(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0163230
(43) 공개일자 2023년11월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/78 (2006.01) *C12N 1/20* (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01) *C12R 1/40* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/78 (2013.01)
C12N 1/20 (2021.05)
(21) 출원번호 10-2022-0063103
(22) 출원일자 2022년05월23일
심사청구일자 2022년05월23일

(71) 출원인
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(72) 발명자
이성국
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
티와리라메쉬와르
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(74) 대리인
제일특허법인(유)

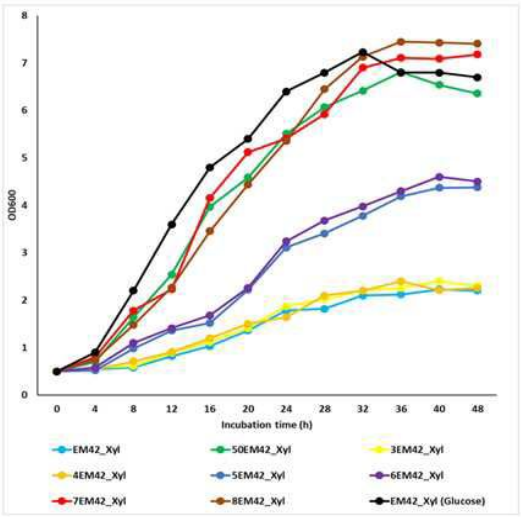
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **포도당 및 자일로스를 동시에 탄소원으로 이용할 수 있는 슈도모나스 균주 변이체**

(57) 요 약

본 발명은 포도당 및 자일로스 모두를 탄소원으로 이용할 수 있는 슈도모나스 균주 변이체에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명의 슈도모나스 균주 변이체를 이용함으로써, 포도당이 고갈되지 않은 상황에서도 포도당과 자일로스 모두를 탄소원으로 이용할 수 있다. 따라서, 본 발명의 슈도모나스 균주 변이체는 미생물을 이용한 생화학 내지 생물학적 물질 생산에 유용하게 활용할 수 있다.

대 표 도 - 도4



(52) CPC특허분류
C12N 15/52 (2013.01)
C12R 2001/40 (2021.05)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711135212
과제번호 2020R1A4A1018332
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 집단연구지원(R&D)
연구과제명 합성곱 신경망 기반 바이오 에너지 생산 기초 연구
기 여 율 1/2
과제수행기관명 울산과학기술원
연구기간 2021.06.01 ~ 2022.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711146191
과제번호 2018H1D3A1A01074745
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 인재활용확산지원(R&D)
연구과제명 새로운 플랫폼 대장균 균주 개발을 통한 cellodextrin 기반 3-hydroxypropionate 생산
기 여 율 1/2
과제수행기관명 울산과학기술원
연구기간 2021.01.01 ~ 2021.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

자일로스 유도성 XutR/P_{xutA} 발현 시스템에 의해 *XylXABCD* 오페론을 발현하며,

PP_RS11505 및 PP_RS17605 중 적어도 하나의 유전자가 결실되거나 또는 돌연변이된, 포도당 및 자일로스를 동시에 탄소원으로 이용할 수 있는 슈도모나스 균주 변이체.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 XutR 전사인자는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것인, 슈도모나스 균주 변이체.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 아미노산 서열은 서열번호 2로 표시되는 염기서열로 코딩되는 것인, 슈도모나스 균주 변이체.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 P_{xutA} 프로모터는 서열번호 3으로 표시되는 염기서열을 포함하는 것인, 슈도모나스 균주 변이체.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 *XylXABCD* 오페론은 서열번호 4로 표시되는 염기서열을 포함하는 것인, 슈도모나스 균주 변이체.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 PP_RS11505 유전자 돌연변이는 *P. putida* KT2440의 게놈 내에 유전자 위치 2,530,900에 존재하는 PP_RS11505 유전자 내에 염기서열 GGCAAC 반복이 8회에서 5회로 감소하는 것인, 슈도모나스 균주 변이체.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 PP_RS17605 유전자 돌연변이는 *P. putida* KT2440의 게놈 내에 유전자 위치 3,825,092에 존재하는 PP_RS17605 유전자 내에 염기서열 GGCTGCGCCG 반복이 1회에서 2회로 증가하는 것인, 슈도모나스 균주 변이체.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 PP_RS11505 및 PP_RS17605 유전자가 모두 결실되거나 모두 돌연변이된 것인, 슈도모나스 균주 변이체.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 슈도모나스 균주는 *Pseudomonas putida* EM42인 것인, 슈도모나스 균주 변이체.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 포도당 및 자일로스를 동시에 탄소원으로 이용할 수 있는 슈도모나스 균주 변이체에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 형질전환 균주(플랫폼 미생물)을 이용하여 목질계 바이오매스를 화학물질로 전환하는 것은 석유 의존도와 인위적인 온실 가스 배출을 줄임으로써 바이오리파이너리의 지속 가능성을 보장하기 위한 방법으로 큰 관심을 받고 있으며, 상기 형질전환 균주를 이용하여 표적하는 혼합 또는 비천연 탄소원을 고수율 생산하는 것은 해당 분야에 있어 매우 중요한 과제이다.

[0003] 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*) 균주는 신진대사의 다양성과 폭넓은 적용 가능성을 가지고 있으며 GRAS(Generally Regarded as Safe) 미생물로서 차세대 합성 생물학 숙주 또는 산업적 대량 생산 균주로 부상하고 있다(Nikel *et al.*, Metabolic Engineering, 50, 142-155, 2018).

[0004] 특히, EM42 균주로 불리는 *P. putida* KT2440의 게놈 감소 유도체는 방향족, 유기산 및 포도당을 이화할 수 있으며, 산업용 용매 및 산화 스트레스에 대한 내성을 가지고 있으므로, 표적 화학물질을 생산하는 대규모 산업에 필요한 모든 측면을 충족한다. 다만, 기존 *P. putida* EM42는 목질계 바이오매스의 가수분해 산물 내에 존재하는 자일로스를 소비하는 능력이 부족하여 바이오매스 유래 주요 탄소원을 처리할 수 없다는 문제가 있다.

[0005] 한편, 목질계 가수분해산물로부터 얻어지는 주된 당은 포도당과 자일로스이지만 가수분해산물 내에 선호되는 당류(예를 들어, 포도당)가 존재하는 경우 그 외의 탄소원을 이용하는데 요구되는 효소의 생합성이 억제되는 현상인, 탄소원 이화물 억제(carbon catabolite repression, CCR)가 발생한다는 문제가 있다. 즉, 가수분해산물 내에 존재하는 자일로스는 포도당이 완전히 고갈될 때까지 대사될 수 없는 것으로 이해되고 있다.

[0006] 따라서, 포도당과 자일로스를 동시에 이용할 수 있는 형진전환 균주 내지 변이체를 제조하는 것은 화학물질 또는 생물연료의 대규모 생산에 있어 해결해야 할 과제로 간주 될 수 있으며 이를 해결하기 위한 지속적인 연구가 필요한 실정이다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) Nikel et al., Metabolic Engineering, 50, 142-155, 2018

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 이에 본 발명자들은 포도당과 자일로스를 동시에 이용할 수 있는 슈도모나스 균주에 대해 연구한 결과, 자일로스를 유도제로 하는 프로모터 시스템하에서 특정 오페론을 발현하고, 특정 유전자가 결실 또는 돌연변이된 슈도모나스 균주 변이체를 제조하여, 상기 슈도모나스 균주 변이체가 포도당과 자일로스 모두를 탄소원으로 이용하는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 측면은, XutR/P_{xutA} 전사인자/프로모터에 의해 *XylXABCD* 오페론을 발현하며, PP_RS11505, PP_RS17605 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 유전자가 결실되거나 또는 돌연변이된, 포도당 및 자일로스를 동시에 탄소원으로 이용할 수 있는 슈도모나스 균주 변이체를 제공하는 것이다.

발명의 효과

[0010] 본 발명의 슈도모나스 균주 변이체는 포도당이 고갈되지 않은 상황에서도 포도당과 자일로스 모두를 탄소원으로 이용할 수 있으므로, 미생물을 이용한 생화학 내지 생물학적 물질 생산에 유용하게 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 XutR 전사인자의 영향을 받는 자일로스 유도성 발현 시스템(XutR/P_{xutA})의 개략도이다.

도 2는 형질전환체 EM42_*XutR*의 탄소원 농도별 유전자 발현 수준 확인한 것이다.

도 3은 자일로스 유도성 발현 시스템(XutR/P_{xutA}) 하에서 발현하는 웨임버그 경로를 코딩하는 *Xy1XABCD* 오페론을 이용한 대사 공학 전략의 전반적인 개략도이다.

도 4는 형질전환체 또는 변이체 EM42_*Xy1*, 50EM42_*Xy1*, 3EM42_*Xy1*, 4EM42_*Xy1*, 5EM42_*Xy1*, 6EM42_*Xy1*, 7EM42_*Xy1* 및 8EM42_*Xy1*을 각각 자일로스를 포함하는 배지에서 배양하여, 배양 직후부터 배양 후 48시간까지의 각 형질전환체/변이체의 성장을 비교한 것이다.

도 5는 형질전환체 또는 변이체 EM42_*Xy1*, 50EM42_*Xy1* 및 7EM42_*Xy1*을 포도당 및 자일로스를 포함하는 배지에서 배양하여, 배양 직후부터 배양 후 48시간까지의 기질 잔류량을 비교한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명한다.

[0013] 본 발명의 일 측면은 자일로스 유도성 XutR/P_{xutA} 발현 시스템에 의해 *Xy1XABCD* 오페론을 발현하며, PP_RS11505 및 PP_RS17605 중 적어도 하나의 유전자가 결실되거나 또는 돌연변이된, 포도당 및 자일로스 모두를 탄소원으로 이용할 수 있는 슈도모나스 균주 변이체를 제공한다.

[0014] 상기 XutR 전사인자는 자일로스 이소머라제를 코딩하는 P_{xutA} 프로모터 서열과 결합함으로써 자일로스를 탄소원으로 하여 유도되는 유전자 발현 시스템을 형성할 수 있다. 본 발명의 하나의 태양에 따르면, 상기 XutR 전사인자는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있으며, 상기 아미노산 서열은 서열번호 2로 표시되는 염기서열로 코딩될 수 있다.

[0015] 상기 P_{xutA} 프로모터는 XutA의 상류의 프로모터 서열로서 XutR 전사인자와 결합하는 염기서열이며, XutR의 상류의 또 다른 프로모터 서열인 P_{xutR}과는 22 bp 만큼 떨어져있다. 또한, P_{xutA} 프로모터 서열은 P_{xutA}-I 및 P_{xutA}-II라는 2개의 절반 부위를 포함하고 있으며, 상기 2개의 절반 부위는 이량체인 XutR과 상호작용할 수 있다. 본 발명의 하나의 태양에 따르면, 상기 P_{xutA} 프로모터는 서열번호 3으로 표시되는 염기서열을 포함할 수 있다.

[0016] 한편, 탄소원으로서 자일로스가 존재하지 않는 경우 상기 두 절반 부위 중 P_{xutA}-II와 XutR의 결합은 매우 약해지며 이는 P_{xutA} 프로모터의 불활성화를 야기할 수 있다. 반면, 탄소원으로서 자일로스가 존재하는 경우 XutR-자일로스 복합체가 P_{xutA}-I 및 P_{xutA}-II에 단단히 결합하여 P_{xutA} 프로모터의 활성화를 야기할 수 있다(도 1).

[0017] 상기 *Xy1XABCD* 오페론은 *Caulobacter vibrioides* CB15의 웨임버그 자일로스 이화 경로를 코딩할 수 있으며, 자일로스 디하이드로게나제(*xy1B*), 자일로노락토나제(*xy1C*), 자일로네이트 디하이드라타제(*xy1D*), 2-디하이드로-3-데옥시-D-자일로네이트 디하이드라타제(*xy1X*), 2,5-다이옥소펜타노에이트 디하이드로게나제(*xy1A*)를 모두 포함할 수 있다. 본 발명의 하나의 태양에 따르면, 상기 *Xy1XABCD* 오페론은 서열번호 4로 표시되는 염기서열을 포함할 수 있다.

[0018] 본 발명의 용어 "전사인자"는 DNA의 특정 부위에 결합하여 유전자의 발현을 촉진하거나 억제하는 단백질을 의미한다. 특히, 전사인자는 DNA-결합 영역(DNA-binding domain, DBD)과 트랜스크립션 조절 영역(transcriptional regulation domain)을 갖는다.

[0019] 본 발명의 용어 "프로모터"는 유전자의 기본 전사 및/또는 조절 전사에 필요한, 일반적으로 코딩 서열 바로 상류의 DNA 서열을 의미한다. 특히, 프로모터는 전사의 개시를 가능하게 하는 정보를 가지며, 일반적으로 전사 개시 시작 부위 및 중합효소 복합체에 대한 결합 부위를 갖는다.

[0020] 본 발명의 용어 "오페론"은 기능적으로 연관성이 큰 일련의 단백질의 발현을 조절하는, 밀집된 유전자 발현 시스템을 의미한다. 특히, 오페론은 밀집된 여러 개의 유전자군, 활성자가 결합하는 프로모터, 유전자 발현을 함께 조절하는 부가적인 서열(작동자)을 모두 포함하며, 이들의 발현은 하나의 프로모터(promoter)에 의해 조절된다.

[0021] 본 발명에서 사용되는 염기서열은, 서열 목록에 기재된 서열과 실질적인 동일성을 나타내는 서열을 포함하는 것으로 이해된다. 여기서, "실질적인 동일성"은 본 발명의 서열과 임의의 다른 서열로서 70% 이상의 상동성, 구체적으로 80% 이상의 상동성, 보다 더 구체적으로 90% 이상의 상동성을 갖는 서열이며, 이들 상동성 범위에 있는 염기서열도 본 발명의 권리범위에 포함되는 것으로 해석된다.

[0022] 본 발명의 일 실시예에서는 EM42_*Xyl* 균주를 50회 연속 성장 주기 동안 배양하여 수득한 50EM42_*Xyl* 균주의 게놈을 분석하여 28개의 돌연변이를 확인하였으며, 50EM42_*Xyl* 및 EM42_*Xyl* 균주 모두에서 예측된 돌연변이 부분을 재-서열분석하여 주목할 만한 2개의 돌연변이로서 PP_RS11505$^{(GGCAAC)8\rightarrow5}$ 및 PP_RS17605$^{(GGCTGCGCCG)1\rightarrow2}$를 확인하였다.

[0023] 상기 PP_RS11505 유전자 돌연변이는 *P. putida* KT2440의 게놈 내에 유전자 위치 2,530,900에 존재하는 PP_RS11505 유전자 내에 염기서열 GGCAAC 반복이 8회에서 5회로 감소하는 것일 수 있다. 구체적으로, PP_RS11505유전자에서의 돌연변이는 코딩 서열 돌연변이였으며, 상기 돌연변이는 프레임 이동은 야기하지 않지만 적응 균주에서 뉴클레오티드 서열 GGCAAC 반복을 8회에서 5회로 감소시킨다.

[0024] 상기 PP_RS17605 유전자 돌연변이는 *P. putida* KT2440의 게놈 내에 유전자 위치 3,825,092에 존재하는 PP_RS17605 유전자 내에 염기서열 GGCTGCGCCG 반복이 1회에서 2회로 증가하는 것일 수 있다. 구체적으로, PP_RS17605 유전자는 *PtxS* 및 2-케토글루코네이트(2-ketogluconate)의 사용을 억제하는 인자를 코딩하는 유전자이며, PP_RS17605 유전자 내에 염기서열 GGCTGCGCCG가 2회 반복됨에 따라 코딩 서열에 프레임 이동을 야기시킬 수 있다.

[0025] 한편, PtxS 단백질은 전사 조절인자를 코딩하는 *ptxS*와 또 다른 오페론을 형성하는 *kguT*, *kguK* 및 *kguD*에 의해 코딩된 2-케토글루코네이트 분해 경로에 연관된 억제인자이다. 상기 PtxS는 효과기 분자로서 2-케토글루코네이트를 가지며, 이에 상응하는 유전자의 발현을 억제하는 서열인 -10 영역 부근에 위치한 회문 서열 5'-TGAAACCGGTTTCA-3'에 결합한다. 또한, PtxS는 *P. putida* KT2440 에서 그 자신의 발현뿐 아니라, 오페론 *gad*(gluconate dehydrogenase) 및 *kgu*의 발현을 함께 조절할 수 있으므로, 상기 돌연변이 PP_RS17605$^{(GGCTGCGCCG)1\rightarrow2}$는 당의 주변세포질의 산화 경로에 직접 연관될 수 있다.

[0026] 상기 형질전환 슈도모나스는 PP_RS11505 또는 PP_RS17605 유전자가 결실된 것일 수 있으며, PP_RS11505 및 PP_RS17605 유전자가 모두 결실된 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 PP_RS11505 및 PP_RS17605 유전자가 모두 결실된 것일 수 있다.

[0027] 또한, 상기 형질전환 슈도모나스는 PP_RS11505 또는 PP_RS17605 유전자가 돌연변이 된 것일 수 있으며, PP_RS11505 및 PP_RS17605 유전자가 모두 돌연변이 된 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 PP_RS11505 및 PP_RS17605 유전자가 모두 돌연변이된 것일 수 있다.

[0028] 상기 슈도모나스 균주 변이체는 자일로스 유도성 XutR/P_{xutA} 발현 시스템에 의해 발현하는 *Xyl1XABCD* 오페론을 포함하는 발현벡터, PP_RS11505 및/또는 PP_RS17605 유전자의 결실 또는 돌연변이를 포함하는 발현벡터로 형질전환시켜 제조할 수 있다.

[0029] 본 발명의 용어 "발현 벡터"는 숙주세포에서 목적으로 하는 외래 유전자를 발현할 수 있는 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동 가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 벡터를 의미한다.

[0030] 상기 발현 벡터는 형질전환체에 의해서 발현되는 유전자 및 조절 서열로 구성되는 DNA 벡터로서, 오픈 리딩 프레임, 폴리아데닐화 부위를 포함하는 3' 비번역 영역을 추가로 포함할 수 있다. 또한, 공지의 방법에 의하여 인위적으로 디자인된 재조합 발현 벡터일 수 있다.

[0031] 상기 발현 벡터는 공지된 다양한 벡터를 사용하여 제조할 수 있으며, 예를 들어, 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파아지 벡터 또는 바이러스 벡터 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는, 상기 발현 벡터로 플라스미드 벡터를 사용하였으며, 구체적으로, pPROBE-*eGFP+* 및 pQSAK를 사용하였다.

[0032] 본 발명의 용어 "형질전환체"는 외래의 유전물질을 포함하여 유전형질이 변화된 미생물과 같은 생물체를 의미한다. 본 발명에 따른 형질전환체는 유전자 조작이 용이하며 다양한 발현 시스템에 적용될 수 있으며, 대량 배양에 이용될 수 있다.

[0033] 상기 발현 벡터는 형질전환 방법을 통해 미생물, 균주 내로 도입시킬 수 있다. 본 발명에서는 상기 발현 벡터를

형질전환 방법을 통해 슈도모나스 균주에 도입시켰으며, 구체적으로, 상기 슈도모나스 균주는 *Pseudomonas putida* EM42일 수 있다. 상기 *Pseudomonas putida* EM42는 Microb Cell Fact. 2014; 13: 159에 개시된 균주일 수 있다.

[0034] 상기 형질전환시키는 방법으로는, 당해 분야에서 공지된 방법을 이용할 수 있으며, 예를 들면, 일시적 형질감염(transient transfection), 미세주사, 형질도입(transduction), 세포융합, 칼슘 포스페이트 침전법, 리포좀 매개된 형질감염(liposome-mediated transfection), DEAE 덱스트란-매개된 형질감염(DEAE Dextran-mediated transfection), 폴리브렌-매개된 형질감염(polybrene-mediated transfection), 전기침공법(electroporation), 유전자 총(gene gun) 또는 세포 내로 핵산을 유입시키기 위한 다른 공지의 방법에 의해 세포 내로 도입할 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 일 실시예에서는 전기천공법을 사용하였다.

[0035] 본 발명의 일 실시예에서는 EM42 균주에서 PP_RS11505 및/또는 PP_RS17605 유전자를 결실시킨 후, 발현벡터 pPROBE_*XutR*/P_{xutA}_*Xy1XABCD*로 각각 형질전환시켜, XutR/P_{xutA} 하에서 *Xy1XABCD* 오페론을 발현하며, PP_RS11505 및/또는 PP_RS17605 유전자가 결실된 형질전환체 "3EM42_*Xy1*", "5EM42_*Xy1*"및 "7EM42_*Xy1*"를 각각 제조하였다.

[0036] 본 발명의 일 실시예에서는 EM42 균주에 돌연변이된 PP_RS11505 및/또는 PP_RS17605 유전자를 삽입한 후, 발현벡터 pPROBE_*XutR*/P_{xutA}_*Xy1XABCD*로 각각 형질전환시켜, XutR/P_{xutA} 하에서 *Xy1XABCD* 오페론을 발현하며, 돌연변이된 PP_RS11505 및/또는 PP_RS17605 유전자가 삽입된 형질전환체 "4EM42_*Xy1*", "6EM42_*Xy1*"및 "8EM42_*Xy1*"를 각각 제조하였다.

[0037] 본 발명의 형질전환 슈도모나스 균주는 자일로스를 사용할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 상기 EM42_*Xy1*, 50EM42_*Xy1*, 3EM42_*Xy1*, 4EM42_*Xy1*, 5EM42_*Xy1*, 6EM42_*Xy1*, 7EM42_*Xy1* 및 8EM42_*Xy1* 균주를 자일로스를 포함하는 배지에서 각각 배양하여 각 균주의 성장을 비교 분석하였으며, 5EM42_*Xy1*, 6EM42_*Xy1*, 7EM42_*Xy1* 및 8EM42_*Xy1*에서 EM42_*Xy1* 대비 자일로스를 포함한 배지에서 더 빠른 성장을 나타내는 것을 확인하였다. 이를 통해, XutR/P_{xutA} 하에서 *Xy1XABCD* 오페론을 발현하며, PP_RS17605 유전자가 결실되거나 돌연변이 PP_RS17605 유전자가 삽입되는 경우, 자일로스를 포함한 배지에서 EM42_*Xy1* 대비 유의한 성장을 나타낼 수 있으며, 특히, XutR/P_{xutA} 하에서 *Xy1XABCD* 오페론을 발현하며, PP_RS11505 및 PP_RS17605 유전자가 모두 결실되거나(7EM42_*Xy1*), 돌연변이된 PP_RS11505 및 PP_RS17605 유전자가 모두 삽입되는 경우(8EM42_*Xy1*), 자일로스를 포함한 배지에서 50EM42_*Xy1*와 유사한 수준으로 매우 빠른 성장을 나타낼 수 있다는 것을 확인하였다.

[0038] 본 발명의 형질전환 슈도모나스 균주는 포도당과 자일로스를 동시에 사용할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 상기 EM42_*Xy1*, 50EM42_*Xy1* 및 7EM42_*Xy1* 균주를 포도당 및 자일로스를 포함하는 M9 배지에서 배양한 후, 각 균주의 기질 잔류량을 확인하였다. 이를 통해, XutR/P_{xutA} 하에서 *Xy1XABCD* 오페론을 발현하며, PP_RS11505 및 PP_RS17605 유전자가 모두 결실된 7EM42_*Xy1* 균주는 EM42_*Xy1* 균주와 달리 포도당과 자일로스를 동시에 소모할 수 있으며, 50EM42_*Xy1* 균주보다 포도당과 자일로스를 더욱 균일하게 소모할 수 있음을 확인하였다.

[0039] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

[0040] **참고예**

[0041] 유전자 발현 시스템의 유전자 서열 및 아미노산 서열을 하기 표 1에 나타낸다. 또한, 실시예에서 사용된 균주 및 플라스미드를 표 2에 나타낸다.

표 1

[0042]

단백질	아미노산 서열	서열번호
XutR	MKTLPPVHRIALLFNGSKIYDRGIIAGIGNYLSSTRASWDLFLEEDFLCRLKGIERWQGDGIIADFDDPLI GEALSGSTLPVVAVGGSYEDARAYPKGIPYVATDNHALMKLAYEHLIEAGLTRFACFSLPEAQANRWA QEREKAFRRLLQRDGLHVEVYRGLGTSAPLWDSAVEQQIAWLHSLPKPIGIIAVTDARARQLLQACLTA GIAVPEEVALIGIDNDPLTRTLTRVPLSSVIQGTETMGRTAAALLHQMLHGKPCAGTQILVPPDAINVQ ASSLHQPLGNPYVMQALLFIRQYACQGIKTAQVAAYVGVSRSSLEAHFRKVRGCSVHDEILRFKLAAAA KGLADPDLAIADIASSCGFTSAQYLHTVFRREFGCTPREYQQGAA	1

[0043]

유전자	유전자 서열(5' - 3')	서열번호
XutR 코딩 서열	ATGAAAACCCTACCGCCCGTGCACCGCATTGCCTTGCTCTTCAACGGCAGCAAAATCTACGACCGC GGCATCATCGCCGGCATCGGCAACTACCTGAGCAGCACCCGCGCGTCCTGGGACTTGTTCCTGGA AGAGGACTTTCTCTGTCGCCTCAAAGGCATCGAGCGCTGGCAGGGCGACGGCATCATCGCCGACT TCGACGACCCGCTGATCGGCGAGGCGTTGTCCGGGAGCACGCTGCCGGTGGTGGCGGTGGGGG GCTCTTATGAGGATGCGCGCGCCTACCCCAAGGGCATTCCTTATGTGGCCACCGATAACCACGCCTT GATGAAGCTGGCCTACGAACATTTGATCGAAGCGGGCCTGACGCGGTTTGCCTGTTTCAGCCTGCC CGAGGCCCAGGCCAATCGCTGGGCCCAGGAGCGCGAAAAAGCCTTTCGCCGTCTGCTGCAACGC GATGGCCTGCACGTCGAGGTGTATCGCGGCCTGGGCACCAGTGCGCCGTTGTGGGACAGCGCGG TGGAACAACAGATCGCCTGGCTGCACAGCCTGCCCAAGCCCATCGGTATCATCGCCGTCACCGACG CCCGCGCCCGGCAGTTGCTGCAAGCCTGCCTCACCGCCGGCATCGCCGTGCCGGAGGAGGTGGC GTTGATCGGCATCGACAACGACCCGCTGACCCGCACCCTTACGCGGGTGCCGCTGAGTTCGGTGAT CCAGGGCACCGAAACCATGGGCCGCACCGCCGCGGCGTTGCTGCACCAGATGCTGCACGGCAAA CCCTGCGCCGGGACGCAGATCCTGGTGCCGCCGGATGCGATCAATGTGCAGGCCTCCAGCTTGCAT CAACCCTTGGGCAATCCCTATGTGATGCAAGCGTTGCTGTTTATCCGGCAGTACGCCTGCCAGGGC ATCAAGACCGCGCAGGTGGCGGCCTACGTCGGCGTGTCGCGTTCCTCCCTGGAAGCGCACTTTCG CAAAGTGCGCGGCTGCAGCGTGCATGACGAGATCCTGCGCTTCAAACTCGCCGCCGCCGCCAAGG GCCTGGCCGACCCCGACCTGGCCATTGCCGACATTGCGTCGAGCTGCGGCTTCACCTCCGCGCAGT ACTTGCATACGGTGTTTCGCCGTGAGTTCGGTTGTACGCCACGGGAGTACCAGCAGGGTGCGGCC TAG	2
P_{xutA}	TGTTGTTGTCCTGGGGCCAGTCGCCACAGACTAGACCCTGCCACTCAAAATCGCACTGTCCTTTGG TGATTTTCATAATCGGCAAGGCCGATGCCGTTGCTAGTATCGAGACACCGCCAAGAACAATAAGGA AAACGCC	3
XylXABC D	ATGGTTTGTCGGCGGCTTCTAGCATGGACCGCCCGCGCCCGTGAGGCCGAGGATTTCGCGCTGGT CAGACAACCTACTTGCCGTCCCCACATGTTAGCGCTACCAAGTGCCGACGAACGCGCGCCGCCGAC GGTGTCGGCGCTTCAGACGCTCGAGTTTTGGGGAGACGACGCCGTGGGCGTGAGTGAATTCCTG CCGGAAGATTGGAAAGCCGCGACCCTGCTGGGGCGCATCGACTTTGGCGAAGGCCCGACGCCGG TGCTGGTGCGCGGCGGCCGCGTCGAGGACGTCTCGAAGATCGCCCCCACCGTCGCTGACCTGATG AACGCCTTCCAGCCCGGCGCGGTGATCCCGCGCGGCGAGGACAAGGGTCCGCTGGAAGCCCTCG ACATCCGCCCAGTCTGGGAAGACCCGGACGGCGCCGCGCCGGTCAAGCTGTTGGCCCCCGTCGAC CTGCAATGCCTGAAGGCCGCCGGCGTGACCTTCGCGGTCTCGACCCTTGAGCGGGTCATCGAGGA GCGCGCGCGCGGCGACGCCGGCGAGGCGCTGAAGATCCGCACCCTGCTGGCCGAACGCATGGGC GGCGACCTCAAGAGCGTCGAGCCGGGCTCGCAGGGCGCCCAGCGCCTGAAGGACGCCCTGATCG CCGACGGCCTGTGGTCGCAGTATCTGGAAGTGGCGATCGGCCCGGACGCCGAGATCTTCACCAAG GGCCCGACCCTGTCCTCGATGGGCTGGGGCGACCAGGTCGGCGTCCGCTATGACAGCCACTGGAA CAATCCCGAGCCGGAAGTCGTGCTGCTGTGCGACGGTTCGGGCCTGATCCGCGGCGCGGCGCTG GGCAACGACGTCAATCTGCGCGACTTCGAAGGTCGTTCGGCCCTGCTGCTCAGCAAGGCCAAGGA CAACAACGCCAGCTGCGCCATCGGTCCGTTCTTCCGCCTGTTCGACGAGACCTTCGGCCTGGACGA CGTCCGTTCGGCCGAGGTCGAGCTGAAGATCACCGGCCGCGACAACTTCGTGCTCGACGGCAAGT CGAACATGAGCCTGATCAGCCGCGACCCGGCCGTGCTGGCCGGACAGGCCTATGGCAAGCAGCAC CAGTATCCGGACGGCTTTGCTTTGTTCCTGGGCACCATGTTCGCCCCGATCCAGGACCGCGACACC CCCGGCCAGGGTTTCACCCACAAGGTCGGCGACCGCGTGCGTGTCTCGACGCCGAAGCTGGGCG TGCTCGAGAACGAAGTCACCACCTGCGACAAGGCCAAGCCGTGGACGTTCGGCATCTCGGCCCTG ATCCGCAACCTGGCCGGCCGCGGCCTCCTCTAATCGAAAGCTTCCCGCGATGACCGACACCCTGCG	4

[0044]

[0045]

	CCATTACATCGGCGGCGAACGCGTCGCGGCCGACGCCCCGGCCGAGAGCCTGAACCCGTCCAACA CCAACGACGTCGTCGCCAAGGTCCCGATGGGCGGCCAGGCCGAGGTCGACGCCGCCGTCGACGC CGCGCGCAAGGCCTTCCCGGCCTGGGCCGACGCCTCGCCGGAGGTCCGCTCGGACCTCTTGGAC AAGGTCGGTTCGACCATCATCGCCCGCAGCGCCGACATCGGCCGCCTGCTGGCCCGCGAAGAGGG CAAGACCCTGGCGGAAGGCATCGGCGAGACCGTCCGCGCCGGCCGCATCTTCAAGTACTTCGCCG GTGAAGCCCTGCGCCGTCACGGCCAGAACCTGGAAAGCACCCGTCCGGGCGTCGAGATCCAGAC CTATCGTCAGGCCGTGGGCGTCTATGGCCTGATCACGCCCTGGAACTTCCCGATCGCCATCCCGGCC TGGAAGGCCGCCCCGGCGCTCGCCTTCGGCAACACCGTGGTGATCAAGCCGGCCGGCCCGACGC CCGCCACCGCCAACGTGCTGGCCGACATCATGGCCGAGTGCGGCGCCCCGGCCGGCGTGTTCAAC ATGCTGTTTGGTCGCGGCTCGATGGGCGATGCGCTGATCAAGCACAAGGACGTGGACGGCGTCTC GTTCACCGGCTCGCAGGGCGTGGGCGCGCAGGTCGCCGCCGCCGCCGTGGCCCGTCAGGCCCGC GTGCAGCTGGAGATGGGCGGCAAGAACCCGCTGATCGTGCTGGACGACGCCGACCTGGAGCGCG CGGTCGCCATCGCCCTGGACGGCTCGTTCTTCGCCACCGGCCAGCGCTGCACCGCCAGCTCGCGC CTGATCGTCCAGGACGGGATTCACGACAAGTTCGTGGCCCTGCTGGCCGAGAAGGTCGCCGCCCT GCGCGTGGGCGACGCTCTGGACCCCAACACCCAGATCGGCCCGGCCGTCTCCGAAGACCAGATG GAGACTTCGTACCGCTATATCGACATCGCTGCCTCCGAAGGCGGCCGCGTGGTCACCGGCGGCGA CCGCATCAAGCTCGACAATCCGGGCTGGTACGTGCGTCCGACCCTGATCGCCGACACGCAAGCCG GCATGCGGATCAACAACGAGGAGGTCTTCGGCCCCGTCGCCTCGACCATCCGCGTCAAGAGCTAC GAAGAGGCGCTGGAGATCGCCAACGGCGTCGAGTTCGGCCTTTCGGCCGGCATCGCCACCACCTC GCTCAAGCACGCCCGCCACTTCCAGCGCTATGCCCGCGCGGGCATGACCATGGTCAATCTGGCCAC GGCCGGCGTCGACTATCACGTGCCGTTCGGCGGCACGAAGAGCAGCTCGTACGGCGCCCGCGAG CAGGGCTTCGCGGCGGTCGAGTTCTTCACCCAGACCAAAACCTCCTACTCGTGGTCGTAAGCAGC ATGTCCTCAGCCATCTATCCCAGCCTGAAGGGCAAGCGCGTCGTCATCACCGGCGGCGGCTCGGGC ATCGGGGCCGGCCTCACCGCCGGCTTCGCCCGTCAGGGCGCGGAGGTGATCTTCCTCGACATCGC CGACGAGGACTCCAGGGCTCTTGAGGCCGAGCTGGCCGGCTCGCCGATCCCGCCGGTCTACAAGC GCTGCGACCTGATGAACCTCGAGGCGATCAAGGCGGTCTTCGCCGAGATCGGCGACGTCGACGTG CTGGTCAACAACGCCGGCAATGACGACCGCCACAAGCTGGCCGACGTGACCGGCGCCTATTGGGA CGAGCGGATCAACGTCAACCTGCGCCACATGCTGTTCTGCACCCAGGCCGTCGCGCCGGGCATGA AGAAGCGTGGCGGCGGGGCGGTGATCAACTTCGGTTCGATCAGCTGGCACCTGGGGCTTGAGGA CCTCGTCCTCTACGAAACCGCCAAGGCCGGCATCGAAGGCATGACCCGCGCGCTGGCCCGGGAGC TGGGTCCCGACGACATCCGCGTCACCTGCGTGGTGCCGGGCAACGTCAAGACCAAGCGCCAGGA GAAGTGGTACACGCCCGAAGGCGAGGCCCAGATCGTGGCGGCCCAATGCCTGAAGGGCCGCATC GTCCCGGAGAACGTCGCCGCGCTGGTGCTGTTCCTGGCCTCGGATGACGCGTCGCTCTGCACCGG CCACGAATACTGGATCGACGCCGGCTGGCGTTGACCTAAGAAAACTGTCATCCCGGCCCAGCGTG AAGCGCGCCGAGCCGGGACCACGGCAAGCGCCACGCGTCCGGAGGTCCCGGCTCTCCGCTGTGC TACGGCCGGGATGACAGAGGAATGATTGTATGACCGCTCAAGTCACTTGCGTATGGGATCTGAAGG CCACGTTGGGCGAAGGCCCGATCTGGCATGGCGACACCCTGTGGTTCGTCGACATCAAGCAGCGT AAAATCCACAACTACCACCCCGCCACCGGCGAGCGCTTCAGCTTCGACGCGCCGGATCAGGTGAC CTTCCTCGCGCCGATCGTCGGCGCGACCGGCTTTGTCGTCGGTCTGAAGACCGGGATTCACCGCTT CCACCCGGCCACGGGCTTCAGCCTGCTGCTCGAGGTCGAGGACGCGGCGCTGAACAACCGCCCC AACGACGCCACGGTCGACGCGCAAGGCCGTCTGTGGTTCGGCACCATGCACGACGGGGAAGAGA ACAATAGCGGCTCGCTCTATCGGATGGACCTCACCGGCGTCGCCCGGATGGACCGCGACATCTGCA TCACCAACGGCCCGTGCGTCTCGCCCGACGGCAAGACCTTCTACCACACCGACACCCTGGAAAAG ACGATCTACGCCTTCGACCTGGCCGAGGACGGCCTGCTGTCGAACAAGCGCGTCTTCGTGCAGTTC GCCCTGGGCGACGATGTCTATCCGGACGGTTCGGTCGTCGATTCCGAAGGCTATCTGTGGACCGCC CTGTGGGGCGGTTTCGGCGCGGTCCGCTTCTCGCCGCAAGGCGACGCCGTGACGCGCATCGAACT GCCCGCCCCCAACGTCACCAAGCCCTGCTTCGGCGGGCCTGACCTGAAGACCCTCTATTTCACCAC CGCCCGCAAGGGCCTGAGCGACGAGACCCTGGCCCAGTACCCGCTGGCCGGCGGTGTGTTCGCC GTTCCGGTCGATGTGGCCGGCCAACCCCAGCATGAGGTCCGCCTTGTCTAACCGCACGCCCCGCCG GTTCCGGTCCCGCGATTGGTTCGATAACCCCGACCATATCGACATGACCGCGCTCTATCTGGAGCGC TTCATGAACTACGGGATCACGCCGGAGGAGCTGCGCAGCGGCAAGCCGATCATCGGCATCGCCCA GACCGGCAGCGACATCTCGCCCTGCAACCGCATCCACCTGGACCTGGTCCAGCGGGTGCGGGACG GGATCCGCGACGCCGGGGGCATCCCCATGGAGTTCCCGGTCCATCCGATCTTCGAGAACTGCCGTC	

[0046]

[0047]

GCCCGACGGCGGCGCTGGACCGGAACCTCTCGTACCTGGGTCTCGTCGAGACCCTGCACGGCTAT
CCGATCGACGCCGTGGTTCTGACCACCGGCTGCGACAAGACCACCCCGGCCGGGATCATGGCCGC
CACCACGGTCAATATCCCGGCCATCGTGCTGTCGGGCGGCCCGATGCTGGACGGCTGGCACGAGA
ACGAGCTCGTGGGCTCGGGCACCGTGATCTGGCGCTCGCGCCGCAAGCTGGCGGCCGGCGAGAT
CACCGAGGAAGAGTTCATCGACCGCGCCGCCAGCTCGGCGCCGTCGGCGGGCCACTGCAACACC
ATGGGCACGGCCTCGACCATGAACGCCGTGGCCGAGGCGCTGGGCCTGTCGCTGACCGGCTGCG
CGGCCATCCCCGCCCCCTACCGCGAGCGCGGCCAGATGGCCTACAAGACCGGCCAGCGCATCGTC
GATCTGGCCTATGACGACGTCAAACCGCTCGACATCCTGACCAAGCAAGCCTTCGAGAACGCCATC
GCCCTGGTGGCGGCGGCCGGCGGCTCGACCAACGCCCAGCCGCACATCGTGGCCATGGCCCGTC
ACGCCGGCGTCGAGATCACCGCCGACGACTGGCGCGCGGCCTATGACATCCCGCTGATCGTCAAC
ATGCAGCCGGCCGGCAAGTATCTGGGCGAGCGCTTCCACCGAGCCGGCGGCGCGCCGGCGGTGC
TGTGGGAGCTGTTGCAGCAAGGCCGCCTGCACGGCGACGTGCTGACCGTCACCGGCAAGACGAT
GAGCGAGAACCTGCAAGGCCGCGAAACCAGCGACCGCGAGGTGATCTTCCCGTACCACGAGCCG
CTGGCCGAGAAGGCCGGGTTCCTGGTTCTCAAGGGCAACCTCTTCGACTTCGCGATCATGAAGTC
CAGCGTGATCGGCGAGGAGTTCCGCAAGCGCTACCTGTCGCAGCCCGGCCAGGAAGGCGTGTTC
GAAGCCCGCGCCATCGTGTTCGACGGCTCGGACGACTATCACAAGCGGATCAACGATCCGGCCCT
GGAGATCGACGAGCGCTGCATCCTGGTGATCCGCGGCGCGGGTCCGATCGGCTGGCCCGGCTCG
GCCGAGGTCGTCAACATGCAGCCGCCGGATCACCTTCTGAAGAAGGGGATCATGAGCCTGCCCAC
CCTGGGCGATGGCCGTCAGTCGGGCACCGCCGACAGCCCCTCGATCCTGAACGCCTCGCCCGAAA
GCGCGATCGGCGGCGGCCTGTCGTGGCTGCGCACCGGCGACACCATCCGCATCGACCTCAACACC
GGCCGCTGCGACGCCCTGGTCGACGAGGCGACGATCGCCGCGCGCAAGCAGGACGGCATCCCGG
CGGTTCCCGCCACCATGACGCCCTGGCAGGAAATCTACCGCGCCCACGCCAGTCAGCTCGACACC
GGCGGCGTGCTGGAGTTCGCGGTCAAGTACCAGGACCTGGCGGCCAAGCTGCCCCGCCACAACC
ACTGA

[0048]

표 2

번호	균주	내용
1	*E. coli* DH10B	cloning host
2	*Pseudomonas putida* EM42	Derivative strain from wild type *P. putida* KT2440
3	*Pseudomonas fluorescens SBW25*	used for harboring *XutR*/P_{xutA}
4	*Caulobacter vibrioides* CB15	used for harboring *Xy1XABCD* operon
5	EM42_*XutR*	EM42::pPROBE_*XutR*/P_{xutA}_*eGFP*
6	EM42_*Xy1*	EM42:: pPROBE_*XutR*/P_{xutA}_*Xy1XABCD*
7	50EM42_*Xy1*	Adoptive laboratory evolved EM42::pPROBE_*XutR*/P_{xutA}_*Xy1XABCD*
8	EM42_ΔPP_RS11505	EM42 with deleted PP_RS11505
9	EM42::PP_RS11505$_{(mut)}$	EM42 with insertion of mutated PP_RS11505$^{(GGCAAC)\ 8\rightarrow5}$ gene
10	EM42_ΔPP_RS17605	EM42 with deleted PP_RS17605
11	EM42::PP_RS17605$_{(mut)}$	EM42 with insertion of mutated PP_RS17605$^{(GGCTGCGCCG)1\rightarrow2}$ gene
12	EM42_ΔPP_RS11505_ ΔPP_RS17605	EM42 with deleted PP_RS11505 and PP_RS17605
13	EM42::PP_RS11505$_{(mut)}$::PP_RS17605$_{(mut)}$	EM42 with insertion of mutated PP_RS11505$^{(GGCAAC)\ 8\rightarrow5}$ gene and mutated PP_RS17605$^{(GGCTGCGCCG)1\rightarrow2}$ gene
14	3EM42_*Xy1*	EM42_ΔPP_RS11505:: pPROBE_*XutR*/P_{xutA}_*Xy1XABCD*
15	4EM42_*Xy1*	EM42::PP_RS11505$_{(mut)}$:: pPROBE_*XutR*/P_{xutA}_*Xy1XABCD*
16	5EM42_*Xy1*	EM42_ΔPP_RS17605:: pPROBE_*XutR*/P_{xutA}_*Xy1XABCD*
17	6EM42_*Xy1*	EM42::PP_RS17605$_{(mut)}$:: pPROBE_*XutR*/P_{xutA}_*Xy1XABCD*
18	7EM42_*Xy1*	EM42_ΔPP_RS11505_ΔPP_RS17605::pPROBE_*XutR*/P_{xutA}_*Xy1XABCD*
19	8EM42_*Xy1*	EM42::PP_RS11505$_{(mut)}$::PP_RS17605$_{(mut)}$::pPROBE_*XutR*/P_{xutA}_*Xy1XABCD*
번호	**플라스미드**	**내용**
20	pPROBE-e*GFP+*	pPROBE plasmid containing pBBR1-ori, Km^R, broad-host-range expression vector
21	pPROBE_*XutR*/P_{xutA}_*eGFP+*	pPROBE plasmid harboring eGFP under the control of *XutR*/P_{xutA} xylose inducible promoter from *P. fluorescens* SBW25

22	pPROBE_*XutR*/P_{xutA}_*Xy1XABCD*	pPROBE plasmid (pBBR1-ori, Km^R) harboring *Xy1XABCD* operon from *C. vibrioides* CB15 under the control of *XutR*/P_{xutA} xylose inducible promoter from *P. fluorescens* SBW25
23	pQSAK	ColE1-ori, sacB, Km^R and Amp^R
24	pQSAK-*17605*	used to delete PP_RS17605
25	pQSAK-*17605**	used to insert mutated PP_RS17605
26	pQSAK-*11505*	used to delete PP_RS11505
27	pQSAK-*11505**	used to insert mutated PP_RS11505

[0049] **실시예 1. XutR/P_{xutA} 유전자 발현 카세트를 포함하는 발현 벡터 및 이를 포함한 형질전환체(EM42_*XutR*) 제조**

[0050] XutR/P_{xutA} 유전자 발현 조절 부위를 포함하는 발현 벡터를 제조하기 위해서, 먼저, *Pseudomonas fluorescens* SBW25의 게놈 DNA를 주형으로 PCR을 수행하여 XutR 전사인자 및 P_{xutA} 프로모터 서열을 증폭시켰다. 이때, Q5™ DNA 중합효소(New England Biolabs, USA) 및 Gibson assembly cloning kit (New England Biolabs, USA)를 이용하여 하기 표 3의 조건으로 PCR을 진행하였으며, PCR에 사용한 프라이머는 하기 표 4에 나타내었다.

표 3

[0051]

PCR 단계	온도	시간
1단계	98 ℃	3 minutes
2단계	98 ℃	10 seconds
3단계	70 ℃	30 seconds
4단계	72 ℃	45 seconds
5단계	72 ℃	3 minutes
1단계: 초기 변성, 2단계: 변성, 3단계: 결합, 4단계: 신장, 5단계: 최종 연장. Step 2 to 4 was repeated for 30 cycles.		

표 4

[0052]

프라이머	서열	서열번호
XutRA_fwd	gaattggggatcggaagctgaattcctaggccgcaccctgctg	5
XutRP_rev	ttaagcttctgcagtcgacggatccggcgttttccttattgttcttggcg	6

[0053] 상기 PCR을 통해 증폭된 유전자를 제한 효소 EcoRI 및 BamHI로 절단된 프로모터-비함유 광범위 숙주 벡터(pPROBE-eGFP+, BBR1-ori, Km^R) 내에 접합시켜 XutR/P_{xutA} 유전자 발현 조절 부위를 포함하는 발현 벡터를 제조하였으며, 이를 "pPROBE_*XutR*/P_{xutA}_eGFP"로 명명하였다.

[0054] 이후, LB 액체 배지 내, 30℃에서 200rpm의 진동 조건에서 배양된 *P. putida* EM42를 MicroPulser 전기천공기(Bio-Rad, USA)를 사용하여 pPROBE_*XutR*/P_{xutA}_eGFP로 형질전환시켰으며, 형질전환체를 "EM42_*XutR*"로 명명하였다.

[0055] **실시예 2. 형질전환체 EM42_*XutR*의 탄소원 농도별 유전자 발현 수준 확인**

[0056] 상기 실시예 1에서 제조한 형질전환체를 이용하여 각 탄소원 농도별 유전자 발현 수준을 비교 분석하였다.

[0057] 먼저, 상기 실시예 1에서 제조한 형질전환체를 5 g 효모 추출물, 10 g 펩톤 및 10 g 염화나트륨(NaCl)으로 처리된 LB 배지에 넣어 200 rpm, 30℃의 조건에서 전-배양한 후, 포도당을 4 g/L로 포함하는 20 ㎖의 M9 배지에 계대배양하였으며, 이때, 초기 OD_{600}을 0.1로 설정하였다. 이후, OD_{600}(600nm에서의 광학 밀도) 값이 0.5에 도달하면 5 ㎕씩 수집하여 195 ㎕의 M9 배지를 포함하는 Corning 96-웰 플레이트(Corning 96-well plate)에 접종하였다.

[0058] 이때, 상기 M9 배지는 1 리터당 6.78 g NaH_2PO_4, 3 g KH_2PO_4, 1 g NaCl, 1 g NH_4Cl, 0.011 g $CaCl_2$, 및 0.49 g

$MgSO_4.7H_2O$를 포함하였으며, 0.4 g/L 포도당, 0.4 g/L 자일로스, 0.4 g/L 포도당과 0.1 g/L 자일로스, 0.4 g/L 포도당과 0.2 g/L 자일로스, 0.4 g/L 포도당과 0.3 g/L 자일로스, 및 0.4 g/L 포도당과 0.4 g/L 자일로스를 각각 더 포함하였다.

[0059] 이후, Infinite F200 PRO 형광 판독기(Tecan, Austria)를 사용하여 GFP 형광 강도를 측정하였으며, 형광 강도는 배양물의 OD_{600} 값을 기준으로 정규화하였다.

[0060] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, EM42_*XutR* 균주는 포도당(Glucose)만 포함하는 경우 자일로스(Xylose)만 포함하는 경우에 비해 유의한 형광을 나타내지 않았으며, 포도당의 농도가 0.4 g/L로 일정한 경우, 자일로스의 농도가 0.1 g/L에서 0.4 g/L로 증가함에 따라 유전자 발현이 향상되었음을 확인하였다.

[0061] **실시예 3. XutR/P_{xutA} 하에서 *Xy1XABCD* 오페론을 발현하는 유전자 발현 조절 부위를 포함하는 발현 벡터 및 이를 포함한 형질전환체(EM42_*Xy1*) 제조**

[0062] XutR/P_{xutA} 하에서 *Xy1XABCD* 오페론을 발현하는 유전자 발현 조절 부위를 포함하는 발현 벡터를 제조하기 위해서, 먼저 *Caulobacter vibrioides* CB15의 게놈 DNA를 주형으로 PCR을 수행하여 웨임버그 자일로스 이화 경로 오페론(이하, "*xy1XABCD* 오페론"으로 기재함)을 코딩하는 유전자를 포함하는 영역을 증폭시켰다. 이때, Q5™ DNA 중합효소(New England Biolabs, USA) 및 Gibson assembly cloning kit (New England Biolabs, USA)를 이용하여 하기 표 5의 조건으로 PCR을 진행하였으며, PCR에 사용한 프라이머는 하기 표 6에 나타내었다.

표 5

[0063]

PCR 단계	온도	시간
1단계	98 ℃	3 minutes
2단계	98 ℃	10 seconds
3단계	72 ℃	30 seconds
4단계	72 ℃	3 minutes
5단계	72 ℃	3 minutes
1단계: 초기 변성, 2단계: 변성, 3단계: 결합, 4단계: 신장, 5단계: 최종 연장 Step 2 to 4 was repeated for 30 cycles.		

표 6

[0064]

프라이머	서열	서열번호
Xy1XABCD_fwd	ctttataaggaggaaaaacatatggtttgtcggcggcttctagc	7
Xy1XABCD_rev	agtccaagctcagctaattaagctttcagtggttgtggcggggca	8

[0065] 상기 PCR을 통해 증폭된 유전자를 제한 효소 NdeI 및 HindIII로 절단된 벡터 pPROBE_*XutR*/P_{xutA}_eGFP 내에 접합시켜 XutR/P_{xutA} 하에서 *Xy1XABCD* 오페론을 발현하는 유전자 발현 조절 부위를 포함하는 발현 벡터를 제조하였으며, 이를 "pPROBE_*XutR*/P_{xutA}_*Xy1XABCD*"로 명명하였다.

[0066] 상기 실시예 1과 같은 방법으로 XutR/P_{xutA} 하에서 *Xy1XABCD* 오페론을 발현하는 유전자 발현 조절 부위를 포함하는 발현 벡터 pPROBE_*XutR*/P_{xutA} _*Xy1XABCD*를 *P. putida* EM42에 도입하여 형질전환체를 제조하였으며, 이를 "EM42_*Xy1*" 균주로 명명하였다.

[0067] **실시예 4. 적응 실험실 진화 방법을 이용한 50EM42_*Xy1* 제조**

[0068] **실시예 4-1. 자일로스 최소 배지에서 EM42_*Xy1* 균주의 성장 확인**

[0069] EM42_*Xy1* 균주의 성장을 자일로스를 함유하는 최소 배지에서 확인하였다. 웨임버그 경로를 발현하는 슈도모나스 푸티다 EM42는 자일로스 수송체를 필요로 하지 않으며, 자일로스를 2-케토글루타레이트의 공급물로서 TCA 회로-유래 화학물질로 전환시킨다. 상기 형질전환체는 자일로스 함유 M9 배지에서 배양 초기에 매우 느린 속도로 성장하였다.

[0070] **실시예 4-2. 적응 실험실 진화 방법을 이용한 50EM42_*Xyl* 균주 제조**

[0071] 실시예 4-1에서 확인된 바와 같이, 실시예 3에서 제조된 EM42_*Xyl* 균주가 자일로스 함유 배지에서 초기 배양시 느린 성장 속도를 보였으므로, 상기 EM42_*Xyl* 균주를 적응 실험실 진화(Adaptive Laboratory Evolution, ALE) 방법을 이용하여 50회 성장 주기 동안 자일로스 배지에 적응시켰다.

[0072] 구체적으로, EM42_*Xyl* 균주를 50회 연속 성장 주기 동안 자일로스를 10 g/L 포함하는 M9 배지에서 배양하여 적응시켰다. 이때, 상기 성장 주기는 24 시간 동안 자일로스를 포함한 M9 배지에서 성장하는 것을 1회로 하며, 1회의 성장 주기가 끝나면 곧바로 균주를 수거하여 자일로스를 포함하는 새로운 M9 배지에 재접종하였다.

[0073] 상기와 같이 50회 연속으로 배양하여 수득한 EM42_*Xyl* 균주를"50EM42_*Xyl*"로 명명하였다.

[0074] **실시예 5. EM42_*Xyl* 및 50EM42_*Xyl* 균주의 탄소원별 기질 소모율 확인**

[0075] 상기 실시예 3 및 4에서 각각 제조된 EM42_*Xyl* 및 50EM42_*Xyl* 균주를 포도당 및 자일로스로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 탄소원을 포함하는 M9 배지에서 균주를 배양한 후, 각 균주의 기질 소모율을 확인하였다.

[0076] 구체적으로, 10 g/L 포도당, 10 g/L 자일로스, 및 5 g/L 포도당과 5 g/L 자일로스를 각각 더 포함하는 M9 배지에서 균주를 배양하였다. 이후, OD_{600} 값이 0.5에 도달하면 새 배지로 희석한 후 200 rpm, 30℃의 조건에서 계속 교반하였다.

[0077] 배양 8시간 및 16시간에 1 ㎖의 배양액을 수거하여 30분 동안 원심분리하였으며, 상등액을 80℃에서 1시간 동안 가열한 후, 16,500xg 조건에서 30분 동안 다시 원심분리하였다. 수득한 최종 샘플을 10 내지 20배 희석한 후, 20 ㎕ 분취량을 0.5 ㎖/분 및 35℃의 컬럼 온도의 조건에서 HPX-87P 컬럼(Bio-Rad) 내에 주입하였으며, 굴절률 검출기(Shimadzu) 및 SIL-20A 자동-샘플러(Shimadzu)가 장착된 Shimadzu HPLC station을 통해 기질 소모율 분석을 수행하였다. 이때, 기질 소모율(r)은 하기와 같이 계산되었다.

[0078] 기질 소모율(r)= (t0에서의 c 기질 - t1에서의 c 기질) / (t1 - t0)

[0079] 그 결과, 포도당 또는 자일로스를 포함하는 M9 배지에서 배양하는 경우, ALE방법으로 수득된 50EM42_*Xyl* 균주는 EM42_*Xyl* 균주와 유사한 성장세를 보였다. 반면, 포도당 및 자일로스를 모두 포함하는 M9 배지에서 배양하는 경우, EM42_*Xyl* 균주는 포도당을 0.3 g/L/h의 속도로 소모하고, 자일로스는 0.04 g/L/h의 속도로 소모하였으나, ALE방법으로 수득된 50EM42_*Xyl* 균주는 포도당 및 자일로스 모두 0.3 g/L/h의 속도로 동시에 소모하였다(도 5).

[0080] 이를 통해, 상기 ALE방법으로 수득된 50EM42_*Xyl* 균주는 EM42_*Xyl* 균주와 달리 포도당과 자일로스를 동시에 소모할 수 있음을 확인하였다.

[0081] **실시예 6. 50EM42_*Xyl* 균주의 게놈 분석**

[0082] 포도당과 자일로스를 동시에 소모할 수 있는 50EM42_*Xyl*의 돌연변이 여부를 확인하기 위하여, 50EM42_*Xyl*의 전체 게놈을 일루미나(Illumina) 플랫폼 상에서 Next Generation Sequencing(마크로젠 인코포레이티드, 한국)을 이용하여 서열 분석하였다. 이때, *P. putida* KT2440(NC_002947)을 게놈에 대한 기준으로 사용하였으며, Breseq 및 Bowtie2를 이용하여 변이된 서열을 확인하였다.

[0083] 이후, 확인된 변이된 서열을 PCR로 증폭시키고, DNA 서열 분석하였다. 이때, *P. putida* EM42 균주는 *P. putida* KT2440로부터 파생되었으므로, *P. putida* KT2440과 대비하여 결실된 10개의 유전자 또는 영역은 돌연변이 목록에서 제외하였으며, 상기와 같은 방식으로 분석한 50EM42_*Xyl* 균주의 28개의 돌연변이를 표 7에 나타내었다.

표 7

[0084]

번호	위치	돌연변이	유전자
1	4,586,030	2 bp→TC	PP_RS28355 → / ← PP_RS21100
2	4,586,035	+G	PP_RS28355 → / ← PP_RS21100
3	4,586,057	+C	PP_RS28355 → / ← PP_RS21100
4	6,013,885	T→C	PP_RS27440 → / ← PP_RS27445
5	5,681,415	+CGGG	PP_RS26015 ← / ← PP_RS26020
6	5,674,751	+G	PP_RS25985 → / ← PP_RS25990
7	5,674,753	G→C	PP_RS25985 → / ← PP_RS25990

8	5,555,608	+GCC	PP_RS25515 ← / ← PP_RS25520
9	3,951,161	A→T	PP_RS18130 ←
10	3,951,159	T→C	PP_RS18130 ←
11	3,845,705	+G	PP_RS17675 ← / ← PP_RS17680
12	**3,825,092**	**(GGCTGCGCCG)1→2**	**PP_RS17605 ←**
13	3,226,305	G→A	PP_RS14690 →
14	2,586,629	Δ1 bp	PP_RS11780 → / → PP_RS11785
15	**2,530,900**	**(GGCAAC)8→5**	**PP_RS11505 →**
16	1,932,640	+C	PP_RS08900 ← / ← minE
17	1,499,480	2 bp→AC	PP_RS06785 → / → PP_RS06790
18	1,499,508	+C	PP_RS06785 → / → PP_RS06790
19	1,499,498	1 bp→CG	PP_RS06785 → / → PP_RS06790
20	1,419,549	+C	PP_RS06445 ← / ← PP_RS06450
21	1,126,647	+C	PP_RS05165 ← / ← gcvP
22	1,070,248	+GA	PP_RS04875 → / ← PP_RS04880
23	499,203	A→G	PP_RS02165 → / → PP_RS02170
24	278,744	+A	PP_RS01190 ← / ← yecC
25	353,067	A→G	hisF → / ← choV
26	4,740,811	(T)7→6	gltA → / ← PP_RS21780
27	4,740,816	T→G	gltA → / ← PP_RS21780
28	4,740,819	2 bp→CT	gltA → / ← PP_RS21780

[0085] 상기 돌연변이들 중에서 50EM42_*Xyl* 및 EM42_*Xyl* 균주 모두에서 예측된 돌연변이 부분을 재-서열분석하여 주목할 만한 2개의 돌연변이로서 PP_RS11505$^{(GGCAAC)8\rightarrow5}$ 및 PP_RS17605$^{(GGCTGCGCCG)1\rightarrow2}$를 확인하였다.

[0086] **실시예 7. PP_RS11505 및/또는 PP_RS17605 유전자가 결실된 형질전환체 제조**

[0087] 상기 실시예 6에서 확인된 두 가지 돌연변이를 추가 검증하기 위해, 먼저, PP_RS11505 및/또는 PP_RS17605 유전자가 결실된 형질전환체를 제조하였다.

[0088] 이 때, pQSAK 플라스미드를 사용하는 sacB 음성 카운터-선별 시스템(sacB negative counter-selection system)을 기반으로 하는 온전한 염색체 인-프레임 유전자-결실 방법(scarless chromosomal in-frame gene-deletion method)을 이용하여 유전자가 결실된 형질전환체를 제조하였다.

[0089] 구체적으로, EM42 균주 내에 PP_RS11505 또는 PP_RS17605를 결실시키기 위해, 표적 유전자의 약 500 bp 상류 및 하류 영역을 포함하는 단편을 PCR을 사용하여 증폭시켰다. 이때, 하기 표 8의 조건으로 PCR을 진행하였으며, PCR에 사용한 프라이머는 하기 표 9에 나타내었다.

표 8

[0090]

PCR 단계	온도	시간
1단계	98 ℃	3 minutes
2단계	98 ℃	10 seconds
3단계	℃(Ta)	30 seconds
4단계	72 ℃	30 seconds
5단계	72 ℃	3 minutes
1단계: 초기 변성, 2단계: 변성, 3단계: 결합, 4단계: 신장, 5단계: 최종 연장. Step 2 to 4 was repeated for 30 cycles.		

표 9

[0091]

프라이머	서열	서열번호
US11505_F	cgaaaagtgccacctgacgtcgagaaacgcaaaaagccc	9
US11505_R	gcatccatgcatgaatcgcccaaatgcac	10
DS11505_F	ggcgattcatgcatggatgcccgtcaag	11
DS11505_R	caaataaatttttttatgatttctcgagaagtgttgaacaggctcac	12

US17605_F	cgaaaagtgccacctgacgtctgcagcatcggttcgatc	13
US17605_R	aaacccatgagtaagaaaacggcaggcttg	14
DS17605_F	gttttcttactcatgggttttccttatg	15
DS17605_R	caaataaatttttttatgatttctcgagctgacatcgagatctagaaaag	16

[0092] 상기 PCR을 통해 증폭된 유전자를 AatII 및 XhoI 절단된 pQSAK 플라스미드에 클로닝하여 결실 벡터를 제조하였으며, 이를 각각 "pQSAK-11505" 및 "pQSAK-17605"로 명명하였다.

[0093] 전기천공법을 이용하여 생성된 결실 벡터 "pQSAK-11505" 및 "pQSAK-17605"를 EM42 균주에 각각 형질전환시켰다. 이 중 단일 크로스오버(single crossover)를 선별한 후 LB 배지와 카나마이신을 포함한 플레이트에 재-선상도말하여 단일 콜로니들을 분리하였다. 또한, 상기 단일 크로스오버 배양액의 100 ㎖를 LB 배지와 10% 슈크로스를 포함한 플레이트에 평판도말하여 이중 크로스오버(double crossover)를 선별하였다.

[0094] 이어서, 상기 플레이트에서 선별된 각각의 콜로니를 LB 배지와 카나마이신을 포함하는 플레이트에 패치한 후, 각각의 결실된 유전자의 external 프라이머 및 콜로니 PCR을 이용하여 유전자가 결실되었는지 검사하였으며, 서열분석으로 다시 한 번 확인하였다. 이때, 하기 표 10의 조건으로 콜로니 PCR을 진행하였으며, 결실된 유전자의 external 프라이머는 하기 표 11에 나타내었다.

표 10

[0095]

PCR 단계	온도	시간
1단계	98 ℃	3 minutes
2단계	98 ℃	10 seconds
3단계	℃(Ta)	30 seconds
4단계	72 ℃	1 minutes 30 seconds
5단계	72 ℃	3 minutes
1단계: 초기 변성, 2단계: 변성, 3단계: 결합, 4단계: 신장, 5단계: 최종 연장 Step 2 to 4 was repeated for 30 cycles.		

표 11

[0096]

프라이머	서열	서열번호
11505F	ccctatcatcacagcca	17
11505R	gcaacagatcgcagact	18
17605F	ggcaaccagacggccat	19
17605R	gaagccaagaccggcaggt	20

[0097] 이를 통해, EM42 균주로부터 PP_RS11505 및/또는 PP_RS17605 유전자가 결실된 형질전환체인 EM42_ΔPP_RS11505, EM42_ΔPP_RS17605 및 EM42_ΔPP_RS11505 ΔPP_RS17605 균주를 각각 제조하였다.

[0098] **실시예 8. 돌연변이된 PP_RS11505 및/또는 PP_RS17605 유전자가 삽입된 형질전환체 제조**

[0099] 상기 실시예 6에서 확인된 두 가지 돌연변이를 추가 검증하기 위해, 먼저, 돌연변이된 PP_RS11505 및/또는 PP_RS17605의 유전자가 삽입된 형질전환체를 제조하였다.

[0100] 이 때, 상기 표 2의 pQSAK 플라스미드를 사용하는 sacB 음성 카운터-선별 시스템(sacB negative counter-selection system)을 기반으로 하는 온전한 염색체 인-프레임 유전자-삽입 방법(scarless chromosomal in-frame gene- insertion method)을 이용하여 돌연변이된 유전자가 삽입된 형질전환체를 제조하였다.

[0101] 구체적으로, EM42 균주 내에 돌연변이된 PP_RS11505$^{(GGCAAC)8\rightarrow5}$ 유전자 및 PP_RS17605$^{(GGCTGCGCCG)1\rightarrow2}$ 유전자를 삽입시키기 위해, 표적 유전자의 약 500 bp 상류 및 하류 영역을 포함하는 단편을 PCR을 사용하여 50EM42_Xyl 균주로부터 증폭시켰다. 이때, 하기 표 12의 조건으로 PCR을 진행하였으며, PCR에 사용한 프라이머는 다음과 같다: 돌연변이된 PP_RS11505$^{(GGCAAC)8\rightarrow5}$ 유전자 증폭용으로 서열번호 9 및 12의 프라이머, 돌연변이된 PP_RS17605$^{(GGCTGCGCCG)1\rightarrow2}$ 유전자 증폭용으로 서열번호 13 및 16의 프라이머(표 9 참조).

표 12

[0102]

PCR 단계	온도	시간
1단계	98 ℃	3 minutes
2단계	98 ℃	10 seconds
3단계	℃(Ta)	30 seconds
4단계	72 ℃	1 minutes 30 seconds
5단계	72 ℃	3 minutes
1단계: 초기 변성, 2단계: 변성, 3단계: 결합, 4단계: 신장, 5단계: 최종 연장 Step 2 to 4 was repeated for 30 cycles.		

[0103] 상기 PCR을 통해 증폭된 유전자를 AatII 및 XhoI 절단된 pQSAK 플라스미드에 클로닝하여 삽입 벡터를 제조하였으며, 이를 각각 "pQSAK-11505*" 및 "pQSAK-17605*"로 명명하였다.

[0104] 상기 삽입 벡터 "pQSAK-11505*" 및 "pQSAK-17605*"를 각 유전자 결실된 균주 EM42_ΔPP_RS11505 또는 EM42_ΔPP_RS17605에 형질전환시켰고, 상기 실시예 7과 동일한 방법으로 콜로니 선별하였으며, 콜로니 PCR 및 서열분석을 수행하여 돌연변이 유전자가 삽입되었는지 확인하였다.

[0105] 이를 통해, EM42 균주로부터 돌연변이된 PP_RS11505 및/또는 PP_RS17605 유전자가 삽입된 형질전환체인 EM42::PP_RS11505$_{(mut)}$, EM42::PP_RS17605$_{(mut)}$ 및 EM42::PP_RS11505$_{(mut)}$:: PP_RS11505$_{(mut)}$ 균주를 각각 제조하였다

[0106] **실시예 9. XutR/P$_{xutA}$의 조절에 의해 *Xy1XABCD* 오페론을 발현하며, PP_RS11505 및/또는 PP_RS17605 유전자가 결실된 형질전환체(3EM42_*Xy1*, 5EM42_*Xy1* 및 7EM42_*Xy1*) 제조**

[0107] 상기 실시예 7에서 제조한 각각의 형질전환체에 상기 실시예 3에서 제조한 발현 벡터를 도입하여 XutR/P$_{xutA}$의 조절에 의해 *Xy1XABCD* 오페론을 발현하며, PP_RS11505 및/또는 PP_RS17605 유전자가 결실된 형질전환체 제조하였다.

[0108] 상기 실시예 1과 같은 방법으로 EM42_ΔPP_RS11505, EM42_ΔPP_RS17605 및 EM42_ΔPP_RS11505 ΔPP_RS17605 균주에 발현 벡터 pPROBE_*XutR*/P$_{xutA}$ _*Xy1XABCD*를 도입하여 형질전환체를 제조하였으며, 이를 각각 "3EM42_*Xy1*", "5EM42_*Xy1*"및 "7EM42_*Xy1*"로 명명하였다.

[0109] **실시예 10. XutR/P$_{xutA}$의 조절에 의해 *Xy1XABCD* 오페론을 발현하며, 돌연변이된 PP_RS11505 및/또는 PP_RS17605 유전자가 삽입된 형질전환체(4EM42_*Xy1*, 6EM42_*Xy1* 및 8EM42_*Xy1*) 제조**

[0110] 상기 실시예 8에서 제조한 각각의 형질전환체에 상기 실시예 3에서 제조한 발현 벡터를 도입하여 XutR/P$_{xutA}$의 조절에 의해 *Xy1XABCD* 오페론을 발현하며, 돌연변이된 PP_RS11505 및/또는 PP_RS17605 유전자가 삽입된 형질전환체를 제조하였다.

[0111] 상기 실시예 1과 같은 방법으로 EM42::PP_RS11505$_{(mut)}$, EM42::PP_RS17605$_{(mut)}$ 및 EM42::PP_RS11505$_{(mut)}$:: PP_RS11505$_{(mut)}$ 균주에 발현 벡터 pPROBE_*XutR*/P$_{xutA}$_*Xy1XABCD*를 도입하여 형질전환체를 제조하였으며, 이를 각각 "4EM42_*Xy1*", "6EM42_*Xy1*"및 "8EM42_*Xy1*"로 명명하였다.

[0112] **실시예 11. 형질전환체별 자일로스를 포함하는 배지에서의 성장 확인**

[0113] 상기 실시예 3, 4, 9 및 10에서 제조된 각 균주(EM42_*Xy1*, 50EM42_*Xy1*, 3EM42_*Xy1*, 4EM42_*Xy1*, 5EM42_*Xy1*, 6EM42_*Xy1*, 7EM42_*Xy1* 및 8EM42_*Xy1*)의 자일로스를 포함하는 배지에서의 성장을 비교 분석하였다.

[0114] 먼저, 상기 실시예 3, 4, 9 및 10에서 제조한 각 균주를 5 g 효모 추출물, 10 g 펩톤 및 10 g 염화나트륨(NaCl)으로 처리된 LB 배지에 넣어 200 rpm, 30℃의 조건에서 전-배양한 후, 포도당을 4 g/L로 포함하는 20 ㎖의 M9 배지에 계대배양하였으며, 이때, 초기 OD_{600}을 0.1로 설정하였다. 이후, OD_{600}(600nm에서의 광학 밀도) 값이 0.5에 도달하면 5 ㎕씩 수집하여 195 ㎕의 M9 배지를 포함하는 Corning 96-웰 플레이트(Corning 96-well plate)에 접종하였다.

[0115] 이때, 상기 M9 배지는 1 리터당 6.78 g NaH_2PO_4, 3 g KH_2PO_4, 1 g NaCl, 1 g NH_4Cl, 0.011 g $CaCl_2$, 및 0.49 g

$MgSO_4.7H_2O$를 포함하였으며, 10 g/L 자일로스를 더 포함하였다.

[0116] 이후, 실시예 2와 동일한 방법으로 배양물의 OD_{600} 값을 기준으로 각 균주의 성장을 확인하였다.

[0117] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, XutR/P_{xutA}의 조절에 의해 *Xy1XABCD* 오페론을 발현하며 PP_RS17605 유전자가 결실된 5EM42_*Xy1* 및 XutR/P_{xutA}의 조절에 의해 *Xy1XABCD* 오페론을 발현하며 돌연변이된 PP_RS17605 유전자가 삽입된 6EM42_*Xy1* 모두에서 EM42_*Xy1* 대비 자일로스를 포함한 배지에서 더 빠른 성장을 나타내었다. 또한, XutR/P_{xutA}의 조절에 의해 *Xy1XABCD* 오페론을 발현하며 PP_RS11505 및 PP_RS17605 유전자가 결실된 7EM42_*Xy1* 및 XutR/P_{xutA}의 조절에 의해 *Xy1XABCD* 오페론을 발현하며 돌연변이된 PP_RS11505 및 PP_RS17605 유전자가 삽입된 8EM42_*Xy1* 모두에서 EM42_*Xy1* 대비 자일로스를 포함한 배지에서 더 빠른 성장을 나타내었으며, 그 수준은 50EM42_*Xy1*과 유사하였다.

[0118] 이를 통해, XutR/P_{xutA}의 조절에 의해 *Xy1XABCD* 오페론을 발현하며, PP_RS17605 유전자가 결실되거나 돌연변이 PP_RS17605 유전자가 삽입되는 경우, 자일로스를 포함한 배지에서 EM42_*Xy1* 대비 유의한 성장을 나타낼 수 있으며, 특히, XutR/P_{xutA}의 조절에 의해 *Xy1XABCD* 오페론을 발현하며, PP_RS11505 및 PP_RS17605 유전자가 결실되거나 돌연변이된 PP_RS11505 및 PP_RS17605 유전자가 삽입되는 경우, 자일로스를 포함한 배지에서 50EM42_*Xy1*와 유사한 수준으로 매우 빠른 성장을 나타낼 수 있다는 것을 확인하였다.

[0119] **실시예 12. EM42_*Xy1*, 50EM42_*Xy1* 및 7EM42_*Xy1* 균주의 포도당 및 자일로스를 포함하는 배지에서의 기질 잔류량 확인**

[0120] 상기 실시예 3, 4 및 9에서 각각 제조된 EM42_*Xy1*, 50EM42_*Xy1* 및 7EM42_*Xy1* 균주를 포도당 및 자일로스를 포함하는 M9 배지에서 균주를 배양한 후, 각 균주의 기질 잔류량을 확인하였다.

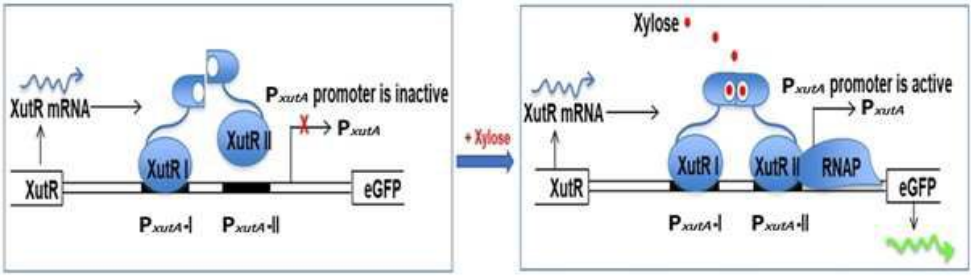
[0121] 구체적으로, 5 g/L 포도당과 5 g/L를 자일로스를 각각 더 포함하는 M9 배지에서 균주를 배양하였다. 이후, OD_{600} 값이 0.5에 도달하면 새 배지로 희석한 후 200 rpm, 30℃의 조건에서 계속 교반하였다.

[0122] 배양 후 4시간에 한 번씩 1 ㎖의 배양액을 수거하여 상기 실시예 5와 동일한 방법으로 최종 샘플을 수득한 후, Shimadzu HPLC station을 통해 각 기질 잔류량을 측정하였다.

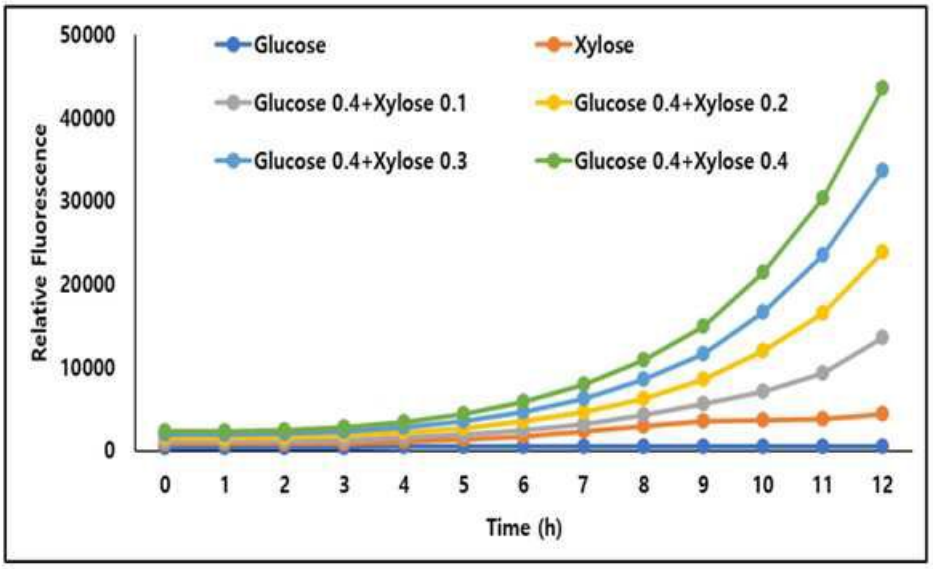
[0123] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 7EM42_*Xy1* 균주는 EM42_*Xy1* 균주와 달리 포도당과 자일로스를 동시에 소모할 수 있음을 확인하였으며, 50EM42_*Xy1* 균주보다 포도당과 자일로스를 더욱 균일하게 소모할 수 있음을 확인하였다.

도면

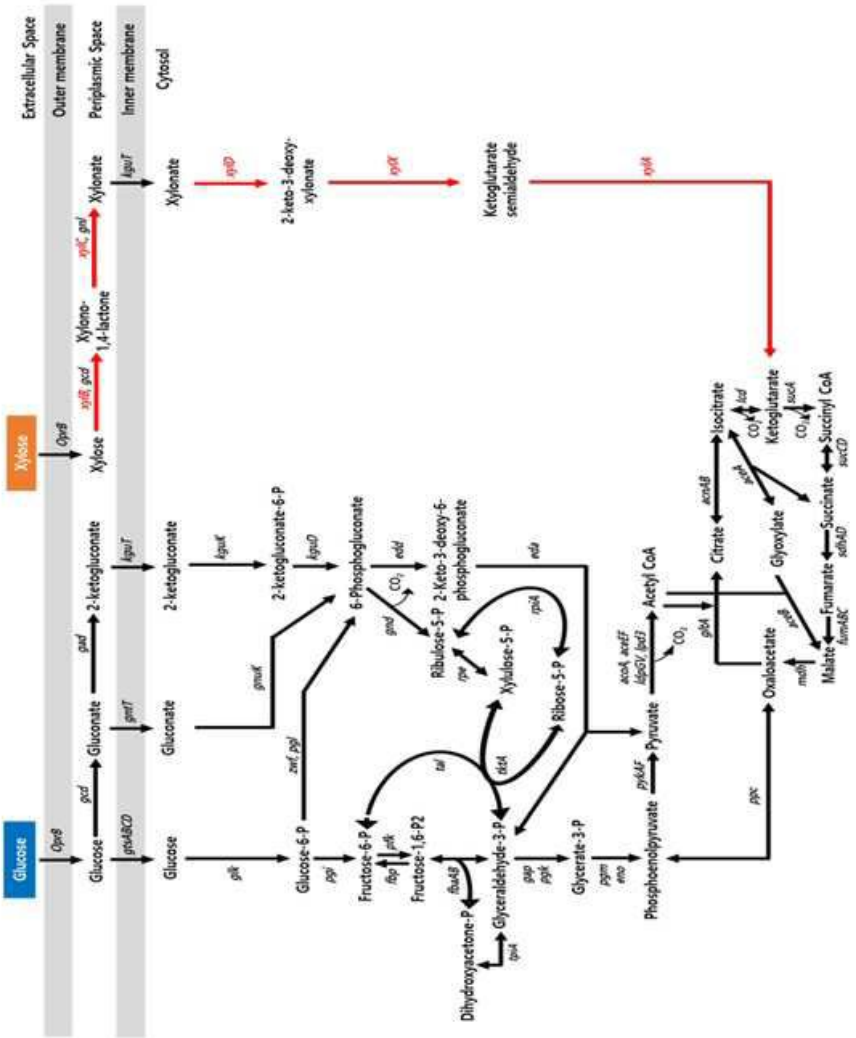
도면1



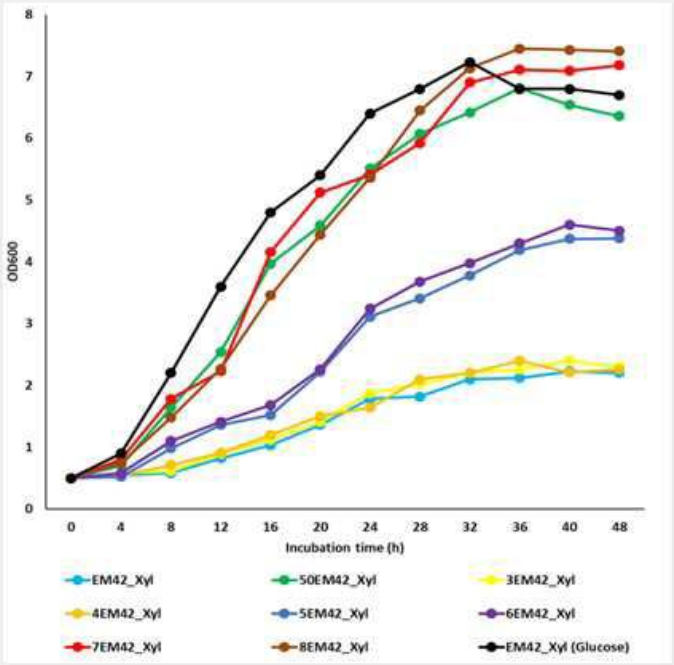
도면2


Glucose
Xylose
Glucose 0.4+Xylose 0.1
Glucose 0.4+Xylose 0.2
Glucose 0.4+Xylose 0.3
Glucose 0.4+Xylose 0.4
Relative Fluorescence
50000
40000
30000
20000
10000
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
Time (h)

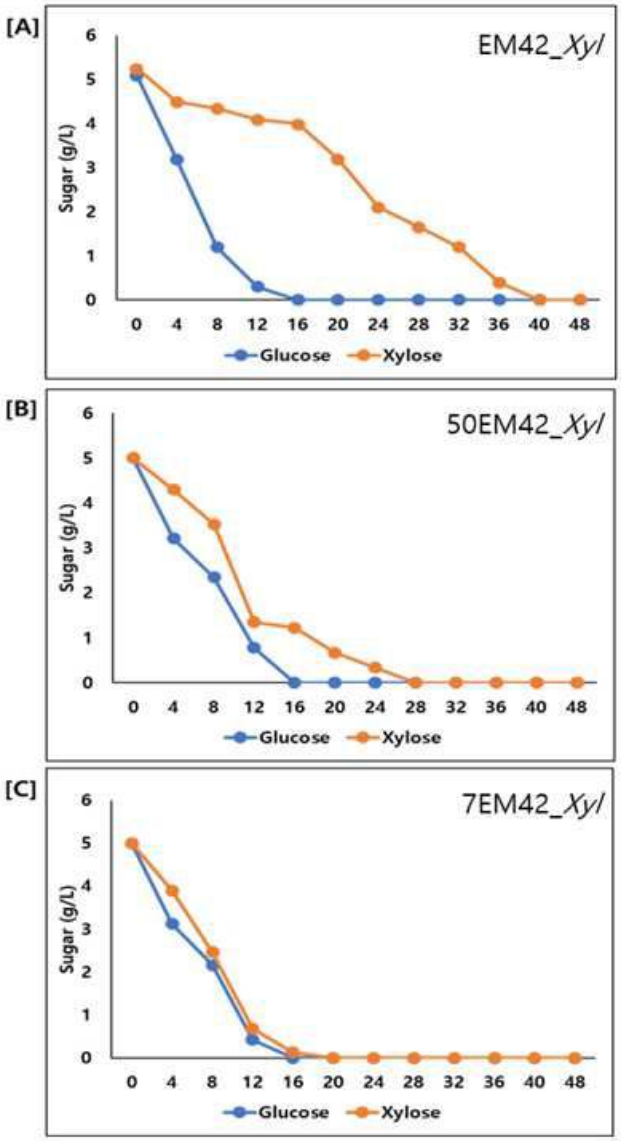
도면3


Extracellular Space
Outer membrane
Periplasmic Space
Inner membrane
Cytosol
Xylose
Glucose
Xylonate
2-keto-3-deoxy-xylonate
Ketoglutarate semialdehyde
Xylono-1,4-lactone
2-ketogluconate
2-ketogluconate-6-P
6-Phosphogluconate
2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconate
Gluconate
Ribulose-5-P
Xylulose-5-P
Ribose-5-P
Glucose-6-P
Fructose-6-P
Fructose-1,6-P2
Glyceraldehyde-3-P
Dihydroxyacetone-P
Glycerate-3-P
Phosphoenolpyruvate
Pyruvate
Acetyl CoA
Citrate
Isocitrate
Ketoglutarate
Succinyl CoA
Succinate
Fumarate
Malate
Oxaloacetate
Glyoxylate

도면4


OD600
Incubation time (h)
0
4
8
12
16
20
24
28
32
36
40
48
EM42_Xyl
50EM42_Xyl
3EM42_Xyl
4EM42_Xyl
5EM42_Xyl
6EM42_Xyl
7EM42_Xyl
8EM42_Xyl
EM42_Xyl (Glucose)

도면5



서 열 목 록

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

<120> PSEUDOMONAS STRAIN VARIANT CAPABLE OF SIMULTANEOUSLY UTILIZING GLUCOSE AND XYLOSE AS CARBON SOURCE

<130> FPD/202112-0006

<160> 20

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 391

<212> PRT

<213> Pseudomonas fluorescens

<400> 1

Met Lys Thr Leu Pro Pro Val His Arg Ile Ala Leu Leu Phe Asn Gly
1 5 10 15
Ser Lys Ile Tyr Asp Arg Gly Ile Ile Ala Gly Ile Gly Asn Tyr Leu

20 25 30
Ser Ser Thr Arg Ala Ser Trp Asp Leu Phe Leu Glu Glu Asp Phe Leu
35 40 45
Cys Arg Leu Lys Gly Ile Glu Arg Trp Gln Gly Asp Gly Ile Ile Ala
50 55 60
Asp Phe Asp Asp Pro Leu Ile Gly Glu Ala Leu Ser Gly Ser Thr Leu
65 70 75 80
Pro Val Val Ala Val Gly Gly Ser Tyr Glu Asp Ala Arg Ala Tyr Pro
85 90 95

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

165 170 175
Gln Ile Ala Trp Leu His Ser Leu Pro Lys Pro Ile Gly Ile Ile Ala
180 185 190
Val Thr Asp Ala Arg Ala Arg Gln Leu Leu Gln Ala Cys Leu Thr Ala
195 200 205
Gly Ile Ala Val Pro Glu Glu Val Ala Leu Ile Gly Ile Asp Asn Asp
210 215 220
Pro Leu Thr Arg Thr Leu Thr Arg Val Pro Leu Ser Ser Val Ile Gln
225 230 235 240

Gly Thr Glu Thr Met Gly Arg Thr Ala Ala Ala Leu Leu His Gln Met

245 250 255

Leu His Gly Lys Pro Cys Ala Gly Thr Gln Ile Leu Val Pro Pro Asp

260 265 270

Ala Ile Asn Val Gln Ala Ser Ser Leu His Gln Pro Leu Gly Asn Pro

275 280 285

Tyr Val Met Gln Ala Leu Leu Phe Ile Arg Gln Tyr Ala Cys Gln Gly

290 295 300

Ile Lys Thr Ala Gln Val Ala Ala Tyr Val Gly Val Ser Arg Ser Ser

305 310 315 320

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

325 330 335

Ile Leu Arg Phe Lys Leu Ala Ala Ala Ala Lys Gly Leu Ala Asp Pro

340 345 350

Asp Leu Ala Ile Ala Asp Ile Ala Ser Ser Cys Gly Phe Thr Ser Ala

355 360 365

Gln Tyr Leu His Thr Val Phe Arg Arg Glu Phe Gly Cys Thr Pro Arg

370 375 380

Glu Tyr Gln Gln Gly Ala Ala

385 390

<210> 2

<211> 1176

<212> DNA

<213> Pseudomonas fluorescens

<400> 2

atgaaaaccc taccgcccgt gcaccgcatt gccttgctct tcaacggcag caaaatctac 60

gaccgcggca tcatcgccgg catcggcaac tacctgagca gcacccgcgc gtcctgggac 120

ttgttcctgg aagaggactt tctctgtcgc ctcaaaggca tcgagcgctg gcagggcgac 180

ggcatcatcg ccgacttcga cgacccgctg atcggcgagg cgttgtccgg gagcacgctg 240

ccggtggtgg cggtgggggg ctcttatgag gatgcgcgcg cctaccccaa gggcattcct 300

tatgtggcca ccgataacca cgccttgatg aagctggcct acgaacattt gatcgaagcg 360

ggcctgacgc ggtttgcctg tttcagcctg cccgaggccc aggccaatcg ctgggcccag 420

gagcgcgaaa aagcctttcg ccgtctgctg caacgcgatg gcctgcacgt cgaggtgtat 480

cgcggcctgg gcaccagtgc gccgttgtgg gacagcgcgg tggaacaaca gatcgcctgg 540

ctgcacagcc tgcccaagcc catcggtatc atcgccgtca ccgacgcccg cgcccggcag 600

ttgctgcaag cctgcctcac cgccggcatc gccgtgccgg aggaggtggc gttgatcggc 660

atcgacaacg acccgctgac ccgcaccctt acgcgggtgc cgctgagttc ggtgatccag 720

ggcaccgaaa ccatgggccg caccgccgcg gcgttgctgc accagatgct gcacggcaaa 780

ccctgcgccg ggacgcagat cctggtgccg ccggatgcga tcaatgtgca ggcctccagc 840

ttgcatcaac ccttgggcaa tccctatgtg atgcaagcgt tgctgtttat ccggcagtac 900

gcctgccagg gcatcaagac cgcgcaggtg gcggcctacg tcggcgtgtc gcgttcctcc 960

ctggaagcgc actttcgcaa agtgcgcggc tgcagcgtgc atgacgagat cctgcgcttc 1020

aaactcgccg ccgccgccaa gggcctggcc gaccccgacc tggccattgc cgacattgcg 1080

tcgagctgcg gcttcacctc cgcgcagtac ttgcatacgg tgtttcgccg tgagttcggt 1140

tgtacgccac gggagtacca gcagggtgcg gcctag 1176

<210> 3

<211> 139

<212> DNA

<213> Pseudomonas fluorescens

<400> 3

tgttgttgtc ctggggccag tcgccacaga ctagaccctg ccactcaaaa tcgcactgtc 60

ctttggtgat tttcataatc ggcaaggccg atgccgttgc tagtatcgag acaccgccaa 120

gaacaataag gaaaacgcc 139

<210> 4

<211> 6296

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> XylABCD DNA sequence

<400> 4

atggtttgtc ggcggcttct agcatggacc gcccgcgccc gtgaggccga ggatttcgcg 60

ctggtcagac aacctacttg ccgtccccac atgttagcgc taccaagtgc cgacgaacgc 120

gcgccgccga cggtgtcggc gcttcagacg ctcgagtttt ggggagacga cgccgtgggc 180

gtgagtgaat tcctgccgga agattggaaa gccgcgaccc tgctggggcg catcgacttt 240

ggcgaaggcc cgacgccggt gctggtgcgc ggcggccgcg tcgaggacgt ctcgaagatc 300

gcccccaccg tcgctgacct gatgaacgcc ttccagcccg gcgcggtgat cccgcgcggc 360

gaggacaagg gtccgctgga agccctcgac atccgcccag tctgggaaga cccggacggc 420

gccgcgccgg tcaagctgtt ggcccccgtc gacctgcaat gcctgaaggc cgccggcgtg 480

accttcgcgg tctcgaccct tgagcgggtc atcgaggagc gcgcgcgcgg cgacgccggc 540

gaggcgctga agatccgcac cctgctggcc gaacgcatgg gcggcgacct caagagcgtc 600

gagccgggct cgcagggcgc ccagcgcctg aaggacgccc tgatcgccga cggcctgtgg 660

tcgcagtatc tggaagtggc gatcggcccg gacgccgaga tcttcaccaa gggcccgacc 720

ctgtcctcga tgggctgggg cgaccaggtc ggcgtccgct atgacagcca ctggaacaat 780

cccgagccgg aagtcgtgct gctgtgcgac ggttcgggcc tgatccgcgg cgcggcgctg 840

ggcaacgacg tcaatctgcg cgacttcgaa ggtcgttcgg ccctgctgct cagcaaggcc 900

aaggacaaca acgccagctg cgccatcggt ccgttcttcc gcctgttcga cgagaccttc 960

ggcctggacg acgtccgttc ggccgaggtc gagctgaaga tcaccggccg cgacaacttc 1020

gtgctcgacg gcaagtcgaa catgagcctg atcagccgcg acccggccgt gctggccgga 1080

caggcctatg gcaagcagca ccagtatccg gacggctttg ctttgttcct gggcaccatg 1140

ttcgccccga tccaggaccg cgacaccccc ggccagggtt tcacccacaa ggtcggcgac 1200

cgcgtgcgtg tctcgacgcc gaagctgggc gtgctcgaga acgaagtcac cacctgcgac 1260

aaggccaagc cgtggacgtt cggcatctcg gccctgatcc gcaacctggc cggccgcggc 1320

ctcctctaat cgaaagcttc ccgcgatgac cgacaccctg cgccattaca tcggcggcga 1380

acgcgtcgcg gccgacgccc cggccgagag cctgaacccg tccaacacca acgacgtcgt 1440

cgccaaggtc ccgatgggcg gccaggccga ggtcgacgcc gccgtcgacg ccgcgcgcaa 1500

ggccttcccg gcctgggccg acgcctcgcc ggaggtccgc tcggacctct tggacaaggt 1560

cggttcgacc atcatcgccc gcagcgccga catcggccgc ctgctggccc gcgaagaggg 1620

caagaccctg gcggaaggca tcggcgagac cgtccgcgcc ggccgcatct tcaagtactt 1680

cgccggtgaa gccctgcgcc gtcacggcca gaacctggaa agcacccgtc cgggcgtcga 1740

gatccagacc tatcgtcagg ccgtgggcgt ctatggcctg atcacgccct ggaacttccc 1800

gatcgccatc ccggcctgga aggccgcccc ggcgctcgcc ttcggcaaca ccgtggtgat 1860

caagccggcc ggcccgacgc ccgccaccgc caacgtgctg gccgacatca tggccgagtg 1920

cggcgccccg gccggcgtgt tcaacatgct gtttggtcgc ggctcgatgg gcgatgcgct 1980

gatcaagcac aaggacgtgg acggcgtctc gttcaccggc tcgcagggcg tgggcgcgca 2040

ggtcgccgcc gccgccgtgg cccgtcaggc ccgcgtgcag ctggagatgg gcggcaagaa 2100

cccgctgatc gtgctggacg acgccgacct ggagcgcgcg gtcgccatcg ccctggacgg 2160

ctcgttcttc gccaccggcc agcgctgcac cgccagctcg cgcctgatcg tccaggacgg 2220

gattcacgac aagttcgtgg ccctgctggc cgagaaggtc gccgccctgc gcgtgggcga 2280

cgctctggac cccaacaccc agatcggccc ggccgtctcc gaagaccaga tggagacttc 2340

gtaccgctat atcgacatcg ctgcctccga aggcggccgc gtggtcaccg gcggcgaccg 2400

catcaagctc gacaatccgg gctggtacgt gcgtccgacc ctgatcgccg acacgcaagc 2460

cggcatgcgg atcaacaacg aggaggtctt cggccccgtc gcctcgacca tccgcgtcaa 2520

gagctacgaa gaggcgctgg agatcgccaa cggcgtcgag ttcggccttt cggccggcat 2580

cgccaccacc tcgctcaagc acgcccgcca cttccagcgc tatgcccgcg cgggcatgac 2640

catggtcaat ctggccacgg ccggcgtcga ctatcacgtg ccgttcggcg gcacgaagag 2700

cagctcgtac ggcgcccgcg agcagggctt cgcggcggtc gagttcttca cccagaccaa 2760

aacctcctac tcgtggtcgt aagcagcatg tcctcagcca tctatcccag cctgaagggc 2820

aagcgcgtcg tcatcaccgg cggcggctcg ggcatcgggg ccggcctcac cgccggcttc 2880

gcccgtcagg gcgcggaggt gatcttcctc gacatcgccg acgaggactc cagggctctt 2940

gaggccgagc tggccggctc gccgatcccg ccggtctaca agcgctgcga cctgatgaac 3000

ctcgaggcga tcaaggcggt cttcgccgag atcggcgacg tcgacgtgct ggtcaacaac 3060

gccggcaatg acgaccgcca caagctggcc gacgtgaccg gcgcctattg ggacgagcgg 3120

atcaacgtca acctgcgcca catgctgttc tgcacccagg ccgtcgcgcc gggcatgaag 3180

aagcgtggcg gcggggcggt gatcaacttc ggttcgatca gctggcacct ggggcttgag 3240

gacctcgtcc tctacgaaac cgccaaggcc ggcatcgaag gcatgacccg cgcgctggcc 3300

cgggagctgg gtcccgacga catccgcgtc acctgcgtgg tgccgggcaa cgtcaagacc 3360

aagcgccagg agaagtggta cacgcccgaa ggcgaggccc agatcgtggc ggcccaatgc 3420

ctgaagggcc gcatcgtccc ggagaacgtc gccgcgctgg tgctgttcct ggcctcggat 3480

gacgcgtcgc tctgcaccgg ccacgaatac tggatcgacg ccggctggcg ttgacctaag 3540

aaaactgtca tcccggccca gcgtgaagcg cgccgagccg ggaccacggc aagcgccacg 3600

cgtccggagg tcccggctct ccgctgtgct acggccggga tgacagagga atgattgtat 3660

gaccgctcaa gtcacttgcg tatgggatct gaaggccacg ttgggcgaag gcccgatctg 3720

gcatggcgac accctgtggt tcgtcgacat caagcagcgt aaaatccaca actaccaccc 3780

cgccaccggc gagcgcttca gcttcgacgc gccggatcag gtgaccttcc tcgcgccgat 3840

cgtcggcgcg accggctttg tcgtcggtct gaagaccggg attcaccgct tccacccggc 3900

cacgggcttc agcctgctgc tcgaggtcga ggacgcggcg ctgaacaacc gccccaacga 3960

cgccacggtc gacgcgcaag gccgtctgtg gttcggcacc atgcacgacg gggaagagaa 4020

caatagcggc tcgctctatc ggatggacct caccggcgtc gcccggatgg accgcgacat 4080

ctgcatcacc aacggcccgt gcgtctcgcc cgacggcaag accttctacc acaccgacac 4140

cctggaaaag acgatctacg ccttcgacct ggccgaggac ggcctgctgt cgaacaagcg 4200

cgtcttcgtg cagttcgccc tgggcgacga tgtctatccg gacggttcgg tcgtcgattc 4260

cgaaggctat ctgtggaccg ccctgtgggg cggtttcggc gcggtccgct tctcgccgca 4320

aggcgacgcc gtgacgcgca tcgaactgcc cgcccccaac gtcaccaagc cctgcttcgg 4380

cgggcctgac ctgaagaccc tctatttcac caccgcccgc aagggcctga gcgacgagac 4440

cctggcccag tacccgctgg ccggcggtgt gttcgccgtt ccggtcgatg tggccggcca 4500

accccagcat gaggtccgcc ttgtctaacc gcacgccccg ccggttccgg tcccgcgatt 4560

ggttcgataa ccccgaccat atcgacatga ccgcgctcta tctggagcgc ttcatgaact 4620

acgggatcac gccggaggag ctgcgcagcg gcaagccgat catcggcatc gcccagaccg 4680

gcagcgacat ctcgccctgc aaccgcatcc acctggacct ggtccagcgg gtgcgggacg 4740

ggatccgcga cgccgggggc atccccatgg agttcccggt ccatccgatc ttcgagaact 4800

gccgtcgccc gacggcggcg ctggaccgga acctctcgta cctgggtctc gtcgagaccc 4860

tgcacggcta tccgatcgac gccgtggttc tgaccaccgg ctgcgacaag accacccccgg 4920

ccgggatcat ggccgccacc acggtcaata tcccggccat cgtgctgtcg ggcggcccga 4980

tgctggacgg ctggcacgag aacgagctcg tgggctcggg caccgtgatc tggcgctcgc 5040

gccgcaagct ggcggccggc gagatcaccg aggaagagtt catcgaccgc gccgccagct 5100

cggcgccgtc ggcgggccac tgcaacacca tgggcacggc ctcgaccatg aacgccgtgg 5160

ccgaggcgct gggcctgtcg ctgaccggct gcgcggccat ccccgccccc taccgcgagc 5220

gcggccagat ggcctacaag accggccagc gcatcgtcga tctggcctat gacgacgtca 5280

aaccgctcga catcctgacc aagcaagcct tcgagaacgc catcgccctg gtggcggcgg 5340

ccggcggctc gaccaacgcc cagccgcaca tcgtggccat ggcccgtcac gccggcgtcg 5400

agatcaccgc cgacgactgg cgcgcggcct atgacatccc gctgatcgtc aacatgcagc 5460

cggccggcaa gtatctgggc gagcgcttcc accgagccgg cggcgcgccg gcggtgctgt 5520

gggagctgtt gcagcaaggc cgcctgcacg gcgacgtgct gaccgtcacc ggcaagacga 5580

tgagcgagaa cctgcaaggc cgcgaaacca gcgaccgcga ggtgatcttc ccgtaccacg 5640

agccgctggc cgagaaggcc gggttcctgg ttctcaaggg caacctcttc gacttcgcga 5700

tcatgaagtc cagcgtgatc ggcgaggagt tccgcaagcg ctacctgtcg cagcccggcc 5760

aggaaggcgt gttcgaagcc cgcgccatcg tgttcgacgg ctcggacgac tatcacaagc 5820

ggatcaacga tccggccctg gagatcgacg agcgctgcat cctggtgatc cgcggcgcgg 5880

gtccgatcgg ctggcccggc tcggccgagg tcgtcaacat gcagccgccg gatcaccttc 5940
tgaagaaggg gatcatgagc ctgcccaccc tgggcgatgg ccgtcagtcg ggcaccgccg 6000
acagcccctc gatcctgaac gcctcgcccg aaagcgcgat cggcggcggc ctgtcgtggc 6060
tgcgcaccgg cgacaccatc cgcatcgacc tcaacaccgg ccgctgcgac gccctggtcg 6120
acgaggcgac gatcgccgcg cgcaagcagg acggcatccc ggcggttccc gccaccatga 6180
cgccctggca ggaaatctac cgcgcccacg ccagtcagct cgacaccggc ggcgtgctgg 6240
agttcgcggt caagtaccag gacctggcgg ccaagctgcc ccgccacaac cactga 6296

<210> 5
<211> 43
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> nucleotide sequence for primer XutRA_fwd
<400> 5
gaattgggga tcggaagctg aattcctagg ccgcaccctg ctg 43
<210> 6
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> nucleotide sequence for primer XutRP_rev
<400> 6
ttaagcttct gcagtcgacg gatccggcgt tttccttatt gttcttggcg 50
<210> 7
<211> 44
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence for primer XylXABCD_fwd
<400> 7
ctttataagg aggaaaaaca tatggtttgt cggcggcttc tagc 44
<210> 8
<211> 45
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence for primer XylXABCD_rev

<400> 8

agtccaagct cagctaatta agctttcagt ggttgtggcg gggca 45

<210> 9

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence for primer US11505_F

<400> 9

cgaaaagtgc cacctgacgt cgagaaacgc aaaaagccc 39

<210> 10

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence for primer US11505_R

<400> 10

gcatccatgc atgaatcgcc caaatgcac 29

<210> 11

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence for primer DS11505_F

<400> 11

ggcgattcat gcatggatgc ccgtcaag 28

<210> 12

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence for primer DS11505_R

<400> 12

caaataaatt ttttatgatt tctcgagaag tgttgaacag gctcac 46

<210> 13

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence for primer US17605_F

<400> 13

cgaaaagtgc cacctgacgt ctgcagcatc ggttcgatc 39

<210> 14

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence for primer US17605_R

<400> 14

aaacccatga gtaagaaaac ggcaggcttg 30

<210> 15

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence for primer DS17605_F

<400> 15

gttttcttac tcatgggttt tccttatg 28

<210> 16

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence for primer DS17605_R

<400> 16

caaataaatt ttttatgatt tctcgagctg acatcgagat ctagaaaag 49

<210> 17

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence for primer 11505F

<400> 17

ccctatcatc acagcca 17

<210> 18

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence for primer 11505R

<400> 18

gcaacagatc gcagact 17

<210> 19

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence for primer 17605F

<400> 19

ggcaaccaga cggccat 17

<210> 20

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence for primer 17605R

<400> 20

gaagccaaga ccggcaggt 19