



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0068923
(43) 공개일자 2021년06월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/62 (2006.01) C12N 9/04 (2006.01)

C12N 9/14 (2006.01) C12P 7/16 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 15/52 (2013.01)

C12N 9/0006 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0158537

(22) 출원일자 2019년12월02일

심사청구일자 2019년12월02일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

김경현

서울특별시 서초구 서초중앙로 200, 18동 805호(서초동, 삼풍아파트)

신철수

경기도 수원시 권선구 권중로 31, 303동 502호(권선동, 풍림, 신안아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인다나

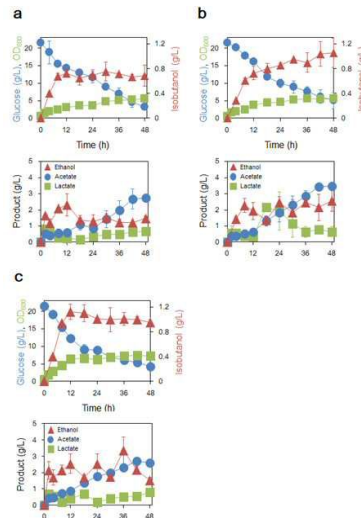
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 신규 이소부탄올 내성 유전자 및 그의 용도

(57) 요약

본 발명은 신규 이소부탄올 내성 유전자 및 그의 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로, 본 발명은 이소부탄올 내성인자를 선별하고 이를 이용하여 이소부탄올의 생산능을 높임으로써 연료분야에 적용할 수 있는 효과가 있다.

대표도 - 도7



(52) CPC특허분류

C12N 9/14 (2013.01)

C12P 7/16 (2013.01)

C12Y 101/01035 (2013.01)

C12Y 306/03023 (2013.01)

(72) 발명자

박용철

서울특별시 성북구 정릉로 77, 과학관 205호(정릉동, 국민대학교)

양정우

서울특별시 강북구 삼양로74길 8, 103동 101호(미아동, 경남아너스빌)

송영하

경기도 용인시 기흥구 기흥로116번길 100, 206동 201호(언남동, 초원마을성원상페빌)

장영서

서울특별시 성북구 개운사길 31(안암동5가)

김태인

제주특별자치도 제주시 신설로7길 4, 201호(아라이동, 노엘빌딩)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	10048684
부처명	산업통상자원부
과제관리(전문)기관명	한국산업기술평가관리원
연구사업명	산업핵심기술개발사업
연구과제명	바이오 기반 이소부틸렌 생산기술 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	(주)에이피테크놀로지
연구기간	2018.05.01 ~ 2019.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

fadB 및 *dppC*로 이루어진 군에 선택된 하나 이상의 유전자를 포함하는 이소부탄올 내성 증진용 재조합 벡터.

청구항 2

제1항에 있어서,

*fadB*는 SEQ ID NO: 1의 염기서열로 표시되는, 이소부탄올 내성 증진용 재조합 벡터.

청구항 3

제1항에 있어서,

*dppC*는 SEQ ID NO: 2의 염기서열로 표시되는, 이소부탄올 내성 증진용 재조합 벡터.

청구항 4

제1항의 이소부탄올 내성 증진용 재조합 벡터를 포함하는 이소부탄올 내성 증진용 조성물.

청구항 5

제1항의 이소부탄올 내성 증진용 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체.

청구항 6

제5항에 있어서,

형질전환체는 상기 이소부탄올 내성 증진용 재조합 벡터를 클로스트리디움(*Clostridium*) 균주 또는 이소부탄올을 생산하는 재조합 균주에 형질전환시켜 제조되는 것인, 형질전환체.

청구항 7

제6항에 있어서,

이소부탄올을 생산하는 재조합 균주는 *alsS*, *ilvD*, *ilvC*, *kivD* 및 *adhP*를 포함하는 유전자군을 발현하는 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) 또는 대장균(*Escherichia coli*)을 포함하는, 형질전환체.

청구항 8

제7항에 있어서, 이소부탄올을 생산하는 재조합 균주는

SEQ ID NO: 3의 염기서열로 표시되는 *alsS*;

SEQ ID NO: 4의 염기서열로 표시되는 *ilvD*;

SEQ ID NO: 5의 염기서열로 표시되는 *ilvC*;

SEQ ID NO: 6의 염기서열로 표시되는 *kivD*; 및

SEQ ID NO: 7의 염기서열로 표시되는 *adhP*를 포함하는 유전자군을 발현하는 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) 또는 대장균(*Escherichia coli*)을 포함하는, 형질전환체.

청구항 9

제5항의 형질전환체를 배양매지에서 배양하는 단계를 포함하는 이소부탄올의 생산 증진 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신규 이소부탄올 내성 유전자 및 그의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 화석 연료의 오랜 사용과 국제적인 에너지 소비량 증가는 급격한 기후 변화와 같은 전 세계적인 문제를 야기하고 있으며, 이로 인해 미생물 발효에 의해 생산되는 에탄올과 같은 재생 가능한 연료의 필요성이 제기되었다. 그 중 이소부탄올은 에탄올에 비하여 가솔린에 근접하는 높은 에너지 밀도를 가지고 있으며, 친수성이 낮아 높은 비례의 혼합을 실현할 수 있으며, 기존 석유 파이프를 그대로 사용하여 운송할 수 있는 장점 등이 있다.

[0003] 이소부탄올은 클로스트리디움(*Clostridium*) 균주에서 생산된다고 알려져 있으나 유전적 조작이 힘들다는 이유로 효모(*Saccharomyces cerevisiae*)와 대장균(*Escherichia coli*)과 같은 균주에서 5개의 필수유전자(*alsS*, *ilvC*, *ilvD*, *kdc*, *adh* 등)를 과발현하여 이소부탄올을 생산하는 추세이다. 그러나 여전히 조효소 불균형, 낮은 효소 발현량, 이소부탄올 독성에 의한 성장 저해 등 이소부탄올 생산을 저해하는 요인들이 존재한다. 특히, 이소부탄올의 독성은 세포 생장의 방해로 인해 미생물의 이소부탄올 생산량을 감소시키는 원인이 된다.

[0004] 따라서, 본 발명자들은 이소부탄올에 내성을 가지는 미생물의 내성인자를 파악하여 이소부탄올 생산을 증진함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0005] (비특허문헌 0001) Carmen Felpeto-Santero et al. AMB Express (2015) 5:32

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 이소부탄올의 내성을 증진시키는 유전인자를 포함하는 재조합 벡터 및 이의 용도를 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 상기 재조합 벡터로 형질전환되어 이소부탄올에 대한 내성이 증진됨으로써 이소부탄올의 생산을 증진시킬 수 있는 형질전환체를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 형질전환체를 이용하여 이소부탄올의 생산을 증진하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 *fadB* 및 *dppC*로 이루어진 군에 선택된 하나 이상의 유전자를 포함하는 이소부탄올 내성 증진용 재조합 벡터를 제공한다.

[0010] 본 발명을 또한 상기 이소부탄올 내성 증진용 재조합 벡터를 포함하는 이소부탄올 내성 증진용 조성물을 제공한다.

[0011] 본 발명은 또한 상기 이소부탄올 내성 증진용 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공한다.

[0012] 본 발명은 또한 상기 형질전환체를 배양배지에서 배양하는 단계를 포함하는 이소부탄올의 생산 증진 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명은 이소부탄올 내성인자를 선별하고 이를 이용하여 이소부탄올의 생산능을 높임으로써 연료분야에 적용할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [0014] 도 1은 이소부탄을 내성 균주를 개발하기 위한 적정 이소부탄을 농도 설정 결과를 나타낸 것이다: (a) 다양한 이소부탄을 농도(0-1%, v/v)에서 *E. coli* BL21(DE3)의 성장 곡선 및 (b) *E. coli* MG1655(DE3)의 성장 곡선이다.
- 도 2는 이소부탄을 내성 균주 개발을 위한 연속배양과 그에 따른 세포성장 변화를 나타낸 것이다: (a) *E. coli* BL21(DE3) 및 (b) *E. coli* MG1655(DE3).
- 도 3은 이소부탄을 내성 돌연변이의 세포생장을 측정 결과이다. 연속배양 과정 중 다양한 이소부탄을 농도에 진화 적응된 균주들의 최대 세포생장을 나타낸 것이다(1.2% 이소부탄을 조건): (a) *E. coli* BL21(DE3) 및 (b) *E. coli* MG1655(DE3). 모균주 및 진화된 이소부탄을 내성 돌연변이 간의 생장률 비교 결과이다: (c) *E. coli* BL21(DE3)와 *E. coli* BL21(DE3)_TI133, (d) *E. coli* MG1655(DE3)와 *E. coli* MG1655(DE3)_TI136의 생장률 비교. P, 모균주; E, 진화공학을 이용하여 개발된 이소부탄을 내성 돌연변이 균주.
- 도 4는 진화공학을 거친 대장균의 유전적 안정성 테스트 결과를 나타낸 것이다: 이소부탄을 농도에 따른 (a) *E. coli* BL21(DE3)_TI133의 생장률 및 (b) *E. coli* MG1655(DE3)_TI136의 생장률.
- 도 5는 이소부탄을 내성 돌연변이 균주들의 전사체 분석 결과를 나타낸 것이다: 이소부탄을 스트레스 조건에서, *E. coli* BL21(DE3)_TI133와 *E. coli* MG1655(DE3)_TI136에서 공통적으로 상향조절된 유전자(a) 및 하향조절된 유전자(b)의 기능별 정리.
- 도 6은 전사체 분석으로부터 선별된 내성 유전인자의 이소부탄을 내성검증 결과를 나타낸 것이다. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001
- 도 7은 내성유전인자가 도입된 이소부탄을 생산 대장균 균주의 이소부탄을 발효 결과를 나타낸 것이다: (a) 빈 벡터가 도입된 이소부탄을 생산 균주(대조군), (b) *fadB* 및 (c) *dppC*가 도입된 이소부탄을 생산 균주의 발효 프로파일.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0015] 본 발명자들은 모균주인 *E. coli* BL21(DE3)과 *E. coli* MG1655(DE3)를 이소부탄을 스트레스 조건에서 연속 배양한 뒤 이소부탄에 내성을 지니는 균주를 분리하였으며, 돌연변이 균주들의 전사체 분석을 통하여 공통적으로 상향조절된 30개 유전자와 하향조절된 74개의 유전자를 분리할 수 있었다. 이중 상향조절된 17개의 유전자를 내성 후보유전자로 선정 후, 대장균에 각 후보유전자를 과발현하여 이소부탄을 1%(v/v)에서 내성 실험을 진행하였으며, 그 후 최종적으로 *acs*, *fadB*, *csiD*, *fadH*, *argT*, *dppC*의 6개 내성인자를 선별하였다. 끝으로, 이소부탄을 생산이 가능한 재조합 대장균에 4개의 내성인자(*acs*, *csiD*, *dppC*, *fadB*)를 각각 도입한 후 이소부탄을 발효를 진행한 결과 *dppC*와 *fadB*가 각각 도입된 이소부탄을 생산이 가능한 재조합 대장균에서 이소부탄의 생산량이 증가하여 *dppC*와 *fadB*이 생산량을 높이는 유전인자임을 알 수 있었다.
- [0016] 따라서, 본 발명은 *fadB* 및 *dppC*로 이루어진 균에 선택된 하나 이상의 유전자를 포함하는 이소부탄을 내성 증진용 재조합 벡터를 제공한다.
- [0017] 상기 *fadB* 및 *dppC*는 이소부탄을 스트레스 조건에서 이소부탄을 내성 균주에서 발현이 상향조절되고, 이소부탄을 생산 균주에 도입 시 이소부탄의 생산을 증가시키는 특징이 있다.
- [0018] 상기 유전자는 대장균(*E. coli*)등을 포함하는 원핵생물 및 효모(*Saccharomyces cerevisiae*)등을 포함하는 진핵생물에서 유래된 것일 수 있고, 구체적으로 대장균(*E. coli*), 보다 구체적으로 이소부탄을 내성 대장균으로부터 유래된 것일 수 있다.
- [0019] 상기 *fadB*는 Fatty acid oxidation complex subunit alpha의 약어로, SEQ ID NO: 1의 염기서열로 표시될 수 있다.
- [0020] 상기 *dppC*는 Dipeptide transport system permease protein DppC의 약어로, SEQ ID NO: 2의 염기서열로 표시될 수 있다.
- [0021] 보다 구체적으로, 본 발명의 재조합 벡터는 SEQ ID NO: 1의 염기서열을 갖는 *fadB* 및 SEQ ID NO: 2의 염기서열을 갖는 *dppC*이 삽입되어 이소부탄의 내성을 증진시킬 수 있다.
- [0022] 본 발명에서 "재조합 벡터"란 적당한 숙주세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있는 벡터로서, 인 비보(*in vivo*)

또는 인 비트로(*in vitro*)에서 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물(construct)을 말한다. 본 명세서에 있어서, 용어 "플라스미드", "벡터" 또는 "발현 벡터"는 상호 교환적으로 사용된다. 유전자 작제물은 숙주세포에 *fadB* 및/또는 *dppC*의 핵산 분자를 삽입하기 위해 사용될 수 있다. 이들 유전자 작제물에서 *fadB* 및/또는 *dppC*의 핵산 분자는 숙주세포 내에서 발현될 수 있도록 적합한 조절 서열에 작동가능하게 연결(operably linked)되며, 숙주세포로 삽입되면, 벡터는 숙주 계통과는 무관하게 복제하고 기능할 수 있거나 또는 일부 경우에 숙주 계통 그 자체에 통합될 수 있다.

- [0023] 상기 벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파아지 벡터 또는 바이러스 벡터 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 적합한 발현벡터는 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, 복제가능한 발현벡터인 경우 복제 기원을 포함한다.
- [0024] 상기 "작동가능하게 연결된"은 적절한 핵산 분자가 조절 서열에 결합될 때 유전자 발현을 가능하게 하는 방식으로 연결된 것을 의미한다.
- [0025] 본 명세서에서, 용어 "핵산 분자"는 cDNA, genomic DNA, 합성 DNA 또는 RNA, PNAS 또는 LNA 기원의 임의의 단일 또는 이중 나선 핵산 분자, 또는 이들의 혼합물을 의미한다. "핵산" 및 "폴리뉴클레오타이드"는 본원에서 상호교환적으로 사용될 수 있다.
- [0026] 본 발명의 재조합 벡터는 바람직하게는 일반적인 대장균 균주 발현용 벡터에 상술한 유전자를 삽입함으로써 제조될 수 있다. 상기 대장균 균주 발현용 벡터는 일반적으로 사용할 수 있는 모든 대장균 발현용 벡터가 제한 없이 사용될 수 있다.
- [0027] 본 발명을 또한 상기 이소부탄올 내성 증진용 재조합 벡터를 포함하는 이소부탄올 내성 증진용 조성물을 제공한다.
- [0028] 본 발명의 조성물은 유효성분으로 *fadB* 및/또는 *dppC*의 핵산 분자가 삽입된 재조합 벡터, 더 구체적으로, SEQ ID NO: 1의 염기서열을 갖는 *fadB* 및 SEQ ID NO: 2의 염기서열을 갖는 *dppC*가 삽입된 재조합 벡터를 포함하며, 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 미생물에 형질전환시킴으로써 미생물의 이소부탄올에 대한 내성을 증진시킬 수 있다.
- [0029] 상기 미생물은 이소부탄올을 생산하는 미생물일 수 있고, 예컨대, 클로스트리디움(*Clostridium*) 균주, 이소부탄올을 생산하는 재조합 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) 또는 대장균(*Escherichia coli*) 등일 수 있다.
- [0030] 본 발명은 또한 상기 이소부탄올 내성 증진용 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공한다.
- [0031] 본 발명의 형질전환체는 본 발명의 이소부탄올 내성 증진용 재조합 벡터를 이소부탄올 생산 균주에 도입하여 이소부탄올의 내성을 증진시켜 이소부탄올 독성에 의한 성장 저해를 억제시킴으로써 이소부탄올의 생산을 증진시킬 수 있는 특징이 있다.
- [0032] 상기 이소부탄올 생산 균주는 클로스트리디움(*Clostridium*) 균주 또는 이소부탄올을 생산하는 재조합 균주일 수 있다.
- [0033] 상기 이소부탄올을 생산하는 재조합 균주는 *alsS*, *ilvD*, *ilvC*, *kivD* 및 *adhP*를 포함하는 유전자군을 발현하는 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) 또는 대장균(*Escherichia coli*)을 포함할 수 있다.
- [0034] 보다 구체적으로, 이소부탄올을 생산하는 재조합 균주는
- [0035] SEQ ID NO: 3의 염기서열로 표시되는 *alsS*;
- [0036] SEQ ID NO: 4의 염기서열로 표시되는 *ilvD*;
- [0037] SEQ ID NO: 5의 염기서열로 표시되는 *ilvC*;
- [0038] SEQ ID NO: 6의 염기서열로 표시되는 *kivD*; 및
- [0039] SEQ ID NO: 7의 염기서열로 표시되는 *adhP*를 포함하는 유전자군을 발현하는 사카로마이세스 세레비지애

(*Saccharomyces cerevisiae*) 또는 대장균(*Escherichia coli*)일 수 있다.

- [0040] 상기 형질전환은 핵산을 유기체, 세포, 조직 또는 기관에 도입하는 어떤 방법도 포함되며, 당 분야에서 공지된 바와 같이 숙주세포에 따라 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 이런 방법에는 전기충격유전자전달법(electroporation), 원형질 융합, 인산칼슘(CaPO_4) 침전, 염화칼슘(CaCl_2) 침전, 실리콘 카바이드 섬유 이용한 교반, 아그로박테리아 매개된 형질전환, PEG, 텍스트란 설페이트, 리포펙타민 등이 포함되나 이로 제한되지 않는다.
- [0041] 또한, 숙주세포에 따라서 단백질의 발현량과 수식 등이 다르게 나타나므로, 목적에 가장 적합한 숙주세포를 선택하여 사용하면 된다.
- [0042] 숙주세포로는 대장균(*Escherichiacoli*), 자이모모나스 모빌리스(*Zymomonas mobilis*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 스트렙토마이세스(*Streptomyces*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*) 또는 스태필로코쿠스(*Staphylococcus*)와 같은 원핵생물이 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 진균(예를 들어, 아스퍼질러스(*Aspergillus*)), 효모(예를 들어, 피치아 파스토리스(*Pichiapastoris*), 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*), 쉬조사카로마세스(*Schizosaccharomyces*), 뉴로스포라 크라사(*Neurosporacrassa*))등의 진핵생물이 사용될 수 있으나, 이에 제한하는 것은 아니다. 보다 구체적으로, 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) 또는 대장균(*Escherichia coli*)일 수 있다.
- [0043] 본 발명은 또한 상기 형질전환체를 배양배지에서 배양하는 단계를 포함하는 이소부탄올의 생산 증진 방법을 제공한다.
- [0044] 본 발명의 형질전환체는 이소부탄올에 대한 내성이 증진되어 이소부탄올 독성에 의한 성장 저해를 억제함으로써 이소부탄올 생산 균주로부터 이소부탄올의 생산량을 증진시킬 수 있다.
- [0045] 형질전환체의 (대량) 배양을 위해, 다양한 배양 방법이 적용될 수 있는데, 예컨대 제조합 미생물로부터 발현 또는 과발현된 유전자 산물의 대규모 제조는 회분(batch) 또는 연속 배양 방법에 의해 달성될 수 있다. 회분 및 유가식(fed-batch) 배양 방법은 통상적인 것으로서 당분야에 공지되어 있다. 연속 배양 공정을 위한 영양분 및 성장 인자의 조절 방법, 뿐만 아니라 생성물 형성율을 최대화 하기 위한 기법은 미생물 산업 분야에 공지되어 있다. 또한, 배양배지로는 탄소원, 질소원, 비타민 및 미네랄로 구성된 배지를 사용할 수 있으며, 당분야에 공지된 바에 따라 조성 구성할 수 있다.
- [0046] 이하, 본 발명에 따르는 실시예 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하나, 본 발명의 범위가 하기 제시된 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.
- [0047] <실시예 1> 진화공학을 위한 적정 이소부탄올 농도의 결정
- [0048] 진화공학을 이용하여 이소부탄올 내성을 지니는 대장균 균주를 제작하기 위하여 세포 성장을 완전히 저해되지 않는으면서, 최소한의 세포 생장이 일어날 수 있는 이소부탄올 농도를 찾아야 했다. 이를 위해, *E. coli* BL21(DE3)와 *E. coli* MG1655(DE3)를 0-1%(v/v)의 이소부탄올을 첨가한 LB(Luria-Bertani)배지에 세포농도 $\text{OD}_{600}=0.01$ 이 되도록 접종하여 37℃에서 200rpm으로 12시간 동안 배양하였다. 그 뒤, 2시간 간격으로 600nm 파장에서의 흡광도를 통해 세포 성장을 측정하였다.
- [0049] 다양한 농도의 이소부탄올에서 대장균 *E. coli* BL21(DE3) 및 *E. coli* MG1655(DE3)를 배양한 결과, 전반적으로 이소부탄올 농도가 높아질수록 대장균의 생장이 둔화되는 것을 확인할 수 있었다. 1%(v/v)의 이소부탄올 농도에서는 균의 생장이 완전히 저해(lethal)되는 반면, 0.75%(v/v) 이소부탄올 농도에서는 미약한 균의 성장(sub-lethal)을 관찰할 수 있었다. 따라서 0.75%(v/v)를 이소부탄올 내성 균주를 개발하기 위한 적정 이소부탄올 농도로 설정하였다(도 1).
- [0050] <실시예 2> 진화공학을 이용한 이소부탄올 내성 균주 제작
- [0051] 상기 실시예 1에서 정해진 이소부탄올 0.75%(v/v)에서 *E. coli* BL21(DE3)와 *E. coli* MG1655(DE3) 균주를 12시간마다 연속 배양하여 대장균 최대성장 $\text{OD}_{600}=1.5$ 가 되는 시점에서 이소부탄올 농도를 0.75에서 1.2%(v/v)까지 서서히 높여가며 연속배양을 실시하였다. 이를 위해, 0.75%(v/v)의 이소부탄올을 첨가한 LB(Luria-Bertani)배지에 세포농도 $\text{OD}_{600}=0.01$ 이 되도록 접종하여 37℃에서 200rpm으로 12시간 동안 배양하였고, 12시간뒤 배양액으로부터 초기 세포농도를 $\text{OD}_{600}=0.01$ 이 되도록 새로운 LB배지에 접종하여 다시 37℃, 200rpm에서 배양하였다. 이를

계속 반복하며 이소부탄을 농도를 1.2%까지 증가시켰으며, 50mL 튜브에 10mL working volume으로 실험을 진행하였다.

[0052] 또한, 12시간 연속배양을 하는 동안, 새로운 배지에 transfer를 하기 위한 세포배양액의 일부(aliquot)을 취하여 셀 스톡(cell stock)을 제작하였다. Transfer별 세포를 다시 키운 뒤, 1.2%(v/v)의 이소부탄을 첨가한 LB 배지에 세포 농도 OD₆₀₀=0.01이 되도록 접종하여 37°C에서 200rpm으로 12시간 동안 배양하였고, 2시간 간격으로 600nm 파장에서 흡광도를 측정하여 세포 생장을 분석하였다.

[0053] 도 2 및 3에 나타난 바와 같이, 최대 1.2%(v/v) 이소부탄을 농도에서 내성을 지니는 돌연변이 균주 *E. coli* BL21(DE3)_TI133와 *E. coli* MG1655_TI136를 획득하였다(도 2, 도 3a, 3b).

[0054] 또한, 획득된 이소부탄을 내성 돌연변이 *E. coli* BL21(DE3)_TI133와 *E. coli* MG1655_TI136는 다양한 이소부탄을 조건에서도 잘 성장하는 균주임을 확인할 수 있었다(도 3c, d).

[0055] <실시예 3> 최종 선별된 이소부탄을 내성 균주의 유전적 안정성 평가

[0056] 진화공학을 통하여 제작된 내성 돌연변이 균주는 일시적인 표현형(phenotype)에 의한 이소부탄을 내성이 아니라 진화에 의한 유전적 변이의 결과로써 내성을 가짐을 증명하기 위하여 균주의 안정성 평가를 실시하였다. 이를 위해, 이소부탄이 없는 10mL LB 배지에서 28회 transfer(약 100세대)하여 키운 후, 진화 균주를 1.0, 1.1 및 1.2%(v/v) 이소부탄을 농도에서 37°C, 200rpm 조건으로 16시간 배양하여 성장률을 계산하였다.

[0057] 그 결과, 성장률이 0.4 - 0.5 h⁻¹ 사이로 측정되었다(도 4). 그리하여, 돌연변이 균주는 유전적 변이에 의한 이소부탄을 내성임을 확인할 수 있었다.

[0058] <실시예 4> 진화공학으로 내성 증가된 돌연변이의 전사체 분석

[0059] 이소부탄이 있는 조건에서 모균주와 돌연변이 균주를 4시간 동안 키운 후 총 RNA를 분리하여 DNALink(<http://www.dnalink.com>)에 전사체 분석을 의뢰하였다. DEGs(Differentially expressed genes) 데이터를 분석하여 돌연변이 균주인 *E. coli* BL21(DE3)_TI133와 *E. coli* MG1655_TI136에서 모균주보다 발현량이 공통적으로 2배 이상 차이가 나는 상향조절된 유전자 30개와 하향조절된 유전자 74개를 선별하였다(표 1 및 표 2). 이 중, 유전자 기능을 고려하여 최종적으로 이소부탄을 내성에 밀접한 연관이 있을 거라고 예상되는 17개의 상향조절된 유전자를 선별하였다(도 5).

표 1

이소부탄을 내성 돌연변이 균주들에서 공통적으로 상향조절된 유전자 목록

gene	Function	<i>E. coli</i> BL21(DE3)_TI133		<i>E. coli</i> MG1655(DE3)_TI136	
		Fold Change	p-value	Fold Change	p-value
uidA	Beta-glucuronidase	5.10	0.012	2.66	0.0392
putA	Bifunctional protein PutA	4.01	0.018	5.18	0.016
acs	Acetyl-coenzyme A synthetase	4.00	0.019	6.92	0.007
ycdI	Uncharacterized HTH-type transcriptional regulator YcdI	3.98	0.049	3.75	0.006
ymgA	Probable two-component-system connector protein YmgA	3.95	0.004	3.96	0.012
ytkK	Uncharacterized protein YtkK	3.94	0.001	2.09	0.023
gltI	Glutamate aspartate import solute-binding protein	3.82	0.039	2.57	0.038
fadB	Fatty acid oxidation complex subunit alpha	3.67	0.030	3.66	0.000
argT	Lysine/arginine-ornithine-binding periplasmic protein	3.60	0.016	4.23	0.000
betI	HTH-type transcriptional regulator BetI	3.49	0.012	3.98	0.001
csiD	Protein CsiD	3.43	0.001	3.19	0.002
dppC	Dipeptide transport system permease protein DppC	3.40	0.020	3.78	0.001
fadD	Long-chain-fatty-acid-CoA ligase	3.31	0.045	3.51	0.014
fadH	2,4-dienoyl-CoA reductase	3.29	0.036	4.60	0.036
ylaC	Inner membrane protein YlaC	3.18	0.001	2.23	0.028
glcG	Protein GlcG	3.01	0.027	2.36	0.016
fadL	Long-chain fatty acid transport protein	3.00	0.024	3.78	0.007
ydcT	Uncharacterized ABC transporter ATP-binding protein YdcT	2.84	0.012	2.55	0.011
cpxB	Periplasmic protein CpxP	2.77	0.015	3.05	0.008
gabD	Succinate-semialdehyde dehydrogenase [NADP(+)] GabD	2.65	0.002	2.68	0.014
ycgZ	Probable two-component-system connector protein YcgZ	2.61	0.008	3.60	0.012
dppB	Dipeptide transport system permease protein DppB	2.57	0.047	3.34	0.023
yeaR	Submitted name: DUF1971 domain-containing protein	2.52	0.010	3.51	0.012
msrB	Peptide methionine sulfoxide reductase MsrB	2.44	0.012	2.39	0.015
spy	Periplasmic chaperone Spy	2.32	0.047	4.19	0.007
fadA	3-ketoacyl-CoA thiolase FadA	2.20	0.011	3.33	0.005
ydiE	Uncharacterized protein YdiE	2.18	0.043	3.05	0.026
lhgO	L-2-hydroxyglutarate oxidase LhgO	2.09	0.042	2.97	0.011
puuA	Gamma-glutamylputrescine synthetase PuuA	2.06	0.016	3.27	0.001
gabT	4-aminobutyrate aminotransferase GabT	2.04	0.038	2.37	0.019

[0060]

표 2

이소부탄을 내성 돌연변이 균주들에서 공통적으로 하향조절된 유전자 목록

gene	Function	<i>E. coli</i> BL21(DE3) T1133		<i>E. coli</i> MG1655(DE3) T1136	
		Fold Change	p-value	Fold Change	p-value
<i>hcr</i>	NADH oxidoreductase HCR	2.01	0.021	2.56	0.017
<i>ydhY</i>	Uncharacterized ferredoxin-like protein YdhY	2.03	0.009	2.87	0.003
<i>upp</i>	Uracil phosphoribosyltransferase	2.09	0.007	3.35	0.005
<i>hupA</i>	DNA-binding protein HU- α	2.14	0.005	2.63	0.014
<i>yeeX</i>	UPF0265 protein YeeX	2.15	0.015	2.19	0.041
<i>garP</i>	Probable galactarate transporter	2.16	0.004	2.12	0.022
<i>ydhV</i>	Uncharacterized oxidoreductase YdhV	2.16	0.018	3.19	0.002
<i>dmsC</i>	Anaerobic dimethyl sulfoxide reductase chain C	2.18	0.003	4.59	0.000
<i>nikR</i>	Nickel-responsive regulator	2.18	0.021	2.91	0.006
<i>ydeN</i>	Uncharacterized sulfatase YdeN	2.20	0.021	3.04	0.019
<i>yisS</i>	UPF0381 protein YisS	2.21	0.010	3.22	0.006
<i>caiF</i>	Transcriptional activatory protein CaiF	2.22	0.006	2.67	0.008
<i>tdcD</i>	Propionate kinase	2.22	0.008	3.43	0.012
<i>nagA</i>	Periplasmic nitrate reductase	2.24	0.019	2.84	0.007
<i>manY</i>	PTS system mannose-specific EIIC component	2.30	0.015	4.07	0.005
<i>yfjA</i>	ATP-dependent 6-phosphofructokinase isozyme 1	2.31	0.015	2.32	0.031
<i>wrlA</i>	NAD(P)H dehydrogenase (quinone)	2.33	0.012	2.47	0.043
<i>ynfH</i>	Anaerobic dimethyl sulfoxide reductase chain YnfH	2.36	0.006	2.64	0.013
<i>ynfA</i>	Cytochrome c-552	2.37	0.004	2.35	0.031
<i>yfjZ</i>	UPF0381 protein YfjZ	2.37	0.007	2.70	0.005
<i>tdcB</i>	L-threonine dehydratase catabolic TdcB	2.38	0.009	4.93	0.025
<i>yhbV</i>	Uncharacterized protein YhbV	2.41	0.002	3.62	0.000
<i>rncC</i>	Non-specific ribonuclease hydrolase RncC	2.43	0.003	2.04	0.050
<i>gnd</i>	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	2.45	0.009	2.35	0.049
<i>cadA</i>	Inducible lysine decarboxylase	2.47	0.008	2.73	0.013
<i>srIB</i>	PTS system glucitol/sorbitol-specific EIIA component	2.51	0.012	3.00	0.006
<i>gadC</i>	Probable glutamate/gamma-aminobutyrate antiporter	2.60	0.019	2.74	0.017
<i>exuI</i>	Hexuronate transporter	2.62	0.032	3.77	0.005
<i>yjyO</i>	Hydrogenase-2 small chain	2.62	0.045	3.02	0.015
<i>dcuC</i>	Anaerobic C4-dicarboxylate transporter DcuC	2.63	0.001	3.19	0.006
<i>mdtE</i>	Multidrug resistance protein MdtE	2.66	0.002	2.77	0.005
<i>tdcG</i>	L-serine dehydratase TdcG	2.67	0.001	2.96	0.030
<i>yjzZ</i>	Putative selenoprotein YjzZ	2.69	0.007	3.83	0.001
<i>dmsB</i>	Anaerobic dimethyl sulfoxide reductase chain B	2.73	0.000	4.55	0.000
<i>tdcF</i>	Putative reactive intermediate deaminase TdcF	2.75	0.002	4.04	0.000
<i>rpsE</i>	50S ribosomal protein L31	2.78	0.007	3.41	0.003

[0061]

[0062]

<실시예 5> 발굴된 유전인자의 이소부탄을 내성 검증

[0063]

상기 실시예 4에서 선별한 상향조절된 유전자들을 pET21(a) 벡터에서 과발현 되도록 삽입하여 *E. coli* BL21(DE3)에 형질전환하고, 형질전환된 17개의 균주를 pET21(a) 공벡터가 삽입된 대조균 균주와 함께 1%(v/v)의 이소부탄올이 들어가 있는 LB 배지에서 배양하여 세포 성장을 관찰하였다.

[0064]

구체적으로, 상향조절된 17개의 후보유전자를 획득하기 위하여 특정 프라이머를 이용하여 PCR(Polymerase Chain Reaction)을 진행하였다(표 3). PCR 산물과 pET21(a) 벡터는 제한효소 절단 후 T4 리가아제를 이용해 후보유전자들을 pET21(a)에 삽입하여 재조합 플라스미드를 제작하였다. 그 뒤, 각각의 재조합 플라스미드를 *E. coli* BL21(DE3)에 형질전환시켜 각각의 유전자를 과발현할 수 있는 균주들을 제작하였다. 이소부탄올 스트레스에 대한 내성 테스트를 위하여, 각각의 형질전환된 균주들을 100mL의 LB 배지에 배양하였고 세포농도가 OD₆₀₀=0.5에 도달하면 이소부탄올 농도가 1%(v/v)가 되도록 넣어 주었고, 동시에 유전자 과발현을 위하여 0.1mM IPTG를 넣어 준 뒤 37℃, 200rpm 조건으로 12시간 배양하였다. 끝으로, 세포생장의 측정을 위하여 2시간 간격으로 흡광도(OD₆₀₀)를 측정하였다.

표 3

[0065]

본 발명에서 사용한 균주, 플라스미드 및 프라이머 목록

<i>E. coli</i> 균주	설명	참고문헌
K12	Wild type, source of targeted genes	Blattner et al., 1997
DH5 α	A Hoffman-Berling 1100 strain derivative (Meselson68)	Invitrogen
BL21(DE3)	<i>E. coli</i> B strain with DE3, a ϕ prophage carrying the T7 RNA polymerase gene and lacI ^q	RBC Bioscience
MG1655(DE3)	Wild type K-12 strain with DE3, a ϕ prophage carrying the T7 RNA polymerase gene and lacI ^q	Addgene
JK209	<i>E. coli</i> BL21(DE3) harboring pJK01 and pJK02	본 발명
플라스미드		
pET21a(+)	T7 lac promoter, T7 terminator, bacterial origin (ori) and Amp ^R	Novagen

pJK01	pCDFDuet-1 carrying <i>alsS</i> and <i>ilvD</i> genes; Sm ^R	본 발명
pJK02	pET28a carrying <i>ilvC</i> , <i>kivD</i> , and <i>adhP</i> genes; Kan ^R	본 발명
삽입된 유전자 및 서열	<i>fadB</i> , <i>dppC</i> : 각각 SEQ ID NOS: 1 및 2에 기재된 염기서열 <i>alsS</i> , <i>ilvD</i> , <i>ilvC</i> , <i>kivD</i> , <i>adhP</i> : 각각 SEQ ID NOS: 3 내지 7에 기재된 염기서열	
프라이머	염기서열(5'-3')	
uidA_F uidA_R putA_F putA_R acs_F acs_R gluI_F gluI_R fadB_F fadB_R argT_F argT_R csiD_F csiD_R dppC_F dppC_R fadD_F fadD_R fadH_F fadH_R ylaC_F ylaC_R cpxP_F cpxP_R gabD_F gabD_R dppB_F dppB_R yeaR_F yeaR_R spy_F spy_R fadA_F fadA_R puuA_F puuA_R gabT_F gabT_R	GACAAGCTTATGTTACGTCCTGTAGAAACCCC TGACTCGAGTCATTGTTTGCCTCCCTG GACAAGCTTATGGGAACCACCACCATG TGACTCGAGTTAACCTATAGTCATTAAGCTGGCG TGAGGATCCATGAGCCAAATTCACAAACACA GACAAGCTTTTACGATGGCATCGCGATA TACGGATCCATGCAATTACGTAACCTGCC TCAAAGCTTTTAGTTCAAGTGCCTTGTCATTG TATGGATCCATGCTTTACAAAGGCGACACC GATAAGCTTTTAAGCCGTTTTCAGGTCG CACGGATCCATGAAGAAGTCGATTCTCGCTC GATCTCGAGTCAGTCACCGTAGACATTAAGTCG CTAGGATCCATGAATGCACTGACCGCC CGTAAGCTTTTACTGATGCGTCTGCTAGTGG CGTGGATCCATGTCACAGTTACTGAAAATAAAGTG GATAAGCTTTTACTGCTTCAGTTGGGATCG CTAGGATCCCTGAAGAAGGTTTGGCTTAACC CGTAAGCTTTCAGGCTTTATTGTCCACTTTG CGTAAGCTTATGAGCTACCCGTCGCTG GAACTCGAGTTAAATCTCCAGCGCCAGC CTAGGATCCATGACCGAAATACAACGCCT CGTAAGCTTTTAAGATGTTGATTGCGCGC CTAGGATCCATGCGCATAGTTACCGCTG CGTAAGCTTCTACTGGGAACGTGAGTTGCTAC CTAGGATCCATGAACTTAACGACAGTAACCTATTC GAACTCGAGTTAAAGACCGATGCACATATATT CTAGGATCCATGTTGCAGTTTATTCTCCGAC CGTAAGCTTTTACTTCTTATGACGAATACGCG CTAGGATCCATGCTTCAAATCCACAGAATT CGTAAGCTTTCATTCCCGTTATGAATGACTT CTAGGATCCATGCGTAAATTAAGTCACTGTTT CGTAAGCTTTTATTACGAGTTGACAGCA CTAGGATCCATGGAACAGGTTGTCATTGTCG CGTAAGCTTTTAAACCCGCTCAAACACC CTAGGATCCATGGAAACCAATATCGTTGAAGTAG CGTAAGCTTTTACGCGTTTTCACATCC CTAGGATCCATGAACAGCAATAAAGAGTTAATGCA CGTAAGCTTCTACTGCTTCGCCTCATCAAA	본 발명
Underlines indicate restriction sites of HindIII, AAGCTT; XhoI, CTCGAG; and BamHI, GGATCC		

[0066] 그 결과, *acs*, *fadB*, *csiD*, *fadH*, *argT*, *dppC* 6개의 유전자가 이소부탄을 내성인자임을 확인할 수 있었다(도 6).

[0067] <실시예 6> 내성인자 이용한 이소부탄올의 생산증대

[0068] 상기 실시예 5에서 선별한 6개의 유전자 중 이소부탄을 내성에 가장 효과가 큰 4개의 유전자(*acs*, *fadB*, *csiD*, *dppC*)를 이소부탄을 생산균주인 *E. coli* JK209에 적용하여 이소부탄올 발효를 실시하였다(표 3). 구체적으로, 실시예 5의 이소부탄을 내성실험에 사용된 내성인자(*acs*, *fadB*, *csiD*, *dppC*)가 삽입된 재조합 플라스미드를 이

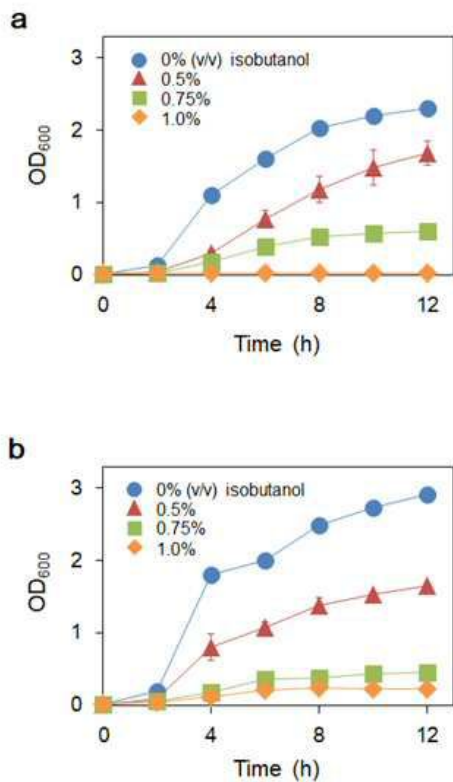
소부탄을 생산균주인 *E. coli* JK209(표 3 참조)에 각각 형질전환하여 이소부탄을 발효실험을 하였다. 이를 위해 사용된 배지는 Glucose(20 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (2 g/L), Yeast extract(20 g/L), Casein peptone(3 g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (10 g/L), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (3 g/L), KH_2PO_4 (3 g/L), NaCl(0.5 g/L)의 조성으로 제작되었다. 각각의 형질 전환된 균주들을 위 배지에 배양하였고 세포농도가 $\text{OD}_{600}=0.5$ 에 도달하면 유전자들의 과발현을 위하여 0.1mM IPTG를 넣어준 뒤 37℃, 200rpm 조건으로 48시간 동안 배양하였다. 끝으로, 이소부탄을, 글루코스, 에탄올, 아세테이트, 락테이트 농도는 HPLC를 이용하여 분석 및 정량하였으며, 세포생장은 흡광도(OD_{600})를 측정하여 분석하였다.

[0069]

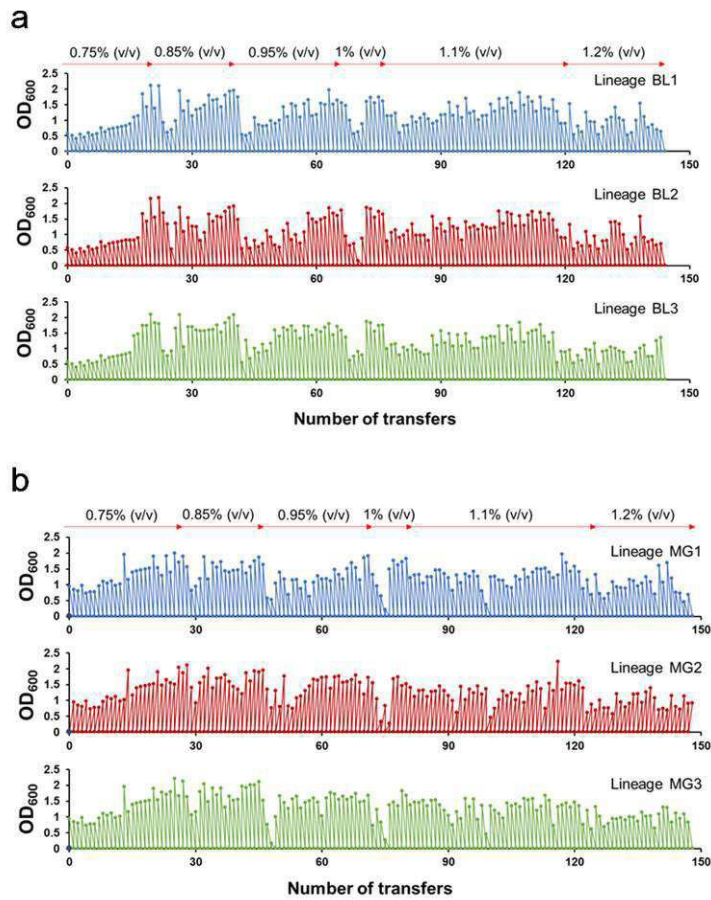
그 결과, 공백터가 들어간 대조군 균주의 이소부탄을 최대 생산량은 0.752 g/L였으며, *fadB* 및 *dppC*가 각각 삽입된 균주의 이소부탄을 최대 생산량 1.099 g/L 및 1.035 g/L으로, 1.5배 및 1.4배가 증가됨을 확인하였다(도 7). 그러나, *acs* 및 *csid*가 삽입된 균주의 이소부탄을 최대생산량은 평균 0.77 g/L로 대조군 균주와 큰 차이가 없었다.

도면

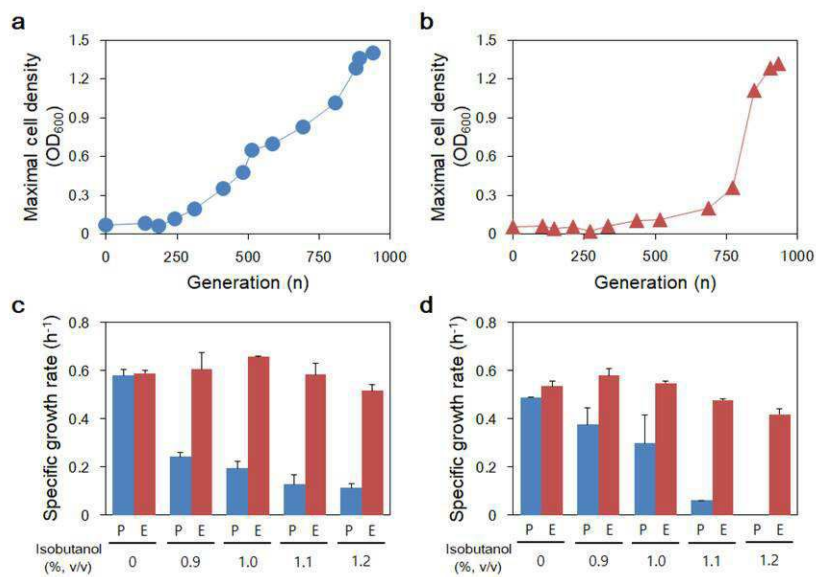
도면1



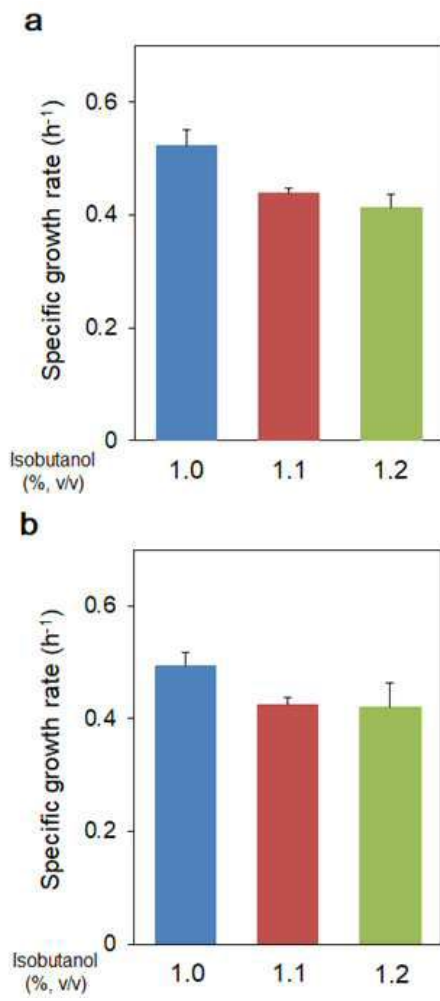
도면2



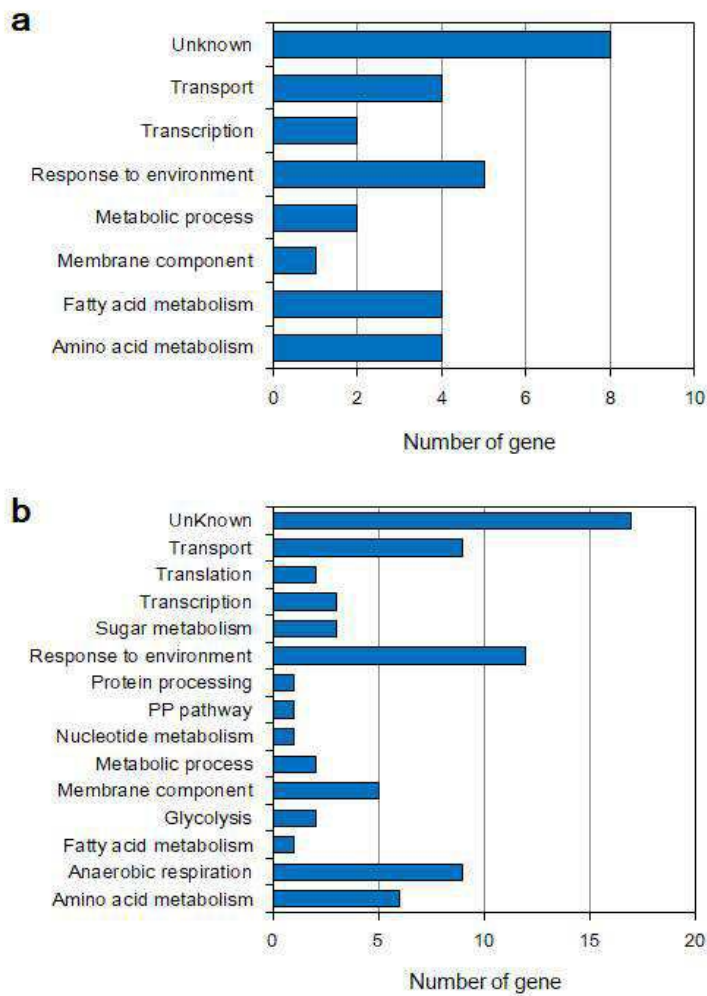
도면3



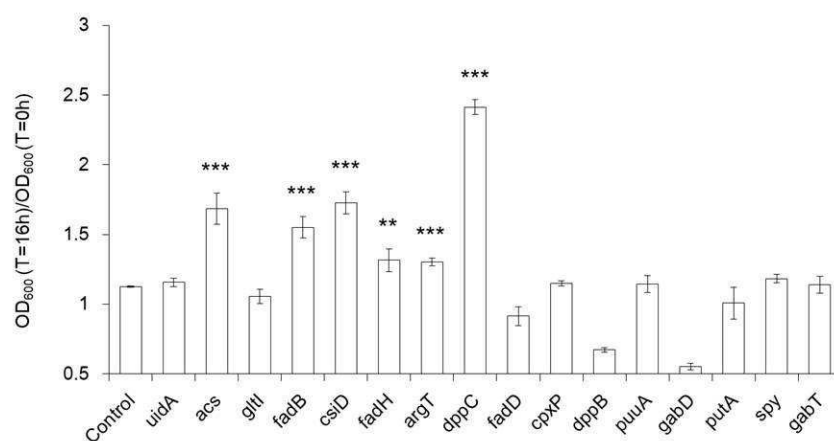
도면4



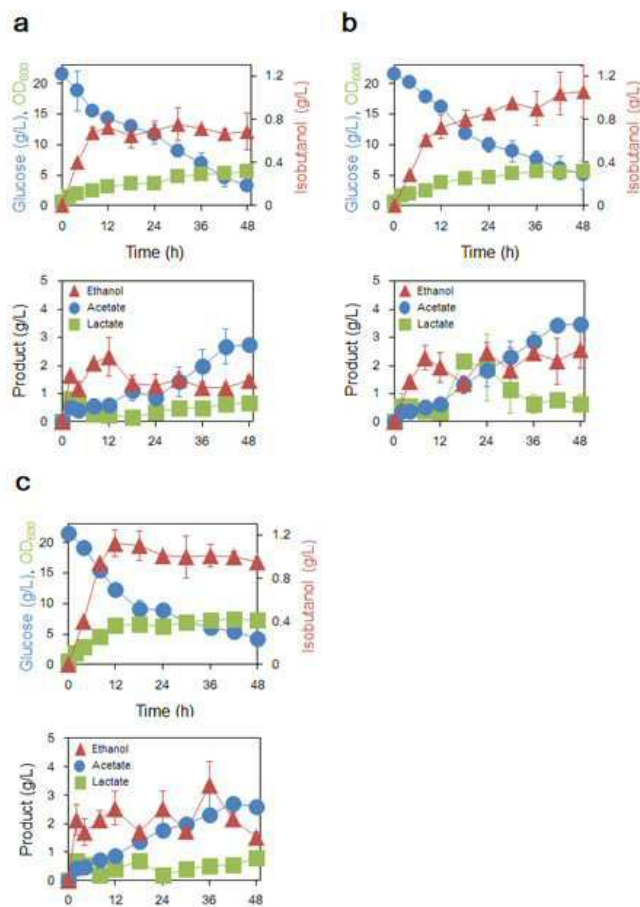
도면5



도면6



도면7



서열 목록

<110>	KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION	
<120>	Novel genes responsible for isobutanol tolerance and use thereof	
<130>	P19U13C0836	
<160>	7	
<170>	KoPatent In 3.0	
<210>	1	
<211>	2190	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	fadB gene	
<400>	1	
atgctttaca aaggcgacac cctgtacctt gactggctgg aagatggcat tgccgaactg		60
gtatttgatg cccaggttc agttaataaa ctgcacactg cgaccgtcgc cagcctcggc		120

gaggccatcg gcgtgctgga acagcaatca gatctaaaag ggctgctgct gcgttcgaac 180

aaagcagcct ttatcgctcg tgctgatatc accgaatctt tgtccctgtt cctcgttcct 240

gaagaacagt taagtcagtg gctgcacttt gccaatagcg tgtttaatcg cctggaagat 300

ctgccggtgc cgaccattgc tgccgtcaat ggctatgcgc tgggcggtgg ctgcgaatgc 360

gtgctggcga ccgattatcg tctggcgacg ccggatctgc gcatcggtct gccggaaacc 420

aaactgggca tcatgcctgg ctttggcggg tctgtacgta tgccacgtat gctgggcgct 480

gacagtgcgc tggaaatcat tgccgccggg aaagatgtcg gcgcggatca ggcgctgaaa 540

atcggctctgg tggatggcgt agtcaaagca gaaaaactgg ttgaaggcgc aaaggcggtt 600

ttacgccagg ccattaacgg cgacctcgac tggaaagcaa aacgtcagcc gaagctggaa 660

ccactaaaac tgagcaagat tgaagccacc atgagcttca ccatcgctaa agggatggtc 720

gcacaaacag cggggaaaca ttatccggcc cccatcaccc cagtaaaaac cattgaagct 780

gcggcccgtt ttggtcgtga agaagcctta aacctggaaa acaaaagttt tgtcccgtg 840

gcgcatacca acgaagcccg cgactgggtc ggcatcttcc ttaacgatca atatgtaaaa 900

ggcaaagcga agaaactcac caaagacgtt gaaaccccg aacaggccgc ggtgctgggt 960

gcaggcatta tgggcggcgg catcgcttac cagtctgcgt ggaaaggcgt gccggttgct 1020

atgaaagata tcaacgacaa gtcgttaacc ctccgcatga ccgaagccgc gaaactgctg 1080

aacaagcagc ttgagcgcgg caagatcgat ggtctgaaac tggctggcgt gatctccaca 1140

atccacccaa cgctcgacta cgccggattt gaccgcgtgg atattgtggt agaagcggtt 1200

gttgaaaacc cgaaagtga aaaagccgta ctggcagaaa ccgaacaaaa agtacgccag 1260

gataccgtgc tggcgtctaa cacttaacc attcctatca gcgaactggc caacgcgtg 1320

gaacgcccg aaaacttctg cgggatgcac ttctttaacc cggccaccg aatgccgttg 1380

gtagaaatta ttcgcggcga gaaaagctcc gacgaaacca tcgcgaaagt tgtcgcttg 1440

gcgagcaaga tgggcaagac gccgattgtg gttaacgact gccccggtt ctttgttaac 1500

cgctgctgt tcccgtatct cgccggtttc agccagctgc tgcgcgacgg cgcggtttc 1560

cgcaagatcg acaaagtgat ggaaaaacag ttggctggc cgatgggccc ggcatactg 1620

ctggacgttg tgggcattga taccgcgat cacgtcagg ctgtcatggc agcaggcttc 1680

ccgcagcgga tgcagaaaga ttaccgcgat gccatcgacg cgctgtttga tgccaaccgc 1740

tttggtcaga agaacggcct cggtttctgg cgttataaag aagacagcaa aggtagccg 1800

aagaaagaag aagacgccgc cgttgaagac ctgctggcag aagttagcca gccgaagcgc 1860

gatttcagcg aagaagagat tatcggccgc atgatgatcc cgatggtcaa cgaagtgggtg 1920

cgctgtctgg aggaaggcat tatcgccact ccggcggaag cggatatggc gctgggtctac 1980
ggcctgggct tccctccgtt ccacggcggc gcgttccgt ggctggacac cctcggtagc 2040
gcaaaatacc tcgatatggc acagcaatat cagcacctcg gcccgtgtga tgaagtgccg 2100
gaaggtctgc gtaataaagc gcgtcataac gaaccgtact atcctccggt tgagccagcc 2160
cgtccggttg gcgacctgaa aacggcttaa 2190

<210> 2
<211> 903
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> dppC gene

<400> 2

atgtcacagg ttactgaaaa taaagtgatt agcgcaccgg tgccgatgac cccgttacag 60
gagttctggc actattttaa acgcaacaaa ggcgcggtcg tcgggctggt ttacgtcgtc 120
atcgtgctgt tcatcgcat ctttgccaac tggattgcac cctataaccc ggcggaacag 180
ttccgcgatg cactgctcgc cccgccagcc tggcaggaag gcggcagcat ggcgcaactg 240
ctgggcaccg atgacgtagg ccgtgatgtg ctgtcgcgcc tgatgtacgg tgcgcgcctg 300
tcgtgctgg ttggctgtct ggtagttgtg ttatcgctga ttatgggcgt tattctcggc 360

ctgatcgccg gttactttgg cggcctggtc gataacatca ttatgcgcgt ggtcgatadc 420
atgttggcgc tgccaagtct gctgctggcg ctggtgctgg tggcaatttt cggcccgtcg 480
attggtaacg ccgcgtggc actgaccttc gttgccttgc cgactatgt gcgcttaacc 540
cgcgccgccg tgctggtgga agttaaccgc gattacgtca ccgcgtctcg cgtggcgggt 600
gccggggcga tgcgtcagat gtttattaac atcttccga actgccttgc gccgctgatt 660
gttcaggcgt cgctcggttt ctctaaccgc attctcgata tggtctctct tggtttctc 720
ggcatggggg cacagccgcc aacgcctgag tggggcacca tgctctccga cgtgttcag 780

ttcgcgcaaa gcgcctgggt ggtcgtgacc ttcccgggtc tggcgatcct gctgacggtg 840
ctggcattta acctgatggg tgacggtctg cgtgacgcgc tcgatccaa actgaagcag 900
taa 903

<210> 3
<211> 1713
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> alsS gene

<400> 3

ttgacaaaag caacaaaaga acaaaaatcc cttgtgaaaa acagaggggc ggagcttggt	60
gttgattgct tagtggagca aggtgtcaca catgtatttg gcattccagg tgcaaaaatt	120
gatgcggtat ttgacgcttt acaagataaa ggacctgaaa ttatcgttgc ccggcacgaa	180
caaaacgcag cattcatggc ccaagcagtc ggccgtttta ctggaaaacc gggagtcgtg	240
ttagtcacat caggaccggg tgcctctaac ttggcaacag gcctgctgac agcgaacact	300
gaaggagacc ctgtcgttgc gcttgcctga aacgtgatcc gtgcagatcg tttaaaacgg	360
acacatcaat ctttggataa tgcggcgcta ttccagccga ttacaaaata cagtgtagaa	420
gttcaagatg taaaaaatat accggaagct gttacaaatg catttaggat agcgtcagca	480
gggcaggctg gggccgcttt tgtgagcttt ccgcaagatg ttgtgaatga agtcacaaat	540
acgaaaaacg tgcgtgctgt tgcagcgcca aaactcggtc ctgcagcaga tgatgcaatc	600
agtgccgcca tagcaaaaat ccaaacagca aaacttcctg tcgttttggt cggcatgaaa	660
ggcgggaagac cggaagcaat taaagcgggt cgcaagcttt tgaaaaaggt tcagcttcca	720
tttgttgaaa catatcaage tgcgggtacc ctttctagag atttagagga tcaatatatt	780
ggccgctatcg gtttgttccg caaccagcct ggcgatttac tgctagagca ggcagatgtt	840
gttctgacga tcggctatga cccgattgaa tatgatccga aattctggaa tatcaatgga	900
gaccggacaa ttatccattt agacgagatt atcgtgaca ttgatcatgc ttaccagcct	960
gatcttgaat tgatcggtag cattccgtcc acgatcaatc atatcgaaca cgatgctgtg	1020
aaagtggat ttgcagagcg tgagcagaaa atcctttctg atttaaaaca atatatgcat	1080
gaaggtgagc aggtgcctgc agattggaaa tcagacagag cgcaccctct tgaaatcgtt	1140
aaagagtgc gtaatgcagt cgatgatcat gttacagtaa cttgcgatat cggttcgcac	1200
gccatttggg tgtcacgtta tttccgcagc tacgagccgt taacattaat gatcagtaac	1260
ggtatgcaaa cactcggcgt tgcgttcct tgggcaatcg gcgcttcatt ggtgaaaccg	1320
ggagaaaaag tggtttctgt ctctggtgac ggcggtttct tattctcagc aatggaatta	1380
gagacagcag ttcgactaaa agcaccaatt gtacacattg tatggaacga cagcacatat	1440
gacatggttg cattccagca attgaaaaaa tataaccgta catctgcggt cgatttcgga	1500
aatatcgata tcgtgaaata tgcggaaagc ttccggagcaa ctggcttgcg cgtagaatca	1560
ccagaccagc tggcagatgt tctgcgtcaa ggcatgaacg ctgaaggtcc tgtcatcatc	1620
gatgtcccgg ttgactacag tgataacatt aatttagcaa gtgacaagct tccgaaagaa	1680
ttcggggaac tcatgaaaac gaaagctctc tag	1713

<210> 4

<211> 1851

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ilvD gene

<400> 4

atgcctaagt accgttccgc caccaccact catggtcgta atatggcggg tgctcgtgcg	60
ctgtggcgcg ccaccggaat gaccgacgcc gatttcggta agccgattat cgcggttgtg	120
aactcgttca cccaatttgt accgggtcac gtccatctgc gcgatctcgg taaactggtc	180
gccgaacaaa ttgaagcggc tggcggcggt gccaaagagt tcaacaccat tgcgggtgat	240
gatgggattg ccatgggcca cgggggggatg ctttattcac tgccatctcg cgaactgac	300
gctgattccg ttgagtatat ggtcaacgcc cactgcgccg acgccatggt ctgcattctt	360
aactgcgaca aaatcacccc ggggatgctg atggcttccc tgcgcctgaa tattccggtg	420
atctttgttt ccggcggccc gatggaggcc gggaaaacca aactttccga tcagatcatc	480
aagctcgatc tggttgatgc gatgatccag ggcgagacc cgaaagtatc tgactcccag	540
agcgatcagg ttgaacgttc cgcgtgtccg acctgcggtt cctgctccgg gatgtttacc	600
gctaactcaa tgaactgcct gaccgaagcg ctgggcctgt cgcagccggg caacggctcg	660
ctgctggcaa cccagccga ccgtaagcag ctgttcctta atgctggtaa acgattgtt	720
gaattgacca aacgttatta cgagcaaac gacgaaagt cactgccgcg taatatcgcc	780
agtaaggcgg cgtttgaaaa cgccatgacg ctggatatcg cgatgggtgg atcgactaac	840
accgtacttc acctgctggc ggcggcgcag gaagcggaat tcgacttcac catgagtgat	900
atcgataagc tttcccgcaa ggttccacag ctgtgtaaag ttgcgccgag caccagaaa	960
taccatatgg aagatgttca ccgtgctggt ggtgttatcg gtattctcgg cgaactggat	1020
cgcgcggggt tactgaaccg tgatgtgaaa aacgtacttg gcctgacgtt gccgcaaacg	1080
ctggaacaat acgacgttat gctgaccag gatgacgcgg taaaaaatat gttccgcgca	1140
ggtcctgcag gcattcgtac cacacaggca ttctcgcaag attgccgttg ggatacgtg	1200
gacgacgac gcgccaatgg ctgtatccgc tcgctggaac acgcctacag caaagacggc	1260
ggcctggcgg tgctctacgg taactttgcg gaaaacggct gcacgtgaa aacggcaggc	1320
gtcgatgaca gcatcctcaa attcaccggc ccggcgaaaag tgtacgaaag ccaggacgat	1380
gcggtagaag cgattctcgg cggtaaagtt gtcgccggag atgtgtagt aattcgtat	1440
gaaggccga aaggcgggtc ggggatgcag gaaatgctct acccaaccag cttcctgaaa	1500
tcaatgggtc tcggcaaacg ctgtgcgctg atcaccgacg gtcgtttctc tgggtgcacc	1560

tctggctctt ccacggcca cgtctcaccg gaagcgga ggcggcag cattggcctg	1620
attgaagatg gtgacctgat cgctatcgac atcccgaacc gtggcattca gttacaggta	1680
agcgatgccg aactggcggc gcgtcgtgaa gcgcaggacg ctcgaggta caaagcctgg	1740
acgccgaaaa atcgtgaacg tcaggctctc ttgcccctgc gtgcttatgc cagcctggca	1800
accagcgccg acaaaggcgc ggtgcgcgat aaatcgaaac tgggggggtta a	1851
<210> 5	
<211> 1476	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> ilvC gene	
<400> 5	
atggctaact acttcaatac actgaatctg cgccagcagc tggcacagct gggcaaatgt	60
cgctttatgg gccgcgatga attcgccgat ggcgcgagct accttcaggg taaaaaagta	120
gtcatcgctg gctgtggcgc acagggtctg aaccagggcc tgaacatgcg tgattctggt	180
ctcgatatct cctacgctct gcgtaaagaa gcgattgccg agaagcgcgc gtcctggcgt	240
aaagcgaccg aaaatggttt taaagtgggt acttacgaag aactgatccc acaggcggat	300
ctggtgatta acctgacgcc ggacaagcag cactctgatg tagtgcgac cgtacagcca	360
ctgatgaaag acggcgcgcc gctgggctac tcgcacggtt tcaacatcgt cgaagtgggc	420
gagcagatcc gtaaagatat caccgtagtg atggttgcgc cgaaatgccc aggcaccgaa	480
gtgcgtgaag agtacaaacg tgggttcggc gtaccgacgc tgattgccgt tcacccggaa	540
aacgatccga aaggcgaagg catggcgatt gccaaagcct gggcggtgc aaccggtggt	600
caccgtgcgg gtgtgctgga atcgtccttc gttgcggaag tgaaatctga cctgatgggc	660
gagcaaacca tcctgtgcgg tatgttcag gctggctctc tgctgtgctt cgacaagctg	720
gtggaagaag gtaccgatcc agcatacgca gaaaaactga ttcagttcgg ttgggaaacc	780
atcacgaag cactgaaaca gggcggcac accctgatga tggaccgtct ctctaaccg	840
gcgaaactgc gtgcttatgc gctttctgaa cagctgaaag agatcatggc acccctgttc	900
cagaaacata tggacgacat catctccggc gaattctctt ccggtatgat ggcggactgg	960
gccaacgatg ataagaaact gctgacctgg cgtgaagaga ccggcaaac cgcgtttgaa	1020
accgcgccg agtatgaagg caaaatcggc gagcaggagt acttcgataa aggcgtactg	1080
atgattgcga tggtgaaagc gggcgttgaa ctggcgttcg aaaccatggt cgattccggc	1140
atcattgaag agtctgcata ttatgaatca ctgcacgagc tgccgctgat tgccaacacc	1200

atgccccgta agcgtctgta cgaaatgaac gtggttatct ctgataccgc tgagtacggt 1260
aactatctgt tctcttacgc ttgtgtgccg ttgctgaaac cgtttatggc agagctgcaa 1320
ccggcgacc tgggtaaagc tattccggaa ggcgcggtag ataacgggca actgcgtgat 1380
gtgaacgaag cgattcgcag ccatgcgatt gagcaggtag gtaagaaact gcgcggctat 1440
atgacagata tgaaacgtat tgctgttgcg ggttaa 1476

<210> 6

<211> 1647

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> kivD gene

<400> 6

atgtatacag taggagatta cctattagac cgattacacg agttaggaat tgaagaaatt 60
tttggagtcc ctggagacta taacttacia tttttagatc aaattatttc ccgcaaggat 120
atgaaatggg tcggaatgc taatgaatta aatgcttctt atatggctga tggctatgct 180
cgtactaaaa aagctgccgc atttcttaca acctttggag taggtgaatt gagtgcagtt 240
aatggattag caggaagtta cgccgaaaat ttaccagtag tagaaatagt gggatcacct 300
acatcaaaag tccaaatga aggaaaattt gttcatcata cgctggctga cggtgatatt 360

aaacacttta tgaaatgca cgaacctgtt acagcagctc gaactttact gacagcagaa 420
aatgcaaccg ttgaaattga ccgagtactt tctgcactac taaaagaaag aaaacctgtc 480
tatatcaact taccagtga tggtgtgctt gcaaaagcag agaaccctc actccctttg 540
aaaaaagaaa atccaacttc aaatacaagt gaccaagaga ttttgaataa aattcaagaa 600
agcttgaaaa atgcaaaaa accaatctg attacaggac atgaataat tagctttggc 660
ttagaaaata cagtcactca atttatttca aagacaaaac tccctattac gacattaaac 720
tttgaaaaa gttcagttga tgaaactctc cttcatattt taggaatcta taatggtaaa 780

ctctcagagc ctaatcttaa agaattctgt gaatcagccg acttcatcct gatgcttggg 840
gttaactca cagactcttc aacaggagca ttaccatc atttaaatga aaataaatg 900
atttactga acatagacga aggaaaaata tttacgaaa gcattcaaaa ttttgatttt 960
gaatccctca tctcctctct cttagacctt agcggaatag aatacaaagg aaaatatatc 1020
gataaaaagc aagaagactt tgttccatca aatgcgcttt tatcacaaga ccgcctatgg 1080
caagcagttg aaaacctaac tcaagcaat gaaacaatcg ttgctgaaca agggacatca 1140
ttctttggcg cttcatcaat tttcttaaaa ccaagagtc atttatttgg tcaaccctta 1200

tggggatcaa ttggatatac attcccagca gcattaggaa gccaaattgc agataaagaa 1260
 agcagacacc ttttatttat tggatgatgt tcacttcaac ttacagtgcga agaattagga 1320
 ttagcaatca gagaaaaaat taatccaatt tgctttatta tcaataatga tggttataga 1380
 gtcgaaagag aaattcatgg accaaatcaa agctacaatg atattccaat gtggaattac 1440
 tcaaaattac cagaatcatt tggagcaaca gaagaacgag tagtctcgaa aatcgtaga 1500
 actgaaatg aatttgtgtc tgtcatgaaa gaagctcaag cagatccaaa tagaatgtac 1560
 tggattgagt tagttttggc aaaagaagat gcacaaaag tactgaaaaa aatgggtaaa 1620

ctatttgctg aacaaaataa atcataa 1647

<210> 7

<211> 1011

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> adhP gene

<400> 7

atgaaggctg cagttgttac gaaggatcat catgttgacg ttacgtataa aacactgcgc 60
 tcactgaaac atggcgaagc cctgctgaaa atggagtgtt gtggtgtatg tcataccgat 120
 ctctcatgta agaatggcga ttttggtagc aaaaccggcg taattctggg ccatgaaggc 180
 atcgggtgtg tggcagaagt ggggtccaggt gtcacctcat taaaaccagg cgatcgtgcc 240
 agcgtggcgt ggttctacga aggatgcggt cattgcgaat actgtaacag tggtaacgaa 300

acgctctgcc gttcagttaa aaatgccgga tacagcgttg atggcgggat ggcggaagag 360
 tgcacgtggt tcgccgatta cgcggtaaaa gtgccagatg gtctggactc ggcggcggcc 420
 agcagcatta cctgtgcggg agtcaccacc taaaagccg ttaagctgtc aaaaattcgt 480
 ccagggcagt ggattgctat ctacggtctt ggcggtctgg gtaacctcgc cctgcaatac 540
 gcgaagaatg tctttaacgc caaagtgatc gccattgatg tcaatgatga gcagttaaaa 600
 ctggcaaccg aaatgggcgc agatttagcg attaaactac acaccgaaga cgccgcaaaa 660
 attgtgcagg agaaaactgg tggcgtcac gctgcggtgg taacagcggg agctaaagct 720

gcgtttaact cggcagttga tgctgtccgt gcaggcggtc gtgttgtggc tgcggtcta 780
 ccgccggagt ctatgagcct ggatatccca cgtcttgtgc tggatggat tgaagtggc 840
 ggttcgctgg tcggcacgcg ccaggattta actgaagcct tccagtttgc cgccgaaggt 900
 aaagtgtgc cgaagtgc cctgcgtccg ttagcgga tcaacacat ctttactgag 960
 atggaagaag gcaaaatccg tggccgatg gtgattgatt tccgtcacta a 1011