



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0092358  
(43) 공개일자 2025년06월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 15/70 (2006.01) C12N 15/52 (2006.01)  
C12N 9/10 (2006.01) C12N 9/88 (2006.01)  
C12P 7/625 (2022.01)  
(52) CPC특허분류  
C12N 15/70 (2013.01)  
C12N 15/52 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2023-0181931  
(22) 출원일자 2023년12월14일  
심사청구일자 2023년12월14일

(71) 출원인  
한국과학기술원  
대전광역시 유성구 대학로 291(구성동)  
이화여자대학교 산학협력단  
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)  
(72) 발명자  
이상엽  
대전광역시 유성구 대학로 291 (구성동, 한국과학기술원)  
최소영  
대전광역시 유성구 대학로 291 (구성동, 한국과학기술원)  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
이처영, 장제환

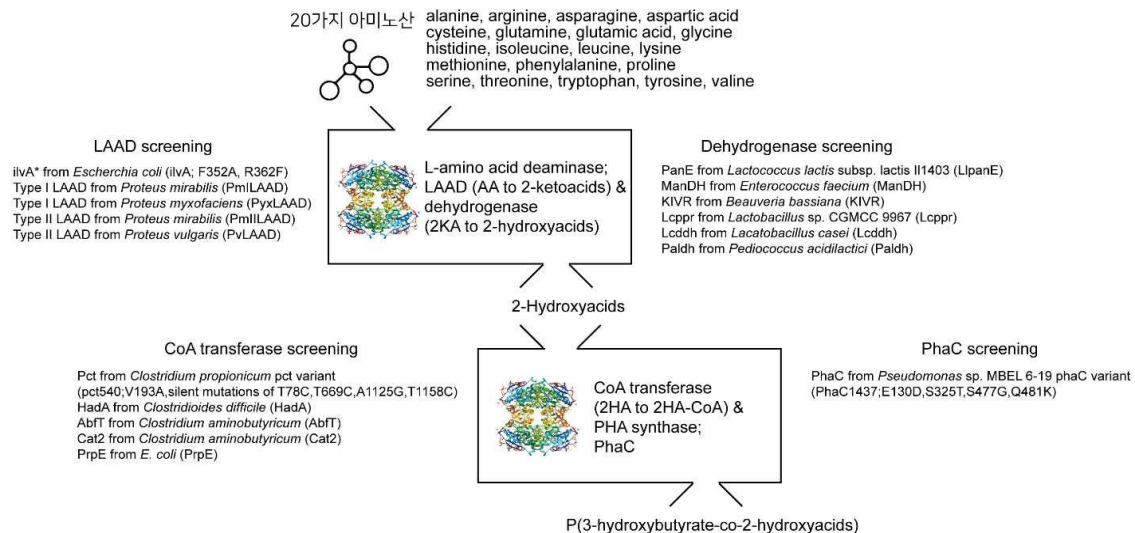
전체 청구항 수 : 총 12 항

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

### (57) 요약

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.

### 대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

**C12N 9/1029** (2013.01)

**C12N 9/13** (2013.01)

**C12N 9/88** (2013.01)

**C12P 7/625** (2022.01)

(72) 발명자

**박시재**

경기도 고양시 일산서구 하이파크3로 62, 501동  
1002호 (덕이동, 하이파크시티일산아이파크5단지)

**손진아**

서울특별시 성동구 행당로 82, 108동 2201호 (행당  
동, 행당한진타운)

**김유진**

부산광역시 북구 만덕대로155번길 15, 1904호 (덕  
천동, 삼정그린코아)

**김채린**

부산광역시 해운대구 반여로 133, 111동 1401호 (반여동, 센텀롯데캐슬아파트)

**윤도혜**

경기도 의왕시 바라산로 75, 108동 102호 (학의동, 의왕백운골드클래스아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호

1055001313

과제번호

2022M3J5A105611712

부처명

과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명

한국연구재단

연구사업명

원천기술개발사업

연구과제명

(N01230512)(통합EZ)차세대 바이오리파이너리를 위한 세포공장 구축 원천기술

개발(2023년도)

기 여 율

1/2

과제수행기관명

한국과학기술원

연구기간

2023.02.24 ~ 2024.01.23

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호

1055001188

과제번호

2022M3J4A1053696

부처명

과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명

한국연구재단

연구사업명

원천기술개발사업(통합)-바이오매스 기반 탄소중립형 바이오플라스틱 제품기술개발

연구과제명

원스텝-원팻 기반 차세대 생분해성 바이오플라스틱 생산을 위한 인공미생물 플랫폼

원천 기술 개발

기 여 율

1/2

과제수행기관명

이화여자대학교

연구기간

2022.07.01 ~ 2025.12.31

## 명세서

### 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 *PmIILAAD* 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 *PmIILAAD* 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 *Pal dh* 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.

### 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 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.

### 배경 기술

[0002] 폴리하이드록시알카노에이트(polyhydroxyalkanoates; PHAs)는 다양한 미생물에 의해 합성되는 생물학적 폴리

스테르(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 자원으로부터 생성된다(Lee, S. Y. *Biotechnol. Bioeng.* 49:1 1996).

[0003] 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).

[0004] 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).

[0005] 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.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 아미노산으로부터 전환된 2-하이드록시산을 단량체로 포함하는 폴리하이드록시알카노에이트 생성능을 가지는 재조합 미생물을 제공하는데 있다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 상기 재조합 미생물을 이용하여, 아미노산으로부터 전환된 2-하이드록시산을 단량체로 포함하는 폴리하이드록시알카노에이트를 제조하는 방법을 제공하는데 있다.

### 과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 탄소원으로부터 아세틸-CoA 생성능을 가지는 미생물에 아미노산 디아미네이스 (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.

[0009] 본 발명은 또한, 다음 단계를 포함하는 아미노산으로부터 전환된 2-하이드록시산 (2-hydroxyacid: 2-HA)를 단량체로 포함하는 폴리하이드록시알카노에이트의 제조방법을 제공한다:

[0010] (a) 상기 재조합 미생물을 배양하여 폴리하이드록시알카노에이트를 생성하는 단계; 및 (b) 상기 폴리하이드록시알카노에이트를 수득하는 단계.

### 발명의 효과

[0011] 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.

[0012] 또한, 본 발명에 따르면 아미노산 종류에 따라 폴리머 중 포함되는 2-하이드록시산을 다양한 물분율로 포함하는 폴리머를 제조할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 아미노산 기반 지방족 2-하이드록시산 함유 폴리머를 합성하는 과정에 대한 개요이다.

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

도 3은 아미노산 20가지 종류와 아미노산들이 아미노산 디아미네이스 (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.

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

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0014] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [0015] 제조합 미생물에 총 20가지 아미노산을 첨가하여 미생물 내에서 2번째 탄소에 히드록시기가 붙은 2-하이드록시산을 단량체로 포함하는 다양한 고분자를 생산할 수 있음을 확인하였다.
- [0016] 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.
- [0017] 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).
- [0018] 제조된 고분자는 3-하이드록시부티르산 (3-hydroxybutyric acid: 3HB)을 백본 (backbone)으로 하고 2-HA가 포함된 P(3HB-Co-2HA) 형태의 고분자이다.
- [0019] 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.
- [0020] 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.
- [0021] 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.
- [0022] 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.
- [0023] 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.
- [0024] 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.
- [0025] 아미노산 20가지 종류와 아미노산들이 변환될 수 있는 2-HA의 구체적 종류는 다음 표 1과 같다.

[0026] [표 1]

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

[0027]

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

[0028]

[0029] 상기 아미노산 디아미네이즈는 아미노산으로부터 2-케토산을 생산하기 위한 효소로, 상기 아미노산 디아미네이즈 코딩 유전자는 예를 들어, 다음과 같을 수 있다.

[0030] *ilvA*\* from *Escherchia coli* (*ilvA*; F352A, R362F);

[0031] Type I LAAD from *Proteus mirabilis* (PmILAAD);

[0032] Type I LAAD from *Proteus myxofaciens* (PyxLAAD);

[0033] Type II LAAD from *Proteus mirabilis* (PmIILAAD); 또는

[0034] Type II LAAD from *Proteus vulgaris* (PvLAAD).

[0035] 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 *PmIILAAD* 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.

[표 2]

| SEQ ID No. | 유전자             | 서열                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|------------|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1          | <i>ilaA</i>     | MADSQPLSGAPEGAEYLRAVLRAPVYEEAAQVTPLQKMEKLSSRLDN<br>VILVKREDRQPVHSFKLRGAYAMMAGLTEEQKAHGVITASAGNHA<br>QGVAFSSARLGVKALIVMPTATADIKVDAVRGFGGEVLLHGANFDE<br>AKAKAIELSQQGGFTWVPPFDHPMVIAGQGTLALELLQQDAHLDRV<br>FVPVGGGGLAAGVAVLIKQLMPQIKVIAVEAEDSACLKAALDAGHP<br>VDLPRVGLFAEGVAVKRIGDETFRLCQEYLDDIITVSDAICAAMKD<br>LFEDVRAVAEPSGALALAGMKKYIALHNIRGERLAHILSGANVNFHG<br>LRYVSERCELGEQREALLAVTIPEEKGSFLKFCQLLGGRSVTEFNRYF<br>ADAKNACIFVGVRLSRGLEERKEILQMLNDGGYSVVVDLSDDMAKL<br>HVRVMVGGRPSHPLQERLYSFEFPESPGALLRFLNTLGTYWNISLFH<br>YRSHGTDYGRVLA AFELGDHEPDFETRLNELGYDCHDETNNPAFRF<br>FLAG |
| 2          | <i>PmIILAAD</i> | MNISRRKLLLGVAAGVLAGGAALVPMVRRDGKFVEAKSRASFVE<br>GTEGALPKESDAVIIGGGIQQGIMTAINLAERGMSTILEKGEIGGEQSG<br>RAYSQIISYQTSPEIFPLHHYGKILWRGMNEKIGADTSYRTQGRVEAL<br>ADEKAFDKAQAWIKTAKETAGFDTPLNTRIHKGEELSNRLVGAQTPW<br>TVAAFEEDSGSVDPETGTPALARYAKQIGVKIYTNC AVRGIETAGGK<br>ISDVVTEKGAIRTSHVVLAGGIWSRLFMGNMGIDIPTLNVYLSQQRV<br>SGVPGAPRGNVHLPNGIHFREQADGTYAVAPRIFTSSIVKDSFLLGPK<br>FMHLLGGGELPLEFSIGEDLFNSFKMPTSWKLDEKTPFEQYRIATATQ<br>NTEHLDAVFQRMKA EFPVFEKSQVVERWGAVVSPTFDELPISEVKE<br>YPGLVINTATVWGMTEGPAAGEVTADIVTGKKPVIDPTPFSLDRFKK                                                   |

|    |                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|----|----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 3. | <i>PmIII</i><br><i>AAD</i> | MAISRRKFILGGTVVAVAAGAGVLTPLMTREGRFVPGTTPRHGFVEGT<br>GGPLPKQDDVVVIGAGILGIMTAINLAERGLSVTIVEKGNIAGEQSSR<br>FYGQAISYKMPDETFLHHLGKHRWREMNAKVGDITTYRTQGRVE<br>VPLDEEDLENVRKWIDAKSKDVGSDIPFRTKMIEGAELKQRLRGATT<br>DWKIAGFEEDSGSFDPEVATFVMAEYAKKMGKIFTNCAARGLETQ<br>AGVISDVVTEKGPIKTSRVVAGGVGSRLFMQNLNVDPVTLPAYQS<br>QQLISAAPNAPGGNVALPGGIFFRDQADGTATSPRVIVAPVVKESFT<br>YGYKYLPLLALPDFPVHISLNEQLNSFMQSTHWDLNNEESPFEKYRD<br>MTALPDLPELNASLEKLKKEFPAPFKESTLIDQWSGAMAIAPDENPIIS<br>DVKEYPGLVINTATGWGMTESPVSAEITADLLLGGKPVLDKPFSLY<br>RF. |
| 4. | <i>PvLA</i><br><i>AD</i>   | MAISRRKFIIIGTVVAVAAGAGILTPMLTREGRFVPGTTPRHGFVEGTE<br>GALPKQADV VVGAGILGIMTAINLVERGLSVVIVEKGNIAGEQSSR<br>FYGQAISYKMPDETFLHHLGKHRWREMNAKVGDITTYRTQGRVE<br>VPLDEEDLVNVRKWIDERSKNVGS DIPFKTRIIEGAELNQRLRGATT<br>WKIAGFEEDSGSFDPEVATFVMAEYAKKMGVRIYTQCAARGLETQA<br>GVISDVVTEKGAIKTSQVVVAGGVWSRLFMQNLNVDPVTLPAYQSQ<br>QLISGSPTAPGGNVALPGGIFFREQADGTATSPRVIVAPVVKESFTY<br>GYKYLPLLALPDFPVHISLNEQLNSFMQSTHWNLDEVSPFEQFRNM<br>TALPDLPELNASLEKLKAEFPAPFKESTLIDQWSGAMAIAPDENPIISEV<br>KEYPGLVINTATGWGMTESPVSAELTADLLLGGKPVLDKPFSLYRF.    |
| 5. | <i>PvL</i><br><i>AAD</i>   | MVRRDGKFVESKSRALFVESTEGALPSES DVV IIGGGIQQGIMTAINLA<br>ERGMSVTILEKGEVAGEQSGRAYSQIISYQTSPEIFPLHHYGKILWRG<br>MNEKIGADTSYRTQGRVEALADEKALDRAQEWIKTAKETAGFDVPL<br>NTRIIGKEELSNRLVGAQTPWTVAAFEEDSGSVD PETGTPTLARYAK<br>QIGVKIYTHCAVRGIETAGGKISDVVTEKGAIKTSNVVLAGGIWSRLF<br>MGNMGVDLPTLN VYLSQQRVSGVPGAPRGNVHLPNGIHFFREQADG<br>TYAVAPRIFTSSIVKDSFLLGPKFMHLLGGGELPLEFSIGEDLFNSFKM<br>PTSWKLDEKSPFEQYRIATATQNTHELDVVFQRMKTEFPVFEKSQIV<br>ERWGA VVSPTFDELPIISEVKEYPGLVINTATVWGMTGPAAGEVTA<br>DIVTGKKPVIDPTPFSLDRFKK.                    |

[0038]

[0039]

상기 디하이드로게나제는 2-케토산에서 2-하이드록시산을 생산하기 위한 효소로, 상기 디하이드로게나제 코딩 유전자는 예를 들어, 다음과 같을 수 있다.

[0040]

PanE from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* I11403 (L1panE);

[0041]

ManDH from *Enterococcus faecium* (ManDH);

[0042]

KIVR from *Beauveria bassiana* (KIVR)];

[0043]

Lcpr from *Lactobacillus* sp. CGMCC 9967 (Lcpr);

[0044]

Lcddh from *Lactobacillus casei* (Lcddh); 또는

[0045]

Pal dh from *Pediococcus acidilactici* (Pal dh).

[0046]

구체적으로, 상기 디하이드로게나제 코딩 유전자는 서열번호 6의 서열을 포함하는 효소를 코딩하는 *L1panE* 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 10의 서열을 포함하는 효소를 코딩하는 *Lcddh* 유전자 및 서열번호 11의 서열을 포함하는 효소를 코딩하는 *Pal dh* 유전자로 구성된 군에서 선택된 하나 이상일 수 있다.

[0047] [표 3]

| SEQ ID No. | 유전자                     | 서열                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|------------|-------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 6          | <i>LpanE</i>            | MRITLAGAGAMGSRFGLMLHKGGNEVTIDGWPEHVKAIKEHGLRA<br>NYNGEELTAHLSVELQSEISSKEKTDLIILFTKAMQLDKMLQDIKPLI<br>DEHTKVLCLLNGIGHEDTIEKYVSKNNIFIGNTMWTAGLEGPGKAKL<br>FGDGSVELQNLISGEEETAKKLAELSESGLNAKYSNNIHYSIYRKAC<br>VNGTMNGLCTILDNTMAGLGETKPAHDMVVTIVNEFAAVAKFENV<br>NLDIAEVVQHVETCFDPSTIGLHYPSPMYQDLIKNNRLTEIDYINGAVS<br>RKGKKYNVATPYCDFLTQLVHSKEELLKAK                                                                                                                                                                  |
| 7          | <i>KIVR</i>             | MPSPEHPSWLSTLLADTRPPPKLFAWSPANLDSPTAVKPDADRGRDF<br>DPGKYPVDAPITTASEPVKRIYIVGPGNVGRLYASYMSRQRDALPITL<br>VVHRKELLSQWVTSEGVVLADRGGKVTKNKQFDVEWWTESRPRY<br>GPVREVADGEKLHNVFISTKADAGLGEADRLRRYLGRCSSVVFQAN<br>GVSKLWAPYGPLYVASRYHADDAPSFSACVVNHGISAAGLFYSIHTS<br>PSDAFIGPIFKGSAAPAHGQNKRRRLDDDFFTTYSSTPFLLDTKHVSSG<br>QLWIIQLEKLVNAAINPLTLLRCKTGQLFASYDSHDALTRVLDQL<br>LWQASAVIQALINHDANIDMLTSAETVHRLVPGSDDYGRNFANIRR<br>KLTVRFSQPILKAKLYAFGLNIREHRSSMLQDAEAGRKTEIRDVNGW<br>IVDMAEYLGDLDDVGIHRGLIELIEECVVL DKEELARRLL |
| 8          | <i>ManD<sub>H</sub></i> | MKIAIAGAGAMGSRFGLMLHQSGNEVLLIDGWAEHVQQIKEHGLQA<br>NFNGKEVEAKLPIVLQSEVEKEDQVDLIILFTKAMQLEKMLQDIQSLI<br>KKDTEVLCLLNGIGHEDIEKFVPMENIYIGNTMWTAGLEGPGQVKL<br>FGSGSVELQNLGDGKEAAAKKLADKLSESGLNAHFSNDNIHYSIYRKA<br>CVNGTMNGLCTILDVNMAELGKTSTAHKMVATIVNEFAKVAAVEKI<br>ELDVPEVIAHCESCDFPETIGLHYPSPMYQDLIKNHRLTEIDYINGAISR<br>KGGKYGVATPYCDFLTTEL VHAKEDSLNVK                                                                                                                                                              |
| 9          | <i>Lcprp</i>            | MMKILNSFSLKPEQRQTLEAAGHTVIDADKLDDATAQQIDVVYGWN<br>AAATRVNFDRLQFVQAMSAGVDYLPALAKHHVLLANTSGIHAEP<br>IAEYVLGALFTISRILPAIRADRDMLTLRQERPPMTLLKGKTAVIFG<br>TGHIGSTIATKLQALGLHTIGVSAHGRPAAGFDQVMTDVATHEAAG<br>RADVVINALPLTPDTKHFYDEAFFAAASKQPLFINIGRGPSVDMAAL<br>TQALKNKQISAAALDVVDPEPLPQDSPLWGMTNVLLTPHISGTVPQL<br>RDKVFKIFNDNLKTLISSGQLASHQVDLTRGY                                                                                                                                                                    |

[0048]

|    |              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|----|--------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 10 | <i>Lcddh</i> | MKIIAYGARVDEIQYFKQWAKDTGNTLEYHTEFLDENTVEWAKGFD<br>GINSLQTTTPYAAGVFEKMHA YGIKFLTIRNVGTDNIDMTAMKQYGIR<br>LSNVPAYSAPAAIAEFALDTLYLLRNMGKVQAQLQAGDYEKAGTFI<br>GKELGQQTVGVMGTGHIGQVAIKLFKGFGAKVIA YDPYPMKGDHP<br>DFDYVSLEDLFKQSDVIDLHVPGLIEQNTHIINEAAFNLMPGAIVINT<br>ARPNLIDTQAMLSNLKSGKLAGVGIDTYEYETEDLLNLAKHGSFKDP<br>LWDELLGMPNVVLSPHIAYYTETA VHNMVYFSLQHLVDFLTKFKPA<br>RKLLVQQVVN |
| 11 | <i>Paldh</i> | MKIIAYGIRDDEKPYLDEWVTKNHIEVKAVPDLDDSSNIDLAKNYDG<br>VVAYQQKPYTADLFDKMHEFGIHAFSLRNVGVNDNPADALKKNDI<br>KISNVPAYSAPRAIAELSVTQLLALLRKIPEFEYKMAHGDYRWE PDIGL<br>ELNQMTVG VIGTGRIGRAAIDIFKGFGAKVIA YDVFRNPALKEGMY<br>VDILEELYQQANVITLHVPALKDNYHMLDEKAFGQM QDGTFILNFA<br>RGTLDVTPALLKALDSGKVAGAALD TYENEVGIFDVHDGDQPIDDP<br>VFNDLMSRRNVMITPHAAFYTRPAVKNMVQIALDNRRDLIEKNSSK<br>NEVKFE    |

[0049]

[0050] 상기 CoA 전이효소는 2-히드록시산으로부터 2-HA CoA를 생산하기 위한 효소로, 상기 CoA 전이효소 코딩 유전자는 예를 들어, 다음과 같을 수 있다:

- [0051] 4HBS from *Metallosphaera sedula* (4HBS);
- [0052] Pct from *Clostridium propionicum* pct variant (pct540; V193A, silent mutations of T78C, T669C, A1125G, T1158C) ;
- [0053] HadA from *Clostridioides difficile* (HadA);
- [0054] AbfT from *Clostridium aminobutyricum* (AbfT);
- [0055] Cat2 from *Clostridium aminobutyricum* (Cat2); 또는
- [0056] PrpE from *Cupriavidus necator* (PrpE).
- [0057] 본 발명에 따른 CoA 전이효소 코딩 유전자는 구체적으로, 서열번호 12의 서열을 포함하는 효소를 코딩하는 *hadA* 유전자일 수 있다.
- [0058] [서열번호 12]
- [0059] MLLEGVKVVELSSFIAAPCCAKMLGDWGAEVIKIEPIEGDGIRVMGGTFKSPASDDENPMFELENGNKKGVSINVKSKEGVEILHKLLSEADIFVTNVRVQA  
LEKMGIAVDQIKDKYPGLIFSQILGYGEKGPLKDKPGFDYTAYFARGGVSQSVMEKGTSPANTAAGFGDHYAGLALAAGSLAALHKKAAQTGKGERVTVSLFH  
TAIYGMGTMITTAQYGNEMPLSRENPNSPLMTTYKCKDGRWIQLALIQYNKWLKGFCKVINREYILEDTRYNNIDSMVNHVEDLVKIVGEAMLEKTLDEWSA  
LLEEADLPFEKIQSCEDLLDDEQAWANDFLFKKTYDSGNTGVLVNTPVMFNRNEGIKEYTPAPKVGQHTVEVLKSLGYDEEKINNFKDSKVVRV
- [0060] 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.

| SEQ ID No. | 유전자         | 서열                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|------------|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 16         | <i>4HBS</i> | MTVLQEYERIHEELRREGYINTQYPLNPSETLWNKKIMTMKREELEK<br>VKSFRLLKRIVKWAWDNVPFYRNFWKSKGFEPDQIRDWKDIVKIPILR<br>KDELKDLKSANPPFGSIMVPELAKRIRFVSATSGSTGLPTFQGWGALE<br>LDYFEEAQARYLWTFAGVKPTTVYANYLNMSGFYSWGPPVETAM<br>WRCGATAIAGGGETYFSWKARHNLIFRLWKVDVLATTPWLHRLIGE<br>EAKAEGWESPFKVLLLHGGAAGAAENTKKKLFQVHPNAKLAISVWGTT<br>DGHMAVEVPGLDGQLVIWEDMEIFDIVDPKTDEPASPGERGELIATL<br>LNHFTMPLIRYSLGDYVKNEFTTDPDPTYGITHARFVEPIGRVWWM<br>FKVKGKLLLPYVEDAVNEIPDTTGMEFNVIHYGNEMDKLKIRVETRR<br>NMVDSTYDSRAREILAERIGLNKDDVEIEWVEPGKTAWTGYKLQVF<br>LDQRKK |
| 17         | <i>Abt1</i> | MDWKKIYEDRTCTADEAVKSIKSGDRVLFAHCVAEPPVLVEAMVA<br>NAAAYKNVTVSHMVTLGKGEYSKPEYKENFTFEGWFTSPSTRGSIA<br>EGHGQFVPVFFHEVPSLIRKDIFHVDVFMVMVSPPDHNGFCCVGVSS<br>DYTMQAIKSAKIVLAEVNDQVPVYGDTFVHVSEIDKFVETSHPLPEI<br>GLPKIGEVEAAIGKHCASLIEDGSTLQLGIGAIPDAVLSQLKDKKHLGI<br>HSEMISDGVVDLYEAGVIDCSQKSIDKGKMAITFLMGTKRLYDFAA<br>NNPKVELKPVDTYNHPSVVAQCCKMVCINACLQVDFMGQIVSDSIGT<br>KQFSGVGGQVDFVRGASMSIDGKGKAILAMPVAVKKKDGSMISKIVP<br>FIDHGAAVTTSRNDADYVVTEYGAEMKKGKSLQDRARALINIAHPDF<br>KDELKAEFEKRFNAAF                                         |
| 18         | <i>Cat2</i> | MEWEEIYKEKLVTAEKAVSKIENHSRVVFAHAVGEPVDLVNALVKN<br>KDNYIGLEIVHVMVAMGKGEYTKEGMQRHFRHNALFVGGCTRDAVN<br>SGRADYTPCFFYEVPSTLFKEKRLPVDVALIQVSEPDKYGYCSFGVSN<br>DYTKPAAESAKL VIAEVNKNMPRTLGDSTFIHVSIDIDYIVEASHPLLEL<br>QPPKLG DVEKAIGENCASLIEDGATLQLGIGAIPDAVLLFLKNKKNLG<br>IHSEMISDGVMELVKAGVINNKKKTLHPGKIVVTFLMGTKKLYDFV<br>NNNPMVETYSVDYVNNPLVIMKNDNMVSINSCVQVDLMGQVCSESI<br>GLKQISGVGGQVDFIRGANLSKGGKAILAIPSTAGKGKVSRTPLLD<br>TGA VTTSRNEVDYVVTEYGV AHLKGKTLRNRARALINIAHPKFRES<br>LMNEFKKRF                                           |

[0061]

|                 |                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|-----------------|--------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 19 <sup>3</sup> | <i>Pct54</i><br><i>0<sup>3</sup></i> | MRKVPIITADEAAKLIKDGDTVTTSGFVGNAIPEALDRAVEKRFLGTG<br>EPKNITYVYCGSQGNRDGRGAEHFAHEGLLKRYLAGHWATVPALGK<br>MAMENKMEAYNVSQGALCHLFRDIASHKPGVFTKVVGIGTFIDPRNG<br>GGKVNITKEDIVELVEIKGQEYLFYPAFPIHVALIRGTYADESGNITF<br>EKEAAPLEGTSVCQAVKNSGGIVVVQVERVVKAGTLDPRHVKVPGI<br>YVDYVVVADPEDHQQSLDCEYDPALSGEHRPEVVGEPLPLSAKKV<br>IGRRGAIELEKDVAVNLGVGAPEYVASVADEEGIVDFMTLTAESGAI<br>GGVPAGGVRFGASYNADALIDQGYQFDYYDGGGLDLCYLGLAEC<br>EKGNNVSRFGPRIAGCGGFINITQNTPKVFFCGTFTAGGLKVKIEDG<br>KVIIVQEGKQKKFLKAVEQITFNGDVALANKQQVTYITERCVFLLKE<br>DGLHLSEIAPGIDLQTQILDVMDFAPIHARDANGQIKLMDAALFAEGL<br>MGLKEMKS <sup>3</sup>                                                                                                                  |
| 20 <sup>3</sup> | <i>PrpE<sup>3</sup></i>              | MTASHAVHARSLADPEGFWAEQAARIDWETPFGQVLDNSRAPFTR<br>WVVGGRITNLCHNAVDRHLAARASQPALHWVSTETDQARTFTYAE<br>HDEVSRMAAILQGLDVQKGDRLIYMPMIPEAAAFAMLACARIGAIHS<br>VVFGGFASVSLAARIEDARPRVVVSADAGSRAGKVVPYKPLLDEAIR<br>LSSHQPGKVLLVDRQLAQMPRTEGRDEDYAAWRERVAGVQVPCV<br>WLESSEPSYVLYTSGTTGPKGVQRTDGGYAVALATSMYEIFCGKP<br>GDTMFTASDIGWVVGHSYIVYGPLLAGMAITLMEGTPIRPDGGILW<br>RLVEQYKVNLMFSAPTALRVLKKQDPAWLTRYDLSSLRLFLAGEPL<br>DEPTARWIQDGLGKPVVDNYWQTESGWPIAIQRGIEALPPKLGSPG<br>VPAYGYDLKIVDENTGAECPPGQKGVVAIDGPLPPGCMSTVWGDDD<br>RFVRTYWQAVPNRLCYSTFDWGVVDADGYVFILGRITDDVINVAGH<br>RLGTREIEESLSSNAVAEVAVVGVDALKGQVAMAFCLARDPART<br>ATAEARLALBEGELMKTVEQQLGAVARPARVFFVNALPKTRSGKLLR<br>RAMQAVAEGRPDGLTTIEDPGALEQLQAALKG <sup>3</sup> |

[0062]

[0063]

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.

[0064]

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).

[0065]

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.

[0066]

[서열번호 13]

[0067]

MSNKSNDLKYQASENTLGLNPVGLRGKDLLASARMVLRQAIKQPVHVSVKHVAHFGLLEKNVLLGKSGLQPTSDRRFADPAWSQNPLYKRYLQTYLAWRK  
ELHDWIDESNLAPKDVARGHFVINLMTDAMAPTNTAANPAVKKRFETGGKSLDGLSHLAKDLVHNGMPSQVNMGAFAVEVGKSLGVTEGAVVFRNDVLELI  
QYKPTTEQVYERPLL VPPQINKFYVFDLSPDKSLARFCLRNNTQTFIVSWRNPTKEQREWGLSTYIEALKEAVDVVTAITGSKDVNMLGACSGGITCTALL  
GHYAAIGENKVNALTLLVTVLDTTLDSDVALFVNEQTLEAAKRHSYQAGVLEGRDMAKVFAMWRPNLDIWNVWVNNYLLGNEPPVFDILFVNNDDTRLPAAF  
HGDLEVELFKNPLIRPNALEVCCTPIDLKQVTADIFSLAGTNDHITPWKSCYKSAQLFGGNVEFVLSGGHIKSLNPPGNPKSRYMTSTEVAENADEWQAN  
ATKHTDSWWLHWQAWQAQRSGELKKSPTKLGSKAYPAGEAAPGTYYVHER

[0068]

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.

[0069]

[서열번호 14]

[0070]

MTDVVIVSAARTAVGKFGGSLAKIPAPELGAVVIAALERAGVKPEQVSEVIMGQVLTAGSGQNPARQAAIKAGLPAMVPAMTINKVCGSGLKAVMLAANA  
MAGDAEIVVAGGQENMSAAPHVLPGRDGRMGDAKLVDTMIVDGLWDVYNQYHMGITAEVNAKEYGITREAQDEFVGSQNKAAEAQKAGKFDEEIVPVL  
PQRKGDVPVAFKTDEFVRQGATLDSMSGKLPAPFDKAGTVTAANASGLNDGAAAVVMSAAKAKELGLTPLATIKSYANAGVDPKVMGMGPVPASKRALSR  
AEW

TPQDLDLMEINEAFAAQALAVHQQMGWDTSKVNVNGGAIAIGHPIGASGCRILVTLHEMKRRDAKKGLASLCIGGGMGVALAVERK

- [0071] [서열번호 15]
- [0072] MTQRIAYVTGGMGIGTAICQRLAKDGRFVAGCGPNSPREKWLEQQKALGFDFIASEGNVADWDSTKTAFDKVKSEVGEVDVLINNAGITRDVFRKMTRADWDVIDTNLTSLFNVTQVIDGMADRGWGRIVNISSVNGQKGQFGQTNYSTAKAGLHGFTMALAQEVATKGVTNTVSPGYIATDMVKAIRQDVLDKIVA  
TIPVKRLGLPEEIASICAWLSSEESGFSTGADFSLNGGLHMG
- [0073] 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.
- [0074] 다른 관점에서, 본 발명은 (a) 상기 재조합 미생물을 배양하여 폴리하이드록시알카노에이트를 생성하는 단계; 및 (b) 상기 폴리하이드록시알카노에이트를 수득하는 단계를 포함하는 아미노산으로부터 전환된 2-하이드록시산(2-hydroxyacid : 2-HA)를 단량체로 포함하는 폴리하이드록시알카노에이트의 제조방법에 관한 것이다.
- [0075] 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.
- [0076] 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.
- [0077] 아미노산 20가지 종류와 아미노산들이 변환될 수 있는 2-HA의 구체적 종류는 앞서 설명된 바와 같다.
- [0078] 상기 아미노산 디아미네이즈 코딩 유전자는 예를 들어, 다음과 같을 수 있다.
- [0079] *ilvA*\* from *Escherichia coli* (*ilvA*; F352A, R362F);
- [0080] Type I LAAD from *Proteus mirabilis* (PmILAAD);
- [0081] Type I LAAD from *Proteus myxofaciens* (PyxLAAD);
- [0082] Type II LAAD from *Proteus mirabilis* (PmIILAAD); 또는
- [0083] Type II LAAD from *Proteus vulgaris* (PvLAAD).
- [0084] 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 *PmIILAAD* 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.
- [0085] 상기 디하이드로게나제 코딩 유전자는 예를 들어, 다음과 같을 수 있다.
- [0086] PanE from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* I11403 (LlpanE);
- [0087] ManDH from *Enterococcus faecium* (ManDH);
- [0088] KIVR from *Beauveria bassiana* (KIVR)];
- [0089] Lcpr from *Lactobacillus* sp. CGMCC 9967 (Lcpr);
- [0090] Lcddh from *Lactobacillus casei* (Lcddh); 또는
- [0091] Paldh from *Pediococcus acidilactici* (Paldh).
- [0092] 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 10의 서열을 포함하

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

[0093] 상기 CoA 전이효소 코딩 유전자는 예를 들어, 다음과 같을 수 있다:

[0094] 4HBS from *Metallosphaera sedula* (4HBS);

[0095] Pct from *Clostridium propionicum* pct variant (pct540; V193A,silent mutations of T78C,T669C,A1125G,T1158C) ;

[0096] HadA from *Clostridioides difficile* (HadA);

[0097] AbfT from *Clostridium aminobutyricum* (AbfT);

[0098] Cat2 from *Clostridium aminobutyricum* (Cat2); 또는

[0099] PrpE from *Cupriavidus necator* (PrpE).

[0100] 본 발명에 따른 CoA 전이효소 코딩 유전자는 구체적으로, 서열번호 12의 서열을 포함하는 효소를 코딩하는 *hadA* 유전자일 수 있다.

[0101] [서열번호 12]

[0102] MLLEGVKVVELSSFIAAPCCAKMLGDWGAIEVIKIEPIEGDGI RVMGGTFKSPASDDENPMFELENGNKKGVSVINVKSEKGEVILHKLLSEADIFVTNVRVQA  
LEKMGIAVDQIKDKYPGLIFSQILGYGEKGPLKDKPGFDYTAYFARGGVSSQSVMEKGTSPANTAAGFGDHYAGLALAAGSLAALHKKAAQTGKGERVTVSLFH  
TAIYGMGTMITTAQYGNEMPLSRENPNLSPLMTTYKCKDGRWILQALIQYNKWLKGFCKVINREYILEDDRYNNIDSMNVHVEDLVKIVGEAMLEKTLDEWSA  
LLEEADLPFEKIQSCEDLLDDEQAWANDFLFKKTYDSGNTGVLVNTPMFRNEG IKEYTPAPKVGQHTVEVLKSLGYDEEKINNFKDSKVVRY

[0103] 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.

[0104] 분지쇄 아미노산인 루신, 이소루신, 발린, 노르루신 (norleucine), 노르발린 (norvaline)을 사용하여 위와 같은 2-HA를 다양한 물분자로 포함하는 고분자를 생산하였다. 해당 결과를 통해 다섯 가지 종류의 CoA 전이효소 중 HadA 만이 2-HA를 수용할 수 있음을 확인하였다.

[0105] 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.

[0106] 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.

[0107] [서열번호 13]

[0108] MSNKSNDLKYQASENTLGLNPVVGLRGKDLLASARMVLRQAIKQPVHSVHVHAFHGLELKNVLLGKSGLQPTSDRRFADPAWSQNPLYKRYLQTYLAWRK  
ELHDWIDESNLAPKDVARGHFVINLMTDAMAPTNTAANPAAVKRFFETGGKSLDLGLSHLAKDLVHNGGMPQSQVNMGAFAVEVGKSLGVTEGAVVFRNDVLELI  
QYKPTTEQVYERPLLVPVPQINKFYVFDLSPDKSLARFCLRNNVQTIFVSWRNPTKEQREWGLSTYIEALKEAVDVVTAITGSKDVNMLGACSGGITCTALL  
GHYAAIGENKVNALTLTVLDTLSDSDVALFVNEQTLEAAKRHSYQAGVLEGRDMAKVF AWMRPNDLIWNYWVNNYLLGNPEPPVFDILFWNNDTTRLPAAF  
HGDVLFKNNPLIRPNALEVCGTPIDLKQVTADIFSLAGTNDHITPWKSCYSAQLFGGNVEFVLSGGHIKSILNPPGNPKSRYMTSTEAENADEWQAN  
ATKHTDSWWLHWQAWQAQRSGELKKSPTKLGSKAYPAGEAAPGYVHER

[0109] 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.

[0110] [서열번호 14]

[0111] MTDVIVSAARTAVGKFGGSLAKIPAPELGAVVKAALERAGVKPEQVSEVIMGQVLTAGSGQNPARQAAIKAGLPAMVPAMTINKVCGSGLKAVMLAANA  
MAGDAEIVVAGGQENMSAAPHVLPGSRDGFMRGDAKLVDTMI VDGLWDVYNQYHMGITAEVNAKEYGITREAQDEFVGSQNKAEAAQKAGKFDEEIVPVL  
PQRKGDPAFKTDEFVRQATLDSMSGLKPAFDKAGTVTAANASGLNDGAAAVVMSAAKAKELGLTPLATIKSYANAGVDPMVMGMGPVPASKRALSRAEW  
TPQDLDLMEINEAFAAQALAVHQMQMGWDTSKVNVNGGAIAIGHPIGASGRILVTLHEMKRRDAKKGLASLCIGGGMGVALAVERK

- [0112] [서열번호 15]
- [0113] MTQRIAYVTGGMGIGTAICQRLAKDGRFVAGCGPNSPREKWLEQQKALGFDFIASEGNVADWDSTKTAFDKVKSEVGEVDVLINNAGITRDVVFVKMTRADWDVIDTNLTSLFNVTKQVIDGMADRGWGRIVNISSVNGQKGQFGQNTYSTAKAGLHGFTMALAQEVATKGVTVNTVSPGYIATDMVKAIRQDVLDKIVA TIPVKRLGLPEEIASICAWLSSEESGFGTADGDFSLNGLHMG
- [0114] 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.
- [0115] 본 발명에서 "재조합"은 숙주세포 내에서 자연적으로 발생하지 않은 폴리뉴클레오티드 또는 단백질을 포함하는 것을 의미한다.
- [0116] 본 발명에서 도입은 유전자가 염색체의 인자로서 또는 염색체 통합 완성에 의해 복제 가능하게 되는 것을 의미한다. 유전자가 형질전환된 것으로, 형질 전환된 유전자는 미생물 내에서 발현될 수 있지만 한다면, 미생물의 염색체 내에 삽입된 것이든 염색체 외에 위치하고 있는 것이든 어느 것이든지 포함될 수 있다. 또한, 상기 유전자는 단백질을 코딩할 수 있는 폴리뉴클레오티드로 DNA 및 RNA를 포함할 수 있다.
- [0117] 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.
- [0118] 본 발명에서 "과발현"이란 보통상태에서 세포내 해당유전자가 발현되는 수준보다 높은 수준의 발현을 일컫는 것으로서, 유전체 상에 존재하는 유전자의 프로모터를 강력한 프로모터로 치환하거나, 발현벡터에 해당유전자를 클로닝하여 세포에 형질전환시키는 방법을 통해 발현량을 증가시키는 것 등을 포함하는 개념이다.
- [0119] 본 발명에서, "벡터(vector)"는 적합한 숙주 내에서 DNA를 발현시킬 수 있는 적합한 조절 서열에 작동가능하게 연결된 DNA 서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다.
- [0120] 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.
- [0121] 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.
- [0122] 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.
- [0123] 라이게이션 후에, 벡터는 적절한 숙주세포로 형질전환 되어야 한다. 상기 숙주세포는 원핵세포이다. 적합한 원핵 숙주세포는 *E. coli* DH5 $\alpha$ , *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.
- [0124] 전술한 *E. coli*에 덧붙여, 아그로박테리움 A4와 같은 아그로박테리움 속 균주, 바실루스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)와 같은 바실리(bacilli), 살모넬라 타이피뮤리움(*Salmonella typhimurium*) 또는 세라티아 마르게센스(*Serratia marcescens*)와 같은 또 다른 장내세균 및 다양한 슈도모나스(*Pseudomonas*) 속 균주가 숙주세포로서 이용될 수 있다.
- [0125] 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.
- [0126] 예를 들면, 전서열(pre-sequence) 또는 분비 리더 (leader)에 대한 DNA는 폴리펩타이드의 분비에 참여하는 전단

백질로서 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.

[0127] "작동가능하게 연결된"은 연결된 DNA 서열이 접촉하고, 또한 분비 리더의 경우 접촉하고 리딩 프레임 내에 존재하는것을 의미한다. 그러나, 인핸서 (enhancer)는 접촉할 필요가 없다. 이들 서열의 연결은 편리한 제한 효소 부위에서 라이케이션(연결)에 의해 수행된다. 그러한 부위가 존재하지 않는 경우, 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터 (oligonucleotide adaptor) 또는 링커(linker)를 사용한다.

[0128] 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.

[0129] 당업계에 주지된 바와 같이, 숙주세포에서 형질감염 유전자의 발현 수준을 높이기 위해서는, 해당 유전자가, 선택된 발현 숙주 내에서 기능을 발휘하는 전사 및 해독 발현 조절 서열에 작동가능하도록 연결되어야만 한다. 바람직하게는 발현 조절서열 및 해당 유전자는 세균 선택 마커 및 복제 개시점(replication origin)을 같이 포함하고 있는 하나의 발현 벡터 내에 포함되게 된다. 숙주세포가 진핵세포인 경우에는, 발현 벡터는 진핵 발현 숙주 내에서 유용한 발현 마커를 더 포함하여야만 한다.

[0130] 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.

[0131] 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.

[0132] 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.

[0133] 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.

[0134] 발현 클로닝에 의해 본 발명에 따른 단백질의 cDNA를 클로닝하려고 할 때의 스크리닝법으로서 바인딩법(binding 법), 페닝법(panning법), 필름에멀션법(film emulsion 법)등이 적용될 수 있다.

[0135] 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.

[0136] 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<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.8 g MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>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 FeSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O, 2 g CaCl<sub>2</sub>, 2.2 g ZnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O, 0.5 g MnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O, 1 g CuSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O, 0.1 g (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> · H<sub>2</sub>O, and 0.02 g Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> · 10H<sub>2</sub>O를 함유한다.

- [0137] 상기 재조합 미생물을 30℃ 내지 37℃의 온도에서 배양하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다. 상기와 같은 온도 조건에서 폴리하이드록시알카노에이트를 효율적으로 수득할 수 있다.
- [0138] 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 성장물은 향상될 수 있다.
- [0139] 실시예
- [0140] 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.
- [0141] 하기 실시예에서는 재조합 미생물로 대장균을 사용하였으나, 적용 가능한 미생물이라면 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.
- [0142] 실시예 1. 2HA 포함 PHA 생산에 관여하는 유전자들의 플라스미드 제작 및 균주, 배양 방법
- [0143] 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 34µg/mL 클로람페니콜)를 준비하여 배지에 보충하였다. 하기 실시예에서 사용한 균주, 플라스미드 및 프라이머를 표 1와 표 2에 나타내었다.
- [0144] 1-1 플라스미드 p437ReAB의 제작
- [0145] 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).
- [0146] 1-2 플라스미드 pKM212\_ 아미노산 디아미네이즈 및 디하이드로게나제의 제작
- [0147] 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, PmIILAAD, 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 PmIILAAD, pKM212 PvLAAD, pKM212 PyxLAAD의 구축을 위해 플라스미드 pKM212를 각각 EcoRI/KpnI를 사용하여 소화시켰다. 상응하는 *ilvA*를 MfeI/KpnI를 사용하여 분해하고 PmILAAD, PmIILAAD, PvLAAD, PyxLAAD 유전자를 각각 EcoRI/KpnI를 사용하여 분해하고 플라스미드 pKM212에 라이게이션시켰다. 다음으로 dehydrogenation 단독 모듈을 구축하기 위하여 pKM212를 각각 EcoRI/SbfI을 사용하여 소화한 후 상응하는 LlpnE, KIVR, MandH, Lcddh, Lcprp, Paldh 유전자를 각각 EcoRI/SbfI을 사용하여 분해하고 상기 플라스미드 5종에 라이게이션시켰다.
- [0148] 1-3 플라스미드 pKA312\_ CoA transferase의 제작
- [0149] 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/KpnI를 사용하여 소화시켰다. 상응하는 4HBS, AbfT, Cat2, HadA, Pct540,

PrpE 유전자를 각각 EcoRI/KpnI를 사용하여 분해하고 플라스미드 pKA312에 라이게이션시켰다.

[0150]

[표 1]

| 균주 또는 플라스미드     | 특징                                                                                                                                              | 인용문헌 또는 일수처             |
|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| 균주              |                                                                                                                                                 |                         |
| XL 1-Blue       | recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' groAB lacI <sup>q</sup> Z ΔM15 Tn10 (Tet <sup>R</sup> )]                                   | Stratagene <sup>®</sup> |
| XB-1            | XL 1-Blue ΔghA                                                                                                                                  | 랩 스타크                   |
| 플라스미드           |                                                                                                                                                 |                         |
| pKM212          | pBBR1MCS2 derivative; tac promoter, <i>R. eutropha</i> PHA biosynthesis genes transcription terminator; Km <sup>R</sup>                         | 1                       |
| pKA312          | pBBR1MCS2 derivative; tac promoter, <i>R. eutropha</i> PHA biosynthesis genes transcription terminator; Cm <sup>R</sup>                         | 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 | 1                       |
| pKM212 ilxA*    | pKM212-MCS derivative; tac 프로모터, <i>E. coli</i> 유래의 <i>ilxA</i> (F352A, R362F) 유전자, Km <sup>R</sup>                                             | 본 발명                    |
| pKM212 PmIIAAD  | pKM212-MCS derivative; tac 프로모터, <i>P. mirabilis</i> 유래의 Type I LAAD 유전자, Km <sup>R</sup>                                                       | 본 발명                    |
| pKM212 PmIIIAAD | pKM212-MCS derivative; tac 프로모터, <i>P. mirabilis</i> 유래의 Type II LAAD 유전자, Km <sup>R</sup>                                                      | 본 발명                    |
| pKM212 PxAAD    | pKM212-MCS derivative; tac 프로모터, <i>P. vulgaris</i> 유래의 Type II LAAD 유전자, Km <sup>R</sup>                                                       | 본 발명                    |
| pKM212 PxxAAD   | pKM212-MCS derivative; tac 프로모터, <i>P. myxofaciens</i> 유래의 Type I LAAD 유전자, Km <sup>R</sup>                                                     | 본 발명                    |

[0151]

|                                                                     |                                                                                                                                                                          |                   |
|---------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| pKM212<br><i>ihxA*</i><br><i>LganE</i> <sup>Δ</sup>                 | pKM212-MCS derivative; tac 프로모터, <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i><br>H1403 유래의 <i>ganE</i> 유전자 pKM212 <i>ihxA*</i> 에 삽입됨,<br><i>Km</i> <sup>R</sup> <sup>Δ</sup>    | 본 발명 <sup>Δ</sup> |
| pKM212<br><i>PmIIAAD</i> <sup>Δ</sup><br><i>LganE</i> <sup>Δ</sup>  | pKM212-MCS derivative; tac 프로모터, <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i><br>H1403 유래의 <i>ganE</i> 유전자 pKM212 <i>PmIIAAD</i> 에<br>삽입됨, <i>Km</i> <sup>R</sup> <sup>Δ</sup>  | 본 발명 <sup>Δ</sup> |
| pKM212<br><i>PmIIIAAD</i> <sup>Δ</sup><br><i>LganE</i> <sup>Δ</sup> | pKM212-MCS derivative; tac 프로모터, <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i><br>H1403 유래의 <i>ganE</i> 유전자 pKM212 <i>PmIIIAAD</i> 에<br>삽입됨, <i>Km</i> <sup>R</sup> <sup>Δ</sup> | 본 발명 <sup>Δ</sup> |
| pKM212<br><i>PvIAAD</i> <sup>Δ</sup><br><i>LganE</i> <sup>Δ</sup>   | pKM212-MCS derivative; tac 프로모터, <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i><br>H1403 유래의 <i>ganE</i> 유전자 pKM212 <i>PvIAAD</i> 에 삽입됨,<br><i>Km</i> <sup>R</sup> <sup>Δ</sup>   | 본 발명 <sup>Δ</sup> |
| pKM212<br><i>PvXIAAD</i> <sup>Δ</sup><br><i>LganE</i> <sup>Δ</sup>  | pKM212-MCS derivative; tac 프로모터, <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i><br>H1403 유래의 <i>ganE</i> 유전자 pKM212 <i>PvXIAAD</i> 에 삽입됨,<br><i>Km</i> <sup>R</sup> <sup>Δ</sup>  | 본 발명 <sup>Δ</sup> |
| pKM212 <sup>Δ</sup><br><i>LganE</i> <sup>Δ</sup>                    | pKM212-MCS derivative; tac 프로모터, <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i><br>H1403 유래의 <i>ganE</i> 유전자, <i>Km</i> <sup>R</sup> <sup>Δ</sup>                                 | 본 발명 <sup>Δ</sup> |
| pKM212<br>KIVR <sup>Δ</sup>                                         | pKM212-MCS derivative; tac 프로모터, <i>B. bassiana</i> 유래의<br><i>ktivR</i> 유전자, <i>Km</i> <sup>R</sup> <sup>Δ</sup>                                                         | 본 발명 <sup>Δ</sup> |
| pKM212 <sup>Δ</sup><br><i>ManDH</i> <sup>Δ</sup>                    | pKM212-MCS derivative; tac 프로모터, <i>E. faecium</i> 유래의<br><i>manDH</i> 유전자, <i>Km</i> <sup>R</sup> <sup>Δ</sup>                                                          | 본 발명 <sup>Δ</sup> |
| pKM212 <sup>Δ</sup><br><i>Lcdh</i> <sup>Δ</sup>                     | pKM212-MCS derivative; tac 프로모터, <i>L. casei</i> 유래의 <i>cdh</i><br>유전자, <i>Km</i> <sup>R</sup> <sup>Δ</sup>                                                              | 본 발명 <sup>Δ</sup> |
| pKM212 <sup>Δ</sup><br><i>Lgppx</i> <sup>Δ</sup>                    | pKM212-MCS derivative; tac 프로모터, <i>Lactobacillus</i> sp.<br>CGMCC 9967 유래의 <i>gppx</i> 유전자, <i>Km</i> <sup>R</sup> <sup>Δ</sup>                                         | 본 발명 <sup>Δ</sup> |

[0152]

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

[0153]

[0154] <sup>a</sup> Ap: ampicillin; Km: kanamycin; Cm: chloramphenicol; R: resistance.

[0155] <sup>b</sup> Stratagene Cloning System, La Jolla, CA, USA.

[0156] <sup>1</sup>Park *et al.*, *Metab. Eng.*, 20, 20-28, 2013

[0157] <sup>2</sup>Choi *et al.*, *Nature biotechnology.*, 34,4, 435-440

[0158] [표 2]

| Cloning       | 이름           | 서열                                                   |
|---------------|--------------|------------------------------------------------------|
| ilvA*         | ilvA*_F      | aaaaaaCAATTGatggctgaatgcacccct                       |
| "             | ilvA*_R      | aaaaaaGGTACCctaaccggccaaaagaacc                      |
| PmIIAAD       | PmIIAAD_F    | aaaaaaGAATTCATGAACATTTCAAGGAGAAA                     |
| "             | PmIIAAD_R    | aaaaaaGGTACCTTACTTCTTAAAACGATCCA                     |
| PmIIIAAD<br>D | PmIIIAAD_F   | aaaaaagaattcATGGCAATAAGTAGAAGAAAATTTA                |
| "             | PmIIIAAD_R   | aaaaaaggtaccTTAGAAAACGATACAGACTAAATGGT               |
| PxIAAD        | PxIAAD_F     | aaaaaagaattcATGGCGATATCCAGAAGAAAATTTA                |
| "             | PxIAAD_R     | aaaaaaggtaccTTAGAATCTGTAAAGACTAAATGGT                |
| PxxIAAD       | PxxIAAD_F    | aaaaaagaattcATGGTGCGCAGAGATGGTAAATTTC                |
| "             | PxxIAAD_R    | aaaaaaggtaccTTTCTTAAATCGATCGAGACTAAAA                |
| LlpanE        | LlpanE_F     | aaaaaGAATTCatgagaattacaattgccgtgcag                  |
| "             | LlpanE_F_RBS | aaaaaggatcctttcacacagggaacaatsagaattacaattgccgtgcag  |
| "             | LlpanE_R     | aaaaacctgcaggttatttctttaataacactctct                 |
| ManDH         | ManDH_F      | aaaaaaGAATTCATGAAAATTGCCATTGCGGG                     |
| "             | ManDH_F_RBS  | aaaaaaGGATCCmtcacacagggaacaATGAAAATTGCCATTGC<br>GGG  |
| "             | ManDH_R      | aaaaaaCCTGCAGGttaTTTAACATTAAAGAGAGTCCT               |
| KIVR          | KIVR_F       | aaaaaaGAATTCATGCCATCCCCTGAAACATCC                    |
| "             | KIVR_F_RBS   | aaaaaaGGATCCmtcacacagggaacaATGCCATCCCCTGAAACA<br>TCC |
| "             | KIVR_R       | aaaaaaCCTGCAGGTAACAGTCTACGGGCAAGTT                   |

[0159]

|            |                  |                                                         |
|------------|------------------|---------------------------------------------------------|
| Lcddh      | Lcddh_F          | aaaaaaGAATTCttcacacaggaacaATGAAAATTATTGCGTATGG          |
| ..         | Lcddh_F_RB<br>S  | aaaaaaGGATCCttcacacaggaacaATGAAAATTATTGCGTATGG          |
| ..         | Lcddh_R          | aaaaaaCCTGCAGGTTAGTTCACCACTTGCTGCA                      |
| Lcpph      | Lcpph_F          | aaaaaaGAATTCATGATGAAAATTCTGAACAGCTTAA                   |
| ..         | Lcpph_F_RB<br>S  | aaaaaaGGATCCttcacacaggaacaATGATGAAAATTCTGAACAGC<br>TTTA |
| ..         | Lcpph_R          | aaaaaaCCTGCAGGTTAATAGCCGCGGGTCAGATCCACT                 |
| Palddh     | Palddh_F         | aaaaaaGAATTCATGAAAATTATTGCGTATGGCATTG                   |
| ..         | Palddh_F_RB<br>S | aaaaaaGGATCCttcacacaggaacaATGAAAATTATTGCGTATGGC<br>ATTG |
| ..         | Palddh_R         | aaaaaaCCTGCAGGTTATTCAAATTCCTTCGTTTTTG                   |
| AbfI       | AbfI_F           | ggcccgaaatcatgagatggaagaagatc                           |
| ..         | AbfI_R           | ggaaaGGTACCTtagaatgccggttgaac                           |
| Cat2       | Cat2_F           | aaaaaaGAATTCatgagtggaagagatata                          |
| ..         | Cat2_R           | aaaaaaGGTACCTaaaatctcttttaaat                           |
| HadA       | HadA_F           | aaaaaaGAATTCatgcttttagaaggagttaa                        |
| ..         | HadA_R           | aaaaaaGGTACCTaatatcttaaaattac                           |
| Pct54<br>D | Pct540_F         | aaaaaaGAATTCatgagaaagttccattat                          |
| ..         | Pct540_R         | aaaaaaGGTACCTtaggacttcatttcctca                         |
| PrpE       | PrpE_F           | aaaaaaGAATTCatgacggcaagccatgccgt                        |
| ..         | PrpE_R           | aaaaaaGGTACCTagccttcagcgctgct                           |
| 4HBS       | 4HBS_F           | AAAAAAGAATTCATGACCGTGCTG CTAGAATA                       |
| ..         | 4HBS_R           | AAAAAAGGTACCTTATTTTTGCGCTGATCCA                         |

[0160]

[0161]

Tttcacacaggaaca

| 명칭  | 서열                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|-----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ihA | atggctgactgcgaaccctgtctcgggtctccggaagggtcccgaataattaaagacagtgctgcgcgcgcgggtt<br>acgagggcggcgaggttacgccctacaaaaatggaaaaactgtcgtcgcgtctgataacgtcattctgtgaa<br>ggcggaagatcgccagccagtcacacgtttaagctgcgcggcgacatacgccatgatggcgccgtgcagcgaa<br>gaacagaagaagcgcaaggcgtgacactgtctctcggttaaccacgcgcagggcgctcgcgtttctctgcgcgg<br>ttaggcgtgaagggcctgtatcgttatccaaaccgccaccgccgacatcaagtcgacgcggcgccggcttcgg<br>cggcggaagtgtgtctcacggcggaacttgatgaagcgaaagcgaagcgatcgaactgtcacagcagcag<br>gggttcactgggtccgccgttcgacatccgatgtgaltgcgggcaaggcacgctggcgctggaactgtc<br>cagcaggacgccatctcgaccgctatttgtccagtcggcgccggcgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt<br>gatcaaacactgatccgcaaatcaaatgatccgtagaagcggaagactccgctgctgaagcagcgc<br>tggatgcgggtatccggttatctgcgcggttagggctatttgtgaagcgtagcggtaaaacgcatcgggtga<br>cgaaaccttcggttatccaggagtatctgcacgacatcatccgtcgtatgcgatgcgatzctgtgcgcgatga<br>aggatttatcgaaagtgtgcgcgggtgcggaaccctctggcgctgtgcgtgcgggaatgaanaatasta<br>tcgccctgcacaaactcgcgcgaacggctggcgcatattcttccgggtgccaaactgaactccacggcctgcg<br>ctactctcagaacgtctcgaactggcggaacagcgtgaagcgttgttggtgtgaccattccggaagaaaaag<br>gcagctctcgaatctgcgaactgttgccggcgcttcggctacccgagttcaactacggttttccgatgcgaana<br>acgctctcatctgtcgtgtgcgcctgagccgcggcctcgaagagcgcaagaaattttgcagatgtcctaaca<br>cggcgagctacagcgtgtgtgatctctccgacgacgaatggcgaaagctacacgtgcgtatattgtcggcggac<br>ggccatcgcatcgttgtaggaacgctctacagcttgaattccggaaacacggcgcgctagctgcgttct<br>caacacgctgggtacgtactggaacattctttgttcactatcgagccatggcaccgactacggcgcgctactgg<br>cggcggttcgaactggcgacatgaacggatttcgaaacccggctgaatgagctgggtacgattccacgacg<br>aaaccaataaccggcggttcaggtctttttggcgggttag |

[0162]

– 23 –

- 24 -

|                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| UgaH <sup>+</sup><br>Δ | atgagaaattacattgcccgggagagc gatgggagtcgttttggttaatgcttcataaagggtggcaatgaagta<br>acccttatagatgagctggaacacgttaaacgattaaaggacatggtttcggagctaatcaatggagaga<br>actcaccgctcattctatcgggtgagttacaaatctgagattcttctaaagaaagacagatttaatttttttacta<br>ggccatgcaattagataagatgctacaaatattaaacattaaatgacgagcacaacaggtaacttttctactaa<br>gaattggctcaggaagatactatagaaaatattgttctgaaaaataatactttattgtaatactatgtggaactgctg<br>tagaaggctcaggttaagcctaattatttggatggttcggttgagctc aaaaatcttattcaggtggaagaa<br>cagctaaaaagttgacagaaatattatcagaatcgggactgaatgctaaatattctaacaaatattctatttata<br>gaaaagcttggtaattggaacaaatgaatgggtttgtactatttagacactaatatgcccggattaggtaaacaaa<br>accagcacatgaatggtttgtactattgttaattgaattgcagcagtagc aaaaattggaatgaacattgattgc<br>tgaagtagtgcagcaggtgaacatgtttgatccatctacaattggattacatccctctatgtaicaggatttgatt<br>aaaaaataatgattgacagagattgactatattaatgggctgtttcagctaaaggtaaaaaataatgtagccaca<br>ccttatgtgattcttaacacaaatggttcacagcaagaaagattatataaagcaaaataa <sup>+</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| KixR <sup>+</sup><br>Δ | atgccatccctgaacatcctctcgtgtaagcaggttgcctggagatactagaccgcccccgaattatctgcgtgg<br>agtcacagccaatttagactcgcacacagccgtcaaacccgaccgcgggacgcgggagacttggatccagggcaa<br>ataccacgttgacgcccggatctacgactgcgtcggaaacagtaaaagatactatagtggtgcccggcaacgt<br>gggagcgtttgtacgaagttacatgagcagacaacgggagctgctgctatcacccctggtggttaccgcaagag<br>ttactgtcccaatgggtcaccctcgaaggaggtgttttggccgataaggggaaaaagtcacaaagaaacgaacat<br>tcgacgtgggaatggtggacggagtcgaagcctcgcctatggcccgtcagagaggtggcagatggggagaabta<br>cacaaigtgttcatttccacaaaagctgacgctggcctggcagagcagaccgccctagacgtgacttgggtatg<br>cagcagctgtctcttcgctcgaagacggcgttaagtaagctgtgggcacatgagcccgttgatgtggcgtcgcggt<br>atcaltgcgacgacgcacccgtcgtctccgcgtgtgttgaacacagggatattccggcggcgttcttctattca<br>tcacacactcaccatcggagcgtatcagaaggccatcttcaaaaggagtgccgcccccgtctacggccagaata<br>aacgtcgcagattgagcagcatttcttcaaacgtataattcagatacccccgttttgacactaaagcattgtatctct<br>ggccagctttggatcatacagttagaagaagctgtgtctgaatcccgcgataaatcccttacaacattacttgcgtga<br>aaacggagcagcgtgttgcagttatgacagccacgacgattgactagaatttggaccagttattatggaagcat<br>cggcagtaatacagcgtcttataccacgacgctaatttgaatgctgactagctatgacagagactgtccatcgt<br>tggtccacgggtgcgacgaatcggctgtaacttgcctaatttgcgcgaacactgacgtcagatttgcagccc<br>tacttaaaagcaaaagctgtatgttttggcttaacatacgtgagcctcttctcctatgctcaggtgacgggaagcagg<br>acgcaagacgggaatacgggacgtaaatgggtgacgtgacatggcagagactgtggattggacttagacgt<br>tggtatccatcggcgttaatagaactattgaagaaatgctgagtttggataaaggagaactgtcccgtagactgtta <sup>+</sup> |

|                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|-------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ManDH <sup>+</sup><br>Δ | atgaaaattgccattgcgggagcaggggctatgggaagccgttcgggcttatgctgcatcagcttggcaacgaag<br>ttctctatcgtatggtggccgaacatgtacagcaaatcaaggagcagcgtttgcaagcaactcaacggaaa<br>ggaaagtgaagctaaattcccattgtatgcaatcagaggttgaaaaagaggaaccaggtc gattgatactctttt<br>acaagggcaatgagtggtgggaaaatgcttcaagacatcacaatcaatcaagaaggatactgaggtgtgtgtt<br>cttaattggatgggacgaagacatcagaaaagttgtaaccatggaaaacatcacaatcggcaatactatgtg<br>gactcgggactgaaggtcccgtcaggtgaacatttccgggagtggttcagtcgaattgcagaaccttggcgcac<br>gggaaaagagccgccgtaaaaagctggccgacaaattgtcgtgacgggcttaacgctcacttctcagaaata<br>tacctatgtatttaccgggaagcagtcgtaaacgggaacgatgaacggactgtgacgatacttgatgtcaatag<br>ggccgaactgggaaaacgtcgaaccgcaataaatgtcgtacgaatgaacaggtttgcaaggtagcagca<br>gttgagaagatcgaactggatgtcccgaagtcacgcacactgcgagagttgtttcgaacccgaaacgataggatt<br>gcacatccctctatgtatcagaacctgattaaaaacatcgtttgactgagatcattacataaatgtgcatctct<br>cgcaagggaaaaaatacggggttgcgactccatactgtgatttctaaacagagctgttcacgccaaaggagact<br>ctcttaattgttaaa <sup>+</sup>                                                                |
| Icddh <sup>+</sup><br>Δ | atgaaaattattgcctatggcgcgcggtgagtaaatcagttatataaacagtgggcgaagataccggcaaac<br>cctggataatcctaccgaatttctgagtaaaacacccgtggaaatggcgaagggctttgagctatcaacagcctgc<br>agaccacccgctatgcggcggcgtgtttgaaaaatgcatgcgtatggcattaaattctgaacattcgaacgtg<br>ggcaccgataacattgataatgacgcgatgaacagatagcattgcctgagcaaacgtccggcgtatagccc<br>ggcgcgattgctgaattgctgacgataccctglatctgctgcgaacatgggcaagtgcaagcgcagctg<br>caagcgggcatatgaaaaagcgggcacaccttattggcaagaactgggtcagcagaccgtggcgtgattg<br>caccggccalattggccaagtggcgattaaactgttaagggcttggcgggaagtgatgtgtatgcgtatcc<br>gatgaagcgcgtatcccgatttgaattatgtgagcctggaaagatctgttaaacagagcgaigtattgactgc<br>gtgcggcgatgaacagaaacacccatattatgaagcggcgttaaacctgatgaacccggcggcgtattgga<br>ttaacaccggcgcgccgaacctgattgatacccaagcgtatgctgagcaacctgaaaagcgcgaacatggcggc<br>gtggcattgatacctatgaataatgaacccaagatctgtgaacctggcgaacatggcagctttaaagatccgt<br>gtggatgactgctggcgtatccgaacgtgtgtgctgagcccgcatattcgtattatacgaacccgcgtgcat<br>aacatgtgtatttagcctgcagcatctgtgtgatttctgaccaaattaaacccggcgcgaacatgctgtgacg<br>caagtggtgaactaa <sup>+</sup> |

[0165]

[0166]

[0168]

[0170]

– 27 –

|                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| HadA <sup>+</sup> | atgcttttagaaggagtttaaagtagtagaacttcaagtttcaicgcagcaccctgttctgcaaaaatgttagtgact<br>gggtgtcagaggtttattagattgaacctatagaaggtgtgtgaaataaggttatgtgtggaacatttaastctcca<br>gcacagatgtgtgaaacccctatgtttgaattagaataatggaataaaaaggtgtgtaagtataatgtaaaatcaaaa<br>gaaggagtagaataattatcataaattatcagaagcagacataattgtaactaatgttagagttcaagcattagaaa<br>aatgtgtatagcttatgaccaaataaagataagtaiccaggaataatattcttcaaatattaggaatgtgtgaaa<br>aggaccttaaasagataaacagggtttgactatactgcatactcgaagagagaggttagccagtcgtttatgga<br>aaaagggaacatctccaaataacagcagcaggtttgtgtaccctatgtcaggtctagcactagcagcaggaag<br>tttagcagcatatcataaaaagctcaactgtgtgaaggtgagagagtaacagtaagcttctccatacagctatata<br>ggatgtggaacagtatacaacagcacactacggaaatgaaatgctttatcaaggaataatccaaacagccca<br>ttaatgactacatataaatgtaaagatggaagatgattcaattgactttaatacaatacaacaaagtggttaggcaaat<br>ctgtagggtataaataagaaataatattagaaatgtagatataataacatagattcaatgttataatcattgtgaag<br>atttagttaagatagttgtggaagctatgttagaaaacaattagacgagtggtcagctttaattagaagaagcagact<br>accatttgaaaaattcaagctgtgtgaagatttatagatgacgaacaagcttggtgcaaatgactcttaattaga<br>acatacgtatagcggaaatacaggtgtcttagttaatactccagttatgttagaaatgaaaggaattaaagaataacac<br>cagcaccaaaagtaggtcacaatactgttagaaggtataaastctttaggtacgatgaggaataaataacttta<br>aagatagttaaagttgtagatattaa <sup>+</sup> |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

[0171]

[0172]

[0173]

실시에 2. 재조합 대장균에서 2HA 포함 고분자 생성 확인

본 발명의 실시예에서 재조합 대장균에서, 2HA 포함 PHA를 생산하기 위하여 사용되는 MR 배지는 1L 당, 6.67 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.8 g MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>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 FeSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O, 2 g CaCl<sub>2</sub>, 2.2 g ZnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O, 0.5 g MnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O, 1 g CuSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O, 0.1 g (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> · H<sub>2</sub>O, and 0.02 g Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> · 10H<sub>2</sub>O를 함유한다.

[0174]

각 균주 배양에 있어서, 종균배양은 5mL LB 배지가 첨가된 25mL 튜브에서 30℃로 하룻밤 진탕배양하였으며, 1mL의 배양액을 20 g/L의 글루코스와 2 g/L의 아미노산을 함유하는 100 mL의 MR 배지를 함유하는 250 mL 플라스크에 접종하여 30℃에서 96시간 동안 진탕배양하였다. 필요한 경우에는 3HB 2 g/L를 추가로 공급해주었다.

[0175]

PHA의 농도와 PHA 모노머의 조성을 fused silica capillary column (Supelco SPB™-5, 30 m × 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.

[0176]

2-1 L-amino acid deaminase 스크리닝

[0177]

각 아미노산 별로 다른 활성을 보이는 아미노산 디아미네이즈 효소 선택에 있어서 높은 2HA 분해를 가지는 폴리(2HA-co-3HB) 공중합체를 생산하는 ilvA, PmILAAD, PmIILAAD, 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 LlpnE, PHA 합성 효소는 PhaC1437 (E130D, S325T, S477G 및 Q481K) 이고 CoA 전이효소는 HadA로 고정하였다. 본 실시예에서는 락테이트 단량체가 고분자 공중합체로 합입되는 것을 억제하기 위하여 ldhA가 결실된 숙주세포인 재조합 대장균 XB-1 균주를 사용하였다. 상기 배지에서 배양된 형질전환된 재조합 대장균 XB-1 균주로부터 생산된 고분자 분석 결과를 표 3에 나타내었다.

[0178] 표 3. Leucine를 공급하여 주었을 때 재조합 대장균이 생산하는 PHA 공중합체의 조성 및 농도

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

[0179]

[0180] : Leucine을 외부에서 첨가하여 주었을 때, 상기 디아미네이즈 효소 중에 PyxLAAD가 상대적으로 가장 높은 2HIC 함량을 가진 고분자를 생성하는 것을 확인하였다.

[0181] 표 4. Isoleucine를 공급하여 주었을 때 재조합 대장균이 생산하는 PHA 공중합체의 조성 및 농도

| 재조합 균주 <sup>a</sup>                                   | 폴리머 조성 <sup>b</sup> (mol%) |       |    | 폴리머 함량<br>(wt%) | 폴리머 농도<br>(g/L) |
|-------------------------------------------------------|----------------------------|-------|----|-----------------|-----------------|
|                                                       | 2H3MP                      | 3HB   | LA |                 |                 |
| XB-1/ p437540<br>pKM212 LipanE<br>pKA312 HadA         | 41.86                      | 58.14 | —  | 12.95           | 0.11            |
| XB-1/ p437540<br>pKM212 ihvA* LipanE<br>pKA312 HadA   | 16.22                      | 83.78 | —  | 18.27           | 0.16            |
| XB-1/ p437540<br>pKM212 PmILAAD<br>Lipane pKA312 HadA | 51.60                      | 48.40 | —  | 1.49            | 0.01            |
| XB-1/ p437540<br>pKM212 PmILAAD<br>Lipane pKA312 HadA | 18.06                      | 81.94 | —  | 1.71            | 0.01            |
| XB-1/ p437540<br>pKM212 PyLAAD<br>Lipane pKA312 HadA  | 24.97                      | 75.03 | —  | 7.51            | 0.06            |
| XB-1/ p437540<br>pKM212 PyxLAAD<br>Lipane pKA312 HadA | 16.56                      | 83.44 | —  | 4.26            | 0.04            |

[0182]

[0183] : 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.

[0184] 표 5. Valine를 공급하여 주었을 때 재조합 대장균이 생산하는 PHA 공중합체의 조성 및 농도

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

[0185]  
[0186] : 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.

[0187] 표 6. Norvaline를 공급하여 주었을 때 재조합 대장균이 생산하는 PHA 공중합체의 조성 및 농도

| 재조합 균주 <sup>a</sup>                                        | 폴리머 조성 <sup>b</sup> (mol%) <sup>c</sup> |                    |                 | 폴리머 함량<br>(wt%) <sup>c</sup> | 폴리머 농도<br>(g/L) <sup>c</sup> |
|------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------|-----------------|------------------------------|------------------------------|
|                                                            | 2HV <sup>c</sup>                        | 3HB <sup>c</sup>   | LA <sup>c</sup> |                              |                              |
| XB-1/<br>pKM212 LipanE<br>pKA312 HadA <sup>c</sup>         | 55.64 <sup>c</sup>                      | 44.36 <sup>c</sup> | -- <sup>c</sup> | 36.09 <sup>c</sup>           | 0.31 <sup>c</sup>            |
| XB-1/<br>pKM212 ilvA* LipanE<br>pKA312 HadA <sup>c</sup>   | 0.81 <sup>c</sup>                       | 99.19 <sup>c</sup> | -- <sup>c</sup> | 21.32 <sup>c</sup>           | 0.18 <sup>c</sup>            |
| XB-1/<br>pKM212 PmILAAD<br>LipanE pKA312 HadA <sup>c</sup> | 3.23 <sup>c</sup>                       | 96.77 <sup>c</sup> | -- <sup>c</sup> | 14.65 <sup>c</sup>           | 0.11 <sup>c</sup>            |
| XB-1/<br>pKM212 PmILAAD<br>LipanE pKA312 HadA <sup>c</sup> | 2.86 <sup>c</sup>                       | 97.14 <sup>c</sup> | -- <sup>c</sup> | 4.96 <sup>c</sup>            | 0.03 <sup>c</sup>            |
| XB-1/<br>pKM212 PyLAAD<br>LipanE pKA312 HadA <sup>c</sup>  | 13.20 <sup>c</sup>                      | 86.80 <sup>c</sup> | -- <sup>c</sup> | 1.38 <sup>c</sup>            | 0.01 <sup>c</sup>            |
| XB-1/<br>pKM212 PyxLAAD<br>LipanE pKA312 HadA <sup>c</sup> | 1.48 <sup>c</sup>                       | 98.52 <sup>c</sup> | -- <sup>c</sup> | 11.54 <sup>c</sup>           | 0.09 <sup>c</sup>            |

[0188]

[0189] : 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.

[0190] 표 7. Norleucine를 공급하여 주었을 때 재조합 대장균이 생산하는 PHA 공중합체의 조성 및 농도

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

[0191]

[0192] : 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.

[0193] 표 8. Methionine를 공급하여 주었을 때 재조합 대장균이 생산하는 PHA 공중합체의 조성 및 농도

| 재조합 균주 <sup>a</sup>                                   | 폴리머 조성 <sup>b</sup> (mol%) |       |    | 폴리머 함량<br>(wt%) | 폴리머 농도<br>(g/L) |
|-------------------------------------------------------|----------------------------|-------|----|-----------------|-----------------|
|                                                       | TB                         | 3HB   | LA |                 |                 |
| XB-1/ p437540<br>pKM212 LipanE<br>pKA312 HadA         | 63.50                      | 36.50 | -- | 65.75           | 0.81            |
| XB-1/ p437540<br>pKM212 ihxA* LipanE<br>pKA312 HadA   | 25.96                      | 74.04 | -- | 36.74           | 0.44            |
| XB-1/ p437540<br>pKM212 PmILAAD<br>LipanE pKA312 HadA | 60.33                      | 39.67 | -- | 41.74           | 0.40            |
| XB-1/ p437540<br>pKM212 PmILAAD<br>LipanE pKA312 HadA | 24.69                      | 75.31 | -- | 4.34            | 0.04            |
| XB-1/ p437540<br>pKM212 PyLAAD<br>LipanE pKA312 HadA  | 47.46                      | 52.54 | -- | 32.74           | 0.32            |
| XB-1/ p437540<br>pKM212 PyxLAAD<br>LipanE pKA312 HadA | 24.27                      | 75.73 | -- | 5.56            | 0.05            |

[0194]

[0195] : 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.

[0196] 표 9. Phenylalanine를 공급하여 주었을 때 재조합 대장균이 생산하는 PHA 공중합체의 조성 및 농도

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

[0197]

[0198] : 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.

[0199]

<sup>a</sup> 각각의 균주의 경우 3HB 첨가 MR 배지에서 96시간동안 배양되었다.

[0200]

<sup>b</sup> 3HB: 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

[0201]

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

[0202]

2-2 Dehydrogenase 스크리닝

[0203]

2KA 를 2HA로 전환하는 디하이드로게나제의 선택에 있어서 높은 2HA 분획을 가지는 폴리(2HA-co-3HB) 공중합체를 생산하는 LpanE, KIVR, ManDH, Lcddh, Lcpr, 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.

[0204] 표 10. Leucine를 공급하여 주었을 때 재조합 대장균이 생산하는 PHA 공중합체의 조성 및 농도

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

[0205]

[0206] : Leucine을 외부에서 첨가하여 주었을 때, 상기 디하이드로게나제 효소 중에 LpanE가 상대적으로 가장 높은 2HIC 함량을 가진 고분자를 생성하는 것을 확인하였다.

[0207] 표 11. Isoleucine를 공급하여 주었을 때 재조합 대장균이 생산하는 PHA 공중합체의 조성 및 농도

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

[0208]

[0209] : Isoleucine을 외부에서 첨가하여 주었을 때, 상기 디하이드로게나제 효소 중에 L1panE가 상대적으로 가장 높은 2H3MP 함량을 가진 고분자를 생성하는 것을 확인하였다.

[0210] 표 12. Valine를 공급하여 주었을 때 재조합 대장균이 생산하는 PHA 공중합체의 조성 및 농도

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

[0211]

[0212] : Valine를 외부에서 첨가하여 주었을 때, 상기 디하이드로게나제 효소 중에 LpanE와 Paldh가 상대적으로 가장 높은 2HV 함량을 가진 고분자를 생성하는 것을 확인하였다.

[0213] 표 13. Norleucine를 공급하여 주었을 때 재조합 대장균이 생산하는 PHA 공중합체의 조성 및 농도

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

[0214]

[0215] : Norleucine을 외부에서 첨가하여 주었을 때, 상기 디하이드로게나제 효소 중에 LpanE와 Paldh가 상대적으로 가장 높은 2HHx 함량을 가진 고분자를 생성하는 것을 확인하였다.

[0216] 표 14. Norvaline를 공급하여 주었을 때 재조합 대장균이 생산하는 PHA 공중합체의 조성 및 농도

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

[0217]

[0218] : Norvaline을 외부에서 첨가하여 주었을 때, 상기 디하이드로게나제 효소 중에 LpanE와 Paldh가 상대적으로 가장 높은 2HV 함량을 가진 고분자를 생성하는 것을 확인하였다.

[0219] 표 15. Methionine를 공급하여 주었을 때 재조합 대장균이 생산하는 PHA 공중합체의 조성 및 농도

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

[0220]

[0221] : Methionine을 외부에서 첨가하여 주었을 때, 상기 디하이드로게나제 효소 중에 Lcddh와 Lcpph가 상대적으로 가장 높은 TB 함량을 가진 고분자를 생성하는 것을 확인하였다.

[0222] 표 16. Phenylalanine를 공급하여 주었을 때 재조합 대장균이 생산하는 PHA 공중합체의 조성 및 농도

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

[0223]

[0224] : Phenylalanine을 외부에서 첨가하여 주었을 때, 상기 디하이드로게나제 효소 중에 Lcpph를 이용하였을 때 상대적으로 가장 높은 PhP 함량을 가진 고분자를 생성하는 것을 확인하였다.

[0225] <sup>a</sup>각각의 균주의 경우 MR 배지에서 96시간동안 배양되었다.

[0226] <sup>b</sup>3HB: 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

[0227] : 상기 결과를 통해서 아미노산 별로 높은 2HA 물분율을 서포트하는 디하이드로게나제가 각각 다름을 확인할 수 있었다.

[0228] 2-3 CoA transferase 스크리닝

[0229] 2HA 를 2HA-CoA로 전환하는 CoA transferase의 선택에 있어서 높은 2HA 분획을 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.

[0230] 표 17. Leucine를 공급하여 주었을 때 재조합 대장균이 생산하는 PHA 공중합체의 조성 및 농도

| 재조합 균주 <sup>a</sup>                                             | 폴리머 조성 <sup>b</sup> (mol%) <sup>c</sup> |                    |                 | 폴리머 함량<br>(wt%) <sup>c</sup> | 폴리머 농도<br>(g/L) <sup>c</sup> |
|-----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------|-----------------|------------------------------|------------------------------|
|                                                                 | 2HIC <sup>c</sup>                       | 3HB <sup>c</sup>   | LA <sup>c</sup> |                              |                              |
| XB-1/<br>p437ReAB<br>pKM212 LlpnE<br>pKA312 4HBS <sup>c</sup>   | 0.05 <sup>c</sup>                       | 99.95 <sup>c</sup> | — <sup>c</sup>  | 61.86 <sup>c</sup>           | 1.42 <sup>c</sup>            |
| XB-1/<br>p437ReAB<br>pKM212 LlpnE<br>pKA312 AbfT <sup>c</sup>   | 0.05 <sup>c</sup>                       | 99.95 <sup>c</sup> | — <sup>c</sup>  | 71.42 <sup>c</sup>           | 1.43 <sup>c</sup>            |
| XB-1/<br>p437ReAB<br>pKM212 LlpnE<br>pKA312 Cat2 <sup>c</sup>   | 0.05 <sup>c</sup>                       | 99.95 <sup>c</sup> | — <sup>c</sup>  | 72.65 <sup>c</sup>           | 1.33 <sup>c</sup>            |
| XB-1/<br>p437ReAB<br>pKM212 LlpnE<br>pKA312 Pct540 <sup>c</sup> | 0.03 <sup>c</sup>                       | 99.97 <sup>c</sup> | — <sup>c</sup>  | 76.30 <sup>c</sup>           | 1.56 <sup>c</sup>            |
| XB-1/<br>p437ReAB<br>pKM212 LlpnE<br>pKA312 PxpE <sup>c</sup>   | 0.04 <sup>c</sup>                       | 99.96 <sup>c</sup> | — <sup>c</sup>  | 79.48 <sup>c</sup>           | 1.72 <sup>c</sup>            |
| XB-1/<br>p437ReAB<br>pKM212 LlpnE<br>pKA312 HadA <sup>c</sup>   | 19.38 <sup>c</sup>                      | 80.62 <sup>c</sup> | — <sup>c</sup>  | 68.95 <sup>c</sup>           | 1.01 <sup>c</sup>            |

[0231]

[0232] : Leucine을 외부에서 첨가하여 주었을 때, 상기 CoA transferase 효소 중에 HadA가 상대적으로 가장 높은 2HIC 함량을 가진 고분자를 생성하는 것을 확인하였다.

[0233] 표 18. Isoleucine를 공급하여 주었을 때 재조합 대장균이 생산하는 PHA 공중합체의 조성 및 농도

| 재조합 균주 <sup>a</sup>                                          | 폴리머 조성 <sup>b</sup> (mol%) <sup>c</sup> |                     |                 | 폴리머 함량<br>(wt%) <sup>c</sup> | 폴리머 농도<br>(g/L) <sup>c</sup> |
|--------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|---------------------|-----------------|------------------------------|------------------------------|
|                                                              | 2H3MP <sup>c</sup>                      | 3HB <sup>c</sup>    | LA <sup>c</sup> |                              |                              |
| XB-1/ p437ReAB<br>pKM212 LlpnE<br>pKA312 4HBS <sup>c</sup>   | 0 <sup>c</sup>                          | 100.00 <sup>c</sup> | — <sup>c</sup>  | 78.79 <sup>c</sup>           | 1.85 <sup>c</sup>            |
| XB-1/ p437ReAB<br>pKM212 LlpnE<br>pKA312 AbfT <sup>c</sup>   | 0 <sup>c</sup>                          | 100.00 <sup>c</sup> | — <sup>c</sup>  | 65.70 <sup>c</sup>           | 1.78 <sup>c</sup>            |
| XB-1/ p437ReAB<br>pKM212 LlpnE<br>pKA312 Cat2 <sup>c</sup>   | 0 <sup>c</sup>                          | 100.00 <sup>c</sup> | — <sup>c</sup>  | 79.32 <sup>c</sup>           | 1.87 <sup>c</sup>            |
| XB-1/ p437ReAB<br>pKM212 LlpnE<br>pKA312 Pct540 <sup>c</sup> | 0 <sup>c</sup>                          | 100.00 <sup>c</sup> | — <sup>c</sup>  | 47.39 <sup>c</sup>           | 0.49 <sup>c</sup>            |
| XB-1/ p437ReAB<br>pKM212 LlpnE<br>pKA312 PtpE <sup>c</sup>   | 0 <sup>c</sup>                          | 100.00 <sup>c</sup> | — <sup>c</sup>  | 59.82 <sup>c</sup>           | 0.59 <sup>c</sup>            |
| XB-1/ p437ReAB<br>pKM212 LlpnE<br>pKA312 HadA <sup>c</sup>   | 14.98 <sup>c</sup>                      | 85.02 <sup>c</sup>  | — <sup>c</sup>  | 63.82 <sup>c</sup>           | 1.32 <sup>c</sup>            |

[0234]

[0235] : Isoleucine을 외부에서 첨가하여 주었을 때, 상기 CoA transferase 효소 중에 HadA가 상대적으로 가장 높은 2H3MP 함량을 가진 고분자를 생성하는 것을 확인하였다.

[0236] 표 19. Valine를 공급하여 주었을 때 재조합 대장균이 생산하는 PHA 공중합체의 조성 및 농도

| 재조합 균주 <sup>a</sup>                                             | 폴리머 조성 <sup>b</sup> (mol%) <sup>c</sup> |                    |                 | 폴리머 함량<br>(wt%) <sup>c</sup> | 폴리머 농도<br>(g/L) <sup>c</sup> |
|-----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------|-----------------|------------------------------|------------------------------|
|                                                                 | 2HIV <sup>c</sup>                       | 3HB <sup>c</sup>   | LA <sup>c</sup> |                              |                              |
| XB-1/<br>p437ReAB<br>pKM212 LpanE<br>pKA312 4HBS <sup>c</sup>   | 0.09 <sup>c</sup>                       | 99.91 <sup>c</sup> | — <sup>c</sup>  | 72.23 <sup>c</sup>           | 1.46 <sup>c</sup>            |
| XB-1/<br>p437ReAB<br>pKM212 LpanE<br>pKA312 AbfT <sup>c</sup>   | 0.22 <sup>c</sup>                       | 99.78 <sup>c</sup> | — <sup>c</sup>  | 73.50 <sup>c</sup>           | 1.30 <sup>c</sup>            |
| XB-1/<br>p437ReAB<br>pKM212 LpanE<br>pKA312 Cat2 <sup>c</sup>   | 0.09 <sup>c</sup>                       | 99.91 <sup>c</sup> | — <sup>c</sup>  | 64.54 <sup>c</sup>           | 1.15 <sup>c</sup>            |
| XB-1/<br>p437ReAB<br>pKM212 LpanE<br>pKA312 Pct540 <sup>c</sup> | 0.06 <sup>c</sup>                       | 99.94 <sup>c</sup> | — <sup>c</sup>  | 69.87 <sup>c</sup>           | 1.36 <sup>c</sup>            |
| XB-1/<br>p437ReAB<br>pKM212 LpanE<br>pKA312 PcpE <sup>c</sup>   | 0.09 <sup>c</sup>                       | 99.91 <sup>c</sup> | — <sup>c</sup>  | 67.22 <sup>c</sup>           | 1.33 <sup>c</sup>            |
| XB-1/<br>p437ReAB<br>pKM212 LpanE<br>pKA312 HadA <sup>c</sup>   | 3.09 <sup>c</sup>                       | 96.91 <sup>c</sup> | — <sup>c</sup>  | 60.92 <sup>c</sup>           | 1.60 <sup>c</sup>            |

[0237]

[0238] : Valine을 외부에서 첨가하여 주었을 때, 상기 CoA transferase 효소 중에 HadA가 상대적으로 가장 높은 2HIV 함량을 가진 고분자를 생성하는 것을 확인하였다.

[0239] 표 20. Norleucine를 공급하여 주었을 때 재조합 대장균이 생산하는 PHA 공중합체의 조성 및 농도

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

[0240]

[0241] : Norleucine을 외부에서 첨가하여 주었을 때, 상기 CoA transferase 효소 중에 HadA가 상대적으로 가장 높은 2HHx 함량을 가진 고분자를 생성하는 것을 확인하였다.

[0242] 표 21. Norvaline를 공급하여 주었을 때 재조합 대장균이 생산하는 PHA 공중합체의 조성 및 농도

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

[0243]

[0244] : Norvaline을 외부에서 첨가하여 주었을 때, 상기 CoA transferase 효소 중에 HadA가 상대적으로 가장 높은 2HV 함량을 가진 고분자를 생성하는 것을 확인하였다.

[0245] 표 22. Methionine를 공급하여 주었을 때 재조합 대장균이 생산하는 PHA 공중합체의 조성 및 농도

| 재조합 균주 <sup>a</sup>                                                 | 폴리머 조성 <sup>b</sup> (mol%) <sup>c</sup> |                     |                 | 폴리머 함량<br>(wt%) <sup>c</sup> | 폴리머 농도<br>(g/L) <sup>c</sup> |
|---------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|---------------------|-----------------|------------------------------|------------------------------|
|                                                                     | TB <sup>c</sup>                         | 3HB <sup>c</sup>    | LA <sup>c</sup> |                              |                              |
| XB-1/<br>pKM212<br>pKA312 4HBS <sup>c</sup><br>p437ReAB<br>Lipase   | 0 <sup>c</sup>                          | 100.00 <sup>c</sup> | — <sup>c</sup>  | 77.87 <sup>c</sup>           | 1.35 <sup>c</sup>            |
| XB-1/<br>pKM212<br>pKA312 AbfT <sup>c</sup><br>p437ReAB<br>Lipase   | 0 <sup>c</sup>                          | 100.00 <sup>c</sup> | — <sup>c</sup>  | 70.99 <sup>c</sup>           | 1.26 <sup>c</sup>            |
| XB-1/<br>pKM212<br>pKA312 Cat2 <sup>c</sup><br>p437ReAB<br>Lipase   | 0 <sup>c</sup>                          | 100.00 <sup>c</sup> | — <sup>c</sup>  | 81.02 <sup>c</sup>           | 1.39 <sup>c</sup>            |
| XB-1/<br>pKM212<br>pKA312 Pct540 <sup>c</sup><br>p437ReAB<br>Lipase | 0 <sup>c</sup>                          | 100.00 <sup>c</sup> | — <sup>c</sup>  | 69.98 <sup>c</sup>           | 1.11 <sup>c</sup>            |
| XB-1/<br>pKM212<br>pKA312 PrpE <sup>c</sup><br>p437ReAB<br>Lipase   | 0 <sup>c</sup>                          | 100.00 <sup>c</sup> | — <sup>c</sup>  | 59.80 <sup>c</sup>           | 0.98 <sup>c</sup>            |
| XB-1/<br>pKM212<br>pKA312 HadA <sup>c</sup><br>p437ReAB<br>Lipase   | 18.84 <sup>c</sup>                      | 81.16 <sup>c</sup>  | — <sup>c</sup>  | 79.08 <sup>c</sup>           | 0.25 <sup>c</sup>            |

[0246] : Methionine을 외부에서 첨가하여 주었을 때, 상기 디하이드로게나제 효소 중에 Lcddh와 Lcpdh가 상대적으로 가장 높은 TB 함량을 가진 고분자를 생성하는 것을 확인하였다.

[0248] 표 23. Phenylalanine를 공급하여 주었을 때 재조합 대장균이 생산하는 PHA 공중합체의 조성 및 농도

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

[0249]

[0250] : Phenylalanine을 외부에서 첨가하여 주었을 때, 상기 CoA transferase 효소 중에 HadA를 이용하였을 때 상대적으로 가장 높은 PhP 함량을 가진 고분자를 생성하는 것을 확인하였다.

[0251] <sup>a</sup>각각의 균주의 경우 MR 배지에서 96시간동안 배양되었다.

[0252] <sup>b</sup>3HB: 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

[0253] : 상기 결과를 통해서 HadA가 모든 아미노산에서 높은 2HA 물분율을 서포트하는 효소임을 확인할 수 있었다.

[0254] 실시예 3. P(3HB-Co-2HA) 생산

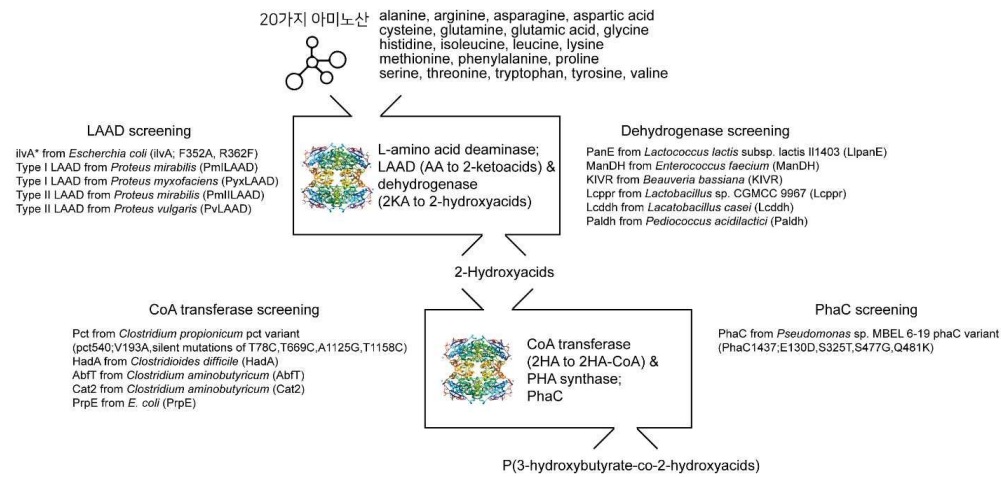
[0255] 2-HA는 CoA 전이효소에 의해 2HA-CoA가 되고, PHA 합성효소를 통해 PhaA, PhaB를 통해 만들어진 3HB-CoA와 함께 중합되어 P(3HB-Co-2HA) 형태의 고분자가 생산되었다 (도 4).

[0256] 실시예 1 및 실시예 2에서 기술한 바와 같이 외부에서 아미노산 공급하여 주었을 때 다양한 조합의 단량체와 조성을 가지는 고분자를 생산하였다.

[0257] 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.

## 도면

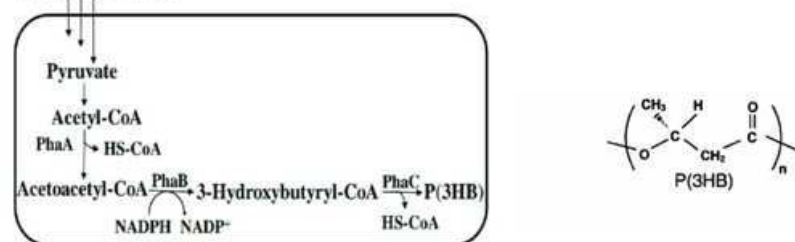
### 도면1



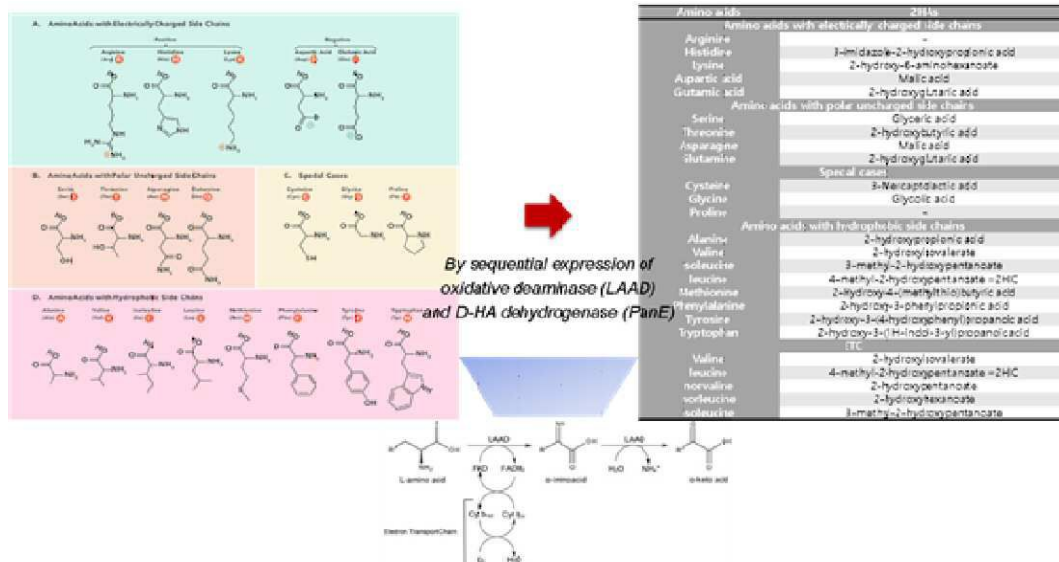
### 도면2

- Escherichia coli* XL1-Blue
- Genotype: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [*F'* *proAB* *lacIq* *ZΔM15* Tn10 (Tetr)]

#### Renewable substrates



### 도면3



#### 도면4



##### 1. LAAD screening

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

##### 2. Dehydrogenase screening

- PanE from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* II1403 (LpanE)
- ManDH from *Enterococcus faecium* (ManDH)
- KIVR from *Beauveria bassiana* (KIVR)
- Lcprp from *Lactobacillus* sp. CGMCC 9967 (Lcprp)
- Lcddh from *Lactobacillus casei* (Lcddh)
- Paldh from *Pediococcus acidilactici* (Paldh)

##### 3. CoA transferase screening

- Pct from *Clostridium propionicum* pct variant (pct540, V193A, silent mutations of T78C, T689C, A1125G, T1158C)
- HadA from *Clostridioides difficile* (HadA)
- AbfT from *Clostridium aminobutyricum* (AbfT)
- Cat2 from *Clostridium aminobutyricum* (Cat2)
- PrpE from *Cupriavidus necator* (PrpE)

##### 4. PHA synthase screening

- PhaC from *Pseudomonas* sp. MBEL 6-19 *phaC* variant (PhaC1437, E130D, S325T, S477G, Q481K)

## 서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.