



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0059981
(43) 공개일자 2018년06월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/70 (2006.01) C07K 14/245 (2006.01)
C12P 7/64 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/70 (2013.01)
C07K 14/245 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0158895
(22) 출원일자 2016년11월28일
심사청구일자 2016년11월28일

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

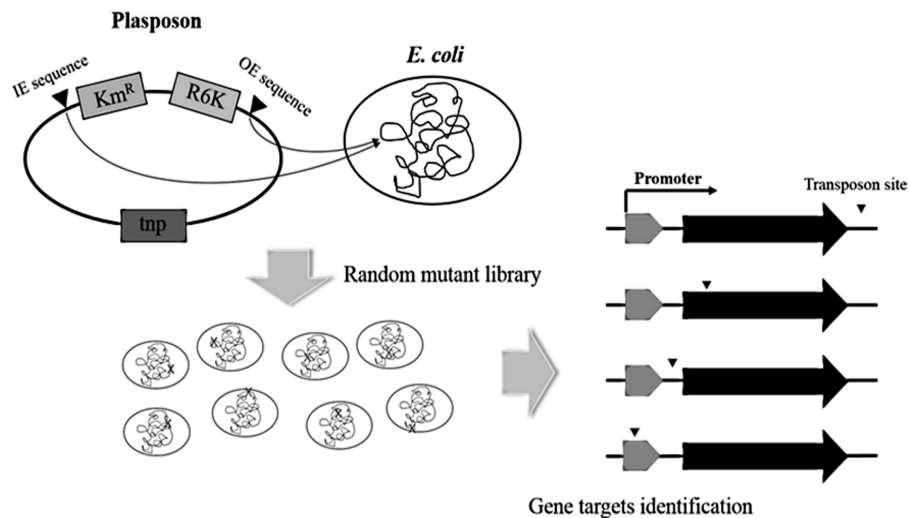
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 지방산 생성능이 개선된 변이 대장균 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 지방산 생성능이 개선된 변이 대장균 및 이의 제조방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 특정 유전자가 불활성화됨으로써 우수한 지방산 생산을 나타내는 변이 대장균 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 변이 대장균은 야생형 대장균에 비해 개선된 지방산 생성능을 나타내므로, 지방산 생산 및 이로부터 함유화 학제품을 생산하는데 유용하게 사용될 수 있다. 특히, 본 발명에서 새롭게 규명된 envR, gusC 및 md1A 유전자들은 불활성화되는 경우 지방산에 의한 부작용(예를 들어, 세포독성)을 감소시켜 대장균에서 지방산의 생산을 증가시키는데 기여하므로, 상기 유전자들은 지방산 생산과 관련된 다양한 연구에 응용될 수 있을 것이다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

C12P 7/6409 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1395045997

부처명 농림수산식품부

연구관리전문기관 경상대학교산학협력단

연구사업명 차세대바이오그린21사업

연구과제명 식물 유전자를 이용한 다양한 사슬길이 지방산 합성 대장균 제작 및 응용

기 여 율 1/1

주관기관 울산과학기술원

연구기간 2016.01.01 ~ 2016.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

envR, gusC 및 mdIA로 이루어진 균으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자가 불활성화된 변이 대장균.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 하나 이상의 유전자가 돌연변이된 것을 특징으로 하는 변이 대장균.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 돌연변이가 트랜스포존(transposon) 또는 플라스포존(plasposon)을 이용한 무작위적 삽입 돌연변이유발(random insertional mutagenesis)에 의한 것을 특징으로 하는 변이 대장균.

청구항 4

제1항에 있어서, envR 및 gusC 유전자가 불활성화된 것을 특징으로 하는 변이 대장균.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 변이 대장균이 개선된 지방산 생성능을 나타내는 것을 특징으로 하는 변이 대장균.

청구항 6

야생형 대장균의 envR, gusC 및 mdIA로 이루어진 균으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자를 불활성화시키는 단계를 포함하는, 지방산 생성능이 개선된 변이 대장균을 제조하는 방법.

청구항 7

(a) 야생형 대장균을 트랜스포존(transposon) 또는 플라스포존(plasposon)을 이용한 무작위적 삽입 돌연변이유발(random insertional mutagenesis)에 의해 돌연변이시켜 라이브러리를 제작하는 단계; 및

(b) 상기 라이브러리로부터 envR, gusC 및 mdIA로 이루어진 균으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자가 불활성화된 변이 균주를 선별하는 단계를 포함하는, 지방산 생성능이 개선된 변이 대장균을 제조하는 방법.

청구항 8

(a) 야생형 대장균을 트랜스포존(transposon) 또는 플라스포존(plasposon)을 이용한 무작위적 삽입 돌연변이유발(random insertional mutagenesis)에 의해 돌연변이시켜 라이브러리를 제작하는 단계; 및

(b) 상기 라이브러리로부터 야생형 대장균과 비교하여 지방산 생성능이 개선된 균주를 선별하는 단계를 포함하는, 지방산 생성능이 개선된 변이 대장균을 제조하는 방법.

청구항 9

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 변이 대장균을 배양하는 단계를 포함하는, 변이 대장균을 이용하여 지방산을 생산하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 지방산 생성능이 개선된 변이 대장균 및 이의 제조방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 특정 유전자의 불활성화에 의해 우수한 지방산 생성능을 나타내는 변이 대장균 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 지방산은 수송연료, 소비재, 그리고 공산품과 같은 함유화학제품(oleochemicals)의 전구체로 사용되는 물질로서 식물성 기름 및 동물성 유지로부터 합성되고 있다. 하지만, 바이오디젤과 같은 함유화학제품의 수요가 급증함에 따라 기존의 방법과는 달리 지속가능하고 친환경적인 방법으로, 예를 들어 미생물로부터 지방산을 생산하려는 노력이 계속되고 있다.
- [0003] 최근에는 미생물, 특히 대장균의 대사경로를 조절하여 대사흐름을 바꿈으로써 지방산의 생산을 증대시킬 수 있는 대사공학적 방법이 주목을 받고 있다(Pfleger et al., *Metab Eng.* 29, 1-11, 2015).
- [0004] 대장균에서의 지방산 합성은 여러 단백질이 관여하는 복잡한 과정에 의해 수행된다. 일반적으로, 아세틸코에이(acetyl-CoA)가 여러 단계의 효소반응을 통해 아실-ACP(acyl-ACP)가 된 후에 최종적으로 싸이오에스터라아제(thioesterase)에 의해 지방산으로 전환된다. 지방산 생산 경로에 의해 만들어진 아실-ACP는 음성 피드백 억제(negative feedback inhibition)를 통해 생산에 관여하는 여러 단백질의 활성을 저해시킨다(Fujita et al., *Mol. Microbiol.* 66, 829839, 2007). 따라서, 싸이오에스터라아제의 발현을 통한 음성 피드백 억제의 완화는 대장균에서의 지방산 생산량을 15배 증가시키는 것으로 나타났다(Lu et al., *Metab. Eng.* 10, 333339 2008; Steen et al., *Nature* 463, 559562, 2010). 추가적인 지방산의 생산 증대는 분해 경로를 불활성화시킴으로써 이루어졌다. 지방산의 분해 경로에 수반되는 유전자의 제거는 생성된 지방산의 분해를 막아 대장균에서의 지방산 합성을 향상시켰고(Steen et al., *Nature* 463, 559562, 2010), 탄소원의 대사(central carbon metabolism)를 조절함으로써 지방산 전구체의 공급을 증가시키는 기법도 대장균에서의 지방산 생산을 증가시켰다(He et al., *Biotechnol Bioeng.* 111, 575585 2014). 또한 대장균의 지방산 대사를 전반적으로 조절하는 전사인자의 발현은 지방산 대사경로를 활성화시켜 생산량을 증가시켰다(Zhang et al., *Metab. Eng.* 14, 653660, 2012). 하지만 대장균에 의해 생산되는 많은 양의 지방산은 전자 전달계 방해, 산화성 인산화, 영양분 수송 방해, 그리고 세포의 용해와 같은 항균 효과(antibacterial effect)를 나타내어 대장균의 세포 성장을 억제하는 등의 부작용이 있었다(Desbois and Smith, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 1629-1642, 2010; Lennen et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 81148128, 2011). 이러한 지방산의 세포독성은 대장균에서의 지방산 생산 증대를 방해하는 걸림돌 중 하나이다.
- [0005] 종래의 합리적 접근 방법(rational approach)이 대장균에서 지방산의 생산을 상당히 증가시켜 왔음에도 불구하고, 여전히 지방산의 이론적 수율은 70% 밖에 미치지 못하고 있는 상황이다. 그러므로 지방산의 수송, 그리고 내성에 직간접적으로 영향을 미치는 유전자들의 규명 및 연구가 절실하다(Hoover et al., *Environmental Progress & Sustainable Energy* 31, 17-23, 2012). 그러나, 이러한 유전자들을 합리적인 접근방법을 통해서 예측하는 것은 많은 시간과 노동력을 필요로 하므로, 무작위 접근방법(random approach)이 지방산 생산과 관련된 타겟 유전자들을 예측 및 규명하는데 더 유용할 수 있다.
- [0006] 이에, 본 발명자는 플라스포존(plasposon)을 이용하여 대장균의 유전자가 무작위적으로 불활성화된 돌연변이 라이브러리(mutant library)를 제작하였다. 이후, 본 발명자들은 지방산 바이오센서를 이용하여 상기 라이브러리로부터 지방산의 생성능이 개선된 돌연변이 균주를 선별하고, 상기 선별된 균주들에서 지방산 생산에 관여하는 유전자들을 규명함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0007] (비특허문헌 0001) Pfleger et al., Metab Eng. 29, 1-11, 2015;
 (비특허문헌 0002) Fujita et al., Mol. Microbiol. 66, 829839. 2007;
 (비특허문헌 0003) Lu et al., Metab. Eng. 10, 333339 2008;
 (비특허문헌 0004) Steen et al., Nature 463, 559562, 2010;
 (비특허문헌 0005) He et al., Biotechnol Bioeng. 111, 575585 2014;
 (비특허문헌 0006) Zhang et al., Metab. Eng. 14, 653660. 2012;
 (비특허문헌 0007) Desbois and Smith, Appl. Microbiol. Biotechnol. 85. 1629-1642. 2010;
 (비특허문헌 0008) Lennen et al., Appl. Environ. Microbiol. 77, 81148128. 2011;
 (비특허문헌 0009) Hoover et al., Environmental Progress & Sustainable Energy 31, 17-23. 2012.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명의 목적은 지방산 생성능이 개선된 변이 대장균을 제공하는 것이다.
 [0009] 본 발명의 다른 목적은 지방산 생성능이 개선된 변이 대장균을 제조하는 방법을 제공하는 것이다.
 [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 전술한 변이 대장균을 이용하여 지방산을 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 envR, gusC 및 mdIA로 이루어진 균으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자가 불활성화된 변이 대장균을 제공한다.
 [0012] 또한, 본 발명은 야생형 대장균의 envR, gusC 및 mdIA로 이루어진 균으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자를 불활성화시키는 단계를 포함하는, 지방산 생성능이 개선된 변이 대장균을 제조하는 방법을 제공한다.
 [0013] 나아가, 본 발명은 (a) 야생형 대장균을 트랜스포존(transposon) 또는 플라스포존(plasposon)을 이용한 무작위적 삽입 돌연변이유발(random insertional mutagenesis)에 의해 돌연변이시켜 라이브러리를 제작하는 단계; 및 (b) 상기 라이브러리로부터 envR, gusC 및 mdIA로 이루어진 균으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자가 불활성화된 변이 균주를 선별하는 단계를 포함하는 지방산 생성능이 개선된 변이 대장균을 제조하는 방법을 제공한다.
 [0014] 더욱이, 본 발명은 (a) 야생형 대장균을 트랜스포존(transposon) 또는 플라스포존(plasposon)을 이용한 무작위적 삽입 돌연변이유발(random insertional mutagenesis)에 의해 돌연변이시켜 라이브러리를 제작하는 단계; 및 (b) 상기 라이브러리로부터 야생형 대장균과 비교하여 지방산 생성능이 개선된 균주를 선별하는 단계를 포함하는 지방산 생성능이 개선된 변이 대장균을 제조하는 방법을 제공한다.
 [0015] 또한, 본 발명은 전술한 변이 대장균을 배양하는 단계를 포함하는, 변이 대장균을 이용하여 지방산을 생산하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0016] 본 발명에 따른 변이 대장균은 야생형 대장균에 비해 개선된 지방산 생성능을 나타내므로, 지방산 생산 및 이로 부터 함유화학제품을 생산하는데 유용하게 사용될 수 있다. 특히, 본 발명에서 새롭게 규명된 envR, gusC 및

mdlA 유전자들은 불활성화되는 경우 지방산에 의한 부작용(예를 들어, 세포독성)을 감소시켜 대장균에서 지방산의 생산을 증가시키는데 기여하므로, 상기 유전자들은 지방산 생산과 관련된 다양한 연구에 응용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0017] 도 1a는 본 발명의 일 구현예에 따라 플라스포존을 이용하여 무작위적 삽입 돌연변이의 라이브러리를 제작하는 과정을 도식적으로 나타낸 것이고; 도 1b는 본 발명에서 제조된 플라스포존의 지도를 나타낸 것이다.
- 도 2는 본 발명에서 선별된 변이 균주의 지방산 생산량을 나타낸 것이다. 대조균(control)은 pBbB6c-tesA를 포함하는 야생형 *E. coli* MG1655를 나타내고, $\Delta envR$ -TesA, $\Delta gusC$ -TesA 및 $\Delta mdlA$ -TesA는 pBbB6c-tesA를 포함하나 각각 envR, gusC 및 mdlA가 불활성화된 변이 대장균(MG1655)을 나타낸다.
- 도 3은 본 발명에서 선별된 변이 균주의 세포 내부 및 외부 지방산의 농도 (mg/L)를 측정한 결과이다. 각 막대의 하부 영역은 세포 내부 지방산 농도를, 상부 영역은 세포 외부에서의 지방산 농도를 나타낸다. 대조균(control)은 pBbB6c-tesA를 포함하는 야생형 *E. coli* MG1655를 나타내고, $\Delta envR$ -TesA, $\Delta gusC$ -TesA 및 $\Delta mdlA$ -TesA는 pBbB6c-tesA를 포함하나 각각 envR, gusC 및 mdlA가 불활성화된 변이 대장균(MG1655)을 나타낸다.
- 도 4는 본 발명의 선별된 변이 균주의 지방산 유무에 따른 세포 성장 속도를 측정한 것이다. MG- $\Delta fadD$ (대조균)는 아실-CoA 합성효소를 암호화하는 fadD가 제거되어 지방산 분해경로가 불활성화된 대장균을 나타내고, $\Delta envR$, $\Delta gusC$ 및 $\Delta mdlA$ 는 MG- $\Delta fadD$ 균주로부터 EnvR, MdlA 및 GusC 유전자를 각각 제거한 변이 균주를 나타낸다. 각 도면에서 화살표는 지방산이 첨가된 시점을 가리킨다.
- 도 5는 본 발명에서 규명된 유전자들의 이중제거(double knockout)에 의한 변이 대장균에서의 지방산 생산량을 나타낸 것이다. ' $\Delta envR \Delta gusC$ -TesA'는 envR 및 gusC가 이중제거된 돌연변이를, ' $\Delta gusC \Delta mdlA$ -TesA'는 gusC 및 mdlA가 이중제거된 돌연변이를, ' $\Delta envR \Delta mdlA$ -TesA'는 envR 및 mdlA가 이중제거된 돌연변이를, 그리고 대조균(control)은 상기 유전자가 제거되지 않은 균주를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0018] 본 발명은 envR, gusC 및 mdlA로 이루어진 균주로부터 선택되는 하나 이상의 유전자가 불활성화된 변이 대장균을 제공한다.
- [0019] 상기 변이 대장균은 본 발명자들에 의해 규명된 신규 유전자가 불활성화된 것을 특징으로 한다.
- [0020] 본 발명자들은 플라스포존(plasposon)을 이용하여 대장균의 유전자가 무작위적으로 불활성화된 돌연변이 라이브러리(mutant library)를 제작하고, 상기 라이브러리로부터 본 발명자들이 개발한 지방산 바이오센서를 이용하여 지방산의 생성능이 개선된 돌연변이 균주를 수득하였고, 상기 선별된 균주들의 유전자형을 확인함으로써 대장균의 게놈 내의 envR, gusC 및 mdlA 유전자가 대장균에서의 지방산 생산에 관여한다는 것을 새로운 사실을 확인하였다.
- [0021] 본 발명자들이 확인한 결과, 상기 3종의 유전자들은 종래에 지방산 생산과 밀접한 관련성이 있다는 것이 알려져 있지 않았고, 이들 유전자를 이용하여 대장균에서 지방산 생산을 개선하고자 하는 노력도 보고된 바 없었다.
- [0022] 본원에서 확인된 유전자 중 하나인 'EnvR'(envCD로도 알려짐)은 대장균의 수송 펌프인 AcrAB와 AcrEF의 발현을 억제하는 것으로 알려져 있다(Hirakawa et al., *J Bacteriol.* 190, 6276-9. 2008; WO 2006/1138972). EnvR은 상기 수송 펌프를 조절을 통해 물질의 수송에 관여하는 것으로 예상되나, EnvR이 대장균에서 지방산의 생산과 연관되는지, 그리고 이를 제거함으로써 대장균에서 지방산의 생산을 증가시킬 수 있는지에 관한 구체적인 보고는 없다.
- [0023] 본원에서 확인된 다른 유전자인 'GusC'는 글루쿠로니드(glucuronide)를 세포내로 수송하는 외막 단백질(outer membrane protein)이다. 글루쿠로니드는 글루쿠론산이 결합되어 있는 형태의 물질로 지방산과 유사하게 탄소사슬과 카복실기로 구성되어 있다. 현재까지 GusC와 지방산과의 관계는 밝혀진 바가 없지만, 글루쿠로니드가 지방산과 유사한 구조를 가지고 있다는 점을 고려할 때 GusC가 지방산의 수송에도 관여하는 것이 아닐까 판단된다.

- [0024] 본원에서 확인된 또 다른 유전자인 'mdlA'는 정확한 역할이 아직 밝혀진 바 없으나, 본 발명자들에 의해 아미노산 분석 결과 기존에 밝혀진 다중약물방출단백질(multi-drug efflux pump)들의 역할을 할 것으로 보인다.
- [0025] 진술한 바와 같이, 본 발명에 따른 변이 대장균은 envR, gusC 및 mdlA로 이루어진 균으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자가 불활성화된 것을 특징으로 한다.
- [0026] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 '불활성화'는 해당 유전자가 발현되지 않거나 발현되더라도 기능성이 있는 해당 유전자 산물을 생산하지 않는 것을 의미한다. 또한, '불활성화'란 해당 유전자가 완전하게 불활성화되어 있는 것뿐만 아니라 그 발현 수준이 현저하게 낮아 실질적으로 발현되지 않는 것도 포함되는 의미이다.
- [0027] 본원에서 유전자의 불활성화는 당업계에서 알려진 임의의 방법, 예를 들면, 돌연변이유발, 상동성 재조합 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0028] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 변이 대장균은 envR 유전자가 불활성화된 변이 대장균이다.
- [0029] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 변이 대장균은 gusC 유전자가 불활성화된 변이 대장균이다.
- [0030] 본 발명의 또 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 변이 대장균은 mdlA 유전자가 불활성화된 변이 대장균이다.
- [0031] 본 발명의 또 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 변이 대장균은 envR 및 gusC 유전자가 불활성화된 변이 대장균이다.
- [0032] 본 발명의 또 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 변이 대장균은 envR 및 mdlA 유전자가 불활성화된 변이 대장균이다.
- [0033] 본 발명의 또 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 변이 대장균은 gusC 및 mdlA 유전자가 불활성화된 변이 대장균이다.
- [0034] 상기 변이 대장균에서 각각의 유전자는 독립적인 방법에 의해 불활성될 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 즉, envR, gusC 및 mdlA 유전자는 서로 다른 방법에 의해 불활성화될 수 있다.
- [0035] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명에 따른 변이 대장균은 envR, gusC 및 mdlA로 이루어진 균으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자가 돌연변이된 변이 대장균이다.
- [0036] 본원에서 사용된 용어 "돌연변이", "변이"는 야생형과 비교하여, 유전자 내의 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열의 변화를 가리킨다. 이러한 돌연변이는 삽입(insertion), 결실(deletion), 치환(substitution), 점 돌연변이(point mutation), 다수의 뉴클레오타이드 또는 아미노산의 돌연변이, 전위(transposition), 역위(inversion), 프레임 쉬프트(frame shift), 표적 서열을 넌센스 돌연변이 또는 유전자의 야생형 서열과 차별화하는 다른 형태의 변형을 포함한다. 하지만, 상기 돌연변이는 envR, gusC 및 mdlA 중 하나 이상의 유전자의 작용(예를 들면, 발현)을 억제 또는 감소시키는 한 특별한 제한이 없다.
- [0037] 이러한 돌연변이 방법으로는, 부위-특이 돌연변이 기법(site-directed mutagenesis)(Sambrook, J. and Russell, D. W., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. Y., 2001), 카세트 돌연변이 기법(cassette mutagenesis)(Arkin, A. and Youvan, D. C., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:7811-7815, 1992; Delagrave et al., *Protein Engineering*, 6:327-331, 1993; Goldman, E. R. and Youvan, D. C., *Bio/Technology*, 10:1557-1561, 1992), 포화 돌연변이 기법(saturation mutagenesis)(USP No. 6,171,820 및 USP No. 6,238,884), 에러-유발성 중합효소 연쇄반응 기법(error-prone PCR)(Leung, D. W. et al., *Technique*, 1:11-15, 1989; Caldwell, R. C. and Joyce, G. F., *PCR Methods and Applications*, 2:28-33, 1992; Gramm, H. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:3576-3580, 1992), 화학적 돌연변이 기법(chemical mutagenesis)(Myers, R. M. et al., *Science*, 229:242-247, 1985; Walton, C. et al., *Directed Mutagenesis: A practical approach*(ed. M. J. McPherson), 135-162, IRL Press, Oxford, United Kingdom, 1991) 등을 들 수 있다.
- [0038] 상기 돌연변이는 트랜스포존(transposon) 또는 플라스포존(plasposon)을 이용한 무작위적 삽입 돌연변이유발(random insertional mutagenesis)에 의해 획득될 수 있다.

- [0039] 본원에서 사용된 용어 "트랜스포존"은 트랜스포자아제(transposase) 또는 인테그라제(integrase) 효소에 의해 인식되는 핵산 절편을 가리키며, 이는 타겟 핵산 내로 삽입될 수 있는, 즉 전위(transposition)될 수 있는 기능적 핵산-단백질 복합체 중 필수 성분이다. 트랜스포존을 이용한 무작위적 삽입 돌연변이유발은 당업계에 널리 알려져 있다. 이들 트랜스포존은 세포의 게놈에 새로운 표현형을 혼입하기 위한 유전자 도입 툴로서, 변이 도입, 유전자 트래핑, 트랜스제닉 개체의 제작 및 약제 내성 단백질을 발현시키는 것 등에 이용되고 있다.
- [0040] 본원에서 사용된 용어 "플라스포존"은 복제 원점을 갖는 미니-트랜스포존을 가리킨다. 대표적인 예로서, TnMod 라는 명칭의 기본 플라스포존이 알려져 있으며, 이는 삽입 돌연변이의 맵핑 및 그램 음성 박테리아로부터 클론을 신속하게 회수하는데 사용된다(Dennis and Zylstra, *Appl Environ Microbiol.* 64, 2710-5, 1998).
- [0041] 전술한 트랜스포존 또는 플라스포존을 이용한 무작위적 삽입 돌연변이유발은 상기 트랜스포존 또는 플라스포존이 대장균의 게놈 내에 무작위로 삽입되어 대장균의 다양한 유전자의 돌연변이를 유발한다. 상기 돌연변이유발에 의해 무작위적 삽입 돌연변이 라이브러리를 수득할 수 있고, 그 중에서 envR, gusC 및 mdIA로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자가 불활성화된 변이 대장균을 선별할 수 있다.
- [0042] 전술한 본 발명에 따른 변이 대장균은 변이되지 않은 대장균, 예컨대 야생형(wild-type) 대장균과 비교하여 개선된 지방산 생성능을 나타내는 것을 특징으로 한다. 상기 지방산 생성능의 개선은 변이 대장균이 야생형 대장균에 비해 동일한 조건에서 증가된 지방산 생산량을 나타낸다는 것을 의미한다. 이는 본 발명에서 확인된 유전자의 불활성화가 대장균에서 지방산의 생산에 크게 기여한다는 것을 가리킨다. 예를 들어, 본 발명에 따른 변이 대장균은 변이되지 않은 야생형 대장균과 비교하여 적어도 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300% 또는 그 이상의 증가된 지방산 생산량을 나타낸다.
- [0043] 또한, 본 발명에 따른 변이 대장균은 변이되지 않은 대장균, 예컨대 야생형 대장균과 비교하여 세포 외부 지방산의 비율이 더 높은 것을 특징으로 한다. 상기 세포 외부 지방산의 비율은 총 지방산 농도 (세포 내부 지방산 및 세포 외부 지방산 모두 포함) 대비 세포 외부 지방산의 농도의 비를 의미한다. 이는 본 발명에서 확인된 유전자의 불활성화가 대장균 내의 세포 내부 지방산의 비율을 낮추고 세포 외부 지방산의 비율을 증가시키는데 크게 기여한다는 것을 가리킨다. 예를 들어, 본 발명에 따른 변이 대장균은 총 지방산 중 외부 지방산의 비율이 25% 이상, 27% 이상, 30% 이상, 33% 이상, 35% 이상, 40% 이상, 45% 이상, 또는 50% 이상일 수 있다. 본 발명에 따른 변이 대장균은 세포 내부 지방산의 비율을 낮춤으로써 지방산으로 인한 세포 독성을 줄일 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 변이 대장균은 세포 성장에 대한 저해없이 지방산을 생산할 수 있다.
- [0044] 본원이 envR, gusC 및/또는 mdIA 유전자가 불활성화된, 예컨대 돌연변이된 대장균만을 기술하고 있음에도 불구하고, 본 기술분야의 숙련자라면, 타겟 미생물이 게놈 내에 상기 유전자를 가지는 한, 본 발명의 방법이 대장균 이외의 다른 다양한 타겟 미생물에 적용될 수 있음을 인식할 것이다.
- [0045] 또한, 본 발명은 야생형 대장균의 envR, gusC 및 mdIA로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자를 불활성화시키는 단계를 포함하는, 지방산 생성능이 개선된 변이 대장균을 제조하는 방법을 제공한다.
- [0046] 전술한 바와 같이, 상기 유전자의 불활성화는 당업계에 알려진 다양한 방법, 예컨대 돌연변이유발에 의해 수행될 수 있다. 본 발명에 따른 지방산 생성능이 개선된 변이 대장균의 제조방법은 envR, gusC 및 mdIA로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 불활성화를 달성하기만 하면 될 뿐, 그 불활성화 방법에 제한되지 않는다.
- [0047] 나아가, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 지방산 생성능이 개선된 변이 대장균을 제조하는 방법을 제공한다:
- [0048] (a) 야생형 대장균을 트랜스포존(transposon) 또는 플라스포존(plasposon)을 이용한 무작위적 삽입 돌연변이유발(random insertional mutagenesis)에 의해 돌연변이시켜 라이브러리를 제작하는 단계; 및
- [0049] (b) 상기 라이브러리로부터 envR, gusC 및 mdIA로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자가 불활성화된 변이 균주를 선별하는 단계.

- [0050] 전술한 방법에서, 단계 (a)는 목적하는 특성을 갖는 균주를 얻기 위한 다양한 변이된 돌연변이 집단을 수득하는 단계이다. 상기 돌연변이의 집단은 종래 공지된 다양한 방법에 의해 수행될 수 있으나, 무작위적 삽입 돌연변이 유발에 의해 수행하는 것이 바람직하다. 상기 무작위적 삽입 돌연변이유발의 구체적인 예로는, 트랜스포존을 이용한 돌연변이유발 또는 플라스포존을 이용한 돌연변이유발을 들 수 있으며, 바람직하게는 플라스포존을 이용한 돌연변이유발에 의해 수행될 수 있다.
- [0051] 플라스포존을 이용한 돌연변이유발에 따르면, 적절하게 제조된 플라스포존을 공여세포(donor cell)에 삽입한 후 세포접합(conjugation)에 의해 상기 플라스포존을 수용세포(recipient cell)에 전달함으로써 무작위적 삽입 돌연변이 균주를 생성할 수 있다. 상기 플라스포존을 이용한 무작위 삽입 돌연변이유발은 공여세포와 수용세포를 구별하고, 플라스포존이 삽입되지 않은 수용세포와 플라스포존이 삽입된 수용세포를 구별할 수 있는 조건하에 수행될 수 있다. 예를 들어, 영양요구주 공여세포를 사용함으로써 공여세포와 수용세포를 구별할 수 있고, 카나마이신 및 특정한 복제기점을 갖는 플라스포존을 사용함으로써 플라스포존이 삽입되지 않은 수용세포와 플라스포존이 삽입된 수용세포를 구별할 수 있다.
- [0052] 전술한 플라스포존 및 세포접합을 이용한 방법은 본 기술분야에 널리 알려져 있다.
- [0053] 전술한 방법에서, 단계 (b)는 단계 (a)에서 수득된 무작위적 삽입 돌연변이 라이브러리 내의 균주를 분석하여 envR, gusC 및 mdIA 중 어느 하나의 유전자가 변이된 변이 균주를 선별하는 것이다.
- [0054] 이는 상기 라이브러리 내의 균주들의 플라스포존 삽입 부위를 시퀀싱하여 서열을 확인함으로써 수행될 수 있다. 또한, 시퀀싱하는 균주의 수를 축소시키기 위하여, 시퀀싱과 더불어 무작위적 삽입 돌연변이 라이브러리 내의 균주 중 야생형 대장균에 비해 지방산 생성이 증가된 균주를 선별하는 과정을 조합할 수 있다. 예를 들어, 상기 라이브러리 내의 균주들에 대해 지방산 생성을 조사하여 지방산 생성능이 개선된 균주들을 1차 선별한 후, 상기 선별된 균주에 대해 플라스포존 삽입 부위의 서열을 조사함으로써 envR, gusC 및 mdIA 중 어느 하나의 유전자가 변이된 변이 균주를 선별할 수 있다.
- [0055] 한편, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 지방산 생성능이 개선된 변이 대장균을 제조하는 방법을 제공한다:
- [0056] (a) 야생형 대장균을 트랜스포존(transposon) 또는 플라스포존(plasposon)을 이용한 무작위적 삽입 돌연변이유발(random insertional mutagenesis)에 의해 돌연변이시켜 라이브러리를 제작하는 단계; 및
- [0057] (b) 상기 라이브러리로부터 야생형 대장균과 비교하여 지방산 생성능이 개선된 균주를 선별하는 단계.
- [0058] 전술한 방법에서, 단계 (a)는 앞서 설명한 바와 같다.
- [0059] 전술한 방법에서, 단계 (b)는 단계 (a)에서 수득된 무작위적 돌연변이 라이브러리 내의 균주를 분석하여 야생형 대장균에 비해 지방산 생성능이 개선된 균주를 선별한다.
- [0060] 상기 방법에서, 변이 대장균의 지방산 생성능은 지방산 대사경로의 전사인자인 fadR, tetA 및 적색 형광 단백질(RFP)을 포함하는 플라스미드에 의해 측정될 수 있다. 상기 플라스미드는 본 발명자에 의해 개발된 것으로서, 본원에서 '지방산 바이오센서(fatty acid biosensor; FAB)'로 명명된다.
- [0061] 하나의 구현예에서, 상기 지방산 바이오센서 플라스미드는 pBAD 프로모터 및 이의 제어 하에 있는 fadR 유전자를 포함하고, FadR 결합 부위가 P_L 프로모터에 삽입된 P_{LR} 프로모터 및 이의 제어하에 있는 tetA 및 rfp 유전자를 포함한다.
- [0062] 상기 지방산 바이오센서 플라스미드는 지방산이 불충분한 경우 FadR이 프로모터 내의 FadR 결합 부위에 결합하여 RNA 폴리머라아제가 프로모터에 결합하는 것을 막음으로써 tetA와 rfp 전사를 억제한다. 한편, 지방산이 충분한 경우 지방산이 아실-CoA로 활성화되고 이는 FadR의 DNA 결합 활성을 길항하며, RNA 폴리머라아제는 프로모터에 결합하여 tetA와 rfp 전사를 작동시킨다. 따라서, 테트라사이클린에 대한 내성과 RFP의 발현량을 측정함으로써 지방산 생성량을 측정할 수 있다.
- [0063] 본 발명은 또한 전술한 변이 대장균을 배양하는 단계를 포함하는, 변이 대장균을 이용하여 지방산을 생산하는

방법을 제공한다.

[0064] 상기 변이 대장균의 배양은 적절한 대장균 배양용 배지, 예를 들면 LB 배지, M9-최소 배지 등을 이용하여 수행될 수 있다. 상기 배양 중 싸이오에스터라제의 발현을 돕기 위해 0.01 내지 1 mM, 바람직하게는 0.3 mM의 IPTG가 첨가될 수 있다.

[0065] 상기 배양 과정을 통해 수득한 배양물은 지방산을 수득하기 위해 종래 알려진 통상적인 방법, 예를 들면 셉록 미생물 동정 시스템(SherlockTM Microbial Identification System) 방법을 추가로 거칠 수 있다.

[0066] 이하, 본 발명을 실시예를 들어 상세히 설명하고자 하나, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 이로 인해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

[0067] **참고예: 세균 균주, 플라스미드 및 프라이머**

[0068] 하기 실시예에서 사용된 프라이머를 하기 표 1에 나타내었고, 균주 및 플라스미드를 하기 표 2에 나타내었다.

표 1

	명칭	서열	서열번호
--	----	----	------

프라이머	R6K-Kan FP	AAGGTACCAGATTGCAGCATTACACGTC	1
	R6K-Kan RP	CGAGCTCCTGAGATAGGTGCCTCACTG	2
	TesA FP	AAAGAATTCAAAAGATCTTTTAAGAAGGAGATATACATATGGCGGACACGTTATT GAT	4
	TesA RP	TTACTCGAGTTATGAGTCATGATTTACTA	5
	FadR FP	AAAGATCTTTTAAGAAGGAGATATACAT ATGGTCATTAAGGCGCAAAG	7
	FadR RP	TACTCGAGTTATCGCCCTGAATGGCTA	8
	TetA FP	ACATCAGCAGGACGCACTGACCGAATTCAATTTAAGAAGGAGATATACATATGAA ATCTAACAATGCGCTCATCG	9
	TetA RP	AGAACCGCCTCCAGAACCACCACCGAGCCGCCGCGCTTCCACCGCC GGTCGAGGTGGCCCGCTCCATGCA	10
	RFP FP	GGCGGTGGAAGCGCGCGGCTCCGGTGGTGGTTCTGGAGCGGTTCT ATGGCGAGTAGCGAAGACGTTATCA	11
	RFP RP	GTCAAGTTGTCATAAAGCGTCTACCGCCTTTGAGTGAGCTG	12
	K2 RP	GGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGT	13
	Km seq RP	GAAGAACTCGTCAAGAAGCGATAG	14
	EnvR delete FP	GAAGTGAATTTTCAGGACAGAATGTGAATTTACATGACACTTAATTCATTGTGTA GGCTGGAGCTGCTTC	15
	EnvR delete RP	ATTTTCTCACTCTGTGTCGAATATATTTATTTCTGAATAATTAATCATGATTCC GGGGATCCGTCGACC	16
	EnvR sequencing FP	GTTAAGCGAAGTTGACCCGATCTC	17
	EnvR sequencing RP	AAAGAAAAATACAGTTCTGCTATCCT	18
	GusC delete FP	CCGGAGATTTTCTCTCCGGCGTTATTTTTTACTTCAGCATAAAGTCATAGTGA GGCTGGAGCTGCTTC	19
	GusC delete RP	ACTAATTAATATTCAATAAAAAATAATCAGAACATCAAAGGTGCAACTATGATTCC GGGGATCCGTCGACC	20
	GusC sequencing FP	GGCATGTTTGCGATGCCAGCTCTTA	21
	GusC sequencing RP	CCGGCGTGCGAATTGAAGGGCTCAC	22
	MdIA delete FP	TCTTTACCCATCGAATAAATATCCAGAATCAGGTCAGGACACAACGCGTGGTGA GGCTGGAGCTGCTTC	23
	MdIA delete RP	GCTTGAGAGTCGGCCACAGTTGGCTAAACTACGCATCGACGGCTCCTCATTC GGGGATCCGTCGACC	24
	MdIA sequencing FP	AACGGCTGGAGGACGACGGTATCCT	25
	MdIA sequencing RP	ACAGCAGCGACTGCGCGTAATGTAG	26
	FadD delete FP	CATTTGGGGTTGCGATGACGACGAACACGCATTTTAGAGGTGAAGAATTGGTGA GGCTGGAGCTGCTTC	27
	FadD delete RP	TAACCGGCGTCTGACGACTGACTTAACGCTCAGGCTTTATTGTCCACTTTATTCC GGGGATCCGTCGACC	28
	FadD sequencing FP	GAGAGTACAAACAGTTGTAACGTG	29
	FadD sequencing RP	CCATCGAAAAGTTGAATCAA	30

표 2

[0070]	명칭	특성	입수처 또는 참고문헌
--------	----	----	-------------

균주	<i>E. coli</i> MG1655	야생형	Blattner 등 <i>Science</i> 277, 5331, 1453-1474(1997)
	<i>E. coli</i> MFD Δ pir	MG1655 RP4-2-Tc::[Δ Mu1::aac(3)IV- Δ aphA- Δ nic35- Δ Mu2::zeo] Δ dapA::(erm-pir) Δ recA	Ferrieres et al., <i>J Bacteriol.</i> 192, 6418-27. 2010
	<i>E. coli</i> MFD Δ pir-플라스포존	플라스포존을 포함하는 <i>E. coli</i> MFD Δ pir	하기 실시예에서 제조
	MG- Δ fadD	acyl-CoA 합성효소를 암호화하는 fadD가 제거된 MG1655	하기 실시예에서 제조
	MG- Δ envR	envR이 제거된 MG1655	하기 실시예에서 제조
	MG- Δ gusC	gusC가 제거된 MG1655	하기 실시예에서 제조
	MG- Δ mdlA	mdlA가 제거된 MG1655	하기 실시예에서 제조
	MG-TesA(control)	pBbB6c-tesA를 포함하는 야생형 MG1655	하기 실시예에서 제조
	MG- Δ envR-TesA	pBbB6c-tesA를 포함하는 MG- Δ envR	하기 실시예에서 제조
	MG- Δ gusC-TesA	BbB6c-tesA를 포함하는 MG- Δ gusC	하기 실시예에서 제조
	MG- Δ mdlA-TesA	BbB6c-tesA를 포함하는 MG- Δ mdlA	하기 실시예에서 제조
	MG- Δ envR, Δ gusC-TesA	BbB6c-tesA를 포함하는 MG- Δ envR, Δ gusC	하기 실시예에서 제조
	MG- Δ envR, Δ mdlA-TesA	BbB6c-tesA를 포함하는 MG- Δ envR, Δ mdlA	하기 실시예에서 제조
	MG- Δ mdl, Δ gusC-TesA	BbB6c-tesA를 포함하는 MG- Δ mdl, Δ gusC	하기 실시예에서 제조
플라스미드	pBbB6c-tesA	BBR1 ori; Cm ^r , P _{lacO1} -tesA	하기 실시예에서 제조
	pBbB8a-FadR	ColE1 ori; Amp ^r , P _{BAD} -fadR	하기 실시예에서 제조
	Fatty Acid Biosensor (FAB)	ColE1 ori; Amp ^r , P _{BAD} -fadR, PLR-tetA-RFP	하기 실시예에서 제조
	pKD13	R6K ori ; Km ^r	Datsenko and Wanner, <i>Proc Natl Acad Sci U S A.</i> 97, 6640-5, 2000
	pTNMod-OTc	pMB1 ori; Tetr, OriT, Tnp	Dennis and Zylstra, <i>Appl Environ Microbiol.</i> 64, 2710-5, 1998
	pTNMod-R6K-Km	R6k ori; Kmr, OriT, Tnp	하기 실시예에서 제조
	pCP20	R101 origin, repA101(ts); FLP 재조합효소, Amp ^R , Cm ^R	Cherepanov and Wackernagel, <i>Gene.</i> 158, 9-14. 1995
	pSIM5	R101 origin, repA101(ts); Red 재조합효소, Cm ^R	Datsenko and Wanner, <i>Proc Natl Acad Sci U S A.</i> 97, 6640-5, 2000

[0071]

[0072] 실시예 1: 플라스포존을 이용한 무작위적 삽입 돌연변이 라이브러리의 제작

[0073]

도 1에 도시된 바와 같이, 대장균의 게놈에 무작위로 삽입되어 유전자를 불활성화시키는 플라스포존을 이용하여 무작위적 삽입 돌연변이 라이브러리를 제작하였다.

[0074]

<1-1> 플라스포존의 제조

[0075]

박테리아의 게놈에 무작위적으로 삽입되는 플라스미드인 플라스포존 pTNMod-OTc를 G. J. ZYLSTRA 박사로부터 제공받았다(Dennis and Zylstra, *Appl Environ Microbiol.* 64, 2710-5, 1998). 상기 플라스포존 내의 테트라사이클린 내성유전자(Tetr) 및 pMB1 복제기점(pMB1 ori)을 프라이머(서열번호 1: AAGGTACCAGATTGCAGCATTACACGTC; 및 서열번호 2: CGAGCTCCTGAGATAGGTGCCTCACTG)를 이용한 PCR에 의해 플라스미드 pKD13(Datsenko and Wanner, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97, 6640-5, 2000) 유래의 카나마이신 내성유전자(Kmr) 및 R6K 복제기점으로 교체하였다(도 1 참조). 상기 제조된 플라스포존을 'pTNMod-R6K-Km'으로 명명하였다. 상기 제조된 플라스포존의 지도가 도 1b에 나타나 있으며, 전체 염기서열이 서열번호 3으로 표시되어 있다.

[0076]

상기 플라스포존은 차후 실시예 2에서 사용될 바이오센서를 고려하여 제조하였다. 상기 바이오센서는 테트라사

이클린 저항성에 의해 균주를 선별하므로, 플라스포존의 항생제 마커를 테트라사이클린에서 카나마이신으로 교체하였다. 그리고, pMB1 복제기점은 대장균에서 복제가 가능하여 돌연변이 균주를 선별하는데 사용될 수 없으므로, 이를 자살벡터(suicide vector)의 복제기점인 R6K로 교체하였다. 따라서, 카나마이신 내성 유전자 및 R6K가 대장균의 게놈에 삽입된 변이 균주는 카나마이신 함유 플레이트에서 성장할 수 있다.

[0077] <1-2> 무작위적 삽입 돌연변이 라이브러리의 제작

[0078] 실시예 <1-1>에서 제조된 플라스포존을 공여세포에 삽입한 후, 세포접합을 통해 무작위적 삽입 돌연변이 라이브러리를 제작하였다.

[0079] 구체적으로, 공여세포(donor cell)로서 *E. coli* MFD λ pir(Institut Pasteur; France) 및 수용세포(recipient cell)로서 *E. coli* MG1655(Blattner 등 *Science*, 277, 5331, 1453-1474(1997))를 이용하였다.

[0080] 먼저, 공여세포에 형질전환을 통해 실시예 <1-1>의 플라스포존 'pTNMod-R6K-Km'을 삽입하여 'MFD λ pir-플라스포존' 균주를 준비하였다.

[0081] 공여세포로서 상기 균주 및 수용세포로서 *E. coli* MG1655를 각각 0.3 mM의 디아미노피멜산(DAP)이 첨가된 LB 배지 및 DAP가 첨가되지 않은 LB 배지에서 37℃에서 16시간 동안 배양하였다. 상기 배양된 세포들을 같은 조성의 배지에 1:100 희석하여 접종을 한 후 세포의 흡광도가 0.5~0.8이 될 때까지 배양하였다.

[0082] 공여세포에 포함된 카나마이신 내성 유전자와 자살벡터(suicide vector)의 복제기점인 R6K를 수용세포에 전달하기 위하여, 상기 배양된 두 균주를 멸균수로 행군 다음 1:5의 부피비(공여:수용, 30 mL:150 mL)로 혼합하여 LB 플레이트에 도말하고, 37℃에서 6시간 동안 배양하였다. 상기 배양 중, 공여세포에 있던 플라스포존은 세포접합을 통하여 수용세포로 전달되고 플라스포존에 암호화되어 있던 트랜스포자아제가 발현되어 카나마이신 내성유전자와 R6K가 수용세포의 게놈에 무작위적으로 삽입된다. 이후, 상기 삽입에 의해 수용세포의 게놈에 있는 유전자가 무작위로 불활성화된다. 상기 공여세포는 디아미노피멜릭산이 없는 배지에서 생존할 수 없고, 게놈에 카나마이신 내성유전자와 R6K가 삽입되지 않은 수용세포는 카나마이신을 함유하는 배지에서 생존할 수 없다. 따라서, 세포를 디아미노피멜릭산이 결여되고 카나마이신을 함유하는 배지에서 성장시킴으로써 유전자가 무작위적으로 불활성화된 변이 대장균만을 수득할 수 있다.

[0083] 상기 6시간 배양 후, 세포들을 카나마이신 항생제가 포함된 LB 플레이트에 도말하여 성장시킴으로써, 다양한 유전자가 불활성화된 무작위적 돌연변이 라이브러리(총 18,882개의 균주)를 획득하였다.

[0084] 실시예 2: 지방산 생성능이 증가된 균주의 선별 및 유전자 규명

[0085] 실시예 1에서 획득한 돌연변이 라이브러리 중에서 지방산 생성능이 증가된 균주를 선별하고, 상기 균주로부터 지방산 생성능에 관여하는 유전자를 확인하였다.

[0086] 상기 균주의 선별을 위해, 하기 실시예 <2-1> 및 <2-2>에서 제조된 싸이오에스테라제 발현 플라스미드와 지방산 바이오센서 플라스미드를 이용하였다.

[0087] <2-1> 싸이오에스테라아제 발현 플라스미드의 제조

[0088] MG1655 게놈의 싸이오에스테라아제를 주형으로 하고 프라이머로서 TesA FP(서열번호 4: AAAGAATTCAAAGATCTTTTAAGAAGGAGATATACATATGGCGGACACGTTATTGAT)와 TesA RP(서열번호 5: TTACTCGAGTTATGAGTCATGATTTACTA)를 이용한 PCR에 의해 552bp의 싸이오에스테라아제(*tesA*) 유전자를 증폭시켰다. 상기 증폭된 *tesA*를 *EcoRI*과 *XhoI*으로 절단한 후, 동일한 제한효소로 처리된 pBbB6c-RFP 플라스미드(Joint BioEnergy Institute, USA)에 라이게이션하여 싸이오에스테라아제를 발현하는 플라스미드 'pBbB6c-tesA'를 제조하였다.

[0089] <2-2> 지방산 바이오센서(FAB)의 제조

- [0090] 문헌[Fuzhong et al., *Nature Biotechnology*, 30, 354-359(2012)]에 기재된 방법을 참조하여, 지방산의 농도를 간접적으로 감지할 수 있는 FAB 플라스미드를 제작하였다.
- [0091] 먼저, 대장균의 지방산 대사경로의 전사인자인 FadR이 결합할 수 있는 DNA 서열(서열번호 6: ATCTGGTACGACCAGAT)을 프라이머(서열번호 9: ACATCAGCAGGACGCACTGACCGAATTCATTTAAGAAGGAGATATACATATGAAATCTAACAATGCGCTCATCG)를 이용하여 P_L 프로모터에 삽입하였다.
- [0092] 이후, FadR의 원활한 발현을 위해 대장균의 FadR 유전자를 프라이머(서열번호 7: AAAGATCTTTAAGAAGGAGATATACATATGGTCATTAAGGCGCAAAG; 및 서열번호 8: TACTCGAGTTATCGCCCTGAATGGCTA)를 이용한 PCR에 의해 증폭한 다음, 이를 bglII와 XhoI로 절단하였다. 상기 절단된 단편을 동일한 제한 효소로 처리된 대장균용 발현 플라스미드 pBbB8a(Joint BioEnergy Institute, USA)에 삽입하여 FadR을 포함하는 플라스미드 'pBbB8a-FadR'을 제작하였다.
- [0093] 한편, tetA 유전자를 플라스미드 pBBR1MCS-3(Applied Environmental Microbiology Lab, UNIST, Korea)을 주형으로 하여 프라이머(서열번호 9: ACATCAGCAGGACGCACTGACCGAATTCATTTAAGAAGGAGATATACATATGAAATCTAACAATGCGCTCATCG; 및 서열번호 10: AGAACCGCTCCAGAACCACCGGAGCCGCCGCTTCCACCGCGGTGAGGTGCGCCGCTCCATGCA)의 프라이머를 이용한 PCR에 의해 증폭하였다. 또한, 적색 형광 단백질(Red Fluorescent Protein; RFP) 유전자를 플라스미드 pBbB8a-RFP(Joint BioEnergy Institute, USA)를 주형으로 하여 프라이머(서열번호 11: GCGGTGGAAGCGCGCGGCTCCGGTGGTGGTTCTGGAGCGGTTCTATGGCGAGTAGCGAAGACGTTATCA; 및 서열번호 12: GTCAAGTTGTCATAAGACGTCTACCGCCTTTGAGTGAGCTG)를 이용한 PCR에 의해 증폭하였다.
- [0094] 상기 증폭된 tetA 유전자 및 RFP 유전자를 SOEing PCR 기법으로 연결하여 하나의 융합 단백질(fusion protein)을 제조하였다. 상기 융합 단백질을 AatI로 절단한 후, 동일한 제한 효소로 처리된 플라스미드 pBbB8a-FadR에 삽입하여 지방산의 농도를 간접적으로 감지할 수 있는 '지방산 바이오센서(FAB)'를 제조하였다.
- [0095] <2-3> 싸이오에스테라제 발현 플라스미드와 지방산 바이오센서를 이용한 지방산 생성능이 증가된 균주의 선별
- [0096] 상기 실시예 <2-1> 및 <2-2>에서 제조된 싸이오에스테라제 발현 플라스미드 및 FAB를 상기 제작된 돌연변이 라이브러리의 각 균주에 형질전환에 의해 삽입하였다.
- [0097] 상기 형질전환된 균주들을 40~60 ug/mL의 테트라사이클린이 함유된 LB 배지에서 농축배양 후 FACS(Fluorescence-activated cell sorting)를 통해 강한 RFP(red fluorescent protein)를 발현하는 균주들을 선별하였다.
- [0098] 선별된 균주들을 M9 배지(1X M9, 2mM MgSO₄, 0.1mM CaCl₂, 100mM 인산나트륨 완충액(pH 7.0), 및 2% 글루코오스)에서 배양하면서, 세포의 흡광도(optical density)가 1이 될 때 0.3 mM의 IPTG를 첨가하여 싸이오에스테라제의 발현 및 이에 따른 지방산의 생성을 유도하였다.
- [0099] 생성된 지방산의 농도를 가스크로마토그래피를 이용하여 측정하였다. 상기 측정된 지방산 농도를 기초로 지방산 생성능이 증가된 균주들을 선별하였다.
- [0100] <2-4> 지방산 생성에 관여하는 유전자의 확인
- [0101] 상기 지방산 생산량이 증가된 균주의 유전자형을 확인하기 위하여, 프라이머(서열번호 13: GGACTGGCTGCTATTGGCGAAGT)를 이용하여 RATE(random amplification of transposon ends) PCR을 실시하였다(Ducey and Dyer et al., EPICENTRE Forum 9: 67, 2002). 이후, 카나마이신 내성유전자에 결합할 수 있는 프라이머(서열번호 14: GAAGAACTCGTCAAGAAGGCGATAG)를 이용한 염기서열 분석에 의해 플라스포존에 의해 불활성화된 유전자를 확인하였다.
- [0102] 상기 결과, 불활성화된 유전자 중에 envR, gusC, 및 mdlA 유전자가 확인되었다. 상기 유전자들은 기존에 알려진 지방산 생산에 관여하는 유전자가 아닌 새로운 유전자들이었다.
- [0103] EnvR(envCD로도 알려짐)은 대장균의 수송 펌프인 AcrAB와 AcrEF의 발현을 억제하는 것으로 알려져 있다

(Hirakawa et al., *J. Bacteriol.* 190, 6276-9. 2008; WO 2006/1138972). EnvR은 상기 수송 펌프를 조절을 통해 물질의 수송에 관여하는 것으로 예상된다. 따라서 본 발명에서 규명된 EnvR의 불활성화는 지방산 수송펌프의 발현을 향상시킴으로써 지방산에 의해 발생하는 세포독성을 줄이고 대장균의 지방산 생성능을 증가시키는 것으로 여겨진다. GusC는 글루쿠로니드(glucuronide)를 세포내로 수송하는 외막 단백질(outer membrane protein)이다. 글루쿠로니드는 글루쿠론산이 결합되어 있는 형태의 물질로 지방산과 유사하게 탄소사슬과 카복실기로 구성되어 있다. 현재까지 GusC와 지방산과의 관계는 밝혀진 바가 없지만 지방산과 유사한 구조를 가지고 있어 지방산의 수송에도 관여하는 것으로 여겨진다. MdlA의 경우 아미노산 서열을 분석한 결과 기존에 밝혀진 다중약물방출단백질(multi-drug efflux pump)들의 역할을 할 것으로 보이지만 정확한 역할은 아직 밝혀지지 않았다.

[0104] 실시예 3: envR, gusC, 및 mdlA 유전자의 지방산 생성 효과

[0105] 실시예 2에서 확인된 envR, gusC, 및 mdlA 유전자가 대장균에서의 지방산 생산에 관여하는지 살펴보기 위하여, 실시예 <2-3>에서와 같이 상기 유전자가 불활성화되어 지방산의 생성이 증가된 변이 대장균을 대상으로 지방산 농도를 측정하였다.

[0106] 상기 결과를 도 2에 나타내었다. 도 2에서 대조군(control)은 pBbB6c-tesA를 포함하는 야생형 *E. coli* MG1655를 나타내고, $\Delta envR$ -TesA, $\Delta gusC$ -TesA 및 $\Delta mdlA$ -TesA는 각각 pBbB6c-tesA를 포함하고 envR, gusC 및 mdlA가 불활성화된 변이 대장균(MG1655)을 나타낸다.

[0107] 상기 도 2에서 보는 바와 같이, envR, gusC 및 mdlA가 불활성화된 변이 대장균은 대조군과 비교하여 우수한 지방산 생성능을 나타내었다.

[0108] 실시예 4: 변이 대장균의 세포 내부 및 외부 지방산량 비교

[0109] 선별된 유전자들의 기능이 지방산의 수송과 관련 있는지 살펴보기 위하여, 상기 변이 대장균 세포 내부와 외부의 지방산량을 비교하였다.

[0110] 실시예 3에서 사용된 변이 대장균의 각 배양액을 10,000 RCF(relative centrifugal force)에서 5분 동안 원심 분리하여 세포를 분리하였다. 상등액과 세포 부분을 분리하여 각각 다른 튜브에 보관하였다. 세포부분 (cell fraction)은 상등액과 동일한 양의 증류수를 넣어 다시 풀어준 후 지방산을 추출 및 메틸화하여 가스크로마토그래피로 지방산의 양을 측정하였다(Steen et al., *Nature* 463, 559562, 2010). 요약하면, 2.0 mL의 튜브에 500 μ L의 배양액 (세포 외부의 경우 원심분리 후 상등액 부분을, 세포 내부의 경우 증류수에 풀어진 세포 부분을 가 리킴), 50 μ L의 6N HCl, 50 μ L의 메틸노나데카노에이트 (1g/L, 내부 표준으로서 사용됨), 및 500 μ L의 에틸아세 테이트를 첨가한 후 30초간 강하게 볼텍싱하여 지방산을 유기용매층으로 추출하였다. 이후, 13500 rpm에서 2분 간 원심분리하여 유기용매층을 분리하였다. 500 μ L의 유기용매층을 메틸화(100 μ L의 MeOH:6N HCl (9:1, v/v) 혼합액에 100 μ L의 TMS-디아조메탄 첨가)한 후 가스크로마토그래피로 각각 세포 내부 및 세포 외부의 지방산 농도를 측정하였다.

[0111] 상기 결과를 도 3에 나타내었다. 도 3에서 각 막대의 하부 영역은 세포 내부 지방산 농도이며, 상부 영역은 세포 외부에서의 지방산 농도이다. 상기 도면에서 대조군(control)은 pBbB6c-tesA를 포함하는 야생형 *E. coli* MG1655를 나타내고, $\Delta envR$ -TesA, $\Delta gusC$ -TesA 및 $\Delta mdlA$ -TesA는 pBbB6c-tesA를 포함하나 각각 envR, gusC 및 mdlA가 불활성화된 변이 대장균(MG1655)을 나타낸다.

[0112] 상기 결과에서 보는 바와 같이, 대조군(야생형 대장균)의 경우 전체 지방산 중 세포 외부 지방산의 비율이 약 25%인데 반해, 본 발명에 따른 변이 대장균의 경우 세포 외부 지방산의 비율이 모두 30%를 넘는 것으로 나타났다. 그 중에서도, 수송 단백질들의 전사조절인자인 EnvR이 불활성화된 돌연변이 균주가 외부 지방산의 비율이 가장 높았고, 그 다음으로 MdlA 및 GusC의 순이었다.

[0113] 상기 결과는 EnvR, MdlA 및 GusC 중 어느 하나의 유전자의 불활성화가 내부 지방산의 비율을 감소시킨다는 것을 보여준다. 따라서, EnvR, MdlA 및 GusC 중 어느 하나의 유전자의 불활성화는 내부 지방산의 비율을 감소시켜 상기 내부 지방산으로 인한 대장균의 성장 억제 및 부작용을 최소화할 수 있을 것으로 예상된다.

[0114] 실시예 5: 지방산의 유무에 따른 변이 대장균의 성장 변화

[0115] 본 발명에서 확인된 유전자들의 특성을 이해하기 위하여, 본 발명의 변이 대장균이 지방산의 유무에 따라 세포 성장에 영향을 받는지 살펴보았다.

[0116] 먼저, 문헌[Lennen et al., *Biotechnol Bioeng.* 106, 193-202, 2010]을 참고하여, acyl-CoA 합성효소를 암호화하는 *fadD*가 제거되어 지방산 분해경로가 불활성화된 대장균을 제조하였다. 상기 제조된 대장균을 'MG- Δ *fadD*'로 명명하였다.

[0117] 한편, 상기 제조된 MG- Δ *fadD* 균주로부터 본 발명에서 확인된 *EnvR*, *MdIA* 및 *GusC* 유전자를 각각 제거하여 변이 균주를 제조하였다. 각각의 유전자와 상동성 서열을 지니고 있는 프라이머 (*EnvR*의 제거를 위한 서열번호 15 및 16의 프라이머, *GusC*의 제거를 위한 서열번호 19 및 20의 프라이머, *mdIA*의 제거를 위한 서열번호 23 및 24의 프라이머) 및 주형으로서 pKD13을 이용하여 kan 카세트를 PCR 증폭하였다. λ Red 재조합 시스템을 pSIM5로부터 발현한 후, 상동성 재조합을 통해 상기 유전자들을 제거하였다. 이후, pCP20를 이용하여 kan 카세트를 제거하여 상기 유전자들을 대장균의 게놈에서 제거하였다. 상기 제조된 변이 균주를 각각 'MG- Δ *envR*', 'MG- Δ *gusC*' 및 'MG- Δ *mdIA*'로 명명하였다.

[0118] 상기 제조된 4종의 균주를 M9배지(1X M9, 2mM MgSO_4 , 0.1mM CaCl_2 , 100mM 인산나트륨 완충액(pH 7.0), 2% 글리세롤, 및 지방산을 수용화하기 위한 0.05% tween-80)에서 배양하였다. 세포 흡광도가 1.1~1.3일 때 5 g/L(C12 : C14 : C16 : C18:1 = 30 : 50 : 10 : 10 (%), w/v)의 지방산을 첨가한 후 세포 흡광도를 측정하였다. 상기 결과를 도 4에 나타내었다.

[0119] 도 4에서 보는 바와 같이, 대조균 MG- Δ *fadD* 균주의 경우 지방산의 첨가에 따라 세포 생장이 30~40% 감소하는 것으로 나타났다. 이에 반해, 본 발명에서 확인된 유전자가 제거된 균주들은 지방산의 첨가에 의해 세포 생장이 크게 영향을 받지 않았다. 따라서, 본 발명에서 확인된 3개의 유전자는 내부 지방산에 의한 세포 독성을 감소시킴으로써 세포 성장을 개선하고, 이에 따라 대장균의 지방산 생성능을 증가시키는 것으로 예상된다.

[0120] 실시예 6: 2 가지 유전자의 불활성화에 따른 지방산 생성능

[0121] 본 발명에서 확인된 유전자들의 다양한 조합을 불활성화시키는 것이 지방산의 생성능을 추가적으로 증가시키는 지 살펴보기 위하여, 이중제거(double knockout) 돌연변이 균주를 제작하였다.

[0122] 구체적으로, 기존의 잘 알려진 λ -재조합 시스템(λ -recombinase system)을 이용하여 타겟 유전자들을 제거하였다(Datsenko and Wanner, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97, 6640-5, 2000). 상기 각 유전자의 제거를 위해 프라이머(*envR* -서열번호 15, 16, 17, 및 18; *gusC* - 서열번호 19, 20, 21, 및 22; *mdIA* - 서열번호 23, 24, 25 및 26)를 이용하였다. 상기 제작된 이중제거된 균주를 각각 'MG- Δ *envR*, Δ *gusC*-TetA', 'MG- Δ *gusC*, Δ *mdIA*-TetA' 및 'MG- Δ *envR*, Δ *mdIA*-TetA'로 명명하였다. 또한, 대조균으로서, 프라이머(*fadD*-서열번호 27, 28, 29, 및 30)를 사용하여 *FadD*가 제거된 균주를 제조하였다.

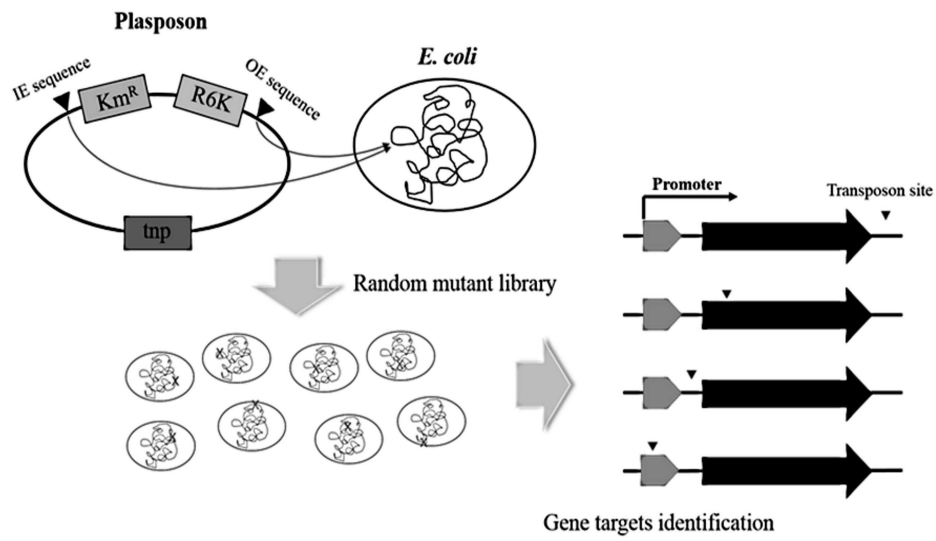
[0123] 실시예 2에서와 같이, 상기 이중제거 균주에 싸이오에스테라아제를 도입한 후 상기과 동일한 조성의 M9 배지에서 배양하여 지방산의 생산량을 측정하였다. 상기 결과를 도 5에 나타내었다.

[0124] 도 5에서 보는 바와 같이, *gusC*와 *envR*이 동시에 제거된 MG- Δ *envR*, Δ *gusC*-TetA 균주가 가장 높은 지방산 생성능을 보였으며, 이는 *envR*만이 제거된 돌연변이 균주 및 *gusC*가 단독 제거된 돌연변이 균주(도 2)보다 지방산 생성능이 우수하였다. 또한, 다른 두 균주(MG- Δ *gusC*, Δ *mdIA*-TetA 및 MG- Δ *envR*, Δ *mdIA*-TetA)는 모 균주(parental strain)와 비슷한 양의 지방산을 생산하였다.

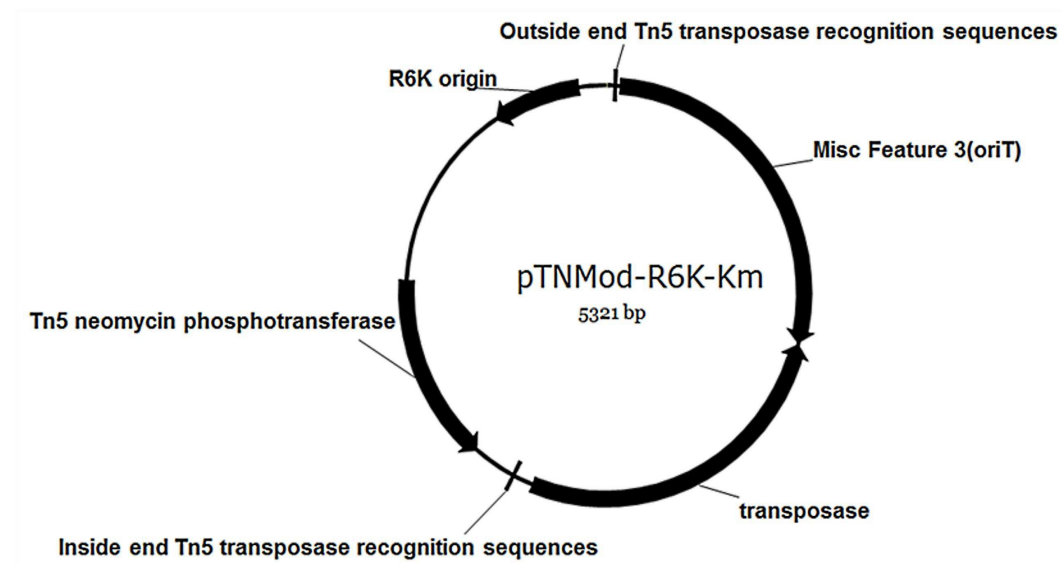
[0125] 상기 결과는 본 발명에서 확인된 유전자들의 조합을 불활성화함으로써 대장균의 지방산 생성능을 개선할 수 있음을 보여준다.

도면

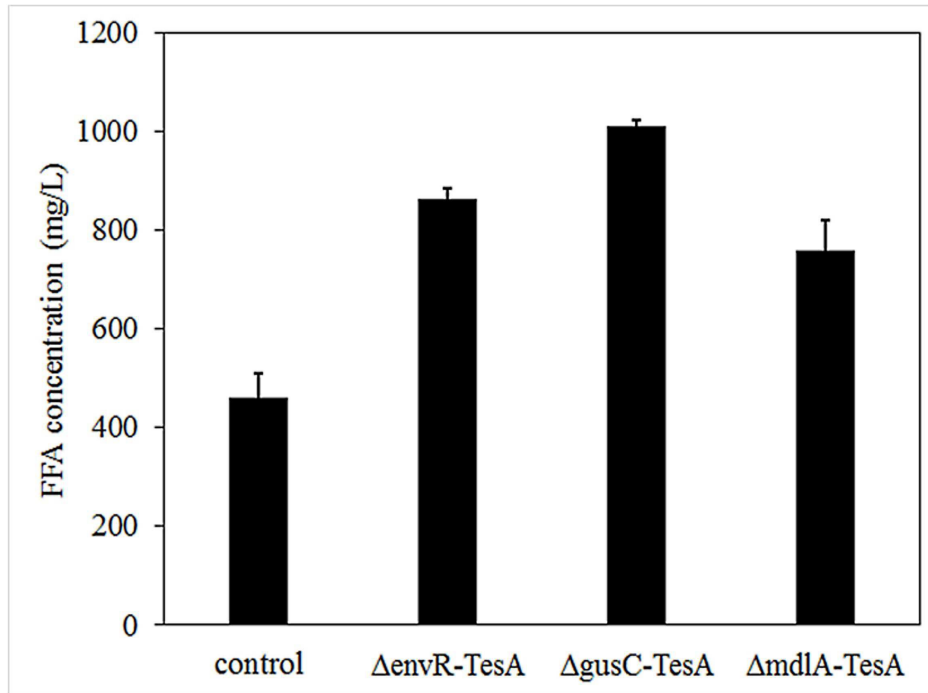
도면1a



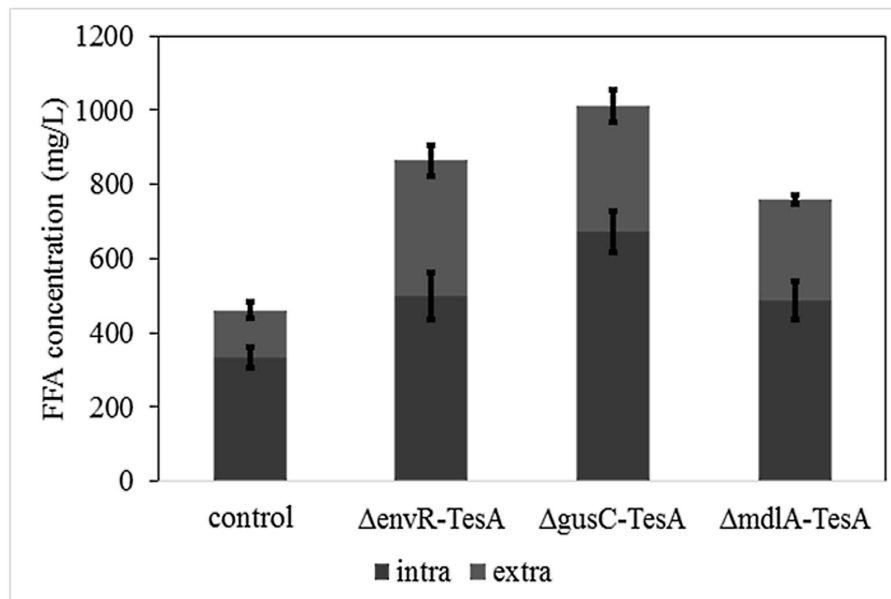
도면1b



도면2

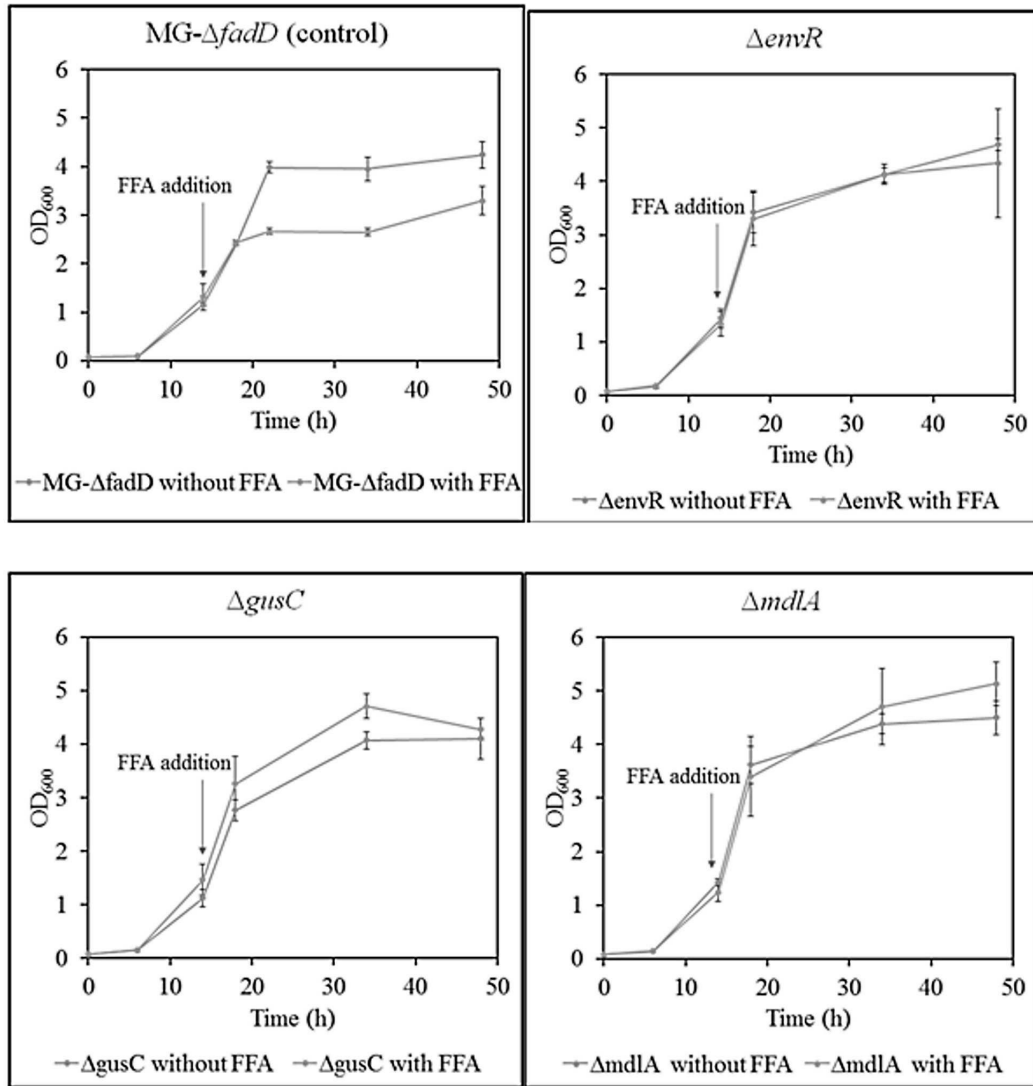


도면3

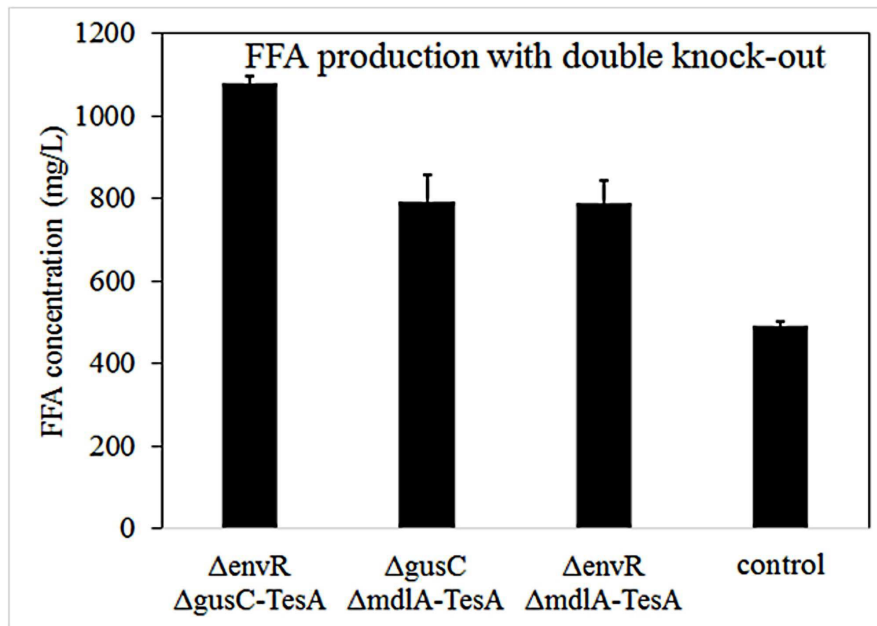


	Control	$\Delta envR$ -TesA	$\Delta gusC$ -TesA	$\Delta mdlA$ -TesA
intra FFA (%)	73.99997	59.83183	67.42963	64.61179
extra FFA (%)	26.00003	40.16817	32.57037	35.38821

도면4



도면5



서 열 목 록

- <110> UNIST(ULSAN NATIONAL INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY)
- <120> MUTANT ESCHERICHIA COLI HAVING AN IMPROVED FATTY ACID PRODUCTION ABILITY AND METHOD FOR PREPARING THE SAME
- <130> FPD201610-0011
- <160> 30
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 28
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> R6K-Kan FP
- <400> 1
- aaggtaccag attgcagcat tacacgtc
- <210> 2
- <211> 27
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> R6K-Kan RP
- <400> 2

cgagctcctg agataggtgc ctcaactg	27
<210> 3	
<211> 5321	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> pTNMod-R6K-Km	
<220><221> misc_feature	
<222> (35)..(52)	
<223> Outside end Tn5 transposase recognition sequences	
<220><221> misc_feature	
<222> (53)..(1070)	
<223> Misc Feature 3(oriT)	
<220><221> misc_feature	
<222> (1537)..(2559)	
<223> transposase	
<220><221> misc_feature	
<222> (3066)..(3084)	
<223> Inside end Tn5 transposase recognition sequences	
<220><221> misc_feature	
<222> (3249)..(4041)	
<223> Tn5 neomycin phosphotransferase	
<220><221> misc_feature	
<222> (4825)..(5211)	
<223> R6K origin	
<400> 3	
cttaattaat ttaaactctag actagtgcgg ccgcacttgt gtataagagt cagaattcta	60
ctgtttgggt gtatgagcta ttgcaaagg aaattggtga tgacaaagct cggcgctatt	120
tgaagaaaat cgactatggc aacgccgatc ctttttgtcc ggtgttgggt tgaagtgaa	180
gccggtcggg gccgcagcgg gggccggcctt ttcagccttg ccccccctgct tcggccgccg	240
tggtccggc gtcttgggtg ccggcgcggg ttccgcagcc ttggcctgcg gtgcgggcac	300
atcggcgggc ttggccttga tgtgccgcct ggcgtgcgag cggaacgtct ctaggagaa	360
cttgaccttc cccgtttccc gcatgtgtc ccaaatggtg acgagcgcac agccggacgc	420
taacgccgc tcgacatccg cctcaccgc caggaacgca accgcagcct catcacgccg	480

gcgcttcttg gccgcgcggg attcaacca ctcggccagc tcgtcgggtg agctcttttg	540
catcgtctct cgctgtccc ctcagttcag taatttcttg catttgcctg tttccagtcg	600
gtagatattc caaaaacag cagggaagca gcgcttttcc gctgcataac cctgcttcgg	660
ggtcattata gcgatttttt cggtatatcc atcctttttc gcacgatata caggattttg	720
ccaaagggtt cgtgtagact ttctttggtg tatccaacgg cgtcagccgg gcaggatagg	780
tgaagtaggc ccaccgcga gcgggtgttc cttcttcact gtcccttatt cgcacctggc	840
ggtgctcaac gggaaatcctg ctctgcgagg ctggccggct accgccggcg taacagatga	900
gggcaagcgg atggctgatg aaaccaagcc aaccaggaag ggcagccac ctatcaaggt	960
gtactgcctt ccagacgaac gaagagcgtg tgaggaaaag gcggcggcgg ccggcatgag	1020
cctgtcggcc tacctgctgg ccgtcggcca gggtacaaa atcacgggcg tcgtggacta	1080
tgagcacgtc cgcgagctgg cccgcatcaa tggcgacctg ggccgcctgg gcggcctgct	1140
gaaactctgg ctaccgcag acccgcgcac ggcgcggttc ggtgatgcca cgatccgggc	1200
aacgttgttg ccattgctgc aggcgcagaa ctggtaggta tggaagatcc tctacgccgg	1260
acgcacgtg gccggcatca ccggcgccac aggtgcgggt gctggcgctt atatgccga	1320
catcaccgat ggggaagatc gggctcgcca ctccggctc atgagcgctt gtttcggcgt	1380
gggtatggtg gcaggccccg tggccggggg actgttgggc gccatctcct tgcctgcacc	1440
attccttgcg gcggcgggtc tcaacggcct caacctacta ctgggctgct tcctaataca	1500
ggagtcgcat aaggagagc gtcgagcggg ggccgatcag atcttgatcc cctgcgcat	1560
cagatccttg gcggcaagaa agccatccag ttactttgc agggcttccc aaccttccca	1620
gagggcgccc cagctggcaa ttccggttcg ctgctgtcc ataaaaccgc ccagtctagc	1680
tatcgccatg taagccact gcaagctacc tgccttctct ttgcgcttgc gttttccctt	1740
gtccagatag ccagtagct gacattcatc cggggtcagc accgtttctg cggactggt	1800
ttctacgtgt tccgttctt ttagcagccc ttgcgccctg agtgcttgcg gcagcgtgaa	1860
gctttctctg agctgtaaca gcctgaccgc aacaaacgag aggatcgaga ccatccgctc	1920
cagattatcc ggctcctcca tgcgttgcct ctcggctcct gctccggttt tccatgcctt	1980
atggaactcc tcgatccgc agcgatgggt ataaatgtcg atgacgcga aggcttgggc	2040
tagcgactcg accggttcgc tggtcagcaa caaccattc aacggggtct cacccttggg	2100
cgggttaatc tctcggcca gcaccgcgtt gagcgtgata ttccctgtt ttagcgtgat	2160
gcgcccactg cgcaggctca agctcgctt gcgggctggg cgatttttac gtttaccgcg	2220
tttatccacc acgccctttt gcggaatgct gatctgatag ccaccaact ccggttgggt	2280

cttcagatgg tcgtacagat acaaccaga ctctacgtcc ttgcgtgggt gcttgagcgc	2340
caccacgaag cgctcgttat gcgccagttt gtcctgcaga taagcatgaa tateggttc	2400
gcggtcacag accgcaatca cgttgctcat catgctgccc atgcgtaacc ggctagtgc	2460
ggcggctgcc agccatttgc cactctcctt ttcattccga tcggcagggt catccgggcg	2520
catccaccac tctgatgca gtaatcctac ggtgcggaat gtggtggcct cgagcaagag	2580
aacggagtga acccaccatc cgccgggattt atcctgaata gagcccagct tgccaagctc	2640
ttcggcgacc tggtagcgat aactcaaaga ggtggtgtcc tcaatggcca gcagttcggg	2700
aaactcctga gccaaattga ctgtttgcat ggccgcagcc tttctgatcg cctcggcaga	2760
aacgttggga ttgcggataa atcggttaagc gccttctctgc atggcttcac taccctctga	2820
tgagatggtt attgatttac cagaatattt tgccaattgg gcggcgacgt taaccaagcg	2880
ggcagtagcg cgaggatcac ccagcgccgc cgaagagaac acagatttag cccagtcggc	2940
cgcacgatga agagcagaag ttatcatgaa cgttaccatg ttaggcaggt cacatggaag	3000
atcagatcct ggaaaacggg aaaggttccg ttcaggacgc tacttgtgta cgggatcggc	3060
ctagactgtc tcttgatcag atctggccac ctaggccggc cgcgatcgcc ggccgcgccat	3120
gcatgtcgac ggtaccagat tgcagcatta cacgtcttga gcgatttgtt aggcctggagc	3180
tgcttcgaag ttctatact ttctagagaa taggaacttc ggaataggaa ctccaagatc	3240
cccttattag aagaactcgt caagaaggcg atagaaggcg atgcgctgcg aatcgggagc	3300
ggcgataccg taaagcacga ggaagcggtc agccattcgc ccgccaagct cttcagcaat	3360
atcacgggta gccaacgcta tgtctgata gcggtccgcc acaccagcc ggccacagtc	3420
gatgaatcca gaaaagcggc cattttccac catgatattc ggcaagcagg catcgccatg	3480
ggtcacgacg agatcctcgc cgctgggcat gcgcgccttg agcctggcga acagttcggc	3540
tggcgcgagc cctgatgct cttcgtccag atcatcctga tcgacaagac cggcttccat	3600
ccgagtacgt gctcgtcga tgcgatgttt cgcttggtgg tcgaatgggc aggtagccgg	3660
atcaagccta tgcagccgcc gcattgcac agccatgatg gatactttct cggcaggagc	3720
aaggtgagat gacaggagat cctgccccgg cacttcgccc aatagcagcc agtcccttc	3780
cgcttcagtg acaacgtcga gcacagctgc gcaaggaaac cccgtcgtgg ccagccacga	3840
tagccgcgct gcctcgtcct gcagttcatt cagggcacgc gacaggtcgg tcttgacaaa	3900
aagaaccggg cgccccctgc ctgacagccg gaacacggcg gcatcagagc agccgattgt	3960
ctgttgtgcc cagtcatagc cgaatagcct ctccacccaa gcggccggag aacctgcgtg	4020

caatccatct tgttcaatca tgcgaaacga tctcctcct gtctcttgat cagatcttga 4080
 tccccctgcgc catcagatcc ttggcggcaa gaaagccatc cagtttactt tgcagggctt 4140
 cccaacctta ccagagggcg cccagctgg caattccggt tcgcttgctg tccataaaac 4200
 cgcccagtct agctatcgcc atgtaagccc actgcaagct acctgctttc tctttgcgct 4260
 tgcgttttcc ctgtccaga tagcccgta gctgacattc atccggggtc agcaccgttt 4320
 ctgcggaactg gctttctacg tgttccgctt cctttagcag cctttgcgcc ctgagtgcct 4380
 gcggcagcgt gagcttcaaa agcgctctga agttcctata ctttctagag aataggaact 4440

tcgaactgca ggtcgacgga tccccggaat taattctcat gtttgacagc ttatcactga 4500
 tcagtgaatt aatggcgatg acgcatcctc acgataatat ccgggtaggc gcaatcactt 4560
 tcgtctctac tccgttacaa agcgaggctg ggtatttccc ggcctttctg ttatccgaaa 4620
 tccactgaaa gcacagcggc tggctgagga gataaataat aaacgagggg ctgtatgcac 4680
 aaagcatctt ctgttgagtt aagaacgagt atcgagatgg cacatagcct tgctcaaatt 4740
 ggaatcaggt ttgtgccaat accagtagaa acagacgaag aagctagctt tgcactggat 4800
 tgcgaggctt tgccatggct aattcccatg tcagccgtta agtgttctg tgtcactgaa 4860

aattgctttg agaggctcta agggcttctc agtgcgttac atccctggct tgttgtccac 4920
 aaccgttaaa ccttaaaagc tttaaaagcc ttatatattc ttttttttct tataaaactt 4980
 aaaaccttag aggtatttta agttgctgat ttatattaat tttattgttc aaacatgaga 5040
 gcttagtacg tgaaacatga gagcttagta cgttagccat gagagcttag tacgttagcc 5100
 atgagggttt agttcgtaa acatgagagc ttagtacgtt aaacatgaga gcttagtacg 5160
 tgaaacatga gagcttagta cgtactatca acaggttgaa ctgcggatct tgcggccgca 5220
 aaaattaaaa atgaagtttt aatcaatct aaagtatata tgagtaaact tggcttgaca 5280

gttaccaatg cttaatcagt gaggcaccta tctcaggagc t 5321

<210> 4

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TesA FP

<400> 4

aaagaattca aaagatcttt taagaaggag atatacatat ggcggacacg ttattgat 58

<210> 5

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TesA RP

<400> 5

ttactcgagt tatgagtcac gatttacta 29

<210> 6

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence binding to FadR

<400> 6

atctggtacg accagat 17

<210> 7

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FadR FP

<400> 7

aaagatcttt taagaaggag atatacatat ggtcattaag gcgcaaag 48

<210> 8

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FadR RP

<400> 8

tactcgagtt atcgcccctg aatggcta 28

<210>

> 9

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TetA FP

<400> 9

acatcagcag gacgcactga ccgaattcaa tttagaagg agatatacat atgaaatcta 60

acaatgcgct catcg 75

<210> 10
 <211> 73
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TetA RP
 <400> 10
 agaaccgcct ccagaaccac caccggagcc gccgccgctt ccaccgccgg tcgaggtggc 60
 ccggctccat gca 73

<210> 11
 <211> 73
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> RFP FP
 <400> 11
 ggcggtggaa gcggcggcgg ctccggtggt ggttctggag gcggttctat ggcgagtagc 60
 gaagacgtta tca 73

<210> 12
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> RFP RP
 <400> 12
 gtcaagttgt cataagacgt ctaccgcctt tgagtgaagt g 41

<210> 13
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> K2 RP
 <400> 13
 ggactggctg ctattgggcg aagt 24

<210> 14
 <211> 25
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Km seq RP

<400> 14

gaagaactcg tcaagaaggc gatag 25

<210> 15

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EnvR delete FP

<400> 15

gaactgaatt ttcaggacag aatgtgaatt tacatgacac ttaattcatt gtgtaggctg 60

gagctgcttc 70

<210> 16

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EnvR delete RP

<400> 16

attttctcac tctgtgtcga atatatttat ttcctgaata attaatacatg attccgggga 60

tccgtcgacc 70

<210> 17

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EnvR sequencing FP

<400> 17

gttaagcgaa gttgaccccg atctc 25

<210> 18

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EnvR sequencing RP

<400> 18

aaagaaaaat acagttcgct atcct 25

<210> 19

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GusC delete FP

<400> 19

ccggagattt ttctctccgg cggtattttt tacttcagca taaagtcata gtgtaggctg 60

gagctgcttc 70

<210> 20

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

><223> GusC delete RP

<400> 20

actaattaat attcaataaa aataatcaga acatcaaagg tgcaactatg attccgggga 60

tccgtcgacc 70

<210> 21

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GusC sequencing FP

<400> 21

ggcatgtttg cgatgccagc tctta 25

<210> 22

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GusC sequencing RP

<400>

> 22

ccggcgtgcg aattgaaggg ctcac 25

<210> 23

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MdlA delete FP

<400> 23

tctttaccca tcgaataaat atccagaatc aggtcaggac acaacgcgtg gtgtaggctg 60

gagctgcttc 70

<210> 24

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MdlA delete RP

<400> 24

gcttgagagt cggccacagt tggctaaaac tacgcatcga cggcctcctc attccgggga 60

tccgtcgacc 70

<210> 25

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MdlA sequencing FP

<400> 25

aacggctgga ggacgacggt atcct 25

<210> 26

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MdlA sequencing RP

<400> 26

acagcagcga ctgcgcgtaa tgtag 25

<210> 27

<211> 70

<212>

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FadD delete FP

<400> 27
catttggggt tgcgatgacg acgaacacgc attttagagg tgaagaattg gtgtaggctg 60
gagctgcttc 70
<210> 28
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> FadD delete RP
<400> 28
taaccggcgt ctgacgactg acttaacgct caggctttat tgtccacttt attccgggga 60
tccgtcgacc 70
<210> 29
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> FadD sequencing FP
<400> 29
gagagtacaa acagttgtaa ctg 23
<210> 30
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> FadD sequencing RP
<400> 30
ccatcgaaaa gttgaatcaa 20