(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0020364
(43) 공개일자 2013년02월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/70 (2006.01) *C12N 15/31* (2006.01)
C12P 7/64 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0082962
(22) 출원일자 2011년08월19일
심사청구일자 2011년08월19일

(71) 출원인
인하대학교 산학협력단
인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동)
(72) 발명자
윤현식
서울특별시 강남구 압구정로 201, 현대 아파트 87동 505호 (압구정동)
도경희
인천광역시 연수구 먼우금로 126, 현대대림2차 아파트 201동 503호 (동춘동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김순웅

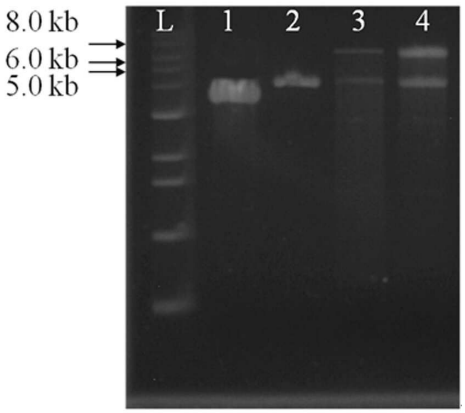
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **지방산을 생산하는 재조합 대장균, 및 이를 이용한 지방산의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 지방산을 생산하는 재조합 대장균, 및 이를 이용한 지방산의 제조방법에 관한 것으로, 상기 대장균 K-12 MG1655의 베타-케토 아실-아실 운반 단백질 합성효소I(KASI, β-keto acyl-acyl carrier protein synthase I)의 유전정보를 보유한 뉴클레오티드(*fabB*, 서열번호 1), 대장균 K-12 MG1655의 베타-케토 아실-아실 운반 단백질 합성효소II(KASII, β-keto acyl-acyl carrier protein synthaseI)의 유전정보를 보유한 뉴클레오티드(*fabF*, 서열번호 2), 및 대장균 K-12 MG1655의 티오에스터라제I(thioesteraseI)의 유전정보를 보유한 뉴클레오티드(*tesA*, 서열번호 3)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 뉴클레오티드를 포함하는 재조합 플라스미드에 의해 형질전환된 것을 특징으로 한다. 본 발명에 따른 지방산을 생산하는 재조합 대장균은, 2 종류의 유전자 *fabB*와 *tesA* 또는 *fabF*와 *tesA*가 하나의 플라스미드에 위치하여 동시에 발현되는 시스템을 구축하는 동시에 숙주균주인 대장균(*E.coli* BL21(DE3))에 들어가 공동으로 형질전환을 일으킴으로써, 두 유전자를 동시에 발현시키는 효과가 있다. 또한, 상기 재조합 대장균을 이용하여 지방산을 제조한 경우, 불포화지방산 박센산(vaccenic acid)의 비율과 양이 크게 늘어나, 불포화 지방산을 효과적으로 생산할 수 있다.

대 표 도 - 도11



(72) 발명자

노용호

인천광역시 남구 독배로389번길 50-25 (용현동)

김세경

인천광역시 남동구 만수로111번길 38, 신동아아파트 6동 1505호 (만수동)

김다혜

경기도 부천시 원미구 조마루로 134, 보람마을아파트 1117동 1502호 (중동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2010-0028809
부처명	교육과학기술부
연구사업명	기후변화대응 기초원천기술개발사업
연구과제명	바이오매스를 이용한 C3-C6 화합물 대체연료 생산 원천기술 개발
주관기관	서강대학교 산학협력단
연구기간	2010.09.30 ~ 2011.09.29

특허청구의 범위

청구항 1

대장균 K-12 MG1655의 베타-케토 아실-아실 운반 단백질 합성효소I(KASI, β-keto acyl-acyl carrier protein synthaseI)의 유전정보를 보유한 뉴클레오티드 (*fabB*, 서열번호 1), 대장균 K-12 MG1655의 베타-케토 아실-아실 운반 단백질 합성효소II(KASII, β-keto acyl-acyl carrier protein synthaseII)의 유전정보를 보유한 뉴클레오티드(*fabF*, 서열번호 2), 및 대장균 K-12 MG1655의 티오에스터라제I (thioesteraseI)의 유전정보를 보유한 뉴클레오티드(*tesA*, 서열번호 3)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 뉴클레오티드를 포함하는 재조합 플라스미드에 의해 형질전환된 지방산을 생산하는 재조합 대장균.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 재조합 플라스미드는 pEcoliNterm 6xHN::*fabB*, pEcoliNterm 6xHN::*fabF*, 및 pCDF-1b::*tesA*로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 재조합 대장균.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 재조합 플라스미드는 (pEcoliNterm 6xHN::*fabB* + pCDF-1b::*tesA*) 또는 (pEcoliNterm 6xHN::*fabF* + pCDF-1b::*tesA*) 중에서 선택된 것임을 특징으로 하는 재조합 대장균.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 재조합 대장균은 *E.coli* BL21::pEcoliN::*fabB* + pCDF::*tesA* 인 것을 특징으로 하는 재조합 대장균(수탁번호 : KCTC 11996BP).

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 재조합 대장균은 *E.coli* BL21::pEcoliN::*fabF* + pCDF::*tesA* 인 것을 특징으로 하는 재조합 대장균(수탁번호 : KCTC 11997BP).

청구항 6

1) 제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항의 재조합 대장균을 배양하는 단계,

2) 상기 1)단계에서 얻은 배양액을 원심분리하여 균체와 배지를 분리하는 단계,

3) 상기 2)단계에서 분리된 균체에 황산과 메탄올의 혼합용액을 첨가하고, 질소를 충전한 다음, 에스터화 반응을 수행하는 단계,

4) 상기 3)단계의 반응액에 헥산과 증류수를 첨가하여 층을 분리하는 단계, 및

5) 상기 4)단계에서 분리된 헥산층을 분석하여 지방산의 조성을 분석하는 단계를 포함하는, 지방산의 제조방법.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 1)단계에서 재조합 대장균은 *E.coli* BL21::pEcoliN::*fabB* + pCDF::*tesA* (수탁번호 : KCTC 11996BP)인 것을 특징으로 하는 지방산의 제조방법.

청구항 8

제 6항에 있어서, 상기 1)단계에서 재조합 대장균은 *E.coli* BL21::pEcoliN::*fabF* + pCDF::*tesA* (수탁번호 : KCTC 11997BP)인 것을 특징으로 하는 지방산의 제조방법.

청구항 9

제 6항에 있어서, 상기 5)단계에서 지방산의 조성 분석은 가스크로마토그래피를 수행하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 지방산의 제조방법.

청구항 10

제 6항에 있어서, 상기 5)단계에서 지방산은 박센산(vaccenic acid)인 것을 특징으로 하는 지방산의 제조방법.

명 세 서

기 술 분 야

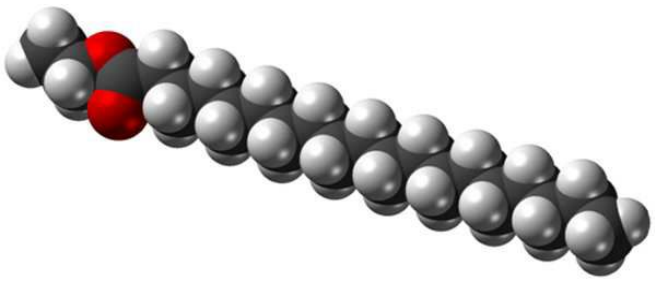
[0001] 본 발명은 지방산을 생산하는 재조합 대장균, 및 이를 이용한 지방산의 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 오늘날 세계 경제의 높은 성장은 지속적인 에너지 사용 증가를 바탕으로 이루어지고 있다. 이 에너지 사용 증가는 주로 화석연료인 석유, 석탄 및 가스의 소비 증가로 이어지며, 이것은 매장량이 한정된 화석연료의 가격상승의 결과로 나타난다. 국내의 2000~2005년 사이의 원유 수입액은 평균 11.1%의 증가를 보였고, 국내 물가의 상승 원인이 되었다. 특히, 국내 연료시장은 대부분 수입에 의존하기 때문에 상승되는 가격에 의한 피해를 막기 위하여 대체 원료의 개발의 필요성이 대두되고 있다.

[0003] 바이오 연료(biofuel)는 살아있는 바이오매스(biomass)로부터 유기체뿐만 아니라 대사활동에 의한 부산물을 포함하는 생산물을 이용한 신재생에너지의 종류이다. 바이오 연료의 대표적인 예로는 현재 수송연료로 사용이 되고 있는 바이오에탄올(bioethanol), 바이오디젤(biodiesel), 메탄올(methanol), 바이오가스(biogas) 및 고형연료 등이 있으며, 이들 모두 전력생산이나 수송연료로서의 가능성이 있다.

[0004] 바이오디젤은 하기와 같은 구조로 표시되는 화학적으로 긴 지방산 고리를 가진 단일 알킬에스터(alkyl ester) 혼합물이다. 바이오디젤은 경유와 매우 비슷한 물리적 특성을 가지기 때문에, 현재 사용되는 내연기관의 교체없이 사용할 수 있는 장점이 있다. 또한 기존시설을 통해 운반, 판매가 가능하여 운송연료의 대표적인 대체에너지로 꼽히고 있다. 바이오디젤의 품질은 원료에 따라 결정이 되는데, 포화지방산이 많이 함유된 경우에는 상대적인 산화안정성은 우수하지만 겨울철에 저온유동성이 나쁜 단점이 있다. 반면 불포화지방산이 많은 경우에는 저온유동성이 좋지만 이중결합의 수가 많을 경우 산화안정성이 떨어지는 단점이 있다. 따라서, 가장 안정적인 원료는 올레인산(oleic acid, octadecenoic acid, C18:1Δ^{11})의 함량이 60%가 넘는 바이오디젤로 알려져 있다.



[0005]

[0006] 바이오매스 원료가 바이오디젤의 성분변화 및 물리적 특성변화에 미치는 영향에 대해 각각 하기 표 1 및 표 2에 나타내었다.

표 1

[0007]

	바이오디젤의 성분변화					
	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3
야자나무	42.6	0.3	4.4	40.5	10.1	0.2
대두	13.9	0.3	2.1	23.2	56.2	4.3
평지씨	3.5	0	0.9	64.1	22.3	8.2

표 2

[0008]

	바이오디젤의 물리적 특성변화		
	야자나무	대두	평지씨

저온 필터 막힘점 (CFPP, cold filter plugging point) (℃)	12	-3	-21
산화안정성 (110℃, hr)	10	2~3	5~6

[0009] 한편, 대장균(*Escherichia coli*)의 지방산 합성과정은, 포유동물과는 다른 타입 2(type 2)의 지방산 합성 시스템(fatty acid synthesis, FAS)을 가지고 있다. 이 시스템은 주로 대장균을 모델로 많은 연구가 진행되었다. 지방산 합성 타입 2 시스템은 개시단계와 아실기의 신장단계에서 기본적인 효소들을 가지고 있으며, 이러한 효소의 신장단계는 도 1에 나타내었다. 대장균에 필요한 지방산은 이러한 반복적인 합성으로 생산되며, 주로 생산되는 포화지방산으로는 탄소수 16개인 팔미트산(palmitic acid, hexadecanoic acid)과 불포화지방산으로는 탄소수 18개에 이중결합이 하나 존재하는 박센산(vaccenic acid, *cis*-11-octadecanoic acid)이 있다.

[0010] 대장균의 fab(fatty acid biosynthesis) 유전자들은 지방산 신장 단계에 관여하는 효소 생산 유전자들이다. 지방산의 합성은 크게 중합(condensation)과정, 환원(reduction)과정, 신장(elongation)과정을 거친다. 이 중에서 *fabB, fabF* 유전자는 지방산 신장단계의 마지막 단계에 작용하는 효소 KASI(β-ketoacyl-acyl-carrier-protein synthaseI)와 KASII(β-ketoacyl-ACP synthaseII)의 정보를 가지고 있는 유전자로서, 반복되는 지방산 생합성 과정에서 지방산-ACP에 말로닐-ACP를 결합함으로써 지방산의 탄소수를 2개 늘려 지방산의 길이를 신장시키는 역할을 한다. 또한, *tesA* 유전자는 티오에스터라제I(thioesteraseI) 효소를 만들어 지방 아실-ACP를 자유지방산(free fatty acid)으로 전환하는 역할을 한다. 대장균의 지방산 생합성 관여 효소 및 유전자 정보는 표 3에 나타내었다.

표 3

[0011]

유전자	발현 단백질	돌연변이 경우 나타나는 표현형 (phenotype) 변화
aas	Acyl-ACP tynthetase	lysophosphatidyl ethanolamine 축적
accA	Acetyl-CoA carboxylase	Carboxyltransferase α subunit
accB	Acetyl-CoA carboxylase	BCCP subunit
accC	Acetyl-CoA carboxylase	Biotin carboxylase subunit
accD	Acetyl-CoA carboxylase	Carboxyltranferase β subunit
acpP	ACP	ACP structural gene
acpS	ACP synthetase	apo-ACP 축적
cfa	Cyclopropane fatty acid synthase	Cells lack cyclopropane fatty acids
fabA	β-Hydroxydecanoyl ACP dehydrase	불포화지방산 자가영양 (unsaturated fatty acid auxotroph)
fabAup	-	포화지방산(saturated fatty acid) 과생산
fabB	β-Ketoacyl-ACP synthaseI	불포화지방산 자가영양 (unsaturated fatty acid auxotroph)
fabD	Malonyl-CoA:ACP transacylase	온도에 따라 포화지방산, 불포화지방산의 자가영양(auxotroph) 필요
fabE	Acetyl-CoA carboxylase	-
fabF	β-Ketoacyl-ACP synthaseII	온도에따라 조절
fabG	β-Ketoacyl-ACP synthase	-
fabH	β-Ketoacyl-ACP synthaseIII	-
fadR	Transcriptional reglulator of *fabA*	-
fatA		trans-불포화지방산의 이용
lpxA	UDP-Glc-NAc acyltransferase	지질 A(lipid A) 축적
orf-17	Putative dehydrase	-
plsB	*sn*-Glycerol-3-phosphate acyltransferase	Glycerol-3-phosphate 자가영양
plsC	1-Acylglycerol phosphaste acyltransferase	-
plsX	Unkown	PlsB 표현현에 필요
tesA	ThioesteraseI	효소활성 결핍
tesB	ThioesteraseII	효소활성 결핍

[0012] 상기와 같이, 화석연료의 대체 에너지로서 바이오디젤로 변환이 가능한 지방산에 대한 관심이 점점 증대되고 있으며, 이로 인해 지방산을 생합성하는 대장균에 대한 관심도 증대되고 있어, 이에 관한 연구가 꾸준히 진행되고 있다.

[0013] 따라서, 신재생에너지 개발의 일환으로 바이오디젤로 전환하였을 때 물리적 특성이 유리한 불포화 지방산의 조성을 높일 수 있는 균주의 개발의 필요성이 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 본 발명자들은 불포화 지방산의 조성을 높일 수 있는 균주에 대하여 연구하던 중, 대장균의 지방산 합성 개시단계에 위치하며 지방산 신장단계에서 탄소 사슬을 신장의 마지막 단계에 작용하는 효소(KASI, KASII)의 정보를 가진 두개의 유전자 *fabB*, *fabF*, 및 티오에스터라제I(thioesteraseI) 정보를 가진 유전자 *tesA*의 염기서열을 포함하는 재조합 플라스미드를 제조하고 이에 의해 형질전환된 재조합 대장균을 제조하였으며, 상기 재조합 대장균을 배양하고 이로부터 지방산을 추출하여 불포화지방산 박센산(vaccenic acid)의 비율과 양이 크게 늘어남을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

[0015] 따라서, 본 발명은 지방산을 생산하는 재조합 대장균, 및 이를 이용한 지방산의 제조방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0016] 본 발명은 대장균 K-12 MG1655의 베타-케토 아실-아실 운반 단백질 합성효소I(KASI, β-keto acyl-acyl carrier protein synthaseI)의 유전정보를 보유한 뉴클레오티드(*fabB*, 서열번호 1), 대장균 K-12 MG1655의 베타-케토 아실-아실 운반 단백질 합성효소II(KASII, β-keto acyl-acyl carrier protein synthaseII)의 유전정보를 보유한 뉴클레오티드(*fabF*, 서열번호 2), 및 대장균 K-12 MG1655의 티오에스터라제I(thioesteraseI)의 유전정보를 보유한 뉴클레오티드(*tesA*, 서열번호 3)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 뉴클레오티드를 포함하는 재조합 플라스미드에 의해 형질전환된 지방산을 생산하는 재조합 대장균을 제공한다.

[0017] 또한, 본 발명은

[0018] 1) 상기 재조합 대장균을 배양하는 단계,

[0019] 2) 상기 1)단계에서 얻은 배양액을 원심분리하여 균체와 배지를 분리하는 단계,

[0020] 3) 상기 2)단계에서 분리된 균체에 황산과 메탄올의 혼합용액을 첨가하고, 질소를 충전한 다음, 에스터화 반응을 수행하는 단계,

[0021] 4) 상기 3)단계의 반응액에 헥산과 증류수를 첨가하여 층을 분리하는 단계, 및

[0022] 5) 상기 4)단계에서 분리된 헥산층을 분석하여 지방산의 조성을 분석하는 단계를 포함하는, 지방산의 제조방법을 제공한다.

[0023] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.

[0024] 본 발명에 따른 지방산을 생산하는 재조합 대장균은, 대장균 K-12 MG1655의 베타-케토 아실-아실 운반 단백질 합성효소I(KASI, β-keto acyl-acyl carrier protein synthaseI)의 유전정보를 보유한 뉴클레오티드(서열번호 1), 대장균 K-12 MG1655의 베타-케토 아실-아실 운반 단백질 합성효소II (KASII, β-keto acyl-acyl carrier protein synthaseII)의 유전정보를 보유한 뉴클레오티드(서열번호 2), 및 대장균 K-12 MG1655의 티오에스터라제I(thioesteraseI)의 유전정보를 보유한 뉴클레오티드(서열번호 3)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 뉴클레오티드를 포함하는 재조합 플라스미드에 의해 형질전환된 것을 특징으로 한다.

[0025] 본 발명에 사용된 유전자 정보는 대장균(*E.coli*K-12 MG1655)의 유전 정보를 바탕으로 하여, 지방산 합성 개시단계에 위치하며 지방산 신장단계에서 탄소 사슬을 신장의 마지막 단계에 작용하는 효소(KASI, KASII)의 정보를 가진 두개의 유전자 *fabB*, *fabF*, 및 지방 아실-ACP(fatty acyl-ACP)를 자유 지방산(free fatty acid)으로 전환하는 효소인 티오에스터라제I(thioesteraseI) 정보를 가진 유전자 *tesA*의 염기서열을 이용한다. 구체적으로는, 중합효소연쇄반응(PCR)을 위한 대장균의 주형 유전자를 얻기 위해, 대장균(*E.coli*K-12 MG1655)을 배양하고 원심분리하여 DNA를 분리한다. 그 다음, 분리된 DNA를 주형으로 하여 각각의 유전자(*fabB*, *fabF*, 및 *tesA*)의 프라이머를 이용하여 중합효소연쇄반응을 수행하여 목적 유전자를 확보한다. 확보한 유전자 뉴클레오티드(*fabB*, *fabF*, 및 *tesA*)와 단백질 발현을 위한 플라스미드(pEcoliNterm 6xHN, pCDF-1b)를 제한효소 반응과 라이게이션(ligation) 반응을 수행하여 재조합 플라스미드를 제조한다[pEcoliNterm 6xHN::*fabB*, pEcoliNterm 6xHN::*fabF*, pCDF-1b::*tesA*]. 상기 플라스미드는 CDF ori를 보유하며(플라스미드 pEcoliNterm 6xHN의 경우는 pBR322 ori를

더 포함), 항생제인 암피실린 내성 유전자, 염기서열 분석을 위한 T7 프로모터를 보유하며, 유전자 발현 조절을 목적으로 하는 *lac* operator를 보유한다.

[0026] 상기 제조된 재조합 플라스미드를 이용하여 열충격 형질전환방법을 통해 재조합 대장균을 제조한다[*E.coli* BL21::pEcoliN::*fabB*, *E.coli* BL21::pEcoliN::*fabF*, *E.coli* BL21::pEcoliN::*fabB* + pCDF-1b::*tesA* 및 *E.coli* BL21::pEcoliN::*fabF* + pCDF-1b::*tesA*]. 상기 제조된 재조합 대장균은 항생제가 포함된 고체 LB 배지에서 원형 콜로니 형태로 자라는 것을 확인하였으며, 이 콜로니를 암피실린이 포함된 액체 LB 배지에서 배양하고 플라스미드를 추출한 후 제한효소로 처리한 플라스미드의 유전자(*fabB*, *fabF*, 및 *tesA*)와 대장균 K-12 MG1655의 유전자와의 크기 및 염기서열을 비교하여 일치함을 확인하였다. 상기 제조된 재조합 균주(*E.coli* BL21::pEcoliN::*fabB* + pCDF::*tesA* 및 *E.coli* BL21::pEcoliN::*fabF* + pCDF::*tesA*)를 2011년 8월 9일자로 한국생명공학연구원 생물자원센터 유전자은행 (KCTC)에 기탁하였으며, 각각 KCTC 11996BP 및 KCTC 11997BP의 수탁번호를 부여받았다.

[0027] 상기 제조된 재조합 대장균(*E.coli* BL21::pEcoliN::*fabB* + pCDF::*tesA* 및 *E.coli* BL21::pEcoliN::*fabF* + pCDF::*tesA*)을 배양하고, 원심분리하여 균체와 배지를 분리한 후, 분리된 균체에 황산과 메탄올의 혼합용액을 첨가하고, 질소를 충전한 다음, 에스터화 반응을 수행하고, 반응액에 헥산과 증류수를 첨가하여 층을 분리하고 헥산층을 가스크로마토그래피를 수행하여 지방산의 조성을 확인한 결과, 불포화지방산 박센산(vaccenic acid)의 비율과 양이 크게 늘어남을 확인하였다.

[0028] 상기한 바와 같이, 본 발명에 따른 재조합 대장균은 불포화 지방산을 효과적으로 생산함으로써, 바이오연료로 유용하게 사용될 수 있다.

발명의 효과

[0029] 본 발명에 따른 지방산을 생산하는 재조합 대장균은, 2 종류의 유전자 *fabB*와 *tesA* 또는 *fabF*와 *tesA*가 하나의 플라스미드에 위치하여 동시에 발현되는 시스템을 구축하는 동시에 숙주 균주인 대장균(*E.coli* BL21(DE3))에 들어가 공동으로 형질전환을 일으킴으로써, 두 유전자를 동시에 발현시키는 효과가 있다. 또한, 상기 재조합 대장균을 이용하여 지방산을 제조한 경우, 불포화지방산 박센산 (vaccenic acid)의 비율과 양이 크게 늘어나, 불포화 지방산을 효과적으로 생산할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0030] 도 1은 대장균(*E. coli*)의 지방산 생합성 과정을 나타낸 도이다.

도 2는 대장균 내 단백질 발현을 위한 플라스미드 pEcoliNterm 6xHN의 구조 및 클로닝 사이트를 나타낸 도이다.

도 3은 대장균 내 단백질 발현을 위한 플라스미드 pCDF-1b의 구조 및 클로닝 사이트를 나타낸 도이다.

도 4는 대장균 내 단백질 발현을 위한 플라스미드 pEcoliNterm 6xHN와 *fabB* 유전자 정보를 포함한 뉴클레오티드를 결합시킨 재조합 플라스미드(pEcoliNterm 6xHN::*fabB*)의 구조 및 크기 변화를 나타낸 도이다.

도 5는 대장균 내 단백질 발현을 위한 플라스미드 pEcoliNterm 6xHN와 *fabF* 유전자 정보를 포함한 뉴클레오티드를 결합시킨 재조합 플라스미드(pEcoliNterm 6xHN::*fabF*)의 구조 및 크기 변화를 나타낸 도이다.

도 6은 대장균 내 단백질 발현을 위한 플라스미드 pCDF-1b와 *tesA* 유전자 정보를 포함한 뉴클레오티드를 결합시킨 재조합 플라스미드(pCDF-1b::*tesA*)의 구조 및 크기 변화를 나타낸 도이다.

도 7은 재조합 플라스미드를 제한효소로 처리하여 선형이 된 pEcoliNterm 6xHN::*fabB*와 pEcoliNterm 6xHN::*fabF*의 크기를 확인한 도이다(L: 1kb DNA 표지 선별자(ladder), 1: 플라스미드 pEcoliNterm 6xHN::*fabB*, 2: 플라스미드 pEcoliNterm 6xHN::*fabF*).

도 8은 유전자의 염기서열 분석을 이용하여 재조합 플라스미드를 제한효소로 처리하여 선형이 된 플라스미드 pEcoliNterm 6xHN::*fabB*의 *fabB* 유전자의 염기서열과 대장균 K-12 MG1655의 *fabB* 유전자의 염기서열의 분석결과를 나타낸 도이다.

도 9는 유전자의 염기서열 분석을 이용하여 재조합 플라스미드를 제한효소로 처리하여 선형이 된 플라스미드 pEcoliNterm 6xHN::*fabF*의 *fabF* 유전자의 염기서열과 대장균 K-12 MG1655의 *fabF* 유전자의 염기서열의 분석결과를 나타낸 도이다.

도 10은 *fabB* 유전자의 아미노산 번역시 나타나는 아미노산 서열의 일치함을 확인한 도이다.

도 11은 재조합 플라스미드를 제한효소로 처리하여 선형이 된 pEcoliNterm 6xHN::*fabB*와 pCDF-1b::*tesA*, 그리고 pEcoliNterm 6xHN::*fabF*와 pCDF-1b::*tesA*의 크기를 확인한 도이다(L: 1kb DNA 표지 선별자(ladder), 2: pCDF-1b, 3: pEcoliNterm 6xHN::*fabB*와 pCDF-1b::*tesA*, 4: pEcoliNterm 6xHN::*fabF*와 pCDF-1b::*tesA*).

도 12는 유전자의 염기서열 분석을 이용하여 재조합 플라스미드를 제한효소로 처리하여 선형이 된 플라스미드 pCDF-1b::*tesA*의 *tesA* 유전자의 염기서열과 대장균 K-12 MG1655의 *tesA* 유전자의 염기서열 분석결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0032] **실시예 1 : 목적 유전자의 정보를 보유한 뉴클레오티드를 포함하는 재조합 플라스미드의 제조**

[0033] **1. PCR을 이용한 유전자 증폭**

[0034] 본 발명에 사용된 유전자 정보는 대장균(*E.coli*K-12 MG1655)의 유전 정보를 바탕으로 하여, 지방산 합성 개시단계에 위치하며 지방산 신장단계에서 탄소 사슬을 신장의 마지막 단계에 작용하는 효소(KASI, KASII)의 정보를 가진 두개의 유전자 *fabB*, *fabF*, 및 지방 아실-ACP(fatty acyl-ACP)를 자유 지방산(free fatty acid)으로 전환하는 효소인 티오에스터라제I(thioesteraseI) 정보를 가진 유전자 *tesA*의 염기서열을 이용하였다. 염기서열 정보는 KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, www.genome.jp/kegg/)에서 참고하였으며, 제작한 프라이머를 이용하여 중합효소연쇄반응(PCR, polymerase chin reaction)을 수행하여 목적 유전자를 확보하였다. 목적 유전자의 증폭반응을 위한 프라이머 제작 및 제한효소는 표 4에 나타내었다.

표 4

[0035]

목적 유전자	발현 효소	플라스미드	프라이머	제한효소
fabB	KASI (β-keto acyl-acyl carrier protein synthaseI)	pEcoliNterm-6xHN	5'-GGA AGA TCT GAA GGA GAT ATA CCA TGA AAC GTG CAG TGA TTA CTG GCC-3' (서열번호 4)	BglII, NotI
			5'-ATA AGA ATG CGG CCG CTT AAT CTT TCA GCT TGC GCA TTA CCA-3' (서열번호 5)	
fabF	KASII (β-keto acyl-acyl carrier protein synthaseII)	pEcoliNterm-6xHN	5'-AAA ACT GCA GGT GTG TCT AAG CGT CGT GTA GTT GTG A-3' (서열번호 6)	PstI, SalI
			5'-ACG CGT CGA CTT AGA TCT TTT TAA AGA TCA AAG AAC C-3' (서열번호 7)	
tesA	thioesteraseI	pCDF-1b	5'-CGG GAT CCC ATG ATG AAC TTC AAC AAT GTT TTC CG-3' (서열번호 8)	BamHI, PstI
			5'-GGA AGA TCT GAA GGA GAT ATA CCA TGA AAC GTG CAG TGA TTA CTG GCC-3' (서열번호 9)	

[0036] 중합효소연쇄반응을 위한 대장균의 주형 유전자는 하기와 같은 방법으로 획득하였다. 먼저, 대장균 K12 MG1655를 배양한 후, 대장균 배양액을 원심분리하고 상등액을 취하였다. 상등액에 5㎖의 리소자임 용액을 첨가하여 혼합한 후, 투명한 점성이 나타날 때까지 혼합하였다. 점성이 나타나면 2㎖의 10% SDS(sodium dodecyl sulfate) 용액을 첨가하고 30분 동안 반응하였다. 혼합물을 0.7㎖씩 마이크로튜브에 분주하고, PCI용액(페놀, 클로로포름, 이소아밀 알콜)을 첨가하고 층 분리가 일어나지 않을 때까지 혼합하였다. 이 후 원심분리하고 상등액을 모아 같은 방법으로원심분리 하였다. 모아진 상등액 부피의 1/10 만큼 pH 6으로 적정한 3M 아세테이트와 두 배의 에탄올을 첨가하여 DNA를 분리하였다. 분리한 DNA를 주형으로 하여, 각각의 유전자들(*fabB*, *fabF*, *tesA*)의 프라이머와 함께 중합효소연쇄반응을 이용하여 유전자를 증폭하였다. 중합효소연쇄반응의 조건은 통상적인 조건으로 변성온도 (denaturing temperature) 94℃, 결합온도(annealing temperature) 65℃, 신장온도(extension temperature) 72℃에서 진행되었으며, 총 30회 반응을 수행하였다. 반응에 사용한 중합효소(polymerase)는 NEB(New England Biolabs Inc.) 사의 제품을 사용하였다. 증폭된 유전자 물질은 정제과정을 거

치고, 0.7% 아가로오스 겔 (agarose gel)에서 확인하였다.

[0037] **2. 목적 유전자의 정보를 보유한 뉴클레오티드를 포함하는 재조합 플라스미드의 제조**

[0038] 확보한 유전자 뉴클레오티드와 단백질 발현 벡터를 말단부위를 제외한 다른 부위를 절단하지 않는 공통된 제한효소를 사용하여 절단하고, 전기영동으로 확인하였다. 확인된 아가로오스 겔의 밴드(band)를 절단하여 50℃에서 녹인 후, 정제 과정을 거쳐 라이게이션(ligation)을 4℃에서 수행하여 선형의 pEcoliNterm 6xHN에 *fabB*, *fabF*을 결합시킨 2종류의 원형 플라스미드(pEcoliNterm 6xHN::*fabB*, pEcoliNterm 6xHN::*fabF*)와, 선형의 pCDF-1b에 *tesA*를 결합시킨 1종류의 원형 플라스미드(pCDF-1b::*tesA*)를 제조하였다.

[0039] 대장균 내 단백질 발현을 위한 플라스미드 pEcoliNterm 6xHN 또는 pCDF-1b의 구조 및 클로닝 사이트는 각각 도 2 및 도 3에 나타내었으며, 플라스미드 pEcoliNterm 6xHN와 *fabB* 또는 *fabF*의 유전자 정보를 포함한 뉴클레오티드를 결합시킨 재조합 플라스미드의 구조 및 크기 변화는 각각 도 4 및 도 5에 나타내었으며, 플라스미드 pCDF-1b와 *tesA* 유전자 정보를 포함한 뉴클레오티드를 결합시킨 재조합 플라스미드의 구조 및 크기 변화는 도 6에 나타내었다.

[0040] **실시예 2 : 재조합 플라스미드에 의해 형질전환된 재조합 대장균의 제조**

[0041] **1. 재조합 대장균의 제조(*Ecoli*BL21::pEcoliN::*fabB* 및 *Ecoli*BL21::pEcoliN::*fabF*)**

[0042] 재조합 대장균을 제조하기 위해, 목적 유전자의 운반을 목적으로 하는 플라스미드 pEcoliNterm 6xHN::*fabB*, pEcoliNterm 6xHN::*fabF*를 숙주세포에 넣기 전, 벡터의 안정성과 숙주 균주로의 형질전환시 효율 향상을 위해 대장균 XL1-Blue (*E.coli XL1-B*)를 이용하여 컴피턴트 세포(competent cell)를 제조하여 일차 형질전환을 시도하였다.

[0043] 컴피턴트 세포는 하기와 같은 과정으로 제조하였다. 37℃에서 배양한 대장균XL1-Blue을 계대배양하여, 생장 곡선의 지수기에 접어들었을 때 회수하여, 0℃에서 30분 동안 보관하였다. 배양액을 5000rpm에서 원심분리한 후 상등액을 제거하고, 세포벽을 플라스미드 이동이 용이하게 처리하기 위하여 $MgCl_2$ 용액을 넣어 30분 동안 0℃에서 보관하였다. 상기 용액을 다시 원심분리 하여 상등액을 제거하고 $CaCl_2$ 용액을 넣어 60분간 0℃에서 이차 처리하였다. 여기에 외부 유전자를 포함한 재조합 플라스미드(pEcoliNterm 6xHN::*fabB*, pEcoliNterm 6xHN::*fabF*)를 넣어 0℃에서 30분 동안 반응시키고, 42℃의 온수조에서 30초 동안 열처리하고, 5분 동안 0℃의 얼음조에서 처리하는 열충격 형질전환방법(heat-shock method)을 실시하였다. 상기 열충격 형질전환방법을 실시한 샘플은 37℃에서 1시간 동안 배양하여 형질전환 과정을 거친 세포들의 정상 생장을 도왔다. 이 세포들을 항생제인 암피실린이 포함된 고체 LB 배지(LB 아가 플레이트, 트립톤 10g/ℓ, NaCl 5g/ℓ, 효모 추출액 5g/ℓ, 아가 15g/ℓ)에 일정량 도말(spreading)하였다.

[0044] 상기 형질전환과정을 거친 샘플은 항생제가 포함된 고체 LB 배지에서 작은 원형 콜로니(colony) 형태로 자라는 것을 확인하였다. 이 콜로니를 암피실린이 포함된 5mℓ의 액체 LB 배지에서 배양하고 일반적인 플라스미드 추출 키트(Mini-prep kit)를 이용하여 플라스미드를 추출하였다. 상기 추출한 플라스미드는 중합효소연쇄반응 과정 후에 라이게이션을 위해 처리한 제한효소를 이용하여 플라스미드와 목적 유전자의 정보를 보유한 뉴클레오티드를 절단하여 대장균 K-12 MG1655의 유전자와의 크기를 비교하였다. 또한 상기와 같은 플라스미드의 유전자 염기서열 분석결과와 KEGG에 공개된 유전정보가 일치하는지 확인하여, 형질전환 과정의 돌연변이나 중합효소연쇄반응 도중에 일어나는 합성오류를 점검하였다.

[0045] 재조합 플라스미드를 제한효소로 처리하여 선형이 된 pEcoliNterm 6xHN::*fabB*와 pEcoliNterm 6xHN::*fabF*의 크기를 확인한 결과는 도 7에 나타내었다 (L: 1kb DNA 표지 선별자(ladder), 1: 플라스미드 pEcoliNterm 6xHN::*fabB*, 2: 플라스미드 pEcoliNterm 6xHN::*fabF*). 또한, 유전자의 염기서열 분석을 이용하여 재조합 플라스미드를 제한효소로 처리하여 선형이 된 플라스미드 pEcoliNterm 6xHN::*fabB*의 *fabB* 유전자의 염기서열과 대장균 K-12 MG1655의 *fabB* 유전자의 염기서열 분석결과는 도 8에 나타내었고, 유전자의 염기서열 분석을 이용하여 재조합 플라스미드를 제한효소로 처리하여 선형이 된 플라스미드 pEcoliNterm 6xHN::*fabF*의 *fabF* 유전자의 염기서열과 대장균 K-12 MG1655의 *fabF* 유전자의 염기서열 분석결과는 도 9에 나타내었다. 또한, *fabB* 유전자의 아미노산 번역시 나타나는 아미노산 서열의 일치함을 확인한 결과는 도 10에 나타내었다.

[0046] 도 8 내지 도 10에 나타난 바와 같이, 재조합 플라스미드를 제한효소로 처리하여 선형이 된 플라스미드 pEcoliNterm 6xHN::*fabB*의 *fabB* 유전자의 염기서열과 대장균 K-12 MG1655의 *fabB* 유전자의 염기서열 분석결과

에서 뉴클레오티드 한 곳의 서열이 대장균 K-12 MG1655와 상이하였지만, 아미노산으로 번역이 된 경우의 아미노산 서열과 효소의 기능을 하는 단백질로 입체구조를 가지는 경우에는 일치함을 확인하였다.

[0047] **2. 재조합 대장균의 제조(*Ecoli*BL21::pEcoliN::*fabB* + pCDF-1b::*tesA*, 및 *Ecoli*BL21::pEcoliN::*fabF* + pCDF-1b::*tesA*)**

[0048] 상기 1에서 합성오류를 점검한 재조합 균주(*Ecoli*pEcoliN::*fabB* 및 *Ecoli*pEcoliN::*fabF*)에 *tesA*의 유전정보를 보유한 뉴클레오티드를 포함하는 재조합 플라스미드 pCDF-1b::*tesA*를 넣기 위해서, 상기 컴피턴트 세포의 제조 방법과 동일한 방법으로 재조합 균주를 처리하고 열충격 형질전환방법을 다시 시도하여 외래 종의 *fabB*와 *tesA*, *fabF*와 *tesA*가 함께 존재하는 재조합 균주를 제조하였다[*E.coli* BL21::pEcoliN::*fabB* + pCDF-1b::*tesA* 및 *E.coli* BL21::pEcoliN::*fabF* + pCDF-1b::*tesA*].

[0049] 상기 재조합 균주들은 항생제가 포함된 고체 LB 배지에서 작은 원형 콜로니 (colony) 형태로 자라는 것을 확인하였다. 이 콜로니를 암피실린이 포함된 5㎖의 액체 LB 배지에서 배양하고 일반적인 플라스미드 추출 키트(Mini-prep kit)를 이용하여 플라스미드를 추출하였다. 상기 추출된 플라스미드를 제한효소로 처리하여 대장균 K-12 MG1655의 유전자와의 크기를 비교하였다. 또한 상기와 같은 플라스미드의 *tesA* 염기서열 분석결과와 KEGG에 공개된 유전정보가 일치하는지 확인하였다.

[0050] 재조합 플라스미드를 제한효소로 처리하여 선형이 된 pEcoliNterm 6xHN::*fabB*와 pCDF-1b::*tesA*, 그리고 pEcoliNterm 6xHN::*fabF*와 pCDF-1b::*tesA*의 크기를 확인한 결과는 도 11에 나타내었다 (L: 1kb DNA 표지 선별자(ladder), 2: pCDF-1b, 3: pEcoliNterm 6xHN::*fabB*와 pCDF-1b::*tesA*, 4: pEcoliNterm 6xHN::*fabF*와 pCDF-1b::*tesA*). 또한, 유전자의 염기서열 분석을 이용하여 재조합 플라스미드를 제한효소로 처리하여 선형이 된 플라스미드 pCDF-1b::*tesA*의 *tesA* 유전자의 염기서열과 대장균 K-12 MG1655의 *tesA* 유전자의 염기서열 분석결과는 도 12에 나타내었다.

[0051] 도 11에 나타난 바와 같이, 재조합 플라스미드를 제한효소로 처리하여 선형이 된 플라스미드 pCDF-1b::*tesA*의 *tesA* 유전자의 염기서열과 대장균 K-12 MG1655의 *tesA* 유전자의 염기서열의 크기는 일치하였다. 특히, 3번 및 4번 밴드에서 pEcoliNterm 6xHN에 *fabB* 및 *fabF*의 유전자 정보를 보유한 각각의 플라스미드와 함께 pCDF-1b에 *tesA*의 유전자 정보를 보유한 플라스미드가 존재함을 알 수 있다.

[0052] 또한 도 12에 나타난 바와 같이, 재조합 플라스미드를 제한효소로 처리하여 선형이 된 플라스미드 pCDF-1b::*tesA*의 *tesA* 유전자의 염기서열과 대장균 K-12 MG1655의 *tesA* 유전자의 염기서열이 일치함을 확인하였다.

[0053] 따라서, 상기 제조한 재조합 균주(*E.coli* BL21::pEcoliN::*fabB* + pCDF::*tesA* 및 *E.coli* BL21::pEcoliN::*fabF* + pCDF::*tesA*)를 2011년 8월 9일자로 한국생명공학연구원 생물자원센터 유전자은행(KCTC)에 기탁하였으며, 각각 KCTC 11996BP 및 KCTC 11997BP의 수탁번호를 부여받았다.

[0054] 상기 제조된 재조합 대장균, 목적 유전자 및 재조합 플라스미드는 표 5에 나타내었다.

표 5

[0055]

재조합 대장균	목적 유전자	재조합 플라스미드
E.coli BL21::pEcoliN::*fabB*	*fabB*	pEcoliNterm 6xHN::*fabB*
E.coli BL21::pEcoliN::*fabF*	*fabF*	pEcoliNterm 6xHN::*fabBF*
E.coli BL21::pEcoliN::*fabB* + pCDF::*tesA*	*fabB*, *tesA*	pEcoliNterm 6xHN::*fabB*, pCDF-1b::*tesA*
E.coli BL21::pEcoliN::*fabF* + pCDF::*tesA*	*fabF*, *tesA*	pEcoliNterm 6xHN::*fabF*, pCDF-1b::*tesA*

[0056] **실시예 3 : 재조합 대장균을 이용하여 지방산의 제조**

[0057] 상기 실시예 2에서 제조된 재조합 대장균(*Ecoli*BL21::pEcoliN::*fabB*, *Ecoli*BL21::pEcoliN::*fabF*, *E.coli* BL21::pEcoliN::*fabB* + pCDF::*tesA*, *E.coli* BL21::pEcoliN::*fabF* + pCDF::*tesA*)을 각각 항생제인 암피실린이 포함된 200㎖의 액체 LB 배지에 넣고 37℃의 진탕배양기에서 200rpm의 속도로 회전시키면서 23시간 동안 배양하였다. 배양액의 OD(optical density)가 0.5~0.8에 이르렀을 때 유전자 발현을 목적으로 1.0mM IPTG(Isopropyl-ß-D-thiogalactopyranoside)를 첨가한 다음, 원심분리하여 균체와 배지를 분리하고, 동결건조하여 균체의 수분을 제거하였다. 분석을 위한 샘플을 제조하기 위해서, 균체가 포함된 유리 시험관에 황산과 메탄올(5:100의 부

피비)의 혼합용액을 첨가하고, 질소를 충전하였다. 시험관을 밀봉하여 90℃에서 30분 동안 에스터화 반응을 하고 상온에서 냉각시켰다. 그 다음, 헥산과 증류수를 첨가하여 교반기 위에서 섞어주고 층 분리를 하여 FAME(fatty acid methyl ester)이 용해된 상층의 헥산층을 분석하였다. 분석에 이용한 장비는 가스크로마토그래피/질량분석기(gas chromatography/mass detector, Agilent 7890N)이며, 이용한 컬럼은 Agilent 19091N-133 capillary 컬럼이다.

[0058] 본 발명의 재조합 대장균의 지방산 조성 분석 결과는 표 6에 나타내었다.

표 6

[0059]

균주이름	C12:0 (Laurate)	C14:0 (Myristic acid)	C16:0 (Palmitic acid)	C16:1Δ9 (Palmitoleic acid)	C18:0 (Stearic acid)	C18:1Δ9 (Oleic acid)	C18:1Δ11 (Vaccenic acid)	C19:0 (Phytomonic acid)
E.coli BL21	9.18	32.72	323.01	10.79	-	-	60.37	25.57
E.coli BL21::pEcoliN::*fabB*	16.12	37.30	339.71	2.40	27.10	-	183.95	128.35
E.coli BL21::pEcoliN::*fabF*	19.76	50.45	416.40	2.00	-	1.71	133.99	160.78
E.coli BL21::pEcoliN::*fabB* +pCDF::*tesA*	12.25	48.55	311.79	7.27	37.07	-	160.23	100.35
E.coli BL21::pEcoliN::*fabF* +pCDF::*tesA*	21.80	67.67	480.32	2.91	-	2.77	78.03	195.85

[0060] 표 6에 나타난 바와 같이, 본 발명의 재조합 균주는 야생형 균주와 비교하여 지방산 조성에서 차이가 생겼으며, 특히 *E.coli* BL21::pEcoliN::*fabB* + pCDF::*tesA*와 *E.coli* BL21::pEcoliN::*fabF* + pCDF::*tesA*의 경우에 불포화 지방산 박센산 (vaccenic acid)의 비율과 양이 크게 늘어남을 확인하였다.

수탁번호

[0061]

기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC11996BP

수탁일자 : 20110809

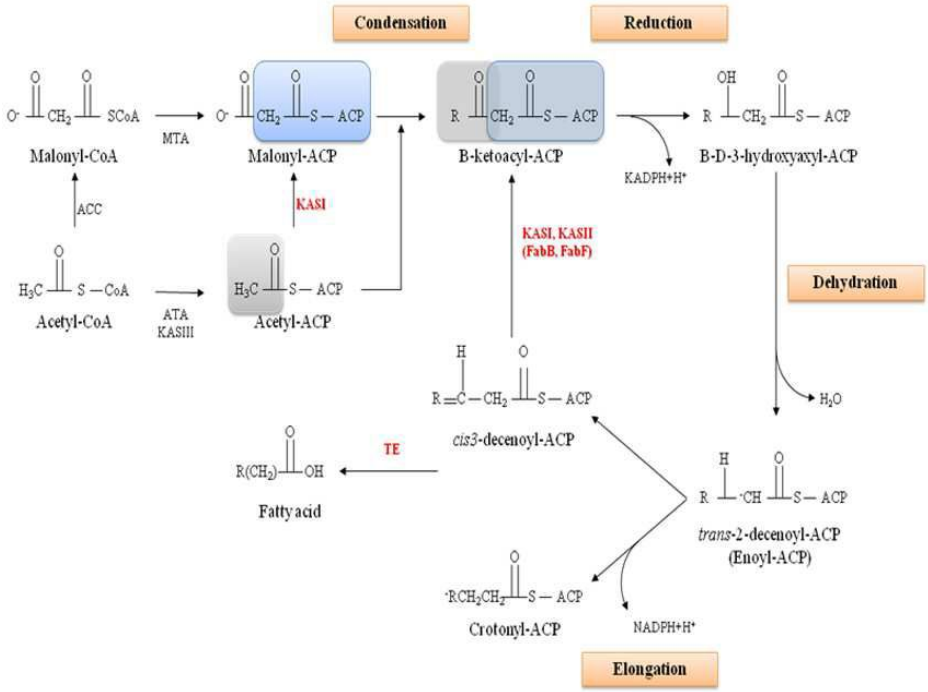
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC11997BP

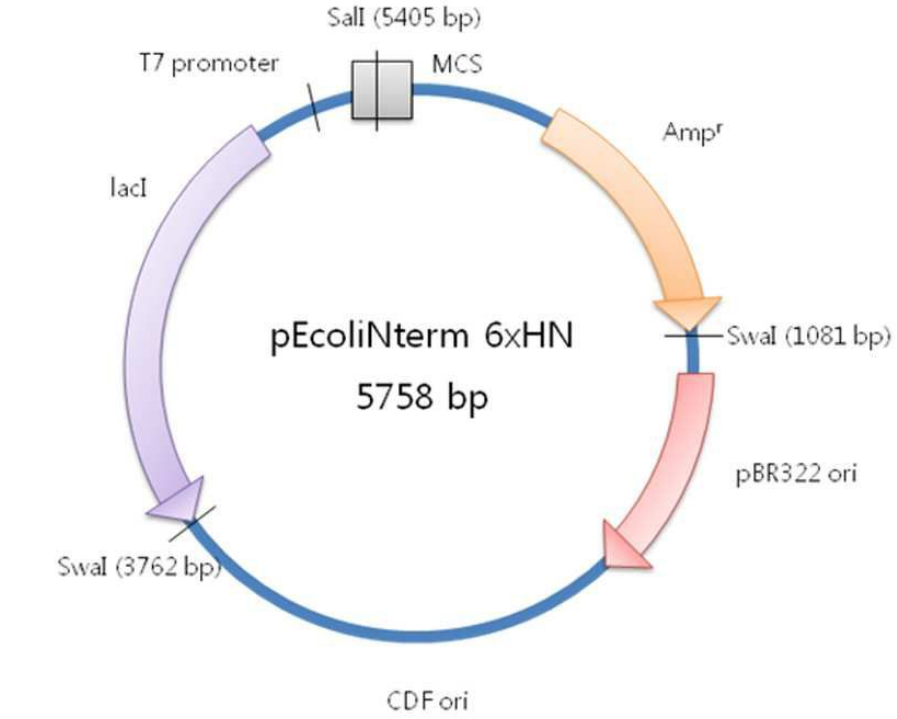
수탁일자 : 20110809

도면

도면1


Condensation
Reduction
Malonyl-CoA
MTA
Malonyl-ACP
B-ketoacyl-ACP
KADPH+H+
B-D-3-hydroxyaxyl-ACP
ACC
KASI
KASI, KASII
(FabB, FabF)
Dehydration
Acetyl-CoA
ATA
KASIII
Acetyl-ACP
H2O
cis3-decenoyl-ACP
TE
Fatty acid
trans-2-decenoyl-ACP
(Enoyl-ACP)
Crotonyl-ACP
NADPH+H+
Elongation

도면2



RBS — 6xHN tag

5317 AGA AGG AGA TAT ACC ATG GGT CAT AAT CAT AAT CAT AAT CAT AAT CAT AAT
Met Gly His Asn His Asn His Asn His Asn His Asn

Enterokinase cleavage site

6xHN tag — PstI — StuI — SalI — BglII

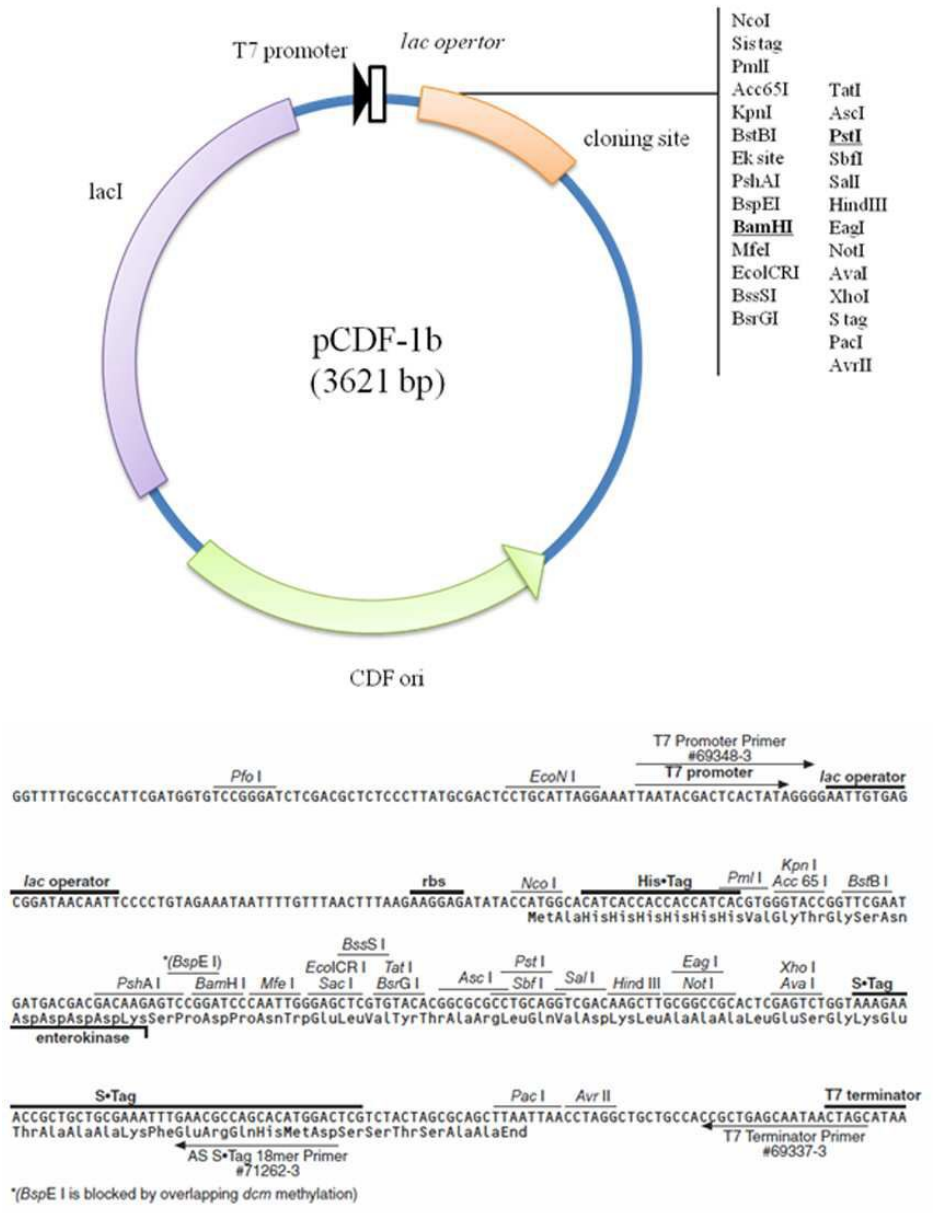
5368 CAC AAC GCT GCA GGT GAT GAC GAT GAT AAG GCC TCT GTC GAC CAG ATC TCT
His Asn Ala Ala Gly Asp Asp Asp Asp Lys Ala Ser Val Asp Gln Ile Ser

PacI

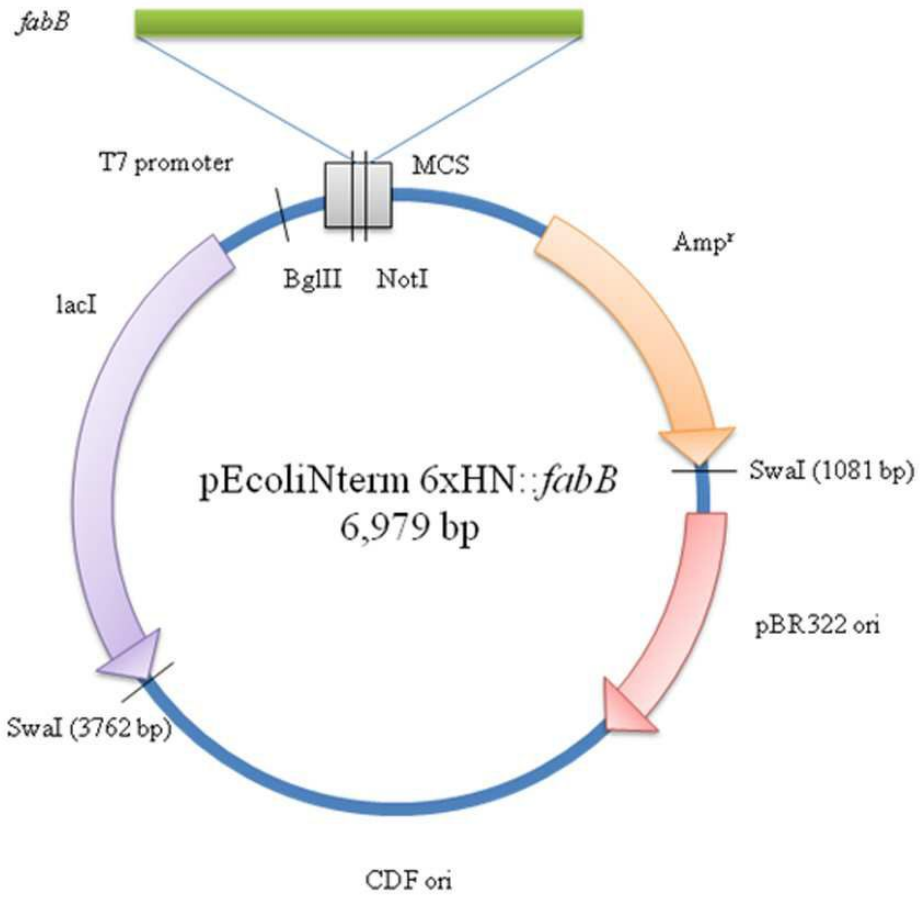
HindIII — EcoRI — NotI — PacI — XbaI

5419 AAG CTT GCG AAT TCT GGC GGC CGC TTA ATT AAT TAA TCT AGA
Lys Leu Ala Asn Ser Gly Gly Arg Leu Ile Asn *** Stop codon

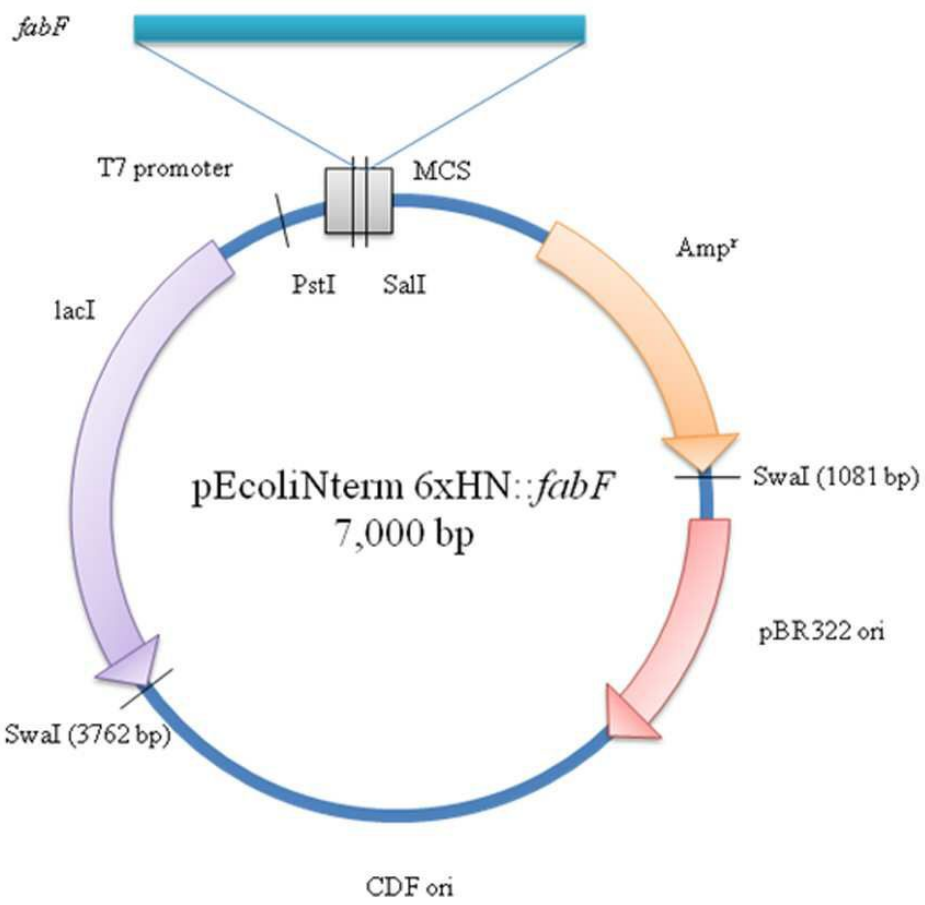
도면3


T7 promoter
lac opertor
cloning site
lacI
pCDF-1b
(3621 bp)
CDF ori
NcoI
Sistag
PmlI
Acc65I
KpnI
BstBI
Ek site
PshAI
BspEI
BamHI
MfeI
EcoICRI
BssSI
BsrGI
TatI
AscI
PstI
SbfI
SalI
HindIII
EagI
NotI
AvaI
XhoI
S tag
PacI
AvrII
T7 Promoter Primer
#69348-3
T7 promoter
lac operator
rbs
His•Tag
T7 terminator
T7 Terminator Primer
#69337-3
AS S•Tag 18mer Primer
#71262-3
enterokinase
*(BspE I is blocked by overlapping dcm methylation)

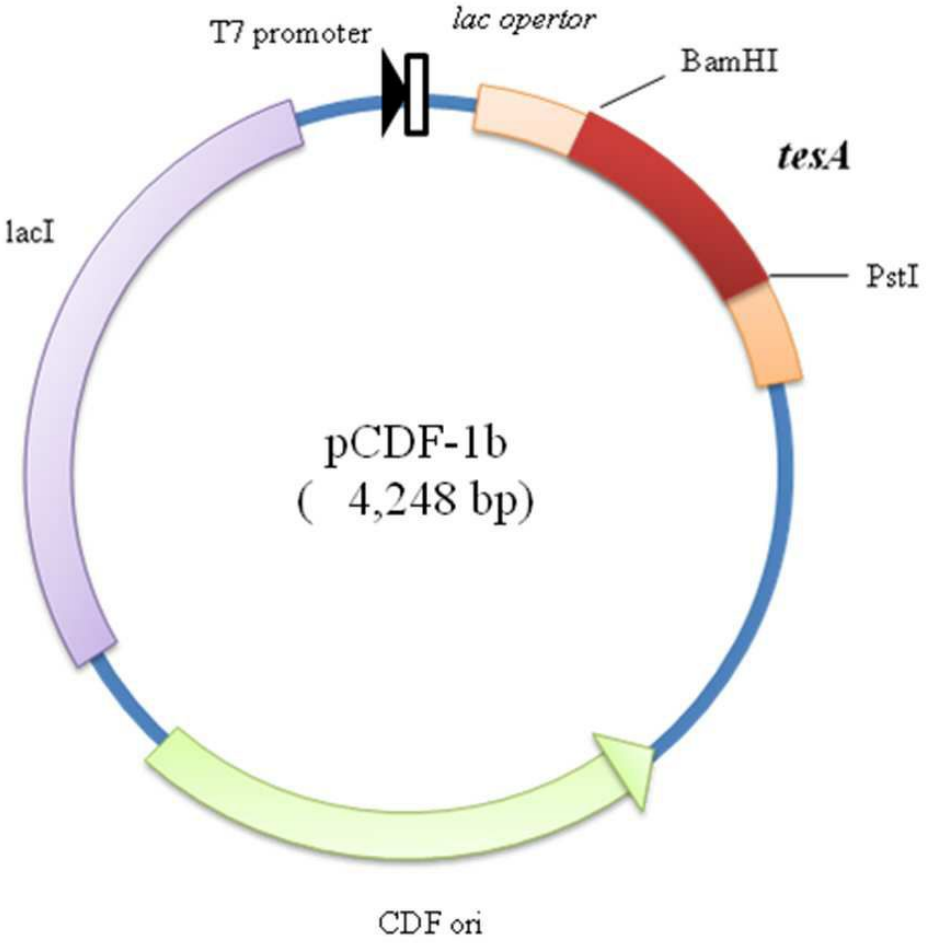
도면4


fabB
T7 promoter
MCS
BglII
NotI
lacI
Amp^r
pEcoliNterm 6xHN::fabB
6,979 bp
SwaI (1081 bp)
pBR322 ori
SwaI (3762 bp)
CDF ori

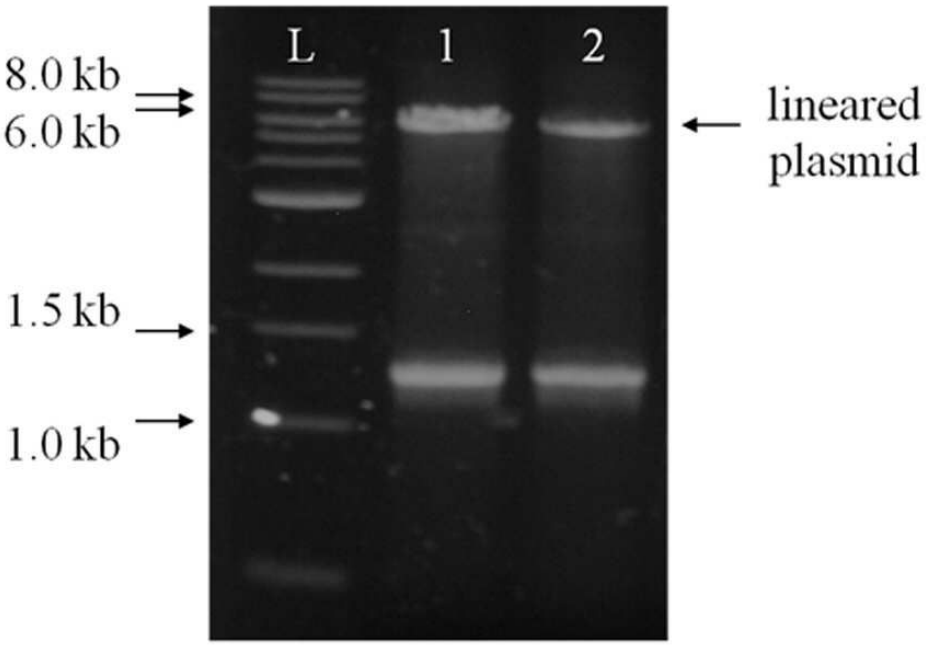
도면5


fabF
T7 promoter
MCS
PstI
SalI
Amp^r
lacI
pEcoliNterm 6xHN::fabF
7,000 bp
SwaI (1081 bp)
pBR322 ori
SwaI (3762 bp)
CDF ori

도면6


T7 promoter
lac opertor
BamHI
tesA
PstI
lacI
pCDF-1b
(4,248 bp)
CDF ori

도면7


L
1
2
8.0 kb
6.0 kb
1.5 kb
1.0 kb
lineared
plasmid

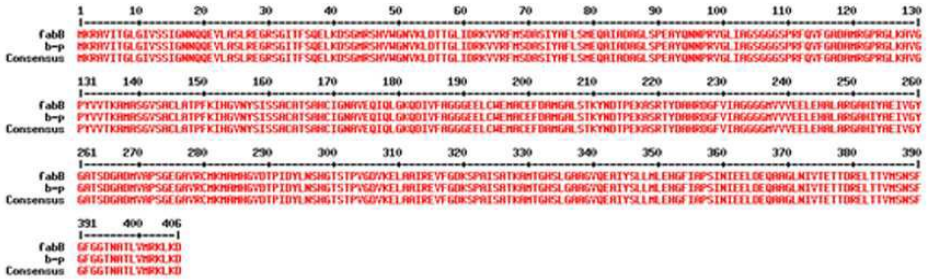
도면8



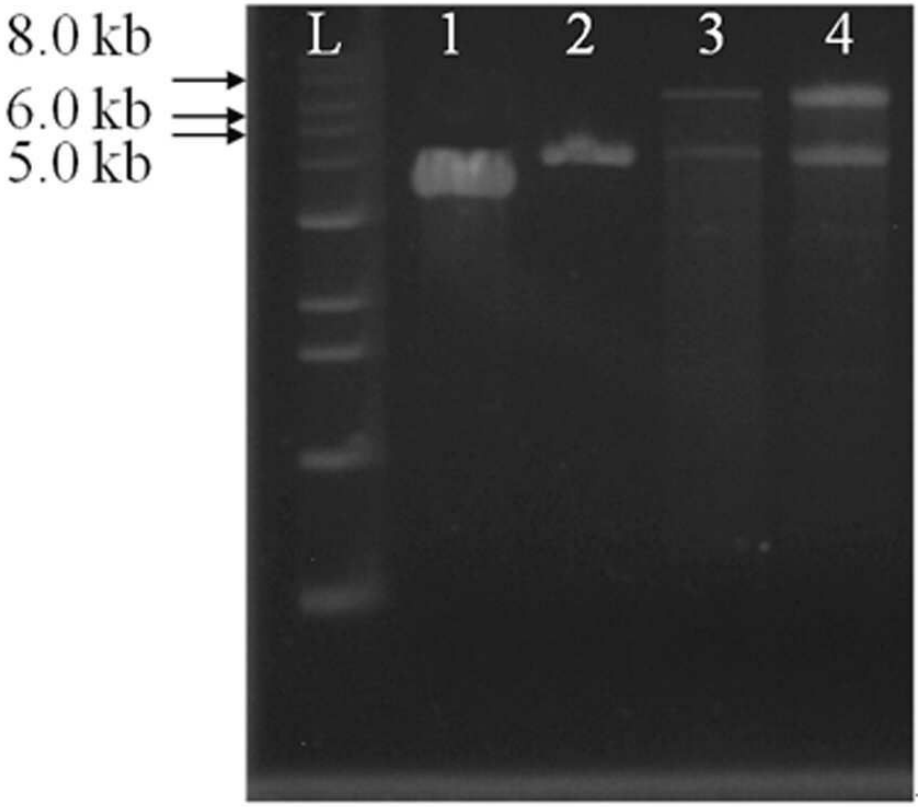
도면9



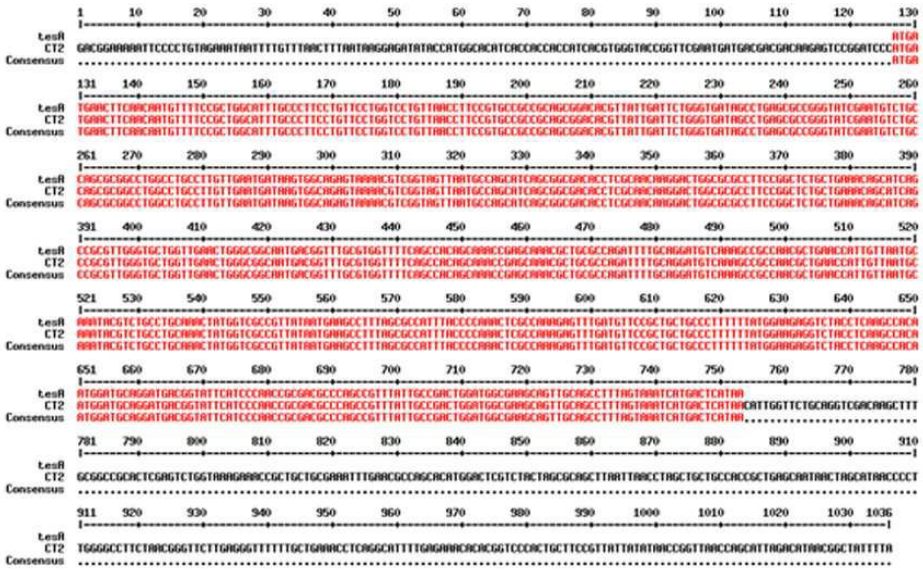
도면10



도면11



도면12



서 열 목 록

<110> INHA-INDUSTRY PARTNERSHIP INSTITUTE

<120> Recombinant E.coli producing fatty acid, and method for producing fatty acid using the same

<130> INHA1-62P

<160> 9

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 1221

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 1

atgaaacgtg cagtgattac tggcctgggc attgtttcca gcatcggtaa taaccagcag 60

gaagtcctgg catctctgcg tgaaggacgt tcagggatca ctttctctca ggagctgaag 120

gattccggca tgcgtagcca cgtctggggc aacgtaaaac tggataccac tggcctcatt 180

gaccgcaaag ttgtgcgctt tatgagcgac gcatccattt atgcattcct ttctatggag 240

caggcaatcg ctgatgcggg cctctctccg gaagcttacc agaataaccc gcgcgttggc 300

ctgattgcag gttccggcgg cggctccccg cgtttccagg tgttcggcgc tgacgcaatg 360

cgcggcccgc gcggcctgaa agcggttggc ccgtatgtgg tcaccaaagc gatggcatcc 420

ggcgtttctg cctgcctcgc caccccgttt aaaattcatg gcgttaacta ctccatcagc 480

tccgcgtgtg cgacttccgc acactgtatc ggtaacgcag tagagcagat ccaactgggc 540

aaacaggaca tcgtgtttgc tggcggcggc gaagagctgt gctgggaaat ggcttgcgaa 600

ttcgacgcaa tgggtgcgct gtctactaaa tacaacgaca ccccggaaaa agcctcccgt 660
acttacgacg ctcaccgtga cggtttcgtt atcgctggcg gcggcggtat ggtagtggtt 720
gaagagctgg aacacgcgct ggcgcgtggt gctcacatct atgctgaaat cgttggctac 780
ggcgcaacct ctgatggtgc agacatggtt gctccgtctg gcgaaggcgc agtacgctgc 840
atgaagatgg cgatgcatgg cgttgatacc ccaatcgatt acctgaactc ccacggtact 900
tcgactccgg ttggcgacgt gaaagagctg gcagctatcc gtgaagtgtt cggcgataag 960
agcccggcga tttctgcaac caaagccatg accggtcact ctctgggcgc tgctggcgta 1020

caggaagcta tctactctct gctgatgctg gaacacggct ttatcgcccc gagcatcaac 1080
attgaagagc tggacgagca ggctgcgggt ctgaacatcg tgaccgaaac gaccgatcgc 1140
gaactgacca ccgttatgtc taacagcttc ggcttcggcg gcaccaacgc cacgctggta 1200
atgcgcaagc tgaaagatta a 1221

<210> 2

<211> 1242

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 2

gtgtctaagc gtcgtgtagt tgtgaccgga ctgggcatgt tgtctcctgt cggcaatacc 60
gtagagtcta cctggaaagc tctgcttgcc ggtcagagtg gcatcagcct aatcgaccat 120

ttcgatacta gcgcctatgc aacgaaattt gctggcttag taaaggattt taactgtgag 180
gacattatct cgcgcaaaga acagcgcaag atggatgcct tcattcaata tggaattgtc 240
gctggcgttc aggccatgca ggattctggc cttgaaataa cggaagagaa cgcaacccgc 300
attggtgccg caattggctc cgggattggc ggcctcggac tgatcgaaga aaaccacaca 360
tctctgatga acggtggtcc acgtaagatc agcccattct tcgttccgtc aacgattgtg 420
aacatggtgg caggtcatct gactatcatg tatggcctgc gtggcccgag catctctatc 480
gcgactgcct gtacttccgg cgtgcacaac attggccatg ctgcgcgtat tatcgcgtat 540

ggcgatgctg acgtgatggt tgcaggtggc gcagagaaag ccagtacgcc gctgggcgtt 600
ggtggttttg gcgcggcacg tgcattatct acccgcaatg ataacccgca agcggcgagc 660
cgcccgtggg ataaagagcg tgatggtttc gtactgggcg atggtgccgg tatgctggta 720
cttgaagagt acgaacacgc gaaaaaacgc ggtgcgaaaa tttacgctga actcgtcggc 780
tttggtatga gcagcgatgc ttatcatatg acgtcaccgc cagaaaatgg cgcaggcgca 840

gctctggcga tggcaaatgc tctgcgtgat gcaggcattg aagcgagtca gattggctac 900

gttaacgcgc acggtacttc tacgccggct ggcgataaag ctgaagcgca ggcggtgaaa 960

accatcttcg gtgaagctgc aagccgtgtg ttggtaagct ccacgaaatc tatgaccggt 1020

cacctgttag gtgcggcggg tgcagtagaa tctatctact ccatcctggc gctgcgcgat 1080

caggctgttc cgccaaccat caacctggat aacccggatg aaggttgcga tctggatttc 1140

gtaccgcacg aagcgcgtca ggttagcgga atggaataca ctctgtgtaa ctccttcggc 1200

ttcggtggca ctaatggttc tttgatcttt aaaaagatct aa 1242

<210> 3

<211> 627

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 3

atgatgaact tcaacaatgt tttccgctgg catttgccct tcctgttcct ggtcctgtta 60

accttccgtg ccgccgcagc ggacacgtta ttgattctgg gtgatagcct gagcgccggg 120

tatcgaatgt ctgccagcgc ggcctggcct gccttgttga atgataagtg gcagagtaaa 180

acgtcggtag ttaatgccag catcagcggc gacacctcgc aacaaggact ggcgcgcctt 240

ccggctctgc tgaaacagca tcagccgcgt tgggtgctgg ttgaactggg cggcaatgac 300

ggtttgcgtg gttttcagcc acagcaaacc gagcaaacgc tgcgccagat tttgcaggat 360

gtcaaagccg ccaacgctga accattgtta atgcaaatac gtctgcctgc aaactatggt 420

cgccgttata atgaagcctt tagcgccatt taccccaaac tcgccaaaga gtttgatgtt 480

ccgctgctgc cctttttat ggaagaggtc tacctcaagc cacaatggat gcaggatgac 540

ggtattcatc ccaaccgcga cgcccagccg tttattgccg actggatggc gaagcagttg 600

cagcctttag taaatcatga ctcataa 627

<210> 4

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for fabB gene

<400> 4

ggaagatctg aaggagatat accatgaaac gtgcagtgat tactggcc 48

<210> 5

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for fabB gene

<400> 5

ataagaatgc ggccgcttaa tctttcagct tgcgcattac ca 42

<210> 6

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for fabF gene

<400> 6

aaaactgcag gtgtgtctaa gcgtcgtgta gttgtga 37

<210> 7

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for fabF gene

<400> 7

acgcgtcgac ttagatcttt ttaaagatca aagaacc 37

<210> 8

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for tesA gene

<400> 8

cgggatccca tgatgaactt caacaatgtt ttccg 35

<210> 9

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for tesA gene

<400> 9

ggaagatctg aaggagatat accatgaaac gtgcagtgat tactggcc 48