(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0029964
(43) 공개일자 2019년03월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/70 (2006.01) *C12N 9/00* (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01) *C12P 7/52* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/70 (2013.01)
C12N 9/0008 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0117097
(22) 출원일자 2017년09월13일
심사청구일자 2017년09월13일

(71) 출원인
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(72) 발명자
박성훈
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
김연희
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
무게쉬 산카라나라야난
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(74) 대리인
특허법인이룸리온

전체 청구항 수 : 총 23 항

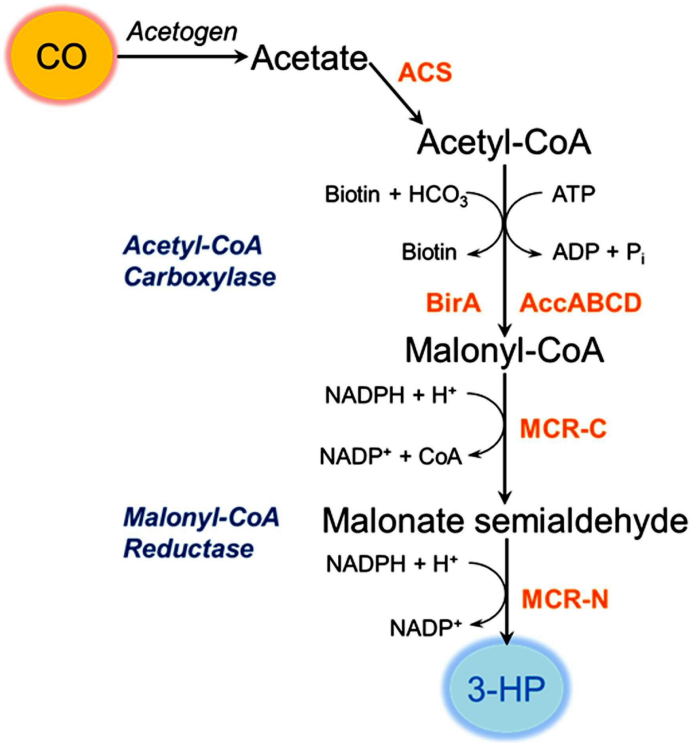
(54) 발명의 명칭 **신규한 재조합 대장균 균주 및 이를 이용한 3-하이드록시프로피온산 생산 방법**

(57) 요 약

본 발명은 신규한 재조합 대장균 균주 및 이를 이용한 3-하이드록시프로피온산 생산 방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게 본 발명은 아세테이트로부터 3-하이드록시프로피온산을 생산할 수 있는 재조합 대장균 균주 및 이를 아세테이트가 포함된 배지에 배양하여 3-하이드록시프로피온산을 생산하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 신규 재

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도1



조합 대장균 균주는 아세틸코에이 카르복실화 효소(ACC) 및 말로닐코에이 환원 효소(MCR)를 과발현시킴으로써 아세테이트로부터 효과적으로 3-하이드록시프로피온산을 생산할 수 있다. 또한 본 발명의 재조합 대장균 균주는 포름산염의 산화를 통해 NADH 및 이산화탄소를 생산할 수 있도록 포름산염 탈수소효소(FDH)를 과발현시킴으로써 포름산염이 추가로 포함된 아세테이트 배지에서 3-하이드록시프로피온산의 생산성을 높일 수 있다. 본 발명의 재조합 균주를 이용하여 일산화탄소 또는 이산화탄소와 같은 C1 화합물로부터 전환된 아세테이트 또는 포름산염을 기질로 하여 3-하이드록시프로피온산을 효과적으로 생산할 수 있다.

(52) CPC특허분류
C12N 9/93 (2013.01)
C12P 7/52 (2013.01)
C12Y 102/01002 (2013.01)
C12Y 102/01075 (2013.01)
C12Y 604/01002 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2.170178.01
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 기후변화대응기술개발
연구과제명 부생가스를 이용한 3-Hydroxypropionic acid의 생물공학적 생산기술 개발
기 여 율 1/1
주관기관 울산과학기술원
연구기간 2017.04.01 ~ 2017.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

아세테이트로부터 3-하이드록시프로피온산 생산능을 갖는 재조합 대장균 균주.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 재조합 대장균 균주는 말로닐코에이 환원효소(Malonyl-CoA reductase)를 암호화하는 *mcr* 유전자를 포함하는 재조합 플라스미드로 형질전환된 것을 특징으로 하는 재조합 대장균 균주.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 *mcr* 유전자는 클로로플렉서스 오란티아쿠스(*Chloroflexus aurantiacus*) 균주에서 유래된 것을 특징으로 하는 재조합 대장균 균주.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 *mcr* 유전자는 대장균 숙주 내에서 최적 발현을 위해 코돈 최적화된 것을 특징으로 하는 재조합 대장균 균주.

청구항 5

제2항에 있어서,

상기 재조합 플라스미드에 포함된 *mcr* 유전자는 N 말단부와 C 말단부로 분리되어 재조합된 것을 특징으로 하는 재조합 대장균 균주.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 *mcr* 유전자의 N 말단부는 서열번호 1로 표시되는 뉴클레오티드 서열인 재조합 대장균 균주.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 *mcr* 유전자의 C 말단부는 서열번호 2로 표시되는 뉴클레오티드 서열인 재조합 대장균 균주.

청구항 8

제2항에 있어서,

상기 재조합 플라스미드는 도 6의 계열지도를 갖는 것을 특징으로 하는 재조합 대장균 균주.

청구항 9

제2항에 있어서,

상기 재조합 대장균 균주는 추가적으로 아세틸코에이 카르복실화 효소(Acetyl-CoA carboxylase)를 암호화하는 *acc* 유전자를 포함하는 재조합 플라스미드로 형질전환된 것을 특징으로 하는 재조합 대장균 균주.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 *acc* 유전자는 대장균 BL21 균주에서 유래된 것을 특징으로 하는 재조합 대장균 균주.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 재조합 플라스미드는 도 7의 계열지도를 갖는 것을 특징으로 하는 재조합 대장균 균주.

청구항 12

제9항에 있어서,

상기 재조합 대장균 균주는 수탁번호 KCTC 13318BP로 기탁된 재조합 대장균 균주.

청구항 13

제9항에 있어서,

상기 재조합 대장균 균주는 추가적으로 포름산 탈수소효소(Formate dehydrogenase)를 암호화하는 *fdh* 유전자를 포함하는 재조합 플라스미드로 형질전환된 것을 특징으로 하는 재조합 대장균 균주.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 *fdh* 유전자는 캔디다 보이디니(*Candida boidinii*) 균주에서 유래된 것을 특징으로 하는 재조합 대장균 균주.

청구항 15

제13항에 있어서,

상기 재조합 플라스미드는 도 8의 계열지도를 갖는 것을 특징으로 하는 재조합 대장균 균주.

청구항 16

제13항에 있어서,

상기 재조합 대장균 균주는 수탁번호 KCTC 13319BP로 기탁된 재조합 대장균 균주.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항의 재조합 대장균 균주를 탄소원이 포함된 배지에서 배양하는 단계; 및

상기 배양액으로부터 3-하이드록시프로피온산을 수득하는 단계를 포함하는 3-하이드록시프로피온산 생산 방법.

청구항 18

제17항에 있어서,

상기 탄소원은 아세테이트; 또는 아세테이트 및 포름산염의 혼합물인 것을 특징으로 하는 3-하이드록시프로피온산 생산 방법.

청구항 19

제18항에 있어서,

상기 아세테이트 또는 포름산염은 C1 화합물로부터 생산된 것을 특징으로 하는 3-하이드록시프로피온산 생산 방법.

청구항 20

제19항에 있어서,

상기 C1 화합물은 일산화탄소(CO) 또는 이산화탄소(CO_2)인 것을 특징으로 하는 3-하이드록시프로피온산 생산 방법.

청구항 21

제17항에 있어서,

상기 재조합 대장균 균주를 호기성 조건에서 배양하는 것을 특징으로 하는 하는 3-하이드록시프로피온산 생산 방법.

청구항 22

제17항에 있어서,

상기 배지에 IPTG(Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside)를 첨가하는 것을 특징으로 하는 3-하이드록시프로피온산 생산 방법.

청구항 23

제17항에 있어서,

상기 배지에 세룰레닌(cerulenin)을 첨가하는 것을 특징으로 하는 3-하이드록시프로피온산 생산 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 신규한 재조합 대장균 균주 및 이를 이용한 3-하이드록시프로피온산 생산 방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게 본 발명은 아세테이트로부터 3-하이드록시프로피온산을 생산할 수 있는 재조합 대장균 균주 및 이를 아세테이트가 포함된 배지에 배양하여 3-하이드록시프로피온산을 생산하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 3-하이드록시프로피온산(3-hydroxypropionic acid; 3-HP)은 하이드록실기(-OH)와 카르복실기(-COOH)를 갖는 젖산(lactic acid)의 이성질체이다. 3-하이드록시프로피온산은 여러 화학공정에 사용될 수 있는 중간체로서 아크릴산, 1,3-프로판다이올, 메틸 아크릴레이트, 아크릴아마이드, 아크로니트릴 등으로의 전환이 가능하며, 흡수제, 도료, 정전기 방지제, 카펫이나 의복, 화장품 제조 등의 원료로 활용되는 중요한 플랫폼 화합물질이다.

[0004] 3-하이드록시프로피온산은 일반적으로 글리세롤이나 포도당을 기질로 하여 생물학적으로 생산될 수 있으며, 주로 대장균, 크렙시엘라 뉴모니아, 슈도모나스 디나이트리피칸스를 숙주세포로 하는 생산 공정이 연구되었다. 특히 글리세롤을 원료로 사용하는 3-하이드록시프로피온산 생산 공정에 대한 연구가 많이 이루어져 있다. 이 공정에서 글리세롤은 먼저 코엔자임 B12-의존성 글리세롤 탈수효소(Glycerol dehydratase, GDHt)에 의해 3-하이드록시프로피온 알데히드(3- hydroxypropionic aldehyde, 3-HPA)로 탈수된다. 이어서 독성이 강한 3-HPA를 기질로 하고, NAD+(nicotinamide adenine dinucleotide)를 조효소로 사용하는 알데히드 탈수소효소(aldehyde dehydrogenase, ALDH)의 촉매작용을 통해 3-HPA를 산화시켜 3-하이드록시프로피온산을 생산한다. 여기서 중요한 중간 대사산물인 3-HPA에 높은 활성을 가진 알데히드 탈수소효소는 대장균, 크랩시엘라 뉴모니애, 아조스피릴리움 브라질런스 등에서 스크리닝, 클로닝, 분리 정제되고 그 특성이 밝혀진 바 있다(Rathnasingh et al., 2009). 또한 글리세롤로부터 3-하이드록시프로피온산을 생산하는 유전자 재조합 대장균과 이를 이용한 플라스크 및 바이오 리액터 규모 발효의 최적화가 보고된 바 있다.

[0005] 삼성종합기술원은 대장균을 이용하여 글리세롤을 기질로 약 100 g/L 농도로 3-하이드록시프로피온산을 생산하였다. 기업 특성상 세부 내용은 공개되어 있지 않으나, 지금까지 보고된 3-하이드록시프로피온산 생산 농도 중에는 가장 높다. 그러나 탄소원 대비 수율이 낮고 고가의 코엔자임 B12(coenzyme B12)를 다량 사용하며, 플라스미드 기반 균주를 사용하는 등 극복해야 하는 문제점들이 있다.

[0006] 한편, 일산화탄소(CO)는 최근 급격하게 생산이 증가하고 있는 셰일 가스, 그리고 바이오매스 가스화 공정에서 발생하는 합성가스의 20 ~ 70%를 차지하는 주요 성분으로서 이를 원료로 할 경우 기존 석유 화학 리파이너리 공정을 대체할 가스 리파이너리 공정의 개발이 가능하다. 일산화탄소는 반응성이 우수하고, 화학촉매 또는 바이오 전환 공정을 통해 유용 바이오 연료 및 고부가가치 플랫폼 화합물로 전환될 수 있다.

[0007] 미생물 생촉매를 이용한 생물학적 전환 공정은 화학촉매 공정에 비해 상온·상압에서 운전이 가능하고 재생성이 높으며 저순도 및 저농도의 가스 기질을 이용한 전환공정 개발이 가능하다는 장점이 있다. 뿐만 아니라 단독공정 물론 화학공정과의 유기적 결합도 가능하다. 생물학적 가스 전환 방법은 생물 전환의 단점인 농산물 유래 원료 의존성을 피할 수 있고, 열화학적 전환의 약점인 가스의 조성이나 불순물에 대한 민감성에서 비교적 자유로운 장점을 가지고 있다. 일산화탄소 및 이산화탄소 등을 탄소원 혹은 에너지원으로 활용하는 미생물은 대부분 혐기성으로 광합성 미생물, 아세토젠, 일산화탄소 영양 미생물, 메탄생성 미생물 등이 있으며 일산화탄소가 포함된 합성가스로부터 수소, 아세트산, 에탄올, 부탄올, 부티르산 등을 생산할 수 있다.

[0008] 일산화탄소를 활용한 생물공학적 전환기술은 주로 란자테크(Lanza Tech), 이네오스 바이오(Ineos Bio), 코스카타(Coskata) 등의 회사에서 에탄올 생산을 중심으로 하는 연구가 진행되고 있으며, 현재 재조합 균주 개발 및 개량, 공정개발 및 스케일 업, 현장 적용 등의 연구가 진행 중이다. 특히 란자테크에서 클로스트리디움 오토에타노지눔(*Clostridium autoethanogenum*) 균주를 이용한 3-하이드록시프로피온산 생산 공정에 관한 특허를 출원한 바 있으나 개념 검증(proof-of-concept) 수준에 머무르고 있을 뿐이고, 기업 특성상 자세한 정보 접근은 어려운 실정이다.

[0009] 국내에서도 일산화탄소를 이용하는 생물전환 공정 관련 연구가 다수 수행 되었다. 해양연구원은 심해 열수구에서 고온성 일산화탄소 전환 균주인 서모코커스 온누리우스 NA1(*Thermococcus onnurineus* NA1)을 분리하였으며,

이 균주가 포름산염(formate)을 기질로 이용하여 성장하고 효율적으로 수소를 생산할 수 있다는 결과를 보고하였다(Kim YJ et al., Nature 2010). 또한 서강대학교 연구진은 해양연구원과 공동으로 수성가스 개질 반응 연구를 통해 수소를 생산하는 반응기, 특히 기-액 물질 전달 등을 향상시키는 반응기 개발연구를 진행하고 있다. 이러한 생물공학적 합성가스 전환 기술은 미생물 촉매와 생물 반응기 시스템의 결합이 무엇보다 중요한 연구 분야이고, 일산화탄소 대사 속도와 대사산물 생산성이 우수한 미생물을 발굴하는 것은 물론, 경제성 향상을 위한 고부가 화학물질 타깃을 개발하는 것이 필요하다.

[0010] 그러나 현재까지 일산화탄소 또는 이산화탄소로부터 생산된 아세테이트를 기질로 이용하여 3-하이드록시프로피온산을 생산하는 재조합 균주 및 이를 이용한 3-하이드록시프로피온산 생산 방법에 대한 연구는 보고된 바 없다.

[0011] 이에 본 발명자들은 일산화탄소 또는 이산화탄소와 같은 C1 화합물로부터 생성된 아세테이트 등을 기질로 하여 3-하이드록시프로피온산을 생산하기 위한 방법을 개발하기 위해 예의 노력한 결과, 아세틸코에이 카르복실화 효소(ACC)와 말로닐코에이 환원효소(MCR)을 과발현할 수 있는 재조합 대장균 균주를 개발하고, 이를 이용하여 아세테이트 등으로부터 3-하이드록시프로피온산을 효과적으로 생산할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명의 목적은 아세테이트로부터 3-하이드록시프로피온산 생산능을 갖는 재조합 대장균 균주를 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 재조합 대장균 균주를 아세테이트가 포함된 배지에서 배양하는 단계 및 상기 배양액으로부터 3-하이드록시프로피온산을 수득하는 단계를 포함하는 3-하이드록시프로피온산 생산 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0016] 본 발명은 상술한 문제점을 해결하기 위한 것으로, 아세테이트(acetate)로부터 3-하이드록시프로피온산 생산능을 갖는 재조합 대장균 균주를 제공한다.

[0017] 바람직하게, 본 발명의 상기 재조합 대장균 균주는 말로닐코에이 환원효소(Malonyl-CoA reductase; MCR)를 암호화하는 *mcr* 유전자를 포함하는 재조합 플라스미드로 형질전환된 것으로서 MCR이 과발현된 것일 수 있다.

[0018] 본 발명의 용어 "재조합 플라스미드"는 적당한 숙주세포에서 목적 펩티드를 발현할 수 있는 재조합 벡터로서, 삽입된 타겟 유전자가 발현되도록 작동 가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 발현벡터의 일종을 의미한다. 본 발명의 재조합 플라스미드는 통상적인 재조합 플라스미드에 포함된 요소로서 프로모터, 오퍼레이터, 개시 코돈, 종결 코돈과 같은 발현조절 요소들을 포함할 수 있다. 상기 개시 코돈 및 종결 코돈은 일반적으로 폴리펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 일부로 간주되며, 재조합 플라스미드가 숙주세포에 도입되었을 때 반드시 작용을 나타내야만 하며 코딩 서열과 인프레임(in frame)에 있어야 한다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다.

[0019] 본 발명의 용어 "형질전환"이란, 상기 재조합 플라스미드 절편이 숙주 세포의 게놈 안으로 이동하여 목적하는 펩티드를 발현할 수 있도록, 유전적으로 안정한 유전을 일으키는 모든 행위를 의미한다. 본 발명의 형질전환 방법은 임의의 형질전환 방법이 사용될 수 있으며, 당업계의 통상적인 방법에 따라 용이하게 수행할 수 있다. 일반적으로 형질전환 방법에는 $CaCl_2$ 침전법, $CaCl_2$ 방법에 DMSO(dimethyl sulfoxide)라는 환원물질을 사용함으로써 효율을 높인 Hanahan 방법, 전기천공법(electroporation), 인산칼슘 침전법, 원형질 융합법, 실리콘 카바이드 섬유를 이용한 교반법, 아그로박테리아 매개된 형질전환법, PEG를 이용한 형질전환법, 덱스트란 설페이트, 리포펙타민 및 건조/억제 매개된 형질전환 방법 등이 있다.

[0020] 본 발명에서 상기 *mcr* 유전자는 클로로플렉서스 오란티아쿠스(*Chloroflexus aurantiacus*) 균주에서 유래된 것일

수 있다.

[0021] 본 발명에서 상기 *mcr* 유전자는 대장균 숙주 내에서 최적 발현을 위해 코돈 최적화된 것일 수 있다.

[0022] 본 발명의 용어 "코돈 최적화"란 숙주 세포에서 이종 재조합 단백질을 보다 효과적으로 발현시키기 위하여, 드물게 존재하는 코돈을 숙주세포에서 이종 재조합 단백질을 암호화하는 핵산 중 자주 존재하는 코돈으로 변형시키고, 상기 숙주세포를 재조합 단백질을 암호화하는 핵산으로 형질전환시킨 후 재조합 뉴클레오티드를 발현시키는 것을 발한다. 이종발현 시스템에서 이와 같은 최적화는 외래 단백질을 생성시킬 수 있는 숙주의 능력을 개선시킬 수 있다.

[0023] 본 발명에서 상기 재조합 플라스미드에 포함된 *mcr* 유전자는 말로닐코에이환원효소(MCR 단백질)를 암호화하는 유전자 서열을 그대로 포함할 수 있으며, *mcr* 유전자가 N 말단부와 C 말단부로 분리되어 재조합된 것일 수 있다. 이 때 상기 N 말단부는 MCR 단백질의 1 ~ 549번 아미노산을 암호화하는 것이고, C 말단부는 550 ~ 1219번 아미노산을 암호화하는 것일 수 있으며, 바람직하게 상기 C 말단부는 940N>V, 1106K>W, 1114S>R로 돌연변이된 것일 수 있으나, 이와 상동성을 나타내는 서열을 포함할 수 있으며 이에 제한되지 않는다.

[0024] 본 발명에서 상기 *mcr* 유전자의 C 말단부는 서열번호 1 및 이와 기능적 동등성이 있는 상동성 폴리뉴클레오티드에 의하여 제조되는 모든 티로시나아제를 제한 없이 포함할 수 있다.

[0025] 본 발명에서 상기 *mcr* 유전자의 N 말단부는 서열번호 및 이와 기능적 동등성이 있는 상동성 폴리뉴클레오티드에 의하여 제조되는 모든 티로시나아제를 제한 없이 포함할 수 있다.

[0026] 상기 상동성 폴리뉴클레오티드란, 두 개 이상의 폴리뉴클레오티드 서열 사이에 유사한 또는 상호 교환 가능한 서열을 지칭한다. 바람직하게는, 상동성인 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 폴리뉴클레오티드 서열에 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 더 바람직하게는 적어도 90%, 더 바람직하게는 95%, 더 바람직하게는 97%, 더 바람직하게는 98%, 더더욱 바람직하게는 99%의 서열 동일성을 갖는 것을 말하며, 이와 같은 상동성 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 폴리뉴클레오티드의 코돈 최적화 서열에 의해 상기 조건을 만족하게 되는 폴리뉴클레오티드 서열 역시 모두 제한 없이 포함할 수 있다.

[0027] 본 발명에서 상기 *mcr* 유전자를 포함하는 재조합 플라스미드는 도 6의 계열지도를 갖는 것일 수 있으며, 도 6의 재조합 플라스미드는 서열번호 3으로 표시되는 뉴클레오티드 서열일 수 있다.

[0028] 또한, 본 발명의 상기 재조합 대장균 균주는 *mcr* 유전자를 포함하는 재조합 플라스미드에 추가적으로 아세틸코에이 카르복실화 효소(Acetyl-CoA carboxylase; ACC)를 암호화하는 *acc* 유전자를 포함하는 재조합 플라스미드로 형질전환된 것으로서 MCR 및 ACC가 과발현된 것일 수 있다.

[0029] 본 발명에서 상기 *acc* 유전자는 대장균 BL21 균주에서 유래된 것일 수 있다.

[0030] 본 발명에서 *acc* 유전자를 포함하는 재조합 플라스미드는 도 7의 계열지도를 갖는 것일 수 있으며, 서열번호 4로 표시되는 뉴클레오티드 서열일 수 있다.

[0031] 본 발명의 일실시예에 따른 재조합 대장균 균주는 수탁번호 KCTC 13318BP로 기탁된 것일 수 있다.

[0032] 또한, 본 발명의 상기 재조합 대장균 균주는 *mcr* 유전자를 포함하는 재조합 플라스미드 및 *acc* 유전자를 포함하는 재조합 플라스미드에 추가적으로 포름산 탈수소효소(Formate dehydrogenase; FDH)를 암호화하는 *fdh* 유전자를 포함하는 재조합 플라스미드로 형질전환된 것으로서 MCR, ACC 및 FDH가 과발현된 것일 수 있다.

[0033] 본 발명에서 상기 *fdh* 유전자는 캔디다 보이디니(*Candida boidinii*) 균주에서 유래된 것일 수 있다.

[0034] 본 발명에서 상기 *fdh* 유전자를 포함하는 재조합 플라스미드는 도 8의 계열지도를 갖는 것일 수 있으며, 서열번호 5로 표시되는 뉴클레오티드 서열일 수 있다.

[0035] 본 발명의 일실시예에 따른 재조합 대장균 균주는 수탁번호 KCTC 13319BP로 기탁된 것일 수 있다.

[0037] 본 발명은 또한, 상기 재조합 대장균 균주를 탄소원이 포함된 배지에서 배양하는 단계 및 상기 배양액으로부터 3-하이드록시프로피온산을 수득하는 단계를 포함하는 3-하이드록시프로피온산 생산 방법을 제공한다.

[0038] 본 발명에서 상기 탄소원은 아세테이트(acetate)를 단독으로 포함하는 것이거나, 아세테이트 및 포름산염(formate)의 혼합물을 포함하는 것일 수 있다.

[0039] 아세테이트는 아세틸코에이(acetyl-CoA)로 전환된 후 아세틸코에이 카르복실화 효소(ACC)에 의해 말로닐코에이로 전환되고, 이어서 말로닐코에이 환원효소(MCR)에 의해 3-하이드록시프로피온산으로 전환된다. 이 과정에서 본 발명의 재조합 대장균 균주는 아세틸코에이 카르복실화 효소 또는 말로닐코에이 환원효소를 과발현시킴으로써 아세테이트로부터 3-하이드록시프로피온산 생산 반응을 촉진시킬 수 있다.

[0040] 본 발명의 상기 아세테이트 또는 포름산염은 C1 화합물로부터 생산된 것일 수 있으며, 상기 C1 화합물은 일산화탄소(CO) 또는 이산화탄소(CO_2)일 수 있다. 일산화탄소 또는 이산화탄소와 같은 C1 화합물로부터 아세테이트 또는 포름산염의 합성 방법은 종래 알려진 임의의 합성 방법이 사용될 수 있으며, 당업계의 통상적인 방법에 따라 용이하게 수행할 수 있다.

[0041] 본 발명의 일실시예에 따라 C1 화합물로부터 3-하이드록시프로피온산을 생산하는 반응 경로를 도 1에 나타내었다.

[0042] 특히 본 발명의 재조합 대장균 균주에 있어서 포름산염 탈수소 효소(FDH)를 과발현시키는 재조합 플라스미드로 형질전환된 경우, 탄소원으로 아세테이트에 포름산염을 추가함으로써 3-하이드록시프로피온산의 생산 효율을 높일 수 있다. FDH에 의해 포름산염의 산화 반응이 일어나면서 이산화탄소(CO_2)와 NADH가 생성되는데 이는 3-하이드록시프로피온산 생산에 필요한 에너지원으로 사용될 수 있다.

[0043] 본 발명의 3-하이드록시프로피온산 생산 방법은 상기 재조합 대장균 균주를 호기성 조건에서 배양할 수 있다. 본 발명의 생산 방법에서 아세테이트 단독 또는 아세테이트 및 포름산염으로부터 3-하이드록시프로피온산을 효율적으로 생산하기 위하여 산소가 존재하는 조건에서 균주를 배양하는 것이 바람직하다.

[0044] 본 발명의 3-하이드록시프로피온산 생산 방법에서 상기 배지는 IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside)를 더 포함할 수 있다. IPTG 는 T7 프로모터 유도물질로서 본 발명의 상기 재조합 대장균 균주에 도입된 재조합 플라스미드로부터 *mcr*, *acc* 및 *fdh* 유전자 발현을 높이는 역할을 한다.

[0045] 본 발명의 3-하이드록시프로피온산 생산 방법에서 상기 배지는 세룰레닌(Cerulenin)을 더 첨가할 수 있다. 세룰레닌은 지방산 합성 저해제로서 말로닐코에이의 지방산 생합성 경로를 차단함으로써 3-하이드록시프로피온산의 생산 효율을 높일 수 있다.

발명의 효과

[0047] 본 발명의 신규 재조합 대장균 균주는 아세틸코에이 카르복실화 효소(ACC) 및 말로닐코에이 환원 효소(MCR)를 과발현시킴으로써 아세테이트로부터 효과적으로 3-하이드록시프로피온산을 생산할 수 있다. 또한 본 발명의 재조합 대장균 균주는 포름산염의 산화를 통해 NADH 및 이산화탄소를 생산할 수 있도록 추가적으로 포름산염 탈수소효소(FDH)를 과발현시킴으로써 포름산염이 더 포함된 아세테이트 배지에서 3-하이드록시프로피온산의 생산성을 높일 수 있다. 본 발명의 재조합 균주를 이용하여 일산화탄소 또는 이산화탄소와 같은 C1 화합물로부터 전환된 아세테이트 또는 포름산염을 기질로 하여 3-하이드록시프로피온산을 효과적으로 생산할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0049] 도 1은 일산화탄소로부터 아세테이트 생산 단계 및 아세테이트를 이용한 3-HP 생산을 위한 반응경로를 나타내는 모식도이다(ACS, acetyl-CoA synthetase; BirA, biotinilase; AccABCD, acetyl-CoA carboxylase; MCR-C, C-termius of malonyl-CoA reductase; MCR-N, N-terminus of malonyl-CoA reductase).

도 2는 ACC 및 MCR 과발현 유전자 재조합 대장균(BL21_*acc_mcr*)을 포도당 또는 아세테이트가 탄소원으로 포함된 배지에서 배양하였을 때 세포 성장 및 생산 프로파일을 나타내는 결과이다: 도 2a는 포도당 이용 시 세포 성장(○), 포도당(▼), 3-HP(●) 생산 프로파일, 도 2b는 포도당 이용 시 대사물질 젖산(◇) 및 아세테이트(■) 생산 프로파일, 도 2c는 아세테이트 이용 시 세포 성장(○), 포도당(▼), 3-HP(●) 생산 프로파일, 도 2d는 아세테이트 이용 시 대사산물 젖산(◇) 및 아세테이트(■) 생산 프로파일 변화를 보여준다.

도 3은 ACC 및 MCR 과발현 유전자 재조합 대장균(BL21_*acc_mcr*)가 아세테이트(50 mM)를 단독 탄소원으로 이용할 때 IPTG 농도 및 세룰레닌 유무에 따른 세포 성장 및 3-HP 생산 프로파일을 나타내는 결과이다: 도 3a는 IPTG

무첨가, 세룰레닌 무첨가 된 경우, 도 3b는 IPTG 0.05 mM, 세룰레닌 무첨가 된 경우, 도 3c는 IPTG 0.10 mM, 세룰레닌 무첨가 된 경우, 도 3d는 IPTG 0.05 mM, 세룰레닌 20 μg/mL 첨가 된 경우, 각각의 세포 성장(○), 아세테이트 소모(▼), 3-HP(●) 생산 프로파일을 보여준다.

도 4는 ACC, MCR 및 FDH 과발현 유전자 재조합 균주(BL21_*acc_mcr_fdh*)를 아세테이트 단독 첨가 배지(회색막대), 아세테이트 및 포름산염 첨가 배지(검정막대)의 호기성 조건에서 배양한지 24시간 경과 후 (도4a) 세포농도, (도4b) 아세테이트 소모 농도, (도4c) 포름산염 소모 농도, (도4d) 3-HP 생산을 나타내는 결과이다.

도 5는 본 발명의 일실시예에 따라 유전자 재조합 대장균 균주를 배양하여 3-HP를 생산하는 방법에 있어, 일산화탄소 또는 이산화탄소로부터 아세테이트 또는 포름산염으로 전환한 후, 아세테이트나 아세테이트 및 포름산염으로부터 3-HP를 효율적으로 생산하기 위하여 호기성 조건에서 배양하는 2단 배양 방법에 대한 플로우를 제시한 것이다.

도 6은 본 발명의 일실시예에 따른 말로닐코에이 환원효소(Malonyl-CoA reductase)를 암호화하는 *mcr* 유전자를 포함하는 재조합 플라스미드(pCDFDuet_*mcrC*N*)의 계열지도를 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명의 일실시예에 따른 아세틸코에이 카르복실화 효소(Acetyl-CoA carboxylase)를 암호화하는 *acc* 유전자를 포함하는 재조합 플라스미드(pACYCDuet_*acc*)의 계열지도를 나타낸 것이다.

도 8은 본 발명의 일실시예에 따른 포름산 탈수소효소(Formate dehydrogenase)를 암호화하는 *fdh* 유전자를 포함하는 재조합 플라스미드(pRSFDuet_*fdh*)의 계열지도를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0050] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0052] **<실험예>**

[0053] 하기의 실험예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.

[0055] **1. 균주와 재료**

[0057] 특정 DNA 조각 증폭을 위한 중합효소연쇄반응(Polymerase chain reaction, PCR)을 위해 사용된 Pfu-X 중합효소는 Solgent(서울, 대한민국)에서 구매하였다. PCR을 위한 올리고뉴클레오타이드 합성과 DNA 시퀀싱은 Macrogen(서울, 대한민국)을 통해 수행되었다. 유전자 서열의 최적화 및 mcr-CN의 합성은 Genescript(Piscataway, NJ, 미국)을 통해 수행되었다. 효모 추출물, Bacto 트립톤, Bacto 아가는 Difco(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, 미국)에서 구매하였고, 세룰레닌(Cerulenin)은 Cayman Chemical(Michigan, 미국)에서 공급되었다. 특별히 기재한 바가 아니면, 표시되지 않은 화학물질들은 Sigma-Alrich(MO, 미국)에서 구매하였다. 본 발명에서는 시약-등급이나 더 높은 등급의 화학 물질들을 사용하였다.

[0059] **2. 플라스미드 제작**

[0061] 본 발명에 사용된 미생물 균주 및 플라스미드에 관한 정보는 하기 [표 1]에 나타내었다.

[0062] 아세틸코에이 카르복실화 효소(acetyl-CoA carboxylase, ACC)의 과발현은 Rathansingh et al.(J Biotechnol, 2012)에서 구축된 플라스미드를 가지고 성능을 살펴보았다.

[0063] 말로닐코에이 환원효소(Malonyl-CoA reductase, MCR)를 암호화하는 유전자 *mcr*의 경우, N-말단(N-terminus, 1-549 아미노산)과 C-말단(C-terminus, 550-1219 아미노산)으로 각각 나누어 준비하고, *mcr-C**의 경우, Liu et al. (Met Eng 2016) 940N > V, 1106K > W, 1114S > R 로 돌연변이(mutated) 되었고 대장균에서 높은 수준의 발

현을 위해 코돈 최적화되었다. 상기의 최적화된 유전자(*mcr-N* 및 *mcr-C**)를 합성하였고, 각각의 유전자 조각들을 pCDFDuet 벡터에 클로닝한 후 T7프로모터의 조절을 통해 발현시켰다. 최종적인 플라스미드 제작은 특정 유전자 PCR 증폭을 통하여 확인하였다.

[0064] 포름산염 탈수소효소(Formate dehydrogenase1, FDH1)의 과발현은 pCDFDuet 벡터의 MCS2에서 T7 프로모터에 의해 조절되도록 제작하였다. FDH를 단독으로 발현할 수 있도록 pRSFDuet 벡터를 이용하여 발현 벡터를 제작하였다.

표 1

[0066]

Strain and plasmids	Description	Source
Strain		
BL21	*Escherichia coli* BL21(DE3), expression host	KCTC, Korea
BL21_acc_mcr	*E. coli* BL21(DE3) harboring pACYCDuet_*acc* and pCDFDuet_*mcrC*N*	This study 수탁번호 KCTC 13318BP
BL21_acc_mcr_fdh	*E.coli* BL21(DE3) harboring pACYCDuet_*acc*, pCDFDuet_*mcrC*N* and pRSFDuet_*fdh1*	This study 수탁번호 KCTC 13319BP
Plasmids		
pACYCDuet_acc	pACYCDuet_*accA_accD_accB_accC_birA*	Rathnasingh et al.
pCDFDuet_mcrC*N	pCDFDuet_*mcr-C*_mcr-N* *mcr-C*, mcr-C mutants with (550-1219) mutation on 940N>V, 1106K>W and 1114S>R*	This study
pRSFDuet_fdh	pRSFDuet_*fdh1*	This study

[0068] **3. 배양조건**

[0070] 모든 3-HP 생산 조건 실험은 50 mL 배지를 포함하는 250 mL의 삼각 플라스크(Erlenmeyer flask)에서 진행되었다. 회전 교반 인큐베이터를 사용하였고 교반 속도250 rpm, 온도는 37℃이었다. 사용된 배지는 변형된 M9 배지였고, 조성은 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.25 g/L; NaCl, 1.0 g/L; NH_4Cl, 1.0 g/L; 효모 추출물, 0.5 g/L; 그리고 50 mM 아세테이트 혹은 포도당(탄소원)이었다. 또한 포타슘 포스페이트 버퍼(pH 7.0)가 100 mM 첨가되었고, 플라스미드 유지를 위해 적절한 항생제가 첨가되었다. 세포 흡광도(optical density, OD600)가 0.4 ~ 0.8 OD600(약 2시간 배양 후)에 도달하였을 때 0.05 mM 또는 0.1 mM IPTG(Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside)가 유도물질로 첨가되었다.

[0071] ACC 활성을 높이기 위하여 조효소로서 50 mg/L 바이오틴(biotin)이 첨가되었다. 또한, 20 mM 탄산수소나트륨(sodium biocarbonate)은 아세틸코에이(acetyl-CoA)에서 말로닐코에이(malonyl-CoA)로의 전환에 있어 탄소를 제공하기 위해 첨가되었다.

[0072] 말로닐코에이는 지방산 합성(fatty acid biosynthesis)에 있어 중요한 전구체이다. 이러한 말로닐코에이에서부터 지방산 합성경로를 저해하기 위하여, 저해제 세룰레닌(cerulenin)을 첨가하여 그 영향을 살펴보았다. 세룰레닌은 매우 값비싼 화학물질이기 때문에, 세룰레닌 첨가의 실험의 경우 125 mL의 삼각플라스크에서 25 mL의 배지 부피로 실험을 진행하였다. 20 μg/L 세룰레닌은 배양 시작 후 4시간일 때 첨가되었다(Rogers et al., PNAS, 2016).

[0073] 또한, FDH의 영향을 살펴보기 위해, 20 mM 포름산(formate)을 아세테이트(acetate)를 탄소원으로 사용한 배지에 첨가하여 실험하였다. 또한 세포 질량, pH, 남아있는 포도당 혹은 아세테이트 양과 축적된 대사물질을 측정하기 위해 배양액을 주기적으로 추출하였다.

[0075] **4. 분석방법**

[0077] 세포 성장은 10 mm 통로 길이의 석영 큐벳과 자외선/가시광선 분광광도계 (UV/Vis spectrophotometer, Lambda 265, Perkin Elmer, CT, 미국)를 사용하여 600 nm 파장에서 세포배양의 흡광도 측정을 통해 살펴보았다. 600 nm(OD600) 파장에서의 1단위는 1 L 당 0.31 g의 세포 건조 중량에 해당한다(cdw: g/L). 처음 넣어준 아세테이트 혹은 포도당의 농도와 생산된 3-HP의 농도, 생산된 다른 대사산물(젖산 등)은 고성능 액체크로마토그래피(HPLC, high performance liquid chromatography, Agilent 1260 Infinity II, 미국)로 측정하였고, Rathnasingh et al. 등이 보고한 방법에서 약간 변형된 방법을 사용하였다. HPLC 분석 전 배양액은 10,000 x g의 속도로 10분 동안 원심분리 하였고, 0.2 μm 나일론 디스크로 필터링 하였다. 각각의 샘플 1 μL은 0.5 ml/L의 속도, 65℃의 온도로 300 x 7.8 mm, 9 μm Aminex HPX-87H 칼럼(Bio-Rad, 미국)에서 분석하였다. 아세테이트 혹은 포도당은 35℃ 조건에서 Refractive index detector를 통해 검출하였고, 다른 유기산의 농도는 Diode array detector에서 210 nm의 파장으로 분석하였다.

[0079] **실시예 1. 유전자 재조합 대장균 균주의 다양한 탄소원에 의한 3-HP 생산**

[0081] 아세틸코에이 카르복실화효소(ACC) 및 말로닐코에이 환원효소(MCR)를 포함한 pACYCDuet_*acc*와 pCDFDuet_*mcrC*N* 두 플라스미드를 가진 재조합 대장균 BL21_*acc_mcr*(수탁번호 KCTC 13318BP)을 사용하여 플라스크에서의 포도당 혹은 아세테이트를 탄소원으로 포함하는 배지를 이용하여 배양하였고, 시간에 따른 3-HP 생산 연구를 수행하였다.

[0082] 구체적으로, 재조합 대장균 균주는 아세테이트로부터 3-HP 생산 가능성을 검증하기 위하여 M9 최소 배지 상에서 배양을 시작하였고, 포도당을 탄소원으로 포함하는 배지에서의 경우와 비교하였다.

[0083] 그 결과 도 2에 나타낸 바와 같이, 포도당을 탄소원으로 사용한 경우, 세포 성장은 최대 3.5 OD600까지 자랐으나(도 2A), 아세테이트를 사용한 경우는 낮은 세포성장이 관찰되었다(최대 1 OD600; 도 2C). 또한, 포도당의 경우 탄소원을 매우 빠르게 소모하는 경향을 보인 반면, 아세테이트의 경우 36 시간 동안 배양했음에도 불구하고 모두 소모되지 못하였다. 낮은 농도에서 조차도 아세테이트는 세포에 대하여 높은 독성을 띄며 낮은 세포 성장과 적은 아세테이트 소모는 이를 재확인해 주는 결과이다. 또한, 3-HP 생산의 경우, 포도당을 탄소원으로 사용한 배지에서 자란 재조합 균주는 배양 24시간 후, 8.5 mM의 3-HP를 생산한 반면, 아세테이트의 경우 3.2 mM 3-HP 생산을 관찰하였다.

[0084] 포도당 또는 아세테이트를 사용했을 경우 3-HP의 생산수율은 각각 0.16 mol 3-HP/mol 포도당 또는 0.1 mol 3-HP/mol 아세테이트이고, 이는 최대 이론수율 대비 각각 10.7%(포도당), 20%(아세테이트)를 나타내었다. 비록 아세테이트가 독성이 있고, 탄소수가 2개로 포도당에 비해 선호되지 않는 탄소원이나, 3-HP 생산에 있어 탄소원 대비 혹은 이론수율 대비 높은 수율을 보여주었으며, 이로부터 아세테이트를 탄소원으로 하는 3-HP의 생산 가능성을 확인할 수 있었다. 또한, 포도당을 탄소원으로 사용한 경우 이전 논문에 보고된 Rathansingh et al. 결과보다 높은 3-HP 생산성을 보였다. 야생형 mcr 보다 효소활성이 높다고 알려진 돌연변이 mcr을 사용한 것이 그 원인으로 추정된다.

[0085] 한편, 포도당 배지에서 아세테이트와 젖산은 유일한 부산물이었고, 배양 시간 증가에 따라 아세테이트 축적이 증가되었으나(도 2C), 아세테이트를 탄소원으로 하는 경우 아세테이트와 젖산 부산물이 거의 발생하지 않는 것을 확인할 수 있었다(도 2D).

[0087] **실시예 2. IPTG 농도 및 세룰레닌 첨가 유무에 따른 3-HP 생산**

[0089] 본 발명자들은 ACC 및 MCR 발현을 조절함으로써 3-HP 생산이 증가되는지 여부를 관찰하고, 또한 말로닐코에이가 지방산 생합성(fatty acid biosynthesis)에 사용되는 경로를 저해함으로써 3-HP 생합성 경로에 사용되는 말로닐코에이가 증가되는지를 확인하기 위해 하기와 같은 실험을 하였다.

[0090] 먼저, 상기 실시예와 동일한 재조합 대장균 BL21_*acc_mcr*을 사용하여 아세테이트를 탄소원으로 포함하는 배지에서 동일한 방법으로 배양하되, ACC 및 MCR 발현을 높이기 위해 전사 T7 프로모터의 유도물질인 IPTG의 농도 변화에 따른 3-HP 생산의 변화를 관찰하였다. IPTG를 전혀 첨가하지 않았을 경우 3-HP 생산은 나타나지 않았다(도 3A). 한편 IPTG를 첨가한 경우, 그렇지 않은 경우에 비해 3-HP 생산은 증가하였으나, 0.05 mM 과 0.1 mM IPTG(도 3B 와 3C)를 첨가하였을 경우, 세포성장, 아세테이트 소모속도, 3-HP 생산에는 거의 변화가 관찰되지 않았다. 이 결과로부터 IPTG 0.05 mM 이상에서는 ACC 및 MCR 효소가 충분히 발현되었음을 알 수 있었다.

[0091] 또한, 말로닐코에이에 대한 세룰레닌(cerulenin)의 영향을 조사하기 위해 20 μg/L 세룰레닌을 배양 시작 2시간 후에 첨가한 결과, 3-HP 생산이 효과적으로 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 세룰레닌을 첨가하지 않은 경우 3.2 mM 3-HP를 생산(도 3B)한 반면, 세룰레닌을 첨가한 경우 6 mM 3-HP이 생산(도 3D)되어 무첨가 대비 약 1.9배의 생산량 증가가 관찰되었다. 이에 따라 생산 수율 또한 0.1 mol 3-HP/mol acetate에서 0.17 mol/mol acetate로 증가하였다.

[0092] 이 결과는 세포 내 존재하는 지방산 생합성 경로와 신규로 넣어준 3-HP 합성경로가 말로닐-코에이의 사용을 놓고 서로 경쟁하고 있다는 사실을 보여준다. 또한, 이러한 가용성이 3-HP 생산에 있어 중요한 속도제한 요소이고, 말로닐-코에이의 가용성 증대에 대한 효과적인 대사공학적 전략 수립이 3-HP 생산성 향상에 매우 중요하다는 것을 나타내고 있다.

[0094] **실시예 3. ACC, MCR 및 FDH 과발현 유전자 재조합 대장균 균주의 3-HP 생산**

[0096] 포름산염 탈수소효소(FDH)는 포름산염을 기질로 사용하여 이산화탄소 및 NADH를 생산할 수 있다. 본 발명에서 이용하고 있는 MCR 효소 반응은 NADPH 조효소와 CO_2 공급을 필요로 하므로 FDH 발현이 3-HP 생산을 증대시킬 것으로 기대되었다.

[0097] 이에 캔디다 보이디니(*Candida boidinii*)의 NAD+ 의존적 FDH1을 대장균에서 과발현하였다. *acc, mcr, fdh* 유전자를 각각 발현하기 위해 pACYCDuet_*acc*, pCDFDuet_*mcr-C*N*, pRSFDuet_*fdh1* 로 발현벡터 시스템을 제작하고, 이것을 대장균 균주에 도입하여 *acc, mcr* 뿐만 아니라 *fdh* 도 과발현된 유전자 재조합 대장균(BL21_*acc_mcr_fdh*; 수탁번호 KCTC 13319BP)을 완성하였다. 이 균주를 이용하여 아세테이트만 첨가된 배지에서 배양할 때(도4, 회색막대) 또는 아세테이트와 포름산염을 동시에 첨가한 배지에서 배양할 때(도4, 검정막대)의 세포성장(도4A), 아세테이트(도4B), 포름산염 소모(도4C), 3-HP 생산 (도 4D)에 대한 결과를 살펴보았다.

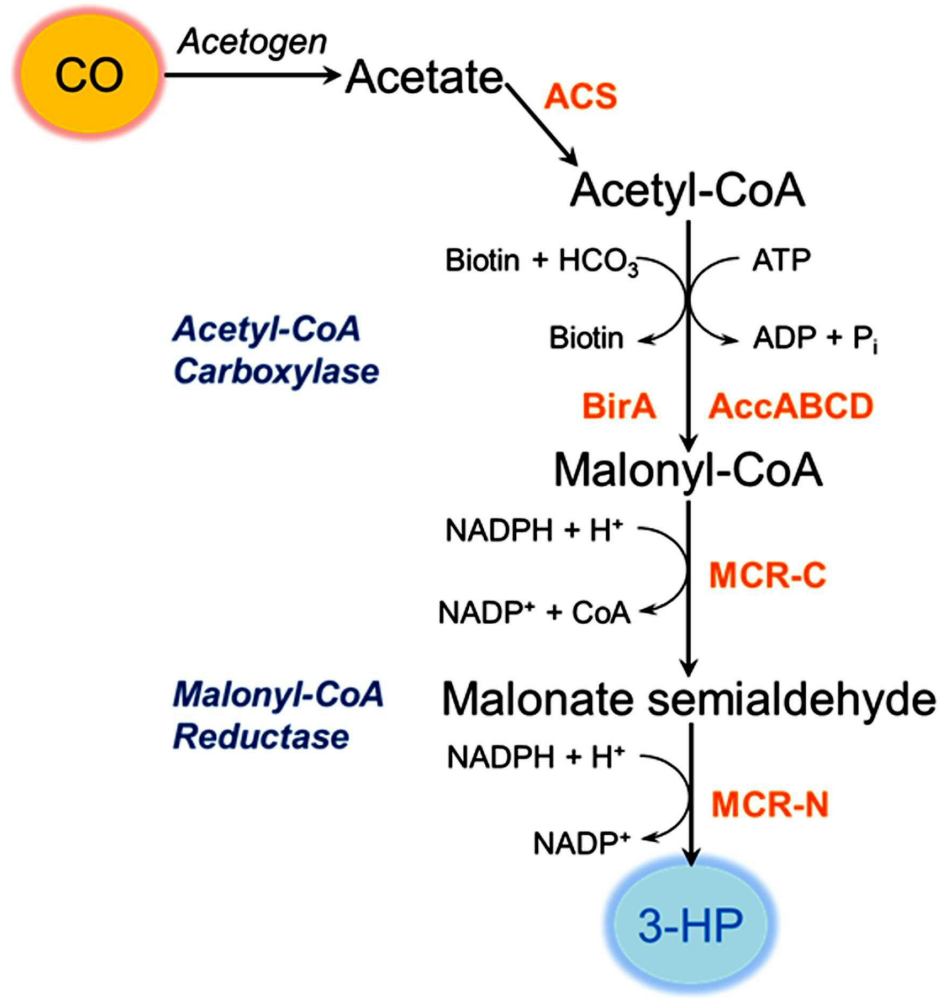
[0098] 그 결과, 포름산염 첨가 유무와 상관없이 세포성장 및 아세테이트 소모에는 큰 차이가 관찰되지 않았다. 24시간 배양 후 세포성장은 두 그룹 모두 1.1 OD600 에 도달하였고(도 4A), 탄소원인 아세테이트 소모는 25 mM(아세테이트 단독 배양) 와 28 mM(아세테이트 및 포름산염 동시 첨가 배양)이었다(도 4B). 포름산염은 최초 20 mM 첨가한 경우 24시간 배양하는 동안 9 mM(45%)이 소모되었다(도 4C).

[0099] 최종적으로 3-HP는 각각 1.9 mM(아세테이트 단독)과 2.4 mM(아세테이트 및 포름산염)이 생산되었으며, 이로부터 fdh를 과발현하였을 경우, 3-HP 생산이 포름산염 첨가에 따라 약25% 가량 증가하는 것을 알 수 있었다. 이것은 포름산염 탈수소효소에 의하여 NADH 및 이산화탄소 공급이 가능하여 MCR 효소의 활성에 도움을 주었고, 최종적으로 3-HP 생산이 증가된 것으로 추정된다.

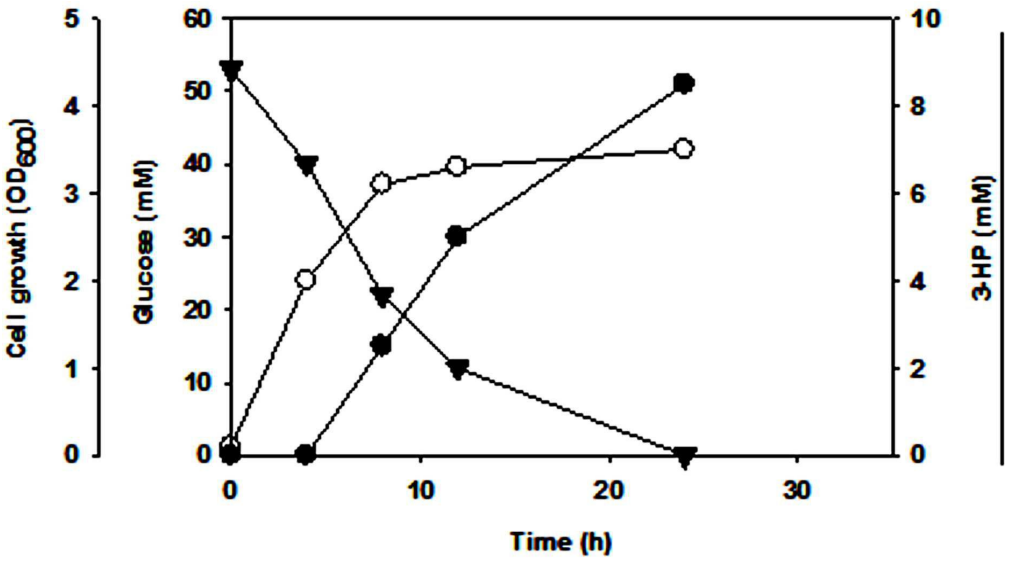
[0101] 본 실시예 결과를 바탕으로 본 발명의 유전자 재조합 대장균 균주의 배양방법에 있어 아세테이트 단독 배지나 아세테이트 및 포름산염 혼합 배지로부터 3-HP를 효율적으로 생산하기 위하여 산소가 존재하는 조건에서 배양하는 2단 배양 방법에 대한 플로우의 예를 도 5에 제시하였다.

도면

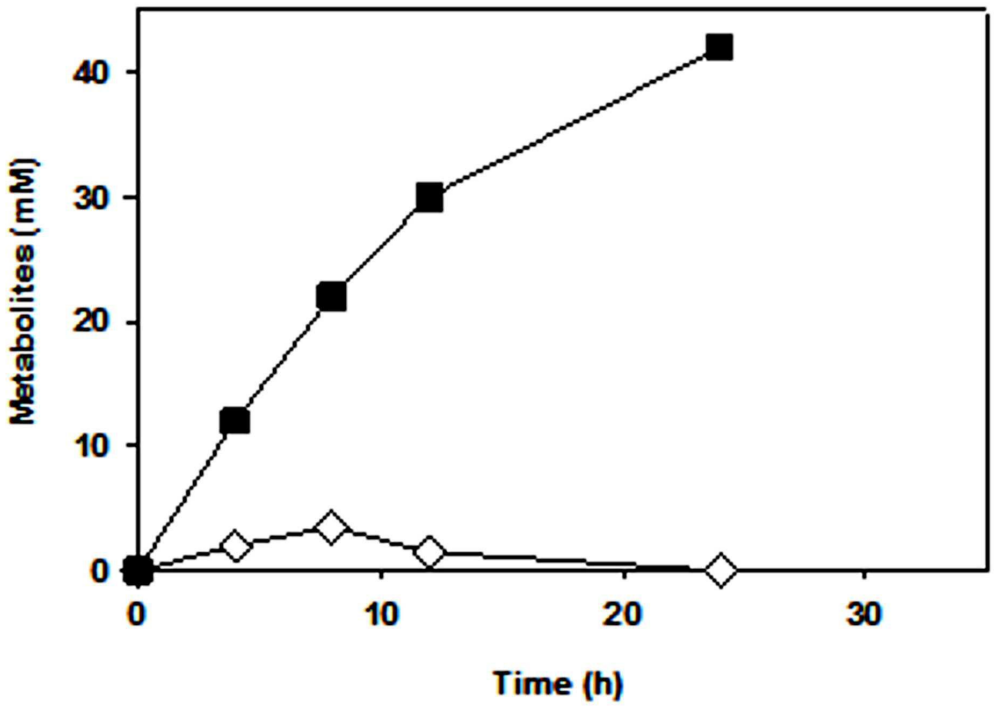
도면1


CO
Acetogen
Acetate
ACS
Acetyl-CoA
Biotin + HCO3
ATP
Biotin
ADP + Pi
Acetyl-CoA Carboxylase
BirA
AccABCD
Malonyl-CoA
NADPH + H+
NADP+ + CoA
MCR-C
Malonyl-CoA Reductase
Malonate semialdehyde
NADPH + H+
NADP+
MCR-N
3-HP

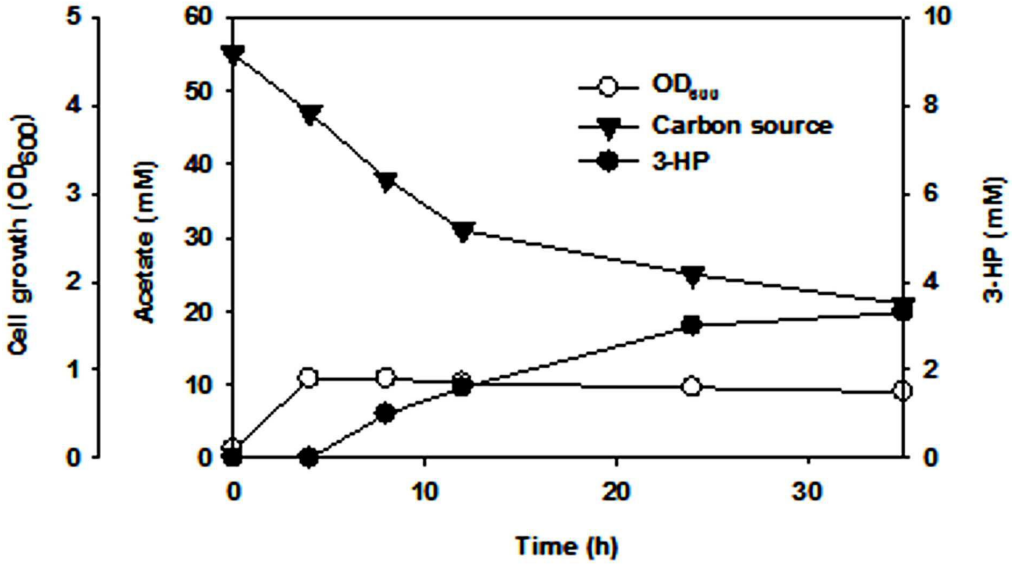
도면2a


Cell growth (OD600)
Glucose (mM)
3-HP (mM)
Time (h)
0
10
20
30
40
50
60
1
2
3
4
5
6
8

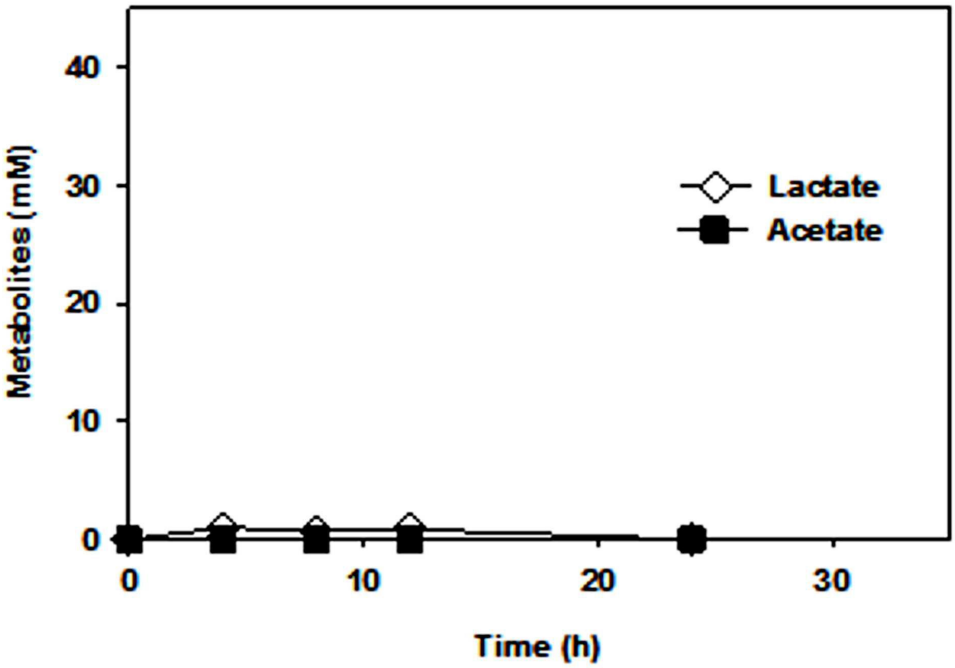
도면2b


Metabolites (mM)
Time (h)
0
10
20
30
40

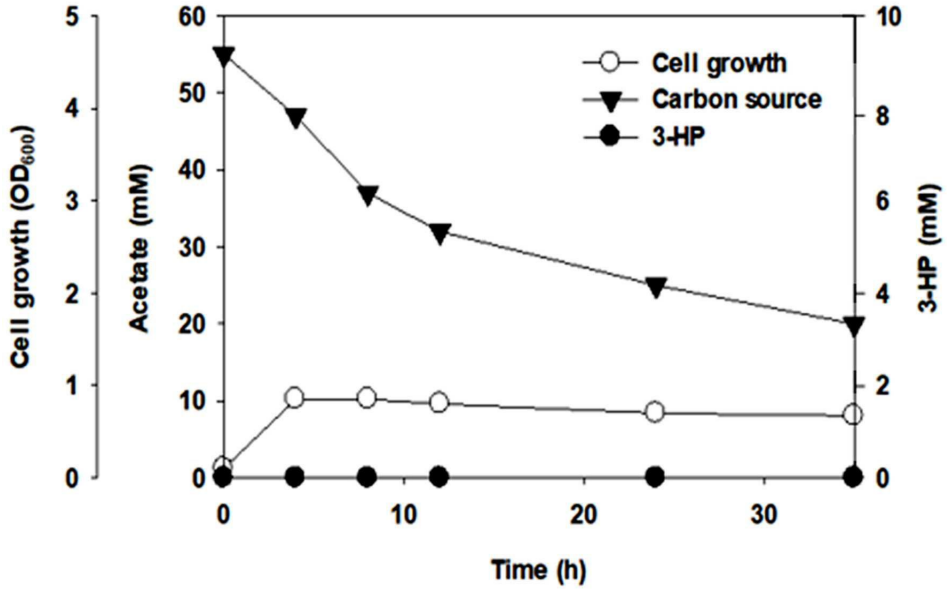
도면2c


Cell growth (OD600)
Acetate (mM)
3-HP (mM)
Time (h)
OD600
Carbon source
3-HP

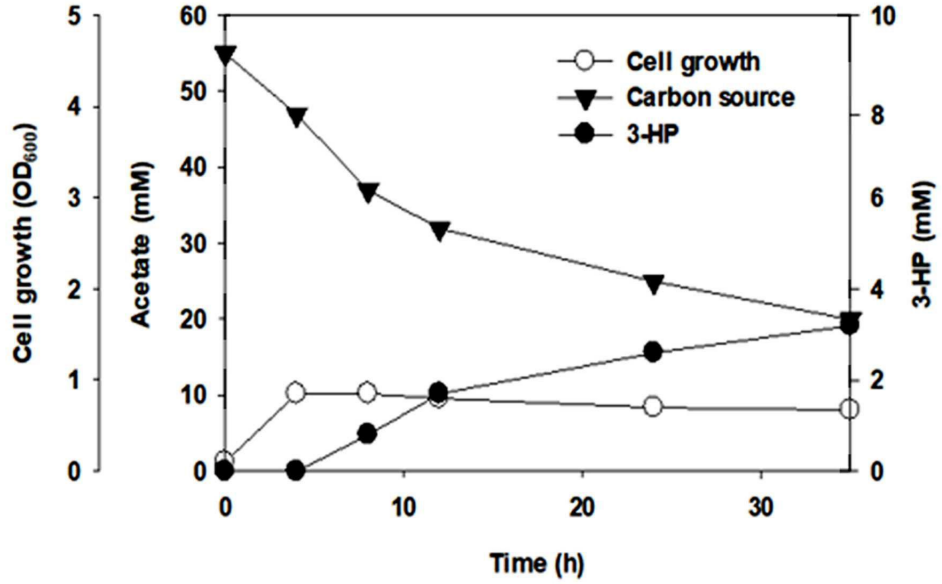
도면2d


Metabolites (mM)
40
30
20
10
0
0
10
20
30
Time (h)
Lactate
Acetate

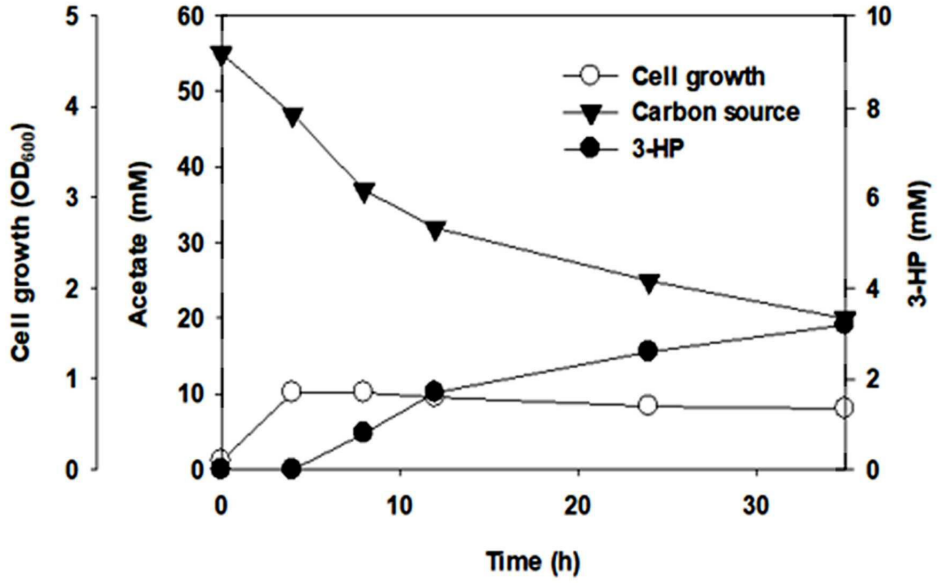
도면3a


Cell growth (OD600)
Acetate (mM)
3-HP (mM)
Time (h)
Cell growth
Carbon source
3-HP

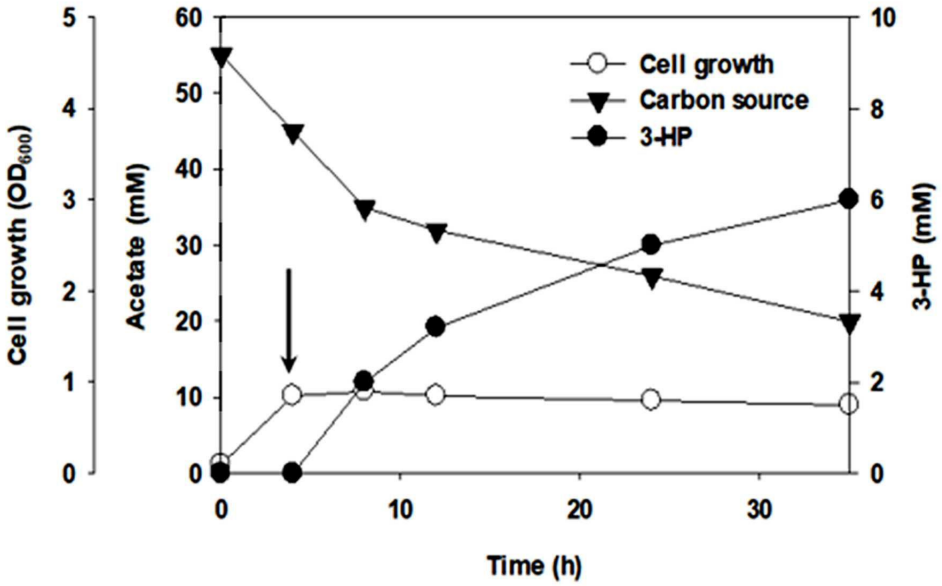
도면3b


Cell growth (OD600)
Acetate (mM)
3-HP (mM)
Time (h)
Cell growth
Carbon source
3-HP

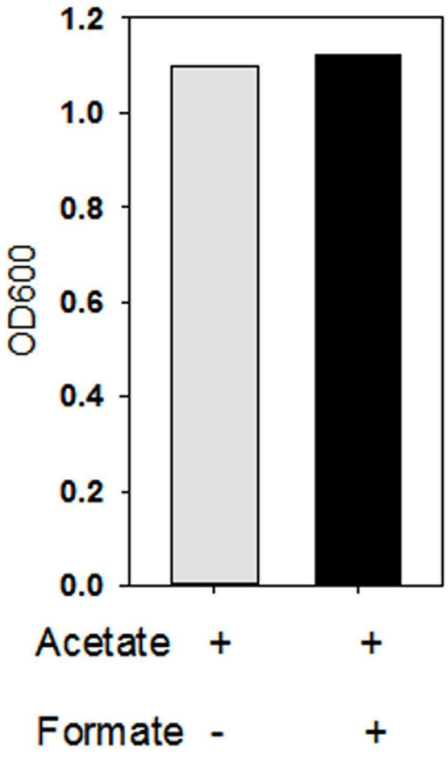
도면3c


Cell growth (OD600)
Acetate (mM)
3-HP (mM)
Time (h)
Cell growth
Carbon source
3-HP

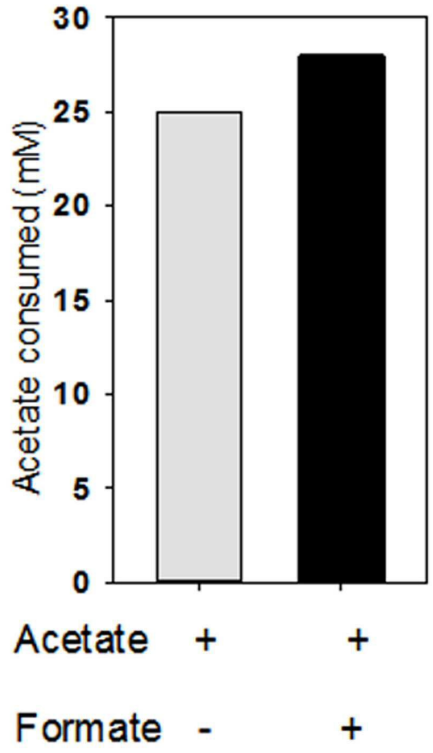
도면3d


Cell growth (OD600)
Acetate (mM)
3-HP (mM)
Time (h)
Cell growth
Carbon source
3-HP
0
1
2
3
4
5
0
10
20
30
40
50
60
0
2
4
6
8
10
0
10
20
30

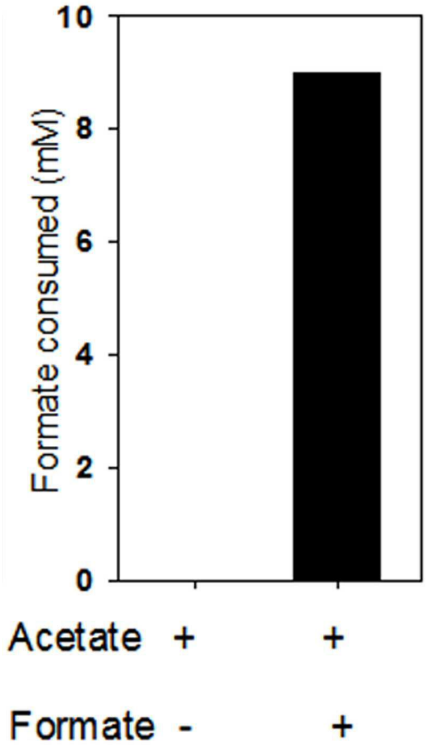
도면4a


OD600
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
Acetate + +
Formate - +

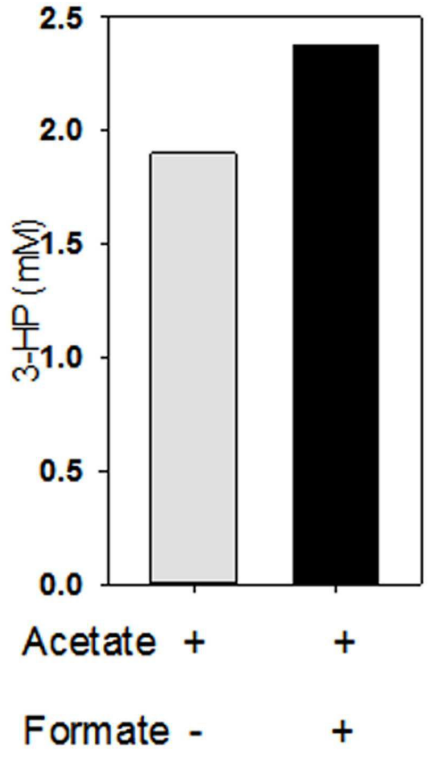
도면4b


30
25
20
15
10
5
0
Acetate consumed (mM)
Acetate + +
Formate - +

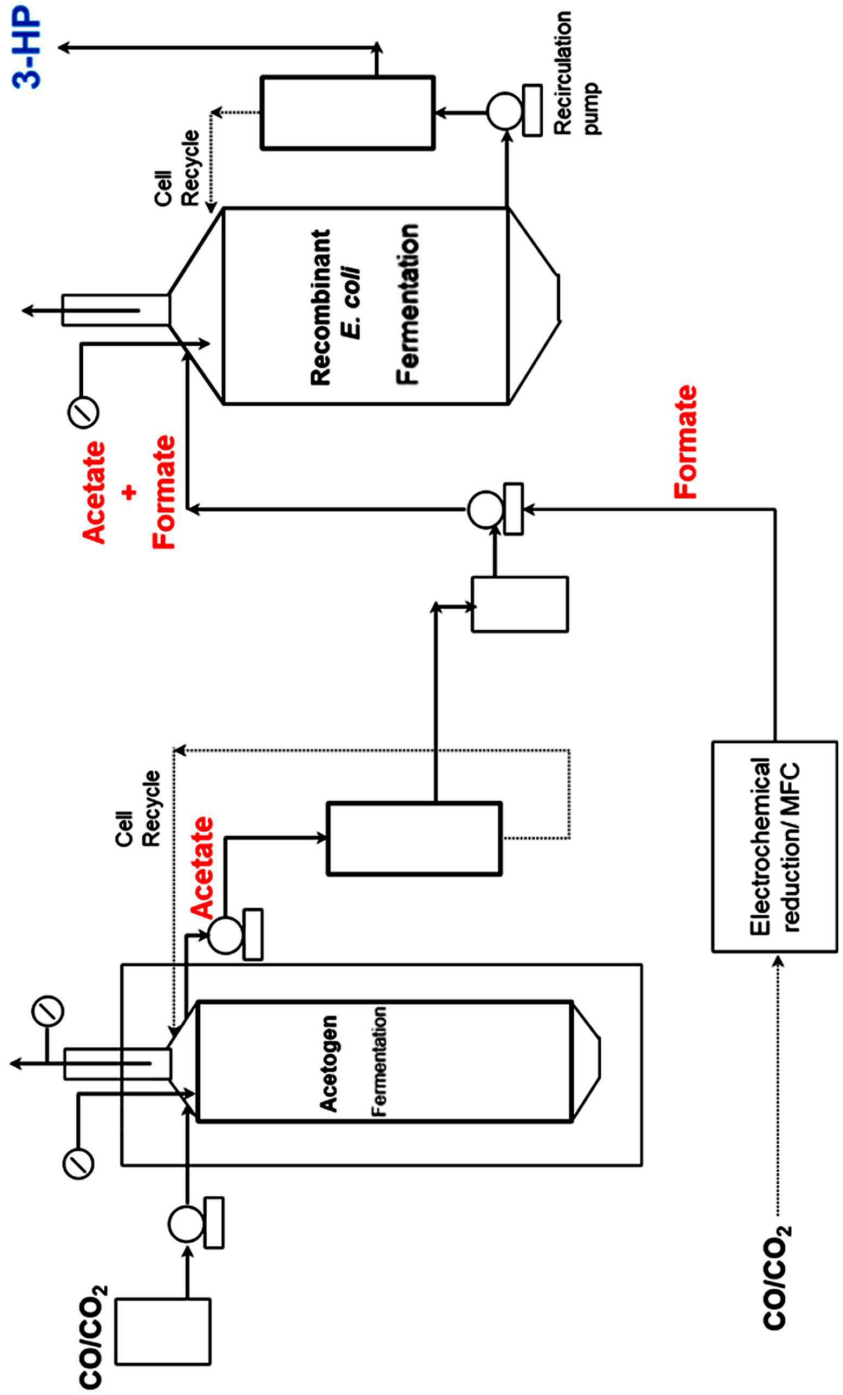
도면4c


10
8
6
4
2
0
Formate consumed (mM)
Acetate + +
Formate - +

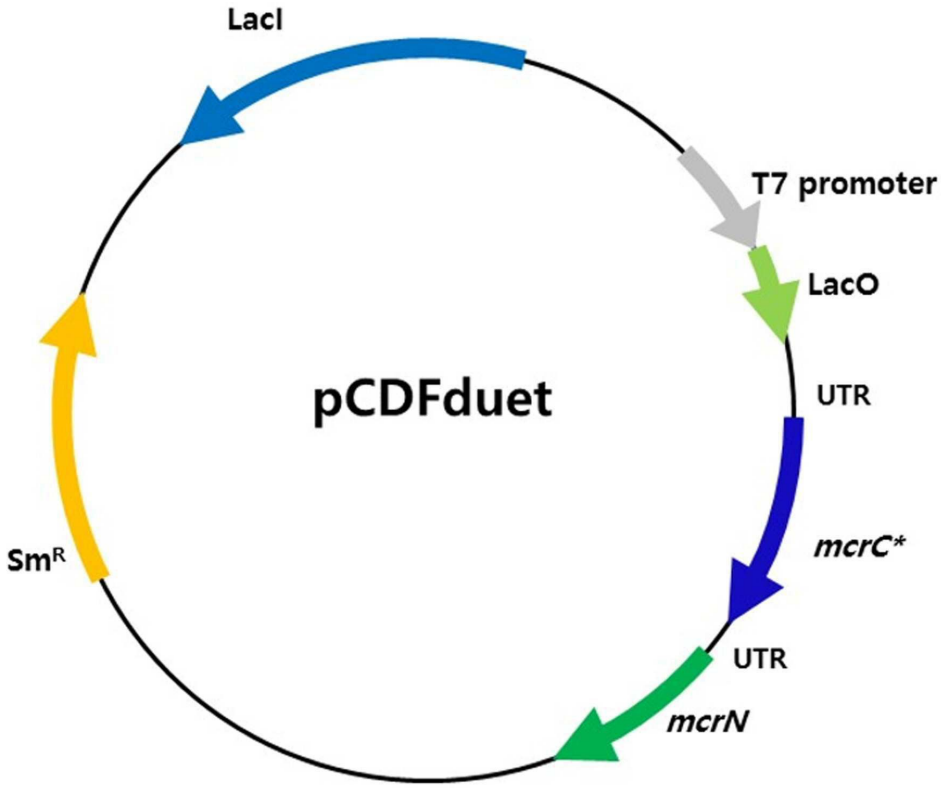
도면4d



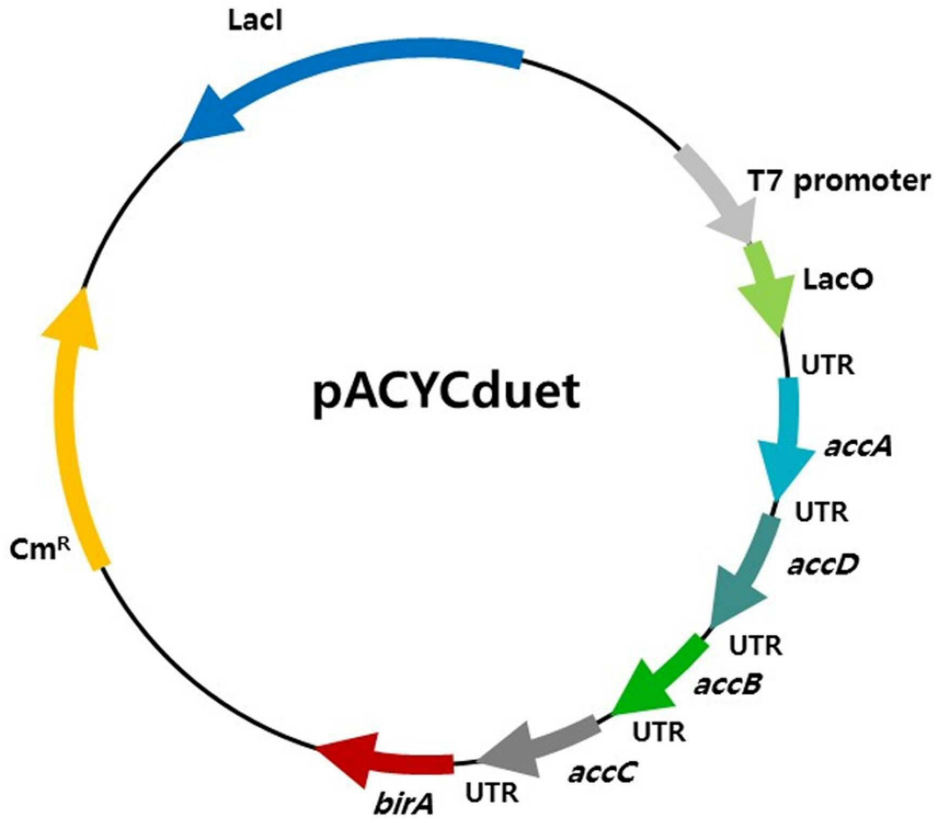
도면5


3-HP
Recirculation pump
Cell Recycle
Recombinant E. coli Fermentation
Acetate + Formate
Formate
Cell Recycle
Acetate
Acetogen Fermentation
Electrochemical reduction/ MFC
CO/CO2
CO/CO2

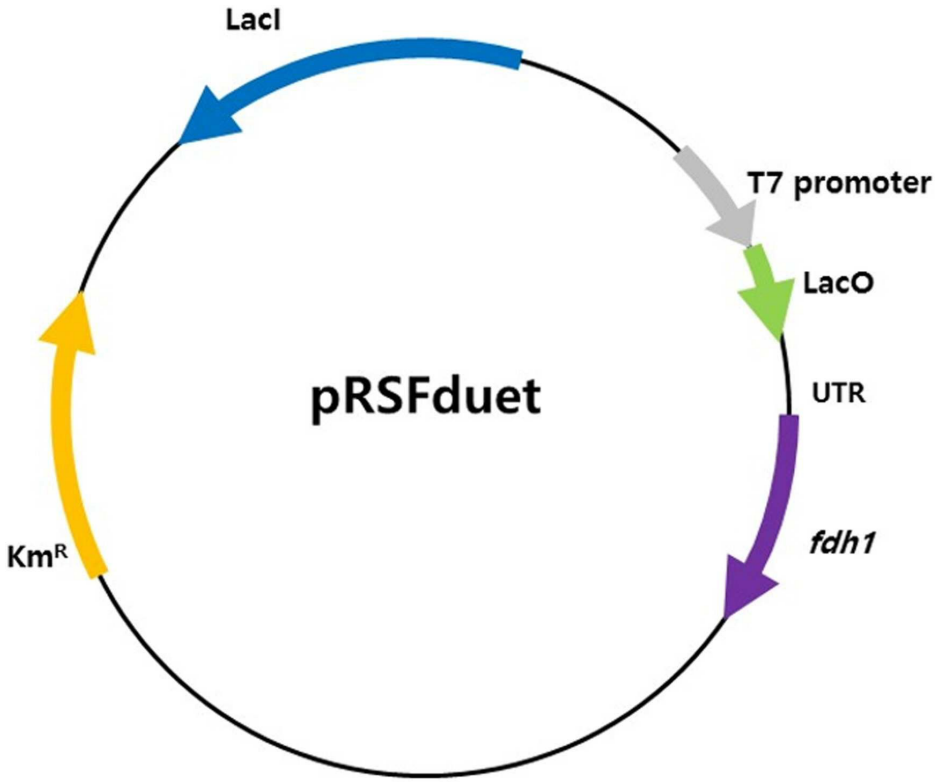
도면6


LacI
T7 promoter
LacO
UTR
mcrC*
UTR
mcrN
SmR
pCDFduet

도면7


LacI
T7 promoter
LacO
UTR
accA
UTR
accD
UTR
accB
UTR
accC
UTR
birA
CmR
pACYCduet

도면8



서 열 목 록

<110> UNIST(ULSAN NATIONAL INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY)

<120> Novel recombinant E. coli strains and method for producing 3-hydroxypropionic acid using thereof

<130> 1062722

<160> 5

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 1650

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mcrN

<400> 1

atgagcggca ccggtcgcct ggccggcaag atcgccctga tcaccggcgg tgccggtaac 60

atcggtagcg agctgacccg ccgtttcctg gcggaaggtg ccaccgtgat catcagcggc 120

cgtaaccgcg ccaagctgac cgccctggcg gaacgcatgc aggcggaagc gggcgtgccg 180

gccaaacgta tcgacctgga agtgatggac ggtagcgacc cggtggcggt gcgtgccggc 240

atcgaagcca tcgtggcgcg tcacggtcag atcgacatcc tggtgaacaa cgccggcagc 300

gccggtgcgc agcgccgtct ggccgagatc ccgctgaccg aagcggaact gggtccgggc 360

gccgaggaaa ccctgcacgc cagcatcgcg aacctgctgg gcatgggttg gcacctgatg 420

cgtatcgcgg cgccgcacat gccggtgggc agcgcggtga tcaacgtgag caccatcttc 480

agccgcgccg aatactacgg tcgtatcccg tacgtgaccc cgaaggcggc cctgaacgcc 540

ctgagccagc tggccgcgcg cgagctgggc gcccgcggta tccgtgtgaa caccatcttt 600

ccgggcccga tcgaaagcga ccgcatccgt accgtgttcc agcgcatgga ccagctgaaa 660

ggccgtccgg agggtgacac cgcccaccac ttcctgaaca ccatgcgtct gtgccgtgcc 720

aacgaccagg gcgcgctgga gcgccgtttc ccgagcgtgg gtgacgtggc ggacgccgcg 780

gtgttcctgg ccagcgcgga aagcgccgcg ctgagcggtg aaaccatcga agtgacccac 840

ggcatggagc tgccggcgtg cagcgaaacc agcctgctgg cgcgtaccga cctgcgcacc 900

atcgacgcca gcggtcgcac caccctgatc tgcgccggcg accagatcga ggaagtgatg 960

gccctgaccg gtatgctgcg tacctgcggt agcgaggtga tcatcggttt ccgtagcgcc 1020

gcggccctgg cccagttcga gcaggccgtg aacgaaagcc gccgtctggc cggcgcggac 1080

ttcaccccgc cgatcgccct gccgctggac ccgcgcgacc cggccaccat cgacgccgtg 1140

ttcgactggg cgggcgagaa caccggcggt atccacgcgg ccgtgatcct gccggccacc 1200

agccacgaac cggccccgtg cgtgatcgag gtggacgacg aacgtgtgct gaacttcctg 1260

gccgacgaaa tcaccggcac catcgtgatc gccagccgcc tggcgcgtta ctggcagagc 1320

cagcgcctga cgccgggcgc ccgcgcccgc ggcccgcgtg tgatcttcct gagcaacggc 1380

gccgaccaga acggcaacgt gtacggtcgc atccagagcg cggccatcgg tcagctgatc 1440

cgcgtgtggc gtcacgaggc cgaactggac taccagcgtg cgagcgcggc cggcgaccac 1500

gtgctgccgc cggtgtgggc caaccagatc gtgcgtttcg cgaaccgcag cctggagggc 1560

ctggagttcg cctgcgcctg gaccgcccag ctgctgcaca gccagcgcca catcaacgag 1620

atcaccctga acatcccggc caacatctaa 1650

<210> 2

<211> 2016

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mcrC*

<400> 2

atgagcgcca ccaccggtgc ccgtagcgcg agcgtgggtt gggcggaaag cctgatcggc 60

ctgcacctgg gtaaagtggc gctgattacc ggcggtagcg cgggtatcgg cggtcagatc 120

ggccgcctgc tggccctgag cggcgcgcgt gtgatgctgg cggcccgcga ccgtcacaaa 180

ctggagcaga tgcaggccat gatccagagc gagctggcgg aagtgggcta caccgacgtg 240

gaagaccgtg tgcacatcgc gccgggttgc gacgtgagca gcgaggccca gctggcggac 300

ctggtggaac gtaccctgag cgccttcggc accgtggact acctgatcaa caacgccggc 360

atcgcgggtg tggaggaaat ggtgatcgac atgccggtgg agggttggcg ccacaccctg 420

ttcgcgaacc tgatcagcaa ctacagcctg atgcgtaagc tggccccgct gatgaagaaa 480

cagggcagcg gttacatcct gaacgtgagc agctacttcg gcggtgaaaa agacgccgcc 540

atcccgtacc cgaaccgcgc ggactacgcg gtgagcaagg ccggtcagcg tgcgatggcc 600

gaggtgttcg cccgtttcct gggtccggaa atccagatca acgccatcgc gccgggtccg 660

gtggagggtg accgcctgcg tggcaccggc gagcgtccgg gcctgttcgc ccgccgtgcg 720

cgcctgatcc tggagaacaa acgtctgaac gaactgcacg ccgccctgat cgccgccgca 780

cgtaccgacg agcgcagcat gcacgaactg gtggagctgc tgctgccgaa cgacgtggcc 840

gcgctggaac agaacccggc cgcaccgacc gccctgcgtg agctggcgcg ccgtttccgt 900

agcgaaggcg acccggccgc cagcagcagc agcgccctgc tgaaccgcag catcgcggcc 960

aagctgctgg cccgtctgca caacggcggt tacgtgctgc cggccgacat cttcgccaac 1020

ctgccgaacc cgccggaccc gttcttcacc cgcgcccaga tcgaccgtga ggcccgtaaa 1080

gtgcgtgacg gcatcatggg tatgctgtac ctgcaacgca tgccgaccga gttcgacgtg 1140

gcgatggcca ccgtgtacta cctggccgac cgtgtggtga gcggtgaaac cttccacccg 1200

agcggcggtc tgcgttacga acgcaccccg accggcggtg aactgttcgg tctgccgagc 1260

ccggagcgcc tggccgaact ggtgggtagc accgtgtacc tgatcggcga gcacctgacc 1320

gaacacctga acctgctggc ccgtgcgtac ctggagcgtt acggcgcccg tcaggtggtg 1380

atgatcgtgg aaaccgaaac cggtgccgaa accatgcgcc gtctgctgca cgaccacgtg 1440

gaagcgggtc gcctgatgac catcgtggcc ggcgaccaga tcgaagccgc gatcgaccag 1500

gccatcaccc gttacggccg tccgggcccg gtggtgtgca ccccgttccg cccgctgccg 1560

accgtgccgc tggttggccg taaggacagc gactggagca ccgtgctgag cgaggcggag 1620

ttcgccgagc tgtgcgaaca ccagctgacc caccacttcc gtgtggcccg ctggatcgcc 1680

ctgagcgacg gcgcccgcct ggcgctggtg accccggaaa ccaccgccac cagcaccacc 1740

gaacagttcg ccctggcgaa cttcatcaaa accaccctgc acgccttcac cgccaccatc 1800

ggtgtggaga gcgaacgtac cgcccagcgc atcctgatca accaggtgga cctgacccgc 1860

cgtgcccgtg cggaggaacc gcgcgacccg cacgagcgtc agcaggagct ggaacgcttc 1920

atcgaagccg tgctgctggt gaccgcgccg ctgccgccgg aggcggacac ccgttacgcg 1980

ggccgcatcc accgcggtcg tgccatcacc gtgtaa 2016

<210> 3

<211> 7334

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pCDFDuet_mcr-C*_mcr-N

<400>

3

cctgcattag gaaataatac gactcactat aggggaattg tgagcggata acaattcccc 60

tgtagaaata attttgttta actttaataa ggagatatac catgggcagc agccatcacc 120

atcatcacca cagccaggat ccgaattcga gctcggcgcg cctgcaggtc gacaagcttg 180

aaaacaaaaa aaggaggaaa aattatgagc gccaccaccg gtgcccgtag cgcgagcgtg 240

ggttgggcgg aaagcctgat cggcctgcac ctgggtaaag tggcgctgat taccggcggt 300

agcgcgggta tcggcggtca gatcggccgc ctgctggccc tgagcggcgc gcgtgtgatg 360

ctggcggccc gcgaccgtca caaactggag cagatgcagg ccatgatcca gagcgagctg 420

gcggaagtgg gctacaccga cgtggaagac cgtgtgcaca tcgcgccggg ttgcgacgtg 480

agcagcgagg cccagctggc ggacctggtg gaacgtaccc tgagcgcctt cggcaccgtg 540

gactacctga tcaacaacgc cggcatcgcg ggtgtggagg aaatggtgat cgacatgccg 600

gtggagggtt ggcgccacac cctgttcgcg aacctgatca gcaactacag cctgatgcgt 660

aagctggccc cgctgatgaa gaaacagggc agcggttaca tcctgaacgt gagcagctac 720

ttcggcggtg aaaaagacgc cgccatcccg tacccgaacc gcgcggacta cgcggtgagc 780

aaggccggtc agcgtgcgat ggccgaggtg ttcgcccgtt tcctgggtcc ggaaatccag 840

atcaacgcca tcgcgccggg tccggtggag ggtgaccgcc tgcgtggcac cggcgagcgt 900

ccgggcctgt tcgcccgccg tgcgcgcctg atcctggaga acaaacgtct gaacgaactg 960

cacgccgccc tgatcgccgc cgcacgtacc gacgagcgca gcatgcacga actggtggag 1020

ctgctgctgc cgaacgacgt ggccgcgctg gaacagaacc cggccgcacc gaccgccctg 1080

cgtgagctgg cgcgccgttt ccgtagcgaa ggcgacccgg ccgccagcag cagcagcgcc 1140

ctgctgaacc gcagcatcgc ggccaagctg ctggcccgtc tgcacaacgg cggttacgtg 1200

ctgccggccg acatcttcgc caacctgccg aacccgccgg acccgttctt cacccgcgcc 1260

cagatcgacc gtgaggcccg taaagtgcgt gacggcatca tgggtatgct gtacctgcaa 1320

cgcatgccga ccgagttcga cgtggcgatg gccaccgtgt actacctggc cgaccgtgtg 1380

gtgagcggtg aaaccttcca cccgagcggc ggtctgcgtt acgaacgcac cccgaccggc 1440

ggtgaactgt tcggtctgcc gagcccggag cgcctggccg aactggtggg tagcaccgtg 1500

tacctgatcg gcgagcacct gaccgaacac ctgaacctgc tggcccgtgc gtacctggag 1560

cgttacggcg cccgtcaggt ggtgatgatc gtggaaaccg aaaccggtgc cgaaaccatg 1620

cgccgtctgc tgcacgacca cgtggaagcg ggtcgcctga tgaccatcgt ggccggcgac 1680

cagatcgaag ccgcgatcga ccaggccatc acccgttacg gccgtccggg cccggtggtg 1740

tgcaccccgt tccgcccgct gccgaccgtg ccgctggttg gccgtaagga cagcgactgg 1800

agcaccgtgc tgagcgaggc ggagttcgcc gagctgtgcg aacaccagct gacccaccac 1860

ttccgtgtgg cccgctggat cgccctgagc gacggcgccc gcctggcgct ggtgaccccg 1920

gaaaccaccg ccaccagcac caccgaacag ttcgccctgg cgaacttcat caaaaccacc 1980

ctgcacgcct tcaccgccac catcggtgtg gagagcgaac gtaccgccca gcgcatcctg 2040

atcaaccagg tggacctgac ccgccgtgcc cgtgcggagg aaccgcgcga cccgcacgag 2100

cgtcagcagg agctggaacg cttcatcgaa gccgtgctgc tggtgaccgc gccgctgccg 2160

ccggaggcgg acacccgtta cgcgggccgc atccaccgcg gtcgtgccat caccgtgtaa 2220

catatgaaca actacaaaag gaggataaaa catgagcggc accggtcgcc tggccggcaa 2280

gatcgccctg atcaccggcg gtgccggtaa catcggtagc gagctgaccc gccgtttcct 2340

ggcggaaggt gccaccgtga tcatcagcgg ccgtaaccgc gccaagctga ccgccctggc 2400

ggaacgcatg caggcggaag cgggcgtgcc ggccaaacgt atcgacctgg aagtgatgga 2460

cggtagcgac ccggtggcgg tgcgtgccgg catcgaagcc atcgtggcgc gtcacggtca 2520

gatcgacatc ctggtgaaca acgccggcag cgccggtgcg cagcgccgtc tggccgagat 2580

cccgctgacc gaagcggaac tgggtccggg cgccgaggaa accctgcacg ccagcatcgc 2640

gaacctgctg ggcatgggtt ggcacctgat gcgtatcgcg gcgccgcaca tgccggtggg 2700

cagcgcggtg atcaacgtga gcaccatctt cagccgcgcc gaatactacg gtcgtatccc 2760

gtacgtgacc ccgaaggcgg ccctgaacgc cctgagccag ctggccgcgc gcgagctggg 2820

cgcccgcggt atccgtgtga acaccatctt tccgggcccg atcgaaagcg accgcatccg 2880

taccgtgttc cagcgcatgg accagctgaa aggccgtccg gagggtgaca ccgcccacca 2940

cttcctgaac accatgcgtc tgtgccgtgc caacgaccag ggcgcgctgg agcgccgttt 3000

cccgagcgtg ggtgacgtgg cggacgccgc ggtgttcctg gccagcgcgg aaagcgccgc 3060

gctgagcggt gaaaccatcg aagtgaccca cggcatggag ctgccggcgt gcagcgaaac 3120

cagcctgctg gcgcgtaccg acctgcgcac catcgacgcc agcggtcgca ccaccctgat 3180

ctgcgccggc gaccagatcg aggaagtgat ggccctgacc ggtatgctgc gtacctgcgg 3240

tagcgaggtg atcatcggtt tccgtagcgc cgcggccctg gcccagttcg agcaggccgt 3300

gaacgaaagc cgccgtctgg ccggcgcgga cttcaccccg ccgatcgccc tgccgctgga 3360

cccgcgcgac ccggccacca tcgacgccgt gttcgactgg gcgggcgaga acaccggcgg 3420
tatccacgcg gccgtgatcc tgccggccac cagccacgaa ccggccccgt gcgtgatcga 3480
ggtggacgac gaacgtgtgc tgaacttcct ggccgacgaa atcaccggca ccatcgtgat 3540
cgccagccgc ctggcgcgtt actggcagag ccagcgcctg acgccgggcg cccgcgcccg 3600
cggcccgcgt gtgatcttcc tgagcaacgg cgccgaccag aacggcaacg tgtacggtcg 3660
catccagagc gcggccatcg gtcagctgat ccgcgtgtgg cgtcacgagg ccgaactgga 3720
ctaccagcgt gcgagcgcgg ccggcgacca cgtgctgccg ccggtgtggg ccaaccagat 3780

cgtgcgtttc gcgaaccgca gcctggaggg cctggagttc gcctgcgcct ggaccgccca 3840
gctgctgcac agccagcgcc acatcaacga gatcaccctg aacatcccgg ccaacatcta 3900
agatatcggc cggccacgcg atcgctgacg tcggtaccct cgagtctggt aaagaaaccg 3960
ctgctgcgaa atttgaacgc cagcacatgg actcgtctac tagcgcagct taattaacct 4020
aggctgctgc caccgctgag caataactag cataacccct tggggcctct aaacgggtct 4080
tgaggggttt tttgctgaaa cctcaggcat ttgagaagca cacggtcaca ctgcttccgg 4140
tagtcaataa accggtaaac cagcaataga cataagcggc tatttaacga ccctgccctg 4200

aaccgacgac cgggtcatcg tggccggatc ttgcggcccc tcggcttgaa cgaattgtta 4260
gacattattt gccgactacc ttggtgatct cgcctttcac gtagtggaca aattcttcca 4320
actgatctgc gcgcgaggcc aagcgatctt cttcttgtcc aagataagcc tgtctagctt 4380
caagtatgac gggctgatac tgggccggca ggcgctccat tgcccagtcg gcagcgacat 4440
ccttcggcgc gattttgccg gttactgcgc tgtaccaaat gcgggacaac gtaagcacta 4500
catttcgctc atcgccagcc cagtcgggcg gcgagttcca tagcgttaag gtttcattta 4560
gcgcctcaaa tagatcctgt tcaggaaccg gatcaaagag ttcctccgcc gctggaccta 4620

ccaaggcaac gctatgttct cttgcttttg tcagcaagat agccagatca atgtcgatcg 4680
tggctggctc gaagatacct gcaagaatgt cattgcgctg ccattctcca aattgcagtt 4740
cgcgcttagc tggataacgc cacggaatga tgtcgtcgtg cacaacaatg gtgacttcta 4800
cagcgcggag aatctcgctc tctccagggg aagccgaagt ttccaaaagg tcgttgatca 4860
aagctcgccg cgttgtttca tcaagcctta cggtcaccgt aaccagcaaa tcaatatcac 4920
tgtgtggctt caggccgcca tccactgcgg agccgtacaa atgtacggcc agcaacgtcg 4980
gttcgagatg gcgctcgatg acgccaacta cctctgatag ttgagtcgat acttcggcga 5040

tcaccgcttc cctcatactc ttccttttc aatattattg aagcatttat cagggttatt 5100

gtctcatgag cggatacata tttgaatgta tttagaaaaa taaacaaata gctagctcac 5160

tcggtcgcta cgctccgggc gtgagactgc ggcgggcgct gcggacacat acaaagttac 5220

ccacagattc cgtggataag caggggacta acatgtgagg caaaacagca gggccgcgcc 5280

ggtggcgttt ttccataggc tccgccctcc tgccagagtt cacataaaca gacgcttttc 5340

cggtgcatct gtgggagccg tgaggctcaa ccatgaatct gacagtacgg gcgaaacccg 5400

acaggactta aagatcccca ccgtttccgg cgggtcgctc cctcttgcgc tctcctgttc 5460

cgaccctgcc gtttaccgga tacctgttcc gcctttctcc cttacgggaa gtgtggcgct 5520

ttctcatagc tcacacactg gtatctcggc tcggtgtagg tcgttcgctc caagctgggc 5580

tgtaagcaag aactccccgt tcagcccgac tgctgcgcct tatccggtaa ctgttcactt 5640

gagtccaacc cggaaaagca cggtaaaacg ccactggcag cagccattgg taactgggag 5700

ttcgcagagg atttgtttag ctaaacacgc ggttgctctt gaagtgtgcg ccaaagtccg 5760

gctacactgg aaggacagat ttggttgctg tgctctgcga aagccagtta ccacggttaa 5820

gcagttcccc aactgactta accttcgatc aaaccacctc cccaggtggt tttttcgttt 5880

acagggcaaa agattacgcg cagaaaaaaa ggatctcaag aagatccttt gatcttttct 5940

actgaaccgc tctagatttc agtgcaattt atctcttcaa atgtagcacc tgaagtcagc 6000

cccatacgat ataagttgta attctcatgt tagtcatgcc ccgcgcccac cggaaggagc 6060

tgactgggtt gaaggctctc aagggcatcg gtcgagatcc cggtgcctaa tgagtgagct 6120

aacttacatt aattgcgttg cgctcactgc ccgctttcca gtcgggaaac ctgtcgtgcc 6180

agctgcatta atgaatcggc caacgcgcgg ggagaggcgg tttgcgtatt gggcgccagg 6240

gtggtttttc ttttcaccag tgagacgggc aacagctgat tgcccttcac cgcctggccc 6300

tgagagagtt gcagcaagcg gtccacgctg gtttgcccca gcaggcgaaa atcctgtttg 6360

atggtggtta acggcgggat ataacatgag ctgtcttcgg tatcgtcgta tcccactacc 6420

gagatgtccg caccaacgcg cagcccggac tcggtaatgg cgcgcattgc gcccagcgcc 6480

atctgatcgt tggcaaccag catcgcagtg ggaacgatgc cctcattcag catttgcatg 6540

gtttgttgaa aaccggacat ggcactccag tcgccttccc gttccgctat cggctgaatt 6600

tgattgcgag tgagatattt atgccagcca gccagacgca gacgcgccga gacagaactt 6660

aatgggcccg ctaacagcgc gatttgctgg tgacccaatg cgaccagatg ctccacgccc 6720

agtcgcgtac cgtcttcatg ggagaaaata atactgttga tgggtgtctg gtcagagaca 6780

tcaagaaata acgccggaac attagtgcag gcagcttcca cagcaatggc atcctggtca 6840

tccagcggat agttaatgat cagcccactg acgcgttgcg cgagaagatt gtgcaccgcc 6900

gctttacagg cttcgacgcc gcttcgttct accatcgaca ccaccacgct ggcacccagt 6960

tgatcggcgc gagatttaat cgccgcgaca atttgcgacg gcgcgtgcag ggccagactg 7020

gaggtggcaa cgccaatcag caacgactgt ttgcccgcca gttgttgtgc cacgcggttg 7080

ggaatgtaat tcagctccgc catcgccgct tccacttttt cccgcgtttt cgcagaaacg 7140

tggctggcct ggttcaccac gcgggaaacg gtctgataag agacaccggc atactctgcg 7200

acatcgtata acgttactgg tttcacattc accaccctga attgactctc ttccgggcgc 7260

tatcatgcca taccgcgaaa ggttttgcgc cattcgatgg tgtccgggat ctcgacgctc 7320

tcccttatgc gact 7334

<210> 4

<211> 8658

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pACYCDuet_accA_accD_accB_accC_birA

<400> 4

cctgcattag gaaattaata cgactcacta taggggaatt gtgagcggat aacaattccc 60

ctgtagaaat aattttgttt aactttaata aggagatata ccatgggcag cagccatcac 120

catcatcacc acagccagga tccgaacact cataaaggag catccccaat gagtctgaat 180

ttccttgatt ttgaacagcc gattgcagag ctggaagcga aaatcgattc tctgactgcg 240

gttagccgtc aggatgagaa actggatatt aacatcgatg aagaagtgca tcgtctgcgt 300

gaaaaaagcg tagaactgac acgtaaaatc ttcgccgatc tcggtgcatg gcagattgcg 360

caactggcac gccatccaca gcgtccttat accctggatt acgttcgcct ggcatttgat 420

gaatttgacg aactggctgg cgaccgcgcg tatgcagacg ataaagctat cgtcggtggt 480

atcgcccgtc tcgatggtcg tccggtgatg atcattggtc atcaaaaagg tcgtgaaacc 540

aaagaaaaaa ttcgccgtaa ctttggtatg ccagcgccag aaggttaccg caaagcactg 600

cgtctgatgc aaatggctga acgctttaag atgccaatca tcacctttat cgacaccccg 660

ggggcttatc cgggcgtggg cgcagaagag cgcggtcagt ctgaagccat tgcacgcaac 720

ctgcgtgaaa tgtctcgcct tagcgtaccg actatttgta ccgttatcgg tgaaggtggt 780

tctggcggcg cgctggcgat tggcgtgggc gataaagtga atatgctgca atacagcacc 840

tattccgtta tctcgccgga aggttgtgcg tccattctgt ggaagagcgc tgataaagcg 900

ccgctggcgg ctgaagcgat gggtatcatc gctccgcgtc tgaaagaact aaaactgatc 960

gactccatca tcccagaacc gctgggtggt gctcaccgta acccggaagc gatggcggca 1020

tcgttgaaag cgcaactgtt ggcggatctg gccgatctcg acgtgttaag cactgaagat 1080

ttaaaaaatc gtcgttatca gcgcctgatg agctacggtt acgcgtaacc cttcacaaaa 1140

aggagcatcc ctgatgagct ggattgaacg aattaaaagc aacattactc ccacccgcaa 1200

ggcgagcatt cctgaagggg tgtggactaa gtgtgatagc tgcggtcagg ttttataccg 1260

cgctgagctg gaacgtaatc ttgaggtctg tccgaagtgt gaccatcaca tgcgtatgac 1320

agcgcgtaat cgcctgcata gcctgttaga tgaaggaagc cttgtggagc tgggtagcga 1380

gcttgagccg aaagatgtgc tgaagtttcg tgactccaag aagtataaag accgtctggc 1440

atctgcgcag aaagaaaccg gcgaaaaaga tgcgctggtg gtgatgaaag gcactctgta 1500

tggaatgccg gttgtcgctg cggcattcga gttcgccttt atgggcggtt caatggggtc 1560

tgttgtgggt gcacgtttcg tgcgtgccgt tgagcaggcg ctggaagata actgcccgct 1620

gatctgcttc tccgcctctg gtggcgcacg tatgcaggaa gcactgatgt cgctgatgca 1680

gatggcgaaa acctctgcgg cactggcaaa aatgcaggag cgcggcttgc cgtacatctc 1740

cgtgctgacc gacccgacga tgggcggtgt ttctgcaagt ttcgccatgc tgggcgatct 1800

caacatcgct gaaccgaaag cgttaatcgg ctttgccggt ccgcgtgtta tcgaacagac 1860

cgttcgcgaa aaactgccgc ctggattcca gcgcagtgaa ttcctgatcg agaaaggcgc 1920

gatcgacatg atcgtccgtc gtccggaaat gcgcctgaaa ctggcgagta ttctggcgaa 1980

gttgatgaat ctgccagcgc cgaatcctga agcgccgcgt gaaggcgtag tggtaccccc 2040

ggtaccggat caggaacctg aggcctgaga gctcggcgcg cctgcagtga caattaatca 2100

tcggctcgta taatgtagat cgacgaaaag gagcatcgcc aatggatatt cgtaagatta 2160

aaaaactgat cgagctggtt gaagaatcag gcatctccga actggaaatt tctgaaggcg 2220

aagagtcagt acgcattagc cgtgcagctc ctgccgcaag tttccctgtg atgcaacaag 2280

cttacgctgc accaatgatg cagcagccag ctcaatctaa cgcagccgct ccggcgaccg 2340

ttccttccat ggaagcgcca gcagcagcgg aaatcagtgg tcacatcgta cgttccccga 2400

tggttggtac tttctaccgc accccaagcc cggacgcaaa agcgttcatc gaagtgggtc 2460

agaaagtcaa cgtgggcgat accctgtgca tcgttgaagc catgaaaatg atgaaccaga 2520

tcgaagcgga caaatccggt accgtgaaag caattctggt cgaaagtgga caaccggtag 2580

aatttgacga gccgctggtc gtcatcgagt aaaccggaaa taaaaggagc atcaattatg 2640

ctggataaaa ttgttattgc caaccgcggc gagattgcat tgcgtattct tcgtgcctgt 2700

aaagaactgg gcatcaagac tgtcgctgtg cactccagcg cggatcgcga tctaaaacac 2760

gtattactgg cagatgaaac ggtctgtatt ggccctgctc cgtcagtaaa aagttatctg 2820

aacatcccgg caatcatcag cgccgctgaa atcaccggcg cagtagcaat ccatccgggt 2880

tacggcttcc tctccgagaa cgccaacttt gccgagcagg ttgaacgctc cggctttatc 2940

ttcattggcc cgaaagcaga aaccattcgc ctgatgggcg acaaagtatc cgcaatcgcg 3000

gcgatgaaaa aagcgggcgt cccttgcgta ccgggttctg acggcccgct gggcgacgat 3060

atggataaaa accgtgccat tgctaaacgc attggttatc cggtgattat caaagcctcc 3120

ggcggcggcg gcggtcgcgg tatgcgcgta gtgcgcggcg acgctgaact ggcacaatcc 3180

atctccatga cccgtgcgga agcgaaagct gctttcagca acgatatggt ttacatggag 3240

aaatacctgg aaaatcctcg ccacgtcgag attcaggtac tggctgacgg tcagggcaac 3300

gctatctatc tggcggaacg tgactgctcc atgcaacgcc gccaccagaa agtggtcgaa 3360

gaagcgccag caccgggcat taccccggaa ctgcgtcgct acatcggcga acgttgcgct 3420

aaagcgtgtg ttgatatcgg ctatcgcggt gcaggtactt tcgagttcct gttcgaaaac 3480

ggcgagttct atttcatcga aatgaacacc cgtattcagg tagaacaccc ggttacagaa 3540

atgatcaccg gcgttgacct gatcaaagaa cagctgcgta tcgctgccgg tcaaccgctg 3600

tcgatcaagc aagaagaagt tcacgttcgc ggccatgcgg tggaatgtcg tatcaacgcc 3660

gaagatccga acaccttcct gccaagtccg ggcaaaatca cccgtttcca cgcacctggc 3720

ggttttggcg tacgttggga gtctcatatc tacgcgggct acaccgtacc gccgtactat 3780

gactcaatga tcggtaagct gatttgctac ggtgaaaacc gtgacgtggc gattgcccgc 3840

atgaagaatg cgctgcagga gctgatcatc gacggtatca aaaccaacgt tgatctgcag 3900

atccgcatca tgaatgacga gaacttccag catggtggca ctaacatcca ctatctggag 3960

aaaaaactcg gtcttcagga aaaataaacg aaatatctaa ggaggttcga acatgaagga 4020

taacaccgtg ccactgaaat tgattgccct gttagcgaac ggtgaatttc actctggcga 4080

gcagttgggt gaaacgctgg gaatgagccg ggcggctatt aataaacaca ttcagacact 4140

gcgtgactgg ggcgttgatg tctttaccgt tccgggtaaa ggatacagcc tgcctgagcc 4200

tatccagtta cttaatgcta aacagatatt gggtcagctg gatggcggta gtgtagccgt 4260

gctgccagtg attgactcca cgaatcagta ccttcttgat cgtatcggag agcttaaatc 4320

gggcgatgct tgcattgcag aataccagca ggctggccgt ggtcgccggg gtcggaaatg 4380

gttttcgcct tttggcgcaa acttatattt gtcgatgttc tggcgtctgg aacaaggccc 4440

ggcggcggcg attggtttaa gtctggttat cggtatcgtg atggcggaag tattacgcaa 4500

gctgggtgca gataaagttc gtgttaaatg gcctaatgac ctctatctgc aggatcgcaa 4560

gctggcaggc attctggtgg agctgactgg caaaactggc gatgcggcgc aaatagtcat 4620

tggagccggg atcaacatgg caatgcgccg tgttgaagag agtgtcgtta atcaggggtg 4680

gatcacgctg caggaagcgg ggatcaatct cgatcgtaat acgttggcgg ccatgctaat 4740
acgtgaatta cgtgctgcgt tggaactctt cgaacaagaa ggattggcac cttatctgtc 4800
gcgctgggaa aagctggata attttattaa tcgcccagtg aaacttatca ttggtgataa 4860
agaaatattt ggcatttcac gcggaataga caaacagggg gctttattac ttgagcagga 4920
tggaataata aaaccctgga tgggcggtga aatatccctg cgtagtgcag aaaaataaca 4980
tatggcagat ctcaattgga tatcggccgg ccacgcgatc gctgacgtcg gtaccctcga 5040
gtctggtaaa gaaaccgctg ctgcgaaatt tgaacgccag cacatggact cgtctactag 5100

cgcagcttaa ttaacctagg ctgctgccac cgctgagcaa taactagcat aacccccttgg 5160
ggcctctaaa cgggtcttga ggggtttttt gctgaaacct caggcatttg agaagcacac 5220
ggtcacactg cttccggtag tcaataaacc ggtaaaccag caatagacat aagcggctat 5280
ttaacgaccc tgccctgaac cgacgaccgg gtcgaatttg ctttcgaatt tctgccattc 5340
atccgcttat tatcacttat tcaggcgtag caccaggcgt ttaagggcac caataactgc 5400
cttaaaaaaa ttacgccccg ccctgccact catcgcagta ctgttgtaat tcattaagca 5460
ttctgccgac atggaagcca tcacagacgg catgatgaac ctgaatcgcc agcggcatca 5520

gcaccttgtc gccttgcgta taatatttgc ccatagtgaa aacgggggcg aagaagttgt 5580
ccatattggc cacgtttaaa tcaaaactgg tgaaactcac ccagggattg gctgagacga 5640
aaaacatatt ctcaataaac cctttaggga aataggccag gttttcaccg taacacgcca 5700
catcttgcga atatatgtgt agaaactgcc ggaaatcgtc gtggtattca ctccagagcg 5760
atgaaaacgt ttcagtttgc tcatggaaaa cggtgtaaca agggtgaaca ctatcccata 5820
tcaccagctc accgtctttc attgccatac ggaactccgg atgagcattc atcaggcggg 5880
caagaatgtg aataaaggcc ggataaaact tgtgcttatt tttctttacg gtctttaaaa 5940

aggccgtaat atccagctga acggtctggt tataggtaca ttgagcaact gactgaaatg 6000
cctcaaaatg ttctttacga tgccattggg atatatcaac ggtggtatat ccagtgattt 6060
ttttctccat tttagcttcc ttagctcctg aaaatctcga taactcaaaa aatacgcccg 6120
gtagtgatct tatttcatta tggtgaaagt tggaacctct tacgtgccga tcaacgtctc 6180
attttcgcca aaagttggcc cagggcttcc cggtatcaac agggacacca ggatttattt 6240
attctgcgaa gtgatcttcc gtcacaggta tttattcggc gcaaagtgcg tcgggtgatg 6300
ctgccaactt actgatttag tgtatgatgg tgtttttgag gtgctccagt ggcttctgtt 6360

tctatcagct gtccctcctg ttcagctact gacggggtgg tgcgtaacgg caaaagcacc 6420

gccggacatc agcgctagcg gagtgtatac tggcttacta tgttggcact gatgagggtg 6480

tcagtgaagt gcttcatgtg gcaggagaaa aaaggctgca ccggtgcgtc agcagaatat 6540

gtgatacagg atatattccg cttcctcgct cactgactcg ctacgctcgg tcgttcgact 6600

gcggcgagcg gaaatggctt acgaacgggg cggagatttc ctggaagatg ccaggaagat 6660

acttaacagg gaagtgagag ggccgcggca aagccgtttt tccataggct ccgcccccct 6720

gacaagcatc acgaaatctg acgctcaaat cagtggtggc gaaacccgac aggactataa 6780

agataccagg cgtttcccct ggcggctccc tcgtgcgctc tcctgttcct gcctttcggt 6840

ttaccggtgt cattccgctg ttatggccgc gtttgtctca ttccacgcct gacactcagt 6900

tccgggtagg cagttcgctc caagctggac tgtatgcacg aacccccccgt tcagtccgac 6960

cgctgcgcct tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc cggaaagaca tgcaaaagca 7020

ccactggcag cagccactgg taattgattt agaggagtta gtcttgaagt catgcgccgg 7080

ttaaggctaa actgaaagga caagttttgg tgactgcgct cctccaagcc agttacctcg 7140

gttcaaagag ttggtagctc agagaacctt cgaaaaaccg ccctgcaagg cggtttttc 7200

gttttcagag caagagatta cgcgcagacc aaaacgatct caagaagatc atcttattaa 7260

tcagataaaa tatttctaga tttcagtgca atttatctct tcaaatgtag cacctgaagt 7320

cagccccata cgatataagt tgtaattctc atgttagtca tgccccgcgc ccaccggaag 7380

gagctgactg ggttgaaggc tctcaagggc atcggtcgag atcccggtgc ctaatgagtg 7440

agctaactta cattaattgc gttgcgctca ctgcccgctt tccagtcggg aaacctgtcg 7500

tgccagctgc attaatgaat cggccaacgc gcggggagag gcggtttgcg tattgggcgc 7560

cagggtggtt tttcttttca ccagtgagac gggcaacagc tgattgccct tcaccgcctg 7620

gccctgagag agttgcagca agcggtccac gctggtttgc cccagcaggc gaaaatcctg 7680

tttgatggtg gttaacggcg ggatataaca tgagctgtct tcggtatcgt cgtatcccac 7740

taccgagatg tccgcaccaa cgcgcagccc ggactcggta atggcgcgca ttgcgcccag 7800

cgccatctga tcgttggcaa ccagcatcgc agtgggaacg atgccctcat tcagcatttg 7860

catggtttgt tgaaaaccgg acatggcact ccagtcgcct tcccgttccg ctatcggctg 7920

aatttgattg cgagtgagat atttatgcca gccagccaga cgcagacgcg ccgagacaga 7980

acttaatggg cccgctaaca gcgcgatttg ctggtgaccc aatgcgacca gatgctccac 8040

gcccagtcgc gtaccgtctt catgggagaa aataatactg ttgatgggtg tctggtcaga 8100

gacatcaaga aataacgccg gaacattagt gcaggcagct tccacagcaa tggcatcctg 8160

gtcatccagc ggatagttaa tgatcagccc actgacgcgt tgcgcgagaa gattgtgcac 8220

cgccgcttta caggcttcga cgccgcttcg ttctaccatc gacaccacca cgctggcacc 8280

cagttgatcg gcgcgagatt taatcgccgc gacaatttgc gacggcgcgt gcagggccag 8340

actggaggtg gcaacgccaa tcagcaacga ctgtttgccc gccagttgtt gtgccacgcg 8400

gttgggaatg taattcagct ccgccatcgc cgcttccact ttttcccgcg ttttcgcaga 8460

aacgtggctg gcctggttca ccacgcggga aacggtctga taagagacac cggcatactc 8520

tgcgacatcg tataacgtta ctggtttcac attcaccacc ctgaattgac tctcttccgg 8580

gcgctatcat gccataccgc gaaaggtttt gcgccattcg atggtgtccg ggatctcgac 8640

gctctccctt atgcgact 8658

<210> 5

<211> 4870

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pRSFDuet_ fdh1

<400> 5

cctgcattag gaaattaata cgactcacta taggggaatt gtgagcggat aacaattccc 60

ctgtagaaat aattttgttt aactttaata aggagatata ccatgggcag cagccatcac 120

catcatcacc acagccagga tccgaattcg agctcggcgc gcctgcaggt cgacaagctt 180

gcggccgcat aatgcttaag tcgaacagaa agtaatcgta ttgtacacgg ccgcataatc 240

gaaattaata cgactcacta taggggaatt gtgagcggat aacaattccc catcttagta 300

tattagttaa gtataagaag gagatataca tatgaaaatc gtgctggtgc tgtatgatgc 360

cggcaaacat gccgccgatg aagaaaaact gtatggctgc accgaaaaca aactgggcat 420

cgccaactgg ctgaaagatc agggccatga actgatcacc accagcgata aagaaggcga 480

aaccagcgaa ctggataaac atatcccgga tgccgatatc atcatcacca ccccgtttca 540

tccggcctat atcaccaaag aacgcctgga taaagccaaa aacctgaaac tggtggtggt 600

ggccggcgtg ggcagcgatc atatcgatct ggattatatc aaccagaccg gcaaaaaaat 660

cagcgtgctg gaagtgaccg gcagcaacgt ggtgagcgtg gccgaacatg tggtgatgac 720

catgctggtg ctggtgcgca actttgtgcc ggcccatgaa cagatcatca accatgattg 780

ggaagtggcc gccatcgcca aagatgccta tgatatcgaa ggcaaaacca tcgccaccat 840

cggcgccggc cgcatcggct atcgcgtgct ggaacgcctg ctgccgttta acccgaaaga 900

actgctgtat tatgattatc aggccctgcc gaaagaagcc gaagaaaaag tgggcgcccg 960

ccgcgtggaa aacatcgaag aactggtggc ccaggccgat atcgtgaccg tgaacgcccc 1020

gctgcatgcc ggcaccaaag gcctgatcaa caaagaactg ctgagcaaat ttaaaaaagg 1080

cgcctggctg gtgaacaccg cccgcggcgc catctgcgtg gccgaagatg tggccgccgc 1140

cctggaaagc ggccagctgc gcggctatgg cggcgatgtg tggtttccgc agccggcccc 1200

gaaagatcat ccgtggcgcg atatgcgcaa caaatatggc gccggcaacg ccatgacccc 1260

gcattatagc ggcaccaccc tggatgccca gacccgctat gccgaaggca ccaaaaacat 1320

cctggaaagc ttttttaccg gcaaatttga ttatcgcccg caggatatca tcctgctgaa 1380

cggcgaatat gtgaccaaag cctatggcaa acatgataaa aaataactcg agtctggtaa 1440

agaaaccgct gctgcgaaat ttgaacgcca gcacatggac tcgtctacta gcgcagctta 1500

attaacctag gctgctgcca ccgctgagca ataactagca taacccccttg gggcctctaa 1560

acgggtcttg aggggttttt tgctgaaacc tcaggcattt gagaagcaca cggtcacact 1620

gcttccggta gtcaataaac cggtaaacca gcaatagaca taagcggcta tttaacgacc 1680

ctgccctgaa ccgacgacaa gctgacgacc gggtctccgc aagtggcact tttcggggaa 1740

atgtgcgcgg aacccctatt tgtttatttt tctaaataca ttcaaatatg tatccgctca 1800

tgaattaatt cttagaaaaa ctcatcgagc atcaaatgaa actgcaattt attcatatca 1860

ggattatcaa taccatattt ttgaaaaagc cgtttctgta atgaaggaga aaactcaccg 1920

aggcagttcc ataggatggc aagatcctgg tatcggtctg cgattccgac tcgtccaaca 1980

tcaatacaac ctattaattt cccctcgtca aaaataaggt tatcaagtga gaaatcacca 2040

tgagtgacga ctgaatccgg tgagaatggc aaaagtttat gcatttcttt ccagacttgt 2100

tcaacaggcc agccattacg ctcgtcatca aaatcactcg catcaaccaa accgttattc 2160

attcgtgatt gcgcctgagc gagacgaaat acgcggtcgc tgttaaaagg acaattacaa 2220

acaggaatcg aatgcaaccg gcgcaggaac actgccagcg catcaacaat attttcacct 2280

gaatcaggat attcttctaa tacctggaat gctgttttcc cggggatcgc agtggtgagt 2340

aaccatgcat catcaggagt acggataaaa tgcttgatgg tcggaagagg cataaattcc 2400

gtcagccagt ttagtctgac catctcatct gtaacatcat tggcaacgct acctttgcca 2460

tgtttcagaa acaactctgg cgcatcgggc ttcccataca atcgatagat tgtcgcacct 2520

gattgcccga cattatcgcg agcccattta tacccatata aatcagcatc catgttggaa 2580

tttaatcgcg gcctagagca agacgtttcc cgttgaatat ggctcatact cttccttttt 2640

caatattatt gaagcattta tcagggttat tgtctcatga gcggatacat atttgaatgt 2700

atttagaaaa ataaacaaat aggcatgcag cgctcttccg cttcctcgct cactgactcg 2760

ctacgctcgg tcgttcgact gcggcgagcg gtgtcagctc actcaaaagc ggtaatacgg 2820

ttatccacag aatcagggga taaagccgga aagaacatgt gagcaaaaag caaagcaccg 2880

gaagaagcca acgccgcagg cgtttttcca taggctccgc ccccctgacg agcatcacaa 2940

aaatcgacgc tcaagccaga ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accaggcgtt 3000

tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc ctgccgctta ccggatacct 3060

gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct gttggtatct 3120

cagttcggtg taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc 3180

cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc aacccggtaa gacacgactt 3240

atcgccactg gcagcagcca ttggtaactg atttagagga ctttgtcttg aagttatgca 3300

cctgttaagg ctaaactgaa agaacagatt ttggtgagtg cggtcctcca acccacttac 3360

cttggttcaa agagttggta gctcagcgaa ccttgagaaa accaccgttg gtagcggtgg 3420

tttttcttta tttatgagat gatgaatcaa tcggtctatc aagtcaacga acagctattc 3480

cgttactcta gatttcagtg caatttatct cttcaaatgt agcacctgaa gtcagcccca 3540

tacgatataa gttgtaattc tcatgttagt catgccccgc gcccaccgga aggagctgac 3600

tgggttgaag gctctcaagg gcatcggtcg agatcccggt gcctaatgag tgagctaact 3660

tacattaatt gcgttgcgct cactgcccgc tttccagtcg ggaaacctgt cgtgccagct 3720

gcattaatga atcggccaac gcgcggggag aggcggtttg cgtattgggc gccagggtgg 3780

tttttctttt caccagtgag acgggcaaca gctgattgcc cttcaccgcc tggccctgag 3840

agagttgcag caagcggtcc acgctggttt gccccagcag gcgaaaatcc tgtttgatgg 3900

tggttaacgg cgggatataa catgagctgt cttcggtatc gtcgtatccc actaccgaga 3960

tgtccgcacc aacgcgcagc ccggactcgg taatggcgcg cattgcgccc agcgccatct 4020

gatcgttggc aaccagcatc gcagtgggaa cgatgccctc attcagcatt tgcatggttt 4080

gttgaaaacc ggacatggca ctccagtcgc cttcccgttc cgctatcggc tgaatttgat 4140

tgcgagtgag atatttatgc cagccagcca gacgcagacg cgccgagaca gaacttaatg 4200

ggcccgctaa cagcgcgatt tgctggtgac ccaatgcgac cagatgctcc acgcccagtc 4260

gcgtaccgtc ttcatgggag aaaataatac tgttgatggg tgtctggtca gagacatcaa 4320

gaaataacgc cggaacatta gtgcaggcag cttccacagc aatggcatcc tggtcatcca 4380

gcggatagtt aatgatcagc ccactgacgc gttgcgcgag aagattgtgc accgccgctt 4440

tacaggcttc gacgccgctt cgttctacca tcgacaccac cacgctggca cccagttgat 4500

cggcgcgaga tttaatcgcc gcgacaattt gcgacggcgc gtgcagggcc agactggagg 4560

tggcaacgcc aatcagcaac gactgtttgc ccgccagttg ttgtgccacg cggttgggaa 4620

tgtaattcag ctccgccatc gccgcttcca ctttttcccg cgttttcgca gaaacgtggc 4680

tggcctggtt caccacgcgg gaaacggtct gataagagac accggcatac tctgcgacat 4740

cgtataacgt tactggtttc acattcacca ccctgaattg actctcttcc gggcgctatc 4800

atgccatacc gcgaaaggtt ttgcgccatt cgatggtgtc cgggatctcg acgctctccc 4860

ttatgcgact 4870