



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년01월11일
(11) 등록번호 10-2201271
(24) 등록일자 2021년01월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/82 (2006.01) C12N 9/00 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01) C12N 9/90 (2006.01)
C12P 17/06 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/825 (2013.01)
C12N 9/1051 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0111687
(22) 출원일자 2019년09월09일
심사청구일자 2019년09월09일
(56) 선행기술조사문헌
W02016193504 A1*
Ying Zang 등. J. Agric. Food Chem. Vol. 67,
No. 49, 페이지 13430-13436 (2019.03.28.)*
US07604968 B2*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이
화여자대학교)
(72) 발명자
윤여준
서울특별시 강남구 압구정로 113, (압구정동, 미
성아파트) 25동 506호
송명중
서울특별시 동작구 사당로6길 14, 송백빌딩 401호
최하경
서울특별시 서대문구 이화여대길 52, 이화여자대
학교 종합과학관 D-207호
(74) 대리인
특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 15 항

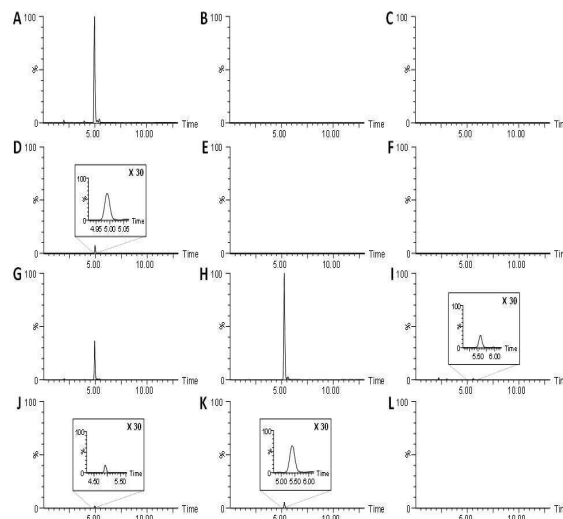
심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 생물전환 공정을 이용한 플라바논의 생산방법

(57) 요약

본 발명은 벼로부터 유래된 Os4CL 효소를 코딩하는 유전자와 겔보리로부터 유래된 HvCHS2 효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 발현벡터를 포함하는 플라바논 생산용 조성물, 상기 발현벡터가 도입된 형질전환체를 포함하는 플라바논 생산용 조성물, 상기 Os4CL 효소와 HvCHS2 효소를 포함하는 플라바논 생산용 조성물 및 상기 조성물을 사용하여 메틸화된 페닐프로판산으로부터 플라바논을 생산하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에서 제공하는 형질전환체를 사용하면, 페룰산, 4-메틸카페인산 등의 다양한 메틸화된 페닐프로판산으로부터 플라바논을 생산할 수 있으므로, 플라보노이드의 산업적인 생산에 널리 활용될 수 있을 것이다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

C12N 9/90 (2013.01)
C12N 9/93 (2013.01)
C12P 17/06 (2013.01)
C12Y 204/01016 (2013.01)
C12Y 505/01006 (2013.01)
C12Y 602/01012 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	114019-05-5-HD020
부처명	농림축산식품부
과제관리(전문)기관명	농림수산식품기술기획평가원
연구사업명	고부가가치식품기술개발사업
연구과제명	식품바이오 소재 Pterostilbene 및 플라본 메틸 유도체의 미생물 생산 시스템 구축
기 여 율	60/100
과제수행기관명	(주)인트론바이오테크놀로지
연구기간	2018.08.01 ~ 2019.07.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2019R1A2B5B03069338
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	후속연구지원(도전)
연구과제명	미생물 유래 천연물의 생합성경로 규명 및 재설계
기 여 율	30/100
과제수행기관명	이화여자대학교
연구기간	2018.04.01 ~ 2019.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2016R1A6A3A11930649
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	리서치펠로우
연구과제명	미생물을 이용한 Methylated Flavonoid 유도체 생합성
기 여 율	10/100
과제수행기관명	이화여자대학교
연구기간	2017.11.01 ~ 2018.10.31

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 염기서열을 포함하는, 벼(*Oryza sativa*)로부터 유래된 Os4CL 효소를 코딩하는 유전자; 및 서열번호 4의 염기서열을 포함하는, 겉보리(*Hordeum vulgare*)로부터 유래된 HvCHS2 효소를 코딩하는 유전자를 포함하는, 메틸화된 페닐프로판산으로부터 플라바논을 생산하기 위한 발현벡터.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 Os4CL 효소는 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 발현벡터.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 HvCHS2 효소는 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 발현벡터.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 발현벡터는 CHI(chalcone isomerase)을 코딩하는 유전자를 추가로 포함하는 것인, 발현벡터.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 발현벡터를 포함하는, 플라바논 생산용 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 발현벡터가 도입된, 플라바논 생산용 형질전환체.

청구항 7

제6항의 형질전환체 또는 그의 배양산물을 포함하는 플라바논 생산용 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 배양산물은 상기 형질전환체의 배양물, 배양상등액, 과쇄물 또는 이들의 분획물인 것인, 조성물.

청구항 9

서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 베틀로부터 유래된 Os4CL 효소 및 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 겔보리로부터 유래된 HvCHS2 효소를 포함하는, 메틸화된 페닐프로판산으로부터 플라바논을 생산하기 위한 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 조성물은 말로닐-CoA(malonyl-CoA) 및 알칼리 완충액을 추가로 포함하는 것인, 조성물.

청구항 11

제6항의 형질전환체를 메틸화된 페닐프로판산이 포함된 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, 메틸화된 페닐프로판산으로부터 플라바논을 생산하는 방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 메틸화된 페닐프로판산은 페룰산 또는 4-메틸카페인산인 것인, 방법.

청구항 13

제11항에 있어서,

상기 배지내 메틸화된 페닐프로판산의 농도는 0.1 내지 10mM 인 것인, 방법.

청구항 14

제11항에 있어서,

상기 배양을 통해 수득한 배양물로부터 플라바논을 회수하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 방법.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 플라바논은 호모에리오딕티올 또는 헤스페레틴인 것인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 생물전환 공정을 이용한 플라바논의 생산방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로, 본 발명은 베틀로부터 유래된 Os4CL 효소를 코딩하는 유전자와 겔보리로부터 유래된 HvCHS2 효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 발현 벡터를 포함하는 플라바논 생산용 조성물, 상기 발현벡터가 도입된 형질전환체를 포함하는 플라바논 생산용 조성물, 상기 Os4CL 효소와 HvCHS2 효소를 포함하는 플라바논 생산용 조성물 및 상기 조성물을 사용하여 메틸화된 페닐프로판산으로부터 플라바논을 생산하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 플라보노이드는 항생제, 항암제, 항염증제, 항산화제 및 항바이러스 활성과 같은 인간 건강에 많은 유익한 영향을 미치는 매우 흔한 천연 식물성 화학 물질이다. 그러나, 식물 자원에서 유래된 플라보노이드 화합물은 식물 성장에 직접적으로 영향을 미치는 계절적 및 지리적 조건 뿐만 아니라 식물 추출물에 포함된 다양한 성분으로 인하여, 산업적인 활용성이 낮은 편이다. 이에 따라, 상기 플라보노이드 화합물을 미생물을 이용한 생물전환 공정에 의해 생산하려는 연구가 활발히 진행되고 있다.
- [0003] 일반적으로, 플라보노이드의 생합성은 4-쿠마린산(4-coumaric acid)과 같은 페닐프로판 산(phenylpropanoic acid)을 원료로 사용하여 시작되는데, 상기 페닐프로판 산은 TAL(tyrosine ammonia-lyase)을 사용하여 티로신으로부터 합성될 수 있다. 상기 4-쿠마린산은 4CL(4-coumarate:coenzyme A ligase, 4-coumarate:CoA ligase)에 의해 4-쿠마린-CoA(4-coumaric-CoA)로 활성화되고, 상기 활성화된 4-쿠마린-CoA는 CHS(Chalcone synthase)에 의해 3개의 말로닐-CoA(malonyl-CoA)와 반응하여, 나린게닌 찰콘(naringenin chalcone)을 생성한다. 상기 생성된 나린게닌 찰콘은 CHI(chalcone isomerase)에 의해 3개의 링을 가지는 (2S)-나린게닌((2S)-naringenin)을 형성하거나 또는 알칼리 조건하에서 수행되는 불안정한 찰콘의 고리화 반응에 의해 (2S)- 및 (2R)-나린게닌의 라세미 혼합물을 형성한다고 알려져 있다(Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouysegu L (2011) Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis. Angew Chem Int Ed Engl. 50 (3):586-621; Mol JNM, Robbins MP, Dixon RA, Veltkamp E (1985) Spontaneous and enzymic rearrangement of naringenin chalcone to flavanone. Phytochemistry 24:2267-2269).
- [0004] 한편, 플라보노이드 화합물의 하이드록시 유도체 또는 메톡시 유도체로 알려져 있는 플라바논(flavanone)은 다양한 효소작용에 의하여 플라보노이드, 플라본, 플라보놀, 이소플라본 등의 다양한 화합물로 전환될 수 있다고 알려져 있는데(Song MC, Kim EJ, Kim E, Rathwell K, Nam SJ, Yoon YJ (2014) Microbial biosynthesis of medicinally important plant secondary metabolites. Nat Prod Rep 31:1497-1509), 이들은 대사안정성과 경구 시 생체이용율이 우수하고, 인간의 CYP1B1을 억제하여 잠재적 항암활성을 나타내고, 항혈소판 응집활성을 나타내는 등의 다양한 약리활성을 나타낸다고 알려져 있다. 그러나, 이러한 플라바논은 자연계의 식물로부터 극히 미량만을 분리정제할 수 있다고 알려져 있다. 예를 들어, 10kg의 건조된 겨우살이 잎과 줄기로부터 24mg의 호모 에리오딕티올을 분리할 수 있고, 헤스페레틴은 유자씨에 0.7%로 포함되어 있다고 알려져 있다.
- [0005] 이에 따라, 생물전환 공정에 의하여 페룰산, 4-메틸카페인산 등의 단순한 메틸화된 페닐프로판산으로부터 플라바논을 생합성하기 위한 연구가 진행되었다. 앞서 설명한 바와 같이 페닐프로판산의 일종인 4-쿠마린산으로부터 플라바논의 일종인 나린게닌을 생합성하는데 필요한 효소는 4CL, CHS 및 CHI이며, 이 중 필수적인 효소는 4CL 및 CHS임이 알려져 있기 때문에, 이들 효소를 코딩하는 유전자가 도입된 형질전환 미생물을 이용하여 단순한 메틸화된 페닐프로판산으로부터 플라바논을 생합성하려는 연구가 수행되었다. 그러나, 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 유래의 4CL 및 CHS는 페룰산을 호모에리오딕티올로 전환시키지 못하였고, 그룹웰(*Lithospermum erythrorhizon*) 유래의 4CL과 파슬리(*Petroselinum crispum*) 유래의 CHS를 조합하여 사용한 경우에도 플라바논을 생합성하지 못하였다. 이로부터, 식물체로부터 유래된 4CL 및 CHS는 메틸화된 페닐프로판산을 기질로 사용할 경우에는 기질 특이성을 나타낼 것으로 예상되었고, 이에 따라, 다양한 메틸화된 페닐프로판산으로부터 플라바논을 생합성하기에 적합한 범용적인 4CL 및 CHS를 발굴하려는 연구가 진행되고 있는 실정이다.
- [0006] 이러한 배경하에서, 본 발명자들은 다양한 메틸화된 페닐프로판산으로부터 플라바논을 생합성하기에 적합한 범용적인 4CL 및 CHS를 발굴하고자 예의 연구노력한 결과, 벼(*Oryza sativa*) 유래의 4CL인 Os4CL 유전자와 걸보리(*Hordeum vulgare*) 유래의 CHS인 HvCHS2 유전자가 도입된 형질전환체를 이용할 경우, 생물전환 공정에 의해 다양한 메틸화된 페닐프로판산으로부터 플라바논을 생합성할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명의 하나의 목적은 벼로부터 유래된 Os4CL 효소를 코딩하는 유전자와 걸보리로부터 유래된 HvCHS2 효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 발현벡터를 제공하는 것이다.
- [0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 발현벡터를 포함하는 플라바논 생산용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 발현벡터가 도입된 플라바논 생산용 형질전환체를 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 형질전환체를 포함하는 플라바논 생산용 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 Os4CL 효소와 HvCHS2 효소를 포함하는 플라바논 생산용 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 사용하여 메틸화된 페닐프로판산으로부터 플라바논을 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 지금까지 연구된 바에 의하면, 페닐프로판산으로부터 플라바논을 생합성하는 경로에는 3가지 효소(4CL, CHS 및 CHI)가 관여하는 것으로 알려져 있다. 4CL(4-coumarate:coenzyme A ligase, 4-coumarate:CoA ligase)는 페닐프로판산을 중간체 화합물로 전환시키고, CHS(Chalcone synthase)는 상기 전환된 중간체 화합물을 찰콘 화합물로 전환시키며, CHI(chalcone isomerase)는 상기 전환된 찰콘 화합물을 플라바논 화합물로 전환시킨다.

[0014] 이러한 효소의 작용은 페닐프로판산 대신에 메틸화된 페닐프로판산을 사용할 경우에도 동일하게 작용할 것이라고 예상되었다(도 1).

[0015] 도 1은 효소의 전환작용에 의해 페닐프로판산 또는 메틸화된 페닐프로판산이 플라바논 화합물로 전환되는 과정을 나타내는 개략도이다.

[0016] 본 발명자들은 다양한 메틸화된 페닐프로판산으로부터 플라바논을 생합성하기에 적합한 범용적인 4CL 및 CHS를 발굴하고자 다양한 식물로부터 유래된 4CL 및 CHS의 조합을 발현시킬 수 있는 형질전환체를 제작하고, 이들 형질전환체 중에서 메틸화된 페닐프로판산의 일종인 4-쿠마린산, 페룰산 또는 4-메틸카페인산으로부터 각각 플라바논의 일종인 나린게닌, 호모에리오디티올 또는 헤스페레틴을 생산할 수 있는 형질전환체를 발굴한 결과, 벼로부터 유래된 Os4CL 효소를 코딩하는 유전자와 결보리로부터 유래된 HvCHS2 효소를 코딩하는 유전자가 도입된 형질전환체가 3가지 메틸화된 페닐프로판산으로부터 각각의 플라바논을 생산할 수 있음을 확인하였다.

[0017] 이처럼 다양한 메틸화된 페닐프로판산으로부터 각각의 플라바논을 모두 생산할 수 있는 범용적인 4CL 및 CHS의 조합은 지금까지 보고되지 않았고, 본 발명자에 의하여 최초로 발굴되었다.

[0018] 상술한 목적을 달성하기 위한 본 발명의 일 실시양태는 벼로부터 유래된 Os4CL 효소를 코딩하는 유전자와 결보리로부터 유래된 HvCHS2 효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 발현벡터 및 상기 발현벡터를 포함하는 플라바논 생산용 조성물을 제공한다.

[0019] 본 발명의 용어 "Os4CL 효소"란, 벼로부터 유래된 4CL(4-coumarate:coenzyme A ligase, 4-coumarate:CoA ligase)의 일종을 의미한다. 상기 4CL은 4-쿠마린산과 같은 메틸화된 페닐프로판산을 4-쿠마린-CoA와 같은 중간대사체 화합물의 형태로 전환시키는 효소활성을 나타낸다. 상기 Os4CL 효소의 아미노산 서열 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 염기서열은 미국 국립 보건원 GenBank와 같은 데이터베이스를 통하여 얻을 수 있다(BAD27987, L43362.1, AB234050.1 등).

[0020] 본 발명에 있어서, 상기 Os4CL 효소는 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 다른 예로서, 서열번호 1의 염기서열로 구성된 폴리뉴클레오티드로부터 발현될 수 있다.

[0021] 또한, 상기 Os4CL 효소는 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열을 가지는 단백질뿐만 아니라, 서열번호 5와 80% 이상, 구체적으로는 90% 이상, 보다 구체적으로는 95% 이상, 보다 더욱 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 가지는 단백질로서, 실질적으로 Os4CL 효소와 동일하거나 상응하는 생물학적 활성을 가지는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가되는 아미노산 서열을 갖는 경우도 본 발명의 범주에 포함하며, 이는 당업자에게 자명하다.

[0022] 본 발명의 용어 "HvCHS2 효소"란, 결보리로부터 유래된 CHS(Chalcone synthase)의 일종을 의미한다. 상기 CHS는 4-쿠마린-CoA와 같은 중간대사체 화합물을 나린게닌 찰콘(naringenin chalcone)과 같은 찰콘 화합물의 형태로 전환시키는 효소활성을 나타내는데, 이때, 3개의 말로닐-CoA(malonyl-CoA)가 사용된다. 상기 HvCHS2 효소의 아미노산 서열 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 염기서열은 미국 국립 보건원 GenBank와 같은 데이터베이스를 통하여 얻을 수 있다(Y09233, X58339.1, KT962221.1 등).

[0023] 본 발명에 있어서, 상기 HvCHS2 효소는 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 다른 예로서, 서열번호 4의 염기서열로 구성된 폴리뉴클레오티드로부터 발현될 수 있다.

[0024] 또한, 상기 HvCHS2 효소 역시 서열번호 8로 표시되는 아미노산 서열을 가지는 단백질뿐만 아니라, 서열번호 8과

80% 이상, 구체적으로는 90% 이상, 보다 구체적으로는 95% 이상, 보다 더욱 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 가지는 단백질로서, 실질적으로 HvCHS2 효소와 동일하거나 상응하는 생물학적 활성을 가지는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가되는 아미노산 서열을 갖는 경우도 본 발명의 범주에 포함하며, 이는 당업자에게 자명하다.

[0025] 본 발명의 용어 "발현벡터"란, 적당한 숙주세포에서 목적 단백질 또는 목적 RNA를 발현할 수 있는 벡터로서, 유전자 삽입물(상기 폴리뉴클레오티드)이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 의미한다. 발현벡터는 일단 숙주 세포 내에 있으면 숙주 염색체 DNA와 무관하게 복제할 수 있으며 삽입된 외래 DNA가 발현될 수 있다. 플라스미드가 현재 벡터의 가장 통상적으로 사용되는 형태이므로, 본 발명의 명세서에서 "플라스미드(plasmid)" 및 "벡터(vector)"는 때로 상호 교환적으로 사용된다.

[0026] 본 발명에 있어서, 상기 발현벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파지 벡터 및 바이러스 벡터 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 적합한 발현벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서 같은 발현 조절 엘리먼트 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 시그널 서열 또는 리더 서열을 포함하며 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있고, 상기 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 또한, 발현벡터는 벡터를 함유하는 숙주 세포를 선택하기 위한 선택 마커를 포함하고, 복제 가능한 발현벡터인 경우 복제 기원을 포함할 수 있다.

[0027] 또한, 상기 발현벡터는 Os4CL 효소를 코딩하는 유전자와 겔보리로부터 유래된 HvCHS2 효소를 코딩하는 유전자 이외에 CHI(chalcone isomerase)을 코딩하는 유전자를 추가로 포함할 수 있다.

[0028] 상기 CHI는 찰콘 화합물에 작용하여 상기 찰콘 화합물을 플라바논으로 전환시키는 활성을 나타낸다. 본 발명에서 제공하는 HvCHS2 효소에 의해 생성된 찰콘 화합물은 알칼리 조건하에서 자발적으로 수행되는 불안정한 찰콘의 고리화 반응에 의해 두 종류(S품 및 R품)의 플라바논 화합물을 포함하는 라세미 혼합물을 형성할 수 있는데, 이러한 라세미 혼합물을 사용하기 위하여는 S품의 화합물과 R품의 화합물을 각각 분리하여야 하는 단점이 있다. 이에 반하여, 상기 형질전환체에서 CHI가 발현되면, 찰콘 화합물을 한가지 종류의 플라바논 화합물로 전환시킬 수 있어, 보다 효과적으로 플라바논 화합물을 생산할 수 있다.

[0029] 본 발명의 다른 실시양태는 상기 발현벡터가 도입된 형질전환체 및 상기 형질전환체 또는 그의 배양산물을 포함하는 플라바논 생산용 조성물을 제공한다.

[0030] 본 발명의 용어 "형질전환"이란, 상기 용어 "형질전환"은 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체의 인자로서 또는 염색체 통합완성에 의해 복제가능하게 되도록 하는 모든 행위를 의미한다. 본 발명에 따른 형질전환에 사용될 수 있는 숙주 세포는 원핵 또는 진핵 세포 모두를 포함할 수 있으며, DNA의 도입효율이 높고, 도입된 DNA의 발현효율이 높은 숙주가 사용될 수 있다. 예를 들어, 에스케리키아, 슈도모나스, 바실러스, 스트렙토마이세스, 진균, 효모와 같은 주지의 진핵 및 원핵숙주들, 스포도프테라 프루기페르다(SF9)와 같은 곤충 세포, CHO, COS 1, COS 7, BSC 1, BSC 40, BMT 10 등의 동물 세포 등이 사용될 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0031] 형질전환은 폴리뉴클레오티드를 도입하는 어떤 방법도 포함되며, 당 분야에서 공지된 바와 같이 숙주세포에 따라 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 이런 방법에는 전기충격유전자전달법(electroporation), 원형질 융합, 인산 칼슘(CaPO₄) 침전, 염화 칼슘(CaCl₂) 침전, 실리콘 카바이드 섬유 이용한 교반, 아그로박테리아-매개 형질전환, PEG(polyethylene glycol), 텍스트란 설페이트, 리포펙타민, 입자 충격법(particle bombardment) 등이 포함되나 이로 제한되지 않는다.

[0032] 본 발명에 있어서, 상기 형질전환체는 상술한 바와 같이, 벼로부터 유래된 Os4CL 효소를 코딩하는 유전자와 겔보리로부터 유래된 HvCHS2 효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 발현벡터가 숙주세포에 도입되어 발현되는 형질전환 미생물인 것으로 해석될 수 있다.

[0033] 또한, 상기 형질전환체의 배양산물은 메틸화된 페닐프로판산으로부터 플라바논을 생산하는데 사용될 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서, 상기 형질전환체의 배양물, 배양상등액, 파쇄물, 이들의 분획물 등이 될 수 있고, 다른 예로서, 형질전환체의 배양물을 원심분리하여 수득한 배양상등액, 형질전환체를 물리적으로 또는 초음파처리하여 수득한 파쇄물, 상기 배양물, 배양상등액, 파쇄물 등을 원심분리, 크로마토그래피 등의 방법에 적용하여 수득한 분획물 등이 될 수 있다.

[0034] 본 발명의 또 다른 실시양태는 벼로부터 유래된 Os4CL 효소 및 겔보리로부터 유래된 HvCHS2 효소를 포함하는 플라바논 생산용 조성물을 제공한다.

- [0035] 상술한 바와 같이, Os4CL은 메틸화된 페닐프로판산을 중간대사체 화합물의 형태로 전환시킬 수 있고, HvCHS2는 상기 중간대사체 화합물을 찰콘 화합물의 형태로 전환시킬 수 있으므로, 상기 Os4CL 효소와 HvCHS2 효소를 포함하는 조성물은 실험실환경(in vitro)상에서 메틸화된 페닐프로판산을 찰콘 화합물로 전환시킬 수 있고, 전환된 찰콘 화합물을 알칼리 환경하에서 플라바논 화합물로 전환될 수 있다. 따라서, 상기 Os4CL 효소와 HvCHS2 효소를 포함하는 조성물은 플라바논 생산용 조성물로 사용될 수 있다.
- [0036] 본 발명에서 제공하는 상기 플라바논 생산용 조성물은 Os4CL 효소와 HvCHS2 효소 이외에도 HvCHS2 효소반응에 사용되는 말로닐-CoA(malonyl-CoA), 자발적으로 수행되는 찰콘 화합물의 전환반응에 사용되는 알칼리 완충액 등의 성분을 추가로 포함할 수 있다.
- [0037] 본 발명의 또 다른 실시양태는 상기 플라바논 생산용 조성물을 사용하여 메틸화된 페닐프로판산으로부터 플라바논을 생산하는 방법을 제공한다.
- [0038] 구체적으로, 본 발명에서 제공하는 메틸화된 페닐프로판산으로부터 플라바논을 생산하는 방법은 상기 발현벡터가 도입된 형질전환체를 메틸화된 페닐프로판산이 포함된 배지에서 배양하는 단계를 포함한다.
- [0039] 이때, 상기 발현벡터 및 형질전환체에 대하여는 앞서 설명한 바와 동일하다.
- [0040] 상기 배지에 포함된 메틸화된 페닐프로판산은 본 발명에서 제공하는 형질전환체에 의하여 플라바논의 생산에 사용될 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서, 페룰산, 4-메틸카페인산 등이 될 수 있다.
- [0041] 또한, 상기 배지에 포함된 메틸화된 페닐프로판산의 함량 역시 본 발명에서 제공하는 형질전환체에 의하여 플라바논의 생산에 사용될 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서, 0.1 내지 10mM이 될 수 있고, 다른 예로서, 0.5 내지 5mM이 될 수 있으며, 또 다른 예로서, 1mM이 될 수 있다.
- [0042] 본 발명의 용어 "배양"이란, 상기 형질전환체를 적당히 인공적으로 조절한 환경조건에서 생육시키는 방법을 의미한다.
- [0043] 본 발명에 있어서, 상기 형질전환체를 배양하는 방법은 당업계에 널리 알려져 있는 방법을 이용하여 수행할 수 있다. 구체적으로 상기 배양은 상기 형질전환체를 사용하여 메틸화된 페닐프로판산으로부터 플라바논을 생산할 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 배치 공정 또는 주입 배치 또는 반복 주입 배치 공정(fed batch or repeated fed batch process)에서 연속식으로 배양할 수 있다.
- [0044] 배양에 사용되는 배지는 적당한 탄소원, 질소원, 아미노산, 비타민 등을 함유한 통상의 배지 내에서 호기성 조건 하에서 온도, pH 등을 조절하면서 적절한 방식으로 특정 균주의 요건을 충족해야 한다. 사용될 수 있는 탄소원으로는 메탄, 글루코즈, 자일로즈, 수크로즈, 락토즈, 프락토즈, 말토즈, 전분, 셀룰로즈와 같은 당 및 탄수화물, 대두유, 해바라기유, 피마자유, 코코넛유 등과 같은 오일 및 지방, 팔미트산, 스테아린산, 리놀레산과 같은 지방산, 글리세롤, 에탄올과 같은 알코올, 아세트산과 같은 유기산 등을 부가적으로 사용할 수 있는데, 이들 물질은 개별적으로 또는 혼합물로서 사용될 수 있다. 사용될 수 있는 질소원으로는 암모니아, 황산암모늄, 염화암모늄, 초산암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄, 및 질산 암모늄과 같은 무기질소원; 글루탐산, 메티오닌, 글루타민과 같은 아미노산 및 펩톤, NZ-아민, 육류 추출물, 효모 추출물, 맥아 추출물, 옥수수 침지액, 카세인 가수분해물, 어류 또는 그의 분해생성물, 탈지 대두 케이크 또는 그의 분해생성물 등 유기질소원이 사용될 수 있다. 이들 질소원은 단독 또는 조합되어 사용될 수 있다. 상기 배지에는 인원으로서는 인산 제1칼륨, 인산 제2칼륨 및 대응되는 소듐-함유 염이 포함될 수 있다. 사용될 수 있는 인원으로는 인산이수소칼륨 또는 인산수소이칼륨 또는 상응하는 나트륨-함유 염이 포함된다. 또한, 무기화합물로는 염화나트륨, 염화칼슘, 염화철, 황산마그네슘, 황산철, 황산망간 및 탄산칼슘 등이 사용될 수 있다. 마지막으로, 상기 물질에 더하여 아미노산 및 비타민과 같은 필수 성장 물질이 사용될 수 있다.
- [0045] 또한, 배양 배지에 적절한 전구체들이 사용될 수 있다. 상기된 원료들은 배양과정에서 배양물에 적절한 방식에 의해 회분식, 유가식 또는 연속식으로 첨가될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다. 수산화나트륨, 수산화칼륨, 암모니아와 같은 기초 화합물 또는 인산 또는 황산과 같은 산 화합물을 적절한 방식으로 사용하여 배양물의 pH를 조절할 수 있다.
- [0046] 또한, 지방산 폴리글리콜 에스테르와 같은 소포제를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다. 호기 상태를 유지하기 위해 배양물 내로 산소 또는 산소-함유 기체(예, 공기)를 주입한다. 배양물의 온도는 보통 27℃ 내지 37℃, 바람직하게는 30℃ 내지 35℃이다. 배양은 상기 펩타이드의 생성량이 최대로 얻어질 때까지 계속한다. 이러한 목적으로 보통 10 내지 100시간에서 달성된다.

[0047] 또한, 상기 배양을 통해 수득한 배양물로부터 플라바논을 회수하는 단계를 추가로 포함할 수 있는데, 상기 배양물로부터 플라바논을 회수하는 단계는 투석, 원심분리, 여과, 용매추출, 크로마토그래피, 결정화 등의 당업계에 공지된 방법에 의해 수행될 수 있다. 예를 들면, 상기 배양물을 원심분리하여 형질전환체가 제거된 상등액을 수득하고, 상기 수득한 상등액을 용매추출법에 적용하여 목적하는 플라바논을 회수하는 방법을 사용할 수 있고, 이외에도 상기 목적하는 플라바논의 특성에 맞추어 공지된 실험방법을 조합하여 상기 플라바논을 회수할 수 있는 방법이라면 특별히 제한되지 않고 사용될 수 있다.

발명의 효과

[0048] 본 발명에서 제공하는 형질전환체를 사용하면, 페룰산, 4-메틸카페인산 등의 다양한 메틸화된 페닐프로판산으로부터 플라바논을 생산할 수 있으므로, 플라보노이드의 산업적인 생산에 널리 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0049] 도 1은 효소의 전환작용에 의해 페닐프로판산 또는 메틸화된 페닐프로판산이 플라바논 화합물로 전환되는 과정을 나타내는 개략도이다.

도 2는 본 발명에서 제공하는 4종의 형질전환 균주(DE3/0s4CL-PeCHS, DE3/0s4CL-PeCHS, DE3/0s4CL-HvCHS2 및 DE3/At4CL-HvCHS2)에 4-쿠마린산, 페룰산 또는 4-메틸카페인산을 공급하여 생산된 3종의 플라바논의 생성량을 분석한 결과를 나타내는 그래프로서, A는 DE3/0s4CL-PeCHS 균주로부터 생성된 나린게닌을 나타내고, B는 DE3/0s4CL-PeCHS 균주로부터 생성된 호모에리오딕티올을 나타내며, C는 DE3/0s4CL-PeCHS 균주로부터 생성된 헤스페레틴을 나타내고, D는 DE3/At4CL-PeCHS 균주로부터 생성된 나린게닌을 나타내며, E는 DE3/At4CL-PeCHS 균주로부터 생성된 호모에리오딕티올을 나타내고, F는 DE3/At4CL-PeCHS 균주로부터 생성된 헤스페레틴을 나타내며, G는 DE3/0s4CL-HvCHS2 균주로부터 생성된 나린게닌을 나타내고, H는 DE3/0s4CL-HvCHS2 균주로부터 생성된 호모에리오딕티올을 나타내며, I는 DE3/0s4CL-HvCHS2 균주로부터 생성된 헤스페레틴을 나타내고, J는 DE3/At4CL-HvCHS2 균주로부터 생성된 나린게닌을 나타내며, K는 DE3/At4CL-HvCHS2 균주로부터 생성된 호모에리오딕티올을 나타내고, L는 DE3/At4CL-HvCHS2 균주로부터 생성된 헤스페레틴을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0050] 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.

[0051] 실시예 1: 형질전환 균주의 제작

[0052] 플라바논(flavanone)을 생산하기 위해 각각의 발현벡터 pOs4CL-PeCHS 및 pAt4CL-PeCHS를 제작하였다.

[0053] 대략적으로, 벼에서 유래된 4CL인 Os4CL 유전자(서열번호 1), 애기장대에서 유래된 4CL인 At4CL 유전자(서열번호 2), 이태리포플러로부터 유래된 CHS인 PeCHS 유전자(서열번호 3) 및 겔보리로부터 유래된 CHS인 HvCHS2 유전자(서열번호 4)를 각각 합성하고(Genotech, 대한민국), 이를 PCR 방법으로 증폭시켰다.

[0054] 상기 증폭된 각 유전자를 pGEM-T Easy 벡터 (Promega, Madison, WI, USA)에 1차로 클로닝하여 각각의 유전자를 수득하고, 상기 4CL과 CHS를 조합하여 pCDFduet-1(Novagen, Madison, WI, USA)의 HindIII/AvrII 부위의 사이에 클로닝하여 각각의 발현벡터 pOs4CL-PeCHS, pAt4CL-PeCHS, pOs4CL-HvCHS2 및 pAt4CL-HvCHS2를 제작하였다.

[0055] 제작된 각 발현벡터를 대장균 BL21 (DE3)에 도입하여 각각의 형질전환 균주 (DE3/0s4CL-PeCHS, DE3/0s4CL-PeCHS, DE3/0s4CL-HvCHS2 및 DE3/At4CL-HvCHS2)를 각각 제작하였다.

[0056] 실시예 2: 형질전환 균주를 이용한 플라바논의 생산

[0057] 상기 실시예 1에서 제작된 각각의 형질전환 균주를 3mL LB 배지에 사전점종하고, 37℃에서 하룻밤동안 배양하였다. 다음날, OD₆₀₀이 0.2가 되도록 각각의 사전배양물 0.5mL을 50mL의 새로운 LB 배지에 점종하고 0.7-0.8의 값에 도달할 때까지 배양하였다.

[0058] 이어서, 최종 농도가 1mM가 되도록 IPTG를 배양물에 첨가하여 유전자 발현을 유도하고, 배양물을 30℃에서 3시간 동안 추가로 배양하였다. 상기 배양물을 6,000 rpm 및 4℃에서 10분 동안 원심분리하여 세포를 수득한 다음, 이를 25 mL YM9 배지에 재현탁시켰다. 끝으로, 상기 재현탁 산물에 1mM 4-쿠마린산(164.0mg/L), 페룰산(194.1mg/L) 또는 4-메틸카페인산(194.1 mg/L)과 1mM IPTG를 첨가하고, 30℃에서 48시간 동안 추가로

배양하여, 플라바논을 생산하였다.

[0059] **실시예 3: 플라바논의 생산성 분석**

[0060] 실시예 2에서 생산된 플라바논은 UPLC(ultra performance liquid chromatography)-qTOF-HR-MS(quadrapole time-of-flight high resolution mass spectrometry)를 사용하여 추출 및 분석하였다. 이때, Acquity I-Class system(Waters, Milford, MA, USA)으로 구성된 Xbridge C18 컬럼(2.1mm × 100mm, 3.5 μm)이 구비된 Acquity UPLC system과 결합된 Xevo G2S QToF 질량 분석기를 사용하였다.

[0061] 상기 실시예 1에서 제작된 형질전환 균주 중에서 DE3/Os4CL-HvCHS2에 페룰산을 가하여 생산된 호모에리오딕티올을 다음과 같이 분석하였다(도 2 및 표 1):

[0062] 대략적으로, 배양물 1L에서 수득한 추출물을 HPLC 정제방법에 적용하여 호모에리오딕티올을 분리정제하였다. 상기 HPLC 정제방법은 SP930D 농도구배 펌프와 254 nm로 설정된 UV730D 검출기로 구성된 Acme 9000 HPLC system (YL Instrument Co., Ltd., Anyang, Republic of Korea) 및 이에 구비된 반정제 Watchers 120 ODS-BP 컬럼 (10mm X 250mm, 5 μm)을 사용하여 수행되었다. 이때, 분리조건은 순수한 호모에리오딕티올 화합물 (~ 50mg)을 45% aq. 4mL/분의 유속 및 이동상으로 아세토니트릴을 사용하였다.

[0063] 도 2는 본 발명에서 제공하는 4종의 형질전환 균주(DE3/Os4CL-PeCHS, DE3/Os4CL-PeCHS, DE3/Os4CL-HvCHS2 및 DE3/At4CL-HvCHS2)에 4-쿠마린산, 페룰산 또는 4-메틸카페인산을 공급하여 생산된 3종의 플라바논의 생성량을 분석한 결과를 나타내는 그래프로서, A는 DE3/Os4CL-PeCHS 균주로부터 생성된 나린게닌을 나타내고, B는 DE3/Os4CL-PeCHS 균주로부터 생성된 호모에리오딕티올을 나타내며, C는 DE3/Os4CL-PeCHS 균주로부터 생성된 헤스페레틴을 나타내고, D는 DE3/At4CL-PeCHS 균주로부터 생성된 나린게닌을 나타내며, E는 DE3/At4CL-PeCHS 균주로부터 생성된 호모에리오딕티올을 나타내고, F는 DE3/At4CL-PeCHS 균주로부터 생성된 헤스페레틴을 나타내며, G는 DE3/Os4CL-HvCHS2 균주로부터 생성된 나린게닌을 나타내고, H는 DE3/Os4CL-HvCHS2 균주로부터 생성된 호모에리오딕티올을 나타내며, I는 DE3/Os4CL-HvCHS2 균주로부터 생성된 헤스페레틴을 나타내고, J는 DE3/At4CL-HvCHS2 균주로부터 생성된 나린게닌을 나타내며, K는 DE3/At4CL-HvCHS2 균주로부터 생성된 호모에리오딕티올을 나타내고, L는 DE3/At4CL-HvCHS2 균주로부터 생성된 헤스페레틴을 나타낸다.

표 1

[0064] 형질전환 대장균에서 나린게닌, 호모에리오딕티올 및 헤스페레틴의 생산성 비교

형질전환 균주	생산역가 (mg/L)		
	나린게닌	호모에리오딕티올	헤스페레틴
DE3/Os4CL-PeCHS	53 ± 2	n.d.	n.d.
DE3/At4CL-PeCHS	9 ± 0.3	n.d.	n.d.
DE3/Os4CL-HvCHS2	35 ± 4	52 ± 2	0.4 ± 0.02
DE3/At4CL-HvCHS2	3 ± 0.2	7 ± 1	n.d.

[0065] n.d.: 검출되지 않음

[0066] 도 2 및 표 1에서 보듯이, DE3/Os4CL-PeCHS 및 DE3/At4CL-PeCHS는 각각 약 53mg/L 및 9mg/L의 나린게닌을 생산하였으나, 호모에리오딕티올 및 헤스페레틴은 생산하지 못하였고; DE3/Os4CL-HvCHS2 균주는 약 35mg/L의 나린게닌, 52mg/L의 호모에리오딕티올 및 0.4mg/L의 헤스페레틴을 생산하였으며; DE3/At4CL-HvCHS2 균주 역시 약 3mg/L의 나린게닌 및 7mg/L의 호모에리오딕티올을 생산하였으나, 헤스페레틴은 생산하지 못함을 확인하였다.

[0067] 따라서, 다양한 메틸화된 페닐프로판산으로부터 플라바논을 생합성하기에 적합한 범용적인 4CL은 벼에서 유래된 4CL인 Os4CL이고, 범용적인 CHS는 겉보리로부터 유래된 CHS인 HvCHS2임을 알 수 있었다.

[0068] **실시예 4: 플라바논의 구조분석**

[0069] 상기 실시예 3에서 확인된 플라바논이 정상적인 구조를 갖는 화합물인지를 확인하기 위하여, 분리된 호모에리오딕티올을 대상으로, NMR 분석에 의해 그의 화학적인 구조를 확인하였다:

[0070] 대략적으로, 분리된 화합물을 500 μL의 DMSO-d6 (Cambridge Isotope Laboratories Inc., Andover, MA, USA)에 용해시켜서 얻어진 용액을 5-mm Shigemi advanced NMR microtube (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)에 담고, NMR 분석용 용매에 개별적으로 매치시켰다. 이때, 1H 및 13C NMR 스펙트럼은 Varian INOVA 500 spectrometer

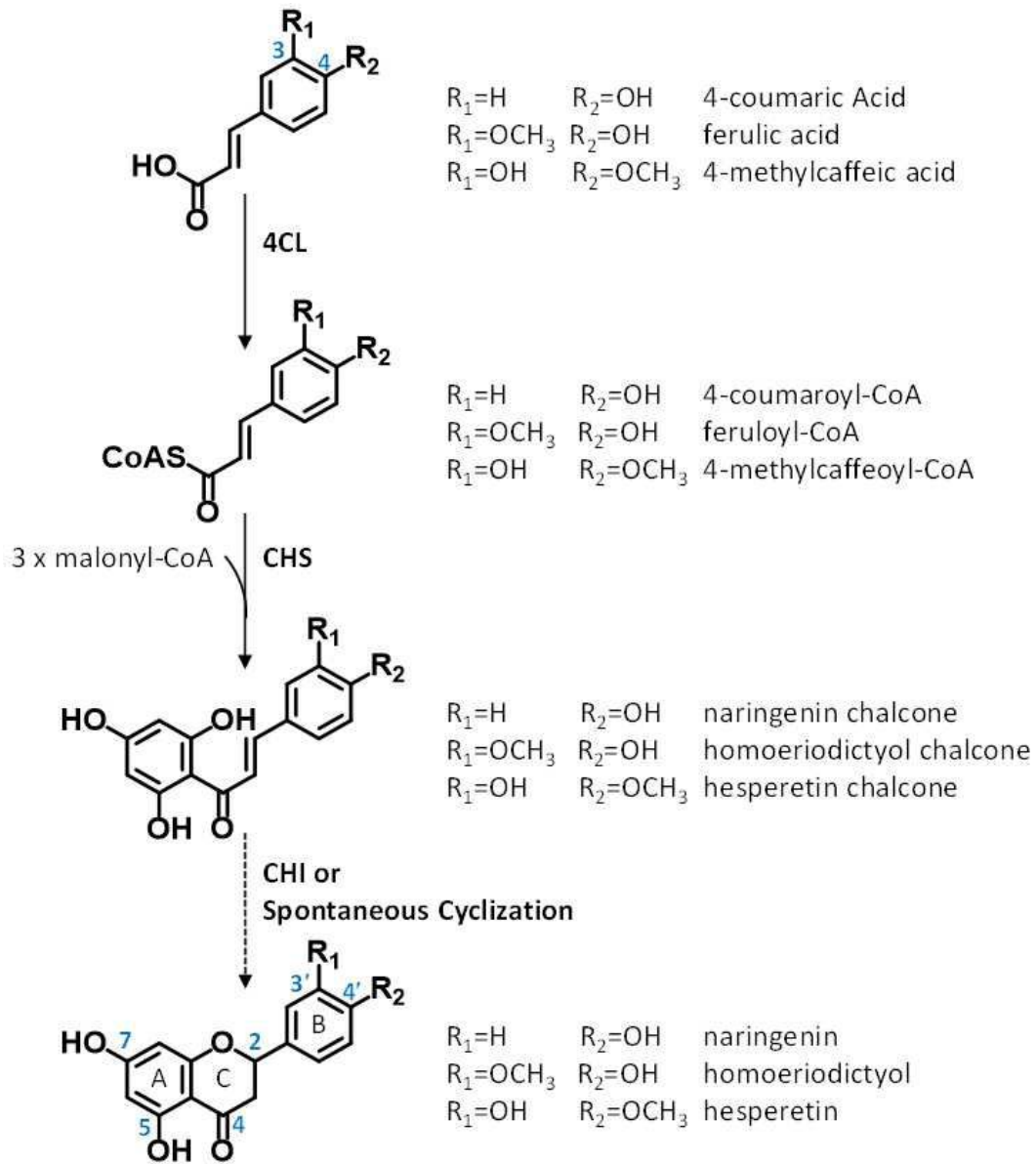
(Palo Alto, CA, USA)를 사용하여 500MHz에서 측정되었고, 내부대조군으로서 TMS(tetramethylsilane)를 사용하여 화학적 이동(chemical shift)을 ppm으로 표시하였다.

[0071] (±)-Homoeriodictyol: Pale yellow powder (CH₃OH); [α]_D 0 (c = 0.052); positive high-resolution electrospray ionization mass spectrometry (HR-ESI-MS) *m/z*: 303.0869 [M+H]⁺ (calcd. 303.0863 for C₁₆H₁₅O₆⁺); ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆, δ_H) 7.09 (1H, br s, H-2'), 6.90 (1H, br d, J = 8.0 Hz, H-6'), 6.79 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-5'), 5.90 (2H, br s, H-6/8), 5.42 (1H, br d, J = 12.5 Hz, H-2), 3.79 (3H, s, OCH₃ on C-3'), 3.31 (1H, dd, J = 17.0, 12.5 Hz, H-3a), 2.68 (1H, br d, J = 17.0 Hz, H-3b); ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆, δ_C) 197.1 (C-4), 167.3 (C-7), 164.2 (C-5), 163.6 (C-9), 148.2 (C-3'), 147.7 (C-4'), 130.1 (C-1'), 120.4 (C-6'), 115.9 (C-5'), 111.8 (C-2'), 102.4 (C-10), 96.5 (C-8), 95.7 (C-6), 79.4 (C-2), 56.4 (OCH₃ on C-3'), 42.8 (C-3).

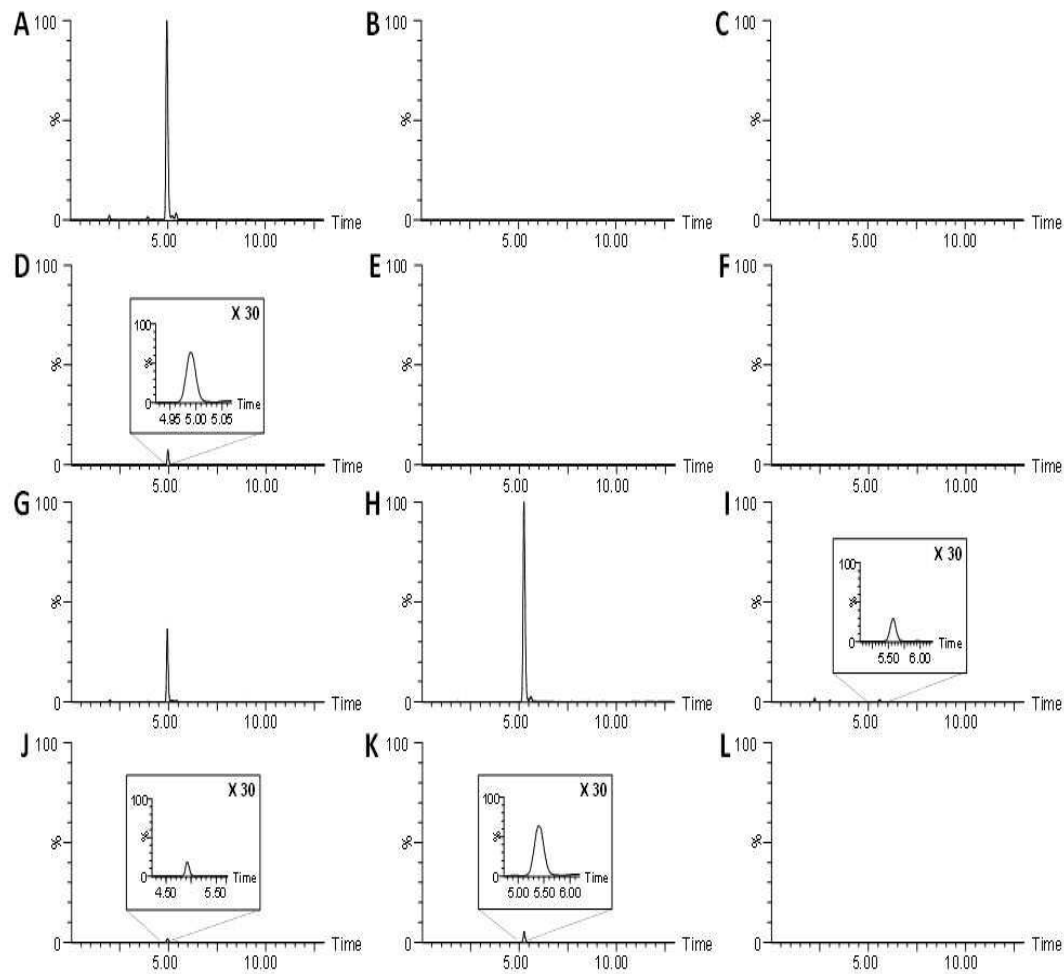
[0072] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

도면1



도면2



서열 목록

<110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation

<120> Process for preparing flavanone using bioconversion

<130> KPA191112-KR

<160> 8

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 1665

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> recombinant Os4CL

<400> 1

atggggtcgg tggcggcgga ggaggtggtg gtgttcggt cgaagctgcc ggacatcgag 60

atcgacaaca gcatgacgct gcaggagtac tgcttcgca ggaatggcgga ggtcggggcg 120

cggccgtgcc tgatcgacgg gcagaccggg gaggctgaca cgtacgcgga ggtggagtcc 180

gcgtcgccgc gcgcccgcc ggggctccgg cggatggggg tgggcaaggc cgacgtggtg 240

atgagcctcc tccgcaactg ccccgagttc gccttctcct tcctcgccgc ggccaggctg 300

ggcgccgcca ccacgacggc gaacccttc tacacgccgc acgaggtcca ccgccaggcg 360

gaggcccgcc gcgccagggt gatcgtcacc gaggcgtgcg ccgtcgagaa ggtgcgggag 420

ttcgcccgcc agagggggcgt ccccggtgtc accgtggacg gcgcgttcga cggctgcgtg 480

gagttccgcg aggtgctcgc cgcggaggag ctgacgccgc acgccgacgt ccaccccgac 540

gacgtcgtcg cctccccccta ctctccggc accaccggcc tcccgaaggc cgtcatgctc 600

accaccgcca gcctcatcac cagcgtcgcc cagcaggtgg atggagagaa ccctaactg 660

tacttcagca aggatgatgt tatactatgc ctgctgccac tgttccacat ctactcgtc 720

aactccgtgc tgcgtggctgg cctgcgtgcc gggtcgacca tcgtgatcat gcggaagttt 780

gatcttggcg cgctcgtcga ccttgtgcgc aagcacaaca tcaccatcgc ccccttcgtg 840

ccccccatcg tgggtggagat cgccaagagc ccccgctca ccgcggagga ctcgcctcc 900

atccgcatgg tcatgtccgg tgccgcgcc atggggaagg accttcagga tgcattcatg 960

gccaaagatcc ccaatgccgt ctcgggacag ggttacggtg tgactgaggc tgggccagtg 1020

ctggcaatgt gctggcggtt tgccaaggag ccttcaagg ttaagtccgg gtcgtgcggt 1080

acagtgggtc gcaacgcgga gctgaagatc gtcgaccccg acaccggcac ctccctcgcc 1140

cggaaccagt ccggcgagat ctgcatccgc ggagaacaga tcatgaaagg ctatctgaat 1200

gatcctgagg cgaccaagaa caccatcgac gaggacgggt ggctgcacac cggagacatc 1260

ggcttcgtcg acgacgacga cgagatcttc atcgtggaca ggctcaagga gatcatcaag 1320

tacaaggggt tccaggtgcc accggccgag ctggaggcgc tgctcatcac tcaccggag 1380

atcaaggacg ccgccgtcgt ctgcatgaag gatgatcttg ccggtgaagt gccagtcgcc 1440

ttcattgtcc ggacagaagg ctcaaaaac accgaggtg agatcaagaa attcgttgca 1500

aaagagggtg tgttctacaa gaggatcaac aagggtgtct tcaccgattc catcccaag 1560

aacccttcg gcaagatcct caggaaggac ttgagagcca ggctcgccgc cggcatcccc 1620

gacgccgtcg ccgccgccgc cgccgatcgc cccaaaagca gctaa 1665

<210> 2

<211> 1686

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> recombinant At4CL

<400> 2

atggcgccac aagaacaagc agtttctcag gtgatggaga aacagagcaa caacaacaac	60
agtgacgtca ttttccgata aaagttaccg gatatttaca tcccgaacca cctatctctc	120
cacgactaca tcttccaaaa catctccgaa ttccgacta agccttgcct aatcaacgga	180
ccaaccggcc acgtgtacac ttactccgac gtccacgtca tctcccgcca aatcgccgcc	240
aattttcaca aactcggcgt taacaaaaac gacgtcgtca tgcctctcct cccaaactgt	300
cccgaattcg tctctctttt cctcgccgcc tccttccgcg gcgcaaccgc caccgccgca	360
aaccttttct tcactccggc ggagatagct aaacaagcca aagcctccaa caccaaactc	420
ataatcaccg aagctcgtta cgtcgacaaa atcaaaccac ttcaaaacga cgacggagta	480
gtcatcgtct gcatcgacga caacgaatcc gtccaatcc ctgaaggctg cctccgcttc	540
accgagttag ctacgtcgac aaccgaggca tcagaagtca tcgactcggg ggagatttca	600
ccggacgacg tggtagcact accttactcc tctggcacga cgggattacc aaaaggagtg	660
atgctgactc acaagggact agtcacgagc gttgctcagc aagtcgacgg cgagaaccgc	720
aatctttatt tccacagcga tgacgtcata ctctgtgttt tgeccatgtt tcatacttac	780
gctttgaact cgatcatgtt gtgtggtctt agagttggtg cggcgattct gataatgccg	840
aagtttgaga tcaatctgct attggagctg atccagaggt gtaaagtgc ggtggctccg	900
atggttccgc cgatttgttt ggccattgcg aagtcttcgg agacggagaa gtatgatttg	960
agctcgataa gagtggtaga atctgggtgct gctcctcttg gtaagaact tgaagatgcc	1020
gttaatgcca agtttctaa tgccaaactc ggtcagggat acggaatgac ggaagcaggt	1080
ccagtgctag caatgtcgtt aggttttgca aaggaacctt ttccggttaa gtcaggagct	1140
tgtggtactg ttgtaagaaa tgctgagatg aaaatagttg atccagacac cggagattct	1200
ctttcgagga atcaaccggc tgagatttgt attcgtggtc accagatcat gaaaggttac	1260
ctcaacaatc cggcagctac agcagagacc attgataaag acggttggct tcatactgga	1320
gatattggat tgatcgatga cgatgacgag cttttcatcg ttgatcgatt gaaagaactt	1380
atcaagtata aaggttttca ggtagctccg gctgagctag aggctttgct catcggtcat	1440
cctgacatta ctgatgttgc tgttgcgca atgaaagaag aagcagctgg tgaagttcct	1500
gttgcatattg tggtagaatc gaaggattcg gagttatcag aagatgatgt gaagcaattc	1560
gtgtcgaaac aggttgtgtt ttacaagaga atcaacaaag tgttcttcac tgaatccatt	1620
cctaaagctc catcaggga gatattgagg aaagatctga gggcaaaact agcaaatgga	1680

ttgtga	1686
<210> 3	
<211> 1191	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> recombinant PeCHS	
<400> 3	
atggcaccgt cgattgagga gatcagaaag gcccgagcgag ccagtgggcc agccaccatc	60
ctggccattg gcaaggccac cccggccaac tgtgtctccc aggetgacta tctgactac	120
tacttccgga tcaccaacag tgaacacatg actgagttga aggagaaatt caaacgcatg	180
tgtgacaaat ctatgatcaa gaaacggtag atgcacctaa cggaggagat actgaaagag	240
aactctagca tgtgtgaata catggctccg tctcttgatg cagccaaga catggtggtt	300
gtggaggtgc caaagctagg aaaagaagca gcagctaagg ctataaaaga gtgggggtcag	360
ccaaaatcca agatcaccca ctttgtattc tgtacaacct caggtgtaga catgccaggt	420
gctgactacc agctcaccaa gctcctcggc ctgcgttctt ccgtaaagag attcatgatg	480
tatcagcagg gctgcttcgc cggcgggacc gtccttcgct tagctaagga cttggctgag	540
aacaacaagg gctcacgcgt tcttgtttgc tgcctgaga tcaactgctg cacttttctg	600
ggaccatctg atactcactt ggattcaatg gtaggtcaag cgctttttgg cgatggtgct	660
gcagcagtta ttgtaggtgc tgatcctgac acttccattg agcgtccatt attccagatt	720
gtttcagctg cacaacat ccttctgac tctgatgggg ccatcgatgg acacttacgt	780
gaggttggtt taacctttca cctgctaaag gatgttcttg ggctaattct aaagaacata	840
gagaaaagcc tgggtgaagc attcgtcca attggtatca acgattggaa ctccatattt	900
tggattgcac accttggagg ccccgcgatt ctgaccagg ttgagattaa gctagatcta	960
aaggaagaga aactgagagc tacaagaaac gtcctgagtg attatggcaa catgtcaagt	1020
gcttgtgttt tgtttatctt ggacgagatg agaacaagt ctctcgagga agggaaaagc	1080
accaccggtg aagggttga gtggggtgtt ttgtttggat tcggaccagg actcacgtt	1140
gagacagtgg tgttacacag cgttccagta gaacaaaca tttactcatg a	1191
<210> 4	
<211> 1200	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> recombinant HvCHS2

<400> 4

atggctgcgg tgaggttgaa ggaagtgaga atggcacagc gggctgaggg cctggcgaca	60
gtgtggcca ttggcacgc cgtgccggcc aactgcgtgt accaggcgac ctaccagac	120
tattacttca gaticacgaa gagcgagcac ctgcggacc tcaaggagaa gttccagagg	180
atgtcgaca agtccatgat cagaaagagg cacatgcacc taaccgagga gatactaatt	240
aagaacccca agatctgcgc gcacatggag acctcgcttg acgcgcgcca tgccattgcg	300
ctcgtcgagg tcccgaagct ggggcaagga gctgcggaga aggcaatcaa ggagtggggc	360
cagccattgt ccaagatcac ccacctctg tctgcacaa cctctggcgt cgacatgcca	420
ggcgccgact accagctgac caagttgctc ggctctccc cgacggtgaa acgcctgatg	480
atgtaccagc aggggtgctt ggccggcgcc acggttcttc gccttgccaa ggacatcgct	540
gagaacaacc gcggcgctcg tgtgtgtggt gtctgctcgg agataaccgc catggccttc	600
cgtggtcctt gcaagtccca tctcgactcg ctggtcgcc atgcactctt tggcgatggc	660
gcagctgctg ccatcatcgg cgctgacct gaccagctgg acgagcagcc agtgttcag	720
ctggtgtcag cgagccagac catctgccg gactcggagg gagccatcga cggccacctt	780
acggaggcgg gcctgacct ccaccttctc aaggacgtgc cgggactcat ctctgagaat	840
atcgagaag cattagagga cgcgttgag cctctgggca tccacaactg gaactccatc	900
ttctggattg ctaccctgg ggggctgcc atccttgaca gggtcgagga cagagttggc	960
cttgacaaga agcgcatcg cgcaagccgg gaggttctgt cggagtacgg aaacatgtcc	1020
agcgcaagtg tactcttctg ccttgacgtt atcgtaaga gctccgcaa ggatgcctc	1080
gccacaactg gagaaggcaa ggactggggt gtcctcttcg gcttcggccc tggcctcacc	1140
gtcgagacac tcgtctcca cagctcccc gtccccgtcc ccaccgccgc tagtgcatga	1200
	1200

<210> 5

<211> 554

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> recombinant Os4CL

<400> 5

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

1	5	10	15
---	---	----	----

Pro Asp Ile Glu Ile Asp Asn Ser Met Thr Leu Gln Glu Tyr Cys Phe

20 25 30

Ala Arg Met Ala Glu Val Gly Ala Arg Pro Cys Leu Ile Asp Gly Gln

35 40 45

Thr Gly Glu Ser Tyr Thr Tyr Ala Glu Val Glu Ser Ala Ser Arg Arg

50 55 60

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

65 70 75 80

Met Ser Leu Leu Arg Asn Cys Pro Glu Phe Ala Phe Ser Phe Leu Gly

85 90 95

Ala Ala Arg Leu Gly Ala Ala Thr Thr Thr Ala Asn Pro Phe Tyr Thr

100 105 110

Pro His Glu Val His Arg Gln Ala Glu Ala Ala Gly Ala Arg Val Ile

115 120 125

Val Thr Glu Ala Cys Ala Val Glu Lys Val Arg Glu Phe Ala Ala Glu

130 135 140

Arg Gly Val Pro Val Val Thr Val Asp Gly Ala Phe Asp Gly Cys Val

145 150 155 160

Glu Phe Arg Glu Val Leu Ala Ala Glu Glu Leu Asp Ala Asp Ala Asp

165 170 175

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

180 185 190

Gly Leu Pro Lys Gly Val Met Leu Thr His Arg Ser Leu Ile Thr Ser

195 200 205

Val Ala Gln Gln Val Asp Gly Glu Asn Pro Asn Leu Tyr Phe Ser Lys

210 215 220

Asp Asp Val Ile Leu Cys Leu Leu Pro Leu Phe His Ile Tyr Ser Leu

225 230 235 240

Asn Ser Val Leu Leu Ala Gly Leu Arg Ala Gly Ser Thr Ile Val Ile

245 250 255

Met Arg Lys Phe Asp Leu Gly Ala Leu Val Asp Leu Val Arg Lys His

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

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

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

 450 455 460
 Ala Val Val Ser Met Lys Asp Asp Leu Ala Gly Glu Val Pro Val Ala
 465 470 475 480
 Phe Ile Val Arg Thr Glu Gly Ser Glu Ile Thr Glu Asp Glu Ile Lys
 485 490 495
 Lys Phe Val Ala Lys Glu Val Val Phe Tyr Lys Arg Ile Asn Lys Val
 500 505 510
 Phe Phe Thr Asp Ser Ile Pro Lys Asn Pro Ser Gly Lys Ile Leu Arg

515 520 525
 Lys Asp Leu Arg Ala Arg Leu Ala Ala Gly Ile Pro Asp Ala Val Ala
 530 535 540
 Ala Ala Ala Ala Asp Ala Pro Lys Ser Ser
 545 550
 <210> 6
 <211> 561
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> recombinant At4CL
 <400> 6
 Met Ala Pro Gln Glu Gln Ala Val Ser Gln Val Met Glu Lys Gln Ser
 1 5 10 15
 Asn Asn Asn Asn Ser Asp Val Ile Phe Arg Ser Lys Leu Pro Asp Ile
 20 25 30
 Tyr Ile Pro Asn His Leu Ser Leu His Asp Tyr Ile Phe Gln Asn Ile
 35 40 45
 Ser Glu Phe Ala Thr Lys Pro Cys Leu Ile Asn Gly Pro Thr Gly His
 50 55 60
 Val Tyr Thr Tyr Ser Asp Val His Val Ile Ser Arg Gln Ile Ala Ala
 65 70 75 80
 Asn Phe His Lys Leu Gly Val Asn Gln Asn Asp Val Val Met Leu Leu
 85 90 95
 Leu Pro Asn Cys Pro Glu Phe Val Leu Ser Phe Leu Ala Ala Ser Phe
 100 105 110
 Arg Gly Ala Thr Ala Thr Ala Ala Asn Pro Phe Phe Thr Pro Ala Glu
 115 120 125
 Ile Ala Lys Gln Ala Lys Ala Ser Asn Thr Lys Leu Ile Ile Thr Glu
 130 135 140
 Ala Arg Tyr Val Asp Lys Ile Lys Pro Leu Gln Asn Asp Asp Gly Val
 145 150 155 160

Val Ile Val Cys Ile Asp Asp Asn Glu Ser Val Pro Ile Pro Glu Gly

165 170 175

Cys Leu Arg Phe Thr Glu Leu Thr Gln Ser Thr Thr Glu Ala Ser Glu

180 185 190

Val Ile Asp Ser Val Glu Ile Ser Pro Asp Asp Val Val Ala Leu Pro

195 200 205

Tyr Ser Ser Gly Thr Thr Gly Leu Pro Lys Gly Val Met Leu Thr His

210 215 220

Lys Gly Leu Val Thr Ser Val Ala Gln Gln Val Asp Gly Glu Asn Pro

225 230 235 240

Asn Leu Tyr Phe His Ser Asp Asp Val Ile Leu Cys Val Leu Pro Met

245 250 255

Phe His Ile Tyr Ala Leu Asn Ser Ile Met Leu Cys Gly Leu Arg Val

260 265 270

Gly Ala Ala Ile Leu Ile Met Pro Lys Phe Glu Ile Asn Leu Leu Leu

275 280 285

Glu Leu Ile Gln Arg Cys Lys Val Thr Val Ala Pro Met Val Pro Pro

290 295 300

Ile Val Leu Ala Ile Ala Lys Ser Ser Glu Thr Glu Lys Tyr Asp Leu

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

Phe Ala Lys Glu Pro Phe Pro Val Lys Ser Gly Ala Cys Gly Thr Val

370 375 380

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

385 390 395 400

Leu Ser Arg Asn Gln Pro Gly Glu Ile Cys Ile Arg Gly His Gln Ile

405 410 415
Met Lys Gly Tyr Leu Asn Asn Pro Ala Ala Thr Ala Glu Thr Ile Asp
420 425 430
Lys Asp Gly Trp Leu His Thr Gly Asp Ile Gly Leu Ile Asp Asp Asp
435 440 445
Asp Glu Leu Phe Ile Val Asp Arg Leu Lys Glu Leu Ile Lys Tyr Lys

450 455 460
Gly Phe Gln Val Ala Pro Ala Glu Leu Glu Ala Leu Leu Ile Gly His
465 470 475 480
Pro Asp Ile Thr Asp Val Ala Val Val Ala Met Lys Glu Glu Ala Ala
485 490 495
Gly Glu Val Pro Val Ala Phe Val Val Lys Ser Lys Asp Ser Glu Leu
500 505 510
Ser Glu Asp Asp Val Lys Gln Phe Val Ser Lys Gln Val Val Phe Tyr
515 520 525

Lys Arg Ile Asn Lys Val Phe Phe Thr Glu Ser Ile Pro Lys Ala Pro
530 535 540
Ser Gly Lys Ile Leu Arg Lys Asp Leu Arg Ala Lys Leu Ala Asn Gly
545 550 555 560
Leu

<210> 7

<211> 396

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> recombinant PeCHS

<400> 7

Met Ala Pro Ser Ile Glu Glu Ile Arg Lys Ala Gln Arg Ala Ser Gly
1 5 10 15
Pro Ala Thr Ile Leu Ala Ile Gly Lys Ala Thr Pro Ala Asn Cys Val

20 25 30
Ser Gln Ala Asp Tyr Pro Asp Tyr Tyr Phe Arg Ile Thr Asn Ser Glu

35	40	45	
His Met Thr Glu Leu Lys Glu Lys Phe Lys Arg Met Cys Asp Lys Ser			
50	55	60	
Met Ile Lys Lys Arg Tyr Met His Leu Thr Glu Glu Ile Leu Lys Glu			
65	70	75	80
Asn Ser Ser Met Cys Glu Tyr Met Ala Pro Ser Leu Asp Ala Arg Gln			
85	90	95	
Asp Met Val Val Val Glu Val Pro Lys Leu Gly Lys Glu Ala Ala Ala			
100	105	110	
Lys Ala Ile Lys Glu Trp Gly Gln Pro Lys Ser Lys Ile Thr His Leu			
115	120	125	
Val Phe Cys Thr Thr Ser Gly Val Asp Met Pro Gly Ala Asp Tyr Gln			
130	135	140	
Leu Thr Lys Leu Leu Gly Leu Arg Ser Ser Val Lys Arg Phe Met Met			
145	150	155	160
Tyr Gln Gln Gly Cys Phe Ala Gly Gly Thr Val Leu Arg Leu Ala Lys			
165	170	175	
Asp Leu Ala Glu Asn Asn Lys Gly Ser Arg Val Leu Val Val Cys Ser			
180	185	190	
Glu Ile Thr Ala Val Thr Phe Arg Gly Pro Ser Asp Thr His Leu Asp			
195	200	205	
Ser Met Val Gly Gln Ala Leu Phe Gly Asp Gly Ala Ala Ala Val Ile			
210	215	220	
Val Gly Ala Asp Pro Asp Thr Ser Ile Glu Arg Pro Leu Phe Gln Ile			
225	230	235	240
Val Ser Ala Ala Gln Thr Ile Leu Pro Asp Ser Asp Gly Ala Ile Asp			
245	250	255	
Gly His Leu Arg Glu Val Gly Leu Thr Phe His Leu Leu Lys Asp Val			
260	265	270	
Pro Gly Leu Ile Ser Lys Asn Ile Glu Lys Ser Leu Val Glu Ala Phe			
275	280	285	
Ala Pro Ile Gly Ile Asn Asp Trp Asn Ser Ile Phe Trp Ile Ala His			

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

305 310 315 320
Lys Glu Glu Lys Leu Arg Ala Thr Arg Asn Val Leu Ser Asp Tyr Gly

325 330 335
Asn Met Ser Ser Ala Cys Val Leu Phe Ile Leu Asp Glu Met Arg Asn

340 345 350
Lys Ser Leu Glu Glu Gly Lys Ser Thr Thr Gly Glu Gly Leu Glu Trp

355 360 365
Gly Val Leu Phe Gly Phe Gly Pro Gly Leu Thr Val Glu Thr Val Val

370 375 380

Leu His Ser Val Pro Val Glu Gln Thr Ile Tyr Ser

385 390 395

<210> 8

<211> 399

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> recombinant HvCHS2

<400> 8

Met Ala Ala Val Arg Leu Lys Glu Val Arg Met Ala Gln Arg Ala Glu

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Tyr Gln Ala Thr Tyr Pro Asp Tyr Tyr Phe Arg Val Thr Lys Ser

35 40 45

Glu His Leu Ala Asp Leu Lys Glu Lys Phe Gln Arg Met Cys Asp Lys

50 55 60

Ser Met Ile Arg Lys Arg His Met His Leu Thr Glu Glu Ile Leu Ile

65 70 75 80

Lys Asn Pro Lys Ile Cys Ala His Met Glu Thr Ser Leu Asp Ala Arg

85 90 95

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

100	105	110	
Glu Lys Ala Ile Lys Glu Trp Gly Gln Pro Leu Ser Lys Ile Thr His			
115	120	125	
Leu Val Phe Cys Thr Thr Ser Gly Val Asp Met Pro Gly Ala Asp Tyr			
130	135	140	
Gln Leu Thr Lys Leu Leu Gly Leu Ser Pro Thr Val Lys Arg Leu Met			
145	150	155	160
Met Tyr Gln Gln Gly Cys Phe Gly Gly Ala Thr Val Leu Arg Leu Ala			
165	170	175	
Lys Asp Ile Ala Glu Asn Asn Arg Gly Ala Arg Val Leu Val Val Cys			
180	185	190	
Ser Glu Ile Thr Ala Met Ala Phe Arg Gly Pro Cys Lys Ser His Leu			
195	200	205	
Asp Ser Leu Val Gly His Ala Leu Phe Gly Asp Gly Ala Ala Ala Ala			
210	215	220	
Ile Ile Gly Ala Asp Pro Asp Gln Leu Asp Glu Gln Pro Val Phe Gln			
225	230	235	240
Leu Val Ser Ala Ser Gln Thr Ile Leu Pro Glu Ser Glu Gly Ala Ile			
245	250	255	
Asp Gly His Leu Thr Glu Ala Gly Leu Thr Ile His Leu Leu Lys Asp			
260	265	270	
Val Pro Gly Leu Ile Ser Glu Asn Ile Glu Gln Ala Leu Glu Asp Ala			
275	280	285	
Phe Glu Pro Leu Gly Ile His Asn Trp Asn Ser Ile Phe Trp Ile Ala			
290	295	300	
His Pro Gly Gly Pro Ala Ile Leu Asp Arg Val Glu Asp Arg Val Gly			
305	310	315	320
Leu Asp Lys Lys Arg Met Arg Ala Ser Arg Glu Val Leu Ser Glu Tyr			
325	330	335	
Gly Asn Met Ser Ser Ala Ser Val Leu Phe Val Leu Asp Val Met Arg			
340	345	350	

Lys Ser Ser Ala Lys Asp Gly Leu Ala Thr Thr Gly Glu Gly Lys Asp
 355 360 365
 Trp Gly Val Leu Phe Gly Phe Gly Pro Gly Leu Thr Val Glu Thr Leu
 370 375 380
 Val Leu His Ser Val Pro Val Pro Val Pro Thr Ala Ala Ser Ala
 385 390 395