



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0139310

(43) 공개일자 2015년12월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 1/21 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)

C12N 9/16 (2006.01) C12P 7/64 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0067747

(22) 출원일자 2014년06월03일

심사청구일자 2014년06월03일

(71) 출원인

서강대학교산학협력단

서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)

(72) 발명자

이정국

서울특별시 마포구 백범로 25길 63, 염리삼성아파트 105동 1504호

김의진

서울특별시 마포구 신수로6길 3, 3층

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

최규환

전체 청구항 수 : 총 14 항

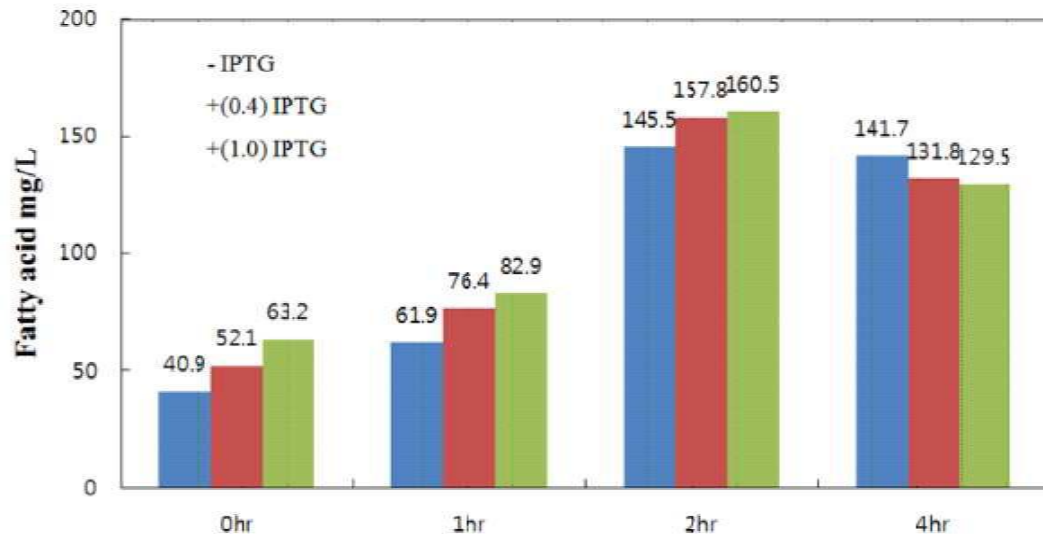
(54) 발명의 명칭 포스포리파제에 의한 지방산 분비 균주 및 이를 이용한 지방산의 생산방법

(57) 요약

본 발명은 포스포리파제를 이용하여 지방산을 균체 외부로 분비하도록 유도하는 것을 특징으로 하는 지방산 분비용 균주에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 지방산 분비용 균주를 이용한 지방산의 생산방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 지방산의 생산방법을 이용하면 균체를 사멸시키지 않고 균체 외부로 분비되는 지방산

(뒷면에 계속)

대표도 - 도7



을 지속적으로 수득할 수 있어 그 비용을 저감시키고 생산 효율을 증진시킬 수 있다. 또한 포스포리파제는 대표적인 지방산 분비 효소인 티오에스터라제와는 달리 인지질을 분해하여 지방산을 생산하므로, 두 종류의 포스포리파제의 기질특이성을 이용하여 특정 조성을 갖는 지방산을 선택적으로 생산하는 공정을 구현할 수 있다. 아울러 본 발명에 의해 자발적으로 분비된 지방산은 기존의 세포나 조직으로부터 지방을 수득하는 방법과는 달리 유기용매를 대량으로 이용하는 추출의 과정 없이도 생산된 지방산을 소수성 물질에 결합시키는 방법을 통해 수득이 가능함으로 보다 경제적이고 친환경적인 바이오오일 생산공정으로 이어질 수 있다.

(72) 발명자

통, 시아맹

서울특별시 마포구 백범로 35, 서강대학교 리치과
학관 207호

오은경

경기도 용인시 기흥구 구성2로 42-9, 휴먼시아 물
푸레마을 7단지 703동 501호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 201332020

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 (재)한국연구재단

연구사업명 클러벌프린티어사업

연구과제명 지방산 생산 세포막 구조 조정

기 여 율 30/100

주관기관 서강대학교 산학협력단

연구기간 2013.09.01 ~ 2014.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 201432001

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 (재)한국연구재단

연구사업명 미래융합융합기술 파이프라인 사업

연구과제명 광합성 생체 소재 활용 플랫폼 구축

기 여 율 50/100

주관기관 서강대학교 산학협력단

연구기간 2014.03.01 ~ 2015.02.28이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 201331042

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 (주)한국연구재단

연구사업명 도약연구

연구과제명 식품안전성 향상을 위한 식중독균의 위해인자 검출, 추적, 평가 및 제어

기 여 율 10/100

주관기관 서강대학교 산학협력단

연구기간 2013.09.01 ~ 2014.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 201331047

부처명 교육부

연구관리전문기관 (재)한국연구재단

연구사업명 중점연구소사업

연구과제명 세포 손상 제어 소재 발굴

기 여 율 10/100

주관기관 서강대학교 산학협력단

연구기간 2013.09.01 ~ 2014.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

균체의 원형질막 공간(periplasmic space) 내에서 포스포리파제(phospholipase)가 발현되어 지방산을 균체 외부로 분비하는 것을 특징으로 하는 지방산 분비용 균주.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 포스포리파제는 포스포리파제 A1 및 포스포리파제 A2로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 지방산 분비용 균주.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 포스포리파제 A1 및 포스포리파제 A2는 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 유래인 것을 특징으로 하는 지방산 분비용 균주.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 포스포리파제는 이를 코딩하는 유전자에 시토크롬(cytochrome) c2 펩타이드를 코딩하는 유전자가 연결되어 원형질막 공간 내에서 발현되는 것을 특징으로 하는 지방산 분비용 균주.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 균주는 acetyl-CoA carboxylase, malonyl-CoA:ACP transacylase(FabD) 및 β -keto ACP synthase III(FabH)로 구성된 군으로부터 선택되는 1 이상의 효소를 추가적으로 발현하여 상기 지방산의 분비 효율이 증진되는 것을 특징으로 하는 지방산 분비용 균주.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 지방산은 팔미트산(palmitic acid), 스테아르산(stearic acid) 및 바크센산(vaccenic acid)으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 지방산 분비용 균주.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 분비된 지방산은 균체로 다시 흡수되는 현상이 억제되는 것을 특징으로 하는 지방산 분비용 균주.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 균주는 대장균(*Escherichia coli*)인 것을 특징으로 하는 지방산 분비용 균주.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 대장균은 DH5@(pRK-fabD+pIND4-cycApLA1)(기탁번호 KCTC12599BP) 또는 DH5@(pRK-fabH+pIND4-cycApLA2)(기탁번호 KCTC12600BP)인 것을 특징으로 하는 지방산 분비용 균주.

청구항 10

하기의 단계를 포함하는 지방산 분비용 균주의 제조방법:

- (a) 포스포리파제(phospholipase)를 발현시키는 발현 구조물(expression construct)을 제조하는 단계; 및
- (b) 상기 포스포리파제가 균체의 원형질막 공간(periplasmic space) 내에서 발현되도록 상기 발현 구조물을 균체에 접합하여 형질전환하는 단계.

청구항 11

제 10 항에 있어서, 상기 발현 구조물은 포스포리파제를 코딩하는 유전자 및 시토크롬(cytochrome) c2 펩타이드를 코딩하는 유전자가 삽입된 것을 특징으로 하는 지방산 분비용 균주의 제조방법.

청구항 12

제 1 항의 균주를 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 지방산의 생산방법.

청구항 13

제 12 항에 있어서, 상기 배지는 탄소원으로 포도당(glucose) 또는 글리세롤(glycerol)을 포함하는 것을 특징으로 하는 지방산의 생산방법.

청구항 14

제 12 항에 있어서, 상기 배지에 탄소원이 0.1%(w/v) 내지 4.0%(w/v) 포함된 것을 특징으로 하는 지방산의 생산방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 포스포리파제 활성을 이용하여 지방산을 균체 외부로 분비시키는 것을 특징으로 하는 재조합 균주 및 이를 이용한 지방산의 생산방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 현대 산업은 아직까지도 화학공업의 원료 물질 및 에너지원의 대부분을 화석 연료에 의존하는 구조이다. 화석 연료의 이용은 그 한정된 매장량에 따른 비용의 증가라는 경제적 문제와 함께 대기 중의 이산화탄소 농도를 증가시키는 등 다양한 환경문제를 야기한다. 화석 연료의 사용에 따른 다양한 환경문제 발생과 아울러 그 고갈에 대비할 미래기술을 개발해야한다는 당위성 및 사회적 인식에는 크게 달라진바가 없으나, 아직까지는 기존의 화석연료를 대체하는 생산성 및 경제성을 갖는 신재생에너지의 개발이 이루어지지 못한 상황이다.

[0003] 최근 여러 신재생에너지 중에서도 공기 중의 이산화탄소를 고정하거나 폐유기물을 재활용하여 지방산을 생산하려는 다양한 연구개발이 진행 중에 있다. 지방산은 용이한 화학반응을 통해 지방산 에스테르 형태로 전환되며, 지방산 및 그 유도체 물질은 기존의 인프라를 사용하면서도 석유를 대체할 수 있는 신재생에너지로서

각광받고 있다. 따라서 향후 지방산 생산 기술력의 향상에 따른 경제성의 제고와 함께 사회 정책적인 고려로 인하여, 지방산 및 그 유도 물질이 대체에너지로서 사용되는 것이 현실화되는 시점이 보다 앞당겨질 것이라는 예측을 가능케 한다.

[0004] 특히 불포화지방산(unsaturated fatty acid)은 에너지 자원으로서의 가치뿐만 아니라, 의약품, 화장품, 사료 및 건강보조식품 등의 원료가 되는 고부가가치 물질이다. 기존에는 식물 및 미세조류(microalgae) 등을 이용하여 이미 정해진 조성의 지방산 생산만이 가능했지만, 합성생물학 기술의 발달로 지방산의 조성을 원하는 목적에 따라 변형시키는 것이 가능해졌으며, 특히 유용한 불포화지방산의 조성을 증가시켜 특정 지방산의 생산성을 획기적으로 증진시키는 기술개발이 가능한 시점에 이르렀다.

[0005] 중성지질(neutral fat)을 풍부하게 함유하는 식물을 이용하여 지방산을 확보하는 1세대 지방산 생산방법은 농지로 사용가능한 지역을 이용하기 때문에 전지구적인 환경변화와 식량생산의 불균형에 의한 식량문제와 맞물려 윤리적인 문제에 봉착할 가능성이 매우 높다. 따라서 향후 지방산 생산방법의 개발은 사막이나 산악지대, 바다와 같은 인류가 충분히 사용하지 못했던 공간을 이용하는 방향으로 지향되어야 할 것이다.

[0006] 미세조류는 지질을 저장하는 기전을 가지고 있어 생산성이 높은 장점은 있으나 현재까지는 용이한 유전학적 접근이 어려워 대사공학적 방법에 의한 지방산의 추가적인 생산성 향상이 어렵다는 점에서 그 한계를 나타내고 있다. 아울러 기존의 식물이나 미세조류로부터 지방산을 얻는 공정의 경우 전처리, 추출 등의 과정에서 많은 비용과 이차오염 문제가 발생되고 있다.

[0007] 대한민국공개특허 제10-2009-0068266호에서 제시된 발명은 포스포리파제(phospholipase) 활성을 갖는 폴리펩티드(polypeptide), 이를 코딩하는 핵산(nucleic acid) 및 이와 결합하는 항체(antibody)의 정보를 제공한다. 상기 발명은 또한 포스포리파제를 함유한 조성물에서 오일(oil)을 탈검(degumming)하는 산업적 방법을 제공한다. 대한민국공개특허 제10-2011-0034116호에서 제시된 발명은 고정화된 포스포리파제를 이용하여 인지질(phospholipid) 내의 지방산을 치환시켜 그 조성이 변형된 인지질을 생산하는 방법을 제공한다. 본 발명은 포스포리파제를 유효한 구성 요소로서 사용한다는 점에서는 상기 두 발명과 유사하지만, 상기 발명들과는 달리 유전적으로 변이된 균주를 이용하여 균주 내에서의 지방산 합성 효율을 높이고 합성된 지방산의 세포 외부로의 분비를 유도하기 위하여 포스포리파제를 사용한다는 점에서 그 목적과 구성이 상이하다.

[0008] 티오에스터라아제(thioesterase)의 작용에 의해 지방산이 세포 외부로 분비될 수 있다는 사실은 여러 문헌을 통해 잘 알려져 있다(Lennen and Pfleger, 2012, Cell, 30: 659-667.). 미국공개특허 제2012/0237987A1호에서 제시된 발명은 남세균(Cyanobacteria)에서 지방산의 생산을 위하여 그 분비를 유도한다는 점에서는 본 발명과 그 목적이 유사하지만, 지방산의 분비를 유도하기 위하여 acyl-acyl carrier protein(acyl-ACP)을 그 기질로 하는 효소인 티오에스터라아제를 이용한다는 점에서 본원과 그 구성이 상이하다. 또한 본원에서는 상기 발명에서와 같이 티오에스터라아제를 세포질(cytoplasm)에서 발현시키는 것이 아니라 지질의 분해효율 및 지방산의 생산성 향상을 유도하도록 포스포리파제를 세포내막(inner membrane)과 세포외막(outer membrane)의 사이인 원형질막 공간(periplasmic space)에서 발현시키는 용법을 제시하는 것을 그 주된 특성으로 한다는 점에서 그 내용이 기존의 발명과 상이하다.

[0009] 상기한 배경기술로서 설명된 사항들은 본 발명의 배경에 대한 이해 증진을 위한 것일 뿐, 이 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 이미 알려진 종래기술에 해당함을 인정하는 것으로 받아들여져서는 안 될 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명자들은 기존의 지방산 분비를 통한 생산기술이 세포질 내에서 합성된 지방산을 그 분비 대상으로 하므로 보다 높은 효율을 갖는 신규한 지방산 분비 방법을 구축하고자 노력하였다. 그 결과, 원형질막 공간에서 외래의 포스포리파제를 발현하여 인지질을 선택적으로 분해하고 이 때 생산된 지방산이 분비되도록 유도하는 기술을 고안하였다. 상기 포스포리파제의 활성 수준이 지나치게 높을 경우 세포의 사멸로 이르게 되므로, 인지질의 기질이 되는 지방산의 합성을 증진시키고 동시에 포스포리파제 효소의 발현을 조절하는 방법을 적용하여 본 발명을 완성하였다.

[0011] 따라서, 본 발명의 목적은 균체의 원형질막 공간 내에서 포스포리파제가 발현되어 지방산을 균체 외부로 분비하는 지방산 분비용 균주를 제공하는데 있다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 상기 균주를 제조하는 방법을 제공하는데 있다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 균주를 이용하여 지방산을 생산하는 방법을 제공하는데 있다.

[0014] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0015] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 균체의 원형질막 공간(periplasmic space) 내에서 포스포리파제(phospholipase)가 발현되어 지방산을 균체 외부로 분비하는 지방산 분비용 균주를 제공한다.

[0016] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 포스포리파제를 발현시키는 발현 구조물을 제조하는 단계를 포함하는 지방산 분비용 균주의 제조방법을 제공한다.

[0017] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 균주를 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 지방산의 생산방법을 제공한다.

[0018] 본 발명자들은 균주 세포를 파쇄하거나 사멸시키지 않고 지속적으로 지방산을 분비할 수 있는 고효율의 지방산 분비 균주를 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 균체의 원형질막 공간에서 포스포리파제를 발현시킬 경우 인지질을 선택적으로 분해하고 이 때 생산된 지방산이 안정적으로 분비되는 것을 확인하였다.

[0019] 대장균을 비롯한 미생물과 식물은 지방산 생합성에 관여하는 효소들이 모두 독립적으로 존재하여 개별적인 반응을 유도함으로써 지방산의 de novo synthesis를 매개하는 type II fatty acid synthase system을 가지고 있으며, 이는 지방산 생합성의 모든 단계의 효소가 하나의 복합체로서 작용하는 동물의 type I fatty acid synthase system과 대비된다(White *et al.* 2005. Annu Rev Biochem. 74: 791-831.). 따라서 미생물을 이용하여 지방산 생합성에 관여하는 효소들의 발현체계를 재구성하고, 결과적으로 지방산의 생성 정도 및 그 조성의 변화를 유도할 수 있다.

[0020] 지방산의 조성은 세포막의 물리적 성질에 해당하는 막의 유동성(membrane fluidity) 및 막의 투과성(membrane permeability)을 결정하는 주된 요인으로 작용하는데, 이러한 막의 물성이 변화하면 세포막에 존재하는 단백질의 기능에도 영향을 주어, 세포막의 주된 기능인 전자전달(electron transfer), 세포 신호전달(signal transduction), 물질의 선택적 투과성 등도 달라지게 된다. 지방산의 조성 중 세포막 환경에 가장 크게 영향을 미치는 요인은 지방산의 불포화도(degree of unsaturation)이며, 지방산의 불포화화는 생체 내에서 서로 다른 두 종류의 방식으로 일어날 수 있다. 불포화 지방산은 최초 지방산 합성의 elongation 과정에서 β -hydroxydecanoyl-ACP dehydratase/isomerase(FabA) 및 β -keto ACP synthase I(FabB)의 연속된 반응을 통해서 합성되며(Feng and Cronan. 2009. J Biol Chem. 284: 29526-29535.), 이미 합성된 포화지방산을 기질로 하여 fatty acid desaturase(desA/desB/desC/desD)의 작용을 통해서도 생성될 수 있다(Wada and Murata. 1990. Plant Physiol. 92: 1062-1069.). 지방산을 산업적인 목적으로 생산하는 경우에도 지방산의 조성이 중요한 이슈가 되는데, 지방산의 생합성 속도뿐만 아니라 그 조성 또한 관련 효소들의 작용체계를 재설계하고 이를 제어함으로써 변화시킬 수 있다. 즉, β -keto ACP synthase I(FabB)의 발현을 증진시키거나, 외래의 fatty acid

desaturase를 도입함으로써 지방산의 불포화도를 높임과 동시에 부가가치가 높은 특정 불포화 지방산의 함량을 증가시키는 것도 가능하다.

[0021] 생성된 지방산은 체내에서 그 농도가 높아질 경우 새로운 지방산의 합성을 저해하는 되먹임 저해(feedback inhibition) 현상을 일으키게 된다(Zhang and Rock, 2009, 50(Suppl): S115-S119). 즉, 세포 내부에서 축적된 지방산은 지방산 합성과 분해와 관련된 전사조절인자인 FadR 및 FabR과 결합하여, 지방산 합성에 필요한 유전체의 발현을 억제하고 동시에 지방산의 분해 작용을 활성화시킨다. 따라서 이러한 되먹임 저해 현상을 억제하고 지방산 생합성의 효율을 높이기 위해서 생성된 지방산을 생체 외부로 분비(secretion)시키는 전략을 고려할 수 있다.

[0022] 티오에스터라제(thioesterase, TesA)는 지방산과 ACP 사이의 에스테르 결합을 끊어주는 효소로서, 외래의 TesA를 세포 내에서 발현시킴으로써 합성된 지방산을 유리지방산(free fatty acids)로 전환하여 세포막 밖으로 분비되도록 유도할 수 있다(Lennen and Pfleger, 2012, Cell 30: 659-667.). 이러한 전략을 채택할 경우 지방산 합성의 효율을 증진시킬 수 있을 뿐만 아니라 세포를 수득하고 유기용매를 사용하여 세포를 파쇄하지 않고도 배지 중으로 용출된 유리지방산을 수득할 수 있다는 장점이 있다. 그러나 지방산의 세포 외부로의 분비를 위하여 티오에스터라제를 사용하는 경우에는 인지질을 그 기질로 하는 포스포리파제를 사용하는 경우와는 달리 지방산의 acyl-ACP 형태를 그 기질로 사용하므로 기질특이성이 다른 지방산의 선별적인 생산이 어렵게 된다. 또한 티오에스터라제는 acyl-ACP가 존재하는 세포질 내에서 작동해야 되므로 그람 음성(Gram negative) 균의 경우 생성된 유리지방산이 배지로 용출되기 위해서는 세포내막과 세포외막을 두 번 통과해야 하므로 그 지방산의 생산 효율이 낮아진다는 단점을 갖는다.

[0023] 따라서, 본 발명의 큰 특징 중 하나는, 세포질(cytoplasm) 내에서 발현이 되어 생산된 지방산이 세포막을 통과하기 어렵고, 생성된 지방산이 되먹임 저해 현상을 유도하여 세포질 내 지방산이 분해되는 점, 그리고 기질특이성이 낮아 지방산의 생산효율이 떨어지는 상기 티오에스터라제의 단점을 극복하기 위하여, 포스포리파제가 균체의 원형질막 공간 내에서 발현되어 지방산이 균체 외부로 신속하고도 효율적으로 분비될 수 있도록 하였다는 것이다.

[0024] 상기 포스포리파제는 동물 또는 식물로부터 유래된 것으로 제한이 없으나, 바람직하게는 포스포리파제 A1 또는 포스포리파제 A2인 것이며, 보다 바람직하게는 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 유래의 포스포리파제 A1 또는 포스포리파제 A2인 것이다.

[0025] 상기 포스포리파제 유전자는 발현 구조물(expression construct)로 제작되어 균체의 원형질막 공간 내에서 발현되도록 유도할 수 있다.

[0026] 포스포리파제 유전자를 균체의 원형질막 공간 내에서 발현되도록 유도하는 방법은 제한되지 않으나, 바람직하게는 원형질막으로 수송되어 작동하도록 leader peptide를 가지고 있는 단백질의 유전자(예를 들어, CycA의 유전자 등)를 상기 포스포리파제 유전자와 함께 발현 구조물에 삽입하여 제조할 수 있다. 상기 발현 구조물은 균체에 접합(conjugation)함으로써 균체를 형질전환하여 상기 포스포리파제가 균체의 원형질막 공간 내에서 발현되도록 할 수 있다.

[0027] 또한, 지방산의 생합성 속도를 증진시키기 위해서 acetyl-CoA로부터 malonyl-CoA를 합성하는 acetyl-CoA carboxylase, malonyl-CoA를 malnoyl-ACP로 전환시키는 malonyl-CoA:ACP transacylase(FabD), 그리고 지방산 elongation 반응의 최초 전구체 C4-ACP를 합성하는 β -keto ACP synthase III(FabH)를 추가적으로 발현하도록 상기 발현 구조물을 제작할 수도 있다. 이는 이들 효소가 다른 모든 탄소 대사작용을 매개하는 중심 대사회로로부터 지방산 합성 대사회로의 metabolic flux를 전환시키는 역할을 담당하기 때문이며, 이후 지방산의 elongation 반응은 모두 ACP가 결합된 상태로 진행되어 다른 대사회로들과 구분되어 진행되므로 증진된 metabolic flux는 모두 지방산의 합성 증진으로 이어지게 된다. 아울러 지방산 합성 증진을 위해서 탄소성 저장 물질인 poly- β -hydroxybutyrate(PHB)의 합성 대사회로를 차단하는 등 세포의 성장에 필수적이지 않은 경로를 차단함으로써 지방산 합성 효율을 극대화할 수 있다.

[0028] 본 발명에 따른 지방산 분비용 균주로부터 수득할 수 있는 지방산의 종류에는 제한이 없으나, 바람직하게는 탄소수가 16 이상인 지방산, 보다 바람직하게는 팔미트산(palmitic acid), 스테아르산(stearic acid), 바크센산(vaccenic acid) 등을 고효율로 수득할 수 있다.

[0029] 본 발명의 또 다른 큰 특징 중 하나는, 상기 지방산이 균체로 다시 흡수되는 현상이 억제된다는 것이다. 예를

들어, 균체를 배양하는 배지 중으로 용출된 지방산은 이를 다시 흡수하는 작용을 담당하는 long chain fatty transporter인 FadL의 작용으로 균체 안으로 들어올 수 있으며, 또한 long chain fatty acyl-CoA synthetase(FadD)의 작용에 의해 재사용될 수 있다.

[0030] 상기 지방산의 흡수 억제는 상기 지방산의 흡수를 담당하는 단백질 및/또는 지방산의 재사용을 담당하는 단백질의 서열 중 전부 또는 일부를 결실시켜 상기 단백질들의 활성을 용이하게 제어할 수 있다.

[0031] 본 발명에 따른 균주는 제한되지 않으며, 바람직하게는 대장균(*Escherichia coli*)을 이용할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 기탁번호 KCTC12599BP로 기탁된 DH5@ (pRK-fabD+pIND4-cycApLA1) 및 기탁번호 KCTC12600BP로 기탁된 DH5@ (pRK-fabH+pIND4-cycApLA2)를 이용하였으나, 당업계에 공지된 다양한 미생물을 이용하여 상기의 특성을 갖는 지방산 분비용 균주를 제조할 수 있다.

[0032] 또한, 본 발명의 균주를 이용한 지방산의 생산의 효율을 높이기 위해 배지에 탄소원을 추가로 제공할 수도 있다. 상기 탄소원은 당업계에 공지된 다양한 탄소원을 포함하며, 바람직하게는 포도당(glucose) 또는 글리세롤(glycerol)을 포함한다. 상기 추가되는 탄소원의 바람직한 농도는 0.1%(w/v) 내지 4.0%(w/v) 정도가 적당하며, 보다 바람직하게는 0.4%(w/v) 내지 2.0%(w/v)인 것이다. 상기 농도보다 낮을 경우 지방산 생성 증진의 효과가 거의 없으며, 높을 경우 포화현상이 일어날 수 있다.

발명의 효과

[0033] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0034] (i) 본 발명은 포스포리파제를 이용하여 지방산을 균체 외부로 분비하도록 유도하는 것을 특징으로 하는 지방산 분비용 균주를 제공한다.

[0035] (ii) 또한, 본 발명은 상기 지방산 분비용 균주의 제조방법을 제공한다.

[0036] (iii) 추가적으로, 본 발명은 상기 지방산 분비용 균주를 이용하여 지방산을 생산하는 방법을 제공한다.

[0037] (iv) 본 발명에 따른 지방산의 생산 방법을 이용하면 균체를 사멸시키지 않고 균체 외부로 분비되는 지방산을 지속적으로 수득할 수 있게 되므로, 분비되는 지방산을 지속적으로 수득할 수 있어 높은 효율 및 안정성을 갖는다. 또한 포스포리파제의 기질특이성을 이용하여 특정 조성을 갖는 지방산을 선택적으로 생산하는 공정을 구현할 수 있다. 아울러, 본 발명에 의해 자발적으로 분비된 지방산은 기존의 세포나 조직으로부터 지방을 수득하는 방법과는 달리 유기용매를 대량으로 이용하는 추출의 과정 없이도 생산된 지방산을 소수성 물질에 결합시키는 방법을 통해 수득이 가능하므로 보다 경제적이고 친환경적인 바이오오일 생산공정으로 이어질 수 있다는 장점을 갖는다.

도면의 간단한 설명

[0038] 도 1은 예기장대 유래의 포스포리파제 A1 및 포스포리파제 A2를 원형질막 내에서 발현시키기 위한 pIND4 유래 구조물인 pIND4-cycApLA1 및 pIND4-cycApLA2의 모식적인 구조를 나타낸다. 상기 포스포리파제가 원형질막 내에서 발현되도록 유도하기 위해 2종의 포스포리파제의 N-말단 지역에 모두 CycA N-말단의 23개의 아미노산으로 구성되는 leader peptide 서열이 연결되어 발현되도록 제작하였다.

도 2는 로도박터 스페로이데스 유래의 AccABCD, FabD 및 FabH를 각각 대장균에서 발현시키기 위한 pRK415 유래 구조물인 pRK-accABCD, pRK-fadD 및 pRK-fadH의 모식적인 구조를 나타낸다.

도 3은 분비 지방산의 재흡수에 관여하는 대장균 FadD의 유전자 주변의 염색체 지도 및 이를 파괴하기 위한 DNA 구조물의 제작 방법을 나타낸다. 도면에 함께 나타낸 주변의 유전자들의 예상되는 기능은 다음과 같다. *yeaX*, predicted oxidoreductase; *rnd*, ribonuclease D; *yeaY*, lipoprotein; *tsaB*, tRNA threonylcarbamoyladenosine modification protein.

도 4는 포스포리파제 A1을 발현시키는 균주에서 AccABCD, FabD 및 FabH를 각각 동시에 발현시키는 경우의 분비 지방산 생산량을 나타낸다. 3종의 재조합 균주를 LB 배지에서 성장시키면서 IPTG를 첨가한 경우 및 첨가하지 않은 경우를 시험하였다. 상단의 그림은 배지로 분비된 지방산을 GC를 이용하여 정량 분석하여 mg/L의 값으로

나타내었으며, 하단의 그림은 이때의 성장 곡선을 나타낸다.

도 5는 포스포리파제 A2를 발현시키는 균주에서 AccABCD, FabD 및 FabH를 각각 동시에 발현시키는 경우의 분비 지방산 생산량을 나타낸다. 3종의 재조합 균주를 LB 배지에서 성장시키면서 IPTG를 첨가한 경우 및 첨가하지 않은 경우를 시험하였다. 상단의 그림은 배지로 분비된 지방산을 GC를 이용하여 정량 분석하여 mg/L의 값으로 나타내었으며, 하단의 그림은 이때의 성장 곡선을 나타낸다.

도 6은 포스포리파제 A1 및 FabD를 동시에 발현하는 재조합 균주를 이용하여 LB 배지에 포도당을 농도 별로 첨가하여 성장시키면서 시간에 따른 분비 지방산의 생산량을 측정한 나타낸다. 배지로 분비된 지방산을 GC를 이용하여 정량 분석하여 mg/L의 값으로 나타내었다.

도 7은 포스포리파제 A1 및 FabD를 동시에 발현하는 재조합 균주를 이용하여 LB 배지에 글리세롤을 0.4%(w/v)의 농도로 첨가하여 성장시키면서 시간에 따른 분비 지방산의 생산량을 측정한 나타낸다. 배지로 분비된 지방산을 GC를 이용하여 정량 분석하여 mg/L의 값으로 나타내었다.

도 8은 포스포리파제 A2 및 FabH를 동시에 발현하는 재조합 균주를 이용하여 LB 배지에 글리세롤을 0.4%(w/v)의 농도로 첨가하여 성장시켜 분비 지방산의 생산량을 측정한 나타낸다. 배지로 분비된 지방산을 GC를 이용하여 정량 분석하여 mg/L의 값으로 나타내었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0039]

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0040]

실시예

[0041]

실시예 1: 포스포리파제의 원형질막 공간 내 발현

[0042]

포스포리파제(phospholipase)는 인지질(phospholipid)로부터 지방산(fatty acid)을 절단시키는 인지질의 분해 효소로서 그 절단부위의 특이성에 따라 A1, A2, C 및 D 형태로 분류된다. 포스포리파제 A1은 인지질의 sn-1 지역의 공유결합을 전달시켜 sn-1 지역에 결합되어 있던 지방산 및 지방산이 하나만 결합된 인지질(lysophospholipid)로 분해하는 효소이며, 포스포리파제 A2는 인지질의 sn-2 지역의 공유결합을 전달시켜 sn-2 지역에 결합되어 있던 지방산 및 지방산이 하나만 결합된 인지질로 분해하는 효소이다. 서열번호 1에 나타난 포스포리파제 A1의 상보적 DNA(complementary DNA, cDNA) 및 서열번호 2의 포스포리파제 A2의 cDNA는 모두 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)로부터 확보하였다. 이를 위해 애기장대의 RNA를 세포로부터 추출하였고, RNA로부터 DNA를 합성해 주는 효소(RNA-dependent DNA polymerase)인 역전사 효소(reverse transcriptase)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 상기 cDNA를 원형모형(template)으로 하여 서열번호 3의 전방 프라이머(primer) 및 서열번호 4의 후방 프라이머를 이용한 폴리머라아제 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 수행하여 포스포리파제 A1 유전자를 획득하였다. 상기 전방 프라이머에는 제한효소(restriction enzyme) *Xba*I의 인식부분을 삽입하였으며 상기 후방 프라이머에는 제한효소 *Hind*III의 인식부분을 삽입하였다. 이와 비슷한 방법으로 상기 애기장대의 cDNA를 원형모형으로 하여 서열번호 5의 전방 프라이머 및 서열번호 6의 후방 프라이머를 이용한 PCR을 수행하여 포스포리파제 A2 유전자를 획득하였다. 상기 전방 프라이머에는 역시 제한효소 *Xba*I의 인식부분을 삽입하였으며 상기 후방 프라이머에는 제한효소 *Hind*III의 인식부분을 삽입하였다.

[0043]

상기 포스포리파제 A1 및 포스포리파제 A2가 원형질막 공간 내에서 발현되도록 하기 위해서 확보한 포스포리파제 A1 유전자 및 포스포리파제 A2 유전자의 상위지역에 시토크롬(cytochrome) c2인 서열번호 7의 CycA의 N-말단 부분 23개의 아미노산을 연결시키는 구조를 제조하고자 하였다. 이를 위해 서열번호 8에서 나타난 CycA의 유전자 중 상위지역에 해당하는 69개의 뉴클레오타이드(nucleotide)를 확보하였다. CycA는 원형질막으로 수송되어 작동하도록 leader peptide를 가지고 있는데 포스포리파제의 N-말단에 해당 서열이 연결되어 번역되도록 하여 결과적으로 포스포리파제가 원형질막 내에서 발현되도록 유도할 수 있다. 서열번호 9의 전방 프라이머 및 서열번호 10의 후방 프라이머를 이용한 폴리머라아제 연쇄반응을 로도박터 스페로이데스(*Rhodobacter sphaeroides*) DNA(chromosomal DNA)를 그 원형모형으로 사용하여 수행하였다. 상기 전방 프라이머에는 제한효소 *Nco*I의 인식부분을 삽입하였으며 상기 후방 프라이머에는 제한효소 *Xba*I의 인식부분을 삽입하였다. 포스포리파제 A1 및 포스포리파제 A2의 cDNA를 확보하는 과정에서 가장 상위지역에 제조한 제한효소 *Xba*I의 인식부분

이용하여 CycA의 유전자 중 상위지역에 해당하는 69개의 DNA 조각을 연결시켰다. 연결된 DNA 절편을 *NcoI* 및 *HindIII*를 이용하여 절단 후 IPTG의 첨가에 의해 그 전사를 조절하는 것이 가능한 pIND4(Alice et al. 2009. Appl Environ Microbiol. 75: 66136615.) 상에 위치시켜 재조합 벡터를 완성하였다.

[0044]

도 1은 애기장대 유래의 포스포리파제 A1 및 포스포리파제 A2를 원형질막 공간 내에서 발현시키기 위해 제조한 pIND4 유래의 구조물인 pIND4-cycApLA1 및 pIND4-cycApLA2의 모식적인 구조를 나타낸다. 상기 2종의 구조물을 이용하여 서열번호 11 및 서열번호 12의 애기장대 유래의 포스포리파제 A1 효소 및 서열번호 2의 포스포리파제 A2 효소를 대장균(*Escherichia coli*)에서 각각 발현하였다. 추가적으로 포스포리파제 A1 유전자 및 포스포리파제 A2 유전자의 하위지역에 각각 대장균 유래 알칼리 포스파타아제(alkaline phosphatase)를 코딩하는 유전자를 in-frame으로 연결하여 그 번역과정에서 두 효소가 연결될 수 있도록 구조물을 제작하였다. 상기 구조물에 의한 알칼리 포스파타아제 활성을 측정할 결과, 상기 2종의 포스포리파제가 예측한 바와 같이 세포질 내가 아니라 원형질막 공간 내에서 발현되는 현상을 확인할 수 있었다.

[0045]

실시예 2: 지방산 초기 대사과정의 증진

[0046]

아세틸 조효소-A(acetyl-CoA)로부터 말로닐 조효소-A(malonyl-CoA)를 합성하는 기능을 갖는 효소인 서열번호 13 내지 서열번호 16의 아세틸 조효소-A 카복실라제(acetyl-CoA carboxylase, AccABCD)의 유전자, malonyl-CoA를 malonyl-ACP로 전환시키는 효소인 서열번호 17의 malonyl-CoA:ACP transacylase(FabD)의 유전자, 그리고 지방산 중합 반응의 전구체 C4-ACP를 합성하는 서열번호 18의 β -keto ACP synthase III(FabH)의 유전자를 각각 로도박터 스페로이데스로부터 확보하고 해당 효소들을 각각 대장균에서 발현시키기 위한 유전자의 클로닝(cloning)을 수행하였다. 네 개의 단량체(subunit)로 구성되는 서열번호 19 내지 서열번호 22의 AccABCD, 서열번호 23의 FabD 및 서열번호 24의 FabH를 대장균에서 발현시키기 위한 구조물들을 제작하였다. 이 과정에서 로도박터 스페로이데스의 염색체 DNA를 원형모형으로 하는 폴리머라아제 연쇄 반응을 수행하였으며, 확보된 DNA의 염기서열의 이상 여부를 모두 검증하였다. AccA의 유전자를 확보하기 위하여 서열번호 25의 전방 프라이머 및 서열번호 26의 후방 프라이머를 사용하였고, 전방 프라이머는 제한효소 *XbaI*의 인식부분을 삽입하였으며 후방 프라이머는 제한효소 *PstI*의 인식부분을 삽입하였다. 이와 유사하게, AccBC의 유전자를 확보하기 위하여 서열번호 27의 전방 프라이머 및 서열번호 28의 후방 프라이머를 사용하였고, 전방 프라이머는 제한효소 *HindIII*의 인식부분을 삽입하였으며 후방 프라이머는 제한효소 *XbaI*의 인식부분을 삽입하였다. 또한, AccD의 유전자를 확보하기 위하여 서열번호 29의 전방 프라이머 및 서열번호 30의 후방 프라이머를 사용하였고, 전방 프라이머는 제한효소 *XbaI*의 인식부분을 삽입하였으며 후방 프라이머는 제한효소 *PstI*의 인식부분을 삽입하였다. 이후 AccA의 유전자 및 AccD의 유전자를 포함하는 DNA 절편은 각각 pBlueScript SK-(Stratagene)의 *XbaI* 및 *PstI* 자리에 클로닝(cloning)하여 하위지역에 *KpnI*의 인식부분을 연결하였다. 마지막으로, 상기 세 부분의 DNA 절편들을 해당되는 제한효소로 절단하고, pRK415(Keen et al. 1988. Gene 70: 191-197.) 벡터 상에 차례로 연결되도록 위치시킴으로서 AccABCD를 발현하는 재조합 벡터 pRK-accABCD를 완성하였다. 또한, FabD의 유전자를 확보하기 위하여 서열번호 31의 전방 프라이머 및 서열번호 32의 후방 프라이머를 사용하였고, 전방 프라이머는 제한효소 *XbaI*의 인식부분을 삽입하였으며 후방 프라이머는 제한효소 *PstI*의 인식부분을 삽입하였다. 이후 FabD의 유전자를 포함하는 DNA 절편을 pBlueScript SK-의 *XbaI* 및 *PstI* 자리에 클로닝하여 하위지역에 *KpnI*의 인식부분을 연결하였다. 상기 DNA 절편을 해당되는 제한효소로 절단하고 pRK415 벡터 상에 위치시켜 FabD를 발현하는 재조합 벡터 pRK-FabD를 완성하였다. 또한, FabH의 유전자를 확보하기 위하여 서열번호 33의 전방 프라이머 및 서열번호 34의 후방 프라이머를 사용하였고, 전방 프라이머는 제한효소 *KpnI*의 인식부분을 삽입하였으며 후방 프라이머는 제한효소 *XbaI*의 인식부분을 삽입하였다. 상기 DNA 절편을 해당되는 제한효소로 절단하고 pRK415 벡터 상에 위치시켜 FabH를 발현하는 재조합 벡터 pRK-FabH를 완성하였다. 상기 방법을 통해 폴리머라아제 연쇄 반응으로부터 얻은 DNA 절편들을 모두 pRK415 벡터에 접합하였는데, 결과적으로 AccABCD, FabD 및 FabH를 각각 대장균에서 발현시키기 위한 구조물을 제조하였으며 그 모식적인 구조를 도 2에 나타내었다.

[0047]

실시예 3: 분비된 지방산의 재흡수 억제

[0048]

배지 중으로 용출된 지방산은 이를 다시 흡수하는 작용을 담당하는 long chain fatty transporter인 FadL의 작용으로 균체 안으로 들어올 수 있으며, 또한 long chain fatty acyl-CoA synthetase(FadD)의 작용에 의해 재사용될 수 있다. 따라서 분비된 지방산이 재흡수되어 이용되지 않도록 하기 위해서 서열번호 35에 해당하는 대

장균 FadD의 유전자를 파괴하여 이미 합성된 지방산을 분해하는 대사과정을 억제하고 결과적으로 지방산의 생산 효율을 향상시키고자 하였다. FadD의 유전자를 파괴하는 구조물을 제조하기 위해 대장균의 염색체 DNA를 원형 모형으로 하는 폴리머라아제 연쇄 반응을 수행하였으며, 확보된 DNA의 염기서열의 이상 여부를 확인하였다. FadD의 유전자 상단 DNA를 확보하기 위하여 서열번호 36의 전방 프라이머 및 서열번호 37의 후방 프라이머를 사용하였고, 전방 프라이머는 제한효소 *Sa*II의 인식부분을 삽입하였으며 후방 프라이머는 제한효소 *Eco*RI의 인식부분을 삽입하였다. 이와 유사하게, FadD의 유전자 하단 DNA를 확보하기 위하여 서열번호 38의 전방 프라이머 및 서열번호 39의 후방 프라이머를 사용하였고, 전방 프라이머는 제한효소 *Eco*RI의 인식부분을 삽입하였으며 후방 프라이머는 제한효소 *Sph*I의 인식부분을 삽입하였다. 상기 폴리머라아제 연쇄 반응으로부터 얻은 DNA 절편들은 각각 자살벡터(suicide vector)인 pDM4(Milton et al. 1996. J Bacteriol. 178: 1310-1319.)에 접합하였는데, 결과적으로 FadD의 유전자중 1,220 bp가 제거되도록 유도하는 구조물을 제조하였으며, 그 모식적인 구조를 도 3에 나타내었다. 완성된 구조물을 대장균 K-12의 아종인 MG1655에 접합법(conjugation)으로 가동화시킨 후 염색체 상에 상동변이(homologous recombination)를 유도하였으며, 항생제인 클로람페니콜(chloramphenicol)을 사용하여 선별하였다. 이후 double crossover가 일어난 결과 FadD의 유전자가 파괴된 균주를 10%(w/v) 농도의 서당(sucrose)이 존재하는 조건에서 선별하였다. 얻어진 FadD 변이주의 염색체 상 구조는 서열번호 34 및 서열번호 37의 프라이머를 사용한 PCR을 수행하여 확인하였다. 본 실시예에서는 대장균의 지방산 재흡수를 억제하기 위해 FadD의 유전자를 파괴하였지만, 당업자라면 사용하려는 균체의 종류에 따라서 FadD 뿐만 아니라 지방산의 흡수 및 재사용 과정에 작용하는 acyl-ACP synthetase(AasS) 등을 용이하게 선택하여 제어할 수 있을 것이다.

[0049] **실시예 4: 포스포리파제를 이용한 지방산의 분비 및 지방산 정량**

[0050] 실시예 2에서 제조된 3종의 지방산 합성의 초기 효소 AccABCD, FabD 및 FabH를 발현하는 pRK415 유래 재조합 벡터 및 2종의 포스포리파제를 발현하는 pIND4 유래 재조합 벡터를 각각 조합으로 하여 대장균에 형질전환(transformation) 하였다. pRK415 유래 재조합 벡터를 선별하고 유지하기 위해서는 항생제인 테트라사이클린(tetracycline)을 사용하였고, pIND4 유래 재조합 벡터를 선별하고 유지하기 위해서는 역시 항생제인 카나마이신(kanamycin)을 사용하였다. 재조합 벡터들을 형질전환을 통해 대장균 내에서 가동화시킨 후에, 완성된 6종의 형질전환 균주들을 그 용법이 잘 알려진 LB(Luria-Bertani) 배지를 사용하여 배양 및 유지하였다.

[0051] 상기 포스포리파제의 작용에 의한 지방산의 균체 외부로의 분비 여부를 확인하기 위해 배지 내 지방산을 추출하여 분석하고자 하였다. 형질 전환된 대장균 균주를 각각 300 ml 용량의 플라스크에 30 ml의 LB 배지를 넣어준 후 접종하여 250 rpm(resolution per minute)의 속도로 진탕 배양하며 37℃의 호기성 조건에서 성장시켰다. 실험 목적에 따라서는 상기 LB 배지에 포도당(glucose) 또는 글리세롤(glycerol)이 약 0.4%의 농도가 되도록 첨가하여 시험하였다. 배양 과정에서 균주의 600 nm에서의 흡광도가 약 0.4 내지 1.0이 되었을 때 포스포리파제의 발현을 유도하기 위해 IPTG(Isopropyl β-D-thiogalactopyranoside)를 0.4 mM의 농도가 되도록 첨가하였으며, 상기 성장조건에서 균주의 600 nm에서의 흡광도가 약 2.0 내지 4.0이 되도록 배양하였다. 도 4 및 도 5의 하단에서 나타난 바와 같이 상기 재조합 균주들의 성장속도는 서로간의 차이를 나타내지 않았으며, IPTG 처리에 따른 성장저해 또한 나타나지 않았다. 배양된 균체는 약 7,000 g의 힘으로 4℃에서 10분간 원심분리를 수행하여 수득하여 제거하였으며, 상층액(supernatant)에 해당되는 사용 후 배지를 공극의 크기가 0.22 μm에 이르는 필터(filter)를 사용하여 걸러주어 배양액에 잔존하는 대장균 균체를 완전하게 제거하고자 하였다.

[0052] 세포를 직접 추출하여 지방산을 얻는 일반적인 지방산 생산법과는 달리 배지로 분비된 지방산을 수득하는 방법은 그 선택에 있어서 특별한 제한이 없다. 본 실시예에서는 클로로포름(chloroform) 및 메탄올(methanol)이 2:1의 비율로 혼합된 유기용매를 이용하여 배지 내 지방산을 추출하였으나, 유기용매의 사용을 최소화하기 위해서 C18과 같은 소수성(hydrophobic) 물질로 구성된 column을 통과시켜 지방산을 수득하는 고체상 분리법(solid phase extraction)을 대신 사용할 수 있다.

[0053] 추출된 지방산의 조성 및 양을 확인하기 위해 알려진 방법(Benning and Somerville. 1992. J Bacteriol. 174: 2352-2360.)에 따라 메탄을 염산(methanolic HCl)을 사용하는 메틸 에스테르(methyl ester)화 반응을 통해 지방산 메틸 에스테르(fatty acid methyl ester, FAME)로 전환시켰고, 기체 크로마토그래피(gas chromatography, GC) 분석법을 이용하여 FAME를 측정하였다. 이때 내부표준물질(internal standard, IS)로서 대장균에서 발견되지 않는 pentadecanoic acid(C15)를 첨가하여 분석하였으며, 검출된 FAME는 해당 표준물질의 검량선을 이용하여 정량하였다.

- [0054] 균체 외부로 분비된 유리지방산을 GC로 검출한 결과를 도 4 및 도 5의 상단에 나타내었다. 분비된 지방산의 주된 조성은 포화지방산인 palmitic acid(C16)와 stearic acid(C18), 그리고 불포화지방산인 cis-vaccenic acid(C18:1_{Δ11})가 해당되었으며, 실제 배지에 있었을 것으로 추정되는 전체 지방산의 양은 IS의 수득 및 검출 비율을 이용하여 환산하였다. 대장균의 야생형 균주는 유사한 조건으로 시험하였을 경우 지방산이 거의 분비되지 않는다는 사실이 널리 알려져 있다. 그러나 상기 재조합 균주들에서는 배지 내로 유리지방산이 분비된다는 사실을 확인할 수 있었다. 포스포리파제 A1을 발현시키는 균주는 IPTG의 첨가에 의해서 약 10-20% 수준의 생산효율 증진을 나타낸 반면, 포스포리파제 A2를 발현시키는 균주는 IPTG의 첨가에 의해서 약 30-50% 수준의 생산효율 증진을 나타내었다. IPTG를 첨가하지 않은 경우에도 최소수준 발현(basal level expression)에 의해 생성된 포스포리파제에 의해 지방산이 일부 분비되는 것으로 나타났으며, 따라서 포스포리파제 A1을 발현시키는 균주를 공정에 적용 시 상대적으로 비용의 부담이 있는 IPTG를 사용하지 않아도 유리지방산의 생산이 가능할 것이다.
- [0055] 포스포리파제 A1을 발현시키는 균주는 FabD와 함께 발현하였을 때 그 지방산 생산량이 가장 높게 나타났으며, IPTG 첨가 후 4시간 이후의 시점에서 가장 높은 약 60 mg/L를 나타내었다. 반면 포스포리파제 A2를 발현시키는 균주는 FabH와 함께 발현하였을 때 그 지방산 생산량이 가장 높게 나타났으며, IPTG 첨가 후 1시간 이후의 시점에서 가장 높은 약 68 mg/L의 생산량을 나타내었다.
- [0056] **실시예 5: 탄소원 사용의 효과**
- [0057] 유리지방산의 생산 효율을 증진시키기 위해 LB 배지 내에 탄소원을 추가로 제공하여 시험하였다. 탄소원으로는 포도당(glucose) 및 글리세롤(glycerol)을 첨가하였으며, 대상 균주로는 실시예 4에서 가장 높은 지방산 생산 효율을 나타낸 포스포리파제 A1 및 FabD를 동시에 발현시키는 균주 및 포스포리파제 A2 및 FabH를 동시에 발현시키는 균주를 사용하여 시험하였다.
- [0058] 도 6에서는 포스포리파제 A1 및 FabD를 동시에 발현시키는 균주를 성장시키면서 포도당의 첨가 농도에 따른 효과를 시험하였다. 그 결과 지방산의 생산 효율은 포도당의 최소 시험 농도인 0.5%(w/v)의 농도 조건에서부터 증진되었으며, 포도당 농도의 증가에 비례하여 증진되었으나, 2.0%(w/v)의 농도 이상에서는 그 증가 현상이 포화되는 것으로 나타났다. 포스포리파제 A1 및 FabD를 동시에 발현시키는 균주는 2.0%(w/v) 농도의 포도당이 첨가된 조건에서 IPTG의 첨가 후 약 2시간 이후의 시점에서 가장 높은 약 111 mg/L의 생산량을 나타내었다.
- [0059] 식물성 오일을 이용하여 연료를 생산하는 과정에서 부산물로서 생산되는 글리세롤은 포도당에 비해 매우 낮은 시장 가격을 갖는다. 따라서 도 7에서는 포스포리파제 A1 및 FabD를 동시에 발현시키는 균주를 성장시키면서 글리세롤의 첨가에 따른 효과를 시험하였는데, 글리세롤의 첨가 농도를 0.4%(w/v)로 고정하는 대신 IPTG의 첨가 시점을 다르게 하였다. IPTG를 첨가하지 않은 경우, 600 nm에서의 흡광도가 약 0.4에 이르렀을 때 IPTG를 첨가한 경우 및 600 nm에서의 흡광도가 약 1.0에 이르렀을 때 IPTG를 첨가한 경우를 시험하였다. 그 결과 세 조건에서의 지방산의 생산 효율은 크게 다르게 나타나지 않았으며, 이는 포스포리파제 A1을 발현시키는 균주가 IPTG의 첨가에 의해서 약 10-20%의 효율 증진을 나타낸 실시예 4에서의 결과와 일치한다. 반면 사용하는 탄소원의 종류에 따라서는 지방산의 생산 효율에 있어 큰 차이가 나타나는 현상을 확인할 수 있었는데, 포스포리파제 A1 및 FabD를 동시에 발현시키는 균주는 LB 배지에서 약 60 mg/L의 생산량을 나타내었으나, 2.0%(w/v) 농도의 포도당이 첨가된 조건에서 약 111 mg/L의 생산량을 나타내었으며, 0.4%(w/v) 농도의 글리세롤이 첨가된 조건에서는 약 161 mg/L의 생산량을 나타내었다. 따라서 시험한 탄소원 중 글리세롤이 가장 효과적으로 지방산 생산효율 증진을 유도하는 것으로 나타났다.
- [0060] 상기 실시예에서 가장 효과적인 조건으로 나타난 0.4 %(w/v) 농도의 글리세롤이 첨가된 조건에서 포스포리파제 A2 및 FabH를 동시에 발현시키는 균주를 사용하여 시험하였다. 도 8에서 나타난 바와 같이 포스포리파제 A2를 발현시키는 균주는 IPTG의 첨가에 의해서 약 50% 수준의 생산효율 증진을 나타내었으며, IPTG 첨가 후 2시간 이후의 시점에서 가장 높은 약 166 mg/L의 생산량을 나타내었다. 따라서 포스포리파제 A2 및 FabH를 동시에 발현시키는 균주는 동일한 조건에서 포스포리파제 A1 및 FabD를 동시에 발현시키는 균주와 유사한 생산성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.
- [0061] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다.

따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

수탁번호

[0062]

기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC12599BP

수탁일자 : 20140526

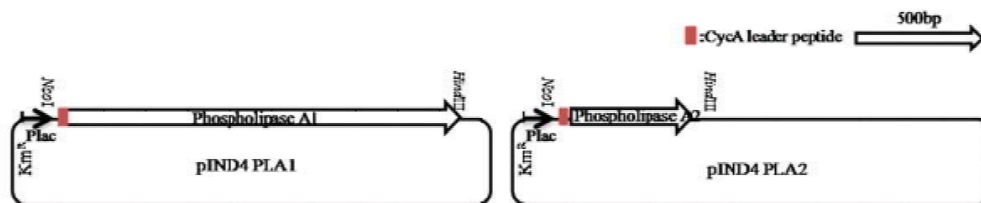
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC12600BP

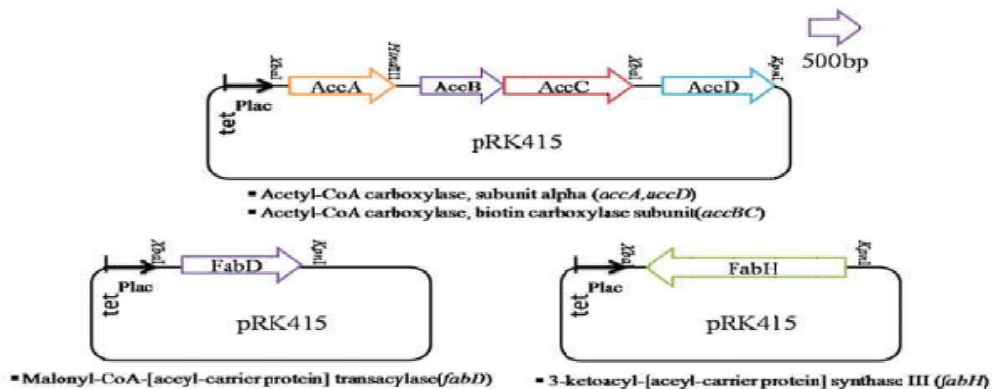
수탁일자 : 20140526

도면

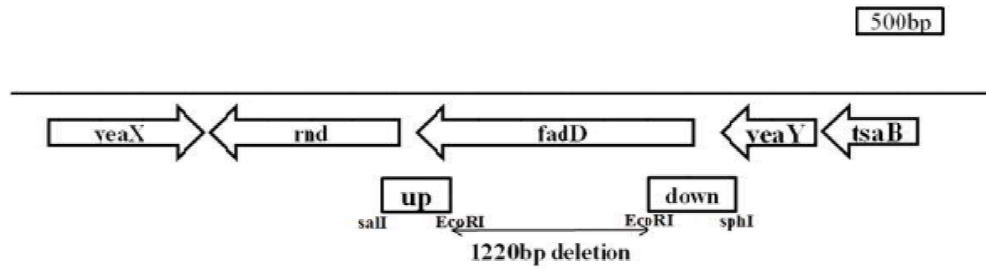
도면1



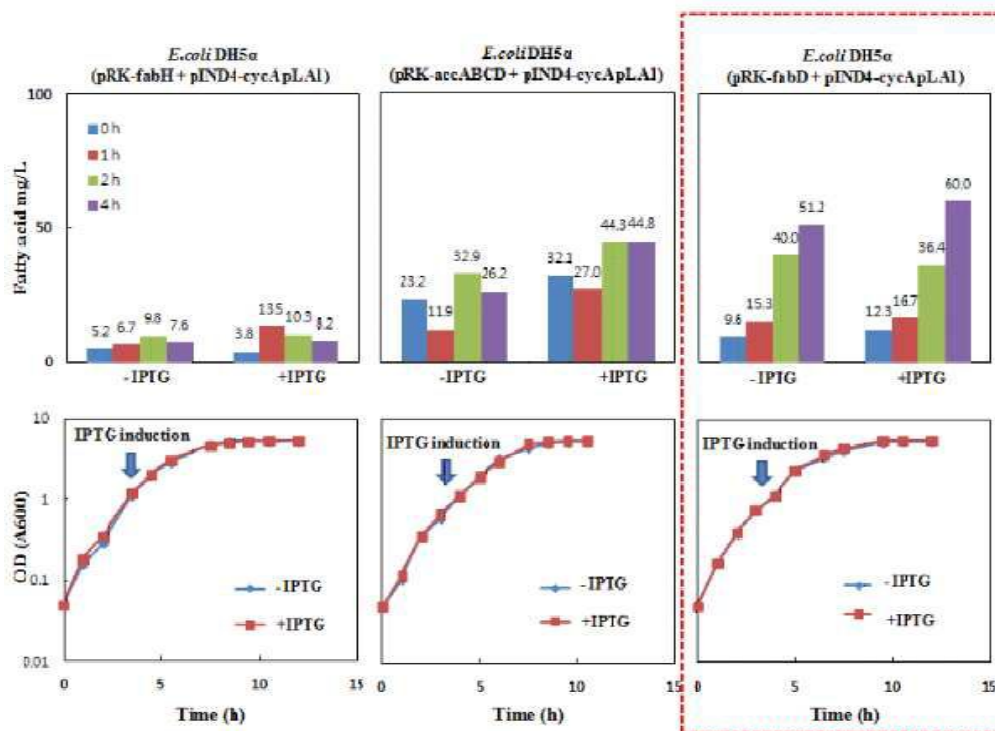
도면2



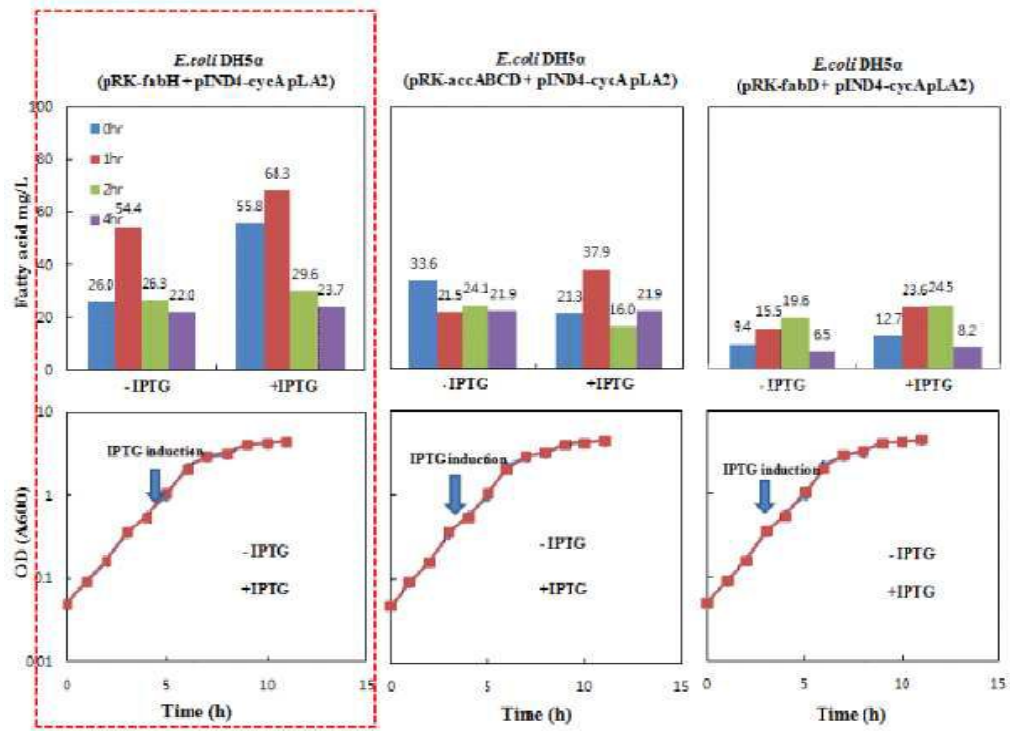
도면3



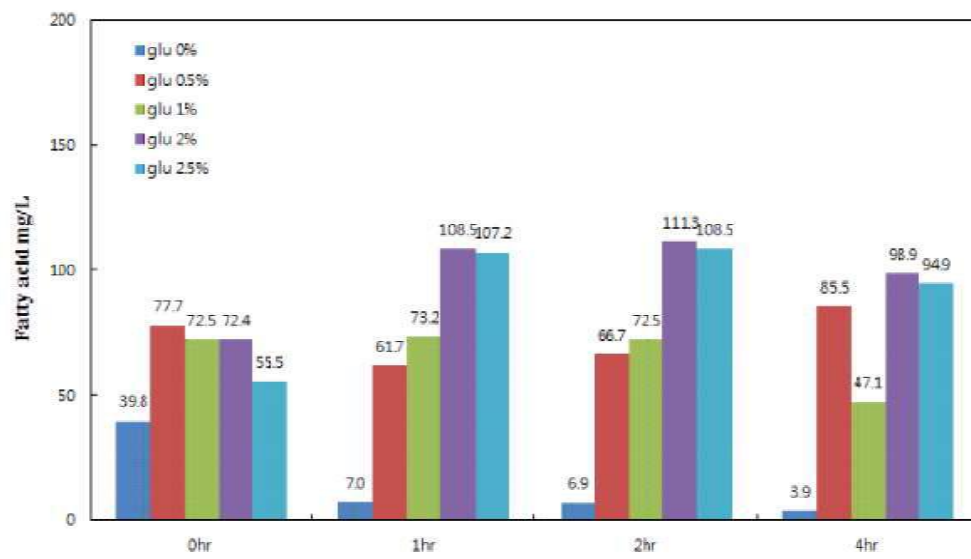
도면4



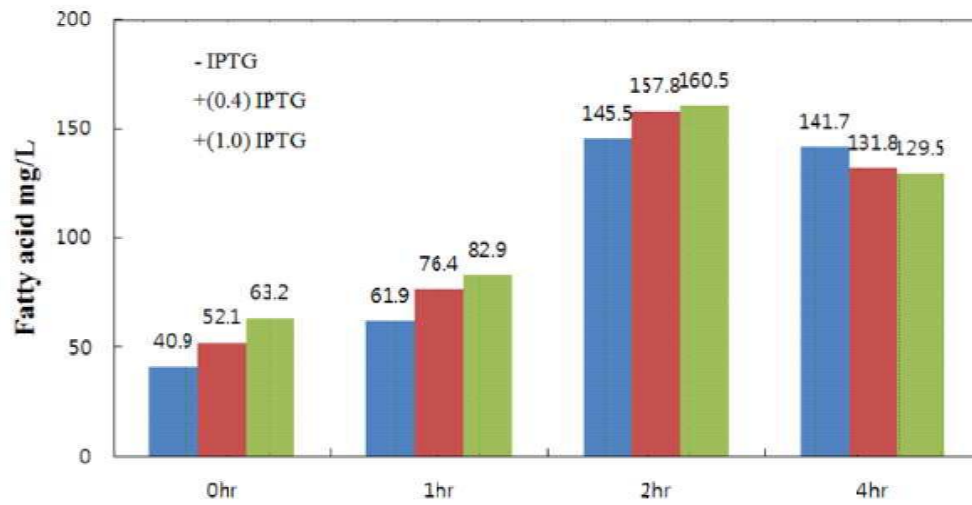
도면5



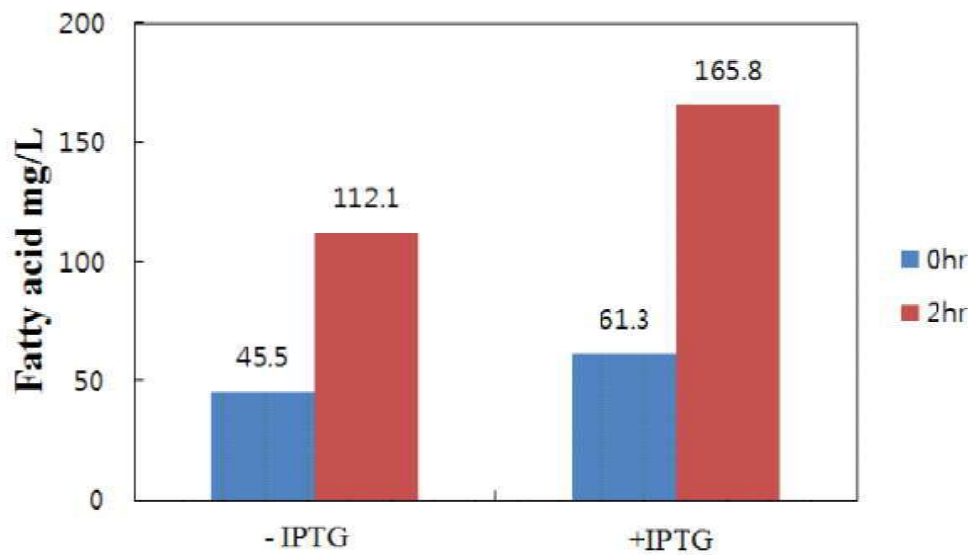
도면6



도면7



도면8



서열목록

- <110> Industry-University Cooperation Foundation Sogang University
- <120> Novel strain secreting fatty acids by phospholipase and method
for producing fatty acids using it
- <130> DP-2014-0281
- <160> 39
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1

<211> 1548

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 1

atggcgacca ttcctccca caaccttcgt cctcatacga ccaaccaaag gactcagtac	60
tctctttcct tcagaccaca cttttcacgc tctactctga tcactttccc ggcaagatca	120
tcgccggcga gggctatgtc cagaaccgac gaggaggctt caatatctac aaggctcgag	180
caagaaagct atgggctgac gacggcagag gacattcgcc gacgggatgg agaagcaaaa	240
gaatccaaga ggttgagaga cacgtggcgg aagatccaag gggaagatga ttgggccggg	300
ttaatggatc cgatggaccc ggttctgaga tctgagctga tccggtacgg agaaatggcc	360
caggcctgtt acgacgcctt cgatttcgat ccattttcaa ggtactgcgg gagctgcaga	420
ttcacgcgcc gtcacttgtt cgattcgctc gggataatcg attctggcta tgaggtggcg	480
cgttatctct acgcgacgtc gaacatcaac cttcctaatt tcttctccaa atcgagatgg	540
tccaagggtg ggagcaagaa cgccaattgg atgggttacg tggctgtatc cgacgacaac	600
gaagccacgc gctgccgttt aggacgccgc gacattgcc a tcgcctggag agggactgtc	660
acgcggctcg agtggatagc tgatctcaag gatttcctca aaccggtatc cggaaacgga	720
ttccgatgcc ccgacccggc cgtaaaagcc gaatccgggt ttctggatct atacacggac	780
aaagatacat cctgcaattt ctccaaattc tcggcgcgag agcaggttct tacggaagtg	840
aagcggctgg tggaaagta cggcgacgag gaaggagaag aactgagcat caccgtgacg	900
ggacacagtc tcggcgggtc gctggcggtg ctaagcgcgt acgacgtggc ggagatgggt	960
gtgaacagaa cgaggaaagg aaaagtgatt ccggtgacgg cgttcacgta cggaggaccg	1020
cgagtggga acattcgatt caaggagagg attgagaaat tgggagtga ggtgttgaga	1080
gtggtgaacg agcacgacgt cgtggcgaaa tcgccgggac tgtttctgaa cgagcgtgcg	1140
ccacaggcgc taatgaaatt ggcgggagga ttgccgtggt gctatagcca cgtgggagaa	1200
atgctgccgt tggatcatca gaagtctccg ttctttaagc ccaccgttga tctttctacg	1260
gctcataact tggaaactct cctccatctc cttgacgggt atcatgggaa aggacagaga	1320
tttgtgttat caagtgggag agatccagcg ttagtgaaca aagcatctga ttttttga	1380
gaccatttca tggctccctc ttattggcgc caagacgcaa acaaagggat ggtgaggaa	1440
actgacggcc gttggattca acctgatcgc atccgtgcag atgatcaaca tgctcctgac	1500
atacatcaac tctcaccca actccatcat ccatcacaac tcttgtaa	1548

<210> 2

<211> 447
 <212> DNA
 <213> Arabidopsis thaliana
 <400> 2
 atggcggctc cgatcatact tttctctttc cttttattct tctctgtctc tgtctcggca 60
 cttaacgtcg gtgttcagct catacatccc tccatttcct tgactaaaga atgtagccgg 120
 aaatgtgaat cagagttttg ttcagtgcct ccatttctga ggtatgggaa gtactgtgga 180
 ctactttaca gtggatgtcc tggtgagaga ccttgtgatg gtcttgattc ttgttgcattg 240

 aaacatgatg ctttgtgtcca atccaagaat aatgattatc taagccaaga gtgtagttag 300
 aagttcatta actgcatgaa caatttcagc cagaagaagc aaccgacgtt caaaggtaac 360
 aaatgcgacg ctgatgaagt gattgatgtc atctccattg tcatggaagc tgctcttattc 420
 gccggcaaag tcctcaagaa accctaa 447
 <210> 3
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> phospholipase A1 forward primer
 <400> 3
 gctctagaat gtcttctaca tgttcttc 28

 <210> 4
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> phospholipase A1 reverse primer
 <400> 4
 caagcttcta tacattagga agatgac 27
 <210> 5
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> phospholipase A2 forward primer
 <400> 5
 ctctagactt aacgtcgggtg ttcagctcat 30

<210> 6
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> phospholipase A2 reverse primer

<400> 6
 caagctttta gggtttcttg aggactttgc cg 32

<210> 7
 <211> 438
 <212> DNA
 <213> Rhodobacter sphaeroides
 <400> 7
 atgaagttcc aagtcaaggc cctcgccgcc atcgccgcat tcgcggcgct gccggcgctc 60
 gcgcaggaag gcgacccgga agccggggcc aaggccttca accagtgccca gacctgccac 120
 gtcacgtggc acgattccgg caccaccatc gccggccgca acgccaagac cggcccgaac 180
 ctctacggcg tcgtggggcg caccgcgggc acgcaggcgg acttcaaggg ctatggcgaa 240
 ggcatgaagg aagccggcgc gaaagggctc gcctgggatg aagagcattt cgtccagtat 300

gttcaggatc cgaccaagtt cctgaaggaa tataccggcg acgcgaaagc caagggaag 360
 atgaccttca agctgaagaa ggaagcggac gcccacaaca tctgggccta cctccagcag 420
 gtcgccgtcc ggcctga 438

<210> 8
 <211> 145
 <212> PRT
 <213> Rhodobacter sphaeroides
 <400> 8

Met Lys Phe Gln Val Lys Ala Leu Ala Ala Ile Ala Ala Phe Ala Ala
 1 5 10 15

Leu Pro Ala Leu Ala Gln Glu Gly Asp Pro Glu Ala Gly Ala Lys Ala

20 25 30
 Phe Asn Gln Cys Gln Thr Cys His Val Ile Val Asp Asp Ser Gly Thr
 35 40 45

Thr Ile Ala Gly Arg Asn Ala Lys Thr Gly Pro Asn Leu Tyr Gly Val

50 55 60
Val Gly Arg Thr Ala Gly Thr Gln Ala Asp Phe Lys Gly Tyr Gly Glu
65 70 75 80
Gly Met Lys Glu Ala Gly Ala Lys Gly Leu Ala Trp Asp Glu Glu His
85 90 95

Phe Val Gln Tyr Val Gln Asp Pro Thr Lys Phe Leu Lys Glu Tyr Thr
100 105 110
Gly Asp Ala Lys Ala Lys Gly Lys Met Thr Phe Lys Leu Lys Lys Glu
115 120 125
Ala Asp Ala His Asn Ile Trp Ala Tyr Leu Gln Gln Val Ala Val Arg
130 135 140

Pro

145

<210> 9

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CycA leader forward primer

<400> 9

cccatggatg aagttccaag tc

22

<210> 10

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CycA leader reverse primer

<400> 10

ctctagacgc gagegccggc agcgccgcga at

32

<210> 11

<211> 515

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 11

Met Ala Thr Ile Pro Ser His Asn Leu Arg Pro His Thr Thr Asn Gln

1	5	10	15
Arg Thr Gln Tyr Ser Leu Ser Phe Arg Pro His Phe Ser Arg Ser Thr			
20	25	30	
Leu Ile Thr Phe Pro Ala Arg Ser Ser Pro Ala Arg Ala Met Ser Arg			
35	40	45	
Thr Asp Glu Glu Ala Ser Ile Ser Thr Arg Leu Glu Gln Glu Ser Tyr			
50	55	60	
Gly Leu Thr Thr Ala Glu Asp Ile Arg Arg Arg Asp Gly Glu Ala Lys			
65	70	75	80
Glu Ser Lys Arg Leu Arg Asp Thr Trp Arg Lys Ile Gln Gly Glu Asp			
85	90	95	
Asp Trp Ala Gly Leu Met Asp Pro Met Asp Pro Val Leu Arg Ser Glu			
100	105	110	
Leu Ile Arg Tyr Gly Glu Met Ala Gln Ala Cys Tyr Asp Ala Phe Asp			
115	120	125	
Phe Asp Pro Phe Ser Arg Tyr Cys Gly Ser Cys Arg Phe Thr Arg Arg			
130	135	140	
His Leu Phe Asp Ser Leu Gly Ile Ile Asp Ser Gly Tyr Glu Val Ala			
145	150	155	160
Arg Tyr Leu Tyr Ala Thr Ser Asn Ile Asn Leu Pro Asn Phe Phe Ser			
165	170	175	
Lys Ser Arg Trp Ser Lys Val Trp Ser Lys Asn Ala Asn Trp Met Gly			
180	185	190	
Tyr Val Ala Val Ser Asp Asp Asn Glu Ala Thr Arg Cys Arg Leu Gly			
195	200	205	
Arg Arg Asp Ile Ala Ile Ala Trp Arg Gly Thr Val Thr Arg Leu Glu			
210	215	220	
Trp Ile Ala Asp Leu Lys Asp Phe Leu Lys Pro Val Ser Gly Asn Gly			
225	230	235	240
Phe Arg Cys Pro Asp Pro Ala Val Lys Ala Glu Ser Gly Phe Leu Asp			
245	250	255	

Leu Tyr Thr Asp Lys Asp Thr Ser Cys Asn Phe Ser Lys Phe Ser Ala
 260 265 270
 Arg Glu Gln Val Leu Thr Glu Val Lys Arg Leu Val Glu Arg Tyr Gly
 275 280 285
 Asp Glu Glu Gly Glu Glu Leu Ser Ile Thr Val Thr Gly His Ser Leu
 290 295 300
 Gly Gly Ala Leu Ala Val Leu Ser Ala Tyr Asp Val Ala Glu Met Gly
 305 310 315 320

 Val Asn Arg Thr Arg Lys Gly Lys Val Ile Pro Val Thr Ala Phe Thr
 325 330 335
 Tyr Gly Gly Pro Arg Val Gly Asn Ile Arg Phe Lys Glu Arg Ile Glu
 340 345 350
 Lys Leu Gly Val Lys Val Leu Arg Val Val Asn Glu His Asp Val Val
 355 360 365
 Ala Lys Ser Pro Gly Leu Phe Leu Asn Glu Arg Ala Pro Gln Ala Leu
 370 375 380
 Met Lys Leu Ala Gly Gly Leu Pro Trp Cys Tyr Ser His Val Gly Glu

 385 390 395 400
 Met Leu Pro Leu Asp His Gln Lys Ser Pro Phe Leu Lys Pro Thr Val
 405 410 415
 Asp Leu Ser Thr Ala His Asn Leu Glu Ala Leu Leu His Leu Leu Asp
 420 425 430
 Gly Tyr His Gly Lys Gly Gln Arg Phe Val Leu Ser Ser Gly Arg Asp
 435 440 445
 Pro Ala Leu Val Asn Lys Ala Ser Asp Phe Leu Lys Asp His Phe Met
 450 455 460

 Val Pro Pro Tyr Trp Arg Gln Asp Ala Asn Lys Gly Met Val Arg Asn
 465 470 475 480
 Thr Asp Gly Arg Trp Ile Gln Pro Asp Arg Ile Arg Ala Asp Asp Gln
 485 490 495
 His Ala Pro Asp Ile His Gln Leu Leu Thr Gln Leu His His Pro Ser
 500 505 510

Gln Leu Leu

515

<210> 12

<211> 148

<212> PRT

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 12

Met Ala Ala Pro Ile Ile Leu Phe Ser Phe Leu Leu Phe Phe Ser Val

1	5	10	15
Ser Val Ser Ala Leu Asn Val Gly Val Gln Leu Ile His Pro Ser Ile			
20	25	30	
Ser Leu Thr Lys Glu Cys Ser Arg Lys Cys Glu Ser Glu Phe Cys Ser			
35	40	45	
Val Pro Pro Phe Leu Arg Tyr Gly Lys Tyr Cys Gly Leu Leu Tyr Ser			
50	55	60	
Gly Cys Pro Gly Glu Arg Pro Cys Asp Gly Leu Asp Ser Cys Cys Met			
65	70	75	80

Lys His Asp Ala Cys Val Gln Ser Lys Asn Asn Asp Tyr Leu Ser Gln			
85	90	95	
Glu Cys Ser Gln Lys Phe Ile Asn Cys Met Asn Asn Phe Ser Gln Lys			
100	105	110	
Lys Gln Pro Thr Phe Lys Gly Asn Lys Cys Asp Ala Asp Glu Val Ile			
115	120	125	
Asp Val Ile Ser Ile Val Met Glu Ala Ala Leu Ile Ala Gly Lys Val			
130	135	140	

Leu Lys Lys Pro

145

<210> 13

<211> 960

<212> DNA

<213> *Rhodobacter sphaeroides*

<400> 13

atgaactatc tcgaattcga aaagccgctg tccgagatcg agggcaaggc cgaggagtgtg	60
cgcgcgctcg cgcggggca caggagatg gacgtcgaga aggaagcgtc ggcgctcgac	120
aagaaggccg agacgtctgt gaaggatctc tacaaggacc tgacccctg gcggaagtgc	180
caggtggcgc gccatcccga ccgcccgcac tgcaaggact atatcgaggg cctcttcacc	240
gaatatacgc cgctcgcggg cgaccggaac ttgccgacg accatgcgat catgggcggg	300
ctcgcgcggt tcaacgacaa tccggtggtg gtgatcggtc aggagaaggg ccacgacacc	360
aagacccgga tcgagcgcaa cttcggcatg gcccggcccg agggctatcg caaagccatc	420
cggctgatgg agatggcgca ccgcttcggg ctgccggtca tcacgtctgt ggatacgccc	480
ggcgccctatc ccggaaggg tgcggaagag cgcggccagg ccgaggccat tgcgggggcc	540
acgcagaaat gcctcgagat cggcgtgccg ctgggtggcg tggtgatcgg cgaggcgggc	600
tcgggcgggg cggtggcgct ggccacggcg aaccggatcg ccatgctcga acattcggtc	660
tattcgtga tctcgcccga gggctgcgcc tcgatcctgt ggaaggatgc cgagaagatg	720
cgcgaagccg ccgaagccct gcgctgacc gcgcaggatc tccacaagct cggcgtgac	780
gaccggatca tcaaggagcc gctcggcggg gcgcagcgcg gaccccgga gacggtcgac	840
gccgtgggca aggccatcga gatgatgctg aaggagctgg tgggccgcaa gcccagtggtg	900
ctcgtgaagg atcggcgcaa caagttcctc gacatggggt cgaagggcct cgcggcgtga	960
	960
<210> 14	
<211> 495	
<212> DNA	
<213> Rhodobacter sphaeroides	
<400> 14	
atgagcaaga acaacaccga ggccgatgtc gccttcaccc aggccttgc cgaactgtg	60
aacagcaacg agctcacgga actttcggtc aaacgggaat atggcgagga cgacagcctc	120
gaggtccgcg tggtaagca ggccaacatc gtgacgaccc aggttgcggc gccgatgatg	180
gccgccgccc ccgcgcgat gccggcggtc ggcggtgcc cgcgcgcgc tccggccgcg	240
gtcgaggatc cggcccagca tccggcgccc gtcacctcgc ccatggtggg caccgtctat	300
atgcccccg agccggcgcg ctcgcccttc gtcaccgtgg gcgccaccgt gaccgagggg	360
cagacgtcc tcatcatcga ggcgatgaag accatgaacc acatccccgc cccgcgcgcg	420
ggcacggtga agcgggtcct cgtctcgac ggacggcggc tcgaatacgg cgcgccctc	480
atgatcatcg agtga	495

<210> 15

<211> 1347

<212> DNA

<213> Rhodobacter sphaeroides

<400> 15

atgttcgaaa agatcctgat cgccaaccgc ggcgagatcg ccttgcgcgt gatccgcgcc 60

tgccaggaga tggggatcaa gtcggtcgcc gtccattcga ccgcggaacgc cgatgccatg 120

catgtccgca tggccgatga gagcgtctgc atcgccccgg cctcctcgac cgacagctat 180

ctcaacaagg cctcgatcat ctccggcctgc gagatcacgc gggccgaggc cgtccatccg 240

ggttacggct tcctctccga gaacgcggcc ttgccccagg cgctgcagga ccacgggatac 300

gagttcatcg gcccgaaccgc ggaccatatc cgcacatgga gcgacaagat caccgccaag 360

gacacgatga aggctctggg cgtgccctgc gtgcccggct ccgacggcgg cgtgcccgcac 420

tacgagacgg ccacgccac ggccagagac atcggtctcc cggatcatcat caaggccacg 480

gcgggcggcg gcgggcggcg catgaaggtc gcgcggaacg agcaggaact cgagatcgcc 540

ttccgcaccg cgcgttcgga agccaaggcc gccttcggca acgacgaagt ctatatggag 600

aaatatctcc agaagccgcg gcacatcgag atccagggtg tcggcgacgg caagggccgc 660

gcggtccatc tgggcgagcg tgactgctcg ctgcagcggc ggaccagaa ggtgttcgag 720

gaagccccgg gtccggatcat ccccccgag atgcgtgcgg agatcggcag gatctgcgcc 780

gacgcggtgg cgcggatcaa ctacatcggc gcgggcacga tcgaattcct ctacgaggac 840

ggccagtctt acttcacga gatgaacacc cgctgcagg tggagcatcc ggtgaccgag 900

gcgatcttcg gcgtcgatct cgtgcgcgag cagatccggg tcgcggcggg cctgccgatg 960

agcttcaatc aggatgcgct ggagatcaac ggccacgcca tcgagggtcg gatcaacgcc 1020

gagaagctgc cgaacttttc gccctgcccc ggcaaggctc gggctctcca cgcgccgggc 1080

ggcctcgggg tgcggatgga ttccggcctc tatggcggtt attccatccc gccctattac 1140

gacagcctga tcggcaagct gatcgtgcac ggccgcgacc ggcccagggc gctggcgcgc 1200

ctgcaccgcg ccctgggcga gctgatcgtg gacgggatcg acacgacggt gccgctgttc 1260

cacgcgttc tggccgagcc cgacatccag aatggcgact acaatatcca ctggctggaa 1320

aaatggctcg ccgccagtt cggtga 1347

<210> 16

<211> 954

<212> DNA

<213> Rhodobacter sphaeroides

<400> 16

atgaactgga tctccaacta cgtccgcccg aagatcaact cgctcttttc ggcgcgcgag	60
gtgccggaga acctctggac caagtgcccg gagtgcggga cgatgctctt ccaccgcgag	120
ctggccgaga acctgaacgt ctgctccacc tgcgaccacc acatgaacat cagcccgcgg	180
gaccggttcg ccgcgctctt cgacggcggg atcttcaccg aggtcgaggt gccggtgccg	240
ctgcccgacc cgctccagtt ccgcgaccag aagcgtatc ccgaccggat gaaggcggcg	300
cagaagacca cgggcgagaa ggaagccatg ctggtcgtcg agggcgagat cccccggacg	360
caggtggtgg ccgcggccca ggacttcagc ttcattggcg gctccatggg catgtatgtg	420
ggcaatgcca tcatcgccgc cgccgagcgc gcggtgaagc tcaaatgcc gctcatcctg	480
tttgccgcg ccggcggcgc gcggatgcag gaggggatct tgtcgctcat gcagatgccg	540
cgcacgacgg tggcgggtgca gatgctgcgc gaggcgggcc tgcctacat ctgcatcctg	600
accacccga ccacgggcgg cgtcaccgcc tcctatgcga tgcgggcga cgtgcagatc	660
gccgagccca atgcgctgat ctgcttcgcc ggcccccgcg tgatcgagca gacgatccgc	720
gagaagctgc ccgagggctt ccagcgcgcc gaatatctgc tcgaccacgg gatgctcgac	780
cgggtgaccc accgcaaggc gatcgcgag gagctggtca ccatcatccg gatgctgatg	840
aaccagccgc cgcgatcaa gggcgacctg cctgcgcccg agccgaagcc ggtgatcgac	900
ctgccgccgc cgccgacgcc ggaggcggtg gtcgacgaca aggcgccga gtga	954

<210> 17

<211> 933

<212> DNA

<213> Rhodobacter sphaeroides

<400> 17

atgagccgcg cattcgtgtt ccccgggcag ggcgctcaga ccatcgcat gggccgcgcg	60
ctcgccaag cctatcctgc ggcgcgggcg gtattcgacg aggtggacga ggcgctcggc	120
gagaaactct cggcgctgat ctgggacgga tccatcgagg agctcacgt gacgcagaac	180
gcgcagcccg cgctgatggc gacctcgatg gcggccctcg cggcgctcga ggtcgaaggc	240
ctgggcatcg ccaccgctc cttcgtggcg ggtcactcgc tcggcgaata ttccgccctg	300
tgcgcggcga agtcgctgaa gctctcgat acggcgcggc ttctgcgcat ccgcgggcgag	360
gccatgcagg aggcgggtgcc ggtgggcgtg ggcgcgatgg ccgcgctcct cgggctcgat	420
tacgacaccg cggtcgaggt cgcgcacgag gcggcgcagg gcgaagtgtg ccaggccgcc	480
aacgacaacg atccggcgca ggtgggtgtc tcgggccaca aggcggccgt cgagagggca	540

gtggagatcg ccaagggcgg cggcgccaag cgggccatcc tgctgccggt gagcgccccc 600
 ttccattcgg cactgatgca gcatgccgcg agcgtcatgt ccgaagctct cgccgcggtg 660
 gtgatcgagg cgccggtctg cccggctcgc gtgaacgtgc gcgccgaggc ggtgtcggag 720
 ccggaccgga tccgtgcgct cctcgtggca caggtgacgg ggcccggtccg ctggcgcgag 780

agcgtgatgt ggatggaaaa tgcgggctg gacgagttct gggaaatcgg tgccggcaag 840
 gcgctgtcgg gcatgatcaa gcggatgcc aaggcgcgcg cgacccgggc catcggcacg 900
 cccgaggatg tggcggtcgc cgccacggcc tga 933

<210> 18

<211> 972

<212> DNA

<213> Rhodobacter sphaeroides

<400> 18

atgacaatac gcgccgtggt gaggggctgc gggcactatc tgcccacgacg tgcgtcccg 60
 aactccgaac tcgaggcgat cgtcgagacg accgacgaat ggatccgcac ccggtcgggc 120
 atcgaacggc ggcatcttcgc ggccggaggga cagacgacct ccgacctgc cgcccgcgcg 180

gcgcgtgcag cgctcgagga cgccgggctt cagccggacg acatcgacac gctgatcgtc 240
 gccacctcca cgcccgatct caccttcccc tcccgccca ccatggtgca ggccgcttg 300
 ggcatgacct gcggtctcgc cttcgacgtg caggcggtct gcgcgggctt cgtctatcgc 360
 ctggccaatg ccgatgcgct gatccgctcg ggtcaggcgc agcgcgtgct cgtgatcggg 420
 gccgagacct tcagccgct gatggactgg aacgaccggg ccacctgct gctcttcggc 480
 gatggcgcg gcgcgggtgt gctcgagggc accgagagcg ccggcacctc cgccgaccgc 540
 ggcatccttg cgaccgacct gcatcggac ggccgcttca aggacctgct ctatgtcgat 600

ggcggtcct cgaccggcac caccggccac ctgcggatgc agggacgca ggttttcgc 660
 catgccgttg agaagcttg agaaacagcg catacggcac tggagaaggc ggccctcggc 720
 gccggcgatg tcgactggat cgtgccgcat caggccaacc tgcgcatcat ctcggccacc 780
 gccagcgga tgcaggttcc gatggaccgc gtgactctga cggcgcagga tcacggcaat 840
 acctcggccg cctcgattcc cctggccctc tcggtcggca aggcacgcgg gcagatcaag 900
 gaaggcgacc ttctggtcac cgaagcgtc ggccggcggc tcgctgggg ctcggtggtc 960
 ctccgctggt ag 972

<210> 19

<211> 319

<212> PRT

<213> Rhodobacter sphaeroides

<400> 19

Met Asn Tyr Leu Glu Phe Glu Lys Pro Leu Ser Glu Ile Glu Gly Lys

1 5 10 15

Ala Glu Glu Leu Arg Ala Leu Ala Arg Gly Asn Arg Glu Met Asp Val

20 25 30

Glu Lys Glu Ala Ser Ala Leu Asp Lys Lys Ala Glu Thr Leu Leu Lys

35 40 45

Asp Leu Tyr Lys Asp Leu Thr Pro Trp Arg Lys Cys Gln Val Ala Arg

50 55 60

His Pro Asp Arg Pro His Cys Lys Asp Tyr Ile Glu Gly Leu Phe Thr

65 70 75 80

Glu Tyr Thr Pro Leu Ala Gly Asp Arg Asn Phe Ala Asp Asp His Ala

85 90 95

Ile Met Gly Gly Leu Ala Arg Phe Asn Asp Asn Pro Val Val Val Ile

100 105 110

Gly Gln Glu Lys Gly His Asp Thr Lys Thr Arg Ile Glu Arg Asn Phe

115 120 125

Gly Met Ala Arg Pro Glu Gly Tyr Arg Lys Ala Ile Arg Leu Met Glu

130 135 140

Met Ala His Arg Phe Arg Leu Pro Val Ile Thr Leu Val Asp Thr Pro

145 150 155 160

Gly Ala Tyr Pro Gly Lys Gly Ala Glu Glu Arg Gly Gln Ala Glu Ala

165 170 175

Ile Ala Arg Ala Thr Gln Lys Cys Leu Glu Ile Gly Val Pro Leu Val

180 185 190

Ala Val Val Ile Gly Glu Gly Gly Ser Gly Gly Ala Val Ala Leu Ala

195 200 205

Thr Ala Asn Arg Ile Ala Met Leu Glu His Ser Val Tyr Ser Val Ile

210 215 220

Ser Pro Glu Gly Cys Ala Ser Ile Leu Trp Lys Asp Ala Glu Lys Met

225 230 235 240
Arg Glu Ala Ala Glu Ala Leu Arg Leu Thr Ala Gln Asp Leu His Lys

245 250 255
Leu Gly Val Ile Asp Arg Ile Ile Lys Glu Pro Leu Gly Gly Ala Gln

260 265 270

Arg Gly Arg Arg Glu Thr Val Asp Ala Val Gly Lys Ala Ile Glu Met

275 280 285
Met Leu Lys Glu Leu Val Gly Arg Lys Pro Glu Trp Leu Val Lys Asp

290 295 300
Arg Arg Asn Lys Phe Leu Asp Met Gly Ser Lys Gly Leu Ala Ala

305 310 315

<210> 20

<211> 164

<212> PRT

<213> Rhodobacter sphaeroides

<400> 20

Met Ser Lys Asn Asn Thr Glu Ala Asp Val Ala Phe Ile Gln Ala Leu

1 5 10 15
Ala Glu Leu Leu Asn Ser Asn Glu Leu Thr Glu Leu Ser Val Lys Arg

20 25 30
Glu Tyr Gly Glu Asp Asp Ser Leu Glu Val Arg Val Val Lys Gln Ala

35 40 45
Asn Ile Val Thr Thr Gln Val Ala Ala Pro Met Met Ala Ala Ala Pro

50 55 60
Ala Ala Met Pro Ala Val Gly Gly Ala Pro Ala Ala Ala Pro Ala Ala

65 70 75 80

Val Glu Asp Pro Ala Gln His Pro Gly Ala Val Thr Ser Pro Met Val

85 90 95
Gly Thr Val Tyr Ile Ala Pro Glu Pro Gly Ala Ser Pro Phe Val Thr

100 105 110
Val Gly Ala Thr Val Thr Glu Gly Gln Thr Leu Leu Ile Ile Glu Ala

115 120 125

Met Lys Thr Met Asn His Ile Pro Ala Pro Arg Ala Gly Thr Val Lys
130 135 140

Arg Val Leu Val Ser Asp Gly Thr Ala Val Glu Tyr Gly Ala Pro Leu

145 150 155 160
Met Ile Ile Glu

<210> 21

<211> 448

<212> PRT

<213> Rhodobacter sphaeroides

<400> 21

Met Phe Glu Lys Ile Leu Ile Ala Asn Arg Gly Glu Ile Ala Leu Arg
1 5 10 15

Val Ile Arg Ala Cys Gln Glu Met Gly Ile Lys Ser Val Ala Val His
20 25 30

Ser Thr Ala Asp Ala Asp Ala Met His Val Arg Met Ala Asp Glu Ser

35 40 45
Val Cys Ile Gly Pro Ala Ser Ser Thr Asp Ser Tyr Leu Asn Lys Ala

50 55 60
Ser Ile Ile Ser Ala Cys Glu Ile Thr Gly Ala Glu Ala Val His Pro

65 70 75 80
Gly Tyr Gly Phe Leu Ser Glu Asn Ala Ala Phe Ala Gln Ala Leu Gln

85 90 95
Asp His Gly Ile Glu Phe Ile Gly Pro Thr Ala Asp His Ile Arg Ile

100 105 110

Met Gly Asp Lys Ile Thr Ala Lys Asp Thr Met Lys Ala Leu Gly Val
115 120 125

Pro Cys Val Pro Gly Ser Asp Gly Gly Val Pro Asp Tyr Glu Thr Ala
130 135 140

Ile Ala Thr Ala Arg Asp Ile Gly Phe Pro Val Ile Ile Lys Ala Thr
145 150 155 160

Ala Gly Gly Gly Gly Arg Gly Met Lys Val Ala Arg Asn Glu Gln Glu

165 170 175
 Leu Glu Ile Ala Phe Arg Thr Ala Arg Ser Glu Ala Lys Ala Ala Phe

 180 185 190
 Gly Asn Asp Glu Val Tyr Met Glu Lys Tyr Leu Gln Lys Pro Arg His
 195 200 205
 Ile Glu Ile Gln Val Phe Gly Asp Gly Lys Gly Arg Ala Val His Leu
 210 215 220
 Gly Glu Arg Asp Cys Ser Leu Gln Arg Arg His Gln Lys Val Phe Glu
 225 230 235 240
 Glu Ala Pro Gly Pro Val Ile Thr Pro Glu Met Arg Ala Glu Ile Gly
 245 250 255

 Arg Ile Cys Ala Asp Ala Val Ala Arg Ile Asn Tyr Ile Gly Ala Gly
 260 265 270
 Thr Ile Glu Phe Leu Tyr Glu Asp Gly Gln Phe Tyr Phe Ile Glu Met
 275 280 285
 Asn Thr Arg Leu Gln Val Glu His Pro Val Thr Glu Ala Ile Phe Gly
 290 295 300
 Val Asp Leu Val Arg Glu Gln Ile Arg Val Ala Ala Gly Leu Pro Met
 305 310 315 320
 Ser Phe Asn Gln Asp Ala Leu Glu Ile Asn Gly His Ala Ile Glu Val

 325 330 335
 Arg Ile Asn Ala Glu Lys Leu Pro Asn Phe Ser Pro Cys Pro Gly Lys
 340 345 350
 Val Arg Val Phe His Ala Pro Gly Gly Leu Gly Val Arg Met Asp Ser
 355 360 365
 Ala Leu Tyr Gly Gly Tyr Ser Ile Pro Pro Tyr Tyr Asp Ser Leu Ile
 370 375 380
 Gly Lys Leu Ile Val His Gly Arg Asp Arg Pro Glu Ala Leu Ala Arg
 385 390 395 400

 Leu His Arg Ala Leu Gly Glu Leu Ile Val Asp Gly Ile Asp Thr Thr
 405 410 415

Val Pro Leu Phe His Ala Leu Leu Ala Glu Pro Asp Ile Gln Asn Gly
420 425 430

Asp Tyr Asn Ile His Trp Leu Glu Lys Trp Leu Ala Ala Gln Phe Gly
435 440 445

<210> 22

<211> 317

<212> PRT

<213> Rhodobacter sphaeroides

<400> 22

Met Asn Trp Ile Ser Asn Tyr Val Arg Pro Lys Ile Asn Ser Leu Phe

1 5 10 15
Ser Arg Arg Glu Val Pro Glu Asn Leu Trp Thr Lys Cys Pro Glu Cys
20 25 30

Gly Thr Met Leu Phe His Arg Glu Leu Ala Glu Asn Leu Asn Val Cys
35 40 45

Ser Thr Cys Asp His His Met Asn Ile Ser Pro Arg Asp Arg Phe Ala
50 55 60

Ala Leu Phe Asp Gly Gly Ile Phe Thr Glu Val Glu Val Pro Val Pro
65 70 75 80

Leu Ala Asp Pro Leu Gln Phe Arg Asp Gln Lys Arg Tyr Pro Asp Arg
85 90 95

Met Lys Ala Ala Gln Lys Thr Thr Gly Glu Lys Glu Ala Met Leu Val
100 105 110

Val Glu Gly Glu Ile Ala Arg Thr Gln Val Val Ala Ala Ala Gln Asp
115 120 125

Phe Ser Phe Met Ala Gly Ser Met Gly Met Tyr Val Gly Asn Ala Ile
130 135 140

Ile Ala Ala Ala Glu Arg Ala Val Lys Leu Lys Cys Pro Leu Ile Leu

145 150 155 160
Phe Ala Ala Ala Gly Gly Ala Arg Met Gln Glu Gly Ile Leu Ser Leu

165 170 175
Met Gln Met Pro Arg Thr Thr Val Ala Val Gln Met Leu Arg Glu Ala

180 185 190
 Gly Leu Pro Tyr Ile Cys Ile Leu Thr His Pro Thr Thr Gly Gly Val
 195 200 205
 Thr Ala Ser Tyr Ala Met Leu Gly Asp Val Gln Ile Ala Glu Pro Asn
 210 215 220

 Ala Leu Ile Cys Phe Ala Gly Pro Arg Val Ile Glu Gln Thr Ile Arg
 225 230 235 240
 Glu Lys Leu Pro Glu Gly Phe Gln Arg Ala Glu Tyr Leu Leu Asp His
 245 250 255
 Gly Met Leu Asp Arg Val Thr His Arg Lys Ala Met Arg Glu Glu Leu
 260 265 270
 Val Thr Ile Ile Arg Met Leu Met Asn Gln Pro Pro Ala Ile Lys Gly
 275 280 285
 Asp Leu Pro Ala Pro Glu Pro Lys Pro Val Ile Asp Leu Pro Pro Pro

 290 295 300
 Pro Thr Pro Glu Ala Val Val Asp Asp Lys Ala Ala Glu
 305 310 315
 <210> 23
 <211> 310
 <212> PRT
 <213> Rhodobacter sphaeroides
 <400> 23
 Met Ser Arg Ala Phe Val Phe Pro Gly Gln Gly Ala Gln Thr Ile Gly
 1 5 10 15
 Met Gly Arg Ala Leu Ala Glu Ala Tyr Pro Ala Ala Arg Ala Val Phe
 20 25 30
 Asp Glu Val Asp Glu Ala Leu Gly Glu Lys Leu Ser Ala Leu Ile Trp

 35 40 45
 Asp Gly Ser Ile Glu Glu Leu Thr Leu Thr Gln Asn Ala Gln Pro Ala
 50 55 60
 Leu Met Ala Thr Ser Met Ala Ala Leu Ala Ala Leu Glu Val Glu Gly
 65 70 75 80

Leu Gly Ile Ala Thr Ala Ser Phe Val Ala Gly His Ser Leu Gly Glu
85 90 95

Tyr Ser Ala Leu Cys Ala Ala Lys Ser Leu Lys Leu Ser Asp Thr Ala
100 105 110

Arg Leu Leu Arg Ile Arg Gly Gln Ala Met Gln Glu Ala Val Pro Val
115 120 125

Gly Val Gly Ala Met Ala Ala Leu Leu Gly Leu Asp Tyr Asp Thr Ala
130 135 140

Val Glu Val Ala His Glu Ala Ala Gln Gly Glu Val Cys Gln Ala Ala
145 150 155 160

Asn Asp Asn Asp Pro Ala Gln Val Val Val Ser Gly His Lys Ala Ala
165 170 175

Val Glu Arg Ala Val Glu Ile Ala Lys Gly Arg Gly Ala Lys Arg Ala

180 185 190

Ile Leu Leu Pro Val Ser Ala Pro Phe His Cys Ala Leu Met Gln His
195 200 205

Ala Ala Ser Val Met Ser Glu Ala Leu Ala Ala Val Val Ile Glu Ala
210 215 220

Pro Val Cys Pro Val Val Val Asn Val Arg Ala Glu Ala Val Ser Glu
225 230 235 240

Pro Asp Arg Ile Arg Ala Leu Leu Val Ala Gln Val Thr Gly Ala Val
245 250 255

Arg Trp Arg Glu Ser Val Met Trp Met Glu Asn Ala Gly Val Asp Glu
260 265 270

Phe Trp Glu Ile Gly Ala Gly Lys Ala Leu Ser Gly Met Ile Lys Arg
275 280 285

Ile Ala Lys Gly Ala Ala Thr Arg Ala Ile Gly Thr Pro Glu Asp Val
290 295 300

Ala Ala Ala Ala Thr Ala

305 310

<210> 24

<211> 323

<212> PRT

<213> Rhodobacter sphaeroides

<400> 24

Met Thr Ile Arg Ala Val Val Arg Gly Val Gly His Tyr Leu Pro Asp

1 5 10 15
Arg Val Val Pro Asn Ser Glu Leu Glu Ala Ile Val Glu Thr Thr Asp
20 25 30
Glu Trp Ile Arg Thr Arg Ser Gly Ile Glu Arg Arg His Phe Ala Ala
35 40 45
Glu Gly Gln Thr Thr Ser Asp Leu Ala Ala Arg Ala Ala Arg Ala Ala
50 55 60
Leu Glu Asp Ala Gly Leu Gln Pro Asp Asp Ile Asp Thr Leu Ile Val
65 70 75 80

Ala Thr Ser Thr Ala Asp Leu Thr Phe Pro Ser Ala Ala Thr Met Val
85 90 95
Gln Ala Ala Leu Gly Met Thr Arg Gly Phe Ala Phe Asp Val Gln Ala
100 105 110
Val Cys Ala Gly Phe Val Tyr Ala Leu Ala Asn Ala Asp Ala Leu Ile
115 120 125
Arg Ser Gly Gln Ala Gln Arg Val Leu Val Ile Gly Ala Glu Thr Phe
130 135 140
Ser Arg Leu Met Asp Trp Asn Asp Arg Ala Thr Cys Val Leu Phe Gly

145 150 155 160
Asp Gly Ala Gly Ala Val Val Leu Glu Gly Thr Glu Ser Ala Gly Thr
165 170 175
Ser Ala Asp Arg Gly Ile Leu Ala Thr Asp Leu His Ser Asp Gly Arg
180 185 190
Phe Lys Asp Leu Leu Tyr Val Asp Gly Gly Ser Ser Thr Gly Thr Thr
195 200 205
Gly His Leu Arg Met Gln Gly Arg Glu Val Phe Arg His Ala Val Glu
210 215 220

Lys Leu Ala Glu Thr Ala His Thr Ala Leu Glu Lys Ala Gly Leu Gly
 225 230 235 240
 Ala Gly Asp Val Asp Trp Ile Val Pro His Gln Ala Asn Leu Arg Ile
 245 250 255
 Ile Ser Ala Thr Ala Gln Arg Met Gln Val Pro Met Asp Arg Val Ile
 260 265 270
 Leu Thr Val Gln Asp His Gly Asn Thr Ser Ala Ala Ser Ile Pro Leu
 275 280 285
 Ala Leu Ser Val Gly Lys Ala Arg Gly Gln Ile Lys Glu Gly Asp Leu

 290 295 300
 Leu Val Thr Glu Ala Ile Gly Gly Gly Leu Ala Trp Gly Ser Val Val
 305 310 315 320
 Leu Arg Trp

<210> 25

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> accA forward primer

<400> 25

gctctagatt cctccggcgc tcgtgtgg

28

<210> 26

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> accA reverse primer

<400> 26

aactgcagtc acgccgcgag gcccttcgac

30

<210> 27

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> accBC forward primer

<400>	27	
caagcttggtt gtcggcgctc ttgtagc		27
<210>	28	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	accBC reverse primer	
<400>	28	
gctctagacg gcgaaatcct catccac		27
<210>	29	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	accD forward primer	
<400>	29	
gtctcctccg aagcaggcgc		20
<210>	30	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	accD reverse primer	
<400>	30	
tcactcggcg gccttgtcgt cg		22
<210>	31	
<211>	32	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	fabD forward primer	
<400>	31	
gctctagaag gatcatcata tccgcacagt tc		32
<210>	32	
<211>	29	
<212>	DNA	

<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	fabD reverse primer	
<400>	32	
aactgcagtc aggccgtggc ggcagccgc		29
<210>	33	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	fabH forward primer	
<400>	33	
ggggtaccct atgcccga cggcttcagc etc		33
<210>	34	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	fabH reverse primer	
<400>	34	
gctctagatg aagcacggat tccaccag		28
<210>	35	
<211>	1686	
<212>	DNA	
<213>	Escherichia coli	
<400>	35	
ttgaagaagg tttggcttaa ccgttatccc gcggacgttc cgacggagat caaccctgac		60
cgttatcaat ctctggtaga tatgtttgag cagtcggtcg cgcgtacgc cgatcaacct		120
gcgtttgtga atatggggga ggtaatgacc ttccgcaagc tggaagaacg cagtcgcgcg		180
tttgccgctt atttgaaca agggttgggg ctgaagaaag gcgatcgctg tgcgttgatg		240
atgcctaatt tattgcaata tccggtggcg ctgtttggca ttttgcgtgc cgggatgac		300
gtcgtaaacg ttaaccgtt gtatccccg cgtgagcttg agcatcagct taacgatagc		360
ggcgcacg cgattgttat cgtgtctaac tttgctcaca cactggaaaa agtggttgat		420
aaaaccgccc ttcagcacgt aattctgacc cgtatggcg atcagctatc tacggcaaaa		480
ggcacggtag tcaatttcgt tgttaatac atcaagcgtt tgggtccgaa ataccatctg		540
ccagatgcc tttcatttcg tagcgactg cataacggct accggatgca gtacgtcaaa		600

cccgaactgg tgccggaaga tttagctttt ctgcaataca ccggcggcac cactggtgtg 660

gcgaaaggcg cgatgctgac tcaccgcaat atgctggcga acctggaaca ggttaacgcg 720

acctatggtc cgctgttgca tccgggcaaa gagctgggtg tgacggcgct gccgctgtat 780

cacatTTTTG ccctgacat taactgcctg ctgtttatcg aactgggtgg gcagaacctg 840

cttatcacta acccgcgcgga tattccaggg ttggtaaaag agttagcgaa atatccgttt 900

accgctatca cgggcgttaa cacctgttc aatgcgttgc tgaacaataa agagttccag 960

cagctggatt tctccagtct gcatctttcc gcaggcgggt ggatgccagt gcagcaagtg 1020

gtggcagagc gttgggtgaa actgaccgga cagtatctgc tggaaggcta tggccttacc 1080

gagtgtgcgc cgctgggtcag cgtaaccca tatgatattg attatcatag tggtagcatc 1140

ggtttgccgg tgccgtcgac ggaagccaaa ctggtggatg atgatgataa tgaagtacca 1200

ccagggtcaac cgggtgagct ttgtgtcaaa ggaccgcagg tgatgctggg ttactggcag 1260

cgtcccgatg ctaccgatga aatcatcaaa aatggctggt tacacaccgg cgacatcgcg 1320

gtaatggatg aagaaggatt cctgcgcatt gtcgatcgta aaaaagacat gattctggtt 1380

tccggtttta acgtctatcc caacgagatt gaagatgtcg tcatgcagca tcctggcgta 1440

caggaagtgc cggctgttgg cgtaccttcc ggctccagtg gtgaagcggg gaaaatcttc 1500

gtagtgaaaa aagatccatc gcttaccgaa ggtcactgg tgactttttg ccgccgtcag 1560

ctcacgggat acaaagtacc gaagctgggtg gagtttcgtg atgagttacc gaaatctaac 1620

gtcggaaaaa ttttgcgacg agaattacgt gacgaagcgc gcggcaaaagt ggacaataaa 1680

gcctga 1686

<210> 36

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> fadD upstream forward primer

<400> 36

gtcgacagtg acgcgcttcg caacctt 27

<210> 37

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> fadD upstream reverse primer

<400> 37
gaattcaaca gcgccaccgg atattgc 27
<210> 38
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> fadD downstream forward primer
<400> 38
gaattcgtgg tgaagcgggtg aaaatct 27
<210> 39
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> fadD downstream reverse primer

<400> 39
gcatgcagtt gaatcaaccc cagctgc 27