



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년06월08일
(11) 등록번호 10-1743105
(24) 등록일자 2017년05월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/74 (2006.01) C12N 9/88 (2006.01)
C12P 7/64 (2006.01) C12R 1/15 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/74 (2013.01)
C12N 9/88 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0012671
(22) 출원일자 2015년01월27일
심사청구일자 2015년01월27일
(65) 공개번호 10-2016-0092557
(43) 공개일자 2016년08월05일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020130132254 A
KR1020130001039 A

(73) 특허권자
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
이진원
서울특별시 송파구 양재대로 1218 (방이동, 올림
픽션수기자촌아파트) 201동 1601호
이병훈
서울특별시 영등포구 양평로12가길 2 509호 (당산
동6가)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
윤대웅, 공병욱

전체 청구항 수 : 총 9 항

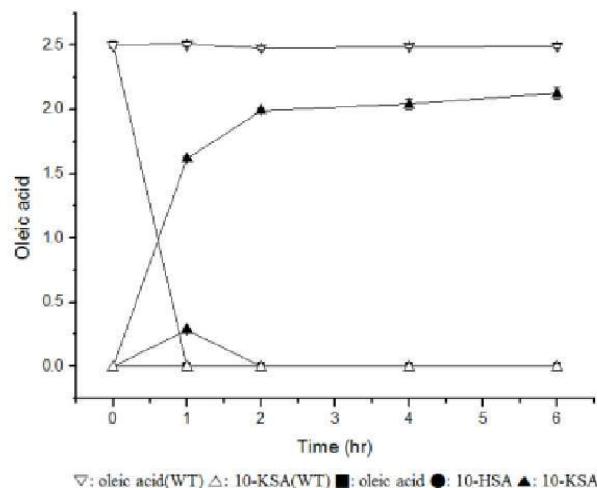
심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 10-케토스테아린 산의 생산능이 우수한 코리네박테리움 글루타미쿰 균주 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 (a) 하이드라테이즈(hydratase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열; (b) 알코올 디하이드로게네이스(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열; 또는 (c) 하이드라테이즈(hydratase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열과 알코올 디하이드로게네이스(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현벡터로 형질전환된 10-케토스테아린 산(10-ketostearic acid) 생산용 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) 균주에 관한 것이다. 야생종 코리네박테리움 글루타미쿰 균주가 10-케토스테아린 산의 생산이 전혀 이루어지지 않는데 반해, 유전자 조작을 통해 재조합된 본 발명의 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) 균주는 우수한 10-케토스테아린 산 생성능을 가지며, 10-케토스테아린 산을 탄소원으로 사용하지 않아 지속적으로 10-케토스테아린 산을 생산할 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류
C12P 7/6409 (2013.01)
C12R 1/15 (2013.01)

김현수

서울특별시 강남구 학동로 609 12동 907호 (청담동, 삼익아파트)

(72) 발명자

이재범

대전광역시 대덕구 동춘당로114번길 47 (송촌동, 선비마을2단지아파트) 206동 201호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 10044604

부처명 산업통상자원부

연구관리전문기관 한국산업기술평가관리원

연구사업명 산업핵심기술개발사업

연구과제명 지방/지방산으로부터 장쇄디카르복실산의 생물/화학적 전환 기술 개발

기여율 1/1

주관기관 (주)에이피테크놀로지

연구기간 2014.06.01 ~ 2015.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열목록 제1서열의 아미노산 서열로 이루어진 하이드라테이즈(hydratase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열과 서열목록 제3서열의 아미노산 서열로 이루어진 알코올 디하이드로게네이스(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현벡터로 형질전환된 10-케토스테아린 산(10-ketostearic acid) 생산용 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) 균주.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 코리네박테리움 글루타미쿰 균주는 서열목록 제1서열의 아미노산 서열로 이루어진 하이드라테이즈(hydratase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열과 서열목록 제3서열의 아미노산 서열로 이루어진 알코올 디하이드로게네이스(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 각각 포함하는 2개의 발현벡터로 공동형질전환된 것을 특징으로 하는 코리네박테리움 글루타미쿰 균주.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 코리네박테리움 글루타미쿰 균주는 서열목록 제1서열의 아미노산 서열로 이루어진 하이드라테이즈(hydratase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열과 서열목록 제3서열의 아미노산 서열로 이루어진 알코올 디하이드로게네이스(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 모두 포함하는 1개의 발현벡터로 형질전환된 것을 특징으로 하는 코리네박테리움 글루타미쿰 균주.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 하이드라테이즈(hydratase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 스테노트로포모나스 말토틸리아(*Stenotrophomonas maltophilia*)로부터 유래하고, 알코올 디하이드로게네이스(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 마이크로코쿠스 루테우스(*Micrococcus luteus*)로부터 유래한 것을 특징으로 하는 코리네박테리움 글루타미쿰 균주.

청구항 5

삭제

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 하이드라테이즈를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열목록 제 2 서열의 뉴클레오티드 서열로 이루어지고, 상기 알코올 디하이드로게네이스를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열목록 제 4 서열의 뉴클레오티드 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 코리네박테리움 글루타미쿰 균주.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 발현벡터는 도 3의 유전자 지도를 갖는 pCES-L10이고, 상기 뉴클레오티드 서열은 pCES-L10의 MCS(multiple cloning site)에 삽입되는 것을 특징으로 하는 코리네박테리움 글루타미쿰 균주.

청구항 8

다음 단계를 포함하는 10-케토스테아린 산(10-ketostearic acid) 생산용 코리네박테리움 글루타미컴(*Corynebacterium glutamicum*) 균주의 제조방법:

- (a) 서열목록 제1서열의 아미노산 서열로 이루어진 하이드라테이즈(hydratase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열과 서열목록 제3서열의 아미노산 서열로 이루어진 알코올 디하이드로게네이스(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 발현벡터에 삽입시키는 단계; 및
- (b) 상기 뉴클레오티드 서열이 삽입된 발현벡터로 코리네박테리움 글루타미컴 균주를 형질전환시키는 단계.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 코리네박테리움 글루타미컴 균주를 형질전환시키는 단계 (b)는 전기천공 방법으로 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

다음 단계를 포함하는 10-케토스테아린 산(10-ketostearic acid) 생합성 방법:

- (a) 제 1 항 내지 제 4 항, 제 6 항 및 제 7 항 중 어느 한 항의 코리네박테리움 글루타미컴 균주를 배양하여 10-케토스테아린 산을 생합성하는 단계; 및
- (b) 상기 단계 (a)의 생합성된 10-케토스테아린 산을 수득하는 단계.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 10-케토스테아린 산(10-ketostearic acid) 생산용 코리네박테리움 글루타미컴(*Corynebacterium glutamicum*) 균주, 이의 제조방법 및 상기 균주를 이용한 10-케토스테아린 산 생합성 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 코리네박테리움 글루타미컴(*Corynebacterium glutamicum*)은 그람-양성 토양박테리아로서, 비병원성이며 빠른 균 성장과 주변 환경 적응에 강한 성질로 인해 현재 산업용 균주로 많이 사용되고 있다. 특히 현재 글루타메이트와 라이신 등의 아미노산 생산용 균주으로써 산업현장에서 널리 사용 되고 있는 균주이다(도 1).

[0003] 한편, 미생물을 이용하여 10-하이드록시스테아린 산(10-hydroxystearic acid; 10-HSA) 및 10-케토스테아린 산(10-ketostearic acid; 10-KSA)의 생산 연구가 많이 진행되어왔지만, 산업용 균주인 코리네박테리움 글루타미컴으로 생산하는 연구는 아직 진행되지 않았으며, 일반적인 10-HSA 및 10-KSA 생산 경로는 도 2와 같다.

[0004] 현재 재생 가능한 지방산을 이용한 생물 전환반응에 관한 연구에 가장 널리 알려진 균주는 대장균(*Escherichia coli*)이다. 하지만, 대장균 같은 경우는 10-KSA를 탄소원으로 사용하기 때문에 10-KSA를 지속적으로 생산하기란 쉽지 않다.

[0005] 그리하여, 본 발명자들은 10-KSA를 탄소원으로 사용하지 않고, 지속적으로 생산 가능하도록, 적응력이 강한 코리네박테리움 글루타미컴(*Corynebacterium glutamicum*)을 이용하여 10-KSA를 생산하고자 하였다.

[0006] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허공보 제10-2014-0015086호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명자들은 우수한 10-케토스테아린 산(10-ketostearic acid) 생산능을 가지며, 유전자 조작을 통해 10-케토스테아린 산 생합성 대사산물을 안정적이고, 효과적으로 생산하는 균주의 개발을 위하여 예의 연구 노력하였고, 그 결과 스테노트로포모나스 말토피리아(*Stenotrophomonas maltophilia*) 유래 *OhyA* 유전자 및 마이크로코쿠스 루테우스(*Micrococcus luteus*) 유래 *ADH* 유전자군으로부터 선택된 1종 이상의 유전자를 코리네박테리움 글루타미컴(*Corynebacterium glutamicum*) 균주를 형질전환 시킨 결과, 효과적으로 10-케토스테아린 산 생합성 경로가 과발현되고, 10-케토스테아린 산을 탄소원으로 사용하지 않아 지속적으로 10-케토스테아린 산을 생산 가능함을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

[0009] 따라서, 본 발명의 목적은 10-케토스테아린 산(10-ketostearic acid) 생산용 코리네박테리움 글루타미컴(*Corynebacterium glutamicum*) 균주를 제공하는 데 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 상술한 본 발명의 10-케토스테아린 산 생산용 코리네박테리움 글루타미컴(*Corynebacterium glutamicum*) 균주의 제조방법을 제공하는 데 있다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상술한 본 발명의 코리네박테리움 글루타미컴(*Corynebacterium glutamicum*) 균주를 이용하여 10-케토스테아린 산 생합성 방법을 제공하는 데 있다.

[0012] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 하이드라테이즈(hydratase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열; (b) 알코올 디하이드로게네이즈(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열; 또는 (c) 하이드라테이즈(hydratase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열과 알코올 디하이드로게네이즈(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현벡터로 형질전환된 10-케토스테아린 산(10-ketostearic acid) 생산용 코리네박테리움 글루타미컴(*Corynebacterium glutamicum*) 균주를 제공한다.

[0014] 본 발명자들은 우수한 10-케토스테아린 산(10-ketostearic acid) 생산능을 가지며, 유전자 조작을 통해 10-케토스테아린 산 생합성 대사산물을 안정적이고, 효과적으로 생산하는 균주의 개발을 위하여 예의 연구 노력하였고, 그 결과 스테노트로포모나스 말토피리아(*Stenotrophomonas maltophilia*) 유래 *OhyA* 유전자 및 마이크로코쿠스 루테우스(*Micrococcus luteus*) 유래 *ADH* 유전자군으로부터 선택된 1종 이상의 유전자를 코리네박테리움 글루타미컴(*Corynebacterium glutamicum*) 균주를 형질전환 시킨 결과, 효과적으로 10-케토스테아린 산 생합성 경로가 과발현되고, 10-케토스테아린 산을 탄소원으로 사용하지 않아 지속적으로 10-케토스테아린 산을 생산 가능함을 확인하였다.

[0015] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 코리네박테리움 글루타미컴 균주는 하이드라테이즈(hydratase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열과 알코올 디하이드로게네이즈(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 각각 포함하는 2개의 발현벡터로 공동형질전환된다.

[0016] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 코리네박테리움 글루타미컴 균주는 하이드라테이즈(hydratase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열과 알코올 디하이드로게네이즈(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을

모두 포함하는 1개의 발현벡터로 공동형질전환된다.

- [0017] 본 명세서에서, “하이드라테이스(hydratase)”는 올레산(oleic acid)으로부터 10-하이드록시스테아린 산(10-hydroxystearic acid)을 생산하는 효소로서, *OhyA* 유전자가 이를 코딩하는 유전자이다.
- [0018] 본 발명의 발현벡터에서 발현되는 상기 하이드라테이스는 스테노트로포모나스 말토펠리아(*Stenotrophomonas maltophilia*)로부터 유래한 것을 사용하는 것이 바람직하다. 더욱 바람직하게는 서열목록 제1서열로 표시되는 하이드라테이스를 발현하도록 할 수 있으며, 상기 하이드라테이스를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 바람직하게는 서열목록 제2서열로 표시될 수 있다.
- [0019] 본 명세서에서, “알코올 디하이드로게네이스(alcohol dehydrogenase)”는 10-하이드록시스테아린 산(10-hydroxystearic acid)으로부터 10-케토스테아린 산(10-ketostearic acid)을 생산 하는 효소로서, *ADH* 유전자가 이를 코딩하는 유전자이다.
- [0020] 본 발명의 발현벡터에서 발현되는 상기 알코올 디하이드로게네이스는 마이크로코쿠스 루테우스(*Micrococcus luteus*)로부터 유래한 것을 사용하는 것이 바람직하다. 보다 바람직하게는 서열목록 제3서열로 표시되는 알코올 디하이드로게네이스를 발현하도록 할 수 있으며, 상기 알코올 디하이드로게네이스를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 바람직하게는 서열목록 제4서열로 표시될 수 있다.
- [0021] 본 발명에서 이용되는 뉴클레오티드 서열은 상기 언급된 서열 이외에 상기 뉴클레오티드 서열에 대하여 실질적인 동일성을 나타내는 뉴클레오티드 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 본 발명의 뉴클레오티드 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 80%의 상동성, 보다 바람직하게는 최소 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 최소 95%의 상동성을 나타내는 뉴클레오티드 서열을 의미한다. 서열비교를 위한 얼라인먼트 방법은 당업계에 공지되어 있다. 얼라인먼트에 대한 다양한 방법 및 알고리즘은 Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482(1981); Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443(1970); Pearson and Lipman, *Methods in Mol. Biol.* 24: 307-31(1988); Higgins and Sharp, *Gene* 73:237-44(1988); Higgins and Sharp, *CABIOS* 5:151-3(1989); Corpet et al., *Nuc. Acids Res.* 16:10881-90(1988); Huang et al., *Comp. Appl. BioSci.* 8:155-65(1992) and Pearson et al., *Meth. Mol. Biol.* 24:307-31(1994)에 개시되어 있다. NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-10(1990))은 NCBI (National Center for Biological Information) 등에서 접근 가능하며, 인터넷 상에서 blastp, blastm, blastx, tblastn and tblastx와 같은 서열 분석 프로그램과 연동되어 이용할 수 있다. BLSAT는 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>에서 접속 가능하다. 이 프로그램을 이용한 서열 상동성 비교 방법은 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_help.html에서 확인할 수 있다.
- [0022] 상기 유전자들은 발현벡터 내부에 도입되어 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)에서 발현되게 된다. 본 명세서에 있어서, 용어 “발현벡터”는 발현벡터의 전사에 제공되는 추가단편에 작동가능하게 연결된 관심의 폴리펩티드를 암호화하는 단편으로 구성되는 선형 또는 원형의 DNA 분자이다. 그와 같은 추가 단편은 프로모터 및 종료암호 서열을 포함한다. 발현벡터는 하나 이상의 복제 개시점, 하나 이상의 선택마커, 폴리아데닐화 신호 등을 또한 포함한다. 발현벡터는 일반적으로 플라스미드 또는 바이러스 DNA로부터 유도되거나, 또는 둘 다의 요소를 함유한다.
- [0023] 본 발명의 벡터 시스템은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있으며, 이에 대한 구체적인 방법은 Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press(2001)에 개시되어 있으며, 이 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.
- [0024] 본 발명의 상기 유전자를 인코딩하는 핵산 분자는 원핵세포에서 작동하는 프로모터에 작동적으로 연결(operatively linked)된다. 본 명세서에서, 용어 “작동적으로 결합된”은 핵산 발현 조절 서열(예: 프로모터, 시그널 서열, 또는 전사조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 해독을 조절하게 된다.
- [0025] 본 발명의 벡터는 전형적으로 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 원핵세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터(예컨대, tac 프로모터, lac 프로모터, lacUV5 프로모터, lpp 프로모터, pL^λ 프로모터, pR^λ 프로모터, rac5 프로모터, amp 프로모터, recA 프로모터, SP6 프로모터, trp 프로모터 및 T7 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결

서열을 포함하는 것이 일반적이다.

- [0026] 한편, 본 발명에 이용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드(예: pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHc79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, pET28a, pGEX 시리즈, pET 시리즈, pUC18K, pEKEx2 및 pCES-L10 등), 파지(예: λ gt4 λ B, λ -Charon, λ Δ z1 및 M13 등) 또는 바이러스(예: SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있으나, 바람직하게는 10-케토스테아린 산 생합성에 이용될 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)을 위한 특정 유전자를 미생물 생체 내로 운반하여 외부로부터 삽입된 유전자의 발현을 효과적으로 조절할 수 있도록 상기 발현벡터는 도 3의 유전자 지도를 갖는 pCES-L10이고, 상기 뉴클레오티드 서열은 pCES-L10의 MCS(multiple cloning site)에 삽입된다.
- [0027] 한편, 본 발명의 벡터는 선택표지로서, 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함하며, 예를 들어 암피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자가 있다.
- [0028] 본 발명의 발현 벡터는 프로모터서열, 발현 대상 유전자(구조 유전자)의 뉴클레오티드 서열 및 터미네이터 서열을 포함하며, 상기 서열들이 5'-3' 순서대로 연결되는 것이 바람직하다. 본 발명에서는 *OhyA* 및/또는 *ADH*의 유전자 서열이 5'-3' 순서대로 연결되어 제공되었다.
- [0029] 본 발명의 발현벡터에는 상기 유전자들이 효소의 과발현 기능을 포함하여 최소한의 길이를 가지도록 RBS(ribosomal bindingsite) 및 효소발현에 꼭 필요한 부분을 포함하는 염기서열만을 서열로 정하여 삽입시키는 것이 숙주세포의 대사부담(metabolic burden)을 줄이는 측면에서 바람직하다.
- [0030] 상기 유전자가 포함된 발현벡터는 이후 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) 내부로 도입되는데, 본 발명의 벡터를 대장균 내로 운반하는 방법은 CaCl₂ 방법(Cohen, S.N. et al., Proc. Natl. Acac. Sci. USA, 9:2110-2114(1973)), 하나한 방법(Cohen, S.N. et al., Proc. Natl. Acac. Sci. USA, 9:2110-2114(1973); 및 Hanahan, D., J. Mol. Biol., 166:557-580(1983)) 및 전기 천공 방법(Dower, W.J. et al., Nucleic. Acids Res., 16:6127-6145(1988)) 등에 의해 실시될 수 있으나, 형질전환체의 안정적 제조와 효율을 높이기 위해서는 전기 충격에 의한 형질전환 방법을 사용하는 것이 바람직하다.
- [0031] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 10-케토스테아린 산(10-ketostearic acid) 생산용 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) 균주의 제조방법을 제공한다: (a) (i) 하이드라테이즈(hydratase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열; (ii) 알코올 디하이드로게네이즈(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열; 또는 (iii) 하이드라테이즈(hydratase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열과 알코올 디하이드로게네이즈(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현벡터에 삽입시키는 단계; 및 (b) 상기 뉴클레오티드 서열이 삽입된 발현벡터로 코리네박테리움 글루타미쿰 균주를 형질전환시키는 단계.
- [0032] 본 발명의 10-케토스테아린 산 생산용 형질전환 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) 균주의 제조방법은 상술한 본 발명의 코리네박테리움 글루타미쿰 균주를 제조하는 것이므로 상술한 내용과 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.
- [0033] 본 발명의 또 다른 구현예에 따르면, 상기 코리네박테리움 글루타미쿰 균주를 발현시키는 단계 (b)는 전기충격 방법으로 수행된다.
- [0034] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 10-케토스테아린 산(10-ketostearic acid) 생합성 방법을 제공한다: (a) 상술한 본 발명의 코리네박테리움 글루타미쿰 균주를 배양하여 10-케토스테아린 산을 생합성하는 단계; 및 (b) 상기 단계 (a)의 생합성된 10-케토스테아린 산을 수득하는 단계.
- [0035] 상기 형질전환 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) 균주 내에서 생합성된 10-케토스테아린 산을 분리하는 단계는 당업계에 공지된 통상의 분리 또는 정제 방법에 따라 실시될 수 있다(참조: B. Aourousseau et al., *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 57(3):1558-9331(1980); Frank C. Magne et al., *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 34(3):127-129(1957)).

발명의 효과

- [0036] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0037] (i) 본 발명은 (a) 하이드라테이즈(hydratase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열; (b) 알코올 디하이드로게네이스(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열; 또는 (c) 하이드라테이즈(hydratase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열과 알코올 디하이드로게네이스(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현벡터로 형질전환된 10-케토스테아린 산(10-ketostearic acid) 생산용 코리네박테리움 글루타미컴(*Corynebacterium glutamicum*) 균주를 제공한다.
- [0038] (ii) 야생종 코리네박테리움 글루타미컴 균주가 10-케토스테아린 산의 생산이 전혀 이루어지지 않는데 반해, 유전자 조작을 통해 재조합된 본 발명의 코리네박테리움 글루타미컴(*Corynebacterium glutamicum*) 균주는 우수한 10-케토스테아린 산 생성능을 가지며, 10-케토스테아린 산을 탄소원으로 사용하지 않아 지속적으로 10-케토스테아린 산을 생산할 수 있다.
- [0039] (iii) 또한, 본 발명의 코리네박테리움 글루타미컴 균주는 10-케토스테아린 산 대사경로에 필수적인 유전자를 과발현 시키는 과정을 통해 10-케토스테아린 산의 생산량이 증가하였다.

도면의 간단한 설명

- [0040] 도 1은 코리네박테리움 글루타미컴(*Corynebacterium glutamicum*)을 보여주는 사진이다.
- 도 2는 10-케토스테아린 산(10-ketostearic acid)의 생산경로를 보여준다.
- 도 3은 발현벡터인 pCES-L10을 보여주는 도식화이다.
- 도 4는 야생종 코리네박테리움 글루타미컴 ACTC13032 및 본 발명의 일 실시예에 따른 재조합 균주인 코리네박테리움 글루타미컴 ATCC13032-pCESL10::OhyA::ADH의 GC/MS 분석 결과를 보여준다.
- 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 재조합 균주인 코리네박테리움 글루타미컴 ATCC13032-pCESL10::OhyA::ADH의 GC/MS 분석 결과를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0041] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0042] 실시예

- [0043] 코리네박테리움 글루타미컴(*Corynebacterium glutamicum*)의 경우, 지방산으로부터 10-케토스테아린 산(10-ketostearic acid; 10-KSA)을 생산하는데 필요한 효소들인 하이드라테이즈(hydratase)를 코딩하는 *OhyA* 유전자와 알코올 디하이드로게네이스(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는 *ADH* 유전자를 가지고 있지 않다.
- [0044] 따라서, 코리네박테리움 글루타미컴이 가지고 있지 않은 스테노트로포모나스 말토펠리아(*Stenotrophomonas maltophilia*) 유래 *OhyA* 및 마이크로코쿠스 루테우스(*Micrococcus luteus*) NCTC2665 유래 *ADH* 유전자를 발현 벡터(expression vector)인 pCES-L10를 이용하여 삽입하여 재조합 코리네박테리움 글루타미컴(*Corynebacterium glutamicum*) 균주 (*Corynebacterium glutamicum* ATCC13032::pCES-L10::OhyA::ADH)를 제작하였다.

[0045] 실시예 1: 중합효소 연쇄 반응(Polymerase Chain Reaction; PCR)을 이용한 *OhyA* 및 *ADH* 유전자 증폭

표 1

[0046]

유전자	생산 효소
<i>OhyA</i>	Hydratase
<i>ADH</i>	Alcohol dehydrogenase

[0047] 상기 표 1의 *OhyA* 유전자를 증폭하기 위한 프라이머는 Forward - GGATCCATGTACTACAGCAGTGGCAATTACG Tm=61.61(31mer)(서열목록 제5서열) 및 Reverse CATATGTCAGTCCTCTGCACCAG Tm=58.35(24mer)(서열목록 제6서열)를 이용하였고, 제한효소는 *Bam*HI 및 *Nde*I을 이용하였다.

[0048] 상기 표 1의 *ADH* 유전자를 증폭하기 위한 프라이머는 Forward - GGAATCAAAGTAAATGTCAGTTCACCCGTTTC Tm=65.33(35mer)(서열목록 제7서열) 및 Reverse - AATTTTGAAGTTAATCAGCCGAGCGGGGTGTC Tm=65.37(32mer)(서열목록 제8서열)를 이용하였으며, 제한효소는 *Hpa*I을 이용하였다.

[0049] 상기 프라이머(primer)를 사용하여 증폭한 결과, *OhyA*는 1770 bp, *ADH*는 933 bp의 크기로 증폭되었다. 각각의 증합효소 연쇄 반응은 통상적인 반응조건(10 mM Tris-HCl(pH 9.0), 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100, 2 mM MgSO₄, Taq DNA 증합효소(DaKaRa)) 아래에서 *ADH* 유전자 경우는 95°C/5분(denaturation), 65°C/1분(annealing), 72°C/1분(extension)로 1회 수행한 후, 95°C/20초(denaturation), 65°C/30초(annealing), 72°C/1분 20초(extension)로 27회 반복 수행하였다. 마지막 단계로 안정적인 신장(extension)을 위해 95°C/1분(denaturation), 65°C/1분(annealing), 72°C/10분(extension) 반응하였고, *OhyA* 유전자 경우는 5°C/5분(denaturation), 60°C/1분(annealing), 72°C/1분(extension)로 1회 수행한 후, 95°C/20초(denaturation), 60°C/30초(annealing), 72°C/1분 20초(extension)로 27회 반복 수행하였다. 마지막 단계로 안정적인 신장(extension)을 위해 95°C/1분(denaturation), 60°C/1분(annealing), 72°C/10분(extension) 반응하였다.

[0050] **실시예 2: 재조합 플라스미드의 제조**

[0051] 상기 실시예 1의 증합효소 연쇄 반응 후 증폭된 DNA는 0.8% 아가로스 젤 상에서 확인 후 정제하여 발현 벡터(expression vector)인 pCES-L10(도 3)의 다중삽입부위(multicloning site) 클로닝에 이용하였다. 조합 플라스미드인 pCESL10::*OhyA*::*ADH*를 위의 제한효소들과 37°C 항온수조(water bath)에서 약 1시간 30분 반응하였다. 각각의 DNA 절편들을 절단한 뒤 발현 벡터(expression vector)인 pCES-L10(도 3)의 다중삽입부위(multicloning site)에 T4 라이게이즈(Dakara) 및 SLIC(sequence and ligation independent cloning) 클로닝을 기법을 이용하여 재조합 플라스미드를 완성하였다. 각 단계마다 삽입된 유전자의 삽입여부를 확인하기 위해 대장균(*E. coli* DH5a competent cell, RBS)에 형질 전환 시킨 후 재조합 플라스미드를 추출하여 이를 다시 원래 삽입부위의 제한효소로 처리하여 잘린 DNA 조각의 크기를 0.8% 아가로스 젤 상에서 전기영동하여 비교하는 방법을 사용하였다.

[0052] **실시예 3 : 이중 코리네박테리움 글루타미컴 형질전환체 제조**

[0053] 통상적으로 클로닝용으로 많이 쓰이는 균주의 경우 CaCl₂ 버퍼를 사용한 컴피턴트 세포를 만든 후 열 충격(42°C) 방법에 의해 플라스미드를 숙주세포내로 넣지만, 본 발명에서는 형질전환체의 안정적 제조와 효율을 높이기 위해 전기천공법(electroporation)에 의한 형질전환방법을 사용하였다. 상기 전기 충격에 의한 형질 전환방법을 위해 16시간동안 전 배양 된 500 uL(0.1%)의 야생종 코리네박테리움 글루타미컴(*Corynebacterium glutamicum* ATCC13032) 배양액을 41.5 mL의 BHI(5 g/L beef heart, 12.5 g/L calf brains, 2.5 g/L disodium hydrogen phosphate, 2 g/L D(+)-glucose, 10 g/L peptone, 5 g/L sodium chloride)에 100 mg/mL의 이소니코틴산(isonicotinic acid) 2 mL, 200 mg/mL의 글라이신 6.25 mL, 20%(v/v) 트윈 80 0.25 mL를 첨가한 배지에 접종하여 배양액의 흡광도(absorbance)가 600 nm 파장에서 0.6에 이르렀을 때, 배양액 전체에 해당하는 50 mL의 배양액을 원심 분리(12000 rpm, 10분)하여 상등액과 세포를 분리하였다. 모아진 세포는 10% 글리세롤 50 mL로 3회 세척해준 후, 다시 원심분리(12000 rpm, 1분)하여 상등액과 세포로 나누어 주었다. 세포는 10% 글리세롤 0.25 mL로 현탁하였다. 현탁 된 세포 50 uL에 재조합 플라스미드 1.5 uL를 첨가시켜주었다. 상기 플라스미드가 들어있는 분주된 51.5 uL의 액체는 전기천공법(electroporation)용 큐벳(BIO-RAD, Gene pulser cuvette)에 담아 BIO-RAD, Gene pulser Xcell로 전기 충격(2500v, 25uF, 200Ω)을 가하였다. 미리 준비해둔 1 mL BHI(5 g/L beef heart, 12.5 g/L calf brains, 2.5 g/L disodium hydrogen phosphate, 2 g/L D(+)-glucose, 10 g/L peptone, 5 g/L sodium chloride)를 첨가한 뒤 1시간 동안 200 rpm, 30°C에서 진탕 배양하였다. 배양 된 형질전환체는 카나마이신(50 ug/mL)이 첨가된 BHI 아가(5 g/L beef heart, 12.5 g/L calf brains, 2.5 g/L disodium hydrogen phosphate, 2 g/L D(+)-glucose, 10 g/L peptone, 5 g/L sodium chloride, agar 20 g/L)에서 단일 균체가 생성될 때까지 30°C에서 배양하였다. 이를 통해 재조합 플라스미드를 코리네박테리움 글루타미컴(*Corynebacterium glutamicum* ATCC13032) 균주에 형질 전환한 코리네박테리움 글루타미컴

ATCC13032::OhyA::ADH 재조합 균주를 개발하였다.

[0054] 실험예 1: 전세포 생물전환(Whole cell bioconversion)

[0055] ① *C. glutamicum* ACTC13032::pCES-L10::OhyA::ADH 균주가 올레산(oleic acid)으로부터 10-KSA의 생산 가능성을 확인하기 위해 플라스크 배양 및 생물전환 반응을 진행하였다. 100 ml 플라스크 배양 및 25 ml 생물전환 조건 그리고, 배지 조성은 다음 표 2와 같으며, 플라스크 배양(flask fermentation) 실험은 500 ml 삼각 플라스크를 이용해 100 ml 부피로 진행하였고, 생물전환 실험은 250 ml 배플(baffle) 삼각 플라스크를 이용해 25 ml 부피로 진행하였다.

표 2

Strains		BHI Medium	
<i>C. glutamicum</i>	Wild type	Calf Brains	7.7 g/l
	::OhyA::ADH	Beef Heart	9.8 g/l
Culture conditions		Proteose peptone	10.0 g/l
Agitation	200rpm	Dextrose	2.0 g/l
Temperature	30°C	Sodium Chloride	5.0 g/l
Initial pH	6.1	Disodium Phosphate	2.5 g/l
Bioconversion conditions		Buffer solution	
Agitation	200rpm	Tris-HCl (pH7.5)	50mM
Temperature	30°C		
pH	7.5		
Oleic acid	2.5g		
Tween 80	0.05 g/l		

[0056]

[0057] 12시간의 배양하여 정체 성장기(stationary growth phase)까지 세포를 키운 후에 Tris-HCl(pH 7.5) 버퍼로 풀어준 후에 기질인 올레산(oleic acid) 2.5 g/l 넣어서 생물 전환 반응을 진행하였다. 실험 결과, 도 4에서 알 수 있듯이, 최대 전환수율 78.4%, 최대 생산성 2.0 g/l/h의 10-케토스테아린 산이 생산되었다. 또한, 1시간 이후에 10-케토스테아린 산이 감소하지 않고 그대로 유지되는 점에 있어서 *C. glutamicum* ACTC13032 ::pCES-L10::OhyA::ADH가 10-케토스테아린 산을 생산하는 균주로서 산업적 가능성이 있다고 판단된다. 한편, 대조군인 야생형의 경우 10-케토스테아린 산 생산이 전혀 이루어지지 않았다.

[0058] ② 최종적으로 산업적으로 쓰이기 위해서는 올레산(oleic acid) 보다 경제력 있는 올리브오일을 기질로 하여 *C. glutamicum* ACTC13032 ::pCES-L10::OhyA::ADH 균주로 생물 전환 반응을 진행하였다. 올리브 오일은 올리브나무 열매에 들어있는 30-70%의 기름을 추출해 만들어지며 주성분은 불포화지방산인 올레산(oleic acid)으로, 전체 함량은 65-85% 정도다.

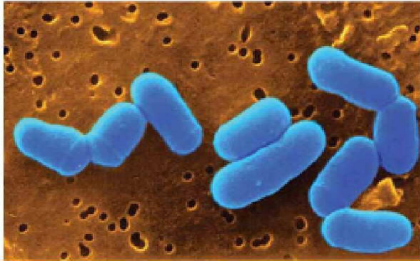
[0059] 배지배양 조성 및 생물 전환 조건은 위와 동일하며, 기질만 올리브 오일을 라파아제(lipase) 처리만 하여 생물 전환 반응을 진행하였다. 실험 결과, 도 5에서 볼 수 있듯이, 6시간에 1.3 g/l 10-KSA가 생산되었으며, 최대 전환 수율 65%, 최대 생산성 0.7 g/l/h로써, 이 균주가 10-KSA 생산을 위한 균주로서 산업적 가능성이 있음을 다시 확인 할 수 있었다.

[0060] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한

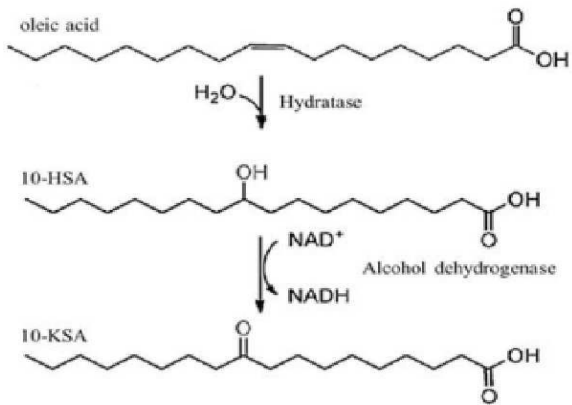
구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

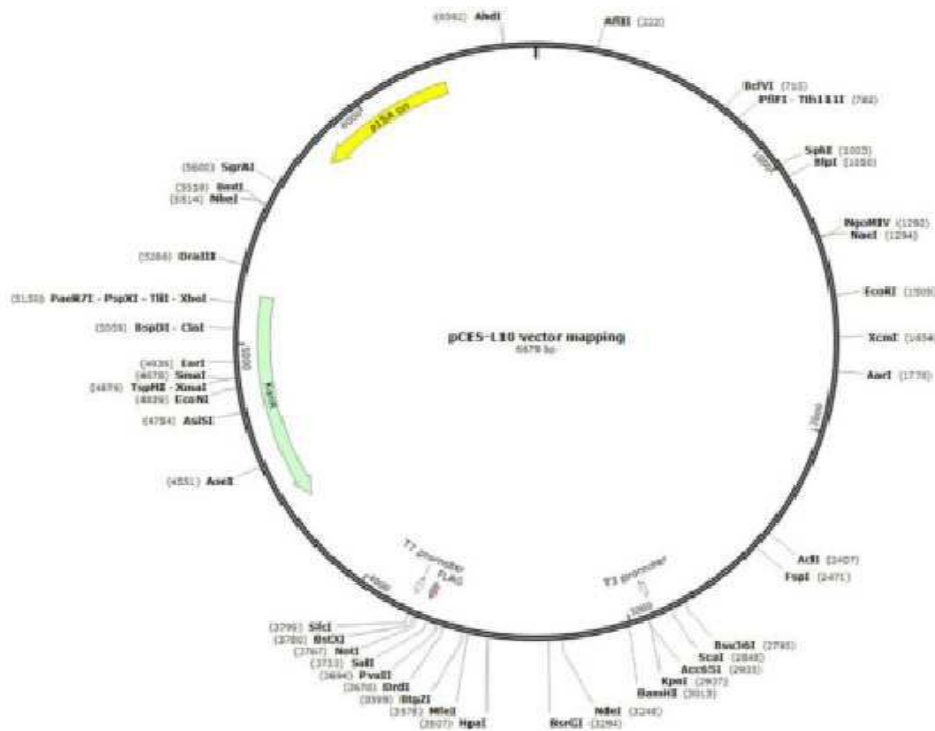
도면1



도면2

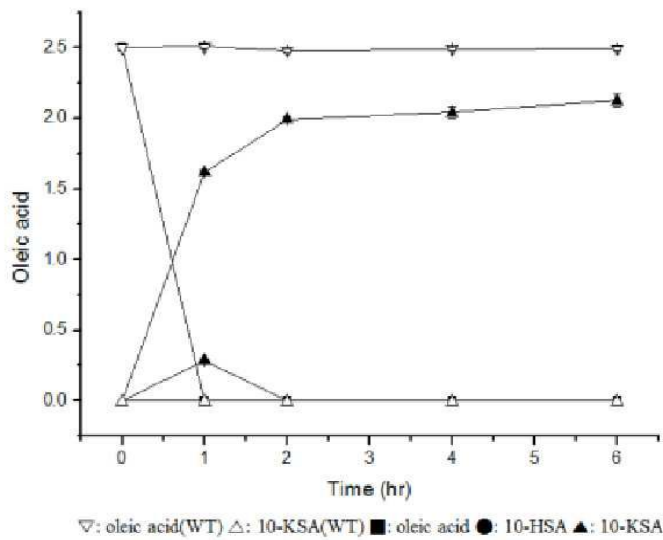


도면3

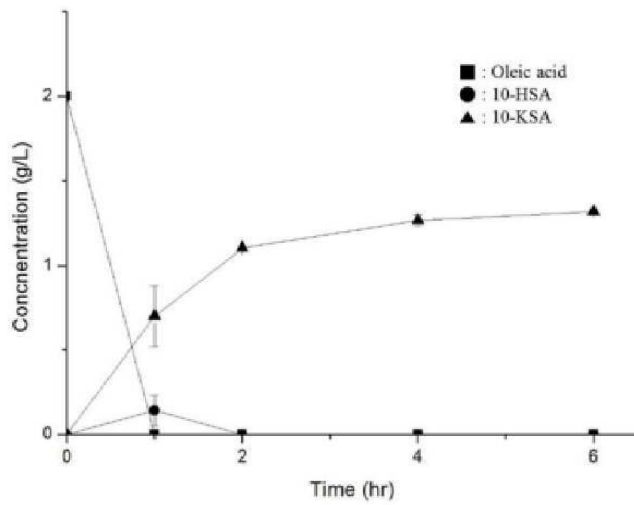


< pCES-L10 vector Mapping - kan^R, a fully synthetic promoter >

도면4



도면5



서열 목록

- <110> Sogang University
- <120> Corynebacterium glutamicum Strains Having Excellent Production Potential of 10-ketostearic acid and Method for Preparing Thereof
- <130> PN150013
- <160> 8
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 589
- <212> PRT
- <213> Hydratase from Stenotrophomonas maltophilia
- <400> 1

Met Tyr Tyr Ser Ser Gly Asn Tyr Glu Ala Phe Ala Arg Pro Arg Lys
 1 5 10 15
 Pro Ala Gly Val Asp Gly Lys Arg Ala Trp Phe Val Gly Ser Gly Leu
 20 25 30
 Ala Ser Leu Ala Gly Ala Ala Phe Leu Val Arg Asp Gly His Met Ala
 35 40 45
 Gly Glu Cys Ile Thr Ile Leu Glu Gln Gln Gln Ile Pro Gly Gly Ala
 50 55 60
 Leu Asp Gly Leu Lys Val Pro Glu Lys Gly Phe Val Ile Arg Gly Gly
 65 70 75 80
 Arg Glu Met Glu Asp His Phe Glu Cys Leu Trp Asp Leu Phe Arg Ser

	85	90	95
Ile Pro Ser Leu Glu Ile Glu Asp Ala Ser Val Leu Asp Glu Phe Tyr			
	100	105	110
Trp Leu Asn Lys Asp Asp Pro Asn Tyr Ser Leu Gln Arg Ala Thr Ile			
	115	120	125
Asn Arg Gly Glu Asp Ala His Thr Asp Gly Leu Phe Thr Leu Thr Glu			
	130	135	140
Gln Ala Gln Arg Asp Ile Val Ala Leu Phe Leu Ala Thr Arg Gln Glu			
145	150	155	160
Met Glu Asn Lys Arg Ile Asn Glu Val Leu Gly Arg Asp Phe Leu Asp			
	165	170	175
Ser Asn Phe Trp Leu Tyr Trp Arg Thr Met Phe Ala Phe Glu Glu Trp			
	180	185	190
His Ser Ala Leu Glu Met Lys Leu Tyr Leu His Arg Phe Ile His His			
	195	200	205
Ile Gly Gly Leu Pro Asp Phe Ser Ala Leu Lys Phe Thr Lys Tyr Asn			
	210	215	220
Gln Tyr Glu Ser Leu Val Leu Pro Leu Val Lys Trp Leu Gln Asp Gln			
225	230	235	240
Gly Val Val Phe Gln Tyr Gly Thr Glu Val Thr Asp Val Asp Phe Asp			
	245	250	255
Leu Gln Pro Asp Arg Lys Gln Ala Thr Arg Ile His Trp Met His Asp			
	260	265	270
Gly Val Ala Gly Gly Val Glu Leu Gly Ala Asp Asp Leu Leu Phe Met			
	275	280	285
Thr Ile Gly Ser Leu Thr Glu Asn Ser Asp Asn Gly Asp His His Thr			
	290	295	300
Ala Ala Arg Leu Asn Glu Gly Pro Ala Pro Ala Trp Asp Leu Trp Arg			
305	310	315	320
Arg Ile Ala Ala Lys Asp Asp Ala Phe Gly Arg Pro Asp Val Phe Gly			
	325	330	335

Ala His Ile Pro Glu Thr Lys Trp Glu Ser Ala Thr Val Thr Thr Leu
 340 345 350

Asp Ala Arg Ile Pro Ala Tyr Ile Gln Lys Ile Ala Lys Arg Asp Pro
 355 360 365

Phe Ser Gly Lys Val Val Thr Gly Gly Ile Val Ser Val Arg Asp Ser
 370 375 380

Arg Trp Leu Met Ser Trp Thr Val Asn Arg Gln Pro His Phe Lys Asn
 385 390 395 400

Gln Pro Lys Asp Gln Ile Val Val Trp Val Tyr Ser Leu Phe Val Asp
 405 410 415

Thr Pro Gly Asp Tyr Val Lys Lys Pro Met Gln Asp Cys Thr Gly Glu
 420 425 430

Glu Ile Thr Arg Glu Trp Leu Tyr His Leu Gly Val Pro Val Glu Glu
 435 440 445

Ile Asp Glu Leu Ala Ala Thr Gly Ala Lys Thr Val Pro Val Met Met
 450 455 460

Pro Tyr Ile Thr Ala Phe Phe Met Pro Arg Gln Ala Gly Asp Arg Pro
 465 470 475 480

Asp Val Val Pro Glu Gly Ala Val Asn Phe Ala Phe Ile Gly Gln Phe
 485 490 495

Ala Glu Ser Lys Gln Arg Asp Cys Ile Phe Thr Thr Glu Tyr Ser Val
 500 505 510

Arg Thr Pro Met Glu Ala Val Tyr Thr Leu Leu Gly Ile Glu Arg Gly
 515 520 525

Val Pro Glu Val Phe Asn Ser Thr Tyr Asp Val Arg Ser Leu Leu Ala
 530 535 540

Ala Thr Gly Arg Leu Arg Asp Gly Lys Glu Leu Asp Ile Pro Gly Pro
 545 550 555 560

Ala Phe Leu Arg Asn Leu Leu Met Asn Lys Leu Asp Lys Thr Gln Ile
 565 570 575

Gly Gly Leu Leu Arg Glu Phe Lys Leu Val Gln Glu Asp
 580 585

<210> 2

<211> 1770

<212> DNA

<213> OhyA sequence coding Hydratase from *Stenotrophomonas maltophilia*

<400> 2

```

atgtactaca gcagtggcaa ttacgaagcc ttcgcgcgcc cgcgcaagcc cgccggtgtg      60
gatggcaagc gtgcatggtt cgtcggttcg ggctggcct cgttggccgg tgcccgttc      120
ctggtgcgcg acggccacat ggccggtgag tgcacacca tccttgagca gcagcagatt      180
ccgggcggcg cgctggacgg cctgaaagtg ccgaaaagg gtttcgtgat ccgtggtggc      240
cgcgagatgg aagatcattt cgagtgccctg tgggacctgt tccgctcgat accgtcgctg      300
gagatcgaag atgccagcgt gctggacgag ttctactggt tgaacaagga cgacccgaac      360

tattcgctgc agcgcgccac catcaatcgc ggcgaggatg cacacaccga tggcctgttc      420
acgctgaccg agcaggcaca gagggacatc gtcgcgctgt tcctggccac ccgtcaggag      480
atggagaaca agcgcaccaa cgaagtactg ggccgtgatt tcctggacag caacttctgg      540
ctgtactggc gaacatggtt cgcgttcgaa gagtggcatt cggcgtgga gatgaagctg      600
tacctgcatc gcttcatcca ccatatcggc ggccctgccg atttctcggc gctgaagttc      660
acgaagtaca accagtacga atcgtcgttg ctgccctgg tgaagtggtt gcaggaccag      720
ggcgtggtgt tccagtacgg taccgaggtg accgacgtcg actttgatct gcagccggac      780

cgcaagcagg ccacgcgcat ccattggatg catgacggtg tagccggtgg cgtggaactc      840
ggcgcggatg atctgctgtt catgaccatc ggttcgctga ccgagaactc ggataatggc      900
gaccaccaca ctgcggcacg cctgaacgaa ggcccggcgc ctgcctggga cctgtggcgc      960
cgcattgccg cgaaggatga cgcgttcggg cgtccggatg tgttcggcgc gcacattcca      1020
gaaaccaagt gggaatcggc aacggtgacc acgctggatg cgcgcattcc ggcctacatc      1080
cagaagatcg ccaagcgcga tccttcagc ggcaaagtgg tgaccggcgg catcgtcagc      1140
gtgcgcgact cgcgctggct gatgagctgg acggtgaatc gccagccaca tttcaagaac      1200

cagcccaagg accagatcgt ggtctgggtg tattcgttgt tcgtggatag gcccggcgac      1260
tacgtgaaga agccgatgca ggaactgcacc ggcgaggaga tcacgcgcga atggctgtat      1320
cacctggcgc tgccggtgga agagatcgat gagctggccg cgaccggcgc gaagacagtg      1380
ccggtgatga tgccgtacat cacggcgttc ttcatgccac gccaggcagg tgaccccccg      1440
gacgtggtgc cggaaggtgc ggtgaacttc gctttcatcg gccagttcgc cgaatcgaag      1500
cagcgcgact gcatcttcac caccgagtac tcggtgcgca cgccgatgga ggccggtgtac      1560

```

acc ttgctgg g gatcgagcg tggcgtgccg gaggtgttca attccacgta tgacgtgcgc 1620

tcgctgctgg ccgcgaccgg ggcctgcgt gatggcaagg aactggacat tcccgggcca 1680

gcgttcctgc gcaacctgct gatgaacaag ctggacaaga cccagatcgg tggctctgctg 1740

cgcgagttca agctggtgca ggaggactga 1770

<210> 3

<211> 310

<212> PRT

<213> Alcohol dehydrogenase from *Micrococcus luteus* NCTC2665

<400> 3

Met Ser Glu Phe Thr Arg Phe Glu Gln Val Ala Val Leu Gly Thr Gly

1 5 10 15

Val Leu Gly Ser Gln Ile Ile Met Gln Ala Ala Tyr His Gly Lys Lys

20 25 30

Val Met Ala Tyr Asp Ala Val Pro Ala Ala Leu Glu Gly Ile Glu Arg

35 40 45

Arg Trp Ala Trp Ile Arg Gln Gly Tyr Glu Ala Asp Leu Gly Glu Gly

50 55 60

Tyr Asp Pro Gln Arg Phe Asp Glu Ala Ile Ala Arg Ile Thr Pro Thr

65 70 75 80

Ser Asp Leu Gly Glu Ala Leu Ala Asp Ala Asp Ile Val Ile Glu Ala

85 90 95

Val Pro Glu Asn Leu Glu Leu Lys Arg Lys Val Trp Ala Gln Val Gly

100 105 110

Glu Leu Ala Pro Ala Thr Thr Leu Phe Ala Thr Asn Thr Ser Ser Leu

115 120 125

Leu Pro Ser Asp Phe Ala Asp Ala Ser Gly His Pro Glu Arg Phe Leu

130 135 140

Ala Leu His Tyr Ala Asn Arg Ile Trp Ala Gln Asn Thr Ala Glu Val

145 150 155 160

Met Gly Thr Ala Ala Thr Ser Pro Glu Ala Val Ala Gly Ala Leu Gln

165 170 175

Phe Ala Glu Glu Thr Gly Met Val Pro Val His Val Arg Lys Glu Ile
 180 185 190
 Pro Gly Tyr Phe Leu Asn Ser Leu Leu Ile Pro Trp Leu Gln Ala Gly
 195 200 205
 Ser Lys Leu Tyr Met His Gly Val Gly Asn Pro Ala Asp Ile Asp Arg
 210 215 220
 Thr Trp Arg Val Ala Thr Gly Asn Glu Arg Gly Pro Phe Gln Thr Tyr
 225 230 235 240

Asp Ile Val Gly Phe His Val Ala Ala Asn Val Ser Arg Asn Thr Gly
 245 250 255
 Val Asp Trp Gln Leu Gly Phe Ala Glu Leu Leu Glu Lys Ser Ile Ala
 260 265 270
 Glu Gly His Ser Gly Val Ala Asp Gly Gln Gly Phe Tyr Arg Tyr Gly
 275 280 285
 Pro Asp Gly Glu Asn Leu Gly Pro Val Glu Asp Trp Asn Leu Gly Asp
 290 295 300
 Lys Asp Thr Pro Leu Gly

305 310

- <210> 4
- <211> 933
- <212> DNA
- <213> ADH sequence coding Alcohol dehydrogenase from *Micrococcus luteus* NCTC2665
- <400> 4

atgtccgagt tcaccgitt cgagcaggtc gccgtgctgg gcaccggcgt gctgggttcg 60
 cagatcatca tgcaggcggc gtaccacggc aagaagtgga tggcctacga cgccgtcccc 120
 gccgcctctg aggggatcga gcgccgctgg gcgtggatcc gccaaggcta cgaagcagac 180
 ctcggggagg gctacgacc gcagcgcttc gacgaggcca tcgccgcat cagcccgacc 240
 tccgaccteg gcgaggcctt ggcggatgcg gacatcgtga tcgaggccgt cccggagaac 300

 ctggagctca agcgaaggt gtgggcccag gtgggcgagc tcgccccgc cagcacctg 360
 ttgccacga acacctctc cctgetgccc tcggaattcg ccgacgccag cggccatccg 420
 gagcgcttc tggccctgca ctacccaac cgcattctggg cgagaacac cgccgaggtc 480
 atgggcaccg ccgccacctc gccggaggcc gtcgcgggag ccctgcagtt cgccgaggag 540

accgcatgg tccccgtgca cgtgcaag gagatcccgg gctacttct caactcctg 600
ctcatcccgt ggctgcaggc cggctccaag ctgtacatgc acggagtggg caaccggcg 660
gacatcgacc gcacctggcg cgtggccacc ggcaacgagc gcggcccgtt ccagacctac 720

gacatcgtgg gcttccactg ggccgccaac gtctcccga acacgggctg cgactggcag 780
ctcggcttcg ctgagctgct cgagaagagc atcgccgagg gccacagcgg cgtggctgac 840
ggccagggct tetaccgcta cgggccggac ggggagaacc tcggcccgtt ggaggactgg 900
aacctgggcg acaaggacac cccgctcggc tga 933

<210> 5
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Forward primer for amplifying OhyA gene
<400> 5
ggatccatgt actacagcag tggcaattac g 31

<210> 6
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Reverse primer for amplifying OhyA gene
<400> 6
catatgtcag tcctcctgca ccag 24

<210> 7
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Forward primer for amplifying ADH gene
<400> 7
ggaatcaaag ttaaatgtcc gagttcacc gtttc 35

<210> 8
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer for amplifying ADH gene

<400> 8

aattttgaag ttaatcagcc gagcggggtg tc

32