



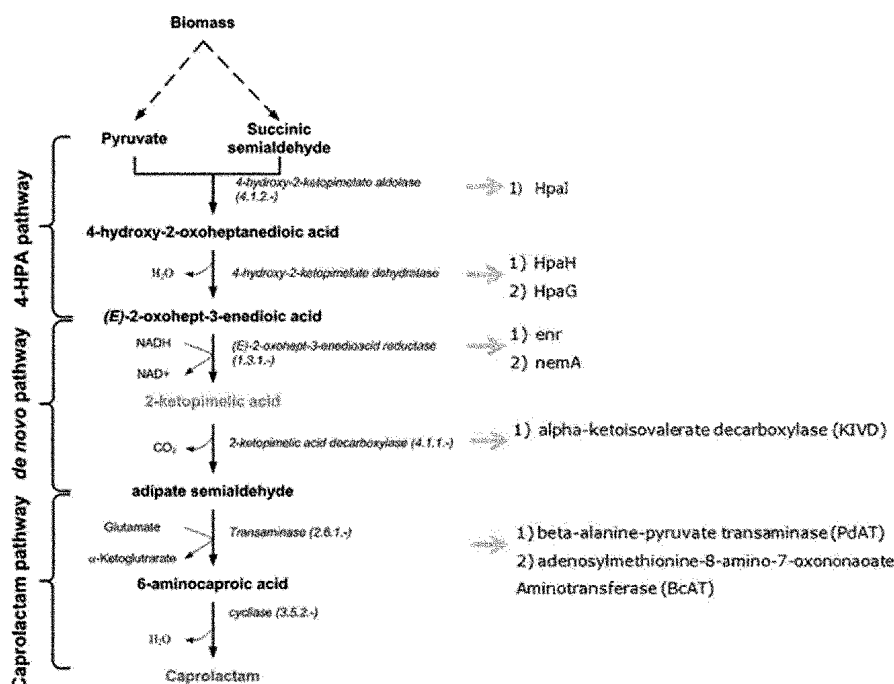
- (51) 국제특허분류:
C12N 1/21 (2006.01) C12P 7/44 (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2014/003933
- (22) 국제출원일: 2014년 5월 2일 (02.05.2014)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2013-0050676 2013년 5월 6일 (06.05.2013) KR
10-2014-0053249 2014년 5월 2일 (02.05.2014) KR
- (71) 출원인: 한국생명공학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE) [KR/KR]; 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 이홍원 (LEE, Hong-Weon); 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 안정오 (AHN, Jung-Oh); 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 정준기 (JUNG, Joon Ki); 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 고희주 (KO, Hee-Ju); 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 박선주 (PARK, Sun-joo); 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 김천석 (KIM, Chun Sug); 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 이혁원 (LEE,

- Hyeok Won); 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 이은교 (LEE, Eun Gyo); 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 이주환 (LEE, Joo Hwan); 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 다나 (DANA PATENT LAW FIRM); 135-936 서울시 강남구 역삼로 3길 11, 광성빌딩 신관 4-6층, 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: BIOLOGICAL SYNTHESIS OF 6-AMINOCAPROIC ACID AND TRANSGENIC MICROORGANISM THEREFOR

(54) 발명의 명칭 : 6-아미노카프로산의 생물학적 합성 및 이를 위한 형질전환 미생물



(57) Abstract: The present invention relates to a method for preparing a recombinant microorganism simultaneously comprising genes encoding enzymes used for a biosynthesis pathway of 6-aminocaproic acid which is a precursor of caprolactam, biosynthesizing 6-aminocaproic acid from the microorganism, and producing same so as to synthesize caprolactam.

(57) 요약서: 본 발명은 카프로락탐을 합성하기 위해 그의 전구체인 6-아미노카프로산의 생합성 경로에 이용되는 효소들을 암호화하는 유전자들을 함께 포함하는 재조합 미생물을 제조하여 6-아미노카프로산을 상기 미생물로부터 생합성하여 생산하는 방법에 관한 것이다.



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 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 6-아미노카프로산의 생물학적 합성 및 이를 위한 형질전환 미생물

기술분야

- [1] 본 발명은 카프로락탐을 합성하기 위한 6-아미노카프로산을 미생물 내에서 생물학적으로 합성하기 위한 재조합 미생물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 카프로락탐은 6-아미노헥산산(ϵ -아미노헥산산, 6-아미노카프로산)의 락탐인 유기 화합물이다. 이는 다르게는 카프로산의 환형 아미드로 고려될 수 있다. 카프로락탐의 한가지 용도는 나일론-6의 생산에서 단량체로서이다. 카프로락탐의 생산에 가장 범용적으로 사용되는 원료는 벤젠(benzene), 페놀(phenol), 톨루엔(toluene) 등의 방향족 화합물이다. 카프로락탐은 이들 방향족 화합물 원료에서 얻어진 싸이클로헥산온(cyclohexanone)과 히드록실아민(hydroxylamine)을 반응시키는 옥심화반응(oximation)으로 옥심화합물을 제조한 후 최종적으로 황산촉매를 이용한 베크만 자리옮김 반응(Beckmann Rearrangement)을 통해 합성된다. 이러한 공정을 통해 카프로락탐을 합성하면 부산물인 암모늄 설페이트의 생성을 피하기 어렵다. 카프로락탐 제조 공정에 있어 암모늄 설페이트가 많이 생성될수록 카프로락탐의 수율이 감소하기 때문에 암모늄 설페이트 생성을 억제해야만 고수율로 카프로락탐을 얻을 수 있다.
- [3] 최근 카프로락탐(caprolactam) 제조기술의 최근 개발 동향은 카프로락탐 제조공정 부산물인 암모늄 설페이트(ammonium sulfate) 발생을 감소시키거나 제거하는 공정을 개발하기 위한 것과 대체 원료물질을 개발하기 위한 것으로 나뉜다. 암모늄 설페이트의 발생을 감소시키기 위한 공정 개발의 예는 일본 스미모토(Sumitomo)사가 최근 건설한 카프로락탐 생산시설이 있다. 이는 유동층 지올라이트 촉매(fluid bed gas-phase zeolite-catalyst)를 이용한 기체상 베크만 자리옮김반응과 에니켄(EniChem)사의 과산화수소 촉매(hydrogen peroxide catalyst)에 의한 암모니아 부가반응(ammoximation reaction)을 이용한다. 또한, 카프로락탐의 대체물질로서 개발된 원료물질로는 헥사메틸렌디아민(hexamethylene diamine ; HMDA)과 테트라메틸렌디아민(tetramethylene diamine ; TMDA)이 있다. HMDA는 아디포나이트릴(adiponitrile), 프로필렌(propylene), 아크릴로나이트릴(acrylonitrile)로부터 제조될 수 있다. 하지만 아디포나이트릴을 이용해서 HMDA를 제조하는 공정은 BASF, 솔루티아(Solutia), 부타키미(Butachimie), 듀폰(DuPont)사만이 사용할 수 있다. 아디포나이트릴은 부타디엔(butadiene)과 시안화수소(hydrogen cyanide)를

반응시켜 제조된다. 부타디엔은 나일론 4,6의 원료물질인 아디픽 산(adipic acid)의 원료물질로도 사용된다. 현재 나일론 생산에 사용되는 중간체들은 거의 부타디엔에 그 기원을 두고 있으며 이러한 추세는 점점 더 확산되고 있다.

- [4] 이와 같이, 환경 문제와 화석 자원의 가용성에 대한 우려가 증가함에 따라 생물정제공정을 통해 재생 가능한 비식품 바이오매스로부터 이러한 화학물질과 재료를 생산하는 것에 많은 관심을 가지고 있다. 생물정제공정(biorefinery) 과정의 발달에 따라 미생물은 재생 가능 자원으로부터 성공적으로 화학물질, 플라스틱과 연료를 생산할 수 있는 핵심 생체축매로 사용되었다. 그러나, 조작되지 않은 자연적 미생물은 그들의 낮은 물질대사 능력 때문에 산업 수준의 타겟 생산물을 효율적으로 생산하기에 적합하지 않다. 따라서, 원하는 생산물을 효율적으로 생산하기 위한 미생물의 물질대사 능력을 향상시키는 기술들이 연구되고 있다. 이러한 미생물의 최적화를 시스템 수준의 대사공학인 시스템 대사공학(systems metabolic engineering)을 통해 해결하고자 많은 연구가 진행되고 있다.

[5]

- [6] 이에, 본 발명자들은 카프로락탐의 제조를 위해 그 전구체인 6-aminocaproic acid 생합성 경로에서 이용되는 효소들의 유전자들을 발현하여 미생물 내에서 6-aminocaproic acid를 생합성할 수 있는 형질전환 미생물을 제작하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명의 목적은 6-아미노카프로산(6-aminocaproic acid) 생산방법을 제공하는 것이다.
- [8] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 *HpaI*(4-hydroxy-2-oxo-heptane-1,7-dioate aldolase)-*HpaH*(2-oxo-hept-3-ene-1,7-dioate dehydratase) 유전자, *nemaA* (N-ethylmaleimide reductase) 유전자, *KIVD*(alpha-ketoisovalerate decarboxylase) 유전자; 를 포함하고, 그리고 *PdAT*(beta-alanine-pyruvate transaminase) 및 *BcAT* (adenosylmethionine-8-amino-7-oxononaoate Aminotransferase) 유전자 중 어느 하나 이상;을 모두 포함하는 6-아미노카프로산(6-aminocaproic acid) 생합성용 발현벡터를 제공하는 것이다.
- [9] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 상기 발현벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공하는 것이다.
- [10] 아울러, 본 발명의 또 다른 목적은 6-아미노카프로산 생산방법에 의해 생산된 6-아미노카프로산을 카프로락탐으로 전환시키는 단계를 추가로 포함하는 카프로락탐 생산방법을 제공하는 것이다.

[11]

과제 해결 수단

- [12] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 6-아미노카프로산(6-aminocaproic

acid) 생산방법을 제공한다.

- [13] 또한, 본 발명은 *HpaI*(4-hydroxy-2-oxo-heptane-1,7-dioate aldolase)-*HpaH*(2-oxo-hept-3-ene-1,7-dioate dehydratase) 유전자, *nemA*(N-ethylmaleimide reductase) 유전자, *KIVD*(alpha-ketoisovalerate decarboxylase) 유전자; 를 포함하고, 그리고 *PdAT*(beta-alanine-pyruvate transaminase) 및 *BcAT* (adenosylmethionine-8-amino-7-oxononaoate Aminotransferase) 유전자 중 어느 하나 이상;을 모두 포함하는 6-아미노카프로산(6-aminocaproic acid) 생합성용 발현벡터를 제공한다.
- [14] 또한, 본 발명은 상기 발현벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공한다.
- [15] 아울러, 본 발명은 6-아미노카프로산 생산방법에 의해 생산된 6-아미노카프로산을 카프로락탐으로 전환시키는 단계를 추가로 포함하는 카프로락탐 생산방법을 제공한다.

[16]

발명의 효과

- [17] 본 발명의 6-아미노카프로산(6-aminocaproic acid) 생합성 경로에 이용되는 효소들을 암호화하는 유전자 *HpaI*(4-hydroxy-2-oxo-heptane-1,7-dioate aldolase), *HpaH*(2-oxo-hept-3-ene-1,7-dioate dehydratase), *nemA*(N-ethylmaleimide reductase), *KIVD*(alpha-ketoisovalerate decarboxylase); 를 포함하고, 그리고 *PdAT* (beta-alanine-pyruvate transaminase) 및 *BcAT* (adenosylmethionine-8-amino-7-oxononaoate Aminotransferase) 유전자 중 어느 하나 이상;을 포함하는 벡터로 형질전환된 미생물은 세포 내에서 목적 물질인 6-아미노카프로산(6-aminocaproic acid)를 효율적으로 생합성하므로, 이를 카프로락탐의 합성을 위해 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [18] 도 1은 6-아미노카프로산(6-aminocaproic acid)의 생합성 경로와 생합성 경로에서 이용되는 효소 및 이를 암호화하는 유전자를 나타낸 도식이다.
- [19] 도 2는 *HpaI*(4-hydroxy-2-oxo-heptane-1,7-dioate aldolase), *HpaH* (2-oxo-hept-3-ene-1,7-dioate dehydratase), *nemA*(N-ethylmaleimide reductase), *KIVD* (alpha-ketoisovalerate decarboxylase), *PdAT*(beta-alanine-pyruvate transaminase) 및 *BcAT*(adenosylmethionine-8-amino-7-oxononaoate Aminotransferase) 유전자를 포함하는 pACYCWG 벡터의 맵이다.
- [20] 도 3은 aldolase-dehydratase (*HpaI*-*HpaH*)의 효소 반응에 의한 기질인 pyruvate의 농도를 변화를 확인한 표준곡선(standard curve)이다.
- [21] 도 4는 reductase (*nemA*)의 효소 활성을 확인하기 위한 역반응에서 생성물인 NADH의 농도 변화를 확인한 표준곡선이다.
- [22] 도 5는 aldolase-dehydratase (*HpaI*-*HpaH*) 및 reductase (*nemA*)의 커플링 반응에 의한 2-ketopimelic acid의 생성을 Lc-ms/ms로 확인한 도이다;

- [23] 첫 번째 크로마토그램: total ion current plot (TIC);
- [24] 두 번째 크로마토그램: Selected Ion Monitoring (SIM); 및
- [25] 세 번째 크로마토그램: Selected Reaction Monitoring (SRM).
- [26] 도 6은 decarboxylase (*KIVD*) 및 transaminase (*PdAT* 및/또는 *BcAT*)의 커플링 반응에 의한 2-ketopimelic acid로부터의 6-aminocaproic acid의 전환을 TLC로 확인한 도이다;
- [27] L1: 1M 6-aminocaproic acid;
- [28] L2: 음성대조군 (chemical blank);
- [29] L3: 음성대조군 (biological blank-w/*KIVD*-his);
- [30] L4: *KIVD-PdAT*; 및
- [31] L5: *KIVD-PdAT-BcAT*.
- [32] 도 7은 decarboxylase (*KIVD*) 및 transaminase (*PdAT* 및/또는 *BcAT*)의 커플링 반응에 의한 2-ketopimelic acid로부터의 6-aminocaproic acid의 전환을 LC-ms/ms로 확인한 도이다;
- [33] 첫 번째 크로마토그램: total ion current plot (TIC);
- [34] 두 번째 크로마토그램: Selected Ion Monitoring (SIM); 및
- [35] 세 번째 크로마토그램: Selected Reaction Monitoring (SRM).
- [36] 도 8은 본 발명의 유전자들을 모두 포함하는 pACYCWG 벡터로 형질전환된 대장균에서의 6-aminocaproic acid 생합성 활성을 TLC로 확인한 도이다;
- [37] SM: 6-aminocaproic acid;
- [38] L1: 음성대조군 (pACYC184); 및
- [39] L2: 반응군 pACYCWG.
- [40] 도 9는 본 발명의 유전자들을 모두 포함하는 pACYCWG 벡터로 형질전환된 대장균에서의 6-aminocaproic acid 생합성 활성을 LC-ms/ms로 확인한 도이다;
- [41] 첫 번째 크로마토그램: total ion current plot (TIC);
- [42] 두 번째 크로마토그램: Selected Ion Monitoring (SIM); 및
- [43] 세 번째 크로마토그램: Selected Reaction Monitoring (SRM).
- [44] 도 10은 한 벡터에 클로닝 된 모든 효소들의 발현을 웨스턴 블랏으로 확인한 도이다;
- [45] L1: pACYCWG 총 단백질;
- [46] L2: pACYCWG 수용성 단백질;
- [47] L3: pACYCWG 정제 단백질 1/5 희석;
- [48] L4: pACYCWG 정제 단백질;
- [49] ①: aldolase-dehydratase (*HpaI-HpaH*)-58KD;
- [50] ②: decarboxylase (*KIVD*)-55KD;
- [51] ③: aminotransferase 1 (*PdAT*)-46KD;
- [52] ④: reductase (*nemA*)-40KD; 및
- [53] ⑤: aminotransferase 1 (*BcAT*)-38KD.

- [54] 도 11은 본 발명의 유전자들을 모두 포함하는 pACYCWG 벡터로 형질전환된 대장균에서의 6-aminocaproic acid 생합성 활성을 LC-MS로 확인한 도이다.
- [55] 도 12는 본 발명의 구체예에 따른 발효 배지 실험에서 pACYCWG 벡터로 형질전환된 대장균의 발효 그래프이다.
- [56] 도 13은 본 발명의 구체예에 따른 발효 배지 실험에서 대장균 배양 후 상등액을 얻어 6-aminocaproic acid 생합성 활성을 LC-MS로 확인한 결과이다.
- [57] 도 14는 본 발명의 구체예에 따른 발효 배지 실험에서 벡터에 클로닝된 모든 효소들의 발현을 웨스턴 블롯으로 확인한 도이다.
- [58] 위에서부터, 첫번째 화살표: *HpaI-H*
- [59] 두번째 화살표: *Kivd*
- [60] 세번째 화살표: *PdAT*
- [61] 네번째 화살표: *nema*
- [62] 도 15는 본 발명의 구체예에 따른 균주 개량 실험에서 pACYCWG-BcAT 벡터로 형질전환된 대장균의 발효 그래프이다.
- [63] 도 16은 본 발명의 구체예에 따른 균주 개량 실험에서 대장균 배양 후 상등액을 얻어 6-aminocaproic acid 생합성 활성을 LC-MS로 확인한 결과이다.

[64]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [65] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [66]
- [67] 본 발명에서 사용된 용어 "폴리뉴클레오티드", "올리고뉴클레오티드" 및 "핵산"은 동일한 의미를 지니고, 어떠한 길이를 지닌 뉴클레오티드 폴리머를 나타낸다. 또한 이러한 용어는 "올리고뉴클레오티드 유도체" 또는 "폴리뉴클레오티드 유도체"도 포함한다. "올리고뉴클레오티드 유도체" 또는 "폴리뉴클레오티드 유도체"는 뉴클레오티드 유도체를 포함하거나 뉴클레오티드 사이에서 일반적인 계통과 다른 계통을 지닌 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드를 나타내고, 이는 상호교환가능하게 사용된다.
- [68]
- [69] 본 발명에서 사용된 용어 "폴리뉴클레오티드"는 핵산, 올리고뉴클레오티드 및 폴리뉴클레오티드와 상호교환가능하게 사용되고, cDNA, mRNA, 게놈 DNA 등을 포함한다. 여기에 사용된 폴리뉴클레오티드는 용어 "유전자"에 의해 포함된다. 유전자 서열을 인코드하는 폴리뉴클레오티드는 "스플라이싱(splicing) 변이체"를 포함한다. 유사하게는, 핵산에 의해 인코드된 특정한 단백질은 그에 의해 인코드된 스플라이싱 변이체에 의해 인코드된 단백질을 포함한다. 명칭이 나타내는 바와 같이 용어 "스플라이싱 변이체"는 대안적인 스플라이싱 변이체의 생성물을 나타낸다. 전사 후 첫 번째 핵산 전사체는 다른(뚜렷한) 핵산 스플라이싱 생성물과 같은 다른 폴리펩타이드를 인코드하는 것으로

스플라이스된다. 스플라이싱 변이체의 생성 메카니즘이다르더라도 이는 엑손 선택적 스플라이싱을 포함한다. 부정확한 전사에 의한 동일한 핵산으로부터 유도된 다른 폴리펩타이드는 이러한 정의를 포함한다. 스플라이싱 반응의 생성물(재조합 형태의 스플라이싱 생성물 포함)도 상기 정의에 포함된다.

[70]

[71] 본 발명에서 사용된 바와 같이 유전자, 폴리뉴클레오티드, 폴리펩타이드 등과 같은 유전자 생성물의 "발현"이라는 용어는 유전자가 미리 결정된 생체 내 작용에 의해 영향을 받아 또 다른 형태로 변화되는 것을 나타낸다. 바람직하게는, 용어 "발현"은 유전자, 폴리뉴클레오티드 등이 전사되고 폴리펩타이드로 번역됨을 나타낸다. 본 발명의 하나의 실시태양에서 유전자는 mRNA로 전사된다. 더욱 바람직하게는 이들 폴리펩타이드는 후-번역적 처리 변형을 지닌다. 따라서 여기에 사용된 유전자, 폴리뉴클레오티드, 폴리펩타이드의 "발현"의 "감소"는 본 발명의 작용제가 작용할 때 발현량이 작용제가 작용하지 않을 때와 비교시 유의적으로 감소됨을 나타낸다. 바람직하게는, 발현의 감소는 폴리펩타이드 발현량의 감소를 포함한다. 더욱 상세하게는, 발현량의 감소는 작용제의 후-작용과 전-작용을 비교시 적어도 약 10% 이상, 바람직하게는 적어도 약 20% 이상, 더욱 바람직하게는 적어도 약 30% 이상, 더욱 더 바람직하게는 적어도 약 40% 이상, 더욱 더 바람직하게는 적어도 약 50% 이상, 더욱 더 바람직하게는 적어도 약 75% 이상, 더욱 더 바람직하게는 적어도 약 90% 이상, 더욱 더 바람직하게는 적어도 약 100% 이상의 발현 감소를 나타낸다. 여기에 사용된 유전자, 폴리뉴클레오티드, 폴리펩타이드 "발현"의 "증가"는 본 발명의 작용제가 작용시 발현량이 작용제가 작용하지 않을 때와 비교시 유의적으로 증가됨을 나타낸다. 바람직하게는, 발현 증가는 폴리펩타이드 발현량의 증가를 포함한다. 더욱 상세하게는, 발현량의 증가는 작용제의 후-작용과 전-작용을 비교시 적어도 약 10% 이상, 바람직하게는 적어도 약 20% 이상, 더욱 바람직하게는 적어도 약 30% 이상, 더욱 더 바람직하게는 적어도 약 40% 이상, 더욱 더 바람직하게는 적어도 약 50% 이상, 더욱 더 바람직하게는 적어도 약 75% 이상, 더욱 더 바람직하게는 적어도 약 90% 이상, 더욱 더 바람직하게는 적어도 약 100% 이상, 더욱 더 바람직하게는 200%의 발현 감소 또는 작용제의 작용 전에 발현하지 않은 발현이 발생하는 것을 나타낸다.

[72]

[73] 본 발명은 1) *HpaI*(4-hydroxy-2-oxo-heptane-1,7-dioate aldolase)-*HpaH*(2-oxo-hept-3-ene-1,7-dioate dehydratase) 유전자, *nemA*(N-ethylmaleimide reductase) 유전자, *KIVD*(alpha-ketoisovalerate decarboxylase) 유전자; 를 포함하고, 그리고 *PdAT*(beta-alanine-pyruvate transaminase) 및 *BcAT* (adenosylmethionine-8-amino-7-oxononaoate Aminotransferase) 유전자 중 어느 하나 이상;을 포함하는 발현백터를 제조하는 단계; 및

- [74] 2) 상기 단계 1)의 발현백터를 미생물에 형질전환하는 단계를 포함하는 6-아미노카프로산(6-aminocaproic acid) 생산방법을 제공한다.
- [75]
- [76] 상기 HpaI-HpaH 유전자는 피루베이트(pyruvate) 및/또는 숙신산 세미알데히드(succinic semialdehyde, SSA)를 2-oxohept-3-enedioic acid로 전환하는 알돌라아제(aldolase)-디하이드라타제(dehydratase)를 암호화하는 서열번호 3으로 표시되는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것이 바람직하나, 이에 제한되지 않는다.
- [77] 상기 *nema* 유전자는 2-oxohept-3-enedioic acid를 2-ketopimelic acid로 전환하는 reductase를 암호화하는 서열번호 4로 표시되는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것이 바람직하나, 이에 제한되지 않는다.
- [78] 상기 *KIVD*(alpha-ketoisovalerate decarboxylase) 유전자는 2-ketopimelic acid를 adipate semialdehyde로 전환하는 효소 decarboxylase를 암호화하는 서열번호 5로 표시되는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것이 바람직하나, 이에 제한되지 않는다.
- [79] 상기 *PdAT*(beta-alanine-pyruvate transaminase) 유전자는 adipate semialdehyde를 6-aminocaproic acid로 전환하는 효소 transaminase를 암호화하는 서열번호 6으로 표시되는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것이 바람직하나, 이에 제한되지 않는다.
- [80] 상기 *BcAT*(adenosylmethionine-8-amino-7-oxononanoate Aminotransferase) 유전자는 adipate semialdehyde를 6-aminocaproic acid로 전환하는 효소 transaminase를 암호화하는 서열번호 7로 표시되는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것이 바람직하나, 이에 제한되지 않는다.
- [81] 상기 단계 1)의 발현백터는 GST, MBP, NusA, 티오레독신(thioredoxin), 유비퀴틴, FLAG, BAP, 6HIS, STREP, CBP, CBD, 또는 S-태그 친화성 태그(affinity tag)를 코딩하는 핵산서열을 추가로 포함하는 것이 바람직하나, 이에 제한되지 않는다.
- [82] 상기 단계 1)의 발현백터는 효모의 *kex2p*, 포유동물의 푸린, Factor Xa, 엔테로키나아제, 서브틸리신, 담배식각바이러스 프로테아제, 트롬빈 또는 유비퀴틴 가수분해효소의 인식 서열을 코딩하는 핵산서열을 추가로 포함하는 것이 바람직하나, 이에 제한되지 않는다.
- [83] 상기 단계 2)의 미생물은 박테리아, 효모 또는 진균류인 것이 바람직하고, 대장균인 것이 더욱 바람직하나, 이에 제한되지 않는다.
- [84] 상기 단계 2)의 형질전환된 미생물을 유가식 발효 배양시켜 6-아미노카프로산을 생산 및 분비시키는 단계를 추가로 포함하는 것이 바람직하나, 이에 제한되지 않는다.
- [85] 상기 분비된 단백질을 정제하는 단계를 추가로 포함하는 것이 바람직하나, 이에 제한되지 않는다.

- [86] 본 발명의 폴리뉴클레오티드들은 각각의 염기 서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기 서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.
- [87]
- [88] 또한 본 발명은 HpaI-HpaH 유전자, *nemaA* 유전자, *KIVD*(alpha-ketoisovalerate decarboxylase) 유전자; 를 포함하고, 그리고 *PdAT*(beta-alanine-pyruvate transaminase) 및 *BcAT*(adenosylmethionine-8-amino-7-oxononaoate Aminotransferase) 유전자 중 어느 하나 이상;을 모두 포함하는 6-아미노카프로산(6-aminocaproic acid) 생합성용 발현백터를 제공한다.
- [89] 상기 발현백터는 도 2에 도시된 pACYCWG인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [90] 본 발명의 재조합 백터는 상기 유전자들 또는 이의 단편들을 발현용 백터에 통상적인 클로닝 방법(Sambrook et al, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.)에 따라 삽입하여 얻을 수 있다. 특히 유전자 컨스트럭트의 클로닝을 용이하게 하기 위해 삽입 전에 적절한 어댑터를 유전자 컨스트럭트에 연결할 수도 있다.
- [91] 용어 "백터", "발현백터" 또는 "재조합 백터"는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 지칭할 때 사용된다. 백터는 DNA를 복제시키고, 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. 상기 백터는 목적한 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. 미생물 세포에서 이용 가능한 프로모터, 인핸서, 종결신호 및 폴리아데닐레이션 신호는 공지되어 있다.
- [92] 본 발명의 백터는 전형적으로 클로닝 또는 발현을 위한 백터로서 구축될 수 있다. 또한, 본 발명의 백터는 원핵 세포 또는 진핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 재조합 백터가 발현백터이고, 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터 (예컨대, pLλ프로모터, trp 프로모터, lac 프로모터, T7 프로모터, tac 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 리보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다.
- [93] 한편, 본 발명에 이용될 수 있는 백터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드 (예: pSC101, ColE1, pBR322, pUC8/9, pHC79, pGEX 시리즈, pET 시리즈, pACYC184 및 pUC19 등), 파지 (예: λgt4·λB, λ-Charon, λΔz1 및 M13 등) 또는 바이러스 (예: SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있다.
- [94] 발현백터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함할 것이다. 상기 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로,

형질전환된 세포를 비형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다. 그 예로는 글리포세이트(glyphosate), 글루포시네이트암모늄(glufosinate ammonium) 또는 포스피노트리신(phosphinothricin)과 같은 제초제 저항성 유전자, 카나마이신(kanamycin), G418, 블레오마이신(Bleomycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol)과 같은 항생제 내성 유전자가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[95] 본 발명의 벡터에서, 프로모터는 CaMV 35S, 액틴, 유비퀴틴, pEMU, MAS 또는 히스톤 프로모터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. "프로모터"란 용어는 구조 유전자로부터의 DNA 업스트림의 영역을 의미하며 전사를 개시하기 위하여 RNA 폴리머라아제가 결합하는 DNA 분자를 말한다. "구성적(constitutive) 프로모터"는 대부분의 환경 조건 및 발달 상태 또는 세포 분화하에서 활성이 있는 프로모터이다. 형질전환체의 선택이 각종 단계에서 각종 조직에 의해서 이루어질 수 있기 때문에 구성적 프로모터가 본 발명에서 바람직할 수 있다. 따라서, 구성적 프로모터는 선택 가능성을 제한하지 않는다.

[96] 본 발명의 벡터에서, 통상의 터미네이터를 사용할 수 있으며, 그 예로는 노팔린 신타아제(NOS), 벼 α -아밀라아제 RAmy1 A 터미네이터, 파세올린(phaseoline) 터미네이터, 아그로박테리움 투메파시엔스(Agrobacterium tumefaciens)의 옥토파인(Octopine) 유전자의 터미네이터 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[97]

[98] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터로 형질전환체를 제공한다.

[99] 상기 형질전환체는 박테리아, 효모 및 진균류로 이루어진 군에서 선택되는 것이 바람직하며, 박테리아가 더욱 바람직하고, 대장균이 가장 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[100] 상기 형질전환체는 피루베이트(pyruvate) 및/또는 숙신산 세미알데히드(succinic semialdehyde, SSA)를 6-아미노카프로산(6-aminocaproic acid)으로 전환시키는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[101] 본 발명의 벡터를 숙주세포 내로 운반하는 방법은, 미세주입법, 칼슘포스페이트 침전법, 전기천공법, 리포좀-매개 형질감염법, 아그로박테리움-매개 형질 감염법, DEAE-덱스트란 처리법, 및 유전자 밤바드먼트 등에 의해 벡터를 숙주세포 내로 주입할 수 있다.

[102]

[103] 아울러, 본 발명은 본 발명에 따른 6-아미노카프로산 생산방법에 의해 생산된 6-아미노카프로산을 카프로락탐으로 전환시키는 단계를 추가로 포함하는 카프로락탐 생산방법을 제공한다.

[104]

[105] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 카프로락탐의 전구체인

6-aminocaproic acid의 생합성 경로 (도 1 참조)에 관련된 효소들인 aldolase를 암호화하는 유전자 *HpaI*, dehydratase를 암호화하는 유전자 *HpaH*, reductase를 암호화하는 유전자 *nemA*, decarboxylase를 암호화하는 유전자 *KIVD* 및 transaminase를 암호화하는 유전자 *BcAT* 및 *PdAT*들을 분리하여 벡터로 도입하였다. 또한, 상기 벡터들로부터 유전자들을 모두 연결하여 하나의 벡터에 도입하였다 (도 2). 또한, pyruvate 및/또는 succinic semialdehyde -> 2-oxohept-3-enedioic acid -> 2-ketopimelic acid -> adipate semialdehyde -> 6-aminocaproic acid의 반응 경로에서의 상기 유전자들로부터 발현된 효소들 각각 또는 효소들의 조합에 의한 반응을 확인하여 효소 활성을 확인하였다 (도 3 내지 도 8). 아울러, 상기 유전자들이 모두 함께 도입된 벡터를 형질도입한 대장균에서의 6-aminocaproic acid 생합성을 확인하였다 (도 9 및 도 10).

[106] 따라서, 본 발명의 유전자들이 도입된 벡터로 형질전환된 형질전환체에서 카프로락탐의 전구체인 6-aminocaproic acid의 생합성이 가능하므로, 이를 6-aminocaproic acid의 생합성에 이용할 수 있다.

[107]

[108] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[109]

발명의 실시를 위한 형태

[110] <실시예 1> 6-aminocaproic acid 생합성 경로의 효소들을 암호화하는 유전자 클로닝 및 벡터 제작

[111] <1-1> 각각의 효소 클로닝

[112] Pyruvate로부터 6-aminocaproic acid를 생합성하는 경로의 효소들을 암호화하는 유전자들을 대장균으로부터 클로닝하였다.

[113] 구체적으로, 하기 표 1에 기재된 대장균주들로부터 pyruvate 및/또는 succinic semialdehyde를 4-hydroxy-2-oxoheptanedioic acid로 전환하는 효소 aldolase를 암호화하는 유전자 *HpaI*(서열번호 1); 4-hydroxy-2-oxoheptanedioic acid를 2-oxohept-3-enedioic acid로 전환하는 효소 dehydratase를 암호화하는 유전자 *HpaH* (서열번호 2); 2-oxohept-3-enedioic acid를 2-ketopimelic acid로 전환하는 효소 reductase를 암호화하는 유전자 *nemA* (서열번호 4); 2-ketopimelic acid를 adipate semialdehyde로 전환하는 효소 decarboxylase를 암호화하는 유전자 *KIVD* (alpha-ketoisovalerate decarboxylase) (서열번호 5); 및 adipate semialdehyde를 6-aminocaproic acid로 전환하는 효소 transaminase를 암호화하는 유전자 *PdAT* (beta-alanine-pyruvate transaminase) (서열번호 6) 및 *BcAT* (adenosylmethionine-8-amino-7-oxononaoate Aminotransferase) (서열번호 7)를 각각

표 2에 기재된 프라이머들 (서열번호 15 내지 26)을 이용하여 PCR (95°C 30초, [95°C 30초, 각 프라이머 별 TM 값 30초 및 72°C 60초, 총 30 cycle], 72도 5분)을 통해 증폭하였다. 표 2의 프라이머 중에서 이탤릭체 부분은 제한효소 사이트를 의미하며, 밑줄 친 부분은 In-fusion™ Advantage PCR cloning kit (Clontech, USA)에 도입되었다. 증폭 후 *HpaI*와 *HpaH*를 링커를 이용하여 함께 발현되도록 연결하였고 이를 *HpaI*-*HpaH* (서열번호 3)로 명명하였다. 링커를 가지는 상기 증폭된 PCR 산물이 제한효소 (*NdeI* 및 *BamHI*)로 분해된 PET28(b+) 벡터에 도입되었으며 도입된 발현벡터를 pETHpaI, pETHpaH, pETnemA, pETKIVD, pETBcAT 및 pETPdAT로 명명하였다 (표 4).

[114]

[115] 표 1

[Table 1]

균주	
DH5α	E. coli strain used for standard cloning procedures
BL21(DE3)	E. coli strain used for heterologous gene expression
MG1655(DE3)	E. coli strain used for heterologous gene expression

[116]

[117] 표 2

[Table 2]

증폭 유전자	방향성 ¹	프라이머명	서열번호	서열 (5'-3')	source
HpaI	F	hpaI_F	15	<u>CGCGCGGCAGCCATATG</u> ATGGA AAACAGTTTTTAAAGCGGCGC	Escherichia coliw3110
	R	hpaI_R	16	<u>GGTGGTGGTGCTCGAG</u> ATACAC GCCGGGCTTAATCGCT	
HpaH	F	hpaH_F	17	<u>CGCGCGGCAGCCATATG</u> ATGTT CGACAAACACACCCACACC	Escherichia coliw3110
	R	hpaH_R	18	<u>GGTGGTGGTGCTCGAG</u> AACAA AGCGGCAGCTAATGGAGC	
nemA	F	nemA_F	19	<u>CGCGCGGCAGCCATATG</u> ATGTC ATCTGAAAAACTGTATTCCCC	Escherichia coliw3110
	R	nemA_R	20	<u>GGTGGTGGTGCTCGAG</u> CAACGT CGGGTAATCGGTATAGC	Escherichia coliw3110
KIVD	F	KIVD_F	21	<u>CGCGCGGCAGCCATATG</u> ATGTA TACAGTAGGAGATTACCTATT	Lactococcus lactis KCTC3115
	R	KIVD_R	22	<u>GGTGGTGGTGCTCGAG</u> TGATTT ATTTTGTTTCAGCAAATAGTTT	Lactococcus lactisKTC3115

BcAT	F	BcAT_F	23	<u>CGCGCGGCAGCCATATG</u> ATGATCTATTTTGATAATAGTGCG	Bacillus cereusKC TC1012
	R	BcAT_R	24	GGTGGTGGTGCT <u>CGAGC</u> CTCATCACTTCATATAATTTTGG	Bacillus cereusKC TC3115
PdAT	F	PdAT_F	25	<u>CGCGCGGCAGCCATATG</u> ATGAA CCAACCGCAAAGC	Paracoccus denificans KCTC2528
	R	PdAT_R	26	GGTGGTGGTGCT <u>CGAGG</u> GCCACCTCGGCAAA	Paracoccus denificans KCTC2528

[118] 'F: forward primer, R: reverse primer

[119]

[120] <1-2> 각각의 효소를 암호화하는 유전자들의 연결 벡터 제작

[121] Pyruvate로부터 6-aminocaproic acid를 생합성하는 경로의 효소들을 암호화하는 유전자들 *HpaI*, *HpaH*, *nemA*, *KIVD*, *PdAT* 및 *BcAT*를 모두 포함하는 벡터를 제작하였다.

[122] 구체적으로, aldolase를 암호화하는 *HpaI*와 hydratase를 암호화하는 *HpaH*를 링커를 이용하여 함께 발현되도록 연결하였고 이를 pETHpaI-HpaH로 명명하였다. 또한, 상기 효소들을 암호화하는 유전자들을 한 벡터에 도입하기 위하여 상기 실시예 <1-1>에서 제조한 발현벡터 각각을 주형으로 하고 표 3에 나온 각각의 프라이머들 (서열번호 27 내지 36)를 이용하여 PCR을 수행하였고(95°C 30초, [95°C 30초, 각 프라이머 별 TM 값 30초 및 72°C 60초, 총 30 cycle], 72도 5분), 프라이머의 밑줄 친 부분은 In-fusion™ Advantage PCR cloning kit (Clontech, USA)에 도입되었다. 제일 먼저 링커를 가지는 PCR 산물인 *BcAT*가 제한효소 *sphI*로 분해된 pACYC184에 도입되었다. 그 후에 상기 *BcAT*가 도입된 벡터를 *HindIII*로 분해하고 *PdAT* PCR 산물을 도입하였다. 또한, *BcAT*와 *PdAT*가 도입된 상기 벡터를 *SalI*로 분해하고 *KIVD* PCR 산물을 도입하였다. 또한, *BcAT*, *PdAT* 및 *KIVD*가 도입된 상기 벡터를 *BamHI*로 분해하고 *nemA* PCR 산물을 도입하였다. 아울러, 상기 효소들이 도입된 벡터를 *AhdI*로 분해한 다음 *HpaI*-*HpaH* PCR 산물을 도입하였다.

[123] 그 결과, 6-aminocaproic acid 생합성 경로의 효소들을 암호화하는 유전자 *HpaI-HpaH* (*HpaI*와 *HpaH* 연결), *nema*, *KIVD*, *PdAT* 및 *BcAT*를 모두 포함하는 발현벡터가 제작되었으며, 이를 pACYCWG로 명명하였다 (표 4 및 도 2).

[124] 표 3

[Table 3]

증폭유전자	방향성 ¹	프라이머명	서열번호	서열 (5'-3')	source
pACYC HpaI-H	F	pACYCh palH_F	27	<u>CGATACTATGACTGATAATACG</u> ACTCACTATAGGGGAATTG	pETI-H 벡터
	R	pACYCh palH_R	28	<u>CATGGCGTTGACTCTCAAAAAA</u> CCCCTCAAGACCC	pETI-H 벡터
pACYCn emA	F	pACYCn emA_F	29	<u>CCCGTCCTGTGGATGTAATACG</u> ACTCACTATAGGGGAATTG	pETnem A 벡터
	R	pACYCn emA_R	30	<u>CCGGCGTAGAGGATCCAAAAAA</u> CCCCTCAAGACCC	pETnem A 벡터
pACYCk ivd	F	pACYC KIVD_F	31	<u>AAGGGAGAGCGTCGATAATACG</u> ACTCACTATAGGGGAATTG	pETKIV D 벡터
	R	pACYC KIVD_R	32	<u>AAGGGCATCGGTCGACAAAAA</u> ACCCCTCAAGACCC	pETKIV D 벡터
pACYC BcAT	F	pACYC BcAT_F	33	<u>CCATCTCCTTGCATGTAATACG</u> ACTCACTATAGGGGAATTG	pETBcA T 벡터
	R	pACYC BcAT_R	34	<u>AAGGAATGGTGCATGCAAAAAA</u> ACCCCTCAAGACCC	pETBcA T 벡터
pACYC PdAT	F	pACYC PdAT_F	35	<u>TATCATCGATAAGCTTAATACG</u> ACTCACTATAGGGGAATTG	pETPdA T 벡터
	R	pACYC PdAT_R	36	<u>TACCGCATTAAGCTCAAAAAA</u> CCCCTCAAGACCC	pETPdA T 벡터

[125] 표 4

[Table 4]

플라스미드	설명	source
pETI-H	PT7,His-tag, kanr; E. coli expression vector carrying aldolase	
pETnemA	PT7,His-tag, kanr; E. coli expression vector carrying reductase	
pETKIVD	PT7,His-tag, kanr; E. coli expression vector carrying decarboxylase	
pETBcAT	PT7,His-tag, kanr; E. coli expression vector carrying transaminase	
pETPdAT	PT7,His-tag, kanr; E. coli expression vector carrying transaminase	
pACYC184	E. coli cloning vector	Mo-bi tec사
pACYCWG	E. coli cloning vector carrying whole genes contained PT7	

[126]

[127] <실시예 2> 각각의 효소 및 융합단백질 확인

[128] <2-1> 각각의 효소 및 융합단백질의 발현 및 정제

[129] 상기 <실시예 1>에서 제작한 플라스미드 pETHpaI, pETHpaH, pETnemA, pETKIVD, pETBcAT, pETPdAT, pETHpaI-HpaH 및 pACYCWG를 열충격법을 통해 *E. coli* BL21(DE3)에 형질전환하였다. 상기 형질전환체를 37 °C에서 50 ug/ml의 항생제를 함유하는 LB배지에서 배양하였다. 형질전환체 배양액이 세포 농도 A600=0.5에 도달했을 때, 0.5 mM IPTG(isopropyl-β-thio-D-galactopyranoside)를 첨가하고 37 °C에서 3시간 동안 추가 배양하였다. 배양한 세포들을 원심분리하여 모으고 생성된 펠릿을 소니케이션으로 파쇄하였다. 파쇄 후 상등액으로부터 Ni-NTA 아가로스(agarose) (Qiagen, Germany), Econo Pac Chromatography Column (Bio-Rad, USA)을 이용하여 제조자의 설명에 따라 HpaI (서열번호 8), HpaH (서열번호 9), HpaI-HpaH (서열번호 10), nemA (서열번호 11), KIVD (서열번호 12), PdAT (서열번호 13), BcAT (서열번호 14)를 정제하였다. 정제한 단백질의 농도는 BCA protein assay kit (Pierce, USA)로 측정하였다. 그 결과, HpaI-H : 0.216mg/ml; Kivd : 0.523mg/ml; PdAT : 0.176mg/ml; BcAT : 0.632mg/ml; nemA : 0.659mg/ml;로 나타났으며, 단백질 purity는 하기 표 7에서와 같이 나타났다.

[130]

- [131] <실시예 3> 정제한 효소 활성 확인
- [132] <3-1> 정제한 **aldolase-dehydratase (HpaI-HpaH)**의 활성 확인
- [133] 상기 실시예 <2-1>에서 정제한 aldolase 및 aldolase-dehydratase (HpaI-HpaH) 효소 (pETHpaI-HpaH로 형질전환된 대장균을 이용하여 정제)에 의한 pyruvate 및/또는 succinic semialdehyde의 2-oxohept-3-enedioic acid로의 전환을 확인하기 위하여, 효소 반응을 진행하였다.
- [134] 구체적으로, 기질인 pyruvate 4 g/L와 SSA(succinic semialdehyde) 4 g/L, 보조인자(cofactor)로 $MnCl_2$ 50 mM 및 상기 실시예 <2-1>에서 정제한 *HpaI* 발현 단백질인 aldolase 및 *HpaI*와 *HpaH*가 연결되어 발현된 aldolase-dehydratase를 각각 혼합하고 pH 발란스를 위하여 100 mM HEPES buffer (pH8.0)로 볼륨을 맞추고 30 °C에서 하룻밤 동안 반응을 유도하였다. 반응 후 Pyruvate assay kit (Sigma, USA)로 A570에서 흡광도를 측정하여 기질인 pyruvate의 농도 변화를 확인하였다 (표 5).
- [135] 그 결과, aldolase-hydratase (HpaI-HpaH)에 의해 기질인 pyruvate의 농도가 감소함을 확인하여 pyruvate 및/또는 succinic semialdehyde의 2-oxohept-3-enedioic acid로의 전환 반응이 수행되었음을 알 수 있었다 (도 3).

[136] 표 5

[Table 5]

aldolase_hydratas e	pyruvate	SSA	A ₅₇₀ (흡광도)	Pyruvate[uM]
0	100	100	0.603	3.42
300	0	0	0.162	1.22
300	100	100	0.184	1.33
100	100	100	0.322	2.01

- [137]
- [138] <3-2> 정제한 **reductase (nemA)**의 활성 확인
- [139] 상기 실시예 <2-1>에서 정제한 Reductase (*nemA*)에 의해 2-oxohept-3-enedioic acid가 2-ketopimeli acid로 전환되는지 확인하기 위하여 효소 반응을 진행하였다.
- [140] 구체적으로, 기질인 2-oxohept-3-enedioic acid를 구매하기 어렵기 때문에 본 반응이 역 반응으로도 진행됨을 이용하여 2-ketopimeli acid를 기질로 이용하였다. 상기 기질에 보조인자로 4 mM NAD 와 0.4 mM $FeSO_4$ 및 *nemA*가 발현된 reductase를 첨가한 후 pH 발란스를 위하여 1 M potassium phosphate buffer (pH5.3)로 볼륨을 맞추어 30 °C에서 반응을 유도하였다. 반응 후, 반응시 NAD에서 NADH로 전환되어 생성되는 NADH의 양을 NADH assay kit (abcam, USA)로 A450에서 흡광도를 측정하여 전환 효과를 확인하였다 (표 6).
- [141] 그 결과, pETnemA에 의해 발현 및 정제된 reductase가 NADH를 생성함을

확인함으로써, 2-ketopimeli acid의 2-oxohept-3-enedioic acid로의 전환 효과를 확인할 수 있었다 (도 4). 상기 실시예 2 및 3의 결과를 표 7에서 정리하였다.

[142] 표 6

[Table 6]

reductase	2-ketopimelic acid	NAD	FeSO ₄	nemA
200	0	4mM	0.4mM	0.754
200	4mM	4mM	0.4mM	1.26
100	4mM	4mM	0.4mM	0.943
0	4mM	4mM	0.4mM	0.881

[143]

[144] 표 7

[Table 7]

	발현특성	Purity(%)	Specific activity(U/mg)	Assay
HpaI-HpaH	Soluble	22	13.41	Pyruvate
nemA	Soluble	43	2.71	NADH
KivD	Soluble	24	-	No STD
PdAT	Soluble	84	13.13	Glutamate

[145]

[146] <3-3> aldose-dehydratase 및 reductase 커플링(coupling) 반응 분석

[147] 상기 실시예 <3-1>에서 pyruvate 및/또는 succinic semialdehyde의 2-oxohept-3-enedioic acid로의 전환을 확인하고, <3-2>에서 2-oxohept-3-enedioic acid의 2-ketopimeli acid로의 전환을 역반응으로 확인하였으므로, 상기 두 효소에 의해 두 반응이 함께 일어나는지 확인하였다.

[148] 구체적으로, 기질로 4 g/L의 pyruvate, 4 g/L의 SSA 및 200 mM NADH를 넣어준 뒤 보조인자로 50 mM MnCl₂를 첨가하고 HpaI-HpaH가 발현된 aldolase-hydratase 및 nemA가 발현된 reductase를 넣고 pH 발란스를 위하여 100 mM potassium phosphate buffer (pH8.0)로 볼륨을 맞추었다. 그 후 효소 반응을 유도하여 생성물인 2-ketopimelic acid를 LC-ms/ms로 확인하였다. TIC는 m/z의 50-300까지 전체적으로 분리한 것이며, SIM은 full scan에서는 보이지 않는 피크(peak)를 분자이온만(여기서는 155) 따로 모니터링 하는 방법이고, SRM은 분자 이온을 높은 에너지에서 쪼개 daughter ion을 생성하는 방법이다.

[149] 그 결과, 대조군인 2-ketopimelic acid (Sigma Aldrich)와 유사한 시간 (RT)에 피크가 형성되었으며, 피크의 mass 값이 동일함을 확인하였다 (도 5). 따라서, 두

효소가 함께 발현되면 pyruvate 및/또는 succinic semialdehyde로부터 2-ketopimelic acid가 생성됨을 알 수 있었다.

[150]

[151] **<3-4> 정제한 transaminase (BcAT 또는 PdAT)의 활성 확인**

[152] 상기 실시예 <2-1>에서 정제한 transaminase에 의해 adipate semialdehyde가 6-aminocaproic acid로 전환되는지 확인하기 위하여 효소 반응을 진행하였다.

[153] 구체적으로, 기질인 adipate semialdehyde의 구매가 어려우므로, 본 반응이 역반응으로도 진행됨을 이용하여 20 mM 6-aminocaproic acid를 기질로 첨가하고 아미노기 제공자로 10 mM sodium alpha keto glutarate를 보조인자로 0.2 mM PLP를 첨가한 뒤 상기 실시예 <2-1>에서 각각의 BcAT 및 PdAT가 발현되고 정제된 transaminase를 넣고 pH 발란스를 위하여 100mM potassium phosphate buffer(pH7.0)로 볼륨을 맞추었다. 효소 반응을 30 °C에서 하룻밤 동안 수행한 뒤 반응을 확인하기 위하여 생성물인 글루타메이트(glutamate)의 생성 여부 및 농도 변화를 글루타메이트 분석기로 측정한 후 specific activity를 계산하였다.

[154] 그 결과, PdAT와 BcAT 모두 glutamate가 형성되었으며 pdAT에서 활성이 더 높은 것을 확인할 수 있었다(표 8).

[155]

[156] 표 8

[Table 8]

	glutamate(mM)	Specific activity (U/mg)
pETPdAT	1.40	13.13
pETcAT	0.56	3.55

[157]

[158] **<3-5> transaminase (BcAT 및/또는 PdAT) 및 decarboxylase (KIVD)의 커플링(coupling) 반응 분석**

[159] 상기 실시예 <3-4>에서 확인한 transaminase (BcAT 및/또는 PdAT)와 본 발명의 decarboxylase (KIVD)에 의해 2-ketopimelic acid가 6-aminocaproic acid로 전환되는지 확인하였다.

[160] 구체적으로, 상기 두 반응이 함께 일어나는지 확인하기 위하여 기질로 2-ketopimelic acid, 아미노기 제공자로 20 mM glutamate, 보조인자로 5 mM MgSO₄와 0.1 mM PLP를 첨가하고 KIVD가 발현되고 정제된 decarboxylase와 BcAT 및 PdAT가 발현되고 정제된 transaminase를 넣어준 뒤 pH 발란스를 위하여 100 mM potassium phosphate buffer (pH7.0)로 볼륨을 맞췄다. 30 °C에서 하룻밤 동안 효소 반응을 유도한 뒤에 생성물을 얻었다.

[161] 상기 생성물을 TLC를 이용하여 확인하기 위하여, 실리카겔(silicagel)판의

아랫부분 양쪽 가로 세로 1cm부분을 연필로 줄을 그어서 표시하고 샘플을 점적할 부분을 연필로 아주 작게 점으로 표시한 뒤, 상기에서 얻은 생성물을 1ul씩 총 5회 점적한 후 판을 잘 말려 탱크(tank)에 넣고 입구를 봉한 후 1시간 전개하였다. 전개시약은 n-butanol: acetic acid: D.W.를 5:1:5로 잘 섞은 뒤 상등액만 사용하였다. 전개가 끝난 뒤 판을 꺼내어 1% ninhydrin solution을 스프레이로 뿌린 뒤 80°C에서 5분간 구운 뒤 스팟의 색을 확인하였다.

[162] 또한, 상기 생성물을 Lc-ms/ms (컬럼: 250X4.6mm OptimaPak C18, (RS Tech, korea); 이동상: A-20% 아세토니트릴, B-80% 증류수; 유속: 300 μ l/min; 주입량: 1 μ l; Ionization: ESI(+)-MS, positivw scan mode; Source voltage=2.5kV; Capillary temperature=350°C; m/z=50-150; step size=0.1m/z; nebuliser pressure=100psi)으로 확인하였다.

[163] 그 결과, 6-aminocaproic acid가 생성된 것을 TLC 및 Lc-ms/ms로 확인할 수 있었다 (도 6 및 도 7).

[164]

[165] <실시예 4> 세포 내에서의 **6-aminocaproic acid** 생합성 및 효소 활성 확인

[166] <4-1> **6-aminocaproic acid** 생합성 확인

[167] 상기 실시예 <1-2>에서 pACYCWG로 형질전환된 대장균 내에서의 융합 단백질 (aldolase-dehydratase-reductase-decarboxylase-transaminase) 발현에 의한 glucose 및 SSA의 6-aminocaproic acid로의 생합성을 확인하였다.

[168] 구체적으로, 하기 표 9의 조성의 배지 2 L에서 pACYCWG로 형질전환한 대장균과 대조균으로 빈 벡터로 형질전환한 대장균을 24시간 동안 37°C에서 유가 배양하였다. 배양 후 세포를 원심분리하여 펠릿을 얻었으며, 상기 펠릿을 증류수로 5회 세척한 뒤 50 ml의 증류수에 다시 현탁하였다. 상기 현탁액에 10g glucose, 4g/L succinic semialdehyde 및 1ml/L trace elements를 넣은 후 37°C에서 16시간 동안 in vivo 반응을 유도하였다. 반응 후에 상등액만 얻어 TLC 및 LC-ms(컬럼: 250X4.6mm OptimaPak C18, (RS Tech, korea); 이동상: A-20% 아세토니트릴, B-80% 증류수; 유속: 300 μ l/min; 주입량: 1 μ l; Ionization: ESI(+)-MS, positive scan mode; Source voltage=2.5kV; Capillary temperature=350°C; m/z=50-150; step size=0.1m/z; nebuliser pressure=100psi)로 6-aminocaproic acid를 확인하였다. TIC는 m/z의 50-300까지 전체적으로 분리한 것이며, SIM은 full scan에서는 보이지 않는 피크(peak)를 분자이온만(여기서는 155) 따로 모니터링 하는 방법이고, SRM은 분자 이온을 높은 에너지에서 쪼개 daughter ion을 생성하는 방법이다.

[169] 그 결과, 20시간 배양한 세포를 가지고 생합성 전환을 유도한 3번 레인에서 6-aminocaproic acid와 같은 라인의 spot이 보였으므로 6-aminocaproic acid가 형성됨을 확인할 수 있었다 (도 8). 또한, Lc- ms와 Lc-ms/ms에서 측정한 결과에서도 6-aminocaproic acid 피크를 확인함으로써 in vivo로의 생합성 경로를 확인하였다 (도 9).

[170] 표 9

[Table 9]

component	g/L
Glucose	15
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2
Yeast extract	5
(NH ₄) ₂ SO ₄	10
NaCl	0.5
Trace elements	1
KH ₂ PO ₄	3
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	3
chloramphenicol	0.01
lactose	5

[171] 또한 글루코오스에서 6-aminocaproic acid(6-ACA)로의 전환 수율을 구하기 위하여 사용된 글루코오스양을 glucose analyser를 사용하여 측정하고 생성된 6-aminocaproic acid양을 LC-MS로부터 구하였다. 실제 반응 시 glucose 10g을 넣어주었으나 실제로 균주가 사용한 양은 initial glucose에서 last glucose를 뺀 양으로 구하였으며, 6-ACA가 형성된 것을 정량 값으로 나타냈다 (No plasmid, Pacyc184, HpaIH-nemA, PdAT-Kivd: 음성대조군). 그 결과, 글루코오스에서 6-ACA로 약 2.5%의 전환 수율을 나타냄을 확인하였다 (표 10).

[172]

[173] 표 10

[Table 10]

	Initial glucose(g/L)	LastGlucose(g/L)	6-ACA(g/L)
No plasmid	10	9.87	ND(not detected)
pACYC184	10	6.19	ND
HpaIH-nemA	10	6.23	ND
PdAT-Kivd	10	6.54	ND
pACYCWG	10	4.17	≒0.3

[174]

[175] <4-2> 세포내에서의 효소 발현 확인

[176] 상기 실시예 <4-1>에서 배양된 세포 내 용해한 재조합 단백질을 Laemmli의

방법에 따라 SDS-PAGE를 이용하여 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다 (Laemmli, U.K. 1970, *Nature* 227:680-685).

- [177] 구체적으로, 10% SDS-PAGE 겔로 분리된 단백질들을 니트로셀룰로오스 멤브레인으로 트랜스퍼하였다. 트랜스퍼 후 니트로셀룰로오스 멤브레인을 5% 탈지분유를 포함하는 PBS(phosphate buffered saline)로 블락킹하였으며, PBST (0.1% Tween20 in PBS)로 세 번 세척하였다. 세척한 상기 멤브레인을 His-probe 단일클론 항체 (Santa Cruz Biotechnology, USA)로 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 그 후 IgG AP (alkaline phosphatase) 항체 (sigma, USA)와 특이적으로 반응하는 항원이 AP 결합 기질 키트 (Bio-rad, USA)에 나타났다 (도 10).

[178]

- [179] <실시예 5> 높은 효소 활성을 나타내는 발효 조건 분석

- [180] <5-1> 플라스크 배양

- [181] pACYCWG로 형질전환한 대장균의 배양 상등액으로부터 6-aminocaproic acid가 형성됨을 확인하기 위하여 플라스크로 배양하여 배양액을 분석하였다.

- [182] 구체적으로, 하기 표 11의 조성의 배지 100 mL에서 pACYCWG로 형질전환한 대장균 및 대조균으로 빈 벡터로 형질전환한 대장균을 24시간 동안 28°C에서 배양하였다. 대장균 배양 후 상등액을 얻어 LC-ms로 분석하였다.

- [183] 그 결과, 생합성 전환이 유도된 것을 LC-ms의 스펙트럼으로 확인할 수 있었다 (도 11).

- [184] 표 11

[Table 11]

component	g/L
Glucose	15
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2
Yeast extract	20
Casein peptone	10
(NH ₄) ₂ SO ₄	10
NaCl	0.5
Trace elements	1
KH ₂ PO ₄	3
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	3
chloramphenicol	0.01

[185]

- [186] <5-2> 발효 배양

- [187] 6-aminocaproic acid의 대량배양을 위하여 하기 표 12의 조성의 배지 2.5L에서

pACYCWG로 형질전환한 대장균을 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 초기 당이 소진되는 시점에 15g/L의 lactose를 추가하여 효소들의 발현을 유도한 뒤 시간 당 4g/L의 당을 피딩(feeding)하였다 (도 12). 대장균 배양 후 상등액을 얻어 LC-MS로 분석하였다. 그 결과 6-aminocaproic acid가 생성됨을 확인하였다 (도 13). 또한 웨스턴 블롯을 통해 발효 배양으로 원하는 효소가 발현되었음을 확인하였다 (도 14).

[188] 표 12

[Table 12]

component	g/L
Glucose	15
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2
Yeast extract	5
(NH ₄) ₂ SO ₄	10
NaCl	0.5
Trace elements	1
KH ₂ PO ₄	1.6
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	4.4
chloramphenicol	20ug/ml

[189]

[190] <5-3> 균주 개량(Strain improvement)

[191] 지금까지 transaminase 두 종류를 사용하였으나, 효소들이 많아 발현이 잘 되지 않는 단점이 있어 하나만 선택 사용하고자 하였다. PdAT, BcAT 둘 중 specific activity가 높은 PdAT만을 사용하여 벡터를 제작하였고 이 벡터는 pPKNI (pACYCWG-BcAT) 로 명명하였다.

[192] 벡터 사이즈가 크기 때문에 균주 내 recombination 가능성이 있어 recombinase를 인코딩하는 유전자 RecA가 mutation된 균주 HMS174(DE3)를 선별하여 사용하였다.

[193] pPKNI를 균주 HMS174(DE3)에 형질 전환하였고 발효를 통해 6-ACA 생산을 유도하였다. 구체적으로 하기 표 12의 조성의 배지 2.5L로 대장균을 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 3시간 후 0.4mM IPTG를 추가하여 효소들의 발현을 유도하였고 초기 당 소진 후 시간 당 5g/L의 당을 피딩(feeding)하였다 (도 15). 대장균 배양 후 상등액을 얻어 LC-MS/MS로 분석하였다. 그 결과 6-aminocaproic acid가 생성됨을 확인하였다 (도 16).

[194]

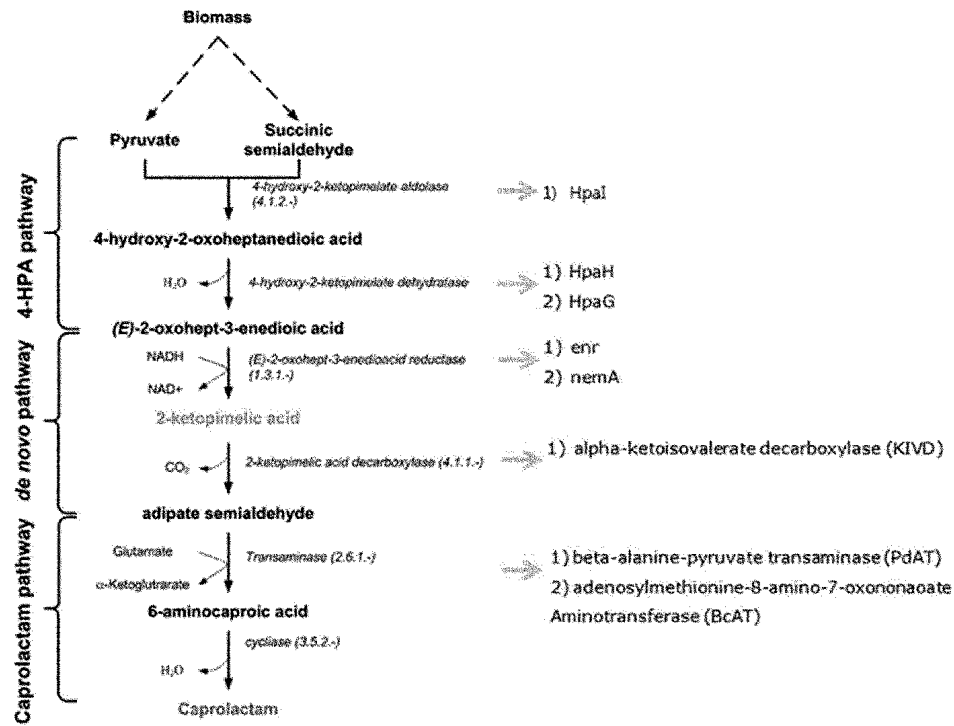
[195]

청구범위

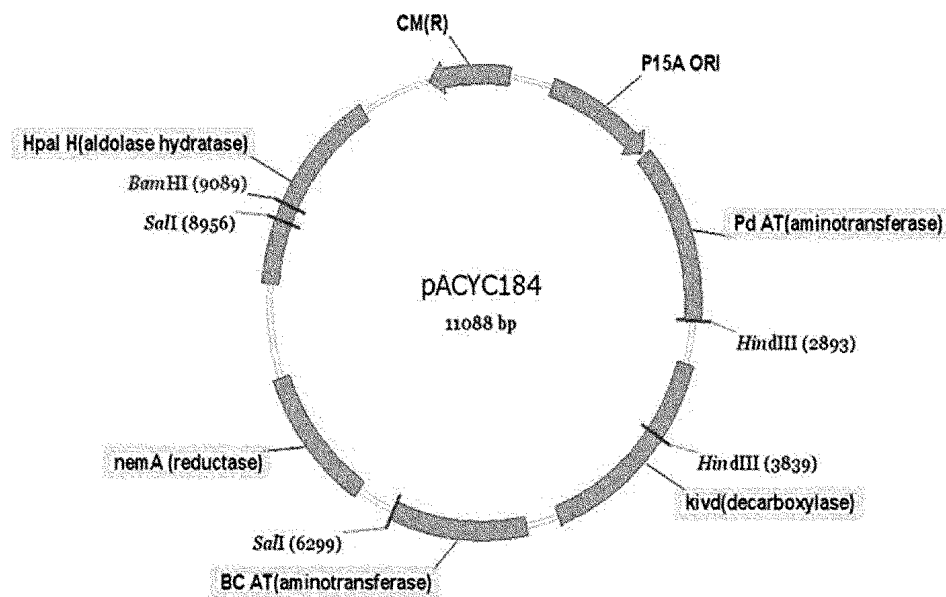
- [청구항 1] 1) *HpaI*(4-hydroxy-2-oxo-heptane-1,7-dioate aldolase)-*HpaH*(2-oxo-hept-3-ene-1,7-dioate dehydratase) 유전자, *nema*(N-ethylmaleimide reductase) 유전자, *KIVD*(alpha-ketoisovalerate decarboxylase) 유전자; 를 포함하고, 그리고 *PdAT*(beta-alanine-pyruvate transaminase) 및 *BcAT*(adenosylmethionine-8-amino-7-oxononaoate Aminotransferase) 유전자 중 어느 하나 이상;을 포함하는 발현벡터를 제조하는 단계; 및
- 2) 상기 단계 1)의 발현벡터를 미생물에 형질전환하는 단계를 포함하는 6-아미노카프로산(6-aminocaproic acid) 생산방법.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서, 상기 *HpaI*-*HpaH* 유전자는 알돌라아제(aldolase)-디하이드라타제(dehydratase)를 암호화하는 서열번호 3으로 표시되는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것을 특징으로 하는 6-아미노카프로산의 생산방법.
- [청구항 3] 제 1항에 있어서, 상기 *nema* 유전자는 리덕타아제(reductase)를 암호화하는 서열번호 4로 표시되는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것을 특징으로 하는 6-아미노카프로산의 생산방법.
- [청구항 4] 제 1항에 있어서, 상기 *KIVD*(alpha-ketoisovalerate decarboxylase) 유전자는 디카르복실라아제(decarboxylase)를 암호화하는 서열번호 5로 표시되는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것을 특징으로 하는 6-아미노카프로산의 생산방법.
- [청구항 5] 제 1항에 있어서, 상기 *PdAT*(beta-alanine-pyruvate transaminase) 유전자는 트랜스아미나아제(transaminase)를 암호화하는 서열번호 6으로 표시되는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것을 특징으로 하는 6-아미노카프로산의 생산방법.
- [청구항 6] 제 1항에 있어서, 상기 *BcAT*(adenosylmethionine-8-amino-7-oxononaoate Aminotransferase) 유전자는 트랜스아미나아제(transaminase)를 암호화하는 서열번호 7로 표시되는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것을 특징으로 하는 6-아미노카프로산의 생산방법.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 단계 1)의 발현벡터는 GST, MBP, NusA, 티오레독신(thioredoxin), 유비퀴틴, FLAG, BAP, 6HIS, STREP, CBP, CBD, 또는 S-태그 친화성 태그(affinity tag)를 코딩하는 핵산서열을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 6-아미노카프로산의 생산방법.
- [청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 단계 1)의 발현벡터는 효모의 *kex2p*,

- 포유동물의 퓨린, Factor Xa, 엔테로키나아제, 서브틸리신, 담배식각바이러스 프로테아제, 트롬빈 또는 유비퀴틴 가수분해효소의 인식 서열을 코딩하는 핵산서열을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 6-아미노카프로산의 생산방법.
- [청구항 9] 제1항에 있어서, 상기 단계 2)의 미생물은 박테리아, 효모 또는 진균류인 것을 특징으로 하는 6-아미노카프로산의 생산방법.
- [청구항 10] 제1항에 있어서, 상기 단계 2)의 형질전환된 미생물을 유가식 발효 배양시켜 6-아미노카프로산을 생산 및 분비시키는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 6-아미노카프로산의 생산방법.
- [청구항 11] 제10항에 있어서, 상기 분비된 단백질을 정제하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 6-아미노카프로산의 생산방법.
- [청구항 12] *HpaI-HpaH* 유전자, *nemA* 유전자, *KIVD*(α -ketoisovalerate decarboxylase) 유전자; 를 포함하고, 그리고 *PdAT* (β -alanine-pyruvate transaminase) 및 *BcAT* (adenosylmethionine-8-amino-7-oxononanoate Aminotransferase) 유전자 중 어느 하나 이상;을 모두 포함하는 6-아미노카프로산(6-aminocaproic acid) 생합성용 발현벡터.
- [청구항 13] 제 12항에 있어서, 상기 발현벡터는 도 2에 도시된 pACYCWG인 것을 특징으로 하는 6-아미노카프로산(6-aminocaproic acid) 생합성용 발현벡터.
- [청구항 14] 제 12항의 발현벡터로 형질전환된 형질전환체.
- [청구항 15] 제 14항에 있어서, 상기 형질전환체는 박테리아, 효모 또는 진균류인 것을 특징으로 하는 형질전환체.
- [청구항 16] 제 14항에 있어서, 상기 형질전환체는 피루베이트(pyruvate) 및/또는 숙신산 세미알데히드(succinic semialdehyde, SSA)를 6-아미노카프로산(6-aminocaproic acid)으로 전환시키는 것을 특징으로 하는 형질전환체.
- [청구항 17] 제 1항 내지 제 11항 중 어느 한 항의 6-아미노카프로산 생산방법에 의해 생산된 6-아미노카프로산을 카프로락탐으로 전환시키는 단계를 추가로 포함하는 카프로락탐 생산방법.

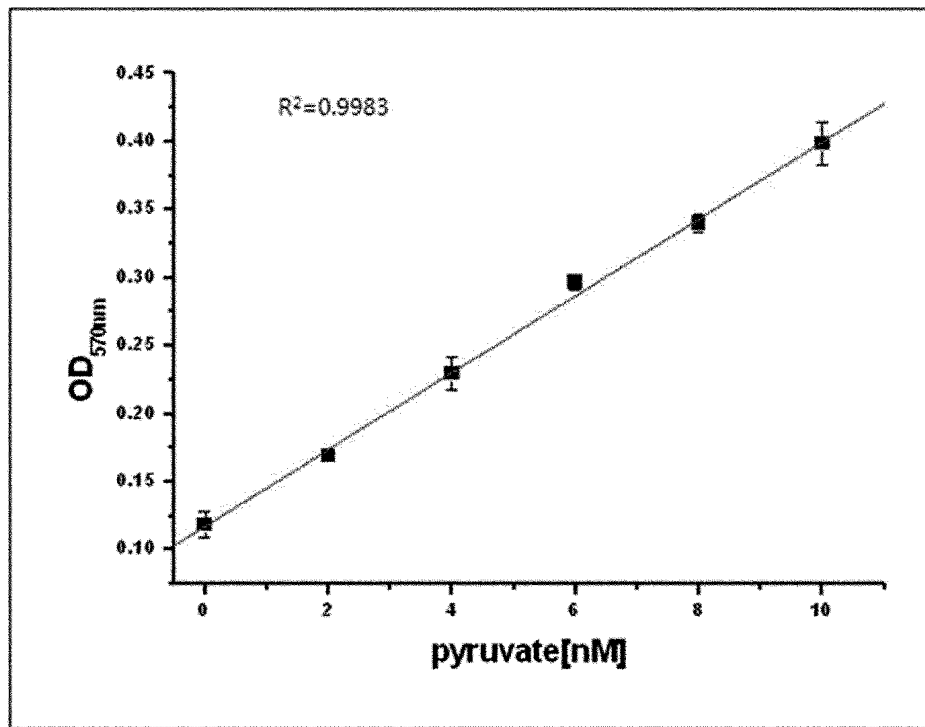
[Fig. 1]



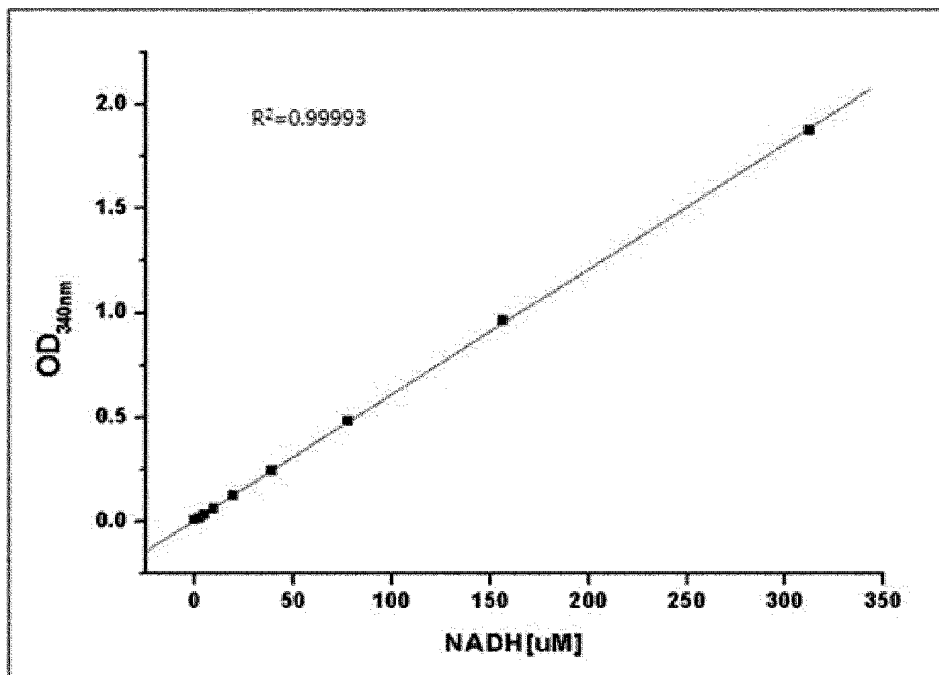
[Fig. 2]



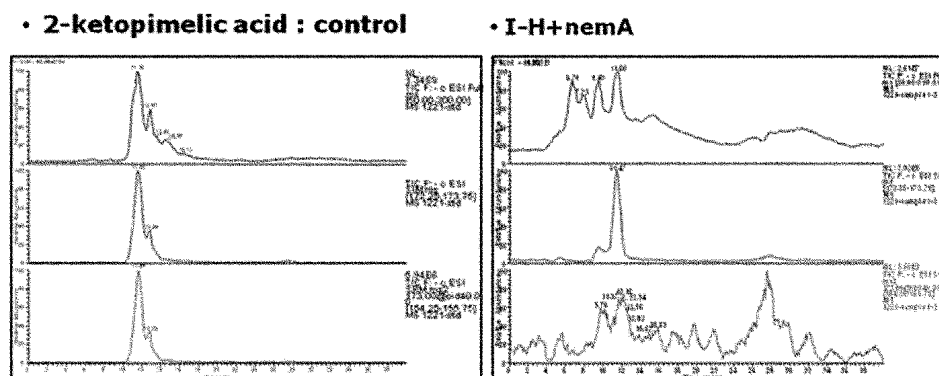
[Fig. 3]



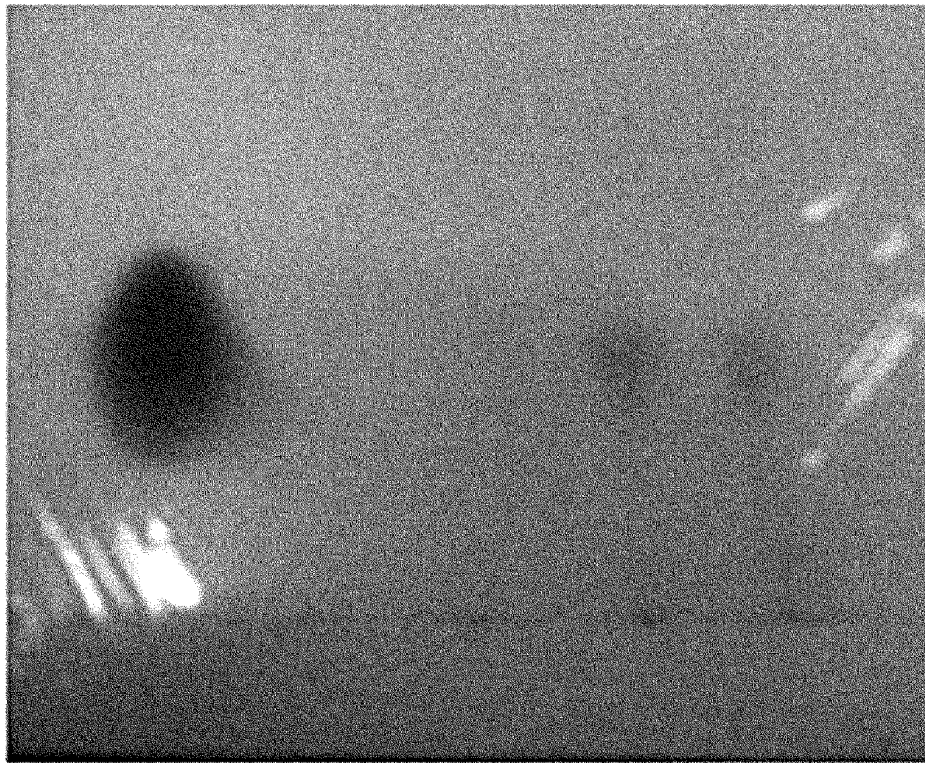
[Fig. 4]



[Fig. 5]

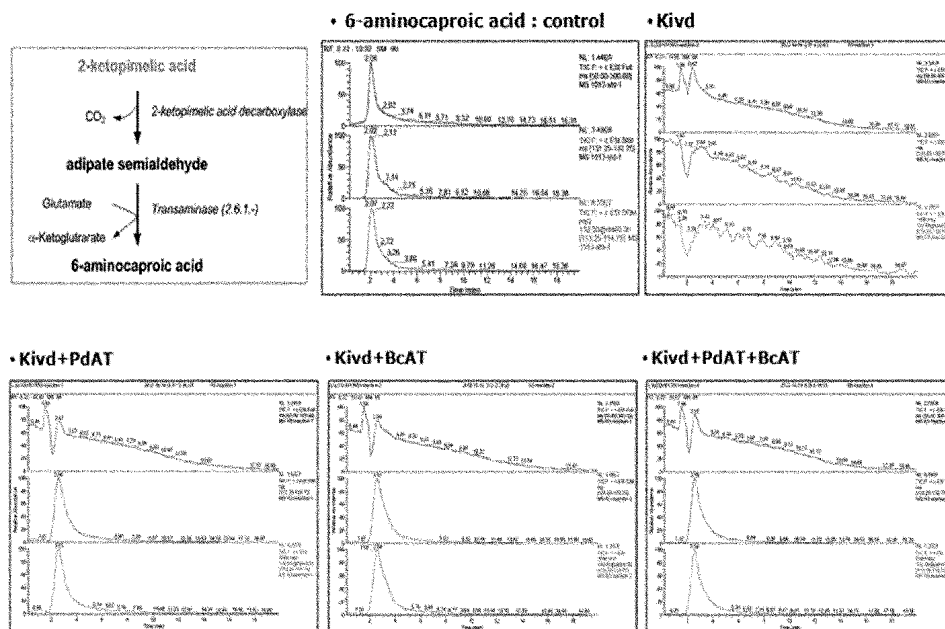


[Fig. 6]

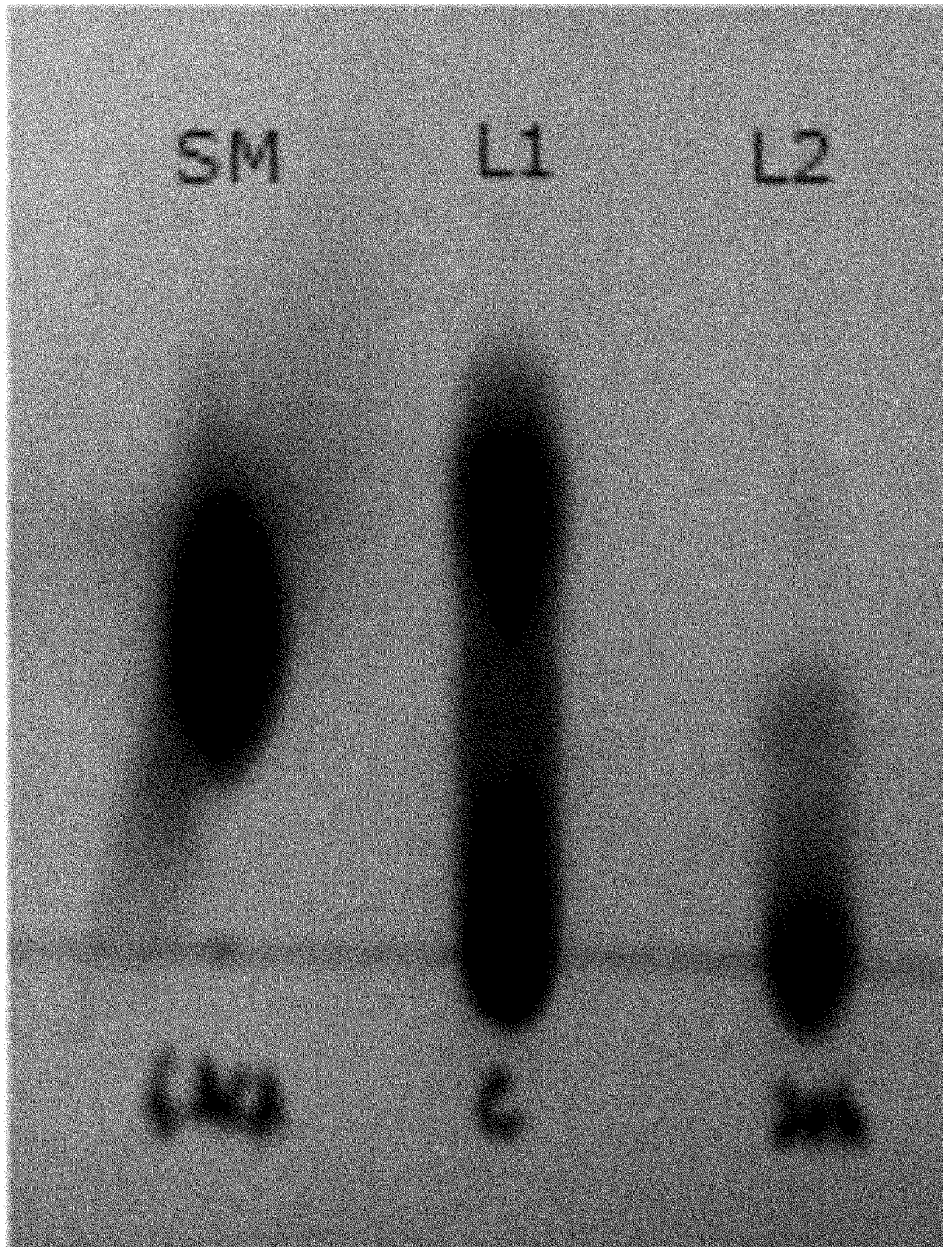


L1 L2 L3 L4 L5

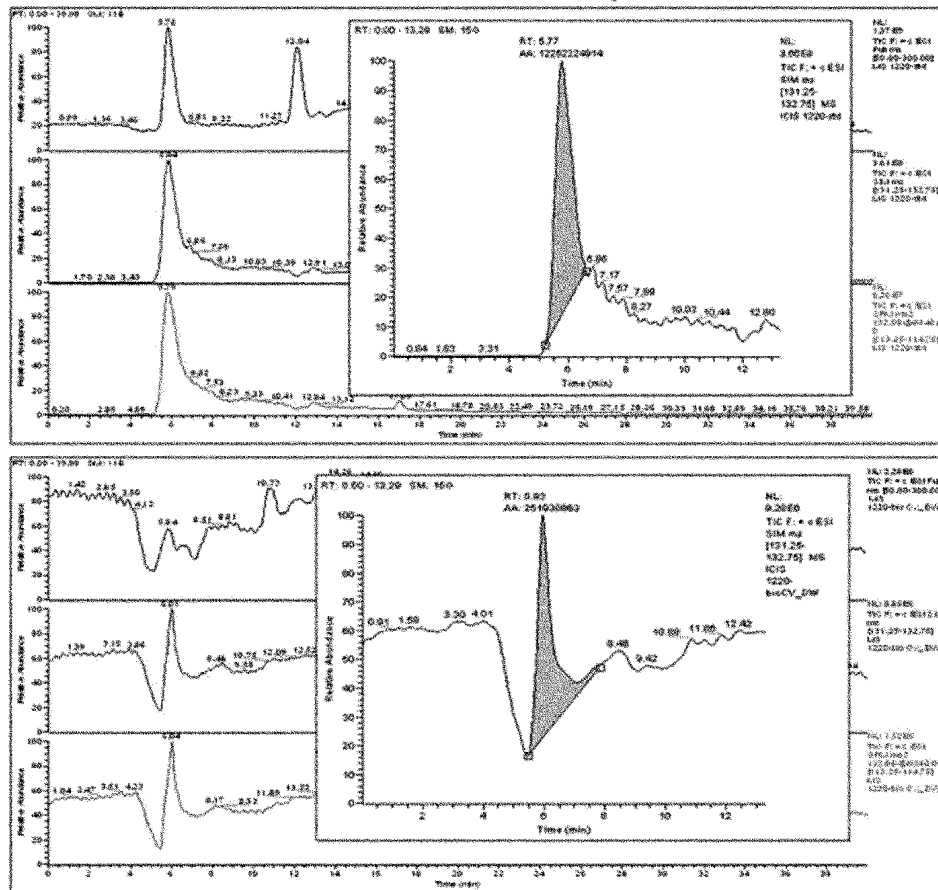
[Fig. 7]



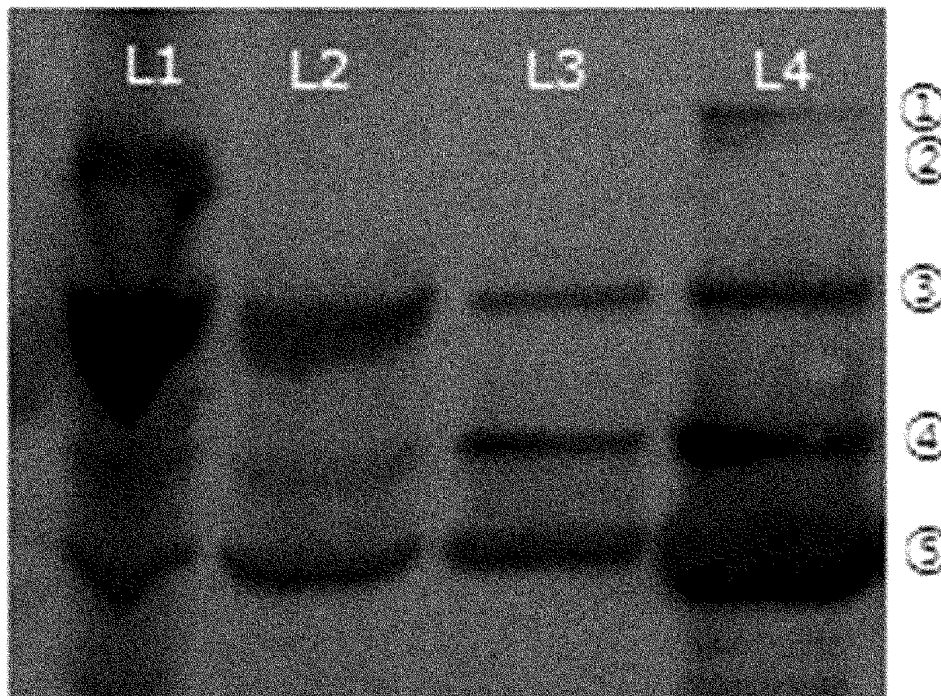
[Fig. 8]



• 6-aminocaproic acid : control

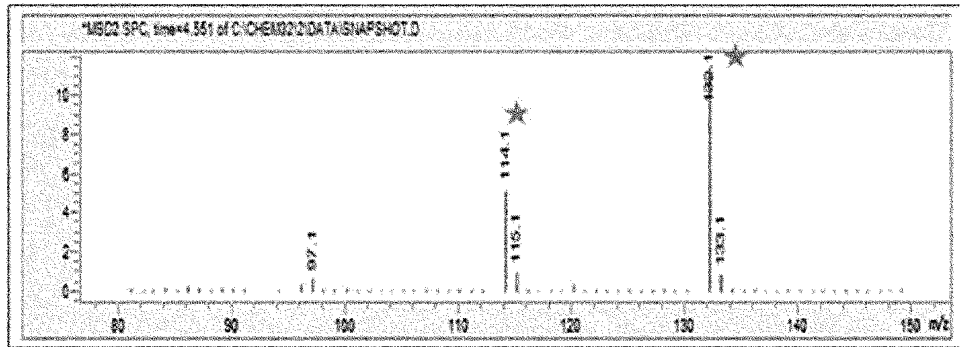


[Fig. 10]

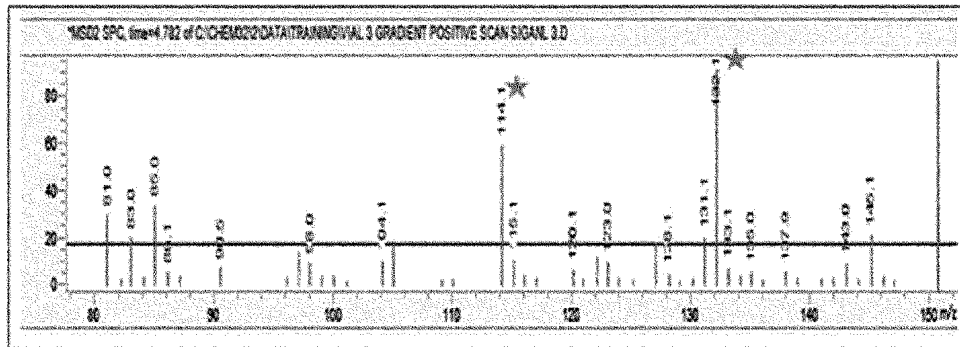


[Fig. 11]

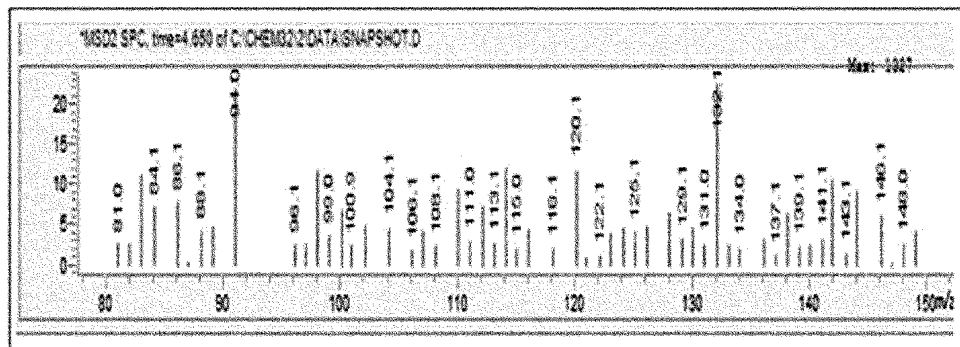
• positive control - 6-aminocaproic acid



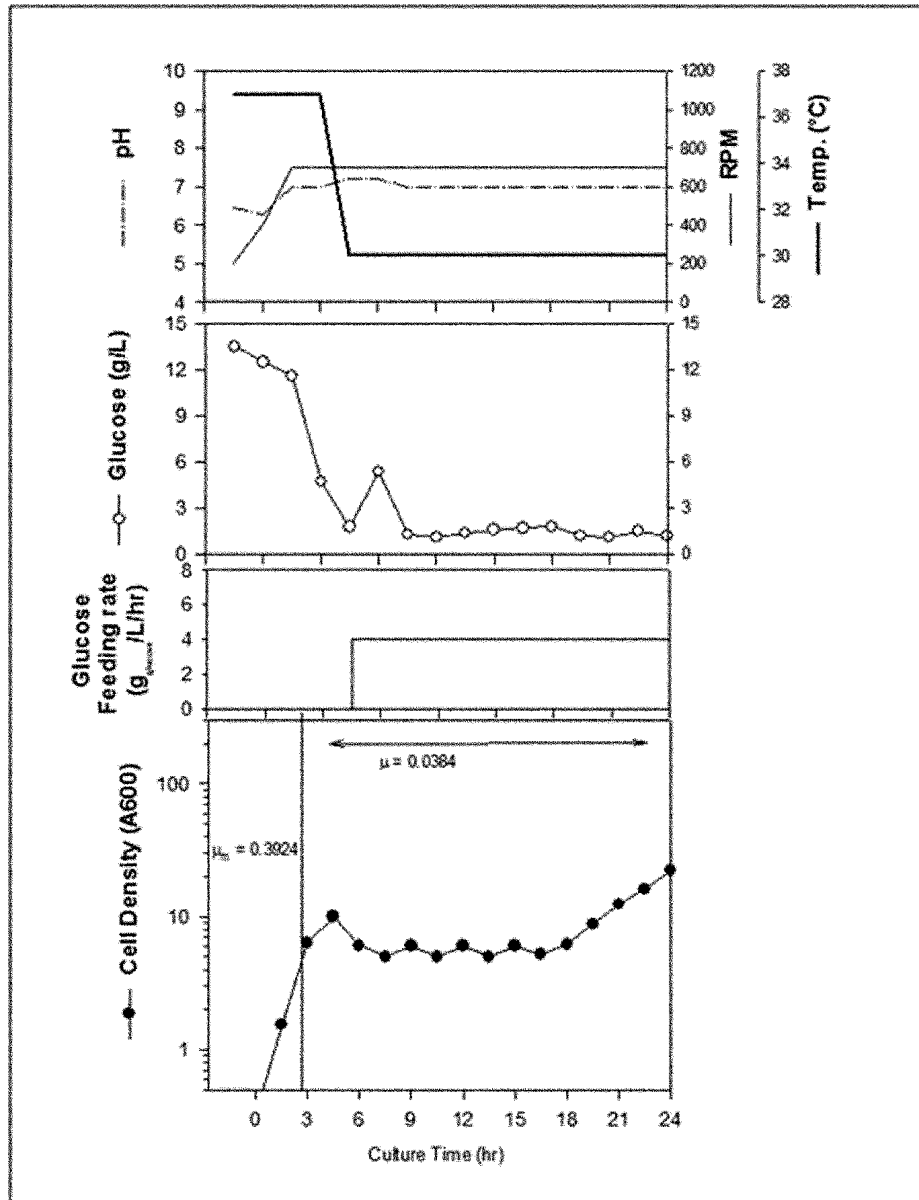
• reaction



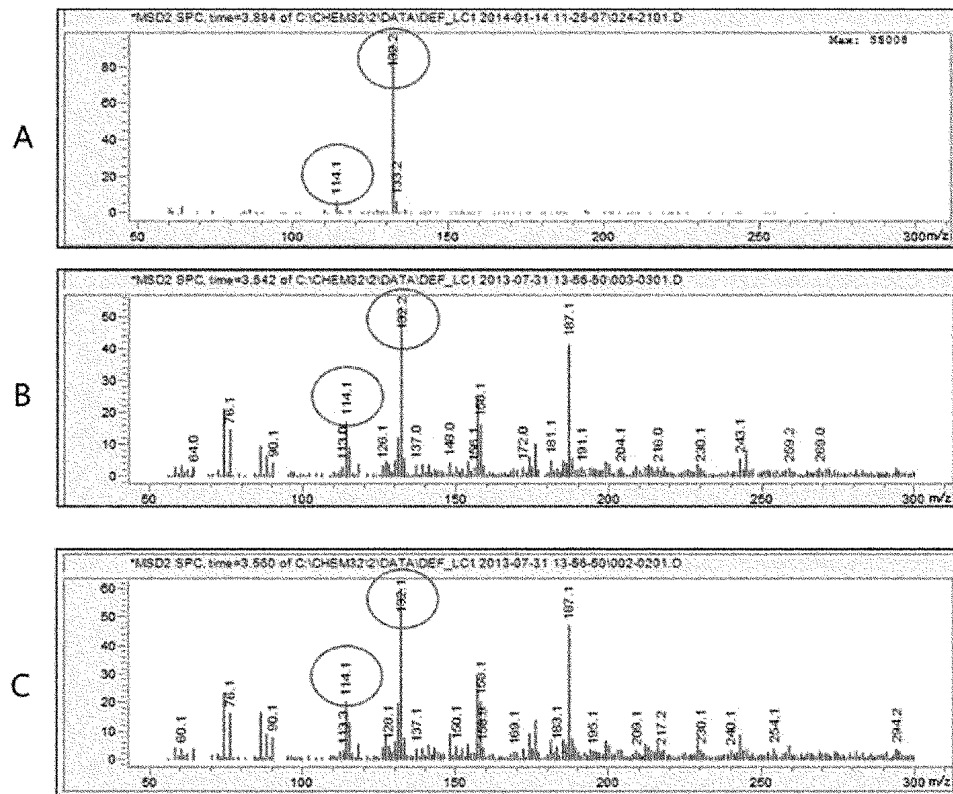
• negative control - empty vector



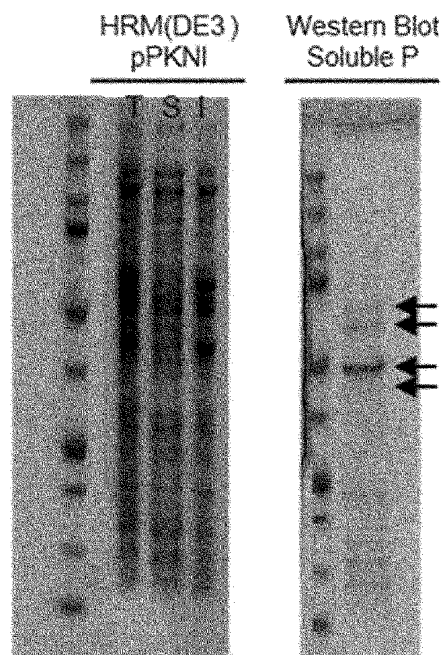
[Fig. 12]



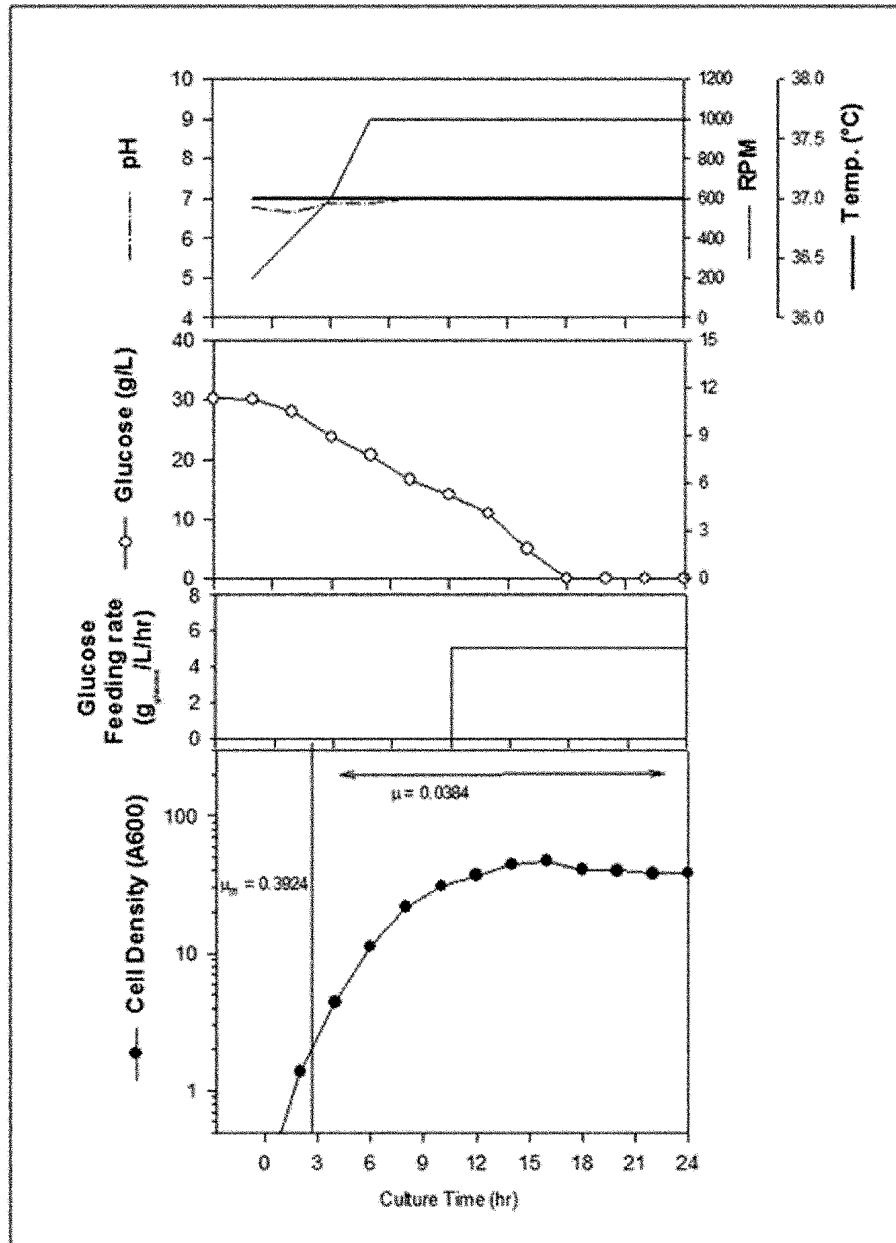
[Fig. 13]



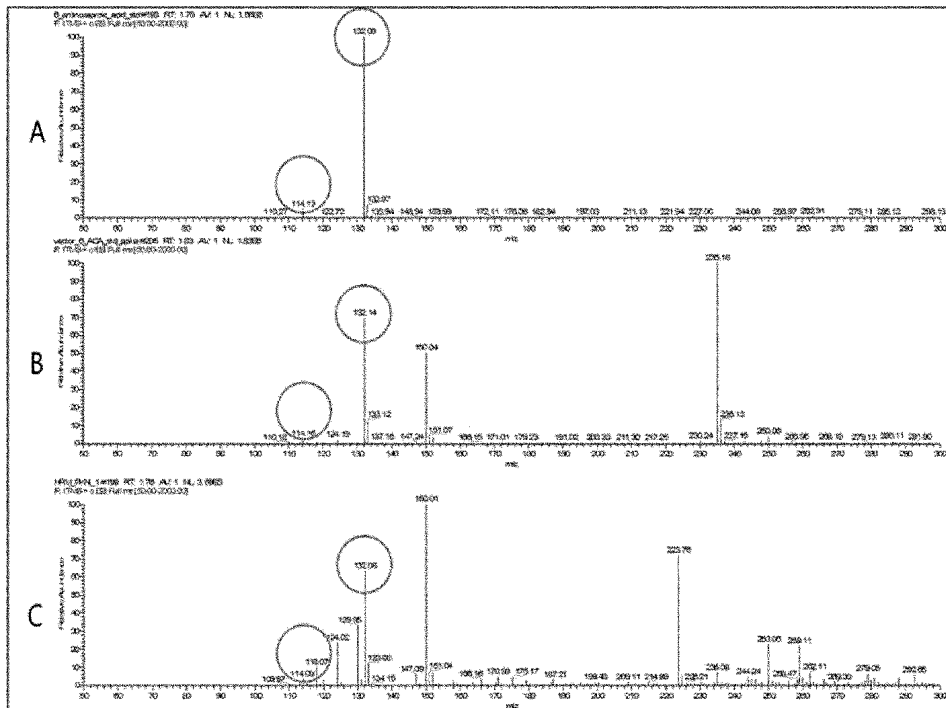
[Fig. 14]



[Fig. 15]



[Fig. 16]



A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 1/21(2006.01)i, C12N 15/52(2006.01)i, C12P 7/44(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 1/21; C12P 13/06; C12P 7/04; C12N 15/09; C07D 201/08; C12N 15/52; C12P 7/44; C12P 13/00; C12N 1/19

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: HpaI-HpaH, nemA, KIVD, PdAT, BcAT, 6-aminocaproic acid, caprolactam, expression vector, microorganism, synthesis

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2012-0034640 A (GENOMATICA, INC.) 12 April 2012 See abstract; claims 1, 95, 112; and paragraph 8.	1-17
A	WO 2012-177721 A1 (GENOMATICA, INC.) 27 December 2012 See the entire document.	1-17
A	US 2013-0017593 A1 (BAYNES, Brian M. et al.) 17 January 2013 See the entire document.	1-17
A	JP 2011-515111 A (GENOMATICA, INC.) 19 May 2011 See the entire document.	1-17
A	JP 2013-515050 A (DSM IP ASSETS BV) 02 May 2013 See the entire document.	1-17
A	US 2011-0171699 A1 (RAEMAKERS-FRANKEN, Petronella Catharina et al.) 14 July 2011 See the entire document.	1-17

☐ 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

25 AUGUST 2014 (25.08.2014)

Date of mailing of the international search report

26 AUGUST 2014 (26.08.2014)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2012-0034640 A	12/04/2012	AU 2010-245687 A1	11/11/2010
		EP 2427544 A1	14/03/2012
		JP 2012-525856 A	25/10/2012
		US 2010-0317069 A1	16/12/2010
		US 8377680 B2	19/02/2013
		WO 2010-129936 A1	11/11/2010
WO 2012-177721 A1	27/12/2012	AU 2012-273093 A1	02/05/2013
		AU 2013-203175 A1	02/05/2013
US 2013-0017593 A1	17/01/2013	US 2012-0301950 A1	29/11/2012
		US 8404465 B2	26/03/2013
		US 8722385 B2	13/05/2014
JP 2011-515111 A	19/05/2011	EP 2265709 A2	29/12/2010
		US 2009-0305364 A1	10/12/2009
		US 2010-0330626 A1	30/12/2010
		US 2011-195466 A1	11/08/2011
		US 2012-115194 A1	10/05/2012
		US 2012-264179 A1	18/10/2012
		US 2012-309062 A1	06/12/2012
		US 2013-095540 A1	18/04/2013
		US 7799545 B2	21/09/2010
		US 8062871 B2	22/11/2011
		US 8088607 B2	03/01/2012
		US 8216814 B2	10/07/2012
		US 8592189 B2	26/11/2013
		WO 2009-151728 A2	17/12/2009
		WO 2009-151728 A3	27/05/2010
JP 2013-515050 A	02/05/2013	US 2013-0030146 A1	31/01/2013
		WO 2011-078668 A1	30/06/2011
US 2011-0171699 A1	14/07/2011	AU 2009-224089 A1	17/09/2009
		EP 2252577 A2	24/11/2010
		US 2014-134681 A1	15/05/2014
		US 8673599 B2	18/03/2014
		WO 2009-113855 A2	17/09/2009
		WO 2009-113855 A3	10/12/2009

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 1/21(2006.01)i, C12N 15/52(2006.01)i, C12P 7/44(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 1/21; C12P 13/06; C12P 7/04; C12N 15/09; C07D 201/08; C12N 15/52; C12P 7/44; C12P 13/00; C12N 1/19

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:HpaI-HpaII, nemA, KIVD, PdAT, BcAT, 6-아미노카프로산, 카프로락탐, 발현 벡터, 미생물, 합성

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2012-0034640 A (게노마티카 인코포레이티드) 2012.04.12. 요약; 청구항 1, 95, 112; 및 단락 8 참조.	1-17
A	WO 2012-177721 A1 (GENOMATICA, INC.) 2012.12.27. 전체 문헌 참조.	1-17
A	US 2013-0017593 A1 (BAYNES, BRAIN M. 외 2명) 2013.01.17. 전체 문헌 참조.	1-17
A	JP 2011-515111 A (게노마티카, 인코포레이티드) 2011.05.19. 전체 문헌 참조.	1-17
A	JP 2013-515050 A (DSM IP ASSETS BV) 2013.05.02. 전체 문헌 참조.	1-17
A	US 2011-0171699 A1 (RAEMAKERS-FRANKEN, PETRONELLA CATHARINA 외 3명) 2011.07.14. 전체 문헌 참조.	1-17

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“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

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2014년 08월 25일 (25.08.2014)

국제조사보고서 발송일

2014년 08월 26일 (26.08.2014)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



대한민국 특허청

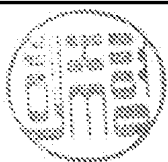
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2012-0034640 A	2012/04/12	AU 2010-245687 A1 EP 2427544 A1 JP 2012-525856 A US 2010-0317069 A1 US 8377680 B2 WO 2010-129936 A1	2010/11/11 2012/03/14 2012/10/25 2010/12/16 2013/02/19 2010/11/11
WO 2012-177721 A1	2012/12/27	AU 2012-273093 A1 AU 2013-203175 A1	2013/05/02 2013/05/02
US 2013-0017593 A1	2013/01/17	US 2012-0301950 A1 US 8404465 B2 US 8722385 B2	2012/11/29 2013/03/26 2014/05/13
JP 2011-515111 A	2011/05/19	EP 2265709 A2 US 2009-0305364 A1 US 2010-0330626 A1 US 2011-195466 A1 US 2012-115194 A1 US 2012-264179 A1 US 2012-309062 A1 US 2013-095540 A1 US 7799545 B2 US 8062871 B2 US 8088607 B2 US 8216814 B2 US 8592189 B2 WO 2009-151728 A2 WO 2009-151728 A3	2010/12/29 2009/12/10 2010/12/30 2011/08/11 2012/05/10 2012/10/18 2012/12/06 2013/04/18 2010/09/21 2011/11/22 2012/01/03 2012/07/10 2013/11/26 2009/12/17 2010/05/27
JP 2013-515050 A	2013/05/02	US 2013-0030146 A1 WO 2011-078668 A1	2013/01/31 2011/06/30
US 2011-0171699 A1	2011/07/14	AU 2009-224089 A1 EP 2252577 A2 US 2014-134681 A1 US 8673599 B2 WO 2009-113855 A2 WO 2009-113855 A3	2009/09/17 2010/11/24 2014/05/15 2014/03/18 2009/09/17 2009/12/10