



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0086931
(43) 공개일자 2017년07월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/74 (2006.01) C12P 7/28 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/74 (2013.01)
C12P 7/28 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0006582
(22) 출원일자 2016년01월19일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
오민규
경기도 성남시 분당구 정자일로 248, 602동 1601호(정자동, 파크뷰)
장지웅
부산광역시 영도구 와치로 266, 106동 1501호(동삼동, 벽산아파트)
(74) 대리인
특허법인다나

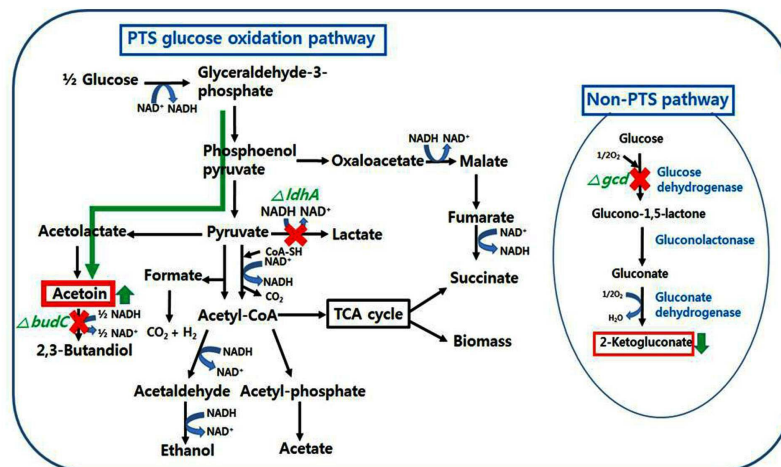
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 아세트인 생성능이 증진된 재조합 미생물 및 이를 이용한 아세트인의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 아세트인 생성능이 증진된 재조합 미생물 및 이를 이용한 아세트인의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명의 재조합 미생물은 대사공학적 방법을 통하여 지속적인 호기성 조건에서도 아세트인의 높은 생산수율을 유지할 수 있으며, 최소배지에 배양시킴으로써 아세트인의 생산비용을 효과적으로 절감시킬 수 있음을 확인하였는바, 아세트인 생산의 핵심 기술로 활용될 수 있을 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12Y 101/01027 (2013.01)

C12Y 101/01047 (2013.01)

C12Y 101/01304 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 G031715211

부처명 산업통상자원부

연구관리전문기관 한국에너지기술평가원

연구사업명 에너지기술개발사업

연구과제명 케톤-알코올 발효공정과 화학축매공정을 융합한 고탄소 바이오연료 생산 기술

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2014.12.01 ~ 2016.01.31

명세서

청구범위

청구항 1

2,3-부탄디올 (2,3-butandiol) 및 락테이트 (Lactate) 생합성 경로를 갖는 미생물에 있어서,

상기 미생물은, 젖산 탈수소효소 (Lactate dehydrogenase) 및 아세토인 환원효소 (Acetoin reductase)의 활성이 약화 또는 불활성화되어 아세토인 생성능이 증진된, 엔테로박테리아세아에 (*Enterobacteriaceae*) 과의 세균인 것을 특징으로 하는, 재조합 미생물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 미생물은, 젖산 탈수소효소를 코딩하는 *ldhA* 유전자, 및 아세토인 환원효소를 코딩하는 *budC* 유전자가 결실되어 있는 것을 특징으로 하는, 재조합 미생물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 미생물은, 포도당 탈수소효소 (Glucose dehydrogenase)의 활성이 추가적으로 약화 또는 불활성화되어 있는 것을 특징으로 하는, 재조합 미생물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 미생물은, 포도당 탈수소효소를 코딩하는 *gcd* 유전자가 추가적으로 결실되어 있는 것을 특징으로 하는, 재조합 미생물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 세균은, 엔테로박터 (*Enterobacter*) 속 또는 크렙시엘라 (*Klebsiella*) 속의 세균인 것을 특징으로 하는, 재조합 미생물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 세균은, 엔테로박터 에어로게네스균 (*Enterobacter aerogenes*)인 것을 특징으로 하는, 재조합 미생물.

청구항 7

(a) 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 재조합 미생물을 탄소원이 포함된 배지에 배양시키는 단계; 및

(b) 상기 재조합 미생물이 배양된 배지로부터 아세트인을 회수하는 단계를 포함하는, 아세트인의 제조방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 세균은, 엔테로박터 속 또는 크렙시엘라 속의 세균인 것을 특징으로 하는, 제조방법.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 세균은, 엔테로박터 에어로게네스균인 것을 특징으로 하는, 제조방법.

청구항 10

제7항에 있어서,

상기 배양배지는, Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , NaCl , NH_4Cl , MgSO_4 , 및 CaCl_2 를 함유한 최소배지인 것을 특징으로 하는, 제조방법.

청구항 11

제7항에 있어서,

상기 배양은, 호기성 조건에서 실시되는 것을 특징으로 하는, 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 아세트인 생성능이 증진된 재조합 미생물 및 이를 이용한 아세트인의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 화석 연료의 사용에 따른 지구 온난화 가스 및 폐기물은 인류에게 심각한 환경적인 위기를 초래하고 있다. 이에, 화학 공업을 대체할 수 있는, 즉, 인류에게 유해한 폐기물의 생산 및 에너지 소비를 최소화할 수 있는 바이오매스를 원료로 사용하는 환경 친화적인 새로운 생물 공정의 개발이 필요하다. 바이오에너지로 널리 알려진 바이오에탄올, 바이오디젤, 바이오가스에 대한 관심이 증가하고 있으며, 언급된 종류의 바이오에너지 모두 전력 생산이나 수송용 연료로 활용되고 있으나, 생산 방법에서의 몇몇 단점으로 인해 새로운 신재생에너지 자원인 탄화수소 형태의 화합물에 대한 관심이 증가되고 있다. 이에 따라 식품이나 제약, 화장품 등 많은 산업에서 다양한 산업적 가치를 지닌 플랫폼용 화합물인 아세트인 (Acetoin)을 대사 산물로서 생성할 수 있는 재조합 균주에 대한 관심이 증대되고 있다.

[0004] 우선, 지금까지 연구된 재조합 균주들은 복합배지에서 배양되어 아세트인을 생산하여 왔다. 그러나 상기 복합배지에는 Yeast extract, Corn steep liquor 등의 성분들이 함유되어 있으며, 이러한 성분은 배양액의 총 비용에서 50% 이상 차지하는바, 생산비용을 증가시키는 결과를 초래하였다. 이뿐만 아니라, 다양한 복합배지의 성분은 미생물 배양 후, 아세트인을 정제하는 과정에서 추가적인 문제를 일으키기도 하는바, 실제 상용화에 있어서 걸림돌이 되고 있는 실정이다.

[0005] 한편, 대사 산물로서 아세트인을 생산할 수 있는 균주인 *Enterobacteriaceae*는 포도당을 탄소원으로 하여 분해하는 2개의 대사 경로, 즉 Phosphotransferase system (PTS)을 통해 6-Phospho-glucose로 전환시키는 PTS 대사

경로와 Glucose dehydrogenase를 이용하여 gluconate로 전환시키는 Non-PTS 대사 경로를 지니고 있다 (도 1 참조). 해당 균주는, 이들 중 PTS 대사 경로를 통해 포도당을 세포 내로 유입시키고 해당과정을 거친 후, Acetolactate synthase와 Acetolactate decarboxylase에 의해 아세트인을 생성하게 되는데, 상기 생성된 아세트인은 Aceotoin reductase에 의해 추가적으로 대사되어 2,3-부탄디올이 생산되기 때문에 아세트인의 생산수율은 크게 감소하게 된다. 또한, 상기 균주를 배양하는 과정에서, 호기성 조건을 유지해야 아세트인의 생산효율을 높일 수 있으나, *Enterobacteriaceae*는, 호기성 조건이 지속되면 포도당이 PTS 회로가 아닌, Non-PTS 대사 경로를 통해 포도당이 분해되고 2-Ketogluconate가 쌓이게 되어 아세트인의 생산효율이 급격하게 떨어지게 된다. 따라서 아세트인의 대량생산을 위해서는, PTS 대사 경로에서의 추가적인 대사를 차단하고, 호기성 조건이 지속되는 조건에서도 아세트인의 높은 생산효율이 유지되는 재조합 균주의 개발이 필요하다.

[0006] 이러한 배경하에서, 아세트인의 생산효율을 증진시키고, 생산비용을 절감시킬 수 있는 새로운 재조합 균주에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으나, 아직은 미비한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 한국 공개특허 제2015-0076410호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로서, 본 발명자들은, PTS (Phosphotransferase system) 대사 경로 내 아세트인의 추가적인 대사를 억제할 뿐만 아니라, 지속적인 호기성 조건에서도 Non-PTS 대사 경로가 활성화되지 않는 재조합 미생물을 최초로 규명하였으며, 이를 통해 대사 산물인 아세트인의 생산수율을 현저하게 향상시킬 수 있음을 확인하고, 이에 기초하여 본 발명을 완성하게 되었다.

[0010] 이에, 본 발명의 목적은, 2,3-부탄디올 (2,3-butandiol) 및 락테이트 (Lactate) 생합성 경로를 갖는 미생물로서, 젖산 탈수소효소 (Lactate dehydrogenase) 및 아세트인 환원효소 (Acetoin reductase)의 활성이 약화 또는 불활성화되어 아세트인 생성능이 증진된, 엔테로박테리아세아에 (*Enterobacteriaceae*) 과의 세균인 재조합 미생물을 제공하는 것이다.

[0011] 또한, 본 발명의 다른 목적은, 상기 재조합 미생물에 있어서, 포도당 탈수소효소 (Glucose dehydrogenase)의 활성이 추가적으로 약화 또는 불활성화된, 아세트인 생성능이 증진된 재조합 미생물을 제공하는 것이다.

[0012] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은, (a) 상기 재조합 미생물을 탄소원이 포함된 배지에 배양시키는 단계; 및 (b) 상기 재조합 미생물이 배양된 배지로부터 아세트인을 회수하는 단계를 포함하는, 아세트인의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0014] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0016] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 2,3-부탄디올 (2,3-butandiol) 및 락테이트 (Lactate) 생합성 경로를 갖는 미생물로서, 젖산 탈수소효소 (Lactate dehydrogenase) 및 아세트인 환원효소 (Acetoin reductase)의 활성이 약화 또는 불활성화되어 아세트인 생성능이 증진된, 엔테로박테리아세아에 (*Enterobacteriaceae*) 과의 세균인 재조합 미생물을 제공한다.

[0017] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 미생물은, 젖산 탈수소효소를 코딩하는 *ldhA* 유전자 및 아세트인 환원효소를 코

당하는 *budC* 유전자가 결실되어 있을 수 있다.

- [0018] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 미생물은, 포도당 탈수소효소 (Glucose dehydrogenase)의 활성이 추가로 약화 또는 불활성화될 수 있으며, 포도당 탈수소효소 (Glucose dehydrogenase)를 코딩하는 *gcd* 유전자가 추가적으로 결실되어 있을 수 있다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 세균은, 엔테로박터 (*Enterobacter*) 속 또는 크렙시엘라 (*Klebsiella*) 속 일 수 있으며, 바람직하게는, 엔테로박터 에어로게네스균 (*Enterobacter aerogenes*)일 수 있다.
- [0020] 본 발명은 (a) 상기 재조합 미생물을 탄소원이 포함된 배지에 배양시키는 단계; 및 (b) 상기 재조합 미생물이 배양된 배지로부터 아세트인을 회수하는 단계를 포함하는, 아세트인의 제조방법을 제공한다.
- [0021] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 세균은, 엔테로박터 속 또는 크렙시엘라 속일 수 있으며, 바람직하게는, 엔테로박터 에어로게네스균일 수 있다.
- [0022] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 배양 배지는 Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , NaCl , NH_4Cl , MgSO_4 , 및 CaCl_2 를 함유한 최소배지일 수 있다.
- [0023] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 배양은 호기성 조건에서 실시될 수 있다.

발명의 효과

- [0025] 본 발명에 따른 재조합 미생물은, 대사공학적 방법을 통하여 지속적인 호기성 조건에서도 대사 산물인 아세트인의 생산수율을 현저하게 향상시킬 수 있을 뿐만 아니라, 복합배지에서 배양되는 종래의 기술과 달리, 최소배지에서 배양함으로써 아세트인의 생산비용을 효과적으로 절감시킬 수 있는바, 아세트인 생산의 핵심 기술로 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0027] 도 1은, 본 발명의 재조합 균주에서, PTS 포도당 분해 회로, 및 Non-PTS 포도당 분해 회로 내 차단되는 대사 경로를 나타낸 도이다.
- 도 2는, 본 발명에서 이용된 람다 레드 재조합 기술 (λ -red-recombination)을 간략하게 나타낸 도이다.
- 도 3은, 본 발명의 재조합 균주를 이용한 아세트인의 생산방법에서, 아세트인의 생성수율을 비교한 것으로, A는 재조합 균주 II, B는 재조합 균주 I, 및 C는 대조균 균주로부터 생성된 아세트인의 생성수율을 나타낸 결과이다.
- 도 4는, (a) *Serratia marcescens* H32 배양을 위한 복합배지, (b) *Paenibacillus polymyxa* CS107J 배양을 위한 복합배지, 및 (c) 본 발명의 M9 최소배지의 조성 및 이의 생산단가를 나타낸 결과이다.
- 도 5는, 본 발명의 재조합 균주를 이용한 아세트인의 생산방법에서, 생성된 2,3-부탄디올의 농도를 비교한 것으로, A는 재조합 균주 II, B는 재조합 균주 I, 및 C는 대조균 균주로부터 생성된 2,3-부탄디올의 농도를 나타낸 결과이다.
- 도 6은, 본 발명의 재조합 균주를 이용한 아세트인의 생산방법에서, 생성된 2-케토글루코네이트의 농도를 비교한 것으로, A는 재조합 균주 II, B는 재조합 균주 I, 및 C는 대조균 균주로부터 생성된 2-케토글루코네이트의 농도를 나타낸 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0028] 이하, 본 발명을 상세히 설명하기로 한다.
- [0029] 본 발명은, 2,3-부탄디올 (2,3-butandiol) 및 락테이트 (Lactate) 생합성 경로를 갖는 미생물로서, 젖산 탈수소효소 (Lactate dehydrogenase) 및 아세트인 환원효소 (Acetoin reductase)의 활성이 약화 또는 불활성화되어 아세트인 생성능이 증진된, 엔테로박테리아세아에 (*Enterobacteriaceae*) 과의 세균인 재조합 미생물을 제공한다.

- [0030] 또한, 본 발명은, 상기 재조합 미생물에서, 포도당 탈수소효소 (Glucose dehydrogenase)의 활성이 추가적으로 약화 또는 불활성화된, 아세토인 생성능이 증진된 재조합 미생물을 제공한다.
- [0031] 본 발명에서, “아세토인 (Acetoin)”은 2,3-부탄디올의 전구체로서, 3-하이드록시부타논 (3-Hydroxybutanone) 또는 아세틸 메틸 카비놀 (acetyl methyl carbinol)이라고도 일컬으며, Phosphotransferase system (PTS) 대사 경로의 대사 산물 중 하나이다. 최근, 아세토인의 대량생산을 위한 다양한 재조합 균주들이 개발되고 있으나, 배양배지의 비경제성 및 호기성 조건에서 활성화되는 Non-PTS 대사 경로에 의해 어려움을 겪고 있는 실정이다.
- [0032] 본 발명에서 사용되는 용어, “젖산 탈수소효소” 및 “아세토인 환원효소”는 Phosphotransferase system (PTS) 대사 경로에 관여하는 효소로서, 상기 젖산 탈수소효소는 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 서열번호 2의 염기서열로, 상기 아세토인 환원효소는 서열번호 3의 아미노산 서열 또는 서열번호 4의 염기서열로 이루어질 수 있고, 상기 서열번호 1 내지 4의 아미노산 또는 염기서열과 각각 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 포함할 수 있다. 도 1 나 타낸 바와 같이, 이들은 각각 피루브산을 젖산으로 전환시키는 반응, 및 아세토인을 2,3-부탄다이올로 전환시키는 반응을 촉매한다. 즉, 포도당의 대사과정에서 젖산 탈수소효소, 및 아세토인 환원효소에 의해 부산물인 젖산 및 2,3-부탄다이올이 생성되며, 이는 아세토인의 생산수율을 저하시키는 요인으로 작용하는바, 상기 효소들의 활성을 약화 또는 불활성화시킬 필요가 있다.
- [0033] 본 발명에서 사용되는 용어, “포도당 탈수소효소”는 호기성 조건에서 활성화되는 Non-PTS 대사 경로에 관여하는 효소로서, 상기 포도당 탈수소효소는 서열번호 5의 아미노산 서열 또는 서열번호 6의 염기서열로 이루어질 수 있고, 상기 서열번호 5의 아미노산 및 서열번호 6의 염기서열과 각각 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 포함할 수 있다. 도 1에 나타낸 바와 같이, 이는 포도당을 글루코-1,5-락톤으로 전환시키는 반응을 촉매한다. 즉, 아세토인의 생산수율은 호기성 조건에서 더욱 증진될 수 있으나, 이러한 호기성 조건이 지속되면 포도당이 PTS 회로가 아닌, Non-PTS 대사 경로에 의해 포도당이 분해되고 2-Ketogluconate가 쌓이게 되어 아세토인 생산 효율이 급격하게 감소하게 된다. 따라서 아세토인의 생산수율을 증진시키기 위해서는 상기 효소의 활성을 약화 또는 불활성화시켜 Non-PTS 대사 경로를 차단시킬 필요가 있다.
- [0034] 본 발명에서, 상기 “효소 활성의 약화”는 본래 미생물이 천연의 상태 또는 변형 전의 상태에서 가지고 있는 효소의 활성과 비교하였을 때, 그 활성이 감소된 것을 의미한다. 상기 약화는 상기 효소를 코딩하는 유전자의 변이 등으로 효소 자체의 활성이 본래 미생물이 가지고 있는 효소의 활성에 비해 감소한 경우와, 이를 코딩하는 유전자의 발현 저해 또는 번역 (translation) 저해 등으로 세포 내에서 전체적인 효소 활성 정도가 천연형 또는 변형 전의 균주에 비하여 낮은 경우를 포함하는 개념이다.
- [0035] 또한, 상기 “불활성화”는 효소를 코딩하는 유전자의 발현이 천연형 균주 또는 변형 전의 균주에 비하여 전혀 발현이 되지 않는 경우 및 발현이 되더라도 그 활성이 없는 경우를 의미한다.
- [0036] 이러한 효소 활성의 약화 또는 불활성화는, 당해 분야에 잘 알려진 다양한 방법의 적용으로 달성될 수 있다. 상기 방법의 예로, 상기 효소의 활성이 제거된 경우를 포함하여 상기 효소의 활성이 감소되도록 돌연변이된 유전자로, 염색체상의 상기 효소를 코딩하는 유전자를 대체하는 방법; 상기 효소를 코딩하는 염색체상의 유전자의 발현 조절 서열에 변이를 도입하는 방법; 상기 효소를 코딩하는 유전자의 발현 조절 서열을 활성이 약하거나 없는 서열로 교체하는 방법; 상기 효소를 코딩하는 염색체상의 유전자의 전체 또는 일부를 결실시키는 방법; 상기 염색체상의 유전자의 전사체에 상보적으로 결합하여 상기 mRNA로부터 효소로의 번역을 저해하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (예컨대, 안티센스 RNA)를 도입하는 방법; 상기 효소를 코딩하는 유전자의 SD 서열 앞단에 SD 서열과 상보적인 서열을 인위적으로 부가하여 2차 구조물을 형성시켜 리보솜(ribosome)의 부착이 불가능하게 만드는 방법 및 해당 서열의 ORF(open reading frame)의 3' 말단에 역전사 되도록 프로모터를 부가하는 RTE(Reverse transcription engineering) 방법 등이 있다.
- [0037] 구체적으로, 젖산 탈수소효소를 코딩하는 *ldhA* 유전자, 아세토인 환원효소를 코딩하는 *budC* 유전자, 또는 포도당 탈수소효소를 코딩하는 *gcd* 유전자의 전체 또는 일부를 결실시킴으로써 각각의 효소에 대한 활성을 약화 또는 불활성화시킬 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0038] 본 발명에서, 상기 세균은 엔테로박터 (*Enterobacter*) 속 또는 크렙시엘라 (*Klebsiella*) 속일 수 있으며, 바람직하게는, 엔테로박터 에어로게네스균 (*Enterobacter aerogenes*)일 수 있으나, 2,3-부탄디올 (2,3-butandiol) 및 락테이트 (Lactate) 생합성 경로를 갖는 미생물이라면, 제한 없이 포함될 수 있다.

- [0039] 본 발명의 일 실시예에서는, 람다 레드 재조합 기술을 통해 *ldhA* 및 *budC* 유전자가 제거된 재조합 균주 I와 *ldhA*, *budC*, 및 *gcd* 유전자가 제거된 재조합 균주 II를 제조하였으며, 이를 통해 아세트인의 생산수율을 현저하게 증가시킬 수 있으며, 최소배지에 배양시킴으로써 아세트인의 생산비용을 효과적으로 절감시킬 수 있음을 확인하였다 (실시예 1 참조).
- [0040] 또한, 상기 재조합 균주를 이용하여 아세트인을 생산함으로써, PTS 대사 경로의 부산물인 2,3-부탄디올, Non-PTS 대사 경로의 부산물인 2-케토글루코네이트의 생성을 감소시킬 수 있음을 확인하였다 (실시예 2 참조).
- [0041] 이에, 본 발명은, (a) 상기 재조합 미생물을 탄소원이 포함된 배지에 배양시키는 단계; 및 (b) 상기 재조합 미생물이 배양된 배지로부터 아세트인을 회수하는 단계를 포함하는, 아세트인의 제조방법을 제공한다.
- [0042] 본 발명에서, 상기 세균은 엔테로박터 (*Enterobacter*) 속 또는 크렙시엘라 (*Klebsiella*) 속일 수 있으며, 바람직하게는, 엔테로박터 에어로게네스균 (*Enterobacter aerogenes*)일 수 있으나, 2,3-부탄디올 (2,3-butandiol) 및 락테이트 (Lactate) 생합성 경로를 갖는 미생물이거나, 제한 없이 포함될 수 있다.
- [0043] 본 발명의 방법에 사용되는 배지는, Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , NaCl , NH_4Cl , MgSO_4 , 및 CaCl_2 를 함유한 최소배지로서, 바람직하게 5~7g/l의 Na_2HPO_4 , 2~4g/l의 KH_2PO_4 , 0.3~0.7g/l의 NaCl , 0.5~1.5g/l의 NH_4Cl , 0.39~0.59g/l의 MgSO_4 , 및 0.004~0.0024g/l의 CaCl_2 로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0044] 본 발명의 방법에 사용되는 배지에 이용되는 탄소원으로는, 배지에 탄소원으로 첨가될 수 있는 통상의 탄수화물을 포함하며, 바람직하게는 수크로스, 락토스, 말토스, 트레할로스, 투라노스, 셀로비오스, 라피노스, 멜레치토스, 말로트리오스, 아카보스, 스타키오스, 글루코스, 아밀로스, 셀룰로스, 프럭토스, 아노스, 또는 갈락토스일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0045] 또한, 본 발명의 배양 중에 수산화암모늄, 수산화칼륨, 암모니아, 인산, 및 황산과 같은 화합물을 배양물에 적절한 방식으로 첨가하여, 배양물의 pH를 조절할 수 있으며, 배양물의 호기 상태를 유지하기 위하여, 배양물 내로 산소 또는 산소 함유 기체를 주입할 수도 있다.
- [0047] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.
- [0049] **제조예 1. 아세트인 생산능이 재조합 균주의 제조**
- [0050] 본 실시예에서는, Lactate dehydrogenase 유전자 (*ldhA*)가 결실된 *Enterobacter aerogenes* (KCTC 2190)를 모 균주로 하여, 대사공학적 방법인 람다 레드 재조합 기술 (λ -red-recombination)을 통해 아세트인 생산능이 증진된 재조합 균주를 제조하였다. 즉, 상기 모 균주로부터, Acetoin reductase 유전자 (*budC*)를 제거하여 아세트인에서 2,3-부탄디올 (2,3-butandiol)로 전환되는 경로가 차단된 재조합 균주 I ($\Delta ldhA$, $\Delta budC$), 상기 Acetoin reductase 유전자뿐만 아니라, Glucose dehydrogenase 유전자 (*gcd*)도 제거하여 호기성 조건에서 활성화되는 Non-PTS 포도당 분해 경로까지 차단된 재조합 균주 II ($\Delta ldhA$, $\Delta budC$, Δgcd)를 제조하였다.
- [0051] λ -red-recombinase 효소, 및 Flippase 효소의 발현을 위하여, 각각 Gene bridge GmbH사 pRedET 플라스미드 및 707FLP 플라스미드를 이용하였고, 카나마이신 시퀀스 등이 포함된 카세트 DNA는 pKD4 plasmid를 주형으로 이용하여 제조하였다.
- [0052] 구체적으로, 모 균주에 전기천공법 (electroporator, 1800V)을 통해 pRedET 플라스미드를 도입한 후, 이를 테트라사이클린이 첨가된 배지에 30에서 배양시켰다. 이와 함께, FRT-카나마이신-FRT 카세트를 포함하는 pKD4 플라스미드를 주형으로 하여, 제거하고자 하는 타겟 유전자의 양 주변부와 상동한 염기쌍 (homologous region, 50bp)이 포함된 프라이머를 제조한 후, Tm값 45로 GS taq 폴리머라제 프로토콜에 따라 PCR을 실행하여 카세트 DNA를 준비하였으며, 상기 프라이머에 대한 서열정보는 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

프라이머		Cassette PCR 뉴클레오타이드 서열
<i>budC</i>	Forward	CCAGCTACACCTGAGTCAAATTCTTTAAGTCATCACAAAAGG AAATGGAAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC (서열번호 7)
	Reverse	AAAGCCCCCTGCGAACAGGCAGGGGCAAACCATGTCAGAGCTT ATTTTTTAGTCCATATGAATATCCTCCT (서열번호 8)
<i>gcd</i>	Forward	TCCTATAATTAATTGCAGTTAAAAAATTAACAACTGAAGAGT GTCTTTCTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC (서열번호 9)
	Reverse	AGGGGAGGGGGCAAACAAAAAACGGCAACTTTCGTTGCCGT TTTGC GTTGTCCATATGAATATCCTCCT (서열번호 10)

[0053]

[0055] 상기 pRedET가 도입된 모 균주를 테트라사이클린이 첨가된 LB 배지에 접종한 다음, OD600이 약 0.2 정도 되었을 때, 20% L-arabinose (0.9ml)를 첨가하여 람다 레드 재조합 효소 (recombinase)를 발현시켰으며, 다시 OD600이 0.5가 될 때까지 배양시켜 컴피턴트한 상태의 세포를 제조하였다. 이후, 상기 세포를 10% 글라이세롤 용액으로 희석한 후, 전기천공법 (1800V)을 통해 준비된 카세트 DNA (100ng)를 도입하여 형질전환시키고, LB 배지에서 1 시간 동안 배양시킨 후, 카나마이신 항생제 플레이트로 스크리닝하였다.

[0056] 이후, 상기 형질전환된 균주에서, 카세트 DNA의 도입을 확인하고자 Colony PCR을 실시하였다. 우선, 상기 카나마이신 항생제 플레이트로 스크리닝된 콜로니를 10 μ l의 DW로 희석한 후, 100℃로 5분간 가열하여 genomic DNA를 수득하였다. 이후, 희석시킨 콜로니 (1 μ l)를 주형으로 Colony PCR 프라이머를 사용하여 GS taq 폴리머라제 프로토콜에 따라 PCR을 실행하였으며, 상기 PCR 결과물을 전기영동하여 카세트 DNA의 도입을 확인하였다 상기 프라이머에 대한 서열정보는 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

프라이머		Colony PCR 뉴클레오타이드 서열
<i>budC</i>	Forward	AAAGCCTATGCCGAATCCTT (서열번호 11)
	Reverse	CTTCTCCGGGCTACCAAATC (서열번호 12)
<i>gcd</i>	Forward	ATTTCACTGCCGCTGTCTTT (서열번호 13)
	Reverse	GGTGAGTGAAGTGCTGGTGA (서열번호 14)

[0057]

[0059] 이후, 다시 전기천공법 (1800V)을 통해 707FLP 플라스미드를 도입하고, LB배지에 30℃로 배양시킨 다음, 37℃에서 0/N 배양시켜 카세트 DNA 및 플라스미드를 모두 제거함으로써, 모 균주에서 타겟 유전자인 *budC* 또는 *gcd*를 각각 제거하였다.

[0061] 실시예 1. 아세트인 생산능 증진 효과 확인

[0062] 상기 제조예 1에서 제조된 재조합 균주 I 및 II를 이용한 아세트인의 생산과정에서, 목적 생성물인 아세트인의 생산수율을 평가하였다.

[0063] 이를 위하여, M9 최소 배지에 유일한 탄소원인 포도당을 첨가한 후, 상기 재조합 균주 각각을 호기성 조건 하, 24시간 동안 플라스크 회분 배양을 하였다. 대조군으로는, Lactate dehydrogenase 유전자 (*ldhA*)만 결실된 재조합 균주를 이용하였다.

[0064] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 대조군에서 아세트인의 생산수율은 0.02g/g로 매우 낮았던 반면, 재조합 균주 I 및 II 이용한 방법 모두에서 아세트인의 생산수율이 크게 증가됨을 확인할 수 있었으며, 특히, 재조합 균

주 II에서 0.38g/g으로 가장 높은 생산수율을 나타내었다.

[0066] 한편, 기존의 미생물을 이용한 아세트인의 생산방법에서, *Serratia marcescens* CS107J, 또는 *Paenibacillus polymyxa* H32가 생산균주로 알려져 있으며, 이들의 배양배지로는, 각각 복합배지가 사용되고 있다. 다만, 상기 복합배지들은 도 4a 및 도 4b에 나타낸 바와 같이, Corn steep powder 또는 Yeast extract와 같은 성분들이 함유되어 있으며, 상기 성분들은 비용적인 측면에서 전체의 50% 이상을 차지하고 있다. 이 뿐만 아니라, 이들은 아세트인의 정제과정에서 추가적인 비용을 발생시킬 가능성을 내포하고 있는바, 아세트인 생산단가의 증가에 주요한 요인으로 작용하고 있다.

[0067] 이에 반하여, 본 발명의 재조합 균주가 배양되는 M9 최소 배지는, 도 4c에 나타낸 바와 같이, Corn steep powder 또는 Yeast extract와 같은 성분이 전혀 함유되어 있지 않은 배지로서, 비용적인 측면에서 상기 복합배지에 비해 약 10배, 또는 약 25배가량 저렴하고, 배양배지로부터 아세트인을 간이하게 분리, 정제할 수 있는바, 이를 통해 아세트인의 생산단가를 낮출 수 있음을 확인할 수 있었다.

[0069] 상기 결과를 종합해 볼 때, 본 발명의 재조합 균주를 이용한 아세트인의 생산방법은, 최소배지에서 이를 배양시킴으로써 생산단가를 절감시킬 수 있으며, 대사 경로의 차단, 특히 호기성 조건에서 활성화되는 Non-PTS 대사 경로의 차단을 통해 아세트인의 생산수율을 극대화시킬 수 있음을 알 수 있다.

[0071] 실시예 2. 부산물 생성 감소 효과 확인

[0072] 상기 실시예 1과 동일한 방법으로, 상기 제조예 1에서 제조된 재조합 균주 I 및 II를 이용한 아세트인의 생산 과정에서, PTS 포도당 분해 경로에 의한 2,3-부탄디올 (2,3-butanediol), 및 호기성 조건에서 활성화되는 Non-PTS 포도당 분해 경로에 의한 2-케토글루코네이트 (2-ketogluconate)의 농도를 측정하였다. 대조군으로는, Lactate dehydrogenase 유전자 (*ldhA*)만 결실된 재조합 균주를 이용하였다.

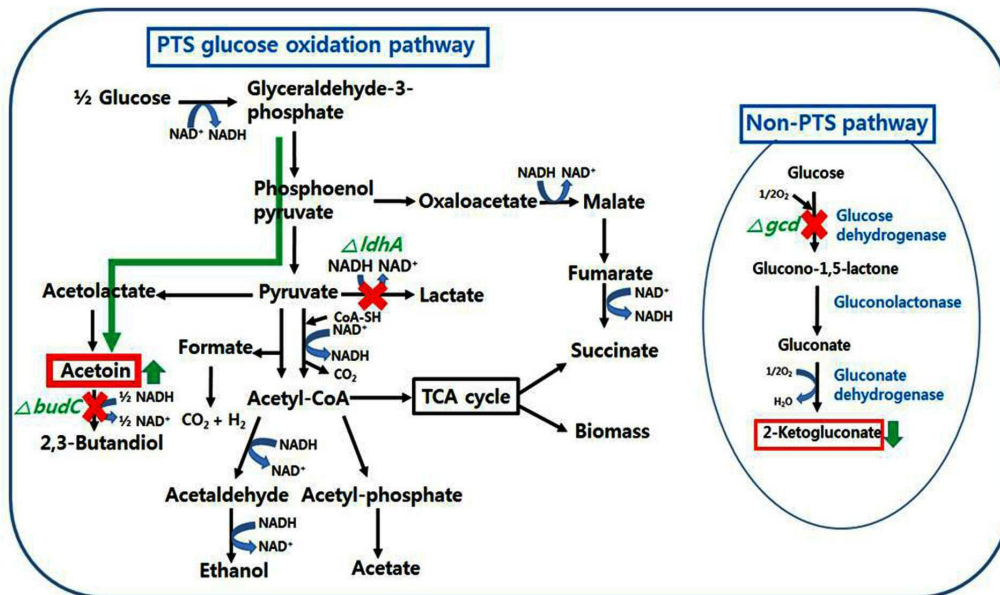
[0074] 그 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이, 대조군에서 생성된 2,3-부탄디올의 농도는 약 8.87g/ℓ 였던 반면, 재조합 균주 I 및 II 이용한 방법 모두에서 2,3-부탄디올의 농도가 현격하게 감소됨을 확인할 수 있었다. 상기 결과와 마찬가지로, 도 6에 나타낸 바와 같이, 대조군에서 생성된 2-케토글루코네이트의 농도는 약 4g/ℓ 였던 반면, 재조합 균주 I 및 II에서는 2-케토글루코네이트의 농도가 유의적으로 감소되었으며, 특히, Acetoin reductase 유전자뿐만 아니라, Glucose dehydrogenase 유전자 (*gcd*)도 제거한 재조합 균주 II에서는, 2-케토글루코네이트가 전혀 검출되지 않았다.

[0075] 상기 결과로부터, 본 발명의 재조합 균주를 이용한 아세트인은 생산방법은, 생산과정에서 부산물의 생성을 최소화시킴으로써, 목적 생성물인 아세트인의 생산수율이 증진될 수 있음을 알 수 있다.

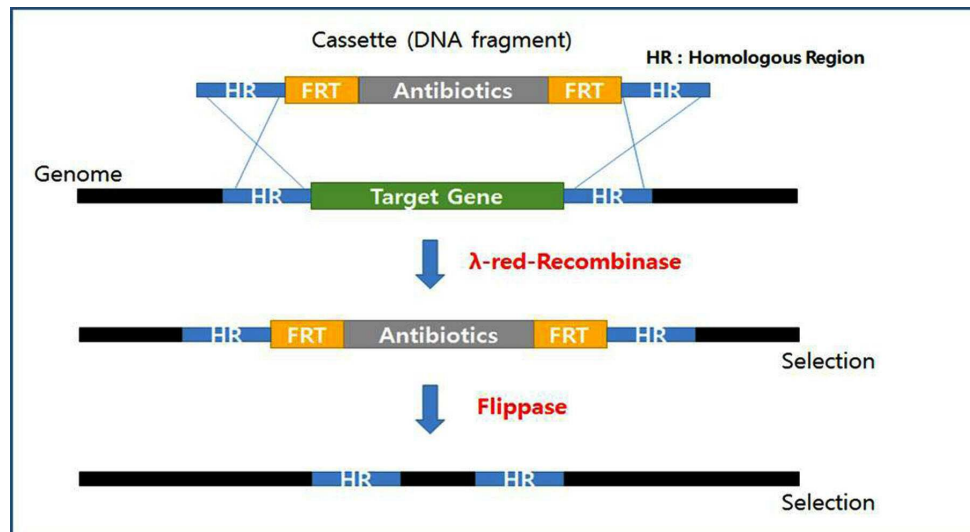
[0077] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

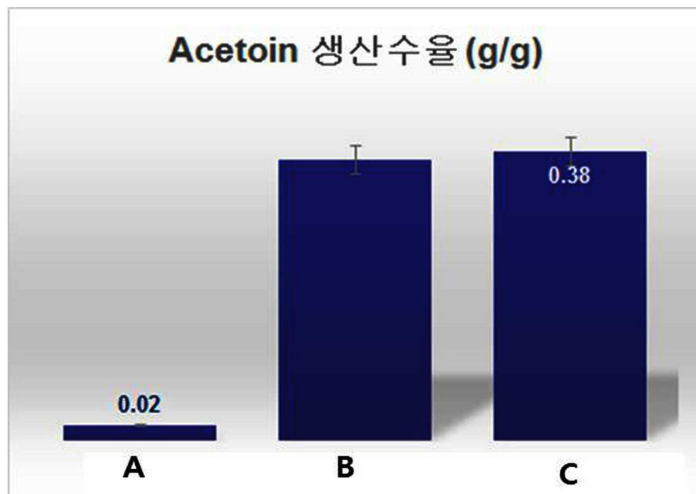
도면1



도면2



도면3



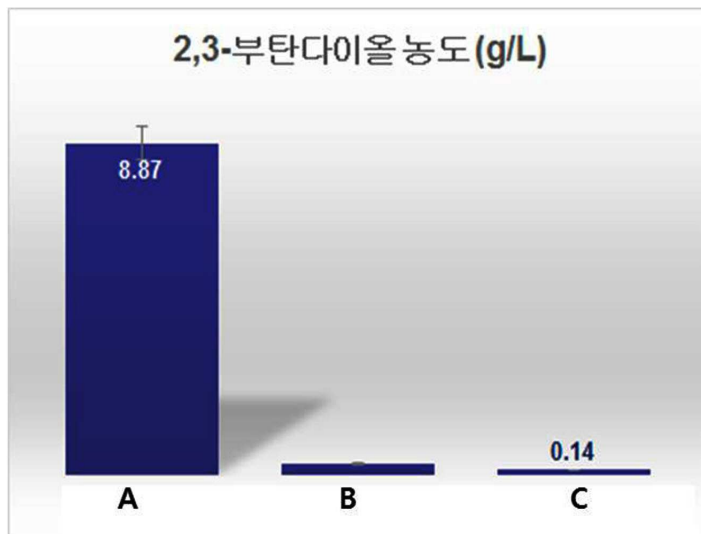
도면4

a	<i>Serratia marcescens</i> H32	g/L	KRW (1kg)	KRW (g/L)
	Ammonium citrate	12	28,600	343.2
	Corn steep powder	9.8	102,000	999.6
	KH ₂ PO ₄	0.9	12,500	11.25
	MgSO ₄	0.2	13,800	2.76
	MnSO ₄ ·H ₂ O	0.15	28,960	4.344
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.02	20,000	0.4
	Sum			1361.554

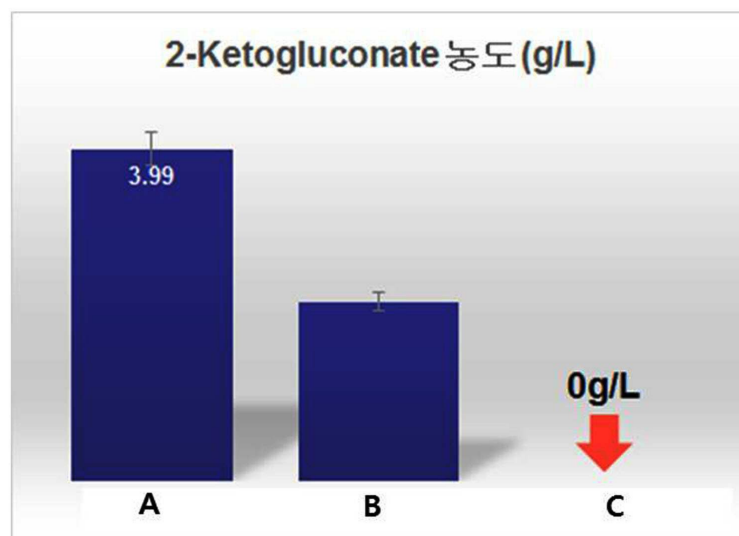
b	<i>Paenibacillus polymyxa</i> CS107	g/L	KRW (1kg)	KRW (g/L)
	Yeast extract	10	200,000	2000
	Tryptone	5	248,000	1240
	KH ₂ PO ₄	0.5	12,500	6.25
	FeSO ₄	0.005	20,000	0.5
	MnSO ₄	0.005	12,500	0.0625
	MgSO ₄	0.5	13,800	6.9
	Sum			3253.7125

c	<i>Enterobacteriaceae</i>	g/L	KRW (1kg)	KRW (g/L)
	Na ₂ HPO ₄	6	12,500	75
	KH ₂ PO ₄	3	12,500	37.5
	NaCl	0.5	6,000	3
	NH ₄ Cl	1	8,800	8.8
	MgSO ₄	0.49	13,800	6.762
	CaCl ₂	0.014	11,300	0.1582
	Sum			131.2202

도면5



도면6



서 열 목 록

- <110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION
- <120> Recombinant microorganisms enhanced ability of producing acetoin
and method for preparing acetoin using the same
- <130> DP-2016-0024_P16U13C0037
- <160> 15
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 329

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> lactate dehydrogenase_amino acid

<400> 1

Met Lys Ile Ala Val Tyr Ser Thr Lys Gln Tyr Asp Lys Lys Tyr Leu

1 5 10 15

Gln His Val Asn Asp Ala Tyr Gly Phe Glu Leu Glu Phe Phe Asp Phe

20 25 30

Leu Leu Thr Glu Lys Thr Ala Lys Thr Ala Asn Gly Cys Glu Ala Val

35 40 45

Cys Ile Phe Val Asn Asp Asp Gly Ser Arg Pro Val Leu Glu Glu Leu

50 55 60

Lys Ala His Gly Val Lys Tyr Ile Ala Leu Arg Cys Ala Gly Phe Asn

65 70 75 80

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

85 90 95

Val Pro Ala Tyr Ser Pro Glu Ala Val Ala Glu His Ala Ile Gly Met

100 105 110

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

115 120 125

Asp Ala Asn Phe Ser Leu Glu Gly Leu Thr Gly Phe Thr Met Tyr Gly

130 135 140

Lys Thr Ala Gly Val Ile Gly Thr Gly Lys Ile Gly Val Ala Thr Leu

145 150 155 160

Arg Ile Leu Lys Gly Phe Gly Met Arg Leu Leu Ala Phe Asp Pro Tyr

165 170 175

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

180 185 190

Thr Leu Tyr Ala Gln Ser Asp Val Ile Ser Leu His Cys Pro Leu Thr

195 200 205

Asn Glu Asn Tyr His Leu Leu Asn Gln Ala Ala Phe Asp Gln Met Lys

210 215 220

Asp Gly Val Met Val Ile Asn Thr Ser Arg Gly Ala Leu Ile Asp Ser

225 230 235 240

Gln Ala Ala Ile Asp Ala Leu Lys His Gln Lys Ile Gly Ala Leu Gly

245 250 255

Met Asp Val Tyr Glu Asn Glu Arg Asp Leu Phe Phe Glu Asp Lys Ser

260 265 270

Asn Asp Val Ile Gln Asp Asp Val Phe Arg Arg Leu Ser Ala Cys His

275 280 285

Asn Val Leu Phe Thr Gly His Gln Ala Phe Leu Thr Ala Glu Ala Leu

290 295 300

Ile Gly Ile Ser Glu Thr Thr Leu Gly Asn Leu Gln Gln Val Ala Lys

305 310 315 320

Gly Glu Thr Cys Pro Asn Ala Leu Val

325

<210> 2

<211> 990

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> lactate dehydrogenase_nucleotide

<400> 2

atgaaaatcg ctgtttatag taccaagcag tacgataaaa agtatctgca gcatgttaac 60

gacgcatacg gctttgaact ggaatttttc gatttcctgc tgaccgaaaa gaccgcgaaa 120

acggccaacg gcigtgaagc ggtatgtatc ttcgttaatg acgacggtag ccgcccgggtg 180

ctggaagagc taaaagccca cggcgtgaaa tatatcgcgc tgcgctgcgc cggctttaac 240

aacgtcgatc ttgaggcggc taaagagctg ggcctgcgcg tcgtgcgcgt cccggcctac 300

tcgccggaag ccgttgctga acacgccatc ggtatgatga tgtcgttgaa ccgtcgcatt 360

catcgcgcct atcagcgtac ccgcgatgcc aacttctcgc tgggaagggt gaccggcttc 420

acgatgtacg gtaaaaccgc aggggtgatc ggcaccggtg aaatcggcgt tgcgacgctg 480

cggatcctca aaggtttcgg tatgcgcctg ctggcgtttg atccctatcc gagcgcggcg 540

gcgctggatc tcggcgttga atatgtcgac ctgccgacgc tgtacgcgca gtccgacgtc 600

atctccctgc actgcccgtt taccaacgaa aactatcacc tgctcaacca ggccggcattc 660

gatcagatga aagacggcgt gatggtcatt aataccagcc gcggcgcgct tatcgattca 720
 caagcggcta tcgacgcgct gaagcatcag aaaatcggcg cgctgggaat ggacgtgtat 780
 gaaaaatgaac gcgatctgtt ctttgaagat aaatcgaatg atgtcatcca ggatgacgtg 840
 ttccgccggc tciccgctg ccacaacgtc ctgtttaccg ggcaccaggc attcctgacg 900
 gctgaggcgc tgatcggtat ttccgagaca acgcttggca atctgcagca ggtagctaag 960
 ggcgaaacct gcccgaaacgc gctggtctaa 990

<210> 3

<211> 256

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> acetoin reductase_amino acid

<400> 3

Met Lys Lys Val Ala Leu Val Thr Gly Ala Gly Gln Gly Ile Gly Lys

1 5 10 15

Ala Ile Ala Leu Arg Leu Val Lys Asp Gly Phe Ala Val Ala Ile Ala

20 25 30

Asp Tyr Asn Asp Val Thr Ala Lys Ala Val Ala Asp Glu Ile Asn Gln

35 40 45

His Gly Gly Arg Ala Ile Ala Val Lys Val Asp Val Ser Asp Arg Glu

50 55 60

Gln Val Phe Ala Ala Val Glu Gln Ala Arg Lys Thr Leu Gly Gly Phe

65 70 75 80

Asn Val Ile Val Asn Asn Ala Gly Val Ala Pro Ser Thr Pro Ile Glu

85 90 95

Ser Ile Thr Pro Glu Ile Val Asp Lys Val Tyr Asn Ile Asn Val Lys

100 105 110

Gly Val Ile Trp Gly Ile Gln Ala Ala Val Glu Ala Phe Lys Lys Glu

115 120 125

Gly His Gly Gly Lys Ile Ile Asn Ala Cys Ser Gln Ala Gly His Val

130 135 140

Gly Asn Pro Glu Leu Ala Val Tyr Ser Ser Ser Lys Phe Ala Val Arg

145 150 155 160

Gly Leu Thr Gln Thr Ala Ala Arg Asp Leu Ala Pro Leu Gly Ile Thr
165 170 175
Val Asn Gly Tyr Cys Pro Gly Ile Val Lys Thr Pro Met Trp Ala Glu
180 185 190
Ile Asp Arg Gln Val Ser Glu Ala Ala Gly Lys Pro Leu Gly Tyr Gly

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

<210> 4
<211> 711
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223

> acetoin reductase_nucleotide

<400> 4
cgctcgtga aggacggttt tgccgtggcg atcgccgatt acaatgacgt cacagcgaaa 60
gccgtggcgg atgaaatcaa ccagcacggc ggccgggcaa tcgcggtcaa agtcgatgtt 120
tccgaccgtg agcagggtgtt tgccgccgtc gaacaggcgc gaaaaacgt gggcggattc 180
aacgtcatcg tcaataacgc cggggtcgcg ccatcaacgc ctatcgaatc cattacgccg 240
gagattgtcg acaaggtcta caacatcaac gttaaagggg tgatctgggg gattcaggcg 300
gcagtcgagg cttttaaaaa agaggggcac ggcggcaaaa tcatcaacgc ctgttcgcag 360

gccggacacg tcggcaaccc ggaactggcg gtctacagct cgagcaaatt cgccgtacgc 420
ggtttaacgc aaaccgccgc tcgcgacctg gcgccgtgg gtattaccgt taacggctac 480
tgcccgggga ttgtgaaac gccgatgtgg gccgagatcg atcgtcaggt atccgaagcg 540
gcgggtaaac ctctgggcta cgggacagcc gaattcgcca aacgcatcac cctcggccgc 600
ctgtctgagc cagaagatgt cgccgcctgc gtctcttata tcgccagccc ggattccgat 660
tatatgaccg gtcaatcgct gctgatcgat ggcgggatgg tattcaatta a 711

<210> 5
<211> 796

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> glucose dehydrogenase_amino acid

<400> 5

Met Ala Glu Thr Lys Ser Gln Gln Ser Arg Leu Leu Val Thr Leu Thr

1 5 10 15

Ala Leu Phe Ala Ala Phe Cys Gly Leu Tyr Leu Leu Ile Gly Gly Val

20 25 30

Trp Leu Ala Ala Ile Gly Gly Ser Trp Tyr Tyr Pro Ile Ala Gly Leu

35 40 45

Val Met Leu Ala Val Thr Val Met Leu Phe Arg Gly Lys Arg Ala Ala

50 55 60

Leu Trp Leu Tyr Ala Ala Leu Leu Leu Ala Thr Met Ile Trp Gly Val

65 70 75 80

Trp Glu Val Gly Phe Asp Phe Trp Ala Leu Thr Pro Arg Ser Asp Ile

85 90 95

Leu Val Phe Phe Gly Ile Trp Leu Ile Leu Pro Phe Val Trp Arg Arg

100 105 110

Leu Pro Val Pro Ser Ala Gly Ala Val Gly Gly Leu Val Ile Ala Leu

115 120 125

Leu Ile Ser Gly Gly Ile Leu Thr Trp Ala Gly Phe Asn Asp Pro Gln

130 135 140

Glu Val Asn Gly Thr Leu Ser Ala Asp Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ile

145 150 155 160

Ser Thr Val Ala Asp Ser Asp Trp Pro Ala Tyr Gly Arg Asn Gln Glu

165 170 175

Gly Gln Arg Tyr Ser Pro Leu Lys Gln Ile Asn Thr Asp Asn Val Lys

180 185 190

Asn Leu Lys Glu Ala Trp Val Phe Arg Thr Gly Asp Leu Lys Gln Pro

195 200 205

Asn Asp Pro Gly Glu Ile Thr Asn Glu Val Thr Pro Ile Lys Val Gly

210 215 220
 Asp Met Leu Tyr Leu Cys Thr Ala His Gln Arg Leu Phe Ala Leu Asp
 225 230 235 240
 Ala Ala Thr Gly Lys Glu Lys Trp His Phe Asp Pro Gln Leu Asn Ala
 245 250 255
 Asp Pro Ser Phe Gln His Val Thr Cys Arg Gly Val Ser Tyr His Glu
 260 265 270

 Ala Lys Ala Asp Asn Ala Pro Ala Asp Val Val Ala Asp Cys Pro Arg
 275 280 285
 Arg Ile Ile Leu Pro Val Asn Asp Gly Arg Leu Phe Ala Val Asn Ala
 290 295 300
 Asp Asn Gly Lys Leu Cys Glu Thr Phe Ala Asn Lys Gly Ile Leu Asn
 305 310 315 320
 Leu Gln Thr Asn Met Pro Val Thr Thr Pro Gly Met Tyr Glu Pro Thr
 325 330 335
 Ser Pro Pro Ile Ile Thr Asp Lys Thr Ile Val Ile Ala Gly Ala Val

 340 345 350
 Thr Asp Asn Phe Ser Thr Arg Glu Pro Ser Gly Val Ile Arg Gly Phe
 355 360 365
 Asp Val Asn Thr Gly Lys Leu Leu Trp Ala Phe Asp Pro Gly Ala Lys
 370 375 380
 Asp Pro Asn Ala Ile Pro Ser Asp Glu His His Phe Thr Leu Asn Ser
 385 390 395 400
 Pro Asn Ser Trp Ala Pro Ala Ala Tyr Asp Ala Lys Leu Asp Leu Val
 405 410 415

 Tyr Leu Pro Met Gly Val Thr Thr Pro Asp Ile Trp Gly Gly Asn Arg
 420 425 430
 Thr Pro Glu Gln Glu Arg Tyr Ala Ser Ser Ile Val Ala Leu Asn Ala
 435 440 445
 Thr Thr Gly Lys Leu Ala Trp Ser Tyr Gln Thr Val His His Asp Leu
 450 455 460
 Trp Asp Met Asp Met Pro Ser Gln Pro Thr Leu Ala Asp Ile Asp Val

465 470 475 480
 Asn Gly Lys Thr Val Pro Val Ile Tyr Ala Pro Ala Lys Thr Gly Asn

 485 490 495
 Ile Phe Val Leu Asp Arg Arg Asn Gly Glu Leu Val Val Pro Ala Pro
 500 505 510
 Glu Lys Pro Val Pro Gln Gly Ala Ala Lys Gly Asp Tyr Val Ala Lys
 515 520 525
 Thr Gln Pro Phe Ser Glu Leu Ser Phe Arg Pro Lys Lys Asp Leu Thr
 530 535 540
 Gly Ala Asp Met Trp Gly Ala Thr Met Phe Asp Gln Leu Val Cys Arg
 545 550 555 560

 Val Ile Phe His Gln Met Arg Tyr Glu Gly Ile Phe Thr Pro Pro Ser
 565 570 575
 Glu Gln Gly Thr Leu Val Phe Pro Gly Asn Leu Gly Met Phe Glu Trp
 580 585 590
 Gly Gly Ile Ser Val Asp Pro Asn Arg Gln Val Ala Ile Ala Asn Pro
 595 600 605
 Met Ala Leu Pro Phe Val Ser Lys Leu Ile Pro Arg Gly Pro Gly Asn
 610 615 620
 Pro Met Glu Pro Pro Lys Asp Ala Lys Gly Ser Gly Thr Glu Ser Gly

 625 630 635 640
 Val Gln Pro Gln Tyr Gly Val Pro Phe Gly Val Thr Leu Asn Pro Phe
 645 650 655
 Leu Ser Pro Phe Gly Leu Pro Cys Lys Gln Pro Ala Trp Gly Tyr Ile
 660 665 670
 Ser Ala Leu Asp Leu Lys Thr Asn Glu Val Val Trp Lys Lys Arg Ile
 675 680 685
 Gly Thr Pro Gln Asp Ser Leu Pro Phe Pro Leu Pro Val Pro Leu Pro
 690 695 700

 Phe Asn Met Gly Met Pro Met Leu Gly Gly Pro Ile Ser Thr Ala Gly
 705 710 715 720

Asn Val Leu Phe Ile Ala Ala Thr Ala Asp Asn Tyr Leu Arg Ala Tyr
725 730 735
Asn Met Ser Asn Gly Glu Lys Leu Trp Gln Ala Arg Leu Pro Ala Gly
740 745 750
Gly Gln Ala Thr Pro Met Thr Tyr Glu Val Asn Gly Lys Gln Tyr Val
755 760 765
Val Ile Ser Ala Gly Gly His Gly Ser Phe Gly Thr Lys Met Gly Asp

770 775 780
Tyr Ile Val Ala Tyr Ala Leu Pro Asp Asp Ala Lys
785 790 795

<210> 6

<211> 2391

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> glucose dehydrogenase_nucleotide

<400> 6

atggcagaaa caaaatctca acaatcacgg ttacttgtca cgctgacggc gctgtttgcc 60
gccttctgtg gcctgtatct gttaatcggg ggggtatggc tggccgctat tggcggttcc 120
tggtactacc ctatcgcagg cctgggtgatg ctggccgtca ccgttatgct gttccgcggc 180

aagcgcgctg cgctgtggct gtacgccgcc ctgctgctgg caaccatgat ttggggggta 240
tgggaagtgc gtttcgactt ctgggcgctg acgccgcgta gcgacatcct ggtcttcttc 300
ggcatctggc tgattctgcc atttgtctgg cgtcgtctgc cggtccttc cgccggtgcc 360
gttggcggtc tggttatcgc cctgctgatt agcggcgagg tccctgacct ggccggtttc 420
aacgatccgc aggaagtga cggtagcgtg agcgtgacg cgacgccggc tgcgccgatt 480
tctaccgtcg ccgatatcga ctggccggct tatggccgca accaggaagg ccagcgttat 540
tcaccgtga agcaaattaa taccgataac gtaagaacc tgaaggaagc ctgggtattc 600

cgcaccggcg acctgaagca gccgaacgat ccgggtgaaa tactaacga agtgacgccg 660
attaaagttg gcgacatgct gtatctgtgt accgcgcacc agcgtctgtt cgcgcttgac 720
gcggccaccg gtaaagagaa gtggcatttt gacccgcagc tgaacgccga tccgtcgttc 780
cagcacgtga cctgccgtgg cgtctcctat catgaagcca aagcagataa cgcgcctgcc 840
gacgtcgtcg ccgactgccc gcgccgtatt attctgccgg tcaacgatgg ccgtctgttc 900
gcggtgaacg ccgacaacgg taagctgtgc gaaaccttg ccaacaaagg cattctcaac 960

ctgcaaacca atatgccggt aaccacgccg ggtatgtatg aaccgacgtc gccgccgatt 1020

atcaccgata aaactatcgt cattgccggc gcggtaacg ataacttctc aaccgcgag 1080

ccatcaggcg tgatccggc ctttgatgtg aataccgta aactgctgtg ggccttcgac 1140

ccgggtgcga aagaccctaa tgcgatccg agcgatgagc atcacttcac actcaattca 1200

cctaactcct gggcgctgc cgcctatgac gcgaagctgg atttagtcta tctgccgatg 1260

ggcgttacca cgccggatat ctggggcggc aatcgcacgc cggaacagga acgttacgcc 1320

agctctatcg tagcgctgaa cgcaaccacc gggaaactgg catggagcta ccaaaccgta 1380

caccacgac tgtgggatat ggatatgccg tcgcagccga cgctggccga cattgatgtg 1440

aacggtaaaa ccgtaccggt gatttacgt cggccaaaa ccggcaacat ctctgtgctg 1500

gatcgccgta atggcgagct ggtggtcccg gcgccgaaa aaccggttcc gcaaggtgcg 1560

gcgaaaggcg attatgttgc taaaaccag ccgttctccg agctgagctt ccgtccgaag 1620

aaagacctga ccggcgaga tatgtggggc gccacatgt ttgaccaact ggtgtgccgc 1680

gttatcttcc atcagatgcg ctatgaaggt atcttcactc cgccgtctga acagggcacg 1740

ctggtcttcc cggggaacct ggggatgttt gaatggggcg gtatctccgt cgatccaaac 1800

cgtcaggtgg ctatcgcaa cccgatggcg ctccgttcg tctctaaact gatcccacgc 1860

ggccccggca acccgatgga accgcaaaa gacgcgaaag gctctggtac cgagtcggc 1920

gttcagccgc agtatggcgt cccgttcggc gtcacgtga acccgttcct gtcgccgttt 1980

ggcctgccgt gtaaacacc ggcatggggt tatatctcgg cgctggatct gaagaccaac 2040

gaagtgggtg gaaaaaacg catcggtacg ccgcaggata gtctgccgtt cccgtgcct 2100

gttcactgc cattcaatat gggtatgccg atgctgggcg ggccgatctc aaccgccggt 2160

aacgtgctgt ttatcgccgc caccgccgat aactacctgc gcgcttaca catgagtaat 2220

ggtgaaaaac tgtggcaggc gcgtctgcct gcaggtggcc aggcgacgcc gatgacctat 2280

gaagtgaatg gcaagcagta cgttgtcatc tctgccggcg gtcattggctc gttcggtact 2340

aaaatggcg actacatcgt tgcctatcgc ttaccgatg acgcgaaata a 2391

<210> 7

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> budC_Forward

<400> 7

ccagctacac ctgagtcaaa ttctttaagt catcacaaaa ggaaatggaa gtgtaggctg 60

gagctgcttc	70
<210> 8	
<211> 70	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223>	
> budC_Reverse	
<400> 8	
aaagcccctg cgaacaggca ggggcaaacc atgtcagagc ttatTTTTTA gtccatatga	60
atatcctcct	70
<210> 9	
<211> 70	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> gcd_Forward	
<400> 9	
tcctataatt aattgcagtt aaaaaattaa caactgaaga gtgtctttct gtgtaggctg	60
gagctgcttc	70
<210> 10	
<211> 70	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> gcd_Reverse	
<400> 10	
aggggagggg gcaaacaaaa aaacggcaac tttcgttgcc gttttgcgtt gtccatatga	60
atatcctcct	70
<210> 11	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> budC_Colony_Forward	
<400> 11	
aaagcctatg ccgaatcctt	20
<210> 12	

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> budC_Colony_Reverse

<400> 12
 ctctctccggg ctaccaaattc 20

<210> 13
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> gcd_Colony_Forward

<400> 13
 atttcactgc cgctgtcttt 20

<210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> gcd_Colony_Reverse

<400> 14
 ggtgagtga gtgctggtga 20

<210> 15
 <211>
 > 1580
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> cassette_nucleotide

<400> 15
 tcctataatt aattgcagtt aaaaaattaa caactgaaga gtgtctttct gtgtaggctg 60
 gagctgcttc gaagttccta tactttctag agaataggaa cttcggaata ggaacttcaa 120
 gatccctca cgctgccgca agcactcagg gcgcaagggc tgctaaagga agcggaacac 180
 gtagaaagcc agtccgcaga aacggtgctg accccgatg aatgtcagct actgggctat 240
 ctggacaagg gaaaacgcaa gcgcaaagag aaagcaggta gcttgcagtg ggcttacatg 300
 gcgatagcta gactgggcgg ttttatggac agcaagcgaa ccggaattgc cagctggggc 360

gccctctggt aaggttggga agccctgcaa agtaaaactgg atggctttct tgccgccaag	420
gatctgatgg cgcaggggat caagatctga tcaagagaca ggatgaggat cgtttcgc	480
gattgaacaa gatggattgc acgcagggtt tccggccgct tgggtggaga ggctattcgg	540
ctatgactgg gcacaacaga caatcggctg ctctgatgcc gccgtgttcc ggctgtcagc	600
gcagggggcg cgggttcttt ttgtcaagac cgacctgtcc ggtgccctga atgaactgca	660
ggacgaggca gcgcggctat cgtggctggc cagcagggc gttccttgcg cagctgtgct	720
cgacgttgct actgaagcgg gaagggactg gctgctattg ggcaagtgc cggggcagga	780
tctctgtca tctcaccttg ctctgccga gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg	840
gcggctgcat acgcttgatc cggctacctg cccattcgac caccaagcga aacatcgcat	900
cgagcgagca cgtactcgga tggaagccgg tcttgtcgat caggatgatc tggacgaaga	960
gcatcagggg ctgcgccag ccgaactgtt cgccaggctc aaggcgcgca tggccgacgg	1020
cgaggatctc gtcgtgacct atggcgatgc ctgcttgccg aatatcatgg tggaaaatgg	1080
ccgcttttct ggattcatcg actgtggccg gctgggtgtg gcggaccgct atcaggacat	1140
agcgttggct acccgtgata ttgctgaaga gcttggcggc gaatgggctg accgcttct	1200
cgctgctttac ggtatcgccg ctcccattc gcagcgcac gccttctatc gccttcttga	1260
cgagttcttc tgagcgggac tctgggggtc gaaatgaccg accaagcgac gcccaacctg	1320
ccatcacgag atttcgattc caccgccgcc ttctatgaaa ggttgggctt cggaatcgtt	1380
ttccgggacg cggctggat gatcctccag cgcggggatc tcatgctgga gttcttcgcc	1440
cacccagct tcaaaagcgc tctgaagttc ctatactttc tagagaatag gaacttcgga	1500
ataggaacta aggaggatat tcatatggac aacgcaaaac ggcaacgaaa gttgccgttt	1560
ttttgtttgc cccctccct	1580