주지된 바와 같이, 숙주세포에서 형질감염 유전자의 발현 수준을 높이기 위해서는, 해당 유전자가, 선택된 발현 숙주 내에서 기능을 발휘하는 전사 및 해독 발현 조절 서열에 작동가능하도록 연결되어야만 한다. 바람직하게는 발현 조절서열 및 해당 유전자는 세균 선택 마커 및 복제 개시점 (replication origin)을 같이 포함하고 있는 하나의 발현 벡터 내에 포함되게 된다. 숙주세포가 진핵세포인 경우에는, 발현 벡터는 진핵 발현 숙주 내에서 유용한 발현 마커를 더 포함하여야만 한다.
- [56] 상술한 발현 벡터에 의해 형질전환 또는 형질감염된 숙주 세포는 본 발명의 또 다른 측면을 구성한다. 본원 명세서에 사용된 용어 "형질전환"은 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체외 인자로서 또는 염색체 통합완성에 의해 복제 가능하게 되는 것을 의미한다. 본원 명세서에 사용된 용어 "형질감염"은 임의의 코딩 서열이 실제로 발현되든 아니든 발현 벡터가 숙주 세포에 의해 수용되는 것을 의미한다.
- [57] 물론 모든 벡터와 발현 조절 서열이 본 발명의 DNA 서열을 발현하는데 모두 동등하게 기능을 발휘하지는 않는다는 것을 이해하여야만 한다. 마찬가지로 모든 숙주가 동일한 발현 시스템에 대해 동일하게 기능을 발휘하지는 않는다. 그러나, 당업자라면 과도한 실험적 부담없이 본 발명의 범위를 벗어나지 않는 채로 여러 벡터, 발현 조절 서열 및 숙주 중에서 적절한 선택을 할 수 있다. 예를 들어, 벡터를 선택함에 있어서는 숙주를 고려하여야 하는데, 이는 벡터가 그

안에서 복제되어야만 하기 때문이다. 벡터의 복제 수, 복제 수를 조절할 수 있는 능력 및 당해 벡터에 의해 코딩되는 다른 단백질, 예를 들어 항생제 마커의 발현도 또한 고려되어야만 한다. 발현 조절 서열을 선정함에 있어서도, 여러 가지 인자들을 고려하여야만 한다. 예를 들어, 서열의 상대적 강도, 조절가능성 및 본 발명의 DNA 서열과의 상용성 등, 특히 가능성있는 이차 구조와 관련하여 고려하여야 한다. 단세포 숙주는 선정된 벡터, 본 발명의 DNA 서열에 의해 코딩되는 산물의 독성, 분비 특성, 단백질을 정확하게 폴딩시킬 수 있는 능력, 배양 및 발효 조건들, 본 발명 DNA 서열에 의해 코딩되는 산물을 숙주로부터 정제하는 것의 용이성 등의 인자를 고려하여 선정되어야만 한다. 이들 변수의 범위내에서, 당업자는 본 발명의 DNA 서열을 발효 또는 대규모 동물 배양에서 발현시킬 수 있는 각종 벡터/발현 조절 서열/숙주 조합을 선정할 수 있다. 발현 클로닝에 의해 본 발명에 따른 단백질의 cDNA를 클로닝하려고 할 때의 스크리닝법으로서 바인딩법(binding법), 페닝법(panning법), 필름에멀션법(film emulsion 법)등이 적용될 수 있다.

[58]

[59] 실시예

[60] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[61]

[62] 하기 실시예에서 사용한 균주 및 플라스미드에 대하여 표 1에 나타내었다.

[63]

[64] 표 1

[Table 1]

플라스미드	특징	구입처 및 제작방법 출처
Strains		
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^qZ^Δ15</i> Tn10 (Tet ^R)]	Stratagene ^a
XLdh	XL1-Blue @ <i>dhA</i>	본 발명
Plasmids		
p619C1437-540	pBluescript KS II(+) derivative; <i>R. eutropha</i> PHA biosynthesis promoter, <i>phaC1437_{F86-19}</i> , <i>pct540_{CP}</i> ; Ap ^r	Yang <i>et al.</i> , <i>Biotechnol.</i> <i>Bioeng.</i> 105:150, 2010
pBBR1MCS2	Broad host range vector; Km ^r	Kovach <i>et al</i> <i>Gene</i> 166:175, 1995
pZE12-MCS	Expression vector; P_{Llac0-1} promoter; Ap ^r	EXPRESSYS ^b
pKE12-MCS	Expression vector; P_{Llac0-1} promoter, <i>R. eutropha</i> PHA biosynthesis genes transcription terminator; Ap ^r	본 발명
pZA31-MCS	Expression vector; P_{Ltet0-1} promoter; Cm ^r	EXPRESSYS
pKA32-MCS	Expression vector; P_{Llac0-1} promoter, <i>R. eutropha</i> PHA biosynthesis genes transcription terminator; Cm ^r	본 발명
pKM22-MCS	pBBR1MCS2 derivative ; P_{Llac0-1} promoter, <i>R.</i> <i>eutropha</i> PHA biosynthesis genes transcription terminator; Km ^r	본 발명
pKA32-ReprpE	pKA32-MCS derivative; <i>R. eutropha prpE</i> ; Cm ^r	본 발명
pKM22PanEHadAPf1B	pKM22-MCS derivative; P_{Llac0-1} promoter, <i>L. lactis</i> <i>subsp. lactis</i> 111403 <i>PanE</i> gene, <i>C. difficile hadA</i> <i>pflB</i> gene; Km ^r	본 발명

^aStratagene Cloning System, La Jolla, CA, USA^bwww.expressys.com

[65]

[66] 실시예 1: 제조합 균주를 이용한 글루코스, 프로피온산 및 3HB로부터의

(2-하이드록시부티레이트-co-3-하이드록시부티레이트-co-락테이트) 폴리머
[P(2HB-co-3HB-co-LA)] 생합성

[67]

[68] 글루코오스, 프로피온산 및 3-하이드록시부티레이트로부터
P(2HB-co-3HB-co-LA)를 생산할 수 있는 대사공학적으로 조작된 대장균을
제작하였다.

[69] 유전자 클로닝용 숙주세포로는 *E. coli* XL1-Blue (Stratgene Cloning System,
USA)를 사용하였으며, 37°C LB 배지에서 배양하였다.

[70] 폴리머 합성시에 락테이트 모노머가 P(2HB-co-3HB) 공중합체로 합입되는
것을 억제하기 위하여, *E. coli* XL1-Blue의 염색체에서 *ldhA* 유전자를 원스텝
불활성화방법(Datsenko and Wanner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97,
6640-6645, 2000)으로 제거한 *E. coli* XLdh 균주를 제조하고, 이를 P(2HB-co-3HB)
합성을 위한 숙주세포로 사용하였다.

[71] *E. coli* XLdh 균주는 20g/L의 글루코오스, 프로피온산과 원하는 농도의 3HB가
포함된 MR 배지를 사용하여, 30°C에서 250rpm으로 72시간동안
진탕배양하였으며, 배양 조건에 따라 2HB, 3HB 및 LA의 농도는 조절하였다.

[72] 2-하이드록시부틸-CoA 생산에 관여하는 유전자는 *R. eutropha*
NCIMB11599(KCTC), *Clostridium difficile* 630(ATCC) 및 *Lactococcus lactis sub sp.*
lactis I11403(ATCC)의 염색체 DNA 및 플라스미드 p619C1437-pct540(Yang *et al.*,
Biotechnol. Bioeng. 105,150-160, 2010)으로부터 증폭하였다.

[73] 플라스미드 p619C1437-pct540는 *Ralstonia eutropha*의 PHA synthase 오페론
프로모터 하에, *Pseudomonas* sp. 6-19의 PHA synthase에서 E130D, S325T, S477G
및 Q481K의 4개의 변이를 함유하는 PhaC1437과 *C. propionicum*의
프로피오닐-CoA 전이효소에서 V193A 변이와 뉴클레오티드서열의 4개의
침묵변이(T78C, T669C, A1125G 및 T1158C)를 가지는 Pct540를 발현하는 재조합
플라스미드이다 (Yang *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.*, 105:150, 2010).

[74] 재조합 *E. coli* XLdh에서의 재조합된 유전자의 발현 유도는 배양액의 흡광도가
600nm에서 0.5가 되었을때 1mM 농도가 되도록 IPTG를 첨가하여 수행하였다.

[75] 본 실시예에서는 phaC437, pct540, prpE, hadA 및 *pflB* 유전자를 발현하는
재조합 *E. coli* XLdh에 *L. lactis sub sp. lactis* I11403의 *panE* 유전자를 도입시켜,
20g/L의 글루코오스와 원하는 농도의 propionate 및 3HB가 포함된 MR 배지를
사용하여, 30°C에서 250rpm으로 72시간동안 진탕배양하였으며, 배양 조건에
따라 2HB 및 3HB의 농도는 조절하여 p(2HB-co-3HB-co-LA)를 제조하였다.

[76] 본 실시예에서 재조합 플라스미드의 제작에 사용된 프라이머를 표 2에
나타내었다.

[77]

[78] 표 2

[Table 2]

	Primer sequence	Target gene
Primer 1 (서열번호 4)	gaattc atgacggcaagccatgccgtg	<i>R. eutropha</i> prpE genes
Primer 2 (서열번호 5)	ggtagc ctagcctttcagcgctgcctg	
Primer 3 (서열번호 8)	gaattcatgagaattacaattgccgg	<i>L. lactis subsp. lactis</i> 111403 panE gene
Primer 4 (서열번호 9)	ggtagccttattttgcttttaataactc	
Primer 5 (서열번호 10)	ggtagc ttccacacaggaaaca atgcttttagaaggagttaa	<i>C. difficile</i> 630 hadA gene
Primer 6 (서열번호 11)	ggtagc catatg ttaatatcttacaactttac	
Primer 7 (서열번호 12)	ggtagc ttccacacaggaaaca atgaatgcatggcaaggatt	<i>C. difficile</i> 630 pflB gene
Primer 8 (서열번호 13)	cctgcagg ctaagccattttaccgtgga	
Primer 9 (서열번호 3)	caattgattaaaggagagaaa gaattcgagctcggtagccgggtagctctagagtcgacctgca ggcatgcaagcctt	RBS and MCS for pKE12- MCS
Primer 10 (서열번호 1)	gagtcgacctgcaggcatgcaagcctt cctgccggcctggttcaacc	<i>R. eutropha</i> PHA biosynthesis genes transcription terminator
Primer 11 (서열번호 2)	cctagg gcctcgcccccgaggggcc	
Primer 12 (서열번호 6)	aatatt aattgtgagcggataacaat	P _{L1ac0-1} promoter, MCS, and <i>R. eutropha</i> PHA biosynthesis genes transcription terminator for pKM22-MCS
Primer 13 (서열번호 7)	aatatt gcctcgcccccgaggggcc	

[79]

[80]

발현용 벡터 pZE12-MCS(EXPRESSYS, 미국)는 pTacLac(Lee *et al. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79,633-641,2008)의 MCS(Muti-cloning sites) 및 *Ralstonia eutropha*의 PHA 생합성 유전자 전사 터미네이터를 가지도록 변형시켰다.

- [81] pTacLac 벡터는 pTac99A (Park and Lee, J. Bacteriol. 185, 5391-5397, 2003) 벡터를 SspI으로 절단하여 얻은 Tac 프로모터와 전사종결자(Transcription terminator)를 포함하는 유전자 단편을 SspI으로 절단한 pTrc99A (Pharmacia Biotech, Sweden)에 삽입하여 제작하였으며, 상기 pTac99A는 pTrc99A(Pharmacia Biotech, Sweden)의 trc 프로모터를 pKK223-3(Pharmacia Biotech, Sweden)를 PvuII 및 EcoRI으로 절단하여 얻어진 tac 프로모터로 치환하여 제작하였다.
- [82] 먼저, 통상적인 방법으로 분리된 *Ralstonia eutropha*의 염색체 DNA로부터, PHA 생합성 유전자 전사 터미네이터 유전자 단편을 p619C1437-pct540로부터 서열번호 1~2의 프라이머를 이용하여 PCR로 수득하고, 상기 수득한 유전자 단편을 주형으로 하여 서열번호 2 및 서열번호 3의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하여 RBS, pTacLac MCS 및 *R. eutropha*의 PHA 생합성 유전자 전사 터미네이터를 수득하였다. 상기 PCR 산물을 MfeI 및 AvrII를 처리하여 절단하고, EcoRI/AvrII로 절단된 pZE12-MCS에 삽입하여, pKE12-MCS를 제조하였다.
- [83] pKE31-MCS(EXPRESSYS, 미국)의 P_{LtetO-1} 프로모터를 pKE12-MCS를 XhoI/EcoRI으로 절단하여 수득한 P_{LlacO-1} 프로모터로 치환하여 pKA32-MCS를 제조하였다.
- [84] 상기 pKA32-MCS의 EcoRI 및 KpnI 부위에 *R. eutropha*의 염색체 DNA를 서열번호 4~5의 프라이머를 이용하여, PCR로 증폭한 prpE 유전자를 삽입하여, pKA32-ReprpE를 제조하였다.
- [85] 상기 pKA32-MCS를 서열번호 6~7의 프라이머를 사용하여 PCR하여, P_{LlacO-1} 프로모터, MCS 및 *R. eutropha*의 PHA 생합성 유전자 전사 터미네이터를 포함하는 유전자 단편을 증폭시켰고, 상기 증폭된 유전자 단편을 pBBR1MCS2{GenBank no. U23751; Kovach *et al. Gene*, 166,175-176,1995)의 SspI 부위에 삽입하여, pKM22-MCS를 제조하였다.
- [86] 상기 pKM22-MCS에 *L. lactis* lactisII1403의 염색체 DNA에서, 서열번호 8~9의 프라이머를 이용하여 PCR로 증폭한 lpanE 유전자를 삽입하여, pKM22PanE를 제조하였고, pKM22PanE에 *C. difficile*의 염색체 DNA에서, 서열번호 10~11의 프라이머를 이용하여 PCR로 증폭한 630 hadA와 *C. difficile*의 염색체 DNA에서, 서열번호 12~13의 프라이머를 이용하여 PCR로 증폭한 pflB 유전자를 삽입하여, pKM22PanEHadAPflB를 제조하였다. 위의 hadA 유전자는 2-hydroxyisovalerate와 2-hydroxyisocaproate를 2-hydroxyisovaleryl-CoA 및 2-hydroxyisocaproyl-CoA로 전환하는 효소이나, 본 발명에서 2HB-CoA를 만드는 역할은 pct540에 비하여 매우 낮았다.
- [87] p619C1437-pct540, pKA32-RePrpE, pKM22PanEHadAPflB 플라스미드들로 형질전환되어, *phaC437*, *pct540*, *prpE*, *pflB* 및 *panE* 유전자를 발현하는 재조합 *E.coli* XLdh는 글루코오스로, 프로피온산, 3HB로부터 6.3 중량%이상의 P(73mol%2HB-co-27mol%LA) 중합체를 제조하였다 (표 3).
- [88] 배지 내의 3HB의 농도가 증가될수록, 합성된 폴리머에서의 2HB 단량체와 LA

분획은 감소하였다.

[89]

[90] 표 3

[Table 3]

E.coli XLdh에서 글루코오스, 프로피온산과 3HB를 이용한 p(2HB-co-3HB-co-LA)의 제조

Concentrations (g/L) of propionate and 3HB		Polymer composition (mol%)			Polymer content (wt%)
Propionate	3HB	2HB	3HB	LA	
2.0	0.1	73	0	27	6.3
2.0	0.2	75.5	0	24.5	6.8
2.0	0.5	37.0	58.0	5.0	12.2
2.0	1.0	35.2	60.0	4.8	17.9
2.0	1.5	19.4	78.3	2.3	26.7
2.0	2.0	14.9	82.9	2.2	27.4

[91]

[92] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[93]

산업상 이용가능성

[94] 본 발명은 생분해성 신규 폴리머인 2-하이드록시부티레이트를 모노머로 함유하고 있는 폴리하이드록시알카노에이트를 제조할 수 있는 제조합 미생물 및 상기 제조합 미생물을 배양하는 것을 특징으로 하는 2-하이드록시부티레이트를 모노머로 함유하고 있는 폴리하이드록시알카노에이트의 제조방법을 제공하는 효과가 있다.

[95]

서열목록 Free Text

[96] 전자파일 첨부하였음.

청구범위

- [청구항 1] 탄소원으로부터 아세틸-CoA를 생합성하는 경로를 가지고 있는 미생물에서, 락테이트디하이드로게나아제를 코딩하는 유전자가 결실되어 있고, 폴리하이드록시 알카노에이트 합성효소를 코딩하는 유전자 및 프로피오닐-CoA 전이효소를 코딩하는 유전자, D-2 하이드록시산 디하이드로게나아제를 코딩하는 유전자, propionyl-CoA synthetase를 코딩하는 유전자 및 pyruvate formate lyase를 코딩하는 유전자가 도입되어 있으며, 2-하이드록시부티레이트를 모노머로 함유하고 있는 폴리하이드록시알카노에이트 생성능을 가지는 재조합 미생물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 폴리하이드록시 알카노에이트 합성효소는 *Pseudomonas* sp. 6-19의 PHA synthase 또는 그 변이 효소인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 변이효소는 서열번호 14의 아미노산 서열에서 E130D, S325T, L412M, S477R, S477H, S477F, S477Y, S477G, Q481M, Q481K 및 Q481R로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 변이를 포함하는 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.
- [청구항 4] 제2항에 있어서, 상기 변이효소는 서열번호 14의 아미노산 서열에서 E130D, S325T, L412M, S477G 및 Q481M이 변이된 아미노산 서열(C1335); 서열번호 14의 아미노산 서열에서 E130D, S477F 및 Q481K가 변이된 아미노산 서열(C1310); 및 서열번호 14의 아미노산 서열에서 E130D, S477F 및 Q481R이 변이된 아미노산 서열(C1312)로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 프로피오닐-CoA 전이효소는 *C. propionicum*의 프로피오닐-CoA 전이효소 또는 그 변이효소인 Pct540인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, D-2 하이드록시산 디하이드로게나아제를 코딩하는 유전자는 *Lactobacillus lactis* 유래의 *panE*인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, propionyl-coA synthetase를 코딩하는 유전자는 *Ralstonia eutropha* 유래의 *prpE*인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.
- [청구항 8] 제1항에 있어서, pyruvate formate lyase는 *Clostridium difficile* 유래의

- pflB*인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.
- [청구항 9] 제1항에 있어서, β -케토티올레이즈를 코딩하는 유전자 및 아세토아세틸-CoA 리덕타아제를 코딩하는 유전자가 추가로 도입되어 있는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.
- [청구항 10] 제1항에 있어서, β -케토티올레이즈를 코딩하는 유전자는 *Ralstonia eutropha* 유래의 *phaA*이고, 아세토아세틸-CoA 리덕타아제를 코딩하는 유전자는 *Ralstonia eutropha* 유래의 *phaB*인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.
- [청구항 11] 탄소원으로부터 아세틸-CoA를 생합성하는 경로를 가지고 있는 미생물에서, 락테이트디하이드로게나아제를 코딩하는 유전자가 결실시키고, 폴리하이드록시 알카노에이트 합성효소를 코딩하는 유전자 및 프로피오닐-CoA 전이효소를 코딩하는 유전자, D-2 하이드록시산 디하이드로게나아제를 코딩하는 유전자, propionyl-CoA synthetase를 코딩하는 유전자 및 pyruvate formate lyase를 코딩하는 유전자를 도입시키는 것을 특징으로 하는 2-하이드록시부티레이트를 모노머로 함유하고 있는 폴리하이드록시알카노에이트 생성능을 가지는 재조합 미생물의 제조방법.
- [청구항 12] 제11항에 있어서, 상기 폴리하이드록시 알카노에이트 합성효소는 *Pseudomonas* sp. 6-19의 PHA synthase 또는 그 변이 효소인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 13] 제12항에 있어서, 상기 변이효소는 서열번호 14의 아미노산 서열에서 E130D, S325T, L412M, S477R, S477H, S477F, S477Y, S477G, Q481M, Q481K 및 Q481R로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 변이를 포함하는 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 14] 제12항에 있어서, 상기 변이효소는 서열번호 14의 아미노산 서열에서 E130D, S325T, L412M, S477G 및 Q481M이 변이된 아미노산 서열(C1335); 서열번호 14의 아미노산 서열에서 E130D, S477F 및 Q481K가 변이된 아미노산 서열(C1310); 및 서열번호 14의 아미노산 서열에서 E130D, S477F 및 Q481R이 변이된 아미노산 서열(C1312)로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 15] 제11항에 있어서, 상기 프로피오닐-CoA 전이효소는 *C. propionicum*의 프로피오닐-CoA 전이효소 또는 그 변이 효소인 Pct540인 것을 특징으로 하는 방법.

- [청구항 16] 제11항에 있어서, D-2 하이드록시산 디하이드로게나아제를 코딩하는 유전자는 *Lactobacillus lactis* 유래의 *panE*인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 17] 제11항에 있어서, ppropionyl-coA synthetase를 코딩하는 유전자는 *Ralstonia eutropha* 유래의 *prpE*인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 18] 제11항에 있어서, pyruvate formate lyase는 *Clostridium difficile* 유래의 *pflB*인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 19] 제11항에 있어서, β -케토티올레이즈를 코딩하는 유전자 및 아세토아세틸-CoA 리덕타아제를 코딩하는 유전자를 추가로 도입시키는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 20] 제11항에 있어서, β -케토티올레이즈를 코딩하는 유전자는 *Ralstonia eutropha* 유래의 *phaA*이고, 아세토아세틸-CoA 리덕타아제를 코딩하는 유전자는 *Ralstonia eutropha* 유래의 *phaB*인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 21] 제1항의 제조합 미생물을 글루코오스 및 프로피온산을 함유하는 배지에서 배양하여 2-하이드록시부티레이트를 모노머로 함유하고 있는 폴리하이드록시알카노에이트를 생산하는 단계; 및 상기 생산된 2-하이드록시부티레이트를 모노머로 함유하고 있는 폴리하이드록시알카노에이트를 수득하는 단계를 포함하는 2-하이드록시부티레이트를 모노머로 함유하고 있는 폴리하이드록시알카노에이트의 제조방법.
- [청구항 22] 제21항에 있어서, 2-하이드록시부티레이트를 모노머로 함유하고 있는 폴리하이드록시알카노에이트는 2-하이드록시부티레이트-co-3-하이드록시부티레이트-co-락테이트인 것을 특징으로 하는 2-하이드록시부티레이트를 모노머로 함유하고 있는 폴리하이드록시알카노에이트의 제조방법.
- [청구항 23] 제22항에 있어서, 상기 배지는 3-하이드록시부티레이트를 추가로 함유하는 것을 특징으로 하는 2-하이드록시부티레이트를 모노머로 함유하고 있는 폴리하이드록시알카노에이트의 제조방법.
- [청구항 24] 제9항의 제조합 미생물을 글루코오스 및 프로피온산을 함유하는 배지에서 배양하여 2-하이드록시부티레이트를 모노머로 함유하고 있는 폴리하이드록시알카노에이트를 생산하는 단계; 및 상기 생산된 2-하이드록시부티레이트를 모노머로 함유하고 있는 폴리하이드록시알카노에이트를 수득하는 단계를 포함하는 2-하이드록시부티레이트를 모노머로 함유하고 있는 폴리하이드록시알카노에이트의 제조방법.
- [청구항 25] 제24항에 있어서, 2-하이드록시부티레이트를 모노머로 함유하고

있는 폴리하이드록시알카노에이트는
2-하이드록시부티레이트-co-3-하이드록시부티레이트 인 것을
특징으로 하는 폴리하이드록시알카노에이트의 제조방법.

[Fig. 1]

