(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0078112
(43) 공개일자 2009년07월17일

(51) Int. Cl.
C12P 7/24 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-0003911
(22) 출원일자 2008년01월14일
심사청구일자 2008년01월14일

(71) 출원인
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 가좌동 900
(72) 발명자
김선원
경남 사천시 사남면 월성리 푸르지오아파트 102-102
이은경
경남 진주시 대안동 2-4
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
리앤목특허법인

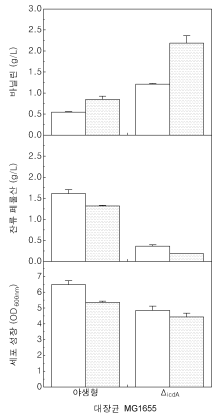
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 아세틸-CoA 소비를 증가시키는 대장균 균주 및 상기균주 및 흡착제 수지를 이용한 바닐린 생산 방법

(57) 요 약

본 발명은 페룰산을 페룰로일-CoA로 전환시키는 페룰로일-CoA 합성효소, 페룰로일-CoA를 바닐린으로 전환시키는 에노일-CoA 히드라타제/알돌라제, 및 아세틸-CoA를 CoA로 전환시키는 시트레이트 합성효소를 과발현하는 바닐린 생산이 증가된 대장균 및 본 발명의 대장균을 페룰산 존재하에 배양하는 단계; 및 상기 배양물로부터 바닐린을 회수하는 단계를 포함하는 페룰산의 전환에 의해 바닐린을 생산하는 방법을 제공한다. 본 발명에 따르면, 아세틸-CoA의 소비를 증가시키는 대장균을 개발하고, 또한 흡착제 수지를 이용함으로써 바닐린 생산성을 증가시킬 수 있다.

대 표 도 - 도5



(72) 발명자

이숙희

경남 마산시 내서읍 중리 동신아파트 105-203

윤상활

충남 부여군 부여읍 동남리 268-2 신안빌라 B동 202호

장희정

경남 진주시 주약동 한보은빛마을아파트 104-101

특허청구의 범위

청구항 1

페룰산을 페룰로일-CoA로 전환시키는 페룰로일-CoA 합성효소, 페룰로일-CoA를 바닐린으로 전환시키는 에노일-CoA 히드라타제/알돌라제, 및 아세틸-CoA를 CoA로 전환시키는 시트레이트 합성효소를 과발현하는 바닐린 생산이 증가된 대장균.

청구항 2

제1항에 있어서, 이소시트레이트를 α-케토글루타레이트로 전환시키는 이소시트레이트 탈수소효소를 코딩하는 유전자 (*icdA* 유전자)가 결손된 것을 특징으로 하는 대장균.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 대장균은 상기 페룰산을 페룰로일-CoA로 전환시키는 페룰로일-CoA 합성효소는 서열번호 2의 *fcs* 유전자에 의하여 코딩되는 것이고, 상기 페룰로일-CoA를 바닐린으로 전환시키는 에노일-CoA 히드라타제/알돌라제는 서열번호 1의 ech 유전자에 의하여 코딩되는 것이고, 상기 아세틸-CoA를 CoA로 전환시키는 시트레이트 합성 효소는 서열번호 3의 *gltA* 유전자에 의하여 코딩되는 것이고, 이소시트레이트를 α-케토글루타레이트로 전환시키는 이소시트레이트 탈수소효소는 서열번호 11의 *icdA* 유전자에 의하여 코딩되는 것을 특징으로 하는 대장균 MG1655의 변이 대장균.

청구항 4

a) 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 대장균을 페룰산 존재하에 배양하는 단계; 및

b) 상기 배양물로부터 바닐린을 회수하는 단계를 포함하는 페룰산의 전환에 의해 바닐린을 생산하는 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 단계 a)에서 상기 배양을 흡착제 수지의 존재하에서 수행하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 흡착제 수지는 중성 수지인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 중성 수지는 XAD-2 수지인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제5항에 있어서, 상기 흡착제 수지의 농도는 10-70% (w/v)인 것을 특징으로 하는 방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

<1> 본 발명은 아세틸-CoA 소비를 증가시키는 균주 및 상기 균주 및 흡착제 수지를 이용한 바닐린 생산 방법에 관한 것으로서, 더욱 구체적으로 본 발명은 아세틸-CoA의 소비를 증가시키는 효소를 발현시킴으로써 바닐린 생산성이 증가된 대장균 및 상기 대장균을 이용한 페룰산의 전환에 의해 바닐린을 생산하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

<2> 바닐린 (3-메톡시-4-히드록시벤즈알데히드)은 특히 식품뿐만 아니라, 약학, 음료 및 향료 산업에 가장 널리 이용되는 방향족 분자 중의 하나이다. 더욱이, 바닐린은 항균 및 항산화 성질을 가지고 있다. 오늘날, 바닐린의 매년 세계적인 소비는 12,000 톤 이상이며, 이 중에서 천연 바닐린은 단지 약 50톤이며, 나머지는 화학 합성에 의해 제공된다. 천연 바닐린의 수요가 바닐라 포드(vanilla pod) 추출에 의해 충당될 수 없으므로, 생물공학적

인 방법을 이용한 바닐린 생산이 대안적인 방법으로 연구되어 왔다. 천연 바닐린은 합성 바닐린이 US$ 15/kg인 것과 대조적으로 US$ 1,200/kg 내지 US$ 4,000/kg으로 매우 비싸다. 유게놀, 이소유게놀 및 페룰산 같은 천연 물질의 바닐린으로의 미생물 전환이 연구되었으나, 페룰산이 바닐린의 적당한 전구체로서 고려된다.

<3> 페룰산은 식물계에서 가장 풍부한 히드록실신남산이며, 주로 세포벽에 있다. 이는 리그닌 및 기타 생물중합체에 공유 결합되어 있다. 농업 폐기물은 바닐린의 생산에 이용되는 페룰산의 높은 비율을 포함한다. 생물전환에서, 페룰산은 먼저 *fcs* 유전자에 의해 코딩되는 페룰로일-CoA 합성효소에 의해 페룰로일-CoA로 활성화된 후, CoA 티오에스테르가 이어서 수화되며, *ech* 유전자에 의해 코딩되는 에노일-CoA 히드라타제/알돌라제에 의해 바닐린 및 아세틸-CoA로 절단된다.

<4> 수많은 미생물, 예를 들면, 아미콜라톱시스 (*Amycolatopsis* sp.) 균주 HR167 (Achterholt et al., *Appl Microbiol Biotechnol* **2000**, *54*, 799-807), 델프티아 아시도보란스 (*Delftia acidovorans*)(Peng et al., *Appl Environ Microbiol* **2003**, *69*, 1417-1427), 바실러스 서틸리스 (*Bacillus subtilis*)(Plaggenborg et al., *FEMS Microbiol Lett* **2001**, *205*, 9-16), 슈도모나스 푸티다 (*Pseudomonas putida*)(Plaggenborg et al., *Appl Microbiol Biotechnol* **2003**, *61*, 528-535), 스핑고모나스 파우시모빌리스 (*Sphingomonas paucimobilis*)(Masai et al., *Appl Environ Microbiol* **2002**, *68*, 4416-4424), 스트렙토마이세스 세토니아이 (*Streptomyces setonii*)(Sutherland et al., *Can J Microbiol* **1983**, *29*, 1253-1257) 및 로도코커스 종 (*Rhodococcus* sp.)(Plaggenborg et al., *Appl Microbiol Biotechnol* **2006**, *72*, 745-755)이 페룰산으로부터 바닐린의 생산에 대해 제안되어 왔다. 그러나, 생산된 바닐린은 기타 형태로 신속하게 전환되거나 또는 탄소 및 에너지 소스로서 이용된다. 10.0g/L 이상의 바닐린 생산이 아미콜라톱시스 (*Amycolatopsis* sp.) 균주 HR167 및 스트렙토마이세스 세토니아이 (*Streptomyces setonii*)와 같은 방선균에 대해 기록되었으나, 발효 및 다운스트림 공정은 상기 미생물에 대해 비용이 비싸다. 그러므로, 대장균이 바닐린 생산에 대한 최상의 선택으로서 고려되는데, 이는 대장균은 바닐린 분해 경로가 없으며, 잘 개발된 발효 및 다운스트림 공정 때문이다 (Kim et al., *Biotechnol Bioprocess Eng* **1999**, *4*, 170-175). 바닐린은 항균 특성을 나타내므로, 바닐린의 만족스러운 생산은 대사적으로 조작된 대장균을 이용하여 초기 연구에서 실현되지 못하였다 (Yoon et al., *Biotechnol Bioprocess Eng* **2005**, *10*, 378-384; Yoon et al., *Biotechnol Lett* **2005**, *27*, 1829-1832).

<5> 한국공개특허 제2001-0085827호에는 탄소원으로부터 바닐린 및 그 유도체를 제조하는 방법에 있어서, a) 탄소원을 재조합 미생물로 바닐린산으로 전환하는 단계; 및 b) 바닐린산을 바닐린으로 환원하는 단계를 포함하는 바닐린 및 그 유도체의 제조 방법이 개시되어 있으나, 본 발명의 아세틸-CoA의 소비를 증가시키는 효소를 발현시키는 재조합 균주와는 상이하다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<6> 페룰산의 바닐린으로의 생체변환에서 (도 1 참고), 바닐린 생산과 함께 아세틸-CoA의 동시 생성 및 이의 세포내 축적은 2가지 주요한 문제점을 야기할 것이다: (1) 바닐린은 세포 외로 분비되지만, 아세틸-CoA의 세포내 축적으로 인해 페룰로일-CoA의 바닐린으로의 반응의 저해 및 (2) 아세틸-CoA로서 CoA의 포획으로 인해 페룰레이트의 페룰로일-CoA로의 반응을 위한 CoA의 부족.

<7> 그러므로, 본 발명의 목적은 바닐린 생산을 증진시키기 위해 바닐린 생산 동안 생성된 여분의 아세틸-CoA를 최대한 이용하는 것이다.

<8> 본 발명자들은 아세틸-CoA의 소비를 증가시키는 효소를 발현시킴으로써 바닐린 생산성이 증가된 대장균 및 식품등급의 흡착제 수지를 이용함으로써 고농도의 페룰산의 바닐린으로의 생물전환을 달성할 수 있음을 발견하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

과제 해결수단

<9> 상기 기술적 과제를 해결하기 위하여 본 발명에서는 아세틸-CoA의 소비를 증가시키는 효소를 발현시킴으로써 바닐린 생산성이 증가된 대장균을 제공한다.

<10> 또한, 본 발명은 상기 대장균을 이용하여 페룰산의 전환에 의해 바닐린을 생산하는 방법을 제공한다.

<11> 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 페룰산을 페룰로일-CoA로 전환시키는 페룰로일-CoA 합성효소, 페룰로일-CoA를 바닐린으로 전환시키는 에노일-CoA 히드라타제/알돌라제, 및 아세틸-CoA를 CoA로 전환시키는 시트

레이트 합성효소를 과발현하는 바닐린 생산이 증가된 대장균을 제공한다.

<12> 본 발명의 일 구체예에서는 fcs 유전자 (서열번호 1)에 의해 코딩되는 페룰산을 페룰로일-CoA로 전환시키는 페룰로일-CoA 합성효소, 및 ech 유전자 (서열번호 2)에 의해 코딩되는 페룰로일-CoA를 바닐린으로 전환시키는 에노일-CoA 히드라타제/알돌라제를 과발현하는, 이전에 본 발명가에 의해 제조된 pTAHEF를 포함하는 대장균 균주 (Yoon et al., 2005 Biotechnol Lett 27, 1829-1832)에 *gltA* 유전자 (서열번호 3)에 의해 코딩되는 아세틸-CoA를 CoA로 전환시키는 시트레이트 합성효소를 과발현하는 바닐린 생산이 증가된 대장균을 제조하였다. 페룰로일-CoA를 바닐린으로 전환시키는 에노일-CoA 히드라타제/알돌라제의 작용에 의해 아세틸-CoA가 세포 내에 축적된다. 세포 내에 축적된 아세틸-CoA는 페룰로일-CoA의 바닐린으로의 반응을 저해하게 되며, 또한 아세틸-CoA로서 CoA의 포획으로 인해 페룰레이트의 페룰로일-CoA로의 반응을 위한 CoA의 부족 현상을 초래하게 된다.

<13> 따라서, 세포 내에 축적된 아세틸-CoA 소비를 증가시키는 균주를 개발하였다. 구체적인 방법으로, *gltA* 유전자에 의해 코딩되는 아세틸-CoA를 CoA로 전환시키는 시트레이트 합성효소를 과발현함으로써 세포 내에 축적된 아세틸-CoA를 감소시킴으로써, 바닐린 생산성을 증가시켰다. 예를 들면, 대장균의 게놈 DNA로부터 적당한 PCR 프라이머를 이용하여 *gltA* 유전자를 증폭하고, 증폭된 *gltA* 유전자를 pTAHEF의 *Xba*I 및 *Pst*I 자리 내로 혼입하여 pTAHEF-*gltA*를 구축함으로써 시트레이트 합성효소를 과발현할 수 있다.

<14> 본 발명의 일 구현예에 따른 대장균에서, 상기 대장균은 이소시트레이트를 α-케토글루타레이트로 전환시키는 이소시트레이트 탈수소효소 코딩 유전자 (*icdA* 유전자)가 결손된 것일 수 있다. 글리옥실레이트 우회로가 TCA 회로보다 더 짧은 경로를 가지지만, 글리옥실레이트 우회로로 아세틸-CoA의 유입은 TCA 회로(1 아세틸-CoA 분자)보다 2배이다 (2 아세틸-CoA 분자). 글리옥실레이트 우회로의 이용은 *icdA* 유전자의 결손에 의해 달성될 수 있다. 따라서, 본 발명에서는 이소시트레이트 탈수소 효소를 코딩하는 *icdA* 유전자를 결손시킨 균주에 *gltA* 유전자를 증폭시킴으로써 글리옥실레이트 우회로로 이소시트레이트의 더 많은 유동을 유도하였다. 이로 인해 아세틸-CoA의 소비를 증가시켰으며, 결국 바닐린의 생산성을 증가시킬 수 있었다.

<15> 본 발명의 대장균의 일 예는, fcs 유전자에 의해 코딩되는 페룰산을 페룰로일-CoA로 전환시키는 페룰로일-CoA 합성효소, 및 ech 유전자에 의해 코딩되는 페룰로일-CoA를 바닐린으로 전환시키는 에노일-CoA 히드라타제/알돌라제, 및 *gltA* 유전자에 의해 코딩되는 아세틸-CoA를 CoA로 전환시키는 시트레이트 합성 효소를 과발현하고, 이소시트레이트를 α-케토글루타레이트로 전환시키는 이소시트레이트 탈수소효소 코딩 유전자 (*icdA* 유전자)가 결손된 대장균 MG1655의 변이주이다.

<16> 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 a) 본 발명의 대장균을 페룰산 존재하에 배양하는 단계; 및 b) 상기 배양물로부터 바닐린을 회수하는 단계를 포함하는 페룰산의 전환에 의해 바닐린을 생산하는 방법을 제공한다.

<17> 본 발명의 바닐린 생산 방법은 본 발명의 대장균을 페룰산 존재하에 배양하는 단계를 포함한다. 상기 대장균 돌연변이 균주는 페룰산을 페룰로일-CoA로 전환시키는 페룰로일-CoA 합성효소, 페룰로일-CoA를 바닐린으로 전환시키는 에노일-CoA 히드라타제/알돌라제, 및 아세틸-CoA를 CoA로 전환시키는 시트레이트 합성효소를 과발현하는 바닐린 생산이 증가된 대장균일 수 있으며, 바람직하게는 페룰산을 페룰로일-CoA로 전환시키는 페룰로일-CoA 합성효소, 페룰로일-CoA를 바닐린으로 전환시키는 에노일-CoA 히드라타제/알돌라제, 및 아세틸-CoA를 CoA로 전환시키는 시트레이트 합성효소를 과발현하며, 여기에 이소시트레이트를 α-케토글루타레이트로 전환시키는 이소시트레이트 탈수소효소 코딩 유전자 (*icdA* 유전자)가 더 결손됨으로써 바닐린 생산이 증가된 대장균일 수 있다. 바람직하게는, fcs 유전자에 의해 코딩되는 페룰산을 페룰로일-CoA로 전환시키는 페룰로일-CoA 합성효소, 및 ech 유전자에 의해 코딩되는 페룰로일-CoA를 바닐린으로 전환시키는 에노일-CoA 히드라타제/알돌라제, 및 *gltA* 유전자에 의해 코딩되는 아세틸-CoA를 CoA로 전환시키는 시트레이트 합성 효소를 과발현하고, 여기에 이소시트레이트를 α-케토글루타레이트로 전환시키는 이소시트레이트 탈수소효소 코딩 유전자 (*icdA* 유전자)가 더 결손된 대장균 MG1655의 변이주이다.

<18> 기질로서 첨가되는 페룰산의 농도는 1.0-10.0 g/L일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

<19> 본 발명의 대장균 돌연변이 균주는 합성, 반합성, 또는 복합 배양 배지에서 배양할 수 있다. 배양 배지로는 탄소원, 질소원, 비타민 및 미네랄로 구성된 배지를 사용할 수 있다. 예를 들어, MRS (Man-Rogosa-Sharp) 액체 배지 및 우유가 첨가된 액체 배지를 사용할 수 있다. 탄소원으로는 전분, 글루코스, 수크로스, 갈락토스, 과당, 글리세롤 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 것을 사용할 수 있으며, 바람직하기로는 글리세롤이다. 질소원으로는 황산암모늄, 질산암모늄, 질산나트륨, 글루탐산, 카사미노산, 효모추출물, 펩톤, 트립톤, 대

두박 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 것을 사용할 수 있으며, 미네랄은 염화나트륨, 인산제이칼륨, 황산마그네슘 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 것을 사용할 수 있다.

<20> 미생물 배양 배지 내 상기 탄소원, 질소원 및 미네랄 각각은 리터당 10 내지 100 g, 5 내지 40 g 및 0.5 내지 4 g 을 이용할 수 있다.

<21> 상기의 통상의 배양 배지에 첨가되는 비타민은 비타민 A, 비타민 B, 비타민 C, 비타민 D, 비타민 E 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 비타민은 통상의 배양 배지에 상기에서 언급한 탄소원, 질소원, 미네랄 등의 배지와 동시에 첨가하거나, 멸균하여 준비된 배지에 첨가할 수 있다.

<22> 배양은 통상의 대장균 배양 조건으로 수행할 수 있으며, 예를 들어 약 15-45℃에서 약 10-72시간 동안 배양할 수 있다.

<23> 또한, 본 발명에 따른 미생물은 당업계에 공지된 통상적인 물리화학적 돌연변이 방법 등에 의해 이와 동등한 활성을 가지거나 또는 이보다 우수한 활성을 가지도록 개선 또는 개량될 수 있다.

<24> 본 발명의 바닐린 생산 방법은 상기 배양물로부터 바닐린을 회수하는 단계를 포함한다. 페룰산의 존재하에 본 발명의 대장균 돌연변이 균주를 배양하면 페룰산의 바닐린으로의 전환에 관여하는 효소의 활성에 의해 바닐린이 생성된다. 이렇게 생성된 바닐린은 당업계에 통상적으로 이용되는 방법을 이용하여 배양물로부터 회수할 수 있다.

<25> 본 발명의 일 구현예에 따른 방법에서, 단계 a)에서 상기 배양을 흡착제 수지의 존재하에서 수행할 수 있다. 페룰산에 의해 전환된 바닐린은 바닐린 생산을 저해하므로, 흡착제 수지를 이용하여 흡착함으로써 바닐린 생산을 증가시킬 수 있다. 바람직하게는, 상기 흡착제 수지는 Amberlite™ XAD-2, Amberlite™ XAD-7 및 Amberlite™ XAD-16과 같은 중성 수지이며, 더욱 바람직하게는 Amberlite™ XAD-2 수지이다. 상기 흡착제 수지는 Lewatit™ OC 1062 또는 OC 1064를 이용할 수도 있다.

<26> 본 발명의 일 구현예에 따른 방법에서, 상기 흡착제 수지의 농도는 10-70% (w/v)일 수 있다. 흡착제 수지의 농도가 상기 범위를 벗어나면 바닐린 생산 효율이 감소하기 때문이다. 바람직하게는, 상기 흡착제 수지의 농도는 40% 내지 60%(w/v), 더욱 바람직하게는 약 50% (w/v)이다.

효 과

<27> 본 발명에 따르면, 아세틸-CoA의 소비를 증가시키는 대장균을 개발하고, 또한 흡착제 수지를 이용함으로써 바닐린 생산성을 증가시킬 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<28> 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<29> **실시예**

<30> **재료 및 방법**

<31> **박테리아 균주 및 배양**

<32> 대장균 DH5α(F⁻ φ80d*lacZ*ΔM15Δ(*lacZYA-argF*)U169 *deoR* *rec*A1 *end*A1 *hsd*R17(r_K^-, m_K^+) *pho*A *sup*E44 λ⁻ *thi*-1 *gyr*A96 *rel*A1), 및 MG1655를 바닐린 생산에 이용하였다. 대장균 MG1655 Δ*icdA* 결손 균주는 Datsenko와 Wanner의 방법 (Datsenko KA and Wanner BL., 2000 Proc Natl Acad Sci U.S.A., 97(12):6640-6645)을 따라서 다음과 같이 제조하였다. *icdA* 유전자로 상동성 재조합에 의하여 선발마커 유전자인 카나마이신 유전자로 대체하기 위하여, pKD13 플라이스미드 (Datsenko KA and Wanner BL., 2000 Proc Natl Acad Sci U.S.A., 97(12):6640-6645)의 카나마이신 유전자에 결합하면서 *icdA* 유전자의 상류 말단과 하류 말단의 염기 서열을 갖는 PCR 프라이머를 제조하였다. 정방향 프라이머는 *icdA* 유전자의 상류 말단의 50bp 염기서열 다음에, 카나마이신 유전자 결합 염기 서열 20bp로 구성되어 있으며, 역방향 프라이머는 *icdA* 유전자의 하류 말단의 50bp 염기서열 다음에, 카나마이신 유전자 결합 염기 서열 20bp로 구성되어 있다. 정방향 프라이머의 유전자 염기서열은 5'-GAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACAAGGCAAGAAGATCACCCTGCAAAAATTCCGGGGATCCGTCGACC-3' (서열번호 4) 이고 역방향 프라

이머의 유전자 염기서열은 5'-CCAGCTGGTAGCCCCAGTCTTTAAACGCTCCTTCGGTGAACTTCATGATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG-3'(서열번호 5)이다. 카나마이신 유전자 결합부위는 밑줄로 표시하였다. 서열번호 4와 5의 올리고뉴클레오티드를 프라이머로 하고, pKD13을 주형으로 PCR 반응을 수행하였다. PCR은 중합효소로서, pfu 폴리머라제를 사용하고, 변성 온도는 94℃에서 30초, 어닐링 55℃에서 30초 및 중합 68℃에서 60초를 30회 반복하였다. PCR 반응산물은 전기영동 후에 겔 용출 (gel elution)을 통해서 분리 정제하였다.

<33> 상기의 정제된 PCR 반응산물은 pKD46 (Datsenko KA and Wanner BL., 2000 Proc Natl Acad Sci U.S.A., 97(12):6640-6645)을 포함한 MG1655 콤페턴트 세포 (competent cell)로 200mm 크기의 큐벳을 통해 2.5kV로 전기 형질전환 (electro transformation)하고, 곧바로 SOC 배지 (2% 박토 트립톤, 0.5% 효모 추출물, 10mM NaCl, 2.5mM KCl, 10mM $MgCl_2$, 10mM $MgSO_4$, 20mM 포도당) 1ml를 첨가하여, 37℃에서 1시간 동안 흔들 배양기 (shaking incubator)에서 세포를 키운 후, 카나마이신 (50μgml^{-1})을 포함하고 있는 평판 배지에 500$\mu\ell$를 스프레딩하여 37℃에서 배양하였다. 카나마이신 저항성을 가진 평판 배지의 콜로니를 콜로니 PCR을 통하여 카나마이신 유전자가 상동성 재조합에 의해서 *icdA* 유전자를 대체했는지를 확인하였다. 콜로니 PCR에 사용된 프라이머는 대장균 MG1655 염색체 상에서 *icdA* 유전자 바로 인접한 영역에 바로 결합하도록 제조하였다. 정방향 프라이머는 5'-CATCGGTGAACTGCGGAAGAACATC-3'(서열번호 6), 역방향 프라이머는 5'-GACCGGCCAGCCTACCCCAAAACTAC-3'(서열번호 7)이다. 콜로니 PCR은 Taq 폴리머라제를 통해 변성 94℃에서 30초, 어닐링 55℃에서 60초 및 중합 72℃에서 20초를 30회 반복하였다.

<34> 얻어진 대장균 MG1655 Δ*icdA* 결손 균주를 37℃에서 진탕 (180rpm) 수조에서 앰피실린 (100μgml^{-1})을 포함하는 2YT 배지 (16g/L 트립톤, 10g/L 효모 추출액, 및 5g/L 염화나트륨)에서 배양하였다. 페룰산 (Sigma-Aldrich)을 2YT 배지에 용해하고, pH를 NaOH를 이용하여 pH 7.0으로 조절한 10%(w/v)의 페룰산 공급액을 제조하였다. 다양한 농도의 페룰산을 상기 배지에 첨가하고, 바닐린 생산에 대한 효과를 시험하였다. 얻어진 대장균 MG1655 Δ*icdA* 결손 균주는 이하 실시예3, 4 및 5에서 재조합 균주를 제조하기 위한 숙주세포로 사용되었다.

<35> **_gltA_를 포함하는 바닐린 플라스미드의 구축**

<36> 시트레이트 합성효소를 코딩하는 *gltA* 유전자를 하기 프라이머를 이용하여 대장균 MG1655의 게놈 DNA로부터 *Pfx* 중합효소 (Invitrogen, USA)를 이용하여 PCR에 의해 증폭하였다: 정방향 프라이머 *gltA*-F, 5'-GC*TCTAGA*GGAG**ACCTTAAATGG**CTG-3'(서열번호 8) 및 역방향 프라이머 *gltA*-R, 5'-G*CTGCAG*CA**TTA**ACGCTTGATATCGC-3'(서열번호 9). 상기 프라이머 서열에서, 코딩 영역, 개시 또는 정지 코돈, 및 제한효소 자리는 각각 진한 글씨, 밑줄, 및 이탤릭체로 나타낸다. 증폭된 *gltA* 유전자를 pBluescript 벡터 (Stratagene Co.; Alting-MeesMA and Short JM, 1989 Nucleic Acids Res. 17 (22): 9494)의 *Eco*RV 자리에 서브클로닝하여 pBgltA를 구축한 후, 서열을 확인하였다. pBgltA로부터 *Xba*I 및 *Pst*I에 의해 절단된 유전자 *gltA*를 pTAHEF의 *Xba*I 및 *Pst*I 자리 내로 혼입하여 pTAHEF-*gltA*를 구축하였다. 플라스미드 pTAHEF는 Yoon et al., 2005 Biotechnol Lett 27, 1829-1832에 기재된 바와 같이 구축하였다. 간단하게, 아미콜라톱시스 (*Amycolatopsis* sp.) 균주 HR167 (DSM 9991)의 게놈 DNA로부터 수득된 *ech* (서열번호 1) 및 *fcs* (서열번호 2)를 포함하는 DNA 단편을 *Nhe*I 및 *Bam*HI을 이용하여 pDAHEF (Yoon et al., Biotechnology and Bioprocess Engineering 2005, 10:1-1)로부터 잘라내고, pTrc99A (NCBI Genbank 허가 번호 M22744: 서열번호 10)의 *Nco*I 및 *Bam*HI 자리에 도입하여 pTAHEF를 수득하였다 (도 2). 도 2는 pTAHEF 벡터의 제조과정을 나타내는 도면이다. 형질전환 및 기타 표준 분자생물학 기술은 (Sambrook et al, 2001 Molecular Cloning, 3rd Ed. Cold spring Harbor Laboratory Press, New York)에 기재된 바와 같이 수행하였다.

<37> **바닐린 생산을 위한 XAD-2 수지의 적용**

<38> XAD-2 수지를 Aldrich (USA)로부터 구입하였다. XAD-2 수지는 소수성 물질로 교차 결합된 폴리스티렌 (polystyrene)으로 20~60 mesh의 크기를 지닌 구슬 형태이며, 물에 녹지 않는다. 이용 전에, 상기 수지를 메탄올에 적셔, 불순물을 제거한 후, 멸균 증류수로 철저히 세정하여 잔류 메탄올을 제거하였다. 배양 배지에 첨가하기 전에, 상기 수지를 2YT 배지로 충분히 세정하였다. 48 시간 배양 후에, 상기 수지를 원심분리에 의해 소비된 배양 배지로부터 분리하고, 수지에 흡착된 바닐린을 정량화를 위해 에탄올로 3회 추출하였다.

<39> **바닐린 및 페룰산의 분석**

<40> 바닐린 및 페룰산 (배양 브로쓰 및 XAD-2 수지로부터 추출된 에탄올 중의)을 이전에 기재된 바와 같이 역상 HPLC 분석에 의해 분석하였다 (Yoon et al,, 2005 Biotechnol Bioprocess Eng 10, 378-384; 및 Yoon et al.,

2005 Biotechnol Lett 27, 1829-1832). 간단하게, 배양 브로쓰 중의 바닐린 및 페룰산을 Sentry guard 칼럼 (20x4.6mm, Waters, USA)을 갖는 Symmetry C18 칼럼 (250 x 4.6mm, 5㎛, Waters, USA)을 이용하여 역상 HPLC 분석에 의해 정량하였다. 이동상은 1 mL/min의 유속으로 다상 구배 (multiphasic gradient)에 의해 20 mM 아세트산나트륨, pH 6.0의 용매 A, 및 메탄올의 용매 B를 이용하였다. 용매 B의 비율은 0 분에 0% (v/v)에서 7분에 50% (v/v)로 증가한 후, 10분에 45% (v/v)로, 최종적으로 20분에 0% (v/v)로 감소하였다. 상기 용출된 대사 산물은 260 nm 및 40℃에서 검출하였다.

<41> **실시예 1: 바닐린 생산에 대한 *gltA* 증폭의 효과**

<42> 페룰산으로부터 바닐린 생산 동안 생성된 아세틸-CoA는 시트레이트 합성효소를 코딩하는 *gltA* 유전자에 의해 CoA로 전환될 수 있다 (도 1). 그리하여, *gltA*의 증폭은 아세틸-CoA를 CoA로 효율적으로 전환하여, 페룰로일-CoA를 통한 바닐린의 증진된 생산을 초래할 수 있다. 이를 조사하기 위해, 대장균의 *gltA* 유전자를 *fcs* 및 *ech* 유전자를 포함하고 있는 pTAHEF에 도입하여, pTAHEF-*gltA*를 수득하였다. 바닐린 생산을 전구체로서 2.0 g/L의 페룰산을 포함하는 2YT 배지를 이용하여 수행하였다. 바닐린 생산의 양 및 속도는 대장균 DH5α-pTAHEF와 비교하여 pTAHEF-*gltA*를 갖는 대장균 DH5α에서 훨씬 높았다 (도 3). pTAHEF 및 pTAHEF-*gltA*에서 바닐린 생산의 최대량은 36시간에 각각 0.92 g/L 및 1.50 g/L 이었다. pTAHEF-*gltA*의 경우에, 페룰산은 12시간에 거의 완전히 소모된 반면 (89.4%), pTAHEF의 경우에는 54.4%가 소모되었다. 이는 pTAHEF-*gltA* 균주가 pTAHEF 균주보다 페룰산 소비에서 훨씬 빠르다는 것을 나타낸다. 바닐린의 몰 전환 수율 (소비된 페룰산 mM 당 생산된 바닐린 mM의 %)은 또한 *gltA* 증폭이 없는 62.2%와 비교하여 *gltA* 증폭에 의해 98.9%로 현저하게 증가하였다. 2가지 재조합 균주 사이에 세포 성장 속도에서 어떤 차이도 관찰되지 않았다. 상기 관찰은 *gltA* 유전자의 증폭이 세포 성장에 어떤 영향 없이 pTAHEF-*gltA*에서 바닐린 생산을 증진시킨다는 것을 제시한다.

<43> **실시예 2: 다양한 농도의 페룰산의 존재하에 바닐린의 생산**

<44> 다양한 농도의 페룰산을 2YT 배지에 초기에 첨가하였다. *gltA* 증폭이 페룰산 소비를 촉진하고, 페룰산이 도 3에서 제한적인 것으로 생각되므로, 페룰산 농도 (제한 또는 여분)에 따른 *gltA* 효과를 조사하였다. pTAHEF-*gltA*를 갖는 대장균 DH5α에 의한 바닐린의 생산은 초기에 첨가된 모든 페룰산 농도에서 대장균 DH5α-pTAHEF보다 높았다 (도 4). 48시간에 3.0 g/L의 초기 페룰산 농도에서 pTAHEF-*gltA* 균주는 pTAHEF 균주에 의해 생산된 0.91 g/L의 바닐린보다 2배 이상 높은 1.98 g/L의 가장 많은 바닐린을 생산하였다. pTAHEF-*gltA* 균주에 의한 바닐린 생산은 3.0 g/L 초과 및 미만의 초기 페룰산에서 감소한 반면, pTAHEF에 의한 바닐린 생산은 2.0g/L 이상의 초기 페룰산 농도에서 0.72 g/L - 1.02 g/L로 거의 유사하였다. 1.0 g/L의 초기 페룰산 농도에서 95.0%의 바닐린의 몰 전환 수율은 *gltA* 증폭에 의해 수득되었으며, 이는 pTAHEF 균주의 69.5%보다 훨씬 높았다. 다른 초기 페룰산 농도에서도 pTAHEF-*gltA* 균주의 몰 수율은 pTAHEF 균주의 것보다 현저하게 높았다. 3.0 g/L의 초기 페룰산 농도에서 pTAHEF-*gltA* 균주에 의해 페룰산은 거의 완전히 고갈되었으나, pTAHEF 균주에서는 비교적 높은의 잔류 페룰산이 배양액에서 관찰되었다. 상기 결과는 pTAHEF-*gltA* 균주가 pTAHEF 균주보다 페룰산을 더욱 효율적으로 이용한다는 것을 나타낸다. pTAHEF 및 pTAHEF-*gltA* 사이에 세포 성장의 현저한 차이는 없었다. 증가된 초기 페룰산 농도에 대해 세포 성장의 점차적인 감소가 관찰되었다. pTAHEF-*gltA*에 의한 바닐린 생산이 pTAHEF보다 높았지만, 세포 성장은 유사하거나 또는 약간 높았다.

<45> **실시예 3: 바닐린 생산에 대한 TCA 회로 및 글리옥실레이트 우회로(bypass)의 효과**

<46> *gltA* 증폭에 의해 TCA 회로를 통한 아세틸-CoA 소비의 증가가 바닐린 생산을 증진시키므로 (도 4), TCA 회로보다 오히려 글리옥실레이트 우회로를 세포가 이용하게 함으로써 바닐린 생산의 증가를 조사하였다. 글리옥실레이트 우회로가 TCA 회로보다 더 짧은 경로를 가지지만, 글리옥실레이트 우회로로 아세틸-CoA의 유입은 TCA 회로(1 아세틸-CoA 분자)보다 2배이다 (2 아세틸-CoA 분자). 글리옥실레이트 우회로의 이용은 *icdA* 유전자의 결실에 의해 달성될 수 있다. 이소시트레이트 탈수소효소를 코딩하는 *icdA*의 결실은 글리옥실레이트 우회로로 이소시트레이트의 유동을 유도할 것이다 (도 1).

<47> pTAHEF가 도입된 *icdA* 유전자가 결실된 MG1655 균주 (MG1655△*icdA*-pTAHEF)를 3.0 g/L의 페룰산의 초기 첨가와 함께 48시간 동안 2YT 배지에서 배양하였다 (도 5). 배양 48 시간에서 바닐린 생산은 모균주인 MG1655-pTAHEF의 0.79 g/L와 비교하여 *icdA* 결손 균주인 MG1655△*icdA*-pTAHEF 균주에서 2.20g/L로 바닐린 생산의 현저한 증가가 있었다.

<48> 페룰산 소비는 48시간에 초기 첨가된 페룰산의 거의 95.0% (w/v) 소비로 *icdA* 결손 균주에서 페룰산은 더욱 신속하게 이용되었다. *icdA* 결손 균주의 세포 성장은 48시간에 OD_{600nm} 값이 모균주의 5.5와 비교하여 4.5로서 약간

감소하였다. *icdA* 결손 균주의 세포 성장의 감소는 바닐린 생산 증가에 의한 더욱 높은 농도의 바닐린의 저해에 의한 것으로 생각된다.

<49> **실시예 4: 바닐린 생산에 대한 *gltA* 증폭 및 글리옥실레이트 우회로의 조합 효과**

<50> pTAHEF-*gltA*를 갖는 *icdA* 유전자가 결손된 대장균 MG1655 (MG1655△*icdA*-pTAHEF-*gltA*)을 이용하여 바닐린 생산에 대한 *icdA* 결손과 *gltA* 증폭의 조합 효과를 조사하였다 (도 6). 매우 흥미롭게도, 배양 24시간 만에 pTAHEF-*gltA*를 갖는 *icdA* 결손 균주에 의한 바닐린 생산은 1.97g/L로 48시간에서의 생산량인 2.32g/L에 근접하였다. 그러므로, 대략 48 시간에서의 바닐린 생산량의 85.0%가 초기 첨가된 페룰산의 87.2%의 소비와 함께 24시간 만에 생산되었다.

<51> 다른 한편으로는, pTAHEF를 갖는 *icdA* 결손 균주는 도 5에서 알 수 있는 바와 같이 초기 첨가된 페룰산의 88.6%를 소비하면서 24시간에 단지 1.21g/L의 바닐린을 생산하였다. 바닐린의 몰 전환 수율은 배양 24시간에 *gltA* 증폭에 의해 56.0% (도 5)에서 92.0%로 증가하였다. 상기 결과는 *icdA* 유전자 결실과 함께 *gltA* 유전자 증폭이 바닐린 생산 속도를 증가시켜서 배양의 초기 24시간 동안 바닐린 생산을 현저하게 향상시킨다는 것을 강하게 제시한다. MG1655△*icdA*-pTAHEF-*gltA* 균주의 48시간에서의 몰 전환 수율은 98.4%로 다른 균주들에 비하여 현저하게 개선되었다.

<52> 본 발명자들은 MG1655△*icdA*/pTAHEF-*gltA* 균주를 부다페스트조약 하의 국제기타기관인 한국생명공학연구원 유전자원센터 유전자 은행 (KCTC)에 2008년 1월2일자로 기탁하였다(수탁번호 KCTC 11253BP).

<53> **실시예 5: XAD-2 수지를 이용한 바닐린 생산**

<54> 도 6에서, 24시간 후에 바닐린 생산의 추가적인 현저한 증가가 없었으므로, pTAHEF-*gltA*를 갖는 *icdA* 결손 균주에서 페룰산의 제한이 있는지 의심되었다. 그러나, 페룰산 농도의 증가와 함께, 배양 동안 초기 페룰산 농도 및 증가된 바닐린 농도의 조합된 저해를 예상할 수 있다. XAD-2 흡착 수지를 이용한 바닐린 (다수) 및 페룰산 (소수) 독성의 감소는 바닐린 내성 대장균 NTG (*N*-메틸-*N*'-니트로-*N*-니트로소구아니딘) 돌연변이 균주에서 바닐린 생산을 개선하였다. 그러므로, pTAHEF-*gltA*를 갖는 *icdA* 결손 균주에 대해 동일한 XAD-2 수지를 이용하여 바닐린 생산을 개선하였다. XAD-2 수지는 배양 배지로부터 바닐린을 흡착하는 것으로 여겨진다.

<55> pTAHEF-*gltA*를 갖는 *icdA* 결손 균주를 50% (w/v) XAD-2 수지의 보충과 함께, 10.0 g/L의 초기 페룰산을 포함하는 2YT 배지에서 키웠다. 5.20g/L의 가장 높은 바닐린 생산은 7.59g/L의 페룰산을 소비하면서 pTAHEF-*gltA*를 갖는 *icdA* 결손 균주에 의해 단지 24시간에 달성되었으며, 그 후에 바닐린 생산의 추가의 증가 없이 정체기에 도달하였다 (도 7). 87.0%의 몰 전환 수율은 XAD-2 수지의 첨가로 pTAHEF-*gltA*를 갖는 *icdA* 결손 균주에 의해 24시간에 달성되었다. 수지가 없는 동일한 균주는 1.95g/L의 페룰산을 소비하면서 단지 1.15g/L의 바닐린을 생산하였다. 10.0g/L의 유리 페룰산은 대장균의 세포 성장 및 바닐린 생산에 매우 독성이었다. XAD-2 수지를 첨가하는 경우에, 실질적인 양의 5.55 g/L의 페룰산이 페룰산의 독성 수준을 감소시키는 수지에 의해 흡착되었다 (도 7C).

<56> 생산된 유리 바닐린의 농도는 또한 시간에 따라 크게 증가하지 않았으므로, 세포에 대한 이의 독성 효과를 감소시켰는데, 이는 생산된 바닐린이 수지에 의해 흡착되었기 때문이다 (도 7C). 그러므로, 수지에 의해 감소된 페룰산 및 바닐린 독성은 바닐린 생산을 현저하게 증가시켰다. 수지의 존재하에 세포 성장은 이의 부재보다 낮았다. 더 낮은 세포 성장은 첨가된 수지에 현저한 양의 세포 (약 70%)의 흡착에 기인하였다. 그러므로, 수지 세포 성장은 흡착된 세포 양을 고려하면 훨씬 높을 것이다.

도면의 간단한 설명

<57> 도 1은 대장균에서 TCA 회로 및 글리옥실레이트 우회로와 연결된 페룰산에서 바닐린의 생산 동안 아세틸-CoA로부터 코엔자임 A (CoA)의 재순환을 보여주는 모식도이다. 시트레이트 합성효소를 코딩하는 *gltA*는 시트레이트가 CoA를 방출하기 위해 아세틸-CoA로부터 합성되는 TCA 회로의 첫번째 반응을 촉매한다. *aceAB*에 의해 코딩되는 글리옥실레이트 우회로 효소인 이소시트레이트 리아제 및 말레이트 합성 효소는 말레이트를 글리옥실레이트를 통해 이소시트레이트로부터 합성한다. 코엔자임 A는 글리옥실레이트에서 말레이트로 가는 동안 아세틸-CoA로 방출된다. *icdA*의 결실에 의해 유도된 글리옥실레이트 우회로는 2개의 아세틸-CoA로부터 2개의 CoA의 재순환을 야기할 수 있다. 유전자 및 해당 효소는 하기와 같다: *fcs*, 페룰로일-CoA 합성효소; *ech*, 에노일-CoA 히드라타제/알돌라제; *gltA*, 시트레이트 합성효소; *icdA*, 이소시트레이트 탈수소효소; *aceA*, 이소시트레이트 리아제; *aceB*, 말레이트 합성효소.

<58> 도 2는 pTAHEF 벡터의 제조과정을 나타내는 도면이다.

<59> 도 3은 대장균 DH5α에서 페룰산으로부터 바닐린의 생산에 대한 *gltA* 유전자의 효과를 보여준다. 배양을 37℃에서 48시간 동안 2 g/L 페룰산을 포함하는 2YT 배지에서 수행하였다. 채운 및 빈 기호는 각각 *gltA* 유전자 증폭의 존재 및 부재의 경우를 나타낸다. 원, 사각형, 및 삼각형은 각각 바닐린의 농도, 페룰산의 농도, 및 세포 성장을 나타낸다.

<60> 도 4는 대장균 DH5α에서 다양한 양의 페룰산으로부터 바닐린의 생산을 보여준다. 배양을 37℃에서 48시간 동안 2YT 배지에서 수행하였다. 채운 및 빈 막대는 각각 *gltA* 유전자 증폭의 존재 및 부재의 경우를 나타낸다.

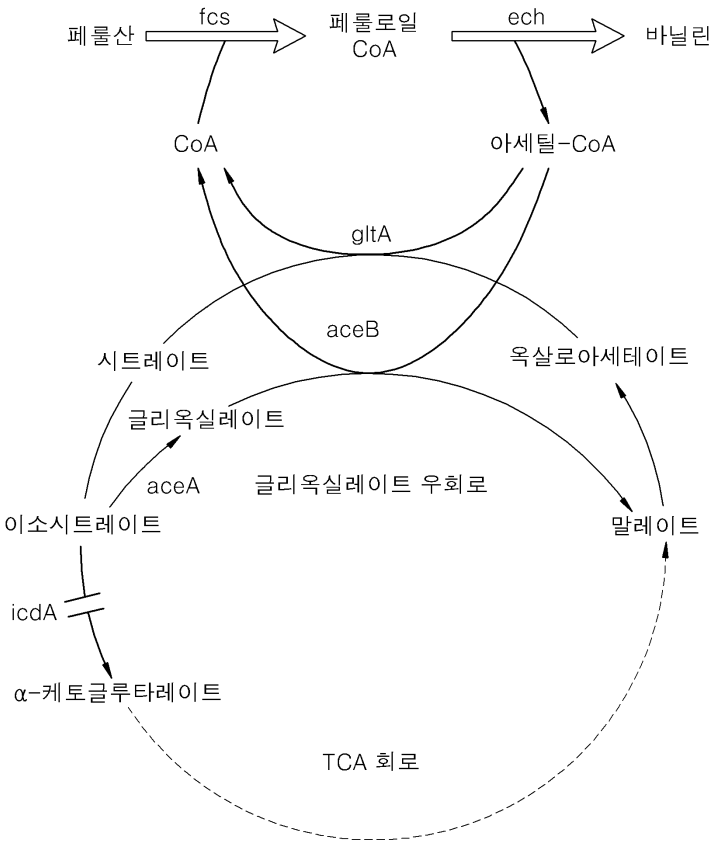
<61> 도 5는 pTAHEF를 갖는 대장균 MG1655과 *icdA* 결손 균주로부터 바닐린의 생산을 보여준다. 배양을 37℃에서 48시간 동안 3.0 g/L 페룰산을 포함하는 2YT 배지에서 수행하였다. 빈 및 채운 막대는 각각 24시간 및 48시간에 바닐린 생산을 나타낸다.

<62> 도 6은 pTAHEF-*gltA*를 갖는 대장균 MG1655 및 *icdA*의 결손 균주로부터 바닐린의 생산을 보여준다. 배양을 37℃에서 48시간 동안 3.0 g/L 페룰산을 포함하는 2YT 배지에서 수행하였다. 빈 및 채운 막대는 각각 24시간 및 48시간에 바닐린 생산을 나타낸다.

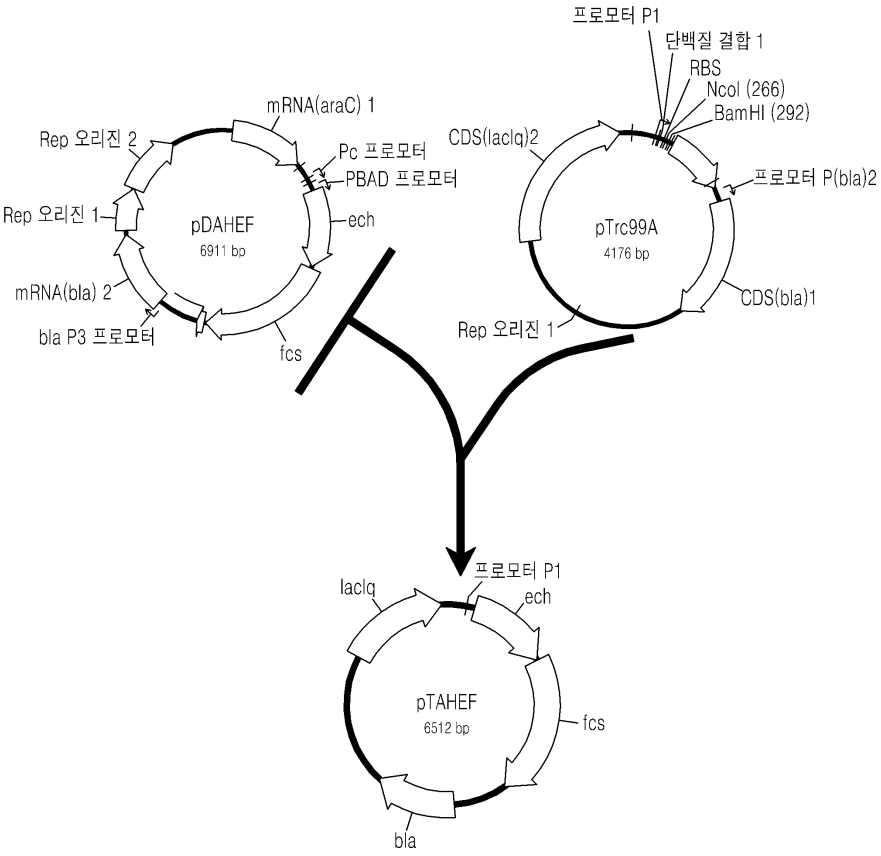
<63> 도 7은 pTAHEF-*gltA*를 갖는 *icdA* 결손 균주의 바닐린 생산에 대한 XAD-2 수지의 효과를 보여준다. 배양을 37℃에서 48시간 동안 10.0 g/L 페룰산을 포함하는 2YT 배지에서 수행하였다. A 및 B에서, 채운 및 빈 기호는 각각 50% (w/v) XAD-2 수지의 첨가의 존재 및 부재의 경우를 나타낸다. 원, 사각형 및 삼각형은 각각 바닐린의 농도, 페룰산의 농도, 및 세포 성장을 나타낸다. (C) 빈 + 음영, 단지 음영 및 단지 빈 영역은 각각 페룰산 및 바닐린의 수지 흡착된 + 수지 비흡착된 부분 (전체), 수지 흡착된 부분 및 수지 비흡착된 부분을 나타낸다.

도면

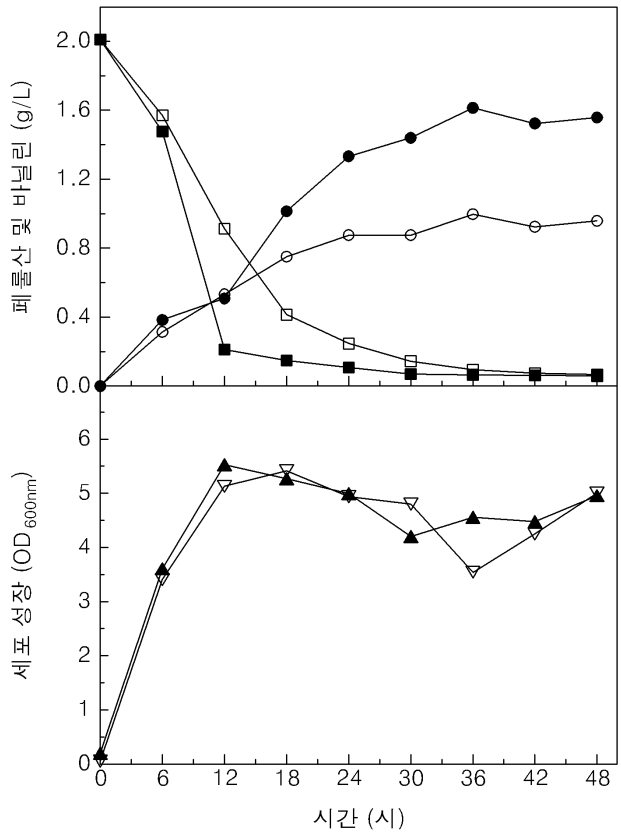
도면1



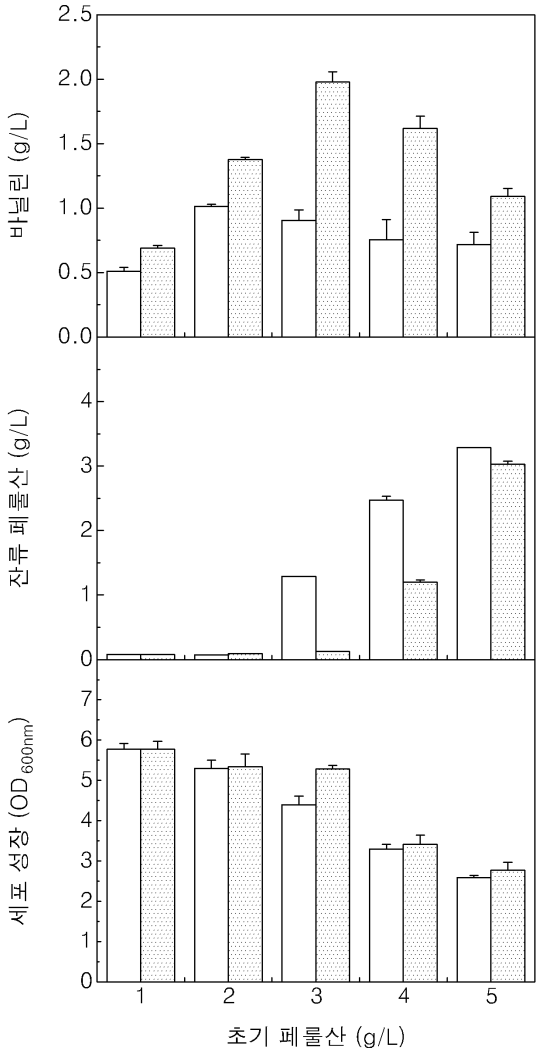
도면2


프로모터 P1
단백질 결합 1
RBS
NcoI (266)
BamHI (292)
mRNA(araC) 1
Rep 오리진 2
Pc 프로모터
PBAD 프로모터
CDS(laclq)2
프로모터 P(bla)2
Rep 오리진 1
pDAHEF
6911 bp
ech
pTrc99A
4176 bp
mRNA(bla) 2
bla P3 프로모터
fcs
CDS(bla)1
Rep 오리진 1
프로모터 P1
laclq
ech
pTAHEF
6512 bp
fcs
bla

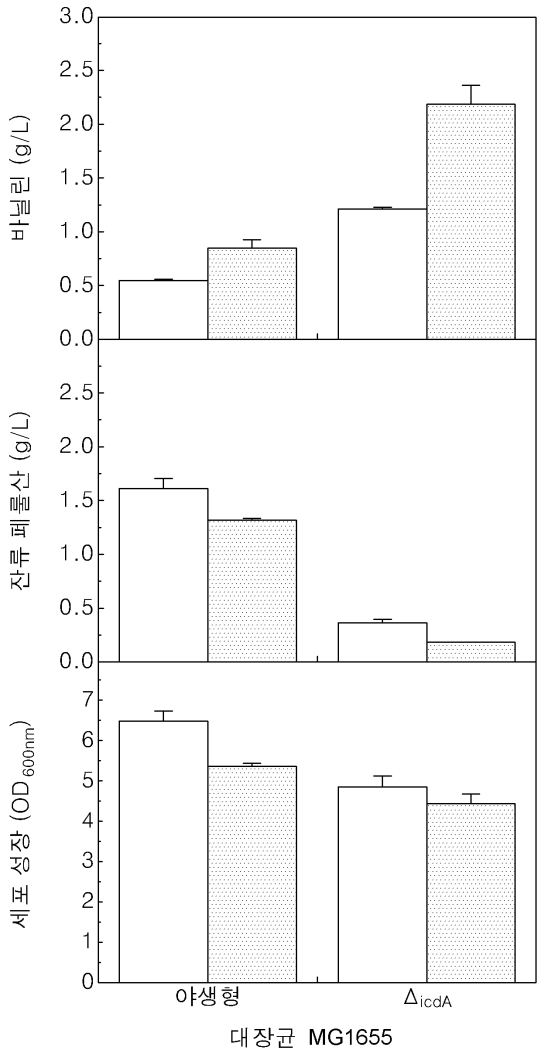
도면3


2.0
1.6
1.2
0.8
0.4
0.0
페룰산 및 바닐린 (g/L)
6
5
4
3
2
1
0
세포 성장 (OD600nm)
0
6
12
18
24
30
36
42
48
시간 (시)

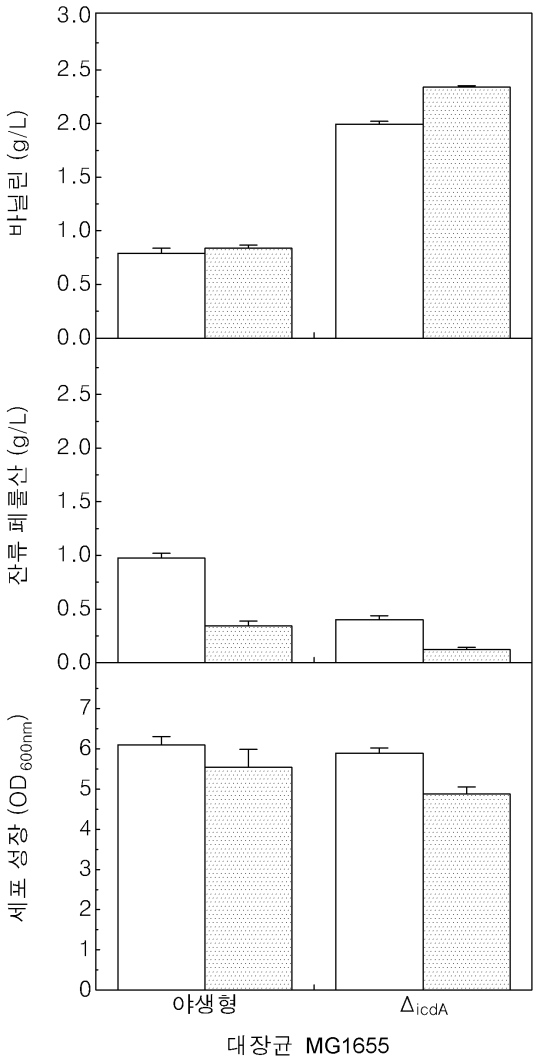
도면4


바닐린 (g/L)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
잔류 페룰산 (g/L)
4
3
2
1
0
세포 성장 (OD600nm)
7
6
5
4
3
2
1
0
1
2
3
4
5
초기 페룰산 (g/L)

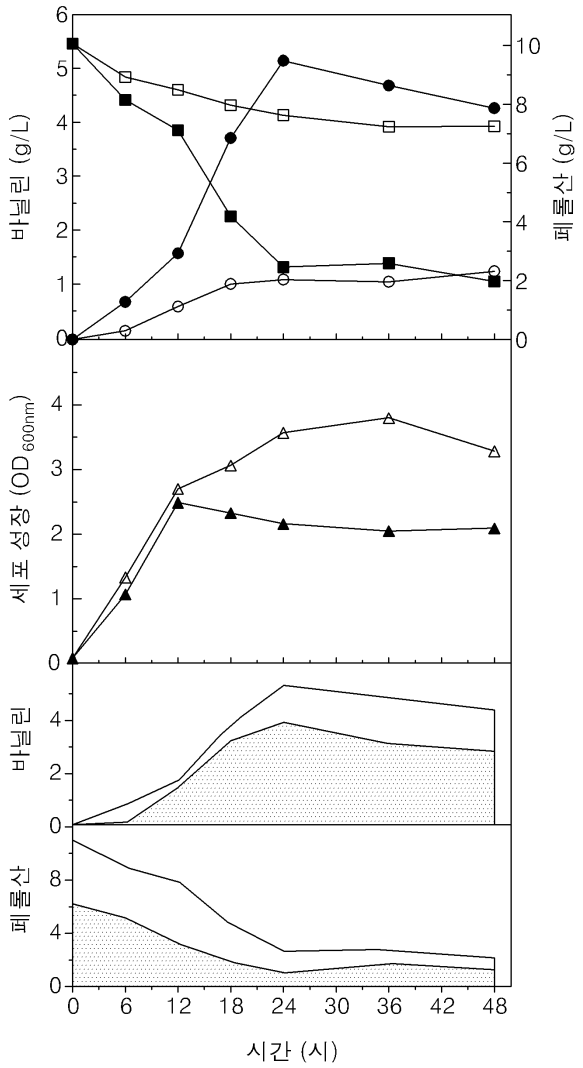
도면5



도면6


바닐린 (g/L)
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
잔류 페룰산 (g/L)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
세포 성장 (OD_{600nm})
7
6
5
4
3
2
1
0
야생형
Δ_{icdA}
대장균 MG1655

도면7



서 열 목 록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY
<120> E. coli strain for increasing acetyl-CoA consumption and method of producing vanillin using the strain and adsorbent resin

<130> PN075382

<160> 11

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 864
<212> DNA

<213> Amycolatopsis sp. HR167

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(864)
<223> ech gene

<400> 1
atgagcacag cggtcggcaa cgggcgggtc cggacggagc cgtggggcga gacggttctg 60

gtggagttcg acgaaggcat cgcctgggtc atgctcaacc ggccggacaa gcgcaacgcc 120

atgaacccca ccctgaacga cgagatggtg cgggtgctgg accacctgga gggcgacgac 180

cgctgccgag tgctggtgct gaccggcgcg ggcgagtcgt tctccgcggg catggacctc 240

aaggagtact tccgcgaggt cgacgccacc ggcagcaccg ccgtgcagat caaggtgcgg 300

cgggccagcg cggagtggca gtggaagcgg ctggcgaact ggagcaagcc gacgatcgcg 360

atggtcaacg gctggtgctt cggcggcgcg ttcaccccgc tggtggcctg cgacctggcc 420

ttcgccgacg aggacgcgcg gttcgggctg tccgaggtca actggggcat cccgccgggc 480

ggcgtggtca gccgggcgct ggcggcgacc gtgccgcagc gcgacgcgct gtactacatc 540

atgaccggtg agcccttcga cggcccgccg cgcgcggaga tgcgcctggt caacgaggcg 600

ctgcccgccg accggctgcg ggagcgcacc cgcgaggtgg cgctgaagct cgcgtcgatg 660

aaccaggtgg tcctgcacgc ggccaagacc gggtacaaga tcgcccagga gatgccctgg 720

gagcaggccg aggactacct ctacgccaag ctcgaccagt cccagttcgc cgacaaggcg 780

ggcgcccgcg ccaaggggct gacccagttc ctcgaccaga agtcctaccg gcccggcctg 840

agcgccttcg acccggagaa gtag 864

<210> 2

<211> 1476
<212> DNA
<213> Amycolatopsis sp. HR167

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1476)
<223> fcs gene

<400> 2
gtgcgcaacc agggtctggg ctcctggccg gtgcgccgcg ccaggatgag cccgcacgcg 60

acagccgtcc ggcacggcgg gacggcgctg acctacgccg agctgtcccg ccgcgtcgcg 120

cggctcgcca acgggctgcg ggccgccggg gtccgccccg gcgaccgggt ggcctacctc 180

gggccgaacc acccggccta cctggagacc ctgttcgcgt gcgggcaggc cggcgcggtg 240

ttcgtgccgc tgaacttccg gctgggcgtc ccggaactgg accacgcgct ggccgactcc 300

ggcgcgtcgg tccttatcca caccccggag cacgcggaga cggtcgcggc gctcgccgcc 360

ggccggctgc tgcgcgtgcc cgcgggcgag ctggacgccg cggacgacga gccgcccgac 420

ctgcccgtcg gcctcgacga cgtgtgcctg ctgatgtaca cctcgggcag caccggacgc 480

cccaagggcg cgatgctcac ccacggcaac ctcacctgga actgcgtcaa cgtcctggtg 540

gagaccgacc tggcgagcga cgagcgggca ctggtcgccg cgccgctgtt ccacgccgcc 600

gcgctcggca tggtgtgcct gcccaccctg ctcaagggcg gcacggtgat cctgcactcc 660

gcgttcgacc ccggcgccgt gctgtccgcg gtggaacagg agcgggtcac gctcgtgttc 720

ggcgtgccca cgatgtacca ggcgatcgcc gcgcacccgc ggtggcgcag cgccgacctg 780

tccagcctgc ggaccctgct gtgcggcggc gcgccggtgc ccgccgacct cgccagccgc 840

tacctcgacc gcgggctcgc gttcgtgcag ggctacggca tgaccgaggc cgcgccgggc 900

gtgctggtcc tcgaccgcgc gcacgtcgcg gagaagatcg gctccgccgg ggtgccctcg 960

ttcttcaccg acgtgcggct ggccggcccg tccggcgagc cggtgccgcc gggggagaag 1020

ggcgagatcg tggtcagcgg gcccaacgtg atgaagggct actggggcag gccggaggcg 1080

accgccgagg tgctgcgcga cgggtggttc cactccggcg acgtggccac cgtggacggc 1140

gacgggtact tccacgtcgt cgaccggctc aaggacatga tcatctccgg cggcgagaac 1200

atctacccgg ccgaggtgga gaacgagctg tacggctacc cgggtgtgga ggcgtgcgcc 1260

gtgatcggcg tgccggaccc gcgctggggc gaggtgggca aggcggtcgt cgtgcccgcc 1320

gacgggagcc gcatcgacgg cgacgagctg ctggcctggc tgcgcacccg gctggccggg 1380

tacaaggtgc ccaagtcggt cgagttcacc gaccggctgc ccacgaccgg ctccggcaag 1440

atcctcaagg gcgaggtccg ccgccgcttc ggctga 1476

<210> 3
<211> 1284
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1284)
<223> glt gene

<400> 3
atggctgata caaaagcaaa actcaccctc aacggggata cagctgttga actggatgtg 60

ctgaaaggca cgctgggtca agatgttatt gatatccgta ctctcggttc aaaaggtgtg 120

ttcacctttg acccaggctt cacttcaacc gcatcctgcg aatctaaaat tacttttatt 180

gatggtgatg aaggtatttt gctgcaccgc ggtttcccga tcgatcagct ggcgaccgat 240

tctaactacc tggaagtttg ttacatcctg ctgaatggtg aaaaaccgac tcaggaacag 300

tatgacgaat ttaaaactac ggtgacccgt cataccatga tccacgagca gattacccgt 360

ctgttccatg ctttccgtcg cgactcgcat ccaatggcag tcatgtgtgg tattaccggc 420

gcgctggcgg cgttctatca cgactcgctg gatgttaaca atcctcgtca ccgtgaaatt 480

gccgcgttcc gcctgctgtc gaaaatgccg accatggccg cgatgtgtta caagtattcc 540

attggtcagc catttgttta cccgcgcaac gatctctcct acgccggtaa cttcctgaat 600

atgatgttct ccacgccgtg cgaaccgtat gaagttaatc cgattctgga acgtgctatg 660

gaccgtattc tgatcctgca cgctgaccat gaacagaacg cctctacctc caccgtgcgt 720

accgctggct cttcgggtgc gaacccgttt gcctgtatcg cagcaggtat tgcttcactg 780

tggggacctg cgcacggcgg tgctaacgaa gcggcgctga aaatgctgga agaaatcagc 840

tccgttaaac acattccgga atttgttcgt cgtgcgaaag acaaaaatga ttctttccgc 900

ctgatgggct tcggtcaccg cgtgtacaaa aattacgacc cgcgcgccac cgtaatgcgt 960

gaaacctgcc atgaagtgct gaaagagctg ggcacgaagg atgacctgct ggaagtggct 1020

atggagctgg aaaacatcgc gctgaacgac ccgtacttta tcgagaagaa actgtacccg 1080

aacgtcgatt tctactctgg tatcatcctg aaagcgatgg gtattccgtc ttccatgttc 1140

accgtcattt tcgcaatggc acgtaccgtt ggctggatcg cccactggag cgaaatgcac 1200

agtgacggta tgaagattgc ccgtccgcgt cagctgtata caggatatga aaaacgcgac 1260

tttaaaagcg atatcaagcg ttaa 1284

<210> 4
<211> 70
<212> DNA

<213> Forward primer

<400> 4
gaaagtaaag tagttgttcc ggcacaaggc aagaagatca ccctgcaaaa attccgggga 60

tccgtcgacc 70

<210> 5
<211> 70
<212> DNA
<213> Reverse primer

<400> 5
ccagctggta gccccagtct ttaaacgctc cttcggtgaa cttcatgatg tgtaggctgg 60

agctgcttcg 70

<210> 6
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer

<400> 6
catcggtgaa ctgcggaaga acatc 25

<210> 7
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse primer

<400> 7
gaccggccag cctaccccaa aactac 26

<210> 8
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Foward primer

<400> 8
gctctagagg agaccttaaa tggctg 26

<210> 9
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse primer

<400> 9
gctgcagcat taacgcttga tatcgc 26

<210> 10
<211> 4176
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> pTrc99A cloning vector : Genbank Accession NO.M22744

<400> 10
gtttgacagc ttatcatcga ctgcacggtg caccaatgct tctggcgtca ggcagccatc 60

ggaagctgtg gtatggctgt gcaggtcgta aatcactgca taattcgtgt cgctcaaggc 120

gcactcccgt tctggataat gtttttgcg ccgacatcat aacggttctg gcaaatattc 180

tgaaatgagc tgttgacaat taatcatccg gctcgtataa tgtgtggaat tgtgagcgga 240

taacaatttc acacaggaaa cagaccatgg aattcgagct cggtacccgg ggatcctcta 300

gagtcgacct gcaggcatgc aagcttggct gttttggcgg atgagagaag attttcagcc 360

tgatacagat taaatcagaa cgcagaagcg gtctgataaa acagaatttg cctggcggca 420

gtagcgcggt ggtcccacct gaccccatgc cgaactcaga agtgaaacgc cgtagcgccg 480

atggtagtgt ggggtctccc catgcgagag tagggaactg ccaggcatca aataaaacga 540

aaggctcagt cgaaagactg ggcctttcgt tttatctgtt gtttgtcggt gaacgctctc 600

ctgagtagga caaatccgcc gggagcggat ttgaacgttg cgaagcaacg gcccggaggg 660

tggcgggcag gacgcccgcc ataaactgcc aggcatcaaa ttaagcagaa ggccatcctg 720

acggatggcc tttttgcgtt tctacaaact ctttttgttt atttttctaa atacattcaa 780

atatgtatcc gctcatgaga caataaccct gataaatgct tcaataatat tgaaaaagga 840

agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg cccttattcc ctttttgcg gcattttgcc 900

ttcctgtttt tgctcaccca gaaacgctgg tgaaagtaaa agatgctgaa gatcagttgg 960

gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg taagatcctt gagagttttc 1020

gccccgaaga acgttttcca atgatgagca cttttaaagt tctgctatgt ggcgcggtat 1080

tatcccgtgt tgacgccggg caagagcaac tcggtcgccg catacactat tctcagaatg 1140

acttggttga gtactcacca gtcacagaaa agcatcttac ggatggcatg acagtaagag 1200

aattatgcag tgctgccata accatgagtg ataacactgc ggccaactta cttctgacaa 1260

cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt ttttgcacaa catgggggat catgtaactc 1320

gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc aaacgacgag cgtgacacca 1380

cgatgcctac agcaatggca acaacgttgc gcaaactatt aactggcgaa ctacttactc 1440

tagcttcccg gcaacaatta atagactgga tggaggcgga taaagttgca ggaccacttc 1500

tgcgctcggc ccttccggct ggctggttta ttgctgataa atctggagcc ggtgagcgtg 1560

ggtctcgcgg tatcattgca gcactggggc cagatggtaa gccctcccgt atcgtagtta 1620

tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag 1680

gtgcctcact gattaagcat tggtaactgt cagaccaagt ttactcatat atactttaga 1740

ttgatttaaa acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt gaagatcctt tttgataatc 1800

tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa 1860

agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcgcgt aatctgctgc ttgcaaacaa 1920

aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt tgccggatca agagctacca actcttttc 1980

cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga taccaaatac tgtccttcta gtgtagccgt 2040

agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac atacctcgct ctgctaatcc 2100

tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac 2160

gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca 2220

gcttggagcg aacgacctac accgaactga gatacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg 2280

ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag 2340

gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt 2400

ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc gtcaggggggg cggagcctat 2460

ggaaaaacgc cagcaacgcg gccttttttac ggttcctggc cttttgctgg ccttttgctc 2520

acatgttctt tcctgcgtta tcccctgatt ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt 2580

gagctgatac cgctcgccgc agccgaacga ccgagcgcag cgagtcagtg agcgaggaag 2640

cggaagagcg cctgatgcgg tattttctcc ttacgcatct gtgcggtatt tcacaccgca 2700

tatggtgcac tctcagtaca atctgctctg atgccgcata gttaagccag tatacactcc 2760

gctatcgcta cgtgactggg tcatggctgc gccccgacac ccgccaacac ccgctgacgc 2820

gccctgacgg gcttgtctgc tcccggcatc cgcttacaga caagctgtga ccgtctccgg 2880

gagctgcatg tgtcagaggt tttcaccgtc atcaccgaaa cgcgcgaggc agcagatcaa 2940

ttcgcgcgcg aaggcgaagc ggcatgcatt tacgttgaca ccatcgaatg gtgcaaaacc 3000

tttcgcggta tggcatgata gcgcccggaa gagagtcaat tcagggtggt gaatgtgaaa 3060

ccagtaacgt tatacgatgt cgcagagtat gccggtgtct cttatcagac cgtttcccgc 3120

gtggtgaacc aggccagcca cgtttctgcg aaaacgcggg aaaaagtgga agcggcgatg 3180

gcggagctga attacattcc caaccgcgtg gcacaacaac tggcgggcaa acagtcgttg 3240

ctgattggcg ttgccacctc cagtctggcc ctgcacgcgc cgtcgcaaat tgtcgcggcg 3300

attaaatctc gcgccgatca actgggtgcc agcgtggtgg tgtcgatggt agaacgaagc 3360

ggcgtcgaag cctgtaaagc ggcggtgcac aatcttctcg cgcaacgcgt cagtgggctg 3420

atcattaact atccgctgga tgaccaggat gccattgctg tggaagctgc ctgcactaat 3480

gttccggcgt tatttcttga tgtctctgac cagacaccca tcaacagtat tattttctcc 3540

catgaagacg gtacgcgact gggcgtggag catctggtcg cattgggtca ccagcaaatc 3600

gcgctgttag cgggcccatt aagttctgtc tcggcgcgtc tgcgtctggc tggctggcat 3660

aaatatctca ctcgcaatca aattcagccg atagcggaac gggaaggcga ctggagtgcc 3720

atgtccggtt ttcaacaaac catgcaaatg ctgaatgagg gcatcgttcc cactgcgatg 3780

ctggttgcca acgatcagat ggcgctgggc gcaatgcgcg ccattaccga gtccgggctg 3840

cgcgttggtg cggatatctc ggtagtggga tacgacgata ccgaagacag ctcatgttat 3900

atcccgccgt caaccaccat caaacaggat tttcgcctgc tggggcaaac cagcgtggac 3960

cgcttgctgc aactctctca gggccaggcg gtgaagggca atcagctgtt gcccgtctca 4020

ctggtgaaaa gaaaaaccac cctggcgccc aatacgcaaa ccgcctctcc ccgcgcgttg 4080

gccgattcat taatgcagct ggcacgacag gtttcccgac tggaaagcgg gcagtgagcg 4140

caacgcaatt aatgtgagtt agcgcgaatt gatctg 4176

<210> 11
<211> 1251
<212> DNA
<213> E.coli

<400> 11
atggaaagta aagtagttgt tccggcacaa ggcaagaaga tcaccctgca aaacggcaaa 60

ctcaacgttc ctgaaaatcc gattatccct tacattgaag gtgatggaat cggtgtagat 120

gtaaccccag ccatgctgaa agtggtcgac gctgcagtcg agaaagccta taaaggcgag 180

cgtaaaatct cctggatgga aatttacacc ggtgaaaaat ccacacaggt ttatggtcag 240

gacgtctggc tgcctgctga aactcttgat ctgattcgtg aatatcgcgt tgccattaaa 300

ggtccgctga ccactcctgt tggtggcggt attcgctctc tgaacgttgc cctgcgccag 360

gaactggatc tctacatctg cctgcgtccg gtacgttact atcagggcac tccaagcccg 420

gttaaacacc ctgaactgac cgatatggtt atcttccgtg aaaactcgga agacatttat 480

gcgggtatcg aatggaaagc agactctgcc gacgccgaga aagtgattaa attcctgcgt 540

gaagagatgg gggtgaagaa aattcgcttc ccggaacatt gtggtatcgg tattaagccg 600

tgttcggaag aaggcaccaa acgtctggtt cgtgcagcga tcgaatacgc aattgctaac 660

gatcgtgact ctgtgactct ggtgcacaaa ggcaacatca tgaagttcac cgaaggcgcg 720

tttaaagact ggggctacca gctggcgcgt gaagagtttg gcggtgaact gatcgacggc 780

ggcccgtggc tgaaagttaa aaacccgaac accggcaaag agatcgtcat taaagacgtg 840

attgctgatg cattcctgca acagatcctg ctgcgtccgg ctgaatatga tgttatcgcc 900

tgtatgaacc tgaacggtga ctacatttct gacgctctgg cagcgcaggt tggcggtatc 960

ggtatcgccc ctggagcaaa catcggtgac gaatgcgccc tgtttgaagc cacccacggt 1020

actgcgccga aatacgccgg tcaggacaaa gtaaaccctg gctctattat tctctccgct 1080

gagatgatgt tacgccatat gggctggact gaagccgcag acctgattgt taaaggtatg 1140

gaaggcgcaa tcaatgcgaa gaccgtaacc tatgacttcg agcgtctgat ggaaggcgct 1200

aaactgctga aatgttcaga atttggtgat gcgatcatca agaacatgta a 1251