(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년07월24일
(11) 등록번호 10-2003374
(24) 등록일자 2019년07월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/70 (2006.01) *C12N 9/04* (2006.01)
C12N 9/12 (2006.01) *C12N 9/92* (2006.01)
C12P 7/42 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/70 (2013.01)
C12N 9/0006 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0061244
(22) 출원일자 2017년05월17일
심사청구일자 2017년05월17일
(65) 공개번호 10-2018-0126322
(43) 공개일자 2018년11월27일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020160043498 A*
US20170121717 A1*
Zheng-Jun Li 등. Metabolic Engineering. Vol.35, No.1, 페이지 1-8 (2016.01.14.) 1부.*
GenBank Accession Number CP013952 (2017.04.28.) 1부.*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
명지대학교 산학협력단
경기도 용인시 처인구 명지로 116 (남동, 명지대학교)
(72) 발명자
정욱진
경기도 성남시 분당구 내정로 186 파크타운대림아파트 102동 1306호
루디스 카부롱
경기도 용인시 처인구 명지로 116 명지대학교
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인다울

전체 청구항 수 : 총 8 항 심사관 : 최준호

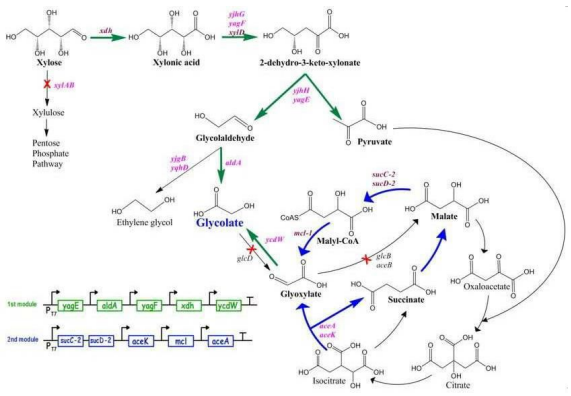
(54) 발명의 명칭 **자일로스로부터 글리콜산의 생산능을 갖는 대장균, 이의 제조방법 및 이를 이용하여 글리콜산을 생산하는 방법**

(57) 요 약

본 발명은 자일로스로부터 글리콜산의 생산능을 갖는 대장균, 이의 제조방법 및 이를 이용하여 글리콜산을 생산하는 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 자일로스로부터 글리콜산을 대량 생산할 수 있는 형질전환 대장균, 이의 제조방법과 상기 형질전환 대장균을 이용하여 자일로스로부터 글리콜산을 생산하는 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따르면 자일로스로부터 글리콜산을 대량 생산할 수 있는 형질전환 대장균을 제공할 수 있다. 또한 본원 발명에 따르면, 자일로스로부터 글리콜산을 생산하는 과정에서 발생하는 부산물을 글리콜산 생합성경로로 도입시킬 수 있는 바, 부산물의 생산은 현저히 낮추면서 동시에 높은 수율로 글리콜산을 생산할 수 있다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
C12N 9/1205 (2013.01)
C12N 9/92 (2013.01)
C12P 7/42 (2013.01)
C12Y 101/01179 (2013.01)
C12Y 101/03015 (2013.01)
C12Y 207/01017 (2013.01)
C12Y 503/01005 (2013.01)

(72) 발명자
크리스 발데후에사
경기도 용인시 처인구 명지로 116 명지대학교
크리스틴 라모스
경기도 용인시 처인구 명지로 116 명지대학교
페리 마자
경기도 용인시 처인구 명지로 116 명지대학교 용인 캠퍼스 명현관 108호
안젤로 바네레스
경기도 용인시 처인구 명지로 116 명지대학교 용인 캠퍼스 명현관 109호
그레이스 니소라
경기도 용인시 처인구 명지로 116 명지대학교 제2공학관8807호
이원근
경기도 용인시 처인구 명지로 116 명지대학교

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2009-0093816
부처명 교육부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 대학중점연구소지원사업
연구과제명 에너지환경융합기술연구소(3단계)-바이오매스기반 바이오화학제품 생산공정 요소기술 개발
기 여 율 1/3
주관기관 명지대학교
연구기간 2015.09.01 ~ 2018.08.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2015H1D3A1062172
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 해외우수신진연구자유치사업
연구과제명 폐바이오매스 유래 탄수화물의 효율적 활용 기술을 이용한 바이오에너지/화학제품 생산용 생합성 공정기술 개발
기 여 율 1/3
주관기관 명지대학교
연구기간 2015.11.01 ~ 2020.02.29
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2016R1C1B1013252
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 신진연구자지원사업
연구과제명 재조합 미생물 균주를 이용한 C5 xylose 기반 C2 및 C4 플랫폼 케미컬 생산 기술 개발
기 여 율 1/3
주관기관 명지대학교
연구기간 2016.06.01 ~ 2019.05.31

공지예외적용 : 있음

명 세 서

청구범위

청구항 1

대장균에서 자일로스 이소머라제(xylose isomerase) 유전자 *xylA* 및 자일루로키나아제(xylulokinase) 유전자 *xylB* 녹아웃 시키는 단계(단계 a);

단계 a의 대장균에서 글리콜산 옥시다아제(glycolate oxidase) 유전자 *glcD*를 녹아웃시키는 단계(단계 b); 및

자일로스 디하이드로게나아제(xylose dehydrogenase) 유전자 *xdh*를 포함하는 발현벡터를 이용하여 단계 b의 대장균을 형질전환시키는 단계(단계 c)를 포함하고,

상기 단계 c의 발현벡터는 글리옥실산 환원효소 유전자 *ycdW*, 이소시트르산 리아제 유전자 *aceA* 및 이소시트르산 디하이드로게나아제 키나아제/포스파타제 유전자 *aceK*의 조합, 또는 글리옥실산 환원효소 유전자 *ycdW*, 이소시트르산리아제 유전자 *aceA*, 이소시트르산 디하이드로게나아제 키나아제/포스파타제 유전자 *aceK*, 말산 티오키나아제(malate thiokinase) 유전자 *sucC-2*, 말산 티오키나아제(malate thiokinase) 유전자 *sucD-2* 및 말릴-CoA 리아제(malyl-CoAlyase) 유전자 *mcl-1*의 조합을 포함하는 것을 특징으로 하는 글리콜산 생산능을 갖는 형질전환 대장균의 제조방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 자일로스 이소머라제 유전자 *xylA*는 서열번호 1의 염기서열로 구성되는 것을 특징으로 하는, 글리콜산 생산능을 갖는 형질전환 대장균의 제조방법.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 자일루로키나아제 유전자 *xylB*는 서열번호 2의 염기서열로 구성되는 것 특징으로 하는, 글리콜산 생산능을 갖는 형질전환 대장균의 제조방법.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 글리콜산 옥시다아제 유전자 *glcD*는 서열번호 3의 염기서열로 구성되는 것을 특징으로 하는, 글리콜산 생산능을 갖는 형질전환 대장균의 제조방법.

청구항 5

청구항 1에 있어서,

상기 자일로스 디하이드로게나아제 유전자 *xdh*는 카우로박터 크리센투스(*Caulobacter crescentus*)로부터 유래된 것으로서 서열번호 4의 염기서열로 구성되는 것을 특징으로 하는, 글리콜산 생산능을 갖는 형질전환 대장균의 제조방법.

청구항 6

삭제

청구항 7

청구항 1에 있어서,

상기 발현벡터에 포함된 유전자인 *ycdW*, *aceA*, *aceK*, *sucC-2*, *sucD-2* 및 *mcl-1*는 각각 서열번호 11, 12, 13, 14, 15 및 16으로 기재되는 염기서열로 구성되는 것을 특징으로 하는, 글리콜산 생산능을 갖는 형질전환 대장균의 제조방법.

청구항 8

삭제

청구항 9

청구항 1에 있어서,

상기 대장균은 *E.coli* W3110(DE3)인 것을 특징으로 하는, 글리콜산 생산능을 갖는 형질전환 대장균의 제조방법.

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

자일로스 이소머라제 유전자 *xylA*, 자일루로키나아제 유전자 *xylB* 및 글리콜산 옥시다아제 유전자 *glcD*가 녹아웃되고, 자일로스 디하이드로게나아제 유전자*xdh*를 포함하는 발현벡터로 형질전환된 대장균을, 자일로스를 포함하는 배지에 배양시키는 단계(단계 1); 및

단계 1에서 배양된 배양물로부터 글리콜산을 수득하는 단계(단계 2)를 포함하고,

상기 단계 1에서 발현벡터는 글리옥실산 환원효소 유전자 *ycdW*, 이소시트르산 리아제 유전자 *aceA* 및 이소시트르산 디하이드로게나아제 키나아제/포스파타제 유전자 *aceK*의 조합, 또는 글리옥실산 환원효소 유전자 *ycdW*, 이소시트르산리아제 유전자 *aceA*, 이소시트르산 디하이드로게나아제 키나아제/포스파타제 유전자 *aceK*, 말산 티오키나아제(malate thiokinase) 유전자 *sucC-2*, 말산 티오키나아제(malate thiokinase) 유전자 *sucD-2* 및 말릴-CoA 리아제(malyl-CoAlyase) 유전자 *mcl-1*의 조합을 포함하는 것을 특징으로 하는 글리콜산의 생산방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 자일로스로부터 글리콜산의 생산능을 갖는 대장균, 이의 제조방법 및 이를 이용하여 글리콜산을 생산하는 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 자일로스로부터 글리콜산을 대량 생산할 수 있는 형질전환 대장균, 이의 제조방법과 상기 형질전환 대장균을 이용하여 자일로스로부터 글리콜산을 생산하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 글리콜산(glycolic acid, GA)은 가장 단순한 알파 하이드록시산(α hydroxy acid)이다. 글리콜산은 일차 알코올과 적당히 강력한 카복실산 작용기로 인해 광범위하게 응용이 가능하다. 일례로, 글리콜산은 박리효과와 보습효과로 인해 화장품과 피부과에서 널리 사용되고 있다. 글리콜산의 중합체 형태인 폴리글리콜산(polyglycolic acid, PGA)은 우수한 가스 차단성으로 인해 좋은 포장재료로 사용되고 있다. 또한 글리콜산은 의학분야에서 약물 전달에 사용되는 폴리락틱코글리콜산(poly(lactic-co-glycolic acid))의 공중합체 기질로서 필수적으로 사용된다. 아울러, PET병과 의료 봉합사(medical sutures)에서 글리콜산에 대한 수요가 매우 높다. 이 밖에도 가죽 공정, 오일 및 가스 공정, 세탁 및 섬유 공정에서 글리콜산의 적용이 가능하다.

[0004] Du Pont Company에서 통상적으로 생산되는 글리콜산은 고온 및 고압 조건에서 화석 연료원으로부터 물과 산 촉매가 존재할 때 포름알데하이드와 일산화탄소의 반응을 통해 생산된다. 다른 제조사에서는 클로로아세트산과 소듐 하이드록시드의 직접 반응과 재산성화(reacidification)를 통해 글리콜산을 제조한다. 그 외, 글리콜산을 합성하는 다른 화학적인 방법으로는 (1) 에틸렌 글리콜을 글리콜알데하이드로 산화한 후 글리콜산으로 산화하는 방법 및 (2) 포름알데하이드 시아노하이드린을 제조한 후 이를 수화하는 방법이 있다.

[0005] 최근 화석 연료의 고갈로 인한 우려가 증가함에 따라, 글리옥실산 션트(glyoxylate shunt) 경로에 관여하는 유전자를 과발현하여 이를 담지한 형질전환된 미생물에서 글리콜산을 생산하는 방법이 개발되어 왔다. 반면에, 글리콜산은 종래 연구에서 *E. coli*의 Dahms 경로를 이용하여 에틸렌 글리콜을 생산하기 위해 자일로스를 발효하는 과정에서 생성되는 부산물로 알려져 있었다. 아울러, 글리옥실산 션트 경로를 역으로 적용하는 방법을 통해 탄소를 보존하면서 순차적으로 글리콜산의 생산을 증가시킬 수 있는 방법이 보고되어 있다. 그러나, 지금까지 Dahms 경로와 글리옥실산 션트 경로를 결합하여 글리콜산을 생합성하는 방법에 대한 연구는 보고된 바 없다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) Mainguet, S. E., L. S. Gronenberg, S. S. Wong, and J. C. Liao (2013) A reverse glyocylate shunt to build a non-native route from C4 to C2 in Escherichia coli. Metab. Eng. 19: 116-127.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 자일로스로부터 글리콜산을 효율적으로 생산할 수 있는 형질 전환된 대장균(재조합 대장균)과 이를 제조하는 방법을 제공한다. 또한 상기 형질 전환된 대장균을 이용하여 글리콜산을 생산하는 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 대장균에서 자일로스 이소머라제(xylose isomerase) 유전자 *xylA* 및 자일루로키나아제(xylulokinase) 유전자 *xylB* 녹아웃 시키는 단계(단계 a); 단계 a의 대장균에서 글리콜산 옥시다아제(glycolate oxidase) 유전자 *glcD*를 녹아웃시키는 단계(단계 b); 및 자일로스 디하이드로게나아제(xylose dehydrogenase) 유전자 *xdh*를 포함하는 발현벡터를 이용하여 단계 b의 대장균을 형질전환시키는 단계(단계 c)를 포함하는, 글리콜산 생산능을 갖는 형질전환 대장균의 제조방법을 제공한다.

[0011] 상기 자일로스 이소머라제 유전자 *xylA*는 서열번호 1로 기재되는 염기서열로 구성될 수 있다.

[0012] 상기 자일루로키나아제 유전자 *xylB*는 서열번호 2로 기재되는 염기서열로 구성될 수 있다.

[0013] 상기 글리콜산 옥시다아제 유전자 *glcD*는 서열번호 3으로 기재되는 염기서열로 구성될 수 있다.

[0014] 상기 자일로스 디하이드로게나아제 유전자 *xdh*는 카우로박터 크리센투스(*Caulobacter crescentus*)로부터 유래된 것으로서 서열번호 4로 기재되는 염기서열로 구성될 수 있다.

[0015] 상기 단계 c의 발현벡터는 자일론산 디하이드라타제(xylonic acid dehydratase) 유전자 *yjhG*, 자일론산 디하이

드라타제(xylonic acid dehydratase) 유전자 *yagF*, 자일론산 디하이드라타제(xylonic acid dehydratase) 유전자 *xylD*, 2,3-케토 자일론산 알돌라아제(2,3-keto xylonate aldolase) 유전자 *yjhH*, 2,3-케토 자일론산 알돌라아제(2,3-keto xylonate aldolase) 유전자 *yagE*, 락트알데하이드 디하이드로게나아제(lactaldehyde dehydrogenase) 유전자 *aldA*, 글리옥실산 환원효소(glyoxylate reductase) 유전자 *ycdW*, 이소시트르산 리아제(isocitrate lyase) 유전자 *aceA*, 이소시트르산 디하이드로게나아제 키나아제/포스파타제(isocitrate dehydrogenase kinase/phosphatase) 유전자 *aceK*, 말산 티오키나아제(malate thiokinase) 유전자 *sucC-2*, 말산 티오키나아제(malate thiokinase) 유전자 *sucD-2* 및 말릴-CoA 리아제(malyl-CoA lyase) 유전자 *mcl-1*으로 이루어진 군 중 하나 이상을 더 포함할 수 있으며, 상기 유전자들은 각각 기재된 순서대로 서열번호 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 및 16으로 기재되는 염기서열로 구성될 수 있다.

[0016] 상기 단계 c의 발현벡터는, 자일론산 디하이드라타제 유전자 *yagF*, 2,3-케토 자일론산 알돌라아제 유전자 *yagE*, 락트알데하이드 디하이드로게나아제 유전자 *aldA*, 글리옥실산 환원효소 유전자 *ycdW*, 이소시트르산 리아제 유전자 *aceA* 및 이소시트르산 디하이드로게나아제 키나아제/포스파타제 유전자 *aceK*의 조합을 포함하는 것이 바람직할 수 있다.

[0017] 상기 대장균은 *E. coli* W3110(DE3)일 수 있다.

[0019] 또한 본 발명은, 자일로스 이소머라제 유전자 *xylA*, 자일루로키나아제(xylulokinase) 유전자 *xylB* 및 글리콜산 옥시다아제 유전자 *glcD*가 녹아웃된 대장균을, 자일로스 디하이드로게나아제 유전자 *xdh*를 포함하는 발현벡터로 형질전환시킨, 글리콜산 생산능을 갖는 형질전환 대장균을 제공한다.

[0020] 상기 발현벡터는 자일론산 디하이드라타제 유전자 *yjhG*, 자일론산 디하이드라타제 유전자 *yagF*, 자일론산 디하이드라타제 유전자 *xylD*, 2,3-케토 자일론산 알돌라아제 유전자 *yjhH*, 2,3-케토 자일론산 알돌라아제 유전자 *yagE*, 락트알데하이드 디하이드로게나아제 유전자 *aldA*, 글리옥실산 환원효소 유전자 *ycdW*, 이소시트르산 리아제 유전자 *aceA*, 이소시트르산 디하이드로게나아제 키나아제/포스파타제 유전자 *aceK*, 말산 티오키나아제 유전자 *sucC-2*, 말산 티오키나아제 유전자 *sucD-2* 및 말릴-CoA 리아제 유전자 *mcl-1*으로 이루어진 군 중 하나 이상을 더 포함할 수 있다.

[0021] 또한 본 발명은, 자일로스 이소머라제 유전자 *xylA*, 자일루로키나아제 유전자 *xylB* 및 글리콜산 옥시다아제 유전자 *glcD*를 녹아웃시킨 대장균을, 자일로스 디하이드로게나아제 유전자 *xdh*, 자일론산 디하이드라타제 유전자 *yagF*, 2,3-케토 자일론산 알돌라아제 유전자 *yagE*, 락트알데하이드 디하이드로게나아제 유전자 *aldA*, 글리옥실산 환원효소 유전자 *ycdW*, 이소시트르산 분해효소 유전자 *aceA* 및 이소시트르산 디하이드로게나아제 키나아제/포스파타제 유전자 *aceK*를 포함하는 발현벡터로 형질전환시킨, 글리콜산의 생산능을 갖는 형질전환 대장균을 제공한다.

[0022] 또한 본 발명은, 자일로스 이소머라제 유전자 *xylA*, 자일루로키나아제 유전자 *xylB* 및 글리콜산 옥시다아제 유전자 *glcD*를 녹아웃시킨 대장균을, 자일로스 디하이드로게나아제 유전자 *xdh*, 자일론산 디하이드라타제 유전자 *yagF*, 2,3-케토 자일론산 알돌라아제 유전자 *yagE*, 락트알데하이드 디하이드로게나아제 유전자 *aldA* 및 글리옥실산 환원효소 유전자 *ycdW*를 포함하는 제1 발현벡터와 이소시트르산 분해효소 유전자 *aceA* 및 이소시트르산 디하이드로게나아제 키나아제/포스파타제 유전자 *aceK*를 포함하는 제2 발현벡터로 형질전환시킨, 글리콜산의 생산능을 갖는 형질전환 대장균을 제공한다.

[0023] 상기 제1 발현벡터는 pACM4이고, 제2 발현벡터는 pETM6일 수 있다.

[0024] 또한 본 발명은, 자일로스 이소머라제 유전자 *xylA*, 자일루로키나아제 유전자 *xylB* 및 글리콜산 옥시다아제 유전자 *glcD*가 녹아웃되고, 자일로스 디하이드로게나아제 유전자 *xdh*를 포함하는 발현벡터로 형질전환된 대장균을, 자일로스를 포함하는 배지에 배양시키는 단계(단계 1); 및 단계 1에서 배양된 배양물로부터 글리콜산을 수득하는 단계(단계 2)를 포함하는, 글리콜산의 생산 방법을 제공한다.

[0025] 상기 단계 1의 배양은 진탕 플라스크 발효(shake flask fermentation) 방법을 사용할 수 있다.

발명의 효과

[0027] 본 발명에 따르면 자일로스로부터 글리콜산을 대량 생산할 수 있는 형질전환 대장균을 제공할 수 있다. 또한 본원 발명에 따르면, 자일로스로부터 글리콜산을 생산하는 과정에서 발생하는 부산물을 글리콜산 생합성경로로 도입시킬 수 있는 바, 부산물의 생산은 현저히 낮추면서 동시에 높은 수율로 글리콜산을 생산할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 형질전환 미생물을 이용하여, Dahms 경로와 변형된 글리옥실산 션트 경로를 통해 글리콜산을 생합성하는 과정을 나타내는 것이다.

도 2는 4 g/L 자일로스를 사용하여 37℃에서 72시간 동안 진탕 플라스크 발효하고 250 rpm에서 교반한 후에 GA1 균주를 초기에 배양하는 과정에서 생성되는 대사산물의 농도를 나타낸 그래프이다.

도 3은 10 g/L 자일로스를 사용하여 72시간 동안 진탕 플라스크 발효한 후에 대조군인 GA0과 GA1 균주에서 생산되는 글리콜산 및 자일론산의 농도를 나타낸 그래프이다.

도 4는 10 g/L 자일로스를 사용하여 37℃에서 72시간동 안 진탕 플라스크 발효하고 250 rpm에서 교반한 후에, 자일론산 디하이드라타제인 *xdh*가 모두 과발현되어 있고, *C. crescentus* 유래 *xylD*, *E. coli* 유래 *yjhG* 및 *yagF* 가 각각 과발현되어 있는 GA2, GA3 및 GA4 균주에서 생산되는 글리콜산 및 자일론산의 농도를 나타낸 그래프이다.

도 5는 10 g/L 자일로스를 사용하여 37℃에서 72시간 동안 진탕 플라스크 발효하고 250 rpm에서 교반한 후에 GA5와 GA6 균주에서 생산되는 글리콜산 및 자일론산의 농도를 나타낸 그래프이다.

도 6은 서로 다른 자일론산 디하이드라타제가 과발현되어 있는 균주에서의 락트알데하이드 디하이드로게나아제(*aldA*)의 과발현이 글리콜산 생산에 미치는 영향을 분석한 그래프이다.

도 7은 96시간 동안 진탕 플라스크 발효한 후에 모듈 Ⅰ 플라스미드와 모듈 Ⅱ의 플라스미드의 유전자를 각자 또는 모두 갖고 있는 균주들로부터 생산되는 글리콜산의 농도를 비교한 결과이다.

도 8은 96시간 동안 진탕 플라스크 발효한 후에 모듈 Ⅰ 플라스미드와 모듈 Ⅱ의 플라스미드의 유전자를 모두 갖고 있으나 서로 다른 유전자가 결실된 균주인 GA14와 GA21로부터 생산되는 글리콜산의 농도 및 수율을 비교한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 본 발명의 목적, 특징, 장점은 이하의 실시예를 통하여 쉽게 이해될 것이다. 본 발명은 여기서 설명하는 실시예에 한정되지 않고, 다른 형태로 구체화될 수도 있다. 여기서 소개되는 실시예는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 본 발명의 사상이 충분히 전달될 수 있도록 하기 위해 제공되는 것이다. 따라서 이하의 실시예에 의해 본 발명이 제한되어서는 안 된다.

[0032] **<실시예>**

[0033] **글리콜산 생산능을 갖는 형질전환 미생물의 제조**

[0034] 본 발명에서 사용한 모든 균주와 플라스미드는 하기 표 1과 같다.

표 1

[0035] 본 발명에서 사용한 플라스미드 및 균주

플라스미드/균주	상대적 특징	참조
pACM4	pACYC-Duet derivative; with ePathBrick feature; T7 promoter; Cmr	Xu et al., 2012
pETM6	pET-Duet derivative; with ePathBrick feature; T7 promoter; Ampr	Xu et al., 2012
pTrcHis2A	pBR322 derivative; Trc promoter; rrnB anti-terminator; lacIq;Ampr	Invitrogen
pX	*Caulobacter crescentus* 유래 코돈-최적화된 *xdh*를 담지한 pACM4	본 발명
pXD	*C. crescentus* 유래 코돈-최적화된 *xdh* 및 *xylD*를 담지한 pACM4	본 발명
pXG	*C. crescentus* 유래 코돈-최적화된 *xdh* 및 *E. coli* 유래 *yjhG*를 담지한 pACM4	본 발명
pXF	*C. crescentus* 유래 코돈-최적화된 *xdh* 및 *E. coli* 유래 *yagF*를 담지한 pACM4	본 발명

pXE	*C. crescentus* 유래 코돈-최적화된 *xdh* 및 *E. coli* 유래 *yagE*를 담지한 pACM4	본 발명
pXH	*C. crescentus* 유래 코돈-최적화된 *xdh* 및 *E. coli* 유래 *yjhH*를 담지한 pACM4	본 발명
pEFX	*E. coli* 유래 *yagE* 및 *yagF*; *C. crescentus* 유래 코돈-최적화된 *xdh*를 담지한 pACM4	본 발명
pEAGX	*E. coli* 유래 *yagE*, *aldA* 및 *yjhG*; *C. crescentus* 유래 코돈-최적화된 *xdh*를 담지한 pACM4	본 발명
pEADX	*E. coli* 유래 *yagE* 및 *aldA*; *C. crescentus* 유래 코돈-최적화된 *xylD* 및 *xdh*를 담지한 pACM4	본 발명
pEAFX	*E. coli* 유래 *yagE*, *aldA* 및 *yagF*; *C. crescentus* 유래 코돈-최적화된 *xdh*를 담지한 pACM4	본 발명
pEAX	*E. coli* 유래 *yagE* 및 *aldA*; *C. crescentus* 유래 코돈-최적화된 *xdh*를 담지한 pACM4	본 발명
pEAFXY(Module I)	*E. coli* 유래 *yagE*, *aldA*, *yagF* 및 *ycdW*; *C. crescentus* 유래 코돈-최적화된 *xdh*를 담지한 pACM4	본 발명
pCD	*Methylococcus capsulatus* 유래 코돈-최적화된 *sucC-2* 및 *sucD-2*를 담지한 pETM6	본 발명
pK	*E. coli* 유래 *aceK*를 담지한 pETM6	본 발명
pM	*Rhodobacter sphaeroides* 유래 코돈-최적화된 *mcl1*을 담지한 pETM6	본 발명
pA	*E. coli* 유래 *aceA*를 담지한 pETM6	본 발명
pCDM	*M. capsulatus* 유래 코돈-최적화된 *sucC-2* 및 *sucD-2*; *R. sphaeroides* 유래 코돈-최적화된 *mcl1*을 담지한 pETM6	본 발명
pKA	*E. coli* 유래 *aceK* 및 *ceA*를 담지한 pETM6	본 발명
pCDKMA(Module II)	*M. capsulatus* 유래 코돈-최적화된 *sucC-2* 및 *sucD-2*; *R. sphaeroides* 유래 코돈-최적화된 *mcl1*; *E. coli* 유래 *aceK* 및 *aceA*를 담지한 pETM6	본 발명
E. coli DH5α	F' Φ80lacZ ΔM15 (lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(rk-,mk+)phoAsupE44thi-1gyrA96relA1	Enzynomics
E. coli W3110 (DE3) xylAB	FmcrA mcrB IN(rrnDrrnE)1λ(DE3); ATCC No.27325; with deletion in xylAB genes	Liu et al., 2012
GA0-1	E. coli W3110 (DE3) ΔxylAB ΔglcD pACM4	본 발명
GA0-2	E. coli W3110 (DE3) ΔxylAB ΔglcD pACM4 and pETM6	본 발명
GA1	E. coli W3110 (DE3) ΔxylAB ΔglcD pX	본 발명
GA2	E. coli W3110 (DE3) ΔxylAB ΔglcD pXD	본 발명
GA3	E. coli W3110 (DE3) ΔxylAB ΔglcD pXG	본 발명
GA4	E. coli W3110 (DE3) ΔxylAB ΔglcD pXF	본 발명
GA5	E. coli W3110 (DE3) ΔxylAB ΔglcD pXE	본 발명
GA6	E. coli W3110 (DE3) ΔxylAB ΔglcD pXH	본 발명
GA7	E. coli W3110 (DE3) ΔxylAB ΔglcD pEFX	본 발명
GA8	E. coli W3110 (DE3) ΔxylAB ΔglcD pEAGX	본 발명
GA9	E. coli W3110 (DE3) ΔxylAB ΔglcD pEADX	본 발명
GA10	E. coli W3110 (DE3) ΔxylAB ΔglcD pEAFX	본 발명
GA11	E. coli W3110 (DE3) ΔxylAB ΔglcD pEAX	본 발명
GA12	E. coli W3110 (DE3) ΔxylAB ΔglcD pEAFXY	본 발명
GA13	E. coli W3110 (DE3) ΔxylAB ΔglcD pEAFX and pCDKMA	본 발명
GA14	E. coli W3110 (DE3) ΔxylAB ΔglcD pEAFXY and pCDKMA	본 발명
GA15	E. coli W3110 (DE3) ΔxylAB ΔglcD pEAFXY and pA	본 발명
GA16	E. coli W3110 (DE3) ΔxylAB ΔglcD pEAFXY and pCD	본 발명
GA17	E. coli W3110 (DE3) ΔxylAB ΔglcD pEAFXY and pK	본 발명
GA18	E. coli W3110 (DE3) ΔxylAB ΔglcD pEAFXY and pM	본 발명
GA19	E. coli W3110 (DE3) ΔxylAB ΔglcD pEAFXY and pKA	본 발명
GA20	E. coli W3110 (DE3) ΔxylAB ΔglcD pEAFXY and pCDM	본 발명
GA21	E. coli W3110 (DE3) ΔxylAB ΔglcDEFGB ΔaceB pEAFXY and pCDKMA	본 발명

[0036] 하기 표 2의 프라이머를 사용하여 *E. coli* 유래 유전자를 복제하기 위해 중합효소 연쇄반응(PCR)하는 과정에서 *E. coli* W3110의 DNA를 주형으로 사용할 동안, 카우로박터 크레센투스(*Caulobacter crescentus*) 유래 *xdh*, 로도박터 스패로이드(*Rhodobacter sphaeroides*) 유래 *mcl* 및 메틸로코커스 캡슐라투스(*Methylococcus*

capsulatus) 유래 *sucC-2* 및 *sucD-2*를 코돈-최적화하였다.

표 2

[0037] 본 발명에서 사용한 프라이머 서열

프라이머	서열 5' → 3' / 제한효소	기능
cc-xdh-F	CGGTCATATGTCTTCTGCGATCTACCCG [NdeI](서열번호 17)	*xdh* 유전자의 증폭
cc-xdh-R	CTTTCTCGAGTCAACGCCAACCCGC [XhoI](서열번호 18)	
cc-xylD-F	CTGTCATATGCGTTCTGCGCTGTCTAAC [NdeI](서열번호 19)	*xylD* 유전자의 증폭
cc-xylD-R	CGTTCTCGAGTCAGTGGTTGTGACGC [XhoI](서열번호 20)	
yjhG-F	GGGGCATATGTCTGTTCGCAATATTTTTG [NdeI](서열번호 21)	*yjhG* 유전자의 증폭
yjhG-R	CGCCCTCGAGTCAGTTTTTATTCATAAAATCGC [XhoI](서열번호 22)	
yagF-F	CCCGCATATGACCATTGAGAAAATT [NdeI](서열번호 23)	*yagF* 유전자의 증폭
yagF-R	CTCTCTCGAGTTAAATTCCGAGCGC [XhoI](서열번호 24)	
yjhH-F	CCCGCATATGAAAAAATTCAGCGGCATTA [NdeI](서열번호 25)	*yjhH* 유전자의 증폭
yjhH-R	CTCTCTCGAGTTCTCCTCAGACTGGTAA [XhoI](서열번호 26)	
yagE-F	CTCGCATATGATTCAGCAAGGAGATC [NdeI](서열번호 27)	*yagE* 유전자의 증폭
yagE-R	CTCTCTCGAGTCAGCAAAGCTTGAGCTG [XhoI](서열번호 28)	
ycdW-F	CCCGCATATGGATATCATCTTTTATCACCC [NdeI](서열번호 29)	*ycdW* 유전자의 증폭
ycdW-R	CTTTCTCGAGTTAGTAGCCGCGTGCGC [XhoI](서열번호 30)	
aceA-F	CCAACAATTGGATGAAAACCCGTACACAAC [MunI](서열번호 31)	*aceA* 유전자의 증폭
aceA-R	CTTTCTCGAGTTAGAACTGCGATTCTTCAG [XhoI](서열번호 32)	
aceK-F	AAAACATATGCCGCGTGGCCTGGAAT [NdeI](서열번호 33)	*aceK* 유전자의 증폭
aceK-R	AAAACTCGAGTCAAAAAAGCATCTCCCCATAC [XhoI](서열번호 34)	
aldA-F	CCACCATATGTCAGTACCCGTTCAACATC [NdeI](서열번호 35)	*aldA* 유전자의 증폭
aldA-R	CCCCCTCGAGTTAAGACTGTAAATAAACCAC [XhoI](서열번호 36)	
mcl-F	CCAACATATGTCTTTCCGTCTGCA [NdeI](서열번호 37)	*mcl1* 유전자의 증폭
mcl-R	CAACCTCGAGTCACGCAGAGATCATTT [XhoI](서열번호 38)	
sucC-2-F	CCAACATATGAACATCCACGAATACCAGG [NdeI](서열번호 39)	*sucC-2* 유전자의 증폭
sucC-2-R	CAACCTCGAGTTAACCTTTAACGATCGCAAC [XhoI](서열번호 40)	
sucD-2-F	CCCCCATATGTCTGTTTTCGTTAA [NdeI](서열번호 41)	*sucD-2* 유전자의 증폭
sucD-2-R	CAAACTCGAGTCAGAAACGGATACC [XhoI](서열번호 42)	
glcD-KO-F	gctggaaaaaggtgtgttgttggtgatggcgcgctttaaaCATATGAATATCCTCCTTAGT(서열번호 43)	*glcD* 파열 카세트(disruption cassette)의 증폭
glcD-KO-R	AAATCATATTGCTGCGATAAACGGGCAATGCCTTCCAGTAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG(서열번호 44)	
glcD-Ver-F	ATGAGCATCTTGTACGAAGA(서열번호 45)	*glcD* 파열 확인
glcD-Ver-R	TTCAGGGAAAGGTAAATGAC(서열번호 46)	
glcB-KO-F	ttctctgcacggacgctcgctgctgtttatccgcaacgtgCATATGAATATCCTCCTTAGT(서열번호 47)	*glcB* 파열 카세트(disruption cassette)의 증폭
glcB-KO-R	TTCAAATTCAGCATTGAACTCGGTCTGGGCAATGTTGGCTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG(서열번호 48)	
glcB-Ver-F	cgcacatcaacgatgttatc(서열번호 49)	*glcB* 파열 확인
glcB-Ver-R	GCCACATTGTGAATATCCGG(서열번호 50)	
aceB-KO-F	tcactggcaccagactggaacaaagtgatcgacgggcaaa CATATGAATATCCTCCTTAGT(서열번호 51)	*aceB* 파열 카세트(disruption cassette)의 증폭
aceB-KO-R	ACCGTTATTGGCTTCCAGCGATTTATCCGCTTTTACTTTGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG(서열번호 52)	
aceB-Ver-F	gaaacagcttccattcgcg(서열번호 53)	*aceB* 파열 확인
aceB-Ver-R	GTAATCGGCGCGTCTTGTTC(서열번호 54)	
yagF-His-F	CCCCTCGAGAACCATTGAGAAAATT [XhoI](서열번호 55)	His tag이 부착된 *yagF* 유전자의 증폭
yagF-His-R	CCCAAGCTTAATTCCGAGCGCTTTTTT [HindIII](서열번호 56)	

[0038] PCR 산물은 NdeI/XhoI 또는 MunI/XhoI으로 처리하였고, Mattheos Koffas에서 제공하고 동일한 효소로 처리된 pACM4(Addgene plasmid # 49797) 또는 pETM6(Addgene plasmid # 49795)로 복제하였다.

[0039] 첫 번째 모듈 플라스미드는 각각의 유전자가 독립적인 프로모터(promoter) 하에서 하나의 종결자(terminator)를

공유하는 슈도-오페론 배열(pseudo-operon configuration)로 제작하였다. 공여자 벡터는 AvrⅡ/SalⅠ으로 처리한 후 SpeⅠ/SalⅠ으로 처리한 목적 벡터와 연결하였다. 열린 해독 틀(open reading frame)이 있는 SalⅠ 자리를 포함하는 *yagF*와 *ycdW* 유전자를 제작하기 위해, AvrⅡ/NheⅠ로 공여자 벡터를 처리한 후, SpeⅠ/NheⅠ으로 처리되고 탈인산화된 목적 벡터와 연결하였다.

[0040] 두 번째 모듈 플라스미드에서, *sucC-2* 및 *sucD-2* 유전자를 오페론 배열로 제작하였고 다른 유전자들은 슈도-오페론 배열로 제작하였다. 재조합 플라스미드는 화학적 또는 전기적으로 활성화된 *E. coli* 세포로 형질전환시켰다. 화학적으로 활성화된 *E. coli* 세포는 형질전환 및 보관 용액(storage solution)을 사용한 원-스텝 방법(one-step method)으로 제작하였다. 다른 DNA 조작, 전기천공법을 통한 형질전환 및 단백질 수준 발현 분석은 표준 절차(Sambrook and Russell, 2001)에 따라 수행하였다. 유전자가 제거된 균주는 원-스텝 유전자 비활성화 방법(Cherepanov and Wackernagel, 1995; Cabulong *et al.*, 2017)을 사용하여 제작하였다.

[0042] **<실험예>**

[0043] **진탕-플라스크 발효를 통한 글리콜산의 생산**

[0044] 진탕-플라스크 발효는 1 g/L 펩톤이 추가된 M9 배지 100 mL, 효모 추출물 0.5 g/L, 자일로스 10 g/L, $MgSO_4$ 1 mM, MOPS 20 g/L, 클로람페니콜 35 ㎍/mL 및 암피실린 100 ㎍/mL를 사용하여 수행하였다. 하룻밤동안 배양시킨 배양액 2 mL를 각각의 플라스크에 접종한 후 37℃에서 72 ~ 96시간동안 발효시킨 후 250 rpm으로 교반하여 배양하였다. 배양액의 OD_{600}이 0.3 AU에 도달했을 때 IPTG 0.5 mM을 추가하여 유도를 수행하였다. 특정 시간 간격에서, 바이오매스의 OD_{600}을 측정하고 시료 1 ml는 HPLC를 사용하여 기질과 대사산물을 정량화하기 위해 수집하였다. 발효는 최소 두 번에 걸쳐 수행하였다.

[0046] **효소 정제**

[0047] 효소를 정제하기 위해 플라스미드 pTrcHis2A에서 히스티딘이 태그된 *yjhG* 또는 *yagF* 유전자가 과발현된 *E. coli* W3110(DE3) xylAB glcD를 사용하였다. 여기서, xylAB는 자일로스 이소머라제(xylose isomerase) 유전자인 *xylA*와 자일루로키나아제(xylulokinase) 유전자인 *xylB*를 결실시켰다는 것을 의미하며, glcD는 글리콜산 옥시다아제(glycolate oxidase) 유전자인 *glcD*를 결실시켰다는 것을 의미한다. 간략하게, 재조합된 균주는 LB 브로쓰 배지에서 배양하고 배양액의 OD_{600}이 0.3 AU에 도달했을 때 IPTG 0.5 mM을 추가하였다. 5시간동안 유도 후, 4℃에서 15분동안 4,000xg로 원심분리하여 세포를 수집하였다. Macherey-Nagel의 Protino Ni-TED 2000 packed columns 프로토콜에 따라, Lysis-Cquilibration-Wash(LEW) 버퍼(50 mM NaH_2PO_4, 300 mM NaCl, pH 8.0) 2-5 mL에서 펠렛된 세포를 재현탁시켰다. 그 후 세포를 파괴하기 위해 리소자임(lysozyme)을 첨가하여 최종 농도를 1 mg/mL로 만들었고, 얼음에서 30분 동안 용액을 저었다. 이후에 얼음에서 5분 동안 15초의 냉각 시간과 15초의 세포 파열 간격을 두면서 초음파처리를 하였다. 그 후 4℃에서 30분 동안 10,000xg로 시료를 원심분리한 후 상청액으로 세포 용해물을 수득하였다. 1x LEW 버퍼로 Protino Ni-TED column을 평형상태로 만든 후에, 세포 용해물은 중력에 의해 컬럼을 통과하였다. 1x LEW 버퍼로 컬럼을 세척한 후 용출 버퍼를 사용하여 폴리히스티딘이 태그된 단백질을 용출시켰다. 하룻밤동안 1x LEW 버퍼를 사용하여 투석을 수행하였다. 정제된 단백질은 폴리아크릴아마이드 겔에서 시각화시키고, Bradford assay 방법을 기반으로 한 Bio-Rad 단백질 키트를 사용하여 농도를 측정하였다.

[0049] **효소 분석**

[0050] *yagF* 및 *yjhG* 디하이드라타제의 효소 활성은 세미카바자이드 어세이(semicarbazide assay)를 사용하여 측정하였다. Tris-HCl 50 mM(pH 8.0), $MgCl_2$ 100 mM, 자일론산 10 mM, 적정 양의 디하이드라타제 및 물을 포함하여 0.15 mL 부피로 반응 혼합물을 만들었다. 30℃에서 30분동안 혼합물을 배양한 후, 세미카바자이드 시약 1 mL를 첨가하여 냉각시켰다. 30℃에서 15분동안 혼합물을 다시 배양한 후, UV-Vis spectrophotometer Agilent 8453을 사용하여 250 nm에서 흡광도를 측정하였다. 디하이드라타제의 활성은 분당 1 μmol의 2-케토-3-디옥시-D-자일론산(KDX)의 형성을 촉매하는 효소의 양으로 정의하였고, 10,200 M^{-1} cm^{-1}의 몰 흡광 계수를 기반으로 측정하였다.

[0052] **실험예 1: 자일로스 디하이드로게나아제가 과발현된 균주의 글리콜산 생산량 분석**

[0053] 종래 연구에서, 글리콜산은 Dahms 경로를 통해 에틸렌 글리콜이 발효되는 과정에서 생성되는 부산물이라고 알려져 있었다. 글리콜산은 *xdh*가 높은 수준으로 발현되어 있을 때 생성되지만 바이오매스를 형성하기 위해 세포에서 리-어시밀레이션(re-assimilation)된다. 따라서, 본 발명에서는 글리콜산이 리-어시밀레이션(re-assimilation)되는 것을 막기 위해 글리콜산 옥시다아제를 코딩하는 *glcD* 유전자를 제거하였다(도 1). 그 후 자

일론산 축적을 감소시키기 위해 카피수가 적은 플라스미드 벡터(low copy plasmid vector)인 pACM4로 *xdh*를 복제하였다. 자일로스가 처음 12시간 동안 소비되는 과정에서 당 소비가 관찰되었고 이는 자일론산의 축적으로 이어졌다; 자일론산이 리-어시밀레이션(re-assimilation)됨에 따라 바이오매스와 글리콜산의 생산량이 증가하였다(도 2). *xdh* 유전자가 단독으로 과발현된 GA1 균주는 초기 발효과정에서 4 g/L 자일로스로부터 0.30 g/g 수율로 글리콜산 1.21 g/L를 생산한 것을 확인할 수 있었다.

[0054] 생산되는 글리콜산의 역가(titer)를 향상시키기 위해, 초기 자일로스 농도를 4 g/L에서 10 g/L로 증가시켰다. 실험 결과, 공플라스미드를 담지하는 대조군 균주인 GA0에서는 자일로스 농도가 증가한 경우에도, 72시간 발효 후에 자일론산과 글리콜산이 축적되지 않았다. 반면에 GA1 균주는 글리콜산 역가의 예상 증가량보다 낮은 0.20 g/g의 수율로 1.96 g/L의 글리콜산을 생산하였다. 이는 발효가 끝난 후에도 3.21 g/L의 자일론산이 배지에 남아 심각한 자일론산의 축적으로 이어졌기 때문에 글리콜산의 생산량이 감소한 것으로 보여진다(도 3). 자일론산의 축적은 *xdh*의 높은 발현과 낮은 경로 활성 때문인 것으로 보인다. 자일론산의 축적은 (a) *xdh* 발현을 낮추고(또는 낮추거나) (b) Dahms 경로에서 생성되는 산물들을 다른 중간체로 빠르게 전환시키기 위해 다운스트림 효소를 과발현함으로서 경감시킬 수 있을 것으로 판단된다.

[0056] **실험예 2: 자일론산 디하이드라타제가 과발현된 균주의 글리콜산 생산량 분석**

[0057] 글리콜산의 생산량을 증가시키기 위하여, 자일론산 디하이드라타제의 과발현 및 효소 선별을 수행하였다. 자일론산 디하이드라타제는 자일론산에서 2,3-케토 자일론산으로의 전환을 촉매하고, 효율적인 자일론산 디하이드라타제는 배지에서 자일론산의 축적을 낮추거나 제거함으로써 자일로스를 글리콜산으로 빠르게 전환시키는 것으로 예상된다. 72시간 동안 발효 후 축적되는 자일론산과 글리콜산을 기반으로 *C. crescentus* 유래 *xylD*와 *E. coli* 유래 *yagF* 및 *yjhG*로 코딩되는 자일론산 디하이드라타제를 비교하기 위해 GA2, GA3 및 GA4 균주를 각각 제작하여 비교하였다. 실험 결과, 도 4와 같이 발효 후 배지에 GA2, GA3 및 GA4로부터 각각 3.55, 1.96 및 0.64 g/L의 자일론산이 남아 축적되었고, 글리콜산은 1.43, 1.55 및 1.64 g/L만큼 생산된 것을 확인할 수 있었다. 세 균주 중 과발현된 *yagF*을 포함하는 GA4 균주에서 자일론산이 가장 적게 축적되었고 글리콜산이 가장 많이 생산되었다. 이는 *yagF* 유전자가 글리콜산 생산에 적합한 자일론산 디하이드라타제라는 것을 의미한다. 이를 추가로 확인하기 위해, *E. coli*에서 유래한 잠정적인 두 가지의 자일론산 디하이드라타제인 *yagF* 및 *yjhG*의 활성을 비교하고자 효소 분석을 수행하였다. 분석 결과, *yagF* 및 *yjhG*의 효소 활성은 각각 34.5 및 13.5 nmol/min/mg으로 나타났다(표 3).

표 3

[0059] 정제된 자일론산 디하이드라타제의 효소 활성

자일론산 디하이드라타제	효소 활성(nmol/min/mg)
YagF	34.5 ± 6.36
YjhG	13.5 ± 0.71

[0060] 이를 통해 *yagF*가 *yjhG*보다 더 높은 효소 활성을 갖고 있으며, 발효과정에서 *yagF*가 *yjhG*에 비해 글리콜산 생산에 좋은 자일론산 디하이드라타제인 것을 확인할 수 있었다.

[0062] **실험예 3: 2,3-케토 자일론산 알돌라아제가 과발현된 균주의 글리콜산 생산량 분석**

[0063] 이어서, *E. coli*에서 유래한 2,3-케토 자일론산 알돌라아제의 선별을 수행하였다. 2,3-케토 자일론산 알돌라아제는 성장에 필요한 피루브산과, 글리콜산 또는 에틸렌 글리콜로 전환되는 글리콜알데하이드를 형성하기 위해 2,3-케토 자일론산을 절단한다. 자일론산 디하이드라타제를 선별한 실험과 유사하게, *E. coli*에서 유래한 *yagE*와 *yjhH*를 과발현시켰고, 72시간 동안 발효 후 축적되는 자일론산과 글리콜산을 기반으로 *yagE* 및 *yjhH*로 코딩되는 2,3-케토 자일론산 알돌라아제를 비교하기 위해 GA5 및 GA6 균주를 각각 제작하여 비교하였다. 도 5에서 나타내는 바와 같이, GA5와 GA6 균주를 적용한 경우, 배지에 남은 자일론산은 각각 3.24 및 3.30 g/L이었고, 글리콜산은 각각 1.59 및 1.34 g/L만큼 생산되는 것으로 확인되었다. *yagE*가 과발현된 GA5 균주는 GA6 균주보다 높은 글리콜산 생산량을 보였으나 자일론산 축적에서는 현저한 차이가 나타나지 않았다. 이를 통해 *yagE* 유전자가 글리콜산 생산에 적합한 2,3-케토 자일론산 알돌라아제라는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 GA2, GA3, GA4, GA5 및 GA6 균주는 GA1 균주에 비해 상당히 낮은 양의 글리콜산을 생산하는 것으로 나타났다. 이는 자일론산 디하이드라타제와 2,3-케토 자일론산 알돌라아제의 과발현에 관여하는 대사 부담과/또는 알려지지 않은 조절 때문인 것으로 보여진다.

[0065] **실험예 4: 형질전환 균주를 통한 락트알데하이드 디하이드로게나아제의 효과 분석**

[0066] Dahms 경로에 관여하는 모든 효소들의 효율적인 작용은 중간체의 효율적인 전환과 중간체의 독성 축적을 방지하는 과정으로 이어지며, 이는 대사 공학에서 최종 역가를 증가시키는 주요 요소 중 하나이다. 본 실험에서는, Dahms 경로에 관여하는 *xdh*, *yagF* 및 *yagE* 세 가지 유전자를 포함하는 플라스미드를 재조합하고 *E. coli* 숙주로 형질전환시켜 GA7 균주를 제작하고 글리콜산 생산을 시험하였다. 실험 결과 글리콜산의 생산이 증가할 것이라는 예상과는 달리, GA7 균주는 1.43 g/L의 글리콜산을 생산하는 것으로 확인되었다(도 6). 이는 글리콜산을 합성시키기 위한 탄소 풀(pull of carbon)이 상기 세 가지 유전자들을 과발현시키는 것만으로는 충분하지 않다는 것을 의미한다. 이후, 자일로스 디하이드로게나아제, 자일론산 디하이드라타제, 2,3-케토 자일론산 알돌라아제 및 락토알데하이드 디하이드로게나아제가 과발현된 플라스미드에서 자일론산 디하이드라타제 유전자만 변화시켜 재조합한 균주들을 이용하여 추가로 발효 실험을 진행하였다. 실험 결과, 상기 네 가지 유전자가 모두 과발현됨에 따라 글리콜산의 생산량이 현저히 증가하는 것을 확인할 수 있었다(도 6). *yjhG*가 과발현된 GA8 균주는 2.74 g/L, *xylD*가 과발현된 GA9 균주는 3.28 g/L, *yagF*가 과발현된 GA10 균주는 3.96 g/L의 글리콜산을 생산하였다. 테스트에 사용한 균주 중 GA10 균주가 0.40 g/g의 수율로 가장 높은 글리콜산 역가를 보였다. 이는 *yagF*의 과발현이 높은 글리콜산의 생산량을 부여하는 것을 의미한다. 아울러 *xdh*, *yagE* 및 *aldA*만 과발현시킨 GA11 균주를 제작하여 실험한 결과, 심각한 자일론산의 축적을 확인할 수 있었다. 이는 *E. coli* 내 자일론산 디하이드라타제의 낮은 활성이 Dahms 경로에 병목 현상을 일으켜서 자일론산을 축적시키고, 동시에 글리콜산의 역가와 생산성을 감소시킨다는 것을 의미한다.

[0068] **실험예 5: 글리콜산 생산에 대한 글리옥실산 환원효소의 효과 확인**

[0069] 모듈 I 플라스미드를 완성하기 위해, 글리옥실산 환원효소를 코딩하는 *ycdW* 를 네 개의 유전자를 포함하는 플라스미드(pEAFX)에 연결시켜, Dahms 경로를 통해 글리콜산을 생산하는 GA12 균주를 제작하고 발효 실험을 진행하였다. *ycdW*는 글리옥실산을 글리콜산으로 전환하는 과정을 촉매한다. 실험 결과 글리콜산의 역가는 *ycdW*가 과발현됨에 따라 증가할 것으로 예상되었으나, GA10이 생산한 글리콜산과 비교한 결과 GA10은 3.96 g/L를 생산한 반면에 GA12는 3.72 g/L를 생산하는 것으로 확인되었다. 96시간 발효 후 두 균주 사이에서 생산되는 글리콜산의 생산량이 유의한 차이를 보이지는 않았다.

[0070] 이후, 플라스미드 pEAFX 및 모듈 II 플라스미드로 형질전환시켜 제조한 GA13 균주를 이용하여 실험하였다. 두 번째 모듈 플라스미드는 *sucC-2* 및 *sucD-2*로 코딩되는 메틸로코커스 캡슐라투스 유래 말산 티오키나아제; *mcl1*으로 코딩되는 로도박터 스패로이드 유래 말릴-CoA 리아제; 및 *E. coli* 유래 *aceA* 및 *aceK*를 포함한다. 상기 유전자들은 글리옥실산에 대한 탄소 플럭스를 증가시키기 위해 높은 카피수의 플라스미드(high copy plasmid)로 포함시켰다.

[0071] 모듈 II 플라스미드를 포함하는 균주를 제작하여 발효를 진행한 결과, 글리콜산의 생산량이 현저히 증가하였다(도 7). GA13 균주는 4.18 g/L의 글리콜산을 생산하였고, GA10 및 GA12 균주에 비해 글리콜산을 더 많이 생산한 것으로 나타났다. *ycdW*가 글리콜산 생산에 중요한 역할을 하는지 확인하기 위해 GA14 균주를 제조하여 실험을 진행한 결과, 4.51 g/L의 글리콜산을 생산하는 것으로 확인되었다. 매우 글리콜산 역가에 도달한 것을 확인하였는 바, 이는 *ycdW*가 Dahms 경로 내 중간체 중 하나에 작용하더라도 글리옥실산 션트 경로에 관여하는 글리콜산의 생합성에 중요한 효소라는 것과, 글리옥실산에 대해 높은 친화성을 갖는다는 것을 의미한다.

[0073] **실험예 6: 글리콜산 생산에 대한 모듈 II 플라스미드 유전자의 효과 확인 1**

[0074] 모듈 II 플라스미드 유래 유전자 중 GA14 균주의 글리콜산의 생산량을 증가시키는 데 관여하는 유전자를 확인하기 위해, 모듈 I 플라스미드와 함께, 모듈 II 플라스미드의 유전자를 개별적으로 발현시켜 GA15(*aceA* 과발현), GA16(*sucC-2* 및 *sucD-2* 과발현), GA17(*aceK* 과발현) 및 GA18(*mcl1* 과발현) 균주를 제작하여 실험을 진행하였다. 실험 결과, 상기 균주들은 각각 4.07, 3.36, 3.00 및 3.39 g/L의 글리콜산을 생산하였다. GA15 균주는 GA13 균주와 글리콜산 생산량에 큰 차이가 없었으나 GA14 균주에 비해 상당히 낮은 글리콜산 생산량을 보였다. 아울러, GA16, GA17 및 GA18 균주도 GA14 균주에 비해 훨씬 낮은 글리콜산 생산량을 보였다. 이는 글리콜산의 생산량을 증가시키는 과정에서 모듈 II 플라스미드의 유전자를 하나만 과발현시키는 것은 유전자들을 조합하는 것에 비해 충분하지 않다는 것을 의미한다.

[0076] **실험예 7: 글리콜산 생산에 대한 모듈 II 플라스미드 유전자의 효과 확인 2**

[0077] 글리옥실산 션트 경로는 *aceK*에 의해 조절되며, 이소시트르산을 -케토글루타르산으로 전환하는 과정을 촉매하는 효소인 이소시트르산 디하이드로게나아제의 인산화 상태에 따라 조절된다. 상기 효소가 인산화될 경우 효소의

활성이 감소하게 되어 글리옥실산 션트가 활성화된다. *aceK*의 발현 수준이 낮을 경우, *aceA*를 단독 과발현시키는 것만으로는 글리콜산 생산량을 증가시키기에 충분하지 않을 수 있다. 본 실험에서는, *aceA*와 *aceK*를 함께 과발현시켜 제조한 GA19 균주를 이용하여 글리콜산 생산량을 분석하였다. 상기 균주는 4.57 g/L의 글리콜산을 생산하였는 바, 글리콜산 생산에 매우 유리하다는 것을 알 수 있다.(표 4).

표 4

[0078] 모듈 I 플라스미드와 모듈 II 플라스미드의 유전자 조합을 담지하는 균주의 글리콜산 역가 및 수율

균주	플라스미드	글리콜산 (g/L)	수율 (g/g)
GA14	첫 번째, 두 번째 모듈	4.51 ± 0.18	0.45
GA19	첫 번째 모듈 및 pKA	4.57 ± 0.24	0.46
GA20	첫 번째 모듈 및 pCDM	2.96 ± 0.40	0.35

[0079] 이후, 모듈 I과 *sucC-2* 및 *sucD-2*가 과발현된 GA20 균주로 실험을 진행한 결과, 2.96 g/L의 글리콜산을 생산하는 것을 확인할 수 있었다. 상기 결과에서 *aceK* 및 *aceA*가 글리옥실산 형성에 관여하여 글리콜산을 생산하는 중요한 유전자라는 것을 알 수 있다.

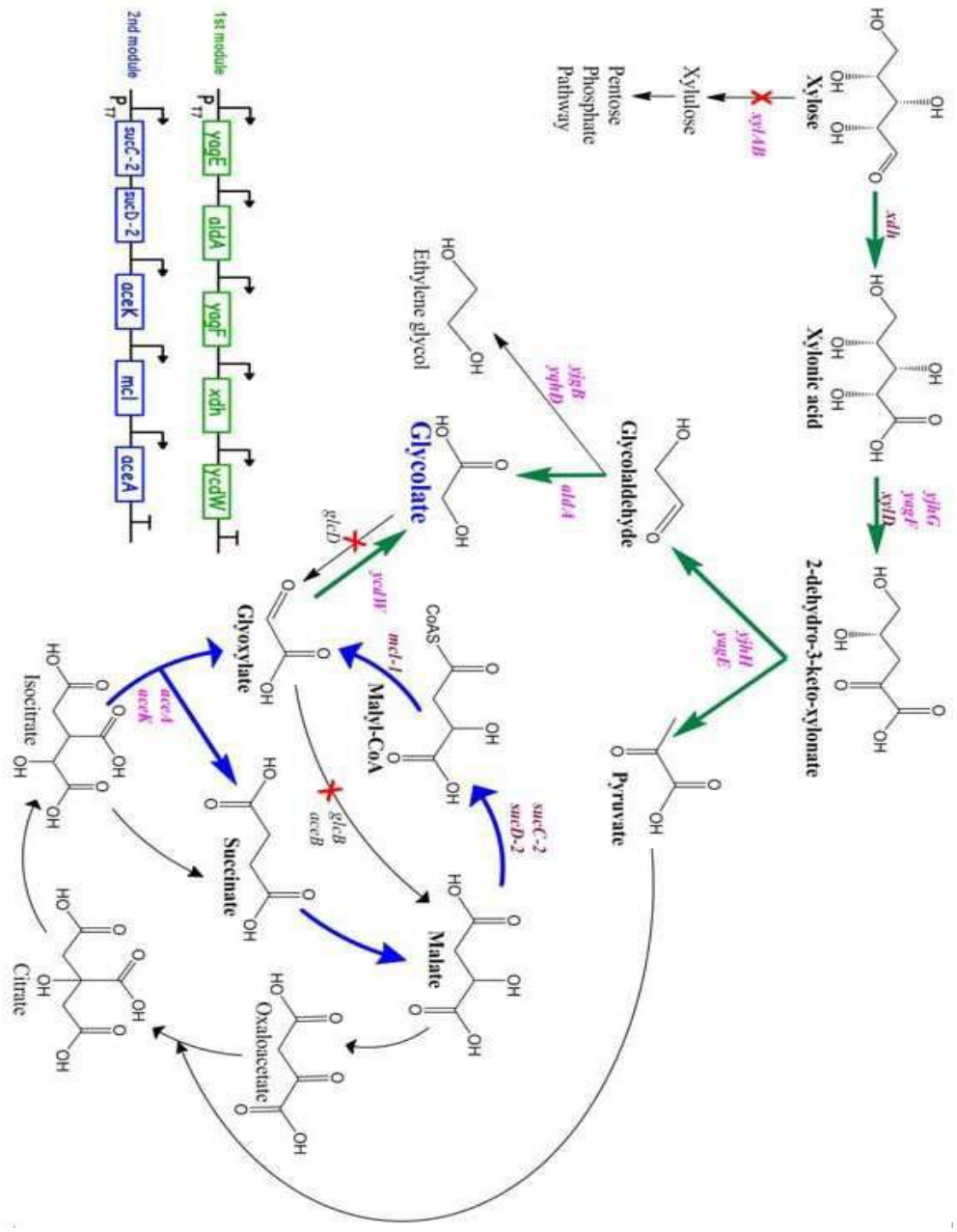
[0081] **실험예 8: 글리콜산 생산에 대한 말산 합성효소 유전자의 효과 확인**

[0082] GA14 균주를 통해 글리콜산의 생산량을 더 증가시킬 수 있는지 확인하기 위해, 말산 합성효소 G와 말산 합성효소 A를 코딩하는 *glcB* 및 *aceB* 유전자를 추가로 결실시킨 균주 GA21을 제작하고 실험을 진행하였다. 참고로, GA21 균주 제작과정에서 *glcD*와 *glcB* 유전자를 결실시킬 때 *glcD*와 *glcB* 사이에 있는 *glcE*(서열번호 57), *glcF*(서열번호 58) 및 *glcG*(서열번호 59) 유전자도 함께 결실되는데, 이는 *glcD* 자리에 남아있는 플립파제 인식 타겟(flippase recognition target, FRT)이 *glcB*와 *glcD* 유전자의 FRT 자리를 모두 인식하기 때문이다. 따라서 플립파제 활성과정에서 *glcD*와 *glcB* 사이에 있는 *glcE*, *glcF* 및 *glcG* 유전자도 함께 결실된다. GA21 균주는 글리옥실산이 말산으로 전환되는 과정이 차단되어 글리콜산 생산 수율이 증가될 것으로 예상되었다. 그러나 예상과 달리, 96시간 발효 후 GA21 균주가 매우 낮은 생산성으로 인해 0.41 g/g의 수율로 2.49 g/L의 글리콜산을 생산하는 것으로 확인되었다(도 8). 이는 세포가 갖는 유전자의 추가적인 제거가 대사에 부담이 된 것으로 보인다. 균주의 글리콜산 생산성, 역가 및 수율을 더욱 향상시키기 위해서는 추가적인 공학 기술이 더 필요할 것으로 사료된다.

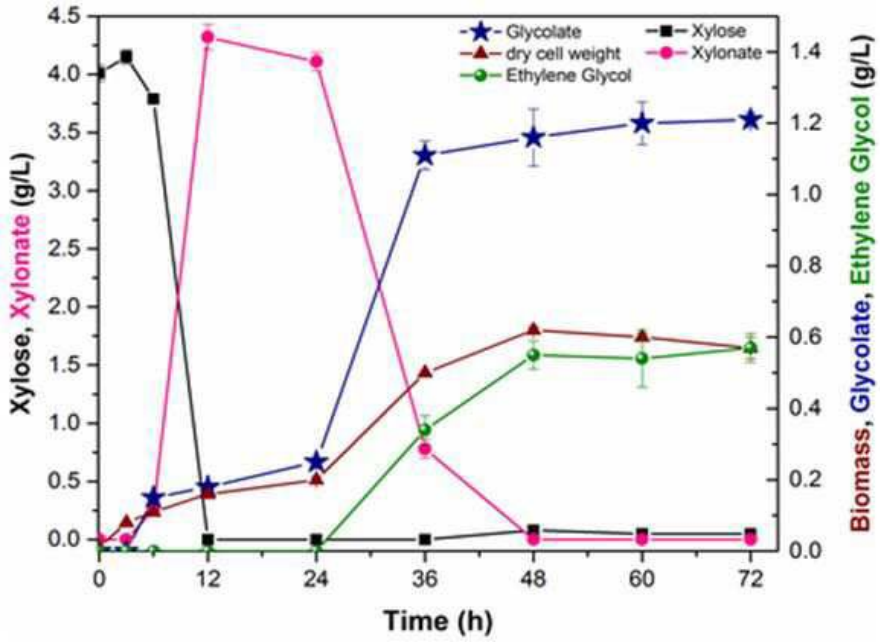
[0084] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

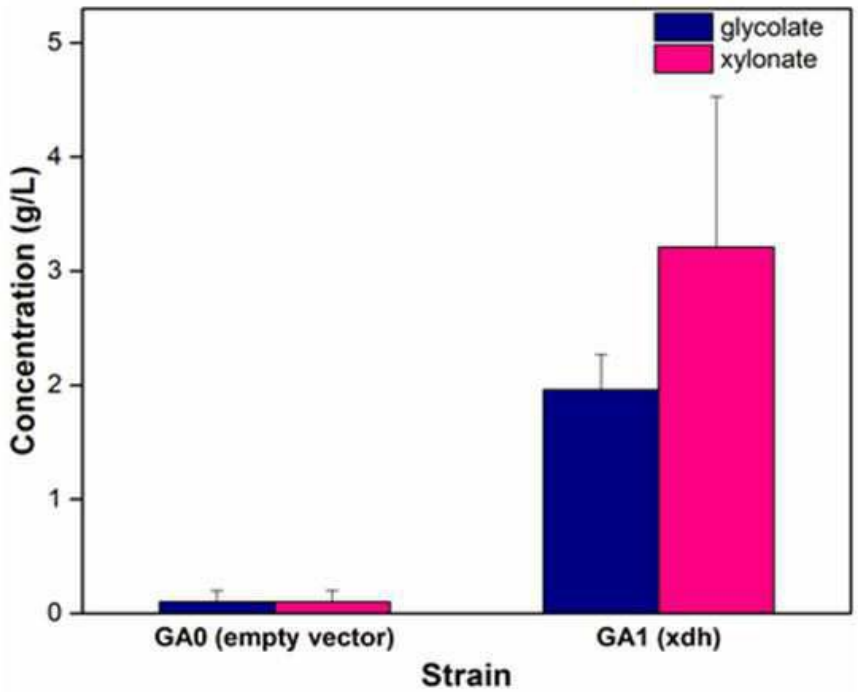
도면1


Xylose
xylAB
Xylulose
Pentose Phosphate Pathway
xdh
Xylonic acid
yjhG yagF xylD
2-dehydro-3-keto-xylonate
yjhH yagE
Pyruvate
Glycolaldehyde
yjgB yqhD
ald-1
Ethylene glycol
Glycolate
glcD
ycdW
Glyoxylate
mcl-1
Malyl-CoA
CoAS
aceA aceK
Isocitrate
glcB aceB
Succinate
sucC-2 sucD-2
Malate
Citrate
Oxaloacetate
1st module
2nd module
yqqE
aldA
yqqF
xdh
ycdW
sucC-2
sucD-2
aceK
mcl
aceA

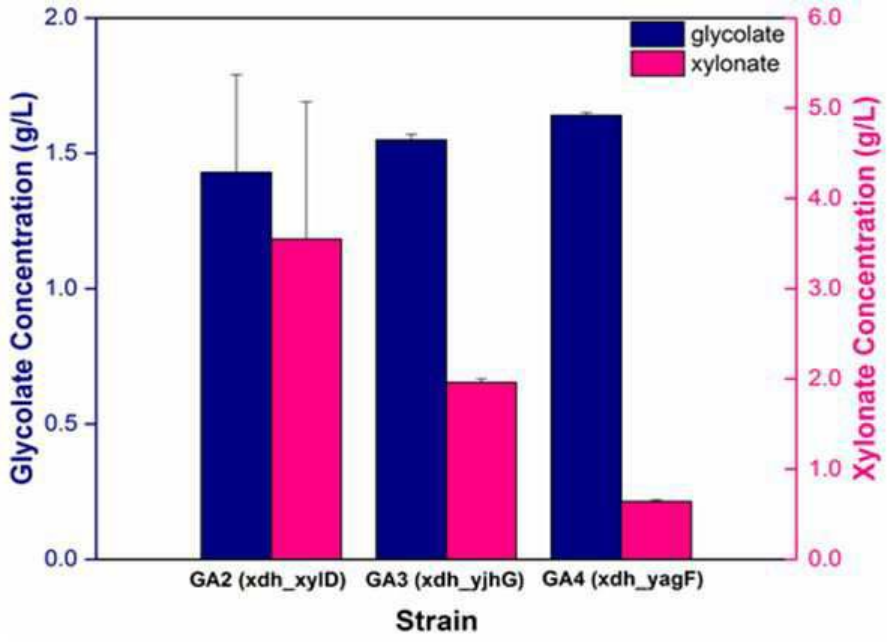
도면2


Glycolate
Xylose
dry cell weight
Xylonate
Ethylene Glycol
Xylose, Xylonate (g/L)
Biomass, Glycolate, Ethylene Glycol (g/L)
Time (h)
0
12
24
36
48
60
72
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0
3.5
4.0
4.5
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
1.4

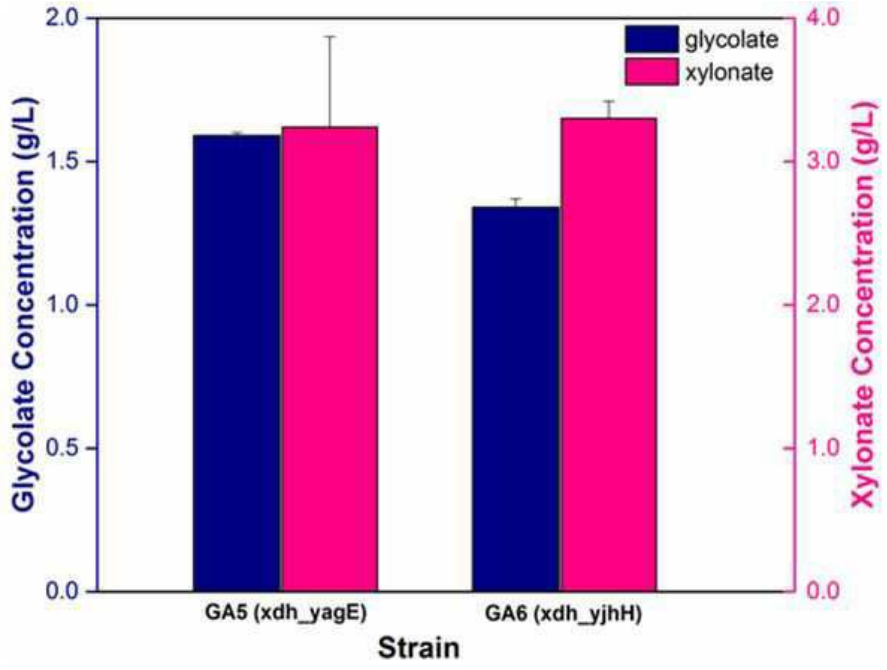
도면3


glycolate
xylonate
Concentration (g/L)
0
1
2
3
4
5
GA0 (empty vector)
GA1 (xdh)
Strain

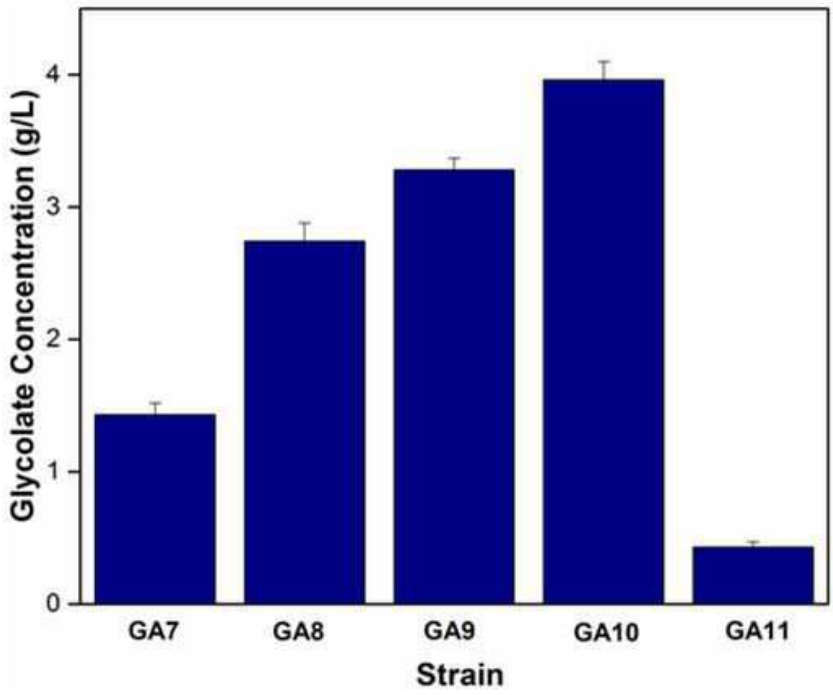
도면4


glycolate
xylonate
Glycolate Concentration (g/L)
Xylonate Concentration (g/L)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
GA2 (xdh_xylD)
GA3 (xdh_yjhG)
GA4 (xdh_yagF)
Strain

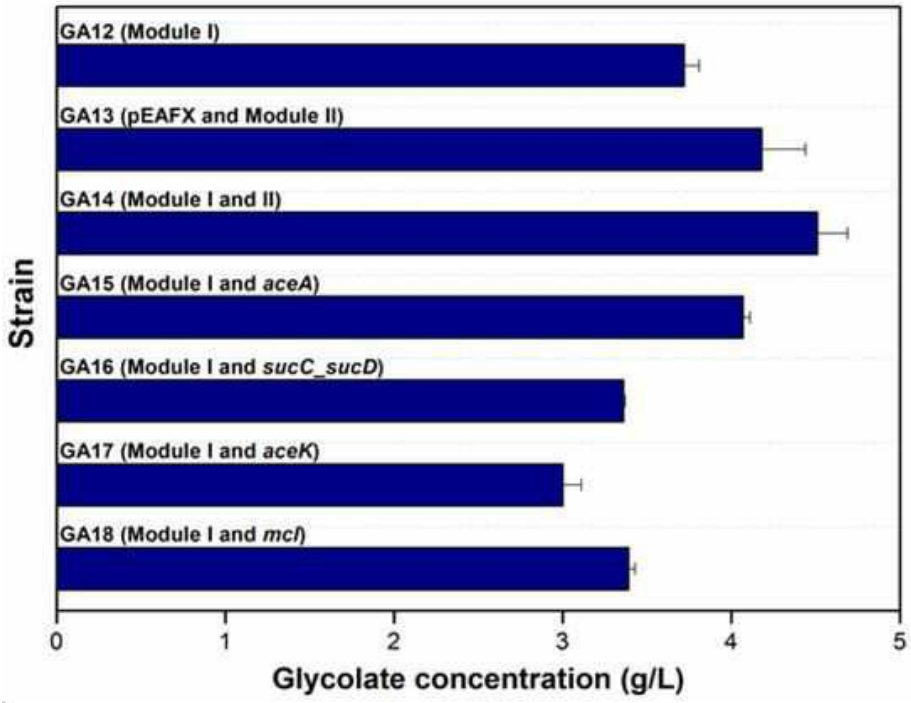
도면5


glycolate
xylonate
Glycolate Concentration (g/L)
Xylonate Concentration (g/L)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
GA5 (xdh_yagE)
GA6 (xdh_yjhH)
Strain

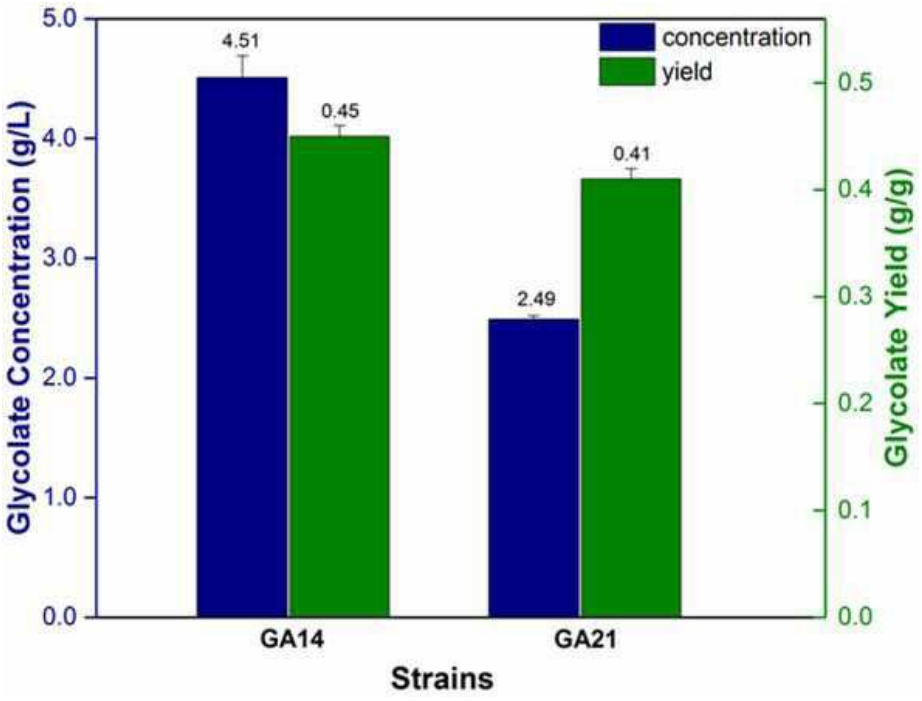
도면6


Glycolate Concentration (g/L)
0
1
2
3
4
GA7
GA8
GA9
GA10
GA11
Strain

도면7


GA12 (Module I)
GA13 (pEAFX and Module II)
GA14 (Module I and II)
GA15 (Module I and aceA)
GA16 (Module I and sucC_sucD)
GA17 (Module I and aceK)
GA18 (Module I and mcl)
Strain
0
1
2
3
4
5
Glycolate concentration (g/L)

도면8



서 열 목 록

<110> MYONGJI UNIVERSITY INDUSTRY AND ACADEMIA COOPERATION FOUNDATION

<120> ESCHERICHIA COLI PRODUCING GLYCOLATE FROM XYLOSE, METHOD FOR PREPARING THE SAME AND METHOD FOR PRODUCING GLYCOLATE USING THE SAME

<130> P17-0067

<160> 59

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 1323

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Escherichia coli W3110 xylose isomerase xylA gene

<400> 1

atgcaagcct attttgacca gctcgatcgc gttcgttatg aaggctcaaa atcctcaaac 60

ccgttagcat tccgtcacta caatcccgac gaactggtgt tgggtaagcg tatggaagag 120

cacttgcgtt ttgccgcctg ctactggcac accttctgct ggaacggggc ggatatgttt 180

ggtgtggggg cgtttaatcg tccgtggcag cagcctggtg aggcactggc gttggcgaag 240

cgtaaagcag atgtcgcatt tgagtttttc cacaagttac atgtgccatt ttattgcttc 300

cacgatgtgg atgtttcccc tgagggcgcg tcgttaaaag agtacatcaa taattttgcg 360

caaatggttg atgtcctggc aggcaagcaa gaagagagcg gcgtgaagct gctgtgggga 420

acggccaact gctttacaaa ccctcgctac ggcgcgggtg cggcgacgaa cccagatcct 480

gaagtcttca gctgggcggc aacgcaagtt gttacagcga tggaagcaac ccataaattg 540

ggcggtgaaa actatgtcct gtggggcggt cgtgaaggtt acgaaacgct gttaaatacc 600

gacttgcgtc aggagcgtga acaactgggc cgctttatgc agatggtggt tgagcataaa 660

cataaaatcg gtttccaggg cacgttgctt atcgaaccga aaccgcaaga accgaccaaa 720

catcaatatg attacgatgc cgcgacggtc tatggcttcc tgaaacagtt tggtctggaa 780

aaagagatta aactgaacat tgaagctaac cacgcgacgc tggcaggtca ctctttccat 840

catgaaatag ccaccgccat tgcgcttggc ctgttcggtt ctgtcgacgc caaccgtggc 900

gatgcgcaac tgggctggga caccgaccag ttcccgaaca gtgtggaaga gaatgcgctg 960

gtgatgtatg aaattctcaa agcaggcggt ttcaccaccg gtggtctgaa cttcgatgcc 1020

aaagtacgtc gtcaaagtac tgataaatat gatctgtttt acggtcatat cggcgcgatg 1080

gatacgatgg cactggcgct gaaaattgca gcgcgcatga ttgaagatgg cgagctggat 1140

aaacgcatcg cgcagcgtta ttccggctgg aatagcgaat tgggccagca aatcctgaaa 1200

ggccaaatgt cactggcaga tttagccaaa tatgctcagg aacatcattt gtctccggtg 1260

catcagagtg gtcgccagga acaactggaa aatctggtaa accattatct gttcgacaaa 1320

taa 1323

<210> 2

<211> 1455

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Escherichia coli W3110 xylulose kinase xylB gene

<400> 2

atgtatatcg ggatagatct tggcacctcg ggcgtaaaag ttattttgct caacgagcag 60

ggtgaggtgg ttgctgcgca aacggaaaag ctgaccgttt cgcgcccgca tccactctgg 120

tcggaacaag acccggaaca gtggtggcag gcaactgatc gcgcaatgaa agctctgggc 180

gatcagcatt ctctgcagga cgttaaagca ttgggtattg ccggccagat gcacggagca 240

accttgctgg atgctcagca acgggtgtta cgccctgcca ttttgtggaa cgacgggcgc 300

tgtgcgcaag agtgcacttt gctggaagcg cgagttccgc aatcgcgggt gattaccggc 360

aacctgatga tgcccggatt tactgcgcct aaattgctat gggttcagcg gcatgagccg 420

gagatattcc gtcaaatcga caaagtatta ttaccgaaag attacttgcg tctgcgtatg 480

acgggggagt ttgccagcga tatgtctgac gcagctggca ccatgtggct ggatgtcgca 540

aagcgtgact ggagtgacgt catgctgcag gcttgcgact tatctcgtga ccagatgccc 600

gcattatacg aaggcagcga aattactggt gctttgttac ctgaagttgc gaaagcgtgg 660

ggtatggcga cggtgccagt tgtcgcaggc ggtggcgaca atgcagctgg tgcagttggt 720

gtgggaatgg ttgatgctaa tcaggcaatg ttatcgctgg ggacgtcggg ggtctatttt 780

gctgtcagcg aagggttctt aagcaagcca gaaagcgccg tacatagctt ttgccatgcg 840

ctaccgcaac gttggcattt aatgtctgtg atgctgagtg cagcgtcgtg tctggattgg 900

gccgcgaaat taaccggcct gagcaatgtc ccagctttaa tcgctgcagc tcaacaggct 960

gatgaaagtg ccgagccagt ttggtttctg ccttatcttt ccggcgagcg tacgccacac 1020

aataatcccc aggcgaaggg ggttttcttt ggtttgactc atcaacatgg ccccaatgaa 1080

ctggcgcgag cagtgctgga aggcgtgggt tatgcgctgg cagatggcat ggatgtcgtg 1140

catgcctgcg gtattaaacc gcaaagtgtt acgttgattg ggggcggggc gcgtagtgag 1200

tactggcgtc agatgctggc ggatatcagc ggtcagcagc tcgattaccg tacgggggg 1260

gatgtggggc cagcactggg cgcagcaagg ctggcgcaga tcgcggcgaa tccagagaaa 1320

tcgctcattg aattgttgcc gcaactaccg ttagaacagt cgcatctacc agatgcgcag 1380

cgttatgccg cttatcagcc acgacgagaa acgttccgtc gcctctatca gcaacttctg 1440

ccattaatgg cgtaa 1455

<210> 3

<211> 1500

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Escherichia coli W3110 glycolate oxidase glcD gene

<400> 3

atgagcatct tgtacgaaga gcgtcttgat ggcgctttac ccgatgtcga ccgcacatcg 60

gtactgatgg cactgcgtga gcatgtccct ggacttgaga tcctgcatac cgatgaggag 120

atcattcctt acgagtgtga cgggttgagc gcgtatcgca cgcgtccatt actggttgtt 180

ctgcctaagc aaatggaaca ggtgacagcg attctggctg tctgccatcg cctgcgtgta 240

ccggtggtga cccgtggtgc aggcaccggg ctttctggtg gcgcgctgcc gctggaaaaa 300

ggtgtgttgt tggtgatggc gcgctttaaa gagatcctcg acattaaccc cgttggtcgc 360

cgcgcgcgcg tgcagccagg cgtgcgtaac ctggcgatct cccaggccgt tgcaccgcat 420

aatctctact acgcaccgga cccttcctca caaatcgcct gttccattgg cggcaatgtg 480

gctgaaaatg ccggcggcgt ccactgcctg aaatatggtc tgaccgtaca taacctgctg 540

aaaattgaag tgcaaacgct ggacggcgag gcactgacgc ttggatcgga cgcgctggat 600

tcacctggtt ttgacctgct ggcgctgttc accggatcgg aaggtatgct cggcgtgacc 660

accgaagtga cggtaaaact gctgccgaag ccgcccgtgg cgcgggttct gttagccagc 720

tttgactcgg tagaaaaagc cggacttgcg gttggtgaca tcatcgccaa tggcattatc 780

cccggcgggc tggagatgat ggataacctg tcgatccgcg cggcggaaga ttttattcat 840

gccggttatc ccgtcgacgc cgaagcgatt ttgttatgcg agctggacgg cgtggagtct 900

gacgtacagg aagactgcga gcgggttaac gacatcttgt tgaaagcggg cgcgactgac 960

gtccgtctgg cacaggacga agcagagcgc gtacgtttct gggccggtcg caaaaatgcg 1020

ttcccggcgg taggacgtat ctccccggat tactactgca tggatggcac catcccgcgt 1080

cgcgccctgc ctggcgtact ggaaggcatt gcccgtttat cgcagcaata tgatttacgt 1140

gttgccaacg tctttcatgc cggagatggc aacatgcacc cgttaatcct tttcgatgcc 1200

aacgaacccg gtgaatttgc ccgcgcggaa gagctgggcg ggaagatcct cgaactctgc 1260

gttgaagttg gcggcagcat cagtggcgaa catggcatcg ggcgagaaaa aatcaatcaa 1320

atgtgcgccc agttcaacag cgatgaaatc acgaccttcc atgcggtcaa ggcggcgttt 1380

gaccccgatg gtttgctgaa ccctgggaaa aacattccca cgctacaccg ctgtgctgaa 1440

tttggtgcca tgcatgtgca tcacggtcat ttacctttcc ctgaactgga gcgtttctga 1500

1500

<210> 4

<211> 747

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Caulobacter crescentus NA1000_codon optimized Xdh gene

<400> 4

atgtcttctg cgatctaccc gtctctgaaa ggtaaacgtg ttgttatcac cggtggtggt 60

tctggtatcg gtgcgggtct gaccgcgggt ttcgcgcgtc agggtgcgga agttatcttc 120

ctggacatcg cggacgaaga ctctcgtgcg ctggaagcgg aactggcggg ttctccgatc 180

ccgccggttt acaaacgttg cgacctgatg aacctggaag cgatcaaagc ggttttcgcg 240

gaaatcggtg acgttgacgt tctggttaac aacgcgggta acgacgaccg tcacaaactg 300

gcggacgtta ccggtgcgta ctgggacgaa cgtatcaacg ttaacctgcg tcacatgctg 360

ttctgcaccc aggcggttgc gccgggtatg aaaaaacgtg gtggtggtgc ggttatcaac 420

ttcggttcta tctcttggca cctgggtctg gaagacctgg ttctgtacga aaccgcgaaa 480

gcgggtatcg aaggtatgac ccgtgcgctg gcgcgtgaac tgggtccgga cgacatccgt 540

gttacctgcg ttgttccggg taacgttaaa accaaacgtc aggaaaaatg gtacaccccg 600

gaaggtgaag cgcagatcgt tgcggcgcag tgcctgaaag gtcgtatcgt tccggaaaac 660

gttgcggcgc tggttctgtt cctggcgtct gacgacgcgt ctctgtgcac cggtcacgaa 720

tactggatcg acgcgggttg gcgttga 747

<210> 5

<211> 1968

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Escherichia coli W3110 dehydratase gene YjhG

<400> 5

atgtctgttc gcaatatttt tgctgacgag agccacgata tttacaccgt cagaacgcac 60

gccgatggcc cggacggcga actcccatta accgcagaga tgcttatcaa ccgcccgagc 120

ggggatctgt tcggtatgac catgaatgcc ggaatgggtt ggtctccgga cgagctggat 180

cgggacggta ttttactgct cagtacactc ggtggcttac gcggcgcaga cggtaaaccc 240

gtggcgctgg cgttgcacca ggggcattac gaactggaca tccagatgaa agcggcggcc 300

gaggttatta aagccaacca tgccctgccc tatgccgtgt acgtctccga tccttgtgac 360

gggcgtactc agggtacaac ggggatgttt gattcgctac ataccgaaaa tgacgcatcg 420

atggtaatgc gccgccttat tcgctctctg cccgacgcga aagcagttat tggtgtggcg 480

agttgcgata aggggcttcc ggccaccatg atggcactcg ccgcgcagca caacatcgca 540

accgtgctgg tccccggcgg cgcgacgctg cccgcaaagg atggagaaga caacggcaag 600

gtgcaaacca ttggcgcacg cttcgccaat ggcgaattat ctctacagga cgcacgccgt 660

gcgggctgta aagcctgtgc ctcttccggc ggcggctgtc aatttttggg cactgccggg 720

acatctcagg tggtggccga aggattggga ctggcaatcc cacattcagc cctggccccct 780

tccggtgagc ctgtgtggcg ggagatcgcc agagcttccg cgcgagctgc gctgaacctg 840

agtcaaaaag gcatcaccac ccgggaaatt ctcaccgata aagcgataga gaatgcgatg 900

acggtccatg ccgcgttcgg tggttcaaca aacctgctgt tacacatccc ggcaattgct 960

caccaggcag gttgccatat cccgaccgtt gatgactgga tccgcatcaa caagcgcgtg 1020

ccccgactgg tgagcgtact gcctaatggc ccggtttatc atccaacggt caatgccttt 1080

atggcaggtg gtgtgccgga agtcatgttg catctgcgca gcctcggatt gttgcatgaa 1140

gacgttatga cggttaccgg cagcacgctg aaagaaaacc tcgactggtg ggagcactcc 1200

gaacggcgtc agcggttcaa gcaactcctg ctcgatcagg aacaaatcaa cgctgacgaa 1260

gtgatcatgt ctccgcagca agcaaaagcg cgcggattaa cctcaactat caccttcccg 1320

gtgggcaata ttgcgccaga aggttcggtg atcaaatcca ccgccattga cccctcgatg 1380

attgatgagc aaggtatcta ttaccataaa ggtgtggcga aggtttatct gtccgagaaa 1440

agtgcgattt acgatatcaa acatgacaag atcaaggcgg gcgatattct ggtcattatt 1500

ggcgttggac cttcaggtac agggatggaa gaaacctacc aggttaccag tgccctgaag 1560

catctgtcat acggtaagca tgtttcgtta atcaccgatg cacgtttctc gggcgtttct 1620

actggcgcgt gcatcggcca tgtggggcca gaagcgctgg ccggaggccc catcggtaaa 1680

ttacgcaccg gggatttaat tgaaattaaa attgattgtc gcgagcttca cggcgaagtc 1740

aatttcctcg gaacccgtag cgatgaacaa ttaccttcac aggaggaggc aactgcaata 1800

ttaaatgcca gacccagcca tcaggattta cttcccgatc ctgaattgcc agatgatacc 1860

cggctatggg caatgcttca ggccgtgagt ggtgggacat ggaccggttg tatttatgat 1920

gtaaacaaaa ttggcgcggc tttgcgcgat tttatgaata aaaactga 1968

<210> 6

<211> 1968

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Escherichia coli W3110 dehydratase gene YagF

<400> 6

atgaccattg agaaaatttt caccccgcag gacgacgcgt tttatgcggt gatcacccac 60

gcggcggggc cgcagggcgc tctgccgctg accccgcaga tgctgatgga atctcccagc 120

ggcaacctgt tcggcatgac gcagaacgcc gggatgggct gggacgccaa caagctcacc 180

ggcaaagagg tgctgattat cggcactcag ggcggcatcc gcgccggaga cggacgccca 240

atcgcgctgg gctaccacac cgggcattgg gagatcggca tgcagatgca ggcggcggcg 300

aaggagatca cccgcaatgg cgggatcccg ttcgcggcct tcgtcagcga tccgtgcgac 360

gggcgctcgc agggcacgca cggtatgttc gattccctgc cgtaccgcaa cgacgcggcg 420

atcgtgtttc gccgcctgat ccgctccctg ccgacgcggc gggcggtgat cggcgtagcg 480

acctgcgata aagggctgcc cgccaccatg attgcgctgg ccgcgatgca cgacctgccg 540

actattctgg tgccgggcgg ggcgacgctg ccgccgaccg tcggggaaga cgcgggcaag 600

gtgcagacca tcggcgcgcg tttcgccaac cacgaactct ccctgcagga ggccgccgaa 660

ctgggctgtc gcgcctgcgc ctcgccgggc ggcgggtgtc agttcctcgg cacggcgggc 720
acctcgcagg tggtcgcgga ggcgctgggt ctggcgctgc cgcactccgc gctggcgccg 780
tccgggcagg cggtgtggct ggagatcgcc cgccagtcgg cgcgcgcggt cagcgagctg 840
gatagccgcg gcatcaccac gcgggatatc ctctccgata aagccatcga aaacgcgatg 900
gtgatccacg cggcgttcgg cggctccacc aatttactgc tgcacattcc ggccatcgcc 960
cacgcggcgg gctgcacgat cccggacgtt gagcactgga cgcgcatcaa ccgtaaagtg 1020
ccgcgtctgg tgagcgtgct gcccaacggc ccggactatc acccgaccgt gcgcgccttc 1080

ctcgcgggcg gcgtgccgga ggtgatgctc cacctgcgcg acctcggcct gctgcatctg 1140
gacgccatga ccgtgaccgg ccagacggtg ggcgagaacc ttgaatggtg gcaggcgtcc 1200
gagcgccggg cgcgcttccg ccagtgcctg cgcgagcagg acggcgtaga gccggatgac 1260
gtgatcctgc cgccggagaa ggcaaaagcg aaagggctga cctcgacggt ctgcttcccg 1320
acgggcaaca tcgctccgga aggttcggtg atcaaggcca cggcgatcga cccgtcggtg 1380
gtgggcgaag atggcgtata ccaccacacc ggccgggtgc gggtgtttgt ctcggaagcg 1440
caggcgatca aggcgatcaa gcgggaagag attgtgcagg gcgatatcat ggtggtgatc 1500

ggcggcgggc cgtccggcac cggcatggaa gagacctacc agctcacctc cgcgctaaag 1560
catatctcgt ggggcaagac ggtgtcgctc atcaccgatg cgcgcttctc gggcgtgtcg 1620
acgggcgcct gcttcggcca cgtgtcgccg gaggcgctgg cgggcgggcc gattggcaag 1680
ctgcgcgata acgacatcat cgagattgcc gtggatcgtc tgacgttaac tggcagcgtg 1740
aacttcatcg gcaccgcgga caacccgctg acgccggaag agggcgcgcg cgagctggcg 1800
cggcggcaga cgcacccgga cctgcacgcc cacgactttt tgccggacga cacccggctg 1860
tgggcggcac tgcagtcggt gagcggcggc acctggaaag gctgtattta tgacaccgat 1920

aaaattatcg aggtaattaa cgccggtaaa aaagcgctcg gaatttaa 1968

<210> 7

<211> 1788

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Caulobacter crescentus CB15_codon optimized XylD dehydratase gene

<400> 7

atgcgttctg cgctgtctaa ccgtaccccg cgtcgtttcc gttctcgtga ctggttcgac 60
aacccggacc acatcgacat gaccgcgctg tacctggaac gtttcatgaa ctacggtatc 120

accccggaag aactgcgttc tggtaaaccg atcatcggta tcgcgcagac cggttctgac 180

atctctccgt gcaaccgtat ccacctggac ctggttcagc gtgttcgtga cggtatccgt 240

gacgcgggtg gtatcccgat ggaattcccg gttcacccga tcttcgaaaa ctgccgtcgt 300

ccgaccgcgg cgctggaccg taacctgtct tacctgggtc tggttgaaac cctgcacggt 360

tacccgatcg acgcggttgt tctgaccacc ggttgcgaca aaaccacccc ggcgggtatc 420

atggcggcga ccaccgttaa catcccggcg atcgttctgt ctggtggtcc gatgctggac 480

ggttggcacg aaaacgaact ggttggttct ggtaccgtta tctggcgttc tcgtcgtaaa 540

ctggcggcgg gtgaaatcac cgaagaagaa ttcatcgacc gtgcggcgtc ttctgcgccg 600

tctgcgggtc actgcaacac catgggtacc gcgtctacca tgaacgcggt tgcggaagcg 660

ctgggtctgt ctctgaccgg ttgcgcggcg atcccggcgc cgtaccgtga acgtggtcag 720

atggcgtaca aaaccggtca gcgtatcgtt gacctggcgt acgacgacgt taaaccgctg 780

gacatcctga ccaaacaggc gttcgaaaac gcgatcgcgc tggttgcggc ggcgggtggt 840

tctaccaacg cgcagccgca catcgttgcg atggcgcgtc acgcgggtgt tgaaatcacc 900

gcggacgact ggcgtgcggc gtacgacatc ccgctgatcg ttaacatgca gccggcgggt 960

aaatacctgg gtgaacgttt ccaccgtgcg ggtggtgcgc cggcggttct gtgggaactg 1020

ctgcagcagg gtcgtctgca cggtgacgtt ctgaccgtta ccggtaaaac catgtctgaa 1080

aacctgcagg gtcgtgaaac ctctgaccgt gaagttatct tcccgtacca cgaaccgctg 1140

gcggaaaaag cgggtttcct ggttctgaaa ggtaacctgt tcgacttcgc gatcatgaaa 1200

tcttctgtta tcggtgaaga attccgtaaa cgttacctgt ctcagccggg tcaggaaggt 1260

gttttcgaag cgcgtgcgat cgttttcgac ggttctgacg actaccacaa acgtatcaac 1320

gacccggcgc tggaaatcga cgaacgttgc atcctggtta tccgtggtgc gggtccgatc 1380

ggttggccgg gttctgcgga agttgttaac atgcagccgc cggaccacct gctgaaaaaa 1440

ggtatcatgt ctctgccgac cctgggtgac ggtcgtcagt ctggtaccgc ggactctccg 1500

tctatcctga acgcgtctcc ggaatctgcg atcggtggtg gtctgtcttg gctgcgtacc 1560

ggtgacacca tccgtatcga cctgaacacc ggtcgttgcg acgcgctggt tgacgaagcg 1620

accatcgcgg cgcgtaaaca ggacggtatc ccggcggttc cggcgaccat gaccccgtgg 1680

caggaaatct accgtgcgca cgcgtctcag ctggacaccg gtggtgttct ggaattcgcg 1740

gttaaatacc aggacctggc ggcgaaactg ccgcgtcaca accactga 1788

<210> 8

<211> 906

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Escherichia coli W3110 aldolase gene YjhH

<400> 8

atgaaaaaat tcagcggcat tattccaccg gtatccagca cgtttcatcg tgacggaacc 60

cttgataaaa aggcaatgcg cgaagttgcc gacttcctga ttaataaagg ggtcgacggg 120

ctgttttatc tgggtaccgg tggtgaattt agccaaatga atacagccca gcgcatggca 180

ctcgccgaag aagctgtaac cattgtcgac gggcgagtgc cggtattgat tggcgtcggt 240

tccccttcca ctgacgaagc ggtcaaactg gcgcagcatg cgcaagccta cggcgctgat 300

ggtatcgtcg ccatcaaccc ctactactgg aaagtcgcac cacgaaatct tgacgactat 360

taccagcaga tcgcccgtag cgtcacccta ccggtgatcc tgtacaactt tccggatctg 420

acgggtcagg acttaacccc ggaaaccgtg acgcgtctgg ctctgcaaaa cgagaatatc 480

gttggcatca aagacaccat cgacagcgtt ggtcacttgc gtacgatgat caacacagtt 540

aagtcggtac gcccgtcgtt ttcggtattc tgcggttacg atgatcattt gctgaatacg 600

atgctgctgg gcggcgacgg tgcgataacc gccagcgcta actttgctcc ggaactctcc 660

gtcggcatct accgcgcctg gcgtgaaggc gatctggcga ccgctgcgac gctgaataaa 720

aaactactac aactgcccgc tatttacgcc ctcgaaacac cgtttgtctc actgatcaaa 780

tacagcatgc agtgtgtcgg gctgcctgta gagacatatt gcttaccacc gattcttgaa 840

gcatctgaag aagcaaaaga taaagtccac gtgctgctta ccgcgcaggg cattttacca 900

gtctga 906

<210> 9

<211> 930

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Escherichia coli W3110 aldolase gene YagE

<400> 9

atgattcagc aaggagatct catgccgcag tccgcgttgt tcacgggaat cattcccct 60

gtctccacca tttttaccgc cgacggccag ctcgataagc cgggcaccgc cgcgctgatc 120

gacgatctga tcaaagcagg cgttgacggc ctgttcttcc tgggcagcgg tggcgagttc 180

tcccagctcg gcgccgaaga gcgtaaagcc attgcccgct ttgctatcga tcatgtcgat 240

cgtcgcgtgc cggtgctgat cggcaccggc ggcaccaacg cccgggaaac catcgaactc 300

agccagcacg cgcagcaggc gggcgcggac ggcatcgtgg tgatcaaccc ctactactgg 360

aaagtgtcgg aagcgaacct gatccgctat ttcgagcagg tggccgacag cgtcacgctg 420

ccggtgatgc tctataactt cccggcgctg accgggcagg atctgactcc ggcgctggtg 480

aaaaccctcg ccgactcgcg cagcaatatt atcggcatca aagacaccat cgactccgtc 540

gcccacctgc gcagcatgat ccataccgtc aaaggtgccc atccgcactt caccgtgctc 600

tgcggctacg acgatcatct gttcaatacc ctgctgctcg gcggcgacgg ggcgatatcg 660

gcgagcggca actttgcccc gcaggtgtcg gtgaatcttc tgaaagcctg gcgcgacggg 720

gacgtggcga aagcggccgg gtatcatcag accttgctgc aaattccgca gatgtatcag 780

ctggatacgc cgtttgtgaa cgtgattaaa gaggcgatcg tgctctgcgg tcgtcctgtc 840

tccacgcacg tgctgccgcc cgcctcgccg ctggacgagc cgcgcaaggc gcagctgaaa 900

accctgctgc aacagctcaa gctttgctga 930

<210> 10

<211> 1440

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Escherichia coli W3110 aldehyde dehydrogenase A gene AldA

<400> 10

atgtcagtac ccgttcaaca tcctatgtat atcgatggac agtttgttac ctggcgtgga 60

gacgcatgga ttgatgtggt aaaccctgct acagaggctg tcatttcccg catacccgat 120

ggtcaggccg aggatgcccg taaggcaatc gatgcagcag aacgtgcaca accagaatgg 180

gaagcgttgc ctgctattga acgcgccagt tggttgcgca aaatctccgc cgggatccgc 240

gaacgcgcca gtgaaatcag tgcgctgatt gttgaagaag ggggcaagat ccagcagctg 300

gctgaagtcg aagtggcttt tactgccgac tatatcgatt acatggcgga gtgggcacgg 360

cgttacgagg gcgagattat tcaaagcgat cgtccaggag aaaatattct tttgtttaaa 420

cgtgcgcttg gtgtgactac cggcattctg ccgtggaact tcccgttctt cctcattgcc 480

cgcaaaatgg ctcccgctct tttgaccggt aataccatcg tcattaaacc tagtgaattt 540

acgccaaaca atgcgattgc attcgccaaa atcgtcgatg aaataggcct tccgcgcggc 600

gtgtttaacc ttgtactggg gcgtggtgaa accgttgggc aagaactggc gggtaaccca 660

aaggtcgcaa tggtcagtat gacaggcagc gtctctgcag gtgagaagat catggcgact 720

gcggcgaaaa acatcaccaa agtgtgtctg gaattggggg gtaaagcacc agctatcgta 780

atggacgatg ccgatcttga actggcagtc aaagccatcg ttgattcacg cgtcattaat 840

agtgggcaag tgtgtaactg tgcagaacgt gtttatgtac agaaaggcat ttatgatcag 900

ttcgtcaatc ggctgggtga agcgatgcag gcggttcaat ttggtaaccc cgctgaacgc 960

aacgacattg cgatggggcc gttgattaac gccgcggcgc tggaaagggt cgagcaaaaa 1020

gtggcgcgcg cagtagaaga aggggcgaga gtggcgttcg gtggcaaagc ggtagagggg 1080

aaaggatatt attatccgcc gacattgctg ctggatgttc gccaggaaat gtcgattatg 1140

catgaggaaa cctttggccc ggtgctgcca gttgtcgcat ttgacacgct ggaagatgct 1200

atctcaatgg ctaatgacag tgattacggc ctgacctcat caatctatac ccaaaatctg 1260

aacgtcgcga tgaaagccat taaagggctg aagtttggtg aaacttacat caaccgtgaa 1320

aacttcgaag ctatgcaagg cttccacgcc ggatggcgta aatccggtat tggcggcgca 1380

gatggtaaac atggcttgca tgaatatctg cagacccagg tggtttattt acagtcttaa 1440

1440

<210> 11

<211> 939

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Escherichia coli W3110 glyoxylate reductase gene YcdW

<400> 11

atggatatca tcttttatca cccaacgttc gatacccaat ggtggattga ggcactgcgc 60

aaagctattc ctcaggcaag agtcagagca tggaaaagcg gagataatga ctctgctgat 120

tatgctttag tctggcatcc tcctgttgaa atgctggcag ggcgcgatct taaagcggtg 180

ttcgcactcg gggccggtgt tgattctatt ttgagcaagc tacaggcaca ccctgaaatg 240

ctgaaccctt ctgttccact ttttcgcctg gaagataccg gtatgggcga gcaaatgcag 300

gaatatgctg tcagtcaggt gctgcattgg tttcgacgtt ttgacgatta tcgcatccag 360

caaaatagtt cgcattggca accgctgcct gaatatcatc gggaagattt taccatcggc 420

attttgggcg caggcgtact gggcagtaaa gttgctcaga gtctgcaaac ctggcgcttt 480

ccgctgcgtt gctggagtcg aacccgtaaa tcgtggcctg gcgtgcaaag ctttgccgga 540

cgggaagaac tgtctgcatt tctgagccaa tgtcgggtat tgattaattt gttaccgaat 600

acccctgaaa ccgtcggcat tattaatcaa caattactcg aaaaattacc ggatggcgcg 660

tatctcctca acctggcgcg tggtgttcat gttgtggaag atgacctgct cgcggcgctg 720

gatagcggca aagttaaagg cgcaatgttg gatgttttta atcgtgaacc cttaccgcct 780

gaaagtccgc tctggcaaca tccacgcgtg acgataacac cacatgtcgc cgcgattacc 840

cgtcccgctg aagctgtgga gtacatttct cgcaccattg cccagctcga aaaaggggag 900

agggtctgcg ggcaagtcga ccgcgcacgc ggctactaa 939

<210> 12

<211> 1305

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Escherichia coli W3110 isocitrate lyase gene AceA

<400> 12

atgaaaaccc gtacacaaca aattgaagaa ttacagaaag agtggactca accgcgttgg 60

gaaggcatta ctcgcccata cagtgcggaa gatgtggtga aattacgcgg ttcagtcaat 120

cctgaatgca cgctggcgca actgggcgca gcgaaaatgt ggcgtctgct gcacggtgag 180

tcgaaaaaag gctacatcaa cagcctcggc gcactgactg gcggtcaggc gctgcaacag 240

gcgaaagcgg gtattgaagc agtctatctg tcgggatggc aggtagcggc ggacgctaac 300

ctggcggcca gcatgtatcc ggatcagtcg ctctatccgg caaactcggt gccagctgtg 360

gtggagcgga tcaacaacac cttccgtcgt gccgatcaga tccaatggtc cgcgggcatt 420

gagccgggcg atccgcgcta tgtcgattac ttcctgccga tcgttgccga tgcggaagcc 480

ggttttggcg gtgtcctgaa tgcctttgaa ctgatgaaag cgatgattga agccggtgca 540

gcggcagttc acttcgaaga tcagctggcg tcagtgaaga aatgcggtca catgggcggc 600

aaagttttag tgccaactca ggaagctatt cagaaactgg tcgcggcgcg tctggcagct 660

gacgtgacgg gcgttccaac cctgctggtt gcccgtaccg atgctgatgc ggcggatctg 720

atcacctccg attgcgaccc gtatgacagc gaatttatta ccggcgagcg taccagtgaa 780

ggcttcttcc gtactcatgc gggcattgag caagcgatca gccgtggcct ggcgtatgcg 840

ccatatgctg acctggtctg gtgtgaaacc tccacgccgg atctggaact ggcgcgtcgc 900

tttgcacaag ctatccacgc gaaatatccg ggcaaactgc tggcttataa ctgctcgccg 960

tcgttcaact ggcagaaaaa cctcgacgac aaaactattg ccagcttcca gcagcagctg 1020

tcggatatgg gctacaagtt ccagttcatc accctggcag gtatccacag catgtggttc 1080

aacatgtttg acctggcaaa cgcctatgcc cagggcgagg gtatgaagca ctacgttgag 1140

aaagtgcagc agccggaatt tgccgccgcg aaagatggct ataccttcgt atctcaccag 1200

caggaagtgg gtacaggtta cttcgataaa gtgacgacta ttattcaggg cggcacgtct 1260

tcagtcaccg cgctgaccgg ctccactgaa gaatcgcagt tctaa 1305

<210> 13

<211> 1737

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Escherichia coli W3110 isocitrate dehydrogenase kinase/phosphatase gene AceK

<400> 13

atgccgcgtg gcctggaatt attgattgct caaaccattt tgcaaggctt cgatgctcag 60

tatggtcgat tcctcgaagt gacctccggt gcgcagcagc gtttcgaaca ggccgactgg 120

catgctgtcc agcaggcgat gaaaaaccgt atccatcttt acgatcatca cgttggtctg 180

gtcgtggagc aactgcgctg cattactaac ggccaaagta cggacgcggc atttttacta 240

cgtgttaaag agcattacac ccggctgttg ccggattacc cgcgcttcga gattgcggag 300

agctttttta actccgtgta ctgtcggtta tttgaccacc gctcgcttac tcccgagcgg 360

ctttttatct ttagctctca gccagagcgc cgctttcgta ccattccccg cccgctggcg 420

aaagactttc accccgatca cggctgggaa tctctactga tgcgcgttat cagcgaccta 480

ccgctgcgcc tgcgctggca gaataaaagc cgtgacatcc attacattat tcgccatctg 540

acggaaacgc tggggacaga caacctcgcg gaaagtcatt tacaggtggc gaacgaactg 600

ttttaccgca ataaagccgc ctggctggta ggcaaactga tcacaccttc cggcacattg 660

ccatttttgc tgccgatcca ccagacggac gacggcgagt tatttattga tacctgcctg 720

acgacgaccg ccgaagcgag cattgttttt ggctttgcgc gttcttattt tatggtttat 780

gcgccgctgc ccgcagcgct ggtcgagtgg ctacgggaaa ttctgccagg taaaaccacc 840

gctgaattgt atatggctat cggctgccag aagcacgcca aaaccgaaag ctaccgcgaa 900

tatctcgttt atctacaggg ctgtaatgag cagttcattg aagcgccggg tattcgtgga 960

atggtgatgt tggtgtttac gctgccgggc tttgatcggg tattcaaagt catcaaagac 1020

aggttcgcgc cgcagaaaga gatgtctgcc gctcacgttc gtgcctgcta tcaactggtg 1080

aaagagcacg atcgcgtggg ccgaatggcg gacacccagg agtttgaaaa ctttgtgctg 1140

gagaagcggc atatttcccc ggcattaatg gaattactgc ttcaggaagc agcggaaaaa 1200

atcaccgatc tcggcgaaca aattgtgatt cgccatcttt atattgagcg gcggatggtg 1260

ccgctcaata tctggctgga acaagtggaa ggtcagcagt tgcgcgacgc cattgaagaa 1320

tacggtaacg ctattcgcca gcttgccgct gctaacattt tccctggcga catgctgttt 1380

aaaaacttcg gtgtcacccg tcacgggcgt gtggtttttt atgattacga tgaaatttgc 1440

tacatgacgg aagtgaattt ccgcgacatc ccgccgccgc gctatccgga agacgaactt 1500

gccagcgaac cgtggtacag cgtctcgccg ggcgatgttt tcccggaaga gtttcgccac 1560

tggctatgcg ccgacccgcg tattggtccg ctgtttgaag agatgcacgc cgacctgttc 1620

cgcgctgatt actggcgcgc actacaaaac cgcatacgtg aagggcatgt ggaagatgtt 1680

tatgcgtatc ggcgcaggca aagatttagc gtacggtatg gggagatgct tttttga 1737

<210> 14

<211> 1170

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Methylococcus capsulatus codon optimized sucC-2 (Succinyl-CoA ligase beta-subunit) gene

<400> 14

atgaacatcc acgaatacca ggcgaaagaa ctgctgaaaa cctacggtgt tccggttccg 60

gacggtgcgg ttgcgtactc tgacgcgcag gcggcgtctg ttgcggaaga aatcggtggt 120

tctcgttggg ttgttaaagc gcagatccac gcgggtggtc gtggtaaagc gggtggtgtt 180

aaagttgcgc actctatcga agaagttcgt cagtacgcgg acgcgatgct gggttctcac 240

ctggttaccc accagaccgg tccgggtggt tctctggttc agcgtctgtg ggttgaacag 300

gcgtctcaca tcaaaaaaga atactacctg ggtttcgtta tcgaccgtgg taaccagcgt 360

atcaccctga tcgcgtcttc tgaaggtggt atggaaatcg aagaagttgc gaaagaaacc 420

ccggaaaaaa tcgttaaaga agttgttgac ccggcgatcg gtctgctgga cttccagtgc 480

cgtaaagttg cgaccgcgat cggtctgaaa ggtaaactga tgccgcaggc ggttcgtctg 540

atgaaagcga tctaccgttg catgcgtgac aaagacgcgc tgcaggcgga aatcaacccg 600

ctggcgatcg ttggtgaatc tgacgaatct ctgatggttc tggacgcgaa attcaacttc 660

gacgacaacg cgctgtaccg tcagcgtacc atcaccgaaa tgcgtgacct ggcggaagaa 720

gacccgaaag aagttgaagc gtctggtcac ggtctgaact acatcgcgct ggacggtaac 780

atcggttgca tcgttaacgg tgcgggtctg gcgatggcgt ctctggacgc gatcaccctg 840

cacggtggtc gtccggcgaa cttcctggac gttggtggtg gtgcgtctcc ggaaaaagtt 900

accaacgcgt gccgtatcgt tctggaagac ccgaacgttc gttgcatcct ggttaacatc 960

ttcgcgggta tcaaccgttg cgactggatc gcgaaaggtc tgatccaggc gtgcgactct 1020

ctgcagatca aagttccgct gatcgttcgt ctggcgggta ccaacgttga cgaaggtcgt 1080

aaaatcctgg cggaatctgg tctgtctttc atcaccgcgg aaaacctgga cgacgcggcg 1140

gcgaaagcgg ttgcgatcgt taaaggttaa 1170

<210> 15

<211> 903

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Methylococcus capsulatus codon optimized sucD-2 (Succinyl-CoA ligase alpha-subunit) gene

<400> 15

atgtctgttt tcgttaacaa acactctaaa gttatcttcc agggtttcac cggtgaacac 60

gcgaccttcc acgcgaaaga cgcgatgcgt atgggtaccc gtgttgttgg tggtgttacc 120

ccgggtaaag gtggtacccg tcacccggac ccggaactgg cgcacctgcc ggttttcgac 180

accgttgcgg aagcggttgc ggcgaccggt gcggacgttt ctgcggtttt cgttccgccg 240

ccgttcaacg cggacgcgct gatggaagcg atcgacgcgg gtatccgtgt tgcggttacc 300

atcgcggacg gtatcccggt tcacgacatg atccgtctgc agcgttaccg tgttggtaaa 360

gactctatcg ttatcggtcc gaacaccccg ggtatcatca ccccgggtga atgcaaagtt 420

ggtatcatgc cgtctcacat ctacaaaaaa ggtaacgttg gtatcgtttc tcgttctggt 480

accctgaact acgaagcgac cgaacagatg gcggcgctgg gtctgggtat caccacctct 540

gttggtatcg gtggtgaccc gatcaacggt accgacttcg ttaccgttct gcgtgcgttc 600

gaagcggacc cggaaaccga aatcgttgtt atgatcggtg aaatcggtgg tccgcaggaa 660

gttgcggcgg cgcgttgggc gaaagaaaac atgaccaaac cggttatcgg tttcgttgcg 720

ggtctggcgg cgccgaccgg tcgtcgtatg ggtcacgcgg gtgcgatcat ctcttctgaa 780

gcggacaccg cgggtgcgaa aatggacgcg atggaagcgc tgggtctgta cgttgcgcgt 840

aacccggcgc agatcggtca gaccgttctg cgtgcggcgc aggaacacgg tatccgtttc 900

tga 903

<210> 16

<211> 957

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Rhodobacter spaeroides codon optimized mcl-1(malyl-CoA lyase) gene

<400> 16

atgtctttcc gtctgcagcc ggcgccgccg gcgcgtccga accgttgcca gctgttcggt 60

ccgggttctc gtccggcgct gttcgaaaaa atggcggcgt ctgcggcgga cgttatcaac 120

ctggacctgg aagactctgt tgcgccggac gacaaagcgc aggcgcgtgc gaacatcatc 180

gaagcgatca acggtctgga ctggggtcgt aaatacctgt ctgttcgtat caacggtctg 240

gacaccccgt tctggtaccg tgacgttgtt gacctgctgg aacaggcggg tgaccgtctg 300

gaccagatca tgatcccgaa agttggttgc gcggcggacg tttacgcggt tgacgcgctg 360

gttaccgcga tcgaacgtgc gaaaggtcgt accaaaccgc tgtctttcga agttatcatc 420

gaatctgcgg cgggtatcgc gcacgttgaa gaaatcgcgg cgtcttctcc gcgtctgcag 480

gcgatgtctc tgggtgcggc ggacttcgcg gcgtctatgg gtatgcagac caccggtatc 540

ggtggtaccc aggaaaacta ctacatgctg cacgacggtc agaaacactg gtctgacccg 600

tggcactggg cgcaggcggc gatcgttgcg gcgtgccgta cccacggtat cctgccggtt 660

gacggtccgt tcggtgactt ctctgacgac gaaggtttcc gtgcgcaggc gcgtcgttct 720

gcgaccctgg gtatggttgg taaatgggcg atccacccga aacaggttgc gctggcgaac 780

gaagttttca ccccgtctga aaccgcggtt accgaagcgc gtgaaatcct ggcggcgatg 840

gacgcggcga aagcgcgtgg tgaaggtgcg accgtttaca aaggtcgtct ggttgacatc 900

gcgtctatca aacaggcgga agttatcgtt cgtcaggcgg aaatgatctc tgcgtga 957

<210> 17

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> cc-xdh-F

<400> 17

cggtcatatg tcttctgcga tctacccg 28

<210> 18

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> cc-xdh-R

<400> 18

ctttctcgag tcaacgccaa cccgc 25

<210> 19

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> cc-xylD-F

<400> 19

ctgtcatatg cgttctgcgc tgtctaac 28

<210> 20

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> cc-xylD-R

<400> 20

cgttctcgag tcagtggttg tgacgc 26

<210> 21

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> yjhG-F

<400> 21

ggggcatatg tctgttcgca atatttttg 29

<210> 22

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> yjhG-R

<400> 22

cgccctcgag tcagttttta ttcataaaat cgc 33

<210> 23

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> yagF-F

<400> 23

cccgcatatg accattgaga aaatt 25

<210> 24

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> yagF-R

<400> 24

ctctctcgag ttaaattccg agcgc 25

<210> 25

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> yjhH-F

<400> 25

cccgcatatg aaaaaattca gcggcatta 29

<210> 26

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> yjhH-R

<400> 26

ctctctcgag ttctcctcag actggtaa 28

<210> 27

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> yagE-F

<400> 27

ctcgcatatg attcagcaag gagatc 26

<210> 28

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> yagE-R

<400> 28

ctctctcgag tcagcaaagc ttgagctg 28

<210> 29

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ycdW-F

<400> 29

cccgcatatg gatatcatct tttatcaccc 30

<210> 30

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ycdW-R

<400> 30

ctttctcgag ttagtagccg cgtgcgc 27

<210> 31

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> aceA-F

<400> 31

ccaacaattg gatgaaaacc cgtacacaac 30

<210> 32

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> aceA-R

<400> 32

ctttctcgag ttagaactgc gattcttcag 30

<210> 33

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> aceK-F

<400> 33

aaaacatatg ccgcgtggcc tggaat 26

<210> 34

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> aceK-R

<400> 34

aaaactcgag tcaaaaaagc atctccccat ac 32

<210> 35

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> aldA-F

<400> 35

ccaccatatg tcagtacccg ttcaacatc 29

<210> 36

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> aldA-R

<400> 36

ccccctcgag ttaagactgt aaataaacca c 31

<210> 37

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mcl-F

<400> 37

ccaacatatg tctttccgtc tgca 24

<210> 38

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mcl-R

<400> 38

caacctcgag tcacgcagag atcattt 27

<210> 39

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sucC-2-F

<400> 39

ccaacatatg aacatccacg aataccagg 29

<210> 40

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sucC-2-R

<400> 40

caacctcgag ttaaccttta acgatcgcaa c 31

<210> 41

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sucD-2-F

<400> 41

cccccatatg tctgttttcg ttaa 24

<210> 42

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sucD-2-R

<400> 42

caaactcgag tcagaaacgg atacc 25

<210> 43

<211> 61

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> glcD-KO-F

<400> 43

gctggaaaaa ggtgtgttgt tggtgatggc gcgctttaaa catatgaata tcctccttag 60

t 61

<210> 44

<211> 61

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> glcD-KO-R

<400> 44

aaatcatatt gctgcgataa acgggcaatg ccttccagta gtgtaggctg gagctgcttc 60

g 61

<210> 45

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> glcD-Ver-F

<400> 45

atgagcatct tgtacgaaga 20

<210> 46

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> glcD-Ver-R

<400> 46

ttcagggaaa ggtaaatgac 20

<210> 47

<211> 61

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> glcB-KO-F

<400> 47

ttctctgcac ggacgctcgc tgctgtttat ccgcaacgtg catatgaata tcctccttag 60

t 61

<210> 48

<211> 61

<212> DNA

<213

> Artificial Sequence

<220><223> glcB-KO-R

<400> 48

ttcaaattca gcattgaact cggtctgggc aatgttggct gtgtaggctg gagctgcttc 60

g 61

<210> 49

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> glcB-Ver-F

<400> 49

cgcacatcaa cgatgttatc 20

<210> 50

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> glcB-Ver-R

<400> 50

gccacattgt gaatatccgg 20

<210> 51

<211> 61

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> aceB-KO-F

<400> 51

tcactggcac cagactggaa caaagtgatc gacgggcaaa catatgaata tcctccttag 60

t 61

<210> 52

<211> 61

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> aceB-KO-R

<400> 52

accgttattg gcttccagcg atttatccgc ttttactttg gtgtaggctg gagctgcttc 60

g 61

<210> 53

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> aceB-Ver-F

<400> 53

gaaacagctt ccattcgcg 19

<210> 54

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> aceB-Ver-R

<400> 54

gtaatcggcg cgtcttgttc 20

<210> 55

<211> 25

<212> DNA

<213

> Artificial Sequence

<220><223> yagF-His-F

<400> 55

cccctcgaga accattgaga aaatt 25

<210> 56

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> yagF-His-R

<400> 56

cccaagctta attccgagcg ctttttt 27

<210> 57

<211> 1053

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> glycolate oxidase glcE gene

<400> 57

atgctacgcg agtgtgatta cagccaggcg ctgctggagc aggtgaatca ggcgattagc 60

gataaaacgc cgctggtgat tcagggcagc aatagcaaag ccttttttagg tcgccctgtc 120

accgggcaaa cgctggatgt tcgttgtcat cgcggcattg ttaattacga cccgaccgag 180

ctggtgataa ccgcgcgtgt cggaacgccg ctggtgacaa ttgaagcggc gctggaaagc 240

gcggggcaaa tgctcccctg tgagccgccg cattatggtg aagaagccac ctggggcggg 300

atggtcgcct gcgggctggc ggggccgcgt cgcccgtgga gcggttcggt ccgcgatttt 360

gtcctcggca cgcgcatcat taccggcgct ggaaaacatc tgcgttttgg tggcgaagtg 420

atgaaaaacg ttgccggata cgatctctca cggttaatgg tcggaagcta cggttgtctt 480

ggcgtgctca ctgaaatctc aatgaaagtg ttaccgcgac cgcgcgcctc cctgagcctg 540

cgtcgggaaa tcagcctgca agaagccatg agtgaaatcg ccgagtggca actccagcca 600

ttacccatta gtggcttatg ttacttcgac aatgcgttgt ggatccgcct tgagggcggc 660

gaaggatcgg taaaagcagc gcgtgaactg ctgggtggcg aagaggttgc cggtcagttc 720

tggcagcaat tgcgtgaaca acaactgccg ttcttctcgt taccaggtac cttatggcgc 780

atttcattac ccagtgatgc gccgatgatg gatttacccg gcgagcaact gatcgactgg 840

ggcggggcgt tacgctggct gaaatcgaca gccgaggaca atcaaatcca tcgcatcgcc 900

cgcaacgctg gcggtcatgc gacccgcttt agtgccggag atggtggctt tgccccgcta 960

tcggctcctt tattccgcta tcaccagcag cttaaacagc agctcgaccc ttgcggcgtg 1020

tttaaccccg gtcgcatgta cgcggaactt tga 1053

<210> 58

<211> 1224

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> glycolate oxidase glcF gene

<400> 58

atgcaaaccc aattaactga agagatgcgg cagaacgcgc gcgcgctgga agccgacagc 60

atcctgcgcg cctgtgttca ctgcggattt tgtaccgcaa cctgcccaac ctatcagctt 120

ctgggcgatg aactggacgg gccgcgcggg cgcatctatc tgattaaaca ggtgctggaa 180

ggcaacgaag tcacgcttaa aacacaggag catctcgatc gctgcctcac ttgccgtaat 240

tgtgaaacca cctgtccttc tggtgtgcgc tatcacaatt tgctggatat cgggcgtgat 300

attgtcgagc agaaagtgaa acgcccactg ccggagcgaa tactgcgcga aggattgcgc 360

caggtagtgc cgcgtccggc ggtcttccgt gcgctgacgc aggtagggct ggtgctgcga 420

ccgtttttac cggaacaggt cagagcaaaa ctgcctgctg aaacggtgaa agctaaaccg 480

cgtccgccgc tgcgccataa gcgtcgggtt ttaatgttgg aaggctgcgc ccagcctacg 540

ctttcgccca acaccaacgc ggcaactgcg cgagtgctgg atcgtctggg gatcagcgtc 600

atgccagcta acgaagcagg ctgttgtggc gcggtggact atcatcttaa tgcgcaggag 660

aaagggctgg cacgggcgcg caataatatt gatgcctggt ggcccgcgat tgaagcaggt 720

gccgaggcaa ttttgcaaac cgccagcggc tgcggcgcgt ttgtcaaaga gtatgggcag 780

atgctgaaaa acgatgcgtt atatgccgat aaagcacgtc aggtcagtga actggcggtc 840

gatttagtcg aacttctgcg cgaggaaccg ctggaaaaac tggcaattcg cggcgataaa 900

aagctggcct tccactgtcc gtgtacccta caacatgcgc aaaagctgaa cggcgaagtg 960

gaaaaagtgt tgcttcgtct tggatttacc ttaacggacg ttcccgacag ccatctgtgc 1020

tgcggttcag cgggaacata tgcgttaacg catcccgatc tggcacgcca gctgcgggat 1080

aacaaaatga atgcgctgga aagcggcaaa ccggaaatga tcgtcaccgc caacattggt 1140

tgccagacgc atctggcgag cgccggtcgt acctctgtgc gtcactggat tgaaattgta 1200

gaacaagccc ttgaaaagga ataa 1224

<210> 59

<211> 405

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> glycolate oxidase glcG gene

<400> 59

atgaaaacta aagtcattct tagccagcaa atggcgagtg caattattgc cgcaggtcag 60

gaagaggcgc agaaaaataa ctggtctgtt tccattgctg ttgccgatga cggcggtcat 120

ctgctggcgt taagtcgcat ggacgattgc gcgccgattg cggcttatat ctcccaggag 180

aaagcgcgta ccgccgcgct ggggcgtcgt gaaactaagg gctatgaaga gatggtgaac 240

aacggacgta ccgcgttcgt gactgcgccg ttattaacgt cgctggaagg cggcgtaccg 300

gttgttgtgg atgggcaaat tattggtgcc gtgggcgttt ctggtttaac cggagcacag 360

gatgcgcagg tcgcgaaagc ggcagcagcg gtgttggcga aataa 405