



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0093169  
(43) 공개일자 2019년08월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C12N 15/70* (2006.01) *C12P 7/64* (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
*C12N 15/70* (2013.01)  
*C12P 7/6409* (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2019-0012446  
(22) 출원일자 2019년01월31일  
심사청구일자 2019년01월31일  
(30) 우선권주장  
1020180011787 2018년01월31일 대한민국(KR)

(71) 출원인  
인하대학교 산학협력단  
인천광역시 미추홀구 인하로 100(용현동, 인하대학교)  
(72) 발명자  
김세경  
인천광역시 남동구 만수로75번길 85, 6-1005 (만수동, 신동아아파트)  
윤현식  
인천광역시 미추홀구 인하로 100, 생명공학과 (용현동)  
(74) 대리인  
김순웅

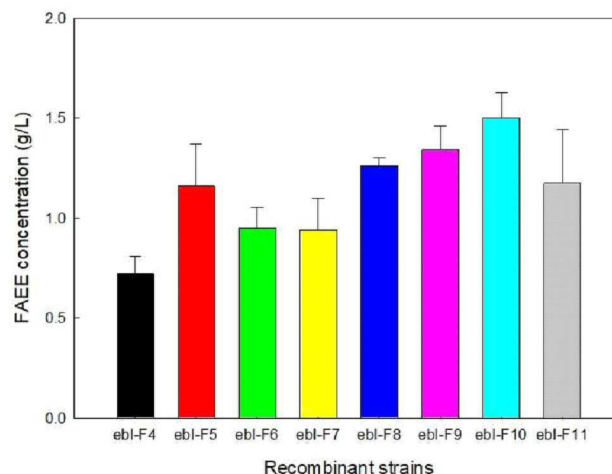
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 지방산을 생산하는 재조합 대장균 및 이를 이용한 바이오디젤의 제조방법

### (57) 요약

본 발명은 지방산 중 FAEE(fatty acid ethyl esters)를 생산하는 재조합 대장균 및 이를 이용한 FAEE(fatty acid ethyl esters)의 제조방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는, 4 종의 유전자 *atfA*, *pdc*, *adhB* 및 *'tesA*가 하나의 플라스미드에 위치하고; 5 종의 유전자 *accA*, *accB*, *accC*, *accD* 및 *fabD*가 하나의 플라스미드에 위치하며; 3 종의 유전자 *fabB*, *fabF* 및 *fabA*가 하나의 플라스미드에 위치하여 동시에 발현되는 시스템을 구축하고, 지방산 합성 베타-옥시데이션 단계의 *fadE*를 제거하여 지방산 감소가 완화된 숙주 균주인 재조합 대장균에 상기 3 종의 재조합 플라스미드를 도입시켜 공동으로 형질전환시킴으로써, FAEE의 생산량이 현저하게 증가한 재조합 대장균을 제작하였고, 이를 이용하여 FAEE를 효과적으로 생산할 수 있다. 따라서, 본 발명의 재조합 대장균은 바이오연료 및 관련 대사 공학 등에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도21



(52) CPC특허분류

**C12P 7/649** (2013.01)  
**C12Y 101/01001** (2013.01)  
**C12Y 203/0102** (2013.01)  
**C12Y 401/01001** (2013.01)

**문관우**

인천광역시 남동구 백범로294번길 16, 210동 2001호(간석동, 간석LH2단지아파트)

(72) 발명자

**진규범**

인천광역시 계양구 계산새로5번길 14, 101동 507호(계산동, 인정프린스아파트)

**박혜민**

인천광역시 계양구 작전시장로19번길 9-2, 401호(작전동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711059265  
 부처명 과학기술정보통신부  
 연구관리전문기관 한국연구재단  
 연구사업명 개인기초연구(미래부)  
 연구과제명 대사공학적으로 조절된 E. coli를 이용한 지방산 기반 바이오연료 생산  
 기 여 율 60/100  
 주관기관 인하대학교  
 연구기간 2017.11.01 ~ 2018.10.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711015475  
 부처명 미래창조과학부  
 연구관리전문기관 한국연구재단  
 연구사업명 기후변화대응기술개발  
 연구과제명 바이오매스를 이용한 지방산계열 대체연료 생산 원천기술 개발  
 기 여 율 40/100  
 주관기관 인하대학교  
 연구기간 2014.09.30 ~ 2015.09.29

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

아시네토박터 베이리(*Acinetobacter baylyi*) ADP1(ATCC 33305)의 아실-코엔자임 에이:디아실글리세롤 아실전이효소(wax-dgaT, acyl-Coenzyme A:diacylglycerol acyltransferase)의 유전정보를 보유한 뉴클레오티드(*atfA*, 서열번호 1);

대장균(*E. coli*) K-12 MG1655의 티오에스테르화효소 I (Thioesterase I)에서 선도서열을 제거하여 주변세포질(periplasm)이 아닌 세포질(cytoplasm)에 존재하게 변형시킨 유전정보를 보유한 뉴클레오티드(*'tesA*, 서열번호 2);

지모모나스 모빌리스 아종 모빌리스(*Zymomonas mobilis* subsp. *Mobilis*) ZM4(ATCC 31821)의 피루브산 탈카르복실화효소(Pyruvate decarboxylase)의 유전정보를 보유한 뉴클레오티드(*pdc*, 서열번호 3);

지모모나스 모빌리스 아종 모빌리스(*Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis*) ZM4(ATCC 31821)의 알코올 탈수소효소(Alcohol dehydrogenase)의 유전정보를 보유한 뉴클레오티드(*adhB*, 서열번호 4);

대장균(*E. coli*) K-12 MG1655의 카복실전이효소 알파-유닛(CT- $\alpha$ , carboxyltransferase  $\alpha$ -unit)의 유전정보를 보유한 뉴클레오티드(*accA*, 서열번호 5);

대장균(*E. coli*) MG1655의 비오틴 카복실 운반 단백질(BCCP, biotin carboxyl carrier protein)의 유전정보를 보유한 뉴클레오티드(*accB*, 서열번호 6);

대장균(*E. coli*) K-12 MG1655의 비오틴 카복실화효소(BC, biotin carboxylase)의 유전정보를 보유한 뉴클레오티드(*accC*, 서열번호 7);

대장균(*E. coli*) K-12 MG1655의 카복실전이효소 베타-유닛(CT- $\beta$ , carboxyltransferase  $\beta$ -unit)의 유전정보를 보유한 뉴클레오티드(*accD*, 서열번호 8);

대장균(*E. coli*) K-12 MG1655의 말로닐-코엔자임 에이:아실 운반 단백질 아실전이효소(Malonyl-Coenzyme A:acyl carrier protein transacylase)의 유전정보를 보유한 뉴클레오티드(*fabD*, 서열번호 9);

대장균(*E. coli*) K-12 MG1655의 베타-케토 아실-아실 운반 단백질 합성효소 II (KAS II,  $\beta$ -keto acyl-acyl carrier protein synthase II)의 유전정보를 보유한 뉴클레오티드(*fabF*, 서열번호 10);

대장균(*E. coli*) K-12 MG1655의 베타-케토 아실-아실 운반 단백질 합성효소 I (KAS I,  $\beta$ -keto acyl-acyl carrier protein synthase I)의 유전정보를 보유한 뉴클레오티드(*fabB*, 서열번호 11); 및

대장균(*E. coli*) K-12 MG1655의 베타-하이드록시 데카노일 티오에스테르 탈수소효소/이성화효소( $\beta$ -hydroxy decanoyl thioester dehydrase/isomerase)의 유전정보를 보유한 뉴클레오티드(*fabA*, 서열번호 12);를 포함하는 재조합 플라스미드로 숙주 대장균을 형질전환시킨 형질전환체인, FAEE(fatty acid ethyl esters)를 생산하는 재조합 대장균으로서,

상기 숙주 대장균은 *E. coli* BL21(DE3)의 지방산 합성 베타-옥시데이션( $\beta$ -oxidation) 단계에서의 아실-CoA 탈수소효소(acyl-CoA dehydrogenase)의 유전정보를 보유한 뉴클레오티드(*fadE*, 서열번호 13)가 제거된 *E. coli* BL21(DE3) *fadE*인 것을 특징으로 하는 재조합 대장균.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 재조합 플라스미드는 pCDFDuet<sup>TM</sup>-1::*atfA*, *'tesA*, *pdc*, *adhB* + pCOLADuet<sup>TM</sup>-1::*accA*, *accB*, *accC*, *accD*, *fabD* + pACYCDuet<sup>TM</sup>-1::*fabF*, *fabB*, *fabA*인 것을 특징으로 하는 재조합 대장균.

### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 재조합 대장균은 *E. coli* BL21(DE3) *fadE::pCDFDuet<sup>TM</sup>-1::atfA*, '*tesA*, *pdC*, *adhB* + *pCOLADuet<sup>TM</sup>-1::accA*, *accB*, *accC*, *accD*, *fabD* + *pACYCDuet<sup>TM</sup>-1::fabF*, *fabB*, *fabA*인 것을 특징으로 하는 재조합 대장균.

### 청구항 4

제3항에 있어서,

상기 재조합 대장균은 수탁번호 KCTC18660P로 기탁된 것을 특징으로 하는 재조합 대장균.

### 청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 재조합 대장균을 배양하는 단계를 포함하는 FAEE(fatty acid ethyl esters)의 제조 방법.

### 청구항 6

제5항에 있어서,

상기 방법은 다음 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:

- (a) 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 재조합 대장균을 1차 배양하는 단계;
- (b) 상기 (a) 단계의 1차 배양한 재조합 대장균을 2차 배양하는 단계;
- (c) 상기 (b) 단계에서 얻은 배양액에 클로로포름과 메탄올의 혼합용액을 첨가하고 교반하여 분리하는 단계;
- (d) 상기 (c) 단계에서 분리한 용액을 원심분리하여 유기용매층과 수용액층으로 분리하는 단계;
- (e) 상기 (d) 단계에서 분리된 유기용매층을 수집하여 질소로 건조시키는 단계; 및
- (f) 상기 (e) 단계의 결과물에 클로로포름과 메탄올의 혼합용액을 첨가하여 FAEE(fatty acid ethyl esters)를 정제하는 단계.

### 청구항 7

제6항에 있어서,

상기 (c) 단계 및 (f) 단계의 클로로포름과 메탄올의 혼합용액은 클로로포름과 메탄올이 2:1의 부피비로 혼합된 것을 특징으로 하는 제조방법.

### 청구항 8

제6항에 있어서,

상기 (f) 단계의 정제는 0.1 내지 0.5  $\mu\text{m}$  필터로 정제하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

### 발명의 설명

## 기술분야

[0001] 본 발명은 지방산 에틸 에스테르(Fatty Acid Ethyl Ester, FAEE)를 생산하는 재조합 대장균, 및 이를 이용한 FAEE의 제조방법에 관한 것이다.

## 배경기술

[0003] 현재 세계 시장의 고성장은 에너지의 사용 증가를 바탕으로 이루어지고 있다. 석유 에너지 고갈로 인한 유가 상승의 고공행진이 이루어지면서, 이를 대체할 에너지의 개발이 시급하다. 이를 위해 태양력이나 풍력 같은 자연 에너지 개발에 관심이 모아지고 있으나, 에너지 밀도가 낮고 간헐적으로 밖에 사용할 수 없다는 등의 단점이 있어 보급에 많은 제약이 따르고 있다. 이 때문에 대체에너지로서 가장 각광받는 것이 바이오연료이다.

[0004] 바이오연료는 바이오매스(biomass)로부터 유기체뿐만 아니라 대사활동에 의한 부산물을 포함하는 생산물을 이용한 신재생에너지의 종류이다. 바이오연료의 대표적인 예로는 현재 수송연료로 사용이 되고 있는 바이오디젤(biodiesel), 바이오 알코올(bioalcohol), 바이오가스(biogas) 및 고형연료 등이 있다.

[0005] 이 중 바이오디젤은 가장 유망한 대체 연료 중 하나이며, 화학적으로 긴 지방산 고리를 단일 알킬에스테르(alkyl ester) 혼합물로서 FAME(지방산 메틸 에스테르, Fatty Acid Methyl Ester)과 FAEE(지방산 에틸 에스테르, Fatty Acid Ethyl Esters)로 구분된다. 바이오디젤은 경유와 매우 비슷한 물리적 특성 때문에 현재 사용되는 내연기관의 교체없이 사용할 수 있는 장점이 있다. 또한 기존시설을 통해 운반, 판매가 가능하여 운송연료의 대표적인 대체에너지로 꼽히고 있다.

[0006] 바이오디젤은 미국의 경우 콩과 옥수수에서 생산하며 휘발유와 디젤 수요의 각각 12%, 6%를 차지한다. 그러나, 바이오연료를 생산하기 위해 옥수수와 콩을 사용하면 환경 문제와 식량 위기가 발생할 수 있다. 결과적으로 곡물을 바이오연료 생산에 사용하는 것은 근본적인 문제를 해결하기에는 부적절한 방법이다. 그렇기 때문에 바이오연료를 생산할 수 있는 미생물 시스템이 고려되었다.

[0007] 미생물 중 *E. coli*는 빠른 성장, 잘 알려진 유전 정보, 쉬운 유전자 조작 및 저렴한 배지로 인해 바이오연료 생산을 위한 적합한 숙주 중 하나이다. 대장균은 2 형 지방산 합성 (FAS) 경로를 사용하여 지방산을 합성한다. 대장균에 존재하는 *fab* (fatty acid biosynthesis) 유전자들은 지방산 합성 단계에 관여하는 효소 생산 유전자들이다. 지방산 생합성 경로는 크게 시작 단계 (initiation step), 신장 단계 (elongation step) 및 종결 단계 (termination step)와 지방산을 분해하는 베타-옥시데이션 단계 ( $\beta$ -oxidation step)로 구성된다. 시작 단계는 *accA*, *accB*, *accC*, *accD*가 아세틸-CoA를 말로닐-CoA로 반응시키는 역할을 한다. 이 반응은 *accA*, *accB*, *accC*, *accD*가 모여 반응이 되는데, 지방산 합성이 느려 율속제한(rate-limiting)이 일어난다. 말로닐-CoA는 *fabD*를 거쳐 말로닐-ACP가 되어 탄소수가 길어지는 신장단계에 쓰이게 된다. 신장 단계에서 *fabB*, *fabA*는 불포화지방산 합성에 필수적인 유전자이고, *fabF*는 지방산-ACP에 말로닐-ACP를 결합시킴으로써 지방산의 탄소수를 2개씩 늘려 지방산의 길이를 신장시키는 역할을 한다. 신장 단계의 다른 하나는 *fabG*, *fabH*, *fabI* 및 *fabZ*로 구성된다. 또한 종결 단계에서 *tesA* 유전자는 티오에스테르화효소 I (Thioesterase I)을 만들어 지방 아실-ACP를 유리지방산 (free fatty acid)으로 전환하는 역할을 한다. 그러나, *tesA*의 경우 대장균의 주변세포질(periplasm)에 존재하여 아실-ACP가 유리지방산으로 전환하는 속도에 한계가 생긴다. 베타-옥시데이션 단계에서는 지방아실-CoA를 아세틸-CoA로 전환하여 FAEE 생산을 감소시키는 *fadE* 유전자가 있다.

[0008] 표 1에 대장균의 지방산 생합성 관여 효소 및 유전자 정보를 나타내었다.

표 1

| 유전자         | 발현 단백질                 | 돌연변이 경우 나타나는 표현형(phenotype) 변화       |
|-------------|------------------------|--------------------------------------|
| <i>aas</i>  | Acyl-ACP synthetase    | lysophosphatidylethanolamine 축적      |
| <i>accA</i> | Acetyl-CoA carboxylase | carboxyltransferase $\alpha$ subunit |
| <i>accB</i> | Acetyl-CoA carboxylase | BCCP subunit                         |
| <i>accC</i> | Acetyl-CoA carboxylase | biotin carboxylase subunit           |
| <i>accD</i> | Acetyl-CoA carboxylase | carboxyltransferase $\beta$ subunit  |
| <i>acpP</i> | ACP                    | ACP structural gene                  |

|               |                                                 |                                                |
|---------------|-------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| <i>acpS</i>   | ACP synthetase                                  | apo-ACP 축적                                     |
| <i>cfa</i>    | Cyclopropane fatty acid synthase                | cells lack cyclopropane fatty acids            |
| <i>fabA</i>   | $\beta$ -Hydroxydecanoyl ACPdehydrase/isomerase | 불포화지방산 자가영양 (unsaturated fatty acid auxotroph) |
| <i>fabAup</i> | -                                               | 포화지방산(saturated fatty acid) 과생산                |
| <i>fabB</i>   | $\beta$ -Ketoacyl-ACP synthase I                | 불포화지방산 자가영양(unsaturated fatty acid auxotroph)  |
| <i>fabD</i>   | Malonyl-CoA:ACP transacylase                    | 온도에 따라 포화지방산, 불포화지방산의 자가영양(auxotroph) 필요       |
| <i>fabE</i>   | Acetyl-CoA carboxylase                          | -                                              |
| <i>fabF</i>   | $\beta$ -Ketoacyl-ACP synthase II               | 온도에 따라 조절                                      |
| <i>fabG</i>   | $\beta$ -Ketoacyl-ACP synthase                  | -                                              |
| <i>fabH</i>   | $\beta$ -Ketoacyl-ACP synthase III              | -                                              |
| <i>fabI</i>   | Enoyl-ACP reductase                             | -                                              |
| <i>fabZ</i>   | 3-hydroxyacyl-ACP dehydratase                   | -                                              |
| <i>fadD</i>   | Long-chain acyl-CoA synthetase                  | -                                              |
| <i>fadR</i>   | Transcriptional regulator of <i>fabA</i>        | -                                              |
| <i>fatA</i>   | -                                               | trans불포화지방산의 이용                                |
| <i>lpxA</i>   | UDP-Glc-NAc acyltransferase                     | 지질 A(lipid A) 축적                               |
| <i>orf-17</i> | Putative dehydrase                              | -                                              |
| <i>plsB</i>   | <i>sn</i> -Glycerol-3-phosphate acyltransferase | glycerol-3-phosphate 자가영양                      |
| <i>plsC</i>   | 1-Acylglycerol phosphatase acyltransferase      | -                                              |
| <i>plsX</i>   | Unknown                                         | PlsB 표현형에 필요                                   |
| <i>tesA</i>   | Thioesterase I                                  | 효소활성 결핍                                        |
| <i>tesB</i>   | Thioesterase II                                 | 효소활성 결핍                                        |

- [0011] 상기와 같이, 화석연료의 대체 에너지로서 바이오디젤로 변환이 가능한 지방산에 대한 관심이 점점 증대되고 있으며, 이로 인해 지방산을 생합성하는 대장균에 대한 관심도 증대되고 있다.
- [0012] 따라서, 신재생에너지 개발의 일환으로 바이오디젤로 전환하였을 때 물리적 특성이 유리한 지방산의 조성을 높일 수 있는 균주의 개발의 필요성이 절실히 요구되고 있다.
- [0013] 한편, 바이오디젤로 변환이 가능한 FAEE(fatty acid ethyl esters)는 왁스 에스테르화효소 (wax esterase)를 사용하여 지방 아실-CoA 및 에탄올로부터 합성된다.
- [0014] 그러나, 에탄올 생산 경로와 관련된 유전자(*Zymomonas mobilis*의 *pdC*와 *adhB*)는 호기성 조건에서 충분한 양의 에탄올을 생산하지 않는다.
- [0015] 이에 따라, 본 발명자들은 지방산의 생산성을 향상시키면서 FAEE를 합성하는 신규한 균주를 개발하고자 하였다.
- [0016] 본 발명의 배경이 되는 기술로, 대한민국 등록특허 제10-1279528호 (2013년 06월 21일)에서 지방산을 생산하는 재조합 대장균, 및 이를 이용한 지방산의 제조방법에 대해 인용하였다.
- [0017] 또한, 본 발명은 대한민국 등록특허 제10-1402108호 (2014년 05월 26일) 및 대한민국 등록특허 제10-1701820호 (2017년 01월 25일)의 제조방법에 개시된 벡터를 이용하였다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

- [0018] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-1279528호 (공개일자 2013년 02월 27일)
- (특허문헌 0002) 대한민국 등록특허 제10-1402108호 (공개일자 2013년 12월 30일)

(특허문헌 0003) 대한민국 등록특허 제10-1701820호 (공개일자 2016년 04월 26일)

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0019] 본 발명자들은 바이오디젤로 변환이 가능한 지방산, 특히 FAEE(fatty acid ethyl esters)의 조성을 높일 수 있는 균주를 개발하고자 예의 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 *adhB*, *pdc*, *atfA*, *'tesA*, *accA*, *accB*, *accC*, *accD*, *fabD*, *fabB*, *fabF* 및 *fabA* 유전자를 도입하고, *fadE* 유전자를 결실시켜서 형질전환된 재조합 대장균을 제작하였고, 이에 의해 FAEE의 생산량이 현저하게 증가했음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [0020] 따라서, 본 발명의 일 목적은 FAEE를 생산하는 재조합 대장균을 제공하는 데 있다.
- [0021] 또한, 본 발명의 다른 목적은 FAEE의 제조방법을 제공하는 데 있다.

### 과제의 해결 수단

- [0022] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0024] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 아시네토박터 베이리(*Acinetobacter baylyi*) ADP1(ATCC 33305)의 아실-코엔자임 에이:디아실글리세롤 아실전이효소(wax-dgaT, acyl-Coenzyme A:diacylglycerol acyltransferase)의 유전정보를 보유한 뉴클레오티드(*atfA*, 서열번호 1);
- [0025] 대장균(*E. coli*) K-12 MG1655의 티오에스테르화효소 I (Thioesterase I)에서 전도서열을 제거하여 주변세포질(periplasm)이 아닌 세포질(cytoplasm)에 존재하게 변형시킨 유전정보를 보유한 뉴클레오티드(*'tesA*, 서열번호 2);
- [0026] 지모모나스 모빌리스 아종 모빌리스(*Zymomonas mobilis* subsp. *Mobilis*) ZM4(ATCC 31821)의 피루브산 탈카르복실화효소(Pyruvate decarboxylase)의 유전정보를 보유한 뉴클레오티드(*pdc*, 서열번호 3);
- [0027] 지모모나스 모빌리스 아종 모빌리스(*Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis*) ZM4(ATCC 31821)의 알코올 탈수소효소(Alcohol dehydrogenase)의 유전정보를 보유한 뉴클레오티드(*adhB*, 서열번호 4);
- [0028] 대장균(*E. coli*) K-12 MG1655의 카복실전이효소 알파-유닛(CT- $\alpha$ , carboxyltransferase  $\alpha$ -unit)의 유전정보를 보유한 뉴클레오티드(*accA*, 서열번호 5);
- [0029] 대장균(*E. coli*) MG1655의 비오틴 카복실 운반 단백질(BCCP, biotin carboxyl carrier protein)의 유전정보를 보유한 뉴클레오티드(*accB*, 서열번호 6);
- [0030] 대장균(*E. coli*) K-12 MG1655의 비오틴 카복실화효소(BC, biotin carboxylase)의 유전정보를 보유한 뉴클레오티드(*accC*, 서열번호 7);
- [0031] 대장균(*E. coli*) K-12 MG1655의 카복실전이효소 베타-유닛(CT- $\beta$ , carboxyltransferase  $\beta$ -unit)의 유전정보를 보유한 뉴클레오티드(*accD*, 서열번호 8);
- [0032] 대장균(*E. coli*) K-12 MG1655의 말로닐-코엔자임 에이:아실 운반 단백질 아실전이효소(Malonyl-Coenzyme A:acyl carrier protein transacylase)의 유전정보를 보유한 뉴클레오티드(*fabD*, 서열번호 9);
- [0033] 대장균(*E. coli*) K-12 MG1655의 베타-케토 아실-아실 운반 단백질 합성효소 II (KAS II,  $\beta$ -keto acyl-acyl carrier protein synthase II)의 유전정보를 보유한 뉴클레오티드(*fabF*, 서열번호 10);
- [0034] 대장균(*E. coli*) K-12 MG1655의 베타-케토 아실-아실 운반 단백질 합성효소 I (KAS I,  $\beta$ -keto acyl-acyl carrier protein synthase I)의 유전정보를 보유한 뉴클레오티드(*fabB*, 서열번호 11); 및
- [0035] 대장균(*E. coli*) K-12 MG1655의 베타-하이드록시 데카노일 티오에스테르 탈수소효소/이성화효소( $\beta$ -hydroxy decanoyl thioester dehydrase/isomerase)의 유전정보를 보유한 뉴클레오티드(*fabA*, 서열번호 12);를 포함하는 재조합 플라스미드로 숙주 대장균을 형질전환시킨 형질전환체인, FAEE(fatty acid ethyl esters)를 생산하는 재조합 대장균을 제공하며, 상기 숙주 대장균은 *E. coli* BL21(DE3)의 지방산 합성 베타-옥시데이션( $\beta$ -oxidation)

단계에서의 아실-CoA 탈수소효소(acyl-CoA dehydrogenase)의 유전정보를 보유한 뉴클레오티드(*fadE*, 서열번호 13)가 제거된 *E. coli* BL21(DE3) *fadE*인 것을 특징으로 한다.

- [0036] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 재조합 대장균은 수탁번호 KCTC18660P로 기탁된 것이다.
- [0037] 본 발명의 바람직한 구현예에 있어서, 상기 재조합 플라스미드는 pCDFDuet<sup>TM</sup>-1::*atfA*, '*tesA*, *pdC*, *adhB* + pCOLADuet<sup>TM</sup>-1::*accA*, *accB*, *accC*, *accD*, *fabD* + pACYCDuet<sup>TM</sup>-1::*fabF*, *fabB*, *fabA*이다.
- [0038] 일 구현예에서, 본 발명은 (1) 에탄올을 생성해 FAEE를 합성하는 3 종의 유전자 *atfA*, *pdC*, *adhB*와 지방산 합성 종결단계의 '*tesA*가 동시 발현되는 하나의 재조합 플라스미드; (2) 지방산 합성 시작단계의 5 종류의 유전자 *accA*, *accB*, *accC*, *accD*, *fabD*가 동시 발현되는 하나의 재조합 플라스미드; 및 (3) 지방산 합성 신장단계의 3 종의 유전자 *fabB*, *fabF*, *fabA*가 동시 발현되는 하나의 재조합 플라스미드를 각각 구축한 후; (4) 상기 3 종의 재조합 플라스미드를, 지방산 합성 베타-옥시데이션 단계의 *fadE*를 제거하여 지방산 감소가 완료된 숙주 균주인 재조합 대장균(*E. coli* BL21(DE3) Δ*fadE*)에 도입하여 형질전환시킴으로써, 총 12 종의 유전자를 동시에 발현하는 신규한 재조합 대장균을 제작하였다.
- [0039] 본 발명의 바람직한 구현예에 있어서, 상기 재조합 대장균은 *E. coli* BL21(DE3) *fadE*::pCDFDuet<sup>TM</sup>-1::*atfA*, '*tesA*, *pdC*, *adhB* + pCOLADuet<sup>TM</sup>-1::*accA*, *accB*, *accC*, *accD*, *fabD* + pACYCDuet<sup>TM</sup>-1::*fabF*, *fabB*, *fabA*이다.
- [0040] 상기 제조된 재조합 균주를 2018년 1월 22일자로 한국생명공학연구원 생물자원센터 유전자은행(KCTC)에 기탁하였으며, KCTC18660P의 수탁번호를 부여받았다.
- [0041] 본 발명의 재조합 대장균은 지방산, 특히 FAEE를 생산하는 생산능이 우수하여, 이를 효과적으로 생산함으로써, 바이오연료로 유용하게 사용될 수 있다.
- [0043] 또한, 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 재조합 대장균을 배양하는 단계를 포함하는 FAEE(fatty acid ethyl esters)의 제조 방법을 제공한다.
- [0044] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 방법은 다음 단계를 포함한다:
- [0045] (a) 상술한 재조합 대장균을 1차 배양하는 단계;
- [0046] (b) 상기 (a) 단계의 1차 배양한 재조합 대장균을 2차 배양하는 단계;
- [0047] (c) 상기 (b) 단계에서 얻은 배양액에 클로로포름과 메탄올의 혼합용액을 첨가하고 교반하여 분리하는 단계;
- [0048] (d) 상기 (c) 단계에서 분리한 용액을 원심분리하여 유기용매층과 수용액층으로 분리하는 단계;
- [0049] (e) 상기 (d) 단계에서 분리된 유기용매층을 수집하여 질소로 건조시키는 단계; 및
- [0050] (f) 상기 (e) 단계의 결과물에 클로로포름과 메탄올의 혼합용액을 첨가하여 FAEE(fatty acid ethyl esters)를 정제하는 단계.
- [0051] 상기 (f) 단계에서 정제한 FAEE 양을 분석하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0052] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 (c) 단계 및 (f) 단계의 클로로포름과 메탄올의 혼합용액은 클로로포름과 메탄올이 2:1의 부피비로 혼합된 것이다.
- [0053] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 (f) 단계의 정제는 0.1 내지 0.5 μm 필터, 가장 바람직하게는 0.2 μm 필터로 필터링하여 정제할 수 있다.
- [0054] 본 발명의 상술한 재조합 대장균을 이용하여 FAEE(fatty acid ethyl esters)를 제조하는 과정에 이용되는 배양 방법, 분리 방법, 정제 방법 등은 본 발명의 재조합 대장균을 이용하여 목적의 FAEE(fatty acid ethyl esters)를 획득할 수 있는 한, 당업계에 공지된 임의의 방법도 이용할 수 있다.
- [0055] 예컨대, 본 발명의 일 구현예에서, 상기 재조합 대장균(*E. coli* BL21(DE3) *fadE*::pCDFDuet<sup>TM</sup>-1::*atfA*, '*tesA*, *pdC*, *adhB* + pCOLADuet<sup>TM</sup>-1::*accA*, *accB*, *accC*, *accD*, *fabD* + pACYCDuet<sup>TM</sup>-1::*fabF*, *fabB*, *fabA*)(ebl-F10)을 항생제인 스트렙토마이신, 카나마이신, 클로로암피니콜이 포함된 300 mL의 액체 LB 배지에 넣고 총 50시간 배양한

다. 37℃의 진탕배양기에서 200 rpm의 속도로 회전시키면서 배양하며, 유전자 발현을 목적으로 1mM IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside)를 첨가한다. 분석을 위한 샘플을 제조하기 위해서 균체가 포함된 배양액에 클로로포름과 메탄올 (2:1의 부피비)의 혼합용액을 첨가하고 분리한다. 그 다음 원심분리를 통해 층을 분리하여 유기용매층을 3 mL 수집한다. 질소를 사용해 말린 후 다시 클로로포름과 메탄올 (2:1의 부피비)의 혼합용액을 1 mL 첨가하여 0.2 μm 필터로 필터링하여 분석한다.

[0057] 본 발명의 방법은 상술한 균주를 이용하여 FAEE를 생산하므로, 상술한 본 발명의 균주와 중복된 내용은 중복된 내용의 기재에 의한 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.

[0059] 본 발명의 방법에 따라 제작된 재조합 대장균은, (1) 에탄올을 생성해 FAEE를 합성하는 3 종의 유전자 *atfA*, *pdc*, *adhB*와 지방산 합성 종결단계의 '*tesA*'가 동시 발현되는 하나의 재조합 플라스미드; (2) 지방산 합성 시작단계의 5 종의 유전자 *accA*, *accB*, *accC*, *accD*, *fabD*가 동시 발현되는 하나의 재조합 플라스미드; 및 (3) 지방산 합성 신장단계의 3 종의 유전자 *fabB*, *fabF*, *fabA*가 동시 발현되는 하나의 재조합 플라스미드를, (4) 지방산 합성 베타-옥시테이션 단계의 *fadE*를 제거하여 지방산 감소가 완료된 숙주 균주인 재조합 대장균 (*E. coli* BL21(DE3) Δ*fadE*)에 도입하여 동시-형질전환시킨 신규한 재조합 균주로서, FAEE를 효과적으로 생산하므로, 바이오연료 및 관련 대사 공학 등에 유용하게 사용될 수 있다.

## 도면의 간단한 설명

[0061] 도 1은 대장균의 지방산 및 FAEE 생합성 과정을 나타낸 도이다.

도 2는 대장균 내 단백질 발현을 위한 플라스미드 pCDFDuet<sup>TM</sup>-1의 구조 및 클로닝 사이트를 나타낸 도이다.

도 3은 대장균 내 단백질 발현을 위한 플라스미드 pCOLADuet<sup>TM</sup>-1의 구조 및 클로닝 사이트를 나타낸 도이다.

도 4는 대장균 내 단백질 발현을 위한 플라스미드 pACYCDuet<sup>TM</sup>-1의 구조 및 클로닝 사이트를 나타낸 도이다.

도 5는 대장균 내 단백질 발현을 위한 플라스미드 pCDFDuet<sup>TM</sup>-1와 *atfA*, '*tesA*', *pdc*, *adhB*의 유전자 정보를 포함한 뉴클레오티드를 결합시킨 재조합 플라스미드의 구조 및 크기 변화를 나타낸 도이다.

도 6은 '*tesA*'의 유전정보에 대한 주형으로 이용된 플라스미드 pCDF<sup>TM</sup>-1b와 유전자 '*tesA*'의 유전자 정보를 포함한 뉴클레오티드를 결합시킨 재조합 플라스미드의 구조와 크기를 나타낸 도이다.

도 7은 대장균 내 단백질 발현을 위한 플라스미드 pCOLADuet<sup>TM</sup>-1와 *accA*, *accB*, *accC*, *accD*, *fabD*의 유전자 정보를 포함한 뉴클레오티드를 결합시킨 재조합 플라스미드의 구조 및 크기 변화를 나타낸 도이다.

도 8은 대장균 내 단백질 발현을 위한 플라스미드 pACYCDuet<sup>TM</sup>-1와 *fabB*, *fabF*, *fabA*의 유전자 정보를 포함한 뉴클레오티드를 결합시킨 재조합 플라스미드의 구조 및 크기 변화를 나타낸 도이다.

도 9는 *fadE* 유전자의 상류 서열과 하류 서열을 나타낸 도이다.

도 10은 *fadE* 유전자 제거에 사용된 재조합 플라스미드 *fadE* fusion-pKOV의 제작 과정을 나타낸 도이다.

도 11은 *fadE* 유전자 제거 과정 중 최종 선별과정 후 존재하는 2가지 종류의 *E. coli* BL21(DE3) 유전체 (genomic DNA)에서의 *fadE* 유전자의 여부를 나타낸 도이다.

도 12는 대장균 내 단백질 발현을 위한 플라스미드 pCDFDuet<sup>TM</sup>-1에 결합시킨 *atfA* 유전자의 염기서열 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 13은 대장균 내 단백질 발현을 위한 플라스미드 pCDFDuet<sup>TM</sup>-1에 결합시킨 '*tesA*' 유전자의 염기서열 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 14는 대장균 내 단백질 발현을 위한 플라스미드 pCDFDuet™-1에 결합시킨 *pdC* 유전자의 염기서열 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 15는 대장균 내 단백질 발현을 위한 플라스미드 pCDFDuet™-1에 결합시킨 *adhB* 유전자의 염기서열 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 16은 대장균 내 단백질 발현을 위한 플라스미드 pCOLADuet™-1에 결합시킨 *accA* 유전자의 염기서열 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 17은 대장균 내 단백질 발현을 위한 플라스미드 pCOLADuet™-1에 결합시킨 *accB*, *accC* 유전자의 염기서열 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 18은 대장균 내 단백질 발현을 위한 플라스미드 pCOLADuet™-1에 결합시킨 *accD* 유전자의 염기서열 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 19는 대장균 내 단백질 발현을 위한 플라스미드 pCOLADuet™-1에 결합시킨 *fabD* 유전자의 염기서열 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 20은 대장균 내 단백질 발현을 위한 플라스미드 pACYCDuet™-1에 결합시킨 *fabF*, *fabB*, *fabA* 유전자의 염기서열 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 21은 본 발명의 제조합 대장균에서의 FAEE 생산량을 보여준다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0062] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

### [0064] 실시예 1 : 목적 유전자의 정보를 보유한 뉴클레오타이드를 포함하는 제조합 플라스미드의 제조

#### [0065] 1. PCR을 이용한 유전자 증폭

[0066] 본 발명에 사용된 유전자 정보는 아시네토박터 베이리(*Acinetobacter baylyi*) ADP1(ATCC 33305)의 아실-코엔자임 에이:디아실글리세롤 아실전이효소(*wax-dgaT*, acyl-Coenzyme A:diacylglycerol acyltransferase)의 유전정보를 보유한 뉴클레오타이드(*atfA*, 서열번호 1), 대장균(*E. coli*) K-12 MG1655의 티오에스터라제 I (Thioesterase I)에서 선도서열을 제거하여 주변세포질(periplasm)이 아닌 세포질(cytoplasm)에 존재하게 변형시킨 유전정보를 보유한 뉴클레오타이드(*tesA*, 서열번호 2), 지모모나스 모빌리스 아종 모빌리스(*Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis*) ZM4(ATCC 31821)의 피루브산 탈카르복실화효소(Pyruvate decarboxylase)의 유전정보를 보유한 뉴클레오타이드(*pdC*, 서열번호 3), 지모모나스 모빌리스 아종 모빌리스(*Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis*) ZM4(ATCC 31821)의 알코올 탈수소효소(Alcohol dehydrogenase)의 유전정보를 보유한 뉴클레오타이드(*adhB*, 서열번호 4), 대장균(*E. coli* K-12 MG1655)의 유전 정보를 바탕으로 하여, 지방산 합성 개시단계에 위치하여 아세틸-CoA를 말로닐-CoA로 반응시키는 효소(ACC)의 정보를 가진 *accA*(서열번호 5), *accB*(서열번호 6), *accC*(서열번호 7), *accD*(서열번호 8), 말로닐-CoA를 신장단계에 쓰이게 되는 말로닐-ACP로 만드는 효소(FabD)의 유전정보를 가진 *fabD*(서열번호 9), 및 지방산 신장단계에서 탄소 사슬의 신장과 지방산 생성 마지막 단계에 작용하는 효소(KASI, KASII)의 정보를 가진 두 개의 유전자 *fabF*(서열번호 10), *fabB*(서열번호 11)와 KASI와 함께 불포화지방산 생성 단계에 관여하는 효소( $\beta$ -Hydroxydecanoyl ACP dehydrase/isomerase)의 유전정보를 가진 유전자 *fabA*(서열번호 12)의 염기서열을 사용하였다. 염기서열 정보는 KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, [www.genome.jp/kegg/](http://www.genome.jp/kegg/))에서 참고하였으며, 제작한 프라이머를 이용하여 중합효소연쇄반응(PCR, Polymerase Chain Reaction)을 수행하여 목적 유전자를 확보하였다. 목적 유전자의 증폭반응을 위한 프라이머 제작 및 제한효소는 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

| 목적 유전자                                        | 발현 효소                                                                                                                                                                                  | 플라스미드                      | 프라이머                                                                                                                              | 제한 효소           |
|-----------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| <i>atfA</i>                                   | Acyl-Coenzyme A:diacylglycerol acyltransferase                                                                                                                                         | pCDFDuet <sup>TM</sup> -1  | 5'-AAAAGGATCCGATGCGCCCAT<br>TACATCCGATTGATTTT-3' (서열번호 14)<br>5'-CCCGTCGACTTAATTGGCTG<br>TTTAAATATCTTCCTGCTTGC-3' (서열번호 15)       | BamH I<br>Sal I |
| <i>'tesA</i>                                  | Modified thioesterase I                                                                                                                                                                | pCDFDuet <sup>TM</sup> -1  | 5'-CCCGTCGACAATAAGGAGAT<br>ATAATGATGAACTTCAACAATGTTTTCC-3' (서열번호 16)<br>5'-AAAAGCGGCCGCTTATGAGTC<br>ATGATTACTAAAGGCT-3' (서열번호 17) | Sal I<br>Not I  |
| <i>pdC</i>                                    | Pyruvate decarboxylase                                                                                                                                                                 | pCDFDuet <sup>TM</sup> -1  | 5'-AAAAACATATGATGAGTTATAC<br>TGTCGGTACCTATTTAGCGGAGCGG-3' (서열번호 18)<br>5'-CCCAGATCTCTAGAGGAGCT<br>TGTTAACAGGCTTACG-3' (서열번호 19)   | Nde I<br>Bgl II |
| <i>adhB</i>                                   | Alcohol dehydrogenase                                                                                                                                                                  | pCDFDuet <sup>TM</sup> -1  | 5'-CCCCAGATCTCAAGAAGGA<br>GATATAATGGCTTCTCAACTTTTATAT-3' (서열번호 20)<br>5'-AAAACGAGTTAGAAAGCGC<br>TCAGGAAGAGTTCTTCAA-3' (서열번호 21)   | Bgl II<br>Xho I |
| <i>accA</i>                                   | Carboxyltransferase $\alpha$ subunit                                                                                                                                                   | pCOLADuet <sup>TM</sup> -1 | 5'-CGGATCCGATGAATTCCTTG<br>ATTTTGAACAGC-3' (서열번호 22)<br>5'-GCGTCGACGTCTTACGCG<br>TAACCGTAG-3' (서열번호 23)                           | BamH I<br>Sal I |
| <i>accB</i> ,<br><i>accC</i>                  | BCCP unit, biotin carboxylase subunit                                                                                                                                                  | pCOLADuet <sup>TM</sup> -1 | 5'-GAAGATCTTCGGATGGATATTC<br>GTAAGATTAAAAAAGTATCG-3' (서열번호 24)<br>5'-CCTTAATTAAGGTTATTTTC<br>CTGAAGACCGAGTTTTTCTC-3' (서열번호 25)    | Bgl II<br>Pac I |
| <i>accD</i>                                   | Carboxyltransferase $\beta$ unit                                                                                                                                                       | pCOLADuet <sup>TM</sup> -1 | 5'-GCGTCGACGTCAAGGAGA<br>TATACATGAGCTGGATTGAAC-3' (서열번호 26)<br>5'-ATAAGAATGCGGCCGCTC<br>AGGCCTCAGGTTC-3' (서열번호 27)                | Sal I<br>Not I  |
| <i>fabD</i>                                   | Malonyl-CoA:ACP transacylase                                                                                                                                                           | pCOLADuet <sup>TM</sup> -1 | 5'-GGAATTCATATGGAATT<br>CCATGACGCAATTTGCATT-3' (서열번호 28)<br>5'-GAAGATCTTCCTCCTT<br>TTAAAGCTCGAGCGCC-3' (서열번호 29)                  | Nde I<br>Bgl II |
| <i>fabF</i> ,<br><i>fabB</i> ,<br><i>fabA</i> | KAS II<br>( $\beta$ -keto acyl-acyl carrier protein synthase II)<br>KAS I<br>( $\beta$ -keto acyl-acyl carrier protein synthase I)<br>$\beta$ -Hydroxydecanoyl ACP dehydrase/isomerase | pACYCDuet <sup>TM</sup> -1 | 5'-AAAAGGATCCGGTGCTA<br>AGCGTCGTGTAGT-3' (서열번호 30)<br>5'-AAAACGAGTCAGAAG<br>GCAGACGTATCCTG-3' (서열번호 31)                           | BamH I<br>Pst I |

[0068]

중합효소연쇄반응을 위한 대장균의 주형 유전자는 하기와 같은 방법으로 획득하였다. 먼저, 대장균 (*E. coli* K-12 MG1655)을 배양한 후, 대장균 배양액을 원심분리하고 상등액을 취하였다. 상등액에 5 ml의 리소자임 용액을 첨가하여 혼합한 후, 투명한 점성이 나타날 때까지 혼합하였다. 점성이 나타나면 2 ml의 10% SDS(sodium dodecyl sulfate) 용액을 첨가하고 30분 동안 반응하였다. 혼합물을 0.7 ml씩 마이크로튜브에 분주하고, PCI용액(페놀, 클로로포름, 이소아밀 알콜)을 첨가하고 층 분리가 일어나지 않을 때까지 혼합하였다. 이 후 원심분리하고 상등액을 모아 같은 방법으로 원심분리 하였다. 모아진 상등액 부피의 1/10 만큼 pH 6으로 적정한 3 M 아세트레이트와 두 배의 에탄올을 첨가하여 DNA를 분리하였다. 분리한 DNA를 주형으로 하여, 각각의 유전자들의 프라이머와 함께 중합효소연쇄반응을 이용하여 유전자를 증폭하였다. 중합효소연쇄반응의 조건은 통상적인 조건으로

변성온도 (denaturing temperature) 94℃, 결합온도(annealing temperature) 65℃, 신장온도 (extension temperature) 72℃에서 진행되었으며, 총 30회 반응을 수행하였다. 반응에 사용한 중합효소(polymerase)는 NEB(New England Biolabs Inc.) 사의 제품을 사용하였다. 증폭된 유전자 물질은 정제과정을 거치고, 0.7% 아가로스 겔(agarose gel)에서 확인하였다.

## 2. 목적 유전자의 정보를 보유한 뉴클레오티드를 포함하는 재조합 플라스미드의 제조

본 발명자들은 확보한 유전자 뉴클레오티드와 단백질 발현 벡터를 말단부위를 제외한 다른 부위를 절단하지 않는 공통된 제한효소를 사용하여 절단하고, 전기영동으로 확인하였다. 확인된 아가로스 겔의 밴드(band)를 절단하여 55℃에서 녹인 후, 정제 과정을 거쳐 라이게이션(ligation)을 4℃에서 수행하여 선형의 pCDFDuet<sup>TM</sup>-1의 MCS1에 결합시킨 *atfA*, '*tesA*'와 MCS2에 *pdC*, *adhB*를 결합시킨 원형 플라스미드(pCDFDuet<sup>TM</sup>-1::*atfA*, '*tesA*', *pdC*, *adhB*), 선형의 pCOLADuet<sup>TM</sup>-1의 MCS1에 결합시킨 *accA*, *accD*와 MCS2에 *accB*, *accC*와 *fabD*를 결합시킨 원형 플라스미드(pCOLADuet<sup>TM</sup>-1::*accA*, *accB*, *accC*, *accD*, *fabD*)와 선형의 pACYCDuet<sup>TM</sup>-1의 MCS1에 *fabF*, *fabB*, *fabA*를 순서대로 결합시킨 원형 플라스미드(pACYCDuet<sup>TM</sup>-1::*fabF*, *fabB*, *fabA*)를 제조하였다. 대장균 내 단백질 발현을 위한 플라스미드 pCDFDuet<sup>TM</sup>-1, pCOLADuet<sup>TM</sup>-1, pACYCDuet<sup>TM</sup>-1의 구조 및 클로닝 사이트는 각각 도 2, 도 3, 도 4에 나타냈으며, 플라스미드 pCDFDuet<sup>TM</sup>-1와 *atfA*, '*tesA*', *pdC*, *adhB*의 유전자 정보를 포함한 뉴클레오티드를 결합시킨 재조합 플라스미드의 구조 및 크기변화는 도 5에 나타내었고, '*tesA*'의 유전정보에 대한 주형으로 이용된 플라스미드 pCDF<sup>TM</sup>-1b와 유전자 '*tesA*'의 유전자 정보를 포함한 뉴클레오티드를 결합시킨 재조합 플라스미드의 구조 및 크기 변화는 도 6에 나타내었다. 플라스미드 pCOLADuet<sup>TM</sup>-1와 *accA*, *accB*, *accC*, *accD*, *fabD*의 유전자 정보를 포함한 뉴클레오티드를 결합시킨 재조합 플라스미드의 구조 및 크기변화는 도 7에 나타내었고, pACYCDuet<sup>TM</sup>-1와 *fabB*, *fabF*, *fabA*의 유전자 정보를 포함한 뉴클레오티드를 결합시킨 재조합 플라스미드의 구조 및 크기 변화는 도 8에 나타내었다.

## 실시예 2 : 재조합 대장균의 제조에 이용할 숙주 대장균의 유전자 제거

### 1. pKOV 벡터를 이용한 유전자 제거

본 발명자들은 본 실시예에서 지방산 생산을 하는데 단백질 발현용 대장균(*E. coli* BL21(DE3))을 사용하였다. 또한, 지방산 합성 베타-옥시데이션( $\beta$ -oxidation) 단계에서의 아실-CoA 탈수소효소(acyl-CoA dehydrogenase) 유전정보를 가진 유전자 *fadE*(서열번호 13)을 숙주(host) 대장균에서 제거하였다. *fadE*를 제거(deletion)하기 위해 본 발명에서는 유전자 교환(gene replacement) 벡터인 pKOV를 사용하였다. 방법은 하기에 나타내었다.

pKOV 벡터는 클로로암피니콜 항생제 내성 유전자를 가지고 있으며, 온도에 민감한 pSC101 복제 오리진(origin)을 가지고 있다. 따라서, 30℃에서 안정적으로 숙주가 벡터를 가지고 성장할 수 있고, 42℃에서는 벡터가 유실된다. 또한, pKOV 벡터는 *sacB* 유전자를 가지고 있는데 수크로즈(sucrose)가 들어간 배지에서 자라지 않는 특성이 있다. 이 특성을 이용하여 유전자 제거를 수행할 수 있다. 먼저 MCS에 제거하고자 하는 유전자의 상류 서열(upstream)과 하류 서열(downstream)의 유전자 서열을 클로닝(cloning)하였다. 염기서열 정보는 KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, <http://www.genome.jp/kegg/>)에서 참고하였다. 제조된 재조합 벡터(pKOV::*fadE* upstream, *fadE* downstream, *fadE* fusion-pKOV)를 대장균 *E. coli* BL21(DE3)에 형질전환을 하고 항생제 배지에서 배양을 하면서 30℃에서 42℃로 온도변화를 주었다. 이때 재조합 벡터가 대장균 *E. coli* BL21(DE3)의 *fadE*의 유전체에 합체(integration)지게 된다. 다시 항생제가 없는 배지에서 온도를 30℃로 변화를 주면 재조합 벡터가 다시 세포질(cytoplasm)으로 나오게 된다. 이때 42℃에서 수크로즈가 있는 배지에서 배양을 하면 최종적으로 유전자 교환이 되고 재조합 벡터는 유실되어 유전자 제거가 일어난 균주와 유전자 제거가 일어나지 않은 두 종류의 균을 얻을 수 있다. PCR을 통한 유전자의 여부를 *fadE*을 제조하였다.

재조합 벡터(pKOV::*fadE* upstream, *fadE* downstream)를 이용한 *fadE* 제거에서 사용된 프라이머와 상류 서열(upstream)과 하류 서열(downstream)의 크기는 하기 표 3에 나타내었다. 대장균 *E. coli* BL21(DE3)에서의 *fadE* 유전자 상류 서열과 하류 서열은 도 8에 나타내었다. 또한, *fadE* fusion-pKOV의 제작과정은 도 9에 나타내었다.

최종 선별과정 후 존재하는 2가지 종류의 *E. coli* BL21(DE3) 유전체(genomic DNA)에서의 *fadE* 유전자의 여부는 도 10에 나타내었다.

표 3

| 프라이머                  |   |        |                                                  |
|-----------------------|---|--------|--------------------------------------------------|
| Upstream<br>(600bp)   | F | BamH I | 5'-AAGGATCCAATAAATTGATAACAAATGCTGAT-3' (서열번호 32) |
|                       | R | Bgl II | 5'-AAAGATCTATGAATAACGGAGCCGAAAG-3' (서열번호 33)     |
| Downstream<br>(983bp) | F | Bgl II | 5'-AAAGATCTAACGAAAAGCCCTTACTTG-3' (서열번호 34)      |
|                       | R | Not I  | 5'-AAGCGGCCGCAAGATTGATTGAAGAATTTT-3' (서열번호 35)   |

### 실시예 3 : 재조합 플라스미드에 의해 형질전환된 재조합 대장균의 제조

#### 1. 재조합 플라스미드의 합성오류 확인

목적 유전자의 운반을 목적으로 하는 각 플라스미드들(pCDFDuet<sup>TM</sup>-1::*atfA*, '*tesA*', *pdC*, *adhB*, pCOLADuet<sup>TM</sup>-1::*accA*, *accB*, *accC*, *accD*, *fabD*, pACYCDuet<sup>TM</sup>-1::*fabF*, *fabB*, *fabA*)을 숙주세포에 넣기 전, 재조합 플라스미드의 합성오류 확인 및 벡터의 안정성과 숙주 균주로의 형질전환 시 효율 향상을 위해 대장균 *E. coli* XL1-Blue를 이용하여 컴피턴트 세포(competent cell)를 제조하여 일차 형질전환을 시도하였다 (*E. coli* XL1-Blue::pCDFDuet<sup>TM</sup>-1::*atfA*, '*tesA*', *pdC*, *adhB*, *E. coli* XL1-Blue::pCOLADuet<sup>TM</sup>-1::*accA*, *accB*, *accC*, *accD*, *fabD*, *E. coli* XL1-Blue::pACYCDuet<sup>TM</sup>-1::*fabF*, *fabB*, *fabA*).

컴피턴트 세포는 하기와 같은 과정으로 제조하였다. 37℃에서 배양한 *E. coli* XL1-Blue를 계대 배양하여, 생장 곡선의 지수기에 접어들었을 때 회수하여, 0℃에서 30 분 동안 보관하였다. 배양액을 7,000 rpm에서 원심분리한 후 상등액을 제거하고, 세포벽을 플라스미드 이동이 용이하게 처리하기 위하여 MgCl<sub>2</sub> 용액을 넣어 30 분 동안 0℃에서 보관하였다. 상기 용액을 다시 원심분리하여 상등액을 제거하고 CaCl<sub>2</sub> 용액을 넣어 60 분 동안 0℃에서 일차 처리하였다. 여기에 외부 유전자를 포함한 각 재조합 플라스미드(pCDFDuet<sup>TM</sup>-1::*atfA*, '*tesA*', *pdC*, *adhB*, pCOLADuet<sup>TM</sup>-1::*accA*, *accB*, *accC*, *accD*, *fabD*, pACYCDuet<sup>TM</sup>-1::*fabF*, *fabB*, *fabA*)를 넣어 0℃에서 30 분 동안 반응시키고, 42℃의 온수조에서 60 초 동안 열처리하고, 5 분 동안 0℃의 얼음에 순차적으로 넣는 열충격 형질전환방법(heat-shock method)을 실시하였다. 상기 열충격 형질전환방법을 실시한 샘플은 37℃에서 1 시간 동안 배양하여 형질전환 과정을 거친 세포들의 정상 생장을 도왔다. 이 세포들은 각 플라스미드가 내성을 가지고 있는 항생제(스트렙토마이신, 카나마이신, 클로로암피니콜)가 포함된 고체 LB 배지(LB 한천 플레이트, 트립톤 10 g/L, NaCl 5 g/L, 효모 추출액 5 g/L, 한천(agar) 15 g/L)에 일정량 도말(spreading)하였다.

상기 형질전환과정을 거친 샘플은 항생제가 포함된 고체 LB 배지에서 작은 원형 콜로니(colony) 형태로 자라는 것을 확인하였다. 이 콜로니를 항생제가 포함된 5 mL의 액체 LB 배지에서 배양하고 일반적인 플라스미드 추출 키트를 이용하여 플라스미드를 추출하였다. 상기 추출한 플라스미드는 중합효소연쇄반응 과정 후에 라이게이션을 위해 처리한 제한효소를 이용하여 플라스미드와 목적 유전자의 정보를 보유한 뉴클레오티드를 절단하여 *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* ZM4(ATCC 31821), *Acinetobacter baylyi* ADP1(ATCC 33305), *E. coli* K-12 MG1655의 유전자와의 크기를 비교하였다. 또한 상기와 같은 플라스미드의 유전자 염기서열 분석결과와 KEGG에 공개된 유전정보가 일치하는지 확인하여, 형질전환 과정의 돌연변이나 중합효소연쇄반응 도중에 일어나는 합성 오류가 없음을 확인하였다. 이는 도 12, 도 13, 도 14, 도 15, 도 16, 도 17, 도 18, 도 19 및 도 20에 나타내었다.

이 중에 재조합 플라스미드 pCOLADuet<sup>TM</sup>-1::*accA*, *accB*, *accC*, *accD*, *fabD*의 *accB* 유전자의 염기서열과 재조합 플라스미드 pACYCDuet<sup>TM</sup>-1::*fabF*, *fabB*, *fabA*의 *fabB* 유전자의 염기서열과 *E. coli* K-12 MG1655의 *accB*, *fabB* 유전자의 염기서열 분석결과에서 뉴클레오티드 한 곳의 서열이 *E. coli* K-12 MG1655와 상이하였지만, 아미노산으로 번역이 된 경우의 아미노산 서열과 효소의 기능을 하는 단백질로 입체구조를 가지는 경우에는 일치함을 확

인하였다.

[0088] 2. 재조합 대장균의 제조(*E. coli* BL21(DE3) *fadE*::pCDFDuet<sup>TM</sup>-1::*atfA*, '*tesA*, *pdC*, *adhB* + pCOLADuet<sup>TM</sup>-1::*accA*, *accB*, *accC*, *accD*, *fabD* + pACYCDuet<sup>TM</sup>-1::*fabF*, *fabB*, *fabA*)

[0089] 상기 1에서 합성오류를 점검한 재조합 플라스미드들(pCDFDuet<sup>TM</sup>-1::*atfA*, '*tesA*, *pdC*, *adhB*, pCOLADuet<sup>TM</sup>-1::*accA*, *accB*, *accC*, *accD*, *fabD*, pACYCDuet<sup>TM</sup>-1::*fabF*, *fabB*, *fabA*)을 넣기 위해서, 상기 1의 컴피턴트 세포 제조방법과 동일한 방법으로 실시예 2에서 제조한 숙주 대장균(*E. coli* BL21(DE3) *fadE*)을 처리하고 재조합 플라스미드들 중 1 개를 선택하여 열충격 형질전환방법을 시도하여 재조합 균주를 제조하고 상기의 재조합 균주를 가지고 상기 1의 방법을 다른 재조합 플라스미드들에 대해 순차적으로 반복 처리하여 최종 재조합 대장균(*E. coli* BL21(DE3) *fadE*::pCDFDuet<sup>TM</sup>-1::*atfA*, '*tesA*, *pdC*, *adhB* + pCOLADuet<sup>TM</sup>-1::*accA*, *accB*, *accC*, *accD*, *fabD* + pACYCDuet<sup>TM</sup>-1::*fabF*, *fabB*, *fabA*)을 제조하였다.

[0090] 따라서, 상기 제작한 본 발명의 재조합 대장균(*E. coli* BL21(DE3) *fadE*::pCDFDuet<sup>TM</sup>-1::*atfA*, '*tesA*, *pdC*, *adhB* + pCOLADuet<sup>TM</sup>-1::*accA*, *accB*, *accC*, *accD*, *fabD* + pACYCDuet<sup>TM</sup>-1::*fabF*, *fabB*, *fabA*)(eb1-F10)을 2018년 1월 22일자로 한국생명공학연구원 생물자원센터 유전자은행(KCTC)에 기탁하였으며, KCTC18660P의 수탁번호를 부여받았다.

[0091] 상기 제작된 본 발명의 재조합 대장균, 목적 유전자 및 재조합 플라스미드는 하기 표 4에 나타내었다.

표 4

| 재조합 대장균                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 목적 유전자                                                                                                                                                                       | 재조합 플라스미드                                                                                                                                                                                                                                                             |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>E. coli</i> BL21(DE3)<br><i>fadE</i> ::pCDFDuet <sup>TM</sup> -1:: <i>atfA</i> , ' <i>tesA</i> ,<br><i>pdC</i> , <i>adhB</i> + pCOLADuet <sup>TM</sup> -1:: <i>accA</i> ,<br><i>accB</i> , <i>accC</i> , <i>accD</i> , <i>fabD</i> +<br>pACYCDuet <sup>TM</sup> -1:: <i>fabF</i> , <i>fabB</i> , <i>fabA</i> | <i>atfA</i> , ' <i>tesA</i> , <i>pdC</i> , <i>adhB</i> , <i>accA</i> ,<br><i>accB</i> , <i>accC</i> , <i>accD</i> , <i>fabD</i> , <i>fabF</i> ,<br><i>fabB</i> , <i>fabA</i> | pCDFDuet <sup>TM</sup> -1:: <i>atfA</i> , ' <i>tesA</i> , <i>pdC</i> ,<br><i>adhB</i> + pCOLADuet <sup>TM</sup> -1:: <i>accA</i> , <i>accB</i> ,<br><i>accC</i> , <i>accD</i> , <i>fabD</i> +<br>pACYCDuet <sup>TM</sup> -1:: <i>fabF</i> , <i>fabB</i> , <i>fabA</i> |

[0093] 실시예 4 : 재조합 대장균을 이용한 FAEE의 생성

[0094] 먼저, 2 차 배양에 들어가기 앞서 세포의 생장을 활성화하여 FAEE 생산에 있어 효과적인 결과를 얻기 위해, 상기 실시예 3에서 제조된 재조합 대장균 (*E. coli* BL21(DE3) *fadE*::pCDFDuet<sup>TM</sup>-1::*atfA*, '*tesA*, *pdC*, *adhB* + pCOLADuet<sup>TM</sup>-1::*accA*, *accB*, *accC*, *accD*, *fabD* + pACYCDuet<sup>TM</sup>-1::*fabF*, *fabB*, *fabA*)(eb1-F10)을 항생제인 스트렙토마이신, 카나마이신, 클로로암피니콜이 포함된 100 mL의 액체 LB 배지에 넣고 총 24 시간동안 1차 배양하였다. 37℃의 진탕배양기에서 200 rpm의 속도로 회전시키면서 배양하였으며, 유전자 발현을 목적으로 1 mM IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside)를 첨가하였다. 그리고 앞서 1차 배양한 재조합 대장균을 300 mL의 액체 LB 배지에 넣고 총 50시간동안 2차 배양하였다. 마찬가지로 37℃의 진탕배양기에서 200 rpm의 속도로 회전시키면서 배양하였으며, 유전자 발현을 목적으로 1 mM IPTG를 첨가하였다. 분석을 위한 샘플을 제조하기 위해서 균체가 포함된 배양액에 클로로포름과 메탄올 (2:1의 부피비)의 혼합용액을 첨가하고 분리하였다. 그 다음 원심분리를 통해 층을 분리하여 유기용매층을 3 mL 수집했다. 질소를 사용해 말린 후 다시 클로로포름과 메탄올 (2:1의 부피비)의 혼합용액을 1 mL 첨가하여 0.2 μm 필터로 여과하여 분석하였다. 분석에 이용한 장비는 가스 크로마토그래피 (gas chromatography, Agilent 6890N)이며, 이용한 컬럼은 Agilent HP-INNOWAX column이다.

[0095] 이때, 비교대조군으로서 하기 표 5에 기재된 플라스미드를 이용하여 재조합 대장균(정상 대조군 및 eb1-F1 내지 eb1-F11)을 제작하였고(표 6), 본 발명의 대장균을 이용했을 때와 FAEE 조성에서의 차이를 확인하였다.

표 5

[0097]

| Name                | Description                                                                                      |
|---------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| pF <sub>1</sub>     | pCDFDuet <sup>TM</sup> -1:: <i>atfA</i> , <i>pdC</i> , <i>adhB</i>                               |
| pF <sub>2</sub>     | pCDFDuet <sup>TM</sup> -1:: <i>atfA</i> , <i>tesA</i> , <i>pdC</i> , <i>adhB</i>                 |
| pF                  | pCDFDuet <sup>TM</sup> -1:: <i>atfA</i> , ' <i>tesA</i> , <i>pdC</i> , <i>adhB</i>               |
| pDel                | pKOV:: <i>fadE</i> front sequence gene, <i>fadE</i> back sequence gene                           |
| pFAS-I              | pCOLADuet <sup>TM</sup> -1:: <i>accA</i> , <i>accB</i> , <i>accC</i> , <i>accD</i> , <i>fabD</i> |
| pFAS-E <sub>1</sub> | pACYCDuet <sup>TM</sup> -1:: <i>fabB</i> , <i>fabF</i> , <i>fabA</i>                             |
| pFAS-E <sub>2</sub> | pTrc99A:: <i>fabG</i> , <i>fabH</i> , <i>fabI</i> , <i>fabZ</i>                                  |

표 6

[0098]

| Name                     | Description                                                                                    |
|--------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>E. coli</i> BL21(DE3) | 정상 대조균                                                                                         |
| eb1-F1                   | <i>E. coli</i> BL21(DE3)::pF <sub>1</sub>                                                      |
| eb1-F2                   | <i>E. coli</i> BL21(DE3)::pF <sub>2</sub>                                                      |
| eb1-F3                   | <i>E. coli</i> BL21(DE3)::pF                                                                   |
| eb1-F4                   | <i>E. coli</i> BL21(DE3) Δ <i>fadE</i> ::pF                                                    |
| eb1-F5                   | <i>E. coli</i> BL21(DE3) Δ <i>fadE</i> ::pF, pFAS-I                                            |
| eb1-F6                   | <i>E. coli</i> BL21(DE3) Δ <i>fadE</i> ::pF, pFAS-E <sub>1</sub>                               |
| eb1-F7                   | <i>E. coli</i> BL21(DE3) Δ <i>fadE</i> ::pF, pFAS-E <sub>2</sub>                               |
| eb1-F8                   | <i>E. coli</i> BL21(DE3) Δ <i>fadE</i> ::pF, pFAS-E <sub>1</sub> , pFAS-E <sub>2</sub>         |
| eb1-F9                   | <i>E. coli</i> BL21(DE3) Δ <i>fadE</i> ::pF, pFAS-I, pFAS-E <sub>2</sub>                       |
| eb1-F10                  | <i>E. coli</i> BL21(DE3) Δ <i>fadE</i> ::pF, pFAS-I, pFAS-E <sub>1</sub>                       |
| eb1-F11                  | <i>E. coli</i> BL21(DE3) Δ <i>fadE</i> ::pF, pFAS-I, pFAS-E <sub>1</sub> , pFAS-E <sub>2</sub> |

[0099]

그 결과, 도 21에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 재조합 대장균(eb1-F10)을 이용하여 FAEE를 제조한 경우, 유전적 조작을 하지 않은 대장균뿐만 아니라 부분적인 조작이 된 비교 대조균 대장균에 비해 본 발명의 재조합 대장균(eb1-F10)에서의 FAEE 양이 현저하게 높았다.

[0100]

즉, FAS 벡터 시스템의 조합으로 FAEE 생산 벡터 시스템을 포함하는 재조합 균주는 유사한 배양 규모의 기존 균주보다 2.23 배 더 많은 농도로 FAEE를 생산하였다. 이는, FAS 관련 유전자가 재조합 대장균의 FAEE의 생산능력을 증가시키는데 영향을 줄 수 있음을 제시한다.

[0101]

따라서, 본 발명의 방법에 따라, FAEE의 생산 및 지방산의 합성과 관련된 유전자를 대사 공학적으로 조작함으로써, 대장균으로부터 직접 FAEE의 생산시킬 수 있을 뿐만 아니라 FAEE 합성을 증가시킬 수 있다.

[0103]

종합적으로, 본 발명자들은 (1) 에탄올을 생성해 FAEE를 합성하는 3 종의 유전자 *atfA*, *pdC*, *adhB*와 지방산 합성 종결단계의 '*tesA*가 동시 발현되는 하나의 재조합 플라스미드; (2) 지방산 합성 시작단계의 5 종류의 유전자 *accA*, *accB*, *accC*, *accD*, *fabD*가 동시 발현되는 하나의 재조합 플라스미드; (3) 지방산 합성 신장단계의 3 종의 유전자 *fabB*, *fabF*, *fabA*가 동시 발현되는 하나의 재조합 플라스미드를 구축하였고; (4) 상기 세 개의 재조합 플라스미드를, 지방산 합성 베타-옥시테이션 단계의 *fadE*를 제거하여 지방산 감소가 완료된 숙주 균주인 재조합 대장균 (*E. coli* BL21(DE3) Δ*fadE*)에 도입하여 공동으로 형질전환시킴으로써, 총 12 종의 유전자를 동시에 발현하는 신규한 재조합 대장균을 제작하였다. 또한, 상기 재조합 대장균(eb1-F10)을 이용하여 FAEE를 제조한 경우, 본 발명의 재조합 대장균에서의 FAEE 양이 크게 늘어났으며, 이는 본 발명에 따라 제작된 재조합 대장균은 FAEE를 효과적으로 생산할 수 있음을 의미한다. 따라서, 본 발명의 재조합 대장균은 바이오연료 및 관련

대사 공학 등에 유용하게 사용될 수 있다.

## 수탁번호

[0105]

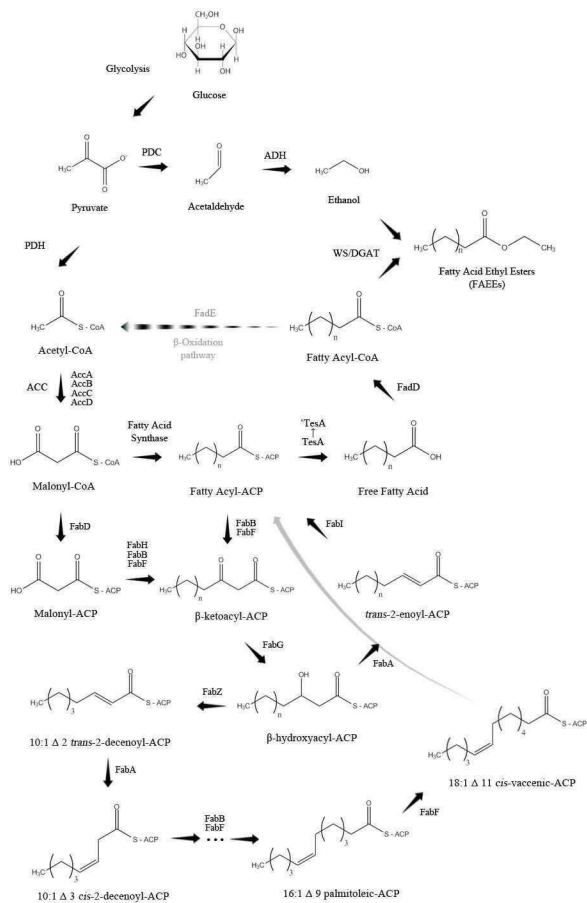
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC18660P

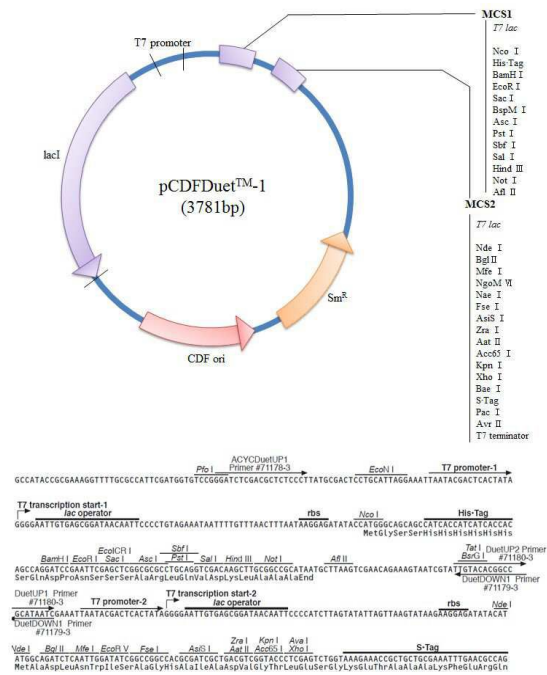
수탁일자 : 20180122

도면

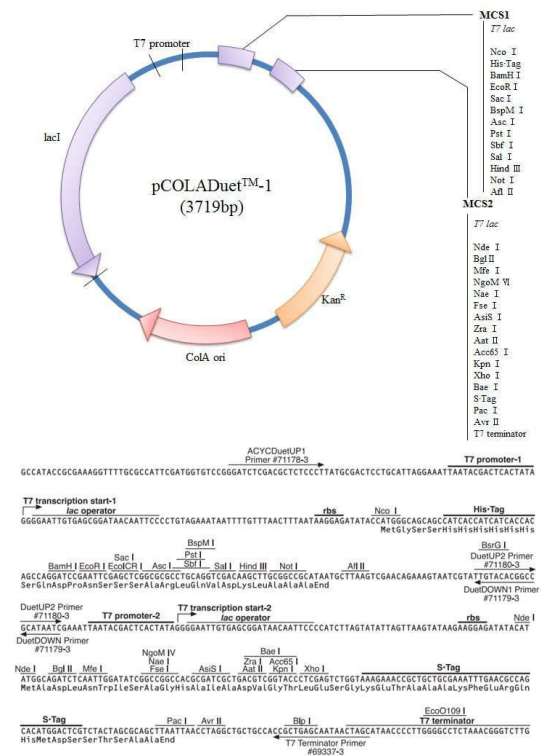
도면1



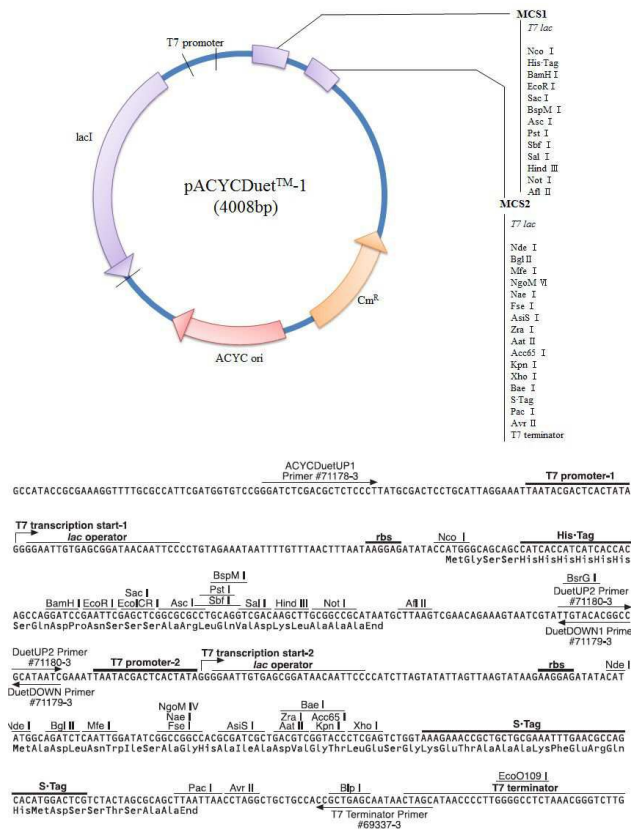
도면2



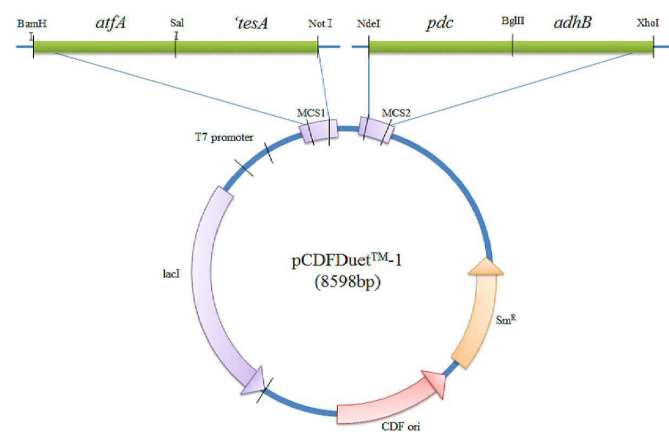
도면3



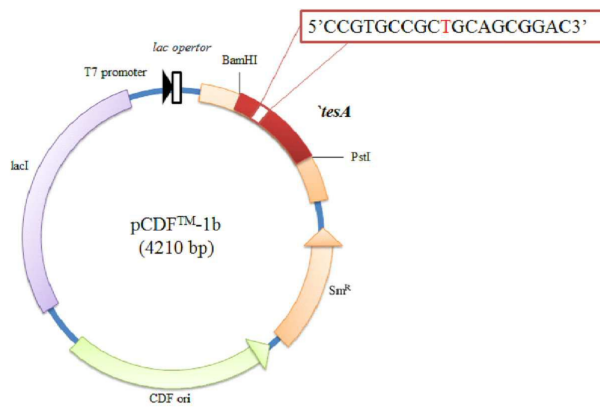
#### 도면4



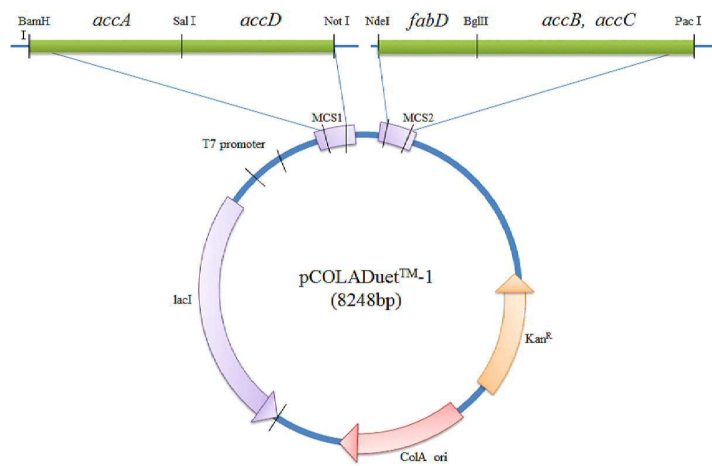
#### 도면5



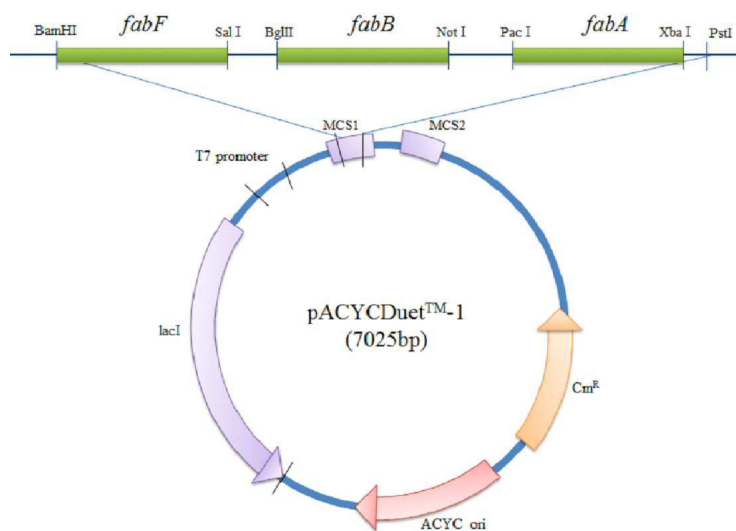
도면6



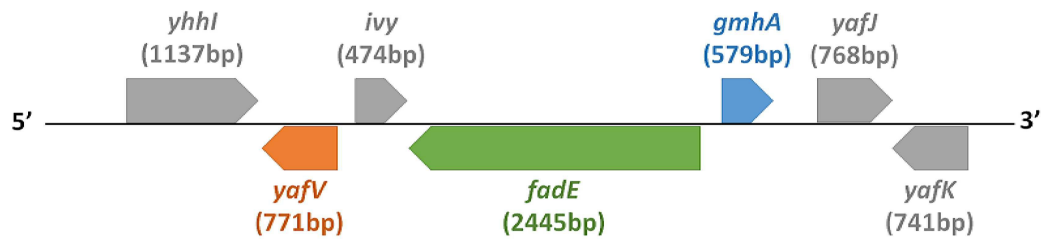
도면7



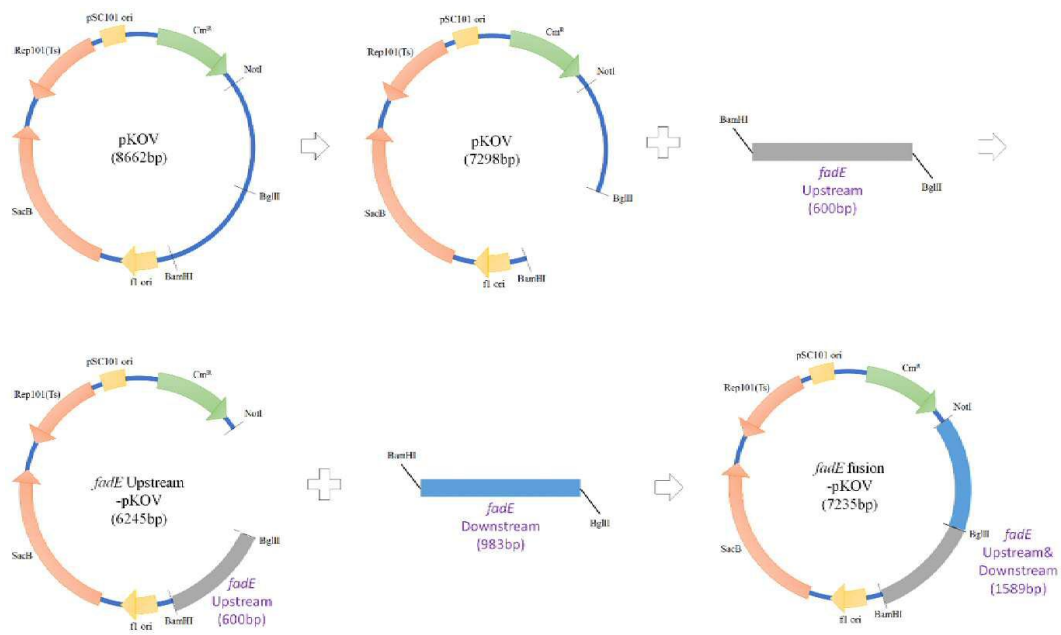
도면8



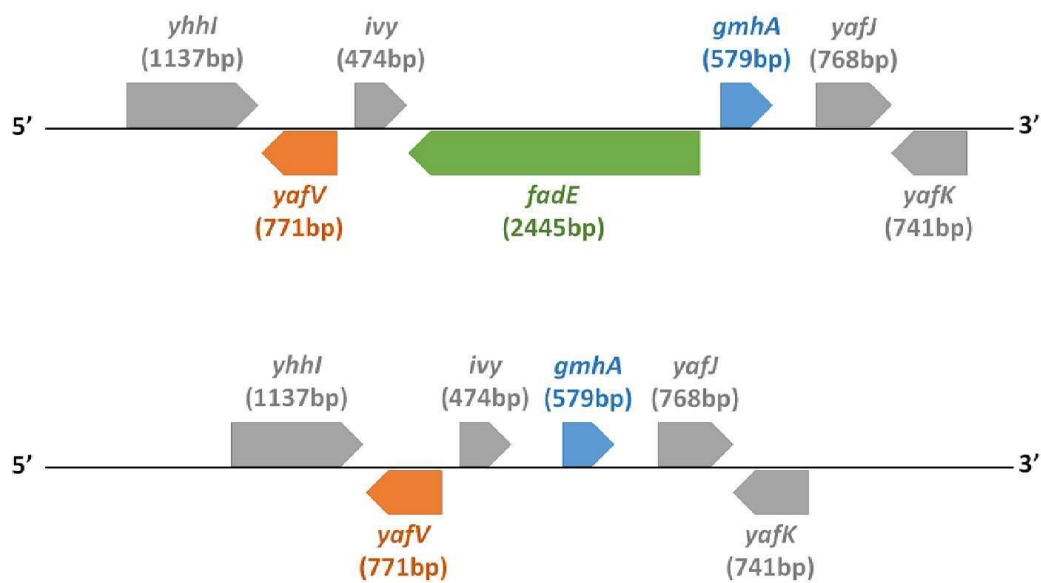
도면9



도면10



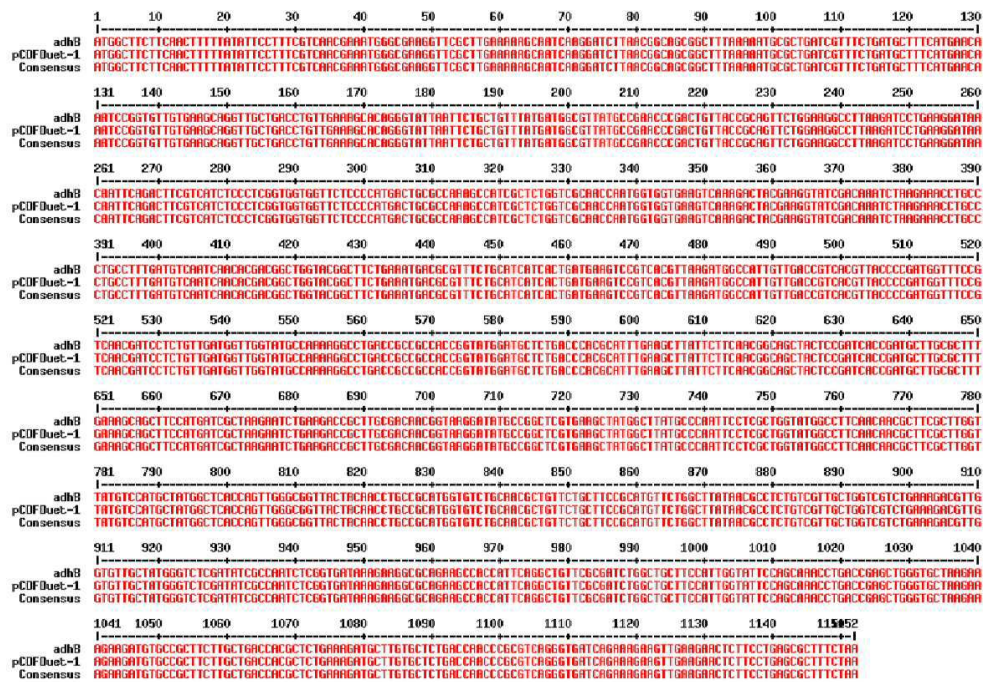
도면11



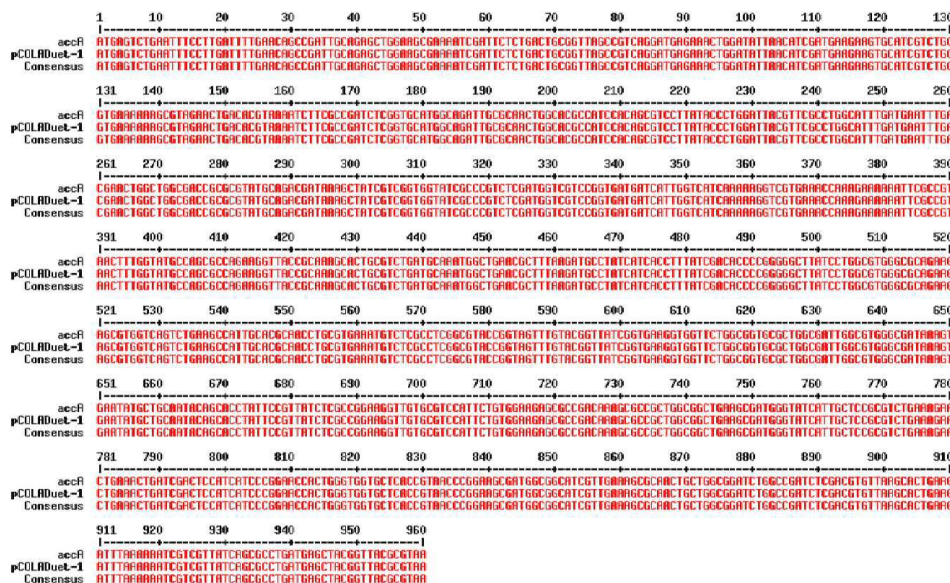




도면15



도면16





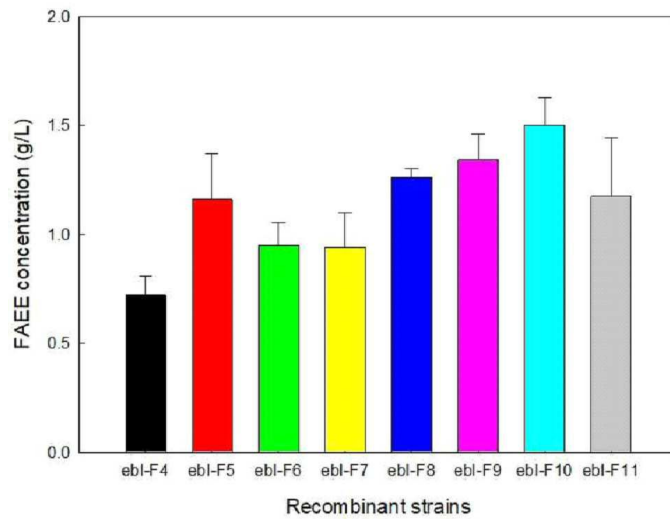
도면19

|             |                                                                                                                                   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|             | 1                                                                                                                                 | 10  | 20  | 30  | 40  | 50  | 60  | 70  | 80  | 90  | 100 | 110 | 120 | 130 |
| FabD        | ATATCCGCAATTTTGGTTTGTATTCCTGAGAGAGGTTTCTCAAAACGTTGGAAATGCTGGCTGATATGGGCGAGCAATCCCAATTCGAGAAAGAGATTGCTGAAGACTTCTGGGAGCTGGGCTACAGAC |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| pCOLADuet-1 | ATGACGCAATTTGCAATTTGTATTCCTGAGAGAGGTTTCTCAAAACGTTGGAAATGCTGGCTGATATGGGCGAGCAATCCCAATTCGAGAAAGAGATTGCTGAAGACTTCTGGGAGCTGGGCTACAGAC |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Consensus   | ATGACGCAATTTGCAATTTGTATTCCTGAGAGAGGTTTCTCAAAACGTTGGAAATGCTGGCTGATATGGGCGAGCAATCCCAATTCGAGAAAGAGATTGCTGAAGACTTCTGGGAGCTGGGCTACAGAC |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|             | 131                                                                                                                               | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 | 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 | 250 | 260 |
| FabD        | TGTGGGCGCTGACCCAGCAGGGGCGGAGCTGAGAACTGAAATAAACCTGGCAACTCAGCTGGCGCTGTGACTGCAATCTGTTGGCGTGATTCGCGTATGGGAGCAGAGGGCGGTAAAGCAGCGGCAT   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| pCOLADuet-1 | TGTGGGCGCTGACCCAGCAGGGGCGGAGCTGAGAACTGAAATAAACCTGGCAACTCAGCTGGCGCTGTGACTGCAATCTGTTGGCGTGATTCGCGTATGGGAGCAGAGGGCGGTAAAGCAGCGGCAT   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Consensus   | TGTGGGCGCTGACCCAGCAGGGGCGGAGCTGAGAACTGAAATAAACCTGGCAACTCAGCTGGCGCTGTGACTGCAATCTGTTGGCGTGATTCGCGTATGGGAGCAGAGGGCGGTAAAGCAGCGGCAT   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|             | 261                                                                                                                               | 270 | 280 | 290 | 300 | 310 | 320 | 330 | 340 | 350 | 360 | 370 | 380 | 390 |
| FabD        | GATGGCGGTCACACCTGGGGGAAATCTCCGCGCTGTTTGGCTGGTGGATTAATTCGCTGATGCGGTCGCTGGTTGAAATGCGGCGAAATTCATGCAAGAGCCGATCCGAGAGCGAGCGG           |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| pCOLADuet-1 | GATGGCGGTCACACCTGGGGGAAATCTCCGCGCTGTTTGGCTGGTGGATTAATTCGCTGATGCGGTCGCTGGTTGAAATGCGGCGAAATTCATGCAAGAGCCGATCCGAGAGCGAGCGG           |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Consensus   | GATGGCGGTCACACCTGGGGGAAATCTCCGCGCTGTTTGGCTGGTGGATTAATTCGCTGATGCGGTCGCTGGTTGAAATGCGGCGAAATTCATGCAAGAGCCGATCCGAGAGCGAGCGG           |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|             | 391                                                                                                                               | 400 | 410 | 420 | 430 | 440 | 450 | 460 | 470 | 480 | 490 | 500 | 510 | 520 |
| FabD        | GCTATGGCGGCAATCATCGCTGGATGATGCGTCTATTGCGAAAGCGTGTGAAAGAGCTGCAAGAGGTCAGGTCGTTTCTCCGTAAGCTTAACTCTCCGGACAGGTGGTTATGCGCGCTCATAAAG     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| pCOLADuet-1 | GCTATGGCGGCAATCATCGCTGGATGATGCGTCTATTGCGAAAGCGTGTGAAAGAGCTGCAAGAGGTCAGGTCGTTTCTCCGTAAGCTTAACTCTCCGGACAGGTGGTTATGCGCGCTCATAAAG     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Consensus   | GCTATGGCGGCAATCATCGCTGGATGATGCGTCTATTGCGAAAGCGTGTGAAAGAGCTGCAAGAGGTCAGGTCGTTTCTCCGTAAGCTTAACTCTCCGGACAGGTGGTTATGCGCGCTCATAAAG     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|             | 521                                                                                                                               | 530 | 540 | 550 | 560 | 570 | 580 | 590 | 600 | 610 | 620 | 630 | 640 | 650 |
| FabD        | AAACGCTTGAAGCTGCTGGCGTGCCTGTAAAGCGGCGGCGAAAGCGCGCTGCGCTTACCAAGTACGCTACGCTCTACTGTGCGCTGATGAAGCAGGCGGCAAGCTGCGAGTAAATTAAG           |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| pCOLADuet-1 | AAACGCTTGAAGCTGCTGGCGTGCCTGTAAAGCGGCGGCGAAAGCGCGCTGCGCTTACCAAGTACGCTACGCTCTACTGTGCGCTGATGAAGCAGGCGGCAAGCTGCGAGTAAATTAAG           |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Consensus   | AAACGCTTGAAGCTGCTGGCGTGCCTGTAAAGCGGCGGCGAAAGCGCGCTGCGCTTACCAAGTACGCTACGCTCTACTGTGCGCTGATGAAGCAGGCGGCAAGCTGCGAGTAAATTAAG           |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|             | 651                                                                                                                               | 660 | 670 | 680 | 690 | 700 | 710 | 720 | 730 | 740 | 750 | 760 | 770 | 780 |
| FabD        | GAATATCACTTTAAAGCAGCAGAGTCCCTTTGTGATTAACCTTATGATGAAATGCGAAACCAATGATGATGCAATCCGTACACACTGGATAGTCAGTTGATTAACCGGTTCAAGTGAACGAGTCT     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| pCOLADuet-1 | GAATATCACTTTAAAGCAGCAGAGTCCCTTTGTGATTAACCTTATGATGAAATGCGAAACCAATGATGATGCAATCCGTACACACTGGATAGTCAGTTGATTAACCGGTTCAAGTGAACGAGTCT     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Consensus   | GAATATCACTTTAAAGCAGCAGAGTCCCTTTGTGATTAACCTTATGATGAAATGCGAAACCAATGATGATGCAATCCGTACACACTGGATAGTCAGTTGATTAACCGGTTCAAGTGAACGAGTCT     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|             | 781                                                                                                                               | 790 | 800 | 810 | 820 | 830 | 840 | 850 | 860 | 870 | 880 | 890 | 900 | 910 |
| FabD        | GTTAGTACATGGAGCGAAGCGGTAAAGATCTCTATGAAGTCGCGCCGAGCAAGTGTCTACTGGCTGACGAAGCAATTCGACACCTGACCGCTCGGCGCTGAACCAACTTCAGCGATGG            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| pCOLADuet-1 | GTTAGTACATGGAGCGAAGCGGTAAAGATCTCTATGAAGTCGCGCCGAGCAAGTGTCTACTGGCTGACGAAGCAATTCGACACCTGACCGCTCGGCGCTGAACCAACTTCAGCGATGG            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Consensus   | GTTAGTACATGGAGCGAAGCGGTAAAGATCTCTATGAAGTCGCGCCGAGCAAGTGTCTACTGGCTGACGAAGCAATTCGACACCTGACCGCTCGGCGCTGAACCAACTTCAGCGATGG            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|             | 911                                                                                                                               | 920 | 930 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| FabD        | CAGCGCGCTCGAGCTTTAA                                                                                                               |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| pCOLADuet-1 | CAGCGCGCTCGAGCTTTAA                                                                                                               |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Consensus   | CAGCGCGCTCGAGCTTTAA                                                                                                               |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

도면20

[illegible]

도면21



## 서열 목록

- <110> Inha University Research and Business Foundation
- <120> Recombinant E. coli producing fatty acid and method for producing biodiesel using the same
- <130> IHU1-263p-1
- <150> KR 10-2018-0011787
- <151> 2018-01-31
- <160> 35
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 1377
- <212> DNA
- <213> Acinetobacter sp.
- <400> 1

atgcgcccat tacatccgat tgattttata ttctgtcac tagaaaaag acaacagcct 60

atgcatttag gtggtttatt ttgtttcag attcctgata acgccccaga cacctttatt 120

caagatctgg tgaatgatat ccggatatca aaatcaatcc ctgttcacc attcaacaat 180

aaactgaatg ggcttttttg ggatgaagat gaagagtttg atttagatca tcattttcgt 240

catattgcac tgcctcatcc tggctgtatt cgtgaattgc ttatttatat ttcacaagag 300

cacagtacgc tgctagatcg ggcaaagccc ttgtggacct gcaatattat tgaaggaatt 360

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| gaaggcaatc gttttgcat gtacttcaaa attcaccatg cgatggtcga tggcgttgct   | 420  |
| ggtatgcggt taattgaaaa atcactctcc catgatgtaa cagaaaaaag tatcgtgcc   | 480  |
| ccttggtgtg ttgagggaag acgtgcaaag cgcttaagag aacctaaaac aggtaaaatt  | 540  |
| aagaaaatca tgcttggtat taagagtcag ctccaggcga caccacagc cattcaagag   | 600  |
| ctttctcaga cagtatttaa agatattgga cgtaactctg atcatgttc aagctttcag   | 660  |
| gcgccttggt ctattttgaa tcagcgtgtg agctcatgc gacgttttc agcacagtct    | 720  |
| tttgacctag atcgttttcg taatattgcc aaatcgttga atgtgacct taatgatgtt   | 780  |
| gtactagcgg tatgttctgg tgcattacgt gcgtatttga tgagtcataa tagtttgctt  | 840  |
| tcaaaacct taattgcat ggttcagcc tctattcga atgacgattc agatgicagc      | 900  |
| aaccgtatta cgatgattct ggcaaatgtt gcaaccaca aagatgatcc ttacaacgt    | 960  |
| cttgaaatta tccgcgtag tgttcaaac tcaaagcaac gttcaaacg tatgaccagc     | 1020 |
| gatcagattc taaattatag tgctgtcgt tatggccctg caggactcaa cataatttct   | 1080 |
| ggcatgatgc caaacgccga agccttcaat ctggttattt ccaatgtgcc tggccaaga   | 1140 |
| gagccacttt actggaatgg tgccaaactt gatgactct acccagcttc aattgtatta   | 1200 |
| gacggctcaag cattgaatat tacaatgacc agttatttag ataaacttga agttggtttg | 1260 |
| attgcatgcc gtaatgcatt gccagaatg cagaatttac tgacacattt agaagaagaa   | 1320 |
| attcaactat ttgaaggcgt aattgcaaag caggaagata ttaaacagc caattaa      | 1377 |
| <210> 2                                                            |      |
| <211> 627                                                          |      |
| <212> DNA                                                          |      |
| <213> Escherichia coli                                             |      |
| <400> 2                                                            |      |
| atgatgaact tcaacaatgt ttccgcgtgg catttgccct tccgttctt ggtcctgtta   | 60   |
| accttcctg ccgctgcagc ggacacgtta ttgattctgg gtgatagcct gagcgccggg   | 120  |
| tatcgaatgt ctgccagcgc ggcctggcct gccttgttga atgataagt gcagagtaa    | 180  |
| acgtcggtag ttaatgccag catcagcggc gacacctgc aacaaggact ggcgcgctt    | 240  |
| ccggctctgc tgaaacagca tcagccgcgt tgggtgctgg ttgaactggg cggaatgac   | 300  |
| ggtttgcgtg gttttcagcc acagcaaacc gagcaaaccg tgcgccagat ttgcaggat   | 360  |
| gtcaaagccg ccaacgctga accattgtta atgcaaatc gtctgcctgc aaactatggt   | 420  |
| cgccgttata atgaagcctt tagcgccatt taccccaaac tcgccaaga gtttgatgtt   | 480  |
| ccgctgctgc cttttttat ggaagaggtc tacctcagc cacaatggat gcaggatgac    | 540  |

ggtattcatc ccaaccgga cgcccagccg ttattgccg actggatggc gaagcagttg 600  
 cagccttttag taaatcatga ctcataa 627  
 <210> 3  
 <211> 1707  
 <212> DNA  
 <213> Zymomonas mobilis  
 <400> 3  
 atgagttata ctgtcggtag ctatttagcg gagcggcttg tccagattgg tctcaagcat 60  
  
 cacttcgcag tcgcgggcga ctacaacctc gtccttcttg acaacctgct ttgaacaaa 120  
 aacatggagc aggtttattg ctgtaacgaa ctgaactgcg gtttcagtgc agaaggttat 180  
 gctcgtgcc aaggcgcagc agcagccgtc gttacctaca gcgtcggtag gctttccgca 240  
 ttgatgcta tcggtggcgc ctatgcagaa aaccttccgg ttatcctgat ctccggtgct 300  
 ccgaacaaca atgatcacgc tgctgggtcac gtgttgcatc acgctcttgg caaaaccgac 360  
 tatcactatc agttggaaat ggccaagaac atcacggccg ccgtgaagc gatttacacc 420  
 ccggaagaag ctccggctaa aatcgatcac gtgattaaaa ctgctcttcg tgagaagaag 480  
  
 ccggtttatc tcgaaatgc ttgcaacatt gcttccatgc cctgcgccgc tcttgaccg 540  
 gcaagcgcgt tgttcaatga cgaagccagc gacgaagctt ctttgaatgc agcggttgaa 600  
 gaaacctga aatcatcgc caaccgcgac aaagtgtccg tctcgtcgg cagcaagctg 660  
 cgccagctg gtgctgaaga agctgctgtc aaatttctg atgctctcgg tggcgcagtt 720  
 gctaccatgg ctgtgcaaa aagcttcttc ccagaagaaa acccgcatc catcggcacc 780  
 tcatggggtg aagtcagcta tccgggcgtt gaaaagacga tgaaagaagc cgatgcggtt 840  
 atcgtcttgg ctctgtctt caacgactac tccaccactg gttggacgga tattcctgat 900  
  
 cctaagaaac tggttctcgc tgaaccgcgt tctgtcgtcg ttaacggcat tcgcttcccc 960  
 agcgtccatc tgaagacta tctgacctgt ttggctcaga aagtttcaa gaaaaccggt 1020  
 gcattggact tcttcaaatc cctcaatgca ggtgaactga agaaagccgc tccggtgat 1080  
 ccgagtgtc cgttgggtcaa cgcagaaatc gccggtcagg tcgaagctct tctgaccccg 1140  
 aacacgacgg ttattgtga aaccggtgac tcttgggtca atgctcagcg catgaagctc 1200  
 ccgaacggtg ctgcgttga atatgaaatg cagtggggtc acattggttg gtccgttctt 1260  
 gccgccttcg gttatgccgt cgggtgtccg gaacgtcgca acatcctcat ggttgggtgat 1320  
  
 gggttcttcc agctgacggc tcaggaagtc gctcagatgg ttcgcctgaa actgccggtt 1380  
 atcatcttct tgatcaataa ctatggttac accatcgaag ttatgatcca tgatgggtccg 1440

tacaacaaca tcaagaactg ggattatgcc ggtctgatgg aagtgttcaa cggtaacggt 1500  
 ggttatgaca gcggtgctgg taaaggcctg aaggctaaaa ccggtggcga actggcagaa 1560  
 gctatcaagg ttgctctggc aaacaccgac ggcccaaccc tgatcgaatg cttcatcggt 1620  
 cgtgaagact gcactgaaga attgggtcaaa tggggtaagc gcgttgctgc cgccaacagc 1680  
 cgtaagcctg ttaacaagct cctctag 1707

<210> 4

<211> 1152

<212> DNA

<213> Zymomonas mobilis

<400> 4

atggcttctt caacttttta tattcctttc gtcaacgaaa tgggcgaagg ttcgcttgaa 60  
 aaagcaatca aggatcttaa cggcagcggc tttaaaaatg cgctgatcgt ttctgatgct 120  
 ttcatgaaca aatccggigt tgtgaagcag gttgctgacc tgttgaaagc acagggtatt 180  
 aattctgctg tttatgatgg cgttatgccg aaccgcactg ttaccgcagt tctggaaggc 240  
 cttaatgacc tgaaggataa caattcagac ttcgtcatct ccttcggtgg tggttctccc 300  
 catgactgcg ccaaagccat cgctctggtc gcaaccaatg gtggtgaagt caaagactac 360

gaaggatcgc acaaatctaa gaaacctgcc ctgcctttga tgtcaatcaa cacgacggct 420  
 ggtacggctt ctgaaatgac gcgtttctgc atcatcactg atgaagtcgc tcacgttaag 480  
 atggccattg ttgaccgtca cgttaccccg atggtttccg tcaacgatcc tctgttgatg 540  
 gttggtatgc caaaaggcct gaccgccgcc accggtatgg atgctctgac ccacgcattt 600  
 gaagcttatt cttaacggc agctactccg atcacgatg cttgcgcttt gaaagcagct 660  
 tccatgatcg ctaagaatct gaagaccgct tgcgacaacg gtaaggatat gccggctcgt 720  
 gaagctatgg cttatgccca attcctcgct ggtatggcct tcaacaacgc ttcgcttggt 780

tatgtccatg ctatggctca ccagttgggc ggttactaca acctgccgca tgggtgtctgc 840  
 aacgctgttc tgcctccgca tgtttcggt tataacgcct ctgtcgttgc tggctgtctg 900  
 aaagacgttg gtgttgctat ggggtctgat atcgccaatc tcggtgataa agaaggcgca 960  
 gaagccacca ttcaggctgt tcgcgatctg gctgcttcca ttggtattcc agcaaacctg 1020  
 accgagctgg gtgctaagaa agaagatgtg ccgcttcttg ctgaccacgc tctgaaagat 1080  
 gcttgtgtct tgaccaaccc gcgtcagggt gatcagaaag aagttgaaga actcttcctg 1140  
 agcgctttct aa 1152

<210> 5

<211> 960  
 <212> DNA  
 <213> Escherichia coli  
 <400> 5

atgagctctga atttccttga ttttgaacag ccgattgcag agctggaagc gaaaatcgat 60  
 tctctgactg cggtttagccg tcaggatgag aaactggata ttaacatcga tgaagaagt 120  
 catcgtctgc gtgaaaaaag cgtagaactg acacgtaaaa tcttcgccga tctcgggtgca 180  
 tggcagattg cgcaactggc acgccatcca cagcgtcctt ataccctgga ttacgttcgc 240  
 ctggcatttg atgaatttga cgaactggct ggcgaccgcg cgtatgcaga cgataaagct 300  
 atcgtcgggtg gtatcgcccg tctcgatggt cgtccggtga tgatcattgg tcatcaaaaa 360

ggtcgtgaaa ccaaagaaaa aattcgccgt aactttggtg tgccagcgcc agaaggttac 420  
 cgcaaagcac tgcgtctgat gcaaatggct gaacgcctta agatgcctat catcaccttt 480  
 atcgacaccc cgggggctta tcctggcgtg ggcgcagaag agcgtgggtca gtctgaagcc 540  
 attgcacgca acctgcgtga aatgtctcgc ctccggctac cggtagtttg tacggttatc 600  
 ggtgaaggtg gtctcggcgg tgcgtggcg attggcgtgg gcgataaagt gaatatgctg 660  
 caatacagca cctattccgt tatctcgccg gaaggttgtg cgtccattct gtggaagagc 720  
 gccgacaaag cgccgctggc ggctgaagcg atgggtatca ttgctccgcg tctgaaagaa 780

ctgaaactga tcgactccat catcccgaa cactgggtg gtgctcaccg taaccggaa 840  
 gcgatggcgg catcgttgaa agcgcaactg ctggcggatc tggccgatct cgacgtgtta 900  
 agcactgaag atttaaaaaa tcgtcgttat cagcgcctga tgagctacgg ttacgcgtaa 960

<210> 6  
 <211> 471  
 <212> DNA  
 <213> Escherichia coli  
 <400> 6

atggatattc gtaagattaa aaaactgac gagctggttg aagaatcagg catctccgaa 60  
 ctggaaaattt ctgaaggcga agagtcagta cgcattagcc gtgcagctcc tgccgcaagt 120

ttccctgtga tgcaacaagc ttacgtgca ccaatgatgc agcagccagc tcaatctaac 180  
 gcagccgctc cggcgaccgt tccttccatg gaagcgccag cagcagcgga aatcagtgg 240  
 cacatcgta gttccccgat ggttggtact ttctaccgca cccaagccc ggacgcaaaa 300  
 gcgttcacg aagtgggtca gaaagtcaac gtggcgata ccctgtgcat cgttgaagcc 360

atgaaaaatga tgaaccagat cgaagcggac aaatccggta ccgtgaaagc aattctggtc 420  
gaaagtggac aaccggtaga atttgacgag cctctggtcg tcacgagta a 471  
<210> 7  
<211> 1350  
<212> DNA  
<213> Escherichia coli  
<400> 7  
atgctggata aaattgttat tgccaaccgc ggcgagattg cattgcgtat tcttcgtgcc 60  
tgtaaaagac tgggcatcaa gactgtcgtc gtgcactcca gcgcggatcg cgatctaaaa 120  
cacgtattac tggcagatga aacggtctgt attggccctg ctccgtcagt aaaaagtat 180  
ctgaacatcc cggcaatcat cagcgcgct gaaatcacgc gcgcagtagc aatccatccg 240  
ggttacggct tctctccga gaacccaac ttgcccagc aggttgaacg ctccggcttt 300  
atcttcattg gcccgaagc agaaaccatt cgctgatgg gcgacaaagt atccgcaatc 360  
gcggcgatga aaaaagcggg cgctcccttc gtaccgggtt ctgacggccc gctgggcgac 420  
gatatggata aaaaccgtgc cattgctaaa cgcatgtgtt atccggtgat tatcaaagcc 480  
tccggcggcg gcggcggtcg cggtatgcgc gtagtgcgc gcgacgtga actggcacia 540  
tccatctcca tgaccgtgc ggaagcgaag gctgctttca gcaacgatat ggtttacatg 600  
gagaaatacc tggaaaatcc tcgccacgtc gagattcagg tactggctga cggtcagggc 660  
aacgctatct atctggcgga acgtgactgc tccatgcaac gccgccacca gaaagtggtc 720  
gaagaagcgc cagcaccggg cattaccccg gaactgcgtc gctacatcgg cgaacgttgc 780  
gctaaagcgt gtgttgatat cggctatcgc ggtgcaggta ctttcgagtt cctgttcgaa 840  
aacggcgagt tctatttcat cgaaatgaac acccgattc aggtagaaca cccggttaca 900  
gaaatgatca ccggcgttga cctgatcaaa gaacagctgc gtatcgctgc cggtaaccg 960  
ctgtcgatca agcaagaaga agttcacgtt cgcggccatg cgggtgaatg tcgtatcaac 1020  
gccgaagatc cgaacacctt cctgccaagt ccgggcaaaa tcaccgctt ccacgcacct 1080  
ggcggttttg gcgtacgttg ggagtctcat atctacgcgg gctacaccgt accgccgtac 1140  
tatgactcaa tgatcggtaa gctgatttgc tacggtgaaa accgtgacgt ggcgattgcc 1200  
cgcatgaaga atgcgctgca ggagctgac atcgacggta tcaaaaccaa cgttgatctg 1260  
cagatccgca tcatgaatga cgagaacttc cagcatgggt gcactaacat ccactatctg 1320  
gagaaaaaac tcggtcttca ggaaaaataa 1350  
<210> 8

<211> 915  
 <212> DNA  
 <213> Escherichia coli  
 <400> 8

atgagctgga ttgaacgaat taaaagcaac attactccca cccgcaaggc gagcattcct 60  
 gaaggggtgt ggactaagtg tgatagctgc ggtcaggttt tataccgcgc tgagctggaa 120  
 cgtaatcttg aggtctgtcc gaagtgtgac catcacatgc gtatgacagc gcgtaatcgc 180

ctgcatagcc tgttagatga aggaagcctt gtggagctgg gtagcgagct tgagccgaaa 240  
 gatgtgctga agtttcgtga ctccaagaag tataaagacc gtctggcatc tgcgcagaaa 300  
 gaaaccggcg aaaaagatgc gctggtgggtg atgaaaggca ctctgtatgg aatgccggtt 360  
 gtcgctgcgg cattcgagtt cgcctttatg ggcggttcaa tggggtctgt tgtgggtgca 420  
 cgtttcgtgc gtgccgttga gcaggcgctg gaagataact gcccgtgat ctgcttctcc 480  
 gcctctggtg gcgcacgtat gcaggaagca ctgatgtcgc tgatgcagat ggcgaaaacc 540  
 tctgcggcac tggcaaaaaa gcaggagcgc ggcttgccgt acatctccgt gctgaccgac 600

ccgacgatgg gcggtgtttc tgcaagtttc gccatgctgg gcgatctcaa catcgctgaa 660  
 ccgaaagcgt taatcggtt tgccggtcgc cgtgttatcg aacagaccgt tcgcgaaaaa 720  
 ctgccgcctg gattccagcg cagtgaattc ctgatcgaga aaggcgcgat cgacatgac 780  
 gtccgtcgtc cggaatgcg cctgaaactg gcgagcattc tggcgaagtt gatgaatctg 840  
 ccagcgccga atcctgaagc gccgcgtgaa ggcgtagtgg taccgccgt accggatcag 900  
 gaacctgagg cctga 915

<210> 9  
 <211> 930  
 <212> DNA  
 <213> Escherichia coli  
 <400> 9

atgacgcaat ttgcatttgt gttccctgga cagggttctc aaaccgttgg aatgctggct 60  
 gatatggcgg cgagctatcc aattgtcgaa gaaacgtttg ctgaagcttc tgcggcgctg 120  
 ggctacgacc tgtgggcgct gaccagcag gggccagctg aagaactgaa taaaacctgg 180  
 caaactcagc ctgcgctgtt gactgcatct gttgcgtgt atcgcgatg gcagcagcag 240  
 ggccgtaaag caccggcaat gatggccgt cacagcctgg ggggaatactc cgcgctggtt 300  
 tgcgctggtg tgattgattt cgctgatgcg gtgcgtctgg ttgagatgcg cggcaagttc 360

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| atgcaagaag ccgtaccgga aggcacgggc gctatggcgg caatcatcgg tctggatgat  | 420 |
| gcgtctattg cgaagcggtg tgaagaagct gcagaaggtc aggtcgtttc tccggtaaac  | 480 |
| tttaactctc cgggacaggt ggttattgcc ggtcataaag aagcggttga gcgtgctggc  | 540 |
| gctgcctgta aagcggcggg cgcaaaacgc gcgctgccgt taccagttag cgtaccgtct  | 600 |
| caactgtgcg tgatgaaacc agcagccgac aaactggcag tagaattagc gaaaatcacc  | 660 |
| tttaacgcac caacagttcc tgttgtgaat aacgttgatg tgaaatgcga aaccaatggt  | 720 |
| gatgccatcc gtgacgcact ggtacgtcag ttgtataacc cggttcagtg gacgaagtct  | 780 |
|                                                                    |     |
| gttagtaca tggcagcgca aggcgtagaa catctctatg aagtcggccc gggcaaagtg   | 840 |
| cttactggcc tgacgaaacg cattgtcgac accctgaccg cctcggcgct gaacgaacct  | 900 |
| tcagcgatgg cagcggcgct cgagctttaa                                   | 930 |
| <210> 10                                                           |     |
| <211> 1242                                                         |     |
| <212> DNA                                                          |     |
| <213> Escherichia coli                                             |     |
| <400> 10                                                           |     |
|                                                                    |     |
| gigtctaagc gtcgtgtagt tgtgaccgga ctgggcatgt tgtctcctgt cggcaatacc  | 60  |
| gtagagtcta cctggaaagc tctgcttgcc ggtcagagtg gcatcagcct aatcgaccat  | 120 |
| ttcgatacta gcgcctatgc aacgaaattt gctggccttag taaaggattt taactgtgag | 180 |
|                                                                    |     |
| gacattatct cgcgcaaaga acagcgcaag atggatgcct tcattcaata tgggaattgtc | 240 |
| gctggcgctt aggcctatgca ggattctggc cttgaaataa cggaagagaa cgcaacccgc | 300 |
| attggtgccg caattggctc cgggattggc ggctcggac tgatcgaaga aaaccacaca   | 360 |
| tctctgatga acggtggtcc acgtaagatc agccattct tcgttcctgc aacgattgtg   | 420 |
| aacatggtgg caggtcatct gactatcatg tatggcctgc gtggcccag catctctatc   | 480 |
| gcgactgcct gtacttcggc cgtgcacaac attggccatg ctgcgcgtat tatcgctat   | 540 |
| ggcgatgctg acgtgatggt tgcaggtggc gcagagaaag ccagtacgcc gctgggcgtt  | 600 |
|                                                                    |     |
| ggtggttttg gcgcggcacg tgcatatct acccgcaatg ataaccgca agcggcgagc    | 660 |
| cgcccggtgg ataaagagcg tgatggtttc gtactggcg atggtgccgg tatgctggtg   | 720 |
| cttgaagagt acgaacacgc gaaaaaacgc ggtgcgaaaa ttacgtga actcgtcggc    | 780 |
| tttggtatga gcagcgatgc ttatcatatg acgtcaccgc cagaaaatgg gcgagcgca   | 840 |
| gctctggcga tggcaaatgc tctgcgtgat gcaggcattg aagcgagtca gattggctac  | 900 |
| gttaacgcgc acggtacttc tacgccggt ggcgataaag ctgaagcgca ggccgtgaaa   | 960 |

accatcttcg gtgaagctgc aagccgtgtg ttgtaagct ccacgaaatc tatgaccggt 1020

cacctgttag gtgcggcggg tgcagtagaa tctatctact ccaccttgge gctgcgcgat 1080

caggctgttc cgccaacat caacctggat aaccggatg aaggttgca tctggatttc 1140

glaccgcacg aagcgcgtca ggttagcgga atggaatata ctctgtgtaa ctcttcggc 1200

ttcgttgga ctaatggttc ttgatcttt aaaaagatct aa 1242

<210> 11

<211> 1221

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 11

atgaaacgtg cagtattac tggcctgggc attgtttcca gcatcggtaa taaccagcag 60

gaagtcctgg catctctcg tgaaggacgt tcagggatca ctttctctca ggagctgaag 120

gattccggca tgcgtagcca cgtctggggc aacgtaaaac tggataccac tggcctcatt 180

gaccgcaaag ttgtgcgtt tatgagcgac gcatccattt atgcattcct ttctatggag 240

caggcaatcg ctgatcgagg cctctctccg gaagcttacc agaataaccc gcgcgttggc 300

ctgattgcag gttccggcgg cggtcccca cgtttccagg tgttcggcgc tgacgcgatg 360

cgccggccgc gggcctgaa agcggttggc ccgtatgtgg tcaccaaagc gatggcatcc 420

ggcgtttctg cctgcctcgc caccctgtt aaaattcatg gcgttaacta ctccatcagc 480

tccgcgtgtg cgacttccgc aactgtatc ggtaacgcag tagagcagat ccaactgggc 540

aaacaggaca tcgtgtttgc tggcggcggc gaagagctgt gctgggaaat ggcttgcgaa 600

ttcgacgcaa tgggtgcgt gtctactaaa tacaacgaca ccccgaaaa agcctcccgt 660

acttacgacg ctaccctga cggtttcgtt atcgctggcg gcggcggtat ggtagtgtt 720

gaagagctgg aacacgcgtt ggcgcgtgtt gctcacatct atgctgaaat cgttggctac 780

ggcgcaacct ctgatgtgc agacatggtt gctccgtctg gcgaaggcgc agtacgtgc 840

atgaagatgg cgatgcattg cgttgatacc ccaatcgatt acctgaactc ccacgtact 900

tcgactccgg ttggcgacgt gaaagagctg gcagctatcc gtgaagtgtt cggcgataag 960

agcccggcga tttctgcaac caaagccatg accggtcact ctctgggcgc tgcctggcga 1020

caggaagcta tctactctt gctgatgctg gaacacggct ttatcgcccc gagcatcaac 1080

attgaagagc tggacgagca ggctgcgggt ctgaacatcg tgaccgaaac gaccgatcgc 1140

gaactgacca ccgttatgtc taacagcttc ggttcggcg gcaccaacgc cacgttgga 1200

atgcgcaagc tgaaagatta a 1221

<210> 12  
 <211> 519  
 <212> DNA  
 <213> Escherichia coli  
 <400> 12

atggtagata aacgcgaatc ctatacaaaa gaagaccttc ttgcctctgg tcgcggtgaa 60

ctgtttggcg ctaaaggccc gcaattgcc a gacccaaca tgctgatgat ggaccgtgtg 120

gtcaaaatga ccgaaacggg tggtaacttc gacaaagggt atgttgaagc agaactggat 180

atcaatccgg atctgtggtt cttcggatgc cactttattg gcgatccggt tatgccggga 240

tcctggggcc tggacgcaat gtggcagctg gtagggttct acctcggctg gctgggcggc 300

gaaggtaaag gccgcgcgtt gggcgttggc gaagtgaat tcactggtca ggtactgccg 360

acagcgaaaa aagtgcacta ccgtattcac tttaaacgca ttgttaaccg tcgtctgatt 420

atgggcctgg cggatggcga agtgctggtt gatggctgct tgatctatac cgccagcgac 480

ctgaaagtcg gtctgttcca ggatacgtct gccttctga 519

<210> 13  
 <211> 2445  
 <212> DNA  
 <213> Escherichia coli  
 <400> 13

atgatgattt tgagtattct cgctacgggt gtccctgctc gcgcgttgtt ctatcaccgc 60

gtgagcttat ttatcagcag tctgattttg ctgcctgga cagccgcct cggcgttgc 120

ggtctgtggt cggcgtgggt actggtgcct ctggccatta tctcgtgcc atttaacttt 180

gcgcctatgc gtaagtcgat gatttccgcg ccggtatttc gcggtttccg taaggtagtg 240

ccgccgatgt cgcgcactga gaaagaagcg attgatgcgg gcaccacctg gtgggagggc 300

gacttgttcc agggcaagcc ggactggaaa aagctgcata actatccga gccgcgcctg 360

accgccgaag agcaagcgtt tctcgacggc ccggtagaag aagcctgcc gatggcgaat 420

gatttccaga tcacctatga gctggcggat ctgccgcgg agttgtgggc gtaccttaaa 480

gagcatcgtt tcttcgcgat gatcatcaaa aaagagtacg gcgggctgga gttctcggt 540

tatgcccagt ctgcgtgct gcaaaaactc tccggcgtga gcgggacct gccgattacc 600

gtcggcgtgc caaactcatt agggccgggc gaactgttgc aacattacgg cactgacgag 660

cagaaagatc actatctgcc gcgtctggcg cgtggtcagg agatcccctg ctttgactg 720

accagcccg aagcgggttc cgatgcgggc gcgattccgg acaccgggat tgtctgcatg 780  
ggcgaatggc agggccagca ggtgtctggg atgcgtctga cctggaacaa acgtacatt 840  
acgttggcac cgattgcgac cgtgcttggg ctggcgttta aactctccga cccggaaaaa 900  
ttactcggcg gtgcagaaga tttaggcatt acctgtgcgc tgatcccaac caccacgccg 960  
ggcgtggaaa ttggtcgtcg ccacttcccg ctgaacgtac cgttccagaa cggaccgacg 1020  
cgcggtaaag atgtcttcgt gccgatcgat tacatcatcg gcgggccgaa aatggccggg 1080  
caaggctggc ggatgctggg ggagtgcctc tcggtaggcc gcggcatcac cctgccttcc 1140

aactcaaccg gcggcgtgaa atcggtagcg ctggcaaccg gcgcgtatgc tcacattcgc 1200  
cgtcagttca aaatctctat tggttaagatg gaagggattg aagagccgct ggcgcgattt 1260  
gccggtaatg cctacgtgat ggatgctgcg gcatcgctga ttacctacgg cattatgctc 1320  
ggcgaaaaac ctgccgtgct gtcggctatc gtttaagtac actgtacca ccgcgggcag 1380  
cagtcgatta ttgatgcgat ggatattacc ggcggtaaag gcattatgct cgggcaaagc 1440  
aacttcttgg cgctgctta ccagggcgca ccgattgcca tcaccgttga aggggctaac 1500  
attctgacct gcagcatgat gatcttcgga caaggagcga ttcgttgcca tccgtacgtg 1560

ctggaagaga tggaagcggc gaagaacaat gacgtcaacg cgttcgataa actgtgttc 1620  
aaacatatcg gtcacgtcgg tagcaacaaa gttcgcagct tctggctggg cctgacgcgc 1680  
ggtttaacca gcagcacgcc aaccggcgat gccactaac gctactatca gcacctgaac 1740  
cgctgagcg ccaacctcgc cctgctttct gatgtctcga tggcagtgct gggcggcagc 1800  
ctgaaacgtc gcgagcgcat ctcgcccggt ctgggggata ttttaagcca gctctacctc 1860  
gcctctgccg tgctgaagcg ttatgacgac gaaggccgta atgaagccga cctgccgctg 1920  
gtgcactggg gcgtacaaga tgcgctgtat caggctgaac aggcgatgga tgatttactg 1980

caaaacttcc cgaaccgctg gggtgccggg ctgctgaatg tggatgattt cccgaccgga 2040  
cgtcattatc tggcaccttc tgacaagctg gatcataaag tggcgaagat tttaaaagt 2100  
ccgaacgcca cccgttcccg cattggctgc ggtcagtacc tgacgccgag cgagcataat 2160  
ccggttggct tgctggaaga ggcgtggtg gatgtgattg ccgccgacct aattcatcag 2220  
cggatctgta aagagctggg taaaacctg ccgtttacct gtctggatga actggcgcac 2280  
aacgcgttgg tgaaggggct gattgataaa gatgaagccg ctattctggt gaaagctgaa 2340  
gaaagccgtc tgcgcagtat taacgttgat gactttgatc cggaagagct ggcgacgaag 2400

ccggtaaagt tgccggagaa agtgcggaaa gttgaagccg cgtaa 2445

<210> 14

<211> 38

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> atfA primer  
 <400> 14  
 aaaaggatcc gatgcgccca ttacatccga ttgatttt 38  
 <210> 15  
 <211> 43  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> atfA primer  
 <400> 15  
 ccccgctgac ttaattggct gttttaatat cttcctgctt tgc 43  
 <210> 16  
 <211> 49  
 <212> DNA  
 <  
 213> Artificial Sequence  
 <220><223> tesA primer  
 <400> 16  
 ccccgctgac aataaggaga tataatgatg aacttcaaca atgttttcc 49  
 <210> 17  
 <211> 38  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> tesA primer  
 <400> 17  
 aaaagcggcc gcttatgagt catgatttac taaaggct 38  
 <210> 18  
 <211> 47  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> pdc primer  
 <400> 18  
 aaaaacatat gatgagttat actgtcggta cctatttagc ggagcgg 47

<210> 19  
 <211> 37  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> pdc primer  
 <400> 19  
 ccccgatct ctagaggagc ttgttaacag gcttacg 37  
 <210> 20  
 <211> 49  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> adhB primer  
 <400> 20  
 cccccagatc tcaagaagga gatataatgg cttcttcaac tttttatat 49  
 <210> 21  
 <211> 39  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> adhB primer  
 <400> 21  
 aaaactcgag ttagaaagcg ctcaggaaga gttcttcaa 39  
 <210> 22  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> accA primer  
 <400> 22  
 cggatccgat gaatttcctt gattttgaac agc 33  
 <210> 23  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> accA primer  
 <400> 23

|                                                 |    |
|-------------------------------------------------|----|
| gcgtcgacgt cttacgcgta accgtag                   | 27 |
| <210> 24                                        |    |
| <211> 43                                        |    |
| <212> DNA                                       |    |
| <213> Artificial Sequence                       |    |
| <220><223> accB accC primer                     |    |
| <400> 24                                        |    |
| gaagatcttc ggatggatat tcgtaagatt aaaaaactga tcg | 43 |
| <210> 25                                        |    |
| <211> 42                                        |    |
| <212> DNA                                       |    |
| <213> Artificial Sequence                       |    |
| <220><223> accB accC primer                     |    |
| <400> 25                                        |    |
| ccctaattaa gggtatTTTT cctgaagacc gagttttttc tc  | 42 |
| <210> 26                                        |    |
| <211> 39                                        |    |
| <212> DNA                                       |    |
| <213> Artificial Sequence                       |    |
| <220><223> accD primer                          |    |
| <400> 26                                        |    |
| gcgtcgacgt caaggagata tacatgagct ggattgaac      | 39 |
| <210> 27                                        |    |
| <211> 31                                        |    |
| <212> DNA                                       |    |
| <213> Artificial Sequence                       |    |
| <220><223> accD primer                          |    |
| <400> 27                                        |    |
| ataagaatgc ggccgctcag gcctcaggtt c              | 31 |
| <210> 28                                        |    |
| <211> 37                                        |    |
| <212> DNA                                       |    |
| <213> Artificial Sequence                       |    |

<220><223> fabD primer  
 <400> 28  
 ggaattccat atggaattcc atgacgcaat ttgcatt 37  
 <210> 29  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> fabD primer  
 <400> 29  
 gaagatcttc ctcttttaa agctcgagcg cc 32  
 <210> 30  
 <211> 31  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> fabF fabB fabA primer  
 <400> 30  
  
 aaaaggatcc ggtgtctaag cgctgtgtag t 31  
 <210> 31  
 <211> 31  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> fabF fabB fabA primer  
 <400> 31  
 aaaactgcag tcagaaggca gacgtatcct g 31  
 <210> 32  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> primer  
 <400> 32  
 aaggatccaa taaattgata acaaagtctg at 32  
 <210> 33  
 <211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 33

aaagatctat gaataacgga gccgaaag 28

<210> 34

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 34

aaagatctaa cgaaaagccc ctacttg 28

<210> 35

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 35

aagcgccgc aagattgatt taagaatttt 30