



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년01월19일  
(11) 등록번호 10-1484108  
(24) 등록일자 2015년01월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 15/70 (2006.01) C12N 1/21 (2006.01)  
C12N 15/31 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2012-0091894  
(22) 출원일자 2012년08월22일  
심사청구일자 2012년08월22일  
(65) 공개번호 10-2014-0025785  
(43) 공개일자 2014년03월05일  
(56) 선행기술조사문헌  
KR1020120092335 A\*  
Parisutham Vinuselvi 등. Appl Microbiol  
Biotechnol. Vol. 92, No. 1, 페이지 125-132  
(2011)\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
국립대학법인 울산과학기술대학교 산학협력단  
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50  
(72) 발명자  
이성국  
울산 울주군 범서읍 구영로 75-9, 301동 203호 (우미린1차아파트)  
파리수탐 비누셀비  
울산광역시 울주군 언양읍 반연리 산 100번지  
(74) 대리인  
제일특허법인

전체 청구항 수 : 총 2 항

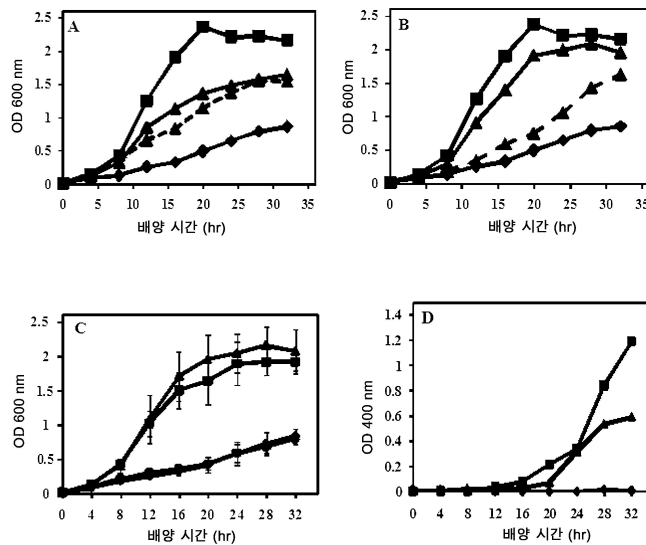
심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 **ascB 또는 chbF 유전자의 과발현을 통해 셀로바이오스의 이용률이 증가되고 셀로바이오스 및 기타 당을 동시에 이용할 수 있는 변이미생물을 제조하는 방법**

(57) 요약

본 발명은 *ascB* 또는 *chbF* 유전자의 과발현을 통해 셀로바이오스의 이용률이 증가되고 셀로바이오스 및 기타 당, 예컨대 자일로스를 동시에 이용할 수 있는 변이미생물을 제조하는 방법, 상기 방법에 의해 제조된 미생물 및 이를 이용하여 바이오연료, 생리활성기능물질, 의약품 물질, 화학산업 기반 화학물질 등을 제조하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 변이미생물은 야생형 미생물과는 달리 셀로바이오스의 이용률이 증가될 뿐만 아니라 자일로스, 만노스 및 갈락토스로 이루어진 균으로부터 선택되는 당과 셀로바이오스를 동시에 이용할 수 있으므로, 이를 이용하면 효소당화공정에 효소를 사용하지 않고 셀룰로오스와 자일로스를 동시에 발효시켜 바이오매스로부터 바이오연료, 생리활성기능물질, 의약품 물질, 화학산업 기반 화학물질 등을 생산할 수 있는 바, 비용, 효율 및 용이성 면에서 뛰어나다.

대표도 - 도8



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0002975  
 부처명 교육과학기술부  
 연구관리전문기관 한국연구재단  
 연구사업명 기본연구지원사업  
 연구과제명 뷰탄올 및 지방산 유래 바이오 연료 생산을 위한 맞춤형 인공미생물제작  
 기여율 1/2  
 주관기관 국립대학법인 울산과학기술대학교 산학협력단  
 연구기간 2011.05.01 ~ 2012.04.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0030396  
 부처명 교육과학기술부  
 연구관리전문기관 한국연구재단  
 연구사업명 기후변화대응 기초원천기술개발  
 연구과제명 SSF 맞춤형 인공미생물 이용 바이오매스의 바이오연료전환 기술연구  
 기여율 1/2  
 주관기관 국립대학법인 울산과학기술대학교 산학협력단  
 연구기간 2011.09.30 ~ 2012.09.29

---

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

야생형 대장균의 *ascB* 및 *chbF*로 이루어진 군에서 선택되는 포스포-β-글루코시다아제를 코딩하는 유전자를 과 발현시키는 단계를 포함하는, 셀로바이오스의 이용률이 증가되고 자일로스, 만노스 및 갈락토스로 이루어진 군으로부터 선택되는 당과 셀로바이오스를 동시에 이용할 수 있는 변이대장균을 제조하는 방법.

**청구항 2**

삭제

**청구항 3**

야생형 대장균의 *ascB* 유전자가 과발현된 것을 특징으로 하는, 셀로바이오스의 이용률이 증가되고 자일로스, 만노스 및 갈락토스로 이루어진 군으로부터 선택되는 당과 셀로바이오스를 동시에 이용할 수 있는 변이대장균.

**청구항 4**

삭제

**청구항 5**

삭제

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 *ascB* 또는 *chbF* 유전자의 과발현을 통해 셀로바이오스의 이용률이 증가되고 셀로바이오스 및 기타 당, 예컨대 자일로스를 동시에 이용할 수 있는 변이미생물을 제조하는 방법에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 석유 화학 연료가 고갈됨에 따라 세계 각국에서는 대체 에너지에 상당한 관심을 쏟고 있다. 이러한 대체 에너지로서의 연료용 에탄올은 섬유소계(cellulose) 바이오매스로부터 전환될 수 있는데, 이 섬유소계 바이오매스는 광합성을 통해 고정되어 매년 방대한 양이 얻어질 수 있고 재생가능하다는 점에서 기능적으로나 경제적으로 매우 유리한 물질이다. 현재 섬유소계 바이오매스 중 많이 이용되고 있는 물질로는 목질계(lignocellulose) 바이오매스가 있으며, 이에 포함된 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스 및 리그닌을 효율적으로 분해시키는 방법과 새로운 균주의 탐색 및 당화발효 공정에 많은 연구가 집중되어 있다.

[0003] 섬유소계 연료 생산에 있어 주요 단계는 i) 적어도 3가지 효소(엔도글루카나아제, 엑소글루카나아제 및 β-글루카나아제)를 이용한 바이오매스의 효소 당화 공정과 ii) 얻어진 당류의 미생물 발효 공정으로 나눌 수 있다. 최근에는 효소 당화 공정과 발효 공정을 한 반응기에서 동시에 수행하여 시설 비용과 효소의 억제 작용을 감소시켜 에탄올 생산 효율을 증가시킨 동시당화발효(simultaneous saccharification and fermentation, SSF) 방법이 많이 연구되고 있다. 또한, 위 과정 중 효소적 당화 과정이 가장 비용이 많이 들기 때문에 당화에 사용되는 상기 효소의 기능을 향상시키거나 이의 사용을 절감하기 위하여 이를 생산하는 발효 균주의 개발을 모색하고 있다. 특히 최근 유전 공학 기술을 이용하여 당화 관련 효소의 유전자를 발효균주에 도입하여 이를 생산하게 함으로써 당화와 발효를 동시에 수행할 수 있는 균주를 개발하고 있다. 하지만, 당화 관련 유전자와 같은 외래 유전자의 발현 효율이 매우 낮으며 또한 과발현시 세포 성장과 대사에 부정적인 영향을 미치는 문제가 있다. 따라서, 외래 유전자를 도입하는 것보다 발효 균주 내의 내생 경로의 조절을 변형시키는 것에 관심이 옮겨지고 있다.

- [0004] 대장균을 포함하는 미생물은 목질계 연료 생산을 위한 효율적인 수단으로 받아들여지고 있는데, 그 이유는 바이오매스의 가수분해산물 내에 존재하는 모든 당을 이용할 수 있기 때문이다. 하지만, 가수분해산물 내에 선호되는 당류(예: 글루코스)가 존재하는 경우 그 외의 탄소원을 이용하는데 요구되는 효소의 생합성이 억제되는 현상인, 탄소원 이화물 억제(carbon catabolite repression, CCR)로 인해 미생물의 잠재성이 제한된다. 가수분해산물 내에 존재하는 자일로스 및 아라비노오스와 같은 당류는 글루코스가 완전히 고갈될 때까지 대사될 수 없다. 이 글루코스 선호 이용은 발효 공정을 방해하여 효율을 감소시키고 이용되지 않은 탄소원의 축적으로 인해 하위 공정에 영향을 미친다. 목질계 가수분해산물로부터 얻어지는 당 혼합물의 조성은 매우 가변적이며, 주된 당은 글루코스와 자일로스이다. 따라서, 섬유소계 연료 생산의 비용, 효율 및 용이성을 개선하기 위해서는, 상기 당을 동시에 이용할 수 있는 변이미생물의 개발이 요구된다.
- [0005] 야생형(wild-type) 대장균은 셀로바이오스를 이용할 수 없지만 셀로바이오스를 단일 탄소원으로 하는 최소 셀로바이오스 배지에서 일정기간 동안 배양하는 경우 셀로바이오스 이용 표현형(phenotype)을 획득하는 것으로 보고되었다(Kachroo AH *et al.*, *Molecular Microbiology*, 66(6), 1382-1395, 2007). 셀로바이오스 이용 표현형은 두 가지 잠재적 오페론인 *chb* 또는 *asc*의 변이와 연관된 것으로 밝혀졌다.
- [0006] *chb* 오페론은 포스포에놀피루베이트 의존성 포스포트랜스퍼라아제(*chbBCA*), 가수분해효소(*chbF*), 이중 활성인자/조절인자(*chbR*) 및 기능이 알려져 있지 않은 단백질(*chbG*)을 암호화한다. 이 오페론은 세 가지 단백질인 ChbR, NagC, 및 이화물 활성인자 단백질(CAP)에 의해 조절된다. ChbR은 AraC 계열의 조절인자로서 *chb* 오페론의 이중 활성인자 및 억제인자로 작용한다. NagC는 *chb* 프로모터 내의 두 부위에 결합하여 RNA 폴리머라아제가 프로모터에 접근하는 것을 방해함으로써 억제인자로 작용한다. CAP는 RNA 폴리머라아제가 프로모터에 결합하는 것을 촉진시키는 활성인자로서 작용한다. 상기 *chb* 오페론은 키토바이오스를 이용하는데 작동될 수 있지만, 셀로바이오스를 이용하는 데는 아직 잠재적이다(Kachroo AH *et al.*, *Molecular Microbiology*, 66(6), 1382-1395, 2007; Plumbridge J, Pellegrini O, *Molecular Microbiology*, 52:437-449, 2004). 이는 셀로바이오스가 전사 활성인자인 ChbR 및 NagC를 통해 프로모터를 유도할 수 없기 때문이다. ChbR은 셀로바이오스를 인식할 수 없기 때문에, NagC 억제를 제거하거나 프로모터를 유도할 수 없다.
- [0007] 한편, 또 다른 잠재적 오페론인 *asc*는 포스포-β-글루코시다아제(AscB) 및 전달자 단백질(AscF)을 암호화한다. 상기 잠재적 *asc* 오페론은 IS 삽입에 의해 입증된 바와 같이, 조절 유전자(*ascG*)의 불활성화를 통해 활성화될 수 있다(Hall BG and Xu L, *Mol. Biol. Evol.*, 9:688-706; Hall BG, *Genetica*, 107:181-187).
- [0008] 본 발명자들은 *chb* 및 *asc* 오페론에 관해 연구하던 중, 야생형 미생물의 *ascB* 또는 *chbF* 유전자를 과발현시킴으로써 셀로바이오스 및 기타 당을 동시에 이용할 수 있게 할 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0009] 따라서, 본 발명의 목적은 셀로바이오스의 이용률이 증가되고 자일로스, 만노스 및 갈락토스로 이루어진 균으로부터 선택되는 당과 셀로바이오스를 동시에 이용할 수 있는 변이미생물을 제조하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 다른 목적은 상기 방법에 따라 변이된 셀로바이오스의 이용률이 증가되고 자일로스, 만노스 및 갈락토스로 이루어진 균으로부터 선택되는 당과 셀로바이오스를 동시에 이용할 수 있는 변이미생물을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 변이미생물을 이용하여 바이오매스로부터 생산된 바이오연료, 생리활성기능물질, 의약품 물질 또는 화학산업 기반 화학물질을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

- [0012] 상기 목적에 따라, 본 발명은 야생형 미생물의 *ascB* 또는 *chbF* 유전자를 과발현시키는 단계를 포함하는, 셀로바이오스의 이용률이 증가되고 자일로스, 만노스 및 갈락토스로 이루어진 균으로부터 선택되는 당과 셀로바이오스를 동시에 이용할 수 있는 변이미생물을 제조하는 방법을 제공한다.
- [0013] 상기 다른 목적에 따라, 본 발명은 야생형 미생물의 *ascB* 또는 *chbF* 유전자가 과발현된 것을 특징으로 하는, 셀로바이오스의 이용률이 증가되고 자일로스, 만노스 및 갈락토스로 이루어진 균으로부터 선택되는 당과 셀로바이오스를 동시에 이용할 수 있는 변이미생물을 제공한다.
- [0014] 상기 또 다른 목적에 따라, 본 발명은 야생형 미생물의 *ascB* 또는 *chbF* 유전자가 과발현된 변이미생물을 이용하여, 바이오매스로부터 생산된 바이오연료, 생리활성기능물질, 의약품 물질 또는 화학산업 기반 화학물질을 제공한다.

**발명의 효과**

- [0015] 본 발명에 따른 변이미생물은 야생형 미생물과는 달리 셀로바이오스의 이용률이 증가될 뿐만 아니라 자일로스, 만노스 및 갈락토스로 이루어진 균으로부터 선택되는 당과 셀로바이오스를 동시에 이용할 수 있으므로, 이를 이용하면 효소당화공정에 효소를 사용하지 않고 셀룰로오스와 자일로스를 동시에 발효시켜 바이오매스로부터 바이오연료, 생리활성기능물질, 의약품 물질, 화학산업 기반 화학물질 등을 생산할 수 있는 바, 비용, 효율 및 용이성 면에서 뛰어나다.

**도면의 간단한 설명**

- [0016] 도 1은 *chb* 오페론의 불활성 프로모터를 활성 프로모터로 치환하는 과정을 예시적으로 나타낸 것이다.
- 도 2는 *asc* 오페론의 불활성 프로모터를 활성 프로모터로 치환하는 과정을 예시적으로 나타낸 것이다.
- 도 3은 CP12CHBASC 균주를 상이한 배지(LB, M9-글루코스 및 M9-셀로바이오스)에서 배양한 후,  $\beta$ -글루코시다아제 활성(U/mL)을 나타낸 그래프이다.
- 도 4는 CP12CHBASC (A) 및 CP12CHBASC CRP\* (B) 균주를 셀로바이오스 및 자일로스를 함유하는 배지에서 배양한 후, 남아 있는 셀로바이오스(◆) 및 자일로스(■)의 농도를 나타낸 그래프이다.
- 도 5는 CP12CHBASC 균주(■) 및 CP12CHBASC30 균주(●)의 자일로스 이용률(A) 및 셀로바이오스 이용률(B)을 나타낸 그래프로서, A는 자일로스를 함유한 배지에서 배양한 후 남아 있는 자일로스의 농도를 나타낸 것이고, B는 셀로바이오스를 함유한 배지에서 배양한 후 남아 있는 셀로바이오스의 농도를 나타낸 것이다.
- 도 6a는 CP12CHBASC 균주 및 CP12CHBASC30 균주에서 상이하게 발현되는 800개의 유전자에 대한 배수-차(fold-difference)의 분포를 묘사한 산점도(scatter plot)이다. 배수-변화가 log2로 표시되어 있다.
- 도 6b는 ADGO를 이용하여 그룹화된 유전자들의 발현 수준의 배수-변화를 나타낸 것이다. 그래프 좌측부터 글루코스 대사 경로 관련 유전자군, 뉴클레오타이드 생합성 경로 관련 유전자군, 아미노산 대사 관련 유전자군, 지질 대사 관련 유전자군, 아민 대사 관련 유전자군, 편모 조립 및 주화성 관련 유전자군, 전사 인자 관련 유전자군 및 스트레스 반응 관련 유전자군을 가리킨다.
- 도 7a는 중추 대사 경로(central metabolism pathway)에 관여하는 유전자 및 CP12CHBASC 및 CP12CHBASC30 균주에서의 발현 정도를 나타낸 것으로서, 도면 내의 숫자는 CP12CHBASC 균주에서의 발현 대비 CP12CHBASC30 균주에서의 각 유전자의 신호 강도의 비율을 의미한다. 또한 도면에서, CP12CHBASC30 균주에서 유의하게 상향조절된 유전자는 적색으로, 유의하게 하향조절된 유전자는 녹색으로 표시되어 있으며, 점선 화살표는 마이크로어레이에서 없어진 전사체에 해당하는 경로를 나타내고, 검은색으로 표시된 유전자는 특별히 변하지 않았거나 마이크로어레이에서 검출되지 않은 유전자를 가리킨다.
- 도 7b는 CP12CHBASC 균주 및 CP12CHBASC30 균주에서의 중추 대사 경로의 상대적 mRNA 존재비를 비교한 히트맵(heat map)이다. 첫 번째 컬럼은 CP12CHBASC30 균주에 해당하고, 두 번째 컬럼은 CP12CHBASC 균주에 해당한다.
- 도 8의 A는 *chbF*가 과발현된 균주의 셀로바이오스 상에서의 성장률을 나타낸 것으로서, 정사각형(■)은

CP12CHBASC30 균주를, 삼각형(▲)은 *chbF*가 과발현된 CP12CHBASC-pZB-C 균주를, 마름모(◆)는 CP12CHBASC 균주를 가리킨다. 또한, 점선은 유도물질(inducer)로서 테트라사이클린을 사용하지 않고 성장한 균주를 나타내며, 직선은 2 ng/mL의 테트라사이클린의 존재하에 성장한 균주를 나타낸다.

도 8의 B는 *ascB*가 과발현된 균주의 셀로바이오스 상에서의 성장률을 나타낸 것으로서, 정사각형(■)은 CP12CHBASC30 균주를, 삼각형(▲)은 *ascB*가 과발현된 CP12CHBASC-pZB-A 균주를, 마름모(◆)는 CP12CHBASC 균주를 가리킨다. 또한, 점선은 유도물질(inducer)로서 테트라사이클린을 사용하지 않고 성장한 균주를 나타내며, 직선은 2 ng/mL의 테트라사이클린의 존재하에 성장한 균주를 나타낸다.

도 8의 C는 *chbF*가 결실된 균주 및 *ascB*가 결실된 균주의 셀로바이오스 상에서의 성장률을 나타낸 것으로서, 삼각형(▲)은 *chbF*가 결실된 CP12CHBASC30 균주를, 정사각형(■)은 CP12CHBASC30 균주를, 마름모(◆)는 CP12CHBASC 균주를, 원(●)은 *ascB*가 결실된 CP12CHBASC30 균주를 가리킨다.

도 8의 D는 *ascB*가 과발현된 균주에서의 β-글루코시다아제 생성 및 안정성을 PNP를 기질로 사용하여 측정한 것으로서, 마름모(◆)은 CP12CHBASC 균주를, 정사각형(■)은 CP12CHBASC30 균주를, 삼각형(▲)은 CP12CHBASC-pZB-A를 나타낸다.

도 9의 A1 내지 A3은 CP12CHBASC 균주에서의 셀로바이오스 및 기타 당의 공동 대사를 비교한 것으로서, 기타 당으로서 A1에서는 자일로스를, A2에서는 갈락토스를, A3에서는 만노스를 사용한 결과이다. 각 도에서 마름모(◆)는 셀로바이오스의 농도(g/L)를, 사각형(■)은 자일로스/갈락토스/만노스의 농도(g/L)를 가리키며, 삼각형(▲)은 균주의 성장속도(OD)를 가리킨다. 또한, 도 9의 B1 내지 B3은 *ascB*가 과발현된 CP12CHBASC-pZB-A 균주를 대상으로 셀로바이오스 및 기타 당의 공동 대사를 비교한 것으로서, 각 도의 표시는 위에서 설명한 바와 같다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0017] 이하 본 발명에 사용된 용어를 설명한다.
- [0018] 본 발명에서 '오펜'이란 단일 조절신호 또는 프로모터의 조절하에 있는 유전자 집단을 함유하는 게놈 물질의 기능 단위를 지칭한다. 본 발명에서 '*chb* 오펜' 및 '*asc* 오펜'은 각각의 구조와 기능이 당해 기술분야에 공지되어 있다.
- [0019] 본 발명에서 '프로모터'는 특정 유전자의 전사를 돕는 DNA 영역을 지칭한다. 또한, '불활성 프로모터'는 다양한 원인에 의해 전사 관련 기능을 수행하지 못하는 프로모터를 지칭하는 반면, '활성 프로모터'는 치환되는 경우 전사 관련 기능을 수행할 수 있는 프로모터를 지칭하며, 그 예로 '유도성 프로모터(inducible promoter)' 및 '항시성 프로모터(constitutive promoter)'를 포함한다. 본 발명의 활성 프로모터의 일종인 상기 '유도성 프로모터(inducible promoter)'는 특정 인자의 존재 또는 부재에 의해 프로모터의 활성이 유도되는 프로모터를 지칭한다. 나아가, 본 발명의 활성 프로모터의 일종인 상기 '항시성 프로모터(constitutive promoter)'는 관련 유전자가 지속적으로 전사되게 하는 조절되지 않은 프로모터를 지칭하며, '항시적 프로모터' 또는 '항시발현용 프로모터'와 상호교환적으로 사용된다. 본 발명에서 *chb* 오펜의 불활성 프로모터와 *asc* 오펜의 불활성 프로모터는 당업계에 공지되어 있다.
- [0020] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0021] 본 발명은 야생형 미생물의 *ascB* 또는 *chbF* 유전자를 과발현시키는 단계를 포함하는, 셀로바이오스의 이용률이 증가되고 자일로스, 만노스 및 갈락토스로 이루어진 균으로부터 선택되는 당과 셀로바이오스를 동시에 이용할 수 있는 변이미생물을 제조하는 방법을 제공한다.
- [0022] 본 발명에서, 야생형 미생물은 대장균일 수 있으며, 대장균의 게놈 유전자와 70% 이상의 상동성을 가진 미생물, 예를 들어 살모넬라(salmonella) 등도 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0023] 상기 *ascB* 유전자는 야생형 미생물에 존재하는 *asc* 오펜 중 2번째 유전자로서, 셀로바이오스-6-포스페이트를 가수분해하는 포스포-β-글루코시다아제를 코딩한다. 상기 *ascB* 유전자의 예로는 *E. coli* str. K12 substr. MG1655의 게놈(Genbank No.NC\_000913.2) 유래의 *ascB* 유전자(서열번호 7), *E. coli* str. K12 substr. BL21(DE3) 게놈(Genbank No.NC\_012947.1) 유래의 *ascB* 유전자(서열번호 7) 등을 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0024] 또한, 상기 *chbF* 유전자는 야생형 미생물에 존재하는 *chb* 오페론 중 5번째 유전자로서, 가수분해효소를 코딩한다. 상기 *chbF* 유전자의 예로는 *E. coli* str. K12 substr. MG1655의 계놈(Genbank No.NC\_000913.2) 유래의 *chbF* 유전자(서열번호 21), *E. coli* str. K12 substr. BL21(DE3) 계놈(Genbank No.NC\_012947.1) 유래의 *chbF* 유전자(서열번호 21) 등을 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0025] 본 발명의 변이미생물은 다른 유전자의 변이 없이 *ascB* 또는 *chbF* 유전자만을 과발현시킴으로써 셀로바이오스 이용률 및 자일로스, 만노스 및 갈락토스로 이루어진 균으로부터 선택되는 당과 셀로바이오스의 동시 이용능을 달성할 수 있다.
- [0026] 상기 *ascB* 유전자의 과발현은 *ascB* 유전자를 포함하는 플라스미드로 야생형 미생물을 형질전환시켜 과발현시키는 방법, 강한 RBS와 프로모터를 사용하여 과발현시키는 방법, 실수유발(error-prone) PCR에 의해 과발현시키는 방법, 돌연변이 유발에 의해 과발현시키는 방법, MAGE(multiplex automated genome engineering)를 통한 기존에 존재하는 효소의 특이성을 증가시키는 방법을 이용하여 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0027] 상기 방법에서 *ascB* 또는 *chbF* 유전자를 포함하는 플라스미드로 야생형 미생물을 형질전환시켜 과발현시키는 방법은 야생형 미생물 내의 *ascB* 또는 *chbF* 유전자의 복제개수(copy number)를 증가시켜 *ascB* 또는 *chbF* 유전자의 발현을 증가시켜 결과적으로 과발현시킬 수 있다. 상기 과발현 방법에 사용될 수 있는 플라스미드는 당해 기술 분야에 널리 알려져 있다. 또한, 강한 RBS를 사용하는 방법은, mRNA로부터 단백질이 합성되는 번역 단계에 있어 리보솜과 결합하여 번역을 개시시키는 mRNA의 부위인 RBS를 이용하는 것이다. RBS가 강할수록 번역개시 속도가 증가되고 이에 따라 유전자 발현이 증가하므로, 강한 RBS를 사용하면 목적하는 유전자를 과발현시킬 수 있다. 당업계에 알려진 강한 RBS 서열의 예는 AAGAAG를 포함하나, 이 외의 다른 서열도 사용가능하다.
- [0028] 본 발명은 야생형 미생물의 *chb* 오페론 및 *asc* 오페론의 불활성 프로모터를 항시성 프로모터로 치환하여 얻은 균주 'CP12CHBASC'와 상기 균주를 최소 셀로바이오스 배지에서 30일간 적응(adaptation)시켜 얻은 균주 'CP12CHBASC30'가 서로 다른 셀로바이오스 이용률을 나타낸다는 점에 착안하여 수행되었다.
- [0029] 즉, 낮은 셀로바이오스 이용률을 나타내는 'CP12CHBASC' 균주 및 높은 셀로바이오스 이용률을 나타내는 'CP12CHBASC30' 균주 간의 유전자 발현 양상을 분석함으로써 셀로바이오스 이용률에 관련된 유전자를 선발하였다.
- [0030] 상기 'CP12CHBASC' 균주 및 'CP12CHBASC30' 균주 간의 유전자 발현 양상을 분석한 결과, 글루코스 대사 경로 관련 유전자군, 뉴클레오타이드 생합성 경로 관련 유전자군, 아미노산 대사 관련 유전자군, 지질 대사 관련 유전자군, 아민 대사 관련 유전자군, 편모 조립 및 주화성 관련 유전자군, 전사 인자 관련 유전자군 및 스트레스 반응 관련 유전자군에 속하는 많은 유전자들이 상향조절 또는 하향조절되었다(표 2 참조). 구체적으로, CP12CHBASC 균주와 비교하여, CP12CHBASC30 균주에서 스트레스 반응 유전자들이 하향조절된 반면, 편모 생합성 관련 유전자들, 아미노산 대사 관련 유전자들, 에너지 수율 및 뉴클레오타이드 생합성 관련 유전자들 및 전사 인자 관련 유전자들이 상향조절되었다.
- [0031] 특히, CP12CHBASC30 균주에서 *ascB* 유전자의 발현이 가장 많이 증가하였다는 점으로부터 *ascB* 유전자의 발현 변화가 셀로바이오스 대사에 현저한 영향을 미칠 것으로 추측하였다. 또한, *chb* 오페론이 셀로바이오스 대사에 중추적인 역할을 하는 것으로 알려져 있어, 상기 오페론의 유전자 중 *chbF*를 선택하여 실험하였다.
- [0032] 이를 입증하기 위해 *ascB*를 과발현시킨 경우, 셀로바이오스의 이용률 및 기타 당과의 공동 이용률이 향상되었으며, *ascB*를 결실시키는 경우, 상기 효과가 제거되었다. 또한, *chbF*를 과발현시킨 경우, 셀로바이오스의 이용률 및 기타 당과의 공동 이용률이 향상되었다.
- [0033] 따라서, 본 발명에서 *ascB* 또는 *chbF* 유전자는 셀로바이오스의 이용률이 증가되고 자일로스, 만노스 및 갈락토스로 이루어진 균으로부터 선택되는 당과 셀로바이오스를 동시에 이용할 수 있는 변이미생물을 제조하는데 있어서 타겟으로 사용될 수 있다.
- [0034] 본 발명은 또한 야생형 미생물의 *ascB* 또는 *chbF* 유전자가 과발현된 것을 특징으로 하는, 셀로바이오스의 이용률이 증가되고 자일로스, 만노스 및 갈락토스로 이루어진 균으로부터 선택되는 당과 셀로바이오스를 동시에 이

용할 수 있는 변이미생물을 제공한다.

[0035] 사용될 수 있는 미생물, *ascB* 또는 *chbF* 유전자 및 과발현 방법 등은 제조방법과 관련하여 전술한 바와 같다.

[0036] 삭제

[0037] 삭제

[0038] 이하, 하기 실시예에 의하여 본 발명을 보다 상세하게 설명하고자 한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

[0039] 실시예 1: *chb* 오페론 불활성 프로모터 및 *asc* 오페론 불활성 프로모터가 활성 프로모터로 치환된 변이대장균의 제조

[0040] 하기의 방식에 따라 대장균의 *chb* 오페론과 *asc* 오페론 내의 불활성 프로모터를 활성 프로모터의 일종인 항시적으로 발현되는 항시성 프로모터로 치환하여 변이대장균을 제조하고, 이를 "CP12CHBASC"로 명명하였다.

[0041] <1-1> *chb* 오페론 프로모터의 항시성 프로모터로의 치환

[0042] Datsenko 등(Datsenko KA *et al.*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(12), 6640-6645, 2000)에 개시되어 있는  $\lambda$ -Red 재조합 시스템을 이용하여, 대장균 MG1655의 염색체 상의 *chb* 오페론에 존재하는 유일한 잠재적 불활성 프로모터(서열번호 1)를 합성된 항시성 프로모터인 CP12 프로모터(서열번호 2)로 치환하였다. 상기 CP12 프로모터는 Jensen 등(Jensen PR *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.* 64(1), 82-87, 1998)에 개시되어 있으며, 대장균에서 101 밀러 유닛(miller unit)의  $\beta$ -갈락토시다아제 활성을 가진 것으로 보고되어 있다.

[0043] 구체적으로, 상기 Datsenko 등의 문헌을 참조하여, 프로모터 치환을 위해, 두 개의 오버래핑 단편을 SOE(Splice Overlap Extension) PCR을 통해 증폭하여 CP12 프로모터를 카나마이신 카세트에 연결하였다. 단편 1은 표 1에 기재된 세 개의 SOEing CP12 프로모터(서열번호 4 내지 6)를 사용하여 *chb* 오페론 프로모터의 하부 영역에 항시성 프로모터인 CP12를 붙이며, CP12 프로모터 앞쪽에는 단편 2와 연결시킬 수 있는 상동 서열을 가지고 있다. 단편 2는 *chb* 오페론 프로모터의 상부 영역에 상동인 오버행(overhang) 서열과 pKD13으로부터 유래한 카나마이신 카세트가 연결되어 있으며, 카나마이신 카세트 뒤쪽에는 단편 1과 연결시킬 수 있는 상동 서열을 가지고 있다. 상기 SOE PCR은 1단계 98°C 3분, 2단계 95°C 30초, 3단계 50-60°C 30초 및 4단계 72°C 2분으로 수행하였고, 상기 2단계에서 4단계를 30회 반복하였다. 상기 제조과정을 도 1에 개략적으로 나타내었고, 사용된 SOEing CP12 프로모터 및 플라스미드를 표 1에 나타내었다.

표 1

[0044]

프로모터 및 플라스미드	특성	참고
SOEing CP12 프로모터	5'-CATAGCTGTTTCTGTGTGAACAGTACTCAGGTATTATATCATT TG-3'	서열번호 4
	5'-TCAGGTATTATATCATTTTGGCCGACTAGTGTCAGAATAAACTT G-3'	서열번호 5
	5'-TAGTGTCAGAATAAACTTGTATATGATTCCGGGATCCGTCGAC C-3'	서열번호 6
pKD46	$\lambda$ -Red 재조합효소(recombinase) 발현 플라스미드; 온도 민감성 복제	Datsenko and Wanner 2000
pKD13	유전자 파괴(gene disruption)용 주형 플라스미드. 내성 유전자가 FRT 부위의 측면에 있음. <i>pir+</i> <i>E.coli</i> 를 필요로 하는 <i>oriR6K-gamma origin</i> .	Datsenko and Wanner 2000

[0045]

[0046]

<1-2> asc 오페론 프로모터의 항시성 프로모터로의 치환

[0047]

상기 실시예 1-1과 동일한 방식으로, 대장균 MG1655의 염색체 상의 asc 오페론에 존재하는 유일한 잠재적 불활성 프로모터(서열번호 3)를 합성 항시성 프로모터인 CP12 프로모터로 치환하였다.

[0048]

구체적으로, 상기 Datsenko 등의 문헌을 참조하여, 프로모터 치환을 위해, 두 개의 오버래핑 단편을 SOE(Splice Overlap Extension) PCR을 통해 증폭하여 CP12 프로모터를 카나마이신 카세트에 연결하였다. 단편 1은 표 1에 기재된 세 개의 SOEing CP12 프로모터(서열번호 4 내지 6)를 사용하여 asc 오페론 프로모터의 하부 영역에 항시성 프로모터인 CP12를 붙이며, CP12 프로모터 앞쪽에는 단편 2와 연결시킬 수 있는 상동 서열을 가지고 있다. 단편 2는 asc 오페론 프로모터의 상부 영역에 상동인 오버행(overhang) 서열과 pKD13으로부터 유래한 카나마이신 카세트가 연결되어 있으며, 카나마이신 카세트 뒤쪽에는 단편 1과 연결시킬 수 있는 상동 서열을 가지고 있다. 상기 SOE PCR은 1단계 98℃ 3분, 2단계 95℃ 30초, 3단계 50~60℃ 30초 및 4단계 72℃ 2분으로 수행하였고, 상기 2단계에서 4단계를 30회 반복하였다. 상기 제조과정을 도 2에 개략적으로 나타내었고, 사용된 SOEing CP12 프로모터 및 플라스미드를 표 1에 나타내었다.

[0049]

<1-3> 항시성 프로모터 치환 균주의 제작

[0050]

araBAD 프로모터 하에 λ-Red system(pKD46)을 갖는 세포를 10 mM 아라비노스로 유도하여 전기충격용 대장균 세포(electrocompetent cell)를 만들고, 전기천공법으로 실시예 <1-1> 및 <1-2>에서 수득한 PCR 산물을 형질전환시켰다. 카나마이신 저항성 콜로니를 선별하고, PCR, 서열분석 및 기능 분석을 수행하여 부위 특이적 삽입 및 결실을 확인하였다. 상기 과정으로 얻어진 균주를 "CP12CHBASC"로 명명하였다.

[0051]

**실시예 2: chb 오페론 불활성 프로모터 및 asc 오페론 불활성 프로모터가 활성 프로모터로 치환되고, 최소 셀로바이오스 배지에서 적용된 변이대장균의 제조**

[0052]

상기 실시예 <1-3>에서 제작된 균주를 최소 셀로바이오스 배지(2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub> 및 1 g/L의 셀로바이오스가 첨가된 M9 최소 배지)에서 200 rpm으로 교반하면서 37℃에서 30일간 배양하였다. 배양 중 배양액이 1.0의 OD<sub>600</sub>에 도달하면 세포를 새로운 배지로 옮겨 배양하였다. 상기 배양으로 얻어진 균주를 "CP12CHBASC30"으로 명명하였다.

[0053]

**실시예 3: 변이대장균의 자일로스 및 셀로바이오스 이용률 확인**

[0054]

실시예 <1-3>에서 제작된 "CP12CHBASC" 균주 및 실시예 2에서 제작된 "CP12CHBASC30" 균주의 자일로스 및 셀로바이오스 이용률을 비교하였다. 상기 균주를 각각 1g/L의 셀로바이오스 및 자일로스를 함유하는 50 mL의 M9-최소 배지에 접종하였다. 일정한 시간마다 배양 배지를 회수하여, 배양 배지 중의 셀로바이오스와 자일로스의 잔류 농도를, HPC-87P 컬럼(Bio-Rad) 및 굴절율 검출기(Shimadzu)가 장착된 시마주(Shimadzu) HPLC 스테이션(station)을 이용하여 측정하였다. HPLC-등급의 깨끗한 물을 0.6 mL/분의 유속으로, 이동상으로 사용하였다. 오븐 온도는 80℃로 유지하였다. 다양한 농도의 자일로스 및 셀로바이오스를 이용하여 표준 곡선을 결정하였다.

[0055]

측정 결과를 도 5에 나타내었다. 도 5의 A는 자일로스 이용률을, B는 셀로바이오스 이용률을 나타내고, 각 도의 사각형(■)은 CP12CHBASC 균주의 결과를, 원(●)은 CP12CHBASC30 균주의 결과를 나타낸다.

[0056]

도 5에서 보는 바와 같이, 양 균주는 자일로스 이용률이 유사하였다. 하지만, 셀로바이오스 이용률의 경우 CP12CHBASC30 균주가 CP12CHBASC 균주에 비해 현저하게 높았다. 상기 결과는 실시예 2의 진화적 적응을 통해 대장균의 셀로바이오스 이용률을 높일 수 있음을 보여준다.

[0057] 실시예 4: 변이대장균의 유전자 발현 프로파일의 분석

[0058] 실시예 3의 결과를 바탕으로, 진화적 적응으로 인한 대장균의 유전자 발현 변화를 살펴보기 위하여, 마이크로어레이 방법을 이용하여 CP12CHBASC 균주 및 CP12CHBASC30 균주의 유전자 발현 프로파일을 비교하였다.

[0059] 구체적으로, 실시예 1 및 실시예 2에서 얻은 CP12CHBASC 균주 및 CP12CHBASC30 균주를 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 및 4 g/L이 첨가된 M9 최소 배지에서 37°C에서 3일간 배양하였다. 이후, 상기 배지에 테트라사이클린 (1-5 ng/mL) 또는 프로피온산나트륨(20 mM)을 첨가하여 단백질 발현을 유도하였다. Biochrom Libra S22 분광광도계를 이용하여 600 nm(OD<sub>600</sub>)에서 광학 밀도를 측정하여 세포 성장을 관찰하였다. 전사체(transcriptome) 분석을 위해, CP12CHBASC 균주 및 CP12CHBASC30 균주를 최소 셀로마이오스 배지에서 OD<sub>600</sub>에서 0.7까지 성장시켰다. 이후, 원심분리에 의해 세포를 회수하고, 100 mM 인산나트륨 완충액으로 세척한 후, 펠렛을 분석전까지 -80°C에서 보관하였다. 그리고 나서, GE 마이크로어레이 3\*20K(*E.coli* str K12 substr, MG1655) 플랫폼을 이용하여 제조사의 프로토콜에 따라 전사체 프로파일링(transcriptome profiling)을 수행하였다. 각 시료 당 세 개의 반복구를 분석하였다. CP12CHBASC30 균주에서 100을 초과하는 신호 강도를 갖는 유전자를 추가 분석에 사용하였다. CP12CHBASC30 균주의 유전자를 삼반복 판독한 값으로부터 얻은 평균 신호 강도를 CP12CHBASC 균주의 유전자의 대응하는 평균 신호 강도로 정규화(normalization)하고, 배수-변화값(fold-change value)을 얻었다.

[0060] 상기 실험 결과, CP12CHBASC 균주와 비교하여, CP12CHBASC30 균주에서 대략 800개의 유전자가 2배 이상의 발현 차이를 나타내었다. 상기 CP12CHBASC 균주 및 CP12CHBASC30 균주에서 상이하게 발현되는 800개의 유전자에 대한 배수-차(fold-difference)의 분포를 묘사한 산점도(scatter plot)를 도 6a에 나타내었다.

[0061] 이후, 전사체(transcriptome)의 기능 분석을 위해, 상기 배수-변화값에 웹 기반의 도구인 ADGO 2.0(Sang-Mun Chi et al., ADGO 2.0: Interpreting microarray data and list of genes using composite annotations, *Nucleic Acids Research*, 39, W302-W306, 2011)을 적용하였다. 기능 해석을 위해 동시에 세 가지 카테고리의 Gene Ontology(GO)가 선택되었고, Z-통계 방법을 사용하여 각 GO 용어(GO term)의 배수-변화값을 요약하였다.

[0062] 상기 실험 결과, 175개의 상향조절된 GO 용어 및 70개의 상향조절된 GO 용어가 확인되었다. 상기 유전자들을 ADGO를 사용하여 그룹화한 결과를 도 6b에 나타내었다. 도 6b는 ADGO를 이용하여 그룹화된 유전자들의 발현 수준의 배수-변화를 나타낸 것이다. 그래프 좌측부터 글루코스 대사 경로 관련 유전자군, 뉴클레오타이드 생합성 경로 관련 유전자군, 아미노산 대사 관련 유전자군, 지질 대사 관련 유전자군, 아민 대사 관련 유전자군, 편모 조립 및 주화성 관련 유전자군, 전사 인자 관련 유전자군 및 스트레스 반응 관련 유전자군을 가리킨다. 이들 유전자들은 광범위한 기능적 카테고리에 걸쳐 분포되어 있었다.

[0063] 상기 ADGO로부터 얻은 대표적인 카테고리를 하기 표 2에 나타내었다. 문헌[Feist et al., *Molecular System Biology* 3, 2007]을 참조하여 대장균의 대사 모델링(metabolic modeling)에서 중추대사경로(CMP)에 해당하는 유전자들(iAF1260 모델에 따름)이 선정되었다.

표 2

기능적 카테고리	2배 이상 발현된 유전자	2배 이하 발현된 유전자
아민 대사	<i>livF, ybaS, gcvT, glmU, gadB, gadA</i>	<i>astC, asnA, gabD, tdcA, astA, tdcE, gabT</i>
아미노산 대사	<i>gdhA, gadA, lysC, asd, metE, gadB, proX, dapD, hisG, gltD, aroG, livJ, serA, hisC, folE, betB, speD, proV, glnS, gcvT, speE, livK, valS, serC, dapF, asnS, gshB, thrA, gltX, livM, aspS, lysA, carB</i>	<i>gabT, tnaB, tdcE, astA, tdcA, metJ, argA, argC, gabD, tyrA, asnA, astC</i>
편모 조립 및 주화성	<i>fliC, flgE, flgB, flgD, fliA, flhD, flgL, flgG, fliF, flgC, fliG, flgN</i>	<i>trg</i>
글루코스 대사 경로	<i>pdhR, aceE, pgi, maeA, tpiA, gapA, aceF, tktA, eno, pgk, talB, zwf</i>	<i>epd, treR</i>

지질 대사	<i>lpxD, glmU</i>	<i>prpB, prpC, mhpC</i>
뉴클레오티드 생합성	<i>pyrI, pyrC, guaA, metE, pyrF, atpB, atpE, atpF, purD, atpH, guaB, purH, adk, atpA, purU, atpG, purM, gmK</i>	미검출
스트레스 반응	<i>recA, xseB, ybfE, tufB, recF, betI, betB, proX, dinI</i>	<i>osmB, treR, dinG, rpoS, ddpX</i>
전사 인자	<i>rplD, gyrB, flgM, galR, hpf, betI, rpoB, rbsR, mprA, flhD, pdhR, fliA</i>	<i>pspA, cpxP, pspB, lrhA, yiaG, crp, cspE, cspA, treR, metJ, tdcA, yddM, yfeR, rpoS</i>

[0065]

[0066]

이후, R 프로그래밍을 이용하여 CP12CHBASC 균주 및 CP12CHBASC30 균주에서 선발된 유전자의 상대적 신호 강도를 비교하여 도 7a 및 7b에 나타내었다. 도 7a는 중추 대사 경로(central metabolism pathway)에 관여하는 유전자 및 그 발현을 나타낸다. 도 7a 내의 숫자는 CP12CHBASC 균주에서의 발현 대비 CP12CHBASC30 균주에서의 각 유전자의 신호 강도의 비율을 의미한다. CP12CHBASC30 균주에서 유의하게 상향조절된 유전자는 적색으로, 그리고 유의하게 하향조절된 유전자는 녹색으로 표시되어 있다. 점선 화살표는 마이크로어레이에서 없어진 전사체(missing transcript)에 해당하는 경로를 나타낸다. 검은색으로 표시된 유전자는 특별한 변화를 나타내지 않거나 마이크로어레이에서 검출되지 않은 유전자를 가리킨다. 한편, 도 7b는 CP12CHBASC 및 CP12CHBASC30 균주에서의 중추 대사 경로에 관여하는 유전자들의 상대적 mRNA 존재비를 비교한 히트맵(heat map)이다. 상기 도에서 첫 번째 컬럼은 CP12CHBASC30 균주에 해당하고, 두 번째 컬럼은 CP12CHBASC 균주에 해당한다.

[0067]

상기 결과에서 보는 바와 같이, 해당과정을 TCA 사이클과 연결하는 보충대사반응(anaplerotic reaction)을 코딩하는 *ppc*의 전사가 CP12CHBASC30 균주에서 더 높았다. 일반적으로, 글루코스 상에서 성장하며 글루코스-제한 성장 조건 하에서 활성화된 세포 내에는 글리옥실레이트 경로의 발현이 존재하지 않는다(Franchini et al., *Microbiology*, 152, 2111-2127, 2006). 하지만, CP12CHBASC 균주에서 글리옥실레이트 경로 유전자 *aceA*가 *rmf* 다음으로 가장 많이 존재하였고, *aceA* 발현은 CP12CHBASC30 균주에서 1.7배 감소하였다(도 7a 및 7b). CP12CHBASC 균주 및 CP12CHBASC30 균주들은 *sucAB*에 해당하는 전사체를 발현하지 않았으며, 이는 TCA 사이클이 이들 균주에서 완전히 활성이 아님을 보여준다.

[0068]

한편, 상기 마이크로어레이 실험 결과를 종합한 결과, CP12CHBASC 및 CP12CHBASC30 균주 간에 하기와 같은 유전자군들이 변화된 것으로 확인되었다.

[0069]

<스트레스 반응 유전자의 하향조절>

[0070]

상기 실험결과, 스트레스 반응 유전자들이 하향조절된 것으로 확인되었다. 즉, CP12CHBASC 균주의 경우 2개의 잠재적 오페론(*chb* 및 *asc* 오페론)의 항시적 발현(constitutive expression)이 스트레스 반응을 촉발하여 스트레스 반응 유전자들의 발현이 증가하나, 진화적 적응된 CP12CHBASC30 균주의 경우 스트레스 반응이 감소되어 스트레스 반응 유전자들이 하향조절된 것으로 판단되었다.

[0071]

구체적으로, CP12CHBASC 균주에서 스트레스 반응 유전자인 *rmf*(ribosome modulation factor)가 과발현되었으나, CP12CHBASC30 균주에서의 *rmf* mRNA 수준은 CP12CHBASC 균주에서보다 2.6배 낮았다. 또한, 삼투 스트레스 반응 유전자인 *osmB*가 CP12CHBASC30 균주에서 10배 감소하였다. 비슷하게, 보편적인 스트레스 반응의 마스터 조절자(master regulator)인 *rpoS*의 발현이 CP12CHBASC30 균주에서 2배 감소하였으며, *uspB*(tolerance to ethanol stress) 및 *ddpX*(dipeptidase)와 같은 몇 가지 *rpoS*-조절된 스트레스 반응 유전자들 역시 하향조절되었다.

[0072]

상기 결과들은 셀로바이오스 상에서의 적응 진화(adaptive evolution) 이후 셀로바이오스로 인한 스트레스로부터 활성형 대사로 페리다임이 이동하였음을 보여준다.

[0073]

<편모 생합성(flagellar biosynthesis) 관련 유전자의 상향조절>

[0074] 편모 구조 및 주화성 유전자는 선호되지 않는 탄소원 상에서 성장하는 세포에서 고도로 발현된다(Zhao et al., *Nucleic Acids Research*, 35, 4441-4452, 2007). 실험 결과, 편모 조립을 담당하는 유전자가 CP12CHBASC 균주에서보다 CP12CHBASC30에서 50배 높게 발현되었다(도 6b). 비슷하게 글루코스, 갈락토스 및 리보스에 대한 주화성 수용체인 *trg*의 발현은 CP12CHBASC30에서 1.5배 더 낮았다. CP12CHBASC30 균주의 주화성 및 운동 거동에서의 변화가 셀로바이오스의 이용률을 증가시키는데 관여하는 것으로 판단되었고, 스트레스 반응의 제거가 편모 생합성을 증가시키는 것으로 판단되었다.

[0075] <아미노산 대사 관련 유전자 상향조절>

[0076] 디아미노피멜레이트(diaminopimelate)는 라이신 및 세포벽 생합성에서의 공통된 대사 중간체이다. 실험 결과, 디아미노피멜레이트를 라이신으로 전환시키는 과정에 관여하는 9개의 유전자 중 5개의 유전자가 CP12CHBASC30 균주에서 상향조절되었다. 또한 라이신 및 메티오닌 생합성과 관련된 유전자들이 CP12CHBASC30 균주에서 상향조절되었다. 문헌[Horinouchi, T. et al., *BMC Genomics*, 11,579, 2010]은 진화(adaptation)를 통해 얻은 에탄올 내성을 모방하기 위해 아미노산들을 치환할 필요성이 있음을 언급하였다. 하지만, 이들의 발견과는 달리 아미노산 대사는 셀로바이오스 대사에 영향을 미치지 않는 것으로 판단되었다(도 6b).

[0077] <에너지 수율 및 뉴클레오타이드 생합성 관련 유전자 상향조절>

[0078] F1F0 ATP 합성효소 복합체는 *atpCHAGD*(F1 복합체) 및 *atpFEBI*(F0 복합체)에 의해 코딩된다. 이들 유전자들은 CP12CHBASC30 균주에서 3배 유도되었다. 또한 많은 뉴클레오타이드 생합성 유전자들이 CP12CHBASC30 균주에서 상향조절되었다. 피리미딘의 드 노보(de novo) 생합성의 첫 번째 단계에서 촉매작용을 하는 아스파테이트 트랜스카바미라아제(*aspartate transcarbamylase*)의 서브유닛을 코딩하는, *pyrI* 및 *pyrB*의 전사가 CP12CHBASC30 균주에서 25배 높았다.

[0079] 활발하게 성장하는 세포들은 더 많은 ATP를 생성하며, 이런 이유로 ATP 합성 관련 유전자들이 상향조절된다. 또한, DNA 및 RNA를 합성하기 위해 그리고 성장하는 세포에서의 이화 과정을 위해 더 많은 뉴클레오타이드가 필요하다. 상기 결과들은 CP12CHBASC30 균주의 빠른 성장을 입증한다.

[0080] <전사 인자 관련 유전자의 상향조절>

[0081] 실험 결과, 몇 가지 전사 인자의 mRNA 수준이 CP12CHBASC30 균주에서 2 내지 7배 가량 높은 것으로 나타났다. 예를 들어, 편모 생합성을 조절하는데 관련된 *flhD* 및 *fliA*의 발현 수준이 CP12CHBASC30 균주에서 각각 4배 및 7배 가량 높았다. 또한, 자일로스 오페론의 전사 활성화자 *xyIR*의 발현 역시 CP12CHBASC30 균주에서 1.5배 높았다. 이 결과는 CP12CHBASC30 균주가 자일로스 및 셀로바이오스를 공동으로 대사시킬 수 있음을 보여준다. 대조적으로, *crp* 발현은 CP12CHBASC30 균주에서 3배 가량 감소하였지만, *crp*에 의해 조절될 것으로 예측된 유전자들은 CP12CHBASC 균주와 CP12CHBASC30 균주 간에 특별한 변화를 보이지 않았다. 이는 이들 유전자가 몇 가지 인자, 예를 들어 전반적 조절자(global regulator), 유전자-특이적 조절자 및 대사산물에 의해 조절되기 때문일 수 있다.

[0082] **실시예 5: *ascB* 및 *chbF* 과발현 또는 결실 균주의 제조**

[0083] *ascB* 및 *chbF*는 세포내 셀로바이오스-6-포스페이트를 가수분해하는 포스포-β-글루코시다아제(각각 54kDa 및 50kDa)를 코딩하는 유전자로서, *asc* 및 *chb* 오페론 중 각각 2번째 및 5번째 유전자이다. 따라서, *asc* 및 *chb* 오페론 중에서도 상기 유전자들이 셀로바이오스 이용률 및 기타 당과의 공동 대사에 관여할 가능성이 높을 것으로 예상되었다.

[0084] 특히, 실시예 4의 결과에서 볼 수 있는 바와 같이, CP12CHBASC30 균주에서 *ascB* 유전자의 발현이 제일 증가하였고, CP12CHBASC 균주보다 5배 가량 증가하였기 때문에(도 7a 및 7b 참조), *ascB* 발현 변화가 셀로바이오스 대사에 현저한 영향을 미치는 것으로 추측되었다. 또한, *chb* 오페론이 셀로바이오스 대사에 중추적인 역할을 하는

것으로 알려져 있어, 상기 오피론 중 *chbF* 유전자를 선택하였다.

[0085] 상기 유전자의 효과를 입증하기 위하여, 하기와 같이 *ascB* 과발현 균주, *chbF* 과발현 균주, *ascB* 결실 균주 및 *chbF* 결실 균주를 각각 제조하였다.

[0086] <5-1> *ascB* 과발현 균주의 제조

[0087] 대장균 MG1655로부터 Geneall kit(General Biosystem, 한국)를 사용하여 게놈 DNA를 얻은 후, P14 및 P15 프라이머를 이용한 PCR에 의해 *ascB* 유전자를 증폭시켰다. 상기 PCR은 1단계 98℃ 3분, 2단계 95℃ 30초, 3단계 50~60℃ 30초 및 4단계 72℃ 2분으로 수행하였고, 상기 2단계에서 4단계를 30회 반복하였다. 이후, 상기 PCR 산물에 프라이머 P11을 이용한 PCR 방법에 의해 RBS(리보솜 결합 부위; AAGAAG) 및 *PstI* 제한효소 부위를 도입하였다. 상기 얻어진 단편을 *PstI* 및 *AvrII*로 처리한 후, 동일한 제한효소로 처리한 플라스미드 pZB(Lee, S. K. et al., *Journal of Bacteriology*, 187, 2793-2800 참고)에 삽입하여 재조합 플라스미드 "pZB-A"를 제조하였다. 상기 플라스미드를 CP12CHBASC 균주에 전기천공법으로 도입하여 *ascB*가 과발현된 균주인 "CP12CHBASC-pZB-A"를 제조하였다.

[0088] <5-2> *chbF* 과발현 균주의 제조

[0089] 대장균 MG1655로부터 Geneall kit(General Biosystem, 한국)를 사용하여 게놈 DNA를 얻은 후, P12 및 P13 프라이머를 이용한 PCR에 의해 *chbF* 유전자를 증폭시켰다. 상기 PCR은 1단계 98℃ 3분, 2단계 95℃ 30초, 3단계 50~60℃ 30초 및 4단계 72℃ 2분으로 수행하였고, 상기 2단계에서 4단계를 30회 반복하였다. 이후, 상기 PCR 산물에 프라이머 P11을 이용한 PCR 방법에 의해 RBS(리보솜 결합 부위; AAGAAG) 및 *PstI* 제한효소 부위를 도입하였다. 상기 얻어진 단편을 *PstI* 및 *AvrII*로 처리한 후, 동일한 제한효소로 처리한 플라스미드 pZB(Lee, S. K. et al., *Journal of Bacteriology*, 187, 2793-2800 참고)에 삽입하여 재조합 플라스미드 "pZB-C"를 제조하였다. 상기 플라스미드를 대장균 MG1655에 전기천공법으로 도입하여 *chbF* 과발현 균주인 "CP12CHBASC-pZB-C"를 제조하였다.

[0090] <5-3> *ascB* 결실 균주의 제조

[0091] 실시예 1에서 사용한 pKD13의 카나마이신 카세트를 P18 및 P19 프라이머쌍을 사용한 PCR에 의해 증폭시켰다. 온도 민감성 복제를 하는  $\lambda$ -Red 재조합효소 발현 플라스미드 pSIM5 [문헌 Datta et al., *Gene*, 379, 109-115, 2006 참조]를 갖는 균주(대장균 DH10B, gifted Professor Donald Church)를 42℃에서 15분간 유도시킨 다음, 상기 증폭된 카나마이신 카세트로 형질전환시켰다. 상기 형질전환된 균주의 게놈 DNA를 주형으로 하여 P22 및 P23 프라이머쌍을 이용한 PCR에 의해 카나마이신 카세트의 삽입을 확인하였다.

[0092] <5-4> *chbF* 결실 균주의 제조

[0093] 실시예 1에서 사용한 pKD13의 카나마이신 카세트를 P16 및 P17 프라이머쌍을 사용한 PCR에 의해 증폭시켰다. 온도 민감성 복제를 하는  $\lambda$ -Red 재조합효소 발현 플라스미드 pSIM5 [문헌 Datta et al., *Gene*, 379, 109-115, 2006 참조]를 갖는 균주(대장균 DH10B, gifted Professor Donald Church)를 42℃에서 15분간 유도시킨 다음, 상기 증폭된 카나마이신 카세트로 형질전환시켰다. 상기 형질전환된 균주의 게놈 DNA를 주형으로 하여 P20 및 P21 프라이머쌍을 이용한 PCR에 의해 카나마이신 카세트의 삽입을 확인하였다.

[0094] 상기 <5-1> 내지 <5-4>에서 사용된 프라이머 서열을 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

[0095]

사용목적	프라이머	서열번호
RBS 및 PstI 제한 효소 도입	P11	8
<i>chbF</i> 증폭	P12	9
	P13	10
	P14	11
<i>ascB</i> 증폭	P15	12
	P16	13
	P17	14
<i>chbF</i> 결실	P18	15
	P19	16
	P20	17
<i>ascB</i> 결실	P21	18
	P22	19
	P23	20

[0096]

[0097]

**실시예 6: *ascB* 및 *chbF* 변이 균주들의 셀로바이오스 상에서의 성장률 및 β-글루코시다아제 활성 측정**

[0098]

실시예 5에서 제조된 *ascB/chbF* 변이 균주들의 셀로바이오스 상에서의 성장률 및 β-글루코시다아제 활성을 하기와 같이 측정하였다.

[0099]

실험 균주들을 최소 셀로바이오스 배지 상에서 배양하면서, 4시간마다 1 mL의 배양액을 회수하여 -20℃에서 보관하였다. 원심분리하여 세포 펠렛을 회수한 다음, 100 μL의 100 mM 인산나트륨 완충액(pH 7.0)에 용해시켰다. 그리고 나서, 400 μL의 10 mM p-니트로페닐-β-글루코사이드(PNPG)를 첨가하여 37℃에서 40분간 배양하였다. 이후, 1 M 탄산나트륨 용액을 첨가하여 상기 반응을 정지시켰다. 발색된 노란색을 410 nm 또는 600 nm에서 OD를 측정하여 정량화하였다. 모든 실험은 3회 반복 수행하여 평균±표준편차로 나타내었다.

[0100]

상기 실험결과를 도 8의 A 내지 D에 나타내었다. 도 8의 A 내지 C는 세포 성장률을 나타내며, 도 8의 D는 β-글루코시다아제 활성을 나타낸다.

[0101]

도 8의 A는 *chbF*가 과발현된 균주의 셀로바이오스 상에서의 성장률을 나타낸 것으로서, 정사각형(■)은 CP12CHBASC30 균주를, 삼각형(▲)은 *chbF*가 과발현된 CP12CHBASC-pZB-C 균주를, 마름모(◆)는 CP12CHBASC 균주를 가리킨다. 또한, 점선은 유도물질(inducer)로서 테트라사이클린을 사용하지 않고 성장한 균주를 나타내며, 직선은 2 ng/mL의 테트라사이클린의 존재하에 성장한 균주를 나타낸다.

[0102]

상기 결과에서 보는 바와 같이, *chbF*가 과발현된 CP12CHBASC-pZB-C 균주는 CP12CHBASC 균주에 비해 높은 성장을 보였다. 이는 *chbF*를 과발현시킴으로써 셀로바이오스 이용률을 향상시킬 수 있음을 보여준다.

[0103]

한편, 도 8의 B는 *ascB*가 과발현된 균주의 셀로바이오스 상에서의 성장률을 나타낸 것으로서, 정사각형(■)은 CP12CHBASC30 균주를, 삼각형(▲)은 *ascB*가 과발현된 CP12CHBASC-pZB-A 균주를, 마름모(◆)는 CP12CHBASC 균주를 가리킨다. 또한, 점선은 유도물질(inducer)로서 테트라사이클린을 사용하지 않고 성장한 균주를 나타내며, 직선은 2 ng/mL의 테트라사이클린의 존재하에 성장한 균주를 나타낸다.

[0104]

*ascB*가 과발현된 CP12CHBASC-pZB-A 균주는 CP12CHBASC 균주에 비해 높은 성장을 보였으며, 특히 CP12CHBASC30 균주와 유사한 성장을 나타내었다. 이는 *ascB*만을 과발현시킴으로써 셀로바이오스의 이용률을 향상시킬 수 있음을 보여준다.

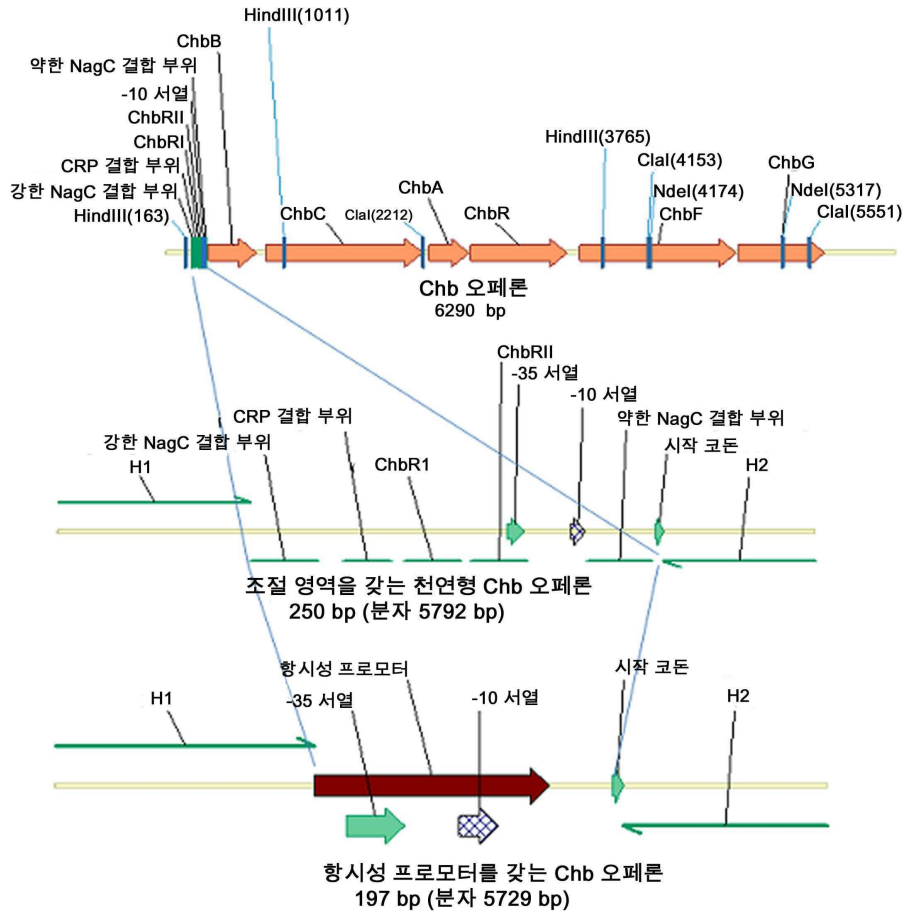
[0105]

또한, 도 8의 C는 *chbF*가 결실된 균주 및 *ascB*가 결실된 균주의 셀로바이오스 상에서의 성장률을 나타낸 것으로서, 삼각형(▲)은 *chbF*가 결실된 CP12CHBASC30 균주를, 정사각형(■)은 CP12CHBASC30 균주를, 마름모(◆)는 CP12CHBASC 균주를, 원(●)은 *ascB*가 결실된 CP12CHBASC30 균주를 가리킨다.

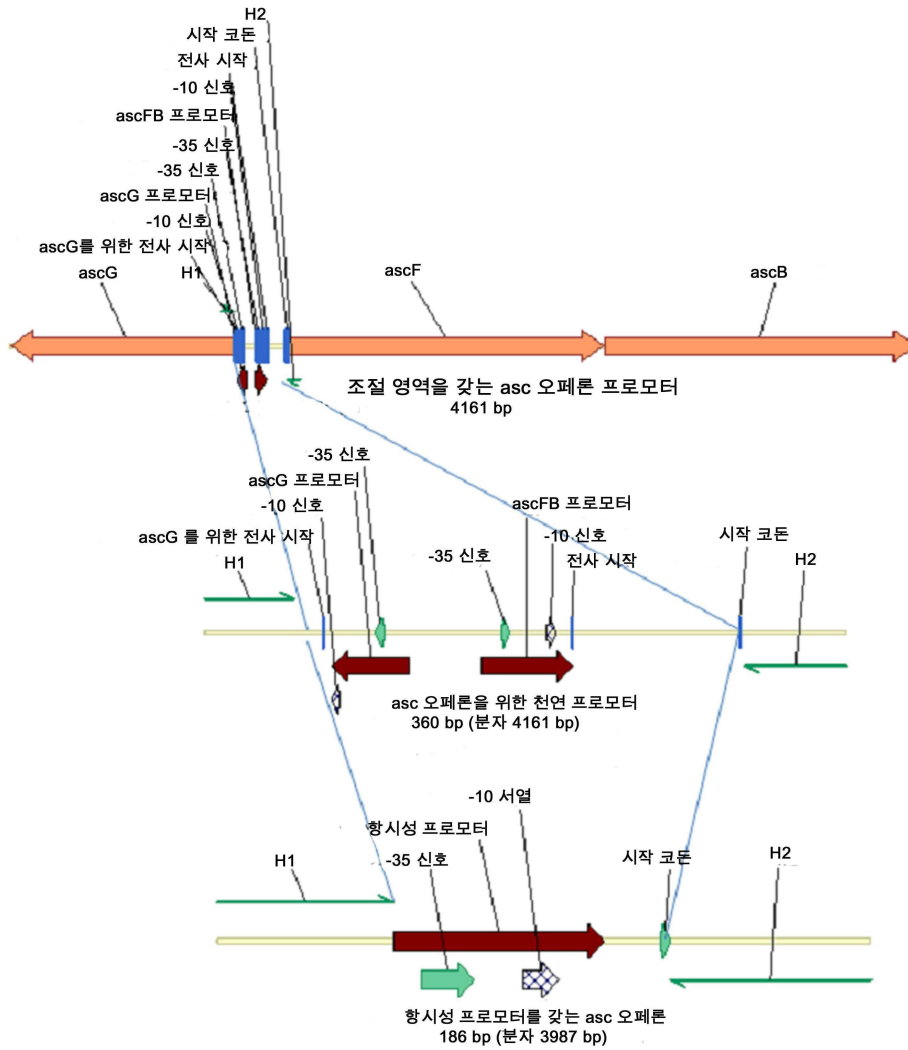
- [0106] 상기 결과에서 보는 바와 같이, *ascB* 결실 균주는 성장 속도가 느리고 *chbF* 결실 균주는 성장속도에 변화가 없었다. 이는 *ascB*가 *chbF* 보다 셀로바이오스 대사에서 더 중요한 요소임을 보여준다.
- [0107] 나아가, 도 8의 D는 *ascB*가 과발현된 균주에서의  $\beta$ -글루코시다아제 생성 및 안정성을 PNPg를 기질로 사용하여 측정된 것으로서, 마름모(◆)는 CP12CHBASC 균주를, 정사각형(■)은 CP12CHBASC30 균주를, 삼각형(▲)은 CP12CHBASC-pZB-A를 나타낸다.
- [0108] 상기 도에서 보는 바와 같이, CP12CHBASC 균주는  $\beta$ -글루코시다아제 활성이 거의 없었으나, *ascB*가 과발현된 CP12CHBASC-pZB-A 균주는 배양 시간에 따라  $\beta$ -글루코시다아제 활성이 높아지는 것으로 나타났다. 상기 결과는 *ascB* 과발현만으로  $\beta$ -글루코시다아제의 발현이 증가한다는 것을 보여준다.
- [0109] **실시예 7: *ascB* 과발현 균주의 셀로바이오스 및 기타 당의 공동 대사 확인**
- [0110] 실시예 5에서 제조된 *ascB* 과발현 균주의 셀로바이오스 및 기타 당(자일로스, 만노스 및 갈락토스)의 동시 대사 여부를 살펴보기 위하여, 상기 균주를 2 g/L의 농도의 셀로바이오스 및 2 g/L의 농도의 기타 당(자일로스, 갈락토스 및 만노스)이 첨가된 M9 최소 배지를 함유하는 250 mL 웨이크 플라스크에서 배양하였다. 이후 5시간 간격으로 배양액을 회수하고, 배양액 중의 셀로바이오스 및 자일로스/갈락토스/만노스의 잔류 농도를 HPX-87P 컬럼 (Bio-Rad) 및 굴절율 검출기(Shimadzu)가 장착된 시마주(Shimadzu) HPLC 스테이션(station)을 이용하여 측정하였다. HPLC-등급의 깨끗한 물을 0.6 mL/분의 유속으로, 이동상으로 사용하였다. 오븐 온도는 80°C로 유지하였다. 다양한 농도의 자일로스 및 셀로바이오스를 이용하여 표준 곡선을 결정하였다.
- [0111] 측정 결과를 도 9에 나타내었다. 도 9의 A는 CP12CHBASC 균주를 대상으로 실험한 것이고, 도 9의 B는 *ascB*가 과발현된 CP12CHBASC-pZB-A 균주를 대상으로 실험한 것이다. 또한, 상기 그래프에서 마름모(◆)는 셀로바이오스의 농도(g/L)를, 사각형(■)은 자일로스/갈락토스/만노스의 농도(g/L)를 가리키며, 삼각형(▲)은 균주의 성장 속도(OD)를 가리킨다.
- [0112] 상기 도에서 보는 바와 같이, *ascB* 과발현 균주들은 CP12CHBASC 균주들보다 만노스/갈락토스 및 셀로바이오스를 더 빠르게 소모하였다(A2, A3, B2 및 B3 참조). 이들 결과들은 셀로바이오스의 가수분해로부터 생성된 세포내 글루코스가 CCR(carbon catabolite repression)에 기여하지 않는다는 것을 보여준다. 하지만, CP12CHBASC30 균주가 자일로스와 셀로바이오스를 동시에 소모하는 것과는 달리, *ascB* 과발현 균주는 자일로스가 고갈된 후 셀로바이오스를 소모하는 것으로 판단되었다(A1 및 B1 참조).

도면

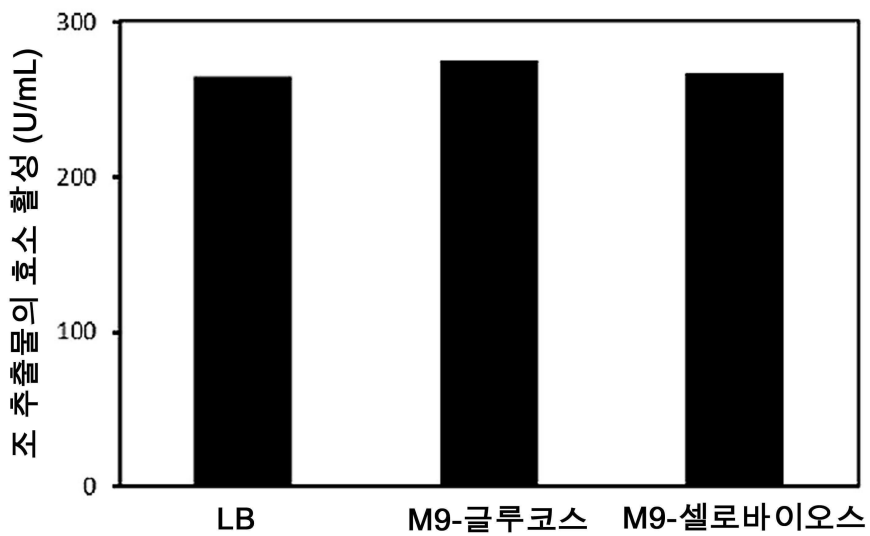
도면1



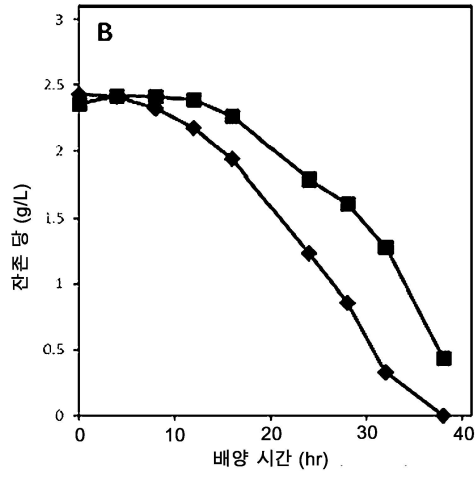
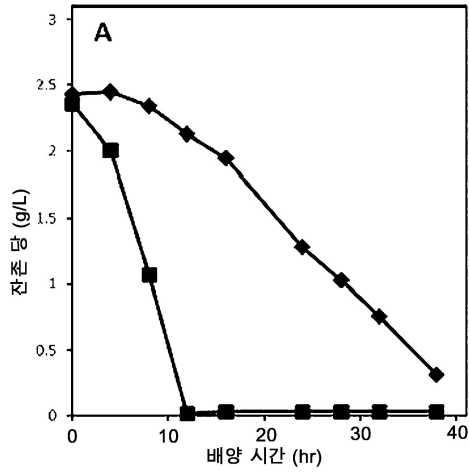
도면2



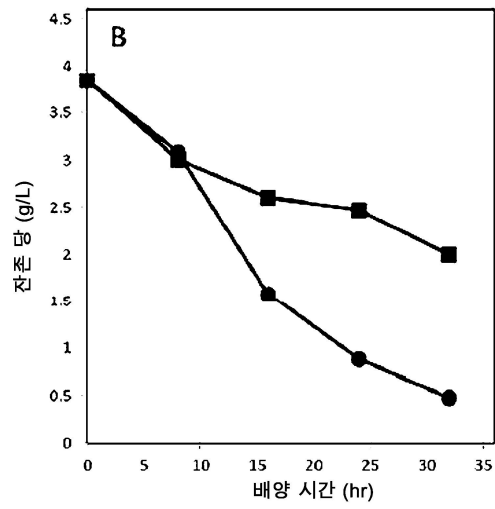
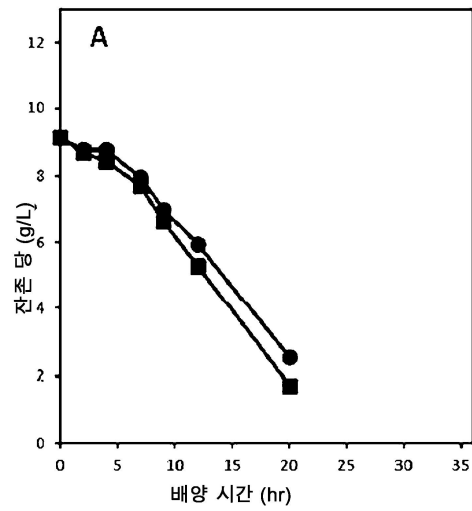
도면3



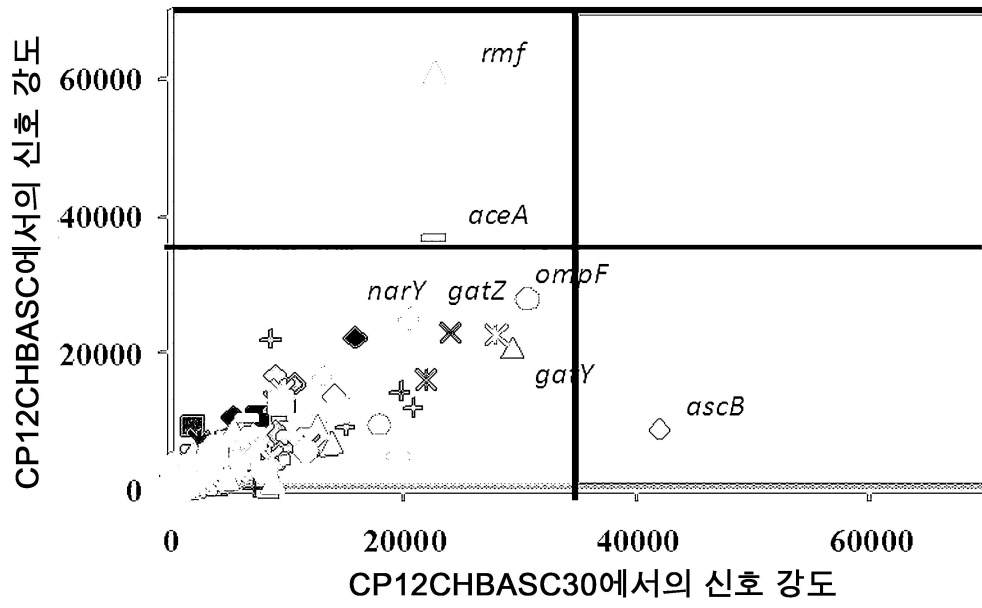
도면4



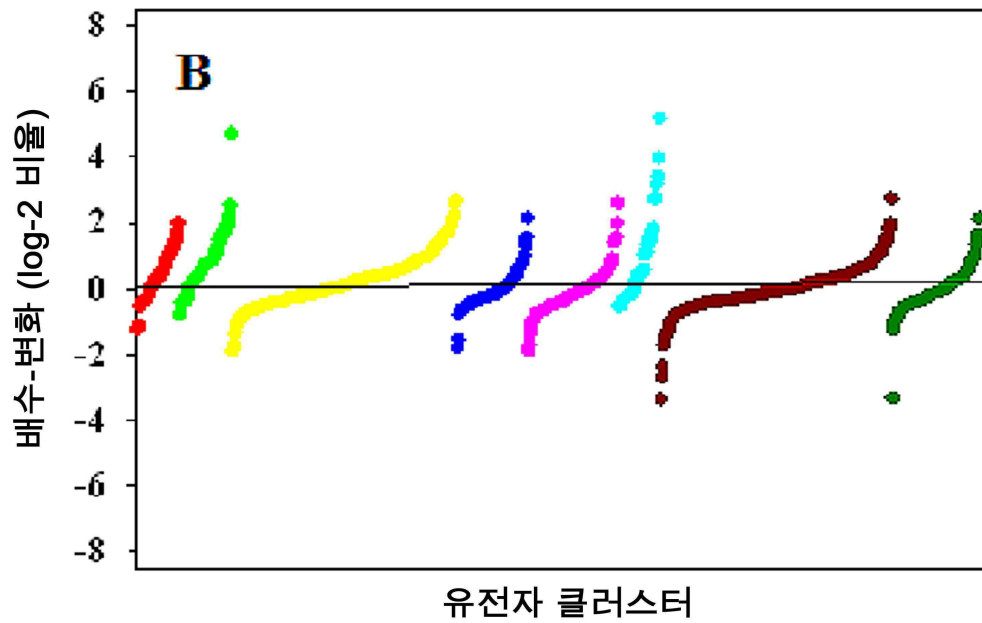
도면5



도면6a

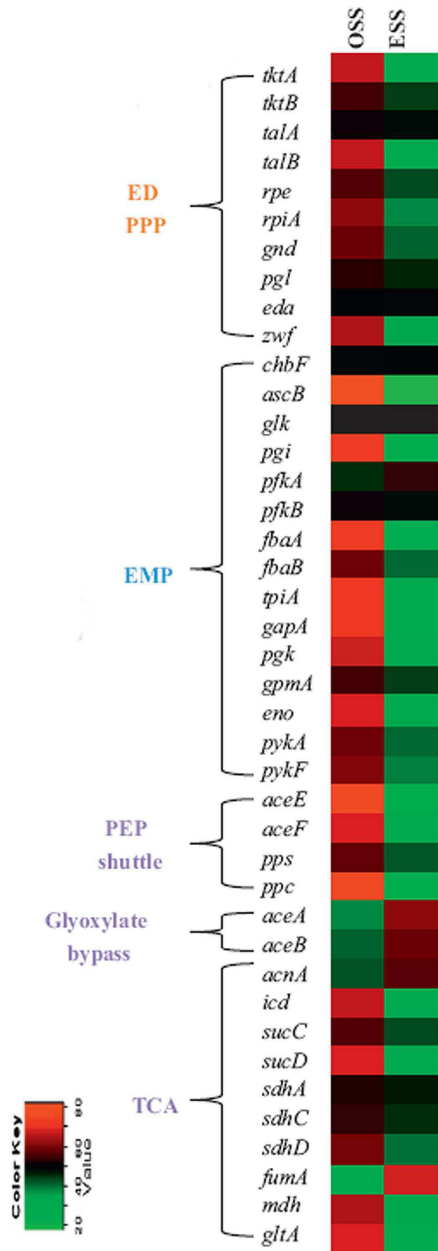


도면6b

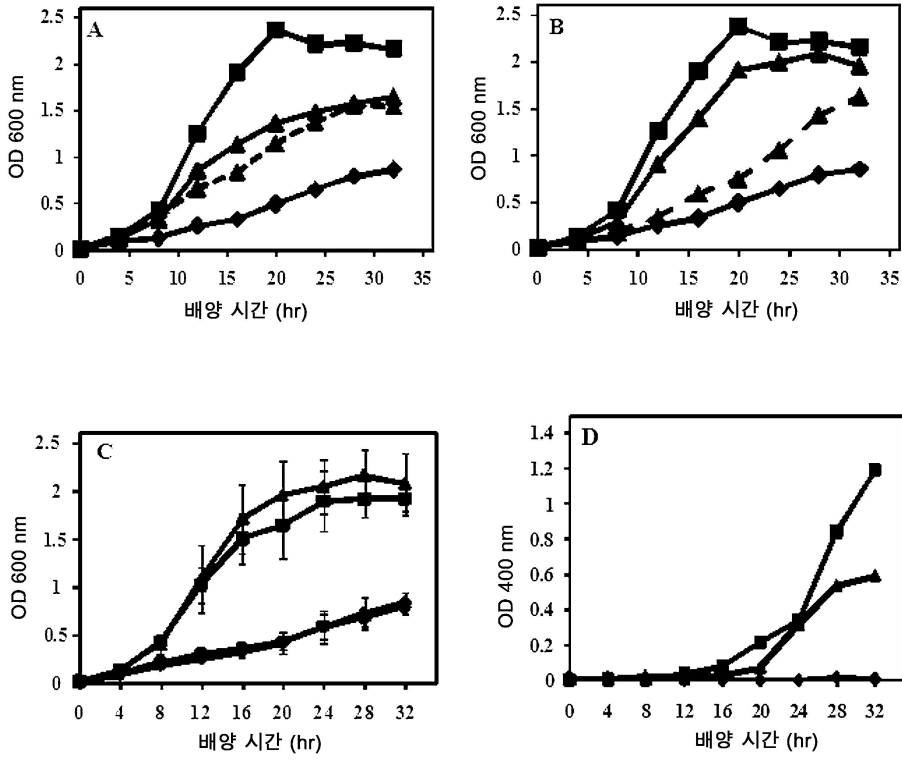




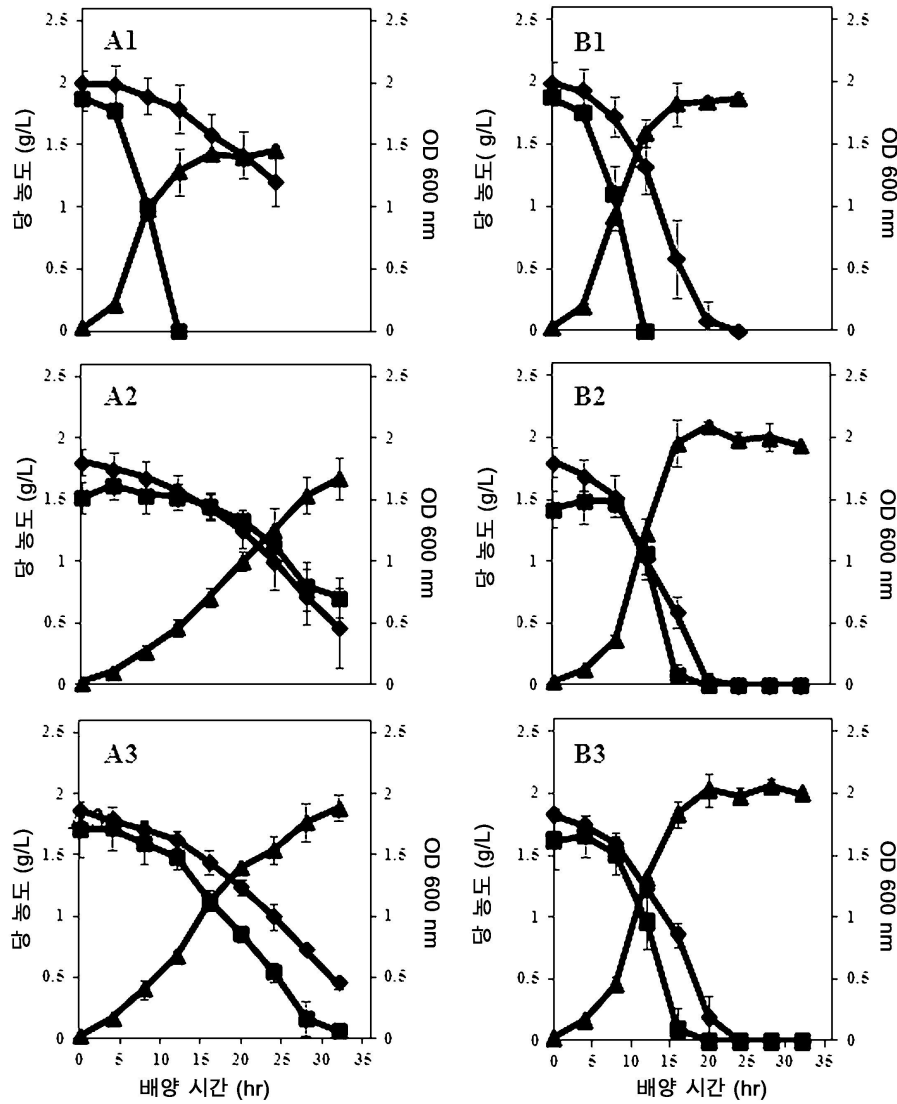
도면7b



도면8



도면9



서열목록

- <110> Ulsan National Institute of Science and Technology Academy-Industry Research Corporation
- <120> METHOD FOR PREPARING MUTANT MICROORGANISM HAVING IMPROVED  
CELLOBIOSE UTILIZATION AND BEING CAPABLE OF STIMULTANEOUSLY  
UTILIZING CELLOBIOSE AND OTHER SUGARS VIA OVEREXPRESSION OF ASCB  
OR CHBF GENE
- <130> FPD201206-0039
- <160> 21
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- <211> 142

<212> DNA  
 <213> Escherichia coli  
 <400> 1  
 cttattatc ttcgcaatt attgcccga aatgtgaaga gggtcataac cacaggtcaa 60  
  
 ggagaaacaa tttataaggt caaagaaata ctattgctca ggtctatacc gtatactct 120  
 ttcagccaca aaaaaagtca tg 142  
 <210> 2  
 <211> 79  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> constitutive promoter  
 <400> 2  
 catatacaag tttattcttg aactagtcg gccaaaatga tataatacct gagtactgtt 60  
 cacacaggaa acagctatg 79  
 <210> 3  
 <211> 253  
 <212> DNA  
 <213> Escherichia coli  
 <400>  
 > 3  
 ccctttacac gcaatcaacg cagtgtactg caccgtttgc cgattgtcct tgcacaatcg 60  
 gcgggaaaaa tattcaggtg accggtttca caaatataaa aaatgaacaa ttcactctct 120  
 tgcttattta gtgacaacta ttcattgatt tgtgaaaccg gtttcttaac tccgtttcag 180  
 catcggcatt tttccgtcac gtcgactgat aacaactaca tctaccctac tgataacagg 240  
 ataaaatccg atg 253  
 <210> 4  
 <211> 47  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> SOEing CP12 promoter  
  
 <400> 4  
 catagctgtt tcctgtgtga acagtactca ggtattatat cattttg 47  
 <210> 5

<211> 46  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> SOEing CP12 promoter  
 <400> 5  
 tcaggtatta tatcattttg gccgactagt gtcaagaata aacttg 46  
 <210> 6  
 <211> 46  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> SOEing CP12 promoter  
 <400> 6  
 tagtgtcaag aataaacttg tatatgattc cggggatccg tcgacc 46  
 <210> 7  
 <211>  
 > 1425  
 <212> DNA  
 <213> Escherichia coli  
 <400> 7  
 atgtcagtat ttccagaaag ttttttatgg ggcggcgcgc ttgccccaa ccagtctgaa 60  
 ggtgcgttcc gtgaaggatga caaaggctcg accactgtcg atatgatccc acacggcgag 120  
 catcgaatgg cggtgaaact ggggctggaa aaacgttttc agttgcgaga tgacgagttt 180  
 tatcccagcc atgaggcgac ggatttttat catcgttata aagaagatat cgcctgatg 240  
 gcagagatgg gattcaaggt tttccgtacc tcaattgcct ggagccgtct ctttccgcag 300  
 ggcgatgaaa tcacgccc aa tcagcagggc attgcttttt atcgttctgt ctttgaagag 360  
 tgtaaaaagt acggtatcga accgctggtc acgttgtgcc acttcgatgt gccgatgcat 420  
 ctggtcaccg aatatggctc ctggcgtaac cgcaagctgg tggagttttt cagccgctac 480  
 gccagaacct gctttgaagc atttgatggt ctggtgaaat actggctaac cttcaatgaa 540  
 atcaacatta tgttgcatag cccgttctcc ggcgcgggtc tgggttttga agaagtgaa 600  
 aatcaggatc aggtgaaata tcaggccgcg catcaccagc tgggtgccag tgcgctagcc 660  
 accaaaatcg cccatgaggt taaccgcaa aatcaggtgg gctgtatgct ggcgggcggt 720  
 aacttctacc cttacagtgt caagccggaa gatgtctggg cggcgctgga gaaagaccgg 780  
 gaaaacctgt tttttatcga tgtgcaggcg cggggcacgt atccggetta ctctgcccgc 840

gtattccgcg aaaaagggt aaccatcaac aaagcaccgg gcgatgatga aatcctgaaa 900  
aacaccgtcg attttgtctc tttcagctat tacgcctcgc gctgcgcctc ggcggagatg 960  
aacccaaca acagcagtg gcgcaacgtg gtgaaatcgc tgcgtaatcc gtatctacag 1020  
gtgagcgact ggggctgggg aattgatcca ctcggtctgc gtatcacat gaatatgatg 1080  
tacgatcgtt atcagaagcc gctgtttctg gtggaaaacg gcctgggagc aaaagatgaa 1140  
tttctgcca atggcgagat taacgacgac tatcgcacatca gctacttacg cgaacatc 1200

cgcgcaatgg gcgaagcgt tgcagacggc attccgctga tgggctacac cacatggggc 1260  
tgtattgatt tagtttccgc ctctacgggt gaaatgagca aacgctacgg ctttctcttt 1320  
gttgaccgtg acgacgcagg caacggtagc ctgacgcgca cgcgtaagaa atcattctgg 1380  
tggataaaa aagtattgc cagtaatggg gaagatttag agtag 1425

<210> 8  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> P11 primer  
<400> 8  
gcctgcagaa ataattttgt ttaactttaa gaaggagata tacat 45

<210>  
9  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> P12 primer  
<400> 9  
aactttaaga aggagatata catatgagcc agaaattaa agtcg 45

<210> 10  
<211> 36  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> P13 primer  
<400> 10  
ccctaggtt attaatgtgc tttttaagc tctgcg 36

<210> 11  
<211> 43

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> P14 primer  
 <400> 11  
 aactttaaga aggagatata catatgtcag tatttccaga aag 43

<210> 12  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> P15 primer  
 <400> 12  
 ccctaggtt attactctaa atcttccca ttac 34

<210> 13  
 <211> 71  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> P16 primer  
 <400> 13  
 atcagtaagc gttccataat cagcctcggg taatgtgctt ttttaagctc gtgtaggctg 60  
 gagctgcttc g 71

<210> 14  
 <211> 70  
 <212> DNA  
 <213>  
 > Artificial Sequence  
 <220><223> P17 primer  
 <400> 14  
 ggggcagata tgccagatat cagtattctg tactgaaggg agaaattatg attccgggga 60  
 tccgtcgacc 70

<210> 15  
 <211> 71  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> P18 primer

<400> 15  
 gtacaaccga ccgtgcctca agaagtaagt ctttaattgag gatgaaaatg gtgtaggctg 60  
 gagctgcttc g 71  
 <210> 16

<211> 70  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> P19 primer  
 <400> 16  
 ggcgttcagc ccgcatccgg cactgttacc tactctaaat cttecccatt attccgggga 60  
 tccgtcgacc 70  
 <210> 17  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> P20 primer  
 <400> 17  
 tcgtcgacgt gacaatccca ttg 23  
 <210> 18  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> P21 primer  
 <400> 18  
 attgcgtttg aggccgggta 20  
 <210> 19  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> P22 primer  
 <400> 19  
 tcctcacact gttgctcggc tttg 24  
 <210> 20

<211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> P23 primer  
 <400> 20  
 gaaccagctc tgatgcaaaa tgcta 25  
 <210>  
 21  
 <211> 1353  
 <212> DNA  
 <213> Escherichia coli  
 <400> 21  
 ttaatgtgct ttttaagct ctgcgatgca gtcggcaaag tttggcagcc atttctcgtg 60  
 cgccagaatc atctcgcgtg ccagcagctc agcatcgcga tcggaatgca ccaacggact 120  
 aaggtttagc gccagtaaca catcgtaaaa ttctccgcta agtgcggcgt tactggcagc 180  
 aatctcgaag cctttaatgg tgtgaatcag cccattact ttatcatcga aatgcgtaat 240  
 gcgcggatgt ggcgtcgcgc catcgcgccc cagcttacag gtcatttcta ctgccagtc 300  
 tgccggaata ttatcaatct gcccatgatg cgggatatta acgtaatggt ctgcttgctt 360  
 gtcgtttag atagcgttga tcaacttcga tgctgcatca gagtaataag ccccaccgcg 420  
 ctgttccagt tctttcggt taactttcag ctcaggattt ttatacagct caaaaagttg 480  
 tttctcgact ttctgtacta cctgcgctcg tgcgccgect ttgtagtatt cgcccatttc 540  
 aatagccagc atctctttct gcttgaagta atacagcaga taagaacatg gcagcagatt 600  
 caacgaacga attaagcctt cactaaatgg cagatcgaaa atatttttta cagaggacgc 660  
 ttttaactgc cctgacgcca caccatcaag caattcggca aagcgcgact tgccatttat 720  
 cagcacatcc ttaatgaaca ccatatggtt gaggccgaac aaatcgatag ataaatcatc 780  
 gctgtctttc agcatcagaa catcgcgaat aaacatcttc atgccgatcg gaattattaca 840  
 cacgccgata aagcgtttaa atccggtatg acgataaacg gcttcagtga ccattcccgc 900  
 cgggttagtg aagttaatca cccatgcatt cggacaaaagt tcttcgacat cttttacgat 960  
 gtcaaaaatc accggaatgg tacgcagacc tttaaacaaa ccgcccgcgc cgttggtttc 1020  
 ctgaccaaga taaccatgac ttaatggaat acggtcatcc agttcacgcg ccgtaattg 1080  
 gccaacgcgc agttgggtag taacgaaatc agcatcttcc aatgcttcgc ggcgatccag 1140  
 cgttttataa agcttcatcg ggacgccagc gttatcaatc atccgttggc agagatcgaa 1200

aataatatcc agtttcggtt taccacctic gacatccacc agccataatt cgctgaccgg	1260
caattcgtga taacgcttaa taaatcctic cagtaactcc ggggtatagc tgctcccgcc	1320
accaatagtg acgactttta atttctggct cat	1353