



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0092557
(43) 공개일자 2016년08월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/74 (2006.01) *C12N 9/88* (2006.01)

C12P 7/64 (2006.01) *C12R 1/15* (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 15/74 (2013.01)

C12N 9/88 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0012671

(22) 출원일자 2015년01월27일

심사청구일자 2015년01월27일

(71) 출원인

서강대학교산학협력단

서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)

(72) 발명자

이진원

서울특별시 송파구 양재대로 1218 (방이동, 올림픽선수기자촌아파트) 201동 1601호

이병훈

서울특별시 영등포구 양평로12가길 2 509호 (당산동6가)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양부현

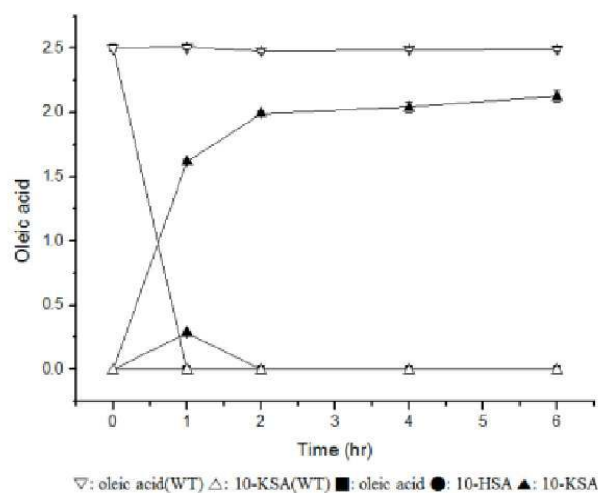
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 10-케토스테아린 산의 생산능이 우수한 코리네박테리움 글루타미쿰 균주 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 (a) 하이드라테이즈(hydratase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열; (b) 알코올 디하이드로게네이스(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열; 또는 (c) 하이드라테이즈(hydratase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열과 알코올 디하이드로게네이스(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현벡터로 형질전환된 10-케토스테아린 산(10-ketostearic acid) 생산용 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) 균주에 관한 것이다. 야생종 코리네박테리움 글루타미쿰 균주가 10-케토스테아린 산의 생산이 전혀 이루어지지 않는데 반해, 유전자 조작을 통해 재조합된 본 발명의 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) 균주는 우수한 10-케토스테아린 산 생성능을 가지며, 10-케토스테아린 산을 탄소원으로 사용하지 않아 지속적으로 10-케토스테아린 산을 생산할 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

C12P 7/6409 (2013.01)

C12R 1/15 (2013.01)

(72) 발명자

이재범

대전광역시 대덕구 동춘당로114번길 47 (송촌동,
선비마을2단지아파트) 206동 201호

김현수

서울특별시 강남구 학동로 609 12동 907호 (청담
동, 삼익아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 10044604

부처명 산업통상자원부

연구관리전문기관 한국산업기술평가관리원

연구사업명 산업핵심기술개발사업

연구과제명 지방/지방산으로부터 장쇄디카르복실산의 생물/화학적 전환 기술 개발

기 여 율 1/1

주관기관 (주)에이피테크놀로지

연구기간 2014.06.01 ~ 2015.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

(a) 하이드라테이즈(hydratase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열; (b) 알코올 디하이드로게네이즈(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열; 또는 (c) 하이드라테이즈(hydratase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열과 알코올 디하이드로게네이즈(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현벡터로 형질전환된 10-케토스테아린 산(10-ketostearic acid) 생산용 코리네박테리움 글루타미컴(*Corynebacterium glutamicum*) 균주.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 코리네박테리움 글루타미컴 균주는 하이드라테이즈(hydratase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열과 알코올 디하이드로게네이즈(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 각각 포함하는 2개의 발현벡터로 공동형질전환된 것을 특징으로 하는 코리네박테리움 글루타미컴 균주.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 코리네박테리움 글루타미컴 균주는 하이드라테이즈(hydratase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열과 알코올 디하이드로게네이즈(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 모두 포함하는 1개의 발현벡터로 공동형질전환된 것을 특징으로 하는 코리네박테리움 글루타미컴 균주.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 하이드라테이즈(hydratase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 스테노트로포모나스 말토펠리아(*Stenotrophomonas maltophilia*)로부터 유래하고, 알코올 디하이드로게네이즈(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 마이크로코쿠스 루테우스(*Micrococcus luteus*)로부터 유래한 것을 특징으로 하는 코리네박테리움 글루타미컴 균주.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 하이드라테이즈는 서열목록 제 1 서열의 아미노산 서열을 포함하고, 상기 알코올 디하이드로게네이즈는 서열목록 제 3 서열의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 코리네박테리움 글루타미컴 균주.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 하이드라테이즈를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열목록 제 2 서열의 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 상기 알코올 디하이드로게네이즈를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열목록 제 4 서열의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 코리네박테리움 글루타미컴 균주.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 발현벡터는 도 3의 유전자 지도를 갖는 pCES-L10이고, 상기 뉴클레오티드 서열은 pCES-

L10의 MCS(multiple cloning site)에 삽입되는 것을 특징으로 하는 코리네박테리움 글루타미컴 균주.

청구항 8

다음 단계를 포함하는 10-케토스테아린 산(10-ketostearic acid) 생산용 코리네박테리움 글루타미컴(*Corynebacterium glutamicum*) 균주의 제조방법:

(a) (i) 하이드라테이즈(hydratase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열; (ii) 알코올 디하이드로게네이스(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열; 또는 (iii) 하이드라테이즈(hydratase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열과 알코올 디하이드로게네이스(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현벡터에 삽입시키는 단계; 및

(b) 상기 뉴클레오티드 서열이 삽입된 발현벡터로 코리네박테리움 글루타미컴 균주를 형질전환시키는 단계.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 코리네박테리움 글루타미컴 균주를 발현시키는 단계 (b)는 전기충격 방법으로 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

다음 단계를 포함하는 10-케토스테아린 산(10-ketostearic acid) 생합성 방법:

(a) 제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항의 코리네박테리움 글루타미컴 균주를 배양하여 10-케토스테아린 산을 생합성하는 단계; 및

(b) 상기 단계 (a)의 생합성된 10-케토스테아린 산을 수득하는 단계.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 10-케토스테아린 산(10-ketostearic acid) 생산용 코리네박테리움 글루타미컴(*Corynebacterium glutamicum*) 균주, 이의 제조방법 및 상기 균주를 이용한 10-케토스테아린 산 생합성 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 코리네박테리움 글루타미컴(*Corynebacterium glutamicum*)은 그람-양성 토양박테리아로서, 비병원성이며 빠른 균 생장과 주변 환경 적응에 강한 성질로 인해 현재 산업용 균주로 많이 사용되고 있다. 특히 현재 글루타메이트와 라이신 등의 아미노산 생산용 균주로써 산업현장에서 널리 사용 되고 있는 균주이다(도 1).

[0003] 한편, 미생물을 이용하여 10-하이드록시스테아린 산(10-hydroxystearic acid; 10-HSA) 및 10-케토스테아린 산(10-ketostearic acid; 10-KSA)의 생산 연구가 많이 진행되어왔지만, 산업용 균주인 코리네박테리움 글루타미컴으로 생산하는 연구는 아직 진행되지 않았으며, 일반적인 10-HSA 및 10-KSA 생산 경로는 도 2와 같다.

[0004] 현재 재생 가능한 지방산을 이용한 생물 전환반응에 관한 연구에 가장 널리 알려진 균주는 대장균(*Escherichia coli*)이다. 하지만, 대장균 같은 경우는 10-KSA를 탄소원으로 사용하기 때문에 10-KSA를 지속적으로 생산하기란 쉽지 않다.

[0005] 그리하여, 본 발명자들은 10-KSA를 탄소원으로 사용하지 않고, 지속적으로 생산 가능하도록, 적응력이 강한 코리네박테리움 글루타미컴(*Corynebacterium glutamicum*)을 이용하여 10-KSA를 생산하고자 하였다.

[0006] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명

의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허공보 제10-2014-0015086호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명자들은 우수한 10-케토스테아린 산(10-ketostearic acid) 생산능을 가지며, 유전자 조작을 통해 10-케토스테아린 산 생합성 대사산물을 안정적이고, 효과적으로 생산하는 균주의 개발을 위하여 예의 연구 노력하였고, 그 결과 스테노트로포모나스 말토피리아(*Stenotrophomonas maltophilia*) 유래 *OhyA* 유전자 및 마이크로코쿠스 루테우스(*Micrococcus luteus*) 유래 *ADH* 유전자군으로부터 선택된 1종 이상의 유전자를 코리네박테리움 글루타미킴(*Corynebacterium glutamicum*) 균주를 형질전환 시킨 결과, 효과적으로 10-케토스테아린 산 생합성 경로가 과발현되고, 10-케토스테아린 산을 탄소원으로 사용하지 않아 지속적으로 10-케토스테아린 산을 생산 가능함을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

[0009] 따라서, 본 발명의 목적은 10-케토스테아린 산(10-ketostearic acid) 생산용 코리네박테리움 글루타미킴(*Corynebacterium glutamicum*) 균주를 제공하는 데 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 상술한 본 발명의 10-케토스테아린 산 생산용 코리네박테리움 글루타미킴(*Corynebacterium glutamicum*) 균주의 제조방법을 제공하는 데 있다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상술한 본 발명의 코리네박테리움 글루타미킴(*Corynebacterium glutamicum*) 균주를 이용하여 10-케토스테아린 산 생합성 방법을 제공하는 데 있다.

[0012] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 하이드라테이즈(hydratase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열; (b) 알코올 디하이드로게네이즈(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열; 또는 (c) 하이드라테이즈(hydratase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열과 알코올 디하이드로게네이즈(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현벡터로 형질전환된 10-케토스테아린 산(10-ketostearic acid) 생산용 코리네박테리움 글루타미킴(*Corynebacterium glutamicum*) 균주를 제공한다.

[0014] 본 발명자들은 우수한 10-케토스테아린 산(10-ketostearic acid) 생산능을 가지며, 유전자 조작을 통해 10-케토스테아린 산 생합성 대사산물을 안정적이고, 효과적으로 생산하는 균주의 개발을 위하여 예의 연구 노력하였고, 그 결과 스테노트로포모나스 말토피리아(*Stenotrophomonas maltophilia*) 유래 *OhyA* 유전자 및 마이크로코쿠스 루테우스(*Micrococcus luteus*) 유래 *ADH* 유전자군으로부터 선택된 1종 이상의 유전자를 코리네박테리움 글루타미킴(*Corynebacterium glutamicum*) 균주를 형질전환 시킨 결과, 효과적으로 10-케토스테아린 산 생합성 경로가 과발현되고, 10-케토스테아린 산을 탄소원으로 사용하지 않아 지속적으로 10-케토스테아린 산을 생산 가능함을 확인하였다.

[0015] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 코리네박테리움 글루타미킴 균주는 하이드라테이즈(hydratase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열과 알코올 디하이드로게네이즈(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 각각 포함하는 2개의 발현벡터로 공동형질전환된다.

- [0016] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 코리네박테리움 글루타미쿰 균주는 하이드라테이즈(hydratase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열과 알코올 디하이드로게네이즈(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 모두 포함하는 1개의 발현벡터로 공동형질전환된다.
- [0017] 본 명세서에서, “하이드라테이즈(hydratase)”는 올레산(oleic acid)으로부터 10-하이드록시스테아린 산(10-hydroxystearic acid)을 생산하는 효소로서, *OhyA* 유전자가 이를 코딩하는 유전자이다.
- [0018] 본 발명의 발현벡터에서 발현되는 상기 하이드라테이즈는 스테노트로포모나스 말토포필리아(*Stenotrophomonas maltophilia*)로부터 유래한 것을 사용하는 것이 바람직하다. 더욱 바람직하게는 서열목록 제1서열로 표시되는 하이드라테이즈를 발현하도록 할 수 있으며, 상기 하이드라테이즈를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 바람직하게는 서열목록 제2서열로 표시될 수 있다.
- [0019] 본 명세서에서, “알코올 디하이드로게네이즈(alcohol dehydrogenase)”는 10-하이드록시스테아린 산(10-hydroxystearic acid)으로부터 10-케토스테아린 산(10-ketostearic acid)을 생산 하는 효소로서, *ADH* 유전자가 이를 코딩하는 유전자이다.
- [0020] 본 발명의 발현벡터에서 발현되는 상기 알코올 디하이드로게네이즈는 마이크로코쿠스 루테우스(*Micrococcus luteus*)로부터 유래한 것을 사용하는 것이 바람직하다. 보다 바람직하게는 서열목록 제3서열로 표시되는 알코올 디하이드로게네이즈를 발현하도록 할 수 있으며, 상기 알코올 디하이드로게네이즈를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 바람직하게는 서열목록 제4서열로 표시될 수 있다.
- [0021] 본 발명에서 이용되는 뉴클레오티드 서열은 상기 언급된 서열 이외에 상기 뉴클레오티드 서열에 대하여 실질적인 동일성을 나타내는 뉴클레오티드 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 본 발명의 뉴클레오티드 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 열라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 열라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 80%의 상동성, 보다 바람직하게는 최소 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 최소 95%의 상동성을 나타내는 뉴클레오티드 서열을 의미한다. 서열비교를 위한 열라인먼트 방법은 당업계에 공지되어 있다. 열라인먼트에 대한 다양한 방법 및 알고리즘은 Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482(1981); Needleman and Wunsch, *J. Mol. Bio.* 48:443(1970); Pearson and Lipman, *Methods in Mol. Biol.* 24: 307-31(1988); Higgins and Sharp, *Gene* 73:237-44(1988); Higgins and Sharp, *CABIOS* 5:151-3(1989); Corpet et al., *Nuc. Acids Res.* 16:10881-90(1988); Huang et al., *Comp. Appl. BioSci.* 8:155-65(1992) and Pearson et al., *Meth. Mol. Biol.* 24:307-31(1994)에 개시되어 있다. NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-10(1990))은 NCBI (National Center for Biological Information) 등에서 접근 가능하며, 인터넷 상에서 blastp, blastn, blastx, tblastn and tblastx와 같은 서열 분석 프로그램과 연동되어 이용할 수 있다. BLSAT는 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>에서 접속 가능하다. 이 프로그램을 이용한 서열 상동성 비교 방법은 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_help.html에서 확인할 수 있다.
- [0022] 상기 유전자들은 발현벡터 내부에 도입되어 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)에서 발현되게 된다. 본 명세서에 있어서, 용어 “발현벡터”는 발현벡터의 전사에 제공되는 추가단편에 작동가능하게 연결된 관심의 폴리펩티드를 암호화하는 단편으로 구성되는 선형 또는 원형의 DNA 분자이다. 그와 같은 추가단편은 프로모터 및 종료암호 서열을 포함한다. 발현벡터는 하나 이상의 복제 개시점, 하나 이상의 선택마커, 폴리아데닐화 신호 등을 또한 포함한다. 발현벡터는 일반적으로 플라스미드 또는 바이러스 DNA로부터 유도되거나, 또는 둘 다의 요소를 함유한다.
- [0023] 본 발명의 벡터 시스템은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있으며, 이에 대한 구체적인 방법은 Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press(2001)에 개시되어 있으며, 이 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.
- [0024] 본 발명의 상기 유전자를 인코딩하는 핵산 분자는 원핵세포에서 작동하는 프로모터에 작동적으로 연결(operatively linked)된다. 본 명세서에서, 용어 “작동적으로 결합된”은 핵산 발현 조절 서열(예: 프로모터, 시그널 서열, 또는 전사조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 해독을 조절하게 된다.
- [0025] 본 발명의 벡터는 전형적으로 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 원핵세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터(예컨대, tac 프로모터, lac 프로모터, lacUV5 프로모터, lpp 프로모터, pL^λ 프로모터, pR^λ 프로모터, rac5 프로모터, amp 프로모터, recA 프로모터,

SP6 프로모터, trp 프로모터 및 T7 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다.

[0026] 한편, 본 발명에 이용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드(예: pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHC79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, pET28a, pGEX 시리즈, pET 시리즈, pUC18K, pEKEx2 및 pCES-L10 등), 파지(예: λ gt4 λ B, λ -Charon, λ Δz1 및 M13 등) 또는 바이러스(예: SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있으나, 바람직하게는 10-케토스테아린 산 생합성에 이용될 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)을 위한 특정 유전자를 미생물 생체 내로 운반하여 외부로부터 삽입된 유전자의 발현을 효과적으로 조절할 수 있도록 상기 발현벡터는 도 3의 유전자 지도를 갖는 pCES-L10이고, 상기 뉴클레오티드 서열은 pCES-L10의 MCS(multiple cloning site)에 삽입된다.

[0027] 한편, 본 발명의 벡터는 선택표지로서, 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함하며, 예를 들어 암피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게테티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자가 있다.

[0028] 본 발명의 발현 벡터는 프로모터서열, 발현 대상 유전자(구조 유전자)의 뉴클레오티드 서열 및 터미네이터 서열을 포함하며, 상기 서열들이 5'-3' 순서대로 연결되는 것이 바람직하다. 본 발명에서는 *OhyA* 및/또는 *ADH*의 유전자 서열이 5'-3' 순서대로 연결되어 제공되었다.

[0029] 본 발명의 발현벡터에는 상기 유전자들이 효소의 과발현 기능을 포함하여 최소한의 길이를 가지도록 RBS(ribosomal bindingsite) 및 효소발현에 꼭 필요한 부분을 포함하는 염기서열만을 서열로 정하여 삽입시키는 것이 숙주세포의 대사부담(metabolic burden)을 줄이는 측면에서 바람직하다.

[0030] 상기 유전자가 포함된 발현벡터는 이후 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) 내부로 도입되는데, 본 발명의 벡터를 대장균 내로 운반하는 방법은 CaCl_2 방법(Cohen, S.N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 9:2110-2114(1973)), 하나한 방법(Cohen, S.N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 9:2110-2114(1973); 및 Hanahan, D., J. Mol. Biol., 166:557-580(1983)) 및 전기 천공 방법(Dower, W.J. et al., Nucleic. Acids Res., 16:6127-6145(1988)) 등에 의해 실시될 수 있으나, 형질전환체의 안정적 제조와 효율을 높이기 위해서는 전기 충격에 의한 형질전환 방법을 사용하는 것이 바람직하다.

[0031] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 10-케토스테아린 산(10-ketostearic acid) 생산용 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) 균주의 제조방법을 제공한다: (a) (i) 하이드라테이즈(hydratase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열; (ii) 알코올 디하이드로게네이즈(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열; 또는 (iii) 하이드라테이즈(hydratase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열과 알코올 디하이드로게네이즈(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현벡터에 삽입시키는 단계; 및 (b) 상기 뉴클레오티드 서열이 삽입된 발현벡터로 코리네박테리움 글루타미쿰 균주를 형질전환시키는 단계.

[0032] 본 발명의 10-케토스테아린 산 생산용 형질전환 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) 균주의 제조방법은 상술한 본 발명의 코리네박테리움 글루타미쿰 균주를 제조하는 것이므로 상술한 내용과 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재 생략한다.

[0033] 본 발명의 또 다른 구현예에 따르면, 상기 코리네박테리움 글루타미쿰 균주를 발현시키는 단계 (b)는 전기충격 방법으로 수행된다.

[0034] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 10-케토스테아린 산(10-ketostearic acid) 생합성 방법을 제공한다: (a) 상술한 본 발명의 코리네박테리움 글루타미쿰 균주를 배양하여 10-케토스테아린 산을 생합성하는 단계; 및 (b) 상기 단계 (a)의 생합성된 10-케토스테아린 산을 수득하는 단계.

[0035] 상기 형질전환 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) 균주 내에서 생합성된 10-케토스테아린 산을 분리하는 단계는 당업계에 공지된 통상의 분리 또는 정제 방법에 따라 실시될 수 있다(참조: B. Aourousseau et al., *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 57(3):1558-9331(1980); Frank C. Magne et al., *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 34(3):127-129(1957)).

발명의 효과

- [0036] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0037] (i) 본 발명은 (a) 하이드라테이즈(hydratase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열; (b) 알코올 디하이드로게네이스(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열; 또는 (c) 하이드라테이즈(hydratase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열과 알코올 디하이드로게네이스(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현벡터로 형질전환된 10-케토스테아린 산(10-ketostearic acid) 생산용 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) 균주를 제공한다.
- [0038] (ii) 야생종 코리네박테리움 글루타미쿰 균주가 10-케토스테아린 산의 생산이 전혀 이루어지지 않는데 반해, 유전자 조작을 통해 재조합된 본 발명의 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) 균주는 우수한 10-케토스테아린 산 생성능을 가지며, 10-케토스테아린 산을 탄소원으로 사용하지 않아 지속적으로 10-케토스테아린 산을 생산할 수 있다.
- [0039] (iii) 또한, 본 발명의 코리네박테리움 글루타미쿰 균주는 10-케토스테아린 산 대사경로에 필수적인 유전자를 과발현 시키는 과정을 통해 10-케토스테아린 산의 생산량이 증가하였다.

도면의 간단한 설명

- [0040] 도 1은 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)을 보여주는 사진이다.
- 도 2는 10-케토스테아린 산(10-ketostearic acid)의 생산경로를 보여준다.
- 도 3은 발현벡터인 pCES-L10을 보여주는 도식화이다.
- 도 4는 야생종 코리네박테리움 글루타미쿰 ACTC13032 및 본 발명의 일 실시예에 따른 재조합 균주인 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032-pCESL10::OhyA::ADH의 GC/MS 분석 결과를 보여준다.
- 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 재조합 균주인 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032-pCESL10::OhyA::ADH의 GC/MS 분석 결과를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0041] 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.

실시예

- [0043] 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)의 경우, 지방산으로부터 10-케토스테아린 산(10-ketostearic acid; 10-KSA)을 생산하는데 필요한 효소들인 하이드라테이즈(hydratase)를 코딩하는 OhyA 유전자와 알코올 디하이드로게네이스(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는 ADH 유전자를 가지고 있지 않다.
- [0044] 따라서, 코리네박테리움 글루타미쿰이 가지고 있지 않은 스테노트로포모나스 말토틸리아(*Stenotrophomonas maltophilia*) 유래 OhyA 및 마이크로코쿠스 루테우스(*Micrococcus luteus*) NCTC2665 유래 ADH 유전자를 발현 벡터(expression vector)인 pCES-L10를 이용하여 삽입하여 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) 균주(*Corynebacterium glutamicum* ATCC13032::pCES-L10::OhyA::ADH)를 제작하였다.

- [0045] 실시예 1: 중합효소 연쇄 반응(Polymerase Chain Reaction; PCR)을 이용한 OhyA 및 ADH 유전자 증폭

표 1

유전자	생산 효소
OhyA	Hydratase
ADH	Alcohol dehydrogenase

[0047] 상기 표 1의 *OhyA* 유전자를 증폭하기 위한 프라이머는 Foward - GGATCCATGTACTACAGCAGTGGCAATTACG Tm=61.61(31mer)(서열목록 제5서열) 및 Reverse CATATGTCAGTCCTCCTGCACCAG Tm=58.35(24mer)(서열목록 제6서열)를 이용하였고, 제한효소는 *Bam*HI 및 *Nde*I을 이용하였다.

[0048] 상기 표 1의 *ADH* 유전자를 증폭하기 위한 프라이머는 Foward - GGAATCAAAGTTAAATGTCCGAGTTCACCCGTTTC Tm=65.33(35mer)(서열목록 제7서열) 및 Reverse - AATTTTGAAGTTAATCAGCCGAGCGGGGTGTC Tm=65.37(32mer)(서열목록 제8서열)를 이용하였으며, 제한효소는 *Hpa*I을 이용하였다.

[0049] 상기 프라이머(primer)를 사용하여 증폭한 결과, *OhyA*는 1770 bp, *ADH*는 933 bp의 크기로 증폭되었다. 각각의 증합효소 연쇄 반응은 통상적인 반응조건(10 mM Tris-HCl(pH 9.0), 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100, 2 mM MgSO₄, Taq DNA 증합효소(DaKaRa)) 아래에서 *ADH* 유전자 경우는 95℃/5분(denaturation), 65℃/1분(annealing), 72℃/1분(extension)로 1회 수행한 후, 95℃/20초(denaturation), 65℃/30초(annealing), 72℃/1분 20초(extension)로 27회 반복 수행하였다. 마지막 단계로 안정적인 신장(extension)을 위해 95℃/1분(denaturation), 65℃/1분(annealing), 72℃/10분(extension) 반응하였고, *OhyA* 유전자 경우는 5℃/5분(denaturation), 60℃/1분(annealing), 72℃/1분(extension)로 1회 수행한 후, 95℃/20초(denaturation), 60℃/30초(annealing), 72℃/1분 20초(extension)로 27회 반복 수행하였다. 마지막 단계로 안정적인 신장(extension)을 위해 95℃/1분(denaturation), 60℃/1분(annealing), 72℃/10분(extension) 반응하였다.

[0050] 실시예 2: 재조합 플라스미드의 제조

[0051] 상기 실시예 1의 증합효소 연쇄 반응 후 증폭된 DNA는 0.8% 아가로스 젤 상에서 확인 후 정제하여 발현 벡터(expression vector)인 pCES-L10(도 3)의 다중삽입부위(multicloning site) 클로닝에 이용하였다. 조합 플라스미드인 pCESL10::*OhyA*::*ADH*를 위의 제한효소들과 37℃ 항온수조(water bath)에서 약 1시간 30분 반응하였다. 각각의 DNA 절편들을 절단한 뒤 발현 벡터(expression vector)인 pCES-L10(도 3)의 다중삽입부위(multicloning site)에 T4 라이게이즈(Dakara) 및 SLIC(sequence and ligation independent cloning) 클로닝을 기법을 이용하여 재조합 플라스미드를 완성하였다. 각 단계마다 삽입된 유전자의 삽입여부를 확인하기 위해 대장균(*E. coli* DH5a competent cell, RBS)에 형질 전환 시킨 후 재조합 플라스미드를 추출하여 이를 다시 원래 삽입부위의 제한효소로 처리하여 잘린 DNA 조각의 크기를 0.8% 아가로스 젤 상에서 전기영동하여 비교하는 방법을 사용하였다.

[0052] 실시예 3 : 이중 코리네박테리움 글루타미컴 형질전환체 제조

[0053] 통상적으로 클로닝용으로 많이 쓰이는 균주의 경우 CaCl₂ 버퍼를 사용한 컴피턴트 세포를 만든 후 열 충격(42℃) 방법에 의해 플라스미드를 숙주세포내로 넣지만, 본 발명에서는 형질전환체의 안정적 제조와 효율을 높이기 위해 전기천공법(electroporation)에 의한 형질전환방법을 사용하였다. 상기 전기 충격에 의한 형질전환방법을 위해 16시간동안 전 배양 된 500 μ L(0.1 %)의 야생종 코리네박테리움 글루타미컴(*Corynebacterium glutamicum* ATCC13032) 배양액을 41.5 mL의 BHI(5 g/L beef heart, 12.5 g/L calf brains, 2.5 g/L disodium hydrogen phosphate, 2 g/L D(+)-glucose, 10 g/L peptone, 5 g/L sodium chloride)에 100 mg/mL의 이소니코틴산(isonicotinic acid) 2 mL, 200 mg/mL의 글라이신 6.25 mL, 20%(v/v) 트윈 80 0.25 mL를 첨가한 배지에 접종하여 배양액의 흡광도(absorbance)가 600 nm 파장에서 0.6에 이르렀을 때, 배양액 전체에 해당하는 50 mL의 배양액을 원심 분리(12000 rpm, 10분)하여 상등액과 세포를 분리하였다. 모아진 세포는 10% 글리세롤 50 mL로 3회 세척해준 후, 다시 원심분리(12000 rpm, 1분)하여 상등액과 세포로 나누어 주었다. 세포는 10% 글리세롤 0.25 mL로 현탁하였다. 현탁 된 세포 50 μ L에 재조합 플라스미드 1.5 μ L를 첨가시켜주었다. 상기 플라스미드가 들어있는 분주된 51.5 μ L의 액체는 전기천공법(electroporation)용 큐벳(BIO-RAD, Gene pulser cuvette)에 담아 BIO-RAD, Gene pulser Xcell로 전기 충격(2500v, 25 μ F, 200 Ω)을 가하였다. 미리 준비해둔 1 mL BHI(5 g/L beef heart, 12.5 g/L calf brains, 2.5 g/L disodium hydrogen phosphate, 2 g/L D(+)-glucose, 10 g/L peptone, 5 g/L sodium chloride)를 첨가한 뒤 1시간 동안 200 rpm, 30℃에서 진탕 배양하였다. 배양 된 형질전환체는 카나마이신(50 μ g/mL)이 첨가된 BHI 아가(5 g/L beef heart, 12.5 g/L calf brains, 2.5 g/L disodium hydrogen phosphate, 2 g/L D(+)-glucose, 10 g/L peptone, 5 g/L sodium chloride, agar 20 g/L)에서 단일 균체가 생성될 때까지 30℃에서 배양하였다. 이를 통해 재조합 플라스미드를 코리네박테리움 글루타미컴(*Corynebacterium glutamicum* ATCC13032) 균주에 형질 전환한 코리네박테리움 글루타미컴

ATCC13032::OhyA::ADH 재조합 균주를 개발하였다.

[0054] 실험예 1: 전세포 생물전환(Whole cell bioconversion)

[0055] ① *C. glutamicum* ACTC13032::pCES-L10::OhyA::ADH 균주가 올레산(oleic acid)으로부터 10-KSA의 생산 가능성을 확인하기 위해 플라스크 배양 및 생물전환 반응을 진행하였다. 100 ml 플라스크 배양 및 25 ml 생물전환 조건 그리고, 배지 조성은 다음 표 2와 같으며, 플라스크 배양(flask fermentation) 실험은 500 ml 삼각 플라스크를 이용해 100 ml 부피로 진행하였고, 생물전환 실험은 250 ml 배플(baffle) 삼각 플라스크를 이용해 25 ml 부피로 진행하였다.

표 2

Strains		BHI Medium	
<i>C. glutamicum</i>	Wild type	Calf Brains	7.7 g/l
	ΔOhyA::ADH	Beef Heart	9.8 g/l
Culture conditions		Proteose peptone	10.0 g/l
Agitation	200rpm	Dextrose	2.0 g/l
Temperature	30°C	Sodium Chloride	5.0 g/l
Initial pH	6.1	Disodium Phosphate	2.5 g/l
Bioconversion conditions		Buffer solution	
Agitation	200rpm	Tris-HCl (pH7.5)	50mM
Temperature	30°C		
pH	7.5		
Oleic acid	2.5g		
Tween 80	0.05 g/l		

[0056]

[0057] 12시간의 배양하여 정체 성장기(stationary growth phase)까지 세포를 키운 후에 Tris-HCl(pH 7.5) 버퍼로 풀어준 후에 기질인 올레산(oleic acid) 2.5 g/l 넣어서 생물 전환 반응을 진행하였다. 실험 결과, 도 4에서 알 수 있듯이, 최대 전환수율 78.4%, 최대 생산성 2.0 g/l/h의 10-케토스테아린 산이 생산되었다. 또한, 1시간 이후에 10-케토스테아린 산이 감소하지 않고 그대로 유지되는 점에 있어서 *C. glutamicum* ACTC13032::pCES-L10::OhyA::ADH가 10-케토스테아린 산을 생산하는 균주로서 산업적 가능성이 있다고 판단된다. 한편, 대조군인 야생형의 경우 10-케토스테아린 산 생산이 전혀 이루어지지 않았다.

[0058] ② 최종적으로 산업적으로 쓰이기 위해서는 올레산(oleic acid) 보다 경제력 있는 올리브오일을 기질로 하여 *C. glutamicum* ACTC13032::pCES-L10::OhyA::ADH 균주로 생물 전환 반응을 진행하였다. 올리브 오일은 올리브나무 열매에 들어있는 30-70%의 기름을 추출해 만들어지며 주성분은 불포화지방산인 올레산(oleic acid)으로, 전체 함량은 65-85% 정도다.

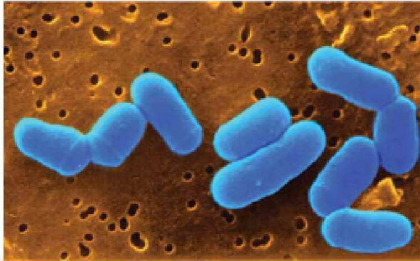
[0059] 배지배양 조성 및 생물 전환 조건은 위와 동일하며, 기질만 올리브 오일을 라파아제(lipase) 처리만 하여 생물 전환 반응을 진행하였다. 실험 결과, 도 5에서 볼 수 있듯이, 6시간에 1.3 g/l 10-KSA가 생산되었으며, 최대 전환 수율 65%, 최대 생산성 0.7 g/l/h로써, 이 균주가 10-KSA 생산을 위한 균주로서 산업적 가능성이 있음을 다시 확인 할 수 있었다.

[0060] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한

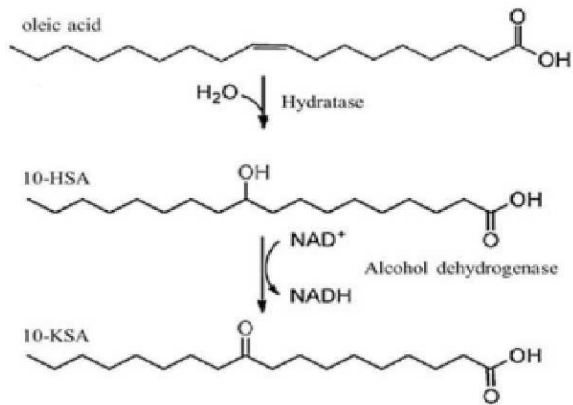
구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

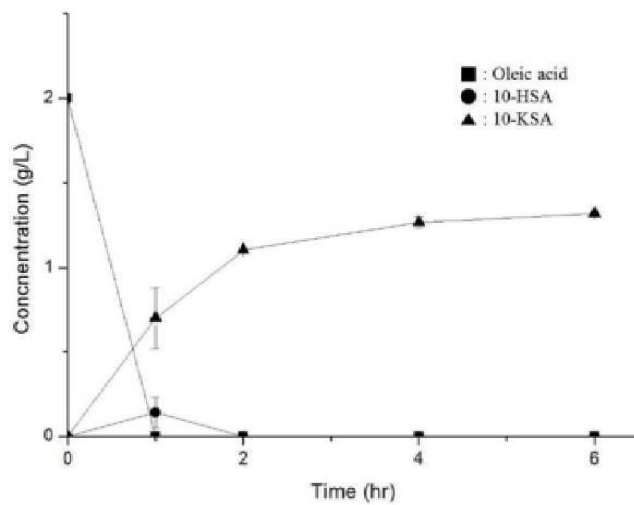
도면1



도면2



도면5



서열 목록

- <110> Sogang University
- <120> Corynebacterium glutamicum Strains Having Excellent Production
Potential of 10-ketostearic acid and Method for Preparing Thereof
- <130> PN150013
- <160> 8
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 1770
- <212> PRT
- <213> Hydratase from Stenotrophomonas maltophilia
- <400> 1

Ala Thr Gly Thr Ala Cys Thr Ala Cys Ala Gly Cys Ala Gly Thr Gly
 1 5 10 15
 Gly Cys Ala Ala Thr Thr Ala Cys Gly Ala Ala Gly Cys Cys Thr Thr
 20 25 30
 Cys Gly Cys Gly Cys Gly Cys Cys Cys Gly Cys Gly Cys Ala Ala Gly
 35 40 45
 Cys Cys Cys Gly Cys Cys Gly Gly Thr Gly Thr Gly Gly Ala Thr Gly
 50 55 60
 Gly Cys Ala Ala Gly Cys Gly Thr Gly Cys Ala Thr Gly Gly Thr Thr
 65 70 75 80
 Cys Gly Thr Cys Gly Gly Thr Thr Cys Gly Gly Gly Cys Cys Thr Gly

85	90	95	
Gly Cys Cys Thr Cys Gly Thr Thr Gly Gly Cys Cys Gly Gly Thr Gly			
100	105	110	
Cys Cys Gly Cys Gly Thr Thr Cys Cys Thr Gly Gly Thr Gly Cys Gly			
115	120	125	
Cys Gly Ala Cys Gly Gly Cys Cys Ala Cys Ala Thr Gly Gly Cys Cys			
130	135	140	
Gly Gly Thr Gly Ala Gly Thr Gly Cys Ala Thr Cys Ala Cys Cys Ala			
145	150	155	160
Thr Cys Cys Thr Thr Gly Ala Gly Cys Ala Gly Cys Ala Gly Cys Ala			
165	170	175	
Gly Ala Thr Thr Cys Cys Gly Gly Gly Cys Gly Gly Cys Gly Cys Gly			
180	185	190	
Cys Thr Gly Gly Ala Cys Gly Gly Cys Cys Thr Gly Ala Ala Ala Gly			
195	200	205	
Thr Gly Cys Cys Gly Gly Ala Ala Ala Ala Gly Gly Gly Thr Thr Thr			
210	215	220	
Cys Gly Thr Gly Ala Thr Cys Cys Gly Thr Gly Gly Thr Gly Gly Cys			
225	230	235	240
Cys Gly Cys Gly Ala Gly Ala Thr Gly Gly Ala Ala Gly Ala Thr Cys			
245	250	255	
Ala Thr Thr Thr Cys Gly Ala Gly Thr Gly Cys Cys Thr Gly Thr Gly			
260	265	270	
Gly Gly Ala Cys Cys Thr Gly Thr Thr Cys Cys Gly Cys Thr Cys Gly			
275	280	285	
Ala Thr Ala Cys Cys Gly Thr Cys Gly Cys Thr Gly Gly Ala Gly Ala			
290	295	300	
Thr Cys Gly Ala Ala Gly Ala Thr Gly Cys Cys Ala Gly Cys Gly Thr			
305	310	315	320
Gly Cys Thr Gly Gly Ala Cys Gly Ala Gly Thr Thr Cys Thr Ala Cys			
325	330	335	

Thr Gly Gly Thr Thr Gly Ala Ala Cys Ala Ala Gly Gly Ala Cys Gly
340 345 350

Ala Cys Cys Cys Gly Ala Ala Cys Thr Ala Thr Thr Cys Gly Cys Thr
355 360 365

Gly Cys Ala Gly Cys Gly Cys Gly Cys Cys Ala Cys Cys Ala Thr Cys
370 375 380

Ala Ala Thr Cys Gly Cys Gly Gly Cys Gly Ala Gly Gly Ala Thr Gly
385 390 395 400

Cys Ala Cys Ala Cys Ala Cys Cys Gly Ala Thr Gly Gly Cys Cys Thr
405 410 415

Gly Thr Thr Cys Ala Cys Gly Cys Thr Gly Ala Cys Cys Gly Ala Gly
420 425 430

Cys Ala Gly Gly Cys Ala Cys Ala Gly Ala Gly Gly Gly Ala Cys Ala
435 440 445

Thr Cys Gly Thr Cys Gly Cys Gly Cys Thr Gly Thr Thr Cys Cys Thr
450 455 460

Gly Gly Cys Cys Ala Cys Cys Cys Gly Thr Cys Ala Gly Gly Ala Gly
465 470 475 480

Ala Thr Gly Gly Ala Gly Ala Ala Cys Ala Ala Gly Cys Gly Cys Ala
485 490 495

Thr Cys Ala Ala Cys Gly Ala Ala Gly Thr Ala Cys Thr Gly Gly Gly
500 505 510

Cys Cys Gly Thr Gly Ala Thr Thr Thr Cys Cys Thr Gly Gly Ala Cys
515 520 525

Ala Gly Cys Ala Ala Cys Thr Thr Cys Thr Gly Gly Cys Thr Gly Thr
530 535 540

Ala Cys Thr Gly Gly Cys Gly Ala Ala Cys Cys Ala Thr Gly Thr Thr
545 550 555 560

Cys Gly Cys Gly Thr Thr Cys Gly Ala Ala Gly Ala Gly Thr Gly Gly
565 570 575

Cys Ala Thr Thr Cys Gly Gly Cys Gly Cys Thr Gly Gly Ala Gly Ala
580 585 590

Thr Gly Ala Ala Gly Cys Thr Gly Thr Ala Cys Cys Thr Gly Cys Ala

595 600 605

Thr Cys Gly Cys Thr Thr Cys Ala Thr Cys Cys Ala Cys Cys Ala Thr

610 615 620

Ala Thr Cys Gly Gly Cys Gly Gly Cys Cys Thr Gly Cys Cys Gly Gly

625 630 635 640

Ala Thr Thr Thr Cys Thr Cys Gly Gly Cys Gly Cys Thr Gly Ala Ala

645 650 655

Gly Thr Thr Cys Ala Cys Gly Ala Ala Gly Thr Ala Cys Ala Ala Cys

660 665 670

Cys Ala Gly Thr Ala Cys Gly Ala Ala Thr Cys Gly Cys Thr Gly Gly

675 680 685

Thr Gly Cys Thr Gly Cys Cys Gly Cys Thr Gly Gly Thr Gly Ala Ala

690 695 700

Gly Thr Gly Gly Thr Thr Gly Cys Ala Gly Gly Ala Cys Cys Ala Gly

705 710 715 720

Gly Gly Cys Gly Thr Gly Gly Thr Gly Thr Thr Cys Cys Ala Gly Thr

725 730 735

Ala Cys Gly Gly Thr Ala Cys Cys Gly Ala Gly Gly Thr Gly Ala Cys

740 745 750

Cys Gly Ala Cys Gly Thr Cys Gly Ala Cys Thr Thr Thr Gly Ala Thr

755 760 765

Cys Thr Gly Cys Ala Gly Cys Cys Gly Gly Ala Cys Cys Gly Cys Ala

770 775 780

Ala Gly Cys Ala Gly Gly Cys Cys Ala Cys Gly Cys Gly Cys Ala Thr

785 790 795 800

Cys Cys Ala Thr Thr Gly Gly Ala Thr Gly Cys Ala Thr Gly Ala Cys

805 810 815

Gly Gly Thr Gly Thr Ala Gly Cys Cys Gly Gly Thr Gly Gly Cys Gly

820 825 830

Thr Gly Gly Ala Ala Cys Thr Cys Gly Gly Cys Gly Cys Gly Gly Ala

835	840	845	
Thr Gly Ala Thr Cys Thr Gly Cys Thr Gly Thr Thr Cys Ala Thr Gly			
850	855	860	
Ala Cys Cys Ala Thr Cys Gly Gly Thr Thr Cys Gly Cys Thr Gly Ala			
865	870	875	880
Cys Cys Gly Ala Gly Ala Ala Cys Thr Cys Gly Gly Ala Thr Ala Ala			
885	890	895	
Thr Gly Gly Cys Gly Ala Cys Cys Ala Cys Cys Ala Cys Ala Cys Thr			
900	905	910	
Gly Cys Gly Gly Cys Ala Cys Gly Cys Cys Thr Gly Ala Ala Cys Gly			
915	920	925	
Ala Ala Gly Gly Cys Cys Cys Gly Gly Cys Gly Cys Cys Thr Gly Cys			
930	935	940	
Cys Thr Gly Gly Gly Ala Cys Cys Thr Gly Thr Gly Gly Cys Gly Cys			
945	950	955	960
Cys Gly Cys Ala Thr Thr Gly Cys Cys Gly Cys Gly Ala Ala Gly Gly			
965	970	975	
Ala Thr Gly Ala Cys Gly Cys Gly Thr Thr Cys Gly Gly Gly Cys Gly			
980	985	990	
Thr Cys Cys Gly Gly Ala Thr Gly Thr Gly Thr Thr Cys Gly Gly Cys			
995	1000	1005	
Gly Cys Gly Cys Ala Cys Ala Thr Thr Cys Cys Ala Gly Ala Ala Ala			
1010	1015	1020	
Cys Cys Ala Ala Gly Thr Gly Gly Gly Ala Ala Thr Cys Gly Gly Cys			
1025	1030	1035	1040
Ala Ala Cys Gly Gly Thr Gly Ala Cys Cys Ala Cys Gly Cys Thr Gly			
1045	1050	1055	
Gly Ala Thr Gly Cys Gly Cys Gly Cys Ala Thr Thr Cys Cys Gly Gly			
1060	1065	1070	
Cys Cys Thr Ala Cys Ala Thr Cys Cys Ala Gly Ala Ala Gly Ala Thr			
1075	1080	1085	
Cys Gly Cys Cys Ala Ala Gly Cys Gly Cys Gly Ala Thr Cys Cys Cys			

1090	1095	1100	
Thr Thr Cys Ala Gly Cys Gly Gly Cys Ala Ala Ala Gly Thr Gly Gly			
1105	1110	1115	1120
Thr Gly Ala Cys Cys Gly Gly Cys Gly Gly Cys Ala Thr Cys Gly Thr			
	1125	1130	1135
Cys Ala Gly Cys Gly Thr Gly Cys Gly Cys Gly Ala Cys Thr Cys Gly			
	1140	1145	1150
Cys Gly Cys Thr Gly Gly Cys Thr Gly Ala Thr Gly Ala Gly Cys Thr			
	1155	1160	1165
Gly Gly Ala Cys Gly Gly Thr Gly Ala Ala Thr Cys Gly Cys Cys Ala			
1170	1175	1180	
Gly Cys Cys Ala Cys Ala Thr Thr Thr Cys Ala Ala Gly Ala Ala Cys			
1185	1190	1195	1200
Cys Ala Gly Cys Cys Cys Ala Ala Gly Gly Ala Cys Cys Ala Gly Ala			
	1205	1210	1215
Thr Cys Gly Thr Gly Gly Thr Cys Thr Gly Gly Gly Thr Gly Thr Ala			
	1220	1225	1230
Thr Thr Cys Gly Thr Thr Gly Thr Thr Cys Gly Thr Gly Gly Ala Thr			
	1235	1240	1245
Ala Cys Gly Cys Cys Cys Gly Gly Cys Gly Ala Cys Thr Ala Cys Gly			
1250	1255	1260	
Thr Gly Ala Ala Gly Ala Ala Gly Cys Cys Gly Ala Thr Gly Cys Ala			
1265	1270	1275	1280
Gly Gly Ala Cys Thr Gly Cys Ala Cys Cys Gly Gly Cys Gly Ala Gly			
	1285	1290	1295
Gly Ala Gly Ala Thr Cys Ala Cys Gly Cys Gly Cys Gly Ala Ala Thr			
	1300	1305	1310
Gly Gly Cys Thr Gly Thr Ala Thr Cys Ala Cys Cys Thr Gly Gly Gly			
1315	1320	1325	
Cys Gly Thr Gly Cys Cys Gly Gly Thr Gly Gly Ala Ala Gly Ala Gly			
1330	1335	1340	

Ala Thr Cys Gly Ala Thr Gly Ala Gly Cys Thr Gly Gly Cys Cys Gly
1345 1350 1355 1360
Cys Gly Ala Cys Cys Gly Gly Cys Gly Cys Gly Ala Ala Gly Ala Cys
1365 1370 1375
Ala Gly Thr Gly Cys Cys Gly Gly Thr Gly Ala Thr Gly Ala Thr Gly
1380 1385 1390
Cys Cys Gly Thr Ala Cys Ala Thr Cys Ala Cys Gly Gly Cys Gly Thr
1395 1400 1405
Thr Cys Thr Thr Cys Ala Thr Gly Cys Cys Ala Cys Gly Cys Cys Ala
1410 1415 1420
Gly Gly Cys Ala Gly Gly Thr Gly Ala Cys Cys Gly Cys Cys Cys Gly
1425 1430 1435 1440
Gly Ala Cys Gly Thr Gly Gly Thr Gly Cys Cys Gly Gly Ala Ala Gly
1445 1450 1455
Gly Thr Gly Cys Gly Gly Thr Gly Ala Ala Cys Thr Thr Cys Gly Cys
1460 1465 1470
Thr Thr Thr Cys Ala Thr Cys Gly Gly Cys Cys Ala Gly Thr Thr Cys
1475 1480 1485
Gly Cys Cys Gly Ala Ala Thr Cys Gly Ala Ala Gly Cys Ala Gly Cys
1490 1495 1500
Gly Cys Gly Ala Cys Thr Gly Cys Ala Thr Cys Thr Thr Cys Ala Cys
1505 1510 1515 1520
Cys Ala Cys Cys Gly Ala Gly Thr Ala Cys Thr Cys Gly Gly Thr Gly
1525 1530 1535
Cys Gly Cys Ala Cys Gly Cys Cys Gly Ala Thr Gly Gly Ala Gly Gly
1540 1545 1550
Cys Gly Gly Thr Gly Thr Ala Cys Ala Cys Cys Thr Thr Gly Cys Thr
1555 1560 1565
Gly Gly Gly Gly Ala Thr Cys Gly Ala Gly Cys Gly Thr Gly Gly Cys
1570 1575 1580
Gly Thr Gly Cys Cys Gly Gly Ala Gly Gly Thr Gly Thr Thr Cys Ala
1585 1590 1595 1600

Ala Thr Thr Cys Cys Ala Cys Gly Thr Ala Thr Gly Ala Cys Gly Thr

1605 1610 1615
Gly Cys Gly Cys Thr Cys Gly Cys Thr Gly Cys Thr Gly Gly Cys Cys
1620 1625 1630
Gly Cys Gly Ala Cys Cys Gly Gly Gly Cys Gly Cys Cys Thr Gly Cys
1635 1640 1645
Gly Thr Gly Ala Thr Gly Gly Cys Ala Ala Gly Gly Ala Ala Cys Thr
1650 1655 1660
Gly Gly Ala Cys Ala Thr Thr Cys Cys Cys Gly Gly Gly Cys Cys Ala
1665 1670 1675 1680

Gly Cys Gly Thr Thr Cys Cys Thr Gly Cys Gly Cys Ala Ala Cys Cys
1685 1690 1695
Thr Gly Cys Thr Gly Ala Thr Gly Ala Ala Cys Ala Ala Gly Cys Thr
1700 1705 1710
Gly Gly Ala Cys Ala Ala Gly Ala Cys Cys Cys Ala Gly Ala Thr Cys
1715 1720 1725
Gly Gly Thr Gly Gly Thr Cys Thr Gly Cys Thr Gly Cys Gly Cys Gly
1730 1735 1740
Ala Gly Thr Thr Cys Ala Ala Gly Cys Thr Gly Gly Thr Gly Cys Ala

1745 1750 1755 1760
Gly Gly Ala Gly Gly Ala Cys Thr Gly Ala
1765 1770

<210> 2
<211> 1770
<212> DNA
<213> OhyA sequence coding Hydratase from Stenotrophomonas maltophilia
<400> 2

atgtactaca gcagtggcaa ttacgaagcc ttcgcgcgcc cgcgcaagcc cgccggtgtg 60
gatggcaagc gtgcatggtt cgtcggttcg ggccctggcct cggtggccgg tgccgcgttc 120
ctggtgcgcg acggccacat ggccggtgag tgcacacca tccttgagca gcagcagatt 180

ccgggcggcg cgctggacgg cctgaaagtg ccggaaaagg gtttcgtgat ccgtggtggc 240

cgcgagatgg aagatcatTT cgagTgcctg tgggacctgt tccgctcgat accgtcgctg 300
gagatcgaag atgccagcgt gctggacgag ttctactggt tgaacaagga cgacccgaac 360
tattcgctgc agcgcgccac catcaatcgc ggcgaggatg cacacaccga tggcctgttc 420
acgtgaccg agcaggcaca gagggacatc gtcgcgctgt tcctggccac cgtcaggag 480
atggagaaca agcgcatcaa cgaagtactg ggccgtgatt tcctggacag caacttctgg 540
ctgtactggc gaaccatgtt cgcgttcgaa gattggcatt cggcgctgga gatgaagctg 600

tacctgcac gcttcatcca ccatatcggc ggctgcccgg atttctcggc gctgaagttc 660
acgaagtaca accagtacga atcgctggtg ctgccgctgg tgaagtgtt gcaggaccag 720
ggcgtggtgt tccagtacgg taccgaggTg accgacgtcg actttgatct gcagccggac 780
cgcaagcagg ccacgcgcat ccattggatg catgacggtg tagccggtgg cgtggaactc 840
ggcgcggtg atctgctgtt catgaccatc ggttcgctga ccgagaactc ggataatggc 900
gaccaccaca ctgcggcacg cctgaacgaa ggcccggcgc ctgcctggga cctgtggcgc 960
cgcatTgccg cgaaggatga cgcgttcggg cgtccggatg tgttcggcgc gcacattcca 1020

gaaaccaagt gggaatcggc aacggtgacc acgtggatg cgcgcattcc ggcctacatc 1080
cagaagatcg ccaagcgca tcccttcagc ggcaaagtgg tgaccggcgg catcgtcagc 1140
gtgcgcgact cgcgctggct gatgagctgg acggtgaatc gccagccaca ttccaagaac 1200
cagcccaagg accagatcgt ggtctgggtg tattegtgt tcgtggatac gcccggcgac 1260
tacgtgaaga agccgatga ggactgcacc ggcgaggaga tcacgcgca atggctgat 1320
cacctgggcg tgccggtgga agagatgat gagctggccg cgaccggcgc gaagacagtg 1380
ccggtgatga tgccgtacat cacggcgttc ttcatgccac gccaggcagg tgaccgcccg 1440

gacgtggtgc cggaaggTgc ggtgaacttc gctttcatcg gccagtTgc cgaatcgaag 1500
cagcgcgact gcatcttcac caccgagtac tcggtgcgca cgccgatgga ggcggtgtac 1560
accttgctgg ggatcgagcg tggcgtgccg gaggtgttca attccacgta tgacgtgcgc 1620
tcgtgctgg ccgcgaccgg gcgcctgcgt gatggcaagg aactggacat tcccgggcca 1680
gcgttcctgc gcaacctgct gatgaacaag ctggacaaga cccagatcgg tggctctgctg 1740
cgcgagtTca agctggTgca ggaggactga 1770

<210> 3

<211> 933

<212> PRT

<213> Alcohol dehydrogenase from *Micrococcus luteus* NCTC2665

<400> 3

Ala Thr Gly Thr Cys Cys Gly Ala Gly Thr Thr Cys Ala Cys Cys Cys
1 5 10 15
Gly Thr Thr Thr Cys Gly Ala Gly Cys Ala Gly Gly Thr Cys Gly Cys
20 25 30
Cys Gly Thr Gly Cys Thr Gly Gly Gly Cys Ala Cys Cys Gly Gly Cys
35 40 45
Gly Thr Gly Cys Thr Gly Gly Gly Thr Thr Cys Gly Cys Ala Gly Ala
50 55 60
Thr Cys Ala Thr Cys Ala Thr Gly Cys Ala Gly Gly Cys Gly Gly Cys
65 70 75 80
Gly Thr Ala Cys Cys Ala Cys Gly Gly Cys Ala Ala Gly Ala Ala Gly
85 90 95
Gly Thr Gly Ala Thr Gly Gly Cys Cys Thr Ala Cys Gly Ala Cys Gly
100 105 110
Cys Cys Gly Thr Cys Cys Cys Cys Gly Cys Cys Gly Cys Cys Cys Thr
115 120 125
Cys Gly Ala Gly Gly Gly Gly Ala Thr Cys Gly Ala Gly Cys Gly Cys
130 135 140
Cys Gly Cys Thr Gly Gly Gly Cys Gly Thr Gly Gly Ala Thr Cys Cys
145 150 155 160
Gly Cys Cys Ala Ala Gly Gly Cys Thr Ala Cys Gly Ala Ala Gly Cys
165 170 175
Ala Gly Ala Cys Cys Thr Cys Gly Gly Gly Gly Ala Gly Gly Gly Cys
180 185 190
Thr Ala Cys Gly Ala Cys Cys Cys Gly Cys Ala Gly Cys Gly Cys Thr
195 200 205
Thr Cys Gly Ala Cys Gly Ala Gly Gly Cys Cys Ala Thr Cys Gly Cys
210 215 220
Cys Cys Gly Cys Ala Thr Cys Ala Cys Gly Cys Cys Gly Ala Cys Cys
225 230 235 240
Thr Cys Cys Gly Ala Cys Cys Thr Cys Gly Gly Cys Gly Ala Gly Gly
245 250 255

Cys Cys Cys Thr Gly Gly Cys Gly Gly Ala Thr Gly Cys Gly Gly Ala
 260 265 270

 Cys Ala Thr Cys Gly Thr Gly Ala Thr Cys Gly Ala Gly Gly Cys Cys
 275 280 285
 Gly Thr Cys Cys Cys Gly Gly Ala Gly Ala Ala Cys Cys Thr Gly Gly
 290 295 300
 Ala Gly Cys Thr Cys Ala Ala Gly Cys Gly Cys Ala Ala Gly Gly Thr
 305 310 315 320
 Gly Thr Gly Gly Gly Cys Cys Cys Ala Gly Gly Thr Gly Gly Gly Cys
 325 330 335
 Gly Ala Gly Cys Thr Cys Gly Cys Cys Cys Cys Gly Cys Cys Ala

 340 345 350
 Cys Gly Ala Cys Cys Cys Thr Gly Thr Thr Cys Gly Cys Cys Ala Cys
 355 360 365
 Gly Ala Ala Cys Ala Cys Cys Thr Cys Cys Thr Cys Cys Cys Thr Gly
 370 375 380
 Cys Thr Gly Cys Cys Cys Thr Cys Gly Gly Ala Cys Thr Thr Cys Gly
 385 390 395 400
 Cys Cys Gly Ala Cys Gly Cys Cys Ala Gly Cys Gly Gly Cys Cys Ala
 405 410 415

 Thr Cys Cys Gly Gly Ala Gly Cys Gly Cys Thr Thr Cys Cys Thr Gly
 420 425 430
 Gly Cys Cys Cys Thr Gly Cys Ala Cys Thr Ala Cys Gly Cys Cys Ala
 435 440 445
 Ala Cys Cys Gly Cys Ala Thr Cys Thr Gly Gly Gly Cys Gly Cys Ala
 450 455 460
 Gly Ala Ala Cys Ala Cys Cys Gly Cys Cys Gly Ala Gly Gly Thr Cys
 465 470 475 480
 Ala Thr Gly Gly Gly Cys Ala Cys Cys Gly Cys Cys Gly Cys Cys Ala

 485 490 495
 Cys Cys Thr Cys Gly Cys Cys Gly Gly Ala Gly Gly Cys Cys Gly Thr

500 505 510
 Cys Gly Cys Gly Gly Gly Ala Gly Cys Cys Cys Thr Gly Cys Ala Gly
 515 520 525
 Thr Thr Cys Gly Cys Cys Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Cys Cys Gly
 530 535 540
 Gly Cys Ala Thr Gly Gly Thr Cys Cys Cys Cys Gly Thr Gly Cys Ala
 545 550 555 560

 Cys Gly Thr Gly Cys Gly Cys Ala Ala Gly Gly Ala Gly Ala Thr Cys
 565 570 575
 Cys Cys Gly Gly Gly Cys Thr Ala Cys Thr Thr Cys Cys Thr Cys Ala
 580 585 590
 Ala Cys Thr Cys Cys Cys Thr Gly Cys Thr Cys Ala Thr Cys Cys Cys
 595 600 605
 Gly Thr Gly Gly Cys Thr Gly Cys Ala Gly Gly Cys Cys Gly Gly Cys
 610 615 620
 Thr Cys Cys Ala Ala Gly Cys Thr Gly Thr Ala Cys Ala Thr Gly Cys

 625 630 635 640
 Ala Cys Gly Gly Ala Gly Thr Gly Gly Gly Cys Ala Ala Cys Cys Cys
 645 650 655
 Gly Gly Cys Gly Gly Ala Cys Ala Thr Cys Gly Ala Cys Cys Gly Cys
 660 665 670
 Ala Cys Cys Thr Gly Gly Cys Gly Cys Gly Thr Gly Gly Cys Cys Ala
 675 680 685
 Cys Cys Gly Gly Cys Ala Ala Cys Gly Ala Gly Cys Gly Cys Gly Gly
 690 695 700

 Cys Cys Cys Gly Thr Thr Cys Cys Ala Gly Ala Cys Cys Thr Ala Cys
 705 710 715 720
 Gly Ala Cys Ala Thr Cys Gly Thr Gly Gly Gly Cys Thr Thr Cys Cys
 725 730 735
 Ala Cys Gly Thr Gly Gly Cys Cys Gly Cys Cys Ala Ala Cys Gly Thr
 740 745 750
 Cys Thr Cys Cys Cys Gly Cys Ala Ala Cys Ala Cys Gly Gly Gly Cys

755 760 765
Gly Thr Cys Gly Ala Cys Thr Gly Gly Cys Ala Gly Cys Thr Cys Gly

770 775 780
Gly Cys Thr Thr Cys Gly Cys Thr Gly Ala Gly Cys Thr Gly Cys Thr
785 790 795 800
Cys Gly Ala Gly Ala Ala Gly Ala Gly Cys Ala Thr Cys Gly Cys Cys
805 810 815
Gly Ala Gly Gly Gly Cys Cys Ala Cys Ala Gly Cys Gly Gly Cys Gly
820 825 830
Thr Gly Gly Cys Thr Gly Ala Cys Gly Gly Cys Cys Ala Gly Gly Gly
835 840 845

Cys Thr Thr Cys Thr Ala Cys Cys Gly Cys Thr Ala Cys Gly Gly Gly
850 855 860
Cys Cys Gly Gly Ala Cys Gly Gly Gly Gly Ala Gly Ala Ala Cys Cys
865 870 875 880
Thr Cys Gly Gly Cys Cys Cys Gly Gly Thr Gly Gly Ala Gly Gly Ala
885 890 895
Cys Thr Gly Gly Ala Ala Cys Cys Thr Gly Gly Gly Cys Gly Ala Cys
900 905 910
Ala Ala Gly Gly Ala Cys Ala Cys Cys Cys Cys Gly Cys Thr Cys Gly

915 920 925
Gly Cys Thr Gly Ala

930
<210> 4
<211> 933
<212> DNA
<213> ADH sequence coding Alcohol dehydrogenase from Micrococcus luteus NCTC2665
<400> 4

atgtccgagt tcacccgttt cgagcaggtc gccgtgctgg gcaccggcgt gctgggttcg 60
cagatcatca tgcaggcggc gtaccacggc aagaaggtga tggcctacga cgccgtcccc 120
gccgcctctg aggggatcga gcgccgctgg gcgtggatcc gccaaaggcta cgaagcagac 180

ctcggggagg gctacgaccc gcagcgcttc gacgaggcca tcgcccgcac cagccgacc 240

tccgacctcg gcgaggccct ggcggatgcg gacatcgtga tcgaggccgt cccggagaac 300

ctggagctca agcgcaaggt gtgggcccag gtgggcgagc tcgccccgc cagaccctg 360

ttcgccacga acacctctc cctgctgcc tcggacttcg ccgacgccag cggccatccg 420

gagcgcttcc tggccctgca ctacccaac cgcacttggg cgcagaacac cgccgaggtc 480

atgggcaccg cgcaccctc gccggaggcc gtgcggggag ccctgcagtt cgccgaggag 540

accggcatgg tccccgtgca cgtgcgcaag gagatcccgg gctacttct caactcctg 600

ctcatcccg ggctgcaggc cggctccaag ctgtacatgc acggagtggg caaccggcg 660

gacatcgacc gcacctggcg cgtggccacc ggcaacgagc gcggcccgtt ccagacctac 720

gacatcgtgg gcttcacgt ggccccaac gtctccgca acacgggct cgactggcag 780

ctcggttcg ctgagctgt cgagaagagc atcgccgagg gccacagcg cgtggctgac 840

ggccagggt tctaccgta cgggccggac ggggagaacc tcggcccgtt ggaggactgg 900

aacctgggcg acaaggacac cccgctcggc tga 933

<210> 5

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer for amplifying OhyA gene

<400> 5

ggatccatgt actacagcag tggcaattac g 31

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer for amplifying OhyA gene

<400> 6

catatgtcag tctctctgca ccag 24

<210> 7

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer for amplifying ADH gene

<400> 7

ggaatcaaag ttaaattgcc gagttcaccc gtttc

35

<210> 8

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer for amplifying ADH gene

<400> 8

aattttgaag ttaatcagcc gagcggggtg tc

32