(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0051311
(43) 공개일자 2020년05월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/81 (2006.01) *C12P 5/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/81 (2013.01)
C12P 5/002 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0134522
(22) 출원일자 2018년11월05일
심사청구일자 2018년11월05일

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
이진원
서울특별시 송파구 양재대로 1218 (방이동, 올림픽선수기자촌아파트) 201동 1601호
양정모
서울특별시 은평구 가좌로 275-17 203호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
윤대웅, 공병욱

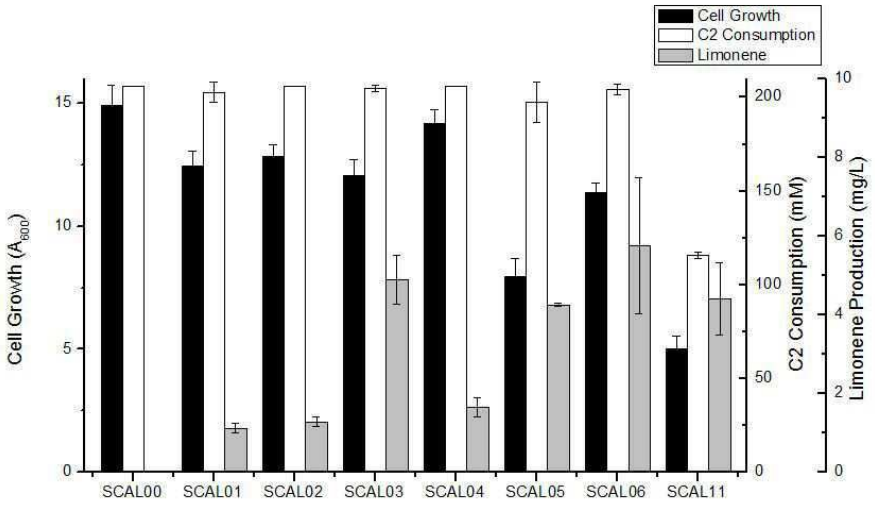
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 **리모넨 생산능을 갖는 변이 균주**

(57) 요 약

본 발명은 리모넨 생산능을 증가시키는 유전자를 포함하는 재조합 벡터, 상기 재조합 벡터로 형질전환된 사카로미세스(*Saccharomyces*) 속 변이 균주 및 상기 변이 균주를 이용한 리모넨 제조 방법에 관한 것으로, 상기 변이 균주는 야생형 균주와 비교하여 현저히 증가된 리모넨 생산능을 나타낸다.

대 표 도 - 도5



(52) CPC특허분류
C12Y 101/01034 (2013.01)
C12Y 101/01088 (2013.01)
C12Y 203/01009 (2013.01)
C12Y 203/03009 (2013.01)
C12Y 205/01 (2013.01)
C12Y 207/01036 (2013.01)
C12Y 401/03001 (2013.01)
C12Y 402/03 (2013.01)
C12Y 503/03002 (2013.01)
(72) 발명자
조숙형
경기도 고양시 덕양구 백양로 126, 1108동 901호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2015M3D3A1A01064929
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 C1 가스 리파이너리 사업
연구과제명 C1 가스 전환 기술 공통시험 연구
기 여 율 1/1
주관기관 서강대학교
연구기간 2018.01.01 ~ 2018.12.31

나정걸
서울특별시 마포구 모래내로1길 20 KCC상암스튜디오380 1526호

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 변이 리모넨 합성 효소(truncated limonene synthase) 유전자; 및

서열목록 제2서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 변이 Geranyl-PP 합성 효소(truncated Geranyl-PP synthase) 유전자, 서열목록 제3서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 변이 Neryl-PP 합성 효소(truncated Neryl-PP synthase) 유전자, 서열목록 제4서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 아세틸-CoA 아세틸전달효소(Acetyl-CoA acetyltransferase, ERG10) 유전자, 서열목록 제5서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 변이 NADPH 의존성 HMG-CoA 환원 효소(truncated NADPH Dependent HMG-CoA Reductase) 유전자, 서열목록 제6서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 아세틸-CoA 아세틸전달효소/NADH 의존성 HMG-CoA 환원 효소(Acetyl-CoA Acetyltransferase/NADH Dependent HMG-CoA Reductase) 유전자, 서열목록 제7서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 메발로네이트 키나아제(Mevalonate kinase, ERG12) 유전자, 서열목록 제8서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 IPP 델타 이소머라아제(Isopentenyl-diphosphate delta isomerase, IDI1) 유전자, 서열목록 제9서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 아이소시트레이트 리아제(Isocitrate Lyase, ICL1) 유전자 및 서열목록 제10서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 말산염 합성 효소(Malate Synthase, MLS1) 유전자로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 유전자를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 재조합 벡터는 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 변이 리모넨 합성 효소(truncated limonene synthase) 유전자; 및 서열목록 제2서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 변이 Geranyl-PP 합성 효소(truncated Geranyl-PP synthase) 유전자를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 재조합 벡터는 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 변이 리모넨 합성 효소(truncated limonene synthase) 유전자; 서열목록 제3서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 변이 Neryl-PP 합성 효소(truncated Neryl-PP synthase) 유전자를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 재조합 벡터는 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 변이 리모넨 합성 효소(truncated limonene synthase) 유전자; 서열목록 제3서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 변이 Neryl-PP 합성 효소(truncated Neryl-PP synthase) 유전자; 서열목록 제4서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 아세틸-CoA 아세틸전달효소(Acetyl-CoA acetyltransferase, ERG10) 유전자; 및 서열목록 제5서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 변이 NADPH 의존성 HMG-CoA 환원 효소(truncated NADPH Dependent HMG-CoA Reductase) 유전자를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 재조합 벡터는 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 변이 리모넨 합성 효소(truncated limonene synthase) 유전자; 서열목록 제3서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되

는 변이 Neryl-PP 합성 효소(truncated Neryl-PP synthase) 유전자; 서열목록 제4서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 아세틸-CoA 아세틸전달효소(Acetyl-CoA acetyltransferase, ERG10) 유전자; 및 서열목록 제6서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 아세틸-CoA 아세틸전달효소/NADH 의존성 HMG-CoA 환원 효소(Acetyl-CoA Acetyltransferase/NADH Dependent HMG-CoA Reductase) 유전자를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 재조합 벡터는 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 변이 리모넨 합성 효소(truncated limonene synthase) 유전자; 서열목록 제3서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 변이 Neryl-PP 합성 효소(truncated Neryl-PP synthase) 유전자; 서열목록 제4서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 아세틸-CoA 아세틸전달효소(Acetyl-CoA acetyltransferase, ERG10) 유전자; 서열목록 제5서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 변이 NADPH 의존성 HMG-CoA 환원 효소(truncated NADPH Dependent HMG-CoA Reductase) 유전자; 및 서열목록 제7서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 메발로네이트 키나아제(Mevalonate kinase, ERG12) 유전자를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 재조합 벡터는 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 변이 리모넨 합성 효소(truncated limonene synthase) 유전자; 서열목록 제3서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 변이 Neryl-PP 합성 효소(truncated Neryl-PP synthase) 유전자; 서열목록 제4서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 아세틸-CoA 아세틸전달효소(Acetyl-CoA acetyltransferase, ERG10) 유전자; 서열목록 제5서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 변이 NADPH 의존성 HMG-CoA 환원 효소(truncated NADPH Dependent HMG-CoA Reductase) 유전자; 서열목록 제7서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 메발로네이트 키나아제(Mevalonate kinase, ERG12) 유전자; 및 서열목록 제8서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 IPP 델타 이소머라아제(Isopentenyl-diphosphate delta isomerase, IDI1) 유전자를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 재조합 벡터는 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 변이 리모넨 합성 효소(truncated limonene synthase) 유전자; 서열목록 제3서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 변이 Neryl-PP 합성 효소(truncated Neryl-PP synthase) 유전자; 서열목록 제4서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 아세틸-CoA 아세틸전달효소(Acetyl-CoA acetyltransferase, ERG10) 유전자; 서열목록 제5서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 변이 NADPH 의존성 HMG-CoA 환원 효소(truncated NADPH Dependent HMG-CoA Reductase) 유전자; 서열목록 제7서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 메발로네이트 키나아제(Mevalonate kinase, ERG12) 유전자; 서열목록 제8서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 IPP 델타 이소머라아제(Isopentenyl-diphosphate delta isomerase, IDI1) 유전자; 서열목록 제9서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 아이소시트레이트 리아제(Isocitrate Lyase, ICL1) 유전자 및 서열목록 제10서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 말산염 합성 효소(Malate Synthase, MLS1) 유전자를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 9

제 1 항의 재조합 벡터로 형질전환된 리모넨(limonene) 생산능을 갖는 변이 균주.

청구항 10

제 9 항에 있어서, 상기 변이 균주는 사카로미세스(*Saccharomyces*) 속 균주인 것인, 변이 균주.

청구항 11

제 10 항에 있어서, 상기 사카로미세스 속 균주는 사카로미세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*), 사카로미세스 유바룸(*Saccharomyces uqvarum*), 사카로미세스 엘립소이데우스(*Saccharomyces ellipsoideus*), 사카로미세스 카를스베르겐시스(*Saccharomyces carlsbergensis*), 사카로미세스 사케(*Saccharomyces sake*), 사카로미세스 코레아누스(*Saccharomyces coreanus*), 사카로미세스 리폴리티카(*Saccharomyces lipolytica*) 사카로미세스 보울라디(*Saccharomyces boulardii*) 또는 사카로미세스 파스토리아누스(*Saccharomyces pastorianus*)인 것인, 변이 균주.

청구항 12

제 9 항에 있어서, 상기 변이 균주는 1개 이상의 재조합 벡터에 의해 형질전환되는 것인, 변이 균주.

청구항 13

제 9 항 내지 제 12 항 중 어느 한 항의 변이 균주를 배양하는 단계를 포함하는 리모넨(limonene) 제조 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 리모넨 생산능을 갖는 변이 균주에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 리모넨(Limonene)은 C10 터페노이드(terpenoid)에 속하는 물질로써 향료성분으로 넓은 분야에 사용되는 상업적 가치가 높은 물질이다. 또한 리모넨은 최근에 화학공업에 사용되는 해로운 유기용매를 대체할 수 있는 생독성이 비교적 적은 대체 유기용매로의 가치에 주목받고 있으며, 이를 위해 안정적인 대량 생산 방법 연구의 필요성이 대두되고 있다. 기존의 리모넨 은 오렌지와 같은 Citrus 계열 식물의 껍질에서 추출하여 사용하였으나, 공급량이 많지 않고 안정적이지 못하다는 한계점을 가지고 있다. 하지만, 미생물을 이용한 리모넨 생산 연구를 진행하여 상업화 할 경우, 대체 유기용매뿐 아니라 다양한 사용처에 필요한 수요에 대한 안정적인 공급이 가능할 것이다.

[0004] 일반적으로 미생물을 통한 리모넨 생산연구는 탄수화물(글루코오스, 갈락토오스 등)을 탄소원으로 진행되어 왔으나, 생합성 경로 자체가 매우 길고 진핵생물인 식물의 유전자를 발현시켜야 한다는 점에서 생산효율이 높이 나오지 않는 문제가 있다.

[0005] *Saccharomyces cerevisiae* 균주 내에서 아세트산과 에탄올은 주요 대사 중간체인 Acetyl-CoA로 직접 전환되어 세포 내 에너지 생성 및 세포 구성성분 동화작용을 위한 TCA Cycle - Glyoxylate Shunt 혹은 지방산 생합성 경로로 유입되거나 세포막 구성성분인 에르고스테롤(Ergosterol)을 합성하기 위한 메발로네이트(Mevalonate) 경로로 유입된다. 생산물인 리모넨은 메발로네이트 경로를 거쳐 생성된 DMAPP(Dimethylallyl-Pyrophosphate)와 IPP(Isopentenyl-Pyrophosphate)가 중합되어 생성된 GPP(Geranyl-Pyrophosphate)로부터 NPP(Neryl-Pyrophosphate)를 거쳐 합성된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명자들은 증가된 리모넨 생산능을 갖는 변이 균주를 제조하고자 노력하였고, 그 결과, 리모넨 합성 경로에 관여하는 다양한 효소의 유전자 재조합을 통해 제조한 변이 균주에서 증가된 리모넨 생산능을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0008] 따라서, 본 발명의 목적은 리모넨 합성 경로에 관여하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 재조합 벡터로 형질전환된 리모넨 생산능 변이 균주를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명의 변이 균주를 이용한 리모넨 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 변이 리모넨 합성 효소(truncated limonene synthase) 유전자; 및

[0013] 서열목록 제2서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 변이 Geranyl-PP 합성 효소(truncated Geranyl-PP synthase) 유전자, 서열목록 제3서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 변이 Neryl-PP 합성 효소(truncated Neryl-PP synthase) 유전자, 서열목록 제4서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 아세틸-CoA 아세틸전달효소(Acetyl-CoA acetyltransferase, ERG10) 유전자, 서열목록 제5서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 변이 NADPH 의존성 HMG-CoA 환원 효소(truncated NADPH Dependent HMG-CoA Reductase) 유전자, 서열목록 제6서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 아세틸-CoA 아세틸전달효소/NADH 의존성 HMG-CoA 환원 효소(Acetyl-CoA Acetyltransferase/NADH Dependent HMG-CoA Reductase) 유전자, 서열목록 제7서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 메발로네이트 키나아제(Mevalonate kinase, ERG12) 유전자, 서열목록 제8서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 IPP 델타 이소머라아제(Isopentenyl-diphosphate delta isomerase, IDI1) 유전자, 서열목록 제9서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 아이소시트레이트 리아제(Isocitrate Lyase, ICL1) 유전자 및 서열목록 제10서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 말산염 합성 효소(Malate Synthase, MLS1) 유전자로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 유전자를 포함하는 재조합 벡터에 관한 것이다.

[0014] 본 발명자들은 증가된 리모넨 생산능을 갖는 변이 균주를 제조하고자 노력하였고, 그 결과, 리모넨 합성 경로에 관여하는 다양한 효소의 유전자 재조합을 통해 제조한 변이 균주에서 증가된 리모넨 생산능을 확인하였다.

[0015] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 재조합 벡터는 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 변이 리모넨 합성 효소(truncated limonene synthase) 유전자; 및 서열목록 제2서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 변이 Geranyl-PP 합성 효소(truncated Geranyl-PP synthase) 유전자를 포함하는 재조합 벡터일 수 있다.

[0016] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 재조합 벡터는 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 변이 리모넨 합성 효소(truncated limonene synthase) 유전자; 서열목록 제3서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 변이 Neryl-PP 합성 효소(truncated Neryl-PP synthase) 유전자를 포함하는 재조합 벡터일 수 있다.

[0017] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 재조합 벡터는 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 변이 리모넨 합성 효소(truncated limonene synthase) 유전자; 서열목록 제3서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 변이 Neryl-PP 합성 효소(truncated Neryl-PP synthase) 유전자; 서열목록 제4서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 아세틸-CoA 아세틸전달효소(Acetyl-CoA acetyltransferase, ERG10) 유전자; 및 서열목록 제5서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 변이 NADPH 의존성 HMG-CoA 환원 효소(truncated NADPH Dependent HMG-CoA Reductase) 유전자를 포함하는 재조합 벡터일 수 있다.

[0018] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 재조합 벡터는 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 변이 리모넨 합성 효소(truncated limonene synthase) 유전자; 서열목록 제3서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 변이 Neryl-PP 합성 효소(truncated Neryl-PP synthase) 유전자; 서열목록 제4서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 아세틸-CoA 아세틸전달효소(Acetyl-CoA acetyltransferase, ERG10) 유전자; 및 서열목록 제6서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 아세틸-CoA 아세틸전달효소/NADH 의존성 HMG-CoA 환원 효소(Acetyl-CoA Acetyltransferase/NADH Dependent HMG-CoA Reductase) 유전자를 포함하는 재조합

벡터일 수 있다.

[0019] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 재조합 벡터는 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 변이 리모넨 합성 효소(truncated limonene synthase) 유전자; 서열목록 제3서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 변이 Neryl-PP 합성 효소(truncated Neryl-PP synthase) 유전자; 서열목록 제4서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 아세틸-CoA 아세틸전달효소(Acetyl-CoA acetyltransferase, ERG10) 유전자; 서열목록 제5서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 변이 NADPH 의존성 HMG-CoA 환원 효소(truncated NADPH Dependent HMG-CoA Reductase) 유전자; 및 서열목록 제7서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 메발로네이트 키나아제(Mevalonate kinase, ERG12) 유전자를 포함하는 재조합 벡터일 수 있다.

[0020] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 재조합 벡터는 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 변이 리모넨 합성 효소(truncated limonene synthase) 유전자; 서열목록 제3서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 변이 Neryl-PP 합성 효소(truncated Neryl-PP synthase) 유전자; 서열목록 제4서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 아세틸-CoA 아세틸전달효소(Acetyl-CoA acetyltransferase, ERG10) 유전자; 서열목록 제5서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 변이 NADPH 의존성 HMG-CoA 환원 효소(truncated NADPH Dependent HMG-CoA Reductase) 유전자; 서열목록 제7서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 메발로네이트 키나아제(Mevalonate kinase, ERG12) 유전자; 및 서열목록 제8서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 IPP 델타 이소머라아제(Isopentenyl-diphosphate delta isomerase, IDI1) 유전자를 포함하는 재조합 벡터일 수 있다.

[0021] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 재조합 벡터는 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 변이 리모넨 합성 효소(truncated limonene synthase) 유전자; 서열목록 제3서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 변이 Neryl-PP 합성 효소(truncated Neryl-PP synthase) 유전자; 서열목록 제4서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 아세틸-CoA 아세틸전달효소(Acetyl-CoA acetyltransferase, ERG10) 유전자; 서열목록 제5서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 변이 NADPH 의존성 HMG-CoA 환원 효소(truncated NADPH Dependent HMG-CoA Reductase) 유전자; 서열목록 제7서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 메발로네이트 키나아제(Mevalonate kinase, ERG12) 유전자; 서열목록 제8서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 IPP 델타 이소머라아제(Isopentenyl-diphosphate delta isomerase, IDI1) 유전자; 서열목록 제9서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 아이소시트레이트 리아제(Isocitrate Lyase, ICL1) 유전자 및 서열목록 제10서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 말산염 합성 효소(Malate Synthase, MLS1) 유전자를 포함하는 재조합 벡터일 수 있다.

[0022] 상기 용어 "벡터(vector)"는 숙주 세포에서 목적 유전자를 발현시키기 위한 수단을 의미한다. 예를 들어, 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터 및 박테리오파아지 벡터, 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 및 아데노연관 바이러스 벡터와 같은 바이러스 벡터를 포함한다.

[0023] 상기 재조합 벡터는 전형적으로 클로닝을 위한 벡터 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 상기 발현용 벡터는 당업계에서 식물, 동물 또는 미생물에서 외래의 단백질을 발현하는 데 사용되는 통상의 것을 사용할 수 있다.

[0024] 또한, 상기 재조합 벡터는 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있다.

[0026] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 상기 재조합 벡터로 형질전환된 리모넨(limonene) 생산능을 갖는 변이 균주에 관한 것이다.

[0027] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 목적 단백질이 삽입된 발현벡터를 숙주세포에 삽입함으로써 리모넨 생산능이 향상된 형질전환체를 만들 수 있으며, 상기 형질전환체는 상기 재조합 벡터를 적절한 숙주 세포에 도입시킴으로써 얻어진 것일 수 있다. 상기 숙주세포는 상기 발현벡터를 안정되면서 연속적으로 클로닝 또는 발현시킬 수 있는 세포로서 당업계에 공지된 어떠한 숙주 세포도 이용할 수 있고, 예를 들어, 사카로미세스(*Saccharomyces*) 속 균주일 수 있다.

[0028] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 사카로미세스(*Saccharomyces*) 속 균주는 사카로미세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*), 사카로미세스 유바룸(*Saccharomyces uqvarum*), 사카로미세스 엘립소이데우스(*Saccharomyces ellipsoideus*), 사카로미세스 카를스베르겐시스(*Saccharomyces carlsbergensis*), 사카로미세스 사케(*Saccharomyces sake*), 사카로미세스 코레아누스(*Saccharomyces coreanus*), 사카로미세스 리폴리티카

(*Saccharomyces lipolytica*) 사카로미세스 보울라디(*Saccharomyces boulardii*) 또는 사카로미세스 파스토리아누스(*Saccharomyces pastorianus*) 일 수 있고, 예를 들어, 사카로미세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*) 일 수 있다.

[0029] 상기 재조합 벡터의 숙주 세포 내로의 운반(도입)은, 당업계에 널리 알려진 운반 방법을 사용할 수 있다. 상기 운반 방법은 예를 들어, 숙주 세포가 원핵 세포인 경우, $CaCl_2$ 방법 또는 전기 천공 방법 등을 사용할 수 있고, 숙주 세포가 진핵 세포인 경우에는, 미세 주입법, 칼슘 포스페이트 침전법, 전기 천공법, 리포좀매개 형질감염법 및 유전자 밤바드먼트 등을 사용할 수 있으나, 이에 한정하지는 않는다.

[0030] 상기 형질 전환된 숙주 세포를 선별하는 방법은 선택 표지에 의해 발현되는 표현형을 이용하여, 당업계에 널리 알려진 방법에 따라 용이하게 실시할 수 있다. 예를 들어, 상기 선택 표지가 특정 항생제 내성 유전자인 경우에는, 상기 항생제가 함유된 배지에서 형질전환체를 배양함으로써 형질전환체를 용이하게 선별할 수 있다.

[0031] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 변이 균주는 상기 재조합 벡터로 형질전환되지 않은 대조군과 비교하여 리모넨 생산량이 현저히 증가되는 효과를 나타낸다.

[0032] 본 명세서에서 용어 "리모넨(limonene)"은 아이소프렌 단위가 두 개 반복된 테르펜 중 하나로, 오렌지향의 성분이며, 화학식은 $C_{10}H_{16}$ 이다. 소나무와 감귤류(특히 오렌지 및 레몬의 껍질)에 풍부하게 들어있는 식물성 정유로 명칭도 레몬에서 유래한 것이다. 그 특유의 향기로 인해 향료의 원료나 방향제로 사용된다. 광학적 이성질체로 d- 및 l-리모넨이 존재한다. d-리모넨은 오렌지 등의 감귤류에 많으며 l-리모넨은 소나무과 식물에 많이 함유되어 있다. 리모넨은 항균제, 항바이러스제, 항진균제, 항유충제, 곤충 유인제, 방취제, 착취제 등의 다양한 특성을 가지며 맛을 생성하는 효과도 있다.

[0033] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 변이 균주는 1개 이상의 재조합 벡터에 의해 형질전환되는 것일 수 있다.

[0035] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 상기 변이 균주를 배양하는 단계를 포함하는 리모넨 제조 방법에 관한 것이다.

[0036] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 변이 균주를 전배양 또는 종배양 하는데 있어서 공지된 다양한 배양 방법을 통해 배양할 수 있다.

[0037] 본 발명에 천연배지 또는 합성배지를 사용할 수 있으며, 배지의 탄소원으로는 예를 들어, 아세트산, 에탄올, 글루코오스, 수크로오스, 덱스트린, 글리세롤, 녹말 등이 사용될 수 있고, 질소원으로는 펩톤, 육류 추출물, 효모 추출물, 건조된 효모, 대두 케이크, 우레아, 티오우레아, 암모늄염, 나이트레이트 및 기타 유기 또는 무기 질소-함유 화합물이 사용될 수 있으나, 이러한 성분에 한정되는 것은 아니다.

[0038] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 변이 균주를 배양한 배양액으로부터 리모넨을 수득할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0040] 도 1은 아세트산과 에탄올이 *Saccharomyces cerevisiae* 생체 내에서 리모넨을 포함하여 다양한 생화학 물질로 전환되는 대사회로를 나타낸 그림이다.

도 2는 DMAPP, IPP로부터 리모넨과 에르고스테롤을 생산하는 생산 회로를 나타낸 그림이다.

도 3은 Acetyl-CoA로부터 DMAPP, IPP까지의 메발로네이트 경로를 나타낸 그림이다.

도 4는 글리옥실레이트 Shunt에 대한 모식도이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 변이 균주에 대한 플라스크 배양 결과를 나타낸다. 검정색 막대는 600 nm에서의 흡광도를 나타내고, 흰색 막대는 아세트산 및 에탄올의 총 소비량을 나타내며, 회색 막대는 도데칸 층에서의 리모넨 농도를 나타낸다.

도 6a는 본 발명의 일 실시예에 따른 SCAL06 변이 균주에 대한 회분 배양 결과를 나타낸다.

도 6b는 본 발명의 일 실시예에 따른 SCAL11 변이 균주에 대한 회분 배양 결과를 나타낸다. 검정색 다이아몬드는 에탄올 농도(mM)를 나타내고, 검정색 삼각형은 아세트산 농도(mM)를 나타내며, 회색 사각형은 600 nm에서의

흡광도를 나타내고, 회색 원은 도데칸 층에서의 리모넨 농도를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0041] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0043] **실시예 1: 리모넨 합성 경로와 관련된 유전자에 대한 벡터 제작**

[0044] 사카로미세스 세레비시아 생체 내에서 Acetyl-CoA로부터 합성된 C5 단량체 DMAPP와 IPP는 Geranyl-PP (Geranyl Pyrophosphate) - Farnesyl-PP(Farnesyl Pyrophosphate)를 거쳐 세포 중요 성분인 에르고스테롤(Ergosterol)을 합성하게 된다. 리모넨 합성의 전구체인 Geranyl-PP에서 Farneyl-PP가 합성되는 단계는 DMAPP와 IPP를 Geranyl-PP로 합성하는 Geranyl-PP 합성 효소가 같이 관여하며, 활성이 매우 높기 때문에 리모넨 합성 효소 유전자의 발현만으로 리모넨의 생산이 어렵다고 알려져 있다. 따라서 시그널 펩타이드가 제거된 Codon-Optimized Truncated (S)-리모넨 합성 효소(trLS from *Mentha spicata*)와 더불어 Farnesyl-PP 합성 효소 활성이 적다고 알려진 시그널 펩타이드가 제거된 Codon-Optimized Geranyl-PP 합성 효소(trGPPS2 from *Abies grandis*) 혹은 Geranyl-PP와 이성질체 관계이며 Farnesyl-PP로의 추가 반응의 기질이 될 수 없는 Neryl Pyrophosphate (Neryl-PP)를 합성하는 시그널 펩타이드가 제거된 Codon-Optimized Neryl-PP 합성 효소(trNDPS1 from *Solanum lycopersicum*)를 Acetate-Ethanol Inducible ICL1 프로모터, ADH1 - CYC1 터미네이터와 조합하여 Yeast Episomal Plasmid pESC-TRP 벡터에 Gibson Assembly 기법 (NEB)을 이용하여 삽입 (pASC-TRP1, 2 벡터) 및 발현시켜 리모넨 생산이 가능하도록 하였다.

표 1

[0045]

프라이머	서열(5'-3')	서열목록 번호
PICL1(trLS)_F (MluI)	**AGTATAATGTTACATGCGTACACGCGT**TTTTGCTACTCGTCATCCGAT	11
PICL1(trLS)__R	**GACGTTCCAT**TTTTCGTTGACTTTTTGTTATGTTATG	12
trLS_F	**TCAACGAAAA**ATGGAACGTCGTTCTGGTAATT	13
trLS_R	**TAGAGCGGAT**TTAAGCAAATGGCTCGAACAA	14
TCYC1_F	**ATTTGCTTAA**ATCCGCTCTAACCGAAAAGG	15
TCYC1_R	**AGTAGCAAAA**CTTCGAGCGTCCCAAAAC	16
PICL1(trGPPS2, trNDPS1)_F	**ACGCTCGAAG**TTTTGCTACTCGTCATCCGAT	17
PICL1(trGPPS2)_F	**AATTCTACCAT**TTTTCGTTGACTTTTTGTTATGTTATG	18
trGPPS2_F	**GTCAACGAAAA**ATGGTAGAATTTGATTTTAACAAATATATGG	19
trGPPS2_R (XhoI)	**CGAAGAATTGTTAATTAAGAGCTC**TTAATTTTGTCTGAATGCAACATAATC	20
PICL1(trNDPS1)_R	**TGGCGGACA**TTTTCGTTGACTTTTTGTTATGTTATG	21
trNDPS1_F	**TCAACGAAAA**ATGTCCGCCAGAGGATTG	22
trNDPS1_R (XhoI)	**CGAAGAATTGTTAATTAAGAGCTC**TTAATATGTGTGTCCACCGAATCT	23

[0046] **실시예 2: 메발로네이트 합성 경로와 관련된 유전자에 대한 벡터 제작**

[0047] 리모넨의 고농도 생산을 위해서는 Acetyl-CoA로부터 DMAPP, IPP 까지의 메발로네이트 경로의 흐름을 강화하는 것이 필요하다. 기존 문헌으로부터 메발로네이트 경로의 Bottle-Neck인 4개의 단계를 확인하였으며 유전자 과발현을 통해 이 Bottle-Neck을 해결함으로써 리모넨 생산량이 어떻게 증가하는지 양상을 확인하였다.

[0049] **2-1. 메발로네이트 합성 상위 경로와 관련된 유전자에 대한 벡터 제작**

[0050] Acetyl-CoA로부터 메발로네이트까지의 단계를 상위 경로라 칭하며, 상위 경로 중 Bottle-Neck 단계를 먼저 강화하고자 하였다. 두 분자의 Acetyl-CoA가 중합되어 Acetoacetyl-CoA가 되고 메발로네이트 경로로 유입되는 시점인 Acetyl-CoA Acetyltransferase 유전자(ERG10, Homologous Expression)와 3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-CoA (HMG-CoA)를 환원시켜 메발로네이트를 합성하는 Truncated NADPH Dependent HMG-CoA Reductase (trHMG1, Homologous Expression) 혹은 Codon-Optimized Acetyl-CoA Acetyltransferase/NADH Dependent HMG-CoA Reductase (*mvaE* from *Enterococcus faecalis*) 를 Acetate-Ethanol Inducible PCK1 프로모터, ADH1 - CYC1 터

미네이터와 조합하여 Yeast Episomal Plasmid pESC-LEU 벡터에 Gibson Assembly 기법(NEB)을 이용하여 삽입(pASC-LEU1, 2 벡터) 및 발현시켜 리모넨 생산량 증가를 확인하였다.

표 2

[0051]

프라이머	서열(5'-3')	서열목록 번호
PPCK1(ERG10)_F (MluI)	**AGTATAATGTTACATGCGTACACGCGT**GATCTGGATTTCCTAATTTGGATACA	24
PPCK1(ERG10)_R	**GTTCTGAGACAT**GTTGTTATTTTATTATGGAATAATTAGTTGC	25
ERG10_F	**TAAAATAACAAC**ATGTCTCAGAACGTTTACATTGTATCG	26
ERG10_R	**TTAGAGCGGAT**TCATATCTTTTCAATGACAATAGAGGA	27
TCYC1_F	**AAAAGATATGA**ATCCGCTCTAACCGAAAAGG	28
TCYC1_R	**AATCCAGATC**CTTCGAGCGTCCCAAAAC	29
PPCK1(trHMG1)_F	**ACGCTCGAAG**GATCTGGATTTCCTAATTTGGATACA	30
PPCK1(trHMG1)_R	**CTGCTGCCAT**GTTGTTATTTTATTATGGAATAATTAGTTGC	31
trHMG1_F	**AAATAACAAC**ATGGCAGCAGACCAATTGGTGAAAACT	32
trHMG1_R (XhoI)	**CGAAGAATTGTTAATTAAGAGCTC**TTAGGATTTAATGCAGGTGACG	33
PPCK1(mvaE)_R	**ACCGTTTTCAT**GTTGTTATTTTATTATGGAATAATTAGTTGC	34
mvaE_F	**AAAATAACAAC**ATGAAAACGGTTGTTATTATTGATGC	35
mvaE_F (XhoI)	**CGAAGAATTGTTAATTAAGAGCTC**TTATTGTTTTCTGAGATCATTCAAGATAG	36

[0052] **2-2. 메발로네이트 합성 상위 경로와 관련된 유전자에 대한 벡터 제작**

[0053] 메발로네이트로부터 DMAPP와 IPP까지의 단계를 하위 경로라 칭하며, 하위 경로 중 Bottle-Neck 단계를 강화하여 추가적인 리모넨 생산량 증가를 확인하였다. 메발로네이트가 ATP에 의해 인산화 되어 Phosphomevalonate (Mevalonate-P)가 되는 메발로네이트 키나아제 유전자(ERG12, Homologous Expression)만을 발현하거나, ERG13을 DMAPP와 IPP간의 이성질체화를 통해 DMAPP와 IPP의 비율을 조절하는 IPP Delta-Isomerase (IDI1, Homologous Expression)를 같이 Acetate-Ethanol Inducible FBP1 프로모터, ADH1 - CYC1 터미네이터와 조합하여 Yeast Episomal Plasmid pESC-HIS Vector에 Gibson Assembly 기법 (NEB)을 이용하여 삽입 (pASC-HIS1, 2 벡터) 및 발현시켜 리모넨 생산량 증가를 확인하였다.

표 3

[0054]

프라이머	서열(5'-3')	서열목록 번호
PFBP1(ERG12, IDI1) _F (MluI)	**AGTATAATGTTACATGCGTACACGCGT**AACCCATCAAACTGCATGGT	37
PFBO1(ERG12)_R	**GGTAATGACAT**ATGTGTGGTAGTATGAGGGATGTTT	38
ERG12_F	**TACCACACAT**ATGTCATTACCGTTCTTAACTTCTGC	39
ERG12_R (XhoI)	**CGAAGAATTGTTAATTAAGAGCTC**TTATGAAGTCCATGGTAAATTCGTG	40
PFBP1(IDI1)_R	**CGGCAGTCAT**ATGTGTGGTAGTATGAGGGATGTTT	41
IDI1_F	**TACCACACAT**ATGACTGCCGACAACAATAGTATG	42
IDI1_R	**TTAGAGCGGAT**TTATAGCATTCTATGAATTTGCCTGT	43
TCYC1_F	**AATGCTATAA**ATCCGCTCTAACCGAAAAGG	44
TCYC1_R	**TTGATGGGTT**CTTCGAGCGTCCCAAAAC	45
PFBP1(ERG12)_F	**ACGCTCGAAG**AACCCATCAAACTGCATGGT	46

[0055] **실시예 3: 글리옥실산 회로와 관련된 유전자에 대한 벡터 제작**

[0056] 비 탄수화물 탄소원인 아세트산과 에탄올을 이용하여 균이 생장 및 대사할 때 세포 구성성분 합성을 위한 당신생합성(Gluconeogenesis)를 위해서는 TCA Cycle의 이산화탄소 배출을 막고 탄소를 옥살산(Oxaloacetate)로 축적하기 위한 Glyoxylate Shunt의 활성화 및 유지가 필요하다. 아세트산과 에탄올 활용능력 증대를 위해 Glyoxylate Shunt 구성 유전자 Isocitrate Lyase(ICL1, Homologous Expression), 말산염 합성 효소(MLS1, Homologous Expression)를 Acetate-Ethanol Inducible PGI1 프로모터, ADH1 - CYC1 터미네이터와 조합하여 pESC-URA 벡터에 Gibson Assembly 기법을 이용하여 삽입 (pASC-URA 벡터) 및 발현시켜 리모넨 생산량의 변화를 확인하였다.

표 4

[0057]

프라이머	서열(5'-3')	서열목록 번호
PPGI1(ICL1)_F (MluI)	**AGTATAATGTTACATGCGTACACGCGT**TAACAAAAATCACGATCTGGGT	47
PPGI1(ICL1)_R	**GGATAGGCAT**TTTTAGGCTGGTATCTTGATTCTAAAT	48
ICL1_F	**CAGCCTAAAA**ATGCCTATCCCCGTTGG	49
ICL1_R	**GTTAGAGCGGAT**CTATTTCTTTACGCCATTTTCTTTG	50
TCYC1_F	**TAAAGAAATAG**ATCCGCTCTAACCGAAAAGG	51
TCYC1_R	**ATTTTTGTTA**CTTCGAGCGTCCCAAAAC	52
PPGI1(MLS1)_F	**ACGCTCGAAG**TAACAAAAATCACGATCTGGGT	53
PPGI1(MLS1)_R	**CCTTAACCAT**TTTTAGGCTGGTATCTTGATTCTAAAT	54
MLS1_F	**CAGCCTAAAA**ATGGTTAAGGTCAGTTTGGATAACG	55
MLS1_R (XhoI)	**CGAAGAATTGTTAATTAAGAGCTC**TCACAATTTGCTCAAATCAGTG	56

표 5

[0059]

Designation	Genotype	Notes
SCAL00	pESC-TRP, TRP1, pESC-LEU, LEU2, pESC-HIS, HIS3	Positive Control
SCAL01	pSCAL-TRP1, TRP1, P_{ICL1}-trGPPS2-T_{ADH1}, P_{ICL1}-trLS-T_{CYC1} pESC-LEU, LEU2, pESC-HIS, HIS3	Codon optimized trLS from *Mentha spicate* Codon optimized trGPPS2 from *Abies grandis*
SCAL02	pSCAL-TRP2, TRP1, P_{ICL1}-trNDPS1-T_{ADH1}, P_{ICL1}-trLS-T_{CYC1} pESC-LEU, LEU2, pESC-HIS, HIS3	Codon optimized trNDPS1 from *Solanum lycospersicum*
SCAL03	pSCAL-TRP2, TRP1, P_{ICL1}-trNDPS1-T_{ADH1}, P_{ICL1}-trLS-T_{CYC1} pSCAL-LEU1, LEU2, P_{PCK1}-ERG10-T_{ADH1}, P_{PCK1}-trHMG1-T_{CYC1} pESC-HIS, HIS3	
SCAL04	pSCAL-TRP2, TRP1, P_{ICL1}-trNDPS1-T_{ADH1}, P_{ICL1}-trLS-T_{CYC1} pSCAL-LEU2, LEU2, P_{PCK1}-ERG10-T_{ADH1}, P_{PCK1}-*mvaE*-T_{CYC1} pESC-HIS, HIS3	Codon optimized *mvaE* from *Enterococcus faecalis*
SCAL05	pSCAL-TRP2, TRP1, P_{ICL1}-trNDPS1-T_{ADH1}, P_{ICL1}-trLS-T_{CYC1} pSCAL-LEU1, LEU2, P_{PCK1}-ERG10-T_{ADH1}, P_{PCK1}-trHMG1-T_{CYC1} pSCAL-HIS1, HIS3, P_{FBP1}-ERG12-T_{ADH1}	
SCAL06	pSCAL-TRP2, TRP1, P_{ICL1}-trNDPS1-T_{ADH1}, P_{ICL1}-trLS-T_{CYC1} pSCAL-LEU1, LEU2, P_{PCK1}-ERG10-T_{ADH1}, P_{PCK1}-trHMG1-T_{CYC1} pSCAL-HIS2, HIS3, P_{FBP1}-ERG12-T_{ADH1}, P_{FBP1}-IDI1-T_{CYC1}	
SCAL11	pSCAL-TRP2, TRP1, P_{ICL1}-trNDPS1-T_{ADH1}, P_{ICL1}-trLS-T_{CYC1} pSCAL-LEU1, LEU2, P_{PCK1}-ERG10-T_{ADH1}, P_{PCK1}-trHMG1-T_{CYC1} pSCAL-HIS2, HIS3, P_{FBP1}-ERG12-T_{ADH1}, P_{FBP1}-IDI1-T_{CYC1} pSCAL-URA, URA3, P_{PGI1}-ICL1-T_{ADH1}, ,P_{PGI1}-MLS1-T_{CYC1}	

[0061] **실시예 4: 변이 균주 제작**

[0062] 전배양한 배양액을 50 mL YPAD 배지에 OD600이 0.25가 되도록 접종하고, OD600이 1.0이 될 때까지 배양한 다음, 1000Xg로 5분간 원심분리하고 10 mL LTE 버퍼로 재현탁(Resuspension)한 후 다시 1000Xg 로 5분간 원심분리하였다. 0.5 mL LTE 버퍼로 재현탁한 후 50 μL씩 분주하고 1 μg의 형질전환할 벡터 첨가하였다. 300 μL의 Transformation Mix를 첨가하고 30℃에서 30분간 배양 후 42℃에서 15분 배양하였다. 100 μL를 Seletion Agar Plate (SD dropout Agar) 에 도말 후 30℃에서 2일 배양하였다.

[0064] **실시예 5: 재조합 변이 균주의 리모넨 생산 수율 확인**

[0065] **5-1. 배지 조성**

표 6

[0066]

	SD Media	SAE Media
Phosphate Buffer		150mM (pH 5.7)
Carbon Substrate	Dextrose 20 g/L	Acetate Buffer 50mM Ethanol 150mM
Ammonium Sulfate	5 g/L	
Monopotassium Phosphate	1 g/L	
Magnesium Sulfate	0.5 g/L	
Sodium Chloride	0.1 g/L	
Calcium Chloride	0.1 g/L	
Boric Acid	0.5 mg/L	
Manganese Sulfate	0.4 mg/L	
Zinc Sulfate	0.4 mg/L	
Ferric Chloride	0.2 mg/L	
Sodium Molybdate	0.2 mg/L	
Potassium Iodide	0.1 mg/L	
Copper Sulfate	0.04 mg/L	
Inositol	2 mg/L	
Niacin	0.4 mg/L	
Pyridoxin HCl	0.4 mg/L	
Thiamine HCl	0.4 mg/L	
Calcium Pantothenate	0.4 mg/L	
Riboflavin	0.2 mg/L	
p-Aminobenzoic Acid	0.2 mg/L	
Folic Acid	2 μg/L	
Biotin	2 μg/L	
Adenine Sulfate	200 mg/L	
Uracil	100 mg/L (Exceptional in -URA)	
L-Lysine HCl	150 mg/L	
L-Tryptophan	200 mg/L (Exceptional in -TRP)	
L-Leucine	300 mg/L (Exceptional in -LEU)	
L-Histidine	100 mg/L (Exceptional in -HIS)	
L-Arginine HCl	20 mg/L	
L-Aspartate	100 mg/L	
L-Glutamate	100 mg/L	
L-Methionine	20 mg/L	
L-Phenylalanine	50 mg/L	
L-Serine	375 mg/L	
L-Threonine	200 mg/L	
L-Tyrosine	30 mg/L	
L-Valine	150 mg/L	

[0068] **5-2. 배양 및 분석 조건**

표 7

[0069]

배지 & 배양	배양 조건	분석
SAE-TRP-LEU-HIS(-URA) 배지 (합성 아세테이트-알코올 배지) 150 mM pH 5.7 인산완충액 50 mM 아세트산 나트륨 150 mM 에탄올 O.D. = 0.6 접종 From SD-TRP-LEU-HIS(-URA) 배양 (합성 덱스트로스 배지) 배양 4시간째 도데칸 층(10% v/v)	배플 플라스크 교반: 250 rpm 워킹 볼륨: 50 mL 온도: 30℃ 72시간 배양 회분 배양 교반: 300 rpm 통기: 1.5 vvm 워킹 볼륨: 1L 온도: 30℃ 72시간 배양	수상(Aqueous Phase) 기기: HPLC (Younglin) 컬럼: Hi Plex-H Column 온도: 80℃ 이동상: 0.1N H_2SO_4 유기상(Organic Phase) 기기: GC-MS (Agilent) 컬럼: HP5-MS Column 온도: 50℃ →? 90℃? →? 96℃? 이동상: 헬륨

[0071] 72시간 동안 플라스크에서 배양한 결과, 리모넨 생산량은 SCAL01<SCAL02 (trNDPS), SCAL04<SCAL03 (trHMG1), SCAL05 < SCAL06 (ERG12, IDI)의 결과를 보였다. Glyoxylate Shunt Expression(SCAL11)의 결과 생산속도는 감소하였지만 수율의 증가를 보였다(도 5 및 표 8).

표 8

[0072]

	Cell Growth (A600)		C2 Consumption (mM)		Limonene Production (mg/L)	
SCAL00	14.896	0.82472	15.67242	0	0	0
SCAL01	12.46	0.60622	15.44173	0.39957	1.8032	0.17724
SCAL02	12.845	0.48452	15.67242	0	2.0556	0.19024
SCAL03	12.054	0.65774	15.59648	0.13154	7.8188	0.98304
SCAL04	14.168	0.57829	15.67242	0	2.6508	0.37604
SCAL05	7.973	0.72574	15.05039	0.82588	6.8048	0.05958
SCAL06	11.368	0.37703	15.56026	0.19427	9.2156	2.77338
SCAL11	4.99767	0.55267	8.82281	0.14503	7.05214	1.45027

[0073] 72시간 동안 회분 배양한 결과, SCAL06의 생장 속도가 더 빨랐지만(도 6a 및 표 9), SCAL11에서 리모넨 생산량이 약 12.6 mg/L Dodecane의 농도로 나타나 가장 높은 생산량을 기록하였다(도 6b 및 표 10).

표 9

[0074]

Time (h)	Cell Growth (A600)	Acetate (mM)	Ethanol (mM)	Limonene (mg/L)
0	0.645	47.58265	142.1597	0
4	1.494	47.94271	134.7505	0
8	1.56	47.55288	116.7933	0.60549
11	1.674	46.7892	108.2449	0.83713
22	2.208	42.79486	75.26443	1.88687
34	3.33	31.91628	48.65299	3.70632
48	5.863	11.06765	19.36254	7.1103
58	7.436	0	0	9.40429
72	7.326	0	0	10.33353

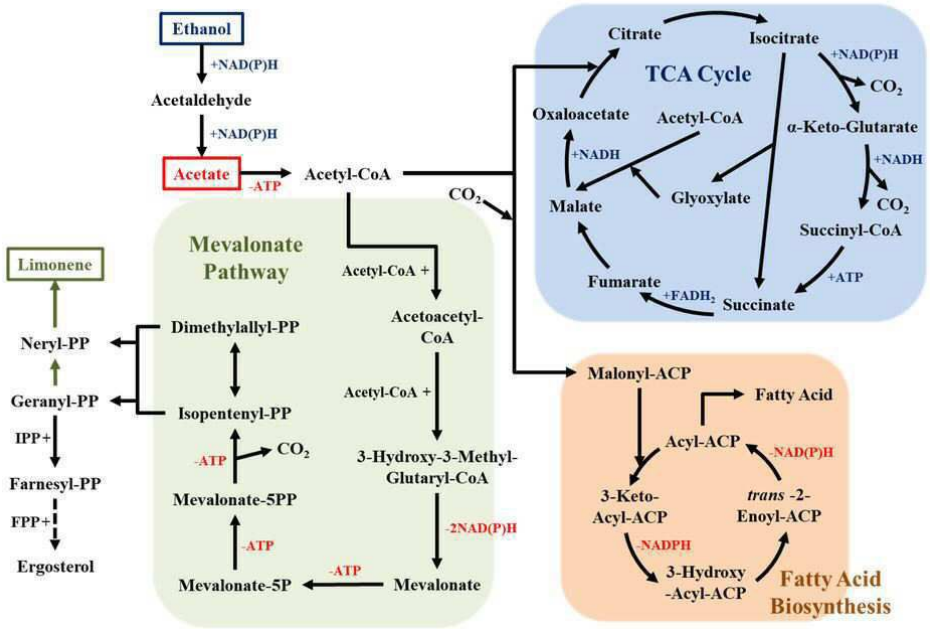
표 10

[0075]

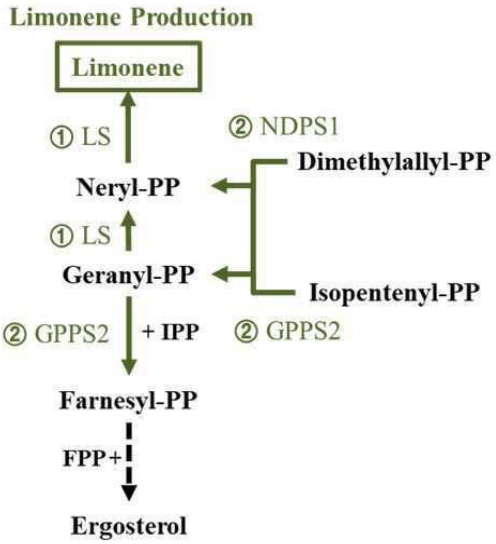
Time (h)	Cell Growth (A600)	Acetate (mM)	Ethanol (mM)	Limonene (mg/L)
0	0.627	48.00402	142.4696	0
4	1.224	48.88074	135.1548	0
8	1.35	48.80533	121.0565	0.84101
11	1.452	48.593	111.9966	1.39103
22	1.758	47.16727	77.19594	2.22597
34	2.538	41.40302	45.10052	4.9424
48	3.806	29.84346	24.43126	8.46249
58	4.72	21.24138	14.4651	10.20487
72	6.061	0	0	12.64235

도면

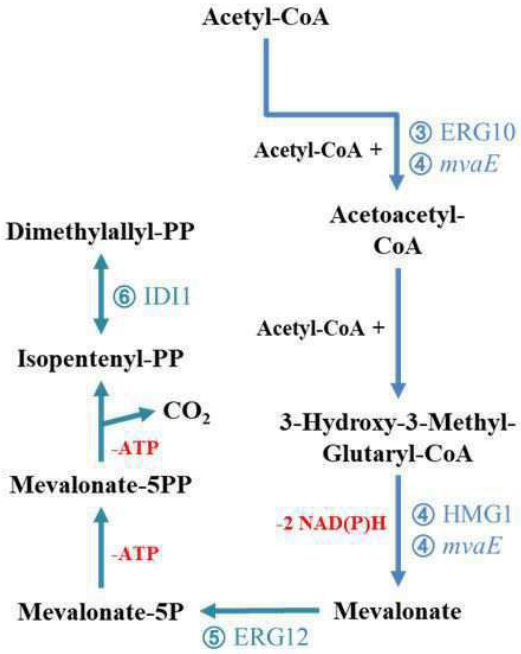
도면1



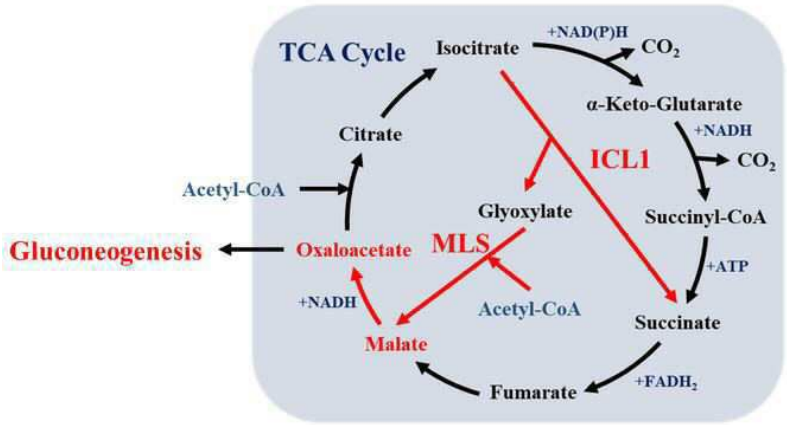
도면2


Limonene Production
Limonene
① LS
② NDPS1
Dimethylallyl-PP
Neryl-PP
① LS
Geranyl-PP
Isopentenyl-PP
② GPPS2
+ IPP
② GPPS2
Farnesyl-PP
FPP+
Ergosterol

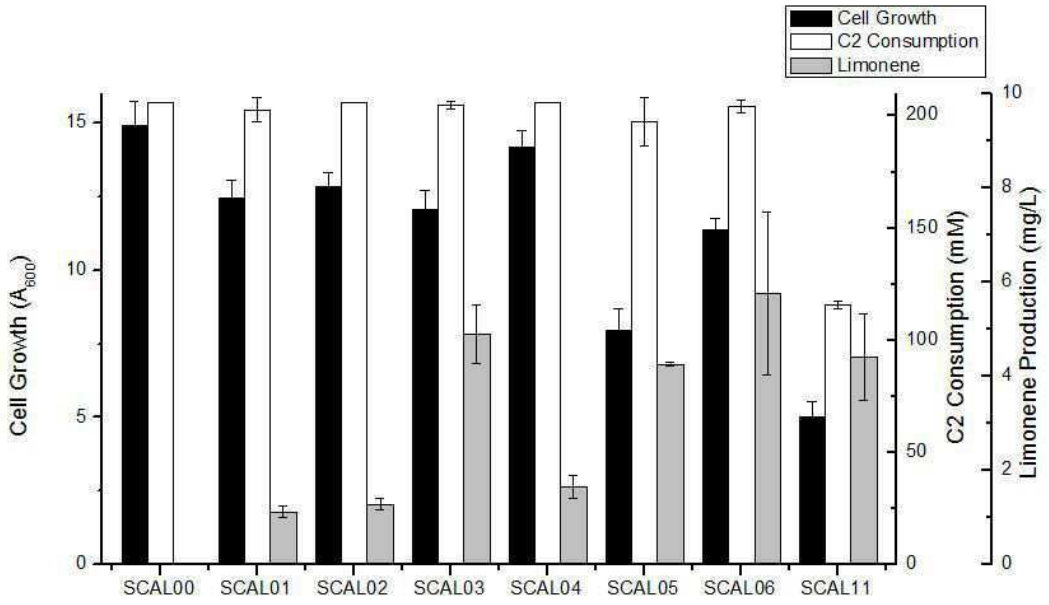
도면3


Acetyl-CoA
Acetyl-CoA +
③ ERG10
④ mvaE
Acetoacetyl-CoA
Dimethylallyl-PP
⑥ IDI1
Acetyl-CoA +
Isopentenyl-PP
CO2
-ATP
3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-CoA
Mevalonate-5PP
-2 NAD(P)H
④ HMG1
④ mvaE
-ATP
Mevalonate-5P
Mevalonate
⑤ ERG12

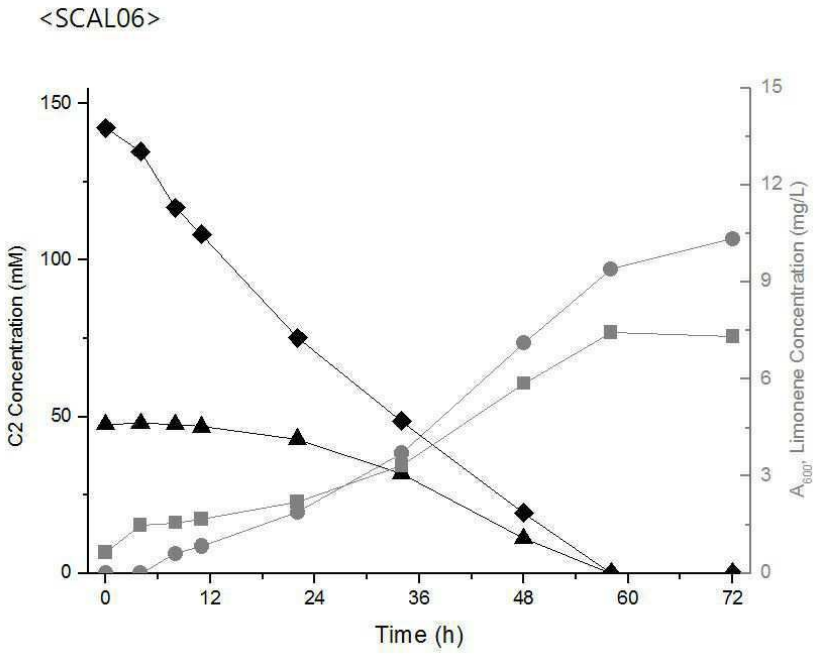
도면4


TCA Cycle
Isocitrate
+NAD(P)H
CO_2
α-Keto-Glutarate
+NADH
CO_2
Succinyl-CoA
+ATP
Succinate
+$FADH_2$
Fumarate
Malate
+NADH
Oxaloacetate
Citrate
Acetyl-CoA
Gluconeogenesis
ICL1
Glyoxylate
MLS
Acetyl-CoA

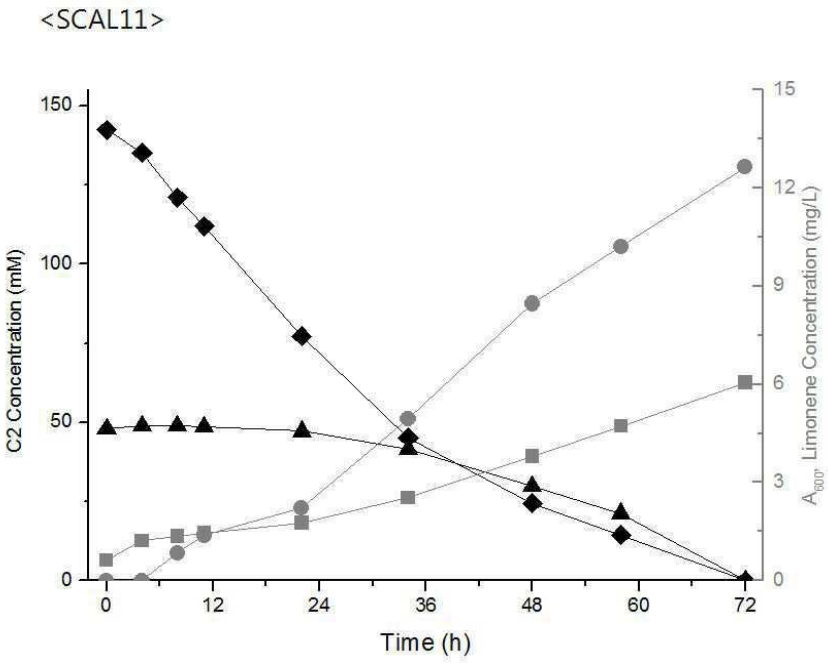
도면5


Cell Growth
C2 Consumption
Limonene
Cell Growth (A_{600})
C2 Consumption (mM)
Limonene Production (mg/L)
0
5
10
15
0
50
100
150
200
0
2
4
6
8
10
SCAL00
SCAL01
SCAL02
SCAL03
SCAL04
SCAL05
SCAL06
SCAL11

도면6a



도면6b



서 열 목 록

<110> SOGANG UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION

<120> Mutant Strain with Limonene Production Ability

<130> PN180368

<160> 56

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 1635

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> trLS, Codon-Optimized Truncated (S)-Limonene Synthase

<400> 1

atggaacgtc gttctggtaa ttataatcca tctagatggg atgttaattt tatacaatct 60

ttgttgtcgg attataaaga ggataagcac gttattagag cttctgaatt ggttactttg 120

gttaaaatgg aattggaaaa agaaactgat caaattagac aattggaatt gatagacgat 180

ttgcagagaa tgggtttgtc cgatcatttc caaaatgaat tcaaagaaat cttgagctct 240

atttatttgg atcatcacta ttataaaaac ccattcccaa aagaagaaag ggacttgtac 300

tctacatctc tggctttcag attgctgcga gagcatggtt ttcaagtggc tcaagaagtt 360

tttgattctt ttaagaatga ggaaggcgaa tttaaggaat ccttgtctga tgataccaga 420

ggtttgttgc agttgtacga ggcttctttt ttgttgaccg agggtgagac aactttggaa 480

tctgcgagag aattcgctac caagtttttg gaagagaagg tcaacgaagg tggggttgat 540

ggggacttgt tgacgcgtat tgcttacagt ttggatattc ctctacattg gaggattaaa 600

cgaccaaacg ctccagtctg gattgaatgg tacagaaaaa gacccgatat gaatccagtt 660

gttttggaat tggcaattct cgatttgaat attgtacaag ctcagttcca ggaagaactt 720

aaagagtctt ttaggtggtg gaggaataca ggattcgtag aaaaattgcc gttcgcaaga 780

gatagactcg ttgaatgtta cttttggaat actggtatta tcgaaccgcg tcaacacgct 840

tctgcccgca tcatgatggg taaagttaat gctcttataa cggttattga tgacatctat 900

gatgtttacg gaactttgga agaattggag cagtttacgg acttgatcag gaggtgggat 960

atcaattcta tagatcagtt gcctgactat atgcagttgt gttttttggc ccttaataat 1020

tttgtcgatg atacttctta tgacgttatg aaggagaagg gtgtgaatgt tattccttat 1080

ttgagacaat cttgggttga cttggctgat aaatacatgg ttgaagctag atggttttat 1140

ggtggacata agccaagctt ggaagagtac ttggagaact cttggcaatc tatttctggc 1200

ccttgcatgt taacacacat attcttccgt gttacagact cattcactaa agaaaccgtt 1260

gatagtttgt ataagtatca cgatttggtt cgctggagct cttttgttct gagattggct 1320

gacgatttgg gtacttctgt ggaggaggtg tcccggggtg acgttcccaa gtctttgcaa 1380

tgttacatgt ctgactataa cgcttcggaa gcggaagcta ggaaacatgt taaatggttg 1440

atcgctgaag tttggaaaaa aatgaacgct gaaagagttt ctaaggattc ccctttggc 1500

aaggatttta ttgggtgcgc tgtggacctt ggtagaatgg ctcaattgat gtaccataac 1560

ggtgacggcc atggtactca acatccaatt atacatcaac aaatgactag aactttgttc 1620

gagccatttg cttaa 1635

<210> 2

<211> 897

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> trGPPS2, Codon-Optimized Geranyl-PP Synthase

<400> 2

atggtagaat ttgattttaa caaatatatg gactctaagg caatgactgt gaacgaagct 60

ttaaataaag ccattccttt aagataccca caaaaaatat atgagtcgat gagatattct 120

ttattagcgg gtggtaaaag agtccgtcca gtactttgca tcgcagcatg cgaacttgtc 180

ggtggtaccg aagaattagc tattccaaca gcatgcgcca ttgaaatgat ccatactatg 240

agtttaatgc atgatgatct accctgtatc gataacgacg atttaaggag gggcaagccg 300

acaaatcata aaatatttgg cgaggatacg gcagtcacag ctggtaatgc tttacatagc 360

tatgcttttg aacacattgc tgtgtccact tcaaagacag tgggtgcaga tagaatatta 420

aggatggtga gtgaattggg tcgagctacc ggctcagaag gtgttatggg aggacaaatg 480

gttgatattg cttccgaagg cgatccatca atcgatttgc aaactttaga gtggattcac 540

attcataaga ccgcaatgtt actagaatgt agtgttgtat gtggagctat aatgggggt 600

gcttctgaaa ttgtaattga aagagctaga agatacgcaa gatgtgtcgg tttattattt 660

caggttgttg atgacatctt agatgttacg aaaagctctg acgaactagg taaaactgcg 720

ggaaaggatt taatttcaga caaagcaaca taccctaagt tgatgggttt agaaaaagct 780

aaagaattct ccgacgaact tctaaatcgt gctaagggtg aattgtcttg tttcgatcca 840

gttaaagctg ctcctttatt gggacttgct gattatgttg cattcagaca aaattaa 897

<210> 3

<211> 783

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> trNDPS1, Codon-Optimized Neryl-PP Synthase

<400> 3

atgtccgcca gaggattgaa caaaattagt tgttctttga atctgcaaac ggaaaagttg 60

tgttatgagg ataatgacaa cgatttggat gaggaattga tgcctaagca tattgcattg 120

attatggatg gcaatagacg ttgggctaaa gataaaggct tggaagttta tgaaggacat 180

aaacatatta ttccaaagct aaaagagatc tgtgatattt cttctaagtt ggggattcaa 240

atcattacag cttttgcatt ttcaaccgag aactggaaga ggtccaagga agaagtcgac 300

ttttttgctac agatgtttga agaaatatac gatgaatttt ctagatcggg tgtgagagta 360

agtattatcg gttgtaaaag cgatttgccc atgacgctcc aaaagtgcat cgctctaact 420

gaagaaacta ctaaaggaaa taagggtttg cacttggtaa ttgcgcttaa ctacggtggc 480

tactatgaca tattgcaggc cacaaagtca atagttaata aggccatgaa cggtcttctt 540

gacgtcgaag acataaataa aaacttgttc gatcaagaat tggagagcaa atgcccaaat 600

cctgacctgt tgatcagaac cgggggtgag caaagggttt caaacttcct gctttggcaa 660

ctagcatata ccgaattcta cttcactaac acattgtttc cagatttcgg tgaggaagat 720

ttgaaagaag ctataatgaa ctttcaacag agacatagaa gattcggtgg acacacatat 780

taa 783

<210> 4

<211> 1197

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ERG10, Acetyl-CoA Acetyltransferase

<400> 4

atgtctcaga acgtttacat tgtatcgact gccagaaccc caattggttc attccagggt 60

tctctatcct ccaagacagc agtggaattg ggtgctgttg ctttaaaagg cgccttggct 120

aaggttccag aattggatgc atccaaggat tttgacgaaa ttatttttgg taacgttctt 180

tctgccaatt tgggccaagc tccggccaga caagttgctt tggctgccgg tttgagtaat 240

catatcgttg caagcacagt taacaaggtc tgtgcatccg ctatgaaggc aatcattttg 300

ggtgctcaat ccatcaaatg tggtaatgct gatgttgtcg tagctggtgg ttgtgaatct 360

atgactaacg caccatacta catgccagca gcccgtgcgg gtgccaaatt tggccaaact 420

gttcttgttg atggtgtcga aagagatggg ttgaacgatg cgtacgatgg tctagccatg 480

ggtgtacacg cagaaaagtg tgcccgtgat tgggatatta ctagagaaca acaagacaat 540

tttgccatcg aatcctacca aaaatctcaa aaatctcaaa aggaaggtaa attcgacaat 600

gaaattgtac ctgttaccat taagggattt agaggtaagc ctgatactca agtcacgaag 660

gacgaggaac ctgctagatt acacgttgaa aaattgagat ctgcaaggac tgttttccaa 720

aaagaaaacg gtactgttac tgccgctaac gcttctccaa tcaacgatgg tgctgcagcc 780

gtcatcttgg tttccgaaaa agttttgaag gaaaagaatt tgaagccttt ggctattatc 840

aaaggttggg gtgaggccgc tcatcaacca gctgatttta catgggctcc atctcttgca 900

gttccaaagg ctttgaaaca tgctggcatc gaagacatca attctgttga ttactttgaa 960

ttcaatgaag ccttttcggt tgtcggtttg gtgaacacta agattttgaa gctagaccca 1020

tctaaggtta atgtatatgg tggtgctgtt gctctaggtc acccattggg ttgttctggt 1080

gctagagtgg ttgttacact gctatccatc ttacagcaag aaggaggtaa gatcggtgtt 1140

gccgccattt gtaatggtgg tggtggtgct tcctctattg tcattgaaaa gatatga 1197

<210> 5

<211> 1584

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> trHMG1, Truncated HMG-CoA Reductase

<400> 5

atggcagcag accaattggt gaaaactgaa gtcaccaaga agtcttttac tgctcctgta 60

caaaaggctt ctacaccagt tttaaccaat aaaacagtca tttctggatc gaaagtcaaa 120

agtttatcat ctgcgcaatc gagctcatca ggaccttcat catctagtga ggaagatgat 180

tcccgcgata ttgaaagctt ggataagaaa atacgtcctt tagaagaatt agaagcatta 240

ttaagtagtg gaaatacaaa acaattgaag aacaaagagg tcgctgcctt ggttattcac 300

ggtaagttac ctttgtacgc tttggagaaa aaattaggtg atactacgag agcggttgcg 360

gtacgtagga aggctctttc aattttggca gaagctcctg tattagcatc tgatcgttta 420

ccatataaaa attatgacta cgaccgcgta tttggcgctt gttgtgaaaa tgttataggt 480

tacatgcctt tgcccgttgg tgttataggc cccttggtta tcgatggtac atcttatcat 540

ataccaatgg caactacaga gggttgtttg gtagcttctg ccatgcgtgg ctgtaaggca 600

atcaatgctg gcggtggtgc aacaactgtt ttaactaagg atggtatgac aagaggccca 660

gtagtccgtt tcccaacttt gaaaagatct ggtgcctgta agatatggtt agactcagaa 720

gagggacaaa acgcaattaa aaaagctttt aactctacat caagatttgc acgtctgcaa 780

catattcaaa cttgtctagc aggagattta ctcttcatga gatttagaac aactactggt 840

gacgcaatgg gtatgaatat gatttctaaa ggtgtcgaat actcattaaa gcaaatggta 900

gaagagtatg gctgggaaga tatggaggtt gtctccgttt ctggtaacta ctgtaccgac 960

aaaaaaccag ctgccatcaa ctggatcgaa ggtcgtggta agagtgtcgt cgcagaagct 1020

actattcctg gtgatgttgt cagaaaagtg ttaaaaagtg atgtttccgc attggttgag 1080

ttgaacattg ctaagaattt ggttggatct gcaatggctg ggtctgttgg tggatttaac 1140

gcacatgcag ctaatttagt gacagctgtt ttcttggcat taggacaaga tcctgcacaa 1200

aatgttgaaa gttccaactg tataacattg atgaaagaag tggacggtga tttgagaatt 1260

tccgtatcca tgccatccat cgaagtaggt accatcggtg gtggtactgt tctagaacca 1320

caaggtgcca tgttggactt attaggtgta agaggcccgc atgctaccgc tcctggtacc 1380

aacgcacgtc aattagcaag aatagttgcc tgtgccgtct tggcaggtga attatcctta 1440

tgtgctgccc tagcagccgg ccatttggtt caaagtcata tgacccacaa caggaaacct 1500

gctgaaccaa caaaacctaa caatttggac gccactgata taaatcgttt gaaagatggg 1560

tccgtcacct gcattaaatc ctaa 1584

<210> 6

<211> 2412

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Codon Optimized mvaE, Codon-Optimized Acetyl-CoA Acetyltransferase/NADH Dependent HMG-CoA Reductase

<400> 6

atgaaaacgg ttgttattat tgatgctttg agaactccaa tagggaaata taagggttct 60

ttgtctcaag tttctgcggt tgatttgggt actcatgtca ctactcagtt gttgaagaga 120

cattctacta tttctgaaga aatcgatcag gttatttttg gtaatgtttt gcaagctggc 180

aatggtcaaa atcctgctag acaaattgct atcaattcag gtttgtctca cgaaattcca 240

gctatgactg ttaatgaagt atgtgggtct ggcatgaagg ctgtgatttt ggctaaacaa 300

ttgattcaat tgggggaagc tgaggttttg attgccggtg gaattgaaaa tatgtctcaa 360

gcgccaaaat tacaaaggtt taactatgaa actgagagtt acgatgctcc attctcttct 420

atgatgtatg atggtttgac tgatgctttt tcgggccaag ctatgggttt gactgctgaa 480

aatgttgctg aaaagtatca tgtaactagg gaagagcaag atcaattttc tgttcattct 540

cagttgaaag ccgctcaagc acaagctgaa ggaatctttg ctgatgaaat tgctcctttg 600

gaagtttctg gtactttggt tgaaaaagat gagggtatta gacctaattc tagcgttgaa 660

aaacttggta ctttgaagac tgtttttaaa gaggatggta ctgttactgc tggtaatgcc 720

agtactatta atgacggtgc ttcagctttg attattgctt ctcaagagta cgctgaagct 780

cacggactcc cttatttggc tattattaga gactctgttg aggtcggtat tgatcctgct 840

tacatgggta tttctccgat taaagctatt cagaaattgc tagctagaaa tcaattgact 900

actgaagaaa ttgatttgta cgaaattaac gaagcttttg ctgctacttc tattgtagtt 960

caaagagaat tggctttgcc ggaggagaaa gtgaatatat atggtggtgg aatttccttg 1020

ggtcacgcta taggtgctac gggtgctaga ttactcactt ctttgtctta tcagttgaac 1080

caaaaagaaa agaagtatgg tgttgcttct ttgtgcattg gtggtgggtt gggtttggct 1140

atgttgttgg aaaggccaca gcaaaaaaaa aactctagat tctaccaaat gtcgccagaa 1200

gaaaggttgg cttctcttct caatgaaggt caaatttctg ctgatactaa gaaagaattt 1260

gaaaatactg ctttgtcttc tcaaatcgct aatcatatga ttgagaatca aatctctgaa 1320

actgaagttc ccatgggtgt tggtttgcat ttgacagttg acgagaccga ttacttggtt 1380

ccaatggcta ctgaagaacc atctgttatt gctgctttgt caaatggtgc taagattgct 1440

caaggtttta aaactgttaa tcagcaaaga ttgatgaggg gtcaaatagt tttctacgat 1500

gttgctgacg ctgaatcttt gattgatgag ttgcaggtcc gtgaaactga gatttttcaa 1560

caagccgaac tttcttatcc aagtatcgtg aaaagaggtg gtgggttgag agatttgcaa 1620

tatcgggctt tcgacgaatc tttcgtttct gttgatttct tggttgatgt aaaagacgct 1680

atgggcgcta atattgttaa cgctatgttg gaaggtgttg ctgaattgtt tcgagaatgg 1740

tttgcggaac agaaaatttt gttcagtatt ttgtctaatt atgctacgga atctgttgtt 1800

actatgaaaa cagcgattcc cgtgtctaga ttgtcaaaag gttctaatgg tcgagaaatt 1860

gccgaaaaaa tcgttttggc ttctagatat gctagcttgg acccataccg cgctgttacc 1920

cataacaaag gtattatgaa tggtattgaa gctgtcgttt tagctactgg taatgacact 1980

agagctgttt ctgcttcttg tcatgctttc gcagttaaag aaggtagata ccaaggtttg 2040

acatcttgga ctttggacgg tgaacaactt attggtgaaa tttctgttcc attggctctt 2100

gcaactgtag gtggtgctac taaagtttta cctaagtctc aggctgctgc tgacttgttg 2160

gccgttacgg atgctaagga gttgtctaga gttgttgctg ctgttggtct ggctcagaat 2220

ttggccgctt tgagagcatt ggtgtctgaa gggattcaga aaggtcacat ggctttgcag 2280

gctagatcgt tagctatgac tgttggggct acaggtaaag aagtcgaagc tgttgctcaa 2340

cagttgaaga gacaaaaaac tatgaatcaa gatagagctt tagctatctt gaatgatctc 2400

agaaaacaat aa 2412

<210> 7

<211> 1332

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ERG12, Mevalonate Kinase

<400> 7

atgtcattac cgttcttaac ttctgcaccg ggaaaggtta ttatttttgg tgaacactct 60

gctgtgtaca acaagcctgc cgtcgctgct agtgtgtctg cgttgagaac ctacctgcta 120

ataagcgagt catctgcacc agatactatt gaattggact tcccggacat tagctttaat 180

cataagtggt ccatcaatga tttcaatgcc atcaccgagg atcaagtaaa ctcccaaaaa 240

ttggccaagg ctcaacaagc caccgatggc ttgtctcagg aactcgttag tcttttggat 300

ccgttgttag ctcaactatc cgaatccttc cactaccatg cagcgttttg tttcctgtat 360

atgtttgttt gcctatgccc ccatgccaag aatattaagt tttctttaaa gtctacttta 420

cccatcggtg ctgggttggg ctcaagcgcc tctatttctg tatcactggc cttagctatg 480

gcctacttgg gggggttaat aggatctaat gacttggaaa agctgtcaga aaacgataag 540

catatagtga atcaatgggc cttcataggt gaaaagtgta ttcacggtac cccttcagga 600

atagataacg ctgtggccac ttatggtaat gccctgctat ttgaaaaaga ctcacataat 660

ggaacaataa acacaaacaa ttttaagttc ttagatgatt tcccagccat tccaatgatc 720

ctaacctata ctagaattcc aaggtctaca aaagatcttg ttgctcgcgt tcgtgtgttg 780

gtcaccgaga aatttcctga agttatgaag ccaattctag atgccatggg tgaatgtgcc 840

ctacaaggct tagagatcat gactaagtta agtaaatgta aaggcaccga tgacgaggct 900

gtagaaacta ataatgaact gtatgaacaa ctattggaat tgataagaat aaatcatgga 960

ctgcttgtct caatcggtgt ttctcatcct ggattagaac ttattaaaaa tctgagcgat 1020

gatttgagaa ttggctccac aaaacttacc ggtgctggtg gcggcggttg ctctttgact 1080

ttgttacgaa gagacattac tcaagagcaa attgacagct tcaaaaagaa attgcaagat 1140

gattttagtt acgagacatt tgaaacagac ttgggtggga ctggctgctg tttgttaagc 1200

gcaaaaaatt tgaataaaga tcttaaaatc aaatccctag tattccaatt atttgaaaat 1260

aaaactacca caaagcaaca aattgacgat ctattattgc caggaaacac gaatttacca 1320

tggacttcat aa 1332

<210> 8

<211> 867

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IDI1, Isopentenyl-PP Delta-Isomerase

<400> 8

atgactgccg acaacaatag tatgccccat ggtgcagtat ctagttacgc caaattagtg 60

caaaaccaaa cacctgaaga cattttggaa gagtttcctg aaattattcc attacaacaa 120

agacctaata cccgatctag tgagacgtca aatgacgaaa gcggagaaac atgtttttct 180

ggtcatgatg aggagcaaat taagttaatg aatgaaaatt gtattgtttt ggattgggac 240

gataatgcta ttggtgccgg taccaagaaa gtttgtcatt taatggaaaa tattgaaaag 300

ggtttactac atcgtgcatt ctccgtcttt attttcaatg aacaaggtga attactttta 360

caacaaagag ccactgaaaa aataactttc cctgatcttt ggactaacac atgctgctct 420

catccactat gtattgatga cgaattaggt ttgaagggta agctagacga taagattaag 480

ggcgctatta ctgcggcggt gagaaaacta gatcatgaat taggtattcc agaagatgaa 540

actaagacaa ggggtaagtt tcacttttta aacagaatcc attacatggc accaagcaat 600

gaaccatggg gtgaacatga aattgattac atcctatttt ataagatcaa cgctaaagaa 660

aacttgactg tcaacccaaa cgtcaatgaa gttagagact tcaaatgggt ttcaccaaat 720

gatttgaaaa ctatgtttgc tgacccaagt tacaagttta cgccttggtt taagattatt 780

tgcgagaatt acttattcaa ctggtgggag caattagatg acctttctga agtggaaaat 840

gacaggcaaa ttcatagaat gctataa 867

<210> 9

<211> 1674

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ICL1, Isocitrate Lyase

<400> 9

atgcctatcc ccgttggaaa tacgaagaac gattttgcag ctttacaagc aaaactagat 60

gcagatgctg ccgaaattga gaaatggtgg tctgactcac gttggagtaa gactaagaga 120

aattattcag ccagagatat tgctgttaga cgcgggacat tcccaccaat cgaataccca 180

tcttcggtca tggccagaaa attattcaag gtattagaga agcatcacaa tgagggtaca 240

gtctctaaaa ctttcggtgc cctagatcct gtccagattt ctcaaatggc aaaatactta 300

gacacaatct atatttctgg ttggcagtgt tcatcaactg cttccacctc aaatgaacct 360

ggtccagact tagctgatta tccaatggac accgttccaa acaaagtgga acatttgttc 420

aaggcccaat tgtttcacga cagaaaacaa ctagaggcac ggtcaaaggc taaatctcag 480

gaagaactcg atgagatggg tgccccaatt gactacctaa caccaattgt cgctgatgca 540

gacgcaggcc acggcggttt aaccgcagtc ttcaaattga ccaagatgtt cattgagcgt 600

ggtgctgctg ggatccacat ggaagaccag acatctacaa ataagaaatg tgggcatatg 660

gcaggaagat gtgttatacc cgttcaggaa catgttaaca gattggtgac tattagaatg 720

tgtgctgata tcatgcattc tgacttaatt gtcgttgcta ggactgattc agaagcagcc 780

actttgatta gctcaaccat cgataccaga gatcattatt tcattgtcgg tgccaccaat 840

ccaaatatcg agccatttgc cgaagtttta aatgatgcca tcatgagtgg tgcatcagga 900

caagaactag ctgacattga acaaaaatgg tgtagagacg ctggactcaa gttattccat 960

gaagccgtca ttgatgaaat tgaaagatca gccctgtcaa ataagcaaga attgattaag 1020

aaattcacct ctaaagtggg tccattgact gaaacatccc acagagaagc caagaagctc 1080

gctaaagaaa ttcttggcca cgaaattttc ttcgactggg agctaccacg cgtaagggaa 1140

gggttgtacc gttacagagg tgggacgcaa tgttctatca tgagggcccg tgcatttgct 1200

ccatatgctg atttggtatg gatggaatct aactacccag acttccaaca ggccaaggag 1260

tttgcagaag gtgttaaaga gaaattccct gaccaatggc tagcttacaa cttgtctcca 1320

tcctttaact ggccaaaagc catgtccgtt gatgaacaac acaccttcat ccaaaggctg 1380

ggtgatctag gttacatctg gcaatttatc acattggccg gtttacacac taacgcttta 1440

gctgtccata acttctctcg tgactttgcc aaggatggga tgaaagctta tgcccagaat 1500

gttcagcaga gggaaatgga cgatggtgtt gatgtgttga aacatcaaaa atggtctggt 1560

gcggagtaca tcgatgggtt attgaagtta gctcaaggtg gtgttagcgc aacagctgct 1620

atgggaaccg gtgtcacaga agatcaattc aaagaaaatg gcgtaaagaa atag 1674

<210> 10

<211> 1665

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MLS1, Malate Synthase

<400> 10

atggttaagg tcagtttgga taacgtcaaa ttactggtgg atgttgataa ggagcctttc 60

tttaaaccat ctagtactac agtgggagat attcttacca aggatgctct agagttcatt 120

gttcttttac acagaacttt caacaacaag agaaaacaat tattggaaaa cagacaagtt 180

gttcagaaga aattagactc gggctcctat catctggatt tcctgcctga aactgcaaat 240

attagaaatg atcccacttg gcaaggtcca attttggcac cggggttaat taataggtca 300

acggaaatca cagggcctcc attgagaaat atgctgatca acgctttgaa tgctcctgtg 360

aacacctata tgactgattt tgaagattca gcttcaccta cttggaacaa catggtttac 420

ggtcaagtta atctctacga cgcgatcaga aatcaaatcg attttgacac accaagaaaa 480

tcgtacaaat tgaatggaaa tgtggccaac ttgcccacta ttatcgtgag accccgtggt 540

tggcacatgg tggaaaagca cctttatgta gatgatgaac caatcagcgc ttccatcttt 600

gattttggtt tatatttcta ccataatgcc aaagaattaa tcaaattggg caaaggtcct 660

tacttctatt tgccaaagat ggagcaccac ttggaagcta aactatggaa cgacgtcttc 720

tgtgtagctc aagattacat tgggatccca aggggtacaa tcagagctac tgtgttgatt 780

gaaactttgc ctgctgcttt ccaaatggaa gagatcatct atcaattaag acaacattct 840

agtgggttga attgcggacg ttgggactat attttctcta caatcaagag attaagaaat 900

gatcctaatc acattttgcc caatagaaat caagtgacta tgacttcccc attcatggat 960

gcatacgtga aaagattaat caatacctgt catcggaggg gtgttcatgc catgggtggt 1020

atggctgcgc aaatccctat caaagacgac ccggcagcca atgaaaaggc catgactaaa 1080

gtccgtaatg ataagattag agagctgaca aatggacatg atgggtcatg ggttgcacac 1140

ccagcactgg cccctatttg taatgaagtt ttcattaata tgggaacacc aaaccaaatc 1200

tatttcattc ctgaaaacgt tgtaacggct gctaatctgc tggaaaccaa aattccaaat 1260

ggtgagatta ctaccgaggg aattgtacaa aacttggata tcgggttgca gtacatggaa 1320

gcttggctca gaggctctgg atgtgtgccc atcaacaact tgatggaaga cgccgccact 1380

gctgaagtgt ctcgttgtca attgtatcaa tgggtgaaac acggtgttac tctaaaggac 1440

acgggagaaa aggtcacccc agaattaacc gaaaagattc taaaagaaca agtggaaaga 1500

ctgtctaagg caagtccatt gggtgacaag aacaaattcg cgctggccgc taagtatttc 1560

ttgccagaaa tcagaggcga gaaattcagt gaatttttga ctacattgtt gtacgacgaa 1620

attgtgtcca ctaaggcgac gcccactgat ttgagcaaat tgtga 1665

<210> 11

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PICL1(trLS)_F (MluI)

<400> 11

agtataatgt tacatgcgta cacgcgtttt tgctactcgt catccgat 48

<210> 12

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PICL1(trLS)__R

<400> 12

gacgttccat ttttcgttga ctttttgtta tgttatg 37

<210> 13

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> trLS_F

<400> 13

tcaacgaaaa atggaacgtc gttctggtaa tt 32

<210> 14

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> trLS_R

<400> 14

tagagcggat ttaagcaaat ggctcgaaca a 31

<210> 15

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TCYC1_F

<400> 15

atttgcttaa atccgctcta accgaaaagg 30

<210> 16

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TCYC1_R

<400> 16

agtagcaaaa cttcgagcgt cccaaaac 28

<210> 17

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PICL1(trGPPS2, trNDPS1)_F

<400> 17

acgctcgaag ttttgctact cgtcatccga t 31

<210> 18

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PICL1(trGPPS2)_F

<400> 18

aattctacca tttttcgttg actttttgtt atgttatg 38

<210> 19

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> trGPPS2_F

<400> 19

gtcaacgaaa aatggtagaa tttgatttta acaaatatat gg 42

<210> 20

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> trGPPS2_R (XhoI)

<400> 20

cgaagaattg ttaattaaga gctcttaatt ttgtctgaat gcaacataat c 51

<210> 21

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PICL1(trNDPS1)_R

<400> 21

tggcggacat tttcgttgac tttttgttat gttatg 36

<210> 22

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> trNDPS1_F

<400> 22

tcaacgaaaa atgtccgcca gaggattg 28

<210> 23

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> trNDPS1_R (XhoI)

<400> 23

cgaagaattg ttaattaaga gctcttaata tgtgtgtcca ccgaatct 48

<210> 24

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PPCK1(ERG10)_F (MluI)

<400> 24

agtataatgt tacatgcgta cacgcgtgat ctggatttcc taatttggat aca 53

<210> 25

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PPCK1(ERG10)_R

<400> 25

gttctgagac atgttgttat tttattatgg aataattagt tgc 43

<210> 26

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ERG10_F

<400> 26

taaaataaca acatgtctca gaacgtttac attgtatcg 39

<210> 27

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ERG10_R

<400> 27

ttagagcgga ttcatatctt ttcaatgaca atagagga 38

<210> 28

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TCYC1_F

<400> 28

aaaagatatg aatccgctct aaccgaaaag g 31

<210> 29

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TCYC1_R

<400> 29

aatccagatc cttcgagcgt cccaaaac 28

<210> 30

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PPCK1(trHMG1)_F

<400> 30

acgctcgaag gatctggatt tcctaatttg gataca 36

<210> 31

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PPCK1(trHMG1)_R

<400> 31

ctgctgccat gttgttattt tattatggaa taattagttg c 41

<210> 32

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> trHMG1_F

<400> 32

aaataacaac atggcagcag accaattggt gaaaact 37

<210> 33

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> trHMG1_R (XhoI)

<400> 33

cgaagaattg ttaattaaga gctcttagga tttaatgcag gtgacg 46

<210> 34

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PPCK1(mvaE)_R

<400> 34

accgttttca tgttgttatt ttattatgga ataattagtt gc 42

<210> 35

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mvaE_F

<400> 35

aaaataacaa catgaaaacg gttgttatta ttgatgc 37

<210> 36

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mvaE_F (XhoI)

<400> 36

cgaagaattg ttaattaaga gctcttattg ttttctgaga tcattcaaga tag 53

<210> 37

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PFBP1(ERG12, IDI1) _F (MluI)

<400> 37

agtataatgt tacatgcgta cacgcgtaac ccatcaaact gcatggt 47

<210> 38

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PFBO1(ERG12)_R

<400> 38

ggtaatgaca tatgtgtggt agtatgaggg atgttt 36

<210> 39

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ERG12_F

<400> 39

taccacacat atgtcattac cgttcttaac ttctgc 36

<210> 40

<211> 49

<212> DNA

<213

> Artificial Sequence

<220><223> ERG12_R (XhoI)

<400> 40

cgaagaattg ttaattaaga gctcttatga agtccatggt aaattcgtg 49

<210> 41

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PFBP1(IDI1)_R

<400> 41

cggcagtcat atgtgtggta gtatgaggga tgttt 35

<210> 42

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IDI1_F

<400> 42

taccacacat atgactgccg acaacaatag tatg 34

<210> 43

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IDI1_R

<400> 43

ttagagcgga tttatagcat tctatgaatt tgcctgt 37

<210> 44

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TCYC1_F

<400> 44

aatgctataa atccgctcta accgaaaagg 30

<210> 45

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TCYC1_R

<400> 45

ttgatgggtt cttcgagcgt cccaaaac 28

<210> 46

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PFBP1(ERG12)_F

<400> 46

acgctcgaag aacccatcaa actgcatggt 30

<210> 47

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PPGI1(ICL1)_F (MluI)

<400> 47

agtataatgt tacatgcgta cacgcgttaa caaaaatcac gatctgggt 49

<210> 48

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PPGI1(ICL1)_R

<400> 48

ggataggcat ttttaggctg gtatcttgat tctaaat 37

<210> 49

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ICL1_F

<400> 49

cagcctaaaa atgcctatcc ccgttgg 27

<210> 50

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ICL1_R

<400> 50

gttagagcgg atctatttct ttacgccatt ttctttg 37

<210> 51

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TCYC1_F

<400> 51

taaagaaata gatccgctct aaccgaaaag g 31

<210> 52

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TCYC1_R

<400> 52

atttttgtta cttcgagcgt cccaaaac 28

<210> 53

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PPGI1(MLS1)_F

<400> 53

acgctcgaag taacaaaaat cacgatctgg gt 32

<210> 54

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PPGI1(MLS1)_R

<400> 54

ccttaaccat ttttaggctg gtatcttgat tctaaat 37

<210> 55

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MLS1_F

<400> 55

cagcctaaaa atggttaagg tcagtttgga taacg 35

<210> 56

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MLS1_R (XhoI)

<400> 56

cgaagaattg ttaattaaga gctctcacaa tttgctcaaa tcagtg 46