



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0048292
(43) 공개일자 2016년05월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/21 (2006.01) C12N 15/77 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01) C12N 9/88 (2006.01)
C12P 7/18 (2006.01) C12R 1/15 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0144348
(22) 출원일자 2014년10월23일
심사청구일자 2014년10월23일

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
이진원
서울특별시 송파구 양재대로 1218 (방이동, 올림픽선수기자촌아파트) 201동 1601호
이수진
서울 마포구 백범로25길 63, 105동 1504호 (염리동, 염리삼성래미안)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양부현

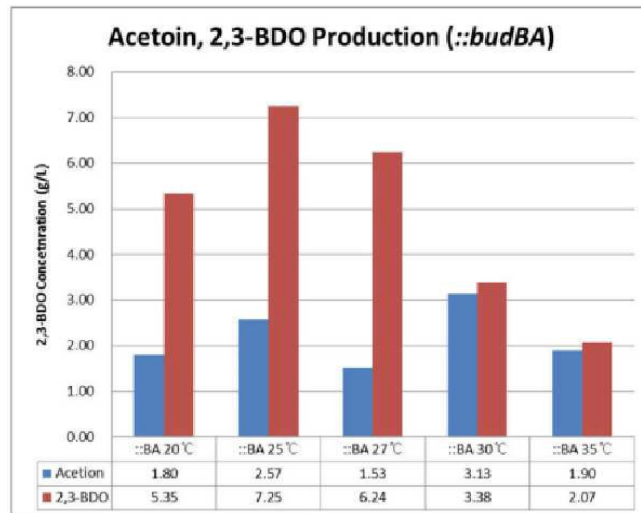
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 2,3-부탄다이올의 저온 생산능이 우수한 비병원성 코리네박테리움 글루타미쿰 균주 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 (a) 아세토락테이트 디카복실실레이즈(acetolactate decarboxylase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열; (b) 아세토락테이트 신타제(acetolactate synthase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열; 또는 (c) 아세토락테이트 디카복실실레이즈(acetolactate decarboxylase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열과 아세토락테이트 신타제(acetolactate synthase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현벡터로 형질전환된 2,3-부탄다이올 생산용 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) 균주에 관한 것이다. 유전자 조작을 통해 재조합된 본 발명의 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) 균주는 비병원성이면서 저온에서 우수한 2,3-부탄다이올 생성능을 가진다.

대표도 - 도7



(72) 발명자

김보림

서울 금천구 금하로23라길 31, 507호 (시흥동, 현대아파트)

정다운

경기 시흥시 옥구천서로373번길 8-1, 501동 401호 (정왕동, 영남5차아파트)

양정모

인천 부평구 원적로 344, 204동 1203호 (산곡동, 금호이수마운트밸리아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 10035578

부처명 산업통산자원부

연구관리전문기관 한국산업기술평가관리원

연구사업명 산업핵심기술개발사업

연구과제명 2,3-부탄다이올 생산용 균주 발굴 및 대사회로 최적화 기술 개발

기 여 율 1/1

주관기관 서강대학교 산학협력단

연구기간 2014.04.01 ~ 2015.03.31

명세서

청구범위

청구항 1

(a) 아세토락테이트 디카복실실레이즈(acetolactate decarboxylase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열; (b) 아세토락테이트 신타제(acetolactate synthase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열; 또는 (c) 아세토락테이트 디카복실실레이즈(acetolactate decarboxylase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열과 아세토락테이트 신타제(acetolactate synthase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현벡터로 형질전환된 2,3-부탄다이올 생산용 코리네박테리움 글루타미컴(*Corynebacterium glutamicum*) 균주.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 코리네박테리움 글루타미컴 균주는 아세토락테이트 디카복실실레이즈(acetolactate decarboxylase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열과 아세토락테이트 신타제(acetolactate synthase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 각각 포함하는 2개의 발현벡터로 공동형질전환된 것을 특징으로 하는 코리네박테리움 글루타미컴 균주.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 코리네박테리움 글루타미컴 균주는 아세토락테이트 디카복실실레이즈(acetolactate decarboxylase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열과 아세토락테이트 신타제(acetolactate synthase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 모두 포함하는 1개의 발현벡터로 공동형질전환된 것을 특징으로 하는 코리네박테리움 글루타미컴 균주.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 코리네박테리움 글루타미컴 균주는 비병원성 이면서 저온에서 2,3-부탄다이올 생성능을 가지는 것을 특징으로 하는 코리네박테리움 글루타미컴 균주.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 저온은 37℃ 이하의 온도인 것을 특징으로 하는 코리네박테리움 글루타미컴 균주.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 아세토락테이트 디카복실실레이즈를 코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 아세토락테이트 신타제를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 크렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*)로부터 유래한 것을 특징으로 하는 코리네박테리움 글루타미컴 균주.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 아세토락테이트 디카복실실레이즈는 서열목록 제 1 서열의 아미노산 서열을 포함하고, 상기 아세토락테이트 신타제는 서열목록 제 2 서열의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 코리네박테리움 글루타미컴 균주.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 아세토락테이트 디카복실실레이즈를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열목록 제 3 서열의 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 상기 아세토락테이트 신타제를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열목록 제 4 서열의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 코리네박테리움 글루타미컴 균주.

청구항 9

제 1 항에 있어서, 상기 발현벡터는 도 4의 유전자 지도를 갖는 pEKEx2이고, 상기 뉴클레오티드 서열은 pEKEx2의 MCS(multiple cloning site)에 삽입되는 것을 특징으로 하는 코리네박테리움 글루타미컴 균주.

청구항 10

다음 단계를 포함하는 2,3-부탄다이올 생산용 코리네박테리움 글루타미컴(*Corynebacterium glutamicum*) 균주의 제조방법:

- (a) (i) 아세토락테이트 디카복실실레이즈(acetolactate decarboxylase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열; (ii) 아세토락테이트 신타제(acetolactate synthase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열; 또는 (iii) 아세토락테이트 디카복실실레이즈(acetolactate decarboxylase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열과 아세토락테이트 신타제(acetolactate synthase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현벡터에 삽입시키는 단계; 및
- (b) 상기 뉴클레오티드 서열이 삽입된 발현벡터로 코리네박테리움 글루타미컴 균주를 형질전환시키는 단계.

청구항 11

제 10 항에 있어서, 상기 코리네박테리움 글루타미컴 균주를 발현시키는 단계 (b)는 전기충격 방법으로 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

다음 단계를 포함하는 2,3-부탄다이올 생합성 방법:

- (a) 제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항의 코리네박테리움 글루타미컴 균주를 배양하여 2,3-부탄다이올을 생합성하는 단계; 및
- (b) 상기 단계 (a)의 생합성된 2,3-부탄다이올을 수득하는 단계.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 2,3-부탄다이올 생산용 코리네박테리움 글루타미컴(*Corynebacterium glutamicum*) 균주, 이의 제조방법 및 상기 균주를 이용한 2,3-부탄다이올 생합성 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 2,3-부탄다이올은 용매, 부동액(anti-freeze solution), 가소제(plasticizer)의 합성에 이용되는 화학물질이다. 화학적인 전환을 통해 합성고무 제조에 사용되는 부타디엔(1,3-butadiene), 액체연료 첨가제(liquid fuel additive)인 MEK(methyl ethyl ketone), 식품 첨가제 향료로써 사용되는 아세토인(acetoin)과 디아세틸(diacyetyl), 폴리우레탄의 전구체 등의 생산이 가능하다.

[0003] 2,3-부탄다이올은 혼합산 발효(mixed acid fermentation) 대사경로를 통해 생산되며 균주와 탄소원에 따라서 다

양한 생산 양산을 보여준다. 글루코스를 탄소원으로 이용하는 경우, 피루베이트(pyruvate)와 아세트인(acetoin)을 거쳐 2,3-부탄다이올이 생산되거나 디아세틸(diacetyl)을 거치는 부탄다이올 사이클을 통해 2,3-부탄다이올이 생산되는 선택적 경로를 갖고 있으며, 일반적인 2,3-BDO 생산 경로는 도 1에 나타내었다.

[0004] 한편, 2,3-부탄다이올은 생물학적 방법으로 생산이 가능하며, 2차 세계대전 당시 상업적 규모로 개발되어졌다가, 최근 산업바이오 기술 개발과 함께 다시 관심을 받고 있으며, 이에 2,3-부탄다이올을 대사산물로서 생성할 수 있는 재조합 균주에 대한 관심이 증대되고 있다.

[0005] 2,3-BDO 생산균주로 가장 널리 알려진 균주는 크랩시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*), 엔테로박터 에어로게네스(*Enterobacter aerogenes*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 등이 있다.

[0006] 이 중, 크랩시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*)는 페렴균으로 그람음성이며 운동성이 없고 유당 발효를 하는 조건적 혐기성 균주이다. 뉴모니아는 장내세균과(*Enterobacteriaceae*)의 크랩시엘라(*Klebsiella*) 속으로 크랩시엘라 옥시토카와 유사하지만, 인돌음성(indole-negative)과 멜레치토스(melezitose), 3-하이드록시부티레이트(hydroxybutyrate) 배지에서 성장할 수 있다는 특성으로 구분된다. 주로 흙에서 발견되며 30% 정도는 혐기 조건에서 질소 고정 능력을 갖고 있다. 크랩시엘라 뉴모니아는 폐렴(*Klebsiella pneumonia*) 질병을 일으킨다.

[0007] 그리고, 크랩시엘라 뉴모니아와 같은 일반적인 2,3-부탄다이올 생산 균주의 경우 대부분 병원성 균주로써, 산업화를 위해서는 병원성을 제거하는 또 다른 연구과정이 필요하며, 병원성을 완벽히 제거하기란 쉽지 않은 문제점이 있었다.

[0008] 이에, 본 발명자들은 병원성이 없고 크랩시엘라 뉴모니아 보다 낮은 온도에서도 2,3-BDO를 생산할 수 있는 재조합 균주 개발의 필요성을 인식하였다.

[0009] 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

[0010] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허공보 제10-2012-0128776호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명자들은 종래 2,3-부탄다이올(butanediol; BDO) 생산 균주로 알려진 크랩시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*) 균주 등의 병원성 제거가 곤란한 문제점을 해결하고, 저온에서도 우수한 2,3-부탄다이올(BDO) 생산능을 가지며, 유전자 조작을 통해 2,3-부탄다이올 생합성 대사산물을 안정적이고, 효과적으로 생산하는 균주의 개발을 위하여 예의 연구 노력하였고, 그 결과 크랩시엘라 뉴모니아의 *budA* 및 *budB* 유전자군으로부터 선택된 1종 이상의 유전자와 함께 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) 균주를 형질전환 시킨 결과, 효과적으로 2,3-부탄다이올 생합성 경로가 과발현되고, 저온에서도 우수한 2,3-부탄다이올(BDO) 생산능을 가지는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

[0012] 따라서, 본 발명의 목적은 2,3-부탄다이올 생산용 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) 균주를 제공하는 데 있다.

[0013] 본 발명의 다른 목적은 상술한 본 발명의 2,3-부탄다이올 생산용 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium*

glutamicum) 균주의 제조방법을 제공하는 데 있다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 상술한 본 발명의 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) 균주를 이용하여 2,3-부탄다이올 생합성 방법을 제공하는 데 있다.

[0015] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0016] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 아세토락테이트 디카복실실레이즈(acetolactate decarboxylase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열; (b) 아세토락테이트 신타제(acetolactate synthase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열; 또는 (c) 아세토락테이트 디카복실실레이즈(acetolactate decarboxylase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열과 아세토락테이트 신타제(acetolactate synthase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현벡터로 형질전환된 2,3-부탄다이올 생산용 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) 균주를 제공한다.

[0017] 본 발명자들은 종래 2,3-부탄다이올(butanediol; BDO) 생산 균주로 알려진 크렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*) 균주 등의 병원성 제거가 곤란한 문제점을 해결하고, 저온에서도 우수한 2,3-부탄다이올(BDO) 생산능을 가지며, 유전자 조작을 통해 2,3-부탄다이올 생합성 대사산물을 안정적이고, 효과적으로 생산하는 균주의 개발을 위하여 예의 연구 노력하였고, 그 결과 크렙시엘라 뉴모니아의 *budA* 및 *budB* 유전자군으로부터 선택된 1 종 이상의 유전자와 함께 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) 균주를 형질전환 시킨 결과, 효과적으로 2,3-부탄다이올 생합성 경로가 과발현되고, 저온에서도 우수한 2,3-부탄다이올(BDO) 생산능을 가지는 것을 확인하였다.

[0018] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 코리네박테리움 글루타미쿰 균주는 아세토락테이트 디카복실실레이즈(acetolactate decarboxylase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열과 아세토락테이트 신타제(acetolactate synthase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 각각 포함하는 2개의 발현벡터로 공동형질전환된다.

[0019] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 코리네박테리움 글루타미쿰 균주는 아세토락테이트 디카복실실레이즈(acetolactate decarboxylase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열과 아세토락테이트 신타제(acetolactate synthase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 모두 포함하는 1개의 발현벡터로 공동형질전환된다.

[0020] 본 명세서에서, “코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)”은 그람-양성 토양박테리아로서, 비병원성이며 빠른 균 생장과 주변 환경 적응에 강한 성질로 인해 현재 산업용 균주로 많이 사용되고 있다. 특히 현재 글루타메이트와 라이신 등의 아미노산 생산용 균주로써 산업현장에서 널리 사용 되고 있는 균주이다(도 2).

[0021] 한편, 본 발명자들은 크렙시엘라 뉴모니아와 같은 일반적인 2,3-부탄다이올 생산 균주의 경우 대부분 병원성 균주로써, 산업화를 위해서는 병원성을 제거하는 또 다른 연구과정이 필요하며, 병원성을 완벽히 제거하기란 쉽지 않는 문제점을 인식하여, 코리네박테리움 글루타미쿰 균주의 특성을 이용하고자 하였다.

[0022] 다만, 코리네박테리움 글루타미쿰의 경우 본래 2,3-BDO를 생산 할 수 있는 균주이긴 하나, 아세토락테이트(acetolactate)에서 아세토인(acetoin)으로 직접 전환하여 빠르게 2,3-부탄다이올을 생산할 수 있도록 하는 중간 효소인 아세토락테이트 디카복실실레이즈(acetolactate decarboxylase)를 코딩하는 *budA* 유전자를 가지고 있지 않아, 디아세틸(diacetyl)을 거치는 자발적인 반응(spontaneous reaction)만을 통해 2,3-BDO를 생산하므로, 매우 적은 양의 2,3-부탄다이올이 생산되는 단점이 있어(도 3), 이에 본 발명자들은 크렙시엘라 뉴모니아 유래 (a) 아세토락테이트 디카복실실레이즈(acetolactate decarboxylase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열; 및/또는 (b) 아세토락테이트 신타제(acetolactate synthase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 채택하게 된 것이다.

[0023] 본 발명의 또 다른 구현예에 따르면, 상기 코리네박테리움 글루타미쿰 균주는 비병원성 이면서 저온에서 2,3-부탄다이올 생성능을 가지며, 보다 바람직하게는 상기 저온은 37℃ 이하의 온도이고, 보다 더 바람직하게는 상기

저온은 20-35℃ 의 온도이며, 보다 더욱 더 바람직하게는 상기 저온은 20-27℃ 의 온도이고, 보다 더 더욱 더 바람직하게는 상기 저온은 25-27℃ 의 온도이며, 가장 바람직하게는 상기 저온은 25℃ 의 온도이다.

- [0024] 본 명세서에서, “크렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*)”는 폐렴간균으로 그람음성이며 운동성이 없고 유당 발효를 하는 조건적 혐기성 균주이다. 뉴모니아는 장내세균과(*Enterobacteriaceae*)의 크렙시엘라(*Klebsiella*) 속으로 크렙시엘라 옥시토카와 유사하지만, 인돌음성(indole-negative)과 멜레치토스(melezitose), 3-하이드록시부티레이트(hydroxybutyrate)배지에서 성장할 수 있다는 특성으로 구분된다. 주로 흡에서 발견되며 30% 정도는 혐기 조건에서 질소 고정 능력을 갖고 있다. 크렙시엘라 뉴모니아는 폐렴(*Klebsiella pneumonia*) 질병을 일으킨다.
- [0025] 본 명세서에서, “아세토락테이트 디카복실실레이즈(acetolactate decarboxylase)”는 2,3-부탄다이올의 전구체인 아세토인을 생산하는 효소로서, *budA* 유전자가 이를 코딩하는 유전자이다.
- [0026] 본 발명의 발현벡터에서 발현되는 상기 아세토락테이트 디카복실실레이즈는 크렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*)로부터 유래한 것을 사용하는 것이 바람직하다. 더욱 바람직하게는 서열목록 제1서열로 표시되는 아세토락테이트 디카복실실레이즈를 발현하도록 할 수 있으며, 상기 아세토락테이트 디카복실실레이즈를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 바람직하게는 서열목록 제3서열로 표시될 수 있다.
- [0027] 본 명세서에서, “아세토락테이트 신타제(acetolactate synthase)”는 아세토락테이트를 합성하는 효소로서, *budB* 유전자가 이를 코딩하는 유전자이다.
- [0028] 본 발명의 발현벡터에서 발현되는 상기 아세토락테이트 신타제는 크렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*)로부터 유래한 것을 사용하는 것이 바람직하다. 더욱 바람직하게는 서열목록 제2서열로 표시되는 아세토락테이트 신타제를 발현하도록 할 수 있으며, 상기 아세토락테이트 신타제를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 바람직하게는 서열목록 제4서열로 표시될 수 있다.
- [0029] 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 열라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 열라인된 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 열라인먼트 방법은 당업계에 공지되어 있다. 열라인먼트에 대한 다양한 방법 및 알고리즘은 Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482(1981); Needleman and Wunsch, *J. Mol. Bio.* 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, blasm, 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.
- [0030] 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 추가단편은 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.
- [0031] 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.

- [0032] 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.
- [0033] 본 발명의 벡터는 전형적으로 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 원핵 세포를 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.
- [0034] 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 및 pEKEx2 등), 파지(예: λgt4?λB, λ-Charon, λΔz1 및 M13 등) 또는 바이러스(예: SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있으나, 바람직하게는 2,3-부탄다이올 생합성에 이용될 코리네박테리움 글루타미컴(*Corynebacterium glutamicum*)을 위한 특정 유전자를 미생물 생체 내로 운반하여 외부로부터 삽입된 유전자의 발현을 효과적으로 조절할 수 있도록 상기 발현벡터는 도 4의 유전자 지도를 갖는 pEKEx2이고, 상기 뉴클레오티드 서열은 pEKEx2의 MCS(multiple cloning site)에 삽입되는 것을 특징으로 한다.
- [0035] 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.
- [0036] 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 *budA* 및/또는 *budB*의 유전자 서열이 5'-3' 순서대로 연결되어 제공되었다.
- [0037] 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.
- [0038] 상기 유전자가 포함된 발현벡터는 이후 코리네박테리움 글루타미컴(*Corynebacterium glutamicum*) 내부로 도입되는데, 본 발명의 벡터를 대장균 내로 운반하는 방법은 CaCl₂ 방법(Cohen, S.N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 9:2110-2114(1973)), 하나한 방법(Cohen, S.N. et al., Proc. Natl. Acad. 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.
- [0039] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 2,3-부탄다이올 생산용 코리네박테리움 글루타미컴(*Corynebacterium glutamicum*) 균주의 제조방법을 제공한다: (a) (i) 아세토락테이트 디카복실실레이즈(acetolactate decarboxylase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열; (ii) 아세토락테이트 신타제(acetolactate synthase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열; 또는 (iii) 아세토락테이트 디카복실실레이즈(acetolactate decarboxylase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열과 아세토락테이트 신타제(acetolactate synthase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현벡터에 삽입시키는 단계; 및 (b) 상기 뉴클레오티드 서열이 삽입된 발현벡터로 코리네박테리움 글루타미컴 균주를 형질전환시키는 단계.
- [0040] 본 발명의 2,3-부탄다이올 생산용 형질전환 코리네박테리움 글루타미컴(*Corynebacterium glutamicum*) 균주의 제조방법은 상술한 코리네박테리움 글루타미컴 균주를 제조하는 것이므로 상술한 내용과 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.
- [0041] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 2,3-부탄다이올 생합성 방법을 제공한다: (a) 상술한 본 발명의 코리네박테리움 글루타미컴 균주를 배양하여 2,3-부탄다이올을 생합성하는 단계; 및 (b)

상기 단계 (a)의 생합성된 2,3-부탄다이올을 수득하는 단계.

[0042] 상기 형질전환 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) 균주 내에서 생합성된 2,3-부탄다이올을 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

[0043] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0044] (i) 본 발명은 (a) 아세토락테이트 디카복실실레이즈(acetolactate decarboxylase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열; (b) 아세토락테이트 신타제(acetolactate synthase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열; 또는 (c) 아세토락테이트 디카복실실레이즈(acetolactate decarboxylase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열과 아세토락테이트 신타제(acetolactate synthase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현벡터로 형질전환된 2,3-부탄다이올 생산용 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) 균주를 제공한다.

[0045] (ii) 유전자 조작을 통해 재조합된 본 발명의 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) 균주는 비병원성이면서 저온에서 우수한 2,3-부탄다이올 생성능을 가진다.

[0046] (iii) 특히, 야생종 코리네박테리움 글루타미쿰 균주가 2,3-부탄다이올의 생산이 전혀 이루어지지 않는데 반해, 본 발명의 코리네박테리움 글루타미쿰 균주는 저온에서도 우수한 2,3-부탄다이올의 생성능을 가지며, 이는 상기 코리네박테리움 글루타미쿰 균주에 과발현한 원 균주인 크렙시엘라 뉴모니아 균주와 비교하여 온도를 제외한 동일한 조건에서 동등 이상의 2,3-부탄다이올의 생성능을 나타내었다.

[0047] (iv) 또한, 야생종 코리네박테리움 글루타미쿰 균주가 2,3-부탄다이올의 생산이 전혀 이루어지지 않는데 반해, 본 발명의 코리네박테리움 글루타미쿰 균주는 2,3-부탄다이올 대사경로에 필수적인 유전자를 과발현 시키는 과정을 통해 포도당의 소모량에 따른 2,3-부탄다이올의 생산량이 증가하였다.

도면의 간단한 설명

[0048] 도 1은 2,3-부탄다이올(butanediol; BDO)의 생산경로를 보여준다.

도 2는 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)을 보여주는 사진이다.

도 3은 코리네박테리움 글루타미쿰의 2,3-부탄다이올 생산경로를 보여준다.

도 4는 발현벡터인 pEKEx2를 보여주는 도식화이다.

도 5a 및 5b는 야생종 코리네박테리움 글루타미쿰 ACTC13032의 플라스크 배양 HPLC 분석 결과를 보여준다.

도 6a 및 6b는 본 발명의 일 실시예에 따른 재조합 균주인 코리네박테리움 글루타미쿰 ACTC13032::pEKEx2::budA::budB 의 플라스크 배양 HPLC 분석 결과를 보여준다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 재조합 균주인 코리네박테리움 글루타미쿰 ACTC13032::pEKEx2::budA::budB 의 온도별 아세토인(acetoin) 및 2,3-BDO 생산량 비교를 보여준다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 재조합 균주인 코리네박테리움 글루타미쿰 ACTC13032::pEKEx2::budA::budB 의 회분 배양 HPLC 분석 결과를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0049] 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.

[0050] 실시예

[0051] 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)의 2,3-BDO 생산능력을 증가시키기 위해, 코리네박테리움 글루타미쿰이 가지고 있지 않은 budA와 피루베이트(pyruvate)로부터 아세토락테이트(acetolactate)로의 전환

반응을 늘리기 위해 *budB* 유전자를 2,3-BDO 생산 균주인 크랩시엘라 뉴모니아(KCTC 2242)로부터 발현 벡터 (expression vector)인 pEKEx2를 이용해 삽입하여 재조합 코리네박테리움 글루타미컴 균주(*Corynebacterium glutamicum* ATCC13032::pEKEx2::*budA*::*budB*)를 제작하였다.

실시예 1: 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)을 이용한 *budA* 및 *budB* 유전자를 발현하는 재조합 플라스미드의 제조

표 1

유전자	생산 효소
<i>budA</i>	acetolactate decarboxylase
<i>budB</i>	acetolactate synthase

상기 표 1의 유전자를 증폭하기 위한 프라이머는 Forward - GGATCCAGGAAGTGGTATATGAATCATTCTGC Tm=60.90(32mer)(서열목록 제5서열) 및 Reverse - GAATTCCTTACAGAATCTGACTCAGATGCAGC Tm=62.12(31mer)(서열목록 제6서열)를 이용하였고, 제한효소는 *Bam*HI 및 *Eco*RI를 이용하였다.

상기 프라이머(primer)를 사용하여 증폭한 결과, *budA*는 792 bp, *budB*는 1680 bp의 크기로 증폭되었다. 각각의 중합효소연쇄반응은 통상적인 반응조건(10 mM Tris-HCl(pH9.0), 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100, 2 mM MgSO₄, Taq DNA 중합효소(DaKaRa)) 아래에서 95℃/5분(denaturation), 60℃/1분(annealing), 72℃/1분(extension)로 1회 수행한 후, 95℃/20초(denaturation), 60℃/30초(annealing), 72℃/1분 20초(extension)로 27회 반복 수행하였다. 마지막 단계로 안정적인 신장(extension)을 위해 95℃/1분(denaturation), 60℃/1분(annealing), 72℃/10분(extension) 반응하였다.

중합효소연쇄반응 후 증폭된 DNA는 0.8% 아가로스 젤 상에서 확인 후 정제하여 T-벡터 클로닝에 이용하였다. pGEM-T easy 벡터(DaKaRa)에 라이게이션(ligation)을 수행하여 재조합 플라스미드인 pGEM-T::*budA*::*budB*를 제작하였다. 상기 재조합 플라스미드들은 대장균(*E. coli* DH5a competent cell, RBS)에서 형질 전환하여 균주를 제조하였다.

실시예 2: 재조합 플라스미드의 제조

상기 실시예 1의 재조합 플라스미드인 pGEM-T::*budA*::*budB*를 위의 제한효소들과 37℃ 항온수조(water bath)에서 약 1시간 30분 반응하였다. 각각의 DNA 절편들을 절단한 뒤 발현 벡터(expression vector)인 pEKEx2(도 4)의 다중삽입부위(multicloning site)에 T4 라이게이즈(Dakara)를 이용, 16℃에서 라이게이션 반응하여 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.

실시예 3 : 이중 코리네박테리움 글루타미컴 형질전환체 제조

통상적으로 클로닝용으로 많이 쓰이는 균주의 경우 CaCl₂ 버퍼를 사용한 컴피턴트 세포를 만든 후 열 충격(42℃) 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 μ L(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) 트윈80 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 μ L에 재조합 플라스미드 1.5 μ L를 첨가시켜주었다. 상기 플라스미

드가 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℃에서 진탕 배양하였다. 배양된 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℃에서 배양하였다. 이를 통해 재조합 플라스미드를 코리네박테리움 글루타미컴(*Corynebacterium glutamicum* ATCC13032) 균주에 형질 전환한 코리네박테리움 글루타미컴 ATCC13032::*budA*::*budB* 재조합 균주를 개발하였다

[0061] 실시예 4: 플라스크 배양

[0062] 저온에서 코리네박테리움 글루타미컴 ACTC13032::pEKEx2::*budA*::*budB*의 2,3-BDO 생산 가능성을 확인하기 위해, 온도를 변인으로 설정하여 플라스크 배양을 진행하였고 대조군으로는 코리네박테리움 글루타미컴 ACTC13032 야생형을 선정하였다. 배양 조건은 아래 표 2와 같으며, 모든 실험은 500 ml 삼각 플라스크를 이용해 100 ml 부피로 진행하였다. 그리고 그 결과는 아래 도 5 내지 7에 나타내었다.

표 2

[0063] 100 mL 플라스크 배양 조건 및 배지 조성

균주			CGX II 배지		
<i>C. glutamicum</i>	야생형 :: <i>budBA</i>		스톡(stock) 1	(NH ₄) ₂ SO ₄	6.6 g/L
				K ₂ HPO ₄	13.48 g/L
				KH ₂ PO ₄	16.68 g/L
				요소	5 g/L
배양 조건			스톡 2	MgSO ₄	0.25 g/L
교반	200 rpm		스톡 3	FeSO ₄	0.01 g/L
				ZnSO ₄	0.001 g/L
				MnSO ₄	0.01 g/L
				CaCl ₂	0.01 g/L
		CuSO ₄		200 μg/L	
		NiCl ₂		20 μg/L	
초기 pH	6.1	스톡 4	프로토키테큐산	0.03 g/L	
글루코스	30 g/L	스톡 5	바이오틴	200 μg/L	

[0064] 도 5 내지 7에서 확인할 수 있듯이, 48시간의 배양 실험 결과, 20℃에서 5.35 g, 25℃에서 7.25 g, 27℃에서 6.24 g, 30℃ 3.38 g, 35℃에서 2.07 g의 2,3-BDO가 각각 생산되었고, 대조군인 야생형의 경우 2,3-BDO 생산이 전혀 이루어지지 않았다. 온도를 제외한 위와 동일한 조건에서 코리네박테리움 글루타미컴에 과발현 한 유전자의 원 균주인 크렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*) KCTC2242를 배양 했을 때 7.11 g의 2,3-BDO가 생산되는 것을 통해 코리네박테리움 글루타미컴 ACTC13032::pEKEx2::*budA*::*budB*가 2,3-BDO를 생산을 위한 저온 균주로서 산업적 가능성이 있다고 판단된다.

[0065] 상기 크렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*) KCTC2242의 최적 배양 온도는 35-45℃이며, 실시예 4에서 원 균주는 37℃의 온도로 배양하였다.

[0066] 위의 온도 범위보다 높거나 낮은 온도에서는 크렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*) KCTC2242의 성장과 대사가 저해된다고 알려져 있는데, 이러한 이유는 크렙시엘라 뉴모니아가 폐렴간균으로서 사람이나 동물의 체내에서 생육하는 특징을 가지고 있기 때문이다.

[0067] 실시예 5: 회분(batch) 배양

[0068] 플라스크 배양 결과를 바탕으로 2.5 L 회분식 반응기에서 1 L 부피(working volume)로 플라스크 배양과 동일한 배지조성에서 회분 배양을 수행하였다. 배양 조건 및 배지 조성은 아래 표 3과 같고, 결과는 아래 도 8에 나타내었다.

표 3

[0069] 1 L 회분 배양 조건 및 배지 조성

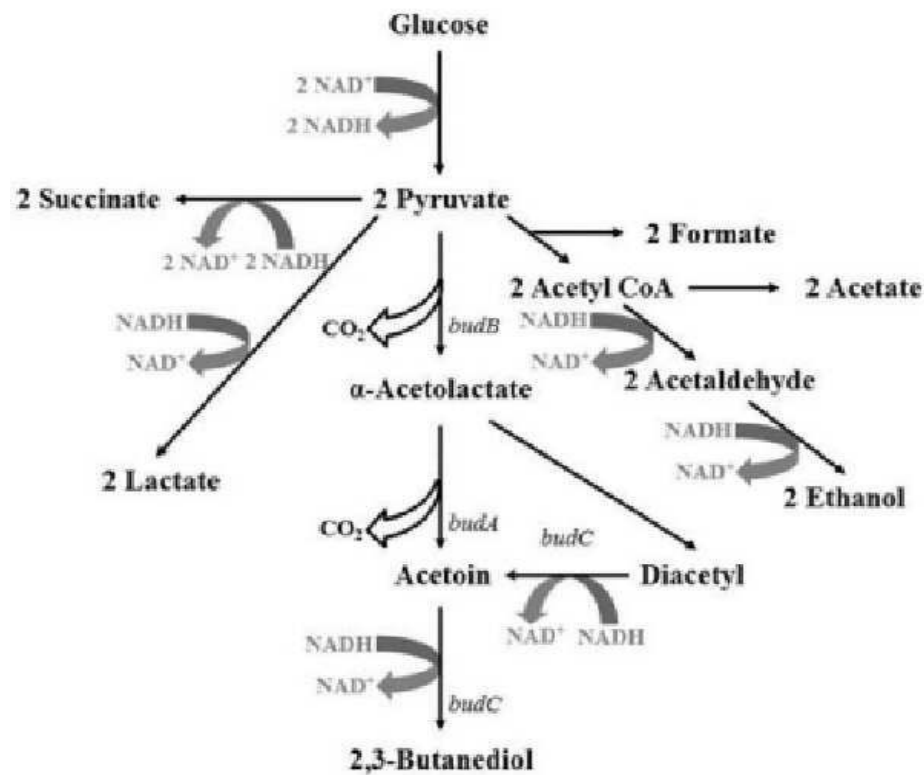
균주			CGX II 배지		
<i>C. glutamicum</i>	야생형		스톡(stock) 1	(NH ₄) ₂ SO ₄	6.6 g/L
	<i>::budBA</i>			K ₂ HPO ₄	13.48 g/L
배양 조건				KH ₂ PO ₄	16.68 g/L
				요소	5 g/L
교반	200 rpm		스톡 2	MgSO ₄	0.25 g/L
온도	25℃		스톡 3	FeSO ₄	0.01 g/L
				ZnSO ₄	0.001 g/L
MnSO ₄	0.01 g/L				
CaCl ₂	0.01 g/L				
통기(aeration)	1.5 vvm	CuSO ₄		200 μg/L	
pH 조절	6.5	NiCl ₂		20 μg/L	
		스톡 4	프로토키테큐산	0.03 g/L	
글루코스	30 g/L	스톡 5	바이오틴	200 μg/L	

[0070] 도 8에서 확인할 수 있듯이, 43시간의 배양 실험 결과, 야생형 균주는 숙시네이트, 락테이트 및 아세테이트 등의 유기산이 과량 생산되었고 아세토인과 2,3-BDO는 생산되지 않았다. 그에 반해 코리네박테리움 글루타미쿰 ACTC13032::pEKEx2::*budA*::*budB*의 경우 43시간에 7.22 g의 2,3-BDO가 생산되었으며, 수율은 0.38 g 2,3-BDO/g Glucose로써, 이 균주가 2,3-BDO를 생산을 위한 저온 균주로서 산업적 가능성이 있음을 다시 확인할 수 있었다.

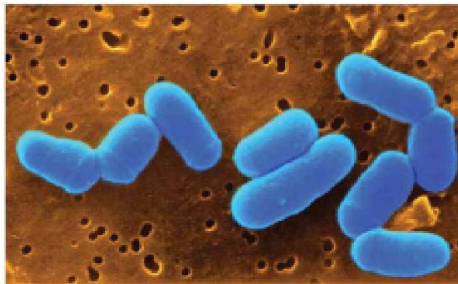
[0071] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

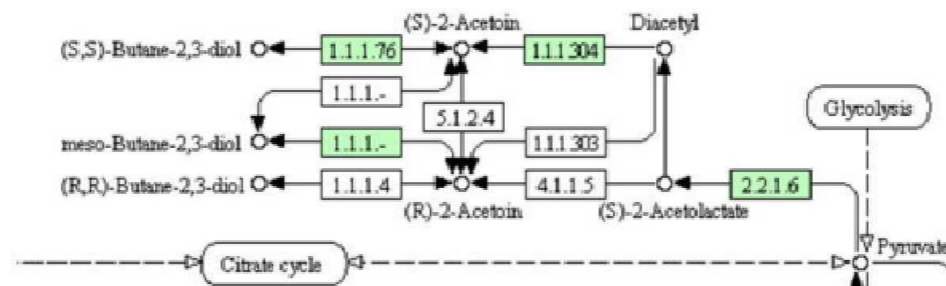
도면1



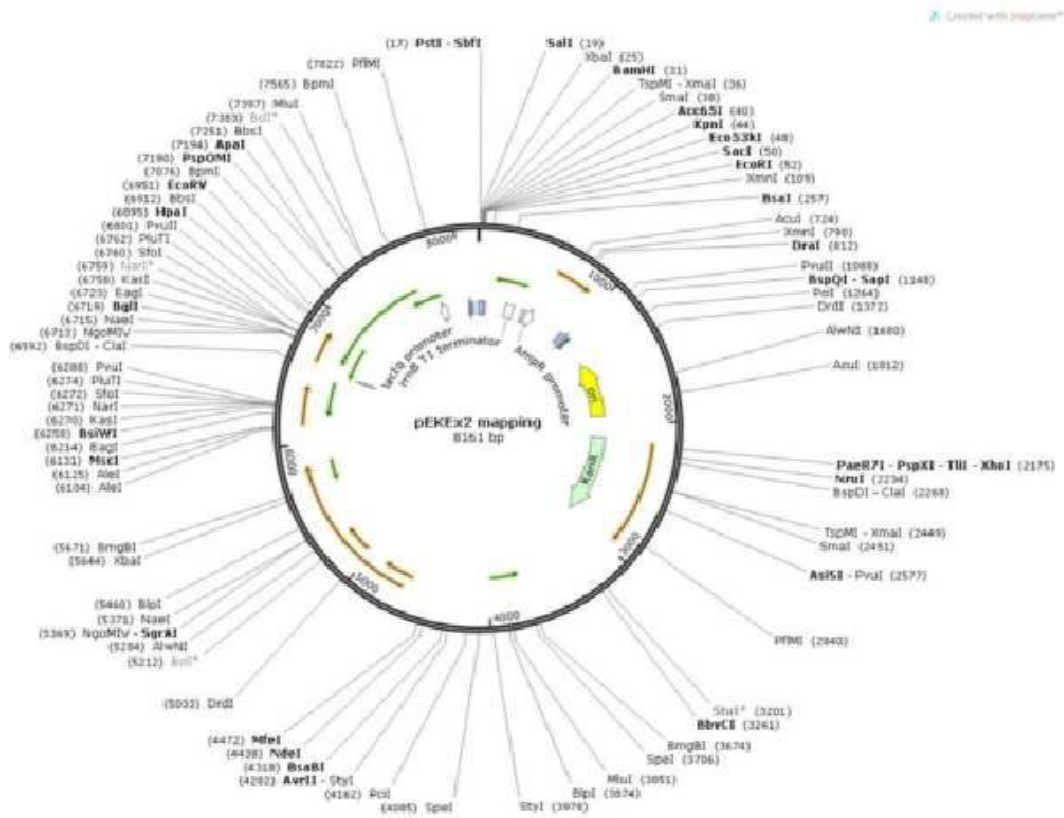
도면2



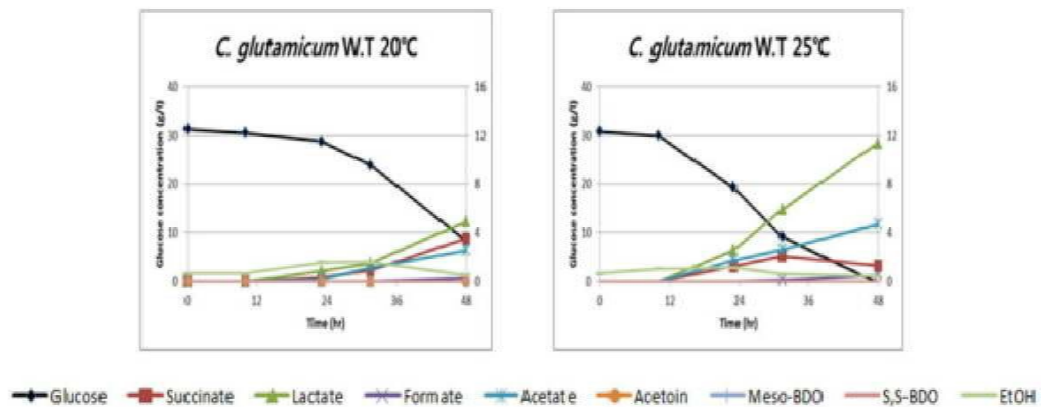
도면3



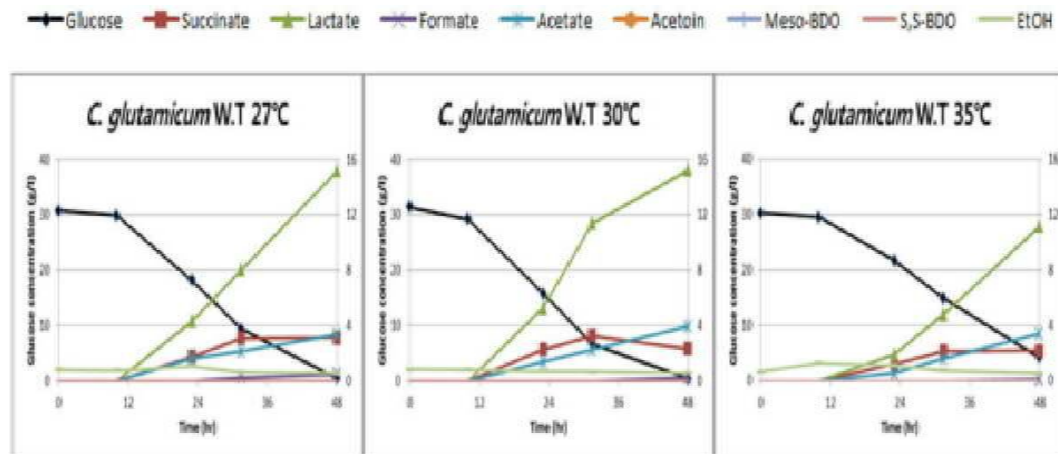
도면4



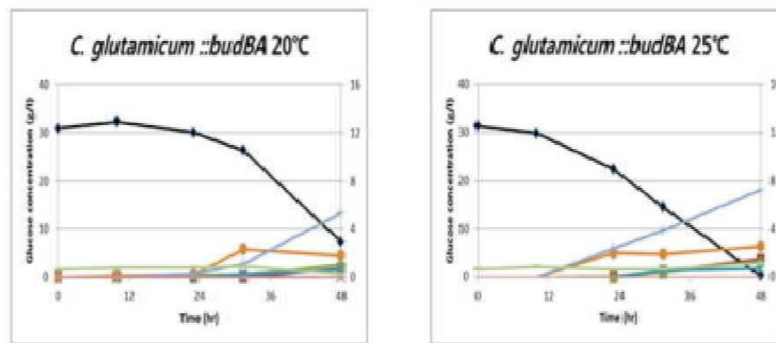
도면5a



도면5b

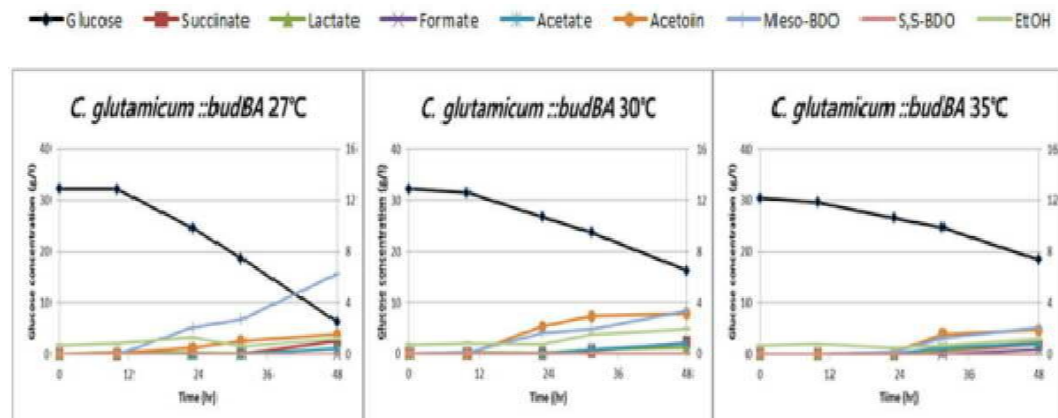


도면6a

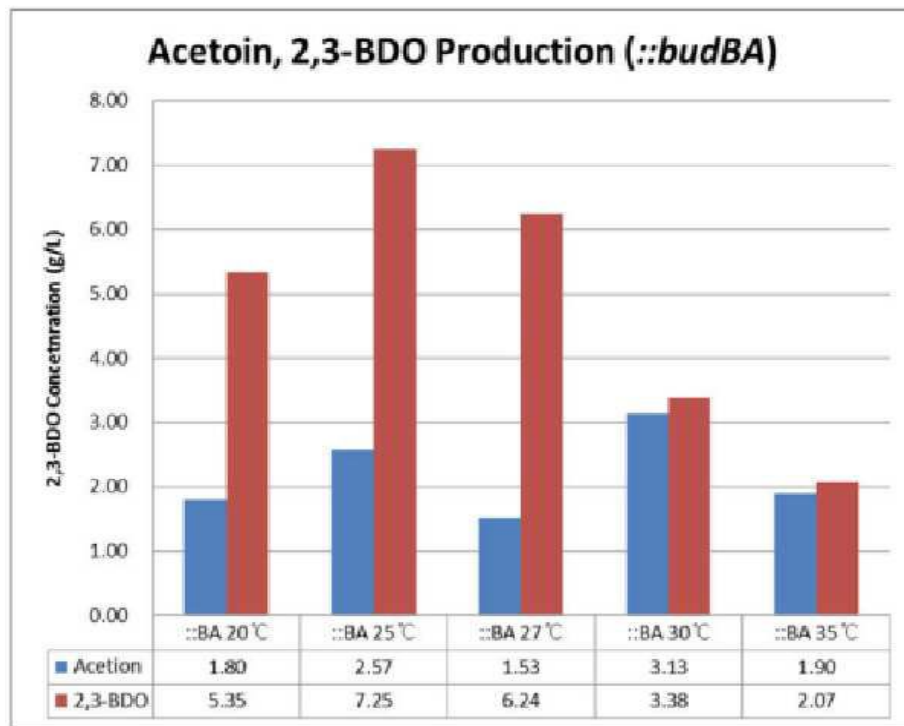


—●— Glucose —■— Succinate —▲— Lactate —×— Formate —◆— Acetate —◇— Acetoin —▽— Meso-BDO —— S,S-BDO —○— EtOH

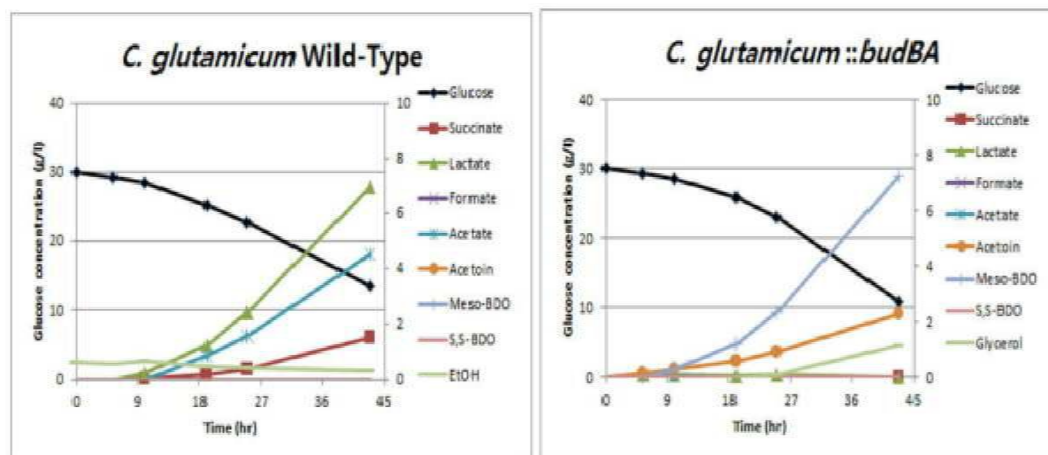
도면6b



도면7



도면8



서열 목록

- <110> Sogang University
- <120> Avirulent and Psychrophilic Corynebacterium glutamicum Strains Having Excellent Production Potential of 2,3-Butanediol and Method for Preparing Thereof
- <130> PN140504
- <160> 6
- <170> Kopatent In 2.0

<210> 1
 <211> 792
 <212> PRT
 <213> *Klebsiella pneumoniae*
 <400> 1
 Ala Gly Gly Ala Ala Gly Thr Gly Gly Thr Ala Thr Ala Thr Gly Ala
 1 5 10 15
 Ala Thr Cys Ala Thr Thr Cys Thr Gly Cys Thr Gly Ala Ala Thr Gly
 20 25 30
 Cys Ala Cys Cys Thr Gly Cys Gly Ala Ala Gly Ala Gly Ala Gly Thr
 35 40 45
 Cys Thr Ala Thr Gly Cys Gly Ala Ala Ala Cys Cys Cys Thr Gly Cys
 50 55 60
 Gly Gly Gly Cys Gly Thr Thr Thr Thr Cys Cys Gly Cys Gly Cys Ala
 65 70 75 80
 Gly Cys Ala Thr Cys Cys Cys Gly Ala Gly Ala Gly Cys Gly Thr Gly
 85 90 95
 Cys Thr Cys Thr Ala Thr Cys Ala Gly Ala Cys Ala Thr Cys Gly Cys
 100 105 110
 Thr Cys Ala Thr Gly Ala Gly Cys Gly Cys Cys Cys Thr Gly Cys Thr
 115 120 125
 Gly Ala Gly Cys Gly Gly Gly Gly Thr Thr Thr Ala Cys Gly Ala Ala
 130 135 140
 Gly Gly Cys Ala Gly Cys Ala Cys Cys Ala Cys Cys Ala Thr Cys Gly
 145 150 155 160
 Cys Cys Gly Ala Cys Cys Thr Gly Cys Thr Gly Ala Ala Ala Cys Ala
 165 170 175
 Cys Gly Gly Cys Gly Ala Thr Thr Thr Cys Gly Gly Cys Cys Thr Cys
 180 185 190
 Gly Gly Cys Ala Cys Cys Thr Thr Thr Ala Ala Thr Gly Ala Gly Cys
 195 200 205
 Thr Gly Gly Ala Cys Gly Gly Gly Gly Ala Gly Cys Thr Gly Ala Thr

210 215 220
 Cys Gly Cys Cys Thr Thr Cys Ala Gly Cys Ala Gly Thr Cys Ala Gly
 225 230 235 240

 Gly Thr Cys Thr Ala Thr Cys Ala Gly Cys Thr Gly Cys Gly Cys Gly
 245 250 255
 Cys Cys Gly Ala Cys Gly Gly Cys Ala Gly Cys Gly Cys Gly Cys Gly
 260 265 270
 Cys Ala Ala Ala Gly Cys Cys Cys Ala Gly Cys Cys Gly Gly Ala Gly
 275 280 285
 Cys Ala Gly Ala Ala Ala Ala Cys Gly Cys Cys Gly Thr Thr Cys Gly
 290 295 300
 Cys Gly Gly Thr Gly Ala Thr Gly Ala Cys Cys Thr Gly Gly Thr Thr

 305 310 315 320
 Cys Cys Ala Gly Cys Cys Gly Cys Ala Gly Thr Ala Cys Cys Gly Gly
 325 330 335
 Ala Ala Ala Ala Cys Cys Thr Thr Thr Gly Ala Cys Cys Ala Thr Cys
 340 345 350
 Cys Gly Gly Thr Gly Ala Gly Cys Cys Gly Cys Cys Ala Gly Cys Ala
 355 360 365
 Gly Cys Thr Gly Cys Ala Cys Gly Ala Gly Gly Thr Gly Ala Thr Cys
 370 375 380

 Gly Ala Cys Cys Ala Gly Cys Ala Ala Ala Thr Cys Cys Cys Cys Thr
 385 390 395 400
 Cys Thr Gly Ala Cys Ala Ala Cys Cys Thr Gly Thr Thr Cys Thr Gly
 405 410 415
 Cys Gly Cys Cys Cys Thr Gly Cys Gly Cys Ala Thr Cys Gly Ala Cys
 420 425 430
 Gly Gly Cys Cys Ala Thr Thr Thr Cys Cys Gly Cys Cys Ala Thr Gly
 435 440 445
 Cys Cys Cys Ala Thr Ala Cys Cys Cys Gly Cys Ala Cys Cys Gly Thr

 450 455 460

Gly Cys Cys Gly Cys Gly Cys Cys Ala Gly Ala Cys Gly Cys Cys Gly
 465 470 475 480
 Cys Cys Gly Thr Ala Cys Cys Gly Gly Gly Cys Gly Ala Thr Gly Ala
 485 490 495
 Cys Cys Gly Ala Cys Gly Thr Ala Cys Thr Cys Gly Ala Cys Gly Ala
 500 505 510
 Thr Cys Ala Gly Cys Cys Gly Gly Thr Gly Thr Thr Cys Cys Gly Cys
 515 520 525

 Thr Thr Thr Ala Ala Cys Cys Ala Gly Cys Gly Cys Gly Ala Ala Gly
 530 535 540
 Gly Gly Gly Thr Gly Cys Thr Gly Gly Thr Cys Gly Gly Cys Thr Thr
 545 550 555 560
 Cys Cys Gly Gly Ala Cys Cys Cys Cys Gly Cys Ala Gly Cys Ala Thr
 565 570 575
 Ala Thr Gly Cys Ala Gly Gly Gly Gly Ala Thr Cys Ala Ala Cys Gly
 580 585 590
 Thr Cys Gly Cys Cys Gly Gly Gly Thr Ala Thr Cys Ala Cys Gly Ala

 595 600 605
 Gly Cys Ala Thr Thr Thr Thr Ala Thr Thr Ala Cys Cys Gly Ala Thr
 610 615 620
 Gly Ala Cys Cys Gly Cys Ala Ala Ala Gly Gly Cys Gly Gly Cys Gly
 625 630 635 640
 Gly Thr Cys Ala Cys Cys Thr Gly Cys Thr Gly Gly Ala Thr Thr Ala
 645 650 655
 Cys Cys Ala Gly Cys Thr Cys Gly Ala Cys Cys Ala Cys Gly Gly Gly
 660 665 670

 Gly Thr Gly Cys Thr Gly Ala Cys Cys Thr Thr Cys Gly Gly Cys Gly
 675 680 685
 Ala Ala Ala Thr Thr Cys Ala Cys Ala Ala Gly Cys Thr Gly Ala Thr
 690 695 700
 Gly Ala Thr Cys Gly Ala Cys Cys Thr Gly Cys Cys Cys Gly Cys Cys
 705 710 715 720

Gly Ala Cys Ala Gly Cys Gly Cys Gly Thr Thr Cys Cys Thr Gly Cys
725 730 735
Ala Gly Gly Cys Thr Ala Ala Thr Cys Thr Gly Cys Ala Thr Cys Cys
740 745 750
Cys Gly Ala Thr Ala Ala Thr Cys Thr Cys Gly Ala Thr Gly Cys Cys
755 760 765
Gly Cys Cys Ala Thr Cys Cys Gly Thr Thr Cys Cys Gly Thr Ala Gly
770 775 780
Ala Ala Ala Gly Thr Thr Ala Ala
785 790
<210> 2
<211> 1680
<212> PRT
<213> *Klebsiella pneumoniae*
<400> 2
Ala Thr Gly Gly Ala Cys Ala Ala Ala Cys Ala Gly Thr Ala Thr Cys
1 5 10 15
Cys Gly Gly Thr Ala Cys Gly Cys Cys Ala Gly Thr Gly Gly Gly Cys
20 25 30
Gly Cys Ala Cys Gly Gly Cys Gly Cys Cys Gly Ala Thr Cys Thr Cys
35 40 45
Gly Thr Cys Gly Thr Cys Ala Gly Thr Cys Ala Gly Cys Thr Gly Gly
50 55 60
Ala Ala Gly Cys Ala Cys Ala Gly Gly Gly Gly Gly Thr Ala Cys Gly
65 70 75 80
Cys Cys Ala Gly Gly Thr Gly Thr Thr Cys Gly Gly Cys Ala Thr Cys
85 90 95
Cys Cys Cys Gly Gly Cys Gly Cys Cys Ala Ala Ala Ala Thr Cys Gly
100 105 110
Ala Cys Ala Ala Gly Gly Thr Cys Thr Thr Cys Gly Ala Thr Thr Cys
115 120 125
Ala Cys Thr Gly Cys Thr Gly Gly Ala Thr Thr Cys Cys Thr Cys Cys

130 135 140
 Ala Thr Thr Cys Gly Cys Ala Thr Thr Ala Thr Thr Cys Cys Gly Gly

 145 150 155 160
 Thr Ala Cys Gly Cys Cys Ala Cys Gly Ala Ala Gly Cys Cys Ala Ala

 165 170 175
 Cys Gly Cys Cys Gly Cys Ala Thr Thr Thr Ala Thr Gly Gly Cys Cys

 180 185 190
 Gly Cys Cys Gly Cys Cys Gly Thr Cys Gly Gly Ala Cys Gly Thr Ala

 195 200 205
 Thr Thr Ala Cys Cys Gly Gly Cys Ala Ala Ala Gly Cys Gly Gly Gly

 210 215 220

 Cys Gly Thr Gly Gly Cys Gly Cys Thr Gly Gly Thr Cys Ala Cys Cys
 225 230 235 240
 Thr Cys Cys Gly Gly Thr Cys Cys Gly Gly Gly Thr Thr Gly Thr Thr

 245 250 255
 Cys Thr Ala Ala Cys Cys Thr Gly Ala Thr Cys Ala Cys Cys Gly Gly

 260 265 270
 Cys Ala Thr Gly Gly Cys Cys Ala Cys Cys Gly Cys Gly Ala Ala Cys

 275 280 285
 Ala Gly Cys Gly Ala Ala Gly Gly Cys Gly Ala Cys Cys Cys Gly Gly

 290 295 300
 Thr Gly Gly Thr Gly Gly Cys Cys Cys Thr Gly Gly Gly Cys Gly Gly
 305 310 315 320
 Cys Gly Cys Gly Gly Thr Ala Ala Ala Ala Cys Gly Cys Gly Cys Cys

 325 330 335
 Gly Ala Thr Ala Ala Ala Gly Cys Cys Ala Ala Ala Cys Ala Gly Gly

 340 345 350
 Thr Cys Cys Ala Cys Cys Ala Gly Ala Gly Thr Ala Thr Gly Gly Ala

 355 360 365

 Thr Ala Cys Gly Gly Thr Gly Gly Cys Gly Ala Thr Gly Thr Thr Cys
 370 375 380

Ala Gly Cys Cys Cys Gly Gly Thr Cys Ala Cys Cys Ala Ala Ala Thr
385 390 395 400
Ala Cys Gly Cys Cys Gly Thr Cys Gly Ala Gly Gly Thr Gly Ala Cys
405 410 415
Gly Gly Cys Gly Cys Cys Gly Gly Ala Thr Gly Cys Gly Cys Thr Gly
420 425 430
Gly Cys Gly Gly Ala Ala Gly Thr Gly Gly Thr Cys Thr Cys Cys Ala
435 440 445
Ala Cys Gly Cys Cys Thr Thr Cys Cys Gly Cys Gly Cys Cys Gly Cys
450 455 460
Cys Gly Ala Gly Cys Ala Gly Gly Gly Cys Cys Gly Gly Cys Cys Gly
465 470 475 480
Gly Gly Cys Ala Gly Cys Gly Cys Gly Thr Thr Cys Gly Thr Thr Ala
485 490 495
Gly Cys Cys Thr Gly Cys Cys Gly Cys Ala Gly Gly Ala Thr Gly Thr
500 505 510
Gly Gly Thr Cys Gly Ala Thr Gly Gly Cys Cys Cys Gly Gly Thr Cys
515 520 525
Ala Gly Cys Gly Gly Cys Ala Ala Ala Gly Thr Ala Cys Thr Gly Cys
530 535 540
Cys Gly Gly Cys Cys Ala Gly Cys Gly Gly Gly Gly Cys Cys Cys Cys
545 550 555 560
Gly Cys Ala Gly Ala Thr Gly Gly Gly Cys Gly Cys Cys Gly Cys Gly
565 570 575
Cys Cys Gly Gly Ala Thr Gly Ala Thr Gly Cys Cys Ala Thr Cys Gly
580 585 590
Ala Cys Cys Ala Gly Gly Thr Gly Gly Cys Gly Ala Ala Gly Cys Thr
595 600 605
Thr Ala Thr Cys Gly Cys Cys Cys Ala Gly Gly Cys Gly Ala Ala Gly
610 615 620
Ala Ala Cys Cys Cys Gly Ala Thr Cys Thr Thr Cys Cys Thr Gly Cys
625 630 635 640

Thr Cys Gly Gly Cys Cys Thr Gly Ala Thr Gly Gly Cys Cys Ala Gly
645 650 655

Cys Cys Ala Gly Cys Cys Gly Gly Ala Ala Ala Ala Cys Ala Gly Cys
660 665 670

Ala Ala Gly Gly Cys Gly Cys Thr Gly Cys Gly Cys Cys Gly Thr Thr
675 680 685

Thr Gly Cys Thr Gly Gly Ala Gly Ala Cys Cys Ala Gly Cys Cys Ala
690 695 700

Thr Ala Thr Thr Cys Cys Ala Gly Thr Cys Ala Cys Cys Ala Gly Cys
705 710 715 720

Ala Cys Cys Thr Ala Thr Cys Ala Gly Gly Cys Cys Gly Cys Cys Gly
725 730 735

Gly Ala Gly Cys Gly Gly Thr Gly Ala Ala Thr Cys Ala Gly Gly Ala
740 745 750

Thr Ala Ala Cys Thr Thr Cys Thr Cys Thr Cys Gly Cys Thr Thr Cys
755 760 765

Gly Cys Cys Gly Gly Cys Cys Gly Gly Gly Thr Thr Gly Gly Gly Cys
770 775 780

Thr Gly Thr Thr Thr Ala Ala Cys Ala Ala Cys Cys Ala Gly Gly Cys
785 790 795 800

Cys Gly Gly Gly Gly Ala Cys Cys Gly Thr Cys Thr Gly Cys Thr Gly
805 810 815

Cys Ala Gly Cys Thr Thr Gly Cys Cys Gly Ala Cys Cys Thr Gly Gly
820 825 830

Thr Gly Ala Thr Cys Thr Gly Cys Ala Thr Cys Gly Gly Cys Thr Ala
835 840 845

Cys Ala Gly Cys Cys Cys Gly Gly Thr Gly Gly Ala Ala Thr Ala Cys
850 855 860

Gly Ala Ala Cys Cys Gly Gly Cys Gly Ala Thr Gly Thr Gly Gly Ala
865 870 875 880

Ala Cys Ala Gly Cys Gly Gly Cys Ala Ala Cys Gly Cys Gly Ala Cys

885 890 895
 Gly Cys Thr Gly Gly Thr Gly Cys Ala Cys Ala Thr Cys Gly Ala Cys
 900 905 910
 Gly Thr Gly Cys Thr Gly Cys Cys Cys Gly Cys Cys Thr Ala Thr Gly
 915 920 925
 Ala Ala Gly Ala Gly Cys Gly Cys Ala Ala Cys Thr Ala Cys Ala Cys
 930 935 940

 Cys Cys Cys Gly Gly Ala Thr Gly Thr Cys Gly Ala Gly Cys Thr Gly
 945 950 955 960
 Gly Thr Ala Gly Gly Cys Gly Ala Thr Ala Thr Cys Gly Cys Cys Gly
 965 970 975
 Gly Cys Ala Cys Thr Cys Thr Cys Ala Ala Cys Ala Ala Gly Cys Thr
 980 985 990
 Gly Gly Cys Gly Cys Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Cys Gly Ala Thr
 995 1000 1005
 Cys Ala Thr Cys Gly Gly Cys Thr Gly Gly Thr Gly Cys Thr Cys Thr

 1010 1015 1020
 Cys Cys Cys Cys Gly Cys Ala Gly Gly Cys Gly Gly Cys Gly Gly Ala
 1025 1030 1035 1040
 Gly Ala Thr Cys Cys Thr Cys Cys Gly Cys Gly Ala Cys Cys Gly Cys
 1045 1050 1055
 Cys Ala Gly Cys Ala Cys Cys Ala Gly Cys Gly Cys Gly Ala Gly Cys
 1060 1065 1070
 Thr Gly Cys Thr Gly Gly Ala Cys Cys Gly Cys Cys Gly Cys Gly Gly
 1075 1080 1085

 Cys Gly Cys Gly Cys Ala Gly Cys Thr Cys Ala Ala Cys Cys Ala Gly
 1090 1095 1100
 Thr Thr Thr Gly Cys Cys Cys Thr Gly Cys Ala Thr Cys Cys Gly Cys
 1105 1110 1115 1120
 Thr Gly Cys Gly Thr Ala Thr Cys Gly Thr Thr Cys Gly Cys Gly Cys
 1125 1130 1135
 Cys Ala Thr Gly Cys Ala Gly Gly Ala Cys Ala Thr Cys Gly Thr Cys

1140 1145 1150
Ala Ala Cys Ala Gly Cys Gly Ala Cys Gly Thr Cys Ala Cys Gly Thr

1155 1160 1165
Thr Gly Ala Cys Cys Gly Thr Gly Gly Ala Cys Ala Thr Gly Gly Gly

1170 1175 1180
Cys Ala Gly Cys Thr Thr Cys Cys Ala Thr Ala Thr Cys Thr Gly Gly

1185 1190 1195 1200
Ala Thr Thr Gly Cys Cys Cys Gly Cys Thr Ala Cys Cys Thr Gly Thr

1205 1210 1215
Ala Cys Ala Gly Cys Thr Thr Cys Cys Gly Cys Gly Cys Cys Cys Gly

1220 1225 1230
Cys Cys Ala Gly Gly Thr Gly Ala Thr Gly Ala Thr Cys Thr Cys Cys

1235 1240 1245
Ala Ala Cys Gly Gly Cys Cys Ala Gly Cys Ala Gly Ala Cys Cys Ala

1250 1255 1260
Thr Gly Gly Gly Cys Gly Thr Cys Gly Cys Cys Cys Thr Gly Cys Cys

1265 1270 1275 1280
Cys Thr Gly Gly Gly Cys Cys Ala Thr Cys Gly Gly Cys Gly Cys Cys

1285 1290 1295
Thr Gly Gly Cys Thr Gly Gly Thr Cys Ala Ala Thr Cys Cys Thr Gly

1300 1305 1310
Ala Gly Cys Gly Cys Ala Ala Ala Gly Thr Gly Gly Thr Cys Thr Cys

1315 1320 1325
Cys Gly Thr Cys Thr Cys Cys Gly Gly Cys Gly Ala Cys Gly Gly Cys

1330 1335 1340
Gly Gly Cys Thr Thr Cys Cys Thr Gly Cys Ala Gly Thr Cys Gly Ala

1345 1350 1355 1360
Gly Cys Ala Thr Gly Gly Ala Gly Cys Thr Gly Gly Ala Gly Ala Cys

1365 1370 1375
Cys Gly Cys Cys Gly Thr Cys Cys Gly Cys Cys Thr Gly Ala Ala Ala

1380 1385 1390
Cys Gly Cys Cys Gly Thr Cys Cys Gly Cys Cys Thr Gly Ala Ala Ala

Gly Cys Cys Ala Ala Cys Gly Thr Gly Cys Thr Gly Cys Ala Cys Cys
1395 1400 1405

Thr Gly Ala Thr Cys Thr Gly Gly Gly Thr Cys Gly Ala Thr Ala Ala
1410 1415 1420

Cys Gly Gly Cys Thr Ala Cys Ala Ala Cys Ala Thr Gly Gly Thr Gly
1425 1430 1435 1440

Gly Cys Cys Ala Thr Thr Cys Ala Gly Gly Ala Ala Gly Ala Gly Ala
1445 1450 1455

Ala Ala Ala Ala Ala Thr Ala Cys Cys Ala Gly Cys Gly Cys Cys Thr
1460 1465 1470

Gly Thr Cys Cys Gly Gly Cys Gly Thr Cys Gly Ala Gly Thr Thr Thr
1475 1480 1485

Gly Gly Gly Cys Cys Gly Ala Thr Gly Gly Ala Thr Thr Thr Thr Ala
1490 1495 1500

Ala Ala Gly Cys Cys Thr Ala Thr Gly Cys Cys Gly Ala Ala Thr Cys
1505 1510 1515 1520

Cys Thr Thr Cys Gly Gly Cys Gly Cys Gly Ala Ala Ala Gly Gly Gly
1525 1530 1535

Thr Thr Thr Gly Cys Cys Gly Thr Gly Gly Ala Ala Ala Gly Cys Gly
1540 1545 1550

Cys Cys Gly Ala Gly Gly Cys Gly Cys Thr Gly Gly Ala Gly Cys Cys
1555 1560 1565

Gly Ala Cys Cys Cys Thr Gly Cys Gly Cys Gly Cys Gly Gly Cys Gly
1570 1575 1580

Ala Thr Gly Gly Ala Cys Gly Thr Cys Gly Ala Cys Gly Gly Cys Cys
1585 1590 1595 1600

Cys Gly Gly Cys Gly Gly Thr Ala Gly Thr Gly Gly Cys Cys Ala Thr
1605 1610 1615

Cys Cys Cys Gly Gly Thr Gly Gly Ala Thr Thr Ala Thr Cys Gly Cys
1620 1625 1630

Gly Ala Thr Ala Ala Cys Cys Cys Gly Cys Thr Gly Cys Thr Gly Ala
1635 1640 1645

Thr Gly Gly Gly Cys Cys Ala Gly Cys Thr Gly Cys Ala Thr Cys Thr

1650

1655

1660

Gly Ala Gly Thr Cys Ala Gly Ala Thr Thr Cys Thr Gly Thr Ala Ala

1665

1670

1675

1680

<210> 3

<211> 792

<212> DNA

<213> Klebsiella pneumoniae

<400> 3

aggaagtggg atatgaatca ttctgctgaa tgcacctgcg aagagagtct atgcgaaacc 60

ctgcgggcgt tttccgcgca gcatcccgag agcgtgctct atcagacatc gctcatgagc 120

gccctgctga gcgggggttta cgaaggcagc accaccatcg ccgacctgct gaaacacggc 180

gatttcggcc tcggcacctt taatgagctg gacggggagc tgatcgctt cagcagtcag 240

gtctatcagc tgcgcgcgca cggcagcgcg cgcaaagccc agccggagca gaaaacgcgcg 300

ttcgcgggtga tgacctggtt ccagccgcag taccggaaaa cctttgacca tccggtagc 360

cgccagcagc tgcacgaggt gatcgaccag caaatccct ctgacaacct gtctgcgcc 420

ctgcgcatcg acggccattt ccgccatgcc cataccgca ccgtgccgcg ccagacgcgcg 480

ccgtaccggg cgatgaccga cgtactcgac gatcagccgg tgttccgctt taaccagcgc 540

gaaggggtgc tggtcggctt ccggaccccg cagcatatgc aggggatcaa cgtcgccggg 600

tatcacgagc atttattac cgatgaccgc aaaggcggcg gtcacctgct ggattaccag 660

ctcgaccacg gggtagctgac cttcggcgaa attcacaagc tgatgatcga cctgcccgcc 720

gacagcgcgt tctgcagge taatctgeat ccgataatc tcgatgccgc catccgttec 780

gtagaaagtt aa 792

<210> 4

<211> 1680

<212> DNA

<213> Klebsiella pneumoniae

<400> 4

atggacaaac agtatccggt acgccagtgg gcgcacggcg ccgatctcgt cgtcagtcag 60

ctggaagcac agggggtacg ccaggtgttc ggcatccccg gcgcaaaat cgacaaggtc 120

ttcgattcac tgctggattc ctccattcgc attattccgg tacgccacga agccaacgcc 180

gcatttatgg ccgccgccgt cggacgtatt accggcaaag cgggcgtggc gctggtcacc 240
 tccggtccgg gtgtttctaa cctgatcacc ggcatggcca ccgcaacag cgaaggcgac 300
 ccggtggtgg ccttgggcgg cgcggtaaaa cgcgccgata aagccaaaca ggtccaccag 360
 agtatggata cggtaggcgt gttcagcccg gtcaccaaat acgccgtcga ggtgacggcg 420
 ccggaatgcg tgccggaagt ggtctccaac gccttcgcg ccgccgagca gggccggccg 480
 ggccagcggt tcgttagcct gccgcaggat gtggtcgatg gcccggtcag cggcaaagta 540
 ctgccggcca gcggggcccc gcagatgggc gccgcgccgg atgatgcat cgaccaggtg 600

gcgaagctta tcgccaggc gaagaacccg atcttctgc tcggcctgat ggccagccag 660
 ccggaataca gcaaggcgct gcgccgtttg ctggagacca gccatattcc agtcaccagc 720
 acctatcagg ccgccggagc ggtgaatcag gataacttct ctgccttcgc cggccgggtt 780
 gggctgttta acaaccaggc cggggaccgt ctgctgcagc ttgccgacct ggtgatctgc 840
 atcggtaca gcccggtgga atacgaaccg gcgatgtgga acagcggcaa cgcgacgctg 900
 gtgcacatcg acgtgtgcc cgcctatgaa gagcgcaact acaccccgga tgtcgagctg 960
 gtaggcgata tcgccggcac tctcaacaag ctggcgcaaa atatcgatca tcggctggtg 1020

ctctccccgc aggcggcgga gatcctccgc gaccgccagc accagcgcga gctgctggac 1080
 cgccgggcg cgcagctcaa ccagttgcc ctgcatccgc tgcgtatcgt tcgcgcatg 1140
 caggacatcg tcaacacgca cgtcacgttg accgtggaca tgggcagctt ccatacttgg 1200
 attgcccgt accgttacg cttccgcgcc cgcaggtga tgatctcaa cggccagcag 1260
 accatggcg tcgccctgcc ctgggccatc ggcgctggc tggtaatcc tgagcgcaaa 1320
 gtggtctccg tctccggcga cggcggttc ctgcagtcga gcatggagct ggagaccgcc 1380
 gtccgcctga aagccaacgt gctgcacctg atctgggtcg ataacggcta caacatggtg 1440

gccattcagg aagagaaaaa ataccagcgc ctgtccggcg tcgagtttgg gccgatggat 1500
 tttaaagcct atccgaatc cttcggcgcg aaagggtttg ccgtggaaag cggcaggcg 1560
 ctggagccga ccttgcgcgc ggcatggac gtcgacggcc cggcggtagt ggccatccc 1620
 gtggattatc gcgataacc gctgctgatg ggccagctgc atctgagtca gattctgtaa 1680
 1680

- <210> 5
- <211> 32
- <212> DNA
- <213> Forward Primer
- <400> 5

ggatccagga agtggatat gaatcattct gc

32

<210> 6

<211> 31

<212> DNA

<213> Reverse Primer

<400> 6

gaattcttac agaatctgac tcagatgcag c

31