



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0142057
(43) 공개일자 2016년12월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/70 (2006.01) C12P 7/06 (2006.01)
C12P 7/46 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/70 (2013.01)
C12P 7/06 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0077917
(22) 출원일자 2015년06월02일
심사청구일자 2015년06월02일

(71) 출원인
인하대학교 산학협력단
인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동)
(72) 발명자
노용호
인천광역시 연수구 앵고개로205번길 41, 207동 105호 (동춘동, 하나아파트)
윤현식
인천광역시 남구 인하로 100 (용현동) 인하대학교 (뒷면에 계속)
(74) 대리인
김순웅

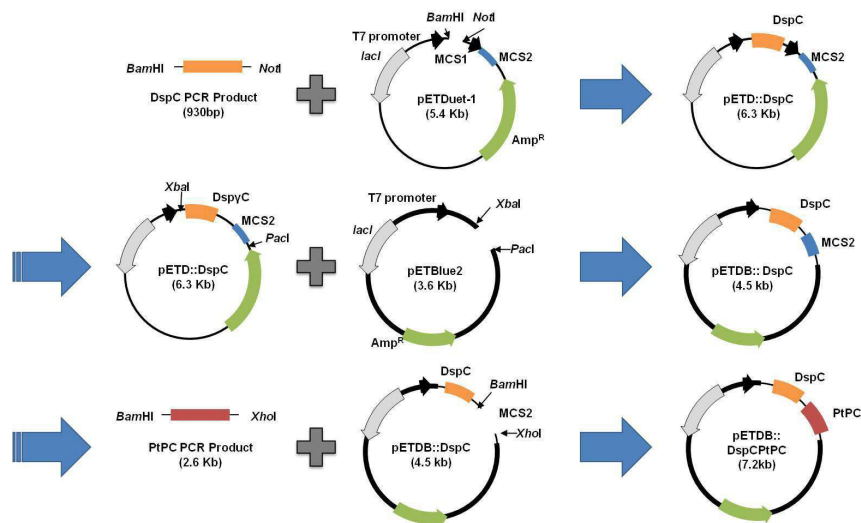
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 유기산을 생산하는 신규한 재조합 미생물 및 이를 이용한 유기산의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 본 발명은 유기산을 생산하는 신규한 재조합 미생물 및 이를 이용한 유기산의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 본 발명의 재조합 미생물은 숙신산 및 알코올과 같은 유기산 생산능이 우수하여, 미생물을 이용한 대사공학 등에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12P 7/46 (2013.01)
C12Y 101/01027 (2013.01)
C12Y 102/04001 (2013.01)
C12Y 401/01031 (2013.01)
C12Y 402/01001 (2013.01)

(72) 발명자

김세경

인천광역시 남동구 만수로111번길 38, 6동 1005호
 (만수동, 신동아아파트)

정수연

서울특별시 영등포구 선유로42길 6, 101동 703호
 (양평동3가, 삼익플라주아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2010-0020501

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 해양극지기초원천기술개발사업

연구과제명 해양 유래 개량 CA 및 PEPCase을 통한 in vitro/vivo 기반 생물전환 시스템 연구

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2014.06.23 ~ 2015.06.22

명세서

청구범위

청구항 1

탄산 무수화 효소(carbonic anhydrase)를 코딩하는 *ca* 유전자 및 포스포에놀피루브산 카르복실아제(phosphoenolpyruvate carboxylase)를 코딩하는 *ppc* 유전자가 도입되고; 젖산 탈수소화효소(lactate dehydrogenase)를 코딩하는 *ldhA* 유전자, 피루브산 포름산 분해효소(pyruvate formate lyase)를 코딩하는 *pf1B* 유전자 및 포스포트랜스페라아제 시스템 글루코오스 수송체(glucose-specific transporter of the phosphotransferase system)를 코딩하는 *ptsG* 유전자가 결실된, 유기산을 생산하는 재조합 신규 미생물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 미생물은 수탁번호 KCTC18378P로 기탁된 것을 특징으로 하는 재조합 신규 미생물.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 미생물은 대장균인 것을 특징으로 하는 재조합 신규 미생물.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 유기산은 숙신산 및 에탄올인 것을 특징으로 하는 재조합 신규 미생물.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 탄산 무수화 효소를 코딩하는 *ca* 유전자는 두날리엘라(*Dunaliella* sp.)로부터 유래되고, 서열번호 1의 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 재조합 신규 미생물.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 포스포에놀피루브산 카르복실라제를 코딩하는 *ppc* 유전자는 파이오텍틸룸 트리코뉴툼(*Phaeodactylum tricornutum*)로부터 유래되고, 서열번호 2의 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 재조합 재조합 신규 미생물.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 *ldhA* 유전자는 서열번호 6의 염기서열로 이루어지는 올리고뉴클레오티드 프라이머 및 서열번호 7의 염기서열로 이루어지는 올리고뉴클레오티드 프라이머를 이용하여 유전자 제거되는 것을 특징으로 하는 재조합 신규 미생물.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 *pf1B* 유전자는 서열번호 8의 염기서열로 이루어지는 올리고뉴클레오티드 프라이머 및 서열번호 9의 염기서열로 이루어지는 올리고뉴클레오티드 프라이머를 이용하여 유전자 제거되는 것을 특징으로 하는 재조합 신규 미생물.

청구항 9

제 1 항에 있어서, 상기 *ptsG* 유전자는 서열번호 10의 염기서열로 이루어지는 올리고뉴클레오티드 프라이머 및 서열번호 11의 염기서열로 이루어지는 올리고뉴클레오티드 프라이머를 이용하여 유전자 제거되는 것을 특징으로 하는 재조합 신규 미생물.

청구항 10

다음 단계를 포함하는 유기산의 생산 방법:

(a) 제 1 항의 재조합 신규 미생물을 성장 정체기까지 호기 배양하는 단계;

(b) 상기 (a) 단계의 배양균주를 혐기성 조건에서 이소프로필 티오- β -D 갈락토사이드 및 글루코오스를 처리하는 단계; 및

(c) 상기 (b) 단계의 균주에 이산화탄소를 처리하여 혐기 발효시키는 단계.

청구항 11

제 10 항에 있어서, 상기 (a) 단계의 미생물은 수탁번호 KCTC18378P로 기탁된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제 10 항에 있어서, 상기 (a) 단계의 미생물은 대장균인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제 10 항에 있어서, 상기 유기산은 숙신산 및 알코올인 것을 특징으로 하는 유기산의 생산 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 유기산을 생산하는 신규한 제조합 미생물 및 이를 이용한 유기산의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 해양에 서식하는 미세조류는 광합성을 하기 위해, 이산화탄소를 고정화(fixation)하는 탄소고정기작(CCM, carbon concentration mechanism)을 지니며, 광범위한 이산화탄소 농도에 적응할 수 있게 생리학적, 형태학적으로 진화하였다.

[0003] 현재까지 해양 미세조류의 CCM 기작 중에서 탄산 무수화 효소(carbonic anhydrase, CA)에 대한 연구는 많이 알려지지 않았으며, 초기 연구단계에서 높은 염도에 대한 생리적 적응에 따른 독특한 CA가 보고되었다. 2000년 이후에 밝혀진 CA의 종류는 현재까지 총 5개의 종류가 있으며, 각각 α -CA, β -CA, γ -CA, δ -CA, ζ -CA로 분류하며(Hewett-Emmett D and Tashian R. E, 1996, Trip *et al.*, 2001), 각 그룹 간에는 단백질의 일차 구조의 유사성이 전혀 없기 때문에 서로 다른 경로를 통해서 진화한 것으로 여겨지고 있다. CA는 막에 위치하여 미생물 외부에 존재하는 이산화탄소를 생체 내부로 도입하는 역할을 하며, 이때 생산되는 탄산(carbonic acid)은 주변 환경에 의하여 중탄산염(bicarbonate) 이온이나 탄산염 이온으로 전환된다.

[0004] 한편, 또 다른 효소인 포스포에놀피루브산 카르복실라제(phosphoenolpyruvate carboxylase, PEP carboxylase)는 미생물의 해당(glycolysis) 과정에서 핵심적인 역할을 하는 중간물질을 생성하는 효소이다. 상기 효소의 기질인 대장균의 PEP(phosphoenolpyruvate)는 혐기적인 조건에서 젖산염(lactate), 포름산염(formate), 아세테이트(acetate) 및 에탄올로 전환된다. 그리고 상기 반응과 함께 피루브산 카르복실라제(pyruvate carboxylase, PYC)에 의하여 옥살아세테이트(oxaloacetate)가 만들어진다. 포스포에놀피루브산 카르복실라제는 효소 반응에서 기질로서 PEP를 사용하여 물과 이산화탄소를 이용하여 4탄소 물질인 옥살레이트(oxaloacetate)를 생산한다. 상기 옥살레이트는 대사과정을 거쳐 숙신산 염 등으로 전환된다.

[0005] 세포 내외에서 무기탄소인 중탄산염(HCO_3^-)과 CO_2 의 상호 전환을 촉매하는 효소인 탄산 무수화 효소(carbonic anhydrase)는 이산화탄소 고정화에 중요 기능을 담당하고, 미생물 내 C4 물질 생산을 이끄는 포스포에놀피루브산 카르복실라제(phosphoenolpyruvate carboxylase)는 중탄산염과 물 분자를 이용하여 TCA 회로의 옥살로아세테이트(oxaloacetate)로 전환하는 반응을 이끄는 대사를 촉진하여, 결과적으로 숙신산 생산을 촉진한다.

[0006] 한편, 숙신산 수율과 생산력을 증가시키기 위하여, 대장균(*E. coli*)의 혐기성 중심 물질대사 경로를 조작하려는 다양한 시도가 있어왔다(Bunch, et al. Microbiology 143:187-195(1997)/ Chatterjee, et al. Appl. Environ. Microbiol. 67(1):148-54(2001)). 생산 조건의 최적화와 함께 유전자 조작 역시 숙신산과 같은 유기산의 생산을 증가시키는 것으로 밝혀졌다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명자는 미세조류인 두날리엘라(*Dunaliella* sp.) 유래의 탄산 무수화 효소(carbonic anhydrase)를 코딩하는 *ca* 및 파이오텍틸룸 트리코뉴툼 CCMP 632(*Phaeodactylum tricornutum* CCMP 632) 유래의 포스포에놀피루브산 카르복실라제(phosphoenolpyruvate carboxylase)를 코딩하는 *ppc*를 포함하는 재조합 플라스미드를 제조하고; 이를 *ldhA*(fermentative D-lactate dehydrogenase), *pflB*(pyruvate formate lyase) 및 *ptsG*(fused glucose-specific PTS enzymes) 유전자를 결손시킨 대장균에 형질전환시킴으로써, 유기산 생산능이 우수한 재조합 미생물을 제조하여 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0008] 따라서, 본 발명의 목적은 유기산을 생산하는 재조합 신규 미생물을 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 재조합 미생물을 이용하여 유기산을 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0010] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 탄산 무수화 효소(carbonic anhydrase)를 코딩하는 *ca* 유전자 및 포스포에놀피루브산 카르복실라제(phosphoenolpyruvate carboxylase)를 코딩하는 *ppc* 유전자가 도입되고; 젖산 탈수소화효소(lactate dehydrogenase)를 코딩하는 *ldhA* 유전자, 피루브산 포름산 분해효소(pyruvate formate lyase)를 코딩하는 *pflB* 유전자 및 포스포트랜스페라아제 시스템 글루코오스 수송체(glucose-specific transporter of the phosphotransferase system)를 코딩하는 *ptsG* 유전자가 결실된, 유기산을 생산하는 재조합 신규 미생물을 제공한다.
- [0011] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 미생물은 수탁번호 KCTC18378P로 기탁된 것이다.
- [0012] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 유기산은 숙신산 및 에탄올이고, 가장 바람직하게는 숙신산이다.
- [0013] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 탄산 무수화 효소를 코딩하는 *ca* 유전자는 두날리엘라(*Dunaliella* sp.)로부터 유래되고, 서열번호 1의 염기서열을 갖는다.
- [0014] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 포스포에놀피루브산 카르복실라제를 코딩하는 *ppc* 유전자는 파이오텍틸룸 트리코뉴툼 (*Phaeodactylum tricornutum*)로부터 유래되고, 서열번호 2의 염기서열을 갖는다.
- [0015] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 *ldhA* 유전자는 대장균(*E. coli*)로부터 유래되고, 서열번호 3의 염기서열을 가지며, 서열번호 6의 염기서열로 이루어지는 올리고뉴클레오티드 프라이머 및 서열번호 7의 염기서열로 이루어지는 올리고뉴클레오티드 프라이머를 이용하여 제거된다.
- [0016] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 *pflB* 유전자는 대장균(*E. coli*)로부터 유래되고, 서열번호 4의 염기서열을 가지며, 서열번호 8의 염기서열로 이루어지는 올리고뉴클레오티드 프라이머 및 서열번호 9의 염기서열로 이루어지는 올리고뉴클레오티드 프라이머를 이용하여 제거된다.
- [0017] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 *ptsG* 유전자는 대장균(*E. coli*)로부터 유래되고, 서열번호 5의 염기서열을 가지며, 서열번호 10의 염기서열로 이루어지는 올리고뉴클레오티드 프라이머 및 서열번호 11의 염기서열로 이루어지는 올리고뉴클레오티드 프라이머를 이용하여 제거된다.
- [0018] 본 발명의 재조합 미생물은 탄산 무수화 효소를 발현하고, 상기 효소는 이산화탄소를 생물체 내부로 도입하는 역할을 하며, 이때 생산되는 탄산(carbonic acid)은 주변 환경에 의하여 중탄산염(bicarbonate) 이온이나 탄산염 이온으로 전환시킬 수 있다.
- [0019] 또한, 본 발명의 재조합 미생물은 포스포에놀피루브산 카르복실라제를 발현하고, 상기 효소는 PEP를 사용하여 물과 이산화탄소를 이용하여 4탄소 물질인 옥살로아세트산(oxaloacetate)을 생산한다. 상기 효소들은 이산화탄소를 고정하여 옥살레이트를 생산하며, 옥살로아세트산의 생산은 숙신산과 같은 유기산의 생산을 이끈다.
- [0020] 또한, 본 발명의 재조합 미생물은 혐기성 조건 하에 유기산 생산을 개선하기 위하여 3가지 이상의 대장균(*E. coli*)의 혐기성 중심 물질대사 경로가 불활성화된다. 상기 불활성화는 대장균 유래의 젖산 탈수소화효소(lactate dehydrogenase)를 코딩하는 *ldhA* 유전자; 피루브산 포름산 분해효소(pyruvate formate lyase)를 코딩

하는 *pf1B* 유전자; 및 포스포트랜스페라아제 시스템 글루코오스 수송체(glucose-specific transporter of the phosphotransferase system)를 코딩하는 *ptsG* 유전자;의 결실로 인한 유전자 발현 불활성화를 의미한다.

- [0021] 이렇게 하여 생산되는 유기산 조성은 *E. coli* BW25113과 비교하여 다른 경향성을 나타낸다.
- [0022] 본 발명의 재조합 미생물을 제조하기 위하여, 두날리엘라(*Dunaliella* sp.) 유래의 탄산 무수화 효소(carbonicanhydrase)를 코딩하는 *ca* 유전자 및 파이오텍틸룸 트리코뉴툼 CCMP 632(*P.tricornutum* CCMP 632) 유래의 포스포에놀피부르산 카르복실라제(phosphoenolpyruvate carboxylase)를 코딩하는 *ppc* 유전자를 PCR을 통하여 특정 프라이머를 통하여 증폭하였다.
- [0023] 이후, 두날리엘라 유래의 탄산 무수화 효소(carbonic anhydrase)를 코딩하는 *ca* 유전자를 pETDuet-1 플라스미드에 제한효소(*Bam*HI, *Not*I)를 이용하여 삽입시킨 재조합 플라스미드를 제작하였으며, 이를 pETD::DspC라고 명명하였다.
- [0024] 상기 pETD::DspC 재조합 플라스미드에 제한효소(*Xba*I, *Pac*I)를 이용하여 pETBlue2 플라스미드를 라이게이션한 재조합 플라스미드를 제작하였으며, 이를 pETDB::DspC라고 명명하였다.
- [0025] 상기 pETDB::DspC 재조합 플라스미드에 제한효소(*Bam*HI, *Xho*I)를 이용하여 파이오텍틸룸 트리코뉴툼 CCMP 632 유래의 포스포에놀피부르산 카르복실라제(phosphoenolpyruvate carboxylase)를 코딩하는 *ppc* 유전자를 삽입시킨 재조합 플라스미드를 제작하였으며, 이를 pETDB::DspCpTtPC라고 명명하였다.
- [0026] 즉, 확보한 유전자를 대장균에서 발현시키기 위하여 두 종류의 플라스미드 pETDuet-1, pETBlue2를 사용하였다. 두 개의 DspC와 PtPC 유전자를 동시에 발현할 수 있는 pETDuet-1의 multi cloning site를 포함하고, 높은 플라스미드 복제 능력을 지닌 pETBlue2의 일부를 포함한 플라스미드(pETDB::DspCpTtPC)를 개발하였다.
- [0027] 한편, *E.coli* BW25113은 당업계에 공지된 레드 리컴비나아제(Red recombinase)를 이용한 유전자 제거 방법을 사용하여 *ldhA*, *pf1B*, *ptsG*를 순차적으로 제거하였다. 세 가지 유전자를 제거한 대장균을 *E.coli* BWLPP로 명명하였다.
- [0028] 상기 재조합된 플라스미드들을 *E. coli* BWLPP에 형질전환하여, 재조합 미생물을 제작하였다.
- [0029] 상기 재조합 미생물의 염기서열을 분석한 결과, 상기 두날리엘라 유래의 *ca* 유전자는 γ -탄산 무수화 효소(carbonic anhydrase)를 코딩하는 γ -ca 유전자임을 확인하였고, 상기 염기서열을 서열번호 1에 나타내었다.
- [0030] 또한, 파이오텍틸룸 트리코뉴툼 CCMP 632 유래의 포스포에놀피부르산 카르복실라제(phosphoenolpyruvate carboxylase)를 코딩하는 *ppc* 유전자는 포스포에놀피부르산 카르복실라제(phosphoenolpyruvate carboxylase)를 코딩하는 유전자임을 확인하였고, 상기 염기서열을 서열번호 2에 나타내었다.
- [0031] 본 발명에서 미생물은 대장균이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0032] 본 발명의 재조합된 미생물을 *Escherichia coli* BWLPP/pETDB::DspCpTtPC로 명명하여, 2015년 04월 22일자로 한국생명공학연구원 생물자원센터 유전자은행(KCTC)에 기탁하였으며, KCTC18378P의 수탁번호를 부여받았다.
- [0033] 본 발명의 균주는 유기산 생산능이 우수하여, 미생물을 이용한 대사공학 등에 유용하게 사용될 수 있다.
- [0034] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 유기산의 생산 방법을 제공한다:
- [0035] (a) 상술한 수탁번호 KCTC18378P로 기탁된 재조합 신규 미생물을 성장 정체기까지 호기 배양하는 단계;
- [0036] (b) 상기 (a) 단계의 배양균주를 혐기성 조건에서 이소프로필 티오- β -D 갈락토사이드 및 글루코오스를 처리하는 단계; 및
- [0037] (c) 상기 (b) 단계의 균주에 이산화탄소를 처리하여 혐기 발효시키는 단계.
- [0038] 상기 ITPG는 형질전환된 유전자의 발현을 유도하기 위한 물질로서, 당업계에서 통상 사용하는 투여량을 처리할 수 있다. 또한, 상기 글루코오스는 이에 제한되지 않으나, 5~60g/l를 처리할 수 있고, 바람직하게는 10g/l를 처리할 수 있다.
- [0039] 본 발명의 방법은 상술한 균주를 이용하여 유기산을 생산하므로, 상술한 본 발명의 균주와 중복된 내용은 중복

된 내용의 기재에 의한 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.

발명의 효과

[0040] 본 발명의 재조합 미생물은 숙신산 및 알코올과 같은 유기산 생산능이 우수하여, 미생물을 이용한 대사공학 등에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0041] 도 1은 *Dunaliella* sp.의 탄산무수화 효소와 *Phaeodactylum tricornutum*의 포스포에놀피루브산 카르복실아제 효소를 대장균에서 발현하기 위한 플라스미드 제조 과정을 나타낸 도이다.

도 2는 대장균의 염색체에 존재하는 유전자 제거 과정을 나타낸 도이다.

도 3은 대장균의 염색체에 존재하는 유전자 제거 과정에서 사용하는 플라스미드의 종류와 구조에 관한 도이다.

도 4는 *E. coli* BW25113 및 *ldhA*, *pflB*, *ptsG* 유전자를 제거한 *E. coli* BWLPP, 탄산무수화 효소와 포스포에놀피루브산 카르복실아제 효소를 보유한 균주의 단백질 발현을 확인한 SDS-PAGE 결과를 보여준다.

(lane L: SDS-PAGE Standards, Broad Range, Bio-Rad, lane 1: *E. coli* BW25113, lane 2: *E. coli* BWLPP, lane 3: *E. coli* BW25113/DspCpPC, and lane 4: *E. coli* BWLPP/DspPtPC)

도 5는 본 발명의 *ldhA*, *pflB*, *ptsG*가 제거되고 *Dunaliella* sp.의 탄산무수화 효소와 *Phaeodactylum tricornutum*의 포스포에놀피루브산 카르복실아제 효소를 발현하는 형질전환체 대장균의 혐기상태의 발효 산물 대사과정을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0042] 이하, 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0043] 실시예 1: 탄산무수화 효소와 포스포에놀피루브산 카르복실아제 효소를 발현하는 유전자 염기서열을 포함하는 재조합 플라스미드 제조

[0044] 1-1. 중합효소 연쇄반응 (PCR)을 이용한 유전자 서열 증폭

[0045] 본 발명에 사용된 유전자 증폭은 표 1의 프라이머를 제작하여 사용하였다. 중합효소 연쇄반응의 조건은 변성온도 (denature temperature) 94°C에서 40초, 결합온도 (annealing temperature) 65°C 30초, 신장온도 (extension temperature) 72°C에서 70초 동안 반응을 하였으며 총 25회 반응을 수행하였다. 반응에 사용한 중합효소는 NEB (New England Biolabs Inc.) 제품을 사용하였다.

표 1

명명	발현 효소	유전자 출처	프라이머	제한효소
DspC	탄산무수화효소	<i>Dunaliella</i> sp.	5'-AAGGATCCGTTACAGTCGTCATTTCCGCATGC-3' 5'-AAGCGGCCGCTTACTTCTTAGCCCTTGTTG-3'	<i>Bam</i> HI, <i>Not</i> I
PtPC	포스포에놀피루브산 카르복실아제	<i>P. tricornutum</i>	5'-AAAGATCTCATGATTGACGCC GCCAGCAAG-3' 5'-AACTCGAGTCCACTGTTTCGC ATTCCTGA-3'	<i>Bgl</i> II, <i>Xho</i> I

[0047] 1-2. 재조합 플라스미드 제조 (pETDB:DspCpPC)

[0048] 상기 실시예 1-1에서 확보한 뉴클레오티드 단편을 이용해, 탄산무수화 효소와 포스포에놀피루브산 카르복실아제를 발현하는 플라스미드를 제조하였다. 두 유전자를 동시에 발현하기 위하여 도 1과 같은 과정을 거쳤다. 우선 제한 효소를 사용하여 multi-cloning site를 지닌 pETDuet-1와 DspC의 말단부위를 선택적으로 절단하고, 상기 뉴클레오티드와 플라스미드를 전기영동으로 확인하고 아가로스 겔 (agarose gel)에서 추출하여 4°C에서 라이게이션(ligation) 과정을 수행하였다. 완성된 pETD::DspC의 프로모터 부위와 multicloning site를 포함하는 부위를 제한 효소 *xbaI*, *PacI*으로 절단하고, pETBlue2를 같은 제한 효소로 절단하여 상기와 같은 확인 과정을 거쳐 라이게이션 과정을 수행하였다. 상기 과정을 거쳐 완성된 pETDB::DspC와 PtPC 뉴클레오티드 단편을 제한효소 *BamHI*과 *XhoI*을 사용해 절단하고 확인 작업과 함께 라이게이션 과정을 수행해 pETDB::DspCPtPC를 제조하였다. 이 플라스미드는 미세조류의 탄산무수화 효소와 포스포에놀피루브산 카르복실아제의 유전자 정보를 가지고 이중인 대장균에서 발현을 목적으로 제작되었다.

[0049] 실시예 2: 유기산 생산 효율 변화를 위해 Red recombinase를 이용한 유전자 제거 과정을 거친 *E. coli* BWLPP 제조

[0050] 대장균에서 유기산 생산에 관여하는 유전자 *ldhA*, *pflB*, *ptsG*를 제거하기 위하여 *E. coli* BW25113에서 염색체 특정 부위 제거용 재조합 벡터를 이용하였다. 유전자 제거 과정과 이용한 플라스미드는 도 2 및 3에 나타내었다. 유전자 제거를 위한 homology arm과 카나마이신 내성 유전자를 가지는 유전자 단편을 얻기 위하여 pKD13을 사용하여 중합효소 연쇄반응을 실행하였다. 정제한 유전자 제거 과정에서 사용한 primer는 다음 표 2와 같다.

표 2

제거 유전자	프라이머
<i>ldhA</i>	5'-GCTTAAATGTGATTCAACATCACTGGAGAAAGTCTTATGAAACTCGCCG GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC - 3' (서열번호 6) 5'-ATTGGGGATTATCTGAATCAGCTCCCCTGGAATGCAGGGGAGCGGCGAGA ATTCCGGGGATCCGTCGAC - 3' (서열번호 7)
<i>pflB</i>	5'-CGAAGTACGCAGTAAATAAAAAATCCACTTAAGAAGGTAGGTGTTACATG GTGTAGGCTGGAGCTGCTT - 3' (서열번호 8) 5'-CCCCACTTTCGTGGAGCCTTTATTGTACGCTTTTACTGTACGATTTCAG ATTCCGGGGATCCGTCGAC - 3' (서열번호 9)
<i>ptsG</i>	5'-GCGTGAGAACGTAAAAAAGCACCCATACTCAGGAGCACTCTCAATTATG GTGTAGGCTGAGCTGCTTC - 3' (서열번호 10) 5'-AAAAAGGCAGCATCTGGCTGCCTTAGTCTCCCAACGTCTTACGGATTA ATTCCGGGGATCCGTCGAC - 3' (서열번호 11)

[0052] 프라이머의 밑줄 친 부분은 도 3에서 *E. coli*에서 제거할 유전자의 포함하는 말단 부위와 같은 염기서열을 지닌 부분을 표시한 것이다. 이 부분을 포함한 PCR product (pKD13을 이용해 만든 PCR 단편)의 말단에 위치하게 되고, Red recombinase의 도움을 받아 chromosome과 같은 염기서열 부분이 교차된다.

[0053] 확보한 유전자 단편은 아가로스 겔에서 전기영동 후 정제과정을 실행하였다. 유전자 제거에 필요한 Red recombinase 정보를 보유한 pKD46을 가지는 *E. coli* BW25113을 arabinose가 들어간 LB에 접종하여 OD_{600 nm} 0.6까지 배양한 후에 전기천공법 (electroporation)을 위한 준비를 실행하였다. 전기천공법은 Bio-Rad사의 MicroPulser 제품의 실험 방법을 준수하였다. 전기천공법 실행 후, SOB 배지에서 한 시간 배양하고 카나마이신을 첨가한 LB배지에 도말하였다.

[0054] 상기 도말한 배지에서 자란 콜로니는 콜로니 중합효소 연쇄반응 (colony PCR)을 이용해 대장균 내에 유전자 치환과 카나마이신 내성 유전자의 존재를 확인하였다. 유전자가 제거된 상태의 균주에서는 카나마이신 내성 유전자가 대장균의 염색체에 계속 존재하게 되는데, 이때 저항 유전자의 양 말단에 FRT 염기서열이 존재한다. 이 염기서열을 인지하여 유전자 재조합 과정에 FLP recombinase를 일으키는 효소 정보를 보유한 플라스미드, pCP20을 상기 유전자 제거 대장균에서 발현시켰다. 이 과정을 거쳐 FLP recombinase를 발현시켜 카나마이신 내성 유전자를 제거하였다.

[0055] 상기 방법으로 *ldh*, *pfl*, *pts* 유전자를 순차적으로 제거하여 *E. coli* BWLPP를 개발하였다.

[0056] 실시예 3: 재조합 플라스미드에 의한 형질전환 재조합 대장균 제조

[0057] 상기 실시예 1-2에서 확보한 재조합 플라스미드 pETDB::DspCpTPC를 이중 생물인 *E. coli* BW25113과 *E. coli* BWLPP에 삽입하기 전에 상기 플라스미드의 안정성과 숙주 균주로의 형질 전환시 효율 향상을 위해 컴피턴트 세포 (competent cell)로 제조하였다. 컴피턴트 세포는 하기와 같은 과정을 거쳤다. 37°C LB에서 배양한 *E. coli* BW25113과 *E. coli* BWLPP를 0.8~1.0 OD_{600 nm}의 지수기에서 회수하여, 충분히 0°C에서 차게 한 후 원심분리를 이용해 상등액을 제거하였다. MgCl₂ 용액을 0°C에서 1시간 동안 처리해 세포벽으로 플라스미드 이동이 용이하게 하고 원심분리로 상등액을 제거해 상기 과정을 1회 더 반복하였다.

[0058] 상기 과정을 거쳐 준비한 컴피턴트 세포를 100 µl 분주하고 실시예 1-2에서 제조한 플라스미드를 넣어 열충격 형질전환 방법을 수행하였다. 상기 열충격 형질전환 방법을 실시한 샘플을 37°C에서 1시간 동안 배양해 형질전환 과정을 거친 세포의 정상 생장을 유도하였다. 이 세포들을 암피실린이 포함된 LB 배지에 도말하여 고체 배지에서 원형 콜로니로 성장하는 것을 확인하였다. 상기 형질전환 균주에서 플라스미드를 추출하여 염기서열 분석을 의뢰한 결과 *Dunaliella* sp.의 탄산무수화 효소의 유전자 *P. tricornutum*의 포스포에놀피루브산 카르복실아제 효소 유전자의 염기서열과 일치함을 확인하였다. 상기 제조한 재조합 균주를 *E. coli* BWLPP/pETDB::DspCpTPC로 명명하였다.

[0059] 실험예 1. 재조합 대장균의 단백질 확인

[0060] 실시예 3에서 제조한 미생물 *E. coli* BWLPP/pETDB::DspCpTPC의 단백질 발현을 확인하기 위하여 37°C의 LB배지에서 배양을 하였다. 0.8~1.0 OD_{600 nm}에서 플라스미드의 유전자 발현을 위한 이소프로필 티오-β-D 갈락토사이드 (isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside, IPTG)를 첨가하고, 입체구조를 이루도록 8시간 동안 배양하였다. 생성된 단백질의 분리를 위하여 원심분리한 후 PBS 완충용액으로 현탁상태로 만들었다. 이 후, 2분동안 초음파 처리하고 1분 동안 정지를 하는 과정을 총 3회 반복하고 SDS-PAGE를 실시하였다. SDS-PAGE에 사용된 겔은 7% 분리 겔 (resolving gel)과 5% 적층 겔 (stacking gel)로 이루어졌다. 상기 SDS-PAGE 결과는 도 4에 나타내었다. 도 4에 나타난 것과 같이 *E. coli* BWLPP/pETDB::DspCpTPC에서 탄산무수화 효소와 포스포에놀피루브산 카르복실아제의 단백질 크기와 일치하는 단백질 밴드 (band)가 존재하는 것을 알 수 있었다.

[0061] 실험예 2. 재조합 대장균의 유기산 생산

[0062] 실시예 3에서 개발한 재조합 미생물 *E. coli* BWLPP/pETDB::DspCpTPC의 유기산 생산 변화를 살펴보기 위하여 상변화발효 (phase transition fermentation) 방법을 수행하였다. 5 L 크기의 발효기에 2 L의 LB 배지를 준비하여 균주를 배양하였고, 플라스미드 보유 균주들은 항생제 암피실린을 첨가하였다. 37°C, pH6.5를 유지하면서 분당 200 rpm으로 임펠러 (impeller)를 회전시켰다. pH 유지를 위해인산 (phosphoric acid)와 암모니아 용액을 사용하였다. 호기 배양을 진행하여 균이 정체기에 이르렀을 때, 유전자 발현을 위한 이소프로필 티오-β-D 갈락토사이드 및 10 g/L의 포도당 용액을 첨가하였다. 두 용액을 첨가하고 이산화탄소 공급은 질량유량계 (Mass flow controller)를 이용해 95% 질소와 5% 이산화탄소를 공급해 혐기 상태로 유지하였다.

[0063] 배양액의 포도당이 모두 소비되고 배양액을 1 mL 채취하여 원심분리와 필터처리를 하였다. 포도당 분석과 유기산 분석은 고속(능)액체크로마토그래피를 이용하였다. 고속(능)액체크로마토그래피 분석은 이동상으로 5 mM 황산용액을 사용하였다. 분석을 위한 탐지기는 RI 검출기를 이용하였다. 사용한 컬럼은 Aminex HPX-87H (Bio-Rad)이다. 분석 결과는 배양을 2회 진행하여 생산되는 유기산을 분석해 사용한 포도당 몰농도에서 생산된 유기산 몰농도 비율 (mol product/mol glucose)의 평균 값을 표 3에 나타내었다.

표 3

균주	숙신산	젖산	개미산	에탄올
<i>E. coli</i> BW25113	0.03	0.23	0.04	0.61

<i>E. coli</i> BWLPP	0.32	0.00	0.00	0.97
<i>E. coli</i> BWLPP/DspPtPC	0.37	0.00	0.00	0.78
<i>E. coli</i> BWLPP/DspPtPC 질소 공급	0.20	0.00	0.00	0.90

[0065] 표 3의 결과와 같이 대조군인 *E. coli* BW25113과 비교하여 유기산의 생산 경향에 차이가 나타났다. 유전자 제거가 된 균주들은 젖산과 개미산 생산이 이루어지지 않고 숙신산 생산의 효율성이 현저히 증가하는 것을 확인하였다. 또한 포도당 용액에서 숙신산 생산을 위해 배양기에 이산화탄소를 공급하는 것이 탄산무수화효소와 포스포에놀피루브산 카르복실아제에 의한 숙신산 생산 효율 증가를 이끄는 것을 확인하였다. 보다 구체적으로 세 유전자가 제거되고 탄산무수화효소와 포스포에놀피루브산 카르복실아제를 발현하는 재조합 대장균의 숙신산 생산 효율은 *E. coli* BW25113의 숙신산 생산 효율보다 12.3배 증가함을 확인하였다.

[0066] 따라서, 본 발명의 재조합 미생물 (*E. coli* BWLPP/DspPtPC)을 이용하여 변화한 유기산 조성을 이용하여 숙신산 생산에 유리한 균주를 개발하였음을 확인하였다. 본 발명으로 개발된 재조합 대장균의 유기산 생산 과정은 [도 5]와 같이 변화 하였다.

수탁번호

[0067]

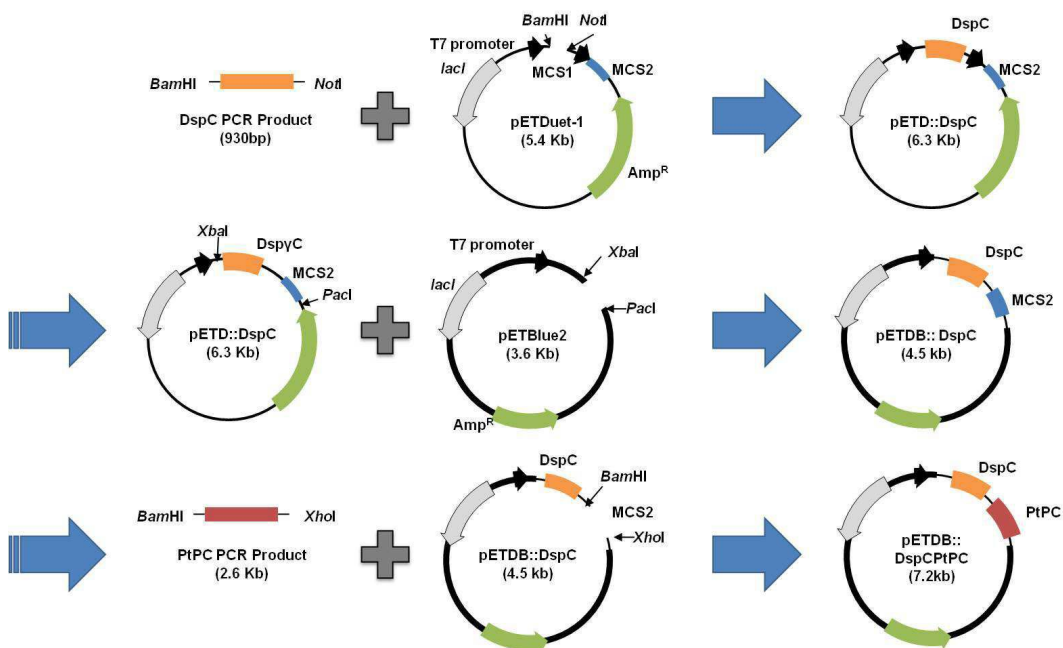
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC18378P

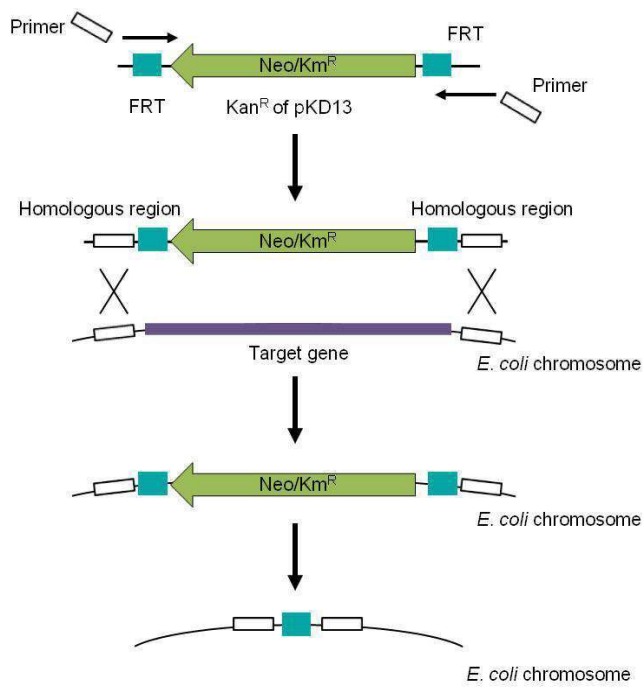
수탁일자 : 20150422

도면

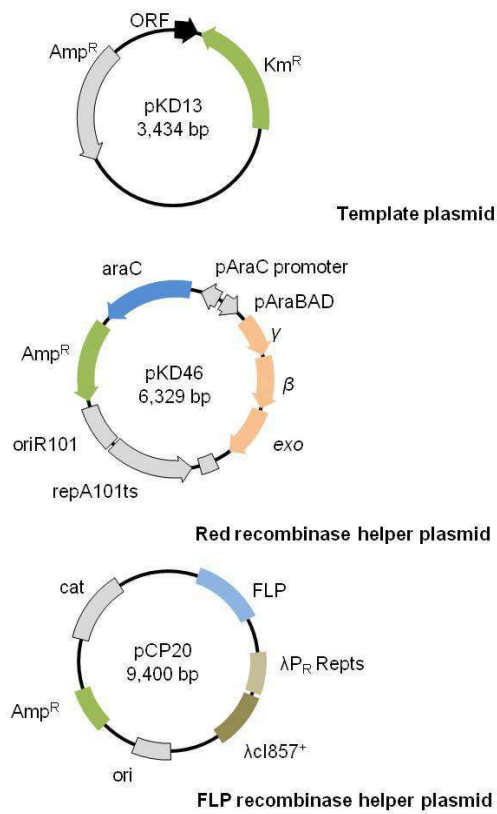
도면1



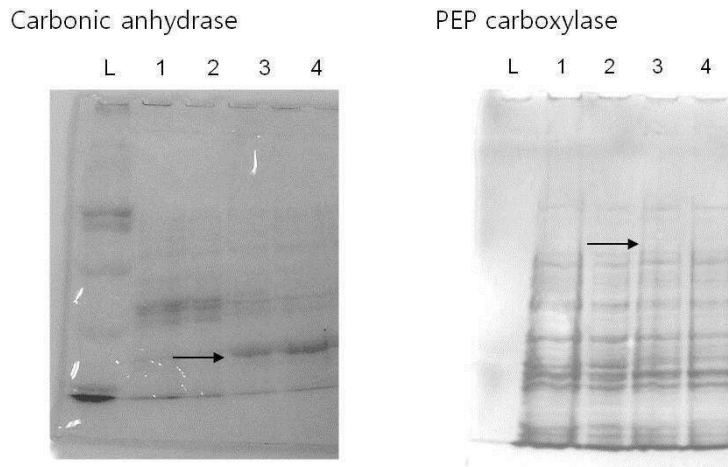
도면2



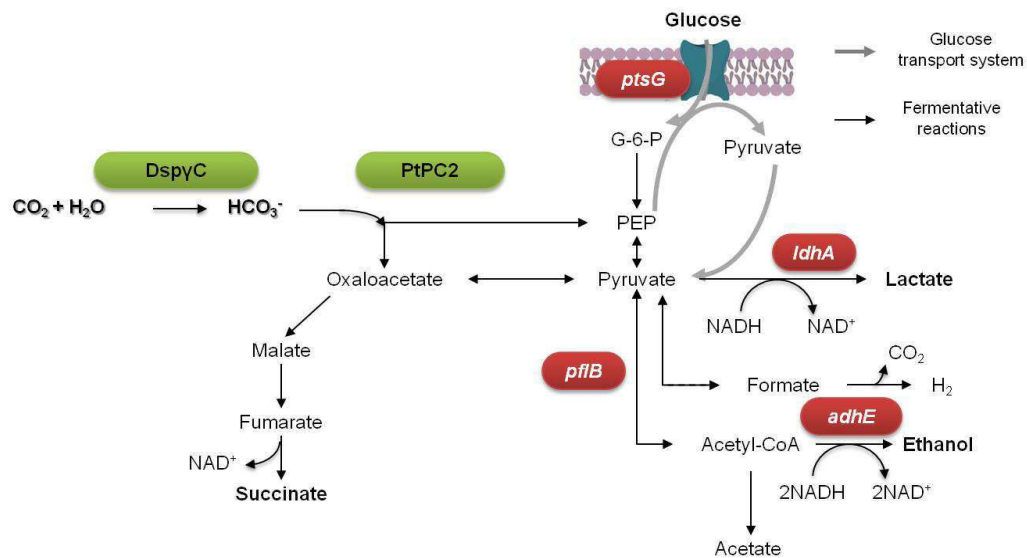
도면3



도면4



도면5



서열 목록

- <110> INHA-INDUSTRY PARTNERSHIP INSTITUTE
- <120> Novel Recombinant Microorganism Producing Organic Acid, And
Method for Producing Organic Acid Using the Same
- <130> P1-159
- <160> 11
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 930
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> it is DNA sequence coding carbonic anhydrase of Dunaliella sp

<400> 1

atgttacagt cgtcatttcg ccatgcgggg tggagtttcc ctttccgcca cccccctgca	60
tccggagccc ttgagaagac cctggctggt gtaggctcct tgttccgtgt gctgggctct	120
gctattgatg gctttggagc cacgctgcaa gggcctggag cgttgagaga acaagttcag	180
cccaatctgg cctgggcccc caccaagctg gatgagcgct gcccgcctc gcgcggccag	240
gtggtgaacc tgccatccat ggccgcatg ccgtctttga agcatgttgt gttgccgctc	300
aaggcgaca acgtctttat cgctcccaat gccaatgtga tgggtgacgt gaagattggc	360
gccaaactct ccatctgcta tggagccgta ttgagagggt acgtgaacag cattgaagta	420
ggcagcaaca ccaacattca ggacaacgcc atcatccacg tggccaagca cagcatcagt	480
ggcgatgcca agcccacaat cattggcaac aacgtgacaa ttgggcatgg agccactgtg	540
catgccgcca ccattgaaga caacgtgctc attgggatgg gggcgacagt gcttgatgga	600
tgcgtggtgg aggctggagc gattgtagca gcaggatcaa tggtaactcc agggaagaga	660
gtgcctcgag ggaggtctg ggacggcaac cccgcgcgt acctgaggga tgtggagcca	720
gaggagcacg gctttgtgga gtcaagtgcc tctaattatg ccgagctggc agacttgcac	780
aaattcgaga actcaaagac ctttgaggag ttgagcgcgg agcgagctat tgaggtcgac	840
cgctacgttg ccagtactc caccaatagc gtgcacaaaa tgtggatctt tgataagcag	900
accttgcttg caacaaggcc taagaagtaa	930

<210> 2

<211> 2634

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> it is DNA sequence coding phosphoenolpyruvate carboxylase of
P.tricornutum CCMP 632

<400> 2

atgattgacg ccgccagcaa gctcaccgag acggaagccc tgggcgtgac gcgcgtcttt	60
tccatcatgc tcaatctcgt caacgccgcc gaagtccagc accgcaaccg acagattcgg	120
gcacacgagt ccaccaagga cccctccggt ggccctctcc ccaaaacgga agattccatt	180
cgcggaacca tggagacgct gttggaatcg aaacaggcga caccggaaga aatatttgcc	240
cagctgcaga agcaaaaagt ggaaatcgtc ctgacggctc atccgactca agtcagcgc	300
aaatcgcttc tgcgcaagta ccgtcgcgtt tcggagatgc tcgcttattt ggagcgaccc	360
gatttgatg gttttgaaaa gtcgtccgcc caaacagct tgcaacaacat cttgagcagc	420

atttggggag ctgacgaaat tcgaagacaa aaaccgacac cacaacaaga ggccgcaggg	480
ggtaacgcaa tattggagtc ggttttgtgg gacgcggtgc cagcctatct gcgcaaattg	540
gatcaacagt gccgacttac cctggggcag tcgctgcccg tggacgtatg ccccatcaag	600
tttgcttcct ggatcgggtg ggatcgcat ggtaacccca acgtgacgcc cgaagttacc	660
cgcgaggttg ttctgcaaca acgattgcgg gctgctcgtt tgctttctca ggacatgtac	720
gatttgatct ccgaattggc aatttctagc cgcttttcgc ccgcatgga tgccttgga	780
gattccgtca aggactcgca gcataagcgt gaaaagtacc gtcgtgtgat tggacacttg	840
atcaaacgtc tcgtcaaaac ggcccgtgaa tgtgaattag aattgtcgaa actcaacacc	900
tcagctagta tggtcagtc gactctcgtt gaggaagcag tggatggttg gcaagacgtc	960
gatgctcttg acgatgcgac tgatttgatc aagcctttgc gcataatgta cgattcgttg	1020
gttgaacagg gcttcggttt ggtggccgac ggtttattgg tcgatatcat tcgtcgattg	1080
tatgtgtttg gtatgtccct cgtgcccttg gatattcgcg aggagagtac caagcacacg	1140
gaagcgtag atgccattac gcgttggttg ggaattggct cctatagtga atggaccgaa	1200
gaggctcgtc tcagctgggt gacttctgag ctttccaaca aacgtccctt gtaccgaatt	1260
cggaattgc ccaagctggg tttcaatgac agtgtcttga agacgctcaa cgtattcggc	1320
accatagcta ccctacgacc atcttgtttg ggagcctacg tcattagtca ggcgcagacc	1380
gcaagtgatg tcttggccgt catgcttttg caaaagcagt acggtatgac ggacaagaac	1440
agaaacatga tcgtgtggt tccgttggtt gagacctga atgacttgac caacgcgccc	1500
gacaaactcg aacagctctt cagtattccg ctttacgtcg gcgccgtcaa agggaaacag	1560
gaagtaatgg tcgggtatag tgacagtgcc aaggatgccg gacgtctggc tgcctgctgg	1620
gcgcagtaca actcgcaaga acgaatggtg aaggtagcgg cgaagcaca cattgaattg	1680
actttcttcc acggcaaagg gggtagcgtg ggacgtggcg gtaacccatc cgtctatcgt	1740
gccattatga gccatccgcc caataccatt aatggccgtt tccgggtgac ggaacagggt	1800
gaaatgataa cgcaaaactt tggagctccg tcattgctg aacgaacttt ggacatttac	1860
acggctggcg tatgtcgca agctttttct gagcgcgtgg aaccgtcgca agcatggcgc	1920
gaccagatgc aacggatctc cgatgtgagt tgtgccgagt accgccactt agtccgtgag	1980
gaaccgcggt ttgttccta ctttcgccag gcgacaccgg agttggaact cggaagtttg	2040
aacataggca gtcgtccggc caaacgtaac ccgaaaggcg gtattgaaag tctccgcgcg	2100
attccgtgga ctttgcttg gacgcagacg cgcacacact tatcggcgtg gctgggagtt	2160
ggcgtggtc tcacaacgac agatcaaagc gaattgaaga cgcttcgagc aatgtacatt	2220
gaatggcctt ggtttcgtga aactattgat ctaattgcca tgattgtatc caagacagac	2280

ttttccatat ccaaaaatta tgacgatcaa ctggtggaaa agaaagaagg ttgttgaag 2340

ctgggagacg aggtcaggga gaaaatgggtg caaactcgtc aagctgttct tgatgtgacc 2400

gagtctacgg atgttgcctgg ggctcacgtc gcccttatgc gaggtcgtc gaccattcgt 2460

catccatacg tcgatccggt caacgttatt caagccgaat tgctcaagcg attgcgagtc 2520

atggacaaga aaaagtctct gtcgcgggat gaaatggaag aacaagaaat tttaaaggat 2580

gccctgatta tcagtatcaa tggcatcgct cagggaatgc gaaacagtgg ataa 2634

<210> 3

<211> 990

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> It is DNA sequence coding lactate dehydrogenase of E. coli

<400> 3

atgaaactcg ccgtttatag cacaaaacag tacgacaaga agtacctgca acaggtgaac 60

gagtcctttg gctttgagct ggaatttttt gactttctgc tgacggaaaa aaccgctaaa 120

actgccaatg gctgcgaagc ggtatgtatt ttcgtaaacg atgacggcag cgcgccggtg 180

ctggaagagc taaaaagca cggcgtaaaa tatatcgccc tgcgctgtgc cgttttcaat 240

aacgtcgacc ttgacgcggc aaaagaactg gggctgaaag tagtccgtgt tccagcctat 300

gatccagagg ccgttgctga acacgccatc ggtatgatga tgacgtgaa cgcgcgtatt 360

caccgcgct atcagcgtac ccgtgatgct aacttctctc tggaaggtct gaccggcttt 420

actatgtatg gaaaacggc aggcgttatc ggtaccggtg aaatcggtgt ggcatgctg 480

cgcattctga aaggttttgg tatgcgtctg ctggcgcttc atccgtatcc aagtgcagcg 540

gcgctggaac tcggtgtgga gtatgtcgat ctgccaaccc tgttctctga atcagacgtt 600

atctctctgc actgcccgtc gacaccgga aactatcatc tgttgaacga agccgccttc 660

gaacagatga aaaaaggcgt gatgatcgtc aataccagtc gcggtgcatt gattgattct 720

caggcagcaa ttgaagcgtc gaaaaatcag aaaattgggt cgttgggtat ggacgtgtat 780

gagaacgaac gcgatctatt ctttgaagat aaatccaacg acgtgatcca ggatgacgta 840

ttccgtcgcc tgtctgcctg ccacaacgtg ctgtttaccg ggcaccaggc attcctgaca 900

gcagaagctc tgaccagtat ttctcagact acgctgcaaa acttaagcaa tctggaaaaa 960

ggcgaaacct gcccgaaacga actggtttta 990

<210> 4

<211> 2283

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> It is DNA sequence coding pyruvate formate lyase of E. coli

<400> 4

atgtccgagc ttaatgaaaa gttagccaca gcctgggaag gttttacaa aggtgactgg	60
cagaatgaag taaacgtccg tgacttcatt cagaaaaact acactccgta cgagggtgac	120
gagtccttcc tggctggcgc tactgaagcg accaccaccc tgtgggacaa agtaatggaa	180
ggcgttaaac tggaaaaccg cactcacgcg ccagttgact ttgacaccgc tgttgcttcc	240
accatcacct ctcacgacgc tggctacatc aacaagcagc ttgagaaaat cgttggtctg	300
cagactgaag ctccgctgaa acgtgctctt atcccgttcg gtggatcaa aatgatcgaa	360
ggttcctgca aagcgtacaa ccgcaactg gatccgatga tcaaaaaat cttcactgaa	420
taccgtaaaa ctcacaacca gggcgtgttc gacgtttaca ctccggacat cctgcgttgc	480
cgtaaatctg gtgttctgac cggctctgcca gatgcatatg gccgtggccg tatcatcggt	540
gactaccgtc gcgttgcgt gtacggatgc gactacctga tgaaagacaa actggcacag	600
ttcacttctc tgcaggctga tctggaaaac ggcgtaaacc tggaacagac tatccgtctg	660
cgcgaagaaa tcgctgaaca gcaccgcgt ctgggtcaga tgaaagaaat ggctgcgaaa	720
tacggctacg acatctctgg tccggctacc aacgctcagg aagctatcca gtggacttac	780
ttcggctacc tggctgctgt taagtctcag aacggtgctg caatgtcctt cggctcgtacc	840
tccaccttcc tggatgtgta catcgaacgt gacctgaaag ctggcaagat caccgaacaa	900
gaagcgcagg aaatggttga ccacctggtc atgaaactgc gtatggttcg cttcctgcgt	960
actccggaat acgatgaact gttctctggc gacccgatct gggcaaccga atctatcggt	1020
ggatggggc tcgacggctg taccctggtt accaaaaaca gcttccgttt cctgaacacc	1080
ctgtacacca tgggtccgtc tccggaaccg aacatgacca ttctgtggtc tgaaaaactg	1140
ccgtgaact tcaagaaatt cgccgctaaa gtgtccatcg acacctcttc tctgcagtat	1200
gagaacgatg acctgatcgc tccggacttc aacaacgatg actacgctat tgcttctgc	1260
glaagcccga tgatcgttgg taaacaaatg cagttcttcg gtgcgcgtgc aaacctggcg	1320
aaaaccatgc tgtacgcaat caacggcggc gttgacgaaa aactgaaaat gcaggttgg	1380
ccgaagtctg aaccgatcaa aggcgatgic ctgaactatg atgaagtgat ggagcgcgatg	1440
gatcacttca tggactggct ggctaaacag tacatcactg cactgaacat catccactac	1500
atgcacgaca agtacagcta cgaagcctct ctgatggcgc tgcacgaccg tgacgttatc	1560
cgcacatgg cgtgtgglat cgctggtctg tccgttctg ctgactccct gtctgcaatc	1620

aaatatgcga aagttaaacc gattcgtgac gaagacggtc tggctatcga cttcgaaatc	1680
gaaggcgaat acccgcagtt tggtaacaat gatccgcgtg tagatgacct ggctgttgac	1740
ctggtagaac gtttcatgaa gaaaattcag aaactgcaca cctaccgtga cgctatcccg	1800
actcagtctg ttctgacat cacttctaac gttgtgtatg gtaagaaaac gggtaacacc	1860
ccagacggtc gtcgtgctgg cgcccgcttc ggaccgggtg ctaacccgat gcacggtcgt	1920
gaccagaaag gtgcagtagc ctctctgact tccgttgcta aactgccgtt tgcttacgt	1980
aaagatggta tctcctacac cttctctatc gttccgaacg cactgggtaa agacgacgaa	2040
gttcgtaaga ccaacctggc tggctctgat gatggttact tccaccacga agcatccatc	2100
gaagggtggc agcacctgaa cgtaaacgtg atgaaccgtg aaatgctgct cgacgcgatg	2160
gaaaacccgg aaaaatatcc gcagctgacc atccgtgtat ctggctacgc agtacgtttc	2220
aactcgctga ctaaagaaca gcagcaggac gttattactc gtaccttcac tcaatctatg	2280
taa	2283
<210> 5	
<211> 1434	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> It is DNA sequence coding glucose-specific transporter of the phosphotransferase system of E. coli	
<400> 5	
atgtttaaga atgcatttgc taacctgcaa aaggctcggtg aatcgctgat gctgccggta	60
tccgtactgc ctatcgagg tattctgctg ggcgtcgggt ccgcgaattt cagctggctg	120
cccgcggttg tatcgcatgt tatggcagaa gcaggcgggt ccgtctttgc aaacatgcca	180
ctgatttttg cgatcgggtg cgccctcggc ttaccaata acgatggcgt atccgcgctg	240
gccgcagttg ttgcctatgg catcatggtt aaaacatgg ccgtggttgc gccactggta	300
ctgcatttac ctgctgaaga aatgcctctt aaacacctgg cggatactgg cgtactcgga	360
gggattatct ccggtgcgat cgcagcgtac atgtttaacc gtttctaccg tattaagctg	420
cctgagtatc ttggcttctt tgccggtaaa cgctttgtgc cgatcatttc tggcctggct	480
gccatcttta ctggcgttgt gctgtccttc atttggccgc cgattgggtc tgcaatccag	540
accttctctc agtgggctgc ttaccagaac ccggtagtgt cgtttggcat ttacggtttc	600
atcgaacgtt gcctgggtacc gtttgggtctg caccacatct ggaacgtacc tttccagatg	660
cagattgggtg aatacaccaa cgcagcaggt cagggtttcc acggcgacat tccgcgttat	720

atggcgggtg acccgactgc gggtaaactg tctggtggct tcctgttcaa aatgtacggt 780
ctgccagctg ccgcaattgc tatctggcac tctgctaaac cagaaaaccg cgcgaaagtg 840
ggcggattta tgatctccgc ggcgctgacc tcgttcctga ccggtatcac cgagccgac 900
gagttctcct tcatgttcgt tgcgccgac ctgtacatca tccacgcgat tctggcaggc 960

ctggcattcc caatctgtat tcttctgggg atgcgtgacg gtacgtcgtt ctgcacggt 1020
ctgatcgact tcatcgttct gtctggtaac agcagcaaac tgtggctgtt cccgatcgtc 1080
ggatcgggtt atgcgattgt ttactacacc atcttcgcg tgctgattaa agcactggat 1140
ctgaaaacgc cgggtcgtga agacgcgact gaagatgcaa aagcgacagg taccagcgaa 1200
atggcaccgg ctctggttgc tgcatttggg ggtaaagaaa acattactaa cctcgacgca 1260
tgtattacc gtctgcgcgt cagcgttgct gatgtgtcta aagtggatca ggccggcctg 1320
aagaaactgg gcgcagcggg cgtagtggtt gctggttctg gtgttcaggc gattttcgg 1380

actaaatccg ataacctgaa aaccgagatg gatgagtaca tccgtaacca ctaa 1434

<210> 6

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ldhA primer F

<400> 6

gcttaaatgt gattcaacat cactggagaa agtcttatga aactcgccgg tgtaggctgg 60

agctgcttc 69

<210> 7

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ldhA primer R

<400> 7

attggggatt atctgaatca gctcccctgg aatgcagggg agcggcgaga attccgggga 60

tccgtcgac 69

<210> 8

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pflB primer F
 <400> 8
 cgaagtacgc agtaataaaa aaatccactt aagaaggtag gtgttacatg gtgtaggctg 60
 gagctgctt 69
 <210> 9
 <211> 69
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pflB primer R
 <400> 9
 cccactttc gtggagcctt tattgtacgc tttttactgt acgatttcag attccgggga 60
 tccgtcgac 69
 <210> 10
 <211> 69
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ptsG primer F
 <400> 10
 gcgtgagaac gtaaaaaaag caccatact caggagcact ctcaattatg gtgtaggctg 60
 agctgcttc 69
 <210> 11
 <211> 69
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ptsG primer R
 <400> 11
 aaaaaggcag ccactctggct gccttagtct cccaacgtc ttacggatta attccgggga 60
 tccgtcgac 69