

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020년 4월 30일 (30.04.2020) WIPO | PCT



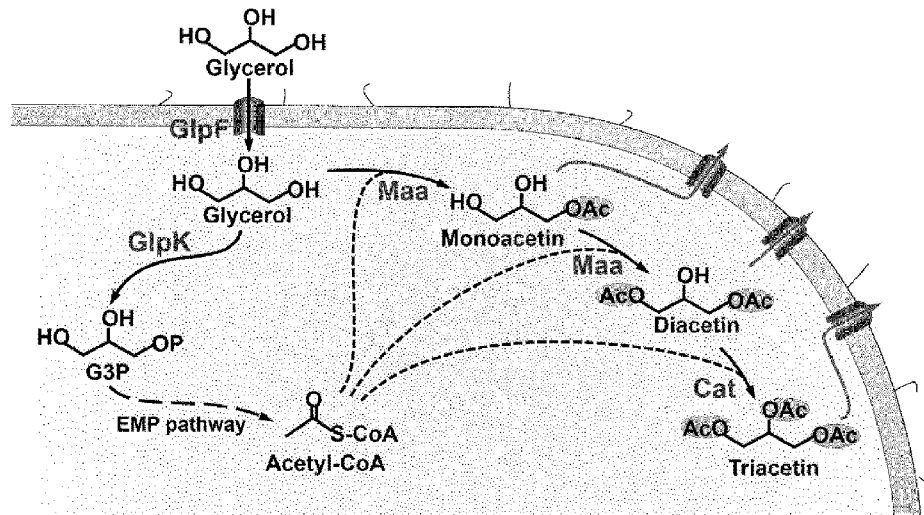
(10) 국제공개번호
WO 2020/085879 A1

- (51) 국제특허분류: *C12P 7/62* (2006.01) *C12N 15/52* (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2019/014256
- (22) 국제출원일: 2019년 10월 28일 (28.10.2019)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2018-0129090 2018년 10월 26일 (26.10.2018) KR
- (71) 출원인: 경상대학교산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY) [KR/KR]; 52828 경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동), Gyeongsangnam-do (KR). 경북대학교 산학협력단 (KYUNGPOOK NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 41566 대구시 북구 대학로 80 (산격동, 경북대학교), Daegu (KR).
- (72) 발명자: 김선원 (KIM, Seon Won); 30062 세종시 고운북 3길 17(고운동), Sejong-si (KR). 정성희 (JEONG, Seong Hee); 50803 경상남도 김해시 상동면 여차로699번길 11-1, Gyeongsangnam-do (KR). 김경진 (KIM, Kyung Jin); 42040 대구시 수성구 동원로 135, 101동 306호(만촌동, 메트로팰레스1단지아파트), Daegu (KR). 바크자다 (BAKHT, Zada); 52849 경상남도 진주시 내동면 내동로219번길 41-16, Gyeongsangnam-do (KR).
- (74) 대리인: 특허법인리채 (LEECHAE INTELLECTUAL PROPERTY); 06236 서울시 강남구 테헤란로26길12, 3층, 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, 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,

(54) Title: METHOD FOR BIOLOGICALLY PRODUCING ACETIN COMPOUND

(54) 발명의 명칭: 아세틴 화합물의 생물학적 제조 방법

[도1]



(57) Abstract: The present invention pertains to a method for biologically producing monoacetyl, diacetyl, or triacetyl by transferring acetyl groups to glycerol using an O-acetyl transferase, and pertains to a method and a composition for obtaining an acetyl compound of better quality that is sustainable, does not cause environmental pollution, and is safe.

(57) 요약서: 본 발명은 O-아세틸 전이효소를 이용해서 글리세롤에 아세틸기를 전이시켜서 모노아세틴, 다이아세틴, 트리아세틴을 생물학적으로 제조하는 방법에 관한 것으로서, 지속가능하고 환경오염을 유발하지 않으며 안전하고 더 좋은 품질의 아세틴을 얻을 수 있는 제조 방법 및 제조용 조성물에 관한 것이다.

[다음 쪽 계속]

WO 2020/085879 A1

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

- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역
내 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), 유
럽 (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))

명세서

발명의 명칭: 아세틴 화합물의 생물학적 제조 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 아세틴 화합물의 제조 방법 및 아세틴 제조용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 아세틴(acetins)은 글리세롤(glycerol)의 수산기(-OH)에 초산기(acetyl group)가 에스터(ester) 결합을 하고 있는 물질로, 결합된 초산기의 수에 따라서 1 개가 붙은 모노아세틴(monoacetin), 2 개가 붙은 디아세틴(diacetin), 3 개가 붙은 트리아세틴(triacetin)으로 구분한다. 트리아세틴은 글리세린 트리아세테이트(glycerin triacetate) 또는 트리글리세라이드 1,2,3-트라아세톡시프로페인(triglyceride 1,2,3-triacetoxyp propane)으로도 알려져 있다.
- [3] 아세틴은 향료 용매와 습윤제 등의 식품첨가물로 사용되고, 제약산업에서 보습제, 가소제 및 용제로 사용된다. 트리아세틴은 또한 가솔린의 엔진 노킹(engine knocking)을 줄이는 항노크제(antiknock agent)와 바이오디젤의 저온 및 점도 특성을 개선 할 수 있는 연료 첨가제로 사용될 수 있다. 바이오디젤 생산공정에서 다량의 부산물로 발생하는 폐글리세롤을 이용해서 바이오디젤의 연료첨가제로 활용될 수 있는 아세틴을 만드는 것은 최근 바이오리파이너리 산업분야에서 화두가 되고 있는 폐기물 또는 부산물의 발생을 줄이거나 재활용을 하는 제로-웨이스트(Zero-Wastes)의 개념을 실현할 수 있는 기술을 제공하는 것이다. 5 대 담배 회사가 발표 한 1994년 보고서에서 따르면 트리아세틴은 담배 제조 첨가물의 하나로 담배필터 제조 공정의 가소제로도 사용된다. 또한 긴 우주비행 임무를 수행하는 우주비행사들의 인공 우주식품에서 비행사들에게 필요한 에너지의 절반 이상을 공급하는 중요한 재료로 활용되고 있다. 미국 식품의약국(FDA)은 매우 안전한 식품첨가물(Generally Recognized as Safe: GRAS)로 인정하고 있다.
- [4] 한편, 아세틴 물질은 점성을 갖는 무색, 무취의 액체이다. 기존의 아세틴 물질은 글리세롤에 초산 또는 무수초산을 화학반응을 통해 결합시킨 인공 화학 합성 물질이다.
- [5] 기존에 생물학적으로 아세틴을 제조하는 방식이 없었으나, 생물학적인 방법을 통해서 아세틴 물질을 생산함으로써 지속가능하고 환경오염을 유발하지 않으며 안전하고 더 좋은 품질의 아세틴 물질의 생산 방법에 대한 요구가 꾸준히 있었다.
- [6] 본 발명자들은 아세틴 화합물들은 글리세롤 또는 글리세롤의 유도체들에 초산기를 에스테르화 반응을 통해서 결합시키는 효소들에 의해서 생물학적인 방식으로 제조될 수 있다는 것을 밝혀냈고, 자연계에 글리세롤을 탄소원으로

이용하는 장내세균(엔테로박테리아속, Enterobacteriaceae)의 일부에서 미량의 모노아세틴이 생성되는 것 또한 밝혀내었다.

- [7] 이에 따라 본 발명자들은 글리세롤 또는 포도당을 출발기질로 해서 모노아세틴, 다이아세틴, 트리아세틴을 생산할 수 있는 제조합 미생물을 만들어서, 본 발명을 완성하기에 이르렀다(도 1, 도 2).

[8]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [9] 본 발명은 아세틴 화합물의 생물학적 제조 방법 및 아세틴 화합물의 제조용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[10]

과제 해결 수단

- [11] 1. 제1 O-아세틸 전이효소(O-acetyl transferase) 존재 하에 아세틸-CoA와 글리세롤을 반응시켜 모노아세틴 또는 다이아세틴을 얻는 단계;를 포함하는 아세틴의 제조 방법.
- [12] 2. 위 1에 있어서, 상기 제1 O-아세틸 전이효소는 말토오스 O-아세틸 전이효소인, 아세틴의 제조 방법.
- [13] 3. 위 1에 있어서, 상기 제1 O-아세틸 전이효소는 서열번호 5의 아미노산 서열의 위치 70에 상응하는 위치의 아미노산이 아스파르트산(ASP)이고, 위치 84에 상응하는 위치의 아미노산이 아스파라긴(ASN)이고, 위치 114에 상응하는 위치의 아미노산이 히스티딘(HIS)이고, 위치 126에 상응하는 위치의 아미노산이 글루탐산(GLU)인, 아세틴의 제조 방법.
- [14] 4. 위 3에 있어서, 상기 제1 O-아세틸 전이효소는 서열번호 5의 아미노산 서열의 위치 15에 상응하는 위치의 아미노산이 티로신(TYR) 또는 페닐알라닌(PHE)이고, 위치 26에 상응하는 위치의 아미노산이 아르기닌(ARG) 또는 글루타민(GLN)이고, 위치 30에 상응하는 위치의 아미노산이 아르기닌(ARG) 또는 리신(LYS)이고, 위치 71에 상응하는 위치의 아미노산이 티로신(TYR)이고, 위치 82에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 티로신(TYR)인 아세틴의 제조 방법.
- [15] 5. 위 1에 있어서, 상기 제1 O-아세틸 전이효소는 서열번호 1 내지 6 중 어느 하나의 서열로 이루어진 것인, 아세틴의 제조 방법.
- [16] 6. 위 1에 있어서, 제2 O-아세틸 전이효소 존재 하에 상기 반응 생성물인 다이아세틴을 아세틸-CoA와 반응시켜 트리아세틴을 얻는 단계;를 더 포함하는, 아세틴의 제조 방법.
- [17] 7. 위 6에 있어서, 상기 제2 O-아세틸 전이효소는 서열번호 7의 아미노산 서열의 위치 31에 상응하는 위치의 아미노산이 시스테인(CYS) 또는 류신(LEU)이고, 위치 102에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는

- 이소류신(ILE)이고, 위치 143에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 타이로신(TYR)이고, 위치 166에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 타이로신(TYR)이고, 위치 170에 상응하는 위치의 아미노산이 발린(VAL), 이소류신(ILE), 또는 류신(LEU)이고, 위치 193에 상응하는 위치의 아미노산이 히스티딘(HIS)인 아세틴의 제조 방법.
- [18] 8. 위 6에 있어서, 상기 제2 O-아세틸 전이효소는 서열번호 7 내지 10 중 어느 하나의 서열로 이루어진 것인, 아세틴의 제조 방법.
- [19] 9. 제1 O-아세틸 전이효소(O-acetyl transferase)를 코딩하는 유전자를 발현하는 미생물을 클리세롤을 포함하는 배지 중에서 배양하는 단계;를 포함하는 아세틴의 제조 방법.
- [20] 10. 위 9에 있어서, 상기 제1 O-아세틸 전이효소는 말토오스 O-아세틸 전이효소인, 아세틴의 제조 방법.
- [21] 11. 위 9에 있어서, 상기 제1 O-아세틸 전이효소는 서열번호 5의 아미노산 서열의 위치 70에 상응하는 위치의 아미노산이 아스파르트산(ASP)이고, 위치 84에 상응하는 위치의 아미노산이 아스파라긴(ASN)이고, 위치 114에 상응하는 위치의 아미노산이 히스티딘(HIS)이고, 위치 126에 상응하는 위치의 아미노산이 글루탐산(GLU)인, 아세틴의 제조 방법.
- [22] 12. 위 9에 있어서, 상기 제1 O-아세틸 전이효소는 서열번호 5의 아미노산 서열의 위치 15에 상응하는 위치의 아미노산이 티로신(TYR) 또는 페닐알라닌(PHE)이고, 위치 26에 상응하는 위치의 아미노산이 아르기닌(ARG) 또는 글루타민(GLN)이고, 위치 30에 상응하는 위치의 아미노산이 아르기닌(ARG) 또는 리신(LYS)이고, 위치 71에 상응하는 위치의 아미노산이 티로신(TYR)이고, 위치 82에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 티로신(TYR)인, 아세틴의 제조 방법.
- [23] 13. 위 9에 있어서, 상기 제1 O-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자는 서열번호 16 내지 21의 서열 중 어느 하나의 서열로 이루어진 것인, 아세틴의 제조 방법.
- [24] 14. 위 9에 있어서, 상기 미생물은 다이아세틴에 아세틸기를 전이하는 제2 O-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자를 더 발현하는 것인, 아세틴의 제조 방법.
- [25] 15. 위 14에 있어서, 상기 제2 O-아세틸 전이효소는 서열번호 7의 아미노산 서열의 위치 31에 상응하는 위치의 아미노산이 시스테인(CYS) 또는 류신(LEU)이고, 위치 102에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 이소류신(ILE)이고, 위치 143에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 타이로신(TYR)이고, 위치 166에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 타이로신(TYR)이고, 위치 170에 상응하는 위치의 아미노산이 발린(VAL), 이소류신(ILE), 또는 류신(LEU)이고, 위치 193에 상응하는 위치의 아미노산이 히스티딘(HIS)인, 아세틴의 제조 방법.
- [26] 16. 위 14에 있어서, 상기 제2 O-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자는 서열번호 24 내지 27 중 어느 하나의 서열로 이루어진 것인, 아세틴의 제조 방법.

- [27] 17. 위 9에 있어서, 상기 미생물은 아세틸에스테라제(acetyl esterase)를 코딩하는 유전자가 감쇄 또는 결실된 것인, 아세틴의 제조 방법.
- [28] 18. 위 9에 있어서, 상기 미생물은 글리세롤 3-인산 탈수소효소(glycerol-3-phosphate dehydrogenase) 및 글리세롤 3-탈인산효소(DL-glycerol-3-phosphatase)를 코딩하는 유전자를 더 발현하고, 상기 배지는 포도당을 포함하는 것인, 아세틴의 제조 방법.
- [29] 19. 제1 O-아세틸 전이효소(O-acetyl transferase)를 코딩하는 유전자를 발현하는 미생물을 포함하는 아세틴 제조용 조성물.
- [30] 20. 위 19에 있어서, 상기 제1 O-아세틸 전이효소는 말토오스 O-아세틸 전이효소인, 아세틴 제조용 조성물.
- [31] 21. 위 19에 있어서, 상기 제1 O-아세틸 전이효소는 서열번호 5의 아미노산 서열의 위치 70에 상응하는 위치의 아미노산이 아스파르트산(ASP)이고, 위치 84에 상응하는 위치의 아미노산이 아스파라긴(ASN)이고, 위치 114에 상응하는 위치의 아미노산이 히스티딘(HIS)이고, 위치 126에 상응하는 위치의 아미노산이 글루탐산(GLU)인, 아세틴 제조용 조성물.
- [32] 22. 위 19에 있어서, 상기 제1 O-아세틸 전이효소는 서열번호 5의 아미노산 서열의 위치 15에 상응하는 위치의 아미노산이 티로신(TYR) 또는 페닐알라닌(PHE)이고, 위치 26에 상응하는 위치의 아미노산이 아르기닌(ARG) 또는 글루타민(GLN)이고, 위치 30에 상응하는 위치의 아미노산이 아르기닌(ARG) 또는 리신(LYS)이고, 위치 71에 상응하는 위치의 아미노산이 티로신(TYR)이고, 위치 82에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 티로신(TYR)인, 아세틴 제조용 조성물.
- [33] 23. 위 19에 있어서, 상기 제1 O-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자는 서열번호 16 내지 21 중 어느 하나의 서열로 이루어진 것인, 아세틴 제조용 조성물.
- [34] 24. 위 19에 있어서, 상기 미생물은 다이아세틴에 아세틸기를 전이하는 제2 O-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자를 더 발현하는 것인, 아세틴 제조용 조성물.
- [35] 25. 위 24에 있어서, 상기 제2 O-아세틸 전이효소는 서열번호 7의 아미노산 서열의 위치 31에 상응하는 위치의 아미노산이 시스테인(CYS) 또는 류신(LEU)이고, 위치 102에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 이소류신(ILE)이고, 위치 143에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 타이로신(TYR)이고, 위치 166에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 타이로신(TYR)이고, 위치 170에 상응하는 위치의 아미노산이 발린(VAL), 이소류신(ILE), 또는 류신(LEU)이고, 위치 193에 상응하는 위치의 아미노산이 히스티딘(HIS)인, 아세틴 제조용 조성물.
- [36] 26. 위 24에 있어서, 상기 제2 O-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자는 서열번호 24 내지 27 중 어느 하나의 서열로 이루어진 것인, 아세틴 제조용

조성물.

[37] 27. 위 19에 있어서, 상기 미생물은 아세틸에스테라제(acetylsterase)를 코딩하는 유전자가 감쇄 또는 결실된 것인, 아세틴 제조용 조성물.

[38] 28. 위 19에 있어서, 상기 미생물은 글리세롤 3-인산 탈수소효소(glycerol-3-phosphate dehydrogenase) 및 글리세롤 3-탈인산효소(DL-glycerol-3-phosphatase)를 코딩하는 유전자를 더 발현하는 것인, 아세틴 제조용 조성물.

[39]

발명의 효과

[40] 본 발명에 따르면 생물학적인 방법을 통해서 아세틴 물질을 제조함으로써 지속가능하고 환경오염을 유발하지 않으며 안전하고 더 좋은 품질의 아세틴 물질을 제조하는 방법을 제공한다.

[41]

도면의 간단한 설명

[42] 도 1은 세포 내로 유입된 글리세롤이 모노아세틴, 다이아세틴, 트리아세틴으로 전환되는 경로를 나타낸 것이다.

[43] 도 2는 세포 내로 유입된 포도당이 모노아세틴, 다이아세틴, 트리아세틴으로 전환되는 경로를 나타낸 것이다.

[44] 도 3의 (A)는 모노아세틴과 다이아세틴을 생산하기 위해서 글리세롤에 아세틸기를 전이할 수 있는 대장균 내의 O-acetyltransferases 후보 유전자들을 선별하고 각 유전자들을 pTrc99A 발현벡터에 클로닝해서 만들어진 플라스미드 pMD1 - pMD8의 구조 도면 이고, (B)는 (A)의 플라스미드들로 형질전환 된 재조합 대장균 DH-MD1 - DH-MD8에서의 모노아세틴과 다이아세틴 생산성을 비교한 도면이며(DH-MD0는 공벡터인 pTrc99A로 형질전환 된 재조합 대장균을 나타냄.), (C)는 대장균 maltose O-acetyltransferase (Maa)의 구조와 아미노산 서열을 근거로 글리세롤에 아세틸기를 전이할 것으로 추정되는 다른 미생물 유래의 후보 유전자들을 선별하고 각 유전자들을 pTrc99A 발현벡터에 클로닝해서 만들어진 플라스미드 pMD9 - pMD13의 구조 도면이고, (D)는 이 플라스미드들로 형질전환 된 재조합 대장균 DH-MD9 - DH-MD13에서의 모노아세틴과 다이아세틴 생산성을 비교한 도면이다.

[45] 도 4의 (A)는 모노아세틴과 다이아세틴 생산성이 가장 좋았던 *B. subtilis*의 Maa 유전자(*Bs-maa*)를 pTrc99A, pET28a, pSTV28 발현벡터에 클로닝해서 만들어진 플라스미드 pMD13, pMD14, pMDT1의 구조 도면이고, (B)는 상기 플라스미드들로 형질전환 된 재조합 대장균 DH-MD13, DH-MD14, DH-MDT1에서의 모노아세틴, 다이아세틴, 트리아세틴 생산성을 비교한 도면이며, (C)는 각 재조합 대장균의 균체 증식을 비교한 도면이다.

[46] 도 5의 (A)는 모노아세틴(1), 다이아세틴(2), 트리아세틴(3)의 혼합

표준화합물(STD)과 재조합 대장균 DH-MD06, DH-MD8, DH-MDT1의 배양액을 에틸아세테이트로 추출한 후 GC로 분석한 가스크로마토그램 도면이고, (B)는 GC-MS로 각 시료에서 얻어진 모노아세틴, 다이아세틴, 트리아세틴의 질량분석을 표준화합물(STD)의 질량분석과 비교한 도면이다.

- [47] 도 6의 (A)는 다이아세틴을 트리아세틴으로 전환하는 chloramphenicol-O-acetyltransferase 유전자(*cat*)와 *B. subtilis*의 *Maa* 유전자(*Bs-maa*)를 pTrc99A 발현벡터에 클로닝해서 만들어진 플라스미드 pMDT2의 구조 도면이고, (B)와 (C)는 상기 플라스미드로 형질전환 된 재조합 대장균 DH-MDT2의 아세틴 복합물의 생산성과 조성을 대조구인 DH-MDT1와 비교한 도면이며, (D)는 재조합 대장균 DH-MDT2에서의 아세틴 복합물의 배양시간에 따른 생산 변화를 나타낸 도면이다.
- [48] 도 7의 (A)는 Chloramphenicol O-acetyltransferase의 구조와 아미노산 서열을 근거로 다이아세틴에 아세틸기를 전이할 것으로 추정되는 후보 유전자들을 다양한 미생물들에서 발견하고 플라스미드 pMD13에 클로닝 해서 만들어진 플라스미드 pMDT2 - pMDT7의 구조 도면이고, (B)는 상기 플라스미드로 형질전환 된 재조합균주 DH-MDT2 - DH-MDT7의 아세틴 복합물 생산량 비교한 도면이며, (C)는 상기 재조합 균주들의 균체 증식을 비교한 도면이다.
- [49] 도 8은 대장균 균종과 글리세롤 농도에 따른 아세틴 복합물의 생산성을 비교한 것으로서, (A)는 대장균 DH5 α , AceCo, BW25113, W3110, MG1655를 플라스미드 pMDT2로 형질전환 한 재조합 대장균 DH-MDT2, AC-MDT2, BW-MDT2, W3-MDT2, MG-MDT2를 배양해서 아세틴 복합물 생산성을 비교한 것이며, (B)는 상기 재조합 대장균들의 균체 증식을 비교한 것이고, (C)는 재조합 균주 MG-MDT2의 배양에서 글리세롤 농도에 따른 아세틴 복합물 생산성을 나타낸 것이며, (D)는 상기 균주의 글리세롤 농도에 따른 균체 증식을 비교한 것이다.
- [50] 도 9는 대장균 BW25113에서 acetyltransferase 유전자(*aes*)의 증폭 및 결손을 통한 아세틴 화합물의 변화를 관찰한 것으로서, (A)와 (B)는 대장균 BW25113에 pTrc99A와 pTAes로 각각 형질전환 한 재조합균주 BW-Empty와 BW-Aes를 15 g/L의 트리아세틴 표준화합물이 첨가된 2YT 배지에 접종하고 트리아세틴의 분해 양상을 관찰한 것이며, (C)는 BW25113과 *aes* 유전자가 결손된 JW0465 균주를 플라스미드 pMDT2로 형질전환 시킨 재조합균주 BW-MDT2와 BW-MDT2 (*Daes*)를 10% (v/v) 글리세롤이 첨가된 2YT 배지에서 배양해서 아세틴 복합물 생산성을 비교한 것이며, (D)는 상기 재조합 균주들의 균체 증식을 비교한 것이다.
- [51] 도 10의 (A)는 포도당으로부터 아세틴 복합물 생산을 위해서 사카라마이세스 세레비지에 유래 글리세롤 생산 유전자인 *Sc-gpd1*과 *Sc-gpp2*를 pMDT2 플라스미드에 클로닝해서 만들어진 플라스미드 pMDT8의 구조 도면이고, (B)는 상기 플라스미드로 형질전환 된 재조합 대장균 DH-MDT8의 포도당으로부터의 아세틴 복합물 생산, (C)는 상기 대장균들의 균체 증식, (D)는 배양액의 pH변화를

나타낸 것이다.

[52] 도 11은 BsMAA 말토오스 아세틸전이효소의 기질 결합 부위 구조를 도시한 것이다. 글리세롤 아세틸화 반응의 핵심잔기는 아미노산 서열의 위치 70의 아스파르트산(ASP), 위치 84의 아스파라긴(ASN), 위치 114의 히스티딘(HIS), 위치 126의 글루탐산(GLU) 이다.

[53] 도 12는 *Bacillus subtilis* MAA-like enzymes의 서열 정렬(alignment) 결과이다.

[54] 도 13은 CAT 클로람페니콜-O-아세틸 전이효소(Chloramphenicol-O-acetyltransferase)의 기질결합 부위 구조를 도시한 것이다. 다이아세틴 아세틸화 반응의 핵심잔기는 아미노산 서열의 위치 102의 페닐알라닌(PHE), 위치 143의 페닐알라닌(PHE), 위치 193의 히스티딘(HIS)이다. 서열의 위치 102와 143의 잔기는 유사한 성질의 아미노산인 이소류신(ILE)과 티로신(TYR)으로 각각 대체될 수 있다. 이것은 제2 O-아세틸 전이효소들의 아미노산 서열 정렬 비교 도면 14에서 알 수 있다.

[55] 도 14는 CAT-like enzymes의 서열 정렬 결과이다.

[56]

발명의 실시를 위한 형태

[57] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[58]

[59] 본 발명은 제1 O-아세틸 전이효소(O-acetyl transferase) 존재 하에 아세틸-CoA와 글리세롤을 반응시켜 모노아세틴 또는 다이아세틴을 얻는 단계;를 포함하는 아세틴의 제조 방법에 관한 것이다.

[60] 상기 제1 O-아세틸 전이효소는 상기 아세틸-CoA에서 O-아세틸을 글리세롤로 전이시킬 수 있고, 예를 들면 말토오스 O-아세틸 전이효소일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[61] 상기 제1 O-아세틸 전이효소는 생물로부터 유래된 것이거나, 합성된 것일 수 있다.

[62] 또한, 상기 제1 O-아세틸 전이효소는 제1 O-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자를 가진 미생물에서 발현되는 것일 수 있고, 상기 미생물 내 제1 O-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자는 해당 미생물에 내재된 것일 수 있고, 유전자공학기술로 외부에서 미생물 내로 도입된 것일 수 있으며, 이 경우 글리세롤과 아세틸-CoA는 미생물 내에서 반응되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[63] 상기 아세틴은 모노아세틴(monoacetin), 다이아세틴(diacetin) 또는 트리아세틴(triacetin)을 포함할 수 있고, 이들의 복합물일 수 있다.

[64] 상기 제1 O-아세틸 전이효소는 글리세롤과 아세틸-CoA의 반응에서 촉매로 작용하여 모노아세틴이 생성될 수 있고, 모노아세틴은 제1 O-아세틸 전이효소 존재 하에 아세틸-CoA와 한 번 더 반응하여 다이아세틴을 생성할 수 있으나,

이에 제한되는 것은 아니다.

- [65] 상기 제1 O-아세틸 전이효소는 서열번호 5의 아미노산 서열의 위치 70에 상응하는 위치의 아미노산이 아스파르트산(ASP)이고, 위치 84에 상응하는 위치의 아미노산이 아스파라긴(ASN)이고, 위치 114에 상응하는 위치의 아미노산이 히스티딘(HIS)이고, 위치 126에 상응하는 위치의 아미노산이 글루탐산(GLU)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [66] 또한, 상기 제1 O-아세틸 전이효소는 서열번호 5의 아미노산 서열의 위치 15에 상응하는 위치의 아미노산이 티로신(TYR) 또는 페닐알라닌(PHE)이고, 위치 26에 상응하는 위치의 아미노산이 아르기닌(ARG) 또는 글루타민(GLN)이고, 위치 30에 상응하는 위치의 아미노산이 아르기닌(ARG) 또는 리신(LYS)이고, 위치 71에 상응하는 위치의 아미노산이 티로신(TYR)이고, 위치 82에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 티로신(TYR)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [67] 상기 제1 O-아세틸 전이효소의 서열번호 5의 아미노산 서열의 위치 15에 상응하는 위치의 아미노산인 티로신(TYR) 또는 페닐알라닌(PHE), 위치 26에 상응하는 위치의 아미노산인 아르기닌(ARG) 또는 글루타민(GLN), 위치 30에 상응하는 위치의 아미노산인 아르기닌(ARG) 또는 리신(LYS), 위치 71에 상응하는 위치의 아미노산인 티로신(TYR) 및 위치 82에 상응하는 위치의 아미노산인 페닐알라닌(PHE) 또는 티로신(TYR)은 기질결합포켓(substrate binding pocket)을 형성하는 잔기로서, 상대적으로 보존이 잘 되어있으며, 아세틴을 제조하는 데 중요한 역할을 하는 아미노산 잔기에 해당한다.
- [68] 상기 제1 O-아세틸 전이효소의 서열번호 5의 아미노산 서열의 위치 70에 상응하는 위치의 아미노산인 아스파르트산(ASP), 위치 84에 상응하는 위치의 아미노산인 아스파라긴(ASN) 및 위치 126에 상응하는 위치의 아미노산인 글루탐산(GLU)은 글리세롤을 안정화시키는 아미노산 잔기로서, 상대적으로 보존이 잘 되어있으며, 아세틴을 제조하는 데 중요한 역할을 하는 아미노산 잔기에 해당한다.
- [69] 상기 제1 O-아세틸 전이효소의 서열번호 5의 아미노산 서열의 위치 114에 상응하는 위치의 아미노산인 히스티딘(HIS)은 촉매 역할을 하는 잔기로서, 상대적으로 보존이 잘 되어있으며, 아세틴을 제조하는 데 중요한 역할을 하는 아미노산 잔기에 해당한다.
- [70] 또한, 상기 제1 O-아세틸 전이효소는 그 아미노산 서열이 서열번호 5의 아미노산 서열과 상동성이 50% 이상일 수 있다.
- [71] 상기 말토오스 O-아세틸 전이효소는 예를 들어, 에세리키아 콜라이(*Escherichia coli*)의 말토오스 O-아세틸 전이효소(서열번호 1), 스타필로코커스 카노수스(*Staphylococcus carnosus*)의 말토오스 O-아세틸 전이효소(서열번호 2), 할알칼리코커스 젓갈리(*Halalkalicoccus jeotgali*)의 말토오스 O-아세틸 전이효소(서열번호 3), 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*)의 말토오스

O-아세틸 전이효소(서열번호 4), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)의 말토오스 O-아세틸 전이효소(서열번호 5) 또는 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*)의 말토오스 O-아세틸 전이효소(서열번호 6)일 수 있고, 바람직하게는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)의 말토오스 O-아세틸 전이효소일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[72] 에세리키아 콜라이(*Escherichia coli*)의 말토오스 O-아세틸 전이효소(서열번호 1) 아미노산 서열은 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)의 말토오스 O-아세틸 전이효소(서열번호 5) 아미노산 서열과 상동성이 65%이고, 스타필로코커스 카노수스(*Staphylococcus carnosus*)의 말토오스 O-아세틸 전이효소(서열번호 2) 아미노산 서열은 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)의 말토오스 O-아세틸 전이효소(서열번호 5) 아미노산 서열과 상동성이 58%이고, 할알칼리코커스 젓갈리(*Halalkalicoccus jeotgali*)의 말토오스 O-아세틸 전이효소(서열번호 3) 아미노산 서열은 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)의 말토오스 O-아세틸 전이효소(서열번호 5) 아미노산 서열과 상동성이 53%이고, 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*)의 말토오스 O-아세틸 전이효소(서열번호 4) 아미노산 서열은 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)의 말토오스 O-아세틸 전이효소(서열번호 5) 아미노산 서열과 상동성이 55%이고, 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*)의 말토오스 O-아세틸 전이효소(서열번호 6) 아미노산 서열은 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)의 말토오스 O-아세틸 전이효소(서열번호 5) 아미노산 서열과 상동성이 50%이다.

[73] 또한, 본 발명의 아세틴의 제조 방법은 제2 O-아세틸 전이효소 존재 하에 상기 반응 생성물인 디아아세틴을 아세틸-CoA와 반응시키는 단계;를 더 포함할 수 있다.

[74] 상기 제2 O-아세틸 전이효소는 서열번호 7의 아미노산 서열의 위치 31에 상응하는 위치의 아미노산이 시스테인(CYS) 또는 류신(LEU)이고, 위치 102에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 이소류신(ILE)이고, 위치 143에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 타이로신(TYR)이고, 위치 166에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 타이로신(TYR)이고, 위치 170에 상응하는 위치의 아미노산이 발린(VAL), 이소류신(ILE), 또는 류신(LEU)이고, 위치 193에 상응하는 위치의 아미노산이 히스티딘(HIS)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[75] 제2-아세틸 전이효소는 디아아세틴에 아세틸기를 전이해 트리아세틴을 생성할 수 있고, 예를 들면 클로람페니콜-O-아세틸 전이효소(Chloramphenicol-O-acetyltransferase)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[76] 클로람페니콜-O-아세틸 전이효소는 예를 들면 서열번호 7의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[77] 상기 서열번호 7의 클로람페니콜-O-아세틸 전이효소(서열번호 7)는 예를 들어,

클로람페니콜 저항성 항생제 마커를 갖는 pSTV28 벡터에서 발현되는 것일 수 있고, 클로람페니콜 저항성 항생제 마커를 갖는 미생물에서 발현되는 것일 수 있고, pSTV28 벡터를 선천적 또는 후천적으로 갖는 미생물에서 발현되는 것일 수 있고, 합성에 의해 제조될 수도 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [78] 상기 제1 O-아세틸 전이효소 및 상기 제2 O-아세틸 전이효소 존재 하에 상기 글리세롤과 아세틸-CoA가 반응하는 경우, 모노아세틴, 다이아세틴, 트리아세틴의 복합물이 생성될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [79] 상기 제2 O-아세틸 전이효소는 클로람페니콜-O-아세틸 전이효소이거나, 그와 유사한 단백질 서열 및 구조를 가져, 다이아세틴에 아세틸기를 전이시켜 트리아세틴을 생성할 수 있다.
- [80] 상기 제2 O-아세틸 전이효소는 제2 O-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자를 가진 미생물에서 발현되는 것일 수 있고, 상기 미생물 내 제2 O-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자는 해당 미생물에 내재된 것일 수 있고, 유전자공학기술로 외부에서 미생물 내로 도입된 것일 수 있으며, 이 경우 글리세롤과 아세틸-CoA는 미생물 내에서 반응되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [81] 상기 제2 O-아세틸 전이효소는 생물로부터 유래된 것이거나, 합성된 것일 수 있다.
- [82] 상기 제2 O-아세틸 전이효소는 서열번호 7의 아미노산 서열의 위치 31에 상응하는 위치의 아미노산이 시스테인(CYS) 또는 류신(LEU)이고, 위치 93에 상응하는 위치의 아미노산인 트레오닌(THR) 또는 프롤린(PRO), 위치 102에 상응하는 위치의 아미노산인 페닐알라닌(PHE) 또는 이소류신(ILE), 위치 143에 상응하는 위치의 아미노산인 페닐알라닌(PHE) 또는 티로신(TYR), 위치 166에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 타이로신(TYR) 및 위치 170에 상응하는 위치의 아미노산인 발린(VAL), 이소류신(ILE) 및 류신(LEU) 중 어느 하나는 기질결합포켓(substrate binding pocket)을 형성하는 잔기로서, 상대적으로 보존이 잘 되어있으며, 아세틴을 제조하는 데 중요한 역할을 하는 아미노산 잔기에 해당한다.
- [83] 상기 제2 O-아세틸 전이효소는 서열번호 7의 아미노산 서열의 위치 193에 상응하는 위치의 아미노산인 히스티딘(HIS)은 촉매 역할을 하는 잔기로서, 상대적으로 보존이 잘 되어있으며, 아세틴을 제조하는 데 중요한 역할을 하는 아미노산 잔기에 해당한다.
- [84] 또한, 상기 제2 O-아세틸 전이효소는 그 아미노산 서열이 서열번호 7의 아미노산 서열과 상동성이 32% 이상일 수 있다.
- [85] 상기 제2 O-아세틸 전이효소는 구체적으로는, 서열번호 7의 클로람페니콜-O-아세틸 전이효소, 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*)의 O-아세틸 전이효소(서열번호 8), 슈도모나스 애루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*)의 O-아세틸 전이효소(서열번호 9) 또는 클로스트리디움

아세트부틸리쿰(*Clostridium acetobutylicum*)의 O-아세틸 전이효소(서열번호 10)일 수 있고, 바람직하게는 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*)의 O-아세틸 전이효소일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [86] 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*)의 O-아세틸 전이효소(서열번호 8) 아미노산 서열은 클로람페니콜-O-아세틸 전이효소(서열번호 7) 아미노산 서열과 상동성이 43% 이상이고, 슈도모나스 애루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*)의 O-아세틸 전이효소(서열번호 9) 아미노산 서열은 클로람페니콜-O-아세틸 전이효소(서열번호 7) 아미노산 서열과 상동성이 62%이고, 클로스트리디움 아세트부틸리쿰(*Clostridium acetobutylicum*)의 O-아세틸 전이효소(서열번호 10) 아미노산 서열은 클로람페니콜-O-아세틸 전이효소(서열번호 7) 아미노산 서열과 상동성이 32%이다.
- [87]
- [88] 또한, 본 발명의 아세틴의 제조 방법은 포도당을 글리세롤 3-인산 탈수소효소(glycerol-3-phosphate dehydrogenase) 및 글리세롤 3-탈인산효소(DL-glycerol-3-phosphatase)와 순차적으로 반응시켜 상기 글리세롤을 얻는 단계;를 더 포함할 수 있다.
- [89] 상기 글리세롤의 경우 포도당으로부터 효소와 반응시키는 생합성을 통해 얻을 수 있고, 이의 구체적인 예로서, 포도당을 글리세롤 3-인산 탈수소효소(glycerol-3-phosphate dehydrogenase, GPD1) 및 글리세롤 3-탈인산효소(DL-glycerol-3-phosphatase, GPP2)와 순차적으로 반응시켜 상기 글리세롤을 얻는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [90] 상기 글리세롤 3-인산 탈수소효소(glycerol-3-phosphate dehydrogenase) 및 글리세롤 3-탈인산효소(DL-glycerol-3-phosphatase)는 화학적으로 합성될 수 있다.
- [91] 또한, 상기 글리세롤 3-인산 탈수소효소(glycerol-3-phosphate dehydrogenase) 및 글리세롤 3-탈인산효소(DL-glycerol-3-phosphatase)는 글리세롤 3-인산 탈수소효소(glycerol-3-phosphate dehydrogenase) 및 글리세롤 3-탈인산효소(DL-glycerol-3-phosphatase)를 코딩하는 유전자를 가진 미생물에서 발현되는 것일 수 있고, 상기 미생물 내 글리세롤 3-인산 탈수소효소(glycerol-3-phosphate dehydrogenase) 및 글리세롤 3-탈인산효소(DL-glycerol-3-phosphatase)를 코딩하는 유전자는 해당 미생물에 내재된 것일 수 있고, 유전자공학기술로 외부에서 미생물 내로 도입된 것일 수 있으며, 이 경우 포도당으로부터 글리세롤을 얻는 것은 미생물 내에서 이루어지는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [92] 상기 글리세롤 3-인산 탈수소효소(glycerol-3-phosphate dehydrogenase)는 미생물 종류에 따라 다른 아미노산 서열을 가질 수 있고, 해당 미생물에서 해당경로의 중간대사물질인 글리세론 인산(glycerone phosphate, DHAP)을 글리세롤 3-인산(glycerol-3-phosphate, G3P)으로 전환할 수 있는 것이면 족하다. 예를 들어,

사카라마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)의 경우, 서열번호 14의 사카라마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)의 글리세롤 3-인산 탈수소효소(glycerol-3-phosphate dehydrogenase, GPD1)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[93] 상기 글리세롤 3-탈인산효소(DL-glycerol-3-phosphatase)는 미생물 종류에 따라 다른 아미노산 서열을 가질 수 있고, 해당 미생물에서 해당경로의 중간대사물질인 글리세롤 3-인산(glycerol-3-phosphate, G3P)을 글리세롤(glycerol)로 전환할 수 있는 것이면 족하며, 예를 들어, 사카라마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)의 경우, 서열번호 15의 사카라마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)의 글리세롤 3-탈인산효소(DL-glycerol-3-phosphatase, GPP2)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[94] 상기 포도당은 해당경로(Embden-Meyerhof pathway)를 통해 중간대사물질인 글리세론 인산(glycerone phosphate, DHAP)을 형성하고, 상기 글리세론 인산은 글리세롤 3-인산 탈수소효소와 반응하여 글리세롤 3-인산으로 전환될 수 있고, 상기 글리세롤 3-인산(glycerol-3-phosphate, G3P)은 글리세롤 3-탈인산효소와 반응하여 글리세롤(glycerol)이 제조될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[95]

[96] 또한, 본 발명은 제1 O-아세틸 전이효소(O-acetyl transferase)를 코딩하는 유전자를 발현하는 미생물을 글리세롤을 포함하는 배지 중에서 배양하는 단계;를 포함하는 아세틴의 제조 방법에 관한 것이다.

[97] 상기 제1 O-아세틸 전이효소는 서열번호 5의 아미노산 서열의 위치 70에 상응하는 위치의 아미노산이 아스파르트산(ASP)이고, 위치 84에 상응하는 위치의 아미노산이 아스파라긴(ASN)이고, 위치 114에 상응하는 위치의 아미노산이 히스티딘(HIS)이고, 위치 126에 상응하는 위치의 아미노산이 글루탐산(GLU)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[98] 또한, 상기 제1 O-아세틸 전이효소는 서열번호 5의 아미노산 서열의 위치 15에 상응하는 위치의 아미노산이 티로신(TYR) 또는 페닐알라닌(PHE)이고, 위치 26에 상응하는 위치의 아미노산이 아르기닌(ARG) 또는 글루타민(GLN)이고, 위치 30에 상응하는 위치의 아미노산이 아르기닌(ARG) 또는 리신(LYS)이고, 위치 71에 상응하는 위치의 아미노산이 티로신(TYR)이고, 위치 82에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 티로신(TYR)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[99] 또한, 상기 제1 O-아세틸 전이효소는 그 아미노산 서열이 서열번호 5의 아미노산 서열과 상동성이 50% 이상일 수 있다.

[100] 상기 제1 O-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자는 예를 들어, 말토오스 O-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자일 수 있고, 상기 말토오스 O-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자는 예를 들어, 에세리키아 콜라이(*Escherichia coli*

)의 말토오스 O-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자(*maa*, 서열번호 16), 스태필로코커스 카노수스(*Staphylococcus carnosus*)의 말토오스 O-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자(*Sc-maa*, 서열번호 17), 할알칼리코커스 젓갈리(*Halalkalicoccus jeotgali*)의 말토오스 O-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자(*Hj-maa*, 서열번호 18), 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*)의 말토오스 O-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자(*Lb-maa*, 서열번호 19), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)의 말토오스 O-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자(*Bs-maa*, 서열번호 20) 또는 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*)의 말토오스 O-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자(*Pp-maa*, 서열번호 21)일 수 있고, 바람직하게는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)의 말토오스 O-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [101] 상기 미생물은 배지 내에서 배양되어 제1 O-아세틸 전이효소를 발현할 수 있고, 상기 제1 O-아세틸 전이효소가 글리세롤과 아세틸-CoA의 반응을 촉매하여 모노아세틴을 생성할 수 있고, 상기 모노아세틴과 아세틸-CoA의 반응을 한 번 더 촉매하여 다이아세틴을 생성할 수 있다.
- [102] 상기 미생물은 제1 O-아세틸 전이 효소를 발현하는 미생물이라면 제한없이 사용가능하며, 예를 들어, 원핵 세포, 진핵 세포, 또는 분리된 동물세포로 액체 배지에서 배양될 수 있는 것일 수 있다. 상기 미생물은 예를 들면, 박테리아, 곰팡이, 또는 이들의 조합일 수 있다. 박테리아는 그람 양성 박테리아, 그람 음성 박테리아, 또는 이들의 조합일 수 있다. 그람 음성 박테리아는 에세리키아(*Escherichia*) 속일 수 있다. 그람 양성 박테리아는 바실러스 속, 코리네박테리움 속, 유산균 등 또는 이들의 조합일 수 있다. 곰팡이는 사카라마이세스 세레비지에, 클루베로마이세스 등 또는 이들의 조합일 수 있다. 상기 미생물은 구체적으로 대장균(*E.coli*)일 수 있고, 보다 구체적으로 DH5 α , DH5 α (DE3), AceCo, BW25113, W3110 또는 MG1655일 수 있다. 상기 미생물은 대장균 중 생산성 측면에서 바람직하게는 DH5 α (DE3), BW25113, W3110 또는 MG1655일 수 있고, 보다 바람직하게는 MG1655일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [103] 상기 미생물은 제1 O-아세틸 전이효소(O-acetyl transferase)를 코딩하는 유전자를 선천적으로 보유하는 미생물일 수 있고, 형질전환, 형질도입 등의 생명공학기술 등에 의해 상기 유전자를 후천적으로 보유하는 미생물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [104] 상기 형질전환은 재조합 플라스미드를 상기 미생물 내부에 도입함으로써 이루어질 수 있고, 상기 재조합 플라스미드는 벡터에 상기 제1 O-아세틸 전이효소(O-acetyl transferase)를 코딩하는 유전자가 삽입된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [105] 상기 벡터는 예를 들어, pTrc99A(서열번호 78), pET28a(서열번호 79) 또는 pSTV28(서열번호 77)일 수 있고, 바람직하게는 pSTV28일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [106] 상기 유전자 삽입 시, 상기 벡터와 상기 유전자를 제한효소로 자르고 ligase로 연결되어 클로닝되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [107] 상기 배지는 상기 미생물의 증식, 또는 배양을 목적으로 미생물이 일반적으로 생존하고 번식하는 자연 환경과 유사한 영양 상태를 유지 하도록 고안된 물질로서 자라는데 필요한 모든 영양소를 첨가하여 만든 액체 및 고체의 물질로서, 글리세롤 뿐만 아니라 아세틸-CoA를 포함하는 배지일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [108]
- [109] 또한, 본 발명의 상기 미생물은 다이아세틴에 아세틸기를 전이하는 제2 O-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자를 더 발현하는 것일 수 있다.
- [110] 상기 제2 O-아세틸 전이효소는 서열번호 7의 아미노산 서열의 위치 31에 상응하는 위치의 아미노산이 시스테인(CYS) 또는 류신(LEU)이고, 위치 102에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 이소류신(ILE)이고, 위치 143에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 타이로신(TYR)이고, 위치 166에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 타이로신(TYR)이고, 위치 170에 상응하는 위치의 아미노산이 발린(VAL), 이소류신(ILE), 또는 류신(LEU)이고, 위치 193에 상응하는 위치의 아미노산이 히스티딘(HIS) 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [111] 상기 미생물은 배지 내 배양되며, 제1 O-아세틸 전이효소 외에 추가적으로 클로람페니콜-O-아세틸 전이효소 또는 2 O-아세틸 전이효소를 더 발현할 수 있다.
- [112] 상기 클로람페니콜-O-아세틸 전이효소(서열번호 7)를 코딩하는 유전자(*cat*, 서열번호 24)는 클로람페니콜 저항성 항생제 마커를 갖는 벡터에 존재할 수 있고, 상기 벡터는 예를 들어 pSTV28 벡터일 수 있고, 해당 벡터는 미생물이라면 제한없이 도입되어 해당 미생물로부터 클로람페니콜-O-아세틸 전이효소가 발현될 수 있고, 예를 들어 대장균에 상기 벡터가 도입되어 대장균으로부터 클로람페니콜-O-아세틸 전이효소가 발현될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [113] 상기 제2 O-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자는 예를 들어, 클로람페니콜-O-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자(*cat*, 서열번호 24), 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*)의 O-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자(*Bc-Oat*, 서열번호 25), 슈도모나스 애루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*)의 O-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자(*Pa-Oat*, 서열번호 26) 또는 클로스트리디움 아세토부틸리쿰(*Clostridium acetobutylicum*)의 O-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자(*Ca-Oat*, 서열번호 27)일 수 있고, 바람직하게는 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*)의 O-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [114] 또한, 상기 제2 O-아세틸 전이효소는 그 아미노산 서열이 서열번호 7의

아미노산 서열과 상동성이 32% 이상일 수 있다.

[115]

[116] 또한, 본 발명의 상기 미생물은 아세틸에스테라제(acetylsterase)를 코딩하는 유전자가 감쇄 또는 결실된 것일 수 있다.

[117] 에스터 화합물인 아세틴은 에스터 결합 분해 효소(esterases)에 의해서 글리세롤과 아세테이트로 분해될 수 있고, 상기 아세틴을 분해하는 에스터 결합 분해 효소는 예를 들어 아세틸에스테라제일 수 있다.

[118] 상기 아세틸에스테라제를 코딩하는 유전자가 감쇄 또는 결실된 미생물의 경우 아세틸에스테라제를 발현하지 않아, 아세틴의 생산량이 증가될 수 있다.

[119] 상기 아세틸에스테라제는 미생물 종류에 따라 다른 서열을 가질 수 있고, 이를 코딩하는 유전자도 마찬가지로 다른 서열을 가질 수 있는 바, 해당 미생물에서 아세틸에스테라제를 코딩하는 유전자(*aes*)가 감쇄 또는 결실된 것일 수 있다. 예를 들어, 대장균의 경우, 서열번호 13의 아세틸에스테라제를 코딩하는 서열번호 30의 유전자가 감쇄 또는 결실된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[120] 또한, 상기 미생물은 제1 O-아세틸 전이 효소를 발현하는 미생물이라면 제한없이 사용가능하며, 전술한 범위 내의 미생물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[121]

[122] 또한, 본 발명의 상기 미생물의 본 배양 시 초기 균체 농도가 OD_{600nm}에서 0.05 내지 0.15일 때, 상기 배지에 포함된 글리세롤의 농도는 3%(v/v) 내지 13%(v/v)일 수 있으며, 바람직하게는 초기 균체 농도가 OD_{600nm}에서 0.08 내지 0.12일 때, 글리세롤의 농도는 5%(v/v) 내지 11%(v/v)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[123] 상기 글리세롤 농도를 가지는 배지에서 상기 균체의 농도로 미생물을 배양할 경우, 아세틴이 다량 생성될 수 있다.

[124] 상기 글리세롤의 농도가 13%(v/v) 초과인 경우, 과도한 삼투압 증가의 영향으로 균체 증식과 아세틴 생산이 모두 감소할 수 있으며, 농도가 3%(v/v) 미만인 경우, 기질의 농도가 적어서 아세틴의 생산량이 적을 수 있다.

[125]

[126] 또한, 본 발명의 상기 미생물은 글리세롤 3-인산 탈수소효소(glycerol-3-phosphate dehydrogenase) 및 글리세롤 3-탈인산효소(DL-glycerol-3-phosphatase)를 코딩하는 유전자를 더 발현하고, 상기 배지는 포도당을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[127] 전술한 바와 같이 상기 미생물은 글리세롤 3-인산 탈수소효소 및 글리세롤 3-탈인산효소를 발현하며, 포도당은 해당경로를 통해 글리세론 인산으로 변환된 후 상기 효소들을 통해 글리세롤로 변환될 수 있다.

[128] 상기 글리세롤 3-인산 탈수소효소(glycerol-3-phosphate dehydrogenase)를

코딩하는 유전자(Gpd1)는 미생물 종류에 따라 다른 염기 서열을 가질 수 있고, 해당 미생물에서 해당경로의 중간대사물질인 글리세론 인산(glycerone phosphate, DHAP)을 글리세롤 3-인산(glycerol-3-phosphate, G3P)으로 전환할 수 있는 것이면 족하다. 예를 들어, 사카라마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)의 경우, 서열번호 31의 사카라마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)의 글리세롤 3-인산 탈수소효소(glycerol-3-phosphate dehydrogenase)를 코딩하는 유전자(*Sc-gpd1*)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[129] 상기 글리세롤 3-탈인산효소(DL-glycerol-3-phosphatase)를 코딩하는 유전자(Gpp2)는 미생물 종류에 따라 다른 염기 서열을 가질 수 있고, 해당 미생물에서 해당경로의 중간대사물질인 글리세롤 3-인산(glycerol-3-phosphate, G3P)을 글리세롤(glycerol)로 전환할 수 있는 것이면 족하다. 예를 들어, 사카라마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)의 경우, 서열번호 32의 사카라마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)의 글리세롤 3-탈인산효소(DL-glycerol-3-phosphatase)를 코딩하는 유전자(*Sc-gpp2*)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[130] 상기 글리세롤은 전술한 제1 O-아세틸 전이효소 및 클로람페니콜-O-아세틸 전이효소 또는 제2 O-아세틸 전이효소 등에 의해 아세틴 복합물로 변환될 수 있다.

[131]

[132] 또한, 본 발명은 제1 O-아세틸 전이효소(O-acetyl transferase)를 코딩하는 유전자를 발현하는 미생물을 포함하는 아세틴 제조용 조성물에 관한 것이다.

[133] 상기 조성물은 글리세롤과 접촉하는 경우 전술한 범위 및 방법으로 아세틴을 제조할 수 있다.

[134] 상기 제1 O-아세틸 전이효소는 서열번호 5의 아미노산 서열의 위치 70에 상응하는 위치의 아미노산이 아스파르트산(ASP)이고, 위치 84에 상응하는 위치의 아미노산이 아스파라긴(ASN)이고, 위치 114에 상응하는 위치의 아미노산이 히스티딘(HIS)이고, 위치 126에 상응하는 위치의 아미노산이 글루탐산(GLU)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[135] 또한, 상기 제1 O-아세틸 전이효소는 서열번호 5의 아미노산 서열의 위치 15에 상응하는 위치의 아미노산이 티로신(TYR) 또는 페닐알라닌(PHE)이고, 위치 26에 상응하는 위치의 아미노산이 아르기닌(ARG) 또는 글루타민(GLN)이고, 위치 30에 상응하는 위치의 아미노산이 아르기닌(ARG) 또는 리신(LYS)이고, 위치 71에 상응하는 위치의 아미노산이 티로신(TYR)이고, 위치 82에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 티로신(TYR)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[136] 또한, 상기 제1 O-아세틸 전이효소는 그 아미노산 서열이 서열번호 5의 아미노산 서열과 상동성이 50% 이상일 수 있다.

[137] 상기 제1 O-아세틸 전이효소는 말토오스 O-아세틸 전이효소일 수 있고, 보다

구체적으로는 에세리키아 콜라이(*Escherichia coli*), 스타필로코커스 카노수스(*Staphylococcus carnosus*), 할알칼리코커스 젓갈리(*Halalkalicoccus jeotgali*), 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 또는 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*)의 말토오스 O-아세틸 전이효소일 수 있고, 바람직하게는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)의 말토오스 O-아세틸 전이효소일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [138] 상기 제1 O-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자는 예를 들어, 말토오스 O-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자일 수 있고, 상기 말토오스 O-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자는 예를 들어, 에세리키아 콜라이(*Escherichia coli*)의 말토오스 O-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자(*maa*, 서열번호 16), 스타필로코커스 카노수스(*Staphylococcus carnosus*)의 말토오스 O-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자(*Sc-maa*, 서열번호 17), 할알칼리코커스 젓갈리(*Halalkalicoccus jeotgali*)의 말토오스 O-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자(*Hj-maa*, 서열번호 18), 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*)의 말토오스 O-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자(*Lb-maa*, 서열번호 19), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)의 말토오스 O-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자(*Bs-maa*, 서열번호 20) 또는 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*)의 말토오스 O-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자(*Pp-maa*, 서열번호 21)일 수 있고, 바람직하게는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)의 말토오스 O-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[139]

- [140] 또한, 상기 미생물은 다이아세틴에 아세틸기를 전이하는 제2 O-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자를 더 발현하는 것일 수 있다.

- [141] 상기 제2 O-아세틸 전이효소는 서열번호 7의 아미노산 서열의 위치 31에 상응하는 위치의 아미노산이 시스테인(CYS) 또는 류신(LEU)이고, 위치 102에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 이소류신(ILE)이고, 위치 143에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 타이로신(TYR)이고, 위치 166에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 타이로신(TYR)이고, 위치 170에 상응하는 위치의 아미노산이 발린(VAL), 이소류신(ILE), 또는 류신(LEU)이고, 위치 193에 상응하는 위치의 아미노산이 히스티딘(HIS)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [142] 상기 클로람페니콜-O-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자는 클로람페니콜 저항성 항생제 마커를 갖는 벡터에 존재할 수 있고, 예를 들어 pSTV28 벡터일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [143] 상기 제2 O-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자는 예를 들어, 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*), 슈도모나스 애루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 또는 클로스트리디움 아세토부틸리쿰(*Clostridium acetobutylicum*)의 O-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자일 수 있고, 바람직하게는 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*)의 O-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

Bacillus cereus)의 O-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[144] 또한, 상기 제2 O-아세틸 전이효소는 그 아미노산 서열이 서열번호 7의 아미노산 서열과 상동성이 32% 이상일 수 있다.

[145]

[146] 또한, 상기 미생물은 아세틸에스테라제(acetyl esterase)를 코딩하는 유전자가 감쇄 또는 결실된 것일 수 있다.

[147] 에스터 화합물인 아세틴은 에스터 결합 분해 효소(esterases)에 의해서 글리세롤과 아세테이트로 분해될 수 있고, 상기 아세틴을 분해하는 에스터 결합 분해 효소는 예를 들어 아세틸에스테라제일 수 있다.

[148] 상기 아세틸에스테라제를 코딩하는 유전자(*aes*)가 감쇄 또는 결실된 미생물의 경우 아세틸에스테라제를 발현하지 않아, 아세틴의 생산량을 증가시킬 수 있다.

[149] 상기 아세틸에스테라제는 미생물 종류에 따라 다른 서열을 가질 수 있고, 이를 코딩하는 유전자도 마찬가지로 다른 서열을 가질 수 있는 바, 해당 미생물에서 아세틸에스테라제를 코딩하는 유전자가 감쇄 또는 결실된 것일 수 있다. 예를 들어, 대장균의 경우, 서열번호 13의 아세틸에스테라제를 코딩하는 서열번호 30의 유전자가 감쇄 또는 결실된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[150] 또한, 상기 미생물은 전술한 바와 같으나, 구체적으로 대장균(*E.coli*)일 수 있고, 보다 구체적으로는 DH5 α , DH5 α (DE3), AceCo, BW25113, W3110 또는 MG1655일 수 있고, 바람직하게는 MG1655일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[151]

[152] 또한, 상기 미생물은 글리세롤 3-인산 탈수소효소(glycerol-3-phosphate dehydrogenase) 및 글리세롤 3-탈인산효소(DL-glycerol-3-phosphatase)를 코딩하는 유전자를 더 발현하는 것일 수 있다.

[153] 전술한 바와 같이 상기 미생물은 글리세롤 3-인산 탈수소효소 및 글리세롤 3-탈인산효소를 발현하며, 포도당은 해당경로 및 상기 효소들을 통해 글리세롤로 변환될 수 있다.

[154] 상기 글리세롤 3-인산 탈수소효소(glycerol-3-phosphate dehydrogenase)를 코딩하는 유전자(*Gpd1*)는 미생물 종류에 따라 다른 염기 서열을 가질 수 있고, 해당 미생물에서 해당경로의 중간대사물질인 글리세론 인산(glycerone phosphate, DHAP)을 글리세롤 3-인산(glycerol-3-phosphate, G3P)으로 전환할 수 있는 것이면 족하다. 예를 들어, 사카라마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)의 경우, 서열번호 31의 사카라마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)의 글리세롤 3-인산 탈수소효소(glycerol-3-phosphate dehydrogenase)를 코딩하는 유전자(*Sc-gpd1*)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[155] 상기 글리세롤 3-탈인산효소(DL-glycerol-3-phosphatase)를 코딩하는 유전자(*Gpp2*)는 미생물 종류에 따라 다른 염기 서열을 가질 수 있고, 해당

미생물에서 해당경로의 중간대사물질인 글리세롤 3-인산(glycerol-3-phosphate, G3P)을 글리세롤(glycerol)로 전환할 수 있는 것이면 족하다. 예를 들어, 사카라마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)의 경우, 서열번호 32의 사카라마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)의 글리세롤 3-탈인산효소(DL-glycerol-3-phosphatase)를 코딩하는 유전자(*Sc-gpp2*)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[156] 상기 글리세롤은 전술한 O-아세틸 전이효소 및 클로람페니콜-O-아세틸 전이효소 등에 의해 아세틴 복합물로 변환될 수 있다.

[157]

[158] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 하기 실시예에 사용된 플라스미드와 균주는 표 1에, PCR primer들은 표 2에 정리하였다.

[159]

[160]

[35]

Names	Descriptions	Sources
Plasmids		
pSTV28	P _{lac} expression vector, pACYC184 origin, lacZ α , Cm ^r	Takara Co., Ltd
pTrc99A	P _{trc} expression vector, pBR322 origin, lacI ^q , Amp ^r	Amersham Bioscience
pET28a (+)	P _{T7} expression vector, pBR322 origin, lacI, and Kan ^r	Novagen
pMD1	pTrc99A vector containing lacA from E. coli	-
pMD2	pTrc99A vector containing cysE from E. coli	-
pMD3	pTrc99A vector containing yjgM from E. coli	-
pMD4	pTrc99A vector containing yjaB from E. coli	-
pMD5	pTrc99A vector containing yiiD from E. coli	-
pMD6	pTrc99A vector containing wecH from E. coli	-
pMD7	pTrc99A vector containing nhoA from E. coli	-
pMD8	pTrc99A vector containing maa from E. coli	-
pMD9	pTrc99A vector containing maa from S. carnosus	-
pMD10	pTrc99A vector containing maa from H. jeotgali	-
pMD11	pTrc99A vector containing maa from L. brevis	-
pMD12	pTrc99A vector containing maa from P. putida	-
pMD13	pTrc99A vector containing maa from B. subtilis	-
pMD14	pET28a vector containing maa from B. subtilis	-
pT-CAT	pTrc99A vector containing cat from pSTV28	-
pMDT1	pSTV28 vector containing maa from B. subtilis	-
pMDT2	pTrc99A vector containing cat from pSTV28 and maa from B. subtilis	-
pMDT3	pTrc99A vector containing oat from B. cereus and maa from B. subtilis	-
pMDT4	pTrc99A vector containing oat from P. aeruginosa and maa from	-

	B. subtilis	
pMDT5	pTrc99A vector containing oat from C. acetobutylicum and maa from B. subtilis	-
pMDT6	pTrc99A vector containing oat from M. abscessus and maa from B. subtilis	-
pMDT7	pTrc99A vector containing oat from L. brevis and maa from B. subtilis	-
pMDT8	pMDT2 containing gpd1 and gpp2 from S. cerevisiae	-
Strains		
MG1655	E. coli K-12; F ⁻ lambda ⁻ , ilvG ⁻ , rfb-50, rph-1	ATCC700926
DH5α	E. coli K-12; F ⁻ , Φ80lacZΔM15, Δ(lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rK ⁻ , mK ⁺) phoA, supE44, λ ⁻ , thi-1	ATCC98040
BW25113	Δ(araD-araB)567, ΔlacZ4787(::rrnB-3), lambda ⁻ , rph-1, Δ(rhaD-rhaB)568, hsdR514	NBRP, NIG
AceCo	MG1655 ΔackA-pta, poxB, ldhA, dld, adhE, pps, atoDA	Ref. 1
W3110	E. coli K-12; F ⁻ , λ ⁻ IN (rrnD-rrnE)1	ATCC27325
DH5α (DE3)	E. coli K-12; F ⁻ , Φ80lacZΔM15, Δ(lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rK ⁻ , mK ⁺) phoA, supE44, λ ⁻ , thi-1, λ(DE3)	-
JW0465	BW25113 Δaes	NBRP, NIG
DH-MD0	E. coli DH5α harboring pTrc99A	-
DH-MD1	E. coli DH5α harboring pMD1	-
DH-MD2	E. coli DH5α harboring pMD2	-
DH-MD3	E. coli DH5α harboring pMD3	-
DH-MD4	E. coli DH5α harboring pMD4	-

DH-MD 5	E. coli DH5 α harboring pMD5	-
DH-MD 6	E. coli DH5 α harboring pMD6	-
DH-MD 7	E. coli DH5 α harboring pMD7	-
DH-MD 8	E. coli DH5 α harboring pMD8	-
DH-MD 9	E. coli DH5 α harboring pMD9	-
DH-MD 10	E. coli DH5 α harboring pMD10	-
DH-MD 11	E. coli DH5 α harboring pMD11	-
DH-MD 12	E. coli DH5 α harboring pMD12	-
DH-MD 13	E. coli DH5 α harboring pMD13	-
DH-MD 14	E. coli DH5 α (DE3) harboring pMD14	-
DH-MD T1	E. coli DH5 α harboring pMDT1	-
DH-EM PT	E. coli DH5 α harboring pTrc99A	-
DH-CAT	E. coli DH5 α harboring pT-CAT	-
DH-MD T2	E. coli DH5 α harboring pMDT2	-
DH-MD T3	E. coli DH5 α harboring pMDT3	-
DH-MD T4	E. coli DH5 α harboring pMDT4	-
DH-MD T5	E. coli DH5 α harboring pMDT5	-

DH-MD T6	E. coli DH5 α harboring pMDT6	-
DH-MD T7	E. coli DH5 α harboring pMDT7	-
AC-MD T2	E. coli AceCo harboring pMDT2	-
BW-MD T2	E. coli BW25113 harboring pMDT2	-
W3-MD T2	E. coli W3110 harboring pMDT2	-
MG-MD T2	E. coli MG1655 harboring pMDT2	-
BW-Em pty	E. coli BW25113 harboring pTrc99A	-
BW-Aes	E. coli BW25113 harboring pT-Aes	-
BW-MD T2 (<i>Daes</i>)	E. coli JW0465 harboring pMDT2	-
DH-MD T8	E. coli DH5 α harboring pMDT8	-

- [161] Ref. 1. Kim, J.-H. et al. Isoprene production by *Escherichia coli* through the exogenous mevalonate pathway with reduced formation of fermentation byproducts. *Microbial Cell Factories* 15, 214 (2016).

[162]

[표 2]

Primers ^{a, b, c}	Descriptions (5'→ 3')	서열번호
Ec-lacA-F	CT <u>GGATCC</u> AGGAGGTAATAAA ATGGAACATGCCAATGACCG	33
Ec-lacA-R	GTT <u>TCTAGAT</u> TAAACTGACGATTCAACTTTATAATC	34
Ec-cysE-F	CT <u>GGATCC</u> AGGAGGTAATAAA ATGTCGTGTGAAGAACTGGAAATTG	35
Ec-cysE-R	GTT <u>TCTAGAT</u> TAGATCCCATCCCCATACTC	36
Ec-yjgM-F	CT <u>GGATCC</u> AGGAGGTAATAAA ATGAATAACATTGCGCCGC	37
Ec-yjgM-R	GTT <u>TCTAGAT</u> TAGAGTTCGCGCAACATCC	38
Ec-yjaB-F	CT <u>GGATCC</u> AGGAGGTAATAAA ATGGTTATTAGTATTCGCCGCTC	39
Ec-yjaB-R	GTT <u>TCTAGAT</u> TACGCCCCCACATACGC	40
Ec-yiiD-F	CT <u>GGATCC</u> AGGAGGTAATAAA ATGAGCCAGCTTCCAGGG	41
Ec-nhoA-F	CT <u>GGATCC</u> AGGAGGTAATAAA ATGACGCCCATTCTGAATCAC	42
Ec-nhoA-R	GTT <u>TCTAGAT</u> TATTTTCCCGCCTCCGGG	43
Ec-wecH-F	CT <u>GGATCC</u> AGGAGGTAATAAA ATGCAGCCCAAAATTTACTGG	44
Ec-WecH-R	GTT <u>TCTAGAT</u> TAACTCACTAATCTGTTTCTGTCTG	45
Ec-yiiD-R	GTT <u>TCTAGAT</u> TACTCTTCTTCGTTCCCGC	46
Ec-maa-F	CT <u>GGATCC</u> AGGAGGTAATAAA ATGAGCACAGAAAAAGAAAAGATG	47
Ec-maa-R	GTT <u>TCTAGAT</u> TACAATTTTTTAATTATTCTGGCTG	48
Sc-maa-F	CT <u>GGATCC</u> AGGAGGTAATAAA ATGACCACCGAGAAGGAAAAAATG	49
Sc-maa-R	GTT <u>TCTAGAT</u> TAATCCAGCGGCACTTCAC	50
Hj-maa-F	CT <u>GGATCC</u> AGGAGGTAATAAA ATGACCAGCGAGAAGGAACG	51

Hj-maa-R	GTT <u>TCTAGAT</u> TAATCAACGTCCTTCAGCACA	52
Lb-maa-F	CT <u>GGATCC</u> AGGAGGTAATAAA ATGGACAAGAGCGAGAAGG	53
Lb-maa-R	GTT <u>TCTAGAT</u> TATTTCAGCGGCTTAATCAC	54
Pp-maa-F	CT <u>GGATCC</u> AGGAGGTAATAAA ATGAGCCTGAGCGAGAAGCAC	55
Pp-maa-R	GTT <u>TCTAGAT</u> TATTGACCCTGATCCGGCTG	56
Bs-maa-F	CT <u>GGATCC</u> AGGAGGTAATAAA ATGCTGCGTACCGAGAAGG	57
Bs-maa-R	GTT <u>TCTAGAT</u> TACAGTTGTTTCAGAATACGCGC	58
Cat-F	CTAG <u>GAGCTC</u> AGGAGAAATATA ATGGAGAAAAAATCACTGGATATAC	60
Cat-R	CT <u>GGATCCT</u> TACGCCCCGCCCTGCC	61
Trc-Bs.maa-F	AGATCT GAGTCGACAGTATCGGCGGG	62
Trc-Bs.maa-R	TATATTTCTCCT GAGGATCCCCGGGTACCG	63
Bc-Oat-F	CTCGGTACCCGG <u>GGATCC</u> TCAGGAGAAATATA ATGGA CTTCACCAGATC	64
Bc-Oat-R	CCCGCCGATACT <u>GTTCGACAGATCT</u> TACAGCCATTC CTCAAAG	65
Ca-Oat-F	CTCGGTACCCGG <u>GGATCC</u> TCAGGAGAAATATA ATGAACAGCAACTTCCAC	66
Ca-Oat-R	CCCGCCGATACT <u>GTTCGACAGATCT</u> TAAACGAATCCA CTCTTTC	67
Lb-Oat-F	CTCGGTACCCGG <u>GGATCC</u> TCAGGAGAAATATA ATGACCGAGCTGAACACCC	68
Lb-Oat-R	CCCGCCGATACT <u>GTTCGACAGATCT</u> TACGCGGTCAG CCACAG	69
Ma-Oat-F	CTCGGTACCCGG <u>GGATCC</u> TCAGGAGAAATATA ATGCCGGCGGAGCACGCG	70
Ma-Oat-R	CCCGCCGATACT <u>GTTCGACAGATCT</u> TAATCACGAAC CCAATCCGGGTCCG	71

Pa-Oat-F	CTCGGTACCCGG <u>GGATCC</u> TCAGGAGAAATATA ATGAGCTACACCCGTGTTG	72
Pa-Oat-R	CCCGCCGATACT<u>GTTCGACAGATCT</u>TAGCCACCCGC TTCATC	73
Ec-aes-F	CTGGATCC <i>GTCACCCAACCCTTT</i> ATGAAGCCGGAAAACAACTACC	74
Ec-aes-R	TATC <u>GTGACT</u> TAAAGCTGAGCGGTAAAGAACTG	75
Sc-gpd1-F	GC <u>GGATCC</u> AGGAGGTAATAAAA TGTCTGCTGCTGCTGATAGATTAAAC	76
Sc-gpd1-R	AATG <u>CTGCAG</u> TTAATCTTCATGTAGATCTAATTCTTCAATC	59
Sc-gpp2-F	TG <u>CTGCAG</u> AGGAGGTAATTTAT ATGGGATTGACTACTAAACCTCTATC	22
Sc-gpp2-R	CCC <u>AAGCTT</u> ACCATTTC AACAGATCGTCC	23

[163] ^aRestriction enzyme sites are underlined. ^bRBS sequences are italic. ^cThe overlapping sequences are bolded.

[164]

[165] 실시예

[166] 1. 대장균 유래 **O-acetyltransferases** 효소들을 이용한 모노아세틴과 다이아세틴 생산

[167] 모노아세틴과 다이아세틴을 생산하기 위해서 글리세롤에 아세틸기를 전이할 수 있는 대장균 내의 O-acetyltransferases 후보 유전자들을 8종 선별하고 각 유전자들을 pTrc99A 발현벡터(서열번호 78)에 클로닝해서 플라스미드 pMD1 - pMD8를 구축하였다. 후보 유전자들은 galactoside O-acetyltransferase, maltose O-acetyltransferase(서열번호 1), serine acetyltransferase, O-acetyltransferase WecH, arylamine N-acetyltransferase를 각각 코딩하는 *lacA*(서열번호 80), *maa*(서열번호 16), *cysE*(서열번호 81), *wecH*(서열번호 82), *nhoA*(서열번호 83)와 3종의 O-acetyltransferase 추정 유전자 *yjgm*(서열번호 84), *yjaB*(서열번호 85), *yiiD*(서열번호 86)를 대장균 MG1655의 염색체를 주형으로 해서 PCR 증폭을 통해서 얻었다. 이 때 사용한 PCR primer들은 Ec-lacA-F(서열번호 33)/Ec-lacA-R(서열번호 34), Ec-maa-F(서열번호 47)/Ec-maa-R(서열번호 48), Ec-cysE-F(서열번호 35)/Ec-cysE-R(서열번호 36), Ec-wecH-F(서열번호 44)/Ec-wecH-R(서열번호 45), Ec-nhoA-F(서열번호 42)/Ec-nhoA-R(서열번호 43), Ec-yjgm-F(서열번호 37)/Ec-yjgm-R(서열번호 38), Ec-yjaB-F(서열번호 39)/Ec-yjaB-R(서열번호 40), Ec-yiiD-F(서열번호 41)/Ec-yiiD-R(서열번호 46)이다.

상기 PCR 반응산물은 BamHI과 XbaI을 이용해서 pTrc99A 벡터에 클로닝 되었다. 이렇게 구축한 플라스미드 pDM1 - pDM8로 대장균 DH5 α 를 형질전환해서 재조합균주 DH-MD1 ~ DH-MD8을 만들고 모노아세틴 및 다이아세틴 생성을 분석하였다(도 3).

[168] 종 배양은 LB 복합배지(10 g tryptone, 5 g yeast extract and 10 g sodium chloride per liter)를 이용해서 37°C에서 약 12시간 진탕 배양을 했다. 본 배양은 M9 최소배지($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 12.8 g/L; KH_2PO_4 , 3g/L; NaCl, 0.5 g/L; NH_4Cl , 1 g/L; MgSO_4 , 1mM; CaCl_2 , 100 mM)에 5 g/L의 yeast extract와 2% (v/v)의 glycerol을 첨가하고, 배양온도 37°C와 진탕속도 250rpm에서 48시간 동안 진행했다. 재조합균주에 도입된 플라스미드의 항생제 마커에 따라서 100 mg/L ampicillin, 50 mg/L chloramphenicol, 또는 50 mg/L kanamycin 항생제를 첨가했다. 본 배양의 초기 균체 농도는 OD_{600nm}에서 0.1이 되게 하였고, 플라스미드에 도입한 유전자들의 발현을 위해서 0.5 mM Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)를 배양 초기에 첨가하였다.

[169] 아세틴 화합물의 분석은 HP-INNOVAX column (19091N-133, 30 m in length, 0.250 mm in internal diameter and 0.25 μm film thicknesses)이 장착된 GC (Agilent Technologies 7890A, 미국)와 GC-MS (GC-MS-QP2010, SHIMADZU, 일본)를 이용했다. 아세틴 표준화합물은 Sigma (미국)에서 구입하였다. 본 배양에서 생산된 아세틴 복합물은 ethyl acetate 용매를 이용해서 배양액으로부터 추출하고, 추출 시료의 1 μL 를 GC 또는 GC-MS에 주입하였다. GC의 오븐 온도는 50°C에서 시작해서 20°C/min의 속도로 90°C까지, 15°C/min의 속도로 150°C까지, 20°C/min의 속도로 190°C까지, 15°C/min의 속도로 230°C까지 올리고, 2 분간 유지하였다. 불꽃 이온 검출기(FID)의 온도는 280°C로 유지했다. 상기 분석방법에 따른 분석결과는 도 5에 나타내었다.

[170] 도 3의 재조합균주 DH-MD1 ~ DH-MD8의 배양결과에 따르면 pMD8 플라스미드로 형질전환된 DH-MD8 균주에서만 모노아세틴과 다이아세틴이 생산되었다. 이것은 대장균 유래 8종의 O-acetyltransferases 후보 유전자들 중에서 maltose O-acetyltransferase 유전자(*maa*)만이 글리세롤에 아세틸기를 전이할 수 있는 능력이 있다는 것이다.

[171]

[172] **2. 대장균 Maa 유사 효소들을 이용한 모노아세틴 생산**

[173] 대장균에서 발굴된 Maa 보다 더 우수한 활성을 갖는 O-acetyl transferases를 발굴하기 위해서 대장균 Maa의 아미노산 서열로 BLAST 검색을 하고, *Staphylococcus carnosus*, *Halalkalicoccus jeotgali*, *Lactobacillus brevis*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas putida* 미생물로부터 추가로 5종의 maltose O-acetyl transferases(Sc-mOat(서열번호 2), Hj-mOat(서열번호 3), Lb-mOat(서열번호 4), Bs-mOat(서열번호 5), Pp-mOat(서열번호 6))를 확보하고 이들을 대장균에 발현한 후에 모노아세틴과 다이아세틴 생산성을 비교했다(도 3).

- [174] 상기 미생물 유래 유전자들은 숙주인 대장균에서의 발현을 최적화하기 위해서 GenScript (미국)에서 대장균 코돈 이용도에 맞춰서 합성을 했다. 상기 합성한 유전자들을 Sc-maa-F(서열번호 49)/Sc-maa-R(서열번호 50), Hj-maa-F(서열번호 51)/Hj-maa-R(서열번호 52), Lb-maa-F(서열번호 53)/Lb-maa-R(서열번호 54), Pp-maa-F(서열번호 55)/Pp-maa-R(서열번호 56), Bs-maa-F(서열번호 57)/Bs-maa-R(서열번호 58)의 PCR primers를 이용해서 증폭하여 얻은 *Sc-maa* (서열번호 17), *Hj-maa* (서열번호 18), *Lb-maa* (서열번호 19), *Pp-maa* (서열번호 21), *Bs-maa* (서열번호 20) 유전자를 BamHI과 XbaI을 이용해서 pTrc99A 벡터에 클로닝 하였다. 이렇게 구축한 플라스미드 pMD9 - pMD13로 대장균 DH5 α 를 형질전환해서 재조합균주 DH-MD9 ~ DH-MD13을 만들고 모노아세틴과 다이아세틴 생산성을 비교하였다(도 3).
- [175] 비교 결과 *B. subtilis*의 Maa (*Bs-maa*)가 가장 높은 모노아세틴과 다이아세틴 생산성을 보인 것을 확인하였다. 배양방법과 분석방법은 실시예 1과 동일하다.
- [176]
- [177] **3. Chloramphenicol-O-acetyltransferase를 이용한 트리아세틴 생산**
- [178] 모노아세틴과 다이아세틴 생산성이 가장 좋았던 *B. subtilis*의 Maa 유전자(*Bs-maa*)의 발현 최적화를 위해서 pTrc99A(서열번호 78), pET28a(서열번호 79), pSTV28(서열번호 77) 등의 다양한 발현벡터에 클로닝해서 pMD13, pMD14, pMDT1) 플라스미드를 구축하고, 이 플라스미드들로 형질전환 된 재조합 대장균 DH-MD13, DH-MD14, DH-MDT1를 만들었다. T7 프로모터를 갖는 pMD14의 형질전환 숙주 균주로는 대장균 DH5 α (DE3)를 이용했다. DH5 α (DE3) 균주는 Novagen 회사(미국)의 λ DE3 Lysogenization Kit를 이용해서 대장균 DH5 α 로부터 만들었다. DH-MDT1 균주에서 모노아세틴과 다이아세틴 생산성이 가장 높았을 뿐만 아니라 트리아세틴의 생산까지 관찰되었다(도 4).
- [179] 이것은 pSTV28 벡터의 항생제 마커인 chloramphenicol-O-acetyltransferase (CAT, 서열번호 7)에 의한 것으로 추정된다. CAT은 광범위한 기질특이성을 갖고 있어서 다양한 기질들에 아세틸기를 전이시키는 것으로 알려져 있다. 모노아세틴과 다이아세틴에 추가적인 아세틸기 전이를 통해 트리아세틴(triacetin)을 생산하는 CAT 효소 유전자(*cat*, 서열번호 24)의 발현을 강화하기 위해서 pMD13 플라스미드의 *Bs-maa* 유전자 앞에 도입한 pMDT2 플라스미드를 구축하였다(도 6).
- [180] 이를 위해서 Cat-F(서열번호 60)/Cat-R(서열번호 61)의 PCR primers를 이용해서 pSTV28로부터 *cat* 유전자를 PCR 증폭하고, SacI과 BamHI으로 절단해서 pMD13의 해당 제한효소 부위로 도입하였다. pMDT2로 형질전환 된 DH-MDT2 재조합균주의 모노아세틴, 다이아세틴, 트리아세틴의 복합물 생산량과 트리아세틴의 비율이 모두 DH-MDT1 균주에 비해서 크게 증가했다. 배양방법과 분석방법은 실시예 1과 동일하다.

[181]

- [182] **4. CAT 유사 효소들을 이용한 트리아세틴 화합물 생산**
- [183] 모노아세틴과 다이아세틴을 트리아세틴으로 전환하는 효소들을 추가로 발굴하기 위해서 CAT 효소의 아미노산 서열로 BLAST 검색을 실시하였다. 이 검색을 통해서 상동성이 높은 5종의 O-acetyltransferases (OAT, Bc-OAT(서열번호 8), Pa-OAT(서열번호 9), Ca-OAT(서열번호 10), Ma-OAT(서열번호 11), Lb-OAT(서열번호 12))를 *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium acetobutylicum*, *Mycobacterium abscessus*, *Lactobacillus brevis*에서 도출하고 숙주인 대장균에서의 발현을 최적화하기 위해서 GenScript 회사(미국)에서 대장균 코돈 이용도에 맞춰서 합성을 했다.
- [184] 상기 미생물 유래 OAT 합성 유전자들(*Bc-Oat*(서열번호 25), *Pa-Oat*(서열번호 26), *Ca-Oat*(서열번호 27), *Ma-Oat*(서열번호 28), *Lb-Oat*(서열번호 29))을 Bc.Oat-F(서열번호 64)/Bc.Oat-R(서열번호 65), Pa.Oat-F(서열번호 72)/Pa.Oat-R(서열번호 73), Ca.Oat-F(서열번호 66)/Ca.Oat-R(서열번호 67), Ma.Oat-F(서열번호 70)/Ma.Oat-R(서열번호 71), Lb.Oat-F(서열번호 68)/Lb.Oat-R(서열번호 69)의 PCR primers를 이용해서 증폭한다.
- [185] 이렇게 증폭한 각 유전자들의 단편은 pMD13 기반의 플라스미드 골격과 HiFi DNA assembly 방법으로 연결해서 플라스미드 pMDT3 ~ pMDT7을 구축하였다(도 7).
- [186] HiFi DNA assembly는 NEB 회사(미국)의 HiFi DNA assembly kit를 이용했고, 상기 pMD13 기반의 플라스미드 골격은 pMD13을 주형으로 Trc-Bs.maa-F(서열번호 62)와 Trc-Bs.maa-R(서열번호 63)를 PCR primer로 PCR을 수행해서 얻었다. pMDT3 ~ pMDT7 플라스미드로 형질전환 된 재조합균주 DH-MDT2 ~ DH-MDT7의 아세틴 복합물 생산량을 비교하였다(도 7).
- [187] 그 결과 OAT 유전자 종류에 따라서 아세틴 복합물의 생산량에 큰 차이가 있었고, *L. brevis*와 *M. abscessus* 유래의 O-acetyltransferase는 트리아세틴 생산 능력이 없었고, *B. cereus*, *P. aeruginosa*, *C. acetobutylicum*의 유래의 O-acetyltransferase는 트리아세틴을 생산했지만 pSTV28의 항생제 마커인 CAT에 비해서는 생산성이 낮았다. 배양방법과 분석방법은 실시예 1과 동일하다.
- [188]
- [189] **5. 대장균 균종 및 글리세롤 첨가량에 따른 아세틴 복합물 생성량 변화**
- [190] 앞의 실시예들에서 숙주로 대장균 DH5 α 를 이용했다. 대장균의 종류에 따른 아세틴 화합물의 생산성을 비교하기 위해서 본 실시예에서는 숙주로 대장균 AceCo, BW25113, W3110, MG1655를 플라스미드 pMDT2로 형질전환 한 재조합 대장균 DH-MDT2, AC-MDT2, BW-MDT2, W3-MDT2, MG-MDT2를 배양해서 아세틴 복합물 생산성을 비교했다(도 8A, 8B).
- [191] 재조합균주 MG-MDT2에서 아세틴 복합물 생산성이 가장 높았기 때문에 대장균 MG1655가 아세틴 화합물 생산에 가장 적합한 숙주라는 것을 알았다. 배양방법과 분석방법은 실시예 1과 동일하다.

- [192] 가장 높은 아세틴 화합물 생산성을 보인 재조합균주 MG-MDT2에서 기질인 글리세롤 첨가량에 따른 아세틴 화합물 생산성을 고찰하기 위해서 모든 배양조건과 분석방법은 실시예1과 동일하고 다만 첨가하는 글리세롤의 농도를 2 ~ 15% (v/v)로 변화시켰다(도 8C, 8D).
- [193] 아세틴 복합물의 생산량은 출발기질인 글리세롤의 첨가량이 증가할수록 높아졌으나, 15% 이상의 과도한 글리세롤 첨가의 경우에는 과도한 삼투압 증가의 영향으로 균체 증식과 아세틴 생산이 모두 감소하는 결과를 얻었다.
- [194]
- [195] **6. 아세틴 화합물을 분해하는 효소 유전자 제거를 통한 생산성 향상**
- [196] 에스터 화합물인 아세틴은 에스터 결합 분해 효소(esterases, 서열번호 13)에 의해서 글리세롤과 아세테이트로 분해될 수 있기 때문에 대장균의 acetyltransferase 효소 유전자(*aes*, 서열번호 30)의 증폭 또는 결손의 영향을 고찰했다(도 9).
- [197] *Aes* 유전자 단편은 대장균 MG1655의 염색체를 주형으로 Ec-*aes*-F(서열번호 74)와 Ec-*aes*-R(서열번호 75)을 프라이머로 이용해서 PCR 증폭해서 얻었고, BamHI과 SalI 제한효소로 pTrc99A에 클로닝 해서 플라스미드 pTAes를 구축하였다. *Aes* 효소에 의한 트리아세틴의 분해를 관찰하기 위해서 대장균 BW25113을 공벡터 pTrc99A와 플라스미드 pTAes로 형질전환한 재조합균주 BW-Empty와 BW-*Aes*를 제조하고, 트리아세틴 표준화합물 15 g/L가 첨가된 배지에서 배양하였다. 배양조건은 상기 실시 예들에서 이용한 아세틴 복합물 생산조건과 동일하게 수행하였다(도 9A, 9B).
- [198] BW-Empty와 BW-*Aes* 균주에서 모두 트리아세틴 표준화합물의 분해가 일어났지만 분해의 정도는 *aes* 유전자를 과발현시킨 BW-*Aes*에서 훨씬 더 큰 것을 확인했다. 트리아세틴의 분해로 배양액에는 소량의 다이아세틴이 측정되었지만 모노아세틴은 검출되지 않았다. 이것은 모노아세틴의 분해가 더 빠르게 일어나기 때문인 것으로 추정된다.
- [199] *Aes*가 아세틴 화합물을 분해한다는 상기 결과로부터 유전자 *aes*가 결손된 JW0465와 야생형 균주인 BW25113을 pMDT2로 형질전환 해서 재조합균주 BW-MDT2와 BW-MDT2 (*Daes*)를 제조하고, 이들 재조합 균주들에서의 아세틴 복합물 생산과 균체 증식을 비교했다(도 9C, 9D).
- [200] JW0465 균주는 BW25113 균주에서 *aes* 유전자가 결손된 균주로 NBRP (NIG, 일본)에서 분양을 받았다. 기질인 글리세롤을 10% (v/v) 첨가한 2YT 복합배지(16 g tryptone, 10 g yeast extract, and 5 g sodium chloride per liter)에서 배양을 했고, 기타 배양 및 분석조건은 상기 실시 예들과 동일하게 실시하였다.
- [201] *Aes*가 결손된 BW-MDT2 (*Daes*) 균주에서 아세틴의 분해가 차단됨으로써 아세틴 복합물 생산량이 BW-MDT2 균주에 비해서 약 2배 이상 높은 것을 확인했다. 반면에 두 재조합 균주의 균체 증식에서는 차이가 없었다. 이 결과로부터 *Aes*가 아세틴 화합물의 분해에 관련되고, 이 유전자를 결손하면 아세틴 복합물의 생산성을 향상시킬 수 있다는 것을 알았다.

[202]

[203] 7. 포도당을 기질로 이용한 아세틴 화합물의 생산

[204] 도 2에 제시한 바와 같이 해당경로(Embden-Meyerhof pathway)의 중간 대사산물인 글리세론 인산(glycerone phosphate, DHAP)은 글리세롤 3-인산 탈수소효소(glycerol-3-phosphate dehydrogenase)와 글리세롤 3-탈인산효소(DL-glycerol-3-phosphatase)에 의해 글리세롤 3-인산을 거쳐서 글리세롤로 전환될 수 있다. 따라서 포도당을 출발기질로 하는 아세틴 복합물의 생산도 글리세롤 3-인산 탈수소효소와 글리세롤 3-탈인산효소의 추가 과발현을 통해서 가능하다. 글리세롤 3-인산 탈수소효소와 글리세롤 3-탈인산효소로 사카라마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) 유래의 Gpd1(서열번호 14)과 Gpp2(서열번호 15)를 이용했다.

[205] 도 10은 포도당으로부터 아세틴 복합물 생산을 위해서 사카라마이세스 세레비지애 유래 글리세롤 생산 유전자인 *Sc-gpd1*(서열번호 31)과 *Sc-gpp2*(서열번호 32)를 pMDT2 플라스미드에 클로닝해서 만들어진 플라스미드 pMDT8의 구조 도면(A)과 이 플라스미드로 형질전환 된 재조합 대장균 DH-MDT8의 포도당으로부터의 아세틴 복합물 생산과 균체 증식, 배양액의 pH변화를 대조구인 DH-MDT2와 비교한 도면(B), 도면(C), 도면(D)를 나타내고 있다.

[206] 사카라마이세스 세레비지애의 염색체를 주형으로 *Sc-gpd1*-F(서열번호 76)와 *Sc-gpd1*-R(서열번호 59)을 프라이머로 이용해서 *Sc-gpd1*을 PCR 증폭하고, *Sc-gpp2*-F(서열번호 22)와 *Sc-gpp2*-R(서열번호 23)을 프라이머로 이용해서 *Sc-gpp2*을 PCR 증폭해서, 전자는 BamHI과 PstI 제한효소로, 후자는 PstI과 HindIII 제한효소로 절단해서 pMDT2 플라스미드의 해당 제한효소 부위로 도입해서 플라스미드 pMDT8를 구축했다. 배양은 재조합균주 DH-MDT2와 DH-MDT8을 글리세롤 대신에 포도당 1% (w/v)를 첨가한 2YT 복합배지에서 접종해서 48시간 동안 진행했다. 기타 배양 및 분석조건은 상기 실시 예와 동일하게 수행했다.

[207] 두 재조합 균주 중에서 유전자 *Sc-gpd1*과 *Sc-gpp2*가 발현된 DH-MDT8 균주에서만 아세틴 복합물이 생산되었고, 균체 증식 및 배양액의 pH는 유사했다.

청구범위

- [청구항 1] 제1 O-아세틸 전이효소(O-acetyl transferase) 존재 하에 아세틸-CoA와 글리세롤을 반응시켜 모노아세틴 또는 다이아세틴을 얻는 단계;를 포함하는 아세틴의 제조 방법.
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서, 상기 제1 O-아세틸 전이효소는 말토오스 O-아세틸 전이효소인, 아세틴의 제조 방법.
- [청구항 3] 청구항 1에 있어서, 상기 제1 O-아세틸 전이효소는 서열번호 5의 아미노산 서열의 위치 70에 상응하는 위치의 아미노산이 아스파르트산(ASP)이고, 위치 84에 상응하는 위치의 아미노산이 아스파라긴(ASN)이고, 위치 114에 상응하는 위치의 아미노산이 히스티딘(HIS)이고, 위치 126에 상응하는 위치의 아미노산이 글루탐산(GLU)인, 아세틴의 제조 방법.
- [청구항 4] 청구항 3에 있어서, 상기 제1 O-아세틸 전이효소는 서열번호 5의 아미노산 서열의 위치 15에 상응하는 위치의 아미노산이 티로신(TYR) 또는 페닐알라닌(PHE)이고, 위치 26에 상응하는 위치의 아미노산이 아르기닌(ARG) 또는 글루타민(GLN)이고, 위치 30에 상응하는 위치의 아미노산이 아르기닌(ARG) 또는 리신(LYS)이고, 위치 71에 상응하는 위치의 아미노산이 티로신(TYR)이고, 위치 82에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 티로신(TYR)인 아세틴의 제조 방법.
- [청구항 5] 청구항 1에 있어서, 상기 제1 O-아세틸 전이효소는 서열번호 1 내지 6 중 어느 하나의 서열로 이루어진 것인, 아세틴의 제조 방법.
- [청구항 6] 청구항 1에 있어서, 클로람페니콜-O-아세틸 전이효소(Chloramphenicol-O-acetyltransferase) 또는 제2 O-아세틸 전이효소 존재 하에 상기 반응 생성물인 다이아세틴을 아세틸-CoA와 반응시켜 트리아세틴을 얻는 단계;를 더 포함하는, 아세틴의 제조 방법.
- [청구항 7] 청구항 6에 있어서, 상기 제2 O-아세틸 전이효소는 서열번호 7의 아미노산 서열의 위치 31에 상응하는 위치의 아미노산이 시스테인(CYS) 또는 류신(LEU)이고, 위치 102에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 이소류신(ILE)이고, 위치 143에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 타이로신(TYR)이고, 위치 166에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 타이로신(TYR)이고, 위치 170에 상응하는 위치의 아미노산이 발린(VAL), 이소류신(ILE), 또는 류신(LEU)이고, 위치 193에 상응하는 위치의 아미노산이 히스티딘(HIS)인, 아세틴의 제조 방법.
- [청구항 8] 청구항 6에 있어서, 상기 클로람페니콜-O-아세틸 전이효소(Chloramphenicol-O-acetyltransferase)는 서열번호 7의 서열로 이루어지고, 제2 O-아세틸 전이효소는 서열번호 8 내지 10 중 어느 하나의

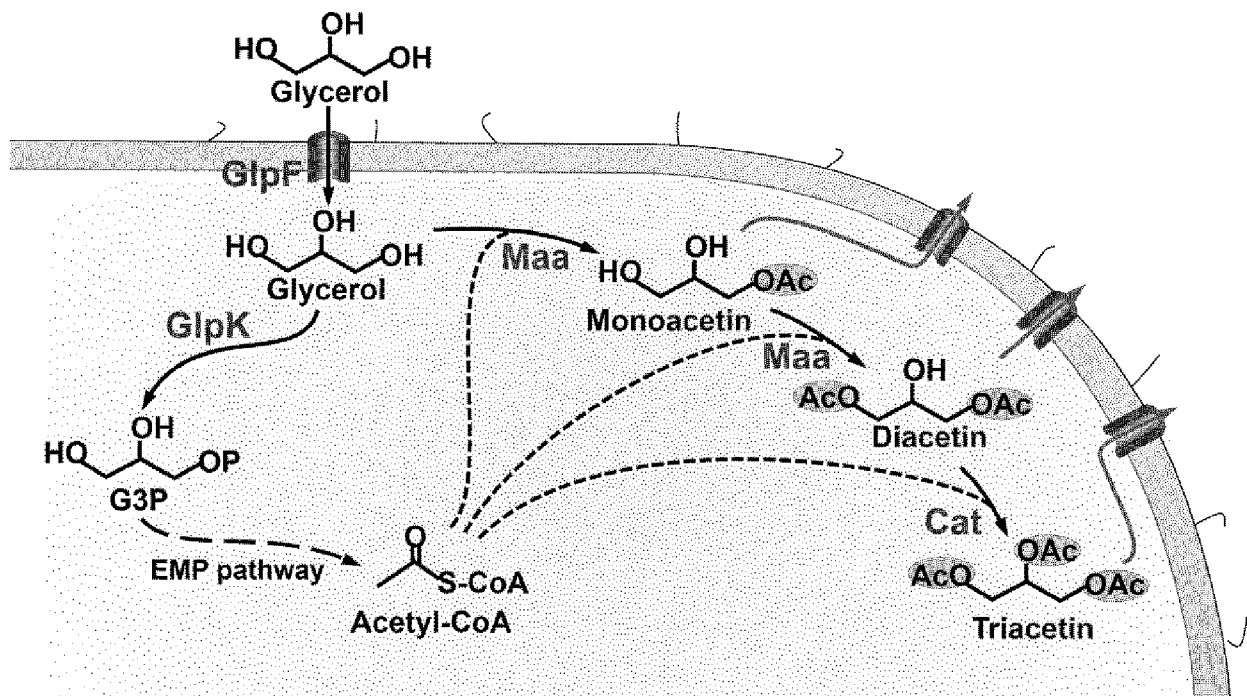
- 서열로 이루어진 것인, 아세틴의 제조 방법.
- [청구항 9] 제1 O-아세틸 전이효소(O-acetyl transferase)를 코딩하는 유전자를 발현하는 미생물을 글리세롤을 포함하는 배지 중에서 배양하는 단계;를 포함하는 아세틴의 제조 방법.
- [청구항 10] 청구항 9에 있어서, 상기 제1 O-아세틸 전이효소는 말토오스 O-아세틸 전이효소인, 아세틴의 제조 방법.
- [청구항 11] 청구항 9에 있어서, 상기 제1 O-아세틸 전이효소는 서열번호 5의 아미노산 서열의 위치 70에 상응하는 위치의 아미노산이 아스파르트산(ASP)이고, 위치 84에 상응하는 위치의 아미노산이 아스파라긴(ASN)이고, 위치 114에 상응하는 위치의 아미노산이 히스티딘(HIS)이고, 위치 126에 상응하는 위치의 아미노산이 글루탐산(GLU)인, 아세틴의 제조 방법.
- [청구항 12] 청구항 9에 있어서, 상기 제1 O-아세틸 전이효소는 서열번호 5의 아미노산 서열의 위치 15에 상응하는 위치의 아미노산이 티로신(TYR) 또는 페닐알라닌(PHE)이고, 위치 26에 상응하는 위치의 아미노산이 아르기닌(ARG) 또는 글루타민(GLN)이고, 위치 30에 상응하는 위치의 아미노산이 아르기닌(ARG) 또는 리신(LYS)이고, 위치 71에 상응하는 위치의 아미노산이 티로신(TYR)이고, 위치 82에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 티로신(TYR)인, 아세틴의 제조 방법.
- [청구항 13] 청구항 9에 있어서, 상기 제1 O-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자는 서열번호 16 내지 21의 서열 중 어느 하나의 서열로 이루어진 것인, 아세틴의 제조 방법.
- [청구항 14] 청구항 9에 있어서, 상기 미생물은 다이아세틴에 아세틸기를 전이하는 클로람페니콜-O-아세틸 전이효소(Chloramphenicol-O-acetyltransferase) 또는 제2 O-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자를 더 발현하는 것인, 아세틴의 제조 방법.
- [청구항 15] 청구항 14에 있어서, 상기 제2 O-아세틸 전이효소는 서열번호 7의 아미노산 서열의 위치 31에 상응하는 위치의 아미노산이 시스테인(CYS) 또는 류신(LEU)이고, 위치 102에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 이소류신(ILE)이고, 위치 143에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 타이로신(TYR)이고, 위치 166에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 타이로신(TYR)이고, 위치 170에 상응하는 위치의 아미노산이 발린(VAL), 이소류신(ILE), 또는 류신(LEU)이고, 위치 193에 상응하는 위치의 아미노산이 히스티딘(HIS)인, 아세틴의 제조 방법.
- [청구항 16] 청구항 14에 있어서, 상기 클로람페니콜-O-아세틸 전이효소(Chloramphenicol-O-acetyltransferase)를 코딩하는 유전자는 서열번호 24의 서열로 이루어지고, 제2 O-아세틸 전이효소를 코딩하는

- 유전자는 서열번호 25 내지 27 중 어느 하나의 서열로 이루어진 것인, 아세틴의 제조 방법.
- [청구항 17] 청구항 9에 있어서, 상기 미생물은 아세틸에스테라제(acetyl esterase)를 코딩하는 유전자가 감쇄 또는 결실된 것인, 아세틴의 제조 방법.
- [청구항 18] 청구항 9에 있어서, 상기 미생물은 글리세롤 3-인산 탈수소효소(glycerol-3-phosphate dehydrogenase) 및 글리세롤 3-탈인산효소(DL-glycerol-3-phosphatase)를 코딩하는 유전자를 더 발현하고, 상기 배지는 포도당을 포함하는 것인, 아세틴의 제조 방법.
- [청구항 19] 제1 O-아세틸 전이효소(O-acetyl transferase)를 코딩하는 유전자를 발현하는 미생물을 포함하는 아세틴 제조용 조성물.
- [청구항 20] 청구항 19에 있어서, 상기 제1 O-아세틸 전이효소는 말토오스 O-아세틸 전이효소인, 아세틴 제조용 조성물.
- [청구항 21] 청구항 19에 있어서, 상기 제1 O-아세틸 전이효소는 서열번호 5의 아미노산 서열의 위치 70에 상응하는 위치의 아미노산이 아스파르트산(ASP)이고, 위치 84에 상응하는 위치의 아미노산이 아스파라긴(ASN)이고, 위치 114에 상응하는 위치의 아미노산이 히스티딘(HIS)이고, 위치 126에 상응하는 위치의 아미노산이 글루탐산(GLU)인, 아세틴 제조용 조성물.
- [청구항 22] 청구항 19에 있어서, 상기 제1 O-아세틸 전이효소는 서열번호 5의 아미노산 서열의 위치 15에 상응하는 위치의 아미노산이 티로신(TYR) 또는 페닐알라닌(PHE)이고, 위치 26에 상응하는 위치의 아미노산이 아르기닌(ARG) 또는 글루타민(GLN)이고, 위치 30에 상응하는 위치의 아미노산이 아르기닌(ARG) 또는 리신(LYS)이고, 위치 71에 상응하는 위치의 아미노산이 티로신(TYR)이고, 위치 82에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 티로신(TYR)인, 아세틴 제조용 조성물.
- [청구항 23] 청구항 19에 있어서, 상기 제1 O-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자는 서열번호 16 내지 21 중 어느 하나의 서열로 이루어진 것인, 아세틴 제조용 조성물.
- [청구항 24] 청구항 17에 있어서, 상기 미생물은 다이아세틴에 아세틸기를 전이하는 클로람페니콜-O-아세틸 전이효소(Chloramphenicol-O-acetyltransferase) 또는 제2 O-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자를 더 발현하는 것인, 아세틴 제조용 조성물.
- [청구항 25] 청구항 24에 있어서, 상기 제2 O-아세틸 전이효소는 서열번호 7의 아미노산 서열의 위치 31에 상응하는 위치의 아미노산이 시스테인(CYS) 또는 류신(LEU)이고, 위치 102에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 이소류신(ILE)이고, 위치 143에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 타이로신(TYR)이고, 위치 166에

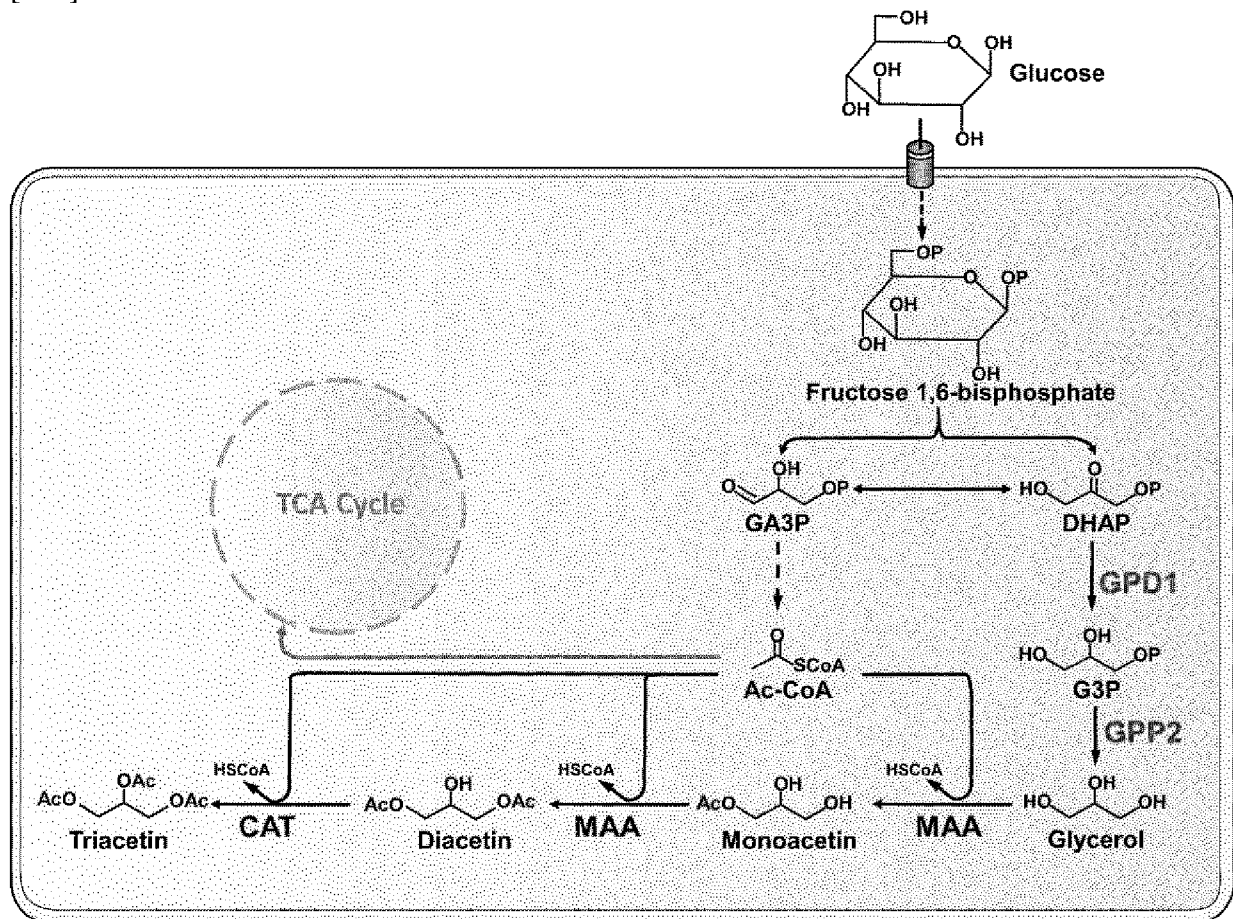
상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 타이로신(TYR)이고, 위치 170에 상응하는 위치의 아미노산이 발린(VAL), 이소류신(ILE), 또는 류신(LEU)이고, 위치 193에 상응하는 위치의 아미노산이 히스티딘(HIS)인, 아세틴 제조용 조성물.

- [청구항 26] 청구항 24에 있어서, 상기 클로람페니콜-O-아세틸 전이효소(Chloramphenicol-O-acetyltransferase)를 코딩하는 유전자는 서열번호 24의 서열로 이루어지고, 제2 O-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자는 서열번호 25 내지 27 중 어느 하나의 서열로 이루어진 것인, 아세틴 제조용 조성물.
- [청구항 27] 청구항 19에 있어서, 상기 미생물은 아세틸에스테라제(acetylcetase)를 코딩하는 유전자가 감쇄 또는 결실된 것인, 아세틴 제조용 조성물.
- [청구항 28] 청구항 19에 있어서, 상기 미생물은 글리세롤 3-인산 탈수소효소(glycerol-3-phosphate dehydrogenase) 및 글리세롤 3-탈인산효소(DL-glycerol-3-phosphatase)를 코딩하는 유전자를 더 발현하는 것인, 아세틴 제조용 조성물.

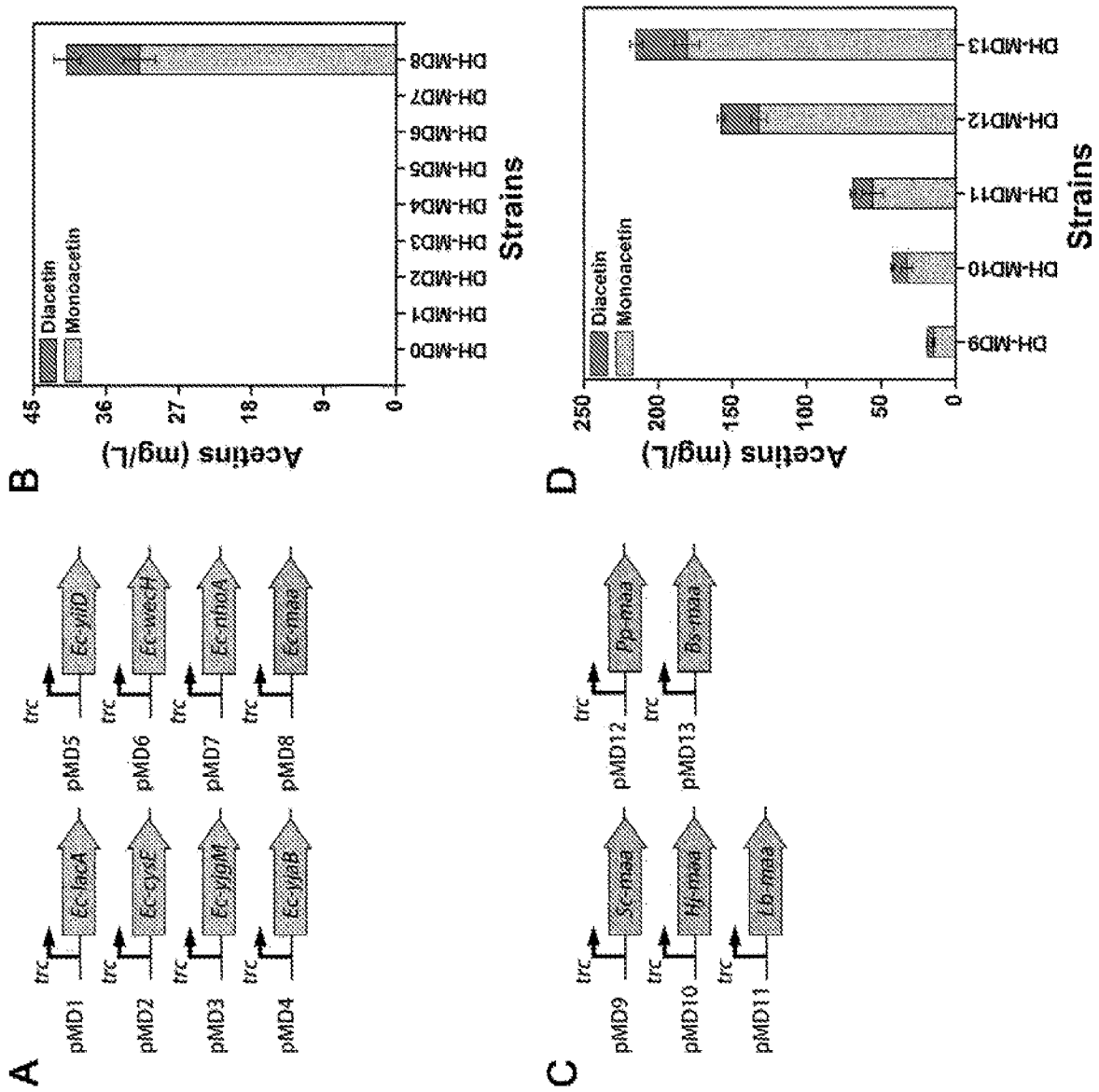
[도1]



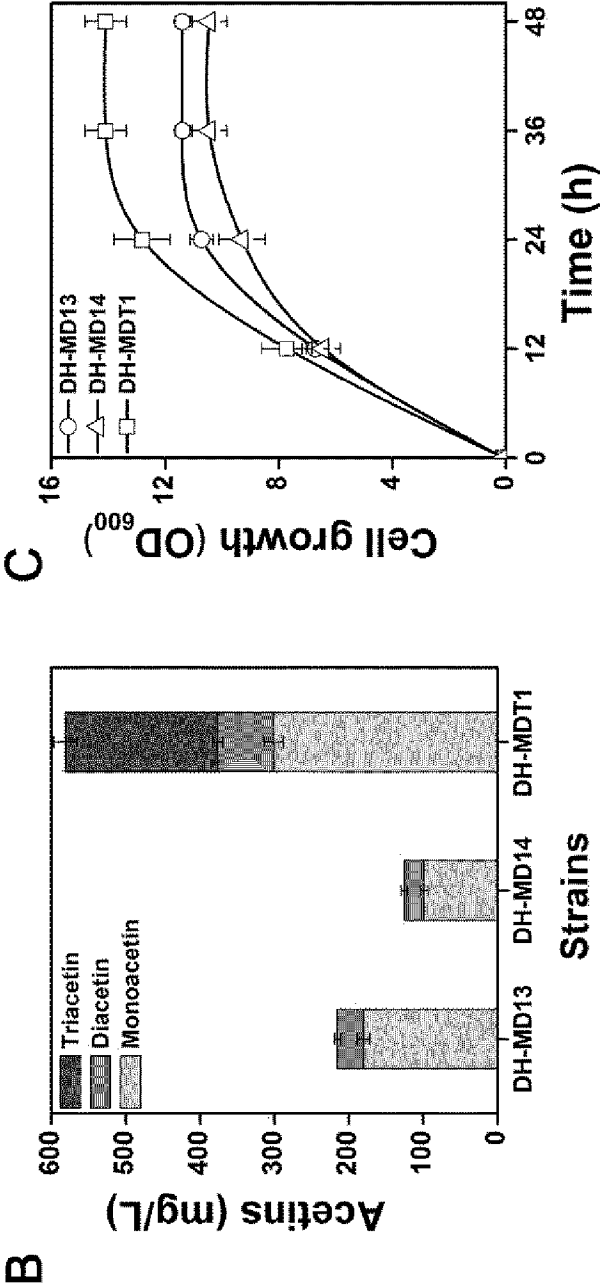
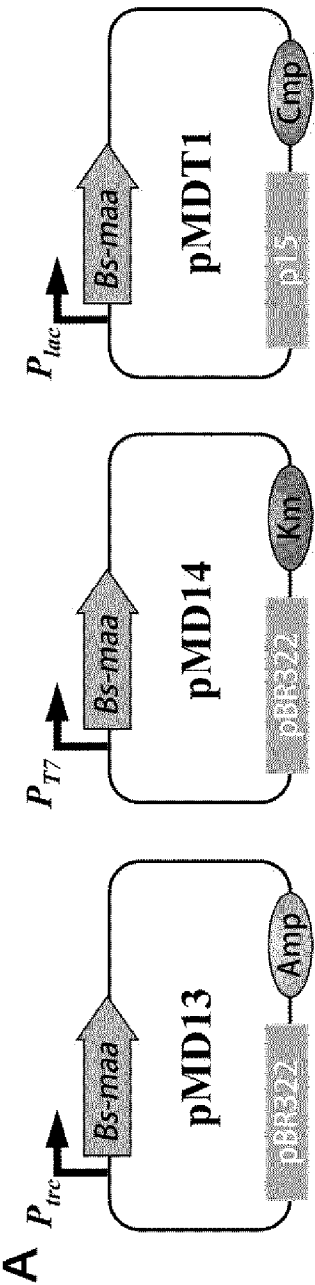
[도2]

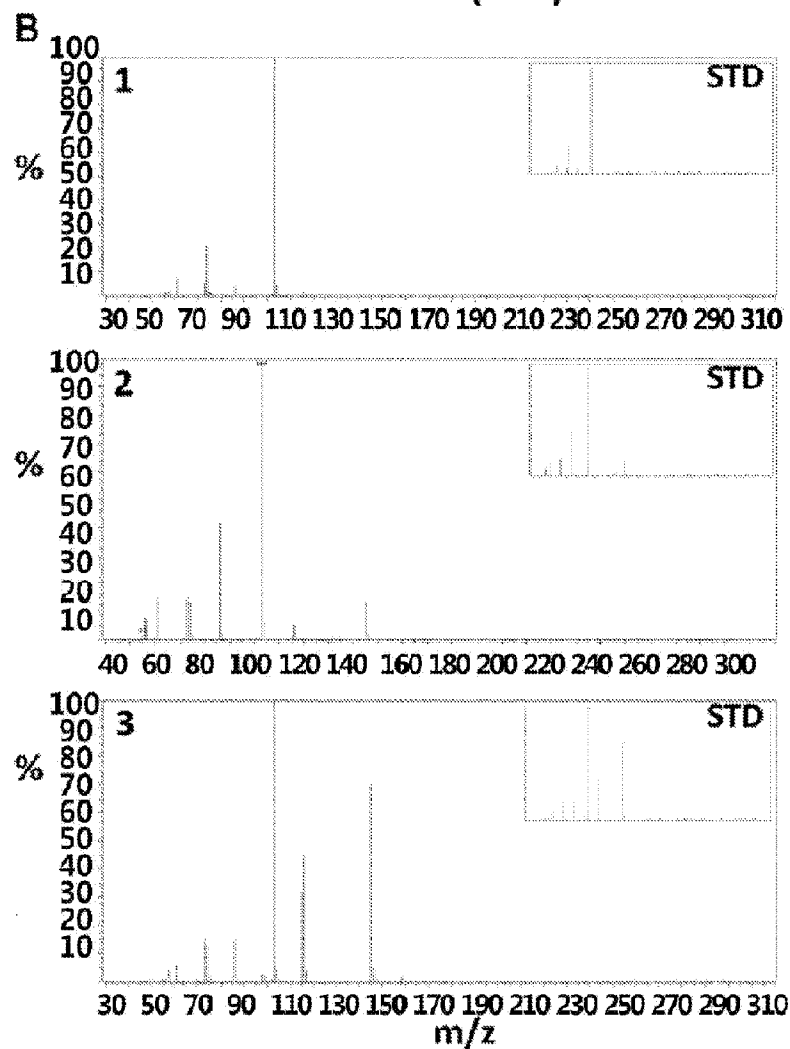
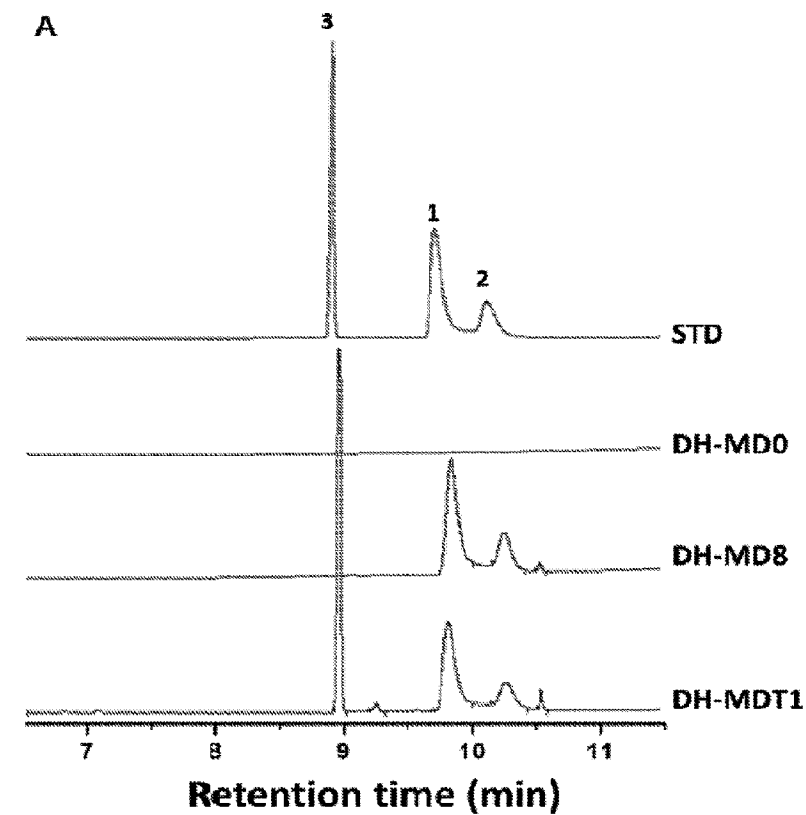


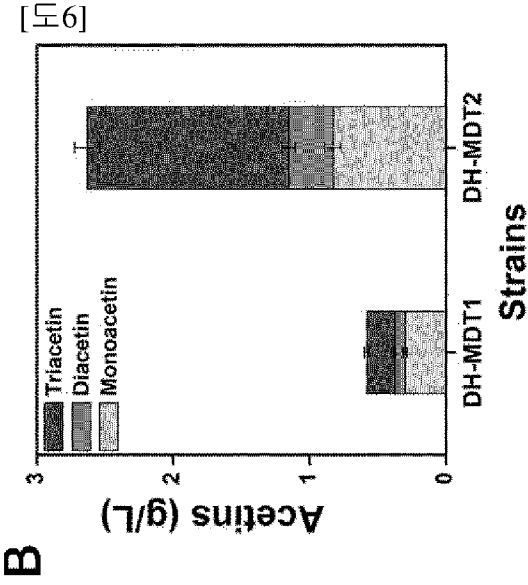
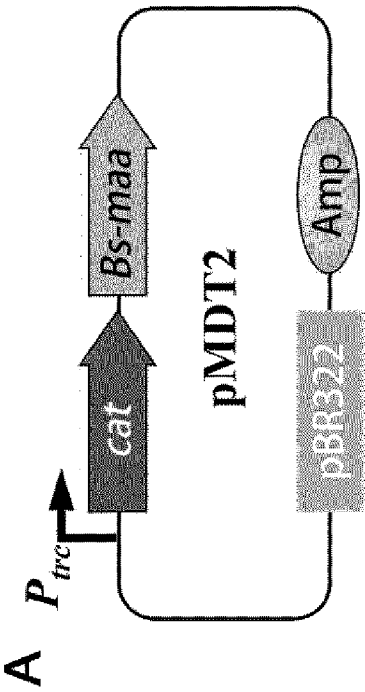
[도3]



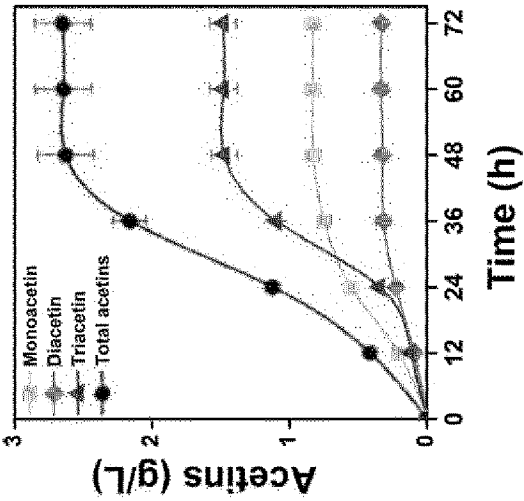
[도 4]



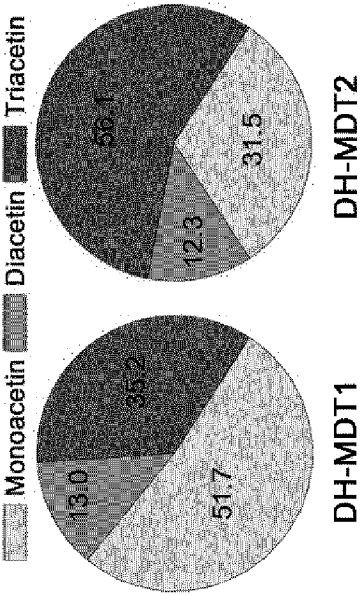




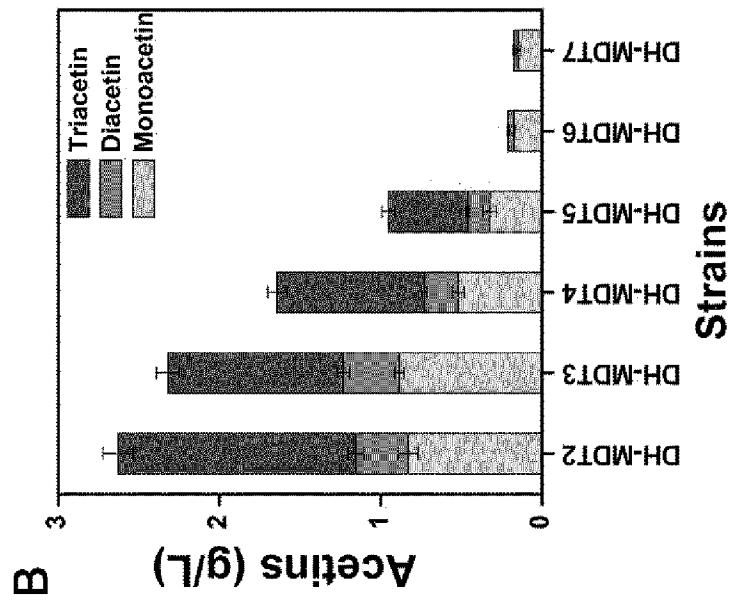
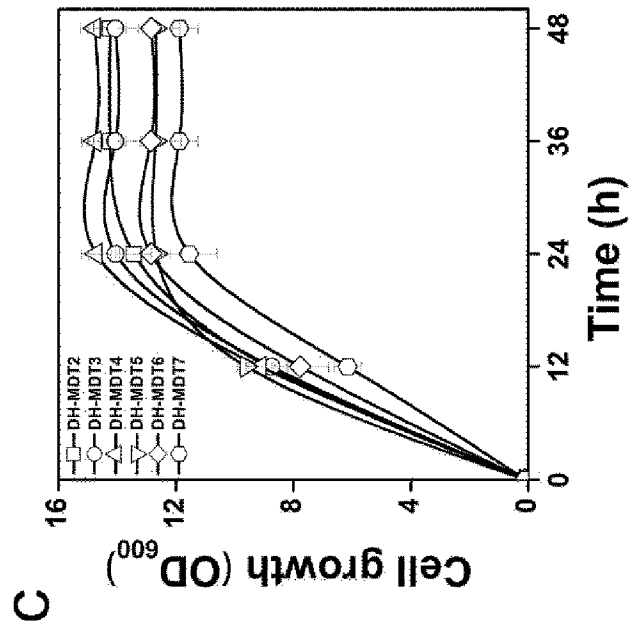
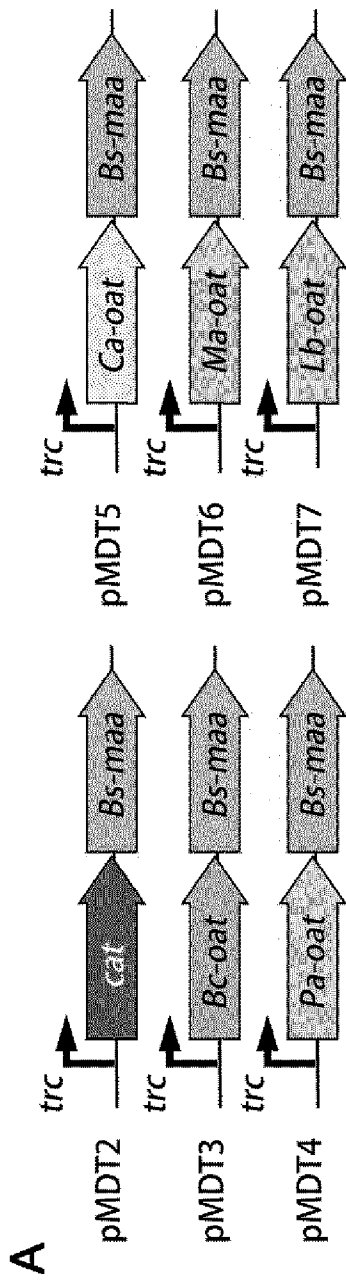
D



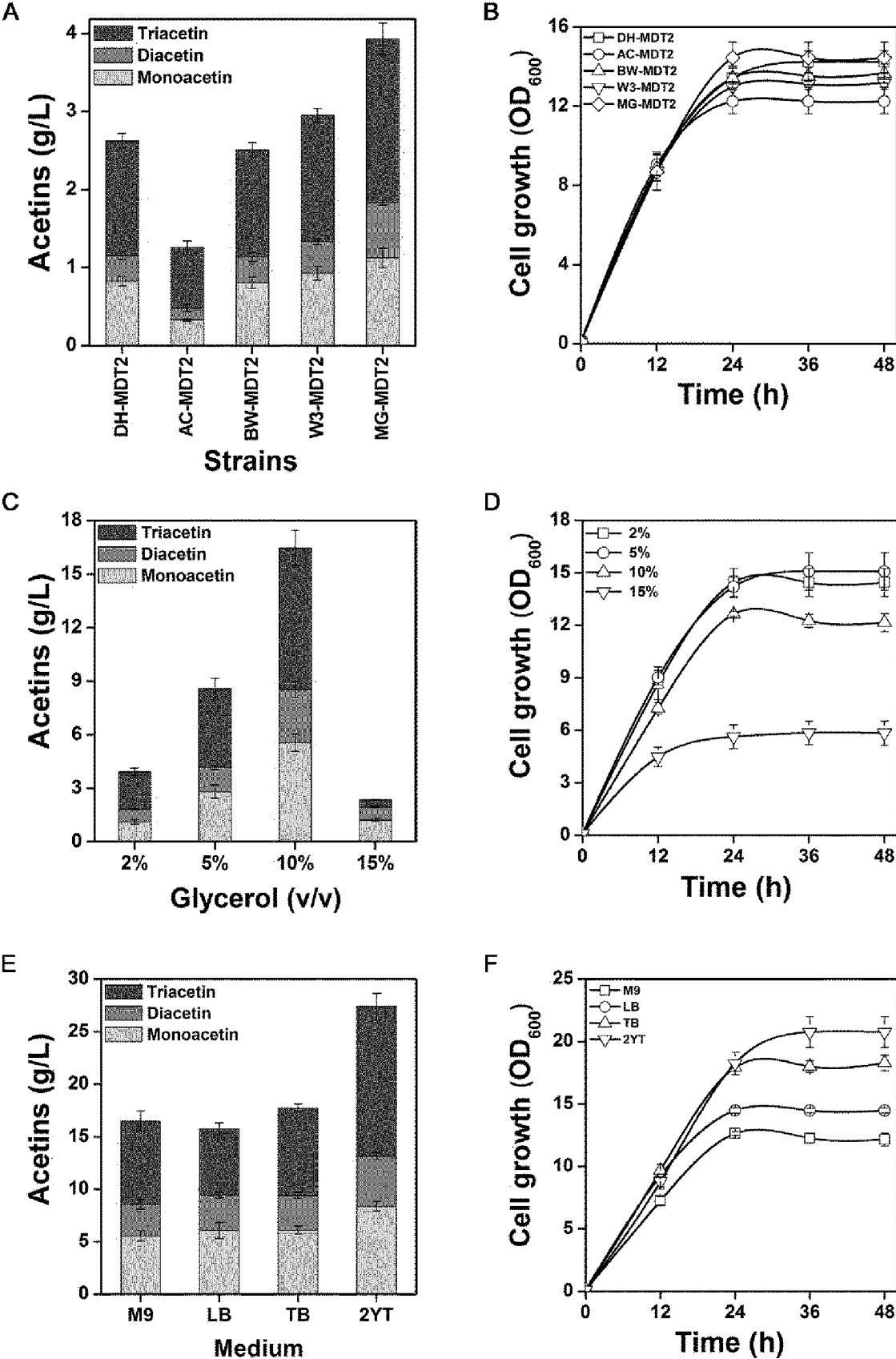
C



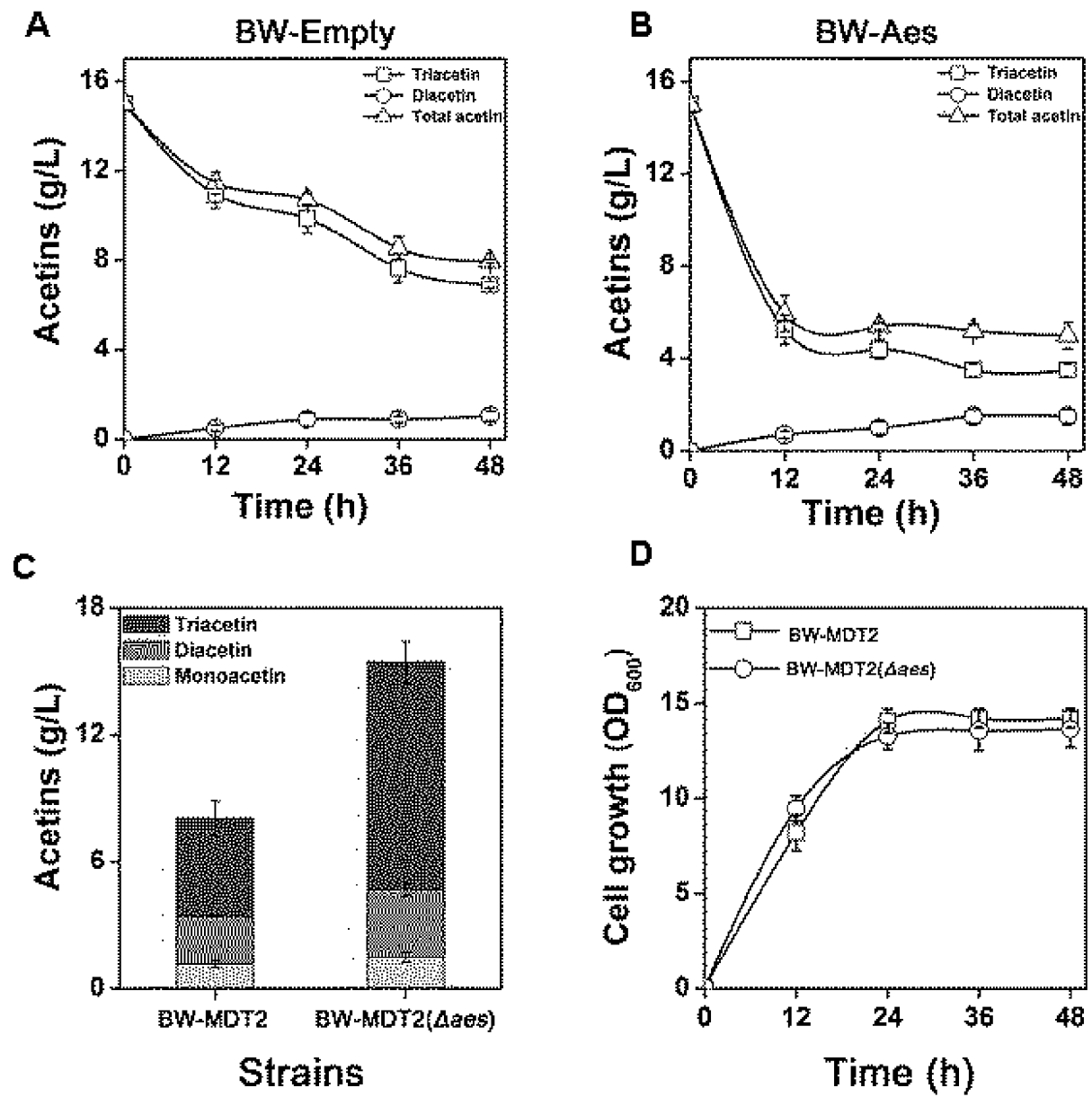
[도7]



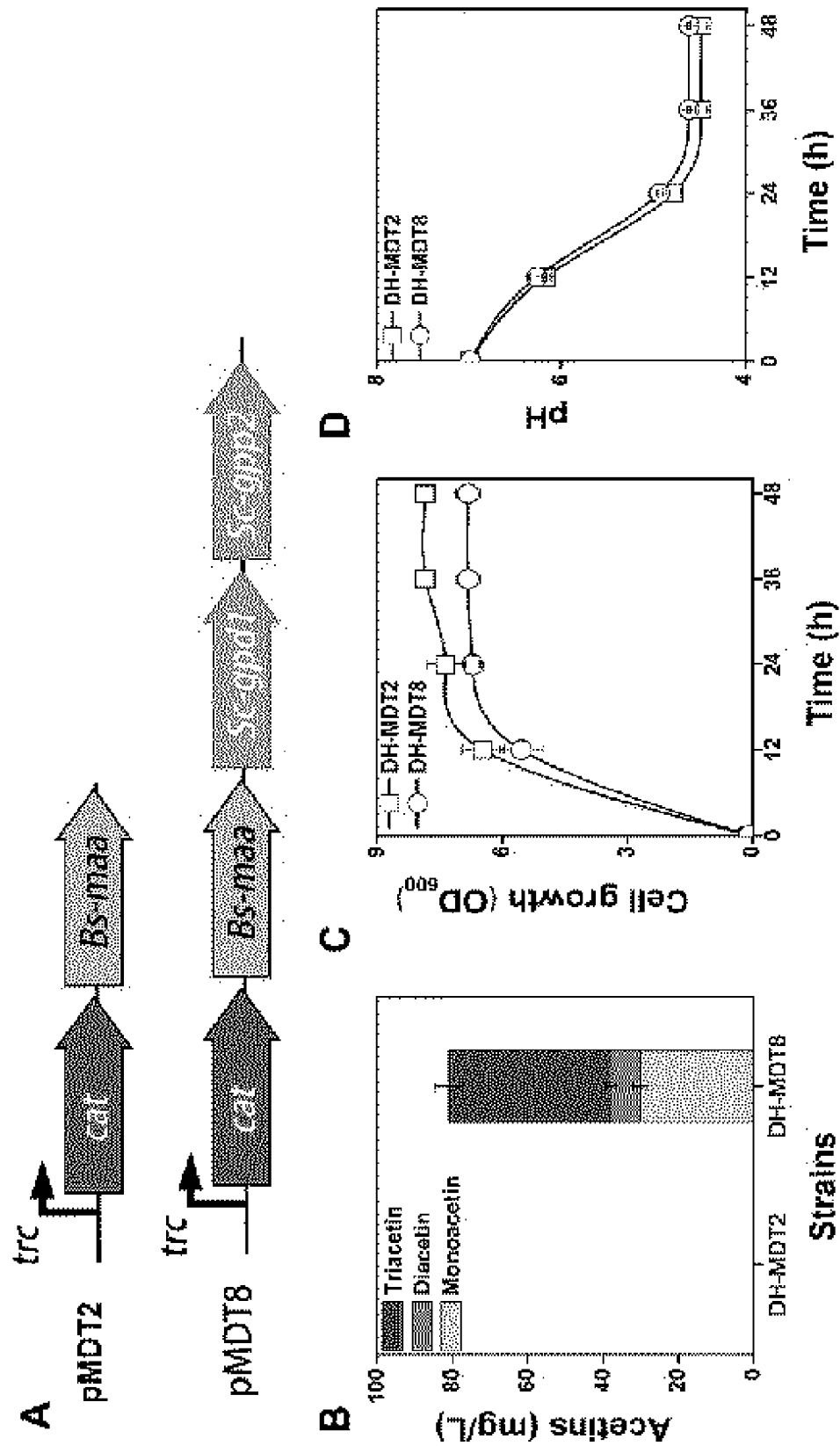
[도8]



[도9]

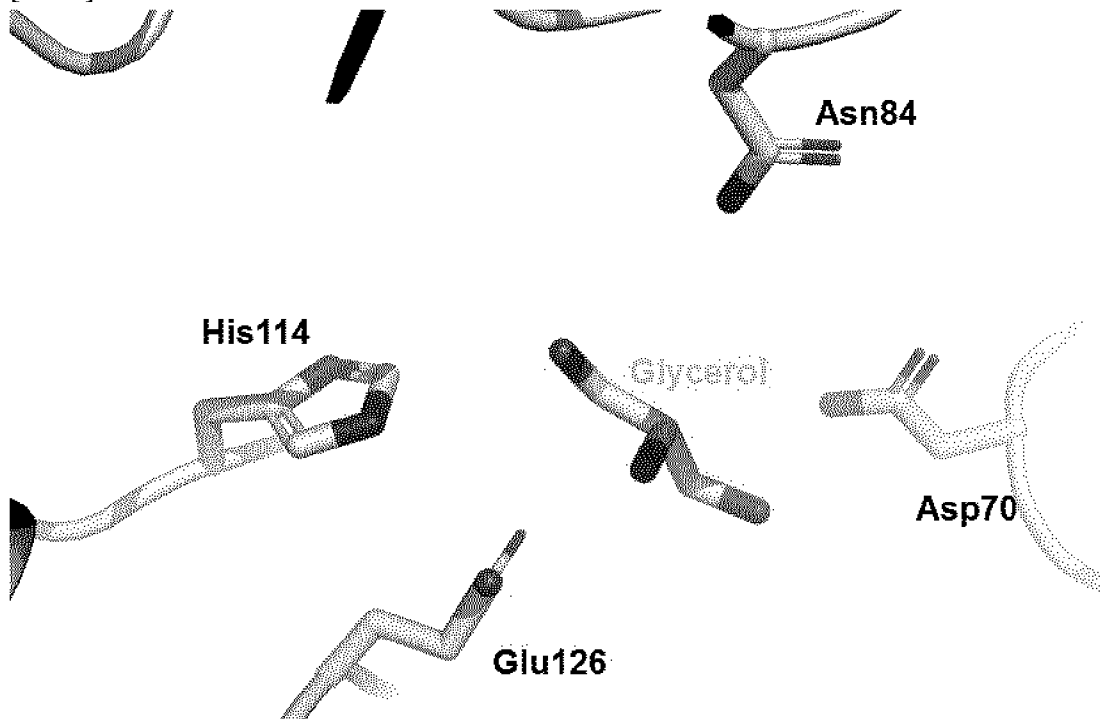


[도 10]



[도11]

10/11



[도12]

	1	10	20	30	40	50																																																					
BsMAA	M	L	R	T	E	K	E	K	M	A	G	E	L	N	S	E	D	C	Q	L	L	E	R	K	H	A	N	Q	L	I	R	Q	Y	E	T	P	E	.	D	D	A	V	R	T	K	L	L	K	E	L	L	G	S	V	G	D			
EcMAA	.	M	S	T	E	K	E	K	M	I	A	G	E	L	N	S	A	D	E	T	M	S	R	D	E	L	R	A	N	Q	L	I	R	Y	.	N	H	S	L	A	E	E	H	T	L	R	Q	Q	I	L	A	D	L	F	G	O	V	T	E
HjMAA	.	M	T	E	K	E	K	M	E	R	G	E	P	Y	D	A	S	.	S	E	L	V	A	E	R	Q	H	A	E	L	T	K	Y	.	N	R	T	T	A	T	E	S	O	R	K	E	R	L	I	E	E	L	F	G	S	V	E	D	
LbMAA	M	O	K	S	E	K	E	K	M	I	T	E	L	N	V	I	E	P	E	L	V	A	E	R	G	A	A	R	Q	O	V	E	A	I	.	N	E	L	G	S	O	D	P	E	K	S	Q	Q	L	V	K	R	L	F	G	A	T	S	E
PpMAA	M	S	L	S	E	K	E	K	M	L	I	G	O	L	N	H	A	G	C	P	E	L	O	A	E	C	I	A	N	M	H	W	M	A	R	Y	.	N	S	V	E	L	L	N	D	A	R	H	G	L	V	E	H	F	G	O	V	G	E
ScMAA	.	M	T	E	K	E	K	M	I	S	G	O	L	N	S	R	E	P	C	L	V	K	E	N	H	K	A	S	H	A	T	K	A	I	.	N	A	T	S	.	.	I	K	E	R	H	F	L	R	O	S	I	G	H	C	G	D		

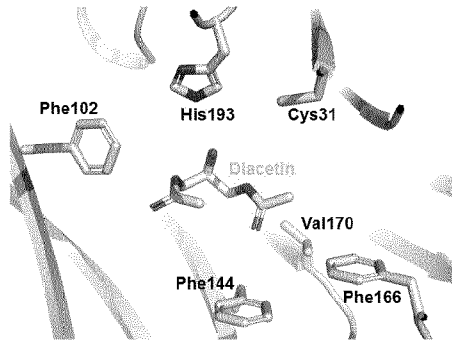
	60	70	80	90	100	110																																																									
BsMAA	Q	N	T	I	R	L	E	T	F	R	C	D	Y	G	Y	H	I	H	I	C	D	H	T	F	V	N	F	D	C	V	L	D	V	C	E	V	R	I	G	C	H	C	L	E	A	D	G	S	V	H	I	Y	T	A	G	H	E	L	D	P	I		
EcMAA	.	L	A	Y	I	E	F	T	F	R	C	D	Y	G	Y	N	I	F	L	G	N	N	F	F	A	N	F	D	C	V	M	L	D	V	C	F	.	R	I	G	D	N	C	H	L	A	D	G	S	V	H	I	Y	T	A	T	H	P	I	D	P	V	
HjMAA	.	L	A	I	V	E	F	F	I	R	C	D	Y	G	Y	N	V	H	V	G	E	N	F	T	A	N	F	D	C	V	I	L	D	V	R	R	V	E	F	G	T	R	C	L	L	O	D	G	S	V	H	I	Y	T	A	T	H	P	I	D	D	A	E
LbMAA	Q	N	E	V	H	A	T	F	R	C	D	Y	G	Y	N	I	Y	V	G	E	N	F	F	A	N	F	D	C	T	L	D	V	A	P	.	R	I	G	K	H	C	L	L	O	D	R	V	Q	I	Y	S	V	N	H	P	A	S	E	E				
PpMAA	G	A	V	I	R	P	P	F	Y	C	D	Y	G	Y	N	I	S	G	R	N	T	F	M	N	F	N	C	V	L	D	V	V	P	V	R	I	G	D	D	C	Q	T	G	D	N	V	Q	I	Y	T	A	D	H	P	L	D	P	E					
ScMAA	N	Y	F	I	S	E	D	I	H	T	D	Y	C	Y	N	I	S	L	C	N	H	P	Y	A	N	E	N	P	Y	M	L	D	V	A	P	.	T	I	G	N	H	V	L	L	G	E	N	N	V	Q	I	T	A	T	H	P	E	N	F	A			

	120	130	140	150	160	170																																																							
BsMAA	E	H	K	S	G	.	K	E	F	C	K	P	V	T	I	G	D	V	N	I	G	G	R	A	V	I	N	F	G	V	T	I	G	D	N	A	V	I	A	S	.	S	S	V	T	R	D	V	P	A	N	T	I	V	V	G	.	G	N	F	A
EcMAA	A	R	N	S	G	.	A	E	L	C	K	F	Y	T	I	G	N	V	N	I	G	G	R	A	V	I	N	F	G	V	T	I	G	D	N	V	V	V	A	S	.	G	A	V	V	T	R	D	V	P	D	N	V	V	G	.	G	N	F	A	
HjMAA	E	H	A	A	G	.	G	R	S	G	A	F	Y	T	V	G	D	V	N	I	G	G	R	A	V	L	N	S	G	V	S	V	G	D	G	S	V	I	A	S	.	G	A	V	V	T	R	D	V	P	A	G	A	L	V	G	.	G	N	F	A
LbMAA	L	K	R	N	G	A	M	C	I	S	K	E	V	I	L	G	D	V	N	I	G	G	R	A	V	I	C	F	G	V	T	I	G	D	N	V	I	V	A	A	.	G	A	V	V	T	R	S	F	C	S	N	V	I	L	G	.	G	N	F	A
PpMAA	V	R	E	G	.	L	E	S	G	R	T	V	T	I	G	D	N	V	N	I	G	G	R	A	V	I	L	G	V	T	I	G	D	N	A	L	V	C	A	G	.	S	V	V	T	R	D	V	P	A	G	A	T	V	V	.	G	N	F	A	
ScMAA	E	H	A	A	S	G	.	L	E	S	A	F	F	I	M	I	G	D	N	V	N	I	G	A	V	I	L	G	V	T	I	G	D	N	V	V	V	G	A	S	.	S	V	V	T	R	D	V	P	D	N	O	V	V	A	.	G	N	F	A	

	180												
BsMAA	E	L	I	S	E	V	F	L	D	.	.	.	.
EcMAA	E	Y	E	R	K	L	.	.	.	.	.	.	
HjMAA	E	V	L	R	D	V	D	.	.	.	.	.	
LbMAA	R	V	I	K	F	L	K	.	.	.	.	.	
PpMAA	R	V	R	Q	P	D	Q	G	Q	.	.	.	
ScMAA	E	L	I	S	E	V	F	L	D	.	.	.	

★ 주요잔기

[도13]



[도14]

	1	10	20	30	40	50
CAT	MEKKITG	TTVDLSQWHRKEHFEAT	QSVAQ	CTYNQTVQLDITAF	LKTVKKNKH	
BcOAT	MDTHQID	IDRWNRKPYFEHYIKEGK	CSYSVTANLNV	TALLNGLRKKNM		
PaOAT	MSYTRVD	LSSWNRKEHFEIRGDGQ	CTFSQTVQLDITR	LLDFITRSRGY		
CaOAT	MNSNFHA	IDMNTYPRANTYNYFTKT	VSTLIYSINTILDV	TILRATLKNKGL		
MaOAT	MPAEHALLVVMAT	EPDLQQWPRREWEHYLD	RCP	TYYSMTYVDLDITN	LRAAVDASGR	
LbOAT	MTELNTHATP	IDQTTWARREYFYYFTK	MMP	TGFTLVVDMIDITAT	KAWLTKHOR	
				★		
	60	70	80	90	100	110
CAT	KFYPAFIHILARLMNAHP	FERMAMKD	GELVIWDSVHPCYTV	HEQTEFTFSSLWSEY	HDD	
BcOAT	KLYPAFIYMLISRVVNSH	IEFRTAFNDKGQLGY	WEQMVETTYIIFHKED	KTFSSAMWTEYSSD		
PaOAT	RFYPVFIHSTAKVVNRFP	EYRMAMKG	DELIWDCVHFNYYTTF	HPDTETFSSEFWSHY	HDD	
CaOAT	KFFPAYVYLVTIRALGRH	QEFMAIQN	DMGYWDCRTPFPYFIE	HEDDKTITELWTEYNE	D	
MaOAT	KTYPTQIWAALATVVNRH	PEERMALDDQGNPGV	WDVVDPAETVENPDR	ETFAGISARYTPO		
LbOAT	KFNPAVLLYLVTIKLTKH	PERVQVD	GOVVEVLVHLHPSYST	EGDGLTISNLWTA	ADPS	
				★		
	120	130	140	150	160	170
CAT	FRQFLHIYSQDVAC	YGENLAYFPKGEI	..ENMFFVVSANP	WVSFTSFDLN	VANMDNFFAPV	
BcOAT	FSLEYKNYLQDIDR	YGDKKGLWVKENV	PANTFSISALP	WVSFTGFTQLN	LYNGE	YLDPI
PaOAT	LARFLAEYSMDREK	YRNDHSYFPKGEI	..ENVFVVSANP	WVSFTSFDNF	FASANNFFAPL	
CaOAT	FEVFKNYIISDI	REYGNHGMILSKDAP	PSNNYIISCIP	WFSFTWLSMQL	QNAKNYYAPI	
MaOAT	EDAPHSEAAELLSE	YRNASTLFPQGA	PRPRNVFEDISS	IPWTRFTGFTLT	IAPGWAHLAPL	
LbOAT	FEQTHQNYLADQAT	YGQHTPMP	KAPQGANTYM	IGSIFWTHFNSY	TPLPFTPLNTFF	FPV
			★		★	★
	180	190	200	210		
CAT	FTMGKYYTQGD	KVLMP	LAIQVHHAVCDG	HHVGRMINELQ	QYCD	EWQGGA..
BcOAT	ITLGKYYFS	DGETVCLP	ISLQVHHAVCDG	HHVSMFINELQ	KLADS	FEEWL..
PaOAT	FTVGGKYY	SQAGKTLV	PLAVQVHHAVCDG	HHAAARLVTELQ	KLCD	EAGG...
CaOAT	FEAGRFTE	TETNGIIT	PLSITVNHATVDG	HHIKLLIDELQ	WSMS	HPKEWIR.
MaOAT	FTIGKYEY	QEGRTMPL	ALQIHAAADG	HSARLVEELRQ	IIADP	DWVRD.
LbOAT	IQAGRFTE	KDQWLMP	LSFTIHHA	ADGHHV	SQFFNELQ	RVFDHP
			★			

★ 주요잔기

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/014256

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P 7/62(2006.01)i, C12N 9/10(2006.01)i, C12N 15/52(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 7/62; C07C 29/74; C07C 31/22; C12N 1/20; C12N 15/09; C12N 9/10; C12P 23/00; C12N 15/52

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: glycerol, O-acetyl transferase, acetyl CoA, monoacetin, diacetin

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2008-245600 A (NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL & TECHNOLOGY et al.) 16 October 2008	9,19
A		1-8,10-18,20-28
Y	TSOU, M. F. et al. Characterization of arylamine N-acetyltransferase in Enterobacter aerogenes. Microbios. 1998, vol. 94, no. 379, pages 133-143 See abstract.	9,19
A	OH, S. et al. Enzymatic production of glycerol acetate from glycerol. Enzyme and Microbial Technology. 2015 (Electronic publication on 29 November 2014), vol. 69, pages 19-23 See the entire document.	1-28
A	CN 1020306M A (SHANGHAI UNIVERSITY et al.) 27 April 2011 See the entire document.	1-28
A	US 2015-0322412 A1 (DSM IP ASSETS B.V.) 12 November 2015 See the entire document.	1-28



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

“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

05 FEBRUARY 2020 (05.02.2020)

Date of mailing of the international search report

05 FEBRUARY 2020 (05.02.2020)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

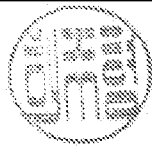
Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/014256

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
JP 2008-245600 A	16/10/2008	None	
CN 102030614 A	27/04/2011	None	
US 2015-0322412 A1	12/11/2015	CA 2895166 A1	26/06/2014
		CN 105339490 A	17/02/2016
		EA 201500659 A1	30/12/2015
		EP 2935571 A1	28/10/2015
		EP 2935571 B1	07/03/2018
		JP 2016-501543 A	21/01/2016
		JP 2018-183139 A	22/11/2018
		JP 6607567 B2	20/11/2019
		KR 10-2015-0096754 A	25/08/2015
		US 465174 B2	05/11/2019
		WO 2014-096992 A1	26/06/2014
		WO 2014-096992 A8	26/06/2014

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12P 7/62(2006.01)i, C12N 9/10(2006.01)i, C12N 15/52(2006.01)i																							
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12P 7/62; C07C 29/74; C07C 31/22; C12N 1/20; C12N 15/09; C12N 9/10; C12P 23/00; C12N 15/52 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: 글리세롤(glycerol), O-아세틸 전이효소(O-acetyl transferase), 아세틸-CoA(acetyl CoA), 모노아세틴(monoacetin), 다이아세틴(diacetin)																							
C. 관련 문헌 <table border="1"> <thead> <tr> <th>카테고리*</th> <th>인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재</th> <th>관련 청구항</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>JP 2008-245600 A (NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL & TECHNOLOGY 등) 2008.10.16</td> <td>9,19</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td></td> <td>1-8,10-18,20-28</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>TSOU, M. F. 등, "Characterization of arylamine N-acetyltransferase in Enterobacter aerogenes", Microbios, 1998, 94권, 379호, 페이지 133-143 초록</td> <td>9,19</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>OH, S. 등, "Enzymatic production of glycerol acetate from glycerol", Enzyme Microb Technol., 2015(전자공개 2014.11.29), 69권 페이지 19-23 전체 문헌</td> <td>1-28</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 102030614 A (SHANGHAI UNIVERSITY 등) 2011.04.27 전체 문헌</td> <td>1-28</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2015-0322412 A1 (DSM IP ASSETS B.V.) 2015.11.12 전체 문헌</td> <td>1-28</td> </tr> </tbody> </table>			카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항	Y	JP 2008-245600 A (NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL & TECHNOLOGY 등) 2008.10.16	9,19	A		1-8,10-18,20-28	Y	TSOU, M. F. 등, "Characterization of arylamine N-acetyltransferase in Enterobacter aerogenes", Microbios, 1998, 94권, 379호, 페이지 133-143 초록	9,19	A	OH, S. 등, "Enzymatic production of glycerol acetate from glycerol", Enzyme Microb Technol., 2015(전자공개 2014.11.29), 69권 페이지 19-23 전체 문헌	1-28	A	CN 102030614 A (SHANGHAI UNIVERSITY 등) 2011.04.27 전체 문헌	1-28	A	US 2015-0322412 A1 (DSM IP ASSETS B.V.) 2015.11.12 전체 문헌	1-28
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항																					
Y	JP 2008-245600 A (NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL & TECHNOLOGY 등) 2008.10.16	9,19																					
A		1-8,10-18,20-28																					
Y	TSOU, M. F. 등, "Characterization of arylamine N-acetyltransferase in Enterobacter aerogenes", Microbios, 1998, 94권, 379호, 페이지 133-143 초록	9,19																					
A	OH, S. 등, "Enzymatic production of glycerol acetate from glycerol", Enzyme Microb Technol., 2015(전자공개 2014.11.29), 69권 페이지 19-23 전체 문헌	1-28																					
A	CN 102030614 A (SHANGHAI UNIVERSITY 등) 2011.04.27 전체 문헌	1-28																					
A	US 2015-0322412 A1 (DSM IP ASSETS B.V.) 2015.11.12 전체 문헌	1-28																					
☐ 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 이후 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌																							
국제조사의 실제 완료일 2020년 02월 05일 (05.02.2020)		국제조사보고서 발송일 2020년 02월 05일 (05.02.2020)																					
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-8150 																					

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호

PCT/KR2019/014256

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
JP 2008-245600 A	2008/10/16	없음	
CN 102030614 A	2011/04/27	없음	
US 2015-0322412 A1	2015/11/12	CA 2895166 A1	2014/06/26
		CN 105339490 A	2016/02/17
		EA 201500659 A1	2015/12/30
		EP 2935571 A1	2015/10/28
		EP 2935571 B1	2018/03/07
		JP 2016-501543 A	2016/01/21
		JP 2018-183139 A	2018/11/22
		JP 6607567 B2	2019/11/20
		KR 10-2015-0096754 A	2015/08/25
		US 465174 B2	2019/11/05
		WO 2014-096992 A1	2014/06/26
		WO 2014-096992 A8	2014/06/26