(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0041910
(43) 공개일자 2011년04월22일

(51) Int. Cl.
C12N 1/21 (2006.01) *C12N 9/90* (2006.01)
C12P 19/02 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0098938
(22) 출원일자 2009년10월16일
심사청구일자 2009년10월16일

(71) 출원인
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 가좌동 900
(72) 발명자
김선원
경상남도 사천시 사남면 월성리 푸르지오아파트 102-102
이숙희
경상남도 창녕군 도천면 어만리 502번지
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
리앤목특허법인

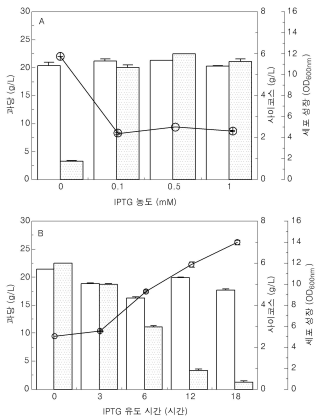
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 사이코스 3-에피머라제 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 대장균 및 그를 이용하여 사이코스를 생산하는 방법

(57) 요 약

본 발명의 하나이상의 구체예는 과당을 사이코스로의 전환을 촉매하는 활성을 가진 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 대장균 및 그를 이용하여 사이코스를 생산하는 방법을 제공한다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

장희정

경상남도 진주시 주약동 111-10번지 305호

윤상활

충청남도 부여군 부여읍 동남리 268-1번지 신안빌라 B동 202호

고민수

서울특별시 용산구 이태원2동 227-16번지

특허청구의 범위

청구항 1

과당을 사이코스로의 전환을 촉매하는 활성을 가진 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 대장균로서, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1의 아미노산 서열을 코딩하는 것인 대장균.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 대장균은 6-포스포프락토키나제를 코딩하는 유전자, rpiB, alsR, alsB, alsA, alsC, alsE, alsK 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나이상의 유전자로 이루어진 하나의 영역이 불활성화된 것인 대장균.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 따른 대장균을 과당을 포함하는 배지 중에서 배양하는 단계; 및

상기 배양물로부터 사이코스를 회수하는 단계;를 포함하는 사이코스를 생산방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 과당은 1 % (w/v) 내지 35 % (w/v)의 농도인 것인 방법.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 배양은 과당을 사이코스로의 전환을 촉매하는 활성을 가진 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 발현을 유도하는 물질을 첨가하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 6

제3항에 있어서, 상기 과당을 포함하는 배지 중에서 배양하는 단계 전에,

제1항 또는 제2항에 따른 대장균을 과당을 포함하지 않는 배지 중에서 배양하여 과당을 사이코스로의 전환을 촉매하는 활성을 가진 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현시키는 단계; 및

배양물로부터 대장균을 회수하는 단계;를 더 포함하고,

과당을 포함하는 배지 중에서 배양하는 단계에서 사용되는 대장균은 상기 회수된 대장균인 것인 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 회수된 대장균은 상기 배지에서 OD_{600}이 5 내지 50가 되도록 하는 농도로 접종하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 과당은 10 % (w/v) 내지 80 % (w/v)의 농도인 것인 방법.

청구항 9

제3항에 있어서, 상기 배양물로부터 대장균을 분리하는 단계를 더 포함하는 것인 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 분리된 대장균을 상기 과당을 포함하는 배지 중에서 배양하는 것인 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 분리된 대장균은 상기 배지에서 OD_{600}이 5 내지 50가 되도록 하는 농도로 접종하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 과당은 10 % (w/v) 내지 80 % (w/v)의 농도인 것인 방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명의 하나이상의 구체예는 과당을 사이코스로의 전환을 촉매하는 활성을 가진 효소 (이하 사이코스 3-에피머라제 (D-psicose 3-epimerase)라 함)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 대장균 및 그를 이용하여 사이코스를 생산하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 사이코스 (D-psicose)는 과당 (D-fructose)의 3번 탄소의 에피머 (epimer)로써 일반 당류들처럼 감미를 가지지만 인체내에서 대사가 되지 않아서 거의 칼로리는 제로에 가까워 당뇨 및 비만환자에게 설탕 대체 기능성 감미료로 사용될 수 있는 기능성 당이다. 또한 간에서의 지질합성에 관여하는 효소 활성을 억제해서 복부비만을 감소시키는 기능을 가지고 있고 당뇨병과 동맥경화 치료제로 현재 연구 중에 있는 당이다.

[0003] 이처럼 사이코스는 감미료로 각광받으면서 식품 산업 분야에 있어 사이코스를 효율적으로 생산할 수 있는 방법에 대한 개발의 필요성이 점점 높아지고 있다. 사이코스는 천연물질 내에는 당밀 처리 과정 또는 포도당 이성화 반응과정 중에 매우 소량 존재하기에 기존의 사이코스 생산은 주로 화학적 과정을 거쳐 생산되어졌다. 빌릭 (Bilik)등은 몰리브산 이온의 촉매작용을 활용하여 과당으로부터 사이코스를 생산하는 기술을 개발하였다. 맥도날드 (McDonald)는 1,2:4,5-디-o-이소프로필리덴-베타-D-파p프락토피라노즈 (1,2:4,5-di-o-isppropylidene-bata-D-fructopyranose)로부터 3단계의 화학적 처리과정으로 사이코스를 생산하였다. 또한, 도너 (Doner)는 에탄올과 트리에틸아민과 함께 과당을 가열하는 방법으로 사이코스를 생산하였다. 그러나, 이들 화학적 방법에 의한 사이코스 생산은 비용이 많이 소모되는 반면 그 생산효율은 낮고 또한 부산물의 과량 발생한다는 문제점이 있다.

[0004] 생물학적 방법에 의한 사이코스 생산방법으로 이즈모리 (Ken Izumori)등은 미생물 세포반응을 활용하여 갈락시톨 (galacitol), 디-타가토스 (D-tagatose) 또는 디-탈리톨 (D-talitol) 등으로부터 사이코스를 생산할 수 있다는 것을 보였다. 그러나, 이 기질들 또한 자연계에서 비교적 희귀한 당 또는 당알코올로 그 원가가 높다는 단점이 있다. 최근까지 알려진 가장 효율적인 사이코스 생산방법은 분리미생물 슈도모나스 치코리 ST-24 (Pseudomonas cichorii ST-24)의 디-타가토스-3-에피머화 효소 (D-tagatose-3-epimerase)를 재조합 대장균에서 생산하고 정제하여 과당을 사이코스로 효소 전환하는 방법이다. 이즈모리 등은 디-타가토스-3-에피머화 효소를 고정화시킨 반응시스템으로 약 25%의 전환율로 사이코스를 생산하였다.

[0005] 이러한 종래 기술에 의하면, 과당으로부터 사이코스를 생산하기 위해서 효소를 정제하고 그 정제된 효소를 고정화하여 사이코스 생산성을 높이는 방향으로 연구되어왔다. 이처럼 효소를 정제하는 과정에는 시간 및 비용이 많이 요구되는 것이 현실이다.

[0006] 따라서, 효소 정제의 과정을 생략하여 제조원가가 낮고 사이코스를 높은 효율로 생산할 수 있는 균주 및 이를 이용하여 사이코스를 생산하는 방법이 요구되고 있다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0007] 본 발명의 일 구체예는 과당을 사이코스로의 전환을 촉매하는 활성을 가진 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 대장균을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 구체예는 상기 대장균을 이용하여 사이코스를 생산방법을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

[0009] 본 발명의 일 구체예는 과당을 사이코스로의 전환을 촉매하는 활성을 가진 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 대장균을 제공한다.

[0010] 상기 과당을 사이코스로의 전환을 촉매하는 활성을 가진 효소는 아그로박테리움 투메파시엔스 유래 효소일 수 있다. 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1의 아미노산 서열을 코딩하는 것일 수 있다. 상기 폴리뉴클레오티드는 예를 들면, 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열을 갖는 것일 수 있다.

[0011] 상기 대장균은 내재적 6-포스포프락토키나제를 코딩하는 유전자 및 알로즈 대사 오페론 (allose metabolic operon)으로 이루어진 하나의 영역이 불활성화된 것일 수 있다. 상기 6-포스포프락토키나제를 코딩하는 유전자는 서열번호 3의 아미노산 서열을 코딩하는 것일 수 있다. 상기 6-포스포프락토키나제를 코딩하는 유전자는 예를 들면, 서열번호 4의 뉴클레오티드 서열을 코딩하는 것일 수 있다. 상기 알로즈 대사 오페론은 rpiB, alsR, alsB, alsA, alsC, alsE, alsK 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나이상의 유전자가 불활성화된 것일 수 있다. 상기 rpiB, alsR, alsB,alsA, alsC, alsE, 및 alsK 유전자는 서열번호 5, 7, 9, 11, 13, 15 및 17의 아미노산 서열을 각각 코딩하는 것일 수 있다. 상기 rpiB, alsR, alsB,alsA, alsC, alsE, 및 alsK 유전자는 예를 들면, 서열번호 6, 8, 10, 12, 14, 16 및 18의 뉴클레오티드 서열을 각각 갖는 것일 수 있다. 용어 "불활성화"란 상기 유전자의 발현이 감소되거나 발현이 이루어지지 않는 것을 의미한다. 상기 "불활성화"는 당업계에 알려진 방법에 의하여 이루어질 수 있다. 예를 들면, 상동 재조합 (homologuous recombination)에 의하여 불활성화된 것일 수 있다. 상기 상동 재조합은 예를 들면, 전이인자 돌연변이 (transposon mutagenesis) 또는 P1 형질도입 (P1 transduction)에 의하여 매개된 것일 수 있다.

[0012] 상기 대장균은 BL21, K-12, DH5α, W3110 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다. 상기 대장균 K-12는 대장균 K-12 MG1655 균주일 수 있다.

[0013] 상기 폴리뉴클레오티드는 당업계에 알려진 임의의 방법에 의하여 도입되는 것일 수 있다. 상기 폴리뉴클레오티드는 예를 들면, 상기 폴리뉴클레오티드 자체로 또는 벡터에 의하여 도입되는 것일 수 있다. 용어 "벡터"란 연결되어 있는 다른 핵산을 전달할 수 있는 핵산 분자를 의미한다. 특정한 유전자의 도입을 매개하는 핵산 서열이라는 관점에서, 본 발명에서 벡터는, 핵산 구조체, 및 카세트와 상호 교환 가능하게 사용될 수 있는 것으로 해석된다. 벡터에는 예를 들면 플라스미드 또는 바이러스 유래 벡터 등이 포함된다. 플라스미드란 추가의 DNA가 연결될 수 있는 원형의 이중가닥 DNA 고리를 말한다. 본 발명에서 사용되는 벡터에는 예를 들면, 플라스미드 발현벡터, 바이러스 발현벡터 (예, 복제결함 레트로바이러스, 아데노바이러스, 및 아데노 연관 바이러스) 및 이들과 동등한 기능을 수행할 수 있는 바이러스 벡터가 포함되나 이들에 한정되는 것은 아니다. 상기 벡터는 예를 들면, 도 8에 나타낸 제한효소 지도를 갖는 것일 수 있다.

[0014] 상기 폴리뉴클레오티드는 프로모터 및 전사종결인자로 이루어지는 하나 이상의 요소와 작동가능하게 연결되어 있는 것일 수 있다. 또한, 상기 폴리뉴클레오티드는 조절 요소 (regulatory element)와 작동가능하게 연결된 것일 수 있다. 예를 들면, 상기 조절 요소는 화학물질 유도성 요소 (inducible element) 및 온도 민감성 요소 (temperature sensitive element)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다. 상기 화학물질 유도성 요소 (inducible element)는 lac 오페론 및 trc 프로모터로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다. 상기 trc 프로모터는 키메라 프로모터로서 -35 영역은 trp (트립토판) 프로모터 부분이고 -10 영역과 오퍼레이터 영역은 lacUV5 부분을 갖는 것일 수 있다. 상기 trc 프로모터는 서열번호 19의 뉴클레오티드 서열을 갖는 것일 수 있다.

[0015] 상기 대장균은 예를 들면, 대장균 K-12에 서열번호 1의 아미노산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 도입된 대장균일 수 있다. 상기 대장균 K-12는 예를 들면, 대장균 K-12 MG1655 균주일 수 있다. 상기 폴리뉴클레오티드는 도 8의 제한효소 지도를 갖는 벡터에 의하여 형질전환에 의하여 상기 대장균에 도입된 것일 수 있다.

[0016] 본 발명의 다른 구체예는, 상기 대장균을 과당을 포함하는 배지 중에서 배양하는 단계; 및 상기 배양물로부터 사이코스를 회수하는 단계;를 포함하는 사이코스를 생산방법을 제공한다.

[0017] 상기 방법은 과당을 포함하는 배지 중에서 배양하는 단계를 포함한다. 상기 배양은 대장균 배양에 사용되는 알려진 조건이 사용될 수 있다. 예를 들면, 36℃ 내지 38℃, 예를 들면 37℃에서 배양하는 것일 수 있다. 상기 배지는 2YT 배지 및 LB 배지로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다. 상기 과당은 1 % (w/v) 내지 35 % (w/v)의 농도로 포함되는 것일 수 있다. 상기 배양은 연속, 반연속, 또는 뱃치 (batch) 형식 배양일 수 있다.

[0018] 상기 배양은 과당을 사이코스로의 전환을 촉매하는 활성을 가진 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 발현을 유도하는 물질을 첨가하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 유도 물질의 첨가는 선택되는 유도 요소에 따라 달라

질 수있다. 예를 들면, 상기 유도 요소가 lac 오페론 또는 trc 포로모터인 경우, IPTG (이소프로필 β-D-1-티오갈락토티오피라노시드)일 수 있다. 상기 유도는 배양의 적절한 시기에 이루어질 수 있다. 상기 시기는 당업자에 의하여 용이하게 선택될 수 있다. 상기 유도는 세포 성장이 충분히 이루어진 후 이루어지는 것일 수 있다. 예를 들면, 상기 유도는 지연기 (lag phase), 지수기 (exponential phase), 정체기 (stantionary phase) 및 사멸기 (death phase)로 이루어지는 세포 성장기 중 지수기 초반 내지 중반에 이루어지는 것일 수 있다.

[0019] 상기 배양은 상기 대장균을 상기 배지에서 OD_{600}이 0.05 내지 0.5가 되도록 하는 농도로 접종하는 것을 포함하는 것일 수 있다. 상기 유도는 예를 들면, 상기 대장균을 상기 배지에서 OD_{600}이 0.05 내지 0.5가 되도록 하는 농도로 접종하는 경우, 1 시간 내지 2 시간에서 유도하는 것일 수 있다.

[0020] 상기 방법은 상기 배양물로부터 사이코스를 회수하는 단계를 포함한다. 사이코스를 회수하는 방법은 당업계에 알려져 있다. 예를 들면, 상기 회수는 원심분리, 여과, 결정화, 이온교환 크로마토그래피 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 방법에 의하여 이루어질 수 있다. 예를 들면, 배양물을 원심분리에 의하여 배양액을 균체로부터 분리하고, 상기 배양액을 여과, 결정화, 이온교환 크로마토그래피 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 방법에 의하여 사이코스를 배양액으로부터 분리함으로써 이루어질 수 있다.

[0021] 상기 방법에 있어서, 상기 과당을 포함하는 배지 중에서 배양하는 단계 전에, 상기 대장균을 과당을 포함하지 않은 배지 중에서 배양하여 과당을 사이코스로의 전환을 촉매하는 활성을 가진 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현시키는 단계; 및 배양물로부터 대장균을 회수하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0022] 상기 대장균을 과당을 포함하지 않은 배지 중에서 배양하여 과당을 사이코스로의 전환을 촉매하는 활성을 가진 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현시키는 단계는 과당을 포함하지 않은 배지를 사용하는 것을 제외하고는, 상기 대장균을 과당을 포함하는 배지 중에서 배양하는 단계와 동일하게 수행되는 것일 수 있다.

[0023] 상기 배양물로부터 대장균을 회수하는 단계는 당업계에 알려진 회수 방법이 사용될 수 있다. 예를 들면, 원심분리, 여과 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나이상의 방법이 사용될 수 있다. 이렇게 회수된 대장균은 원하는 농도 예를 들면, 고농도로 농축된 상태로 사용될 수 있다. 예를 들면, 상기 대장균은 고농도로 상기 과당을 포함하는 배지 중에 접종되어 배양될 수 있다. 따라서, 과당을 포함하는 배지 중에서 배양하는 단계에서 사용되는 대장균은 상기 회수된 대장균인 것일 수 있다. 상기 회수된 대장균은 상기 배지에서 OD_{600}이 0.05 내지 50, 예를 들면 5 내지 50, 10 내지 50, 20 내지 50, 또는 20 내지 40이 되도록 하는 농도로 접종될 수 있다. 이렇게 고농도의 상기 효소를 포함하는 대장균을 사용함으로써 배지 중에서 고농도로 과당이 포함된 배지에서 효율적으로 과당을 사이코로스로 전환할 수 있다. 상기 방법에 있어서, 상기 회수된 대장균이 사용되는 경우, 상기 과당은 1 % (w/v) 내지 80 % (w/v), 1 % (w/v) 내지 35 % (w/v), 10 % (w/v) 내지 80 % (w/v), 20 % (w/v) 내지 80 % (w/v), 또는 30 % (w/v) 내지 80 % (w/v) 또는 30 % (w/v) 내지 50 % (w/v)의 농도로 배지 중에 포함될 수 있다.

[0024] 상기 방법에 있어서, 상기 배양물로부터 대장균을 분리하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 분리된 대장균은 상기 과당을 포함하는 배지 중에서 배양될 수 있다. 즉, 상기 분리된 대장균은 2회 이상, 예를 들면, 3회 사용될 수 있다. 상기 분리된 대장균은 상기 배지에서 OD_{600}이 0.05 내지 50, 예를 들면 5 내지 50, 10 내지 50, 20 내지 50, 또는 20 내지 40이 되도록 하는 농도로 접종될 수 있다. 이렇게 고농도의 상기 효소를 포함하는 대장균을 사용함으로써 배지 중에서 고농도로 과당이 포함된 배지에서 효율적으로 과당을 사이코로스로 전환할 수 있다. 상기 방법에 있어서, 상기 분리된 대장균이 사용되는 경우, 상기 과당은 1 % (w/v) 내지 80 % (w/v), 1 % (w/v) 내지 35 % (w/v), 10 % (w/v) 내지 80 % (w/v), 20 % (w/v) 내지 80 % (w/v), 또는 30 % (w/v) 내지 80 % (w/v) 또는 30 % (w/v) 내지 50 % (w/v)의 농도로 배지 중에 포함될 수 있다.

효 과

[0025] 본 발명의 일 구체예에 따른 대장균에 의하면, 과당을 사이코스로 전환시키는 효율이 우수하다.

[0026] 본 발명의 다른 구체예에 따른 사이코스를 생산방법에 의하면, 과당으로부터 사이코스를 효율적으로 생산할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0027] 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.

[0028] **재료 및 방법**

[0029] 이하의 실시예에서는 과당을 기질로 사용하였으며 균체를 배양하기 위해 사용된 2YT 배지 (물 1L 중 16g 트립톤, 10g 효모 추출물 및 5g NaCl)에는 항생제 암피실린, 카나마이신, 및 테트라사이클린을 각각 100㎍/mL, 50㎍/mL 및 10㎍/mL로 사용하였다. 배양은 37℃, 250rpm의 진탕 배양기를 사용하여 수행하였다.

[0030] 또한, 과당 및 사이코스의 농도는 액체고속크로마토그래피 (HPLC)를 이용하여 측정하였다. HPLC는 SCL-10A (Shimadzu, 일본)을 사용하였으며 탐지 장치로는 Shimadzu RID-10A, 분리 컬럼으로는 BP-100 Ca^{2+} 탄화수소칼럼 (Benson polymeric Inc. USA)을 이용하였다. 용출은 80℃에서 증류수로 하였으며 용출속도는 0.4ml/min으로 수행하였다.

[0031] **EZ::TN™ <KAN-2> 트란스포존 (Epicenter 사, 미국)**: 대장균에서 기능적인 Tn903 카나마이신 저항성 유전자를 포함하고 있으며, 이 유전자는 과반응성 (hyperactive) 19-bp 모자이크 말단 (Mosaic End: ME) EZ::TN 트란스포자제 인식 서열 (tranposase recognition sequence)에 인접 (flank)되어 있다. EZ::TN 트란스포자제와 함께 사용되는 경우, EZ::TN™ <KAN-2> 트란스포존은 인 비트로에서 임의의 표적 DNA에 무작위적으로 삽입된다. EZ::TN™ <KAN-2> 트란스포존은 유전자 "녹아웃 (knockout)"을 만들기 위해서 사용될 수 있다. EZ::TN™ <KAN-2> 트란스포존은 KAN-2 FP-1 포워드 (서열번호 20) 및 KAN-2 RP-1 리버스 프라이머 (서열번호 21)를 위한 결합 부위를 포함한다. 이들 프라이머는 EZ::TN™ <KAN-2> 트란스포존이 삽입된 표적 DNA를 맵핑하는데 사용될 수 있다. EZ::TN™ <KAN-2> 트란스포존의 뉴클레오티드 서열은 서열번호 22에 나타내었다.

[0032] **pKD46-recA (Nature Technology Corporation, 미국)**: 아라비노즈 유도성 *exo*, *bet*, 및 *gam* 및 orf60a 유전자를 포함하며, 30℃에서 유지되고 42℃에서 상실되는 조건성 온도 민감성 (ts) 벡터이다. 또한, 스트렙토마이신 저항성 (rpsL-기초한) 숙주 균주에서 플라스미드에 대하여 카운터 선택된다. 대장균에서의 재조합은 종종 파지 λ Red 재조합 기능을 이용한다. Red 재조합에 관련된 λ 유전자는 *exo*, *bet*, 및 *gam*이다. *exo* (Redα) 유전자 산물은 5′로부터 3′으로의 엑소누클레아제 활성을 가지고, *bet* (Redβ) 유전자 산물은 어닐링을 촉진하는 단일 가닥 DNA 결합 단백질이다. *gam* 유전자 산물은 RecBCD 누클레아제를 억제하여 선형 DNA (즉, PCR 산물) 분해를 방지한다. 도 9는 pKD46-recA의 지도를 나타내는 도면이다.

[0033] **실시예 1: 서열번호 1의 아미노산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 대장균의 제조**

[0034] 본 실시예에서는 서열번호 1의 아미노산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 6-포스포프락토키나제를 코딩하는 유전자 및 알로즈 대사 오페론 (allose metabolic operon)이 불활성화된 대장균에 형질전환하여, 서열번호 1의 아미노산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 대장균을 제조하였다.

[0035] **(1) 트란스포존을 매개로 한 대장균의 6-포스포프락토키나제를 코딩하는 유전자의 불활성화**

[0036] EZ::TN™ <KAN-2> 트란스포존 키트는 미국, Epicentre사로부터 구입하였다. 트란스포존이 삽입되어질 숙주 균주로 대장균 (*Escherichia coli*) K-12 MG1655를 이용하였다.

[0037] pKD46-recA 플라스미드 (Nature Technology Corporation, 미국)가 도입된 대장균 MG1655를 2YT 배지에서 배양하여 OD_{600nm} 값이 0.6 에 도달하였을 때 0.2% (w/v)의 아라비노즈를 첨가하여 아라비노즈 유도성 *exo*, *bet*, 및 *gam* 및 orf60a 유전자의 발현을 유도시킨 후 OD_{600nm} 값이 3이 될 때까지 종배양하였다.

[0038] 얻어진 종배양물을 아라비노즈가 첨가된 새로운 2YT 배지로 OD_{600nm} 값이 0.1 이 되게 접종하고 18℃에서 OD_{600nm} 값이 0.6이 될 때까지 배양하였다. 형질전환 능력 세포 (competent cell)는 Inoue 등의 방법 (Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. 1990. Gene. 96(1): 23-28)에 따라 제조하여 사용하였다.

[0039] 먼저, 트란스포존을 이용하여 녹아웃 (knock-out)시키고자 하는 표적 유전자인 6-포스포프락토키나제를 코딩하는 유전자를 증폭하기 위한 서열번호 23 및 24 의 프라이머 쌍을 프라이머로 사용하고, 상기 배양된 대장균 중의 염색체를 주형으로 하여 PCR을 수행하였다. PCR로 증폭된 유전자를 정제한 후 제조사의 지침에 따라 증폭된 PCR 산물을 트란스포존에 연결하였다.

[0040] 다음으로, 얻어진 PCR 산물을 함유하는 트란스포존을 화학적 방법으로 상기 배양된 대장균에 형질전환하고, 아라비노즈, 암피실린 및 카나마이신을 함유한 평판 2YT 배지에 도말하였다. 이후 30℃에서 약 48 시간 후 단일 콜로니를 얻은 후 일부의 콜로니를 카나마이신만이 함유된 평판 2YT 배지에 도말하고 42℃에서 배양하였다. 여기서 얻은 단일 콜로니들을 소량의 증류수에 현탁하여 10분간 가열하고, 이를 원심 분리한 후 상층액을 주형으로 하고, 서열번호 23 및 24의 프라이머 쌍을 프라이머로 사용하여 PCR을 수행하였다. PCR 산물을 아가로즈 겔에 적재하고 전기영동한 결과 본래 크기보다 약 1.2kb 이상 길이가 길어진 것을 확인하였다. 이는 상기 6-포스포프락토키나제를 코딩하는 유전자가 상동 재조합에 의한 삽입 돌연변이에 의하여 불활성화된 것을 나타낸다. 그 결과, 최종적으로 선택된 *pfkA* 유전자가 불활성화된 대장균 균주인 대장균 MG1655 (△*pfkA*)를 확보하였다.

[0041] **(2) 대장균 MG1655 (△*pfkA*)에서 P1 형질도입을 매개로 한 알로스 대사 오페론의 불활성화**

[0042] 상기에서 대장균 MG1655 (△*pfkA*)에서 알로즈 대사 오페론을 추가적으로 불활성화시키기 위하여 Kim 등 (Kim, C., Song, S., and Park, C. 1997. J Bacteriol. 179 (24): 7631-7637.)이 구축한 대장균 CP1010 균주 (이하 대장균 MG1655 (△*als*)라 함)에 P1 파지를 형질도입하고 얻어진 P1 용해물 (P1 phase lysate)을 대장균 MG1655 (△*pfkA*)에 형질도입하고 선발하여 MG1655 (△*pfkA*, △*als*)를 얻었다.

[0043] 먼저, 대장균 MG1655 (△*als*)를 LB 배지 (물 1L 중 10g 트립톤, 5g 효모 추추물 및 10g NaCl)에서 37℃에서 OD_{600nm} 값이 3이 될 때까지 종배양하였다. 이를 LGC 배지 (LB 30mL, 20% 포도당 150㎕, 100 mM $CaCl_2$ 1.5mL) 3mL에 1/100로 접종한 후 37℃에서 OD_{600nm} 값이 0.2가 될 때까지 배양한 후 P1을 첨가하여 37℃에서 용해가 이루어지도록 하였다. 얻어진 용해물에 클로로포름을 100㎕ 첨가하여 강력하게 1분 동안 보르텍스한 후 원심분리하여 상층액만 회수하여 에펜도르프 튜브에 옮겼다. 여기에 클로로포름 50㎕를 다시 첨가하여 강력하게 1분 동안 보르텍스한 후 원심분리하여 상층액을 회수하였다. 이렇게 만들어진 P1 용해물 (P1 lysate)를 4℃에서 보관하였다.

[0044] 다음으로, 대장균 MG1655 (△*pfkA*)를 LB 배지 중 37℃에서 OD_{600nm} 값이 3이 될 때까지 종배양하였다. 이를 LB 배지 3mL에 1/100로 접종한 후 37℃에서 OD_{600nm} 값이 1이 될 때까지 배양한 후 원심분리 (7000 rpm, 2분)하여 상층액을 제거하고 MC 버퍼 (10 mM $MgSO_4$, 10 mM $CaCl_2$) 300㎕로 균체를 잘 현탁한 다음 에펜도르프 튜브에 100㎕씩 분주하였다. 여기에 앞서 준비된 P1 용해물 0 내지 100㎕를 첨가하고 잘 섞은 다음 30℃ 정치 배양조에 30분 동안 두었다. 1M Na_3 시트레이트 100㎕를 상기 튜브에 첨가한 후 원심분리 (7000 rpm, 1분)하여 상층액을 제거하고, 100mM Na_3 시트레이트 100㎕로 균체를 잘 현탁시킨 다음 카나마이신과 테트라사이클린을 함유한 평판 LB 배지에 도말하고 37℃에서 약 24시간 동안 배양한 후 단일 콜로니를 얻었다.

[0045] **(3) 사이코스 3-에피머화 효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터 제조 및 형질전환**

[0046] 아그로박테리움 투메파시엔스 C58의 사이코스 3-에피머화 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 특이적으로 결합하는 서열번호 25 및 26의 프라이머를 프라이머로 하고, 아그로박테리움 투메파시엔스 C58 중의 염색체를 주형으로 하여 PCR을 수행하였다. 얻어진 PCR 산물을 제한 효소 *EcoRI*과 *XbaI*을 사용하여 pTrc99A (Pharmacia, 미국) (서열번호 27)의 동일한 효소 부위에 삽입하여 재조합 벡터 pTPE를 제조하였다. 도 8은 재조합 벡터 pTPE를 나타내는 도면이다.

[0047] 상기 pTPE 벡터를 통상적인 형질전환 방법에 의해 상기 대장균 MG1655 (△*pfkA*,△*als*)에 형질전환하여 재조합 대장균 (이하 대장균 MG1655 (△*pfkA*,△*als*,*pe+*)라고도 함)을 만들었다. 얻어진 재조합 대장균은 -80℃에서 보관한 후 배양에 사용하였다.

[0048] **실시예 2: 대장균 MG1655 (△*pfkA*,△*als*,*pe+*)를 이용한 사이코스의 생산**

[0049] 본 실시예에서는 대장균 MG1655 (△*pfkA*,△*als*,*pe+*)를 과당을 포함하는 배지 중에서 배양하여 사이코스를 생산하기 조건을 확립하였다.

[0050] **(1) IPTG 농도와 유도 시간 (induction time)에 따른 생산성 조사**

[0051] IPTG의 농도에 따라 단백질 발현양이 달라지고 그로 인하여 사이코스 생산량이 영향을 받을 수 있기 때문에 IPTG 농도별로 실험을 수행하였다. 냉동 보관된 대장균 MG1655 (△*pfkA*,△*als*,*pe+*)를 2YT 3ml에 접종하여 OD_{600nm}에서 3.0이 될 때까지 37℃의 진탕 배양기에서 종배양하였다. 이를 다시 3%의 과당이 첨가된 새로운 2YT 배지 5ml에 OD_{600nm}가 0.1이 되게 접종하여 37℃의 진탕 배양기에서 본배양을 수행하였다. 이때, IPTG는 본배양

초기에 0 내지 1 mM의 IPTG 농도를 다르게 첨가하여 사이코스 3-에피머화 효소의 발현을 유도하였다.

[0052] 본배양은 24시간 동안 수행한 후 샘플을 취하여 사이코스 생산량을 측정하였다. 도 1은 IPTG 첨가량 (A) 및 첨가 시기 (B)에 따른 균체량을 나타내는 도면이다. 도 1에서 흰색 막대는 과당, 검은색 막대는 사이코스, ○는 세포 생장을 나타낸다.

[0053] 도 1A에 나타낸 바와 같이, IPTG를 첨가하지 않은 경우에는 균체 생장이 OD_{600nm} 값이 12인 반면 0.1 mM 이상의 IPTG를 첨가하면 OD_{600nm} 값이 5로 2배 이상 감소되었다. 즉, IPTG를 첨가하지 않은 경우에는 균체의 생장은 활발한 반면 단백질의 발현은 원활하게 이루어지지 않아 사이코스 생산량에 영향을 미치게 되어 약 1g/L의 사이코스가 생산되는 반면 0.1 mM 이상의 IPTG가 첨가되면 충분한 단백질 발현으로 인하여 5배 이상 증가된 5.5 g/L 이상의 사이코스가 생산됨을 확인하였다. 그리고 0.1 mM 이상의 IPTG를 첨가한 경우에는 배양액의 pH가 8로 염기성에 해당하지만 IPTG를 첨가하지 않은 경우에는 pH가 5로 산성이었다. 이는 IPTG를 첨가하지 않은 경우에는 균체의 생장이 급속도로 이루어지면서 젖산이 축적되어 그의 영향으로 배양액의 pH가 산성으로 나타나는 것으로 생각된다. 상기의 실험 결과로 보아 사이코스를 생산함에 있어서는 0.1 mM 이상의 IPTG가 요구됨을 알 수 있었고 특히 0.5 mM의 IPTG가 첨가되었을 경우 6 g/L로 0.5 g/L 더 많은 사이코스가 생산되었다.

[0054] IPTG를 초기에 첨가하게 되면 단백질 발현은 원활하게 이루어지나 균체의 생장은 저해를 받게 되고, IPTG를 후기에 첨가하게 되면 균체의 생장은 활발한 반면 균체의 노화로 인해 단백질 발현이 원활하게 이루어지지 않는 문제점이 발생할 수 있다. 사이코스 생산에 있어서 균체 생장과 단백질 발현량을 동시에 만족시키는 최적의 IPTG 첨가시기를 알아보기 위해 본 실험을 수행하였다. 대장균 MG1655 (△*pfkA*,△*als*,*pe+*)를 3% (w/v) 과당이 첨가된 2YT 배지에 접종한 후 0시간, 3시간, 6시간, 12시간, 18시간에 0.5 mM IPTG를 첨가하여 배양 수행 후 사이코스의 생산량을 분석하였다.

[0055] 도 1B에 나타낸 바와 같이, 0.5 mM의 IPTG를 배양초기 (0시간)에 첨가할 경우 6g/L의 최대의 사이코스를 생산하였고 IPTG의 첨가시기가 늦어질수록 사이코스 생산이 점차 감소하여 18시간에 IPTG를 첨가할 경우 0.3g/L의 사이코스를 생산함에 그쳤다. 이는 IPTG를 첨가하게 되면 균체의 생장보다 단백질 발현에 더 치중하게 되면서 그 결과 더 많은 사이코스를 생산하게 됨을 나타내는 결과이다. 그리고 IPTG를 후기에 첨가할수록 과당의 소모량이 많아지는 반면 생산된 사이코스 양은 감소하는 것으로 볼 때, 과당이 균체 증식에 이용되었을 것으로 생각된다. IPTG의 첨가시기가 늦어질수록 균체의 생장이 급격하게 증가하는데 이에 반하여 pH는 감소되어 산성쪽으로 가는 것을 확인하였다. 그리고 균체 증식은 6시간이면 거의 정지기에 도달하므로 그 이후인 12시간, 18시간의 IPTG 첨가는 단백질 발현에 좋지 않은 영향을 끼쳐 결국 사이코스 생산에도 좋지 않은 결과를 나타내었다. 18시간에 IPTG를 첨가하여 6시간이 지난 24시간의 배양결과를 도 1B에 나타낸 이유는 48시간의 배양을 수행하였지만 그 결과에서 큰 차이점을 발견할 수 없었기 때문이다.

[0056] **(2) 기질 양에 따른 생산성 조사**

[0057] 냉동보관된 대장균 MG1655 (△*pfkA*,△*als*,*pe+*)를 2YT 3ml에 접종하여 OD_{600nm}에서 3.0이 될 때까지 37℃의 진탕 배양기에서 종배양하였다. 이를 다시 0.5mM IPTG를 첨가한 새로운 2YT 배지 5ml에 OD_{600nm}가 0.1이 되게 접종하여 37℃의 진탕 배양기에서 본배양을 수행하였다.

[0058] 과당을 1 내지 35% (w/v)의 농도 범위로 포함하는 2YT 배지 중에서 37℃에서 상기 본배양에서 얻어진 대장균 MG1655 (△*pfkA*,△*als*,*pe+*)를 배양하고 사이코스 생산량을 측정하였다. 도 2는 과당의 농도에 따른 사이코스 생산량을 나타내는 도면이다. 도 2에서 흰색 막대는 과당, 검은색 막대는 사이코스, ○는 세포 생장, ■는 전환효율 (conversion yield) (%)를 나타낸다.

[0059] 도 2에 나타낸 바와 같이, 과당의 농도가 1 내지 30%로 증가할수록 삼투 스트레스 (osmotic stress)로 인해 균체 생장이 저해를 받게 되고 35%의 과당이 첨가될 경우에는 균체의 생장이 전혀 일어나지 않는 것을 확인하였다. 과당의 농도가 1% 내지 20%로 증가할수록 사이코스 생산량은 약 3g/L 내지 30g/L로 거의 비례적으로 증가되나 25%의 과당 첨가시에는 사이코스가 약 33g/L로 20%의 과당 첨가의 경우와 큰 차이를 보이지 않았다. 그리고 30%의 과당 첨가시에는 사이코스 생산이 오히려 감소되어 20g/L였고 35%의 과당이 첨가될 경우에는 사이코스가 전혀 생산되지 않는 것을 볼 때 사이코스 생산은 균체의 생장과 밀접한 관련이 있음을 알 수 있었다.

[0060] 전환수율 (conversion yield)은 사이코스 생산량을 과당 소모량으로 나누어 %로 환산한 것으로 과당을 5% 이상 넣어주었을 경우 전환수율이 80% 이상이었으나 1%의 과당을 넣어주었을 경우에는 전환수율이 약 40%에 그쳤다.

이는 1%의 과당을 첨가하였을 경우에는 균체의 생육에 있어 과당을 이용함으로써 균체 생장은 OD_{600nm} 값이 9로 상대적으로 더 높고, 과당의 소모량이 상대적으로 더 많기에 전환수율은 낮아지게 된 것이라 생각된다.

[0061] **(3) 고농도의 균체를 이용한 사이코스 생산성 조사**

[0062] 균체는 그 자체가 효소 담체 또는 효소를 담은 용기로서 효소 고정화와 같은 장점을 얻을 수 있다. 균체의 경우는 원심분리를 통하여 균체만을 회수하여 재사용이 가능하지만 효소의 경우는 그렇지 못하다. 그리고 효소는 활성을 장기간 유지시킬 수 있는 환경을 조성하기 위해 담체에 고정화시키는 부차적인 과정이 필요하지만 균체의 경우는 그 자체가 담체의 역할을 충분히 함으로써 효소의 활성이 급격히 저하되는 것을 막아 재사용이 가능하도록 한다.

[0063] 고농도의 과당을 첨가할 때 균체 생육 저해의 문제를 해결하기 위해 별도로 배양한 고농도의 균체를 첨가할 수 있다면 고농도의 사이코스 생산이 가능하다. 고농도의 균체를 확보하기 위해 대장균 MG1655 (△*pfkA*,△*als*,*pe+*) 균주를 2YT 배지에 접종하여 OD_{600nm} 값이 3.0이 될 때까지 37℃의 진탕 배양기에서 종배양하였다. 이를 다시 새로운 2YT 배지에 OD_{600nm} 값이 0.1이 되게 접종하였다.

[0064] 다음으로, 0.5 mM IPTG를 첨가하고 37℃의 진탕 배양기에서 12시간 배양하여 충분한 단백질의 발현을 유도하였다. 이후 배양액을 원심분리하여 상층액을 제거하고 충분한 균체량을 확보하였다. 확보된 균체를 고농도의 과당이 함유된 새로운 2YT 배지에 고농도로 현탁하여 37℃에서 배양을 수행하였다.

[0065] **(3.1) 고농도의 균체와 기질 존재하의 배양액량의 최적화**

[0066] 고농도의 균체를 현탁하여 실험이 이루어지기에 용존 산소가 부족하지 않을까 하는 우려를 점검하기 위해 배양액 부피를 3 내지 15mL로 달리한 2YT 배지에 과당을 40% (w/v)로 첨가하고 균체는 OD_{600nm} 값이 30이 되도록 현탁하여 진탕배양기에서 37℃에서 250rpm으로 교반하면서 배양하였다.

[0067] 도 3은 배양액량에 따른 사이코스 생산량을 나타내는 도면이다. 도 3에서 ■, □, ●, ○, ▲는 각각 작업 배양액량 (working culture volume) 3ml, 5ml, 7ml, 10ml 및 15ml를 나타낸다. 도 3에 나타낸 바와 같이, 배양액량에 따른 과당의 소모량과 사이코스의 생산량에 있어서는 큰 차이점이 없었고 48시간에 약 100g/L의 과당이 소모되고 약 70g/L의 사이코스가 생산됨을 확인하였다. 이렇게 배양액량에 따른 차이가 없음을 볼 때 사이코스를 생산함에 있어서 용존 산소에 따른 영향은 받지 않음을 알 수 있었다. 이는 40%의 고농도의 과당이 첨가된 2YT 배지에서 실험이 수행되기 때문에 삼투압 스트레스로 인해서 균체 생육이 저해를 받아 더 이상 균체 생장이 이루어지지 않기 때문에 균체 생장과 직접적으로 연관되어 있는 용존 산소량과 관련이 없게 되는 것이다. 그렇기에 배양액량을 달리하여 용존 산소 농도를 달리하여도 사이코스 생산에는 영향을 주지 않는 것으로 여겨진다.

[0068] **(3.2) 고농도의 균체 존재하의 기질 농도의 최적화**

[0069] 촉매 역할을 하는 균체의 양이 고농도로 존재하는 경우, 기질의 양에 따른 사이코스 생산량을 측정하였다.

[0070] 균체 양을 OD_{600nm} 값 30으로 고정시키고 기질인 과당의 양을 10 내지 80% (w/v)로 변화를 주어 기질의 양에 따른 사이코스의 생산성 변화를 확인하였다. 도 4는 과당의 양에 따른 사이코스 생산량을 나타내는 도면이다. 도 4에서 ■, □, ●, ○, ▲는 각각 과당 농도 (%, v/v) 10, 20, 40, 60 및 80을 나타낸다.

[0071] 도 4A 및 C에 나타낸 바와 같이, 첨가한 기질의 양이 증가됨에 따라 생산된 사이코스 양 역시 증가되었다. 10 내지 20%의 과당이 첨가된 경우에는 24시간에 과당의 소모와 사이코스 생산이 거의 멈추는 반면 40 내지 80%의 과당이 첨가된 경우에는 24시간까지는 과당의 소모와 사이코스 생산이 빠르게 일어나다가 24시간 이후부터는 많이 느려짐을 알 수 있었다. 80% 과당을 첨가하였을 때 48시간 후에 140g/L의 사이코스를 생산함으로써 10% 과당 첨가시보다 14배, 40% 과당 첨가시보다 2배 더 많은 양을 생산하였다.

[0072] 도 4B에 나타낸 바와 같이, 전환수율 (conversion yield)은 사이코스 생산량을 과당 소모량으로 나누어 %로 환산한 것으로 40 내지 70% 사이로 나타났다. 도 4D에 나타낸 바와 같이, 생산성 (productivity)은 시간에 따른 사이코스 생산량을 나타낸 것으로 고농도의 과당이 첨가될수록 급격하게 사이코스가 생산되지만 시간이 흐를수록 생산성에 있어서는 감소가 일어나는데 이는 과당과 사이코스 사이에 존재하는 반응평형에 가까워질수록 전환속도는 느려질 수밖에 없기 때문인 것으로 생각된다. 80%의 과당이 첨가되었을 경우 12시간까지 시간당 약 7g/L의 사이코스가 생산됨으로써 같은 시간내에 10% 과당 첨가시보다 10배, 40% 과당 첨가시보다 2배 더 빨리 그 생산에 도달하였다.

[0073] **(3.3) 고농도 기질 존재하의 균체 농도의 최적화**

[0074] 고농도의 기질이 존재할 때 균체, 즉 촉매가 어느 정도 요구되는지 알아보기 위하여 기질 양을 고정시키고 촉매량에 변화를 줌으로써 사이코스 생산에 어떠한 영향을 주는지 살펴보았다. 과당의 농도는 40% (w/v)가 되도록 하였고 균체는 OD_{600nm} 값이 5 내지 50으로 다양한 농도로 현탁하고 37℃에서 2YT 배지 중에서 배양하였다.

[0075] 도 5는 균체량에 따른 사이코스 생산량을 나타내는 도면이다. 도 5에서 ■, □, ●, ○, ▲ 및 △는 각각 초기 세포 농도 (OD_{600}) 5, 10, 20, 30, 40 및 50을 나타낸다.

[0076] 도 5A 및 C에 나타낸 바와 같이, 균체량이 증가할수록 과당의 소모와 사이코스의 생산이 빠른 속도로 이루어졌다. 그러나, 48시간에는 과당의 소모량과 사이코스 생산량이 균체 농도에 따른 차이를 나타내지 않고 약 100g/L의 과당이 소모되고 약 70g/L의 사이코스가 생산됨을 확인하였다. 이는 도 5D의 생산성 (productivity) 결과를 보면 더 확실히 알 수 있는데, 균체, 즉 촉매는 반응속도를 빠르게 하기에 촉매량이 많을수록 6시간까지는 급격하게 사이코스를 생산하도록 유도하지만 시간이 지날수록 생산속도는 감소하게 되고 48시간의 충분한 시간이 주어지게 되면 균체량의 증가에 따른 사이코스 생산은 차이가 없음을 알 수 있었다.

[0077] 도 5B에 나타낸 바와 같이, 전환수율 (conversion yield)은 60 내지 80 사이로 상당히 높음을 알 수 있었다. 이 결과에서 균체량 OD_{600nm}, 40과 50에서는 과당의 소모량, 사이코스 생산량, 전환수율, 및 생산성에 있어 큰 차이를 나타내지 않았다. 이는 과당 40% (w/v)에 있어 균체량 OD_{600nm}, 40이상에서 기질에 대한 촉매가 포화되는 것을 의미하는 것으로 그 이하의 균체량은 기질에 대한 촉매의 제한으로 사이코스 생산속도에 영향을 주지만 그 이상의 균체량은 사이코스 생산에 영향을 주지 않는다는 것을 알 수 있었다.

[0078] **(3.4) 최적 배양 조건하에서 사이코스 고농도 생산**

[0079] 40% (w/v)의 과당에 있어 균체량 OD_{600nm}, 40일 때 기질에 대한 촉매가 포화됨을 위 실험을 통해 알 수 있었기에 과당과 균체량을 과당 40% (w/v)에 균체 (OD_{600nm}) 40, 과당 60% (w/v)에 균체 (OD_{600nm}) 60, 과당 80% (w/v)에 균체 (OD_{600nm}) 80이 되도록 비례적으로 증가시킬 경우에 사이코스의 생산량에는 어떠한 영향을 미치는지 살펴보았다.

[0080] 도 6은 사이코스 생산에 있어 최적화된 기질과 균체량을 이용함에 따른 사이코스 생산량을 나타내는 도면이다. 도 6에서, ■, ● 및 ▲는 각각 과당 40% (w/v)에 균체 (OD_{600nm}) 40, 과당 60% (w/v)에 균체 (OD_{600nm}) 60, 및 과당 80% (w/v)에 균체 (OD_{600nm}) 80인 조건에서 사이코스 생산량을 나타낸다.

[0081] 도 6에 나타낸 바와 같이, 기질과 촉매량이 비례적으로 증가함에 따라 사이코스 생산량 역시 비례적으로 증가함을 확인하였고 (도 6A 및 C), 생산속도 역시 빠름을 확인할 수 있었지만 시간이 흐를수록 생산속도는 감소함을 알 수 있었다 (도 6D). 도 6B에 나타낸 바와 같이, 전환수율은 과당 80%에 균체 (OD_{600nm}) 80인 경우에는 50% 정도 되지만 과당 40%에 균체 (OD_{600nm}) 40인 경우에는 60 내지 70% 정도로 다소 높음을 확인하였다. 과당 80%에 균체 (OD_{600nm}) 80을 이용하여 실험한 결과 48시간에 150g/L의 고농도의 사이코스가 생산되었다.

[0082] 고농도의 기질을 이용하여 실험을 수행하였기에 기질 이용에 필요한 충분한 시간을 부여하기 위하여 72시간 이상의 시간동안 과당의 소모량과 사이코스 생산량을 비교하였으나 48시간 이후에는 과당의 소모와 사이코스 생산이 거의 멈추어 큰 변화가 없음을 확인하였다.

[0083] **(3.5) 균체의 재사용을 통한 사이코스 생산**

[0084] 여기서는 균체를 회수하여 재사용함으로써 원하는 생산물을 대량으로 생산할 수 있는지 확인하였다.

[0085] 먼저, 앞서 수행된 실험결과를 토대로 하여 실험을 계획하였다. 도 6에서 알 수 있듯이 촉매인 균체는 소모되거나 변하지 않고 그대로 존재하고 있는데 24시간 이후부터 사이코스 생산속도가 크게 감소하면서 48시간 이후에는 더 이상 사이코스가 생산되지 않음은 과당과 사이코스 사이에 존재하는 반응평형에 도달하였기 때문이라 판단하였다.

[0086] 24시간 후에도 균체의 과당을 사이코스로 전환하는 활성이 유지된다는 것을 확인하기 위하여, 과당의 존재하에서 24시간 동안 균체를 배양하고, 배양물로부터 균체를 분리하여, 다시 과당의 존재하에서 24시간 동안 균체를 배양하는 과정을 3회 반복하였다. 도 6에 따른 결과에 근거하여, 과당과 균체량을 과당 40% (w/v)에 균체

(OD_{600nm}) 40 및 과당 60%에 균체 (OD_{600nm}) 60인 조건에서 배양하고, 이와 함께 과당 40% (w/v)에 균체 (OD_{600nm}) 80 및 과당 60%에 균체 (OD_{600nm}) 80인 조건에서 추가적으로 배양하였다. 이렇게 고농도의 균체를 추가적으로 이용해 본 이유는 24시간을 주기로 3번 균체를 재사용하게 되는데, 이 때 같은 농도의 과당을 이용함에 있어 더 많은 양의 균체 재사용이 각 단계의 사이코스 생산에 더 긍정적인 영향을 미치는지 알아보기 위한 것이다.

[0087] 도 7은 균체를 재사용함에 따른 사이코스 생산량를 나타내는 도면이다. 도 7에서, ■, ▨ 및 □는 각각 1회, 2회 및 3회 균체 사용을 나타낸다.

[0088] 도 7에 나타낸 바와 같이, 균체 (OD_{600nm}) 80 보다 높은 농도의 균체를 사용하는 것을 시도해보았으나 고농도의 과당이 첨가된 2YT 배지에 현탁이 불가능하여 현탁이 가능한 최고농도의 균체량인 80으로 실험을 수행하였다. 40% (w/v)의 과당을 첨가한 경우에 있어서 균체 (OD_{600nm}) 40과 80, 및 60% (w/v)의 과당을 첨가한 경우에 있어서 균체 (OD_{600nm}) 60과 80, 즉 같은 농도의 과당에 있어 균체량의 증가에 따른 사이코스 생산량에는 큰 차이가 없음을 확인하였다. 이는 상기에 언급한 바와 같이 기질에 대해 촉매가 포화된 상태라면 더 많은 촉매가 존재하여도 반응에는 영향을 미치지 않음을 나타내는 것이다. 하지만 3번의 균체 재사용으로 72시간 동안 과당 40% (w/v)에 균체 (OD_{600nm}) 80일 경우에는 210 g/L를, 과당 60%에 균체 (OD_{600nm}) 80일 경우에는 320g/L의 사이코스를 생산할 수 있었다. 그리고 1회, 2회 및 3회로 균체를 재사용함에도 불구하고 각 단계에서 생산되는 사이코스의 양은 거의 동일하며 생산량이 감소되지 않고 잘 생산되는 것을 볼 때 균체의 활성 감소는 일어나지 않으며 반복적인 연속 균체 재사용이 가능함을 알 수 있었다.

[0089] 이상과 같이, 본 발명의 실시예에 따른 사이코스 생산 방법은 기존에 보고되어진 효소를 이용하지 않고 균체를 바로 이용함으로써 효소를 정제, 고정화 하는 과정이 불필요하여 시간,비용적으로 경제적이다. 또한, 효소반응시 요구되는 금속이온이나 조효소 등의 첨가가 불필요하고, 단가가 낮은 기질을 사용함으로 생산경비를 크게 줄이는 한편 생산 효과를 극대화 할 수 있는 효과가 있다.

[0090] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 사이코스 생산 방법은 과당을 기능성이 우수한 사이코스로 대량생산하는 방법이기에 기능성 식품 및 의약품 제조에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0091] 도 1은 IPTG 첨가량 (A) 및 첨가 시기 (B)에 따른 균체량을 나타내는 도면이다.

[0092] 도 2는 과당의 농도에 따른 사이코스 생산량을 나타내는 도면이다.

[0093] 도 3은 배양액량에 따른 사이코스 생산량을 나타내는 도면이다.

[0094] 도 4는 과당의 양에 따른 사이코스 생산량을 나타내는 도면이다.

[0095] 도 5는 균체량에 따른 사이코스 생산량을 나타내는 도면이다.

[0096] 도 6은 사이코스 생산에 있어 최적화된 기질과 균체량을 이용함에 따른 사이코스 생산량을 나타내는 도면이다.

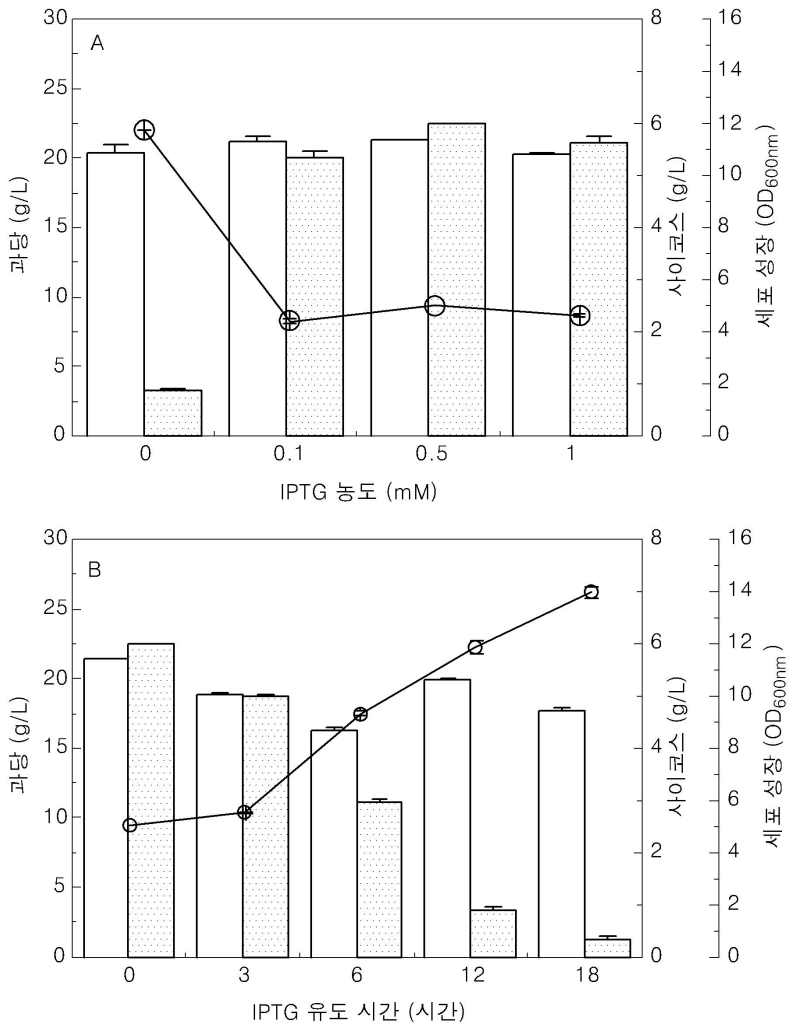
[0097] 도 7은 균체를 재사용함에 따른 사이코스 생산량를 나타내는 도면이다.

[0098] 도 8에 나타낸 제한효소 지도를 갖는 것일 수 있다.

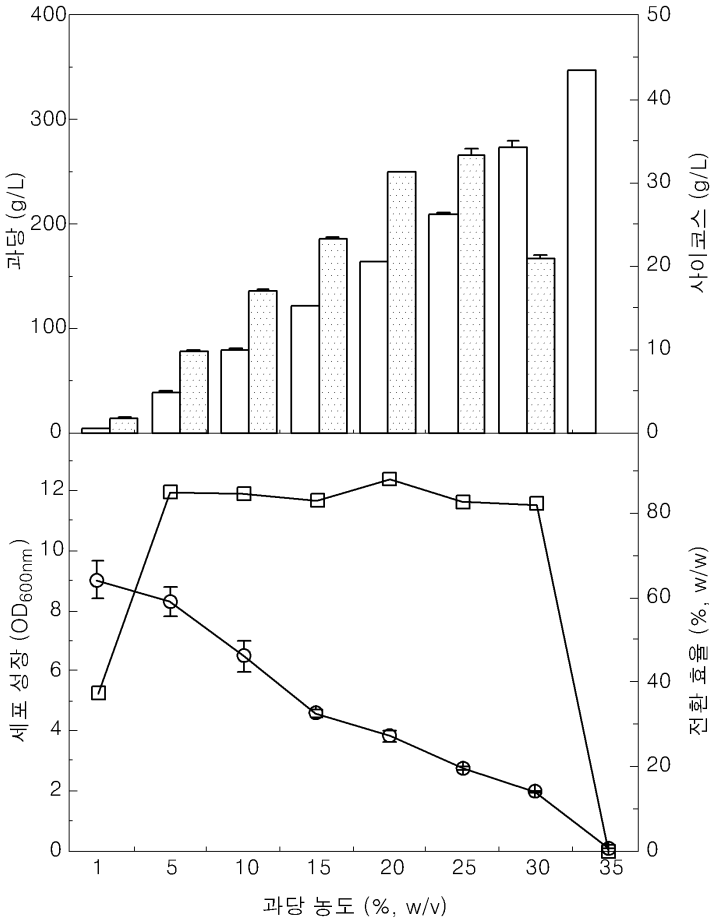
[0099] 도 9는 pKD46-recA의 지도를 나타내는 도면이다.

도면

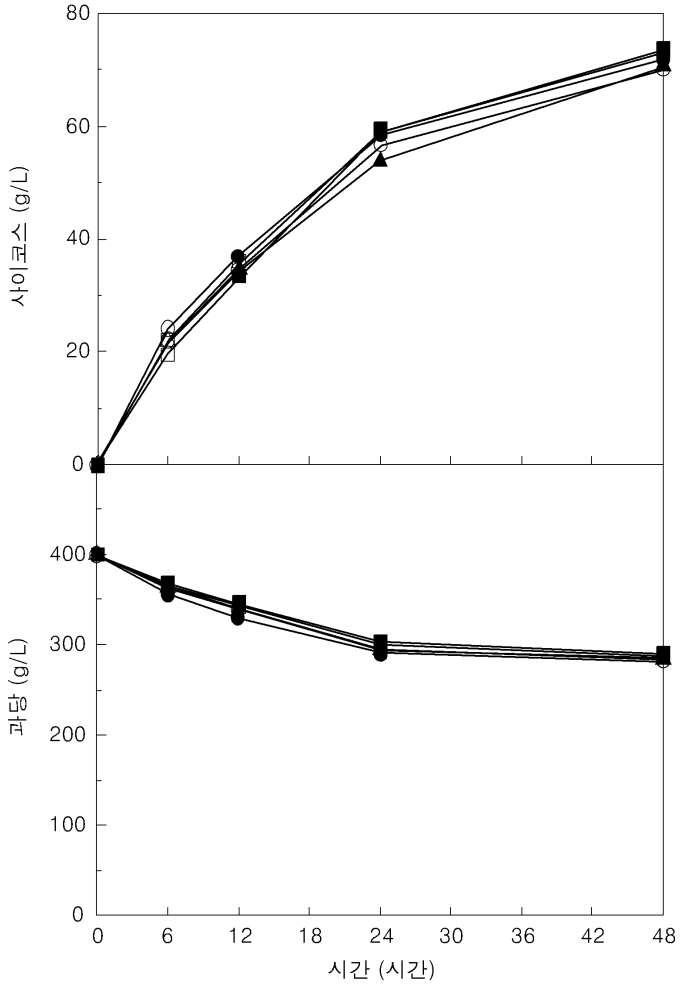
도면1


A
과당 (g/L)
사이코스 (g/L)
세포 성장 (OD600nm)
IPTG 농도 (mM)
0
0.1
0.5
1
B
IPTG 유도 시간 (시간)
3
6
12
18

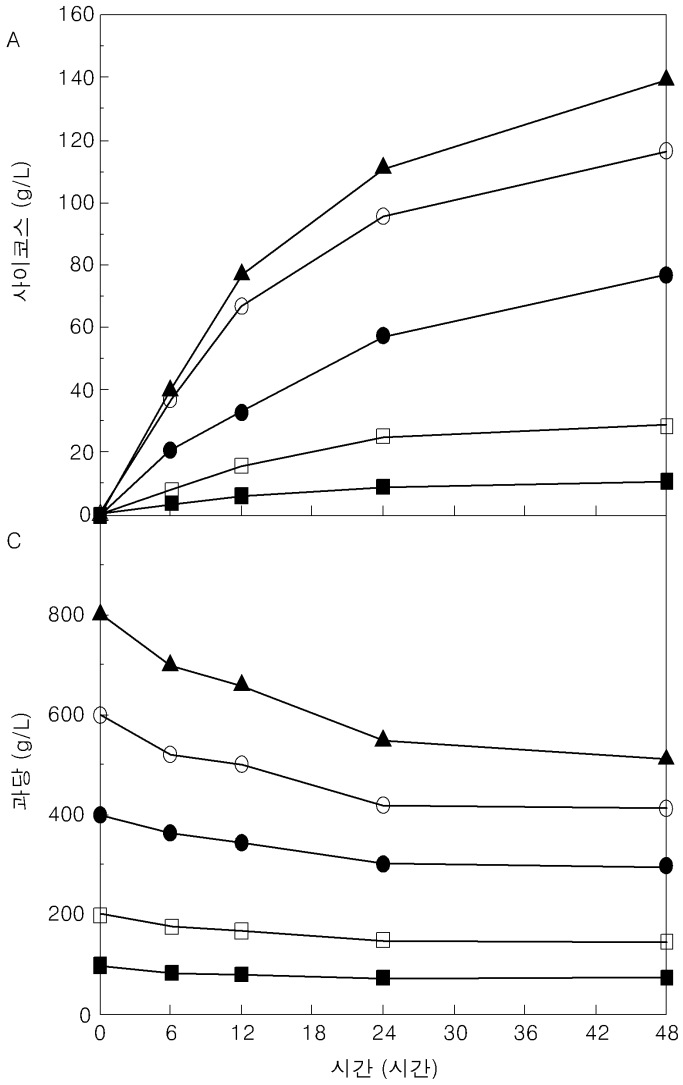
도면2


과당 (g/L)
사이코스 (g/L)
세포 성장 (OD600nm)
전환 효율 (%, w/w)
과당 농도 (%, w/v)
0
100
200
300
400
10
20
30
40
50
2
4
6
8
12
60
80
1
5
15
25
35

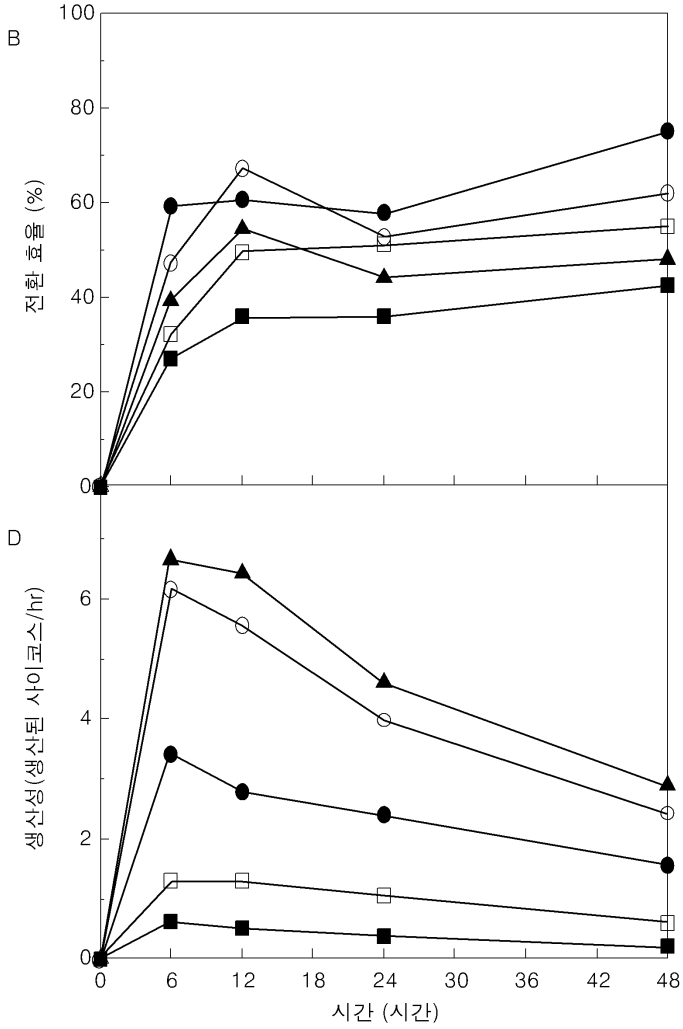
도면3


80
60
40
20
0
사이코스 (g/L)
400
300
200
100
0
과당 (g/L)
0
6
12
18
24
30
36
42
48
시간 (시간)

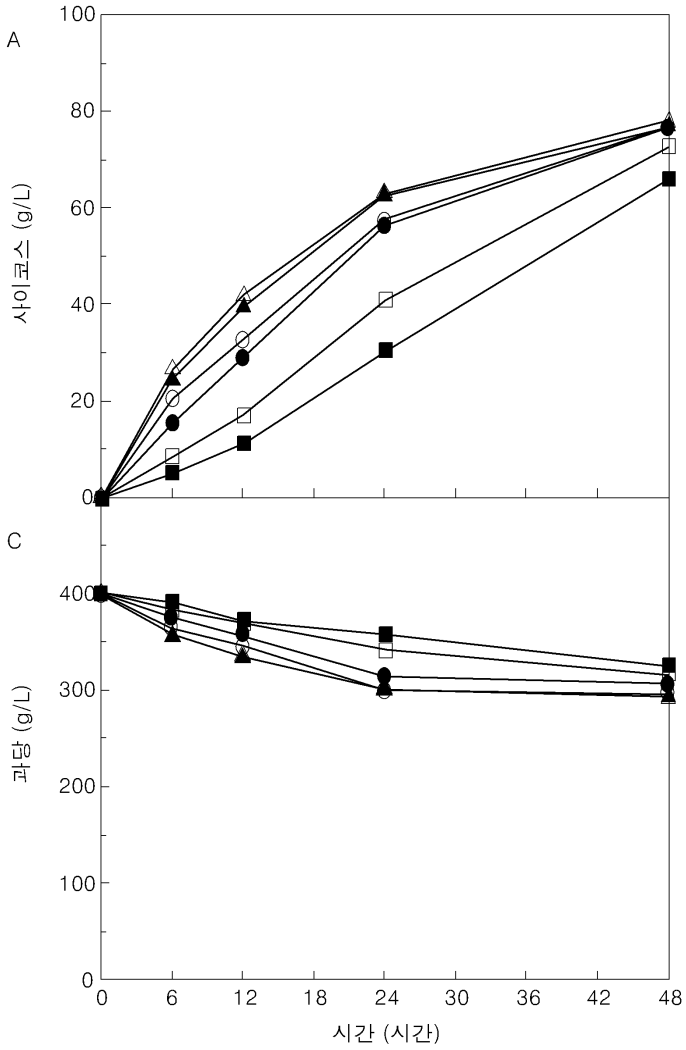
도면4a


A
160
140
120
100
80
60
40
20
0
사이코스 (g/L)
C
800
600
400
200
0
과당 (g/L)
0
6
12
18
24
30
36
42
48
시간 (시간)

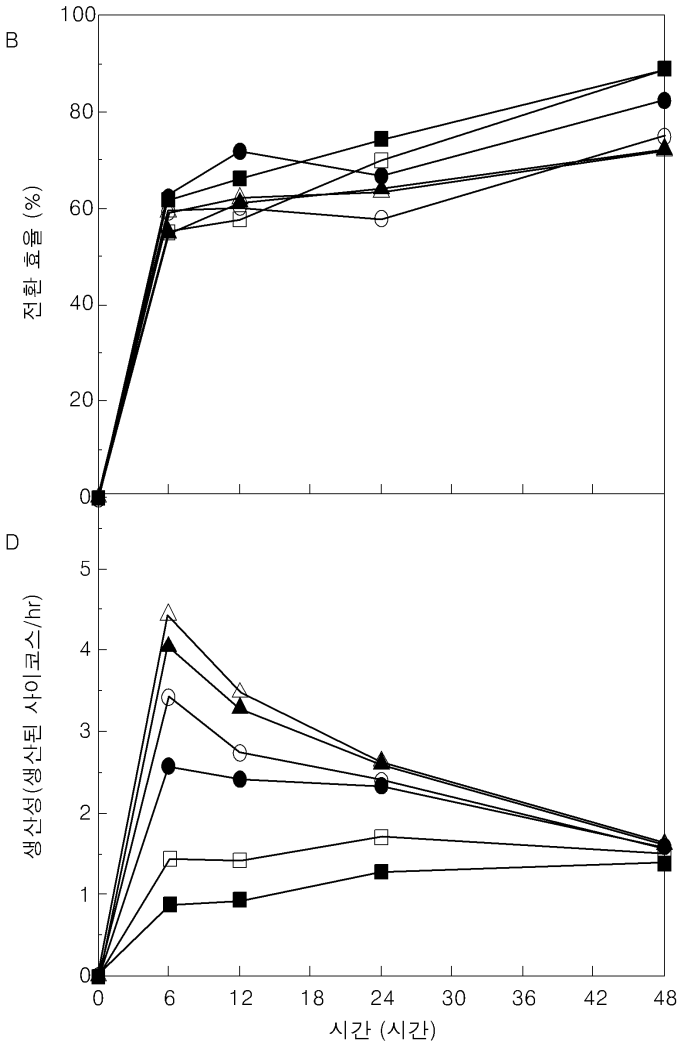
도면4b


B
전환 효율 (%)
100
80
60
40
20
0
D
생산성(생산된 사이코스/hr)
6
4
2
0
0
6
12
18
24
30
36
42
48
시간 (시간)

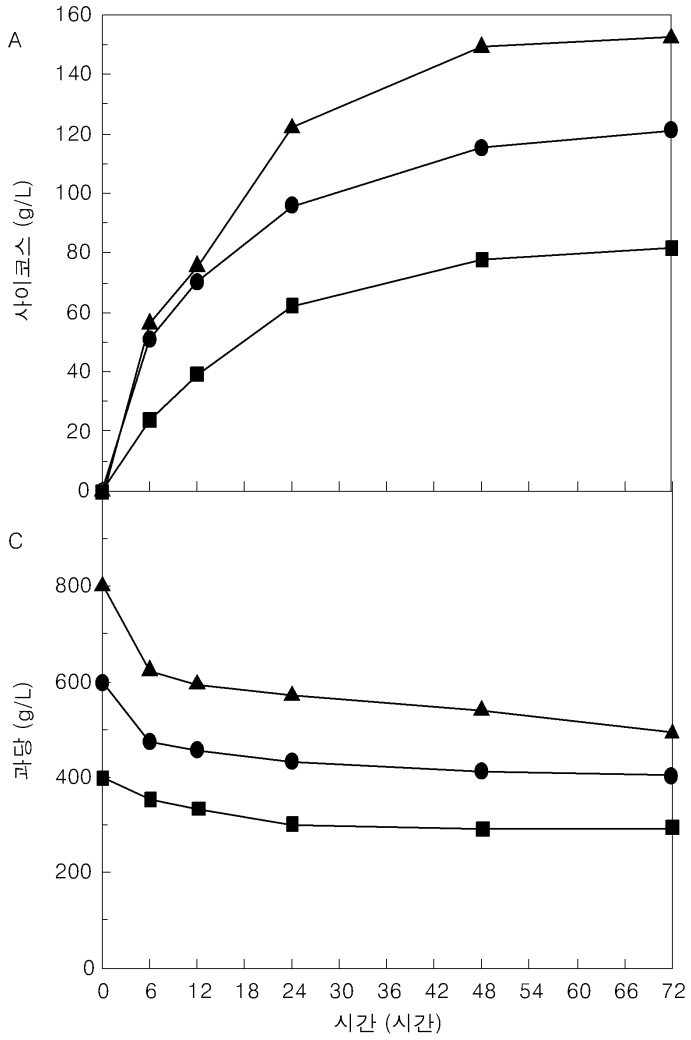
도면5a


A
사이코스 (g/L)
100
80
60
40
20
0
C
과당 (g/L)
400
300
200
100
0
0
6
12
18
24
30
36
42
48
시간 (시간)

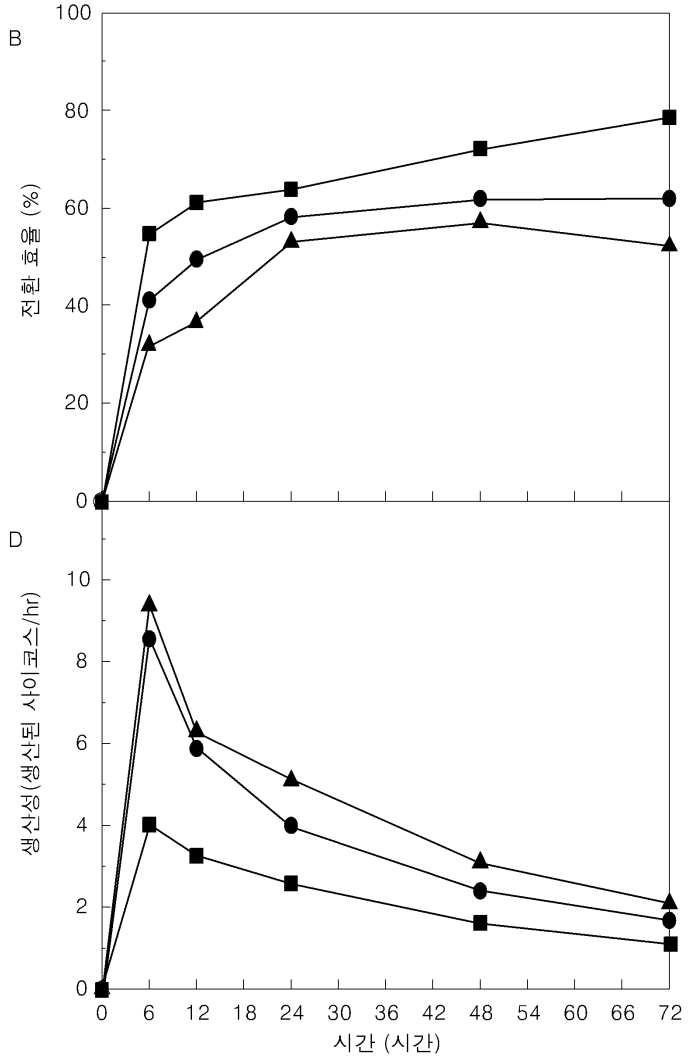
도면5b


B
전환 효율 (%)
100
80
60
40
20
0
D
생산성(생산된 사이코스/hr)
5
4
3
2
1
0
0
6
12
18
24
30
36
42
48
시간 (시간)

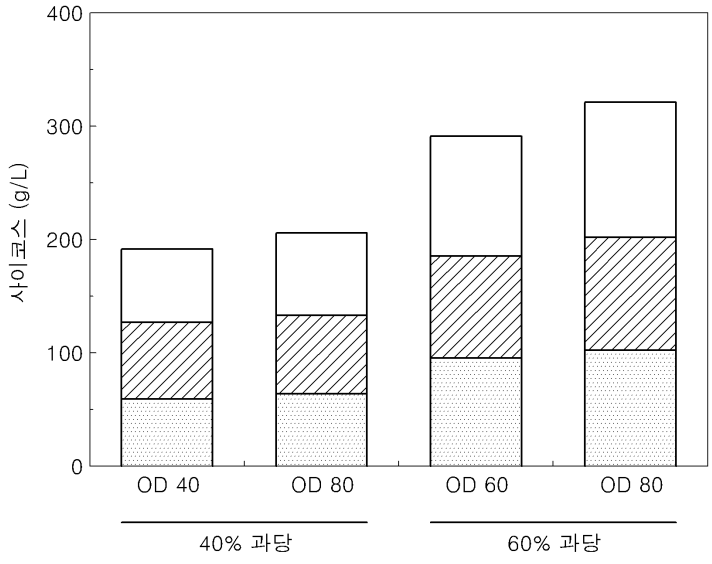
도면6a


A
160
140
120
100
80
60
40
20
0
사이코스 (g/L)
C
800
600
400
200
0
과당 (g/L)
0
6
12
18
24
30
36
42
48
54
60
66
72
시간 (시간)

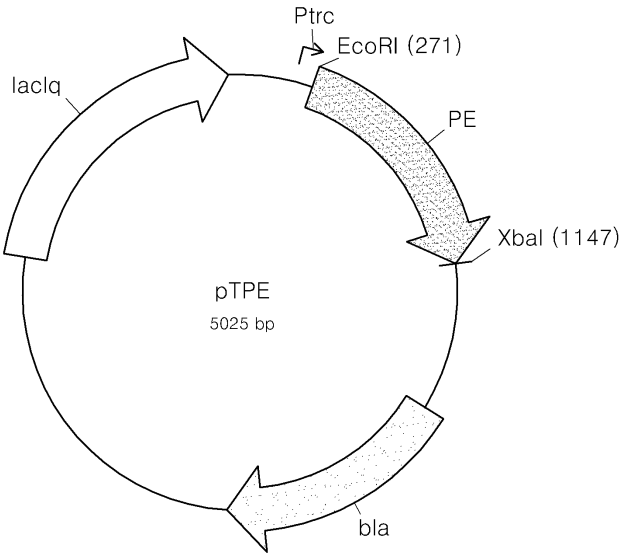
도면6b


B
전환 효율 (%)
100
80
60
40
20
0
D
생산성(생산된 사이코스/hr)
10
8
6
4
2
0
0 6 12 18 24 30 36 42 48 54 60 66 72
시간 (시간)

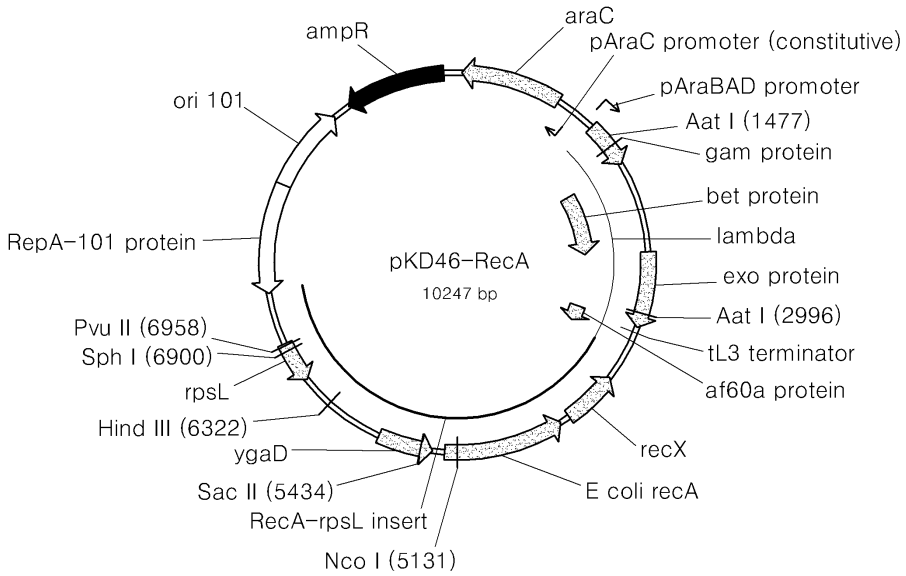
도면7


사이코스 (g/L)
400
300
200
100
0
OD 40
OD 80
OD 60
OD 80
40% 과당
60% 과당

도면8



도면9



서 열 목 록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY

<120> A Echerichia coli comprising a polynucleotide encoding psicose 3-epimerase and method of producing psicose using the same

<130> PN084856

<160> 27

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 289
<212> PRT
<213> Agrobacterium tumefaciens

<400> 1

```
Met Lys His Gly Ile Tyr Tyr Ser Tyr Trp Glu His Glu Trp Ser Ala
  1               5                  10                  15

Lys Phe Gly Pro Tyr Ile Glu Lys Val Ala Lys Leu Gly Phe Asp Ile
             20                  25                  30

Ile Glu Val Ala Ala His His Ile Asn Glu Tyr Ser Asp Ala Glu Leu
         35                  40                  45

Ala Thr Ile Arg Lys Ser Ala Lys Asp Asn Gly Ile Ile Leu Thr Ala
     50                  55                  60

Gly Ile Gly Pro Ser Lys Thr Lys Asn Leu Ser Ser Glu Asp Ala Ala
 65                  70                  75                  80

Val Arg Ala Ala Gly Lys Ala Phe Phe Glu Arg Thr Leu Ser Asn Val
                 85                  90                  95

Ala Lys Leu Asp Ile His Thr Ile Gly Gly Ala Leu His Ser Tyr Trp
            100                 105                 110

Pro Ile Asp Tyr Ser Gln Pro Val Asp Lys Ala Gly Asp Tyr Ala Arg
        115                 120                 125

Gly Val Glu Gly Ile Asn Gly Ile Ala Asp Phe Ala Asn Asp Leu Gly
    130                 135                 140

Ile Asn Leu Cys Ile Glu Val Leu Asn Arg Phe Glu Asn His Val Leu
145                 150                 155                 160

Asn Thr Ala Ala Glu Gly Val Ala Phe Val Lys Asp Val Gly Lys Asn
                165                 170                 175

Asn Val Lys Val Met Leu Asp Thr Phe His Met Asn Ile Glu Glu Asp
```

180 185 190

Ser Phe Gly Asp Ala Ile Arg Thr Ala Gly Pro Leu Leu Gly His Phe
195 200 205

His Thr Gly Glu Ser Asn Arg Arg Val Pro Gly Lys Gly Arg Met Pro
210 215 220

Trp His Glu Ile Gly Leu Ala Leu Arg Asp Ile Asn Tyr Thr Gly Ala
225 230 235 240

Val Ile Met Glu Pro Phe Val Lys Thr Gly Gly Thr Ile Gly Ser Asp
245 250 255

Ile Lys Val Trp Arg Asp Leu Ser Gly Gly Ala Asp Ile Ala Lys Met
260 265 270

Asp Glu Asp Ala Arg Asn Ala Leu Ala Phe Ser Arg Phe Val Leu Gly
275 280 285

Gly

<210> 2
<211> 870
<212> DNA
<213> Agrobacterium tumefaciens

<400> 2
atgaaacacg gcatctatta ttcttactgg gaacatgagt ggagcgccaa gttcggtccc 60

tatatcgaga aggtcgccaa gctcggtttc gacatcatcg aagtcgccgc ccaccatatc 120

aacgaataca gcgacgccga actcgcgacc atcaggaaga gcgcgaagga taacggcatc 180

atcctcaccg ccggcatcgg tccgtcgaaa accaagaacc tgtcgtcgga agatgctgcg 240

gtgcgtgcgg ccggcaaggc gttctttgaa agaacccttt cgaacgtcgc caagctcgat 300

atccacacca tcggcggcgc attgcattcc tattggccaa tcgattattc gcagcccgtc 360

gacaaggcag gcgattatgc gcgcggcgtc gagggtatca acggcattgc cgatttcgcc 420

aatgatctcg gcatcaacct gtgcatcgaa gtcctcaacc gctttgaaaa ccacgtcctc 480

aacacggcgg cggaaggcgt cgcttttgtg aaggatgtcg gcaagaacaa tgtgaaagtc 540

atgctggata ccttccacat gaacatcgag gaagacagtt tcggtgacgc catccgcacg 600

gccggcccgc ttctggggca cttccatacc ggtgaaagca atcgccgcgt accgggcaag 660

ggcagaatgc cgtggcacga aatcggcctt gcgctgcgtg atatcaacta caccggcgcg 720

gtaatcatgg agcctttcgt caagacaggc ggcaccatcg gctcggatat caaggtgtgg 780

cgcgacctga gcggtggcgc cgacatcgcg aaaatggatg aagatgcccg caatgcgctg 840

gcattctccc gcttcgttct tggtggctaa 870

<210> 3
<211> 320
<212> PRT
<213> Escherichia coli K-12 MG1655

<400> 3
Met Ile Lys Lys Ile Gly Val Leu Thr Ser Gly Gly Asp Ala Pro Gly
1 5 10 15

Met Asn Ala Ala Ile Arg Gly Val Val Arg Ser Ala Leu Thr Glu Gly
20 25 30

Leu Glu Val Met Gly Ile Tyr Asp Gly Tyr Leu Gly Leu Tyr Glu Asp
35 40 45

Arg Met Val Gln Leu Asp Arg Tyr Ser Val Ser Asp Met Ile Asn Arg
50 55 60

Gly Gly Thr Phe Leu Gly Ser Ala Arg Phe Pro Glu Phe Arg Asp Glu
65 70 75 80

Asn Ile Arg Ala Val Ala Ile Glu Asn Leu Lys Lys Arg Gly Ile Asp
85 90 95

```
Ala Leu Val Val Ile Gly Gly Asp Gly Ser Tyr Met Gly Ala Met Arg
            100                 105                 110

Leu Thr Glu Met Gly Phe Pro Cys Ile Gly Leu Pro Gly Thr Ile Asp
        115                 120                 125

Asn Asp Ile Lys Gly Thr Asp Tyr Thr Ile Gly Phe Phe Thr Ala Leu
    130                 135                 140

Ser Thr Val Val Glu Ala Ile Asp Arg Leu Arg Asp Thr Ser Ser Ser
145                 150                 155                 160

His Gln Arg Ile Ser Val Val Glu Val Met Gly Arg Tyr Cys Gly Asp
                165                 170                 175

Leu Thr Leu Ala Ala Ala Ile Ala Gly Gly Cys Glu Phe Val Val Val
            180                 185                 190

Pro Glu Val Glu Phe Ser Arg Glu Asp Leu Val Asn Glu Ile Lys Ala
        195                 200                 205

Gly Ile Ala Lys Gly Lys Lys His Ala Ile Val Ala Ile Thr Glu His
    210                 215                 220

Met Cys Asp Val Asp Glu Leu Ala His Phe Ile Glu Lys Glu Thr Gly
225                 230                 235                 240

Arg Glu Thr Arg Ala Thr Val Leu Gly His Ile Gln Arg Gly Gly Ser
                245                 250                 255

Pro Val Pro Tyr Asp Arg Ile Leu Ala Ser Arg Met Gly Ala Tyr Ala
            260                 265                 270

Ile Asp Leu Leu Leu Ala Gly Tyr Gly Gly Arg Cys Val Gly Ile Gln
        275                 280                 285

Asn Glu Gln Leu Val His His Asp Ile Ile Asp Ala Ile Glu Asn Met
    290                 295                 300

Lys Arg Pro Phe Lys Gly Asp Trp Leu Asp Cys Ala Lys Lys Leu Tyr
305                 310                 315                 320
```

<210> 4
<211> 963
<212> DNA
<213> Escherichia coli K-12 MG1655

<400> 4
atgattaaga aaatcggtgt gttgacaagc ggcggtgatg cgccaggcat gaacgccgca 60

attcgcgggg ttgttcgttc tgcgctgaca gaaggtctgg aagtaatggg tatttatgac 120

ggctatctgg gtctgtatga agaccgtatg gtacagctag accgttacag cgtgtctgac 180

atgatcaacc gtggcggtac gttcctcggt tctgcgcgtt tcccggaatt ccgcgacgag 240

aacatccgcg ccgtggctat cgaaaacctg aaaaaacgtg gtatcgacgc gctggtggtt 300

atcggcggtg acggttccta catgggtgca atgcgtctga ccgaaatggg cttcccgtgc 360

atcggtctgc cgggcactat cgacaacgac atcaaaggca ctgactacac tatcggtttc 420

ttcactgcgc tgagcaccgt tgtagaagcg atcgaccgtc tgcgtgacac ctcttcttct 480

caccagcgta tttccgtggt ggaagtgatg ggccgttatt gtggagatct gacgttggct 540

gcggccattg ccggtggctg tgaattcgtt gtggttccgg aagttgaatt cagccgtgaa 600

gacctggtaa acgaaatcaa agcgggtatc gcgaaaggta aaaaacacgc gatcgtggcg 660

attaccgaac atatgtgtga tgttgacgaa ctggcgcatt tcatcgagaa agaaaccggt 720

cgtgaaaccc gcgcaactgt gctgggccac atccagcgcg gtggttctcc ggtgccttac 780

gaccgtattc tggcttcccg tatgggcgct tacgctatcg atctgctgct ggcaggttac 840

ggcggtcgtt gtgtaggtat ccagaacgaa cagctggttc accacgacat catcgacgct 900

atcgaaaaca tgaagcgtcc gttcaaaggt gactggctgg actgcgcgaa aaaactgtat 960

taa 963

<210> 5
<211> 149
<212> PRT
<213> Escherichia coli K-12 MG1655

<400> 5
Met Lys Lys Ile Ala Phe Gly Cys Asp His Val Gly Phe Ile Leu Lys
1 5 10 15

His Glu Ile Val Ala His Leu Val Glu Arg Gly Val Glu Val Ile Asp
20 25 30

Lys Gly Thr Trp Ser Ser Glu Arg Thr Asp Tyr Pro His Tyr Ala Ser
35 40 45

Gln Val Ala Leu Ala Val Ala Gly Gly Glu Val Asp Gly Gly Ile Leu
50 55 60

Ile Cys Gly Thr Gly Val Gly Ile Ser Ile Ala Ala Asn Lys Phe Ala
65 70 75 80

Gly Ile Arg Ala Val Val Cys Ser Glu Pro Tyr Ser Ala Gln Leu Ser
85 90 95

Arg Gln His Asn Asp Thr Asn Val Leu Ala Phe Gly Ser Arg Val Val
100 105 110

Gly Leu Glu Leu Ala Lys Met Ile Val Asp Ala Trp Leu Gly Ala Gln
115 120 125

Tyr Glu Gly Gly Arg His Gln Gln Arg Val Glu Ala Ile Thr Ala Ile
130 135 140

Glu Gln Arg Arg Asn
145

<210> 6
<211> 450
<212> DNA
<213> Escherichia coli K-12 MG1655

<400> 6

atgaaaaaga ttgcatttgg ctgtgatcat gtcggtttca ttttaaaaca tgaaatagtg 60

gcacatttag ttgagcgtgg cgttgaagtg attgataaag gaacctggtc gtcagagcgt 120

actgattatc cacattacgc cagtcaagtc gcactggctg ttgctggcgg agaggttgat 180

ggcgggattt tgatttgtgg tactggcgtc ggtatttcga tagcggcgaa caagtttgcc 240

ggaattcgcg cggtcgtctg tagcgaacct tattccgcgc aactttcgcg gcagcataac 300

gacaccaacg tgctggcttt tggttcacga gtggttggcc tcgaactggc aaaaatgatt 360

gtggatgcgt ggctgggcgc acagtacgaa ggcggtcgtc atcaacaacg cgtggaggcg 420

attacggcaa tagagcagcg gagaaattaa 450

<210> 7
<211> 296
<212> PRT
<213> Escherichia coli K-12 MG1655

<400> 7
Met Ser Gln Ser Glu Phe Asp Ser Ala Leu Pro Asn Gly Ile Gly Leu
1 5 10 15

Ala Pro Tyr Leu Arg Met Lys Gln Glu Gly Met Thr Glu Asn Glu Ser
20 25 30

Arg Ile Val Glu Trp Leu Leu Lys Pro Gly Asn Leu Ser Cys Ala Pro
35 40 45

Ala Ile Lys Asp Val Ala Glu Ala Leu Ala Val Ser Glu Ala Met Ile
50 55 60

Val Lys Val Ser Lys Leu Leu Gly Phe Ser Gly Phe Arg Asn Leu Arg
65 70 75 80

Ser Ala Leu Glu Asp Tyr Phe Ser Gln Ser Glu Gln Val Leu Pro Ser
85 90 95

Glu Leu Ala Phe Asp Glu Ala Pro Gln Asp Val Val Asn Lys Val Phe

100 105 110

Asn Ile Thr Leu Arg Thr Ile Met Glu Gly Gln Ser Ile Val Asn Val
115 120 125

Asp Glu Ile His Arg Ala Ala Arg Phe Phe Tyr Gln Ala Arg Gln Arg
130 135 140

Asp Leu Tyr Gly Ala Gly Gly Ser Asn Ala Ile Cys Ala Asp Val Gln
145 150 155 160

His Lys Phe Leu Arg Ile Gly Val Arg Cys Gln Ala Tyr Pro Asp Ala
165 170 175

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

Leu Val Val Thr His Ser Gly Arg Thr Ser Asp Val Lys Ala Ala Val
195 200 205

Glu Leu Ala Lys Lys Asn Gly Ala Lys Ile Ile Cys Ile Thr His Ser
210 215 220

Tyr His Ser Pro Ile Ala Lys Leu Ala Asp Tyr Ile Ile Cys Ser Pro
225 230 235 240

Ala Pro Glu Thr Pro Leu Leu Gly Arg Asn Ala Ser Ala Arg Ile Leu
245 250 255

Gln Leu Thr Leu Leu Asp Ala Phe Phe Val Ser Val Ala Gln Leu Asn
260 265 270

Ile Glu Gln Ala Asn Ile Asn Met Gln Lys Thr Gly Ala Ile Val Asp
275 280 285

Phe Phe Ser Pro Gly Ala Leu Lys
290 295

<210> 8
<211> 891
<212> DNA
<213> Escherichia coli K-12 MG1655

<400> 8
atgagccagt cagagtttga ttcagcgctt ccgaacggta tagggttagc gccttacctg 60

cgaatgaagc aggaaggaat gacagaaaat gaaagccgca tcgtggagtg gttactcaaa 120

cccggtaacc tgagttgtgc acccgcaatt aaagatgtcg cagaagctct ggcggtatct 180

gaagcgatga tagttaaggt atcaaagctg ctggggttta gcggctttcg taacttacgc 240

agtgcgctgg aagattattt ttctcagtca gaacaggtat tgccttccga gttggctttt 300

gatgaagcgc cgcaggatgt ggtgaataag gtatttaaca tcactttacg caccattatg 360

gaaggtcagt cgatcgtcaa cgttgatgag atccaccgtg ccgcccgctt tttctatcag 420

gccagacagc gggatttgta cggtgccgga ggatcaaatg ctatctgtgc tgatgtacag 480

cacaagttct tgcgcattgg cgtacgctgt caggcctatc ctgatgctca catcatgatg 540

atgtccgctt cgttgttaca ggaaggagat gttgtgctgg tagtgaccca ttccgggcga 600

accagtgatg taaaagcggc cgtagaactg gcaaaaaaga acggggcaaa gattatttgt 660

ataacccata gctaccattc accgatagcg aaactggccg attatattat ttgctcacca 720

gccccggaaa cgccgttatt aggtcgtaat gcctcggcaa gaatattaca actaactttg 780

ctggacgctt tttttgtctc tgtcgcccag ctcaacattg aacaagctaa tattaatatg 840

caaaaaaccg gcgcaattgt tgatttcttc tcaccaggcg cgctgaaata a 891

<210> 9
<211> 311
<212> PRT
<213> Escherichia coli K-12 MG1655

<400> 9
Met Asn Lys Tyr Leu Lys Tyr Phe Ser Gly Thr Leu Val Gly Leu Met
1 5 10 15

```
Leu Ser Thr Ser Ala Phe Ala Ala Ala Glu Tyr Ala Val Val Leu Lys
             20                  25                  30

Thr Leu Ser Asn Pro Phe Trp Val Asp Met Lys Lys Gly Ile Glu Asp
         35                  40                  45

Glu Ala Lys Thr Leu Gly Val Ser Val Asp Ile Phe Ala Ser Pro Ser
     50                  55                  60

Glu Gly Asp Phe Gln Ser Gln Leu Gln Leu Phe Glu Asp Leu Ser Asn
 65                  70                  75                  80

Lys Asn Tyr Lys Gly Ile Ala Phe Ala Pro Leu Ser Ser Val Asn Leu
                 85                  90                  95

Val Met Pro Val Ala Arg Ala Trp Lys Lys Gly Ile Tyr Leu Val Asn
            100                 105                 110

Leu Asp Glu Lys Ile Asp Met Asp Asn Leu Lys Lys Ala Gly Gly Asn
        115                 120                 125

Val Glu Ala Phe Val Thr Thr Asp Asn Val Ala Val Gly Ala Lys Gly
    130                 135                 140

Ala Ser Phe Ile Ile Asp Lys Leu Gly Ala Glu Gly Gly Glu Val Ala
145                 150                 155                 160

Ile Ile Glu Gly Lys Ala Gly Asn Ala Ser Gly Glu Ala Arg Arg Asn
                165                 170                 175

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

Ser Gln Pro Ala Asp Trp Asp Arg Ile Lys Ala Leu Asp Val Ala Thr
        195                 200                 205

Asn Val Leu Gln Arg Asn Pro Asn Ile Lys Ala Ile Tyr Cys Ala Asn
    210                 215                 220

Asp Thr Met Ala Met Gly Val Ala Gln Ala Val Ala Asn Ala Gly Lys
225                 230                 235                 240

Thr Gly Lys Val Leu Val Val Gly Thr Asp Gly Ile Pro Glu Ala Arg
                245                 250                 255
```

Lys Met Val Glu Ala Gly Gln Met Thr Ala Thr Val Ala Gln Asn Pro
260 265 270

Ala Asp Ile Gly Ala Thr Gly Leu Lys Leu Met Val Asp Ala Glu Lys
275 280 285

Ser Gly Lys Val Ile Pro Leu Asp Lys Ala Pro Glu Phe Lys Leu Val
290 295 300

Asp Ser Ile Leu Val Thr Gln
305 310

<210> 10
<211> 936
<212> DNA
<213> Escherichia coli K-12 MG1655

<400> 10
atgaataaat atctgaaata tttcagcggc acactcgtgg gcttaatgtt gtcaaccagc 60

gcttttgctg ccgccgaata tgctgtcgta ttgaaaaccc tctccaaccc attttgggta 120

gatatgaaaa aaggcattga agatgaagca aaaacactgg gcgtcagcgt tgatattttt 180

gcctctcctt cagaaggcga ttttcaatct caattgcagt tatttgaaga tctcagtaat 240

aaaaattaca aaggtatcgc cttcgctcca ttatcctcag tgaatctggt catgcctgtc 300

gcccgcgcat ggaaaaaagg catttatctg gttaatctcg atgaaaaaat cgacatggat 360

aatctgaaaa aagctggcgg caatgtggaa gcttttgtca ccaccgataa cgttgctgtc 420

ggggcgaaag gcgcgtcgtt cattattgac aaattgggcg ctgaaggtgg tgaagtcgca 480

atcattgagg gtaaagccgg taacgcctcc ggtgaagcgc gtcgtaatgg tgccaccgaa 540

gccttcaaaa aagcaagcca gatcaagctt gtcgccagcc agcctgccga ctgggaccgc 600

attaaagcac tggatgtcgc cactaacgtg ttgcaacgta atccgaatat taaagcgatc 660

tattgcgcga atgacacgat ggcaatgggt gttgctcagg cagtcgcaaa cgccggaaaa 720

acgggaaaag tgctggtcgt cggtacagat ggcattccgg aagcccgcaa aatggtggaa 780

gccggacaaa tgaccgcgac ggttgcccag aacccggcgg atatcggcgc aacgggtctg 840

aagctgatgg ttgacgctga gaaatccggc aaggttatcc cgctggataa agcaccggaa 900

tttaaactgg tcgattcaat cctggtcact caataa 936

<210> 11
<211> 510
<212> PRT
<213> Escherichia coli K-12 MG1655

<400> 11
Met Ala Thr Pro Tyr Ile Ser Met Ala Gly Ile Gly Lys Ser Phe Gly
1 5 10 15

Pro Val His Ala Leu Lys Ser Val Asn Leu Thr Val Tyr Pro Gly Glu
20 25 30

Ile His Ala Leu Leu Gly Glu Asn Gly Ala Gly Lys Ser Thr Leu Met
35 40 45

Lys Val Leu Ser Gly Ile His Glu Pro Thr Lys Gly Thr Ile Thr Ile
50 55 60

Asn Asn Ile Ser Tyr Asn Lys Leu Asp His Lys Leu Ala Ala Gln Leu
65 70 75 80

Gly Ile Gly Ile Ile Tyr Gln Glu Leu Ser Val Ile Asp Glu Leu Thr
85 90 95

Val Leu Glu Asn Leu Tyr Ile Gly Arg His Leu Thr Lys Lys Ile Cys
100 105 110

Gly Val Asn Ile Ile Asp Trp Arg Glu Met Arg Val Arg Ala Ala Met
115 120 125

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

```
    130                 135                 140

Asn Leu Ser Ile Ser His Lys Gln Met Leu Glu Ile Ala Lys Thr Leu
145                 150                 155                 160

Met Leu Asp Ala Lys Val Ile Ile Met Asp Glu Pro Thr Ser Ser Leu
                165                 170                 175

Thr Asn Lys Glu Val Asp Tyr Leu Phe Leu Ile Met Asn Gln Leu Arg
            180                 185                 190

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

Arg Arg Ile Cys Asp Arg Tyr Thr Val Met Lys Asp Gly Ser Ser Val
    210                 215                 220

Cys Ser Gly Ile Val Ser Asp Val Ser Asn Asp Asp Ile Val Arg Leu
225                 230                 235                 240

Met Val Gly Arg Glu Leu Gln Asn Arg Phe Asn Ala Met Lys Glu Asn
                245                 250                 255

Val Ser Asn Leu Ala His Glu Thr Val Phe Glu Val Arg Asn Val Thr
            260                 265                 270

Ser Arg Asp Arg Lys Lys Val Arg Asp Ile Ser Phe Ser Val Cys Arg
        275                 280                 285

Gly Glu Ile Leu Gly Phe Ala Gly Leu Val Gly Ser Gly Arg Thr Glu
    290                 295                 300

Leu Met Asn Cys Leu Phe Gly Val Asp Lys Arg Ala Gly Gly Glu Ile
305                 310                 315                 320

Arg Leu Asn Gly Lys Asp Ile Ser Pro Arg Ser Pro Leu Asp Ala Val
                325                 330                 335

Lys Lys Gly Met Ala Tyr Ile Thr Glu Ser Arg Arg Asp Asn Gly Phe
            340                 345                 350

Phe Pro Asn Phe Ser Ile Ala Gln Asn Met Ala Ile Ser Arg Ser Leu
        355                 360                 365
```

```
Lys Asp Gly Gly Tyr Lys Gly Ala Met Gly Leu Phe His Glu Val Asp
    370                 375                 380

Glu Gln Arg Thr Ala Glu Asn Gln Arg Glu Leu Leu Ala Leu Lys Cys
385                 390                 395                 400

His Ser Val Asn Gln Asn Ile Thr Glu Leu Ser Gly Gly Asn Gln Gln
                405                 410                 415

Lys Val Leu Ile Ser Lys Trp Leu Cys Cys Cys Pro Glu Val Ile Ile
            420                 425                 430

Phe Asp Glu Pro Thr Arg Gly Ile Asp Val Gly Ala Lys Ala Glu Ile
        435                 440                 445

Tyr Lys Val Met Arg Gln Leu Ala Asp Asp Gly Lys Val Ile Leu Met
    450                 455                 460

Val Ser Ser Glu Leu Pro Glu Ile Ile Thr Val Cys Asp Arg Ile Ala
465                 470                 475                 480

Val Phe Cys Glu Gly Arg Leu Thr Gln Ile Leu Thr Asn Arg Asp Asp
                485                 490                 495

Met Ser Glu Glu Glu Ile Met Ala Trp Ala Leu Pro Gln Glu
            500                 505                 510
```

<210> 12
<211> 1533
<212> DNA
<213> Escherichia coli K-12 MG1655

<400> 12

```
atggccacgc catatatatc gatggcgggg atcggcaagt cctttggtcc ggttcacgca        60

ttaaagtcgg ttaatttaac ggtttatcct ggtgaaatac atgcattact aggagaaaat        120

ggcgcgggta aatccacgct aatgaaagtt ttatccggaa tacatgagcc gaccaaaggc        180

accattacca ttaataacat tagctataac aagctggatc ataaattagc ggcacaactc        240

ggtatcggga ttatttatca ggaactcagc gttattgatg aattaaccgt actggaaaat        300
```

ttatatattg gtcgtcatct gacgaaaaaa atctgtggcg tcaatattat cgactggcga 360

gaaatgcgtg tccgcgccgc catgatgtta ttacgcgtgg gcttgaaagt tgatctagat 420

gagaaagtgg cgaatttatc tatcagccac aagcagatgc tagaaattgc caaaacgctg 480

atgctcgatg ccaaagtcat catcatggat gaacccacct cctcactcac caataaagag 540

gtggactatc tgtttctgat catgaatcag ttgcgtaaag agggtacggc catcgtctat 600

atctcgcata agttggcgga aattcgccgt atttgcgacc gctatacggt gatgaaagac 660

ggcagcagcg tttgcagcgg catagtaagc gatgtgtcaa atgacgatat cgtccgtctg 720

atggtaggcc gcgaactgca aaaccgtttt aacgcgatga aggagaatgt cagcaacctt 780

gcgcacgaaa cggtttttga ggtgcggaac gtcaccagtc gtgacagaaa aaaggtccgg 840

gatatctcat ttagcgtctg ccggggagaa atattaggct ttgccggact ggtcggttcc 900

ggacgtactg aactgatgaa ttgtctgttt ggcgtggata aacgcgctgg cggagaaatc 960

cgtcttaatg gcaaagatat ctctccacgt tcacccctgg atgccgtgaa aaaagggatg 1020

gcttacatca ctgaaagccg ccgggataac ggtttttttcc ccaacttttc catcgctcag 1080

aacatggcga tcagccgcag tctgaaagac ggcggctata aaggcgcgat gggcttgttt 1140

catgaagttg acgagcaacg taccgctgaa aatcaacgcg aactgctggc gctgaaatgt 1200

cattcggtaa accagaatat caccgaactc tccgggggaa atcagcagaa agtcctgatc 1260

tccaaatggc tgtgctgttg cccggaagtg attattttcg atgaacctac ccgcggcatc 1320

gacgttggcg cgaaagccga aatttacaaa gtgatgcgcc aactggcgga cgacggaaaa 1380

gtcatcctga tggtgtcatc tgaactacct gaaattatca ccgtctgcga ccgcatcgcc 1440

gtgttctgcg aaggacgact gacgcaaatc ctgacgaatc gcgatgacat gagcgaagag 1500

gagattatgg catgggcttt accacaagag taa 1533

<210> 13
<211> 326
<212> PRT
<213> Escherichia coli K-12 MG1655

<400> 13
Met Gly Phe Thr Thr Arg Val Lys Ser Glu Ala Ser Glu Lys Lys Pro
1 5 10 15

Phe Asn Phe Ala Leu Phe Trp Asp Lys Tyr Gly Thr Phe Phe Ile Leu
20 25 30

Ala Ile Ile Val Ala Ile Phe Gly Ser Leu Ser Pro Glu Tyr Phe Leu
35 40 45

Thr Thr Asn Asn Ile Thr Gln Ile Phe Val Gln Ser Ser Val Thr Val
50 55 60

Leu Ile Gly Met Gly Glu Phe Phe Ala Ile Leu Val Ala Gly Ile Asp
65 70 75 80

Leu Ser Val Gly Ala Ile Leu Ala Leu Ser Gly Met Val Thr Ala Lys
85 90 95

Leu Met Leu Ala Gly Val Asp Pro Phe Leu Ala Ala Met Ile Gly Gly
100 105 110

Val Leu Val Gly Gly Ala Leu Gly Ala Ile Asn Gly Cys Leu Val Asn
115 120 125

Trp Thr Gly Leu His Pro Phe Ile Ile Thr Leu Gly Thr Asn Ala Ile
130 135 140

Phe Arg Gly Ile Thr Leu Val Ile Ser Asp Ala Asn Ser Val Tyr Gly
145 150 155 160

Phe Ser Phe Asp Phe Val Asn Phe Phe Ala Ala Ser Val Ile Gly Ile
165 170 175

```
Pro Val Pro Val Ile Phe Ser Leu Ile Val Ala Leu Ile Leu Trp Phe
            180                 185                 190

Leu Thr Thr Arg Met Arg Leu Gly Arg Asn Ile Tyr Ala Leu Gly Gly
        195                 200                 205

Asn Lys Asn Ser Ala Phe Tyr Ser Gly Ile Asp Val Lys Phe His Ile
    210                 215                 220

Leu Val Val Phe Ile Ile Ser Gly Val Cys Ala Gly Leu Ala Gly Val
225                 230                 235                 240

Val Ser Thr Ala Arg Leu Gly Ala Ala Glu Pro Leu Ala Gly Met Gly
                245                 250                 255

Phe Glu Thr Tyr Ala Ile Ala Ser Ala Ile Ile Gly Gly Thr Ser Phe
            260                 265                 270

Phe Gly Gly Lys Gly Arg Ile Phe Ser Val Val Ile Gly Gly Leu Ile
        275                 280                 285

Ile Gly Thr Ile Asn Asn Gly Leu Asn Ile Leu Gln Val Gln Thr Tyr
    290                 295                 300

Tyr Gln Leu Val Val Met Gly Gly Leu Ile Ile Ala Ala Val Ala Leu
305                 310                 315                 320

Asp Arg Leu Ile Ser Lys
                325
```

<210> 14
<211> 981
<212> DNA
<213> Escherichia coli K-12 MG1655

<400> 14

```
atgggcttta ccacaagagt aaaaagcgaa gcgagcgaga agaaaccgtt caactttgcg        60

ctgttctggg ataaatacgg cacctttttt atcctggcga tcatcgtcgc catctttggt       120

tcgctgtcac cagaatattt tctgaccacc aataatatta cccagatttt tgttcaaagc       180
```

tccgtgacgg tattgatcgg catgggcgag tttttcgcta tcctggtcgc tggtatcgac 240

ctctcggttg gcgcgattct ggcgctttcc ggtatggtga ccgccaaact gatgttggca 300

ggtgttgacc cgtttctcgc agcgatgatt ggcggtgtac tggttggcgg cgcactgggg 360

gcgatcaacg gctgcctggt caactggacg gggctacacc cgttcatcat cacccttggc 420

accaacgcga ttttccgtgg gatcacgctg gtgatctccg atgccaactc ggtatacggc 480

ttctcatttg acttcgtgaa cttctttgcc gccagcgtaa ttgggatacc tgtccccgtt 540

atcttctcac taattgtcgc gctcatcctt tggtttctga caacgcgtat gcggctcggg 600

cgcaacatct acgcactggg cggcaacaaa aattcggcgt tctattccgg gattgacgtg 660

aaattccaca tcctggtggt gtttatcatc tccggtgttt gtgcaggtct ggcaggcgtc 720

gtctcaactg cacgactcgg tgccgcagaa ccgcttgccg gtatgggttt tgaaacctat 780

gccattgcca gcgccatcat tggcggcacc agtttcttcg gcggcaaggg gcgcattttc 840

tctgtggtga ttggcgggtt gatcatcggc accatcaaca acggtctgaa tattttgcag 900

gtacaaacct attaccaact ggtggtgatg ggcggattaa ttatcgcggc tgtcgccctt 960

gaccgtctta tcagtaagta a 981

<210> 15
<211> 231
<212> PRT
<213> Escherichia coli K-12 MG1655

<400> 15
Met Lys Ile Ser Pro Ser Leu Met Cys Met Asp Leu Leu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Glu Gln Ile Glu Phe Ile Asp Ser His Ala Asp Tyr Phe His Ile Asp
20 25 30

```
Ile Met Asp Gly His Phe Val Pro Asn Leu Thr Leu Ser Pro Phe Phe
         35                  40                  45

Val Ser Gln Val Lys Lys Leu Ala Thr Lys Pro Leu Asp Cys His Leu
     50                  55                  60

Met Val Thr Arg Pro Gln Asp Tyr Ile Ala Gln Leu Ala Arg Ala Gly
 65                  70                  75                  80

Ala Asp Phe Ile Thr Leu His Pro Glu Thr Ile Asn Gly Gln Ala Phe
                 85                  90                  95

Arg Leu Ile Asp Glu Ile Arg Arg His Asp Met Lys Val Gly Leu Ile
            100                 105                 110

Leu Asn Pro Glu Thr Pro Val Glu Ala Met Lys Tyr Tyr Ile His Lys
        115                 120                 125

Ala Asp Lys Ile Thr Val Met Thr Val Asp Pro Gly Phe Ala Gly Gln
    130                 135                 140

Pro Phe Ile Pro Glu Met Leu Asp Lys Leu Ala Glu Leu Lys Ala Trp
145                 150                 155                 160

Arg Glu Arg Glu Gly Leu Glu Tyr Glu Ile Glu Val Asp Gly Ser Cys
                165                 170                 175

Asn Gln Ala Thr Tyr Glu Lys Leu Met Ala Ala Gly Ala Asp Val Phe
            180                 185                 190

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

Ala Trp Arg Ile Met Thr Ala Gln Ile Leu Ala Ala Lys Ser Glu Val
    210                 215                 220

Gln Pro His Ala Lys Thr Ala
225                 230
```

<210> 16
<211> 696
<212> DNA
<213> Escherichia coli K-12 MG1655

<400> 16
atgaaaatct ccccctcgtt aatgtgtatg gatctgctga aatttaaaga acagatcgaa 60

tttatcgaca gccatgccga ttacttccac atcgatatca tggacggtca ctttgtcccc 120

aatctgacac tctcaccgtt cttcgtaagt caggttaaaa aactggcaac taaaccgctc 180

gactgtcatc tgatggtgac gcggccgcag gattacattg ctcaactggc gcgtgcggga 240

gcagatttca tcactctgca tccggaaacc atcaacggcc aggcgttccg cctgattgat 300

gaaatccgcc gtcatgacat gaaagtgggg ctgatcctta acccggagac gccagttgag 360

gccatgaaat actatatcca taaggccgat aaaattacgg tcatgactgt cgatcccggc 420

tttgccggac aaccgttcat tcctgaaatg ctggataaac ttgccgaact gaaggcatgg 480

cgtgaacgag aaggtctgga gtacgaaatt gaggtggacg gttcctgcaa ccaggcaact 540

tacgaaaaac tgatggcggc aggggcggat gtctttatcg tcggcacttc cggcctgttt 600

aatcatgcgg aaaatatcga cgaagcatgg agaattatga ccgcgcagat tctggctgca 660

aaaagcgagg tacagcctca tgcaaaaaca gcataa 696

<210> 17
<211> 309
<212> PRT
<213> Escherichia coli K-12 MG1655

<400> 17
Met Gln Lys Gln His Asn Val Val Ala Gly Val Asp Met Gly Ala Thr
1 5 10 15

His Ile Arg Phe Cys Leu Arg Thr Ala Glu Gly Glu Thr Leu His Cys
20 25 30

Glu Lys Lys Arg Thr Ala Glu Val Ile Ala Pro Gly Leu Val Ser Gly
35 40 45

Ile Gly Glu Met Ile Asp Glu Gln Leu Arg Arg Phe Asn Ala Arg Cys
50 55 60

His Gly Leu Val Met Gly Phe Pro Ala Leu Val Ser Lys Asp Lys Arg
65 70 75 80

Thr Ile Ile Ser Thr Pro Asn Leu Pro Leu Thr Ala Ala Asp Leu Tyr
85 90 95

Asp Leu Ala Asp Lys Leu Glu Asn Thr Leu Asn Cys Pro Val Glu Phe
100 105 110

Ser Arg Asp Val Asn Leu Gln Leu Ser Trp Asp Val Val Glu Asn Arg
115 120 125

Leu Thr Gln Gln Leu Val Leu Ala Ala Tyr Leu Gly Thr Gly Met Gly
130 135 140

Phe Ala Val Trp Met Asn Gly Ala Pro Trp Thr Gly Ala His Gly Val
145 150 155 160

Ala Gly Glu Leu Gly His Ile Pro Leu Gly Asp Met Thr Gln His Cys
165 170 175

Ala Cys Gly Asn Pro Gly Cys Leu Glu Thr Asn Cys Ser Gly Met Ala
180 185 190

Leu Arg Arg Trp Tyr Glu Gln Gln Pro Arg Asn Tyr Pro Leu Arg Asp
195 200 205

Leu Phe Val His Ala Glu Asn Ala Pro Phe Val Gln Ser Leu Leu Glu
210 215 220

Asn Ala Ala Arg Ala Ile Ala Thr Ser Ile Asn Leu Phe Asp Pro Asp
225 230 235 240

Ala Val Ile Leu Gly Gly Gly Val Met Asp Met Pro Ala Phe Pro Arg
245 250 255

Glu Thr Leu Val Ala Met Thr Gln Lys Tyr Leu Arg Arg Pro Leu Pro
260 265 270

His Gln Val Val Arg Phe Ile Ala Ala Ser Ser Ser Asp Phe Asn Gly

275 280 285

Ala Gln Gly Ala Ala Ile Leu Ala His Gln Arg Phe Leu Pro Gln Phe
290 295 300

Cys Ala Lys Ala Pro
305

<210> 18
<211> 930
<212> DNA
<213> Escherichia coli K-12 MG1655

<400> 18
atgcaaaaac agcataacgt cgtagcgggc gtggatatgg gggcaacgca tatccgcttt 60

tgtctgcgga cagcagaagg tgaaacgcta cactgcgaaa aaaagcggac cgcagaagtc 120

attgctcccg gcctggtgtc gggtatcggc gaaatgattg acgagcaact caggcgcttt 180

aacgctcgct gtcatggtct ggtgatggga tttccggcgc tggtcagtaa agataaacgc 240

accattattt ctacgcctaa cctgccgtta acagcggcgg atttatatga tctcgccgat 300

aagctcgaaa atacgctgaa ttgtccggtt gagttttccc gcgacgttaa cctgcaactc 360

tcctgggacg tagtagaaaa ccgccttacg caacaactgg ttctggcggc ctatctcggt 420

acggggatgg ggttcgcagt gtggatgaac ggtgcgccgt ggacgggtgc acacggtgtg 480

gcaggcgaac tgggtcatat ccccctggga gatatgaccc aacactgcgc gtgtggcaat 540

cctgggtgcc tggaaaccaa ttgctctgga atggcgctaa gacgctggta cgaacaacag 600

ccccgaaatt acccattgcg cgatcttttc gtccatgcgg aaaacgcccc tttcgtccag 660

agtctgcttg aaaacgcggc acgggccatt gccaccagca ttaatctgtt cgatcccgat 720

gcggtgatcc tgggcggtgg cgtgatggat atgcccgcct tcccacgcga gactctcgtt 780

gccatgaccc aaaagtacct gcgccgtcca ctgccgcatc aggtcgtgcg ctttattgcc 840

gcctcatctt ctgactttaa tggcgctcag ggtgcagcaa tattggcgca tcaacgtttt 900

ttgccacagt tctgtgctaa agccccataa 930

<210> 19
<211> 246
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> trc promoter

<400> 19
cgactgcacg gtgcaccaat gcttctggcg tcaggcagcc atcggaagct gtggtatggc 60

tgtgcaggtc gtaaatcact gcataattcg tgtcgctcaa ggcgcactcc cgttctggat 120

aatgtttttt gcgccgacat cataacggtt ctggcaaata ttctgaaatg agctgttgac 180

aattaatcat ccggctcgta taatgtgtgg aattgtgagc ggataacaat ttcacacagg 240

aaacag 246

<210> 20
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> FP-1 forward primer

<400> 20
acctacaaca aagctctcat caacc 25

<210> 21
<211> 25
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> KAN-2 RP-1 reverse primer

<400> 21
gcaatgtaac atcagagatt ttgag 25

<210> 22
<211> 1221
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> EZ::TN <KAN-2> Transposon 1221 bp

<400> 22
ctgtctctta tacacatctc aaccatcatc gatgaattgt gtctcaaaat ctctgatgtt 60

acattgcaca agataaaaat atatcatcat gaacaataaa actgtctgct tacataaaca 120

gtaatacaag gggtgttatg agccatattc aacgggaaac gtcttgctcg aggccgcgat 180

taaattccaa catggatgct gatttatatg ggtataaatg ggctcgcgat aatgtcgggc 240

aatcaggtgc gacaatctat cgattgtatg ggaagcccga tgcgccagag ttgtttctga 300

aacatggcaa aggtagcgtt gccaatgatg ttacagatga gatggtcaga ctaaactggc 360

tgacggaatt tatgcctctt ccgaccatca agcattttat ccgtactcct gatgatgcat 420

ggttactcac cactgcgatc cccggaaaaa cagcattcca ggtattagaa gaatatcctg 480

attcaggtga aaatattgtt gatgcgctgg cagtgttcct gcgccggttg cattcgattc 540

ctgtttgtaa ttgtcctttt aacagcgatc gcgtatttcg tctcgctcag gcgcaatcac 600

gaatgaataa cggtttggtt gatgcgagtg attttgatga cgagcgtaat ggctggcctg 660

ttgaacaagt ctggaaagaa atgcataaac ttttgccatt ctcaccggat tcagtcgtca 720

ctcatggtga tttctcactt gataacctta tttttgacga ggggaaatta taggttgta 780

ttgatgttgg acgagtcgga atcgcagacc gataccagga tcttgccatc ctatggaact 840

gcctcggtga gttttctcct tcattacaga aacggctttt tcaaaaatat ggtattgata 900

atcctgatat gaataaattg cagtttcatt tgatgctcga tgagtttttc taatcagaat 960

tggttaattg gttgtaacac tggcagagca ttacgctgac ttgacgggac ggcggctttg 1020

ttgaataaat cgaacttttg ctgagttgaa ggatcagatc acgcatcttc ccgacaacgc 1080

agaccgttcc gtggcaaagc aaaagttcaa aatcaccaac tggtccacct acaacaaagc 1140

tctcatcaac cgtggcgggg atcctctaga gtcgacctgc aggcatgcaa gcttcagggt 1200

tgagatgtgt ataagagaca g 1221

<210> 23
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer

<400> 23
gtgttgacaa gcggcggtga t 21

<210> 24
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> reverse primer

<400> 24
gcttacgcta tcgatctgct gctg 24

<210> 25
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer

<400> 25
ggaattcatg aaacacggca tctattattc 30

<210> 26
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse primer

<400> 26
ctctagatta gccaccaaga acgaagcgg 29

<210> 27
<211> 4176
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> pTrc99A sequence

<400> 27
gtttgacagc ttatcatcga ctgcacggtg caccaatgct tctggcgtca ggcagccatc 60

ggaagctgtg gtatggctgt gcaggtcgta aatcactgca taattcgtgt cgctcaaggc 120

gcactcccgt tctggataat gtttttgcg ccgacatcat aacggttctg gcaaatattc 180

tgaaatgagc tgttgacaat taatcatccg gctcgtataa tgtgtggaat tgtgagcgga 240

taacaatttc acacaggaaa cagaccatgg aattcgagct cggtacccgg ggatcctcta 300

gagtcgacct gcaggcatgc aagcttggct gttttggcgg atgagagaag attttcagcc 360

tgatacagat taaatcagaa cgcagaagcg gtctgataaa acagaatttg cctggcggca 420

gtagcgcggt ggtcccacct gaccccatgc cgaactcaga agtgaaacgc cgtagcgccg 480

atggtagtgt ggggtctccc catgcgagag tagggaactg ccaggcatca aataaaacga 540

aaggctcagt cgaaagactg ggcctttcgt tttatctgtt gtttgtcggt gaacgctctc 600

ctgagtagga caaatccgcc gggagcggat ttgaacgttg cgaagcaacg gcccggaggg 660

tggcgggcag gacgcccgcc ataaactgcc aggcatcaaa ttaagcagaa ggccatcctg 720

acggatggcc tttttgcgtt tctacaaact ctttttgttt atttttctaa atacattcaa 780

atatgtatcc gctcatgaga caataaccct gataaatgct tcaataatat tgaaaaagga 840

agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg cccttattcc ctttttgcg gcattttgcc 900

ttcctgtttt tgctcaccca gaaacgctgg tgaaagtaaa agatgctgaa gatcagttgg 960

gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg taagatcctt gagagttttc 1020

gccccgaaga acgttttcca atgatgagca cttttaaagt tctgctatgt ggcgcggtat 1080

tatcccgtgt tgacgccggg caagagcaac tcggtcgccg catacactat tctcagaatg 1140

acttggttga gtactcacca gtcacagaaa agcatcttac ggatggcatg acagtaagag 1200

aattatgcag tgctgccata accatgagtg ataacactgc ggccaactta cttctgacaa 1260

cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt ttttgcacaa catgggggat catgtaactc 1320

gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc aaacgacgag cgtgacacca 1380

cgatgcctac agcaatggca acaacgttgc gcaaactatt aactggcgaa ctacttactc 1440

tagcttcccg gcaacaatta atagactgga tggaggcgga taaagttgca ggaccacttc 1500

tgcgctcggc ccttccggct ggctggttta ttgctgataa atctggagcc ggtgagcgtg 1560

ggtctcgcgg tatcattgca gcactggggc cagatggtaa gccctcccgt atcgtagtta 1620

tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag 1680

gtgcctcact gattaagcat tggtaactgt cagaccaagt ttactcatat atactttaga 1740

ttgatttaaa acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt gaagatcctt tttgataatc 1800

tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa 1860

agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcgcgt aatctgctgc ttgcaaacaa 1920

aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt tgccggatca agagctacca actcttttc 1980

cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga taccaaatac tgtccttcta gtgtagccgt 2040

agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac atacctcgct ctgctaatcc 2100

tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac 2160

gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca 2220

gcttggagcg aacgacctac accgaactga gatacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg 2280

ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag 2340

gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt 2400

ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc gtcaggggggg cggagcctat 2460

ggaaaaacgc cagcaacgcg gccttttac ggttcctggc cttttgctgg ccttttgctc 2520

acatgttctt tcctgcgtta tcccctgatt ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt 2580

gagctgatac cgctcgccgc agccgaacga ccgagcgcag cgagtcagtg agcgaggaag 2640

cggaagagcg cctgatgcgg tattttctcc ttacgcatct gtgcggtatt tcacaccgca 2700

tatggtgcac tctcagtaca atctgctctg atgccgcata gttaagccag tatacactcc 2760

gctatcgcta cgtgactggg tcatggctgc gccccgacac ccgccaacac ccgctgacgc 2820

gccctgacgg gcttgtctgc tcccggcatc cgcttacaga caagctgtga ccgtctccgg 2880

gagctgcatg tgtcagaggt tttcaccgtc atcaccgaaa cgcgcgaggc agcagatcaa 2940

ttcgcgcgcg aaggcgaagc ggcatgcatt tacgttgaca ccatcgaatg gtgcaaaacc 3000

tttcgcggta tggcatgata gcgcccggaa gagagtcaat tcagggtggt gaatgtgaaa 3060

ccagtaacgt tatacgatgt cgcagagtat gccggtgtct cttatcagac cgtttcccgc 3120

gtggtgaacc aggccagcca cgtttctgcg aaaacgcggg aaaaagtgga agcggcgatg 3180

gcggagctga attacattcc caaccgcgtg gcacaacaac tggcgggcaa acagtcgttg 3240

ctgattggcg ttgccacctc cagtctggcc ctgcacgcgc cgtcgcaaat tgtcgcggcg 3300

attaaatctc gcgccgatca actgggtgcc agcgtggtgg tgtcgatggt agaacgaagc 3360

ggcgtcgaag cctgtaaagc ggcggtgcac aatcttctcg cgcaacgcgt cagtgggctg 3420

atcattaact atccgctgga tgaccaggat gccattgctg tggaagctgc ctgcactaat 3480

gttccggcgt tatttcttga tgtctctgac cagacaccca tcaacagtat tattttctcc 3540

catgaagacg gtacgcgact gggcgtggag catctggtcg cattgggtca ccagcaaatc 3600

gcgctgttag cgggcccatt aagttctgtc tcggcgcgtc tgcgtctggc tggctggcat 3660

aaatatctca ctcgcaatca aattcagccg atagcggaac gggaaggcga ctggagtgcc 3720

atgtccggtt ttcaacaaac catgcaaatg ctgaatgagg gcatcgttcc cactgcgatg 3780

ctggttgcca acgatcagat ggcgctgggc gcaatgcgcg ccattaccga gtccgggctg 3840

cgcgttggtg cggatatctc ggtagtggga tacgacgata ccgaagacag ctcatgttat 3900

atcccgccgt caaccaccat caaacaggat tttcgcctgc tggggcaaac cagcgtggac 3960

cgcttgctgc aactctctca gggccaggcg gtgaagggca atcagctgtt gcccgtctca 4020

ctggtgaaaa gaaaaaccac cctggcgccc aatacgcaaa ccgcctctcc ccgcgcgttg 4080

gccgattcat taatgcagct ggcacgacag gtttcccgac tggaaagcgg gcagtgagcg 4140

caacgcaatt aatgtgagtt agcgcgaatt gatctg 4176