

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

(43) 국제공개일
2025년 6월 19일 (19.06.2025) WIPO | PCT

WO 2025/127744 A1

(51) 국제특허분류:

C12N 15/70 (2006.01) C12N 9/10 (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01) C12P 7/625 (2022.01)
C12N 9/88 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2024/020376

(22) 국제출원일: 2024년 12월 16일 (16.12.2024)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2023-0181931 2023년 12월 14일 (14.12.2023) KR

(71) 출원인: 한국과학기술원 (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [KR/KR]; 34141 대전광역시 유성구 대학로 291 (KR).
이화여자대학교 산학협력단 (EWHHA UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION) [KR/KR]; 03760 서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (KR).

(72) 발명자: 이상엽 (LEE, Sang Yup); 34141 대전광역시 유성구 대학로 291 (KR). 최소영 (CHOI, So Young); 34141 대전광역시 유성구 대학로 291 (KR). 박시재 (PARK, Si Jae); 10234 경기도 고양시 일산서구 하이파크3로 62, #501-1002 (KR). 손진아 (SON, Jin-A);

04717 서울특별시 성동구 행당로 82, #108-2201 (KR). 김유진 (KIM, Yujin); 46554 부산광역시 북구 만덕대로 155번길 15, #1904 (KR). 김채린 (KIM, Chaerin); 48035 부산광역시 해운대구 반여로 133, #111-1401 (KR). 윤도혜 (YOON, Dohye); 16016 경기도 의왕시 바라산로 75, #108-102 (KR).

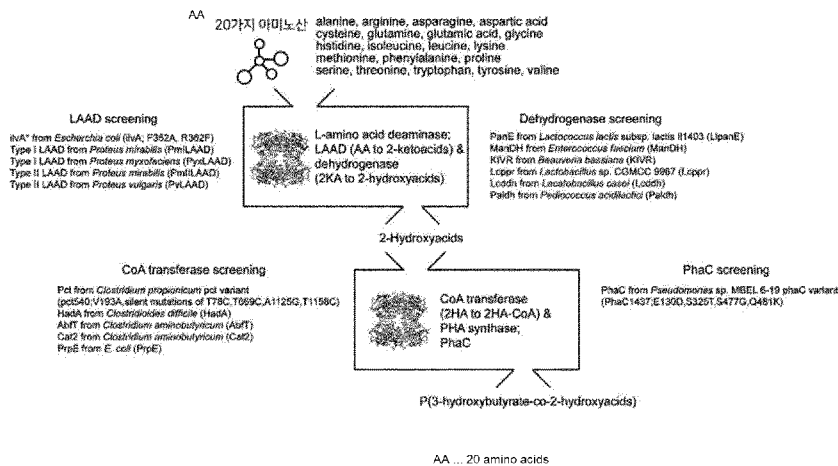
(74) 대리인: 이처영 등 (LEE, Cheo Young et al.); 06210 서울특별시 강남구 언주로 430, 16층 (KR).

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

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,

(54) Title: RECOMBINANT MICROORGANISM CAPABLE OF PRODUCING POLYHYDROXYALKANOATE AND METHOD FOR PRODUCING POLYHYDROXYALKANOATE USING THE SAME

(54) 발명의 명칭: 폴리하이드록시알카노에이트 생성능을 가지는 제조합 미생물 및 이를 이용한 폴리하이드록시알카노에이트의 제조방법



(57) Abstract: The present invention relates to a recombinant microorganism capable of producing polyhydroxyalkanoate and a method for producing polyhydroxyalkanoate, using same and, more specifically, to: a recombinant microorganism in which a gene encoding an enzyme for converting amino acids into 2-hydroxy acids, a gene encoding hydroxyisocaproate-CoA transferase, and a gene encoding polyhydroxyalkanoate synthase are introduced or amplified; and a method for producing polyhydroxyalkanoate, using the recombinant microorganism.

(57) 요약서: 본 발명은 폴리하이드록시알카노에이트 생성능을 가지는 제조합 미생물 및 이를 이용한 폴리하이드록시알카노에이트의 제조방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 아미노산으로부터 2-하이드록시산으로 전환을 위한 효소 코딩 유전자, 하이드록시이소카프로에이트-CoA 전이효소 코딩 유전자 및 폴리하이드록시알카노에이트 합성효소를 코딩하는 유전자가 도입 또는 증폭되어 있는 제조합 미생물 및 상기 제조합 미생물을 이용한 폴리하이드록시알카노에이트의 제조방법에 관한 것이다.

[다음 쪽 계속]

WO 2025/127744 A1

ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,
ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM,
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

발명의 설명

발명의 명칭: 폴리하이드록시알카노에이트 생성능을 가지는 재조합 미생물 및 이를 이용한 폴리하이드록시알카노에이트의 제조방법

기술분야

- [1] 본 발명은 폴리하이드록시알카노에이트 생성능을 가지는 재조합 미생물 및 이를 이용한 폴리하이드록시알카노에이트의 제조방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 아미노산으로부터 2-하이드록시산으로 전환을 위한 효소 코딩 유전자, 하이드록시이소카프로에이트-CoA 전이효소 코딩 유전자 및 폴리하이드록시알카노에이트 합성효소를 코딩하는 유전자가 도입 또는 증폭되어 있는 재조합 미생물 및 상기 재조합 미생물을 이용한 폴리하이드록시알카노에이트의 제조방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 폴리하이드록시알카노에이트(polyhydroxyalkanoates; PHAs)는 다양한 미생물에 의해 합성되는 생물학적 폴리에스테르(polyester)이다. 이들 폴리머는 생분해성과 생체적합성 특성을 갖는 열가소성 물질이며, 석유 기반 고분자와 유사한 물성을 가질 수 있기 때문에 다양한 산업적 생의학적 응용이 가능하고, 재생 자원으로 부터 생성된다(Lee, S. Y. *Biotechnol. Bioeng.* 49:1 1996).
- [4] PHAs는 사이드 체인의 길이에 따라 짧은 탄소수를 가지는 SCL-PHA(short-chain-length PHA)와 긴 탄소수를 가지는 MCL-PHA(medium-chain-length PHA)로 구분된다. *Ralstonia eutropha*, *pseudomonas*, *Bacillus* 등의 미생물 유래의 PHA 합성 유전자를 클로닝하여 재조합 미생물을 제작하고 이를 통해 다양한 PHA가 합성된 바 있다(Qi et al., *FEMS Microbiol. Lett.*, 157:155, 1997; Qi et al., *FEMS Microbiol. Lett.*, 167:89, 1998; Langenbach et al., *FEMS Microbiol. Lett.*, 150:303, 1997; WO 01/55436; US 6,143,952; WO 98/54329; WO 99/61624).
- [5] 수많은 천연 PHA 생산 박테리아가 분리되었고, 중합 효소(PHA 합성효소)를 코딩하는 유전자가 확인되었다. 대사 효소 및 PHA 생합성에 관여하는 보조 단백질을 코딩하는 유전자가 분자 수준에서 규명되었다. 더 높은 PHA 역가를 가진 PHA 생산 박테리아를 개발 및 생산성을 높이기 위한 다양한 대사 공학적 접근법이 확인되었다 (G. Q. Chen, *Chem. Soc. Rev.* 2009, 38, 2434).
- [6] 이러한 기술적 배경하에서, 본 출원의 발명자들은 2-하이드록시산을 단량체로 함유한 PHA를 생합성하기 위한 방법을 개발하고자 예의 노력한 결과, 20개의 아미노산을 기질로 하여 아미노산으로부터 전환된 2-하이드록시산을 통해 PHA의 생산이 가능하다는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

[7]

[8] **발명의 요약**

[9] 본 발명의 목적은 아미노산으로부터 전환된 2-하이드록시산을 단량체로 포함하는 폴리하이드록시알카노에이트 생성능을 가지는 재조합 미생물을 제공하는데 있다.

[10] 본 발명의 다른 목적은 상기 재조합 미생물을 이용하여, 아미노산으로부터 전환된 2-하이드록시산을 단량체로 포함하는 폴리하이드록시알카노에이트를 제조하는 방법을 제공하는데 있다.

[11] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 탄소원으로부터 아세틸-CoA 생성능을 가지는 미생물에 아미노산 디아미네이즈 (amino acid deaminase) 코딩 유전자; 디하이드로게나제 (dehydrogenase) 코딩 유전자; CoA 전이효소 (CoA transferase) 코딩 유전자; 및 폴리하이드록시알카노에이트 합성효소를 코딩하는 유전자가 도입 또는 증폭되어 있는, 아미노산으로부터 전환된 2-하이드록시산 (2-hydroxyacid : 2-HA)을 단량체로 포함하는 폴리하이드록시알카노에이트 생성능을 가지는 재조합 미생물을 제공한다.

[12] 본 발명은 또한, 다음 단계를 포함하는 아미노산으로부터 전환된 2-하이드록시산 (2-hydroxyacid: 2-HA)를 단량체로 포함하는 폴리하이드록시알카노에이트의 제조방법을 제공한다:

[13] (a) 상기 재조합 미생물을 배양하여 폴리하이드록시알카노에이트를 생성하는 단계; 및 (b) 상기 폴리하이드록시알카노에이트를 수득하는 단계.

[14]

도면의 간단한 설명

[15] 도 1은 아미노산 기반 지방족 2-하이드록시산 함유 폴리머를 합성하는 과정에 대한 개요이다.

[16] 도 2는 3-하이드록시부티르산 (3-hydroxybutyric acid)을 미생물 내에서 생산하고 고분자의 단량체로 중합하는 경로를 나타내는 것이다.

[17] 도 3은 아미노산 20가지 종류와 아미노산들이 아미노산 디아미네이즈 (amino acid deaminase) 예를 들어 LAAD 코딩 유전자에 의해 탈아민화 (deamination) 및 디하이드로게나제 (dehydrogenase) 코딩 유전자에 의해 탈수소화 (dehydrogenation)되어 2-HA가 생산되는 과정을 나타낸 것이다.

[18] 도 4는 아미노산 기반 지방족 2-하이드록시산 함유 폴리머 생산을 위한 효소 후보군을 기재한 것이다.

[19]

[20] **발명의 상세한 설명 및 바람직한 구현예**

[21] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

- [22] 제조합 미생물에 총 20가지 아미노산을 첨가하여 미생물 내에서 2번째 탄소에 히드록시기가 붙은 2-하이드록시산을 단량체로 포함하는 다양한 고분자를 생산할 수 있음을 확인하였다.
- [23] 제조합 미생물 배양시 아미노산을 첨가하여 아미노산 디아미네이즈 (amino acid deaminase) 예를 들어 LAAD의 작용을 통해 2-케토산 (2-ketoacids: 2KA) 이 생산되고, 생산된 2KA는 디하이드로게나제에 의해 2-하이드록시산 (2-hydroxyacid : 2-HA)으로 전환된다.
- [24] 세포내에서 CoA 전이효소 (CoA transferase)에 의해 2HA에 CoA가 붙어 2HA-CoA가 생산되고, 최종적으로는 폴리하이드록시알카노에이트 합성효소 (PHA synthase)가 생산된 2HA-CoA를 고분자의 단량체로 중합하는 역할을 하게 된다 (도 1).
- [25] 제조된 고분자는 3-하이드록시부티르산 (3-hydroxybutyric acid: 3HB)을 백본 (backbone)으로 하고 2-HA가 포함된 P(3HB-Co-2HA) 형태의 고분자이다.
- [26] 구체적으로, 본원발명에 따르면, 3-하이드록시부티르산 (3-hydroxybutyric acid: 3HB)을 백본 (backbone)으로 하고 다양한 2-HA가 0.5 mol% 내지 20 mol% 수준으로 포함되어 있는 고분자이다.
- [27] 미생물 종류로 *E. coli* XL1-blue를 사용하였다. 3-하이드록시부티르산 미생물 내에서 생산하고 고분자의 단량체로 중합하는 경로는 도 2에서와 같다. P(3HB)를 제조하기 위해서는 *Ralstonia eutropha* 유래의 PhaA, PhaB가 필요하며, PhaC는 *Pseudomonas sp.* MBEL 6-19 phaC variant (PhaC1437; E130D, S325T, S477G, Q481K)를 사용하였다. PhaA, PhaB 및 PhaC 코딩 유전자 3종이 모두 들어있는 플라스미드를 p437ReAB라고 명명하였다.
- [28] 이를 바탕으로, 본 발명은 일 관점에서 본 발명은 탄소원으로부터 아세틸-CoA 생성능을 가지는 미생물에 아미노산 디아미네이즈 (amino acid deaminase) 코딩 유전자; 디하이드로게나제 (dehydrogenase) 코딩 유전자; CoA 전이효소 (CoA transferase) 코딩 유전자; 및 폴리하이드록시알카노에이트 합성효소를 코딩하는 유전자가 도입 또는 증폭되어 있는, 아미노산으로부터 전환된 2-하이드록시산 (2-hydroxyacid : 2-HA)을 단량체로 포함하는 폴리하이드록시알카노에이트 생성능을 가지는 제조합 미생물에 관한 것이다.
- [29] 상기 탄소원은 글루코오스, 프룩토오스, 수크로오스, 말토오스, 만니톨, 소르비톨 등과 같은 탄수화물; 당 알코올, 글리세롤, 피루브산, 락트산, 시트르산 등과 같은 알코올; 유기산 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 탄소원은 단독으로 사용되거나 2 종 이상이 조합되어 사용될 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [30] 상기 아미노산은 예를 들어, 글리신, 알라닌, 발린, 노르발린, 류신, 노르류신, 아이소류신, 트레오닌, 세린, 시스테인, 메티오닌, 아스파르트산, 아스파라긴, 글루탐산, 글루타민, 라이신, 아르기닌, 히스티딘, 페닐알라닌, 타이로신, 트립토판 및

프롤린으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [31] 본 발명에서 사용한 아미노산 20가지 종류와 아미노산들이 아미노산 디아미네이즈 (amino acid deaminase) 예를 들어 LAAD 코딩 유전자에 의해 탈아민화 (deamination) 및 디하이드로게나제 (dehydrogenase) 코딩 유전자에 의해 탈수소화 (dehydrogenation)되어 2-HA가 생산될 수 있다 (도 3). 각 아미노산의 경우 아민기 (amine group)와 황 그룹 (sulfur group)을 가지고 있어 아민 기능성 중합체 (amine functional polymer) 또는 유황 기능성 중합체 (sulfur functional polymer) 생산이 가능할 것으로 판단된다.
- [32] 아미노산 20가지 종류와 아미노산들이 변환될 수 있는 2-HA의 구체적 종류는 다음 표 1과 같다.
- [33] [표 1]
- [34]

Amino acids ^α	2HAs ^α
Amino acids with electrically charged side chains^α	
Arginine ^α	— ^α
Histidine ^α	3-Imidazole-2-hydroxypropionic acid ^α
Lysine ^α	2-Hydroxy-6-aminohexanoate ^α
Aspartic acid ^α	Malic acid ^α
Glutamic acid ^α	2-Hydroxyglutaric acid ^α
Amino acids with polar uncharged side chains^α	
Serine ^α	Glyceric acid ^α
Threonine ^α	2-Hydroxybutyric acid ^α
Asparagine ^α	Malic acid ^α
Glutamine ^α	2-Hydroxyglutaric acid ^α
Special cases^α	
Cysteine ^α	3-Mercaptolactic acid ^α
Glycine ^α	Glycolic acid ^α
Proline ^α	— ^α
Amino acids with hydrophobic side chains^α	
Alanine ^α	2-Hydroxypropionic acid ^α
Valine ^α	2-Hydroxyisovalerate ^α
isoleucine ^α	3-Methyl-2-hydroxypentanoate ^α
leucine ^α	4-Methyl-2-hydroxypentanoate =2HIC ^α
Methionine ^α	2-Hydroxy-4-(methylthio)butyric acid ^α
Phenylalanine ^α	2-Hydroxy-3-phenylpropionic acid ^α
Tyrosine ^α	2-Hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)propanoic acid ^α

[35]

Tryptophan	2-Hydroxy-3-(1H-indol-3-yl)propanoic acid
ETC	
norvaline	2-hydroxypentanoate
norleucine	2-hydroxyhexanoate

[36] 상기 아미노산 디아미네이즈는 아미노산으로부터 2-케토산을 생산하기 위한 효소로, 상기 아미노산 디아미네이즈 코딩 유전자는 예를 들어, 다음과 같을 수 있다.

[37] *ilvA** from *Escherchia coli* (*ilvA*; F352A, R362F);

[38] Type I LAAD from *Proteus mirabilis* (PmILAAD);

[39] Type I LAAD from *Proteus myxofaciens* (PyxLAAD);

[40] Type II LAAD from *Proteus mirabilis* (PmIIAAD); 또는

[41] Type II LAAD from *Proteus vulgaris* (PvLAAD).

[42]

[43] 구체적으로, 상기 아미노산 디아미네이즈 코딩 유전자는 서열번호 1의 서열을 포함하는 효소를 코딩하는 *ilvA* 유전자, 서열번호 2의 서열을 포함하는 효소를 코딩하는 *PmILAAD* 유전자, 서열번호 3의 서열을 포함하는 효소를 코딩하는 *PmIIAAD* 유전자, 서열번호 4의 서열을 포함하는 효소를 코딩하는 *PvLAAD* 유전자 및 서열번호 5의 서열을 포함하는 효소를 코딩하는 *PyxLAAD* 유전자로 구성된 군에서 선택된 하나 이상일 수 있다.

[44] [표 2]

[45]

SEQ ID No. ¹⁾	유전 자 ²⁾	서열 ³⁾
1 ⁴⁾	<i>ikd</i> ⁵⁾	MADSQLSGAPEGAEYLRAVLRAPVYEEAAQVTPLQKMEKLSSRLDN VILVKREDRQPVHSFKLRGAYAMMAGLTEEQKAHGVITASAGNHA QGVAFSSARLGVKALIVMPTATADIKVDAVRGFGGEVLLHGANFDE AKAKAIELSQQQGFTWVPPFDHPMVIAGQGTLAELLQQDAHLDRV FVPVGGGGLAAGVAVLIKQLMPQIKVIAVEAEDSACLKAALDAGHP VDLPRVGLFAEGVAVKRIGDETFRLCQEYLDDIITVSDAICAAMKD LFEDVRAVAEPSGALALAGMKKYIALHNIRGERLAHILSGANVNFHG LRYVSECELGEQREALLAVTIPEEKGSFLKFCQLLGGRSVTEFNRYF ADAKNACIFVGVRLSRGLEERKEILQMLNDGGYSVVLDLSDDEMAKL HVRVMVGGRPSHPLQERLYSFEPESPALLRFLNTLGTYNISLFH YRSHGTDYGRVLA AFELGDHEPDEFTRLNELGYDCHDETNNPAFRF FLAG ⁶⁾
2 ⁴⁾	<i>PmIL</i> <i>AAD</i> ⁵⁾	MNISRRKLLLVGAAGVLAGGAALVPMVRRDGKFVEAKSRASFVE GTEGALPKESDAVIIGGGIQGIMTAINLAERGMSVTILEKGEIGGEQSG RAYSQIISYQTSPEIFPLHHYGKILWRGMNEKIGADTSYRTQGRVEAL ADEKAFDKAQAWIKTAKETAGFDTPLNTRIHKGEELSNRLVGAQTPW TVAAFEEDSGSVDPETGTPALARYAKQIGVKIYTNC AVRGIETAGGK ISDVVTEKGAIRTSHVVLAGGIWSRLFMGNMGIDIPTLNVYLSQQRV SGVPGAPRGNVHLPNGIHFREQADGTYAVAPRIFTSSIVKDSFLLGPK FMHLLGGGELPLEFSIGEDLFNSFKMPTSWKLDEKTPFEQYRIATATQ NTEHLDAVFQRMKA EFPVFEKSQVVERWGAVVSPTFDELPIISEVKE YPGLVINTATVWGMTEGPAAGEVTADIVTGKKPVIDPTPFSLDRFKK ⁶⁾

[46]

3-	<i>PmIII</i> <i>AD</i>	MAISRRKFILGGTVVAVAAGAGVLTPLMTREGRFVPGTPRHGFVEGT GGPLPKQDDVVVIGAGILGIMTAINLAERGLSVTIVEKGNIAGEQSSR FYGQAISYKMPDETFLHLHGLKHRWREMNAKVIGIDTTYRTQGRVE VPLDEEDLENVRKWIDAKSKDVGS DIPFR TKMIEGAELKQRLRGATT DWKIAGFEEDSGSFDPEVATFVMAEYAKKMGIKIFTNCAARGLETQ AGVISDVVTEKGPIKTSRVV VAGGVGSRLFMQNLNVDVPTLPAYQS QQLISAAPNAPGGNVALPGGIFFRDQADGTYATSPRVIVAPVVKESFT YGYKYLPLLALPDFPVHISLNEQLINSFMQSTHWDLNEESPFEKYRD MTALPDLPELNASLEKLKKEFP AFKESTLIDQWSGAMAIAPDENPIIS DVKEYPGLVINTATGWGMTESPVSAEITADLLL GKKPVLD AKPFSLY RF
4-	<i>PvII</i> <i>AD</i>	MAISRRKFIIGGTVVAVAAGAGILTPMLTREGRFVPGTPRHGFVEGTE GALPKQADV VVGAGILGIMTAINL VERGLSVVIVEKGNIAGEQSSR FYGQAISYKMPDETFLHLHGLKHRWREMNAKVIGIDTTYRTQGRVE VPLDEEDLVNVRKWIDERSKNVGS DIPFKTRIIEGAELNQR LRGATT WKIAGFEEDSGSFDPEVATFVMAEYAKKMGVRIYTQCAARGLETQA GVISDVVTEKGAIKTSQVV VAGGVWSRLFMQNLNVDVPTLPAYQSQ QLISGSPTAPGGNVALPGGIFFREQADGTYATSPRVIVAPVVKESFTY GYKYLPLLALPDFPVHISLNEQLINSFMQSTHWNLDEVSPFEQFRNM TALPDLPELNASLEKLKAEFP AFKESKLIDQWSGAMAIAPDENPIISEV KEYPGLVINTATGWGMTESPVSAELTADLLL GKKPVLD PKPFSLYRF
5-	<i>PvII</i> <i>AD</i>	MVRRDGGKFVESKSRALFVESTEGALPSES DVV IGGGIQGIMTAINLA ERGMSVTILEKGEVAGEQSGRAYSQIISYQTSPEIFPLHHYGKILWRG MNEKIGADTSYRTQGRVEALADEKALDRAQEWIKTAKETAGFDVPL NTRIIKGEELSNRLVGAQTPWTVAAFEEDSGSVD PETGTPTLARYAK QIGVKIYTHCAVRGIETAGGKISDVVTEKGAIRTSNVVLAGGIWSRLF MGNMGVDLPTLNVYLSQQRVSGVPGAPRGNVHLPNGIHFREQADG TYAVAPRIFTSSIVKDSFLLGPKFMHLLGGGELPLEFSIGEDLFNSFKM PTSWKLDEKSPFEQYRIATATQNTHELD AVFQRMKTEFPVFEKSQIV ERWGAVVSPTFDELPIISEVKEYPGLVINTATVWGMTEGPAAGEVTA DIVTGKKPVIDPTPFSLDRFKK

- [47] 상기 디하이드로게나제는 2-케토산에서 2-하이드록시산을 생산하기 위한 효소로, 상기 디하이드로게나제 코딩 유전자는 예를 들어, 다음과 같을 수 있다.
- [48] PanE from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Il1403 (LlpanE);
- [49] ManDH from *Enterococcus faecium* (ManDH);
- [50] KIVR from *Beauveria bassiana* (KIVR)];
- [51] Lcpr from *Lactobacillus* sp. CGMCC 9967 (Lcpr);
- [52] Lcddh from *Lactobacillus casei* (Lcddh); 또는
- [53] Paldh from *Pediococcus acidilactici* (Paldh).
- [54]
- [55] 구체적으로, 상기 디하이드로게나제 코딩 유전자는 서열번호 6의 서열을 포함하는 효소를 코딩하는 *LlpanE* 유전자, 서열번호 7의 서열을 포함하는 효소를 코딩하는 *KIVR* 유전자, 서열번호 8의 서열을 포함하는 효소를 코딩하는 *ManDH* 유전자, 서열번호 9의 서열을 포함하는 효소를 코딩하는 *Lcpr* 유전자, 서열번호 10

의 서열을 포함하는 효소를 코딩하는 *Lcddh* 유전자 및 서열번호 11의 서열을 포함하는 효소를 코딩하는 *Paldh* 유전자로 구성된 군에서 선택된 하나 이상일 수 있다.

[56] [표 3]

[57]

SEQ ID No.	유전자	서열
6	<i>LpanE</i>	MRITAGAGAMGSRFGLMLHKGGNEVTLIDGWPEHVKAIKEHGLRANYNGEELTAHLSVELQSEISSKEKTDLIILFTKAMQLDKMLQDIKPLIDEHTKVLCLLNGIGHEDTIEKYVSKNNIFIGNTMWTAGLEGPGKAKLFGDGSVELQNLISGEEETAKKLAEILSESGLNAKYSNNIHYSIYRKACVNGTMNGLCTILD TNMAGLGETKPAHDMVVTVNEFAAAVAKFENVNLDIAEVVQHVETCFDPSTIGLHYPSMYQDLIKNNRLTEIDYINGAVSRKGKKYNVATPYCDFLTQLVHSKEELLKAK
7	<i>KIVR</i>	MPSPEHPSWLSTLLADTRPPPKLFAWSPANLDSPTAVKPDRA DRGDFDPGKYPVDAPITTASEPVKRIYIVGPGNVGRLYASYMSRQRDALPITLVVHRKELLSQWVTSEGVVLADRGGKVTKNKQFDVEWWTESRPRYGPVREVADGEKLHNVFISTKADAGLGEADRLRRYLGRCSSVVF AQNGVSKLWAPYGPLYVASRYHADDAPSFSACVVNHGISAAGLFYSIHTSPSDAFIGPIFKGSAAPAHGQNKRRRLDDDDFTTYISSTPFLDTKHVSSGQLWIIQLEKLVLNAAINPLTTLRCKTGQLFASYDSHDALTRVLDQLLWQASAVIQALINHDANIDMLTSYAETVHRLVPGSDDYGRNFANIRRKLTVRFSQPILKAKLYAFGLNIREHRSSMLQDAEAGRKTEIRDVNGWIVDMAEYLGDLVDVGIIHRGLIELIEECVVL DKEELARLL
8	<i>ManD_H</i>	MKIAIAGAGAMGSRFGLMLHQSGNEVLLIDGWAEHVQQIKEHGLQANFNGKEVEAKLPVLQSEVEKEDQVDLIILFTKAMQLEKMLQDIQSLIKKDTEVLCLLNGIGHEDIIEKFVPMENIYIGNTMWTAGLEGPGQVKLFGSGSVELQNLGDGKEAAAKKLADKLSSEGLNAHFSDNIHYSIYRKACVNGTMNGLCTILDVNMAELGKTSTAHKMOVATIVNEFAKVA AVEKIELDVPEVIAHCESC FDPETIGLHYPSMYQDLIKNNRLTEIDYINGAISRKGKKYGVATPYCDFLTTEL VHAKEDSLNVK
9	<i>Lcpan</i>	MMKILNSFSLKPEQRQTLEAAGHTVIDADKLDDATAQQIDVVYGWNAAATRVNFDRLQFVQAMSAGVDYLPLAELAKHHVLLANTSGIHAEP LAEYVLGALFTISR GILPAIRADRD MWTLRQERPPMTLLKGKTAVIFGTGHIGSTIATKLQALGLHTIGVSAHGRPAAGFDQVMTDVATHEAAGRADVVINALPLTPDTKHFYDEAFFAAASKQPLFINIGRGPSV DMAALTQALKNKQISAAALDVVDPEPLPQDSPLWGMTNVLLTPHISGTVPQLRDKVFKIFNDNLKTLISSGQLASHQVDLTRGY

[58]

10.	<i>Lcdsh</i>	MKIIAYGARVDEIQYFKQWAKDTGNTLEYHTEFLDENTVEWAKGFD GINSLQTTTPYAAGVFEKMHAYGIKFLTIRNVGTDNIDMTAMKQYGIR LSNVPAISPAIAEFALTDTLYLLRNMGKVQAQLQAGDYEKAGTFI GKELGQQTVGVMGTGHIGQVAIKLFKGFGAKVIAYDPYPMKGDHP DFDYVSLEDLFKQSDVIDLHVPGIEQNTHIINEAAFNLMKPGAIVINT ARPNLIDTQAMLSNLKSGKLAGVGIDTYEYETEDLLNLAHGSFKDP LWDELLGMPNVVLSPHIAYYTETA VHNMVYFSLQHLVDFTKFKPA RKLLVQQVVN.
11.	<i>Paldh</i>	MKIIAYGIRDDEKPYLDEWVTKNHIEVKAVPDLLDSSNIDLAKNYDG VVAYQQKPYTADLFDMHEFGIHAFSLRNVGVNDNPADALKKNDI KISNVPAISPRAIASVTQLLALLRKIPEFEYKMAHG DYRWE PDIGL ELNQMTVGVI GTGRIGRAAIDIFKFGAKVIA YDVFRNPALKEGMY VDTLEEL YQQANVITLHVPALKDNYHMLDEKAFGQM QDGT FILNFA RGTLVDTPALLKALDSGKVAGAA LDTYENE VGFDVDHGDQP IDDP VFNDLMSRRNVMITPHAAFYTRPAVKNMVQIALDNNRDLIEKNSSK NEVKFE.

[59] 상기 CoA 전이효소는 2-히드록시산으로부터 2-HA CoA를 생산하기 위한 효소로, 상기 CoA 전이효소 코딩 유전자는 예를 들어, 다음과 같을 수 있다:

[60] 4HBS from *Metallosphaera sedula* (4HBS);

[61] Pct from *Clostridium propionicum* pct variant (pct540; V193A, silent mutations of T78C, T669C, A1125G, T1158C);

[62] HadA from *Clostridioides difficile* (HadA);

[63] AbfT from *Clostridium aminobutyricum* (AbfT);

[64] Cat2 from *Clostridium aminobutyricum* (Cat2); 또는

[65] PrpE from *Cupriavidus necator* (PrpE).

[66] 본 발명에 따른 CoA 전이효소 코딩 유전자는 구체적으로, 서열번호 12의 서열을 포함하는 효소를 코딩하는 *hadA* 유전자일 수 있다.

[67] [서열번호 12]

MLLEGVKVVELSSFIAAPCCA KMLGDWGA EVIKIEPIEGDGIRVMGGTFKSPASDDENP
MFELENGNKKGV SINVKSGEGVEILHKLLSEADIFVTNVRVQALEKMGIA YDQIKDKYP
GLIFSQILGYGEKGPLKDKPGFDYTAYFARGGVSQSVMEKGTSPANTAAGFGDHYAGL
ALAAGSLAALHKKAQTGKGERVTVSLFHTAIYGMGTMITTAQYGNEMPLSRENPN SPL
MTTYKCKDGRW IQLALIQYNKWL GKFKCVINREYILEDDRYNNIDSMVNHVEDLVKIV
GEAMLEKTLDEWSALLEEADLPFEKIQSCEDLLDDEQAWANDFLFKKTYDSGNTGVLV
NTPVMFRNEGIKEYTPAPKVGQHTVEVLKSLGYDEEKINNFKDSKVVR Y

[68] 본 발명에 따른 CoA 전이효소 코딩 유전자는 구체적으로, 서열번호 16의 서열을 포함하는 효소를 코딩하는 4HBS 유전자, 서열번호 17의 서열을 포함하는 효소를 코딩하는 AbfT 유전자, 서열번호 18의 서열을 포함하는 효소를 코딩하는 Cat2 유전자, 서열번호 19의 서열을 포함하는 효소를 코딩하는 Pct540 유전자 및

서열번호 20의 서열을 포함하는 효소를 코딩하는 *PrpE* 유전자로 구성된 군에서 선택된 하나 이상일 수 있다.

[69]

SEQ ID No.	유전자	서열
16	<i>4HBS</i>	MTVLQEYERIHEELRREGYINTQYPLNPSETLWNKKIMTMKREELEK VKSFRLKRIVKWAWDNVPFYRNFWSKGFEPDQIRDWKDIVKIPILR KDELKDLKSANPPFGSIMVPELAKRIRFVSATSGSTGLPTFQGGWGALE LDYFEEAQARYLWTFAGVKPTTVYANYLNMSGFYSWGPPVETAM WRCGATAIAGGGETYFSWKARHNLIFRLWKVDVLATTPWLHRLIGE EAKAEGWESPFGVLLHGGAAAENTKKKLFQVHPNAKLAIISVWGTT DGHMAVEVPGLDGQLVIWEDMEIFDIVDPKTDEPASPGERGELIATL LNHFTMPLIRYSLGDYVKNEFTTDPDPTYGITHARFVEPIPGRVEWM FKVKGKLLLPYVEDAVNEIPDTTGFMFNVIIYGNEMDKLKIRVETRR NMVDSTYDSRAREILAEIRGLNKDDVEIEWVEPGKTAWTGYKLQVF LDQRKK
17	<i>AbtL</i>	MDWKKIYEDRTCTADEAVKSIKSGDRVLFHAHCVAEPPVLVEAMVA NAAAYKNVTVSHMVTLGKGEYSKPEYKENFTFEGWFTSPSTRGSIA EGHGQFVPVFFHEVPSLIRKDIFHVDVFMVMVSPPDHNGFCCVGVSS DYTMQAIKSAKIVLAEVNDQVPVVYGDTFVHVSEIDKFVETSHPLPEI GLPKIGEVEAAIGKHCASLIEDGSTLQLGIGAIPDAVLSQLKDKKHLGI HSEMISDGVDLYEAGVIDCSQKSIDKGKMAITFLMGTKRLYDFAA NNPKVELKPDYINHPVVAQCCKMVCINACLQVDFMGQIVSDSIGT KQFSGVGGQVDFVRGASMSIDGKGKAILAMPVAKKKDGSMSISKIVP FIDHGAAVTTSRNDADYVVTEYGAEMKGKSLQDRARALINIAHPDF KDELKAEFEKRFNAAF
18	<i>Cat2</i>	MEWEEIYKEKLVTAEKAVSKIENHSRVVFAHAVGEPVDLVNALVKN KDNIGLEIVHVMVAMGKGEYTKEGMQRHFRHNALFVGGCTRDAVN SGRADYTPCFFYEVPFLFEKRLPVDVALIQVSEPDKYGYCSFGVSN DYTKPAAESAFLVIAEVNKNMPRTLGDSEIHVSDDIDYVEASHPLLEL QPPKLGDVEKAIGENCASLIEDGATLQLGIGAIPDAVLLFLKNKKNLG IHSEMISDGVMELVKAGVINNKKKTLHPGKIVVTFLMGTKKLYDFV NNNPMVETYSVDYVNNPLVIMKNDNMVSINSCVQVDLMGQVCSESI GLKQISGVGGQVDFIRGANLSKGGKAILAIPSTAGKGKVSRTPLLD GAAVTTSRNEVDYVVTEYGVVHLKGLTLNRARALINIAHPKFRES LMNEFKKRF

[70]

19 ^a	<i>Pct54</i> 0 ^a	MRKVPIITADEAAKLIKDGDTVTTSGFVGNAIPEALDRAVEKRFLGTG EPKNITYVYCGSQGNRDGRGAEHFAHEGLLKRYLAGHWATVPALGK MAMENKMEAYNVSQGALCHLFRDIASHKPGVFTKVGIGTFIDPRNG GGKVNDITKEDIVELVEIKGQEYLFYPAFPIHVALIRGTYADESGNITF EKEAAPLEGTSVCQAVKNSGGIVVVQVERVVKAGILDPRHVKVPGI YVDYVVVADPEDHQQSLDCEYDPALSGEHRRPEVVGEPLPLSAKKV IGRRGAIELEKDVAVNLGVGAPEYVASVADEEGIVDFMTLTAESGAI GGVPAGGVRFGASYNADALIDQGYQFDYYDGGGLDLCYLGLAECD EKGNNVSRFGPRIAGCGGFINITQNTPKVFFCGTFTAGGLKVKIEDG KVIIVQEGKQKKFLKAVEQITFNGDVALANKQQVTYITERCVFLLKE DGLHLSLAPGIDLQTQILDVMDFAPIIDRDANGQIKLMDAALFAEGL MGLKEMKS ^a
20 ^a	<i>PcpE</i> ^a	MTASHAVHARSLADPEGFWAEQAARIDWETPFGQVLDNSRAPFTR WFGGRTNLCHNAVDRHLAARASQPALHWVSTETDQARTFTYAEL HDEVSRMAAILQGLDVQKGDRVLIYMPMIPEAAAFAMLACARIGAIHS VVFGGFASVSLAARIEDARPRVVVSADAGSRAGKVVPYKPLLDEAIR LSSHQPGKVLLVDRQLAQMPRTEGRDEDYAAWRERVAGVQVPCV WLESSEPSYVLYTSGTTGKPKGVRDGTGGYAVALATSMYIFCGKP GDTMFTASDIGWVVGHSYIVYGPLLAGMATLMYEGTPIRPDGGILW RLVEQYKVNLMFSAPT AIRVLKKQDPAWLTRYDLSSLRLFLAGEPL DEPTARWIQDGLGKPVVDNYWQTESGWPIAIQRGIEALPPKLGSPG VPAYGYDLKIVDENTGAECPPGQKGVVAIDGPLPPGCMSTVWGDD RFVRTYWQAVPNRLCYSTFDWGV RDADGYVFILGR TDDVINVAGH RLGTREIEESLSSNAAVA EVA VVGVDALKGQVAMAFCLARDPART ATAEARLALEGELMKTVEQQLGAVARPARVFFVNALPKTRSGKLLR RAMQAVAEGRDPGDLTTIEDPGALEQLQAALKG ^a

- [71] 분지쇄 아미노산인 루신, 이소루신, 발린, 노르루신 (norleucine), 노르발린 (norvaline)을 사용하여 위와 같은 2-HA를 다양한 물분율로 포함하는 고분자를 생산하였다. 해당 결과를 통해 다섯 가지 종류의 CoA 전이효소 중 HadA 만이 2-HA를 수용할 수 있음을 확인하였다.
- [72] 본 발명에 의해 생산된 2-HA는 CoA 전이효소 (CoA transferase)에 의해 2-HA-CoA가 되고, PHA 합성효소 예를 들어 PhaA, PhaB 및 phaC로 구성된 군에서 선택되는 효소를 통해 만들어진 3HB-CoA와 함께 중합되어 P(3HB-Co-2HA) 형태의 고분자가 생산될 수 있다 (도 4).
- [73] 상기 폴리하이드록시알카노에이트 합성효소를 코딩하는 유전자는 예를 들어 *Pseudomonas* sp. MBEL 6-19 *phaC* variant일 수 있다. 본 발명에 따른 폴리하이드록시알카노에이트 합성효소를 코딩하는 유전자는 구체적으로, 서열번호 13의 서열을 포함하는 효소를 코딩하는 *PhaC* 유전자일 수 있다.
- [74]

[서열번호 13]

MSNKSNDKLYQASENTLGLNPVVGLRGKDLLASARMVLRQAIKQPVHVSVKHVAHFG
 LELKNVLLGKSGLQPTSDDRRFADPAWSQNPLYKRYLQTYLAWRKELHDWIDESNLAP
 KDVARGHFVINLMTDAMAPTNTAANPAAVKRFFETGGKSLLDGLSHLAKDLVHNGGM
 PSQVNMGAFEVVGKSLGVTEGAVVFRNDVLELIQYKPTTEQVYERPLLVPQINKFYVF
 DLSPDKSLARFCLRNNVQTFIVSWRNPTKEQREWGLSTYIEALKEAVDVVTAITGSKDV
 NMLGACSGGITCTALLGHYAAIGENKVNALTLVTVLDTTLDSDVALFVNEQTLEAAK
 RHSYQAGVLEGRDMAKVFAWMRPNDLIWNYWVNNYLLGNEPPVFDILFWNNDTTRLP
 AAFHGDLEVELFKNNPLIRPNALEVCGTPIDLKQVTADIFSLAGTNDHITPWKSCYKSAQL
 FGGNVEFVLSSGGHIKSILNPPGNPKSRMTSTEVAENADEWQANATKHTDSWWLHW
 QAWQAQRSGELKKSPTKLGSKAYPAGEAAPGTIVHER

- [75] 추가로, 폴리하이드록시알카노에이트 합성을 위해 PhaA 및 PhaB를 포함할 수 있다. 상기 PhaA 및 PhaB 각각은 구체적으로, 서열번호 14 및 15의 서열을 포함하는 효소를 코딩하는 *PhaA* 및 *PhaB* 유전자일 수 있다.

[76] [서열번호 14]

MTDVVIVSAARTAVGKFGGSLAKIPAPELGAVVIKAALERAGVKPEQVSEVIMGQVLTA
 GSGQNPARQAAIKAGLPAMVPAMTINKVCGSGLKAVMLAANAIMAGDAEIVVAGGQE
 NMSAAPHVLPGRDGRMGDAKLVDTMIVDGLWDVYNQYHMGITAENVAKYGITRE
 AQDEFVGSQNKAEAAQKAGKFDEEIVPVLIPQRKGDPVAFKTDDEFVRQGATLDSMSG
 LKPAFDKAGTVTAANASGLNDGAAVVMMSAAKAKELGLTPLATIKSYANAGVDPKV
 MGMGPVPASKRALSRAEWTQDLDLMEINEAFAAQALAVHQMGWDTSKVNVNGGA
 IAIGHPIGASGCRILVTLHEMKRRDAKKGLASLCIGGGMGVALAVERK

[77] [서열번호 15]

MTQRIAYVTGGMGGIGTAICQRLAKDGRVAVAGCGPNSPRREKWLEQQKALGFDIAS
 EGNVADWDSTKTAFDKVKSEVGEVDVLINNAGITRDVVFRKMTRADWDAVIDTNLTS
 LFNVTQKVIDGMADRGWGRIVNISSVNGQKGQFGQTNYSTAKAGLHGFTMALAQEVA
 TKGVTVNTVSPGYIATDMVKAIRQDVLKIVATIPVKRLGLPEEIASICAWLSSEESGFST
 GADFSNLNGGLHMG

- [78] 상기 탄소원으로부터 아세틸-CoA 생성능을 가지는 미생물은 예를 들어, 대장균, 알칼리제네스(*Alcaligenes*)속, 슈도모나스(*Pseudomonas*)속, 에스케리치아(*Escherichia*)속, 랄스토니아(*Ralstonia*)속, 바실러스(*Bacillus*)속, 또는 코리네박테리움(*Corynebacterium*)을 포함할 수 있으나, 적용 가능한 미생물이란 제한없이 사용할 수 있다.
- [79] 다른 관점에서, 본 발명은 (a) 상기 제조합 미생물을 배양하여 폴리하이드록시알카노에이트를 생성하는 단계; 및 (b) 상기 폴리하이드록시알카노에이트를 수득하는 단계를 포함하는 아미노산으로부터 전환된 2-하이드록시산 (2-

hydroxyacid: 2-HA)를 단량체로 포함하는 폴리하이드록시알카노에이트의 제조 방법에 관한 것이다.

- [80] 상기 아미노산은 예를 들어, 글리신, 알라닌, 발린, 노르발린, 류신, 노르류신, 아이소류신, 트레오닌, 세린, 시스테인, 메티오닌, 아스파르트산, 아스파라긴, 글루탐산, 글루타민, 라이신, 아르기닌, 히스티딘, 페닐알라닌, 타이로신, 트립토판 및 프롤린으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [81] 본 발명에서 사용한 아미노산 20가지 종류와 아미노산들이 아미노산 디아미네이즈 (amino acid deaminase) 예를 들어 LAAD 코딩 유전자에 의해 탈아민화 (deamination) 및 디하이드로게나제 (dehydrogenase) 코딩 유전자에 의해 탈수산화 (dehydrogenation)되어 2-HA가 생산될 수 있다 (도 3). 각 아미노산의 경우 아민기 (amine group)와 황 그룹 (sulfur group)을 가지고 있어 아민 기능성 중합체 (amine functional polymer) 또는 유황 기능성 중합체 (sulfur functional polymer) 생산이 가능할 것으로 판단된다.
- [82] 아미노산 20가지 종류와 아미노산들이 변환될 수 있는 2-HA의 구체적 종류는 앞서 설명된 바와 같다.
- [83] 상기 아미노산 디아미네이즈 코딩 유전자는 예를 들어, 다음과 같을 수 있다.
- [84] *ilvA** from *Escherchia coli* (*ilvA*; F352A, R362F);
- [85] Type I LAAD from *Proteus mirabilis* (PmILAAD);
- [86] Type I LAAD from *Proteus myxofaciens* (PyxLAAD);
- [87] Type II LAAD from *Proteus mirabilis* (PmIIAAD); 또는
- [88] Type II LAAD from *Proteus vulgaris* (PvLAAD).
- [89]
- [90] 구체적으로, 상기 아미노산 디아미네이즈 코딩 유전자는 서열번호 1의 서열을 포함하는 효소를 코딩하는 *ilvA* 유전자, 서열번호 2의 서열을 포함하는 효소를 코딩하는 *PmILAAD* 유전자, 서열번호 3의 서열을 포함하는 효소를 코딩하는 *PmIIAAD* 유전자, 서열번호 4의 서열을 포함하는 효소를 코딩하는 *PvLAAD* 유전자 및 서열번호 5의 서열을 포함하는 효소를 코딩하는 *PyxLAAD* 유전자로 구성된 군에서 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [91] 상기 디하이드로게나제 코딩 유전자는 예를 들어, 다음과 같을 수 있다.
- [92] PanE from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Il1403 (LlpanE);
- [93] ManDH from *Enterococcus faecium* (ManDH);
- [94] KIVR from *Beauveria bassiana* (KIVR)];
- [95] Lcppr from *Lactobacillus* sp. CGMCC 9967 (Lcppr);
- [96] Lcddh from *Lacatobacillus casei* (Lcddh); 또는
- [97] Paldh from *Pediococcus acidilactici* (Paldh).
- [98]

- [99] 구체적으로, 상기 디하이드로게나제 코딩 유전자는 서열번호 6의 서열을 포함하는 효소를 코딩하는 *LlpanE* 유전자, 서열번호 7의 서열을 포함하는 효소를 코딩하는 *KIVR* 유전자, 서열번호 8의 서열을 포함하는 효소를 코딩하는 *ManDH* 유전자, 서열번호 9의 서열을 포함하는 효소를 코딩하는 *Lcppr* 유전자, 서열번호 10의 서열을 포함하는 효소를 코딩하는 *Lcddh* 유전자 및 서열번호 11의 서열을 포함하는 효소를 코딩하는 *Paldh* 유전자로 구성된 군에서 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [100] 상기 CoA 전이효소 코딩 유전자는 예를 들어, 다음과 같을 수 있다:
- [101] 4HBS from *Metallosphaera sedula* (4HBS);
- [102] Pct from *Clostridium propionicum* pct variant (pct540; V193A, silent mutations of T78C, T669C, A1125G, T1158C);
- [103] HadA from *Clostridioides difficile* (HadA);
- [104] AbfT from *Clostridium aminobutyricum* (AbfT);
- [105] Cat2 from *Clostridium aminobutyricum* (Cat2); 또는
- [106] PrpE from *Cupriavidus necator* (PrpE).
- [107]
- [108] 본 발명에 따른 CoA 전이효소 코딩 유전자는 구체적으로, 서열번호 12의 서열을 포함하는 효소를 코딩하는 *hadA* 유전자일 수 있다.
- [109] [서열번호 12]
- MLLEGVKVVELSSFIAAPCCA KMLGDWGA EVIKIEPIEGDGIRVMGGTFKSPASDDENP
MFELENGNKKGV SINVKSEKGV EILHKLLSEADIFVTNVRVQALEKMGIA YDQIKDKYP
GLIFSQILGYGEKG PLKDKPGFDYTAYFARGGVSQSVMEKGTSPANTAAGFGDHYAGL
ALAAGSLAALHKKAQTGKGERVTVSLFHTAIYGMGTMITTAQYGNEMPLSRENPN SPL
MTTYKCKDGRW IQLALIQYNKWL GKFKCKVINREYILEDDRYNNIDSMVNHVEDLVKIV
GEAMLEKTLDEWSALLEEADLPFEKIQSCEDLLDDEQAWANDFLFKKTYDSGNTGVLV
NTPVMFRNEG IKEYTPAPKVGQHTVEVLKSLGYDEEKINNFKDSKVVR Y
- [110] 본 발명에 따른 CoA 전이효소 코딩 유전자는 구체적으로, 서열번호 16의 서열을 포함하는 효소를 코딩하는 *4HBS* 유전자, 서열번호 17의 서열을 포함하는 효소를 코딩하는 *AbfT* 유전자, 서열번호 18의 서열을 포함하는 효소를 코딩하는 *Cat2* 유전자, 서열번호 19의 서열을 포함하는 효소를 코딩하는 *Pct540* 유전자 및 서열번호 20의 서열을 포함하는 효소를 코딩하는 *PrpE* 유전자로 구성된 군에서 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [111]
- [112] 분지쇄 아미노산인 루신, 이소루신, 발린, 노르루신 (norleucine), 노르발린 (norvaline)을 사용하여 위와 같은 2-HA를 다양한 물분율로 포함하는 고분자를 생산하였다. 해당 결과를 통해 다섯 가지 종류의 CoA 전이효소 중 HadA 만이 2-HA를 수용할 수 있음을 확인하였다.

- [113] 본 발명에 의해 생산된 2-HA는 CoA 전이효소 (CoA transferase)에 의해 2-HA-CoA가 되고, PHA 합성효소를 통해 PhaA, PhaB를 통해 만들어진 3HB-CoA와 함께 중합되어 P(3HB-Co-2HA) 형태의 고분자가 생산될 수 있다.
- [114] 상기 폴리하이드록시알카노에이트 합성효소를 코딩하는 유전자는 예를 들어 *Pseudomonas* sp. MBEL 6-19 *phaC* variant일 수 있다. 본 발명에 따른 폴리하이드록시알카노에이트 합성효소를 코딩하는 유전자는 구체적으로, 서열번호 13의 서열을 포함하는 효소를 코딩하는 *PhaC* 유전자일 수 있다.
- [115] [서열번호 13]
 MSNKSNDKLYQASENTLGLNPVVGLRGKDLLASARMVLRQAQKQPVHVSVKHVAHFG
 LELKNVLLGKSGLQPTSDDRRFADPAWSQNPLYKRYLQTYLAWRKELHDWIDESNLAP
 KDVARGHFVINLMTDAMAPTNTAANPAAVKRFFETGGKSLLDGLSHLAKDLVHNGGM
 PSQVNMGAFAEVGKSLGVTEGAVVFRNDVLELIQYKPTTEQVYERPLLVPQINKFYVF
 DLSPDKSLARFCLRNQVTFIVSWRNPTKEQREWGLSTYIEALKEAVDVVTITGSKDV
 NMLGACSGGITCTALLGHYAAIGENKVNALTLVTVLDTTLDSDVALFVNEQTLEAAK
 RHSYQAGVLEGRDMAKVFAWMRPNDLIWNYWVNNYLLGNEPPVFDILFWNNDTTRLR
 AAFHGDLVELFKNNPLIRPNALEVCGTPIDLKQVTADIFSLAGTNDHITPWKSCYKSAQL
 FGGNVEFVLSSGGHIKSILNPPGNPKSRYMTSTEVAENADEWQANATKHTDSWWLHW
 QAWQAQRSGELKKSPTKLGSKAYPAGEAAPGTIVHER
- [116] 추가로, 폴리하이드록시알카노에이트 합성을 위해 PhaA 및 PhaB를 포함할 수 있다. 상기 PhaA 및 PhaB 각각은 구체적으로, 서열번호 14 및 15의 서열을 포함하는 효소를 코딩하는 *PhaA* 및 *PhaB* 유전자일 수 있다.
- [117] [서열번호 14]
 MTDVVIVSAARTAVGKFGGSLAKIPAPELGAVVIKAALERAGVKPEQVSEVIMGQVLTA
 GSGQNPARQAAIKAGLPAMVPAMTINKVCGSGLKAVMLAANAIMAGDAEIVVAGGQE
 NMSAAPHVLPGRDGRMGDAKLVDVTMIVDGLWDVYNQYHMGITAENVAKEYGITRE
 AQDEFVAVGSQNKAEAAQKAGKFDEEIVPVLIPQRKGDPAFKTDEFVRQGATLDSMSG
 LKPAFDKAGTVTAANASGLNDGAAVVMMSAAKAKELGLTPLATIKSYANAGVDPKV
 MGMGPVPASKRALSRAEWTPQDLDLMEINEAFAAQALAVHQMGWDTSKVNVNGGA
 IAIGHPIGASGCRILVTLHEMKRRDAKKGLASLCIGGGMGVALAVERK
- [118] [서열번호 15]
 MTQRIAYVTGGMGGIGTAICQRLAKDGRVAVAGCGPNSPRREKWLEQQKALGFDFIAS
 EGNVADWDSTKTAFDKVKSEVGEVDVLINAGITRDVFRKMTRADWDAVIDTNLTS
 LFNVTKQVIDGMADRGWGRIVNISSVNGQKQGQFGQTNYSTAKAGLHGFTMALAQEVA
 TKGVTVNTVSPGYIATDMVKAIRQDVLKIVATIPVKRLGLPEEIASICAWLSSEESGFST
 GADFSNLNGGLHMG
- [119] 상기 탄소원으로부터 아세틸-CoA 생성능을 가지는 미생물은 예를 들어, 대장균, 알칼리제네스(*Alcaligenes*)속, 슈도모나스(*Pseudomonas*)속, 에스케리치아

(*Escherichia*)속, 랄스토니아(*Ralstonia*)속, 바실러스(*Bacillus*)속, 또는 코리네박테리움(*Corynebacterium*)을 포함할 수 있으나, 적용 가능한 미생물이라면 제한없이 사용할 수 있다.

[120] 본 발명에서 "재조합"은 숙주세포 내에서 자연적으로 발생하지 않은 폴리뉴클레오티드 또는 단백질을 포함하는 것을 의미한다.

[121] 본 발명에서 도입은 유전자가 염색체외 인자로서 또는 염색체 통합 완성에 의해 복제 가능하게 되는 것을 의미한다. 유전자가 형질전환된 것으로, 형질전환된 유전자는 미생물 내에서 발현될 수 있지만 한다면, 미생물의 염색체 내에 삽입된 것이든 염색체 외에 위치하고 있는 것이든 어느 것이든 포함될 수 있다. 또한, 상기 유전자는 단백질을 코딩할 수 있는 폴리뉴클레오티드로 DNA 및 RNA를 포함할 수 있다.

[122] 미생물 내로 도입되어 발현될 수 있는 것이면, 어떠한 형태로 도입되는 것이든 상관없다. 예를 들면, 상기 유전자는 자체적으로 발현되는데 필요한 모든 요소를 포함하는 폴리뉴클레오티드 구조체인 발현카세트의 형태로 미생물에 도입될 수 있다.

[123] 본 발명에서 "과발현"이란 보통상태에서 세포내 해당유전자가 발현되는 수준보다 높은 수준의 발현을 일컫는 것으로써, 유전체 상에 존재하는 유전자의 프로모터를 강력한 프로모터로 치환하거나, 발현벡터에 해당유전자를 클로닝하여 세포에 형질전환시키는 방법을 통해 발현량을 증가시키는 것 등을 포함하는 개념이다.

[124] 본 발명에서, "벡터(vector)"는 적합한 숙주 내에서 DNA를 발현시킬 수 있는 적합한 조절 서열에 작동가능하게 연결된 DNA 서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다.

[125] 구체적으로, 상기 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.

[126] 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.

[127] 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.

- [128] 라이게이션 후에, 벡터는 적절한 숙주세포로 형질전환 되어야 한다. 상기 숙주 세포는 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* B21 등을 포함한다. 그러나 FMB101, NM522, NM538 및 NM539와 같은 *E. coli* 균주 및 다른 원핵생물의 종(species) 및 속(genera)등이 또한 사용될 수 있다.
- [129] 전술한 *E. coli*에 덧붙여, 아그로박테리움 A4와 같은 아그로박테리움 속 균주, 바실루스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)와 같은 바실리(bacilli), 살모넬라 타이피리움(*Salmonella typhimurium*) 또는 세라티아 마르게센스(*Serratia marcescens*)와 같은 또 다른 장내세균 및 다양한 슈도모나스(*Pseudomonas*) 속 균주가 숙주세포로서 이용될 수 있다.
- [130] 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.
- [131] 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.
- [132] "작동가능하게 연결된"은 연결된 DNA 서열이 접촉하고, 또한 분비 리더의 경우 접촉하고 리딩 프레임 내에 존재하는 것을 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.
- [133] 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.
- [134] 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 진핵

세포인 경우에는, 발현 벡터는 진핵 발현 숙주 내에서 유용한 발현 마커를 더 포함하여야만 한다.

- [135] 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.
- [136] 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.
- [137] 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.
- [138] 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 배양에서 발현시킬 수 있는 각종 벡터/발현 조절 서열/숙주 조합을 선정할 수 있다.
- [139] 발현 클로닝에 의해 본 발명에 따른 단백질의 cDNA를 클로닝하려고 할 때의 스크리닝법으로서 바인딩법(binding법), 페닝법(panning법), 필름에멀션법(film emulsion 법)등이 적용될 수 있다.
- [140] 본 발명의 여러 양태에서 20가지 아미노산을 사용하여, 입증한 바와 같이 이러한 시스템은 다양한 방향족 중합체의 제조에 사용될 수 있다. 본 발명에 따르면, 재생 가능한 비식량 바이오매스로부터 방향족 폴리에스테르의 제조를 위한 바이오 프로세스를 확립하는데 기여할 수 있다.
- [141] 구체적으로, 상기 재조합 미생물을 배양하는 단계에서 사용된 배지는 예를 들어, LB 배지, MR 배지를 포함할 수 있다. 배지 중 포함되는 LB 배지는 10 g/L 트립톤, 5 g/L NaCl 및 5 g/L 효모 추출물의 농도로 포함될 수 있다. 배지 중 포함되는 MR 배지는 1L 당, 6.67 g KH_2PO_4 , 4 g $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0.8 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.8 g citric acid 및 5 ml trace metal 용액을 함유하고, 상기 trace metal 용액은 1L 당, 0.5

M HCl: 10 g FeSO₄·H₂O, 2 g CaCl₂, 2.2 g ZnSO₄·H₂O, 0.5 g MnSO₄·H₂O, 1 g CuSO₄·H₂O, 0.1 g (NH₄)₆Mo₇O₂₄·H₂O, and 0.02 g Na₂B₄O₇·10H₂O를 함유한다.

[142] 상기 재조합 미생물을 30°C 내지 37°C의 온도에서 배양하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다. 상기와 같은 온도 조건에서 폴리하이드록시알카노에이트를 효율적으로 수득할 수 있다.

[143] 상기 배양 중 pH는 6.8 내지 7.2로 유지하여 배양하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다. 이와 같은 범위의 pH를 유지함으로써, 본 발명에 따른 재조합 미생물의 성장률은 향상될 수 있다.

[144]

[145] 실시예

[146] 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.

[147] 하기 실시예에서는 재조합 미생물로 대장균을 사용하였으나, 적용 가능한 미생물이란 제한없이 사용할 수 있으며, 알칼리제네스(*Alcaligenes*)속, 슈도모나스(*Pseudomonas*)속, 에스케리치아(*Escherichia*)속, 랄스토니아(*Ralstonia*)속, 바실러스(*Bacillus*)속, 코리네박테리움(*Corynebacterium*) 등을 사용할 수 있다.

[148]

[149] 실시예 1. 2HA 포함 PHA 생산에 관여하는 유전자들의 플라스미드 제작 및 균주, 배양 방법

[150] 본 실험에서 대장균(*E. coli*) XL1-Blue (Stratagene, San Diego, CA) 를 플라스미드 구축 및 유지를 위한 숙주 균주로 사용하였다. 재조합 대장균(*E. coli*) 균주는 10 g/L 트립톤, 5 g/L NaCl 및 5 g/L 효모 추출물을 함유한 LB 또는 LB 한천 플레이트(2.0 % w/v)에서 성장시켰다. 적절한 항생제(50 µg/mL 암피실린, 40 µg/mL 카나마이신 또는 34 µg/mL 클로람페니콜)를 준비하여 배지에 보충하였다. 하기 실시예에서 사용한 균주, 플라스미드 및 프라이머를 표 1와 표 2에 나타내었다.

[151]

[152] 1-1 플라스미드 p437ReAB의 제작

[153] 3-HB (3-hydroxybutyric acid)를 미생물 내에서 생산하고 고분자의 단량체로 중합하는 도 2의 경로에 따라 P(3HB)를 만들기 위해서는 *Ralstonia eutropha* 유래의 PhaA, PhaB가 필요하며, 여기서 PhaC는 *Pseudomonas* sp. MBEL 6-19 *phaC* variant (PhaC1437;E130D,S325T,S477G,Q481K)를 사용하였다. 해당 유전자 3종이 모두 들어있는 플라스미드를 p437ReAB라고 명명하였다. 플라스미드 p437ReAB는 *Ralstonia eutropha*의 PHA synthase 오페론 프로모터 하에, *Pseudomonas* sp. 6-19의 PHA synthase에서 E130D, S325T, S477G 및 Q481K의 4개의 변이를 함유하는 PhaC1437과 *Ralstonia eutropha* 유래 PhaA, PhaB를 발현하는 재조합 플라스미드이다 (Park *et al.*, *Metab. Eng.*, 20, 20-28, 2013).

[154]

[155] 1-2 플라스미드 pKM212_ 아미노산 디아미네이즈 및 디하이드로게나제의 제작

[156] 도 3에서와 같이 사용한 아미노산 20가지 종류와 해당 아미노산들이 LAAD 유전자에 의해 탈아민화 및 탈수소화 (dehydrogenase) 유전자에 의해 탈수소화되어 2-HA가 생산되었다. 각 아미노산의 경우 아민기 (amine group)와 설퍼기 (sulfur group)를 가지고 있어 아민기능기 폴리머 (amine functional polymers) 또는 황 기능기 폴리머 (sulfur functional polymer)를 생산 가능할 것으로 보인다. 이를 위해 먼저 아미노산을 디아미네이션 (deamination) 시키는 유전자인 deaminase를 코딩하는 *ilvA*를 대장균 균주의 크로모솜으로부터, PmILAAD, PmIIILAAD, PvLAAD, PyxLAAD의 서열을 코돈 최적화 과정을 거쳐 합성하였고 이를 C1000 써모 사이클러(Bio-Rad, 캘리포니아 주 허큘리스)를 사용하여 PCR을 수행하였다. 먼저, deamination 모듈인 플라스미드 pKM212 *ilvA*, pKM212 PmILAAD, pKM212 PmIIILAAD, pKM212 PvLAAD, pKM212 PyxLAAD의 구축을 위해 플라스미드 pKM212를 각각 *EcoRI/KpnI*를 사용하여 소화시켰다. 상응하는 *ilvA*를 *MfeI/KpnI*를 사용하여 분해하고 PmILAAD, PmIIILAAD, PvLAAD, PyxLAAD 유전자를 각각 *EcoRI/KpnI*를 사용하여 분해하고 플라스미드 pKM212에 라이게이션시켰다. 다음으로 dehydrogenation 단독 모듈을 구축하기 위하여 pKM212를 각각 *EcoRI/SbfI*을 사용하여 소화한 후 상응하는 *LlpanE*, *KIVR*, *ManDH*, *Lcddh*, *Lcppr*, *Paldh* 유전자를 각각 *EcoRI/SbfI*을 사용하여 분해하고 상기 플라스미드 5종에 라이게이션시켰다.

[157]

[158] 1-3 플라스미드 pKA312_ CoA transferase의 제작

[159] 2-HA는 CoA 전이효소에 의해 2HA-CoA가 되고, PHA 합성효소를 통해 PhaA, PhaB를 통해 만들어진 3HB-CoA와 함께 중합되어 P(3HB-Co-2HA) 형태의 고분자가 생산되었다 (도 4). CoA 전이효소를 사용하기 위해 CoA transferase 코딩하는 4HBS, AbfT, Cat2, HadA, Pct540, PrpE의 서열을 코돈 최적화 과정을 거쳐 합성하였고 이를 C1000 써모 사이클러(Bio-Rad, 캘리포니아 주 허큘리스)를 사용하여 PCR을 수행하였다. CoA transferase 모듈인 pKA312 4HBS, pKA312 AbfT, pKA312 Cat2, pKA312 HadA, pKA312 PrpE, pKA312 Pct540의 구축을 위해 플라스미드 pKA312를 각각 *EcoRI/KpnI*를 사용하여 소화시켰다. 상응하는 4HBS, AbfT, Cat2, HadA, Pct540, PrpE 유전자를 각각 *EcoRI/KpnI*를 사용하여 분해하고 플라스미드 pKA312에 라이게이션시켰다.

[160] [표1]

균주 또는 플라스미드	특징	이용문헌 또는 입수처
균주		
XL1-Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac {F' proAB lacI ^q Z ΔM15 Tn10 (Tet ^R)}	Stratagene [®]
XB-1	XL1-Blue Δ ^{lghA}	랩 스타크
플라스미드		
pKM212	pBBR1MCS2 derivative; tac promoter, <i>R. eutropha</i> PHA biosynthesis genes transcription terminator, Km ^R	1
pKA312	pBBR1MCS2 derivative; tac promoter, <i>R. eutropha</i> PHA biosynthesis genes transcription terminator, Cm ^R	2
P437ReAB	pBluescript KS II(+) derivative; <i>R. eutropha</i> PHA biosynthesis promoter, the phaC1437Ps6-19 gene, the <i>R. eutropha</i> phaAB genes; Apr ^R	1
pKM212 Δ <i>ilxA</i> [*]	pKM212-MCS derivative; tac 프로모터, <i>E. coli</i> 유래의 <i>ilxA</i> (F352A, R362F) 유전자, Km ^R	본 발명
pKM212 PmIIAAD	pKM212-MCS derivative; tac 프로모터, <i>P. mirabilis</i> 유래의 Type I LAAD 유전자, Km ^R	본 발명
pKM212 PmIIIAAD	pKM212-MCS derivative; tac 프로모터, <i>P. mirabilis</i> 유래의 Type II LAAD 유전자, Km ^R	본 발명
pKM212 PvAAD	pKM212-MCS derivative; tac 프로모터, <i>P. vulgatus</i> 유래의 Type II LAAD 유전자, Km ^R	본 발명
pKM212 PxIAAD	pKM212-MCS derivative; tac 프로모터, <i>P. mxxofaciens</i> 유래의 Type I LAAD 유전자, Km ^R	본 발명

[161]

pKM212 <i>ilvA*</i> <i>LlganE</i> ⁺	pKM212-MCS derivative; tac 프로모터, <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> II1403 유래의 <i>panE</i> 유전자 pKM212 <i>ilvA*</i> 에 삽입됨, <i>Km</i> ^R	본 발명 ⁺
pKM212 <i>PmIIAAD</i> ⁺ <i>LlganE</i> ⁺	pKM212-MCS derivative; tac 프로모터, <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> II1403 유래의 <i>panE</i> 유전자 pKM212 <i>PmIIAAD</i> 에 삽입됨, <i>Km</i> ^R	본 발명 ⁺
pKM212 <i>PmIIIAAD</i> ⁺ <i>LlganE</i> ⁺	pKM212-MCS derivative; tac 프로모터, <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> II1403 유래의 <i>panE</i> 유전자 pKM212 <i>PmIIIAAD</i> 에 삽입됨, <i>Km</i> ^R	본 발명 ⁺
pKM212 <i>PxIAAD</i> ⁺ <i>LlganE</i> ⁺	pKM212-MCS derivative; tac 프로모터, <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> II1403 유래의 <i>panE</i> 유전자 pKM212 <i>PxIAAD</i> 에 삽입됨, <i>Km</i> ^R	본 발명 ⁺
pKM212 <i>PxxIAAD</i> ⁺ <i>LlganE</i> ⁺	pKM212-MCS derivative; tac 프로모터, <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> II1403 유래의 <i>panE</i> 유전자 pKM212 <i>PxxIAAD</i> 에 삽입됨, <i>Km</i> ^R	본 발명 ⁺
pKM212 ⁺ <i>LlganE</i> ⁺	pKM212-MCS derivative; tac 프로모터, <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> II1403 유래의 <i>panE</i> 유전자, <i>Km</i> ^R	본 발명 ⁺
pKM212 <i>KIVR</i> ⁺	pKM212-MCS derivative; tac 프로모터, <i>B. bassiana</i> 유래의 <i>kivR</i> 유전자, <i>Km</i> ^R	본 발명 ⁺
pKM212 ⁺ <i>ManDH</i> ⁺	pKM212-MCS derivative; tac 프로모터, <i>E. faecium</i> 유래의 <i>manDH</i> 유전자, <i>Km</i> ^R	본 발명 ⁺
pKM212 ⁺ <i>Lcddh</i> ⁺	pKM212-MCS derivative; tac 프로모터, <i>L. casei</i> 유래의 <i>ddh</i> 유전자, <i>Km</i> ^R	본 발명 ⁺
pKM212 ⁺ <i>Lcspc</i> ⁺	pKM212-MCS derivative; tac 프로모터, <i>Lactobacillus</i> sp. CGMCC 9967 유래의 <i>spv</i> 유전자, <i>Km</i> ^R	본 발명 ⁺

pKM212- Paldh ^a	pKM212-MCS derivative; tac 프로모터, <i>P. acidilactici</i> 유래의 <i>igh</i> 유전자, Km ^R	본 발명 ^a
pKA312- AbfI ^a	pKA312-MCS derivative; tac 프로모터, <i>C. aminobutyricum</i> 유래의 <i>abfI</i> 유전자, Cm ^R	본 발명 ^a
pKA312- Cat2 ^a	pKA312-MCS derivative; tac 프로모터, <i>C. aminobutyricum</i> 유래의 <i>cat2</i> 유전자, Cm ^R	본 발명 ^a
pKA312- HadA ^a	pKA312-MCS derivative; tac 프로모터, <i>C. difficile</i> 유래의 <i>hadA</i> 유전자, Cm ^R	본 발명 ^a
pKA312- Pct540 ^a	pKA312-MCS derivative; tac 프로모터, <i>C. propionicum</i> 유래의 <i>pct</i> 유전자 변이체 (V193A, silent mutations of T78C, T669C, A1125G, T1158C), Cm ^R	본 발명 ^a
pKA312- PrpE ^a	pKA312-MCS derivative; tac 프로모터, <i>C. necator</i> 유래의 <i>prpE</i> 유전자, Cm ^R	본 발명 ^a
pKA312- 4HBS ^a	pKA312-MCS derivative; tac 프로모터, <i>M. sedula</i> 유래의 <i>4hbs</i> 유전자, Cm ^R	본 발명 ^a

^aAp: ampicillin; Km: kanamycin; Cm: chloramphenicol; R: resistance.

^bStratagene Cloning System, La Jolla, CA, USA.

¹Park *et al.*, *Metab. Eng.*, 20, 20-28, 2013

²Choi *et al.*, *Nature biotechnology.*, 34,4, 435-440

Cloning ²⁾	이름 ²⁾	서열 ²⁾
ih:A ²⁾	ih:A ²⁾ _F ²⁾	aaaaaaCAATTGatggctgactcgcaaccct ²⁾
²⁾	ih:A ²⁾ _R ²⁾	aaaaaaGGTACCctaaccgccaagaagaacc ²⁾
PmIIAAD ²⁾	PmIIAAD_F ²⁾	aaaaaaGAATTCATGAACATTTCAAGGAGAAA ²⁾
²⁾	PmIIAAD_R ²⁾	aaaaaaGGTACCTTACTTCTTAAACGATCCA ²⁾
PmIIIAA D ²⁾	PmIIIAAD_F ²⁾	aaaaaagaattcATGGCAATAAGTAGAAGAAAATTTA ²⁾
²⁾	PmIIIAAD_R ²⁾	aaaaaaggtaccTTAGAAACGATACAGACTAAATGGT ²⁾
PvLAAD ²⁾	PvLAAD_F ²⁾	aaaaaagaattcATGGCGATATCCAGAAGAAAATTTA ²⁾
²⁾	PvLAAD_R ²⁾	aaaaaaggtaccTTAGAACTCTGTAAAGACTAAATGGT ²⁾
PvxLAAD ²⁾	PvxLAAD_F ²⁾	aaaaaagaattcATGGTGCGCAGAGATGGTAAATTTC ²⁾
²⁾	PvxLAAD_R ²⁾	aaaaaaggtaccTTTCTTAAATCGATCGAGACTAAAA ²⁾
Lipase ²⁾	Lipase_F ²⁾	aaaaaGAATTCatgagaattacaattccggtgcag ²⁾
²⁾	Lipase_F_RB S ²⁾	aaaaaggtatctttcacacaggaacaataagaattacaattccggtgcag ²⁾
²⁾	Lipase_R ²⁾	aaaaacctgcaggtatatttctttaataactctct ²⁾
ManDH ²⁾	ManDH_F ²⁾	aaaaaaGAATTCATGAAAATTGCCATIGCGGG ²⁾
²⁾	ManDH_F_RB S ²⁾	aaaaaaGGATCCttcacacaggaacaATGAAAATTGCCATIGC GGG ²⁾
²⁾	ManDH_R ²⁾	aaaaaaCCTGCAGGtaTTTAAcATTAAAGAGAGTCCT ²⁾
KIVR ²⁾	KIVR_F ²⁾	aaaaaaGAATTCATGCCATCCCCCTGAACATCC ²⁾
²⁾	KIVR_F_RBS ²⁾	aaaaaaGGATCCttcacacaggaacaATGCCATCCCCCTGAACA TCC ²⁾
²⁾	KIVR_R ²⁾	aaaaaaCCTGCAGGTAACAGTCTACGGGCAAGTT ²⁾

Lcddh	Lcddh_F	aaaaaaGAATTCttcacacaggaacaATGAAAATTATTGCGTATGG
	Lcddh_F_RB S	aaaaaaGGATCCttcacacaggaacaATGAAAATTATTGCGTATGG
	Lcddh_R	aaaaaaCCTGCAGGTTAATTCACCACTTGCTGCA
Lcprh	Lcprh_F	aaaaaaGAATTCATGATGAAAATTCTGAACAGCTTTA
	Lcprh_F_RB S	aaaaaaGGATCCttcacacaggaacaATGATGAAAATTCTGAACAGC TTTA
	Lcprh_R	aaaaaaCCTGCAGGTTAATAGCCGCGGGTCAGATCCACT
Palddh	Palddh_F	aaaaaaGAATTCATGAAAATTATTGCGTATGGCATTG
	Palddh_F_RB S	aaaaaaGGATCCttcacacaggaacaATGAAAATTATTGCGTATGGC ATTG
	Palddh_R	aaaaaaCCTGCAGGTTATTCAAATTCACTTCGTTTGTG
AbfI	AbfI_F	ggcccgaaattcatggaatggaagaagatcta
	AbfI_R	ggaaaGGTACCTtagaatgccgcttggaatc
Cat2	Cat2_F	aaaaaaGAATTCatggagtgggaagagata
	Cat2_R	aaaaaaGGTACCTtaaaatctcttttaaat
HadA	HadA_F	aaaaaaGAATTCatgctttagaaggagttaa
	HadA_R	aaaaaaGGTACCTtaatacttacaactttac
Pct54 D	Pct540_F	aaaaaaGAATTCatgagaagggtcccatat
	Pct540_R	aaaaaaGGTACCTtaggacttcatttcctca
PrgE	PrgE_F	aaaaaaGAATTCatgacggcaagccatgccgt
	PrgE_R	aaaaaaGGTACCTtagccttcagcgctgcct
4HBS	4HBS_F	AAAAAAGAATTCATGACCGTGCTGCTAGAATA
	4HBS_R	AAAAAAGGTACCTTATTTTTTGCGCTGATCCA

Ttcacacaggaaca

명칭	서열
인자	atggctgactcgaacccctgtccggtgtctccggaaggtgccgaatatttaagagcagtgctgcgcgcgcgcggtt acgagggcggcgcaggttacgccgtacaaaaatggaaaactgtcgtcgcgtcttgataacgtcatctgtgtgaa gcgcgaagatcggcagccagtgacagctttaagctgcgcggcgcatacgcctatgatggcggcctgacggaa gaacagaaaagcgcacggcgtgacactgtctctgcgggttaaacacgcgcagggcgtcgcgttttctctgcgcgg ttagcctgtsagggccctgacgttatgccaaaccgccaccgccacatcaaatgcacgcgggtgcgcgcttcgg cggcgaagtgtgtctcacggcgcgaacttgatgagcgaagccaaagcgtatgaactgtcacagcagcag gggttacctgggtgcgcgcgttcgaccatccgatggtgattgccgggcaagcgcagctggcgtggaactgtct cagcagggaccccacgtcgcacccggtattgtgcagtcggcggcggcggcttggtctgctgctgacggtgtct gatcaaacactgatccgcacaaacaaagtgtatgccgtagagcgggaagactccgcctgctgaaagcagcgc tggatgcgggtcatccggttgatctgcgcgcgtagggcctatttctgaaaggcgtagcagtaaacgcctcgtga cgaacaccttcgttatgccagggatctcgcacacatcatcacgtcgtatggcgtatgacatctgacggcgtatga aggatttattcgaagatgtgcgcgcgggtggcgaacccctcgcgcgcgtggcgtgctggcgaatgaasaatata tcgccctgcacaaacttcgcggcgaacggctggcgcataattcttcgggtgccaacgtgaacttcacggcctgc ctacgtctcgaagcgtgcgaactgggcgaacagcgtgaagcgttggtggcggtgaccattccggaagaaaag gcagctccctcaatctgcgaactgtctggcgggcgttcggtcacgcagttcaactacggtttgcgcgaigccaaaa acgctgtcatcttgctgggtgtgcgcctgagccgcggcctcgaagagcgcgaagaaatttgcagatgtcacaacga cggcggctacagcgtgggtgtctctccgacgacgaatggcgaagctcacgtgcgtatattgtcggcggac gtccatcccatccgttcaggaaagcctctacagcttcgaattccggaatcacggcgcgcgtcgtcgtctcct caacacgctgggtacgtactggaacattctgtctcactatcgcagccatggcacgcgactacggcgcgtactgg cggcgttcgaactggcgaaccatgaaccggatttcgaacccggctgaatgagctggcctacgattgcacgacg aaaccaataacccggcgttcaggttcttttggcgggttag

[166]

[167]

[168]

UipnE¹	atgagsattacaatigccggtagcaggagcgatggggagtcggttgggttaatgcttcataaagggtggcaatgaagta accctatagatggatggcctgaacacgttaagcgattaaaggagcatgggttgcgagctaatcaaatggagaaga actcaccgctcaltatcgggtgagttacaatctgagattctctaaagaaaaaacagattaatattttttacaaaa ggcattgcaattagataagatctacaaatatttaaacattatgacgggcataccagggtacttgcctactaaatg gaattggctacgaagatactatagaaaaatatttttgaaaaaataatactttattgtaatactatgtggaactgctggat tagaaggctcaggtaagctaaattatttggatggttcggttgagctacaaaatcttatttcaggtgaggaagaaa cagctaaaaagttagcagaatattatcagaatcgggacigaatgctaaatattcaacaaatattcattatctattata gaaaagcttggtaaatggaacaatgaatggcttggtaactatttagacactaatatggccggattaggtgaacaaa accagcacatgatatgggttgaactattgttaattgaattgcagcagtagcaaaatttgagaatgtaaaccttgatattgc tgaagtagttcagcacgttgaaacatgtttgatccatctacaattggattacattacccctctatgatacaggatttgatt aaaaataatcgaattgacagagattgactatattaatgggctgtttcacglaaagggtaaaaatataatgtagccaca cctatttggatttctaacacaaattagttcacagcaagaaggattatlaaaggcaasataa²
KirR²	atgccatccctgaacatcctcctggttaagcacgttgcctggcagatactagaccgcccccaaatatttcgcgtgg agtcacagccaatttagactcggccacagccgtcaaacccgaccgctgggagtcgaggagactttgctcaggcga ataccagtgagcgcgccgattacgactgcctcgggaaccagtaaaaagaaatatactagtggttccggcaacgt gggacgttgtacgcaagttaacatgagcagacaacgggagctctgcctacacccctggtgttgcacgcgaagag ttactgtcccaatgggtcacctccgaaggagttgttttggccgatalagaggaggaaaaagtcacaaagaacaagcaat tcgacgtggaatggtgacggagtcgaagacctcgtatggccgggtcagagaggtggcagatggggagaatta cacaaatgtttcatttccacaaaagctgacgtcgggctggcgaggcagaccgccttagacgggtacttgggtagatg caggcaggttcgtcttcgctcagaacggcgtaagtaagctgtgggcaccttatggccgttgaatgggcgtcgcgggt atcatccgacgatgcacgctgtctccgctgtgttgaataccacgggatatccgaggcgggcccctttctattcaa tcacacctcacatcggacgcattcataggggccatttcaaaaggagtgccgcccccgtcacggccagata aacgtcgcagattggacgacgatttcttcaaacgtatatcttgagtacccggttttggacactaaagcatgtatccct ggccagctttggatcatcagttagagaagctggcttgaatgccgcgataaatcccttacaacattacttgcgtga aaacaggacagctgttgcagttatgacagccacgacgcattgactagagtttggaccagttattatggcaagcat cggcagtaatacaggctcttataccacgacgctaatttgaatgctgactagctatgcagagacgttccatcgt tggccagggtcggacgaltacggctgtaacttgtctaattttgccgcaacigaccgtcagatttccagccca tacttaagcaaaagctgtatgctttgtctaacatacgtgagcctcgttcttccatgcttcaggatgcggaagcagg acgcaagacggaatacgggacgtaaatgggtgacgtggacatggcagagacttgggaltggacttagacgt tggatccatcgggcttaatagaactattgaagaatcgtagtttggataaagaagaacttgccttagactgta³

[169]

ManDH	atgaaasttgcattgcgggagcaggggctatgggaagccgtttcgggcttatgctgcatcagctctggcaacgaag tctcttctc gatagggtggccgaacatgtacagcaaatcaaggagcacgggttgc aagcaactcaacggaaa ggaaattgaagctaaattgccattgtatgcaatcagagggttgaanaagaggacagctc gatttgattatcctttt acaasggcaatg cagttggagaaaatgctcaagacattcaatcaatcaagaaggatactgagggtgtgtgtgtg ctaatgggattgggcacgaagacatcatagaaaagttcgtacc aatggaaaacatctacatcggcaatactatgtg gactgocggacttgaagggtccgggtcaggtaaacctttcgggagtggttcagtcgaattgcagaaccttggcgac gggaaaggaagccggcgtaaaaagctggcggacaatgtctgagttccgggctaacgtcacttctagataata tacactatagttattaccggaaagcatgctgaacggaaagatgaacggactgagcacgatacttgatgtcaatatg ggcgaacttgggaaacgtcgaacggcgtataaatgtgctgactgagttgtaaacgagttgcaaggtagcagca gttgagaagatcgaactggatgtcccgaagtcacgcacactgagagagttgttcgacccgtgaacgatatggtt gcactaccctctatgtatcaagacctgattaaaaaccatcgtttgactgagatc gatttcaataatgtgtgcatctt cgcaagggaanaaaatcggggttgcgactccatactgtgatttctaac agagctggttcacggcaaggaggact ctcttaattgtaaa
Lcdh	atgaaasttattgcgtatgcgcgcgcgtggatgaatcagtaatttaaacagtggcgaaagataccggcaacac cctggaataicacaccgaatttctggatgaanaacaccgtggaaatggcgaaaggctttgagtgcatiaaacagcctgc agaccaccccgatgcggcggcggttgaanaaatgcatgctatggcalttaatttctgaccatttgcascgtg ggcaccgataacattgatatgaccggatgaacagtatggcattcgcctgagcaacgtgcccggcgatatagccg ggcggaattgcgggaattgcgtgaccgataccctgtatctgctgcgaacatgggcaagtgcaagcgagctg caagcggcgattatgaanaagcgggcacctttattggcaagaactgggtcagcagaccgtggcggtgagggg cacggccatattggccaagtggcgaatnaactgtttaaggctttggcggaagtgatgctgtatgacgtatcc gatgaaggcgatcaccggattttgattatgtgagcctggaagatctgtttaaacagagcgatgtgattgattcgc gtgccggcgctgaacagaacacccatatttaaacgaagcggcgtttaacctgatgaacggcgccgaltgtga ttaacaccgcgcgccgaacctgattgatacccaagcgtatgctgagcaacctgaanaagcgcaaacctggcgggc gtggcattgataccatgaatatgaacccaagatctgctgaacctggcgaacatggcagctttaagatccgct gtggatgaactgcctggcaltccgaacgtgtgtgctgagccgcataattgctattatccgaacccgggtgcat aacatggtgtatttagcctgcagcatctggtgattttctgacc aatttaaacggcgcgcaaacctgctggtcag caagtgtgaactaa

[170]

Lcpk¹	atgatgaasattctgaacagctttagcctgaasaccggaacagcgtcagaccctggaggctggggccataccgtg attgatgcggataaacctggtgatgcgaccgcccagcagattgatgtgtgtatggctggaacggcgccggcacc cggcgtgaacttgcctgcctgcaatttgcgaagcagcagcggggcgtggattaicgccctggcgggaactgg cgaacatcatgtgctgctggcgaacacgagcggcattc atgcggaaccgattgcggaatatgtctggcgccgc tgtttaccattagccggcgcttctgcggcgattcgcggcgatcgcgataigtgaccctgcgccaagAACGCC gccgatgaccctgctgaasggcaaaaccggcgtgattttggcaccggccatattggcagcaccattgcgacca actgcasggcgtggcctgcataccattggcgtgagcggcgcstggccgccggcgccggcgttgatcaagtga tgaccgatgtggcgaaccatgagggcgccggcgccggatgtgtgtatAACgcgtgaccgtgacccggga taccAAacattttatgatgaagcgtttttggcgccggcagcgaacagccgctgtttataacattggccggcgcc gagcgtgatatggcgccgcgaccgaagcgcctgaaacaaacagattagcggcgccggcgctggtatgtgtt gatccgggaaccgctgccgaagatagcccgctgtggggcatgaccaacgtgctgctgacccgcataatagcgg cacctgtccgcagcgtgcgctaaagtgttttaaattttaacgataacctgaAACcctgattagcagcggctcagc tggcgagccatcaagtggatctgaccgcggcctattaa²
Paldh²	atgaaaattattgcgtatggcattcgcgatgatgaaaaaccgtatctggatgaatgggtgaccaaaaaccsattgaa gtgaaagcgggtccggaatcgtctgtagcagcaacattgatctggcgaaaaactatgagggcgtgtgtgctatc agcagaaaccgtataccgggaatcgtttgataaaatgcattgaatttggcattcattgcgttagcctgcgcaacgtgg gcgtggataatgtaccggcggtatgcctgaaaaaaacgataataaaitagcaatgtccggcggtatagcccg gcgcgatttgcggaacgtgagcgtgacgcagctgcggcgctgctgcgcaasattccggaatttgataaaaaatgg cgcatggcgattatcgtgggaaccggatattggcctggaaactgaatcagatgaccgtggcggtgattggcaccg ggcgattggccggcgggcgattgataattttaaaggcttggcgcgaaagtgaattgcgtatgatgtgttcgcaacc cggcgctggaaaaagagcgtatgtgtgataccctggaagaactgtatcagcaagcgaacgtgattaccctgc atgtccggcgctgaaagataactatcatatgtctgataaaaaagcgttggcagatgcaggtggcacctttatc tgaactttgcggcgacccctgggtgatacccgccgctgctgaaagcgcgtgataagcggcaaaagtggcggg cggcgccgtggataacctatgaaaacgaagtggcattttgatgtggaatcatggcgatcagccggttgatgatccg gtgttaacgatctgatgagccggcgcaacgtgatgataccccgatggcggtttataaccggccggcggtgaa aaaacatgtgtcagattgcgtgataaacaccggcgtatgtattgaaaaaacagcagcaaaaacgaagtgaat ttgaataa³

[171]

4HBS¹	atgaccgtgtcaggaatgaaacgcaatcatgaagaactgcgcgcgaaggctataaataacacccagtatcgc tgaacccgagcgaaacccctgtggaacaaaaaataagaccatgaacgcgaagaaactggaaagagaaagc ttccgctgaacgcatgtgaaatgggcgtgggataacgicccgtttatcgcaacttttgaaaagcaaggctt gaacggatcagatcgcgattggaaagatatgtgaaaatccgattctgcgcaagatgaactgcgcaagatct gagcgcgaacccgccgttggcagcattatggtgccggaacigcgaacgcattcgcttggagcgcgaccag cggcagcaaccggcctgcgcaccttcagggtggggcgcactggaactggattatttgaagaagcgcaggcgc gctatctgtgaccttgcgggcgtgaaaccgaccacgtgtatgcgaactatcgaacatgagcggcctttatagct ggggcccgccggtggtgaaacgcgattgtggcgtgcgcgcgacgcgattcgggcgccggcgaaacc tattttagctggaagcgcgcataaccctgatttgcctgtggaaagtgtgtgtggcgaccaccgggtgct gcatcgcctgttggcgaagaagcgaagcgggaagcctgggaagcccgtttaaagtgtgtgtgtgtgtgtgtgt ggcgccggcggaacacaaaaaaactgttcagggtgcatccgaacgcgaactggcgattagcgtgtgtg ggcaccaccgattggcctatgtgggtggaatgccgggcctggtatggcagctggtgattgggaagatatgga aatttgatattgtgtatccgaaacgattgaacggcggaacccggcggaacggcggaactgattcgaccct gctgaacattttacatgccgt tccgacctatggcattaccatgcgcgtttgtggaaccgattccggcgccgtgtgaaatggtgtgtgtgtgtgt gcaaacctgt atttatggcaacgaatgataaactgaaatcgggtggaacccggcgcaacatggtgtgtgtgtgtgtgtgtgt ggcgccgcgcggaatctgagggaacgcattggcctgaacaaagatgattggaattgaattggtgtgtgtgtgt ggcaaaaccgcgtggacccgctataaactgcaggtgttctggatcagcgcgaaaaa¹
Abf1²	atggattggaagaagatctatgaagacagaacatgcactgcagatgaagcagtaagagcattaaagtacgtgac agagtgtctatttgcgcactgt aatgtaacggttcacacatgttacccttggaaaggtgtgaatactcaaaaccagaatataaggaaaactttatgtt aagggttggtttacaagcccttcacaaagagatccattgcagaaggaacggacaggttgcctgtatcttcacg aggtaccatcttaatacagaanaagacatttccatgttgaatgtatcattgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt ttctgt tcaggtaccgt cagaatcggacttcctaagatcgggtgaagtagaagctgtattgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt tccacattacagcttgggtatcggagctatccggatgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt actctgaaatgattccgacgggt aaggcgaatggcaataacattctaatgggacgaagagacttatgatttgcgtgcaaacatcgaaggtgaat taaagccggttgactacataaatcaccatctgt gttgaatttatgggtcagattgtatccgatagtatgggacaaagcagttctcaggagtagggcgtcaggttgaactg taagaggtgcatccatgtctattgacggaaggtgaagcgaatcgcggtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt tggaggtatgattcgaagatcgttccattatcgtatcaggcagctgtactacatccagaacgaatgcgacta tgtcgtaacggaaataggtatgt acacctgatttcgaagatgaatgaaggtgtgaattgaaagagattcaacgcgcgcatctaa²

[173]

[174] 실시예 2. 재조합 대장균에서 2HA 포함 고분자 생성 확인

[175] 본 발명의 실시예에서 재조합 대장균에서, 2HA 포함 PHA를 생산하기 위하여 사용되는 MR 배지는 1L 당, 6.67 g KH_2PO_4 , 4 g $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0.8 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.8 g citric acid 및 5 ml trace metal 용액을 함유하고, 상기 trace metal 용액은 1L

당, 0.5 M HCl: 10 g $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 2 g CaCl_2 , 2.2 g $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.5 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1 g $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.1 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot \text{H}_2\text{O}$, and 0.02 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 를 함유한다.

- [176] 각 균주 배양에 있어서, 종균배양은 5mL LB 배지가 첨가된 25mL 튜브에서 30°C로 하룻밤 진탕배양하였으며, 1mL의 배양액을 20 g/L의 글루코스와 2 g/L의 아미노산을 함유하는 100 mL의 MR 배지를 함유하는 250 mL 플라스크에 접종하여 30°C에서 96시간 동안 진탕배양하였다. 필요한 경우에는 3HB 2 g/L를 추가로 공급해주었다.
- [177] PHA의 농도와 PHA 모노머의 조성을 fused silica capillary column (Supelco SPBTM-5, 30 m $\times$ 0.32 mm ID 0.25 mm film, Bellefonte, PA, USA)이 장착된 gas chromatography (6890N GC System, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)로 benzoic acid methyl ester를 internal standard로 사용하여 분석하였다. 건조균체중량 (dry cell weight per liter of culture broth)은 기존에 보고된 방법으로 측정하였다. PHA content (wt%)는 건조균체중량과 PHA 농도의 비율로 정의된다.
- [178]
- [179] 2-1 L-amino acid deaminase 스크리닝
- [180] 각 아미노산 별로 다른 활성을 보이는 아미노산 디아미네이즈 효소 선택에 있어서 높은 2HA 분획을 가지는 폴리(2HA-co-3HB) 공중합체를 생산하는 *ilvA*, *PmILAAD*, *PmIIAAD*, *PvLAAD*, *PyxLAAD* 에 대한 테스트를 진행하였다. 이 경우 외래 유전자인 디아미네이즈를 발현하지 않고 대장균 자체에 존재하는 디아미네이즈를 이용하는 균주를 컨트롤로 사용하였다. 이 때 사용된 디하이드로게나제는 *LlpanE*, PHA 합성 효소는 *PhaC1437* (E130D, S325T, S477G 및 Q481K) 이고 CoA 전이효소는 *HadA*로 고정하였다. 본 실시예에서는 락테이트 단량체가 고분자 공중합체로 함유되는 것을 억제하기 위하여 *ldhA*가 결실된 숙주세포인 재조합 대장균 XB-1 균주를 사용하였다. 상기 배지에서 배양된 형질전환된 재조합 대장균 XB-1 균주로부터 생산된 고분자 분석 결과를 표 3에 나타내었다.
- [181] [표3]

Leucine를 공급하여 주었을 때 재조합 대장균이 생산하는 PHA 공중합체의 조성 및 농도

재조합 균주 ^a	폴리머 조성 ^b (mol%)			폴리머 함량 (wt%)	폴리머 농도 (g/L)
	2HIC	3HB	LA		
XB-1/ p437540 pKM212 LlpnE pKA312 HadA	36.66	63.34	--	35.31	0.26
XB-1/ p437540 pKM212 ilvA* LlpnE pKA312 HadA	30.70	69.30	--	23.38	0.22
XB-1/ p437540 pKM212 PmIIAAD LlpnE pKA312 HadA	33.41	66.59	--	18.69	0.08
XB-1/ p437540 pKM212 PmIIIAAD LlpnE pKA312 HadA	34.84	65.16	--	9.34	0.09
XB-1/ p437540 pKM212 PyLAAD LlpnE pKA312 HadA	48.02	51.98	--	3.20	0.01
XB-1/ p437540 pKM212 PyxLAAD LlpnE pKA312 HadA	33.69	66.31	--	48.68	0.34

[182] : Leucine을 외부에서 첨가하여 주었을 때, 상기 디아미네이즈 효소 중에 PyxLAAD가 상대적으로 가장 높은 2HIC 함량을 가진 고분자를 생성하는 것을 확인하였다.

[183] [표4]

Isoleucine를 공급하여 주었을 때 재조합 대장균이 생산하는 PHA 공중합체의 조성 및 농도

재조합 균주 ^a	폴리머 조성 ^b (mol%) ^c			폴리머 함량 (wt%) ^c	폴리머 농도 (g/L) ^c
	2H3MP ^c	3HB ^c	LA ^c		
XB-1/ p437540 pKM212 LlpnE pKA312 HadA ^c	41.86 ^c	58.14 ^c	-- ^c	12.95 ^c	0.11 ^c
XB-1/ p437540 pKM212 ilxΔ* LlpnE pKA312 HadA ^c	16.22 ^c	83.78 ^c	-- ^c	18.27 ^c	0.16 ^c
XB-1/ p437540 pKM212 PmILAAD LlpnE pKA312 HadA ^c	51.60 ^c	48.40 ^c	-- ^c	1.49 ^c	0.01 ^c
XB-1/ p437540 pKM212 PmIIAAD LlpnE pKA312 HadA ^c	18.06 ^c	81.94 ^c	-- ^c	1.71 ^c	0.01 ^c
XB-1/ p437540 pKM212 P _γ LAAD LlpnE pKA312 HadA ^c	24.97 ^c	75.03 ^c	-- ^c	7.51 ^c	0.06 ^c
XB-1/ p437540 pKM212 P _{γx} LAAD LlpnE pKA312 HadA ^c	16.56 ^c	83.44 ^c	-- ^c	4.26 ^c	0.04 ^c

[184] : Isoleucine을 외부에서 첨가하여 주었을 때, 상기 디아미네이즈 효소를 발현하지 않고 대장균 자체 디아미네이즈를 이용하였을 때 상대적으로 가장 높은 2H3MP 함량을 가진 고분자를 생성하는 것을 확인하였다.

[185] [표5]

Valine를 공급하여 주었을 때 재조합 대장균이 생산하는 PHA 공중합체의 조성 및 농도

재조합 균주 ^a	폴리머 조성 ^b (mol%)			폴리머 함량 (wt%)	폴리머 농도 (g/L)
	2HIV	3HB	LA		
XB-1/ p437540 pKM212 LlpnE pKA312 HadA	33.97	66.03	—	37.93	0.34
XB-1/ p437540 pKM212 ilvA* LlpnE pKA312 HadA	14.21	85.79	—	16.01	0.06
XB-1/ p437540 pKM212 PmILAAD LlpnE pKA312 HadA	33.10	66.90	—	16.85	0.06
XB-1/ p437540 pKM212 PmILAAD LlpnE pKA312 HadA	27.93	72.07	—	33.29	0.16
XB-1/ p437540 pKM212 PylAAD LlpnE pKA312 HadA	12.50	87.50	—	2.72	0.01
XB-1/ p437540 pKM212 PylAAD LlpnE pKA312 HadA	14.84	85.16	—	10.33	0.05

[186] : Valine을 외부에서 첨가하여 주었을 때, 상기 디아미네이즈 효소 중에 PmILAAD와 PmIILAAD 그리고 대장균 자체 디아미네이즈를 이용하였을 때 상대적으로 가장 높은 2HIV 함량을 가진 고분자를 생성하는 것을 확인하였다.

[187] [표6]

Norvaline를 공급하여 주었을 때 재조합 대장균이 생산하는 PHA 공중합체의 조성 및 농도

재조합 균주 ^a	폴리머 조성 ^b (mol%)			폴리머 함량 (wt%)	폴리머 농도 (g/L)
	2HV	3HB	LA		
XB-1/ p437540 pKM212 LlpnE pKA312 HadA	55.64	44.36	--	36.09	0.31
XB-1/ p437540 pKM212 ilx ⁺ A* LlpnE pKA312 HadA	0.81	99.19	--	21.32	0.18
XB-1/ p437540 pKM212 PmILAAD LlpnE pKA312 HadA	3.23	96.77	--	14.65	0.11
XB-1/ p437540 pKM212 PmILAAD LlpnE pKA312 HadA	2.86	97.14	--	4.96	0.03
XB-1/ p437540 pKM212 P ₂ LAAD LlpnE pKA312 HadA	13.20	86.80	--	1.38	0.01
XB-1/ p437540 pKM212 P ₃ LAAD LlpnE pKA312 HadA	1.48	98.52	--	11.54	0.09

[188] : Norvaline을 외부에서 첨가하여 주었을 때, 상기 디아미네이즈 효소를 발현하지 않고 대장균 자체 디아미네이즈를 이용하였을 때 상대적으로 가장 높은 2HV 함량을 가진 고분자를 생성하는 것을 확인하였다.

[189] [표7]

Norleucine를 공급하여 주었을 때 재조합 대장균이 생산하는 PHA 공중합체의 조성 및 농도

재조합 균주 ^a	폴리머 조성 ^b (mol%) ^c			폴리머 함량 (wt%) ^c	폴리머 농도 (g/L) ^c
	2HHx ^c	3HB ^c	LA ^c		
XB-1/ p437540 pKM212 LlpnE pKA312 HadA ^c	34.20 ^c	44.36 ^c	~ ^c	36.09 ^c	0.31 ^c
XB-1/ p437540 pKM212 ilvA* LlpnE pKA312 HadA ^c	1.53 ^c	99.19 ^c	~ ^c	21.32 ^c	0.18 ^c
XB-1/ p437540 pKM212 PmILAAD LlpnE pKA312 HadA ^c	3.67 ^c	96.33 ^c	~ ^c	15.68 ^c	0.12 ^c
XB-1/ p437540 pKM212 PmILAAD LlpnE pKA312 HadA ^c	2.86 ^c	97.14 ^c	~ ^c	4.96 ^c	0.03 ^c
XB-1/ p437540 pKM212 PyLAAD LlpnE pKA312 HadA ^c	13.20 ^c	86.80 ^c	~ ^c	1.38 ^c	0.01 ^c
XB-1/ p437540 pKM212 PxxLAAD LlpnE pKA312 HadA ^c	1.48 ^c	98.52 ^c	~ ^c	11.54 ^c	0.09 ^c

[190] : Norleucine을 외부에서 첨가하여 주었을 때, 상기 디아미네이즈 효소를 발현하지 않고 대장균 자체 디아미네이즈를 이용하였을 때 상대적으로 가장 높은 2HHx 함량을 가진 고분자를 생성하는 것을 확인하였다.

[191] [표8]

Methionine를 공급하여 주었을 때 재조합 대장균이 생산하는 PHA 공중합체의 조성 및 농도

재조합 균주 ^a	폴리머 조성 ^b (mol%) ^c			폴리머 함량 (wt%) ^c	폴리머 농도 (g/L) ^c
	TB ^c	3HB ^c	LA ^c		
XB-1 ^d p437540 pKM212 LlpnE pKA312 HadA ^e	63.50 ^c	36.50 ^c	— ^c	65.75 ^c	0.81 ^c
XB-1 ^d p437540 pKM212 ilvA* LlpnE pKA312 HadA ^e	25.96 ^c	74.04 ^c	— ^c	36.74 ^c	0.44 ^c
XB-1 ^d p437540 pKM212 PmILAAD LlpnE pKA312 HadA ^e	60.33 ^c	39.67 ^c	— ^c	41.74 ^c	0.40 ^c
XB-1 ^d p437540 pKM212 PmILAAD LlpnE pKA312 HadA ^e	24.69 ^c	75.31 ^c	— ^c	4.34 ^c	0.04 ^c
XB-1 ^d p437540 pKM212 P ₁ LAAD LlpnE pKA312 HadA ^e	47.46 ^c	52.54 ^c	— ^c	32.74 ^c	0.32 ^c
XB-1 ^d p437540 pKM212 P ₂ LAAD LlpnE pKA312 HadA ^e	24.27 ^c	75.73 ^c	— ^c	5.56 ^c	0.05 ^c

[192] : Methionine을 외부에서 첨가하여 주었을 때, 상기 디아미네이즈 효소 중에 PmILAAD와 대장균 자체 디아미네이즈를 이용하였을 때 상대적으로 가장 높은 TB 함량을 가진 고분자를 생성하는 것을 확인하였다.

[193] [표9]

Phenylalanine를 공급하여 주었을 때 재조합 대장균이 생산하는 PHA 공중합체의 조성 및 농도

재조합 균주 ^a	폴리머 조성 ^b (mol%)			폴리머 함량 (wt%)	폴리머 농도 (g/L)
	PhP	3HB	LA		
XB-1/ p437540 pKM212 LlpnE pKA312 HadA	63.91	36.09	—	16.53	0.14
XB-1/ p437540 pKM212 ilxA* LlpnE pKA312 HadA	12.95	87.05	—	39.63	0.03
XB-1/ p437540 pKM212 PmILAAD LlpnE pKA312 HadA	28.38	71.62	—	42.30	0.44
XB-1/ p437540 pKM212 PmILAAD LlpnE pKA312 HadA	23.36	76.64	—	13.64	0.10
XB-1/ p437540 pKM212 PyxLAAD LlpnE pKA312 HadA	35.59	64.41	—	10.24	0.06
XB-1/ p437540 pKM212 PyxLAAD LlpnE pKA312 HadA	22.97	77.03	—	44.02	0.48

[194] : Phenylalanine을 외부에서 첨가하여 주었을 때, 상기 디아미네이즈 효소 중에 PmILAAD와 PyxLAAD 그리고 대장균 자체 디아미네이즈를 이용하였을 때 상대적으로 가장 높은 PhP 함량을 가진 고분자를 생성하는 것을 확인하였다.

[195]

[196] ^a각각의 균주의 경우 3HB 첨가 MR 배지에서 96시간동안 배양되었다.

[197] ^b3HB: 3-hydroxybutyrate; LA: lactate; 2HIC: 2-hydroxyisocaproate; 2H3MP: 2-hydroxy-3-methylpentanoate; 2HIV: 2-hydroxyisovalerate; 2HV: 2-hydroxyvalerate; TB: 2-hydroxy-4-(methylthio)butyrate; PhP(PhLA): 2-hydroxy-3-phenylpropionate

[198]

[199] : 상기 결과를 통해서 아미노산 별로 높은 2HA 물분율을 서포트하는 디아미네이즈가 각각 다름을 확인할 수 있었다.

[200]

[201] 2-2 Dehydrogenase 스크리닝

[202] 2KA 를 2HA로 전환하는 디하이드로게나제의 선택에 있어서 높은 2HA 분획을 가지는 폴리(2HA-co-3HB) 공중합체를 생산하는 LlpnE, KIVR, ManDH, Lcddh,

LcpPr, Paldh 에 대한 테스트를 진행하였다. 이 때 사용된 디아미네이즈는 각 아미노산별로 다른 종류를 선택하였고, PHA 합성 효소는 PhaC1437 (E130D, S325T, S477G 및 Q481K), CoA 전이효소는 HadA로 고정하였다. 상기 배지에서 배양된 형질전환된 재조합 대장균 XL1-Blue 균주로부터 생산된 고분자 분석 결과를 표 10에 나타내었다.

[203] [표10]

Leucine를 공급하여 주었을 때 재조합 대장균이 생산하는 PHA 공중합체의 조성 및 농도

재조합 균주 ^a	폴리머 조성 ^b (mol%) ^c			폴리머 함량 (wt%) ^c	폴리머 농도 (g/L) ^c
	2HIC ^c	3HB ^c	LA ^c		
XB-1/ p437ReAB pKM212 LpanE pKA312 HadA ^c	19.38 ^c	80.62 ^c	-- ^c	68.95 ^c	1.01 ^c
XB-1/ p437ReAB pKM212 KIVR pKA312 HadA ^c	1.27 ^c	98.73 ^c	-- ^c	83.52 ^c	2.65 ^c
XB-1/ p437ReAB pKM212 ManDH pKA312 HadA ^c	0.23 ^c	99.77 ^c	-- ^c	78.95 ^c	1.99 ^c
XB-1/ p437ReAB pKM212 Lcddh pKA312 HadA ^c	0.90 ^c	99.10 ^c	-- ^c	53.18 ^c	0.55 ^c
XB-1/ p437ReAB pKM212 LcpPh pKA312 HadA ^c	1.08 ^c	98.92 ^c	-- ^c	60.04 ^c	0.59 ^c
XB-1/ p437ReAB pKM212 Paldh pKA312 HadA ^c	1.23 ^c	98.77 ^c	-- ^c	1.04 ^c	0.01 ^c

[204] : Leucine을 외부에서 첨가하여 주었을 때, 상기 디하이드로게나제 효소 중에 LpanE가 상대적으로 가장 높은 2HIC 함량을 가진 고분자를 생성하는 것을 확인하였다.

[205] [표11]

Isoleucine를 공급하여 주었을 때 재조합 대장균이 생산하는 PHA 공중합체의 조성 및 농도

재조합 균주 ^a	폴리머 조성 ^b (mol%) ^c			폴리머 함량 (wt%) ^d	폴리머 농도 (g/L) ^e
	2H3MP ^a	3HB ^a	LA ^a		
XB-1/ p437ReAB pKM212 LlpnE pKA312 HadA ^e	14.98 ^d	85.02 ^d	— ^d	63.82 ^d	1.32 ^d
XB-1/ p437ReAB pKM212 KIVR pKA312 HadA ^e	0.81 ^d	99.19 ^d	— ^d	66.60 ^d	1.38 ^d
XB-1/ p437ReAB pKM212 ManDH pKA312 HadA ^e	1.03 ^d	98.97 ^d	— ^d	71.23 ^d	1.55 ^d
XB-1/ p437ReAB pKM212 Lcddh pKA312 HadA ^e	5.46 ^d	94.54 ^d	— ^d	48.20 ^d	0.92 ^d
XB-1/ p437ReAB pKM212 Lcphh pKA312 HadA ^e	3.95 ^d	96.05 ^d	— ^d	47.92 ^d	0.79 ^d
XB-1/ p437ReAB pKM212 Paldh pKA312 HadA ^e	1.06 ^d	98.94 ^d	— ^d	1.11 ^d	0.02 ^d

[206] : Isoleucine을 외부에서 첨가하여 주었을 때, 상기 디하이드로게나제 효소 중에 LlpnE가 상대적으로 가장 높은 2H3MP 함량을 가진 고분자를 생성하는 것을 확인하였다.

[207] [표12]

Valine를 공급하여 주었을 때 재조합 대장균이 생산하는 PHA 공중합체의 조성 및 농도

재조합 균주 ^a	폴리머 조성 ^b (mol%) ^c			폴리머 함량 (wt%) ^c	폴리머 농도 (g/L) ^c
	2HIV ^c	3HB ^c	LA ^c		
XB-1/ p437ReAB pKM212 LpanE pKA312 HadA ^c	3.09 ^c	96.91 ^c	— ^c	60.92 ^c	1.60 ^c
XB-1/ p437ReAB pKM212 KIVR pKA312 HadA ^c	0.04 ^c	99.96 ^c	— ^c	70.14 ^c	1.34 ^c
XB-1/ p437ReAB pKM212 ManDH pKA312 HadA ^c	1.01 ^c	98.99 ^c	— ^c	85.79 ^c	1.56 ^c
XB-1/ p437ReAB pKM212 Lcddh pKA312 HadA ^c	0.04 ^c	99.96 ^c	— ^c	71.84 ^c	1.33 ^c
XB-1/ p437ReAB pKM212 Lcphh pKA312 HadA ^c	1.57 ^c	98.43 ^c	— ^c	49.18 ^c	0.94 ^c
XB-1/ p437ReAB pKM212 Paldh pKA312 HadA ^c	17.29 ^c	82.71 ^c	— ^c	10.01 ^c	0.04 ^c

[208] : Valine을 외부에서 첨가하여 주었을 때, 상기 디하이드로게나제 효소 중에 LpanE와 Paldh가 상대적으로 가장 높은 2HIV 함량을 가진 고분자를 생성하는 것을 확인하였다.

[209] [표13]

Norleucine를 공급하여 주었을 때 재조합 대장균이 생산하는 PHA 공중합체의 조성 및 농도

재조합 균주 ^a	폴리머 조성 ^b (mol%) ^c			폴리머 함량 (wt%) ^c	폴리머 농도 (g/L) ^c
	2HHx ^c	3HB ^c	LA ^c		
XB-1/ p437ReAB pKM212 LpanE pKA312 HadA ^c	10.21 ^c	89.79 ^c	— ^c	40.43 ^c	0.18 ^c
XB-1/ p437ReAB pKM212 KIVR pKA312 HadA ^c	1.51 ^c	98.49 ^c	— ^c	6.63 ^c	0.03 ^c
XB-1/ p437ReAB pKM212 ManDH pKA312 HadA ^c	0.11 ^c	99.89 ^c	— ^c	43.79 ^c	0.33 ^c
XB-1/ p437ReAB pKM212 Lcddh pKA312 HadA ^c	20.24 ^c	79.76 ^c	— ^c	0.48 ^c	0.00 ^c
XB-1/ p437ReAB pKM212 Lcphh pKA312 HadA ^c	7.63 ^c	92.37 ^c	— ^c	1.43 ^c	0.01 ^c
XB-1/ p437ReAB pKM212 Paldh pKA312 HadA ^c	14.26 ^c	85.74 ^c	— ^c	15.03 ^c	0.13 ^c

[210] : Norleucine을 외부에서 첨가하여 주었을 때, 상기 디하이드로게나제 효소 중에 LpanE와 Paldh가 상대적으로 가장 높은 2HHx 함량을 가진 고분자를 생성하는 것을 확인하였다.

[211] [표14]

Norvaline를 공급하여 주었을 때 재조합 대장균이 생산하는 PHA 공중합체의 조성 및 농도

재조합 균주 ^a	폴리머 조성 ^b (mol%) ^c			폴리머 함량 (wt%) ^c	폴리머 농도 (g/L) ^c
	2HV ^c	3HB ^c	LA ^c		
XB-1/ p437ReAB pKM212 LpanE pKA312 HadA ^c	4.65 ^c	95.35 ^c	-- ^c	69.21 ^c	1.60 ^c
XB-1/ p437ReAB pKM212 KIVR pKA312 HadA ^c	0.38 ^c	99.62 ^c	-- ^c	16.96 ^c	0.12 ^c
XB-1/ p437ReAB pKM212 ManDH pKA312 HadA ^c	-- ^c	100 ^c	-- ^c	73.04 ^c	1.62 ^c
XB-1/ p437ReAB pKM212 Lcddh pKA312 HadA ^c	9.08 ^c	90.92 ^c	-- ^c	1.80 ^c	0.01 ^c
XB-1/ p437ReAB pKM212 LcnpH pKA312 HadA ^c	0.72 ^c	99.28 ^c	-- ^c	26.36 ^c	0.25 ^c
XB-1/ p437ReAB pKM212 Paldh pKA312 HadA ^c	3.96 ^c	96.04 ^c	-- ^c	30.25 ^c	0.18 ^c

[212] : Norvaline을 외부에서 첨가하여 주었을 때, 상기 디하이드로게나제 효소 중에 LpanE와 Paldh가 상대적으로 가장 높은 2HV 함량을 가진 고분자를 생성하는 것을 확인하였다.

[213] [표15]

Methionine를 공급하여 주었을 때 재조합 대장균이 생산하는 PHA 공중합체의 조성 및 농도

재조합 균주 ^a	폴리머 조성 ^b (mol%) ^c			폴리머 함량 (wt%) ^c	폴리머 농도 (g/L) ^c
	TB ^c	3HB ^c	LA ^c		
XB-1/ p437ReAB pKM212 LlanE pKA312 HadA ^c	18.84 ^c	81.16 ^c	— ^c	79.08 ^c	0.25 ^c
XB-1/ p437ReAB pKM212 KIVR pKA312 HadA ^c	32.73 ^c	67.27 ^c	— ^c	50.16 ^c	0.47 ^c
XB-1/ p437ReAB pKM212 ManDH pKA312 HadA ^c	7.09 ^c	92.91 ^c	— ^c	78.15 ^c	1.92 ^c
XB-1/ p437ReAB pKM212 Lcddh pKA312 HadA ^c	34.30 ^c	65.70 ^c	— ^c	44.89 ^c	0.50 ^c
XB-1/ p437ReAB pKM212 Lcpph pKA312 HadA ^c	25.65 ^c	74.35 ^c	— ^c	52.63 ^c	1.18 ^c
XB-1/ p437ReAB pKM212 Paldh pKA312 HadA ^c	0 ^c	100 ^c	— ^c	0.04 ^c	0.00 ^c

[214] : Methionine을 외부에서 첨가하여 주었을 때, 상기 디하이드로게나제 효소 중에 Lcddh와 Lcpph가 상대적으로 가장 높은 TB 함량을 가진 고분자를 생성하는 것을 확인하였다.

[215] [표16]

Phenylalanine를 공급하여 주었을 때 재조합 대장균이 생산하는 PHA 공중합체의 조성 및 농도

재조합 균주 ^a	폴리머 조성 ^b (mol%) ^c			폴리머 함량 (wt%) ^c	폴리머 농도 (g/L) ^c
	PhP ^c	3HB ^c	LA ^c		
XB-1/ p437ReAB pKM212 LlganE pKA312 HadA ^c	16.90 ^c	83.10 ^c	— ^c	79.08 ^c	0.25 ^c
XB-1/ p437ReAB pKM212 KIVR pKA312 HadA ^c	2.02 ^c	97.98 ^c	— ^c	47.84 ^c	0.66 ^c
XB-1/ p437ReAB pKM212 ManDH pKA312 HadA ^c	0.70 ^c	99.30 ^c	— ^c	43.08 ^c	0.95 ^c
XB-1/ p437ReAB pKM212 Lcddh pKA312 HadA ^c	14.34 ^c	85.66 ^c	— ^c	44.06 ^c	0.59 ^c
XB-1/ p437ReAB pKM212 Lcphh pKA312 HadA ^c	35.05 ^c	64.95 ^c	— ^c	80.22 ^c	2.20 ^c
XB-1/ p437ReAB pKM212 Paldh pKA312 HadA ^c	3.68 ^c	96.32 ^c	— ^c	0.62 ^c	0.01 ^c

[216] : Phenylalanine을 외부에서 첨가하여 주었을 때, 상기 디하이드로게나제 효소
중 Lcphh를 이용하였을 때 상대적으로 가장 높은 PhP 함량을 가진 고분자를 생
성하는 것을 확인하였다.

[217]

[218] ^a각각의 균주의 경우 MR 배지에서 96시간동안 배양되었다.

[219] ^b3HB: 3-hydroxybutyrate; LA: lactate; 2HIC: 2-hydroxyisocaproate; 2H3MP: 2-
hydroxy-3-methylpentanoate; 2HIV: 2-hydroxyisovalerate; 2HV: 2-hydroxyvalerate;
TB: 2-hydroxy-4-(methylthio)butyrate; PhP(PhLA): 2-hydroxy-3-phenylpropionate

[220]

[221] : 상기 결과를 통해서 아미노산 별로 높은 2HA 물분율을 서포트하는 디하이드
로게나제가 각각 다름을 확인할 수 있었다.

[222]

[223] 2-3 CoA transferase 스크리닝

[224] 2HA 를 2HA-CoA로 전환하는 CoA transferase의 선택에 있어서 높은 2HA 분
획을 가지는 폴리(2HA-co-3HB) 공중합체를 생산하는 4HBS, AbfT, Cat2, Pct540,

PrpE, HadA 에 대한 테스트를 진행하였다. 이 때 사용된 디아미네이즈는 각 아미노산별로 다른 종류를 선택하였고, 디하이드로게나제는 LpanE, PHA 합성 효소는 PhaC1437 (E130D, S325T, S477G 및 Q481K)로 고정하였다. 상기 배지에서 배양된 형질전환된 재조합 대장균 XL1-Blue 균주로부터 생산된 고분자 분석 결과를 표 16에 나타내었다.

[225] [표17]

Leucine를 공급하여 주었을 때 재조합 대장균이 생산하는 PHA 공중합체의 조성 및 농도

재조합 균주 ^a	폴리머 조성 ^b (mol%) ^c			폴리머 함량 (wt%) ^d	폴리머 농도 (g/L) ^e
	2HIC ^c	3HB ^c	LA ^c		
XB-1/ p437ReAB pKM212 LpanE pKA312 4HBS ^c	0.05 ^c	99.95 ^c	~ ^c	61.86 ^c	1.42 ^c
XB-1/ p437ReAB pKM212 LpanE pKA312 AbfT ^c	0.05 ^c	99.95 ^c	~ ^c	71.42 ^c	1.43 ^c
XB-1/ p437ReAB pKM212 LpanE pKA312 Cat2 ^c	0.05 ^c	99.95 ^c	~ ^c	72.65 ^c	1.33 ^c
XB-1/ p437ReAB pKM212 LpanE pKA312 Pct540 ^c	0.03 ^c	99.97 ^c	~ ^c	76.30 ^c	1.56 ^c
XB-1/ p437ReAB pKM212 LpanE pKA312 PrpE ^c	0.04 ^c	99.96 ^c	~ ^c	79.48 ^c	1.72 ^c
XB-1/ p437ReAB pKM212 LpanE pKA312 HadA ^c	19.38 ^c	80.62 ^c	~ ^c	68.95 ^c	1.01 ^c

[226] : Leucine을 외부에서 첨가하여 주었을 때, 상기 CoA transferase 효소 중에 HadA가 상대적으로 가장 높은 2HIC 함량을 가진 고분자를 생성하는 것을 확인하였다.

[227] [표18]

Isoleucine를 공급하여 주었을 때 재조합 대장균이 생산하는 PHA 공중합체의 조성 및 농도

재조합 균주 ^a	폴리머 조성 ^b (mol%) ^c			폴리머 함량 (wt%) ^d	폴리머 농도 (g/L) ^e
	2H3MP ^c	3HB ^c	LA ^c		
XB-1/ p437ReAB pKM212 LlpnE pKA312 4HBS ^c	0 ^c	100.00 ^c	→ ^c	78.79 ^c	1.85 ^c
XB-1/ p437ReAB pKM212 LlpnE pKA312 AbfI ^c	0 ^c	100.00 ^c	→ ^c	65.70 ^c	1.78 ^c
XB-1/ p437ReAB pKM212 LlpnE pKA312 Cat2 ^c	0 ^c	100.00 ^c	→ ^c	79.32 ^c	1.87 ^c
XB-1/ p437ReAB pKM212 LlpnE pKA312 Pct540 ^c	0 ^c	100.00 ^c	→ ^c	47.39 ^c	0.49 ^c
XB-1/ p437ReAB pKM212 LlpnE pKA312 PcpE ^c	0 ^c	100.00 ^c	→ ^c	59.82 ^c	0.59 ^c
XB-1/ p437ReAB pKM212 LlpnE pKA312 HadA ^c	14.98 ^c	85.02 ^c	→ ^c	63.82 ^c	1.32 ^c

[228] : Isoleucine을 외부에서 첨가하여 주었을 때, 상기 CoA transferase 효소 중에 HadA가 상대적으로 가장 높은 2H3MP 함량을 가진 고분자를 생성하는 것을 확인하였다.

[229] [표19]

Valine를 공급하여 주었을 때 재조합 대장균이 생산하는 PHA 공중합체의 조성 및 농도

재조합 균주 ^a	폴리머 조성 ^b (mol%) ^c			폴리머 함량 (wt%) ^d	폴리머 농도 (g/L) ^d
	2HIV ^e	3HB ^e	LA ^e		
XB-1/ p437ReAB pKM212 LipanE pKA312 4HBS ^f	0.09 ^g	99.91 ^g	~ ^g	72.23 ^g	1.46 ^g
XB-1/ p437ReAB pKM212 LipanE pKA312 AbfT ^f	0.22 ^g	99.78 ^g	~ ^g	73.50 ^g	1.30 ^g
XB-1/ p437ReAB pKM212 LipanE pKA312 Cat2 ^f	0.09 ^g	99.91 ^g	~ ^g	64.54 ^g	1.15 ^g
XB-1/ p437ReAB pKM212 LipanE pKA312 Pct540 ^f	0.06 ^g	99.94 ^g	~ ^g	69.87 ^g	1.36 ^g
XB-1/ p437ReAB pKM212 LipanE pKA312 PtpE ^f	0.09 ^g	99.91 ^g	~ ^g	67.22 ^g	1.33 ^g
XB-1/ p437ReAB pKM212 LipanE pKA312 HadA ^f	3.09 ^g	96.91 ^g	~ ^g	60.92 ^g	1.60 ^g

[230] : Valine을 외부에서 첨가하여 주었을 때, 상기 CoA transferase 효소 중에 HadA가 상대적으로 가장 높은 2HIV 함량을 가진 고분자를 생성하는 것을 확인하였다.

[231] [표20]

Norleucine를 공급하여 주었을 때 재조합 대장균이 생산하는 PHA 공중합체의 조성 및 농도

재조합 균주 ^a	폴리머 조성 ^b (mol%) ^c			폴리머 함량 (wt%) ^d	폴리머 농도 (g/L) ^e
	2HHx ^a	3HB ^a	LA ^a		
XB-1/ p437ReAB pKM212 LlpnE pKA312 4HBS ^c	0.16 ^a	99.84 ^a	→ ^a	40.78 ^a	0.35 ^a
XB-1/ p437ReAB pKM212 LlpnE pKA312 AbfT ^c	0.30 ^a	99.70 ^a	→ ^a	23.84 ^a	0.14 ^a
XB-1/ p437ReAB pKM212 LlpnE pKA312 Cat2 ^c	0.78 ^a	99.22 ^a	→ ^a	12.66 ^a	0.09 ^a
XB-1/ p437ReAB pKM212 LlpnE pKA312 Pct540 ^c	1.05 ^a	98.95 ^a	→ ^a	10.62 ^a	0.08 ^a
XB-1/ p437ReAB pKM212 LlpnE pKA312 PipE ^c	0.34 ^a	99.66 ^a	→ ^a	24.24 ^a	0.17 ^a
XB-1/ p437ReAB pKM212 LlpnE pKA312 HadA ^c	10.21 ^a	89.79 ^a	→ ^a	40.43 ^a	0.18 ^a

[232] : Norleucine을 외부에서 첨가하여 주었을 때, 상기 CoA transferase 효소 중에 HadA가 상대적으로 가장 높은 2HHx 함량을 가진 고분자를 생성하는 것을 확인하였다.

[233] [표21]

Norvaline를 공급하여 주었을 때 재조합 대장균이 생산하는 PHA 공중합체의 조성 및 농도

재조합 균주 ^a	폴리머 조성 ^b (mol%) ^c			폴리머 함량 (wt%) ^c	폴리머 농도 (g/L) ^c
	2HV ^c	3HB ^c	LA ^c		
XB-1/ p437ReAB pKM212 LipanE pKA312 4HBS ^c	0.02 ^c	99.98 ^c	→ ^c	45.79 ^c	0.64 ^c
XB-1/ p437ReAB pKM212 LipanE pKA312 AbfI ^c	0.35 ^c	99.65 ^c	→ ^c	11.67 ^c	0.09 ^c
XB-1/ p437ReAB pKM212 LipanE pKA312 Cat2 ^c	0.26 ^c	99.04 ^c	→ ^c	20.05 ^c	0.13 ^c
XB-1/ p437ReAB pKM212 LipanE pKA312 Pct540 ^c	2.17 ^c	97.83 ^c	→ ^c	37.91 ^c	0.28 ^c
XB-1/ p437ReAB pKM212 LipanE pKA312 PrpE ^c	0.18 ^c	99.82 ^c	→ ^c	22.99 ^c	0.24 ^c
XB-1/ p437ReAB pKM212 LipanE pKA312 HadA ^c	4.65 ^c	95.35 ^c	→ ^c	69.21 ^c	1.60 ^c

[234] : Norvaline을 외부에서 첨가하여 주었을 때, 상기 CoA transferase 효소 중에 HadA가 상대적으로 가장 높은 2HIV 함량을 가진 고분자를 생성하는 것을 확인하였다.

[235] [표22]

Methionine를 공급하여 주었을 때 재조합 대장균이 생산하는 PHA 공중합체의 조성 및 농도

재조합 균주 ^a	폴리머 조성 ^b (mol%) ^c			폴리머 함량 (wt%) ^d	폴리머 농도 (g/L) ^e
	TB ^c	3HB ^c	LA ^c		
XB-1/ p437ReAB pKM212 LlganE pKA312 4HBS ^c	0 ^c	100.00 ^c	-- ^c	77.87 ^c	1.35 ^c
XB-1/ p437ReAB pKM212 LlganE pKA312 AbfT ^c	0 ^c	100.00 ^c	-- ^c	70.99 ^c	1.26 ^c
XB-1/ p437ReAB pKM212 LlganE pKA312 Cat2 ^c	0 ^c	100.00 ^c	-- ^c	81.02 ^c	1.39 ^c
XB-1/ p437ReAB pKM212 LlganE pKA312 Pct540 ^c	0 ^c	100.00 ^c	-- ^c	69.98 ^c	1.11 ^c
XB-1/ p437ReAB pKM212 LlganE pKA312 PcpE ^c	0 ^c	100.00 ^c	-- ^c	59.80 ^c	0.98 ^c
XB-1/ p437ReAB pKM212 LlganE pKA312 Hada ^c	18.84 ^c	81.16 ^c	-- ^c	79.08 ^c	0.25 ^c

[236] : Methionine을 외부에서 첨가하여 주었을 때, 상기 디하이드로게나제 효소 중에 Lcddh와 Lcpdh가 상대적으로 가장 높은 TB 함량을 가진 고분자를 생성하는 것을 확인하였다.

[237] [표23]

Phenylalanine를 공급하여 주었을 때 재조합 대장균이 생산하는 PHA 공중합체의 조성 및 농도

재조합 균주 ^a	폴리머 조성 ^b (mol%) ^c			폴리머 함량 (wt%) ^c	폴리머 농도 (g/L) ^c
	PhP ^c	3HB ^c	LA ^c		
XB-1/ p437ReAB pKM212 LpanE pKA312 4HBS ^c	0.05 ^c	99.95 ^c	— ^c	71.60 ^c	1.73 ^c
XB-1/ p437ReAB pKM212 LpanE pKA312 AbfT ^c	0.01 ^c	9.99 ^c	— ^c	70.19 ^c	0.71 ^c
XB-1/ p437ReAB pKM212 LpanE pKA312 Cat2 ^c	0.11 ^c	99.89 ^c	— ^c	75.01 ^c	1.87 ^c
XB-1/ p437ReAB pKM212 LpanE pKA312 Pct540 ^c	0.02 ^c	99.98 ^c	— ^c	72.35 ^c	1.59 ^c
XB-1/ p437ReAB pKM212 LpanE pKA312 PrpE ^c	0.04 ^c	99.96 ^c	— ^c	72.52 ^c	1.55 ^c
XB-1/ p437ReAB pKM212 LpanE pKA312 HadA ^c	16.90 ^c	83.10 ^c	— ^c	79.08 ^c	0.25 ^c

[238] : Phenylalanine을 외부에서 첨가하여 주었을 때, 상기 CoA transferase 효소 중에 HadA를 이용하였을 때 상대적으로 가장 높은 PhP 함량을 가진 고분자를 생성하는 것을 확인하였다.

[239]

[240] ^a각각의 균주의 경우 MR 배지에서 96시간동안 배양되었다.

[241] ^b3HB: 3-hydroxybutyrate; LA: lactate; 2HIC: 2-hydroxyisocaproate; 2H3MP: 2-hydroxy-3-methylpentanoate; 2HIV: 2-hydroxyisovalerate; 2HV: 2-hydroxyvalerate; TB: 2-hydroxy-4-(methylthio)butyrate; PhP(PhLA): 2-hydroxy-3-phenylpropionate

[242]

[243] : 상기 결과를 통해서 HadA가 모든 아미노산에서 높은 2HA 물분율을 서포트하는 효소임을 확인할 수 있었다.

[244]

[245] 실시예 3. P(3HB-Co-2HA) 생산

[246] 2-HA는 CoA 전이효소에 의해 2HA-CoA가 되고, PHA 합성효소를 통해 PhaA, PhaB를 통해 만들어진 3HB-CoA와 함께 중합되어 P(3HB-Co-2HA) 형태의 고분자가 생산되었다 (도 4).

[247] 실시예 1 및 실시예 2에서 기술한 바와 같이 외부에서 아미노산 공급하여 주었을 때 다양한 조합의 단량체와 조성을 가지는 고분자를 생산하였다.

[248]

산업상 이용가능성

[249] 본 발명에 따른 폴리하이드록시알카노에이트 생성능을 가지는 재조합 미생물을 통해, 아미노산으로부터 전환된 방향족 2-하이드록시산 (2-hydroxyacid: 2-HA)를 단량체로 포함하는 생분해성 폴리머를 제조할 수 있다.

[250] 또한, 본 발명에 따르면 아미노산 종류에 따라 폴리머 중 포함되는 2-하이드록시산을 다양한 물분율로 포함하는 폴리머를 제조할 수 있다.

[251]

[252] 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.

[253]

서열목록

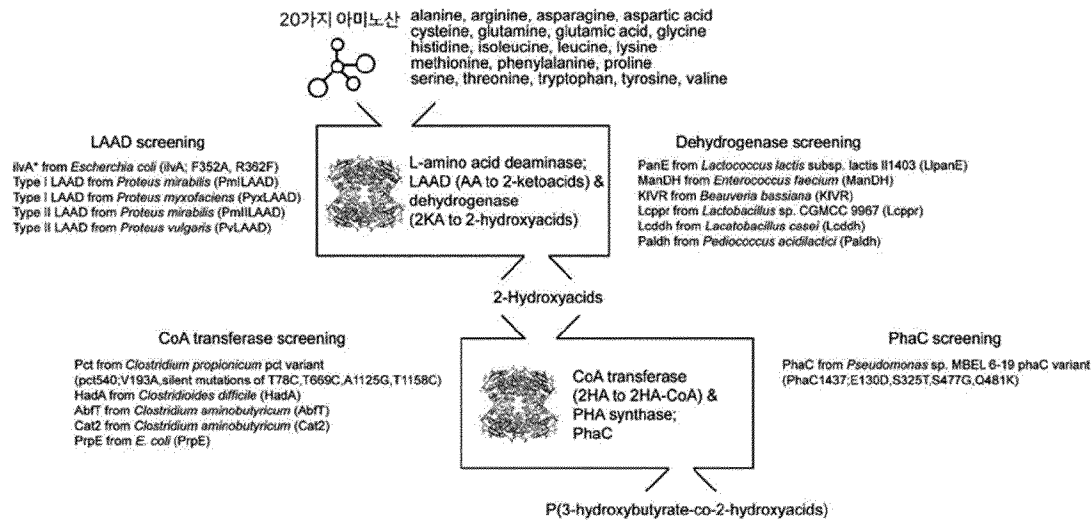
[254] 전자파일 첨부하였음.

청구범위

- [청구항 1] 탄소원으로부터 아세틸-CoA 생성능을 가지는 미생물에 아미노산 디아미네이즈 (amino acid deaminase) 코딩 유전자; 디하이드로게나제 (dehydrogenase) 코딩 유전자; CoA 전이효소 (CoA transferase) 코딩 유전자; 및 폴리하이드록시알카노에이트 합성효소를 코딩하는 유전자가 도입 또는 증폭되어 있는, 아미노산으로부터 전환된 2-하이드록시산 (2-hydroxyacid : 2-HA)을 단량체로 포함하는 폴리하이드록시알카노에이트 생성능을 가지는 재조합 미생물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 아미노산은 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 아이소류신, 트레오닌, 세린, 시스테인, 메티오닌, 아스파르트산, 아스파라긴, 글루탐산, 글루타민, 라이신, 아르기닌, 히스티딘, 페닐알라닌, 타이로신, 트립토판 및 프롤린으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상인 재조합 미생물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 아미노산 디아미네이즈 코딩 유전자는 서열번호 1의 서열을 포함하는 효소를 코딩하는 *ilvA* 유전자, 서열번호 2의 서열을 포함하는 효소를 코딩하는 *PmILAAD* 유전자, 서열번호 3의 서열을 포함하는 효소를 코딩하는 *PmIIAAD* 유전자, 서열번호 4의 서열을 포함하는 효소를 코딩하는 *PvLAAD* 유전자 및 서열번호 5의 서열을 포함하는 효소를 코딩하는 *PyxLAAD* 유전자로 구성된 군에서 선택된 하나 이상인 재조합 미생물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 디하이드로게나제 코딩 유전자는 서열번호 6의 서열을 포함하는 효소를 코딩하는 *LlpanE* 유전자, 서열번호 7의 서열을 포함하는 효소를 코딩하는 *KIVR* 유전자, 서열번호 8의 서열을 포함하는 효소를 코딩하는 *ManDH* 유전자, 서열번호 9의 서열을 포함하는 효소를 코딩하는 *Lcppr* 유전자, 서열번호 10의 서열을 포함하는 효소를 코딩하는 *Lcddh* 유전자 및 서열번호 11의 서열을 포함하는 효소를 코딩하는 *Paldh* 유전자로 구성된 군에서 선택된 하나 이상인 재조합 미생물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 CoA 전이효소 코딩 유전자는 서열번호 12의 서열을 포함하는 효소를 코딩하는 *hadA* 유전자인 재조합 미생물.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 폴리하이드록시알카노에이트 합성효소를 코딩하는 유전자는 서열번호 13의 서열을 포함하는 효소를 코딩하는 *PhaC* 유전자인 재조합 미생물.
- [청구항 7] 다음 단계를 포함하는 아미노산으로부터 전환된 2-하이드록시산 (2-hydroxyacid : 2-HA)를 단량체로 포함하는 폴리하이드록시알카노에이트의 제조방법:
 (a) 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 재조합 미생물을 배양하여 폴리하이드록시알카노에이트를 생성하는 단계; 및
 (b) 상기 폴리하이드록시알카노에이트를 수득하는 단계.

- [청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 아미노산은 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 아이소류신, 트레오닌, 세린, 시스테인, 메티오닌, 아스파르트산, 아스파라긴, 글루탐산, 글루타민, 라이신, 아르기닌, 히스티딘, 페닐알라닌, 타이로신, 트립토판 및 프롤린으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상인 제조방법.
- [청구항 9] 제7항에 있어서, 상기 아미노산 디아미네이즈 코딩 유전자는 서열번호 1의 서열을 포함하는 효소를 코딩하는 *ilvA* 유전자, 서열번호 2의 서열을 포함하는 효소를 코딩하는 *PmILAAD* 유전자, 서열번호 3의 서열을 포함하는 효소를 코딩하는 *PmIIAAD* 유전자, 서열번호 4의 서열을 포함하는 효소를 코딩하는 *PvLAAD* 유전자 및 서열번호 5의 서열을 포함하는 효소를 코딩하는 *PyxLAAD* 유전자로 구성된 군에서 선택된 하나 이상인 제조방법.
- [청구항 10] 제7항에 있어서, 상기 디하이드로게나제 코딩 유전자는 서열번호 6의 서열을 포함하는 효소를 코딩하는 *LlpanE* 유전자, 서열번호 7의 서열을 포함하는 효소를 코딩하는 *KIVR* 유전자, 서열번호 8의 서열을 포함하는 효소를 코딩하는 *ManDH* 유전자, 서열번호 9의 서열을 포함하는 효소를 코딩하는 *Lcppr* 유전자, 서열번호 10의 서열을 포함하는 효소를 코딩하는 *Lcddh* 유전자 및 서열번호 11의 서열을 포함하는 효소를 코딩하는 *Paldh* 유전자로 구성된 군에서 선택된 하나 이상인 제조방법.
- [청구항 11] 제7항에 있어서, 상기 CoA 전이효소 코딩 유전자는 서열번호 12의 서열을 포함하는 효소를 코딩하는 *hadA* 유전자인 제조방법.
- [청구항 12] 제7항에 있어서, 상기 폴리하이드록시알카노에이트 합성효소를 코딩하는 유전자는 서열번호 13의 서열을 포함하는 효소를 코딩하는 *PhaC* 유전자인 제조방법.

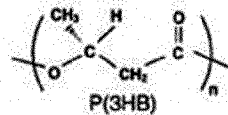
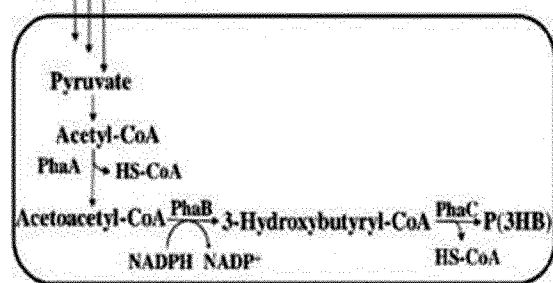
[도1]



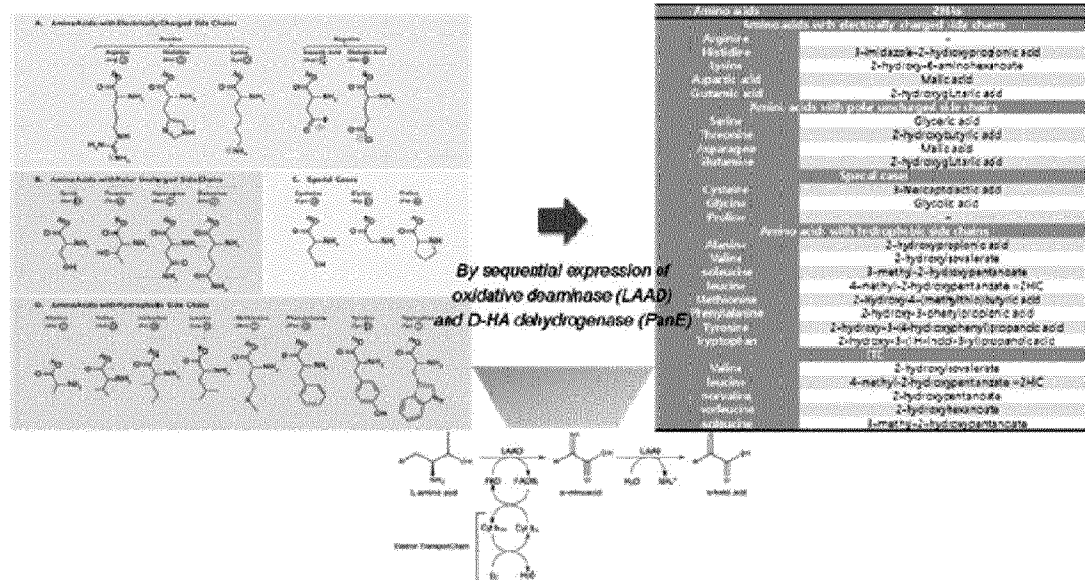
[도2]

- Escherichia coli* XL1-Blue
- Genotype: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [*F'* *proAB lacIQΔM15 Tn10 (Tetr)*]

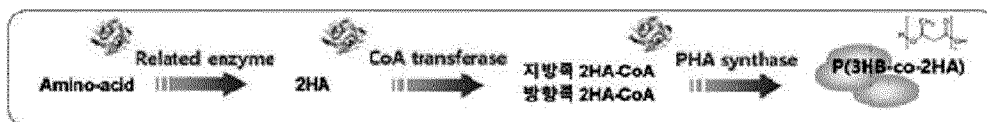
Renewable substrates



[도3]



[도4]



1. LAAD screening

- ilvA* from *Escherichia coli* (ilvA; F352A, R362F)
- Type I LAAD from *Proteus mirabilis* (PmILAAD)
- Type I LAAD from *Proteus myxofaciens* (PylLAAD)
- Type II LAAD from *Proteus mirabilis* (PmIIAAD)
- Type III LAAD from *Proteus vulgaris* (PvLAAD)

2. Dehydrogenase screening

- PanE from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 11403 (LpanE)
- Lcpr from *Lactobacillus* sp. CGMCC 9967 (Lcpr)
- ManDH from *Enteroboccus faecium* (ManDH)
- Lcddh from *Lactobacillus casei* (Lcddh)
- KIVR from *Beauveria bassiana* (KIVR)
- Paidh from *Pediococcus acidilactis* (Paidh)

3. CoA transferase screening

- Pct from *Clostridium propionicum* pct variant (pct540; V193A, silent mutations of T78C, T669C, A1125G, T1158C)
- HadA from *Clostridioides difficile* (HadA)
- AbtT from *Clostridium aminobutyricum* (AbtT)
- Cat2 from *Clostridium aminobutyricum* (Cat2)
- PrpE from *Cupriavidus necator* (PrpE)

4. PHA synthase screening

- PhaC from *Pseudomonas* sp. M8EL 6-10 phaC variant (PhaC1437, E130D, S325T, S417G, Q481K)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/020376

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/70(2006.01)i; C12N 15/52(2006.01)i; C12N 9/88(2006.01)i; C12N 9/10(2006.01)i; C12P 7/625(2022.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 15/70(2006.01); A01H 5/00(2006.01); C08G 63/08(2006.01); C12N 15/52(2006.01); C12N 15/63(2006.01);
C12N 5/10(2006.01)

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

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

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

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 아미노산 디아미네이즈(amino acid deaminase), CoA 전이효소(CoA transferase),
2-하이드록시산(2-hydroxyacid, 2-HA), 폴리하이드록시알카노에이트(polyhydroxyalkanoates; PHAs)**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MIERZATI, M. et al. Biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-2-hydroxyalkanoate) with different comonomer fractions. Polymer Degradation and Stability. 2020, vol. 178, thesis no.:109193, pp. 1-8. See abstract; pages 2 and 3; and figure 2.	1-12
Y	KR 10-2022-0142984 A (LG CHEM, LTD.) 24 October 2022 (2022-10-24) See abstract; claims 1-5; and paragraphs [0008], [0016], [0051], [0064], [0065] and [0078].	1-12
A	KR 10-1774431 B1 (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 05 September 2017 (2017-09-05) See entire document.	1-12
A	US 2011-0252507 A1 (BRUMBLEY, S. M. et al.) 13 October 2011 (2011-10-13) See entire document.	1-12



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“D” document cited by the applicant in the international application

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 March 2025

Date of mailing of the international search report

19 March 2025

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	김유진 등 . 제조함 대장균에서 새로운 코엔자임 에이 트랜스퍼레이즈를 이용한 젖산을 모노머로 함유한 폴리 . Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal. 2016, vol. 31, no. 1, pp. 27-32 (KIM, You Jin et al. Biosynthesis of Lactate-containing Polyhydroxyalkanoates in Recombinant Escherichia coli by Employing New CoA Transferases.) See entire document.	하이드록시알칸산 생산 연구 1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/020376

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

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2024/020376

Patent document cited in search report				Publication date (day/month/year)		Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)	
KR	10-2022-0142984	A	24 October 2022	KR	10-2019-0090602	A		02 August 2019	
				KR	10-2623585	B1		11 January 2024	
KR	10-1774431	B1	05 September 2017	CN	109153998	A		04 January 2019	
				CN	109153998	B		18 October 2022	
				EP	3409781	A1		05 December 2018	
				JP	2019-503188	A		07 February 2019	
				JP	6644156	B2		12 February 2020	
				KR	10-2017-0090101	A		07 August 2017	
				US	10640774	B2		05 May 2020	
				US	2019-0024093	A1		24 January 2019	
				WO	2017-131342	A1		03 August 2017	
US	2011-0252507	A1	13 October 2011	AU	2003-243831	A1		02 February 2004	
				AU	2003-243831	B2		24 July 2008	
				AU	2008-234960	A1		13 November 2008	
				BR	0312602	A		24 May 2005	
				US	2006-0259998	A1		16 November 2006	
				US	7754943	B2		13 July 2010	
				WO	2004-006657	A1		22 January 2004	
				ZA	200500213	B		22 February 2006	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 15/70(2006.01)i; C12N 15/52(2006.01)i; C12N 9/88(2006.01)i; C12N 9/10(2006.01)i; C12P 7/625(2022.01)j		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 15/70(2006.01); A01H 5/00(2006.01); C08G 63/08(2006.01); C12N 15/52(2006.01); C12N 15/63(2006.01); C12N 5/10(2006.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 아미노산 디아미네이즈(amino acid deaminase), CoA 전이효소(CoA transferase), 2-하이드록시산(2-hydroxyacid, 2-HA), 폴리하이드록시알카노에이트(polyhydroxy alkanoates; PHAs)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	MIERZATI, M. 등, 'Biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-2-hydroxyalkanoate) with different comonomer fractions', Polymer Degradation and Stability, 2020, 178권, 논문번호:109193, 페이지 1-8 초록; 페이지 2, 3; 도면 2	1-12
Y	KR 10-2022-0142984 A (주식회사 엔지화학) 2022.10.24 요약; 청구항 1-5; 단락 [0008], [0016], [0051], [0064], [0065], [0078]	1-12
A	KR 10-1774431 B1 (한국과학기술원) 2017.09.05 전체 문헌	1-12
A	US 2011-0252507 A1 (BRUMBLEY, S. M. 등) 2011.10.13 전체 문헌	1-12
A	김유진 등, '제조합 대장균에서 새로운 코엔자임 에이 트랜스퍼레이스를 이용한 젖산을 모노머로 함유한 폴리하이드록시알칸산 생산 연구', Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal, 2016, 31권, 1호, 페이지 27-32 전체 문헌	1-12
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2025년03월19일(19.03.2025)		국제조사보고서 발송일 2025년03월19일(19.03.2025)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373

제1기제란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

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

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

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2022-0142984 A	2022/10/24	KR 10-2019-0090602 A	2019/08/02
		KR 10-2623585 B1	2024/01/11
KR 10-1774431 B1	2017/09/05	CN 109153998 A	2019/01/04
		CN 109153998 B	2022/10/18
		EP 3409781 A1	2018/12/05
		JP 2019-503188 A	2019/02/07
		JP 6644156 B2	2020/02/12
		KR 10-2017-0090101 A	2017/08/07
		US 10640774 B2	2020/05/05
		US 2019-0024093 A1	2019/01/24
		WO 2017-131342 A1	2017/08/03
		US 2011-0252507 A1	2011/10/13
AU 2003-243831 B2	2008/07/24		
AU 2008-234960 A1	2008/11/13		
BR 0312602 A	2005/05/24		
US 2006-0259998 A1	2006/11/16		
US 7754943 B2	2010/07/13		
WO 2004-006657 A1	2004/01/22		
ZA 200500213 B	2006/02/22		