



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0146413
(43) 공개일자 2014년12월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/63 (2006.01) *C12N 15/52* (2006.01)

C12P 7/44 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0069072

(22) 출원일자 2013년06월17일

심사청구일자 2013년06월17일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

김경현

서울 성북구 안암로 145, 생명과학대학 식품공학과 (안암동5가, 고려대학교)

티루마라이사미 바부

5 A 3, Kalukarai, Madathukulam Taluk, Tirupur District, Tamil nadu, India Pin : 642113

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인다나

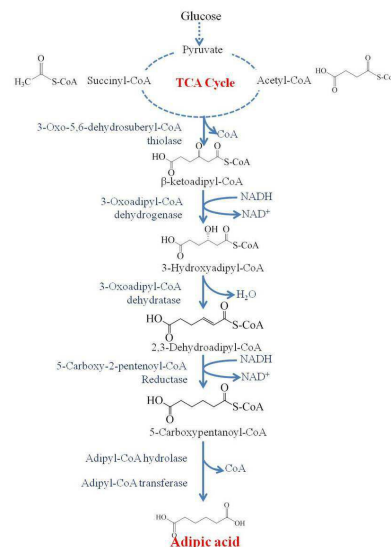
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 새로운 아디프산 합성 경로에 의한 아디프산 제조방법

(57) 요약

본 발명은 새로운 아디프산 합성 경로에 의한 아디프산 제조방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 새로운 아디프산 합성 경로에 관여하는 효소의 재조합 미생물을 이용하여 포도당에서 아디프산을 생산할 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

윤은주

서울 금천구 시흥대로 53, 14동 104호 (시흥동, 현대빌라)

김희택

서울 마포구 성미산로5길 50-7, 202호 (성산동, 조광아트빌)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0031353

부처명 한국연구재단

연구관리전문기관 연구지원부

연구사업명 (원천)글로벌프론티어

연구과제명 [공동]화학 및 단백질촉매 융합시스템을 통한 생물친화형 목질계 바이오매스의 탈구조화
기술개발

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2010.10.22 ~ 2011.08.21

특허청구의 범위

청구항 1

3-옥소-5,6-디하이드로서베릴-CoA 티올라아제(3-Oxo-5,6-dehydrosuberyl-CoA thiolase)를 코딩하는 유전자; 3-옥소아디필-CoA 디하이드로게나아제(3-Oxo adipyl-CoA dehydrogenase)를 코딩하는 유전자; 3-옥소아디필-CoA 디하이드라타아제(3-Oxo adipyl-CoA dehydratase)를 코딩하는 유전자; 5-카르복시-2-펜텐노일-CoA 리덕타아제(5-Carboxy-2-pentenoyl-CoA reductase)를 코딩하는 유전자; 및 아디필 CoA 하이드롤라아제(Adipyl CoA hydrolase)를 코딩하는 유전자 및 아디필 CoA 트랜스퍼라아제(Adipyl CoA transferase)를 코딩하는 유전자로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 포함하는 아디프산 제조용 재조합 벡터.

청구항 2

제1항에 있어서,

3-옥소-5,6-디하이드로서베릴-CoA 티올라아제를 코딩하는 유전자는 SEQ ID NO: 1의 염기서열로 표시되는 아디프산 제조용 재조합 벡터.

청구항 3

제1항에 있어서,

3-옥소아디필-CoA 디하이드로게나아제를 코딩하는 유전자는 SEQ ID NO: 2의 염기서열로 표시되는 아디프산 제조용 재조합 벡터.

청구항 4

제1항에 있어서,

3-옥소아디필-CoA 디하이드라타아제를 코딩하는 유전자는 SEQ ID NO: 3의 염기서열로 표시되는 아디프산 제조용 재조합 벡터.

청구항 5

제1항에 있어서,

5-카르복시-2-펜텐노일-CoA 리덕타아제를 코딩하는 유전자는 SEQ ID NO: 4 또는 5 및 6의 염기서열 중 어느 하나로 표시되는 아디프산 제조용 재조합 벡터.

청구항 6

제1항에 있어서,

아디필 CoA 하이드롤라아제를 코딩하는 유전자는 SEQ ID NO: 7의 염기서열로 표시되는 아디프산 제조용 재조합 벡터.

청구항 7

제1항에 있어서,

아디필 CoA 트랜스퍼라아제를 코딩하는 유전자는 SEQ ID NO: 8의 염기서열로 표시되는 아디프산 제조용 재조합 벡터.

청구항 8

3-옥소-5,6-디하이드로서베릴-CoA 티올라아제(3-Oxo-5,6-dehydrosuberil-CoA thiolase)를 코딩하는 유전자; 3-옥소아디필-CoA 디하이드로게나아제(3-Oxoacyl-CoA dehydrogenase)를 코딩하는 유전자; 3-옥소아디필-CoA 디하이드라타아제(3-Oxoacyl-CoA hydratase)를 코딩하는 유전자; 5-카르복시-2-펜텐노일-CoA 리덕타아제(5-Carboxy-2-pentenoyl-CoA reductase)를 코딩하는 유전자; 및 아디필 CoA 하이드롤라아제(Adipyl CoA hydrolase)를 코딩하는 유전자 및 아디필 CoA 트랜스퍼라아제(Adipyl CoA transferase)를 코딩하는 유전자로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상으로 형질전환된 아디프산 제조용 재조합 미생물.

청구항 9

제8항에 있어서,

3-옥소-5,6-디하이드로서베릴-CoA 티올라아제(3-Oxo-5,6-dehydrosuberil-CoA thiolase)를 코딩하는 유전자, 3-옥소아디필-CoA 디하이드로게나아제(3-Oxoacyl-CoA dehydrogenase)를 코딩하는 유전자, 3-옥소아디필-CoA 디하이드라타아제(3-Oxoacyl-CoA hydratase)를 코딩하는 유전자 및 5-카르복시-2-펜텐노일-CoA 리덕타아제(5-Carboxy-2-pentenoyl-CoA reductase)를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터(A); 및

아디필 CoA 하이드롤라아제(Adipyl CoA hydrolase)를 코딩하는 유전자 및 아디필 CoA 트랜스퍼라아제(Adipyl CoA transferase)를 코딩하는 유전자로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 포함하는 재조합 벡터(B)로 형질전환된 아디프산 제조용 재조합 미생물.

청구항 10

제9항에 있어서,

재조합 벡터(A)는 SEQ ID NO: 4의 염기서열로 표시되는 5-카르복시-2-펜텐노일-CoA 리덕타아제를 코딩하는 유전자, 또는 SEQ ID NO: 4의 염기서열로 표시되는 5-카르복시-2-펜텐노일-CoA 리덕타아제를 코딩하는 유전자와 SEQ ID NO: 5 및 6의 염기서열로 표시되는 5-카르복시-2-펜텐노일-CoA 리덕타아제를 코딩하는 유전자의 융합물 중 어느 하나를 포함하는 아디프산 제조용 재조합 미생물.

청구항 11

제8항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 재조합 미생물을 배양하는 단계를 포함하는 아디프산의 제조방법.

청구항 12

제8항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 재조합 미생물의 배양액 또는 균주 추출액을 숙시닐-CoA 및 아세틸-CoA로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 기질과 반응시키는 단계를 포함하는 아디프산의 제조방법.

명세서

기술분야

본 발명은 새로운 아디프산 합성 경로에 의한 아디프산 제조방법에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

[0002]

화학소재 중에서도 탄소 2 내지 6개의 화합물은 유기용매, 연료, 바이오플라스틱, 의약품, 향수 그리고 식품을 생산하는 데에 중요한 전구체로 사용된다(Jang *et al.* (2012) *Biotechnol Bioeng* 109:2437-2459). 대표적인 예로 젖산(lactic acid)(탄소-3)와 에틸렌(탄소-2)은 바이오플라스틱인 폴리락타이드(polylactide, PLA)를 합성하는 원료로 이용된다. 대부분의 화학 소재들은 화석연료를 이용한 석유화학 공정을 통해서 생산된다. 최근에는 이러한 화학 소재를 합성할 때에 재생 가능한 소재를 이용하는 것이 크게 각광을 받고 있는데, 이는 석유자원 사용 시에 발생하는 자원의 제한성, 유가 급등, 지속가능성 및 환경적인 측면에서 발생하는 문제들을 해소할 수 있기 때문이다(Corma *et al.* (2007) *Chem Rev* 107:2411-2502). 바이오화학산업은 화석원료를 바이오매스로 대체하여 지속가능한 탄소경제로 전환하고 기존 화학공정을 바이오공정으로 대체하여 화학제품을 생산하고 활용하는 산업으로서 환경친화형 바이오폴리머 생산 기술, 석유화학 대체 바이오피라이너리 기술, 기능성 소재 생산 기술 등이 포함되며 기존 주력산업의 경쟁력 제고 및 신 산업 창출을 위한 산업원천기술로 주목받고 있다. 특히 유럽의 신화학물질관리제도(REACH)와 교토의정서 등 세계적인 환경 규제 강화로 바이오 화학 산업에 대한 정부 및 기업들의 관심과 투자가 꾸준히 증가하고 있는 추세이다. 바이오 화학 산업에 대한 관심의 증대로, 기존의 화학회사인 다국적기업들이 바이오소재 제품들을 앞다투어 출시하고 있다. 실제로, NatureWorks사는 바이오플라스틱 폴리락테이트(polylactate) 제품을, Novozyme에서는 바이오소재 생산을 위한 다양한 생물학적 효소들을 생산하고 있다. 재조합 미생물을 이용하여 디카르복실산(dicarboxylic acids), 하이드록시산(hydroxy acids), 아미노 카르복실산(amino carboxylic acids), 알코올류, 아민류, 그리고 방향족 화합물을 포함하는 다양한 플랫폼 화합물들을 생산하는 연구가 보고되어왔다(Ericksol *et al.* (2012) *Biotechnol J* 7:176-185; Jung *et al.* (2010) *Biotechnol Bioeng* 105:161-171; Lee *et al.* (2011) *Curr Opin Biotechnol* 22:758-767; Park *et al.* (2012) *Biotechnol J* 7:199-212; Yang *et al.* (2010) *Biotechnol Bioeng* 105:150-160).

[0003]

이 중에서도 아디프산(adipic acid)은 탄소 6개로 이루어진 디카르복실산이며 분자량이 146.14이다. 아디프산은 헥사메틸렌디아민(hexamethylenediamine)과 아마이드 결합을 통해 폴리아마이드 형태인 나일론 6,6를 만드는 소재로 이용되는 물질이다. 또한 아디프산은 아디프산 세미알데히드(adipic acid semialdehyde)와 6-아미노카프로산(6-aminocaproic acid)을 거쳐 나일론 6의 소재인 카프로락탐(caprolactam)으로 전환될 수 있다. 아디프산은 나일론 6,6 및 나일론 6 외에도 다양한 섬유소재를 만드는 데에 이용된다. 예를 들어, 딱딱한 플라스틱에 유연성 및 탄성을 주어 성형하기 쉽도록 하는 가소제(plasticizer), 불포화 폴리에스테르, 그리고 폴리에스터폴리올을 제조하는 데에 이용된다(미국 공개특허 제2012-0282661호). 뿐만 아니라 폴리우레탄, 윤활유를 제조하는 데에도 이용되고, 향신료와 같이 식품 첨가물로도 사용된다. 산업 공정에서 아디프산은 주로 사이클로헥산(cyclohexanone)과 사이클로헥사놀(cyclohexanol)의 혼합물(케톤-알코올 오일)의 산화 반응에 의해 생산된다. 또한 지방 및 장쇄(long chain)의 오일로부터 지방산 대사경로에서 주로 사용하는 ω -산화(oxidation) 반응을 통해 장쇄의 디카르복실산을 만들고, 이를 β -산화 반응을 통해 아디프산으로 합성하는 반응도 알려져 있다(미국 공개특허 제2012-0021474호). 최근에는 오일과 같은 석유자원 대신 재생 가능한 자원을 이용하여 아디프산을 합성하는 경로가 보고되고 있으나 실제 재조합 미생물을 이용한 아디프산의 생산에 대해서는 거의 보고되어 있지 않다.

선행기술문헌

특허문헌

[0004]

(특허문헌 0001) 미국 공개특허 제2012-0282661호

(특허문헌 0002) 미국 공개특허 제2012-0021474호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005]

본 발명의 목적은 아디프산의 신규 합성 경로를 제시하면서 이에 관여하는 효소의 재조합 벡터, 상기 재조합 벡터로 형질전환된 재조합 미생물 및 상기 재조합 미생물을 이용한 아디프산의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 3-옥소-5,6-디하이드로서베릴-CoA 티올라아제(3-Oxo-5,6-dehydrosuberyl-CoA thiolase)를 코딩하는 유전자; 3-옥소아디필-CoA 디하이드로게나아제(3-Oxo adipyl-CoA dehydrogenase)를 코딩하는 유전자; 3-옥소아디필-CoA 디하이드라타아제(3-Oxo adipyl-CoA dehydratase)를 코딩하는 유전자; 5-카르복시-2-펜텐노일-CoA 리덕타아제(5-Carboxy-2-pentenoyl-CoA reductase)를 코딩하는 유전자; 및 아디필 CoA 하이드롤라아제(Adipyl CoA hydrolase)를 코딩하는 유전자 및 아디필 CoA 트랜스퍼라아제(Adipyl CoA transferase)를 코딩하는 유전자로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 포함하는 아디프산 제조용 재조합 벡터를 제공한다.

[0007] 본 발명은 또한 3-옥소-5,6-디하이드로서베릴-CoA 티올라아제(3-Oxo-5,6-dehydrosuberyl-CoA thiolase)를 코딩하는 유전자; 3-옥소아디필-CoA 디하이드로게나아제(3-Oxo adipyl-CoA dehydrogenase)를 코딩하는 유전자; 3-옥소아디필-CoA 디하이드라타아제(3-Oxo adipyl-CoA dehydratase)를 코딩하는 유전자; 5-카르복시-2-펜텐노일-CoA 리덕타아제(5-Carboxy-2-pentenoyl-CoA reductase)를 코딩하는 유전자; 및 아디필 CoA 하이드롤라아제(Adipyl CoA hydrolase)를 코딩하는 유전자 및 아디필 CoA 트랜스퍼라아제(Adipyl CoA transferase)를 코딩하는 유전자로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상으로 형질전환된 아디프산 제조용 재조합 미생물을 제공한다.

[0008] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 재조합 미생물을 배양하는 단계를 포함하는 아디프산의 제조방법을 제공한다.

[0009] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 재조합 미생물의 배양액 또는 균주 추출액을 숙시닐-CoA 및 아세틸-CoA로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 기질과 반응시키는 단계를 포함하는 아디프산의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명은 포도당으로부터 재조합 미생물을 이용하여 아디프산을 생물학적으로 합성하는 새로운 방법을 제공할 수 있다. 또한 TCA 회로의 중간산물인 숙시닐-CoA와 아세틸-CoA를 아디프산 합성 경로의 출발물질로 사용하므로 포도당뿐만 아니라 다른 당류를 발효하는 데에도 본 발명을 적용할 수 있다.

[0011] 본 발명은 바이오플라스틱인 나일론 6,6 및 나일론 6의 소재로 이용할 수 있는 아디프산을 생물학적으로 생산하여 자동차 소재 및 전기 전자 소재로 널리 쓰이는 바이오플라스틱의 제조뿐만 아니라 나일론 섬유 또는 혼방 섬유의 소재 생산에 이르기까지 적용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 본 발명에 따른 신규 아디프산 합성 경로를 도시한 것이다.

도 2는 본 발명에 따른 재조합 미생물 제조에 사용한 플라스미드 구조물을 도시한 것이다.

도 3은 아디프산 표준물질을 기준으로 하여 본 발명의 재조합 미생물에서 생산된 아디프산 피크의 질량 스펙트럼 분석 결과를 도시한 것이다.

도 4는 본 발명의 재조합 미생물에서 생산된 아디프산의 GC-MS 분석 결과를 도시한 것이다.

도 5는 본 발명의 재조합 미생물에서 생산된 아디프산의 GC-MS 분석에서 나타난 피크 영역을 그래프로 도시한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 본 발명자들은 종래의 아디프산 합성 경로 대신 TCA 회로의 중간 대사물질인 숙시닐-CoA 또는 아세틸-CoA를 출발

물질로 하고 6단계의 효소 반응을 거쳐 아디프산을 합성하는 새로운 합성 경로를 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

[0014] 따라서, 본 발명은 3-옥소-5,6-디하이드로서베릴-CoA 티올라아제(3-Oxo-5,6-dehydrosuberil-CoA thiolase)를 코딩하는 유전자; 3-옥소아디필-CoA 디하이드로게나아제(3-Oxo adipyl-CoA dehydrogenase)를 코딩하는 유전자; 3-옥소아디필-CoA 디하이드라타아제(3-Oxo adipyl-CoA dehydratase)를 코딩하는 유전자; 5-카르복시-2-펜텐노일-CoA 리덕타아제(5-Carboxy-2-pentenoyl-CoA reductase)를 코딩하는 유전자; 및 아디필 CoA 하이드롤라아제(Adipyl CoA hydrolase)를 코딩하는 유전자 및 아디필 CoA 트랜스퍼라아제(Adipyl CoA transferase)를 코딩하는 유전자로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 포함하는 아디프산 제조용 재조합 벡터에 관한 것이다.

[0015] 본 발명의 아디프산 제조를 위한 합성 경로는 도 1을 참조하여 구체적으로 설명한다.

[0016] 본 발명의 합성 경로는 포도당은 해당과정을 통해 TCA 회로로 이동하게 되며, TCA 회로의 중간 대사물질인 숙시닐-CoA 또는 아세틸-CoA를 출발물질로 하고 5단계의 효소 반응을 거쳐 아디프산을 합성하는 경로이다. 즉, 포도당으로부터 해당과정을 통해 숙시닐-CoA 또는 아세틸-CoA가 생성되며, 3-옥소-5,6-디하이드로서베릴-CoA 티올라아제(3-Oxo-5,6-dehydrosuberil-CoA thiolase)에 의해 β -케토아디필-CoA(β -ketoadipyl-CoA)로 전환되고, 상기 β -케토아디필-CoA는 3-옥소아디필-CoA 디하이드로게나아제(3-Oxo adipyl-CoA dehydrogenase)에 의해 3-하이드록시아디필-CoA(3-hydroxyadipyl-CoA)로 환원된다. 상기 3-하이드록시아디필-CoA는 3-옥소아디필-CoA 디하이드라타아제(3-Oxo adipyl-CoA dehydratase)에 의해 2,3-디하이드로아디필-CoA(2,3-dehydroadipyl-CoA)로 전환되고, 상기 2,3-디하이드로아디필-CoA는 5-카르복시-2-펜텐노일-CoA 리덕타아제(5-Carboxy-2-pentenoyl-CoA reductase)에 의해 5-카르복시펜타노일-CoA(5-carboxypentenoyl-CoA)로 환원된다. 상기 5-카르복시펜타노일-CoA는 아디필 CoA 하이드롤라아제(Adipyl CoA hydrolase) 및/또는 아디필 CoA 트랜스퍼라아제(Adipyl CoA transferase)에 의해 아디프산으로 전환되게 된다.

[0017] 상기 3-옥소-5,6-디하이드로서베릴-CoA 티올라아제는 유전자명이 'paaJ'이며, 숙시닐-CoA와 아세틸-CoA를 β -케토아디필-CoA로 전환하는 효소로, 대장균(*E. coli*) K12 MG1655 유래인 것일 수 있고, SEQ ID NO: 1의 염기서열로 표시될 수 있다.

[0018] 상기 3-옥소아디필-CoA 디하이드로게나아제는 유전자명이 'paaH'이며, β -케토아디필-CoA를 3-하이드록시아디필-CoA로 환원하는데 관여하는 효소로, 대장균(*E. coli*) K12 MG1655 유래인 것일 수 있고, SEQ ID NO: 2의 염기서열로 표시될 수 있다.

[0019] 상기 3-옥소아디필-CoA 디하이드라타아제는 유전자명이 'maoC'이며, 3-하이드록시아디필-CoA를 2,3-디하이드로아디필-CoA로 전환하는 효소로 대장균(*E. coli*) K12 MG1655 유래인 것일 수 있고, SEQ ID NO: 3의 염기서열로 표시될 수 있다.

[0020] 상기 5-카르복시-2-펜텐노일-CoA 리덕타아제는 유전자명이 'bcd'이며, 2,3-디하이드로아디필-CoA를 5-카르복시펜타노일-CoA로 환원하는데 관여하는 효소로 클로스트리디움 아세토부틸리쿰(*Clostridium acetobutylicum*) ATCC 824 유래인 것일 수 있고, SEQ ID NO: 4의 염기서열로 표시될 수 있다. 또한, 상기 bcd의 서브 유닛인 etfB 및 etfA를 상기 아디프산 합성 경로의 효소로 사용할 수 있으며, 각각 SEQ ID NO: 5 및 6의 염기서열로 표시될 수 있다.

[0021] 상기 아디필 CoA 하이드롤라아제는 유전자명이 'sucC'이며, 5-카르복시펜타노일-CoA를 아디필 포스페이트로 전환하는 효소로 대장균(*E. coli*) K12 MG1655 유래인 것일 수 있고, SEQ ID NO: 7의 염기서열로 표시될 수 있다.

[0022] 상기 아디필 CoA 트랜스퍼라아제는 유전자명이 'sucD'이며, 5-카르복시펜타노일-CoA를 아디프산으로 전환하는 효소로 대장균(*E. coli*) K12 MG1655 유래인 것일 수 있고, SEQ ID NO: 8의 염기서열로 표시될 수 있다.

[0023] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 카르복시펜타노일-CoA를 아디프산으로 전환하기 위해 아디필 CoA 하이드롤라아제와 아디필 CoA 트랜스퍼라아제 중 어느 하나를 사용하거나, 두 효소를 함께 사용할 수 있다.

[0024] 상술한 유전자들은 효소의 물리 화학적 활성을 갖고 하나 이상의 아미노산이 결실, 치환, 삽입 및/또는 부가된 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 예컨대, SEQ ID NO: 1 내지 8에 기재된 어느 하나의 뉴클레오티드를 포함하고, 효소의 물리 화학적 특성을 갖는 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 엄격한 조건 하에서 혼성화하는 폴리뉴클레오티드도 포함한다. '엄격한 조건하에서 혼성화하는 폴리뉴클레오티드'라 함은, 예컨대 설명서에 기술된 조건하(0.5×SSC를 포함하는 일차 세척 완충액으로 42℃에서 세척)에서 ECL 직접 핵산 표지화 및 검출 시스템(Amersham Pharmacia Biotech)을 이용하여, 효소 단백질로부터 임의적으로 선택된 적어도 20,

바람직하게는 적어도 30의 연속적 잔기(예를 들어, 40, 60 또는 100 연속 잔기)의 서열을 포함하는 하나 이상의 프로브 DNAs에 혼성화하는 폴리뉴클레오티드를 말한다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 분리된 폴리뉴클레오티드를 포함한다. '분리된 뉴클레오티드'라 함은 천연적으로 발생하는 폴리뉴클레오티드에 비해 상이한 형태로 존재하는 폴리뉴클레오티드를 말한다. 예를 들어, 다른 생물체의 게놈에 통합된 벡터 및 폴리뉴클레오티드는 상기 분리된 폴리뉴클레오티드에 포함된다. 또한, 상기 분리된 폴리뉴클레오티드는 cDNA, PCR 산물, 또는 제한 단편으로서 얻어진 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 또한, 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 부분으로서 사용되는 폴리뉴클레오티드는 '분리된 폴리뉴클레오티드'에 또한 포함된다.

[0025] 상술한 본 발명의 효소들을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 예를 들어, 하기 방법에 의해 분리할 수 있다: SEQ ID NO: 1 내지 8의 뉴클레오티드 서열에 기초한 각각의 PCR 프라이머를 설계하고, 주형(template)으로서 효소-생산 균주 유래의 염색체 DNA나 cDNA 라이브러리를 이용한 PCR을 수행하여 본 발명의 DNA를 얻는다.

[0026] 또한, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 프로브로서 얻어진 DNA 단편을 이용하여, 콜로니 혼성화, 플라크 혼성화 등으로, (a) 효소-생산 균주에서 유래된 염색체 DNA의 제한효소 단편을 파지나 플라스미드에 도입하고 상기 파지나 벡터로 대장균 세포를 형질전환하여 얻어진 라이브러리, 또는 (b) cDNA라이브러리에 대한 스크리닝을 수행함으로써 제조할 수 있다.

[0027] 택일적으로, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 PCR로 얻어진 DNA 단편의 뉴클레오티드 서열을 분석; 알려진 DNA 서열의 외부에 가닥(strand)을 신장하기 위해 분석된 서열에 기초한 PCR 프라이머의 설계; 및 적절한 제한효소로 효소-생산 균주의 염색체 DNA의 소화 및 주형으로서 상기 DNA를 이용하는 자가환화 반응(self-cyclizing reaction)에 의한 역-PCR을 수행함으로써 얻어질 수 있다(*Genetics*, 120, 621-623 (1988)). 또한, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 RACE 방법으로 얻어질 수 있다(Rapid Amplification of cDNA End, 'PCR Jikken Manual (Manual for PCR experiments)', 25-33, HBJ Publishing Bureau).

[0028] 상기 방법으로 클로닝된 게놈 DNA 및 cDNA에 더하여, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 합성된 DNAs를 포함한다.

[0029] 본 발명에서 "제조합 벡터"란 적당한 숙주세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있는 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 말한다.

[0030] 상기 벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파아지 벡터 또는 바이러스 벡터 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 적합한 발현벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서 같은 발현 조절 엘리먼트 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 시그널 서열 또는 리더 서열을 포함하며, 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 또한, 발현벡터는 벡터를 함유하는 숙주세포를 선택하기 위한 선택마커를 포함하고, 복제가능한 발현벡터인 경우 복제 기원을 포함한다.

[0031] 본 발명의 제조합 벡터는 바람직하게는 일반적인 대장균 균주 발현용 벡터, 예컨대 하기 표 1에 나열된 플라스미드에 상술한 효소 코딩 핵산을 각각 또는 함께 삽입함으로써 제조될 수 있다. 상기 대장균 균주 발현용 벡터는 일반적으로 사용할 수 있는 모든 대장균주 발현용 벡터가 제한 없이 사용될 수 있다.

[0032] 본 발명은 또한 3-옥소-5,6-디하이드로서베릴-CoA 티올라아제(3-Oxo-5,6-dehydrosuberil-CoA thiolase)를 코딩하는 유전자; 3-옥소아디필-CoA 디하이드로게나아제(3-Oxo adipyl-CoA dehydrogenase)를 코딩하는 유전자; 3-옥소아디필-CoA 디하이드라타아제(3-Oxo adipyl-CoA dehydratase)를 코딩하는 유전자; 5-카르복시-2-펜텐노일-CoA 리덕타아제(5-Carboxy-2-pentenoyl-CoA reductase)를 코딩하는 유전자; 및 아디필 CoA 하이드롤라아제(Adipyl CoA hydrolase)를 코딩하는 유전자 및 아디필 CoA 트랜스퍼라아제(Adipyl CoA transferase)를 코딩하는 유전자로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상으로 형질전환된 아디프산 제조용 제조합 미생물에 관한 것이다.

[0033] 상기 형질전환은 핵산을 유기체, 세포, 조직 또는 기관에 도입하는 어떤 방법도 포함되며, 당 분야에서 공지된 바와 같이 숙주세포에 따라 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 이런 방법에는 전기충격유전자전달법(electroporation), 원형질 융합, 인산칼슘(CaPO₄) 침전, 염화칼슘(CaCl₂) 침전, 실리콘 카바이드 섬유 이용한 교반, 아그로박테리아 매개된 형질전환, PEG, 텍스트란 설페이트, 리포펙타민 등이 포함되나 이로 제한되지 않는다.

[0034] 또한, 숙주세포에 따라서 단백질의 발현량과 수식 등이 다르게 나타나므로, 목적에 가장 적합한 숙주세포를 선택하여 사용하면 된다.

- [0035] 숙주세포로는 대장균(*Escherichia coli*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 스트렙토마이세스(*Streptomyces*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*) 또는 스태필로코쿠스(*Staphylococcus*)와 같은 원핵생물이 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 진균(예를 들어, 아스퍼질러스(*Aspergillus*)), 효모(예를 들어, 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 사카로마이세스 세르비시애(*Saccharomyces cerevisiae*), 쉬조사카로마세스(*Schizosaccharomyces*), 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*))등의 진핵생물이 사용될 수 있으나, 이에 제한하는 것은 아니다. 상기 형질전환체는 상기 유전자들을 포함하는 재조합 벡터를 임의의 숙주세포에 도입시킴으로써 용이하게 제조될 수 있다. 보다 구체적으로, 3-옥소-5,6-디하이드로서베릴-CoA 티올라아제를 코딩하는 유전자, 3-옥소아디필-CoA 디하이드로게나아제를 코딩하는 유전자, 3-옥소아디필-CoA 디하이드라타아제를 코딩하는 유전자 및 5-카르복실-2-펜텐노일-CoA 리덕타아제를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터(A); 및 아디필 CoA 하이드롤라아제를 코딩하는 유전자 및 아디필 CoA 트랜스퍼라아제를 코딩하는 유전자로 이루어진 균으로부터 선택된 하나 이상을 포함하는 재조합 벡터(B)로 형질 전환될 수 있다.
- [0036] 상기 재조합 벡터(A)는 SEQ ID NO: 4의 염기서열로 표시되는 5-카르복실-2-펜텐노일-CoA 리덕타아제를 코딩하는 유전자, 또는 SEQ ID NO: 4의 염기서열로 표시되는 5-카르복실-2-펜텐노일-CoA 리덕타아제를 코딩하는 유전자와 SEQ ID NO: 5 및 6의 염기서열로 표시되는 5-카르복실-2-펜텐노일-CoA 리덕타아제를 코딩하는 유전자의 융합물 중 어느 하나를 포함하는 것일 수 있다.
- [0037] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 재조합 미생물을 배양하는 단계를 포함하는 아디프산의 제조방법에 관한 것이다.
- [0038] 본 발명에 따른 재조합 미생물은 TCA 회로의 중간 대사물인 숙시닐-CoA 또는 아세틸-CoA를 출발물질로 하고 있어, 도 1에 도시된 아디프산 합성 경로를 거쳐 재조합 미생물 내에서 아디프산이 합성되어 재조합 미생물의 배양액으로부터 합성된 아디프산을 분리함으로써 아디프산을 얻을 수 있다.
- [0039] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 재조합 미생물의 배양액 또는 균주 추출액을 숙시닐-CoA 및 아세틸-CoA로 구성된 균으로부터 선택된 하나 이상의 기질과 반응시키는 단계를 포함하는 아디프산의 제조방법에 관한 것이다.
- [0040] 본 발명에 따른 아디프산 합성 경로는 TCA 회로의 중간 대사물인 숙시닐-CoA 또는 아세틸-CoA를 3-옥소-5,6-디하이드로서베릴-CoA 티올라아제, 3-옥소아디필-CoA 디하이드로게나아제, 3-옥소아디필-CoA 디하이드라타아제, 5-카르복실-2-펜텐노일-CoA 리덕타아제, 아디필 CoA 하이드롤라아제 및/또는 아디필 CoA 트랜스퍼라아제의 5단계 효소 반응을 거쳐 아디프산을 합성하므로, 본 발명에 따른 상기 효소들을 발현하는 재조합 미생물의 배양액 또는 균주 추출액을 숙시닐-CoA 및/또는 아세틸-CoA와 반응시킬 경우, 상기 경로를 거쳐 아디프산을 제조할 수 있는 것이다.
- [0041] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0042] <실시예 1> 아디프산의 생합성 경로
- [0043] 포도당으로부터 아디프산을 생산하는 새로운 경로는 도 1에 도시하였다. 본 발명에서 사용한 미생물인 대장균 내에서 포도당은 해당과정을 통해 TCA 회로로 이동하게 된다. TCA 회로의 중간 대사물인 숙시닐-CoA(succinyl-CoA)와 아세틸-CoA(acetyl-CoA)에서 아디프산까지 5단계의 효소 반응을 거치게 된다.
- [0044] 1) 3-옥소-5,6-디하이드로서베릴-CoA 티올라아제(3-Oxo-5,6-dehydrosuberil-CoA thiolase (paaJ)): 숙시닐-CoA 및 아세틸-CoA를 β -케토아디필-CoA(β -ketoadipyl-CoA)로 전환하는 효소
- [0045] 2) 3-옥소아디필-CoA 디하이드로게나아제(3-Oxo-adipyl-CoA dehydrogenase (paaH)): β -케토아디필-CoA를 3-하이드록시아디필-CoA(3-hydroxyadipyl-CoA)로 환원하는 효소
- [0046] 3) 3-옥소아디필-CoA 디하이드라타아제(3-Oxo-adipyl-CoA dehydratase (maoC)): 3-하이드록시아디필-CoA를 2,3-

디하이드로아디필-CoA(2,3-dehydroadipyl-CoA)로 전환하는 효소

[0047] 4) 5-카르복실-2-펜텐노일-CoA 리덕타아제(5-Carboxy-2-pentenoyl-CoA reductase (bcd (etfB+etfA))): 2,3-디하이드로아디필-CoA를 5-카르복시펜타노일-CoA(5-carboxypentanoyl-CoA)로 환원하는 효소

[0048] 5) 아디필 CoA 하이드롤라아제(Adipyl CoA hydrolase (sucC)) 및 아디필 CoA 트랜스퍼라아제(Adipyl CoA transferase (sucD)): 5-카르복시펜타노일-CoA를 아디프산으로 전환하는 효소

[0049] <실시예 2> 아디프산을 합성하는 재조합 미생물의 제조

[0050] (유전자 클로닝 및 재조합 균주)

[0051] 대장균에서 아디프산을 생산하기 위해 각 단계의 유전자들을 클로닝 하였다. paaJ, paaH, 그리고 maoC 유전자는 대장균(*E. coli*) K12 MG1655의 게놈 DNA를 주형으로 하여 PCR을 한 후, *Bam*HI/*Sal*I 제한효소 자리를 이용하여 pAD1 플라스미드에 클로닝하였다. bcd 및 bcd의 서브유닛(subunit)인 etfB+etfA은 클로스트리디움 아세토부틸리쿰(*Clostridium acetobutylicum*) ATCC 824의 게놈 DNA를 주형으로 하여 PCR을 한 후, *Sal*I/*Xba*I 제한효소 자리를 이용하여 pAD5 플라스미드에 클로닝하였다. SucC 및 SucD 유전자도 대장균(*E. coli*) K12 MG1655의 게놈 DNA를 주형으로 하여 PCR을 한 후, *Not*I/*Xho*I 제한효소 자리를 이용하여 pET21α 플라스미드에 클로닝하였다. 클로닝에 사용한 균주 및 플라스미드는 표 1에 나타내었고, PCR 시 사용한 프라이머 서열은 표 2에 나타내었다. 플라스미드 구조는 도 2에 도시하였다. SucC 및 SucD 유전자는 pET21α 벡터에 클로닝하여 독립적으로 *E. coli* K12 MG1655에 넣어주었으며, 나머지 유전자들인 paaJ, paaH, madC, bcd 및 bad의 서브유닛인 etfB+etfA은 같은 플라스미드에 모두 클로닝하였다.

표 1

균주	
<i>E. coli</i> K12 MG1655 lacIQ, <i>E. coli</i> DH5α, <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC824	
플라스미드	설명
pFB	Expression vector:T7:ApR
pFB1	pFB1 derivative containing paaJ
pFB2	pFB1 derivative containing paaH
pFB3	pFB1 derivative containing maoC
pFB4	pFB1 derivative containing bcd
pFB5	pFB1 derivative containing bcd +etfBA
pFB6	pFB1 derivative containing sucC
pFB7	pFB1 derivative containing sucD
pFB8	pFB1 derivative containing pFB6 & pFB7
pAD1	pAD1 fused derivative containing pFB1 & pFB2
pAD2	pAD2 fused derivative containing pFB3 & pFB4
pAD3	pAD3 fused derivative containing pFB3 & pFB5
pAD4	pAD4 fused derivative containing pAD1 & pAD2
pAD5	pAD5 fused derivative containing pAD1 & pAD3
pAD6	pAD6 fused derivative containing pAD4 & pFB8
pAD7	pAD7 fused derivative containing pAD5 & pFB8

[0052]

표 2

프라이머	5'-3' 서열	표적 플라스미드
pFB1_f	AAAGGATCCATGCGTGAAGCCTTTATTTGTG	Plasmid pFB1-paaJ
pFB1_r	AAAGAGCTCTCAACACGCTCCAGAATCATGG	Plasmid pFB1-paaJ
pFB2_f	AAAGAGCTCATGATGATAATGTGCAAACTGTG	Plasmid pFB2-paaH
pFB2_r	AAAGTCGACTTATGACTCATAACCGCTCTCCA	Plasmid pFB2-paaH
pFB3_f	AAAAGTCGACTTAATCGACAAAATCACCGTGC	Plasmid pFB3-maoC
pFB3_r	AAAGCGGCGCTTAATCGACAAAATCACCGTGC	Plasmid pFB3-maoC
pFB4_f	AAAGCGGCGCATGGATTTTAATTTAACAAGAGAACA	Plasmid pFB4-bcd
pFB4_r	TTTCTCGAGTCTAAAAATTTTCTGAAATAACTAATTT	Plasmid pFB4-bcd
pFB5_r	TTTCTCGAGTTAATTATTAGCAGCTTTAACTTGAG	Plasmid pFB5-etfA
pFB6_f	AAAGCGGCGCATGAACCTACATGAATATCAGGCAA	Plasmid pFB6-sucC
pFB6_r	TTTCTCGAGTTATTTTCAGAACAGTTTTCAGTGCT	Plasmid pFB6-sucD
pAD1_jr	ACACCGCTTTCAATGCAGGTCAAACACGCTCCAGAATCATGG	Plasmid pAD1-pFB1 & pFB2
pAD2_hf	CCTGCATTGAAAGCGGGTGTGAGCTCATGATGATAAATGTGCAAACTGTG	Plasmid pAD2-pFB1 & pFB2
pAD2_hr	GACTATTGTGTCGACGATCGTATTATGACTCATAACCGCTCTCCA	Plasmid pAD2-pFB1 & pFB2
pAD3_mf	TACGATGCTGACGACAATAGTCGCGACTTAATCGACAAAATCACCGTGC	Plasmid pAD3-pFB3 & pFB4
pAD3_mr	GCGAGAAATGCTTCGATCTGCGCGGCGGCTTAATCGACAAAATCACCGTGC	Plasmid pAD3-pFB3 & pFB4
pAD4_bf	GCAGATCGAAGCATTCTCGCGCGGCGCATGGATTTTAATTTAACAAGAGAACA	Plasmid pAD4-pFB3 & pFB4

[0053]

[0054]

(아디프산 생산을 위한 재조합 균주의 배양)

[0055]

표 1에서 나타낸 플라스미드 조합 중에서 대조군(void vector), pAD6, 그리고 pAD7을 대장균(*E. coli*) K12 MG1655에 형질전환 시켰다(도 2 참조). 재조합 대장균(*E. coli*) K12 MG1655 균주는 100mL 혈청병(Serum bottle)에서 60mL의 LB 배지에서 배양하였으며, 37℃, 100rpm에서 30시간 동안 배양하였다. 플라스미드 선별 마커로 100μg/mL 농도의 암피실린을 배지에 첨가해주었다. 또한 세포 밀도(OD₆₀₀)가 0.5가 되었을 때 단백질을 발현을 위해 유도제인 0.5mM의 IPTG(β -D-1-thiogalactopyranoside)를 넣어주었다. 샘플링은 5mL씩 실시하였다.

[0056]

(GC-MS를 이용한 아디프산 분석)

[0057]

대조군(void vector), pAD6, 그리고 pAD7의 플라스미드가 들어있는 각각의 재조합 대장균 배양액 중 5mL의 세포 배양액을 13,000rpm에서 1분간 원심분리 하여 세포 펠렛을 얻었다. 그 후에 세포 펠렛을 0.5mL의 메탄올을 이용하여 재현탁 시켰으며, 재현탁액은 초음파 장치를 이용하여 세포를 파쇄 하였다(75 amplitude, 32초간). 그 후에 다시 13,000rpm에서 1분간 원심분리한 후, 상층액을 speed vacuum concentrator를 이용하여 건조시켰다. 건조과정을 거친 후에는 아디프산을 GC-MS로 분석하여 정량하였다.

[0058]

GC-MS 분석을 위한 유도제화 과정은 다음과 같다. 건조시킨 샘플들은 50μL의 2%(w/v)농도의 피리딘에 용해시킨 O-메틸하이드록실아민 하이드로클로라이드(O-methylhydroxylamine hydrochloride in pyridine)을 넣고 75℃에서 30분간 반응을 시켰다. 그리고 80μL의 N-메틸-N-(트리메틸실릴)트리플루오로아세트아마이드(N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide)를 넣고 40℃ 150rpm에서 30분간 반응을 실시하였다.

[0059]

GC-MS 분석을 위한 기기 조건은 다음과 같다. 분석 시 사용한 컬럼은 DB5-MS capillary column이며 GC 컬럼 온도 조건은 먼저 100℃에서 3.5분간 유지하고 160℃까지 승온시킨 후 20분간 유지하였다. 그 후 200℃까지 승온한 후 15분간 유지하고 마지막으로 280℃까지 승온한 후에 5분간 유지하였다. 1μL의 샘플을 splitless mode로 분석하였다. 아디프산 표준물질의 분석을 위해서 아디프산 표준물질(sigma aldrich, product no. 09582)를 위와 같은 방법으로 분석을 실시하였으며 결과는 도 3에 나타내었다. 아디프산 표준물질과 재조합 균주에서 분석한 아디프산은 GC-MS 상의 질량 스펙트럼을 비교함으로써 동정하였다.

[0060]

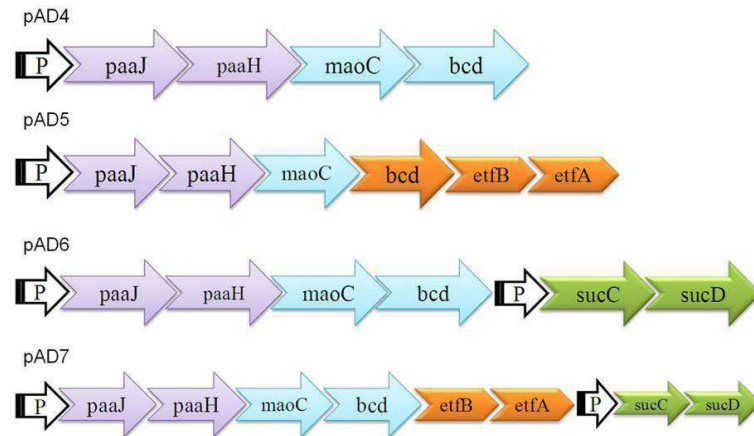
<실시예 3> 재조합 균주에서 생산된 아디프산 분석

[0061]

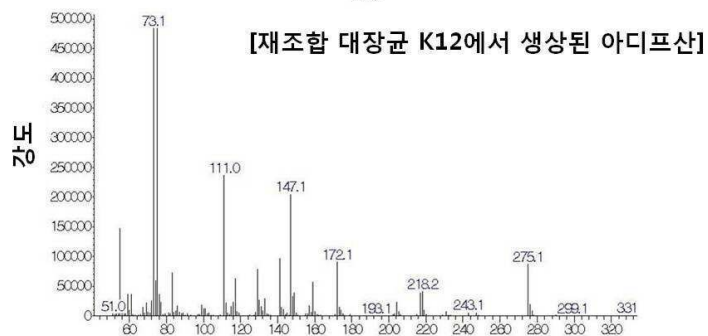
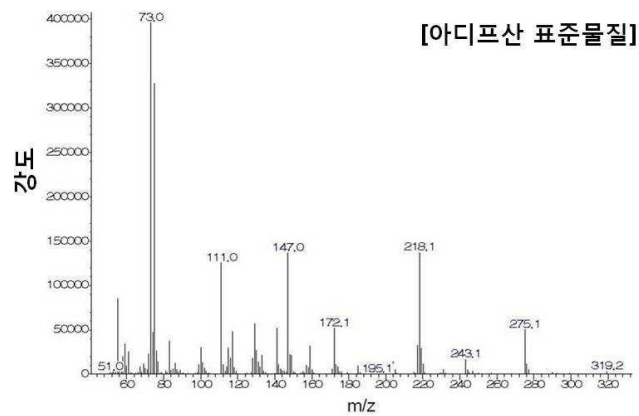
상기 실시예 2에서 얻은 재조합 미생물 배양액을 추출하고, 유도제화를 거친 후 GC-MS로 분석한 결과, 도 4에

도면2

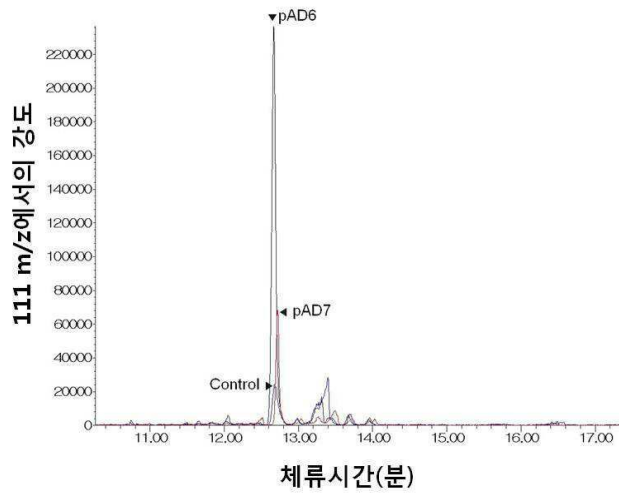
[플라스미드 구조]



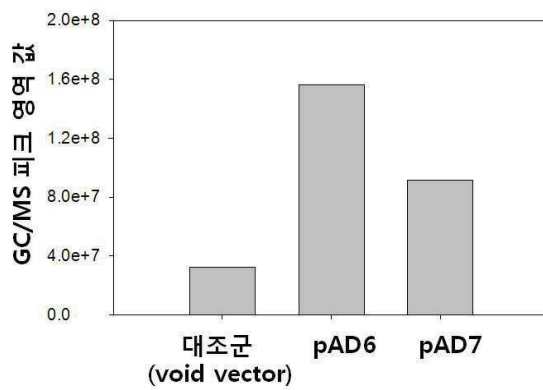
도면3



도면4



도면5



서열 목록

<110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION

<120> Method for preparing adipic acid by novel adipic acid biosynthetic pathway

<130> P130619

<160> 8

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 1206

<212> DNA

<213> Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655, paaJ

<400> 1

atgcgtgaag cctttatttg tgacggaatt cgtacgcaa ttggtcgcta cggcggggca

60

ttatcaagtg ttcgggctga tgatctggct gctatccctt tgcgggaact gctggcgca	120
aaccgcgtc tcgatcgga gtgtatcgat gatgtgatcc tcggctgtgc taatcaggcg	180
ggagaagata accgtaacgt agcccgatg gcgactttac tggcggggct gccgcagagt	240
gtttccggca caaccattaa ccgcttgtgt ggttccgggc tggacgcact ggggtttgcc	300
gcacggcgca ttaaagcggg cgatggcgat ttgctgatcg ccggtggcgt ggagtcaatg	360
tcacgggcac cgtttgttat gggcaaggca gccagtgcac tttctcgta ggctgagatg	420
ttcgatacca ctattggctg gcgatttgtg aaccgcgtca tggctcagca atttggaaact	480
gacagcatgc cggaaacggc agagaatgta gctgaactgt taaaaatctc acgagaagat	540
caagatagtt ttgcgctacg cagtcagcaa cgtacggcaa aagcgcaatc ctcaggcatt	600
ctggctgagg agattgttcc ggttgtgttg aaaaacaaga aaggtgttgt aacagaaata	660
caacatgatg agcatctcg cccggaaacg acgctggaac agttacgtgg gttaaaagca	720
ccatttcgtg ccaatggggt gattaccgca ggcaatgctt ccggggtgaa tgacggagcc	780
gctgcgttga ttattgccag tgaacagatg gcagcagcgc aaggactgac accgcggcg	840
cgtatcgtag ccatggcaac cgccggggtg gaaccgcgcc tgatggggct tggtcgggtg	900
cctgcaactc gccgggtgct ggaacgcgca gggctgagta ttcacgatat ggacgtgatt	960
gaactgaacg aagcgttcgc ggcccaggcg ttgggtgtac tacgcgaatt ggggctgcct	1020
gatgatgccc cacatgttaa cccaacgga ggcgctatcg ccttaggcca tccgttggga	1080
atgagtgtg cccgcctggc actggctgcc agccatgagc tgcatcgcg taacggtcgt	1140
tacgattgt gcaccatgtg catcgggtgc ggtcagggca tcgccatgat tctggagcgt	1200
gtttga	1206
<210> 2	
<211> 1428	
<212> DNA	
<213> Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655, paaH	
<400> 2	
atgatgataa atgtgcaaac tgtggcagtg attgggagcg gcaccatggg ggcaggcatt	60
gctgaagttg ctgccagtca tggacaccag gttttactgt atgacatttc tgctgaagcg	120
ctgacccgcg caatcgacgg gatacacgcg cggctaaatt cacgcgtgac gcggggaaaa	180
ctgactgtcg aaacctgtga acgcacattg aaacgcctga tcccgggtgac cgatattcac	240
gcgctggcag ctgcggacct ggtcattgaa gcggcgtctg aacgtctgga agtcaaaaaa	300
gcgctctttg cacagctggc ggaagtttgc ccgccacaaa cgctattgac cactaacact	360

tcgtcaatct ctataaccgc gattgctgcg gagataaaaa atcctgaacg tgttcgggg	420
ctgcattttt ttaacccggc accggtgatg aagttggtgg aggtggtcag tgggctggca	480
acggcggcgg aagttgttga gcagtttgtt gaactaacgt tgagttgggg taagcagcct	540
gtgcgctgtc attcgactcc tggatttata gttaacctgt ttgcgcgtcc ttattattcc	600
gaggcctggc gggcactgga agagcaggtt gctgcaccag aagtattga cgctgcactt	660
cgcgatggcg ctggtttccc gatggggcgg ctggaattaa ccgatctgat tggtcaggac	720
gtcaattttg ctgtcacctg ttcggtgttt aacgctttct ggaggagcg tcgtttttta	780
ccttcgctgg tgcaacagga actggtgatt ggtggacggt tggcaagaa aagtgggctg	840
ggcgtgtacg actggcgcgc ggaacgtgag gcagttgttg gcctggaagc ggtaagcgac	900
agttttagcc caatgaaagt agaaaagaaa agtgacgggtg tcacggaaat tgacgatgtt	960
ttattgattg agacacaagg cgagacggca caggcgctgg caatacgact ggcacgcccg	1020
gtggtagtga tcgataaaat ggcgggcaag gtggtgacca ttgctgctgc agcggatgaac	1080
ccggactcag cgaccgcaa ggccatttat tacctgcaac agcagggcaa aacagtgtcg	1140
caaattgcag attaccagg aatgctgatt tggcgaacgg tagcaatgat catcaatgaa	1200
gcccttgatg cgcttcaaaa aggcgtggcc tctgaacagg atatcgatac cgccatgcgt	1260
cttggggatg attatccata tggccactt gcctggggag cgcaacttgg ctggcagcga	1320
atattaaggc tccttgaaaa tctacagcat cactatggcg aagaacgcta tcgcccattg	1380
tcattgctgc gccaacgggc gcttctggag agcggttatg agtcataa	1428
<210> 3	
<211> 2046	
<212> DNA	
<213> Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655, maoC	
<400> 3	
atgcagcagt tagccagttt cttatccggt acctggcagt ctggccgggg ccgtagccgt	60
ttgattcacc acgtatttag cggcgaggcg ttatgggaag tgaccagtga aggtcttgat	120
atggcggctg cccgccagtt tgccattgaa aaaggtgccc ccgcccttcg cgctatgacc	180
tttatcgaa gtgcggcgat gcttaaagcg gtcgctaacc atctgctgag tgaaaaagag	240
cgtttctatg ctctttctgc gcaaacaggc gcaacgcggg cagacagttg ggttgatatt	300
gaaggtggca ttgggacgtt atttacttac gccagcctcg gtagccggga gctgcctgac	360
gatacgtgt ggccggaaga tgaattgatc cccttatcga aagaaggtgg atttgccg	420
cgccatttac tgacctcaaa gtcaggcgtg gcagtgcata ttaacgcctt taacttcccc	480

tgctggggaa tgctggaaaa gctggcacca acgtggctgg gcggaatgcc agccatcatc	540
aaaccagcta ccgcgacggc ccaactgact caggcgatgg tgaatcaat tgtcgatagt	600
ggtcttggtc ccgaaggcgc aattagtctg atctgcggtg gtgctggcga cttgttggtg	660
catctggaca gccaggatgt ggtgactttc acgggggtcag cggcgaccgg acagatgctg	720
cgagttcagc caaatatcgt cgccaaatct atccccctca ctatggaagc tgattccctg	780
aactgctgcg tactgggcca agatgtcacc ccggtatcaac cggagtttgc gctgtttatt	840
cgtgaagttg tgcgtgagat gaccacaaaa gccgggcaaa aatgtacggc aatccggcgg	900
attattgtgc cgcaggcatt ggttaatgct gtcagtgtg ctctggttgc gcgattacag	960
aaagtctggt tccgtgatcc tgctcaggaa ggctgaaaa tgggcgcact ggtaaatgct	1020
gagcagcgtg ccgatgtgca ggaaaaagt aacatattgc tggctgcagg atgcgagatt	1080
cgctcgggtg gtcaggcggg tttatctgct gcgggtgcct tcttcccgcc aacctattg	1140
tactgtccgc agccggatga aacaccggcg gtacatgcaa cagaagcctt tggccctgtc	1200
gcaacgtga tgccagcaca aaaccagcga catgctctgc aactggcttg tgcaggcggc	1260
ggtagccttg cgggaacgct ggtgacggct gatccgcaaa ttgcgcgtca gtttattgcc	1320
gacccggcac gtacgcatgg gcgaattcag atctcaatg aagagtcggc aaaagaatcc	1380
accgggcatg gctccccact gccacaactg gtacatgggt ggctgggtcg cgcaggaggc	1440
ggtgaagaat taggcgggtt acgagcgggt aaacattaca tgcagcgaac cgctgttcag	1500
ggtagtccga cgatgcttgc cgctatcagt aaacagtggg tgcgcgggtg gaaagtcgaa	1560
gaagatcgta ttcacccgtt ccgcaaatat ttgaggagc tacaaccagg cgacagcctg	1620
ttgactcccc gccgcacaat gacagaggcc gatattgtta actttgcttg cctcagcggc	1680
gatcatttct atgcacatat ggataagatt gctgctgccg aatctatctt cggtagcggg	1740
gtggtgcatg ggtattttgt gctttctgcg gctcgggtgc tgtttgtcga tgccgggtgc	1800
ggctccgtca ttgctaacta cgggctggaa agcttgcgtt ttatcgaacc cgtaaagcca	1860
ggcgatacca tccagggtcg tctcacctgt aagcgcaaga cgctgaaaaa acagcgtagc	1920
gcagaagaaa aaccaacagg tgtggtggaa tgggctgtag aggtattcaa tcagcatcaa	1980
accccggtgg cgctgtattc aattctgacg ctggtggcca ggcagcacgg tgattttgtc	2040
gattaa	2046
<210> 4	
<211> 1140	
<212> DNA	
<213> Clostridium acetobutylicum ATCC 824, bcd	

<400> 4

atggatttta atttaacaag agaacaagaa ttagtaagac agatggttag agaatttgct	60
gaaaaatgaag ttaaacctat agcagcagaa attgatgaaa cagaaagatt tccaatggaa	120
aatgtaaaga aaatgggtca gtatggtatg atgggaattc cattttcaaa agagtatggt	180
ggcgcagggtg gagatgtatt atcttatata atcgccgttg aggaattatc aaaggtttgc	240
ggtactacag gagttattct ttcagcacat acatcacttt gtgcttcatt aataaatgaa	300
catggtacag aagaacaaaa acaaaaatat ttagtacctt tagctaaagg tgaaaaaata	360
ggtgcttatg gattgactga gccaaatgca ggaacagatt ctggagcaca acaaacagta	420
gctgtacttg aaggagatca ttatgtaatt aatggttcaa aaatattcat aactaatgga	480
ggagtgtcag atacttttgt tataatttga atgactgaca gaactaaagg aacaaaaggt	540
atcagcat ttataataga aaaaggcttc aaaggtttct ctattggtaa agttgaacaa	600
aagcttgaa taagagcttc atcaacaact gaacttgtat ttgaagatat gatagtacca	660
gtagaaaaca tgattggtaa agaaggaaaa ggcttcctta tagcaatgaa aactcttgat	720
ggaggaagaa ttggtatagc agctcaagct ttaggtatag ctgaagggtgc tttcaacgaa	780
gcaagagctt acatgaagga gagaaaaaca ttggaagaa gccttgacaa attccaaggt	840
cttgcattga tgatggcaga tatggatgta gctatagaat cagctagata tttagtatat	900
aaagcagcat atcttaaca agcaggactt ccatacacag ttgatgctgc aagagctaag	960
cttcattgtg caaatgtagc aatggatgta acaactaagg cagtacaatt atttggtgga	1020
tacggatata caaaagatta tccagttgaa agaatgatga gagatgctaa gataactgaa	1080
atatatgaag gaacttcaga agttcagaaa ttagttatct caggaaaaat ttttagataa	1140
	1140

<210> 5

<211> 780

<212> DNA

<213> Clostridium acetobutylicum ATCC 824, etfB

<400> 5

atgaatatag ttgtttgttt aaaacaagtt ccagatacag cggaagttag aatagatcca	60
gttaaggga cacttataag agaaggagtt ccatcaataa taaatccaga tgataaaaac	120
gcacttgagg aagctttagt attaaaagat aattatggtg cacatgtaac agttataagt	180
atgggacctc cacaagctaa aaatgcttta gtagaagctt tggctatggg tgctgatgaa	240
gctgtacttt taacagatag agcatttgga ggagcagata cacttgcgac ttcacataca	300

attgcagcag gaattaagaa gctaaaatat gatatagttt ttgctggaag gcaggctata	360
gatggagata cagctcaggt tggaccagaa atagctgagc atcttggaat acctcaagta	420
acttatgttg agaaagtga agttgatgga gatactttaa agattagaaa agcttgggaa	480
gatggatatg aagttgttga agttaagaca ccagttcttt taacagcaat taaagaatta	540
aatgttccaa gatatatgag ttagaataaa atattcggag catttgataa agaagtaaaa	600
atgtggactg ccgatgatat agatgtagat aaggctaatt taggtcttaa aggttcacca	660
actaaagtta agaagtcac aactaaagaa gttaaaggac agggagaagt tattgataag	720
cctgttaagg aagcagctgc atatgttgtc tcaaaattaa agaagaaca ctatatttaa	780
<210> 6	
<211> 1011	
<212> DNA	
<213> Clostridium acetobutylicum ATCC 824, etfA	
<400> 6	
atgaataaag cagattacaa gggcgtatgg gtgtttgctg aacaaagaga cggagaatta	60
caaaagggtat cattggaatt attaggtaaa ggtaaggaaa tggctgagaa attaggcgtt	120
gaattaacag ctgttttact tggacataat actgaaaaaa tgtcaaagga tttattatct	180
catggagcag ataaggtttt agcagcagat aatgaacttt tagcacattt ttcaacagat	240
ggatatgcta aagttatatg tgatttagtt aatgaaagaa agccagaaat attattcata	300
ggagctactt tcataggaag agatttagga ccaagaatag cagcaagact ttctactggt	360
ttaactgctg attgtacatc acttgacata gatgtagaaa atagagattt attggctaca	420
agaccagcgt ttggtggaaa tttgatagct acaatagttt gttcagacca cagaccacaa	480
atggctacag taagacctgg tgtgtttgaa aaattacctg ttaatgatgc aaatgtttct	540
gatgataaaa tagaaaaagt tgcaattaaa ttaacagcat cagacataag aacaaaagtt	600
tcaaaagttg ttaagcttgc taaagatatt gcagatatcg gagaagctaa ggtattagtt	660
gctggttgta gaggagtgg aagcaaagaa aactttgaaa aacttgaaga gttagcaagt	720
ttacttggtg gaacaatagc cgcttcaaga gcagcaatag aaaaagaatg ggttgataag	780
gaccttcaag taggtcaaac tggtaaaact gtaagaccaa ctctttatat tgcattggtt	840
atatcaggag ctatccagca tttagcaggt atgcaagatt cagattacat aattgctata	900
aataaagatg tagaagcccc aataatgaag gtagcagatt tggctatagt tgggtgatga	960
aataaagttg taccagaatt aatagctcaa gttaaagctg ctaataatta a	1011

<210> 7

<211> 1167

<212> DNA

<213> Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655, sucC

<400> 7

atgaacttac atgaatatca ggcaaaacaa ctttttggcc gctatggctt accagcaccg	60
gtgggttatg cctgtactac tccgcgcgaa gcagaagaag ccgcttcaaa aatcggtgcc	120
gggtccgtggg tagtgaaatg tcaggttcac gctggtgccc gcggtaaagc gggcggtgtg	180
aaagtgttaa acagcaaaga agacatccgt gcttttgagc aaaactggct gggcaagcgt	240
ctggtaacgt atcaaacaga tgccaatggc caaccggtta accagattct ggttgaagca	300
gcgaccgata tcgctaaaga gctgtatctc ggtgccgttg ttgaccgtag ttcccgtcgt	360
gtggtcttta tggcctccac cgaaggcggc gtggaatcg aaaaagtggc ggaagaaact	420
ccgcacctga tccataaagt tgcgttgat ccgtgactg gcccgatgcc gtatcaggga	480
cgcgagctgg cgttcaaact gggctctgaa ggtaaactgg ttcagcagtt caccaaaatc	540
ttcatgggcc tggcgacat tttcctggag cgcgacctgg cgttgatcga aatcaaccg	600
ctggtcatca ccaaacaggg cgatctgatt tgcctcgacg gcaaaactggc cgctgacggc	660
aacgcactgt tccgccagcc tgatctgcgc gaaatgcgtg accagtcgca ggaagatccg	720
cgtgaagcac aggcctgcaca gtgggaactg aactacgttg cgctggacgg taacatcgg	780
tgtatggtta acggcgcagg tctggcgatg ggtacgatgg acatcgtaa actgcacggc	840
ggcgaaccgg ctaacttctt tgacgttgcc ggccggcgcaa ccaaagaacg tgtaaccgaa	900
gcgttcaaaa tcatcctctc tgacgacaaa gtgaaagccg ttctggttaa catcttcggc	960
ggtatcggtc gttgcgacct gatcgctgac ggtatcatcg gcgcggtagc agaagtgggt	1020
gttaacgtac cggctcgtgt acgtctggaa ggtaacaacg ccgaactcgg cgcgaaagaaa	1080
ctggctgaca gcggcctgaa tattattgca gcaaaaggtc tgacggatgc agctcagcag	1140
gttggtgccc cagtggaggg gaaataa	1167

<210> 8

<211> 870

<212> DNA

<213> Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655, sucD

<400> 8

atgtccattt taatcgataa aaacaccaag gttatctgcc agggctttac cggtagccag	60
gggactttcc actcagaaca ggccattgca tacggcacta aaatggttgg cggcgtaacc	120

ccaggtaaag gcggcaccac ccacctcggc ctgccggtgt tcaacaccgt gcgtgaagcc	180
gttgctgcc a ctggcgtac cgtttctgtt atctacgtac cagcacggt ctgcaaagac	240
tccattctgg aagccatcga cgcaggcatc aaactgatta tcaccatcac tgaaggcatc	300
ccgacgctgg atatgctgac cgtgaaagtg aagctggatg aagcaggcgt tcgtatgac	360
ggcccgaact gcccaggcgt tatcactccg ggtgaatgca aaatcggtat ccagcctggt	420
cacattcaca aaccgggtaa agtgggtatc gtttcccggt ccggtacact gacctatgaa	480
gcggttaaac agaccacgga ttacggtttc ggtcagtcga cctgtgtcgg tatcggcggt	540
gacccgatcc cgggctctaa ctttatcgac attctcgaaa tgttcgaaaa agatccgcag	600
accgaagcga tcgtgatgat cggtgagatc ggcggtagcg ctgaagaaga agcagctgcg	660
tacatcaaag agcacgttac caagccagtt gtgggttaca tcgctggtgt gactgcgccg	720
aaaggcaaac gtatgggcca cgcgggtgcc atcattgccg gtgggaaagg gactgcggat	780
gagaaattcg ctgctctgga agccgcaggc gtgaaaaccg ttcgcagcct ggcggtatc	840
ggtgaagcac tgaaaactgt tctgaaataa	870