

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0072017 (43) 공개일자 2014년06월12일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>C12N 1/21</i> (2006.01) <i>C12N 15/52</i> (2006.01) <i>C12P 7/28</i> (2006.01)		(71) 출원인 사이언티스트 오브 포춘 에스.에이. 룩셈부르크, 엘-1628 룩셈부르크, 루 데 글라시, 7에이
(21) 출원번호 10-2014-7002160		(72) 발명자 마를리에르, 필리프 벨기에, 비-7700 무스크론, 뒤 드 룰렘, 173
(22) 출원일자(국제) 2012년07월12일 심사청구일자 없음		(74) 대리인 손민
(85) 번역문제출일자 2014년01월27일		
(86) 국제출원번호 PCT/EP2012/063685		
(87) 국제공개번호 WO 2013/007786 국제공개일자 2013년01월17일		
(30) 우선권주장 11173563.5 2011년07월12일 유럽특허청(EPO)(EP)		

전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 **유용한 대사산물의 생산을 위한 재조합 미생물**

(57) 요약

본 발명은 포스포케톨라제 활성을 갖고, 포스포프럭토키나제를 인코딩하는 유전자(들)의 불활성화에 의해서, 또는 비-변형 미생물과 비교하여 포스포프럭토키나제 활성을 감소시킴으로써 감소되거나 불활성화된 엠텐-마이어호프-파나스 경로 (EMPP)를 가지며, 글루코즈-6-포스페이트 데하이드로게나제를 인코딩하는 유전자(들)의 불활성화에 의해서, 또는 비-변형 미생물과 비교하여 글루코즈-6-포스페이트 데하이드로게나제 활성을 감소시킴으로써 펜토즈 포스페이트 경로 (PPP)의 감소되거나 불활성화된 산화적 브랜치를 갖는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물에 관한 것이다. 이들 미생물은 아세톤, 이소부텐 또는 프로펜과 같은 유용한 대사산물의 생산을 위해서 사용될 수 있다.

특허청구의 범위

청구항 1

- a) 포스포케톨라제 활성을 가지며;
- b) (i) 포스포프럭토키나제를 인코딩하는 유전자(들)의 불활성화에 의해서, 또는 비-변형 미생물과 비교하여 포스포프럭토키나제 활성을 감소시킴으로써, 감소되거나 불활성화된 엠텐-마이어호프-파나스 경로 (EMPP)를 갖거나;
- (ii) 포스포프럭토키나제 활성을 갖지 않으며;
- c) (i) 글루코즈-6-포스페이트 데하이드로게나제를 인코딩하는 유전자(들)의 불활성화에 의해서, 또는 비-변형 미생물과 비교하여 글루코즈-6-포스페이트 데하이드로게나제 활성을 감소시킴으로써, 펜토즈 포스페이트 경로 (PPP)의 감소되거나 불활성화된 산화적 브랜치를 갖거나;
- (ii) 글루코즈-6-포스페이트 데하이드로게나제 활성을 갖지 않는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 2

제1항에 있어서, 추가로 d) 프럭토스-1,6-비스포스페이트 포스파타제 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, EMPP가 글리세르알데히드 3-포스페이트 데하이드로게나제를 인코딩하는 유전자(들)의 불활성화에 의해서, 또는 비-변형 미생물과 비교하여 글리세르알데히드 3-포스페이트 데하이드로게나제 활성을 감소시킴으로써, 더 감소되거나 불활성화된 재조합 미생물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 증가된 포스포케톨라제 활성을 갖도록 유전자 변형된 재조합 미생물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 미생물이 진균인 재조합 미생물.

청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 미생물이 박테리아인 재조합 미생물.

청구항 7

제6항에 있어서, PEP-의존성 PTS 수송체를 인코딩하는 유전자(들)가 불활성화된 재조합 미생물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 추가로 e) 아세틸-CoA를 아세톤으로 전환시킬 수 있는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 9

제8항에 있어서, 추가로 f) 아세톤을 이소부텐으로 전환시킬 수 있는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 10

제8항에 있어서, 추가로 g) 아세톤을 프로펜으로 전환시킬 수 있는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 11

글루코스를 아세틸-CoA로 전환시키기 위한 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 재조합 미생물의 용도.

청구항 12

글루코스를 아세톤으로 전환시키기 위한 제8항 내지 제10항 중 어느 한 항의 재조합 미생물의 용도.

청구항 13

글루코스를 이소부텐으로 전환시키기 위한 제9항의 재조합 미생물의 용도.

청구항 14

글루코스를 프로펜으로 전환시키기 위한 제10항의 재조합 미생물의 용도.

청구항 15

제8항 내지 제10항 중 어느 한 항의 미생물을 적합한 배지에서 배양하는 단계;

선택적으로 아세톤을 배양 배지로부터 회수하는 단계를 포함하는, 글루코스로부터 아세톤을 생산하는 방법.

청구항 16

제9항의 미생물을 적합한 배지에서 배양하는 단계;

선택적으로 이소부텐을 회수하는 단계를 포함하는, 글루코스로부터 이소부텐을 생산하는 방법.

청구항 17

제10항의 미생물을 적합한 배지에서 배양하는 단계;

선택적으로 프로펜을 회수하는 단계를 포함하는, 글루코스로부터 프로펜을 생산하는 방법.

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 포스포케톨라제 활성을 갖고, 포스포프럭토키나제를 인코딩하는 유전자(들)의 불활성화에 의해서, 또는 비-변형 미생물과 비교하여 포스포프럭토키나제 활성을 감소시킴으로써 감소되거나 불활성화된 엠덴-마이아호프-파나스 경로 (Embden-Meyerhof-Parnas pathway; EMP)를 갖거나 포스포프럭토키나제 활성을 갖지 않으며, 글루코즈-6-포스페이트 탈하이드로게나제를 인코딩하는 유전자(들)의 불활성화에 의해서, 또는 비-변형 미생물과 비교하여 글루코즈-6-포스페이트 탈하이드로게나제 활성을 감소시킴으로써 펜토즈 포스페이트 경로 (PPP)의 감소되거나 불활성화된 산화적 브랜치 (oxidative branch)를 갖거나 글루코즈-6-포스페이트 탈하이드로게나제 활성을 갖지 않는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물에 관한 것이다. 이러한 미생물은 아세톤, 이소부텐 또는 프로펜과 같은 유용한 대사산물의 생산에 사용될 수 있다.

배경기술

[0002]

지난 수십 년 동안, 대사 엔지니어링 (metabolic engineering) 전문가들은 화학물질의 생산을 위한 생물학적 해결책을 제공하기 위한 노력을 하였으며, 따라서 더 전통적인 화학적 방법에 대한 대체방법을 제공하였다. 일반적으로, 생물학적 해결책은 재생 가능한 원료 (예를 들어, 당류)의 이용을 고려하고, 기존의 석유화학계 방법과 경쟁한다. 화학물질의 생산을 위한 다단계 생물학적 해결책은 전형적으로 원료의 표적 물질로의 전환을 위한 촉매로서 미생물을 포함한다. 특정한 표적 분자의 생산을 위한 효소 반응의 완전한 세트는 중심 탄소 경로에 속하는 것과 생성물 특이적 경로에 속하는 것으로 그룹을 지을 수 있다. 중심 탄소 및 생성물 특이적 경로에 속하는 반응들은 각각 및 모든 효소 반응의 산화환원 (전형적으로, NAD(P)H) 및 에너지 (전형적으로, ATP) 제약이 방법의 경쟁력에 기여하는 전반적인 균형에 고려되어야 한다는 점에서 연관된다. 역사적으로, 당류 상에서 성장하는 종속 영양생물의 중심 탄소 경로는 엠덴-마이아호프-파나스 경로 (EMP), 펜토즈 포스페이트 경로 (PPP), 엔트너-도우도로프 (Entner-Doudoroff) 경로 (EDP), 및 포스포케톨라제 경로 (PKP)로 기술되었다 (참조: Gottschalk (1986), Bacterial Metabolism, 2nd Edition, Springer-Verlag, New York). 각각의 중심 경로 또는 중심 경로의 조합은 특이적 표적 분자에 관하여 이점 및 단점을 제공한다. 경쟁적 바이오프로세스 (bioprocesses)를 제공하기 위해서, EMP, PPP 및 EDP를 수반하는 변형을 갖는 재조합 미생물이 기술되었다 (M. Emmerling et al., Metab. Eng. 1:117 (1999); L. O. Ingram et al., Appl. Environ. Microbiol. 53: 2420

(1987); C. T. Trinh et al., Appl. Environ. Microbiol. 74:3634 (2008)). 더욱 최근에는, PKP를 수반하는 변형을 갖는 재조합 미생물이 기술되었다 (참조: Sonderegger et al. Appl. Environ. Microbiol. 70 (2004), 2892-2897, 미국 특허 제7,253,001호, Chinen et al. J. Biosci. Bioeng. 103 (2007), 262-269, 미국 특허 제7,785,858호; Fleige et al., Appl. Microbiol. Cell Physiol. 91 (2011), 769-776).

[0003] EMPP는 1 mol의 글루코스를 2 mol의 피루베이트 (PYR)로 전환시킨다. 아세틸-CoA를 원하는 경우에는, 1 mol의 PYR를 1 mol의 CO₂ 및 1 mol의 NADH의 동반 생성과 함께 1 mol의 아세틸-CoA로 전환시킬 수 있다. 전체적인 반응은 식 1로 제시된다.

[0004] (식 1)

[0005] $\text{글루코스} + 2 \text{ ADP} + 2 \text{ H}_3\text{PO}_4 + 2 \text{ CoA} + 4 \text{ NAD}^+ \rightarrow$

[0006] $2\text{-아세틸-CoA} + 2 \text{ CO}_2 + 2 \text{ ATP} + 2 \text{ H}_2\text{O} + 4 \text{ NADH} + 4 \text{ H}^+$

[0007] PPP는 1 mol의 글루코스를 0.67 mol의 프럭토스-6-포스페이트 (F6P) 및 0.33 mol의 글리세르알데히드-3-포스페이트 (GAP)를 동반 생성하면서 1 mol의 CO₂ 및 2 mol의 NADPH로 전환시키는 수단을 제공한다. 이에 따라 형성된 F6P 및 GAP는 다른 반응 경로에 의해서, 예를 들어, EMPP에 의해서 반드시 대사되어야 한다. EDP는 1 mol의 글루코스를 1 mol의 NADPH를 동반 생성하면서 1 mol의 GAP 및 1 mol의 PYR로 전환시킨다. PPP의 경우와 마찬가지로, 이렇게 형성된 GAP는 다른 반응 경로에 의해서 반드시 대사되어야 한다. PKP는 1 mol의 글루코스를 1 mol의 GAP 및 1.5 mol의 아세틸 포스페이트 (AcP)로 전환시키는 수단을 제공한다. 아세틸-CoA를 원하는 경우에는, 1 당량의 AcP와 1 당량의 조효소 A (CoA)를 포스포트랜스아세틸라제의 작용에 의해서 1 당량의 아세틸-CoA 및 1 당량의 무기 포스페이트 (Pi)로 전환시킬 수 있다.

[0008] AcCoA 부위에 대한 PKK 및 거의 산화환원 중성을 통해서 생성된 AcCoA로부터 유래된 특이적 표적 분자에 대해서는 전반적인 에너지 균형의 결핍이 존재한다. PKP (및 유사하게는 PPP 및 EDP)는 글루코스를 글루코스-6-포스페이트로 전환시키는 경우에 ATP를 생성시키지 않는다. 포스포에놀피루베이트 (PEP)-의존성 글루코스 흡수의 경우에, PEP는 반드시 다른 수단에 의해서, 예를 들어, EMPP를 통해서 생성되어야 한다. GAP를 PKP를 통해서 재순환시키는 것은, 특히 생물물 특이적 경로가 ATP를 거의 제공하지 않는 경우에 문제를 악화시킨다.

[0009] Sonderegger (loc. cit.) 및 미국 특허 제7,253,001호는 글루코스/크실로즈 혼합물의 에탄올로의 전환 수율을 증가시키기 위한, 과발현된 포스포트랜스아세틸라제와 함께 천연 또는 과발현된 포스포케톨라제 활성을 포함하는 재조합 사카로마이세스 세레비지에 (*Saccharomyces cerevisiae*) 스트레인을 기술하고 있다. 이들 스트레인은 EMPP 및 PPP 작동성 둘 다와 함께 PEP-독립적 글루코스 흡수를 특징으로 한다.

[0010] Chinen (loc. cit.) 및 미국 특허 제7,785,858호는 글루코스를 L-글루탐산, L-글루타민, L-프롤린, L-아르기닌, L-류신, L-시스테인, 석시네이트 및 폴리하이드록시부티레이트로 구성된 그룹을 포함한 중간체 아세틸-CoA를 통해서 생산된 표적 분자로 전환시키기 위한 증가된 포스포케톨라제 활성을 포함하는 엔테로박테리아세 (*Enterobacteriaceae*) 과, 코리네포름 박테리움 (*Coryneform bacterium*) 및 바실루스 박테리움 (*Bacillus bacterium*)으로 구성된 그룹으로부터 선택된 재조합 박테리아를 기술하였다. 이들 스트레인은 EMPP 작동성과 함께 PEP-의존성 글루코스 흡수를 특징으로 한다. 특히, 미국 특허 제7,785,858호의 박테리아에서 포스포프럭토키나제의 활성은 야생형 또는 비-변형 스트레인의 경우와 비교하여 감소된다 (참조 33면).

[0011] 특정한 미생물이 PEP-독립적 글루코스 흡수 또는 PEP-의존성 글루코스 흡수를 이용하는지 여부는 방법의 전반적인 에너지 균형에 영향을 미친다. 예를 들어, 에스. 세레비지에 (*S. cerevisiae*) 스트레인은 천연적으로 PEP-독립적 글루코스 흡수를 이용하는 반면에 에스케리키아 콜라이 (*Escherichia coli*) 스트레인은 천연적으로 PEP-의존성 글루코스 흡수를 이용한다. PEP-의존성 글루코스 흡수가 PEP-독립적 글루코스 흡수로 대체된 이. 콜라이 스트레인이 기술되었다 (Flores et al., Metabolic Engineering (2005) 7, 70-87; 및 미국 특허 제7,371,558호). 특히, 미국 특허 제7,371,558호는 글루코스의 1,3-프로판디올로의 전환 수율을 증가시키는 글루코스 흡수 변형을 기술하고 있다. 이들 스트레인은 EMPP 및 PPP 작동성 둘 다를 가지며, 특히 포스포케톨라제 활성이 존재하지 않는, PEP-독립적 글루코스 흡수를 특징으로 한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 효소 반응의 산화환원 및 에너지 제약을 최상으로 수용함으로써 공급원료의 생성물로의 전환을 최대화시키는 중심 탄소 및 생성물 특이적 경로를 포함하는 재조합 미생물을 개발하는 것이 필요하다. 본 발명자들은 특허청구 범위에 정의된 바와 같은 구체예를 제공함으로써 이러한 필요성을 다루었다.

과제의 해결 수단

[0013] 따라서, 본 발명은

[0014] a) 포스포케톨라제 활성을 가지며;

[0015] b) (i) 포스포프럭토키나제를 인코딩하는 유전자(들)의 불활성화에 의해서, 또는 비-변형 미생물과 비교하여 포스포프럭토키나제 활성을 감소시킴으로써, 감소되거나 불활성화된 엠텐-마이어호프-파나스 경로 (EMPP)를 갖거나;

[0016] (ii) 포스포프럭토키나제 활성을 갖지 않으며;

[0017] c) (i) 글루코즈-6-포스페이트 데하이드로게나제를 인코딩하는 유전자(들)의 불활성화에 의해서, 또는 비-변형 미생물과 비교하여 글루코즈-6-포스페이트 데하이드로게나제 활성을 감소시킴으로써, 펜토즈 포스페이트 경로 (PPP)의 감소되거나 불활성화된 산화적 브랜치를 갖거나;

[0018] (ii) 글루코즈-6-포스페이트 데하이드로게나제 활성을 갖지 않는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물에 관한 것이다.

[0019] 본 발명에 따르는 미생물은 생산된 아세틸-CoA의 유동을 증가시키기 위해서 포스포케톨라제 활성을 갖는 것을 특징으로 한다. 통상적으로, 미생물은 엠텐-마이어호프-파나스 경로를 통해서 글루코즈를 피루베이트로 전환시키며, 그 다음에 피루베이트는 효소 피루베이트 데하이드로게나제에 의해서 아세틸-CoA로 전환될 수 있다. 그러나, 이러한 전환은 CO₂의 방출을 동반하며, 따라서 유용한 대사산물의 생산에 사용될 수 있는 하나의 탄소 원자를 상실한다. 따라서, 미생물에서 아세틸-CoA의 양을 증가시키기 위해서는 아세틸-CoA가 탄소 원자의 상실을 회피하도록 상이한 경로를 통해서 형성되는 것이 바람직하다. 포스포케톨라제 활성을 갖는 미생물을 사용함으로써, 포스페이트 및 프럭토스-6-포스페이트는 에리트로즈-4-포스페이트 및 아세틸포스페이트로 전환되며, 포스포트랜스아세틸라제는 아세틸포스페이트를 탄소 원자의 상실이 없이 아세틸-CoA로 더 전환시킨다. 따라서, 결국 아세틸-CoA의 수율은 포스포케톨라제 활성을 갖는 미생물을 사용함으로써 증가될 수 있다. 이러한 미생물은 탄소 원자의 상실이 없이 글루코즈를 아세틸-CoA로 전환시킬 수 있다. 포스포케톨라제가 천연적으로 또는 이종 기원으로 발현된 재조합 미생물은 US 7,785,858 및 US 7,253,001에 개시되어 있다.

[0020] 본 발명에서 사용된 것으로서, 용어 "포스포케톨라제 활성"은 다음의 반응에 따라 D-크실룰로즈-5-포스페이트를 D-글리세르알데히드-3-포스페이트로 전환시킬 수 있거나:

[0021] D-크실룰로즈-5-포스페이트 + 포스페이트 → D-글리세르알데히드-3-포스페이트 + 아세틸-포스페이트 + 물

[0022] 상기 나타낸 반응을 촉진시킬 수 있고, 또한 다음의 반응에 따라 D-프럭토스-6-포스페이트를 D-에리트로즈-4-포스페이트로 전환시킬 수 있는 효소 활성을 의미한다:

[0023] D-프럭토스 6-포스페이트 + 포스페이트 → 아세틸 포스페이트 + D-에리트로즈 4-포스페이트 + 물

[0024] 전자의 포스포케톨라제는 통상적으로 EC 4.1.2.9로 분류되고, 후자는 EC 4.1.2.22로 분류된다. 포스포케톨라제의 두 가지 타입은 모두 본 발명의 범위에서 사용될 수 있다. 도 1은 본 발명에 기술된 바와 같은 포스포케톨라제의 두 가지 옵션을 사용한 전체 반응에 대한 반응식을 나타낸다.

[0025] 이 효소 활성은 본 기술분야에서 공지된 시험방법에 의해서 측정될 수 있다. 이러한 시험방법에 대한 예는 이하의 실시예 항목에 제시된다.

[0026] 본 발명과 관련하여, 포스포케톨라제 활성을 갖는 미생물은 예를 들어, 천연적으로 포스포케톨라제 활성을 갖는 미생물, 또는 천연적으로는 포스포케톨라제 활성을 갖지 않으며, 포스포케톨라제를 발현하도록 유전자 변형된 미생물, 또는 천연적으로 포스포케톨라제 활성을 가지며 유전적으로 변형된, 예를 들어, 상기의 미생물에서 포스포케톨라제 활성을 증가시키기 위해서 포스포케톨라제를 인코딩하는 핵산, 예를 들어, 벡터에 의해서 형질전환된 미생물일 수 있다.

- [0027] 본질적으로, 즉 천연적으로 포스포케톨라제 활성을 갖는 미생물은 본 기술분야에서 공지되어 있으며, 이들 중 임의의 것은 본 발명과 관련하여 사용될 수 있다.
- [0028] 또한, 본 발명과 관련하여 미생물은 천연적으로는 포스포케톨라제 활성을 갖지 않지만 포스포케톨라제의 발현을 허용하는 뉴클레오타이드 서열을 함유하도록 유전자 변형된 미생물일 수도 있다. 유사하게, 미생물은 또한, 천연적으로 포스포케톨라제 활성을 갖지만, 예를 들어, 포스포케톨라제를 인코딩하는 외인성 뉴클레오타이드 서열을 도입시킴으로써, 포스포케톨라제 활성을 증진시키도록 유전자 변형된 미생물일 수도 있다.
- [0029] 관심이 있는 효소를 발현시키기 위한 미생물의 유전적 변형은 이하에 상세히 기술될 것이다.
- [0030] 본 발명에 따라 미생물에서 발현된 포스포케톨라제는 임의의 포스포케톨라제라가 될 수 있으며, 특히 원핵성 또는 진핵성 유기체로부터의 포스포케톨라제일 수 있다. 원핵성 포스포케톨라제는 예를 들어, 락토코커스 락티스 (*Lactococcus lactis*)로부터 기술되었으며, 예는 실시예 항목에 제시된다.
- [0031] 본 발명의 바람직한 구체예에서, 포스포케톨라제는 실시예 항목에 나타난 SQ0005에 의해서 인코딩된 아미노산 서열, 또는 상기 아미노산 서열에 대해서 적어도 n% 동일하며, 포스포케톨라제의 활성을 갖는 서열을 포함하는 효소이며, 여기에서 n은 10 내지 100 사이의 정수, 바람직하게는 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99이다.
- [0032] 바람직하게는, 동일성의 정도는 각각의 서열을 상기 언급된 서열번호 중의 어느 하나의 아미노산 서열과 비교함으로써 결정된다. 비교되는 서열이 동일한 길이를 갖지 않는 경우에, 동일성의 정도는 바람직하게는 더 긴 서열 내의 아미노산 잔기와 동일한 더 짧은 서열 내의 아미노산 잔기의 백분율, 또는 더 짧은 서열 내의 아미노산 잔기와 동일한 더 긴 서열 내의 아미노산 잔기의 백분율을 나타낸다. 서열 동일성의 정도는 바람직하게는 클러스탈 (CLUSTAL)과 같은 적합한 컴퓨터 알고리즘을 사용하여 본 기술분야에서 잘 알려진 방법에 따라 결정될 수 있다.
- [0033] 클러스탈 분석방법을 사용하여 특정의 서열이 예를 들어, 기준 서열에 대해서 80% 동일한지 여부를 결정하는 경우에는, 디폴트 셋팅 (default settings)이 사용될 수 있거나, 셋팅은 바람직하게는 다음과 같다: 매트릭스: 블로섬 (blosum) 30; 오픈 갭 페널티 (Open gap penalty): 10.0; 익스텐드 갭 페널티 (Extend gap penalty): 0.05; 딜레이 디버전트 (Delay divergent): 40; 갭 분리 간격 (Gap separation distance): 아미노산 서열의 비교를 위해서 8. 뉴클레오타이드 서열 비교의 경우에, 익스텐드 갭 페널티는 바람직하게는 5.0으로 설정된다.
- [0034] 바람직하게는, 동일성의 정도는 서열의 완전한 길이에 걸쳐서 계산된다.
- [0035] 본 발명에 따르는 미생물에서 발현된 포스포케톨라제는 천연적으로 존재하는 포스포케톨라제일 수 있거나, 이것은 천연적으로 존재하는 포스포케톨라제로부터, 예를 들어, 돌연변이, 또는 예를 들어, 효소 활성, 안정성 등을 변화시키거나 개선시키는 다른 변화를 도입시킴으로써 유래된 포스포케톨라제일 수 있다.
- [0036] 단백질의 원하는 효소 활성을 변형시키고/시키거나 개선시키는 방법은 본 기술분야에서 숙련된 전문가에게 잘 알려져 있으며, 예를 들어, 무작위 돌연변이유발 또는 부위-지시된 돌연변이유발, 및 이어서 소위 "유도 진화 (directed evolution)"의 바람직한 특성 또는 접근방법을 갖는 효소의 선택을 포함한다.
- [0037] 예를 들어, 원핵 세포에서의 유전적 변형의 경우에는, 포스포케톨라제를 인코딩하는 핵산 분자를 DNA 서열의 재조합에 의해서 돌연변이유발 또는 서열 변형을 허용하는 플라스미드 내로 도입시킬 수 있다. 표준 방법 (참조: Sambrook and Russell (2001), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, CSH Press, Cold Spring Harbor, NY, USA)은 염기 변화가 수행되도록 하거나, 천연 또는 합성 서열이 부가되도록 한다. DNA 단편을 단편에 대해서 상호적인 어댑터 (adapters) 및 링커 (linkers)를 사용함으로써 결합시킬 수 있다. 더욱이, 적합한 제한 부위를 제공하거나, 과잉 DNA 또는 제한 부위를 제거하는 엔지니어링 수단이 사용될 수 있다. 삽입, 결실 또는 치환이 가능한 이들 경우에는, 시험관내 돌연변이유발, "프라이머 복구", 제한 또는 결합 (ligation)이 사용될 수 있다. 일반적으로, 서열 분석, 제한 분석 및 그 밖의 다른 생화학 및 분자 생물학의 방법이 분석 방법으로 수행된다. 그 후, 생성된 포스포케톨라제 변이체는 상술한 시험방법에 의해서 바람직한 활성, 예를 들어, 효소 활성에 대해, 특히 그들의 증가된 효소 활성에 대해서 시험한다.
- [0038] 상술한 바와 같이, 본 발명의 미생물은 포스포케톨라제를 인코딩하는 핵산 분자의 도입에 의해서 유전적으로 변형된 미생물이 수 있다. 따라서, 바람직한 구체예에서, 재조합 미생물은 증가된 포스포케톨라제 활성을 갖도록 유전자 변형된 재조합 미생물이다. 이것은 예를 들어, 미생물을 포스포케톨라제를 인코딩하는 핵산으로 형질전환시킴으로써 달성될 수 있다. 미생물의 유전적 변형의 상세한 설명은 이하에 더 제시될 것이다. 바람직하게는,

미생물 내에 도입된 핵산 분자는 미생물에 대해서 이중인 핵산 분자이며, 즉 이것은 상기 미생물 내에 천연적으로 존재하지 않는다.

[0039] 본 발명과 관련하여, "증가된 활성"은 효소, 특히 유전자 변형된 미생물 내의 포스포케톨라제의 발현 및/또는 활성이 상응하는 비-변형 미생물 내에서보다 적어도 10%, 바람직하게는 적어도 20%, 더욱 바람직하게는 적어도 30% 또는 50%, 더 더욱 바람직하게는 적어도 70% 또는 80%, 특히 바람직하게는 적어도 90% 또는 100% 더 큰 것을 의미한다. 더 더욱 바람직한 구체예에서, 발현 및/또는 활성에 있어서의 증가는 적어도 150%, 적어도 200%, 또는 적어도 500%일 수 있다. 특히 바람직한 구체예에서, 발현은 상응하는 비-변형 미생물에서보다 적어도 10-배, 더욱 바람직하게는 적어도 100-배, 더 더욱 바람직하게는 적어도 1000-배 더 크다. 용어 "증가된" 발현/활성은 또한, 상응하는 비-변형 미생물이 상응하는 효소, 예를 들어, 포스포케톨라제를 발현하지 않아 비-변형 미생물에서 상응하는 발현/활성이 제로 (zero)인 상황을 포함한다.

[0040] 세포에서 소정의 단백질의 발현 수준을 측정하는 방법은 본 기술분야에서 숙련된 전문가에게 잘 알려져 있다. 한가지 구체예에서, 발현 수준의 측정은 상응하는 단백질의 양을 측정함으로써 수행된다. 상응하는 방법은 본 기술분야에서 숙련된 전문가에게 잘 알려져 있으며, 웨스턴 블롯 (Western Blot), ELISA 등을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 발현 수준의 측정은 상응하는 RNA의 양을 측정함으로써 수행된다. 상응하는 방법은 본 기술분야에서 숙련된 전문가에게 잘 알려져 있으며, 예를 들어, 노던 블롯 (Northern Blot)을 포함한다.

[0041] 포스포케톨라제의 효소 활성을 측정하는 방법은 본 기술분야에서 공지되어 있으며, 이미 상기에 설명하였다.

[0042] 본 발명에 따르는 미생물은 추가로, 포스포프럭토키나제를 인코딩하는 유전자(들)의 불활성화에 의해서, 또는 비-변형 미생물과 비교하여 포스포프럭토키나제 활성을 감소시킴으로써, 감소되거나 불활성화된 엠텐-마이어호프-파나스 경로 (EMPP)를 갖거나, 포스포프럭토키나제 활성을 갖지 않는 것을 더 특징으로 한다. 따라서, 미생물은 천연적으로는 포스포프럭토키나제 활성을 포함하는 EMPP를 갖지만, 포스포프럭토키나제 활성이 완전히 폐기되거나, 상응하는 비-변형 미생물에 비해 감소되도록 변형, 특히 유전자 변형된 미생물이거나, 또는 미생물은 천연적으로 포스포프럭토키나제 활성을 갖지 않는 미생물이다.

[0043] 상기에서 이미 언급한 바와 같이, 글루코스가 EMPP를 통해서 아세틸-CoA로 처리되는 경우에, 한 개의 탄소 원자가 최종 단계에서 CO₂의 방출에 의해서 상실된다. 포스포케톨라제를 도입시킴으로써 이러한 상실은 방지될 수 있다. 프럭토스-6-포스페이트는 포스포케톨라제에 대한 기질이기 때문에, 프럭토스-6-포스페이트의 풀 (pool)은 아세틸-CoA의 수율을 증가시키기 위해 미생물 내에서 높은 수준으로 유지시키는 것이 바람직하다. 프럭토스-6-포스페이트는 또한 엠텐-마이어호프-파나스 경로의 효소, 즉 포스포프럭토키나제에 대한 기질이기 때문에, 본 발명의 재조합 미생물은 비-변형 미생물에 비해서 감소된 포스포프럭토키나제 활성을 갖거나, 포스포프럭토키나제를 인코딩하는 유전자(들)은 불활성화된다. 이것은 프럭토스-6-포스페이트의 유동을 포스포케톨라제 쪽으로, 및 CO₂의 상실이 없는 아세틸-CoA의 생산 쪽으로 지시하는 것을 보장하는데, 이는 프럭토스-6-포스페이트 또는 대부분의 프럭토스-6-포스페이트가 엠텐-마이어호프-파나스 경로를 통해서 더 이상 처리될 수 없기 때문이다. 포스포케톨라제가 천연적으로 또는 이중 기원으로 발현되고, 감소된 포스포프럭토키나제 활성을 갖는 재조합 미생물은 US 7,785,858에 개시되어 있다.

[0044] "포스포프럭토키나제 활성"은 ATP 및 프럭토스-6-포스페이트를 ADP 및 프럭토스-1,6-비스포스페이트로 전환시키는 효소 활성을 의미한다 (EC 2.7.1.11). 이 효소 활성을 본 기술분야에서 공지된, 예를 들어, 문헌 (Kotlarz et al., Methods Enzymol. (1982) 90, 60-70)에 기술된 시험방법에 의해서 측정될 수 있다.

[0045] 용어 "포스포프럭토키나제를 인코딩하는 유전자(들)의 불활성화에 의해서, 또는 비-변형 미생물과 비교하여 포스포프럭토키나제 활성을 감소시킴으로써, 감소되거나 불활성화된 엠텐-마이어호프-파나스 경로 (EMPP)를 갖는 것을 특징으로 하는 미생물"은 바람직하게는, 포스포프럭토키나제를 인코딩하는 유전자(들)의 불활성화 또는 비-변형 미생물과 비교하여 포스포프럭토키나제 활성의 감소가 상기의 불활성화 또는 감소를 유도하는 미생물의 유전적 변형에 의해서 달성된 미생물을 나타낸다.

[0046] 바람직한 구체예에서, 본 발명의 재조합 미생물은 포스포프럭토키나제를 인코딩하는 유전자(들)의 불활성화에 의해서 불활성화된 엠텐-마이어호프-파나스 경로 (EMPP)를 갖는 재조합 미생물이다. 본 발명과 관련하여 포스포프럭토키나제를 인코딩하는 유전자(들)의 불활성화는 미생물 내에 존재하는 포스포프럭토키나제를 인코딩하는 유전자(들)가 불활성화되어 이들이 더 이상 발현되지 않고/않거나 기능적 포스포프럭토키나제의 합성을 유도하지 않도록 된 것을 의미한다. 불활성화는 본 기술분야에서 공지된 다수의 상이한 방법에 의해서 달성될 수 있다. 불활성화는 예를 들어, 포스포프럭토키나제를 인코딩하는 유전자(들)의 파괴에 의해서, 또는 선택 마커의

도입을 통한 상기 유전자(들)의 깨끗한 결실에 의해서 달성될 수 있다. 대안적으로, 포스포프럭토키나제를 인코딩하는 유전자(들)의 프로모터는 유전자가 더 이상 mRNA로 전사되지 않는 방법으로 돌연변이될 수 있다. 본 기술분야에서 공지된 포스포프럭토키나제를 인코딩하는 유전자(들)를 불활성화시키는 그 밖의 다른 방법은 mRNA가 더 이상 단백질로 해독될 수 없도록 포스포프럭토키나제 유전자(들)의 전사물에 대해서 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 갖는 RNA를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 발현시키거나; RNAi 효과를 통해서 상기 유전자(들)의 발현을 억제하는 RNA를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 발현시키거나; 상기 유전자(들)의 전사물을 특이적으로 분해시키는 활성을 갖는 RNA를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 발현시키거나; 공동-억제 효과를 통해서 상기 유전자(들)의 발현을 억제하는 RNA를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 발현시키는 것이다. 이들 폴리뉴클레오타이드를 벡터 내에 혼입시킬 수 있으며, 이 벡터를 형질전환에 의해 미생물 내로 도입시켜 포스포프럭토키나제를 인코딩하는 유전자(들)의 불활성화를 달성할 수 있다.

[0047] 본 발명과 관련하여 용어 "불활성화"는 바람직하게는 완전한 불활성화를 의미하며, 즉 미생물이 포스포프럭토키나제 활성을 나타내지 않는 것을 의미한다. 이것은 특히, 미생물이 사용된 성장 조건과는 독립적으로 포스포프럭토키나제 활성을 나타내지 않는 것을 의미한다. 바람직하게는, "불활성화"는 미생물에 존재하는 포스포프럭토키나제를 인코딩하는 유전자(들)를 효소의 발현을 방지하도록 유전적으로 변형시키는 것을 의미한다. 이것은 예를 들어, 유전자 또는 그의 일부분 (여기에서, 그의 일부분의 결실은 효소의 발현을 방지한다)의 결실에 의해서, 또는 코딩 지역 내의 또는 프로모터 지역 내의 유전자의 파괴 (여기에서, 이러한 파괴는 단백질이 발현되지 않거나, 기능부전 단백질이 발현되는 효과를 갖는다)에 의해서 달성될 수 있다.

[0048] 바람직한 구체예에서, 본 발명의 재조합 미생물은 비-변형 미생물과 비교하여 포스포프럭토키나제 활성을 감소시킴으로써, 감소된 엠텐-마이어호프-파나스 경로 (EMPP)를 갖는 재조합 미생물이다. 바람직하게는, 이러한 감소는 미생물의 유전적 변형에 의해서 달성된다. 이것은 예를 들어, 프로모터 및/또는 효소의 무작위 돌연변이 유발 또는 부위-지시된 돌연변이 유발, 및 이어서 바람직한 특성을 갖거나 상술한 바와 같은 상보적 뉴클레오타이드 서열 또는 RNAi 효과에 의해서 프로모터 및/또는 효소를 선택함으로써 달성될 수 있다. 미생물의 유전적 변형의 상세한 설명은 이하에 더 제시될 것이다.

[0049] 본 발명과 관련하여 "감소된 활성"은 유전자 변형된 미생물에서 효소, 특히 포스포프럭토키나제의 발현 및/또는 활성이 상응하는 비-변형 미생물에서보다 적어도 10%, 바람직하게는 적어도 20%, 더욱 바람직하게는 적어도 30% 또는 50%, 더 더욱 바람직하게는 적어도 70% 또는 80%, 특히 바람직하게는 적어도 90% 또는 100% 더 낮은 것을 의미한다. 세포 내에서 소정의 단백질의 발현 수준을 측정하는 방법은 본 기술분야에서 숙련된 전문가에게 잘 알려져 있다. 포스포프럭토키나제의 감소된 효소 활성을 측정하는 시험방법은 본 기술분야에서 공지되어 있다.

[0050] 또 다른 구체예에서, 본 발명에 따르는 미생물은 포스포프럭토키나제 활성을 갖지 않는 미생물이다. 이것은 바람직하게는, 이러한 미생물이 천연적으로 포스포프럭토키나제 활성을 갖지 않는 것을 의미한다. 이것은 이러한 미생물이 천연적으로 그의 게놈 내에 포스포프럭토키나제 활성을 갖는 효소를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 함유하지 않는 것을 의미한다. 이러한 미생물에 대한 예는 자이모모나스 모빌리스 (*Zymomonas mobilis*) (J. S. Suo et al., Nat. Biotechnol. 23:63 (2005)) 및 랄스토니아 유티로파 (*Ralstonia eutropha*) (C. Fleige et al., Appl. Microb. Cell Physiol. 91:769 (2011))이다.

[0051] 본 발명에 따르는 미생물은 추가로, 글루코즈-6-포스페이트 데하이드로게나제를 인코딩하는 유전자(들)의 불활성화에 의해서, 또는 비-변형 미생물과 비교하여 글루코즈-6-포스페이트 데하이드로게나제 활성을 감소시킴으로써 펜토즈 포스페이트 경로 (PPP)의 감소되거나 불활성화된 산화적 브랜치를 갖거나, 글루코즈-6-포스페이트 데하이드로게나제 활성을 갖지 않는 것을 특징으로 한다. 따라서, 미생물은 천연적으로는 글루코즈-6-포스페이트 데하이드로게나제 활성을 포함한 PPP를 갖지만 글루코즈-6-포스페이트 데하이드로게나제 활성이 완전히 폐지되도록, 또는 이것이 상응하는 비-변형 미생물에 비해서 감소되도록 변형, 특히 유전자 변형된 미생물이거나, 또는 미생물은 천연적으로 글루코즈-6-포스페이트 데하이드로게나제 활성을 갖지 않는 미생물이다.

[0052] 펜토즈 포스페이트 경로의 산화적 브랜치를 감소 또는 불활성화시키는 것은 아세틸-CoA의 수율을 더 증가시키는 데, 이는 글루코즈-6-포스페이트가 펜토즈 포스페이트 사이클을 통해서 더 이상 유도되지 않을 것이기 때문이다. 미생물 내의 모든, 또는 거의 모든 글루코즈-6-포스페이트는 프럭토스-6-포스페이트로 전환된 다음에 아세틸-CoA로 더 전환될 것이다.

[0053] "글루코즈-6-포스페이트 데하이드로게나제 활성"은 글루코즈-6-포스페이트 및 $NADP^+$ 를 6-포스포글루코노- δ -락톤 및 $NADPH$ 로 전환시키는 효소 활성을 의미한다 (EC 1.1.1.49). 이 효소 활성은 예를 들어, 문헌 (Noltmann et al., J. Biol. Chem. (1961) 236, 1225-1230)에 기술된 바와 같이 본 기술분야에서 공지된 시험방법에 의해

서 측정될 수 있다.

- [0054] 용어 "글루코즈-6-포스페이트 데하이드로게나제를 인코딩하는 유전자(들)의 불활성화에 의해서, 또는 비-변형 미생물과 비교하여 글루코즈-6-포스페이트 데하이드로게나제 활성을 감소시킴으로써, 펜토즈 포스페이트 경로 (PPP)의 감소되거나 불활성화된 산화적 브랜치를 갖는 것을 특징으로 하는 미생물"은 바람직하게는 글루코즈-6-포스페이트 데하이드로게나제를 인코딩하는 유전자(들)의 불활성화, 또는 비-변형 미생물과 비교하여 글루코즈-6-포스페이트 데하이드로게나제 활성의 감소가 상기의 불활성화 또는 감소를 유도하는 미생물의 유전적 변형에 의해서 달성되는 미생물을 나타낸다.
- [0055] 바람직한 구체예에서, 본 발명의 재조합 미생물은 글루코즈-6-포스페이트 데하이드로게나제를 인코딩하는 유전자(들)의 불활성화에 의해서 펜토즈 포스페이트 경로 (PPP)의 불활성화된 산화적 브랜치를 갖는 재조합 미생물이다. 본 발명과 관련하여 글루코즈-6-포스페이트 데하이드로게나제를 인코딩하는 유전자(들)의 불활성화는 미생물 내에 존재하는 글루코즈-6-포스페이트 데하이드로게나제를 인코딩하는 유전자(들)가 불활성화되어 이들이 더 이상 발현되지 않고/않거나 기능적 글루코즈-6-포스페이트 데하이드로게나제의 합성을 유도하지 않도록 된 것을 의미한다. 불활성화는 본 기술분야에서 공지된 다수의 상이한 방법에 의해서 달성될 수 있다. 불활성화는 예를 들어, 글루코즈-6-포스페이트 데하이드로게나제를 인코딩하는 유전자(들)의 파괴에 의해서, 또는 선택 마커의 도입을 통한 상기 유전자(들)의 깨끗한 결실에 의해서 달성될 수 있다. 대안적으로, 글루코즈-6-포스페이트 데하이드로게나제를 인코딩하는 유전자(들)의 프로모터는 유전자(들)가 더 이상 mRNA로 전사되지 않는 방법으로 돌연변이될 수 있다. 본 기술분야에서 공지된 포스포프럭토키나제를 인코딩하는 유전자(들)를 불활성화시키는 그 밖의 다른 방법은 mRNA가 더 이상 단백질로 해독될 수 없도록 글루코즈-6-포스페이트 데하이드로게나제 유전자(들)의 전사물에 대해서 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 갖는 RNA를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 발현시키거나; RNAi 효과를 통해서 상기 유전자(들)의 발현을 억제하는 RNA를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 발현시키거나; 상기 유전자(들)의 전사물을 특이적으로 분해시키는 활성을 갖는 RNA를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 발현시키거나; 공동-억제 효과를 통해서 상기 유전자(들)의 발현을 억제하는 RNA를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 발현시키는 것이다. 이들 폴리뉴클레오타이드를 벡터 내에 혼입시킬 수 있으며, 이 벡터를 형질 전환에 의해 미생물 내로 도입시켜 글루코즈-6-포스페이트 데하이드로게나제를 인코딩하는 유전자(들)의 불활성화를 달성할 수 있다.
- [0056] 본 발명과 관련하여 용어 "불활성화"는 바람직하게는 완전한 불활성화를 의미하며, 즉 미생물이 글루코즈-6-포스페이트 데하이드로게나제 활성을 나타내지 않는 것을 의미한다. 이것은 특히, 미생물이 사용된 성장 조건과는 독립적으로 글루코즈-6-포스페이트 데하이드로게나제 활성을 나타내지 않는 것을 의미한다.
- [0057] 바람직하게는, "불활성화"는 미생물에 존재하는 글루코즈-6-포스페이트 데하이드로게나제를 인코딩하는 유전자(들)를 효소의 발현을 방지하도록 유전적으로 변형시키는 것을 의미한다. 이것은 예를 들어, 유전자 또는 그의 일부분 (여기에서, 그의 일부분의 결실은 효소의 발현을 방지한다)의 결실에 의해서, 또는 코딩 지역 내의 또는 프로모터 지역 내의 유전자의 파괴 (여기에서, 이러한 파괴는 단백질이 발현되지 않거나, 기능부전 단백질이 발현되는 효과를 갖는다)에 의해서 달성될 수 있다.
- [0058] 바람직한 구체예에서, 본 발명의 재조합 미생물은 비-변형 미생물과 비교하여 글루코즈-6-포스페이트 데하이드로게나제 활성을 감소시킴으로써, 펜토즈 포스페이트 경로 (PPP)의 감소된 산화적 브랜치를 갖는 재조합 미생물이다. 바람직하게는, 이러한 감소는 미생물의 유전적 변형에 의해서 달성된다. 이것은 예를 들어, 프로모터 및/또는 효소의 무작위 돌연변이유발 또는 부위-지시된 돌연변이유발, 및 이어서 바람직한 특성을 갖거나 상술한 바와 같은 상보적 뉴클레오타이드 서열 또는 RNAi 효과에 의해서 프로모터 및/또는 효소를 선택함으로써 달성될 수 있다. 미생물의 유전적 변형의 상세한 설명은 이하에 더 제시될 것이다.
- [0059] 본 발명과 관련하여 "감소된 활성"은 유전자 변형된 미생물에서 효소, 특히 글루코즈-6-포스페이트 데하이드로게나제의 발현 및/또는 활성이 상응하는 비-변형 미생물에서보다 적어도 10%, 바람직하게는 적어도 20%, 더욱 바람직하게는 적어도 30% 또는 50%, 더 더욱 바람직하게는 적어도 70% 또는 80%, 특히 바람직하게는 적어도 90% 또는 100% 더 낮은 것을 의미한다. 세포 내에서 소정의 단백질의 발현 수준을 측정하는 방법은 본 기술분야에서 숙련된 전문가에게 잘 알려져 있다. 글루코즈-6-포스페이트 데하이드로게나제의 감소된 효소 활성을 측정하는 시험방법은 본 기술분야에서 공지되어 있다.
- [0060] 또 다른 구체예에서, 본 발명에 따르는 미생물은 글루코즈-6-포스페이트 데하이드로게나제 활성을 갖지 않는 미생물이다. 이것은 바람직하게는, 이러한 미생물이 천연적으로 글루코즈-6-포스페이트 데하이드로게나제 활성을 갖지 않는 것을 의미한다. 이것은 이러한 미생물이 천연적으로 그의 게놈 내에 글루코즈-6-포스페이트 데하이드

로게나제 활성을 갖는 효소를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 함유하지 않는 것을 의미한다. 이러한 미생물의 예는 아시네토박터 베일리이 (*Acinetobacter baylyi*) (Barbe et al., Nucl. Acids Res. 32 (2004), 5766-5779), 초고온생물 문 (hyperthermophilic phylum)의 고세균류 (archae), 예를 들어, 설향로부스 솔파타리쿠스 (*Sulfolobus solfataricus*) (Nunn et al., J. Biol. Chem. 285 (2010), 33701-33709), 더모프로테우스 테낙스 (*Thermoproteus tenax*), 더모플라즈마 에시도필름 (*Thermoplasma acidophilum*) 및 피크로필루스 토리두스 (*Picrophilus torridus*) (Reher and Schonheit, FEBS Lett. 580 (2006), 1198-1204)이다.

[0061] 추가의 구체예에서, 본 발명에 따르는 미생물은 추가로, 바람직하게는 글루코즈 상에서 성장시켰을 때 프럭토스-1,6-비스포스페이트 포스파타제 활성을 갖는 것을 특징으로 한다. 프럭토스-1,6-비스포스페이트 포스파타제는 프럭토스-1,6-비스포스페이트를 프럭토스-6-포스페이트 및 유리 포스페이트로 가수분해시키는 당신생 (gluconeogenesis)에 참여하는 효소이다. 그러나, 기본적으로 글루코즈의 존재 하의 모든 유기체에서는 프럭토스-1,6-비스포스페이트 포스파타제 활성이 억제되고, 글루코즈는 EMPP (해당작용)를 통해서 처리된다. 포스포케톨라제 활성을 갖고, 포스포프럭토키나제 활성을 갖지 않거나 포스포프럭토키나제 활성이 감소되거나, 포스포프럭토키나제를 인코딩하는 그의 유전자가 불활성화된 본 발명의 미생물에서, 포스포케톨라제 (EC 4.1.2.9 또는 EC 4.1.2.22)에 의한 프럭토스-6-포스페이트의 전환에 의한 아세틸-CoA의 수율은 프럭토스-1,6-비스포스페이트 포스파타제 활성의 존재를 보장함으로써, 예를 들어, 글루코즈의 존재 하에서 프럭토스-1,6-비스포스페이트 포스파타제를 억제함으로써 증진될 수 있다. 프럭토스-1,6-비스포스페이트 포스파타제 활성의 존재는 프럭토스-1,6-비스포스페이트 알돌라제에 의해서 생산된 프럭토스-1,6-비스포스페이트의 프럭토스-6-포스페이트로의 재순환을 제공하고, 프럭토스-6-포스페이트는 다음에 포스포케톨라제 경로를 통해서 다시 아세틸-CoA로 전환될 수 있다. 실제로, 포스포케톨라제의 생성물 아세틸 포스페이트는 효소 포스페이트 아세틸트랜스퍼라제 EC 2.3.1.8의 작용을 통해서 아세틸-CoA로 상호전환한다. 따라서, 본 발명의 재조합 미생물은 글루코즈로부터 3:1에 근접하는 화학량론으로 아세틸-CoA를 생산할 수 있다. 전체 반응은 식 2로 제시된다:

[0062] (식 2)

[0063] $\text{글루코즈} + \text{ATP} + 3 \text{ CoA} \rightarrow 3 \text{ 아세틸-CoA} + \text{ADP} + \text{H}_3\text{PO}_4 + 2 \text{ H}_2\text{O}$

[0064] 용어 "프럭토스-1,6-비스포스페이트 포스파타제 활성"은 프럭토스-1,6-비스포스페이트 및 H₂O를 프럭토스-6-포스페이트 및 포스페이트로 전환시키는 효소 활성 (EC 3.1.3.11)을 의미한다. 이 효소 활성은 예를 들어, 문헌 (Hines et al., J. Biol. Chem. (2007) 282, 11696-11704)에 기술된 바와 같이 본 기술분야에서 공지된 시험방법에 의해서 측정될 수 있다. 용어 "프럭토스-1,6-비스포스페이트 포스파타제 활성" 및 "프럭토스-1,6-비스포스페이트 포스파타제"는 또한 이들이 프럭토스-1,6-비스포스페이트 알돌라제/포스파타제 활성을 나타낸다는 개념에서 이작용성인 효소를 포함한다. 이러한 이작용성 효소는 대부분의 고세균 및 크게 분지된 박테리아 계통에서 발견되며, 대부분의 경우에 열-안정성이다. 이러한 효소는 예를 들어, 더모코커스 코다카라엔시스 (*Thermococcus kodakaraensis*), 설향로부스 토크다이 (*Sulfolobus tokodaii*), 이그니코커스 호스피탈리스 (*Ignicoccus hospitalis*), 세나르케움 심비오섬 (*Cenarchaeum symbiosum*), 설향로부스 솔파타리카스 (*Sulfolobus solfataricus*), 더무스 더모필루스 (*Thermus thermophilus*), 더모프로테우스 뉴트로필루스 (*Thermoproteus neutrophilus*), 무렐라 더모아세티카 (*Moorella thermoacetica*) 및 기타 다수에 대해서 보고되었다 (참조: 예를 들어, Say and Fuchs (Nature 464 (2010), 1077); Fushinobu et al. (Nature 478 (2011), 538; Du et al. (Nature 478 (2011), 534).

[0065] 용어 "글루코즈 상에서 성장시켰을 때 프럭토스-1,6-비스포스페이트 포스파타제 활성"은 미생물을 글루코즈 상에서 성장시킬 때 미생물이 프럭토스-1,6-비스포스페이트 포스파타제 활성을 갖는 효소를 발현하는 것을 의미한다. "글루코즈 상에서 성장"은 미생물을 특히 탄소 공급원으로서 글루코즈를 함유하는 배지에서 성장시키는 것을 의미한다. 바람직하게는, 이 용어는 미생물이 유일한 탄소 공급원으로서 글루코즈를 함유하는 배지에서 성장시키는 것을 의미한다.

[0066] 본 발명과 관련하여, 특히 글루코즈 상에서 성장시켰을 때 프럭토스-1,6-비스포스페이트 포스파타제 활성을 갖는 미생물은 예를 들어, 특히 글루코즈 상에서 성장시켰을 때 천연적으로 프럭토스-1,6-비스포스페이트 포스파타제 활성을 갖는 미생물, 또는 특히 글루코즈 상에서 성장시켰을 때 천연적으로는 프럭토스-1,6-비스포스페이트 포스파타제 활성을 갖지 않으며, 특히 글루코즈 상에서 성장시켰을 때 프럭토스-1,6-비스포스페이트 포스파타제를 발현하도록 유전자 변형된 미생물일 수 있다. 이것은 또한, 특히 글루코즈 상에서 성장시켰을 때 천연적으로 프럭토스-1,6-비스포스페이트 포스파타제 활성을 가지며, 상기 미생물에서 포스포케톨라제 활성을 증가시키기 위해서 유전자 변형된, 예를 들어, 프럭토스-1,6-비스포스페이트 포스파타제를 인코딩하는 핵산, 예를 들

어, 벡터에 의해서 형질전환된 미생물일 수도 있다.

- [0067] 특히 글루코즈 상에서 성장시켰을 때 본질적으로, 즉 천연적으로 프럭토즈-1,6-비스포스페이트 포스파타제 활성을 갖는 미생물은 본 기술분야에서 공지되어 있으며, 이들 중 임의의 것을 본 발명과 관련하여 사용될 수 있다.
- [0068] 또한, 본 발명과 관련하여 미생물은 특히 글루코즈 상에서 성장시켰을 때 천연적으로는 프럭토즈-1,6-비스포스페이트 포스파타제 활성을 갖지 않지만, 특히 글루코즈 상에서 성장시켰을 때 프럭토즈-1,6-비스포스페이트 포스파타제를 발현할 수 있도록 유전자 변형된 미생물일 수도 있다. 이것은 예를 들어, 유전자가 미생물을 글루코즈 상에서 성장시킬 때 더 이상 억제되지 않거나, 프로모터가 또 다른 프로모터, 예를 들어, 미생물을 글루코즈 상에서 성장시킬 때에 조절되지 않는 구성적 프로모터에 의해서 대체될 수 있는 방법으로 프럭토즈-1,6-비스포스페이트 포스파타제를 인코딩하는 유전자의 프로모터를 돌연변이시킴으로써 달성될 수 있다.
- [0069] 유사하게, 미생물은 또한, 특히 글루코즈 상에서 성장시켰을 때 천연적으로 프럭토즈-1,6-비스포스페이트 포스파타제 활성을 갖지만, 예를 들어, 프럭토즈-1,6-비스포스페이트 포스파타제를 인코딩하는 외인성 뉴클레오타이드 서열을 도입시킴으로써, 특히 글루코즈 상에서 성장시켰을 때 프럭토즈-1,6-비스포스페이트 포스파타제 활성을 증진/증가시키도록 유전자 변형된 미생물일 수도 있다.
- [0070] 관심이 있는 효소를 발현시키기 위한 미생물의 유전적 변형은 이하에 상세히 기술될 것이다.
- [0071] 본 발명에 따르는 프럭토즈-1,6-비스포스페이트 포스파타제는 천연적으로 존재하는 프럭토즈-1,6-비스포스페이트 포스파타제일 수 있거나, 이것은 예를 들어, 효소 활성, 안정성 등을 변화 또는 개선시키는 돌연변이 또는 다른 변화를 도입시킴으로써 천연적으로 존재하는 프럭토즈-1,6-비스포스페이트 포스파타제로부터 유래된 프럭토즈-1,6-비스포스페이트 포스파타제일 수도 있다. 단백질의 원하는 효소 활성을 변형 및/또는 개선시키는 방법은 본 기술분야에서 숙련된 전문가에게 잘 알려져 있으며, 상술하였다. 그 후, 생성된 프럭토즈-1,6-비스포스페이트 포스파타제 변이체는 그들의 특성, 예를 들어, 효소 활성 또는 조절에 대해서 시험한다. 프럭토즈-1,6-비스포스페이트 포스파타제의 효소 활성을 측정하는 시험방법은 본 기술분야에서 공지되어 있다. 한가지 구체예에서, 프럭토즈-1,6-비스포스페이트 포스파타제는 피드-백 억제에 의해서 조절되지 않는 효소이다.
- [0072] 바람직한 구체예에서, 재조합 미생물은 증가된 프럭토즈-1,6-비스포스페이트 포스파타제 활성을 갖도록 유전적으로 변형되었다. 이것은 예를 들어, 미생물을 프럭토즈-1,6-비스포스페이트 포스파타제를 인코딩하는 핵산으로 형질전환시킴으로써 달성될 수 있다. 미생물의 유전적 변형의 상세한 설명은 이하에 더 제시될 것이다.
- [0073] 본 발명과 관련하여, "증가된 활성"은 글루코즈 상에서 성장시켰을 때 유전자 변형된 미생물 내에서 효소, 특히 프럭토즈-1,6-비스포스페이트 포스파타제의 발현 및/또는 활성이 글루코즈 상에서 성장시켰을 때의 상응하는 비-변형 미생물 내에서보다 적어도 10%, 바람직하게는 적어도 20%, 더욱 바람직하게는 적어도 30% 또는 50%, 더 더욱 바람직하게는 적어도 70% 또는 80%, 특히 바람직하게는 적어도 90% 또는 100% 더 큰 것을 의미한다. 더 더욱 바람직한 구체예에서, 발현 및/또는 활성의 증가는 적어도 150%, 적어도 200% 또는 적어도 500%일 수 있다. 특히 바람직한 구체예에서, 발현은 특히 글루코즈 상에서 성장시켰을 때 상응하는 비-변형 미생물에서보다 적어도 10-배, 더욱 바람직하게는 적어도 100-배, 더 더욱 바람직하게는 적어도 1000-배 더 크다.
- [0074] 세포에서 소정의 단백질의 발현 수준을 측정하는 방법은 본 기술분야에서 숙련된 전문가에게 잘 알려져 있다. 한가지 구체예에서, 발현 수준의 측정은 상응하는 단백질의 양을 측정함으로써 수행된다. 상응하는 방법은 본 기술분야에서 숙련된 전문가에게 잘 알려져 있으며, 웨스턴 블롯, ELISA 등을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 발현 수준의 측정은 상응하는 RNA의 양을 측정함으로써 수행된다. 상응하는 방법은 본 기술분야에서 숙련된 전문가에게 잘 알려져 있으며, 예를 들어, 노던 블롯을 포함한다.
- [0075] 프럭토즈-1,6-비스포스페이트의 효소 활성을 측정하는 방법은 본 기술분야에서 공지되어 있다.
- [0076] 또 다른 구체예에서, 본 발명에 따르는 미생물은 추가로, EMP가 글리세르알데히드 3-포스페이트 데하이드로게나제를 인코딩하는 유전자(들)의 불활성화에 의해서, 또는 비-변형 미생물과 비교하여 글리세르알데히드 3-포스페이트 데하이드로게나제 활성을 감소시킴으로써, 더 감소되거나 불활성화된 것을 특징으로 한다. 글리세르알데히드 3-포스페이트 데하이드로게나제를 감소시키거나 불활성화시킴으로써 더 하류의 단계에서 EMP를 추가로 감소시키는 것은 미생물에서 생산될 수 있는 글리세르알데히드 3-포스페이트가 해당작용을 통해서 아세틸-CoA로 전혀 또는 거의 전혀 처리되지 않음으로써, 하나의 탄소 원자가 피루베이트 데하이드로게나제에 의해서 촉매된 최종 단계에서의 CO₂의 방출에 의해 상실될 것임을 보장한다. 따라서, 글리세르알데히드 3-포스페이트 데하이드로게나제 활성을 감소 또는 불활성화시킴으로써 EMP를 차단하는 것은 전체 유동이 포스포케톨라제 쪽으로 향하

는 것을 더 보장한다.

[0077] "글리세르알데히드 3-포스페이트 데하이드로게나제 활성"은 글리세르알데히드 3-포스페이트, 포스페이트 및 NAD^+ 를 3-포스포-D-글리세로일 포스페이트 및 $\text{NADH} + \text{H}^+$ 로 전환시키는 효소 활성을 의미한다 (EC 1.2.1.12). 이 활성은 예를 들어, 문헌 (D'Alessio et al., J. Biol. Chem. (1971) 246, 4326-4333)에 기술된 바와 같은 본 기술분야에서 공지된 시험방법에 의해서 측정될 수 있다.

[0078] 용어 "글리세르알데히드 3-포스페이트 데하이드로게나제를 인코딩하는 유전자(들)의 불활성화에 의해서, 또는 비-변형 미생물과 비교하여 글리세르알데히드 3-포스페이트 데하이드로게나제 활성을 감소시킴으로써, 더 감소되거나 불활성화된 엠텐-마이어호프-파나스 경로 (EMPP)를 갖는 것을 특징으로 하는 미생물"은 바람직하게는 글리세르알데히드 3-포스페이트 데하이드로게나제를 인코딩하는 유전자(들)의 불활성화 또는 비-변형 미생물과 비교하여 글리세르알데히드 3-포스페이트 데하이드로게나제 활성의 감소가 상기 불활성화 또는 감소를 유도하는 유전적 변형에 의해서 달성된 미생물을 나타낸다.

[0079] 바람직한 구체예에서, 본 발명의 재조합 미생물은 EMPP가 글리세르알데히드 3-포스페이트 데하이드로게나제를 인코딩하는 유전자(들)의 불활성화에 의해서, 또는 비-변형 미생물과 비교하여 글리세르알데히드 3-포스페이트 데하이드로게나제 활성을 감소시킴으로써, 더 감소되거나 불활성화된 재조합 미생물이다. 본 발명과 관련하여 글리세르알데히드 3-포스페이트 데하이드로게나제를 인코딩하는 유전자(들)의 불활성화는 미생물 내에 존재하는 글리세르알데히드 3-포스페이트 데하이드로게나제를 인코딩하는 유전자(들)가 불활성화되어 이들이 더 이상 발현되지 않고/않거나 기능적 글리세르알데히드 3-포스페이트 데하이드로게나제의 합성을 유도하지 않도록 된 것을 의미한다. 불활성화는 본 기술분야에서 공지된 다수의 상이한 방법에 의해서 달성될 수 있다. 불활성화는 예를 들어, 글리세르알데히드 3-포스페이트 데하이드로게나제를 인코딩하는 유전자(들)의 파괴에 의해서, 또는 선택 마커의 도입을 통한 상기 유전자(들)의 깨끗한 결실에 의해서 달성될 수 있다. 대안적으로, 글리세르알데히드 3-포스페이트 데하이드로게나제를 인코딩하는 유전자(들)의 프로모터는 유전자(들)가 더 이상 mRNA로 전사되지 않는 방법으로 돌연변이될 수 있다. 본 기술분야에서 공지된 글리세르알데히드 3-포스페이트 데하이드로게나제를 인코딩하는 유전자(들)를 불활성화시키는 그 밖의 다른 방법은 mRNA가 더 이상 단백질로 해독될 수 없도록 글리세르알데히드 3-포스페이트 데하이드로게나제 유전자(들)의 전사물에 대해서 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 갖는 RNA를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 발현시키거나; RNAi 효과를 통해서 상기 유전자(들)의 발현을 억제하는 RNA를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 발현시키거나; 상기 유전자(들)의 전사물을 특이적으로 분해시키는 활성을 갖는 RNA를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 발현시키거나; 공동-억제 효과를 통해서 상기 유전자(들)의 발현을 억제하는 RNA를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 발현시키는 것이다. 이들 폴리뉴클레오타이드를 벡터 내에 혼입시킬 수 있으며, 이 벡터를 형질전환에 의해 미생물 내로 도입시켜 글리세르알데히드 3-포스페이트 데하이드로게나제를 인코딩하는 유전자(들)의 불활성화를 달성할 수 있다.

[0080] 본 발명과 관련하여 용어 "불활성화"는 바람직하게는 완전한 불활성화를 의미하며, 즉 미생물이 글리세르알데히드 3-포스페이트 데하이드로게나제 활성을 나타내지 않는 것을 의미한다. 이것은 특히, 미생물이 사용된 성장 조건과는 독립적으로 글리세르알데히드 3-포스페이트 데하이드로게나제 활성을 나타내지 않는 것을 의미한다.

[0081] 바람직하게는, "불활성화"는 미생물에 존재하는 글리세르알데히드 3-포스페이트 데하이드로게나제를 인코딩하는 유전자(들)를 효소의 발현을 방지하도록 유전적으로 변형시키는 것을 의미한다. 이것은 예를 들어, 유전자 또는 그의 일부분 (여기에서, 그의 일부분의 결실은 효소의 발현을 방지한다)의 결실에 의해서, 또는 코딩 지역 내의 또는 프로모터 지역 내의 유전자의 파괴 (여기에서, 이러한 파괴는 단백질이 발현되지 않거나, 기능부전 단백질이 발현되는 효과를 갖는다)에 의해서 달성될 수 있다.

[0082] 바람직한 구체예에서, 본 발명의 재조합 미생물은 비-변형 미생물과 비교하여 글리세르알데히드 3-포스페이트 데하이드로게나제 활성을 감소시킴으로써 감소된 EMPP를 갖는 재조합 미생물이다. 바람직하게는, 이러한 감소는 미생물의 유전적 변형에 의해서 달성된다. 이것은 예를 들어, 프로모터 및/또는 효소의 무작위 돌연변이유발 또는 부위-지시된 돌연변이유발, 및 이어서 바람직한 특성을 갖거나 상술한 바와 같은 상보적 뉴클레오타이드 서열 또는 RNAi 효과에 의해서 프로모터 및/또는 효소를 선택함으로써 달성될 수 있다. 미생물의 유전적 변형의 상세한 설명은 이하에 더 제시될 것이다.

[0083] 본 발명과 관련하여 "감소된 활성"은 유전자 변형된 미생물에서 효소, 특히 글리세르알데히드 3-포스페이트 데하이드로게나제의 발현 및/또는 활성이 상응하는 비-변형 미생물에서보다 적어도 10%, 바람직하게는 적어도 20%, 더욱 바람직하게는 적어도 30% 또는 50%, 더 더욱 바람직하게는 적어도 70% 또는 80%, 특히 바람직하게는

적어도 90% 또는 100% 더 낮은 것을 의미한다. 세포 내에서 소정의 단백질의 발현 수준을 측정하는 방법은 본 기술분야에서 숙련된 전문가에게 잘 알려져 있다. 글리세르알데히드 3-포스페이트 데하이드로게나제의 감소된 효소 활성을 측정하는 시험방법은 본 기술분야에서 공지되어 있다.

[0084] 본 발명과 관련하여 용어 "미생물"은 박테리아뿐만 아니라 효모와 같은 진균, 및 또한 조류 및 고세균류를 나타낸다. 한가지 바람직한 구체예에서, 미생물은 박테리아다. 원칙적으로, 어떤 박테리아라도 사용될 수 있다. 본 발명에 따르는 방법에서 사용될 바람직한 박테리아는 바실루스 (*Bacillus*), 클로스트리디움 (*Clostridium*), 코리네박테리움 (*Corynebacterium*), 슈도모나스 (*Pseudomonas*), 자이모모나스 (*Zymomonas*) 또는 에스케리키아 (*Escherichia*) 속의 박테리아다. 특히 바람직한 구체예에서, 박테리아는 에스케리키아 속에 속하며, 더 더욱 바람직하게는 에스케리키아 콜라이 (*Escherichia coli*) 종에 속한다.

[0085] 또 다른 바람직한 구체예에서, 박테리아는 슈도모나스 푸티다 (*Pseudomonas putida*) 종, 또는 자이모모나스 모빌리스 (*Zymomonas mobilis*) 종, 또는 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*) 종에 속한다. 또 다른 바람직한 구체예에서, 미생물은 진균, 더욱 바람직하게는 사카로마이세스 (*Saccharomyces*), 스킴조사카로마이세스 (*Schizosaccharomyces*), 아스퍼질러스 (*Aspergillus*), 트리코더마 (*Trichoderma*), 클루이베로마이세스 (*Kluyveromyces*) 또는 피치아 (*Pichia*) 속의 진균, 더 더욱 바람직하게는 사카로마이세스 세레비시아에 (*Saccharomyces cerevisiae*), 스킴조사카로마이세스 폼베 (*Schizosaccharomyces pombe*), 아스퍼질러스 니거 (*Aspergillus niger*), 트리코더마 리세이 (*Trichoderma reesei*), 클루이베로마이세스 마룩시아누스 (*Kluyveromyces marxianus*), 클루이베로마이세스 락티스 (*Kluyveromyces lactis*), 피치아 파스토리스 (*Pichia pastoris*), 피치아 토룰라 (*Pichia torula*) 또는 피치아 유틸리스 (*Pichia utilis*) 종의 진균이다.

[0086] 재조합 미생물이 박테리아인 더욱 바람직한 구체예에서, PEP-의존성 PTS 수송체를 인코딩하는 유전자(들)는 불활성화된다. 본 발명과 관련하여, 불활성화는 미생물 내에 존재하는 PEP-의존성 PTS 수송체를 인코딩하는 유전자(들)은 이들이 더 이상 발현되지 않고/않거나 기능적 PEP-의존성 PTS 수송체의 합성을 유도하지 않도록 불활성화된 것을 의미한다. PEP-의존성 PTS 수송체를 인코딩하는 유전자(들)의 불활성화는 박테리아가 더 이상 PEP-의존성 PTS 수송체를 통해서 글루코즈를 수송할 수 없도록 되어야 한다.

[0087] PEP-의존성 PTS 수송체 (예를 들어, 이. 콜라이, 비. 서브틸리스로부터 유래)는 본 기술분야에서 공지되어 있다. PEP-의존성 PTS 수송체의 불활성화에 대한 예는 이하의 실시예 항목에 제시된다.

[0088] 불활성화는 본 기술분야에서 공지된 다수의 상이한 방법에 의해서 달성될 수 있다. 불활성화는 예를 들어, PEP-의존성 PTS 수송체를 인코딩하는 유전자(들)의 파괴에 의해서, 또는 선택 마커의 도입을 통한 상기 유전자(들)의 깨끗한 결실에 의해서 달성될 수 있다. 대안적으로, PEP-의존성 PTS 수송체를 인코딩하는 유전자(들)의 프로모터는 유전자(들)가 더 이상 mRNA로 전사되지 않는 방법으로 돌연변이될 수 있다. 본 기술분야에서 공지된 PEP-의존성 PTS 수송체를 인코딩하는 유전자(들)를 불활성화시키는 그 밖의 다른 방법은 mRNA가 더 이상 단백질로 해독될 수 없도록 PEP-의존성 PTS 수송체 유전자(들)의 전사물에 대해서 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 갖는 RNA를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 발현시키거나; RNAi 효과를 통해서 상기 유전자(들)의 발현을 억제하는 RNA를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 발현시키거나; 상기 유전자(들)의 전사물을 특이적으로 분해시키는 활성을 갖는 RNA를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 발현시키거나; 공동-억제 효과를 통해서 상기 유전자(들)의 발현을 억제하는 RNA를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 발현시키는 것이다. 이들 폴리뉴클레오타이드를 벡터 내에 혼입시킬 수 있으며, 이 벡터를 형질전환에 의해 미생물 내로 도입시켜 PEP-의존성 PTS 수송체를 인코딩하는 유전자(들)의 불활성화를 달성할 수 있다.

[0089] 용어 "재조합체"는 본 발명의 미생물이 야생형 또는 비-변형 미생물과 비교되는 것으로서 상기 정의된 바와 같은 효소를 인코딩하는 핵산 분자를 함유하도록, 또는 상기 정의된 바와 같은 효소를 인코딩하는 유전자가 야생형 또는 비-변형 미생물과 비교하여 결실되도록 유전자 변형된 것을 의미한다.

[0090] 상기 정의된 바와 같은 효소를 인코딩하는 핵산 분자는 단독으로, 또는 벡터의 일부분으로 사용될 수 있다.

[0091] 핵산 분자는 핵산 분자 내에 포함된 폴리뉴클레오타이드에 작동적으로 연결된 발현 조절 서열을 더 포함할 수 있다. 본 명세서 전체에 걸쳐서 사용된 것으로서 용어 "작동적으로 연결된" ("operatively linked" 또는 "operably linked")은 발현이 발현 조절 서열과 상호적인 조건 하에서 달성되도록 하는 방식으로 발현될 폴리뉴클레오타이드 내의 하나 또는 그 이상의 발현 조절 서열과 코딩 지역 사이의 결합을 나타낸다.

[0092] 발현은 바람직하게는 해독 가능한 mRNA로의 이중 DNA 서열의 전사를 포함한다. 진균에서 뿐만 아니라 박테리아에서의 발현도 보장하는 조절 요소는 본 기술분야에서 숙련된 전문가에게 잘 알려져 있다. 이들은 프로모터, 인

헨서, 종결 시그널, 표적화 시그널 등을 포함한다. 예는 벡터에 관한 설명과 관련하여 이하에 더 제시된다.

- [0093] 핵산 분자와 관련하여 사용하기 위한 프로모터는 그의 기원과 관련하여 및/또는 발현될 유전자와 관련하여 동종 또는 이종일 수 있다. 적합한 프로모터는 예를 들어, 그들 자체에 구성적 발현을 부여하는 프로모터이다. 그러나, 외부 영향에 의해서 결정된 어느 한 시점에서만 활성인 프로모터가 또한 사용될 수 있다. 이와 관련하여 인공적 및/또는 화학적으로 유도 가능한 프로모터가 사용될 수 있다.
- [0094] 벡터는 벡터 내에 함유된 상기 폴리뉴클레오타이드에 작동적으로 연결된 발현 조절 서열을 더 포함할 수 있다. 이들 발현 조절 서열은 박테리아 또는 진균에서 해독 가능한 RNA의 전사 및 합성을 보장하는데 적합할 수 있다.
- [0095] 또한, 분자 생물학에서 통상적인 방법 (참조: 예를 들어, Sambrook and Russell (2001), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, CSH Press, Cold Spring Harbor, NY, USA)에 의해서 폴리뉴클레오타이드 내로 상이한 돌연변이를 삽입시켜 가능하게는 변형된 생물학적 특성을 갖는 폴리펩타이드의 합성을 유도할 수 있다. 점 돌연변이의 도입은 아미노산 서열의 변형이 예를 들어, 생물학적 활성 또는 폴리펩타이드의 조절에 영향을 미치는 위치에서 생각할 수 있다.
- [0096] 또한, 변형된 기질 또는 생성물 특이성을 갖는 돌연변이체가 제조될 수 있다. 바람직하게는, 이러한 돌연변이체는 증가된 활성을 나타낸다. 대안적으로, 돌연변이체는 기질 결합 활성을 상실함이 없이 폐지되는 촉매적 활성을 갖도록 제조될 수 있다.
- [0097] 또한, 상기 정의한 바와 같은 효소를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 내로의 돌연변이의 도입은 유전자 발현을 및/또는 상기 폴리뉴클레오타이드에 의해서 인코딩된 효소의 활성이 감소되거나 증가하도록 허용한다.
- [0098] 박테리아 또는 진균을 유전자 변형시키기 위해서는, 상기 정의한 바와 같은 효소를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 또는 이들 분자의 일부분을 DNA 서열의 제조법에 의한 돌연변이유발 또는 서열 변형을 허용하는 플라스미드 내로 도입시킬 수 있다. 표준 방법 (참조: Sambrook and Russell (2001), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, CSH Press, Cold Spring Harbor, NY, USA)은 염기 변화가 수행되거나 천연 또는 합성 서열이 부가되도록 허용한다. DNA 단편은 단편에 어댑터 및 링커를 적용함으로써 서로 연결될 수 있다. 또한, 적합한 제한 부위를 제공하거나, 여분의 DNA 또는 제한 부위를 제거하는 엔지니어링 방법이 사용될 수 있다. 삽입, 결실 또는 치환이 가능한 이들 경우에는, 시험관내 돌연변이유발, "프라이머 복구", 제한 또는 결찰이 사용될 수 있다. 일반적으로, 서열 분석, 제한 분석 및 그 밖의 다른 생화학 및 분자 생물학의 방법이 분석 방법으로 수행된다.
- [0099] 따라서, 본 발명에 따르면 재조합 미생물은 상술한 폴리뉴클레오타이드, 핵산 분자 또는 벡터를 진균 또는 박테리아 내에 도입시키는 것을 포함하여 진균 또는 박테리아를 유전자 변형시킴으로써 생산될 수 있다.
- [0100] 본 발명은 상술한 폴리뉴클레오타이드, 핵산 분자 또는 벡터에 의해서 유전적자 변형되거나, 유전자 변형된 박테리아 또는 진균을 생산하는 상기-언급된 방법에 의해서 수득할 수 있는 재조합 미생물, 특히 박테리아 및 진균, 및 이렇게 형질전환된 박테리아 또는 진균으로부터 유래되고, 상기 정의된 바와 같은 폴리뉴클레오타이드, 핵산 분자 또는 벡터를 함유하는 세포에 관한 것이다. 바람직한 구체예에서, 숙주 세포는 이것이 계놈 내에 안정적으로 통합된 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 방법으로 유전자 변형된다.
- [0101] 폴리뉴클레오타이드는 상술한 활성 중의 어떤 것을 갖는 폴리펩타이드의 생산을 유도하도록 발현된다. 다양한 발현 시스템의 개요는 예를 들어, 문헌 (Methods in Enzymology 153 (1987), 385-516; Bitter et al., Methods in Enzymology 153 (1987), 516-544; Sawers et al., Applied Microbiology and Biotechnology 46 (1996), 1-9; Billman-Jacobe, Current Opinion in Biotechnology 7 (1996), 500-4; Hockney, Trends in Biotechnology 12 (1994), 456-463; 및 Griffiths et al., Methods in Molecular Biology 75 (1997), 427-440)에 제시되었다. 효모 발현 시스템의 개요는 예를 들어, 문헌 (Hensing et al., Antonie van Leeuwenhoek 67 (1995), 261-279; Bussineau et al., Developments in Biological Standardization 83 (1994), 13-19; Gellissen et al., Antonie van Leeuwenhoek 62 (1992), 79-93; Fleer, Current Opinion in Biotechnology 3 (1992), 486-496; Vedvick, Current Opinion in Biotechnology 2 (1991), 742-745; 및 Buckholz, Bio/Technology 9 (1991), 1067-1072)에 제시되었다.
- [0102] 발현 벡터는 문헌에 광범하게 기술되어 있다. 대체로, 이들은 선택 마커 유전자 및 선택된 숙주에서의 복제를 보장하는 복제-기원 뿐만 아니라, 박테리아 또는 바이러스 프로모터, 및 대부분의 경우에는 전사에 대한 종결 시그널을 함유한다. 프로모터와 종결 시그널 사이에는 일반적으로 코딩 DNA 서열의 삽입을 가능하게 하는 적어도 하나의 제한 부위 또는 폴리링커가 존재한다. 상응하는 유전자의 전사를 천연적으로 조절하는 DNA 서열은 그것이 선택된 숙주 유기체 내에서 활성이라면 프로모터 서열로 사용될 수 있다. 그러나, 이 서열은 또한, 다른

프로모터 서열과 교환될 수도 있다. 유전자의 구성적 발현을 보장하는 프로모터 및 유전자의 발현의 의도적 조절을 허용하는 유도성 프로모터를 사용할 수 있다. 이들 특성을 갖는 박테리아 및 바이러스 프로모터 서열은 문헌에 상세히 기술되어 있다. 미생물 (예를 들어, 이. 콜라이, 에스. 세레비지아에)에서의 발현을 위한 조절 서열은 문헌에 충분히 기술되어 있다. 하류 서열의 특별히 높은 발현을 허용하는 프로모터는 예를 들어, T7 프로모터 (Studier et al., Methods in Enzymology 185 (1990), 60-89), lacUV5, trp, trp-lacUV5 (DeBoer et al., in Rodriguez and Chamberlin (Eds), Promoters, Structure and Function; Praeger, New York, (1982), 462-481; DeBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983), 21-25), lp1, rac (Boros et al., Gene 42 (1986), 97-100)이다. 유도성 프로모터는 바람직하게는 폴리펩타이드의 합성을 위해서 사용된다. 이들 프로모터는 종종 구성적 프로모터보다 더 높은 폴리펩타이드 수율을 초래한다. 최적량의 폴리펩타이드를 수득하기 위해서는 종종 2-단계 방법이 사용된다. 첫 째로, 숙주 세포를 비교적 높은 세포 밀도까지 최적 조건 하에서 배양한다. 두 번째 단계에서는, 사용된 프로모터의 타입에 따라서 전사를 유도한다. 이에 관해서는, 락토즈 또는 IPTG (=이소프로필-β-D-티오갈락토피라노사이드)에 의해서 유도될 수 있는 tac 프로모터 (deBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 (1983), 21-25)가 특히 적합하다. 전사에 대한 종결 시그널도 문헌에 기술되어 있다.

[0103] 본 발명에 따르는 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터에 의한 숙주 세포의 형질전환은 예를 들어, 문헌 (Sambrook and Russell (2001), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, CSH Press, Cold Spring Harbor, NY, USA; Methods in Yeast Genetics, A Laboratory Course Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990)에 기술된 바와 같은 표준 방법에 의해서 수행될 수 있다. 숙주 세포를 사용된 특정 숙주 세포의 필요조건, 특히 pH 값, 온도, 염 농도, 통기 (aeration), 항생제, 비타민, 미량 원소 등에 관한 필요조건에 맞는 영양 배지 내에서 배양한다.

[0104] 본 발명의 또 다른 관점에서, 재조합 미생물은 추가로 이것이 아세틸-CoA를 아세톤으로 전환시킬 수 있다는 점을 특징으로 한다. 이러한 재조합 미생물을 제공하는 방법은 예를 들어, EP 2 295 593에 개시되어 있다. 본 발명과 관련하여 용어 "아세틸-CoA를 아세톤으로 전환시킬 수 있는"은 유기체/미생물이 아세틸-CoA로부터 아세톤의 생산을 허용하는 효소 활성을 제공하는 효소의 존재에 기인하여 세포 내에서 아세톤을 생산하는 능력을 갖는다는 것을 의미한다.

[0105] 아세톤은 클로스트리디움 아세토부틸리쿰 (Clostridium acetobutylicum), 클로스트리디움 베이제린키 (Clostridium beijerinckii), 클로스트리디움 셀룰로라이티쿰 (Clostridium cellulolyticum), 바실루스 폴리믹사 (Bacillus polymyxa) 및 슈도모나스 푸티다 (Pseudomonas putida)와 같은 특징의 미생물에 의해서 생산된다. 아세톤의 합성은 클로스트리디움 아세토부틸리쿰 내에서 가장 잘 특정화된다. 이것은 아세틸-CoA의 2개의 분자를 아세토아세틸-CoA로 축합시키는 반응 (반응 단계 1)로 시작한다. 이 반응은 아세틸-CoA 아세틸트랜스퍼라제 (EC 2.3.1.9)에 의해서 촉진된다. 그 후, 아세토아세틸-CoA를 아세틸-CoA 또는 부티릴-CoA의 생산을 또한 제공하는 아세트산 또는 부티르산과의 반응에 의해서 아세토아세테이트로 전환시킨다 (반응 단계 2). 이 반응은 예를 들어, 아세토아세틸CoA 트랜스퍼라제 (EC 2.8.3.8)에 의해서 촉진된다. 아세토아세틸CoA 트랜스퍼라제는 다양한 유기체로부터, 예를 들어, 이것이 atoAD 유전자에 의해서 인코딩된 이. 콜라이로부터, 또는 이것이 ctfAB 유전자에 의해서 인코딩된 클로스트리디움 아세토부틸리쿰으로부터 공지되어 있다.

[0106] 그러나, 또한 다른 효소, 예를 들어, 3-옥소산 CoA 트랜스퍼라제 (EC 2.8.3.5) 또는 석시네이트 CoA 리가제 (EC 6.2.1.5)도 이 반응을 촉진시킬 수 있다.

[0107] 마지막으로, 아세토아세테이트를 아세토아세테이트 데카복실라제 (EC 4.1.1.4)에 의해서 촉진된 탈카복실화 단계 (반응 단계 3)에 의해서 아세톤으로 전환시킨다.

[0108] 상술한 반응 단계 1 및 2 및 이들을 촉진시키는 효소는 아세톤 합성에 대해서 특징적인 것이 아니며, 다양한 유기체에서 발견될 수 있다. 그에 반해서, 아세토아세테이트 데카복실라제 (EC 4.1.1.4)에 의해서 촉진된 반응 단계 3은 아세톤을 생산할 수 있는 이들 유기체에서만 발견된다.

[0109] 바람직한 구체예에서, 본 발명의 재조합 미생물은 천연적으로 아세톤을 생산하는 능력을 갖는 미생물이다. 따라서, 바람직하게는 미생물은 클로스트리디움, 바실루스 또는 슈도모나스 속에 속하며, 더욱 바람직하게는 클로스트리디움 아세토부틸리쿰, 클로스트리디움 베이제린키, 클로스트리디움 셀룰로라이티쿰, 바실루스 폴리믹사 또는 슈도모나스 푸티다 종에 속한다.

[0110] 또 다른 바람직한 구체예에서, 본 발명의 재조합 미생물은 천연적으로는 아세톤을 생산하지 않지만, 아세톤을 생산하도록, 즉 미생물에서 아세톤의 생산을 허용하는데 필요한 유전자(들)를 도입시킴으로써 유전자 변형된 유

기체/미생물로부터 유래된 미생물이다. 원칙적으로, 모든 미생물이 이러한 방식으로 유전자 변형될 수 있다. 아세톤의 합성에 책임이 있는 효소는 상기에 기술하였다. 상응하는 효소를 인코딩하는 유전자는 본 기술분야에서 공지되어 있으며, 소정의 미생물을 아세톤을 생산하도록 유전자 변형시키기 위해서 사용될 수 있다. 상술한 바와 같이, 아세톤 합성의 반응 단계 1 및 2는 대부분의 유기체에서 천연적으로 일어난다. 그러나, 반응 단계 3은 아세톤 합성에 대해 특징적으로 결정적이다. 따라서, 바람직한 구체예에서, 천연적으로 아세톤을 생산하지 않는 미생물로부터 유래된 유전자 변형된 미생물은 탈카복실화에 의한 아세토아세테이트의 아세톤으로의 전환을 촉진시키는 효소, 예를 들어, 아세토아세테이트 데카복실라제 (EC 4.1.1.4)를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 함유하도록 변형된다. 이 효소를 인코딩하는 몇 가지 유기체로부터의 뉴클레오타이드 서열, 예를 들어, 클로스트리디움 아세토부틸리쿰 (Uniprot 수탁 번호 P23670 및 P23673), 클로스트리디움 베이제린키 (클로스트리디움 MP; Q9RPK1), 클로스트리디움 파스투리아눔 (Clostridium pasteurianum) (Uniprot 수탁 번호 P81336), 브래디라이조븀 종 (Bradyrhizobium sp.) (스트레인 BTAil / ATCC BAA-1182; Uniprot 수탁 번호 A5EBU7), 버크홀데리아 말레이 (Burkholderia mallei) (ATCC 10399 A9LBS0), 버크홀데리아 말레이 (Uniprot 수탁 번호 A3MAE3), 버크홀데리아 말레이 FMH A5XJB2, 버크홀데리아 세노세파시아 (Burkholderia cenocepacia) (Uniprot 수탁 번호 A0B471), 버크홀데리아 앰비파리아 (Burkholderia ambifaria) (Uniprot 수탁 번호 Q0b5P1), 버크홀데리아 파이토피르만스 (Burkholderia phytofirmans) (Uniprot 수탁 번호 B2T319), 버크홀데리아 종 (Burkholderia spec.) (Uniprot 수탁 번호 Q38ZU0), 클로스트리디움 보툴리눔 (Clostridium botulinum) (Uniprot 수탁 번호 B2TLN8), 랄스토니아 피케티 (Ralstonia pickettii) (Uniprot 수탁 번호 B2UIG7), 스트렙토마이세스 노갈라터 (Streptomyces nogalater) (Uniprot 수탁 번호 Q9EYI7), 스트렙토마이세스 애버미틸리스 (Streptomyces avermitilis) (Uniprot 수탁 번호 Q82NF4), 레지오넬라 뉴모필라 (Legionella pneumophila) (Uniprot 수탁 번호 Q5ZXQ9), 락토바실루스 살리바리우스 (Lactobacillus salivarius) (Uniprot 수탁 번호 Q1WVG5), 로도코커스 종 (Rhodococcus spec.) (Uniprot 수탁 번호 Q0S7W4), 락토바실루스 플란타룸 (Lactobacillus plantarum) (Uniprot 수탁 번호 Q890G0), 라이조븀 레구미노사룸 (Rhizobium leguminosarum) (Uniprot 수탁 번호 Q1M911), 락토바실루스 카세이 (Lactobacillus casei) (Uniprot 수탁 번호 Q03B66), 프란시셀라 툴라렌시스 (Francisella tularensis) (Uniprot 수탁 번호 Q0BLC9), 사카로폴리스포라 에리트레아에 (Saccharopolyspora erythrae) (Uniprot 수탁 번호 A4FKR9), 코라르케움 크립토피룸 (Korarchaeum cryptofilum) (Uniprot 수탁 번호 B1L3N6), 바실루스 아밀로리퀘파시엔스 (Bacillus amyloliquefaciens) (Uniprot 수탁 번호 A7Z8K8), 코클리오볼루스 헤테로스트로푸스 (Cochliobolus heterostrophus) (Uniprot 수탁 번호 Q8NJK3), 설포로부스 이슬란드쿠스 (Sulfolobus islandicus) (Uniprot 수탁 번호 C3ML22) 및 프란시셀라 툴라렌시스 아종 홀라르кти카 (Francisella tularensis subsp. holarctica) (스트레인 OSU18)으로부터 유도된 adc 유전자는 본 기술분야에서 공지되어 있다.

- [0111] 더욱 바람직하게는, 미생물은 아세톤 합성의 상기 언급된 반응 단계 2, 즉 아세토아세틸 CoA의 아세토아세테이트로의 전환을 촉진시킬 수 있는 효소를 인코딩하는 핵산 분자에 의해서 형질전환되도록 유전자 변형된다.
- [0112] 더 더욱 바람직하게는, 미생물은 아세톤 합성의 상기 언급된 반응 단계 1, 즉 2 분자의 아세틸 CoA의 아세토아세틸 CoA로의 축합을 촉진시킬 수 있는 효소를 인코딩하는 핵산 분자에 의해서 형질전환되도록 유전자 변형된다.
- [0113] 특히 바람직한 구체예에서, 미생물은 아세톤 합성의 상기 언급된 반응 단계 1을 촉진시킬 수 있는 효소를 인코딩하는 핵산 분자에 의해서 및 아세톤 합성의 상기 언급된 반응 단계 2를 촉진시킬 수 있는 효소를 인코딩하는 핵산 분자에 의해서, 또는 아세톤 합성의 상기 언급된 반응 단계 1을 촉진시킬 수 있는 효소를 인코딩하는 핵산 분자에 의해서 및 아세톤 합성의 상기 언급된 반응 단계 3을 촉진시킬 수 있는 효소를 인코딩하는 핵산 분자에 의해서, 또는 아세톤 합성의 상기 언급된 반응 단계 2를 촉진시킬 수 있는 효소를 인코딩하는 핵산 분자에 의해서 및 아세톤 합성의 상기 언급된 반응 단계 3을 촉진시킬 수 있는 효소를 인코딩하는 핵산 분자에 의해서, 또는 아세톤 합성의 상기 언급된 반응 단계 1을 촉진시킬 수 있는 효소를 인코딩하는 핵산 분자에 의해서 및 아세톤 합성의 상기 언급된 반응 단계 2를 촉진시킬 수 있는 효소를 인코딩하는 핵산 분자에 의해서 및 아세톤 합성의 상기 언급된 반응 단계 3을 촉진시킬 수 있는 효소를 인코딩하는 핵산 분자에 의해서 형질전환되도록 유전자 변형된다.
- [0114] 상기 언급된 유전자 변형된 미생물을 제조하는 방법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있다. 따라서, 일반적으로 미생물은 미생물 내에서 각각의 효소의 발현을 허용하는 DNA 구조물에 의해서 형질전환된다. 이러한 구조물은 통상적으로 각각의 숙주 세포에서 전사 및 해독을 허용하는 조절 서열, 예를 들어, 프로모터 및/또는 인핸서 및/또는 전사 종결 및/또는 리보솜 결합 부위 등에 연결된 문제의 코딩 서열을 포함한다. 선행 기술은 이미 아세톤

을 생산할 수 있도록 유전자 변형된 미생물을 기술하였다. 특히, 예를 들어, 클로스트리디움 아세토부틸리쿰으로부터의 유전자를 이. 콜라이 내에 도입시킴으로써 천연적으로 아세톤을 생산하지 않는 박테리아인 이. 콜라이 내에서 아세톤의 합성을 허용하였다 (Bermejo et al., Appl. Environ. Microbiol. 64 (1998); 1079-1085; Hanai et al., Appl. Environ. Microbiol. 73 (2007), 7814-7818). 특히, 한나이 (Hanai) 등 (loc. cit.)은 이. 콜라이 내에서의 아세톤 생산을 달성하기 위하여 아세토아세테이트 데카복실라제 (예를 들어, 클로스트리디움 아세토부틸리쿰으로부터 유도된 것)를 인코딩하는 핵산 서열을 도입시키면 충분한 것을 나타내었으며, 이것은 상기-언급된 반응 단계 1 및 2를 촉진시키는 이. 콜라이 내의 내인성 효소 (즉, 이. 콜라이의 발현 생성물 *atoB* 및 *atoAD* 유전자)가 아세톤 생산을 위한 기질을 제공하기에 충분함을 시사한다.

[0115] 본 발명의 또 다른 관점에서, 재조합 미생물은 추가로, 이것이 아세틸-CoA를 아세톤으로 전환시키고, 아세톤을 이소부텐으로 전환시킬 수 있다는 점을 특징으로 한다. 이러한 재조합 미생물을 제공하는 방법은 예를 들어, EP-A 2 295 593 (EP 09 17 0312), WO 2010/001078 및 EP 10 18 8001에 개시되어 있다.

[0116] 본 발명의 또 다른 관점에서, 재조합 미생물은 이것이 아세틸-CoA를 아세톤으로 전환시키고, 아세톤을 프로펜으로 전환시킬 수 있다는 점을 특징으로 한다. 이러한 재조합 미생물을 제공하는 방법은 예난티오머 문헌 (Hanai et al., Appl. Environ. Microbiol. 73 (2007), 7814-7818)에 개시되어 있다.

[0117] 본 기술분야에서 숙련된 전문가들은 본 발명의 미생물에 대한 추가의 유전적 변형이 본 발명의 미생물이 공급원료를 생성물로 전환시키는 효율에 있어서의 개선을 유도할 수 있음을 인식할 것이다. 예를 들어, 천연 미생물은 통상적으로 포르메이트, 아세테이트, 락테이트, 석시네이트, 에탄올, 글리세롤, 2,3-부탄디올, 메틸글리옥살 및 수소와 같은 생성물을 생산하며; 이들은 모두 당으로부터 예를 들어, 아세톤, 이소부틸 또는 프로펜의 생산에 해로울 수 있다. 이러한 원치 않는 부산물의 제거 또는 상당한 감소는 이들의 생산을 유도하는 주요 효소 활성의 제거 또는 감소에 의해서 달성될 수 있다. 이러한 활성에는 다음으로 구성된 그룹이 포함되나, 이들로 제한되지는 않는다:

[0118] - 아세틸-CoA + 포르메이트 = CoA + 피루베이트 (예를 들어, 피루베이트 포르메이트-리아제 (EC 2.3.1.54)로 또한 공지된 포르메이트 C-아세틸트랜스퍼라제에 의해서 촉진됨; 이. 콜라이의 경우 *pfIB*, NCBI-GeneID: 945514);

[0119] - ATP + 아세테이트 = ADP + 아세틸 포스페이트 (예를 들어, 아세테이트 키나제 (EC 2.7.2.1)에 의해서 촉진됨; 이. 콜라이의 경우 *ackA*, NCBI-GeneID: 946775);

[0120] - (R)-락테이트 + NAD⁺ = 피루베이트 + NADH + H⁺ (예를 들어, L-락테이트 데하이드로게나제 (EC 1.1.1.28)에 의해서 촉진됨; 이. 콜라이의 경우 *ldhA*, NCBI-GeneID: 946315);

[0121] - 포스페이트 + 옥살로아세테이트 = 포스포에놀피루베이트 + HCO₃⁻ (예를 들어, 포스포에놀피루베이트 카복실라제 (EC 4.1.1.31)에 의해서 촉진됨; 이. 콜라이의 경우 *ppc*, NCBI-GeneID: 948457);

[0122] - ATP + 옥살로아세테이트 = ADP + 포스포에놀피루베이트 + CO₂ (예를 들어, 포스포에놀피루베이트 카복시키나제 (ATP) (EC 4.1.1.49)에 의해서 촉진됨; 이. 콜라이의 경우 *pck*, NCBI-GeneID: 945667);

[0123] - 석시네이트 + 수용기 = 푸마레이트 + 환원된 수용기 (예를 들어, 석시네이트 데하이드로게나제 (EC 1.3.99.1)에 의해서 촉진됨); 이. 콜라이의 경우 *frdA* 및 *frdB*를 포함, NCBI-GeneID: 각각 948667 및 948666);

[0124] - 2-옥소 카복실레이트 (예를 들어, 피루베이트) = 알데히드 (예를 들어, 아세트알데히드 + CO₂ (예를 들어, 피루베이트 데카복실라제 (EC 4.1.1.1)에 의해서 촉진됨);

[0125] - 아세트알데히드 + CoA + NAD⁺ = 아세틸-CoA + NADH + H⁺ (예를 들어, 아세트알데히드 데하이드로게나제 (아세틸화) (EC 1.2.1.10)에 의해서 촉진됨; 이. 콜라이의 경우 *adhE*, NCBI-GeneID: 945837);

[0126] - sn-글리세롤 3-포스페이트 + NAD(P)⁺ = 글리세론 포스페이트 + NAD(P)H + H⁺ (예를 들어, 글리세롤-3-포스페이트 데하이드로게나제 [NAD(P)⁺] (EC 1.1.1.94)에 의해서 촉진됨; 이. 콜라이의 경우 *gpsA*, NCBI-GeneID: 948125);

[0127] - 2 피루베이트 = 2-아세토락테이트 + CO₂ (예를 들어, 아세토락테이트 신타제 (EC 2.2.1.6)에 의해서 촉진됨;

이. 콜라이의 경우 *ilvH* 및 *ilvI*, NCBI-GeneID: 각각 947267 및 948793);

[0128] - 글리세론 포스페이트 = 메틸글리옥살 + 포스페이트 (예를 들어, 메틸글리옥살 신타제 (EC 4.2.3.3)에 의해서 촉진됨; 이. 콜라이의 경우 *mgsA*, NCBI-GeneID: 945574); 및

[0129] - 포르메이트 + H^+ = CO_2 + H_2 (예를 들어, 포르메이트 하이드로게닐라제 (EC 1.2.1.2와 함께 EC 1.12.1.2)에 의해서 촉진됨; 이. 콜라이의 경우 *fdhF* (EC 1.2.1.2), NCBI-GeneID: 948584).

[0130] 따라서, 바람직한 구체예에서 본 발명에 따르는 미생물은 상기 열거된 효소 활성 중의 하나 또는 그 이상이 제거되거나 감소된 것을 특징으로 한다.

[0131] 본 기술분야에서 숙련된 전문가는 본 발명의 미생물에서 조절 요소에 대한 유전적 변형은 본 발명의 미생물이 공급원료를 생성물로 전환시키는 효율에 있어서의 개선을 유도할 수 있음을 더 인식할 것이다. 이. 콜라이 내에서 이러한 유전적 변형에는 다음으로 구성된 그룹이 포함되나, 이들로 제한되지는 않는다:

[0132] - 혐기성 성장의 전반적 조절인자인 *fnr* 유전자 (NCBI-GeneID: 945908)의 결실; 및

[0133] - RNA 폴리머라제, 시그마 S (sigma 38) 인자인 *rpoS* 유전자 (NCBI-GeneID: 947210)의 결실.

[0134] 따라서, 또 다른 바람직한 구체예에서 본 발명에 따르는 미생물은 이들 결실 중의 적어도 하나를 나타낸다.

[0135] 본 발명의 추가의 관점은 글루코즈의 아세틸-CoA로의 전환을 위한 본 발명의 재조합 미생물의 용도이다. 화학적 구조에서 아세틸 CoA (또한, 아세틸 조효소 A로 공지됨)는 조효소 A (티올)와 아세트산 사이의 티오에스테르이며, 유용한 대사산물의 생산을 위한 중요한 전구체 분자이다. 그 후, 아세틸-CoA는 재조합 미생물에 의해서 L-글루탐산, L-글루타민, L-프롤린, L-아르기닌, L-류신, 석시네이트 및 폴리하이드록시부티레이트와 같은 유용한 대사산물로 더 전환될 수 있다.

[0136] 본 발명의 또 다른 관점은 글루코즈의 아세톤으로의 전환을 위한, 아세틸-CoA를 아세톤으로 전환시킬 수 있는 본 발명의 재조합 미생물의 용도이다.

[0137] 본 발명의 추가의 관점은 글루코즈의 이소부텐으로의 전환을 위한, 아세틸-CoA를 아세톤으로 및 아세톤을 이소부텐으로 전환시킬 수 있는 본 발명의 재조합 미생물의 용도이다.

[0138] 또한, 본 발명의 추가의 관점은 글루코즈의 프로펜으로의 전환을 위한, 아세틸-CoA를 아세톤으로 및 아세톤을 프로펜으로 전환시킬 수 있는 본 발명의 재조합 미생물의 용도이다.

[0139] 따라서, 본 발명은 또한 상기-언급된 재조합 미생물을 아세톤 및/또는 이소부텐 및/또는 프로펜의 생산을 허용하는 조건 하에서 배양하고, 아세톤 및/또는 이소부텐 및/또는 프로펜을 분리시키는 아세톤 및/또는 이소부텐 및/또는 프로펜의 생산을 위한 방법에 관한 것이다. 미생물은 효소 반응(들)의 발생을 허용하는 적합한 배양 조건 하에서 배양한다. 특정의 배양 조건은 사용된 특정의 미생물에 따라 좌우되지만, 본 기술분야에서 숙련된 전문가에게 잘 알려져 있다. 배양 조건은 일반적으로, 이들이 각각의 반응을 위한 효소를 인코딩하는 유전자의 발현을 허용하는 방식으로 선택된다. 화학적 유도제에 의해서, 또는 온도 이동에 의해서 유전자 발현의 유도과 같은 배양의 특정 단계에서 특정 유전자의 발현을 개선시키고 미세 조정하기 위한 다양한 방법이 본 기술분야에서 숙련된 전문가에게 공지되어 있다.

[0140] 또 다른 바람직한 구체예에서, 본 발명에 따르는 방법은 더욱이 가스상 생성물, 특히 이소부텐 또는 프로펜을 수집하고, 반응으로부터 탈기시키고, 즉 예를 들어, 배양물로부터 탈기하는 생성물을 회수하는 단계를 포함한다. 따라서, 바람직한 구체예에서, 상기 방법은 반응 중에 가스상 형태로 이소부텐 또는 프로펜을 수집하는 시스템의 존재 하에서 수행된다.

[0141] 사실상, 이소부텐 및 프로펜과 같은 짧은 알켄은 실온 및 대기압에서 가스상 상태를 채택한다. 따라서, 본 발명에 따르는 방법은 산업적 규모에서 수행되는 경우에 항상 매우 많은 비용이 드는 단계인 액체 배양 배지로부터 생성물의 추출을 필요로 하지 않는다. 가스상 탄화수소의 배출 및 저장 및 이들의 가능한 후속 물리적 분리 및 화학적 전환은 본 기술분야에서 숙련된 전문가에게 공지된 어떤 방법에 따라서라도 수행될 수 있다.

[0142] 본 발명은 이하의 비-제한적 도면 및 실시예를 참고로 하여 더 기술된다.

도면의 간단한 설명

[0143] 도 1은 포스포케톨라제 활성 EC 4.1.2.9 및 EC 4.1.2.22 중의 하나 또는 둘 다를 사용하여 포스포케톨라제 경로

를 통해 글루코즈-6-포스페이트로부터 아세틸-CoA를 생산하는데 관한 두 개의 반응식을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0144] 실시예

[0145] 일반적 방법 및 재료

[0146] 결찰 및 형질전환을 위한 절차는 본 기술분야에서 잘 알려져 있다. 이하의 실시예에서 사용하기에 적합한 기술은 문헌 (Sambrook J., *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989, and Sambrook J., *supra*)에서 찾을 수 있다.

[0147] 박테리아 배양물의 유지 및 성장에 적합한 재료 및 방법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있다. 이하의 실시예에서 사용하는데 적합한 기술은 문헌 (Manual of Methods for General Bacteriology, Philipp Gerhardt, R.G.E. Murray, Ralph N. Costilow, Eugene W. Nester, Willis A. Wood, Noel R. Krieg and G. Briggs Philips, eds)에서 찾을 수 있다.

[0148] 박테리아 세포의 성장 및 유지를 위해서 사용된 모든 시약 및 재료는 다른 식으로 명시되지 않는 한, Sigma-Aldrich Company (St. Louis, MO)로부터 수득하였다.

[0149] 표 1. 사용 및 구성된 플라스미드

플라스미드 명칭	설명
pKD46	Datsenko KA. And Wanner BL., Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000, Vol. 97, No. 12, pp. 6640-6645
pCP20	Datsenko KA. And Wanner BL., Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000, Vol. 97, No. 12, pp. 6640-6645
pGBE0687	플라스미드 pGBE0687은 그 자신의 프로모터의 조절 하에 위치하는 아프라마이신에 대한 저항성 유전자를 나타낸다.
pGBE0688	플라스미드 pGBE0688은 그 자신의 프로모터의 조절 하에 위치하는 스펙티노마이신에 대한 저항성 유전자를 나타낸다.
pGBE0421	엘. 락티스 (<i>L. lactis</i>) 포스포케톨라제에 대해서 인코딩하는 GeneArt® (Invitrogen)로부터의 플라스미드
pGBE0123	변형된 다수의 클로닝 부위 (MCS)를 함유하는 플라스미드 pUC18 (New England Biolabs)의 변형된 버전
pGBE0457	엘. 락티스 포스포케톨라제의 발현을 허용하는 플라스미드
pGBE0689	pBluescript II 파지미드, Agilent Technologies
pGBE0690	pGBE0689 내에 클로닝된 클로스트리디움 아세토부틸리쿰으로부터의 <i>ctfA</i> 및 <i>ctfB</i> 유전자
pGBE0691	pGBE0690 내에 클로닝된 클로스트리디움 아세토부틸리쿰으로부터의 <i>adc</i> 유전자
pGBE0051	pUC19, New England Biolabs
pGBE0692	pGBE0051 내에 클로닝된 클로스트리디움 아세토부틸리쿰으로부터의 <i>ctfA</i> , <i>ctfB</i> 및 <i>adc</i> 유전자
pGBE0693	pGBE0692 내에 클로닝된 클로스트리디움 아세토부틸리쿰으로부터의 <i>thl</i> 유전자
pGBE0124	플라스미드 pSU18 (Borja Bartolome, Yolanda Jubete, Eduardo Martinez and Fernando de la Cruz, Gene, 1991, Vol. 102, Issue 1, pp. 75-78)의 변형된 버전
pGBE0096	pGBE0124 내에 클로닝된 클로스트리디움 아세토부틸리쿰으로부터의 <i>thl</i> , <i>ctfA</i> , <i>ctfB</i> 및 <i>adc</i> 유전자
pGBE0928	엘. 락티스 포스포케톨라제의 발현을 허용하는 플라스미드
pGBE1020	엘. 락티스 포스포케톨라제의 발현 및 아세톤 생산을 허용하는 플라스미드
pGBE1021	아세톤 생산을 허용하는 플라스미드

[0151] 표 2. 사용 및 구성된 스트레인

[0152] FRT : FLP 인식 표적

스트레인 명칭	유전자형	구성 기원의 스트레인	
GBE0129	F- 람다- ilvG- rfb-50 rph-1		<i>에스케리키아 콜라이</i> K12 야생형 MG1655
GBE0170	pKD46	GBE0129	pKD46 플라스미드에 의한 스트레인 GBE0129의 형질전환
GBE0329	pGBE0096	GBE0129	pGBE0096 플라스미드에 의한 스트레인 GBE0129의 형질전환
GBE0901	$\Delta ptsHI::FRT$	GBE0129	
GBE0902	$\Delta ptsHI::FRT$ pKD46	GBE0901	pKD46 플라스미드에 의한 스트레인 GBE0901의 형질전환
GBE0903	$\Delta ptsHI::FRT \Delta zwf_edd_eda::aad^+$	GBE0902	
GBE0929	$\Delta ptsHI::FRT$	GBE0901	탄소의 공급원으로서 글루코즈를 갖는 MS 배지 상에서 스트레인 GBE0901의 선택
GBE1000	$\Delta ptsHI::FRT \Delta zwf_edd_eda::aad^+$	GBE0903.	탄소의 공급원으로서 글루코즈를 갖는 MS 배지 상에서 스트레인 GBE0903의 선택
GBE1001	$\Delta ptsHI::FRT \Delta zwf_edd_eda::aad^+$ pKD46	GBE1000	pKD46 플라스미드에 의한 스트레인 GBE1000의 형질전환
GBE1005_pKD46	$\Delta ptsHI::FRT \Delta zwf_edd_eda::aad^+ \Delta pfkA::aac^+$	GBE1001	
GBE1005	$\Delta ptsHI::FRT \Delta zwf_edd_eda::aad^+ \Delta pfkA::aac^+$	GBE1005_pKD46.	pKD46 플라스미드의 상실이 확인되었다.
GBE1005_p	$\Delta ptsHI::FRT \Delta zwf_edd_eda::aad^+ \Delta pfkA::aac^+ pCP20$	GBE1005	pCP20 플라스미드에 의한 스트레인 GBE1005의 형질전환
GBE1006	$\Delta ptsHI::FRT \Delta zwf_edd_eda::FRT \Delta pfkA::FRT$	GBE1005_p	pCP20 플라스미드의 상실이 확인되었다.
GBE1010	$\Delta ptsHI::FRT \Delta zwf_edd_eda::FRT \Delta pfkA::FRT$ pKD46	GBE1006	pKD46 플라스미드에 의한 스트레인 GBE1006의 형질전환
GBE1014_pKD46	$\Delta ptsHI::FRT \Delta zwf_edd_eda::FRT \Delta pfkA::FRT \Delta pfkB::aad^+$	GBE1010	
GBE1014	$\Delta ptsHI::FRT \Delta zwf_edd_eda::FRT \Delta pfkA::FRT \Delta pfkB::aad^+$	GBE1014_pKD46.	pKD46 플라스미드의 상실이 확인되었다.
GBE1283	$\Delta ptsHI::FRT$	GBE0929	탄소의 공급원으로서 글루코즈를 갖는 MS 배지 내에서 GBE0929의 연속 배양
GBE1284	$\Delta ptsHI::FRT$ pKD46	GBE1283	pKD46 플라스미드에 의한 스트레인 GBE1283의 형질전환
GBE1287	$\Delta ptsHI::FRT \Delta zwf_edd_eda::aad^+$	GBE1284	

[0153]

GBE1337	$\Delta ptsHI::FRT \Delta zwf_edd_eda::aad^+$ pKD46	GBE1287	pKD46 플라스미드에 의한 스트레인 GBE1287의 형질전 환
GBE1339	$\Delta zwf_edd_eda::aac^+$	GBE0170	
GBE1340	$\Delta zwf_edd_eda::aac^+$ pKD46	GBE1339	pKD46 플라스미드에 의한 스트레인 GBE1339의 형질전 환
GBE1341_pKD 46	$\Delta zwf_edd_eda::aac^+ \Delta pfkA::$ aad^+	GBE1340	
GBE1341	$\Delta zwf_edd_eda::aac^+ \Delta pfkA::$ aad^+	GBE1341_pK D46	플라스미드 pKD46의 상실이 확인되었다.
GBE1341_p	$\Delta zwf_edd_eda::aac^+ \Delta pfkA::$ aad^+ pCP20	GBE1341	pCP20 플라스미드에 의한 스 트레인 GBE1341의 형질전환
GBE1342	$\Delta zwf_edd_eda::FRT \Delta pfkA::FRT$	GBE1341_p	pCP20 플라스미드의 상실이 확인되었다.
GBE1343	$\Delta zwf_edd_eda::FRT \Delta pfkA::FRT$ pKD46	GBE1342	pKD46 플라스미드에 의한 스 트레인 GBE1342의 형질전환
GBE1344_pKD 46	$\Delta zwf_edd_eda::FRT \Delta pfkA::FRT$ $\Delta pfkB::aad^+$	GBE1343	
GBE1344	$\Delta zwf_edd_eda::FRT \Delta pfkA::FRT$ $\Delta pfkB::aad^+$	GBE1344_pK D46	pKD46 플라스미드의 상실이 확인되었다.
GBE1345	$\Delta zwf_edd_eda::FRT \Delta pfkA::FRT$ $\Delta pfkB::aad^+$ pGBE457 pGBE0096	GBE1344	pGBE96 및 pGB457 플라스미드 둘 다에 의한 스트레인 GBE1344의 형질전환
GBE1346	pGBE0096	GBE0329	MS 배지 + 글루코즈 (2 g/L) + 클로람페니콜 (25 μ g/ml)에 대한 스트레인 GBE0329의 적 응
GBE1347	$\Delta zwf_edd_eda::FRT \Delta pfkA::FRT$ $\Delta pfkB::aad^+$ pGBE457 pGBE96	GBE1345	MS 배지 + 글루코즈 (2 g/L) + 클로람페니콜 (25 μ g/ml)에 대한 스트레인 GBE1345의 적 응
GBE1348	$\Delta ptsHI::FRT$ pGB96	GBE0929	pGBE96 및 pGB457 플라스미드 둘 다에 의한 스트레인 GBE0929의 형질전환
GBE1349	$\Delta ptsHI::FRT \Delta zwf_edd_eda::FRT$ $\Delta pfkA::FRT \Delta pfkB::aad^+$ pGBE457 pGBE0096	GBE1014	pGBE96 및 pGB457 플라스미드 둘 다에 의한 스트레인 GBE1014의 형질전환
GBE1350	$\Delta ptsHI::FRT$ pGB96	GBE1348	MS 배지 + 글루코즈 (2 g/L) + 클로람페니콜 (25 μ g/ml)에 대한 스트레인 GBE1348의 적 응
GBE1351	$\Delta ptsHI::FRT \Delta zwf_edd_eda::FRT$ $\Delta pfkA::FRT \Delta pfkB::aad^+$ pGBE457 pGBE0096	GBE1349	MS 배지 + 글루코즈 (2 g/L) + 클로람페니콜 (25 μ g/ml)에 대한 스트레인 GBE1349의 적 응
GBE1353_pKD 46	$\Delta ptsHI::FRT$ $\Delta zwf_edd_eda::aad^+ \Delta pfkA::$ aac^+	GBE1337	

[0154]

GBE1353	Δ ptsHI::FRT Δ zwf_edd_eda::aad+ Δ pfkA::aac+	GBE1353_pKD46	pKD46 플라스미드의 상실이 확인되었다.
GBE1353_p	Δ ptsHI::FRT Δ zwf_edd_eda::aad+ Δ pfkA::aac+ pCP20	GBE1353	pCP20 플라스미드에 의한 스트레인 GBE1353의 형질전환
GBE1368	Δ ptsHI::FRT Δ zwf_edd_eda::FRT Δ pfkA::FRT	GBE1353_p	pCP20 플라스미드의 상실이 확인되었다.
GBE1371	Δ ptsHI::FRT Δ zwf_edd_eda::FRT Δ pfkA::FRT pKD46	GBE1368	pKD46 플라스미드에 의한 스트레인 GBE1368의 형질전환
GBE1420_pKD46	Δ ptsHI::FRT Δ zwf_edd_eda::FRT Δ pfkA::FRT Δ pfkB::aad+	GBE1371	
GBE1420	Δ ptsHI::FRT Δ zwf_edd_eda::FRT Δ pfkA::FRT Δ pfkB::aad+	GBE1420_pKD46	pKD46 플라스미드의 상실이 확인되었다.
GBE1433	Δ ptsHI::FRT Δ zwf::aad+	GBE1284	
GBE1436	Δ ptsHI::FRT Δ zwf::aad+ pKD46	GBE1433	pKD46 플라스미드에 의한 스트레인 GBE1433의 형질전환
GBE1441_pKD46	Δ ptsHI::FRT Δ zwf::aad+ Δ pfkA::aac+	GBE1436	
GBE1441	Δ ptsHI::FRT Δ zwf::aad+ Δ pfkA::aac+	GBE1441_pKD46	pKD46 플라스미드의 상실이 확인되었다.
GBE1441_p	Δ ptsHI::FRT Δ zwf::aad+ Δ pfkA::aac+ pCP20	GBE1441	pCP20 플라스미드에 의한 스트레인 GBE1441의 형질전환
GBE1448	Δ ptsHI::FRT Δ zwf::FRT Δ pfkA::FRT	GBE1441_p	pCP20 플라스미드의 상실이 확인되었다.
GBE1449	Δ ptsHI::FRT Δ zwf::FRT Δ pfkA::FRT pKD46	GBE1448	pKD46 플라스미드에 의한 스트레인 GBE1448의 형질전환
GBE1518_pKD46	Δ ptsHI::FRT Δ zwf::FRT Δ pfkA::FRT Δ pfkB::aad+	GBE1449	
GBE1518	Δ ptsHI::FRT Δ zwf::FRT Δ pfkA::FRT Δ pfkB::aad+	GBE1518_pKD46	pKD46 플라스미드의 상실이 확인되었다.
GBE2252_pKD46	Δ ptsHI::FRT Δ pfkA::aad+	GBE1284	
GBE2252	Δ ptsHI::FRT Δ pfkA::aad+	GBE2252_pKD46	pKD46 플라스미드의 상실이 확인되었다.
GBE2253	Δ ptsHI::FRT Δ pfkA::aad+ pKD46	GBE2252	pKD46 플라스미드에 의한 스트레인 GBE2252의 형질전환
GBE2256_pKD46	Δ ptsHI::FRT Δ pfkA::aad+ Δ pfkB::aac+	GBE2253	
GBE2256	Δ ptsHI::FRT Δ pfkA::aad+ Δ pfkB::aac+	GBE2256_pKD46	pKD46 플라스미드의 상실이 확인되었다.
GBE2262	F- 람다- ilvG- rfb-50 rph-1 pGB1021	GBE0129	pGB1021 플라스미드에 의한 스트레인 GBE0129의 형질전환
GBE2263	Δ zwf_edd_eda::FRT Δ pfkA::FRT Δ pfkB::aad+ pGB1020	GBE1344	pGB1020 플라스미드에 의한 스트레인 GBE1344의 형질전환
GBE2264	F- 람다- ilvG- rfb-50 rph-1 pGB1021	GBE2262	MS 배지 + 글루코즈 (2 g/L) + 앰피실린 (100 μ g/mL)에 대한 스트레인 GBE2262의 적응
GBE2265	Δ zwf_edd_eda::FRT Δ pfkA::FRT Δ pfkB::aad+ pGB1020	GBE2263	MS 배지 + 글루코즈 (2 g/L) + 앰피실린 (100 μ g/mL)에 대한 스트레인 GBE2263의 적응
GBE2266	Δ ptsHI::FRT pGB1021	GBE1283	pGB1021 플라스미드에 의한 스트레인 GBE1283의 형질전환

GBE2267	Δ ptsHI::FRT Δ zwf_edd_eda::FRT Δ pfkA::FRT Δ pfkB::aad+ pGB1020	GBE1420	pGB1020 플라스미드에 의한 스트레인 GBE1420의 형질전환
GBE2268	Δ ptsHI::FRT pGB1021	GBE2266	MS 배지 + 글루코즈 (2 g/L) + 앰피실린 (100 μ g/mL)에 대한 스트레인 GBE2266의 적응
GBE2269	Δ ptsHI::FRT Δ zwf_edd_eda::FRT Δ pfkA::FRT Δ pfkB::aad+ pGB1020	GBE2267	MS 배지 + 글루코즈 (2 g/L) + 앰피실린 (100 μ g/mL)에 대한 스트레인 GBE2267의 적응
GBE2270	Δ ptsHI::FRT Δ pfkA::aad+ Δ pfkB::aac+ pGB1020	GBE2256	pGB1020 플라스미드에 의한 스트레인 GBE2256의 형질전환
GBE2271	Δ ptsHI::FRT Δ zwf::FRT Δ pfkA::FRT Δ pfkB::aad+ pGB1020	GBE1518	pGB1020 플라스미드에 의한 스트레인 GBE1518의 형질전환
GBE2272	Δ ptsHI::FRT Δ pfkA::aad+ Δ pfkB::aac+ pGB1020	GBE2270	MS 배지 + 글루코즈 (2 g/L) + 앰피실린 (100 μ g/mL)에 대한 스트레인 GBE2270의 적응
GBE2273	Δ ptsHI::FRT Δ zwf::FRT Δ pfkA::FRT Δ pfkB::aad+ pGB1020	GBE2271	MS 배지 + 글루코즈 (2 g/L) + 앰피실린 (100 μ g/mL)에 대한 스트레인 GBE2271의 적응

[0157] 표 3. 박테리아 염색체 지역, 사용된 유전자, 플라스미드 지역의 서열

명칭	뉴클레오타이드 서열	설명	서열 번호
스트레인 GBE0901로부터의 뉴클레오타이드 서열, 염기쌍 2531736으로부터 2531870까지	Aggctagacttttagttccacaacactaaacctataagttggggaaat acagtgtaggctggagctgcttcgaagttcctatactttctagagaa taggaacttcggaataggaactaaggaggatattcatatg	FRT 지역은 밑줄을 그었다.	SQ 0001
스펙티노마이신 저항성 카세트	agagcggcggccaccgcgggaagttcctatactttctagagaatagg aacttcagctgatagaaacagaagccactggagcacctcaaaaacac catatacactaaatcagtaagttggcagcatcaccgacgacacttt gcccgaataaatacctgtgacggaagatcattcgagaataaata aatcctgggtgccctgttgataccgggaagccctggcccaacttttg gcgaaaaatgagacgttgatcggcacgttagaggttccaactttcacc ataatgaataaagatcactaccgggctatttttgagttatcgaga ttttcaggagctaaaggaagctacatagagtgaataagtgcccgcg agatttcggtgcaactatcacaagcactcaacgtcatcgggcgccac ttggagtcgacgttgctggccgtgcatttgtaggctccgactgga tgccggttgaaaccgtacagtgatattgatgtgctggtgactgtag ctgcaccgctcaatgatgccgtcgccgaagccctgctcgtcgatctc ttggaggtttcagcttccctggccaaaacaggcactccgcgctt ggaagtgaccatcgtcgtgcacagtgacatcgtaacctggcggtatc cgccagcgccggaactgcagttcggagagtgccagcgaagacatc cttgcgggcatcttcgagcccgccacaaccgattctgacttggcgat tctgctaacaaggcaagcaacatagcgtcgtcttggcaggttcag cagcgaaggatctctcagctcagtcaggaagcgatctattcaag gcaactggccgatactctgaagctatggaactcgcccgagatgggc ggcgatgagcgggaatgtagtcttactttgtctcgtatctggtaca ccgcagcaaccggcaagatcgcccaaggatgttgcctgccacttgg gcaatggcacgcttgccagctcaacatcagccatcctgttgatgc caagcgggcttacttgggcaagaagaagattattgcccgtcgtg cggatcaggtggcgccgctcattaaattcgtgaagatgaagcagtt aaactgcttggcgccagcaataagaagttcctatactttctagaga ataggaacttcgcatgcacgcagcatatgc	FRT 지역은 밑줄을 그었다.	SQ 0002

[0158]

아프라마이신 저항성 카세트	agagcggcggccaccgcgggaagttcctatactttctagagaatagg aacttcgggttcagtgacgtccatcagcaaaaggagatgataagtt tatcaccaccgactatttgcaacagtgccttgatcgtgctatgat cgactgatgtcatcagcggtagagtgcaatgctgcaatacgaatg gcgaaaagccgagctcatcggtcagcttctcaaccttgggttaccc ccggcggtgtgctgctgggtccacagctccttcgtagcgtccggccc ctcgaagatgggccaacttggactgatcgaggccctcgctgctgcgct gggtccgggagggagcgtcgtcatgccctcgtggtaggtctggacg acgagccgttcgatcctgccagctcgcccttacaccggaccttgga gttgctctgacacattctggcgctgccaaatgtaagcgacgcgc ccatccatttgccttgcggcagcggggccacagcgagcagatca tctctgatccattgccctgccacctcactcgctgcaagcccggtc gcccgtgtccatgaactcgatgggcaggtacttctcctcgcgctggg acacgatgccaacacgacgtgcatcttgccgagttgatggcaagg ttccctatggggtagcgagacactgcaccattctcaggaaggcaag ttggtacgcgtcgattatctcgagaatgaccactgctgtgagcgctt tgccttggcggacaggtggctcaaggagaagagccttcagaaggaa gtccagtcggtcatgcttctcgttgatccgctcccgcgacatt gtggcgacagccctgggtcaactgggaggagatccgttgatcttct gcatccgacagggcgggatcgagaatgcgatgccgctcgccagt cgattggctgagctcatgagcggagaacgagatgacgttggaggggc aaggtcgcgctgattgctggggcaacacgtggagcgatcggggatt gtctttctcagctcgctgatgatgctgacgctcaatgccgaagtt cctatactttctagagaataggaacttcgcatgcacgcagcatatg c	FRT 지역은 밑줄을 그어져 있다	SQ 0003
pGB0123 플라스미드의 MCS	AAGCTTCGGCGCGGGTTAATTAACCTCCTTAGTTTAACTAGG CATGCCCTTAGAGGATCCCGGGTACCGAGCTCGAAttacCTGCAGG AATTC	HindIII 및 EcoRI에 대한 제한 부위는 밑줄을 그어져 있다.	SQ 0004

[0159]

<i>PacI</i> 및 <i>NotI</i> 제한 부위를 측면에 갖는 최적화된 락토코커스 락티스 (<i>Lactococcus lactis</i>) 포스포케톨라제 유전자	TTAATTAAATGCATCATCACCACCATCACATGACCGAATATAACAGCG AAGCCTATCTGAAAAAACTGGATAAATGGTGGCGTGACGCAACCTAT CTGGGTGCAGGTATGATTTTCTGAAAGAAAATCCGCTGTTTAGCGT TACCGGCACCCCGATTAAAGCAGAAAATCTGAAAGCCAATCOGATTG GTCAATTGGGGCACCCTTAGCGGTACAGACCTTTCTGTATGCACATGCA AATCGCCTGATTAAACAAATATAACCAGAAAATGTTTTATATGGGTGG TCCGGGTATGTTGGTTCAGGCAATGGTTGTTCCGAGCTATCTGGATG GTAGCTATACCGAAGCATATCCGGAATATCCAGGATCTGGAAGGT ATGAGCCGTCTGTTTAAACGTTTATAGCTTTCCGGGTGGTATGGTAG CCACATGACCGCACAGACACCGGGTAGCCTGCATGAAGGTGGTGAAC TGGGTTATGTTCTGAGCCATGCAACCGGTGCAATTCCTGATCAGCG GAACAAATTCGATTGTCAGTTGTTGGTGATGGTGAAGCAGAAACCGG TCCGCTGATGACAGCTGGCATAGCATCAAATTTATCAACCGGAAAA ACGATGGTGCCATTCTGCCGATTCTGGATCTGAATGGCTTTAAATC AGCAATCCGACCCCTTTTGACAGTACCGATGATGTTGATATCCGCAA ATTTTTCGAAGGTCTGGGTTATAGTCCGCTTATATTGAAAACGATG ACATCCATGACTACATGGCCTATCATAAACTGGCAGCAGAAATTTT GACAAAGCCATTGAAGATATCCATCAGATTGAGAAAGATGCCCGTGA AGATAATCGCTATCAGAAATGGTAAATTCGCGCATGGCGATGTTA TTGACAGCTCTGCCGAAAGGTGGGGTGGTCCCTGTTATAATGATTGG AGCGGTCCGAAATTTGATGGTAAAGGTATGCCGATCGAACATAGCTT TCGTGCACATCAGGTTCGCTGCCGCTGAGCAGCAAAAACATGGGCA CCCTGCCGGAATTTGTTAAATGGATGACCAGCTATCAGCCGGAACCC CTGTTTAATGCAGATGGTAGCCTGAAAGAAAGAACTGCGCGATTTTGC ACCGAAAGGTGAAATGCGTATGGCAAGCAATCCGGTTACCAATGGTG GTGTTGATTATAGCAATCTGGTTCTGCCGATTGGCAAGAATTTGCA AATCCGATTAGCGAAAAAATCGTGGTAAACTGCTGCCGATACCAA TGATAATATGGATATGAACGTGCTGAGCAAAATTTTCGCCGAAATG TTAAACTGAACCCGACCCGTTTTCTGTTGTTGGTCCGGATGAAACC ATGAGCAATCGTTTTTGGGAGATGTTAAAGTGACCAATCGTCAGTG GATGCAGGTATCAAAAAATCCGAACGATGAGTTTATTAGTCCGGAAG GTGCAATTATGATAGCCAGCTGAGCGAATCAGGCAGAAAGGTTGG CTGGAAGGTTATACCCCTGACCGGTCTGACCGGTGTTTTTGCAAGCTA TGAAAGTTTTCTGCGTGTGTTGATAGCATGCTGACCCAGCACTTTA AATGGATTGCTAGGCAGCAGATCAGAAATGGCGTCATGATTATCCG AGCCTGAATGTTATTAGCACCAGCACCGTTTTTCAGCAGGATCATAA TGTTATACCCATCAAGATCCGGGTATGCTGACCCATCTGGCAGAGA AAAAAAGCGATTTTATCGTCAGTATCTGCCTGCAGATGGTAATACC CTGCTGGCCGTTTTGATCGTGCATTTAGGATCGCAGCAAAATTA CCATATTGTTGCAAGCAAAACAGCCTCGTCAGCAGTGGTTTACCAAAG AAGAAGCAGAAAAAATGGCCACCGATGGTATTGCAACCATGATTGG GCAAGCACCGCAAAAGATGGTGAAGCCGTTGATCTGTTTTTGCAAG TGCCGGTGCAGAACCGACCATTTGAAACCTGGCAGCACTGCATCTGG TTAATGAAGTTTTTCCGAGGCCAAATTTGCTATGTTAATGTTGTT GAACTGGGTGCTGTCAGAAAAAGAAAGTGCACTGAATCAAGAACG CGAACTGAGTGATGAAGAGTTCGAAAAATACTTTGGTCCGAGCGGTA CACCGGTTATTTTGGTTTTTCATGGCTATGAAGATCTGATCGAGAGC ATCTTTTATCAGCGTGGTCATGATGGTCTGATTGTTTCATGTTATCG TGAAGATGGTGATATTACCACCACTATGATATGCGTGTATTATAGCG AACTGGATCGTTTTTCATCAGGCAATTGATGCAATGCAGGTTCTGTAT GTGAATCGTAAAGTTAATCAGGGTCTGGCCAAAGCATTATGATCG TATGGAACGTACCTGGTGAACATTTTGAAGTTACCGTAATGAAG GCGTTGATATTCCGGAATTTACCGAATGGGTTGGAGCGATCTGAAA AAGTAATGAGCGGCCGC	<i>PacI</i> 및 <i>NotI</i>에 대한 제한 부위는 밑줄 그어져 있다.	SQ 0005
pGB0124 플라스미드의 MCS	GAATTCGAGCTCGGTACCGGGGATCCTCTAGAGGCATGCCTAGGTT TAAACTAAGGAGGTTAATTAAACCCCGCGCGCAAGCTT		SQ 0006

[0160]

[0161] 표 4. 프라이머 서열

명칭	서열	설명	서열번호
0635	Ggttcaattcttcttttagcggc	<i>ptsHI</i> 유전자를 포함하는 이. 콜라이 염색체 지역을 서열화하기 위한 프라이머	RC0001
0638	Ccgcaaaaacgacatccggcagc	<i>ptsHI</i> 유전자를 포함하는 이. 콜라이 염색체 지역을 서열화하기 위한 프라이머	RC0002
0633	caagtataccctggcttaagtaccgggttagtta acttaaggagaatgacAGAGCGGCCGCCACCGCGG	<i>zwf_edd_eda</i> 유전자의 결실을 위한 프라이머	RC0003
0634	gcaaaaaaacgctacaaaaatgcccgatcctcga tcgggcattttgacttGCATATGCTGCGTGCATGCG	<i>zwf_edd_eda</i> 유전자의 결실을 위한 프라이머	RC0004
1036	Cgcacttttgcgcgttttccc	<i>zwf_edd_eda</i> 유전자를 포함하는 이. 콜라이 염색체 지역을 서열화하기 위한 프라이머	RC0005
1037	Ggtgattttcagtgaggtctcccc	<i>zwf_edd_eda</i> 유전자를 포함하는 이. 콜라이 염색체 지역을 서열화하기 위한 프라이머	RC0006
0629	agacttccggcaacagatttcttttgcattcca aagttcagagtagtcAGAGCGGCCGCCACCGCGG	<i>pfkA</i> 유전자의 결실을 위한 프라이머	RC0007
0630	gcttctgtcatcggtttcagggtaaaggaatctg cctttttccgaaatcaGCATATGCTGCGTGCATGCG	<i>pfkA</i> 유전자의 결실을 위한 프라이머	RC0008
0619	Ggcgctcacgatcttcgcacgcggc	<i>pfkA</i> 유전자를 포함하는 이. 콜라이 염색체 지역을 서열화하기 위한 프라이머	RC0009
0620	Cgcctcatattgctgacaaagtgcgc	<i>pfkA</i> 유전자를 포함하는 이. 콜라이 염색체 지역을 서열화하기 위한 프라이머	RC0010
0631	actttccgctgattcggtgccagactgaaatcag cctataggaggaaatgAGAGCGGCCGCCACCGCGG	<i>pfkB</i> 유전자의 결실을 위한 프라이머	RC0011
0632	gttgccgacaggttggtgatgattccccaatgc tgggggaatgtttttgGCATATGCTGCGTGCATGCG	<i>pfkB</i> 유전자의 결실을 위한 프라이머	RC0012
0621	Ccacagcgaccaggcagtggtgtgtcc	<i>pfkB</i> 유전자를 포함하는 이. 콜라이 염색체 지역을 서열화하기 위한 프라이머	RC0013
0622	Gcactttgggtaagccccgaaacc	<i>pfkB</i> 유전자를 포함하는 이. 콜라이 염색체 지역을 서열화하기 위한 프라이머	RC0014
pUC18 _246	Ccattcaggtgcgcaactg	pGB0123 내에 클로닝된 락토코커스 락티스로부터의 포스포케톨라제 유전자를 서열화하기 위한 프라이머	RC0015
pUC18 _3800 rev	Gcgcgttggccgattcattaatgc	pGB0123 내에 클로닝된 락토코커스 락티스로부터의 포스포케톨라제 유전자를 서열화하기 위한 프라이머	RC0016
Pkt lacto 700_d ir	CAATCCGACCCGTGTTGCACGTAC	pGB0123 내에 클로닝된 락토코커스 락티스로부터의 포스포케톨라제 유전자를 서열화하기 위한 프라이머	RC0017

[0162]

Pkt_1 acto_ mil_ d ir	GCTGCCGATACCAATGATAATATGG	pGB0123 내에 클로닝된 락토코커스 락티스로부터의 포스포케톨라제 유전자를 서열화하기 위한 프라이머	RC0018
Pkt_1 acto_ mil_ r ev	CCATATTATCATTTGGTATCCGGCAGC	pGB0123 내에 클로닝된 락토코커스 락티스로부터의 포스포케톨라제 유전자를 서열화하기 위한 프라이머	RC0019
0070	CCCGGGGGATCCAGAATTTAAAGGAGGGATT	클로스트리디움 아세토부틸리쿰 ATCC 824 스트레인으로부터의 <i>ctfA</i> 및 <i>ctfB</i> 유전자를 증폭시키기 위한 프라이머	RC0020
0071	CTCGAGGATATCAAGAATCTTTTAAACAGCCA TGGGTC	클로스트리디움 아세토부틸리쿰 ATCC 824 스트레인으로부터의 <i>ctfA</i> 및 <i>ctfB</i> 유전자를 증폭시키기 위한 프라이머	RC0021
1066	TGTAAACGACGGCCAGT	서열화하기 위한 일반적 프라이머	RC0022
1067	CAGGAAACAGCTATGACC	서열화하기 위한 일반적 프라이머	RC0023
0072	CTCGAGGATATCAGGAAGTGACTTTTATGTAA AGG	클로스트리디움 아세토부틸리쿰 ATCC 824 스트레인으로부터의 <i>adc</i> 유전자를 증폭시키기 위한 프라이머	RC0024
0073	GCATGCGTCGACATTAATAAATAAGAGTTACC	클로스트리디움 아세토부틸리쿰 ATCC 824 스트레인으로부터의 <i>adc</i> 유전자를 증폭시키기 위한 프라이머	RC0025
1068	CCTCACGGCAAAGTCTCAAGC	<i>ctfA</i> 및 <i>ctfB</i> 유전자를 서열화하기 위한 프라이머	RC0026
1069	GCCATGGGTCTAAGTTCATGG	<i>ctfA</i> 및 <i>ctfB</i> 유전자를 서열화하기 위한 프라이머	RC0027
0074	CATGATTTTAAAGGGGGTACCATATGCATAAGTT TAA	클로스트리디움 아세토부틸리쿰 ATCC 824 스트레인으로부터의 <i>thl</i> 유전자를 증폭시키기 위한 프라이머	RC0028
0075	GTTATTTTAAAGGATCCTTTTAGCACTTTTCTA GC	클로스트리디움 아세토부틸리쿰 ATCC 824 스트레인으로부터의 <i>thl</i> 유전자를 증폭시키기 위한 프라이머	RC0029
1070	GGCAGAAAGGGAGAACTGTAG	클로스트리디움 아세토부틸리쿰 (ATCC 824)으로부터의 아세톤 오페론을 서열화하기 위한 프라이머	RC0030
1071	TGGAAGAATACGTGCAGGCGG	클로스트리디움 아세토부틸리쿰 (ATCC 824)으로부터의 아세톤 오페론을 서열화하기 위한 프라이머	RC0031
1072	GATTACGCCAAGCTTGCATGCC	클로스트리디움 아세토부틸리쿰 (ATCC 824)으로부터의 아세톤 오페론을 서열화하기 위한 프라이머	RC0032
1073	CCGGCCTCATCTACAATACTACC	클로스트리디움 아세토부틸리쿰 (ATCC 824)으로부터의 아세톤 오페론을 서열화하기 위한 프라이머	RC0033
1074	CCCATTATTGCTGGGTCAACTCC	클로스트리디움 아세토부틸리쿰 (ATCC 824)으로부터의 아세톤 오페론을 서열화하기 위한 프라이머	RC0034

[0163]

1516	CCCGGTACCTCATTACTTTTTCAGATGCTCAA ACCC	락토코커스 락티스로부터의 포스포 케톨라제 유전자 (YP_003354041.1) 를 증폭시키기 위한 프라이머	RC0035
1517	GGGGAATTCAGGAGGTGTAAGATGCATCATCA CCACCATCATGACC	락토코커스 락티스로부터의 포스포 케톨라제 유전자 (YP_003354041.1) 를 증폭시키기 위한 프라이머	RC0036
1994	CCATAGCTCCACCCATACCAGAGAGC	클로스트리디움 아세토부틸리쿰 (ATCC 824)으로부터의 아세톤 오페 론을 서열화하기 위한 프라이머	RC0037
1995	GCTATTATTACGTCAGCATCTCCTGC	클로스트리디움 아세토부틸리쿰 (ATCC 824)으로부터의 아세톤 오페 론을 서열화하기 위한 프라이머	RC0038
1996	GCAGGCGAAGTTAATGGCGTGC	클로스트리디움 아세토부틸리쿰 (ATCC 824)으로부터의 아세톤 오페 론을 서열화하기 위한 프라이머	RC0039
1997	GATACGGGGTAACAGATAAACCATTTTC	클로스트리디움 아세토부틸리쿰 (ATCC 824)으로부터의 아세톤 오페 론을 서열화하기 위한 프라이머	RC0040
1998	CCCTTCTGCCTTTAATTACTACAGG	클로스트리디움 아세토부틸리쿰 (ATCC 824)으로부터의 아세톤 오페 론을 서열화하기 위한 프라이머	RC0041
1999	GCATCAGGATTAATGACTGTGCGAGC	클로스트리디움 아세토부틸리쿰 (ATCC 824)으로부터의 아세톤 오페 론을 서열화하기 위한 프라이머	RC0042
2000	GGACTAGCGCCATTCCAACATATTC	클로스트리디움 아세토부틸리쿰 (ATCC 824)으로부터의 아세톤 오페 론을 서열화하기 위한 프라이머	RC0043
2001	GCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCC	클로스트리디움 아세토부틸리쿰 (ATCC 824)으로부터의 아세톤 오페 론을 서열화하기 위한 프라이머	RC0044
2002	GCATTGCGTGTACAAGAGTAACGAG	클로스트리디움 아세토부틸리쿰 (ATCC 824)으로부터의 아세톤 오페 론을 서열화하기 위한 프라이머	RC0045
2003	CCTGTCCAAGCTTCATGTACGG	클로스트리디움 아세토부틸리쿰 (ATCC 824)으로부터의 아세톤 오페 론을 서열화하기 위한 프라이머	RC0046
1109	GCGCAAGATCATGTTACCGGTAACATAA AGGATAAGCGCAGATAGCATATGCTGCGTCATG CG	zwf 유전자의 결실을 위한 프라이 머	RC0047
1110	CGCCTGTAAACCGGAGCTCATAGGG	zwf 유전자를 포함하는 이. 콜라이 염색체 지역을 서열화하기 위한 프 라이머	RC0048

[0164]

[0165]

유전자 녹아웃을 위한 염색체 통합

[0166]

DNA를 염색체의 특정 지역 내에 통합시키기 위해서는, 표적화된 염색체 부위 및 선택 마커에 대한 삽입 DNA의 상동성이 요구된다. 마커가 통합 후에 쉽게 제거될 수 있다면 유리하다. FRT/F1p 리컴비나제 시스템은 마커를 제거하는 기전을 제공한다. FRT 부위는 F1p 리컴비나제에 대한 인식 부위이다. F1p는 직접적으로 반복된 인식 부위로부터 개입 DNA를 절제하는 부위 특이적 리컴비나제이다.

[0167]

표적화된 염색체 부위에 대한 상동성 암(arm)을 함유하며, FRT (Datsenko KA. And Wanner BL., Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000, Vol. 97, No. 12, pp. 6640-6645) 부위가 측면에 있는 선택 마커를 인코딩하는 통합 카세트는 pKD46을 수용하는 표적 세포 내로 형질전환시킨다 (Datsenko KA. And Wanner BL., Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000, Vol. 97, No. 12, pp. 6640-6645). 성공적인 구성 성분은 항생제의 존재 하에서의 세포의 성장에 의해서 선택된다. 이어서, pKD46을 세포로부터 회복시킨 다음에, 리컴비나제 플라스미드를 항생제 유전자의 제거를 위한 구성 성분 내에 도입시킨다. FRT 카세트를 함유하는 스트레인을 F1p 리컴비나제를 인코딩하는 pCP20 플라스미드로 형질전환시킨다 (Datsenko KA. And Wanner BL., Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000, Vol. 97, No. 12, pp. 6640-6645). 통합된 마커를 제거한 후에, 리컴비나제 플라스미드를 스트레인으로부터 회복시켰다.

[0168]

실시예 1: 스트레인 GBE1014의 구성

[0169]

이 항목의 목적은 그에 대한 PEP-의존성 글루코즈 흡수가 PTS 수송 유전자의 결실에 의해서 불활성화되고, ATP-의존성 글루코즈 흡수가 가능하고, 엠텐-마이오호프-파나스 경로 (EMPP)가 포스포프럭토키나제 유전자의 결실에 의해서 불활성화되며, 펜토즈 포스페이트 경로 (PPP)가 글루코즈-6-포스페이트 데하이드로게나제 유전자의 결실에 의해서 불활성화된 GBE1014로 불리는 에스케리키아 콜라이 스트레인의 구성을 기술하기 위한 것이다.

[0170]

구성은 스트레인 GBE0901로 시작하였다. GBE0901은 *ptsH* 및 *ptsI* 유전자를 포함하는 bp 2531736으로부터 2533865까지 (NCBI genome database)의 원래의 뉴클레오타이드 서열이 SEQ SQ0001에 의해서 대체된 에스케리키

아 콜라이, (Migula) Castellani and Chalmers, 스트레인 MG1655 (ATCC #700926)이다. 이 결실은 PEP-의존성 포스포트랜스퍼라제 시스템 (PTS)에 영향을 미쳐서 PEP-의존성 글루코즈 흡수가 스트레인 GBE0901에서 불활성화 되도록 한다. *ptsHI* 유전자의 결실은 PCR에 의해서 확인되었으며, 올리고뉴클레오타이드 0635 및 0638 (각각 SEQ RC0001 및 RC0002로 제공됨)이 프라이머로 사용되었다. 생성된 0.4 Kbp PCR 생성물은 동일한 프라이머를 사용하여 서열화되었다.

[0171] 스트레인 GBE0901을 LB 배지에서 배양하고, GBE0901 세포를 전기적격성 (electrocompetent)으로 만들었다. 전기적격성 GBE0901 세포를 pKD46 (Datsenko KA. And Wanner BL., Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000, Vol. 97, No. 12, pp. 6640-6645)으로 불리는 플라스미드로 형질전환시킨 다음에, 앰피실린 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 함유하는 LB 플레이트 상에 플레이팅하였다. 플레이트를 30°C에서 밤새 배양하였다. 플라스미드 pKD46에 의한 GBE0901 세포의 형질전환은 스트레인 GBE0902를 생성시켰다.

[0172] 플라스미드 pGBE0688은 그 자신의 프로모터의 조절 하에 배치된 스펙티노마이신에 대한 저항성 유전자를 나타낸다. 이 저항성 카세트의 서열은 표 3에 나타낸다 (SEQ SQ0002).

[0173] 플라스미드 pGBE0688을 프라이머 0633 및 0634 (각각 SEQ RC0003 및 RC0004로 제공됨)와 함께 주형으로 사용하여 1.3 Kbp PCR 생성물을 생성시켰다. 이 1.3 Kbp PCR 생성물을 전기적격성 GBE0902 박테리아 내로 형질전환시킨 다음에, 형질전환 혼합물을 스펙티노마이신 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 함유하는 LB 플레이트 상에 플레이팅하고, 37°C에서 밤새 배양하여 스트레인 GBE0903을 생성시켰다. 스트레인 GBE0903에서 *zwf*, *edd*, 및 *eda* 유전자로 구성된 DNA 서열을 결실시켰다. 이들 유전자는 각각 글루코즈-6-포스페이트 데하이드로게나제, 6-포스포글루코네이트 데하이드라타제, 및 2-케토-3-테옥시-6-포스포글루코네이트 알돌라제를 인코딩한다. *zwf*, *edd*, 및 *eda* 유전자를 함유하는 이 결실된 DNA 서열은 스펙티노마이신 저항성 카세트에 의해서 대체되었다. *zwf*, *edd*, 및 *eda* 유전자의 효과적인 결실을 체크하기 위해서 PCR 증폭을 프라이머 1036 및 1037 (각각 SEQ RC0005 및 RC0006으로 제공됨)을 사용하여 수행하였다. 최종 1.9 Kbp PCR 생성물을 수득하였다. 이 1.9 Kbp PCR 생성물을 동일한 프라이머 1036 및 1037에 의해서 서열화하였다.

[0174] 그 후, 스트레인 GBE0903을 LB 플레이트 상에 플레이팅하고, 37°C에서 배양하고, 분리된 콜로니를 탄소 공급원으로서 글루코즈 (2 g/L)를 사용하여 MS 플레이트 상에서 스크리닝하였다 (Richaud C., Mengin-Leucreulx D., Pochet S., Johnson EJ., Cohen GN. and Marliere P; The Journal of Biological Chemistry; 1993; Vol. 268; No. 36; pp. 26827-26835). 37°C에서 48 시간 배양한 후에, 콜로니가 보이기 시작하였으며, 글루코즈 (2 g/L)가 공급된 MS 액체 배지에 옮겼다. 이러한 37°C에서의 밤새 배양은 pKD46 플라스미드의 상실을 유도하였다. 하나의 분리체는 7 시간의 배가 시간 (doubling time)을 가졌으며, GBE1000으로 칭하였다.

[0175] 스트레인 GBE1000은 전기적격성으로 만들었다. GBE1000 전기적격성 세포를 플라스미드 pKD46으로 형질전환시킨 다음에, 앰피실린 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 공급된 LB 플레이트 상에 플레이팅하였다. 플레이트를 30°C에서 밤새 배양하였다. 플라스미드 pKD46에 의한 GBE1000 세포의 형질전환은 스트레인 GBE1001을 생성시켰다.

[0176] 플라스미드 pGBE0687은 그 자신의 프로모터의 조절 하에 배치된 아프라마이신에 대한 저항성 유전자를 나타낸다. 이 저항성 카세트의 서열은 표 3에 나타낸다 (SEQ SQ0003).

[0177] 플라스미드 pGBE0687을 프라이머 0629 및 0630 (각각 SEQ RC0007 및 RC0008로 제공됨)과 함께 주형으로 사용하여 1.2 Kbp PCR 생성물을 생성시켰다. 생성된 1.2 Kbp PCR 생성물을 전기적격성 GBE1001 박테리아 내로 형질전환시키고, 형질전환 혼합물을 아프라마이신 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 함유하는 LB 플레이트 상에 플레이팅하였다. 그 후, 플레이트를 37°C에서 밤새 배양하여 GBE1005_pKD46으로 불리는 새로운 스트레인을 생성시켰다. 스트레인 GBE1005_pKD46에서는 포스포프럭토키나제 유전자 *pfkA*가 결실되고, 아프라마이신 저항성 카세트에 의해서 대체되었다. *pfkA* 유전자의 결실이 일어났는지를 체크하기 위해서, PCR 증폭은 프라이머 0619 및 0620 (각각 SEQ RC0009 및 RC0010으로 제공됨)을 사용하여 수행되었다. 이 1.7 Kbp PCR 생성물은 동일한 프라이머 0619 및 0620을 사용하여 서열화되었다. 플라스미드 pKD46의 상실을 체크하기 위해서, 스트레인 GBE1005_pKD46을 LB 플레이트 상에 플레이팅하고, 42°C에서 밤새 배양하였다. 플라스미드 pKD46의 상실은 분리된 콜로니를 앰피실린 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 함유하는 LB 플레이트 상에 플레이팅함으로써 확인하였으며, 30°C에서 밤새 배양하고, LB 플레이트 상에서 밤새 37°C에서 배양하였다. LB 플레이트 상에서 성장된 생성된 스트레인을 37°C에서 배양하였으며, GBE1005로 칭하였다. GBE1005 세포는 앰피실린 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 공급된 LB 플레이트 상에서 성장하지 않았다.

[0178] 스펙티노마이신 카세트는 *zwf_eda* 유전자의 상응하는 유전자좌에 위치하였으며, 아프라마이신 카세트는 *pfkA* 유전자의 상응하는 유전자좌에 위치하였다. 스펙티노마이신 및 아프라마이신 저항성 유전자를 함유하는 저

항성 카세트를 절제하기 위해서, 스트레인 GBE1005를 플라스미드 pCP20 (Datsenko KA. And Wanner BL., Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000, Vol. 97, No. 12, pp. 6640-6645)으로 형질전환시켜 스트레인 GBE1005_p를 수득하였다. 30℃에서 앰피실린 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 함유하는 LB 플레이트 상에서 밤새 배양한 후에, 분리된 콜로니를 앰피실린 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 공급된 LB 플레이트 상에 재스트리킹하고 (restreaked), 30℃에서 밤새 배양하였다. 그 후, 분리된 콜로니를 LB 플레이트 상에 플레이팅하고, 42℃에서 밤새 배양하여 pCP20 플라스미드의 상실을 야기시켰다. 그 후, 2 개의 저항성 카세트의 효과적인 절제 및 pCP20 플라스미드의 상실을 체크하기 위해서, 분리된 콜로니를 스펙티노마이신 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 함유하는 LB 플레이트 상에 스트리킹하고, 37℃에서 아프라마이신 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 함유하는 LB 플레이트 상에서 밤새 배양하고, 30℃에서 앰피실린 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 함유하는 LB 플레이트 상에서 밤새 배양하고, LB 플레이트 상에서 37℃에서 밤새 배양하였다. LB 플레이트 상에서 성장한 생성된 스트레인을 37℃에서 배양하였으며, GBE1006으로 칭하였다. GBE1006 세포는 스펙티노마이신 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 함유하는 LB 플레이트 상에서, 아프라마이신 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 함유하는 LB 플레이트 상에서, 및 앰피실린 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 공급된 LB 플레이트 상에서 성장하지 않았다.

[0179] 스트레인 GBE1006은 전기적격성으로 만들어졌으며, GBE1006 전기적격성 세포를 플라스미드 pKD46으로 형질전환시켰다. 그 후, 형질전환체 세포를 앰피실린 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 함유하는 LB 플레이트 상에 플레이팅하고, 플레이트를 30℃에서 밤새 배양하여 GBE1010으로 불리는 새로운 스트레인을 수득하였다. PCR 생성물은 주형으로 플라스미드 pGBE0688, 및 프라이머로서 올리고뉴클레오타이드 0631 및 0632 (각각 SEQ RC0011 및 RC0012로 제공됨)를 주형으로 사용하여 생성되었다. 생성된 1.3 Kbp PCR 생성물을 전기적격성 GBE1010 박테리아 내로 형질전환시키고, 형질전환 혼합물을 스펙티노마이신 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 함유하는 LB 플레이트 상에 플레이팅하였다. 플레이트를 37℃에서 밤새 배양하여 스트레인 GBE1014_ pKD46을 생성시켰다. 스트레인 GBE1014_ pKD46에서는 포스포프럭토키나제 유전자 *pfkB*가 결실되었으며, 결실된 DNA 서열은 스펙티노마이신 저항성 유전자를 함유하는 카세트에 의해서 대체되었다. *pfkB* 유전자의 결실이 일어났는지를 체크하기 위해서, 프라이머 0621 및 0622 (각각 SEQ RC0013 및 RC0014로 제공됨)를 사용하여 PCR 증폭을 수행하였다. 이 최종 2.2 Kbp PCR 생성물은 동일한 프라이머 0621 및 0622를 사용하여 서열화하였다.

[0180] 플라스미드 pKD46의 상실을 유도하기 위해서, 스트레인 GBE1014_ pKD46을 LB 플레이트 상에 플레이팅하고, 플레이트를 42℃에서 밤새 배양하였다. 플라스미드 pKD46의 상실은 분리된 콜로니를 앰피실린 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 공급된 LB 플레이트 상에 플레이팅함으로써 체크하고, 30℃에서 밤새 배양하고, 37℃에서 밤새 LB 플레이트 상에서 배양하였다. 37℃에서 LB 플레이트 상에서 성장하는 생성된 스트레인은 GBE1014로 칭하였다. GBE1014 세포는 앰피실린 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 공급된 LB 플레이트 상에서 성장하지 않았다.

[0181] **실시예 2: 스트레인 GBE0929의 구성**

[0182] 스트레인 GBE0901을 37℃에서 LB 플레이트 상에 플레이팅하고, 분리된 콜로니를 탄소의 공급원으로서 글루코즈 (2 g/L)를 사용하여 MS 플레이트 상에서 스크리닝하였다. 37℃에서 48 시간 배양한 후에, 콜로니가 보이게 되었다. 하나의 분리체는 5 시간의 배가 시간을 가졌으며, GBE0929로 칭하였다.

[0183] **실시예 3: 스트레인 GBE1344의 구성**

[0184] 구성은 GBE0129로 불리는 스트레인으로 시작하였다. GBE0129는 MG1655 에스케리키아 콜라이 박테리아 (ATCC #700926)다.

[0185] 스트레인 GBE0129를 LB 배지 내에서 배양하고, GBE0129 세포를 전기적격성으로 만들었다. 전기적격성 GBE0129 세포를 플라스미드 pKD46으로 형질전환시킨 다음에, 형질전환체를 앰피실린 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 함유하는 LB 플레이트 상에 플레이팅하였다. 플레이트를 30℃에서 밤새 배양하여 GBE0170로 불리는 새로운 스트레인을 생성시켰다.

[0186] PCR 생성물은 주형으로서 플라스미드 pGBE0687 및 프라이머로서 올리고뉴클레오타이드 0633 및 0634 (각각 SEQ RC0003 및 RC0004로 제공됨)를 사용하여 생성시켰다. 생성된 1.2 Kbp PCR 생성물을 전기적격성 GBE0170 박테리아 내로 형질전환시키고, 형질전환 혼합물을 아프라마이신 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 함유하는 LB 플레이트 상에 플레이팅하였다. 플레이트를 37℃에서 밤새 배양하였다. 배양은 pKD46 플라스미드의 상실을 유발하였으며, GBE1339로 불리는 새로운 스트레인의 생성을 유도하였다. 스트레인 GBE1339에서는, *zwf* 유전자에 의해서 인코딩된 글루코즈-6-포스페이트 데하이드로게나제, *edd* 유전자에 의해서 인코딩된 6-포스포글루코네이트 데하이드라타제, 및 *eda* 유전자에 의해서 인코딩된 2-케토-3-데옥시-6-포스포글루코네이트 알돌라제는 불활성화되었다. 순차적인 *zwf*, *edd*, 및 *eda* 유전자가 결실되고, 아프라마이신 저항성 유전자를 함유하는 카세트에 의해서 대체되었다. *zwf*, *edd*, 및 *eda* 유전자의 결실이 이루어졌는지를 체크하기 위해서, 프라이머 1036 및 1037 (각각 SEQ RC0005 및

RC0006으로 제공됨)을 사용하여 PCR 증폭을 수행하였다. 이 1.8 Kbp PCR 생성물은 동일한 프라이머 1036 및 1037을 사용하여 서열화하였다.

[0187] 스트레인 GBE1339는 전기적격성으로 만들었으며, GBE1339 전기적격성 세포를 플라스미드 pKD46으로 형질전환시켰다. 그 후, 형질전환체를 앰피실린 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 공급된 LB 플레이트 상에 플레이팅하였다. 플레이트를 30℃에서 밤새 배양하여 스트레인 GBE1340을 생성시켰다. PCR 생성물은 주형으로 플라스미드 pGBE0688 및 프라이머로서 올리고뉴클레오타이드 0629 및 0630 (각각 SEQ RC0007 및 RC0008로 제공됨)을 사용함으로써 생성되었다. 생성된 1.3 Kbp PCR 생성물을 전기적격성 GBE1340 박테리아 내로 형질전환시키고, 형질전환 혼합물을 스펙티노마이신 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 함유하는 LB 플레이트 상에 플레이팅하였다. 플레이트를 37℃에서 밤새 배양하여 스트레인 GBE1341_pKD46을 생성시켰다. 스트레인 GBE1341_pKD46에서는 포스포프럭토키나제를 코딩한 *pfkA* 유전자가 스펙티노마이신 저항성 유전자로 대체되었다. *pfkA* 유전자의 결실이 이루어졌는지를 체크하기 위해서, 프라이머 0619 및 0620 (각각 SEQ RC0009 및 RC0010으로 제공됨)을 사용하여 PCR 증폭을 수행하였다. 이 1.8 Kbp PCR 생성물을 동일한 프라이머 0619 및 0620을 사용하여 서열화하였다. 스트레인 GBE1341_pKD46에 대한 플라스미드 pKD46의 상실을 유도하기 위해서, GBE1341_pKD46 세포를 LB 플레이트 상에 플레이팅하고, 42℃에서 배양하였다. 플라스미드 pKD46의 상실은 분리된 콜로니를 앰피실린 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 공급된 LB 플레이트 상에 플레이팅함으로써 확인하고, 30℃에서 밤새 배양하고, LB 플레이트 상에서 37℃에서 밤새 배양하였다. 37℃에서 배양된 LB 플레이트 상에서 성장하는 생성된 스트레인은 GBE1341이었다. GBE1341은 앰피실린 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 공급된 LB 플레이트 상에서 성장하지 않았다.

[0188] *zwf_edd_eda* 및 *pfkA* 유전자의 이전의 유전자좌에 각각 위치하는 아프라마이신 및 스펙티노마이신 저항성 유전자를 함유하는 저항성 카세트를 절제하기 위해서, 스트레인 GBE1341을 플라스미드 pCP20으로 형질전환시켜 GBE1341_p로 불리는 새로운 스트레인을 수득하였다. 30℃에서 앰피실린 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 함유하는 LB 플레이트 상에서 밤새 배양한 후에, 분리된 콜로니를 30℃에서의 추가의 밤새 배양을 위해 앰피실린 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 공급된 LB 플레이트 상에 재스트리킹하였다. 그 후, 분리된 콜로니를 LB 플레이트 상에 플레이팅하고, 42℃에서 밤새 배양하였다. 42℃에서의 이 배양은 pCP20 플라스미드의 상실을 유발하였다. 결국, 2 개의 저항성 카세트의 절제 및 pCP20 플라스미드의 상실을 체크하기 위해서, 분리된 콜로니를 스펙티노마이신 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 함유하는 LB 플레이트 상에 스트리킹하고, 37℃에서 아프라마이신 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 공급된 LB 플레이트 상에서 밤새 배양하고, 30℃에서 앰피실린 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 함유하는 LB 플레이트 상에서 밤새 배양하고, LB 플레이트 상에서 밤새 37℃에서 배양하였다. 37℃에서 배양된 LB 플레이트 상에서 성장하는 생성된 스트레인은 GBE1342로 칭하였다. GBE1342 세포는 스펙티노마이신 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 공급된 LB 플레이트 상에서, 아프라마이신 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 공급된 LB 플레이트 상에서, 및 앰피실린 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 함유하는 LB 플레이트 상에서 성장하지 않았다.

[0189] 스트레인 GBE1342는 전기적격성으로 만들어졌으며, GBE1342 세포를 플라스미드 pKD46으로 형질전환시켰다. 그 후, 형질전환체를 앰피실린 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 공급된 LB 플레이트 상에 플레이팅하고, 30℃에서 밤새 배양하여 스트레인 GBE1343을 수득하였다. PCR 생성물을 주형으로 플라스미드 pGBE0688 및 프라이머로서 올리고뉴클레오타이드 0631 및 0632 (각각 SEQ RC0011 및 RC0012으로 제공됨)를 사용하여 생산하였다. 생성된 1.3 Kbp PCR 생성물을 전기적격성 GBE1343 박테리아 내로 형질전환시키고, 형질전환 혼합물을 스펙티노마이신 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 함유하는 LB 플레이트 상에 플레이팅하고, 이어서 37℃에서 밤새 배양하였다. 새로운 스트레인이 생성되었으며, GBE1344_pKD46으로 칭하였다. 스트레인 GBE1344_pKD46에서는 포스포프럭토키나제에 대해 코딩한 *pfkB* 유전자가 결실되고, 스펙티노마이신 저항성 카세트에 의해서 대체되었다. *pfkB* 유전자의 결실이 일어났는지를 체크하기 위해서, PCR 증폭은 프라이머 0621 및 0622 (각각 SEQ RC0013 및 RC0014로 제공됨)를 사용하여 수행되었다. 수득된 2.2 Kbp PCR 생성물은 동일한 프라이머 0621 및 0622를 사용하여 서열화되었다.

[0190] 플라스미드 pKD46의 상실을 유도하기 위해서, 스트레인 GBE1344_pKD46을 LB 플레이트 상에 플레이팅하고, 42℃에서 밤새 배양하였다. 플라스미드 pKD46의 상실은 분리된 콜로니를 앰피실린 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 함유하는 LB 플레이트 상에 플레이팅함으로써 체크하였으며, 30℃에서 밤새 배양하고, LB 플레이트 상에서 밤새 37℃에서 배양하였다. 37℃에서 배양된 LB 플레이트 상에서 성장하는 생성된 스트레인은 GBE1344로 칭하였다. GBE1344 세포는 앰피실린 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 함유하는 LB 플레이트 상에서 성장하지 않았다.

[0191] **실시예 4: 플라스미드 pGBE0457의 구성**

[0192] 이 항목의 목적은 이. 콜라이 스트레인에서 락토코커스 락티스로부터의 포스포케탈라제 YP_003354041.1의 발현을 허용하는 플라스미드의 구성을 기술하기 위한 것이다.

[0193] 플라스미드 pGBE0123은 플라스미드 pUC18의 변형된 버전 (New England Biolabs)이며, 변형된 다중 클로닝 부위

(MCS)를 함유한다. pUC18로부터의 원래의 MCS (*HindIII* 제한 부위로부터 *EcoRI* 제한 부위까지)는 서열 SQ0004 (표 3)에 의해서 대체되었다. 플라스미드 pGB0123은 Plac 프로모터의 조절 하에서 2 개의 재조합체 단백질의 발현을 허용한다.

포스포케톨라제 유전자 ID	포스포케톨라제 단백질 ID	기원 유기체	GeneArt®로부터의 플라스미드(Invitrogen)
8679043	YP_003354041.1	락토코커스 락티스 아종 락티스 KF147	pGBE0421

[0194]

[0195] 엘. 락티스 (*L. lactis*) 포스포케톨라제 유전자는 에스케리키아 콜라이 내에서의 최적 발현을 위해 GeneArt® (Invitrogen)에 의해서 코돈-최적화되었다. 또한, His-태그를 유전자의 5' 위치에 첨가하고, 추가의 정지 코돈을 3' 위치에 첨가하였다 (SQ0005). 유전자 구성은 *PacI* 및 *NotI* 제한 부위가 측면에 있으며, 플라스미드 pGBE0421 내에 제공되었다.

[0196] 클로닝 실험을 위해서, PCR 생성물 및 제한 단편은 퀴아릭 겔 추출 키트 (QIAquick gel Extraction kit) (Qiagen)를 사용하여 겔 정제하였다. 제한 효소 및 T4 DNA 리가제 (New England Biolabs, Beverly, MA)는 제조자의 권고에 따라 사용하였다.

[0197] 플라스미드 pGBE0421을 제한 효소 *PacI* 및 *NotI*로 소화시켜 2.6 Kbp 생성물을 생성시켰다. pGB0123 플라스미드를 역시 제한 효소 *PacI* 및 *NotI*로 소화시키고, 2.6 Kbp 제한 단편에 결합시켰다. 생성된 플라스미드 (pGBE0457)를 프라이머 1061, 1062, 1063, 1064 및 1065 (각각 SEQ RC0015, RC0016, RC0017, RC0018 및 RC0019로 제공됨)를 사용하여 서열화하였다.

[0198] 락토코커스 락티스로부터의 포스포케톨라제의 발현은 His 트랩 (Protino Ni-IDA 1000 kit, Macherey Nagel)을 사용하여 재조합체 단백질을 정제한 후에 단백질 겔 상에서 체크하였다. 정제는 제조자의 권고에 따라 처리되었다. 정제된 효소를 사용한 효소 시험은 또한, 2 가지 상이한 기질, 즉 크실로로즈-5-포스페이트 및 프럭토즈-6-포스페이트 상에서 포스포케톨라제 활성을 검출하기 위해서 수행되었다. 실험 절차는 용액의 pH가 7.5이고, 1 mM의 $MgCl_2$ 를 첨가하는 것을 제외하고는 레오 밀레 (Leo Meile) 등에 의해서 사용된 것 (Journal of Bacteriology, May 2001, p. 2929-2936)과 동일하였다. 이 효소 시험을 위해서, 10 μ g의 정제된 단백질을 75 μ l의 반응액에 첨가하였다. 비활성 (형성된 아세틸-P의 μ mol/min/단백질 mg)은 D-크실로로즈-5-포스페이트 및 D-프럭토즈-6-포스페이트에 대해서 각각 2815 μ mol/min/단백질 mg 및 1941 μ mol/min/단백질 mg이었다.

[0199] 실시예 5: 플라스미드 pGBE0096의 구성

[0200] 이. 콜라이에서 아세톤 생산을 책임질 수 있는 플라스미드의 구성은 문헌 (Bermejo LL., Welker NE. and Papoutsakis ET., Applied and Environmental Microbiology, 1998, Vol. 64, No. 3, pp. 1076-1085)에 기술된 플라스미드 구성을 기초로 하였다.

[0201] 스트레인 클로스트리디움 아세토부틸리쿰을 주문하였다 (ATCC 824). 이 스트레인으로부터의 게놈 DNA는 박테리아 염색체 및 pSOL1로 불리는 플라스미드로 구성되었다.

[0202] *ctfA* 및 *ctfB* 유전자는 프라이머 0070 및 0071 (각각 SEQ RC0020 및 RC0021로 제공됨)을 사용하여 pSOL1 플라스미드로부터 PCR 증폭시켰다. PCR 생성물의 5' 말단에서 *BamHI* 제한 부위 및 PCR 생성물의 3' 말단에서 *EcoRV* 제한 부위를 도입시켰다. 생성된 1.3 Kbp PCR 생성물을 제한 효소 *BamHI* 및 *EcoRV*로 소화시킨 다음에, 역시 제한 효소 *BamHI* 및 *EcoRV*로 소화시킨 pGB0689 (pBluescript II 파지미드, Agilent Technologies)와 결합시켰다. 생성된 플라스미드 (pGBE0690)를 프라이머 1066 및 1067 (각각 SEQ RC0022 및 RC0023으로 제공됨)을 사용하여 서열화하였다.

[0203] *adc* 유전자 및 유전자 종결인자를 프라이머 0072 및 0073 (각각 SEQ RC0024 및 RC0025로 제공됨)을 사용하여 pSOL1 플라스미드로부터 PCR 증폭시켰다. PCR 증폭은 5' 말단에서 *EcoRV* 제한 부위 및 3' 말단에서 *SaI* 제한 부위의 삽입을 허용하였다. 생성된 0.8 Kbp PCR 생성물을 제한 효소 *EcoRV* 및 *SaI*로 소화시켰다. pGBE0690 플라스미드를 역시 제한 효소 *EcoRV* 및 *SaI*로 소화시킨 다음에 0.8 Kbp PCR 생성물과 결합시켰다. 생성된 플라스미드 (pGBE0691)를 프라이머 1066, 1067, 1068 및 1069 (각각 SEQ RC0022, RC0023, RC0026 및 RC0027로 제공됨)를 사용하여 서열화하였다.

- [0204] 플라스미드 pGBE0691을 제한 효소 *Bam*HI 및 *Sal*I로 소화시켜 2.2 Kbp 생성물을 생성시켰다. 2.2 Kbp 제한 단편은 *ctfA*, *ctfB* 및 *adc* 유전자를 함유하였다. pGBE0051 플라스미드 (pUC19, New England Biolabs)도 역시 제한 효소 *Bam*HI 및 *Sal*I로 소화시킨 다음에, 2.2 Kbp 제한 단편과 결합시켰다. 생성된 플라스미드 (pGBE0692)는 프라이머 1066, 1067, 1068 및 1069 (각각 SEQ RC0022, RC0023, RC0026 및 RC0027로 제공됨)를 사용하여 서열화하였다.
- [0205] 클로스트리디움 아세토부틸리쿰 (ATCC 824) 게놈 DNA로부터의 *thl* 유전자 및 그의 상응하는 *thl* 프로모터를 프라이머 0074 및 0075 (각각 SEQ RC0028 및 RC0029로 제공됨)를 사용하여 PCR 증폭시켰다. PCR 증폭은 5' 말단에서 *Kpn*I 제한 부위 및 3' 말단에서 *Bam*HI 제한 부위의 삽입을 허용하였다. 생성된 1.4 Kbp PCR 생성물을 제한 효소 *Kpn*I 및 *Bam*HI로 소화시키고, 플라스미드 pGBE0692에 대해서도 마찬가지로 하였다. 소화된 pGBE0692 플라스미드를 1.4 Kbp PCR 생성물과 결합시켰다. 생성된 플라스미드 pGBE0693을 프라이머 1066, 1067, 1068, 1069, 1070, 1071, 1072, 1073 및 1074 (각각 SEQ RC0022, RC0023, RC0026 RC0027, RC0030, RC0031, RC0032, RC0033 및 RC0034로 제공됨)를 사용하여 서열화하였다.
- [0206] 플라스미드 pGBE0124는 플라스미드 pSU18 (Borja Bartolome, Yolanda Jubete, Eduardo Martinez and Fernando de la Cruz, Gene, 1991, Vol. 102, Issue 1, pp. 75-78)의 변형된 버전이며, 이것은 변형된 다중 클로닝 부위 (MCS)를 함유한다. pSU18로부터의 원래의 MCS (*Eco*RI 제한 부위로부터 *Hind*III 제한 부위까지)는 서열 SEQ SQ0006 (표 3)에 의해서 대체되었다. 플라스미드 pGB0124는 Plac 프로모터의 조절 하에서 2 개의 재조합체 단백질의 발현을 허용한다.
- [0207] 플라스미드 pGBE0693을 제한 효소 *Kpn*I 및 *Sal*I로 소화시켜 3.5 Kbp 생성물을 생성시켰다. pGBE0124 플라스미드를 역시 제한 효소 *Kpn*I 및 *Sal*I로 소화시킨 다음에, 3.5 Kbp 제한 단편에 결합시켰다. 생성된 플라스미드 (pGBE0096)는 프라이머 1066, 1067, 1068, 1069, 1070, 1071, 1072, 1073 및 1074 (각각 SEQ RC0022, RC0023, RC0026 RC0027, RC0030, RC0031, RC0032, RC0033 및 RC0034로 제공됨)를 사용하여 서열화하였다.
- [0208] **실시예 6: 스트레인 GBE1346 및 GBE1347에 의한 아세톤 생산**
- [0209] 적절한 스트레인 내로의 플라스미드 형질전환의 설명
- [0210] 스트레인 GBE0129는 전기적격성으로 만들었으며, GBE0129 전기적격성 세포를 플라스미드 pGBE0096으로 형질전환시켰다. 그 후, 형질전환체를 클로람페니콜 (25 μ g/ml)을 함유하는 LB 플레이트 상에 플레이팅하고, 플레이트를 30°C에서 밤새 배양하여 스트레인 GBE0329를 생성시켰다.
- [0211] 스트레인 GBE1344를 전기적격성으로 만들고, GBE1344 전기적격성 세포를 플라스미드 pGBE0457 및 pGBE0096 둘다에 의해서 형질전환시켰다. 그 후, 형질전환체를 암피실린 (100 μ g/ml) 및 클로람페니콜 (25 μ g/ml)이 공급된 LB 플레이트 상에 플레이팅하였다. 플레이트를 30°C에서 밤새 배양하여 스트레인 GBE1345를 수득하였다.
- [0212] 스트레인 GBE0329 및 GBE1345로부터 분리된 콜로니를 탄소의 공급원으로서 글루코즈 (2 g/L) 및 클로람페니콜 (25 μ g/ml)을 함유하는 MS 플레이트 상에서 스크리닝하였다. 이들 플레이트를 30°C에서 배양하여 각각 스트레인 GBE1346 및 GBE1347을 수득하였다. 30°C에서의 배양 4일 후에, 콜로니를 글루코즈 (2 g/L) 및 클로람페니콜 (25 μ g/ml)을 함유하는 MS 액체 배지에 옮기고, 30°C에서 3일 동안 배양하였다.
- [0213] 플라스크 조건의 설명
- [0214] 발효 실험을 위해서, 200 mM의 디칼륨 포스페이트를 갖는 MS 배지를 50 mM 디칼륨 포스페이트 대신에 사용하였다. 생성된 배지는 MSP로 칭하였다.
- [0215] 글루코즈 (10 g/L) 및 클로람페니콜 (25 μ g/ml)을 함유하는 400 ml의 MSP 액체 배지를 스트레인 GBE1346의 전 배양물 (pre culture) 또는 스트레인 GBE1347의 전 배양물로 접종하였다. 초기 OD₆₀₀은 0.1이었다. 400 ml의 배양물을 500 ml 병에 접종하고, 30°C에서 170 rpm의 속도 하에 스크류 캡 (screw cap)으로 밀봉하였다. 2 ml 분취액을 1일, 2일, 3일, 6일, 7일 및 8일 후에 취하였다. 각각의 분취액 샘플에 대해서 병을 10 초 동안 개봉하였다.
- [0216] 분석 방법의 설명
- [0217] 분취액을 여과하고, 글루코즈 농도를 제조자의 추천에 따라 글루코즈 (HK) 시험 키트 (GAHK20-1KT, Sigma)에 의해서 결정하였다. 아세톤 농도는 가스 크로마토그래프 (Gas chromatograph) 450-GC (Bruker) 및 다음의 프로그램을 사용한 가스 크로마토그래피에 의해서 결정하였다:

- [0218] - 칼럼: DB-WAX (123-7033, Agilent Technologies)
- [0219] - 분사기 스플리트 (Injector Split)/스플리트레스 (Splitless): $T^{\circ} = 250^{\circ}\text{C}$
- [0220] - 오븐:
- [0221] o 6 분 동안 80°C
- [0222] o 220°C 까지 분당 10°C
- [0223] o 7 분 동안 220°C
- [0224] o 칼럼 유속: 1.5 ml/분 (Nitrogen)
- [0225] - 검출기 FID: $T^{\circ} = 300^{\circ}\text{C}$
- [0226] *결과*
- [0227] 생산된 [아세톤] (mM) / 소비된 [글루코즈] (mM)의 비는 스트레인 GBE1346에 대해서보다 스트레인 GBE1347에 대해서 더 크다.
- [0228] **실시예 7: 스트레인 GBE1350 및 GBE1351에 의한 아세톤 생산**
- [0229] *적절한 스트레인 내로의 플라스미드 형질전환의 설명*
- [0230] 스트레인 GBE0929는 전기적격성으로 만들었으며, GBE0929 전기적격성 세포를 플라스미드 pGBE0096으로 형질전환시켰다. 그 후, 형질전환체를 클로람페니콜 ($25\text{ }\mu\text{g/ml}$)을 함유하는 LB 플레이트 상에 플레이팅하고, 플레이트를 30°C 에서 밤새 배양하여 스트레인 GBE1348을 생성시켰다.
- [0231] 스트레인 GBE1014를 전기적격성으로 만들고, 플라스미드 pGBE0457 및 pGBE0096 둘 다에 의해서 형질전환시켰다. 그 후, 형질전환체를 앰피실린 ($100\text{ }\mu\text{g/ml}$) 및 클로람페니콜 ($25\text{ }\mu\text{g/ml}$)이 공급된 LB 플레이트 상에 플레이팅하고, 플레이트를 30°C 에서 밤새 배양하여 스트레인 GBE1349를 수득하였다.
- [0232] 스트레인 GBE1348 및 GBE1349로부터 분리된 콜로니를 탄소의 공급원으로서 글루코즈 (2 g/L) 및 클로람페니콜 ($25\text{ }\mu\text{g/ml}$)을 함유하는 MS 플레이트 상에서 스크리닝하였다. 이들 플레이트를 30°C 에서 4일 동안 배양하여 각각 스트레인 GBE1350 및 GBE1351을 수득하였다. 그 후, 분리된 콜로니를 글루코즈 (2 g/L) 및 클로람페니콜 ($25\text{ }\mu\text{g/ml}$)을 함유하는 MS 액체 배지에 옮겼다. GBE1350 및 GBE1351 세포를 30°C 에서 배양하였다.
- [0233] *플라스크 조건의 설명*
- [0234] 글루코즈 (10 g/L) 및 클로람페니콜 ($25\text{ }\mu\text{g/ml}$)을 함유하는 400 ml 의 MSP 배지를 스트레인 GBE1350의 전-배양물 또는 스트레인 GBE1351의 전-배양물로 접종하였다. 초기 OD_{600} 은 0.1이었다. 400 ml 의 배양물을 500 ml 병에 배양하고, 30°C 에서 170 rpm 의 속도 하에 스크류 캡으로 밀봉하였다. 2 ml 분취액을 1일, 2일, 3일, 6일, 7일 및 8일 후에 취하였다. 각각의 분취액 샘플에 대해서 병을 10 초 동안 개봉하였다.
- [0235] *분석 방법의 설명*
- [0236] 분취액을 여과하고, 글루코즈 농도를 제조자의 추천에 따라 글루코즈 (HK) 시험 키트 (GAHK20-1KT, Sigma)에 의해서 결정하였다. 아세톤 농도는 가스 크로마토그래프 450-GC (Bruker) 및 다음의 프로그램을 사용한 가스 크로마토그래피에 의해서 결정하였다:
- [0237] - 칼럼: DB-WAX (123-7033, Agilent Technologies)
- [0238] - 분사기 스플리트/스플리트레스: $T^{\circ} = 250^{\circ}\text{C}$
- [0239] - 오븐:
- [0240] o 6 분 동안 80°C
- [0241] o 220°C 까지 분당 10°C
- [0242] o 7 분 동안 220°C
- [0243] o 칼럼 유속: 1.5 ml/분 (Nitrogen)

[0244] - 검출기 FID: T° = 300℃

[0245] 결과

[0246] 생산된 [아세톤] (mM) / 소비된 [글루코즈] (mM)의 비는 스트레인 GBE1350에 대해서보다 스트레인 GBE1351에 대해서 더 컸다.

[0247] 결과 표 I

	GBE1346	GBE1347	GBE1350	GBE1351
PEP 의존성 글루코즈 흡수 (ptsHI)	+	+	-	-
이중 포스포케톨라제 (pkt)				
EMPP (pfkAB)	-	+	-	+
PPP (zwf edd eda)	+	-	+	-
	+	-	+	-
이중 프럭토즈 비스포스파타제 (fbp)	-	-	-	-
이중 아세톤 경로 (thl ctfAB adc)	+	+	+	+
[아세톤] _{생산됨} /[글루코즈] _{소비됨}	0.02	>0.02	0.04	0.14

[0248]

[0249] 실시예 8: 플라스미드 pGBE1020의 구성

[0250] 이 항목의 목적은 락토코커스 락티스 (*Lactococcus lactis*)로부터의 포스포케톨라제 YP_003354041.1의 발현을 허용하고, 또한 이. 콜라이 스트레인에서의 아세톤 생산을 허용하는 플라스미드의 구성을 설명하기 위한 것이다.

[0251] 엘. 락티스 포스포케톨라제 유전자는 프라이머 1516 및 1517 (각각 SEQ RC0035 및 RC0036으로 제공됨)을 사용하여 pGBE0421 플라스미드로부터 PCR 증폭시켰다.

[0252] PCR 증폭은 5' 말단에 *EcoRI* 제한 부위 및 리보솜 결합 부위 (RBS) 및 3' 말단에 *KpnI* 제한 부위의 삽입을 허용하였다. 생성된 2.5 Kbp PCR 생성물을 제한 효소 *EcoRI* 및 *KpnI*로 소화시켰다. pGBE0123 플라스미드를 역시 제한 효소 *EcoRI* 및 *KpnI*로 소화시킨 다음에, 2.5 Kbp PCR 생성물과 결합시켰다. 생성된 플라스미드 (pGBE0928)는 프라이머 1061, 1062, 1063, 1064 및 1065 (각각 SEQ RC0015, RC0016, RC0017, RC0018 및 RC0019로 제공됨)를 사용하여 서열화하였다.

[0253] 플라스미드 pGBE0096을 제한 효소 *KpnI* 및 *NotI*로 소화시켜 3.6 Kbp 생성물을 생성시켰다. pGBE0928 플라스미드를 역시 제한 효소 *KpnI* 및 *NotI*로 소화시키고, 3.6 Kbp 제한 단편에 결합시켰다. 생성된 플라스미드 (pGBE1020)는 프라이머 1994, 1995, 1996, 1997, 1998, 1999, 2000, 2001, 2002 및 2003 (각각 SEQ RC0037, RC0038, RC0039, RC0040, RC0041, RC0042, RC0043, RC0044, RC0045 및 RC0046으로 제공됨)을 사용하여 서열화하였다.

[0254] 실시예 9: 플라스미드 pGBE1021의 구성

[0255] 이 항목의 목적은 이. 콜라이 스트레인에서 아세톤의 생산을 허용하는 플라스미드의 구성을 설명하기 위한 것이다.

[0256] 플라스미드 pGBE0096을 제한 효소 *KpnI* 및 *NotI*로 소화시켜 3.6 Kbp 생성물을 생성시켰다.

[0257] pGBE0123 플라스미드를 역시 제한 효소 *KpnI* 및 *NotI*로 소화시킨 다음에, 3.6 Kbp PCR 생성물과 결합시켰다. 생성된 플라스미드 (pGBE1021)는 프라이머 1994, 1995, 1996, 1997, 1998, 1999, 2000, 2001, 2002 및 2003 (각각 SEQ RC0037, RC0038, RC0039, RC0040, RC0041, RC0042, RC0043, RC0044, RC0045 및 RC0046으로 제공됨)을 사용하여 서열화하였다.

[0258] 실시예 10: 스트레인 GBE2264 및 GBE2265에 의한 아세톤 생산

[0259] 적절한 스트레인 내로의 플라스미드 형질전환의 설명

- [0260] 스트레인 GBE0129는 전기적격성으로 만들었으며, GBE0129 전기적격성 세포를 플라스미드 pGB1021으로 형질전환시켰다. 그 후, 형질전환체를 앰피실린 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 함유하는 LB 플레이트 상에 플레이팅하고, 플레이트를 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 밤새 배양하여 스트레인 GBE2262를 생성시켰다.
- [0261] 스트레인 GBE1344를 전기적격성으로 만들고, GBE1344 전기적격성 세포를 플라스미드 pGBE1020에 의해서 형질전환시켰다. 그 후, 형질전환체를 앰피실린 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 공급된 LB 플레이트 상에 플레이팅하였다. 플레이트를 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 밤새 배양하여 스트레인 GBE2263을 수득하였다.
- [0262] 스트레인 GBE2262 및 GBE2263으로부터 분리된 콜로니를 탄소의 공급원으로서 글루코즈 (2 g/L) 및 앰피실린 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 함유하는 MS 플레이트 상에서 스크리닝하였다. 이들 플레이트를 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 배양하여 각각 스트레인 GBE2264 및 GBE2265를 수득하였다. 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서의 배양 4일 후에, 콜로니를 글루코즈 (2 g/L), 효모 추출물 (0.1 g/L) 및 앰피실린 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 함유하는 MS 액체 배지에 옮기고, 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 3일 동안 배양하였다.
- [0263] *플라스크 조건의 설명*
- [0264] 글루코즈 (10 g/L), 효모 추출물 (0.1 g/L) 및 앰피실린 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 함유하는 MSP 액체 배지 (200 ml)를 스트레인 GBE2264의 전 배양물 또는 스트레인 GBE2265의 전 배양물로 접종하였다. 초기 OD₆₀₀은 0.1이었다. 200 ml의 배양물을 250 ml 병에 접종하고, 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 170 rpm의 속도 하에 스크류 캡으로 밀봉하였다. 분취액 (2 ml)을 1일, 2일, 4일, 5일 및 6일 후에 취하였다. 각각의 분취액 샘플에 대해서 병을 10 초 동안 개봉하였다.
- [0265] *분석 방법의 설명*
- [0266] 분취액을 여과하고, 글루코즈 농도를 가드 칼럼 (guard column) (Agilent, PL Hi-Plex H Guard Column, PL1170-1830)과 함께 애질런트 (Agilent) HPLC (1260 Infinity) 및 하이-플렉스 칼럼 (Hi-Plex Column) (Agilent, PL1170-6830)을 사용한 HPLC 분석에 의해서 결정하였다:
- [0267] - 주입 용적: 20 μl
- [0268] - 용매 조성: [H₂SO₄]: 5.5 mM
- [0269] - 칼럼의 온도: 65 $^{\circ}\text{C}$
- [0270] - RID (G1362A): 온도 설정: 35 $^{\circ}\text{C}$
- [0271] 아세톤은 메틸 아세테이트 (2 용적의 여과된 분취액에 대해서 1 용적의 메틸 아세테이트)와 혼합시킴으로써 여과된 분취액으로부터 추출하였다. 아세톤 농도는 가스 크로마토그래프 450-GC (Bruker) 및 다음의 프로그램을 사용한 가스 크로마토그래피에 의해서 결정하였다:
- [0272] - 칼럼: DB-WAX (123-7033, Agilent Technologies)
- [0273] - 분사기:
- [0274] o 스플리트 비 (Split ratio): 10
- [0275] o T $^{\circ}$ = 250 $^{\circ}\text{C}$
- [0276] - 오븐:
- [0277] o 9 분 동안 50 $^{\circ}\text{C}$
- [0278] o 180 $^{\circ}\text{C}$ 까지 분당 20 $^{\circ}\text{C}$
- [0279] o 5 분 동안 180 $^{\circ}\text{C}$
- [0280] o 칼럼 유속: 1.5 ml/분 (Nitrogen)
- [0281] - 검출기 FID: T $^{\circ}$ = 300 $^{\circ}\text{C}$
- [0282] *결과*
- [0283] 생산된 [아세톤] (mM) / 소비된 [글루코즈] (mM)의 비는 스트레인 GBE2264에 대해서보다 스트레인 GBE2265에 대해서 더 컸다.
- [0284] **실시예 11: 스트레인 GBE1283의 구성**

- [0285] 스트레인 GBE0929를 탄소의 공급원으로서 글루코즈 (2 g/L)를 함유하는 MS 플레이트 상에 플레이팅하였다. 분리된 콜로니를 글루코즈 (2 g/L)를 함유하는 MS 액체 배지에 옮기고, 30℃에서 3일 동안 배양하였다. 글루코즈 (2 g/L)를 함유하는 MS 액체 배지 (100 ml)를 스트레인 GBE0929의 전 배양물로 접종하였다. 초기 OD₆₀₀은 0.1이었다. 100 ml의 배양물을 30℃에서 170 rpm의 속도 하에 1 L 에rlenmeyer (erlenmeyer)에서 배양하였다. OD₆₀₀이 1 보다 크면, 배양물의 분취액을 취하여 신선한 배양을 위한 접종물로 사용하였다 (100 ml의 배양물을 1 L 에rlenmeyer 내에서 30℃에서 170 rpm의 속도 하에 배양하였다). 스트레인 GBE0929를 10 회 계대-배양하여 스트레인 GBE1283을 수득하였다.
- [0286] **실시예 12: 스트레인 GBE2256의 구성**
- [0287] 스트레인 GBE1283을 LB 배지 내에서 배양하고, GBE1283 세포를 전기적격성으로 만들었다. 전기적격성 GBE1283 세포를 pKD46 플라스미드로 형질전환시킨 다음에, 엠포실린 (100 µg/ml)을 함유하는 LB 플레이트 상에 플레이팅하였다. 플레이트를 30℃에서 밤새 배양하였다. 플라스미드 pKD46에 의한 GBE1283 세포의 형질전환은 스트레인 GBE1284를 생성시켰다.
- [0288] 플라스미드 pGBE0688을 프라이머 0629 및 0630 (각각 SEQ RC0007 및 RC0008로 제공됨)과 함께 주형으로 사용하여 1.2 Kbp PCR생성물을 생성시켰다. 생성된 1.2 Kbp PCR 생성물을 전기적격성 GBE1284 박테리아 내로 형질전환시키고, 형질전환 혼합물을 스펙티노마이신 (50 µg/ml)을 함유하는 LB 플레이트 상에 플레이팅하였다. 그 후, 플레이트를 37℃에서 밤새 배양하여 GBE2252_pKD46으로 불리는 새로운 스트레인을 생성시켰다. 스트레인 GBE2252_pKD46에서는 포스포프럭토키나제 유전자 *pfkA*가 결실되고, 스펙티노마이신 저항성 카세트에 의해서 대체되었다. *pfkA* 유전자의 결실이 일어났는지를 체크하기 위해서, 프라이머 0619 및 0620 (각각 SEQ RC0009 및 RC0010으로 제공됨)을 사용하여 PCR 증폭을 수행하였다. 이 1.7 Kbp PCR 생성물을 동일한 프라이머 0619 및 0620을 사용하여 서열화하였다. 플라스미드 pKD46의 상실을 체크하기 위해서, 스트레인 GBE2252_pKD46을 LB 플레이트 상에 플레이팅하고, 42℃에서 밤새 배양하였다. 플라스미드 pKD46의 상실은 분리된 콜로니를 엠포실린 (100 µg/ml)을 함유하는 LB 플레이트 상에 플레이팅함으로써 입증하고, 30℃에서 밤새 배양하고, LB 플레이트 상에서 밤새 37℃에서 배양하였다. 생성된 스트레인은 37℃에서 배양된 LB 플레이트 상에서 성장하였으며, GBE2252로 칭하였다. GBE2252 세포는 엠포실린 (100 µg/ml)이 공급된 LB 플레이트 상에서 성장하지 않았다.
- [0289] 스트레인 GBE2252를 전기적격성으로 만들고, GBE2252 전기적격성 세포를 플라스미드 pKD46으로 형질전환시켰다. 그 후, 형질전환체 세포를 엠포실린 (100 µg/ml)을 함유하는 LB 플레이트 상에 플레이팅하고, 플레이트를 30℃에서 밤새 배양하여 GBE2253으로 불리는 새로운 스트레인을 수득하였다.
- [0290] PCR 생성물은 주형으로서 플라스미드 pGBE0687 및 프라이머로서 올리고뉴클레오타이드 0631 및 0632 (각각 SEQ RC0011 및 RC0012로 제공됨)를 사용함으로써 생성되었다. 생성된 1.3 Kbp PCR 생성물을 전기적격성 GBE2253 박테리아 내로 형질전환시키고, 형질전환 혼합물을 아프라마이신 (50 µg/ml)을 함유하는 LB 플레이트 상에 플레이팅하였다. 플레이트를 37℃에서 밤새 배양하여 스트레인 GBE2256_pKD46을 생성시켰다. 스트레인 GBE2256_pKD46에서는 포스포프럭토키나제 유전자 *pfkB*가 결실되고, 결실된 DNA 서열은 아프라마이신 저항성 유전자를 함유하는 카세트에 의해서 대체되었다. *pfkB* 유전자의 결실이 일어났는지를 체크하기 위해서, 프라이머 0621 및 0622 (각각 SEQ RC0013 및 RC0014로 제공됨)를 사용하여 PCR 증폭을 수행하였다. 이 최종 2.2 Kbp PCR 생성물은 동일한 프라이머 0621 및 0622를 사용하여 서열화하였다.
- [0291] 플라스미드 pKD46의 상실을 유도하기 위해서, 스트레인 GBE2256_pKD46을 LB 플레이트 상에 플레이팅하고, 플레이트를 42℃에서 밤새 배양하였다. 플라스미드 pKD46의 상실은 분리된 콜로니를 엠포실린 (100 µg/ml)이 공급된 LB 플레이트 상에 플레이팅함으로써 체크하고, 30℃에서 밤새 배양하고, LB 플레이트 상에서 밤새 37℃에서 배양하였다. 37℃에서 배양된 LB 플레이트 상에서 성장하는 생성된 스트레인은 GBE2256으로 칭하였다. GBE2256 세포는 엠포실린 (100 µg/ml)이 공급된 LB 플레이트 상에서 성장하지 않았다.
- [0292] **실시예 13: 스트레인 GBE1518의 구성**
- [0293] 플라스미드 pGBE0688을 프라이머 0633 및 1109 (각각 SEQ RC0003 및 RC0047로 제공됨)와 함께 주형으로 사용하여 1.3 Kbp PCR 생성물을 생성시켰다. 이 1.3 Kbp PCR 생성물을 전기적격성 GBE1284 박테리아 내로 형질전환시킨 다음에, 형질전환 혼합물을 스펙티노마이신 (50 µg/ml)을 함유하는 LB 플레이트 상에 플레이팅하고, 37℃에서 밤새 배양하여 스트레인 GBE1433을 생성시켰다. 스트레인 GBE1433에서는 *zwf* 유전자로 구성된 DNA 서열이 결실되었다. *zwf* 유전자를 포함하는 이 결실된 DNA 서열은 스펙티노마이신 저항성 카세트에 의해서 대체되었다. *zwf* 유전자의 효과적인 결실을 체크하기 위해서, 프라이머 1036 및 1110 (각각 SEQ RC0005 및 RC0048로 제공

됨)을 사용하여 PCR 증폭을 수행하였다. 최종적인 1.5 Kbp PCR 생성물을 수득하였다. 이 1.5 Kbp PCR 생성물은 동일한 프라이머 1036 및 1110을 사용하여 서열화하였다.

[0294] 스트레인 GBE1433를 전기적격성으로 만들었다. GBE1433 전기적격성 세포를 플라스미드 pKD46으로 형질전환시킨 다음에, 앰피실린 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 공급된 LB 플레이트 상에 플레이팅하였다. 플레이트를 30℃에서 밤새 배양하였다. 플라스미드 pKD46에 의한 GBE1433 세포의 형질전환은 스트레인 GBE1436을 생성시켰다.

[0295] 플라스미드 pGBE0687을 프라이머 0629 및 0630 (각각 SEQ RC0007 및 RC0008로 제공됨)과 함께 주형으로 사용하여 1.2 Kbp PCR 생성물을 생성시켰다. 생성된 1.2 Kbp PCR 생성물을 전기적격성 GBE1436 박테리아 내에 형질전환시키고, 형질전환 혼합물을 아프라마이신 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 함유하는 LB 플레이트 상에 플레이팅하였다. 그 후, 플레이트를 37℃에서 밤새 배양하여 GBE1441_pKD46으로 불리는 새로운 스트레인을 생성시켰다. 스트레인 GBE1441_pKD46에서는 포스포프럭토키나제 유전자 *pfkA*가 결실되고, 아프라마이신 저항성 카세트에 의해서 대체되었다. *pfkA* 유전자의 결실이 일어났는지를 체크하기 위해서, 프라이머 0619 및 0620 (각각 SEQ RC0009 및 RC0010으로 제공됨)을 사용하여 PCR 증폭을 수행하였다. 이 1.7 Kbp PCR 생성물은 동일한 프라이머 0619 및 0620을 사용하여 서열화하였다. 플라스미드 pKD46의 상실을 체크하기 위해서, 스트레인 GBE1441_pKD46을 LB 플레이트 상에 플레이팅하고, 42℃에서 밤새 배양하였다. 플라스미드 pKD46의 상실은 분리된 콜로니를 앰피실린 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 함유하는 LB 플레이트 상에 플레이팅함으로써 확인하고, 30℃에서 밤새 배양하고, LB 플레이트 상에서 밤새 37℃에서 배양하였다. 생성된 스트레인은 37℃에서 배양된 LB 플레이트 상에서 성장하였으며, GBE1441로 칭하였다. GBE1441 세포는 앰피실린 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 공급된 LB 플레이트 상에서 성장하지 않았다.

[0296] 스펙티노마이신 카세트는 *zwf* 유전자의 상응하는 유전자좌에 위치하였으며, 아프라마이신 카세트는 *pfkA* 유전자의 상응하는 유전자좌에 위치하였다. 스펙티노마이신 및 아프라마이신 저항성 유전자를 함유하는 카세트를 절제하기 위해서, 스트레인 GBE1441을 플라스미드 pCP20으로 형질전환시켜 스트레인 GBE1441_p를 수득하였다. 30℃에서 앰피실린 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 함유하는 LB 플레이트 상에서 밤새 배양한 후에, 분리된 콜로니를 앰피실린 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 공급된 LB 플레이트 상에 재스트리킹하고, 30℃에서 밤새 배양하였다. 그 후, 분리된 콜로니를 LB 플레이트 상에 플레이팅하고, 42℃에서 밤새 배양하여 pCP20 플라스미드의 상실을 야기하였다. 그 후, 2 개의 저항성 카세트의 효과적인 절제 및 pCP20 플라스미드의 상실을 체크하기 위해서, 분리된 콜로니를 37℃에서 밤새 배양된 스펙티노마이신 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 함유하는 LB 플레이트 상에, 37℃에서 밤새 배양된 아프라마이신 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 함유하는 LB 플레이트 상에, 30℃에서 밤새 배양된 앰피실린 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 함유하는 LB 플레이트 상에, 및 37℃에서 밤새 배양된 LB 플레이트 상에 스트리킹하였다. 생성된 스트레인은 37℃에서 배양된 LB 플레이트 상에서 성장하였으며, GBE1448로 칭하였다. GBE1448 세포는 스펙티노마이신 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 함유하는 LB 플레이트 상에서, 아프라마이신 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 함유하는 LB 플레이트 상에서, 및 앰피실린 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 공급된 LB 플레이트 상에서 성장하지 않았다.

[0297] 스트레인 GBE1448을 전기적격성으로 만들고, GBE1448 전기적격성 세포를 플라스미드 pKD46으로 형질전환시켰다. 그 후, 형질전환체 세포를 앰피실린 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 함유하는 LB 플레이트 상에 플레이팅하고, 플레이트를 30℃에서 밤새 배양하여 GBE1449로 불리는 새로운 스트레인을 수득하였다. PCR 생성물은 주형으로 플라스미드 pGBE0688 및 프라이머로서 올리고뉴클레오타이드 0631 및 0632 (각각 SEQ RC0011 및 RC0012로 제공됨)를 사용함으로써 생성되었다. 생성된 1.3 Kbp PCR 생성물을 전기적격성 GBE1449 박테리아 내로 형질전환시키고, 형질전환 혼합물을 스펙티노마이신 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 함유하는 LB 플레이트 상에 플레이팅하였다. 플레이트를 37℃에서 밤새 배양하여 스트레인 GBE1518_pKD46을 생성시켰다. 스트레인 GBE1518_pKD46에서는 포스포프럭토키나제 유전자 *pfkB*가 결실되었으며, 결실된 DNA 서열은 스펙티노마이신 저항성 유전자를 함유하는 카세트에 의해서 대체되었다. *pfkB* 유전자의 결실이 일어났는지를 체크하기 위해서, 프라이머 0621 및 0622 (각각 SEQ RC0013 및 RC0014로 제공됨)를 사용하여 PCR 증폭을 수행하였다. 이 최종 2.2 Kbp PCR 생성물은 동일한 프라이머 0621 및 0622를 사용하여 서열화하였다.

[0298] 플라스미드 pKD46의 상실을 유도하기 위해서, 스트레인 GBE1518_pKD46을 LB 플레이트 상에 플레이팅하고, 플레이트를 42℃에서 밤새 배양하였다. 플라스미드 pKD46의 상실은 분리된 콜로니를 앰피실린 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 공급된 LB 플레이트 상에 플레이팅함으로써 체크하고, 30℃에서 밤새 배양하고, LB 플레이트 상에서 밤새 37℃에서 배양하였다. 37℃에서 배양된 LB 플레이트 상에서 성장하는 생성된 스트레인은 GBE1518로 칭하였다. GBE1518 세포는 앰피실린 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 공급된 LB 플레이트 상에서 성장하지 않았다.

[0299] **실시예 14: 스트레인 GBE1420의 구성**

[0300] 플라스미드 pGBE0688을 프라이머 0633 및 0634 (각각 SEQ RC0003 및 RC0004로 제공됨)와 함께 주형으로 사용하

여 1.3 Kbp PCR 생성물을 생성시켰다. 이 1.3 Kbp PCR 생성물을 전기적격성 GBE1284 박테리아 내로 형질전환시킨 다음에, 형질전환 혼합물을 스펙티노마이신 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 함유하는 LB 플레이트 상에 플레이팅하고, 37°C에서 밤새 배양하여 스트레인 GBE1287을 생성시켰다. 스트레인 GBE1287에서는 *zwf*, *edd*, 및 *eda* 유전자로 구성된 DNA 서열이 결실되었다. *zwf*, *edd*, 및 *eda* 유전자를 포함하는 이 결실된 DNA 서열은 스펙티노마이신 저항성 카세트에 의해서 대체되었다. *zwf*, *edd*, 및 *eda* 유전자의 효과적인 결실을 체크하기 위해서, 프라이머 1036 및 1037 (각각 SEQ RC0005 및 RC0006으로 제공됨)을 사용하여 PCR 증폭을 수행하였다. 최종 1.9 Kbp PCR 생성물을 수득하였다. 이 1.9 Kbp PCR 생성물은 동일한 프라이머 1036 및 1037을 사용하여 서열화하였다.

[0301] 스트레인 GBE1287을 전기적격성으로 만들었다. GBE1287 전기적격성 세포를 플라스미드 pKD46으로 형질전환시킨 다음에, 엠포실린 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 공급된 LB 플레이트 상에 플레이팅하였다. 플레이트를 30°C에서 밤새 배양하였다. 플라스미드 pKD46에 의한 GBE1287 세포의 형질전환은 스트레인 GBE1337을 생성시켰다.

[0302] 플라스미드 pGBE0687을 프라이머 0629 및 0630 (각각 SEQ RC0007 및 RC0008로 제공됨)과 함께 주형으로 사용하여 1.2 Kbp PCR 생성물을 생성시켰다. 생성된 1.2 Kbp PCR 생성물을 전기적격성 GBE1337 박테리아 내로 형질전환시키고, 형질전환 혼합물을 아프라마이신 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 함유하는 LB 플레이트 상에 플레이팅하였다. 그 후, 플레이트를 37°C에서 밤새 배양하여 GBE1353_pKD46으로 불리는 새로운 스트레인을 생성시켰다. 스트레인 GBE1353_pKD46에서는 포스포프럭토키나제 유전자 *pfkA*가 결실되고, 아프라마이신 저항성 카세트에 의해서 대체되었다. *pfkA* 유전자의 결실이 일어났는지를 체크하기 위해서, 프라이머 0619 및 0620 (각각 SEQ RC0009 및 RC0010으로 제공됨)을 사용하여 PCR 증폭을 수행하였다. 이 1.7 Kbp PCR 생성물은 동일한 프라이머 0619 및 0620을 사용하여 서열화하였다. 플라스미드 pKD46의 상실을 체크하기 위해서, 스트레인 GBE1353_pKD46을 LB 플레이트 상에 플레이팅하고, 42°C에서 밤새 배양하였다. 플라스미드 pKD46의 상실을 분리된 콜로니를 엠포실린 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 함유하는 LB 플레이트 상에 플레이팅함으로써 확인하고, 30°C에서 밤새 배양하고, LB 플레이트 상에서 밤새 37°C에서 배양하였다. 생성된 스트레인은 37°C에서 배양된 LB 플레이트 상에서 성장하였으며, GBE1353으로 칭하였다. GBE1353 세포는 엠포실린 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 공급된 LB 플레이트 상에서 성장하지 않았다.

[0303] 스펙티노마이신 카세트는 *zwf_edd_eda* 유전자의 상응하는 유전자좌에 위치하였으며, 아프라마이신 카세트는 *pfkA* 유전자의 상응하는 유전자좌에 위치하였다. 스펙티노마이신 및 아프라마이신 저항성 유전자를 함유하는 저항성 카세트를 절제하기 위해서, 스트레인 GBE1353을 플라스미드 pCP20으로 형질전환시켜 스트레인 GBE1353_p를 수득하였다. 30°C에서 엠포실린 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 함유하는 LB 플레이트 상에서 밤새 배양한 후에, 분리된 콜로니를 엠포실린 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 공급된 LB 플레이트 상에 재스트리킹하고, 30°C에서 밤새 배양하였다. 그 후, 분리된 콜로니를 LB 플레이트 상에 플레이팅하고, 42°C에서 밤새 배양하여 pCP20 플라스미드의 상실을 야기하였다. 그 후, 2 개의 저항성 카세트의 효과적인 절제 및 pCP20 플라스미드의 상실을 체크하기 위해서, 분리된 콜로니를 37°C에서 밤새 배양된 스펙티노마이신 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 함유하는 LB 플레이트 상에, 37°C에서 밤새 배양된 아프라마이신 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 함유하는 LB 플레이트 상에, 30°C에서 밤새 배양된 엠포실린 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 함유하는 LB 플레이트 상에, 및 37°C에서 밤새 배양된 LB 플레이트 상에 스트리킹하였다. 생성된 스트레인은 37°C에서 배양된 LB 플레이트 상에서 성장하였으며, GBE1368로 칭하였다. GBE1368 세포는 스펙티노마이신 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 함유하는 LB 플레이트 상에서, 아프라마이신 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 함유하는 LB 플레이트 상에서, 및 엠포실린 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 공급된 LB 플레이트 상에서 성장하지 않았다.

[0304] 스트레인 GBE1368을 전기적격성으로 만들었으며, GBE1368 전기적격성 세포를 플라스미드 pKD46으로 형질전환시켰다. 그 후, 형질전환체 세포를 엠포실린 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 함유하는 LB 플레이트 상에 플레이팅하고, 플레이트를 30°C에서 밤새 배양하여 GBE1371로 불리는 새로운 스트레인을 수득하였다. PCR 생성물은 주형으로서 플라스미드 pGBE0688 및 프라이머로서 올리고뉴클레오타이드 0631 및 0632 (각각 SEQ RC0011 및 RC0012로 제공됨)를 사용함으로써 생성되었다. 생성된 1.3 Kbp PCR 생성물을 전기적격성 GBE1371 박테리아 내로 형질전환시키고, 형질전환 혼합물을 스펙티노마이신 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 함유하는 LB 플레이트 상에 플레이팅하였다. 플레이트를 37°C에서 밤새 배양하여 스트레인 GBE1420_pKD46을 생성시켰다. 스트레인 GBE1420_pKD46에서는 포스포프럭토키나제 유전자 *pfkB*가 결실되었으며, 결실된 DNA 서열은 스펙티노마이신 저항성 유전자를 함유하는 카세트에 의해서 대체되었다. *pfkB* 유전자의 결실이 일어났는지를 체크하기 위해서, 프라이머 0621 및 0622 (각각 SEQ RC0013 및 RC0014로 제공됨)를 사용하여 PCR 증폭을 수행하였다. 이 최종 2.2 Kbp PCR 생성물은 동일한 프라이머 0621 및 0622를 사용함으로써 서열화되었다.

[0305] 플라스미드 pKD46의 상실을 유도하기 위해서, 스트레인 GBE1420_pKD46을 LB 플레이트 상에 플레이팅하고, 플레이트를 42°C에서 밤새 배양하였다. 플라스미드 pKD46의 상실을 분리된 콜로니를 엠포실린 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 공급된 LB 플레이트 상에 플레이팅함으로써 체크하고, 30°C에서 밤새 배양하고, LB 플레이트 상에서 밤새 37°C에서 배

양하였다. 37℃에서 배양된 LB 플레이트 상에서 성장하는 생성된 스트레인을 GBE1420으로 칭하였다. GBE1420 세포는 앰피실린 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 공급된 LB 플레이트 상에서 성장하지 않았다.

실시예 15: 스트레인 GBE2268 및 GBE2269에 의한 아세톤 생산

적절한 스트레인 내로의 플라스미드 형질전환의 설명

스트레인 GBE1283은 전기적격성으로 만들었으며, GBE1283 전기적격성 세포를 플라스미드 pGB1021로 형질전환시켰다. 그 후, 형질전환체를 앰피실린 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 함유하는 LB 플레이트 상에 플레이팅하고, 플레이트를 30℃에서 밤새 배양하여 스트레인 GBE2266을 생성시켰다.

스트레인 GBE1420을 전기적격성으로 만들었고, GBE1420 전기적격성 세포를 플라스미드 pGBE1020으로 형질전환시켰다. 그 후, 형질전환체를 앰피실린 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 공급된 LB 플레이트 상에 플레이팅하였다. 플레이트를 30℃에서 밤새 배양하여 스트레인 GBE2267을 수득하였다.

스트레인 GBE2266 및 GBE2267로부터 분리된 콜로니를 탄소의 공급원으로서 글루코즈 (2 g/L) 및 앰피실린 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 함유하는 MS 플레이트 상에서 스크리닝하였다. 이들 플레이트를 30℃에서 배양하여 각각 스트레인 GBE2268 및 GBE2269를 수득하였다. 30℃에서의 배양 4일 후에, 콜로니를 글루코즈 (2 g/L), 효모 추출물 (0.1 g/L) 및 앰피실린 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 함유하는 MS 액체 배지에 옮기고, 30℃에서 3일 동안 배양하였다.

플라스크 조건의 설명

글루코즈 (10 g/L), 효모 추출물 (0.1 g/L) 및 앰피실린 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 함유하는 MSP 액체 배지 (200 ml)를 스트레인 GBE2268의 전 배양물 또는 스트레인 GBE2269의 전 배양물로 접종하였다. 초기 OD₆₀₀은 0.1이었다. 200 ml의 배양물을 250 ml 병에 접종하고, 30℃에서 170 rpm의 속도 하에 스크류 캡으로 밀봉하였다. 분취액 (2 ml)을 1일, 2일, 4일, 5일, 6일, 7일 및 8일 후에 취하였다. 각각의 분취액 샘플에 대해서 병을 10 초 동안 개봉하였다.

분석 방법의 설명

분취액을 여과하고, 글루코즈 농도를 가드 칼럼 (Agilent, PL Hi-Plex H Guard Column, PL1170-1830)과 함께 애질런트 HPLC (1260 Infinity) 및 하이-플렉스 칼럼 (Agilent, PL1170-6830)을 사용한 HPLC 분석에 의해서 결정하였다:

- 주입 용적: 20 μl

- 용매 조성: [H₂SO₄]: 5.5 mM

- 칼럼의 온도: 65℃

- RID (G1362A): 온도 설정: 35℃

아세톤은 메틸 아세테이트 (2 용적의 여과된 분취액에 대해서 1 용적의 메틸 아세테이트)와 혼합시킴으로써 여과된 분취액으로부터 추출하였다. 아세톤 농도는 가스 크로마토그래프 450-GC (Bruker) 및 다음의 프로그램을 사용한 가스 크로마토그래피에 의해서 결정하였다:

- 칼럼: DB-WAX (123-7033, Agilent Technologies)

- 분사기:

o 스플리트 비: 10

o T° = 250℃

- 오븐:

o 9 분 동안 50℃

o 180℃까지 분당 20℃

o 5 분 동안 180℃

o 칼럼 유속: 1.5 ml/분 (Nitrogen)

- [0329] - 검출기 FID: $T^{\circ} = 300^{\circ}\text{C}$
- [0330] *결과*
- [0331] 생산된 [아세톤] (mM) / 소비된 [글루코즈] (mM)의 비는 스트레인 GBE2268에 대해서보다 스트레인 GBE2269에 대해서 더 컸다.
- [0332] **실시예 16: 스트레인 GBE2272 및 GBE2273에 의한 아세톤 생산.**
- [0333] *적절한 스트레인 내로의 플라스미드 형질전환의 설명*
- [0334] 스트레인 GBE2256은 전기적격성으로 만들었으며, GBE2256 전기적격성 세포를 플라스미드 pGB1020으로 형질전환시켰다. 그 후, 형질전환체를 앰피실린 ($100\text{ }\mu\text{g/ml}$)을 함유하는 LB 플레이트 상에 플레이팅하고, 플레이트를 30°C 에서 밤새 배양하여 스트레인 GBE2270을 생성시켰다.
- [0335] 스트레인 GBE1518을 전기적격성으로 만들었고, GBE1518 전기적격성 세포를 플라스미드 pGBE1020으로 형질전환시켰다. 그 후, 형질전환체를 앰피실린 ($100\text{ }\mu\text{g/ml}$)이 공급된 LB 플레이트 상에 플레이팅하였다. 플레이트를 30°C 에서 밤새 배양하여 스트레인 GBE2271을 수득하였다.
- [0336] 스트레인 GBE2270 및 GBE2271로부터 분리된 콜로니를 탄소의 공급원으로서 글루코즈 (2 g/L) 및 앰피실린 ($100\text{ }\mu\text{g/ml}$)을 함유하는 MS 플레이트 상에서 스크리닝하였다. 이들 플레이트를 30°C 에서 배양하여 각각 스트레인 GBE2272 및 GBE2273을 수득하였다. 30°C 에서의 배양 4일 후에, 콜로니를 글루코즈 (2 g/L), 효모 추출물 (0.1 g/L) 및 앰피실린 ($100\text{ }\mu\text{g/ml}$)을 함유하는 MS 액체 배지에 옮기고, 30°C 에서 3일 동안 배양하였다.
- [0337] *플라스크 조건의 설명*
- [0338] 글루코즈 (10 g/L), 효모 추출물 (0.1 g/L) 및 앰피실린 ($100\text{ }\mu\text{g/ml}$)을 함유하는 MSP 액체 배지 (200 ml)를 스트레인 GBE2272의 전 배양물 또는 스트레인 GBE2273의 전 배양물로 접종하였다. 초기 OD_{600} 은 0.1이었다. 200 ml 의 배양물을 250 ml 병에 접종하고, 30°C 에서 170 rpm 의 속도 하에 스크류 캡으로 밀봉하였다. 분취액 (2 ml)을 1일, 2일, 4일, 5일 및 6일 후에 취하였다. 각각의 분취액 샘플에 대해서 병을 10 초 동안 개봉하였다.
- [0339] *분석 방법의 설명*
- [0340] 분취액을 여과하고, 글루코즈 농도를 가드 칼럼 (Agilent, PL Hi-Plex H Guard Column, PL1170-1830)과 함께 애질런트 HPLC (1260 Infinity) 및 하이-플렉스 칼럼 (Agilent, PL1170-6830)을 사용한 HPLC 분석에 의해서 결정하였다:
- [0341] - 주입 용적: $20\text{ }\mu\text{l}$
- [0342] - 용매 조성: $[\text{H}_2\text{SO}_4]$: 5.5 mM
- [0343] - 칼럼의 온도: 65°C
- [0344] - RID (G1362A): 온도 설정: 35°C
- [0345] 아세톤은 메틸 아세테이트 ($2\text{ }\mu\text{l}$ 용적의 여과된 분취액에 대해서 $1\text{ }\mu\text{l}$ 용적의 메틸 아세테이트)와 혼합시킴으로써 여과된 분취액으로부터 추출하였다. 아세톤 농도는 가스 크로마토그래프 450-GC (Bruker) 및 다음의 프로그램을 사용한 가스 크로마토그래피에 의해서 결정하였다:
- [0346] - 칼럼: DB-WAX (123-7033, Agilent Technologies)
- [0347] - 분사기:
- [0348] o 스플리트 비: 10
- [0349] o $T^{\circ} = 250^{\circ}\text{C}$
- [0350] - 오븐:
- [0351] o 9 분 동안 50°C
- [0352] o 180°C 까지 분당 20°C
- [0353] o 5 분 동안 180°C

[0354] o 칼럼 유속: 1.5 ml/분 (Nitrogen)

[0355] - 검출기 FID: T° = 300℃

[0356] 결과

[0357] 생산된 [아세톤] (mM) / 소비된 [글루코즈] (mM)의 비는 스트레인 GBE2272에 대해서보다 스트레인 GBE2273에 대해서 더 컸다.

[0358] 결과 표 II

GBE2273	- + - - + +	0,51
GBE2272	- + - + + +	0,05
GBE2273	- + - - + +	0,51
GBE2268	- - + + + +	0,01
GBE2269	- + - - - +	0,22
GBE2268	- - + + + +	0,01
GBE2265	+ + - - - +	0,21
GBE2264	+ - + + + +	0,03

PEP 의존성 글루코즈 흡수 (ptsHI)

이중 포스포케톨라제 (pkt)

EMPP (pfkAB)

PPP (zwf)

EDP (edd eda)

이중 아세톤 경로 (thl ctfAB adc)

[아세톤]_{생산됨}/[글루코즈]_{소비됨} (mM)

보고된 비는 관찰된 최대치였다.

[0359]

도면

도면1

반응식 1. 포스포케틀라제 경로를 통한 글루코즈-6-포스페이트로부터 아세틸-CoA의 생산:대표적인 케이스 1

- 1a.) 2 D-글루코즈-6-포스페이트 = 2 D-프럭토즈-6-포스페이트 (EC 5.3.1.9)
 1b.) D-프럭토즈-6-포스페이트 + 포스페이트 = 아세틸 포스페이트 + D-에리트로즈-4-포스페이트 + H₂O (EC 4.1.2.22)
 1c.) D-에리트로즈-4-포스페이트 + D-프럭토즈-6-포스페이트 = 세도헥솔로즈-7-포스페이트 + D-글리세르알데히드-3-포스페이트 (EC 2.2.1.2)
 1d.) 세도헥솔로즈-7-포스페이트 + D-글리세르알데히드-3-포스페이트 = D-리보즈-5-포스페이트 + D-크실룰로즈-5-포스페이트 (EC 2.2.1.1)
 1e.) D-리보즈-5-포스페이트 = D-리불로즈-5-포스페이트 (EC 5.3.1.6)
 1f.) D-리불로즈-5-포스페이트 = D-크실룰로즈-5-포스페이트 (EC 5.1.3.1)
 1g.) 2 D-크실룰로즈-5-포스페이트 + 2 포스페이트 = 2 아세틸 포스페이트 + 2 D-글리세르알데히드-3-포스페이트 + 2 H₂O (EC 4.1.2.22 및/또는 EC 4.1.2.9)
 1h.) 3 아세틸 포스페이트 + 3 CoA = 3 아세틸-CoA + 3 포스페이트 (EC 2.3.1.8)

-
- 1.) 2 D-글루코즈-6-포스페이트 + 3 CoA = 3 아세틸-CoA + 2 D-글리세르알데히드-3-포스페이트 + 3 H₂O

반응식 2. 포스포케틀라제 경로를 통한 글루코즈-6-포스페이트로부터 아세틸-CoA의 생산:대표적인 케이스 2

- 2a.) 2 D-글루코즈-6-포스페이트 = 2 D-프럭토즈-6-포스페이트 (EC 5.3.1.9)
 2b.) D-프럭토즈-6-포스페이트 + D-글리세르알데히드-3-포스페이트 = D-크실룰로즈-5-포스페이트 + D-에리트로즈-4-포스페이트 (EC 2.2.1.1)
 2c.) D-에리트로즈-4-포스페이트 + D-프럭토즈-6-포스페이트 = 세도헥솔로즈-7-포스페이트 + D-글리세르알데히드-3-포스페이트 (EC 2.2.1.2)
 2d.) 세도헥솔로즈-7-포스페이트 + D-글리세르알데히드-3-포스페이트 = D-리보즈-5-포스페이트 + D-크실룰로즈-5-포스페이트 (EC 2.2.1.1)
 2e.) D-리보즈-5-포스페이트 = D-리불로즈-5-포스페이트 (EC 5.3.1.6)
 2f.) D-리불로즈-5-포스페이트 = D-크실룰로즈-5-포스페이트 (EC 5.1.3.1)
 2g.) 3 D-크실룰로즈-5-포스페이트 + 3 포스페이트 = 3 아세틸 포스페이트 + 3 D-글리세르알데히드-3-포스페이트 + 3 H₂O (EC 4.1.2.9 및/또는 EC 4.1.2.22)
 2h.) 3 아세틸 포스페이트 + 3 CoA = 3 아세틸-CoA + 3 포스페이트 (EC 2.3.1.8)

-
- 2.) 2 D-글루코즈-6-포스페이트 + 3 CoA = 3 아세틸-CoA + 2 D-글리세르알데히드-3-포스페이트 + 3 H₂O

서열 목록

<110> Scientist of Fortune S.A.

<120> Recombinant microorganism for the production of useful metabolites

<130> IPA131345

<150> EP 11173563.5

<151> 2011-07-12

<160> 54

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 134

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleotide Sequence

<400> 1

aggctagact ttagttccac aacactaaac ctataagttg gggaaataca gtgtaggctg	60
gagctgcttc gaagttccta tactttctag agaataggaa cttcggaata ggaactaagg	120
aggatattca tatg	134

<210> 2

<211> 1205

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleotide Sequence

<400> 2

agagcggcgg ccaccgcggg aagttcctat actttctaga gaataggaaac ttcagctgat	60
agaaacagaa gccactggag caccitcaaaa acaccatcat acactaaatc agtaagttgg	120
cagcatcacc cgacgcactt tgcgccgaat aaatacctgt gacggaagat cacttcgcag	180
aataaataaa tcttgggtgc cctgttgata ccgggaagcc ctgggccaac ttttggcgaa	240
aatgagacgt tgatcggcac gtaagagggt ccaactttca ccataatgaa ataagatcac	300
taccgggcgt attttttgag ttatcgagat tttcaggagc taaggaagct acatatgagt	360
gaaaaagtgc ccgccgagat ttcgggtgcaa ctatcacaag cactcaacgt catcgggcgc	420
cacttggagt cgacgttgcg ggccgtgcat ttgtacggct ccgcactgga tggcggattg	480
aaaccgtaca gtgatatgta tttgtcgttg actgtagctg caccgctcaa tgatgccgtg	540
cggcaagccc tgctcgtcga tctcttggag gtttcagctt cccctggcca aaacaaggca	600
ctccgcgcct tggaagtgcac catcgtcgtg cacagtgcac tcgtaccttg gcgttatccg	660
gccaggcggg aactgcagtt cggagagtgg cagcgcaaag acatccttgc gggcatcttc	720
gagcccgcga caaccgattc tgacttggcg attctgctaa caaaggcaaa gcaacatagc	780
gtcgtcttgg caggttcagc agcgaaggat ctcttcagct cagtcccaga aagcgatcta	840
ttcaaggcac tggccgatac tctgaagcia tggaactgc cgccagattg ggcgggcat	900
gagcggaatg tagtgcttac tttgtctcgt atctggtaca ccgcagcaac cggcaagatc	960
gcgccaaagg atgttgcgtc cacttgggca atggcacgct tgccagctca acatcagccc	1020
atcctgttga atgccaagcg ggcttatctt gggcaagaag aagattatct gcccgctcgt	1080
gcggatcagg tggcggcgct cattaaattc gtgaagtatg aagcagttaa actgcttggg	1140

gccagccaat aagaagttcc tatactttct agagaatagg aacttcgcat gcacgcagca 1200

tatgc 1205

<210> 3

<211> 1129

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleotide Sequence

<400> 3

agagcggcgg ccaccgcggg aagtccctat actttctaga gaataggaac ttcgggttca 60

tgtgcagctc catcagcaaa aggggatgat aagtttatca ccaccgacta ttgcaacag 120

tgccgttgat cgtgctatga tcgactgatg tcatcagcgg tggagtgcaa tgcgtgcaa 180

tacgaatggc gaaaagccga gctcatcggg cagcttctca accttggggg taccctcggc 240

ggtgtgctgc tggccacag ctccttccgt agcgtccggc ccctcgaaga tgggccactt 300

ggactgatcg aggcctcg tgcgtcgtg ggtccgggag ggacgctcgt catgccctcg 360

tggtcaggtc tggacgacga gccgttcgat cctgccacgt cggccgttac accggacctt 420

ggagtgtct ctgacacatt ctggcgctg ccaaatgtaa agcgcagcgc ccatccattt 480

gcctttgcgg cagcggggcc acaggcagag cagatcatct ctgatccatt gcccctgcca 540

cctcactcgc ctgcaagccc ggtcgccgt gtccatgaac tcgatgggca ggtacttctc 600

ctcgcgctgg gacacgatgc caacacgacg ctgcatcttg ccgagttgat ggcaaagggt 660

ccctatgggg tgcgagaca ctgcaccatt cttcaggatg gcaagtgggt acgcgtcgat 720

tatctcgaga atgaccactg ctgtgagcgc tttgccttgg cggacagggt gctcaaggag 780

aagagccttc agaaggaagg tccagtcggg catgcctttg ctcggttgat ccgctccgc 840

gacattgttg cgacagccct ggggtcaactg ggccgagatc cgttgatctt cctgcatccg 900

ccagaggcgg gatgcgaaga atgcgatgcc gtcgccagt cgattggctg agctcatgag 960

cggagaacga gatgacgttg gaggggcaag gtcgcgctga ttgctggggc aacacgtgga 1020

gcggatcggg gattgtcttt cttcagctcg ctgatgatat gctgacgctc aatgccgaag 1080

ttctatact ttctagagaa taggaacttc gcatgcacgc agcatatgc 1129

<210> 4

<211> 99

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleotide Sequence

<400> 4

aagcttgccg ccgccccgggtt aattaacctc cttagttaa acctaggcat gcctctagag 60

gatccccggg taccgagctc gaattacctg caggaattc 99

<210> 5

<211> 2508

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleotide Sequence

<400> 5

ttaattaatg catcatcacc accatcacat gaccgaatat aacagcgaag cctatctgaa 60

aaaactggat aaatgggtgc gtgcagcaac ctatctgggt gcaggtatga tttttctgaa 120

agaaaatccg ctgttttagcg ttaccggcac cccgattaaa gcagaaaatc tgaaagccaa 180

tccgattggt cattggggca ccgttagcgg tcagaccttt ctgtatgcac atgcaaatcg 240

cctgattaac aaatataacc agaaaatgtt ttatatgggt ggtccgggtc atggtggtca 300

ggcaatggtt gttccgagct atctggatgg tagctatacc gaagcatatc cggaaattac 360

ccagatctg gaaggtatga gccgtctgtt taaacgtttt agctttccgg gtggtattgg 420

tagccatg accgcacaga caccgggtag cctgcatgaa ggtggtgaac tgggttatgt 480

tctgagccat gcaaccggtg caattctgga tcagccggaa caaattgcat ttgcagttgt 540

tggtgatggt gaagcagaaa ccggtccgct gatgaccagc tggcatagca tcaaatttat 600

caaccgaaa aacgatggtg ccattctgcc gattctggat ctgaatggct taaaatcag 660

caatccgacc ctgtttgcac gtaccagtga tgtgatatc cgcaaatTTT tcgaaggctc 720

gggttatagt ccgcttata ttgaaaacga tgacatccat gactacatgg cctatcataa 780

actggcagca gaagttttt gcaaaagccat tgaagatc catcagattc agaaagatgc 840

ccgtgaagat aatcgtatc agaatggtga aattccggca tggccgattg ttattgcacg 900

tctgccgaaa ggttgggggtg gtcctcgtaa taatgattgg agcgggccga aatttgatgg 960

taaaggtatg ccgatcgaac atagctttcg tgcacatcag gttccgctgc cgctgagcag 1020

caaaaacatg ggcaccctgc cggaatttgt taaatggatg accagctatc agccggaaac 1080

cctgtttaat gcagatggtg gcctgaaaga agaactgcgc gattttgcac cgaaagggtga 1140

aatgcgtatg gcaagcaatc cggttaccaa tgggtggtgtt gattatagca atctggttct 1200

gccggattgg caagaatttg caaatccgat tagcgaaaac aatcgtggtg aactgctgcc 1260

ggataccaat gataatatgg atatgaacgt gctgagcaaa ttttcgccg aaattgttaa 1320

actgaacccg acccgttttc gtctgttttg tccgcatgaa accatgagca atcgtttttg 1380

ggagatgttt aaagtgacca atcgtcagtg gatgcaggtt atcaaaaatc cgaacgatga 1440

gtttattagt ccggaaggtc gcattattga tagccagctg agcgaacatc aggcagaagg 1500

ttggctggaa ggtatatacc tgaccggctg taccggtgtt tttgcaagct atgaaagttt 1560

tctgcgtgtt gttgatagca tgctgacca gcactttaaa tggattcgtc aggcagcaga 1620

tcagaaatgg cgtcatgatt atccgagcct gaatgttatt agcaccagca ccgtttttca 1680

gcaggatcat aatgggtata cccatcaaga tccgggtatg ctgacccatc tggcagagaa 1740

aaaaagcgat ttatttcgtc agtatctgcc tgcagatggt aataccctgc tggccgtttt 1800

tgatcgtgca tticaggatc gcagcaaaat taacatatt gttgcaagca aacagcctcg 1860

tcagcagtgg ttaccaaaag aagaagcaga aaaactggcc accgatggtt ttgcaaccat 1920

tgattgggca agcacgcgaa aagatggtga agccgttgat ctggtttttg caagtgccgg 1980

tgcagaaccg accattgaaa ccctggcagc actgcatctg gttaatgaag tttttccgca 2040

ggccaaattt cgctatgtta atgttggtga actgggtcgt ctgcagaaaa agaaagggtc 2100

actgaatcaa gaacgcgaac tgagtcatga agagttcgaa aaatactttg gtccgagcgg 2160

tacaccgggtt atttttggtt ttcatggcta tgaagatctg atcgagagca tcttttatca 2220

gcgtggtcat gatggtctga ttgttcatgg ttatcgtgaa gatggtgata ttaccaccac 2280

ctatgatatg cgtgtttata gcgaactgga tcgttttcat caggcaattg atgcaatgca 2340

ggttctgtat gtgaatcgt aagttaatca gggctctggc aaagcattta ttgatcgtat 2400

ggaacgtacc ctggtgaaac attttgaagt taccgtaat gaaggcgttg atattccgga 2460

atttaccgaa tgggttttga gcgatctgaa aaagtaatga gcggccgc 2508

<210> 6

<211> 86

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleotide Sequence

<400> 6

gaattcgagc tcggtacccg gggatcctct agaggcatgc ctaggtttta actaaggagg 60

ttaattaacc ccgcggccgc aagctt 86

<210> 7

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleotide Sequence

<400> 7

ggttcaattc ttccttttagc ggc 23

<210> 8

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleotide Sequence

<400> 8

ccgcaaaaac gacatccggc acg 23

<210> 9

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleotide Sequence

<400> 9

caagtatacc ctggcttaag taccgggtta gttaacttaa ggagaatgac agagcggccg 60

ccaccgcggg 70

<210> 10

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleotide Sequence

<400> 10

gcaaaaaaac gctacaaaaa tgcccgatcc tcgatcgggc attttgactt gcatatgctg 60

cgtgcatgcg 70

<210> 11

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleotide Sequence

<400> 11

ccgcactttg cgcgcttttc cc	22
<210> 12	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Nucleotide Sequence	
<400> 12	
ggtgattttc agtgaggtct cccc	24
<210> 13	
<211> 70	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Nucleotide Sequence	
<400> 13	
agacttcgg caacagattt cattttgcat tccaaagttc agaggtagtc agagcggccg	60
ccaccgcggg	70
<210> 14	
<211> 70	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Nucleotide Sequence	
<400> 14	
gtttctgtca tcggtttcag ggtaaaggaa tctgcctttt tccgaaatca gcatatgctg	60
cgtgcatgcg	70
<210> 15	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Nucleotide Sequence	
<400> 15	
ggcgctcacg atcttcgcac gcggc	25
<210> 16	
<211> 27	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleotide Sequence

<400> 16

ccgcctcata ttgctgacaa agtgcgc 27

<210> 17

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleotide Sequence

<400> 17

actttccgct gattcgggtgc cagactgaaa tcagcctata ggaggaaatg agagcggccg 60

ccaccgcggg 70

<210> 18

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleotide Sequence

<400> 18

gttgccgaca ggttggtgat gattcccca atgctggggg aatgtttttg gcatatgctg 60

cgtgcatgcg 70

<210> 19

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleotide Sequence

<400> 19

ccacagcgac caggcagtgg tgtgtcc 27

<210> 20

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleotide Sequence

<400> 20

gcactttggg taagccccga aacc	24
<210> 21	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Nucleotide Sequence	
<400> 21	
ccattcaggc tgcgcaactg	20
<210> 22	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Nucleotide Sequence	
<400> 22	
gcgcgttggc cgattcatta atgc	24
<210> 23	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Nucleotide Sequence	
<400> 23	
caatccgacc ctgtttgcac gtac	24
<210> 24	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Nucleotide Sequence	
<400> 24	
gctgccggat accaatgata atatgg	26
<210> 25	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Nucleotide Sequence

<400> 25

ccatattatc attggtatcc ggcagc

26

<210> 26

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleotide Sequence

<400> 26

cccgggggat ccagaattta aaaggaggga tt

32

<210> 27

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleotide Sequence

<400> 27

ctcgaggata tcaagaattc tttttaaaca gccatgggtc

40

<210> 28

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleotide Sequence

<400> 28

tgtaaacga cggccagt

18

<210> 29

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleotide Sequence

<400> 29

caggaaacag ctatgacc

18

<210> 30

<211> 37

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Nucleotide Sequence
 <400> 30
 ctcgaggata tcaggaaggt gacttttatg ttaaagg 37
 <210> 31
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Nucleotide Sequence
 <400> 31
 gcatgcgtcg acattaaaaa aataagagtt acc 33
 <210> 32
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Nucleotide Sequence
 <400> 32
 cctcacggca aagtctcaag c 21
 <210> 33
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Nucleotide Sequence
 <400> 33
 gccatgggtc taagttcatt gg 22
 <210> 34
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Nucleotide Sequence
 <400> 34
 catgatttta aggggggtac catatgcata agttaa 37
 <210> 35

<211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Nucleotide Sequence
 <400> 35
 gttattttta aggatccttt ttagcacttt tctagc 36

<210> 36
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Nucleotide Sequence
 <400> 36
 ggcagaaagg gagaaactgt ag 22

<210> 37
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Nucleotide Sequence
 <400> 37
 tggaaagaat acgtgcaggc gg 22

<210> 38
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Nucleotide Sequence
 <400> 38
 gattacgcca agcttgcattg cc 22

<210> 39
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Nucleotide Sequence
 <400> 39

ccggcctcat ctacaatact acc	23
<210> 40	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Nucleotide Sequence	
<400> 40	
cccattattg ctgggtcaac tcc	23
<210> 41	
<211> 38	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Nucleotide Sequence	
<400> 41	
cccgtacct cattactttt tcagatcgct ccaaacc	38
<210> 42	
<211> 50	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Nucleotide Sequence	
<400> 42	
ggggaattca ggaggtgtac tagatgcac atcaccacca tcacatgacc	50
<210> 43	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Nucleotide Sequence	
<400> 43	
ccatagctcc acccatacca gagagc	26
<210> 44	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Nucleotide Sequence	

<400> 44
gctattatta cgtcagcatc tcctgc 26

<210> 45
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Nucleotide Sequence
<400> 45
gcaggcgaag ttaatggcgt gc 22
<210> 46
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Nucleotide Sequence
<400> 46
gatacggggt aacagataaa ccatttc 27
<210> 47
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Nucleotide Sequence
<400> 47
ccctttctgc cttaattac tacagg 26

<210> 48
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Nucleotide Sequence
<400> 48
gcatcaggat taaatgactg tgcagc 26
<210> 49
<211> 26
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleotide Sequence

<400> 49

ggactagcgc ccattccaac tattcc 26

<210> 50

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleotide Sequence

<400> 50

gctgcaaggc gattaagtg ggtaacgcc 29

<210> 51

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleotide Sequence

<400> 51

gcattgcgtg tacaagagta acgag 25

<210> 52

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleotide Sequence

<400> 52

cctgtccaag cttcatgtac gg 22

<210> 53

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleotide Sequence

<400> 53

gcgcaagatc atgttacgg taaaataacc ataaaggata agcgagata gcatatgctg 60

cgtgcatgcg 70

<210> 54

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleotide Sequence

<400> 54

cgccctgtaac cggagctcat aggg

24