

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0063860 (43) 공개일자 2012년06월18일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 15/81 (2006.01) C12N 15/52 (2006.01) C12P 7/64 (2006.01) C12N 1/19 (2006.01) (21) 출원번호 10-2010-0125018 (22) 출원일자 2010년12월08일 심사청구일자 2010년12월08일		(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울 성북구 안암동5가 1 (72) 발명자 한성욱 서울특별시 성북구 길음로 119, 대우푸르지오아파트 210동 201호 (길음동) 유경옥 대전광역시 동구 가양동 58-2 (74) 대리인 특허법인다나

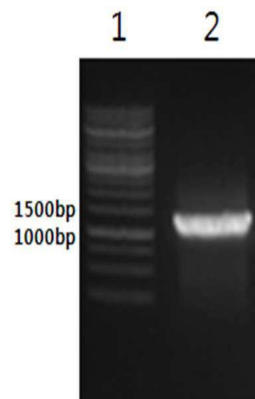
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 지방산 에틸 에스터 합성효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 형질전환체 및 이를 이용한 지방산 에틸 에스터의 생산방법

(57) 요약

본 발명은 지방산 에틸 에스터 합성효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 형질전환체 및 이를 이용한 지방산 에틸 에스터의 생산방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 글리세롤을 발효원으로 이용하도록 제작되어진 형질전환체에의 지방산 에스터 합성 유전자의 발현을 위하여 아시네토박토(*Acinetobacter*) 속에서 탐색되어지는 지방산 에틸 에스터 합성효소인 ws/dgat(wax ester synthase/acyl-coenzymeA: diacylglycerol acyltransferase)를 인코딩하는 atfA 유전자의 발현을 통한 지방산 에틸 에스터의 생산 형질전환체 및 이를 이용한 지방산 에틸 에스터의 생산방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2010-0029799

부처명 교육과학기술부

연구사업명 글로벌 프론티어연구개발사업(차세대 바이오매스 연구)

연구과제명 핵심3-바이오매스 전환 기술 개발/세부3-1-바이오연료 전환 플랫폼기술 개발/협동2-바이오매스의 바이오디젤 및 고부가가치 화학물질 생산을 위한 전환기술 개발

주관기관 탄소순환형 바이오매스 생산/전환 기술연구단

연구기간 2010.10.22 ~ 2012.08.21

특허청구의 범위

청구항 1

지방산 에틸 에스터 합성 효소인 ws/dgat(wax ester synthase/acyl-coenzymeA: diacylglycerol acyltransferase)를 코딩하는 유전자, 글리세롤 디히드로게나제(glycerol dehydrogenase) 유전자, 디히드록시아세톤 키나아제(dihydroxyacetone kinase) 유전자 및 글리세롤 업테이크 프로테인(glycerol uptake protein) 유전자를 포함하는 지방산 에틸 에스터 생산용 형질전환체.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

ws/dgat를 코딩하는 유전자는 아세토박토 속(*Acinetobacter* sp.) 유래의 atfA 유전자인 형질전환체.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

ws/dgat는 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 가지는 형질전환체.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

ws/dgat는 서열번호 2에 기재된 염기 서열을 가지는 형질전환체.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

글리세롤 디히드로게나제는 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열을 가지는 형질전환체.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

글리세롤 디히드로게나제 유전자는 서열번호 4에 기재된 염기 서열을 가지는 형질전환체.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

디히드록시아세톤 키나아제는 서열번호 5에 기재된 아미노산 서열을 가지는 형질전환체.

청구항 8

제 1 항에 있어서,

디히드록시아세톤 키나아제 유전자는 서열번호 6에 기재된 염기서열을 가지는 형질전환체.

청구항 9

제 1 항에 있어서,

글리세롤 업테이크 프로테인은 서열번호 7에 기재된 아미노산 서열을 가지는 형질전환체.

청구항 10

제 1 항에 있어서,

글리세롤 업테이크 프로테인 유전자는 서열번호 8에 기재된 염기서열을 가지는 형질전환체.

청구항 11

제 1 항에 있어서,

형질전환체는 효모인 형질전환체.

청구항 12

제 11 항에 있어서,

효모는 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*)인 형질전환체.

청구항 13

제 11 항에 있어서,

효모는 사카로마이시스 세레비지에 YPH499(pGcydAk, pGup1a ws.dgat cas) [KCCM11094P]인 형질전환체.

청구항 14

지방산 에틸 에스터 합성 효소인 ws/dgat(wax ester synthase/acyl-coenzymeA: diacylglycerol acyltransferase)를 코딩하는 유전자 및 글리세롤 업테이크 프로테인 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제작하는 단계;

글리세롤 디히드로게나제 유전자와 디히드로시아세톤 키나아제 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제작하는 단계; 및

상기 재조합 벡터들을 형질전환하는 단계

를 포함하는 지방산 에틸 에스터 생산용 형질전환체의 제조방법.

청구항 15

글리세롤을 기질로 하여 제 1 항에 따른 형질전환체를 배양하는 단계를 포함하는 지방산 에틸 에스터의 생산 방법.

청구항 16

제 15 항에 있어서,

상기 글리세롤은 바이오디젤의 부산물로 생성된 지방산 에틸 에스터의 생산방법.

청구항 17

제 15 항에 있어서,

상기 형질전환체는 사카로마이스스 세레비지에 YPH499(pGcydAk, pGup1a ws.dgat cas)[KCCM11094P]인 지방산 에틸 에스터의 생산방법.

청구항 18

제 15 항에 있어서,

배양 시 탄소수 12 내지 20개인 지방산염을 첨가하는 지방산 에틸 에스터의 생산방법.

청구항 19

제 15 항에 있어서,

상기 배양온도는 25 내지 30 ℃에서 이루어지는 지방산 에틸 에스터의 생산방법.

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 글리세롤을 발효원으로 하고, 지방산 에틸 에스터 합성 유전자의 발현을 통하여 지방산 에틸 에스터의 생산을 가능하게 한 형질전환체 및 상기 형질전환체를 이용한 지방산 에틸 에스터의 생산방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

1992년 리우환경회의와 1997년 교토협약 이후 공해물질 규제와 이산화탄소의 배출량을 절감하는 재생산성 순환 에너지원인 바이오연료(biofuel)에 대한 관심이 집중되고 있고 현재 전 세계 수송차량의 30% 이상을 처리하며 동시에 50% 이상의 공해를 발생시키는 디젤차량에 대한 청정 대체연료인 바이오디젤의 개발이 절실한 실정이다. 바이오디젤(biodiesel)은 유기체를 가공하여 직접 만들어 낸 것으로, 동, 식물성 기름이 메탄올 또는 에탄올 등의 알코올과 '에스테르화(Esterification)' 과정으로 만들어지는데, 에스테르화된 유지에서 '글리세롤'을 제거하면 지방산 메틸 에스터(fatty acid methyl esters), 지방산 에틸 에스터(fatty acid ethyl esters)가 된다. 바이오디젤은 기존의 석유계 경유와 성질이 매우 유사하며 연소 시 공해가 거의 발생하지 않아 석유계 경유와 섞어서 사용할 경우 대기오염의 주범인 자동차 공해를 획기적으로 줄일 수 있는 선진국형 청정 대체 에너지로 최근 그 수요와 필요성이 대폭 증대되고 있다. 또한, 바이오디젤은 경유 대체 에너지뿐만 아니라 윤활유의 원료, 윤활유 첨가제 등으로 이용될 수 있으며 다양한 무공해 용제 및 생물농약으로 사용이 가능하다. 또한, 바이오디젤은 원유로 오염된 해변정화를 위한 바이오리메디에이션(bioremediation) 촉진을 위한 촉매제로서 이용이 가능하다. 현재까지 이러한 바이오디젤의 생산은 다양한 동, 식물성유지로부터 강산 또는 강염기 등을 이용하는 화학적 촉매방법을 사용하여 생산되고 있으나, 화학적 촉매방법은 고에너지성의 다단계 반응공정이 요구되고 촉매 및 부산물의 회수가 어려울 뿐 아니라 다량의 폐수발생에 의한 2차 환경오염을 유발하는 등의 부작용이 있기 때문에 향후 대규모 바이오디젤의 수요를 충족할 수 있는 저에너지 요구성의 친환경 생물학적 신공정의 필요성이 대두되고 있다. 2006년 Rainer 등[Rainer Kalscheuer et al., Microbiology. 152,2529-2536, 2006]이 대장균(*E. coli*)에서의 지방산 에틸 에스터가 생성됨을 보고하여 생물학적인 방법으로 지방산 에틸 에스터 생산 공정 가능성을 시사하였다. 하지만 대장균에서는 에탄올 등의 알코올에 대한 생산량이 작으며 또한 그 내성이 약한 단점을 가지고 있다. 최근 Eric 등[Eric J. steen et al., Nature. 463. 559-556, 2010]에 의하여 대장균에서의 지방산 에틸 에스터의 생산량을 증가시키는 연구가 진행되고 있으나, 형질전환을 통하여 에탄올 생산이 가능하도록 제작된 대장균에서도 생산해 내는 에탄올의 양이

현저히 적은 이유로 배지에 에탄올 성분을 첨가하여 지방산 에틸 에스터의 생산량을 증가시키는 연구결과가 보고되었다. 본 발명에서는 지방산 에틸 에스터 생산을 위한 숙주로서 에탄올에 내성을 가지며 에탄올 생산능이 뛰어난 효모를 선택함으로써 보다 효율적인 지방산 에틸 에스터 생산 시스템을 개발하였다.

[0003] 또한, 본 발명에서 기질로 사용되는 글리세롤은 $C_3H_8O_3$ 로 $C_6H_{12}O_6$ 인 글루코오스(glucose)에 비하여 1단계 환원된 물질로서 미생물의 대사 과정에서 보다 향상된 환원력을 제공할 수 있다. 발효를 통하여 생산되는 많은 물질이 그 대사과정에서 환원력을 요구하는 경우가 많기 때문에 글리세롤을 기질로 효과적으로 이용할 수 있다면, 원하는 발효산물의 수율 및 생산성의 향상을 가져 올 수 있다. 현재 바이오 디젤의 생산량이 늘어남에 따라 글리세롤의 생산량 늘어났기 때문에 가격이 급격히 하락하고 있는 실정이다. 상기한 바와 같이 바이오디젤의 생산량이 급증함에 따라, 부산물인 글리세롤의 생산도 늘어나 글리세롤을 포함하고 있는 부산물을 효과적으로 처리하는 문제가 발생할 것이다. 따라서, 글리세롤을 이용하여 효과적으로 발효에 의해 유용한 발효산물을 생산할 수 있다면 많은 부속 효과를 가져 올 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명의 목적은 지방산 에틸 에스터 합성 효소인 ws/dgat(wax ester synthase/acyl-coenzymeA: diacylglycerol acyltransferase)를 코딩하는 유전자, 글리세롤 디히드로게나제(glycerol dehydrogenase) 유전자, 디히드록시아세톤 키나아제(dihydroxyacetone kinase) 유전자 및 글리세롤 업테이크 프로테인(glycerol uptake protein) 유전자를 포함하는 지방산 에틸 에스터 생산용 형질전환체 및 이의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0005] 본 발명의 다른 목적은 상기 형질전환체를 이용하여 지방산 에틸 에스터를 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 지방산 에틸 에스터 합성 효소인 ws/dgat(wax ester synthase/acyl-coenzymeA: diacylglycerol acyltransferase)를 코딩하는 유전자, 글리세롤 디히드로게나제 유전자, 디히드록시아세톤 키나아제 유전자 및 글리세롤 업테이크 프로테인 유전자를 포함하는 지방산 에틸 에스터 생산용 형질전환체를 제공한다.

[0007] 본 발명은 또한,

[0008] 지방산 에틸 에스터 합성 효소인 ws/dgat(wax ester synthase/acyl-coenzymeA: diacylglycerol acyltransferase)를 코딩하는 유전자 및 글리세롤 업테이크 프로테인 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제작하는 단계;

[0009] 글리세롤 디히드로게나제 유전자와 디히드록시아세톤 키나아제 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제작하는 단계; 및

[0010] 상기 재조합 벡터들을 형질전환하는 단계

[0011] 를 포함하는 지방산 에틸 에스터 생산용 형질전환체의 제조방법을 제공한다.

[0012] 본 발명은 또한, 글리세롤을 기질로 하여 상기 지방산 에틸 에스터 생산용 형질전환체를 배양하는 단계를 포함하는 지방산 에틸 에스터의 생산방법을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명에 따른 형질전환체는 글리세롤을 탄소원으로 이용하도록 제작되고, 지방산 에틸 에스터의 합성이 가

능하도록 하는 유전자를 삽입함으로써 바이오디젤의 부산물로 생성이 되는 글리세롤을 이용하여 많은 양의 지방산 에틸 에스터를 생산할 수 있어 매우 유용한 발명인 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0014] 도 1은 본 발명에서 아가로스 겔 전기영동을 수행하여 ws/dgat 유전자의 PCR 산물을 확인한 것이다[Lane 1: 1kb DNA 마커; Lane 2: Ws/dgat PCR 산물].
- 도 2는 아가로스 겔 전기영동을 수행하여 PCR 산물을 확인한 것으로서, (A)는 글리세롤 디히드로게나제 유전자의 PCR 산물[Lane 1, 1kb DNA 마커; Lane 2, Gcy PCR 산물], (B)는 디히드록시아세톤 키나아제 유전자의 PCR 산물[Lane 1: 1kb DNA 마커; Lane 2, Dak PCR 산물], (C)는 글리세롤 업테이크 단백질 유전자의 PCR 산물[Lane 1: 1kb DNA 마커; Lane 2: Gup PCR 산물]을 나타낸다.
- 도 3a는 본 발명에서 제시된 ws/dgat 유전자가 삽입된 재조합 벡터 pGup1a ws.dgat cas의 재조합 과정을 나타낸 모식도이고,
- 도 3b는 본 발명에서 제시된 글리세롤 디히드로게나제 유전자와 디히드록시아세톤 키나아제 유전자가 양방향으로 삽입된 재조합 벡터 pGcyDak의 재조합 과정을 나타낸 모식도이고,
- 도 3c는 본 발명에서 제시된 글리세롤 업테이크 단백질 유전자 삽입을 위하여 구축한 재조합 벡터 pGup의 재조합 과정을 나타낸 모식도이다.
- 도 4는 올레인산염 첨가 전(a)과 첨가 후(b)의 GC-MS 결과를 나타낸 것이다.
- 도 5a는 본 발명에서 제시된 지방산 에틸 에스터 합성 유전자가 삽입된 형질전환체의 배양 시 소듐 올레인산염(sodium oleate)을 첨가하지 않을 시 에탄올(좌) 및 지방산 에틸 에스터(우)의 합성을 확인한 것이며,
- 도 5b는 본 발명에서 제시된 지방산 에틸 에스터 합성 유전자가 삽입된 형질전환체의 배양 시 소듐 올레인산염을 첨가 시 에탄올(좌) 및 지방산 에틸 에스터(우)의 합성을 확인한 것이다[Lane 1, YPH499(pESC-TRP), Lane 2: YPH499(pGcyDak, pGup1aWS.DGATcas), ◆: YPH499(pESC-TRP), ■: YPH499 (pGcyDak,pGupCas), ▲: YPH499(pGcyDak, pGup1a ws.dgat cas)].

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0015] 본 발명은 지방산 에틸 에스터 합성 효소인 ws/dgat(wax ester synthase/acyl-coenzymeA: diacylglycerol acyltransferase)를 코딩하는 유전자, 글리세롤 디히드로게나제 유전자, 디히드록시아세톤 키나아제 유전자 및 글리세롤 업테이크 단백질 유전자를 포함하는 지방산 에틸 에스터 생산용 형질전환체에 관한 것이다.
- [0016] 본 발명에서, ws/dgat 유전자는 바람직하게는 아시네토박터(Acinetobacter) 속 유래인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 아니한다.
- [0017] 본 발명에서, ws/dgat는 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 가지는 것이 바람직하나, 서열번호 1에 기재된 단백질에 하나 이상의 치환, 결손, 부가 등의 돌연변이가 유발된 ws/dgat 활성을 가진 돌연변이체도 포함할 수 있다.
- [0018] 본 발명에서, ws/dgat 유전자는 서열번호 2에 기재된 염기 서열을 가지는 것이 바람직하나, 유전자 코드의 디제너러시(degeneracy)를 고려하여 상기 서열번호 2에 기재된 염기서열과 80%의 상동성, 바람직하게는 85%의 상동성, 더욱 바람직하게는 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 95%의 상동성을 가지는 유전자도 포함할 수 있다.
- [0019] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 글리세롤 디히드로게나제 (glycerol dehydrogenase)는 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열을 가지는 것이 바람직하나, 서열번호 3에 기재된 단백질에 하나 이상의 치환, 결손, 부가 등의 돌연변이가 유발된 글리세롤 디히드로게나제 활성을 가진 돌연변이체도 포함할 수 있다.
- [0020] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 글리세롤 디히드로게나제 (glycerol dehydrogenase) 유전자는 서열번호 4에 기재된 염기 서열을 가지는 것이 바람직하나, 유전자 코드의 디제너러시를 고려하여 상기 서열번호 4에 기재된 염기서열과 80%의 상동성, 바람직하게는 85%의 상동성, 더욱 바람직하게는 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 95%의 상동성을 가지는 유전자도 포함할 수 있다.

- [0021] 본 발명의 또 다른 일 구체예에 있어서, 상기 디히드로시아세톤 키나아제(dihydroxyacetone kinase)는 서열번호 5에 기재된 아미노산 서열을 가지는 것이 바람직하나, 서열번호 5에 기재된 단백질에 하나 이상의 치환, 결손, 부가 등의 돌연변이가 유발된 디히드로시아세톤 키나아제 활성을 가진 돌연변이체도 포함할 수 있다.
- [0022] 본 발명의 또 다른 일 구체예에 있어서, 상기 디히드로시아세톤 카나아제 유전자는 서열번호 6에 기재된 염기 서열을 가지는 것이 바람직하나, 유전자 코드의 디제너러시를 고려하여 상기 서열번호 6에 기재된 염기서열과 80%의 상동성, 바람직하게는 85%의 상동성, 더욱 바람직하게는 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 95%의 상동성을 가지는 유전자도 포함할 수 있다.
- [0023] 본 발명의 또 다른 일 구체예에 있어서, 상기 글리세롤 업테이크 프로테인은 서열번호 7에 기재된 아미노산 서열을 가지는 것이 바람직하나, 서열번호 7에 기재된 단백질에 하나 이상의 치환, 결손, 부가 등의 돌연변이가 유발된 디히드로시아세톤 키나아제 활성을 가진 돌연변이체도 포함할 수 있다.
- [0024] 본 발명의 또 다른 일 구체예에 있어서, 상기 글리세롤 업테이크 프로테인 유전자는 서열번호 8에 기재된 염기 서열을 가지는 것이 바람직하나, 유전자 코드의 디제너러시를 고려하여 상기 서열번호 8에 기재된 염기서열과 80%의 상동성, 바람직하게는 85%의 상동성, 더욱 바람직하게는 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 95%의 상동성을 가지는 유전자도 포함할 수 있다.
- [0025] 본 발명의 형질전환체는 효모, 바람직하게는 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 아니한다.
- [0026] 본 발명의 형질전환체는 기탁번호가 KCCM11094P인 효모 사카로마이시스 세레비지애 YPH499(pGcyDak, pGup1a ws.dgat cas)인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 아니한다.
- [0027] 본 발명은 또한,
- [0028] 지방산 에틸 에스터 합성 효소인 ws/dgat(wax ester synthase/acyl-coenzymeA: diacylglycerol acyltransferase)를 코딩하는 유전자 및 글리세롤 업테이크 프로테인 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제작하는 단계;
- [0029] 글리세롤 디히드로게나제 유전자와 디히드로시아세톤 키나아제 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제작하는 단계; 및
- [0030] 상기 재조합 벡터들을 형질전환하는 단계
- [0031] 를 포함하는 지방산 에틸 에스터 생산용 형질전환체의 제조방법에 관한 것이다.
- [0032] 본 발명에서 "재조합 벡터"란 적당한 숙주세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있는 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동 가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 말한다. 상기 벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파지 벡터 및 바이러스 벡터 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 적합한 발현 벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서 같은 발현 조절 엘리먼트 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 시그널 서열 또는 리더 서열을 포함하며, 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 또한, 발현벡터는 벡터를 함유하는 숙주세포를 선택하기 위한 선택마커를 포함하고, 복제 가능한 발현벡터인 경우 복제 기원을 포함한다.
- [0033] 또한, 재조합 벡터에는, 발현의 억제 또는 증폭, 또는 유도를 위한 각종의 기능을 가진 발현억제용의 단편이나, 형질전환체의 선택을 위한 마커나 항생물질에 대한 내성유전자, 또는, 균체 밖으로의 분비를 목적으로 한 시그널을 코딩하는 유전자 등을 추가로 가진 것도 가능하다.
- [0034] 상기 지방산 에틸 에스터 합성 효소인 ws/dgat(wax ester synthase/acyl-coenzymeA: diacylglycerol acyltransferase)를 코딩하는 유전자 및 글리세롤 업테이크 프로테인 유전자를 포함하는 재조합 벡터는 예를 들어 pGup1a ws.dgat cas일 수 있으나, 이에 한정되지 아니한다.
- [0035] 상기 글리세롤 디히드로게나제 유전자와 디히드로시아세톤 키나아제 유전자를 포함하는 재조합 벡터는 예를 들어 pGcyDak 일 수 있으나, 이에 한정되지 아니한다.
- [0036] 본 발명에서 효모를 숙주로서 사용하는 경우는, 발현벡터로서, 예를 들면 YEp13, YCp50, pRS계, pYEX계 벡터 등이 이용 가능하다. 프로모터로는, 예를 들면 GAL프로모터, AOD프로모터 등을 사용할 수 있다.
- [0037] 형질전환은 핵산을 유기체, 세포, 조직 또는 기관에 도입하는 어떤 방법도 포함되며, 효모에의 재조합체 DNA

의 도입방법으로는, 예를 들면 일렉트로포레이션법(Method Enzymol., 194, 182-187(1990)), 스페로플라스트법(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1929-1933(1978)), 아세트산리튬법(J. Bacteriol., 153, 163-168(1983)) 등이 이용 가능하다.

[0038]

[0039] 본 발명은 또한, 글리세롤을 기질로 하여 본 발명의 형질전환체를 배양하는 단계를 포함하는 지방산 에틸 에스터의 생산방법에 관한 것이다.

[0040] 본 발명에서, 글리세롤은 바이오디젤의 부산물로 생성된 글리세롤인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0041] 본 발명의 지방산 에틸 에스터의 생산 시 배지에 탄소수 12 내지 20개의 지방산염을 첨가하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 아니한다.

[0042] 상기 형질전환체는 효모인 것이 바람직하며, 상기 효모는 사카로마이시스 세레비지애인 것이 보다 바람직하고, 특히 사카로마이시스 세레비지애 YPH499(pGcyuDak, pGup1a ws.dgat cas)[KCCM11094P]이 더욱 바람직하다.

[0043] 본 발명의 지방산 에틸 에스터 생성물 조성물은, 예를 들어 상기 형질전환체를 배양하여 글리세롤을 기질로 하여 지방산 에틸 에스터를 생성할 수 있는 조성물을 의미하며, 이를 생성하는데 적합한 폴리펩타이드, 브로쓰, 세포 용해물, 정제 또는 정제되지 않은 효소 추출물 또는 폴리펩타이드 등을 포함할 수 있다.

[0044] 본 발명의 형질전환체를 배양하는 방법은, 숙주의 배양에 사용되는 통상의 배양 방법을 사용하면 된다.

[0045] 상기 배양 방법은 배치(batch)식, 유동배치식, 연속배양, 리액터형식 등, 통상의 미생물의 배양에 사용하는 어떠한 방법도 사용할 수 있다. 대장균, 효모 등을 숙주로 해서 얻게 된 형질전환체를 배양하는 배지로서는, 완전배지 또는 합성배지, 예를 들면 LB 배지, NB 배지 등을 들 수 있다. 또한, 배양온도는 25 내지 30 °C에서 배양함으로써 ws/dgat를 균체 내에 축적시키고, 회수한다.

[0046] 탄소원은 미생물의 증식에 필요하고, 예를 들면 글루코스, 프럭토스, 수크로스, 말토스, 갈락토스, 전분 등의 당류; 에탄올, 프로판올, 부탄올 등의 저급알콜류; 글리세롤 등의 다가알콜류; 아세트산, 시트르산, 숙신산, 타르타르산, 락트산, 글루콘산 등의 유기산; 프로피온산, 부탄산, 펜탄산, 헥산산, 헵탄산, 옥탄산, 노난산, 데칸산, 운데칸산, 도데칸산 등의 지방산 등을 이용할 수 있다.

[0047] 질소원으로서, 예를 들면 암모니아, 염화암모늄, 황산암모늄, 인산암모늄등의 암모늄염 외에, 펩톤, 고기즙, 효모엑기스, 맥아엑기스, 카제인분해물, 옥수수 침지액 등의 천연물 유래의 것을 들 수 있다. 또한, 무기물로서는, 예를 들면 인산제 1칼륨, 인산제 2칼륨, 인산마그네슘, 황산마그네슘, 염화나트륨 등을 들 수 있다. 배양액에, 카나마이신, 암피실린, 테트라사이클린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신 등의 항생물질을 첨가해도 된다.

[0048] 또한, 프로모터가 유도성의 발현벡터를 사용해서 형질전환한 미생물을 배양하는 경우는, 프로모터의 종류에 적합한 유도물질을 배지에 첨가하면 된다. 예를 들면, 이소프로필-β-D-티오갈락토포라노시드(IPTG), 테트라사이클린, 인돌아크릴산(IAA) 등을 유도물질로서 들 수 있다.

[0049] 지방산 에틸 에스터 합성요소인 ws/dgat의 취득은, 형질전환체의 배양물 중으로부터, 균체 또는 상청액을 원심 회수하여, 균체 파쇄, 추출, 친화성 크로마토그래피, 양이온 또는 음이온교환 크로마토그래피, 겔 여과 등을 단독으로 또는 적당히 조합함으로써 행할 수 있다.

[0050] 얻게 된 정제물질이 목적의 효소인 것의 확인은, 통상의 방법, 예를 들면 SDS-폴리아크릴아미드겔 전기영동, 웨스턴블로팅 등에 의해 행할 수 있다.

[0051] 본 발명의 일 실시예로서, 사카로마이세스 세레비제에서의 지방산 에틸 에스터 생산은 배양 시 올레인산(oleic acid) 등의 단쇄 지방산(short chain fatty acid)에 의존하며, 아실 코에이 합성효소(acyl CoA synthase)에 의하여 올레오일 코에이(Oleoyl-CoA)로 전환되며 왁스 에스터 합성효소(wax ester synthase)에 의하여 에탄올과의 반응을 통한 올레인산 에틸 에스터(ethyl oleate ester)를 생산한다.

[0052] 따라서, 본 발명에서는 글리세롤을 탄소원으로 이용하도록 제작된 균주에의 아시네토박토 속 ws/dgat 유전자를 삽입함으로써 지방산 에틸 에스터 합성이 가능하게 되었다.

[0053]

[0054] 이하, 본 발명에 따르는 실시예 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하나, 본 발명의 범위가 하기 제시된 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0055] [실시예]

[0056] 실시예 1: 아시네토박터의 ws/dgat 유전자 증폭

[0057] 지방산 에틸 에스터 합성효소인 ws/dgat(wax ester synthase/acyl-coenzymeA: diacylglycerol acyltransferase)를 코딩하는 아시네토박터 속 유래의 atfA 유전자 삽입을 위하여, 정방향과 역방향에 제한효소 SpeI의 사이트가 포함되어진 프라이머 쌍[정방향 프라이머(5'-actagtcgccgccaccaaggagatgcgccattacatccgat-3', 서열번호 9)와 역방향 프라이머(5'-actagtttaattggctgttttaatatcttc-3', 서열번호 10)]을 이용하여 아시네토박터 속의 게놈 DNA를 주형으로 한 PCR반응을 실시하였다. 이 후 상기합성된 프라이머를 이용하여 PCR을 수행(조건: step 1: 95 °C 10분, step 2: 95 °C 30초, step 3: 50 °C 30초, step 4: 72 °C 2분, step 5: 95 °C 10분, step 2~step 4 30 cycle) 통하여 1.2 kb의 PCR 산물을 얻었다.

[0058] 실시예 2: 아시네토박터의 ws/dgat 유전자의 클로닝 및 형질전환

[0059] 상기 실시예 1에서 얻은 증폭산물을 0.8% 아가로스 겔 상에서 전기영동하였고, 아가로스 겔 상의 DNA 절편은 Biospin gel extraction kit (Bioflux)를 사용하여 회수하였다.

[0060] 그 후, 제한효소 SpeI으로 절단한 후 글리세롤 업테이크 단백질이 삽입되어진 pGup1에 라이게이션(ligation)시켜 대장균(*E. coli*) DH5a(인비트로젠(Invitrogen)에 형질전환을 하였다. 이어 형질전환체로부터 라이게이션(ligation)된 재조합 플라스미드 DNA를 분리하였다. 상기 재조합 벡터를 pGup1/Ws-Dgat이라 명명하였고, 이를 도 3a에 도시하였다. 또한, pGup1/Ws-Dgat를 유전자 삽입하기 위하여, BamHI 인식서열을 포함하도록 센스 프라이머(5'-ggatccatgtcagcatcttaggttaaattccgtg-3'; 서열번호 11) 그리고 안티센스 프라이머(5'-ggatccataatgtcgctgatcagcatcctgtct-3'; 서열번호 12)를 제작하여 효모 유전자 삽입 벡터(yeast integration vector)인 YIP-5 [ATCC]에 클로닝하여 pGup1a ws.dgat cas를 제작하였다. 이를 사카로마이시스 세레비지애의 게놈 DNA에 유전자 삽입하였다[도 3a].

[0061] 실시예 3: 글리세롤 디히드로게나제, 디히드록시아세톤 키나아제, 글리세롤 업테이크 단백질 유전자의 형질전환

[0062] 1. 글리세롤 디히드로게나제, 디히드록시아세톤 키나아제, 글리세롤 업테이크 단백질 유전자의 증폭

[0063] 글리세롤을 해당과정의 중간물질인 DHAP(dihydroxyacetone phosphate)로 효율적으로 전환하기 위하여 글리세롤 디히드로게나제 유전자(Gcy), 디히드록시아세톤 키나아제 유전자(Dak), 글리세롤 업테이크 단백질 유전자(Gup1)를 클로닝하기 위하여 사카로마이시스 세레비지애의 게놈 DNA(BY4741)로부터 펩타이드 부분의 염기서열을 참고로 하였다.

[0064] Gcy의 클로닝을 위하여 BamH(5'-ggatccatgcctgctactttacatgattct-3, 서열번호 13), Sal(5'-gtcgacatacttgaatacttcgaaggag-3), Dak는 Spe(5'-actagtatgtccgctaaatcggttgaagtc-3, 서열번호 14), Cla(5'-atcgatatacaaggcgctttgaacccctt-3, 서열번호 15) 그리고 Gup1에는 EcoR(5'-gaattcatgtcgctgatcagcatcctg-3, 서열번호 16), Spe(5'-actagtcagcatcttaggttaaattccgtg-3, 서열번호 17)로 각각의 인식서열이 삽입되도록 프라이머를 디자인하여 합성하였다. 이후 상기 합성된 프라이머를 이용하여 PCR (조건: step 1: 95 °C 10분, step 2: 95 °C 30초, step 3: 50 °C 30초, step 4: 72 °C 2분, step 5: 95 °C 10분, step 2~step 4 30 cycle)을 수행하였다. 그 결과, 각각 936 bp, 1755 bp 그리고 1683 bp의 PCR 밴드를 확인할 수 있었고 도 2에 각각 도시하였다.

[0065] 2. 글리세롤 디히드로게나제, 디히드록시아세톤 키나아제, 글리세롤 업테이크 단백질 유전자의 클로닝

- [0066] 상기 실시예 3의 1에서 얻은 Gcy, Dak, Gup 증폭산물을 0.8% 아가로스 겔 상에서 전기영동하였고 아가로스 겔 상의 DNA 절편은 Biospin gel extraction kit(Bioflux)를 사용하여 회수하였다.
- [0067] 그 후, Gcy는 BamH, Sal, Dak는 Spe, Cla 그리고 Gup1은 EcoR, Spe로 절단한 후 효모-대장균 셔틀 벡터(yeast-E. coli shuttle vector)인 pESC-trp(Clontech)에 라이게이션(ligation)시켜 대장균 DH5a에 형질전환을 하였다. 이어 형질전환체로부터 라이게이션(ligation)된 재조합 플라스미드 DNA를 분리하였다. 상기 재조합 벡터를 각각 pGcy, pDak, pGup1이라 명명하였다.
- [0068] 그 후 pGcy를 벡터로 하여 Dak를 클로닝하여 대장균 DH5a(인비트로젠(Invitrogen)에 형질전환을 하였다. 이어 상기 형질전환체로부터 라이게이션된 재조합 플라스미드 DNA를 분리하였다. 상기 재조합 벡터를 pGcyDak이라 명명하였고, 도 3b에 도시하였다.
- [0069] 또한, pGup1을 사카로마이시스 세레비지애의 게노믹 DNA에 유전자 삽입하기 위하여, BamH1 인식서열을 포함하도록 센스 프라이머(5'-ggatccatgt cagcatttttaggttaaattccgtg-3', 서열번호 18) 그리고 안티센스 프라이머(5'-ggatccataatgtcgctgatcagcatcctgtct-3', 서열번호 19)를 제작하여 효모 유전자 삽입 벡터(yeast integration vector)인 YIP-5에 클로닝하여 이를 사카로마이시스 세레비지애의 게노믹 DNA에 유전자 삽입하였으며, 이를 재조합 벡터 pGupCas라 명명하였고, 도 3c에 도시하였다
- [0070] **실시예 4: 형질전환체 사카로마이시스 세레비지애 YPH499(pGcyDak, pGup1a ws.dgat cas) 제작**
- [0071] 상기 재조합 벡터들(pGcyDak, pGup1a ws.dgat cas)을 이용하여 클론테크(clontech)사의 이스트메이커 이스트 트랜스포메이션 키트(YEASTMAKER yeast transformation kit2) 에서 제공하는 실험방법에 따라 효모 숙주세포를 형질전환시켰다. 이를 사카로마이시스 세레비지애 YPH499(pGup1a ws.dgat cas)라 명명하였다.
- [0072] 상기 효모 숙주세포로는 사카로마이시스 세레비지애 YPH499(*S. cerevisiae* YPH499, ura3-52lys2-801amberade2-101ochretrp1-63 his3-200 leu2-1)를 사용하였다. 이후, 트립토판 결핍 SD 배지(0.67% yeast nitrogen base, 2% glucose, 0.067% yeast nitrogen base w/o trp, 2% agar)를 이용하여 형질전환체를 선별하였으며, 또한 사카로마이시스 세레비지애 YPH499에 Gup1을 유전자 삽입한 균주의 선별에는 SD 배지에 G418(100 ug/ml)이 첨가된 배지에서 선별하였다.
- [0073] 이를 한국미생물보존센터(KCCM)에 2010년 8월 18일자로 기탁하였으며, 수탁번호 KCCM11094P를 부여받았다.
- [0074] **실시예 5: 형질전환체 사카로마이시스 세레비지애 YPH499(pGcyDak, pGup1a ws.dgat cas)의 배양 조건 검토**
- [0075] 형질전환체 사카로마이시스 세레비지애 YPH499(pGcyDak, pGup1a ws.dgat cas)의 배양 시 단쇄 지방산(short chain fatty acid)인 소듐 올레에이트(sodium oleate)의 첨가를 통한 지방산 에틸 에스터의 합성을 확인하기 위하여 소듐 올레에이트가 첨가된 배지와 첨가되지 않은 배지(0.67% yeast nitrogen base, 2% glycerol, 0.067% yeast nitrogen base w/o trp, 0.2% galactose, 2% agar)에서의 각각 에탄올 및 지방산 에스터의 합성을 측정하였다. 제작된 형질전환체의 배양 시 0.1%의 소듐 올레에이트가 첨가된 배지와 첨가하지 않은 배지에서 96시간 배양 후 GC-MS를 통하여 분석하였다.
- [0076] 그 결과를 도 4에 나타내었으며, 이는 생성된 지방산 에틸에스터의 성분을 GC-MS를 통하여 분석한 것으로, 에틸 올레에이트가 가장 주(major) 구성성분으로서 본 연구를 통하여 제작된 형질전환체에서 성공적으로 지방산 에틸에스터를 생산해냄을 확인하는 것이다.
- [0077] **실시예 6: 형질전환체 사카로마이시스 세레비지애 YPH499(pGcyDak, pGup1a ws.dgat cas)의 지방산 에틸 에스터의 생산**
- [0078] YPH499(pESC-TRP), YPH499(pGcyDak, pGupCas)와 YPH499(pGcyDak, pGup1a ws.dgat cas)를 갈락토오스로 발현 유도되는 SG배지(0.67% yeast nitrogen base, 2% glucose, 0.067% yeast nitrogenase w/o trp, 0.2% galactose)에서 24시간 전배양 후 48시간 진탕 배양하여 2%의 글리세롤이 기질로 첨가된 발효 배지(0.67% yeast nitrogen base, 2% glycerol, 0.067% yeast nitrogen ase w/o trp, 0.2% galactose)에 600 nm 파장에서 흡광도를 측정했을 때 각각 1가 되도록 하였다. 상기 발효배양액을 30 ℃, 100 rpm에서 각각 소듐 올레에이트

를 첨가한 배지와 첨가하지 않은 배지에 배양하며 일정한 시간별로 배양액을 채취하여 가스 크로마토그래피를 실시하여 생산된 에탄올을 측정하였다. 또한, 생산된 지방산 에틸 에스터(올레인산 에틸 에스터)는 TLC를 통하여 측정하였다[도 5 a]. 지방산 에틸 에스터가 생산되도록 균주의 배양 시에 0.1% 소듐 올레이트를 첨가한 배지에서 지방산 에틸 에스터의 합성이 가능해짐을 확인하게 되었다. 이 결과를 도 5b에 도시하였다. 이는 본 발명의 형질전환체의 올레인산에 대한 의존성을 나타내는 것으로, 도 5a는 올레인산을 첨가하지 않았을 때 지방산 에틸 에스터가 생산되지 않음을 나타내며, 도 5b는 올레인산이 첨가 됨으로써 본 균주에서 생산하는 에탄올을 효율적으로 이용하여 지방산 에틸 에스터를 성공적으로 생산해냄을 나타내었다.

수탁번호

[0079]

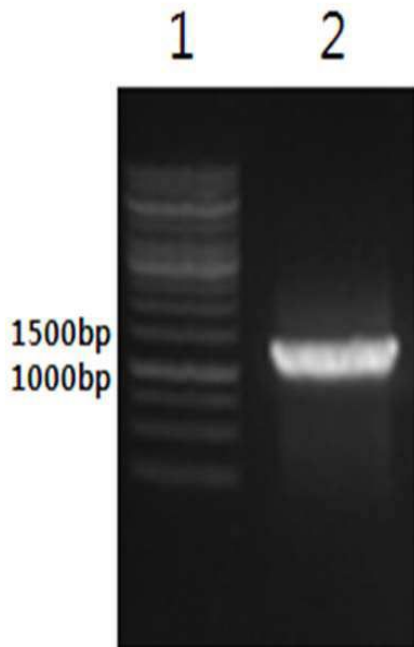
기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

수탁번호 : KCCM11094P

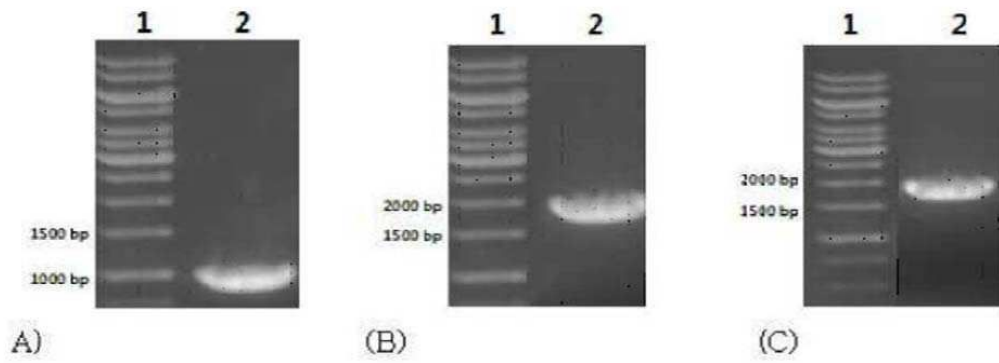
수탁일자 : 20100818

도면

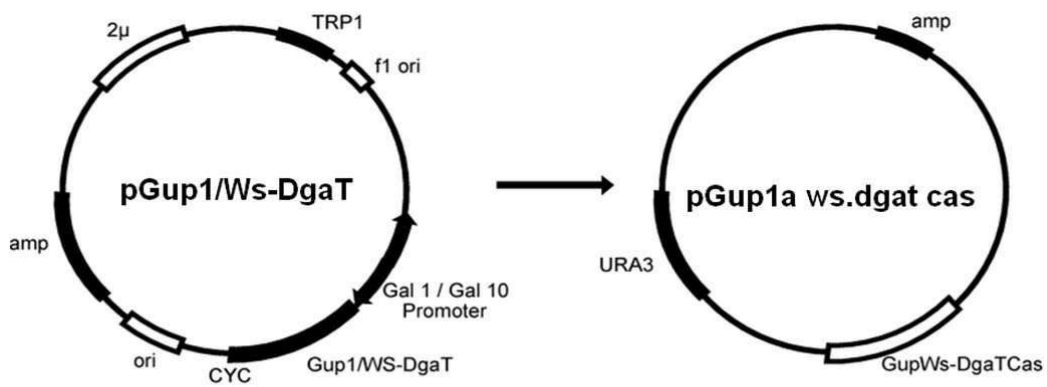
도면1



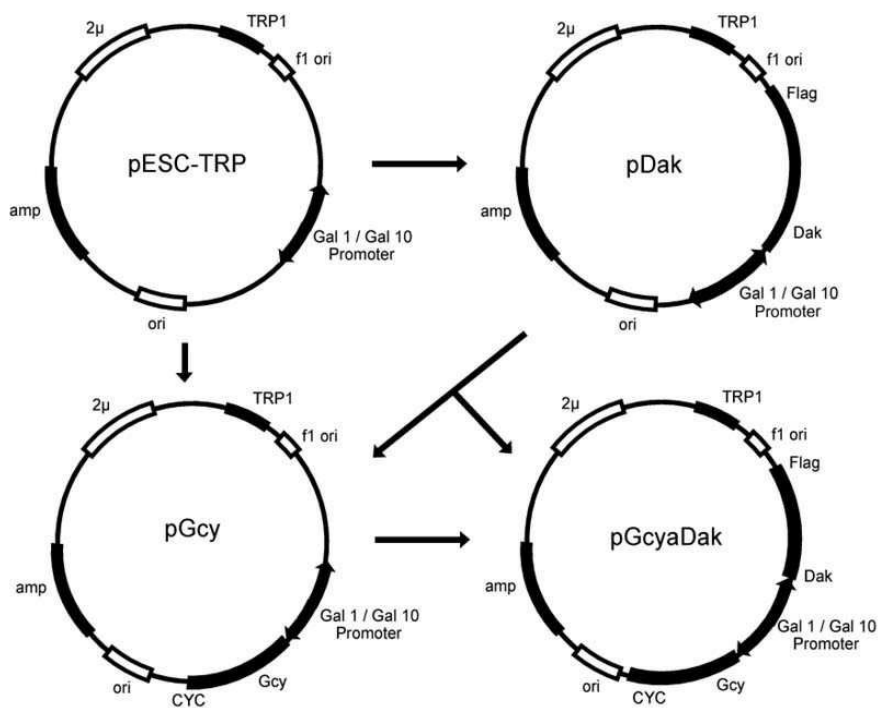
도면2



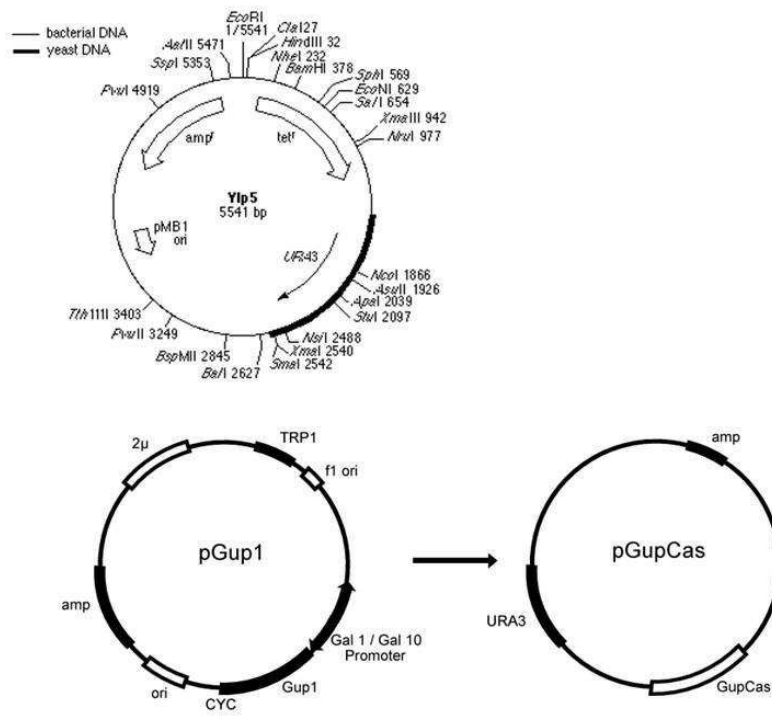
도면3a



도면3b

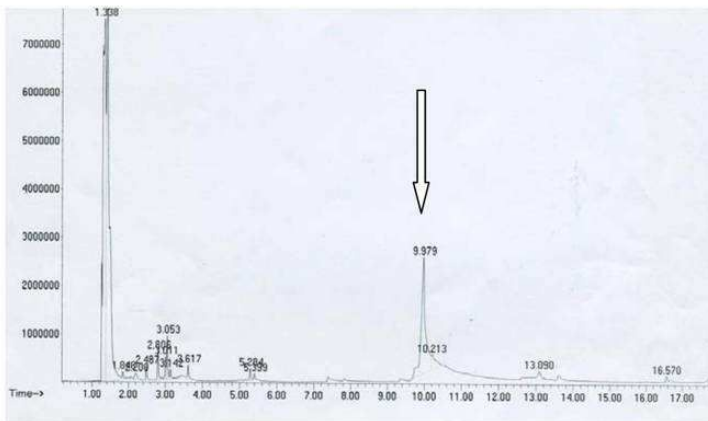


도면3c

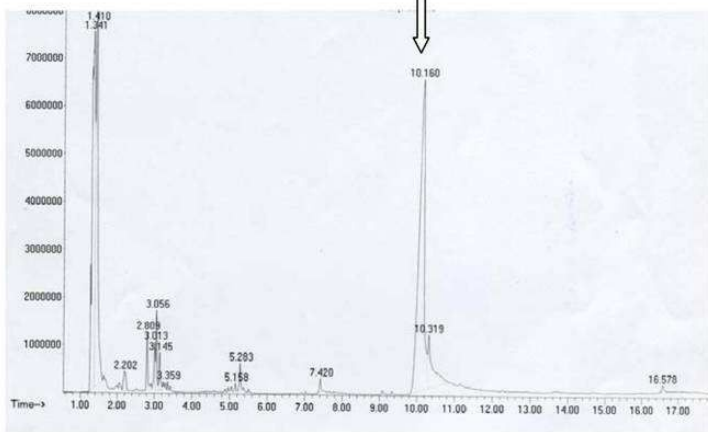


도면4

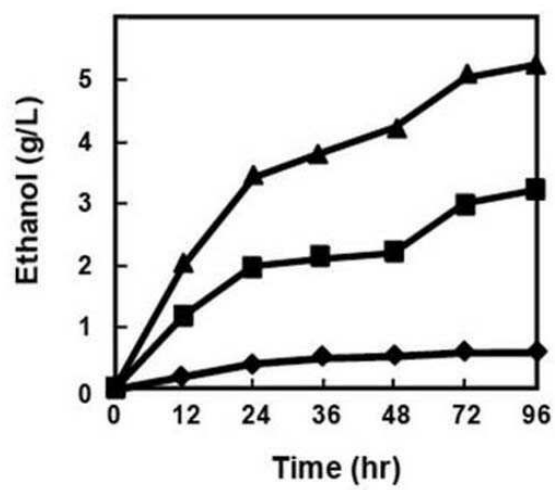
(a)



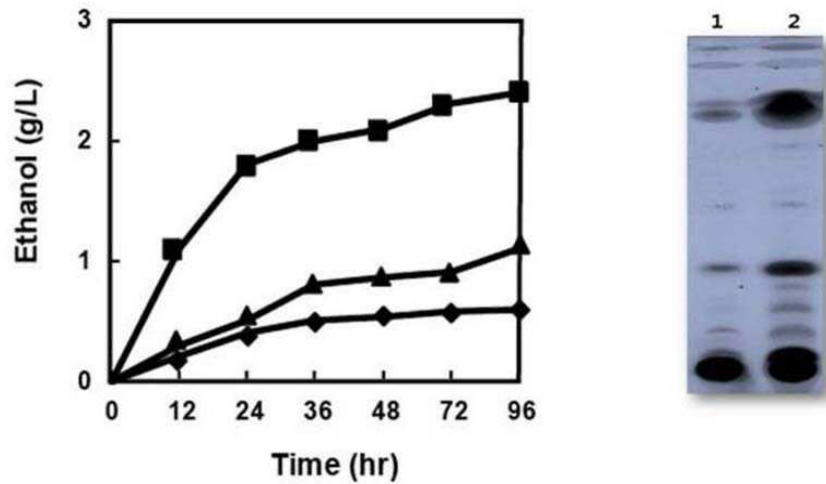
(b)



도면5a



도면5b



서열목록

- <110> Korea University Research and Business Foundation
- <120> Transformant comprising gene coding ws/dgat and producing method of fatty acid ethyl esters using the same
- <160> 19
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- <211> 458
- <212> PRT
- <213> Acinetobacter sp.
- <400> 1

Met Arg Pro Leu His Pro Ile Asp Phe Ile Phe Leu Ser Leu Glu Lys

1 5 10 15

Arg Gln Gln Pro Met His Val Gly Gly Leu Phe Leu Phe Gln Ile Pro

20 25 30

Asp Asn Ala Pro Asp Thr Phe Ile Gln Asp Leu Val Asn Asp Ile Arg

35 40 45

Ile Ser Lys Ser Ile Pro Val Pro Pro Phe Asn Asn Lys Leu Asn Gly

50 55 60

Leu Phe Trp Asp Glu Asp Glu Glu Phe Asp Leu Asp His His Phe Arg

65 70 75 80

His Ile Ala Leu Pro His Pro Gly Arg Ile Arg Glu Leu Leu Ile Tyr

85 90 95

Ile Ser Gln Glu His Ser Thr Leu Leu Asp Arg Ala Lys Pro Leu Trp

100 105 110
 Thr Cys Asn Ile Ile Glu Gly Ile Glu Gly Asn Arg Phe Ala Met Tyr
 115 120 125
 Phe Lys Ile His His Ala Met Val Asp Gly Val Ala Gly Met Arg Leu
 130 135 140
 Ile Glu Lys Ser Leu Ser His Asp Val Thr Glu Lys Ser Ile Val Pro
 145 150 155 160
 Pro Trp Cys Val Glu Gly Lys Arg Ala Lys Arg Leu Arg Glu Pro Lys
 165 170 175

Thr Gly Lys Ile Lys Lys Ile Met Ser Gly Ile Lys Ser Gln Leu Gln
 180 185 190
 Ala Thr Pro Thr Val Ile Gln Glu Leu Ser Gln Thr Val Phe Lys Asp
 195 200 205
 Ile Gly Arg Asn Pro Asp His Val Ser Ser Phe Gln Ala Pro Cys Ser
 210 215 220
 Ile Leu Asn Gln Arg Val Ser Ser Ser Arg Arg Phe Ala Ala Gln Ser
 225 230 235 240
 Phe Asp Leu Asp Arg Phe Arg Asn Ile Ala Lys Ser Leu Asn Val Thr

245 250 255
 Ile Asn Asp Val Val Leu Ala Val Cys Ser Gly Ala Leu Arg Ala Tyr
 260 265 270
 Leu Met Ser His Asn Ser Leu Pro Ser Lys Pro Leu Ile Ala Met Val
 275 280 285
 Pro Ala Ser Ile Arg Asn Asp Asp Ser Asp Val Ser Asn Arg Ile Thr
 290 295 300
 Met Ile Leu Ala Asn Leu Ala Thr His Lys Asp Asp Pro Leu Gln Arg
 305 310 315 320

Leu Glu Ile Ile Arg Arg Ser Val Gln Asn Ser Lys Gln Arg Phe Lys
 325 330 335
 Arg Met Thr Ser Asp Gln Ile Leu Asn Tyr Ser Ala Val Val Tyr Gly

340 345 350
 Pro Ala Gly Leu Asn Ile Ile Ser Gly Met Met Pro Lys Arg Gln Ala
 355 360 365
 Phe Asn Leu Val Ile Ser Asn Val Pro Gly Pro Arg Glu Pro Leu Tyr
 370 375 380
 Trp Asn Gly Ala Lys Leu Asp Ala Leu Tyr Pro Ala Ser Ile Val Leu

 385 390 395 400
 Asp Gly Gln Ala Leu Asn Ile Thr Met Thr Ser Tyr Leu Asp Lys Leu
 405 410 415
 Glu Val Gly Leu Ile Ala Cys Arg Asn Ala Leu Pro Arg Met Gln Asn
 420 425 430
 Leu Leu Thr His Leu Glu Glu Glu Ile Gln Leu Phe Glu Gly Val Ile
 435 440 445
 Ala Lys Gln Glu Asp Ile Lys Thr Ala Asn
 450 455

<210> 2

<211> 1377

<212> DNA

<213> Acinetobacter sp.

<400> 2

atgcgcccac tacatccgat tgattttata ttctgtcac tagaaaaaag acaacagcct	60
atgcattgtag gtggtttatt ttgtttcag attcctgata acgccccaga cacctttatt	120
caagatctgg tgaatgatat ccggatatca aaatcaatcc ctgttcacc attcaacaat	180
aaactgaatg ggcttttttg ggatgaagat gaagagtttg atttagatca tcattttcgt	240
catattgcac tgcctcatcc tggctgtatt cgtgaattgc ttatttatat ttcacaagag	300
cacagtacgc tgctagatcg ggcaaagccc ttgtggacct gcaatattat tgaaggaatt	360
gaaggcaatc gttttgcat gtacttcaaa attcaccatg cgatggtcga tggcgttgct	420
ggtatgcggt taattgaaaa atcactctcc catgatgtaa cagaaaaaag tatcgtgcc	480
ccttggtgtg ttgagggaaa acgtgcaaag cgcttaagag aacctaaaac aggtaaaatt	540
aagaaaatca tgtctggtat taagagtcag cttcaggcga caccacagt cattcaagag	600
ctttctcaga cagtatttaa agatattgga cgtaatcctg atcatgtttc aagctttcag	660
gcgccttggt ctattttgaa tcagcgtgtg agctcatcgc gacgttttgc agcacagtct	720

tttgacctag atcgttttcg taatatggcc aaatcgttga atgtgacct taatgatgtt 780

gtactagcgg tatgttctgg tgcattacgt gcgtatttga tgagtcataa tagtttgcct 840

tcaaaacct taattgcat ggttcagcc tctattcgca atgacgattc agatgcagc 900

aaccgtatta cgatgattct ggcaaatttg gcaaccaca aagatgatcc ttacaacgt 960

cttgaaatta tccgccgtag tgttcaaac tcaaagcaac gcttcaaag tatgaccagc 1020

gatcagattc taaattatag tgctgtcgta tatggccctg caggactcaa cataatttct 1080

ggcatgatgc caaaacgcca agccttcaat ctggttattt ccaatgtgcc tggccaaga 1140

gagccacttt actggaatgg tgccaaactt gatgcactct acccagcttc aattgtatta 1200

gacggtaag cattgaatat tacaatgacc agttatttag ataaacttga agttggtttg 1260

attgcatgcc gtaatgcatt gccagaatg cagaatttac tgacacattt agaagaagaa 1320

attcaactat ttgaaggcgt aattgcaaag caggaagata ttaaacagc caattaa 1377

<210> 3

<211> 312

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> glycerol dehydrogenase

<400> 3

Met Pro Ala Thr Leu His Asp Ser Thr Lys Ile Leu Ser Leu Asn Thr

1333 1337 1342 1347

Gly Ala Gln Ile Pro Gln Ile Gly Leu Gly Thr Trp Gln Ser Lys Glu

1352 1357 1362

Asn Asp Ala Tyr Lys Ala Val Leu Thr Ala Leu Lys Asp Gly Tyr Arg

1367 1372 1377

His Ile Asp Thr Ala Ala Ile Tyr Arg Asn Glu Asp Gln Val Gly Gln

1382 1387 1392

Ala Ile Lys Asp Ser Gly Val Pro Arg Glu Glu Ile Phe Val Thr Thr

1397 1402 1407 1412

Lys Leu Trp Cys Thr Gln His His Glu Pro Glu Val Ala Leu Asp Gln

1417 1422 1427

Ser Leu Lys Arg Leu Gly Leu Asp Tyr Val Asp Leu Tyr Leu Met His

1432 1437 1442

Trp Pro Ala Arg Leu Asp Pro Ala Tyr Ile Lys Asn Glu Asp Ile Leu
1447 1452 1457

Ser Val Pro Thr Lys Lys Asp Gly Ser Arg Ala Val Asp Ile Thr Asn
1462 1467 1472

Trp Asn Phe Ile Lys Thr Trp Glu Leu Met Gln Glu Leu Pro Lys Thr
1477 1482 1487 1492

Gly Lys Thr Lys Ala Val Gly Val Ser Asn Phe Ser Ile Asn Asn Leu
1497 1502 1507

Lys Asp Leu Leu Ala Ser Gln Gly Asn Lys Leu Thr Pro Ala Ala Asn
1512 1517 1522

Gln Val Glu Ile His Pro Leu Leu Pro Gln Asp Glu Leu Ile Asn Phe
1527 1532 1537

Cys Lys Ser Lys Gly Ile Val Val Glu Ala Tyr Ser Pro Leu Gly Ser
1542 1547 1552

Thr Asp Ala Pro Leu Leu Lys Glu Pro Val Ile Leu Glu Ile Ala Lys
1557 1562 1567 1572

Lys Asn Asn Val Gln Pro Gly His Val Val Ile Ser Trp His Val Gln
1577 1582 1587

Arg Gly Tyr Val Val Leu Pro Lys Ser Val Asn Pro Asp Arg Ile Lys
1592 1597 1602

Thr Asn Arg Lys Ile Phe Thr Leu Ser Thr Glu Asp Phe Glu Ala Ile
1607 1612 1617

Asn Asn Ile Ser Lys Glu Lys Gly Glu Lys Arg Val Val His Pro Asn
1622 1627 1632

Trp Ser Pro Phe Glu Val Phe Lys

1637 1642

<210> 4

<211> 939

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> glycerol dehydrogenase gene

<400> 4

atgcctgcta ctttacatga ttctacgaaa atcctttctc taaatactgg agcccaaadc 60
 cctcaaatag gtttaggtac gtggcagtcg aaagagaacg atgcttataa ggctgtttta 120
 accgctttga aagatggcta ccgacacatt gatactgctg ctatttacgg taatgaagac 180
 caagtcggtc aagccatcaa ggattcaggt gtccctcggg aagaaatctt tgttactaca 240
 aagttatggt gtacacaaca ccacgaacct gaagtagcgc tggatcaatc actaaagagg 300

ttaggattgg actacgtaga cttatatttg atgcattggc ctgccagatt agatccagcc 360
 tacatcaaaa atgaagacat cttgagtgtg ccaacaaaga aggatggttc tcgtgcagtg 420
 gatataacca attggaattt catcaaaacc tgggaattaa tgcaggaact accaaagact 480
 ggtaaaacta aggccgttgg agtctccaac ttttctataa ataactgaa agatctatta 540
 gcatctcaag gtaataagct tacgccagct gctaaccaag tcgaaataca tccattacta 600
 cctcaagacg aattgattaa tttttgtaaa agtaaggca ttgtggttga agcttattct 660
 ccgttaggta gtaccgatgc tccactattg aaggaaccgg ttatccttga aattgcgaag 720

aaaaataacg ttcaaccggg acacgttggt attagctggc acgtccaaag aggttatgtt 780
 gtcttgccaa aatctgtgaa tcccgatcga atcaaacga acaggaaaat atttactttg 840
 tctactgagg actttgaagc tatcaataac atatcgaagg aaaagggcga aaaaagggtt 900
 gtacatccaa attggtctcc tttcgaagta ttcaagtaa 939

<210> 5

<211> 584

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> dihydroxyacetone kinase

<400> 5

Met Ser Ala Lys Ser Phe Glu Val Thr Asp Pro Val Asn Ser Ser Leu

1555 1559 1564 1569

Lys Gly Phe Ala Leu Ala Asn Pro Ser Ile Thr Leu Val Pro Glu Glu

1574 1579 1584

Lys Ile Leu Phe Arg Lys Thr Asp Ser Asp Lys Ile Ala Leu Ile Ser

1589 1594 1599

Gly Gly Gly Ser Gly His Glu Pro Thr His Ala Gly Phe Ile Gly Lys

1604 1609 1614

Gly Met Leu Ser Gly Ala Val Val Gly Glu Ile Phe Ala Ser Pro Ser

1619 1624 1629 1634

Thr Lys Gln Ile Leu Asn Ala Ile Arg Leu Val Asn Glu Asn Ala Ser

1639 1644 1649

Gly Val Leu Leu Ile Val Lys Asn Tyr Thr Gly Asp Val Leu His Phe

1654 1659 1664

Gly Leu Ser Ala Glu Arg Ala Arg Ala Leu Gly Ile Asn Cys Arg Val

1669 1674 1679

Ala Val Ile Gly Asp Asp Val Ala Val Gly Arg Glu Lys Gly Gly Met

1684 1689 1694

Val Gly Arg Arg Ala Leu Ala Gly Thr Val Leu Val His Lys Ile Val

1699 1704 1709 1714

Gly Ala Phe Ala Glu Glu Tyr Ser Ser Lys Tyr Gly Leu Asp Gly Thr

1719 1724 1729

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

1734 1739 1744

Ser Leu Asp His Cys Lys Val Pro Gly Arg Lys Phe Glu Ser Glu Leu

1749 1754 1759

Asn Glu Lys Gln Met Glu Leu Gly Met Gly Ile His Asn Glu Pro Gly

1764 1769 1774

Val Lys Val Leu Asp Pro Ile Pro Ser Thr Glu Asp Leu Ile Ser Lys

1779 1784 1789 1794

Tyr Met Leu Pro Lys Leu Leu Asp Pro Asn Asp Lys Asp Arg Ala Phe

1799 1804 1809

Val Lys Phe Asp Glu Asp Asp Glu Val Val Leu Leu Val Asn Asn Leu

1814 1819 1824

Gly Gly Val Ser Asn Phe Val Ile Ser Ser Ile Thr Ser Lys Thr Thr

1829 1834 1839

Asp Phe Leu Lys Glu Asn Tyr Asn Ile Thr Pro Val Gln Thr Ile Ala

1844 1849 1854

Gly Thr Leu Met Thr Ser Phe Asn Gly Asn Gly Phe Ser Ile Thr Leu

1859 1864 1869 1874

Leu Asn Ala Thr Lys Ala Thr Lys Ala Leu Gln Ser Asp Phe Glu Glu

1879	1884	1889	
Ile Lys Ser Val Leu Asp Leu Leu Asn Ala Phe Thr Asn Ala Pro Gly			
1894	1899	1904	
Trp Pro Ile Ala Asp Phe Glu Lys Thr Ser Ala Pro Ser Val Asn Asp			
1909	1914	1919	
Asp Leu Leu His Asn Glu Val Thr Ala Lys Ala Val Gly Thr Tyr Asp			
1924	1929	1934	
Phe Asp Lys Phe Ala Glu Trp Met Lys Ser Gly Ala Glu Gln Val Ile			
1939	1944	1949	1954
Lys Ser Glu Pro His Ile Thr Glu Leu Asp Asn Gln Val Gly Asp Gly			
1959	1964	1969	
Asp Cys Gly Tyr Thr Leu Val Ala Gly Val Lys Gly Ile Thr Glu Asn			
1974	1979	1984	
Leu Asp Lys Leu Ser Lys Asp Ser Leu Ser Gln Ala Val Ala Gln Ile			
1989	1994	1999	
Ser Asp Phe Ile Glu Gly Ser Met Gly Gly Thr Ser Gly Gly Leu Tyr			
2004	2009	2014	
Ser Ile Leu Leu Ser Gly Phe Ser His Gly Leu Ile Gln Val Cys Lys			
2019	2024	2029	2034
Ser Lys Asp Glu Pro Val Thr Lys Glu Ile Val Ala Lys Ser Leu Gly			
2039	2044	2049	
Ile Ala Leu Asp Thr Leu Tyr Lys Tyr Thr Lys Ala Arg Lys Gly Ser			
2054	2059	2064	
Ser Thr Met Ile Asp Ala Leu Glu Pro Phe Val Lys Glu Phe Thr Ala			
2069	2074	2079	
Ser Lys Asp Phe Asn Lys Ala Val Lys Ala Ala Glu Glu Gly Ala Lys			
2084	2089	2094	
Ser Thr Ala Thr Phe Glu Ala Lys Phe Gly Arg Ala Ser Tyr Val Gly			
2099	2104	2109	2114
Asp Ser Ser Gln Val Glu Asp Pro Gly Ala Val Gly Leu Cys Glu Phe			
2119	2124	2129	
Leu Lys Gly Val Gln Ser Ala Leu			

2134

<210> 6

<211

> 1755

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> dihydroxyacetone kinase gene

<400> 6

atgtccgcta aatcgtttga agtcacagat ccagtcaatt caagtctcaa agggtttgcc	60
cttgctaacc cctccattac gctggtcctt gaagaaaaaa ttctcttcag aaagaccgat	120
tccgacaaga tcgcattaat ttctgggtgt gtagtggac atgaacctac acacgccgtt	180
ttcattggta agggatatgtt gaggggcgcc gtggttggcg aaatttttgc atccccctca	240
acaaaacaga ttttaaatgc aatccgttta gtcaatgaaa atgcgtctgg cgtttttattg	300
attgtgaaga actacacagg tgatgttttg cattttggtc tgtccgctga gagagcaaga	360
gccttgggta ttaactgccg cgttgctgtc ataggtgatg atgttgcagt tggcagagaa	420
aagggtggta tggttggtag aagagcattg gcaggtagcg ttttggttca taagattgta	480
ggtgccttcg cagaagaata ttctagtaag tatggcttag acggtacagc taaagtggct	540
aaaattatca acgacaattt ggtgaccatt ggatcttctt tagaccattg taaagttcct	600
ggcaggaaat tcgaaagtga attaaacgaa aaacaaatgg aattgggtat ggggtattcat	660
aacgaacctg gtgtgaaagt ttagaccctt attccttcta ccgaagactt gatctccaag	720
tatatgctac caaaactatt ggatccaaac gataaggata gagcttttgt aaagtttgat	780
gaagatgatg aagttgtctt gttagttaac aatctcggcg gtgtttctaa ttttgttatt	840
agttctatca cttccaaaac tacggatttc ttaaaggaaa attacaacat aaccccggtt	900
caaacaattg ctggcacatt gatgacctcc ttcaatggta atgggttcag taccacatta	960
ctaaacgcca ctaaggctac aaaggctttg caatctgatt ttgaggagat caaatcagta	1020
ctagacttgt tgaacgcatt tacgaacgca ccgggctggc caattgcaga ttttgaaaag	1080
acttctgccc catctgttaa cgatgacttg ttacataatg aagtaacagc aaaggccgtc	1140
ggtagctatg actttgacaa gtttctgtag tggatgaaga gtggtgctga acaagttatc	1200
aagagcgaac cgcacattac ggaactagac aatcaagttg gtgatggtag ttgtggttac	1260
actttagtgg caggagttaa aggcattacc gaaaaccttg acaagctgtc gaaggactca	1320
ttatctcagg cggttgccca aatttcagat ttcatgaag gctcaatggg aggtacttct	1380
ggtggtttat attctattct tttgtcgggt ttttcacacg gattaattca ggtttgtaaa	1440

tcaaaggatg aaccgcgtcac taaggaaatt gtggctaagt cactcggaat tgcattggat 1500
 attttataca aatatacaaa ggcaaggaag ggatcatcca ccatgattga tgcttttagaa 1560
 ccattcggtta aagaatttac tgcattctaag gatttcaata aggcggtaaa agctgcagag 1620

gaagggtgcta aatccactgc tacattcgag gccaaatttg gcagagcttc gtagtgcggc 1680
 gattcatctc aagtagaaga tcttggtgca gtaggcctat gtgagttttt gaaggggggtt 1740
 caaagcgccct tgtaa 1755

<210> 7
 <211> 560
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> glycerol uptake protein
 <400> 7

Met Ser Leu Ile Ser Ile Leu Ser Pro Leu Ile Thr Ser Glu Gly Leu
 1777 1781 1786 1791
 Asp Ser Arg Ile Lys Pro Ser Pro Lys Lys Asp Ala Ser Thr Thr Thr

1796 1801 1806
 Lys Pro Ser Leu Trp Lys Thr Thr Glu Phe Lys Phe Tyr Tyr Ile Ala
 1811 1816 1821
 Phe Leu Val Val Val Pro Leu Met Phe Tyr Ala Gly Leu Gln Ala Ser
 1826 1831 1836
 Ser Pro Glu Asn Pro Asn Tyr Ala Arg Tyr Glu Arg Leu Leu Ser Gln
 1841 1846 1851 1856
 Gly Trp Leu Phe Gly Arg Lys Val Asp Asn Ser Asp Ser Gln Tyr Arg
 1861 1866 1871

Phe Phe Arg Asp Asn Phe Ala Leu Leu Ser Val Leu Met Leu Val His
 1876 1881 1886
 Thr Ser Ile Lys Arg Ile Val Leu Tyr Ser Thr Asn Ile Thr Lys Leu
 1891 1896 1901
 Arg Phe Asp Leu Ile Phe Gly Leu Ile Phe Leu Val Ala Ala His Gly
 1906 1911 1916
 Val Asn Ser Ile Arg Ile Leu Ala His Met Leu Ile Leu Tyr Ala Ile
 1921 1926 1931 1936

Ala His Val Leu Lys Asn Phe Arg Arg Ile Ala Thr Ile Ser Ile Trp

1941 1946 1951

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

1956 1961 1966

Pro Phe Gly Asn Ile Cys Ser Phe Leu Ser Pro Leu Asp His Trp Tyr

1971 1976 1981

Arg Gly Ile Ile Pro Arg Trp Asp Val Phe Phe Asn Phe Thr Leu Leu

1986 1991 1996

Arg Val Leu Ser Tyr Asn Leu Asp Phe Leu Glu Arg Trp Glu Asn Leu

2001 2006 2011 2016

Gln Lys Lys Lys Ser Pro Ser Tyr Glu Ser Lys Glu Ala Lys Ser Ala

2021 2026 2031

Ile Leu Leu Asn Glu Arg Ala Arg Leu Thr Ala Ala His Pro Ile Gln

2036 2041 2046

Asp Tyr Ser Leu Met Asn Tyr Ile Ala Tyr Val Thr Tyr Thr Pro Leu

2051 2056 2061

Phe Ile Ala Gly Pro Ile Ile Thr Phe Asn Asp Tyr Val Tyr Gln Ser

2066 2071 2076

Lys His Thr Leu Pro Ser Ile Asn Phe Lys Phe Ile Phe Tyr Tyr Ala

2081 2086 2091 2096

Val Arg Phe Val Ile Ala Leu Leu Ser Met Glu Phe Ile Leu His Phe

2101 2106 2111

Leu His Val Val Ala Ile Ser Lys Thr Lys Ala Trp Glu Asn Asp Thr

2116 2121 2126

Pro Phe Gln Ile Ser Met Ile Gly Leu Phe Asn Leu Asn Ile Ile Trp

2131 2136 2141

Leu Lys Leu Leu Ile Pro Trp Arg Leu Phe Arg Leu Trp Ala Leu Leu

2146 2151 2156

Asp Gly Ile Asp Thr Pro Glu Asn Met Ile Arg Cys Val Asp Asn Asn

2161 2166 2171 2176

Tyr Ser Ser Leu Ala Phe Trp Arg Ala Trp His Arg Ser Tyr Asn Lys

2181 2186 2191
 Trp Val Val Arg Tyr Ile Tyr Ile Pro Leu Gly Gly Ser Lys Asn Arg
 2196 2201 2206
 Val Leu Thr Ser Leu Ala Val Phe Ser Phe Val Ala Ile Trp His Asp
 2211 2216 2221
 Ile Glu Leu Lys Leu Leu Leu Trp Gly Trp Leu Ile Val Leu Phe Leu

2226 2231 2236
 Leu Pro Glu Ile Phe Ala Thr Gln Ile Phe Ser His Tyr Thr Asp Ala
 2241 2246 2251 2256
 Val Trp Tyr Arg His Val Cys Ala Val Gly Ala Val Phe Asn Ile Trp
 2261 2266 2271
 Val Met Met Ile Ala Asn Leu Phe Gly Phe Cys Leu Gly Ser Asp Gly
 2276 2281 2286
 Thr Lys Lys Leu Leu Ser Asp Met Phe Cys Thr Val Ser Gly Phe Lys
 2291 2296 2301

Phe Val Ile Leu Ala Ser Val Ser Leu Phe Ile Ala Val Gln Ile Met
 2306 2311 2316
 Phe Glu Ile Arg Glu Glu Glu Lys Arg His Gly Ile Tyr Leu Lys Cys
 2321 2326 2331 2336

<210> 8

<211> 1683

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> glycerol uptake protein gene

<400> 8

atgtcgctga tcagcatcct gtctccccta attacttcg agggcttaga ttcaagaatc 60

aaaccttcac caaaaaagga tgcctctact accactaagc catcactatg gaaaactact 120

gagttcaaat tctactacat tgcatttcig gtcgtggttc cttgatgtt ctatgctggg 180

ttacaagcta gttcgccga aaatccaaac tatgcaagat acgaacgtct cctatctcaa 240

ggttggttat ttggcagaaa agtagacaat agtgattctc aatatagggt tttcaggac 300

aattttgcgc tattgtcagt tttaatgcta gtccacactt ctataaaacg cattgtactt 360

tattcaacaa atactactaa attgaggttt gatctgatat ttggtttgat ctttttagtg 420

gccgctcatg gtgtcaattc gataagaatt ttagcccata tgctaatttt atatgccatc	480
gccccatgtac taaagaactt tagaagaata gccacatca gcatttggat ttatggtatt	540
tctacgcttt ttattaacga caacttcaga gcatatccat ttggtaatat ttgctctttt	600
ttaagcccat tggaccattg gtatagaggt atcattccaa gatgggatgt ctttttcaat	660
tttactcttt tgagagtctt aagttacaac ttggacttct tagagaggtg ggagaattta	720
caaaagaaga aaagtccatc ctatgaatca aaagaagcta aatcagccat ttgtctcaat	780
gaacgtgcta gattaactgc tgcacacccc atacaggact acagcttaat gaattatatt	840
gcatatgtta cttacacgcc acttttcatt gccggcccca ttataacatt caatgattat	900
gtttaccaat cgaacatac cttgccatca ataaatttca aattcathtt ttactatgcg	960
gtgagattcg ttattgctct cttatctatg gagttcattt tacactttct ccacgttgtg	1020
gcaatctcaa aaaccaaagc gtgggaaaat gacacacctt tccagatttc catgattggc	1080
ttatttaatt tgaatattat ttggctaaaa ctactgattc cgtggaggct gtttaggctg	1140
tgggctttgc tagacggaat cgatacacct gaaaatatga tcagggtgtg tgataacaat	1200
tacagttcac tagcattctg gagagcttgg catagaagct acaataagtg ggttgtccgt	1260
tacatatata ttctctagg tggttcaaaa aatagagttt tgacatcact agcagttctt	1320
tccttcgtag ctatatggca tgacatcgaa ctaaagtat tattatgggg ttggctaata	1380
gttttgttcc tcttaccaga aatttttgct acccaaattt tctctcatta taccgacgca	1440
gtctgttaca gacacgtttg cgctgtcggg gctgttttca acatatgggt tatgatgatc	1500
gctaattctt ttggattctg cttgggctct gacggtacta aaaaattact aagcgatatg	1560
ttctgtaccg tatctggttt caaatttgta attttgcaa gcgttagttt attcatcgca	1620
gtacaaataa tgtttgaaat cagagaagaa gaaaagaggc acggaattta cctaaatgc	1680
tga	1683
<210> 9	
<211> 44	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> forward primer	
<400> 9	
actagtcctc cgccaccaa ggagatgcgc ccattacatc cgat	44
<210> 10	
<211> 30	

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer
 <400> 10
 actagtttaa ttggctgttt taatatcttc 30
 <210> 11
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> sense primer
 <400> 11
 ggatccatgt cagcatttta ggtaaattcc gtg 33
 <210> 12
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> antisense primer
 <400> 12
 ggatccataa tgcgctgat cagcatcctg tct 33
 <210> 13
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> BamH
 <400> 13
 ggatccatgc ctgctacttt acatgattct 30
 <210> 14
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Spe
 <400> 14
 actagtatgt ccgctaaatc gtttgaagtc 30

<210> 15

<211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Cla
 <400> 15
 atcgatatac aaggcgcttt gaacccccctt 30
 <210> 16
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> EcoR
 <400> 16
 gaattcatgt cgctgatcag catcctg 27
 <210> 17
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Spe
 <400> 17
 actagtcag cattttaggt aaattccgtg 30
 <210> 18
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> sense primer
 <400> 18
 ggatccatgt cagcatttta ggtaaattcc gtg 33
 <210> 19
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> anti-sense primer
 <400> 19
 ggatccataa tgtcgctgat cagcatcctg tct 33