

 (19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2013-0142391 (43) 공개일자 2013년12월30일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>C12N 15/52</i> (2006.01) <i>C12N 1/21</i> (2006.01) <i>C12N 15/70</i> (2006.01) <i>C12P 7/64</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2012-0065577 (22) 출원일자 2012년06월19일 심사청구일자 2012년06월19일	(71) 출원인 인하대학교 산학협력단 인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동) (72) 발명자 윤현식 서울특별시 강남구 압구정동 현대아파트 87동 505호 이진원 서울특별시 송파구 방이동 89올림픽선수기자촌아파트 201동 1601호 (뒷면에 계속) (74) 대리인 김순용

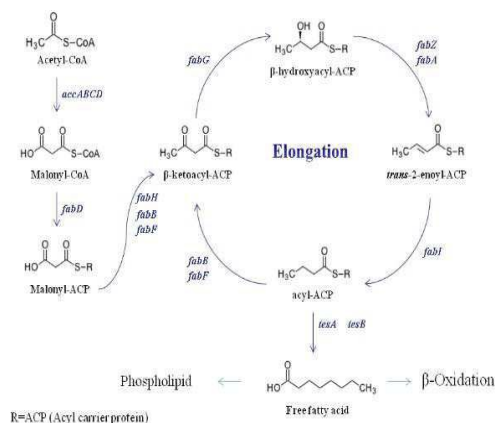
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 불포화 지방산을 생산하는 재조합 대장균, 및 이를 이용한 불포화 지방산의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 불포화 지방산을 생산하는 재조합 대장균, 및 이를 이용한 불포화 지방산의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 불포화 지방산을 생산하는 재조합 대장균은, 4종류의 유전자 *accA*, *accB*, *accC*, *accD*가 하나의 플라스미드에 위치, 3 종류의 유전자 *fabB*, *fabF*, *fabA* 가 하나의 플라스미드에 위치, *tesA*가 하나의 플라스미드에 위치하여 동시에 발현되는 시스템을 구축하는 동시에 숙주 균주인 대장균(*E. coli* BL21(DE3))에 들어가 공동으로 형질전환을 일으킴으로써, 두 유전자를 동시에 발현시키는 효과가 있다. 또한, 상기 재조합 대장균을 이용하여 낮은 온도에서 배양하여 지방산을 제조한 경우, 불포화지방산 박센산(vaccenic acid)의 비율과 양이 크게 늘어나, 불포화 지방산을 효과적으로 생산할 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

도경희

인천광역시 연수구 동춘3동 현대대림2차아파트 20
1동 503호

김세경

인천광역시 남동구 만수2동 신대동아파트 6동 150
5호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0030348

부처명 교육과학기술부

연구사업명 기후변화대응 기술개발사업

연구과제명 바이오매스를 이용한 지방산계열 대체연료 생산 원천기술 개발

기 여 율 1/1

주관기관 인하대학교

연구기간 2011.09.30 ~ 2013.09.29

특허청구의 범위

청구항 1

E. coli K-12 MG1655의 카복실트랜스퍼라제 알파-유닛(CT- α , carboxyltransferase α -unit)의 유전정보를 보유한 뉴클레오티드(*accA*, 서열번호 1), *E. coli* K-12 MG1655의 비오틴 카복실 캐리어 단백질(BCCP, biotin carboxyl carrier protein)의 유전정보를 보유한 뉴클레오티드(*accB*, 서열번호 2), *E. coli* K-12 MG1655의 비오틴 카복실라제(BC, biotin carboxylase)의 유전정보를 보유한 뉴클레오티드(*accC*, 서열번호 3), *E. coli* K-12 MG1655의 카복실트랜스퍼라제 베타-유닛(CT- β carboxyltransferase β -unit)의 유전정보를 보유한 뉴클레오티드(*accD*, 서열번호 4), *E. coli* K-12 MG1655의 베타-케토 아실-아실 운반 단백질 합성효소I(KASI, β -keto acyl-acyl carrier protein synthaseI)의 유전정보를 보유한 뉴클레오티드(*fabB*, 서열번호 5), *E. coli* K-12 MG1655의 베타-케토 아실-아실 운반 단백질 합성효소II(KASII, β -keto acyl-acyl carrier protein synthaseII)의 유전정보를 보유한 뉴클레오티드(*fabF*, 서열번호 6), *E. coli* K-12 MG1655의 베타-하이드록시 데카노일 티오에스터 디하이드라제/이소머라제(β -hydroxy decanoyl thioester dehydrase/isomerase)의 유전정보를 보유한 뉴클레오티드(*fabA*, 서열번호 7). *E. coli* K-12 MG1655의 티오에스터라제I(thioesteraseI)에서 선도 서열을 제거하여 주변세포질(periplasm)이 아닌 세포질에 존재하게 변형시킨 유전정보를 보유한 뉴클레오티드(*tesA*, 서열번호 8)로 이루어진 균으로부터 선택되는 1종 이상의 뉴클레오티드를 포함하는 재조합 플라스미드에 의해 형질전환된, 불포화 지방산을 생산하는 재조합 대장균.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 재조합 플라스미드는 pCOLADuetTM-1::*accA*, *accB*, *accC*, *accD* + pEcoli 6xHN::*fabF*, *fabB*, *fabA* + pCDF-1b::*tesA*인 것을 특징으로 하는 재조합 대장균.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 재조합 대장균은 *E. coli* BL21(DE3)::pCOLADuetTM-1::*accA*, *accB*, *accC*, *accD* + pEcoliNterm 6xHN::*fabF*, *fabB*, *fabA* + pCDF-1b::*tesA*인 것을 특징으로 하는 재조합 대장균(수탁번호 : KCTC 12216BP).

청구항 4

- 1) 제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항의 재조합 대장균을 배양하는 단계,
- 2) 상기 1)단계에서 얻은 배양액을 원심분리하여 균체와 배지를 분리하는 단계,
- 3) 상기 2)단계에서 분리된 균체에 황산과 메탄올의 혼합용액을 첨가하고, 질소를 충전한 다음, 에스테르화 반응을 수행하는 단계,
- 4) 상기 3)단계의 반응액에 헥산과 증류수를 첨가하여 층을 분리하는 단계, 및
- 5) 상기 4)단계에서 분리된 헥산층을 분석하여 지방산의 조성을 분석하는 단계를 포함하는, 불포화 지방산의 제조방법.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 5)단계에서 지방산의 조성 분석은 가스크로마토그래피를 수행하여 이루어지는 것을 특징으로 하는, 불포화 지방산의 제조방법.

청구항 6

제 4항에 있어서, 상기 5)단계에서 지방산은 박센산(vaccenic acid)인 것을 특징으로 하는, 불포화 지방산의 제조방법.

명세서

기술분야

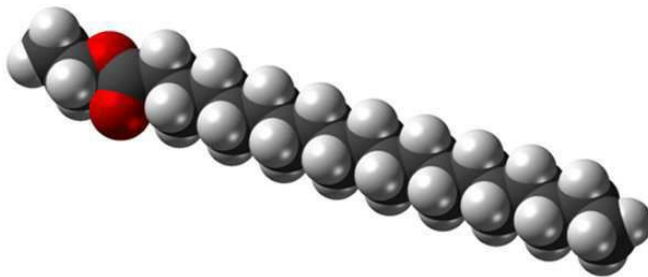
[0001] 본 발명은 불포화 지방산 중 *cis*-박센산(*cis*-vaccenic acid)을 생산하는 제조합 대장균, 및 이를 이용한 불포화 지방산의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 현재 세계 시장의 고성장은 에너지의 사용 증가를 바탕으로 이루어지고 있다. 석유 에너지의 고갈로 인한 유가 상승의 고공행진이 이루어지면서, 이를 대체할 에너지의 개발이 시급한 실정이다. 이를 위해 태양력이나 풍력 같은 자연 에너지 개발에 관심이 모아지고 있지만, 에너지 밀도가 낮고 간헐적으로 밖에 사용할 수 없다는 등의 단점이 있어 보급에 많은 제약이 따르고 있다. 또한, 연료의 대부분을 수입에 의존하고 있는 국내 에너지 시장의 유가는 2011년에 전년대비 36% 상승으로 분석되었으며(한국석유공사 보도자료 참고), 신흥국의 지속적인 수요증대에 따라 고유가 수준을 유지할 전망이라고 분석하였다. 특히, 국제 유가는 서민 생활물가에 바로 영향을 주기 때문에 석유 의존도가 낮은 새로운 대체에너지 생산이 필수적이다.

[0003] 대체에너지로서 가장 각광받는 것이 바이오연료(biofuel)인데, 이는 살아있는 바이오매스(biomass)로부터 유기체뿐만 아니라 대사활동에 의한 부산물을 포함하는 생산물을 이용한 신재생에너지의 종류이다. 바이오연료의 대표적인 예로는 현재 수송연료로 사용이 되고 있는 바이오에탄올(bioethanol), 바이오디젤(biodiesel), 메탄올(methanol), 바이오가스(biogas) 및 고형연료 등이 있으며, 이들 모두 전력생산이나 수송연료로서의 가능성이 있다.

[0004] 바이오디젤은 하기와 같은 구조로 표시되는 화학적으로 긴 지방산 고리를 가진 단일 알킬에스터(alkyl ester) 혼합물이다. 바이오디젤은 경유와 매우 비슷한 물리적 특성 때문에, 현재 사용되는 내연기관의 교체없이 사용할 수 있는 장점이 있다. 또한 기존시설을 통해 운반, 판매가 가능하여 운송연료의 대표적인 대체에너지로 꼽히고 있다. 바이오디젤의 품질은 원료에 따라 결정이 되는데, 포화지방산이 많이 함유된 경우에는 상대적인 산화안정성은 우수하지만 겨울철에 저온유동성이 나쁜 단점이 있다. 반면 불포화지방산이 많은 경우에는 저온유동성이 좋지만 이중결합의 수가 많을 경우 산화안정성이 떨어지는 단점이 있다. 따라서, 가장 안정적인 원료는 올레인산(oleic acid, octadecenoic acid, C18 : 1 Δ^9)의 함량이 60%가 넘는 바이오디젤로 알려져 있다.



[0005]

[0006] 식물성 바이오디젤의 지방산 조성비율 및 식물유로부터 제조한 바이오디젤의 물리적 특성에 대해 각각 하기 표 1 및 표 2에 나타내었다.

표 1

[0007]

바이오디젤 조성						
원료	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
팜유	42.6	0.3	4.4	40.5	10.1	0.2
대두유	13.9	0.3	2.1	23.2	56.2	4.3
유채씨유	3.5	0	0.9	64.1	22.3	8.2

표 2

	동점도 (40, mm ² /s)	세탄가	저위발열량	구름점 (℃)	저온필터 막힘점(℃)	인화점 (℃)	산화안정도 (h), 110℃
팜유	5.7	62	33.5	13	12	164	4.0
대두유	4.0	45	33.5	1	-4	178	2.1
유채씨유	4.4	54.4	-	-3.3	-13	-	7.6

한편, 대장균(*Escherichia coli*)은 포유류들과는 다른 지방산 합성 타입(Type 2)을 이용하기 때문에 이를 통한 연구가 많이 진행되어 왔다. 지방산 합성 타입 2시스템은 개시단계와 아실기의 신장단계에서 기본적인 효소들을 가지고 있으며, 이러한 효소의 지방산 합성 단계는 도 1에 나타내었다. 대장균에 필요한 지방산은 이러한 반복적인 합성으로 생산되며, 주로 생산되는 포화지방산으로는 탄소수 16개인 팔미트 산(palmitic acid, hexadecanoic acid)과 불포화지방산으로는 탄소수 18개에 이중결합이 하나 존재하는 박센산(vaccenic acid, *cis*-11-octadecanoic acid)과 탄소수 16개에 이중결합이 하나 존재하는 팔미톨레익산(palmitoleic acid, 9-*cis*-hexadecenoic acid)이 있다.

대장균에 존재하는 fab(fatty acid biosynthesis) 유전자들은 지방산 합성 단계에 관여하는 효소 생산 유전자들이다. 지방산은 아세틸-CoA를 선구물질로 합성이 시작되는데 *accA*, *accB*, *accC*, *accD*(acetyl-CoA carboxylase)가 아세틸-CoA를 말로닐-CoA로 반응시키는 역할을 한다. 이 반응은 *accA*, *accB*, *accC*, *accD*가 모여 반응이 되는데, 지방산 합성이 느려 율속제한(rate-limiting)이 일어난다. 말로닐-CoA는 *fabD*를 거쳐 말로닐-ACP(acyl-carrier protein)가 되어 탄소수가 길어지는 신장단계에 쓰이게 된다. 특히, *fabB*, *fabF*, *fabA* 유전자는 신장단계에 관여하는데 β -Hydroxydecanoyl ACP dehydrase/isomerase의 정보를 가지고 있는 유전자 *fabA*와 KASI(β -ketoacyl-ACP(acyl-carrier-protein) synthaseI)의 정보를 가지고 있는 유전자 *fabB*는 불포화지방산 합성에 필수적인 유전자이다. *fabB*와 함께 KASII(β -ketoacyl-ACP synthaseII)의 정보를 가지고 있는 유전자 *fabF*는 지방산 신장단계에 위치하며 지방산-ACP에 말로닐-ACP를 결합시킴으로써 지방산의 탄소수를 2개씩 늘려 지방산의 길이를 신장시키는 역할을 한다. 이 세 가지 효소는 대장균의 세포막의 주요 성분인 팔미트산, 팔미톨레익산, 박센산을 생합성하는데 직접적인 경로에 관여하는 유전자이며 특히, 박센산 생성에 핵심적인 역할을 하는 효소로서 KASII의 경우 낮은 온도에서 발현이 잘 된다는 특징이 있다. 또한, *tesA* 유전자는 티오에스테라아제(thioesterase I) 효소를 만들어 지방 아실-ACP를 자유지방산(free fatty acid)으로 전환하는 역할을 한다. 하지만 *tesA*의 경우 대장균의 주변세포질(periplasm)에 존재하여 아실-ACP가 자유지방산(free fatty acid)으로 전환하는 속도에 한계가 생긴다. 이에 *tesA*의 선도서열을 제거(이를 *tesA* 라고 표기)하여 세포질에 존재함으로써 전환되는 속도를 증가시켰으며, 대장균의 지방산 생합성 관여 효소 및 유전자 정보는 표 3에 나타내었다.

표 3

유전자	발현 단백질	돌연변이 경우 나타나는 표현형 (phenotype) 변화
<i>aas</i>	Acyl-ACP synthetase	lysophosphatidyl ethanolamine 축적
<i>accA</i>	Acetyl-CoA carboxylase	Carboxyltransferase α subunit
<i>accB</i>	Acetyl-CoA carboxylase	BCCP subunit
<i>accC</i>	Acetyl-CoA carboxylase	Biotin carboxylase subunit
<i>accD</i>	Acetyl-CoA carboxylase	Carboxyltransferase β subunit
<i>acpP</i>	ACP	ACP structural gene
<i>acpS</i>	ACP synthetase	apo-ACP 축적
<i>cfa</i>	Cyclopropane fatty acid synthase	Cells lack cyclopropane fatty acids
<i>fabA</i>	β -Hydroxydecanoyl ACP dehydrase	불포화지방산 자가영양 (unsaturated fatty acid auxotroph)
<i>fabAup</i>	-	포화지방산(saturated fatty acid) 과생 산
<i>fabB</i>	β -Ketoacyl-ACP synthaseI	불포화지방산 자가영양 (unsaturated fatty acid auxotroph)
<i>fabD</i>	Malonyl-CoA:ACP transacylase	온도에 따라 포화지방산, 불포화지방산의 자가영양(auxotroph) 필요
<i>fabE</i>	Acetyl-CoA carboxylase	-
<i>fabF</i>	β -Ketoacyl-ACP synthaseII	온도에따라 조절
<i>fabG</i>	β -Ketoacyl-ACP synthase	-
<i>fabH</i>	β -Ketoacyl-ACP synthaseIII	-
<i>fadR</i>	Transcriptional regulator of <i>fabA</i>	-
<i>fatA</i>		trans-불포화지방산의 이용
<i>lpxA</i>	UDP-Glc-NAc acyltransferase	지질 A(lipid A) 축적
<i>orf-17</i>	Putative dehydrase	-
<i>plsB</i>	<i>sn</i> -Glycerol-3-phosphate acyltransferase	Glycerol-3-phosphate 자가영양
<i>plsC</i>	1-Acylglycerol phosphatase acyltransferase	-
<i>plsX</i>	Unkown	PlsB· 표현현에 필요
<i>tesA</i>	ThioesteraseI	효소활성 결핍
<i>tesB</i>	ThioesteraseII	효소활성 결핍

[0011]

[0012]

상기와 같이, 화석연료의 대체 에너지로서 바이오디젤로 변환이 가능한 지방산에 대한 관심이 점점 증대되고 있으며, 이로 인해 지방산을 생합성하는 대장균에 대한 관심도 증대되고 있다. 현재의 바이오디젤은 식물성 유지를 이용하여 만들어지고 있다. 불포화지방산 함유량이 많은 바이오디젤의 경우, 낮은 온도에서도 잘 얼지 않는다는 장점이 있다. 예로 유채씨유를 이용한 바이오디젤의 경우, 64%가 넘는 올레익산 함유를 가지고 있어 다른 바이오디젤보다 더 낮은 온도에서 언다. 하지만, 식물성 유지의 경우 식량과 관계하여 곡물가 상승과 농경지 부족, 토지가격 상승 등의 문제가 있어 미생물을 이용한 에너지 생성이 주목받고 있다. 미생물의 경우 세포막을 구성하는 지방 형태로 지방산을 생합성 하고 있으며, 이에 따라 유전자 조작이 가능한 대장균에 대한 관심도 증대하여, 이에 관한 연구가 진행되고 있다.

[0013]

따라서, 신재생에너지 개발의 일환으로 바이오디젤로 전환하였을 때 물리적 특성이 유리한 불포화 지방산의 조성을 높일 수 있는 균주의 개발의 필요성이 절실히 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014]

본 발명자들은 불포화 지방산의 조성을 높일 수 있는 균주에 대하여 연구하던 중, 대장균의 지방산 합성 개시단계에 위치하여 아세틸-CoA를 말로닐-CoA로 반응시키는 효소(ACC)의 정보를 가진 *accA*, *accB*, *accC*, *accD*, 지방

산 신장단계에서 탄소 사슬의 신장과 지방산 생성 마지막 단계에 작용하는 효소(KASI, KASII)의 정보를 가진 두 개의 유전자 *fabB*, *fabF*, 그리고 KASI와 함께 불포화지방산 생성 단계에 관여하는 효소(β -Hydroxydecanoyl ACP dehydrase/isomerase) 정보를 가진 유전자 *fabA* 및 티오에스터라제I(thioesteraseI) 정보를 가지며 선도서열을 제거하여 주변세포질(periplasm)이 아닌 세포질에 존재하게 변형시킨 유전자 *tesA*의 염기서열을 포함하는 재조합 플라스미드를 제조하고, 이에 의해 형질전환된 재조합 대장균을 제조하였다. 상기 재조합 대장균을 낮은 온도에서 배양하고 이로부터 지방산을 추출하여 불포화지방산 중 박센산(*cis*-vaccenic acid)의 비율과 양이 크게 늘어남을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

[0015] 따라서, 본 발명은 불포화 지방산 중 *cis*-박센산(*cis*-vaccenic acid)을 생산하는 재조합 대장균 및 이를 이용한 불포화 지방산의 제조방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0016] 본 발명은 *E.coli* K-12 MG1655의 카복실 트랜스퍼라제 알파-유닛(CT- α , carboxyl transferase α -unit)의 유전정보를 보유한 뉴클레오티드(*accA*, 서열번호 1), *E.coli* K-12 MG1655의 비오틴 카복실 캐리어 단백질(BCCP, biotin carboxyl carrier protein)의 유전정보를 보유한 뉴클레오티드(*accB*, 서열번호 2), *E.coli* K-12 MG1655의 비오틴 카복실라제(BC, biotin carboxylase)의 유전정보를 보유한 뉴클레오티드(*accC*, 서열번호 3), *E.coli* K-12 MG1655의 카복실 트랜스퍼라제 베타-유닛(CT- β carboxyl transferase β -unit)의 유전정보를 보유한 뉴클레오티드(*accD*, 서열번호 4), *E.coli* K-12 MG1655의 베타-케토 아실-아실 운반 단백질 합성효소I(KASI, β -keto acyl-acyl carrier protein synthaseI)의 유전정보를 보유한 뉴클레오티드(*fabB*, 서열번호 5), *E.coli* K-12 MG1655의 베타-케토 아실-아실 운반 단백질 합성효소II(KASII, β -keto acyl-acyl carrier protein synthaseII)의 유전정보를 보유한 뉴클레오티드(*fabF*, 서열번호 6), *E.coli* K-12 MG1655의 베타-하이드록시 데카노일 티오에스터 디하이드라제/아이소머라제(β -hydroxy decanoyl thioester dehydrase/isomerase)의 유전정보를 보유한 뉴클레오티드(*fabA*, 서열번호 7) 및 *E.coli* K-12 MG1655의 티오에스터라제I (thioesteraseI)에서 선도서열을 제거하여 주변세포질(periplasm)이 아닌 세포질에 존재하게 변형시킨 유전정보를 보유한 뉴클레오티드(*tesA*, 서열번호 8)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 뉴클레오티드를 포함하는 재조합 플라스미드에 의해 형질전환된, 불포화지방산을 생산하는 재조합 대장균을 제공한다.

[0017] 또한, 본 발명은

[0018] 1) 상기 재조합 대장균을 배양하는 단계,

[0019] 2) 상기 1)단계에서 얻은 배양액을 원심분리하여 균체와 배지를 분리하는 단계,

[0020] 3) 상기 2)단계에서 분리된 균체에 황산과 메탄올의 혼합용액을 첨가하고, 질소를 충전한 다음, 에스테르화 반응을 수행하는 단계,

[0021] 4) 상기 3)단계의 반응액에 헥산과 증류수를 첨가하여 층을 분리하는 단계, 및

[0022] 5) 상기 4)단계에서 분리된 헥산층을 분석하여 지방산의 조성을 분석하는 단계를 포함하는, 불포화지방산의 제조방법을 제공한다.

[0023] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.

[0024] 본 발명에 따른 지방산을 생산하는 재조합 대장균은, *E.coli* K-12 MG1655의 카복실 트랜스퍼라제 알파-유닛(CT- α , carboxyl transferase α -unit)의 유전정보를 보유한 뉴클레오티드(*accA*, 서열번호 1), *E.coli* K-12 MG1655의 비오틴 카복실 캐리어 단백질(BCCP, biotin carboxyl carrier protein)의 유전정보를 보유한 뉴클레오티드(*accB*, 서열번호 2), *E.coli* K-12 MG1655의 비오틴 카복실라제(BC, biotin carboxylase)의 유전정보를 보유한 뉴클레오티드(*accC*, 서열번호 3), *E.coli* K-12 MG1655의 카복실 트랜스퍼라제 베타-유닛(CT- β carboxyl transferase β -unit)의 유전정보를 보유한 뉴클레오티드(*accD*, 서열번호 4), *E.coli* K-12 MG1655의 베타-케토 아실-아실 운반 단백질 합성효소I(KASI, β -keto acyl-acyl carrier protein synthaseI)의 유전정보를 보유한 뉴클레오티드(*fabB*, 서열번호 5), *E.coli* K-12 MG1655의 베타-케토 아실-아실 운반 단백질 합성효소II(KASII, β -keto acyl-acyl carrier protein synthaseII)의 유전정보를 보유한 뉴클레오티드(*fabF*, 서열번호 6), *E.coli* K-12 MG1655의 베타-하이드록시 데카노일 티오에스터 디하이드라제/이소머라제(β -hydroxy decanoyl thioester dehydrase/isomerase)의 유전정보를 보유한 뉴클레오티드(*fabA*, 서열번호 7), *E.coli* K-12

MG1655의 티오에스터라제I(thioesteraseI)에서 선도서열을 제거하여 주변세포질(periplasm)이 아닌 세포질에 존재하게 변형시킨 유전정보를 보유한 뉴클레오티드(`tesA, 서열번호 8)로 이루어진 균으로부터 선택되는 1종 이상의 뉴클레오티드를 포함하는 재조합 플라스미드에 의해 형질전환된 것을 특징으로 한다.

[0025] 본 발명에 사용된 유전자 정보는 대장균(*E.coli* K-12 MG1655)의 유전 정보를 바탕으로 하여, 지방산 합성 개시 단계에서 율속제한속도에 해당하는 반응에 작용하는 효소(ACC)의 정보를 가진 네 개의 유전자 *accA*, *accB*, *accC*, *accD*와 신장단계에 위치하며 특히, 박센산 생성에 핵심적인 역할을 하는 효소(KASI, KASII)의 정보를 가진 두 개의 유전자 *fabB*와 *fabF* 및 KASI와 함께 불포화지방산 합성에 핵심적인 역할을 하는 효소(β -hydroxydecanoyl thioester dehydrase/isomerase)의 정보를 가진 유전자 *fabA*와 지방 아실-ACP(fatty acyl-ACP)를 자유 지방산(free fatty acid)으로 전환하는 효소이며 선도서열이 제거되어 세포질에 머무를 수 있는 기능과 함께 티오에스터라제I(thioesteraseI) 정보를 가진 유전자 `tesA의 염기서열을 이용한다. 구체적으로는, 중합효소연쇄반응(PCR)에 의해 대장균의 주형 유전자를 얻기 위해, 대장균(*E.coli* K-12 MG1655)을 배양하고 원심분리하여 DNA를 분리한다. 그 다음, 분리된 DNA를 주형으로 하여 각각의 유전자(*accA*, *accB*, *accC*, *accD*, *fabB*, *fabF*, *fabA* 및 *tesA*)의 프라이머를 이용하여 중합효소연쇄반응을 수행하여 목적 유전자를 확보한다. 특히, *accB*와 *accC*는 *E.coli* K-12 MG1655 상에서 연속으로 함께 있는 유전자이므로 동시에 뉴클레오티드를 얻었고, 도 2에 유전자 서열 모습을 나타내었다. 확보한 유전자 뉴클레오티드(*accA*, *accB*, *accC*, *accD*, *fabB*, *fabF*, *fabA* 및 `tesA)와 단백질 발현을 위한 플라스미드(pCOLADuetTM-1, pEcoliNterm 6xHN, pCDF-1b)를 제한효소 반응과 라이게이션(ligation) 반응을 수행하여 재조합 플라스미드를 제조한다[pCOLADuetTM-1::*accA*, *accB*, *accC*, *accD*, pEcoliNterm 6xHN:: *fabF*, *fabB*, *fabA* , pCDF-1b::*tesA*]. 하지만 *tesA*의 경우 선도서열을 제거하기 위해서 75번째 염기서열이 C에서 T로 바꾼 프라이머를 제작하였고, 위치 선택적 돌연변이 방법을 이용한 PCR 방법을 통해 증폭시켜 재조합 플라스미드를 제조하였다[pCDF-1b::`tesA].

[0026] 단백질 발현을 위한 플라스미드의 복제분기점의 경우, pCOLADuetTM-1은 ColA, pEcoliNterm 6xHN은 pBR322, pCDF-1b는 CDF를 포함하며 pCOLADuetTM-1의 경우 카나마이신 내성 유전자, pEcoliNterm 6xHN의 경우 암피실린 내성 유전자, pCDF-1b는 스트렙토마이신 내성 유전자를 가지고, 염기서열 분석을 위한 T7 프로모터를 보유하며, 유전자 발현 조절을 목적으로 하는 *lac* operator를 보유한다.

[0027] 상기 제조된 재조합 플라스미드를 이용하여 열충격 형질전환방법을 통해 재조합 대장균을 제조한다.[*E.coli* BL21(DE3)::pCOLADuetTM-1::*accA*, *accB*, *accC*, *accD* + pEcoliNterm 6xHN:: *fabF*, *fabB*, *fabA* + pCDF-1b::`tesA]. 상기 제조된 재조합 대장균은 항생제가 포함된 고체 LB 배지에서 원형 콜로니 형태로 자라는 것을 확인하였으며, 이 콜로니를 카나마이신, 암피실린 및 스트렙토마이신이 포함된 액체 LB 배지에서 배양하고 플라스미드를 추출한 후 제한효소로 처리한 플라스미드의 유전자 (*accA*, *accB*, *accC*, *accD*, *fabB*, *fabF*, *fabA* 및 `tesA)와 *E.coli* K-12 MG1655의 유전자 염기서열을 비교한 결과 일치함을 확인하였다. 상기 제조된 재조합 균주(*E.coli* BL21(DE3)::pCOLADuetTM-1::*accA*, *accB*, *accC*, *accD* + pEcoliNterm 6xHN:: *fabF*, *fabB*, *fabA* + pCDF-1b::`tesA)를 2012년 05월 18일자로 한국생명공학연구원 생물자원센터 유전자은행(KCTC)에 기탁하였으며, KCTC 12216BP의 수탁번호를 부여받았다.

[0028] 상기 제조된 재조합 대장균(*E.coli* BL21(DE3)::pCOLADuetTM-1::*accA*, *accB*, *accC*, *accD* + pEcoliNterm 6xHN:: *fabF*, *fabB*, *fabA* + pCDF-1b::`tesA)을 37℃에서 중간 지수기까지 자라게 하여 IPTG로 유도시킨 후에 낮은 온도인 17℃에 옮겨 배양하고, 원심분리하여 균체와 배지를 분리한 후, 분리된 균체에 황산과 메탄올의 혼합용액을 첨가하고 질소를 충전한 다음, 에스테르화 반응을 수행하고, 반응액에 헥산과 증류수를 첨가하여 층을 분리하여 헥산층을 가스크로마토그래피를 수행하여 지방산의 조성을 확인한 결과, 불포화지방산인 박센산(vaccenic acid)의 비율과 양이 크게 늘어남을 확인하였다.

[0029] *accA*, *accB*, *accC*, *accD*의 유전자가 발현되어 박센산 생성에 참여하는 단계는 도 3에 나타내었으며, *fabB*, *fabF*, *fabA*의 유전자가 발현되어 박센산 생성에 참여하는 단계는 도 4에 나타내었다.

[0030] 상기한 바와 같이, 본 발명에 따른 재조합 대장균은 불포화 지방산을 효과적으로 생산함으로써, 바이오연료로 유용하게 사용될 수 있다.

발명의 효과

[0031] 본 발명에 따른 불포화지방산을 생산하는 재조합 대장균은, 4종류의 유전자 *accA*, *accB*, *accC* 및 *accD*가 함께 발현되는 플라스미드, 3종류의 유전자 *fabB*, *fabF* 및 *fabA*가 함께 발현되는 플라스미드, *tesA*가 발현되는 플라스미드가 모두 동시에 발현되는 시스템을 구축하는 동시에, 숙주 균주인 대장균(*E. coli* BL21(DE3))에 들어가 공동으로 형질전환을 일으킴으로써, 여덟 개의 유전자를 동시에 발현시키는 효과가 있다. 아울러 상기 재조합 대장균을 이용하여 불포화지방산을 제조한 경우, 불포화지방산인 박센산(vaccenic acid)의 비율과 양이 크게 늘어나, 불포화 지방산을 효과적으로 생산할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0032] 도 1은 대장균(*E. coli*)의 지방산 생합성 과정을 나타낸 도이다.

도 2는 *E. coli* MG1655의 유전자 서열에서 *accB*, *accC*에 해당하는 뉴클레오티드 서열이 연속으로 있음을 나타낸 도이다.

도 3은 *accA*, *accB*, *accC*, *accD*의 유전자가 발현되어 아세틸-CoA가 말로닐-CoA로 반응에 참여하는 과정을 나타낸 도이다.

도 4는 *fabB*, *fabF*, *fabA*의 유전자가 발현되어 박센산 생성에 참여하는 단계를 나타낸 도이다.

도 5는 대장균 내 단백질 발현을 위한 플라스미드 pCOLADuet™-1의 구조 및 클로닝 사이트를 나타낸 도이다.

도 6은 대장균 내 단백질 발현을 위한 플라스미드 pEcoliNterm 6xHN의 구조 및 클로닝 사이트를 나타낸 도이다.

도 7은 대장균 내 단백질 발현을 위한 플라스미드 pCDF-1b의 구조 및 클로닝 사이트를 나타낸 도이다.

도 8은 대장균 내 단백질 발현을 위한 플라스미드 pCOLADuet™-1와 *accA*, *accB*, *accC*, *accD* 유전자 정보를 포함한 뉴클레오티드를 결합시킨 재조합 플라스미드(pCOLADuet™-1:: *accA*, *accB*, *accC*, *accD*)의 구조 및 크기 변화를 나타낸 도이다.

도 9는 대장균 내 단백질 발현을 위한 플라스미드 pEcoliNterm 6xHN와 *fabB*, *fabF*, *fabA* 유전자 정보를 포함한 뉴클레오티드를 결합시킨 재조합 플라스미드(pEcoli N-term 6xHN:: *fabB*, *fabF*, *fabA*)의 구조 및 크기 변화를 나타낸 도이다.

도 10은 대장균 내 단백질 발현을 위한 플라스미드 pCDF-1b와 *tesA* 유전자 정보를 포함한 뉴클레오티드를 결합시킨 재조합 플라스미드(pCDF-1b:: *tesA*)의 구조 및 크기 변화를 나타낸 도이다.

도 11은 재조합 플라스미드 pEcoliNterm 6xHN:: *fabB*, *fabF*, *fabA*의 *fabB* 유전자의 염기서열과 *E. coli* K-12 MG1655의 *fabB* 유전자의 염기서열 분석결과를 나타낸 도이다.

도 12는 *fabF* 유전자의 염기서열과 *E. coli* K-12 MG1655의 *fabF* 유전자의 염기서열 분석결과를 나타낸 도이다.

도 13은 *fabA* 유전자의 염기서열과 *E. coli* K-12 MG1655의 *fabA* 유전자의 염기서열 분석결과를 나타낸 도이다.

도 14는 재조합 플라스미드 pCOLADuet:: *accA*, *accB*, *accC*, *accD*의 *accA* 유전자의 염기서열과 *E. coli* K-12 MG1655의 *accA* 유전자의 염기서열 분석결과를 나타낸 도이다.

도 15는 *accB*와 *accC*를 동시에 중합한 유전자의 염기서열과 *E. coli* K-12 MG1655의 *accB*와 *accC* 유전자의 염기서열 분석결과를 나타낸 도이다.

도 16은 *accD* 유전자의 염기서열과 *E. coli* K-12 MG1655의 *accD* 유전자의 염기서열 분석결과를 나타낸 도이다.

도 17은 대장균 내 단백질 발현을 위한 플라스미드 pCDF-1b에 결합시킨 *tesA* 유전자(75번째 염기를 C에서 T로 바꾼 *tesA*) 염기서열 분석 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0033] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽

게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

실시예 1 : 목적 유전자의 정보를 보유한 뉴클레오티드를 포함하는 재조합 플라스미드의 제조

1. PCR을 이용한 유전자 증폭

본 발명에 사용된 유전자 정보는 대장균(*E. coli* K-12 MG1655)의 유전 정보를 바탕으로 하여, 지방산 합성 개시 단계에 위치하여 아세틸-CoA를 말로닐-CoA로 반응시키는 효소(ACC)의 정보를 가진 *accA*(서열번호 1), *accB*(서열번호 2), *accC*(서열번호 3), *accD*(서열번호 4) 및 지방산 신장단계에서 탄소 사슬의 신장과 지방산 생성 마지막 단계에 작용하는 효소(KASI, KASII)의 정보를 가진 두 개의 유전자 *fabB*(서열번호 5), *fabF*(서열번호 6)와 KASI와 함께 불포화지방산 생성 단계에 관여하는 효소(β -Hydroxydecanoyl ACP dehydrase/isomerase) 정보를 가진 유전자 *fabA*(서열번호 7) 및 지방 아실-ACP(fatty acyl-ACP)를 자유 지방산(free fatty acid)으로 전환하는 효소인 티오에스테라제I(thioesteraseI) 정보를 가지며 선포서열이 제거된 정보를 가진 유전자 *tesA*(서열번호 8)의 염기서열을 이용하였다. 염기서열 정보는 KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, www.genome.jp/kegg/)에서 참고하였으며, 제작한 프라이머를 이용하여 중합효소연쇄반응(PCR, polymerase chain reaction)을 수행하여 목적 유전자를 확보하였다. 목적 유전자의 증폭반응을 위한 프라이머 제작 및 제한효소는 표 4에 나타내었다.

표 4

목적 유전자	발현 효소	플라스미드	프라이머	제한효소
<i>accA</i>	carboxyltransferase a subunit	pCOLADuet TM -1	5'-CGG ATC CGA TGA ATT TCC TTG ATT TTG AAC AGC-3' (서열목록 9)	BamH I , Sal I
			5'-GCG TCG ACG TCT TAC GCG TAA CCG TAG-3'(서열목록 10)	
<i>accB, accC</i>	BCCP unit, biotin carboxylase subunit	pCOLADuet TM -1	5'-GAA GAT CTT CGG ATG GAT ATT CGT AAG ATT AAA AAA CTG ATC G-3'(서열목록 11)	Bgl II , Pac I
			5'-CCT TAA TTA AGG TTA TTT TTC CTG AAG ACC GAG TTT TTT CTC-3'(서열목록 12)	
<i>accD</i>	carboxyltransferase β -unit	pCOLADuet TM -1	5'-GCG TCG ACG TCA AGG AGA TAT ACA TGA GCT GGA TTG AAC-3'(서열목록 13)	Sal I , Not I
			5'-ATA AGA ATG CGG CCG CTC AGG CCT CAG GTT C-3' (서열목록 14)	
<i>fabB</i>	KASI (β -keto acyl-acyl carrier protein synthaseI)	pEcoliNterm-6xHN	5'-GGA AGA TCT GAA GGA GAT ATA CCA TGA AAC GTG CAG TGA TTA CTG GCC-3'(서열목록 15)	Bgl II , Not I
			5'-ATA AGA ATG CGG CCG CTT AAT CTT TCA GCT TGC GCA TTA CCA-3'(서열목록 16)	
<i>fabF</i>	KASII (β -keto acyl-acyl carrier protein synthaseII)	pEcoliNterm-6xHN	5'-AAA ACT GCA GGT GTG TCT AAG CGT CGT GTA GTT GTG A-3'(서열목록 17)	Pst I , Sal I
			5'-ACG CGT CGA CTT AGA TCT TTT TAA AGA TCA AAG AAC C-3'(서열목록 18)	
<i>fabA</i>	β -Hydroxydecanoyl ACP dehydrase/isomerase	pEcoliNterm-6xHN	5'-CCT TAA TTA AGG AAG GAG GGA TGG TAG ATA AAC GCG AAT CC-3'(서열목록 19)	Pac I , Xba I
			5'-GCT CTA GAG CTC AGA AGG CAG ACG TAT CCT G-3' (서열목록 20)	

<i>tesA</i>	thioesterase A	pCDF-1b	5'-CGG GAT CCC ATG ATG AAC TTC AAC AAT GTT TTC CG-3' (서열목록 21)	BamHI, Pst I
			5'-GGA AGA TCT GAA GGA GAT ATA CCA TGA AAC GTG CAG TGA TTA CTG GCC-3'(서열목록 22)	
<i>`tesA</i>	modified thioesterase A	pCDF-1b	5'-GTT AAC CTT CCG TGC CGC TGC AGC GGA CAC GTT ATT G-3'(서열목록 23)	
			5'-CAA TAA CGT GTC CGC TGC AGC GGC ACG GAA GGT TAA C-3'(서열목록 24)	

[0038] 중합효소연쇄반응을 위한 대장균의 주형 유전자는 하기와 같은 방법으로 획득하였다. 먼저, *E.coli* K12 MG1655를 배양한 후, 대장균 배양액을 원심분리하고 상등액을 취하였다. 상등액에 5ml의 리소자임 용액을 첨가하여 혼합한 후, 투명한 점성이 나타날 때까지 섞어주었다. 점성이 나타나면 2ml의 10% SDS(sodium dodecyl sulfate) 용액을 첨가하고 30분 동안 반응하였다. 혼합물을 0.7ml씩 마이크로튜브에 분주하고, PCI용액(페놀, 클로로포름, 이소아밀 알콜)을 넣어 층 분리가 일어나지 않을 때까지 혼합하였다. 이 후 원심분리하고 상등액을 모아 같은 방법으로 원심분리 하였다. 모아진 상등액 부피의 1/10 만큼 pH 6으로 적정한 3M 아세테이트와 두 배의 에탄올을 첨가하여 DNA를 분리하였다. 분리한 DNA를 주형으로 하여, 각각의 유전자들(*accA*, *accB*, *accC*, *accD*, *fabB*, *fabF*, *fabA*, *tesA*)의 프라이머와 함께 중합효소연쇄반응에 이용하여 유전자를 증폭하였다. 중합효소연쇄반응의 조건은 통상적인 조건으로 변성온도(denaturing temperature) 94℃, 결합온도(annealing temperature) 65℃, 신장온도(extension temperature) 72℃에서 진행되었으며, 총 30회 반응을 수행하였다. 반응에 사용한 중합효소(polymerase)는 NEB(New England Biolabs Inc.)사의 제품을 사용하였다. 증폭된 유전자 물질은 정제과정을 거치고, 0.7% 아가로오스 겔에서 확인하였다.

[0039] 2. 목적 유전자의 정보를 보유한 뉴클레오티드를 포함하는 재조합 플라스미드의 제조

[0040] 확보한 유전자 뉴클레오티드와 단백질 발현 벡터를 말단부위를 제외한 다른 부위를 절단하지 않는 공통된 제한 효소를 사용하여 절단하고, 전기영동으로 확인하였다. 확인된 아가로오스 겔의 밴드(band)를 절단하여 50℃에서 녹인 후, 정제 과정을 거쳐 라이게이션(ligation)을 4℃에서 수행하여 선형의 pCOLADuetTM-1의 MCS1에 결합시킨 *accA*, *accD* 및 MCS2에, *accB*와 *accC*를 결합시킨 원형 플라스미드 (pCOLADuetTM-1::*accA*, *accB*, *accC*, *accD*), pEcoliNterm 6xHN에 *fabF*, *fabB*, *fabA*를 순서대로 결합시킨 원형 플라스미드(pEcoliNterm 6xHN::*fabF*, *fabB*, *fabA*), 선형의 pCDF-1b에 *tesA*를 결합시킨 1종류의 원형 플라스미드(pCDF-1b::*tesA*)를 제조하였다. *tesA*의 경우 서열의 75번째 염기인 C를 T로 바꾸기 위해서 서열을 바꾼 프라이머를 다시 제조하였고, 재조합된 플라스미드(pCDF-1b::*tesA*)를 가지고 PCR을 통해 염기가 바뀐 *`tesA*를 포함하는 플라스미드를 제조하였다. 이 과정에서 중합효소는 Stratagene 제품인 pfu Ultra HF DNA polymerase를 사용하였고, pCDF-1b::*tesA*는 Dpn로 제거하여 특정위치 돌연변이(site-directed mutation) 된 pCDF-1b::*`tesA*를 선별하였다.

[0041] 대장균 내 단백질 발현을 위한 플라스미드 pCOLADuetTM-1, pEcoliNterm 6xHN와 pCDF-1b의 구조 및 클로닝 사이트는 각각 도 5, 도 6 및 도 7에 나타내었으며, 플라스미드 pCOLADuetTM-1와 *accA*, *accB*, *accC*, *accD*의 유전자 정보를 포함한 뉴클레오티드를 결합시킨 재조합 플라스미드의 구조 및 크기변화는 도 8에 나타내었고, pEcoliNterm 6xHN와 *fabB*, *fabF*, *fabA*의 유전자 정보를 포함한 뉴클레오티드를 결합시킨 재조합 플라스미드의 구조 및 크기 변화는 도 9에 나타내었으며, 플라스미드 pCDF-1b와 *`tesA*(75번째 염기가 C에서 T로 바뀐 *tesA* 유전자) 유전자 정보를 포함한 뉴클레오티드를 결합시킨 재조합 플라스미드의 구조 및 크기 변화는 도 10에 나타내었다.

[0042] 실시예 2 : 재조합 플라스미드에 의해 형질전환된 재조합 대장균의 제조

[0043] 1. 재조합 대장균의 제조(*E.coli* BL21::pEcoliN::*fabF*, *fabB*, *fabA*)

[0044] 재조합 대장균을 제조하기 위해, 목적 유전자의 운반을 목적으로 하는 플라스미드 pEcoliNterm 6xHN:: *fabF*,

fabB, *fabA*를 숙주세포에 넣기 전, 벡터의 안정성과 숙주 균주로의 형질전환시 효율 향상을 위해 *E.coli* XL1-Blue를 이용하여 컴피턴트 세포(competent cell)를 제조하여 일차 형질전환을 시도하였다.

[0045] 컴피턴트 세포는 하기와 같은 과정으로 제조하였다. 37℃에서 배양한 *E.coli* XL1-Blue를 계대배양하여, 생장 곡선의 지수기에 접어들었을 때 회수하여, 0℃에서 30분 동안 보관하였다. 배양액을 5000rpm에서 원심분리한 후 상등액을 제거하고, 세포벽을 플라스미드 이동이 용이하게 처리하기 위하여 $MgCl_2$ 용액을 넣어 30분 동안 0℃에서 보관하였다. 상기 용액을 다시 원심분리 하여 상등액을 제거하고 $CaCl_2$ 용액을 넣어 60분간 0℃에서 이차 처리하였다. 여기에 외부 유전자를 포함한 재조합 플라스미드(pEcoliNterm 6xHN:: *fabF*, *fabB*, *fabA*)를 넣어 0℃에서 30분 동안 반응시키고, 42℃의 온수조에서 30초 동안 열처리하고, 5분 동안 0℃의 얼음에 순차적으로 넣는 열충격 형질전환방법(heat-shock method)을 실시하였다. 상기 열충격 형질전환방법을 실시한 샘플은 37℃에서 1시간 동안 배양하여 형질전환 과정을 거친 세포들의 정상 생장을 도왔다. 이 세포들을 항생제인 암피실린이 포함된 고체 LB 배지(LB 아가 플레이트, 트립톤 10g/ℓ, NaCl 10g/ℓ, 효모 추출액 5g/ℓ, 아가 15g/ℓ)에 일정량 도말(spreading)하였다.

[0046] 상기 형질전환과정을 거친 샘플은 항생제가 포함된 고체 LB 배지에서 작은 원형 콜로니(colony) 형태로 자라는 것을 확인하였다. 이 콜로니를 암피실린이 포함된 5ml의 액체 LB 배지에서 배양하고 일반적인 플라스미드 추출 키트(Mini-prep kit)를 이용하여 플라스미드를 추출하였다. 상기 추출한 플라스미드는 중합효소연쇄반응 과정 후에 라이게이션을 위해 처리한 제한효소를 이용하여 플라스미드와 목적 유전자의 정보를 보유한 뉴클레오티드를 절단하여 *E.coli* K-12 MG1655의 유전자와의 크기를 비교하였다. 또한 상기와 같은 플라스미드의 유전자 염기서열 분석결과와 KEGG에 공개된 유전정보가 일치하는지 확인하여, 형질전환 과정의 돌연변이나 중합효소연쇄반응 도중에 일어나는 합성오류가 없음을 점검하였다.

[0047] 유전자의 염기서열 분석을 이용하여 재조합 플라스미드 pEcoliNterm 6xHN::*fabB*, *fabF*, *fabA*의 *fabB* 유전자의 염기서열과 *E.coli* K-12 MG1655의 *fabB* 유전자의 염기서열 분석결과를 도 11에 나타내었고, *fabF* 유전자의 염기서열과 *E.coli* K-12 MG1655의 *fabF* 유전자의 염기서열 분석결과를 도 12에 나타내었다. 또한 *fabA* 유전자의 염기서열과 *E.coli* K-12 MG1655의 *fabA* 유전자의 염기서열 분석결과를 도 13에 나타내었다.

[0048] 도 11 내지 도 13에 나타난 바와 같이, 재조합 플라스미드 pEcoliNterm 6xHN::*fabB*, *fabF*, *fabA*의 *fabB* 유전자의 염기서열과 *E.coli* K-12 MG1655의 *fabB* 유전자의 염기서열 분석결과에서 뉴클레오티드 한 곳의 서열이 *E.coli* K-12 MG1655와 상이하였지만, 아미노산으로 번역이 된 경우의 아미노산 서열과 효소의 기능을 하는 단백질로 입체구조를 가지는 경우에는 일치함을 확인하였다.

[0049] **2. 재조합 대장균의 제조(*E.coli* BL21::pEcoliN::*fabF*, *fabB*, *fabA* + *E.coli* BL21::pEcoli N::*fabF*, *fabB*, *fabA* + pCDF-1b::`*tesA*)**

[0050] 상기 1에서 합성오류를 점검한 재조합 균주(*E.coli* BL21(DE3)::pEcoliNterm 6xHN:: *fabF*, *fabB*, *fabA*)에 *accA*, *accB*, *accC*, *accD*의 유전정보를 보유한 뉴클레오티드를 포함하는 재조합 플라스미드 pCOLADuet::*accA*, *accB*, *accC*, *accD*를 넣기 위해서, 상기 컴피턴트 세포의 제조방법과 동일한 방법으로 재조합 균주를 처리하고, 열충격 형질전환방법을 다시 시도하여 외래 종의 *accA*, *accB*, *accC*, *accD*, *fabF*, *fabB* 및 *fabA*가 함께 존재하는 재조합 균주를 제조하였다[*E.coli* BL21(DE3)::pCOLADuet::*accA*, *accB*, *accC*, *accD* + pEcoliN::*fabF*, *fabB*, *fabA*]. 또한 `*tesA*의 유전정보를 보유한 뉴클레오티드를 포함하는 재조합 플라스미드 pCDF-1b::`*tesA*를 제조하기 위해서 pCDF-1b::`*tesA*를 주형으로 하여 75번째 염기를 C에서 T로 바꾼 프라이머를 제조하였고, PCR을 통해 중합하여 pCDF-1b::`*tesA*를 제조하였다. PCR에 이용된 pCDF-1b::`*tesA*는 Dpn를 첨가하여 제거하였고, 열충격 형질전환방법을 시도하여 외래종의 *accA*, *accB*, *accC*, *accD*, *fabF*, *fabB*, *fabA* 및 `*tesA*가 함께 존재하는 재조합 균주를 제조하였다[*E.coli* BL21(DE3)::pCOLADuet::*accA*, *accB*, *accC*, *accD* + pEcoliN::*fabF*, *fabB*, *fabA* + pCDF-1b::`*tesA*]

[0051] 상기 재조합 균주들은 항생제가 포함된 고체 LB 배지에서 작은 원형 콜로니(colony) 형태로 자라는 것을 확인하였다. 이 콜로니를 카나마이신, 암피실린, 스트렙토마이신이 포함된 5ml의 액체 LB 배지에서 배양하고 일반적인 플라스미드 추출 키트(Mini-prep kit)를 이용하여 플라스미드를 추출하였다. 상기 추출된 플라스미드를 통해 *accA*, *accB*, *accC*, *accD* 및 `*tesA*(75번째 염기가 C에서 T로 바뀐 *tesA* 유전자) 염기서열 분석결과와 KEGG에 공개된 유전정보가 일치하는지 확인하였다.

[0052] 유전자의 염기서열 분석을 이용하여 재조합 플라스미드 pCOLADuet::*accA*, *accB*, *accC*, *accD*의 *accA* 유전자의 염기서열과 *E.coli* K-12 MG1655의 *accA* 유전자의 염기서열 분석결과를 도 14에 나타내었고, *accB*와 *accC*를 동시에 중합한 유전자의 염기서열과 *E.coli* K-12 MG1655의 *accB*와 *accC* 유전자의 염기서열 분석결과를 도 15에 나타내었으며, *accD* 유전자의 염기서열과 *E.coli* K-12 MG1655의 *accD* 유전자의 염기서열 분석결과를 도 16에 나타내었다. 또한 플라스미드 pCDF-1b::`*tesA*의 `*tesA* 유전자의 염기서열과 *E.coli* K-12 MG1655의 *tesA*에서 75번째 염기를 C에서 T로 바꾼 `*tesA* 유전자의 염기서열 분석결과를 도 17에 나타내었다.

[0053] 도 14 내지 17에 나타난 바와 같이, 재조합 플라스미드 pCOLADuet::*accA*, *accB*, *accC*, *accD*의 *accB*, *accC* 유전자의 염기서열과 *E.coli* K-12 MG1655의 *accB*, *accC* 유전자의 염기서열 분석결과에서 뉴클레오티드 한 곳의 서열이 *E.coli* K-12 MG1655와 상이하였지만, 아미노산으로 번역이 된 경우의 아미노산 서열과 효소의 기능을 하는 단백질로 입체구조를 가지는 경우에는 일치함을 확인하였다.

[0054] 따라서, 상기 제조한 재조합 균주(*E.coli* BL21(DE3)::pCOLADuet::*accA*, *accB*, *accC*, *accD* + pEcoliN::*fabF*, *fabB*, *fabA* + pCDF::`*tesA*)를 2012년 05월 18일자로 한국생명공학연구원 생물자원센터 유전자은행(KCTC)에 기탁하였으며, KCTC 12216BP의 수탁번호를 부여받았다.

[0055] 상기 제조된 재조합 대장균, 목적 유전자 및 재조합 플라스미드는 표 5에 나타내었다.

표 5

재조합 대장균	목적 유전자	재조합 플라스미드
<i>E.coli</i> BL21(DE3)::pCOLADuet TM -1:: <i>accA</i> , <i>accB</i> , <i>accC</i> , <i>accD</i> +pEcoliN:: <i>fabF</i> , <i>fabB</i> , <i>fabA</i> + pCDF::` <i>tesA</i>	<i>accA</i> , <i>accB</i> , <i>accC</i> , <i>accD</i> , <i>fabF</i> , <i>fabB</i> , <i>fabA</i> , ` <i>tesA</i>	pCOLADuet TM -1:: <i>accA</i> , <i>accB</i> , <i>accC</i> , <i>accD</i> +pEcoli 6xHN:: <i>fabF</i> , <i>fabB</i> , <i>fabA</i> + pCDF-1b::` <i>tesA</i>

[0057] 실시예 3 : 재조합 대장균을 이용하여 지방산의 생성

[0058] 상기 실시예 2에서 제조된 재조합 대장균(*E.coli* BL21(DE3):: pCOLADuet::*accA*, *accB*, *accC*, *accD* + pEcoliN::*fabF*, *fabB*, *fabA* + pCDF::`*tesA*)을 항생제인 카나마이신, 암피실린, 스트렙토마이신이 포함된 200ml의 액체 LB 배지에 넣고 37℃의 진탕배양기에서 200rpm의 속도로 회전시키면서 23시간 동안 배양하였다. 배양액의 OD(optical density)가 0.5~0.8에 이르렀을 때 유전자 발현을 목적으로 1.0mM IPTG(Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside)를 첨가한 다음 낮은 온도에서 KASⅡ의 발현이 효율적임을 고려하여 낮은 온도인 17℃로 옮겨 배양하였으며, 원심분리하여 균체와 배지를 분리하고, 동결건조하여 균체의 수분을 제거하였다. 분석을 위한 샘플을 제조하기 위해서, 균체가 포함된 유리 시험관에 황산과 메탄올(5:100의 부피비)의 혼합용액을 첨가하고, 질소를 충전하였다. 시험관을 밀봉하여 90℃에서 30분 동안 에스터화 반응을 하고 상온에서 냉각시켰다. 그 다음, 헥산과 증류수를 첨가하여 교반기 위에서 섞어주고 층 분리를 하여 FAME(fatty acid methyl ester)이 용해된 상층의 헥산층을 분석하였다. 분석에 이용한 장비는 가스크로마토그래피(gas chromatography, Agilent 6890N)이며, 이용한 컬럼은 Agilent 19091N-133 capillary 컬럼이다.

[0059] 본 발명의 재조합 대장균의 불포화지방산 조성 분석 결과는 표 6 내지 표 7에 나타내었다.

표 6

균주 이름	C12:0 (Lauric acid)	C14:0 (Myristic acid)	C16:0 (Palmitic acid)	16:1 Δ 9 (Palmitol eic acid)	Cyclo17:0 (cis-9,10- Methylene Hexadecan oic acid)	C18:0 (Stearic acid)	C18:1 Δ 11 (cis-vaccenic acid)	Cyclo 19:0 (Phytomonic acid)
<i>E. coli</i> BL21(DE3):: pCOLADuet TM -1+pEcoli 6xHN+pCDF-1b	6.15	10.34	58.68	15.50	6.95	1.9	61.74	3.34
<i>E. coli</i> BL21(DE3):: pCOLADuet TM -1::accA, accB, accC, accD+pEcoli 6xHN::fabB, fabF, fabA+pCDF-1b::tesA	7.65	11.09	59.12	11.19	11.36	2.86	135.39	4.5

단위: nmol/ml

[0060]

표 7

균주 이름	UFA/SFA 비	전체 지방산 중 18:1 Δ 11 함량 (%)
<i>E. coli</i> BL21(DE3):: pCOLADuet TM -1+pEcoli 6xHN+pCDF-1b	1.14	37.44
<i>E. coli</i> BL21(DE3):: pCOLADuet TM -1::accA, accB, accC, accD+pEcoli 6xHN::fabB, fabF, fabA+pCDF-1b::tesA	2.02	55.52

UFA(Unsaturated fatty acid), SFA(Saturated fatty acid)

[0061]

[0062] 표 6에서 나타난 바와 같이, 본 발명의 재조합 균주는 야생형 균주와 비교하여 불포화 지방산 조성에서 차이가 생겼으며, 특히 표 7에 나타난 바와 같이 불포화 지방산의 비율과 양이 크게 늘어남을 확인하였다.

수탁번호

[0063]

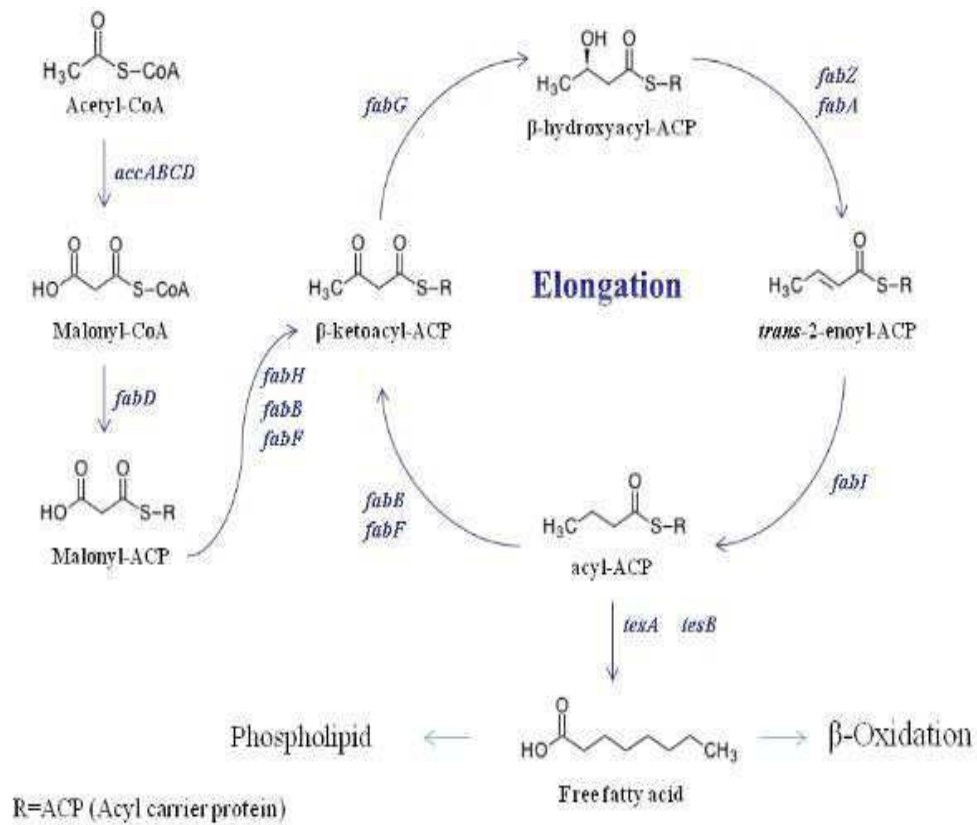
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC12216BP

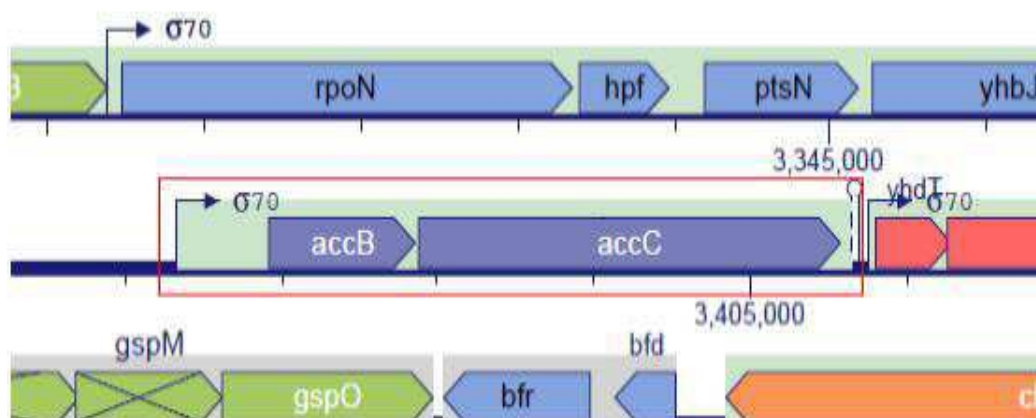
수탁일자 : 20120518

도면

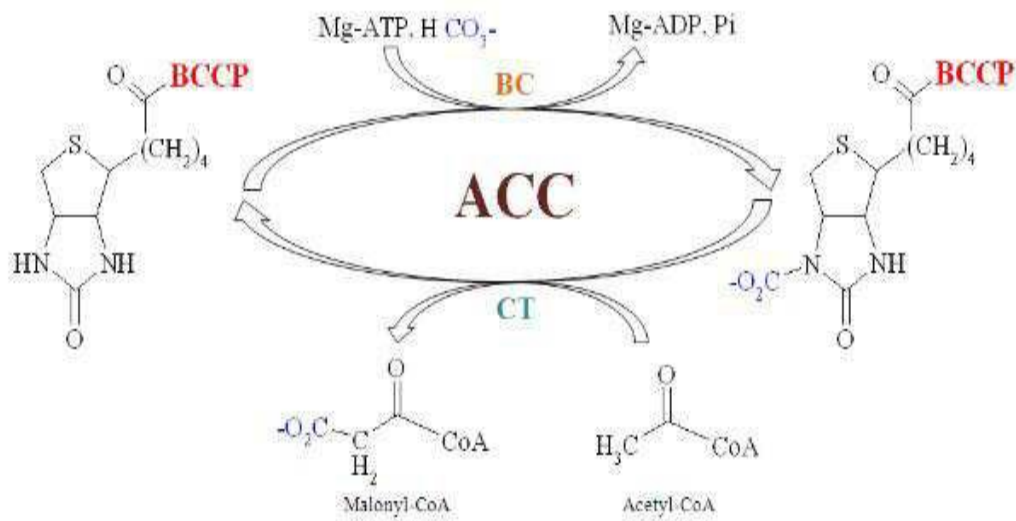
도면1



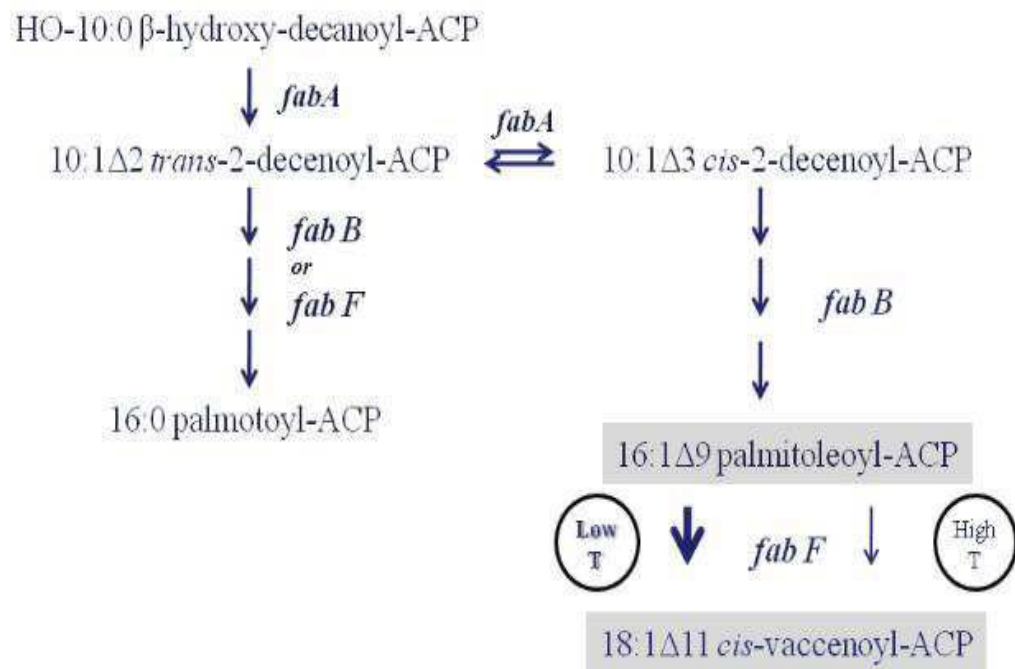
도면2



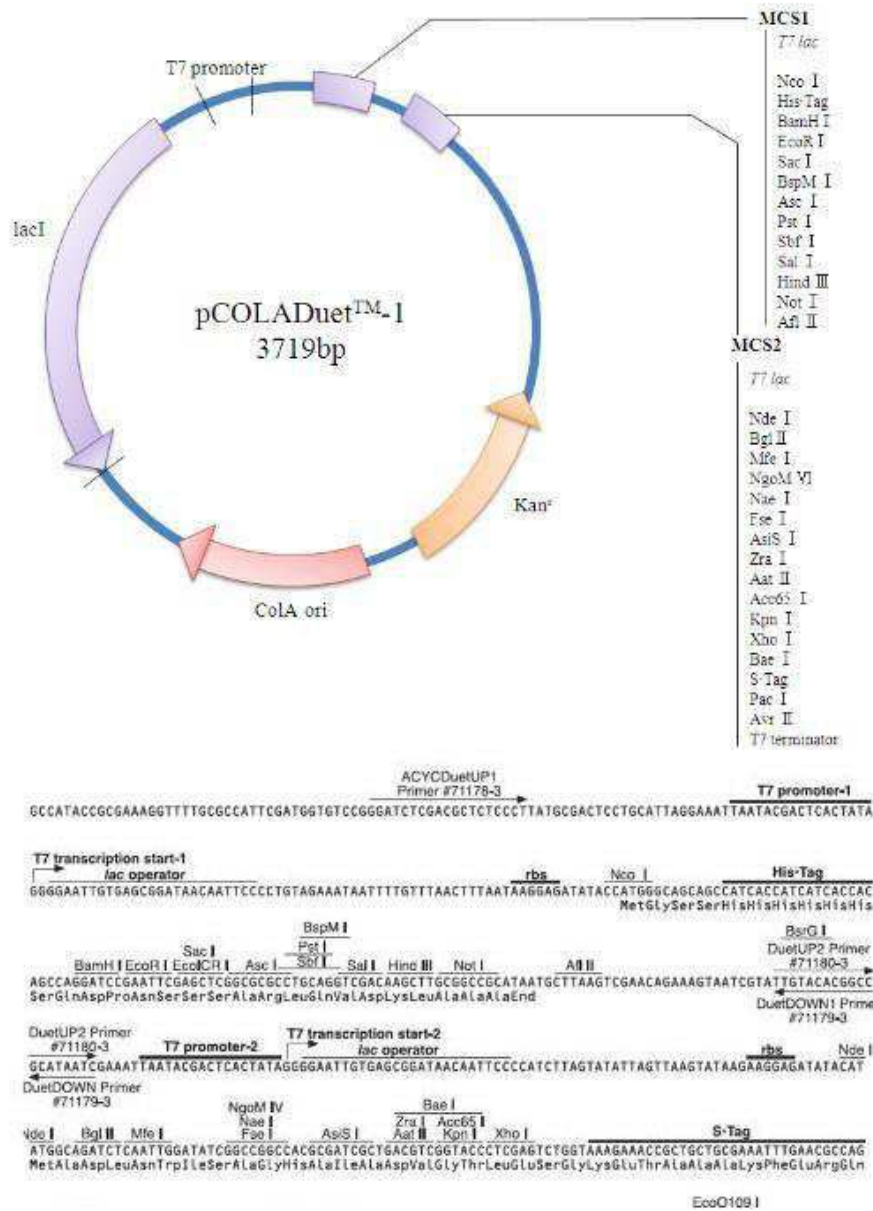
도면3



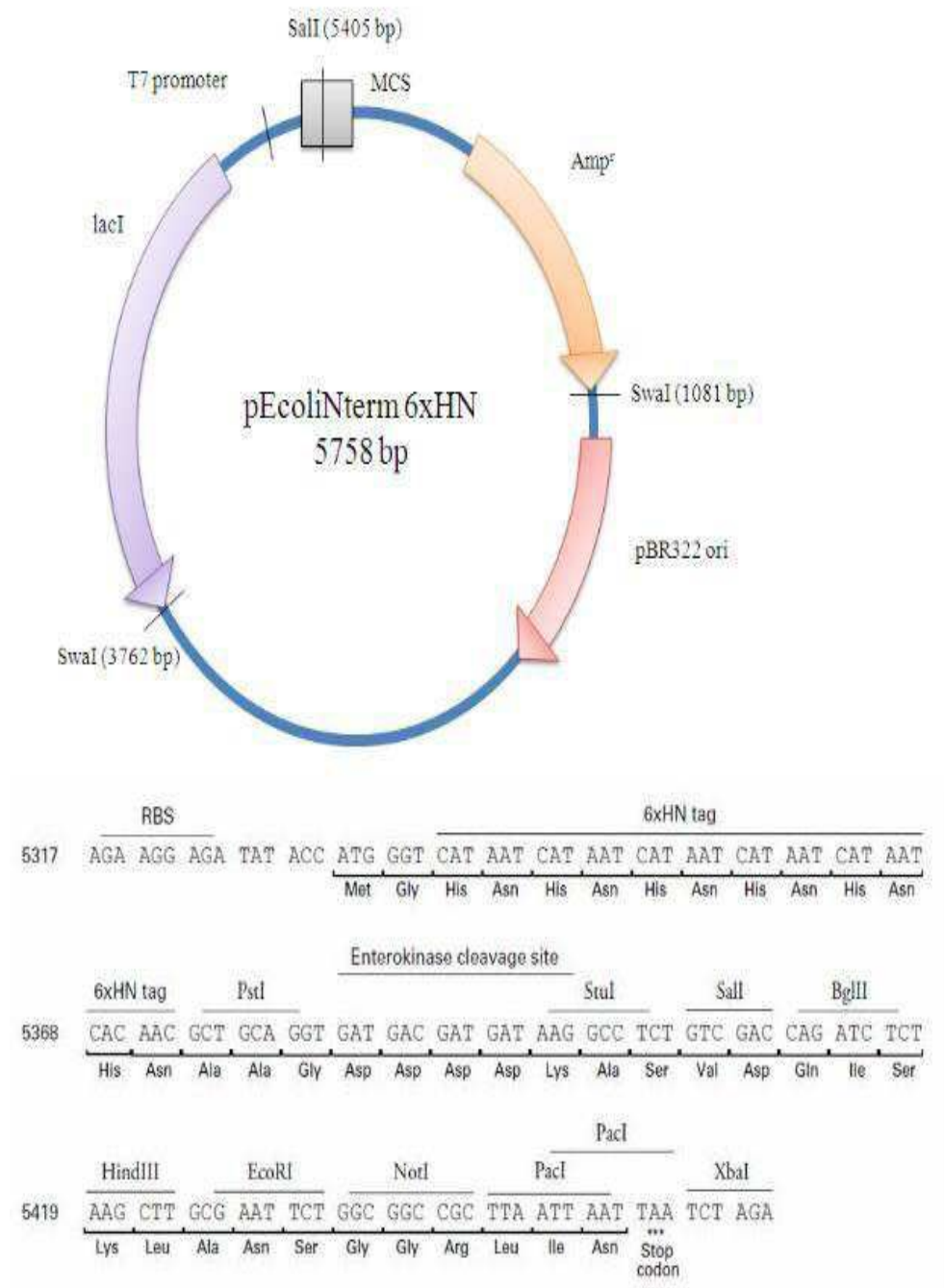
도면4



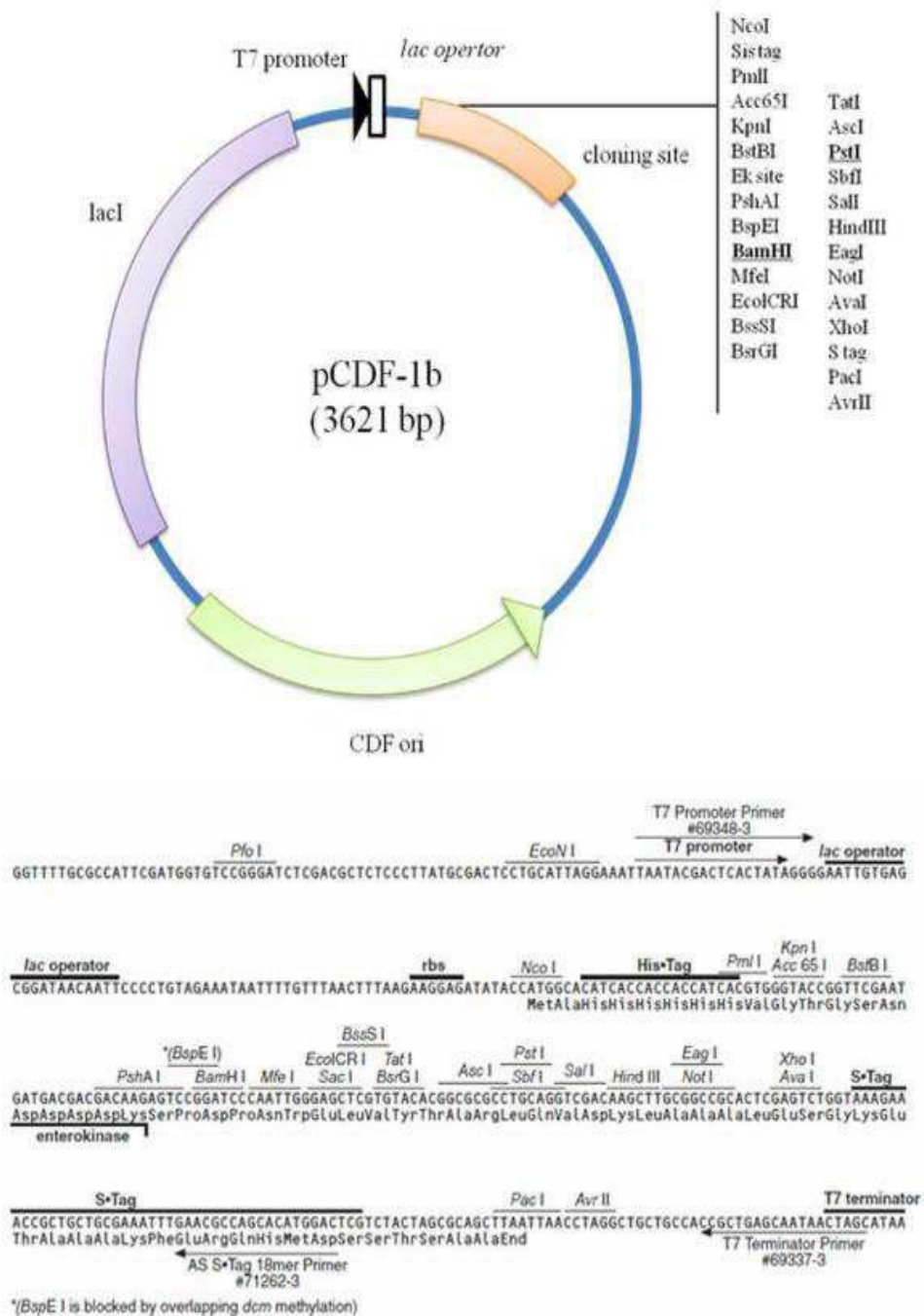
도면5



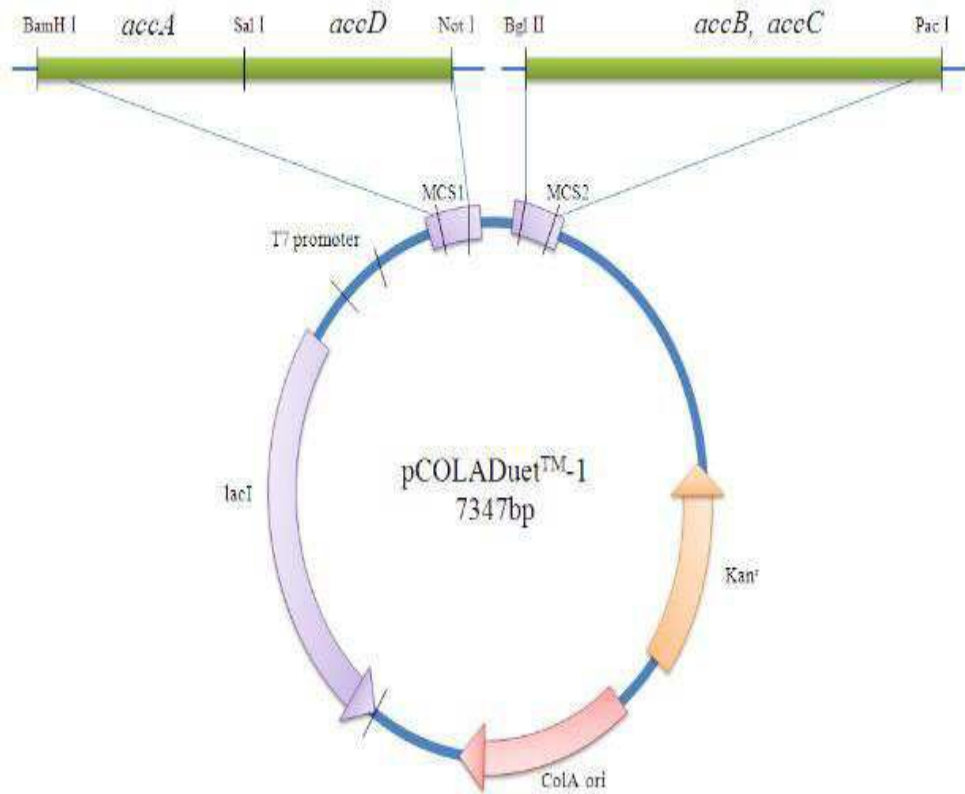
도면6



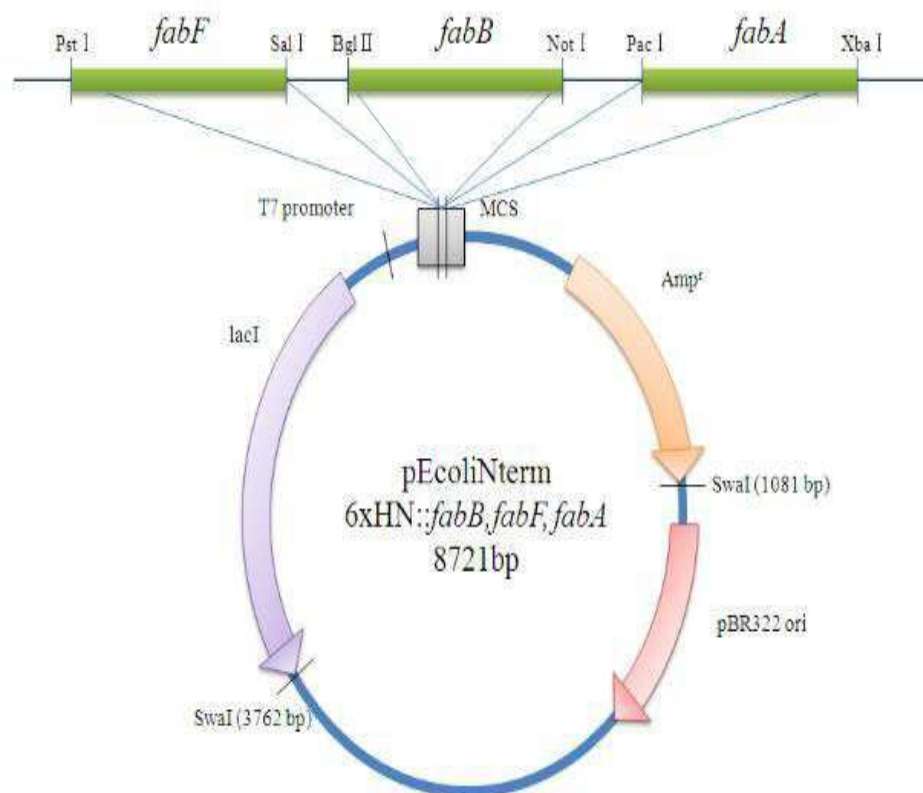
도면7



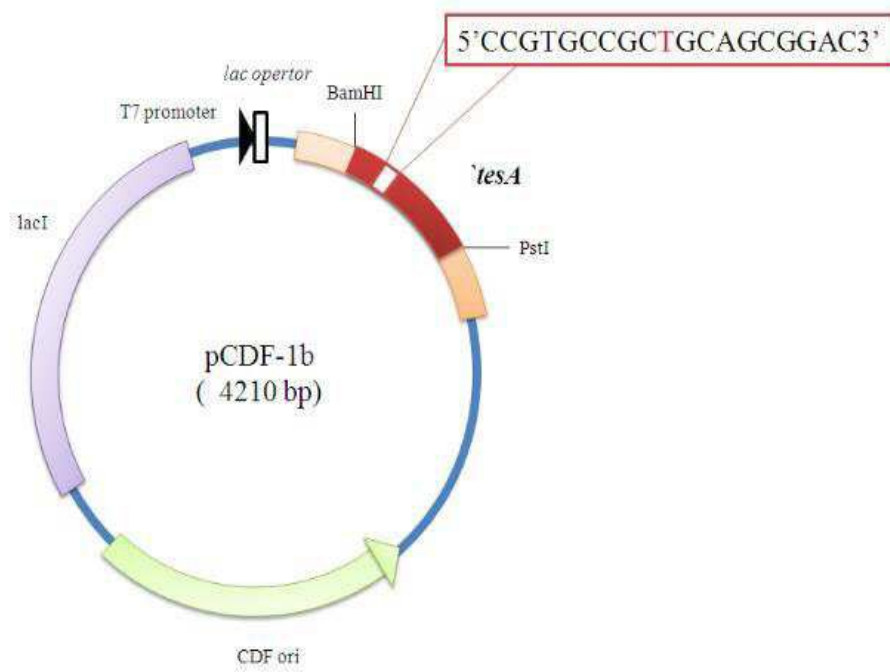
도면8



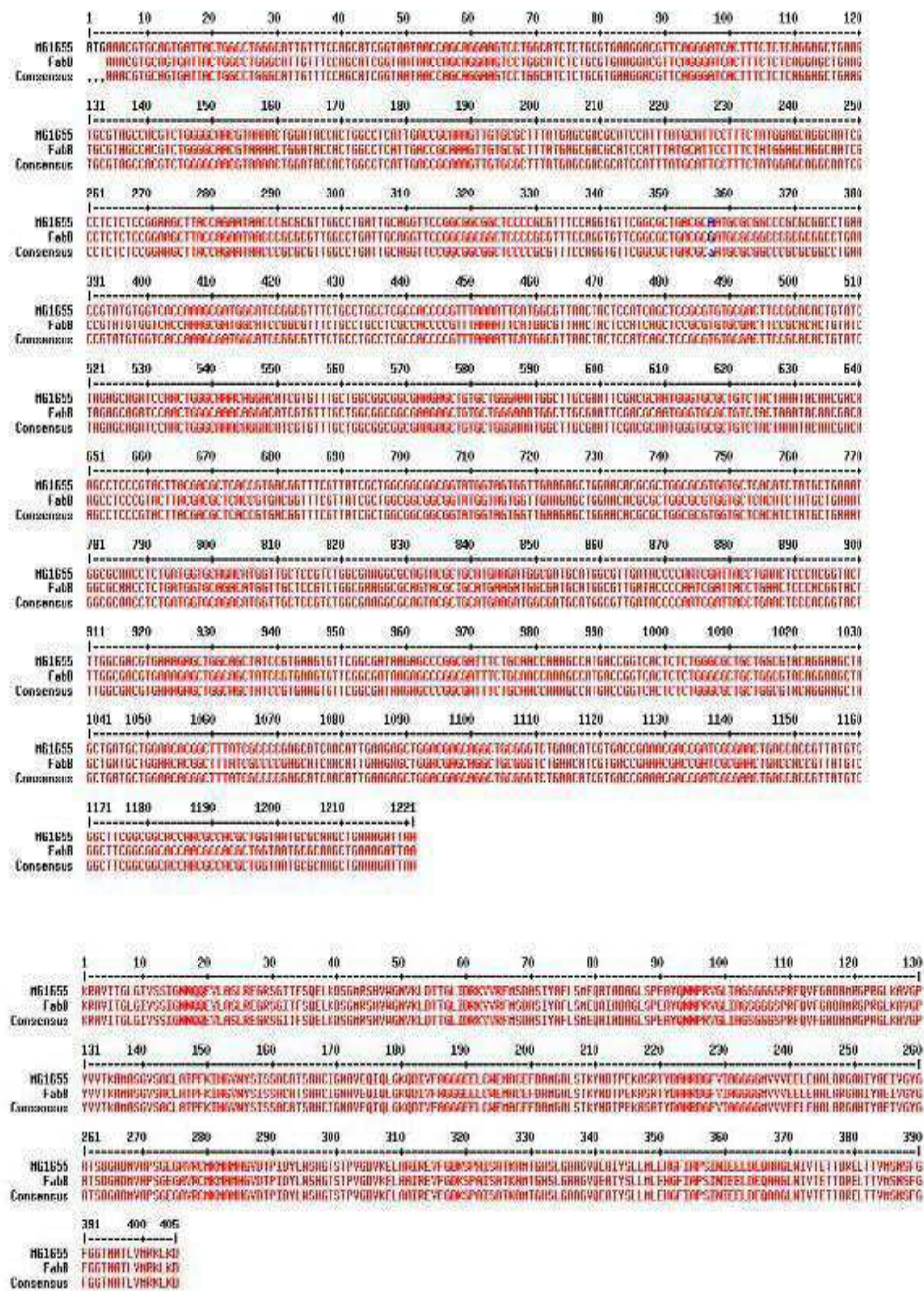
도면9



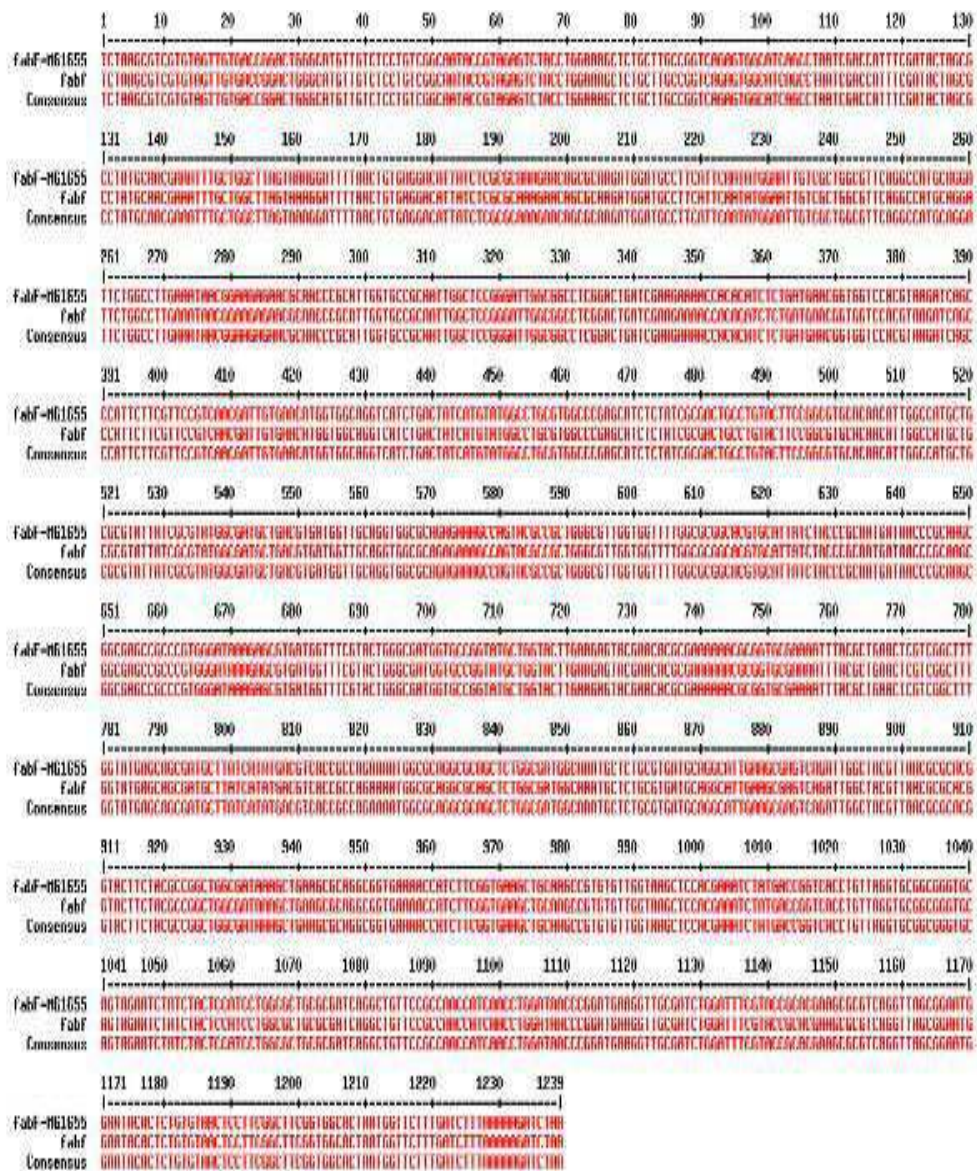
도면10



도면11



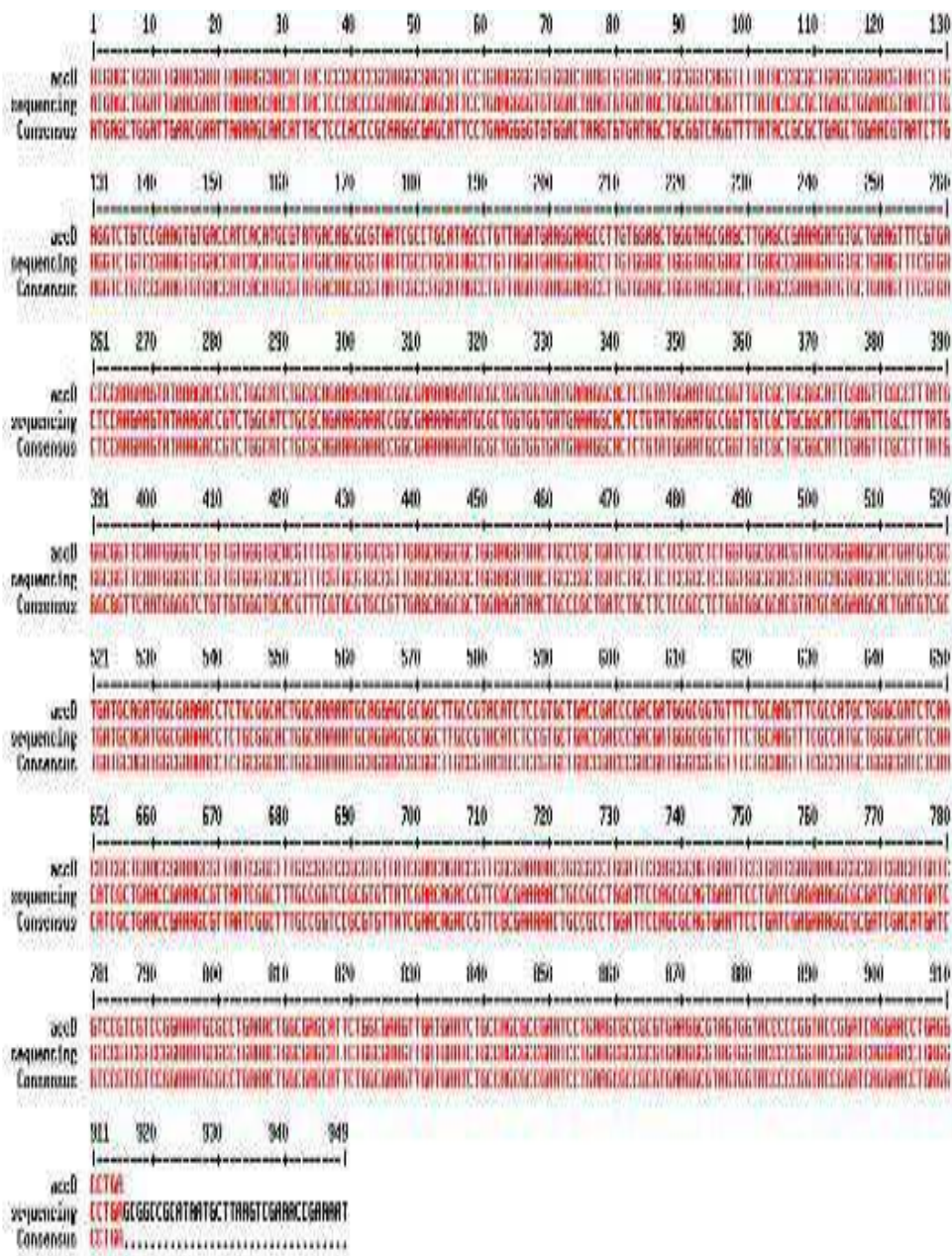
도면12



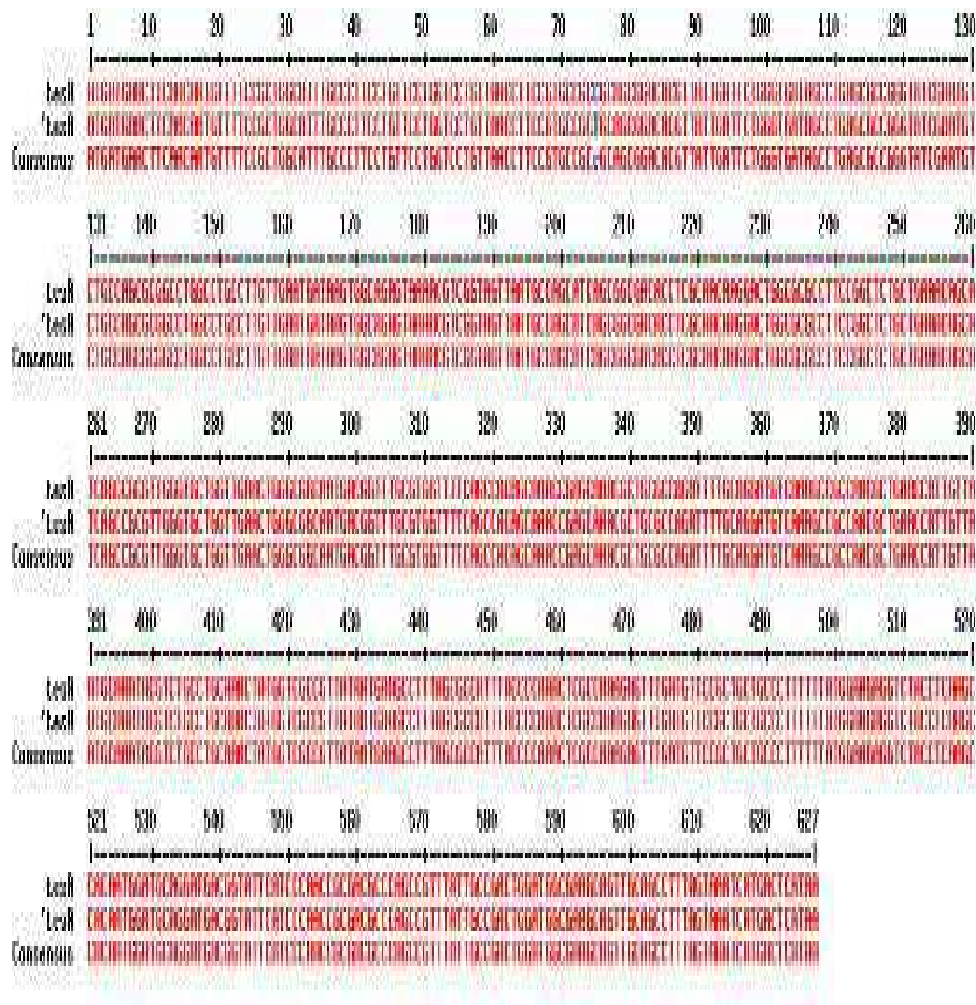
도면15

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
accBL	AA													

도면16



도면17



서열목록

- <110> INHA-INDUSTRY PARTNERSHIP INSTITUTE
 - <120> Recombinant E.coli producing unsaturated fatty acid, and method
for producing unsaturated fatty acid using the same
 - <130> P-175
 - <160> 24
 - <170> KopatentIn 2.0
 - <210> 1
 - <211> 960
 - <212> DNA
 - <213> Escherichia coli
 - <400> 1
- atgagctga atttcctga ttttgacag ccgattgcag agctggaagc gaaaatcgat 60
- tctctgactg cggtttagccg tcaggatgag aaactggata ttaacatcga tgaagaagtg 120

catcgtctgc gtgaaaaaag cgtagaactg acacgtaaaa tcttcgccga tctcgggtgca	180
tggcagattg cgcaactggc acgccatcca cagcgtcctt ataccctgga ttacgttcgc	240
ctggcatttg atgaatttga cgaactggct ggcgaccgcg cgtatgcaga cgataaagct	300
atcgtcgggt gtatcgccc tctcgatggt cgtccggtga tgatcattgg tcatcaaaaa	360
ggtcgtgaaa ccaaagaaaa aattcgccgt aactttggta tgccagcgcc agaaggttac	420
cgcaaagcac tgcgtctgat gcaaatggct gaacgcttta agatgcctat catcaccttt	480
atcgacaccc cgggggctta tcttggcgtg ggcgacagaag agcgtggtca gtctgaagcc	540
attgcacgca acctgcgtga aatgtctcgc ctccggttac cggtagtttg tacggttatc	600
ggtgaagggt gtcttggcgg tgcgtggcg attggcgtgg gcgataaagt gaatatgctg	660
caatacagca cctattccgt tatctgccg gaaggttgtg cgtccattct gtggaagagc	720
gccgacaaag cgccgctggc ggctgaagcg atgggtatca ttgctccgcg tctgaaagaa	780
ctgaaactga tcgactccat catcccgaa cactgggtg gtgctcaccg taaccggaa	840
gcgatggcgg catcgttgaa agcgcaactg ctggcggatc tggccgatct cgacgtgta	900
agcactgaag atttaaaaaa tcgtcgttat cagcgctga tgagctacgg ttacgcgtaa	960
	960
<210> 2	
<211> 1831	
<212> DNA	
<213> Escherichia coli	
<400> 2	
atggatattc gtaagattaa aaaactgac gagctggttg aagaatcagg catctccgaa	60
ctggaaattt ctgaaggcga agagtcagta cgcattagcc gtgcagctcc tgccgcaagt	120
ttccctgtga tgcaacaagc ttacgtgca ccaatgatgc agcagccagc tcaatctaac	180
gcagccgctc cgccgaccgt tcttccatg gaagcgccag cagcagcgga aatcagtgtt	240
cacatcgtac gtccccgat ggttggtact ttctaccgca cccaagccc ggacgcaaaa	300
gcgttcacg aagtggtgca gaaagtcaac gtggcgata ccctgtgcat cgttgaagcc	360
atgaaaatga tgaaccagat cgaagcggac aaatccggtg ccgtgaaagc aattctggtc	420
gaaagtggac aaccggtaga atttgacgag ccgtggtcg tcatcgagta acgaggcgaa	480
catgctggat aaaattgtta ttgccaaccg cggcgagatt gcattgcgta ttcttcgtgc	540
ctgtaaagaa ctgggcatca agactgtcgc tgtgactcc agcgcggatc gcgatctaaa	600
acacgtatta ctggcagatg aaacggtctg tattggccct gtcctgcag taaaaagtta	660

tctgaacatc ccggcaatca tcagcgccgc tgaatcacc ggcgtagtag caatccatcc	720
gggttacggc ttctctccg agaacgcaa ctttgccgag caggttgaac gctccggctt	780
tatcttcatt ggcccgaag cagaaacat tcgcctgatg ggcgacaaag tatccgaat	840
cgcgcgatg aaaaaagcgg gcgtcccttg cgtaccgggt tctgacggcc cgctggcgca	900
cgatatggat aaaaaccgtg ccattgctaa acgcatgggt tatccggtga ttatcaaagc	960
ctccggcggc ggcgcggtc gcggtatgcg cgtagtgcgc ggcgacgctg aactggcaca	1020
atccatctcc atgaccctg cggaagcgaa agctgcttc agcaacgata tggtttcat	1080
ggagaaatac ctggaaaac ctcgccacgt cgagattcag gtactggctg acggtcaggg	1140
caacgtatc tatctggcgg aacgtgactg ctccatgcaa cgccgccacc agaaagtgt	1200
cgaagaagcg ccagcaccgg gcattacccc ggaactgcgt cgctacatcg gcgaacgttg	1260
cgctaaagcg tgtgttgata tcggtatcg cggtgcaggt actttcgagt tctgttcga	1320
aaacggcgag ttctatttca tcgaaatgaa caccctgatt caggtagaac acccggttac	1380
agaaatgac accggcgttg acctgatcaa agaacagctg cgtatcgctg ccggtcaacc	1440
gtgtcgatc aagcaagaag aagttcacgt tcgcgccat gcggtggaat gtcgtatcaa	1500
cgccaagat ccgaacacct tctgccaag tccgggcaaa atcaccctt tccacgcacc	1560
tggcggtttt gggtacgtt gggagtctca tatctacgcg ggctacaccg taccgccga	1620
ctatgactca atgatcggtg agctgatttg ctacggtgaa aaccgtgacg tggcgattgc	1680
ccgcatgaag aatgcgctgc aggagctgat catcgacgt atcaaaacca acgttgatct	1740
gcagatccgc atcatgaatg acgagaactt ccagcatggt ggcaactaaca tccactatct	1800
ggagaaaaaa ctcggtcttc aggaaaaata a	1831
<210> 3	
<211> 1831	
<212> DNA	
<213> Escherichia coli	
<400> 3	
atggatattc gtaagattaa aaaactgatc gagctggttg aagaatcagg catctccgaa	60
ctggaaattt ctgaaggcga agagtcagta cgcattagcc gtgcagctcc tgccgcaagt	120
ttccctgtga tgcaacaagc ttacgtgca ccaatgatgc agcagccagc tcaatctaac	180
gcagccgctc cgcgaccgt tcttccatg gaagcgccag cagcagcgga aatcagtggt	240
cacatcgta gttccccat ggttggtact ttctaccgca cccaagccc ggacgcaaaa	300
gcgttcacg aagtggtgca gaaagtcaac gtggcgata ccctgtgcat cgttgaagcc	360

atgaaaaatga tgaaccagat cgaagcggac aaatccggta ccgtgaaagc aattctggtc 420
gaaagtggac aaccggtaga atttgacgag ccgctggctg tcatcgagta acgaggcgaa 480
catgctggat aaaattgtta ttgccaaccg cggcgagatt gcattgcgta ttcttcgtgc 540

ctgtaaagaa ctgggcatca agactgtcgc tgtgcactcc agcgcggatc gcgatctaaa 600
acacgtatta ctggcagatg aaacgggtctg tattggccct gctccgtcag taaaaagtta 660
tctgaacatc cgggcaatca tcagcgccgc tgaatcacc ggcgagtag caatecatcc 720
gggttacggc ttctctccg agaacccaa ctttggcgag caggttgaac gctccggctt 780
tatcttcatt ggccgaaag cagaaacat tcgctgatg ggcgacaaag tatccgcaat 840
cgcgcgatg aaaaaagcgg gcgtcccttg cgtaccgggt tctgacggcc cgctggcgga 900
cgatatggat aaaaaccgtg ccattgctaa acgcattggt tatccggtga ttatcaaagc 960

ctccggcggc ggcgcggtc gcggtatgcg cgtagtgcgc ggcgacgtg aactggcaca 1020
atccatctcc atgacccgtg cggaagcgaa agctgctttc agcaacgata tggtttacat 1080
ggagaaatac ctggaaaac ctcgccacgt cgagattcag gtactggctg acggtcaggg 1140
caacgtatc tatctggcgg aacgtgactg ctccatgcaa cgccgccacc agaaagtgg 1200
cgaagaagcg ccagcaccgg gcattacccc ggaactgcgt cgctacatcg gcgaacgttg 1260
cgctaaagcg tgtgttgata tcggctatcg cggtcaggt actttcgagt tcctgttcga 1320
aaacggcgag ttctatttca tcgaaatgaa caccgtatt caggtagaac acccggttac 1380

agaaatgac accggcggtg acctgatcaa agaacagctg cgtatcgctg ccggtcaacc 1440
gtgtcgatc aagcaagaag aagttcacgt tcgcgccat gcggtggaat gtcgtatcaa 1500
cgccgaagat ccgaacacct tcctgccaag tcggggcaaa atcacccgtt tccacgcacc 1560
tggcggtttt ggctacgtt gggagtctca tatctacgcg ggctacaccg taccgccgta 1620
ctatgactca atgatcggtg agctgatttg ctacggtgaa aaccgtgacg tggcgattgc 1680
ccgcatgaag aatgcgctgc aggagctgat catcgacggt atcaaaacca acgttgatct 1740
gcagatccgc atcatgaatg acgagaactt ccagcatggt ggactaaca tccactatct 1800

ggagaaaaaa ctcggtcttc aggaaaaata a 1831

<210> 4
<211> 915
<212> DNA
<213> Escherichia coli
<400> 4

atgagctgga ttgaacgaat taaaagcaac attactccca cccgcaaggc gagcattcct 60

gaaggggtgt ggactaagtg tgatagctgc ggtcaggttt tataccgcgc tgagctggaa	120
cgtaatcttg aggtctgtcc gaagtgtgac catcacatgc gtatgacagc gcgtaatcgc	180
ctgcatagcc tgttagatga aggaagcctt gtggagctgg gtagcgagct tgagccgaaa	240
gatgtgctga agtttcgtga ctccaagaag tataaagacc gtctggcatc tgcgcagaaa	300
gaaaccggcg aaaaagatgc gctggtggtg atgaaaggca ctctgtatgg aatgccggtt	360
gtcgctgcgg cattcgagtt cgcctttatg ggcggttcaa tgggtctgt tgtgggtgca	420
cgtttctgtc gtgccgttga gcaggcgtg gaagataact gcccgtgat ctgcttctcc	480
gcctctggtg gcgcacgtat gcaggaagca ctgatgtcg tgatgcagat ggcgaaaacc	540
tctgcggcac tggcaaaaat gcaggagcgc ggcttgccgt acatctccgt gctgaccgac	600
ccgacgatgg gcggtgttc tgcaagtttc gccatgctgg gcgatctcaa catcgctgaa	660
ccgaaagcgt taatcggtt tgcgggtccg cgtgttatcg aacagaccgt tcgcgaaaaa	720
ctgccgcctg gattccagcg cagtgaattc ctgatcgaga aaggcgcgat cgacatgac	780
gtccgtcgtc cgaaatgcg cctgaaactg gcgagcattc tggcgaagtt gatgaatctg	840
ccagcgccga atcctgaagc gccgcgtgaa ggcgtagtgg taccgccgt accggatcag	900
gaacctgagg ctga	915
<210> 5	
<211> 1221	
<212> DNA	
<213> Escherichia coli	
<400> 5	
atgaaacgtg cagtgattac tggcctgggc attgtttcca gcatcggtaa taaccagcag	60
gaagtccctgg catctctcg tgaaggacgt tcagggatca ctttctctca ggagctgaag	120
gattccggca tgcgtagcca cgtctggggc aacgtaaaac tggataccac tggcctcatt	180
gaccgcaaag ttgtgcgtt tatgagcgac gcatccattt atgcattcct ttctatggag	240
caggcaatcg ctgatgcggg cctctctccg gaagcttacc agaataaacc gcgcgttggc	300
ctgattgcag gtccggcgg cggtccccg cgtttccagg tgttcggcgc tgacgcaatg	360
cgcggcccg gcggcctgaa agcggttggc ccgtatgtgg tcaccaaagc gatggcatcc	420
ggcgtttctg cctgcctcgc caccgcgtt aaaattcatg gcgttaacta ctccatcagc	480
tccgcgtgtg cgacttccg acactgtatc ggtaacgcag tagagcagat ccaactgggc	540
aaacaggaca tcgtgtttgc tggcggcggc gaagagctgt gctgggaaat ggcttgcgaa	600
ttcgacgcaa tgggtgcgt gtctactaaa tacaacgaca ccccgaaaa agcctccgt	660

acttacgacg ctcaccgtga cggtttcgtt atcgctggcg gcggcggat ggtagtgggt	720
gaagagctgg aacacgcgct ggcgctgggt gctcacatct atgctgaaat cgttggctac	780
ggcgcaacct ctgatgggtc agacatgggt gctccgtctg gcgaaggcgc agtacgctgc	840
atgaagatgg cgatgcatgg cgttgatacc ccaatcgatt acctgaactc ccacggtact	900
tcgactccgg ttggcgacgt gaaagagctg gcagctatcc gtgaagtgtt cggcgataag	960
agccccggcg tttctgcaac caaagccatg accggtcact ctctgggcgc tgctggcgta	1020
caggaagcta tctactctct gctgatgctg gaacacggct ttatcgcccc gagcatcaac	1080
attgaagagc tggacgagca ggctgcgggt ctgaacatcg tgaccgaaac gaccgatcgc	1140
gaactgacca ccgttatgtc taacagcttc ggcttcggcg gcaccaacgc cacgctggta	1200
atgcgcaagc tgaaagatta a	1221
<210> 6	
<211> 1242	
<212> DNA	
<213> Escherichia coli	
<400> 6	
gigtctaagc gtcgtgtagt tgtgaccgga ctgggcatgt tgtctcctgt cggcaatacc	60
gtagagtcta cctggaaaagc tctgcttgcc ggctcagagtg gcatcagcct aatcgaccat	120
ttcgatacta gcgcctatgc aacgaaattt gctggccttag taaaggattt taactgtgag	180
gacattatct cgcgcaaaga acagcgcaag atggatgcct tcattcaata tgggaattgtc	240
gctggcgcttc aggccatgca ggattctggc cttgaaataa cggaagagaa cgcaacccgc	300
attggtgccg caattggctc cgggattggc ggctcggac tgatcgaaga aaaccacaca	360
tctctgatga acggtgggcc acgtaagatc agccattct tcgttcgctc aacgattgtg	420
aacatggtgg caggtcatct gactatcatg tatggcctgc gtggcccag catctctatc	480
gcgactgcct gtacttcgga cgtgcacaac attggccatg ctgcgcgtat tatcgctat	540
ggcgaatgctg acgtgatggt tgcaggtggc gcagagaaag ccagtacgcc gctgggcgtt	600
ggtgggtttt gcgcggcacg tgcatatct acccgcaatg ataaccgca agcggcgagc	660
cgcccgctggg ataaagagcg tgatggtttc gtactggcg atggtgccgg tatgctggta	720
cttgaagagt acgaacacgc gaaaaaacgc ggtgcgaaaa ttacgctga actcgtcggc	780
tttggtatga gcagcgatgc ttatcatatg acgtcaccgc cagaaaatgg cgcaggcgca	840
gctctggcga tggcaaatgc tctgcgtgat gcaggcattg aagcgagtca gattggctac	900
gttaacgcgc acggtacttc tacgccggct ggcgataaag ctgaagcgca ggcggtgaaa	960

accatcttcg gtgaagctgc aagccgtgtg ttggtaagct ccacgaaatc tatgaccggt 1020
cacctgttag gtgcggcggg tgcagtagaa tctatctact ccatcctggc gctgcgcgat 1080
caggctgttc cgccaacat caacctggat aacccgatg aaggttgcga tctggatttc 1140
gtaccgcacg aagcgcgtca ggtagcggga atggaatata ctctgtgtaa ctcttcggc 1200
ttcggtaggca ctaatgggtc ttgatcttt aaaaagatct aa 1242

<210> 7

<211> 518

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 7

atggtagata aacggaatc ctatacaaaa gaagaccttc ttgcctctgg tcgcggtgac 60
tgtttggcgc taaaggcccg caattgccag caccgaacat gctgatgatg gaccgtgtgg 120
tcaaatgac cgaacgggt ggtaacttcg acaaaggta tgttgaagca gaactggata 180
tcaatccgga tctgtgttc ttcggatgcc actttattgg cgatccggtt atgccgggat 240
gcctgggcct ggacgcaatg tggcagctgg tagggttcta cctcggctgg ctgggcggcg 300
aaggtaaagg ccgcgcgtg ggcgttggcg aagtgaatt cactggtcag gtactgccga 360

cagcgaaaaa agtgacctac cgtattcact ttaaaccgat tgttaaccgt cgtctgatta 420
tgggcctggc ggatggcgaa gtgctgttg atggtcgtct gatctatacc gccagcgacc 480
tgaaagtcgg tctgttccag gatacgtctg ctttctga 518

<210> 8

<211> 627

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 8

atgatgaact tcaacaatgt ttccgctgg catitgccct tctgttcct ggtcctgtta 60
accttccgtg ccgccgcagc ggacacgtta ttgattctgg gtgatagcct gagcgccggg 120
tatcgaatgt ctgccagcgc ggcctggcct gccttgttga atgataagt gcagagtaaa 180

acgtcggtag ttaatgccag catcagcggc gacacctgc aacaaggact ggcggcctt 240
ccggctctgc tgaacagca tcagccgcgt tgggtgctgg ttgaactggg cggcaatgac 300
ggtttgcgtg gttttcagcc acagcaaacc gagcaaaccg tgcgccagat ttgcaggat 360
gtcaaagccg ccaacgtga accattgtta atgcaatac gtctgcctgc aaactatggt 420
cgccgttata atgaagcctt tagcgccatt tacccaaac tcgccaaga gtttgatgtt 480

ccgctgctgc cttttttat ggaagaggtc tacctcaagc cacaatggat gcaggatgac 540
 ggtattcatc ccaaccgcga cgcccagccg tttattgccg actggatggc gaagcagttg 600

cagccttttag taaatcatga ctcataa 627

<210> 9
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer for accA gene
 <400> 9
 cggatccgat gaatttcctt gattttgaac agc 33
 <210> 10
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer for accA gene
 <400> 10
 gcgtcgacgt cttacgcgta accgtag 27
 <210> 11

<211> 43
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer for accB and accC gene
 <400> 11
 gaagatcttc ggatggatat tcgtaagatt aaaaaactga tcg 43
 <210> 12
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer for accB and accC gene
 <400> 12
 gaagatcttc ggatggatat tcgtaagatt aaaaaactga tcg 43
 <210> 13
 <211> 39

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	forward primer for accD gene	
<400>	13	
	gcgtcgacgt caaggagata tacatgagct ggattgaac	39
<210>	14	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	reverse primer for accD gene	
<400>	14	
	ataagaatgc ggccgctcag gcctcaggtt	30
<210>	15	
<211>	48	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	forward primer for fabB gene	
<400>	15	
	ggaagatctg aaggagatat accatgaaac gtgcagtgat tactggcc	48
<210>	16	
<211>	42	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	reverse primer for fabB gene	
<400>	16	
	ataagaatgc ggccgcttaa tctttcagct tgcgcattac ca	42
<210>	17	
<211>	37	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	forward primer for fabF gene	
<400>	17	
	aaaactgcag gtgtgtctaa gcgtcgtgta gttgtga	37

<210> 18
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer for fabF gene

<400> 18
 acgcgtcgac ttagatcttt ttaaagatca aagaacc 37

<210> 19
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer for fabA gene

<400> 19
 ccttaattaa ggaaggaggg atggtagata aacgcgaatc c 41

<210> 20
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer for fabA gene

<400> 20
 gctctagagc tcagaaggca gacgtatcct g 31

<210> 21
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer for tesA gene

<400> 21
 cgggatccca tgatgaactt caacaatgtt ttccg 35

<210> 22
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer for tesA gene

<400> 22
ggaagatctg aaggagatat accatgaaac gtgcagtgat tactggcc 48
<210> 23
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> forward primer for 'tesA gene

<400> 23
gttaaccttc cgtgccgctg cagcggacac gttattg 37
<210> 24
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> reverse primer for 'tesA gene

<400> 24
caataacgtg tccgctgcag cggcacggaa ggtaac 37