(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0027212
(43) 공개일자 2021년03월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/78 (2006.01) *C12N 9/10* (2006.01)
C12P 7/42 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/78 (2013.01)
C12N 9/1029 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0110632
(22) 출원일자 2020년08월31일
심사청구일자 2020년08월31일
(30) 우선권주장
1020190107196 2019년08월30일 대한민국(KR)

(71) 출원인
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(72) 발명자
이성국
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
차대근
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
하효석
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(74) 대리인
제일특허법인(유)

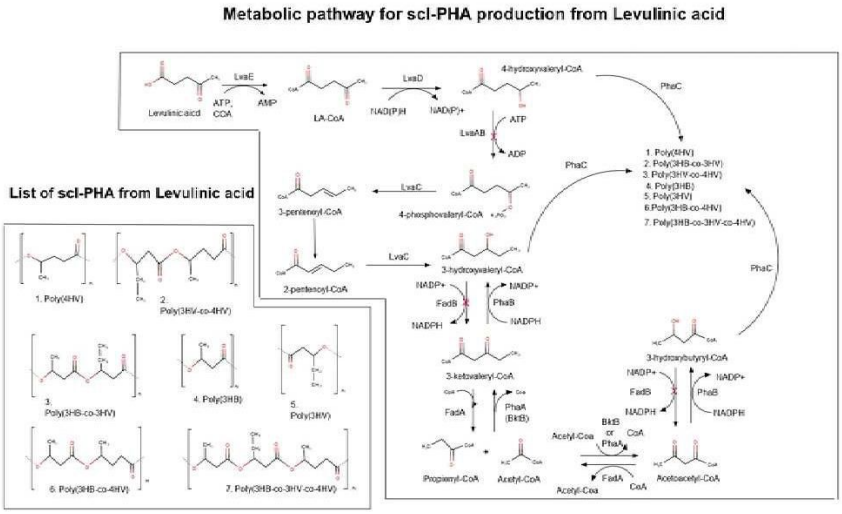
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 **폴리하이드록시알카노에이트를 생산하는 형질전환 미생물**

(57) 요 약

본 발명은 폴리하이드록시알카노에이트를 생산하기 위해 유전자를 변형시킨 형질전환 미생물에 관한 것이다. 보다 구체적으로는, 본 발명은 3-하이드록시부티르산, 3-하이드록시발레르산, 4-하이드록시발레르산 등을 단량체로 하는 폴리하이드록시알카노에이트를 생산하는 형질전환 미생물에 관한 것이다. 본 발명의 형질전환 미생물은 이종 균주의 *phaC* 유전자를 도입시킴으로써 폴리하이드록시알카노에이트의 조성 및 생산량을 조절할 수 있으므로, 다양한 종류의 폴리하이드록시알카노에이트를 생산하는데 활용될 수 있다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
C12P 7/42 (2013.01)
C12Y 203/01 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

이종 균주의 *phaC* 유전자가 도입된 형질전환 미생물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 이종 균주는 파라콕쿠스 데니트리피칸스(*Paracoccus denitrificans*), 크로모박테리움 비올라세움(*Chromobacterium violaceum*), 쿠프리아비더스 네카토르(*Cupriavidus necator*), 슈도모나스 올레오보란스(*Pseudomonas oleovorans*) 또는 티오캅사 프펜니기이(*Thiocapsa pfennigii*)인, 형질전환 미생물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 이종 균주의 *phaC* 유전자는 슈도모나스 올레오보란스(*Pseudomonas oleovorans*)의 *phaC1* 유전자 및 *phaC2* 유전자를 포함하는 것인, 형질전환 미생물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 이종 균주의 *phaC* 유전자는 티오캅사 프펜니기이(*Thiocapsa pfennigii*)의 *phaE* 유전자 및 *phaC* 유전자를 포함하는 것인, 형질전환 미생물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 이종 균주의 *phaC* 유전자는 쿠프리아비더스 네카토르(*Cupriavidus necator*)의 *phaA* 유전자, *phaB* 유전자 및 *phaC* 유전자를 포함하는 것인, 형질전환 미생물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 이종 균주의 *phaC* 유전자는 쿠프리아비더스 네카토르(*Cupriavidus necator*)의 *phaC* 유전자를 포함하는 것인, 형질전환 미생물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 이종 균주의 *phaC* 유전자는 크로모박테리움 비올라세움(*Chromobacterium violaceum*)의 *phaC* 유전자를 포함하는 것인, 형질전환 미생물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 이종 균주의 *phaC* 유전자는 파라콕쿠스 데니트리피칸스(*Paracoccus denitrificans*)의 *phaC* 유전자를 포함하는 것인, 형질전환 미생물.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 미생물은 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*) 균주인, 형질전환 미생물.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 형질전환 미생물이 *IvaAB* 유전자, *fadB* 유전자, *phaC* 유전자, *tesB* 유전자 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 유전자의 발현이 억제된 것인, 형질전환 미생물.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 미생물은 폴리하이드록시알카노에이트(PHA)를 생산할 수 있는, 형질전환 미생물.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 폴리하이드록시알카노에이트는 3-하이드록시부티르산(3HB), 3-하이드록시발레르산(3HV), 4-하이드록시발레르산(4HV) 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 단량체가 중합되어 형성된 것인, 형질전환 미생물.

청구항 13

제1항의 형질전환 미생물을 배양하는 단계; 및

상기 형질전환 미생물로부터 생산되는 폴리하이드록시알카노에이트를 수득하는 단계를 포함하는, 폴리하이드록시알카노에이트의 제조방법.

청구항 14

제1항의 형질전환 미생물을 포함하는 배양 배지 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 폴리하이드록시알카노에이트를 생산하기 위해 유전자를 변형시킨 형질전환 미생물에 관한 것이다. 보다 구체적으로는, 본 발명은 3-하이드록시부티르산, 3-하이드록시발레르산, 4-하이드록시발레르산 등을 단량체로 하는 폴리하이드록시알카노에이트를 생산하는 형질전환 미생물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 가볍고 물성이 뛰어나 소재의 혁명을 가져다 주었던 플라스틱 물질은 자연계에서 분해가 되지 않아 심각한 환경문제를 일으키고 있다. 현재 전세계적으로 사용되고 있는 플라스틱이 1억 톤을 넘어서고 있고 우리나라에서의 연간 사용량도 7백만 톤에 육박하고 있으며, 이 중 약 20%가 한 번 사용하고 버리는 포장재, 기저귀, 주사기 등에 쓰여 심각한 공해의 주범으로 지목 받고 있다. 이와 같은 플라스틱에 의한 환경오염 문제를 해결하기 위해 플라스틱 폐기물의 재활용 등을 통한 해결책이 강구되고 있지만, 근본적인 문제 해결책은 되지 못하였다. 이에, 생분해성 플라스틱 개발을 통한 근본적인 해결책에 관심이 집중되고 있다.

[0003] 폴리하이드록시알카노에이트(Polyhydroxyalkanoate, PHA)는 미생물이 질소, 산소, 인, 마그네슘 등의 성장에 필요한 원소가 부족한 상태에서 탄소원이 풍부하게 존재할 때 에너지 및 환원능의 저장을 위하여 미생물 내부에 축적하는 천연 폴리에스터 물질이다. 폴리하이드록시알카노에이트는 종래 석유로부터 유래된 합성 고분자와 비슷한 물성을 가지면서 생분해성 및 생체적합성을 보이기 때문에, 기존의 합성 플라스틱을 대체할 물질로 인식되고 있다.

[0004] 폴리하이드록시알카노에이트는 곁사슬이 있는 하이드록시산 단량체가 중합된 형태를 이룬다. 3-하이드록시부티르산(3-Hydroxybutyric acid), 3-하이드록시발레르산(3-Hydroxyvaleric acid, 3HV) 및 4-하이드록시발레르산(4-Hydroxyvaleric acid, 4HV) 등의 단량체를 조합하여 폴리하이드록시알카노에이트를 구성할 수 있으며, 상기

단량체의 종류는 150가지가 넘는 것으로 알려져 있다. 폴리하이드록시알카노에이트는 중합된 단량체의 조합에 따라 취성(Brittleness) 및 강성(Rigidity) 등의 특성이 현저하게 달라질 수 있다(Yoshiharu. *et. al. Biopolymers*. 2002. Weinheim, Germany: Wiley-VCH. ISBN 978-3-527-30225-3).

[0005] 한편, 단량체인 3-하이드록시부티르산, 3-하이드록시발레르산 및 4-하이드록시발레르산 등은 화학적 합성을 통해 수득되거나, 생물학적 방법을 통해 수득될 수 있다. 그러나, 화학적 합성 방법은 가혹한 조건, 촉매 및 유기용매의 사용으로 과도한 비용이 발생되고, 생체적합성이 떨어지는 문제점이 있다. 또한, 생물학적 합성은 생산량과 수율이 낮다는 문제점이 있다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0006] (비특허문헌 0001) Yoshiharu. et. al. Biopolymers. 2002. Weinheim, Germany: Wiley-VCH. ISBN 978-3-527-30225-3.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 이에, 본 발명은 폴리하이드록시알카노에이트(PHA)를 효과적으로 생산할 수 있는 형질전환 미생물을 제공하는 것을 그 목적으로 한다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 미생물을 이용하여 폴리하이드록시알카노에이트를 생산하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 측면은, 이종 균주의 *phaC* 유전자가 도입된 형질전환 미생물을 제공한다.

[0010] 본 발명의 다른 측면은, 상기 형질전환 미생물을 배양하는 단계; 및 상기 형질전환 미생물로부터 생산되는 폴리하이드록시알카노에이트를 수득하는 단계를 포함하는, 폴리하이드록시알카노에이트의 제조방법을 제공한다.

[0011] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 형질전환 미생물을 포함하는 배양 배지 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명의 형질전환 미생물은 이종 균주의 *phaC* 유전자를 도입시킴으로써 폴리하이드록시알카노에이트의 조성 및 생산량을 조절할 수 있으므로, 다양한 종류의 폴리하이드록시알카노에이트를 생산하는데 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 레불린산으로부터 다양한 폴리하이드록시알카노에이트를 생산하는 경로를 도식화한 것이다.

도 2a는 본 발명의 일 구체예에서 사용된 pPROBE-lvaR_P1vaA_phaBCA 플라스미드의 구조를 도식화한 것이다.

도 2b는 본 발명의 일 구체예에서 사용된 pPROBE-lvaR_P1vaA_phaC_P.d 플라스미드의 구조를 도식화한 것이다.

도 2c는 본 발명의 일 구체예에서 사용된 pPROBE-lvaR_P1vaA_phaC_C.n 플라스미드의 구조를 도식화한 것이다.

도 2d는 본 발명의 일 구체예에서 사용된 pPROBE-lvaR_P1vaA_phaC_T.p. 플라스미드의 구조를 도식화한 것이다.

도 2e는 본 발명의 일 구체예에서 사용된 pPROBE-lvaR_P1vaA_phaC_C.v. 플라스미드의 구조를 도식화한 것이다.

도 3은 *phaC* 유전자 결실 및 레불린산(LA)의 유무에 따른 균주의 PHA 생산 정도를 분석한 그래프이다(자주색: 24시간 배양, 초록색: 48시간 배양, 파란색: 72시간 배양).

도 4는 *phaC* 유전자 결실 유무에 따른 균주의 PHA 조성을 GC-MS(Gas Chromatograph Mass Spectrometer)로 분석한 그래프이다

도 5a는 도입된 이종 균주의 *phaC* 및 배지 조성에 따른 폴리하이드록시알카노에이트(PHA)의 조성을 측정한 것이다.

도 5b는 도입된 이종 균주의 phaC 및 배지 조성에 따른 폴리하이드록시알카노에이트(PHA)의 생산량을 측정한 것이다.

도 6a는 *phaC* 유전자의 추가 결실에 따른 폴리하이드록시알카노에이트(PHA)의 조성 및 생산량 변화를 확인한 그래프이다.

도 6b는 *phaC* 및 *lvaAB* 유전자의 추가 결실에 따른 폴리하이드록시알카노에이트(PHA)의 조성 및 생산량 변화를 확인한 그래프이다.

도 6c는 *phaC* 및 *fadB* 유전자의 추가 결실에 따른 폴리하이드록시알카노에이트(PHA)의 조성 및 생산량 변화를 확인한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명한다.

[0015] 본 발명의 일 측면은 이종 균주의 *phaC* 유전자가 도입된 형질전환 미생물을 제공한다.

[0016] 본 발명에서 사용하는 용어, "phaC"는 단량체인 하이드록시알카노에이트(hydroxyalkanoate)를 중합하여 폴리하이드록시알카노에이트를 생합성시키는 합성 효소이다.

[0017] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 이종 균주는 파라콕쿠스 데니트리피칸스(*Paracoccus denitrificans*), 크로모박테리움 비올라세움(*Chromobacterium violaceum*), 쿠프리아비더스 네카토르(*Cupriavidus necator*), 슈도모나스 올레오보란스(*Pseudomonas oleovorans*) 또는 티오캅사 프펜니기이(*Thiocapsa pfennigii*)일 수 있다.

[0018] 상기 이종 균주의 *phaC* 유전자는 파라콕쿠스 데니트리피칸스(*Paracoccus denitrificans*)의 *phaC* 유전자를 포함하는 것일 수 있다. 상기 파라콕쿠스 데니트리피칸스(*Paracoccus denitrificans*)의 *phaC* 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오타이드일 수 있다. 또한, 상기 *phaC* 유전자는 서열번호 1의 염기서열과 약 70%, 80%, 90% 또는 95% 이상의 상동성을 가질 수 있다. 한편, 상기 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오타이드가 코딩하는 phaC 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩타이드일 수 있다. 상기 phaC 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열과 약 70%, 80%, 90% 또는 95% 이상의 상동성을 가질 수 있다.

[0019] 상기 이종 균주의 *phaC* 유전자는 크로모박테리움 비올라세움(*Chromobacterium violaceum*)의 *phaC* 유전자를 포함하는 것일 수 있다. 상기 크로모박테리움 비올라세움(*Chromobacterium violaceum*)의 *phaC* 유전자는 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오타이드일 수 있다. 또한, 상기 *phaC* 유전자는 서열번호 3의 염기서열과 약 70%, 80%, 90% 또는 95% 이상의 상동성을 가질 수 있다. 한편, 상기 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오타이드가 코딩하는 phaC 단백질은 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩타이드일 수 있다. 상기 phaC 단백질은 서열번호 4의 아미노산 서열과 약 70%, 80%, 90% 또는 95% 이상의 상동성을 가질 수 있다.

[0020] 상기 이종 균주의 *phaC* 유전자는 쿠프리아비더스 네카토르(*Cupriavidus necator*)의 *phaC* 유전자를 포함하는 것일 수 있다. 상기 쿠프리아비더스 네카토르(*Cupriavidus necator*)의 *phaC* 유전자는 서열번호 5의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오타이드일 수 있다. 또한, 상기 *phaC* 유전자는 서열번호 5의 염기서열과 약 70%, 80%, 90% 또는 95% 이상의 상동성을 가질 수 있다. 한편, 상기 서열번호 5의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오타이드가 코딩하는 phaC 단백질은 서열번호 6의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩타이드일 수 있다. 상기 phaC 단백질은 서열번호 6의 아미노산 서열과 약 70%, 80%, 90% 또는 95% 이상의 상동성을 가질 수 있다.

[0021] 상기 이종 균주의 *phaC* 유전자는 쿠프리아비더스 네카토르(*Cupriavidus necator*)의 *phaA* 유전자, *phaB* 유전자 및 *phaC* 유전자를 포함하는 것일 수 있다. 상기 쿠프리아비더스 네카토르(*Cupriavidus necator*)의 *phaA* 유전자, *phaB* 유전자 및 *phaC* 유전자는 각각 서열번호 15, 서열번호 17 및 서열번호 5의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오타이드일 수 있다. 또한, *phaA* 유전자, *phaB* 유전자 및 *phaC* 유전자는 각각 서열번호 15, 서열번호 17 및 서열번호 5의 염기서열과 약 70%, 80%, 90% 또는 95% 이상의 상동성을 가질 수 있다. 한편, 상기 서열번호 15, 서열번호 17 및 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어진 폴리뉴클레오타이드가 코딩하는 phaA 단백질, phaB 단백질 및 phaC 단백질은 각각 서열번호 16, 서열번호 18 및 서열번호 6의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩타이드일 수 있다. 상기 phaA 단백질, phaB 단백질 및 phaC 단백질은 각각 서열번호 16, 서열번호 18 및 서열번호 6의 아미노산 서열과 약 70%, 80%, 90% 또는 95% 이상의 상동성을 가질 수 있다.

[0022] 상기 이종 균주의 *phaC* 유전자는 슈도모나스 올레오보란스(*Pseudomonas oleovorans*)의 *phaC1* 유전자 및 *phaC2* 유전자를 포함하는 것일 수 있다. 상기 슈도모나스 올레오보란스(*Pseudomonas oleovorans*)의 *phaC1* 유전자 및 *phaC2* 유전자는 각각 서열번호 7 및 서열번호 9의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오타이드일 수 있다. 또한, *phaC1* 유전자 및 *phaC2* 유전자는 각각 서열번호 7 및 서열번호 9의 염기서열과 약 70%, 80%, 90% 또는 95% 이상의 상동성을 가질 수 있다. 한편, 상기 서열번호 7 및 서열번호 9의 아미노산 서열로 이루어진 폴리뉴클레오타이드가 코딩하는 phaC1 단백질 및 phaC2 단백질은 각각 서열번호 8 및 서열번호 10의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩타이드일 수 있다. 상기 phaC1 단백질 및 phaC2 단백질은 각각 서열번호 8 및 서열번호 10의 아미노산 서열과 약 70%, 80%, 90% 또는 95% 이상의 상동성을 가질 수 있다.

[0023] 상기 이종 균주의 *phaC* 유전자는 티오캅사 프펜니기이(*Thiocapsa pfennigii*)의 *phaE* 유전자 및 *phaC* 유전자를 포함하는 것일 수 있다. 상기 티오캅사 프펜니기이(*Thiocapsa pfennigii*)의 *phaE* 유전자 및 *phaC* 유전자는 각각 서열번호 11 및 서열번호 13의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오타이드일 수 있다. 또한, *phaE* 유전자 및 *phaC* 유전자는 각각 서열번호 11 및 서열번호 13의 염기서열과 약 70%, 80%, 90% 또는 95% 이상의 상동성을 가질 수 있다. 한편, 상기 서열번호 11 및 서열번호 13의 아미노산 서열로 이루어진 폴리뉴클레오타이드가 코딩하는 phaE 단백질 및 phaC 단백질은 각각 서열번호 12 및 서열번호 14의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩타이드일 수 있다. 상기 phaE 단백질 및 phaC 단백질을 각각 서열번호 12 및 서열번호 14의 아미노산 서열과 약 70%, 80%, 90% 또는 95% 이상의 상동성을 가질 수 있다.

[0024] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 형질전환 미생물은 자이모모나스(*Zymomonas*), 에스케리키아(*Escherichia*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 알칼리제네스(*Alcaligenes*), 살모넬라(*Salmonella*), 시겔라(*Shigella*), 버크홀데리아(*Burkholderia*), 올리고트로파(*Oligotropha*), 클렙시엘라(*Klebsiella*), 피치아(*Pichia*), 칸디아(*Candida*), 한세눌라(*Hansenula*), 사카로마이세스(*Saccharomyces*), 또는 클루이베로마이세스(*Kluyveromyces*) 속에 속하는 미생물일 수 있다. 본 발명의 일 구체예에서 상기 형질전환 미생물은 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*)일 수 있고, 구체적으로는 슈도모나스 푸티다 EM42 균주일 수 있다.

[0025] 상기 형질전환 미생물은 *lvaAB* 유전자, *fadB* 유전자, *phaC* 유전자, *tesB* 유전자 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 유전자의 발현이 억제된 것일 수 있다.

[0026] 상기 "*lvaAB* 유전자"는 슈도모나스 푸티다 균주 내 lva 오페론에 존재하는 효소를 암호화하는 유전자이다. 상기 *lvaAB* 유전자에 의해 코딩된 lvaAB 단백질은 4HV-CoA와 ATP가 반응하여 4PV-CoA(4-phosphovaleryl-CoA)를 생성하는데 기여한다. 구체적으로, 상기 lvaAB 단백질은 인산기의 전이를 촉매하는 효소인 인산전이효소(phosphotransferase) lvaA와 가설 단백질(hypothetical protein)인 lvaB가 합성된 효소이다.

[0027] *lvaAB* 유전자 발현의 억제는 *lvaA* 유전자의 발현이 억제된 것일 수 있고, *lvaB* 유전자의 발현이 억제된 것일 수 있으며, *lvaA* 유전자 및 *lvaB* 유전자의 발현이 모두 억제된 것일 수 있다.

[0028] 이때, 상기 "*lvaA* 유전자"는 서열번호 19의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오타이드일 수 있다. 상기 *lvaA* 유전자는 서열번호 19의 염기서열과 약 70%, 80%, 90% 또는 95% 이상의 상동성을 가질 수 있다. 한편, 상기 서열번호 19의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오타이드가 코딩하는 lvaA 단백질은 서열번호 20의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩타이드일 수 있다. 상기 lvaA 단백질은 서열번호 20의 아미노산 서열과 약 70%, 80%, 90% 또는 95% 이상의 상동성을 가질 수 있다.

[0029] 또한, 상기 *lvaB* 유전자는 서열번호 21의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오타이드일 수 있다. 상기 *lvaB* 유전자는 서열번호 21의 염기서열과 약 70%, 80%, 90% 또는 95% 이상의 상동성을 가질 수 있다. 한편, 상기 서열번호 21의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오타이드가 코딩하는 lvaB 단백질은 서열번호 22의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩타이드일 수 있다. 상기 lvaB 단백질은 서열번호 22의 아미노산 서열과 약 70%, 80%, 90% 또는 95% 이상의 상동성을 가질 수 있다.

[0030] 상기 "*fadB* 유전자"는 PHA 합성의 전구체로 사용되는 아실-CoA 계열의 중간체 화합물을 초기 형태로 환원시키는 역할을 한다. 본 발명의 일 구체예에서, 상기 *fadB* 유전자는 슈도모나스 푸티타 균주의 유전자로, 서열번호 23의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오타이드일 수 있다. 상기 *fadB* 유전자는 서열번호 23의 염기서열과 약 70%, 80%, 90% 또는 95% 이상의 상동성을 가질 수 있다. 한편, 상기 서열번호 23의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오타이드가 코딩하는 fadB 단백질은 서열번호 24의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩타이드일 수 있다. 상기 fadB 단백질은 서열번호 24의 아미노산 서열과 약 70%, 80%, 90% 또는 95% 이상의 상동성을 가질 수 있다.

[0031] 상기 슈도모나스 푸티타 균주의 "*phaC* 유전자"는 *phaC1* 유전자, *phaZ* 유전자 및 *phaC2* 유전자로 이루어질 수 있

다. 상기 *phaC1* 유전자, *phaZ* 유전자 및 *phaC2* 유전자는 각각 서열번호 25, 서열번호 27 및 서열번호 29의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오타이드일 수 있다. 또한, 상기 슈도모나스 푸티타 균주의 *phaC1* 유전자, *phaZ* 유전자 및 *phaC2* 유전자는 각각 서열번호 25, 서열번호 27 및 서열번호 29의 염기서열과 약 70%, 80%, 90% 또는 95% 이상의 상동성을 가질 수 있다. 한편, 상기 슈도모나스 푸티타 균주의 phaC 단백질은 phaC1 단백질, phaZ 단백질 및 phaC2 단백질로 이루어질 수 있다. 상기 phaC 단백질은 phaC1 단백질, phaZ 단백질 및 phaC2 단백질은 각각 서열번호 26, 서열번호 28 및 서열번호 30의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩타이드일 수 있고, 각각 서열번호 26, 서열번호 28 및 서열번호 30의 아미노산 서열과 약 70%, 80%, 90% 또는 95% 이상의 상동성을 가질 수 있다.

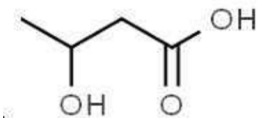
[0032] 상기 "*tesB* 유전자"는 슈도모나스 푸티다 균주에서 4HV-CoA(4-hydroxyvaleryl-CoA)를 4HV로 전환시키는 짧은 사슬 또는 넓은 사슬-길이에 특이적인 티오에스터라제(thioesterase)인 tesB 단백질을 암호화하는 유전자이다. 본 발명의 일 구체예에서 상기 *tesB* 유전자는 서열번호 31의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오타이드일 수 있다. 상기 *tesB* 유전자는 서열번호 31의 염기서열과 약 70%, 80%, 90% 또는 95% 이상의 상동성을 가질 수 있다. 한편, 상기 서열번호 31의 폴리뉴클레오타이드가 코딩하는 tesB 단백질은 서열번호 32의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩타이드일 수 있다. 상기 tesB 단백질은 서열번호 32의 아미노산 서열과 약 70%, 80%, 90% 또는 95% 이상의 상동성을 가질 수 있다.

[0033] 본 발명에서 "유전자의 도입" 및 "유전자의 발현 억제"는 당업계에서 사용되고 있는 방법이라면 제한없이 사용될 수 있다. 본 발명의 일 구체예에서는 Gibson 방법(Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R.-Y., Venter, J. C., Hutchison III, C. A., & Smith, H. O. (2009))에 따라 상기 "유전자의 도입" 및 "유전자의 발현 억제"를 수행하였다. 본 발명의 일 구체예에서, 상기 형질전환 미생물은 폴리하이드록시알카노에이트(PHA)를 생산할 수 있다.

[0034] 상기 "폴리하이드록시알카노에이트"는 여러 가지 탄소 곁사슬이 있는 하이드록시산 폴리에스테르를 총칭하는 것으로, 3-하이드록시부티르산(3HB), 3-하이드록시발레르산(3HV) 및 4-하이드록시발레르산(4HV)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 단량체가 중합되어 형성될 수 있으며, 광범위한 세균의 탄소와 에너지의 저장물질이며, 세포 내 봉입체로 존재한다. 상기 폴리하이드록시알카노에이트의 생산 경로를 도식화하여 도 1에 나타내었다.

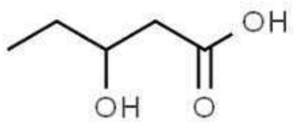
[0035] 본 발명에서 상기 "3-하이드록시부티르산"은 $CH_3CH_2(OH)CHCOOH$의 화학식을 가지며, 하기 화학식 1과 같은 구조를 가질 수 있다.

[0036] [화학식 1]

[0037] 

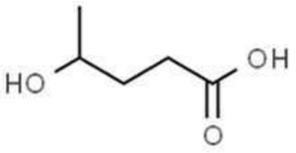
[0038] 본 발명에서 상기 3-하이드록시발레르산"은 $CH_3(CH_2)_2(OH)CHCOOH$의 화학식을 가지며, 하기 화학식 2와 같은 구조를 가질 수 있다.

[0039] [화학식 2]

[0040] 

[0041] 본 발명에서 상기 "4-하이드록시발레르산"은 $CH_3CH(OH)(CH_2)_2COOH$의 화학식을 가지며, 하기 화학식 3과 같은 구조를 가질 수 있다.

[0042] [화학식 3]

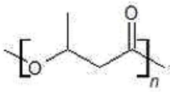


[0043]

[0044] 본 발명에서 상기 폴리하이드록시알카노에이트는 폴리(3-하이드록시부티르산), 폴리(3-하이드록시발레르산), 폴리(4-하이드록시발레르산), 폴리(3-하이드록시부티르산-co-3-하이드록시발레르산), 폴리(3-하이드록시부티르산-co-4-하이드록시발레르산), 폴리(3-하이드록시발레르산-co-4-하이드록시발레르산) 및 폴리(3-하이드록시부티르산-co-4-하이드록시발레르산-co-4-하이드록시발레르산)으로 구성된 군에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있다.

[0045] 상기 폴리(3-하이드록시부티르산)은 하기 화학식 4와 같은 구조를 가질 수 있다.

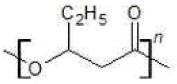
[0046] [화학식 4]



[0047]

[0048] 상기 폴리(3-하이드록시발레르산)은 하기 화학식 5와 같은 구조를 가질 수 있다.

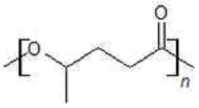
[0049] [화학식 5]



[0050]

[0051] 상기 폴리(4-하이드록시발레르산)은 하기 화학식 6과 같은 구조를 가질 수 있다.

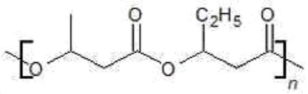
[0052] [화학식 6]



[0053]

[0054] 상기 폴리(3-하이드록시부티르산-co-3-하이드록시발레르산)은 하기 화학식 7과 같은 구조를 가질 수 있다.

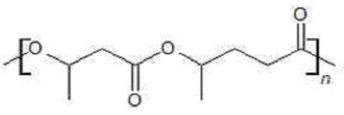
[0055] [화학식 7]



[0056]

[0057] 상기 폴리(3-하이드록시부티르산-co-4-하이드록시발레르산)은 하기 화학식 8과 같은 구조를 가질 수 있다.

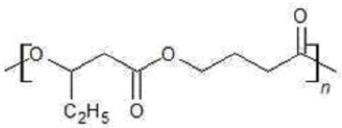
[0058] [화학식 8]



[0059]

[0060] 상기 폴리(3-하이드록시발레르산-co-4-하이드록시발레르산)은 하기 화학식 9와 같은 구조를 가질 수 있다.

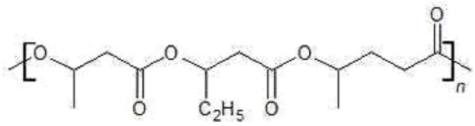
[0061] [화학식 9]



[0062]

[0063] 상기 폴리(3-하이드록시부티르산-co-4-하이드록시발레르산-co-4-하이드록시발레르산)은 하기 화학식 10과 같은 구조를 가질 수 있다.

[0064] [화학식 10]

[0065] 

[0066] 본 발명의 다른 측면은 제1항의 형질전환 미생물을 배양하는 단계; 및 상기 형질전환 미생물로부터 생산되는 폴리하이드록시알카노에이트를 수득하는 단계를 포함하는, 폴리하이드록시알카노에이트의 제조방법을 제공한다.

[0067] 본 발명의 미생물의 배양에 사용되는 배지 및 기타 배양 조건은 통상의 미생물, 특히, 슈도모나스 속 미생물의 배양에 사용되는 배지라면 특별한 제한 없이 어느 것이나 사용할 수 있으나, 구체적으로는 본 발명의 미생물을 적당한 탄소원, 질소원, 인원, 무기화합물, 아미노산 및/또는 비타민 등을 함유한 통상의 배지 내에서 호기성 조건 하에서 온도, pH 등을 조절하면서 배양할 수 있다.

[0068] 탄소원의 예로는 수크로오스 또는 글루코오스가 포함될 수 있고, 수크로오스를 다량으로 포함한 당밀 또한 탄소원으로 이용될 수 있으며, 그 외의 적정량의 탄소원이 다양하게 이용될 수 있다.

[0069] 질소원의 예로는 펩톤, 효모 추출물, 육즙, 맥아 추출물, 옥수수 침지액, 및 대두밀과 같은 유기 질소원 및 요소, 황산암모늄, 염화암모늄, 인산암모늄, 탄산안모늄, 및 질산암모늄과 같은 무기질소원이 포함될 수 있다. 이들 질소원은 단독 또는 조합되어 사용될 수 있다. 상기 배지에는 인원으로서 인산이수소칼륨, 인산수소이칼륨 및 대응되는 소듐-함유 염이 포함될 수 있다. 또한, 황산마그네슘 또는 황산 철과 같은 금속염을 포함할 수 있다. 그 외에 아미노산, 비타민 및 적절한 전구체 등이 포함될 수 있다.

[0070] 배양 중에 수산화암모늄, 수산화칼륨, 암모니아, 인산 및 황산과 같은 화합물을 배양물에 적절한 방식으로 첨가하여, 배양물의 pH를 조정할 수 있다. 또한 배양물의 호기 상태를 유지하기 위하여, 배양물 내로 산소 또는 산소 함유 기체를 주입하거나 혐기 및 미호기 상태를 유지하기 위해 기체의 주입 없이 혹은 질소, 수소 또는 이산화탄소 가스를 주입할 수 있다.

[0071] 배양물의 온도는 보통 20℃ 내지 40℃, 구체적으로는, 25℃ 내지 35℃ 더욱 구체적으로는, 30℃일 수 있으나, 목적하는 목적에 따라 제한 없이 변경될 수 있다. 배양 기간은 원하는 유용 물질의 생성량에 도달할 때까지 계속 할 수 있으며, 구체적으로는 10시간 내지 100시간일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0072] 본 발명의 폴리하이드록시알카노에이트를 생산하는 방법은, 상기 배양에 따른 배지 또는 상기 미생물로부터 생산되는 폴리하이드록시알카노에이트를 수득하는 단계를 포함할 수 있다. 미생물 또는 배지로부터 폴리하이드록시알카노에이트를 회수하는 방법은 당업계에 알려진 방법, 예컨대 원심분리, 여과, 음이온 교환 크로마토그래피, 결정화 및 HPLC 등이 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0073] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 형질전환 미생물을 포함하는 배양 배지 조성물을 제공한다.

[0074] 상기 형질전환 미생물을 포함하는 배양 배지 조성물은 폴리하이드록시알카노에이트를 높은 수율로 생산하는데 사용될 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서, 상기 형질전환 미생물의 배양물, 배양상등액, 파쇄물, 이들의 분획물 등이 될 수 있고, 다른 예로서, 형질전환 미생물의 배양물을 원심분리하여 수득한 배양상등액, 형질전환 미생물을 물리적으로 또는 초음파처리하여 수득한 파쇄물, 상기 배양물, 배양상등액, 파쇄물 등을 원심분리, 크로마토그래피 등의 방법에 적용하여 수득한 분획물 등이 될 수 있다.

[0075] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

[0076] **실험예 1. 특정 유전자의 발현이 억제된 형질전환 미생물 제작**

[0077] 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida, P. putita*) EM42 균주에서 특정 유전자를 결실시키기 위해 결실시키고자 하는 유전자의 상동 영역(homologous region)을 하기 표 1의 프라이머를 이용하여 PCR로 증폭하였다. 이 PCR 결과물을 제한효소 XhoI과 XbaI로 처리한 pQSAK 플라스미드와 함께 Gibsson 방법으로 연결하여 pQSAK suicide 플라스미드를 제작하였다. 이때, Gibsson 방법은 Phusion DNA polymerase(NEB biolabs), Taq DNA ligase(NEB biolabs) 및 T5 Exonuclease(NEB biolabs)을 이용하여 Master mix를 만들어 사용하였다.

표 1

[0078]

프라이머 명	서열정보	비고
*lvaA*_upstream_fwd (서열번호 33)	5'-gaggccctttcgtcttcacctcgagatggttgtagctgagcacg-3'	lvaAB deletion
*lvaA*_upstream_rev(서열번호 34)	5'-actgctgcatggttctgtaggccctgcc-3'	lvaAB deletion
*lvaB*_downstream_fwd(서열번호 35)	5'-cctgcaatgaaaccgcatcgaccacccc-3'	lvaAB deletion
*lvaB*_downstream_rev(서열번호 36)	5'-cgcaaaagaaaatgccgattctagacatggcgaagcacgaacg-3'	lvaAB deletion
*phaC1*_up_fwd(서열번호 37)	5'-gaggccctttcgtcttcacctcgaggaacaactgtgggcag-3'	phaC1ZC2 deletion
*phaC1*_up_rev(서열번호 38)	5'-cagcacgtagcccagggtgttttccgag-3'	phaC1ZC2 deletion
*phaC2*_down_fwd(서열번호 39)	5'-acaccctgggctacgtgctgacccgatg-3'	phaC1ZC2 deletion
*phaC2*_down_rev(서열번호 40)	5'-cgcaaaagaaaatgccgattctagagcgtgcgtttgattgcattg-3'	phaC1ZC2 deletion
*fadB*_up_fwd(서열번호 41)	5'-gaggccctttcgtcttcacctcgagtgtagtcgccttggctc-3'	fadB deletion
*fadB*_up_rev(서열번호 42)	5'-catttcacgctgttgacggactcacccttg-3'	fadB deletion
fadB_down_fwd(서열번호 43)	5'-tccgtcaacagcgtgaaatggccaagaac-3'	fadB deletion
*fadB*_down_rev(서열번호 44)	5'-cgcaaaagaaaatgccgattctagatctgcagtcaggcccatc-3'	fadB deletion

[0079] 상기 EM42 균주 및 특정 유전자의 pQSAK suicide 플라스미드 정보는 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

[0080]

	명칭	특성	입수처
균주	*Pseudomonas putida*(*P. putida*) EM42	KT2440 derivative;△prophage1 △prophage4 △prophage3 △?prophage2 △Tn7 △endA-1△endA-2 △hsdRMS △flagellum △Tn4652	CSIC
pQSAK suicide 플라스미드	pQSAK-lvaAB	*P. putida*에서 *lvaA, lvaB* 유전자를 삭제하기 위한 suicide 플라스미드	실험예 1에서 제조
	pQSAK-tesB	*P. putida*에서 *tesB* 유전자를 삭제하기 위한 suicide 플라스미드	실험예 1에서 제조
	pQSAK-phaC1ZC2	*P. putida*에서 *phaC1, phaZ, phaC2* 유전자를 삭제하기 위한 suicide 플라스미드	실험예 1에서 제조
	pQSAK-fadB	*P. putida*에서 *fadB* 유전자를 삭제하기 위한 suicide 플라스미드	실험예 1에서 제조

[0081] 상기 pQSAK-lvaAB, pQSAK-fadB 및 pQSAK-phaC1ZC2 플라스미드를 EM42 균주에 전기 천공법을 이용하여 도입시킨 후, 카나마이신(kanamycin)이 첨가된 배지에서 1차 선별하였다. 그 후, PCR 분석을 통해 상기 EM42 균주 내 pQSAK-lvaAB, pQSAK-fadB 및 pQSAK-phaC1ZC2 플라스미드의 도입을 확인하였다. pQSAK-lvaAB, pQSAK-fadB 및 pQSAK-phaC1ZC2 플라스미드 도입이 확인된 EM42 균주의 콜로니(colony)를 10% 수크로스(sucrose)가 첨가된 배지에서 성장시켜 *lvaAB* 유전자, *fadB* 유전자 및 *phaC* 유전자가 결실된 EM42 균주(실시예 1)를 선별하였다.

[0082] 상기 pQSAK-*phaC1ZC2*, pQSAK-tesB 및 pQSAK-fadB 플라스미드를 EM42 균주에 전기 천공법을 이용하여 도입시킨 후, 카나마이신이 첨가된 배지에서 1차 선별하였다. 그 후, PCR 분석을 통해 상기 EM42 균주 내 pQSAK-phaC1ZC2, pQSAK-*tesB* 및 pQSAK-fadB 플라스미드 도입을 확인하였다. pQSAK-phaC1ZC2, pQSAK-*tesB* 및 pQSAK-fadB 플라스미드 도입이 확인된 EM42 균주의 콜로니를 10% 수크로스 배지에서 성장시켜 *phaC* 유전자, *tesB* 유전

자 및 *fadB* 유전자가 결실된 EM42 균주(실시예 2)를 선별하였다. 한편, 유전자를 결실하지 않은 EM42 균주(실시예 3)를 선별하였다.

[0083] 나아가, 상기 pQSAK-phaC1ZC2 플라스미드를 EM42 균주에 전기 천공법을 이용하여 도입시킨 후, 카나마이신이 첨가된 배지에서 1차 선별하였다. 그 후, PCR 분석을 통해 상기 EM42 균주 내 pQSAK-phaC1ZC2 플라스미드의 도입을 확인하였다. pQSAK-phaC1ZC2 플라스미드 도입이 확인된 EM42 균주의 콜로니를 10% 수크로스 배지에서 성장시켜 *phaC* 유전자가 결실된 EM42 균주(실시예 4)를 선별하였다.

[0084] 상기 pQSAK-lvaAB 및 pQSAK-phaC1ZC2 플라스미드를 EM42 균주에 전기 천공법을 이용하여 도입시킨 후, 카나마이신이 첨가된 배지에서 1차 선별하였다. 그 후, PCR 분석을 통해 상기 EM42 균주 내 pQSAK-lvaAB 및 pQSAK-phaC1ZC2 플라스미드의 도입을 확인하였다. pQSAK-lvaAB 및 pQSAK-phaC1ZC2 플라스미드 도입이 확인된 EM42 균주의 콜로니를 10% 수크로스 배지에서 성장시켜 *lvaAB* 유전자 및 *phaC* 유전자가 결실된 EM42 균주(실시예 5)를 선별하였다.

[0085] 상기 pQSAK-fadB 및 pQSAK-phaC1ZC2 플라스미드를 EM42 균주에 전기 천공법을 이용하여 도입시킨 후, 카나마이신이 첨가된 배지에서 1차 선별하였다. 그 후, PCR 분석을 통해 상기 EM42 균주 내 pQSAK-fadB 및 pQSAK-phaC1ZC2 플라스미드의 도입을 확인하였다. pQSAK-fadB 및 pQSAK-phaC1ZC2 플라스미드 도입이 확인된 EM42 균주의 콜로니를 10% 수크로스 배지에서 성장시켜 *fadB* 유전자 및 *phaC* 유전자가 결실된 EM42 균주(실시예 6)를 선별하였다.

[0086] 상기 선별된 EM42 균주에서 유전자의 결실은 PCR 밴드 확인 및 밴드의 시퀀싱(sequencing)을 통해 확인하였다.

[0087] **실험예 2. 이종 균주의 phaC 유전자가 도입된 형질전환 미생물의 제조**

[0088] 상기 실시예 1 내지 실시예 6의 EM42 균주에 이종 균주의 *phaC* 유전자를 도입하기 위해, 파라콕쿠스 데니트리피칸스(*Paracoccus denitrificans*), 크로모박테리움 비올라세움(*Chromobacterium violaceum*), 쿠프리아비더스 네카토르(*Cupriavidus necator*), 슈도모나스 올레오보란스(*Pseudomonas oleovorans*) 또는 티오캅사 프펜니기이(*Thiocapsa pfennigii*)의 *phaC* 유전자를 각각 pPROBE 플라스미드(Improved gfp and inaZ Broad-Host-Range Promoter-Probe Vectors - William G. Miller, Johan H. J. Leveau, and Steven E. Lindow의 저자로부터 증여받음)에 lvaR 레귤레이터(lvaR regulator) 및 lvaA 프로모터(lvaA promoter)와 함께 클로닝하여 레불린산(LA) inducible phaC expression system을 구축하였다.

[0089] 상기 이종 균주 및 각각의 이종 균주의 *phaC* 유전자가 삽입된 pPROBE 플라스미드의 정보는 하기 표 3 및 도 2a 내지 도 2e에 나타내었다.

표 3

[0090]

	명칭	특성	입수처
균주	*Cupriavidus necator* H16	야생형	KCTC 22469
	Chromobacterium violaceum	야생형	KCTC 2897
	Paracoccus denitrificans	야생형	KCTC No. 2530
	Pseudomonas oleovolans Gpo1	야생형	ATCC 29347
	Thiocapsa pfennigii	야생형	DSM226

pPROBE 플라스미드	pPROBE- lvaR-P_{lvaA}-phaC_P.d.	*Paracoccus denitrificans*의 phaC가 LA inducible system에 의해 발현되는 플라스미드	실험예 2에서 제조
	pPROBE-lvaR-P_{lvaA}-phaC_C.v.	*Chromobacterium violaceum*의 phaC가 LA inducible system에 의해 발현되는 플라스미드	실험예 2에서 제조
	pPROBE- lvaR-P_{lvaA}-phaC_T.p.	*Thiocapsa pfennigii*의 phaE 및 phaC가 LA inducible system에 의해 발현되는 플라스미드	실험예 2에서 제조
	pPROBE-lvaR-PlvaA-phaBCA_phaBCA.	*Cupriavidus necator* H16의 phaA, phaB, phaC가 LA inducible system에 의해 발현되는 플라스미드	실험예 2에서 제조
	pPROBE- lvaR-P_{lvaA}-phaC_P.o.	*Pseudomonas oleovorans*의 phaC1및 phaC2가 LA inducible system에 의해 발현되는 플라스미드	실험예 2에서 제조
	pPROBE- lvaR-P_{lvaA}-phaC_C.n.	*Cupriavidus necator* H16의 phaC가 LA inducible system에 의해 발현되는 플라스미드	실험예 2에서 제조

[0091] 구체적으로, 파라콕쿠스 데니트리피칸스(*Paracoccus denitrificans*), 크로모박테리움 비올라세움(*Chromobacterium violaceum*) 또는 쿠프리아비더스 네카토르(*Cupriavidus necator*)의 *phaC*는 pPROBE 플라스미드의 일부와 lvaA 프로모터를 끝에 포함하도록 하기 표 4의 프라이머를 이용하여 PCR로 증폭하였다.

표 4

[0092]

프라이머 명	서열정보	비고
phaC_P.d._fwd (서열번호 45)	5'-ctttataaggaggaaaaacatatggccgcgccccgcgcc-3'	pPROBE-lvaR-PlvaA-phaC_Pd
phaC_P.d._rev(서열번호 46)	5'-agtccaagctcagctaattaagcttttacgcccgctcgtggacgtaaaggccc-3'	pPROBE-lvaR-PlvaA-phaC_Pd
phaC_C.v._fwd (서열번호 47)	5'-ctttataaggaggaaaaacatatgcagcagttcgtcaactcg-3'	pPROBE-lvaR-PlvaA-phaC_Cv
phaC_C.v._rev(서열번호 48)	5'-agtccaagctcagctaattaagctttcattgcaggctggcggc-3'	pPROBE-lvaR-PlvaA-phaC_Cv
phaC_C.n_fwd(서열번호 49)	5'-ctttataaggaggaaaaacatatggcgaccggcaaaggc-3'	pPROBE-lvaR-PlvaA-phaC_Cn
phaC_C.n_rev(서열번호 50)	5'-agtccaagctcagctaattaagctcatgccttggctttgacgtatcg-3'	pPROBE-lvaR-PlvaA-phaC_Cn

[0093] pPROBE-lvaR-P_{lvaA} 플라스미드는 HindIII와 NdeI으로 절단하여 준비하였다. 준비된 *phaC* PCR 프래그먼트(fragment)는 Gibson 방법으로 pPROBE-lvaR-PlvaA 플라스미드와 연결하였다(각각 pPROBE-lvaR-P_{lvaA}-phaC_C.v.; pPROBE-lvaR-P_{lvaA}-phaC_C.n.; 및 pPROBE-lvaR-P_{lvaA}-phaC_P.d.). 이후 제작된 플라스미드는 DH10B 균주에 전기천공법을 이용하여 형질도입시킨 후, 항생제가 첨가된 배지에서 선별한 콜로니로부터 수득하였다.

[0094] 슈도모나스 올레오보란스(*Pseudomonas oleovorans*)는 *phaC1*과 *phaC2*를 각각 하기 표 5의 프라이머를 이용하여 PCR로 증폭하고, HindIII와 NdeI으로 절단된 pPROBE-lvaR-PlvaA 플라스미드에 Gibson 방법으로 연결하였다(pPROBE- lvaR-P_{lvaA}-phaC_P.o.).

표 5

[0095]

프라이머 명	서열정보	비고
phaC1_fwd (서열번호 63)	5'-aggtgagagtggaggaggtccatttatgcgagacaagtcgaac-3'	pPROBE-lvaR-PlvaA-phaC1C2 P.o
phaC1_rev(서열번호 64)	5'-agtccaagctcagctaattaagctttcagcggatatgcacgtag-3'	pPROBE-lvaR-PlvaA-phaC1C2 P.o
phaC2_fwd(서열번호 65)	5'-ctttataaggaggaaaaacatatgagtgacaagaacaacgaag-3'	pPROBE-lvaR-PlvaA-phaC1C2 P.o

phaC2_rev(서열번호 66)	5'-aaatggacctcctccactctcaccttcagcgttcgtgcacatag-3'	pPROBE-lvaR-PlvaA-phaC1C2 P.o

[0096] 티오캅사 프펜니기이(*Thiocapsa pfennigii*)는 *phaE*와 *phaC*를 각각 하기 표 6의 프라이머로 PCR로 증폭하고, HindIII와 NdeI으로 절단된 pPROBE-lvaR-PlvaA 플라스미드에 Gibson 방법으로 연결하였다(pPROBE-lvaR-PlvaA-phaC_T.p.).

표 6

[0097]

프라이머 명	서열정보	비고
phaE_T.p._fwd (서열번호 51)	5'-ctttataaggaggaaaaacatatgaacgatacggccaacaag-3'	pPROBE-lvaR-PlvaA-phaEC
phaE_T.p._rev (서열번호 52)	5'-atggggacatggcactctctcctggtgg-3'	pPROBE-lvaR-PlvaA-phaEC
phaC_T.p._fwd (서열번호 53)	5'-agagagtgccatgtccccattcccgatc-3'	pPROBE-lvaR-PlvaA-phaEC
phaC_T.p._rev (서열번호 54)	5'-caagctcagctaattaagctttcagccgcgttcgttcag-3'	pPROBE-lvaR-PlvaA-phaEC

[0098] 쿠프리아비더스 네카토르(*Cupriavidus necator*)의 *phaBCA*는 *phaA*, *phaB* 및 *phaC*를 각각 하기 표 7의 프라이머를 이용하여 PCR로 증폭한 후 HindIII와 NdeI으로 절단된 pPROBE-lvaR-PlvaA 플라스미드(도 4a)에 Gibson 방법으로 연결하였다(pPROBE-lvaR-PlvaA-phaBCA_C.n.).

표 7

[0099]

프라이머 명	서열정보	비고
phaA_C.n_fwd (서열번호 55)	5'-caaggcatgaattgaaaggactacacaatgac-3'	pPROBE-lvaR-PlvaA-phaBCA_Cn
phaA_C.n_rev(서열번호 56)	5'-agtccaagctcagctaattaagcttatttgcgctcgactgc-3'	pPROBE-lvaR-PlvaA-phaBCA_Cn
phaB_C.n_fwd(서열번호 57)	5'-ctttataaggaggaaaaacatatgactcagcgcattgcg-3'	pPROBE-lvaR-PlvaA-phaBCA_Cn
phaB_C.n_rev_RBS(서열번호 58)	5'-ttgtctctcttcagcccatatgcaggcc-3'	pPROBE-lvaR-PlvaA-phaBCA_Cn
phaC_C.n_fwd_RBS(서열번호 59)	5'-tatgggctgaagagagacaatcaaatcatgg-3'	pPROBE-lvaR-PlvaA-phaBCA_Cn
phaC_C.n_rev_RBS(서열번호 60)	5'-tcctttcaattcatgccttggctttgac-3'	pPROBE-lvaR-PlvaA-phaBCA_Cn

[0100] 상기 제작된 pPROBE-lvaR-P_{lvaA}-phaC_C.v.; pPROBE-lvaR-P_{lvaA}-phaC_C.n.; 및 pPROBE-lvaR-P_{lvaA}-phaC_P.d.; pPROBE- lvaR-P_{lvaA}-phaC_P.o.; pPROBE-lvaR-PlvaA-phaC_T.p.; 및 pPROBE-lvaR-PlvaA-phaBCA_C.n. 플라스미드는 각각 DH10B 균주에 전기천공법을 이용하여 형질도입시킨 후, 항생제가 첨가된 배지에서 선별한 콜로니로부터 수득하였다.

[0101] 상기 수득한 pPROBE-lvaR-P_{lvaA}-phaC_C.v.; pPROBE-lvaR-P_{lvaA}-phaC_C.n.; 및 pPROBE-lvaR-P_{lvaA}-phaC_P.d.; pPROBE-lvaR-P_{lvaA}-phaC_P.o.; pPROBE-lvaR-PlvaA-phaC_T.p.; 및 pPROBE-lvaR-PlvaA-phaBCA_C.n. 플라스미드가 상기 실시예 1 내지 실시예 6에 각각 도입된 균주를 하기 표 8에 나타내었다.

표 8

[0102]

pPROBE 플라스미드	실시예 1	실시예 2	실시예 3	실시예 4	실시예 5	실시예 6
pPROBE-lvaR-P_{lvaA}phaC_P.d.	실시예 1-1	실시예 2-1	실시예 3-1	실시예 4-1	실시예 5-1	실시예 6-1
pPROBE-lvaR-P_{lvaA}-phaC_C.v	실시예 1-2	실시예 2-2	실시예 3-2	실시예 4-2	실시예 5-2	실시예 6-2

pPROBE-lvaR-P_{lvaA}phaC_T.p.	실시예 1-3	실시예 2-3	실시예 3-3	실시예 4-3	실시예 5-3	실시예 6-3
pPROBE-lvaR-PlvaA-phaBCA_phaBCA.	실시예 1-4	실시예 2-4	실시예 3-4	실시예 4-4	실시예 5-4	실시예 6-4
pPROBE-lvaR-P_{lvaA}-phaC_P.o.	실시예 1-5	실시예 2-5	실시예 3-5	실시예 4-5	실시예 5-5	실시예 6-5
pPROBE-lvaR-P_{lvaA}-phaC_C.n.	실시예 1-6	실시예 2-6	실시예 3-6	실시예 4-6	실시예 5-6	실시예 6-6

[0103] 한편, 대조군의 경우, 플라스미드를 사용하지 않았다.

[0104] **실험예 3. 형질전환 미생물의 표현형 확인**

[0105] **실험예 3-1. phaC 유전자 결실 및 레불린산 처리 유무에 따른 PHA 생산량 비교**

[0106] 상기 실시예 3-4 및 실시예 4-4의 균주에 대하여 레불린산(LA)의 유무에 따른 PHA의 생산량을 비교하였다(도 3).

[0107] 구체적으로, 균주는 미량원소(trace element, per liter 2.4 g $FeCl_3.6H_2O$, 0.3 g $CoCl_2.6H_2O$, 0.15 g $CuCl_2.2H_2O$, 0.3 g $ZnCl_2$, 0.3 g $Na_2MO_4.2H_2O$, 0.075 g H_3BO_3 및 0.495 g $MnCl_2.4H_2O$) 및 탄소원(Bioshop에서 구입한 D-glucose)을 첨가한 LB(Merck사에서 구입) 배지에서 O.D.값이 0.5 내지 1이 되도록 30℃ 200 RPM 조건에서 배양하였다. 이후, 레불린산을 각각의 균주에 처리하였으며, 24시간마다 추가로 레불린산을 투여하여 48시간 내지 72시간 동안 배양하였다.

[0108] 상기 배양액 1 ㎖을 원심분리하여 펠렛을 모으고, 차가운 증류수로 세척한 후, 1 ㎖의 증류수와 80 ㎍/L 농도의 나일레드(Nile red, sigma)를 DMSO로 희석한 용액과 함께 혼합하여 1시간 동안 반응시켰다. 이후 한 번 더 증류수로 세척한 후, PBS(바이오세상에서 구입)로 희석하여 BD FACSCalibur Flow Cytomerer(BD Biosciences)를 이용하여 나일레드의 형광 세기를 분석하여 각각의 균주에서 생산된 PHA 생산량을 측정하였다.

[0109] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 실시예 3-4 및 실시예 4-4의 균주 모두 레불린산을 처리하지 않은 경우, PHA가 생산되지 않는 것을 확인하였다. 반면, 실시예 3-4 및 실시예 4-4의 균주에 레불린산을 처리하는 경우, 실시예 4-4의 균주에서 실시예 3-4 균주보다 PHA를 많이 생산하는 것을 확인하였다. 이때, 가로축은 균주에서 생산된 PHA 그래뉼에 염색된 나일 레드의 형광 세기를 의미하고, 세로축은 균주 수를 의미하며, 도 3의 각 선은 배양 시간에 따른 결과를 의미한다.

[0110] **실험예 3-2. phaC 유전자 결실에 따른 PHA 조성 변화 확인**

[0111] 또한, *phaC* 유전자 결실에 따라 native PHA생산을 억제할 수 있는지 확인하기 위해, 상기 실시예 3-4 및 실시예 4-4 균주에서 생산되는 PHA의 조성을 분석하였다.

[0112] 구체적으로, 상기 실시예 3-4 및 실시예 4-4의 균주를 LB-아가-플레이트에 접종하고 30℃ 온도에서 하룻밤 동안 배양하였다. 각각 3개의 콜로니를 플레이트에서 선택하여 5 ㎖의 LB 배지(per liter: 5 g 효모 추출물, 10 g 펩톤, 및 10 g NaCl)에 접종하고 진탕 조건에서 15시간 동안 배양하였다.

[0113] 그 후, i) 7.5 g/L 포도당, ii) 7.5 g/L 레불린산, iii) 미량원소(trace element, per liter: 2.4 g $FeCl_3.6H_2O$, 0.3 g $CoCl_2.6H_2O$, 0.15 g $CuCl_2.2H_2O$, 0.3 g $ZnCl_2$, 0.3 g $Na_2MO_4.2H_2O$, 0.075 g H_3BO_3 및 0.495 g $MnCl_2.4H_2O$) 및 iv) 4X인산염 완충액(per liter: $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 7.50 g 및 K_2HPO_4 15.52 g)을 포함하는 20 ㎖ 또는 40 ㎖의 개량된 M9 배지(modified M9 medium)가 포함된 250 ㎖ 플라스크에 1 ㎖의 배양물을 접종하였다.

[0114] 24시간 동안 30℃, 200 rpm 조건으로 진탕 배양기에서 배양하였다. 그 후, 다시 같은 농도의 포도당과 레불린산을 배양물을 보충한 후 30℃, 200 rpm 조건으로 진탕 배양기에서 배양하였다. PHA 분석을 위해 2 ㎖ 또는 10 ㎖의 배양물을 수집하고, 4℃ 온도에서 20분 동안 2,600×g에서 원심분리하였다. 수집된 펠렛을 차가운 증류수로 2회 세척하였으며, 추가 분석을 위해 -80℃에서 보관하였다. 모든 실험은 세 번씩 수행되었다.

[0115] 상기 동결된 펠렛을 2.5 L 벤치-탑 동결 건조기를 이용하여 동결 건조하여 바이오 매스 함량(CDM: 세포 건조 질량)을 측정하였다. PHA 함량 및 조성은 메탄올 분해에 이어 GC-MS 분석을 통해 확인하였다.

[0116] 상기 동결건조한 펠렛을 각각 2 ㎖의 클로로포름(Acros Organic에서 구입, 99.8%), 2 ㎖의 메탄올-황산 혼합액(15% v/v의 95% 황산) 용액과 혼합하고, 100℃ 온도에서 4시간 동안 메탄올리시스(Methanolysis)하였다. 반응 후 실온에서 용액을 식히고, 1 ㎖의 증류수를 첨가한 후, 볼텍싱(vortexing)하여 용액을 혼합하였다. 이후 실온에서 하룻밤 동안 상 분리를 시켰으며, 하부 유기 용매층에서 100 ㎕의 시료를 채취하여, 900 ㎕의 클로로포름에 희석하여 1 ㎖의 GC-MS 분석용 시료를 준비하였다.

[0117] 상기 준비한 시료를 5977B Mass Selective Detector가 장착된 7890B GC 장비를 이용하여 하기 표 9의 조건으로 분석하였다.

표 9

[0118]

1	column	CycloSil-B column (30 m × 0.320 mm x 0.25 ㎛)
2	sample volume	2 ㎕
3	flow rate	1.5 ㎖/min
4	temperature	initially set at 60 ℃ thereafter increased at a rate of 10 ℃/min for 7 minutes and 30 ℃/min until a maximum temperature of 250 ℃was attained, and subsequently held for 3 min

[0119] PHA 함량(wt %)은 질량 기준으로 CDM의 백분율로 계산하였으며, PHA 단량체 조성(mol %)은 총 단량체 수의 몰 백분율로 표시하였다.

[0120] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 실시예 3-4 균주(a)의 경우 1, 2 및 3번 피크의 native PHA가 검출되는 반면, 실시예 4-4 균주(b)의 경우 1, 2 및 3번 피크의 native PHA가 검출되지 않는 것을 확인하였다.

[0121] **실험예 3-3. phaC 유전자의 유래 및 배지 조성에 따른 PHA 조성 변화 확인**

[0122] 또한, 실시예 3-1 내지 실시예 3-4의 균주에 대하여 배지 조성을 달리하였을 때, 상기 균주들로부터 생산되는 3-하이드록시부티르산(3HB), 3-하이드록시발레르산(3HV) 및 4-하이드록시발레르산(4HV)의 비율과 생산량을 평가하였다(도 5a 및 5b).

[0123] 상기 실시예 3-1 내지 실시예 3-4의 균주를 LB-아가-플레이트에 접종하고 30℃ 온도에서 하룻밤 동안 배양하였다. 각각 3개의 콜로니를 플레이트에서 선택하여 5 ㎖의 LB 배지(per liter: 5 g 효모 추출물, 10 g 펩톤, 및 10 g NaCl)에 접종하고 진탕 조건에서 15시간 동안 배양하였다.

[0124] 그 후, i) 7.5 g/L 포도당, ii) 7.5 g/L 레불린산, iii) 미량원소(trace element, per liter: 2.4 g $FeCl_3.6H_2O$, 0.3 g $CoCl_2.6H_2O$, 0.15 g $CuCl_2.2H_2O$, 0.3 g $ZnCl_2$, 0.3 g $Na_2MO_4.2H_2O$, 0.075 g H_3BO_3 및 0.495 g $MnCl_2.4H_2O$) 및 iv) 4X인산염 완충액(per liter: $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 7.50 g 및 K_2HPO_4 15.52 g)을 포함하는 20 ㎖ 또는 40 ㎖의 개량된 M9 배지(modified M9 medium), TB 배지(Alfa Aesa) 또는 LA(Sigma-Aldrich에서 구입) 배지가 포함된 250 ㎖ 플라스크에 1 ㎖의 배양물을 접종하였다.

[0125] 24시간 동안 30℃, 200 rpm 조건으로 진탕 배양기에서 배양하였다. 그 후, 다시 같은 농도의 포도당과 레불린산을 배양물을 보충한 후 30℃, 200 rpm 조건으로 진탕 배양기에서 배양하였다. PHA 분석을 위해 2 ㎖ 또는 10 ㎖의 배양물을 수집하고, 4℃ 온도에서 20분 동안 2,600×g에서 원심분리하였다. 수집된 펠렛을 차가운 증류수로 2회 세척하였으며, 추가 분석을 위해 -80℃에서 보관하였다. 모든 실험은 세 번씩 수행되었다.

[0126] 상기 동결된 펠렛을 2.5 L 벤치-탑 동결 건조기를 이용하여 동결 건조하여 바이오 매스 함량(CDM: 세포 건조 질량)을 측정하였다. PHA 함량 및 조성은 메탄올 분해에 이어 GC-MS 분석을 통해 확인하였다.

[0127] 상기 동결건조한 펠렛을 각각 2 ㎖의 클로로포름(Acros Organic에서 구입, 99.8%), 2 ㎖의 메탄올-황산 혼합액(15% v/v의 95% 황산) 용액과 혼합하고, 100℃ 온도에서 4시간 동안 메탄올리시스(Methanolysis)하였다. 반응 후 실온에서 용액을 식히고, 1 ㎖의 증류수를 첨가한 후, 볼텍싱(vortexing)하여 용액을 혼합하였다. 이후 실온에서 하룻밤 동안 상 분리를 시켰으며, 하부 유기 용매층에서 100 ㎕의 시료를 채취하여, 900 ㎕의 클로로포름에 희석하여 1 ㎖의 GC-MS 분석용 시료를 준비하였다.

[0128] 상기 준비한 시료를 5977B Mass Selective Detector가 장착된 7890B GC 장비를 이용하여 상기 표 9의 조건으로 분석하였으며, PHA 함량(wt %)은 질량 기준으로 CDM의 백분율로 계산하였으며, PHA 단량체 조성(mol %)은 총 단

량체 수의 몰 백분율로 표시하였다.

표 10

[0129]

구분	배지	3HB	3HV	4HV	PHA% of CDW
실시예 3-1	TB	7.7	60.0	1.3	1.4
실시예 3-2		69.8	1342.9	1669.1	38.7
실시예 3-3		9.6	269.9	225.8	8.0
실시예 3-4		87.1	98.9	4.1	4.0
대조군		0.0	0.0	0.0	0.0
실시예 3-1	M9 & Glu	26.4	1702.8	1009.7	58.3
실시예 3-2		31.7	1205.3	0.0	35.4
실시예 3-3		0.6	554.4	167.5	37.1
실시예 3-4		808.6	1045.6	5.5	49.0
대조군		0.0	0.0	0.0	0.0
실시예 3-3	M9	0.0	51.9	0.0	3.5
대조군		0.0	0.0	0.0	0.0

[0130] 표 10 및 도 5a 및 도 5b에 나타난 바와 같이, *phaC* 유전자의 유래 및 배지의 조성에 따라 생성된 PHA의 조성(도 5a) 및 생산량(도 5b)이 상이함을 확인하였다.

[0131] **실험예 3-4. lavAB, fadB, phaC 유전자 추가 결실 및 phaAB 유전자 추가 도입에 따른 PHA 조성 변화 확인**

[0132] *lavAB, fadB, phaC* 유전자 추가 결실에 따른 PHA 조성 변화를 확인하기 위해, 상기 실시예 4, 실시예 4-3, 실시예 5, 실시예 5-3, 실시예 6 및 실시예 6-3 균주들로부터 생산되는 3-하이드록시부티르산(3HB), 3-하이드록시발레르산(3HV) 및 4-하이드록시발레르산(4HV)의 비율과 생산량을 실시예 3-3과 동일한 방법으로 평가하였다(도 6a 내지 6c). 또한, 상기 실시예 4-3, 실시예 5-3 및 실시예 6-3 균주에 각각 pRK415-lvaR-PlvaA-phaAB 플라스미드를 도입시킨 실시예 4-4, 실시예 5-4 및 실시예 6-4 균주를 제조하여 균주들로부터 생산되는 3-하이드록시부티르산(3HB), 3-하이드록시발레르산(3HV) 및 4-하이드록시발레르산(4HV)의 비율과 생산량도 함께 평가하였다. 상기 pRK415-lvaR-PlvaA-phaAB는 pRK415 플라스미드(Nova lifetech inc.) 및 하기 표 11의 프라이머를 이용하여 쿠프리아비더스 네카토르(*Cupriavidus necator*)의 phaA 및 phaB를 증폭한 후, 실험예 2와 동일한 방법으로 제조하였다(pRK415-lvaR-PlvaA-phaAB).

표 11

[0133]

프라이머 명	서열정보	비고
phaB_rev_phaBA (서열번호 61)	5'-tcctttcaattcagcccatatgcaggcc-3'	pRK415-lvaR-PlvaA-phaBA
phaA_fwd_phaBA(서열번호 62)	5'-tatgggctgaattgaaaggactacacaatgac-3'	pRK415-lvaR-PlvaA-phaBA

[0134] 이때, 배지는 7.5 g/L 포도당, ii) 7.5 g/L 레불린산, iii) 미량원소(trace element, per liter: 2.4 g $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 0.3 g $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.15 g $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.3 g $ZnCl_2$, 0.3 g $Na_2MO_4 \cdot 2H_2O$, 0.075 g H_3BO_3 및 0.495 g $MnCl_2 \cdot 4H_2O$) 및 iv) 4X인산염 완충액(per liter: $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 7.50 g 및 K_2HPO_4 15.52 g)을 포함하는 20 ㎖ 또는 40 ㎖의 개량된 M9 배지(modified M9 medium)를 사용하였다.

표 12

[0135]

구분	배지	3HB	3HV	4HV	CDM	PHA content(dry wt%)

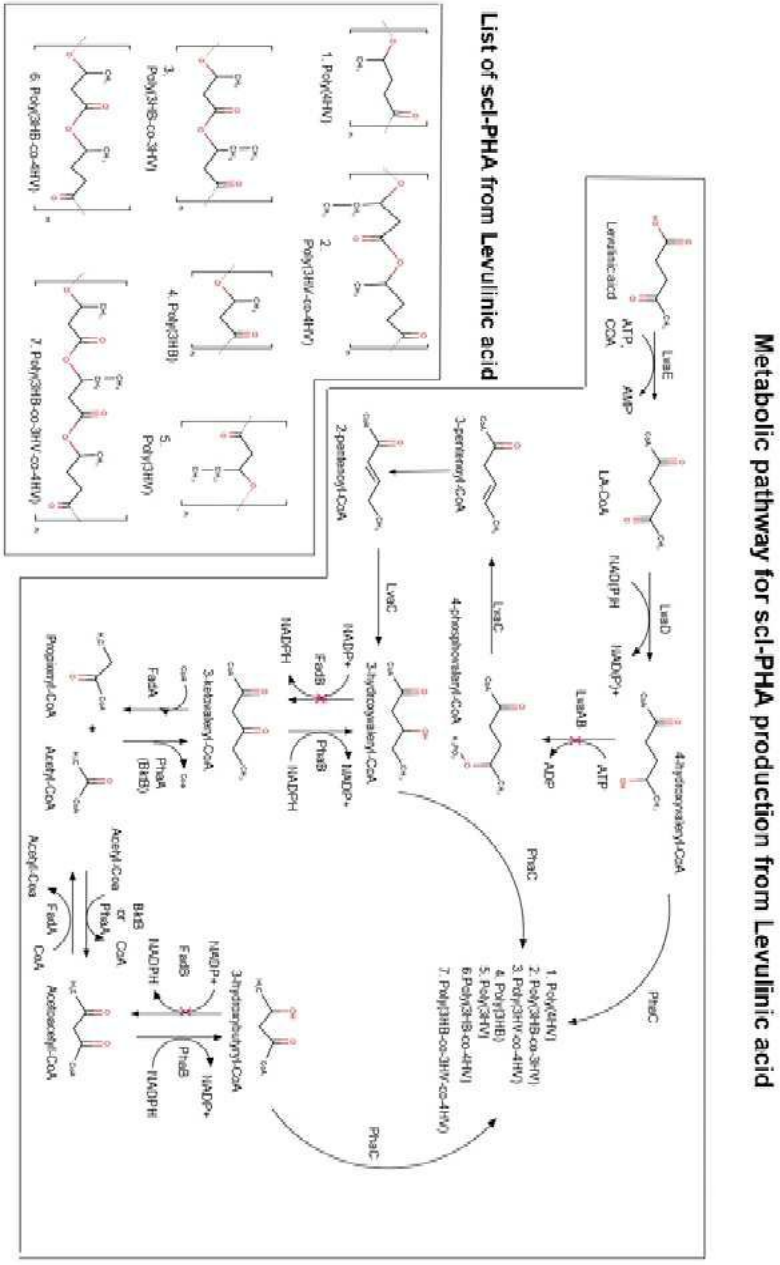
실시예 4 (No plasmid)	M9 & Glu	0	0	0	2.376666667	0.023174824
실시예 4-3 (pPHA_Tp)		0.680519125	59.91356	39.45262	9.43	37.24471
실시예 4-4 (pPHA_Tp pPHA_AB)		8.853452	67.26591	23.88064	7.665	38.33716
실시예 5 (No plasmid)		0	0	0	1.533333	0.062615
실시예 5-3(pPHA_Tp)		0	2.059927	97.94007	1.16	2.244671
실시예 5-4 (pPHA_Tp pPHA_AB)		0	0	0	1.126667	0.251628
실시예 6 (No plasmid)		0	0	0	2.33	0.117577
실시예 6-3 (pPHA_Tp)		2.41463	74.32329	23.26208	7.213333	34.04846
실시예 6-4 (pPHA_Tp pPHA_AB)		1.643472	77.35955	20.99697	2.75	25.52309

[0136] 그 결과, 상기 표 12 및 도 6a 내지 도 6c에 나타난 바와 같이, *lavAB, fadB, phaC* 유전자 추가 결실 및 *phaAB* 유전자 추가 도입에 따라 생성된 PHA의 조성 및 생산량이 상이함을 확인하였다.

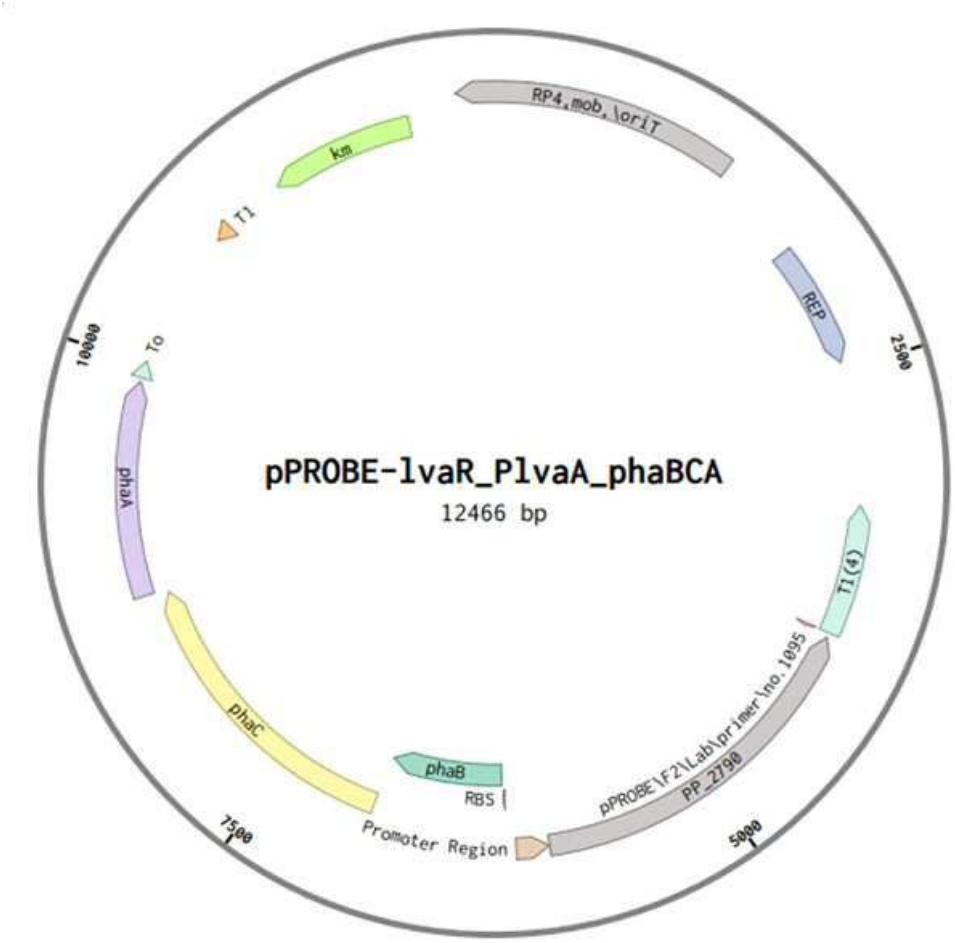
[0137] 상기 실시예들을 통해, 기존의 단량체 공급이나 영양 불균형에 의존한 생산 방법 외에 새로운 폴리머 생산 방법을 제시하며, 다양한 이종 유래 phaC를 비교하며 각각의 기질 선호도를 보여줘 하나의 균주에서 다양한 조성의 폴리머 생산이 가능함을 증명한다. 더불어, 슈도모나스 푸티다의 대사 과정과 LA 유도성 프로모터를 활용하여 레불린산을 기질, 유도자(inducer)와 탄소원으로 활용하여 PHA 폴리머를 생산할 수 있는 방법을 보여준다. 따라서, 본 발명에 따른 미생물을 활용하여 영양불균형이나 별도의 유도자(inducer)와 같은 제한 사항 없이 슈도모나스 푸티다 단일 균주에서 레불린산을 활용하여 다양한 단량체 조성의 PHA를 생산할 수 있으며, PHA 생산에 관여하는 슈도모나스 푸티다의 유전자와 이종 유래 PhaC 유전자의 조합을 통해 폴리머의 생산성을 증대시킬 수 있음을 의미한다.

도면

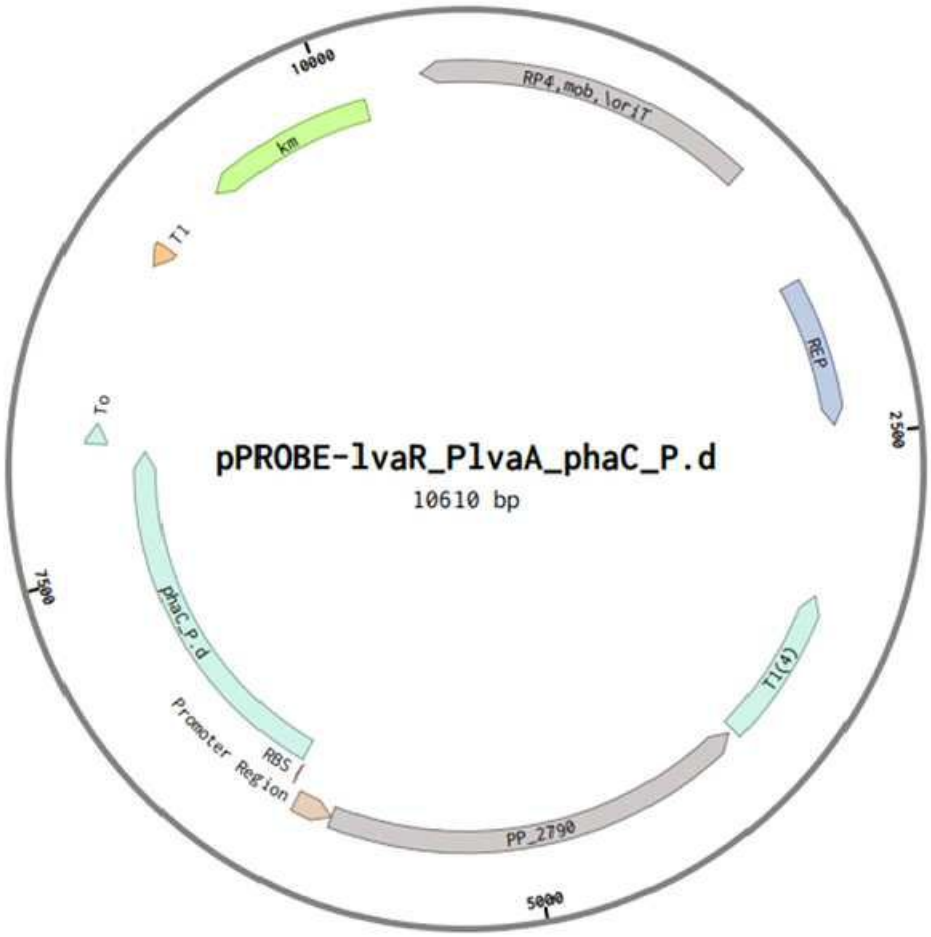
도면1


Metabolic pathway for scl-PHA production from Levulinic acid
Levulinicacid
ATP
CoA
LvaE
AMP
LA-CoA
NADPH
NADP+
LvaD
4-hydroxyvaleryl-CoA
LvaB
ADP
ATP
PhaC
1 Poly(4HV)
2 Poly(3HB-co-3HV)
3 Poly(3HV-co-4HV)
4 Poly(3HB)
5 Poly(3HV)
6 Poly(3HB-co-4HV)
7 Poly(3HB-co-3HV-co-4HV)
LvaC
3-pentenoyl-CoA
2-pentenoyl-CoA
4-chrotonoyl-CoA
3-hydroxyvaleryl-CoA
FadB
PhaB
3-ketovaleryl-CoA
FadA
PhaA
(BHB)
Propionyl-CoA
Acetyl-CoA
3-hydroxyheptanoyl-CoA
FadB
PhaB
Acetyl-Coa
or
PhaA
CoA
BHB
Acetoacetyl-CoA
List of scl-PHA from Levulinic acid
1. Poly(4HV)
2. Poly(3HV-co-4HV)
3. Poly(3HB-co-3HV)
4. Poly(3HB)
5. Poly(3HV)
6. Poly(3HB-co-4HV)
7. Poly(3HB-co-3HV-co-4HV)

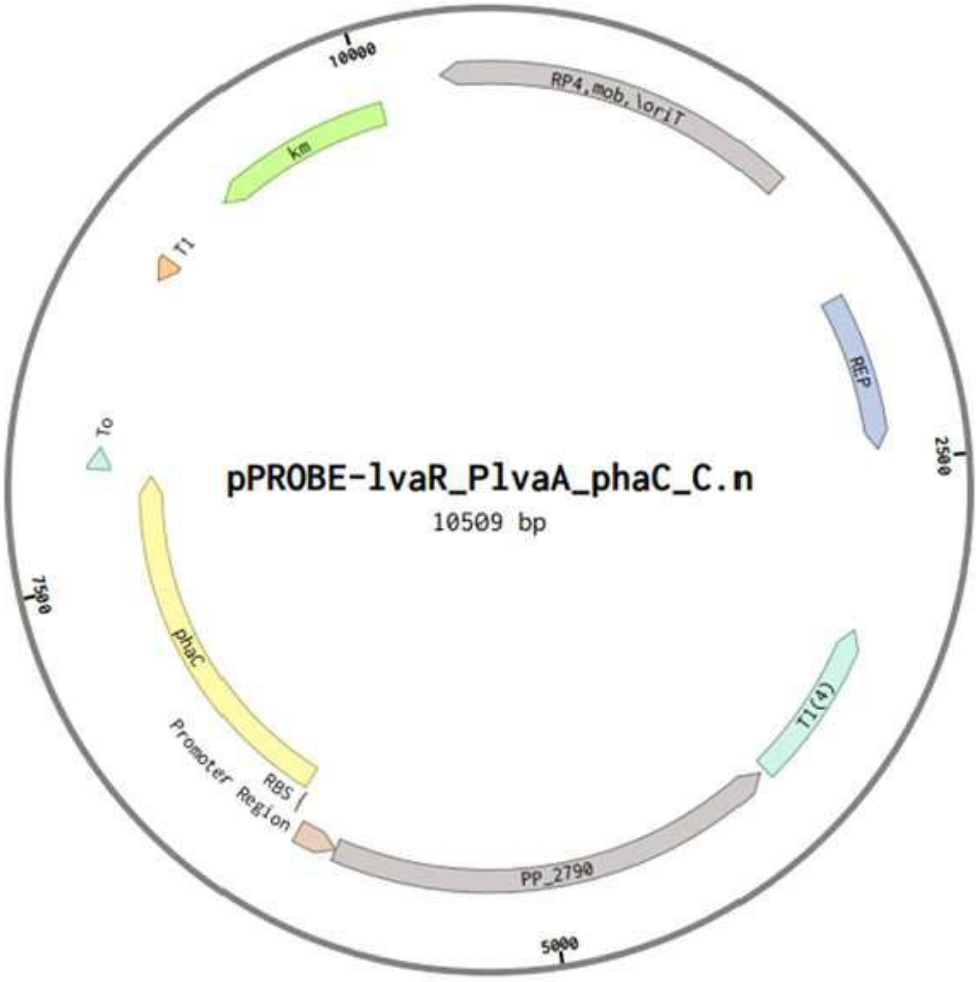
도면2a


pPROBE-lvaR_PlvaA_phaBCA
12466 bp
RP4_mob_oriT
Km
T1
REP
T0
phaA
phaC
phaB
RBS
Promoter Region
pPROBE\F2\Lab\primer\no.1095
PP_2790
T1(4)
10000
2500
7500
5000

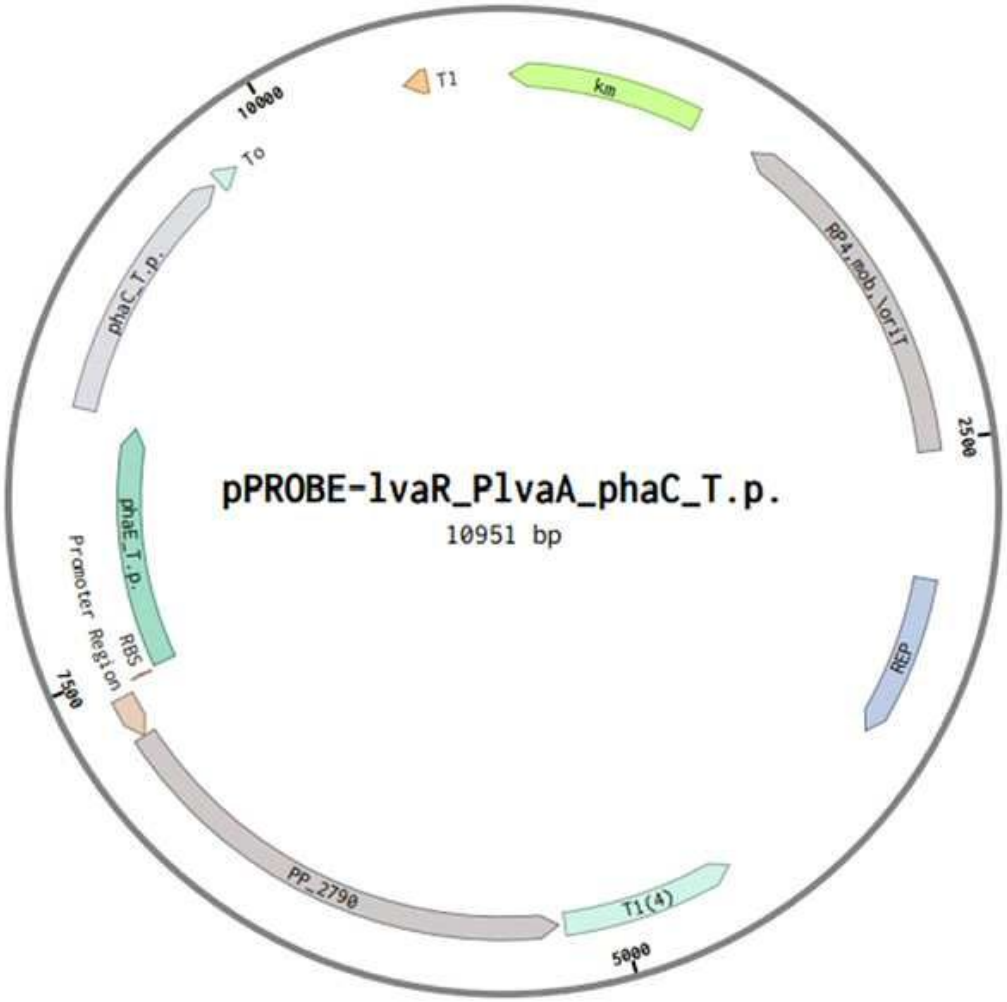
도면2b


pPROBE-lvaR_PlvaA_phaC_P.d
10610 bp
10000
2500
5000
7500
RP4,mob,\oriT
km
T1
REP
To
phaC_P.d
T1(4)
Promoter Region
RBS
PP_2790

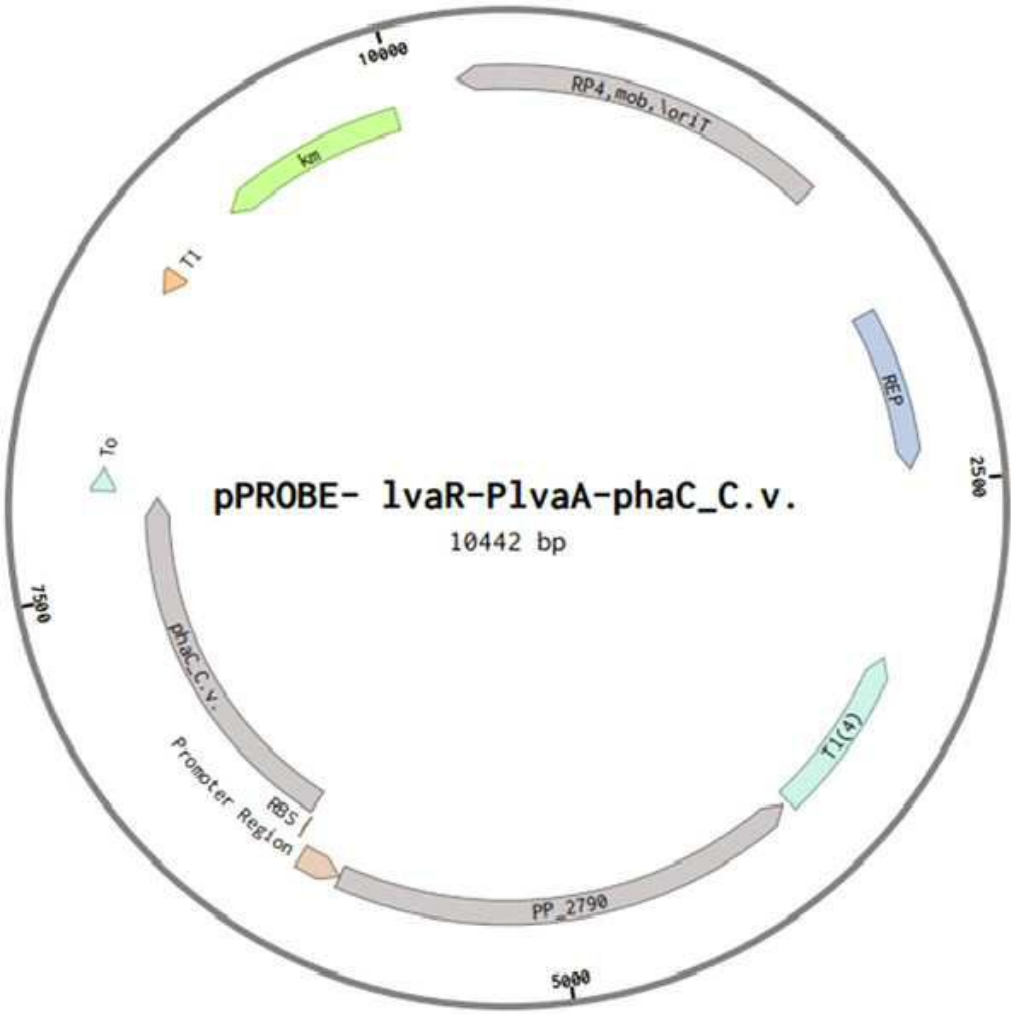
도면2c


10000
RP4,mob,oriT
km
T1
REP
2500
To
pPROBE-lvaR_PlvaA_phaC_C.n
10509 bp
7500
phaC
Promoter Region
RBS
T1(4)
PP_2790
5000

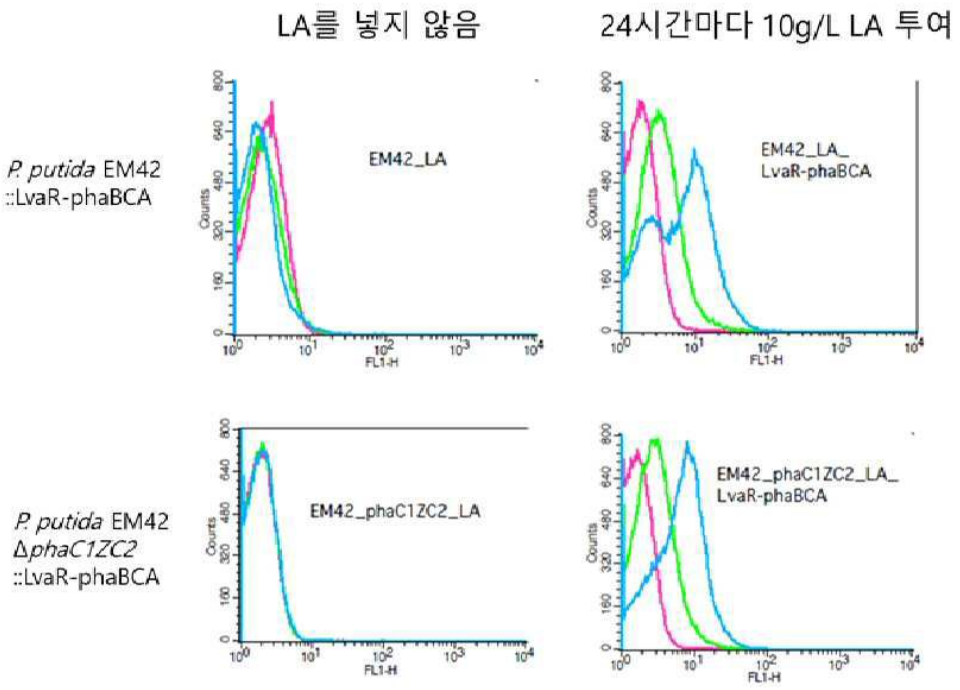
도면2d


pPROBE-lvaR_PlvaA_phaC_T.p.
10951 bp
T1
km
RP4_mob_oriT
REP
T1(4)
PP_2790
Promoter Region
RBS
phaE_T.p.
phaC_T.p.
To
10000
2500
5000
7500

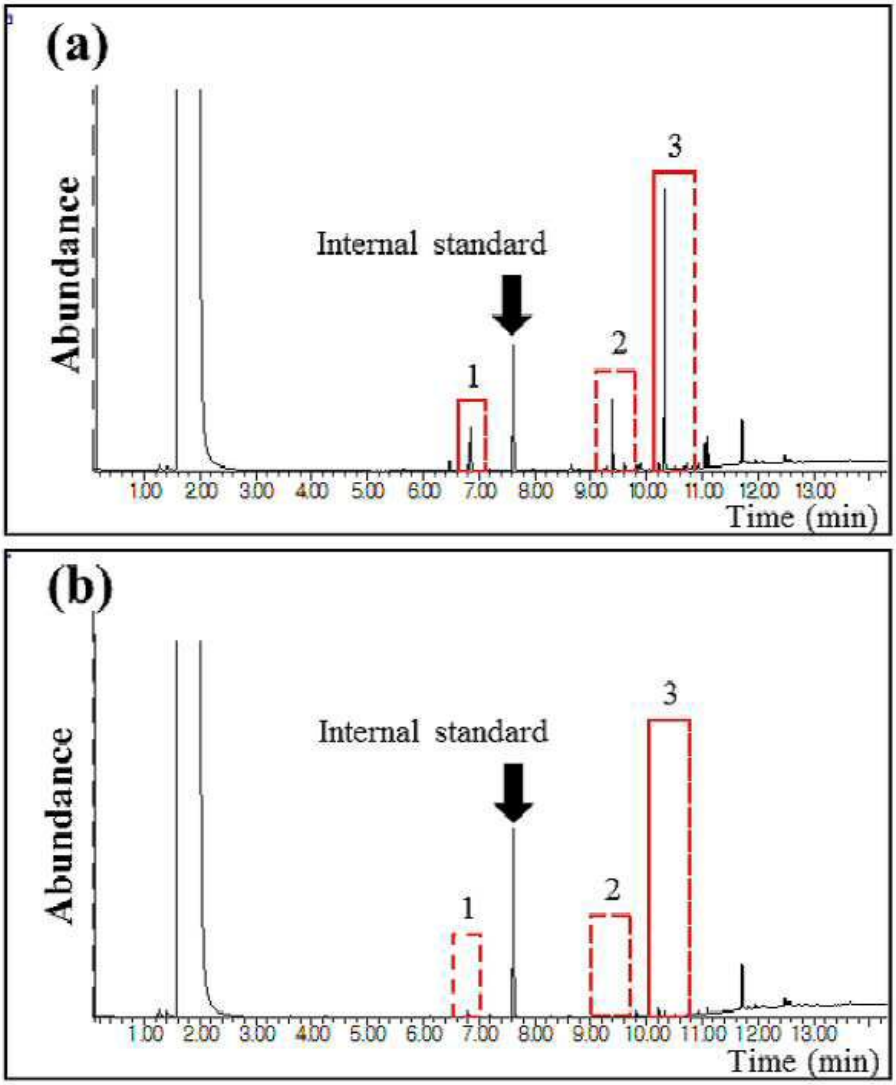
도면2e


10000
RP4,mob,\oriT
Km
T1
REP
2500
To
pPROBE- lvaR-PlvaA-phaC_C.v.
10442 bp
7500
phaC_C.v.
Promoter Region
RBS
T1(4)
PP_2790
5000

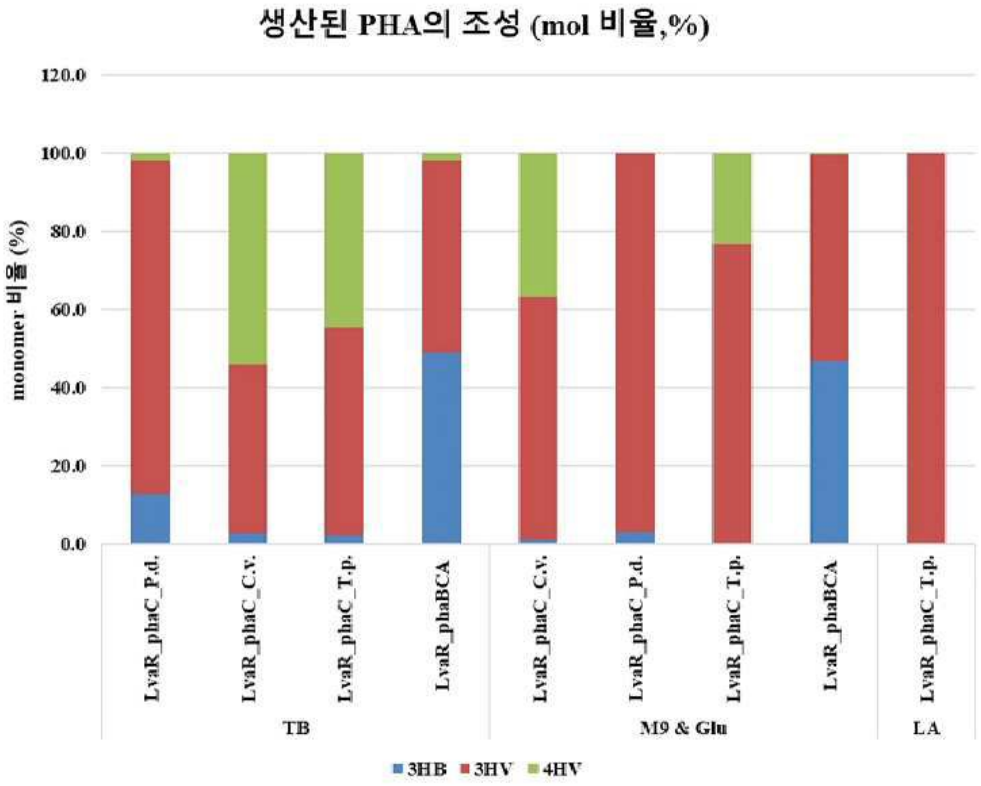
도면3


LA를 넣지 않음
24시간마다 10g/L LA 투여
P. putida EM42 ::LvaR-phaBCA
P. putida EM42 ΔphaC1ZC2 ::LvaR-phaBCA
EM42_LA
EM42_LA_ LvaR-phaBCA
EM42_phaC1ZC2_LA
EM42_phaC1ZC2_LA_ LvaR-phaBCA
Counts
FL1-H

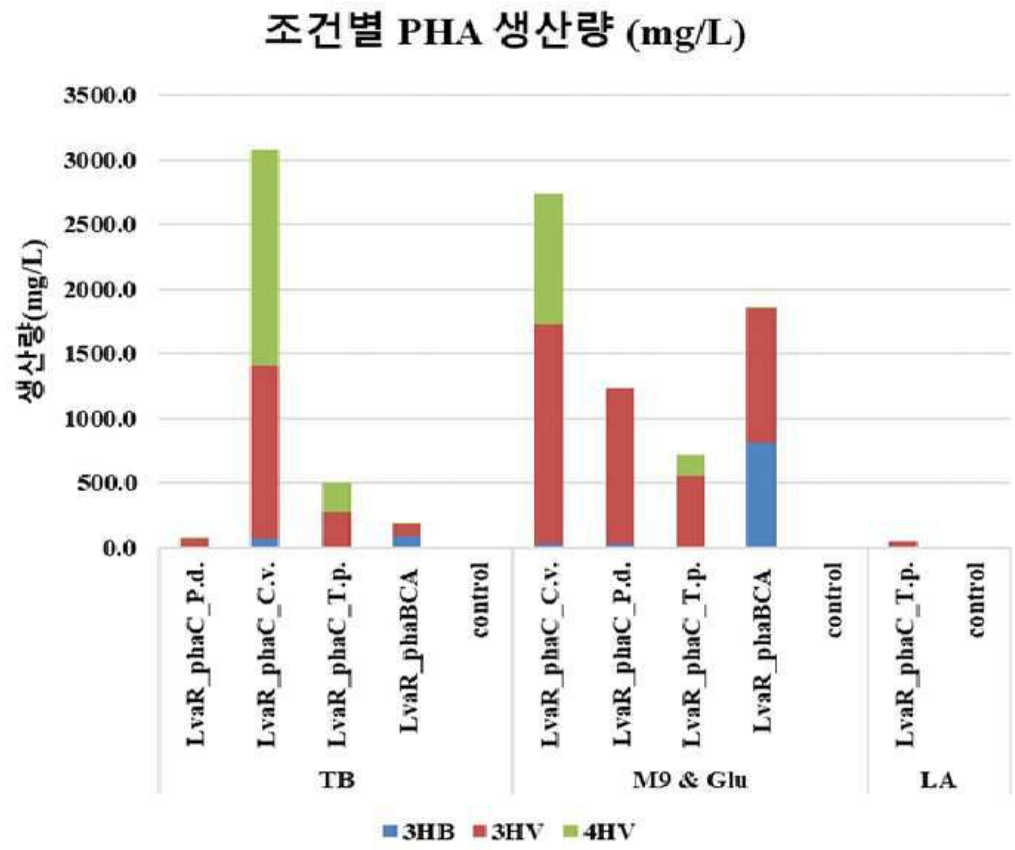
도면4


(a)
Abundance
Internal standard
1
2
3
1.00 2.00 3.00 4.00 5.00 6.00 7.00 8.00 9.00 10.00 11.00 12.00 13.00
Time (min)
(b)
Abundance
Internal standard
1
2
3
1.00 2.00 3.00 4.00 5.00 6.00 7.00 8.00 9.00 10.00 11.00 12.00 13.00
Time (min)

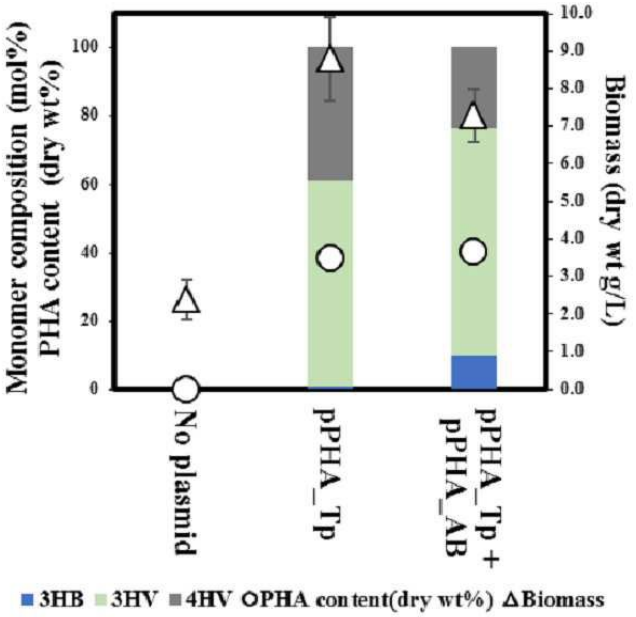
도면5a


생산된 PHA의 조성 (mol 비율,%)
monomer 비율 (%)
120.0
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
LvaR_phaC_P.d.
LvaR_phaC_C.v.
LvaR_phaC_T.p.
LvaR_phaBCA
LvaR_phaC_C.v.
LvaR_phaC_P.d.
LvaR_phaC_T.p.
LvaR_phaBCA
LvaR_phaC_T.p.
TB
M9 & Glu
LA
3HB
3HV
4HV

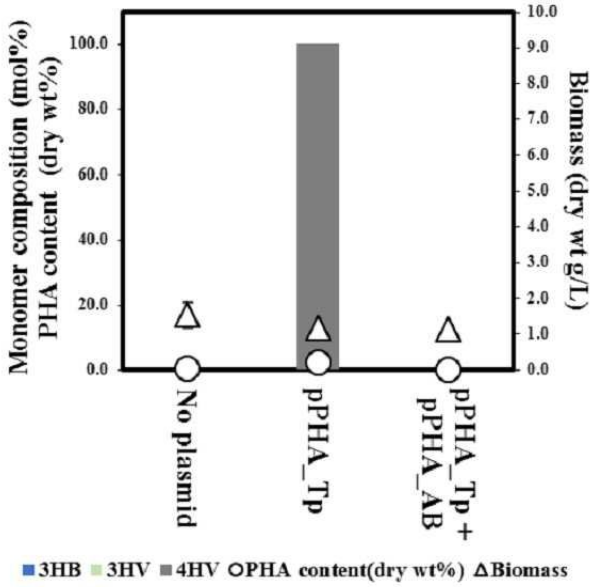
도면5b


조건별 PHA 생산량 (mg/L)
생산량(mg/L)
3500.0
3000.0
2500.0
2000.0
1500.0
1000.0
500.0
0.0
LvaR_phaC_P.d.
LvaR_phaC_C.v.
LvaR_phaC_T.p.
LvaR_phaBCA
control
LvaR_phaC_C.v.
LvaR_phaC_P.d.
LvaR_phaC_T.p.
LvaR_phaBCA
control
LvaR_phaC_T.p.
control
TB
M9 & Glu
LA
3HB
3HV
4HV

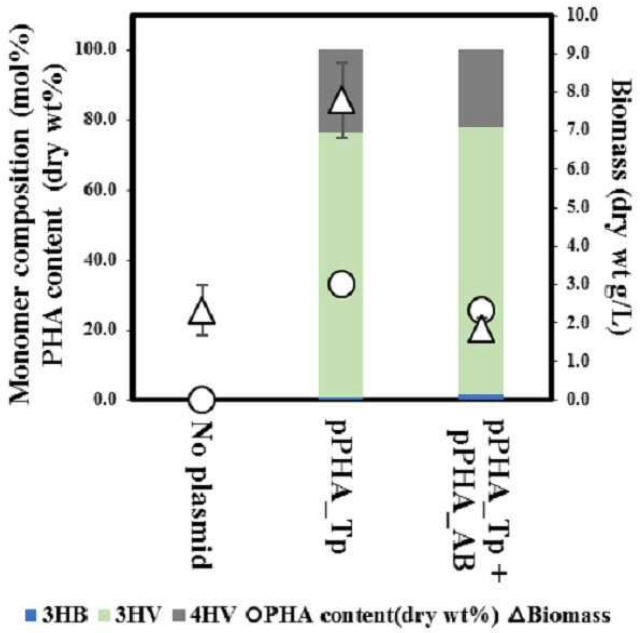
도면6a


Monomer composition (mol%)
PHA content (dry wt%)
Biomass (dry wt g/L)
No plasmid
pPHA_Tp
pPHA_Tp + pPHA_AB
3HB 3HV 4HV OPHA content(dry wt%) ΔBiomass

도면6b


Monomer composition (mol%)
PHA content (dry wt%)
Biomass (dry wt g/L)
No plasmid
pPHA_Tp
pPHA_Tp + pPHA_AB
3HB 3HV 4HV OPHA content(dry wt%) ΔBiomass

도면6c



서 열 목 록

<110> UNIST(ULSAN NATIONAL INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY)

<120> TRANSFORMED MICROORGANISM PRODUCING POLYHYDROXYALKANOATE

<130> FPD/202008-0001

<150> KR 10-2019-0107196

<151> 2019-08-30

<160> 66

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 1875

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Paracoccus denitrificans-phaC-gene

<400> 1

atggccgcgc cccgcgccca ggctgccgcc ccggcgggga ccggccagtc tgccggactc 60

gctgccgagc cgcatccagc ccgaacaccg ccgccttcgt cgaggcggcc ttcggtcccg 120

gcagccgcct cccaacagct ggcccagaac atcgagcgca tcgaatcgct gacccagcgc 180

ctgatcagcg cgctggcgca gcgccgtccc tcgaatcccg gcgtcgagat gccgggcccc 240

gacctttcg ccaccgcgac ctcggcctgg atcaagcttc tggccgagca gcccgagcgg 300

gtgatcggcc agcaggtcag ctattggggc gaaaccttgc gccatttcgc cgaggcccag 360

gccgcctttg cccgcggcac cgtgacgccg ccgcccagcg aagggccgcg ggaccggcgc 420

tttgccaacc cgctgtggga ggcgcatccc ttcttcaact tcatcaagcg gcaataccag 480

atcaacgccc aggccctgca ggaggcggcc agcacactgg acctgcccga gatgaccgac 540

cggcgccgga tcgaatggtt cacccgccag atgatcgaca tgatggcgcc gacgaatttt 600

ctggccacca atcccgacga cagctggaaa aggcgctgga gaccgaggga cgaaagcctg 660

gtcaggggcc ttgagaacct ggtgcgcgac gtcgagcaga acagcggcga gctgatcgtg 720

tcgctggccg accgcgatgc cttccgtgtg ggcgagaaca tcggcaccac cgagggcacg 780

gtggtcgcgc gcaccaagct ttacgagctg atccagtaca agcccaccac cgcgcaggtg 840

catgagatcc cgctggtgat ctttccgccc tggatcaaca aattctacat cctcgacctc 900

aagccgcaga acagcctgat caaatggatc gtggaccagg gccatacgct gttcgtggtg 960

gcctggaaga accccgaccc cagctatggc gacaccggca tggacgatta cgtcagcgcc 1020

tatctggagg tgatggaccg ggttctggat ctgaccgacc agaaaaagct gaatgcggtg 1080

ggctattgca tcgccggcac caccctggcg ctgacccctg tcgtgctgaa gcagcgcggc 1140

gacgaccggg tgaacgcggc caccttcttc accgcgctga ccgatttcgc cgaccagggc 1200

gagttcactg cctatctgca ggaggatttc gtctcaggca tcgaggagga ggcggcgcgg 1260

accggcatcc tgggcgcgca gctgatgacg cgcaccttca gcttcctgcg cgccaacgac 1320

ctggtctggg ggccggcgat ccgcagctac atgctgggcg agacgccgcc ggccttcgac 1380

ctgctgttct ggaacggcga cggcaccaac ctgcccgggc gcatggccgt ggaatacctg 1440

cgcggcctgt gccagcagaa ccgcttcgtc aaggaggggt tcgatctgat gggccaccgc 1500

ctgcatgtcg gcgacgtgac cgtgccgctt tgcgccatcg cctgcgagac cgaccatatc 1560

gcgccctgga aggacagctg gcgcggcatc gcgcagatgg gctccaggga caagaccttc 1620

atcctgtccg aatcgggcca tatcgccggc atcgtcaacc cgcccagcaa gaagaaatac 1680

ggccattata cctcggacgc cggtttcggt cagggcgagc agcactggct ggacaaggcc 1740

agccatcacg agggcagctg gtggggccgc tggggcgaat ggctggcccg gcgggcgggg 1800

ggcatggtcg atgcccgcga cccgggcgag ggcttcggcc ctgcgccggg cctttacgtc 1860

cacgagcggg cgtaa 1875

<210> 2

<211> 624

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Paracoccus denitrificans-phaC-peptide

<400> 2

Met Ala Ala Pro Arg Ala Gln Ala Ala Ala Pro Ala Gly Thr Gly Gln
1 5 10 15

Ser Ala Gly Leu Ala Ala Glu Pro His Pro Ala Arg Thr Pro Pro Pro
20 25 30

Ser Ser Arg Arg Pro Ser Val Pro Ala Ala Ala Ser Gln Gln Leu Ala
35 40 45

Gln Asn Ile Glu Arg Ile Glu Ser Leu Thr Gln Arg Leu Ile Ser Ala
50 55 60

Leu Ala Gln Arg Arg Pro Ser Asn Pro Gly Val Glu Met Pro Gly Pro
65 70 75 80

Asp Leu Phe Ala Thr Ala Thr Ser Ala Trp Ile Lys Leu Leu Ala Glu
85 90 95

Gln Pro Glu Arg Val Ile Gly Gln Gln Val Ser Tyr Trp Gly Glu Thr
100 105 110

Leu Arg His Phe Ala Glu Ala Gln Ala Ala Phe Ala Arg Gly Thr Val
115 120 125

Thr Pro Pro Pro Ser Glu Gly Pro Arg Asp Arg Arg Phe Ala Asn Pro
130 135 140

Leu Trp Glu Ala His Pro Phe Phe Asn Phe Ile Lys Arg Gln Tyr Gln
145 150 155 160

Ile Asn Ala Gln Ala Leu Gln Glu Ala Ala Ser Thr Leu Asp Leu Pro
165 170 175

Glu Met Thr Asp Arg Arg Arg Ile Glu Trp Phe Thr Arg Gln Met Ile
180 185 190

Asp Met Met Ala Pro Thr Asn Phe Leu Ala Thr Asn Pro Asp Asp Ser
195 200 205

Trp Lys Arg Arg Trp Arg Pro Arg Asp Glu Ser Leu Val Arg Gly Leu
210 215 220

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

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

245 250 255

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

260 265 270

Tyr Lys Pro Thr Thr Ala Gln Val His Glu Ile Pro Leu Val Ile Phe

275 280 285

Pro Pro Trp Ile Asn Lys Phe Tyr Ile Leu Asp Leu Lys Pro Gln Asn

290 295 300

Ser Leu Ile Lys Trp Ile Val Asp Gln Gly His Thr Leu Phe Val Val

305 310 315 320

Ala Trp Lys Asn Pro Asp Pro Ser Tyr Gly Asp Thr Gly Met Asp Asp

325 330 335

Tyr Val Ser Ala Tyr Leu Glu Val Met Asp Arg Val Leu Asp Leu Thr

340 345 350

Asp Gln Lys Lys Leu Asn Ala Val Gly Tyr Cys Ile Ala Gly Thr Thr

355 360 365

Leu Ala Leu Thr Pro Val Val Leu Lys Gln Arg Gly Asp Asp Arg Val

370 375 380

Asn Ala Ala Thr Phe Phe Thr Ala Leu Thr Asp Phe Ala Asp Gln Gly

385 390 395 400

Glu Phe Thr Ala Tyr Leu Gln Glu Asp Phe Val Ser Gly Ile Glu Glu

405 410 415

Glu Ala Ala Arg Thr Gly Ile Leu Gly Ala Gln Leu Met Thr Arg Thr

420 425 430

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

435 440 445

Ser Tyr Met Leu Gly Glu Thr Pro Pro Ala Phe Asp Leu Leu Phe Trp

450 455 460

Asn Gly Asp Gly Thr Asn Leu Pro Gly Arg Met Ala Val Glu Tyr Leu

465 470 475 480

Arg Gly Leu Cys Gln Gln Asn Arg Phe Val Lys Glu Gly Phe Asp Leu

485 490 495

Met Gly His Arg Leu His Val Gly Asp Val Thr Val Pro Leu Cys Ala

500 505 510

Ile Ala Cys Glu Thr Asp His Ile Ala Pro Trp Lys Asp Ser Trp Arg

515 520 525

Gly Ile Ala Gln Met Gly Ser Arg Asp Lys Thr Phe Ile Leu Ser Glu

530 535 540

Ser Gly His Ile Ala Gly Ile Val Asn Pro Pro Ser Lys Lys Lys Tyr

545 550 555 560

Gly His Tyr Thr Ser Asp Ala Gly Phe Gly Gln Gly Glu Gln His Trp

565 570 575

Leu Asp Lys Ala Ser His His Glu Gly Ser Trp Trp Gly Arg Trp Gly

580 585 590

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

595 600 605

Gly Glu Gly Phe Gly Pro Ala Pro Gly Leu Tyr Val His Glu Arg Ala

610 615 620

<210> 3

<211> 1707

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chromobacterium violaceum-phaC-gene

<400> 3

atgcagcagt tcgtcaactc gctgtcgcag cctccagccc ccgacggcgc agcccatccc 60

ttcgccggcg cctgggcgca gctgatgaac cagaccaacc agctgttcgc tctccagtcc 120

tcgctttacc agcagcagct caatctgtgg tcgcaattcc tcggccaggc cgccggccag 180

gaagccgccg ccgaagcggg cgccaagccg gccgaccgcc gcttcgcgtc gccggaatgg 240

aacgagcacc cgttctacaa cttcctcaag cagagctatc tgcagacctc caagtggatg 300

atggagctgg tggacaagac ccagctcgac gaggacgcca aggacaagct ggctttcgcc 360

acccgccagt acctggacgc gatgtccccc agcaacttca tgctgaccaa ccccgacgtg 420

gtcaagcgcg cgatcgagac caagggcgaa agcctggtcg agggcatgaa gaacatgctg 480

gacgacttcc agaagggcca catctcgatg tcggacgaga gcaagttcga gatcggcaag 540

aacctggtgg tcaccccggg ccaggtggtg ttccgcaacg aactgatcga gctgatccag 600

tacacgccga ccaccgacaa ggtctacgag aagccgctgc tgttcgtgcc gccctgcatc 660

aacaagtact acctgatgga cctgcagccg gacaactcca tggtgcgcca cttcgtcgcc 720

cagggttacc gcgtgttcct gatcagctgg cgctccgcgg tcgccgagat gaagcacttc 780

acctgggaaa cctatatcga gaaaggcgtg ttcgccgcgg cggaagcggt gcagaaaatc 840

accaagcagc cgacgatgaa cgtgctgggc ttctgcgtcg gcggcgtcat cctcaccacc 900

gcgctgtgcg tggctcaggc caaggggctg aaatacttcg actccgccac cttcatgacc 960

tcgctgatcg accacgccga accgggcgag atctccttct tcatcgacga gagcgtggtg 1020

gccggccgcg aagccaagat ggccagcggc ggcatcatca gcggcaagga aatcggccgc 1080

accttcgcca gcctgcgcgc caacgacctg gtgtggaact acgtggtcaa caactacctg 1140

ctgggcaaga ccccggcgcc gttcgacctg ctgttctgga acaacgacgc ggtggatctg 1200

ccgctgccga tgcacacctt cctgctgcgc cagttctaca tgaacaacgc gctggtgcgt 1260

ccgggcgcga tcacgctgtg cggcgtgccg atcgacatcg ccaagatcga cgtgccggtc 1320

tacatgttcg ccgcgcgcga cgaccacatc gtgctgtgga gctccgcctt ctccggcctg 1380

aaatacctgc agggcgcgcc cagccgccgc ttcgtgctgg gcgcgtccgg ccacatcgcc 1440

ggctcgatca acccggtcac caaggacaag cgcaactact gggccaacga cacgctgccg 1500

ctgcacgccg aggaatggct ggaaagcgcg gaaagccgcc ccggcagctg gtggaaggac 1560

tgggacgcct ggctggcgcc gcagtccggc aagcaagtgg ccgcgcccaa aagcctgggc 1620

aacaaggaat tcccgccgct gctggcggcg ccgggcagtt atgtgctggc caaggccatg 1680

ccgtccgtcg ccgccagcct gcaatga 1707

<210> 4

<211> 568

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chromobacterium violaceum-phaC-peptide

<400> 4

Met Gln Gln Phe Val Asn Ser Leu Ser Gln Pro Pro Ala Pro Asp Gly

1 5 10 15

Ala Ala His Pro Phe Ala Gly Ala Trp Ala Gln Leu Met Asn Gln Thr

20 25 30

Asn Gln Leu Phe Ala Leu Gln Ser Ser Leu Tyr Gln Gln Gln Leu Asn

35 40 45

Leu Trp Ser Gln Phe Leu Gly Gln Ala Ala Gly Gln Glu Ala Ala Ala

50 55 60

Glu Ala Gly Ala Lys Pro Ala Asp Arg Arg Phe Ala Ser Pro Glu Trp

65 70 75 80

Asn Glu His Pro Phe Tyr Asn Phe Leu Lys Gln Ser Tyr Leu Gln Thr

85 90 95

Ser Lys Trp Met Met Glu Leu Val Asp Lys Thr Gln Leu Asp Glu Asp

100 105 110

Ala Lys Asp Lys Leu Ala Phe Ala Thr Arg Gln Tyr Leu Asp Ala Met

115 120 125

Ser Pro Ser Asn Phe Met Leu Thr Asn Pro Asp Val Val Lys Arg Ala

130 135 140

Ile Glu Thr Lys Gly Glu Ser Leu Val Glu Gly Met Lys Asn Met Leu

145 150 155 160

Asp Asp Phe Gln Lys Gly His Ile Ser Met Ser Asp Glu Ser Lys Phe

165 170 175

Glu Ile Gly Lys Asn Leu Val Val Thr Pro Gly Gln Val Val Phe Arg

180 185 190

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

195 200 205

Tyr Glu Lys Pro Leu Leu Phe Val Pro Pro Cys Ile Asn Lys Tyr Tyr

210 215 220

Leu Met Asp Leu Gln Pro Asp Asn Ser Met Val Arg His Phe Val Ala

225 230 235 240

Gln Gly Tyr Arg Val Phe Leu Ile Ser Trp Arg Ser Ala Val Ala Glu

245 250 255

Met Lys His Phe Thr Trp Glu Thr Tyr Ile Glu Lys Gly Val Phe Ala

260 265 270

Ala Ala Glu Ala Val Gln Lys Ile Thr Lys Gln Pro Thr Met Asn Val

275 280 285

Leu Gly Phe Cys Val Gly Gly Val Ile Leu Thr Thr Ala Leu Cys Val

290 295 300

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

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

435 440 445

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

Arg Pro Gly Ser Trp Trp Lys Asp Trp Asp Ala Trp Leu Ala Pro Gln
515 520 525
Ser Gly Lys Gln Val Ala Ala Pro Lys Ser Leu Gly Asn Lys Glu Phe

530 535 540

Pro Pro Leu Leu Ala Ala Pro Gly Ser Tyr Val Leu Ala Lys Ala Met

545 550 555 560

Pro Ser Val Ala Ala Ser Leu Gln

565

<210> 5

<211> 1770

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Cupriavidus necator-phaC-gene

<400> 5

atggcgaccg gcaaaggcgc ggcagcttcc acgcaggaag gcaagtccca accattcaag 60

gtcacgccgg ggccattcga tccagccaca tggctggaat ggtcccgcca gtggcagggc 120

actgaaggca acggccacgc ggccgcgtcc ggcattccgg gcctggatgc gctggcaggc 180

gtcaagatcg cgccggcgca gctgggtgat atccagcagc gctacatgaa ggacttctca 240

gcgctgtggc aggccatggc cgagggcaag gccgaggcca ccggtccgct gcacgaccgg 300

cgcttcgccg gcgacgcatg gcgcaccaac ctcccatatc gcttcgctgc cgcgttctac 360

ctgctcaatg cgcgcgcctt gaccgagctg gccgatgccg tcgaggccga tgccaagacc 420

cgccagcgca tccgcttcgc gatctcgcaa tgggtcgatg cgatgtcgcc cgccaacttc 480

cttgccacca atcccgaggc gcagcgcctg ctgatcgagt cgggcggcga atcgctgcgt 540

gccggcgtgc gcaacatgat ggaagacctg acacgcggca agatctcgca gaccgacgag 600

agcgcgtttg aggtcggccg caatgtcgcg gtgaccgaag gcgccgtggt cttcgagaac 660

gagtacttcc agctgttgca gtacaagccg ctgaccgaca aggtgcacgc gcgcccgctg 720

ctgatggtgc cgccgtgcat caacaagtac tacatcctgg acctgcagcc ggagagctcg 780

ctggtgcgcc atgtggtgga gcagggacat acggtgtttc tggtgtcgtg gcgcaatccg 840

gacgccagca tggccggcag cacctgggac gactacatcg agcacgcggc catccgcgcc 900

atcgaagtcg cgcgcgacat cagcggccag gacaagatca acgtgctcgg cttctgcgtg 960

ggcggcacca ttgtctcgac cgcgctggcg gtgctggccg cgcgcggcga gcacccggcc 1020

gccagcgtca cgctgctgac cacgctgctg gactttgccg acacgggcat cctcgacgtc 1080

tttgtcgacg agggccatgt gcagttgcgc gaggccacgc tgggcggcgg cgccggcgcg 1140

ccgtgcgcgc tgctgcgcgg ccttgagctg gccaatacct tctcgttctt gcgcccgaac 1200

gacctggtgt ggaactacgt ggtcgacaac tacctgaagg gcaacacgcc ggtgccgttc 1260

gacctgctgt tctggaacgg cgacgccacc aacctgccgg ggccgtggta ctgctggtac 1320

ctgcgccaca cctacctgca gaacgagctc aaggtaccgg gcaagctgac cgtgtgcggc 1380

gtgccggtgg acctggccag catcgacgtg ccgacctata tctacggctc gcgcgaagac 1440

catatcgtgc cgtggaccgc ggcctatgcc tcgaccgcgc tgctggcgaa caagctgcgc 1500

ttcgtgctgg gtgcgtcggg ccatatcgcc ggtgtgatca acccgccggc caagaacaag 1560

cgcagccact ggactaacga tgcgctgccg gagtcgccgc agcaatggct ggccggcgcc 1620

atcgagcatc acggcagctg gtggccggac tggaccgcat ggctggccgg gcaggccggc 1680

gcgaaacgcg ccgcgcccgc caactatggc aatgcgcgct atcgcgcaat cgaacccgcg 1740

cctgggcgat acgtcaaagc caaggcatga 1770

<210> 6

<211> 589

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cupriavidus necator-phaC-peptide

<400> 6

Met Ala Thr Gly Lys Gly Ala Ala Ala Ser Thr Gln Glu Gly Lys Ser
1 5 10 15

Gln Pro Phe Lys Val Thr Pro Gly Pro Phe Asp Pro Ala Thr Trp Leu
20 25 30

Glu Trp Ser Arg Gln Trp Gln Gly Thr Glu Gly Asn Gly His Ala Ala
35 40 45

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

Pro Ala Gln Leu Gly Asp Ile Gln Gln Arg Tyr Met Lys Asp Phe Ser
65 70 75 80

Ala Leu Trp Gln Ala Met Ala Glu Gly Lys Ala Glu Ala Thr Gly Pro
85 90 95

Leu His Asp Arg Arg Phe Ala Gly Asp Ala Trp Arg Thr Asn Leu Pro
100 105 110

Tyr Arg Phe Ala Ala Ala Phe Tyr Leu Leu Asn Ala Arg Ala Leu Thr
115 120 125

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

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

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

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

370 375 380

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

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

Leu Pro Glu Ser Pro Gln Gln Trp Leu Ala Gly Ala Ile Glu His His
530 535 540
Gly Ser Trp Trp Pro Asp Trp Thr Ala Trp Leu Ala Gly Gln Ala Gly
545 550 555 560
Ala Lys Arg Ala Ala Pro Ala Asn Tyr Gly Asn Ala Arg Tyr Arg Ala
565 570 575
Ile Glu Pro Ala Pro Gly Arg Tyr Val Lys Ala Lys Ala
580 585

<210> 7
<211> 1680

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Pseudomonas oleovorans-phaC1-gene

<400> 7

atgagtgaca agaacaacga agacctgaaa cgccaggcct ctgaaaacac cctgggactc 60

aacccggtaa tcggcattcg cggcaaggat ctgctgacct ctgcccgtat ggtgctcgcc 120

caggcactca agcaaccctt ccacagtgcc aagcatgtcg cccacttcgg cctggagctg 180

aagaacgtca tcctcggtca gtccgcgctc aaacccgaag acggtgaccg ccgcttcaat 240

gatccgacct ggagccagaa cccactgtat cgccgttatc tgcagaccta cctggcctgg 300

cgcaaggagc tgcatgactg gatcgaacac agttcgctgt ccgagcagga cgccagtcgc 360

ggccacttcg tcatcaacct gatgaccgaa gccatggcgc cgagcaacag catggccaac 420

ccggcggcag tcaaacgttt cttcgaaacc ggcggcaaga gcctgctcga cggcctttcg 480

cacctggcca aggacatggt gcacaacggc ggcatgccca gcctggtgaa catggaggcc 540

ttcgaggtcg gcaagaacct ggccaccacc gacggcgccg tggtgtttcg caacgacgtg 600

ctggagctga tccagtacaa gccgatcacc gagagcgtgc acgagcgccc gctgctggtg 660

gtgccaccgc agatcaacaa gttctacgta ttcgacctgt caccggaaaa aagcctggcg 720

cgcttcctgt tgcgcagcca ggtgcagacc ttcgtggtca gctggcgcaa cccgaccaag 780

gcgcagcgtg agtggggcct gtccacctac atcgaggcgc tcaaggaagc catcgacgtg 840

atctgcgcca tcaccggcag caaggacgtc aacatgcttg gcgcctgctc cggcggcctg 900

accactgcct cgctgctcgg tcactatgca gcgcttggcc agcagaaggt caacgccctg 960

accctgctgg tcagcgtgct cgacactcag ctagacaccc aggttgccct gttcgccgac 1020

gagaagaccc tggaagccgc caaacgccgc tcctaccagg ccggcgtact ggagggtagt 1080

gacatggcca aggtgttcgc ctggatgcgc cccaacgacc tgatctggaa ctactgggtc 1140

aacaactacc tgctcggcaa cgagccaccg gtgttcgaca tcctctactg gaacaacgac 1200

accacgcgcc tgccggccgc gctgcgtggc gagttcatcg agatgttccg gaccaaccca 1260

ctgacccgcc cgggcgcgct ggaagtctgc ggcacaccga tcgacctgaa gcaggtcacc 1320

tgtgatttct tcgtcgtcgc tggcaccacc gaccacatca ccccctggga ttcctgctac 1380

aagtcggcgc acctgttcgg cggcaaatgc gagttcgtgc tgtccaacag cggccatatc 1440

caaagcattc tcaacccgcc gggcaacccc aaggcgcgct acatgaccaa tagcgcgatg 1500

ccgctggacc cgaaagcctg gcaggaaagc tcgaccaagc acgccgactc ctggtggcta 1560

cattggcaga cgtggctgag cgaacgctcg ggcgaaacca agaatgctcc acaggcgctg 1620

ggcaacaaga aattcccggc tggcgaagcc gcaccaggca cctatgtgca cgaacgctga 1680

1680

<210> 8

<211> 559

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pseudomonas oleovorans-phaC1-peptide

<400> 8

Met Ser Asp Lys Asn Asn Glu Asp Leu Lys Arg Gln Ala Ser Glu Asn
1 5 10 15

Thr Leu Gly Leu Asn Pro Val Ile Gly Ile Arg Gly Lys Asp Leu Leu
20 25 30

Thr Ser Ala Arg Met Val Leu Ala Gln Ala Leu Lys Gln Pro Phe His
35 40 45

Ser Ala Lys His Val Ala His Phe Gly Leu Glu Leu Lys Asn Val Ile
50 55 60

Leu Gly Gln Ser Ala Leu Lys Pro Glu Asp Gly Asp Arg Arg Phe Asn
65 70 75 80

Asp Pro Thr Trp Ser Gln Asn Pro Leu Tyr Arg Arg Tyr Leu Gln Thr
85 90 95

Tyr Leu Ala Trp Arg Lys Glu Leu His Asp Trp Ile Glu His Ser Ser
100 105 110

Leu Ser Glu Gln Asp Ala Ser Arg Gly His Phe Val Ile Asn Leu Met
115 120 125

Thr Glu Ala Met Ala Pro Ser Asn Ser Met Ala Asn Pro Ala Ala Val
130 135 140

Lys Arg Phe Phe Glu Thr Gly Gly Lys Ser Leu Leu Asp Gly Leu Ser
145 150 155 160

His Leu Ala Lys Asp Met Val His Asn Gly Gly Met Pro Ser Leu Val
165 170 175

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

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

Ile Thr Glu Ser Val His Glu Arg Pro Leu Leu Val Val Pro Pro Gln
210 215 220
Ile Asn Lys Phe Tyr Val Phe Asp Leu Ser Pro Glu Lys Ser Leu Ala
225 230 235 240
Arg Phe Leu Leu Arg Ser Gln Val Gln Thr Phe Val Val Ser Trp Arg

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

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

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

450 455 460

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

530 535 540
Phe Pro Ala Gly Glu Ala Ala Pro Gly Thr Tyr Val His Glu Arg
545 550 555

<210> 9
<211> 1683
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Pseudomonas oleovorans-phaC2-gene
<400> 9

atgcgagaca agtcgaaccc ggcttcactg ccggcacccg ccagtttcat gaacgcccag 60
agcgcggtgg tgggcgtgca cggtcgcgat ctgctgtcca ccatgcgcct gctggctgcc 120
cagggcctga agaatccggt gcgcagtgga cgtcatctgc tggccttcgg cggccagctt 180

ggccgggtgc tgctcggcga taccctgcac aaggtcaatc cgcaggatgc gcgcttcgct 240
gatccgacct ggcacctcaa tcccttctac cgccgcagcc tgcaggccta tctggcgtgg 300
cagaaacaac tggccgcgtg gatcgacgac agcgacctgt cggccgatga ccgctcccgc 360
gcgcgctttc tcgcctcact gatgagcgac gccctgtcgc cctccaacag cccgctcaac 420
ccgcaggcgc tcaaggagct gttcaacacc ggtggcagca gtgccttcaa gggcttgcgc 480
catctgctcg acgacctgct gaacaacgac ggcctgccca gccaggtcag caaacacgcc 540
ttcgaagtcg gccgcaatct ggcctgcacg ccaggtgccg tggtgtttcg caacgagctg 600

ctggaactga tccagtacaa accgatgagc gaaaagcagt acctgcgccc gctgctgatc 660
gtgccgccac agatcaataa gtactacata ttcgatctat ccaacgacaa gagcttcgtc 720

cagtacgcac tgaagaacgg cctgcagacc ttcatgatca gctggcgcaa ccccgaccca 780

cggcatcgcg aatggggcct gtcgagctat gtgcaggccg tcgaggaggc cgtcgatgcc 840

tgccgcgcca tctccggcag caaggacgtc aacctgctcg gcgcctgcgc cggcggtctg 900

accatcgccg ccctgcaagg ccacctgcag gcacgccgcc aactgcgcaa gattgccagc 960

gccacctaca tggtcagtct gctcgatagc cagatcgaca gcccggcgat gctctttgcc 1020

gacgaggaaa ccctcgagtc ggcaaagcgc cgctcctatc agcaaggcgt gctggacggt 1080

cgcgacatgg ccagggtatt cgcctggatg cgtcccaacg acctgatctg gaactactgg 1140

gtcaacaact acctgctcgg caggcagccg ccagccttcg acatcctcta ctggaacaac 1200

gacaacacgc gcctgcccgc tgcactgcat ggcgacctga tcgacttctt caagcacaat 1260

ccgcttagcc gcaacggcgg cctcgaagtc tgcggtacgc cggtggatct gaccaaggtc 1320

aacgtcgaca gtttcagcgt ggccggcatc aacgaccaca tcacgccctg ggatgcggtc 1380

tatcgctcga ccctgctgct tggcggcaac cgccgtttca tcctgtccaa cagcgggcat 1440

atccagagca ttctcaaccc gccgggcaac cccaaggcca actactacga gaacaccaag 1500

ctcacctccg accctcgcgc ctggtatcac gatgccacgc accagcaagg tagttggtgg 1560

ccacagtggc tggaatggat gcaggcgcgt tccggcgcgc aacgcgaaac cctgatggcg 1620

ctgggcaacc agaaccatcc accgatggag gcagcgcccg gcacctacgt gcatatccgc 1680

tga 1683

<210> 10

<211> 560

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pseudomonas oleovorans-phaC2-peptide

<400> 10

Met Arg Asp Lys Ser Asn Pro Ala Ser Leu Pro Ala Pro Ala Ser Phe
1 5 10 15

Met Asn Ala Gln Ser Ala Val Val Gly Val His Gly Arg Asp Leu Leu
20 25 30

Ser Thr Met Arg Leu Leu Ala Ala Gln Gly Leu Lys Asn Pro Val Arg
35 40 45

Ser Gly Arg His Leu Leu Ala Phe Gly Gly Gln Leu Gly Arg Val Leu
50 55 60

Leu Gly Asp Thr Leu His Lys Val Asn Pro Gln Asp Ala Arg Phe Ala

65 70 75 80

Asp Pro Thr Trp His Leu Asn Pro Phe Tyr Arg Arg Ser Leu Gln Ala

85 90 95

Tyr Leu Ala Trp Gln Lys Gln Leu Ala Ala Trp Ile Asp Asp Ser Asp

100 105 110

Leu Ser Ala Asp Asp Arg Ser Arg Ala Arg Phe Leu Ala Ser Leu Met

115 120 125

Ser Asp Ala Leu Ser Pro Ser Asn Ser Pro Leu Asn Pro Gln Ala Leu

130 135 140

Lys Glu Leu Phe Asn Thr Gly Gly Ser Ser Ala Phe Lys Gly Leu Arg

145 150 155 160

His Leu Leu Asp Asp Leu Leu Asn Asn Asp Gly Leu Pro Ser Gln Val

165 170 175

Ser Lys His Ala Phe Glu Val Gly Arg Asn Leu Ala Cys Thr Pro Gly

180 185 190

Ala Val Val Phe Arg Asn Glu Leu Leu Glu Leu Ile Gln Tyr Lys Pro

195 200 205

Met Ser Glu Lys Gln Tyr Leu Arg Pro Leu Leu Ile Val Pro Pro Gln

210 215 220

Ile Asn Lys Tyr Tyr Ile Phe Asp Leu Ser Asn Asp Lys Ser Phe Val

225 230 235 240

Gln Tyr Ala Leu Lys Asn Gly Leu Gln Thr Phe Met Ile Ser Trp Arg

245 250 255

Asn Pro Asp Pro Arg His Arg Glu Trp Gly Leu Ser Ser Tyr Val Gln

260 265 270

Ala Val Glu Glu Ala Val Asp Ala Cys Arg Ala Ile Ser Gly Ser Lys

275 280 285

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

290 295 300

Leu Gln Gly His Leu Gln Ala Arg Arg Gln Leu Arg Lys Ile Ala Ser

305 310 315 320

Ala Thr Tyr Met Val Ser Leu Leu Asp Ser Gln Ile Asp Ser Pro Ala

325 330 335

Met Leu Phe Ala Asp Glu Glu Thr Leu Glu Ser Ala Lys Arg Arg Ser

340 345 350

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

355 360 365

Trp Met Arg Pro Asn Asp Leu Ile Trp Asn Tyr Trp Val Asn Asn Tyr

370 375 380

Leu Leu Gly Arg Gln Pro Pro Ala Phe Asp Ile Leu Tyr Trp Asn Asn

385 390 395 400

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

405 410 415

Phe Lys His Asn Pro Leu Ser Arg Asn Gly Gly Leu Glu Val Cys Gly

420 425 430

Thr Pro Val Asp Leu Thr Lys Val Asn Val Asp Ser Phe Ser Val Ala

435 440 445

Gly Ile Asn Asp His Ile Thr Pro Trp Asp Ala Val Tyr Arg Ser Thr

450 455 460

Leu Leu Leu Gly Gly Asn Arg Arg Phe Ile Leu Ser Asn Ser Gly His

465 470 475 480

Ile Gln Ser Ile Leu Asn Pro Pro Gly Asn Pro Lys Ala Asn Tyr Tyr

485 490 495

Glu Asn Thr Lys Leu Thr Ser Asp Pro Arg Ala Trp Tyr His Asp Ala

500 505 510

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

515 520 525

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

530 535 540

Asn His Pro Pro Met Glu Ala Ala Pro Gly Thr Tyr Val His Ile Arg

545 550 555 560

<210> 11

<211> 1104

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Thiocapsa pfennigii-phaE-gene

<400> 11

atgaacgata cggccaacaa gaccagcgac tggctggaca tccaacgcaa gtactgggag 60

acctggtcgg agctcggccg caagaccttg ggtctggaga agaccccggc caatccttgg 120

gccggcgccc tcgatcattg gtggcagacg gtctcgcccg ccgcccccaa cgacctggtt 180

cgcgacttca tggagaagct cgccgagcag ggcaaggcct tcttcggcct caccgactac 240

ttcacgaagg gcctcggcgg cagtagcggt acgcagggct gggacaccct ctcgaagacc 300

atcgacgaca tgcaaaaggc cttcgccagc ggccggatcg aaggcgacga gaccttccgc 360

cgcctgatgg ccttctggga gatgccgctc gacaactggc agcgcaccat gtcctcgctg 420

tccccggtgc ccggcgacct gctgcgcaac atgccgcacg accaagtcag ggacagcgtc 480

gaccgcatcc tctcggcacc cgggctcggc tacacgcgcg aggagcaggc ccgctaccag 540

gatctgatcc gccgctcgct ggagtaccag tcggccctga acgaatacaa cggcttcttc 600

ggccagctcg gtgtcaagtc cctcgagcgg atgcgcgcct tcctgcaggg acaggccgag 660

aagggcgtcg ccatcgagtc ggcgcgcacc ctctacgacg cctgggtcgg ctgctgcgaa 720

gaggtctatg ccgaggaggt cagctccgcc gactacgcgc acatccacgg ccgcctcgtc 780

aacgcccaga tggccctcaa gcagcgcatg tcgaccatgg tcgacgaggt cctcggcgcg 840

atgccgctgc cgacccgcag cgagctgcgc acgctccagg atcggctcca ggagtcgcgc 900

ggcgagggca agcgccagcg ccaagagatc gagacgctga agcggcaggt cgcggccttg 960

gccggcggcg cccagcccgc gccccaggcc tccgcccagc ccagcacccg gcccgcgccg 1020

gcgacggccc cggcggcgag cgcggcgccc aagcgcagca ccacgacccg ccgcaagacc 1080

accaagccca ccaccggcca gtga 1104

<210> 12

<211> 367

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Thiocapsa pfennigii-phaE-peptide

<400> 12

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

1 5 10 15

Lys Tyr Trp Glu Thr Trp Ser Glu Leu Gly Arg Lys Thr Leu Gly Leu

20 25 30

Glu Lys Thr Pro Ala Asn Pro Trp Ala Gly Ala Leu Asp His Trp Trp

35 40 45

Gln Thr Val Ser Pro Ala Ala Pro Asn Asp Leu Val Arg Asp Phe Met

50 55 60

Glu Lys Leu Ala Glu Gln Gly Lys Ala Phe Phe Gly Leu Thr Asp Tyr

65 70 75 80

Phe Thr Lys Gly Leu Gly Gly Ser Ser Gly Thr Gln Gly Trp Asp Thr

85 90 95

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

100 105 110

Ile Glu Gly Asp Glu Thr Phe Arg Arg Leu Met Ala Phe Trp Glu Met

115 120 125

Pro Leu Asp Asn Trp Gln Arg Thr Met Ser Ser Leu Ser Pro Val Pro

130 135 140

Gly Asp Leu Leu Arg Asn Met Pro His Asp Gln Val Arg Asp Ser Val

145 150 155 160

Asp Arg Ile Leu Ser Ala Pro Gly Leu Gly Tyr Thr Arg Glu Glu Gln

165 170 175

Ala Arg Tyr Gln Asp Leu Ile Arg Arg Ser Leu Glu Tyr Gln Ser Ala

180 185 190

Leu Asn Glu Tyr Asn Gly Phe Phe Gly Gln Leu Gly Val Lys Ser Leu

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

Glu Val Tyr Ala Glu Glu Val Ser Ser Ala Asp Tyr Ala His Ile His

245 250 255

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

260 265 270

Met Val Asp Glu Val Leu Gly Ala Met Pro Leu Pro Thr Arg Ser Glu

275 280 285

Leu Arg Thr Leu Gln Asp Arg Leu Gln Glu Ser Arg Gly Glu Gly Lys

290 295 300

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

305 310 315 320

Ala Gly Gly Ala Gln Pro Ala Pro Gln Ala Ser Ala Gln Pro Ser Thr

325 330 335

Arg Pro Ala Pro Ala Thr Ala Pro Ala Ala Ser Ala Ala Pro Lys Arg

340 345 350

Ser Thr Thr Thr Arg Arg Lys Thr Thr Lys Pro Thr Thr Gly Gln

355 360 365

<210> 13

<211> 1074

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Thiocapsa pfennigii-phaC-gene

<400> 13

atgtccccat tcccgatcga catccggccc gacaagctga ccgaggagat gctggagtac 60

agccgcaagc tcggcgaggg tatgcagaac ctgctcaagg ccgaccagat cgacacaggc 120

gtcaccccca aggacgtcgt ccaccgcgag gacaagctgg tcctctaccg ctaccggcgc 180

ccggcgcagg tggcgaccca gacgatcccg ctgctgatcg tctacgccct cgtcaatcgg 240

ccctacatga ccgacatcca ggaggatcgc tcgacgatca agggcctgct cgccaccggt 300

caggacgtct atctgatcga ctggggctac ccggatcagg ccgaccgggc gctgaccctc 360

gatgactaca tcaacggcta catcgaccgc tgcgtcgact acctgcgcga gacccacggc 420

gtcgaccagg tcaacctgct cgggatctgc cagggcgggg ccttcagcct ctgctacacg 480

gccctgcact ccgagaaggt caaaaacctc gtcaccatgg tcacgccggt cgacttccag 540

accccgggca acctgctctc ggcctgggtc cagaacgtcg acgtcgacct ggccgtcgac 600

accatgggca acatcccggg cgaactgctc aactggacct tcctgtcgct caagcccttc 660

agcctgaccg gccagaagta cgtcaacatg gtcgacctgc tcgacgacga ggacaaggtc 720

aagaacttcc tgcggatgga gaagtggatc ttcgacagcc cggaccaggc cggcgagacc 780

ttccgccagt tcatcaagga cttctaccag cgcaacggct tcatcaacgg cggcgtcctg 840

atcggcgatc aggaggtcga cctgcgcaac atccgctgcc cggtcctgaa catctacccg 900

atgcaggacc acctggtgcc gccggatgcc tccaaggccc tcgcgggact gacctccagc 960

gaggactaca cggagctcgc cttccccggc gggcacatcg gcatctacgt cagcggcaag 1020

gcgcaggaag gagtcacccc ggcgatcggc cgctggctga acgaacgcgg ctga 1074

<210> 14

<211> 357

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Thiocapsa pfennigii-phaC-peptide

<400> 14

Met Ser Pro Phe Pro Ile Asp Ile Arg Pro Asp Lys Leu Thr Glu Glu
1 5 10 15

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

Lys Ala Asp Gln Ile Asp Thr Gly Val Thr Pro Lys Asp Val Val His
35 40 45

Arg Glu Asp Lys Leu Val Leu Tyr Arg Tyr Arg Arg Pro Ala Gln Val

50 55 60

Ala Thr Gln Thr Ile Pro Leu Leu Ile Val Tyr Ala Leu Val Asn Arg
65 70 75 80

Pro Tyr Met Thr Asp Ile Gln Glu Asp Arg Ser Thr Ile Lys Gly Leu
85 90 95

Leu Ala Thr Gly Gln Asp Val Tyr Leu Ile Asp Trp Gly Tyr Pro Asp
100 105 110

Gln Ala Asp Arg Ala Leu Thr Leu Asp Asp Tyr Ile Asn Gly Tyr Ile
115 120 125

Asp Arg Cys Val Asp Tyr Leu Arg Glu Thr His Gly Val Asp Gln Val
130 135 140

Asn Leu Leu Gly Ile Cys Gln Gly Gly Ala Phe Ser Leu Cys Tyr Thr
145 150 155 160

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

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

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

340 345 350
Leu Asn Glu Arg Gly
355

<210> 15
<211> 1182
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Cupriavidus necator-phaA-gene
<400> 15

atgactgacg ttgtcatcgt atccgccgcc cgcaccgcgg tcggcaagtt tggcggctcg 60

ctggccaaga tcccggcacc ggaactgggt gccgtggtca tcaaggccgc gctggagcgc 120

gccggcgtca agccggagca ggtgagcgaa gtcatcatgg gccaggtgct gaccgccggt 180

tcgggccaga accccgcacg ccaggccgcg atcaaggccg gcctgccggc gatggtgccg 240

gccatgacca tcaacaaggt gtgcggctcg ggcctgaagg ccgtgatgct ggccgccaac 300

gcgatcatgg cgggcgacgc cgagatcgtg gtggccggcg gccaggaaaa catgagcgcc 360

gccccgcacg tgctgccggg ctcgcgcgat ggtttccgca tgggcgatgc caagctggtc 420

gacaccatga tcgtcgacgg cctgtgggac gtgtacaacc agtaccacat gggcatcacc 480

gccgagaacg tggccaagga atacggcatc acacgcgagg cgcaggatga gttcgccgtc 540

ggctcgcaga acaaggccga agccgcgcag aaggccggca agtttgacga agagatcgtc 600

ccggtgctga tcccgcagcg caagggcgac ccggtggcct tcaagaccga cgagttcgtg 660

cgccagggcg ccacgctgga cagcatgtcc ggcctcaagc ccgccttcga caaggccggc 720

acggtgaccg cggccaacgc ctcgggcctg aacgacggcg ccgccgcggt ggtggtgatg 780

tcggcggcca aggccaagga actgggcctg accccgctgg ccacgatcaa gagctatgcc 840

aacgccggtg tcgatcccaa ggtgatgggc atgggcccgg tgccggcctc caagcgcgcc 900

ctgtcgcgcg ccgagtggac cccgcaagac ctggacctga tggagatcaa cgaggccttt 960

gccgcgcagg cgctggcggt gcaccagcag atgggctggg acacctccaa ggtcaatgtg 1020

aacggcggcg ccatcgccat cggccacccg atcggcgcgt cgggctgccg tatcctggtg 1080

acgctgctgc acgagatgaa gcgccgtgac gcgaagaagg gcctggcctc gctgtgcatc 1140

ggcggcggca tgggcgtggc gctggcagtc gagcgcaaat aa 1182

<210> 16

<211> 393

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cupriavidus necator-phaA-peptide

<400> 16

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

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

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

35 40 45

Ser Glu Val Ile Met Gly Gln Val Leu Thr Ala Gly Ser Gly Gln Asn

50 55 60

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

65 70 75 80

Ala Met Thr Ile Asn Lys Val Cys Gly Ser Gly Leu Lys Ala Val Met

85 90 95

Leu Ala Ala Asn Ala Ile Met Ala Gly Asp Ala Glu Ile Val Val Ala

100 105 110

Gly Gly Gln Glu Asn Met Ser Ala Ala Pro His Val Leu Pro Gly Ser

115 120 125

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

130 135 140

Val Asp Gly Leu Trp Asp Val Tyr Asn Gln Tyr His Met Gly Ile Thr

145 150 155 160

Ala Glu Asn Val Ala Lys Glu Tyr Gly Ile Thr Arg Glu Ala Gln Asp

165 170 175

Glu Phe Ala Val Gly Ser Gln Asn Lys Ala Glu Ala Ala Gln Lys Ala

180 185 190

Gly Lys Phe Asp Glu Glu Ile Val Pro Val Leu Ile Pro Gln Arg Lys

195 200 205

Gly Asp Pro Val Ala Phe Lys Thr Asp Glu Phe Val Arg Gln Gly Ala

210 215 220

Thr Leu Asp Ser Met Ser Gly Leu Lys Pro Ala Phe Asp Lys Ala Gly

225 230 235 240

Thr Val Thr Ala Ala Asn Ala Ser Gly Leu Asn Asp Gly Ala Ala Ala

245 250 255

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

260 265 270

Leu Ala Thr Ile Lys Ser Tyr Ala Asn Ala Gly Val Asp Pro Lys Val

275 280 285

Met Gly Met Gly Pro Val Pro Ala Ser Lys Arg Ala Leu Ser Arg Ala

290 295 300

Glu Trp Thr Pro Gln Asp Leu Asp Leu Met Glu Ile Asn Glu Ala Phe

305 310 315 320

Ala Ala Gln Ala Leu Ala Val His Gln Gln Met Gly Trp Asp Thr Ser

325 330 335

Lys Val Asn Val Asn Gly Gly Ala Ile Ala Ile Gly His Pro Ile Gly

340 345 350

Ala Ser Gly Cys Arg Ile Leu Val Thr Leu Leu His Glu Met Lys Arg

355 360 365

Arg Asp Ala Lys Lys Gly Leu Ala Ser Leu Cys Ile Gly Gly Gly Met

370 375 380

Gly Val Ala Leu Ala Val Glu Arg Lys

385 390

<210> 17

<211> 741

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cupriavidus necator-phaB-gene

<400> 17

atgactcagc gcattgcgta tgtgaccggc ggcatgggtg gtatcggaac cgccatttgc 60

cagcggctgg ccaaggatgg ctttcgtgtg gtggccggtt gcggccccaa ctcgccgcgc 120

cgcgaaaagt ggctggagca gcagaaggcc ctgggcttcg atttcattgc ctcggaaggc 180

aatgtggctg actgggactc gaccaagacc gcattcgaca aggtcaagtc cgaggtcggc 240

gaggttgatg tgctgatcaa caacgccggt atcacccgcg acgtggtgtt ccgcaagatg 300

acccgcgccg actgggatgc ggtgatcgac accaacctga cctcgctgtt caacgtcacc 360

aagcaggtga tcgacggcat ggccgaccgt ggctggggcc gcatcgtcaa catctcgtcg 420

gtgaacgggc agaagggcca gttcggccag accaactact ccaccgccaa ggccggcctg 480

catggcttca ccatggcact ggcgcaggaa gtggcgacca agggcgtgac cgtcaacacg 540

gtctctccgg gctatatcgc caccgacatg gtcaaggcga tccgccagga cgtgctcgac 600

aagatcgtcg cgacgatccc ggtcaagcgc ctgggcctgc cggaagagat cgcctcgatc 660

tgcgcctggt tgtcgtcgga ggagtccggt ttctcgaccg gcgccgactt ctcgctcaac 720

ggcggcctgc atatgggctg a 741

<210> 18

<211> 246

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cupriavidus necator-phaB-peptide

<400> 18

Met Thr Gln Arg Ile Ala Tyr Val Thr Gly Gly Met Gly Gly Ile Gly
1 5 10 15

Thr Ala Ile Cys Gln Arg Leu Ala Lys Asp Gly Phe Arg Val Val Ala
20 25 30

Gly Cys Gly Pro Asn Ser Pro Arg Arg Glu Lys Trp Leu Glu Gln Gln
35 40 45

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

Trp Asp Ser Thr Lys Thr Ala Phe Asp Lys Val Lys Ser Glu Val Gly
65 70 75 80

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

Phe Arg Lys Met Thr Arg Ala Asp Trp Asp Ala Val Ile Asp Thr Asn
100 105 110

Leu Thr Ser Leu Phe Asn Val Thr Lys Gln Val Ile Asp Gly Met Ala
115 120 125

Asp Arg Gly Trp Gly Arg Ile Val Asn Ile Ser Ser Val Asn Gly Gln
130 135 140

Lys Gly Gln Phe Gly Gln Thr Asn Tyr Ser Thr Ala Lys Ala Gly Leu
145 150 155 160

His Gly Phe Thr Met Ala Leu Ala Gln Glu Val Ala Thr Lys Gly Val
165 170 175

Thr Val Asn Thr Val Ser Pro Gly Tyr Ile Ala Thr Asp Met Val Lys
180 185 190

Ala Ile Arg Gln Asp Val Leu Asp Lys Ile Val Ala Thr Ile Pro Val

195 200 205

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

210 215 220

Ser Ser Glu Glu Ser Gly Phe Ser Thr Gly Ala Asp Phe Ser Leu Asn

225 230 235 240

Gly Gly Leu His Met Gly

245

<210> 19

<211> 1059

<212>

DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pseudomonas putida-lvaA-gene

<400> 19

atgagcagtt caccaacgat ttccccggcc agcgatacgt tcgcggccat gactgacgat 60

caccgcctgg ccgagttcat ccgcgagcag gcctcggcaa cgcgggtggt catccaggcg 120

cgcaagcgcc tgagcggcgg cgctatccag gaaaactggc tgctggacct gctgatcgaa 180

ggcggcccgt gggccggtgt ccggcgttgg gtactgcgca gcgatgcgct ttcagcgcta 240

cccgccagcc ttgaccgtga acaggagttc gccgtgctgc aggtggttta ccaggccggc 300

gtgaaagtgc cacgcccgct ctggctgtgc cgcgatgtgc gcgtgcatgg gcgggtgttc 360

ttcctgatgg agtatgtgcc gggtagcgct gccggccgcg cgctcagcac cggcgccggt 420

cctcagggcc gggcgcaact ggcgacgcag cttggcgcca acctggcgcg tctgcatcag 480

gtccgcccgc cgtgcgccac gctgtgcttc ctgtccgttc cggacagctc gccggccctg 540

gcgaccatcg acgcctaccg ccgctacctc gacaccctcg ccgatgccta tccggtgctg 600

gaatggggcc tgcgctggtg cgagctgcat gcgccgcgca gcagcaccct gtgcctgttg 660

caccgtgact accgcaccgg caactacctg gccagcgaag aagggctgga ggccgtgctc 720

gactgggagt tcaccggctg gggagatcct tgcgaggacc tcggctggtt caccgcccgt 780

tgctggcgtt ttacccgtcc agacctcgaa gccggcggca ttggccagct ggaggatttt 840

ctgcgtggtt atcacgaggt gtcttcgctg tgcatcgagc gcagtcggct ccactactgg 900

caagtcatgg ccaccctgcg ctgggcggtg attgccttgc agcaagggca gcgccatctg 960

tccggtgaag aaccgtcgct cgagctagca ctgacagccc ggctgttgcc ggagctcgaa 1020

ctcgacatcc tgcacatgac cggagccgaa gcgccatga 1059

<210> 20

<211> 352

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pseudomonas putida-lvaA-peptide

<400> 20

Met Ser Ser Ser Pro Thr Ile Ser Pro Ala Ser Asp Thr Phe Ala Ala
1 5 10 15

Met Thr Asp Asp His Arg Leu Ala Glu Phe Ile Arg Glu Gln Ala Ser
20 25 30

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

Ile Gln Glu Asn Trp Leu Leu Asp Leu Leu Ile Glu Gly Gly Pro Trp
50 55 60

Ala Gly Val Arg Arg Trp Val Leu Arg Ser Asp Ala Leu Ser Ala Leu

65 70 75 80

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

Tyr Gln Ala Gly Val Lys Val Pro Arg Pro Leu Trp Leu Cys Arg Asp
100 105 110

Val Arg Val His Gly Arg Val Phe Phe Leu Met Glu Tyr Val Pro Gly
115 120 125

Ser Ala Ala Gly Arg Ala Leu Ser Thr Gly Ala Gly Pro Gln Gly Arg
130 135 140

Ala Gln Leu Ala Thr Gln Leu Gly Ala Asn Leu Ala Arg Leu His Gln
145 150 155 160

Val Arg Pro Pro Cys Ala Thr Leu Cys Phe Leu Ser Val Pro Asp Ser
165 170 175

Ser Pro Ala Leu Ala Thr Ile Asp Ala Tyr Arg Arg Tyr Leu Asp Thr
180 185 190

Leu Ala Asp Ala Tyr Pro Val Leu Glu Trp Gly Leu Arg Trp Cys Glu
195 200 205

Leu His Ala Pro Arg Ser Ser Thr Leu Cys Leu Leu His Arg Asp Tyr

210 215 220

Arg Thr Gly Asn Tyr Leu Ala Ser Glu Glu Gly Leu Glu Ala Val Leu
225 230 235 240

Asp Trp Glu Phe Thr Gly Trp Gly Asp Pro Cys Glu Asp Leu Gly Trp
245 250 255

Phe Thr Ala Arg Cys Trp Arg Phe Thr Arg Pro Asp Leu Glu Ala Gly
260 265 270

Gly Ile Gly Gln Leu Glu Asp Phe Leu Arg Gly Tyr His Glu Val Ser
275 280 285

Ser Leu Cys Ile Glu Arg Ser Arg Leu His Tyr Trp Gln Val Met Ala
290 295 300

Thr Leu Arg Trp Ala Val Ile Ala Leu Gln Gln Gly Gln Arg His Leu
305 310 315 320

Ser Gly Glu Glu Pro Ser Leu Glu Leu Ala Leu Thr Ala Arg Leu Leu
325 330 335

Pro Glu Leu Glu Leu Asp Ile Leu His Met Thr Gly Ala Glu Ala Pro
340 345 350

<210> 21

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pseudomonas putida-lvaB-gene

<400> 21

atgacccaac ccaacgccca cgaattgctc gagatcgccc gcgcgacgct tctggagcag 60

ctgctgccag cgctgcccgg cgagttgcgt tacccggccc tgatgatcgc caacgccatg 120

gccattgcgg cccgcgaaaa ccgcttgggc gctcaggccg aggatcagga gcaggcgcgt 180

ctggccgcct tggtcgatga cgcgccgtcg acattgcccg acctgcgccg ccaactggct 240

cgcgccattc gccagggcag ccatgacgcc ccgcaaaccc ggcgcaccct ggtcgagaca 300

ttacgccaga tcaccgttgc ccgattggcg atcagcaacc ccaaggcctt gccctga 357

<210> 22

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pseudomonas putida-lvaB-peptide

<400> 22

Met Thr Gln Pro Asn Ala His Glu Leu Leu Glu Ile Ala Arg Ala Thr
1 5 10 15

Leu Leu Glu Gln Leu Leu Pro Ala Leu Pro Gly Glu Leu Arg Tyr Pro
20 25 30

Ala Leu Met Ile Ala Asn Ala Met Ala Ile Ala Ala Arg Glu Asn Arg
35 40 45

Leu Gly Ala Gln Ala Glu Asp Gln Glu Gln Ala Arg Leu Ala Ala Leu
50 55 60

Val Asp Asp Ala Pro Ser Thr Leu Pro Asp Leu Arg Arg Gln Leu Ala
65 70 75 80

Arg Ala Ile Arg Gln Gly Ser His Asp Ala Pro Gln Thr Arg Arg Thr
85 90 95

Leu Val Glu Thr Leu Arg Gln Ile Thr Val Ala Arg Leu Ala Ile Ser
100 105 110

Asn Pro Lys Ala Leu Pro
115

<210> 23

<211> 2148

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pseudomonas putida-fadB-gene

<400> 23

atgatttacg aaggtaaagc catcacggtt aaggctcttg aaagtggcat cgtcgagctc 60

aagttcgacc tcaagggtga gtccgtcaac aagttcaacc gccttaccct gaacgagctg 120

cgccaggccg tcgatgccat ccgggccgat gcttcggtca agggcgtgat cgtcaggagt 180

ggcaaggacg tgttcatcgt cggcgccgac atcaccgagt tcgtcgacaa cttcaagctg 240

cctgaggccg aactggtcgc tggcaacctg gaagccaatc gcatcttcaa cgcgttcgaa 300

gacctcgaag tgccgaccgt tgccgccatc aacggcatcg cgctgggcgg cggcctggaa 360

atgtgcctgg cggccgacta ccgggtcatg tccaccagcg ccaggatcgg cctgccggaa 420

gtcaagctgg gtatctaccc gggctttggc ggtaccgtgc gcctgccgcg cctgatcggc 480

tcggacaacg ccatcgagtg gatcgccgcc ggcaaggaaa accgtgccga agatgccctg 540

aaagtggggg ccgtcgacgc cgtggtcgcc cctgagctgc tgctggccgg tgccctcgac 600

ctgatcaagc gtgccatcag tggcgagctg gactacaagg ccaagcgcca gccgaagctg 660

gaaaagctca agctcaatgc catcgagcag atgatggcct tcgagactgc caagggcttc 720

gtcgctggcc aggccggccc gaactacccg gccccggtcg aagcgatcaa gagcatccag 780

aaagccgcca acttcggtcg cgacaaggcc ctggaagtcg aagccgcagg ctttgccaag 840

ctggccaaga cctctgtcgc cgagagcctg atcggcttgt tcctcaacga tcaggaactc 900

aagcgcaagg ccaaggcgca tgacgagatc gcccacgacg tgaagcaggc cgccgtgctc 960

ggcgccggca tcatgggcgg cggtatcgcc taccagtcgg cggtcaaagg tacgccgatc 1020

ctgatgaagg acatccgcga ggaagccatt cagctgggtc tgaacgaggc ctccaagttg 1080

cttggcaacc gcgtcgagaa gggccgcctg accccggcca agatggccga ggccctcaac 1140

gccattcgcc cgaccctgtc ctatggcgat ttcgccaatg tcgacatcgt cgtcgaggct 1200

gtggtcgaga acccgaaggt caagcaagcg gtactggcgg aagtggaagg ccaggtgaag 1260

gacgatgcga tcctcgcttc caacacctct accatctcca tcaacctgct ggccaaggcg 1320

ctcaagcgcc cggaaaactt cgtcggcatg cacttcttca acccggtgca catgatgccg 1380

ctggttgaag tgatccgtgg cgagaagtcc agtgacgtgg cggtcgccac caccgtggcc 1440

tacgccaaga aaatgggcaa gaacccgatc gtggtcaacg actgcccggg ctttttggtc 1500

aaccgcgtgc tgttcccgta ctttggcggt tttgccaagc tggtcagcgc cggtgtcgac 1560

ttcgtgcgca tcgacaaggt catggagaag ttcggctggc cgatgggccc agcctacttg 1620

atggacgtgg tcggcatcga caccggccac cacggccgtg acgtcatggc cgaaggcttc 1680

ccggatcgca tgaaggacga gcgccgctcg gcagtcgacg cgttgtacga ggccaaccgc 1740

ctgggccaga agaacggtaa gggcttctac gcctacgaaa ccgacaagcg cggcaagccg 1800

aagaaggtct tcgatgccac cgtgctcgac gtgctcaaac cgatcgtgtt cgagcagcgt 1860

gaagtcactg acgaagacat catcaactgg atgatggtcc cgctgtgcct tgagaccgtg 1920

cgttgcctgg aagacggcat cgtcgaaacc gctgccgaag ccgacatggg cctggtctac 1980

ggcattggtt tccctccctt ccgcggtggt gcgctgcgtt acatcgactc gatcggtgtg 2040

gccgaattcg tcgccctggc cgatcagtat gccgacctgg ggccgctgta ccacccgacc 2100

gccaagctgc gtgaaatggc caagaacggc cagcgcttct tcaactga 2148

<210> 24

<211> 715

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pseudomonas putida-fadB-peptide

<400> 24

Met Ile Tyr Glu Gly Lys Ala Ile Thr Val Lys Ala Leu Glu Ser Gly
1 5 10 15

Ile Val Glu Leu Lys Phe Asp Leu Lys Gly Glu Ser Val Asn Lys Phe
20 25 30

Asn Arg Leu Thr Leu Asn Glu Leu Arg Gln Ala Val Asp Ala Ile Arg
35 40 45

Ala Asp Ala Ser Val Lys Gly Val Ile Val Arg Ser Gly Lys Asp Val
50 55 60

Phe Ile Val Gly Ala Asp Ile Thr Glu Phe Val Asp Asn Phe Lys Leu
65 70 75 80

Pro Glu Ala Glu Leu Val Ala Gly Asn Leu Glu Ala Asn Arg Ile Phe
85 90 95

Asn Ala Phe Glu Asp Leu Glu Val Pro Thr Val Ala Ala Ile Asn Gly
100 105 110

Ile Ala Leu Gly Gly Gly Leu Glu Met Cys Leu Ala Ala Asp Tyr Arg
115 120 125

Val Met Ser Thr Ser Ala Arg Ile Gly Leu Pro Glu Val Lys Leu Gly
130 135 140

Ile Tyr Pro Gly Phe Gly Gly Thr Val Arg Leu Pro Arg Leu Ile Gly
145 150 155 160

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

Glu Asp Ala Leu Lys Val Gly Ala Val Asp Ala Val Val Ala Pro Glu
180 185 190

Leu Leu Leu Ala Gly Ala Leu Asp Leu Ile Lys Arg Ala Ile Ser Gly
195 200 205

Glu Leu Asp Tyr Lys Ala Lys Arg Gln Pro Lys Leu Glu Lys Leu Lys
210 215 220
Leu Asn Ala Ile Glu Gln Met Met Ala Phe Glu Thr Ala Lys Gly Phe
225 230 235 240

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

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

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

450 455 460

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

465 470 475 480

Tyr Ala Lys Lys Met Gly Lys Asn Pro Ile Val Val Asn Asp Cys Pro

485 490 495

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

500 505 510

Lys Leu Val Ser Ala Gly Val Asp Phe Val Arg Ile Asp Lys Val Met

515 520 525

Glu Lys Phe Gly Trp Pro Met Gly Pro Ala Tyr Leu Met Asp Val Val

530 535 540

Gly Ile Asp Thr Gly His His Gly Arg Asp Val Met Ala Glu Gly Phe

545 550 555 560

Pro Asp Arg Met Lys Asp Glu Arg Arg Ser Ala Val Asp Ala Leu Tyr

565 570 575

Glu Ala Asn Arg Leu Gly Gln Lys Asn Gly Lys Gly Phe Tyr Ala Tyr

580 585 590

Glu Thr Asp Lys Arg Gly Lys Pro Lys Lys Val Phe Asp Ala Thr Val

595 600 605

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

610 615 620

Glu Asp Ile Ile Asn Trp Met Met Val Pro Leu Cys Leu Glu Thr Val

625 630 635 640

Arg Cys Leu Glu Asp Gly Ile Val Glu Thr Ala Ala Glu Ala Asp Met

645 650 655

Gly Leu Val Tyr Gly Ile Gly Phe Pro Pro Phe Arg Gly Gly Ala Leu

660 665 670

Arg Tyr Ile Asp Ser Ile Gly Val Ala Glu Phe Val Ala Leu Ala Asp

675 680 685

Gln Tyr Ala Asp Leu Gly Pro Leu Tyr His Pro Thr Ala Lys Leu Arg

690 695 700

Glu Met Ala Lys Asn Gly Gln Arg Phe Phe Asn

705 710 715

<210> 25

<211> 1680

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pseudomonas putida-phaC1-gene

<400> 25

atgagtaaca agaacaacga tgagctacag cggcaggcct cggaaaacac cctggggctg 60

aacccggtca tcggcatccg ccgcaaggac ctgttgagct cggcacgcac cgtgctgcgc 120

caggccgtgc gccaaccgct gcacagcgcc aagcatgtgg ctcactttgg cctggagctg 180

aagaacgtgt tgctgggcaa atccagcctg gccccggaca gcgacgaccg tcgcttcaat 240

gacccggcct ggagcaacaa cccgctgtac cgccgctacc tgcaaaccta cctggcctgg 300

cgcaaggagc tgcaggactg ggtgagcagc agcgacctgt ccccccagga catcagccgc 360

ggccagttcg tcatcaacct gatgaccgag gccatggcgc cgaccaatac cctgtccaac 420

ccggctgcgg tcaaacgctt cttcgaaacc ggcggcaaga gcctgctcga tggcctgtcc 480

aacctggcca aggacatggt caacaacggc ggcatgccca gccaggtgaa catggatgcc 540

ttcgaagtgg gcaagaacct gggcaccagc gaaggcgcgg tggtgtaccg caacgatgtg 600

ctggaactga tccagtacag ccccatcacc gagcaggtgc atgcccgtcc gctgctggtg 660

gtgccaccgc agatcaacaa gttctacgtg ttcgacctca gcccggaaaa gagcctggcg 720

cgcttctgcc tgcgctcgca gcagcagacc ttcatcatca gctggcgcaa cccgaccaag 780

gcccagcgtg aatggggcct gtccacctac atcgatgcgc tgaaagaagc cgtcgacgcg 840

gtgctgtcga ttaccggcag caaggacctg aacatgctcg gcgcctgctc cggtggcatc 900

acttgtaccg cactggtggg ccactatgcc gccattggcg agaacaaggt caacgccctg 960

accctgctgg tcagcgtgct ggacaccacc atggacaacc aggttgcttt gtttgtcgac 1020

gagcagacct tggaggccgc caagcgccac tcctatcagg cgggcgtgct ggaaggcagc 1080

gaaatggcca aggtgttcgc ctggatgcgc cccaacgacc tgatctggaa ctactgggta 1140

aacaactacc tgctcggcaa tgagcccccc gtgttcgaca tcctgttctg gaacaacgac 1200

accacgcgcc tgccggccgc cttccacggc gacctgatcg aaatgttcaa gagcaacccg 1260

ctgacccgcc ccgacgccct ggaagtgtgc ggcaccgcga tcgacctgaa acaggtcaaa 1320

tgcgacatct acagcctcgc cggcaccaac gaccacatca ccccctggcc gtcatgctac 1380

cgctcggcac atctgttcgg cggcaagatc gaattcgtac tgtccaacag cgggcatatc 1440

cagagcatcc tcaacccgcc gggcaacccg aaggcacgtt tcatgaccgg tgccgatcgc 1500

ccgggtgacc cggtggcctg gcaggaaaat gccatcaagc atgcagactc ctggtggttg 1560

cactggcaga gttggctggg cgagcgtgcc ggcgcgctga aaaaggcacc gacccgcctg 1620

ggcaaccgta cctatgccgc cggcgaagcc tccccaggca cctacgttca cgagcgttga 1680

1680

<210> 26

<211> 559

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pseudomonas putida-phaC1-peptide

<400> 26

Met Ser Asn Lys Asn Asn Asp Glu Leu Gln Arg Gln Ala Ser Glu Asn

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Ser Ala Arg Thr Val Leu Arg Gln Ala Val Arg Gln Pro Leu His

35 40 45

Ser Ala Lys His Val Ala His Phe Gly Leu Glu Leu Lys Asn Val Leu

50 55 60

Leu Gly Lys Ser Ser Leu Ala Pro Asp Ser Asp Asp Arg Arg Phe Asn

65 70 75 80

Asp Pro Ala Trp Ser Asn Asn Pro Leu Tyr Arg Arg Tyr Leu Gln Thr

85 90 95

Tyr Leu Ala Trp Arg Lys Glu Leu Gln Asp Trp Val Ser Ser Ser Asp

100 105 110

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

115 120 125

Thr Glu Ala Met Ala Pro Thr Asn Thr Leu Ser Asn Pro Ala Ala Val

130 135 140

Lys Arg Phe Phe Glu Thr Gly Gly Lys Ser Leu Leu Asp Gly Leu Ser

145 150 155 160

Asn Leu Ala Lys Asp Met Val Asn Asn Gly Gly Met Pro Ser Gln Val

165 170 175

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

180 185 190

Ala Val Val Tyr Arg Asn Asp Val Leu Glu Leu Ile Gln Tyr Ser Pro

195 200 205

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

210 215 220

Ile Asn Lys Phe Tyr Val Phe Asp Leu Ser Pro Glu Lys Ser Leu Ala

225 230 235 240

Arg Phe Cys Leu Arg Ser Gln Gln Gln Thr Phe Ile Ile Ser Trp Arg

245 250 255

Asn Pro Thr Lys Ala Gln Arg Glu Trp Gly Leu Ser Thr Tyr Ile Asp

260 265 270

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

275 280 285

Asp Leu Asn Met Leu Gly Ala Cys Ser Gly Gly Ile Thr Cys Thr Ala

290 295 300

Leu Val Gly His Tyr Ala Ala Ile Gly Glu Asn Lys Val Asn Ala Leu

305 310 315 320

Thr Leu Leu Val Ser Val Leu Asp Thr Thr Met Asp Asn Gln Val Ala

325 330 335

Leu Phe Val Asp Glu Gln Thr Leu Glu Ala Ala Lys Arg His Ser Tyr

340 345 350

Gln Ala Gly Val Leu Glu Gly Ser Glu Met Ala Lys Val Phe Ala Trp

355 360 365

Met Arg Pro Asn Asp Leu Ile Trp Asn Tyr Trp Val Asn Asn Tyr Leu

370 375 380

Leu Gly Asn Glu Pro Pro Val Phe Asp Ile Leu Phe Trp Asn Asn Asp

385 390 395 400

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

405 410 415

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

485 490 495
Gly Ala Asp Arg Pro Gly Asp Pro Val Ala Trp Gln Glu Asn Ala Ile
500 505 510
Lys His Ala Asp Ser Trp Trp Leu His Trp Gln Ser Trp Leu Gly Glu
515 520 525
Arg Ala Gly Ala Leu Lys Lys Ala Pro Thr Arg Leu Gly Asn Arg Thr
530 535 540
Tyr Ala Ala Gly Glu Ala Ser Pro Gly Thr Tyr Val His Glu Arg
545 550 555

<210> 27
<211> 852
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Pseudomonas putida-phaZ-gene
<400> 27
atgccgcaac cctatatttt caggaccgtc gagctggaca accagtccat ccgcaccgct 60
gttcgccccg gcaagccgca cctgacgccg ttgctgatct ttaacggcat cggcgccaac 120
ctcgagctgg tgttcccgtt catcgatgca cttgacccgg acctggaagt catcgccttt 180
gatgtgcccg gggtcggcgg ctcgtctacg ccacgcaacc cgtaccgctt ccctgggctg 240
gccaagctga ccgcgcggat gctcgactac ctcgactacg gccaggtcaa cgtcatcggc 300

gtgtcctggg gcggcgccct ggcccagcag tttgctcacg attaccccga gcgctgcaag 360
aagctggtgc tggccgccac cgctgccggt gcggtaatgg tgccaggcaa gcccaaggtg 420
ctgtggatga tggccagccc ccggcgttac gtgcagccat cgcatgtcat ccgcattgcg 480

ccgatgatct atggcggcgg cttccgacgt gaccccgacc tggccatgca ccatgccgcc 540

aaggtgcgct ccggcggcaa gctgggctac tactggcagc tgttcgcagg gctcggctgg 600

accagcatcc actggctgca caagatccgg cagcccaccc tggtactggc tggcgacgac 660

gacccgttga tcccgctgat caacatgcgc ctgctggcct ggcggattcc caatgcccag 720

ctacacatta tcgacgacgg ccatctgttc ctgatcaccc gtgccgaagc cgtcgccccg 780

atcatcatga agttcctgca ggaagaacgt cagcgtgcgg tcatgcatcc ccgtccggcc 840

tcgggggggt ga 852

<210> 28

<211> 283

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pseudomonas putida-phaZ-peptide

<400> 28

Met Pro Gln Pro Tyr Ile Phe Arg Thr Val Glu Leu Asp Asn Gln Ser
1 5 10 15

Ile Arg Thr Ala Val Arg Pro Gly Lys Pro His Leu Thr Pro Leu Leu
20 25 30

Ile Phe Asn Gly Ile Gly Ala Asn Leu Glu Leu Val Phe Pro Phe Ile
35 40 45

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

Val Gly Gly Ser Ser Thr Pro Arg Asn Pro Tyr Arg Phe Pro Gly Leu
65 70 75 80

Ala Lys Leu Thr Ala Arg Met Leu Asp Tyr Leu Asp Tyr Gly Gln Val
85 90 95

Asn Val Ile Gly Val Ser Trp Gly Gly Ala Leu Ala Gln Gln Phe Ala
100 105 110

His Asp Tyr Pro Glu Arg Cys Lys Lys Leu Val Leu Ala Ala Thr Ala
115 120 125

Ala Gly Ala Val Met Val Pro Gly Lys Pro Lys Val Leu Trp Met Met
130 135 140

Ala Ser Pro Arg Arg Tyr Val Gln Pro Ser His Val Ile Arg Ile Ala

145 150 155 160

Pro Met Ile Tyr Gly Gly Gly Phe Arg Arg Asp Pro Asp Leu Ala Met

165 170 175

His His Ala Ala Lys Val Arg Ser Gly Gly Lys Leu Gly Tyr Tyr Trp

180 185 190

Gln Leu Phe Ala Gly Leu Gly Trp Thr Ser Ile His Trp Leu His Lys

195 200 205

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

210 215 220

Pro Leu Ile Asn Met Arg Leu Leu Ala Trp Arg Ile Pro Asn Ala Gln

225 230 235 240

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

245 250 255

Ala Val Ala Pro Ile Ile Met Lys Phe Leu Gln Glu Glu Arg Gln Arg

260 265 270

Ala Val Met His Pro Arg Pro Ala Ser Gly Gly

275 280

<210> 29

<211> 1683

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pseudomonas putida-phaC2-gene

<400> 29

atgacagaca aaccggccaa aggatcgaca acgctccccg ccacccgcat gaacgtgcag 60

aacgccatcc tcggcctgcg cggccgcgac ctgctttcca cgctgcgcaa cgtcggccgc 120

cacggcctgc gccacccgct gcataccgcg catcatctgc tggcgcttgg cgggcagttg 180

gggcgggtga tgctggggga cacgccctac cagccgaacc cgcgtgacgc acgcttcagt 240

gacccgacct ggagccagaa cccgttctac cgccgcggcc tgcaagccta tctggcctgg 300

cagaagcaga cacgccagtg gatcgatgaa agccatttga acgacgatga tcgagcccgc 360

gcccacttcc tgttcaacct gatcaacgat gcgctggcgc ccagcaactc actgctcaat 420

ccgttggcgg tcaaggagct gttcaacacc ggcggccaga gcctggtgcg cggcgtggct 480

cacctgctcg acgacctgcg tcacaacgat gggctgcctc gtcaggtgga cgagcgcgcc 540

ttcgaagtgg gcgttaacct ggccgcaacc cctggcgcag tggtatttcg caacgagctg 600

ctggagctga tccagtactc gccgatgagc gaaaagcagc acgcacgccc actgctggtc 660

gtgccgcctc agatcaacaa gttctacatc ttcgacctca gcgcgaccaa cagcttcgtc 720

cagtacatgc tcaaaagcgg cttgcaggtg ttcatggtca gctggcgcaa ccccgaccca 780

cgccaccgtg aatggggcct ttccagctat gtgcaagccc tggaggaagc gctcaatgcc 840

tgccgcagta tcagcggcaa ccgcgacccc aacctgatgg gtgcctgtgc cggcggcctg 900

accatggccg cactgcaagg ccatctgcaa gccaagaagc aattgcgccg ggtgcgcagt 960

gccacgtatc tggtcagctt gctggacagc aagttcgaaa gcccggccag cctgttcgcc 1020

gatgagcaga ccatcgaagc ggccaagcga cgctcctatc agcgtggcgt gctggacggt 1080

ggtgaagtgg cgcggatctt cgcctggatg cggcccaacg acctgatctg gaactactgg 1140

gtaaacaact acctgctcgg caagacaccg ccggcgttcg acatcctgta ctggaatgcc 1200

gacagcacgc gcctgcccgc cgcgctgcat ggcgacctgc tggagttttt caagctcaac 1260

cccttgacct acgcgtccgg gctggaggtg tgcggtacgc cgatcgacct gcagcaggtc 1320

aatatcgaca gctttaccgt ggccggcagc aacgaccaca tcacaccatg ggatgcggtg 1380

taccgctcgg ccttgctgct gggtggcgag cggcgcttcg tgctggccaa cagcgggcat 1440

atccagagca tcatcaaccc gccaggcaac cccaaggcct actacctggc caaccccaag 1500

ctgagcagcg acccacgcgc ctggttccac gacgccaagc gcagtgaagg cagctggtgg 1560

ccgttgtggc tggagtggat caccgcacgc tccggcctgc tcaaggcacc gcgtactgaa 1620

ctgggcaacg ccacttaccc accgctaggc cccgcgccag gcacctacgt gctgacccga 1680

tga 1683

<210> 30

<211> 560

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pseudomonas putida-phaC2-peptide

<400> 30

Met Thr Asp Lys Pro Ala Lys Gly Ser Thr Thr Leu Pro Ala Thr Arg

1 5 10 15

Met Asn Val Gln Asn Ala Ile Leu Gly Leu Arg Gly Arg Asp Leu Leu

20 25 30

Ser Thr Leu Arg Asn Val Gly Arg His Gly Leu Arg His Pro Leu His

35 40 45

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

50 55 60

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

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

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

Ala Leu Glu Glu Ala Leu Asn Ala Cys Arg Ser Ile Ser Gly Asn Arg
275 280 285

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

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

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

485 490 495
Ala Asn Pro Lys Leu Ser Ser Asp Pro Arg Ala Trp Phe His Asp Ala
500 505 510
Lys Arg Ser Glu Gly Ser Trp Trp Pro Leu Trp Leu Glu Trp Ile Thr
515 520 525
Ala Arg Ser Gly Leu Leu Lys Ala Pro Arg Thr Glu Leu Gly Asn Ala
530 535 540

Thr Tyr Pro Pro Leu Gly Pro Ala Pro Gly Thr Tyr Val Leu Thr Arg
545 550 555 560

<210> 31
<211> 870
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Pseudomonas putida-tesB-gene
<400> 31

atgagtcatg tgttggacga cctggtcgac ctgttgagcc tcgaatccat cgaggagaac 60
ctgttccgtg gacgtagcca ggacctgggc ttccgccagc tttacggtgg ccaagtgctg 120
ggccagtcgt tgtcggccgc cagtcagaca gtcgaggacg cgcgccatgt gcattcgttg 180
cacggctact tcctgcgccc gggcgatgcc agccttccag tggtgtactc ggtagaccgc 240
gtgcgcgatg gcggcagctt cagtacacgg cgggtgacgg cgatccagaa gggccagacc 300

atcttcacct gcagcgcgtc gttccagtac gacgaggaag gcttcgagca ccaggcgcag 360
atgcctgacg tggtcggccc ggaaaacctg cctaccgaag tcgaactggc ccatgccatg 420
gccgaccagt tgcccgagcg catccgcgac aaggtgctgt gcgccaagcc gatcgagatc 480
cgcccggtca ccgagcgcga cccgttcaac cccaagccgg gcgacccggt gaagtacgcc 540
tggttccgcg ccgacggcaa cctgcctgac gtgcctgccc tgcacaagta catgctggcc 600
tacgcctcgg acttcggcct gctgaccacg gcgttgctgc cccatggcaa atcggtgtgg 660
cagcgcgaca tgcagatcgc cagcctcgac cattcgctgt ggtttcacgg caacctgcgc 720

gccgaccagt ggctactgta cgccaccgat agcccctggg ccggcaattc ccgtggcttc 780
tgccgcggca gcattttcaa ccaggccggg caactggtgg catcgtcgag ccaggaaggc 840
ctgattcgcc atcgcaagga ctgggcatga 870
<210> 32
<211> 289
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Pseudomonas putida-tesB-peptide
<400> 32

Met Ser His Val Leu Asp Asp Leu Val Asp Leu Leu Ser Leu Glu Ser
1 5 10 15

Ile Glu Glu Asn Leu Phe Arg Gly Arg Ser Gln Asp Leu Gly Phe Arg

20 25 30

Gln Leu Tyr Gly Gly Gln Val Leu Gly Gln Ser Leu Ser Ala Ala Ser

35 40 45

Gln Thr Val Glu Asp Ala Arg His Val His Ser Leu His Gly Tyr Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

Val Arg Asp Gly Gly Ser Phe Ser Thr Arg Arg Val Thr Ala Ile Gln

85 90 95

Lys Gly Gln Thr Ile Phe Thr Cys Ser Ala Ser Phe Gln Tyr Asp Glu

100 105 110

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

115 120 125

Asn Leu Pro Thr Glu Val Glu Leu Ala His Ala Met Ala Asp Gln Leu

130 135 140

Pro Glu Arg Ile Arg Asp Lys Val Leu Cys Ala Lys Pro Ile Glu Ile

145 150 155 160

Arg Pro Val Thr Glu Arg Asp Pro Phe Asn Pro Lys Pro Gly Asp Pro

165 170 175

Val Lys Tyr Ala Trp Phe Arg Ala Asp Gly Asn Leu Pro Asp Val Pro

180 185 190

Ala Leu His Lys Tyr Met Leu Ala Tyr Ala Ser Asp Phe Gly Leu Leu

195 200 205

Thr Thr Ala Leu Leu Pro His Gly Lys Ser Val Trp Gln Arg Asp Met

210 215 220

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

225 230 235 240

Ala Asp Gln Trp Leu Leu Tyr Ala Thr Asp Ser Pro Trp Ala Gly Asn

245 250 255

Ser Arg Gly Phe Cys Arg Gly Ser Ile Phe Asn Gln Ala Gly Gln Leu

260 265 270

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

275 280 285

Ala

<210> 33

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> lvaA_upstream_fwd

<400> 33

gaggcccttt cgtcttcacc tcgagatggt tgtagctgag cacg 44

<210> 34

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> lvaA_upstream_rev

<400> 34

actgctgcat ggttctgtag gccctgcc 28

<210> 35

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> lvaB_downstream_fwd

<400> 35

cctgcaatga aaccgcatcg accacccc 28

<210> 36

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> lvaB_downstream_rev

<400> 36

cgcaaaagaa aatgccgatt ctagacatgg cgaagcacga acg 43

<210> 37

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> phaC1_up_fwd

<400> 37

gaggcccttt cgtcttcacc tcgaggaaca actgtgggca g 41

<210> 38

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> phaC1_up_rev

<400> 38

cagcacgtag cccagggtgt tttccgag 28

<210> 39

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> phaC2_down_fwd

<400> 39

acaccctggg ctacgtgctg acccgatg 28

<210> 40

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> phaC2_down_rev

<400> 40

cgcaaaagaa aatgccgatt ctagagcgtg cgtttgattg cattg 45

<210> 41

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> fadB_up_fwd

<400> 41

gaggcccttt cgtcttcacc tcgagtgtag tcgccttggc tc 42

<210> 42

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> fadB_up_rev

<400> 42

catttcacgc tgttgacgga ctcacccttg 30

<210> 43

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> fadB_down_fwd

<400> 43

tccgtcaaca gcgtgaaatg gccaagaac 29

<210> 44

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> fadB_down_rev

<400> 44

cgcaaaagaa aatgccgatt ctagatctgc agtcaggccc atc 43

<210> 45

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> phaC_P.d._fwd

<400> 45

ctttataagg aggaaaaaca tatggccgcg ccccgcgcc 39

<210> 46

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> phaC_P.d._rev

<400> 46

agtccaagct cagctaatta agcttttacg cccgctcgtg gacgtaaagg ccc 53

<210> 47

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> phaC_C.v._fwd

<400> 47

ctttataagg aggaaaaaca tatgcagcag ttcgtcaact cg 42

<210> 48

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> phaC_C.v._rev

<400> 48

agtccaagct cagctaatta agctttcatt gcaggctggc ggc 43

<210> 49

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> phaC_C.n_fwd

<400> 49

ctttataagg aggaaaaaca tatggcgacc ggcaaaggc 39

<210> 50

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> phaC_C.n_rev

<400> 50

agtccaagct cagctaatta agctcatgcc ttggctttga cgtatcg 47

<210> 51

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> phaE_T.p._fwd

<400> 51

ctttataagg aggaaaaaca tatgaacgat acggccaaca ag 42

<210> 52

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> phaE_T.p._rev

<400> 52

atggggacat ggcactctct cctggtgg 28

<210> 53

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> phaC_T.p._fwd

<400> 53

agagagtgcc atgtccccat tcccgatc 28

<210> 54

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> phaC_T.p._rev

<400> 54

caagctcagc taattaagct ttcagccgcg ttcgttcag 39

<210> 55

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> phaA_C.n_fwd

<400> 55

caaggcatga attgaaagga ctacacaatg ac 32

<210> 56

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> phaA_C.n_rev

<400> 56

agtccaagct cagctaatta agcttatttg cgctcgactg c 41

<210> 57

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> phaB_C.n_fwd

<400> 57

ctttataagg aggaaaaaca tatgactcag cgcattgcg 39

<210> 58

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> phaB_C.n_rev_RBS

<400> 58

ttgtctctct tcagcccata tgcaggcc 28

<210> 59

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> phaC_C.n_fwd_RBS

<400> 59

tatgggctga agagagacaa tcaaatcatg g 31

<210> 60

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> phaC_C.n_rev_RBS

<400> 60

tcctttcaat tcatgccttg gctttgac 28

<210> 61

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> phaB_rev_phaBA

<400> 61

tcctttcaat tcagcccata tgcaggcc 28

<210> 62

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> phaA_fwd_phaBA

<400> 62

tatgggctga attgaaagga ctacacaatg ac 32

<210> 63

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> phaC1_fwd

<400> 63

aggtgagagt ggaggaggtc catttatgcg agacaagtcg aac 43

<210> 64

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> phaC1_rev

<400> 64

agtccaagct cagctaatta agctttcagc ggatatgcac gtag 44

<210> 65

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> phaC2_fwd

<400> 65

ctttataagg aggaaaaaca tatgagtgac aagaacaacg aag 43

<210> 66

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> phaC2_rev

<400> 66

aaatggacct cctccactct caccttcagc gttcgtgcac atag 44