



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년03월02일  
(11) 등록번호 10-2221587  
(24) 등록일자 2021년02월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 15/65 (2006.01) C07K 14/195 (2006.01)  
C12N 15/70 (2006.01) C12P 7/18 (2006.01)  
C12Q 1/26 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
C12N 15/65 (2013.01)  
C07K 14/195 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2019-0073014  
(22) 출원일자 2019년06월19일  
심사청구일자 2019년06월19일  
(65) 공개번호 10-2020-0084753  
(43) 공개일자 2020년07월13일  
(30) 우선권주장  
1020190000712 2019년01월03일 대한민국(KR)  
(56) 선행기술조사문헌  
Molecular Microbiology (2008) 67(3), 570-583.  
KR1020140010235 A  
ISRN Biochem. 2013, 2013: 645983.

(73) 특허권자  
명지대학교 산학협력단  
경기도 용인시 처인구 명지로 116 (남동, 명지대학교)  
(72) 발명자  
정육진  
경기도 성남시 분당구 내정로 186, 102동 1306호 (수내동, 파크타운대림아파트)  
안젤로 바네레스  
경기도 용인시 처인구 명지로 116 명지대학교 (뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
특허법인 천지

전체 청구항 수 : 총 8 항

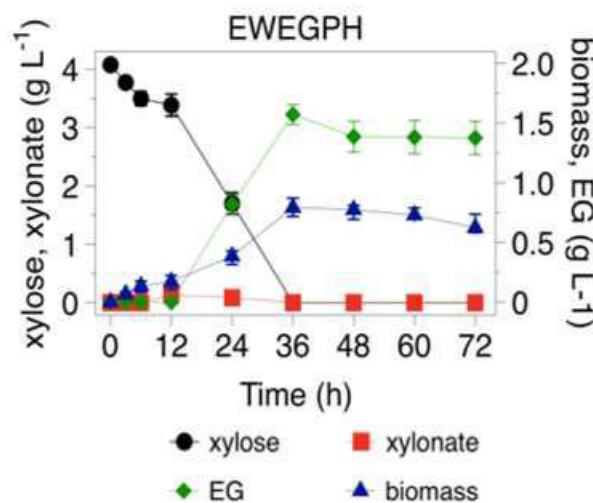
심사관 : 이현지

(54) 발명의 명칭 D-자일로오스 대사 산물을 생산하기 위한 발현 벡터, 형질전환체 및 pH 감지용 바이오 센서

(57) 요약

본 발명은 D-자일로오스 대사 산물을 생산하기 위한 발현 벡터, 상기 발현 벡터로 형질전환된 형질전환체 및 상기 형질전환체를 포함하는 D-자일로오스 대사 산물을 생산하기 위한 배지의 pH를 탐지 하기 위한 바이오 센서에 관한 것으로, 본 발명에 따른 발현 벡터는 감소하는 pH에 대한 반응성이 높아 대장균에서 D-자일론산 대사 산물을 생산하기 위한 합성 회로에 적용할 경우, D-자일론산 축적에 의해 감소되는 pH를 조절함으로써 D-자일론산 대사 산물의 생산 수율 및 생산 균주의 성장 증가시킬 수 있다.

대표도 - 도5d



(52) CPC특허분류

**C12N 15/70** (2013.01)

**C12P 7/18** (2013.01)

**C12Q 1/26** (2013.01)

(72) 발명자

**크리스 발테후에사**

경기도 용인시 처인구 명지로 116 명지대학교

**크리스틴 라모스**

경기도 용인시 처인구 명지로 116 명지대학교

**그레이스 니솔라**

경기도 용인시 처인구 명지로 116 명지대학교

**이원근**

경기도 용인시 처인구 명지로 116 명지대학교

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2009-0093816

부처명 교육부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 대학중점연구소지원사업

연구과제명 에너지환경융합기술연구소(3단계)-바이오매스기반 바이오화학제품 생산공정 요소기

술 개발

기 여 율 70/100

과제수행기관명 명지대학교

연구기간 2015.09.01 ~ 2018.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015H1D3A1062172

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 해외우수신진연구자유치사업

연구과제명 폐바이오매스 유래 탄수화물의 효율적 활용 기술을 이용한 바이오에너지/화학제품

생산용 생합성 공정기술 개발

기 여 율 15/100

과제수행기관명 명지대학교

연구기간 2015.11.01 ~ 2020.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016R1C1B1013252

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 신진연구지원사업

연구과제명 제조합 미생물 균주를 이용한 C5 xylose 기반 C2 및 C4 플랫폼 케미컬 생산 기술

개발

기 여 율 15/100

과제수행기관명 명지대학교

연구기간 2016.06.01 ~ 2019.05.31

공지예외적용 : 있음

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

i) pH 센서로서 CadC 단백질의 염기서열인 서열번호 1에서 475bp 내지 495bp가 결실된 서열번호 2의 염기서열로 표시되는 유전자 및 상기 서열번호 2의 염기서열로 표시되는 유전자의 발현을 조절하는 프로모터;

ii) 락토오스 단백질을 코딩하는 *lacI* 유전자 및 상기 *lacI* 유전자의 발현을 조절하는 프로모터; 및

iii) 자일로오스 탈수소효소를 코딩하는 *xyIB<sub>cc</sub>* 유전자 및 자일로노락토네이즈를 코딩하는 *xyIC* 유전자; 및 락토오스 단백질의 발현에 따라 하류의 *xyIB<sub>cc</sub>* 유전자 및 *xyIC* 유전자의 발현을 조절하는 프로모터; 를 함유하고,

상기 i)에서 유전자의 발현을 조절하는 프로모터는 프로모터 *lacIq*이고, ii)에서 유전자의 발현을 조절하는 프로모터는 *cadBA*이며, iii)에서 유전자의 발현을 조절하는 프로모터는 프로모터 T7인 것을 특징으로 하는 D-자일로오스 대사 산물을 생산하기 위한 발현 벡터.

#### 청구항 2

삭제

#### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 D-자일로오스 대사 산물은 에틸렌글리콜, 글리콜산, 1,2,4-부탄트리올, 1,4-부탄디올, 에탄올 및 옥살로글루타르산으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 발현 벡터.

#### 청구항 4

제1항의 발현 벡터로 형질 전환된 D-자일로오스 대사 산물을 생산하기 위한 형질전환체.

#### 청구항 5

제4항에 있어서,

상기 형질전환체는 대장균(*Escherichia coli*)인 것을 특징으로 하는 형질전환체.

#### 청구항 6

제4항에 있어서,

상기 D-자일로오스 대사 산물은 에틸렌글리콜, 글리콜산, 1,2,4-부탄트리올, 1,4-부탄디올, 에탄올 및 옥살로글루타르산으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 형질전환체.

#### 청구항 7

제1항의 발현 벡터로 형질 전환된 형질전환체를 포함하는 D-자일로오스 대사 산물을 생산하기 위한 배지의 pH를 감지하기 위한 바이오 센서.

**청구항 8**

제7항에 있어서,

상기 바이오 센서는 배지의 pH가 5.5 내지 6.5 이하로 감소하는 것을 방지하고, 배지의 pH를 5.5 내지 6.5로 유지하는 것을 특징으로 하는 바이오 센서.

**청구항 9**

제7항에 있어서,

상기 D-자일로오스 대사 산물은 에틸렌글리콜, 글리콜산, 1,2,4-부탄트리올, 1,4-부탄디올, 에탄올 및 옥살로글루타르산으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 바이오 센서.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 D-자일로오스 대사 산물을 생산하기 위한 발현 벡터, 상기 발현 벡터로 형질전환된 형질전환체 및 상기 형질전환체를 포함하는 D-자일로오스 대사 산물을 생산하기 위한 배지의 pH를 탐지 하기 위한 바이오 센서에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0003] 조작된 균주의 대사 경로에 바이오 센서의 통합은 최대 생산성을 위한 최적화된 생합성 경로에 효과적이다. 이러한 접근은 특정 수준에서 독성이 있는 대사 경로의 전구 물질이나 관심 생산물의 합성을 담당하는 효소의 발현 시기 및 수준을 미세하게 조정함으로써 화학적 생산의 신진대사 부담을 최소화하기 위한 병목 현상을 완화하는 것을 목표로 한다(Keasling, 2010; Ajikumar et al., 2010).

[0004] 공학적 대사 경로의 최적화를 위한 리보 스위치, 전사 인자 또는 효소와 같은 바이오 센서에 대한 엄청난 장래성에도 불구하고 바이오 센서 기술에 대한 몇 가지 제약이 계속해서 제기되고 있다(Jung et al., 2018). 지금까지 화학적 생산을 위한 인공 대사 경로의 내장된 대부분의 바이오 센서는 세포 내 자극이나 분자만을 검출할 수 있을 뿐, 세포외 환경에 있고 세포질 막을 통과 할 수 없는 것들은 검출할 수 없다는 문제점이 있다. 예를 들어 Chong and Ching (2016)의 연구에서 유기인계 농약(organophosphorus pesticides)의 가수분해 생성물인 4-니트로페놀(4-nitrophenol)이 세포막을 통해 침투할 수 있는 살충제를 직접 감지하는 대신 작동 분자로 사용되어 세포내 바이오 센서로 감지 할 수 있게 하였다. 이 제한은 외부 자극을 감지 할 수 있는 특성화된 수용체가 없기 때문이다. 따라서, 외부 자극을 검출할 수 있는 바이오 센서를 찾고, 대사 신호 경로의 자율적인 조절을 허용하는 정보를 세포 신호로 변환할 필요가 있다.

[0005] 대장균(*Escherichia coli*)에는 외부 자극을 탐지하는 잠재적인 바이오 센서로 활용할 수 있는 자연적 투과막 신호 시스템이 있다. 막 통합 일체형 시스템은 ToxR family(콜레라균(*Vibrio cholerae*)의 독성 주요 조절 인자의 이름을 따서 명명 됨), 세포질의(periplasmic) 센서 도메인 및 세포내 winged helix-turn-helix DNA 결합 도메인을 가진 bitopic 막 단백질(단일 막관통 단백질 α-helix)로 구성된다(Jung et al., 2018). 이들은 또한 포스포릴 수용체 도메인이 없기 때문에 박테리아 막 관통 신호 시스템의 가장 단순한 형태로 간주된다. 광범위하게 연구된 박테리아 transmembrane one-component 조절제 중 하나는 CadC이다. 이 레귤레이터는 낮은 pH 및 라이신의 두 가지 자극에 의해 활성화된다(Fritz et al., 2009). CadC의 주변 세포질 영역(periplasmic domain; 페리플라즘 도메인)은 산성 아미노산 잔기의 부분적 양성자화 결과로서 pH의 감소를 직접 감지한다(D198, D200, E461, E468, and D471) (Jung et al., 2018; Dell et al., 1994; Haneburger et al., 2011). 이것은 서브 도메인/모노머들 사이의 반발력을 감소시키고 박테리아 세포질에서 CadC에 의한 전사 활성화를 개시하는 주변 세포질 영역의 이합체화를 촉진시킨다(Eichinger et al., 2011; Lindner and White, 2014).

[0006] 각각 도메인에 의해 수신된 신호는 DNA 결합 도메인 트랜스멤브레인 나선(transmembrane helix)을 통해 cadBA 프로모터와 상호 작용하여 오페론의 발현을 유도함으로써 형질 도입된다(Buchner et al., 2015; Küper et al.,

2005). 실제로, CadC는 전체 길이의 막-통합 수용체가 cadBA 프로모터에 결합할 수 있는 신호 전달의 드문 방식을 갖는다. 더욱이, 라이신 특이적인 이차 수송체 LysP에 대한 CadC의 헤테로 올리고머 상호 작용은 낮은 pH에 의해 활성화되는 전사 인자로서의 능력을 제한한다. 라이신의 부재는 전사 활성화를 방해하는 반면, 두 단백질의 상호 작용은 라이신 및 낮은 pH의 존재 하에서 손상되어 헤테로-올리고머 상호 작용의 구조 변화 및 불안정화를 초래한다(De11 et al., 1994; Rauschmeier et al., 2014; Tetsch et al., 2008). LysP는 라이신 존재 하에서 라이신 의존성 형태 변화를 통해 CadC에 신호를 전달한다.

[0007] CadC는 대장균의 transmembrane에 결합되어있을 때 세포외 자극을 감지하는 잠재적인 바이오 센서이지만 LysP와의 이중 고분자 상호 작용은 라이신의 존재를 필요로 하는 순수한 pH 센서로서의 기능을 제한한다. 따라서, 이 한계를 극복하기 위해, 라이신 비의존성 CadC 변이체를 확인하고, 본 발명에서 pH 센서로서 사용하였다. 첫 번째 변이체는 라이신과 무관한 것으로 입증된 아미노산 클러스터(F159 ~ 165)가 결실된 CadC이다(Tetsch et al., 2008). Tetsch et al.의 연구에서(2008), 이 CadC 변종은 과발현되지 않았음에도 불구하고 다른 변이 형에서 더 높은 활성을 보였다.

[0008] 자일론산(Xylonate)의 축적은 자일로오스(Xylose) 산화 경로(XOP)를 에틸렌 글리콜과 같은 부가가치 화합물의 합성을 위한 유일한 경로로 사용하는 대장균의 대사 공학에서 문제가 되어 왔으며, 특히 자일로오스 탈수소효소(xylose dehydrogenase; xdh)를 과다 발현한 경우에 자일론산(Xylonate) 축적 문제가 심화되었다. 배지에서의 자일론산의 축적은 조작된 균주에서 pH 저하에 대한 스트레스 반응을 유도할 수 있으며, 조작된 균주의 최적 성장 및 최적의 효소 기능에 대해 세포외 환경이 적합하지 않아 수율과 생산성이 낮아진다. 낮은 pH에서 최적으로 기능하는 효소가 있지만 대부분의 효소는 중성 pH에서 최적이다. 이전의 연구에서, D-자일로오스의 D-자일론산으로의 전환은 pH 수준이 4.0에 도달하면 멈추는 것으로 관찰되었다(Liu et al., 2012). 이 결과에 근거하여, 자일로오스 탈수소효소(xylose dehydrogenase)는 낮은 pH의 영향을 받을 수 있다고 가정하였다. 또한, Valdehuesa et al. (2013)은 배양물에서 검출된 유일한 유기산인 D-자일론산의 축적으로 인해 pH의 저하가 또한 관찰되었다고 보고했다. 이 연구는 또한 자일론산 축적의 결과로 pH가 낮아짐에 따라 최종 생산물의 생산성과 수율이 낮다는 것을 문제점을 확인하였다.

[0009] 이에, 본 발명자들은 상기 종래기술들의 문제점들을 극복하기 위하여 예의 연구노력한 결과, pH 센서로서 CadC 단백질의 염기서열인 서열번호 1에서 475bp 내지 495bp가 결실된 서열번호 2의 염기서열로 표시되는 유전자 및 상기 서열번호 2의 염기서열로 표시되는 유전자의 발현을 조절하는 프로모터; 락토오스 단백질을 코딩하는 *lacI* 유전자 및 상기 *lacI* 유전자의 발현을 조절하는 프로모터; 및, 자일로오스 탈수소효소를 코딩하는 *xyIB<sub>cc</sub>* 유전자, 자일로노락토네이즈를 코딩하는 *xyIC* 유전자 및 락토오스 단백질의 발현에 따라 하류의 *xyIB<sub>cc</sub>* 유전자 및 *xyIC* 유전자의 발현을 조절하는 프로모터; 를 함유하는 발현 벡터는 낮은 pH에 대한 반응성이 우수하므로, 이를 Dahms 경로에 적용할 경우, pH가 감소함에 따라 자일로오스 탈수소효소의 발현을 하향 조절하여 배지에서 pH가 감소하는 것을 방지하고 일정 수준의 pH를 유지함으로써 D-자일로오스 대사 산물의 생산성 및 Dahms 경로를 지닌 균주의 성장을 증가시킬 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 주된 목적은 pH에 대한 반응성이 우수한 D-자일로오스 대사 산물을 생산하기 위한 발현 벡터를 제공하는 데 있다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 상기 발현 벡터로 형질전환된 형질전환체 및 상기 형질전환체를 함유하는 D-자일로오스 대사 산물을 생산하기 위한 배지의 pH를 탐지 하기 위한 바이오 센서를 제공하는데 있다.

#### 과제의 해결 수단

[0014] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은, i) pH 센서로서 CadC 단백질의 염기서열인 서열번호 1에서 475bp 내지 495bp가 결실된 서열번호 2의 염기서열로 표시되는 유전자 및 상기 서열번호 2의 염기서열로 표시되는 유전자의 발현을 조절하는 프로모터; ii) 락토오스 단백질을 코딩하는 *lacI* 유전자 및 상기 *lacI* 유전자의 발현을 조절하는 프로모터; 및 iii) 자일로오스 탈수소효소를 코딩하는 *xyIB<sub>cc</sub>* 유전자, 자일로노락토네이즈를 코딩하는 *xyIC* 유전자; 및, 락토오스 단백질의 발현에 따라 하류의 *xyIB<sub>cc</sub>* 유전자 및 *xyIC* 유전자의 발현을 조절하는 프로모터; 를 함유하는 D-자일로오스 대사 산물을 생산하기 위한 발현 벡터를 제공한다.

- [0015] 본 발명에서 용어 "발현 벡터"란 적당한 숙주세포에서 목적 유전자가 발현할 수 있도록 프로모터 등의 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 의미한다. 본 발명과 관련된 발현 벡터는 프로모터가 lacIq 프로모터 및 cadBA 프로모터인 벡터로서, 프로모터는 목적 유전자의 발현을 유도하도록 작동가능하게 연결되어 있으며 벡터는 숙주세포의 게놈내로 통합되어 있는 형태일 수도 있다.
- [0016] 본 발명에서 "작동가능하게 연결된(operably linked)"는 일반적 기능을 수행하도록 D-자일론산 반응성 발현조절 서열과 목적하는 유전자를 코딩하는 뉴클레오티드 서열이 기능적으로 연결되어 있는 것을 말한다. 제조합 벡터와의 작동적 연결은 당해 기술분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용한다.
- [0017] 본 발명의 발현 벡터는 조절 요소로 pH 센서로서 CadC 단백질의 염기서열인 서열번호 1에서 475bp 내지 495bp가 결실된 서열번호 2의 염기서열로 표시되는 유전자 및 상기 서열번호 2의 염기서열로 표시되는 유전자의 발현을 조절하는 프로모터를 필수적으로 포함하고, 단백질의 발현에 영향을 미칠 수 있는 발현 조절 서열, 예를 들어, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널, 인핸서, 막 표적화 또는 분비를 위한 신호서열 등을 포함할 수 있다.
- [0018] 본 발명의 발현 벡터는 D-자일로오스 대사 과정에서 D-자일론산의 생성에 의해 감소하는 pH에 대한 반응성이 우수하며, 이에 따라 본 발명에서는 상기 발현 벡터를 pH 센서라고 지칭하였다.
- [0019] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 발현 벡터로 형질전환된(pH 센서를 갖는) 균주는 형질전환되지 않은(pH 센서를 갖는 균주)보다 높은 pH에서 자일론산 생성이 억제되는 것을 확인하였다(실시예 1 및 도 2b, 2c 참조). 이러한 결과는, 본 발명에 따른 발현 벡터는 감소하는 pH에 대한 반응성이 우수하므로, 자일로오스 산화 경로의 최적화를 위한 도구로서 이용 가능성을 시사한다.
- [0020] 본 발명의 발현 벡터에 있어서, 상기 i)에서 유전자의 발현을 조절하는 프로모터는 프로모터 lacIq이고, ii)에서 유전자의 발현을 조절하는 프로모터는 프로모터 cadBA이며, iii)에서 유전자의 발현을 조절하는 프로모터는 프로모터 T7인 것을 특징으로 한다.
- [0021] 본 발명의 발현 벡터에 있어서, 상기 D-자일로오스 대사 산물은 에틸렌글리콜, 글리콜산, 1,2,4-부탄트리올, 1,4-부탄디올, 에탄올 및 옥살로글루타르산으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 한다.
- [0022] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 발현 벡터의 자일론산 축적 조절 메커니즘을 확인한 결과, 본 발명의 발현 벡터로 형질전환된 대장균은 배지의 pH를 6.0 이상으로 유지시킴과 동시에 바이오매스도 증가시켰다(실시예 2 및 도 3a 내지 도 3d 참조). 이러한 결과는, 본 발명에 따른 발현 벡터가 배지의 pH가 감소되는 것을 빠르게 감지하여 자일론산의 생성을 일시적으로 억제시키고, 바이오매스를 증가시켜 대장균 세포의 성장을 증가시킴으로써 D-자일론산 대사 산물의 생산성을 증가시킬 수 있음을 보여준다.
- [0023] 본 발명의 다른 한 양태에 따르면, 본 발명은 상기 발현 벡터로 형질 전환된 D-자일로오스 대사 산물을 생산하기 위한 형질전환체를 제공한다.
- [0024] 본 발명의 발현 벡터로 형질전환된 형질전환체에 있어서, 벡터로 형질전환 가능한 숙주세포는 제조합 단백질을 생산하는 숙주세포로서 공지된 것이라면 어떠한 것이든 이용가능하다. 숙주세포로는 박테리아, 효모, 곰팡이 등이 가능하나, 이에 제한되는 것은 아니며, 바람직하게는 대장균(*Escherichia coli*)인 것을 특징으로 한다.
- [0025] 본 발명의 발현 벡터로 형질전환된 형질전환체에 있어서, 상기 D-자일로오스 대사 산물은 에틸렌글리콜, 글리콜산, 1,2,4-부탄트리올, 1,4-부탄디올, 에탄올 및 옥살로글루타르산으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 한다.
- [0026] 본 발명의 다른 한 양태에 따르면, 본 발명은 발현 벡터로 형질 전환된 형질전환체를 포함하는 D-자일로오스 대사 산물을 생산하기 위한 배지의 pH를 탐지 하기 위한 바이오 센서를 제공한다.
- [0027] 본 발명의 바이오 센서에 있어서, 상기 바이오 센서는 배지의 pH가 5.5 내지 6.5 이하로 떨어지는 것을 방지하고, 배지의 pH를 5.5 내지 6.5로 유지하는 것을 특징으로 한다.
- [0028] 본 발명의 바이오 센서에 있어서, D-자일로오스 대사 산물은 에틸렌글리콜, 글리콜산, 1,2,4-부탄트리올, 1,4-부탄디올, 에탄올 및 옥살로글루타르산으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 한다.
- [0029] 본 발명의 일 실시예에 따르면, D-자일로오스 대사 산물 중 하나인 에틸렌 글리콜의 생산성을 확인하기 위하여, 본 발명의 발현 벡터로 형질전환된 균주를 실험 배지에서 배양한 결과, 상기 균주가 배양된 배지에는 생성된 자

일론산이 거의 없었으며, 대조 균주 대비 에틸렌 글리콜 생산성이 우수하였다(실시예 4 및, 도 5b 내지 도 5d). 이러한 결과는, 본 발명에 따른 발현 벡터가 배지의 pH가 감소되는 것을 빠르게 감지하여 자일론산의 생성을 억제시킴으로써 D-자일론산 대사 산물인 에틸렌 글리콜의 생산성을 증가시킬 수 있음을 보여준다.

**발명의 효과**

[0031] 진술한 바와 같이, 본 발명에 따른 발현 벡터는 감소하는 pH에 대한 반응성이 높아 대장균에서 D-자일론산 대사 산물을 생산하기 위한 합성 회로에 적용할 경우, D-자일론산 축적에 의해 감소되는 pH를 조절함으로써 D-자일론산 대사 산물의 생산 수율 및 생산 균주의 성장 증가시킬 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

[0033] 도 1은 CadC 변종을 이용한 낮은 pH 센서의 구성 및 용량 감지를 확인한 결과로서, 도 1a는 낮은 pH 센서의 구조(PT7, 박테리오파지 T7 프로모터; cadCv, 라이신 비의존성 pH 민감성 cadC 변이체(cadC<sub>ΔF159-165</sub> 또는 CadC<sub>1-215</sub>); PcadBA, 낮은 pH에서 CadC에 의해 활성화되는 cadB(카다베린 및 lysine antiporter(라이신 역수송체) 유전자) 및 cadA (라이신 데시복실라제 유전자)의 천연 프로모터; sfGFP, superfolder 녹색 형광 단백질(리포터 단백질))이고, 도 1b는 중성 pH(7.0) 조건 하에서 재조합 균주의 sfGFP 형광을 측정된 결과이며, 도 1c는 낮은 pH(5.8) 조건에서 재조합 균주의 sfGFP 형광을 측정된 결과. 도 1b 및 도 1c에서, 0H와 12H는 OD600이 0.6에 도달했을 때 형광 측정 값을 나타낸다.

도 2는 본 발명에 따른 유전자 회로 및 이를 적용한 대장균에서 낮은 pH-의존성 자일론산의 생산 결과를 나타낸다. 도 2a는 lacIq 프로모터의 하류에 있는 cadC<sub>ΔF159-165</sub>로 구성된 자일로오스 산화 경로에서 조작된 발현 벡터 (pH 센서)를 도식화한 것으로, T7 프로모터 하류에는 자일론산 생산 유전자인 xyIB<sub>cc</sub>(xylose dehydrogenase) 및 xyIC (xylonolactonase)가 위치하고, lacI 유전자(LacI 리프레서 코딩 유전자)는 cadBA 프로모터의 하류에 위치한다. 도 2b 및 도 2c는 발현 벡터(pH 센서)가 없는 BLXA 균주 및 발현 벡터(pH 센서)가 있는 BLXAPH 균주의 자일론산 생산 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 xylose oxidative pathway(XOP)에서 발현 벡터(pH 센서)에 의한 자일론산 축적의 조절을 보여주는 것으로, 도 3a 및 3b는 자일로오스 탈수소효소의 pH 수준 및 효소 활성을 나타내는 결과이고, 도 3c 및 도 3d는 균주의 자일로오스 소모, 자일론산 축적 및 바이오매스 생성 결과이다.

도 4a는 배지의 pH 레벨을 나타내는 것이고, 도 4b는 효소 활성 나타내며, 도 4c 및 도 4d는 EWXA and EWXAPH에서 자일론산 소모 및 자일론산 축적을 확인한 결과이다.

도 5는 낮은 pH 조절을 통한 에틸렌 글리콜 생산 결과를 나타내는 것으로, 도 5a는 발현 벡터(pH 센서)에 의해 조절되는 에틸렌 글리콜 생합성 과정을 도식화한 것이고, 도 5b는 대조 균주 EWEG 및 EWEGPH에 따른 배지의 pH를 나타내는 결과이고, 도 5c 및 도 5d는 EWEGPH 및 EWEG 균주에서의 대사 산물 농도를 나타낸다.

도 6은 본 발명에서 사용된 플라스미드 지도이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0034] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0036] **[실험방법]**

[0037] DNA 조작

[0038] 표준 기술을 모든 유전자 조작 실험에 사용하였다(Green and Sambrook 2012). 약간의 변경을 가한 Gibson 등은 조립 방법을 DNA 조립에 사용하였다(Gibson et al. 2009). 본 발명에서 사용된 재조합 플라스미드 및 대장균 균주 목록은 표 1에 나타내었다. Michael Davidson과 Geoffrey Waldo(Addgene plasmid # 54519) (P<sup>É</sup>delacq et al. 2006)로 부터 기증받은 plasmid sfGFP-pBAD를 sfGFP 유전자를 위해 사용하였다. 모든 PCR 반응은 표 2에 기재된 적절한 올리고 뉴클레오타이드를 사용하여 Phusion High-fidelity DNA 증합 효소를 사용하여 수행하였다. 본 발명에서 사용된 유전자 요소와 유전자의 전체 목록은 표 3에 나타내었다. 구축된 플라스미드는 one-step TSS(형질 전환 및 저장 솔루션) 프로토콜을 사용하여 화학적으로 유능한 DH5 α 세포로 형질 전환되었

으며(Chung 외. 1989), DNA 시퀀싱을 통해 염기서열을 확인하였다.

표 1

[0040]

플라스미드	상대적 특징	레퍼런스
pACM4	pACYC-Duet derivative; with ePathBrick feature; T7 promoter; Cm <sup>r</sup>	Xu <i>et al.</i> , 2012
pRSETA	T7 promoter; ampR	Invitrogen
sfGFP-pBAD	P <sub>pBAD</sub> -sfGFP (Addgene #54519)	*
pRT7	pRSETA carrying sfGFP under T7 promoter	This work
pRCADC1	pRSETA carrying sfGFP under cadAB promoter; Mutant cadC <sub>ΔF159-165</sub> (Deletion of amino acids F159-F165 of cadC) under T7 promoter.	This work
pRCADC2	pRSETA carrying sfGFP under cadAB promoter; Truncated cadC1-215 (CadC protein with 1-215 amino acids only) under T7 promoter.	This work
pRBC	pRSETA carrying codon-optimized xylB and xylC from <i>C. crescentus</i> under T7 promoter.	This work
pRBCPH	pRSETA carrying codon-optimized xylB and xylC from <i>C. crescentus</i> under T7 promoter, lacI under cadAB promoter, and cadC <sub>ΔF159-165</sub> under lacIq promoter.	This work
pAB	pACM4 without lacI carrying yjgB from <i>E. coli</i> under lacIq promoter.	This work
<b>Strains</b>		
<i>E. coli</i> DH5 α	F' Φ80lacZ · ΔM15 · f(lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(r <sub>k</sub> <sup>-</sup> , m <sub>k</sub> <sup>+</sup> )phoAsupE44thi-lgyrA96relA1	Enzynomics
BL21(DE3)	F' ompT hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) gal dcm (DE3)	Novagen
BL21(DE3) ΔxylAB	BL21 (DE3) with deletion in xylAB genes	This work
<i>E. coli</i> W3110 (DE3) ΔxylAB	F <sup>-</sup> mcrA mcrB IN(rrnD <sup>-</sup> rrnE)1λ <sup>-</sup> (DE3); ATCC No.27325; with deletion in xylAB genes	Liu <i>et al.</i> , 2012
<i>E. coli</i> W3110 ΔxylAB ΔyjgB ΔaldA	F <sup>-</sup> mcrA mcrB IN(rrnD <sup>-</sup> rrnE)1λ <sup>-</sup> (DE3); ATCC No.27325; with deletion in xylA, xylB, yjgB and aldA genes	Cabulong <i>et al.</i> , 2017
BLC	BL21(DE) pRSETA	This work
BLT7	BL21(DE) pRT7	This work
BLPH1	BL21(DE) pRCADC1	This work
BLPH2	BL21(DE) pRCADC2	This work
BLXA	BL21(DE3) ΔxylAB pRBC	This work
BLXAPH	BL21(DE3) ΔxylAB pRBCPH	This work
EWXA	<i>E. coli</i> W3110 (DE3) pRBC	This work
EWXAPH	<i>E. coli</i> W3110 (DE3) pRBCPH	This work
EWEG	<i>E. coli</i> W3110 ΔxylAB ΔyjgB ΔaldA pRBC pAB	This work
EWEGPH	<i>E. coli</i> W3110 ΔxylAB ΔyjgB ΔaldA pRBCPH pAB	This work

[0041]

\*sfGFP-pBAD는 Michael Davidson & Geoffrey Waldo (Addgene plasmid # 54519)로부터 기증 받았다.

표 2

[0043]

	프라이머 이름	염기서열 (5' →3')*
	Gibson Assembly <sup>a</sup> 를 위한 클로닝 프라이머	
서열번호		
9	1CadCdelta159-165/1-215 F	tgacgataaaggatcgatgggATGCAACAACCTGTAGTTCGCGTTGGCGAATG
10	1CadCdelta159-165 R	acgacaacagGGTAGTGAATCGTTTGCTTTTAACTGGGGATTGTTC
11	2 CadCdelta159-165 F	attcactaccCTGTTGCGTTAGGTATCTGTGTAGCACTG



12	2 CadCdelta159-165 R	aattccatggTTATTCTGAAGCAAGAAATTTGTCGAGATAAGG
13	T7 Terminator for CadCdelta159-165 F	ttcagaataaCCATGGAATTCGAAGCTTGATCCGGCTGC
14	CadC1-215 R	aattccatggTAAATACGGGAACTCCAGCTGTACAACTTTTATTACATATTAATG
15	T7-Terminator for CadC1-215R	cccgtattaaCCATGGAATTCGAAGCTTGATCCGGCTGC
16	T7-Terminator for CadCdelta159-165/1-215 R	ccgagattacTTCGCTATTACGCCAGATCCGGATATAGTTC
17	CadABp F	taatagcgaaGTAACCTCCGGTTGATTTATGCTCGGAAATATTTG
18	CadABp R	tgctcaccatGCTCTTCTCTAATTTTCATTTTTGAATTTGGAG
19	sfGFP F	ggagaagagcATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTAC
20	sfGFP R	ctttgttagcagcggatcaTACTTGACAGCTCGTCCATGCCGTGAG
21	lacO-xdh F control	gagaccacaacggtttccctGGAATTGTGAGCGGATAACAATCCCCTCTAGAAATAATTTG
22	lacO-xdh R control	tccctcctgtTCAACGCCAACCCGCGTCGATC
23	xylC F control	ttggcgttgaACAGGAGGAATGACCGCGCAG
24	xylC R control	agctgcagatctcgagctcgTAAACCAGACGAACTTCGTGCTGC
25	xdH-xylC F	GagaccacaacggtttccctATGTCTTCTGCGATCTACCCGTCTCTG
26	xdH-xylC R	gatccccatcgatTCAACGCCAACCCGCGTCGATC
27	T7 Terminator F	ttggcgttgaATCGATGGGGATCCGAGCTCGAGATCTGC
28	T7 Terminator R	acggtgaaaaGCCGCTACAGGCGCGTCCC
29	lacIq Promoter F	ctgtagcggcTTTTCACCGTCATCACGAAAC
30	lacIq Promoter R	caggtgttgcacCCTGAATTGACTCTCTCCGG
31	CadC <sub>ΔF159-165</sub> F	tcaattcaggATGCAACAACCTGTAGTTCGC_
32	CadC <sub>ΔF159-165</sub> R	ggcaaatctTTATTCTGAAGCAAGAAATTTGTCGAGATAAGG
33	rrnB Terminator F	ttcagaataaAGAATTTGCCTGGCGCAGTAG
34	rrnB Terminator R	agctgcagatctcgagctcgAACGCAAAAAGCCATCCGTC
35	pacM4 without lacI F	aattgcgttgGGTGTCCGGATCTCGACGC_
36	pacM4 without lacI R	cccggacaccCAACGCAATTAATGTAAGTTAGCTCACTCATTAGGC
37	pacM4 for yjgB F	ATTCACCACCCTGAATTGACTCTCTCCGGGCGCTATCATG_
38	pacM4 for yjgB R	GCGCAACGCAATTAATGTAAGTTAGCTCACTCATTAGGCAC
39	yjgB F	CCGGAAGAGAGTCAATTCAGGGTGGTGAATATGTCGATGATAAAAAGCTATGCCGCAA AAGAAGCGGGCG
40	yjgB R	GTGAGCTAACTTACATTAATTGCGTTGCGCTCAAAAATCGGCTTCAACACCACGCGG TAACGCGCCTTA

[0044] \* 5 '오버행은 밑줄로 표시하였다.

표 3

[0046]

서열 번호	Name	Sequence (5' →3' )
1	cadC WT	ATGCAACAACCTGTAGTTCCGCTTGGCGAATGGCTTGTACTCCGTCACATAAACCAAAATTAGCCGC AATGGGCGTCAACTTACCCTTGAGCCGAGATTAATCGATCTTCTGGTTTTCTTGTCTAACACAGT GGCGAAGTACTTAGCAGGGATGAACCTATCGATAATGTCTGGAAGAGAAGTATTGTCACCAATCAC GTTGTGACGCAGAGTATCTCAGAACTACGTAAGTCATTAAGATAATGATGAAGATAGTCCTGTC TATATCGCTACTGTACCAAAGCGCGCTATAAAATTAATGGTGCCGGTTATCTGGTACAGCGAAGAA GAGGGAGAGGAAATAATGCTATCTTCGCCCTCCCCCTATACCAGAGGCGGTTCTGCCACAGATTCT CCCTCCCACAGTCTTAACATTCAAAACACCGCAACGCCACCTGAACAATCCCAGTTAAAAGCAAA CGATTACTACCTTTTGGGTATGGTTTTTTTCTGTGTGTCGTTAGGTATCTGTGTAGCACTGGTA GCGTTTTCAAGTCTTGATACACGCTTCCCTATGAGCAAATCGCGTATTTTGTCTCAATCCAGCGGAT ATTGACATTAATATGGTAAATAAAAGTTGTAACAGCTGGAGTTCGCCGATCAGCTCTCTTACGCG ATAGGCGTGGGTGATTGGTGGCGACATCACTAACACCTTCTCCACCTTTATGGTGCATGACAAA ATCAACTACAACATTGATGAACCGAGCAGTCCGGTAAAACATTATCTATTGCGTTTGTAAATCAG CGCAATACCGTCTCAACAATGCTTTATGTCGATAAAATTTGGTAGACAATGCAGATGGTTCAACC ATGCTGGATAAACGTTATGTCATCACTAACGGTAAATCAGCTGGCGATTCAAAATGATTTACTGGAG AGTTTATCAAAGCGTTAAACCAACCGTGGCCACAACGAATGCAGGAGACGCTCCAGAAAATTTG CCGCATCGTGGTGGTATTAACTAATTTTATCAGGCACATGATTATTTACTGCATGGCGATGAT AAATCATGAAACCGTGGCAGTGAATTTATAGGTGAGATTGTTCAATCATCCCCAGAATTTACCTAC GCGAGAGCAGAAAAGCATTAGTTGATATCGTGCGCCATTCTCAACATCCTTTAGATGAAAAACAA TTAGCAGCACTGAACACAGAAATAGATAACATTGTTACTGCGGAATGAACAACCTGTCCATT ATATATCAAATAAAAGCGGTGAGTCTCTGGTAAAAGGTAAAACAGATGAGTCTTACCAGGCGATA AATACTGGCATTGATCTTGAATATGCTGGCTAAATTTATGTTGCTGGCAAGGTTTATGAAATG AAGGGATGAACCGGAAGCAGCTGATGCATATCTACCGCTTAAATTTACGCCAGGGGCAAAC ACCCTTTACTGGATTGAAAATGGTATATCCAGACTTCTGTTCTTATGTTGACCTTATCTCGAC AAATTTCTGTCTCAGAATAA
2	CadC <sub>ΔF159-165</sub>	ATGCAACAACCTGTAGTTCCGCTTGGCGAATGGCTTGTACTCCGTCACATAAACCAAAATTAGCCGC AATGGGCGTCAACTTACCCTTGAGCCGAGATTAATCGATCTTCTGGTTTTCTTGTCTAACACAGT GGCGAAGTACTTAGCAGGGATGAACCTATCGATAATGTCTGGAAGAGAAGTATTGTCACCAATCAC GTTGTGACGCAGAGTATCTCAGAACTACGTAAGTCATTAAGATAATGATGAAGATAGTCCTGTC TATATCGCTACTGTACCAAAGCGCGCTATAAAATTAATGGTGCCGGTTATCTGGTACAGCGAAGAA GAGGGAGAGGAAATAATGCTATCTTCGCCCTCCCCCTATACCAGAGGCGGTTCTGCCACAGATTCT CCCTCCCACAGTCTTAACATTCAAAACACCGCAACGCCACCTGAACAATCCCAGTTAAAAGCAAA CGATTACTACCCTGTTGTCGTTAGGTATCTGTGTAGCACTGGTAGCGTTCGAAGTCTTCAAGTACA CGTCTTCTATGAGCAAATCGCGTATTTTGTCTCAATCCACGCGATATTGACATTAATATGGTAAAT AAAAGTTGTAACAGCTGGAGTTCGCCGATCAGCTCTTACGCGATAGGCGTGGGTGATTGGTG GCGACATCACTAACACCTTCTCCACCTTTATGGTGCATGACAAAATCAACTACACATTGATGAA CCGAGCAGTTCGGTAAAACATTATCTATTGCGTTTGTAAATCAGCGCAAATACCGTGCACAAA TGCTTTATGTCGATAAAATTTGGTAGACAATGCAGATGGTTCAACCATGCTGGATAAACGTTATGTC ATCACTAACGGTAATCAGCTGGCGATTCAAATGATTTACTGGAGAGTTTATCAAAGCGTTAAAC CAACCGTGGCCACAACGAATGCAGGAGACGCTCCAGAAAATTTGCGCGATCGTGGTGGGTTATTA ACTAATTTTATCAGGCACATGATTATTTACTGCATGGCGATGATAAATCATTGAACCGTGCCAGT GAATTATTAGGTGAGATTGTTCAATCATCCCCAGAATTTACCTACGCGAGAGCAGAAAAAGCATT GTTGATATCGTGGCCATTCTCAACATCCTTTAGATGAAAAACAATTAGCAGCACTGAACACAGAA ATAGATAACATTGTTACTGCGGAATGAACAACCTGTCCATTATATCAAATAAAAGCGGTC AGTGCTCTGGTAAAAGGTAAAACAGATGAGTCTTACCAGGCGATAAATACTGGCATTGATCTTGAA ATGCTCTGGCTAAATTTATGTTGCTTGGCAAGGTTTATGAAATGAAGGGATGAACCGGAAGCA GCTGATGCATATCTACCGCTTAAATTTACGCCAGGGGCAAACACCCCTTACTGGATTGAAAAT GGTATATCCAGACTTCTGTTCTTATGTTGTACCTTATCTCGACAAAATTTCTGTCTCAGAATAA
3	cadC <sub>1-215</sub>	ATGCAACAACCTGTAGTTCCGCTTGGCGAATGGCTTGTACTCCGTCACATAAACCAAAATTAGCCGC AATGGGCGTCAACTTACCCTTGAGCCGAGATTAATCGATCTTCTGGTTTTCTTGTCTAACACAGT GGCGAAGTACTTAGCAGGGATGAACCTATCGATAATGTCTGGAAGAGAAGTATTGTCACCAATCAC GTTGTGACGCAGAGTATCTCAGAACTACGTAAGTCATTAAGATAATGATGAAGATAGTCCTGTC TATATCGCTACTGTACCAAAGCGCGCTATAAAATTAATGGTGCCGGTTATCTGGTACAGCGAAGAA GAGGGAGAGGAAATAATGCTATCTTCGCCCTCCCCCTATACCAGAGGCGGTTCTGCCACAGATTCT CCCTCCCACAGTCTTAACATTCAAAACACCGCAACGCCACCTGAACAATCCCAGTTAAAAGCAAA CGATTACTACCTTTTGGGTATGGTTTTTTTCTGTGTGTCGTTAGGTATCTGTGTAGCACTGGTA GCGTTTTCAAGTCTTGATACACGCTTCCCTATGAGCAAATCGCGTATTTTGTCTCAATCCACGCGAT ATTGACATTAATATGGTAAATAAAAGTTGTAACAGCTGGAGTTCGCCGATTA
4	cadAB promoter	GTAACCTCCGGTTGATTATGCTCGGAAATATTTGTTGTTGAGTTTTTGTATGTTCTGTGTTGAT AATATGTTGCGGCAATTTATTTGCGCATAATTTTATTACATAAAATTTAACAGAGAATGTCACG CAATCCATTGTAACATTAATGTTATCTTTTCATGATATCAACTGCGATCCTGATGTTGTTAAT AAAAACCTCAAGTTCACCTACAGAACTTTTGTGTTATTTACCTAATCTTTAGGATTAATCC TTTTTCTGTGAGTAATCTTATCGCCAGTTGGTCTGGTCAGGAAATAGTTATACATCATGACCCGG ACTCAAATTCAAAATGAAATTAGGAGAAGAC

5	xy1B <sub>cc</sub>	ATGTCCTCAGCCATCTATCCCAGCCTGAAGGGCAAGCGCGTCGTCATACCGGGCGGCGGCTCGGGC ATCGGGGCGGCTCACCGCCGGCTTCGCCCGTCAGGGCGCGGAGGTGATCTTCCCTCGACATCGCC GACGAGGACTCCAGGGCTCTTGAGGCCGAGCTGGCCGGCTCGCCGATCCC GCCGTCTACAAGCGC TGCGACCTGATGAACCTCGAGGCGATCAAGGGCGTCTTCGCCGAGATCGGCGACGTCGACGTGCTG GTCAACAACGCGGCAATGACGACCGCCACAAGCTGGCCGACGTGACCGGCGCCTATTGGGACGAG CGGATCAACGTCAACCTGCGCCACATGCTGTTCTGACCCAGGCGCTCGCGCCGGGCATGAAGAAAG CGTGGCGGCGGGCGGTGATCAACTTCGGTTCGATCAGCTGGCACCTGGGGCTTGAGGACCTCGTC CTCTACGAAACCGCAAGGCCGCATCGAAGGCATGACCCGCGCGTGGCCGGGAGCTGGGTCCC GACGACATCCGCGTCACCTGCGTGGTGCCGGGCAACGTCAAGACCAAGCGCCAGGAGAAGTGGTAC ACGCCCGAAGGCAGGCCAGATCGTGGCGGCCAATGCTGAAGGCCGATCGTCCGGGAGAAC GTGCGCGCGTGGTGTGTTCTGGCTCGGATGACGCGTTCGCTCTGCACCGGCCAATACTGG ATCGACCGCGCTGGCGTTGA
6	xy1C <sub>cc</sub>	ATGACCGCGCAGGTTACCTGCGTGTGGACCTGAAAGCGACCTGGGTGAAGTCCGATCTGGCAC GGTGACACCTGTGGTTCGTTGACATCAAAACAGCGTAAAATCCACAACCTACCACCGCGGACCGGT GAACGTTTCTCTTCGACGCGCCGGACCAGGTTACCTTCTGGCGCCGATCGTTGGTGGCAGCCGGT TTCGTTGTGGTCTGAAAACCGGTATCCACCGTTCCACCGGCGACCGGTTTCTCTGCTGCTG GAAGTTGAAGACGCGCGCTGAACAACCGTCCGAACGACGCGACCGTTGACGCGCAGGGTCTGCTG TGGTTCGGCACTATGCACGACGGTGAAGAAAACAACCTGTTCTGTACCGTATGGACCTGACC GGTGTTCGCGTATGGACCGTGACATCTGCATCAACAACGTTCCGTGCGTTTCTCCGACGGTAAA ACCTTCTACCACCGACACCTGGAAAAACCATCTACGCGTTCGACCTGGCGGAAGACGGTCTG CTGTCTAACAACGTTTTCGTTTCAGTTCGCGCTGGGTGACGACGTTTACCAGGACCGTTCTGT GTTGACTCTGAAGGTTACCTGTGGACCGCGCTGGGGTGGTTTCGGTGGCGTGGTTCTCTCCG CAGGGTGACGCGTTACCCGTATCGAACTGCCGGCGCAACGTTACCAAACCGTCTCGGTGGT CCGGACCTGAAAACCTGTACTTACCACCGCGCTAAAGGCTGTCTGACGAAACCTGGCGCAG TACCGCTGGCGGTGGTGTTCGCGGTTCCGGTTGACGTTGCGGGTACCGCGACGACAAGTT CGTCTGGTTAA
7	yjbB	ATGTCGATGATAAAAAGCTATGCCGCAAAAAGAAGCGGGCGGCAACTGGAAGTTTATGAGTACGAT CCCGGTGAGCTGAGGCCACAAGATGTTGAAGTGCAGGTGGATTACTGCGGGATCTGCCATTCCGAT CTGTCGATGATCGATAACGAATGGGATTTTACAATATCCGCTGGTTGCCGGCATGAGGTGATT GGGCGCGTGGTGGCACTCGGGAGCGCCGCGCAGGATAAAGTTTGCAGGTGACGCTGTCGCGGG ATTGGCTGGACGCGCTAGCTGTGGTCACTGCGACGCTGTATTAGCGGTAATCAGATCAACTGC GAGCAAGGTGCGGTGCCGACGATTATGAATCGCGGTGGCTTTGCCGAGAAGTTGCGTGGGACTGG CAATGGGTGATTCCACTGCCAGAAAATATTGATATCGAGTCCGCCGGCCGCTGTGTGTCGGCGGT ATCACGGTCTTTAAACCACTGTGATGCACCATATCACTGTACCAGCCGCTGGGGTAATTGGT ATTGGCGGGCTGGGCATATCGCTATAAAACTTCTGCACGCAATGGGATGCGAGGTGACAGCCTTT AGTTCTAATCCGGCGAAAGAGCAGGAAGTGCTGGCGATGGGTGCCGATAAAGTGGTGAATAGCCGC GATCCGCAGGCACTGAAAGCACTGGCGGGCAGTTGATCTCATTATCAACACCGTCAACGTCAGC CTCGACTGGCAGCCCTATTTTGGAGCGCTGACCTATGGCGGTAATTTCCATACGGTTCGGTGGGTT CTCACCGCTGTCTGTTCGGCTTTACGTTAATTGCGGGCGATCGCAGCGTCTCTGGTTCTGCT ACCGGCACGCTTATGAGCTGCGTAAGCTGATGCGTTTGGCCGCCGACGAAAGTTGCGCCGACC ACCGAAGTGTCCCGATGTGCAAAAATTAACGACGCCATCCAGCATGTGCGCGACGGTAAGCGCGT TACCGCGTGGTGTGAAAGCCGATTTTGA
8	sf <sub>gfp</sub>	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCATCCTGGTCTGAGCTGGACGGCGAC GTAACCGCCACAAGTTCAGCGTGCAGCGGAGGGCGAGGGCGATGCCACCAACGGCAAGCTGACC CTGAAGTTCATCTGCACACCGGCAAGCTGCCCGTGCCTGGCCACCTCGTGACCCACCTGACC TACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCATGAAGCGCCACGACTTCTTCAAGTCCGCC ATGCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCAGCTTCAAGGACGACGGACCTACAAGACCCGC GCCGAGGTGAAGTTCGAGGGGACACCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAG GAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAGCTGGAGTACAACCTTCAACGCCACAACGCTATATACC GCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCCAATTCAGATCCGCCACAACGTGGAGGACGGCAGC GTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACCCCCATCGCGCAGGCCCCGTGCTGTGCCCGAC AACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGTGCTGAGCAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCAGATGGTC CTGCTGGAGTTCGTGACCGCGCCGGGATCACTACCGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA

[0048] 배양 조건

[0049] 33.7mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 22.0mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8.55mM NaCl, 9.35mM NH<sub>4</sub>Cl, 1.0mM MgSO<sub>4</sub>, 0.5g/L yeastextract, 1.0g/L peptone 및 2.5g/L glucose을 포함하는 M9 (MM9)를 형광 분석에 이용하였다. 33.7mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 22.0mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8.55mM NaCl, 9.35mM NH<sub>4</sub>Cl, 2.0mM MgSO<sub>4</sub>, 2g/L casaminoacid, 1.0mM thiamineHCl, 0.1mM CaCl<sub>2</sub> 및 0.4% glycerol(v/v)를 포함하는 M9(MM9) 배지는 자일론산 생성 및 댄스 회로의 최적화에 이용하였다.

[0051] 형광 분석

[0052] 균주를 LB broth 배지에서 밤새 배양하고, 각 샘플 100 $\mu$ l를 MM9 배지에 첨가한 후, 멸균된 2M 황산 또는 6M 수산화 나트륨으로 pH 7.0으로 조정 하였다. 세포를 적절한 양의 2M 황산을 첨가함으로써 낮은 pH (5.8) 및 약

0.6의 OD600로 유도 하였다. 샘플을 낮은 pH로 유도한 12시간 전후로 수집 하였다. 배지의 pH는 실험을 통해 모니터링 하였다. 수집된 샘플을 21206xg에서 2분간 원심 분리하고 상등액을 버린 후, 물 1ml를 각 샘플에 첨가 하였다. 세포를 OD600에서의 흡광도에 기초하여 표준화 하였다. 형광 분광계 FluoroMate FS-2(Scinco, Korea)를 사용하여 세포를 형광 분석 하였다. 형광 분광기는 sfGFP에 대해 485nm 여기(excitation), 507nm 방출(emission)로 설정하였다. 특정 형광은 OD 600 당 형광으로 정의하였다(given in a.u).

[0054] 바이오매스 및 대사 산물 정량화

[0055] 재조합 대장균 균주의 바이오매스 및 대사 산물을 이전에 기술한 것과 동일한 조건에 따라 분석하고 정량화 하였다(Liu et al. 2013). 바이오매스를 정량하기 위해, 샘플을 2ml의 예비 건조 및 사전 칭량된 원심 분리 튜브에 수집하고, 8,000xg에서 10분 동안 펠렛화한 다음, 탈이온수로 두 번 세척한 하고, 105℃에서 건조시켰다. 600nm(OD 600)에서의 광학 밀도와 관련된 건조 세포 중량의 표준 곡선을 생성하였다. 하나의 OD600 단위는 건조 셀 중량의 0.32g<sup>L<sup>-1</sup></sup>과 같다. 반면, 용리액으로 5mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 사용하는 Bio-Rad Aminex HPX-87H (300 x 7.8 mm)가 장착된 HPLC를 사용하여 0.4 ml/min의 일정한 유속으로 공급된 대사 산물 농도를 정량화하였다. 컬럼은 55℃에서 유지하였으며, 피크는 물 2414 굴절률 검출기를 사용하여 검출하였다.

[0057] 효소 활성 분석

[0058] D-자일로오스 탈수소효소 활성은 이전에 보고된 방법에 따라 조세포 추출물로부터 측정하였다(Berghäll et al., 2007). 세포를 4,000xg 및 4℃에서 원심 분리하여 수집 하였다. 수확된 세포를 세척하고 Tris-HCl(50mM, pH 8.0)로 재현탁시킨 다음, 라이소자임 1mg mL<sup>-1</sup>을 첨가하여 용해시킨 후 저온(얼음 하)에서 30분 동안 인큐베이션 하였다. 세포 현탁액을 얼음 위에서 10 분 동안 초음파 처리하였다(5초 버스트와 5초 냉각 주기). 가공되지 않은 용해물은 4 ℃에서 30 분간 10,000g에서 원심 분리한 후 수득하였다. 단백질 농도는 Bradford 분석을 통해 결정하였다(Bradford, 1976). 자일로오스 탈수소효소(Xylose dehydrogenase)는 D-자일로오스의 산화를 촉매하고, 보조인자인 NAD<sup>+</sup>를 감소시켰다. 보조인자 감소로 형성된 NADH의 분광광도 측정을 통해 활성을 확인 하였다. 340 nm에서의 흡광도의 변화는 반응에서 소비된 D-자일로오스의 농도에 비례한다( $\epsilon_{\text{NADH}} = 6220\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ). 1ml의 반응 혼합물은 Tris HCl (50mM, pH 8.0), NAD<sup>+</sup> (100mM) 및 조세포 추출물 (10 $\mu$ l)을 함유한다. NAD<sup>+</sup>에서 NADPH로의 반응을 갖는 고유의 효소를 포화시키기 위하여 기질 D-자일로오스(10 mM)를 반응 혼합물을 37 ℃에서 30분 동안 배양 한 후 나중에 첨가하였다.

[0060] 참고예 1: CadC 변이체의 pH 민감성 설계 및 확인

[0061] Tetsch et al. (2008)은 아미노산 클러스터(F159 ~ 165)가 결실된 CadC는 주변 세포질 영역의 C-terminal 부분이 절단된 CadC1-215와 마찬가지로 낮은 pH 및 라이신 부재 하에 활성화될 수 있음이 알려져 있다. 이 두 라이신-독립적 CadC 변이체는 다른 변이체들 사이에서 상대적으로 높은 pH 감지 능력으로 인해 공학 대사 경로에서 잠재적인 세포의 pH 센서이다. 원칙적으로, 비유도 조건 하에서 H-NS는 cadBA 프로모터 영역 내에서 H-NS1, H-NS2, H-NS4 및 H-NS5의 4 개의 부위에 결합함으로써 억제자 복합물의 형성하며, 이는 cadBA 프로모터 영역 내에서 DNA의 루핑(looping) 및 RNA 폴리머라제에 대한 -35 / -10 결합 영역의 점유를 초래한다(Kuper and Jung 2005). 낮은 pH로 CadC를 활성화시키면 cad1 결합 부위에 결합하여 H-NS 분자를 방출하고 RNA 중합 효소가 비접화된 -35 / -10 부위에 결합함으로써 억제자 복합체가 불안정해진다. 이어서, 또다른 CadC는 cad2 결합 부위에 결합하여 cad1 결합된 CadC와 이합체를 형성하여 cadBA 오페론이 활성화된다.

[0062] 상기와 같은 CadC 막전위 전사 인자의 특성을 기초로 CadC 변이체의 발현 벡터(pH 센서)를 설계하고 확인하였다. 구체적으로, CadC<sub>v</sub>를 합성 유도제인 이소프로필 β-D-1-티오갈락토피라노시드(IPTG)를 첨가하지 않고도 구성적으로 만드는 lacI 억제자 및 lac 오퍼레이터가 없는 pRSETA 벡터에서 T7 프로모터 하류에 위치시키고, 반면에 리포터 단백질 sfGFP를 cadBA 프로모터의 하류에 위치하도록 설계하여 센서를 제작하였다(도 1a).

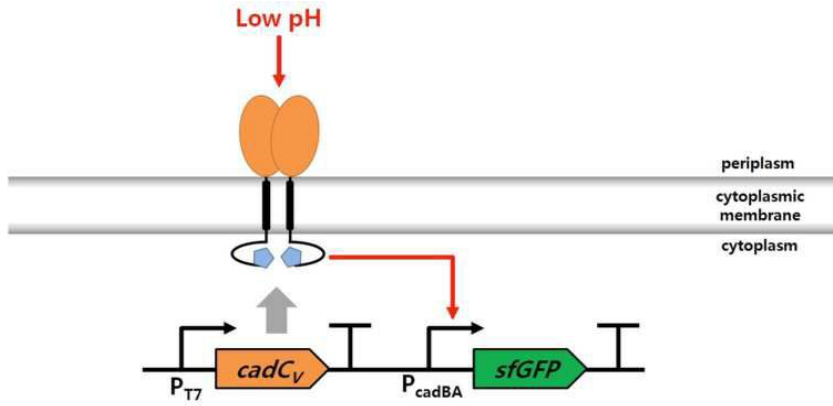
[0063] 그 결과, 도 1b 및 도 1c에서 확인할 수 있듯이, 제작된 발현 벡터(pH 센서)는 BLPH1의 경우 거의 5배 증가하고 BLPH2의 경우 1배 증가하는 것을 통해 낮아지는 pH에 반응하는 것을 확인할 수 있었다. 즉, 제작된 발현 벡터(pH 센서)는 낮아지는 pH 의존적인 전사 활성을 나타내어 표적 화합물의 생산을 최적화하는데 사용될 수 있는 산성 중간체를 포함하는 합성 대사 조절을 수행할 수 있음을 시사한다.

[0065] 실시예 1: 개량된 대장균에서 pH-의존적 자일론산의 생성

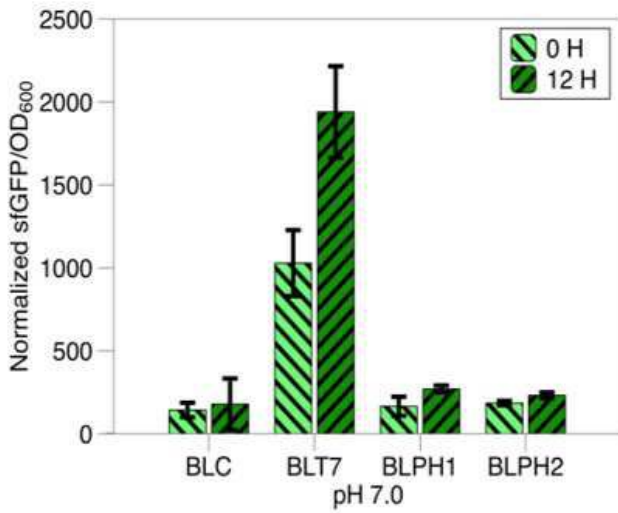
- [0066] 배지에서 자일론산 축적은 pH 저하에 의해 조작된 균주에서 스트레스 반응을 유도하며, 이는 최적의 성장 및 최적의 효소 기능에 부적합한 세포의 환경을 만들어 낮은 수율 및 생산성을 발생시킨다. 따라서 자일론산의 축적을 조절할 수 있는 pH 센서의 개발은 자일로스(xylose) 산화 경로에서 생산 역가와 수율을 최적화하는데 큰 가능성을 가지고 있다. 이것은 자일로오스를 자일론산으로 전환시키는 효소인 자일로오스 탈수소효소를 암호화하는 *xyIBcc* 유전자를 끄면 가능하다.
- [0067] 본 발명의 참고예 1로부터 확인한 바와 같이,  $CadC_{\Delta F159-165}$ 는  $CadC_{1-215}$ 와 비교하여 낮아지는 pH에 대한 우수한 반응을 나타내어 발현 벡터의 구성요소로 선택하였다. 자일론산에 의해 발생하는 낮아지는 pH에 대한 바이오 센서의 반응을 테스트하기 위한 발현 벡터(pH 센서; 유전자 회로)는 도 2a와 같이 제작하였다. 구체적으로,  $CadC_{\Delta F159-165}$ 는 프로모터 *lacIq* 하류에, *lacI* 유전자는 *cadBA* 프로모터 하류에 위치하도록 하였다. 또한, 각각 자일로오스 탈수소효소 및 xyloolactonase(효소는 자일로오스에서 자일론산으로의 전환에 관여한다)를 코딩하는 *xyIBcc*와 *xyIC* 유전자는 T7 프로모터의 하류에 위치하도록 하였다. 그 다음, 플라스미드를 BL21(DE3)  $\Delta xy1AB$ 로 형질 전환시켜 BLXAPH 균주에서 자일로오스 이성질화 효소 경로를 불안정화시켰다.
- [0068] 그 결과, 도 2b 및 도 2c에서 확인할 수 있듯이, 제작된 발현 벡터는 pH가 떨어지는 것에 대한 반응성을 나타내었고, 또한, 낮은 pH에서는 발현벡터(pH 센서)가 없는 BLXA 대조군 대비 자일론산 생성이 억제되었다. 이러한 결과는, 본 발명에 따른 회로가 자일로오스 산화 경로의 최적화를 위한 잠재적 도구로서 이용 가능함을 보여준다.
- [0070] **실시예 2: pH 센서에 의한 Dahms Pathway의 최적화**
- [0071] 합성 pH 센서가 어떻게 자일론산의 축적을 조절 하는지를 더 확인하기 위하여, 시험 플라스미드 및 대조 플라스미드로서 각각 플라스미드 pRBCPH 및 pRBC를 대장균 W3110 (DE3)  $\Delta xy1AB$ 로 형질 전환시킨 후, 자일로오스 산화 경로에 미치는 영향을 확인하였다.
- [0072] 그 결과, 도 3a 내지 도 3d에서 확인할 수 있듯이, 발현 벡터(pH 센서)를 자일로오스 산화 경로에 통합시킴으로써 성공적으로 자일론산의 축적을 낮추었으며, 발효를 통해 배지의 pH를 6.0 이상으로 유지 시켰으며, 효과적으로 바이오매스를 증가시켰다. 이는 본 발명에 따른 발현 벡터(pH 센서)의 효과에 기인한 것이며, 이러한 결과는 발현 벡터(pH 센서)가 Dahms Pathway를 최적화하는 효과적인 도구가 될 수 있음을 시사한다.
- [0074] **실시예 3: 순환 피딩 실험**
- [0075] 이중 경로의 정확한 제어 및 조절을 시험하기 위해, 균주 EWXAPH를 순환 피딩 실험 하였다. 36 시간마다 자일로오스  $4gL^{-1}$ 을 첨가하고, 샘플은 기질의 첨가 전후에 수집 하였다. 이 실험에서, 결과는 자일론산 축적 단독으로부터 유도된 낮은 pH에 대한 발현 벡터(pH 센서)의 감도를 나타냈다.
- [0076] 그 결과, 도 4a 및 도 4b에서 확인할 수 있듯이, 바이오 센서의 반응은 자일로오스 탈수소효소 재발현(도 4b)의 성공적인 조절을 가능하게 하여 pH 수준을 조절한다(도 4a). 더욱이, 감소된 자일론산 축적은 실험 전반에 걸쳐 센서의 큰 가능성을 보여주었다.
- [0078] **실시예 4: pH 센서의 통합을 통한 에틸렌 글리콜의 효율적인 생산**
- [0079] 센서는 에틸렌 글리콜의 생산성을 확인 하기 위하여 추가로 적용되었다. 이 실험에서 배지는  $1gL^{-1}$  펩톤 및  $0.5gL^{-1}$  효모 추출물 및  $4gL^{-1}$  자일로오스를 포함하는 최소 배지 M9로 변경하였다. 본 발명에서는 Cabulong et al. (2016) E. coli W3110  $\Delta xy1AB\Delta yjgB\Delta aldA$  균주를 사용하였다. 플라스미드 pRBCPH 및 pAB (표 1) 모두 상기 균주로 형질 전환시켰으며, 이의 에틸렌 글리콜의 생산 결과는 도 5에 나타내었다.
- [0080] 그 결과, 도 5b 내지 도 5d에서 확인할 수 있듯이, 제작된 균주 EWEGPH는 배지에서 자일론산 염의 흔적이 거의 없고, 대조 균주와 비교하여 상대적으로 높은 에틸렌 글리콜의 생산성을 나타내었다.

도면

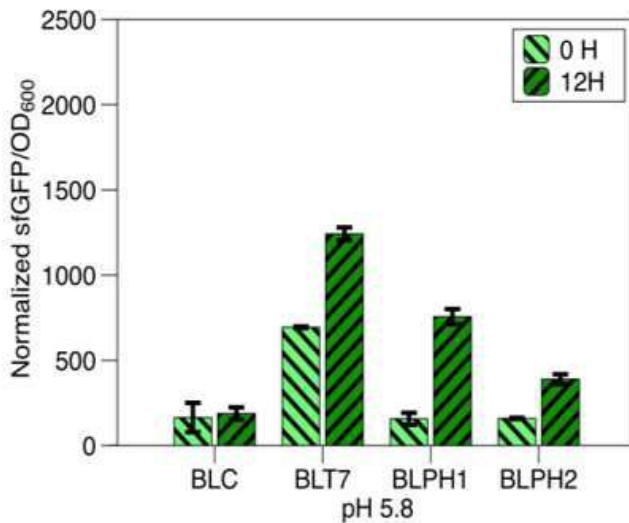
도면1a



도면1b

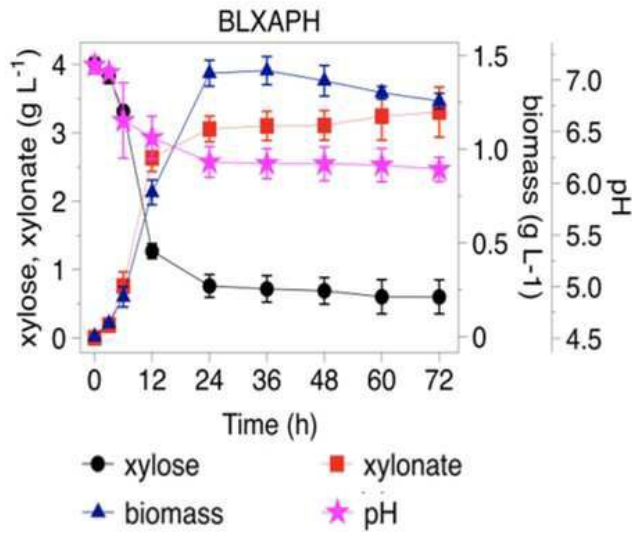


도면1c

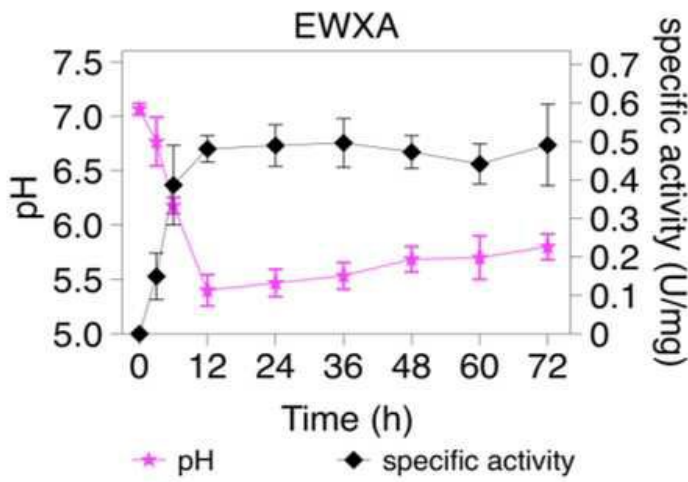




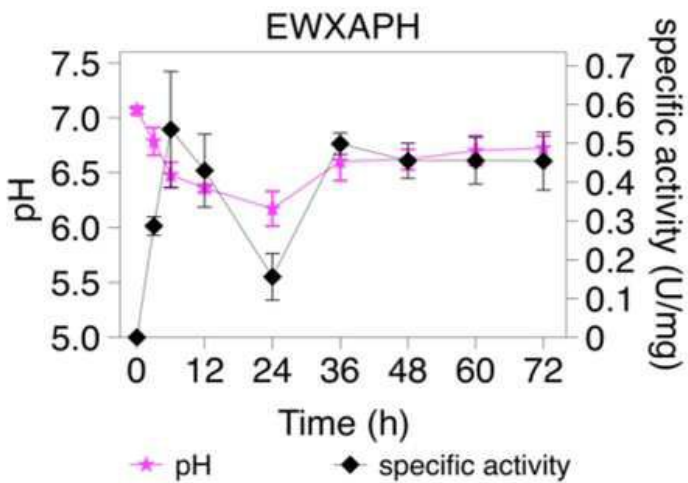
도면2c



도면3a

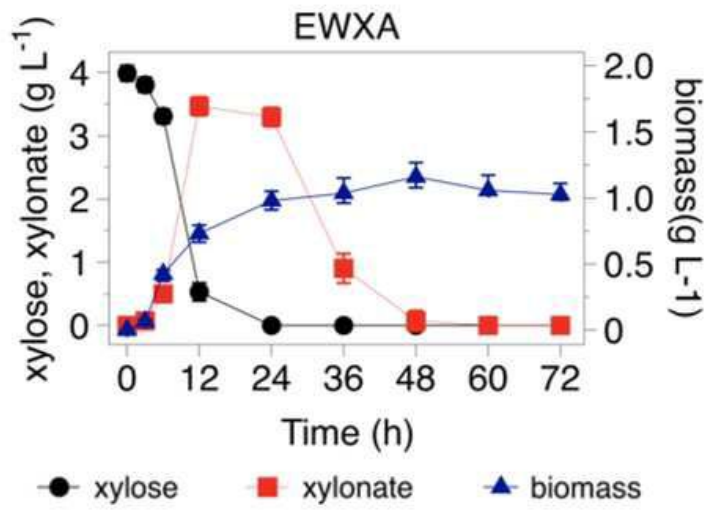


도면3b

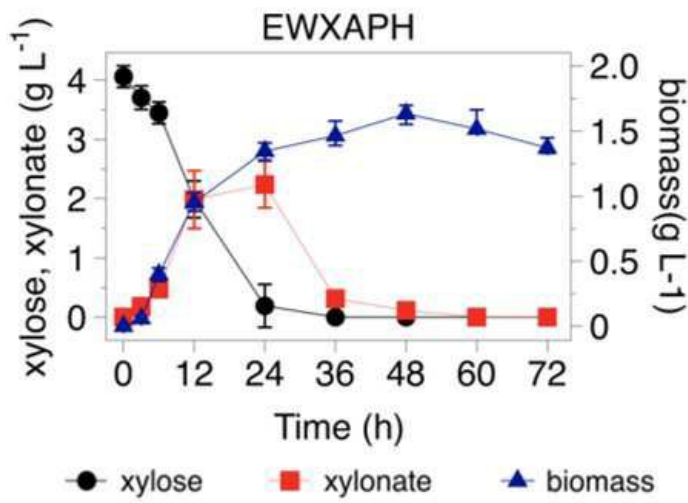




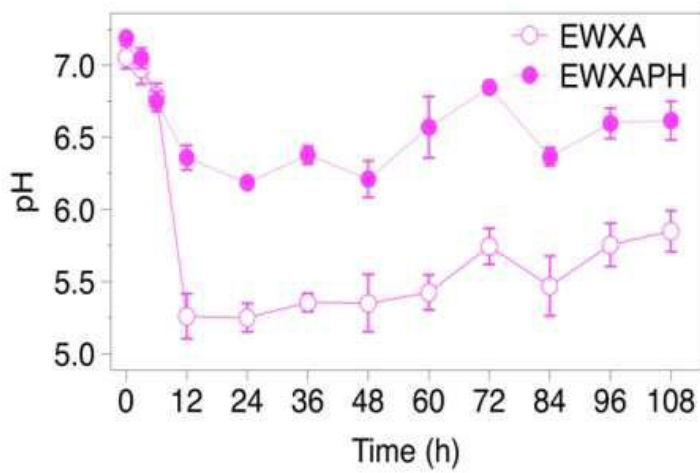
도면3c



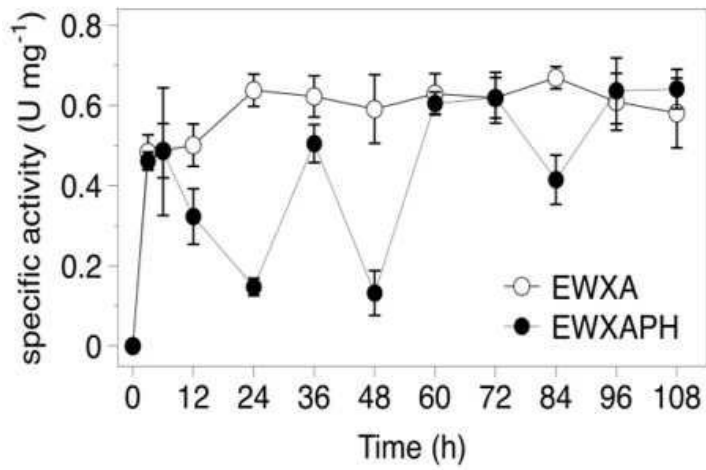
도면3d



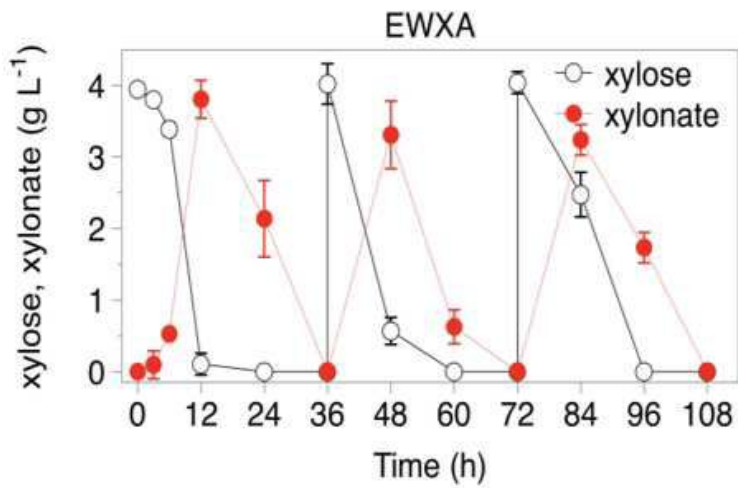
도면4a



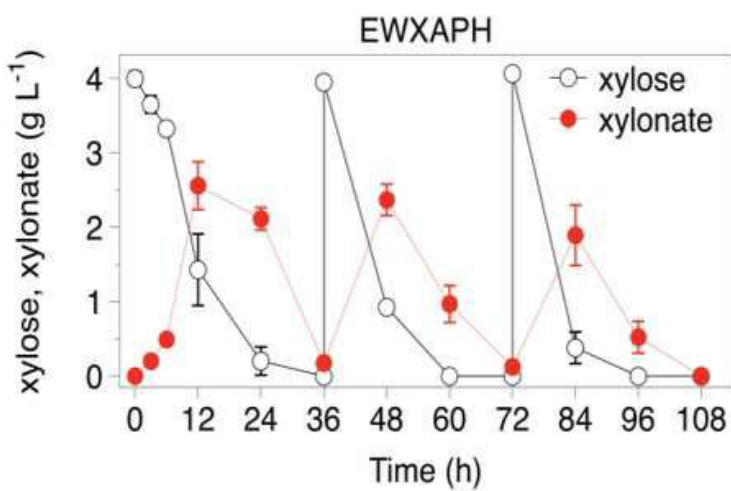
도면4b



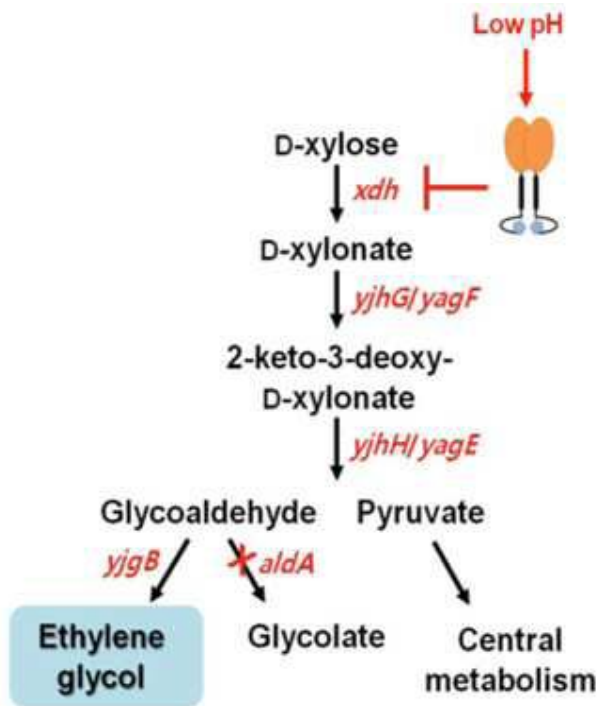
도면4c



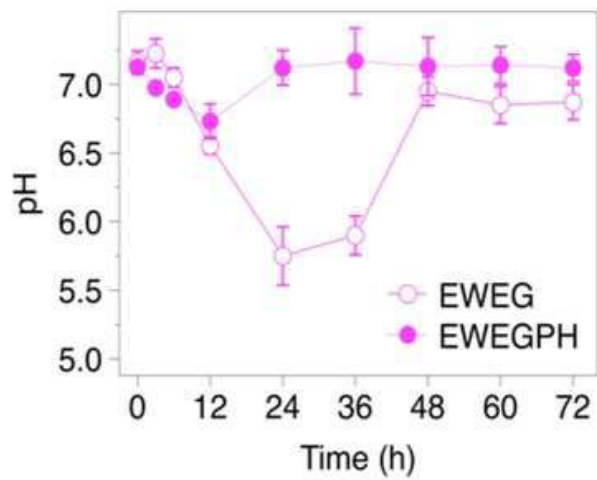
도면4d



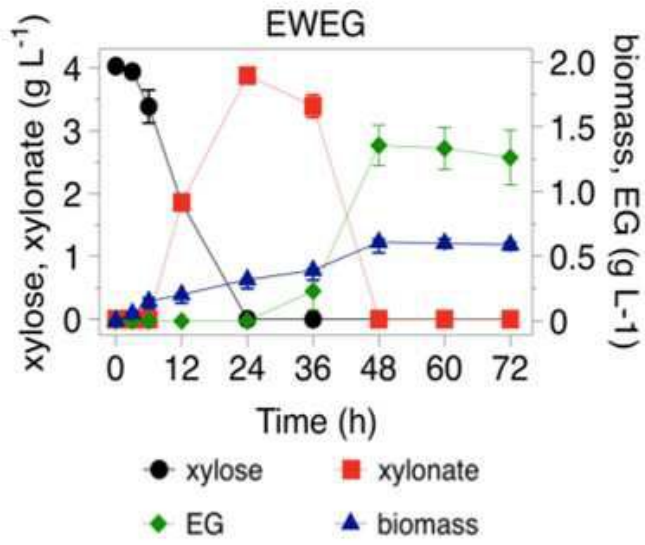
도면5a



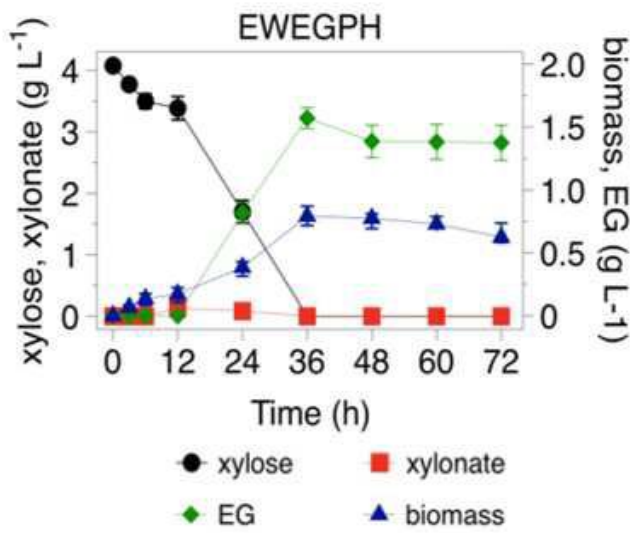
도면5b



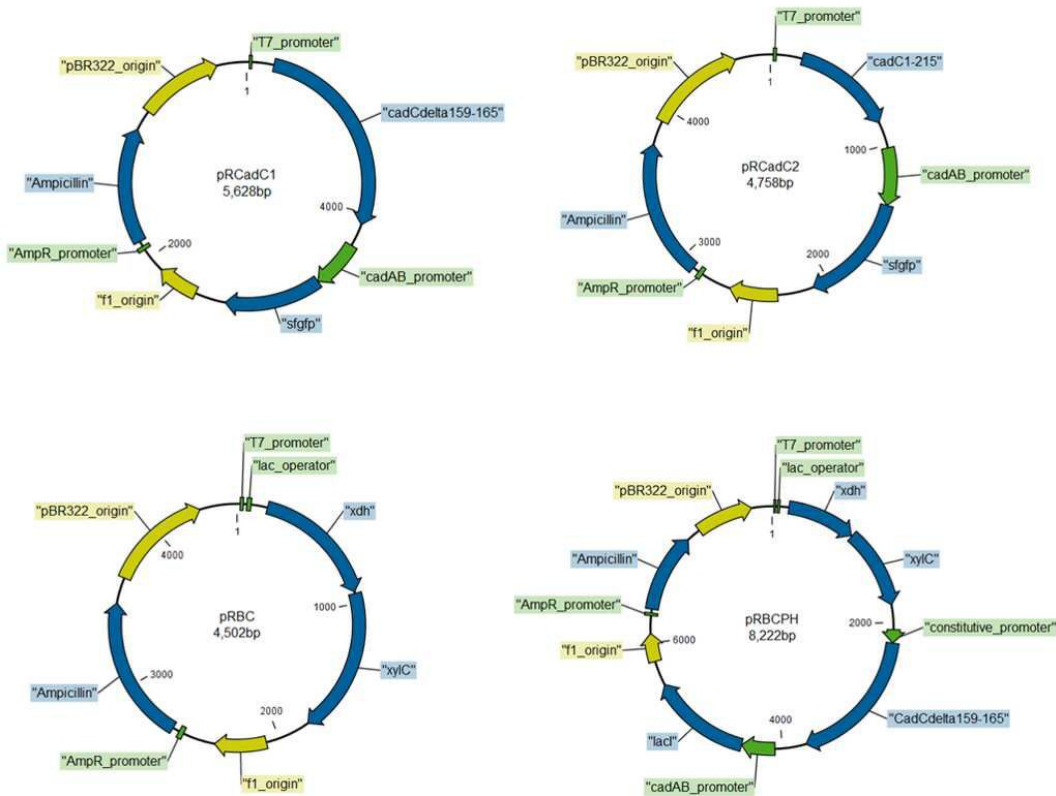
도면5c



도면5d



도면6



서열목록

- <110> MYONGJI UNIVERSITY INDUSTRY AND ACADEMIA COOPERATION FOUNDATION
- <120> EXPRESSION VECTOR FOR PRODUCING D-XYLOSE METABOLITES, TRANSFORMANT, AND BIOSENSOR FOR PH SENSING
- <130> P19-0014/MJU
- <150> KR 2019/0000712
- <151> 2019-01-03
- <160> 40
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 1539
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Nucleotide sequence of cadC WT
- <400> 1

atgcaacaac ctgtagtctg cgttggcgaa tggcttgta ctccgtccat aaaccaaatt 60

agccgcaatg ggcgtcaact tacccttgag ccgagattaa tcgatcttct ggttttcttt 120

gctcaacaca gtggcgaagt acttagcagg gatgaactta tcgataatgt ctggaagaga 180  
 agtattgtca ccaatcacgt tgtgacgcag agtatctcag aactacgtaa gtcatataaa 240  
 gataatgatg aagatagtc tgtctatata gctactgtac caaagcgcgg ctataaatta 300  
 atggtgccgg ttatctggta cagcgaagaa gagggagagg aaataatgct atcttcgcct 360  
 cccctatac cagagcgggt tctgccaca gattctcct cccacagtct taacattcaa 420  
 aacaccgcaa cgccacctga acaatccca gttaaaagca aacgattcac taccttttgg 480

glatggtttt ttttctgtt gtcgttaggt atctgtgtag cactggtagc gttttcaagt 540  
 ctgatacac gtcttctat gagcaaatcg cgtattttgc tcaatccacg cgatattgac 600  
 attaatatgg taataaaaag ttgtaacagc tggagtccc cgtatcagct ctcttacgcg 660  
 ataggcgtgg gtgatttggg ggcgacatca cttaacacct tctccacctt tatggtgcat 720  
 gacaaaaatca actacaacat tgatgaaccg agcagttccg gtaaaacatt atctattgcg 780  
 tttgttaatc agcgccaata ccgtgctcaa caatgcttta tgtcgataaa attggtagac 840  
 aatgcagatg gttcaacct gctggataaa cgttatgtca tcaactaacgg taatcagctg 900

gcgattcaaa atgatttact ggagagttaa tcaaaagcgt taaaccaacc gtggccacaa 960  
 cgaatgcagg agacgctcca gaaaattttg ccgcatcgtg gtgcgttatt aactaatttt 1020  
 tatcaggcac atgattattt actgcatggc gatgataaat cattgaaccg tgccagtgaa 1080  
 ttattaggtg agattgttca atcatcccca gaatttacct acgcgagagc agaaaaagca 1140  
 ttagttgata tcgtgcgcca ttctcaacat ctttagatg aaaaacaatt agcagcactg 1200  
 aacacagaaa tagataacat tgttacctg ccggaattga acaacctgtc cattatata 1260  
 caaataaaag cggtcagtc tctggtaaaa ggtaaaacag atgagtctta ccaggcgata 1320

aatactggca ttgatcttga aatgcctgg ctaaattatg tgttgcttgg caagtttat 1380  
 gaaatgaagg ggatgaaccg ggaagcagct gatgcatac tcaccgcctt taatttacgc 1440  
 ccaggggcaa acaccttta ctggattgaa aatggtatat tccagacttc tgttccttat 1500  
 gttgtacctt atctcgacaa atttcttgc tcaagaataa 1539

<210> 2  
 <211> 1518  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Nucleotide sequence of cadCdeltaF159-165  
 <400> 2  
 atgcaacaac ctgtagtctg cgttggcgaa tggcttgta ctccgtccat aaaccaatt 60

agccgcaatg ggcgtcaact tacccttgag ccgagattaa tcgatcttct ggttttcttt	120
gctcaacaca gtggcgaagt acttagcagg gatgaactta tcgataatgt ctggaagaga	180
agtattgtca ccaatcacgt tgtgacgcag agtatctcag aactacgtaa gtcattaaaa	240
gataatgatg aagatagtc tgtctatata gctactgtac caaagcgcgg ctataaatta	300
atggtgccgg ttatctggta cagcgaagaa gagggagagg aaataatgct atcttcgctt	360
ccccctatac cagaggcggg tcttcccaca gattctccct cccacagtct taacattcaa	420
aacaccgcaa cgccacctga acaatcccca gttaaaagca aacgattcac taccctgttg	480
tcgttaggta tctgtgtagc actggttagcg ttttcaagtc ttgatacacg tcttcctatg	540
agcaaatcgc gtatcttctt caatccacgc gatattgaca ttaatatggt aaataaaagt	600
tgtaacagct ggagttcccc gtatcagctc tcttacgcga taggcgtggg tgatttgggtg	660
gcgacatcac ttaacacctt ctccaccttt atggtgcatg acaaaatcaa ctacaacatt	720
gatgaaccga gcagttccgg taaaacatta tctattgcgt ttgttaatca gcgccaatac	780
cgtgctcaac aatgctttat gtcgataaaa ttggtagaca atgcagatgg ttcaaccatg	840
ctggataaac gttatgtcat cactaacggt aatcagctgg cgattcaaaa tgatttactg	900
gagagtttat caaaagcgtt aaaccaaccg tggccacaac gaatgcagga gacgctccag	960
aaaatcttgc cgcacgtgg tgcgttatta actaatcttt atcaggcaca tgattattta	1020
ctgcatggcg atgataaatc attgaaccgt gccagtgaat tattaggtga gattgttcaa	1080
tcatccccag aatttaccta cgcgagagca gaaaaagcat tagttgatat cgtgcgccat	1140
tctcaacatc cttagatga aaaacaatta gcgcaactga acacagaaat agataacatt	1200
gttacactgc cggaattgaa caacctgtcc attatatatc aaataaaagc ggtcagtgct	1260
ctggtaaaag gtaaacaga tgagtcttac caggcgataa atactggcat tgatcttgaa	1320
atgtcctggc taaattatgt gttgcttggc aaggtttatg aaatgaaggg gatgaaccgg	1380
gaagcagctg atgcataatc caccgccttt aatttacgcc caggggcaaa caccctttac	1440
tggattgaaa atggtatatt ccagacttct gttccttatg ttgtacctta tctcgacaaa	1500
tttcttgctt cagaataa	1518
<210> 3	
<211> 648	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Nucleotide sequence of cadC1-215	
<400> 3	

atgcaacaac ctgtagtctg cgttggcga tggcttgta ctccgtccat aaaccaaatt 60

agccgcaatg ggcgtcaact tacccttgag cggagattaa tcgatcttct ggttttcttt 120

gctcaacaca gtggcgaagt acttagcagg gatgaactta tcgataatgt ctggaagaga 180

agtattgtca ccaatcacgt tgtgacgcag agtatctcag aactacgtaa gtcattaaaa 240

gataatgatg aagatagtc tgtctatct gctactgtac caaagcgcgg ctataaatta 300

atggtgccgg ttatctggta cagcgaagaa gagggagagg aaataatgct atcttcgcct 360

ccccctatac cagaggcggg tcttccaca gattctccct cccacagtct taacattcaa 420

aacaccgcaa cgccacctga acaatcccca gttaaaagca aacgattcac taccttttgg 480

glatggtttt ttttctggt gtcgttaggt atctgtgtag cactggtagc gttttcaagt 540

cttgatacac gtcttctat gagcaaatcg cgtattttgc tcaatccacg cgatattgac 600

attaatatgg taataaaaag ttgtaacagc tggagtccc cgtattaa 648

<210> 4

<211> 364

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleotide sequence of cadAB promoter

<400> 4

gtaactccgg gttgattat gctcggaaat atttgttgtt gagtttttgt atgttctctg 60

tggtataata tgttgcggca atttatttgc cgcataattt ttattacata aatttaacca 120

gagaatgtca cgcaatccat tgtaaacatt aaatgtttat cttttcatga tatcaacttg 180

cgatcctgat gtgttaataa aaaacctcaa gttctcactt acagaaactt ttgtgttatt 240

tcacctaate tttaggatta atcctttttt cgtgagtaat cttatcgcca gtttggctctg 300

gtcaggaaat agttatacat catgaccggg actcceaatt caaaaatgaa attaggagaa 360

gagc 364

<210> 5

<211> 747

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleotide sequence of xylBCc

<400> 5

atgtcctcag ccatctatcc cagcctgaag ggcaagcgcg tcgtcatcac cggcggcggc 60



tcgggcatcg gggccggcct caccgccggc ttcccccgtc agggcgcgga ggtgatcttc 120  
 ctcgacatcg ccgacgagga ctccagggct cttgaggccg agctggccgg ctcgccgatc 180  
 ccgccggtct acaagcgtcg cgacctgatg aacctcgagg cgatcaagc ggtcttcgcc 240  
 gagatcggcg acgtcgactg gctggtaaac aacgccgga atgacgaccg ccacaagctg 300  
 gccgactga ccggcgccta ttgggacgag cggatcaacg tcaacctgcg ccacatgctg 360  
 ttctgcacc aggccgtcgc gccgggcatg aagaagcgtg gcggcggggc ggtgatcaac 420

ttcggttca tcagctggca cctggggctt gaggacctcg tcctctacga aaccgccaag 480  
 gccggcatcg aaggcatgac ccgcccgtcg gccccgggagc tgggtcccga cgacatccgc 540  
 gtcacctgcg tggtgccggg caacgtcaag accaagcgc aggagaagtg gtacacgccc 600  
 gaaggcgagg ccagatcgt ggccgcccga tgctgaagg gccgcatcgt cccggagaac 660  
 gtcccgccgc tgggtctgtt cctggcctcg gatgacgctg cgctctgcac cggccacgaa 720  
 tactggatcg acgccggctg gcgttga 747

<210> 6  
 <211> 870  
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleotide sequence of xylCCc

<400> 6

atgaccgcgc aggttacctg cgtttgggac ctgaaagcga ccctgggtga aggtccgatc 60  
 tggcacgggt acacctgtg gttcgttgac atcaaacagc gtaaaatcca caactaccac 120  
 ccggcgaccg gtgaacgtt ctctttcgac gcgccgacc aggttacctt cctggcgcgg 180  
 atcgttgggt cgaccggtt cgttgttggc ctgaaaaccg gtatccaccg ttccaccgg 240  
 gcgaccggtt tcctctgct gctggaagt gaagacgcgg cgctgaacaa ccgtccgaac 300  
 gacgcgaccg ttgacgcga gggctgtctg tggttcggca ctatgcacga cggtaagaa 360

aacaactctg gttctctgta ccgtatggac ctgaccggtg ttgcgcgat ggaccgtgac 420  
 atctgcatca ccaacggtcc gtgcgtttct ccggacggta aaaccttcta ccacaccgac 480  
 acctggaaa aaaccatcta cgcgttcgac ctggcgggaag acggtctgct gtctaacaaa 540  
 cgtgttttcg ttcagttcgc gctgggtgac gacgtttacc cggacggttc tgttgttgac 600  
 tctgaagggt acctgtggac cgcgctgtgg ggtggtttcg gtgcggttcg tttctctccg 660  
 cagggtgacg cggttaccgg tatcgaactg ccggcgcgga acgttacaa accgtgcttc 720  
 ggtggtccgg acctgaaaac cctgtacttc accaccgcgc gtaaaggtct gtctgacgaa 780

accctggcgc agtaccgcct ggcgggtggt gttttcgcgg ttccggttga cgttgcgggt 840  
cagccgcagc acgaagttcg tctggtttaa 870  
<210> 7  
<211> 1020  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Nucleotide sequence of yjgB  
<400> 7  
atgtcgatga taaaaagcta tgcccaaaa gaagcgggcg gcgaactgga agtttatgag 60  
tacgatcccg gtgagctgag gccacaagat gttgaagtgc aggtggatta ctgcgggatc 120  
tgccattccg atctgtcgat gatcgataac gaatggggat tttcacaata tccgctggtt 180  
  
gccgggcatg aggtgattgg gcgctgtggtg gcactcggga gcgcccgcga ggataaaggt 240  
ttgcaggctcg gtcagcgtgt cgggattggc tggacggcgc gtagctgtgg tcaactgcgac 300  
gcctgtatta gcgtaatca gatcaactgc gagcaagtg cggtgccgac gattatgaat 360  
cgcggtggct ttgccgagaa gttgcgtgcg gactggcaat ggggattcc actgccagaa 420  
aatattgata tcgagtccgc cgggccgctg ttgtcggcg gtatcacggt ctttaaacca 480  
ctgttgatgc accatatcac tgctaccagc cgcgttgggg taattggtat tggcgggctg 540  
gggcatatcg ctataaaact tctgcacgca atgggatgcg aggtgacagc ctttagttct 600  
  
aatccggcga aagagcagga agtgcctggcg atgggtgccg ataaagtgt gaatagccgc 660  
gatccgcagg cactgaaagc actggcgggg cagtttgatc tcattatcaa caccgtcaac 720  
gtcagcctcg actggcagcc ctattttgag gcgctgacct atggcggtaa tttccatagc 780  
gtcggtgccg ttctcacgcc gctgtctgtt ccggccttta cgttaattgc gggcgatcgc 840  
agcgtctctg gtictgctac cggcacgcct tatgagctgc gtaagctgat gcgttttgcc 900  
gcccgcagca aggttgccgc gaccaccgaa ctgttcccga tgtcgaaaat taacgacgcc 960  
atccagcatg tgcgacgag taagcgcgct taccgcgtgg tgttgaaagc cgatTTTTga 1020  
  
1020  
<210> 8  
<211> 720  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Nucleotide sequence of sfgfp  
<400> 8

atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac 60  
 ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg cgcggcgagg gcgagggcga tgccaccaac 120  
 ggcaagctga cctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc 180  
 ctcgtgacca cctgaccta cggcgtgcag tgcttcagcc gctaccccga ccacatgaag 240

cgccacgact tcttcaagtc cgccatgcc gaaggctacg tccaggagcg caccatcagc 300  
 ttcaaggacg acggcaccta caagaccgc gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg 360  
 gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac 420  
 aagctggagt acaacttcaa cagccacaac gtctatatca ccgccgacaa gcagaagaac 480  
 ggcatcaagg ccaacttcaa gatccgccac aacgtggagg acggcagcgt gcagctcgcc 540  
 gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac 600  
 tacctgagca cccagtcggt gctgagcaaa gaccccaacg agaagcgcga tcacatggtc 660

ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actcacggca tggacgagct gtacaagtaa 720  
 720

- <210> 9
- <211> 52
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> 1CadCdelta159-165/1-215 (forward primer)

<400> 9  
 tgacgataag gatcgatggg atgcaacaac ctgtagtctg cgttggcgaa tg 52

- <210> 10
- <211> 46
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> 1CadCdelta159-165 (reverse primer)

<400> 10  
 acgacaacag ggtagtgaat cgtttgcttt taactgggga ttgttc 46

- <210> 11
- <211> 40
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> 2CadCdelta1 59-165 (forward primer)

<400> 11  
attcactacc ctgttgcgt taggtatctg ttagcactg 40

<210> 12  
<211> 43  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> 2CadCdelta159-165 (reverse primer)  
<400> 12  
aattccatgg ttattctgaa gcaagaaatt tgtcgagata agg 43

<210> 13  
<211> 39  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> T7 Terminator for CadCdelta159-165 (forward primer)  
<400> 13  
ttcagaataa ccatggaatt cgaagcttga tccggctgc 39

<210> 14  
<211> 59  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> CadC1-215 (reverse primer)  
<400> 14  
aattccatgg ttaatacggg gaactccagc tgttacaact tttatttacc atattaatg 59

<210> 15  
<211> 39  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> T7-Terminator for CadC1-215 (reverse primer)  
<400> 15  
cccgatttaa ccatggaatt cgaagcttga tccggctgc 39

<210> 16  
<211> 42  
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> T7-Terminator for CadCdelta159-165/1-215 (reverse primer)

<400> 16

ccggagttac ttcgctatta cgccagatcc ggatatagtt cc 42

<210> 17

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CadABp (forward primer)

<400>

> 17

taatagcgaa gtaactccgg gttgatttat gctcggaat atttg 45

<210> 18

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CadABp (reverse primer)

<400> 18

tgctcacat gctcttctcc taatttcatt tttgaattg gag 43

<210> 19

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sfGFP (forward primer)

<400> 19

ggagaagagc atggtgagca agggcgagga gctgttcac 39

<210> 20

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sfGFP (reverse primer)

<400> 20

ctttgttagc agccgatca ttacttgtag agctcgcca tgccgtgag 49

<210> 21

<211> 63  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> lac0-xdh control (forward primer)  
 <400> 21  
 gagaccacaa cggtttccct ggaattgtga gcggataaca attcccctct agaaataatt 60  
 ttg 63  
 <210> 22  
 <211> 32  
  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> lac0-xdh control (reverse primer)  
 <400> 22  
 ttctctctgt tcaacgcca cccgcgtcga tc 32  
 <210> 23  
 <211> 31  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> xylC control (forward primer)  
 <400> 23  
 ttggcgttga acaggaggaa tgaccgcgca g 31  
 <210> 24  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> xylC control (reverse primer)  
  
 <400> 24  
 agctgcagat ctcgagctcg ttaaaccaga cgaacttctg gctgc 45  
 <210> 25  
 <211> 47  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> xdh-xylC (forward primer)

<400> 25  
gagaccacaa cggtttcct atgtcttctg cgatctacc gtctctg 47

<210> 26  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> xdH-xylC (reverse primer)  
<400> 26  
gatcccatc gattcaacgc caaccgcgt cgatc 35

<210>  
> 27  
<211> 39  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> T7 Terminator (forward primer)  
<400> 27  
ttggcgttga atcgatgggg atccgagctc gagatctgc 39

<210> 28  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> T7 Terminator (reverse primer)  
<400> 28  
acggtgaaaa gccgctacag ggcgcgtccc 30

<210> 29  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> lacIq Promoter (forward primer)  
<400> 29  
ctgtagcggc ttttcaccgt catcaccgaa ac 32

<210> 30  
<211> 34  
<212> DNA

<213> Artificial Sequence  
 <220><223> lacIq Promoter (reverse primer)  
 <400> 30  
 caggttggtg catcctgaat tgactctctt ccgg 34  
 <210> 31  
 <211> 31  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> CadCdeltaF159-165 (forward primer)  
 <400> 31  
 tcaattcagg atgcaacaac ctgtagttcg c 31  
  
 <210> 32  
 <211> 43  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> CadCdeltaF159-165 (reverse primer)  
 <400> 32  
 ggcaaattct ttattctgaa gcaagaaatt tgcgagata agg 43  
 <210> 33  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> rrnB Terminator (forward primer)  
 <400> 33  
 ttcagaataa agaatttgcc tggcggcagt ag 32  
 <210> 34  
 <211> 41  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> rrnB Terminator (reverse primer)  
 <400> 34  
 agctgcagat ctcgagctcg aacgcaaaaa ggccatccgt c 41  
 <210> 35



<211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> pacM4 without lacI (forward primer)  
 <400> 35  
 aattgcgttg ggtgtccggg atctcgacgc 30  
 <210> 36  
 <211> 46  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> pacM4 without lacI (reverse primer)  
 <400> 36  
 cccggacacc caacgaatt aatgtaagt agtcactca ttaggc 46  
  
 <210> 37  
 <211> 41  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> pacM4 for yjgB (forward primer)  
 <400> 37  
 attcaccacc ctgaattgac tctcttccgg gcgctatcat g 41  
 <210> 38  
 <211> 41  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> pacM4 for yjgB (reverse primer)  
 <400> 38  
 gcgcaacgca attaatgtaa gttagctcac tcattaggca c 41  
 <210> 39  
 <211> 70  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223>  
 > yjgB (forward primer)  
 <400> 39

ccggaagaga gtcaattcag ggtggtgaat atgtcgatga taaaaagcta tgccgcaaaa	60
gaagcgggcg	70
<210> 40	
<211> 70	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> yjgB (reverse primer)	
<400> 40	
gtgagctaac ttacattaat tgcgttgcg tcaaaaatcg gctttcaaca ccacgcgta	60
acgcgcctta	70