



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0000176
(43) 공개일자 2017년01월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/70 (2006.01) C12N 9/16 (2006.01)
C12P 7/64 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/70 (2013.01)
C12N 9/16 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0089040
(22) 출원일자 2015년06월23일
심사청구일자 2015년06월23일

(71) 출원인
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(72) 발명자
이성국
울산광역시 남구 문수로409번길 23, 202동 601호
(신정동, 문수로아이파크2단지)
신광수
충청남도 예산군 예산읍 역전로 150-13, 201동
902호 (서오아파트)
(74) 대리인
제일특허법인

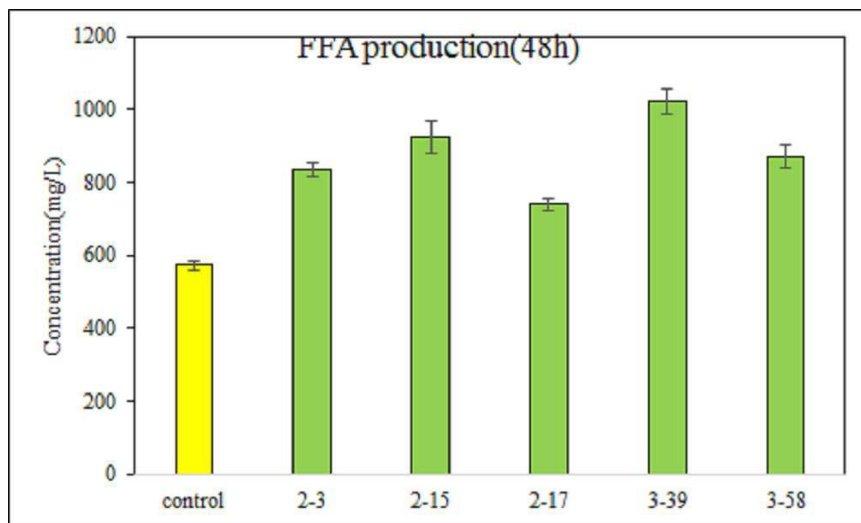
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 지방산 생성능이 증가된 변이 대장균 및 이를 이용한 지방산의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 싸이오에스터라제의 특정 아미노산이 치환됨으로써 우수한 지방산 생성능을 나타내는 변이 대장균 및 이를 이용한 지방산의 제조방법에 관한 것으로서, 본 발명에 따른 변이 대장균은 야생형 대장균에 비해 지방산 생성능이 우수한 바, 함유화학제품의 생산에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도9



(52) CPC특허분류

C12P 7/6409 (2013.01)

C12Y 301/02 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2009-0093491

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기후변화대응기초원천기술개발

연구과제명 바이오연료 생산을 위한 인공 미생물 설계·제작 플랫폼 기술개발

기 여 율 1/2

주관기관 국립대학법인 울산과학기술대학교 산학협력단

연구기간 2014.09.30 ~ 2015.09.29이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013R1A1A2058667

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기본연구(개인)

연구과제명 광부산물 기반 바이오리파이너리용 인공미생물 연구

기 여 율 1/2

주관기관 국립대학법인 울산과학기술대학교 산학협력단

연구기간 2014.11.01 ~ 2015.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열에서 K30R, D45G, R64C, D74G, A120D, A171V 및 Q175R로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는 싸이오에스테라제(thioesterase)를 포함하는, 변이 대장균(*E. coli*).

청구항 2

제1항에 있어서, K30R 및 Q175R의 아미노산 치환을 갖는 싸이오에스테라제를 포함하는 것을 특징으로 하는 변이 대장균.

청구항 3

제1항에 있어서, A120D 및 A171V의 아미노산 치환을 갖는 싸이오에스테라제를 포함하는 것을 특징으로 하는 변이 대장균.

청구항 4

제1항에 있어서, D45G의 아미노산 치환을 갖는 싸이오에스테라제를 포함하는 것을 특징으로 하는 변이 대장균.

청구항 5

제1항에 있어서, R64C의 아미노산 치환을 갖는 싸이오에스테라제를 포함하는 것을 특징으로 하는 변이 대장균.

청구항 6

제1항에 있어서, D74G의 아미노산 치환을 갖는 싸이오에스테라제를 포함하는 것을 특징으로 하는 변이 대장균.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 변이 대장균을 배양하는 단계를 포함하는, 변이 대장균으로부터 지방산을 제조하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 지방산 생성능이 증가된 변이 대장균 및 이를 이용한 지방산의 제조방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 싸이오에스테라제의 특정 아미노산이 치환됨으로써 우수한 지방산 생성능을 나타내는 변이 대장균 및 이를 이용한 지방산의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0001]

- [0002] 함유화학제품(oleochemicals)은 지방질이나 지방산으로부터 과생되어 생산되는 지방족화합물이다. 함유화학제품은 화장품, 샴푸, 세제 등과 같은 소비재 분야에서부터 페인트, 윤활유, 의약품, 바이오플라스틱, 바이오연료 등과 같은 산업적인 분야까지 널리 이용되고 있다(Brian *et al.*, *Metab. Eng.* 29, 1-11 (2015)).
- [0003] 함유화학제품은 지방산이나 아실-싸이오에스테르(acyl-thioester)를 기질로 하여 미생물에서 일련의 효소반응에 의해 생산된다. 그러므로, 함유화학제품의 생산을 위해서는, 미생물 내에서의 대사 흐름을 탄소원에서 지방산으로 흐르게 하고 최종적으로 지방산에서 함유화학제품으로 흐르도록 하는 대사공학적 방법이 중요하다. 특히, 대장균의 지방산 대사경로는 많은 에너지를 필요로 하는 과정이므로 매우 복잡할 뿐만 아니라 엄격하게 조절된다(Chan *et al.*, *Biochem. J.* 430, 119 (2010); Janen *et al.*, *Biotechnol. Biofuels*, 7:7 (2014)). 대장균에서의 지방산 합성은 반복되는 대사과정에 의해 수행된다. 일반적으로, 대장균에서의 지방산 합성은 아세틸-CoA(acetyl-CoA)와 말로닐-ACP(malonyl-ACP)의 축합반응으로 생성되는 아세토아세틸-ACP(acetoacetyl-ACP)로부터 시작된다. 하지만 이를 매개하는 효소의 기질특이성이 다양하기 때문에 홀수의 사슬길이의 지방산도 생산이 가능하다(Heath *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 271, 10996-11000 (1996); Torella *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 11290-11295 (2013)). 한 반응당 두 개의 탄소가 아실사슬(acyl-chain)에 첨가되면서 긴 길이의 아실사슬이 생성된다. 대장균이나 바실러스와 같은 미생물의 경우 제2유형의 지방산 생합성(Type II fatty acid biosynthesis)을 갖기 때문에 연장반응(elongation)에서 생성되는 중간체는 다른 경로의 효소들과 반응하여 전혀 새로운 물질을 합성할 수도 있다(Brian *et al.*, *Metab. Eng.* 29, 1-11 (2015)). 최종적으로는 싸이오에스테라제(thioesterase)가 아실사슬과 결합하고 있던 아실기 운반 단백질(acyl carrier protein, ACP)을 가수분해함으로써 지방산이 생산된다. 지방산 합성의 최종단계인 이 효소는 유래된 미생물에 따라 각기 다른 활성 및 기질특이성이 있기 때문에 목적하는 지방산을 생산하는데 매우 중요하다(Cantu *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 39, D342-D346 (2011)).
- [0004] 대사 경로에 존재하는 효소들의 충분한 활성은 대사공학적 방법을 이용한 함유화학제품의 생산에 필수적이다. 이를 위해 DNA의 복제수(copy number)나 프로모터 혹은 리보솜결합부위(ribosome binding site, RBS)의 강도를 조절하여 효소의 발현량을 높이는 방법이 사용되고 있으나, 단순히 효소의 발현량을 증가시키거나 조절하는 것은 미생물의 생장을 저해하거나 발현 벡터의 안정성을 감소시키는 대사 부담(metabolic burden)을 야기하여 목표하는 생산물의 생산성이나 수율을 오히려 감소시킬 수도 있다(Bentley *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.* 35, 668-681 (1990); Snia *et al.*, *Journal of Biotechnology*, 164, 396-408 (2013); Germn *et al.*, *Frontiers in Microbiology*, 5, 1-17 (2014)).
- [0005] 이에, 본 발명자들은 대장균의 지방 대사 경로에 관여하는 싸이오에스테라제 내의 특정 아미노산을 치환함으로써 대장균의 지방산 생성능을 증가시킬 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0006] (비특허문헌 0001) Brian *et al.*, *Metab. Eng.* 29, 1-11 (2015)
- (비특허문헌 0002) Chan *et al.*, *Biochem. J.* 430, 119 (2010)
- (비특허문헌 0003) Janen *et al.*, *Biotechnol. Biofuels*, 7:7 (2014)
- (비특허문헌 0004) Heath *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 271, 10996-11000 (1996)
- (비특허문헌 0005) Torella *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 11290-11295 (2013)
- (비특허문헌 0006) Cantu *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 39, D342-D346 (2011)
- (비특허문헌 0007) Bentley *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.* 35, 668-681 (1990)
- (비특허문헌 0008) Snia *et al.*, *Journal of Biotechnology*, 164, 396-408 (2013)

(비특허문헌 0009) Germn et al., *Frontiers in Microbiology*, 5, 1-17 (2014)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 따라서, 본 발명의 목적은 지방 대사 경로에 관여하는 효소를 개량함으로써 지방산 생성능이 증가된 변이 대장균을 제공하는 것이다.
- [0008] 본 발명의 다른 목적은 전술한 변이 대장균을 이용하여 지방산을 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열에서 K30R, D45G, R64C, D74G, A120D, A171V 및 Q175R로 이루어진 균으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는 싸이오에스테라제(thioesterase)를 포함하는, 변이 대장균(*E. coli*)을 제공한다.
- [0010] 상기 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 전술한 변이 대장균을 배양하는 단계를 포함하는, 변이 대장균으로부터 지방산을 제조하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0011] 본 발명에 따른 변이 대장균은 싸이오에스테라제의 개량을 통해 우수한 지방산 생성능을 나타내며, 함유화학제품의 생산에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0012] 도 1은 본 발명에 따른 변이 대장균의 제조 과정을 개략적으로 도식화한 것이다.
- 도 2의 (a)는 본 발명에 사용된 지방산 바이오센서(FAB) 플라스미드에 포함되는 프로모터 및 유전자의 구조를 나타낸 것이고, (b)는 본 발명에 사용된 FAB 플라스미드의 작동 원리를 나타낸 것이다.
- 도 3은 야생형 대장균 MG1655, MG-FAB 및 MG-fadE-FAB의 적색 형광 단백질(RFP)의 발현량을 측정한 결과이다.
- 도 4는 대장균 MG-FAB를 0.05%의 트윈-20 및 증가하는 농도의 올레산(c18:1; 0부터 2 mM까지의 올레산)을 포함하는 LB 배지에서 각각 배양한 후, RFP의 발현량을 측정한 결과이다.
- 도 5는 대장균 MG-FAB를 다양한 농도의 테트라사이클린을 함유하는 배지에서 배양할 때의 균주의 성장 속도를 나타낸 것이다.
- 도 6은 대장균 MG-FAB를 40 ug/mL의 테트라사이클린 및 다양한 농도의 올레산을 함유하는 배지에서 배양할 때의 균주의 성장 속도를 나타낸 것이다.
- 도 7은 지방산을 축적하는 균주인 MG-fadE와 야생형 대장균 MG1655에 지방산 바이오센서 플라스미드를 넣은 후 테트라사이클린 40 ug/mL이 함유된 LB 배지에서 성장시켰을 때의 성장속도를 나타낸 것이다.
- 도 8은 지방산을 축적하는 균주인 MG-fadE와 야생형 대장균 MG1655에 지방산 바이오센서 플라스미드를 넣은 후 테트라사이클린 40 ug/mL이 함유된 LB 배지에서 95:5의 비율로 섞어서 24시간을 1 사이클로 농축배양하였을 때 MG-fadE의 비율이 증가함을 나타낸 것이다.
- 도 9는 균주 2-3, 2-15, 2-17, 3-39 및 3-58의 지방산 생성능을 비교한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0013] 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열에서 K30R, D45G, R64C, D74G, A120D, A171V 및 Q175R로 이루어진 균으

로부터 선택되는 어느 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는 싸이오에스테라제(thioesterase)를 포함하는, 변이 대장균(*E. coli*)을 제공한다.

- [0014] 본원에 사용된 용어 '싸이오에스테라제(thioesterase)'는 대장균 내의 지방산 대사 경로에서 아실-ACP(acyl-acyl carrier protein)로부터 지방산을 생산하는 단계를 촉매하는 효소를 가리킨다.
- [0015] 대장균 내에 존재하는 변이되지 않은 야생형 싸이오에스테라제는 대장균에서의 발현량이 낮으므로, 상기 야생형 싸이오에스테라제를 포함하는 대장균은 지방산 생성능이 낮다. 이에 반해, 본 발명에 따른 아미노산 치환을 갖는 싸이오에스테라제는 특정 아미노산의 치환으로 인해 촉매 활성이 향상되므로, 상기 변이 싸이오에스테라제를 포함하는 본 발명에 따른 변이 대장균은 야생형 대장균에 비해 증가된 지방산 생성능을 나타낸다.
- [0016] 본 발명에 따른 변이 대장균은 야생형 대장균 내에 존재하는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 싸이오에스테라제를 변이시킴으로써 제조될 수 있다. 구체적으로, 본 발명에 따른 변이 대장균은 야생형 대장균에 존재하는 싸이오에스테라제를 에러 유발(error-prone) PCR에 의해 무작위 돌연변이시켜 돌연변이 라이브러리를 생성한 다음(1단계), 상기 생성된 라이브러리 중 효소 활성이 우수한 라이브러리를 농축 배양하여 1차 스크리닝한 다음(2단계), 1차 스크리닝된 라이브러리를 FACS sorting에 의해 효소 활성이 우수한 균주를 2차 스크리닝함으로써(3단계) 수득될 수 있다(도 1).
- [0017] 하나의 바람직한 구현예에서, 본 발명에 따른 변이 대장균은 서열번호 1의 아미노산 서열에서 K30R 및 Q175R의 아미노산 치환을 갖는 싸이오에스테라제를 포함한다. 상기 변이 대장균 내에 포함된 싸이오에스테라제는 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는다.
- [0018] 다른 바람직한 구현예에서, 본 발명에 따른 변이 대장균은 서열번호 1의 아미노산 서열에서 A120D 및 A171V의 아미노산 치환을 갖는 싸이오에스테라제를 포함한다. 상기 변이 대장균 내에 포함된 싸이오에스테라제는 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는다.
- [0019] 또 다른 바람직한 구현예에서, 본 발명에 따른 변이 대장균은 서열번호 1의 아미노산 서열에서 D45G의 아미노산 치환을 갖는 싸이오에스테라제를 포함한다. 상기 변이 대장균 내에 포함된 싸이오에스테라제는 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는다.
- [0020] 또 다른 바람직한 구현예에서, 본 발명에 따른 변이 대장균은 서열번호 1의 아미노산 서열에서 R64C의 아미노산 치환을 갖는 싸이오에스테라제를 포함한다. 상기 변이 대장균 내에 포함된 싸이오에스테라제는 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는다.
- [0021] 또 다른 바람직한 구현예에서, 본 발명에 따른 변이 대장균은 서열번호 1의 아미노산 서열에서 D74G의 아미노산 치환을 갖는 싸이오에스테라제를 포함한다. 상기 변이 대장균 내에 포함된 싸이오에스테라제는 서열번호 6의 아미노산 서열을 갖는다.
- [0022] 본 발명에 따른 변이 대장균의 지방산 생성능은 지방산 대사경로의 전사인자인 *fadR*, *tetA* 및 적색 형광 단백질(RFP)을 포함하는 플라스미드에 의해 측정될 수 있다. 상기 플라스미드는 본원에서 '지방산 바이오센서(fatty acid biosensor; FAB)' 플라스미드로 명명된다.
- [0023] 하나의 구현예에서, 상기 지방산 바이오센서 플라스미드는 pBAD 프로모터 및 이의 제어하에 있는 *fadR* 유전자를 포함하고, *FadR* 결합 부위가 P_L 프로모터에 삽입된 P_{LR} 프로모터 및 이의 제어하에 있는 *tetA* 및 *rfp* 유전자를 포함한다(도 2(a) 참조).
- [0024] 상기 지방산 바이오센서 플라스미드는 지방산이 불충분한 경우 *FadR*이 프로모터 내의 *FadR* 결합 부위에 결합하여 RNA 폴리머라아제가 프로모터에 결합하는 것을 막음으로써 *rfp* 전사를 억제한다. 한편, 지방산이 충분한 경우 지방산이 아실-CoA로 활성화되고 이는 *FadR*의 DNA 결합 활성을 길항하며, RNA 폴리머라아제는 프로모터에 결합하여 *rfp* 전사를 작동시킨다. 따라서, RFP의 발현량을 측정함으로써 지방산 생성량을 측정할 수 있다.

[0025] 한편, 본 발명은 전술한 변이 대장균을 배양하는 단계를 포함하는, 대장균으로부터 지방산을 제조하는 방법을 제공한다.

[0026] 상기 변이 대장균의 배양은 적절한 대장균 배양용 배지, 예를 들면 LB 배지, M9-최소 배지 등을 이용하여 수행될 수 있다. 상기 배양 중 싸이오에스터라제의 발현을 돕기 위해 0.01 내지 1 mM, 바람직하게는 0.3 mM의 IPTG가 첨가될 수 있다.

[0027] 상기 배양 과정을 통해 수득한 배양물은 지방산을 수득하기 위해 종래 알려진 통상적인 방법, 예를 들면 Sherlock Microbial Identification System 방법을 추가로 거칠 수 있다.

[0028]

[0029] 이하, 본 발명을 실시예를 들어 상세히 설명하고자 하나, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 이로 인해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

[0030] **참고예: 사용된 균주, 플라스미드 및 프라이머**

[0031] 하기 실시예에서 사용된 균주 및 플라스미드를 하기 표 1에 나타내었으며, 프라이머를 표 2에 나타내었다.

표 1

	명칭	특성	입수처 또는 참고문헌
균주	<i>E. coli</i> MG1655	야생형	Blattner 등 Science 277, 5331, 1453-1474 (1997)
	MG-fadE	아실-CoA 탈수소화효소를 암호화하는 fadE가 제거된 MG1655	하기 제조예 <2-1>에서 제조
	MG-FAB	지방산 바이오센서 플라스미드를 갖는 MG1655	하기 제조예 <2-1>에서 제조
	MG-fadE-FAB	지방산 바이오센서 플라스미드를 갖는 MG1655-fadE	하기 실시예에서 제조
	MG-FAB-pBbB6c-tesA	지방산 바이오센서 플라스미드와 pBbB6c-tesA를 갖는 MG1655	하기 실시예에서 제조
플라스미드	pBbB6c-tesA	BBR1 ori; Cm ^r , P _{lacO1} -tesA	하기 실시예에서 제조
	pBbB8a-FadR	ColE1 ori; Ampr, P _{BAD} -fadR	하기 실시예에서 제조
	Fatty Acid Biosensor(FAB)	ColE1 ori; Ampr, P _{BAD} -fadR, PLR-tetA-RFP	Fuzhong 등 Nature Biotechnology 4, 30, 354-360 (2012)

[0033]

표 2

[0034]

	명칭	서열	서열번호
프라이머	FadR FP	AAAGATCTTTTAAGAAGGAGATATACAT ATGGTCATTAAGGCGCAAAG	8
	FadR RP	TACTCGAG TTATCGCCCTGAATGGCTA	9
	TetA FP	ACATCAGCAGGACGCACTGA CCGAATTCATTTAAGAAGGAGATATACAT ATGAAATCTAACAATGCGCTCATCG	10
	TetA RP	AGAACCGCCTCCAGAACCACCACCGAGCCGCCGCCGCTTCCACCGCC GGTCGAGGTGGCCCGGCTCCATGCA	11
	RFP FP	GGCGGTGGAAGCGGCGGCGGCTCCGGTGGTGGTTCTGGAGGCGGTCT ATGGCGAGTAGCGAAGACGTTATCA	12
	RFP RP	GTCAAGTTGTCATAAGACGTCTACCGCCTTTGAGTGAGCTG	13
	TesA FP	AAAGAATTCAAAAGATCTTTTAAGAAGGAGATATACATATGGCGGACACGTTATTG AT	14
	TesA RP	TTACTCGAGTTATGAGTCATGATTACTA	15
	P _{LlacO} FP	CGAGCCCGATCTTCCCCATC	16
	dbI RP	TATAAACGCAGAAAGGCCCA	17
	fadE seq FP	AAAAGTTAGCCAGCGTTTCCGCCGC	18
	fadE seq RP	ACGTTGGGAGATGAGACGTATCAGG	19

[0035]

[0036]

제조예 1: 지방산 바이오센서(FAB) 플라스미드의 제작

[0037]

문헌[Fuzhong et al., *Nature Biotechnology* 30, 354-359 (2012)]에 기재된 방법을 참조하여, 지방산의 농도를 간접적으로 감지할 수 있는 FAB 플라스미드를 제작하였다.

[0038]

먼저, 대장균의 지방산 대사경로의 전사인자인 FadR이 결합할 수 있는 DNA 서열(서열번호 7: atctggtacgaccagat)을 서열번호 10의 프라이머를 이용하여 P_L 프로모터에 삽입하였다.

[0039]

이후, FadR의 원활한 발현을 위해 대장균의 FadR 유전자를 서열번호 8 및 9의 프라이머를 이용한 PCR에 의해 증폭한 다음, 이를 bglII와 XhoI로 절단하였다. 상기 절단된 단편을 동일한 제한 효소로 처리된 대장균용 발현 플라스미드 pBbB8a(Joint BioEnergy Institute, USA)에 삽입하여 FadR을 포함하는 플라스미드 pBbB8a-FadR을 제작하였다.

[0040]

한편, tetA 유전자를 플라스미드 pBBR1MCS-3(Applied Environmental Microbiology Lab, UNIST, Korea)를 주형으로 하여 서열번호 10 및 11의 프라이머를 이용한 PCR에 의해 증폭하였다. 또한, 적색 형광 단백질(Red Fluorescent Protein; RFP) 유전자를 플라스미드 pBbB8a-RFP(Joint BioEnergy Institute, USA)를 주형으로 하여 서열번호 12 및 13의 프라이머를 이용한 PCR에 의해 증폭하였다.

[0041]

상기 증폭된 tetA 유전자 및 RFP 유전자를 SOEing PCR 기법으로 연결하여 하나의 융합단백질(fusion protein)을 제조하였다. 상기 융합 단백질을 AatI로 절단한 후, 동일한 제한 효소로 처리된 플라스미드 pBbB8a-FadR에 삽입하여 지방산의 농도를 간접적으로 감지할 수 있는 FAB 플라스미드를 제작하였다.

[0042]

제조예 2: FAB 플라스미드를 갖는 대장균의 제조

[0043]

제조예 1에서 제조된 FAB 플라스미드의 지방산 감지 능력을 확인하기 위해, FAB 플라스미드를 갖는 대장균 및 아실-CoA 탈수소화효소를 암호화하는 fadE가 제거되고 FAB 플라스미드를 갖는 대장균을 제조하였다.

- [0044] <2-1> FAB 플라스미드를 갖는 대장균의 제조
- [0045] 야생형 대장균 MG1655(Blattner 등 Science 277, 5331, 1453-1474 (1997))를 제조예 1에서 제조된 FAB 플라스미드로 형질전환하여, FAB 플라스미드를 갖는 대장균을 제조하였다.
- [0046] 구체적으로, MG1655를 LB 배지에서 OD 0.6까지 성장시킨 다음, 4℃에서 LB의 성분을 TDW로 제거하였다. 이후, FAB 플라스미드를 25 ng 첨가하여 전기천공에 의해 MG1655를 형질전환하였다. 이후 암피실린 100 ug/ml이 포함된 아가 플레이트에 형질전환체를 도말하여, FAB 플라스미드를 갖는 대장균을 제조하였다. 상기 제조된 대장균을 'MG-FAB'로 명명하였다.
- [0047] <2-2> fadE 및 FAB 플라스미드를 갖는 대장균의 제조
- [0048] 아실-CoA 탈수소화효소를 암호화하는 fadE가 제거된 대장균을 문헌[One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products, PNAS, 2000]에 기재된 방법을 참조하여 제조하였다. 상기 제조된 대장균을 MG-fadE로 명명하였다.
- [0049] 이후, 대장균 MG-fadE를 제조예 1에서 제조된 FAB 플라스미드로 형질전환하여, fadE가 제거되고 FAB 플라스미드를 갖는 대장균을 제조하였다. 상기 제조된 대장균을 'MG-fadE-FAB'로 명명하였다.
- [0050] **실험예 1: FAB 플라스미드의 효능 확인**
- [0051] 제조예 1에서 제조된 FAB 플라스미드의 효능을 확인하기 위해, 야생형 대장균 MG1655, 제조예 <2-1>에서 제조된 MG-FAB 및 제조예 <2-2>에서 제조된 MG-fadE-FAB를 LB 배지에서 37℃에서 24시간 동안 배양하였다. 그리고 나서, 배양액 150 ul를 취한 후 마이크로플레이트 리더에서 발현된 적색 형광 단백질(RFP)의 양을 측정하였다. 이때 파장은 λ_{ex} :585nm, λ_{em} :615nm을 이용하여 RFP의 강도를 측정하고 OD는 파장 600nm에서 측정한 후 RFP 값을 OD 값으로 나누어 정규화하였다. 상기 결과를 도 3에 나타내었다.
- [0052] 도 3에서 보는 바와 같이, 야생형 대장균은 RFP를 발현하지 않았으나, FAB 플라스미드를 갖는 대장균들은 RFP를 발현하였다. 특히, 지방산 분해경로가 비활성화되어 세포내 아실-CoA의 농도가 높은 대장균 MG-fadE-FAB가 가장 높은 RFP 발현을 나타내었다.
- [0053] 한편, 대장균 MG-FAB를 0.05%의 트윈-20 및 증가하는 농도의 올레산(c18:1; 0부터 2 mM까지의 올레산)을 포함하는 LB 배지에서 각각 배양한 후, 적색 형광 단백질(RFP)의 양을 측정하였다. 상기 결과를 도 4에 나타내었다.
- [0054] 상기 도 4에서 보는 바와 같이, 배지 중에 지방산 농도가 증가함에 따라 RFP의 발현량도 증가하는 것으로 나타났다.
- [0055] 또한, 대장균 MG-FAB를 다양한 농도의 테트라사이클린을 함유하는 LB배지에서 14시간 동안 배양하면서 2시간 단위로 600 nm에서 광학밀도(O.D)를 측정하여 균주의 성장 속도를 분석하였다. 배양은 37℃, 200 rpm에서 수행하였고, 테트라사이클린이 빛에 의해 분해되는 것을 막기 위해 호일로 플라스크를 덮어 이를 방지하였다. 상기 결과를 도 5에 나타내었다.
- [0056] 도 5에서 보는 바와 같이, 40ug/mL의 테트라사이클린이 첨가된 배지에서 대장균 MG-FAB는 강한 성장 저해를 나타내었다.
- [0057] 이후, 상기 대장균 MG-FAB를 40 ug/mL의 테트라사이클린 및 다양한 농도의 올레산을 함유하는 LB 배지에서 14시간 동안 배양하면서 2시간 단위로 600 nm에서 광학밀도(O.D)를 측정하여 균주의 성장 속도를 분석하였다. 올레산을 배지에 완전히 녹이기 위해 0.05%의 트윈-20을 첨가하였고 배양은 37℃, 200 rpm에서 수행하였으며 테트라사이클린이 빛에 의해 분해되는 것을 막기 위해 호일로 플라스크를 덮어 이를 방지하였다. 상기 결과를 도 6에

나타내었다.

[0058] 도 6에서 보는 바와 같이, 대장균 MG-FAB는 지방산 농도가 증가함에 따라 성장 속도가 증가하는 것으로 나타났다. 도 5에서는 40 ug/ml의 테트라사이클린이 MG-FAB의 성장을 저해하였지만 올레산을 배지에 넣어 키워주게 되면 성장속도가 다시 증가하는 것을 볼 수 있었다(도 6). 이는 FadR이 올레산을 인지하여 프로모터로부터 해리되고 tetA 유전자가 발현되어 테트라사이클린에 내성이 생기게 됨을 의미한다. 또한 올레산의 농도와 성장속도가 비례함을 볼 때 제작된 FAB가 지방산을 잘 인식하여 프로모터로부터 해리되고 tetA와 rfp를 발현함을 의미한다.

[0059] 상기 실험 결과는 제조예 1에서 제작된 FAB 플라스미드가 지방산의 농도를 감지할 수 있다는 것과, 지방산의 농도에 따라 tetA와 RFP의 활성이 바뀐다는 것을 시사한다.

[0060] 이후, 지방산을 축적하는 균주인 MG-fadE-FAB와 MG-FAB을 테트라사이클린 40ug/ml이 함유된 LB 배지에서 10시간 동안 배양하면서 2시간 단위로 600 nm에서 광학밀도(O.D)를 측정하여 균주의 성장 속도를 분석하였다. 배양은 37℃, 200 rpm에서 수행하였고 테트라사이클린이 빛에 의해 분해되는 것을 막기 위해 호일로 플라스크를 덮어 이를 방지하였다. 상기 결과를 도 7에 나타내었다.

[0061] 도 7에서 보는 바와 같이, 대장균 MG-FAB는 지방산을 축적하지 않아 TetA의 발현량이 낮으므로 테트라사이클린이 함유된 배지에서 느리게 자라지만 지방산을 축적하는 균주인 MG-fadE-FAB는 TetA의 발현이 활성화되어 테트라사이클린이 함유되어도 성장속도가 빠른 것으로 나타났다.

[0062] 이후, 지방산을 축적하는 균주인 MG-fadE-FAB와 MG-FAB을 5:95의 비율로 섞어 테트라사이클린 40 ug/ml이 함유된 LB 배지에서 농축배양을 실시하였다. 1주기의 농축배양은 24시간으로 배양되었고 총 4주기의 농축배양을 수행하였다. 매 주기마다 100 ul의 배양액을 100 ug/ml의 암피실린이 함유된 아가 플레이트에 도말한 후 37℃에서 15시간 배양하였다. 그 후 20개의 콜로니를 무작위로 선별하여 서열번호 18 및 19의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 이는 대장균내의 fadE 유전자의 존재를 확인할 수 있으므로 MG-fadE-FAB와 MG-FAB의 비율을 측정할 수 있다. 상기 결과를 도 8에 나타내었다.

[0063] 도 8에서 보는 바와 같이, 대장균 MG-fadE-FAB의 비율은 5%에서 최종적으로는 30%까지 증가함을 볼 수 있었고 이는 제작된 FAB를 이용하여 지방산을 축적하는 균주를 농축배양을 통해 농축할 수 있음을 의미한다.

[0064] 실시예 1: 에러 유발(error-prone) PCR 기법에 의한 싸이오에스터라제 변이 균주의 제조

[0065] 싸이오에스터라아제의 리더서열을 제거한 부분을 주형으로 에러 유발(error-prone) PCR을 수행하여 변이된 싸이오에스터라제를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드의 라이브러리를 생성하였다. 상기 과정은 Mutagenex사(미국)에 의뢰하여 수행하였다.

[0066] 상기 제작된 변이된 싸이오에스터라제를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드의 라이브러리를 FAB 플라스미드를 갖는 MG-FAB에 형질전환시켜 다양한 지방산 생성능을 나타내는 라이브러리를 제작하고, 이를 40~60 ug/mL의 테트라사이클린 및 0.3 mM IPTG가 첨가된 LB 배지에서 총 3 사이클로 농축배양(enrichment culture)하였다. 농축배양 후 Fluorescence-activated cell sorting(FACS)를 통해 RFP를 강하게 발현하는 5종의 균주들을 선별하였다. 상기 선별된 균주를 2-3, 2-15, 2-17, 3-39 및 3-58 균주로 명명하였다.

[0067] 실시예 2: 선별된 돌연변이 균주의 지방산 생산량 비교 및 서열 확인

[0068] <2-1> 지방산 생산량 비교

[0069] 상기 선별된 5종의 균주를 대상으로, 지방산 생산량을 비교하였다.

[0070] 대조균의 경우, 야생형 싸이오에스터라제를 포함하는 플라스미드를 제작한 후 상기 플라스미드로 야생형 대장균을 형질전환하여 야생형 싸이오에스터라제를 발현하는 균주를 제조하였다. 구체적으로, MG1655 지놈의 싸이오에

스터라아제를 주형으로 하고 프라이머로서 TesA FP(서열번호: 14)와 TesA RP(서열번호: 15)를 이용한 PCR에 의해 552bp의 싸이오에스테라아제(*tesA*) 유전자를 증폭시켰다. 상기 증폭된 *tesA*를 *EcoRI*과 *XhoI*으로 절단하여 서열번호 1의 단편을 얻은 후, 동일한 제한효소로 처리된 pBbB6c-RFP 플라스미드(Joint BioEnergy Institute, USA)에 라이게이션하여 싸이오에스테라아제를 발현하는 플라스미드 pBbB6c-*tesA*를 제작하였다. 상기 플라스미드 pBbB6c-*tesA*로 야생형 대장균을 형질전환하여 대조균을 제조하였다.

[0071] 한편, 상기 선별된 각 균주들을 3 mL LB 배지에서 15시간 배양한 후, 2% 글루코오스가 함유된 5 mL M9 배지로 옮겨 다시 배양하였다. 세포의 흡광도(optical density)가 0.4~0.7일 때 0.3 mM의 IPTG를 첨가하여 싸이오에스테라아제를 발현시켰다. 배양 후 지방산 농도를 가스크로마토그래피를 이용하여 측정하였다. 상기 측정 결과를 도 9에 나타내었다.

[0072] 도 9에서 보는 바와 같이, 대조균으로서 야생형 싸이오에스테라아제를 갖는 야생형 대장균과 비교하여 본 발명에서 선별된 5종의 균주는 증가된 지방산 생산량을 나타내었다.

[0073] <2-2> 서열 분석

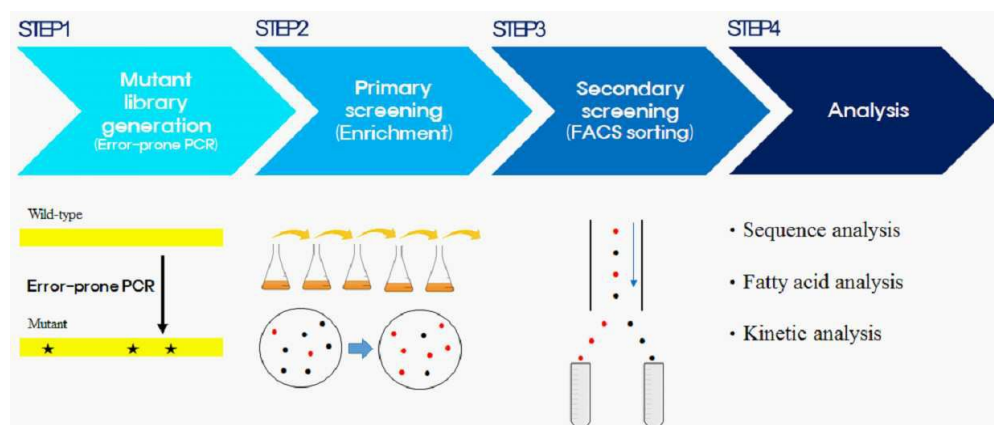
[0074] 상기 증가된 지방산 생성능을 나타낸 6종의 균주를 대상으로, 싸이오에스테라아제의 DNA 서열을 마크로젠사(대한민국)에 의뢰하여 분석하였다(서열번호 16, 17의 프라이머 사용). 상기 DNA 서열을 아미노산으로 번역하였다.

[0075] 상기 분석된 아미노산 서열을 야생형 대장균의 싸이오에스테라아제의 아미노산 서열과 비교하였다. 야생형 싸이오에스테라아제의 아미노산 서열을 서열번호 1로 나타내었고, 상기 5종의 균주의 싸이오에스테라아제의 아미노산 서열을 각각 서열번호 2 내지 6으로 나타내었다.

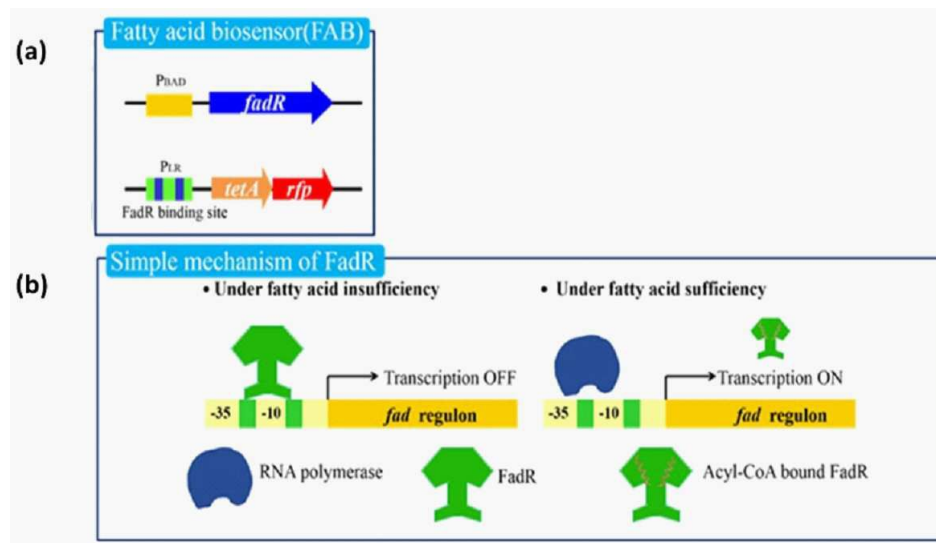
[0076] 싸이오에스테라아제의 아미노산 서열을 비교한 결과, 균주 2-3은 싸이오에스테라아제에서 K30R 및 Q175R의 아미노산 치환을 갖는 것으로 확인되었고, 균주 2-15는 A120D 및 A171V의 아미노산 치환을, 균주 2-17은 D45G의 아미노산 치환을, 균주 3-39는 R64C의 아미노산 치환을, 균주 3-58은 D74G의 아미노산 치환을 갖는 것으로 확인되었다.

도면

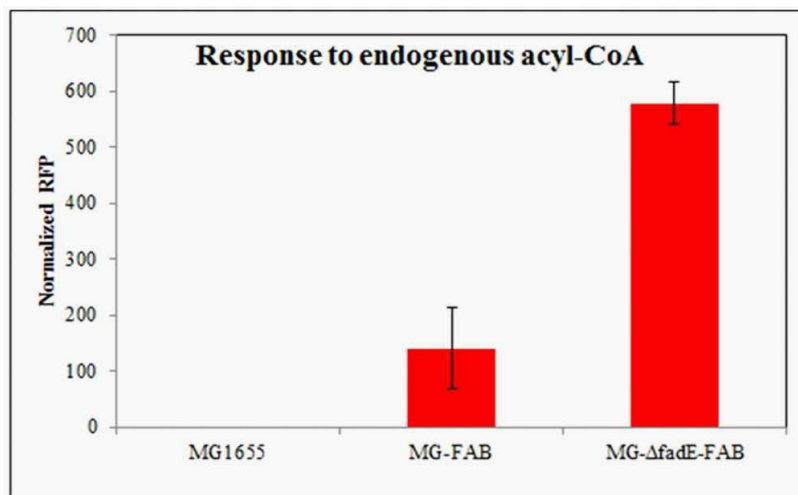
도면1



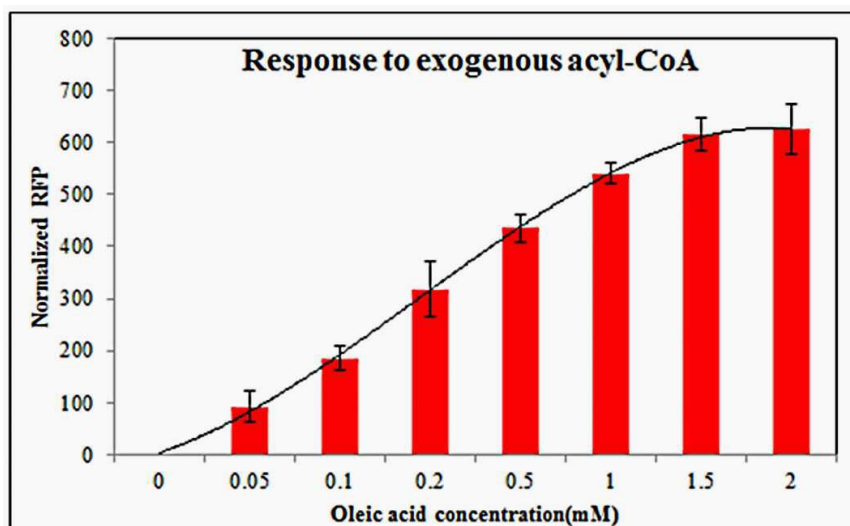
도면2



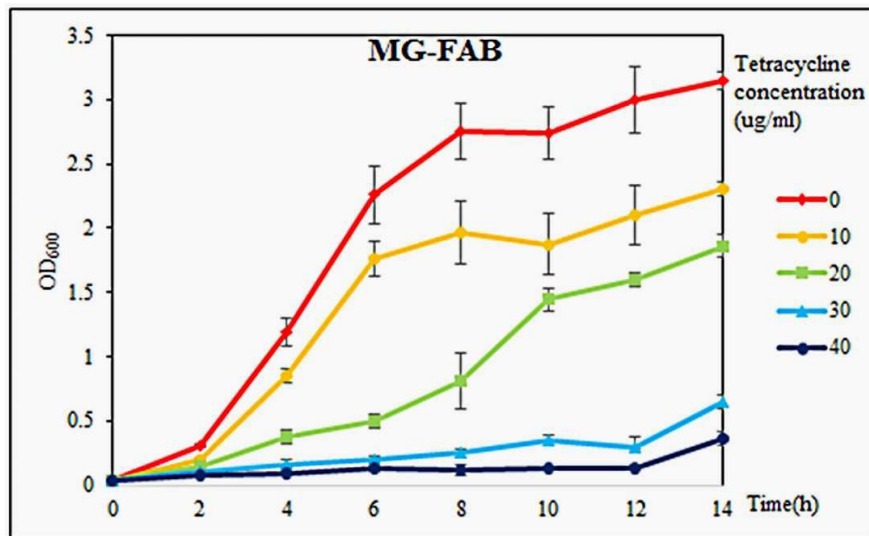
도면3



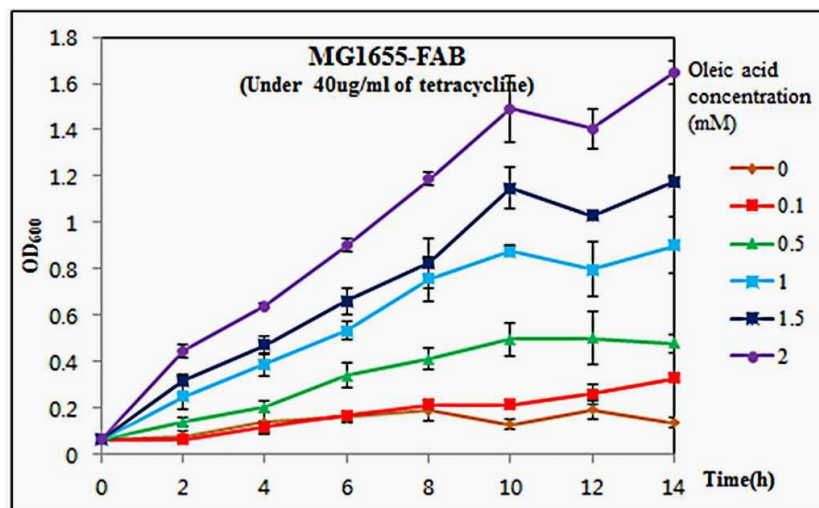
도면4



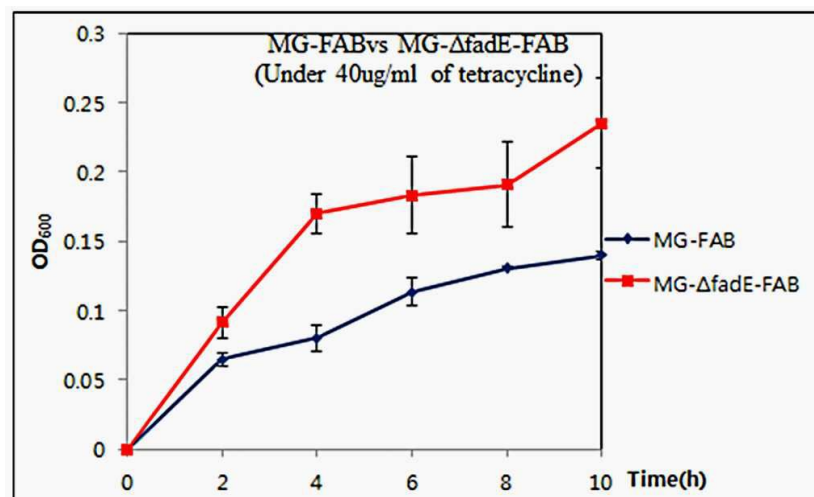
도면5



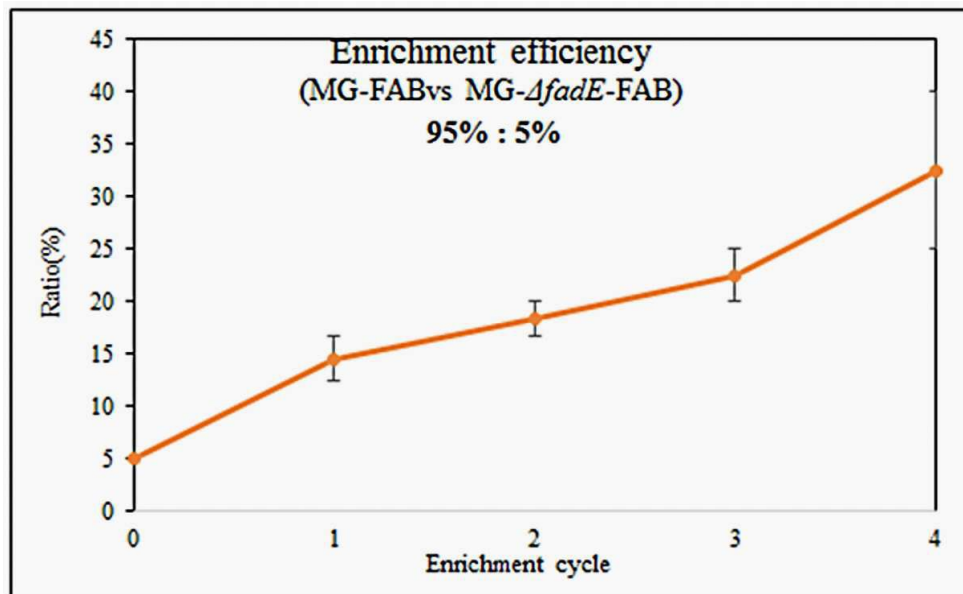
도면6



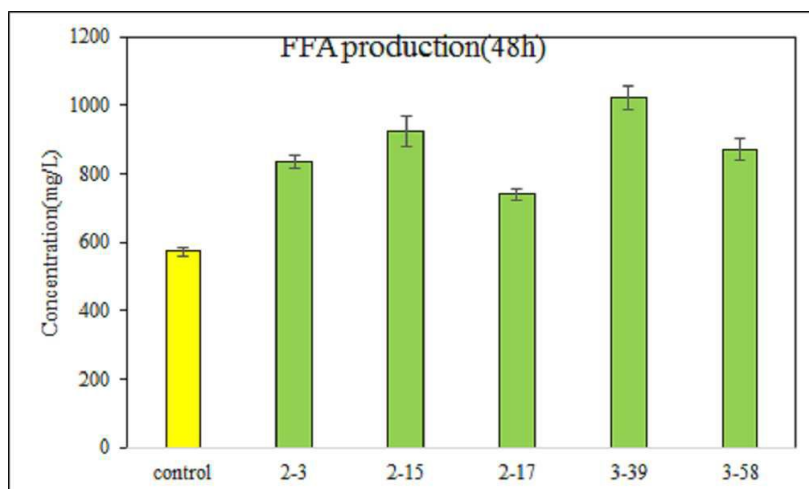
도면7



도면8



도면9



서열 목록

- <110> UNIST ACADEMY-INDUSTRY RESEARCH CORPORATION
- <120> Mutant Escherichia coli having an increased fatty acid production ability and method for preparing fatty acid using the same
- <130> FPD201505-0126
- <160> 19
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 182
- <212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 1

Ala Asp Thr Leu Leu Ile Leu Gly Asp Ser Leu Ser Ala Gly Tyr Arg
1 5 10 15

Met Ser Ala Ser Ala Ala Trp Pro Ala Leu Leu Asn Asp Lys Trp Gln

20 25 30

Ser Lys Thr Ser Val Val Asn Ala Ser Ile Ser Gly Asp Thr Ser Gln

35 40 45

Gln Gly Leu Ala Arg Leu Pro Ala Leu Leu Lys Gln His Gln Pro Arg

50 55 60

Trp Val Leu Val Glu Leu Gly Gly Asn Asp Gly Leu Arg Gly Phe Gln

65 70 75 80

Pro Gln Gln Thr Glu Gln Thr Leu Arg Gln Ile Leu Gln Asp Val Lys

85 90 95

Ala Ala Asn Ala Glu Pro Leu Leu Met Gln Ile Arg Leu Pro Ala Asn

100 105 110

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

115 120 125

Ala Lys Glu Phe Asp Val Pro Leu Leu Pro Phe Phe Met Glu Glu Val

130 135 140

Tyr Leu Lys Pro Gln Trp Met Gln Asp Asp Gly Ile His Pro Asn Arg

145 150 155 160

Asp Ala Gln Pro Phe Ile Ala Asp Trp Met Ala Lys Gln Leu Gln Pro

165 170 175

Leu Val Asn His Asp Ser

180

<210> 2

<211> 182

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> thioesterase of 2-3 strain

<400> 2

Ala Asp Thr Leu Leu Ile Leu Gly Asp Ser Leu Ser Ala Gly Tyr Arg
1 5 10 15
Met Ser Ala Ser Ala Ala Trp Pro Ala Leu Leu Asn Asp Arg Trp Gln
20 25 30
Ser Lys Thr Ser Val Val Asn Ala Ser Ile Ser Gly Asp Thr Ser Gln
35 40 45
Gln Gly Leu Ala Arg Leu Pro Ala Leu Leu Lys Gln His Gln Pro Arg
50 55 60
Trp Val Leu Val Glu Leu Gly Gly Asn Asp Gly Leu Arg Gly Phe Gln
65 70 75 80
Pro Gln Gln Thr Glu Gln Thr Leu Arg Gln Ile Leu Gln Asp Val Lys
85 90 95
Ala Ala Asn Ala Glu Pro Leu Leu Met Gln Ile Arg Leu Pro Ala Asn
100 105 110
Tyr Gly Arg Arg Tyr Asn Glu Ala Phe Ser Ala Ile Tyr Pro Lys Leu
115 120 125
Ala Lys Glu Phe Asp Val Pro Leu Leu Pro Phe Phe Met Glu Glu Val
130 135 140
Tyr Leu Lys Pro Gln Trp Met Gln Asp Asp Gly Ile His Pro Asn Arg
145 150 155 160
Asp Ala Gln Pro Phe Ile Ala Asp Trp Met Ala Lys Gln Leu Arg Pro
165 170 175
Leu Val Asn His Asp Ser

180

<210> 3

<211> 182

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> thioesterase of 2-15 strain

<400> 3

Ala Asp Thr Leu Leu Ile Leu Gly Asp Ser Leu Ser Ala Gly Tyr Arg
1 5 10 15

Met Ser Ala Ser Ala Ala Trp Pro Ala Leu Leu Asn Asp Lys Trp Gln
20 25 30

Ser Lys Thr Ser Val Val Asn Ala Ser Ile Ser Gly Asp Thr Ser Gln
35 40 45

Gln Gly Leu Ala Arg Leu Pro Ala Leu Leu Lys Gln His Gln Pro Arg
50 55 60

Trp Val Leu Val Glu Leu Gly Gly Asn Asp Gly Leu Arg Gly Phe Gln
65 70 75 80

Pro Gln Gln Thr Glu Gln Thr Leu Arg Gln Ile Leu Gln Asp Val Lys
85 90 95

Ala Ala Asn Ala Glu Pro Leu Leu Met Gln Ile Arg Leu Pro Ala Asn
100 105 110

Tyr Gly Arg Arg Tyr Asn Glu Asp Phe Ser Ala Ile Tyr Pro Lys Leu
115 120 125

Ala Lys Glu Phe Asp Val Pro Leu Leu Pro Phe Phe Met Glu Glu Val
130 135 140

Tyr Leu Lys Pro Gln Trp Met Gln Asp Asp Gly Ile His Pro Asn Arg
145 150 155 160

Asp Ala Gln Pro Phe Ile Ala Asp Trp Met Val Lys Gln Leu Gln Pro
165 170 175

Leu Val Asn His Asp Ser
180

<210> 4

<211> 182

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> thioesterase of 2-17 strain

<400> 4

Ala Asp Thr Leu Leu Ile Leu Gly Asp Ser Leu Ser Ala Gly Tyr Arg
1 5 10 15

Met Ser Ala Ser Ala Ala Trp Pro Ala Leu Leu Asn Asp Lys Trp Gln
20 25 30

Ser Lys Thr Ser Val Val Asn Ala Ser Ile Ser Gly Gly Thr Ser Gln
35 40 45

Gln Gly Leu Ala Arg Leu Pro Ala Leu Leu Lys Gln His Gln Pro Arg

50 55 60

Trp Val Leu Val Glu Leu Gly Gly Asn Asp Gly Leu Arg Gly Phe Gln
65 70 75 80

Pro Gln Gln Thr Glu Gln Thr Leu Arg Gln Ile Leu Gln Asp Val Lys
85 90 95

Ala Ala Asn Ala Glu Pro Leu Leu Met Gln Ile Arg Leu Pro Ala Asn
100 105 110

Tyr Gly Arg Arg Tyr Asn Glu Ala Phe Ser Ala Ile Tyr Pro Lys Leu
115 120 125

Ala Lys Glu Phe Asp Val Pro Leu Leu Pro Phe Phe Met Glu Glu Val
130 135 140

Tyr Leu Lys Pro Gln Trp Met Gln Asp Asp Gly Ile His Pro Asn Arg
145 150 155 160

Asp Ala Gln Pro Phe Ile Ala Asp Trp Met Ala Lys Gln Leu Gln Pro
165 170 175

Leu Val Asn His Asp Ser
180

<210> 5

<211> 182

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> thioesterase of 3-39 strain

<400> 5

Ala Asp Thr Leu Leu Ile Leu Gly Asp Ser Leu Ser Ala Gly Tyr Arg
1 5 10 15

Met Ser Ala Ser Ala Ala Trp Pro Ala Leu Leu Asn Asp Lys Trp Gln
20 25 30

Ser Lys Thr Ser Val Val Asn Ala Ser Ile Ser Gly Asp Thr Ser Gln
35 40 45

Gln Gly Leu Ala Arg Leu Pro Ala Leu Leu Lys Gln His Gln Pro Cys
50 55 60

Trp Val Leu Val Glu Leu Gly Gly Asn Asp Gly Leu Arg Gly Phe Gln

65 70 75 80

Pro Gln Gln Thr Glu Gln Thr Leu Arg Gln Ile Leu Gln Asp Val Lys

85 90 95

Ala Ala Asn Ala Glu Pro Leu Leu Met Gln Ile Arg Leu Pro Ala Asn

100 105 110

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

115 120 125

Ala Lys Glu Phe Asp Val Pro Leu Leu Pro Phe Phe Met Glu Glu Val

130 135 140

Tyr Leu Lys Pro Gln Trp Met Gln Asp Asp Gly Ile His Pro Asn Arg

145 150 155 160

Asp Ala Gln Pro Phe Ile Ala Asp Trp Met Ala Lys Gln Leu Gln Pro

165 170 175

Leu Val Asn His Asp Ser

180

<210> 6

<211> 182

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> thioesterase of 3-58 strain

<400> 6

Ala Asp Thr Leu Leu Ile Leu Gly Asp Ser Leu Ser Ala Gly Tyr Arg

1 5 10 15

Met Ser Ala Ser Ala Ala Trp Pro Ala Leu Leu Asn Asp Lys Trp Gln

20 25 30

Ser Lys Thr Ser Val Val Asn Ala Ser Ile Ser Gly Asp Thr Ser Gln

35 40 45

Gln Gly Leu Ala Arg Leu Pro Ala Leu Leu Lys Gln His Gln Pro Arg

50 55 60

Trp Val Leu Val Glu Leu Gly Gly Asn Gly Gly Leu Arg Gly Phe Gln
 65 70 75 80
 Pro Gln Gln Thr Glu Gln Thr Leu Arg Gln Ile Leu Gln Asp Val Lys

85 90 95
 Ala Ala Asn Ala Glu Pro Leu Leu Met Gln Ile Arg Leu Pro Ala Asn
 100 105 110
 Tyr Gly Arg Arg Tyr Asn Glu Ala Phe Ser Ala Ile Tyr Pro Lys Leu
 115 120 125
 Ala Lys Glu Phe Asp Val Pro Leu Leu Pro Phe Phe Met Glu Glu Val
 130 135 140
 Tyr Leu Lys Pro Gln Trp Met Gln Asp Asp Gly Ile His Pro Asn Arg
 145 150 155 160

Asp Ala Gln Pro Phe Ile Ala Asp Trp Met Ala Lys Gln Leu Gln Pro
 165 170 175
 Leu Val Asn His Asp Ser
 180

<210> 7
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> FadR recognition site
 <400> 7

atctggtacg accagat 17

<210> 8
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> FadR FR
 <400> 8

aaagatcttt taagaaggag atatacatat ggtcattaag gcgcaaag 48

<210> 9
 <211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FadR RP

<400> 9

tactcgagtt atcgcccctg aatggcta 28

<210> 10

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TetA FP

<400> 10

acatcagcag gacgcactga ccgaattcaa tttagaagg agatatacat atgaaatcta 60

acaatgcgct catcg 75

<210> 11

<211> 73

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TetA RP

<400> 11

agaacgcct ccagaaccac caccggagcc gccgccgctt ccaccgccgg tcgaggtggc 60

ccggctccat gca 73

<210> 12

<211> 73

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RFP FP

<400> 12

ggcgggtggaa gcggcgccgg ctccggtggt ggttctggag gcggttctat ggcgagtagc 60

gaagacgtta tca 73

<210> 13

<211> 41

<212> DNA

<213>

Artificial Sequence

<220><223> RFP RP

<400> 13

gtcaagttgt cataagacgt ctaccgcctt tgagtga gct g 41

<210> 14

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TesA FP

<400> 14

aaagaattca aaagatcttt taagaaggag atatacatat ggcggacacg ttattgat 58

<210> 15

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TesA RP

<400> 15

ttactcgagt tatgagtc at gatttacta 29

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PLlacO FP

<400> 16

cgagcccgat cttcccatc 20

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> dbl RP

<400> 17

tataaacgca gaaaggccca 20

<210> 18

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> fadE seq FP

<400> 18

aaaagttagc cagcgtttcc gccgc

25

<210> 19

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> fadE seq RP

<400> 19

acgttgggag atgagacgta tcagg

25