



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0052927
(43) 공개일자 2019년05월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/74 (2006.01) C12N 9/04 (2006.01)

C12N 9/16 (2006.01) C12P 7/18 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 15/74 (2013.01)

C12N 9/0006 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-0148780

(22) 출원일자 2017년11월09일

심사청구일자 2017년11월09일

(71) 출원인

지에스칼텍스 주식회사

서울특별시 강남구 논현로 508 (역삼동)

울산과학기술원

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

(72) 발명자

박성훈

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

설은희

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인(유한) 대아

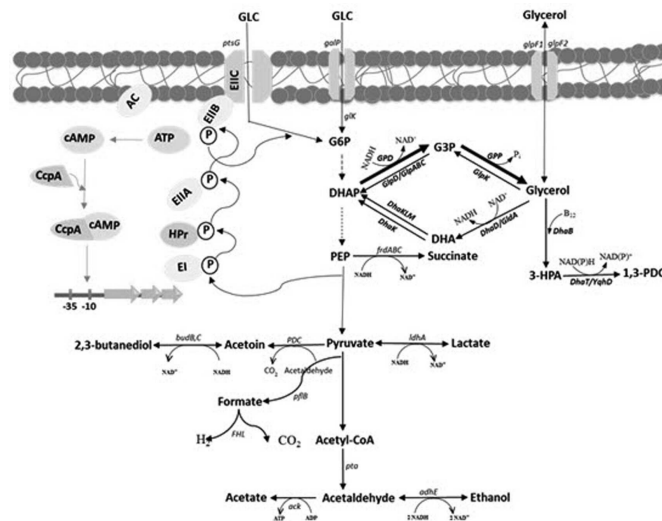
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 포도당으로부터 1,3-프로판디올을 생산하는 신규한 크렙시엘라 뉴모니아 균주 및 이를 이용한 1,3 프로판디올의 생산방법

(57) 요약

본 발명은 포도당으로부터 1,3-프로판디올을 생산할 수 있는 신규한 재조합 크렙시엘라 뉴모니아 균주 및 이를 이용하여 포도당으로부터 1,3-프로판디올을 생산하는 방법에 관한 것이다. 야생형 크렙시엘라 뉴모니아 J2B 균주는 포도당으로부터 글리세롤이나 1,3-프로판디올을 전혀 생산하지 못하였지만, 본 발명의 재조합 크렙시엘라 뉴모니아 균주는 포도당으로부터 최대 0.82 mol/mol 의 수율로 1,3-프로판디올을 생산할 수 있다. 본 발명의 재조합 크렙시엘라 뉴모니아 균주는 배지 내 고가의 비타민 B12 첨가 없이도 1,3-프로판디올을 생산할 수 있어 1,3-프로판디올을 경제적인 생산에 매우 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 9/16 (2013.01)

C12P 7/18 (2013.01)

C12Y 101/01008 (2013.01)

C12Y 207/0103 (2013.01)

C12Y 301/03021 (2013.01)

(72) 발명자

수만라마

울산광역시 울주군 범서읍 구영리 137-6

박중명

세종특별자치시 달빛1로 158, 708동 402호(아름
동, 범지기마을7단지)

라트나싱

대전광역시 서구 만년로 45 초원아파트 108동 609
호

명세서

청구범위

청구항 1

a) 효모 유래 gpd1 유전자를 코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 효모 유래 gpp2 유전자를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, b) 글리세롤 분해경로가 결실된, 포도당으로부터 1,3-프로판디올을 생산하기 위한 재조합 크렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*) 균주.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 균주는 글리세롤을 생산하는 효모 유래 GPD 및 GPP 효소를 발현하는 것을 특징으로 하는 재조합 크렙시엘라 뉴모니아 균주.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 gpd1 유전자를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열번호 1의 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 상기 gpp2 유전자를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 재조합 크렙시엘라 뉴모니아 균주.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 글리세롤 분해 경로의 결실은 글리세롤을 글리세롤-3-포스페이트로 전환시키는 글리세롤-3-포스페이트 키나아제(GlpK)를 암호화하는 glpK 유전자, 및 글리세롤을 디하이드록시아세톤으로 전환시키는 글리세롤-3-포스페이트 디하이드로게나아제(DhaD)를 암호화하는 dhaD 유전자를 개별적으로 또는 동시에 결실시킨 것을 특징으로 하는, 재조합 크렙시엘라 뉴모니아 균주.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 글리세롤 분해 경로의 결실은 추가로 G-3-P 디하이드로게나아제를 암호화하는 glpA 유전자 및 glpD 유전자를 단독 또는 동시에 결실시킨 것을 특징으로 하는, 재조합 크렙시엘라 뉴모니아 균주.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, dhaB1 유전자를 코딩하는 뉴클레오티드 서열, dhaB2 유전자를 코딩하는 뉴클레오티드 서열, dhaB3 유전자를 코딩하는 뉴클레오티드 서열, gdrA 유전자를 코딩하는 뉴클레오티드 서열, gdrB 유전자를 코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 dhaT 유전자를 코딩하는 뉴클레오티드 서열 중 어느 하나를 추가로 포함하는, 재조합 크렙시엘라 뉴모니아 균주.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 dhaB1 유전자를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열번호 3의 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 상기 dhaB2 유전자를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열번호 4의 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 상기 dhaB3 유전자를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열번호 5의 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 상기 gdrA 유전자를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열번호 6의 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 상기 gdrB 유전자를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열번호 7의 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 상기 dhaT 유전자를 코딩하는 뉴클레오티드

은 서열번호 8의 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 재조합 크렙시엘라 뉴모니아 균주.

청구항 8

다음의 단계를 포함하는 1,3-프로판디올 생합성 방법:

- (a) 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 크렙시엘라 뉴모니아 균주를 배양하여 1,3-프로판디올을 생합성하는 단계; 및
- (b) 상기 단계 (a)에서 생합성된 1,3-프로판디올을 수득하는 단계.

청구항 9

다음의 단계를 포함하는 1,3-프로판디올 생합성 방법:

- (a) 제6항의 크렙시엘라 뉴모니아 균주를 배양하여 1,3-프로판디올을 생합성하는 단계; 및
- (b) 상기 단계 (a)에서 생합성된 1,3-프로판디올을 수득하는 단계.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 포도당으로부터 1,3-프로판디올(1,3-propanediol; 1,3-PDO)을 생산하기 위하여 개발한 유전자 변형 크렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*) 균주 및 이를 이용하여 포도당으로부터 1,3-프로판디올을 생산하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 글리세롤로부터 1,3-프로판디올을 생산할 수 있는 미생물로는 크렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*), 크렙시엘라 옥시토카(*K. oxytoca*), 엔테로박터 아글로메란스(*Enterobacter agglomerans*), 클로스트라디움 뷰티리쿰(*Clostridium butyricum*), 클로스트라디움 디올리스(*C. diolis*), 시트로박터 프레운디(*Citrobacter freundii*), 시트로박터 아말로나티쿠스(*C. amalonaticus*)와 같은 것들이 알려져 있다. 이러한 미생물은 NAD(P)H의 산화와 NAD(P)⁺의 재생을 통해 글리세롤을 1,3-PDO로 전환시키며, 동시에 세포 성장을 위한 글리세롤의 동화작용을 필요로 한다(도 1 참조).

[0003] 1,3-프로판디올 생산(환원성 경로)이 진행되는 동안, 글리세롤은 조효소 B12-의존성 글리세롤 탈수효소인 GDHt(DhaB, GdrAB)에 의해 3-하이드록시프로피온 알데히드(3-HPA)로 먼저 탈수되고, 이어서 1,3-PDO 산화환원효소(DhaT) 및/또는 NADPH-의존성 비특이적 알코올 탈수소 효소(YqhD)에 의해 1,3-PDO로 환원된다. 글리세롤이 세포 성장(산화적 경로)을 위해 대사될 때, 글리세롤은 호흡경로(FAD⁺-의존성 글리세롤-3-인산탈수효소(GPD), GlpD/GlpABC) 및/또는 발효경로(NAD⁺-의존성 글리세롤 탈수소효소, DhaD/GldA 및 디히드록시아세톤 키나아제, DhaKLM)에 의해 디히드록시아세톤-3-인산으로 산화되고, 이어서 피루브산으로 전환된다.

[0004] 현재, 자연적으로 포도당으로부터 1,3-프로판디올을 생산할 수 있다고 알려진 미생물은 없다. 그러나 듀폰(Dupont, 미국)은 대장균을 개량하여 포도당으로부터 1,3-프로판디올의 생물학적 생산을 성공적으로 수행하였고 또 상업화하였다. 가장 중요한 유전적 변형은 (1) 해당경로로부터 글리세롤을 합성하는데 필수적인 두 가지 효소, 즉 효모(*Saccharomyces cerevisiae*)에서 유래한 NADH-의존성 GPD(글리세롤-3-인산 탈수소효소) 및 GPP(글리세롤-3-인산 포스포타아제)의 발현, (2) 글리세롤로부터 1,3-프로판디올을 생산하는데 필요한 두 가지 효소, 즉 글리세롤 디하이드라테이즈(glycerol dehydratase; 주로 *K. pneumoniae* 유래의 DhaB)와 1,3-PDO oxidoreductase(주로 *K. pneumoniae* 유래의 DhaT 또는 *E. coli* 유래의 YqhD)의 발현이라 할 수 있다. 또한 이 균주는 조효소 B12의 막 수송 개선을 비롯하여 1,3-프로판디올 생산으로 탄소 흐름 재조정, 주요 효소의 발현 조정을 통한 균형 발현, 그리고 산화환원 및 에너지 요구량을 최소화하기 위한 변형 등, 미생물 대사 전반에 광범위한 변형이 이루어졌다. 결과적으로, 높은 농도의 1,3-프로판디올(135 g/L) 생산을 생산했다.

[0005] 하지만, 듀폰에 의해 포도당으로부터 1,3-프로판디올 생산은 성공적으로 확립되었지만 자세한 기술의 세부사항은 밝혀지지 않았다. 게다가 균주 및 공정에 대한 광범위한 특허는 과학계가 포도당으로부터 1,3-프로판디올 생산을 연구하는 것에 대해 의지를 상실시켰다. 듀폰의 한국등록특허 제10-525325호 '단일미생물에 의한 발효가 능한 탄소원의 1,3-프로판디올로의 생물전환'에서는 데히드라타제 효소(EC4.2.1-)를 발현할 수 있는 유전자를 갖는 대장균과 같은 단일 미생물을 이용하여 탄소원을 1,3-프로판디올로 생물전환시키는 방법을 개시하고 있다. 또한, 한국등록특허 제10-0785997호 '1,3-프로판디올을 높은 역가로 생물학적으로 생산하는 방법'에서는 크렙시엘라 뉴모니아 dha 레귤론 유전자를 사용하여 형질전환시킨 대장균을 사용하여 탄소 공급원으로부터 1,3-프로판디올을 생물학적으로 생산하는 개선된 방법을 개시하고 있다.

[0006] 한편, 리그노셀룰로오스 바이오매스로부터 얻어진 탄소원의 사용수요 증가 및 비싼 코엔자임 B12를 첨가하지 않아도 된다는 점을 고려하면, B12를 천연으로 생산할 수 있는 균주를 이용하여 포도당으로부터 1,3-PDO를 생산하는 것은 중요한 연구라 할 수 있다.

[0007] 크렙시엘라 뉴모니아는 대장균을 능가하는 몇 가지 장점을 가지고 있다. 우선, B12 및 글리세롤로부터 1,3-프로판디올을 자연적으로 생산할 수 있다. 또한, 대장균에 적용되는 대부분의 유전자 틀박스를 큰 변형 없이 적용할 수 있다. 본 발명에 사용된 크렙시엘라 뉴모니아(K. pneumoniae) J2B는 본 연구실에서 분리한 것으로 다른 K. pneumoniae 균주들에 비해 LPS 함성이 낮을 뿐 아니라 병원성의 성질이 높지 않다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 고가의 비타민 B12를 자체적으로 생산할 수 있는 크렙시엘라 뉴모니아(Klebsiella pneumoniae) J2B 균주를 이용하여 포도당으로부터 1,3-프로판디올(1,3-propanediol; 1,3-PDO)을 생산하는 능력을 갖는 Klebsiella pneumoniae J2B 변이 균주 및 상기 균주를 배양하여 1,3-프로판디올을 제조하는 방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 과제의 해결을 위하여, 본 발명은 다양한 유전자를 결실시키거나 새로운 유전자를 도입하고 증폭시키는 대사공학(Metabolic engineering)적 방법을 통해 얻어진 재조합 크렙시엘라 뉴모니아 J2B 균주를 제공한다.

[0011] 바람직하게는, a) 효모 유래 gpd1 유전자를 코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 gpp2 유전자를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, b) 글리세롤 분해경로가 결실된, 포도당으로부터 1,3-프로판디올을 생산하기 위한 재조합 크렙시엘라 뉴모니아(Klebsiella pneumoniae) 균주를 제공한다.

[0012] 또한 바람직하게는, 상기 균주는 LPS 생산이 낮고 배양 후 발효액과 잘 분리되는 것을 특징으로 한다.

[0013] 또한 바람직하게는, 상기 균주는 글리세롤을 생산하는 효모 유래 GPD 및 GPP 효소를 발현하는 것을 특징으로 한다.

[0014] 또한, 상기 gpd1 유전자를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열번호 1의 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 상기 gpp2 유전자를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0015] 또한, 상기 글리세롤 분해 경로의 결실은 글리세롤을 글리세롤-3-포스페이트로 전환시키는 글리세롤-3-포스페이트 키나아제(GlpK)를 암호화하는 glpK 유전자, 및 글리세롤을 디하이드록시아세톤으로 전환시키는 글리세롤-3-포스페이트 디하이드로게나아제(DhaD)를 암호화하는 dhaD 유전자를 개별적으로 또는 동시에 결실시킨 것을 특징으로 한다.

[0016] 또한, 상기 dhaB 유전자, gdrA 유전자, gdrB 유전자 및 dhaT 유전자는 크렙시엘라 뉴모니아 J2B 균주(KCCM11213P)에서 유래된 것을 특징으로 한다.

[0017] 또한, 상기 dhaB1 유전자를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열번호 3의 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 상기 dhaB2 유전자를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열번호 4의 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 상기 dhaB3 유전자를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열번호 5의 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 상기 gdrA 유전자를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열번호 6의 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 상기 gdrB 유전자를 코딩하는 뉴클레오티드

서열은 서열번호 7의 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 상기 dhaT 유전자를 코딩하는 뉴클레오티드는 서열번호 8의 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0018] 또한, 본 발명은 상기 재조합 크렙시엘라 뉴모니아 균주를 배양하여 포도당으로부터 1,3-프로판디올을 제조하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0020] 본 발명은 포도당으로부터 1,3-프로판디올(1,3-propanediol; 1,3-PDO)를 생산하는 능력을 갖는 유전자 변형 크렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*) J2B 균주에 관한 것으로서, 1,3-프로판디올 생산이나 부산물 생산과 관련된 경로의 유전자를 제거하거나 새로 도입하고 증폭하는 등 대사공학 기술을 이용하여 포도당으로부터 1,3-프로판디올을 생산할 수 있는 유전자 재조합 (*Klebsiella pneumoniae*) J2B 균주를 제공한다. 야생형 크렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*) J2B 균주는 포도당으로부터 글리세롤이나 1,3-프로판디올을 전혀 생산하지 못하는데 반해, 본 발명에서 유전자 재조합 크렙시엘라 뉴모니아 J2B 균주는 포도당으로부터 최대 0.82 mol/mol의 수율로 1,3-프로판디올을 생산할 수 있다. 본 발명의 유전자 재조합 크렙시엘라 뉴모니아 J2B 균주는 배지 내 고가의 비타민 B12 첨가 없이도 1,3-프로판디올을 생산할 수 있어, 1,3-프로판디올의 경제적인 생산에 매우 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 크렙시엘라 뉴모니아의 포도당 대사경로 및 포도당으로부터 글리세롤 및 1,3-PDO 생산을 위한 반응경로를 보여준다:

도 2 (A)는 GPD1, GPP2 효소의 발현 및 발현 균주를 이용한 발효 프로파일을 보여준다. 특히 크렙시엘라 뉴모니아 J2B에서 GPD1, GPP2 효소의 발현을 SDS-PAGE로 분석한 결과를 보여준다: lane 1, marker; lane 2, J2B 균주의 세포 파쇄액; lane 3, GPD1/GPP2가 발현된 J2B-1의 세포 파쇄액.

도 2 (B)는 GPD1, GPP2 효소의 발현 및 발현 균주를 이용한 발효 프로파일을 보여준다. 특히 GPD/GPP 과발현 균주 (J2B-1)의 세포 성장 및 생산 프로파일을 보여준다. 세포 성장 (○), 포도당(▼), 글리세롤 (△), 1,3-PDO (□), 2,3-BDO (■), 아세트산 (●), pH (×).

도 2 (C)는 GPD1, GPP2 효소의 발현 및 발현 균주를 이용한 발효 프로파일을 보여준다. 특히 글리세롤 산화 경로의 결실에 따른 J2B-1, J2B1-1, J2B2-1, J2B3-1 및 J2B4-1 균주의 글리세롤과 1,3-PDO 생산 수율 변화를 보여준다.

도 2 (D)는 GPD1, GPP2 효소의 발현 및 발현 균주를 이용한 발효 프로파일을 보여준다. 특히 J2B3-1 균주의 폭기 조건에 따른 글리세롤 및 1,3-PDO 생산 수율 변화를 보여준다.

도 3 (A)은 호기 조건에서 J2B3-1 균주의 세포성장, 글리세롤 및 1,3-PDO 생산과 그 밖의 대사산물 생산 프로파일을 보여준다. 세포 성장(○), 포도당(▼), 글리세롤(△), 1,3-PDO(□), 2,3-BDO(■), 아세트산(●), pH (×).

도 3 (B)는 미호기 타입 I 조건에서 J2B3-1 균주의 세포성장, 글리세롤 및 1,3-PDO 생산과 그 밖의 대사산물 생산 프로파일을 보여준다. 이때 배양 부피는 50 ml이다. 세포 성장(○), 포도당(▼), 글리세롤(△), 1,3-PDO(□), 2,3-BDO(■), 아세트산(●), pH (×).

도 3 (C)는 미호기 타입 II 조건에서 J2B3-1 균주의 세포성장, 글리세롤 및 1,3-PDO 생산과 그 밖의 대사산물 생산 프로파일을 보여준다. 이때 배양 부피는 100 ml이다. 세포 성장(○), 포도당(▼), 글리세롤(△), 1,3-PDO(□), 2,3-BDO(■), 아세트산(●), pH (×).

도 3 (D)는 혐기 조건에서 J2B3-1 균주의 세포성장, 글리세롤 및 1,3-PDO 생산과 그 밖의 대사산물 생산 프로파일을 보여준다. 세포 성장(○), 포도당(▼), 글리세롤(△), 1,3-PDO(□), 2,3-BDO(■), 아세트산(●), pH (×).

도 4(A)는 IPTG 농도 변화에 따른 글리세롤과 1,3-PDO 생산 수율 변화 및 GPD 활성 변화를 보여준다.

도 4(B)는 서로 다른 동종 효소의 사용에 따른 수율 변화를 나타낸다. J2B3-1 (gpd1, gpp2 발현), J2B3-2

(gpd1, gpp1 발현), J2B3-3 (gpd2, gpp1 발현).

도 5 (A)는 1,3-PDO 생산에 관여하는 주요 효소들의 전사 수준 및 효소 활성을 탄소원의 종류에 따라 조사한 결과로, RT-PCR를 이용한 주요 효소의 전사 수준 변화를 보여준다.

도 5 (B)는 1,3-PDO 생산에 관여하는 주요 효소들의 전사 수준 및 효소 활성을 탄소원의 종류에 따라 조사한 결과로, 배양에 사용된 탄소원의 종류에 따른 DhaB, DhaT 활성 변화를 보여준다.

도 6 (A)는 DhaB 및 DhaT의 과발현이 글리세롤 및 1,3-PDO 생산 수율(에 미치는 영향을 보여준다. *K. pneumoniae* J2B3-1(GPD/GPP만 발현), J2B3-4(GPD/GPP와 DhaB 추가발현), J2B3-5(GPD/GPP와 DhaB, DhaT 추가발현), J2B3-6(GPD/GPP와 DhaT 추가발현).

도 6 (B)는 DhaB 및 DhaT의 과발현이 대사산물 생산(B)에 미치는 영향을 보여준다. *K. pneumoniae* J2B3-1(GPD/GPP만 발현), J2B3-4(GPD/GPP와 DhaB 추가발현), J2B3-5(GPD/GPP와 DhaB, DhaT 추가발현), J2B3-6(GPD/GPP와 DhaT 추가발현).

도 7은 GPD, GPP의 구성적 발현을 최적화하기 위해 개발된 다양한 프로모터와 이들 프로모터의 세기를 GFP로 측정한 결과를 보여준다.

도 8 (A)는 DhaB의 추가발현 균주(J2B3-8)의 DhaB 및 DhaT 발현 및 발현 세기에 따른 글리세롤 및 1,3-PDO 생산 수율을 보여준다.

도 8 (B)는 DhaT의 추가발현 균주(J2B3-9)의 DhaB 및 DhaT 발현 및 발현 세기에 따른 글리세롤 및 1,3-PDO 생산 수율을 보여준다.

도 8 (C)는 DhaB, DhaT의 동시 추가발현 균주(J2B3-10)의 DhaB 및 DhaT 발현 및 발현 세기에 따른 글리세롤 및 1,3-PDO 생산 수율을 보여준다.

도 9 (a)는 pQE80L 벡터에 카나마이신 저항 유전자가 삽입되어 있는 발현벡터 pQE80LK의 모식도이다.

도 9 (b)는 pQE80LK에 GPD1 및 GPP2 유전자가 삽입되어 있는 발현벡터 pD1P2의 모식도이다.

도 9 (c)는 pQE80LK에 GPD1, GPP2 및 DhaT 유전자가 삽입되어 있는 발현벡터 pD1P2T의 모식도이다.

도 9 (d)는 pQE80LK에 DhaT 유전자가 삽입되어 있는 발현벡터 pT의 모식도이다.

도 9 (e)는 pDK7(p15A)에 dhaB 및 gdrAB 유전자가 삽입되어 있는 발현벡터 pBG의 모식도이다.

도 9 (f)는 pCDF에 GPD1 및 GPP2 유전자가 삽입되어 있는 발현벡터 pSP10D1P2의 모식도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 본 발명은 포도당으로부터 1,3-프로판디올을 생산하기 위한 재조합 크렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*) 균주를 제공한다.

[0024] 본 발명에서 사용된 용어 ‘크렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*)’는 페렴간균으로 그람음성이며 운동성이 없고 유당 발효를 하는 조건적 혐기성 균주이다.

[0026] 본 발명에서 야생균주로 사용된 ‘크렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*) J2B’는 본 연구실에서 분리한 것으로서, 다른 *K. pneumoniae* 균주들에 비해 LPS 합성이 낮을 뿐 아니라 병원성의 성질이 높지 않다. 상기 균주는 본 발명자들의 선행특허인 한국 공개특허 제10-2013-0095395에 개시된 방법으로 분리될 수 있고, 그람음성의 통성 혐기균으로서, 한국미생물보존센터(국외)에 2011.10.14자로 기탁(기탁번호:KCCM11213P)되어 있다.

[0028] 본 발명에서 사용된 용어 ‘결실’은 유전자가 염색체상 또는 플라스미드 상에서 삭제되어 상기 유전자가 코딩하는 단백질을 생산할 수 없게된 상태를 의미한다.

[0029] 본 발명에 유전자를 숙주세포의 염색체 상에 삽입하는 방법으로는 통상적으로 알려진 유전자 조작방법을 사용할 수 있다. 예를 들어, 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노-연관 바이러스 벡터, 헤르페스 심플렉

스 바이러스 벡터, 폭스바이러스벡터, 렌티바이러스 벡터 또는 비바이러스성 벡터를 이용하는 방법을 들 수 있다.

- [0031] 본 발명에서 사용한 약어는 하기와 같다.
- [0032] GLC, 포도당(glucose);
- [0033] G6P, 글루코스-6-포스페이트(glucose-6-phosphate);
- [0034] DHAP, 디하이드록시아세톤 포스페이트(dihydroxyacetone phosphate);
- [0035] G3P, 글리세롤-3-포스페이트(glycerol-3-phosphate); GLY, 글리세롤(glycerol);
- [0036] DHA, 디하이드록시아세톤(dihydroxyacetone);
- [0037] 3-HPA, 3-하이드록시프로피온알데히드(3-hydroxypropionaldehyde); 1,3-PDO,
- [0038] 1,3-프로판디올(1,3-propanediol);
- [0039] B12, 코엔자임B12(coenzyme B12);
- [0040] GPD1, 글리세롤-3-포스페이트 디하이드로게나제(glycerol-3-phosphate dehydrogenase);
- [0041] GPP2, 글리세롤-3-포스페이트 포스파타제(glycerol-3-phosphate phosphatase);
- [0042] GlpD/GlpABC, 글리세롤-3-포스페이트 디하이드로게나제(glycerol-3-phosphate dehydrogenase);
- [0043] GlpK, 글리세롤 키나제(glycerol kinase);
- [0044] DhaD/GldA, 글리세롤 디하이드로게나제(glycerol dehydrogenase);
- [0045] DhaK/DhaKLM, 디하이드록시아세톤 키나제(dihydroxyacetone kinase);
- [0046] GlpF1/GlpF2, 글리세롤 트랜스포터(glycerol transporter);
- [0047] DhaB, 글리세롤 디하이드레이트(glycerol dehydratase);
- [0048] DhaT, 1,3-프로판디올 옥시도리덕타제(1,3-propanediol oxidoreductase);
- [0049] YqhD, 알코올 디하이드로게나제(alcohol dehydrogenase).

- [0051] 도 1은 크랩시엘라 뉴모니아의 포도당 대사경로 및 포도당으로부터 글리세롤 및 1,3-PDO 생산을 위한 반응경로를 보여준다.
- [0052] 글리세롤에서 1,3-프로판디올 생산에 필수적인 코엔자임 B12의 외부 공급 없이 포도당으로부터 1,3-프로판디올을 생산하기 위해 크랩시엘라 뉴모니아 균주를 호스트로 사용하였다. 본 발명에 사용된 호스트 크랩시엘라 뉴모니아 J2B(KCCM11213P)는 본 연구실에서 분리, 동정된 것으로 병원성의 성질 또한 상대적으로 낮다.
- [0053] 우선, 포도당으로부터 글리세롤을 생산하기 위해 포도당 해당과정의 중간물질인 DHAP(dihydroxyacetone phosphate) 또는 GA3P(glyceraldehyde- 3-phosphate)로부터 글리세롤 생산에 필요한 2가지 종류의 효소인 GPD(glycerol-3-phosphate dehydrogenase) 및 GPP(glycerol-3-phosphate phosphatase)를 효모로부터 클로닝하여 호스트 균주에서 발현시켜 본 발명의 제조합 크랩시엘라 뉴모니아 균주를 제조하였다. 크랩시엘라 뉴모니아가 가지고 있는 GPD는 역반응이 우세하여 글리세롤의 산화에는 사용될 수 있지만 글리세롤 생산 반응에는 부적합하다. 본 발명에서는 GDP 및 GPP를 발현하는 제조합 크랩시엘라 뉴모니아를 제조하고, 포도당으로부터 글리세롤 생산 여부를 확인하였다.
- [0054] 글리세롤 생산으로 인해 GPD 및 GPP의 성공적인 이종 발현을 확인한 후, 생산된 글리세롤이 본래 호스트 균주가 가진 글리세롤 산화경로를 통해 동화되는 것을 막기 위해 산화경로의 다양한 유전자가 결실된 결실 균주를 제작하였다. 산화경로는 G3P(glycerol-3-phosphate)를 중간체로 하는 호흡경로, DHA(dihydroxyacetone)을 중간체로 하는 발효경로로 나눌 수 있다. 이들 경로의 유전자 결실이 글리세롤 및 1,3-프로판디올 생산에 미치는 영향을 조사하기 위해 결실은 개별적으로 또는 동시에 이루어졌다. 두 경로(호흡/발효) 모두에서 결실이 이루어졌을 때

글리세롤 생산 증가 효과가 분명하게 드러났다.

- [0055] 글리세롤 생산 증가와 달리 1,3-프로판디올의 생산은 높지 않았다. 낮은 1,3-프로판디올 생산을 해결하기 위해 글리세롤로부터 1,3-프로판디올을 생산하는 주요 효소들에 대한 과발현을 시도하였다. 과발현은 본래 크렙시엘라 뉴모니아가 가진 유전자를 이용하였다. 또한 기질로 사용되는 포도당이 이들 유전자의 발현에 미치는 영향을 조사함으로써 탄소대사저해의 심각성을 인지하였다. 이들 주요 효소들의 과발현은 산화경로의 결실과 더불어 1,3-프로판디올의 생산 향상에 크게 기여하였다. 하지만 수율 향상은 어느 정도 수준에서 더 이상 증가하지 못했다.
- [0056] 포도당으로부터 글리세롤 및 1,3-프로판디올을 생산하기 위해서는 NADH가 필요하다. 따라서, 세포 내 NADH/NAD⁺ 비는 이들 생산물 생산에 중요한 영향을 미칠 수 있다. 글리세롤이나 1,3-프로판디올 생산에 유리하도록 NADH/NAD⁺ 비를 높게 유지하려면, NADH 재생 또는 공급을 향상시키거나 NADH 소모를 감소시켜야 한다. NADH 공급을 향상시키기 위해 글리세롤 산화경로 중 글리세롤 탈수소효소(DhaD)의 반응을 다시 재개하거나, 5-인산경로(Pentose Phosphate 경로; PP 경로)와 해당과정의 활성화를 위한 유전자 조작 균주가 개발되었다. DhaD 반응은 글리세롤 동화(분해) 반응의 첫 단계 반응이므로 글리세롤을 분해하는 단점이 있지만 NAD⁺의 환원반응을 수반하기 때문에 NADH 공급을 증가시킬 수 있으며, PP 경로는 Zwf, Gnd 효소 반응이 NADPH를 생산함으로써 포도당을 피루브산으로 전환하는 과정에서 해당과정인 Embden Meyerhoff Parnas 경로 (EMP 경로)보다 많은 환원력을 공급해 준다. 한편, NADH 소모를 감소시키기 위한 또 다른 노력으로, NADH를 필요로 하는 숙신산, 젖산, 에탄올 생산경로의 유전자 결실이 이루어졌다.
- [0057] 이러한 변이 균주들은 1,3-프로판디올 생산증가에 어느 정도 기여하였지만, 생산된 글리세롤을 1,3-프로판디올로 모두 전환하지는 못했다. 1,3-프로판디올로 전환되지 못한 글리세롤은 배양 배지로 유출되었다. 글리세롤이 세포 내에서 밖으로 유출되지 않고 세포 내 머물면서 1,3-프로판디올 생산에 충분히 사용될 수 있도록 글리세롤 수송 막 단백질의 결실이 이루어졌다. 결실 균주는 글리세롤 유출 감소 및 1,3-프로판디올 생산증가에 영향을 주었지만 글리세롤 유출을 완전히 막지는 못하였다. 이는 글리세롤 수송에 관련된 다양한 수송체, 혹은 기작들이 존재함을 암시한다.
- [0058] 한편, 탄소대사저해(CCR, carbon catabolite repression)로 인한 주요 효소들(DhaB, DhaT)의 발현저해 및 독성 있는 아세트산 축적과 같은 오버플로우(overflow) 대사를 완화하기 위해 포도당의 PTS 시스템을 비활성화 하였다. PTS 시스템의 비활성화는 ptsG 유전자를 결실함으로써 얻어졌다. ptsG 유전자를 결실시킨 경우 DhaB, DhaT 효소의 과발현 없이 1,3-프로판디올 생산이 성공적으로 이루어졌다. 또한 아세트산의 축적이 유의하게 감소하였다.
- [0059] DhaB, DhaT의 과발현 없이도 1,3-프로판디올을 잘 생산할 수 있고, 아세트산의 축적이 낮은 ptsG 결실 균주를 이용하여 생산 수율을 더욱 향상시키고 부산물의 생산을 최소화하기 위해 앞서 기술되었던 방법들이 복합적으로 적용되었다. 글리세롤 수송체의 결실, NADH 소모하는 다양한 발효경로들의 결실, 아세트산 생산 유전자pta-ackA의 결실이 그것들이다.
- [0061] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당 업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.
- [0063] <실험예>
- [0064] 하기의 실험예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.
- [0066] 1. 실험 재료
- [0067] 제한 효소를 비롯한 유전자 변형에 사용되는 효소들은 New England Bio-Labs (Beverly, MA, USA)에서 구매하였다. DNA 중합 효소는 SolGent co., Ltd (Seoul, Korea)에서, 플라스미드 DNA의 분리 및 젤 DNA 추출 키트는 Cosmogentech Co. Ltd. (Seoul, Korea)에서 각각 구매하였다. 게놈 DNA 분리 키트 및 RNAlater 용액은 Promega (Madison, WI, USA)와 ThermoFisher Scientific (Seoul, Korea)에서 각각 구매하였다. RNA 분리 키트 및

pQE80L 플라스미드는 Qiagen (Mannheim, Germany)에서 구입하였다. Seamless 클로닝 키트와 SuperScript III first-strand synthesis system은 Invitrogen (Seoul, Korea)에서 구입하였다. pCDFDuet-1은 Novagen (Merck Millipore Corporation, Darmstadt, Germany)에서 구입하였다. 프라이머는 Macrogen Co. Ltd. (Seoul, Korea)을 통해 합성하였다. 트립톤과 효모 추출물은 Difco (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)에서 구입하였고 글리세롤, 포도당을 비롯한 표기되지 않은 화학 물질들은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구매하였다.

[0069] 2. 플라스미드 및 균주 제작

[0070] 표 1은 본 발명에 사용된 균주 및 플라스미드를 보여준다.

[0071] 본 발명에서 사용된 호스트 균주는 크렙시엘라 뉴모니아(K.pneumoniae) J2B (KCCM11213P) 균주로서, 본 발명자들의 선행특허인 한국 공개특허 제10-2013-0095395에 개시된 방법으로 분리될 수 있고, 상기 균주는 그람음성의 통성 혐기균으로서, 한국미생물보존센터(국외)에 2011.10.14자로 기탁(기탁번호:KCCM11213P)되어 있다. 그러나 본 발명의 호스트 균주는 반드시 크렙시엘라 뉴모니아 J2B일 필요는 없으며, 일반적인 크렙시엘라 뉴모니아를 사용하면 된다.

[0073] pQE80LK 플라스미드는 pQE80L(중간 카피수, ~30 카피) 벡터에 카나마이신 저항 유전자를 삽입함으로써 새롭게 제작되었다. 코돈-최적화 후 GenScript에서 합성된 GPD를 발현하는 gdp1 유전자(서열번호 1) 및 GPP를 발현하는 gpp2 유전자(서열번호 2)는 발현벡터 pQE80LK에 클로닝되었고, 그 결과 얻어진 발현벡터는 pDIP2로 명명되었다. gfp, gdp1 및 gpp2의 구성적 발현을 위해 이들 유전자의 5'UTR 서열은 "N11-13AAGGAGN6-8" 및 각 코딩 서열의 35개 뉴클레오타이드를 제약 조건으로, 목표 발현 수준을 6백만으로 설정하여 UTR 디자이너 (Seo S. W., Yang J.-S., Kim I., Yang J., Min B. E., Kim S. & Jung G. Y. (2013) Predictive design of mRNA translation initiation region to control prokaryotic translation efficiency. Metab. Eng. 15, 67-74)를 이용해 디자인되었다. 발현 카세트는 gfp의 구성적 발현을 통해 합성 프로모터의 강도를 조사할 수 있도록 고안되었다. 우선, upstream의 insulator와 다른 합성 프로모터를 포함한 합성 카세트들은 합성된 후 pCDF 벡터(중간 카피수, ~40카피)에 클로닝 되었다. 그리고 디자인된 5'UTR과 함께 gfp는 제작된 플라스미드에 클로닝 되었다. gdp1gpp2의 구성적 발현은 pDIP2에서 증폭된 5' UTR-gdp1-5' UTR-gpp2에 의해 gfp를 대체함으로써 제작되었다. DhaT 발현을 위해서는 K. pneumoniae J2B의 dhaT를 pQE80LK 벡터에 클로닝 함으로써 pT, pDIP2T 두 개의 플라스미드가 제작되었다. 도 9는 본 발명에서 제작된 플라스미드의 모식도를 나타낸 것이다.

[0074] 글리세롤 산화경로의 결실균주 개발은 pKOV 플라스미드를 이용하는 방법을 사용하였다(Link A.J., Phillips D. & Church G. M. (1997) Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type Escherichia coli: application to open reading frame characterization. J. Bacteriol. 179, 6228-6237). 간단히 설명하면, 결실 유전자의 upstream과 downstream 영역을 각각 약 500bp씩 포함하는 2개의 DNA fragment를 PCR로 합성한 후, 이들을 overlap PCR로 연결하고 pKOV 벡터에 클로닝 하였다. 결실 유전자의 upstream과 downstream을 포함한 pKOV 벡터는 형질전환을 통해 균주에 도입되었다. 형질전환된 균주는 항생제 마커를 이용해 스크리닝되었고, 30 °C, overnight 배양과 42 °C 배양을 순차적으로 진행함으로써 상동재조합을 통한 유전자를 결실을 시도하였다. 최종 결실 균주는 PCR을 통한 결실 부위의 서열 및 사이즈 확인을 통해 스크리닝되었다. 그리고 도입된 플라스미드는 자당(sucrose)이 포함된 배지에 배양함으로써 큐어링(curing)되었다.

[0076] 본 발명에서 결실되는 유전자의 뉴클레오타이드 서열은 다음과 같다:

[0077] - 서열번호 9: GlpK upstream의 뉴클레오타이드 서열

[0078] - 서열번호 10: GlpK downstream의 뉴클레오타이드 서열

[0079] - 서열번호 11: GlpD upstream의 뉴클레오타이드 서열

[0080] - 서열번호 12: GlpD downstream의 뉴클레오타이드 서열

[0081] - 서열번호 13: DhaD upstream의 뉴클레오타이드 서열

- [0082] - 서열번호 14: DhaD downstream의 뉴클레오타이드 서열
- [0083] - 서열번호 15: GlpA upstream의 뉴클레오타이드 서열
- [0084] - 서열번호 16: GlpA downstream의 뉴클레오타이드 서열

표 1

균주/플라스미드	유전자형 또는 특징
균주	
J2B	<i>K.pneumoniae</i> J2B (KCCM11213P)
J2B1	J2B Δglp
J2B2	J2B $\Delta glpK\Delta glpD\Delta glpA$
J2B3	J2B $\Delta glpK\Delta glpD\Delta glpA\Delta dhaD$
J2B4	J2B $\Delta glpK\Delta glpD\Delta glpA\Delta dhaD\Delta glpA$
J2B5	J2B3 $\Delta pfkA$
J2B6	J2B3 $\Delta adhE$
J2B7	J2B3 $\Delta ldhA$
J2B8	J2B3 $\Delta pfkB$
J2B9	J2B3 $\Delta glpF1$
J2B10	J2B3 $\Delta glpF2$
J2B11	J2B3 $\Delta glpF1\Delta glpF2$
J2B12	J2B3 $\Delta ptsG$
J2B13	J2B12 $\Delta glpF1\Delta glpF2$

[0086]

J2B14	J2B12 $\Delta glpF1\Delta glpF2\Delta adhE\Delta ldhA\Delta frdA\Delta pfIB$
J2B15	J2B12 $\Delta glpF1\Delta glpF2\Delta adhE\Delta ldhA\Delta frdA\Delta pfIB\Delta edd-eda\Deltapta-ackA$
J2B-1	J2B harboring pD1P2
J2B1-1	J2B1 harboring pD1P2
J2B2-1	J2B2 harboring pD1P2
J2B2-5	J2B2 harboring pD1P2T and pBG
J2B3-1	J2B3 harboring pD1P2
J2B3-2	J2B3 harboring pD1P1
J2B3-3	J2B3 harboring pD2P1
J2B3-4	J2B3 harboring pD1P2 and pBG
J2B3-5	J2B3 harboring pD1P2T and pBG
J2B3-6	J2B3 harboring pD1P2T
J2B3-7	J2B3 harboring pSP10D1P2
J2B3-8	J2B3 harboring pSP10D1P2 and pBG
J2B3-9	J2B3 harboring pSP10D1P2 and pT
J2B3-10	J2B3 harboring pSP10D1P2, pBG and pT (KCTC13304BP, 수탁일 2017.06.28)
J2B4-1	J2B4 harboring pD1P2

[0087]

J2B5-5	J2B5 harboring pD1P2T and pBG
J2B6-5	J2B6 harboring pD1P2T and pBG
J2B7-5	J2B7 harboring pD1P2T and pBG
J2B8-5	J2B8 harboring pD1P2T and pBG
J2B9-5	J2B9 harboring pD1P2T and pBG
J2B10-5	J2B10 harboring pD1P2T and pBG
J2B11-5	J2B11 harboring pD1P2T and pBG
J2B12-7	J2B12 harboring pSP10D1P2
J2B13-7	J2B13 harboring pSP10D1P2
J2B14-7	J2B14 harboring pSP10D1P2
J2B15-7	J2B15 harboring pSP10D1P2
플라스미드	
pD1P2	<i>gpd1gpp2</i> under T5 promoter in pQE80LK
pD1P2T	<i>gpd1gpp2</i> and <i>dhaT</i> under T5 promoter in pQE80LK
pT	<i>dhaT</i> under T5 promoter in pQE80LK
pBG	<i>dhaB</i> and <i>gdrAB</i> under <i>tac</i> promoter in pDK7(p15A)
pSP10D1P2	<i>gpd1gpp2</i> under SP10 promoter in pCDF

[0088]

[0090]

본 발명에서 이용한 뉴클레오타이드 서열 또는 아미노산 서열은 표 2에 나타내었다. 또한, 본 발명에서 이용된 유전자 및 이를 증폭하기 위한 프라이머 서열(과발현 유전자의 프라이머 서열)을 각각 표 3 및 표 4에 나타내었다.

표 2

서열번호	서열
1	ATGTCGGCTGCTGCTGATCGCCTGAATCTGACCTCGGGCCATCTGAATGCTGGTCGCAAACG CTCCTCTTCGTGCGGTGTCGCTGAAAGCGGCCGAAAAACCGTTTAAAGTTACCGTCATTGGCA GCGGTAACCTGGGGCACCACGATCGCGAAAGTGTTGCCGAAAATTGCAAAGGCTATCCGGA AGTGTTTGCGCCGATTGTGAGATGTGGGTTTTCAAGAGGAAATCAACGGCGAGAAACTG ACCGAAATTATCAACACGCGCCATCAGAATGTCAAATACCTGCCGGGCATTACCTGCGCGGA TAACCTGGTGGCCAATCCGATCTGATCGACAGCGTTAAAGATGTGGATATCATCGTTTTCAA CATTCCGCACCAGTTCCTGCCGCGCATCTGCTCCAGCTGAAAGGCCATGTGGATAGTCACG TCGTGCGATTCTTGTCTGAAAGGTTTTGAAGTCGGTGCCAAAGGCGTGACGCTGCTGAGC AGCTATATTACCGAGGAACTGGGTATCCAGTGTGGCGCGCTGAGTGGTGCGAACATTGCCAC CGAAGTGGCACAGGAACATTGGTCTGAGACCACGGTCGCTTATCACATCCCGAAAGATTTC GCGGCGAAGGCAAAGATGTTGACCATAAAGTCTGAAAGCACTGTTTCATCGTCCGTACTTC CACGTGTCAGTTATCGAAGACGTGGCCGGCATTTCGATCTGCGGTGCGCTGAAAAATGTCGT GGCCTGGGCTGTGGTTTTGTTGAAGGCCTGGGTTGGGGCAACAATGCGTCAGCAGCTATTC AGCGCGTCGGTCTGGGCGAAATTATCCGTTTCGGCCAGATGTTTTCCCGGAAAGCCGTGAG GAAACCTATTACCGAGAGTCCGCGAGGTGTGGCTGATCTGATCACCACGTGCGCCGGCGGTC GCAACGTCAAAGTGGCACGTCTGATGGCTACCTCAGGCAAAGACGCATGGGAGTGTGAAAA AGAGCTGCTGAATGGCCAGTCGGCTCAGGGTCTGATTACCTGCAAAGAAGTGACAGAGTGG CTGAAACGTGTGGCTCTGTTGAAGATTTCCGCTGTTGAGGCCGTGATCAGATCGTTTAC AACAACCTACCCGATGAAAAACCTGCCGGACATGATTGAAGAACTGGACCTGCACGAGGACT AA
2	ATGGGCTGACGACCAAACCGCTGAGCCTGAAAGTCAACGCTGCACTGTTGACGTGGACG GTACGATTATCATTAGCCAGCCGGCAATTGCGGCCTTTTGGCGCGATTTCGGTAAAGACAAA CCGTATTTTGATGCCGAACATGTGATTCAAGTTAGCCACGGCTGGCGTACCTTCGATGCAATC GCTAAATTTGACCGGACTTCGCTAACGAAGAGTATGTGAATAAACTGGAAGCGGAGATTCC GGTAAATACGGCGAGAAAAGCATCGAAGTGCCGGGCGCCGTGAAACTGTGCAACGCGCTG AATGCCCTGCCGAAAGAAAAATGGGCGGTGCGCACCTCTGGTACGCGCGATATGGCACAGA AATGTTTTGAGCATCTGGGCATTCGCCGTCCGAAATATTCATCACGGCCAACGACGTGAAA CAGGGTAAACCGCACCCGGAACCGTATCTGAAAGGCCGTAAACGGCCTGGGTTACCCGATTA ATGAACAGGACCCGAGCAAATCCAAAGTGGTTGTCTTTGAGGACGCACCGGCTGGCATTGC AGCTGGTAAAGCGGCGGGTTGCAAAATTATCGGTATCGCGACCACGTTTGATCTGGACTTCC TGAAGAAAAAGGCTGTGATATCATCGTTAAAAACCATGAAAGCATCCGCGTCGGCGGTTAC AATGCGGAGACCGACGAGGTGGAGTTTATTTTGACGATTATCTGTATGCGAAAGACGATCT GCTGAAATGGTGA
3	CATGAAAAGATCAAAACGATTGTCAGTACTGGCCAGCGCCCGTCAATCAGGACGGGCTG

[0092]

	ATTGGCGAGTGGCCTGAAGAGGGGCTGATCGCCATGGACAGCCCCTTGACCCGGTCTCTTC AGTAAAAGTGGACAACGGTCTGATCGTCGAGCTGGACGGCAAACGCCGGGACCAGTTTGAC ATGATCGACCGATTATCGCCGATTACGCGATCAACGTTGAGCGCACAGAGCAGGCAATGC GCCTGGAGGCGGTGAAATAGCCCGCATGCTGGTGGATATTACGTCAGTCGGGAGGAGAT CATTGCCATCACTACCGCCATCACGCCGGCCAAAGCGGTGAGGTGATGGCGCAGATGAAC GTGGTGGAGATGATGATGGCGCTGCAGAAGATGCGTGCCCGCCGGACCCCTCCAACCAGT GCCACGTCACCAATCTCAAAGATAATCCGGTGCAGATTGCTGCTGACGCCGCCGAGGCCGG GATCCGCGGCTTCTCAGAACAGGAGACCACGGTCGGTATCGCGCGCTATGCGCCGTTTAAC GCCCTGGCGCTGTTGGTTCGGTTCGAGTGCAGGCCGCCCGCGCTTTTGACGCAGTGCCTGGT GGAAGAGGCCACCGAGCTGGAGCTGGGCATGCGTGGCTTAACCAGCTACGCCGAGACGGT GTCGGTCTACGGCACCGAAGCGGTATTTACCGACGGCGATGATACTCCGTGGTCAAAGGCG TTCCTCGCCTCGGCTACGCTCCCGCGGGTTGAAAATGCGCTACACCTCCGGCACCGGATC CGAAGCGCTGATGGGCTATTCGGAGAGCAAGTCGATGCTCTACCTCGAATCGCGCTGCATCT TCATTACCAAAGGCGCCGGGTTAGGGGCTGAAAACGGCGCGGTGAGCTGTATCGGCAT GACCGGCGCTGTGCCGTGGGCATTGGGCGGTGCTGGCGGAAAACCTGATCGCCTCTATG CTCGACCTCGAAGTGGCGTCCGCCAACGACGAGACTTTCTCCACTCGGATATTCGCCGCAC CGCGCGCACCCCTGATGCAGATGCTGCCGGGCACCGACTTTATTTCTCCGGCTACAGCGCGG TGCCGAACTACGACAACATGTCGCCGGCTCGAATTCGATGCGGAAGATTTTGATGATTAC AACATCCTGCAGCGTGACCTGATGGTTGACGGCGGCCTGCGTCCGGTGACCGAGGCGGAAA CCATTGCCATTGCCAGAAAGCGGCGCGGGCGATCCAGGCGTTTTCCGCGAGCTGGGGCT GCCGCCAATCGCCGACGAGGAGGTGGAGGCCGCCACCTACGCGCACGGTAGCAACGAGAT GCCGCCGCGTAACGTGGTGGAGGATCTGAGTGGGTGGAAGAGATGATGAAGCGCAACAT CACCGGCTCGATATTGTCGGCGCGCTGAGCCGACGCGCTTTGAGGATATGCCAGCAAT ATTCTCAATATGTGCGCCAGCGGGTCACCGCGGATTACCTGCAGACCTCGGCCATTCTCGA TCGGCAGTTCGAGGTGGTGAAGTGGGTCAACGACATCAATGACTATCAGGGGCCGGGCACC GGCTATCGCATCTCTGCCGAACGCTGGGCGGAGATCAAAAATATTCCGGGCGTGGTTACGCC CGACACCATTGAATAA
4	ATGCCCCATGGCGCGATCCTCAAAGAGCTGATTGCCGGGGTGGAAGAAGAGGGGCTTCACG CCCGGGTGGTGCGCATCTGCGCACGTCCGACGTCTCCTTATGGCTGGGATGCGGCCAAC CTGAGCGGCTCGGGGATCGGCATCGGTATCCAGTCAAGGGGACCACGGTCATCCATCAGC GCGATCTGCTGCCGCTCAGCAACCTGGAGCTGTTCTCCAGGCGCCGCTGCTGACGCTGGAA ACCTACCGGCAGATTGGCAAAAACGCCGCGCTATGCGCGCAAAGAGTCACCTTCGCCGG TGCCGGTGGTGAACGATCAGATGGTGGCGCCGAAATTTATGGCCAAAGCCGCGCTATTCAT ATCAAAGAGACCAACATGTGGTGCAGGACGCCGAGCCCCTCACCTGCACGTCGACTTAG TAAGGGAGTGA
5	ATGAGCGAGAAAACCATGCGCGTGCAGGATTATCCGTTAGCCACCCGCTGCCCGGAGCATA TCCTGACGCCTACCGGCAAACATTGACCGATATTACCCTCGAGAAGGTGCTCTCTGGCGAG GTGGGCCCCGAGGATGTGCGGATCTCTGCCAGACCCCTTGAGTACCAGGCGCAGATTGCCG

[0093]

	AGCAGATGCAGCGCCATGCGGTGGCGCGCAATTTCCGCCGCGCGGCGGAGCTTATCGCCAT TCCTGACGAGCGCATTCTGGCTATCTATAACGCGCTGCGCCCGTTCCGCTCCTCGCAGGCGG AGTGCTGGCGATCGCCGACGAGCTGGAGCACACCTGGCATGCGACAGTGAATGCCGCCTT TGTCGGGAGTGGCGGAAGTGTATCAGCAGCGGCATAAGCTGCGTAAAGGAAGCTAA
6	ATGCCGTTAATAGCCGGGATTGATATCGGCAACGCCACCACCGAGGTGGCGCTGGCGTCCG ACGACCCGCGAGGCGAGGGCGTTTGTGGCAGCGGGATCGTCGCGACGACGGGCATGAAAG GGACGCGGGACAATATCGCCGGGACCTCGCCGCGCTGGAGCAGGCCCTGGCGAAAACAC CGTGGTCGATGAGCGATGTCTCTCGCATCTATCTTAACGAAGCCGCGCGGTGATTGGCGAT GTGGCGATGGAGACCATCACCGAGACCATTATCACCGAATCGACCATGATCGGTGATAACCC GCAGACGCCGGGGGGGTGGCGCTTGGCGTGGGGACGACTATCGCCCTCGGGCGGCTGGC GACGCTGCCGGCGCGCAGTATGCCGAGGGTGGATCGTACTGATTGACGACGCCGTCGAT TTCCTTGACGCCGTGTGGTGGCTCAATGAGGCGCTCGACCGGGGGATCAACGTGGTGGCGG CGATCCTCAAAAAGGACGACGGCGTGTGGTGAACAACCGCCTGCGTAAAACCTGCCGGT GGTAGATGAAGTGACGCTGCTGGAGCAGGTCCCCGAGGGGGTAATGGCGGCGGTGGAAGT GGCCGCGCCGGGCCAGGTGGTGGGATCCTGTGCAATCCCTACGGGATCGCCACCTTCTTC GGGCTAAGCCCGGAAGAGACCCAGGCCATCGTCCCATCGCCGCGCCCTGATTGGCAACC GTTACGCGGTGGTGCTCAAGACCCGCGAGGGGGATGTGAGTCGCGGGTGATCCCGGCGG GCAACCTCTACATTAGCGGGGAAAAGCGCCGCGGAGAGGCCGATGTCGCCGAGGGCGCGG AAGCCATCATGAGGCGATGAGCGCTGCGCTCCGGTACGCGACATCCGCGGCGAACCAG GCACTCACGCCGGCGGCATGCTTGAAGCGGTGCGCAAGTAATGGCGTCCCTGACCGACCA TGAGATGAGCGCGATATACATCCAGGATCTGCTGGCGGTGGATACGTTTATTCGCGCAAGG TGCAGGGCGGGATGGCCGGCGAGTGCGCCATGGAATAATGCCGTCGGGATGGCGGCGATGG TGAAAGCGGATCGTCTGCAATGCAGTTATCGCCCGCAACTGAGCGCCCGACTGCAGAC CGAGGTGGTGGTGGGCGCGGTGGAGGCCAATGAGGATCGCCGGGGCGTTAACCACTCC CGGCTGTGCGGCGCCGCTGGCGATCCTCGACCTCGGCGCCGGCTCGACGGATGCGGCGATC GTCAACGCGGAGGGGCGAGATAACGCGCGTCCATCTCGCCGGGGCGGGGAATATGGTCAGC CTGTTGATTAACCCGAGCTGGGCCTCGAGGATCTTTCGCTGGCGGAAGCGATAAAAAAATA CCCGCTGGCCAAAGTGGAAGCCTGTTCAAGTATTCGTCACGAGAATGGCGCGGTGGAGTTCT TTCGGGAAGCCCTCAGCCCGCGGTGTTCCGCAAGTGGTGTACATCAAGGAGGGCGAACT GGTGCCGATCGATAACGCCAGCCGCTGGAAAAAATTCGTCTCGTGCGCCGCGAGGCGAAA GAGAAAGTGTGTCACCAACTGCCTGCGCGCGCTGCGCCAGGTCTACCCGGCGGTTCCAT TCGCGATATCGCCTTTGGTGGTGGTGGGCGGCTCATCGCTGGACTTTGAGATCCCGCAGC TTATCACGGAAGCCTTGTGCACTATGGCGTGGTGGCGGGCAGGGCAATATTCGGGGAAC AGAAGGGCCGCGCAATGCGGTGCCACCGGGCTGCTACTGGCCGGTCAGGCGAATTAA
7	ATGTCGCTTTCACCGCCAGGCGTACGCCTGTTTTACGATCCGCGCGGGCACCATGCCGGCGC CATCAATGAGCTGTGCTGGGGGCTGGAGGAGCAGGGGGTCCCCTGCCAGACCATAACCTAT GACGGAGGCGGTGACGCCGCTGCGTGGGCGCCCTGGCGGCCAGAAGCTCGCCCTGCGG GTGGGTATCGGGCTCAGCGCGTCCGGCGAGATAGCCCTCACTCATGCCAGCTGCCGGCGG

[0094]

	ACGCGCCGCTGGCTACCGGACACGTACCGATAGCGACGATCAACTGCGTACGCTCGGCGC CAACGCCGGGACAGCTGGTTAAAGTCCTGCCGTTAAGTGAGAGAACTGATCTAGA
8	ATGAGCTATCGTATGTTTGATTATCTGGTGCCAAACGTTAACTTTTTGGCCCCAACGCCATTT CTGTAGTCGGCGAACGCTGCCAGCTGTGGGGGGGAAAAAGCCCTGCTGGTCACCGACAA AGGCCTGCGGGCAATTAAGATGGCGCGGTGGACAAAACCTGCATTATCTGCGGGAGGCC GGGATCGAGGTGGCGATCTTTGACGGCGTCGAGCCGAACCCGAAAGACACCAACGTGCGC GACGGCCTCGCCGTGTTTCGCCGCGAACAGTGCGACATCATCGTCACCGTGGGCGGCGCA GCCCCGACGATTGCGGCAAAGGCATCGGCATCGCCGCCACCCATGAGGGCGATCTGTACCA GTATGCCGGAATCGAGACCCTGACCAACCCGCTGCCGCTATCGTCGCGGTCAATACCACC GCCGGCACCGCCAGCGAGGTACCCGCCACTGCGTCCTGACCAACCCGAAACCAAAGTGA AGTTTGATCGTCAGCTGGCGCAACCTGCCGTCGGTCTCTATCAACGATCCACTGCTGATGA TCGGTAAACCGCCGCCCTGACCGCGGCGACCGGGATGGATGCCCTGACCCACGCCGTAGA GGCCTATATCTCAAAGACGCTAACCCGGTGACGGACGCCGCCCATGCAGGCGATCCGC CTCATCGCCGCAACCTGCGCCAGGCCGTGGCCCTCGGCAGCAATCTGCAGGCGCGGGAAA ACATGGCCTATGCCTCTCTGCTGGCCGGGATGGCTTTCAATAACGCCAACCTCGGCTACGTG CACGCCATGGCGCACAGCTGGGCGGCCTGTACGACATGCCGCACGGCGTGGCCAACGCT GTCCTGCTGCCGCATGTGGCGCGCTACAACCTGATCGCCAACCCGGAGAAATTGCCGATAT CGCTGAAGTATGGGCGAAAATATCACGGACTGTCCACTCTCGACGCGCGGAAAAAGCC ATCGCCGCTATCACGCTGTGTCGATGGATATCGGTATTCGCGAGCATCTGCGCGATCTGGG GGTAAAAGAGGCCGACTTCCCTACATGGCGGAGATGGCTCTGAAAGACGGCAATGCGTTC TCGAACCCGCGTAAAGGCAACGAGCAGGAGATTGCCGCGATTTCCGCCAGGCATTCTGA
9	CATTGAAGTTCGATATTCTCGTTTTTGCTCGTTAACGATAAATTAACACTATGCCTACATGG CAATATGGTCGTCTGTGACCACCCTACATACAATAATCATCACCGCTTCAGGATTGATTA TGAGCCAAACATCAACCTTAAAGGCCAGTGCGATCGCAGAGTTCCTCGGTACCGGGTTGTG ATCTTTTTCGGCGTTGGGTGCGTGGCTGCGCTCAAGGTGCGGGAGCCAGCTTCGGACAATG GGAAATCAGCATCATCTGGGGTCTGGGCGTCGCCATGGCGATCTACCTGACCGCCGGGGTC TCCGGTGCGCACCTTAACCCAGCGGTGACTATCGCGCTGTGGCTGTTGCGCTGCTTCGAAGG CCGCAAAGTGGTTCTTTTATTATTTGCAATTGCTGGCGCCTTTGCGCTGCGGCATTAGTT TACGGGCTTTACTACAATCTTTTCTCGATTATGAAACCAACCCACCATATGATTGCGGCAGC GTGGAAGCCTCGATCTGGCCGGCATTTTCTCACTTACCCGAACCCGCACATCAATTTGTG CAGGCCTTCGCGGTAGAGATGGTGATTACCGCTATCCTGATGGGCGTCATCCTGGCGCTGAC CGACGATGGCAACGGCATACCGCGCGGCCGCTGGCCCTCTGCTGATTGGCCTGCTGATT GCGGTGATTGGCGCCTCCATGGGACCGCTGACCGGCTTCGCCATGAACCCGGCGCGTGACA TCGGCCCGAAAGCCTTCGCCTGGCTGGCGGGGTGGGTGACGTCGCCTTACCGGCGGCAA AGATATTCCTATTTCTGGTGCCGCTGTGCGCACCGGTGGTGGCGCGGCGCTGGGCGCAT TCAGCTATCGTAAGCTGATTGGCCGTCACCTGCCTTGCACACCTGCGTGGAGGAAGAGCAA CAGAGCCCCCTCTTCCACCGCTCAACATAAAGCTTCGCTGTAATCTGACTACGGGACACC GACT

[0095]

10	ATTGTGAAGTTATTCCTGGCTTGCAGCGTAAACGCCTGAGCCGGGCTACAAAACCCCAAACA GCACGATCTTGATGCCCCGACAGGTGCGCAGCACCGCTTCCGGGTTTTTATCAACCAAACA TCGGCAGCAGCAGGTACAGCTTAATCACCAGCGCGTTGACGATATCGATAAAGAACGCCCC CACCATCGGCACTACCAGGAAGGCCATATGCGATGGCCCCGAAACGGTCGGTAATCGCCTGC ATATTGGCGATCGCCGTCGGCGTTGCCCCAGGCCAAACCCGCAATGCCCGGCTGCCAGCA CCGCGGCATCGTAGTTTTTCCCCATCATCCGATAGGTGACGAACACCGCATACAGCGCCATC GCCAGCGCCTGCACCGCCAGGATAATAATCATCGGCAGCGCCAGCGAGGCCAACTCCACA GCTTGAGGCTCATCAGCGCCATGGCGAGGAACAGCGACAGGCTGACGTTGCCAACACCGA TACCGCGCGATCGAACACCCGATACAACCCCGCCAGCGCCAGGCTGTTGCTGAGGATCACG CCGATAAACAGCAGCAGACGAAGTTCGGCAGCTCGAAGACGCTCCCCGCCAGCAGTTGC GCAACCACCTTGCCAGCGTCAGACAGATGGCGATCAGGGCGATACTTTCGATCAGACCA GCGAGGTGATCACCCGCCCCACGTCCGGCTTTCAAAGCGGTTGGCGCCACCTGATCGTCC GGTGTCCCGTCCGGTGAGGAAGAGTGCTTACCAGATAACGCGCCACCGGGCCGCCGATCA GGCCGCCCAGCACCAGGCCGAAAGTCGCGCAGGCCATCGCCACCTCGGTGGCGTTGGCAA AACCGTAGCGCTCAACGAACAGCTTACTCCACGCCGCCCGGTGCCGTGGCCGCCGATAA GGTAATCGACCCGCCAGCAGACCCATTAGCGGATCCAGCCCCAGCAGCGTCGCCATGCCG ATACCGAGGGCGTTCTGCAGC
11	TCATTAACATGCAGCGAATCGCTTATTCACACAAAGGGGGATAGTATACCTGCCAGTCGTT AAAACGTCCCGCGCGCCACTTCCGCCGGGAAATGGCGATGCCAGGCGTCGAACCCGCCGTC AACGCTATAGACCTTATCAAACCCCTGCTGCAGCAGATACTGCGCGCGCCCTTGCTGCTGT TGCCGTGATAGCACATCACCATCACCGCCGTGTCAAAGTCGTTGTACGCATAAACGCGCCC AGCGTATCGTTGGTCAGATGAAACGCGCCCGCGTATGACCCATCGCATAGCTTTGCGGATC GCGGATATCGACCACTACCGCGTCTGCTGATGCAGTTTCTGGTGCGCTTCTTCAACATTGAT GCATTCAACTGTTCCATGATTCTTCTCTTCTCGTCATGACGGGCGATGGCCGGCCCAAT TTTACCCTGTAGTGATACCGTCAGGCGGTAAAGAAACGCCAATATGTTACCCCATCACTTCAA AATGTTTTTTGATGTTACCAAAAGCGCGTTTGTGTTGCTATAGTGAGCGATATCGAGCATTAT GAGCTTAAACGAAAGTGTGAGAGGGTAAGAACGTGGA
12	GGAAAGTCTGAAGTGTGTTAGCGTCTGACATCGCGTGGCGCCAGGAGAGAAATACCCGG GCTATGGCTTGCGCTTGCCCGGATACCTGTTCACAAATTAACGAGACTTTTTTCCAGTCG GCAATGTGACATTTATACTGAGTTCTCCCCCAATGCCGAATGTAGCGTTTTAGGGTCGAAA GCCGAGGGTCGTTATCAGTCTGTTCCATTTAGCGATCGTTGGCTGCTTTACCCCATAGCCG CAGCCATCTCTGTTTGCACATTTGCAACTCTTCTCGAAGCAAGTTTAAAGCGACAGACTGGC GTCTCTCTGCCGCTTTCGCTGCAATACGCTGCTGGCTTTCAGGACTCTGTTTCGCCATGAGTTC TTTTAGCGTGGCCATTATCGCTCCTTAGTCAGGTGTTGGCTGAATTCTCTGTGACCCAGAGTA ATCATCTCTTTGTAAAAACGTTTCTCATTATGCCATCCTATCGCCCGCACATAAACGATAG CTTCCGCAGAGGATCAAAAGCAAAAAGGCGCGGATGGGGAGCCCATGATGCTGAACCTG GAGT
13	ATATGATGATTCTGGCTGAGCGGACGAAAAAAGAATGCCTCGACGATCGGGTTTCATTACG

[0096]

	AAACATTGCTTCCTGATTTTGTCTTTATGGAACGTTTTGCTGAGGATATGGTGAAAATGCG AGCTGGCGCGCTTTTTTCTTCTGCCATAAGCGGCGGTGAGGATAGCCGGCGAAGCGGGTGG GAAAAAATTTTTGCTGATTTCTGCCGACTGCGGGAGAAAAGGCGGTCAAACACGGAGGAT TGTAAGGGCATTATGCGGCAAAGGAGCGGATCGGGATCGCAATCCTGACAGAGATTAGGGT TTTTGTTCGAATATGGAACGTAAAAAATTAACCTGTGTTTCATATCAGAACAAAAAGGCGAA AGATTTTTTTGTCCCTGCCGCCCTACAGTGATCGCACTGCTCCGGTACGCTCCGTTTCAGGC CGCGTTCACTGGCCGGCGCGGATAACGCCAGGGCTCATCATGTTTACATGCGCACTTATTT GAGGGTGAAAGGA
14	TTCGCGGTGGCTAAACCGCTGGCCCAGGTGAGCGTTTTTCTTCTCCCTCCGCGAGTCGCT GCCGGAGGGTTCTCTATGGTACAACGCGGAAAAGGATATGACTGTTCACTCAGGATAC CGGGAAGGCGGTCTCTCCGTATCGCCAGTCATGGCACCGCTGCAGCAAGTTTATGCAGC GCGAAACCTGGCAAACGCCGACCGAGGCCAGGGCCTGACCTTCGACTCCATCTGTCGGCG TAAACCGCGCTGCTCACCATCGGCCAGGCGCGCTGGAAGACGCTGGGAGTTTATGGAC GGCCGCCCTGCGCGCTGTTTATTCTTGATGAGTCCGCCTGCATCCTGAGCCGTTGCGGCGA GCCGCAAACCTGGCCCAGCTGGCTGCCCTGGGATTTGCGGACGGCAGCTACTGCGCGGAG AGCATTATCGGCACCTGCGCGCTGTCGCTGGCCGCGATGCAGGGCCAGCCGATCAACACCG CCGGCGATCGGCATTTTAAGCAGGCGCTACAGCCATGGAGTTTT
15	GCAGGAAAATGCGCGGATTCGAGCGGTGAGAGACCGATCCCATGATGAATTCGAAAATCC ATAGGCGATGGAGATACCGGAAAGGGCGAAGCCGAGGTGCCACGAGAGAACCCCTGCTC GATAAGATAAGGCATCGCCAGGGCAAAGTTCTTACGAACCAAATAGTAGCGGCATAACCA AAAAAGATGCCAATAAAAAATCTGCCAGCGTAATCGGCGATATAGCGGGTCAATCTCCGTGC TGGCAAACGCGCTTTATGCGCGCGGGTTAAAAATACTTAACATATCAGCCTCCGTGGCCC TTGCTGTTTTCTACTGACGTACGACAAAAATCCAGATTAATCACCAACTTCAAATATGGTCG CGATGGTAGGCAATACGTAGAGTTGATACTGTGAAACATCGCACAATTTGTTACAGAAATAT GACAAACGTTCCAATGTGAGCACGAAATCACATAACACGCTCAAATAACGCGCGAATATG CTCGAAATCAACAATAACCTTACTAATTGTGGCTAAATGGCGTTAAACGAAAGCAGAGGAG CTGAAGATGACGGGACGT
16	GATGAAGTTTGATTGCGCGATTATCGGCGGCGGGCTCGCCGGCCTGCTGTGCGGGCTGGCC CTGAATCAGCACGGCCTGCGCAGCGTCATCATCAGCCGCGGGCAGAGCGCGCTGCATTTTTC CTCCGCTGCTTAGACCTGCTCTCGGCGCTGCCAACGGCGATAACGTCACTGACGTCGCAC AAGGTGTGAGCAACTCGCTGAACAGCTTCTGAACACCCTTATCCCGTCTCGGCGCCGAG GCGGTGCTCGAATACGCGACACAGACCGAAGCCCTGCTGGCCGCTGCGGCGCGGTGATGC AGGGCGATGCGCGCCGGCCGACCGGCGGGTAACGCCGCTGGGGACGTTGCGCCCGCAT GGCTGTCGCCCTTGAGGTGCTGTGCGGCCCTGCCGTGCGAGGGCGCTGTCTGGTGGG GATCAGCGGCTTTGTGATTTTCAGCCGCATCTCGCCGCCGCGCGCTCGGTCAACACGGAG TTACCGCCGCGGCGGTGGAATCGAGTTACCGCTGCTGGATGTACTGCGTGACA

[0097]

표 3

유전자	생산효소/작용
gfp	녹색 형광 단백질(green fluorescent protein)
gpd1	글리세롤-3-포스페이트 디하이드로게나제(glycerol-3-phosphate dehydrogenase, GDP1)
gpp2	글리세롤-3-포스페이트 디하이드로게나제(glycerol-3-phosphate phosphatase, GPP2)
glpK	글리세롤 키나제(glycerol kinase, GlpK)
glpA/glpD	G-3-P 디하이드로게나제(G-3-P dehydrogenase)
dhaD	글리세롤 디하이드로게나제(glycerol dehydrogenase, DahD)
dhaK	디하이드록시아세톤 키나제(dihydroxyacetone kinase, DhaK)
dhaB	글리세롤 디하이드레이트(glycerol dehydratase, DhaB)/글리세롤 탈수화효소
gdrAB	GDHt reactivase/GDHt 재활성화 효소
dhaT	1,3-프로판디올 옥시도리덕타제(1,3-propanediol oxidoreductase, DhaT)/1,3-PDO 생산
frdA	푸마라제 리덕타제(fumarase reductase)

[0099]

pfkA	포스포프럭토키나제(phosphofructokinase)
adhE	알데하이드-알코올 디하이드로게나제(aldehyde-alcohol dehydrogenase)/에탄올 생성
ldhA	락테이트 디하이드로게나제(lactate dehydrogenase)/젖산 생성
pflB	피루베이트-포메이트 리아제(pyruvate-formate lyase)
glpF1/glpF2	glycerol uptake facilitator protein/글리세롤 전달 막 단백질 암호화
ptsG	PTS glucose-specific enzyme IIBC 포도당 전달 및 인산화 관련 단백질 암호화
edd-eda	포스포글루코네이트 디하이드라타제(phosphogluconate dehydratase, edd), 2-케토-3-디옥시-6-포스포글루코네이트 알돌라제(2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate aldolase, eda)/ED 경로
pta-ackA	포스포트랜스아세틸라제-아세테이트 키나제(phosphotransacetylase-acetate kinase/아세트산 생성

[0100]

표 4

유전자	프라이머 서열
gfp	5' - F GTGTGGAAGCTTCTTGGCTGAAAATAGGAGGTAAATTATGCAGAGCAAAGGCGAAGA ACTG-3' (서열번호 17)
	R 5'-CCGGCCGATATCTTATTAATGGTGATGGTGATGGTGTTTATAC-3' (서열번호 18)
gpd1	F 5'-GAGCTCGGTACCATGTCGGCTGCTGCTGATCG-3' (서열번호 19)
	R 5'-GGTATATCTCCTTGGATCCTTAGTCCTCGTGCAGGTCCAG-3' (서열번호 20)
gpp2	F 5'-GGATCCAAGGAGATATACCATGGGCCTGACGACCAAACC-3' (서열번호 21)
	R 5' -TAATTAAGCTTGCATGCCTGCAGTCACCATTTCAGCAGATCGTC-3' (서열번호 22)
dhaB	F 5'-GAGCTCGGTACCATGAAAAGATCAAAACGATTTG-3' (서열번호 23)
gdrA	R 5'-ACAGCCAAGCTTCTACTGGCCGGTCAGGCGAATTAAAC-3' (서열번호 24)
gdrB	5' - F ACAGCCAAGCTTAAAGGAAGCTAAGCGGAGGTCAGCATGTCGCTTTCACCGCCAGG CGTAC-3' (서열번호 25)
	R 5'-ACAGCCAAGCTTCAGTTTCTCTCACTTAACGGCAGGA-3' (서열번호 26)
dhaT	5' - F ATGGTGACTGCAGGCATGCAAGCTTAGGAGAAATTAAGTATGAGCTATCGTATGTTTG -3' (서열번호 27)
	R 5'-AGGAGTCCAAGCTCAGCTAATTAAGCTTTCAGAATGCCTGGCGGAAAATC-3' (서열번호 28)

[0101]

[0103]

3. 배양 배지 및 조건

[0104]

Luria-Bertani(LB) 아가플레이트의 단일 콜로니를 효모 추출물 (5g/L), NaCl (10g/L) 및 트립톤 (10g/L)이 포함된 LB 배지에 접종한 후 8시간 동안 배양하였다. 세포를 다시 신선한 M9 배지로 옮겨 12시간 배양함으로써 예비-접종물을 준비하였다. 예비-접종물로부터 세포를 다시 동일한 조건의 M9 배지에 접종하여 배양함으로써 생산 연구를 개시하였다. 본 연구에서 사용된 M9 배지(pH 7.0)는 효모 추출물 (1.0g/L), NH₄SO₄(1.0g/L) 및 MgSO₄ · 7H₂O (0.25 g/L)을 포함하고 10g/L의 포도당을 탄소원으로 포함하였다. 모든 실험은 세포농도는 0.05 OD₆₀₀에서 시작하였다.

[0105]

호기성, 미호기성, 혐기성과 같이 다양한 폭기 조건 하에서 30 °C 교반 - 플라스크 배양을 수행 하였다. 호기성

및 미호기성 배양은 산소 투과성 코르크가 사용된 250 mL 플라스크를 사용하였다. 혐기성 배양은 고무마개와 알루미늄 캡으로 닫힌 165 mL 혈청병을 사용하였고, 배양 전 기체상은 아르곤 가스로 치환되었다. 명시되지 않는 한 호기성 조건에서의 작업 배양량은 20mL였고, 미호기성 및 혐기성 조건에서는 50 mL로 고정되었다. 교반 속도는 호기성 조건의 경우 250 rpm이었고 미호기성 및 혐기성 조건의 경우 모두 100 rpm이었다. DhaB 및 DhaT의 과발현 동안 배양 배지에 보효소 B12 10 μ M을 보충하였다. 달리 명시되지 않는 한, 모든 배양액은 발현효소의 유도를 위해 0.1 mM IPTG가 사용되었다.

[0107] 4. 단백질 발현 조사

[0108] 단백질 발현 측정을 위한 균주배양은 LB 배지를 이용해 30 $^{\circ}$ C/200rpm에서 이루어졌고, 0.5mM IPTG로 0.5 OD₆₀₀에서 발현 유도하였다. 유도 후 10시간의 추가 배양이 이루어졌고, 배양액은 10,000 X g, 4 $^{\circ}$ C에서 10 분간 원심 분리하여 수확하였다. 세포 펠렛을 20 mM 인산칼륨 완충액 (pH 7.0)으로 2 회 세척하고 동일한 완충액에 재현탁시켰다. 현탁액은 프렌치프레스 셀 (FA-078A, Thermo Electron Co., Waltham, MA)을 사용하여 파쇄되었고, 파쇄된 세포 현탁액은 10,000 X g, 4 $^{\circ}$ C에서 20 분간 원심분리 후 상등액을 이용해 SDS-PAGE 분석에 사용되었다.

[0110] 5. 효소 활성 측정

[0111] GPD 활성은 활성을 측정하기 위해 적절한 양의 세포 파쇄물을 1 mM 디트리에리트리톨(dithioerythritol)과 1 mM MgCl₂를 함유한 20 mM 이미다졸-HCl 완충액 (pH 7.0)에 섞어 25 $^{\circ}$ C에서 2 분간 예비 배양 하였다. 이어서, 0.6 mM 디하이드록시 아세톤 및 0.1 mM NADH를 첨가하여 반응을 개시하였다. 소모된 NADH의 양은 $6.22 \times 10^3 \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 의 몰 흡광 계수 ($\Delta \epsilon_{340}$)를 사용하여 결정하였다.

[0112] 세포파쇄물의 DhaB 활성은 커플링된 효소 방법 (Yakusheva, M., Malahov, A., Poznanskaya, A. & Yakovlev, V., (1974) Determination of glycerol dehydratase activity by the coupled enzymic method. Anal. Biochem. 60, 293-301)을 약간 수정하여 측정하였다. 간단히 설명하면, 3 mM MgCl₂ 및 40 mM 1,2-프로판디올을 포함하는 20 mM 인산칼륨 완충액 (pH 8.0)을 혐기조건에서 준비하고 DhaB를 포함하는 적당량의 세포파쇄액 및 12 U/ml의 커플링 효소(효모의 알콜탈수소 효소)를 완충액에 혼합하여 37 $^{\circ}$ C 수조에서 3 분간 배양하였다. 효소 반응은 15 μ M 코엔자임 B12, 0.2 mM NADH 및 1.5 mM ATP를 첨가함으로써 개시되었다. 소모된 NADH의 양은 $\Delta \epsilon_{340} = 6.22 \times 10^3 \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 을 사용하여 결정되었다. DhaT 활성은 문헌(Lama, S., Ro, S. M., Seol, E. & Park, S., (2015) Characterization of 1,3-propanediol oxidoreductase (DhaT) from *Klebsiella pneumoniae* J2B. Biotechnol. Bioproc. E. 20, 971-979)에 기재된 방법을 사용하여 340 nm에서의 NAD⁺ 환원정도를 측정하여 결정하였다.

[0114] 6. 정량 PCR

[0115] 탄소원에 따른 유전자 발현을 조사하기 위해, 미호기 조건 하에서 각기 다른 10g/L의 탄소원(포도당, 글리세롤, 포도당+글리세롤, 과당+글리세롤)이 포함된 M9 배지에서 세포를 배양하였다. 배양 6 시간 후, 세포를 수확한 후 원심분리를 통해 펠렛을 수집하였다. 펠렛은 즉시 500 μ L의 RNeasy 용액에 재현탁 되었고 RNA isolation kit를 사용하여 총 RNA를 분리하였다. 분리된 RNA(1 μ g)는 SuperScript III first-strand synthesis system을 이용해 cDNA합성에 사용되었다. 실시간 PCR은 StepOne 실시간 PCR 시스템 (Applied Biosystems, USA)에서 SYBR green 방법을 통해 20 μ L 반응 부피에서 수행되었다. 모든 프라이머의 PCR 효능은 실험적으로 결정되었다. mRNA 수준의 정량 분석은 $\Delta \Delta \text{CT}$ 방법을 통해 계산되었다 (Yim S.H., Kim T.M., Hu H.J., Kim J.H., Kim B.J., Lee J.Y., Han B.G., Shin S.H., Jung S.H. & Chung Y.J. (2010) Copy number variations in East-Asian population and their evolutionary and functional implications. Hum. Mol. Genet. 19:1001-1008).

[0117] 7. 전세포 형광 분석

[0118] 전세포의 형광 (whole cell fluorescence, WCF) 분석은 100 mM 인산 완충액 (pH 7.0)에 현탁된 세포를 이용하여 측정되었다. 형광 강도는 PerkinElmer/Wallac Victor 2 Multi 라벨 계수기 (Ayyadurai, N., Neelamegam,

R., Nagasundarapandian, S., Edwardraja, S., Park, H.S., Lee, S.J., Yoo, T.H., Yoon, H., Lee, S.-G., (2009) Importance of expression system in the production of unnatural recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioproc. E.* 14, 257-265)를 사용하여 485 nm에서의 여기와 515 nm에서 방출을 수집함으로써 측정되었다. 빈 pCDF를 갖는 세포로부터 나온 형광을 기준(blank) 값으로 사용하였고 각각의 측정 값에서 기준 값을 빼줌으로써 보정하였다.

[0120] 8. 분석방법

[0121] 미생물의 농도는 분광 광도계 (Lambda 20, PerkinElmer, Norwalk, CT, USA)를 사용하여 10mm 길이의 큐벳에서 측정하였다. 단백질 농도는 소혈청 알부민을 표준 용액으로 사용하여 마이크로 타이터플레이트 판독기(1420, Wallac Victor 2; Perkin Elmer)에서 Bradford 방법을 사용하여 측정 하였다. 글리세롤, 포도당, 1,3-PDO 및 기타 대사산물의 농도는 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC, Agilent 1200 infinity series, USA)로 측정하였다. 표본들은 분석 전 10,000 x g의 속도로 10분 동안 원심분리 하였고, 얻어진 상등액은 Tuffryn 멤브레인 (Acrodisc, Pall Life Sciences)을 사용하여 여과하였다. HPLC 분석은 300mm x 7.8mm Aminex HPX-87H 컬럼 (Bio-Rad, USA)을 사용하여 65 °C, 2.5 mM H₂SO₄ 이동상으로 이루어졌다.

[0123] 이하에서 실시예를 들어 본 발명을 상세하게 설명한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위를 제한하거나 한정하는 것이 아니다.

[0125] <실시예 1> 글리세롤 생합성 경로가 발현된 크렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*) J2B 균주의 제작 및 효과

[0126] 야생균주인 K. 뉴모니아 J2B(KCCM11213P)가 NADPH-dependent GPD(gpsA)와 putative sugar phosphatases(cdhA, pgpA, ydiA)를 암호화하는 유전자를 보유하고 있지만, 포도당으로부터 글리세롤을 생산하지는 못했다(한국 공개 특허 제10-2013-0095395 참조). K. 뉴모니아 J2B 균주는 이러한 유전자의 발현이나 활성이 DHAP를 글리세롤로 전환하기에 충분하지 못하거나 적절하지 않은 것 같다. 이를 해결하기 위해, 사카로마이세스 세레비시애(*S. cerevisiae*)에서 글리세롤 생산을 촉매하는 두 효소의 유전자 gpd1(서열번호 1), gpp2(서열번호 2)를 코돈-최적화를 통해 합성한 후, pQE80LK(~30 카피수) 플라스미드에 클로닝하였고(pD1P2), 다시 J2B 균주에 발현시켜 재조합 균주 J2B-1를 제조하였다. SDS-PAGE 실험을 통해 두 효소(GPD1: 42 kDa, GPP2: 29kDa)의 발현을 확인할 수 있었다(도 2(A)). 또한 야생균주 J2B와는 달리, 재조합 균주 J2B-1은 호기조건에서 배양 12시간 후 포도당으로부터 24mM (0.56 mol/mol)의 글리세롤을 생산하였다(도 2(B)). 이러한 결과는 *S. cerevisiae*의 GPD1과 GPP2가 J2B-1에서 성공적으로 발현되고 기능하였음을 의미한다. 하지만, 1,3-프로판디올 생산 수율(0.12 mol/mol, 24시간)은 높지 않았다.

[0128] <실시예 2> 글리세롤 분해 경로 결실 효과

[0129] 비록 J2B-1 균주가 포도당으로부터 글리세롤 및 1,3-프로판디올을 생산하였지만 그 생산성은 만족스럽지 못했다. 특히, 1,3-프로판디올의 수율은 이론적 수율 1.42 mol/mol glucose에 비해 상당히 낮았다(Cameron D.C., Altaras N.E., Hoffman M.L. & Shaw AJ, (1998) Metabolic engineering of propanediol pathways. *Biotechnol. Prog.*, 14, 116-125). 이는 포도당으로부터 생산된 글리세롤이 1,3-프로판디올로 전환되기 전에, 글리세롤의 산화경로를 통해 다시 동화되기 때문일 수 있다(도 1 참조). 또한 포도당의 탄소흐름이 폭기 조건에 의해 크게 영향을 받을 수 있기 때문에, 글리세롤의 생산수율 향상을 위해 글리세롤 산화경로를 차단하고 폭기 조건의 영향을 조사하였다.

[0130] 글리세롤 산화경로의 부분적 또는 완전한 결실은 글리세롤을 이용한 세포성장을 크게 저해하였다. 하지만, 포도당을 탄소원으로 한 세포성장은 야생균주와 다르지 않았다. 산화경로의 결실은 글리세롤 생산을 증가시켰고 증가 정도는 산화경로의 결실 유전자 수가 증가할수록 높았다. 특히, G3P로 통하는 호흡(respiratory) 경로 및 DHA를 통하는 발효(fermentative) 경로가 모두 제거되었을 때(J2B3-1($\Delta glpK\Delta glpD\Delta glpA\Delta dhaD$), J2B4-1($\Delta glpK\Delta glpD\Delta glpA\Delta dhaD\Delta gldA$)), 글리세롤 생산수율의 크게 증가하여 0.91 mol/mol glucose에 이르렀다(도 2(C)). 호흡 및 발효경로가 제거된 균주는 상기 '2. 플라스미드 및 균주 제작'에서 기재된 방법으로 제조하였

다. 상기 2가지 균주의 글리세롤 생산수율은 J2B-1에 비해 40% 이상 높은 결과를 보였다. 이러한 결과는 이전 균주에서는 글리세롤이 생산된 후 다시 동화됨으로써 글리세롤 생산 수율을 낮추는 원인이 되었음을 보여준다.

[0131] 하지만 산화경로의 결실에도 불구하고 1,3-프로판디올의 수율 증가는 관찰되지 않았다. 1,3-프로판디올 생산에 관련된 환원 경로의 낮은 유전자 발현, NADH의 비효율적인 재생 또는 조효소 B12의 불충분한 합성과 같은 여러 요인이 원인이 될 수 있다. 아세트산은 모든 경우에서 주요 부산물로 생산되었고 약 0.70 mol/mol glucose에 이르렀다.

[0132] 한편, 글리세롤을 이용해 1,3-프로판디올을 생산할 때 폭기 조건이 그 결과에 중요한 영향을 미치며, 혐기, 미호기 조건이 완전한 호기조건보다 1,3-프로판디올 생산에 더 유리한 것으로 알려져 있다. 이는 완전한 호기조건에서 글리세롤 대사의 환원 경로 반응을 촉매하는 유전자(Dha 오페론)의 발현이 저해되기 때문이다. 또한, 산소가 제한된 조건에서 *K. pneumoniae*는 더 높은 NADH/NAD⁺ 비를 유지함으로써 DhaT 활성 및 조효소 B12 생산에 유리한 조건을 제공한다. 폭기는 세포성장, 탄소대사, 발효산물 생성에도 영향을 미친다. 산소가 제한된 조건에서 세포성장은 감소하고 에탄올, 젖산, 포름산과 같은 발효 산물로의 탄소전환은 증가 한다(Celinska and Grajek, 2009).

[0133] 이에, 글리세롤 및 1,3-프로판디올 생산에 유리한 폭기 조건을 찾기 위해 J2B3-1 균주를 이용하여 그 영향을 조사하였고, 그 결과 도 2(D)에 나타내었다. J2B3-1 균주는 J2B3 균주($\Delta g1pK\Delta g1pD\Delta g1pA\Delta dhaD$)에 상기한 pD1P2를 발현시켜 제조되었다.

[0134] 폭기 조건은 플라스크 내 배양액의 양을 달리하면서 조절되었다. 미호기 조건은 배양 부피를 50ml (type I), 100ml (type II)로 조절하였다. 비록 미호기 type I은 완전한 호기조건과 유사한 글리세롤 대사결과를 보여주었지만, 조효소 B12의 합성 및 글리세롤 환원경로가 높은 활성을 유지한다고 보고된 바 있다.

[0135] 도 3은 다양한 폭기 조건에서 J2B3-1 균주의 세포성장, 글리세롤 및 1,3-POD 생산 및 그 밖의 대사산물 생산 프로파일을 보여준다: (A) 호기조건, (B) 미호기 type I (배양 부피, 50ml), (C) 미호기 type II (배양 부피, 100ml), (D) 혐기 조건. 세포 성장(○), 포도당(▼), 글리세롤(△), 1,3-PDO(□), 2,3-BDO(■), 아세트산(●), pH(×).

[0136] 도 3을 보면, 서로 다른 폭기 조건에서 J2B3-1 균주는 매우 다른 결과 프로파일을 보여주었다. 세포 성장과 포도당 소모 속도는 폭기가 제한될수록 느려졌다. 게다가 가장 높은 글리세롤 생산수율을 나타낸 호기조건(0.91 mol/mol glucose)에 비해 미호기 조건(type II)과 혐기조건에서 각각 40%, 63% 감소하여 0.55, 0.34 mol/mol glucose로 측정되었다(도 2(D)). 그러나, 1,3-프로판디올의 수율은 0.1 mol/mol glucose 이하 범위에서 거의 변화가 없었다. 완전 호기조건에서 1,3-프로판디올로의 글리세롤 전환은 Dha 오페론의 발현과 조효소 B12의 이용가능성에 의해 제한될 수 있다. 그러나 글리세롤 생산의 경우, 높은 폭기조건(완전호기 또는 미호기 type I)이 더 좋은 결과를 보여주었다.

[0138] <실시예 3> GPD, GPP의 발현 수준 및 동종효소의 영향

[0139] 글리세롤 산화경로의 결실로 인해 글리세롤 생산은 상당히 개선되었다. 하지만 추가적인 생산수율의 향상이 가능한지 조사하기 위해 GPD, GPP효소의 발현 수준 및 동종효소(isozymes) 영향을 조사하였다. 이는 GPD/GPP 효소의 활성이 증가하면 GA3P(또는 DHAP) node에서 탄소흐름이 글리세롤 생산으로 확대될 수 있을 것으로 기대되기 때문이다. 이들 효소의 발현 수준이 미치는 영향은 유도인자(Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside, IPTG)의 농도(0~0.5 mM)를 달리하면서 조사하였다. 이들 영향은 미호기 조건(type I)에서 이루어졌다. 글리세롤 수율은 IPTG 농도가 0.1mM까지 증가할수록 향상되었고, 더 높은 농도에서 추가적인 증가가 없었다(도 4(A)). 세포 과쇄액을 이용한 효소 활성 측정 결과, GPD1의 활성이 IPTG 농도 0.1 mM까지 꾸준히 증가하였고 그 이상의 증가는 크지 않았다. 이러한 결과로 볼 때, 테스트에 사용된 균주에서 GPD 활성이 3.14 U/mg protein(0.1 mM IPTG 사용) 이상이 되면 글리세롤 생산에 충분한 활성이 제공됨을 알 수 있다. 그러나 1,3-PDO 생산은 글리세롤 생산에 영향을 받지 않았으며, 이것은 글리세롤의 생성효율이 1,3-PDO 생산을 제한하는 요소가 아님을 의미한다.

[0140] 한편, *S. cerevisiae*에 존재하는 GPD, GPP 각각의 동종 효소에 대한 영향이 조사되었다. 이들 동종효소는 상이한 배양 조건하에서 발현되거나 기능을 하는 것으로 알려져 있다; gpd1, gpp2의 경우 삼투압에 의해 유도되는 반면, gpd2, gpp1은 상시 발현된다. 테스트에 사용된 모든 동종 효소들이 코돈 최적화를 통해 합성되었고, 이들 4개의 유전자는 서로 다른 조합(gpd1-gpp2, gpd1-gpp1, and gpd2-gpp1)으로 J2B3균주에 각각 클로닝 되었다. J2B3-1 (gpd1-gpp2 과발현)가 가장 높은 글리세롤 생산을 보여주었고, J2B3-3(gpd2-gpp1 과발현)가 가장 낮은

결과를 보여주었다 (도 4B). GPD1은 GPD2에 비해 우수한 효소특성을 가지고 있다고 보고된 바 있는데, Km값이 DHAP에 대해 0.31-0.54 mM이며 NADH에 대해 0.018-0.023 mM이다. 이는 GPD2의 0.86 mM (DHAP), 0.018 mM (NADH)보다 우수하다 (Ansell R1, Granath K, Hohmann S, Thevelein JM, Adler L., (1997) The two isoenzymes for yeast NAD⁺-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by GPD1 and GPD2 have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. EMBO J. 16(9), 2179-2187). 세포 과채액으로 GPD 활성을 간단히 확인한 결과, J2B3-1(GPD1-GPP2)은 3.14 U/mg protein, J2B3-3(GPD2-GPP1)은 0.29 U/mg protein로 GPD1이 GPD2보다 87% 높았다. 게다가 J2B3-1의 gpp2가 gpp1으로 치환된 균주 J2B3-2(GPD1-GPP1)의 경우 글리세롤 수율이 50 % 감소했다. 이로써 J2B3-1의 높은 글리세롤 생산이 GPD1, GPP2 모두의 활성에 기인함을 알 수 있다.

[0142] <실시예 4> 글리세롤의 1,3-PDO로의 전환 향상을 위한 DhaB 및 DhaT의 과발현

[0143] 높은 글리세롤 생산에도 불구하고 1,3-PDO의 생산수율은 매우 낮았다. 이는 Dha 오페론에 의해 암호화되는 DhaB, DhaT와 같은 1,3-PDO 생산 경로(글리세롤 환원경로)에 관여한 주요 효소의 낮은 발현이 원인이 될 수 있다. 이를 확인하기 위해, 글리세롤 산화 경로 중 NADH 생산에 기여하지 않는 호흡경로만 제거된 J2B2-1 균주($\Delta glpK\Delta glpD\Delta glpA$)를 이용해, 탄소원이 달라질 경우, 1,3-PDO 생산에 직접 관여된 Dha 오페론 유전자(dhaB1, dhaT, dhaD, dhaR, gdrB)의 전사 및 DhaB, DhaT 효소의 활성이 어떻게 영향을 받는지 조사하였다(도 5A). Dha 오페론 유전자의 전사는 글리세롤 배양에 비해 포도당에서 배양될 때 현저하게 감소하였다. 그러나 글리세롤이 포도당 또는 과당배지에 추가될 때 전사수준이 약간 향상되는 것이 확인되었다. 하지만 글리세롤 단독으로 사용될 때의 수준에는 미치지 못했다. Glp 오페론에 포함되어 글리세롤 수송 역할을 하는 glpF 유전자의 발현 또한 포도당 또는 과당이 존재할 경우 감소하였다. 이러한 결과는 Dha, Glp 오페론이 탄소대사저해(CCR, carbon catabolite repression)의 영향 아래 있음을 보여준다.

[0144] 반면, 다양한 알데히드에 기질특이성을 가진 NADPH-의존성 산화환원효소인 yqhD의 전사는 탄소원의 종류에 상관 없이 발현율이 낮았다. DhaB, DhaT 효소활성 또한 글리세롤 단독 배양에 비해 포도당이 포함될 경우 뚜렷하게 감소하였다. 감소 정도는 포도당 단독 배지에서 각각 80% (DhaB), 95% (DhaT)였고, 포도당/글리세롤 배지에서 각각 64% (DhaB), 91% (DhaT)였다(도. 5B). 이러한 결과는 탄소대사저해로 인한 주요 효소의 발현저하가 1,3-PDO 합성에 영향을 끼친다는 보고들과 일치하는 결과이다.

[0145] 본 발명에서는 탄소대사저해(CCR)의 영향을 극복하고 동시에 1,3-PDO 생산을 향상시키기 위해, Dha 오페론의 6개 유전자(dhaB1, dhaB2, dhaB3, gdrA, gdrB, dhaT)의 과발현이 이루어졌다. 상기 과발현은 dhaB1, dhaB2, dhaB3, gdrA, gdrB 유전자를 포함하는 pBG와 dhaT 유전자를 포함하는 pT를 제조하고, 이를 균주에서 발현시켜 이루어질 수 있다. 상기 dhaB1 유전자를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열번호 3의 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 상기 dhaB2 유전자를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열번호 4의 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 상기 dhaB3 유전자를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열번호 5의 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 상기 gdrA 유전자를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열번호 6의 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 상기 gdrB 유전자를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열번호 7의 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 상기 dhaT 유전자를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열번호 8의 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0146] 그 결과, J2B3-4(gpd1, gpp2, dhaB1, dhaB2, dhaB3, gdrA, gdrB 과발현), J2B3-5(gpd1, gpp2, dhaT, dhaB1, dhaB2, dhaB3, gdrA, gdrB 과발현), J2B3-6(gpd1, gpp2, dhaT 과발현) 균주들이 확보되었다. DhaB와 DhaT의 과발현은 1,3-PDO 생산을 현저하게 향상시켰는데, DhaB 단독 발현(J2B3-4)의 경우, 66%(0.18 mol/mol glucose), DhaB, DhaT 동시 과발현(J2B3-5)의 경우 80%까지 1,3-PDO 생산이 증가하였다. 그러나 DhaB 과발현 없이 DhaT만 발현된 경우는 그 증가가 미미하였다. 이러한 증가에도 불구하고, J2B3-5균주에서 1,3-PDO 보다 3배나 많은 글리세롤이 1,3-PDO로 전환되지 못하고 남아 있었다(도 6). 또한, 독성의 3-HPA 축적이 DhaB, DhaT 동시 과발현 균주에 비해 DhaB만 과발현될 때 증가하는 것이 확인되었다. 3-HPA는 세포성장에 유독하기 때문에 결과적으로 1,3-PDO 생산을 저해할 수 있다. 때문에 DhaB 및 DhaT의 균형 잡힌 활성을 유지하여 그 축적을 막아야 한다. 그러나 현재 개발된 균주의 경우 두 효소 모두 IPTG-유도성 프로모터(tac, T5)를 사용하고 있기 때문에, 두 효소의 활성을 조절하기에 어려움이 있다. 그리고 DhaB, DhaT의 과발현에도 불구하고, 부산물 생산은 변하지 않았고, 모든 경우에 상당량의 아세트산이 생산되었다.

- [0148] <실시예 5> DhaB, GdrA, GdrB, DhaT의 발현 세기의 영향
- [0149] 앞서 DhaB, DhaT의 발현 향상 및 균형 조절은 1,3-PDO 생산 증가를 위해 필요함을 확인하였다. 하지만 모든 과발현 대상 유전자들이 IPTG-유도성 프로모터를 이용하고 있기 때문에 쉽지 않다. 이에 구성적(constitutive) 프로모터를 이용해 gpd1, gpp2를 과발현하고 dhaB123, gdrAB, dhaT를 IPTG-유도성 프로모터(tac, T5)를 이용해 클로닝 함으로써 그 발현 세기를 변화시켰다. gpd1, gpp2의 발현정도는 GPD 활성이 충분하다고 판단된(실시예 3의 결과) 3.14 U/mg protein를 목적으로 하였다(도 4(A)).
- [0150] gpd1, gpp2의 적당한 구성적 발현을 위해 Mutalik 그룹에서 보고한 합성 프로모터 정보를 활용하여 다양한 발현 세기를 가진 pCDFDuel-1 플라스미드들이 개발되었다(도 7). 이 중 SP10 프로모터로 gpd1, gpp2를 발현한 J2B3-7 균주가 J2B3-1(0.1 mM IPTG로 발현)과 유사한 글리세롤 생산을 보여주었다. 세포 파쇄액으로 측정된 J2B3-7 균주의 GPD 활성은 2.9 U/mg protein로 J2B3-1의 값과 매우 유사하였다.
- [0151] DhaB, DhaT의 발현 조절의 영향을 조사하기 위해 pBG(dhaB123, gdrA, gdrB 과발현), pT(dhaT 과발현) 플라스미드가 각각 개발되었고 개별적으로 또는 동시에 J2B3-7 균주에 도입됨으로써, J2B3-8(dhaB1, dhaB2, dhaB3, gdrA, gdrB만 발현), J2B3-9(dhaT만 발현), J2B3-10(dhaB1, dhaB2, dhaB3, gdrA, gdrB, dhaT 동시발현) 균주가 확보되었다.
- [0152] IPTG 농도 변화에 따른 이들 재조합 균주의 배양 결과, IPTG 농도가 증가할수록 1,3-PDO 생산이 점점 증가하였다(도 8). 앞의 결과(도 4)와 유사하게 DhaT 단독 발현 효과는 미비하였다. 이것은 글리세롤의 1,3-PDO 전환은 DhaB 활성에 크게 의존함을 보여준다(도 6B). 그러나 DhaT가 DhaB와 함께 발현될 때, DhaT의 추가 발현은 1,3-PDO 생산을 더욱 증가시키면서 시너지효과를 일으켰다(도 8(C), 균주 J2B3-10).
- [0153] 한편, DhaB 단독 발현 균주(J2B3-8)는 세포 성장과 글리세롤 생산이 IPTG 농도에 반비례하게 감소하였다(도 8(A)). 이것은 IPTG 농도 증가로 인해 더 많은 3-HPA가 축적되기 때문일 것이다. 가장 높은 1,3-PDO 생산은 0.27mol/mol glucose로 0.1~0.2 mM의 IPTG가 처리된 J2B3-10균주에서 얻어졌다(KCTC 13304BP). 이것은 J2B3-5에 얻어진 1,3-PDO 생산에 비해 27% 증가한 결과이다. 이러한 1,3-PDO 생산 증가는 아마도 DhaT 발현이 증가한 결과로 판단된다. 그러나 여전 많은 양(0.52 mol/mol glucose)의 글리세롤이 1,3-PDO로 전환되지 못했다. 게다가 전체 (글리세롤과 1,3-PDO) 생산 수율은 다소 감소했다. 이것은 3개의 플라스미드, 항생제, 여러 유전자의 높은 발현 때문일 것으로 생각된다. 여전히 0.6 mol/mol glucose 가량의 아세트산이 주요 부산물로 생산되었다.
- [0154] 이러한 결과들은 야생균주 J2B에서 포도당이 탄소원으로 사용될 때 CCR로 인해 이들 효소의 발현이 높지 않았음을 나타낸다. 그것은 글리세롤의 효율적인 1,3-PDO로의 전환을 위해서는 이들 두 효소의 과발현이 필요함을 의미한다. 그러나 글리세롤은 1,3-PDO로 완전히 전환되지 못했다. 이것은 환원력 공급의 부족과 같은 다른 제한적 요소가 존재함을 의미한다. 아마도 TCA 사이클의 활성이 낮거나 NADH 생산에 전혀 기여하지 않는 피루베이트-포메이트 리아제(pyruvate formate lyase)의 활성이 높은 탓도 있을 것으로 본다. 대사산물의 탄소 및 환원도 분포 분석결과도 NADH 공급 부족을 뒷받침 한다(표 5).

표 5

Substrate/ metabolites	Carbon balance			Redox balance	
	mmol/L	C-mmol/L	C (%)	NADH formed	NADH consumed
Substrate					
Glucose	52.46	314.76		–	–
Biomass	1.17 ^a	42.27	15.05	–	–
Metabolites					
Glycerol	28.77	86.31	27.42	–	28.77
1,3-PDO	12.01	36.03	11.45	–	24.02
Acetate	39.07	78.14	24.83	39.07	–
Lactate	0.58	1.74	0.55	0.58	0.58
Ethanol	1.82	3.64	1.16	1.82	3.64
2,3-BDO	7.24	28.96	9.20	14.48	7.24
Total products	–	234.82	–	–	–
Carbon recovery %	–	–	89.62	–	–
Total NADH	–	–	–	55.95	64.25

[0156]

[0157]

J2B3-5 균주에서의 탄소 분포 및 산화환원 균형

[0159]

^a g/L.

[0160]

^b An average molecular weight of 23.86, which corresponds to an average cell with a molecular formula of CH_{1.74}O_{0.44}N_{0.22}. The average ash content of 3.6% was deduced from the actual cell dry mass (Stephanopoulos GN, Aristidou AA, Nielsen J (1998) Metabolic engineering: principles and methodologies. Academic Press, San Diego, California).

[0161]

^c (Total carbon in biomass and metabolites)/(Total carbon in glucose) X 100

[0163]

상기 실시예에서 제조된 재조합 크렙시엘라 뉴모니아(Klebsiella pneumoniae) 균주를 이용하여 포도당으로부터 1,3-프로판디올을 생합성할 수 있다.

[0165]

이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이

다.

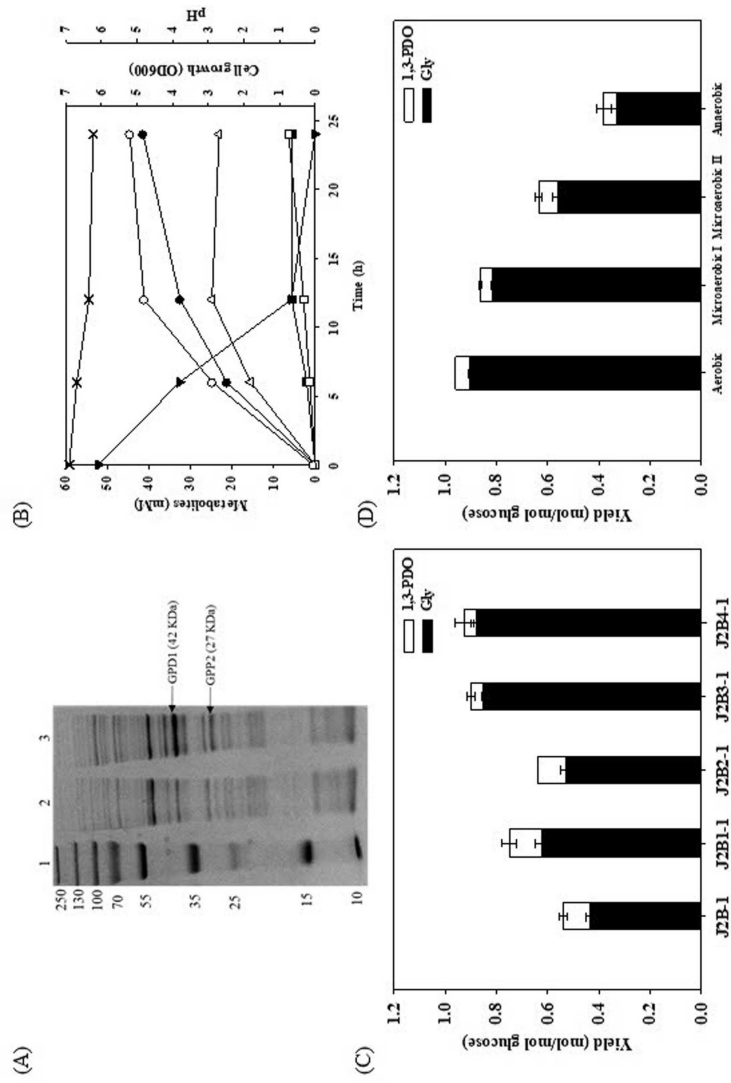
- [0167] <서열목록의 설명>
- [0168] 서열번호 1은 gpd1 유전자를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열이다.
- [0169] 서열번호 2는 gpp2 유전자를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열이다.
- [0170] 서열번호 3은 dhaB1 유전자를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열이다.
- [0171] 서열번호 4는 dhaB2 유전자를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열이다.
- [0172] 서열번호 5는 dhaB3 유전자를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열이다.
- [0173] 서열번호 6은 gdrA 유전자를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열
- [0174] 서열번호 7은 gdrB 유전자를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열
- [0175] 서열번호 8은 dhaT 유전자를 코딩하는 뉴클레오타이드
- [0176] 서열번호 9는 GlpK upstream의 뉴클레오타이드 서열
- [0177] 서열번호 10은 GlpK downstream의 뉴클레오타이드 서열
- [0178] 서열번호 11은 GlpD upstream의 뉴클레오타이드 서열
- [0179] 서열번호 12는 GlpD downstream의 뉴클레오타이드 서열
- [0180] 서열번호 13은 DhaD upstream의 뉴클레오타이드 서열
- [0181] 서열번호 14는 DhaD downstream의 뉴클레오타이드 서열
- [0182] 서열번호 15는 GlpA upstream의 뉴클레오타이드 서열
- [0183] 서열번호 16은 GlpA downstream의 뉴클레오타이드 서열
- [0184] 서열번호 17은 gfp 유전자의 forward 프라이머 서열이다.
- [0185] 서열번호 18은 gfp 유전자의 reverse 프라이머 서열이다.
- [0186] 서열번호 19는 gpd1유전자의 forward 프라이머 서열이다.
- [0187] 서열번호 20은 gpd1 유전자의 reverse 프라이머 서열이다.
- [0188] 서열번호 21은 gpp2 유전자의 forward 프라이머 서열이다.
- [0189] 서열번호 22는 gpp2 유전자의 reverse 프라이머 서열이다.
- [0190] 서열번호 23은 dhaB-gdrA 유전자의 forward 프라이머 서열이다.
- [0191] 서열번호 24는 dhaB-gdrA 유전자의 reverse 프라이머 서열이다.
- [0192] 서열번호 25는 gdrB 유전자의 forward 프라이머 서열이다.
- [0193] 서열번호 26은 gdrB 유전자의 reverse 프라이머 서열이다.
- [0194] 서열번호 27은 dhaT 유전자의 forward 프라이머 서열이다.
- [0195] 서열번호 28은 dhaT 유전자의 reverse 프라이머 서열이다.

수탁번호

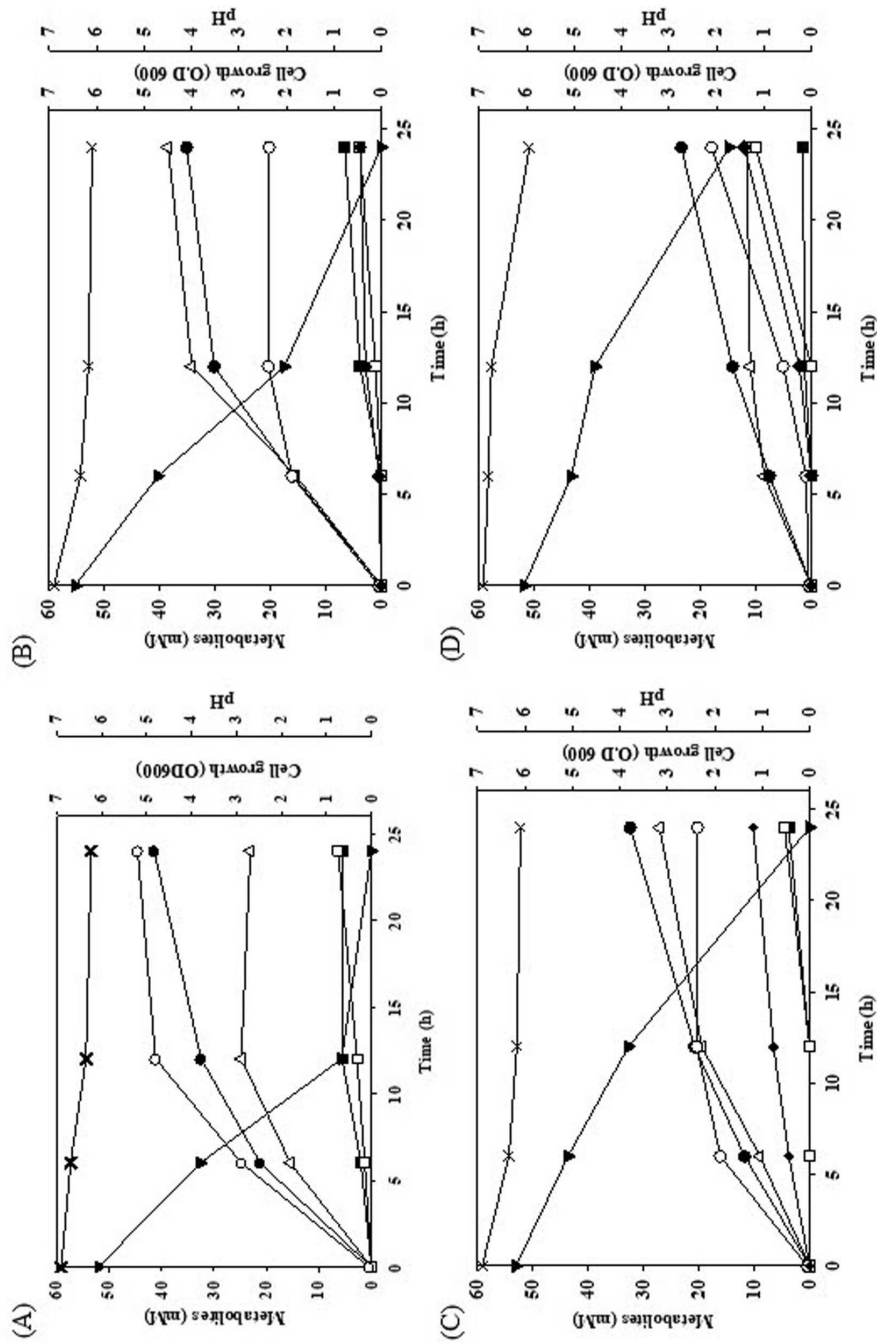
[0197]

기탁기관명 : 한국생명공학연구원

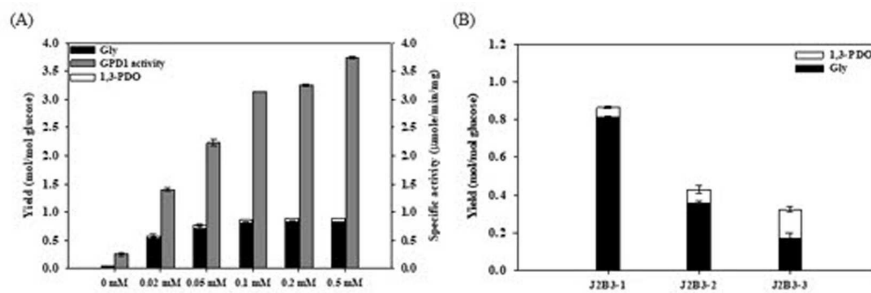
도면2



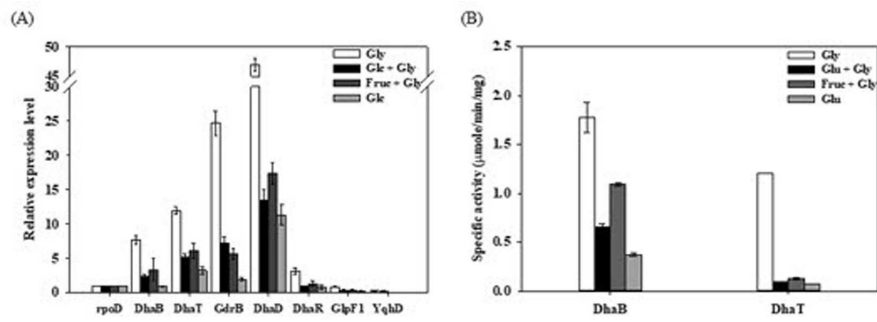
도면3



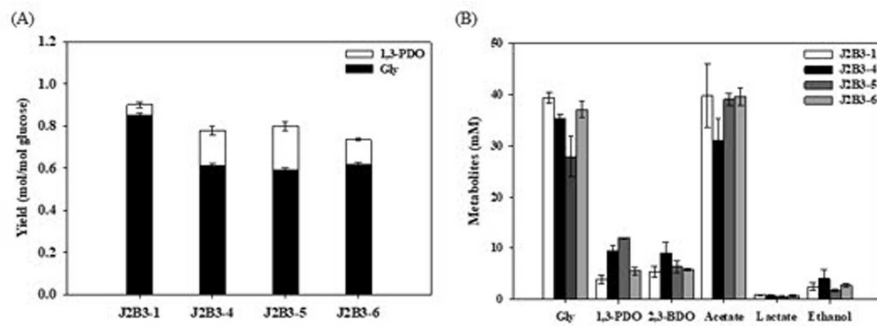
도면4



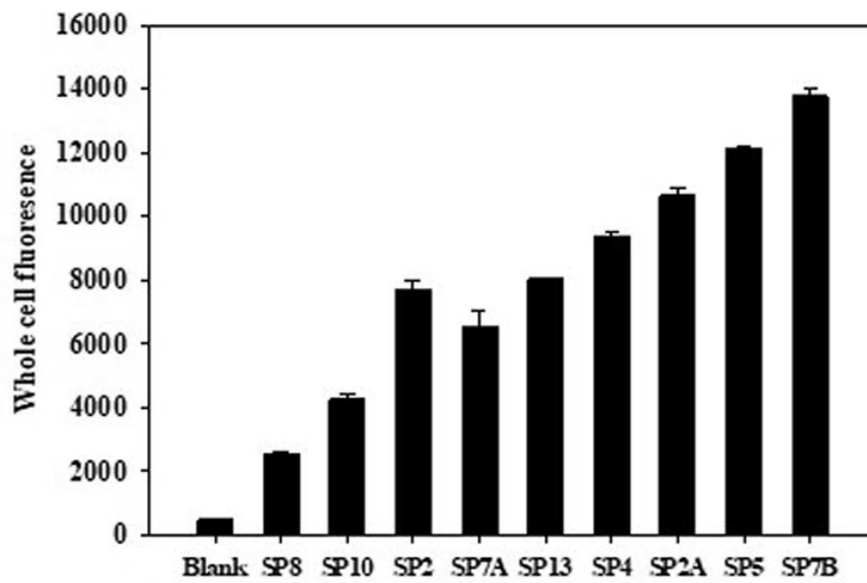
도면5



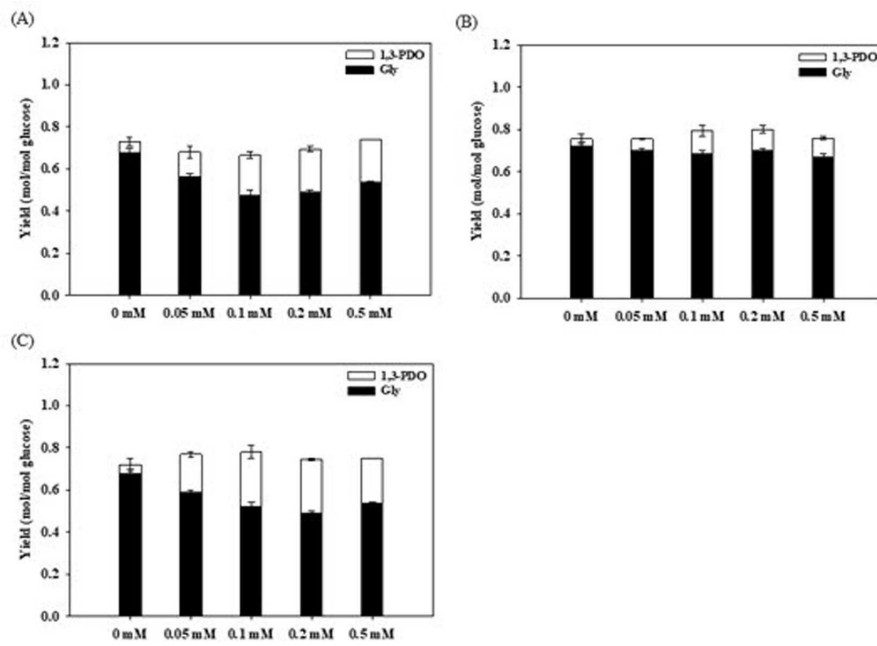
도면6



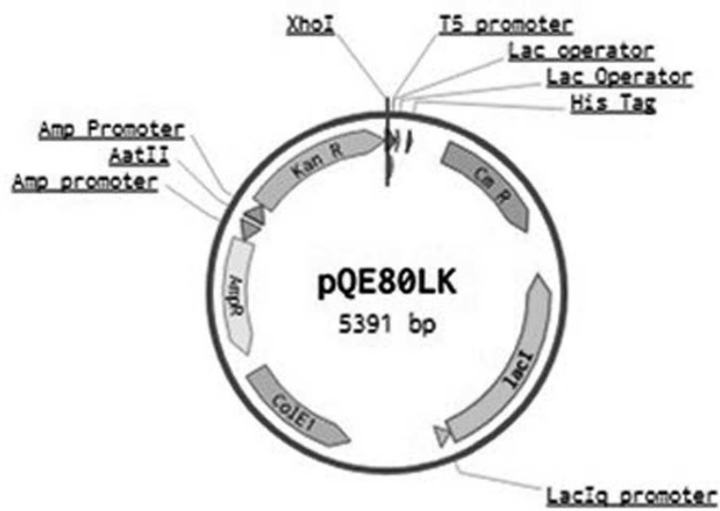
도면7



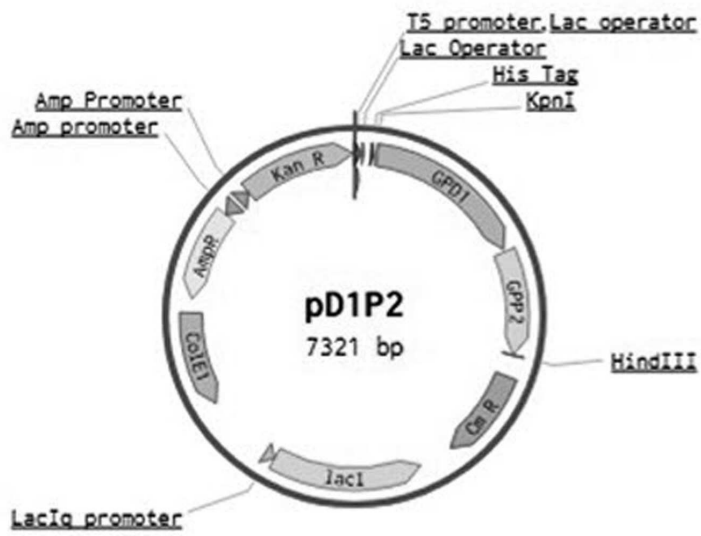
도면8



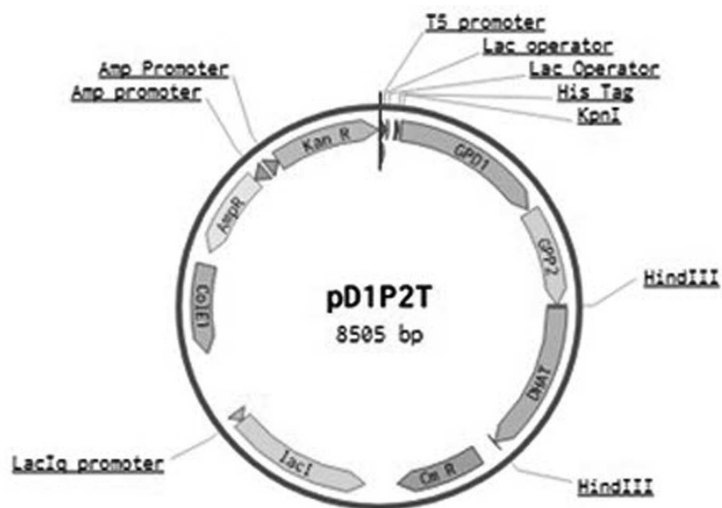
도면9a



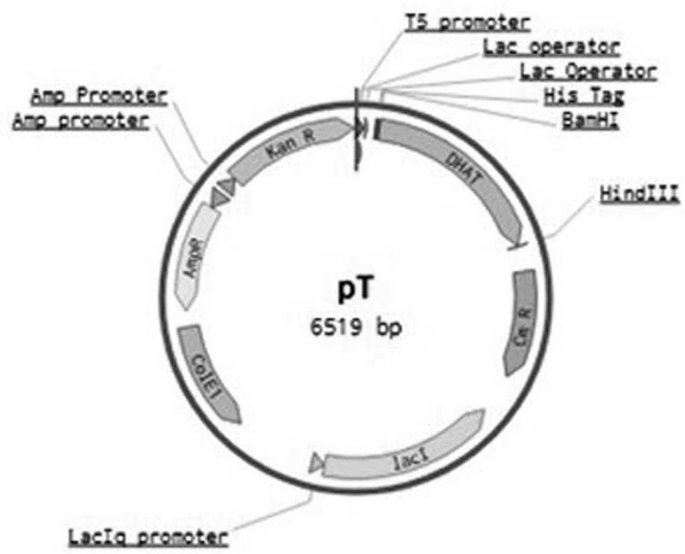
도면9b



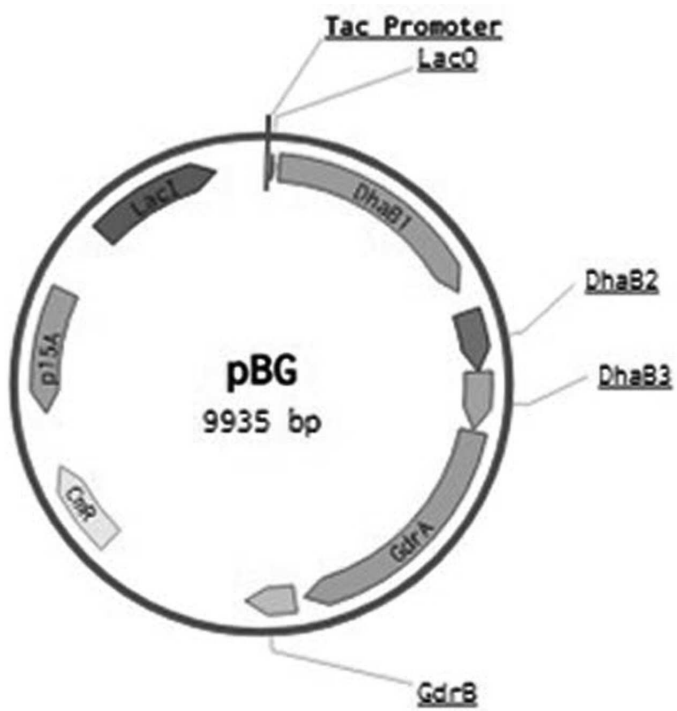
도면9c



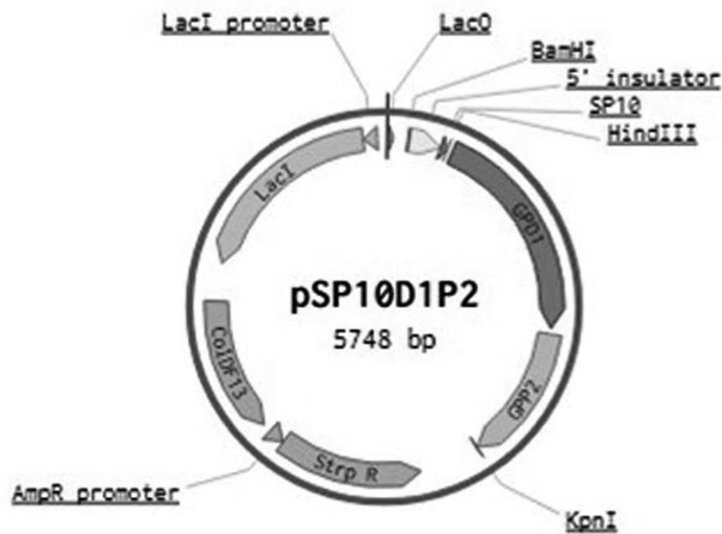
도면9d



도면9e



도면9f



서열 목록

<110>	GS CALTEX	
	UNIST	
<120>	New Klebsiella Pneumoniae Strain For Production of	
	1,3-propanediol From Glucose And Method for Produce	
	1,3-propanediol Using The Same	
<130>	DNP170237	
<160>	28	
<170>	KoPatentIn 3.0	
<210>	1	
<211>	1176	
<212>	DNA	
<213>	Saccharomyces cerevisiae	
<400>	1	
	atgtcggctg ctgctgatcg cctgaatctg acctcgggcc atctgaatgc tggtcgcaa	60
	cgctcctctt cgtcgggtgc gctgaaagcg gccgaaaaac cgtttaaagt taccgtcatt	120
	ggcagcggta actggggcac cagcatcgcg aaagtggttg ccgaaaattg caaaggctat	180
	ccggaagtgt ttgcgccgat tgtgcagatg tgggttttcg aagaggaaat caacggcgag	240
	aaactgaccg aaattatcaa cacgcgcat cagaatgtca aatactgcc gggcattacc	300
	ctgccggata acctgggtgc caatccgat ctgatcgaca gcgttaaaga tgtggatgc	360
	atcgttttca acattccgca ccagttcctg ccgcgcacat gctcccagct gaaaggccat	420
	gtggatagtc acgtgcgtgc gatttcttgi ctgaaagggt ttgaagtcgg tgccaaaggc	480

gtgcagctgc tgagcagcta tattaccgag gaactgggta tccagtgtgg cgcgctgagt 540

ggtagcgaaca ttgccaccga agtggcacag gaacattggg ctgagaccac ggtcgcttat 600

cacatcccga aagatttccg cggcgaaggc aaagatgttg accataaagt cctgaaagca 660

ctgtttcatc gtccgtactt ccacgtgtca gttatcgaag acgtggccgg catttcgac 720

tgcggtgcgc tgaaaaatgt cgtggccctg ggctgtggtt ttgttgaagg cctgggttgg 780

ggcaacaatg cgtcagcagc tattcagcgc gtcggtctgg gcgaaattat ccgtttcggc 840

cagatgtttt tcccggaaag ccgtgaggaa acctattacc aggagtccgc aggtgtggct 900

gatctgatca ccacgtgcgc cggcggtcgc aacgtcaaag tggcacgtct gatggctacc 960

tcaggcaaag acgcatggga gtgtgaaaaa gagctgctga atggccagtc ggctcagggt 1020

ctgattacct gcaaagaagt gcacgagtgg ctggaaacgt gtggctctgt tgaagatttt 1080

ccgtgttcg aggccgtgta tcagatcgtt tacaacaact acccgatgaa aaacctgccg 1140

gacatgattg aagaactgga cctgcacgag gactaa 1176

<210> 2

<211> 753

<212> DNA

<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 2

atgggcctga cgaccaaacc gctgagcctg aaagtcaacg ctgcactgtt cgacgtggac 60

ggtagcatta tcattagcca gccggcaatt gcggcctttt ggcgcgattt cggtaaagac 120

aaacctgatt ttgatgccga acatgtgatt caagttagcc acggctggcg taccttcgat 180

gcaatcgcta aatttcgacc ggacttcgct aacgaagagt atgtgaataa actggaagcg 240

gagattccgg ttaaatacgg cgagaaaagc atcgaagtgc cgggcgccgt gaaactgtgc 300

aacgcgctga atgccctgcc gaaagaaaaa tgggcggtcg ccacctctgg tacgcgcgat 360

atggcacaga aatggtttga gcactcgggc attcgcgcgc cgaaatattt catcacggcc 420

aacgacgtga aacagggtaa accgcacccg gaaccgtatc tgaaaggcgg taacggcctg 480

ggttaccgga ttaatgaaca ggaccgcgac aaatccaaag tggttgtctt tgaggacgca 540

ccggctggca ttgcagctgg taaagcggcg ggttgcaaaa ttatcggtat cgcgaccacg 600

tttgatctgg acttcctgaa agaaaaaggc tgtgatatac tcgttaaaaa ccatgaaagc 660

atccgcgtcg gcggttacaa tgcggagacc gacgaggtgg agtttatttt tgacgattat 720

ctgtatgcga aagacgatct gctgaaatgg tga 753

<210> 3

<211> 1669

<212> DNA

<213> *Klebsiella pneumoniae*

<400> 3

catgaaaaga tcaaaacgat ttgcagtact ggcccagcgc cccgtcaatc aggacgggct 60

gattggcgag tggcctgaag aggggctgat cgccatggac agcccccttg acccggtctc 120

ttcagtaaaa gtggacaacg gtctgatcgt cgagctggac ggcaaacgcc gggaccagtt 180

tgacatgac gaccgattta tgcgcgatta cgcgatcaac gttgagcgca cagagcaggc 240

aatgcgcttg gaggcgggtg aaatagcccc catgctggtg gatattcacg tcagtcggga 300

ggagatcatt gccatcacta ccgccatcac gccggccaaa gcggtcgagg tgatggcgca 360

gatgaacgtg gtggagatga tgatggcgct gcagaagatg cgtgccccgc ggacccccctc 420

caaccagtgc cagctacca atctcaaaga taatccggtg cagattgctg ctgacgccgc 480

cgaggccggg atccgcggct tctcagaaca ggagaccacg gtcggtatcg cgcgctatgc 540

gccgtttaac gccctggcgc tggttggtcgg ttgcagtgcc ggccgccccg gcgttttgac 600

gcagtgtctg gtggaagagg ccaccgagct ggagctgggc atgcgtggct taaccagcta 660

cgccgagacg gtgtcggctt acggcaccga agcggtatct accgacggcg atgatactcc 720

gtggtcaaag gcgttccctg cctcggccta cgcctcccgc gggttgaaaa tgcgtacac 780

ctccggcacc ggatccgaag cgctgatggg ctattcggag agcaagtcca tgctctacct 840

cgaatcgcg tgcatttca ttacaaagg cgcgggggtt caggggctgc aaaacggcgc 900

ggtgagctgt atcggcata cgggcgctgt gccgtcgggc attcgggcgg tgctggcgga 960

aaacctgac gccctatgc tcgacctga agtggcgctc gccaacgacc agactttctc 1020

ccactcgat attcgccga ccgcgcgcac cctgatgcag atgctgccgg gcaccgactt 1080

tattttctcc ggctacagcg cgggtccgaa ctacgacaac atgttcgccg gctcgaactt 1140

cgatgcggaa gattttgatg attacaacat cctgcagcgt gacctgatgg ttgacggcgg 1200

cctgcgtccg gtgaccgagg cggaacacat tgccattcgc cagaaagcgg gcggggcgat 1260

ccaggcgggt ttccgcgagc tggggctgcc gccaatcgcc gacgaggagg tggaggccgc 1320

cacctacgc caggttagca acgagatgcc gccgcgtaac gtggtggagg atctgagtgc 1380

ggtggaagag atgatgaagc gcaacatcac cggcctcgat attgtcggcg cgctgagccg 1440

cagcggtttt gaggatatcg ccagcaatat tctcaatatg ctgcgccagc gggtcaccgg 1500

cgattacctg cagacctcgg ccattctcga tcggcagttc gaggtggtga gtgcggtcaa 1560

cgacatcaat gactatcagg ggccgggcac cggctatcgc atctctgccg aacgtgggc 1620

ggagatcaaa aatattccgg gcgtggttca gcccacacc attgaataa 1669

<210> 4

<211> 441

<212> DNA

<213> Klebsiella pneumoniae

<400> 4

atgccccatg gcgcgatcct caaagagctg attgccgggg tggaagaaga ggggcttcac 60

gcccgggtgg tgcgcattct gcgcacgtcc gacgtctcct ttatggcctg ggatgcggcc 120

aacctgagcg gctcggggat cggcatcggg atccagtcga aggggaccac ggtcatccat 180

cagcgcgatc tgctgccgct cagcaacctg gagctgttct cccaggcgcc gctgctgacg 240

ctggaacct accggcagat tggcaaaaac gccgcgcgct atgcgcgcaa agagtcacct 300

tcgccggtgc cggtggtgaa cgatcagatg gtgcggccga aatttatggc caaagccgcg 360

ctatttcata tcaaagagac caaacatgtg gtgcaggacg ccgagcccct caccctgcac 420

gtcgacttag taagggagtg a 441

<210> 5

<211> 426

<212> DNA

<213> Klebsiella pneumoniae

<400> 5

atgagcgaga aaacatgcg cgtgcaggat tatccgttag ccacccgctg cccggagcat 60

atcctgacgc ctaccggcaa accattgacc gatattacc tcgagaaggt gctctctggc 120

gaggtgggcc cgcaggatgt gcggatctcc tgccagaccc ttgagtacca ggccgagatt 180

gccgagcaga tgcagcgcca tgcggtggcg cgcaatttc gccgcgcggc ggagcttatac 240

gccattcctg acgagcgcat tctggctatc tataacgcgc tgcgcccgtt ccgtctctcg 300

caggcggagc tgctggcgat cgccgacgag ctggagcaca cctggcatgc gacagtgaat 360

gccgcctttg tccgggagtc ggcggaagtg tatcagcagc ggcataagct gcgtaagga 420

agctaa 426

<210> 6

<211> 1824

<212> DNA

<213> Klebsiella pneumoniae

<400> 6

atgccgttaa tagccgggat tgatatcggc aacgccacca ccgaggtggc gctggcgctcc	60
gacgaccgc aggcgagggc gtttgttgcc agcgggatcg tcgcgacgac gggcatgaaa	120
gggacgcggg acaatatcgc cgggaccctc gccgcgctgg agcaggccct ggcgaaaaca	180
ccgtgggtcga tgagcgaigt ctctcgcatc tatcttaacg aagccgcgcc ggtgattggc	240
gatgtggcga tggagaccat caccgagacc attatcacgc aatcgacat gatcggtcat	300
aaccgcaga cgccgggagg ggtgggcgtt ggcgtgggga cgactatcgc cctcgggagg	360
ctggcgacgc tgcggcgagg gcagtatgcc gaggggtgga tcgtactgat tgacgacgcc	420
gtcgatttcc ttgacccgtg gtggtggctc aatgagcgcc tcgaccgggg gatcaacgtg	480
gtggcggcga tcctcaaaaa ggacgacggc gtgctggtga acaaccgcct gcgtaaaacc	540
ctgccgttgg tagatgaagt gacgtgctg gagcaggtcc ccgagggggg aatggcgagg	600
gtggaagtgg ccgcgccggg ccaggtggtg cggatcctgt cgaatcccta cgggatcgcc	660
accttcttcg ggctaagccc ggaagagacc caggccatcg tccccatcgc ccgcgcctg	720
attggcaacc gttcagcggg ggtgctcaag accccgcagg gggatgtgca gtcgcgggtg	780
atcccgaggc gcaacctcta cattagcggc gaaaagcgcc gcggagaggc cgatgtcgcc	840
gagggcgagg aagccatcat gcaggcgatg agcgccctcg ctccggtacg cgacatccgc	900
ggcgaaccgg gcactcacgc cggcgggcatg cttgagcggg tgcgcaaggt aatggcgctc	960
ctgaccgacc atgagatgag cgcgatatac atccaggatc tgcggcggt ggatacgttt	1020
attccgcgca aggtgcaggg cgggatggcc ggcgagtgcg ccatggaaaa tgccgtcggg	1080
atggcggcga tggtgaaagc ggatcgtctg caaatgcagg ttatcgccg cgaactgagc	1140
gcccactgc agaccgaggt ggtggtgggc ggcgtggagg ccaacatggc catcgccggg	1200
gcgttaacca ctcccgctg tgcgcgcggc ctggcgatcc tcgacctgg cgccggtcgc	1260
acggatgcgg cgatcgtcaa cgccgagggg cagataacgg cgggccatct cgccggggcg	1320
gggaatatgg tcagcctgtt gattaaaacc gagctgggccc tcgaggatct ttcgtggcg	1380
gaagcgataa aaaaataccc gctggccaaa gtggaaagcc tgttcagtat tcgtcacgag	1440
aatggcgagg tggagtctt tcgggaagcc ctgagcccg cgggtgtcgc caaagtgtg	1500
tacatcaagg agggcgaact ggtgccgatc gataaccca gcccgctgga aaaaattcgt	1560
ctcgtgcgcc ggcaggcgaa agagaaagtg ttgtcacca actgcctcgc cgcgtgcgc	1620
caggtctcac ccggcggttc cattcgcat atcgctttg tggctgtgtt gggcggtcga	1680
tcgtggact ttgagatccc gcagcttatc acggaagcct tgtcgacta tggcgtggtc	1740
gccgggcagg gcaatatcgc gggaacagaa gggccgcgca atcggtcgc caccgggctg	1800
ctactggcgc gtcaggcgaa ttaa	1824

<210> 7

<211> 360

<212> DNA

<213> *Klebsiella pneumoniae*

<400> 7

```
atgtcgcttt caccgccagg cgtagcctg ttttacgac cgcgcgggca ccatgccggc      60
gccatcaatg agctgtgctg ggggctggag gaggaggggg tccctgccca gaccataacc      120
tatgacggag gcggtgacgc cgctgcgctg ggcgccctgg cggccagaag ctgcccctg      180
cgggtgggta tcgggctcag cgcgcccggc gagatagccc tactcatgc ccagctgccg      240
gcggacgcgc cgctggctac cggacacgtc accgatagcg acgatcaact gcgtacgctc      300
ggcgccaacg ccgggcagct ggttaaagtc ctgccgttaa gtgagagaaa ctgatctaga      360
```

360

<210> 8

<211> 1164

<212> DNA

<213> *Klebsiella pneumoniae*

<400> 8

```
atgagctatc gtatgtttga ttatctggtg ccaaacttta acttttttgg ccccaacgcc      60
atttctgtag tcggcgaacg ctgccagctg ctggggggga aaaaagccct gctggtcacc      120
gacaaaggcc tcggggcaat taaagatggc gcggtggaca aaaccctgca ttatctgcgg      180
gaggccggga tcgaggtggc gatctttgac ggcgctcagc cgaaccgaa agacaccaac      240
gtgcgcgacg gcctcgccgt gtttcgccgc gaacagtgcg acatcatcgt caccgtgggc      300
```

```
ggcggcagcc cgcacattg cggcaaaggc atcggcacgc cgcacacca tgaggcgcat      360
ctgtaccagt atgccggaat cgagaccctg accaaccgcg tgccgctat cgtcgcggtc      420
aataaccacg ccggcaccgc cagcgaggtc acccgccact gcgtcctgac caacaccgaa      480
accaaagtga agtttgtgat cgtcagctgg cgcaacctgc cgtcgggtctc tatcaacgat      540
ccactgctga tgatcggtaa accggccgcc ctgaccgcgg cgaccgggat ggatgcctg      600
accacgcgcg tagaggccta tatctccaaa gacgctaacc cggtagcgga cgccgcgcgc      660
atgcaggcga tccgcctcat cgcccgcaac ctgcgccagg ccgtggccct cggcagcaat      720
```

```
ctgcaggcgc gggaaaacat ggcctatgcc tctctgctgg cgggatggc tttcaataac      780
gccaacctcg gtiacgtgca cgccatggcg caccagctgg gcggcctgta cgacatgccg      840
```

cacggcgtgg ccaacgctgt cctgctgccg catgtggcgc gctacaacct gatcgccaac 900
 ccggagaaat tcgccgatat cgctgaactg atgggcgaaa atatcaccgg actgtccact 960
 ctcgacgcgg cggaanaagc catcgccgct atcacgcgtc tgtcgatgga tatcggtatt 1020
 ccgcagcatc tgcgcgatct gggggtaaaa gaggcgact tcccctacat ggccgagatg 1080
 gctctgaaag acggcaatgc gttctcgaa cgcgtaaaag gcaacgagca ggagattgcc 1140

gcgattttcc gccaggcatt ctga 1164

<210> 9

<211> 999

<212> DNA

<213> Klebsiella pneumoniae

<400> 9

catttgaagt tcgatatttc tcgtttttgc tcgttaacga taaattaaca ctatgcctac 60
 atggcaatat ggtcgtctgt gaccacccta catacaataa tcatcaccac gcttcaggat 120
 tcgattatga gccaaacatc aaccttaaaa ggccagtga tcgcagagtt cctcggtacc 180
 ggggttgtga tctttttcgg cggtgggtgc gtggctgcgc tcaaggtcgc gggagccagc 240
 ttcggacaat gggaaatcag catcatctgg ggtctgggcg tcgcatggc gatctacctg 300

accgccgggg tctccggtgc gcaccttaac ccagcgtga ctatcgcgct gtggctgttc 360
 gcctgcttcg aaggccgcaa agtggttcct tttattattt cgcaattcgc tggcgctttt 420
 tgcgctgcgg cattagttta cgggctttac tacaatcttt tctcgatta tgaaaccacc 480
 caccatatga ttcgccgag cgtagaaagc ctgcgatctgg ccggcatttt ctccacttac 540
 ccgaaccgcg acatcaattt tgtgcaggcc ttcgcggtag agatgggtgat taccgctatc 600
 ctgatgggcg tcatcctggc gctgaccgac gatggcaacg gcataccgcg cgccccgctg 660
 gccctctgc tgattggcct gctgattgcg gtgattggcg cctccatggg accgctgacc 720

ggcttcgcca tgaaccggcg gcgtgacatc ggcccgaag ccttcgcctg gctggcgggg 780
 tggggtgacg tcgccttcac cggcggcaaa gatattcctt atttctggt gccgctgtgc 840
 gcaccggtgg tcggcgcggc gctgggcgca ttcagctatc gtaagctgat tggccgtcac 900
 ctgccttgcg acacctgctg ggaggaagag caacagagcc cctcctcttc caccgctcaa 960
 cataaagctt cgctgtaatc tgactacggg acaccgact 999

<210> 10

<211> 999

<212> DNA

<213> Klebsiella pneumoniae

<400> 10

attgtgaagt tattccccgc ttgcggcgta aacgcctgag ccgggctaca aaaccccaaa	60
cagcacgata ttgtagcccc gacaggtgcg cagcacgct tccgggtttt ttatcaacca	120
aacatcggca gcagcaggta cagcttaatc accagcgcgt tgacgatac gataaagaac	180
gccccacca tcggcactac caggaaggcc atatgcatg gcccgaacg gtcggtaatc	240
gcctgcata tggcgcgcgc cgtcggcggt gccccaggc caaacccgca atgcccggt	300
gccagcaccg cggcatcgta gtttttggc atcatccgat aggtgacgaa caccgatac	360
agcgcctcg ccagcgcctg caccgccagg ataataatca tcggcagcgc cagcgaggcc	420
aactcccaca gcttgaggct catcagcgcc atggcgagga acagcgacag gctgacgttg	480
cccaacaccg ataccgcgcg atcgaacacc cgatacaacc ccgccagcgc caggctgttg	540
ctgaggatca cgccgataaa cagcacgcag acgaaggtcg gcagctcgaa gacgtcccc	600
gccagcagtt gcgcaaccac cttgcccagc gtcagacaga tggcgatcag ggcgatactt	660
tcgatcagca ccagcgaggt gatcacccgc ccacgtccg gcttttcaa ggcgggttggc	720
gccacctgat cgtccggtgt cccgtccggt gaggaagagt gcttcaccag ataacgcgc	780
accgggccgc cgatcaggcc gccagcacc aggccgaaag tcgcgcaggc catcgccacc	840
tcggtggcgt tggcaaaacc gtagcgctca acgaacagct tactccacgc cgccccggtg	900
ccgtggccgc cgataaggt aatcgaccgc gccagcagac ccattagcgg atccagcccc	960
agcagcgtcg ccatgccgat accgagggcg ttctgcagc	999

<210> 11

<211> 599

<212> DNA

<213> Klebsiella pneumoniae

<400> 11

tcattaacat gcagcgaatc gcttattcca cacaaagggg gatagtatac ctgccagtcg	60
ttaaaacgtc ccgcgcgcca ctccgcggg gaaatggcga tgccaggcgt cgaaccgcc	120
gtcaacgcta tagacctat caaacccctg ctgcagcaga tactgcgcgg cgcccttgct	180
gctgttgccg tgatagcaca tcaccatcac cgcctgtca aagtcgttgt cagcataaa	240
cgcgcccagc gtatcgttgg tcagatgaaa cgcgcccggc gtatgacca tcgcatagct	300
ttgcggatcg cgatatcga ccagtaccgc cgtctgtga tgcagtttct ggtgcgttc	360
ttcaacattg atgcattcaa actgttccat gattctcttc tctttctcgt catgacgggc	420
gatggccggc ccaattttac cctgtagtgt accgtcaggc ggtaagaaa cgccaatatg	480

ttacacccat cacttcaaaa tgtttttttg atgttacaa aagcgcgttt gtttgctata	540
gtgagcgata tcgagcattt atgagcttaa acgaaagtgt gagagggtaa gaacgtgga	599
<210> 12	
<211> 569	
<212> DNA	
<213> Klebsiella pneumoniae	
<400> 12	
ggaaagtctg aactgtcgtt agcgtcctga catcgctgg cgccaggaga gaaatacccg	60
ggctatggct tgcgcttggc cgggatacct gttcacaaat taaacgagac ttttttcca	120
gtcggcaatg tgacatttat actgagttct cccccaatg ccgcaatgta gcgttttagg	180
gtcgaagcc gagggctcgtt atcagtctgt tccatttttag cgatcgttgg ctgctttacc	240
cccatagccg cagccatctc tgtttgcgac atttgcaact cttctcgaag caagtttaaa	300
gcgacagact ggcgtctctc tgccgctttc gctgcaatac gctgctggct ttcaggactc	360
tgtttcgcca tgagtcttt tagcgtggcc attatcgctc cttagtcagg tgttggtga	420
attctctgtc agccagagta atcatctctt tgtaaaaacg tttctcattc atgccatcct	480
tatcgccgc acataaaacg atagctttcc gcagaggatc aaaagcaaaa aaggcgcgga	540
tggggagccc atgatgctga acctggagt	569
<210> 13	
<211> 512	
<212> DNA	
<213> Klebsiella pneumoniae	
<400> 13	
atatgatgat tciggctgag cggacgaaaa aaagaatgcc tcgacgatcg ggtttcatta	60
cgaaacattg cttcctgatt ttgtttcttt atggaacgtt tttgctgagg atatggtgaa	120
aatgcgagct ggcgcgttt ttttctctg ccataagcgg cggtcaggat agccggcgaa	180
gcgggtggga aaaaatttt tgctgatttt ctgccactg cgggagaaaa ggcggtcaaa	240
cacggaggat tgtaaggga ttatcggca aaggagcgga tcgggatcgc aatcctgaca	300
gagattaggg tttttgttc caatatggaa cgtaaaaaat taacctgtgt ttcatatcag	360
aacaaaaagg cgaaagattt tttgttccc tgccggccct acagtgatcg cactgctccg	420
gtacgtccg ttcaggccg gcttactgg ccggcgcgga taacgccagg gctcatcatg	480
tttcatgcg cacttatttg agggtgaaag ga	512

<210> 14

<211> 537

<212> DNA

<213> *Klebsiella pneumoniae*

<400> 14

ttcgcggtgg ctaaaccgct ggcccaggtc agcggttttt ctttctcccc tccggcagtc 60

gctgccggag gggtttctta tggtagaacg cggaagga tatgactgtt cagactcagg 120

ataccgggaa ggcggtctct tccgtcatcg ccagtcacg gcaccgtgc agcaagtta 180

tgcagcgga aacctggcaa acgcccacc agggccagg cctgacctc gactccatct 240

gtcggcgtaa aaccgctgtg ctcaccatcg gccaggcggc gctggaagac gcctgggagt 300

ttatggacgg ccgcccctgc gcgctgttta ttcttgatga gtccgctgc atcctgagcc 360

gttgcggcga gccgcaaacc ctggcccagc tggctgccct gggatttcgc gacggcagct 420

actgcgcgga gagcattatc ggcacctgcg cgctgtcgt ggccgcgatg cagggccagc 480

cgatcaaac cgccggcgat cgccatttta agcaggcgct acagccatgg agttttt 537

<210> 15

<211> 572

<212> DNA

<213> *Klebsiella pneumoniae*

<400> 15

gcaggaat gcgcggatc gagcggtcag agaccgatcc catgatgaat ttcgaaatc 60

cataggcgat ggagataccg gaaagggcga agccgaggtc gccacgagag aaccctgct 120

cgataagata aggcacgccc agggcaaagt tcttacgaac caaatagtag gcggcataac 180

caaaaaagat gccataaaa atctgccagc gtaatcgcg atatagcggg tcaatctccg 240

ctgctggcaa acgcgttta tgcgcggcgg gtttaaaat acttaacata tcagcctccg 300

tggcccttgc tgtttctac tgacgtcacg aaaaatccc agattaatca ccaacttcaa 360

atatggtcgc gatggtaggc aatacgtaga gttgatactg tgaacatcg cacaatttgt 420

tacagaaata tgacaaaacg ttccaatgtg agcacgaaat cacataacac gctcaataa 480

cgcggaata tgcgcgaaat caaacaataa cttactaat tgtggctaaa tggcgtaaa 540

cgaaagcaga ggagctgaag atgacgggac gt 572

<210> 16

<211> 545

<212> DNA

<213>	Klebsiella pneumoniae	
<400>	16	
	gatgaagttt gattgcgcga ttatcggcgg cgggctcgcc ggctgctgt gcgggctggc	60
	cctgaatcag cacggcctgc gcagcgtcat catcagccgc gggcagagcg cgctgcattt	120
	ttctccgcg tcgttagacc tgctctcggc gctgcccaac ggcgataacg tcaactgacgt	180
	cgcacaaggt gtgcagcaac tcgctgaaca gcttcttgaa cacccttatt cccgtctcgg	240
	cgccgaggcg gtgctcgaat acgcgacaca gaccgaagcc ctgctggccg cctgcggcgc	300
	ggtgatgcag ggcgatgcgc gccggccgca ccggcgggta acgccgctgg ggacgttgcg	360
	cccggcatgg ctgtcgcccc ttgaggtgcc tgtcgcgccc ctgccgtcgc agggcgccctg	420
	tctggtgggg atcagcggtt ttgctgattt tcagccgcac ctgccgccg ccgcgctcgg	480
	tcaacacgga gttaccgccc cggcgggtgga aatcgagtta ccgctgctgg atgtactgcg	540
	tgaca	545
<210>	17	
<211>	61	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	f primer sequence for gfp gene	
<400>	17	
	gltgtgaagc ttcttggtg aaaataggag gttaaattatg cagagcaaag gcgaagaact	60
	g	61
<210>	18	
<211>	43	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	r primer sequence for gfp gene	
<400>	18	
	ccggccgata tcttattaat ggtgatggtg atggtgttta tac	43
<210>	19	
<211>	32	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	f primer sequence for gpd1 gene	
<400>	19	

gagctcggta ccatgtcggc tgctgctgat cg 32

<210>

20

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> r primer sequence for gpd1 gene

<400> 20

ggtatatctc cttggatcct tagtcctcgt gcaggtccag 40

<210> 21

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> f primer sequence for gpp2 gene

<400> 21

ggatccaagg agatatacca tgggcctgac gaccaaacc 39

<210> 22

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> r primer sequence for gpp2 gene

<400> 22

taattaagct tgcatgcctg cagtcacat ttcagcagat cgtc 44

<210> 23

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> f primer sequence for dhaB to gdrA genes

<400> 23

gagctcggta ccatgaaaag atcaaaacga ttg 34

<210> 24

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> r primer sequence for dhaB to gdrA genes

<400> 24

acagccaagc ttctactggc cggtcaggcg aattaaac

38

<210> 25

<211> 61

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> f primer sequence for gdrB gene

<400> 25

acagccaagc ttaaaggaag ctaagcggag gtcagcatgt cgctttcacc gccaggcgta

60

c

61

<210> 26

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> r primer sequence for gdrB gene

<400> 26

acagccaagc ttcagtttct ctacttaac ggcagga

37

<210

> 27

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> f primer sequence for dhaT gene

<400> 27

atggtgactg caggcatgca agcttaggag aaattaacta tgagctatcg tatgtttg

58

<210> 28

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> r primer sequence for dhaT gene

<400> 28

aggagtccaa gctcagctaa ttaagctttc agaatgcctg gcggaaaatc

50