

# 재조합 대장균에서 MaoC를 이용한 지방산으로부터의 중간사슬길이 폴리하이드록시알칸산 생산 연구

박시재<sup>1</sup>, 이승환<sup>2</sup>, 오영훈<sup>2</sup>, 이상엽<sup>3\*</sup>

## MaoC Mediated Biosynthesis of Medium-chain-length Polyhydroxyalkanoates in Recombinant *Escherichia coli* from Fatty Acid

Si Jae Park<sup>1</sup>, Seung Hwan Lee<sup>2</sup>, Young Hoon Oh<sup>2</sup>, and Sang Yup Lee<sup>3\*</sup>

접수: 2014년 7월 3일 / 게재승인: 2014년 7월 22일  
© 2014 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

**Abstract:** Biosynthesis pathway of medium-chain-length (MCL) polyhydroxyalkanoates (PHA) from fatty acid  $\beta$ -oxidation pathway was constructed in recombinant *Escherichia coli* by introducing the *Pseudomonas* sp. 61-3 PHA synthase gene (*phaC2*) and the *maoC* genes from *Pseudomonas putida*, *Sinorhizobium meliloti*, and *Ralstonia eutropha*. The metabolic link between fatty acid  $\beta$ -oxidation pathway and PHA biosynthesis pathway was constructed by MaoC, which is homologous to *P. aeruginosa* (*R*)-specific enoyl-CoA hydratase (PhaJ1). When the *E. coli* W3110 strains expressing the *phaC2* gene and one of the *maoC* genes from *P. putida*, *Sinorhizobium meliloti*, and *Ralstonia eutropha* were cultured in LB medium containing 2 g/L of sodium decanoate as a carbon source, MCL-PHA that mainly consists of 3-hydroxyhexanoate (3HHx), 3-hydroxyoctanoate (3HO) and 3-hydroxyde-

canoate (3HD), was produced. The monomer composition of PHA and PHA contents varied depending on MaoC employed for the production of PHA. The highest PHA content of 18.7 wt% was achieved in recombinant *E. coli* W3110 expressing the *phaC2* gene and the *P. putida* *maoC* gene. These results suggest that MCL-PHA biosynthesis pathway can be constructed in recombinant *E. coli* strains from the  $\beta$ -oxidation pathway by employing MaoC able to supply (*R*)-3-hydroxyacyl-CoA, the substrate of PHA synthase.

**Keywords:** *Escherichia coli*, MaoC,  $\beta$ -oxidation, Polyhydroxyalkanoates, Fatty acid

<sup>1</sup>명지대학교 환경에너지공학과  
<sup>1</sup>Department of Environmental Engineering and Energy, Myongji University, Yongin 449-728, Korea

<sup>2</sup>한국화학연구원 바이오화학연구센터  
<sup>2</sup>Industrial Biochemicals Research Group, Research Center for Bio-based Chemistry, Division of Convergence Chemistry, Korea Research Institute of Chemical Technology, Daejeon 305-600, Korea

<sup>3</sup>한국과학기술원 생명화학공학과  
<sup>3</sup>Metabolic and Biomolecular Engineering National Research Laboratory, Department of Chemical and Biomolecular Engineering (BK21 Plus Program), Center for Systems and Synthetic Biotechnology, and Institute for the BioCentury, KAIST, Daejeon 305-701, Korea  
Tel: +82-42-350-3930, Fax: +82-42-350-8800  
e-mail: leesy@kaist.ac.kr

## 1. INTRODUCTION

폴리하이드록시알칸산 (polyhydroxyalkanoates, PHAs)은 미생물이 탄소원이 풍부하고 N, P, S, O 등의 생장에 필요한 요소들이 부족할 때 에너지 및 환원력 보존을 위하여 세포내에 축적하는 생분해성 고분자 물질이다. PHA는 생분해성과 생적합성을 지닌 바이오폴리머이고, 모노머의 종류에 따라서 다양한 물성을 나타내기 때문에 기존의 석유화학 유래의 합성고분자를 대체하기 위한 바이오폴리머로서 많은 관심을 받고 있다 [1,2]. PHA의 합성에 가장 중요하고 핵심적인 효소는 PHA synthase이다. PHA synthase는 미생물의 대사회로를

통해 생성된 다양한 hydroxyacyl-CoA (HA-CoA)를 기질로 사용하여 PHA를 합성한다. 만약에 HA-CoA이 광학활성을 지닌다면 모두 (R)-form이기 때문에 PHA의 모노머는 R-form의 광학이성질체이다 [3]. PHA synthase는 3, 4, 5, 6- hydroxyacyl-CoA를 기질로 사용할 수 있으나, 이 중에 가장 효율적으로 이용하는 기질은 (R)-3-hydroxyacyl-CoA (R3HA-CoA) 이다 [1-3]. 탄소수가 4~12개인 R3HA-CoA들이 미생물의 다양한 대사회로의 대사중간산물을 이용하여 만들어 질 수 있다. 이 중, 탄소수가 4개인 (R)-3-hydroxybutyryl-CoA (R3HB-CoA)는 주로 acetyl-CoA로부터 두 효소,  $\beta$ -ketothiolase (PhaA)와 NADPH dependent acetoacetyl-CoA reductase (PhaB)에 의해서 합성되며, 탄소수가 6개 이상인 R3HA-CoA는 지방산 대사회로의 대표적인 대사중간산물인 enoyl-CoA, 3-ketoacyl-CoA, (S)-3-hydroxyacyl-CoA, (R)-3-hydroxyacyl-acyl carrier protein (ACP) 등으로부터 합성될 수 있다 [1,2]. 현재까지 이러한 대사중간산물을 R3HA-CoA로 전환할 수 있는 다양한 효소들이 발견되어져 왔으며, 대표적인 효소로 (R)-specific enoyl-CoA hydratase, 3-ketoacyl-ACP reductase, epimerase, 3-hydroxyacyl-ACP:CoA transferase 등이 알려져 있다 [4-15]. 이러한 효소들의 대사회로 상의 정확한 기능의 규명을 통해 PHA 합성에 관여된 대사회로에 대해 더욱 명확하게 이해할 수 있으며, 효율적으로 PHA를 합성하는 재조합 미생물의 제작이 가능하게 되었다.

지방산을 이용하여 PHA를 합성하는 미생물이 효율적으로 이용하는 대사중간산물은 enoyl-CoA로서, enoyl-CoA를 3HA-CoA로 전환하는 효소인 (R)-specific enoyl-CoA hydratase가 다양한 미생물, 특히 *Pseudomonas* 균주에서 많이 스크리닝 되어져 왔다. 특히, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1균주는 적어도 네 개 이상의 (R)-specific enoyl-CoA hydratase를 코딩하는 유전자 (*phaJ1*, *phaJ2*, *phaJ3* and *phaJ4* gene)를 지니고 있는 것으로 알려져 있으며, 각각의 PhaJ는 다른 기질특이성을 보유하고 있는 것으로 알려져 있다 [10,14,15]. 이에 반해 *P. putida*와 *P. oleovorans* 균주는 비교적 적은 숫자의 *phaJ* 유전

자를 보유하고 있는 것으로 알려져 있으며, 최근에 PhaJ에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다 [14,15].

최근에 우리 그룹은 *P. aeruginosa* PhaJ1이 MaoC like domain을 지니고 있는 정보를 기반으로 하여 대장균의 MaoC 단백질이 enoyl-CoA를 R3HA-CoA로 전환하는 역할을 하는 것을 밝힌 바 있다 [13]. 또한 대장균 MaoC 단백질을 이용하여 재조합 대장균에서 지방산 대사회로를 이용한 medium-chain-length (MCL)-PHA를 합성 대사회로를 제작할 수 있다는 보고를 한 바 있다 [13]. 최근에는 *P. putida*에서도 MaoC domain을 보유한 단백질 (P0580)이 enoyl-CoA hydratase 기능을 한다는 보고가 있었다 [14,15].

본 연구에서는 *P. putida*, *Ralstonia eutropha*, *Sinorhizobium meliloti*에 존재하는 MaoC 단백질을 MaoC domain를 이용한 homology search를 이용하여 스크리닝하였다. 스크리닝된 MaoC 단백질을 이용하여, 지방산을 탄소원으로 사용해서 MCL-PHA를 합성하는 재조합 대장균을 개발하였다.

## 2. MATERIALS AND METHOD

### 2.1. 균주 및 플라스미드

본 연구에 사용된 균주와 플라스미드를 Table 1에 정리하였다. 플라스미드 제작을 위하여 대장균 XL1-Blue를 호스트 균주로 이용하였다. 지방산으로부터 PHA를 생산하기 위하여 대장균 W3110 (KCTC 2223)을 호스트 균주로 사용하였다. MaoC 유전자는 *P. putida* KT2440, *S. meliloti* 1021, *R. eutropha* NCIMN11599 균주의 크로모솜으로부터 Table 2에 정리된 프라이머를 이용하여 PCR을 통해 증폭하였다. 프라이머는 *P. putida* KT2440, *S. meliloti* 1021, *R. eutropha* NCIMB 11599의 유전체 정보를 기반으로 제작하였다. PCR은 PCR Thermal Cycler MP (Takara Shuzo Co., LTD., Shiga, Japan)을 이용하여 Expand<sup>®</sup> High Fidelity PCR System (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany)으로 수행하였다. 플

**Table 1.** Bacterial strains and plasmids used in this study

Strains or Plasmids	Relevant Characteristics	Reference or Source
<b>Strains</b>		
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> , <i>suppE44</i> , <i>relA1</i> , <i>t</i> , <i>lac</i> , <i>F</i> '[ <i>proAB lac<sup>l</sup> lacZ</i> Δ <i>M15</i> , <i>Tn10 (tet)<sup>r</sup></i> ]	Stratagene <sup>a</sup>
<i>E. coli</i> W3110	<i>F mcrA mcrB IN(rrnDrrnE)1λ</i>	KCTC <sup>b</sup>
<i>Pseudomonas putida</i>	wild type	Lab stock
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	wild type	KCTC <sup>b</sup>
<i>Ralstonia eutropha</i>	wild type	KCTC <sup>b</sup>
<b>Plasmids</b>		
p10499A	pTrc99A derivative; Ap <sup>r</sup> ; <i>gntT104</i> promoter	9, 13
pMCS104613C2	pBBR1MCS derivative; <i>gntT104</i> promoter, <i>Pseudomonas</i> sp. 61-3 <i>phaC2</i> gene	13
p10499P0580	p10499A derivative; <i>P. putida</i> KT2442 <i>maoC</i> (P0580) gene	This study
p10499SmMaoC	p10499A derivative; <i>S. meliloti</i> <i>maoC</i> gene	This study
p10499ReMaoC	p10499A derivative; <i>R. eutropha</i> <i>maoC</i> gene	This study

<sup>a</sup>Stratagene Cloning System, La Jolla, CA, USA

<sup>b</sup>Korean Collection for Type Cultures, Daejeon, Republic of Korea

**Table 2.** List of primers used in PCR experiments for the amplification of the *maoC* genes<sup>a</sup>

Primer	Primer sequence	Template used
Primer1	5- <b>GGAATTC</b> ATGAGCCGACAATGGCACGAC	<i>P. putida</i> chromosomal DNA
Primer2	5- <b>CCCAAGCTT</b> TACAGGCTCTCCCAACGGCC	
Primer3	5- <b>GGAATTC</b> ATGAGCGAGCAGACGATCTAT	<i>S. meliloti</i> chromosomal DNA
Primer4	5- <b>CCCAAGCTT</b> TATTGGATAGTTCCCTCAGGTTT	
Primer5	5- <b>GGAATTC</b> ATGAACGCCTATCAACTTTGTC	<i>R. eutropha</i> chromosomal DNA
Primer6	5- <b>CCCAAGCTT</b> CAGTCCCCGCTGCTGCC	

<sup>a</sup>Restriction enzyme sites are shown in bold.

라스미드 pMCS104613C2 는 *gntT104* promoter를 이용하여 *Pseudomonas* sp. 61-3 *phaC2* gene를 발현하는 벡터이다 [13]. *P. putida* KT2440, *S. meliloti* 1021, *R. eutropha* NCIMN11599 의 *maoC* 유전자를 발현하는 벡터는 PCR을 통해 획득한 *maoC* 유전자를 p10499A 벡터 [9]의 *EcoRI* 과 *HindIII* 제한 효소 사이트에 클로닝하여 제작하였다.

## 2.2. 배양조건

대장균 XL1-Blue 는 Luria-Bertani (LB) medium (리터당: 10 g tryptone, 5 g yeast extract, 5 g NaCl 함유)에서 37°C로 배양하였다. PHA의 생산을 위하여, *maoC* 유전자와 *phaC2* 유전자를 발현하는 재조합 대장균 W3110을 100 mL의 LB medium을 함유하고 있는 250 mL 플라스크에서 96시간 동안 배양하였다. 2 g/L의 sodium decanoate (Sigma Co., St. Louis, MO, USA)를 기질로 LB medium에 첨가하였다. 플라스크 배양은 진탕배양기에서 250 rpm과 30°C에서 수행하였다. 결과는 세 번 반복하여 평균값을 구하였다. Ampicillin (Ap, 50 mg l<sup>-1</sup>)과 chloramphenicol (Cm, 34 mg l<sup>-1</sup>)을 균주의 플라즈미드 안정성을 위하여 배지에 첨가하였다.

## 2.3. 분석조건

PHA의 농도와 PHA 모노머의 조성을 fused silica capillary column (Supelco SPB<sup>TM</sup>-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 [16]. PHA의 농도와 PHA 모노머 조성을 측정하기 위하여 다음과 같이 3-hydroxyacid methyl ester를 만들었다. PHA를 합성한 재조합 대장균을 원심분리하여 수득한 후 95°C에서 24시간 건조하여 수분을 모두 제거하였다. 건조된 재조합 대장균 30~100 mg (PHA content에 따라 양을 달리하였음)을 chloroform 2 mL과 PHA solution 1 mL을 넣은 바이알에서 95 °C oven에서 overnight하여 반응하였다. PHA solution은 970 mL의 메탄올에 30 mL의 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>과 8 g의 benzoic acid를 넣어서 제조하였다. Methanolysis 반응 후 상온에서 식으면 증류수 1 mL을 첨가하여 약 1분 간 vortexing하여 섞어준 후 분리된 두 개의 층 중 아래의 chloroform 층을 GC로 분석하였다. 건조균체중량 (dry cell weight per liter of culture broth)은 기존에 보고된 방법으로 측정하였다 [17]. PHA content (wt%)는 건조균체중량과 PHA 농도의 비율로 정의된다.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1. Identification and cloning of the *maoC* genes from *P. putida*, *S. meliloti*, and *R. eutropha*

*P. putida*, *S. meliloti*, *R. eutropha* 의 *maoC* 유전자는 *E. coli* *maoC* 유전자와 *P. aeruginosa* *phaJ1* 유전자서열을 기반으로 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)의 protein homology search를 통해 스크리닝하였다. *E. coli* *maoC* 유전자의 발현을 통해 재조합 대장균에서 지방산으로부터 MCL-PHA를 합성할 수 있었기 때문에 [13], 본 연구에서는 *P. putida*, *S. meliloti*, *R. eutropha*로부터 스크리닝된 *maoC* 유전자의 발현을 통하여 재조합 대장균에서 MCL-PHA의 합성대사 회로를 구축하고자 하였다. *MaoC* 유전자의 발현은 p10499A 플라즈미드에 클로닝하여, 지속적으로 발현할 수 있도록 유도하였다. *P. putida* KT2440에 존재하는 *MaoC* (PP0580)은 (*R*)-specific enoyl-CoA hydratase로 알려져 있으며, *P. putida*에서 발현 및 활성이 확인되었으나 [14,15], 실제로 대장균을 비롯한 재조합 균주에서 PHA 합성에 응용된 적이 없기 때문에 이번 실험에서 PHA 합성에 응용하였다. Fig. 1에 *MaoC* 효소의 multiple alignment 결과를 정리하였다. BLAST search 결과를 통해 *P. putida*, *S. meliloti*, *R. eutropha*의 *MaoC* 효소 모두 *E. coli* *MaoC* 효소와 마찬가지로 *MaoC* domain이 잘 보존되어 있는 것을 알 수 있었다. *P. putida*, *S. meliloti*, *R. eutropha* *MaoC* 효소 모두의 경우 *E. coli* *MaoC*의 경우와 같이 효소활성에 중요한 아미노산 잔기인 히스티딘 (H)과 아스파틱산 (D)가 잘 보존되어 있었다 [13]. PCR를 통해 획득한 각각의 *MaoC* 유전자를 p10499A에 클로닝하여 재조합 대장균 제작에 사용하였다. p10499A는 대장균 *gntT104* 프로모터를 보유한 발현벡터로서, 해당 유전자를 지속적으로 발현할 수 있는 벡터로 많이 사용되어 왔다 [9,13]. Fig. 2에 현재까지 PHA 합성에 사용된 β-oxidation pathway의 대사공학 전략과 본 연구에서 적용된 *MaoC*를 이용한 대사공학 전략을 정리하였다. β-oxidation pathway의 주 효소인 *FadB* 혹은 *FadA*를 제거할 경우 β-oxidation pathway의 대사산물들이 PHA synthase의 기질인 R3HA-CoA로 전환되어 PHA synthase의 발현만으로도 PHA가 합성된다는 보고가 있어왔다 [4-6,12,13]. 하지만 정상적인 β-oxidation pathway를 지닌 재조합 대장균에서는 enoyl-CoA hydratase 혹은 3-ketoacyl-CoA reductase 등을 플라즈미드를 통해 과다발현 해야만 β-oxidation pathway의 대사산물들이 R3HA-CoA로 전환되어 PHA 합성에 이용될 수

Ec_MaoC	524	----IHPFRKYFEELQPGDSSLTPRRTMTEADI-VNFACLSGDHFYAFMDKIAAAESIIFG	578
Sm_MaoC	1	----MSEQTIYEDYEQGHVRLTSGRTITETDF-VVHAGHTGDFPHEMDAEFAKTLPGG	55
Pa_PhaJ1	1	---MSQVQNIPIYAELEVG-QKAEYTSIAERDL-QLFAAVSGDRNPVELDAAYAATTQFK	55
Pp_pp0580	156	----LEGEASEPADPEPD-PLAEATRWYADSDIGRRYAKVCGDYNPIHL SAVSARLFGFP	210
Re_MaoC	1	MNAYQLCPQRYFEDFELGEHFNLPSRTMTDALF-AAFQLASGDNHPVEYDVEYCRALGMP	59
Ec_MaoC	579	ERVVHG--YFVLSAAAGLFVDAGVGPVIANYGLESRLREIEPVKPGDTIQVRLTCKRRTLK	636
Sm_MaoC	56	QRIRHG--TMIFSIGVGLTASL-INPVAFSYGYDRLEVRPVHIGDTIRTRVTIAAKEDD	112
Pa_PhaJ1	56	ERIRHG--MLSGALISAATVLPGGTIYLG-QLRETRPVKLGDDLKVELEVLEKLPK	112
Pp_pp0580	211	TAIRHG--MWTKAMALAALRGHLP HSGYAFEV----DERKPVRLPSEVVL SASEAG----	260
Re_MaoC	60	HMLRHGFQVVIQTAAGAGLPHMVEESLKGFI EQSSRELAPVYVGD TLYCRLTVTELVPG	119
Ec_MaoC	637	KQSAEEKPTGVVEWAVEVFNQHQTPVALYSILTLVARQHGD FVD-	681
Sm_MaoC	113	PKRPGAGR---VVERCEVINQRGEVLAADHILIVERKPEGTI---	152
Pa_PhaJ1	113	NRVRMATR--VFNQAGKQVVDGEAEIMAPEEKLSVELAELPPI SIG	156
Pp_pp0580	261	-----PSGQLRLDGHGDVLH MVGRWESL-----	283
Re_MaoC	120	RTTG-----VLAMRSEVRNQNDVCVMEGTQRYLLRKRVP GSSGD-	158

Fig. 1. Alignment of the deduced amino acid sequence of MaoC from *E. coli*, *P. putida*, *S. meliloti*, *R. eutropha* with that of *P. aeruginosa* (*R*)-specific enoyl-CoA hydratase (PhaJ1). Conserved amino acids are shown in boxes. The catalytically important residues Asp and His are indicated by arrows.

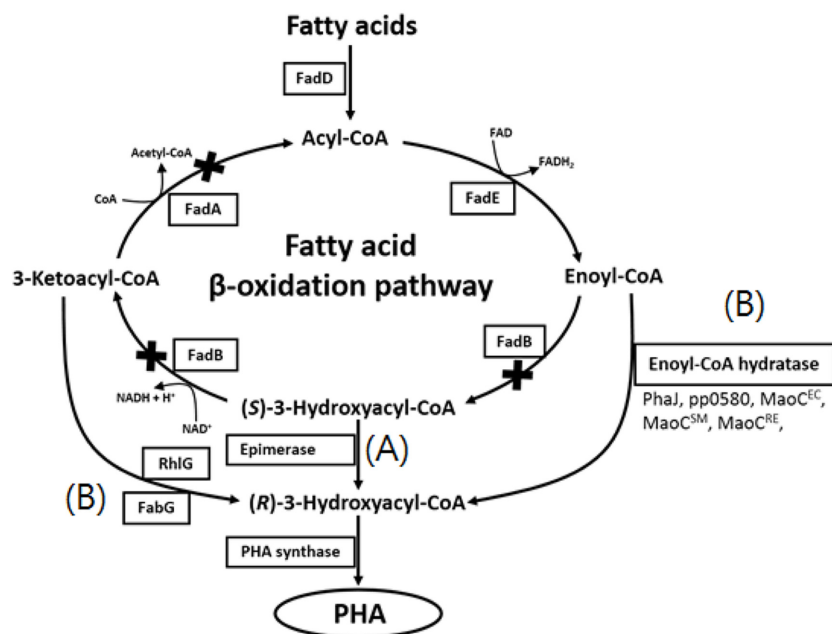


Fig. 2. Metabolic pathways for MCL-PHA biosynthesis in recombinant *E. coli* strain through fatty acid  $\beta$ -oxidation pathway. Enoyl-CoA hydratase, epimerase and 3-ketoacyl-CoA or ACP reductase have been employed to supply PHA precursors. Characters in parenthesis represent: A, enzymes that have not been elucidated in *E. coli*; B, amplified enzymes to supply PHA precursors in active  $\beta$ -oxidation pathway - FabG [7-9], RhIG [9], PhaJ [10,11] and MaoC [13-15, this study]; X, enzymes that have been inactivated to supply PHA precursors from fatty acid [4-6,12,13].

있다 [7-11,13]. 따라서, 본 실험에서  $\beta$ -oxidation pathway의 enoyl-CoA를 R3HA-CoA로 전환하기 위해서는 MaoC의 플라스미드를 통한 발현이 필수적이기 때문에 p10499A 벡터에 MaoC 유전자를 클로닝하여,  $\beta$ -oxidation pathway를 통해 PHA를 합성할 수 있는 재조합 대장균을 제작하였다.

### 3.2. Production of PHA in recombinant *E. coli* strains harboring the PHA synthase gene and the *maoC* gene

MaoC를 이용한 PHA 합성대사회로 구축을 확인하기 위하여, pMCS104613C2와 MaoC 유전자를 발현하는 p10499A 기반 플라스미드를 이용하여 *E. coli* W3110을 형질전환하여 세 종류의 재조합 대장균을 제작하였다. 제작된 재조합 대장균을

**Table 3.** Results of flask cultures of recombinant *E. coli* W3110 strains harboring pMCS104613C2 and a p10499A derivative containing different *maoC* genes<sup>a</sup>

Condition	DCW (g/L)	PHA conc. (g/L)	PHA content (wt%)	Monomer composition (mol%)			
				3HB	3HHx	3HO	3HD
pMCS104613C2 + p10499P0580	1.03±0.01	0.19±0.01	18.7±0.03	2±2	8±2	39±2	51±2
pMCS104613C2 + p10499SmMaoC	1.45±0.01	0.1±0.01	6.9±0.7	0	12±2	50±2	38±2
pMCS104613C2 + p10499ReMaoC	1.56±0.01	0.05±0.01	3.2±0.7	0	22±2	47±2	31±2

<sup>a</sup>Cells were cultivated for 96 h at 30°C in LB medium supplemented with 2 g l<sup>-1</sup> of sodium decanoate. Cultures were carried out in triplicates. Abbreviation: 3HB, (*R*)-3-hydroxybutyric acid; 3HHx, (*R*)-3-hydroxyhexanoic acid; 3HO, (*R*)-3-hydroxyoctanoic acid; 3HD, (*R*)-3-hydroxydecanoic acid

2 g/L의 sodium decanoate 가 함유된 LB medium에서 30°C에서 96시간 동안 배양하였다(Table 3). *P. putida*, *S. meliloti*, *R. eutropha*의 MaoC효소와 PHA synthase를 발현하는 재조합 대장균들은 모두 PHA를 배지에 첨가된 2 g/L의 sodium decanoate으로부터 합성하였으며, 합성된 PHA의 모노머는 3-hydroxybutyrate (3HB), 3-hydroxyhexanoate (3HHx), 3-hydroxyoctanoate (3HO), 3-hydroxydecanoate (3HD)이었다. PHA의 모노머 조성은 MaoC 종류에 따라 달랐으며, *P. putida* MaoC가 이용되었을 때, 3HD 모노머의 고분자 내의 비율이 50 mol%에 달했고, *S. meliloti*와 *R. eutropha*의 MaoC 효소를 적용하였을 때에는 3HO의 몰분율이 제일 높았다 (Table 3). 이는 같은 조건에서 *E. coli* MaoC를 이용했을 때 고분자 내의 몰분율이 3HO가 74 mol%로 제일 높았고, 3HD의 몰분율이 7 mol%였던 예전 결과와 비교해도, 고분자 생산에 적용되는 MaoC의 기질특이성에 따라 생성된 고분자의 몰분율이 상이해질 수 있음을 의미한다. 생성된 고분자의 PHA content는 *P. putida* MaoC가 적용되었을 때 18.7 wt%로 제일 높았고, *R. eutropha* MaoC가 이용되었을 때에는 3.2 wt%로 제일 낮았다.

#### 4. CONCLUSION

본 연구진은 *P. putida*, *S. meliloti*, *R. eutropha*의 MaoC 효소를 클로닝하여  $\beta$ -oxidation pathway의 enoyl-CoA를 R3HA-CoA로 전환하는 대사회로를 제작하였고, 이를 이용하여 지방산으로부터 PHA를 합성하는 재조합 대장균 시스템을 개발하였다. 본 연구진이 개발한 MaoC를 이용한 PHA 생산시스템을 활용한다면, 다양한 모노머 조성을 지닌 MCL-PHA를 지방산으로부터 효율적으로 생산할 수 있어, 다양한 물성을 지닌 MCL-PHA를 합성할 수 있을 것으로 기대된다.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

본 연구는 한국연구재단을 통한 미래창조과학부 기후변화 대응 바이오피라이너리를 위한 시스템대사공학 원천기술개발사업 (NRF-2012-C1AAA001-2012M1A2A2026556)과 교육부 일반연구자사업 연구비 (NRF-2013R1A1A2058379)의 지원

으로 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

#### REFERENCES

- Lee, S. Y. (1996) Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnol. Bioeng.* 49: 1-14.
- Madison, L. L. and G. W. Huisman (1999) Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 21-53.
- Steinbüchel, A. and H. E. Valentin (1995) Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acid. *FEMS Microbiol. Lett.* 128: 219-228.
- Qi, Q., B. H. A. Rehm, and A. Steinbüchel (1997) Synthesis of poly(3-hydroxyalkanoates) in *Escherichia coli* expressing the PHA synthase gene *phaC2* from *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of *PhaC1* and *PhaC2*. *FEMS Microbiol. Lett.* 157: 155-162.
- Langenbach, S., B. H. A. Rehm, and A. Steinbüchel (1997) Functional expression of the PHA synthase gene *phaC1* from *Pseudomonas aeruginosa* in *Escherichia coli* results in poly(3-hydroxyalkanoate) synthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* 150: 303-309.
- Qi, Q., A. Steinbüchel, and B. H. A. Rehm (1998) Metabolic routing towards polyhydroxyalkanoic acid synthesis in recombinant *Escherichia coli* (*fadR*): inhibition of fatty acid beta-oxidation by acrylic acid. *FEMS Microbiol. Lett.* 167: 89-94.
- Ren, Q., N. Sierro, B. Witholt, and B. Kessler (2000) FabG, an NADPH-dependent 3-ketoacyl reductase of *Pseudomonas aeruginosa*, provides precursors for medium-chain-length poly-3-hydroxyalkanoate biosynthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 182: 2978-2981.
- Taguchi, K., Y. Aoyagi, H. Matsusaki, T. Fukui, and Y. Doi (1999) Co-expression of 3-ketoacyl-ACP reductase and polyhydroxyalkanoate synthase genes induces PHA production in *Escherichia coli* HB101 strain. *FEMS Microbiol. Lett.* 176: 183-190.
- Park, S. J., J. P. Park, and S. Y. Lee (2002) Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates rich in specific monomers. *FEMS Microbiol. Lett.* 214: 217-222.
- Tsuge, T., T. Fukui, H. Matsusaki, S. Taguchi, G. Kobayashi, A. Ishizaki, and Y. Doi (2000) Molecular cloning of two (*R*)-specific enoyl-CoA hydratase genes from *Pseudomonas aeruginosa* and their use for polyhydroxyalkanoate synthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* 184: 193-198.
- Tsuge, T., K. Taguchi, S. Taguchi, and Y. Doi (2003) Molecular characterization and properties of (*R*)-specific enoyl-CoA hydrata-

- ses from *Pseudomonas aeruginosa*: metabolic tools for synthesis of polyhydroxyalkanoates via fatty acid  $\beta$ -oxidation. *Int. J. Biol. Macromol.* 31: 195-205.
12. Snell, K. D., F. Feng, L. Zhong, D. Martin, and L. L. Madison (2002) YfcX enables medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoate) formation from fatty acids in recombinant *Escherichia coli fadB* strains. *J. Bacteriol.* 184: 5696-5705.
  13. Park, S. J. and Lee, S. Y. (2003) Identification and characterization of a new enoyl-coA hydratase involved in the biosynthesis of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates in recombinant *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 185: 5391-5397.
  14. Wang, Q., R. C. Tappel, C. Zhu., and C. T. Nomura. (2012) Development of a new strategy for production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by recombinant *Escherichia coli* via inexpensive non-fatty acid feedstocks. *Appl. Environ. Microbiol.* 78: 519-527.
  15. Sato, S., H. Kanazawa., and T. Tsuge (2011) Expression and characterization of (R)-specific enoyl coenzyme A hydratases making a channeling route to polyhydroxyalkanoate biosynthesis in *Pseudomonas putida*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90: 951-959.
  16. Braunegg, G., B. Sonnleitner, and R. M. Lafferty (1978) A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid in microbial biomass. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 6: 29-37.
  17. Choi, J., S. Y. Lee, K. Shin, W. G. Lee, S. J. Park, H. N. Chang, and Y. K. Chang (2002) Pilot scale production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 7: 371-374.