(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0014674
(43) 공개일자 2013년02월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/21 (2006.01) *C12P 1/04* (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01) *C12N 15/31* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0083188
(22) 출원일자 2012년07월30일
심사청구일자 2012년07월30일
(30) 우선권주장
1020110075715 2011년07월29일 대한민국(KR)

(71) 출원인
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
김선원
경상남도 진주시 내동면 독산리 휴먼빌아파트 101-1404
장희정
경상남도 진주시 주약동 111-10 305호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이준호, 박국진, 장영태, 노준태

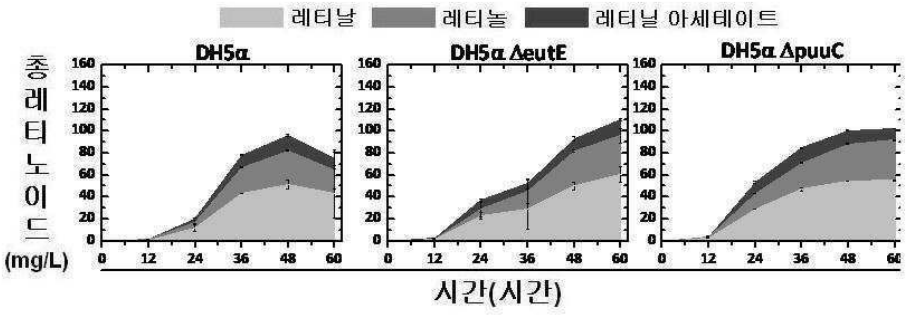
전체 청구항 수 : 총 27 항

(54) 발명의 명칭 **EutE 유전자 또는 PuuC 유전자가 결실된 에세리키아 속 미생물 및 그를 이용한 레티노이드 생산 방법**

(57) 요 약

본 발명은 EutE 유전자 또는 PuuC 유전자가 결실된 에세리키아 속 미생물 및 그를 이용한 레티노이드 생산 방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 EutE 유전자, PuuC 유전자, 또는 그 조합이 감쇄 또는 결실된 레티노이드 생산능을 가진 에세리키아 속 미생물; 및 이 미생물을 배양시켜 얻어진 배양물로부터 레티노이드를 분리하는 것을 포함하는 레티노이드의 생산 방법에 관한 것이다. 이러한 발명들은 모두 EutE와 PuuC 단백질이 레티날과 레티노에이트에 대한 효소 활성을 확인한 것에 기초한다.

대 표 도 - 도3



(72) 발명자

윤상활

충청남도 부여군 부여읍 동남리 268-2 신안빌라 B-202

하보경

경상남도 진주시 문산읍 삼곡리 고려아파트 504호

특허청구의 범위

청구항 1

레티노이드 생산능을 갖는 에세리키아 (Escherichia) 속 모균주의 에탄올아민 이용 단백질 E (Ethanolamine utilization protein E: EutE)를 코딩하는 유전자; 푸트레신 이용 경로 단백질 C (Putrescine utilization pathway protein C: PuuC)를 코딩하는 유전자; 또는 이들의 조합이 감쇄 또는 결실된 에세리키아 속 미생물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 EutE는 서열번호 19의 아미노산 서열을 갖는 것인 미생물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 PuuC는 서열번호 20의 아미노산 서열을 갖는 것인 미생물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 EutE를 코딩하는 유전자는 서열번호 21의 뉴클레오티드 서열을 갖는 것인 미생물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 PuuC를 코딩하는 유전자는 서열번호 22의 뉴클레오티드 서열을 갖는 것인 미생물.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 미생물은 대장균인 미생물.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 대장균은 DH5α, MG1655, BL21(DE), S17-1, XL1-Blue, BW25113 또는 이들의 조합인, 미생물.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 감쇄 또는 결실에 의해 상기 모균주에 비해 레티날의 생산능이 향상된, 미생물.

청구항 9

청구항 1에 있어서, 상기 레티노이드는 레티날, 레티놀, 레티닐에스테르 및 레티노산으로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나인, 미생물.

청구항 10

청구항 1에 있어서, 상기 모균주는 서열번호 1의 엔테로코커스 패칼리스 (Enterococcus faecalis) 유래의 아세

틸-CoA 아세틸트란스퍼라제/하이드록시메틸글루타릴 (HMG)-CoA 리덕타제를 코딩하는 유전자; 서열번호 2의 엔테로코커스 패칼리스 유래의 HMG-CoA 신타제를 코딩하는 유전자; 서열번호 3의 스트렙토코커스 뉴모니애(Streptococcus pneumoniae) 유래의 메발로네이트 키나제를 코딩하는 유전자; 서열번호 4의 스트렙토코커스 뉴모니애 유래의 포스포메발로네이트 키나제를 코딩하는 유전자; 서열번호 5의 스트렙토코커스 뉴모니애 유래의 메발로네이트 디포스페이트 데카르복실라제를 코딩하는 유전자; 서열번호 6의 대장균 유래의 이소펜테닐 디포스페이트 (IPP) 이소머라제를 코딩하는 유전자; 서열번호 7의 판토에아 아글루메란스 (Pantoea agglomerans) 유래의 제라닐제라닐 피로포스페이트 (GGPP) 신타제를 코딩하는 유전자; 서열번호 8의 판토에아 아글루메란스 유래의 피토엔 신타제를 코딩하는 유전자; 서열번호 9의 판토에아 아글루메란스 유래의 피토엔 데히드로게나제를 코딩하는 유전자; 및 서열번호 10의 판토에아 아나나티스 (Pantoea ananatis) 유래의 라이코펜-β-시클라제를 코딩하는 유전자로 형질전환된 것인, 미생물.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 상기 모균주는 서열번호 13의 배양되지 않은 해양 박테리아 (uncultured marine bacterium) 66A03 유래의 β-카로틴 모노옥시게나제를 코딩하는 유전자; 서열번호 14의 생쥐 (Mus musculus) 유래의 β-카로틴 15,15'-모노옥시게나제를 코딩하는 유전자; 서열번호 15의 나트로노모나스 파라오니스 (Natronomonas pharaonis) ATCC35678 유래의 brp 유사 단백질 2 (brp-like protein 2)를 코딩하는 유전자; 및 서열번호 16 또는 17의 할로박테리움 살리나룸 (Halobacterium salinarum) ATCC700922 유래의 β-카로틴 모노옥시게나제를 코딩하는 유전자로 이루어진 군으로 선택되는 하나 이상의 유전자로 더 형질전환된 것인, 미생물.

청구항 12

청구항 10에 있어서, 상기 모균주는 대장균에서 코돈 사용 최적화된 서열번호 18의 염기서열을 갖는 유전자로 더 형질전환된 것인, 미생물.

청구항 13

청구항 1에 있어서, 상기 모균주는 서열번호 11의 대장균 유래 1-데옥시자일룰로즈-5-포스페이트 (DXP) 신타제를 코딩하는 유전자로 형질전환된 것인, 미생물.

청구항 14

청구항 1에 있어서, 상기 모균주는 서열번호 12의 헤마토코커스 플루비알리스 (Haematococcus pluvialis) 유래의 IPP 이소머라제를 코딩하는 유전자로 형질전환된 것인, 미생물.

청구항 15

청구항 1에 있어서, 상기 모균주는 기탁번호 KCTC 11254BP의 대장균 DH5α/pTDHB/pSNA 또는 기탁번호 KCTC 11255BP의 대장균 DH5α/pTDHBSR/pSNA인, 미생물.

청구항 16

청구항 1 내지 15 중 어느 항의 미생물을 배양하는 단계; 및

배양물로부터 레티노이드를 분리하는 단계;를 포함하는,

미생물로부터 레티노이드를 생산하는 방법.

청구항 17

청구항 16에 있어서, 상기 배양은 친유성 물질을 포함하는 배지 중에서 수행되는 것인, 방법.

청구항 18

청구항 16에 있어서, 상기 분리는 친유성 물질 상으로부터 되는 것인, 방법.

청구항 19

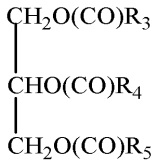
청구항 17 또는 18에 있어서, 상기 친유성 물질은 탄소수 8 내지 50의 알칸 화합물; 하기 화학식 1의 화합물; 하기 화학식 2의 화합물; 또는 이들의 조합인, 방법:

[화학식 1]

$R_1(CO)OR_2$

(식 중, R_1 및 R_2는 각각 독립적으로 탄소수 8 내지 50의 알킬을 나타내고, CO는 카르보닐기를 나타냄),

[화학식 2]



(식 중, R_3, R_4 및 R_5는 각각 독립적으로 탄소수 8 내지 50의 알킬을 나타내고, CO는 카르보닐기를 나타냄).

청구항 20

청구항 17 또는 18에 있어서, 상기 친유성 물질은 옥탄, 데칸, 도데칸, 테트라데칸, 피토스쿠알란, 미네랄 오일, 이소프로필 미리스테이트, 세틸 에틸헥사노에이트, 디옥타노일 데카노일 글리세롤, 스쿠알란, 또는 이들의 조합인, 방법.

청구항 21

청구항 16에 있어서, 상기 레티노이드는 레티날, 레티놀, 레티닐에스테르 및 레티노산로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나인, 방법.

청구항 22

청구항 16에 있어서, 상기 레티노이드는 화장품, 식품 또는 의약품의 소재인, 방법.

청구항 23

EutE 단백질 또는 PuuC 단백질의 활성을 억제하는 물질을 포함하는 조성물을 첨가함으로써 레티날의 레티노에이트로의 분해를 억제하는 방법.

청구항 24

청구항 23에 있어서, 상기 EutE는 서열번호 19의 아미노산 서열을 갖는 것인, 방법.

청구항 25

청구항 23에 있어서, 상기 PuuC는 서열번호 20의 아미노산 서열을 갖는 것인, 방법.

청구항 26

청구항 23에 있어서, 상기 EutE를 코딩하는 유전자는 서열번호 21의 뉴클레오티드 서열을 갖는 것인, 방법.

청구항 27

청구항 23에 있어서, 상기 PuuC를 코딩하는 유전자는 서열번호 22의 뉴클레오티드 서열을 갖는 것인, 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 레티노이드 생산능을 갖는 에세리키아 속 미생물 및 그 미생물을 이용하여 레티노이드를 생산하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 레티노이드는 비타민 A와 화학적으로 관련된 친지질성 이소프레노이드 분자의 클래스이다. 레티노이드는 알코올 (예를 들면, 레티놀), 알데히드 (예를 들면, 레티날), 카르복실산 (예를 들면, 레티노산), 또는 에스테르 (예를 들면, 레티닐 아세테이트) 기능기와 함께, β-이논 고리 및 다불포화(polyunsaturated) 곁사슬로 구성된다. 이들은 시력보호, 골 발달 및 재생, 항산화 효과와 더불어 피부 노화 방지와 같은 인체 건강에 있어 필수적인 역할을 하고 특정 암의 위험을 감소시킨다고 알려져 있다.

[0003] 레티노이드는 최근 수년간 주름개선 및 피부 질환 치료를 위한 효과적인 화장품 및 의약품 원료로서 큰 관심을 받아 왔다. 레티노이드 시장 규모는 세계적으로 약 160억불 정도로 추정된다. 화학적으로 합성된 레티노이드는 대표적인 상업적 원료이다. 레티놀은 펜타디엔 유도체의 환원에 의해 화학적으로 합성된 레티날의 산성화 또는 가수분해로부터 생산된다. 그러나 이러한 화학적 과정은 복잡한 정제 단계 및 원하지 않는 부산물 형성과 같은 단점을 갖는다. 동물은 과일 및 야채로부터 얻은 카로티노이드로부터 레티노이드를 생산하는 반면, 식물은 레티노이드를 합성할 수 없다. 레티노이드 합성의 전체 경로는 보조기(prosthetic group)로서 레티날을 갖는 박테리오로돕신 또는 프로테오로돕신을 포함하는 미생물에서만 가능하다. 그러나, 미생물은 레티날의 단백질 결합 형태를 생산하므로 자유 레티노이드의 대량 생산에는 적합하지 않다. 지금까지 생물학적 생산을 위해서 효소를 이용한 일부 제한적인 시도가 있었지만 성공적인 결과는 없었다. 따라서, 대사적으로 형질전환된 미생물을 사용하는, 레티노이드 생산을 위한 생명공학적 방법의 개발이 필요하다.

[0004] 레티노이드는 그의 반응성 있는 콘쥬게이트된 이중 결합으로 인해 화학적으로 매우 불안정하고, 열, 산소 및 빛에 의해 쉽게 산화되고 이성체화된다. 또한 레티노이드는 생물학적으로 레티노산을 통해 쉽게 분해된다. 따라서, 레티노이드를 보다 효율적으로 생산하는 방법이 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 일 양상은 EutE 및/또는 PuuC 단백질을 코딩하는 유전자가 감쇄 또는 결실된 레티노이드 생산능을 가진 에세리키아 속 미생물을 제공한다.

[0006] 다른 양상은 상기 미생물을 이용하여 레티노이드를 생산하는 방법을 제공한다.

[0007] 또 다른 양상은 EutE 및/또는 PuuC 단백질의 활성을 억제하는 물질을 포함하는 조성물로 레티날의 분해를 억제하는 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0008] 일 양상은 레티노이드 생산능을 갖는 에세리키아 (Escherichia) 속 모균주의 에탄올아민 이용 단백질 E (Ethanolamine utilization protein E: EutE)를 코딩하는 유전자; 푸트레신 이용 경로 단백질 C (Putrescine utilization pathway protein C: PuuC)를 코딩하는 유전자; 또는 이들의 조합이 감쇄 또는 결실된 에세리키아 속 미생물에 관한 것이다.

[0009] 모균주는 레티노이드 생산능을 갖는 야생형 에세리키아 속 미생물 또는 형질전환된 에세리키아 속 미생물일 수 있다. 야생형 에세리키아 속 미생물은 내재적 레티노이드 합성의 경로로서 MEP 경로를 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 형질전환된 에세리키아 속 미생물은 레티노이드 합성의 내재적 MEP 경로에 연관된 유전자, 외래 MVA 경로에 연관된 유전자, 또는 이들의 조합이 도입된 것일 수 있다. MVA 경로 유전자는 아세틸-CoA로부터 IPP를 생산하는데 관여하는 외래 메발로네이트 경로의 효소를 코딩하는 유전자일 수 있다. 또한, 상기 IPP로부터 β-카로틴을 합성하는데 관여하는 효소를 코딩하는 유전자가 도입된 균주일 수 있다. 두 카피 이상의 IPP 이소머라제가 도입되어 IPP로부터 DMAPP로의 전환이 촉진된 것일 수 있다. 따라서, 상기 미생물은 레티노이드를 고농도로 생산할 수 있다. 도 1은 레티날 생합성의 MEP 경로 및 외래의 MVA 경로를 도식적으로 나타낸 도면이다.

[0010] 야생형 에세리키아 속 미생물은 예를 들면, 대장균일 수 있다. 상기 대장균은 DH5α, MG1655, BL21(DE), S17-1, XL1-Blue, BW25113 또는 이들의 조합일 수 있다.

[0011] 모균주는 예를 들면, 서열번호 1의 엔테로코커스 패칼리스 (Enterococcus faecalis) 유래의 아세틸-CoA 아세틸트란스퍼라제/하이드록시메틸글루타릴 (HMG)-CoA 리덕타제를 코딩하는 유전자, 서열번호 2의 엔테로코커스 패칼리스 유래의 HMG-CoA 신타제를 코딩하는 유전자, 서열번호 3의 스트렙토코커스 뉴모니애 (Streptococcus pneumoniae) 유래의 메발로네이트 키나제를 코딩하는 유전자, 서열번호 4의 스트렙토코커스 뉴모니애 유래의 포스포메발로네이트 키나제를 코딩하는 유전자, 서열번호 5의 스트렙토코커스 뉴모니애 유래의 메발로네이트 디포스페이트 데카르복실라제를 코딩하는 유전자, 서열번호 6의 대장균 유래의 이소펜테닐 디포스페이트 (IPP) 이소머라제를 코딩하는 유전자, 서열번호 7의 판토에아 아글루메란스 (Pantoea agglomerans) 유래의 제라닐제라닐 피로포스페이트 (GGPP) 신타제를 코딩하는 유전자, 서열번호 8의 판토에아 아글루메란스 유래의 피토엔 신타제를 코딩하는 유전자, 서열번호 9의 판토에아 아글루메란스 유래의 피토엔 데히드로게나제를 코딩하는 유전자, 및 서열번호 10의 판토에아 아나나티스 (Pantoea ananatis) 유래의 라이코펜-β-시클라제를 코딩하는 유전자로 형질전환된 것일 수 있다.

[0012] 모균주는 서열번호 1 내지 10의 유전자로 형질전환되고, 또한 서열번호 13의 배양되지 않은 해양 박테리아 (uncultured marine bacterium) 66A03 유래의 β-카로틴 모노옥시게나제를 코딩하는 유전자, 서열번호 14의 생쥐 (Mus musculus) 유래의 β-카로틴 15,15'-모노옥시게나제를 코딩하는 유전자, 서열번호 15의 나트로노모나스 파라오니스 (Natronomonas pharaonis) ATCC35678 유래의 brp 유사 단백질 2 (brp-like protein 2: brp2)을 코딩하는 유전자, 및 서열번호 16 또는 17의 할로박테리움 살리나룸 (Halobacterium salinarum) ATCC700922 유래의 β-카로틴 모노옥시게나제를 코딩하는 유전자로 이루어진 군으로 선택되는 하나 이상의 유전자로 더 형질전환된 것일 수 있다.

[0013] 상기 모균주는 서열번호 12의 헤마토코커스 플루비알리스 (Haematococcus pluvialis) 유래의 IPP 이소머라제를 코딩하는 유전자로 더 형질전환된, 레티노이드를 생산하는 것일 수 있다.

[0014] 상기 모균주는 서열번호 11의 대장균 유래 1-데옥시자일룰로즈-5-포스페이트 (DXP) 신타제(dxs)를 코딩하는 유전자로 형질전환된 것일 수 있다. DXP는 내재적 MEP 경로에서 속도 결정 단계에 해당하는 효소이므로 DXP 신타제를 코딩하는 유전자가 추가적으로 도입됨으로써 미생물은 β-카로틴을 고농도로 생산할 수 있게 된다.

[0015] 모균주는 예컨대 기탁번호 KCTC 11254BP의 대장균 DH5α/pTDHB/pSNA (KOREAN COLLECTION FOR TYPE CULTURE, 2008. 1. 2. 기탁) 또는 기탁번호 KCTC 11255BP의 대장균 DH5α/pTDHBSR/pSNA (KOREAN COLLECTION FOR TYPE CULTURE, 2008. 1. 2. 기탁)일 수 있다. 특히, 대장균 DH5α/pTDHBSR/pSNA는 배지 중의 탄소원으로부터 레티노이드를 높은 생산성으로 생산할 수 있다.

[0016] 일 구체예에서, 상기 미생물은 서열번호 1의 엔테로코커스 패칼리스 (*Enterococcus faecalis*) 유래의 아세틸-CoA 아세틸트란스퍼라제/하이드록시메틸글루타릴 (HMG)-CoA 리덕타제를 코딩하는 유전자, 서열번호 2의 엔테로코커스 패칼리스 유래의 HMG-CoA 신타제를 코딩하는 유전자, 서열번호 3의 스트렙토코커스 뉴모니애 (*Streptococcus pneumoniae*) 유래의 메발로네이트 키나제를 코딩하는 유전자, 서열번호 4의 스트렙토코커스 뉴모니애 유래의 포스포메발로네이트 키나제를 코딩하는 유전자, 서열번호 5의 스트렙토코커스 뉴모니애 유래의 메발로네이트 디포스페이트 데카르복실라제를 코딩하는 유전자, 서열번호 6의 대장균 유래의 이소펜테닐 디포스페이트 (IPP) 이소머라제를 코딩하는 유전자, 서열번호 7의 판토에아 아글루메란스 (*Pantoea agglomerans*) 유래의 제라닐제라닐 피로포스페이트 (GGPP) 신타제를 코딩하는 유전자, 서열번호 8의 판토에아 아글루메란스 유래의 피토엔 신타제를 코딩하는 유전자, 서열번호 9의 판토에아 아글루메란스 유래의 피토엔 데히드로게나제를 코딩하는 유전자, 서열번호 10의 판토에아 아나나티스 (*Pantoea ananatis*) 유래의 라이코펜-β-시클라제를 코딩하는 유전자, 서열번호 11의 대장균 유래 1-데옥시자일룰로즈-5-포스페이트 (DXP) 신타제를 코딩하는 유전자 및 서열번호 12의 헤마토코커스 플루비알리스 (*Haematococcus pluvialis*) 유래의 IPP 이소머라제를 코딩하는 유전자로 형질전환된 에세리키아 속 미생물로서, 서열번호 13의 배양되지 않은 해양 박테리아 (uncultured marine bacterium) 66A03 유래의 β-카로틴 모노옥시게나제를 코딩하는 유전자, 서열번호 14의 생쥐 (*Mus musculus*) 유래의 β-카로틴 15,15'-모노옥시게나제를 코딩하는 유전자, 서열번호 15의 나트로노모나스 파라오니스 (*Natronomonas pharaonis*) ATCC35678 유래의 brp 유사 단백질 2 (brp-like protein 2)을 코딩하는 유전자, 및 서열번호 16 또는 17의 할로박테리움 살리나룸 (*Halobacterium salinarum*) ATCC700922 유래의 β-카로틴 모노옥시게나제를 코딩하는 유전자로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자로 더 형질전환된 에세리키아 속 미생물일 수 있다. 서열번호 13의 배양되지 않은 해양 박테리아 (uncultured marine bacterium) 66A03 유래의 β-카로틴 모노옥시게나제를 코딩하는 유전자는 대장균에서 코돈 사용 최적화된 서열번호 18의 염기서열을 갖는 것일 수 있다.

[0017] 본 명세서에 있어서, 용어 "레티노이드 (retinoids)"는 비타민 A에 화학적으로 관련된 화학물질의 부류를 나타낸다. 레티노이드의 구조는 시클릭 말단기, 폴리엔 측쇄 및 극성 말단기로 구성된다. 상기 폴리엔 측쇄의 C=C 이중결합이 교대로 되어 형성된 공액 시스템 (conjugated system)은 레티노이드의 색 (보통 노란색, 오렌지 또는 적색)을 띄게 한다. 많은 레티노이드는 발색소(chromophore)이다. 측쇄 및 말단기를 변화시킴으로써 다양한 레티노이드가 생성될 수 있다. 상기 레티노이드는 레티날, 레티놀, 레티노산, 레티닐 아세테이트, 또는 이들의 조합일 수 있다. 또한, 상기 레티노이드는 레티날, 레티놀, 레티노산, 레티닐 아세테이트, 또는 이들의 조합의 생체 내 분해 산물일 수 있다.

[0018] 레티노이드는 기본 탄소수가 20인 물질로서, 결합하는 지방산 보조기에 따라 최종 탄소수가 달라질 수 있는데, 예컨대 아세테이트 결합시에는 최종 탄소수가 22이고 올레산 결합시에는 탄소수가 38일 수 있다.

[0019] 본 발명에서 "에탄올아민 이용 단백질 E", "EutE" 또는 "EutE 단백질"은 서열번호 19의 아미노산 서열을 갖는 단백질, 및 이 서열과 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 99% 이상의 상동성을 갖고 레티날 탈수소효소 활성을 갖는 단백질을 포함한다.

[0020] 서열번호 19의 아미노산 서열을 갖는 EutE 단백질은 서열번호 21의 뉴클레오티드 서열을 갖는 유전자에 의해 코딩될 수 있다. EutE 단백질을 코딩하는 유전자는 ECK2450, b2455, JW2439 또는 yffX 라고도 한다.

[0021] 본 발명에서 "푸트레신 이용 경로 단백질 C", "PuuC" 또는 "PuuC 단백질"은 서열번호 20의 아미노산 서열을 갖는 단백질, 및 이 서열과 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 99% 이상의 상동성을 갖고 레티날 탈수소효소 활성을 갖는 단백질을 포함한다.

[0022] 서열번호 20의 아미노산 서열을 갖는 PuuC 단백질은 서열번호 22의 뉴클레오티드 서열을 갖는 유전자에 의해 코딩될 수 있다. PuuC 단백질을 코딩하는 유전자는 ECK1295, b1300, JW1293 또는 aldH 라고도 한다.

[0023] EutE 및/또는 PuuC 유전자의 감쇄 또는 결실에 의하여, 레티날의 생산능 또는 레티노이드 중 레티날의 비율이 증가된 것일 수 있다. 레티날의 생산능 또는 레티노이드 중 레티날의 비율의 증가는 레티날이 레티노에이트로 전환 후 레티노에이트가 분해됨을 억제하는 것에 의해 달성되는 것일 수 있다.

[0024] 본 명세서에 있어서, 용어 "감쇄(attenuation)"는 대상 유전자의 발현이 모균주에 비하여 감소한 것을 나타낸다. 용어 "결실(deletion)"은 대상 유전자의 발현이 상실된 것을 나타낸다.

[0025] 상기 감쇄 또는 결실은 유전자 서열의 변이, 예를 들면, 치환, 결실, 삽입 또는 그들의 조합에 의하여 발생할 수 있다. 상기 감쇄 또는 결실은 유전자 조절 부의 서열의 변이, 예를 들면, 치환, 결실, 삽입 또는 그들의 조합에 의하여 발생할 수 있다.

[0026] 에세리키아 (Escherichia) 속 모균주의 EutE 및/또는 PuuC 유전자가 감쇄 또는 결실되거나 증폭된 미생물은 모균주에 비하여 레티노이드, 즉, 레티날, 레티놀, 레티닐에스테르, 레티노산, 또는 이들의 조합 중 적어도 어느 하나의 생산능이 증가된 것일 수 있다. 또한, 상기 미생물은 모균주에 비하여 레티노이드, 즉, 레티날, 레티놀, 레티닐에스테르, 레티노산, 또는 이들의 조합 중 적어도 어느 하나의 생산능이 감소된 것일 수 있다.

[0027] 모균주는 YbbO 단백질을 코딩하는 유전자가 추가로 감쇄 또는 결실되거나, 증폭된 에세리키아 속 미생물일 수 있다.

[0028] YbbO 단백질은 서열번호 23의 아미노산 서열을 갖는 단백질, 및 이 서열과 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 99% 이상의 상동성을 갖고 레티놀 탈수소효소 활성을 갖는 단백질을 포함한다. 서열번호 23의 아미노산 서열을 갖는 YbbO 단백질은 서열번호 24의 뉴클레오티드 서열을 갖는 유전자에 의해 코딩될 수 있다.

[0029] YbbO 유전자의 감쇄 또는 결실에 의하여, 레티날의 생산능 또는 레티노이드 중 레티날의 비율이 증가된 것일 수 있다. YbbO 유전자의 증폭에 의하여 레티놀의 생산능 또는 레티노이드 중 레티놀의 비율이 증가된 것일 수 있다.

[0030] 상기 증폭(amplification)은 외래 레티놀 탈수소효소를 코딩하는 유전자의 도입에 의하여 이루어진 것일 수 있다. 상기 증폭은 일 양상으로 외래 YbbO 유전자의 도입에 의하여 이루어진 것일 수 있다.

[0031] 증폭은 유전자 카피의 증가 및/또는 유전자의 발현량 증가를 나타낸다. 상기 증폭은 일 양상으로 외래 유전자의 도입 또는 내재적 유전자의 카피 수의 증가에 의하여 이루어질 수 있다. 상기 증폭을 위해 유전자의 발현량을 늘릴 수 있도록 프로모터 또는 RBS(ribosomal binding site)를 대체할 수 있다.

[0032] 다른 양상은 상기 미생물을 배양하는 단계; 및 배양물로부터 레티노이드를 분리하는 단계;를 포함하는 상기 미생물로부터 레티노이드를 생산하는 방법에 관한 것이다.

[0033] 상기 방법은 상기한 미생물을 배양하는 단계를 포함한다. 여기서 미생물은 위에서 설명한 레티노이드 생산능을 갖는 에세리키아 (Escherichia) 속 모균주의 EutE 및/또는 PuuC 단백질을 코딩하는 유전자가 감쇄 또는 결실된 에세리키아 속 미생물일 수 있고, 위에서 설명된 에세리키아 속 미생물에 관한 사항이 본 방법의 미생물에도 모두 적용될 수 있다.

[0034] 상기 배양은 친유성 물질을 포함하는 배지 중에서 배양하는 단계를 포함할 수 있다.

[0035] 상기 친유성 물질은 탄소수 8 내지 50의 유기 화합물로서 친유성을 갖는 것일 수 있다.

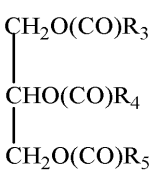
[0036] 상기 친유성 물질은 탄소수 8 내지 50의 알칸 화합물, 하기 화학식 1의 화합물; 하기 화학식 2의 화합물; 또는 이들의 조합일 수 있다:

[0037] [화학식 1]

[0038] $R_1(CO)OR_2$

[0039] (식 중, R_1 및 R_2는 각각 독립적으로 탄소수 8 내지 50의 알킬을 나타내고, CO는 카르보닐기를 나타냄),

[0040] [화학식 2]

[0041] 

[0042] (식 중, R_3, R_4 및 R_5는 각각 독립적으로 탄소수 8 내지 50의 알킬을 나타내고, CO는 카르보닐기를 나타냄).

[0043] 탄소수 8 내지 50의 알칸 화합물은 직쇄 알칸, 분지 알칸, 시클릭 알칸, 또는 이들의 조합일 수 있다. 알칸 화합물은 예를 들면, 탄소수 8 내지 46, 8 내지 40, 8 내지 36, 8 내지 30, 8 내지 26, 8 내지 20, 8 내지 16, 8 내지 12, 8 내지 10, 10 내지 50, 10 내지 46, 10 내지 40, 10 내지 36, 10 내지 30, 10 내지 26, 10 내지 20, 10 내지 16, 10 내지 12, 10 내지 50, 10 내지 46, 12 내지 50, 12 내지 46, 12 내지 36, 12 내지 30, 12 내지 26, 12 내지 20, 또는 12 내지 16의 알칸 화합물일 수 있다.

[0044] 직쇄 알칸은 탄소수 8 (옥탄), 10 (데칸), 12 (도데칸), 14 (테트라데칸), 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50의 알칸, 또는 이들의 조합일 수 있다.

[0045] 분지 알칸은 탄소수 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50의 알칸, 또는 이들의 조합일 수 있다. 분지 알칸은 테르펜 화합물의 포화된 유사체(analogue)일 수 있다. 예를 들면, 피토스쿠알란일 수 있다.

[0046] 직쇄 알칸, 분지 알칸, 및 시클릭 알칸의 조합은 미네랄 오일일 수 있다. 미네랄 오일은 비식물성 원료(미네랄) 유래의 탄소 수 15 내지 40의 알칸의 혼합물일 수 있다. 탄소수 15 내지 40의 알칸은 탄소수 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40의 알칸의 2 이상의 혼합물일 수 있다.

[0047] 미네랄 오일은 경량 미네랄 오일 또는 중량 미네랄 오일일 수 있다. 경량 미네랄 오일(light mineral oil)은 일반적으로 밀도가 880~920kg/m^3이며 20℃에서 비중이 820~860 kg/m^3, 40℃에서 유동성 점도가 14~18cst를 가지는 물질이다. 중량 미네랄 오일(heavy mineral oil)은 일반적으로 밀도가 920kg/m^3이며 20℃에서 비중이 860~900 kg/m^3, 40℃에서 유동성 점도가 65~85cst인 물질이다.

[0048] 화학식 1의 화합물에서 R_1 및 R_2는 각각 독립적으로 직쇄, 분지쇄 또는 고리형의 탄소수 8 내지 50의 알킬이다. R_1과 R_2는 각각 독립적으로 탄소수 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48 또는 50의 알킬일 수 있다.

[0049] R_1과 R_2는 각각 탄소수 8 내지 50, 예를 들면, 탄소수 8 내지 46, 8 내지 40, 8 내지 36, 8 내지 30, 8 내지 26, 8 내지 20, 8 내지 16, 8 내지 12, 8 내지 10, 10 내지 50, 10 내지 46, 10 내지 40, 10 내지 36, 10 내지 30, 10 내지 26, 10 내지 20, 10 내지 16, 10 내지 12, 10 내지 50, 10 내지 46, 12 내지 50, 12 내지 46, 12 내지 36, 12 내지 30, 12 내지 26, 12 내지 20, 또는 12 내지 16의 알킬일 수 있다. R_1이 탄소수 13의 직쇄 알킬이고 R_2가 이소프로필일 수 있다. 또한, R_1이 에틸펜틸기이고 R_2가 세틸일 수 있다.

[0050] 화학식 2의 화합물에서, R_3, R_4 및 R_5는 각각 독립적으로 직쇄, 분지쇄 또는 고리형의 탄소수 8 내지 50의 알킬이다.

[0051] R_3, R_4, 및 R_5는 각각 탄소수 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48 또는 50의 알킬일 수 있다. 상기 화합물은 예를 들면, R_3, R_4, 및 R_5가 각각 탄소수 8 내지 50, 예를 들면, 탄소수 8 내지 46, 8 내지 40, 8 내지 36, 8 내지 30, 8 내지 26, 8 내지 20, 8 내지 16, 8 내지 12, 8 내지 10, 10 내지 50, 10 내지 46, 10 내지 40, 10 내지 36, 10 내지 30, 10 내지 26, 10 내지 20, 10 내지 16, 10 내지 12, 10 내지 50, 10 내지 46, 12 내지 50, 12 내지 46, 12 내지 36, 12 내지 30, 12 내지 26, 12 내지 20, 또는 12 내지 16의 알킬일 수 있다.

[0052] 친유성 물질은 옥탄, 데칸, 도데칸, 테트라데칸, 피토스쿠알란, 미네랄 오일, 이소프로필 미리스테이트, 세틸 에틸헥사노에이트, 디옥타노일 데카노일 글리세롤, 스쿠알란, 또는 이들의 조합일 수 있다.

[0053] 친유성 물질은 생산되는 레티노이드를 안정화시키는 것뿐만 아니라, 미생물에 의한 레티노이드의 생산성을 증가시킬 수 있다. 친유성 물질은 미생물의 생장에 영향을 미치지 않거나 적게 영향을 미치는 것일 수 있다.

[0054] 배양은 합성, 반합성, 또는 복합 배양 배지에서 이루어질 수 있다. 배양 배지로는 탄소원, 질소원, 비타민 및 미네랄로 구성된 배지를 사용할 수 있다. 예를 들어, MRS (Man-Rogosa-Sharp) 액체 배지 또는 우유가 첨가된 액체 배지를 사용할 수 있다.

[0055] 배지의 탄소원으로는 전분, 포도당, 자당, 갈락토스, 과당, 글리세롤, 글루코스 또는 이들의 혼합물이 사용될

수 있다. 예를 들면, 글리세롤이 탄소원으로 사용될 수 있다. 질소원으로는 황산암모늄, 질산암모늄, 질산나트륨, 글루탐산, 카사미노산, 효모추출물, 펩톤, 트립톤, 대두박 또는 이들의 혼합물이 사용될 수 있다. 미네랄은 염화나트륨, 인산제이칼륨, 황산마그네슘 또는 이들의 혼합물이 사용될 수 있다.

[0056] 배양이 발효조에서 이루어지는 경우 글루코스를 배지의 탄소원으로 사용하는 것이 좋다. 시험관 배양의 경우에는 글리세롤을 배지의 탄소원으로 사용하는 것이 좋다.

[0057] 미생물 배양 배지 내 상기 탄소원, 질소원 및 미네랄 각각은 예를 들면, 리터당 10 내지 100 g, 5 내지 40 g 및 0.5 내지 4 g 을 이용할 수 있다.

[0058] 상기의 통상의 배양 배지에 첨가되는 비타민은 비타민 A, 비타민 B, 비타민 C, 비타민 D, 비타민 E 또는 이들의 혼합물일 수 있다. 비타민은 통상의 배양 배지에 상기에서 언급된 탄소원, 질소원, 미네랄 등과 함께 첨가되거나, 멸균하여 준비된 배지에 별도로 첨가될 수 있다.

[0059] 배양은 통상의 대장균 배양 조건으로 수행될 수 있다. 배양은 예를 들어 약 15-45℃, 예를 들면, 15-44℃, 15-43℃, 15-42℃, 15-41℃, 15-40℃, 15-39℃, 15-38℃, 15-37℃, 15-36℃, 15-35℃, 15-34℃, 15-33℃, 15-32℃, 15-31℃, 15-30℃, 20-45℃, 20-44℃, 20-43℃, 20-42℃, 20-41℃, 20-40℃, 20-39℃, 20-38℃, 20-37℃, 20-36℃, 20-35℃, 20-34℃, 20-33℃, 20-32℃, 20-31℃, 20-30℃, 25-45℃, 25-44℃, 25-43℃, 25-42℃, 25-41℃, 25-40℃, 25-39℃, 25-38℃, 25-37℃, 25-36℃, 25-35℃, 25-34℃, 25-33℃, 25-32℃, 25-31℃, 25-30℃, 27-45℃, 27-44℃, 27-43℃, 27-42℃, 27-41℃, 27-40℃, 27-39℃, 27-38℃, 27-37℃, 27-36℃, 27-35℃, 27-34℃, 27-33℃, 27-32℃, 27-31℃ 또는 27-30℃에서 수행될 수 있다.

[0060] 배양액 중의 배양 배지를 제거하고 농축된 균체만을 회수하거나 제거하기 위해 원심분리 또는 여과과정을 거칠 수 있으며 이러한 단계는 당업자의 필요에 따라 수행할 수 있다. 농축된 균체는 통상적인 방법에 따라 냉동하거나 냉동건조하여 그 활성을 잃지 않도록 보존할 수 있다.

[0061] 배양의 일 예에 있어서, 배양은 탄소원으로서 글리세롤을 포함하는 배지에서 이루어지는 것일 수 있다. 글리세롤은 배지 중의 유일한 탄소원일 수 있다. 0.5-5.0%(w/v), 예를 들면, 0.5-4.5%(w/v), 0.5-4.0%(w/v), 0.5-3.5%(w/v), 0.5-3.0%(w/v), 0.5-2.5%(w/v), 0.5-2.0%(w/v), 1-5.0%(w/v), 1-4.5%(w/v), 1-4.0%(w/v), 1-3.5%(w/v), 1-3.0%(w/v) 또는 1-2.5%(w/v)의 글리세롤을 포함하는 배지에서 이루어지는 것일 수 있다. 상기 배지는 글리세롤 및 아라비노스가 첨가된 YT 배지일 수 있다. YT 배지는 1.6중량% 트립톤, 1중량% 효모 추출물 및 0.5 중량% NaCl을 포함할 수 있다.

[0062] 배양은 친유성 물질 존재 하의 배양 배지에서, 예를 들면 배지 표면에 친유성 물질인 도데칸 상(dodecane phase)을 위치시킨 상태로 수행될 수 있다. 배양은 교반되는 상태에서 수행될 수 있다.

[0063] 교반되는 경우, 100 내지 300rpm, 예를 들면, 100 내지 280rpm, 100 내지 260rpm, 100 내지 240rpm, 100 내지 220rpm, 100 내지 200rpm, 100 내지 180rpm, 100 내지 160rpm, 100 내지 140rpm, 100 내지 120rpm, 120 내지 300rpm, 120 내지 280rpm, 120 내지 260rpm, 120 내지 240rpm, 120 내지 220rpm, 120 내지 200rpm, 120 내지 180rpm, 120 내지 160rpm, 120 내지 140rpm, 150 내지 300rpm, 150 내지 280rpm, 150 내지 260rpm, 150 내지 240rpm, 150 내지 220rpm, 150 내지 200rpm, 150 내지 180rpm, 140 내지 160rpm, 200 내지 300rpm, 200 내지 280rpm, 200 내지 260rpm, 200 내지 240rpm, 200 내지 220rpm, 또는 150 rpm으로 교반될 수 있다.

[0064] 교반되는 경우, 상기 친유성 물질, 예컨대 도데칸은 배지 중에서 분산되어 세포와 접촉된다. 친유성 물질은 배지 중에 분산됨으로써 미생물과 접촉하는 면적이 넓어져 배양 중 레티노이드를 효율적으로 세포로부터 분리되게 하여 안정화 및/또는 용해시킬 수 있다.

[0065] 친유성 물질, 예컨대 도데칸 상 없이 상기 기술한 레티노이드를 생산하는 미생물을 배양시켰을 때, 레티노이드 생산은 일정 시점에서 최고치를 나타내고 그 이후에 감소할 수 있다. 이는 미생물 성장의 정체 상태 동안 추가적인 레티노이드 합성이 중단되는 반면, 세포 내에서 그의 산화적 분해가 일어나기 때문일 수 있다.

[0066] 친유성 물질, 예컨대 도데칸 상의 존재 하에 배양 배지에서 상기 미생물을 배양시키게 되면 생산된 레티노이드가 세포 내에서 분해되기 전에 친유성 물질, 예컨대 도데칸 상에 흡수되게 되어 레티노이드 생산량을 향상시킬 수 있다.

[0067] 상기 친유성 물질, 예컨대 도데칸 상은 에세리키아 속 미생물의 세포 성장에 영향을 미치지 않고, 소수성 레티노이드의 추출을 위해 소수성이고, 낮은 휘발성을 갖는 것일 수 있다. 도 2는 β-카로틴의 레티날, 레티놀, 레

티노산, 및 레티닐 에스테르를 포함하는 레티노이드로의 변환을 나타낸다.

[0068] 배지 대 친유성 물질의 부피비는 특정 범위의 비로 한정되지 않고, 예컨대, 배지 대 친유성 물질의 부피비가 1:0.1-3.0, 1:0.2-3.0, 1:0.5-3.0, 1:1.0-3.0, 1:1.5-3.0, 1:2.0-3.0, 1:2.5-3.0, 1:0.2-2.5, 1:0.2-2.0, 1:0.2-1.5, 1:0.2-1.0, 1:0.2-0.5, 1:0.5-2.5, 1:0.5-2.0, 1:0.5-1.5, 1:0.5-1.0, 1:0.8-2.5, 1:0.8-2.0, 1:0.8-1.5, 1:0.8-1.2, 1:0.8-1.0 등이 가능하다.

[0069] 일 구체예에 따르면 상기 배양하는 단계에서 상기 배지는 약 2.0% 농도의 글리세롤를 포함하고, 상기 에세리키아 속 미생물은 대장균 DH5α 또는 MG1655이고, 상기 배양하는 단계는 배양액 약 7 ml, 약 29℃에서 배양시키는 것일 수 있다.

[0070] 상기 방법은 또한, 친유성 물질 상으로부터 레티노이드를 분리하는 단계를 포함한다. 상기 레티노이드, 예를 들면, 레티날, 레티놀, 레티닐 에스테르, 또는 이들의 조합을 분리하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들면, 이온교환 크로마토그래피, HPLC 등의 방법에 의하여 분리될 수 있다. 구체적으로, 균체를 회수한 후에 아세톤 등의 용매를 이용한 추출 후에 고순도의 제품을 얻기 위해서는 HPLC 또는 결정화 작업등을 통한 분리정제가 진행될 수 있다.

[0071] 레티노이드는 화장품, 식품 또는 의약품의 소재로 널리 활용된다.

[0072] 다른 양상으로, 에세리키아 속 미생물로부터 분리된 EutE 및 PuuC 단백질은 레티날을 레티노에이트로 전환시키는 반응에 있어 효소 활성을 나타내므로, EutE 단백질 또는 PuuC 단백질의 활성을 억제하는 물질을 포함하는 조성물을 첨가함으로써 레티날의 레티노에이트로의 분해를 억제시킬 수 있다.

[0073] 상기 EutE 단백질은 앞서 설명한 바와 마찬가지로, 서열번호 19의 아미노산 서열을 갖는 단백질, 및 이 서열과 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 99% 이상의 상동성을 갖고 레티날 탈수소효소 활성을 갖는 단백질을 포함한다.

[0074] 서열번호 19의 아미노산 서열을 갖는 EutE 단백질은 서열번호 21의 뉴클레오티드 서열을 갖는 유전자에 의해 코딩될 수 있다. EutE 단백질을 코딩하는 유전자는 ECK2450, b2455, JW2439 또는 yffX 라고도 한다.

[0075] 상기 PuuC 단백질은 앞서 설명한 바와 마찬가지로, 서열번호 20의 아미노산 서열을 갖는 단백질, 및 이 서열과 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 99% 이상의 상동성을 갖고 레티날 탈수소효소 활성을 갖는 단백질을 포함한다.

[0076] 서열번호 20의 아미노산 서열을 갖는 PuuC 단백질은 서열번호 22의 뉴클레오티드 서열을 갖는 유전자에 의해 코딩될 수 있다. PuuC 단백질을 코딩하는 유전자는 ECK1295, b1300, JW1293 또는 aldH 라고도 한다.

[0077] EutE 단백질 및/또는 PuuC 단백질의 활성을 억제하는 물질을 포함하는 조성물은 용매, 안정제, 각종 첨가제 등 통상의 효소 조성물에 포함되는 성분들을 추가 포함할 수 있다. 또한, EutE 단백질 및/또는 PuuC 단백질이외의 레티날로부터 레티노에이트로의 전환을 억제하는 성분을 추가 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0078] 일 양상에 따른 에세리키아 속 미생물은 증가된 레티노이드 생산능을 갖는다. 또한, 레티노이드 중 특정 산물을 증가된 비율로 생산할 수 있다.

[0079] 다른 양상에 따른 레티노이드를 생산하는 방법에 의하면, 레티노이드를 효율적으로 생산할 수 있다. 또한, 레티노이드 중 특정 산물을 증가된 비율로 생산할 수 있다.

[0080] 본 발명의 EutE 단백질 및/또는 PuuC 단백질을 코딩하는 유전자가 감쇄 또는 결실된 에세리키아 속 미생물을 친유성 물질을 포함하는 배지 중에서 배양시켜 친유성 물질 상으로부터 레티노이드를 분리시키면 보다 효율적으로 레티노이드를 생산할 수 있다.

[0081] 본 발명의 미생물을 이용한 레티노이드 생산 방법을 통해 얻어진 레티노이드는 화장품, 식품, 의약품 등의 소재로 널리 활용될 수 있고, 화장품, 식품, 의약품 등의 제조를 위해 특정 레티노이드의 효과적인 생산이 필요할 경우 본 발명의 레티노이드 생산 방법을 활용하기 적합하다.

도면의 간단한 설명

[0082] 도 1은 레티날 생합성의 MEP 경로 및 외래의 MVA 경로를 도식적으로 나타낸 도면이다.

도 2는 β-카로틴의 레티날, 레티놀, 레티노산, 및 레티닐 에스테르를 포함하는 레티노이드로의 변환을 나타낸 도면이다.

도 3은 EutE 유전자 또는 PuuC 유전자 결실이 레티노이드 생산에 미치는 영향을 나타낸 도면이다.

도 4는 YbbO 유전자 도입이 레티노이드 생산에 미치는 영향을 나타낸 도면이다.

도 5는 YbbO 유전자 결실이 레티노이드 생산에 미치는 영향을 나타낸 도면이다.

도 6은 도데칸이 포함된 배지를 사용한 배양에서의 대장균(pT-DHBSR/pS-NA)의 도데칸 부피에 따른 레티노이드 생산 및 세포 성장을 나타낸 도면이다.

도 7은 도데칸이 포함된 배지를 사용한 배양에서의 대장균(pT-DHBSR/pS-NA)의 배양 시간 및 도데칸 부피에 따른 레티노이드의 분포가 총 레티노이드에 대한 각 구성성분의 백분율로 나타낸 도면이다.

도 8 및 도 9는 다양한 알칸 존재하에서 대장균(pT-DHBSR/pS-NA)의 레티노이드 생산 및 세포성장 결과를 나타낸 도면이다.

도 10, 도 11 및 도 12는 다양한 부피의 경량 미네랄 오일 존재 하에서 대장균(pT-DHBSR/pS-NA)의 레티노이드 생산, 세포성장, 균체당 레티노이드 생산량(cell specific retinoids productivity) 결과를 나타낸 도면이다.

도 13 및 도 14는 중량 미네랄 오일 존재 하에서 대장균(pT-DHBSR/pS-NA)의 레티노이드 생산 및 세포성장 결과를 나타낸 도면이다.

도 15 및 도 16은 중량 미네랄 오일 존재 하에서 시험관을 기울여 배양한 경우 대장균(pT-DHBSR/pS-NA)의 레티노이드 생산 및 세포성장 결과를 나타낸 도면이다.

도 17은 피부 친화적 친유성 물질 존재 하에서 대장균(pT-DHBSR/pS-NA)의 세포 성장 및 pH를 나타낸 도면이다.

도 18 및 도 19는 피부 친화적 친유성 물질의 다양한 종류와 양에 따른 대장균(pT-DHBSR/pS-NA)의 레티노이드 생산결과를 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0083] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다. 이하의 실시예에서 다음의 실험 재료 및 방법을 사용하였다.

[0084] **실시예 1: EutE 유전자와 PuuC 유전자가 결실된 대장균 및 그를 이용한 레티노이드 생산**

[0085] 레티노이드 생산능을 갖는 에세리키아 (Escherichia) 속 미생물인 DH5α(pTDHBSR/pSNA) (기탁번호 KCTC 11255BP)에서 EutE 유전자 및 PuuC 유전자를 결실시키고, 그 결실이 레티노이드 생산에 미치는 영향을 확인하였다.

[0086] **(1) DH5α(pTDHBSR/pSNA)의 eutE 유전자 또는 puuC 유전자 결실**

[0087] 결실은 Datsenko와 Wanner의 방법 (Datsenko KA and Wanner BL., 2000 Proc Natl Acad Sci U.S.A., 97(12):6640-6645)에 따라서 다음과 같이 제조하였다.

[0088] EutE 유전자를 상동성 재조합에 의하여 선발 마커 유전자인 카나마이신 유전자로 대체하기 위하여, pKD13 플라이스미드(Datsenko KA and Wanner BL., 2000 Proc Natl Acad Sci U.S.A., 97(12):6640-6645)의 카나마이신 유전자에 결합하면서 EutE 유전자의 상류 말단과 하류 말단의 염기 서열을 갖는 PCR 프라이머를 제조하였다.

[0089] 정방향 프라이머는 EutE 유전자의 상류 말단의 50bp 염기서열 다음에, 카나마이신 유전자 결합 염기 서열 20bp로 구성되어 있으며, 역방향 프라이머는 EutE 유전자의 하류 말단의 50bp 염기서열 다음에, 카나마이신 유전자

결합 염기 서열 20bp로 구성되어 있다. 사용한 프라이머는 하기 표 1에 표시하였다. 서열번호 32와 서열번호 33의 올리고뉴클레오티드를 프라이머로 하고, pKD13을 주형으로 PCR 반응을 수행하였다.

[0090] 상기의 정제된 PCR 반응산물은 pKD46 (Datsenko KA and Wanner BL., 2000 Proc Natl Acad Sci U.S.A., 97(12):6640-6645)을 포함한 DH5α콤페턴트 세포 (competent cell)로 형질전환하였다. 카나마이신 저항성을 가진 평판 배지의 콜로니를 콜로니 PCR을 통하여 카나마이신 유전자가 상동성 재조합에 의해서 EutE 유전자를 대체했는지를 확인하였다. 콜로니 PCR에 사용된 프라이머는 대장균 DH5α염색체 상에서 EutE 유전자 바로 인접한 영역에 결합하도록 제조하였다.

[0091] PuuC 유전자를 상동성 재조합에 의하여 선발마커 유전자인 클로람페니콜 유전자로 대체하기 위하여, pKD3 플라이스미드 (Datsenko KA and Wanner BL., 2000 Proc Natl Acad Sci U.S.A., 97(12):6640-6645)의 클로람페니콜 유전자에 결합하면서 PuuC 유전자의 상류 말단과 하류 말단의 염기 서열을 갖는 PCR 프라이머를 제조하였다.

[0092] 정방향 프라이머는 PuuC 유전자의 상류 말단의 50bp 염기서열 다음에, 클로람페니콜 유전자 결합 염기 서열 20bp로 구성되어 있으며, 역방향 프라이머는 PuuC 유전자의 하류 말단의 50bp 염기서열 다음에, 클로람페니콜 유전자 결합 염기 서열 20bp로 구성되어 있다. 사용한 프라이머는 하기 표 1에 표시하였다. 서열번호 36과 서열번호 37의 올리고뉴클레오티드를 프라이머로 하고, pKD3을 주형으로 PCR 반응을 수행하였다.

[0093] 상기의 정제된 PCR 반응산물은 pKD46 (Datsenko KA and Wanner BL., 2000 Proc Natl Acad Sci U.S.A., 97(12):6640-6645)을 포함한 DH5α콤페턴트 세포 (competent cell)로 형질전환하였다. 클로람페니콜 저항성을 가진 평판 배지의 콜로니를 콜로니 PCR을 통하여 클로람페니콜 유전자가 상동성 재조합에 의해서 PuuC 유전자를 대체했는지를 확인하였다. 콜로니 PCR에 사용된 프라이머는 대장균 DH5α염색체 상에서 PuuC 유전자 바로 인접한 영역에 결합하도록 제조하였다.

[0094] 그 결과, EutE 유전자 및 PuuC 유전자가 결실된 것을 콜로니 PCR 방법에 의하여 EutE는 하기 표 1의 서열번호 34와 서열번호 35의 프라이머로, PuuC는 하기 표 1의 서열번호 38과 서열번호 39의 프라이머로 확인하였다.

표 1

[0095]

명칭	서열번호
KO eutE-F	32
KO eutE-R	33
KO eutECF-F	34
KO eutECF-R	35
KO puuC-F	36
KO puuC-R	37
KO puuCCF-F	38
KO puuCCF-R	39

[0096] **(2) 레티노이드 생산의 비교**

[0097] (1)에서 얻은 균주를 2% (w/v) 글리세롤 및 0.2% (w/v) 아라비노오스를 함유한 2YT 배지(리터 당 16g 트립톤, 10g 이스트 추출물, 및 5g NaCl) 5mL와 도데칸 5mL의 혼합 배지 중에서 60 시간 동안 배양하였다.

[0098] 배양은 길이 15 cm, 지름 25 mm의 시험관에 상기 혼합 배지를 넣고 각 균주를 접종한 후, 진탕 배양기 (shaking incubator)에 약 250 rpm으로 교반하면서 약 29℃에서 배양하였다. 대조군으로는 상기 유전자가 결실되지 않은 DH5α(pTDHBSR/pSNA)를 사용하였다.

[0099] 도 3은 EutE 유전자, 또는 PuuC 유전자 결실이 레티노이드 생산에 미치는 영향을 나타낸 도면이다. 도 3에 나타낸 바와 같이, 대조군 균주에 비하여, 결실 균주에서 전체 레티노이드의 양 (레티날, 레티놀 및 레티닐 아세테이트의 총량) 및 레티날의 비율이 배양 60시간에서 크게 증가하였다. 대조군 균주의 경우 배양 60시간 총 레티노이드 생산량이 75 mg/L, EutE 유전자가 결실된 경우 110.3 mg/L, PuuC 유전자가 결실된 경우 102.2 mg/L를 나타내었다.

[0100] 이는 EutE 유전자 및 PuuC 유전자가 레티날을 레티노산으로 산화시키는 옥시다제 활성을 코딩하기 때문인 것으로 여겨진다. 그러나, 특정한 기작에 한정되는 것은 아니다.

[0101] **실시예 2: YbbO 유전자가 증폭 또는 결실된 대장균 및 그를 이용한 레티노이드의 생산**

[0102] 레티노이드 생산능을 갖는 에세리키아 속 미생물인 대장균 DH5α(pTDHBSR/pSNA) (기탁번호 KCTC 11255BP)에서 YbbO 유전자를 증폭 또는 결실시키고, 그 증폭 또는 결실이 레티노이드 생산에 미치는 영향을 확인하였다.

[0103] **(1) YbbO 유전자의 증폭된 대장균의 제조 및 레티노이드 생산**

[0104] 대장균 YbbO 유전자 (서열번호 24)를 pBBR1MCS2 플라스미드의 KpnI과 XhoI 제한효소 부위에 삽입하여 pBBR1MCS2(YbbO) 플라스미드를 제조하였다. 다음으로, pBBR1MCS2(YbbO) 플라스미드를 대장균 DH5α(pTDHBSR/pSNA)에 형질전환에 의하여 도입하여 대장균 DH5α(pTDHBSR/pSNA/pBBR1MCS2-YbbO)를 얻었다. 이 과정을 상세히 설명하면 다음과 같다.

표 2

[0105]

효소명	유전자	유전자 서열 (Genbank 허가번호)
야생형 대장균(Escherichia coli MG1655; taxid 511145) 유래의 예상 산화환원효소	*ybbO*	서열번호 24 (1786701)

표 3

[0106]

유전자	방향	프라이머 서열	제한효소
ybbO	F	서열번호 25	*KpnI*
ybbO	R	서열번호 26	*XhoI*

[0107] 게놈 DNA 제조, 제한효소 절단, 형질 전환 및 표준 분자 생물학 기술은 문헌에 기재된 대로 수행하였다 (Sambrook and Russell 2001). PCR은 그의 표준 프로토콜에 의해 *pfu* DNA 폴리머라제(Solgent Co., Korea)를 사용하여 수행하였다.

[0108] 표 2의 유전자 클로닝에 사용된 프라이머 서열과 제한효소는 표 3에 나타내었다. 표 2의 유전자는 해당 유전자를 포함하고 있는 균주의 염색체 DNA를 주형으로 PCR을 통해 증폭되었다. 증폭된 산물을 표 3에 열거된 제한 효소를 이용하여 벡터 pBBR1MCS2 (GenBank 허가번호 U02374)(서열번호 27)에 도입하여, 벡터 pBBR2-ybbO(서열번호 40)를 제조하였다. 그 후, pBBR2-ybbO 플라스미드를 대장균 DH5α(pTDHBSR/pSNA)에 형질전환에 의하여 도입하여 대장균 DH5α(pTDHBSR/pSNA/pBBR2-YbbO)를 얻었다.

[0109] 얻은 균주를 2% (w/v) 글리세롤 및 0.2% (w/v) 아라비노오스를 함유한 2YT 배지(리터 당 16g 트립톤, 10g 이스트 추출물, 및 5g NaCl) 5mL와 도데칸 5mL의 혼합 배지 중에서 72 시간 동안 배양하였다.

[0110] 배양은 길이 15 cm, 지름 25 mm의 시험관에 상기 혼합 배지를 넣고 각 균주를 접종한 후, 진탕 배양기 (shaking incubator)에 약 250 rpm으로 교반하면서 약 29℃에서 배양하였다. 대조군으로는 YbbO 유전자가 도입되지 않은 벡터가 도입된 DH5α(pTDHBSR/pSNA/pBBR1MCS2)를 사용하였다.

[0111] 도 4는 YbbO 유전자 도입이 레티노이드 생산에 미치는 영향을 나타낸 도면이다. 도 4에 나타낸 바와 같이, 대조군 균주(pBBR1MCS-2)에 비하여, YbbO 유전자 도입 균주(pBBR2-ybbO)에서 전체 레티노이드 중 레티놀과 레티닐 아세테이트의 비율이 증가하였다. 전체 레티노이드 생산량은 큰 차이가 없었다. 대조군에서 레티날: 레티놀: 레티닐 아세테이트는 70mg/L: 45 mg/L: 20 mg/L이었으나, YbbO 유전자 균주에서는 10mg/L: 75 mg/L: 45 mg/L이었다.

[0112] YbbO 유전자 도입 균주에 의한 레티노이드 생산시 레티닐 아세테이트 비율 증가는 레티놀 비율의 증가에 의해 야기된 것으로 여겨진다. 반면, YbbO 유전자 도입 균주에 의한 레티노이드 생산시 레티날은 소량 생산되었다.

[0113] **(2) YbbO 유전자의 결실된 대장균의 제조 및 레티노이드 생산**

[0114] 대장균 DH5α △ybbO 균주는 Datsenko와 Wanner의 방법(Datsenko KA and Wanner BL., 2000 Proc Natl Acad Sci

U.S.A., 97(12):6640-6645)에 따라서 다음과 같이 제조되었다.

[0115] ybbO 유전자를 상동성 재조합에 의하여 선발 마커 유전자인 카나마이신 유전자로 대체하기 위하여, pKD13 플라이스미드(Datsenko KA and Wanner BL., 2000 Proc Natl Acad Sci U.S.A., 97(12):6640-6645)의 카나마이신 유전자에 결합하면서 ybbO 유전자의 상류 말단과 하류 말단의 염기 서열을 갖는 PCR 프라이머를 제조하였다.

[0116] 정방향 프라이머는 ybbO 유전자의 상류 말단의 50bp 염기서열 다음에, 카나마이신 유전자 결합 염기 서열 20bp로 구성되어 있으며, 역방향 프라이머는 ybbO 유전자의 하류 말단의 50bp 염기서열 다음에, 카나마이신 유전자 결합 염기 서열 20bp로 구성되어 있다. 사용한 프라이머는 표 4에 표시하였다. 서열번호 28과 29의 올리고뉴클레오티드를 프라이머로 하고, pKD13을 주형으로 PCR 반응을 수행하였다.

[0117] 상기의 정제된 PCR 반응산물은 pKD46 (Datsenko KA and Wanner BL., 2000 Proc Natl Acad Sci U.S.A., 97(12):6640-6645)을 포함한 DH5α 콤페턴트 세포 (competent cell)로 형질전환하였다. 카나마이신 저항성을 가진 평판 배지의 콜로니를 콜로니 PCR을 통하여 카나마이신 유전자가 상동성 재조합에 의해서 ybbO 유전자를 대체했는지를 확인하였다. 콜로니 PCR에 사용된 프라이머는 대장균 DH5α염색체 상에서 ybbO 유전자 바로 인접한 영역에 결합하도록 제조하였다.

[0118] 그 결과, ybbO 유전자가 결실된 것을 콜로니 PCR 방법에 의하여 표 4의 서열번호 30과 서열번호 31의 프라이머를 이용해 확인하였다.

표 4

[0119]

명칭	서열번호
KO YbbO-F	28
KO YbbO-R	29
KO YbbOCF-F	30
KO YbbOCF-R	31

[0120] 얻은 균주를 2% (w/v) 글리세롤 및 0.2% (w/v) 아라비노오스를 함유한 2YT 배지(리터 당 16g 트립톤, 10g 이스트 추출물, 및 5g NaCl) 5mL와 도데칸 5mL의 혼합 배지 중에서 60 시간 동안 배양하였다. 배양은 길이 15 cm, 지름 25 mm의 시험관에 상기 혼합 배지를 넣고 각 균주를 접종한 후, 진탕 배양기 (shaking incubator)에 약 250 rpm으로 교반하면서 약 29℃에서 배양하였다. 대조군으로는 YbbO 유전자가 결실되지 않은 DH5α (pTDHBSR/pSNA)를 사용하였다.

[0121] 도 5는 YbbO 유전자 결실이 레티노이드 생산에 미치는 영향을 나타낸 도면이다. 도 5에 나타낸 바와 같이, 대조군 균주(DH5α)에 비하여, YbbO 유전자 결실 균주(DH5α△ybbO)에서 전체 레티노이드 생산량이 높았다.

[0122] 또한, 전체 레티노이드 중 레티날이 레티놀보다 더 많이 생산되었다. 즉, 60시간 대조군에서, 레티날: 레티놀: 레티닐 아세테이트는 43mg/L: 22 mg/L: 9.7 mg/L이었으나, YbbO 유전자 결실 균주에서, 65mg/L: 25 mg/L: 9.5 mg/L이었다. 따라서, 얻어진 균주를 사용하여 레티날 비율이 높은 레티노이드를 생산할 수 있다.

[0123] 또한, 실시예 1에서 확인된 바와 같이, EutE, PuuC, 또는 그 조합을 결실시킴으로써, 레티날 비율이 높은 레티노이드를 생산할 수 있다.

[0124] **실시예 3: 도데칸 존재하 대장균 배양과 레티노이드 생산**

[0125] 도데칸 함유 배지 중에서 대장균(pT-DHBSR/pS-NA)를 배양하여, 도데칸이 레티노이드 생산 및 세포 성장에 미치는 영향을 확인하였다.

[0126] 2% (w/v) 글리세롤 및 0.2% (w/v) 아라비노오스를 함유한 2YT 배지(리터 당 16g 트립톤, 10g 이스트 추출물, 및 5g NaCl) 5mL와 도데칸 (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6mL)의 혼합 배지 중에서 72 시간 동안 배양하였다. 배양은 길이 15 cm, 지름 25 mm의 시험관에 상기 혼합 배지를 넣고 각 균주를 접종한 후, 진탕 배양기 (shaking incubator)에 약 250 rpm으로 교반하면서 약 29℃에서 배양하였다.

[0127] 도 6은 도데칸 함유 배지에서 대장균(pT-DHBSR/pS-NA)의 레티노이드 생산 및 세포 성장을 나타낸 도면이다. 레티노이드 생산에서 레티날, 레티놀 및 레티닐 아세테이트를 각각 밝은 회색, 어두운 회색 및 검은색으로 나타내었다. 세포 배양시에 오버레이한 도데칸 부피 0 mL, 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL, 5 mL 및 6 mL를 각각 ■, ●,

▲, □, ○, △ 및 ☆로 나타내었다.

[0128] 도 7은 배양 시간 및 도데칸 부피에 따른 레티노이드의 분포가 총 레티노이드에 대한 각 구성성분의 백분율로 나타낸 도면이다. 레티날, 레티놀 및 레티닐 아세테이트를 각각 밝은 회색, 어두운 회색 및 검은색으로 나타내었다.

[0129] 도면의 레티노이드 함량은 배양액중의 도데칸층만을 원심분리로 분리, 회수하여 HPLC를 통해 측정된 값이다.

[0130] 측정 결과, 레티노이드는 세포 또는 세포 파쇄물 중에는 존재하지 않거나 무시할 수 있는 정도로만 존재하였으며, 세포가 제거된 배양액 즉, 도데칸 층에 존재하였다.

[0131] 도 6 및 도 7에 나타낸 바와 같이, 도데칸이 첨가되지 않은 것에 비하여, 도데칸 첨가에 의하여 레티노이드 생산이 증가하였다.

[0132] 도 6에 나타낸 바와 같이, 레티노이드 생산은 도데칸 부피에 비례하였다. 5 mL 도데칸을 갖는 배양의 72 시간에서 136 mg/L의 가장 높은 레티노이드 생산을 얻었고 이는 1 mL 도데칸으로 할 경우(65 mg/L)보다 약 2 배 높은 수치이다. 5 mL 도데칸으로 72 시간 이상 연장된 배양을 시켰을 때 추가적인 레티노이드 생산의 증가는 없었고 그의 최고치를 분해 없이 유지하였다(데이터는 나타내지 않음). 0, 24, 및 48 시간에서 2 mL의 도데칸을 배양에 추가하는 것에 의해 도데칸 첨가 부피를 6 mL까지 증가시켰다. 6 mL 도데칸 첨가 배양에서 5 mL 도데칸을 갖는 배양에 비교하였을 때 전체 레티노이드 생산의 증가는 없었다. 6 mL 도데칸을 초기에 첨가 배양에서도 레티노이드 생산의 증가는 없었다(데이터는 나타내지 않음). 도데칸을 갖는 모든 배양액에서의 세포 성장은 도데칸이 없을 때보다 약간 높았다(도 6).

[0133] 도 7은 도데칸 첨가 부피에 따라 얻은 레티노이드들의 분포를 나타낸 도면이다. 도데칸 첨가가 있는 경우와 없는 경우 얻은 레티날 및 레티놀 비율에서 현저한 레티노이드 분포 차이가 나타난다. 48 시간에서 레티노이드 중 레티날의 비율은 도데칸 첨가 배양에서 약 51% (w/w)이고 도데칸 첨가가 없는 배양에서 23%인 반면, 레티놀 비율은 도데칸 첨가 배양에서 30% 내지 39%이고 도데칸 첨가 없는 배양에서 59%이다. 따라서, 도데칸 첨가는 레티날의 비율을 높이지만 레티놀의 비율을 감소시킨다. 세포에서 레티날로부터의 레티놀 형성의 반응 순서를 고려하였을 때, 레티날은 도데칸에 의해 그의 레티놀로의 전환 전에 세포로부터 추출되는 것으로 생각된다. 48 시간에서의 레티닐 아세테이트 비율은 도데칸 첨가 있는 배양 및 없는 배양 모두에서 20% 미만이고, 이는 레티날 및 레티놀에 비해 상대적으로 낮은 수치이다. 도데칸 첨가 배양에서 레티닐 아세테이트 비율은 배양 시간이 길어짐에 따라 감소하는데 이는 레티닐 아세테이트 형성을 위한 세포 활동이 배양 동안 감소함을 나타낸다. 결론적으로, 도데칸 첨가는 세포 성장의 정체 상태에서 레티노이드 생산의 감소를 방지하고 레티노이드 생산을 증가시켰다.

[0134] 본 발명의 레티노이드의 인-시추 추출에는 세포벽 분해를 위한 리소자임이 필요하지 않다. 레티노이드(C20, 이소프레노이드 분자)는 세포벽의 손실 없이 세포로부터 효과적으로 방출될 수 있다. 레티노이드 생산의 2-상 배양에서, β-카로틴은 레티노이드의 직접적인 전구체이기 때문에 세포 내에 계속 유지되어야 한다. β-카로틴이 도데칸 상에서 추출되는 경우, 이는 시토졸에 위치한 BCD(M)O에 의해 절단될 수 있다.

[0135] β-카로틴은 분자 크기 때문에 세포로부터 방출될 수 없어 도데칸에 의해 추출되지 않으므로, β-카로틴의 2-상 배양에서 세포 내에서 계속 유지될 수 있다.

[0136] **실시예 4: 친유성 물질을 포함하는 배지에서 레티노이드의 생산**

[0137] 본 실시예에서는 다양한 친유성 물질 함유 배지 중에서 대장균(pT-DHBSR/pS-NA)을 배양하여, 친유성 물질이 레티노이드 생산 및 세포 생장에 미치는 영향을 확인하였다.

[0138] **(1) 알칸을 포함하는 배지에서 레티노이드의 생산**

[0139] 위 대장균(pT-DHBSR/pS-NA)을 2% (w/v) 글리세롤 및 0.2% (w/v) 아라비노오스를 함유한 2YT 배지(리터 당 16g 트립톤, 10g 이스트 추출물, 및 5g NaCl) 5mL와 옥탄, 데칸, 도데칸 또는 테르라데칸 5mL의 혼합 배지 중에서 72 시간 동안 배양하였다. 배양은 길이 15 cm, 지름 25 mm의 시험관에 상기 혼합 배지를 넣고 각 균주를 접종한 후, 진탕 배양기 (shaking incubator)에 약 250 rpm으로 교반하면서 약 29℃에서 배양하였다.

[0140] 도 8은 알칸 존재하에서 레티노이드 생산 결과를 나타낸 도면이다. 도 9는 알칸 존재하에서 레티노이드 생산 균주의 생장 결과를 나타낸 도면이다.

[0141] 도 8에 나타낸 바와 같이, 데칸을 사용한 경우에 총 108 mg/L의 레티노이드가 생산되었다. 그 외 균체 증식, pH 및 균체 내 β-카로틴의 양은 알칸에 따라 큰 차이를 보이지 않았다. 그 결과 도데칸에 비해 데칸이 레티노이드 생산에 더 유리한 것으로 여겨진다. 옥탄을 사용한 경우, 레티날 및 레티놀의 생산은 다른 알칸과 유사하였으나, 레티닐 아세테이트는 거의 생산하지 않았다. 테트라데칸은 전체 레티노이드 생산량이 다른 알칸에 비하여 낮았다.

[0142] **(2) 미네랄 오일을 포함 배지에서 레티노이드의 생산**

[0143] **(2.1) 경량 미네랄 오일**

[0144] 경량 미네랄 오일은 알칸에 비하여 가격이 싸다는 장점이 있다. 2% (w/v) 글리세롤 및 0.2% (w/v) 아라비노오스를 함유한 2YT 배지(리터 당 16g 트립톤, 10g 이스트 추출물, 및 5g NaCl) 5ml와 다른 부피의 경량 미네랑 오일(Sigma, Catalog No.M8410)의 혼합 배지 중에서 72 시간 동안 배양하였다.

[0145] 배양은 길이 15 cm, 지름 25 mm의 시험관에 상기 혼합 배지를 넣고 각 균주를 접종한 후, 진탕 배양기 (shaking incubator)에 약 250 rpm으로 교반하면서 약 29℃에서 배양하였다.

[0146] 도 10은 경량 미네랄 오일 존재하에서 레티노이드 생산 결과를 나타낸 도면이다. 도 11은 경량 미네랄 오일 존재하에서 균주의 생장 결과를 나타낸 도면이다.

[0147] 도 10에 나타낸 바와 같이, 도데칸 5ml에서 136.1mg/L이 생산될 때, 2ml 경량 미네랄 오일에서 158mg/L이 생산되었다. 도 11에 나타낸 바와 같이, pH는 도데칸 이외의 경우 큰 차이를 보이지 않았다. 반면, 균체 성장은 경량 미네랄 오일의 양이 증가할수록 감소하였다. 이는 경량 미네랄 오일의 높은 점도와 비중으로 인하여 배지와 미네랄 오일이 충분히 혼합되지 않았기 때문인 것으로 예상된다. 균체 성장의 감소로 인해 레티노이드 생산도 감소하였다.

[0148] 도 12는 균체당 레티노이드 생산량 (cell specific retinoids productivity)을 나타낸 도면이다. 도 12에 나타낸 바와 같이, 미네랄 오일의 양에 상관없이 약 5mg/L/OD_{600nm}의 비생산성을 보였다.

[0149] **(2.2) 중량 미네랄 오일**

[0150] 중량 미네랄 오일은 경량 미네랄 오일에 비하여 싸다. 2% (w/v) 글리세롤 및 0.2% (w/v) 아라비노오스를 함유한 2YT 배지(리터 당 16g 트립톤, 10g 이스트 추출물, 및 5g NaCl) 5ml와 중량 미네랄 오일(Daejung, Catalog No.5658-4400) 2ml의 혼합 배지 중에서 96 시간 동안 배양하였다. 배양은 길이 15 cm, 지름 25 mm의 시험관에 상기 혼합 배지를 넣고 각 균주를 접종한 후, 진탕 배양기 (shaking incubator)에 약 250 rpm으로 교반하면서 약 29℃에서 배양하였다.

[0151] 도 13은 중량 미네랄 오일 존재하에서 레티노이드 생산 결과를 나타낸 도면이다. 도 14는 중량 미네랄 오일 존재하에서 균주의 생장 결과를 나타낸 도면이다. 도 13 및 도 14에 나타낸 바와 같이, 경량 미네랄 오일, 및 도데칸에 비하여 중량 미네랄 오일의 경우 세포 성장이 적었다. 또한, 레티노이드 96.5mg/L을 생산하였다. 이는 중량 미네랄 오일의 점도에 의하여 배지와 미네랄 오일이 잘 혼합되지 않았기 때문인 것으로 예측된다.

[0152] 사용된 시험관 (test tube)를 기울여서 배양기에 배치시키는 것을 제외하고는 위와 동일하게 세포를 배양하였다. 시험관을 기울임으로써 교반의 효과가 더 증대되어 배지와 미네랄 오일이 더 잘 혼합될 수 있었다.

[0153] 도 15는 시험관을 기울여 배양한 경우 레티노이드 생산 결과를 나타낸 도면이다. 도 16은 시험관을 기울여 배양한 경우 균주 생장 결과를 나타낸 도면이다. 도 15 및 도 16에 나타낸 바와 같이, 기울여 배양한 경우 세포 성장 및 레티노이드 생산이 증가하였다. 구체적으로, 시험관을 수직으로 한 경우, 96시간에서 88.2mg/L의 레티노이드가 생산되었으나, 시험관을 기울인 경우, 173.9mg/L이 생산되었다.

[0154] 이는 경량 및 중량 미네랄 오일은 높은 점도로 인하여 배지와의 혼합이 레티노이드 생산에 중요한 인자라는 것을 나타낸다. 따라서, 배양 중 적절한 교반을 제공함으로써 레티노이드에 사용될 수 있다.

[0155] **(3) 피부 친화적 친유성 물질을 포함 배지에서 레티노이드의 생산**

[0156] 피부 친화적 친유성 물질을 포함하는 배지에서 레티노이드를 생산하였다. 피부 친화적 친유성 물질은 이소프로필 미리스테이트 (IPM), 디옥타노일-데카노일 글리세롤(ODO), 세틸 에틸헥사노에이트 (CEH) 및 피토스쿠알란을 사용하였다.

[0157] DH5α에 pT-DHBSR/pSNA가 형질전환된 균주 DH5α(pT-DHBSR/pSNA)를 사용하고, 5ml 배지에 2ml의 중량 미네랄 오일을 각각 첨가하고, 2% (w/v) 글리세롤 및 0.2% (w/v) 아라비노오스를 함유한 2YT 배지(리터 당 16g 트립톤, 10g 이스트 추출물, 및 5g NaCl) 5ml와 이소프로필 미리스테이트 (IPM, Sigma, Catalog No.172472), 디옥타노일-데카노일 글리세롤(ODO), 세틸 에틸헥사노에이트 (CEH), 또는 피토스쿠알란((PHYTOSQUALAN®, Sophim; 분자식 $C_{30}H_{62}$; hydrogenated form of squalane; extracted from Olive) 2mL 또는 5mL의 혼합 배지 중에서 72 시간 동안 배양하였다.

[0158] 배양은 길이 15 cm, 지름 25 mm의 시험관에 상기 혼합 배지를 넣고 각 균주를 접종한 후, 진탕 배양기 (shaking incubator)에 약 250 rpm으로 교반하면서 약 29℃에서 배양하였다.

[0159] 도 17은 피부 친화적 친유성 물질 존재하에서 세포 성장 및 pH를 나타낸 도면이다. 도 18 및 도 19는 피부 친화적 친유성 물질의 양에 따른 레티노이드 생산결과를 나타낸 도면이다.

[0160] 도 18 및 도 19에 나타낸 바와 같이, 도데칸을 제외한 친유성 물질에서 5mL에 비하여 2mL에서 레티노이드 생산량이 많았다. 즉, 경량 미네랄 오일, IPM, ODO, CEH, 및 피토스쿠알란의 배지 5mL에 대하여 약 2mL을 사용한 경우, 레티노이드 생산량이 많았다. IPM, ODO, CEH 및 피토스쿠알란 중 IPM에서 가장 많은 레티노이드가 생산되었다. 특히, IPM 2mL를 첨가한 경우, 180mg/L의 레티노이드가 생산되었다. IPM의 경우, 균체 성장이 비슷한 것을 고려하면, 균체당 비생산성이 높은 것으로 예측된다.

수탁번호

[0161]

기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC11254BP

수탁일자 : 20080107

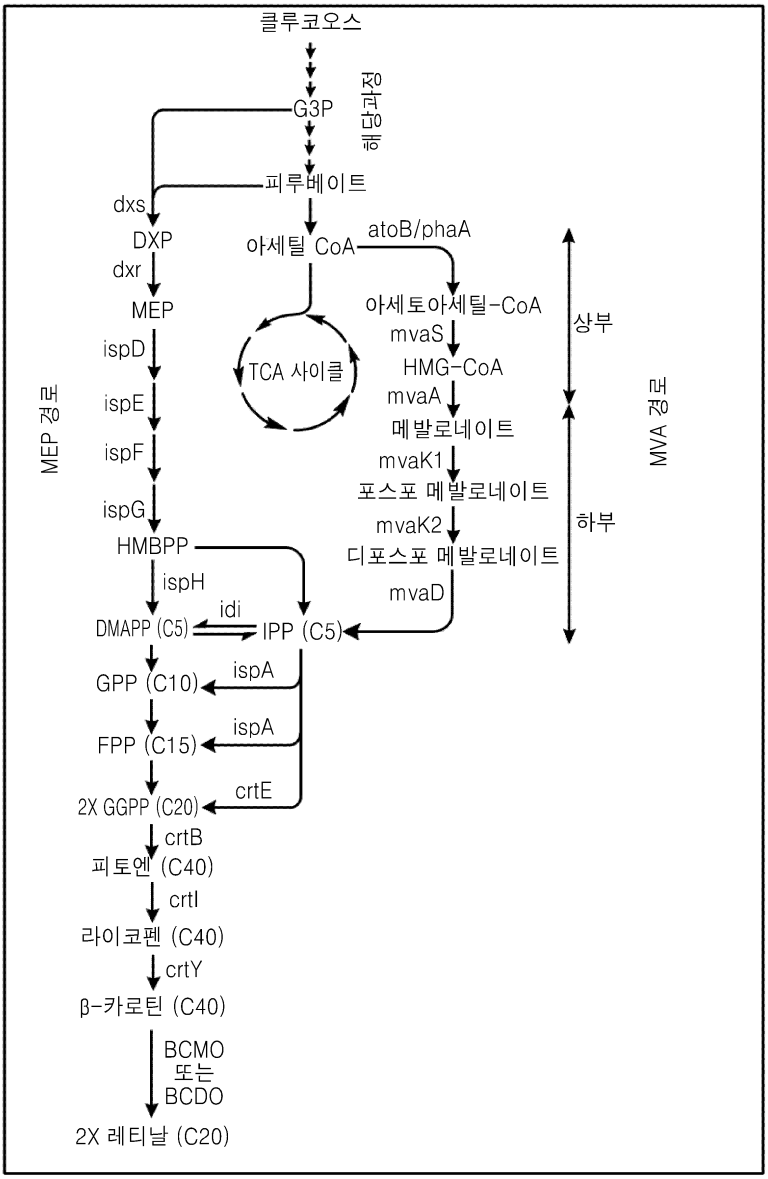
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC11255BP

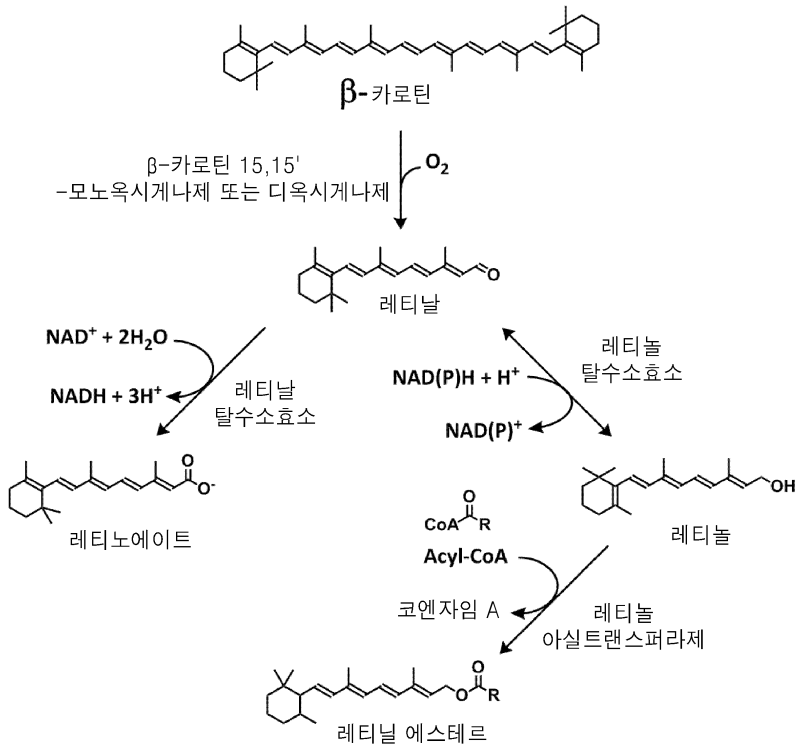
수탁일자 : 20080107

도면

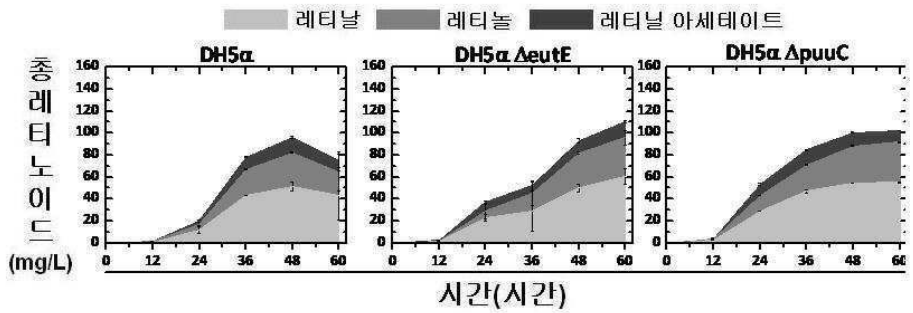
도면1


클루코오스
해당과정
G3P
피루베이트
dxs
DXP
dxr
MEP
ispD
ispE
ispF
ispG
HMBPP
ispH
idi
DMAPP (C5)
IPP (C5)
GPP (C10)
ispA
FPP (C15)
ispA
2X GGPP (C20)
crtE
crtB
피토엔 (C40)
crtI
라이코펜 (C40)
crtY
β-카로틴 (C40)
BCMO
또는
BCDO
2X 레티날 (C20)
MEP 경로
TCA 사이클
아세틸 CoA
atoB/phaA
아세토아세틸-CoA
mvaS
HMG-CoA
mvaA
메발로네이트
mvaK1
포스포 메발로네이트
mvaK2
디포스포 메발로네이트
mvaD
상부
하부
MVA 경로

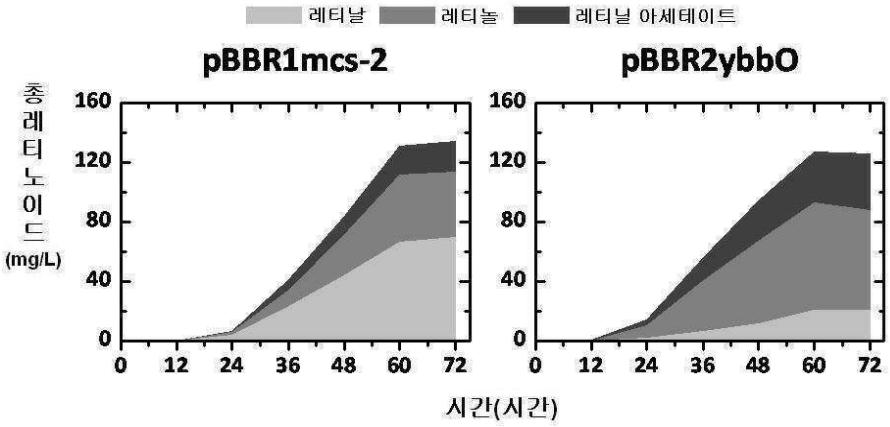
도면2


β-카로틴
β-카로틴 15,15'
-모노옥시게나제 또는 디옥시게나제
O_2
레티날
$NAD^+ + 2H_2O$
$NADH + 3H^+$
레티날
탈수소효소
$NAD(P)H + H^+$
$NAD(P)^+$
레티놀
탈수소효소
레티노에이트
레티놀
CoA R
Acyl-CoA
코엔자임 A
레티놀
아실트랜스퍼라제
레티닐 에스테르

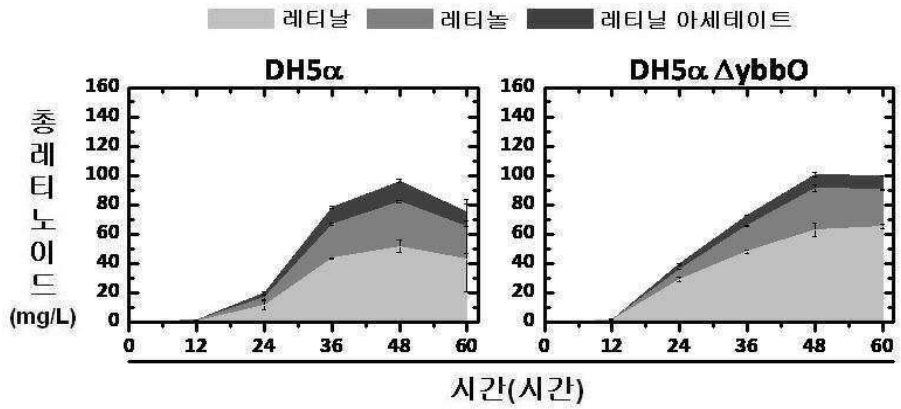
도면3


레티날
레티놀
레티닐 아세테이트
DH5α
DH5α ΔeutE
DH5α ΔpuuC
총 레티노이드 (mg/L)
시간(시간)

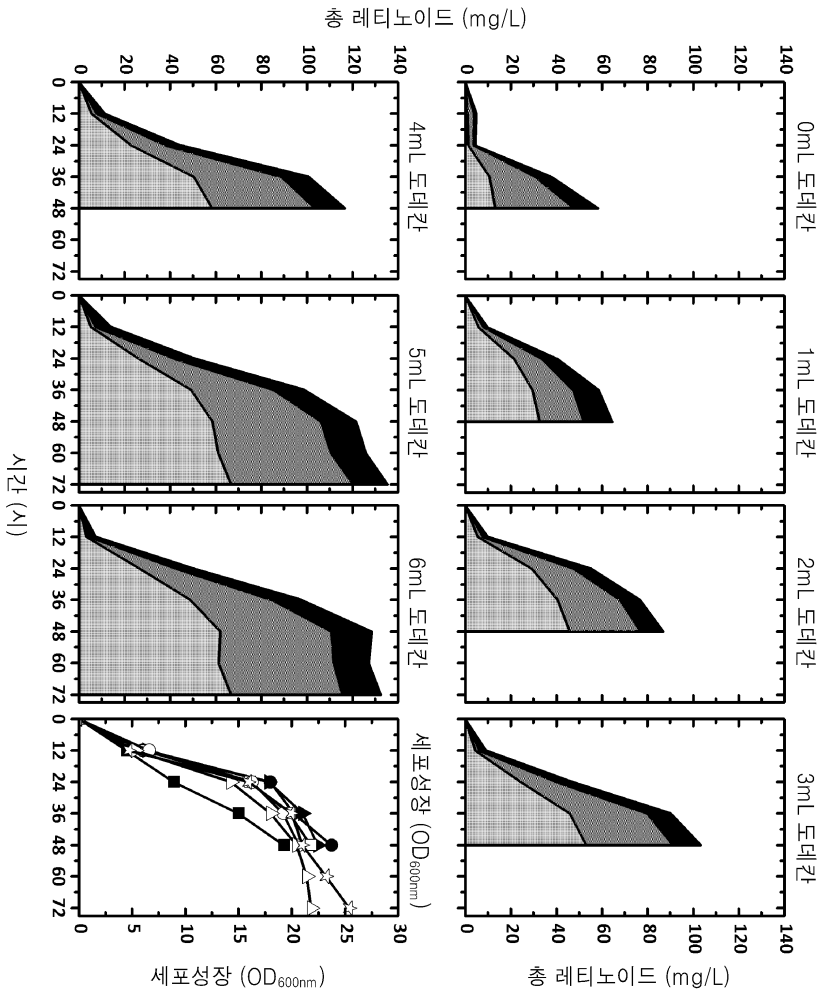
도면4


레티날
레티놀
레티닐 아세테이트
pBBR1mcs-2
pBBR2ybbO
총 레티노이드 (mg/L)
시간(시간)

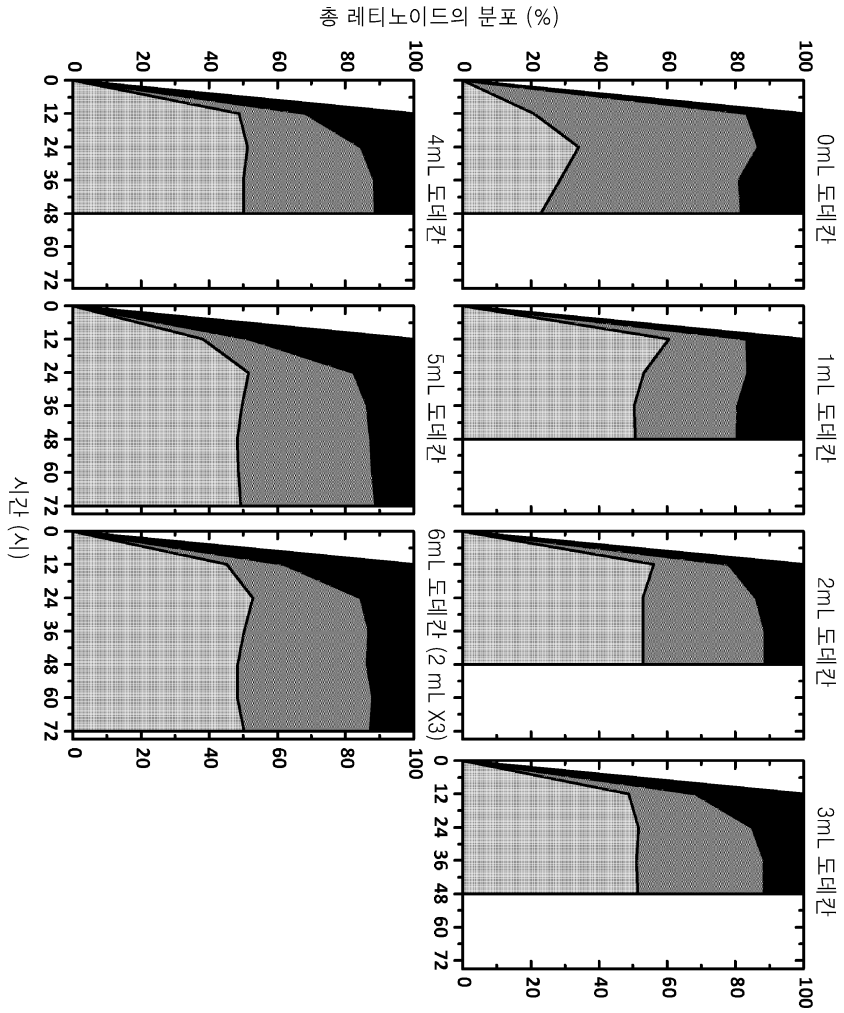
도면5


레티날
레티놀
레티닐 아세테이트
DH5α
DH5α ΔybbO
총 레티노이드 (mg/L)
시간(시간)

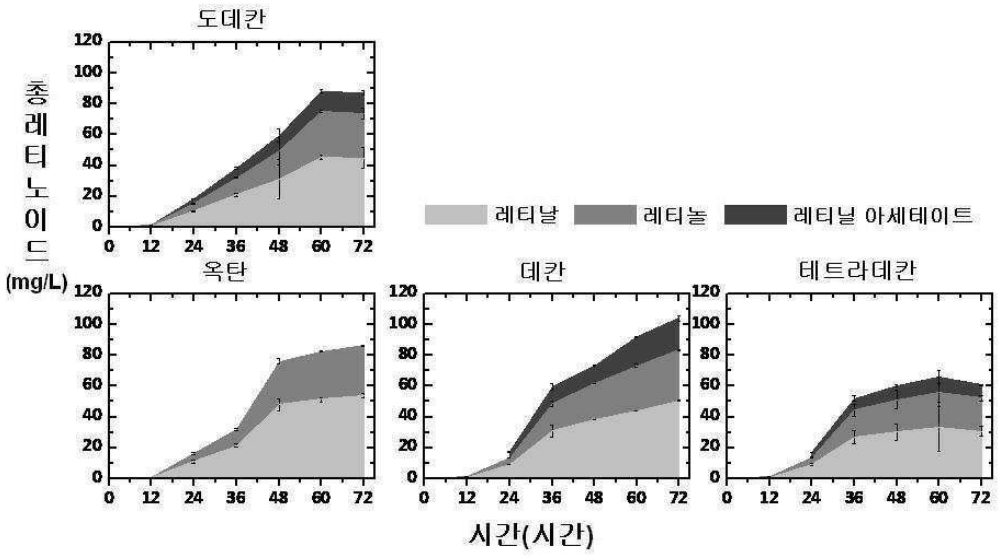
도면6


총 레티노이드 (mg/L)
0mL 도데칸
1mL 도데칸
2mL 도데칸
3mL 도데칸
4mL 도데칸
5mL 도데칸
6mL 도데칸
세포성장 (OD600nm)
시간 (시)

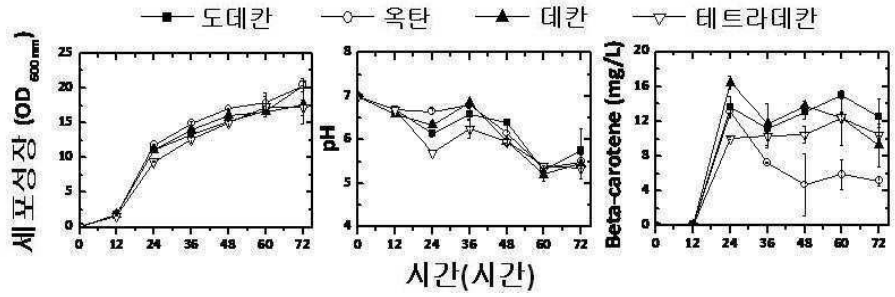
도면7


총 레티노이드의 분포 (%)
0mL 도데칸
1mL 도데칸
2mL 도데칸
3mL 도데칸
4mL 도데칸
5mL 도데칸
6mL 도데칸 (2 mL X3)
시간 (시)

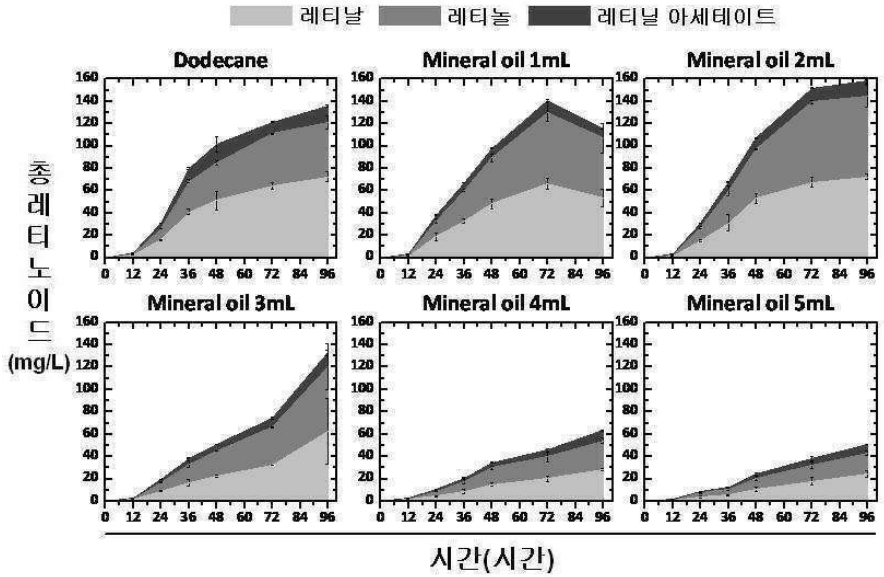
도면8


도데칸
옥탄
데칸
테트라데칸
총 레티노이드 (mg/L)
레티날
레티놀
레티닐 아세테이트
시간(시간)

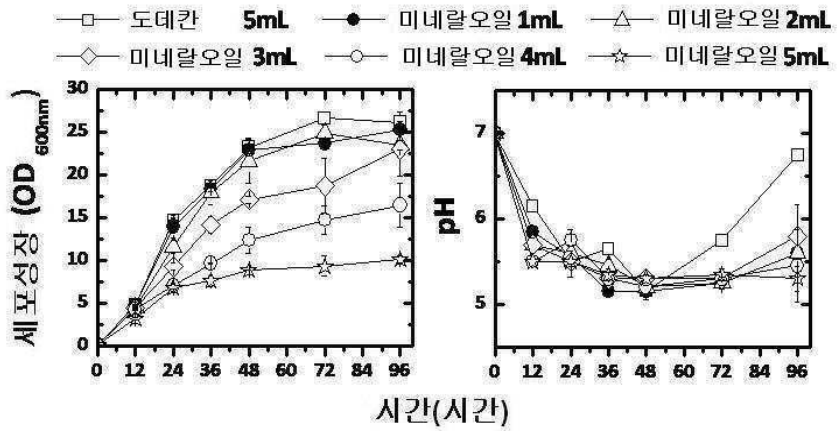
도면9



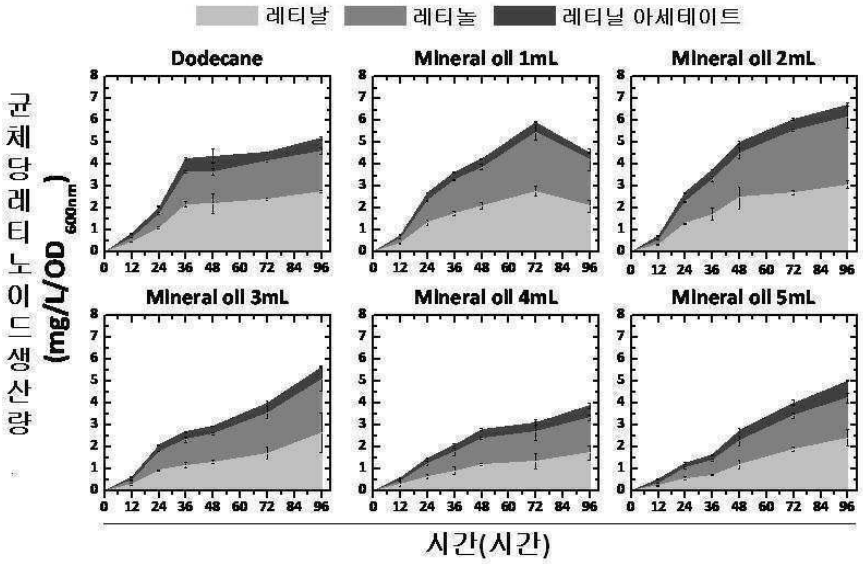
도면10



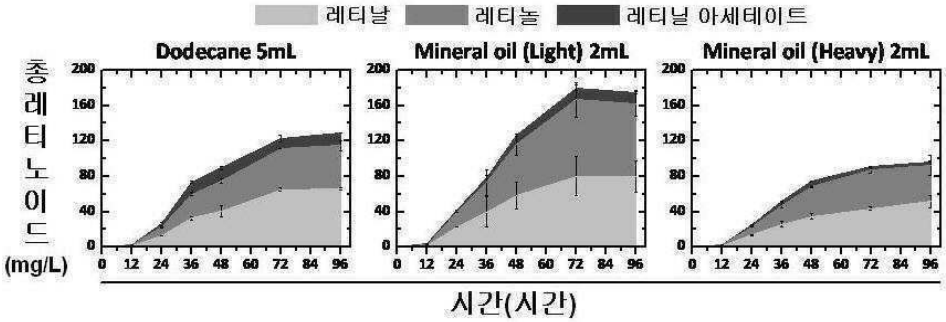
도면11



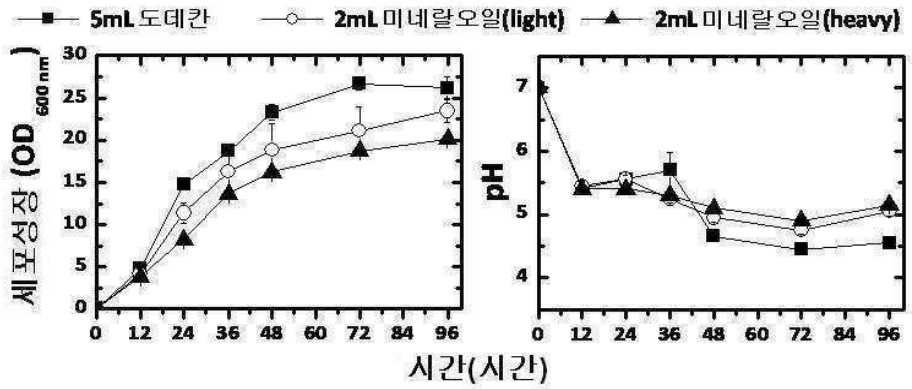
도면12



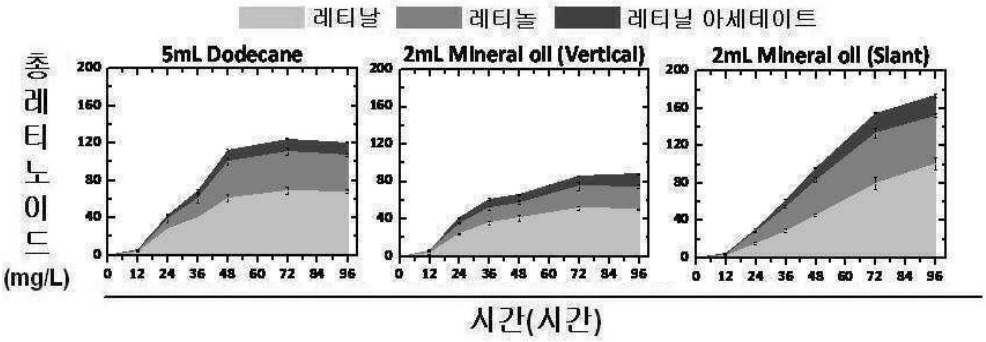
도면13



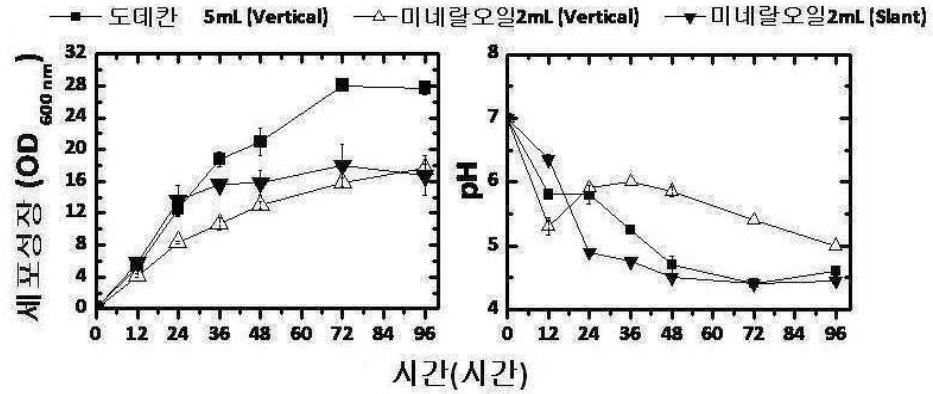
도면14



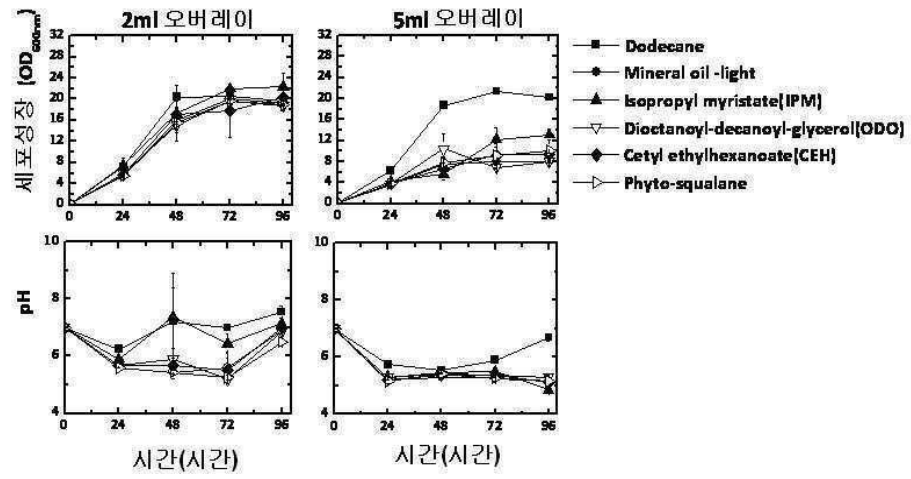
도면15



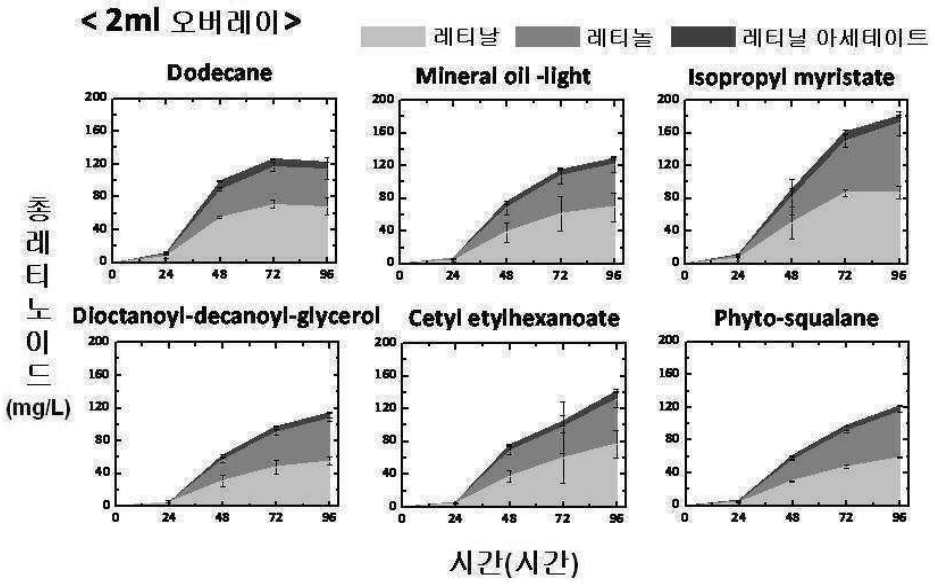
도면16



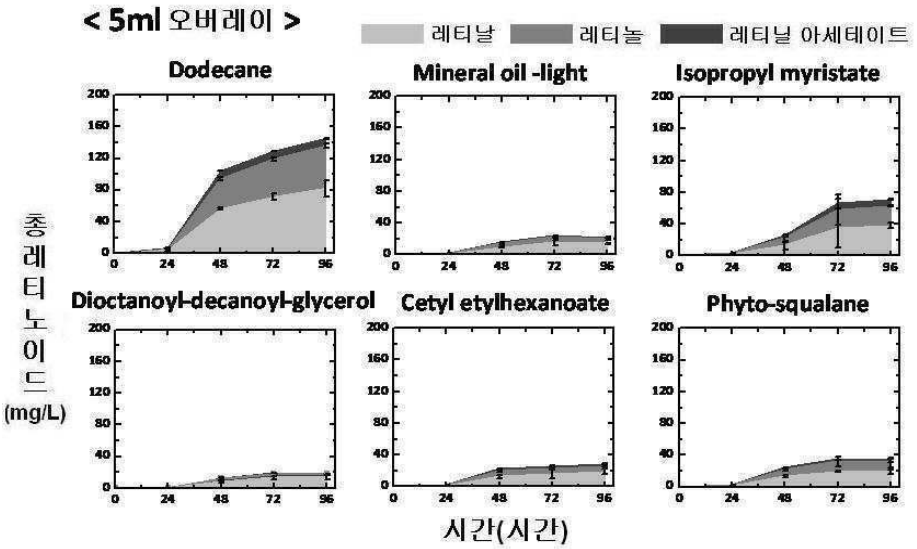
도면17



도면18



도면19



서 열 목 록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY

<120> A method of producing retinoids using a microorganism of Escherichia genus having enhanced retinoids productivity

<130> PN093621

<160> 40

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 803

<212> PRT

<213> Enterococcus faecalis

<400> 1

Met Lys Thr Val Val Ile Ile Asp Ala Leu Arg Thr Pro Ile Gly Lys
1 5 10 15

Tyr Lys Gly Ser Leu Ser Gln Val Ser Ala Val Asp Leu Gly Thr His
20 25 30

Val Thr Thr Gln Leu Leu Lys Arg His Ser Thr Ile Ser Glu Glu Ile
35 40 45

Asp Gln Val Ile Phe Gly Asn Val Leu Gln Ala Gly Asn Gly Gln Asn
50 55 60

Pro Ala Arg Gln Ile Ala Ile Asn Ser Gly Leu Ser His Glu Ile Pro
65 70 75 80

Ala Met Thr Val Asn Glu Val Cys Gly Ser Gly Met Lys Ala Val Ile
85 90 95

Leu Ala Lys Gln Leu Ile Gln Leu Gly Glu Ala Glu Val Leu Ile Ala
100 105 110

Gly Gly Ile Glu Asn Met Ser Gln Ala Pro Lys Leu Gln Arg Phe Asn
115 120 125

Tyr Glu Thr Glu Ser Tyr Asp Ala Pro Phe Ser Ser Met Met Tyr Asp
130 135 140

Gly Leu Thr Asp Ala Phe Ser Gly Gln Ala Met Gly Leu Thr Ala Glu
145 150 155 160

Asn Val Ala Glu Lys Tyr His Val Thr Arg Glu Glu Gln Asp Gln Phe
165 170 175

Ser Val His Ser Gln Leu Lys Ala Ala Gln Ala Gln Ala Glu Gly Ile
180 185 190

Phe Ala Asp Glu Ile Ala Pro Leu Glu Val Ser Gly Thr Leu Val Glu
195 200 205

Lys Asp Glu Gly Ile Arg Pro Asn Ser Ser Val Glu Lys Leu Gly Thr
210 215 220

Leu Lys Thr Val Phe Lys Glu Asp Gly Thr Val Thr Ala Gly Asn Ala

225 230 235 240

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

305 310 315 320
Gln Arg Glu Leu Ala Leu Pro Glu Glu Lys Val Asn Ile Tyr Gly Gly
325 330 335
Gly Ile Ser Leu Gly His Ala Ile Gly Ala Thr Gly Ala Arg Leu Leu
340 345 350
Thr Ser Leu Ser Tyr Gln Leu Asn Gln Lys Glu Lys Lys Tyr Gly Val
355 360 365
Ala Ser Leu Cys Ile Gly Gly Gly Leu Gly Leu Ala Met Leu Leu Glu
370 375 380

Arg Pro Gln Gln Lys Lys Asn Ser Arg Phe Tyr Gln Met Ser Pro Glu
385 390 395 400
Glu Arg Leu Ala Ser Leu Leu Asn Glu Gly Gln Ile Ser Ala Asp Thr
405 410 415
Lys Lys Glu Phe Glu Asn Thr Ala Leu Ser Ser Gln Ile Ala Asn His
420 425 430
Met Ile Glu Asn Gln Ile Ser Glu Thr Glu Val Pro Met Gly Val Gly
435 440 445
Leu His Leu Thr Val Asp Glu Thr Asp Tyr Leu Val Pro Met Ala Thr

450 455 460
Glu Glu Pro Ser Val Ile Ala Ala Leu Ser Asn Gly Ala Lys Ile Ala
465 470 475 480

Gln Gly Phe Lys Thr Val Asn Gln Gln Arg Leu Met Arg Gly Gln Ile
485 490 495
Val Phe Tyr Asp Val Ala Asp Ala Glu Ser Leu Ile Asp Glu Leu Gln
500 505 510
Val Arg Glu Thr Glu Ile Phe Gln Gln Ala Glu Leu Ser Tyr Pro Ser
515 520 525

Ile Val Lys Arg Gly Gly Gly Leu Arg Asp Leu Gln Tyr Arg Ala Phe
530 535 540
Asp Glu Ser Phe Val Ser Val Asp Phe Leu Val Asp Val Lys Asp Ala
545 550 555 560
Met Gly Ala Asn Ile Val Asn Ala Met Leu Glu Gly Val Ala Glu Leu
565 570 575
Phe Arg Glu Trp Phe Ala Glu Gln Lys Ile Leu Phe Ser Ile Leu Ser
580 585 590
Asn Tyr Ala Thr Glu Ser Val Val Thr Met Lys Thr Ala Ile Pro Val
595 600 605
Ser Arg Leu Ser Lys Gly Ser Asn Gly Arg Glu Ile Ala Glu Lys Ile
610 615 620
Val Leu Ala Ser Arg Tyr Ala Ser Leu Asp Pro Tyr Arg Ala Val Thr
625 630 635 640
His Asn Lys Gly Ile Met Asn Gly Ile Glu Ala Val Val Leu Ala Thr
645 650 655
Gly Asn Asp Thr Arg Ala Val Ser Ala Ser Cys His Ala Phe Ala Val
660 665 670

Lys Glu Gly Arg Tyr Gln Gly Leu Thr Ser Trp Thr Leu Asp Gly Glu
675 680 685
Gln Leu Ile Gly Glu Ile Ser Val Pro Leu Ala Leu Ala Thr Val Gly
690 695 700
Gly Ala Thr Lys Val Leu Pro Lys Ser Gln Ala Ala Ala Asp Leu Leu
705 710 715 720
Ala Val Thr Asp Ala Lys Glu Leu Ser Arg Val Val Ala Ala Val Gly
725 730 735

Leu Ala Gln Asn Leu Ala Ala Leu Arg Ala Leu Val Ser Glu Gly Ile

740 745 750

Gln Lys Gly His Met Ala Leu Gln Ala Arg Ser Leu Ala Met Thr Val

755 760 765

Gly Ala Thr Gly Lys Glu Val Glu Ala Val Ala Gln Gln Leu Lys Arg

770 775 780

Gln Lys Thr Met Asn Gln Asp Arg Ala Leu Ala Ile Leu Asn Asp Leu

785 790 795 800

Arg Lys Gln

<210> 2

<211> 383

<212> PRT

<213> Enterococcus faecalis

<400> 2

Met Thr Ile Gly Ile Asp Lys Ile Ser Phe Phe Val Pro Pro Tyr Tyr

1 5 10 15

Ile Asp Met Thr Ala Leu Ala Glu Ala Arg Asn Val Asp Pro Gly Lys

20 25 30

Phe His Ile Gly Ile Gly Gln Asp Gln Met Ala Val Asn Pro Ile Ser

35 40 45

Gln Asp Ile Val Thr Phe Ala Ala Asn Ala Ala Glu Ala Ile Leu Thr

50 55 60

Lys Glu Asp Lys Glu Ala Ile Asp Met Val Ile Val Gly Thr Glu Ser

65 70 75 80

Ser Ile Asp Glu Ser Lys Ala Ala Ala Val Val Leu His Arg Leu Met

85 90 95

Gly Ile Gln Pro Phe Ala Arg Ser Phe Glu Ile Lys Glu Ala Cys Tyr

100 105 110

Gly Ala Thr Ala Gly Leu Gln Leu Ala Lys Asn His Val Ala Leu His

115 120 125

Pro Asp Lys Lys Val Leu Val Val Ala Ala Asp Ile Ala Lys Tyr Gly

130 135 140

Leu Asn Ser Gly Gly Glu Pro Thr Gln Gly Ala Gly Ala Val Ala Met
145 150 155 160
Leu Val Ala Ser Glu Pro Arg Ile Leu Ala Leu Lys Glu Asp Asn Val
165 170 175
Met Leu Thr Gln Asp Ile Tyr Asp Phe Trp Arg Pro Thr Gly His Pro
180 185 190
Tyr Pro Met Val Asp Gly Pro Leu Ser Asn Glu Thr Tyr Ile Gln Ser
195 200 205
Phe Ala Gln Val Trp Asp Glu His Lys Lys Arg Thr Gly Leu Asp Phe

210 215 220
Ala Asp Tyr Asp Ala Leu Ala Phe His Ile Pro Tyr Thr Lys Met Gly
225 230 235 240
Lys Lys Ala Leu Leu Ala Lys Ile Ser Asp Gln Thr Glu Ala Glu Gln
245 250 255
Glu Arg Ile Leu Ala Arg Tyr Glu Glu Ser Ile Ile Tyr Ser Arg Arg
260 265 270
Val Gly Asn Leu Tyr Thr Gly Ser Leu Tyr Leu Gly Leu Ile Ser Leu
275 280 285

Leu Glu Asn Ala Thr Thr Leu Thr Ala Gly Asn Gln Ile Gly Leu Phe
290 295 300
Ser Tyr Gly Ser Gly Ala Val Ala Glu Phe Phe Thr Gly Glu Leu Val
305 310 315 320
Ala Gly Tyr Gln Asn His Leu Gln Lys Glu Thr His Leu Ala Leu Leu
325 330 335
Asp Asn Arg Thr Glu Leu Ser Ile Ala Glu Tyr Glu Ala Met Phe Ala
340 345 350
Glu Thr Leu Asp Thr Asp Ile Asp Gln Thr Leu Glu Asp Glu Leu Lys

355 360 365
Tyr Ser Ile Ser Ala Ile Asn Asn Thr Val Arg Ser Tyr Arg Asn
370 375 380

<210> 3

<211> 292

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 3

Met Thr Lys Lys Val Gly Val Gly Gln Ala His Ser Lys Ile Ile Leu
1 5 10 15

Ile Gly Glu His Ala Val Val Tyr Gly Tyr Pro Ala Ile Ser Leu Pro
20 25 30

Leu Leu Glu Val Glu Val Thr Cys Lys Val Val Ser Ala Glu Ser Pro
35 40 45

Trp Arg Leu Tyr Glu Glu Asp Thr Leu Ser Met Ala Val Tyr Ala Ser
50 55 60

Leu Glu Tyr Leu Asp Ile Thr Glu Ala Cys Val Arg Cys Glu Ile Asp
65 70 75 80

Ser Ala Ile Pro Glu Lys Arg Gly Met Gly Ser Ser Ala Ala Ile Ser
85 90 95

Ile Ala Ala Ile Arg Ala Val Phe Asp Tyr Tyr Gln Ala Asp Leu Pro
100 105 110

His Asp Val Leu Glu Ile Leu Val Asn Arg Ala Glu Met Ile Ala His
115 120 125

Met Asn Pro Ser Gly Leu Asp Ala Lys Thr Cys Leu Ser Asp Gln Pro
130 135 140

Ile Arg Phe Ile Lys Asn Val Gly Phe Thr Glu Leu Glu Met Asp Leu
145 150 155 160

Ser Ala Tyr Leu Val Ile Ala Asp Thr Gly Val Tyr Gly His Thr Arg
165 170 175

Glu Ala Ile Gln Val Val Gln Asn Lys Gly Lys Asp Ala Leu Pro Phe
180 185 190

Leu His Ala Leu Gly Glu Leu Thr Gln Gln Ala Glu Val Ala Ile Ser
195 200 205

Gln Lys Tyr Ala Glu Gly Leu Gly Leu Ile Phe Ser Gln Ala His Leu

210 215 220

His Leu Lys Glu Ile Gly Val Ser Ser Pro Glu Ala Asp Phe Leu Val

225 230 235 240

Glu Thr Ala Leu Ser Tyr Gly Ala Leu Gly Ala Lys Met Ser Gly Gly

245 250 255

Gly Leu Gly Gly Cys Ile Ile Ala Leu Val Thr Asn Leu Thr His Ala

260 265 270

Gln Glu Leu Ala Glu Arg Leu Glu Glu Lys Gly Ala Val Gln Thr Trp

275 280 285

Ile Glu Ser Leu

290

<210> 4

<211> 336

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 4

Met Ile Ala Val Lys Thr Cys Gly Lys Leu Tyr Trp Ala Gly Glu Tyr

1 5 10 15

Ala Ile Leu Glu Pro Gly Gln Leu Ala Leu Ile Lys Asp Ile Pro Ile

20 25 30

Tyr Met Arg Ala Glu Ile Ala Phe Ser Asp Ser Tyr Arg Ile Tyr Ser

35 40 45

Asp Met Phe Asp Phe Ala Val Asp Leu Arg Pro Asn Pro Asp Tyr Ser

50 55 60

Leu Ile Gln Glu Thr Ile Ala Leu Met Gly Asp Phe Leu Ala Val Arg

65 70 75 80

Gly Gln Asn Leu Arg Pro Phe Ser Leu Lys Ile Cys Gly Lys Met Glu

85 90 95

Arg Glu Gly Lys Lys Phe Gly Leu Gly Ser Ser Gly Ser Val Val Val

100 105 110

Leu Val Val Lys Ala Leu Leu Ala Leu Tyr Asn Leu Ser Val Asp Gln

115 120 125

Asn Leu Leu Phe Lys Leu Thr Ser Ala Val Leu Leu Lys Arg Gly Asp
130 135 140
Asn Gly Ser Met Gly Asp Leu Ala Cys Ile Val Ala Glu Asp Leu Val
145 150 155 160
Leu Tyr Gln Ser Phe Asp Arg Gln Lys Ala Ala Ala Trp Leu Glu Glu

165 170 175
Glu Asn Leu Ala Thr Val Leu Glu Arg Asp Trp Gly Phe Phe Ile Ser
180 185 190
Gln Val Lys Pro Thr Leu Glu Cys Asp Phe Leu Val Gly Trp Thr Lys
195 200 205
Glu Val Ala Val Ser Ser His Met Val Gln Gln Ile Lys Gln Asn Ile
210 215 220
Asn Gln Asn Phe Leu Ser Ser Ser Lys Glu Thr Val Val Ser Leu Val
225 230 235 240

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

305 310 315 320
Gly Ile Glu Leu Leu Tyr Gln Glu Arg Ile Gly His Asp Asp Lys Ser
325 330 335

<210> 5

<211> 317

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 5

Met Asp Arg Glu Pro Val Thr Val Arg Ser Tyr Ala Asn Ile Ala Ile

1 5 10 15

Ile Lys Tyr Trp Gly Lys Lys Lys Glu Lys Glu Met Val Pro Ala Thr

20 25 30

Ser Ser Ile Ser Leu Thr Leu Glu Asn Met Tyr Thr Glu Thr Thr Leu

35 40 45

Ser Pro Leu Pro Ala Asn Val Thr Ala Asp Glu Phe Tyr Ile Asn Gly

50 55 60

Gln Leu Gln Asn Glu Val Glu His Ala Lys Met Ser Lys Ile Ile Asp

65 70 75 80

Arg Tyr Arg Pro Ala Gly Glu Gly Phe Val Arg Ile Asp Thr Gln Asn

85 90 95

Asn Met Pro Thr Ala Ala Gly Leu Ser Ser Ser Ser Ser Gly Leu Ser

100 105 110

Ala Leu Val Lys Ala Cys Asn Ala Tyr Phe Lys Leu Gly Leu Asp Arg

115 120 125

Ser Gln Leu Ala Gln Glu Ala Lys Phe Ala Ser Gly Ser Ser Ser Arg

130 135 140

Ser Phe Tyr Gly Pro Leu Gly Ala Trp Asp Lys Asp Ser Gly Glu Ile

145 150 155 160

Tyr Pro Val Glu Thr Asp Leu Lys Leu Ala Met Ile Met Leu Val Leu

165 170 175

Glu Asp Lys Lys Lys Pro Ile Ser Ser Arg Asp Gly Met Lys Leu Cys

180 185 190

Val Glu Thr Ser Thr Thr Phe Asp Asp Trp Val Arg Gln Ser Glu Lys

195 200 205

Asp Tyr Gln Asp Met Leu Ile Tyr Leu Lys Glu Asn Asp Phe Ala Lys

210 215 220

Ile Gly Glu Leu Thr Glu Lys Asn Ala Leu Ala Met His Ala Thr Thr

225 230 235 240

Lys Thr Ala Ser Pro Ala Phe Ser Tyr Leu Thr Asp Ala Ser Tyr Glu

245 250 255

Ala Met Ala Phe Val Arg Gln Leu Arg Glu Lys Gly Glu Ala Cys Tyr
260 265 270
Phe Thr Met Asp Ala Gly Pro Asn Val Lys Val Phe Cys Gln Glu Lys
275 280 285
Asp Leu Glu His Leu Ser Glu Ile Phe Gly Gln Arg Tyr Arg Leu Ile
290 295 300
Val Ser Lys Thr Lys Asp Leu Ser Gln Asp Asp Cys Cys
305 310 315

<210> 6
<211> 182
<212> PRT
<213> E. coli K12 MG1655
<400> 6
Met Gln Thr Glu His Val Ile Leu Leu Asn Ala Gln Gly Val Pro Thr
1 5 10 15
Gly Thr Leu Glu Lys Tyr Ala Ala His Thr Ala Asp Thr Arg Leu His
20 25 30
Leu Ala Phe Ser Ser Trp Leu Phe Asn Ala Lys Gly Gln Leu Leu Val
35 40 45
Thr Arg Arg Ala Leu Ser Lys Lys Ala Trp Pro Gly Val Trp Thr Asn

50 55 60
Ser Val Cys Gly His Pro Gln Leu Gly Glu Ser Asn Glu Asp Ala Val
65 70 75 80
Ile Arg Arg Cys Arg Tyr Glu Leu Gly Val Glu Ile Thr Pro Pro Glu
85 90 95
Ser Ile Tyr Pro Asp Phe Arg Tyr Arg Ala Thr Asp Pro Ser Gly Ile
100 105 110
Val Glu Asn Glu Val Cys Pro Val Phe Ala Ala Arg Thr Thr Ser Ala
115 120 125

Leu Gln Ile Asn Asp Asp Glu Val Met Asp Tyr Gln Trp Cys Asp Leu
130 135 140
Ala Asp Val Leu His Gly Ile Asp Ala Thr Pro Trp Ala Phe Ser Pro

145 150 155 160

Trp Met Val Met Gln Ala Thr Asn Arg Glu Ala Arg Lys Arg Leu Ser

165 170 175

Ala Phe Thr Gln Leu Lys

180

<210> 7

<211> 307

<212> PRT

<213> Pantoea agglomerans

<400> 7

Met Val Ser Gly Ser Lys Ala Gly Val Ser Pro His Arg Glu Ile Glu

1 5 10 15

Val Met Arg Gln Ser Ile Asp Asp His Leu Ala Gly Leu Leu Pro Glu

20 25 30

Thr Asp Ser Gln Asp Ile Val Ser Leu Ala Met Arg Glu Gly Val Met

35 40 45

Ala Pro Gly Lys Arg Ile Arg Pro Leu Leu Met Leu Leu Ala Ala Arg

50 55 60

Asp Leu Arg Tyr Gln Gly Ser Met Pro Thr Leu Leu Asp Leu Ala Cys

65 70 75 80

Ala Val Glu Leu Thr His Thr Ala Ser Leu Met Leu Asp Asp Met Pro

85 90 95

Cys Met Asp Asn Ala Glu Leu Arg Arg Gly Gln Pro Thr Thr His Lys

100 105 110

Lys Phe Gly Glu Ser Val Ala Ile Leu Ala Ser Val Gly Leu Leu Ser

115 120 125

Lys Ala Phe Gly Leu Ile Ala Ala Thr Gly Asp Leu Pro Gly Glu Arg

130 135 140

Arg Ala Gln Ala Val Asn Glu Leu Ser Thr Ala Val Gly Val Gln Gly

145 150 155 160

Leu Val Leu Gly Gln Phe Arg Asp Leu Asn Asp Ala Ala Leu Asp Arg

165 170 175

Thr Pro Asp Ala Ile Leu Ser Thr Asn His Leu Lys Thr Gly Ile Leu
180 185 190
Phe Ser Ala Met Leu Gln Ile Val Ala Ile Ala Ser Ala Ser Ser Pro
195 200 205
Ser Thr Arg Glu Thr Leu His Ala Phe Ala Leu Asp Phe Gly Gln Ala

210 215 220
Phe Gln Leu Leu Asp Asp Leu Arg Asp Asp His Pro Glu Thr Gly Lys
225 230 235 240
Asp Arg Asn Lys Asp Ala Gly Lys Ser Thr Leu Val Asn Arg Leu Gly
245 250 255
Ala Asp Ala Ala Arg Gln Lys Leu Arg Glu His Ile Asp Ser Ala Asp
260 265 270
Lys His Leu Thr Phe Ala Cys Pro Gln Gly Gly Ala Ile Arg Gln Phe
275 280 285

Met His Leu Trp Phe Gly His His Leu Ala Asp Trp Ser Pro Val Met
290 295 300
Lys Ile Ala
305

<210> 8
<211> 309
<212> PRT
<213> Pantoea agglomerans
<400> 8
Met Ser Gln Pro Pro Leu Leu Asp His Ala Thr Gln Thr Met Ala Asn
1 5 10 15
Gly Ser Lys Ser Phe Ala Thr Ala Ala Lys Leu Phe Asp Pro Ala Thr
20 25 30
Arg Arg Ser Val Leu Met Leu Tyr Thr Trp Cys Arg His Cys Asp Asp

35 40 45
Val Ile Asp Asp Gln Thr His Gly Phe Ala Ser Glu Ala Ala Ala Glu
50 55 60
Glu Glu Ala Thr Gln Arg Leu Ala Arg Leu Arg Thr Leu Thr Leu Ala

65 70 75 80

Ala Phe Glu Gly Ala Glu Met Gln Asp Pro Ala Phe Ala Ala Phe Gln

85 90 95

Glu Val Ala Leu Thr His Gly Ile Thr Pro Arg Met Ala Leu Asp His

100 105 110

Leu Asp Gly Phe Ala Met Asp Val Ala Gln Thr Arg Tyr Val Thr Phe

115 120 125

Glu Asp Thr Leu Arg Tyr Cys Tyr His Val Ala Gly Val Val Gly Leu

130 135 140

Met Met Ala Arg Val Met Gly Val Arg Asp Glu Arg Val Leu Asp Arg

145 150 155 160

Ala Cys Asp Leu Gly Leu Ala Phe Gln Leu Thr Asn Ile Ala Arg Asp

165 170 175

Ile Ile Asp Asp Ala Ala Ile Asp Arg Cys Tyr Leu Pro Ala Glu Trp

180 185 190

Leu Gln Asp Ala Gly Leu Thr Pro Glu Asn Tyr Ala Ala Arg Glu Asn

195 200 205

Arg Ala Ala Leu Ala Arg Val Ala Glu Arg Leu Ile Asp Ala Ala Glu

210 215 220

Pro Tyr Tyr Ile Ser Ser Gln Ala Gly Leu His Asp Leu Pro Pro Arg

225 230 235 240

Cys Ala Trp Ala Ile Ala Thr Ala Arg Ser Val Tyr Arg Glu Ile Gly

245 250 255

Ile Lys Val Lys Ala Ala Gly Gly Ser Ala Trp Asp Arg Arg Gln His

260 265 270

Thr Ser Lys Gly Glu Lys Ile Ala Met Leu Met Ala Ala Pro Gly Gln

275 280 285

Val Ile Arg Ala Lys Thr Thr Arg Val Thr Pro Arg Pro Ala Gly Leu

290 295 300

Trp Gln Arg Pro Val

305

<210> 9

<211> 486

<212> PRT

<213> Pantoea agglomerans

<400> 9

Met Lys Lys Thr Val Val Ile Gly Ala Gly Phe Gly Gly Leu Ala Leu

1 5 10 15

Ala Ile Arg Leu Gln Ala Ala Gly Ile Pro Thr Val Leu Leu Glu Gln

20 25 30

Arg Asp Lys Pro Gly Gly Arg Ala Tyr Val Trp His Asp Gln Gly Phe

35 40 45

Thr Phe Asp Ala Gly Pro Thr Val Ile Thr Asp Pro Thr Ala Leu Glu

50 55 60

Ala Leu Phe Thr Leu Ala Gly Arg Arg Met Glu Asp Tyr Val Arg Leu

65 70 75 80

Leu Pro Val Lys Pro Phe Tyr Arg Leu Cys Trp Glu Ser Gly Lys Thr

85 90 95

Leu Asp Tyr Ala Asn Asp Ser Ala Glu Leu Glu Ala Gln Ile Thr Gln

100 105 110

Phe Asn Pro Arg Asp Val Glu Gly Tyr Arg Arg Phe Leu Ala Tyr Ser

115 120 125

Gln Ala Val Phe Gln Glu Gly Tyr Leu Arg Leu Gly Ser Val Pro Phe

130 135 140

Leu Ser Phe Arg Asp Met Leu Arg Ala Gly Pro Gln Leu Leu Lys Leu

145 150 155 160

Gln Ala Trp Gln Ser Val Tyr Gln Ser Val Ser Arg Phe Ile Glu Asp

165 170 175

Glu His Leu Arg Gln Ala Phe Ser Phe His Ser Leu Leu Val Gly Gly

180 185 190

Asn Pro Phe Thr Thr Ser Ser Ile Tyr Thr Leu Ile His Ala Leu Glu

195 200 205

Arg Glu Trp Gly Val Trp Phe Pro Glu Gly Gly Thr Gly Ala Leu Val

210 215 220

Asn Gly Met Val Lys Leu Phe Thr Asp Leu Gly Gly Glu Ile Glu Leu
225 230 235 240
Asn Ala Arg Val Glu Glu Leu Val Val Ala Asp Asn Arg Val Ser Gln
245 250 255
Val Arg Leu Ala Asp Gly Arg Ile Phe Asp Thr Asp Ala Val Ala Ser
260 265 270
Asn Ala Asp Val Val Asn Thr Tyr Lys Lys Leu Leu Gly His His Pro
275 280 285
Val Gly Gln Lys Arg Ala Ala Ala Leu Glu Arg Lys Ser Met Ser Asn

290 295 300
Ser Leu Phe Val Leu Tyr Phe Gly Leu Asn Gln Pro His Ser Gln Leu
305 310 315 320
Ala His His Thr Ile Cys Phe Gly Pro Arg Tyr Arg Glu Leu Ile Asp
325 330 335
Glu Ile Phe Thr Gly Ser Ala Leu Ala Asp Asp Phe Ser Leu Tyr Leu
340 345 350
His Ser Pro Cys Val Thr Asp Pro Ser Leu Ala Pro Pro Gly Cys Ala
355 360 365

Ser Phe Tyr Val Leu Ala Pro Val Pro His Leu Gly Asn Ala Pro Leu
370 375 380
Asp Trp Ala Gln Glu Gly Pro Lys Leu Arg Asp Arg Ile Phe Asp Tyr
385 390 395 400
Leu Glu Glu Arg Tyr Met Pro Gly Leu Arg Ser Gln Leu Val Thr Gln
405 410 415
Arg Ile Phe Thr Pro Ala Asp Phe His Asp Thr Leu Asp Ala His Leu
420 425 430
Gly Ser Ala Phe Ser Ile Glu Pro Leu Leu Thr Gln Ser Ala Trp Phe

435 440 445
Arg Pro His Asn Arg Asp Ser Asp Ile Ala Asn Leu Tyr Leu Val Gly
450 455 460

Ala Gly Thr His Pro Gly Ala Gly Ile Pro Gly Val Val Ala Ser Ala
465 470 475 480
Lys Ala Thr Ala Ser Leu
485

<210> 10
<211> 382
<212> PRT
<213> Pantoea ananatis
<400> 10

Met Gln Pro His Tyr Asp Leu Ile Leu Val Gly Ala Gly Leu Ala Asn
1 5 10 15

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

85 90 95
Ala Glu Val Leu Gln Arg Gln Phe Gly Pro His Leu Trp Met Asp Thr
100 105 110
Ala Val Ala Glu Val Asn Ala Glu Ser Val Arg Leu Lys Lys Gly Gln
115 120 125
Val Ile Gly Ala Arg Ala Val Ile Asp Gly Arg Gly Tyr Ala Ala Asn
130 135 140
Ser Ala Leu Ser Val Gly Phe Gln Ala Phe Ile Gly Gln Glu Trp Arg
145 150 155 160

Leu Ser His Pro His Gly Leu Ser Ser Pro Ile Ile Met Asp Ala Thr
165 170 175
Val Asp Gln Gln Asn Gly Tyr Arg Phe Val Tyr Ser Leu Pro Leu Ser

180 185 190

Pro Thr Arg Leu Leu Ile Glu Asp Thr His Tyr Ile Asp Asn Ala Thr

195 200 205

Leu Asp Pro Glu Cys Ala Arg Gln Asn Ile Cys Asp Tyr Ala Ala Gln

210 215 220

Gln Gly Trp Gln Leu Gln Thr Leu Leu Arg Glu Glu Gln Gly Ala Leu

225 230 235 240

Pro Ile Thr Leu Ser Gly Asn Ala Asp Ala Phe Trp Gln Gln Arg Pro

245 250 255

Leu Ala Cys Ser Gly Leu Arg Ala Gly Leu Phe His Pro Thr Thr Gly

260 265 270

Tyr Ser Leu Pro Leu Ala Val Ala Val Ala Asp Arg Leu Ser Ala Leu

275 280 285

Asp Val Phe Thr Ser Ala Ser Ile His His Ala Ile Thr His Phe Ala

290 295 300

Arg Glu Arg Trp Gln Gln Gln Gly Phe Phe Arg Met Leu Asn Arg Met

305 310 315 320

Leu Phe Leu Ala Gly Pro Ala Asp Ser Arg Trp Arg Val Met Gln Arg

325 330 335

Phe Tyr Gly Leu Pro Glu Asp Leu Ile Ala Arg Phe Tyr Ala Gly Lys

340 345 350

Leu Thr Leu Thr Asp Arg Leu Arg Ile Leu Ser Gly Lys Pro Pro Val

355 360 365

Pro Val Leu Ala Ala Leu Gln Ala Ile Met Thr Thr His Arg

370 375 380

<210> 11

<211> 620

<212> PRT

<213> E. coli K12 MG1655

<400> 11

Met Ser Phe Asp Ile Ala Lys Tyr Pro Thr Leu Ala Leu Val Asp Ser

1 5 10 15

Thr Gln Glu Leu Arg Leu Leu Pro Lys Glu Ser Leu Pro Lys Leu Cys
20 25 30
Asp Glu Leu Arg Arg Tyr Leu Leu Asp Ser Val Ser Arg Ser Ser Gly
35 40 45
His Phe Ala Ser Gly Leu Gly Thr Val Glu Leu Thr Val Ala Leu His

50 55 60
Tyr Val Tyr Asn Thr Pro Phe Asp Gln Leu Ile Trp Asp Val Gly His
65 70 75 80
Gln Ala Tyr Pro His Lys Ile Leu Thr Gly Arg Arg Asp Lys Ile Gly
85 90 95
Thr Ile Arg Gln Lys Gly Gly Leu His Pro Phe Pro Trp Arg Gly Glu
100 105 110
Ser Glu Tyr Asp Val Leu Ser Val Gly His Ser Ser Thr Ser Ile Ser
115 120 125

Ala Gly Ile Gly Ile Ala Val Ala Ala Glu Lys Glu Gly Lys Asn Arg
130 135 140
Arg Thr Val Cys Val Ile Gly Asp Gly Ala Ile Thr Ala Gly Met Ala
145 150 155 160
Phe Glu Ala Met Asn His Ala Gly Asp Ile Arg Pro Asp Met Leu Val
165 170 175
Ile Leu Asn Asp Asn Glu Met Ser Ile Ser Glu Asn Val Gly Ala Leu
180 185 190
Asn Asn His Leu Ala Gln Leu Leu Ser Gly Lys Leu Tyr Ser Ser Leu

195 200 205
Arg Glu Gly Gly Lys Lys Val Phe Ser Gly Val Pro Pro Ile Lys Glu
210 215 220
Leu Leu Lys Arg Thr Glu Glu His Ile Lys Gly Met Val Val Pro Gly
225 230 235 240
Thr Leu Phe Glu Glu Leu Gly Phe Asn Tyr Ile Gly Pro Val Asp Gly
245 250 255
His Asp Val Leu Gly Leu Ile Thr Thr Leu Lys Asn Met Arg Asp Leu

260 265 270

Lys Gly Pro Gln Phe Leu His Ile Met Thr Lys Lys Gly Arg Gly Tyr
275 280 285
Glu Pro Ala Glu Lys Asp Pro Ile Thr Phe His Ala Val Pro Lys Phe
290 295 300
Asp Pro Ser Ser Gly Cys Leu Pro Lys Ser Ser Gly Gly Leu Pro Ser
305 310 315 320
Tyr Ser Lys Ile Phe Gly Asp Trp Leu Cys Glu Thr Ala Ala Lys Asp
325 330 335
Asn Lys Leu Met Ala Ile Thr Pro Ala Met Arg Glu Gly Ser Gly Met

340 345 350
Val Glu Phe Ser Arg Lys Phe Pro Asp Arg Tyr Phe Asp Val Ala Ile
355 360 365
Ala Glu Gln His Ala Val Thr Phe Ala Ala Gly Leu Ala Ile Gly Gly
370 375 380
Tyr Lys Pro Ile Val Ala Ile Tyr Ser Thr Phe Leu Gln Arg Ala Tyr
385 390 395 400
Asp Gln Val Leu His Asp Val Ala Ile Gln Lys Leu Pro Val Leu Phe
405 410 415

Ala Ile Asp Arg Ala Gly Ile Val Gly Ala Asp Gly Gln Thr His Gln
420 425 430
Gly Ala Phe Asp Leu Ser Tyr Leu Arg Cys Ile Pro Glu Met Val Ile
435 440 445
Met Thr Pro Ser Asp Glu Asn Glu Cys Arg Gln Met Leu Tyr Thr Gly
450 455 460
Tyr His Tyr Asn Asp Gly Pro Ser Ala Val Arg Tyr Pro Arg Gly Asn
465 470 475 480
Ala Val Gly Val Glu Leu Thr Pro Leu Glu Lys Leu Pro Ile Gly Lys

485 490 495
Gly Ile Val Lys Arg Arg Gly Glu Lys Leu Ala Ile Leu Asn Phe Gly
500 505 510

Thr Leu Met Pro Glu Ala Ala Lys Val Ala Glu Ser Leu Asn Ala Thr
515 520 525

Leu Val Asp Met Arg Phe Val Lys Pro Leu Asp Glu Ala Leu Ile Leu
530 535 540

Glu Met Ala Ala Ser His Glu Ala Leu Val Thr Val Glu Glu Asn Ala
545 550 555 560

Ile Met Gly Gly Ala Gly Ser Gly Val Asn Glu Val Leu Met Ala His
565 570 575

Arg Lys Pro Val Pro Val Leu Asn Ile Gly Leu Pro Asp Phe Phe Ile
580 585 590

Pro Gln Gly Thr Gln Glu Glu Met Arg Ala Glu Leu Gly Leu Asp Ala
595 600 605

Ala Gly Met Glu Ala Lys Ile Lys Ala Trp Leu Ala
610 615 620

<210> 12

<211> 305

<212> PRT

<213> Haematococcus pluvialis

<400> 12

Met Leu Arg Ser Leu Leu Arg Gly Leu Thr His Ile Pro Arg Val Asn
1 5 10 15

Ser Ala Gln Gln Pro Ser Cys Ala His Ala Arg Leu Gln Phe Lys Leu
20 25 30

Arg Ser Met Gln Met Thr Leu Met Gln Pro Ser Ile Ser Ala Asn Leu
35 40 45

Ser Arg Ala Glu Asp Arg Thr Asp His Met Arg Gly Ala Ser Thr Trp
50 55 60

Ala Gly Gly Gln Ser Gln Asp Glu Leu Met Leu Lys Asp Glu Cys Ile
65 70 75 80

Leu Val Asp Val Glu Asp Asn Ile Thr Gly His Ala Ser Lys Leu Glu
85 90 95

Cys His Lys Phe Leu Pro His Gln Pro Ala Gly Leu Leu His Arg Ala

100 105 110

Phe Ser Val Phe Leu Phe Asp Asp Gln Gly Arg Leu Leu Leu Gln Gln

115 120 125

Arg Ala Arg Ser Lys Ile Thr Phe Pro Ser Val Trp Thr Asn Thr Cys

130 135 140

Cys Ser His Pro Leu His Gly Gln Thr Pro Asp Glu Val Asp Gln Leu

145 150 155 160

Ser Gln Val Ala Asp Gly Thr Val Pro Gly Ala Lys Ala Ala Ala Ile

165 170 175

Arg Lys Leu Glu His Glu Leu Gly Ile Pro Ala His Gln Leu Pro Ala

180 185 190

Ser Ala Phe Arg Phe Leu Thr Arg Leu His Tyr Cys Ala Ala Asp Val

195 200 205

Gln Pro Ala Ala Thr Gln Ser Ala Leu Trp Gly Glu His Glu Met Asp

210 215 220

Tyr Ile Leu Phe Ile Arg Ala Asn Val Thr Leu Ala Pro Asn Pro Asp

225 230 235 240

Glu Val Asp Glu Val Arg Tyr Val Thr Gln Glu Glu Leu Arg Gln Met

245 250 255

Met Gln Pro Asp Asn Gly Leu Gln Trp Ser Pro Trp Phe Arg Ile Ile

260 265 270

Ala Ala Arg Phe Leu Glu Arg Trp Trp Ala Asp Leu Asp Ala Ala Leu

275 280 285

Asn Thr Asp Lys His Glu Asp Trp Gly Thr Val His His Ile Asn Glu

290 295 300

Ala

305

<210> 13

<211> 275

<212> PRT

<213> Uncultured marine bacterium 66A03

<400> 13

Met Gly Leu Met Leu Ile Asp Trp Cys Ala Leu Ala Leu Val Val Phe
1 5 10 15
Ile Gly Leu Pro His Gly Ala Leu Asp Ala Ala Ile Ser Phe Ser Met
20 25 30

Ile Ser Ser Ala Lys Arg Ile Ala Arg Leu Ala Gly Ile Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Leu Leu Leu Ala Thr Ala Phe Phe Leu Ile Trp Tyr Gln Leu Pro
50 55 60
Ala Phe Ser Leu Leu Ile Phe Leu Leu Ile Ser Ile Ile His Phe Gly
65 70 75 80
Met Ala Asp Phe Asn Ala Ser Pro Ser Lys Leu Lys Trp Pro His Ile
85 90 95
Ile Ala His Gly Gly Val Val Thr Val Trp Leu Pro Leu Ile Gln Lys

100 105 110
Asn Glu Val Thr Lys Leu Phe Ser Ile Leu Thr Asn Gly Pro Thr Pro
115 120 125
Ile Leu Trp Asp Ile Leu Leu Ile Phe Phe Leu Cys Trp Ser Ile Gly
130 135 140
Val Cys Leu His Thr Tyr Glu Thr Leu Arg Ser Lys His Tyr Asn Ile
145 150 155 160
Ala Phe Glu Leu Ile Gly Leu Ile Phe Leu Ala Trp Tyr Ala Pro Pro
165 170 175

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

245 250 255

Met Ile Leu Ile Asp Phe Ile Phe Arg Pro His Ser Ser Arg Ile Lys

260 265 270

Ile Lys Asn

275

<210> 14

<211> 566

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 14

Met Glu Ile Ile Phe Gly Gln Asn Lys Lys Glu Gln Leu Glu Pro Val

1 5 10 15

Gln Ala Lys Val Thr Gly Ser Ile Pro Ala Trp Leu Gln Gly Thr Leu

20 25 30

Leu Arg Asn Gly Pro Gly Met His Thr Val Gly Glu Ser Lys Tyr Asn

35 40 45

His Trp Phe Asp Gly Leu Ala Leu Leu His Ser Phe Ser Ile Arg Asp

50 55 60

Gly Glu Val Phe Tyr Arg Ser Lys Tyr Leu Gln Ser Asp Thr Tyr Ile

65 70 75 80

Ala Asn Ile Glu Ala Asn Arg Ile Val Val Ser Glu Phe Gly Thr Met

85 90 95

Ala Tyr Pro Asp Pro Cys Lys Asn Ile Phe Ser Lys Ala Phe Ser Tyr

100 105 110

Leu Ser His Thr Ile Pro Asp Phe Thr Asp Asn Cys Leu Ile Asn Ile

115 120 125

Met Lys Cys Gly Glu Asp Phe Tyr Ala Thr Thr Glu Thr Asn Tyr Ile

130 135 140

Arg Lys Ile Asp Pro Gln Thr Leu Glu Thr Leu Glu Lys Val Asp Tyr

145 150 155 160

Arg Lys Tyr Val Ala Val Asn Leu Ala Thr Ser His Pro His Tyr Asp

165 170 175

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

245 250 255
Ile Leu Lys Met Ala Thr Ala Tyr Met Arg Gly Val Ser Trp Ala Ser
260 265 270
Cys Met Ser Phe Asp Arg Glu Asp Lys Thr Tyr Ile His Ile Ile Asp
275 280 285
Gln Arg Thr Arg Lys Pro Val Pro Thr Lys Phe Tyr Thr Asp Pro Met
290 295 300
Val Val Phe His His Val Asn Ala Tyr Glu Glu Asp Gly Cys Val Leu
305 310 315 320

Phe Asp Val Ile Ala Tyr Glu Asp Ser Ser Leu Tyr Gln Leu Phe Tyr
325 330 335
Leu Ala Asn Leu Asn Lys Asp Phe Glu Glu Lys Ser Arg Leu Thr Ser
340 345 350
Val Pro Thr Leu Arg Arg Phe Ala Val Pro Leu His Val Asp Lys Asp
355 360 365
Ala Glu Val Gly Ser Asn Leu Val Lys Val Ser Ser Thr Thr Ala Thr
370 375 380
Ala Leu Lys Glu Lys Asp Gly His Val Tyr Cys Gln Pro Glu Val Leu

385 390 395 400
Tyr Glu Gly Leu Glu Leu Pro Arg Ile Asn Tyr Ala Tyr Asn Gly Lys
405 410 415
Pro Tyr Arg Tyr Ile Phe Ala Ala Glu Val Gln Trp Ser Pro Val Pro
420 425 430

Thr Lys Ile Leu Lys Tyr Asp Ile Leu Thr Lys Ser Ser Leu Lys Trp
435 440 445
Ser Glu Glu Ser Cys Trp Pro Ala Glu Pro Leu Phe Val Pro Thr Pro
450 455 460

Gly Ala Lys Asp Glu Asp Asp Gly Val Ile Leu Ser Ala Ile Val Ser
465 470 475 480
Thr Asp Pro Gln Lys Leu Pro Phe Leu Leu Ile Leu Asp Ala Lys Ser
485 490 495
Phe Thr Glu Leu Ala Arg Ala Ser Val Asp Ala Asp Met His Leu Asp
500 505 510
Leu His Gly Leu Phe Ile Pro Asp Ala Asp Trp Asn Ala Val Lys Gln
515 520 525
Thr Pro Ala Glu Thr Gln Glu Val Glu Asn Ser Asp His Pro Thr Asp

530 535 540
Pro Thr Ala Pro Glu Leu Ser His Ser Glu Asn Asp Phe Thr Ala Gly
545 550 555 560
His Gly Gly Ser Ser Leu
565

<210> 15
<211> 350
<212> PRT
<213> Natronomonas pharaonis ATCC35678
<400> 15
Met Ser Asn Ala Ser Leu Arg Pro Ser Gly Thr Ala Ser Ala Thr Leu
1 5 10 15
Phe Arg Leu Ala Phe Leu Pro Gly Trp Ala Val Ile Ala Ala Thr Thr

20 25 30
Gly Ala Phe Leu Val Gly Ala Ser Leu Pro Leu Thr Tyr Gln Leu Ile
35 40 45
Pro Leu Ala Ala Ser Val Val Leu Leu Gly Leu Pro His Gly Ala Val
50 55 60
Asp His Leu Ala Leu Pro Arg Thr Arg Asn Glu Arg Val Thr Val Arg

65 70 75 80

Trp Leu Ala Ala Ile Gly Val Leu Tyr Ala Val Val Gly Gly Leu Tyr

85 90 95

Ala Ala Val Trp Phe Leu Ala Pro Val Gly Ala Val Ala Ala Phe Ile

100 105 110

Phe Met Thr Trp Val His Trp Gly Gln Gly Glu Ile Tyr Pro Leu Val

115 120 125

Ala Leu Ala Asp Ala Asp His Leu Asp Gly Arg Leu Glu Arg Gly Leu

130 135 140

Thr Ala Ala Ile Arg Gly Ala Leu Pro Met Leu Val Pro Phe Val Ala

145 150 155 160

Phe Pro Asp Gln Tyr Glu Leu Val Val Thr Thr Leu Val Gly Leu Phe

165 170 175

Asp Ala Asp Ala Ala Ala Thr Ala Ala Ala Ala Phe Thr Pro Thr Ala

180 185 190

Arg Leu Ala Val Ala Val Thr Val Gly Gly Leu Val Ala Val Thr Leu

195 200 205

Gly Ile Gly Ala Val Ala Ala Ser Glu Thr Gly Trp Gly Pro Trp Leu

210 215 220

Leu Asp Ala Gly Glu Thr Gly Leu Leu Ile Leu Phe Phe Ala Ala Val

225 230 235 240

Pro Pro Ile Phe Ala Ile Gly Leu Tyr Phe Cys Phe Trp His Ser Leu

245 250 255

Arg His Ile Val Arg Leu Leu Ala Val Asp Asn Arg Ala Ala Pro Ala

260 265 270

Leu Asp Gly Arg Arg Tyr Gly Ala Ala Leu Ala Arg Phe Ala Arg Asp

275 280 285

Ala Ala Pro Leu Ser Ala Ala Ser Leu Val Leu Leu Gly Leu Leu Tyr

290 295 300

Leu Ala Val Pro Gly Ser Val Asp Ser Pro Leu Ser Leu Val Gly Thr

305 310 315 320

Tyr Leu Val Leu Ile Ala Val Leu Thr Leu Pro His Val Val Val Val
325 330 335
Ala Trp Met Asp His Glu Gln Arg Leu Trp Arg Pro Gly Ala
340 345 350

<210> 16
<211> 284
<212> PRT
<213> Halobacterium salinarum ATCC700922
<400> 16

Met Pro His Gly Ala Ile Asp Tyr Leu Ala Leu Pro Arg Ala Val Thr
1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Val Arg Trp Leu Ala Val Val Gly Val Leu Tyr Leu
20 25 30
Val Leu Gly Gly Gly Tyr Ala Ala Ala Trp Phe Phe Ala Pro Val Pro
35 40 45
Ala Ala Phe Ala Phe Val Ala Ile Thr Trp Leu His Trp Gly Gln Gly
50 55 60
Asp Leu Tyr Pro Leu Leu Asp Phe Leu Asp Val Asp Tyr Leu Asp Thr
65 70 75 80
Arg Pro Arg Arg Ala Ala Thr Val Leu Ile Arg Gly Gly Leu Pro Met

85 90 95
Leu Val Pro Leu Leu Gly Phe Pro Glu Arg Tyr Arg Ser Val Val Asp
100 105 110
Ala Phe Ala Ala Pro Phe Gly Gly Ser Val Gly Asp Leu Ala Val Phe
115 120 125
Asp Pro Arg Val Arg Leu Trp Leu Gly Val Ala Phe Ala Ala Ala Thr
130 135 140
Val Ala Val Leu Ala Ala Gly Arg Arg Arg Thr His Ser Pro Gly Ala
145 150 155 160

Trp Arg Val Asp Ala Ala Glu Thr Leu Leu Leu Trp Val Phe Phe Phe
165 170 175
Val Val Pro Pro Val Phe Ala Val Gly Val Tyr Phe Cys Val Trp His

180 185 190

Ser Val Arg His Val Ala Arg Ala Ile Ala Val Asp Gly Ser Val His

195 200 205

Pro Ser Leu Arg Ala Gly Asp Ile Leu Gly Pro Leu Ala Arg Phe Gly

210 215 220

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

225 230 235 240

Leu Trp Trp Ala Val Pro Asn Pro Pro Thr Thr Leu Glu Ser Gly Ala

245 250 255

Ala Leu Tyr Leu Val Leu Ile Ala Val Leu Thr Leu Pro His Val Ala

260 265 270

Val Val Thr Trp Met Asp Arg Val Gln Gly Val Leu

275 280

<210> 17

<211> 284

<212> PRT

<213> Halobacterium salinarum ATCC700922

<400>

17

Met Pro His Gly Ala Ile Asp Tyr Leu Ala Leu Pro Arg Ala Val Thr

1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Val Arg Trp Leu Ala Val Val Gly Val Leu Tyr Leu

20 25 30

Val Leu Gly Gly Gly Tyr Ala Ala Ala Trp Phe Phe Ala Pro Val Pro

35 40 45

Ala Ala Phe Ala Phe Val Ala Ile Thr Trp Leu His Trp Gly Gln Gly

50 55 60

Asp Leu Tyr Pro Leu Leu Asp Phe Leu Asp Val Asp Tyr Leu Asp Thr

65 70 75 80

Arg Pro Arg Arg Ala Ala Thr Val Leu Ile Arg Gly Gly Leu Pro Met

85 90 95

Leu Val Pro Leu Leu Gly Phe Pro Glu Arg Tyr Arg Ser Val Val Asp

100 105 110

Ala Phe Ala Ala Pro Phe Gly Gly Ser Val Gly Asp Leu Ala Val Phe
115 120 125
Asp Pro Arg Val Arg Leu Trp Leu Gly Val Ala Phe Ala Ala Ala Thr
130 135 140

Val Ala Val Leu Ala Ala Gly Arg Arg Arg Thr His Ser Pro Gly Ala
145 150 155 160
Trp Arg Val Asp Ala Ala Glu Thr Leu Leu Leu Trp Val Phe Phe Phe
165 170 175
Val Val Pro Pro Val Phe Ala Val Gly Val Tyr Phe Cys Val Trp His
180 185 190
Ser Val Arg His Val Ala Arg Ala Ile Ala Val Asp Gly Ser Val His
195 200 205
Pro Ser Leu Arg Ala Gly Asp Ile Leu Gly Pro Leu Ala Arg Phe Gly

210 215 220
Val Glu Ala Ala Pro Met Thr Ala Ala Ala Leu Ala Leu Gly Gly Val
225 230 235 240
Leu Trp Trp Ala Val Pro Asn Pro Pro Thr Thr Leu Glu Ser Gly Ala
245 250 255
Ala Leu Tyr Leu Val Leu Ile Ala Val Leu Thr Leu Pro His Val Ala
260 265 270
Val Val Thr Trp Met Asp Arg Val Gln Gly Val Leu
275 280

<210> 18
<211> 2412
<212> DNA
<213> Enterococcus faecalis
<400> 18
ttgaaaacag tagttattat tgatgcatta cgaacaccaa ttggaaaata taaaggcagc 60
ttaagtcaag taagtgccgt agacttagga acacatgtta caacacaact tttaaaaaga 120
cattccacta tttctgaaga aattgatcaa gtaatctttg gaaatgtttt acaagctgga 180
aatggccaaa atcccgcacg acaaatagca ataaacagcg gtttatctca tgaaattccc 240
gcaatgacag ttaatgaggt ctgcggatca ggaatgaagg ccgttatttt ggcgaaacaa 300

ttgattcaat taggagaagc ggaagtttta attgctggcg ggattgagaa tatgtcccaa 360

gcacctaaat tacaacgatt taattacgaa acagaaagct atgatgcgcc tttttctagt 420

atgatgtacg atgggttaac ggatgccttt agtggtcaag caatgggctt aactgctgaa 480

aatgtggccg aaaagtatca tgtaactaga gaagagcaag atcaattttc tgtacattca 540

caattaaaag cagctcaagc acaagcagaa gggatattcg ctgacgaaat agccccatta 600

gaagtatcag gaacgcttgt ggagaaagat gaagggattc gccctaattc gagcgttgag 660

aagctaggaa cgcttaaaac agtttttaaa gaagacggta ctgtaacagc agggaatgca 720

tcaaccatta atgatggggc ttctgctttg attattgctt cacaagaata tgccgaagca 780

cacggtcttc cttatttagc tattattcga gacagtgtgg aagtcggtat tgatccagcc 840

tatatgggaa tttcgccgat taaagccatt caaaaactgt tagcgcgcaa tcaacttact 900

acggaagaaa ttgatctgta tgaaatcaac gaagcatttg cagcaacttc aatcgtggtc 960

caaagagaac tggctttacc agaggaaaag gtcaacattt atggtggcgg tatttcatta 1020

ggtcatgcga ttggtgccac aggtgctcgt ttattaacga gtttaagtta tcaattaaat 1080

caaaaagaaa agaaatatgg agtggcttct ttatgtatcg gcggtggctt aggactcgct 1140

atgctactag agagacctca gcaaaaaaaa aacagccgat tttatcaaat gagtcctgag 1200

gaacgcctgg cttctcttct taatgaaggc cagatttctg ctgatacaaa aaaagaattt 1260

gaaaatacgg ctttatcttc gcagattgcc aatcatatga ttgaaaatca aatcagtgaa 1320

acagaagtgc cgatgggcgt tggcttacat ttaacagtgg acgaaactga ttatttggta 1380

ccaatggcga cagaagagcc ctcagtgatt gcggctttga gtaatggtgc aaaaatagca 1440

caaggattta aaacagtgaa tcaacaacgt ttaatgcgtg gacaaatcgt tttttacgat 1500

gttgcagacg ccgagtcatt gattgatgaa ctacaagtaa gagaaacgga aatttttcaa 1560

caagcagagt taagttatcc atctatcgtt aaacgcggcg gcggcttaag agatttgcaa 1620

tatcgtgctt ttgatgaatc atttgtatct gtcgactttt tagtagatgt taaggatgca 1680

atgggggcaa atatcgttaa cgctatgttg gaaggtgtgg ccgagttgtt ccgtgaatgg 1740

tttgcggagc aaaagatttt attcagtatt ttaagtaatt atgccacgga gtcggttgtt 1800

acgatgaaaa cggctattcc agtttcacgt ttaagtaagg ggagcaatgg ccgggaaatt 1860

gctgaaaaaa ttgttttagc ttcacgctat gcttcattag atccttatcg ggcagtcacg 1920

cataacaaag ggatcatgaa tggcattgaa gctgtcgttt tagctacagg aaatgataca 1980

cgcgctgtta gcgcttcttg tcatgctttt gcggtgaagg aaggtcgcta ccaaggtttg 2040

actagttgga cgctggatgg cgaacaacta attggtgaaa tttcagttcc gcttgcgtta 2100

gccacggttg gcggtgccac aaaagtctta cctaaatctc aagcagctgc tgatttgtta 2160

gcagtgacgg atgcaaaaga actaagtcga gtagtagcgg ctgttggttt ggcacaaaat 2220

ttagcggcgt tacgggcctt agtctctgaa ggaattcaaa aaggacacat ggctctacaa 2280

gcacgttctt tagcgatgac ggtcggagct actggtaaag aagttgaggc agtcgctcaa 2340

caattaaaac gtcaaaaaac gatgaaccaa gaccgagcct tggctatttt aaatgattta 2400

agaaaacaat aa 2412

<210> 19

<211> 467

<212> PRT

<213> E coli DH5a(pTDHBSR/pSNA)

<400> 19

Met Asn Gln Gln Asp Ile Glu Gln Val Val Lys Ala Val Leu Leu Lys
1 5 10 15

Met Gln Ser Ser Asp Thr Pro Ser Ala Ala Val His Glu Met Gly Val
20 25 30

Phe Ala Ser Leu Asp Asp Ala Val Ala Ala Ala Lys Val Ala Gln Gln
35 40 45

Gly Leu Lys Ser Val Ala Met Arg Gln Leu Ala Ile Ala Ala Ile Arg
50 55 60

Glu Ala Gly Glu Lys His Ala Arg Asp Leu Ala Glu Leu Ala Val Ser
65 70 75 80

Glu Thr Gly Met Gly Arg Val Glu Asp Lys Phe Ala Lys Asn Val Ala
85 90 95

Gln Ala Arg Gly Thr Pro Gly Val Glu Cys Leu Ser Pro Gln Val Leu
100 105 110

Thr Gly Asp Asn Gly Leu Thr Leu Ile Glu Asn Ala Pro Trp Gly Val
115 120 125

Val Ala Ser Val Thr Pro Ser Thr Asn Pro Ala Ala Thr Val Ile Asn
130 135 140

Asn Ala Ile Ser Leu Ile Ala Ala Gly Asn Ser Val Ile Phe Ala Pro
145 150 155 160

His Pro Ala Ala Lys Lys Val Ser Gln Arg Ala Ile Thr Leu Leu Asn
165 170 175
Gln Ala Ile Val Ala Ala Gly Gly Pro Glu Asn Leu Leu Val Thr Val
180 185 190
Ala Asn Pro Asp Ile Glu Thr Ala Gln Arg Leu Phe Lys Phe Pro Gly

195 200 205
Ile Gly Leu Leu Val Val Thr Gly Gly Glu Ala Val Val Glu Ala Ala
210 215 220
Arg Lys His Thr Asn Lys Arg Leu Ile Ala Ala Gly Ala Gly Asn Pro
225 230 235 240
Pro Val Val Val Asp Glu Thr Ala Asp Leu Ala Arg Ala Ala Gln Ser
245 250 255
Ile Val Lys Gly Ala Ser Phe Asp Asn Asn Ile Ile Cys Ala Asp Glu
260 265 270

Lys Val Leu Ile Val Val Asp Ser Val Ala Asp Glu Leu Met Arg Leu
275 280 285
Met Glu Gly Gln His Ala Val Lys Leu Thr Ala Glu Gln Ala Gln Gln
290 295 300
Leu Gln Pro Val Leu Leu Lys Asn Ile Asp Glu Arg Gly Lys Gly Thr
305 310 315 320
Val Ser Arg Asp Trp Val Gly Arg Asp Ala Gly Lys Ile Ala Ala Ala
325 330 335
Ile Gly Leu Lys Val Pro Gln Glu Thr Arg Leu Leu Phe Val Glu Thr

340 345 350
Thr Ala Glu His Pro Phe Ala Val Thr Glu Leu Met Met Pro Val Leu
355 360 365
Pro Val Val Arg Val Ala Asn Val Ala Asp Ala Ile Ala Leu Ala Val
370 375 380
Lys Leu Glu Gly Gly Cys His His Thr Ala Ala Met His Ser Arg Asn
385 390 395 400
Ile Glu Asn Met Asn Gln Met Ala Asn Ala Ile Asp Thr Ser Ile Phe

405 410 415

Val Lys Asn Gly Pro Cys Ile Ala Gly Leu Gly Leu Gly Gly Glu Gly
420 425 430
Trp Thr Thr Met Thr Ile Thr Thr Pro Thr Gly Glu Gly Val Thr Ser
435 440 445
Ala Arg Thr Phe Val Arg Leu Arg Arg Cys Val Leu Val Asp Ala Phe
450 455 460
Arg Ile Val
465

<210> 20
<211> 495
<212> PRT
<213> E coli DH5a(pTDHBSR/pSNA)
<400> 20

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

Ala Lys Arg Lys Ala Val Leu Asn Lys Leu Ala Asp Leu Met Glu Ala
85 90 95
His Ala Glu Glu Leu Ala Leu Leu Glu Thr Leu Asp Thr Gly Lys Pro
100 105 110
Ile Arg His Ser Leu Arg Asp Asp Ile Pro Gly Ala Ala Arg Ala Ile
115 120 125
Arg Trp Tyr Ala Glu Ala Ile Asp Lys Val Tyr Gly Glu Val Ala Thr
130 135 140

Thr Ser Ser His Glu Leu Ala Met Ile Val Arg Glu Pro Val Gly Val

145 150 155 160

Ile Ala Ala Ile Val Pro Trp Asn Phe Pro Leu Leu Leu Thr Cys Trp

165 170 175

Lys Leu Gly Pro Ala Leu Ala Ala Gly Asn Ser Val Ile Leu Lys Pro

180 185 190

Ser Glu Lys Ser Pro Leu Ser Ala Ile Arg Leu Ala Gly Leu Ala Lys

195 200 205

Glu Ala Gly Leu Pro Asp Gly Val Leu Asn Val Val Thr Gly Phe Gly

210 215 220

His Glu Ala Gly Gln Ala Leu Ser Arg His Asn Asp Ile Asp Ala Ile

225 230 235 240

Ala Phe Thr Gly Ser Thr Arg Thr Gly Lys Gln Leu Leu Lys Asp Ala

245 250 255

Gly Asp Ser Asn Met Lys Arg Val Trp Leu Glu Ala Gly Gly Lys Ser

260 265 270

Ala Asn Ile Val Phe Ala Asp Cys Pro Asp Leu Gln Gln Ala Ala Ser

275 280 285

Ala Thr Ala Ala Gly Ile Phe Tyr Asn Gln Gly Gln Val Cys Ile Ala

290 295 300

Gly Thr Arg Leu Leu Leu Glu Glu Ser Ile Ala Asp Glu Phe Leu Ala

305 310 315 320

Leu Leu Lys Gln Gln Ala Gln Asn Trp Gln Pro Gly His Pro Leu Asp

325 330 335

Pro Ala Thr Thr Met Gly Thr Leu Ile Asp Cys Ala His Ala Asp Ser

340 345 350

Val His Ser Phe Ile Arg Glu Gly Glu Ser Lys Gly Gln Leu Leu Leu

355 360 365

Asp Gly Arg Asn Ala Gly Leu Ala Ala Ala Ile Gly Pro Thr Ile Phe

370 375 380

Val Asp Val Asp Pro Asn Ala Ser Leu Ser Arg Glu Glu Ile Phe Gly

385 390 395 400

Pro Val Leu Val Val Thr Arg Phe Thr Ser Glu Glu Gln Ala Leu Gln

405 410 415

Leu Ala Asn Asp Ser Gln Tyr Gly Leu Gly Ala Ala Val Trp Thr Arg

420 425 430

Asp Leu Ser Arg Ala His Arg Met Ser Arg Arg Leu Lys Ala Gly Ser

435 440 445

Val Phe Val Asn Asn Tyr Asn Asp Gly Asp Met Thr Val Pro Phe Gly

450 455 460

Gly Tyr Lys Gln Ser Gly Asn Gly Arg Asp Lys Ser Leu His Ala Leu

465 470 475 480

Glu Lys Phe Thr Glu Leu Lys Thr Ile Trp Ile Ser Leu Glu Ala

485 490 495

<210> 21

<211> 1404

<212> DNA

<213> E coli DH5a(pTDHBSR/pSNA)

<400>

21

atgaatcaac aggatattga acaggtggtg aaagcggtac tgctgaaaat gcaaagcagt 60

gacacgccgt ccgccgccgt tcatgagatg ggcgttttcg cgtccctgga tgacgccgtt 120

gcggcagcca aagtcgccca gcaagggtta aaaagcgtgg caatgcgcca gttagccatt 180

gctgccattc gtgaagcagg cgaaaaacac gccagagatt tagcggaact tgccgtcagt 240

gaaaccggca tggggcgcgt tgaagataaa tttgcaaaaa acgtcgctca ggcgcgcggc 300

acaccaggcg ttgagtgcct ctctccgcaa gtgctgactg gcgacaacgg cctgacccta 360

attgaaaacg caccctgggg cgtggtggct tcggtgacgc cttccactaa cccggcggca 420

accgtaatta acaacgccat cagcctgatt gccgcgggca acagcgtcat ttttgccccg 480

catccggcgg cgaaaaaagt ctcccagcgg gcgattacgc tgctcaacca ggcgattgtt 540

gccgcaggtg ggccggaaaa cttactggtt actgtggcaa atccggatat cgaaaccgcg 600

caacgcttgt tcaagtttcc gggtatcggc ctgctggtgg taaccggcgg cgaagcggta 660

gtagaagcgg cgcgtaaaca caccaataaa cgtctgattg ccgcaggcgc tggcaacccg 720

ccggtagtgg tggatgaaac cgccgacctc gcccgtgccg ctcagtccat cgtcaaaggc 780

gcttctttcg ataacaacat catttgtgcc gacgaaaagg tactgattgt tgttgatagc 840

gtagccgatg aactgatgcg tctgatggaa ggccagcacg cggtgaaact gaccgcagaa 900

caggcgcagc agctgcaacc ggtgttgctg aaaaatatcg acgagcgcgg aaaaggcacc 960

gtcagccgtg actgggttgg tcgcgacgca ggcaaaatcg cggcggcaat cggccttaaa 1020

gttccgcaag aaacgcgcct gctgtttgtg gaaaccaccg cagaacatcc gtttgccgtg 1080

actgaactga tgatgccggt gttgcccgtc gtgcgcgtcg ccaacgtggc ggatgccatt 1140

gcgctagcgg tgaaactgga aggcggttgc caccacacgg cggcaatgca ctcgcgcaac 1200

atcgaaaaca tgaaccagat ggcgaatgct attgatacca gcattttcgt taagaacgga 1260

ccgtgcattg ccgggctggg gctgggcggg gaaggctgga ccaccatgac catcaccacg 1320

ccaaccggtg aaggggtaac cagcgcgcgt acgtttgtcc gtctgcgtcg ctgtgtatta 1380

gtcgatgcgt ttcgcattgt ttaa 1404

<210> 22

<211> 1488

<212> DNA

<213> E coli DH5a(pTDHBSR/pSNA)

<400> 22

atgaattttc atcatctggc ttactggcag gataaagcgt taagtctcgc cattgaaaac 60

cgcttattta ttaacggtga atatactgct gcggcggaaa atgaaacctt tgaaaccgtt 120

gatccggtca cccaggcacc gctggcgaaa attgcccgcg gcaagagcgt cgatatcgac 180

cgtgcgatga gcgcagcacg cggcgtattt gaacgcggcg actggtcact ctcttctccg 240

gctaaacgta aagcggtact gaataaactc gccgatttaa tggaagccca cgccgaagag 300

ctggcactgc tggaaactct cgacaccggc aaaccgattc gtcacagtct gcgtgatgat 360

attcccggcg cggcgcgcgc cattcgctgg tacgccgaag cgatcgacaa agtgtatggc 420

gaagtggcga ccaccagtag ccatgagctg gcgatgatcg tgcgtgaacc ggtcggcgtg 480

attgccgcca tcgtgccgtg gaacttcccg ctgttgctga cttgctggaa actcggcccg 540

gcgctggcgg cgggaaacag cgtgattcta aaaccgtctg aaaaatcacc gctcagtgcg 600

attcgtctcg cggggctggc gaaagaagca ggcttgccgg atggtgtgtt gaacgtggtg 660

acgggttttg gtcatgaagc cgggcaggcg ctgtcgcgtc ataacgatat cgacgccatt 720

gcctttaccg gttcaacccg taccgggaaa cagctgctga aagatgcggg cgacagcaac 780

atgaaacgcg tctggctgga agcgggcggc aaaagcgcca acatcgtttt cgctgactgc 840

ccggatttgc aacaggcggc aagcgccacc gcagcaggca ttttctacaa ccagggacag 900

gtgtgcatcg ccggaacgcg cctgttgctg gaagagagca tcgccgatga attcttagcc 960

ctgttaaaac agcaggcgca aaactggcag ccgggccatc cacttgatcc cgcaaccacc 1020

atgggcacct taatcgactg cgcccacgcc gactcggtcc atagctttat tcgggaaggc 1080

gaaagcaaag ggcaactgtt gttggatggc cgtaacgccg ggctggctgc cgccatcggc 1140

ccgaccatct ttgtggatgt ggacccgaat gcgtccttaa gtcgcgaaga gattttcggt 1200

ccggtgctgg tggtcacgcg tttcacatca gaagaacagg cgctacagct tgccaacgac 1260

agccagtacg gccttggcgc ggcggtatgg acgcgcgacc tctcccgcgc gcaccgcatg 1320

agccgacgcc tgaaagccgg ttccgtcttc gtcaataact acaacgacgg cgatatgacc 1380

gtgccgtttg gcggctataa gcagagcggc aacggtcgcg acaaatccct gcatgccctt 1440

gaaaaattca ctgaactgaa aaccatctgg ataagcctgg aggcctga 1488

<210> 23

<211> 269

<212> PRT

<213> E coli DH5a(pTDHBSR/pSNA)

<400> 23

Met Thr His Lys Ala Thr Glu Ile Leu Thr Gly Lys Val Met Gln Lys
1 5 10 15

Ser Val Leu Ile Thr Gly Cys Ser Ser Gly Ile Gly Leu Glu Ser Ala
20 25 30

Leu Glu Leu Lys Arg Gln Gly Phe His Val Leu Ala Gly Cys Arg Lys
35 40 45

Pro Asp Asp Val Glu Arg Met Asn Ser Met Gly Phe Thr Gly Val Leu
50 55 60

Ile Asp Leu Asp Ser Pro Glu Ser Val Asp Arg Ala Ala Asp Glu Val
65 70 75 80

Ile Ala Leu Thr Asp Asn Cys Leu Tyr Gly Ile Phe Asn Asn Ala Gly
85 90 95

Phe Gly Met Tyr Gly Pro Leu Ser Thr Ile Ser Arg Ala Gln Met Glu
100 105 110

Gln Gln Phe Ser Ala Asn Phe Phe Gly Ala His Gln Leu Thr Met Arg
115 120 125

Leu Leu Pro Ala Met Leu Pro His Gly Glu Gly Arg Ile Val Met Thr
130 135 140
Ser Ser Val Met Gly Leu Ile Ser Thr Pro Gly Arg Gly Ala Tyr Ala
145 150 155 160
Ala Ser Lys Tyr Ala Leu Glu Ala Trp Ser Asp Ala Leu Arg Met Glu
165 170 175
Leu Arg His Ser Gly Ile Lys Val Ser Leu Ile Glu Pro Gly Pro Ile
180 185 190

Arg Thr Arg Phe Thr Asp Asn Val Asn Gln Thr Gln Ser Asp Lys Pro
195 200 205
Val Glu Asn Pro Gly Ile Ala Ala Arg Phe Thr Leu Gly Pro Glu Ala
210 215 220
Val Val Asp Lys Val Arg His Ala Phe Ile Ser Glu Lys Pro Lys Met
225 230 235 240
Arg Tyr Pro Val Thr Leu Val Thr Trp Ala Val Met Val Leu Lys Arg
245 250 255
Leu Leu Pro Gly Arg Val Met Asp Lys Ile Leu Gln Gly

260 265

<210> 24
<211> 810
<212> DNA
<213> E coli DH5a(pTDHBSR/pSNA)
<400> 24
atgactcata aagcaacgga gatcctgaca ggtaaagtta tgcaaaaatc ggtcttaatt 60
accggatgtt ccagtggaat tggcctggaa agcgcgctcg aattaaaacg ccagggtttt 120
catgtgctgg caggttgccg gaaaccggat gatgttgagc gcatgaacag catgggattt 180
accggcgtgt tgatcgatct ggattcacca gaaagtgttg atcgcgcagc cgacgaggtg 240
atcgccctga ccgataattg tctgtatggg atctttaaca atgccggatt cggcatgtat 300

ggcccccttt ccaccatcag ccgtgcgcag atggaacagc agttttccgc caacttttc 360
ggcgcacacc agctcaccat gcgcctgtta cccgcgatgt taccgcacgg tgaagggcgt 420
attgtgatga catcatcggt gatgggatta atctccacgc cgggtcgtgg cgcttacgcg 480
gccagtaaat atgcgctgga ggcgtggtca gatgcactgc gcatggagct gcgccacagc 540

ggaattaaag tcagcctgat cgaacccggt cccattcgta ctcgcttcac cgacaacgtc 600

aaccagacgc aaagtgataa accagtcgaa aatcccggca tcgccgcccg ctttacgttg 660

ggaccggaag cggtggtgga caaagtacgc catgctttta ttagcgagaa gccgaagatg 720

cgctatccgg tgacgctggt gacctgggcg gtaatggtgc ttaagcgcct gctgccgggg 780

cgcgtgatgg acaaaatatt gcaggggtga 810

<210> 25

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> YbbO-F primer

<400> 25

cgggtaccga ggaggtaata atatgactca taaagcaacg gagatcc 47

<210> 26

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> YbbO-R primer

<400> 26

cgctcgagtt acccctgcaa tattttgtcc atc 33

<210> 27

<211> 5144

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pBBR1MCS2

<400> 27

accttcggga gcgcctgaag cccgttctgg acgccctggg gccgttgaat cgggatatgc 60

aggccaaggc cgccgcgatc atcaaggccg tgggcgaaaa gctgctgacg gaacagcggg 120

aagtccagcg ccagaaacag gcccagcgcc agcaggaacg cgggcgcgca catttccccg 180

aaaagtgcca cctgggatga atgtcagcta ctgggctatc tggacaaggg aaaacgcaag 240

cgcaaagaga aagcaggtag cttgcagtgg gcttacatgg cgatagctag actgggcggt 300

tttatggaca gcaagcgaac cggaattgcc agctggggcg ccctctggta aggttgggaa 360

gccctgcaaa gtaaactgga tggctttctt gccgccaagg atctgatggc gcaggggatc 420

aagatctgat caagagacag gatgaggatc gtttcgcatg attgaacaag atggattgca 480

cgcaggttct ccggccgctt gggtggagag gctattcggc tatgactggg cacaacagac 540

aatcggctgc tctgatgccg ccgtgttccg gctgtcagcg caggggcgcc cggttctttt 600

tgtcaagacc gacctgtccg gtgccctgaa tgaactgcag gacgaggcag cgcggctatc 660

gtggctggcc acgacgggcg ttccttgcgc agctgtgctc gacgttgtca ctgaagcggg 720

aagggactgg ctgctattgg gcgaagtgcc ggggcaggat ctcctgtcat ctcaccttgc 780

tcctgccgag aaagtatcca tcatggctga tgcaatgcgg cggctgcata cgcttgatcc 840

ggctacctgc ccattcgacc accaagcgaa acatcgcatc gagcgagcac gtactcggat 900

ggaagccggt cttgtcgatc aggatgatct ggacgaagag catcaggggc tcgcgccagc 960

cgaactgttc gccaggctca aggcgcgcat gcccgacggc gaggatctcg tcgtgaccca 1020

tggcgatgcc tgcttgccga atatcatggt ggaaaatggc cgcttttctg gattcatcga 1080

ctgtggccgg ctgggtgtgg cggaccgcta tcaggacata gcgttggcta cccgtgatat 1140

tgctgaagag cttggcggcg aatgggctga ccgcttcctc gtgctttacg gtatcgccgc 1200

tcccgattcg cagcgcatcg ccttctatcg ccttcttgac gagttcttct gagcgggact 1260

ctggggttcg aaatgaccga ccaagcgacg cccaacctgc catcacgaga tttcgattcc 1320

accgccgcct tctatgaaag gttgggcttc ggaatcgttt tccgggacgc cggctggatg 1380

atcctccagc gcggggatct catgctggag ttcttcgccc accccccatgg gcaaatatta 1440

tacgcaaggc gacaaggtgc tgatgccgct ggcgattcag gttcatcatg ccgtttgtga 1500

tggcttccat gtcggcagaa tgcttaatga attacaacag tttttatgca tgcgcccaat 1560

acgcaaaccg cctctccccg cgcgttggcc gattcattaa tgcagctggc acgacaggtt 1620

tcccgactgg aaagcgggca gtgagcgcaa cgcaattaat gtgagttagc tcactcatta 1680

ggcaccccag gctttacact ttatgcttcc ggctcgtatg ttgtgtggaa ttgtgagcgg 1740

ataacaattt cacacaggaa acagctatga ccatgattac gccaagcgcg caattaaccc 1800

tcactaaagg gaacaaaagc tgggtaccgg gccccccctc gaggtcgacg gtatcgataa 1860

gcttgatatc gaattcctgc agcccggggg atccactagt tctagagcgg ccgccaccgc 1920

ggtggagctc caattcgccc tatagtgagt cgtattacgc gcgctcactg gccgtcgttt 1980

tacaacgtcg tgactgggaa aaccctggcg ttacccaact taatcgcctt gcagcacatc 2040

ccccttcgc cagctggcgt aatagcgaag aggcccgcac cgatcgccct tcccaacagt 2100

tgcgcagcct gaatggcgaa tggaaattgt aagcgttaat attttgttaa aattcgcgtt 2160

aaatttttgt taaatcagct cattttttaa ccaataggcc gactgcgatg agtggcaggg 2220

cggggcgtaa ttttttttaag gcagttattg gtgcccttaa acgcctggtg ctacgcctga 2280

ataagtgata ataagcggat gaatggcaga aattcgaaag caaattcgac ccggtcgtcg 2340

gttcagggca gggtcgttaa atagccgctt atgtctattg ctggtttacc ggtttattga 2400

ctaccggaag cagtgtgacc gtgtgcttct caaatgcctg aggccagttt gctcaggctc 2460

tccccgtgga ggtaataatt gacgatatga tcatttattc tgcctcccag agcctgataa 2520

aaacggtgaa tccgttagcg aggtgccgcc ggcttccatt caggtcgagg tggcccggct 2580

ccatgcaccg cgacgcaacg cggggaggca gacaaggtat agggcggcga ggcggctaca 2640

gccgatagtc tggaacagcg cacttacggg ttgctgcgca acccaagtgc taccggcgcg 2700

gcagcgtgac ccgtgtcggc ggctccaacg gctcgccatc gtccagaaaa cacggctcat 2760

cgggcatcgg caggcgctgc tgcccgcgcc gttcccattc ctccgtttcg gtcaaggctg 2820

gcaggtctgg ttccatgccc ggaatgccgg gctggctggg cggctcctcg ccggggccgg 2880

tcggtagttg ctgctcgccc ggatacaggg tcgggatgcg gcgcaggtcg ccatgcccca 2940

acagcgattc gtcctggtcg tcgtgatcaa ccaccacggc ggcactgaac accgacaggc 3000

gcaactggtc gcggggctgg ccccacgcca cgcggtcatt gaccacgtag gccgacacgg 3060

tgccggggcc gttgagcttc acgacggaga tccagcgctc ggccaccaag tccttgactg 3120

cgtattggac cgtccgcaaa gaacgtccga tgagcttgga aagtgtcttc tggctgacca 3180

ccacggcgtt ctggtggccc atctgcgcca cgaggtgatg cagcagcatt gccgccgtgg 3240

gtttcctcgc aataagcccg gcccacgcct catgcgcttt gcgttccgtt tgcacccagt 3300

gaccgggctt gttcttggct tgaatgccga tttctctgga ctgcgtggcc atgcttatct 3360

ccatgcggta gggtgccgca cggttgcggc accatgcgca atcagctgca acttttcggc 3420

agcgcgacaa caattatgcg ttgcgtaaaa gtggcagtca attacagatt ttctttaacc 3480

tacgcaatga gctattgcgg ggggtgccgc aatgagctgt tgcgtacccc ccttttttaa 3540

gttgttgatt tttaagtctt tcgcatttcg ccctatatct agttctttgg tgcccaaaga 3600

agggcacccc tgcggggttc ccccacgcct tcggcgcggc tccccctccg gcaaaaagtg 3660

gcccctccgg ggcttgttga tcgactgcgc ggccttcggc cttgcccaag gtggcgctgc 3720

ccccttggaa cccccgcact cgccgccgtg aggctcgggg ggcaggcggg cgggcttcgc 3780

cttcgactgc ccccactcgc ataggcttgg gtcgttccag gcgcgtcaag gccaagccgc 3840

tgcgcggtcg ctgcgcgagc cttgacccgc cttccacttg gtgtccaacc ggcaagcgaa 3900

gcgcgcaggc cgcaggccgg aggcttttcc ccagagaaaa ttaaaaaaat tgatggggca 3960

aggccgcagg ccgcgcagtt ggagccggtg ggtatgtggt cgaaggctgg gtagccggtg 4020

ggcaatccct gtggtcaagc tcgtgggcag gcgcagcctg tccatcagct tgtccagcag 4080

ggttgtccac gggccgagcg aagcgagcca gccggtggcc gctcgcggcc atcgtccaca 4140

tatccacggg ctggcaaggg agcgcagcga ccgcgcaggg cgaagcccgg agagcaagcc 4200

cgtagggcgc cgcagccgcc gtaggcggtc acgactttgc gaagcaaagt ctagtgagta 4260

tactcaagca ttgagtggcc cgccggaggc accgccttgc gctgcccccg tcgagccggt 4320

tggacaccaa aagggagggg caggcatggc ggcatacgcg atcatgcgat gcaagaagct 4380

ggcgaaaatg ggcaacgtgg cggccagtct caagcacgcc taccgcgagc gcgagacgcc 4440

caacgctgac gccagcagga cgccagagaa cgagcactgg gcggccagca gcaccgatga 4500

agcgatgggc cgactgcgcg agttgctgcc agagaagcgg cgcaaggacg ctgtgttggc 4560

ggtcgagtac gtcatgacgg ccagcccgga atggtggaag tcggccagcc aagaacagca 4620

ggcggcgttc ttcgagaagg cgcacaagtg gctggcggac aagtacgggg cggatcgcat 4680

cgtgacggcc agcatccacc gtgacgaaac cagcccgcac atgaccgcgt tcgtggtgcc 4740

gctgacgcag gacggcaggc tgtcggccaa ggagttcatc ggcaacaaag cgcagatgac 4800

ccgcgaccag accacgtttg cggccgctgt ggccgatcta gggctgcaac ggggcatcga 4860

gggcagcaag gcacgtcaca cgcgcattca ggcgttctac gaggccctgg agcggccacc 4920

agtgggccac gtcaccatca gcccgcaagc ggtcgagcca cgcgcctatg caccgcaggg 4980

attggccgaa aagctgggaa tctcaaagcg cgttgagacg ccggaagccg tggccgaccg 5040

gctgacaaaa gcggttcggc aggggtatga gcctgcccta caggccgccg caggagcgcg 5100

tgagatgcgc aagaaggccg atcaagccca agagacggcc cgag 5144

<210> 28

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> KO YbbO-F primer

<400> 28

gtttattgcc gactggatgg cgaagcagtt gcagccttta gtaaatcatg attccgggga 60

tccgtcgacc 70

<210> 29

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> KO YbbO-R primer

<400> 29

gacatggggg cttaagcgcg cgcttcaact cacccctgca atattttgtc tgtaggctgg 60

agctgcttcg 70

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> KO YbbOCF-F

<400> 30

gcctgcaaac tatggtcgcc 20

<210> 31

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> KO YbbOCF-R

<400> 31

cagcaccgga gtggtcatcg 20

<210> 32

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> KO EutE-F primer

<400> 32

gtggtgtctg gcggtcaggt aattttccac aaataaggca gaacatcatg attccgggga 60

tccgtcgacc 70

<210> 33

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223

> KO EutE-R primer

<400> 33

attgttcgtc gtgcgccatc tgttactcct taaacaatgc gaaacgcatc tgtaggctgg 60

agctgcttcg 70

<210> 34

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> KO EutECF-F

<400> 34

ggtaatcctg acgggcaatg c 21

<210> 35

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> KO EutECF-R

<400> 35

cgacaccaca tcgcaggtgc 20

<210> 36

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> KO PuuC-F primer

<400> 36

acgttcacaa actgcatata tctgatagac gtgaaacagg agtcataatg atgggaatta 60

gccatggtcc 70

<210> 37

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> KO PuuC-R primer

<400> 37

cgtagtaact gctggtatgt tcggtcattt caggcctcca ggcttatcca tgtaggctgg 60

agctgcttcg 70

<210> 38

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> KO PuuCCF-F

<400> 38

cagaggcggc ttgaaggatg 20

<210> 39

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> KO PuuCCF-R

<400> 39

gtgattgact cattcagcgt gtcg 24

<210> 40

<211> 5959

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pBBR2-ybbO

<400> 40

accttcggga gcgcctgaag cccgttctgg acgccctggg gccgttgaat cgggatatgc 60

aggccaaggc cgccgcgatc atcaaggccg tgggcgaaaa gctgctgacg gaacagcggg 120

aagtccagcg ccagaaacag gcccagcgcc agcaggaacg cgggcgcgca catttccccg 180

aaaagtgcca cctgggatga atgtcagcta ctgggctatc tggacaaggg aaaacgcaag 240

cgcaaagaga aagcaggtag cttgcagtgg gcttacatgg cgatagctag actgggcggt 300

tttatggaca gcaagcgaac cggaattgcc agctggggcg ccctctggta aggttgggaa 360

gccctgcaaa gtaaactgga tggctttctt gccgccaagg atctgatggc gcaggggatc 420

aagatctgat caagagacag gatgaggatc gtttcgcatg attgaacaag atggattgca 480

cgcaggttct ccggccgctt gggtggagag gctattcggc tatgactggg cacaacagac 540

aatcggctgc tctgatgccg ccgtgttccg gctgtcagcg caggggcgcc cggttctttt 600

tgtcaagacc gacctgtccg gtgccctgaa tgaactgcag gacgaggcag cgcggctatc 660

gtggctggcc acgacgggcg ttccttgcgc agctgtgctc gacgttgtca ctgaagcggg 720

aagggactgg ctgctattgg gcgaagtgcc ggggcaggat ctcctgtcat ctcaccttgc 780

tcctgccgag aaagtatcca tcatggctga tgcaatgcgg cggctgcata cgcttgatcc 840

ggctacctgc ccattcgacc accaagcgaa acatcgcatc gagcgagcac gtactcggat 900

ggaagccggt cttgtcgatc aggatgatct ggacgaagag catcaggggc tcgcgccagc 960

cgaactgttc gccaggctca aggcgcgcat gcccgacggc gaggatctcg tcgtgaccca 1020

tggcgatgcc tgcttgccga atatcatggt ggaaaatggc cgcttttctg gattcatcga 1080

ctgtggccgg ctgggtgtgg cggaccgcta tcaggacata gcgttggcta cccgtgatat 1140

tgctgaagag cttggcggcg aatgggctga ccgcttcctc gtgctttacg gtatcgccgc 1200

tcccgattcg cagcgcatcg ccttctatcg ccttcttgac gagttcttct gagcgggact 1260

ctggggttcg aaatgaccga ccaagcgacg cccaacctgc catcacgaga tttcgattcc 1320

accgccgcct tctatgaaag gttgggcttc ggaatcgttt tccgggacgc cggctggatg 1380

atcctccagc gcggggatct catgctggag ttcttcgccc acccccatgg gcaaatatta 1440

tacgcaaggc gacaaggtgc tgatgccgct ggcgattcag gttcatcatg ccgtttgtga 1500

tggcttccat gtcggcagaa tgcttaatga attacaacag tttttatgca tgcgcccaat 1560

acgcaaaccg cctctccccg cgcgttggcc gattcattaa tgcagctggc acgacaggtt 1620

tcccgactgg aaagcgggca gtgagcgcaa cgcaattaat gtgagttagc tcactcatta 1680

ggcaccccag gctttacact ttatgcttcc ggctcgtatg ttgtgtggaa ttgtgagcgg 1740

ataacaattt cacacaggaa acagctatga ccatgattac gccaagcgcg caattaaccc 1800

tcactaaagg gaacaaaagc tgggtaccga ggaggtaata atatgactca taaagcaacg 1860

gagatcctga caggtaaagt tatgcaaaaa tcggtcttaa ttaccggatg ttccagtgga 1920

attggcctgg aaagcgcgct cgaattaaaa cgccagggtt ttcatgtgct ggcaggttgc 1980

cggaaaccgg atgatgttga gcgcatgaac agcatgggat ttaccggcgt gttgatcgat 2040

ctggattcac cagaaagtgt tgatcgcgca gccgacgagg tgatcgccct gaccgataat 2100

tgtctgtatg ggatctttaa caatgccgga ttcggcatgt atggcccccc ttccaccatc 2160

agccgtgcgc agatggaaca gcagttttcc gccaactttt tcggcgcaca ccagctcacc 2220

atgcgcctgt tacccgcgat gttaccgcac ggtgaagggc gtattgtgat gacatcatcg 2280

gtgatgggat taatctccac gccgggtcgt ggcgcttacg cggccagtaa atatgcgctg 2340

gaggcgtggt cagatgcact gcgcatggag ctgcgccaca gcggaattaa agtcagcctg 2400

atcgaacccg gtcccattcg tactcgcttc accgacaacg tcaaccagac gcaaagtgat 2460

aaaccagtcg aaaatcccgg catcgccgcc cgctttacgt tgggaccgga agcggtggtg 2520

gacaaagtac gccatgcttt tattagcgag aagccgaaga tgcgctatcc ggtgacgctg 2580

gtgacctggg cggtaatggt gcttaagcgc ctgctgccgg ggcgcgtgat ggacaaaata 2640

ttgcaggggt aactcgaggt cgacggtatc gataagcttg atatcgaatt cctgcagccc 2700

gggggatcca ctagttctag agcggccgcc accgcggtgg agctccaatt cgccctatag 2760

tgagtcgtat tacgcgcgct cactggccgt cgttttacaa cgtcgtgact gggaaaaccc 2820

tggcgttacc caacttaatc gccttgcagc acatcccccc ttcgccagct ggcgtaatag 2880

cgaagaggcc cgcaccgatc gcccttccca acagttgcgc agcctgaatg gcgaatggaa 2940

attgtaagcg ttaatatttt gttaaaattc gcgttaaatt tttgttaaat cagctcattt 3000

tttaaccaat aggccgactg cgatgagtgg cagggcgggg cgtaatttttt ttaaggcagt 3060

tattggtgcc cttaaacgcc tggtgctacg cctgaataag tgataataag cggatgaatg 3120

gcagaaattc gaaagcaaat tcgacccggt cgtcggttca gggcagggtc gttaaatagc 3180

cgcttatgtc tattgctggt ttaccggttt attgactacc ggaagcagtg tgaccgtgtg 3240

cttctcaaat gcctgaggcc agtttgctca ggctctcccc gtggaggtaa taattgacga 3300

tatgatcatt tattctgcct cccagagcct gataaaaacg gtgaatccgt tagcgaggtg 3360

ccgccggctt ccattcaggt cgaggtggcc cggctccatg caccgcgacg caacgcgggg 3420

aggcagacaa ggtatagggc ggcgaggcgg ctacagccga tagtctggaa cagcgcactt 3480

acgggttgct gcgcaaccca agtgctaccg gcgcggcagc gtgacccgtg tcggcggctc 3540

caacggctcg ccatcgtcca gaaaacacgg ctcatcgggc atcggcaggc gctgctgccc 3600

gcgccgttcc cattcctccg tttcggtcaa ggctggcagg tctggttcca tgcccggaat 3660

gccgggctgg ctgggcggct cctcgccggg gccggtcggt agttgctgct cgcccggata 3720

cagggtcggg atgcggcgca ggtcgccatg ccccaacagc gattcgtcct ggtcgtcgtg 3780

atcaaccacc acggcggcac tgaacaccga caggcgcaac tggtcgcggg gctggcccca 3840

cgccacgcgg tcattgacca cgtaggccga cacggtgccg gggccgttga gcttcacgac 3900

ggagatccag cgctcggcca ccaagtcctt gactgcgtat tggaccgtcc gcaaagaacg 3960

tccgatgagc ttggaaagtg tcttctggct gaccaccacg gcgttctggt ggcccatctg 4020

cgccacgagg tgatgcagca gcattgccgc cgtgggtttc ctcgcaataa gcccggccca 4080

cgcctcatgc gctttgcgtt ccgtttgcac ccagtgaccg ggcttgttct tggcttgaat 4140

gccgatttct ctggactgcg tggccatgct tatctccatg cggtagggtg ccgcacggtt 4200

gcggcaccat gcgcaatcag ctgcaacttt tcggcagcgc gacaacaatt atgcgttgcg 4260

taaaagtggc agtcaattac agattttctt taacctacgc aatgagctat tgcgggggggt 4320

gccgcaatga gctgttgcgt acccccccttt tttaagttgt tgatttttaa gtctttcgca 4380

tttcgcccta tatctagttc tttggtgccc aaagaagggc acccctgcgg ggttccccca 4440

cgccttcggc gcggctcccc ctccggcaaa aagtggcccc tccggggctt gttgatcgac 4500

tgcgcggcct tcggccttgc ccaaggtggc gctgcccccct tggaaccccc gcactcgccg 4560

ccgtgaggct cgggggggcag gcgggcgggc ttcgccttcg actgccccca ctcgcatagg 4620

cttgggtcgt tccaggcgcg tcaaggccaa gccgctgcgc ggtcgctgcg cgagccttga 4680

cccgccttcc acttggtgtc caaccggcaa gcgaagcgcg caggccgcag gccggaggct 4740

tttccccaga gaaaattaaa aaaattgatg gggcaaggcc gcaggccgcg cagttggagc 4800

cggtgggtat gtggtcgaag gctgggtagc cggtgggcaa tccctgtggt caagctcgtg 4860

ggcaggcgca gcctgtccat cagcttgtcc agcagggttg tccacgggcc gagcgaagcg 4920

agccagccgg tggccgctcg cggccatcgt ccacatatcc acgggctggc aagggagcgc 4980

agcgaccgcg cagggcgaag cccggagagc aagcccgtag ggcgccgcag ccgccgtagg 5040

cggtcacgac tttgcgaagc aaagtctagt gagtatactc aagcattgag tggcccgccg 5100

gaggcaccgc cttgcgctgc ccccgtcgag ccggttggac accaaaaggg aggggcaggc 5160

atggcggcat acgcgatcat gcgatgcaag aagctggcga aaatgggcaa cgtggcggcc 5220

agtctcaagc acgcctaccg cgagcgcgag acgcccaacg ctgacgccag caggacgcca 5280

gagaacgagc actgggcggc cagcagcacc gatgaagcga tgggccgact gcgcgagttg 5340

ctgccagaga agcggcgcaa ggacgctgtg ttggcggtcg agtacgtcat gacggccagc 5400

ccggaatggt ggaagtcggc cagccaagaa cagcaggcgg cgttcttcga gaaggcgcac 5460

aagtggctgg cggacaagta cggggcggat cgcatcgtga cggccagcat ccaccgtgac 5520

gaaaccagcc cgcacatgac cgcgttcgtg gtgccgctga cgcaggacgg caggctgtcg 5580

gccaaggagt tcatcggcaa caaagcgcag atgacccgcg accagaccac gtttgcggcc 5640

gctgtggccg atctagggct gcaacggggc atcgagggca gcaaggcacg tcacacgcgc 5700

attcaggcgt tctacgaggc cctggagcgg ccaccagtgg gccacgtcac catcagcccg 5760

caagcggtcg agccacgcgc ctatgcaccg cagggattgg ccgaaaagct gggaatctca 5820

aagcgcgttg agacgccgga agccgtggcc gaccggctga caaaagcggt tcggcagggg 5880

tatgagcctg ccctacaggc cgccgcagga gcgcgtgaga tgcgcaagaa ggccgatcaa 5940

gcccaagaga cggcccgag 5959