



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0047992
(43) 공개일자 2021년05월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/52 (2006.01) *C12N 9/10* (2006.01)

C12N 9/88 (2006.01) *C12P 5/00* (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 15/52 (2013.01)

C12N 9/1085 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0131159

(22) 출원일자 2019년10월22일

심사청구일자 2019년10월22일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

이은열

서울특별시 강남구 광평로34길 55, 104동 802호(수서동, 강남대시앙포레아파트)

뉴엔 덕 안

경기도 용인시 기흥구 서그내로16번길 1, 2-2호(서천동, 진영빌라 4동)

이옥경

경기도 수원시 영통구 봉영로1517번길 27, 907동 402호(영통동, 벽적골9단지 주공아파트)

(74) 대리인

위병갑

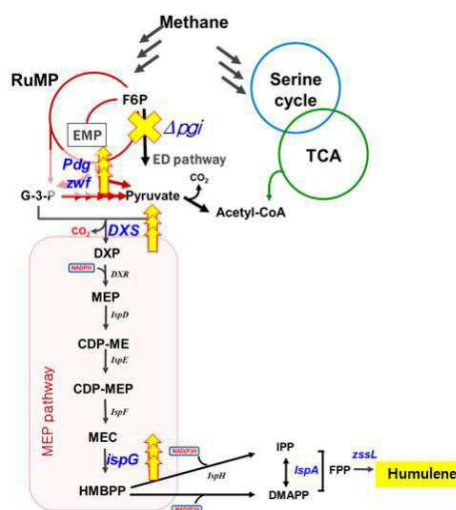
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 알파-휴물렌 생산용 형질전환 메탄자화균 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 메탄으로부터 알파-휴물렌(α -humulene) 생산용 형질전환 메탄자화균 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명의 형질전환 메탄자화균은 항산화, 항염, 항균작용 및 합암작용을 가지는 것으로 알려진 알파-휴물렌을 생산할 수 있고 포도당 기반이 아닌 저가의 탄소원인 메탄을 이용하므로 생산단가를 감소시킬 수 있어서 매우 유용하다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 9/88 (2013.01)
C12P 5/002 (2013.01)
C12Y 101/01044 (2013.01)
C12Y 101/01049 (2013.01)
C12Y 117/07001 (2013.01)
C12Y 202/01007 (2013.01)
C12Y 205/01001 (2013.01)
C12Y 205/0101 (2013.01)
C12Y 401/02009 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2015M3D3A1A01064882
부처명	한국연구재단
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	C1 가스리파이너리 사업
연구과제명	메탄-메탄올 전환 플랫폼 균주 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경희대학교
연구기간	2019.01.01 ~ 2019.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

알파-후물렌 생성효소(α -humulene synthase) 및 파르네실 피로포스페이트 합성효소(farnesyl pyrophosphate synthase)의 활성이 강화된 알파-후물렌을 생산하는 형질전환 메탄자화균.

청구항 2

제 1항에 있어서, 알파-후물렌 생성효소(α -humulene synthase)를 코딩하는 유전자(zssl)는 서열번호 1의 염기서열로 표시되고, 파르네실 피로포스페이트 합성효소(farnesyl pyrophosphate synthase)를 코딩하는 유전자(ispA)는 서열번호 2의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 형질전환 메탄자화균.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 형질전환 메탄자화균은 1-데옥시-크실룰로오스-5-포스페이트 합성효소(1-deoxy-xylulose-5-phosphate synthase) 또는 (E)-4-하이드록시-3-메틸부트-2-에닐-디포스페이트 합성효소((E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl-diphosphate synthase)의 활성이 더 강화되어, MEP(methylerythritol phosphate) 경로가 강화된 것을 특징으로 하는 형질전환 메탄자화균.

청구항 4

제 3항에 있어서, 1-데옥시-크실룰로오스-5-포스페이트 합성효소(1-deoxy-xylulose-5-phosphate synthase)를 코딩하는 유전자(dxsl)는 서열번호 3의 염기서열로 표시되고, (E)-4-하이드록시-3-메틸부트-2-에닐-디포스페이트 합성효소((E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl-diphosphate synthase)를 코딩하는 유전자(ispG)는 서열번호 4의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 형질전환 메탄자화균.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 형질전환 메탄자화균은 글루코즈-6-포스페이트 이성화효소(glucose-6-phosphate isomerase)의 활성이 감소 또는 불활성화되는 것을 특징으로 하는 형질전환 메탄자화균.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 글루코즈-6-포스페이트 이성화효소(glucose-6-phosphate isomerase)를 코딩하는 유전자(pgi)는 서열번호 5의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 형질전환 메탄자화균.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 형질전환 메탄자화균은 글루코즈-6-포스페이트 탈수소효소(glucose 6-phosphate dehydrogenase) 또는 포스포글로코네이트 탈수소효소(phosphogluconate dehydrogenase)의 활성이 더 강화된 것을 특징으로 하는 형질전환 메탄자화균.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 글루코즈-6-포스페이트 탈수소효소(glucose 6-phosphate dehydrogenase)를 코딩하는 유전자(zwf2)는 서열번호 6의 염기서열로 표시되고, 포스포글로코네이트 탈수소효소(phosphogluconate dehydrogenase)를 코딩하는 유전자(gnd)는 서열번호 7의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 형질전환 메탄자화균.

청구항 9

제 1항에 있어서, 상기 형질전환 메탄자화균은 글리포스포케톨라아제(phosphoketolase)의 활성이 더 강화된 것을

특징으로 하는 형질전환 메탄자화균.

청구항 10

제 9항에 있어서, 포스포케톨라아제(phosphoketolase)를 코딩하는 유전자(pkt2)는 서열번호 8의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 형질전환 메탄자화균.

청구항 11

제 1항에 있어서, 상기 메탄자화균은 메틸로모나스 속(Methylomonas), 메틸로박터 속(Methylobacter), 메틸로코커스 속(Methylococcus), 메틸로스페라 속(Methylosphaera), 메틸로칼덤 속(Methylocaldum), 메틸로글로버스 속(Methyloglobus), 메틸로사르시나 속(Methylosarcina), 메틸로프로펀더스 속(Methyloprofundus), 메틸로셀머스 속(Methylothermus), 메틸로할로비우스 속(Methylohalobius), 메틸로게아 속(Methylogaea), 메틸로마리넘 속(Methylomarimum), 메틸로벌럼 속(Methylovulum), 메틸로마리노범 속(Methylomarinovum), 메틸로러브럼 속(Methylorubrum), 메틸로파라코커스 속(Methyloparacoccus), 메틸로시스티스 속(Methylocystis), 메틸로셀라 속(Methylocella), 메틸로캡사 속(Methylocapsa), 메틸로퍼룰라 속(Methylofurula), 메틸아시디필럼 속(Methylacidiphilum), 메틸아시디마이크로비움 속(Methylacidimicrobium), 메틸로마이크로비움 속(Methylomicrobium) 속 또는 메틸로시너스 속(Methylosinus) 균주인 것을 특징으로 하는 형질전환 메탄자화균.

청구항 12

제 1항에 있어서, 상기 메탄자화균은 메틸로마이크로비움 트리코스포룸(*Methylomicrobium alcaliphilum*) 20Z인 것을 특징으로 하는 형질전환 메탄자화균.

청구항 13

제 1항에 있어서, 상기 형질전환 메탄자화균은 메탄을 사용하여 알파-휴물렌을 생산하는 것을 특징으로 하는 형질전환 메탄자화균.

청구항 14

메탄을 포함하는 배양액에 제1항의 형질전환 메탄자화균을 배양하는 단계를 포함하는 알파-휴물렌의 제조방법.

청구항 15

제 14항에 있어서, 상기 배양액으로부터 알파-휴물렌을 회수하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 알파-휴물렌의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 메탄으로부터 알파-휴물렌(α -humulene) 생성능을 가지는 형질전환 메탄자화균 및 이를 이용한 알파-휴물렌의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 이소프레노이드(Isoprenoids)는 식물, 동물 및 미생물을 포함한 많은 생물체의 2차 대사산물로써 의약품, 화장품 및 바이오 연료에 광범위하게 사용되고 있다. 이소프레노이드(isoprenoid)는 낮은 생산성과 추출 방법의 어려움으로 인하여, 대장균과 같은 미생물에 식물 유래 이소프레노이드 생합성 경로를 도입하여 생물학적 전환을 통하여 생산하는 것이 더 매력적이다.

[0003] 수년 동안, 대사공학적으로 개량된 대장균을 이용하여 높은 생산성을 가지고 다양한 이소프레노이드가 생산되어 왔다. 여러 종류의 이소프레노이드 중에서, 세스퀴테르페노이드(sesquiterpenoid)는 7,000개 이상의 물질이 알려진 이소프레노이드의 가장 큰 하위 그룹군이며, 화학 물질(예: farnesol, artemisinin) 및 바이오 연료 대체물(예: farnesene, bisabolene 및 휴물렌)로 사용되고 있다. 세스퀴테르페노이드는 자연적으로 C15 골격을 보유하고, 파르네실 2인산(farnesyl pyrophosphate, FPP)로부터 합성된다. FPP는 2몰의 이소펜 테닐피로인산

(IPP) 및 1몰의 디메틸알릴 피로 포스페이트(DMAPP)의 축합에 의해 형성되며 IPP 및 DMAPP는 일반적으로 메발로산(mevalonate, MVA) 경로 또는 메틸에리트리톨 포스페이트(methylerythritol phosphate, MEP) 경로를 통해 생성된다고 알려져 있으며, 대장균의 MEP 경로의 상향 조절 또는 외래 MVA 경로의 도입을 통하여 효율적인 세스퀴테르페노이드 생산이 가능하다.

[0004] 이소프레노이드 생산을 위하여 사용되는 기질은 주로 포도당으로 기질 단가가 높기 때문에 이소프레노이드 생산 공정 비용을 향상시킬 수 있어, 이를 대체할 저렴한 차세대 탄소 공급원으로 메탄 및 메탄올과 같은 C1 탄소원이 고려되고 있으며, 메탄을 유일 탄소원 및 에너지원으로 사용하는 메탄자화균을 이용한 메탄의 생물학적 이소프레노이드 생산은 향후 유망한 생명공학기술로 평가받을 수 있다. 세스퀴테르페노이드의 한 종류인 휴물렌은 향면역 및 항암치료제로 많은 관심을 받고 있으며 다양한 미생물을 이용한 바이오 생합성이 연구 중에 있으나, 아직까지 메탄자화균을 이용한 생합성 방법은 보고된 바 없다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0005] (비특허문헌 0001) (001) J Microbiol Biotechnol. 2015 Mar;25(3):375-80.
(비특허문헌 0002) (002) Sci Rep. 2018 Feb 6;8(1):2512. doi: 10.1038/s41598-018-20574-z.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 이에 본 발명자들은 저렴한 탄소원인 메탄을 이용하여 알파-휴물렌을 생산할 수 있는 형질전환 메탄자화균을 개발하고, MEP 경로의 재설계를 통한 FPP 또는 NADPH 공급 풀 증가를 위한 경로 재설계 및 포스포케톨레이즈 경로의 도입을 통하여 알파-휴물렌 생산성 증대 기술을 완성하였다.

[0007] 본 발명은 알파-휴물렌 합성효소(α -humulene synthase, *zssI*) 및 파르네실 피로포스페이트 합성효소(farnesyl pyrophosphate, *ispA*)의 활성이 강화된 알파-휴물렌을 생산하는 형질전환 메탄자화균을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 형질전환 메탄자화균에 1-데옥시-크실룰로오스-5-포스페이트 합성 효소(1-deoxy-xylulose-5-phosphate, *dxs*), (E)-4-하이드록시-3-메틸부트-2-에닐-디포스페이트 합성효소 ((E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl-diphosphate synthase, *ispG*)의 활성화이 강화된 알파-휴물렌을 생산하는 형질전환 메탄자화균을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 형질전환 메탄자화균에 글루코즈-6-포스페이트 이성화효소(glucose-6-phosphate isomerase, *pgi*)의 활성이 약화 또는 불활성화된 알파-휴물렌을 생산하는 형질전환 메탄자화균을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 상기 형질전환 메탄자화균에 글루코즈-6-포스페이트 탈수소효소(glucose 6-phosphate dehydrogenase, *zwf2*) 및 포스포글루코네이트 탈수소효소(phosphogluconate dehydrogenase, *gnd*)의 활성이 강화된 알파-휴물렌을 생산하는 형질전환 메탄자화균을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 상기 형질전환 메탄자화균에 포스토케톨레이즈 (phosphoketolase, *pkt*)의 활성이 강화된 알파-휴물렌을 생산하는 형질전환 메탄자화균을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 상기 형질전환 메탄자화균을 이용하여 메탄 기질로부터 알파-휴물렌을 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 발명에서 개시된 각각의 설명 및 실시 형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[0014] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 하나의 양태는 본 발명은 알파-휴물렌 합성효소(α -humulene synthase,

zssI) 및 파르네실 피로포스페이트 합성효소(farnesyl pyrophosphate, *ispA*)의 활성이 강화된 알파-후물렌을 생산하는 형질전환 메탄자화균을 제공한다.

- [0015] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 상기 형질전환 메탄자화균에 1-데옥시-크실룰로오스-5-포스페이트 합성 효소(1-deoxy-xylulose-5-phosphate, *dxs*), (E)-4-하이드록시-3-메틸부트-2-에닐-디포스페이트 합성효소 ((E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl-diphosphate synthase, *ispG*) 활성화이 강화된 알파-후물렌을 생산하는 형질전환 메탄자화균을 제공한다.
- [0016] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 상기 형질전환 메탄자화균에 글루코즈-6-포스페이트 이성화효소 (glucose-6-phosphate isomerase, *pgi*)의 약화 또는 불활성화된 알파-후물렌을 생산하는 형질전환 메탄자화균을 제공한다.
- [0017] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 상기 형질전환 메탄자화균에 글루코즈-6-포스페이트 탈수소효소(glucose 6-phosphate dehydrogenase 2, *zwf* 2) 및 포스포글루코네이트 탈수소효소(phosphogluconate dehydrogenase, *pdg*)의 활성이 강화된 알파-후물렌을 생산하는 형질전환 메탄자화균을 제공한다.
- [0018] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 상기 형질전환 메탄자화균에 포스포케톨레이스(phosphoketolase, *pkt*) 활성이 강화된 알파-후물렌을 생산하는 형질전환 메탄자화균을 제공한다.
- [0019] 또한, 발명자들은 알파-후물렌을 생산할 수 있는 방법으로, 메탄을 유일 탄소원으로 이용하여 예의 연구 노력한 결과, 놀랍게도 본 발명의 형질전환 메탄자화균을 이용할 경우 알파-후물렌을 생산이 가능함을 확인하였다. 메틸로마이크로비움 트리코스포룸(*Methylobacterium alcaliphilum*) 20Z에 MEP(methylerythritol phosphate) 경로의 최적화, EMP 경로로의 대사 흐름 조절, 또는 NADPH 풀을 강화시킴으로써 메탄으로부터 알파-후물렌을 생산할 수 있음은 지금까지 전혀 알려지지 않았고, 본 발명을 통해 최초로 개발되었다는 점에서 그 의의가 매우 크다고 할 수 있다.
- [0020] 본 발명의 용어 "알파-후물렌(α -humulene)"은 11-원고리를 함유하고 3개의 비접합된 C=C 이중 결합을 함유하는 3개의 이소프렌 단위로 이루어진 자연 발생 하나의 고리가 있는 세스퀴테르펜(monocyclic sesquiterpene, $C_{15}H_{24}$)이며, 이들 중 2 개는 삼중 치환되고 하나는 이중 치환된다. 또한, 바이오 디젤 연료로서 대체가 가능하기 때문에 바이오 연료분야로 활용이 가능하다.
- [0021] 본 발명에서 용어 "메탄자화균(methanotroph)"은 메탄을 주요 탄소원 또는 에너지원으로 사용하는 세균을 의미한다. 상기 메탄자화균은 본 발명에서 형질전환의 대상이 되는 숙주 균주를 의미할 수 있으며, 본 발명의 목적상 메탄을 탄소원으로 사용하여, FPP를 거쳐 최종적으로 알파-후물린을 생산할 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않는다. 알파-후물린을 생산할 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않는다. 또한, 메탄, 메탄올, 메틸아민 등 C1 화합물을 에너지원으로 사용하는 메틸자화균(methylotroph) 중에서 메탄을 함께 사용할 수 있는 균주 또한 본 발명의 메탄자화균에 포함될 수 있음은 당업자에게 자명하다. 상기 메탄자화균은 메탄 등 C1 화합물을 에너지원으로 사용할 수 있는 것인한 특별히 이에 제한되지 않으나, 메틸로모나스 속(*Methylomonas*), 메틸로박터속(*Methylobacter*), 메틸로코커스 속(*Methylococcus*), 메틸로스페라 속(*Methylosphaera*), 메틸로칼덤 속(*Methylocaldum*), 메틸로글로버스 속(*Methyloglobus*), 메틸로사르시나 속(*Methylosarcina*), 메틸로프로펀더스 속(*Methyloprofundus*), 메틸로셀머스 속(*Methylothermus*), 메틸로할로비우스 속(*Methylohalobius*), 메틸로게아 속(*Methylogaea*), 메틸로마리넴 속(*Methylomarinum*), 메틸로벌럼 속(*Methylovulum*), 메틸로마리노븀 속(*Methylomarinovum*), 메틸로러브럼 속(*Methylorubrum*), 메틸로파라코커스 속(*Methyloparacoccus*), 메틸로시스티스 속(*Methylocystis*), 메틸로셀라 속(*Methylocella*), 메틸로캡사 속(*Methylocapsa*), 메틸로퍼룰라 속(*Methylofurula*), 메틸아시디필럼 속(*Methylacidiphilum*), 메틸아시디마이크로비움 속(*Methylacidimicrobium*), 메틸로마이크로비움 속(*Methylobacterium*) 또는 메틸로시너스 속(*Methylosinus*) 균주일 수 있으며, 구체적으로 메틸로마이크로비움 트리코스포룸(*Methylobacterium alcaliphilum*) 20Z일 수 있다. 이러한 메탄자화균을 이용한 바이오전환 공정의 경우, 비교적 저렴한 메탄을 탄소원으로 사용할 수 있어 경제적으로 유리하며, 대기 중의 메탄을 사용 가능하다는 점에서 온실가스의 방출 예방 등 환경적인 면에서도 장점이 있다. 또한, 기존에 포도당(glucose)을 이용한 공정 대비 산소의 손실이 없어 최종 생산 물질의 수율 또한 높다.
- [0022] 본 발명에서 용어 "형질전환 메탄자화균"은 상기 메탄자화균의 유전자를 도입하거나 또는 제거하여 형질을 전환시킨 균주를 의미한다.
- [0023] 알파-후물렌 생성효소(α -humulene synthase)를 코딩하는 유전자(*zssI*)는 *Zingiber zerumbet* 유래일 수

있으며, 구체적으로 서열번호 1의 염기서열로 구성된 것일 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 서열번호 1의 서열과 70% 이상, 구체적으로는 80% 이상, 보다 구체적으로는 90% 이상, 보다 더 구체적으로는 95% 이상, 가장 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열로서 실질적으로 α -humulene synthase 활성을 가진 단백질을 발현 가능한 경우, 제한없이 포함될 수 있다.

[0024] 본 발명에서 용어 "파르네실 피로포스페이트 합성효소(farnesyl pyrophosphate synthase)"는 IPP와 DMAPP를 축합하여 FPP로 전환하는 효소이다.

[0025] 상기 파르네실 피로포스페이트 합성효소(farnesyl pyrophosphate synthase)를 코딩하는 유전자(ispA)는 *M. alcaliphilum* 20Z 유래일 수 있으며, 구체적으로 서열번호 2의 염기서열로 구성된 것일 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 서열번호 2의 서열과 70% 이상, 구체적으로는 80% 이상, 보다 구체적으로는 90% 이상, 보다 더 구체적으로는 95% 이상, 가장 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열로서 실질적으로 farnesyl pyrophosphate synthase 활성을 가진 단백질을 발현 가능한 경우, 제한없이 포함될 수 있다.

[0026] 본 발명의 용어 "1-데옥시-크실룰로오스-5-포스페이트 합성효소(1-deoxy-xylulose-5-phosphate synthase, dxs)"는 MEP 경로의 첫 단계로 피루베이트와 G3P를 축합시켜 1-데옥시-크실룰로오스-5-포스페이트(1-deoxy-xylulose-5-phosphate)로 전환하는 효소이다.

[0027] 상기 1-데옥시-크실룰로오스-5-포스페이트 합성효소(1-deoxy-xylulose-5-phosphate synthase)를 코딩하는 유전자(dxs)는 *M. alcaliphilum* 20Z 유래일 수 있으며, 구체적으로 서열번호 3의 염기서열로 구성된 것일 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 서열번호 3의 서열과 70% 이상, 구체적으로는 80% 이상, 보다 구체적으로는 90% 이상, 보다 더 구체적으로는 95% 이상, 가장 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열로서 실질적으로 1-deoxy-xylulose-5-phosphate synthase 활성을 가진 단백질을 발현 가능한 경우, 제한없이 포함될 수 있다.

[0028] 본 발명에서 용어 "4-히드록시-2-메틸부트-2-엔일-디스포스페이트 합성 효소((E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl-diphosphate synthase)"는 2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate(MEC)를 (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate(HMBPP)로 전환하는 효소이다.

[0029] 상기 4-히드록시-2-메틸부트-2-엔일-디스포스페이트 합성 효소((E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl-diphosphate synthase)를 코딩하는 유전자(ispG)는 *M. alcaliphilum* 20Z 유래일 수 있으며, 구체적으로 서열번호 4의 염기서열로 구성된 것일 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 서열번호 4의 서열과 70% 이상, 구체적으로는 80% 이상, 보다 구체적으로는 90% 이상, 보다 더 구체적으로는 95% 이상, 가장 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열로서 실질적으로 (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl-diphosphate synthase 활성을 가진 단백질을 발현 가능한 경우, 제한없이 포함될 수 있다.

[0030] 본 발명에서 용어 "글루코즈-6-포스페이트 이성화효소(glucose-6-phosphate isomerase)"는 glucose 6-phosphate를 fructose 6-phosphate로 전환하는 효소로 가역반응이 가능하다.

[0031] 상기 형질전환 메탄자화균에 글루코즈-6-포스페이트 이성화효소(glucose-6-phosphate isomerase)를 코딩하는 유전자(pgi)는 *M. alcaliphilum* 20Z 유래일 수 있으며, 구체적으로 서열번호 5의 염기서열로 구성된 것일 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 서열번호 5의 서열과 70% 이상, 구체적으로는 80% 이상, 보다 구체적으로는 90% 이상, 보다 더 구체적으로는 95% 이상, 가장 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열로서 실질적으로 glucose-6-phosphate isomerase 활성을 가진 단백질을 발현 가능한 경우, 제한없이 포함될 수 있다.

[0032] 본 발명에서 용어 "글루코즈-6-포스페이트 탈수소효소(glucose 6-phosphate dehydrogenase)"는 glucose 6-phosphate를 6-phospho-D-glucono-1,5-lactone으로 전환하는 효소로 1몰의 NADPH를 생산한다.

[0033] 상기 글루코즈-6-포스페이트 탈수소효소(glucose 6-phosphate dehydrogenase)를 코딩하는 유전자(zwf 2)는 *M. alcaliphilum* 20Z 유래일 수 있으며, 구체적으로 서열번호 6의 염기서열로 구성된 것일 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 서열번호 6의 서열과 70% 이상, 구체적으로는 80% 이상, 보다 구체적으로는 90% 이상, 보다 더 구체적으로는 95% 이상, 가장 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열로서 실질적으로 glucose 6-phosphate dehydrogenase 활성을 가진 단백질을 발현 가능한 경우, 제한없이 포함될 수 있다.

[0034] 본 발명에서 용어 "포스포글로코네이트 탈수소효소(phosphogluconate dehydrogenase)"는 6-phosphogluconate를 ribulose 5-phosphate로 전환하는 효소로 1몰의 NADPH를 생산한다.

[0035] 상기 포스포글로코네이트 탈수소효소(phosphogluconate dehydrogenase)를 코딩하는 유전자(gnd)는 *M. alcaliphilum* 20Z 유래일 수 있으며, 구체적으로 서열번호 7의 염기서열로 구성된 것일 수 있다. 보다 구체적으로,

로, 상기 서열번호 7의 서열과 70% 이상, 구체적으로는 80% 이상, 보다 구체적으로는 90%이상, 보다 더 구체적으로는 95%이상, 가장 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열로서 실질적으로 phosphogluconate dehydrogenase 활성을 가진 단백질을 발현 가능한 경우, 제한없이 포함될 수 있다.

[0036] 본 발명에서 용어 "포스포케톨레이즈 2(phosphketolase)"는 D-xylulose 5-phosphate를 acetyl phosphate로 전환하는 효소이다.

[0037] 상기 포스포케톨레이즈 2(phosphketolase)를 코딩하는 유전자(pkt2)는 *M. alcaliphilum* 20Z 유래일 수 있으며, 구체적으로 서열번호 8의 염기서열로 구성된 것일 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 서열번호 8의 서열과 70% 이상, 구체적으로는 80% 이상, 보다 구체적으로는 90%이상, 보다 더 구체적으로는 95%이상, 가장 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열로서 실질적으로 phosphketolase 활성을 가진 단백질을 발현 가능한 경우, 제한없이 포함될 수 있다.

[0038] 상기 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 일부 또는 전체를 결실하는 방법은 세균 내 염색체 삽입용 벡터를 통해 염색체 내 내재적 목적 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드일부 핵산 서열이 결실된 폴리뉴클레오티드 또는 마커 유전자로 교체함으로써 수행될 수 있다. 본 발명에서 용어 "강화"는 효소 또는 단백질의 활성이 야생형 또는 그 내재적 활성에 비해 증가되는 것을 의미한다. 상기 효소 또는 단백질의 활성 강화는 당업계에 알려진 임의의 방법에 의해 수행될 수 있다.

[0039] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 다른 하나의 양태는 상기 알파-후물렌 생산용 형질전환 메탄자화균을 배양하는 단계를 포함하는, 알파-후물렌의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0040] 본 발명에서 용어 "배양"은 목적하는 세포 또는 조직 등을 인공적으로 조절한 환경 조건에서 생육하는 것을 의미한다. 상기 환경 조건은 대표적으로 영양소, 온도, 삼투압, pH, 기체 조성, 빛 등이 있으나, 직접적인 영향을 주는 것은 배지이며, 배지는 크게 액체배지와 고체배지로 나뉠 수 있다. 본 발명의 형질전환 메탄자화균의 배양은 당업계에 널리 알려져 있는 방법을 이용하여 수행할 수 있다.

[0041] 구체적으로, 상기 배양은 상기 형질전환 메탄자화균으로부터 알파-후물렌을 생산할 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 유가 배양 또는 주입배치 또는 반복 유가 배양 공정(fed batch or repeated fed batch process)에서 연속식으로 배양할 수 있다. 배양에 사용되는 배지는 메탄자화균의 배양에 사용되는 것으로 알려진 NMS(nitrate mineral salts) 배지를 사용할 수 있고, 메탄자화균에 따라 상기 배지에 포함된 성분 또는 이의 함량을 적절히 조절한 배지를 사용할 수 있으나, 이에 특별히 제한되는 것은 아니다. 본 발명에서 형질전환 메탄자화균의 배양 온도는 15℃ 내지 45℃, 구체적으로 20℃ 내지 40℃, 보다 구체적으로 25℃ 내지 35℃일 수 있으며, 메탄과 균주의 원활한 접촉을 위해, 150rpm 내지 300rpm, 구체적으로 180rpm 내지 270rpm, 보다 구체적으로 200rpm 내지 250rpm으로 교반할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0042] 본 발명에 있어서, 상기 알파-후물렌의 제조방법은 상기 형질전환 메탄자화균을 메탄을 포함하는 배양액에 배양하는 것일 수 있다.

[0043] 본 발명에 있어서, 상기 제조방법은 배양액으로부터 알파-후물렌을 회수하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 알파-후물렌을 회수하는 단계는 배양 방법에 따라 당업계에 공지된 적합한 방법에 의해 수행될 수 있다. 구체적으로, 공지된 알파-후물렌 회수 방법은 특별히 이에 제한되지 않으나, 원심분리, 여과, 추출, 분무, 건조, 증발, 침전, 결정화, 전기영동, 분별 용해(예를 들면 암모늄 설페이트 침전), 크로마토그래피(예를 들면 HPLC, 이온교환, 친화성, 소수성 및 크기배제) 등의 방법이 사용될 수 있다.

발명의 효과

[0044] 본 발명의 형질전환 메탄자화균은 메탄으로부터 항산화, 항염, 항균작용 및 함암작용을 가지는 것으로 알려진 알파-후물렌을 생산할 수 있고, 포도당 기반이 아닌 메탄을 탄소원으로 이용하므로 생산단가를 감소시킬 수 있어 매우 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0045] 도 1은 알파-후물렌 생성을 위한 메탄자화균의 대사 경로를 나타낸 모식도이다.

도 2는 알파-후물렌 표준품과 형질전환 메탄자화균(pHM01 및 pHM02 균주)의 알파-후물렌 시료를 GC-MS로 분석한 결과이다.

도 3은 pHM02 균주에 DXS 효소를 추가 도입하여 얻은 형질전환 메탄자화균 pHM03 균주의 알파-후물렌 생산성을 이전 균주와 비교한 그래프이다.

도 4는 형질전환 메탄자화균 pHM03 균주에서 글루코즈-6-포스페이트 이성화효소를 결손시킨 후 후물렌 생산성을 비교한 그래프이다.

도 5의 A는 NADPH 풀을 늘리기 위해 인실리코 시뮬레이션을 통해 타겟 유전자를 예측한 결과이다.

도 5의 B는 NADPH 풀을 늘리기 위해 구축한 형질전환 메탄자화균의 알파-후물렌 생산성을 비교한 그래프이다.

도 6의 A는 phosphoketolase를 통한 F6P 또는 X5P의 acyl phosphate로의 전환을 도식화한 그림이다.

도 6의 B는 pHM03 균주에 phosphoketolase를 추가 도입하여 얻은 pHM20 균주로부터 알파-후물렌의 생산성을 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명에서는 후물렌의 생물학적 생산의 경제적 타당성을 향상시키기 위해 글루코즈(glucose)보다 저렴한 메탄을 탄소원으로 이용하였다. 메탄으로부터의 후물렌 생산을 위해 *M. alcaliphilum* 20Z를 이용하여 모델 플랫폼으로 이용하였다. *Zingiber zerumbet* 유래의 알파-후물렌 합성효소를 *M. alcaliphilum* 20Z에 적합하도록 코돈 최적화한 후 이를 과발현시켜 초기 생산성을 0.04 mg/gDCW를 얻었다. FPP 풀을 향상시키기 위해 MEP 관련 주요 효소(IspA, IspG 및 Dxs)의 과발현을 통해 알파-후물렌 생산성은 초기 균주에 비해 5배 증가하여 0.2 mg/gDCW를 얻었다. 그리고 탄소 핵심 대사 경로의 플럭스를 조절하기 위하여 glucose-6-phosphate isomerase를 결손시킴으로써 초기 균주대비 알파-후물렌 생산량이 3배 증가하였다.

또한, 이차대사 산물 생합성에 필수적으로 요구되는 NADPH 풀을 증가시키기 위해 genome scale model을 사용하여 잠재적인 과발현 표적을 예측하고, 이를 과발현시켜 알파-후물렌 합성에 미치는 영향을 분석하였다. 마지막으로 포스포케톨레이즈의 과발현이 알파-후물렌 생산에 미치는 영향을 분석하고 본 발명을 완성하였다.

<실시예 1> 실험방법

<1-1> 세균 균주 및 성장 조건

본 발명에 사용된 균주 및 플라스미드는 표 1에 기재하였다. *M. alcaliphilum* 20Z 세포는 NMS 배지를 사용하여 배양하였다. *M. alcaliphilum* 20Z 세포를 30℃, 230rpm에서 50ml의 NMS 배지를 함유하는 스크류 캡으로 밀봉된 500ml 진탕형 플라스크에서 배양하였다. 가스 샘플 투입용 주사기(gas-tight syringe)를 사용하여 가스 치환에 의해 메탄을 30%(v/v)를 공급하고, 헤드 스페이스를 매일 30%(v/v) 메탄으로 새로 교체하였다. 세포의 밀도는 1.5ml 큐벳을 사용하는 Beckman 분광 광도계로 측정되었다. 또한, 최종 농도가 50 µg/ml인 카나마이신(Km)을 사용하여 형질전환 메탄자화균의 선별하였다.

표 1

균주	특징	문헌
<i>Escherichia coli</i> DH5α		Novagen
<i>Methylobacterium</i> <i>alcaliphilum</i> 20Z	Used as the host strain	DMSZ
pHM00	<i>M. alcaliphilum</i> 20Z harboring pHM00 vector for overexpression of <i>zssI</i>	This work
pHM01	<i>M. alcaliphilum</i> 20Z harboring pHM01 vector for overexpression of <i>zssI</i> along with <i>ispA</i> from <i>E. coli</i>	This work
pHM02	<i>M. alcaliphilum</i> 20Z harboring pHM02 vector for overexpression of <i>zssI</i> along with <i>ispA</i> from <i>M. alcaliphilum</i> 20Z	This work

pHM03	<i>M. alcaliphilum</i> 20Z harboring pHM03 vector for overexpression of <i>zssl</i> along with <i>ispA</i> , <i>dxs</i> and <i>ispG</i> from <i>M. alcaliphilum</i> 20Z	This work
<i>M. alcaliphilum</i> 20Z <i>pgi</i>	<i>M. alcaliphilum</i> 20Z with deletion of glucose-6-phosphate isomerase	This work
<i>M. alcaliphilum</i> 20Z <i>pgi</i> -pHM03	<i>M. alcaliphilum</i> 20Z <i>pgi</i> harboring pHM03 vector	This work
pHM13	<i>M. alcaliphilum</i> 20Z harboring pHM13 vector for overexpression of <i>zssl</i> along with <i>ispA</i> , <i>dxs</i> , <i>ispG</i> and <i>pntAB</i> from <i>M. alcaliphilum</i> 20Z	This work
pHM14	<i>M. alcaliphilum</i> 20Z harboring pHM14 vector for overexpression of <i>zssl</i> along with <i>ispA</i> , <i>dxs</i> , <i>ispG</i> and <i>zwf1</i> from <i>M. alcaliphilum</i> 20Z	This work
pHM15	<i>M. alcaliphilum</i> 20Z harboring pHM15 vector for overexpression of <i>zssl</i> along with <i>ispA</i> , <i>dxs</i> , <i>ispG</i> and <i>zwf1-gnd</i> from <i>M. alcaliphilum</i> 20Z	This work
pHM20	<i>M. alcaliphilum</i> 20Z harboring pHM20 vector for overexpression of <i>zssl</i> along with <i>ispA</i> , <i>dxs</i> , <i>ispG</i> and <i>ptk2</i> from <i>M. alcaliphilum</i> 20Z	This work

[0057] <1-2> 유전자 변형을 위한 프라이머 및 수행 방법

[0058] 본 발명은 표 2에 제시된 프라이머를 이용하여 유전자를 증폭 및 클로닝하였다. *M. alcaliphilum* 20Z의 gDNA는 Wizard Genomic DNA Purification Kit(Promega, Madison, USA)로 분리하였고, Lamp Pfu 중합 효소(BioFACT, Daejeon, Korea)를 사용하여 PCR을 수행하였으며, Gibson 어셈블리 키트를 이용하여 재조합 벡터를 구축하였다. 올리고머 합성 및 DNA 서열 분석은 Macrogen(Korea)에 의해 수행되었다.

표 2

[0060]

이름	서열	서열 번호	프라이머 설명
pAWP89-For	TAGTTGTCGGGAAGATGCGT	9	For amplifying pAWP89 backbone which contained P _{tac} promoter and SD sequence
pAWP89-Rev	AGCTGTTTCTGTGTGAATA	10	
zssl-89-For	ttcacacaggaacagctATGGAACGGCAATCGATGGC	11	For amplifying zssl and ligated into pAWP89, resulting in pHM00
zssl-89-Rev	gcattctccgacaactaTCAGATCAAAAACGATTCAACA	12	
zssl-pLC291-For	tcagttagatagaggtacATGGAACGGCAATCGATGGC	13	For pHM01 and pHM02 vectors construction. zssl, <i>ispA</i> from 20Z (for pHM02) and <i>E. coli</i> MG1655 (for pHM01) were amplified and ligated into pLC291 vector, resulting in pLC291-zssl- <i>ispA</i> vector. The whole fragment containing zssl, <i>ispA</i> was then amplified and ligated into pAWP89 backbone.
zssl-pLC291-Rev	cgtagatcttctagaggtacTCAGATCAAAAACGATTCAACA	14	
ispA-pLC291-For	gatctgagtacctagaaAATAAGGAGCAATCCAATGAGT AACGCACTGAAAGACT	15	
ispA-pLC291-Rev	catgcactagtagcgtgTAATGATCTCGCTGGATAA	16	
zssl-89-For	ttcacacaggaacagctATGGAACGGCAATCGATGGC	17	
ispA-89-Rev	gcattctccgacaactaTTAATGATCTCGCTGGATAA	18	
ispA-MG1655_For	aaaataaggagcaatccaAATAAGGAGCAATCCAATGGACT TTCCGAGCAACT	19	
ispA-MG1655_Rev	gcattctccgacaactaTTATTTATTACGCTGGATGATGT AGTC C	20	
ispG-For	ttgcgcgtgatacgcgtacAGCAATAGAGAATATAAA CACTAAGGAGGTCAAACATGTCAATCAGCCCAAGAAA	21	
ispG-Rev	cgggtgagctcgcatgcaCTACTGAGCTGTGGTTCGGT	22	
dxs-20Z-For	gagatcattaatacgcgtacAATCCCATATCTCACAAAAT ATATAAGGAGGTCAACATGAAAATCAGGAAATTTCCCCC	23	For amplifying flanks to knockout <i>pgi</i> then ligated into pCM351 vector opened by KpnI
dxs-20Z-Rev	cgggtgagctcgcatgcaTCACGCGCAAAATTGCTCG	24	
pCM351- <i>pgi</i> -F1-For	cagctgtacaattggtacGTCAGGCATTTGCGGTGTTT	25	
pCM351- <i>pgi</i> -F1-Rev	catatgcattccatggtacCAAATGGGCGTTGAACTGGG	26	

pCM351-pgi-F2-For	cgtgttaaccggtgagctTGAACGCGTGTCTTCTGTGA	27	For amplifying flanks to knockout <i>pgi</i> then ligated into pCM351-pgi-F1 vector opened by SacI
pCM351-pgi-F2-Rev	tggatcctctagtgagctCAAGCCCATAAGCGCTAGGA	28	
20Z-PGI-Out-For	TTGGAGCTTGGCTTGCCTTA	29	Primers were designed in out of flank regions to confirmed the knockout of <i>pgi</i>
20Z-PGI-Out-Rev	GCACAAAACCTCTTCGGCTGG	30	
zwf2-20Z-For	cggaaccacagctcagtagAGGAAACAGCTATGAAATCAAA TCAA AAATTCAAACCTTGC	31	zwf2 was amplified from 20Z and ligated into linear pHM03, resulting in pHM14
zwf2-20Z-Rev	gcatcttcccgaactaTTACTCTTCCCAAGCCCGTC	32	
pdg-20Z-89-For	cggaaccacagctcagtagAGGAAACAGCTATGAAAGCGAA T ATCGGTTTAATCGG	33	pdg-zwf1 operon was amplified from 20Z and ligated into linear pHM03, resulting in pHM15
pdg-20Z-89-Rev	gcatcttcccgaactaTTACTGGCACCACTCCGG	34	
pkt2-2-89-For	CGGAACCACAGCTCAGTAGAGGAAACAGCTATGAATACACA A ACTCTGAATCCTGA	35	pkt2 was amplified from 20Z and ligated into linear pHM03, resulting in pHM19
pkt2-2-89-Rev	gcatcttcccgaactaTCATCCTTTCCATTCCAGTGAC	36	

[0062] <1-3> 알파-후물렌의 생산 방법

[0063] 알파-후물렌 생산 플라스미드를 보유한 *M. alcaliphilum* 20Z를 30℃ 및 230 rpm에서 탄소 공급원으로서 30% 메탄을 보충하여 NMS 배지에서 배양하고, 스크류 캡으로 밀봉하였다. 액체 전 배양물을 180ml 진탕 플라스크(10 ml NMS 배지 포함)에서 한천 플레이트로부터 성장시켰다. 이어서, 예비 배양물을 알파-후물렌 생산을 위해 500ml 진탕 플라스크에서 유기상으로서 40ml 배지 및 10ml 도데칸(dodecane)에 접종하였다. 96시간의 배양 후, 50ml의 총 배양 부피를 5 ml 원심 분리 튜브에 따라 내고 3220g에서 10분 동안 원심 분리하였다. 알파-후물렌 분석을 위해 1 ml의 상부의 도데칸 층을 수득하여 분석하였다.

[0065] <1-4> 분석방법

[0066] 알파-후물렌을 분석하고 HP-5MS 컬럼이 장착된 GC-MS(Agilent, USA)를 통해 정량화 하였다. 캐리어 가스: 헬륨; 250℃에서 분할 주입(8 : 1); 컬럼 흐름 : 2.2 ml/분; 인터페이스 온도: 250℃; 프로그램 : 3분 동안 80℃ 유지, 16℃/분~240℃, 2분 동안 유지. 알파-후물렌의 체류 시간은 8.7분이었다. 정량화를 위해, 시그마 (Sigma)로부터 구입한 알파-후물렌 표준의 교정 곡선을 사용하였다.

[0068] <1-5> *M. alcaliphilum* 20Z의 형질전환 방법

[0069] 50 ml의 배양액을 OD₆₀₀ = 0.4 내지 0.6 정도로 배양하고 배양된 균주는 5000× g, 4℃에서 10분 동안 원심분리하여 회수된 세포는 50ml의 멸균수로 재현탁하였다 (2회 반복). 회수된 세포 펠렛은 100 μL의 멸균수로 재현탁시키고 50 μL의 세포 현탁액에 500ng DNA 플라스미드를 넣어 혼합한 후 전기침공법을 이용한 형질전환을 실시하였다. Gene Pulser Xcell™ 전기 침공 시스템(Bio-Rad)을 사용하여 1.3kV, 25 μF 및 2000에서 전기침공을 수행하였다. 전기침공 후 즉시, 1ml의 NMS를 세포에 첨가하여 회수된 세포를 0.1 % 메탄올을 함유하는 10ml NMS 배지 옮겨 30℃에서 24시간 배양한 후, 세포를 원심분리기 5000g에서 10분동안 원심분리하여 얻은 세포를 항생제가 첨가된 NMS 한천 배지에 평판 도말하였다.

[0071] <실시예 1> 알파-후물렌 생산용 형질전환 메탄산화균의 제작

[0072] *M. alcaliphilum* 20Z는 MEP 경로를 통해 FPP를 생산하고 알파-후물렌 합성효소의 이중 발현에 통하여 알파-후물렌을 생산할 수 있다.

[0073] 구체적으로, *M. alcaliphilum* 20Z에서 알파-후물렌 합성하기 위하여 알파-후물렌 합성효소를 도입한 pHM00 벡터

를 구축하고 이를 야생형 균주 *M. alcaliphilum* 20Z에 도입하여 알파-휴물렌 0.04 mg/gDCW이 생산됨을 확인하였다.. FPP 공급 풀을 추가로 향상시키기 위해 pHM00 벡터에 *M. alcaliphilum* 20Z 유래의 FPP 합성 효소 (ispA)와 *E. coli* 유래의 ispA를 추가하여 각각 pHM01 및 pHM02 벡터를 구축한 후 *M. alcaliphilum* 20Z에 형질전환하여 pHM01 및 pHM02 균주를 제작하였다.

[0074] 야생형 균주 *M. alcaliphilum* 20Z, pHM01 및 pHM02 균주의 알파-휴물렌 생산량은 GC-MS를 이용하여 분석하였고 (도 2), 야생형 *M. alcaliphilum* 20Z에서는 휴물렌이 검출되지 않았으며, *M. alcaliphilum* 20Z 유래 ispA와 zss1를 공동 과발현한 pHM02 균주에서 0.14 mg/gDCW의 알파-휴물렌을 생산하여 *E. coli* 유래의 ispA를 도입한 pHM02 균주보다 생산성이 우수하였다(도 2).

[0076] <실시예 2> 알파-휴물렌 생산성 향상을 위한 MEP 경로 최적화

[0077] MEP 경로의 첫 단계는 DXP synthase(dxs)에 의해 피루베이트와 G3P가 축합하여 1-deoxy-xylulose-5-phosphate(DXP)로 전환한다. dxs는 MEP 경로의 rate-limiting step으로 입증되었고, 최근에는 ispG도 MEP 경로의 rate-limiting step으로 알려졌었다. 이에 dxs와 ispG의 과발현을 통해 FPP 풀을 향상시켜, 알파-휴물렌 생산성을 향상시키고자 하였다.

[0078] 그 결과, pHM03 균주(dxs와 ispG를 과발현한 균주)는 pHM02보다 알파-휴물렌 생산성이 1.5배 증가하여 2.0 mg/gDCW의 알파-휴물렌을 생산하였다(도 3).

[0080] <실시예 3> EMP 경로로의 플럭스 증가를 통한 알파-휴물렌 생산성 향상

[0081] 알파-휴물렌 생산을 추가로 늘리기 위해 MEP 경로의 상위 단계를 살펴본 결과, DXP의 전구체인 G3P 및 피루베이트의 불균형은 알파-휴물렌 생산의 병목 단계으로 예측되었다. *M. alcaliphilum* 20Z에서는 세포 내 75% 피루베이트가 EMP 경로를 통해 생성되고 ED 경로로부터 25% 피루베이트로 생성되는 것으로 보고되어 있어, 본 발명에서는 핵심 탄소 경로인 EMP 경로로의 플럭스를 증가시키고자 하였다. 이를 위해 glucose-6-phosphate isomerase(pgi)를 결손시켜 *M. alcaliphilum* 20Z_Δpgi 균주를 구축하였고 PHM03 벡터를 도입하여 알파-휴물렌 생산성을 비교 평가하였다.

[0082] 그 결과, *M. alcaliphilum* 20Z_Δpgi의 알파-휴물렌 생산성은 pHM03 균주(도 3)에 비해 3배 증가하여 0.62 mg/gDCW의 알파-휴물렌을 생산하였다(도 4).

[0084] <실시예 3> NADPH 공급 풀 향상을 통한 알파-휴물렌 생산

[0085] 알파-휴물렌 생산성 향상을 위한 하나의 전략은 *in silico* simulation으로 도출된 NADPH 추가 공급을 위한 경로 재설계이다. MEP 경로 재설계에도 불구하고 생산성이 3배만 향상된 것은 중요한 cofactor인 NADPH pool이 낮은 것에 기인한 것으로 예상된다.

[0086] FBA 분석에서 대부분의 NADPH는 glucose 6-phosphate dehydrogenase(zwf) (62%)와 transhydrogenase(pntAB)(24%)에서 생성됨을 확인하였다. 또한, 유전체 및 전사체 분석에서, NADPH를 생산할 수 있는 phosphogluconate dehydrogenase(pgd)의 발현과 zwf2와 동시 전사가 발견되었다. 이들 NADPH 생성하는 효소들의 과발현은 NADPH의 공급 pool을 향상시킬 수 있으며, 그 결과 알파-휴물렌의 생산성도 향상시킬 것으로 기대하였다.

[0087] 이에 zwf1, zwf2 및 pntAB operon의 과발현을 수행하였고, zwf1의 과발현은 대조군(pHM03) 대비 알파-휴물렌 생산성이 1.5배 증가하였고, pgd-zwf2 및 zwf1의 동시 과발현을 통한 RuMP cycle의 oxidative branch의 활성화는 pHM03 균주 대비 알파-휴물렌 생산성이 4배 향상된 반면, pntAB operon의 과발현은 pHM03 균주보다 휴물렌 생산성이 감소하였다(도 5).

[0089] <실시예 4> 포스포케톨라아제(phosphoketolase) 도입을 통한 알파-휴물렌 생산

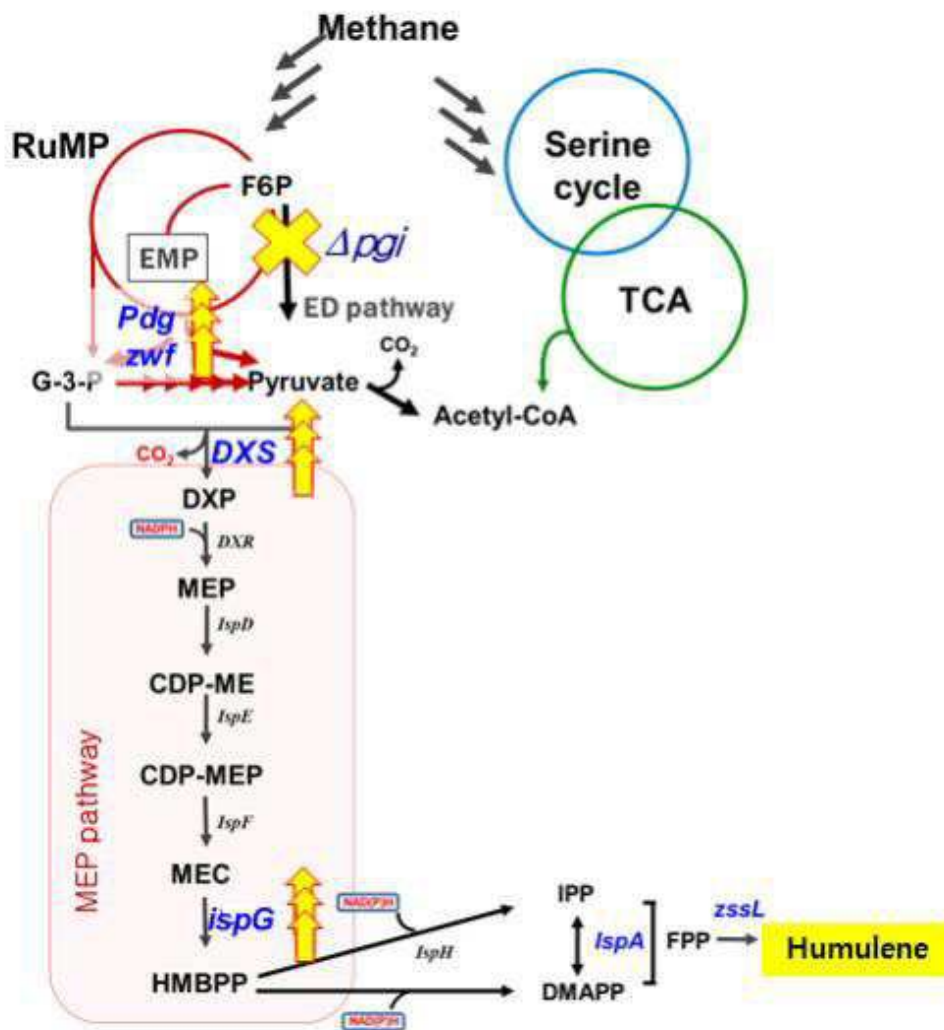
[0090] 포스포케톨라아제(phosphoketolase) 경로는 EMP 경로에서 피루베이트 decarboxylation을 통해 손실되는 CO₂ 경

로를 우회하여 아세틸-CoA를 생산하는 대안 경로이다. *M. alcaliphilum* 20Z는 *M. buryatense*와 유사한 포스포케톨라아제로 2 copy가 보존되어 있으며 이 효소는 메탄과 메탄올에서 배양했을 때 활성화됨을 확인하였다. 포스포케톨라아제 과발현 균주의 metabolite profiling을 살펴본 결과, 탄소 플럭스 변화를 관찰할 수 있었고, *ptkB*의 과발현은 세포 내 아세틸-CoA pool을 2배 증가할 뿐만 아니라, MEP 경로의 장점이 되는 피루베이트 pool도 7배 이상 증가하는 것으로 예측되었다. 이에 두 종류의 phosphoketolases 이성질체를 각각 과발현시켜 알파-휴물렌 생산에 영향을 미치는지 영향을 살펴보았다.

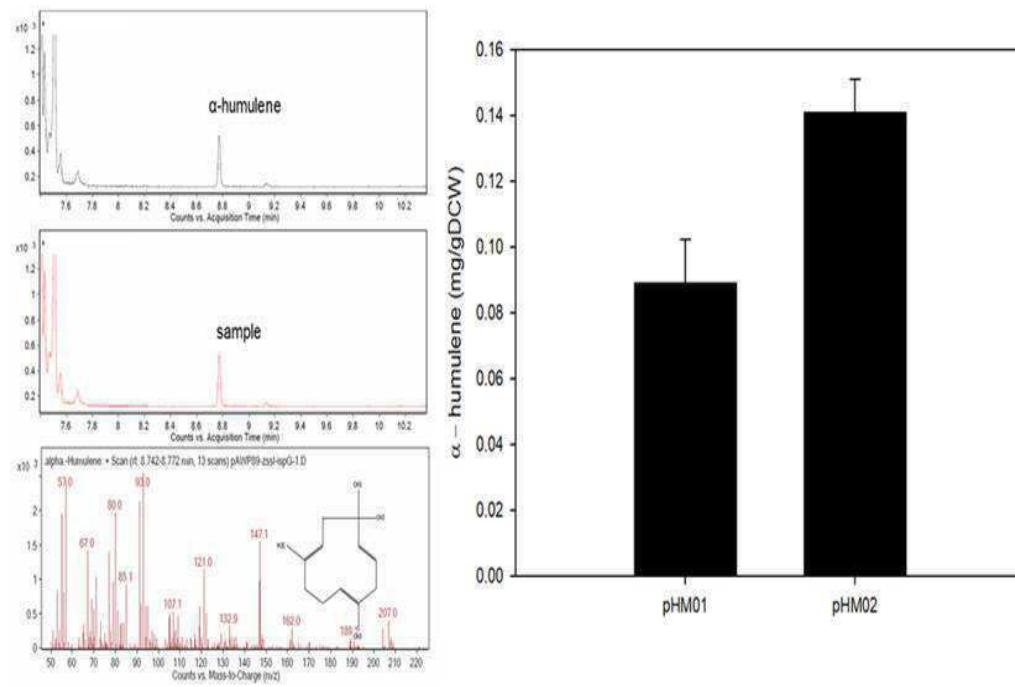
[0091] 그 결과, *ptk2*를 과발현시키 pHM20 균주의 알파-휴물렌 생산성 pHM03 균주 대비 2.5 배 향상되어 0.55 mg/gDCW의 알파-휴물렌을 생산하였다 (도 6).

도면

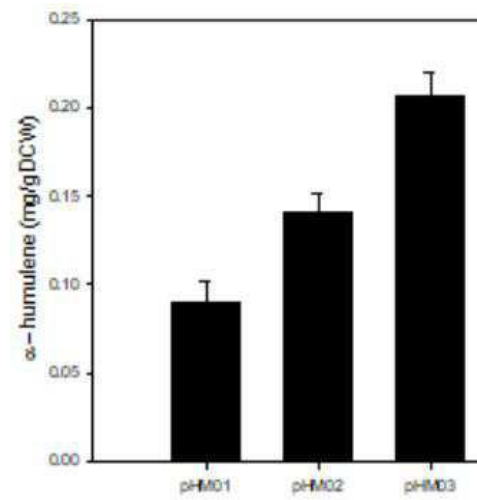
도면1



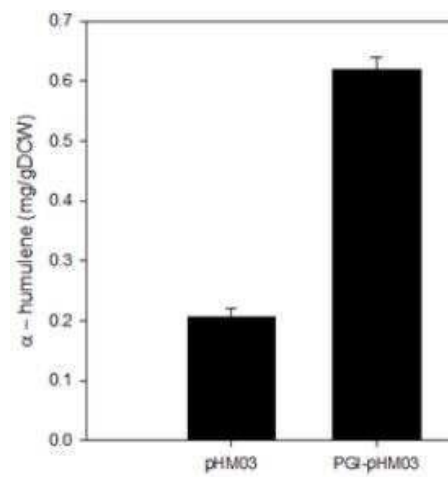
도면2



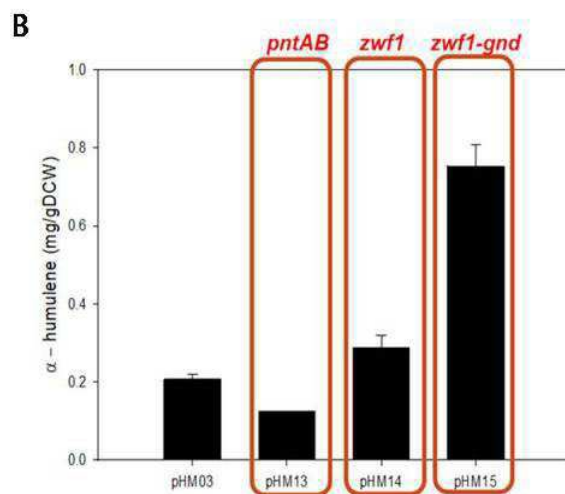
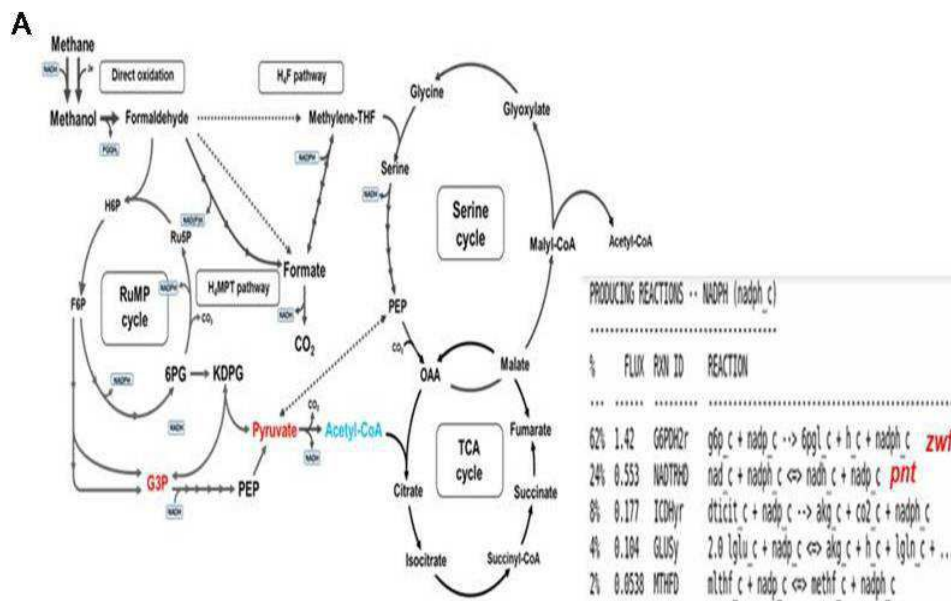
도면3



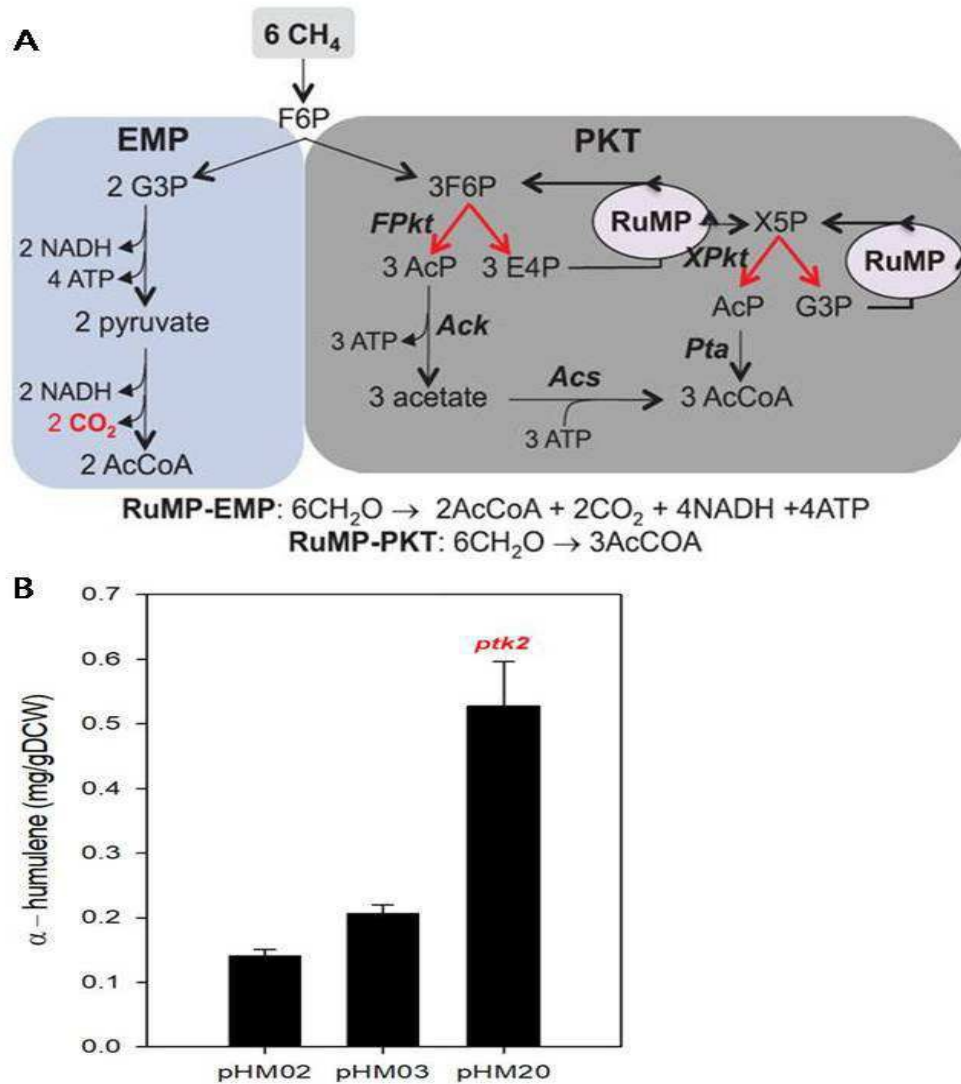
도면4



도면5



도면6



서열 목록

- <110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
- <120> Transformed methanotrophs for producing α-humulene production from methane and uses thereof
- <130> PN1910-473
- <160> 36
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 1647
- <212> DNA
- <213> Unknown
- <220><223> zssl
- <400> 1

atggaacggc aatcgatggc cttggttggc gataaagaag aaatcatccg gaaatcgttt	60
gaatatcatc cgaccgtttg gggcgattat ttatccgga actattcgtg cttgccgttg	120
gaaaaagaat gcatgatcaa acgggttgaa gaattgaaag atcgggttcg gaacttgttt	180
gaagaaaccc atgatgtttt gcaaatcatg atcttggttg attcgatcca attgttgggc	240
ttggattatc attttgaata agaaatcacc gccgccttgc ggttgatcta tgaagccgat	300
gttgaact atggcttcta tgaagtttcg ttgcggttgc ggttgttcg gcaacatggc	360
tataacttgt cgccgatgt ttttaacaaa tttaaagatg ataaaggccg gttttgccg	420
accttgaacg gcgatgcaa aggccttggtg aacttgtata acgccgcta ttgggcacc	480
catgaagaaa ccatcttga tgaagccatc tcgtttacca aatgccaatt ggaatcgttg	540
ttgggcgaat tggaacaacc gttggccatc gaagtctcgt tgtttttgga aacccgttg	600
tatcggcgga cccggcggtt gttggttcgg aaatataatcc cgatctatca agaaaaagt	660
atcggaacg ataccatctt ggaattggcc aaattggatt ttaacttgtt gcaatcgttg	720
catcaagaag aagttaaaaa aatcaccatc tgggtggaacg atttggcctt gacaaaatcg	780
ttgaaatttg cccgggatcg ggttgttgaa tgctattatt ggatcgttcg cgtttat	840
gaaccgcaat attcgcgggc ccgggttatc acctcgaag ccatctcgtt gatgtcgatc	900
atggatgata tctatgata ctattcgacc ttggaagaat cgcggttgtt gaccgaagcc	960
atcgaacggt gggaaccgca agccgttgat tgcgttcgg aatatttgaa agattttat	1020
ttgaaattgt tgaacaccta taaagatttt gaagatgaat tggaaccgaa cgaaaaatat	1080
cggatcccggt atttgcaaga agaaatcaaa gttttgtcgc gggcctat	1140
aaatggggcg ttgaacgcta tgttccggcc ttggaagaac atttgttggt ttcgttgatc	1200
accgccggtt atttgccgt tgcctgcgcc tcgtatgttg gcttgggcga agatgccacc	1260
aaagaaacct ttgaatgggt tgcctcgtcg ccgaaatct tgaaatcgtg ctgatccat	1320
tgccggttga tggatgatat cacctcgcat caacgggaac aagaacggga tcattttgcc	1380
tcgaccgttg aatcgatat gaaagaacat ggcacctcgg ccaaagttgc ctgcgaaaaa	1440
ttgcaagtta tggttgaaca aaaatggaaa gatttgaacg aagaatgctt gcggccgacc	1500
caagtggccc ggccgttgat cgaaatcatc ttgaacttgt cgcgggcat ggaagatc	1560
tataaacata aagataccta taccaactcg aacaccgga tgaaagataa cgtttcgttg	1620
atctttgttg aatcgttttt gatctga	1647
<210> 2	
<211> 897	
<212> DNA	

<213> Unknown

<220><223> ispA

<400> 2

atgagtaacg cactgaaaga ctatctctcc ttttgtcaaa accgtgtcga aagagccttg 60

gaagcccgac tgccaagcga aaaccaaatt cggacaaaat tgcacgaagc gatgcgctat 120

tgcgtgctgg acggcggtta acgcatgcgt ccgatgctaa cctactgtac aggaaaagcc 180

gtgggcattg caccggaaga tttagatggc gggcctgtg cggttgaatt cattcatgtt 240

tattcgttga tacatgacga tttgccggcc atggacgacg acgacctcag acgcggaaag 300

ccgacctgtc atatcgctta tgatgaagcg accgccatth tgaccggcga cgctttacaa 360

gcattggcat tcaaggtctt ggctgacgac cctaccatcc gagccgatgc cgaaagccgt 420

ctaaaaatga ttacgttgct ggctaaggct agcggctctc aaggcatggt cggcggccaa 480

gccatcgatt tagaatcggg cggcacgatg ctgacgtgc ctgagcttga aaatatgcat 540

atccacaaga cgggagcgtt aattcgagcc agcgtcaaca tggcgacgtt aacgagaccc 600

gatatcgacc cgaaacaggc cgaagggtc gatcattacg caaaatgcat cggcctatec 660

ttccaagtca aggatgatat tttggacgaa gaaagcgata ccgcaacact cggcaaaacc 720

caaggcaagg acaaagacaa cgacaagccg acttaccctg ccttactcgg cttggccggc 780

gcaaagcaaa aagctcagga acttcatgag caagccattg aaagcttaaa cggattcggc 840

cccgaagccg atctgcttcg tgacttgtcg ctttatatta tccagcgaga tcattaa 897

<210> 3

<211> 1863

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> dxs

<400> 3

atgaaaatca caggaaatth cccctacta gacagcatca agtccctc cgaccttaga 60

aaactgccaa aggaacgatt aaaaccgtt gccaaagaac ttcgcgagtt tctgaccac 120

acagtcagta tttccggcgg gcatttttcg gcaggcctcg gcaccgtaga gttgactgtg 180

gcgtgcatt acgtattcga cacgccgcgc gatcaattgg tttgggatgt cggccatcag 240

gcctatccgc ataagatcct gaccggacgc aaggagcgca tgacgacaat tcgcaccgc 300

gacggctttt gccctttcc aaaccgttcc aagagcgaat acaatgcctt cggcgtcggc 360

cattcgagca cgicaattag cgcggcctta ggcatggcga tcgcatccgg tttacgcggc 420

gaggacaagc acigtgtcgc gatcattggc gacggcagca tcaccggcgg catggccttc 480
 aaagcaatga accatgccgg tgcgatcgat gcaaatctgt tggatgattt gaacgacaac 540
 aatttgtcaa tttctccaaa tgcgggcccc ttgaaaaatt atctgactaa aattctgtcg 600
 agtaaaatit attcttcggt acgcgaaaaa agcaaaaaag ctctcaccag catgccaagc 660
 gtctgggagc tggcgcgcaa aacaaaaaag cacatgaaag gcatggctgt gcccggcacc 720
 ttgttcaagg aaatggggtt caattatatc ggtccaatcg acggccatga cctggacatg 780

ctggtgtcaa ccttgaaaa tctaaaacac atttccggcc cgcgtttctt gcatactgtc 840
 accaagaaag gcaaggcgta tgcggcggcc gaaaaagacc cgctgccta tcacggcgtg 900
 ccggccttcg acccgagccg cgattgtctg ccgaaatcgg ccccttctcc gcacccgacg 960
 tatacgagg tattcggaca atggctctgc gacatggccg agcaggacga gcgtttgttg 1020
 ggcatattcc cggcaatcgc cgaaggctcg ggcttggtcg ctttttccga acgttttccg 1080
 aagcgttatt tcgatgtcgc catcggcag cagcatgccg tgaccttagc ggcgggcctg 1140
 gcctgcgagg gcggcaaac ggctgtcgcg atctattcaa ccttcttaca acgcggctac 1200

gatcaattga tacacgatgt ggtcttgacg gacctggacg tattgtttgc gctcgaccgc 1260
 gcaggtttag tcggcccgga cggcccgacc catgccgga gtttcgatta cacctacatg 1320
 cgctgcctgc cgaacatgct aatcatggca ccggccgacg agaacgaatg ccggcagatg 1380
 ctctataccg gttatctgca taaaggcccc gtttcggtac gctatccgcg cggcaaaaggc 1440
 ccgggcgtgc cggtcgattg caccatgacc gcgctaccga tcggcaaggc cgaattgcgc 1500
 catcaaggcg gccgcatcgc gattctggcg ttcggcagca tggttacgcc gtcggtcgag 1560
 gtcggtaagc agctcggcgc gaccgtcgtc aatatgcgtt tcgtcaagcc gtcgatgaa 1620

gcgttgattc tggaactggc caagagtcac gatatcatcg tcacggtcga agaaaacgtc 1680
 attgccggcg gcgccggcag cgcggtcaac gaatttctgc aggcacaaag aatcgtgatg 1740
 ccggtcttga atatcggctt gcccgatgcc ttcacgaac aaggcacgcg cgaagaatta 1800
 ctgagttttt gcggattaga tacccaaggc atattgcaga gcatcgagca attttgcgcg 1860
 tga 1863

<210> 4
 <211> 1227
 <212> DNA
 <213> Unknown
 <220><223> i spG
 <400> 4

atgtcaatca gcccaagaaa aattacccat caagttcaaa tcggcgacat caaagtgggc	60
ggcggcgcg ccaatcgtcgt tcaatcaatg accaataccg ataccgccga tatcaaagca	120
acagtcaacc aagtcatgga actgtcgaag gccggatcgg aaatcgtcgg tattaccgtc	180
aactccgaag acgcggctaa agccgttcct gaaatccgca accaactcaa tcaaaaaggc	240
tttaccgttc cgatcgtcgg cgatttccat tttaacggac ataaattact cgaataaac	300
ccgcctcgc ccgaagcctt agataaatat cgcataatc ccggaatgt cggacgaggt	360
aaaaaccgag atccacaatt tcaacaaatg atcgagttcg cttgccgcta cgacaagccc	420
gttcgaatcg gcgttaacgg cggtagcctg gatcaagcgg ttttaacgag ctttttgat	480
gaaaacagac aaaaagaaaa tccggacgaa ctacctgccg ttactcgaga agcaatcatc	540
gtttcggcac tcgaaagcgc ggcccgccgc gaagaaatag gcctaccgc caacaaaatt	600
ttattgtctt gtaaatcag caacgttcag gaattgatca gaatttatca agatctaagt	660
aaacgctcgc attacgcgtt acacctcggc ctaaccgaag ccggcatggg ctcgaaaggc	720
atcgtggcat cttcggccgc tctatccgtg cttatgcaac agggcatcgg agacacgatt	780
cgcactcgc taacaccgga acccgccacg gccagaaccc aagaagtgt agtcgcacag	840
gaaatcttgc aaaccatggg ctttcgttcc ttactccga tggttatcgc ctgcccaggc	900
tgcggccgaa caaccagcga ctatttccaa aaattggcga tggaattca aaattatcta	960
cgcgtcagta tgccgtcttg gcgcactaaa tatcccgcg tcgaagaaat ggaagtcgcg	1020
gtcatgggtt gtgtcgtcaa tggccccgga gaaagtaaga atccagcat cggcatcagc	1080
ttgcccgca ccggagaaac cccgttgcct ccggtttatg aagacggtgt caaacagtg	1140
accttgaaag gcgatcatat agccgaagaa tttcaagcgc tggtcgaac ctatattgaa	1200
acgcactacg gaaccacagc tcagtag	1227
<210> 5	
<211> 1644	
<212> DNA	
<213> Unknown	
<220><223> pgi	
<400> 5	
atgccatctt tgaccgggac cccacctgg aaatccttag ttagtcattg cggcgccctt	60
caagacttcg acctgagaga agcgttcaat ctaaactctc gtcgttttga acaattctcg	120
cttcaattca acgacattct attcgactac tcgaaaaact taatcacaga agacacgct	180
tcattgttgg tcgatttggc aactcattcg gcacttagtt caaaaatcga agccatgttt	240

accggcgaaa agatcaacca caccgaacaa agagctgttt tgcataccgc attacgcaac 300

agaagcaacc acccggtcac ggttgacgga gtcgatgtaa tgtcaaacaat caatcaggtt 360

ctggccaaaa tgcgcgtctt tacggataag gtaagaaacg aacaatggct aggacagact 420

ggaaaaccgc ttaaggacat tgtcaataac gccataggcg gctcgaacct tggcccgaag 480

atggttgcta cagcgctaac cccttatgct tccgataaat taaatgttca ttttgtttca 540

aacgtcgatc aaaccgatct cgtcgaacaa ctcaaaccgc tcaacgccga aacgactctg 600

tttatcgttg catcaaaaat gttcaacact caggaaacca tgactaatgc gcactccgca 660

agaaattggt ttctcgagca aattaatgac gaaaaagcca tcggttaagca ttttgcgcg 720

atttcacac accctgaaaa tgtcattgaa ttggcatcg acccgaaaa cattttcgaa 780

ttttgggact gggttggcgg acgctattca ttatggtcac caattggcct gtccattgac 840

ctacaagtag ggatggataa ttctgaacaa ttgttgcaag gcgcccatga ggccgattta 900

cattttagag atacgccatt cgaccgcaat attccggtca tcatgggttt actaggcatt 960

tggataaca atttttatgg cgcagaatct catgcaatat tgcctacga ccaatcactg 1020

cgttatTTTT gcgagttcct acaacaagc gacatggaaa gtaacggtaa aagcatcgat 1080

agaaaggggc aaccggtaga ttatagtacc ggcccgatca tctggggcca gccgggaacg 1140

aatggacagc atgcatttta ccaattgatc catcaaggca ctaaactaat accttgtgac 1200

ttcctggcag cggctaactc acattatcac ctaccgaaac atcacgatat ttaatttca 1260

aactttcttg ccaaccgga agctttgatg catggcagaa gtgccgaaga ggtcattgcc 1320

gagctacccg aacaagacaa aaataacgcc atattagtgc catctaaagt ctttgtgggc 1380

aacaagccgt ctaattcttt tcttttcgat aagcttacgc ctaaaacatt aggctcgttg 1440

atcgcatTTT acgagcataa aatcttcgtg caaggcgcta tttggaatat caattcttc 1500

gaccaaatgg gcgttgaact gggcaaagta ctggccaaag tcattttgcc cgaactgcta 1560

aatgacgaaa ccatcggcag tcatgactgt tccacgaacg gtctgattaa tgcctataaa 1620

aaattacgta aagcagacga ttaa 1644

<210> 6

<211> 1470

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> zwf2

<400> 6

atgaaatcaa atcaaaaatt caaaccttgc gacctggtca tatatggcgc gttaggcgat 60

ttatcgacac gcaaattatt aatttcgtta tatcggtctg aaaaatccga attgatcgag	120
cccgagactc gtatcatcgg tattgaccgg catgctctcg aagagggcgg cttcgttaaa	180
gttgctagga aaagtttaca gtcttatctt aatgagacga tcgaggatga agtctggcag	240
cgttactcgg ctgcaatgca atatctcatg atcgacctaa ctcagctcga tcaatataaa	300
caattgaatg cggtcacga ttccaaatcc agagtgtcgg tcaattatit agctgtcgcg	360
ccgtttttgt tcaaaaatat ttgccagggt ctcgataaag caaaaatttt gactcgagaa	420
tcgcgagtgg tgatggaaaa accgatcggc aacgatctga aatccaatcg ggaaatcaac	480
gatgccgttg ctgaagtgtt taacgaggat caggtattcc gtatcgatca ttatttaggc	540
aaggaaacgg ttctgaatct gttggcctta cgatttgcca attcgatttt tacgaccaat	600
tggaatcaca atactatcga ccacattcaa attaccgttg gcgaggaagt cggaatcgag	660
ggccgttggg agtatttcga taaaaccggg caactacggg atatgctgca aaatcattta	720
ttgcagatcc tgacctttat cacaatggaa ccgcccgcgt cgctggaagc cgaaagcatt	780
catagcgaaa aaatcaaggt gttgaaagcc ttgcgtccga ttaccgccga caatgtcgaa	840
gaagtaccgg tgcgcgggca atacaccgcc ggttatatga aaggacaagc cgtgccgggc	900
tataccgagg aggaaggcgc cgataaggag agtaccaccg aaagtttcgt cgcggcgcgt	960
gtcgatatcg ataattggcg ctgggccgga gtgccgatat atctgcgtac cggcaagcgc	1020
atgcaaaata agcgcaccga aatcgtcgtt tatttcaage gtttgccaca caatatcttc	1080
aaggacagtt accgcgaatt gccgccgaat aaattgatca ttcatttgca accgaaagaa	1140
ggcgtggaaa tcgaaatgct caataaggta ccggaatcg gcggtagtat cacgttacag	1200
cagaataaac tggatttagag cttttctgaa acgttcaaaa acagcccgtt tttcggcggg	1260
tacgagcggc tgattttgga agcaatgcgg ggcgacccga ccttgttcct gagtcggcag	1320
gaaatcgaa aggcttgggc atgggtcgat tcaatacaag atgcttgggc gcgtagaaaa	1380
attgcgcaa aaccctattc cgcaggaagc tgggggcccgg tcgcgtcggg ggcattgttg	1440
gcgcgtgacg gacgggcttg ggaagagtaa	1470
<210> 7	
<211> 1446	
<212> DNA	
<213> Unknown	
<220><223> gnd	
<400> 7	
atgaaagcga atacggttt aatcgccctg gcggtcatgg gccagaattt agttctcaac	60

atcaatgaca atggttttaa ggtagccgtc tacaaccgca cgacagaaaa gaccgacgag	120
ttcctcacgg ggccggccaa gggcaccgaa atcgctcgaa cttactcgat cgaagatctc	180
gtgcagaaac tggaaacgcc gcgcacgtg atgttaatgg tcaaagccgg aaccgtggtc	240
gatcattata tcgagcaact agtactgcta ctcgatgccg gcgatatcat catcgacggc	300
ggcaattcgc tatttaccga caccgaccga cgcacaaagg cgctaaagga aaaaggcttg	360
ctttatatcg gcaccggcgt atcgggcgga gaggaaggcg cgaggcacgg gccctcgatc	420
atgcccgcg gtcaccgga tgcttggaa cgagtcaaac cggtattgca ggcgatcagc	480
gcaaaagtgc acggccagcc ttgctgtgaa tgggtcggt atggcggcg gggccactat	540
gtcaaaatga tccataacgg catcgaatac ggcgacatgc aaatcatttg cgaagcctat	600
caactgatgt ccgaagggt cggcctttct gccgatgaga tttcctctat tttcgccgaa	660
tggaaacagc cggaactcag ttctactcta gtcgaaatca cggccaatat tcttgccctat	720
aaagacgaag acggcagtc gtccttgac aagatcctcg acacagccgg ccaaaaaggc	780
accggtaaat ggaccggcat caatgcactg gatttgggca ttccgtgac gctgatcggc	840
gaatcggctt tcgacgctg cctgtcgcg atgaaagacg aacgcatcaa tgcctcgcaa	900
aagctgccta aaccggtcaa ccgttttgag ggaaaccggc aagaagccct cgaaacctc	960
cgcaatgcct tgtatgcatc gaaaatcatt tcttacgcgc aggggttccg gctcatgcgc	1020
gaagcggcga aagaatacgg ctggacgttg aactacggta aaatcgact gatgtggcgg	1080
ggcggctgta ttattcgag cgcattttta aacgatatca aacaagcata cgatagcaat	1140
cctgatttgg aaaatttgc gctggccgat ttcttcgtcg atgctatgcg gcaggccgaa	1200
cccggctggc gtaaagccgt catactcagt atcgaactcg gtattccggc cccggcgttt	1260
tccagtgcgc tagcggttta cgacggctac cggacggcac gcttccccgc caatctgttg	1320
caggctcaac gcgattatit cggcgcgcac agttacgaac gcaccgacg tccgcgcggc	1380
gagttttttc ataccgactg gaccgggcac ggcggtaaaa ccgcatcgtc tacttataac	1440
gtttaa	1446
<210> 8	
<211> 2354	
<212> DNA	
<213> Unknown	
<220><223> pkt2	
<400> 8	
atgaatacac aaactctgaa tcctgaattg ctgaggaaaa ttgacgccta ttggcgtgca	60

gcaaactatc taticgttgg tcagatttat ctctatgaca atccgctgtt gaagaagccg	120
ctcaagcagg cgcacatcaa accgcgcctg ctggggcact ggggcacgac gccggggcta	180
aactttgcct acgtccactt gaaccgtgtt atcaagatgc atgatctaaa cgtaatctac	240
attaccgggc cggggcatgg cggaccgcg ctggtggcga atgcctatct agagggtacc	300
tacagcgagg tgtatcccaa tatcgcccaa aatgagtcgg ggatgaaacg gctgttcaaa	360
cagttttcct tccccggcgg cataccgagt cacgttgca ctaaacacc gggctcgatt	420
cacgagggag gcgagctggg ttaticgctg tcgcatgcct acggggcagc gttcgacaat	480
cccgatctga tcgttgcttg tgcgtcggc gatggtgaag cagagaccgg tcctctggct	540
gccagtggc attcgaataa atttctcaat ccggtccacg acggtgccgt gttgcccatc	600
ctgcatttga atggctataa aattgccggc ccacaggttt tggcgcgcat tccgcatgac	660
gaactggacg cgatgtttcg tggcctcggc tacacgccgt atttcgtcga aggcgaggat	720
ccgatggcga tgcatacgt gatggcggc acgctggaca ctgtggtcgg cgagatccaa	780
cgcataccaa ctgaagcccg cgccaacgga ttcaagaaac gtccgaattg gcctatgac	840
atcttgcgt caccgaaagg ctggaccggc cctaaggaag tcgatgacaa acctaccgag	900
ggaacatttc gatcgcatca ggttccgatg ggcgacatga gtgaagcggg gcatgtgaag	960
attctggaaa agtgggtgaa aagctacat ccgaagcaat tgttcgacaa gaccgggaaa	1020
ttggttgccg aattggctga attggcgccg gctggagagc ggcgcatgag tgccaatcca	1080
cacgccaacg gagggtctt gttacagca ctgcatctgc ctgattttca cgactacgag	1140
gttaaggtgt ccaagccggg aaacgtggag gccgaatcca cccgagtga aggggaattt	1200
atccgcgacg tgatcaaacg gaacctgaa aacttccgta tctttagtcc ggacgaaacg	1260
aattcaaacc gctggggcgc tgtgttcgaa gtgacgaacc gttgttcgac cgcggaatt	1320
gtgccggcg acgatcacgt tgccccgat ggccgggtga tggagatatt gagcgagcat	1380
cagtgcgagg gttggctcga aggttacctg ctgactgggc gtcacggatt tttctctgc	1440
tacgaagcgt ttatccacat cattgattcg atgttcaacc agcatgcaa atggctcaag	1500
gtctcgaatc agattccatg gcgcgcgccg attgcatctt tgaactatct gttttcttcg	1560
cacgtctggc gacaggatca taacggtttt agtcatcagg atccaggctt catggacat	1620
gtcgtgaaca aaaaggcgga agtcattcgt gttttctgc cccgatgcg aatacgtgc	1680
tttcggtaac cgatcattgc ctgcgtagcc gcaattatgt caacgttatc gttgccgca	1740
agcaaccctc gccgcagtgg ttagacatgg atgaggccat taaacactgt actgctggtt	1800
tgggtatttg gccgtgggcc agcaacgac aggatggcga accggatgtt gtcattggcat	1860
gctgcggcga cgtaccgac ctagaaacct tggccgccgt cgagtgttg cggaatatt	1920

tcccagagct gaaagttagg gtgattaatg tagtcgattt gatgaaactc cagacccaaa	1980
gcgaacaccc gaatggctctg agcgacaaag atttcgattt actttttacc aaggataagc	2040
cgatcatctt cgccttccac ggttatccat tgcctattca tcggttgacc tategtcgca	2100
gtaaccactc gaacctgcat gtgcgcggtt tcaaagaaga aggcaccacc actacgcctt	2160
tcgacatgac ggtattgaac gacctggacc ggtttcattt ggttggcgat gtcattgacc	2220
gcctcccga attgggagct cgggctgcct acgccaagca agccatgcga gacaagtca	2280
tcgaacacaa acaatacatc aggaagcatg gcgaggatat gccggaaatt cgtcactgga	2340
aatggaaagg atga	2354
<210> 9	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> pAWP89-For	
<400> 9	
tagttgtcgg gaagatgcgt	20
<210>	
10	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> pAWP89-Rev	
<400> 10	
gctgtttcct gtgtgaata	19
<210> 11	
<211> 38	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> zssl-89-For	
<400> 11	
ttcacacagg aaacagctat ggaacggcaa tcgatggc	38
<210> 12	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> zssl-89-Rev
 <400> 12
 gcacgttccc gacaactatc agatcaaaaa cgattcaaca 40

<210> 13
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> zssl-pLC291-For
 <400> 13
 tcagtgatag agaggtacat ggaacggcaa tcgatggc 38
 <210> 14
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> zssl-pLC291-Rev
 <400> 14
 cgtagatctt ctagaggtag tcagatcaaa aacgattcaa ca 42
 <210> 15
 <211> 57
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ispA-pLC291-For
 <400> 15
 gatctgagta cctctagaaa ataaggagca atccaatgag taacgcactg aaagact 57
 <210> 16
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ispA-pLC291-Rev
 <400> 16
 catgcactag tacgcgtatt aatgatctcg ctggataa 38
 <210> 17
 <211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> zssl-89-For

<400> 17

ttcacacagg aaacagctat ggaacggcaa tcgatggc 38

<210> 18

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ispA-89-Rev

<400> 18

gcattctccc gacaactatt aatgatctcg ctggataa 38

<210> 19

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ispA-MG1655_For

<400> 19

aaaataagga gcaatccaaa taaggagcaa tccaatggac tttccgcagc aact 54

<210> 20

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ispA-MG1655_Rev

<400> 20

gcattctccc gacaactatt atttattacg ctggatgatg tagtcc 46

<210> 21

<211> 74

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ispG-For

<400> 21

ttgcgcgtga tacgcgtaca gcaatagaga atataaacac taaggaggtc aaacatgtca 60

atcagcccaa gaaa	74
<210> 22	
<211> 38	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> ispG-Rev	
<400> 22	
ccggtgagct cgcatgcact actgagctgt ggttcgt	38
<210> 23	
<211> 82	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> dxs-20Z-For	
<400> 23	
gagatcatta atacgcgtac aatccccata ttcacaaaa tatataagga ggtcaacatg	60
aaaatcacag gaaatttccc cc	82
<210> 24	
<211> 37	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> dxs-20Z-Rev	
<400> 24	
ccggtgagct cgcatgcac acgcgcaaaa ttgctcg	37
<210> 25	
<211> 38	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> pCM351-pgi-F1-For	
<400> 25	
cagctgtaca attggtacgt caggcatttg cggtgttt	38
<210> 26	
<211> 38	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> pCM351-pgi-F1-Rev

<400> 26

catatgcatc catggtacca aatgggcgtt gaactggg 38

<210> 27

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pCM351-pgi-F2-For

<400> 27

cgtgttaacc ggtgagcttg aacgcgtgtc ttctgtga 38

<210> 28

<211> 38

<212>

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pCM351-pgi-F2-Rev

<400> 28

tggatcctct agtgagctca agcccataag cgctagga 38

<210> 29

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 20Z-PGI-Out-For

<400> 29

ttggagcttg gcttgcctta 20

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 20Z-PGI-Out-Rev

<400> 30

gcacaaaact cttcggctgg 20

<210> 31

<211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> zwf2-20Z-For
 <400> 31
 cggaaccaca gctcagtaga ggaaacagct atgaaatcaa atcaaaaatt caaaccttgc 60
 60
 <210> 32
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> zwf2-20Z-Rev
 <400> 32
 gcattctccc gacaactatt actcttccca agcccgctc 38
 <210> 33
 <211> 56
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pdg-20Z-89-For
 <400> 33
 cggaaccaca gctcagtaga ggaaacagct atgaaagcga atatcggttt aatcgg 56
 <210> 34
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pdg-20Z-89-Rev
 <400> 34
 gcattctccc gacaactatt actggcacca ctccgg 36
 <210> 35
 <211> 56
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pkt2-2-89-For
 <400> 35

cggaaccaca gctcagtaga ggaaacagct atgaatacac aaactctgaa tcctga

56

<210> 36

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pkt2-2-89-Rev

<400> 36

gcattctccc gacaactatc atcctttcca tttccagtga c

41