



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년09월06일  
(11) 등록번호 10-2019280  
(24) 등록일자 2019년09월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 15/70 (2006.01) C12N 15/52 (2006.01)  
C12N 9/02 (2006.01) C12N 9/04 (2006.01)  
C12N 9/96 (2006.01) C12P 7/44 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
C12N 15/70 (2013.01)  
C12N 15/52 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2018-0049113  
(22) 출원일자 2018년04월27일  
심사청구일자 2018년04월27일  
(56) 선행기술조사문헌  
KR101686214 B1\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
울산과학기술원  
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50  
(72) 발명자  
이성국  
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50  
찬드란 사테쉬 프라부  
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50  
(74) 대리인  
제일특허법인(유)

전체 청구항 수 : 총 15 항

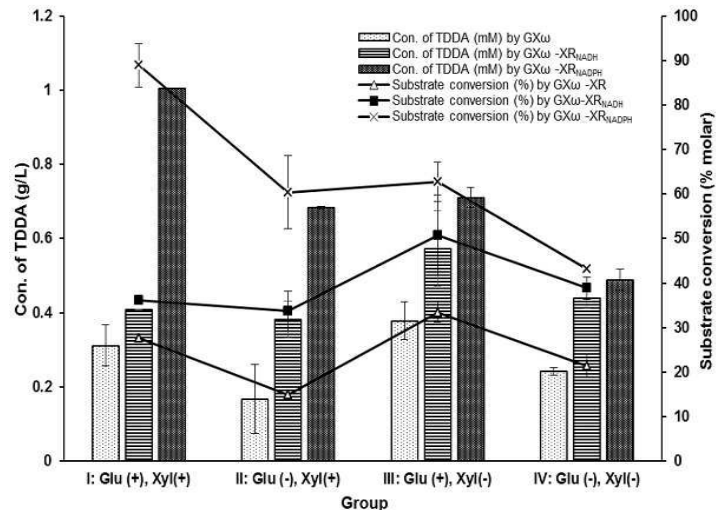
심사관 : 김재현

(54) 발명의 명칭 디카르복실산을 생산하는 형질전환 미생물 및 이를 이용한 디카르복실산 생산방법

(57) 요약

본 발명은 지방산으로부터 디카르복실산을 생산하는 형질전환 미생물 및 이를 이용하여 디카르복실산을 생산하는 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명의 형질전환 미생물은 지방산을 디카르복실산으로 생체 내 변환하는 과정에서 자일로오스 환원효소를 이용하여 자일리톨 변환을 통해 보조인자 재생을 가능하게 함으로써 기존의  $\omega$ -산화경로를 이용한 디카르복실산 생산과정의 문제점을 개선하였다. 또한, 본 발명의 형질전환 미생물은 높은 기질 전환율을 보일 뿐만 아니라 디카르복실산의 생산량이 증가하였다. 따라서, 본 발명의 형질전환 미생물은 디카르복실산을 생산하는데 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

*C12N 9/0006* (2013.01)  
*C12N 9/0042* (2013.01)  
*C12N 9/0071* (2013.01)  
*C12N 9/96* (2013.01)  
*C12P 7/44* (2013.01)  
*C12Y 101/01307* (2013.01)  
*C12Y 106/02004* (2013.01)  
*C12Y 114/14001* (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

|          |                                   |
|----------|-----------------------------------|
| 과제고유번호   | 1395054385                        |
| 부처명      | 농촌진흥청                             |
| 연구관리전문기관 | 농촌진흥청                             |
| 연구사업명    | 차세대바이오그린21(R&D)                   |
| 연구과제명    | 화장품 원료용 디카르복실산 대량 생산 균주 및 생산공정 개발 |
| 기 여 율    | 1/1                               |
| 주관기관     | 울산과학기술원                           |
| 연구기간     | 2018.01.01 ~ 2018.12.31           |

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

시토크롬 P450 모노옥시게나제와 시토크롬 450 환원효소의 결합 유전자(*CYP-NCP*) 및 자일로오스 리덕타아제(*XR*) 유전자가 도입된 형질전환 미생물.

#### 청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 *CYP-NCP* 유전자는 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 갖는 것인, 형질전환 미생물.

#### 청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 *XR* 유전자는 서열번호 2 또는 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 암호화하는 염기서열인 것인, 형질전환 미생물.

#### 청구항 4

제 3항에 있어서,

상기 서열번호 2 또는 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 암호화하는 염기서열은 서열번호 3 또는 서열번호 5로 표시되는 염기서열인 것인, 형질전환 미생물.

#### 청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 미생물이 *fadE* 및 *fadR* 유전자를 녹아웃(knock out)시킨 대장균인 것인, 형질전환 미생물.

#### 청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 미생물이 *AlkL* 유전자를 더 포함하는 것인, 형질전환 미생물.

#### 청구항 7

제 6항에 있어서,

상기 *AlkL* 유전자가 서열번호 6으로 표시되는 염기서열인 것인, 형질전환 미생물.

#### 청구항 8

제 1항에 있어서,

상기 미생물이 *ADH1* 유전자를 더 포함하는 것인, 형질전환 미생물.

#### 청구항 9

제 8항에 있어서,

상기 *ADH1* 유전자가 서열번호 7로 표시되는 염기서열인 것인, 형질전환 미생물.

#### 청구항 10

제 1항에 있어서,

상기 미생물이 *ALD5* 유전자를 더 포함하는 것인, 형질전환 미생물.

#### 청구항 11

제 10항에 있어서,

상기 *ALD5* 유전자가 서열번호 8로 표시되는 염기서열인 것인, 형질전환 미생물.

#### 청구항 12

(a) 제1항의 형질전환 미생물을 배양하고, 휴지기 상태의 미생물을 수확하는 단계; 및

(b) 휴지기 상태의 형질전환 미생물 배양액에  $C_{10}$ ,  $C_{12}$ ,  $C_{14}$ ,  $C_{16}$ ,  $C_{16:1}$ ,  $C_{18}$  및  $C_{18:1}$ 로 이루어진 군으로부터 선택되는 포화 지방산 또는 불포화 지방산을 첨가하는 단계를 포함하는 디카르복실산 생산방법.

#### 청구항 13

제 12항에 있어서,

5-아미노레불린산(aminolevulinic acid, ALA), 티오우레아, 인산 완충액, 항생제, 트윈80, 미량원소 용액 및 이의 조합에서 이루어진 군에서 선택되는 물질을 첨가하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 디카르복실산 생산방법.

#### 청구항 14

제 12항에 있어서,

상기 배양이 25 내지 37℃의 온도에서 이루어지는 것을 특징으로 하는, 디카르복실산 생산방법.

#### 청구항 15

제 12항에 있어서,

상기 배양이 글루코스, 자일로오스 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 보조 기질(co-substrate)의 존재 하에 이루어지는 것을 특징으로 하는, 디카르복실산 생산방법.

### 발명의 설명

#### 기술 분야

[0001] 본 발명은 지방산으로부터 디카르복실산을 생산하는 형질전환 미생물 및 이를 이용하여 디카르복실산을 생산하는 방법에 관한 것이다.

#### 배경 기술

[0002]  $\alpha$ ,  $\omega$ -디카르복실산(dicarboxylic acid, DCA)은 일반적으로  $HOOC-(R)_n-COOH$ 로 표시되고, 말단에  $\omega$ -산화적 기능화된 카복실산으로 폴리아미드, 폴리우레탄, 또는 폴리에스테르의 구성요소로 사용되는 기능성 유기 화합물이다. 또한, DCA는 향료, 접착제, 보존제, 윤활제, 및 치료제로서 직접적인 상업적 응용을 갖는다. DCA는 석유화학물질, 식물성 오일 및 동물성 지방으로부터 생산할 수 있다.

[0003] 하지만, 석유화학물질로부터 DCA를 생산하기 위한 통상적인 화학적 전환공정은 몇 가지 환경적 문제 및 제한을 받는다. 반면, 식물성 오일 및 동물성 지방으로 발견되는 지방산(fatty acid, FA)은 DCA를 포함하는 다양한 화학물질 생산을 위한 기질로 고려될 수 있다. 그러나, 화학적 촉매반응에 의한 FA의 말단에 산화적 기능화는 공정과 관련하여 에너지 요구 및 가혹한 반응 조건, 많은 부산물의 생성, 선택성 및 위치특이성 달성의 어려움과 같은 제한 때문에 널리 실시되지 않고 있다.

[0004] 한편, 미생물을 이용한 생물학적 공정은 비용의 효율성, 증가된 생체촉매 안정성, 세포 대사를 통한 보조인자의 동시적 작용, 및 높은 산물 농도 등의 장점으로 인해 DCA의 생산에 이용되고 있다. DCA의 생산을 위한 생물학적 공정은 환경친화적 산화제로서 분자 산소를 사용하는 FA의 사이토크롬 P450(CYP450) 모노옥시게나제-촉매의 말단 산화적기능화 및 생성된 하이드록시-FA의 DCA로의 산화를 통해 진행된다. 화학적 공정과 비교하였을 때, 환경 친화적이고 비용적 측면에서 효율적인 대안이 될 수 있다. 그러나, 기질 및 산소 접근성, 기질 및 산물에 관

려된 독성 및 공정 저해, 및 보조인자를 재생하는 세포의 능력을 포함하는 몇 가지 인자가 생물학적 공정 과정에서 CYP450-촉매의 반응의 효율에 영향을 미친다.

[0005] 본 발명자들은 CYP450 촉매반응으로부터 출발하여 이중의  $\omega$ -산화경로의 발현에 의해 FA로부터 도데칸디오산(DDDA) 또는 테트라테칸디오산(TDDA)과 같은 긴-사슬의  $\alpha$ ,  $\omega$ -DCA를 생산하는 형질전환된 대장균 균주에 대해 연구한 바 있다(대한민국 출원특허 제2015-0089300호). 상기 형질전환된 대장균 균주의 대사경로에서는 모노옥시게나제 CYP153A 및 사이토크롬 P450 산화환원효소 도메인으로 구성되는 융합 단백질에 의해 FA의  $\omega$ -탄소에서 메틸기가 하이드록실기로 먼저 산화된다. 생성된 하이드록실기는 NAD-의존성 알코올 데하이드로게나제(ADH)에 의해 옥소기로 산화되고, 최종적으로 NAD-의존성 알데하이드 데하이드로게나제(ALD)에 의해 카복실기로 산화되어,  $\alpha$ ,  $\omega$ -DCA를 생산한다.

[0006] 하지만, 상기 디카르복실산을 생산하는 형질전환된 대장균(RE $\omega$ )은 C<sub>12</sub>-FA 및 C<sub>14</sub>-FA에서 각각 14% 및 36%의 낮은 기질 전환 효율을 나타낸다. 또한, RE $\omega$ 에 구축된  $\omega$ -산화경로는 NADP(H) 및 NAD(H)의 산화 또는 환원 형태의 다른 보조인자가 필요하고, FA에서 DCA로의 전환 시 하나의 NADPH 분자의 산화 및 두 개의 NAD<sup>+</sup> 분자의 환원되어 보조인자의 산화환원 균형이 맞지 않아 생합성 반응성이 떨어지는 문제점이 있다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 출원특허 제2015-0089300호

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0008] 이에 본 발명자들은 효율적인 디카르복실산을 생산하는 방법에 대해 연구한 결과, 시토크롬 P450 모노옥시게나제와 시토크롬 450 환원효소의 결합 유전자(CYP-NCP)와 ALD, ADH 반응을 통해서 환원력(DNAPH/DADH)이 축적되면서  $\omega$ -산화경로의 활성이 떨어지는 문제점이 있어, 축적되는 환원력을 사용할 수 있는 자일로오스 리덕타아제 유전자가 도입된 형질전환 대장균을 제작하였다. 또한, 상기 형질전환된 대장균이 높은 디카르복실산 생산량 및 높은 기질 전환율을 보임을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

### 과제의 해결 수단

[0009] 본 발명의 일 측면은 시토크롬 P450 모노옥시게나제와 시토크롬 450 환원효소의 복합체 유전자(CYP-NCP) 및 자일로오스 리덕타아제(xylose reductase, XR) 유전자가 도입된 형질전환 미생물을 제공한다.

[0010] 본 발명의 다른 측면은 (a) 본 발명의 형질전환 미생물을 배양하고, 휴지기 상태의 형질전환 미생물을 수확하는 단계; 및 (b) 휴지기 상태의 형질전환 미생물 배양액에 C<sub>10</sub>, C<sub>12</sub>, C<sub>14</sub>, C<sub>16</sub>, C<sub>16:1</sub>, C<sub>18</sub> 및 C<sub>18:1</sub>로 이루어진 군으로부터 선택되는 포화 지방산 또는 불포화 지방산을 첨가하는 단계를 포함하는 디카르복실산을 생산하는 방법을 제공한다.

### 발명의 효과

[0011] 본 발명의 형질전환 미생물은 지방산을 디카르복실산으로 생체 내 변환하는 과정에서 자일로오스 환원효소를 이용하여 자일리톨 변환을 통한 보조인자 재생을 가능하게 함으로써 기존의  $\omega$ -산화경로를 이용한 디카르복실산 생산과정의 문제점을 개선하였다. 또한, 본 발명의 형질전환 미생물은 높은 기질 전환율을 보일 뿐만 아니라 디카르복실산의 생산량도 증가하였다. 따라서, 본 발명의 형질전환 미생물은 디카르복실산을 생산하는데 유용하게 사용될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은  $\omega$ -산화경로를 이용하여 디카르복실산을 생산하는 생체내 변환 과정을 도식화한 도면이다.

도 2는 자일로오스 환원효소(XR)의 대사과정을 도식화한 도면이다.

도 3은 형질전환된 대장균인 GX $\omega$ , GX-XR<sub>NADH</sub> 및 GX-XR<sub>NADPH</sub>의 테트라테칸디오산(TDDA) 생산량 및 기질 전환율을 비교한 도면이다.

도 4는 형질전환 대장균 GX-MXR을 이용하여 디카르복실산을 생산하는 과정에서 자일로오스가 자일리톨로 변환되는 것을 확인한 도면이다.

도 5는 형질전환 대장균 GX-MXR을 이용하여 디카르복실산을 생산하는 동안 NADPH/NADP<sup>+</sup> 비율 변화를 나타낸 도면이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명한다.

[0014] 본 발명의 일 측면은 시토크롬 P450 모노옥시게나제와 시토크롬 450 환원효소의 복합체 유전자(*CYP-NCP*) 및 자일로오스 리덕타아제(*xylose reductase*, XR) 유전자가 도입된 형질전환 미생물을 제공한다.

[0015] 본 발명에서 사용하는 용어 "*CYP-NCP*"란, 시토크롬 P450 모노옥시게나제 및 시토크롬 450 환원효소의 복합체를 암호화하는 유전자를 의미한다. 구체적으로, 상기 *CYP-NCP*는 마린노박터 아쿠아에올레이 유래의 모노옥시게나제인 CYP153A와 바실러스 마가테리움 유래의 NCP의 도메인 결합을 통해 제조된 융합 단백질을 암호화하는 유전자로서, 대장균에서 지방산을 오메가수산화 지방산으로 전환시킨다. 상기 *CYP-NCP* 유전자는 상기 *CYP-NCP* 유전자의 서열번호 1로 표시되는 염기서열일 수 있다.

[0016] 또한, 상기 *CYP-NCP*는 서열번호 1로 표시되는 염기서열과 적어도 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 또는 98% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열일 수 있다.

[0017] 상기 "서열 상동성의 %"는 두 개의 서열을 최적으로 배열된 상태에서 비교 영역을 비교함으로써 확인된다. 또한, 비교 영역에서의 염기서열 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(예를 들면, 갭)를 포함할 수 있다.

[0018] 본 발명에서 사용하는 용어 "자일로오스 리덕타아제"란, 자일로오스를 자일리톨로 변환하는 대사경로에서의 NAD(P)H에 의존성을 갖는 촉매효소를 의미한다. 상기 본 발명에서 자일로오스 리덕타아제는 NADPH 의존성이 높은 자일로오스 리덕타아제를 XR<sub>NADPH</sub>로 명명하며, NADH에 의존성이 높은 자일로오스 리덕타아제를 XR<sub>NADP</sub>로 명명하였다.

[0019] 구체적으로, 상기 자일로오스 리덕타아제는 하기 화학식 1의 반응에서 촉매 역할을 한다.

[0020] [화학식 1]

[0021] 자일로오스 + NAD(P)H + H<sup>+</sup> 자일리톨 + NAD(P)<sup>+</sup>

[0022] 상기 자일로오스 리덕타아제 유전자는 상기 서열번호 2 또는 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 암호화하는 염기서열일 수 있다. 상기 서열번호 2 또는 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 암호화하는 염기서열은 서열번호 3 또는 서열번호 5로 표시되는 염기서열일 수 있다.

[0023] 또한, 상기 자일로오스 리덕타아제를 암호화 유전자는 자일로오스 리덕타아제의 활성을 유지하는 자일로오스 리덕타아제 변이체를 암호화하는 염기서열일 수 있다. 상기 자일로오스 리덕타아제 변이체는 자일로오스 리덕타아제의 특성이 유지되는 모든 서열을 포함하며, 어느 하나에 특정되는 것은 아니나, 바람직하게는, 상기 자일로오스 리덕타아제 변이체를 암호화하는 염기서열은 서열번호 2 또는 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 또는 98% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 암호화하는 염기서열일 수 있다.

[0024] 또한, 자일로오스 리덕타아제 변이체를 암호화하는 염기서열은 서열번호 3 또는 서열번호 5로 표시되는 염기서열과 적어도 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 또는 98% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열일 수 있다.

[0025] 상기 자일로오스 리덕타아제 유전자는 칸디다 보이디니이(*Candida boidinii*)로부터 유래한 것일 수 있다.

[0026] 상기 미생물은 야생형의 미생물일 수 있으나, 디카르복실산을 효율적으로 생산하도록 형질전환된 미생물일 수 있다. 형질전환은 미생물은 디카르복실산 생산에 적합하도록 미생물 내의 유전자를 불활성화시키거나 새로운 유전자가 도입된 것일 수 있다.

- [0027] 이때, 유전자를 불활성화시키는 방법은 목적 유전자의 일부 또는 전부 결실, 유전자의 일부를 치환하거나 유전자의 외부 핵산을 도입한 것일 수 있다. 변형대상이 되는 유전자는 미생물의 물질대사 경로에 작용하는 효소일 수 있다.
- [0028] 구체적으로, 상기 미생물은 *fadE* 및 *fadR* 유전자를 닉 아웃(knock out)시킨 대장균일 수 있다.
- [0029] 본 발명에서 사용하는 용어 "*fadE* 유전자"란, 아실 CoA 탈수소 효소(acyl coenzyme A dehydrogenase)를 암호화하는 유전자를 의미한다. 상기 아실 CoA 탈수소 효소는 세포의 미토콘드리아 기질에 존재하는 단백질이다. 미토콘드리아에서 지방산을 분해하여 아세틸-CoA, NADH 및 FADH<sub>2</sub>를 생산하는 베타 산화 과정에서 아실 CoA 탈수소 효소는 미토콘드리아 기질로 들어온 지방산에서 수소를 제거하여 FADH<sub>2</sub>를 생성하는 역할을 한다. 본 발명의 일 실시예에서는, 대장균의 *fadE* 유전자를 제거함으로써, 지방산이 베타 산화과정으로 가는 것을 억제하였다.
- [0030] 본 발명에서 사용하는 용어 "*fadR* 유전자"란, 지방산 대사 조절 단백질인 FadR을 암호화하는 유전자를 의미한다. 상기 FadR은 박테리아의 전사 인자로 작용하며, 대장균에서 FadR은 베타 산화과정 및 지방산 생합성에서 관여된 주요 효소의 발현을 조절하는 역할을 한다. 본 발명의 일 실시예에서는, 대장균의 *fadR* 유전자를 닉 아웃시킴으로써, FadR이 대장균 내의 지방산 대사경로에 관여하는 것을 억제하였다.
- [0031] 구체적으로, 대장균의 베타 산화 과정을 불활성시키기 위하여, 상기 대장균에서 아실 CoA 탈수소 효소를 암호화하는 유전자인 *fadE* 유전자를 분리한 후 제거할 수 있다. 또한, 세포 내부에 다량의 지방 아실 CoA가 존재할 경우 베타 산화와 관련된 유전자의 억제자로 작용하는 *fadR* 유전자의 기능을 억제하기 위하여, 상기 *fadR* 유전자를 분리한 후 닉 아웃시킬 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 *fadE* 및 *fadR* 유전자가 닉 아웃된 야생형 대장균 MG1655을 사용하였다. 야생형 대장균에서 *fadE* 및 *fadR* 유전자를 닉 아웃시키는 방법은 당업계에 알려진 유전자 닉 아웃 방법을 사용할 수 있다.
- [0032] 본 발명에서 사용하는 용어 "닉 아웃"이란, 특정 효소의 활성이 불활성되거나 제거되어 해당 효소의 활성을 나타내지 않는 것을 의미한다.
- [0033] 상기 형질전환된 미생물은 *AlkL* 유전자를 더 포함할 수 있다. 상기 *AlkL* 유전자는 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*) 유래의 알칸 트랜스포터를 암호화하는 유전자로서, 서열번호 6으로 표시되는 염기서열일 수 있다. 상기 *AlkL* 유전자를 대장균 내에서 발현시킴으로써 상기 전환된 디카르복실산을 세포 외부로 수송할 수 있다.
- [0034] 또한, 상기 *AlkL* 유전자는 서열번호 6으로 표시되는 염기서열과 적어도 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 또는 98% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열일 수 있다.
- [0035] 또한, 상기 형질전환된 미생물은 *ADH1* 유전자를 더 포함할 수 있다. 상기 *ADH1* 유전자는 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*) 유래의 알코올 탈수소 효소를 암호화하는 유전자로서, 서열번호 7로 표시되는 염기서열일 수 있다. 상기 *ADH1* 유전자를 대장균 내에서 발현시킴으로써 상기 CYP-NCP 유전자에 의해 전환된 오메가수산화 지방산을 옥시 지방산으로 전환시킬 수 있다.
- [0036] 또한, 상기 *ADH1* 유전자는 서열번호 7로 표시되는 염기서열과 적어도 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 또는 98% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열일 수 있다.
- [0037] 또한, 상기 형질전환된 미생물은 *ALD5* 유전자를 더 포함할 수 있다.
- [0038] 상기 *ALD5* 유전자는 칸디다 트로피칼리스(*Candida tropicalis*) 유래의 알데하이드탈수소 효소를 암호화하는 유전자로서, 서열번호 8로 표시되는 염기서열일 수 있다. 상기 *ALD5* 유전자를 대장균 내에서 발현시킴으로써 상기 *ADH1* 유전자에 의해 전환된 옥시 지방산을 디카르복실산으로 전환시킬 수 있다.
- [0039] 또한, 상기 *ALD5* 유전자는 서열번호 8로 표시되는 염기서열과 적어도 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 또는 98% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열일 수 있다.
- [0040] 본 발명에서 사용한 용어 "형질전환"은 목적 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 포함된 벡터를 숙주세포 내에 도입하여 숙주세포 내에서 상기 목적 단백질이 발현할 수 있도록 하는 것을 의미한다. 상기 폴리뉴클레오티드는 숙주세포 내로 도입되어 발현될 수 있는 것이면, 어떠한 형태로 도입되는 것이든 상관없다.
- [0041] 예를 들면, 상기 폴리뉴클레오티드는 자체적으로 발현되는 데 필요한 모든 요소를 포함하는 유전자 구조체인 발현 카세트(expression cassette)의 형태로 숙주세포에 도입될 수 있다. 상기 발현 카세트는 통상 상기 폴리뉴클

레오티드에 작동 가능하게 연결되어 있는 프로모터(promoter), 전사 종결신호, 리보솜 결합부위 및 번역 종결신호를 포함한다. 상기 발현 카세트는 자체 복제가 가능한 발현벡터 형태일 수 있다. 또한, 상기 폴리뉴클레오티드는 그 자체의 형태로 숙주세포에 도입되어, 숙주세포에서 발현에 필요한 서열과 작동 가능하게 연결되어 있는 것일 수도 있다.

[0042] 또한, 상기에서 용어 "작동 가능하게 연결"된 것이란 본 발명의 목적 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 전사를 개시 및 매개하도록 하는 프로모터 서열과 상기 유전자 서열이 기능적으로 연결되어 있는 것을 의미한다.

[0043] 상기 발현벡터는 당업계에 공지된 방법, 예를 들어,  $\text{CaCl}_2$  완충액을 사용한 활성화 세포(competent cell)를 만든 후 열충격(예를 들면,  $42^\circ\text{C}$ ) 방법에 의해 발현벡터를 숙주세포 내로 넣는 방법, 전기 충격에 의한 형질전환 방법, 일시적 형질감염, 미세주사, 세포융합, 칼슘 포스페이트 침전법, 전기천공법 등에 의해 숙주세포 내로 도입할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 바람직하게는 상기 발현벡터는 형질전환 미생물의 안정적 제조와 효율을 높이기 위해서는 전기 천공법에 의한 형질전환 방법을 사용하는 것이 바람직하다.

[0044] 본 발명은 기존의 오메가 산화( $\omega$ -oxidation)를 이용한 디카르복실산 생산에 있어서, 전체 반응에서 NADH 하나가 남는 보조인자 재생 불가능 문제를 개선하고자 하는 목적으로 착안하였다(도 1).

[0045] 이에 본 발명자들은 상기 문제점들을 개선시키기 위해 시토크롬 P450 모노옥시게나제와 시토크롬 450 환원효소의 복합체 유전자(*CYP-NCP*) 및 자일로오스 리덕타아제(xylose reductase, XR) 유전자가 도입된 형질전환 대장균을 개발하였다. 상기 형질전환된 대장균의 대사경로에서 자일로오스 리덕타아제는 자일로오스를 자일리톨로 변환함으로써  $\text{NAD(P)}^+$ 를 재생하였다(도 2).

[0046] 본 발명자들은 본 발명의 형질전환 대장균을 이용하여 디카르복실산을 생산할 경우, 기존의 오메가 산화를 이용해 디카르복실산을 생산할 때보다 생산량이 240% 증가하였으며, 기질 전환율도 95%로 증가하는 것을 확인하였다(도 3).

[0047] 또한, 본 발명자들은 본 발명의 형질전환 대장균을 이용해 디카르복실산을 생산할 경우, 제과·의약품·구강위생제 등에 사용되는 당알코올계 감미료로 사용되는 자일리톨도 생산하는 것을 확인하였다(도 4).

[0048] 따라서, 본 발명의 형질전환 대장균은 디카르복실산을 생산하는데 유용하게 사용될 수 있다.

[0049] 또한, 본 발명의 다른 측면은 (a) 본 발명의 형질전환 미생물을 배양하고, 휴지기 상태의 형질전환 미생물을 수확하는 단계; 및 (b) 휴지기 상태의 형질전환 미생물 배양액에  $\text{C}_{10}$ ,  $\text{C}_{12}$ ,  $\text{C}_{14}$ ,  $\text{C}_{16}$ ,  $\text{C}_{16:1}$ ,  $\text{C}_{18}$  및  $\text{C}_{18:1}$ 로 이루어진 군으로부터 선택되는 포화 지방산 또는 불포화 지방산을 첨가하는 단계를 포함하는 디카르복실산을 생산하는 방법을 제공한다.

[0050] 상기 (a) 단계에서 형질전환 미생물을 배양하기 위한 배지로는 당업계에 공지된 배양배지를 사용할 수 있으며, 본 발명의 일실시예에서는 형질전환된 대장균을 배양하기 위해 LB 배지를 사용하였다. 또한, 상기 배양 배지는 카나마이신, 암피실린 또는 클로람페니콜과 같은 적절한 항생제가 첨가된 배지일 수 있다.

[0051] 상기 형질전환 미생물의 배양은 발현 유도제인 IPTG의 존재 하에서 실시될 수 있으며, 이는 600 nm 파장에서 O.D. 값이 0.5 내지 0.6 사이일 때 첨가할 수 있다.

[0052] 상기 디카르복실산을 생산하는 방법은 5-아미노레불린산(aminolevulinic acid, ALA), 티오우레아, 인산 완충액, 항생제, 트윈80, 미량원소 용액 및 이의 조합에서 이루어진 군에서 선택되는 물질을 첨가하는 단계를 더 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 (a) 단계에서 휴지기 상태의 형질전환 미생물 배양시 5-아미노레불린산(aminolevulinic acid, ALA), 티오우레아 및 이의 조합에서 이루어진 군에서 선택되는 물질을 첨가하는 단계를 더 포함할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는, 휴지기의 형질전환된 대장균을 배양하는 배지에 5-아미노레불린산(aminolevulinic acid, ALA), 티오우레아를 더 첨가하였다.

[0053] 상기 5-아미노레불린산을 첨가함으로써 헴(Heme)의 전구체로서 작용하여 모노옥시제네이스 활성을 높여줌으로서 디카르복실산의 생산 수율을 향상시킬 수 있다. 상기 5-아미노레불린산은 전체 배지 부피를 기준으로 0.25 mM의 양으로 첨가될 수 있다. 또한, 티오우레아를 첨가함으로써 모노옥시제네이스에서 발생할 수 있는 세포에 독성을 가진 과산화수소를 산화시킴으로써 순화하는 역할을 한다.

[0054] 또한, 상기 (b) 단계에서, 휴지기 상태의 형질전환 미생물을 수확할 때, 배양액을  $4^\circ\text{C}$ 에서 15분간 12,000g에서

원심분리한 후 펠렛만을 모아 0.1M, pH7.4의 포타슘인산완충액에 2번 세척한 후 재현탁하는 단계를 포함할 수 있다.

[0055] 나아가, 상기 (b) 단계에서, 휴지기 상태의 형질전환 미생물을 배양시 인산 완충액, 항생제, 트윈80, 미량원소 용액 및 이의 조합에서 이루어진 군에서 선택되는 물질을 첨가하는 단계를 더 포함할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는, 휴지기 상태의 형질전환된 대장균을 배양하는 배지에 0.1M, pH7.4의 포타슘인산버퍼에 50 gcww/L의 휴지기의 형질전환된 대장균을 재현탁시킨 후, 지방산을 효과적으로 녹일 수 있는 세제인 트윈80을 0.5%(v/v) 첨가하고 기질이 되는 지방산(C<sub>12</sub>, C<sub>14</sub> 등)을 1 g/L만큼 첨가한 후 1X 농도 만큼의 필터살균한 미량원소 용액(g/L: 2.4 g FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.3g CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.15g CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.3g ZnCl<sub>2</sub>, 0.3g Na<sub>2</sub>MO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.075g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 및 0.495g MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O)을 첨가하였다.

[0056] 상기 지방산은 긴 사슬 지방산으로서, 예를 들어 C<sub>10</sub>, C<sub>12</sub>, C<sub>14</sub>, C<sub>16</sub> 및 C<sub>18</sub>의 포화 지방산 및 C<sub>16:1</sub> 및 C<sub>18:1</sub>의 불포화 지방산으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다. 상기 지방산은 본 발명의 방법을 거쳐 헥사테칸디온산, 테트라테칸디온산 등과 같은 디카르복실산으로 전환될 수 있다.

[0057] 상기 형질전환 미생물의 배양은 25 내지 37℃ 온도에서 이루어질 수 있다. 또한, 상기 지방산의 디카르복실산으로의 생체 변환 시 온도는 25 내지 37℃ 교반은 200rpm 조건에서 수행될 수 있다. 바람직하게는, 30℃, 200rpm 조건에서 수행되는 것이 디카르복실산의 생산 수율을 향상시킬 수 있다.

[0058] 또한, (b) 단계에서 휴지기의 형질전환 미생물 배양시 글루코스, 자일로오스 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 보조 기질(co-substrate)의 존재 하에 이루어질 수 있다.

[0059] 상기 형질전환 미생물 내에서 생합성된 디카르복실산을 분리하는 단계는 당업계에서 공지된 통상의 분리 또는 정제 방법에 따라 실시될 수 있다(B. Aurousseau et al., Journal of the American, Oil Chemists' Society, 57(3):1558-9331(1980); Frank C. Magne et al., Journal of the American Oil Chemists' Society, 34(3):127-129(1957)).

[0060] 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.

# [0061] 실시예 1. 형질전환 미생물 제작

## [0062] 실시예 1.1. 균주 및 플라스미드 벡터 준비

[0063] 모균주로 야생형 대장균 MG1655(GX50 Δxy1AB, 이하 GX)를 이용하였으며, 대장균(DH10B) 균주를 클로닝에 이용하였다. 상기 대장균 균주는 LB 배지에 37℃, 200 rpm 조건으로 배양시켰다. 또한, 필요시 배지에 카나마이신(Km) 50 μg/ml, 암피실린(Am) 100 μg/ml, 또는 클로람페니콜(Cm) 30 μg/ml 농도로 보충하였다.

[0064] Bglbrick 플라스미드(pBbA6C 및 pBbE6K; A= p15A 레플리콘; E= colE1 레플리콘; 6= PLlacO 프로모터; C= 클로람페니콜 내성 및 K= 카나마이신 내성)를 랩 스톡(lab stock)에서 추출하여 발현 컨스트럭트 제작에 이용하였다.

[0065] 다른 플라스미드들, 예컨대 λ-Red 재조합 발현 플라스미드용 pSIM5 플라스미드; cI 억제제(repressor) 및 온도민감성 레플리케이션에 의해 조절되는 효모 FLP 재조합 유전자용 pCP20 플라스미드; 및 유전자 disruption용 주형 플라스미드로 pKD13, 및 FRT 부위에 의해 플랭킹되는 내성 유전자는 각각의 랩 세포 스톡에서 입수하였다.

[0066] 지방산 및 DCA를 포함하는 모든 물질은 시그마 알드리치사(St. Louis, MO)에서 입수하였으며, 제한효소, 및 DNA 리가아제(New England Biolabs, Ipswich, MA) 및 Phusion 고-충실도(high-Fidelity) DNA 폴리머라제(Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA)를 클로닝 및 플라스미드 구축에 사용하였다. 올리고뉴클레오티드는 마크로젠(Korea)에 의뢰하여 합성하였다. 하기 실시예에서 발현 벡터의 제조에 사용된 프라이머 서열을 표 1에 나타내었으며, 사용된 플라스미드 및 균주를 하기 표 2 및 3에 나타내었다.

표 1

| [0067] 프라이머 | 5'-서열-3'                                                              | 서열번호 |
|-------------|-----------------------------------------------------------------------|------|
| FadE_de1_FP | CCATATCATCACAAGTGGTCAGACCTCTACAAGTAAGGGGCTTTTCGTTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC | 9    |
| FadE_de1_RP | TTACGCGGCTTCAACTTTCGCCACTTTCTCCGGCACTTTACCGGCTTCGATTCCGGGATCCGTCGACC  | 10   |

|              |                                                                                         |    |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| FadE_seq_FP  | AAAAGTTAGCCAGCGTTTCCGCCGC                                                               | 11 |
| FadE_seq_RP  | ACGTTGGGAGATGAGACGTATCAGG                                                               | 12 |
| FadR_del_FP  | TCTGGTATGATGAGTCCAACCTTTGTTTTGCTGTGTTATGGAAATCTCACTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC                 | 13 |
| FadR_del_RP  | AACAACAAAAAACCCCTCGTTTGGGGGTTTGTCTTTAAACGGAAGGGAATTCGGGGATCCGTCGACC                     | 14 |
| FadR_seq_FP  | GGGCGAGTTTGTACCACTCGG                                                                   | 15 |
| FadR_seq_RP  | GCGCGGCGACCGTTCGCTG                                                                     | 16 |
| Maq_F        | ATAGATCTTTTAAGAAGGAGATATACATATGCCAACACTGCCCAGAAC                                        | 17 |
| Maq_R        | CTGTTCACTGCTAGGTGAAGGAATGCTGCCGCCGTGCCGCCGTGCCGCCACTGTTCCGTGTCAGTTTG<br>ACCATCAACCTGGAA | 18 |
| NCP_F        | GCGGCAGCATTCCTTCACCTAGCACTGAACAGTCTGCTAAAAAGTACGCAAAAAGGCAGAAAACGCTAT<br>AATACGCCGCTGC  | 19 |
| NCP_R        | ATTCTCGAGCGATATCGATCGTTATTACCCAGCCCACACGCTCTTTTG                                        | 20 |
| A1kL_F       | GGTCGATCGTTTAAGAAGGAGATATACATATGAGTTTTTCTAATTATAAAGTAATCGCGATGCCG                       | 21 |
| A1kL_R       | ATCTCGAGTTATTAGAAAACATATGACGCACCAA                                                      | 22 |
| ADH1_F       | TTTAAGAAGGAGATATACACATGTCTATCCCAGAAAACCTCA                                              | 23 |
| ADH1_R       | CTTACTCGAGTTATTTAGAAGTGTCACAACAGT                                                       | 24 |
| ALD5_F       | ATACATATGTCTTTGCCAGTCGTCACCAA                                                           | 25 |
| ALD5_R       | GTGTATATCTCCTTCTTAAAAGATCCTTAAGTGAGCTTAATTCTAACAG                                       | 26 |
| ALD_F        | AGGCCTCGAGAATTGTGAGCGGATAACAATTGAC                                                      | 27 |
| XR_FP(NdeI)  | GCGCATATGTCAAGCCCACTTTTAACTTTAAAC                                                       | 28 |
| XR_RP1       | CTTTCCTTTTTGCCTTCACGTGGGATAACTGCTAAACCTC                                                | 29 |
| XR_REG_FP    | CGTGAAGGCAAAAAGGAAAGATTATTAGGTAATT                                                      | 30 |
| XR_RP(BamHI) | CGCGGATCCTTAAATAAATGTTGGAATATTGTAACC                                                    | 31 |
| ALD_FP(NdeI) | ATACATATGTCTTTGCCAGTCGTCACCAA                                                           | 32 |
| ALD_RP(XhoI) | CTTACTCGAGTTAAGTGAGCTTAATTCTAACAGCCT                                                    | 33 |
| ALD_FP(NdeI) | ATACATATGTCTTTGCCAGTCGTCACCAA                                                           | 34 |
| ADH_RP(XhoI) | CTTACTCGAGTTATTTAGAAGTGTCACAACAGT                                                       | 35 |

[0068] 상기 표 1에서 밑줄 친 염기서열 부분은 제한효소 자리를 나타내며, 굵게 표시된 염기서열 부분은 돌연변이 유발 자리를 나타낸다.

# [0069] 실시예 1.2. *fadE* 및 *fadR* 유전자 녀 아웃 대장균 제작

[0070] MG1655 균주의 베타 산화과정을 불활성화시키기 위하여, 문헌(Datsenko and Wanner et al., PNAS, 97, 6640-6645 (2000))에 개시된 방법에 따라  $\lambda$ -Red( $\lambda$ -Red) 및 FLP-매개 부위-특이 재조합 시스템(FLP-mediated site-specific recombination system)을 이용하여 아실-CoA 탈수소효소를 암호화하는 유전자인 *fadE*를 표 2에 제시된 서열번호 9 및 10의 프라이머를 이용하여 녀 아웃시켰다.

[0071] 또한, 세포 내부에 다량의 지방 아실-CoA가 존재할 경우, 베타 산화과정과 관련된 유전자의 억제자로 작용하는 지방산 대사 조절자인 *fadR* 유전자를 서열번호 13, 15의 프라이머를 이용하여 녀 아웃시켰다.

[0072] 구체적으로, 야생형 MG1655 균주를  $\lambda$ -레드 리콤비네이즈를 발현할 수 있는 pSim5 플라스미드로 형질전환시킨 다음, 30℃ 온도에서 1시간 동안 회복시켰다. 이후, 클로람페니콜 아가 배지에서 30℃ 온도에서 밤새 배양된 콜로니를 선택하였다.

[0073] 한편, 서열번호 9, 10 및 13, 15의 프라이머를 이용하여 pKD13 플라스미드로부터 PCR을 통해 카나마이신 카세트 를 증폭시킨 다음, 상기 선택된 세포를 상기 증폭된 카나마이신 카세트 로 형질전환시켰다. 상기 형질전환된 세포를 2 내지 3시간 정도 회복시킨 후, 카나마이신 아가 배지에서 37℃ 온도에서 배양된 콜로니를 선택하였다. 상기 선택된 콜로니를 플립페아제를 발현할 수 있는 PCP20 플라스미드로 형질전환 시킨 후, 1시간 30분 정도 회복시켰다. 상기 콜로니를 암피실린-아가 배지에서 30℃ 온도에서 하룻밤 동안 배양하고, 상기 배양된 콜로니를 일반 LB 배지에서 42℃ 온도에서 교반 배양한 후, 일반 LB-아가 배지에서만 자라는 콜로니를 최종적으로 선별하였다.

[0074] 상기 과정을 거쳐 *fadE* 및 *fadR* 유전자가 제거된 MG1655 대장균을 "GXER"로 지칭하였다.

# [0075] 실시예 1.3. 재조합 플라스미드 벡터 제작

[0076] 문헌(Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press,

2001)의 방법에 따라, 마리노박터 아쿠아에올레이(DSM 11845) 유래의 모노옥시게나제(CYP153A), 바실러스 마가테리움(KCCM 11745) 유래의 NADPH:시토크롬 P450 환원효소(NCP), 사카로마이세스 세레비지에(KCTC 7296) 유래의 알코올 탈수소효소(ADH1), 및 칸디다 트로피칼리스(ATCC 20336) 유래의 알데하이드 탈수소 효소(ALD5)의 DNA를 Phusion 고-충실도 DNA 폴리머라제를 이용하여 증폭시켰다. pGEM-B1(바이오니아, 한국)에 클로닝된 슈도모나스 푸티다-알칸 트랜스포터(A1kL) 유전자는 바이오니아(한국)에서 합성하였다.

[0077] 구체적으로, 문헌(Scheps D et al., Microb Biotechnol 6, 694-707 (2013))을 참조하여, CYP153A와 NCP 도메인을 결합시켜 CYP-NCP 결합 유전자를 제조하였다. CYP153A의 경우 서열번호 17 및 18의 Maq\_F/Maq\_R 프라이머, 그리고, NCP의 경우 서열번호 19 및 20의 NCP\_F/NCP\_R 프라이머를 각각 이용하여 증폭시켰으며, 상기 2개의 유전자를 98℃ 온도에서 2분 후, 98℃ 온도에서 20초, 60℃ 온도에서 30초 및 72℃ 온도에서 60초로 30회 사이클 후, 72℃ 온도에서 5분의 조건하에 오버랩 연장 PCR(overlap extension PCR)을 통해 연결시켰다. 이때 상기 CYP153A와 NCP 사이에는 3XGGS 탠덤 부위(tandem region)를 링커로서 삽입하였다.

[0078] 상기에서 수득한 융합 유전자 CYP-NCP를 pBbA6C 플라스미드(Lee et al., J Biol Eng, 5:12 (2011), A= p15A 레플리콘; E= colE1 레플리콘; 6= PLlacO 프로모터; C= 클로람페니콜 내성 및 K= 카나마이신 내성)의 BglII 및 XhoI 부위에 클로닝하여 "pBbA6C-FP" 플라스미드를 제조하였다.

[0079] A1kL은 서열번호 21 및 22의 A1kL\_F/A1kL\_R 프라이머를 이용하여 98℃ 온도에서 2분 후, 98℃ 온도에서 2분 후, 98℃ 온도에서 20초, 55℃ 온도에서 30초 및 72℃ 온도에서 15초로 30회 사이클 후, 72℃ 온도에서 5분의 조건하에 PCR에 의해 증폭시켰다. 이어, 제한효소 PvuI 및 XhoI를 이용하여 상기에서 제조한 pBbA6C-FP 플라스미드를 절단하고, 상기 증폭된 A1kL를 DNA 리가아제(New England Biolabs Inc.)를 이용하여 라이게이션시켜 "pBbA6C-FP/A1kL" 플라스미드를 제조하였다.

[0080] 한편, 알코올 탈수소효소를 암호화하는 ADH1 유전자를 서열번호 23 및 24의 ADH1\_F/ADH1\_R 프라이머를 이용하여 98℃ 온도에서 2분 후, 98℃ 온도에서 20초, 57℃ 온도에서 30초 및 72℃ 온도에서 20초로 30회 사이클 후, 72℃ 온도에서 5분의 조건하에 PCR을 통해 증폭시켰으며, 알데하이드 탈수소효소를 암호화하는 ALD5 유전자를 서열번호 25 및 26의 ALD5\_F/ALD5\_R 프라이머를 이용하여 98℃ 온도에서 2분 후, 98℃ 온도에서 20초, 58℃ 온도에서 30초 및 72℃ 온도에서 30초로 30회 사이클 후, 72℃ 온도에서 5분의 조건하에 PCR에 의해 증폭시켰다. 상기 2개의 유전자를 98℃ 온도에서 2분 후, 98℃ 온도에서 20초, 60℃ 온도에서 30초 및 72℃ 온도에서 50초로 30회 사이클 후, 72℃ 온도에서 5분의 조건하에 오버랩 연장 PCR에 의해 연결시킨 후, pBbE6K 플라스미드(Lee et al., 2011, A= p15A 레플리콘; E= colE1 레플리콘; 6= PLlacO 프로모터; C= 클로람페니콜 내성 및 K= 카나마이신 내성)의 NdeI/XhoI 부위에 삽입하였다. 이어, 서열번호 27 및 24의 ALD\_F/ADH1\_R 프라이머를 이용하여 상기 pBbE6K로부터 ADH-ALD를 증폭시킨 후, XhoI을 이용하여 절단하였다.

[0081] 또한, XhoI을 이용하여 상기에서 제조한 pBbA6C-FP/A1kL 플라스미드를 절단하고, 여기에 상기 ALD-ADH 산물을 DNA 리가아제(New England Biolabs Inc.)를 이용하여 라이게이션시켜 "pBbA6C- $\omega$ " 플라스미드를 제조하였다.

[0082] 또한, 문헌(Kim et al., 2015. Simultaneous utilization of glucose and xylose via novel mechanisms in engineered Escherichia coli. Metabolic Engineering. 30:141-148)의 방법에 따라, "pXR<sub>NADPH</sub>" 플라스미드를 제조하였다.

[0083] 구체적으로, *Candida boidinii*으로부터 유래된 서열번호 28의 염기서열로 표시되는 XR\_FP(NdeI) 프라이머 및 서열번호 31의 염기서열로 표시되는 XR\_RP(BamHI)를 이용하여 PCR을 통해 자일로오스 리덕타아제 유전자(xy11)를 증폭하였다. PCR 유전자 산물에 NdeI 및 BamHI 제한효소를 처리한 후, pBbB6a 플라스미드에 클로닝하여 "pXR<sub>NADPH</sub>" 플라스미드를 제조하였다.

[0084] 또한, "pXR<sub>NADH</sub>" 플라스미드를 제조하기 위해, 먼저 자일로오스 리덕타아제의 NADPH 결합 포켓에서 Lys<sup>272</sup>, Ser<sup>273</sup> 및 Asn<sup>74</sup> 잔기를 표적으로 함으로써 자일로오스 리덕타아제의 보조인자 의존성을 NADPH에서 NADH로 바꾸었다. 구체적으로, 돌연변이를 유발하기 위해 서열번호 28 내지 31의 염기서열로 표시되는 프라이머들을 이용하여 OE-PCR(overlap extension PCR)을 통해 자일로오스 리덕타아제(XR<sub>NADPH</sub>)의 부위 특이적 돌연변이를 도입하였다. OE-PCR 유전자 산물에 NdeI 및 BamHI 제한효소를 처리한 후, pBbB6a 플라스미드에 클로닝하여 "pXR<sub>NADH</sub>" 플라스미드를 제조하였다.

[0085] 제조한 재조합 플라스미드 벡터를 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

[0086]

|                      |                                                                                                                                                                                              |
|----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 플라스미드                |                                                                                                                                                                                              |
| pA6c-FP              | pBbA6c with <i>rfp</i> ::CYP450_NCP, Cm <sup>R</sup>                                                                                                                                         |
| pA6c-FP/A1kL         | pBbA6c with <i>rfp</i> ::CYP450_NCP/A1kL, Cm <sup>R</sup>                                                                                                                                    |
| pBbA6c- $\omega$     | pBbA6c with <i>rfp</i> ::CYP450_NCP/A1kL/ADH/ALD, Cm <sup>R</sup>                                                                                                                            |
| pXR <sub>NADPH</sub> | pBbB6a with <i>gfp</i> :: <i>xy11</i> ( <i>Candida boidinii</i> , NADPH dependent xylose reductase), Am <sup>R</sup>                                                                         |
| pXR <sub>NADH</sub>  | pBbB6a with <i>gfp</i> :: <i>xy11</i> <sub>m</sub> (Lys <sup>272</sup> , Ser <sup>273</sup> , and Asn <sup>274</sup> to Arg, Glu, and Gly; NADH-dependent xylose reductase), Am <sup>R</sup> |

[0087]

실시예 1.4. 형질전환 대장균 제작

[0088]

상기 실시예 1.2.에서 제조한 *fadE* 및 *fadR* 유전자가 제거된 MG1655 균주를, 상기 실시예 1.3.에서 제조한 각각의 재조합 플라스미스 벡터를 이용하여 전기 천공법으로 형질전환시켰다. 상기 각각의 재조합 플라스미드 벡터를 이용하여 형질전환시킨 각각의 대장균 균주를 하기 표 3에 같이 나타내었다.

표 3

[0089]

|                                  |                                                 |
|----------------------------------|-------------------------------------------------|
| 균주                               | 도입 유전자                                          |
| GXER                             | GX <i>fadE</i> ::FRT, <i>fadR</i> ::FRT 녹아웃     |
| GX-CYP450_NCP                    | GXER 균주에 pA6c-FP 도입                             |
| GX $\omega$                      | GXER 균주에 pBbA6c- $\omega$ 도입                    |
| GX $\omega$ -XR <sub>NADPH</sub> | GX $\omega$ 균주에 pXR <sub>NADPH</sub> 도입         |
| GX $\omega$ -XR <sub>NADH</sub>  | GX $\omega$ 균주에 pXR <sub>NADH</sub> 도입          |
| GX-MXR                           | GXER 균주에 pA6c-FP/A1kL 및 pXR <sub>NADPH</sub> 도입 |

[0090]

실시예 2. 형질전환 대장균을 이용한 디카르복실산 생산

[0091]

실시예 2.1. 휴지기 상태의 형질전환 대장균 제조

[0092]

상기 실시예 1.4.에서 제조한 각각의 형질전환된 대장균의 단일 콜로니 5 mL를 LB 배지에서 접종 후 37°C, 200rpm 조건에서 하룻밤 동안 배양하였다. 밤새 배양된 형질전환된 대장균의 배양액을 50 mL의 LB 배지에 접종 후 37°C, 200rpm 조건에서 재배양하였다. 그 후, 상기 배양물을 1L의 LB 배지에 1:100의 비율로 접종시키고, 600 nm파장에서 O.D.값이 0.5 내지 0.6이 되었을 때 0.1 mM IPTG를 첨가하여 발현을 유도시켰다. 그 후, 0.25 mM의 5-아미노레불린산(5-aminolevulinic acid)을 첨가하고 25°C, 200 rpm 조건에서 20시간 동안 배양하였다. 그 후, 25°C, 12,000g 조건에서 15분 동안 원심 분리시켜 세포들을 회수하고, 인산칼륨 완충액(0.1M, pH 7.4)으로 2번 세척하였다.

[0093]

실시예 2.2. 디카르복실산 생산 및 생산량 확인.

[0094]

상기 실시예 2.1.에서 수득한 각각의 휴지기 상태의 형질전환 대장균 50 g<sub>cww</sub>/L 씩을 0.1 M의 인산칼륨 완충액(pH 7.4)에 재현탁시킨 후 1 g/L의 C<sub>12</sub> 지방산 및 C<sub>14</sub> 지방산을 각각 넣어 주었다. 그 후, 1X 농도의 필터 여과된 미량 원소 수용액(g/L: 2.4 g FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.3 g CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.15 g CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.3 g ZnCl<sub>2</sub>, 0.3 g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.075 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 및 0.495 g MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 및 30 µg/mL 클로람페니콜을 첨가하였다. 또한, 0.1 mM 티오우레아 및 지방산의 용해를 위하여 0.5%의 TWEEN80을 넣어 주었다.

[0095]

또한, 각각 0.4%(w/v) 농도의 글루코스(Glu) 및/또는 자일로오스(Xyl): Glu<sup>+</sup>Xyl<sup>+</sup>(그룹 I), Glu<sup>-</sup>Xyl<sup>+</sup>(그룹 II), Glu<sup>+</sup>Xyl<sup>-</sup>(그룹 III), 및 Glu<sup>-</sup>Xyl<sup>-</sup>(그룹 IV)의 4 가지 다른 배지 조건 및 30°C, 250 rpm 조건에서 배양시킨 후 가스 크로마토그래피(GC)를 이용해 디카르복실산 생산량을 분석하였다. 상기 분석은 형질전환된 대장균의 배양액으로부터 분리한 상등액을 불꽃 이온화 검출기가 장착된 Agilent 7890A(Agilent, Santa Clara, CA)를 이용하여

디카르복실산( $\alpha$ ,  $\omega$ -DCA)을 정량하였다(도 3).

[0096] 또한, 기질 전환 효율은 몰 기준으로 계산하였으며, 모든 실험 데이터는 SPSS(Version 11) 소프트웨어(SPSS Inc., Chicago, IL)를 사용한 Tukey 검정에 따라 일원 분산 분석(ANOVA) 또는 다변량 분산 분석(MANOVA)으로 유의성의 수준을 결정하였다.  $P$  값  $< 0.05$ 는 유의미한 것으로 고려되었다.

[0097] 그 결과,  $GX\omega$ - $XR_{NADPH}$ 를 이용하여 생산한 디카르복실산의 생산량은  $GX\omega$ 에 비해 각각 I 내지 IV 조건에서 130%, 230%, 150%, 및 180%가 증가되었다.  $GX\omega$ - $XR_{NADPH}$ 를 이용하여 생산한 디카르복실산의 생산량은  $GX\omega$ 와 비해 각각 I 내지 IV 조건에서 320%, 410%, 190%, 및 200%가 증가되었다. 또한,  $GX\omega$ - $XR_{NADPH}$ 를 이용하는 경우 I 조건에서 약 90%의 기질 전환율을 보였다.

[0098] 또한, 상기 실시예 2.1.에서 수득한 각각의 휴기지 상태의 형질전환 대장균 50  $g_{cww}/L$  씩을 0.1 M의 인산칼륨 완충액(pH 7.4)에 재현탁시킨 후 1 g/L의  $C_{14}$  지방산을 넣어 주었다. 그 후, 1X 농도의 필터 여과된 미량 원소 수용액(g/L: 2.4 g  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ , 0.3 g  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ , 0.15 g  $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ , 0.3 g  $ZnCl_2$ , 0.3 g  $Na_2MO_4 \cdot 2H_2O$ , 0.075 g  $H_3BO_3$ , 및 0.495 g  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ , 및 30  $\mu g/mL$  클로람페니콜을 첨가하였다. 또한, 0.1 mM 티오우레아 및 지방산의 용해를 위하여 0.5%의 TWEEN80을 넣어 주었다.

[0099] 또한, 각각 0.4%(w/v) 농도의 글루코스(Glu) 및/또는 자일로오스(Xyl):  $Glu^+Xyl^+$ (그룹 I),  $Glu^-Xyl^+$ (그룹 II),  $Glu^+Xyl^-$ (그룹 III), 및  $Glu^-Xyl^-$ (그룹 IV)의 4 가지 다른 배지 조건 및 30°C, 250 rpm 조건에서 배양시킨 후 가스 크로마토그래피(GC)를 이용해 디카르복실산 생산량을 분석하였다. 상기 분석은 형질전환된 대장균의 배양액 으로부터 분리한 상등액을 불꽃 이온화 검출기가 장착된 Agilent 7890A(Agilent, Santa Clara, CA)를 이용하여 디카르복실산( $\alpha$ ,  $\omega$ -DCA)을 정량하였다.

[0100] 그 결과를 표 4에 나타내었다.

표 4

| 균주                         | $C_{14}$ DCA (mg/L) |            |
|----------------------------|---------------------|------------|
|                            | FA + Glu            | FA+Glu/Xyl |
| WT (No heterogenous genes) | 0                   | 0          |
| GX-CYP450_NCP              | 347                 | 352        |
| $GX\omega$                 | 378                 | 361        |
| GX-MXR                     | 711                 | 1000       |
| $GX\omega$ - $XR_{NADPH}$  | 762                 | 1000       |

[0102] 표 4에 나타난 바와 같이 GX-CYP450\_NCP 균주의 DCA 생산량을 통해 대장균이 자체적으로 ADH 및 ALD 효소를 가지고 있는 것을 확인하였다. 아울러, GX-MXR 및  $GX\omega$ - $XR_{NADPH}$  균주를 통해 미생물 내 자일로오스 리덕타아제 유전자가 발현할 경우 DCA 생산량을 증가되는 것을 확인하였다.

### [0103] 실시예 2.3. 자일리톨 생산량 확인

[0104] 상기 실시예 2.2.에서 수득한 형질전환된 대장균 GX-MXR의 배양액으로부터 분리한 상등액을 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)를 이용하여 자일리톨을 생산량을 분석하였다. 자일리톨 생산량을 정량하기 위해 굴절률 검출기(Shimadzu) 및 SIL-20A 오토-샘플러(Shimadzu)가 장착된 Shimadzu HPLC 스테이션(Shimadzu, Kyoto, Japan)을 이용하여 분석하였다.

[0105] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 배양 4시간 후 50% 지방산이 디카르복실산으로 전환과 함께 약 95% 정도의 자일로오스가 자일리톨로 전환되었다. 아울러, 본 발명의 형질전환된 대장균을 이용하여 디카르복실산을 생산하는 경우, 산업적으로 유용한 자일리톨을 생산하는 것을 확인하였다.

### [0106] 실시예 2.4. $NADPH/NADP^+$ 비율 변화 확인

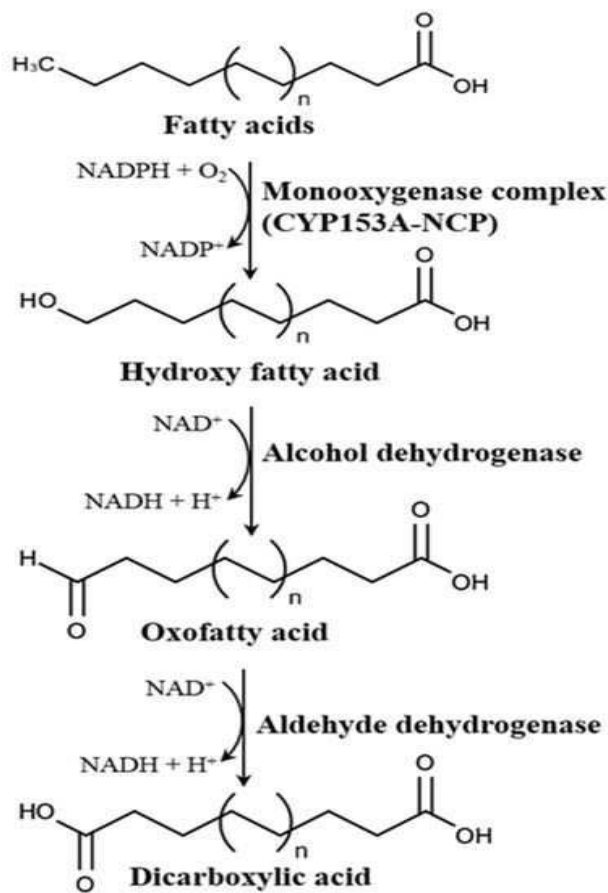
[0107] 상기 실시예 2.2.에서 형질전환된 대장균 GX-MXR을 이용해 디카르복실산을 생산하는 동안, 지방산 첨가 후 4,

8, 및 12시간에 배양액을 수집하였다. 상기 수집한 배양으로부터 상등액을 분리하여 NADPH/NADP<sup>+</sup> 분석 키트 (Sigma-Aldrich)를 이용하여 NADPH 및 NADP<sup>+</sup>를 분석하였다. NADPH/NADP<sup>+</sup> 정량 키트 제조사의 매뉴얼에 따라 수행되었다. NADPH 및 NADP<sup>+</sup>를 추출하고 제조자의 지침에 따라 NADPH/NADP<sup>+</sup> 정량 키트(Sigma-Aldrich)를 사용하여 측정하였다(도 5).

[0108] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 배양 4시간 후까지는 NADPH/NADP<sup>+</sup> 비율이 0이었으나, 배양 12시간 후 NADPH/NADP<sup>+</sup> 비율이 1보다 커진 것을 확인하였다. 따라서, 자일로오스 리덕타아제가 GX-MXR의 생체내 변환 과정에서 NADPH와 NADP<sup>+</sup>의 균형을 조절하는 것을 확인하였다.

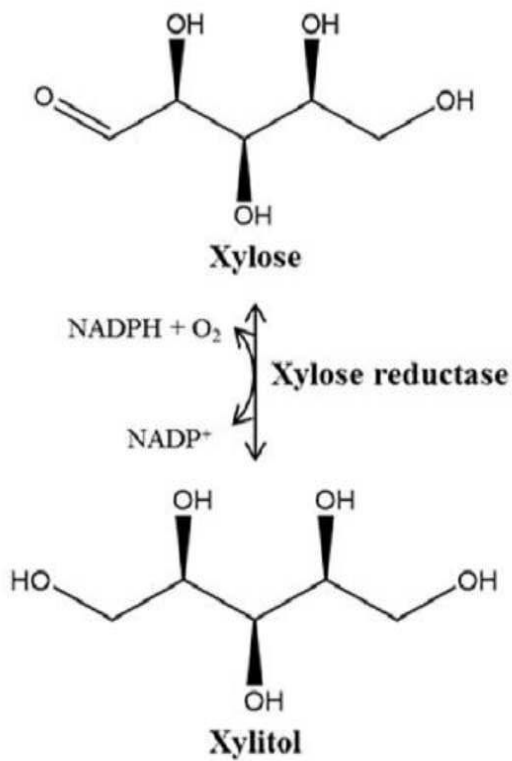
## 도면

### 도면1

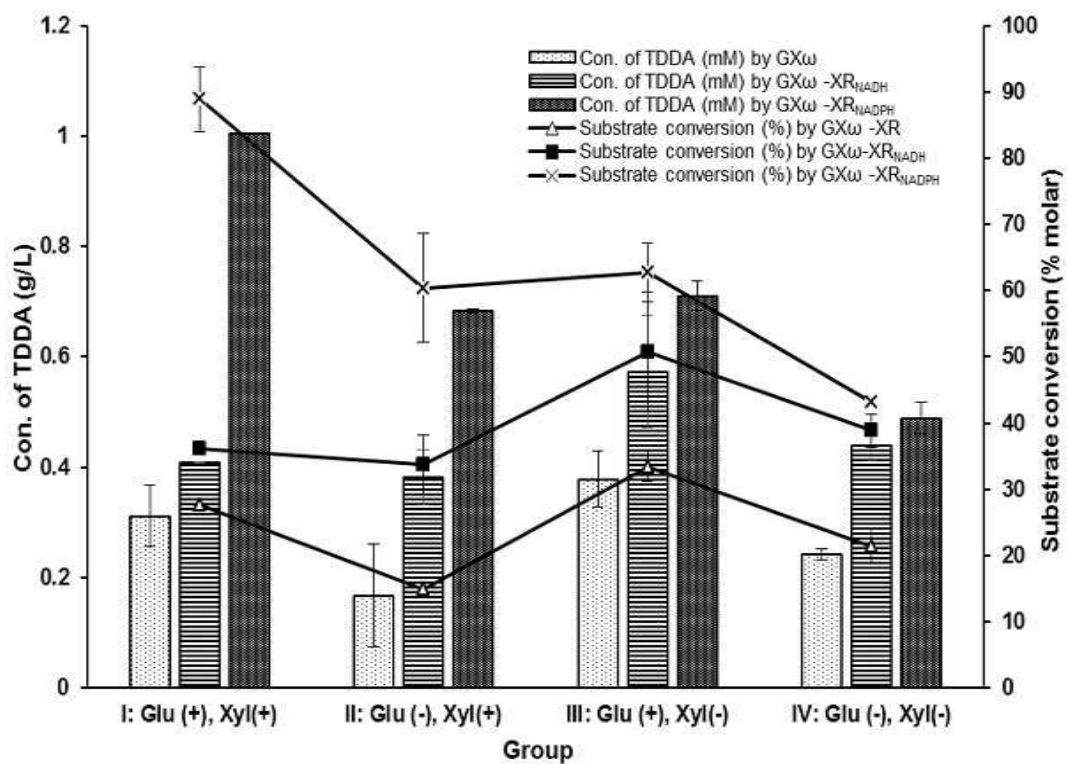


도면2

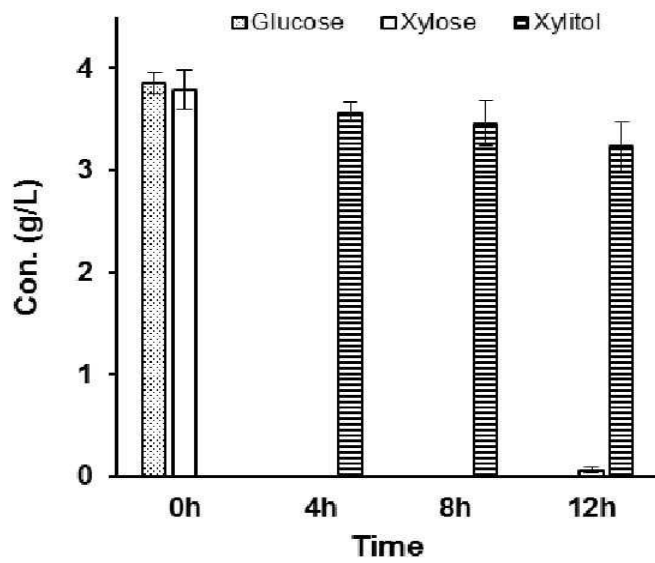
### Balancing redox/regeneration of cofactor



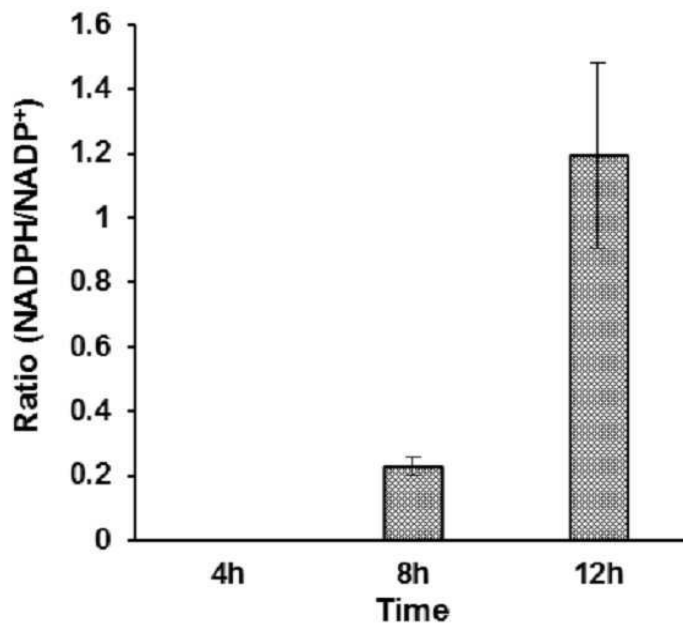
도면3



도면4



도면5



## 서열목록

- <110> ULSAN NATIONAL INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
- <120> TRANSFORMED MICROORGANISM PRODUCING DICARBOXYLIC ACID AND A METHOD FOR PRODUCING DICARBOXYLIC ACID USING THE SAME
- <130> UTP17498KR-00
- <160> 35
- <170> KoPatent In 3.0

<210> 1  
 <211> 3223  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> nucleotide sequence of CYP-NCP  
 <400> 1

atgccaacac tgcccagaac atttgacgac attcagtcgc gactgattaa cgccacctcc 60  
 aggggtggtgc cgatgcagag gcaaattcag ggactgaaat tcttaatgag cgccaagagg 120

aagaccttcg gccacgccg accgatgccc gaattcgttg aaacacccat cccggacgtt 180  
 aacacgttgg ccttgaggga catcgatgtc agcaatccgt tttataaccg gcagggtcag 240  
 tggcgcgcct atttcaaagc gttgcgtgat gaggcgccgg tccattacca gaagaacagc 300  
 cctttcggcc ccttctggtc ggtaactcgg tttgaagaca tctgtttcgt ggataagagt 360  
 cagcacctgt tttccgccga gccgcaaatc attctcgttg accctccgga ggggctgtcg 420  
 gtggaaatgt tcatagcgat ggatccgccg aaacacgatg tgcagcgag ctcggtgcag 480  
 ggagtagtgg caccgaaaaa cctgaaggag atggaggggc tgatccgatc acgcaccggc 540

gatgtgcttg acagcctgcc tacagacaaa ccttttaact gggtacctgc tgtttccaag 600  
 gaactcacag gccgcatgct ggcgacgctt ctggattttc cttacagga acgccacaag 660  
 ctggttgagt ggtcggacag aatggcaggt gcagcatcgg ccaccggcgg ggagtttgcc 720  
 gatgaaaatg ccatgtttga cgacgcggca gacatggccc ggtctttctc caggctttgg 780  
 cgggacaagg aggcgcgccg cgcagcaggc gaggagcccc gtttcgattt gatcagcctg 840  
 ttgcagagca acaaagaac gaaagacctg atcaatcggc cgatggagtt tatcggtaat 900  
 ttgacgctgc tcatagtcgg cggcaacgat acgacgcgca actcgatgag tggtagcctg 960

gtggccatga acgaattccc cagggaattt gaaaaattga aggcaaaacc ggagttgatt 1020  
 ccgaacatgg tgtcggaaat catcgcgttg caaacgccgc tggcctatat gcgccgaatc 1080  
 gccaaagcagg atgtcgaact gggcggccag accatcaaga agggatgatc agttgtcatg 1140  
 tggtagcgt cggttaaccg ggacgagcgc aaatttgaca acccgatca gttcatcatt 1200  
 gatcgcaagg acgcacgaaa ccacatgtcg ttcggctatg gggttcacg ttgcatgggc 1260  
 aaccgtctgg ctgaactgca actgcgcac cttcgggaag aaatactcaa gcgttttgac 1320  
 aacatcgaag tcgtcgaaga gcccgagcgg gtgcagtcca acttcgtgcg gggctattcc 1380

aggttgatgg tcaaactgac accgaacagt ggccgagcgc gcggcagcgg cggcagcatt 1440  
 ccttcaccta gactgaaca gtctgctaaa aaagtacgca aaaaggcaga aaaaggcaga 1500

aaacgctcat aatacgccgc tgcttgtgct atacgggtca aatatgggaa cagctgaagg 1560  
 aacggcgctg gatttagcag atattgcaat gagcaaagga ttgcaccgc aggtcgcaac 1620  
 gcttgattca cagccgggaa atcttccgcg cgaaggagct gtattaattg taacggcgctc 1680  
 ttataacggt catccgcctg ataacgcaaa gcaatttgc gactggtag accaagcgctc 1740  
 tgctgatgaa gtaaaaggcg ttcgctactc cgtatttga tgcggcgata aaaactgggc 1800  
  
 tactacgtat caaaaagtgc ctgcttttat cgtgaaacg cttgccgcta aaggggcaga 1860  
 aaacatcgct gaccgcggtg aagcagatgc aagcgacgac ttgaaggca catatgaaga 1920  
 atggcgtgaa catatgtgga gtgacgtagc agcctacttt aacctcgaca ttgaaaacag 1980  
 tgaagataat aaatctactc ttctacttca atttgcgac agcgcgcggg atatgccgct 2040  
 tgcgaaaatg cagggtgctg tttaacgaa cgtcgtagca agcaaagaac ttcaacagcc 2100  
 aggcagtgc cgaagcagc gacatcttga aattgaactt ccaaaagaag cttcttatca 2160  
 agaaggagat catttaggtg ttattcctcg caactatgaa ggaatagtaa accgtgtaac 2220  
  
 agcaaggttc ggcctagatg catcacagca aatccgtctg gaagcagaag aagaaaaatt 2280  
 agtcatttg ccactcgcta aaacagtatc cgtagaagag cttctgcaat acgtggagct 2340  
 tcaagatcct gttacgcga cgcagcttcg cgcaatggct gctaaaacgg tctgcccgcc 2400  
 gcataaagta gagcttgaag ctttgcctga aaagcaagcc tacaagaac aagtgtggc 2460  
 aaaacgttta acaatgcttg aactgcttga aaaatacccg gcgtgtgaaa tgaaattcag 2520  
 cgaatttacc gcccttctcg caagcatagc cccgcgctat tactcgattt cttcatcacc 2580  
 tcgtgtcgat gaaaaacaag caagcatcac ggtcagcgtt gtctcaggag aagcgtggag 2640  
  
 cggatatgga gaatataaag gaattgcgtc gaactatctt gccgagctgc aagaaggaga 2700  
 tacgattacg tgctttatct ccacaccgca gtcagaattt acgtcgcaa aagaccctga 2760  
 aacgcgctt atcatggtcg gaccgggaac aggcgtcgcg ccgtttagag gctttgtgca 2820  
 ggcgcgcaaa cagctaaaag aacaaggaca gtcacttga gaagcacatt tatacttcgg 2880  
 ctgccgttca cctcatgaag actatctgta tcaagaagag cttgaaaacg cccaaagcga 2940  
 aggcacatt acgttcata ccgctttttc tcgcatgcca aatcagccga aaacatacgt 3000  
 tcagcacgta atggaacaag acggcaagaa attgattgaa cttcttgatc aaggagcgca 3060  
  
 cttctatatt tgcggagacg gaagccaaat ggacactgcc gttgaagcaa cgcttatgaa 3120  
 aagctatgct gacgttcacc aagttagtga agcagacgct cgcttatggc tgcagcagct 3180  
 agaagaaaaa ggccgatagc caaaagacgt gtgggctggg taa 3223

<210> 2

<211> 321

<212> PRT

<213> Candida boidinii

<400> 2

Met Ser Ser Pro Leu Leu Thr Leu Asn Asn Gly Leu Lys Met Pro Gln

1 5 10 15

Ile Gly Phe Gly Cys Trp Lys Val Asp Asn Ala Thr Cys Ala Glu Thr

20 25 30

Ile Tyr Glu Ala Ile Lys Val Gly Tyr Arg Leu Phe Asp Gly Ala Met

35 40 45

Asp Tyr Gly Asn Glu Lys Glu Val Gly Glu Gly Val Asn Lys Ala Ile

50 55 60

Lys Asp Gly Leu Val Lys Arg Glu Glu Leu Phe Ile Val Ser Lys Leu

65 70 75 80

Trp Asn Asn Phe His His Pro Asp Ser Val Lys Leu Ala Ile Lys Lys

85 90 95

Val Leu Ser Asp Leu Asn Leu Glu Tyr Ile Asp Leu Phe Tyr Met His

100 105 110

Phe Pro Ile Ala Gln Lys Phe Val Pro Ile Glu Lys Lys Tyr Pro Pro

115 120 125

Asn Phe Tyr Cys Gly Asp Gly Asp Lys Trp Ser Phe Glu Asp Val Pro

130 135 140

Leu Leu Thr Thr Trp Arg Ala Met Glu Glu Leu Val Glu Glu Gly Leu

145 150 155 160

Val Lys Ser Ile Gly Ile Ser Asn Phe Val Gly Ala Leu Ile Gln Asp

165 170 175

Leu Leu Arg Gly Cys Lys Ile Arg Pro Ala Val Leu Glu Ile Glu His

180 185 190

His Pro Tyr Leu Val Gln Pro Arg Leu Ile Glu Tyr Ala Lys Thr Glu

195 200 205

Gly Ile His Val Thr Ala Tyr Ser Ser Phe Gly Pro Gln Ser Phe Val

210 215 220

Glu Leu Asp His Pro Lys Val Lys Asp Cys Thr Thr Leu Phe Lys His

225                      230                      235                      240

Glu Thr Ile Thr Ser Ile Ala Ser Ala His Asp Val Pro Pro Ala Lys

245 250 255

Val Leu Leu Arg Trp Ala Thr Gln Arg Gly Leu Ala Val Ile Pro Lys

260 265 270

Ser Asn Lys Lys Glu Arg Leu Leu Gly Asn Leu Lys Ile Asn Asp Phe

275 280 285

Asp Leu Thr Glu Ala Glu Leu Glu Lys Ile Glu Ala Leu Asp Ile Gly

290 295 300

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

305                      310                      315                      320

Ile

<210> 3

<211> 966

<212> DNA

<213> Candida boidinii

<400> 3

atgtcaagcc cacttttaac tttaacaat ggcttaaaga tgccacaaat cggttttggt 60

tgttggaaag tcgacaatgc cacttgtgcc gaaactatTT atgaagccat taaagtcggt 120

tacagattat tcgatggtgc tatggattac ggtaatgaaa aagaagttgg tgaagtggtt 180

aacaaagcga tcaaagatgg tttagttaaa agagaagaat tattcattgt ttcaaaatta 240

tggaacaatt tccatcatcc agattcagtt aaactagcaa tcaaaaaagt tctatctgat 300

ttaaatttag aatacattga tttattctat atgcatttcc caattgctca aaaatttggt 360

ccaattgaaa agaaatatcc accaaatfff tattgtggtg atggtgataa atggagtfff 420

gaagatgtcc cacttttaac aacttggaga gctatggaag aattggttga agaaggttta 480

gttaaataca tttggtatctc taactttgtc ggtgctttga ttcaagattt attaagaggt 540

tgtaaaatta gaccagcagt tttagaaatt gaacatcacc catatttagt tcaaccaaga 600

ttaattgaat acgctaaaac tgaaggtatt cacgttaccg catactcttc atttggcca 660

caatcatttg ttgaattaga ccatacctaaa gttaaagact gtaccactct attcaaacat 720

gaaacaatta cttcaattgc ttcagctcat gacgtccctc cagctaaagt cttattgaga 780

tgggctactc aaagaggttt agcagttatc ccaaaatcta ataaaaagga aagattatta 840  
 ggtaatttga aaattaatga ttttgattta actgaagctg aacttgaaaa aattgaagca 900  
 ttagatattg gttaaagatt taatgatcca tggacttggg gttacaatat tccaacattt 960  
 atttaa 966

<210> 4

<211> 321

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of XR

<400

> 4

Met Ser Ser Pro Leu Leu Thr Leu Asn Asn Gly Leu Lys Met Pro Gln

1 5 10 15

Ile Gly Phe Gly Cys Trp Lys Val Asp Asn Ala Thr Cys Ala Glu Thr

20 25 30

Ile Tyr Glu Ala Ile Lys Val Gly Tyr Arg Leu Phe Asp Gly Ala Met

35 40 45

Asp Tyr Gly Asn Glu Lys Glu Val Gly Glu Gly Val Asn Lys Ala Ile

50 55 60

Lys Asp Gly Leu Val Lys Arg Glu Glu Leu Phe Ile Val Ser Lys Leu

65 70 75 80

Trp Asn Asn Phe His His Pro Asp Ser Val Lys Leu Ala Ile Lys Lys

85 90 95

Val Leu Ser Asp Leu Asn Leu Glu Tyr Ile Asp Leu Phe Tyr Met His

100 105 110

Phe Pro Ile Ala Gln Lys Phe Val Pro Ile Glu Lys Lys Tyr Pro Pro

115 120 125

Asn Phe Tyr Cys Gly Asp Gly Asp Lys Trp Ser Phe Glu Asp Val Pro

130 135 140

Leu Leu Thr Thr Trp Arg Ala Met Glu Glu Leu Val Glu Glu Gly Leu

145 150 155 160

Val Lys Ser Ile Gly Ile Ser Asn Phe Val Gly Ala Leu Ile Gln Asp

165 170 175

Leu Leu Arg Gly Cys Lys Ile Arg Pro Ala Val Leu Glu Ile Glu His  
180 185 190

His Pro Tyr Leu Val Gln Pro Arg Leu Ile Glu Tyr Ala Lys Thr Glu  
195 200 205

Gly Ile His Val Thr Ala Tyr Ser Ser Phe Gly Pro Gln Ser Phe Val

210 215 220

Glu Leu Asp His Pro Lys Val Lys Asp Cys Thr Thr Leu Phe Lys His  
225 230 235 240

Glu Thr Ile Thr Ser Ile Ala Ser Ala His Asp Val Pro Pro Ala Lys  
245 250 255

Val Leu Leu Arg Trp Ala Thr Gln Arg Gly Leu Ala Val Ile Pro Arg  
260 265 270

Glu Gly Lys Lys Glu Arg Leu Leu Gly Asn Leu Lys Ile Asn Asp Phe  
275 280 285

Asp Leu Thr Glu Ala Glu Leu Glu Lys Ile Glu Ala Leu Asp Ile Gly  
290 295 300

Leu Arg Phe Asn Asp Pro Trp Thr Trp Gly Tyr Asn Ile Pro Thr Phe  
305 310 315 320

Ile

<210> 5

<211> 966

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence of XR

<400> 5

atgtcaagcc cacttttaac tttaacaat ggcttaaaga tgccacaaat cggttttggt 60

tgttggaag tcgacaatgc cacttgtgcc gaaactatit atgaagccat taaagtcggt 120

tacagattat tcgatgggtgc tatggattac ggtaatgaaa aagaagttgg tgaaggtgtt 180

aacaaagcga tcaaagatgg tttagttaaa agagaagaat tattcattgt ttcaaaatta 240

tggaacaatt tccatcatcc agattcagtt aaactagcaa tcaaaaaagt tctatctgat 300

ttaaatttag aatacattga ttatttctat atgcatttcc caattgtca aaaatttggt 360

|                                                                      |     |
|----------------------------------------------------------------------|-----|
| ccaattgaaa agaaatatcc accaaatattt tattgtgggtg atggtgataa atggagtattt | 420 |
| gaagatgtcc cacttttaac aacttggaga gctatggaag aattgggtga agaaggttta    | 480 |
| gttaaatcaa ttggtatctc taactttgtc ggtgctttga ttcaagattt attaagaggt    | 540 |
| tgtaaaatta gaccagcagt tttagaaatt gaacatcacc cataatttagt tcaaccaaga   | 600 |
| ttaattgaat acgctaaaac tgaaggattt cacgttaccg catactcttc atttgggtcca   | 660 |
| caatcatittg ttgaattaga ccatcctaaa gttaaagact gtaccactct attcaaacat   | 720 |
| gaaacaatta cttaaatgc ttcagctcat gacgtccctc cagctaaagt cttattgaga     | 780 |
| tgggctactc aaagaggttt agcagttatc ccacgtgaag gcaaaaagga aagattatta    | 840 |
| ggtaatttga aaattaatga ttttgattta actgaagctg aacttgaaaa aattgaagca    | 900 |
| ttagatattg gttaagatt taatgatcca tggacttggg gttacaatat tccaacattt     | 960 |
| atttaa                                                               | 966 |
| <210> 6                                                              |     |
| <211> 690                                                            |     |
| <212> DNA                                                            |     |
| <213> Candida tropicalis                                             |     |
| <400> 6                                                              |     |
| atgagttttt ctaattataa agtaatcgcg atgccggtgt tggttgctaa ttttgttttg    | 60  |
| ggggcggcca ctgcatgggc gaatgaaaat tatccggcga aatctgctgg ctataatcag    | 120 |
| ggtgactggg tcgctagctt caatttttct aaggtctatg tgggtgagga gcttggcgat    | 180 |
| ctaaatgttg gagggggggc tttgccaaat gctgatgtaa gtattggtaa tgatacaaca    | 240 |
| cttacgtttg atatgccta tttgttagc tcaaatatag cgggtggattt tttgttggg      | 300 |
| gtgccagcta gggctaaatt tcaaggtgag aaatcaatct cctcgctggg aagagtcagt    | 360 |
| gaagttgatt acggccctgc aattctttcg cttaaatatc attacgatag ctttgagcga    | 420 |
| ctttatccat atgttgggtg tgggtttggt cgggtgctat tttttgataa aaccgacggt    | 480 |
| gctttgagtt cgtttgatat taaggataaa tgggcgcctg cttttcaggt tggccttaga    | 540 |
| tatgaccttg gtaactcatg gatgctaaat tcagatgtgc gttatattcc tttcaaacg     | 600 |
| gacgtcacag gtactcttgg cccggttctt gtttctacta aaattgaggt tgatccttc     | 660 |
| attctcagtc ttggtgcgtc atatgttttc                                     | 690 |
| <210> 7                                                              |     |
| <211> 1044                                                           |     |
| <212> DNA                                                            |     |

<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 7

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| atgtctatcc cagaaactca aaaaggtgtt atctttctacg aatcccacgg taaattggaa | 60  |
| cacaaggata ttccagttcc aaagccaaag gccaacgaat tgttgatcaa cgttaagtac  | 120 |
| tctgggtgtct gtcacaccga cttgcacgct tggcacggtg actggccatt gccagttaag | 180 |
| ctaccattag tcggtggta cgaaggtgcc ggtgtcgttg tcggcatggg tgaacacgtt   | 240 |
| aagggtctga agatcggta ctacccggt atcaaatggt tgaacggttc ttgtatggcc    | 300 |
| tgtgaatact gtgaattggg taacgaatcc aactgtcttc acgtgactt gtctggttac   | 360 |

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| acccacgacg gtcttttcca acaatacgt accgtgacg ctgttcaagc cgctcacatt    | 420 |
| cctcaaggta ccgacttggc ccaagtcgcc cccatcttgt gtgctggtat caccgtctac  | 480 |
| aaggctttga agtctgctaa cttgatggcc ggtcattggg ttgccatttc cgggtctgcc  | 540 |
| ggtggcttag gtcttttggc tgttcaatac gccaaaggcta tgggttacag agtcttgggt | 600 |
| attgacggtg gtgaaggtaa ggaagaatta ttcagatcca tcggtggta agtcttcatt   | 660 |
| gacttacta aggaaaagga cattgtcggg gctgttctaa aggccactga cgggtgtgct   | 720 |
| cacggtgtca tcaacgttcc cgtttccgaa gccgtattg aagcttctac cagatacgtt   | 780 |

|                                                                   |      |
|-------------------------------------------------------------------|------|
| agagctaacg gtaccaccgt tttggtcggg atgccagctg gtgccaagt ttgttctgat  | 840  |
| gtcttcaacc aagtcgtcaa gtccatctct attgttgggt cttacgtcgg taacagagcc | 900  |
| gacaccagag aagcttttga cttcttcgcc agaggtttgg tcaagtctcc aatcaagggt | 960  |
| gtcggttgt ctaccttgcc agaaatttac gaaaagatgg aaaagggtca aatcgttggg  | 1020 |
| agatacgttg ttgacacttc taaa                                        | 1044 |

<210> 8

<211> 1479

<212> DNA

<213> Candida tropicalis

<400> 8

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| atgtctttgc cagtcgtcac caaactcact actcctaagg gtctctccta caaccaacca | 60  |
| ttaggtttgt tcatcaaca cgagttcgtt gtccaaaat ccaagcaaac cttcgaagtc   | 120 |
| ttctccctt ccaccgaaga gaagatcacc gatgtctacg aagcttttagc cgaagatgtc | 180 |
| gacgttgctg ccgaagcagc ttacgccgcc taccacaacg actgggccct tgggtgtcca | 240 |
| gaacaaagag ccaagatctt gctcaagttg gccgacttgg tcgaagaaca cgccgagacc | 300 |
| ttggcccaga tcgaaacctg ggacaacggt aagtccttgc agaacgccag aggcgatatc | 360 |
| ggattcactg ccgcttactt tagatcctgt ggtggatggg ccgacaagaa caccggtgac | 420 |

aacatcaaca ccggtggcac ccaccttact tacaccaga ggtgccatt ggtgtgtgtgt 480  
  
 caaatcatcc cttagaacgc aagtaccttg atggccagtt ggaagcttgg tcccgttacc 540  
 gctaccggtg gtaccactgt gcttaaatca gctgaagcta ccccatagc tgtctgttac 600  
 ctgcaccaat tgtagttga agccggtctt ccaaagggtg tcgttaacat tgtttccggt 660  
 ttcggtacca ctgccggttc cgctatcgct agccatccaa agatcgacaa ggtcgccctt 720  
 actggttcca ccaacaccgg taagatcatc atgaagttgg ctgcggagtc caacttgaag 780  
 aaggtcactt tgggaattggg tggtaagtcc ccacacattg ttttaacga cgctgacttg 840  
 gaccgcgccg tcagctactt ggttgctgcc attttcagta actccggcga gacctgtgct 900  
  
 gccggatccc gtgtcttggg gcaatccggt gtctacgacg aagtgtgtgc taagtccaag 960  
 aaggcgccg aggccgttaa agttggtgac ccattcgacg aagaacctt catgggttcc 1020  
 caagtcaacg aagtccaatt gtctagaatc ttgcaataca tcgagctggg taaggaacaa 1080  
 ggtgccactg ttgtcacggg tggtagtaga gccggggaca agggttactt cgtcaagcca 1140  
 actattttcg ccgacgttca caaggacatg actatcgta aggaagaaat ctttgcct 1200  
 gtgtctccg tcgtcaaatt cgataccatt gaagaagcta tcgctttggc taacgactcc 1260  
 gaatacgggt tggccgctgg tatccacacc actaacatca gcaccggtgt caccgtcgct 1320  
  
 aacagaatca agtccggtac tgtctgggtc aaccttaca atgacttgca cccatggtt 1380  
 ccattcgggt gtttcggcgc ttctggtatc ggagagaaa tgggtgcaga agtcatgaag 1440  
 gaatacaccg aagttaaggc tgtagaatt aagctcact 1479  
  
 <210> 9  
 <211> 70  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Forward primer for FadE\_del  
 <400> 9  
 ccatacatc acaagtggc agacctccta caagtaagg gcttttcgt gtgtaggctg 60  
 gagctgcttc 70  
  
 <210> 10  
 <211> 70  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Reverse primer for FadE\_del

<400> 10  
ttacgcggct tcaactttcc gcactttctc cggcaacttt accggcttcg attccgggga 60  
tccgtcgacc 70

<210> 11  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Forward primer for FadE\_seq  
<400> 11  
aaaagttagc cagcgtttcc gccgc 25  
<210> 12

<211> 25  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Reverse primer for FadE\_seq  
<400> 12  
acgttgggag atgagacgta tcagg 25  
<210> 13  
<211> 70  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Forward primer for FadR\_del  
<400> 13  
tctggtatga tgagtccaac ttgttttgc tgtgttatgg aaatctcact gtgtaggctg 60  
gagctgcttc 70  
<210> 14  
<211> 70

<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Reverse primer for FadR\_del  
<400> 14  
aacaacaaaa aaccctcgt ttgaggggtt tgctctttaa acggaaggga attccgggga 60  
tccgtcgacc 70

<210> 15  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Forward primer for FadR\_seq  
 <400> 15  
 gggcgagttt gtaccagtcg g 21  
 <210> 16  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Reverse primer for FadR\_seq  
 <400> 16  
 gcgcggcgac cgttcgctg 19  
 <210> 17  
 <211> 48  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Forward primer for Maq  
 <400> 17  
 atagatcttt taagaaggag atatacatat gccaacactg cccagaac 48  
 <210> 18  
 <211> 85  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Reverse primer for Maq  
 <400> 18  
 ctgttcagtg ctaggtgaag gaatgctgcc gccgtgccg ccgctgccgc cactgttcgg 60  
 tgtcagtttg accatcaacc tggaa 85  
 <210> 19  
 <211> 83  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer for NCP

<400> 19

gcggcagcat tccttcacct agcactgaac agtctgctaa aaaagtacgc aaaaaggcag 60

aaaacgctat aatagccgc tgc 83

<210> 20

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer for NCP

<400> 20

attctcgagc gatatcgatc gttattacc agccacacg tcttttg 47

<210> 21

<211> 65

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer for AlkL

<400> 21

ggtcgatcgt ttaagaagga gatatacata tgagtttttc taattataaa gtaatcgca 60

tgccg 65

<210> 22

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer for AlkL

<400> 22

atctcgagtt attagaaaac atatgacgca ccaa 34

<210> 23

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer for ADH1

<400> 23

tttaagaagg agatatacac atgtctatcc cagaaactca 40

<210> 24  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Reverse primer for ADH1  
 <400> 24  
 cttactcgag ttatttagaa gtgtcaacaa cgt 33  
 <210> 25  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Forward primer for ALD5  
 <400> 25  
 atacatatgt ctttgccagt cgtcaccaa 29  
 <210> 26  
 <211> 49  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Reverse primer for ALD5  
 <400> 26  
 gtgtatatct ccttcttaaa agatccttaa gtgagcttaa ttctaacag 49  
 <210> 27  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Forward primer for ALD  
 <400> 27  
 aggcctcgag aattgtgagc ggataacaat tgac 34  
 <210> 28  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Forward primer for XR

<400> 28  
gcgcatatgt caagcccact tttaacttta aac 33

<210> 29  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Reverse primer for XR  
<400> 29  
ctttcctttt tgccttcacg tgggataact gctaaacctc 40

<210> 30  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Forward primer for XR\_REG  
<400> 30  
cgtgaaggca aaaaggaaag attattaggt aatt 34

<210> 31  
<211> 36  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Reverse primer for XR\_REG  
<400> 31  
cgcggtatcct taaataaatg ttggaatatt gtaacc 36

<210> 32  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Forward primer for ALD\_FP(NdeI)  
<400> 32  
atacatatgt ctttgccagt cgtcaccaa 29

<210> 33  
<211> 36  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer for ALD\_RP(XhoI)

<400> 33

cttactcgag ttaagtgagc ttaattctaa cagcct 36

<210> 34

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer for ALD\_FP(NdeI)

<400> 34

atacatatgt ctttgccagt cgtcaccaa 29

<210> 35

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer for ADH\_RP(XhoI)

<400> 35

cttactcgag ttatttagaa gtgtcaacaa cgt 33