



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0047437
(43) 공개일자 2020년05월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 7/62 (2006.01) C12N 15/52 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12P 7/62 (2013.01)
C12N 15/52 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0134943
(22) 출원일자 2019년10월28일
심사청구일자 2019년10월28일
(30) 우선권주장
1020180129090 2018년10월26일 대한민국(KR)

(71) 출원인
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
경북대학교 산학협력단
대구광역시 북구 대학로 80 (산격동, 경북대학교)
(72) 발명자
김선원
세종특별자치시 고운북3길 17(고운동)
마크자다
경상남도 진주시 내동면 내동로219번길 41-16
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인리체

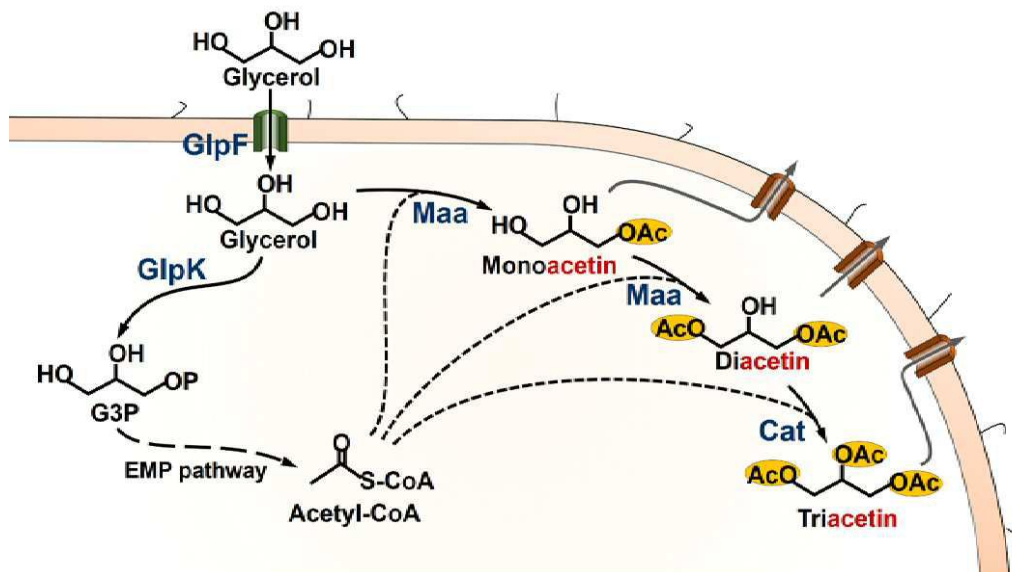
전체 청구항 수 : 총 28 항

(54) 발명의 명칭 아세틴 화합물의 생물학적 제조 방법

(57) 요약

본 발명은 0-아세틸 전이효소를 이용해서 글리세롤에 아세틸기를 전이시켜서 모노아세틴, 다이아세틴, 트리아세틴을 생물학적으로 제조하는 방법에 관한 것으로서, 지속가능하고 환경오염을 유발하지 않으며 안전하고 더 좋은 품질의 아세틴을 얻을 수 있는 제조 방법 및 제조용 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 9/1029 (2013.01)

C12Y 101/01008 (2013.01)

C12Y 203/01028 (2013.01)

C12Y 203/01079 (2013.01)

C12Y 301/01006 (2013.01)

C12Y 301/03021 (2013.01)

(72) 발명자

김경진

대구광역시 수성구 동대구로 345, 2908호(범어동,
범어역우방유헤)

정성희

경상남도 김해시 상동면 여차로699번길 11-1

명세서

청구범위

청구항 1

제1 0-아세틸 전이효소(0-acetyl transferase) 존재 하에 아세틸-CoA와 글리세롤을 반응시켜 모노아세틴 또는 디아아세틴을 얻는 단계;를 포함하는 아세틴의 제조 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 제1 0-아세틸 전이효소는 말토오스 0-아세틸 전이효소인, 아세틴의 제조 방법.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 제1 0-아세틸 전이효소는 서열번호 5의 아미노산 서열의 위치 70에 상응하는 위치의 아미노산이 아스파르트산(ASP)이고, 위치 84에 상응하는 위치의 아미노산이 아스파라긴(ASN)이고, 위치 114에 상응하는 위치의 아미노산이 히스티딘(HIS)이고, 위치 126에 상응하는 위치의 아미노산이 글루탐산(GLU)인, 아세틴의 제조 방법.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 상기 제1 0-아세틸 전이효소는 서열번호 5의 아미노산 서열의 위치 15에 상응하는 위치의 아미노산이 티로신(TYR) 또는 페닐알라닌(PHE)이고, 위치 26에 상응하는 위치의 아미노산이 아르기닌(ARG) 또는 글루타민(GLN)이고, 위치 30에 상응하는 위치의 아미노산이 아르기닌(ARG) 또는 리신(LYS)이고, 위치 71에 상응하는 위치의 아미노산이 티로신(TYR)이고, 위치 82에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 티로신(TYR)인 아세틴의 제조 방법.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 제1 0-아세틸 전이효소는 서열번호 1 내지 6 중 어느 하나의 서열로 이루어진 것인, 아세틴의 제조 방법.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 클로람페니콜-0-아세틸 전이효소(Chloramphenicol-0-acetyltransferase) 또는 제2 0-아세틸 전이효소 존재 하에 상기 반응 생성물인 디아아세틴을 아세틸-CoA와 반응시켜 트리아세틴을 얻는 단계;를 더 포함하는, 아세틴의 제조 방법.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 제2 0-아세틸 전이효소는 서열번호 7의 아미노산 서열의 위치 31에 상응하는 위치의 아미노산이 시스테인(CYS) 또는 류신(LEU)이고, 위치 102에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 이소류신(ILE)이고, 위치 143에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 타이로신(TYR)이고, 위치 166에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 타이로신(TYR)이고, 위치 170에 상응하는 위치의 아미노산이 발린(VAL), 이소류신(ILE), 또는 류신(LEU)이고, 위치 193에 상응하는 위치의 아미노산이 히스티딘(HI

S)인, 아세틴의 제조 방법.

청구항 8

청구항 6에 있어서, 상기 클로람페니콜-0-아세틸 전이효소(Chloramphenicol-0-acetyltransferase)는 서열번호 7의 서열로 이루어지고, 제2 0-아세틸 전이효소는 서열번호 8 내지 10 중 어느 하나의 서열로 이루어진 것인, 아세틴의 제조 방법.

청구항 9

제1 0-아세틸 전이효소(0-acetyl transferase)를 코딩하는 유전자를 발현하는 미생물을 글리세롤을 포함하는 배지 중에서 배양하는 단계;를 포함하는 아세틴의 제조 방법.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 제1 0-아세틸 전이효소는 말토오스 0-아세틸 전이효소인, 아세틴의 제조 방법.

청구항 11

청구항 9에 있어서, 상기 제1 0-아세틸 전이효소는 서열번호 5의 아미노산 서열의 위치 70에 상응하는 위치의 아미노산이 아스파르트산(ASP)이고, 위치 84에 상응하는 위치의 아미노산이 아스파라긴(ASN)이고, 위치 114에 상응하는 위치의 아미노산이 히스티딘(HIS)이고, 위치 126에 상응하는 위치의 아미노산이 글루탐산(GLU)인, 아세틴의 제조 방법.

청구항 12

청구항 9에 있어서, 상기 제1 0-아세틸 전이효소는 서열번호 5의 아미노산 서열의 위치 15에 상응하는 위치의 아미노산이 티로신(TYR) 또는 페닐알라닌(PHE)이고, 위치 26에 상응하는 위치의 아미노산이 아르기닌(ARG) 또는 글루타민(GLN)이고, 위치 30에 상응하는 위치의 아미노산이 아르기닌(ARG) 또는 리신(LYS)이고, 위치 71에 상응하는 위치의 아미노산이 티로신(TYR)이고, 위치 82에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 티로신(TYR)인, 아세틴의 제조 방법.

청구항 13

청구항 9에 있어서, 상기 제1 0-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자는 서열번호 16 내지 21의 서열 중 어느 하나의 서열로 이루어진 것인, 아세틴의 제조 방법.

청구항 14

청구항 9에 있어서, 상기 미생물은 다이아세틴에 아세틸기를 전이하는 클로람페니콜-0-아세틸 전이효소(Chloramphenicol-0-acetyltransferase) 또는 제2 0-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자를 더 발현하는 것인, 아세틴의 제조 방법.

청구항 15

청구항 14에 있어서, 상기 제2 0-아세틸 전이효소는 서열번호 7의 아미노산 서열의 위치 31에 상응하는 위치의 아미노산이 시스테인(CYS) 또는 류신(LEU)이고, 위치 102에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 이소류신(ILE)이고, 위치 143에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 타이로신(TYR)이고, 위치 166에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 타이로신(TYR)이고, 위치 170에 상응하는 위치의 아미

노산이 발린(VAL), 이소류신(ILE), 또는 류신(LEU)이고, 위치 193에 상응하는 위치의 아미노산이 히스티딘(HIS)인, 아세틴의 제조 방법.

청구항 16

청구항 14에 있어서, 상기 클로람페니콜-0-아세틸 전이효소(Chloramphenicol-0-acetyltransferase)를 코딩하는 유전자는 서열번호 24의 서열로 이루어지고, 제2 0-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자는 서열번호 25 내지 27 중 어느 하나의 서열로 이루어진 것인, 아세틴의 제조 방법.

청구항 17

청구항 9에 있어서, 상기 미생물은 아세틸에스테라제(acetyl esterase)를 코딩하는 유전자가 감쇄 또는 결실된 것인, 아세틴의 제조 방법.

청구항 18

청구항 9에 있어서, 상기 미생물은 글리세롤 3-인산 탈수소효소(glycerol-3-phosphate dehydrogenase) 및 글리세롤 3-탈인산효소(DL-glycerol-3-phosphatase)를 코딩하는 유전자를 더 발현하고, 상기 배지는 포도당을 포함하는 것인, 아세틴의 제조 방법.

청구항 19

제1 0-아세틸 전이효소(0-acetyl transferase)를 코딩하는 유전자를 발현하는 미생물을 포함하는 아세틴 제조용 조성물.

청구항 20

청구항 19에 있어서, 상기 제1 0-아세틸 전이효소는 말토오스 0-아세틸 전이효소인, 아세틴 제조용 조성물.

청구항 21

청구항 19에 있어서, 상기 제1 0-아세틸 전이효소는 서열번호 5의 아미노산 서열의 위치 70에 상응하는 위치의 아미노산이 아스파르트산(ASP)이고, 위치 84에 상응하는 위치의 아미노산이 아스파라긴(ASN)이고, 위치 114에 상응하는 위치의 아미노산이 히스티딘(HIS)이고, 위치 126에 상응하는 위치의 아미노산이 글루탐산(GLU)인, 아세틴 제조용 조성물.

청구항 22

청구항 19에 있어서, 상기 제1 0-아세틸 전이효소는 서열번호 5의 아미노산 서열의 위치 15에 상응하는 위치의 아미노산이 티로신(TYR) 또는 페닐알라닌(PHE)이고, 위치 26에 상응하는 위치의 아미노산이 아르기닌(ARG) 또는 글루타민(GLN)이고, 위치 30에 상응하는 위치의 아미노산이 아르기닌(ARG) 또는 리신(LYS)이고, 위치 71에 상응하는 위치의 아미노산이 티로신(TYR)이고, 위치 82에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 티로신(TYR)인, 아세틴 제조용 조성물.

청구항 23

청구항 19에 있어서, 상기 제1 0-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자는 서열번호 16 내지 21 중 어느 하나의 서열로 이루어진 것인, 아세틴 제조용 조성물.

청구항 24

청구항 17에 있어서, 상기 미생물은 다이아세틴에 아세틸기를 전이하는 클로람페니콜-0-아세틸 전이효소(Chloramphenicol-0-acetyltransferase) 또는 제2 0-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자를 더 발현하는 것인, 아세틴 제조용 조성물.

청구항 25

청구항 24에 있어서, 상기 제2 0-아세틸 전이효소는 서열번호 7의 아미노산 서열의 위치 31에 상응하는 위치의 아미노산이 시스테인(CYS) 또는 류신(LEU)이고, 위치 102에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 이소류신(ILE)이고, 위치 143에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 타이로신(TYR)이고, 위치 166에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 타이로신(TYR)이고, 위치 170에 상응하는 위치의 아미노산이 발린(VAL), 이소류신(ILE), 또는 류신(LEU)이고, 위치 193에 상응하는 위치의 아미노산이 히스티딘(HIS)인, 아세틴 제조용 조성물.

청구항 26

청구항 24에 있어서, 상기 클로람페니콜-0-아세틸 전이효소(Chloramphenicol-0-acetyltransferase)를 코딩하는 유전자는 서열번호 24의 서열로 이루어지고, 제2 0-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자는 서열번호 25 내지 27 중 어느 하나의 서열로 이루어진 것인, 아세틴 제조용 조성물.

청구항 27

청구항 19에 있어서, 상기 미생물은 아세틸에스테라제(acetyl esterase)를 코딩하는 유전자가 감쇄 또는 결실된 것인, 아세틴 제조용 조성물.

청구항 28

청구항 19에 있어서, 상기 미생물은 글리세롤 3-인산 탈수소효소(glycerol-3-phosphate dehydrogenase) 및 글리세롤 3-탈인산효소(DL-glycerol-3-phosphatase)를 코딩하는 유전자를 더 발현하는 것인, 아세틴 제조용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 아세틴 화합물의 제조 방법 및 아세틴 제조용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 아세틴(acetins)은 글리세롤(glycerol)의 수산기(-OH)에 초산기(acetyl group)가 에스터(ester) 결합을 하고 있는 물질로, 결합된 초산기의 수에 따라서 1 개가 붙은 모노아세틴(monoacetin), 2 개가 붙은 다이아세틴(diacetin), 3 개가 붙은 트리아세틴(triacetin)으로 구분한다. 트리아세틴은 글리세린 트리아세테이트(glycerin triacetate) 또는 트리글리세라이드 1,2,3-트리아세톡시프로페인(triglyceride 1,2,3-triacetoxyp propane)으로도 알려져 있다.

- [0004] 아세틴은 향료 용매와 습윤제 등의 식품첨가물로 사용되고, 제약산업에서 보습제, 가소제 및 용제로 사용된다. 트리아세틴은 또한 가솔린의 엔진 노킹(engine knocking)을 줄이는 항노크제(antiknock agent)와 바이오디젤의 저온 및 점도 특성을 개선 할 수 있는 연료 첨가제로 사용될 수 있다. 바이오디젤 생산공정에서 다량의 부산물로 발생하는 폐글리세롤을 이용해서 바이오디젤의 연료첨가제로 활용될 수 있는 아세틴을 만드는 것은 최근 바이오리파이너리 산업분야에서 화두가 되고 있는 폐기물 또는 부산물의 발생을 줄이거나 재활용을 하는 제로-웨이스트(Zero-Wastes)의 개념을 실현할 수 있는 기술을 제공하는 것이다. 5 대 담배 회사가 발표 한 1994년 보고서에서 따르면 트리아세틴은 담배 제조 첨가물의 하나로 담배필터 제조 공정의 가소제로도 사용된다. 또한 긴 우주비행 임무를 수행하는 우주비행사들의 인공 우주식품에서 비행사들에게 필요한 에너지의 절반 이상을 공급하는 중요한 재료로 활용되고 있다. 미국 식품의약국(FDA)은 매우 안전한 식품첨가물(Generally Recognized as Safe: GRAS)로 인정하고 있다.
- [0005] 한편, 아세틴 물질은 점성을 갖는 무색, 무취의 액체이다. 기존의 아세틴 물질은 글리세롤에 초산 또는 무수초산을 화학반응을 통해 결합시킨 인공 화학 합성 물질이다.
- [0006] 기존에 생물학적으로 아세틴을 제조하는 방식이 없었으나, 생물학적인 방법을 통해서 아세틴 물질을 생산함으로써 지속가능하고 환경오염을 유발하지 않으며 안전하고 더 좋은 품질의 아세틴 물질의 생산 방법에 대한 요구가 꾸준히 있었다.
- [0007] 본 발명자들은 아세틴 화합물들은 글리세롤 또는 글리세롤의 유도체들에 초산기를 에스테르화 반응을 통해서 결합시키는 효소들에 의해서 생물학적인 방식으로 제조될 수 있다는 것을 밝혀냈고, 자연계에 글리세롤을 탄소원으로 이용하는 장내세균(엔테로박테리아속, Enterobacteriaceae)의 일부에서 미량의 모노아세틴이 생성되는 것 또한 밝혀내었다.
- [0008] 이에 따라 본 발명자들은 글리세롤 또는 포도당을 출발기질로 해서 모노아세틴, 다이아세틴, 트리아세틴을 생산할 수 있는 재조합 미생물을 만들어서, 본 발명을 완성하기에 이르렀다(도 1, 도 2).

선행기술문헌

특허문헌

- [0010] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제0275593호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명은 아세틴 화합물의 생물학적 제조 방법 및 아세틴 화합물의 제조용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0013] 1. 제1 0-아세틸 전이효소(0-acetyl transferase) 존재 하에 아세틸-CoA와 글리세롤을 반응시켜 모노아세틴 또는 다이아세틴을 얻는 단계;를 포함하는 아세틴의 제조 방법.
- [0014] 2. 위 1에 있어서, 상기 제1 0-아세틸 전이효소는 말토오스 0-아세틸 전이효소인, 아세틴의 제조 방법.
- [0015] 3. 위 1에 있어서, 상기 제1 0-아세틸 전이효소는 서열번호 5의 아미노산 서열의 위치 70에 상응하는 위치의 아미노산이 아스파르트산(ASP)이고, 위치 84에 상응하는 위치의 아미노산이 아스파라긴(ASN)이고, 위치 114에 상응하는 위치의 아미노산이 히스티딘(HIS)이고, 위치 126에 상응하는 위치의 아미노산이 글루탐산(GLU)인, 아세틴의 제조 방법.
- [0016] 4. 위 3에 있어서, 상기 제1 0-아세틸 전이효소는 서열번호 5의 아미노산 서열의 위치 15에 상응하는 위치의 아미노산이 티로신(TYR) 또는 페닐알라닌(PHE)이고, 위치 26에 상응하는 위치의 아미노산이 아르기닌(ARG) 또는

글루타민(GLN)이고, 위치 30에 상응하는 위치의 아미노산이 아르기닌(ARG) 또는 리신(LYS)이고, 위치 71에 상응하는 위치의 아미노산이 티로신(TYR)이고, 위치 82에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 티로신(TYR)인 아세틴의 제조 방법.

- [0017] 5. 위 1에 있어서, 상기 제1 0-아세틸 전이효소는 서열번호 1 내지 6 중 어느 하나의 서열로 이루어진 것인, 아세틴의 제조 방법.
- [0018] 6. 위 1에 있어서, 제2 0-아세틸 전이효소 존재 하에 상기 반응 생성물인 다이아세틴을 아세틸-CoA와 반응시켜 트리아세틴을 얻는 단계;를 더 포함하는, 아세틴의 제조 방법.
- [0019] 7. 위 6에 있어서, 상기 제2 0-아세틸 전이효소는 서열번호 7의 아미노산 서열의 위치 31에 상응하는 위치의 아미노산이 시스테인(CYS) 또는 류신(LEU)이고, 위치 102에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 이소류신(ILE)이고, 위치 143에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 타이로신(TYR)이고, 위치 166에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 타이로신(TYR)이고, 위치 170에 상응하는 위치의 아미노산이 발린(VAL), 이소류신(ILE), 또는 류신(LEU)이고, 위치 193에 상응하는 위치의 아미노산이 히스티딘(HIS)인 아세틴의 제조 방법.
- [0020] 8. 위 6에 있어서, 상기 제2 0-아세틸 전이효소는 서열번호 7 내지 10 중 어느 하나의 서열로 이루어진 것인, 아세틴의 제조 방법.
- [0021] 9. 제1 0-아세틸 전이효소(0-acetyl transferase)를 코딩하는 유전자를 발현하는 미생물을 글리세롤을 포함하는 배지 중에서 배양하는 단계;를 포함하는 아세틴의 제조 방법.
- [0022] 10. 위 9에 있어서, 상기 제1 0-아세틸 전이효소는 말토오스 0-아세틸 전이효소인, 아세틴의 제조 방법.
- [0023] 11. 위 9에 있어서, 상기 제1 0-아세틸 전이효소는 서열번호 5의 아미노산 서열의 위치 70에 상응하는 위치의 아미노산이 아스파르트산(ASP)이고, 위치 84에 상응하는 위치의 아미노산이 아스파라긴(ASN)이고, 위치 114에 상응하는 위치의 아미노산이 히스티딘(HIS)이고, 위치 126에 상응하는 위치의 아미노산이 글루탐산(GLU)인, 아세틴의 제조 방법.
- [0024] 12. 위 9에 있어서, 상기 제1 0-아세틸 전이효소는 서열번호 5의 아미노산 서열의 위치 15에 상응하는 위치의 아미노산이 티로신(TYR) 또는 페닐알라닌(PHE)이고, 위치 26에 상응하는 위치의 아미노산이 아르기닌(ARG) 또는 글루타민(GLN)이고, 위치 30에 상응하는 위치의 아미노산이 아르기닌(ARG) 또는 리신(LYS)이고, 위치 71에 상응하는 위치의 아미노산이 티로신(TYR)이고, 위치 82에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 티로신(TYR)인, 아세틴의 제조 방법.
- [0025] 13. 위 9에 있어서, 상기 제1 0-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자는 서열번호 16 내지 21의 서열 중 어느 하나의 서열로 이루어진 것인, 아세틴의 제조 방법.
- [0026] 14. 위 9에 있어서, 상기 미생물은 다이아세틴에 아세틸기를 전이하는 제2 0-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자를 더 발현하는 것인, 아세틴의 제조 방법.
- [0027] 15. 위 14에 있어서, 상기 제2 0-아세틸 전이효소는 서열번호 7의 아미노산 서열의 위치 31에 상응하는 위치의 아미노산이 시스테인(CYS) 또는 류신(LEU)이고, 위치 102에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 이소류신(ILE)이고, 위치 143에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 타이로신(TYR)이고, 위치 166에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 타이로신(TYR)이고, 위치 170에 상응하는 위치의 아미노산이 발린(VAL), 이소류신(ILE), 또는 류신(LEU)이고, 위치 193에 상응하는 위치의 아미노산이 히스티딘(HIS)인, 아세틴의 제조 방법.
- [0028] 16. 위 14에 있어서, 상기 제2 0-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자는 서열번호 24 내지 27 중 어느 하나의 서열로 이루어진 것인, 아세틴의 제조 방법.
- [0029] 17. 위 9에 있어서, 상기 미생물은 아세틸에스테라제(acetyl esterase)를 코딩하는 유전자가 감쇄 또는 결실된 것인, 아세틴의 제조 방법.
- [0030] 18. 위 9에 있어서, 상기 미생물은 글리세롤 3-인산 탈수소효소(glycerol-3-phosphate dehydrogenase) 및 글리세롤 3-탈인산효소(DL-glycerol-3-phosphatase)를 코딩하는 유전자를 더 발현하고, 상기 배지는 포도당을 포함하는 것인, 아세틴의 제조 방법.

- [0031] 19. 제1 0-아세틸 전이효소(0-acetyl transferase)를 코딩하는 유전자를 발현하는 미생물을 포함하는 아세틴 제조용 조성물.
- [0032] 20. 위 19에 있어서, 상기 제1 0-아세틸 전이효소는 말토오스 0-아세틸 전이효소인, 아세틴 제조용 조성물.
- [0033] 21. 위 19에 있어서, 상기 제1 0-아세틸 전이효소는 서열번호 5의 아미노산 서열의 위치 70에 상응하는 위치의 아미노산이 아스파르트산(ASP)이고, 위치 84에 상응하는 위치의 아미노산이 아스파라긴(ASN)이고, 위치 114에 상응하는 위치의 아미노산이 히스티딘(HIS)이고, 위치 126에 상응하는 위치의 아미노산이 글루탐산(GLU)인, 아세틴 제조용 조성물.
- [0034] 22. 위 19에 있어서, 상기 제1 0-아세틸 전이효소는 서열번호 5의 아미노산 서열의 위치 15에 상응하는 위치의 아미노산이 티로신(TYR) 또는 페닐알라닌(PHE)이고, 위치 26에 상응하는 위치의 아미노산이 아르기닌(ARG) 또는 글루타민(GLN)이고, 위치 30에 상응하는 위치의 아미노산이 아르기닌(ARG) 또는 리신(LYS)이고, 위치 71에 상응하는 위치의 아미노산이 티로신(TYR)이고, 위치 82에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 티로신(TYR)인, 아세틴 제조용 조성물.
- [0035] 23. 위 19에 있어서, 상기 제1 0-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자는 서열번호 16 내지 21 중 어느 하나의 서열로 이루어진 것인, 아세틴 제조용 조성물.
- [0036] 24. 위 19에 있어서, 상기 미생물은 다이아세틴에 아세틸기를 전이하는 제2 0-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자를 더 발현하는 것인, 아세틴 제조용 조성물.
- [0037] 25. 위 24에 있어서, 상기 제2 0-아세틸 전이효소는 서열번호 7의 아미노산 서열의 위치 31에 상응하는 위치의 아미노산이 시스테인(CYS) 또는 류신(LEU)이고, 위치 102에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 이소류신(ILE)이고, 위치 143에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 타이로신(TYR)이고, 위치 166에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 타이로신(TYR)이고, 위치 170에 상응하는 위치의 아미노산이 발린(VAL), 이소류신(ILE), 또는 류신(LEU)이고, 위치 193에 상응하는 위치의 아미노산이 히스티딘(HIS)인, 아세틴 제조용 조성물.
- [0038] 26. 위 24에 있어서, 상기 제2 0-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자는 서열번호 24 내지 27 중 어느 하나의 서열로 이루어진 것인, 아세틴 제조용 조성물.
- [0039] 27. 위 19에 있어서, 상기 미생물은 아세틸에스테라제(acetyl esterase)를 코딩하는 유전자가 감쇄 또는 결실된 것인, 아세틴 제조용 조성물.
- [0040] 28. 위 19에 있어서, 상기 미생물은 글리세롤 3-인산 탈수소효소(glycerol-3-phosphate dehydrogenase) 및 글리세롤 3-탈인산효소(DL-glycerol-3-phosphatase)를 코딩하는 유전자를 더 발현하는 것인, 아세틴 제조용 조성물.

발명의 효과

- [0042] 본 발명에 따르면 생물학적인 방법을 통해서 아세틴 물질을 제조함으로써 지속가능하고 환경오염을 유발하지 않으며 안전하고 더 좋은 품질의 아세틴 물질을 제조하는 방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

- [0044] 도 1은 세포 내로 유입된 글리세롤이 모노아세틴, 다이아세틴, 트리아세틴으로 전환되는 경로를 나타낸 것이다.
- 도 2는 세포 내로 유입된 포도당이 모노아세틴, 다이아세틴, 트리아세틴으로 전환되는 경로를 나타낸 것이다.
- 도 3의 (A)는 모노아세틴과 다이아세틴을 생산하기 위해서 글리세롤에 아세틸기를 전이할 수 있는 대장균 내의 0-acetyltransferases 후보 유전자들을 선별하고 각 유전자들을 pTrc99A 발현벡터에 클로닝해서 만들어진 플라스미드 pMD1 - pMD8의 구조 도면 이고, (B)는 (A)의 플라스미드들로 형질전환 된 재조합 대장균 DH-MD1 - DH-MD8에서의 모노아세틴과 다이아세틴 생산성을 비교한 도면이며(DH-MD0는 공벡터인 pTrc99A로 형질전환 된 재조합 대장균을 나타냄.), (C)는 대장균 maltose 0-acetyltransferase (Maa)의 구조와 아미노산 서열을 근거로 글리세롤에 아세틸기를 전이할 것으로 추정되는 다른 미생물 유래의 후보 유전자들을 선별하고 각 유전자들을

pTrc99A 발현벡터에 클로닝해서 만들어진 플라스미드 pMD9 - pMD13의 구조 도면이고, (D)는 이 플라스미드들로 형질전환 된 재조합 대장균 DH-MD9 - DH-MD13에서의 모노아세틴과 다이아세틴 생산성을 비교한 도면이다.

도 4의 (A)는 모노아세틴과 다이아세틴 생산성이 가장 좋았던 *B. subtilis*의 Maa 유전자(*Bs-maa*)를 pTrc99A, pET28a, pSTV28 발현벡터에 클로닝해서 만들어진 플라스미드 pMD13, pMD14, pMDT1의 구조 도면이고, (B)는 상기 플라스미드들로 형질전환 된 재조합 대장균 DH-MD13, DH-MD14, DH-MDT1에서의 모노아세틴, 다이아세틴, 트리아세틴 생산성을 비교한 도면이며, (C)는 각 재조합 대장균의 균체 증식을 비교한 도면이다.

도 5의 (A)는 모노아세틴(1), 다이아세틴(2), 트리아세틴(3)의 혼합 표준화합물(STD)과 재조합 대장균 DH-MD06, DH-MD8, DH-MDT1의 배양액을 에틸아세테이트로 추출한 후 GC로 분석한 가스크로마토그램 도면이고, (B)는 GC-MS로 각 시료에서 얻어진 모노아세틴, 다이아세틴, 트리아세틴의 질량분석을 표준화합물(STD)의 질량분석과 비교한 도면이다.

도 6의 (A)는 다이아세틴을 트리아세틴으로 전환하는 chloramphenicol-O-acetyltransferase 유전자(*cat*)와 *B. subtilis*의 Maa 유전자(*Bs-maa*)를 pTrc99A 발현벡터에 클로닝해서 만들어진 플라스미드 pMDT2의 구조 도면이고, (B)와 (C)는 상기 플라스미드로 형질전환 된 재조합 대장균 DH-MDT2의 아세틴 복합물의 생산성과 조성을 대조구인 DH-MDT1과 비교한 도면이며, (D)는 재조합 대장균 DH-MDT2에서의 아세틴 복합물의 배양시간에 따른 생산 변화를 나타낸 도면이다.

도 7의 (A)는 Chloramphenicol O-acetyltransferase의 구조와 아미노산 서열을 근거로 다이아세틴에 아세틸기를 전이할 것으로 추정되는 후보 유전자들을 다양한 미생물들에서 발견하고 플라스미드 pMD13에 클로닝 해서 만들어진 플라스미드 pMDT2 - pMDT7의 구조 도면이고, (B)는 상기 플라스미드로 형질전환 된 재조합균주 DH-MDT2 - DH-MDT7의 아세틴 복합물 생산량 비교한 도면이며, (C)는 상기 재조합 균주들의 균체 증식을 비교한 도면이다.

도 8은 대장균 균종과 글리세롤 농도에 따른 아세틴 복합물의 생산성을 비교한 것으로서, (A)는 대장균 DH5 α , AceCo, BW25113, W3110, MG1655를 플라스미드 pMDT2로 형질전환 한 재조합 대장균 DH-MDT2, AC-MDT2, BW-MDT2, W3-MDT2, MG-MDT2를 배양해서 아세틴 복합물 생산성을 비교한 것이며, (B)는 상기 재조합 대장균들의 균체 증식을 비교한 것이고, (C)는 재조합 균주 MG-MDT2의 배양에서 글리세롤 농도에 따른 아세틴 복합물 생산성을 나타낸 것이며, (D)는 상기 균주의 글리세롤 농도에 따른 균체 증식을 비교한 것이다.

도 9는 대장균 BW25113에서 acetyltransferase 유전자(*aes*)의 증폭 및 결손을 통한 아세틴 화합물의 변화를 관찰한 것으로서, (A)와 (B)는 대장균 BW25113에 pTrc99A와 pTAes로 각각 형질전환 한 재조합균주 BW-Empty와 BW-Aes를 15 g/L의 트리아세틴 표준화합물이 첨가된 2YT 배지에 접종하고 트리아세틴의 분해 양상을 관찰한 것이며, (C)는 BW25113과 *aes* 유전자가 결손된 JW0465 균주를 플라스미드 pMDT2로 형질전환 시킨 재조합균주 BW-MDT2와 BW-MDT2(*Daes*)를 10% (v/v) 글리세롤이 첨가된 2YT 배지에서 배양해서 아세틴 복합물 생산성을 비교한 것이며, (D)는 상기 재조합 균주들의 균체 증식을 비교한 것이다.

도 10의 (A)는 포도당으로부터 아세틴 복합물 생산을 위해서 사카라마이세스 세레비지에 유래 글리세롤 생산 유전자인 *Sc-gpd1*과 *Sc-gpp2*를 pMDT2 플라스미드에 클로닝해서 만들어진 플라스미드 pMDT8의 구조 도면이고, (B)는 상기 플라스미드로 형질전환 된 재조합 대장균 DH-MDT8의 포도당으로부터의 아세틴 복합물 생산, (C)는 상기 대장균들의 균체 증식, (D)는 배양액의 pH변화를 나타낸 것이다.

도 11은 BsMAA 말토오스 아세틸전이효소의 기질 결합 부위 구조를 도시한 것이다. 글리세롤 아세틸화 반응의 핵심잔기는 아미노산 서열의 위치 70의 아스파르트산(ASP), 위치 84의 아스파라긴(ASN), 위치 114의 히스티딘(HIS), 위치 126의 글루탐산(GLU)이다.

도 12는 *Bacillus subtilis* MAA-like enzymes의 서열 정렬(alignment) 결과이다.

도 13은 CAT 클로람페니콜-O-아세틸 전이효소(Chloramphenicol-O-acetyltransferase)의 기질결합 부위 구조를 도시한 것이다. 다이아세틴 아세틸화 반응의 핵심잔기는 아미노산 서열의 위치 102의 페닐알라닌(PHE), 위치 143의 페닐알라닌(PHE), 위치 193의 히스티딘(HIS)이다. 서열의 위치 102와 143의 잔기는 유사한 성질의 아미노산인 이소류신(ILE)과 티로신(TYR)으로 각각 대체될 수 있다. 이것은 제2 O-아세틸 전이효소들의 아미노산 서열 정렬 비교 도면 14에서 알 수 있다.

도 14는 CAT-like enzymes의 서열 정렬 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0045] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0047] 본 발명은 제1 0-아세틸 전이효소(0-acetyl transferase) 존재 하에 아세틸-CoA와 글리세롤을 반응시켜 모노아세틴 또는 다이아세틴을 얻는 단계;를 포함하는 아세틴의 제조 방법에 관한 것이다.
- [0048] 상기 제1 0-아세틸 전이효소는 상기 아세틸-CoA에서 0-아세틸을 글리세롤로 전이시킬 수 있고, 예를 들면 말토오스 0-아세틸 전이효소일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0049] 상기 제1 0-아세틸 전이효소는 생물로부터 유래된 것이거나, 합성된 것일 수 있다.
- [0050] 또한, 상기 제1 0-아세틸 전이효소는 제1 0-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자를 가진 미생물에서 발현되는 것일 수 있고, 상기 미생물 내 제1 0-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자는 해당 미생물에 내재된 것일 수 있고, 유전자공학기술로 외부에서 미생물 내로 도입된 것일 수 있으며, 이 경우 글리세롤과 아세틸-CoA는 미생물 내에서 반응되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0051] 상기 아세틴은 모노아세틴(monoacetin), 다이아세틴(diacetin) 또는 트리아세틴(triacetin)을 포함할 수 있고, 이들의 복합물일 수 있다.
- [0052] 상기 제1 0-아세틸 전이효소는 글리세롤과 아세틸-CoA의 반응에서 촉매로 작용하여 모노아세틴이 생성될 수 있고, 모노아세틴은 제1 0-아세틸 전이효소 존재 하에 아세틸-CoA와 한 번 더 반응하여 다이아세틴을 생성할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0053] 상기 제1 0-아세틸 전이효소는 서열번호 5의 아미노산 서열의 위치 70에 상응하는 위치의 아미노산이 아스파르트산(ASP)이고, 위치 84에 상응하는 위치의 아미노산이 아스파라긴(ASN)이고, 위치 114에 상응하는 위치의 아미노산이 히스티딘(HIS)이고, 위치 126에 상응하는 위치의 아미노산이 글루탐산(GLU)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0054] 또한, 상기 제1 0-아세틸 전이효소는 서열번호 5의 아미노산 서열의 위치 15에 상응하는 위치의 아미노산이 티로신(TYR) 또는 페닐알라닌(PHE)이고, 위치 26에 상응하는 위치의 아미노산이 아르기닌(ARG) 또는 글루타민(GLN)이고, 위치 30에 상응하는 위치의 아미노산이 아르기닌(ARG) 또는 리신(LYS)이고, 위치 71에 상응하는 위치의 아미노산이 티로신(TYR)이고, 위치 82에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 티로신(TYR)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0055] 상기 제1 0-아세틸 전이효소의 서열번호 5의 아미노산 서열의 위치 15에 상응하는 위치의 아미노산인 티로신(TYR) 또는 페닐알라닌(PHE), 위치 26에 상응하는 위치의 아미노산인 아르기닌(ARG) 또는 글루타민(GLN), 위치 30에 상응하는 위치의 아미노산인 아르기닌(ARG) 또는 리신(LYS), 위치 71에 상응하는 위치의 아미노산인 티로신(TYR) 및 위치 82에 상응하는 위치의 아미노산인 페닐알라닌(PHE) 또는 티로신(TYR)은 기질결합포켓(substrate binding pocket)을 형성하는 잔기로서, 상대적으로 보존이 잘 되어있으며, 아세틴을 제조하는 데 중요한 역할을 하는 아미노산 잔기에 해당한다.
- [0056] 상기 제1 0-아세틸 전이효소의 서열번호 5의 아미노산 서열의 위치 70에 상응하는 위치의 아미노산인 아스파르트산(ASP), 위치 84에 상응하는 위치의 아미노산인 아스파라긴(ASN) 및 위치 126에 상응하는 위치의 아미노산인 글루탐산(GLU)은 글리세롤을 안정화시키는 아미노산 잔기로서, 상대적으로 보존이 잘 되어있으며, 아세틴을 제조하는 데 중요한 역할을 하는 아미노산 잔기에 해당한다.
- [0057] 상기 제1 0-아세틸 전이효소의 서열번호 5의 아미노산 서열의 위치 114에 상응하는 위치의 아미노산인 히스티딘(HIS)은 촉매 역할을 하는 잔기로서, 상대적으로 보존이 잘 되어있으며, 아세틴을 제조하는 데 중요한 역할을 하는 아미노산 잔기에 해당한다.
- [0058] 또한, 상기 제1 0-아세틸 전이효소는 그 아미노산 서열이 서열번호 5의 아미노산 서열과 상동성이 50% 이상일 수 있다.
- [0059] 상기 말토오스 0-아세틸 전이효소는 예를 들어, 에세리키아 콜라이(*Escherichia coli*)의 말토오스 0-아세틸 전이효소(서열번호 1), 스태필로코커스 카노수스(*Staphylococcus carnosus*)의 말토오스 0-아세틸 전이효소(서열번호 2), 할알칼리코커스 젓갈리(*Halalkalicoccus jeotgali*)의 말토오스 0-아세틸 전이효소(서열번호 3), 락토바

실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*)의 말토오스 0-아세틸 전이효소(서열번호 4), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)의 말토오스 0-아세틸 전이효소(서열번호 5) 또는 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*)의 말토오스 0-아세틸 전이효소(서열번호 6)일 수 있고, 바람직하게는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)의 말토오스 0-아세틸 전이효소일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0060] 에세리키아 콜라이(*Escherichia coli*)의 말토오스 0-아세틸 전이효소(서열번호 1) 아미노산 서열은 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)의 말토오스 0-아세틸 전이효소(서열번호 5) 아미노산 서열과 상동성이 65%이고, 스태필로코커스 카노수스(*Staphylococcus carnosus*)의 말토오스 0-아세틸 전이효소(서열번호 2) 아미노산 서열은 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)의 말토오스 0-아세틸 전이효소(서열번호 5) 아미노산 서열과 상동성이 58%이고, 할알칼리코커스 젓갈리(*Halalkalicoccus jeotgali*)의 말토오스 0-아세틸 전이효소(서열번호 3) 아미노산 서열은 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)의 말토오스 0-아세틸 전이효소(서열번호 5) 아미노산 서열과 상동성이 53%이고, 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*)의 말토오스 0-아세틸 전이효소(서열번호 4) 아미노산 서열은 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)의 말토오스 0-아세틸 전이효소(서열번호 5) 아미노산 서열과 상동성이 55%이고, 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*)의 말토오스 0-아세틸 전이효소(서열번호 6) 아미노산 서열은 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)의 말토오스 0-아세틸 전이효소(서열번호 5) 아미노산 서열과 상동성이 50%이다.

[0061] 또한, 본 발명의 아세틴의 제조 방법은 제2 0-아세틸 전이효소 존재 하에 상기 반응 생성물인 다이아세틴을 아세틸-CoA와 반응시키는 단계;를 더 포함할 수 있다.

[0062] 상기 제2 0-아세틸 전이효소는 서열번호 7의 아미노산 서열의 위치 31에 상응하는 위치의 아미노산이 시스테인(CYS) 또는 류신(LEU)이고, 위치 102에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 이소류신(ILE)이고, 위치 143에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 타이로신(TYR)이고, 위치 166에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 타이로신(TYR)이고, 위치 170에 상응하는 위치의 아미노산이 발린(VAL), 이소류신(ILE), 또는 류신(LEU)이고, 위치 193에 상응하는 위치의 아미노산이 히스티딘(HIS)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0063] 제2-아세틸 전이효소는 다이아세틴에 아세틸기를 전이해 트리아세틴을 생성할 수 있고, 예를 들면 클로람페니콜-0-아세틸 전이효소(Chloramphenicol-0-acetyltransferase)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0064] 클로람페니콜-0-아세틸 전이효소는 예를 들면 서열번호 7의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0065] 상기 서열번호 7의 클로람페니콜-0-아세틸 전이효소(서열번호 7)는 예를 들어, 클로람페니콜 저항성 항생제 마커를 갖는 pSTV28 벡터에서 발현되는 것일 수 있고, 클로람페니콜 저항성 항생제 마커를 갖는 미생물에서 발현되는 것일 수 있고, pSTV28 벡터를 선천적 또는 후천적으로 갖는 미생물에서 발현되는 것일 수 있고, 합성에 의해 제조될 수도 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0066] 상기 제1 0-아세틸 전이효소 및 상기 제2 0-아세틸 전이효소 존재 하에 상기 글리세롤과 아세틸-CoA가 반응하는 경우, 모노아세틴, 다이아세틴, 트리아세틴의 복합물이 생성될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0067] 상기 제2 0-아세틸 전이효소는 클로람페니콜-0-아세틸 전이효소이거나, 그와 유사한 단백질 서열 및 구조를 가져, 다이아세틴에 아세틸기를 전이시켜 트리아세틴을 생성할 수 있다.

[0068] 상기 제2 0-아세틸 전이효소는 제2 0-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자를 가진 미생물에서 발현되는 것일 수 있고, 상기 미생물 내 제2 0-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자는 해당 미생물에 내재된 것일 수 있고, 유전자 공학기술로 외부에서 미생물 내로 도입된 것일 수 있으며, 이 경우 글리세롤과 아세틸-CoA는 미생물 내에서 반응되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0069] 상기 제2 0-아세틸 전이효소는 생물로부터 유래된 것이거나, 합성된 것일 수 있다.

[0070] 상기 제2 0-아세틸 전이효소는 서열번호 7의 아미노산 서열의 위치 31에 상응하는 위치의 아미노산이 시스테인(CYS) 또는 류신(LEU)이고, 위치 93에 상응하는 위치의 아미노산인 트레오닌(THR) 또는 프롤린(PRO), 위치 102에 상응하는 위치의 아미노산인 페닐알라닌(PHE) 또는 이소류신(ILE), 위치 143에 상응하는 위치의 아미노산인 페닐알라닌(PHE) 또는 티로신(TYR), 위치 166에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 타이로신(TYR) 및 위치 170에 상응하는 위치의 아미노산인 발린(VAL), 이소류신(ILE) 및 류신(LEU) 중 어느 하나는 기질 결합포켓(substrate binding pocket)을 형성하는 잔기로서, 상대적으로 보존이 잘 되어있으며, 아세틴을 제조하

는 데 중요한 역할을 하는 아미노산 잔기에 해당한다.

- [0071] 상기 제2 0-아세틸 전이효소는 서열번호 7의 아미노산 서열의 위치 193에 상응하는 위치의 아미노산인 히스티딘(HIS)은 촉매 역할을 하는 잔기로서, 상대적으로 보존이 잘 되어있으며, 아세틴을 제조하는 데 중요한 역할을 하는 아미노산 잔기에 해당한다.
- [0072] 또한, 상기 제2 0-아세틸 전이효소는 그 아미노산 서열이 서열번호 7의 아미노산 서열과 상동성이 32% 이상일 수 있다.
- [0073] 상기 제2 0-아세틸 전이효소는 구체적으로는, 서열번호 7의 클로람페니콜-0-아세틸 전이효소, 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*)의 0-아세틸 전이효소(서열번호 8), 슈도모나스 애루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*)의 0-아세틸 전이효소(서열번호 9) 또는 클로스트리디움 아세토부틸리쿰(*Clostridium acetobutylicum*)의 0-아세틸 전이효소(서열번호 10)일 수 있고, 바람직하게는 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*)의 0-아세틸 전이효소일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0074] 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*)의 0-아세틸 전이효소(서열번호 8) 아미노산 서열은 클로람페니콜-0-아세틸 전이효소(서열번호 7) 아미노산 서열과 상동성이 43% 이상이고, 슈도모나스 애루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*)의 0-아세틸 전이효소(서열번호 9) 아미노산 서열은 클로람페니콜-0-아세틸 전이효소(서열번호 7) 아미노산 서열과 상동성이 62%이고, 클로스트리디움 아세토부틸리쿰(*Clostridium acetobutylicum*)의 0-아세틸 전이효소(서열번호 10) 아미노산 서열은 클로람페니콜-0-아세틸 전이효소(서열번호 7) 아미노산 서열과 상동성이 32%이다.
- [0076] 또한, 본 발명의 아세틴의 제조 방법은 포도당을 글리세롤 3-인산 탈수소효소(glycerol-3-phosphate dehydrogenase) 및 글리세롤 3-탈인산효소(DL-glycerol-3-phosphatase)와 순차적으로 반응시켜 상기 글리세롤을 얻는 단계;를 더 포함할 수 있다.
- [0077] 상기 글리세롤의 경우 포도당으로부터 효소와 반응시키는 생합성을 통해 얻을 수 있고, 이의 구체적인 예로서, 포도당을 글리세롤 3-인산 탈수소효소(glycerol-3-phosphate dehydrogenase, GPD1) 및 글리세롤 3-탈인산효소(DL-glycerol-3-phosphatase, GPP2)와 순차적으로 반응시켜 상기 글리세롤을 얻는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0078] 상기 글리세롤 3-인산 탈수소효소(glycerol-3-phosphate dehydrogenase) 및 글리세롤 3-탈인산효소(DL-glycerol-3-phosphatase)는 화학적으로 합성될 수 있다.
- [0079] 또한, 상기 글리세롤 3-인산 탈수소효소(glycerol-3-phosphate dehydrogenase) 및 글리세롤 3-탈인산효소(DL-glycerol-3-phosphatase)는 글리세롤 3-인산 탈수소효소(glycerol-3-phosphate dehydrogenase) 및 글리세롤 3-탈인산효소(DL-glycerol-3-phosphatase)를 코딩하는 유전자를 가진 미생물에서 발견되는 것일 수 있고, 상기 미생물 내 글리세롤 3-인산 탈수소효소(glycerol-3-phosphate dehydrogenase) 및 글리세롤 3-탈인산효소(DL-glycerol-3-phosphatase)를 코딩하는 유전자는 해당 미생물에 내재된 것일 수 있고, 유전자공학기술로 외부에서 미생물 내로 도입된 것일 수 있으며, 이 경우 포도당으로부터 글리세롤을 얻는 것은 미생물 내에서 이루어지는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0080] 상기 글리세롤 3-인산 탈수소효소(glycerol-3-phosphate dehydrogenase)는 미생물 종류에 따라 다른 아미노산 서열을 가질 수 있고, 해당 미생물에서 해당경로의 중간대사물질인 글리세론 인산(glycerone phosphate, DHAP)을 글리세롤 3-인산(glycerol-3-phosphate, G3P)으로 전환할 수 있는 것이면 족하다. 예를 들어, 사카라마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)의 경우, 서열번호 14의 사카라마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)의 글리세롤 3-인산 탈수소효소(glycerol-3-phosphate dehydrogenase, GPD1)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0081] 상기 글리세롤 3-탈인산효소(DL-glycerol-3-phosphatase)는 미생물 종류에 따라 다른 아미노산 서열을 가질 수 있고, 해당 미생물에서 해당경로의 중간대사물질인 글리세롤 3-인산(glycerol-3-phosphate, G3P)을 글리세롤(glycerol)로 전환할 수 있는 것이면 족하며, 예를 들어, 사카라마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)의 경우, 서열번호 15의 사카라마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)의 글리세롤 3-탈인산효소(DL-glycerol-3-phosphatase, GPP2)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0082] 상기 포도당은 해당경로(Embden-Meyerhof pathway)를 통해 중간대사물질인 글리세론 인산(glycerone

phosphate, DHAP)을 형성하고, 상기 글로세론 인산은 글리세롤 3-인산 탈수소효소와 반응하여 글리세롤 3-인산으로 전환될 수 있고, 상기 글리세롤 3-인산(glycerol-3-phosphate, G3P)은 글리세롤 3-탈인산효소와 반응하여 글리세롤(glycerol)이 제조될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0084] 또한, 본 발명은 제1 0-아세틸 전이효소(0-acetyl transferase)를 코딩하는 유전자를 발현하는 미생물을 글리세롤을 포함하는 배지 중에서 배양하는 단계;를 포함하는 아세틴의 제조 방법에 관한 것이다.
- [0085] 상기 제1 0-아세틸 전이효소는 서열번호 5의 아미노산 서열의 위치 70에 상응하는 위치의 아미노산이 아스파르트산(ASP)이고, 위치 84에 상응하는 위치의 아미노산이 아스파라긴(ASN)이고, 위치 114에 상응하는 위치의 아미노산이 히스티딘(HIS)이고, 위치 126에 상응하는 위치의 아미노산이 글루탐산(GLU)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0086] 또한, 상기 제1 0-아세틸 전이효소는 서열번호 5의 아미노산 서열의 위치 15에 상응하는 위치의 아미노산이 티로신(TYR) 또는 페닐알라닌(PHE)이고, 위치 26에 상응하는 위치의 아미노산이 아르기닌(ARG) 또는 글루타민(GLN)이고, 위치 30에 상응하는 위치의 아미노산이 아르기닌(ARG) 또는 리신(LYS)이고, 위치 71에 상응하는 위치의 아미노산이 티로신(TYR)이고, 위치 82에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 티로신(TYR)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0087] 또한, 상기 제1 0-아세틸 전이효소는 그 아미노산 서열이 서열번호 5의 아미노산 서열과 상동성이 50% 이상일 수 있다.
- [0088] 상기 제1 0-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자는 예를 들어, 말토오스 0-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자일 수 있고, 상기 말토오스 0-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자는 예를 들어, 에세리키아 콜라이(*Escherichia coli*)의 말토오스 0-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자(*maa*, 서열번호 16), 스태필로코커스 카노수스(*Staphylococcus carnosus*)의 말토오스 0-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자(*Sc-maa*, 서열번호 17), 할알칼리 코커스 젓갈리(*Halalkalicoccus jeotgali*)의 말토오스 0-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자(*Hj-maa*, 서열번호 18), 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*)의 말토오스 0-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자(*Lb-maa*, 서열번호 19), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)의 말토오스 0-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자(*Bs-maa*, 서열번호 20) 또는 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*)의 말토오스 0-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자(*Pp-maa*, 서열번호 21)일 수 있고, 바람직하게는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)의 말토오스 0-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0089] 상기 미생물은 배지 내에서 배양되어 제1 0-아세틸 전이효소를 발현할 수 있고, 상기 제1 0-아세틸 전이효소가 글리세롤과 아세틸-CoA의 반응을 촉매하여 모노아세틴을 생성할 수 있고, 상기 모노아세틴과 아세틸-CoA의 반응을 한 번 더 촉매하여 다이아세틴을 생성할 수 있다.
- [0090] 상기 미생물은 제1 0-아세틸 전이 효소를 발현하는 미생물이란 제한없이 사용가능하며, 예를 들어, 원핵 세포, 진핵 세포, 또는 분리된 동물세포로 액체 배지에서 배양될 수 있는 것일 수 있다. 상기 미생물은 예를 들면, 박테리아, 곰팡이, 또는 이들의 조합일 수 있다. 박테리아는 그람 양성 박테리아, 그람 음성 박테리아, 또는 이들의 조합일 수 있다. 그람 음성 박테리아는 에세리키아 (*Escherichia*) 속일 수 있다. 그람 양성 박테리아는 바실러스 속, 코리네박테리움 속, 유산균 등 또는 이들의 조합일 수 있다. 곰팡이는 사카라마이세스 세레비지애, 클루베로마이세스 등 또는 이들의 조합일 수 있다. 상기 미생물은 구체적으로 대장균(*E.coli*)일 수 있고, 보다 구체적으로 DH5 α, DH5 α (DE3), AceCo, BW25113, W3110 또는 MG1655일 수 있다. 상기 미생물은 대장균 중 생산성 측면에서 바람직하게는 DH5 α (DE3), BW25113, W3110 또는 MG1655일 수 있고, 보다 바람직하게는 MG1655일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0091] 상기 미생물은 제1 0-아세틸 전이효소(0-acetyl transferase)를 코딩하는 유전자를 선천적으로 보유하는 미생물일 수 있고, 형질전환, 형질도입 등의 생명공학 기술 등에 의해 상기 유전자를 후천적으로 보유하는 미생물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0092] 상기 형질전환은 재조합 플라스미드를 상기 미생물 내부에 도입함으로써 이루어질 수 있고, 상기 재조합 플라스미드는 벡터에 상기 제1 0-아세틸 전이효소(0-acetyl transferase)를 코딩하는 유전자가 삽입된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0093] 상기 벡터는 예를 들어, pTrc99A(서열번호 78), pET28a(서열번호 79) 또는 pSTV28(서열번호 77)일 수 있고, 바

람직하게는 pSTV28일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0094] 상기 유전자 삽입 시, 상기 벡터와 상기 유전자를 제한효소로 자르고 ligase로 연결되어 클로닝되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0095] 상기 배지는 상기 미생물의 증식, 또는 배양을 목적으로 미생물이 일반적으로 생존하고 번식하는 자연 환경과 유사한 영양 상태를 유지 하도록 고안된 물질로서 자라는데 필요한 모든 영양소를 첨가하여 만든 액체 및 고체의 물질로서, 글리세롤 뿐만 아니라 아세틸-CoA를 포함하는 배지일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0097] 또한, 본 발명의 상기 미생물은 다이아세틴에 아세틸기를 전이하는 제2 0-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자를 더 발현하는 것일 수 있다.
- [0098] 상기 제2 0-아세틸 전이효소는 서열번호 7의 아미노산 서열의 위치 31에 상응하는 위치의 아미노산이 시스테인(CYS) 또는 류신(LEU)이고, 위치 102에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 이소류신(ILE)이고, 위치 143에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 타이로신(TYR)이고, 위치 166에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 타이로신(TYR)이고, 위치 170에 상응하는 위치의 아미노산이 발린(VAL), 이소류신(ILE), 또는 류신(LEU)이고, 위치 193에 상응하는 위치의 아미노산이 히스티딘(HIS) 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0099] 상기 미생물은 배지 내 배양되며, 제1 0-아세틸 전이효소 외에 추가적으로 클로람페니콜-0-아세틸 전이효소 또는 2 0-아세틸 전이효소를 더 발현할 수 있다.
- [0100] 상기 클로람페니콜-0-아세틸 전이효소(서열번호 7)를 코딩하는 유전자(*cat*, 서열번호 24)는 클로람페니콜 저항성 항생제 마커를 갖는 벡터에 존재할 수 있고, 상기 벡터는 예를 들어 pSTV28 벡터일 수 있고, 해당 벡터는 미생물이려면 제한없이 도입되어 해당 미생물로부터 클로람페니콜-0-아세틸 전이효소가 발현될 수 있고, 예를 들어 대장균에 상기 벡터가 도입되어 대장균으로부터 클로람페니콜-0-아세틸 전이효소가 발현될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0101] 상기 제2 0-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자는 예를 들어, 클로람페니콜-0-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자(*cat*, 서열번호 24), 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*)의 0-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자(*Bc-Oat*, 서열번호 25), 슈도모나스 애루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*)의 0-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자(*Pa-Oat*, 서열번호 26) 또는 클로스트리디움 아세토부틸리쿰(*Clostridium acetobutylicum*)의 0-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자(*Ca-Oat*, 서열번호 27)일 수 있고, 바람직하게는 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*)의 0-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0102] 또한, 상기 제2 0-아세틸 전이효소는 그 아미노산 서열이 서열번호 7의 아미노산 서열과 상동성이 32% 이상일 수 있다.
- [0104] 또한, 본 발명의 상기 미생물은 아세틸에스테라제(acetylase)를 코딩하는 유전자가 감쇄 또는 결실된 것일 수 있다.
- [0105] 에스터 화합물인 아세틴은 에스터 결합 분해 효소(esterases)에 의해서 글리세롤과 아세테이트로 분해될 수 있고, 상기 아세틴을 분해하는 에스터 결합 분해 효소는 예를 들어 아세틸에스테라제일 수 있다.
- [0106] 상기 아세틸에스테라제를 코딩하는 유전자가 감쇄 또는 결실된 미생물의 경우 아세틸에스테라제를 발현하지 않아, 아세틴의 생산량이 증가될 수 있다.
- [0107] 상기 아세틸에스테라제는 미생물 종류에 따라 다른 서열을 가질 수 있고, 이를 코딩하는 유전자도 마찬가지로 다른 서열을 가질 수 있는 바, 해당 미생물에서 아세틸에스테라제를 코딩하는 유전자(*aes*)가 감쇄 또는 결실된 것일 수 있다. 예를 들어, 대장균의 경우, 서열번호 13의 아세틸에스테라제를 코딩하는 서열번호 30의 유전자가 감쇄 또는 결실된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0108] 또한, 상기 미생물은 제1 0-아세틸 전이 효소를 발현하는 미생물이려면 제한없이 사용가능하며, 전술한 범위 내의 미생물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0110] 또한, 본 발명의 상기 미생물의 본 배양 시 초기 균체 농도가 OD_{600nm}에서 0.05 내지 0.15일 때, 상기 배지에 포함된 글리세롤의 농도는 3%(v/v) 내지 13%(v/v)일 수 있으며, 바람직하게는 초기 균체 농도가 OD_{600nm}에서 0.08 내지 0.12일 때, 글리세롤의 농도는 5%(v/v) 내지 11%(v/v)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0111] 상기 글리세롤 농도를 가지는 배지에서 상기 균체의 농도로 미생물을 배양할 경우, 아세틴이 다량 생성될 수 있다.
- [0112] 상기 글리세롤의 농도가 13%(v/v) 초과인 경우, 과도한 삼투압 증가의 영향으로 균체 증식과 아세틴 생산이 모두 감소할 수 있으며, 농도가 3%(v/v) 미만인 경우, 기질의 농도가 적어서 아세틴의 생산량이 적을 수 있다.
- [0114] 또한, 본 발명의 상기 미생물은 글리세롤 3-인산 탈수소효소(glycerol-3-phosphate dehydrogenase) 및 글리세롤 3-탈인산효소(DL-glycerol-3-phosphatase)를 코딩하는 유전자를 더 발현하고, 상기 배지는 포도당을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0115] 전술한 바와 같이 상기 미생물은 글리세롤 3-인산 탈수소효소 및 글리세롤 3-탈인산효소를 발현하며, 포도당은 해당경로를 통해 글리세론 인산으로 변환된 후 상기 효소들을 통해 글리세롤로 변환될 수 있다.
- [0116] 상기 글리세롤 3-인산 탈수소효소(glycerol-3-phosphate dehydrogenase)를 코딩하는 유전자(Gpd1)는 미생물 종류에 따라 다른 염기 서열을 가질 수 있고, 해당 미생물에서 해당경로의 중간대사물질인 글리세론 인산(glycerone phosphate, DHAP)을 글리세롤 3-인산(glycerol-3-phosphate, G3P)으로 전환할 수 있는 것이면 족하다. 예를 들어, 사카라마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)의 경우, 서열번호 31의 사카라마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)의 글리세롤 3-인산 탈수소효소(glycerol-3-phosphate dehydrogenase)를 코딩하는 유전자(*Sc-gpd1*)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0117] 상기 글리세롤 3-탈인산효소(DL-glycerol-3-phosphatase)를 코딩하는 유전자(Gpp2)는 미생물 종류에 따라 다른 염기 서열을 가질 수 있고, 해당 미생물에서 해당경로의 중간대사물질인 글리세롤 3-인산(glycerol-3-phosphate, G3P)을 글리세롤(glycerol)로 전환할 수 있는 것이면 족하다. 예를 들어, 사카라마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)의 경우, 서열번호 32의 사카라마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)의 글리세롤 3-탈인산효소(DL-glycerol-3-phosphatase)를 코딩하는 유전자(*Sc-gpp2*)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0118] 상기 글리세롤은 전술한 제1 0-아세틸 전이효소 및 클로람페니콜-0-아세틸 전이효소 또는 제2 0-아세틸 전이효소 등에 의해 아세틴 복합물로 변환될 수 있다.
- [0120] 또한, 본 발명은 제1 0-아세틸 전이효소(0-acetyl transferase)를 코딩하는 유전자를 발현하는 미생물을 포함하는 아세틴 제조용 조성물에 관한 것이다.
- [0121] 상기 조성물은 글리세롤과 접촉하는 경우 전술한 범위 및 방법으로 아세틴을 제조할 수 있다.
- [0122] 상기 제1 0-아세틸 전이효소는 서열번호 5의 아미노산 서열의 위치 70에 상응하는 위치의 아미노산이 아스파르트산(ASP)이고, 위치 84에 상응하는 위치의 아미노산이 아스파라긴(ASN)이고, 위치 114에 상응하는 위치의 아미노산이 히스티딘(HIS)이고, 위치 126에 상응하는 위치의 아미노산이 글루탐산(GLU)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0123] 또한, 상기 제1 0-아세틸 전이효소는 서열번호 5의 아미노산 서열의 위치 15에 상응하는 위치의 아미노산이 티로신(TYR) 또는 페닐알라닌(PHE)이고, 위치 26에 상응하는 위치의 아미노산이 아르기닌(ARG) 또는 글루타민(GLN)이고, 위치 30에 상응하는 위치의 아미노산이 아르기닌(ARG) 또는 리신(LYS)이고, 위치 71에 상응하는 위치의 아미노산이 티로신(TYR)이고, 위치 82에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 티로신(TYR)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0124] 또한, 상기 제1 0-아세틸 전이효소는 그 아미노산 서열이 서열번호 5의 아미노산 서열과 상동성이 50% 이상일 수 있다.
- [0125] 상기 제1 0-아세틸 전이효소는 말토오스 0-아세틸 전이효소일 수 있고, 보다 구체적으로는 에세리키아 콜라이(*Escherichia coli*), 스태필로코커스 카노수스(*Staphylococcus carnosus*), 할알칼리코커스 짓갈리

(*Halalkalicoccus jeotgali*), 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 또는 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*)의 말토오스 0-아세틸 전이효소일 수 있고, 바람직하게는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)의 말토오스 0-아세틸 전이효소일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0126] 상기 제1 0-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자는 예를 들어, 말토오스 0-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자일 수 있고, 상기 말토오스 0-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자는 예를 들어, 에세리키아 콜라이(*Escherichia coli*)의 말토오스 0-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자(*maa*, 서열번호 16), 스태필로코커스 카노수스(*Staphylococcus carnosus*)의 말토오스 0-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자(*Sc-maa*, 서열번호 17), 할알칼리코커스 젓갈리(*Halalkalicoccus jeotgali*)의 말토오스 0-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자(*Hj-maa*, 서열번호 18), 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*)의 말토오스 0-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자(*Lb-maa*, 서열번호 19), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)의 말토오스 0-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자(*Bs-maa*, 서열번호 20) 또는 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*)의 말토오스 0-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자(*Pp-maa*, 서열번호 21)일 수 있고, 바람직하게는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)의 말토오스 0-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0128] 또한, 상기 미생물은 다이아세틴에 아세틸기를 전이하는 제2 0-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자를 더 발현하는 것일 수 있다.

[0129] 상기 제2 0-아세틸 전이효소는 서열번호 7의 아미노산 서열의 위치 31에 상응하는 위치의 아미노산이 시스테인(CYS) 또는 류신(LEU)이고, 위치 102에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 이소류신(ILE)이고, 위치 143에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 타이로신(TYR)이고, 위치 166에 상응하는 위치의 아미노산이 페닐알라닌(PHE) 또는 타이로신(TYR)이고, 위치 170에 상응하는 위치의 아미노산이 발린(VAL), 이소류신(ILE), 또는 류신(LEU)이고, 위치 193에 상응하는 위치의 아미노산이 히스티딘(HIS)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0130] 상기 클로람페니콜-0-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자는 클로람페니콜 저항성 항생제 마커를 갖는 벡터에 존재할 수 있고, 예를 들어 pSTV28 벡터일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0131] 상기 제2 0-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자는 예를 들어, 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*), 슈도모나스 애루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 또는 클로스트리디움 아세토부틸리쿰(*Clostridium acetobutylicum*)의 0-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자일 수 있고, 바람직하게는 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*)의 0-아세틸 전이효소를 코딩하는 유전자일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0132] 또한, 상기 제2 0-아세틸 전이효소는 그 아미노산 서열이 서열번호 7의 아미노산 서열과 상동성이 32% 이상일 수 있다.

[0134] 또한, 상기 미생물은 아세틸에스테라제(acetylesterase)를 코딩하는 유전자가 감쇄 또는 결실된 것일 수 있다.

[0135] 에스터 화합물인 아세틴은 에스터 결합 분해 효소(esterases)에 의해서 글리세롤과 아세테이트로 분해될 수 있고, 상기 아세틴을 분해하는 에스터 결합 분해 효소는 예를 들어 아세틸에스테라제일 수 있다.

[0136] 상기 아세틸에스테라제를 코딩하는 유전자(*aes*)가 감쇄 또는 결실된 미생물의 경우 아세틸에스테라제를 발현하지 않아, 아세틴의 생산량을 증가시킬 수 있다.

[0137] 상기 아세틸에스테라제는 미생물 종류에 따라 다른 서열을 가질 수 있고, 이를 코딩하는 유전자도 마찬가지로 다른 서열을 가질 수 있는 바, 해당 미생물에서 아세틸에스테라제를 코딩하는 유전자가 감쇄 또는 결실된 것일 수 있다. 예를 들어, 대장균의 경우, 서열번호 13의 아세틸에스테라제를 코딩하는 서열번호 30의 유전자가 감쇄 또는 결실된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0138] 또한, 상기 미생물은 전술한 바와 같으나, 구체적으로 대장균(*E.coli*)일 수 있고, 보다 구체적으로는 DH5 α , DH5 α (DE3), AceCo, BW25113, W3110 또는 MG1655일 수 있고, 바람직하게는 MG1655일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0140] 또한, 상기 미생물은 글리세롤 3-인산 탈수소효소(glycerol-3-phosphate dehydrogenase) 및 글리세롤 3-탈인산 효소(DL-glycerol-3-phosphatase)를 코딩하는 유전자를 더 발현하는 것일 수 있다.
- [0141] 전술한 바와 같이 상기 미생물은 글리세롤 3-인산 탈수소효소 및 글리세롤 3-탈인산효소를 발현하며, 포도당은 해당경로 및 상기 효소들을 통해 글리세롤로 변환될 수 있다.
- [0142] 상기 글리세롤 3-인산 탈수소효소(glycerol-3-phosphate dehydrogenase)를 코딩하는 유전자(Gpd1)는 미생물 종류에 따라 다른 염기 서열을 가질 수 있고, 해당 미생물에서 해당경로의 중간대사물질인 글리세론 인산(glycerone phosphate, DHAP)을 글리세롤 3-인산(glycerol-3-phosphate, G3P)으로 전환할 수 있는 것이면 족하다. 예를 들어, 사카라마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)의 경우, 서열번호 31의 사카라마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)의 글리세롤 3-인산 탈수소효소(glycerol-3-phosphate dehydrogenase)를 코딩하는 유전자(*Sc-gpd1*)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0143] 상기 글리세롤 3-탈인산효소(DL-glycerol-3-phosphatase)를 코딩하는 유전자(Gpp2)는 미생물 종류에 따라 다른 염기 서열을 가질 수 있고, 해당 미생물에서 해당경로의 중간대사물질인 글리세롤 3-인산(glycerol-3-phosphate, G3P)을 글리세롤(glycerol)로 전환할 수 있는 것이면 족하다. 예를 들어, 사카라마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)의 경우, 서열번호 32의 사카라마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)의 글리세롤 3-탈인산효소(DL-glycerol-3-phosphatase)를 코딩하는 유전자(*Sc-gpp2*)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0144] 상기 글리세롤은 전술한 0-아세틸 전이효소 및 클로람페니콜-0-아세틸 전이효소 등에 의해 아세틴 복합물로 변환될 수 있다.
- [0146] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 하기 실시예에 사용된 플라스미드와 균주는 표 1에, PCR primer 들은 표 2에 정리하였다.

표 1

Names	Descriptions	Sources
Plasmids		
pSTV28	P _{lac} expression vector, pACYC184 origin, lacZ α , Cm ^r	Takara Co., Ltd
pTrc99A	P _{trc} expression vector, pBR322 origin, lacI ^q , Amp ^r	Amersham Bioscience
pET28a (+)	P _{T7} expression vector, pBR322 origin, lacI, and Kan ^r	Novagen
pMD1	pTrc99A vector containing <i>lacA</i> from <i>E. coli</i>	-
pMD2	pTrc99A vector containing <i>cysE</i> from <i>E. coli</i>	-
pMD3	pTrc99A vector containing <i>yjgM</i> from <i>E. coli</i>	-
pMD4	pTrc99A vector containing <i>yjaB</i> from <i>E. coli</i>	-
pMD5	pTrc99A vector containing <i>yiiD</i> from <i>E. coli</i>	-
pMD6	pTrc99A vector containing <i>weeH</i> from <i>E. coli</i>	-
pMD7	pTrc99A vector containing <i>nhoA</i> from <i>E. coli</i>	-
pMD8	pTrc99A vector containing <i>maa</i> from <i>E. coli</i>	-
pMD9	pTrc99A vector containing <i>maa</i> from <i>S. carnosus</i>	-
pMD10	pTrc99A vector containing <i>maa</i> from <i>H. jeotgali</i>	-
pMD11	pTrc99A vector containing <i>maa</i> from <i>L. brevis</i>	-
pMD12	pTrc99A vector containing <i>maa</i> from <i>P. putida</i>	-
pMD13	pTrc99A vector containing <i>maa</i> from <i>B. subtilis</i>	-
pMD14	pET28a vector containing <i>maa</i> from <i>B. subtilis</i>	-
pT-CAT	pTrc99A vector containing <i>cat</i> from pSTV28	-
pMDT1	pSTV28 vector containing <i>maa</i> from <i>B. subtilis</i>	-
pMDT2	pTrc99A vector containing <i>cat</i> from pSTV28 and <i>maa</i> from <i>B. subtilis</i>	-

pMDT3	pTrc99A vector containing <i>oat</i> from <i>B. cereus</i> and <i>maa</i> from <i>B. subtilis</i>	-
pMDT4	pTrc99A vector containing <i>oat</i> from <i>P. aeruginosa</i> and <i>maa</i> from <i>B. subtilis</i>	-
pMDT5	pTrc99A vector containing <i>oat</i> from <i>C. acetobutylicum</i> and <i>maa</i> from <i>B. subtilis</i>	-
pMDT6	pTrc99A vector containing <i>oat</i> from <i>M. abscessus</i> and <i>maa</i> from <i>B. subtilis</i>	-
pMDT7	pTrc99A vector containing <i>oat</i> from <i>L. brevis</i> and <i>maa</i> from <i>B. subtilis</i>	-
pMDT8	pMDT2 containing <i>gpd1</i> and <i>gpp2</i> from <i>S. cerevisiae</i>	-
Strains		
MG1655	<i>E. coli</i> K-12; F ⁻ lambda ⁻ , ilvG ⁻ , rfb-50, rph-1	ATCC 700926
DH5 α	<i>E. coli</i> K-12; F ⁻ , Φ80lacZΔM15, Δ(lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rK ⁻ , mK ⁺) phoA, supE44, λ ⁻ , thi-1	ATCC98040
BW25113	Δ(<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787(::rrnB-3), lambda ⁻ , rph-1, Δ(<i>rhaD-rhaB</i>)568, hsdR514	NBRP, NIG
AceCo	MG1655 Δ <i>ackA-pta</i> , <i>poxB</i> , <i>ldhA</i> , <i>dld</i> , <i>adhE</i> , <i>pps</i> , <i>atoDA</i>	Ref. 1
W3110	<i>E. coli</i> K-12; F ⁻ , λ ⁻ IN (rrnD-rrnE)1	ATCC27325
DH5 α (DE3)	<i>E. coli</i> K-12; F ⁻ , Φ80lacZΔM15, Δ(lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rK ⁻ , mK ⁺) phoA, supE44, λ ⁻ , thi-1, λ(DE3)	-
JW0465	BW25113 Δ <i>aes</i>	NBRP, NIG
DH-MD0	<i>E. coli</i> DH5 α harboring pTrc99A	-
DH-MD1	<i>E. coli</i> DH5 α harboring pMD1	-
DH-MD2	<i>E. coli</i> DH5 α harboring pMD2	-
DH-MD3	<i>E. coli</i> DH5 α harboring pMD3	-
DH-MD4	<i>E. coli</i> DH5 α harboring pMD4	-
DH-MD5	<i>E. coli</i> DH5 α harboring pMD5	-
DH-MD6	<i>E. coli</i> DH5 α harboring pMD6	-
DH-MD7	<i>E. coli</i> DH5 α harboring pMD7	-
DH-MD8	<i>E. coli</i> DH5 α harboring pMD8	-
DH-MD9	<i>E. coli</i> DH5 α harboring pMD9	-
DH-MD10	<i>E. coli</i> DH5 α harboring pMD10	-
DH-MD11	<i>E. coli</i> DH5 α harboring pMD11	-
DH-MD12	<i>E. coli</i> DH5 α harboring pMD12	-
DH-MD13	<i>E. coli</i> DH5 α harboring pMD13	-
DH-MD14	<i>E. coli</i> DH5 α (DE3) harboring pMD14	-
DH-MDT1	<i>E. coli</i> DH5 α harboring pMDT1	-
DH-EMPT	<i>E. coli</i> DH5 α harboring pTrc99A	-
DH-CAT	<i>E. coli</i> DH5 α harboring pT-CAT	-
DH-MDT2	<i>E. coli</i> DH5 α harboring pMDT2	-
DH-MDT3	<i>E. coli</i> DH5 α harboring pMDT3	-
DH-MDT4	<i>E. coli</i> DH5 α harboring pMDT4	-
DH-MDT5	<i>E. coli</i> DH5 α harboring pMDT5	-
DH-MDT6	<i>E. coli</i> DH5 α harboring pMDT6	-
DH-MDT7	<i>E. coli</i> DH5 α harboring pMDT7	-
AC-MDT2	<i>E. coli</i> AceCo harboring pMDT2	-
BW-MDT2	<i>E. coli</i> BW25113 harboring pMDT2	-
W3-MDT2	<i>E. coli</i> W3110 harboring pMDT2	-
MG-MDT2	<i>E. coli</i> MG1655 harboring pMDT2	-
BW-Empty	<i>E. coli</i> BW25113 harboring pTrc99A	-
BW-Aes	<i>E. coli</i> BW25113 harboring pT-Aes	-
BW-MDT2 (Daes)	<i>E. coli</i> JW0465 harboring pMDT2	-
DH-MDT8	<i>E. coli</i> DH5 α harboring pMDT8	-

[0149]

Ref. 1. Kim, J.-H. et al. Isoprene production by *Escherichia coli* through the exogenous mevalonate pathway with reduced formation of fermentation byproducts. *Microbial Cell Factories* 15, 214 (2016).

표 2

[0150]

Primers ^{a, b, c}	Descriptions (5'→ 3')	서열번호
Ec-lacA-F	CTGGATCCAGGAGGTAATAAAATGGAACATGCCAATGACCG	33
Ec-lacA-R	GTTTCTAGATTAACTGACGATTCAACTTTATAATC	34
Ec-cysE-F	CTGGATCCAGGAGGTAATAAAATGTCGTGTGAAGAACTGGAAATTG	35
Ec-cysE-R	GTTTCTAGATTAGATCCCATCCCCATACTC	36
Ec-yjgM-F	CTGGATCCAGGAGGTAATAAAATGAATAACATTGCGCCGC	37
Ec-yjgM-R	GTTTCTAGATTAGAGTTCGCGCAACATCC	38
Ec-yjaB-F	CTGGATCCAGGAGGTAATAAAATGGTTATTAGTATTCGCGCTC	39
Ec-yjaB-R	GTTTCTAGATTACGCCCCACATACGC	40
Ec-yiiD-F	CTGGATCCAGGAGGTAATAAAATGAGCCAGCTTCCAGGG	41
Ec-nhoA-F	CTGGATCCAGGAGGTAATAAAATGACGCCATTCTGAATCAC	42
Ec-nhoA-R	GTTTCTAGATTATTTCCCGCTCCGGG	43
Ec-wecH-F	CTGGATCCAGGAGGTAATAAAATGCAGCCAAAATTTACTGG	44
Ec-wecH-R	GTTTCTAGATTAACTCACTAATCTGTTTCTGTGC	45
Ec-yiiD-R	GTTTCTAGATTACTCTTCTTCGTTCCCGC	46
Ec-maa-F	CTGGATCCAGGAGGTAATAAAATGAGCACAGAAAAAGAAAAGATG	47
Ec-maa-R	GTTTCTAGATTACAATTTTAAATTTATTCTGGCTG	48
Sc-maa-F	CTGGATCCAGGAGGTAATAAAATGACCACCGAGAAGGAAAAAATG	49
Sc-maa-R	GTTTCTAGATTAAATCCAGCGCACTTCAC	50
Hj-maa-F	CTGGATCCAGGAGGTAATAAAATGACCAGCGAGAAGGAACG	51
Hj-maa-R	GTTTCTAGATTAAATCAACGTCCTTCAGCACA	52
Lb-maa-F	CTGGATCCAGGAGGTAATAAAATGGACAAGAGCGAGAAGG	53
Lb-maa-R	GTTTCTAGATTATTCAGCGGCTTAATCAC	54
Pp-maa-F	CTGGATCCAGGAGGTAATAAAATGAGCCTGAGCGAGAAGCAC	55
Pp-maa-R	GTTTCTAGATTATGACCCTGATCCGGCTG	56
Bs-maa-F	CTGGATCCAGGAGGTAATAAAATGCTGCGTACCGAGAAGG	57
Bs-maa-R	GTTTCTAGATTACAGTTGTTTCAGAATACGCGC	58
Cat-F	CTAGGAGCTCAGGAGAAATATAATGGAGAAAAAATCACTGGATATAC	60
Cat-R	CTGGATCCTTACGCCCCGCCCTGCC	61
Trc-Bs.maa-F	AGATCTGAGTCGACAGTATCGGCGGG	62
Trc-Bs.maa-R	TATATTTCTCCTGAGGATCCCCGGGTACCG	63
Bc-Oat-F	CTCGGTACCCGGGATCCTCAGGAGAAATATAATGGACTTCCACCAGATC	64
Bc-Oat-R	CCCGCCGATACTGTCGACAGATCTTACAGCCATTCTCAAAG	65
Ca-Oat-F	CTCGGTACCCGGGATCCTCAGGAGAAATATAATGAACAGCAACTTCCAC	66
Ca-Oat-R	CCCGCCGATACTGTCGACAGATCTTAACGAATCCACTCTTTC	67
Lb-Oat-F	CTCGGTACCCGGGATCCTCAGGAGAAATATAATGACCAGCTGAACACCC	68
Lb-Oat-R	CCCGCCGATACTGTCGACAGATCTTACGCGGTCAGCCACAG	69
Ma-Oat-F	CTCGGTACCCGGGATCCTCAGGAGAAATATAATGCCGCGGAGCACGCG	70
Ma-Oat-R	CCCGCCGATACTGTCGACAGATCTTAATCACGAACCAATCCGGGTCCG	71
Pa-Oat-F	CTCGGTACCCGGGATCCTCAGGAGAAATATAATGAGCTACACCGTGTTG	72
Pa-Oat-R	CCCGCCGATACTGTCGACAGATCTTAGCCACCCGCTTCATC	73
Ec-aes-F	CTGGATCCGTCACCCAACCCCTTATGAAGCCGAAAAACAACTACC	74
Ec-aes-R	TATCGTCGACTTAAAGCTGAGCGGTAAGAACTG	75
Sc-gpd1-F	GCGGATCCAGGAGGTAATAAAATGTCTGCTGCTGCTGATAGATTAAAC	76
Sc-gpd1-R	AATGCTGCAGTTAATCTTCATGTAGATCTAATCTTCAATC	59
Sc-gpp2-F	TGCTGCAGAGGAGGTAATTTATATGGGATTGACTACTAAACCTCTATC	22
Sc-gpp2-R	CCCAAGCTTACCATTTCACAGATCGTCC	23

[0151]

^a Restriction enzyme sites are underlined. ^b RBS sequences are italic.

[0152]

^c The overlapping sequences are bolded.

[0155] **실시예**

[0156] **1. 대장균 유래 O-acetyltransferases 효소들을 이용한 모노아세틴과 다이아세틴 생산**

[0157] 모노아세틴과 다이아세틴을 생산하기 위해서 글리세롤에 아세틸기를 전이할 수 있는 대장균 내의 O-acetyltransferases 후보 유전자들을 8종 선별하고 각 유전자들을 pTrc99A 발현벡터(서열번호 78)에 클로닝해서 플라스미드 pMD1 - pMD8를 구축하였다. 후보 유전자들은 galactoside O-acetyltransferase, maltose O-acetyltransferase(서열번호 1), serine acetyltransferase, O-acetyltransferase WechH, arylamine N-acetyltransferase를 각각 코딩하는 *lacA*(서열번호 80), *maa*(서열번호 16), *cysE*(서열번호 81), *wechH*(서열번호 82), *nhoA*(서열번호 83)와 3종의 O-acetyltransferase 추정 유전자 *yjgm*(서열번호 84), *yjaB*(서열번호 85), *yiiD*(서열번호 86)를 대장균 MG1655의 염색체를 주형으로 해서 PCR 증폭을 통해서 얻었다. 이 때 사용한 PCR primer들은 Ec-lacA-F(서열번호 33)/Ec-lacA-R(서열번호 34), Ec-maa-F(서열번호 47)/Ec-maa-R(서열번호 48), Ec-cysE-F(서열번호 35)/Ec-cysE-R(서열번호 36), Ec-wechH-F(서열번호 44)/Ec-wechH-R(서열번호 45), Ec-nhoA-F(서열번호 42)/Ec-nhoA-R(서열번호 43), Ec-yjgm-F(서열번호 37)/Ec-yjgm-R(서열번호 38), Ec-yjaB-F(서열번호 39)/Ec-yjaB-R(서열번호 40), Ec-yiiD-F(서열번호 41)/Ec-yiiD-R(서열번호 46)이다. 상기 PCR 반응산물은 BamHI과 XbaI을 이용해서 pTrc99A 벡터에 클로닝 되었다. 이렇게 구축한 플라스미드 pMD1 - pMD8로 대장균 DH5 α를 형질전환해서 재조합균주 DH-MD1 ~ DH-MD8을 만들고 모노아세틴 및 다이아세틴 생성을 분석하였다(도 3).

[0158] 종 배양은 LB 복합배지(10 g tryptone, 5 g yeast extract and 10 g sodium chloride per liter)를 이용해서 37℃에서 약 12시간 진탕 배양을 했다. 본 배양은 M9 최소배지(Na₂HPO₄·7H₂O, 12.8 g/L; KH₂PO₄, 3g/L; NaCl, 0.5 g/L; NH₄Cl, 1 g/L; MgSO₄, 1mM; CaCl₂, 100 mM)에 5 g/L의 yeast extract와 2% (v/v)의 glycerol을 첨가하고, 배양온도 37℃와 진탕속도 250rpm에서 48시간 동안 진행했다. 재조합균주에 도입된 플라스미드의 항생제 마커에 따라서 100 mg/L ampicillin, 50 mg/L chloramphenicol, 또는 50 mg/L kanamycin 항생제를 첨가했다. 본 배양의 초기 균체 농도는 OD_{600nm}에서 0.1이 되게 하였고, 플라스미드에 도입한 유전자들의 발현을 위해서 0.5 mM Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)를 배양 초기에 첨가하였다.

[0159] 아세틴 화합물의 분석은 HP-INNOVAX column (19091N-133, 30 m in length, 0.250 mm in internal diameter and 0.25 μm film thicknesses)이 장착된 GC (Agilent Technologies 7890A, 미국)와 GC-MS (GC-MS-QP2010, SHIMADZU, 일본)를 이용했다. 아세틴 표준화합물은 Sigma (미국)에서 구입하였다. 본 배양에서 생산된 아세틴 복합물은 ethyl acetate 용매를 이용해서 배양액으로부터 추출하고, 추출 시료의 1 μL를 GC 또는 GC-MS에 주입하였다. GC의 오븐 온도는 50℃에서 시작해서 20℃/min의 속도로 90℃까지, 15℃/min의 속도로 150℃까지, 20℃/min의 속도로 190℃까지, 15℃/min의 속도로 230℃까지 올리고, 2 분간 유지하였다. 불꽃 이온 검출기(FID)의 온도는 280℃로 유지했다. 상기 분석방법에 따른 분석결과는 도 5에 나타내었다.

[0160] 도 3의 재조합균주 DH-MD1 ~ DH-MD8의 배양결과에 따르면 pMD8 플라스미드로 형질전환된 DH-MD8 균주에서만 모노아세틴과 다이아세틴이 생산되었다. 이것은 대장균 유래 8종의 O-acetyltransferases 후보 유전자들 중에서 maltose O-acetyltransferase 유전자(*maa*)만이 글리세롤에 아세틸기를 전이할 수 있는 능력이 있다는 것이다.

[0162] **2. 대장균 Maa 유사 효소들을 이용한 모노아세틴 생산**

[0163] 대장균에서 발굴된 Maa 보다 더 우수한 활성을 갖는 O-acetyl transferases를 발굴하기 위해서 대장균 Maa의 아미노산 서열로 BLAST 검색을 하고, *Staphylococcus carnosus*, *Halalkalicoccus jeotgali*, *Lactobacillus brevis*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas putida* 미생물로부터 추가로 5종의 maltose O-acetyltransferases(Sc-mOat(서열번호 2), Hj-mOat(서열번호 3), Lb-mOat(서열번호 4), Bs-mOat(서열번호 5), Pp-mOat(서열번호 6))를 확보하고 이들을 대장균에 발현 한 후에 모노아세틴과 다이아세틴 생산성을 비교했다(도 3).

[0164] 상기 미생물 유래 유전자들은 숙주인 대장균에서의 발현을 최적화하기 위해서 GenScript (미국)에서 대장균 코돈 이용도에 맞춰서 합성을 했다. 상기 합성한 유전자들을 Sc-maa-F(서열번호 49)/Sc-maa-R(서열번호 50), Hj-maa-F(서열번호 51)/Hj-maa-R(서열번호 52), Lb-maa-F(서열번호 53)/Lb-maa-R(서열번호 54), Pp-maa-F(서열번호 55)/Pp-maa-R(서열번호 56), Bs-maa-F(서열번호 57)/Bs-maa-R(서열번호 58)의 PCR primers를 이용해서 증폭하여 얻은 *Sc-maa*(서열번호 17), *Hj-maa*(서열번호 18), *Lb-maa*(서열번호 19), *Pp-maa*(서열번호 21), *Bs-maa*(서열번호 20) 유전자를 BamHI과 XbaI을 이용해서 pTrc99A 벡터에 클로닝 하였다. 이렇게 구축한 플라스미드 pMD9

- pMD13로 대장균 DH5 α를 형질전환해서 재조합균주 DH-MD9 ~ DH-MD13을 만들고 모노아세틴과 다이아세틴 생산성을 비교하였다(도 3).

[0165] 비교 결과 *B. subtilis*의 Maa (*Bs-maa*)가 가장 높은 모노아세틴과 다이아세틴 생산성을 보인 것을 확인하였다. 배양방법과 분석방법은 실시예 1과 동일하다.

[0167] 3. Chloramphenicol-O-acetyltransferase를 이용한 트리아세틴 생산

[0168] 모노아세틴과 다이아세틴 생산성이 가장 좋았던 *B. subtilis*의 Maa 유전자(*Bs-maa*)의 발현 최적화를 위해서 pTrc99A(서열번호 78), pET28a(서열번호 79), pSTV28(서열번호 77) 등의 다양한 발현벡터에 클로닝해서 pMD13, pMD14, pMDT1) 플라스미드를 구축하고, 이 플라스미드들로 형질전환 된 재조합 대장균 DH-MD13, DH-MD14, DH-MDT1를 만들었다. T7 프로모터를 갖는 pMD14의 형질전환 숙주 균주로는 대장균 DH5 α (DE3)를 이용했다. DH5 α (DE3) 균주는 Novagen 회사(미국)의 λDE3 Lysogenization Kit를 이용해서 대장균 DH5 α로부터 만들었다. DH-MDT1 균주에서 모노아세틴과 다이아세틴 생산성이 가장 높았을 뿐만 아니라 트리아세틴의 생산까지 관찰되었다(도 4).

[0169] 이것은 pSTV28 벡터의 항생제 마커인 chloramphenicol-O-acetyltransferase (CAT, 서열번호 7)에 의한 것으로 추정된다. CAT은 광범위한 기질특이성을 갖고 있어서 다양한 기질들에 아세틸기를 전이시키는 것으로 알려져 있다. 모노아세틴과 다이아세틴에 추가적인 아세틸기 전이를 통해 트리아세틴(triacetin)을 생산하는 CAT 효소 유전자(*cat*, 서열번호 24)의 발현을 강화하기 위해서 pMD13 플라스미드의 *Bs-maa* 유전자 앞에 도입한 pMDT2 플라스미드를 구축하였다(도 6).

[0170] 이를 위해서 Cat-F(서열번호 60)/Cat-R(서열번호 61)의 PCR primers를 이용해서 pSTV28로부터 *cat* 유전자를 PCR 증폭하고, SacI과 BamHI으로 절단해서 pMD13의 해당 제한효소 부위로 도입하였다. pMDT2로 형질전환 된 DH-MDT2 재조합균주의 모노아세틴, 다이아세틴, 트리아세틴의 복합물 생산량과 트리아세틴의 비율이 모두 DH-MDT1 균주에 비해서 크게 증가했다. 배양방법과 분석방법은 실시예 1과 동일하다.

[0172] 4. CAT 유사 효소들을 이용한 트리아세틴 화합물 생산

[0173] 모노아세틴과 다이아세틴을 트리아세틴으로 전환하는 효소들을 추가로 발굴하기 위해서 CAT 효소의 아미노산 서열로 BLAST 검색을 실시하였다. 이 검색을 통해서 상동성이 높은 5종의 O-acetyltransferases (OAT, Bc-OAT(서열번호 8), Pa-OAT(서열번호 9), Ca-OAT(서열번호 10), Ma-OAT(서열번호 11), Lb-OAT(서열번호 12))를 *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium acetobutylicum*, *Mycobacterium abscessus*, *Lactobacillus brevis*에서 도출하고 숙주인 대장균에서의 발현을 최적화하기 위해서 GenScript 회사(미국)에서 대장균 코돈 이용도에 맞춰서 합성을 했다.

[0174] 상기 미생물 유래 OAT 합성 유전자들(*Bc-Oat*(서열번호 25), *Pa-Oat*(서열번호 26), *Ca-Oat*(서열번호 27), *Ma-Oat*(서열번호 28), *Lb-Oat*(서열번호 29))을 Bc.Oat-F(서열번호 64)/Bc.Oat-R(서열번호 65), Pa.Oat-F(서열번호 72)/Pa.Oat-R(서열번호 73), Ca.Oat-F(서열번호 66)/Ca.Oat-R(서열번호 67), Ma.Oat-F(서열번호 70)/Ma.Oat-R(서열번호 71), Lb.Oat-F(서열번호 68)/Lb.Oat-R(서열번호 69)의 PCR primers를 이용해서 증폭한다.

[0175] 이렇게 증폭한 각 유전자들의 단편은 pMD13 기반의 플라스미드 골격과 HiFi DNA assembly 방법으로 연결해서 플라스미드 pMDT3 ~ pMDT7을 구축하였다(도 7).

[0176] HiFi DNA assembly는 NEB 회사(미국)의 HiFi DNA assembly kit를 이용했고, 상기 pMD13 기반의 플라스미드 골격은 pMD13을 주형으로 Trc-Bs.maa-F(서열번호 62)와 Trc-Bs.maa-R(서열번호 63)를 PCR primer로 PCR을 수행해서 얻었다. pMDT3 ~ pMDT7 플라스미드로 형질전환 된 재조합균주 DH-MDT2 ~ DH-MDT7의 아세틴 복합물 생산량을 비교하였다(도 7).

[0177] 그 결과 OAT 유전자 종류에 따라서 아세틴 복합물의 생산량에 큰 차이가 있었고, *L. brevis*와 *M. abscessus* 유래의 O-acetyltransferase는 트리아세틴 생산 능력이 없었고, *B. cereus*, *P. aeruginosa*, *C. acetobutylicum*의 유래의 O-acetyltransferase는 트리아세틴을 생산했지만 pSTV28의 항생제 마커인 CAT에 비해서는 생산성이 낮았다. 배양방법과 분석방법은 실시예 1과 동일하다.

[0179] **5. 대장균 균종 및 글리세롤 첨가량에 따른 아세틴 복합물 생산량 변화**

[0180] 앞의 실시예들에서 숙주로 대장균 DH5 α 를 이용했다. 대장균의 종류에 따른 아세틴 화합물의 생산성을 비교하기 위해서 본 실시예에서는 숙주로 대장균 AceCo, BW25113, W3110, MG1655를 플라스미드 pMDT2로 형질전환 한 재조합 대장균 DH-MDT2, AC-MDT2, BW-MDT2, W3-MDT2, MG-MDT2를 배양해서 아세틴 복합물 생산성을 비교했다(도 8A, 8B).

[0181] 재조합균주 MG-MDT2에서 아세틴 복합물 생산성이 가장 높았기 때문에 대장균 MG1655가 아세틴 화합물 생산에 가장 적합한 숙주라는 것을 알았다. 배양방법과 분석방법은 실시예 1과 동일하다.

[0182] 가장 높은 아세틴 화합물 생산성을 보인 재조합균주 MG-MDT2에서 기질인 글리세롤 첨가량에 따른 아세틴 화합물 생산성을 고찰하기 위해서 모든 배양조건과 분석방법은 실시예1과 동일하고 다만 첨가하는 글리세롤의 농도를 2 ~ 15% (v/v)로 변화시켰다(도 8C, 8D).

[0183] 아세틴 복합물의 생산량은 출발기질인 글리세롤의 첨가량이 증가할수록 높아졌으나, 15% 이상의 과도한 글리세롤 첨가의 경우에는 과도한 삼투압 증가의 영향으로 균체 증식과 아세틴 생산이 모두 감소하는 결과를 얻었다.

[0185] **6. 아세틴 화합물을 분해하는 효소 유전자 제거를 통한 생산성 향상**

[0186] 에스터 화합물인 아세틴은 에스터 결합 분해 효소(esterases, 서열번호 13)에 의해서 글리세롤과 아세테이트로 분해될 수 있기 때문에 대장균의 acetylsterase 효소 유전자(*aes*, 서열번호 30)의 증폭 또는 결손의 영향을 고찰했다(도 9).

[0187] *Aes* 유전자 단편은 대장균 MG1655의 염색체를 주형으로 Ec-*aes*-F(서열번호 74)와 Ec-*aes*-R(서열번호 75)을 프라이머로 이용해서 PCR 증폭해서 얻었고, BamHI과 SalI 제한효소로 pTrc99A에 클로닝 해서 플라스미드 pTAes를 구축하였다. *Aes* 효소에 의한 트리아세틴의 분해를 관찰하기 위해서 대장균 BW25113을 공백터 pTrc99A와 플라스미드 pTAes로 형질전환한 재조합균주 BW-Empty와 BW-*Aes*를 제조하고, 트리아세틴 표준화합물 15 g/L가 첨가된 배지에서 배양하였다. 배양조건은 상기 실시 예들에서 이용한 아세틴 복합물 생산조건과 동일하게 수행하였다(도 9A, 9B).

[0188] BW-Empty와 BW-*Aes* 균주에서 모두 트리아세틴 표준화합물의 분해가 일어났지만 분해의 정도는 *aes* 유전자를 과발현시킨 BW-*Aes*에서 훨씬 더 큰 것을 확인했다. 트리아세틴의 분해로 배양액에는 소량의 다이아세틴이 측정되었지만 모노아세틴은 검출되지 않았다. 이것은 모노아세틴의 분해가 더 빠르게 일어나기 때문인 것으로 추정된다.

[0189] *Aes*가 아세틴 화합물을 분해한다는 상기 결과로부터 유전자 *aes*가 결손된 JW0465와 야생형 균주인 BW25113을 pMDT2로 형질전환 해서 재조합균주 BW-MDT2와 BW-MDT2(*Daes*)를 제조하고, 이들 재조합 균주들에서의 아세틴 복합물 생산과 균체 증식을 비교했다(도 9C, 9D).

[0190] JW0465 균주는 BW25113 균주에서 *aes* 유전자가 결손된 균주로 NBRP (NIG, 일본)에서 분양을 받았다. 기질인 글리세롤을 10% (v/v) 첨가한 2YT 복합배지(16 g tryptone, 10 g yeast extract, and 5 g sodium chloride per liter)에서 배양을 했고, 기타 배양 및 분석조건은 상기 실시 예들과 동일하게 실시하였다.

[0191] *Aes*가 결손된 BW-MDT2(*Daes*) 균주에서 아세틴의 분해가 차단됨으로써 아세틴 복합물 생산량이 BW-MDT2 균주에 비해서 약 2배 이상 높은 것을 확인했다. 반면에 두 재조합 균주의 균체 증식에서는 차이가 없었다. 이 결과로부터 *Aes*가 아세틴 화합물의 분해에 관련되고, 이 유전자를 결손하면 아세틴 복합물의 생산성을 향상시킬 수 있다는 것을 알았다.

[0193] **7. 포도당을 기질로 이용한 아세틴 화합물의 생산**

[0194] 도 2에 제시한 바와 같이 해당경로(Embden-Meyerhof pathway)의 중간 대사산물인 글리세론 인산(glycerone phosphate, DHAP)은 글리세롤 3-인산 탈수소효소(glycerol-3-phosphate dehydrogenase)와 글리세롤 3-탈인산효소(DL-glycerol-3-phosphatase)에 의해 글리세롤 3-인산을 거쳐서 글리세롤로 전환될 수 있다. 따라서 포도당을 출발기질로 하는 아세틴 복합물의 생산도 글리세롤 3-인산 탈수소효소와 글리세롤 3-탈인산효소의 추가 과발현을 통해서 가능하다. 글리세롤 3-인산 탈수소효소와 글리세롤 3-탈인산효소로 사카라마이세스 세레비지에

(*Saccharomyces cerevisiae*) 유래의 Gpd1(서열번호 14)과 Gpp2(서열번호 15)를 이용했다.

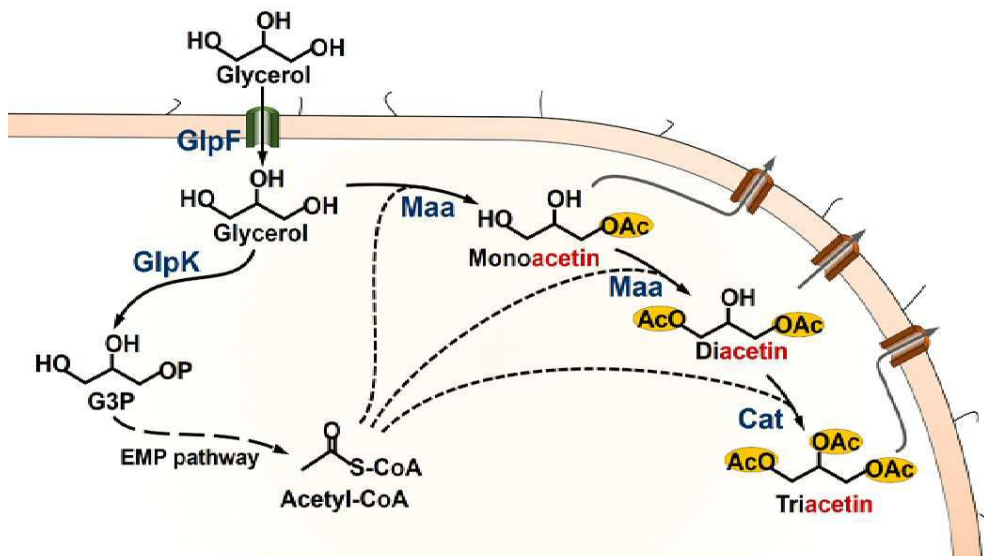
[0195] 도 10은 포도당으로부터 아세틴 복합물 생산을 위해서 사카라마이세스 세레비지에 유래 글리세롤 생산 유전자인 *Sc-gpd1*(서열번호 31)과 *Sc-gpp2*(서열번호 32)를 pMDT2 플라스미드에 클로닝해서 만들어진 플라스미드 pMDT8의 구조 도면(A)과 이 플라스미드로 형질전환 된 재조합 대장균 DH-MDT8의 포도당으로부터의 아세틴 복합물 생산과 균체 증식, 배양액의 pH변화를 대조구인 DH-MDT2와 비교한 도면(B), 도면(C), 도면(D)를 나타내고 있다.

[0196] 사카라마이세스 세레비지에의 염색체를 주형으로 *Sc-gpd1*-F(서열번호 76)와 *Sc-gpd1*-R(서열번호 59)을 프라이머로 이용해서 *Sc-gpd1*을 PCR 증폭하고, *Sc-gpp2*-F(서열번호 22)와 *Sc-gpp2*-R(서열번호 23)을 프라이머로 이용해서 *Sc-gpp2*을 PCR 증폭해서, 전자는 BamHI과 PstI 제한효소로, 후자는 PstI과 HindIII 제한효소로 절단해서 pMDT2 플라스미드의 해당 제한효소 부위로 도입해서 플라스미드 pMDT8를 구축했다. 배양은 재조합균주 DH-MDT2와 DH-MDT8을 글리세롤 대신에 포도당 1% (w/v)를 첨가한 2YT 복합배지에서 접종해서 48시간 동안 진행했다. 기타 배양 및 분석조건은 상기 실시 예와 동일하게 수행했다.

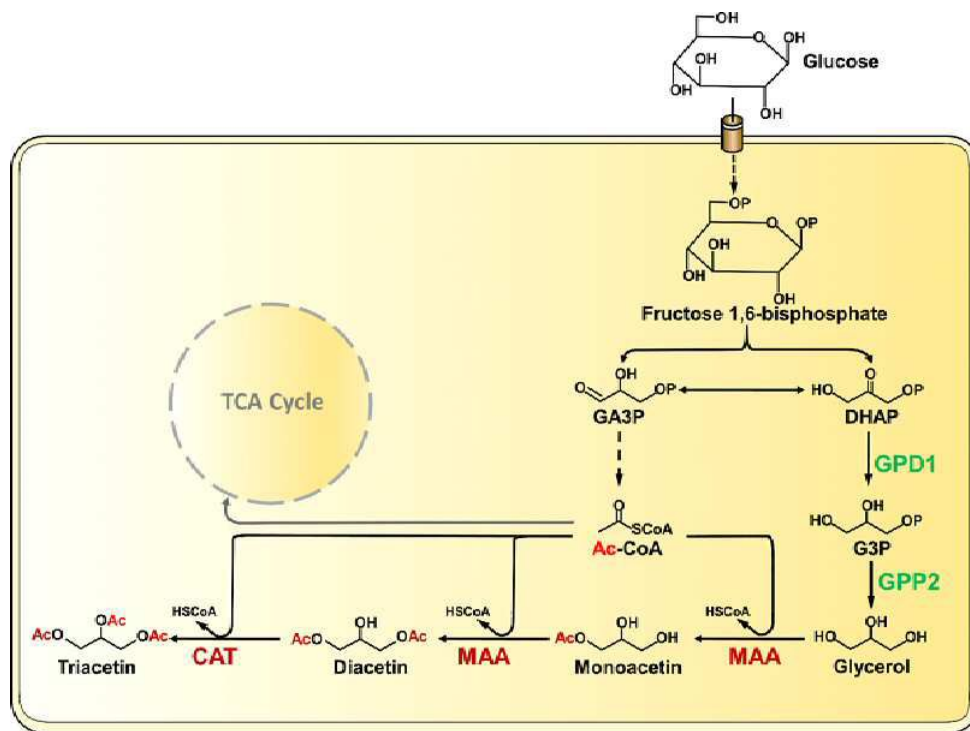
[0197] 두 재조합 균주 중에서 유전자 *Sc-gpd1*과 *Sc-gpp2*가 발현된 DH-MDT8 균주에서만 아세틴 복합물이 생산되었고, 균체 증식 및 배양액의 pH는 유사했다.

도면

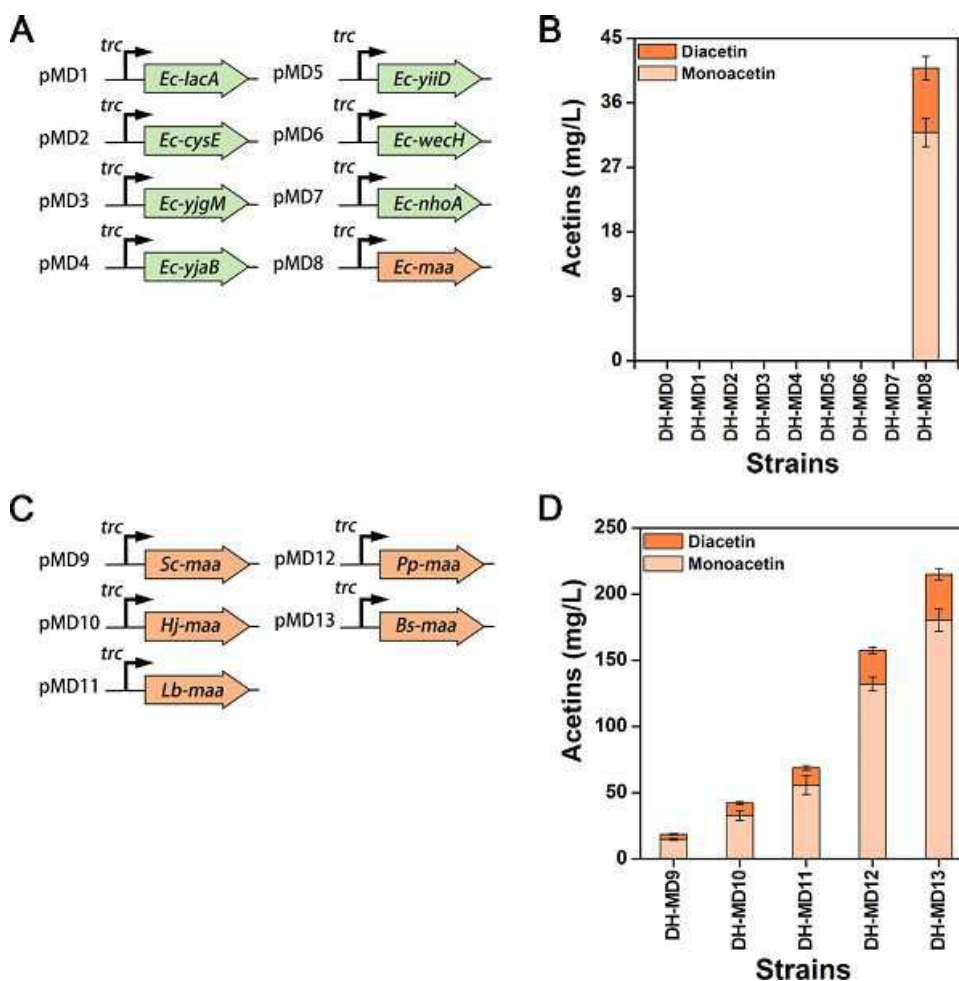
도면1



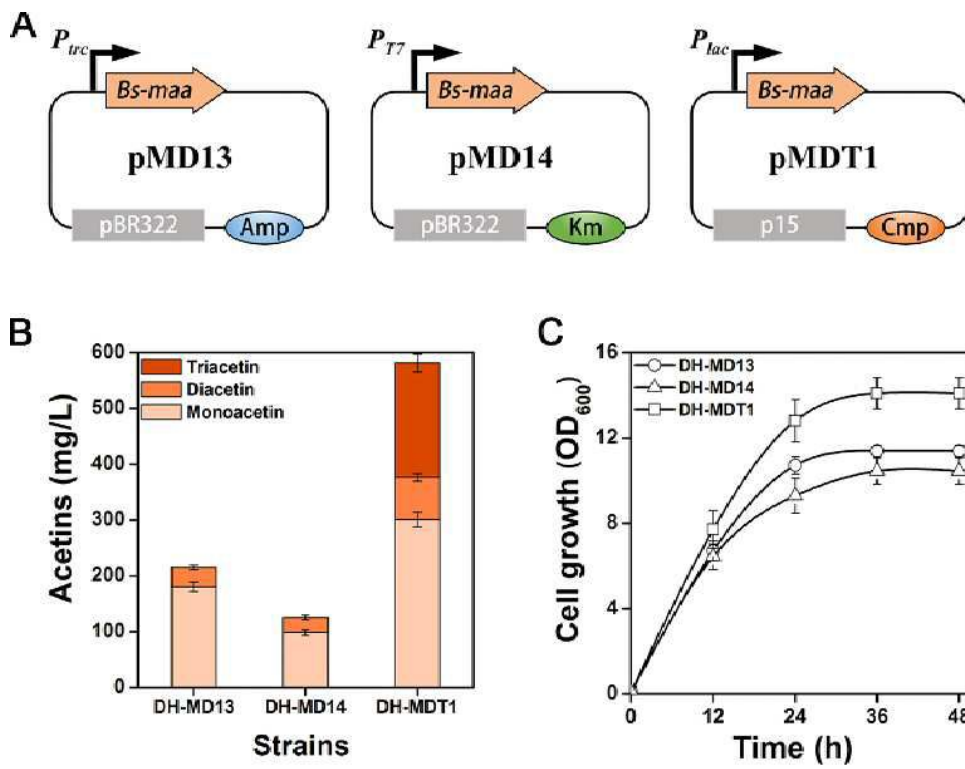
도면2



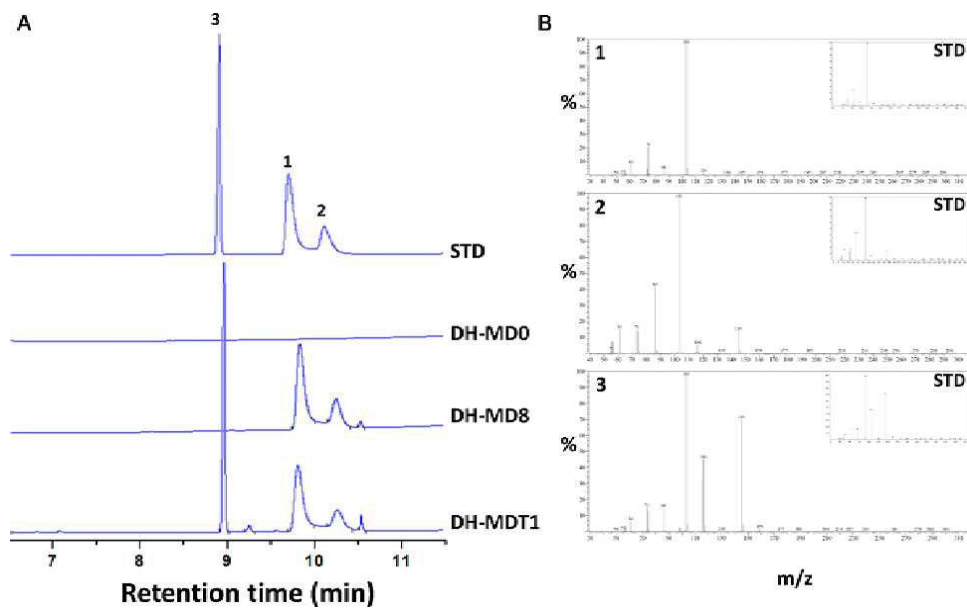
도면3



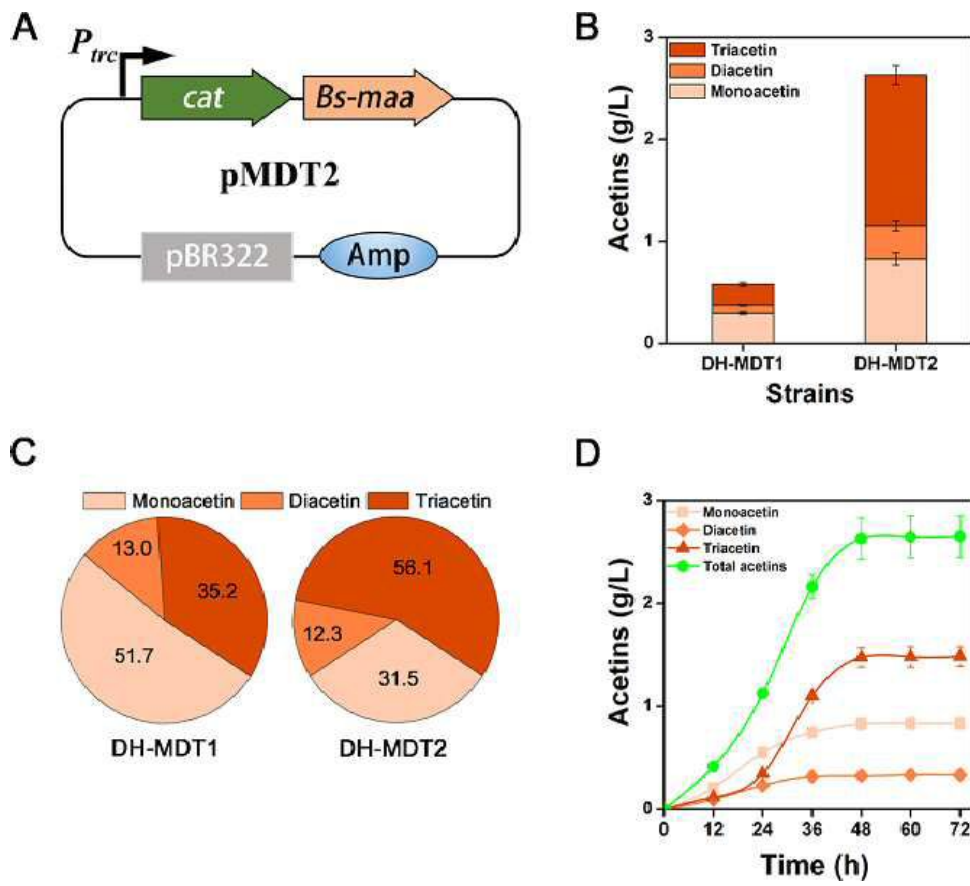
도면4



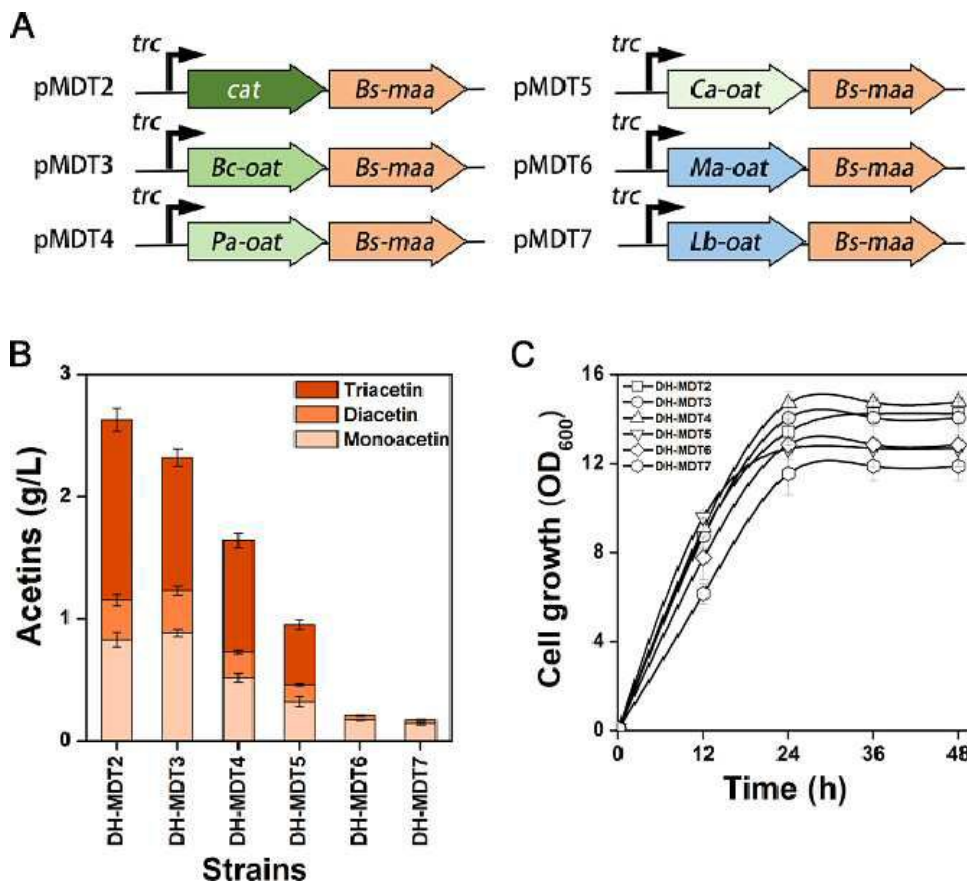
도면5



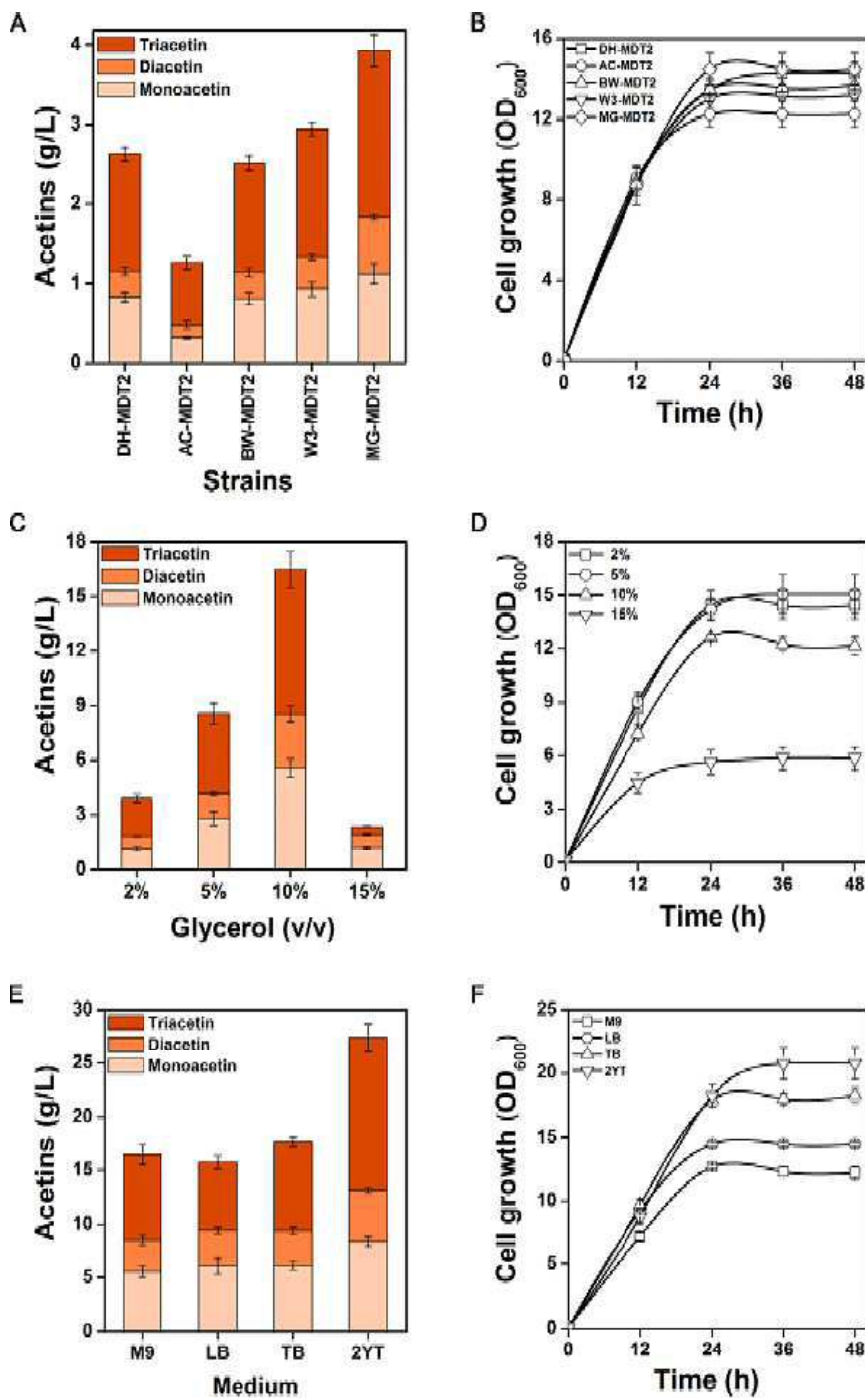
도면6



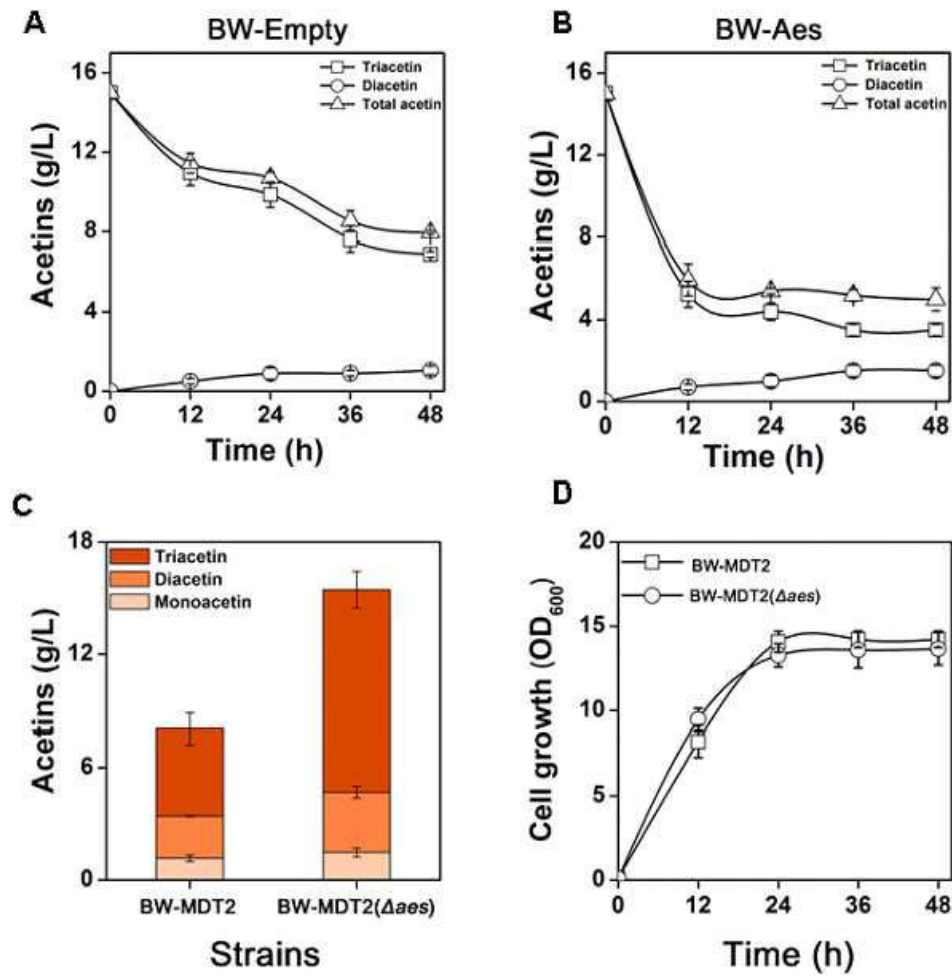
도면7



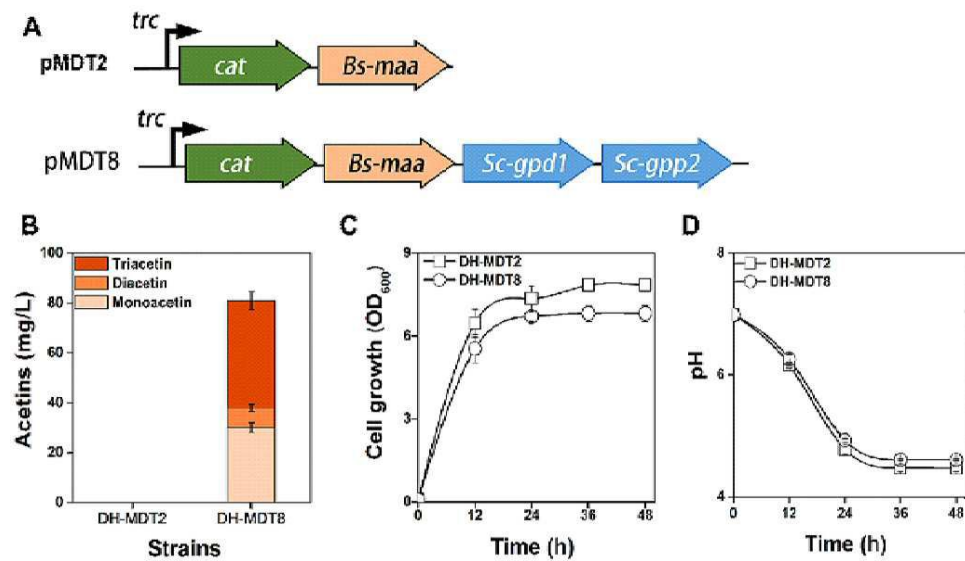
도면8



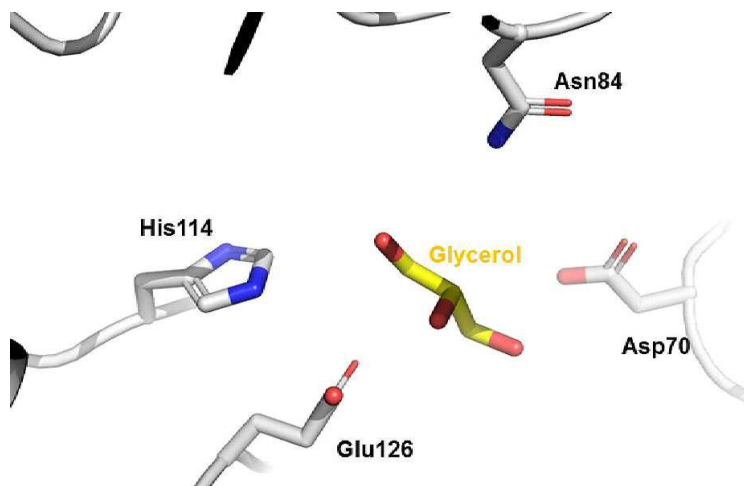
도면9



도면10



도면11



도면12

	1	10	20	30	40	50
BsMAA	MLR	TEKEKMA	AGELYNSE	QQQLLERKH	ARQLIRQYNETPE	DDAVRTKLLKELLGSVGD
EcMAA	.MS	TEKEKMI	AGELYRSADET	LSRDLRLR	ARQLIRRYNHSLAEHTL	RQQILLADLFQGVTE
HjMAA	.MT	SEKERML	IGEPYDAS	SELVAERQHARELT	RKYNNRTTATESDR	ERLLEELFGSVED
LbMAA	MDK	SEKEKMIT	IGELFNVY	DPELVAERGAAR	QQVEALNELGEQDPEKS	QQLVKRLFGATGD
PpMAA	MSL	SEKHKMET	GQLYHAGCP	ELQAEQIANKHNM	RYNNSVELNDAR	RHGILLVEHFGQVGE
ScMAA	.MT	TEKEKML	SGQLYNSR	CPQLVKEERHKAR	HATKAINNAFS	.IKERHFLLRQSIGCHCGD

	60	70	80	90	100	110		
BsMAA	QVITILPTFR	CDYGYHIH	IGDHTFVNFD	CVILDVCEVR	IGCHCLIA	RGVHIYTAGHFLDPI		
EcMAA	.AYIEPTFR	CDYGYNIF	LGNNFANFD	CVMLDVCP	IRIGDNCMLAR	RGVHIYTATHFLDPV		
HjMAA	.ATVEPPIR	CDYGYNVH	VGENFYANFD	CVILDVRR	VEFGTRCL	LGPGVHVYTATHFLDAE		
LbMAA	QVEVHATFR	CDYGYNIY	VGENFYANYD	CTILDVAP	IRIGKHCL	LGPKVQIYSVNHFAEPE		
PpMAA	GAVIRPPFY	CDYGYNIS	VGRNTFMNF	NCVILDVVP	VRIGDDCQ	IGBNVOIYTADHFLDPE		
ScMAA	NVFTEPDI	HF	DYGYNIS	LGNHFYANF	NPVMLDVAP	ITIGNHVL	LG	BNVQLITATHFLNEA

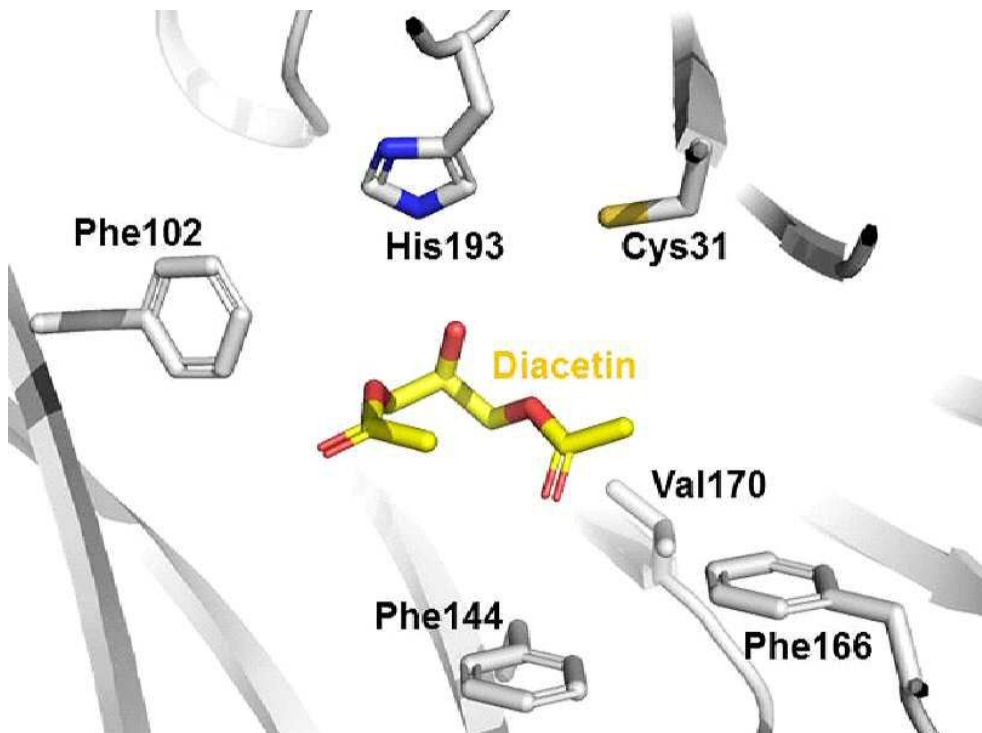
	120	130	140	150	160	170					
BsMAA	ERKSG	.KEFGKPV	TIGDQVWTC	GRAVINP	GVITIGD	NAVIA	SGSVVTKDVP	ANTVVG	GNPA		
EcMAA	ARNSSG	.AELGKPV	TIGNNVWTC	GRAVINP	GVITIGD	NVVV	ASGAVVTKDVP	DNVVG	GNPA		
HjMAA	ERAAG	.LESGAP	VTVGDDVWTC	GRAVLNS	GVSVGD	GSVIA	SGAVVTE	DVP	PAGALVVG	GNPA	
LbMAA	LRRNGA	MGIGKPV	TIGDQVWTC	GAIIICP	GVITIGD	NVIVAA	GAVVTKS	FS	SNVVLG	GNPA	
PpMAA	VRRSG	.LESGRT	VTVGDDVWTC	GAIIILP	GVITIGD	NAIVG	ASGAVVTR	DVP	PAGATVVG	GNPA	
ScMAA	ERASG	.LELA	FPIMIGD	RVWTC	GAGAI	VLPGVITIGD	NVVV	GAGSVVTKD	IP	DNQVVA	GNPA

	180
BsMAA	RILKQL...
EcMAA	RIKKKL...
HjMAA	RVLKDVD...
LbMAA	RVIKPLK...
PpMAA	RVRQPDQ
ScMAA	RFIREVPLD

★ 주요잔기

★ 주요잔기

도면13



도면14

	1	10	20	30	40	50			
CAT	MEKKITG	YTTI	NDISQWRR	EHFEAT	QSVAQ	CTYNQITVQLDITAF	LKTVKKNKH		
BcOAT	MDFHQ	IDIDRNNR	KPYFEHYI	KEGK	CSYSVTANLNV	TALLNGLR	KKNM		
PaOAT	MSYTR	NDISSNRR	EHFEI	FRDGG	CTFSQITVQLDIT	RLDFT	RSRGY		
CaOAT	MNSNF	FHAI	DMNTY	ERAH	TNYFTKT	VSTLIYSIN	ITLDVITLRATL	KNKGL	
MaOAT	MPAEHALLV	VMAT	FEED	LQQW	PRREWF	EHYLD	RCP	TYYSMTVDLDITN	LRAAVDASGR
LbOAT	MTELN	THATP	DDITMAR	REYF	YETKMMP	TGFTLNVD	MDITATKAW	LTKHDR	
					★				
	60	70	80	90	100	110			
CAT	KFYPAFIH	ILARLMNA	IFFRMA	KDGETV	INDSVHP	CTVFEHET	ETFS	LWSEY	HD
BcOAT	KLYPAFIY	MSRVVNSH	IFRTA	FNDKG	QLGYEQ	VPYTI	FHKED	KTF	SA
PaOAT	KFYPVFI	HSIAKRV	VNSH	IFRTA	FNDKG	QLGYEQ	VPYTI	FHKED	KTF
CaOAT	KFEPAFY	LVTRA	IGRHQ	EFLMA	IQN	DMLGY	MDCRT	PFYPI	FHEDD
MaOAT	KTYPTQ	IWALAT	IVVNRH	IFFRMA	LDDQGN	PGVMD	VVDPA	FTV	FNP
LbOAT	KFNPAFY	LVTKLIT	KHIF	FRVQG	VDGQV	ELV	YVLE	PSYST	FHGDD
								★	
	120	130	140	150	160	170			
CAT	FRQSLHI	YSQVAC	YGENL	AYFPK	GFI	ENMFF	VSAN	PWVSE	TS
BcOAT	FSLFYK	NYLQD	IDR	YGD	KKGLV	KENV	PAHT	FSIS	AL
PaOAT	LARFLA	EYISM	DREK	YRND	HSYFP	KGFI	ENMFF	VSAN	PWVSE
CaOAT	FVFPYK	NYIS	DREY	GNNH	GIMLS	KDAPPS	NNYII	ISCI	PWFS
MaOAT	FDAPH	SEAAE	LSEY	RNAST	LFP	QGA	PRPR	NVFD	IS
LbOAT	FEQFHQ	NLA	DQAT	YGD	QHT	PMP	KAPQGA	NTYMG	SI
								★	
	180	190	200	210					
CAT	FIMGK	YITQ	GDKVLM	PAI	IQVH	HAVC	DGFH	YGRM	NELQ
BcOAT	ITLGK	YFSD	GETV	CLP	ISLQ	VHHA	VC	DGFH	YSMF
PaOAT	FTVGK	YYSO	AGKTL	VP	LA	VQVH	HAVC	DGFH	YARL
CaOAT	FEAGR	FTET	NGIIT	ITL	PLS	ITV	HATV	DGYH	IKLL
MaOAT	FTIGK	FYEQ	EGRTM	PE	LALQ	IRH	HAAD	DGYH	SARL
LbOAT	IQAGR	FTFK	DGQW	LM	PE	LSFT	IHA	VAD	DGYH
								★	
									★ 주요잔기

서열 목록

<110> GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY OFFICE OF ACADEMY AND INDUSTRY COLLABORATION
 KYUNGPOOK NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION

<120> A BIOLOGICAL METHOD FOR PREPARING ACETINS

<130> 18P01058

<150> KR 10-2018-0129090

<151> 2018-10-26

<160> 86

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 183

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 1

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

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

His Arg Tyr Asn His Ser Leu Ala Glu Glu His Thr Leu Arg Gln Gln
35 40 45

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

Thr Phe Arg Cys Asp Tyr Gly Tyr Asn Ile Phe Leu Gly Asn Asn Phe
65 70 75 80

Phe Ala Asn Phe Asp Cys Val Met Leu Asp Val Cys Pro Ile Arg Ile

85 90 95

Gly Asp Asn Cys Met Leu Ala Pro Gly Val His Ile Tyr Thr Ala Thr
100 105 110

His Pro Ile Asp Pro Val Ala Arg Asn Ser Gly Ala Glu Leu Gly Lys
115 120 125

Pro Val Thr Ile Gly Asn Asn Val Trp Ile Gly Gly Arg Ala Val Ile
130 135 140

Asn Pro Gly Val Thr Ile Gly Asp Asn Val Val Val Ala Ser Gly Ala
145 150 155 160

Val Val Thr Lys Asp Val Pro Asp Asn Val Val Val Gly Gly Asn Pro

165 170 175

Ala Arg Ile Ile Lys Lys Leu

180

<210> 2

<211> 185

<212> PRT

<213> Staphylococcus carnosus

<400> 2

Met Thr Thr Glu Lys Glu Lys Met Leu Ser Gly Gln Leu Tyr Asn Ser

1 5 10 15

Arg Asp Pro Gln Leu Val Lys Glu Arg His Lys Ala Arg His Ala Thr

20 25 30

Lys Ala Ile Asn Asn Ala Phe Ser Ile Lys Glu Arg His Phe Leu Leu

35 40 45

Arg Gln Ser Ile Gly His Cys Gly Asp Asn Val Phe Ile Glu Pro Asp

50 55 60

Ile His Phe Asp Tyr Gly Tyr Asn Ile Ser Leu Gly Asn His Phe Tyr

65 70 75 80

Ala Asn Phe Asn Pro Val Met Leu Asp Val Ala Pro Ile Thr Ile Gly

85 90 95

Asn His Val Leu Leu Gly Pro Asn Val Gln Leu Ile Thr Ala Thr His

100 105 110

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

115 120 125

Ile Met Ile Gly Asp His Val Trp Ile Gly Ala Gly Ala Ile Val Leu

130 135 140

Pro Gly Val Thr Ile Gly Asp Asn Val Val Val Gly Ala Gly Ser Val

145 150 155 160

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

165 170 175

Arg Phe Ile Arg Glu Val Pro Leu Asp

180 185

<210> 3
 <211> 184
 <212> PRT
 <213> Unknown
 <220><223> Halalkalicoccus jeotgali
 <400> 3
 Met Thr Ser Glu Lys Glu Arg Met Leu Arg Gly Glu Pro Tyr Asp Ala
 1 5 10 15
 Ser Asp Ser Glu Leu Val Ala Glu Arg Gln His Ala Arg Glu Leu Thr
 20 25 30
 Arg Lys Tyr Asn Arg Thr Thr Ala Thr Glu Ser Asp Arg Arg Glu Arg
 35 40 45

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

 115 120 125
 Pro Val Thr Val Gly Asp Asp Val Trp Ile Gly Gly Arg Ala Val Leu
 130 135 140
 Asn Ser Gly Val Ser Val Gly Asp Gly Ser Val Ile Ala Ser Gly Ala
 145 150 155 160
 Val Val Thr Glu Asp Val Pro Ala Gly Ala Leu Val Gly Gly Asn Pro
 165 170 175
 Ala Arg Val Leu Lys Asp Val Asp
 180
 <210> 4
 <211>
 > 187

<212> PRT

<213> Lactobacillus brevis

<400> 4

Met Asp Lys Ser Glu Lys Glu Lys Met Ile Thr Gly Glu Leu Phe Asn
1 5 10 15

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

Val Glu Ala Leu Asn Glu Leu Gly Glu Gln Asp Pro Glu Lys Ser Gln
35 40 45

Gln Leu Val Lys Arg Leu Phe Gly Ala Thr Gly Asp Gln Val Glu Val
50 55 60

His Ala Thr Phe Arg Cys Asp Tyr Gly Tyr Asn Ile Tyr Val Gly Glu
65 70 75 80

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

Arg Ile Gly Lys His Cys Leu Leu Gly Pro Lys Val Gln Ile Tyr Ser
100 105 110

Val Asn His Pro Ala Glu Pro Glu Leu Arg Arg Asn Gly Ala Met Gly
115 120 125

Ile Gly Lys Pro Val Thr Leu Gly Asp Asp Val Trp Val Gly Gly Gly
130 135 140

Ala Ile Ile Cys Pro Gly Val Thr Leu Gly Asp Asn Val Ile Val Ala
145 150 155 160

Ala Gly Ala Val Val Thr Lys Ser Phe Gly Ser Asn Val Val Leu Gly
165 170 175

Gly Asn Pro Ala Arg Val Ile Lys Pro Leu Lys
180 185

<210> 5

<211> 184

<212> PRT

<213> Bacillus subtilis

<400> 5

Met Leu Arg Thr Glu Lys Glu Lys Met Ala Ala Gly Glu Leu Tyr Asn

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

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

145 150 155 160
Ser Val Val Thr Lys Asp Val Pro Ala Asn Thr Val Val Gly Gly Asn
165 170 175
Pro Ala Arg Ile Leu Lys Gln Leu
180

<210> 6
<211> 188
<212> PRT
<213> Pseudomonas putida
<400> 6

Met Ser Leu Ser Glu Lys His Lys Met Leu Thr Gly Gln Leu Tyr His
1 5 10 15

Ala Gly Cys Pro Glu Leu Gln Ala Glu Gln Ile Ala Asn Lys His Trp

20 25 30

Met His Arg Tyr Asn Asn Ser Val Glu Leu Leu Asn Asp Ala Arg His

35 40 45

Gly Leu Leu Val Glu His Phe Gly Gln Val Gly Glu Gly Ala Val Ile

50 55 60

Arg Pro Pro Phe Tyr Cys Asp Tyr Gly Tyr Asn Ile Ser Val Gly Arg

65 70 75 80

Asn Thr Phe Met Asn Phe Asn Cys Val Ile Leu Asp Val Val Pro Val

85 90 95

Arg Ile Gly Asp Asp Cys Gln Ile Gly Pro Asn Val Gln Ile Tyr Thr

100 105 110

Ala Asp His Pro Leu Asp Pro Glu Val Arg Arg Ser Gly Leu Glu Ser

115 120 125

Gly Arg Thr Val Thr Ile Gly Asp Asn Val Trp Ile Gly Gly Ala Ala

130 135 140

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

145 150 155 160

Gly Ser Val Val Thr Arg Asp Val Pro Ala Gly Ala Thr Val Val Gly

165 170 175

Asn Pro Ala Arg Val Arg Gln Pro Asp Gln Gly Gln

180 185

<210> 7

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> pSTV28 VECTOR

<400> 7

Met Glu Lys Lys Ile Thr Gly Tyr Thr Thr Val Asp Ile Ser Gln Trp

1 5 10 15

His Arg Lys Glu His Phe Glu Ala Phe Gln Ser Val Ala Gln Cys Thr

				20						25					30		
Tyr	Asn	Gln	Thr	Val	Gln	Leu	Asp	Ile	Thr	Ala	Phe	Leu	Lys	Thr	Val		
		35					40					45					
Lys	Lys	Asn	Lys	His	Lys	Phe	Tyr	Pro	Ala	Phe	Ile	His	Ile	Leu	Ala		
		50				55					60						
Arg	Leu	Met	Asn	Ala	His	Pro	Glu	Phe	Arg	Met	Ala	Met	Lys	Asp	Gly		
	65				70					75					80		
Glu	Leu	Val	Ile	Trp	Asp	Ser	Val	His	Pro	Cys	Tyr	Thr	Val	Phe	His		
				85					90					95			
Glu	Gln	Thr	Glu	Thr	Phe	Ser	Ser	Leu	Trp	Ser	Glu	Tyr	His	Asp	Asp		
				100				105					110				
Phe	Arg	Gln	Phe	Leu	His	Ile	Tyr	Ser	Gln	Asp	Val	Ala	Cys	Tyr	Gly		
		115				120						125					
Glu	Asn	Leu	Ala	Tyr	Phe	Pro	Lys	Gly	Phe	Ile	Glu	Asn	Met	Phe	Phe		
	130					135					140						
Val	Ser	Ala	Asn	Pro	Trp	Val	Ser	Phe	Thr	Ser	Phe	Asp	Leu	Asn	Val		
145					150					155					160		
Ala	Asn	Met	Asp	Asn	Phe	Phe	Ala	Pro	Val	Phe	Thr	Met	Gly	Lys	Tyr		
				165					170					175			
Tyr	Thr	Gln	Gly	Asp	Lys	Val	Leu	Met	Pro	Leu	Ala	Ile	Gln	Val	His		
			180						185					190			
His	Ala	Val	Cys	Asp	Gly	Phe	His	Val	Gly	Arg	Met	Leu	Asn	Glu	Leu		
		195						200					205				
Gln	Gln	Tyr	Cys	Asp	Glu	Trp	Gln	Gly	Gly	Ala							
		210				215											
<210>	8																
<211>	215																
<212>	PRT																
<213>	Bacillus cereus																
<400>	8																
Met	Asp	Phe	His	Gln	Ile	Asp	Ile	Asp	Arg	Trp	Asn	Arg	Lys	Pro	Tyr		

1 5 10 15

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

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

 Glu Tyr Leu Leu Pro Ile Ile Thr Leu Gly Lys Tyr Phe Ser Asp Gly
 165 170 175
 Glu Thr Val Cys Leu Pro Ile Ser Leu Gln Val His His Ala Val Cys
 180 185 190
 Asp Gly Tyr His Val Ser Met Phe Ile Asn Glu Leu Gln Lys Leu Ala
 195 200 205
 Asp Ser Phe Glu Glu Trp Leu
 210 215
 <210> 9
 <211> 212
 <212> PRT
 <213> Pseudomonas aeruginosa
 <400>

> 9

Met Ser Tyr Thr Arg Val Asp Ile Ser Ser Trp Asn Arg Arg Glu His

1 5 10 15

Phe Glu Ile Phe Arg Gly Asp Gly Gln Cys Thr Phe Ser Gln Thr Val

20 25 30

Gln Leu Asp Ile Thr Arg Leu Leu Asp Phe Thr Arg Ser Arg Gly Tyr

35 40 45

Arg Phe Tyr Pro Val Phe Ile His Ser Ile Ala Lys Val Val Asn Arg

50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Cys Val His Pro Asn Tyr Thr Thr Phe His Pro Asp Thr Glu Thr

85 90 95

Phe Ser Ser Phe Trp Ser His Tyr His Asp Asp Leu Ala Arg Phe Leu

100 105 110

Ala Glu Tyr Ser Met Asp Arg Glu Lys Tyr Arg Asn Asp His Ser Tyr

115 120 125

Phe Pro Lys Gly Phe Ile Glu Asn Val Phe Tyr Val Ser Ala Asn Pro

130 135 140

Trp Val Ser Phe Thr Ser Phe Asp Phe Asn Phe Ala Ser Ala Asn Asn

145 150 155 160

Phe Phe Ala Pro Leu Phe Thr Val Gly Lys Tyr Tyr Ser Gln Ala Gly

165 170 175

Lys Thr Leu Val Pro Leu Ala Val Gln Val His His Ala Val Cys Asp

180 185 190

Gly Phe His Ala Ala Arg Leu Val Thr Glu Leu Gln Lys Leu Cys Asp

195 200 205

Glu Ala Gly Gly

210

<210> 10

<211> 220

<212> PRT

<213> Clostridium acetobutylicum

<400> 10

Met Asn Ser Asn Phe His Ala Ile Asp Met Asn Thr Tyr Pro Arg Ala

1 5 10 15

His Thr Tyr Asn Tyr Phe Thr Lys Thr Val Ser Thr Leu Ile Tyr Ser

20 25 30

Ile Asn Ile Thr Leu Asp Val Thr Ile Leu Arg Ala Thr Leu Lys Asn

35 40 45

Lys Gly Leu Lys Phe Phe Pro Ala Tyr Val Tyr Leu Val Thr Arg Ala

50 55 60

Ile Gly Arg His Gln Glu Phe Leu Met Ala Ile Gln Asn Asp Met Leu

65 70 75 80

Gly Tyr Trp Asp Cys Arg Thr Pro Phe Tyr Pro Ile Phe His Glu Asp

85 90 95

Asp Lys Thr Ile Thr Phe Leu Trp Thr Glu Tyr Asn Glu Asp Phe Glu

100 105 110

Val Phe Tyr Lys Asn Tyr Ile Ser Asp Ile Arg Glu Tyr Gly Asn Asn

115 120 125

His Gly Ile Met Leu Ser Lys Asp Ala Pro Pro Ser Asn Asn Tyr Ile

130 135 140

Ile Ser Cys Ile Pro Trp Phe Ser Phe Asn Ser Leu Ser Met Gln Leu

145 150 155 160

Gln Asn Ala Lys Asn Tyr Tyr Ala Pro Ile Phe Glu Ala Gly Arg Phe

165 170 175

Thr Glu Thr Asn Gly Ile Ile Thr Leu Pro Leu Ser Ile Thr Val Asn

180 185 190

His Ala Thr Val Asp Gly Tyr His Ile Lys Leu Leu Leu Asp Glu Leu

195 200 205

Gln Trp Ser Met Ser His Pro Lys Glu Trp Ile Arg

210 215 220

<210> 11

<211> 229

<212> PRT

<213> Mycobacterium abscessus

<400> 11

Met Pro Ala Glu His Ala Leu Leu Val Val Met Ala Thr Phe Glu Pro

1 5 10 15

Leu Asp Leu Gln Gln Trp Pro Arg Arg Glu Trp Phe Glu His Tyr Leu

20 25 30

Asp Arg Cys Pro Thr Tyr Tyr Ser Met Thr Val Asp Leu Asp Ile Thr

35 40 45

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

50 55 60

Gln Ile Trp Ala Leu Ala Thr Val Val Asn Arg His Pro Glu Phe Arg

65 70 75 80

Met Ala Leu Asp Asp Gln Gly Asn Pro Gly Val Trp Asp Val Val Asp

85 90 95

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

100 105 110

Ser Ala Arg Tyr Thr Pro Asp Phe Asp Ala Phe His Ser Glu Ala Ala

115 120 125

Glu Leu Leu Ser Glu Tyr Arg Asn Ala Ser Thr Leu Phe Pro Gln Gly

130 135 140

Ala Pro Arg Pro Arg Asn Val Phe Asp Ile Ser Ser Ile Pro Trp Thr

145 150 155 160

Arg Phe Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ala Pro Gly Trp Ala His Leu

165 170 175

Ala Pro Ile Phe Thr Ile Gly Lys Phe Tyr Glu Gln Glu Gly Arg Thr

180 185 190

Met Met Pro Leu Ala Leu Gln Ile His His Ala Ala Ala Asp Gly Tyr

195 200 205

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

210 215 220

Asp Trp Val Arg Asp

225

<210> 12

<211> 222

<212> PRT

<213> Lactobacillus brevis

<400> 12

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

1 5 10 15

Ala Arg Arg Glu Tyr Phe Tyr Tyr Phe Thr Lys Met Met Pro Thr Gly

20 25 30

Phe Thr Leu Asn Val Asp Met Asp Ile Thr Ala Thr Lys Ala Trp Leu

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Gln Leu Val Glu Tyr Asp Val Leu His Pro Ser Tyr Ser Thr Phe His

85 90 95

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

100 105 110

Phe Glu Gln Phe His Gln Asn Tyr Leu Ala Asp Gln Ala Thr Tyr Gly

115 120 125

Asp Gln His Thr Pro Met Pro Lys Ala Pro Gln Gly Ala Asn Thr Tyr

130 135 140

Met Ile Gly Ser Ile Pro Trp Thr His Phe Asn Ser Tyr Thr Pro Leu

145 150 155 160

Pro Phe Thr Pro Leu Asn Thr Phe Phe Pro Val Ile Gln Ala Gly Arg

165 170 175

Phe Thr Phe Lys Asp Gly Gln Trp Leu Met Pro Leu Ser Phe Thr Ile

180 185 190

His His Ala Val Ala Asp Gly Tyr His Val Ser Gln Phe Phe Asn Glu

195 200 205

Leu Gln Arg Val Phe Asp His Pro Glu Leu Trp Leu Thr Ala
210 215 220
<210> 13
<211> 319
<212>
> PRT
<213> Escherichia coli
<400> 13
Met Lys Pro Glu Asn Lys Leu Pro Val Leu Asp Leu Ile Ser Ala Glu
1 5 10 15
Met Lys Thr Val Val Asn Thr Leu Gln Pro Asp Leu Pro Pro Trp Pro
20 25 30
Ala Thr Gly Thr Ile Ala Glu Gln Arg Gln Tyr Tyr Thr Leu Glu Arg
35 40 45
Arg Phe Trp Asn Ala Gly Ala Pro Glu Met Ala Thr Arg Ala Tyr Met
50 55 60
Val Pro Thr Lys Tyr Gly Gln Val Glu Thr Arg Leu Phe Cys Pro Gln
65 70 75 80
Pro Asp Ser Pro Ala Thr Leu Phe Tyr Leu His Gly Gly Gly Phe Ile
85 90 95
Leu Gly Asn Leu Asp Thr His Asp Arg Ile Met Arg Leu Leu Ala Ser
100 105 110
Tyr Ser Gln Cys Thr Val Ile Gly Ile Asp Tyr Thr Leu Ser Pro Glu
115 120 125
Ala Arg Phe Pro Gln Ala Ile Glu Glu Ile Val Ala Ala Cys Cys Tyr
130 135 140
Phe His Gln Gln Ala Glu Asp Tyr Gln Ile Asn Met Ser Arg Ile Gly
145 150 155 160
Phe Ala Gly Asp Ser Ala Gly Ala Met Leu Ala Leu Ala Ser Ala Leu
165 170 175
Trp Leu Arg Asp Lys Gln Ile Asp Cys Gly Lys Val Ala Gly Val Leu
180 185 190
Leu Trp Tyr Gly Leu Tyr Gly Leu Arg Asp Ser Val Thr Arg Arg Leu

195 200 205
 Leu Gly Gly Val Trp Asp Gly Leu Thr Gln Gln Asp Leu Gln Met Tyr
 210 215 220
 Glu Glu Ala Tyr Leu Ser Asn Asp Ala Asp Arg Glu Ser Pro Tyr Tyr
 225 230 235 240
 Cys Leu Phe Asn Asn Asp Leu Thr Arg Glu Val Pro Pro Cys Phe Ile
 245 250 255
 Ala Gly Ala Glu Phe Asp Pro Leu Leu Asp Asp Ser Arg Leu Leu Tyr
 260 265 270
 Gln Thr Leu Ala Ala His Gln Gln Pro Cys Glu Phe Lys Leu Tyr Pro
 275 280 285
 Gly Thr Leu His Ala Phe Leu His Tyr Ser Arg Met Met Lys Thr Ala
 290 295 300
 Asp Glu Ala Leu Arg Asp Gly Ala Gln Phe Phe Thr Ala Gln Leu
 305 310 315
 <210> 14
 <211> 391
 <212> PRT
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*
 <400> 14
 Met Ser Ala Ala Ala Asp Arg Leu Asn Leu Thr Ser Gly His Leu Asn
 1 5 10 15
 Ala Gly Arg Lys Arg Ser Ser Ser Ser Val Ser Leu Lys Ala Ala Glu
 20 25 30
 Lys Pro Phe Lys Val Thr Val Ile Gly Ser Gly Asn Trp Gly Thr Thr
 35 40 45
 Ile Ala Lys Val Val Ala Glu Asn Cys Lys Gly Tyr Pro Glu Val Phe
 50 55 60
 Ala Pro Ile Val Gln Met Trp Val Phe Glu Glu Glu Ile Asn Gly Glu
 65 70 75 80
 Lys Leu Thr Glu Ile Ile Asn Thr Arg His Gln Asn Val Lys Tyr Leu

85	90	95
Pro Gly Ile Thr Leu Pro Asp Asn Leu Val Ala Asn Pro Asp Leu Ile		
100	105	110
Asp Ser Val Lys Asp Val Asp Ile Ile Val Phe Asn Ile Pro His Gln		
115	120	125
Phe Leu Pro Arg Ile Cys Ser Gln Leu Lys Gly His Val Asp Ser His		
130	135	140
Val Arg Ala Ile Ser Cys Leu Lys Gly Phe Glu Val Gly Ala Lys Gly		
145	150	155
		160
Val Gln Leu Leu Ser Ser Tyr Ile Thr Glu Glu Leu Gly Ile Gln Cys		
165	170	175
Gly Ala Leu Ser Gly Ala Asn Ile Ala Thr Glu Val Ala Gln Glu His		
180	185	190
Trp Ser Glu Thr Thr Val Ala Tyr His Ile Pro Lys Asp Phe Arg Gly		
195	200	205
Glu Gly Lys Asp Val Asp His Lys Val Leu Lys Ala Leu Phe His Arg		
210	215	220
Pro Tyr Phe His Val Ser Val Ile Glu Asp Val Ala Gly Ile Ser Ile		
225	230	235
		240
Cys Gly Ala Leu Lys Asn Val Val Ala Leu Gly Cys Gly Phe Val Glu		
245	250	255
Gly Leu Gly Trp Gly Asn Asn Ala Ser Ala Ala Ile Gln Arg Val Gly		
260	265	270
Leu Gly Glu Ile Ile Arg Phe Gly Gln Met Phe Phe Pro Glu Ser Arg		
275	280	285
Glu Glu Thr Tyr Tyr Gln Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr		
290	295	300
Thr Cys Ala Gly Gly Arg Asn Val Lys Val Ala Arg Leu Met Ala Thr		
305	310	315
		320
Ser Gly Lys Asp Ala Trp Glu Cys Glu Lys Glu Leu Leu Asn Gly Gln		
325	330	335
Ser Ala Gln Gly Leu Ile Thr Cys Lys Glu Val His Glu Trp Leu Glu		

340 345 350
 Thr Cys Gly Ser Val Glu Asp Phe Pro Leu Phe Glu Ala Val Tyr Gln
 355 360 365
 Ile Val Tyr Asn Asn Tyr Pro Met Lys Asn Leu Pro Asp Met Ile Glu

370 375 380
 Glu Leu Asp Leu His Glu Asp
 385 390

<210> 15
 <211> 250
 <212> PRT
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*
 <400> 15

Met Gly Leu Thr Thr Lys Pro Leu Ser Leu Lys Val Asn Ala Ala Leu
 1 5 10 15
 Phe Asp Val Asp Gly Thr Ile Ile Ile Ser Gln Pro Ala Ile Ala Ala
 20 25 30
 Phe Trp Arg Asp Phe Gly Lys Asp Lys Pro Tyr Phe Asp Ala Glu His

35 40 45
 Val Ile Gln Val Ser His Gly Trp Arg Thr Phe Asp Ala Ile Ala Lys
 50 55 60
 Phe Ala Pro Asp Phe Ala Asn Glu Glu Tyr Val Asn Lys Leu Glu Ala
 65 70 75 80
 Glu Ile Pro Val Lys Tyr Gly Glu Lys Ser Ile Glu Val Pro Gly Ala
 85 90 95
 Val Lys Leu Cys Asn Ala Leu Asn Ala Leu Pro Lys Glu Lys Trp Ala
 100 105 110

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

Gly Tyr Pro Ile Asn Glu Gln Asp Pro Ser Lys Ser Lys Val Val Val
 165 170 175

Phe Glu Asp Ala Pro Ala Gly Ile Ala Ala Gly Lys Ala Ala Gly Cys

180 185 190
 Lys Ile Ile Gly Ile Ala Thr Thr Phe Asp Leu Asp Phe Leu Lys Glu

195 200 205

Lys Gly Cys Asp Ile Ile Val Lys Asn His Glu Ser Ile Arg Val Gly

210 215 220

Gly Tyr Asn Ala Glu Thr Asp Glu Val Glu Phe Ile Phe Asp Asp Tyr

225 230 235 240

Leu Tyr Ala Lys Asp Asp Leu Leu Lys Trp

245 250

<210

> 16

<211> 552

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 16

atgagcacag aaaaagaaaa gatgattgct ggtgagttgt atcgctcggc agatgagacg 60
 ttatctcgcg atcgctcgcg cgctcgtcag cttattcacc gatacaatca ttccttggcg 120
 gaagagcaca cattacgcca gcaaattctc gctgatctat tcggtcaggt gacagaggct 180
 tatattgagc caacgtttcg ctgtgactat ggctataaca tttttctcgg taataathtt 240
 ttcgccaact tcgattgcgt gatgcttgat gtcgtcccta ttcgcatcgg tgataactgt 300
 atgttggcac caggcggtca tatctacacg gcaacacatc ccatcgaccc tgtagcacgt 360

aatagcgggtg ctgaactggg gaaacccgtc accatcggta ataacgtctg gattggcgga 420
 cgcgcggtca ttaacctggg tgtgaccatt ggtgataacg tcgtggtagc ctcaggtgca 480
 gttgtcaca aagatgtccc ggacaacgtt gtcgtgggcg gtaatccagc cagaataatt 540
 aaaaaattgt aa 552

<210> 17

<211> 547

<212> DNA

<213> Staphylococcus carnosus

<400> 17

atgaccaccg agaaggaaaa aatgctgagc ggtcagctgt acaacagccg tgaccgcgaa	60
ctggttaagg agcgtcaca agcgcgtcac gcgaccaagg cgatcaacaa cgcgttcagc	120
attaaaaagt cactttctgc tgcgtcagag catcggtcac tgcggcgaca acgtgttcat	180
cgagccggaa ttcacttcga ttacggttac aacattagcc tgggcaacca cttctatgcg	240
aactttaacc cgtagctgg atgtggcgcc gatcaccatt ggtaaccacg tttctctggg	300
cccgaacgtg caactgatcc cgcgaccac ccgctgaacc cggcggagcg tgcgagcgg	360
ctggaactgg cgttcccgat cataatggcg accacgtttg gattggtgcg ggtgcgattg	420
ttctgccggg tgtgaccatt gcgataactg gttgtgggtg cgggcagcgt tgtgaccaag	480
gacatcccgg ataaccaggt tgtgcgggca accggcgcgt tttattcgtg aagtgccgct	540
ggattaa	547
<210> 18	
<211> 554	
<212> DNA	
<213> Unknown	
<220><223> Halalkalicoccus jeotgali	
<400> 18	
atgaccacg agaaggaacg tatgctgctg ggtgagccgt acgacgcgag cgatagcgag	60
ctggttgcgg aacgtcagca cgcgcgtgaa ctgaccgta aatataaccg taccaccgcg	120
accgagagcg accgtcgtga acgtctgctg gaggaactgt tcggtagcgt ggaggacgcg	180
accgttgaac cgccgatccg ttgcgattac ggttataacg ttcacgttgg cgagaacttc	240
tacgcgaact ttgactgctg tattctggat gtgcgtcgtg ttgaatttgg cacccttgc	300
ctgctgggtc cgggtgttca cgtttatacc gcgaccaccc cgctggatgc ggaggaaact	360
gcggcgggtc tggagagcgg tgcgccgttg accgttgggt acgatgtgtg gatcggtggc	420
cgtgcggttc tgaacagcgg cgtgagcttg gtgacgcgag cgtgattgcg agcgggtcgg	480
tggttaccga agatgttccg gcgggcgcgc tggttggtgg caaccggcg cgtgtgctga	540
aggacgttga ttaa	554
<210> 19	
<211> 563	
<212> DNA	
<213> Lactobacillus brevis	
<400> 19	

atggacaaga gcgagaagga aaaaatgac accggcgagc tgttcaacgt gtacgatccg	60
gagctgttgc ggaacgtggc gcggcgcgtc agcaagtgga ggctgtgaac gagctgggtg	120
aacaggaccc ggaaaagagc cagcaactgg ttaaactgtc gttcggcgcg accggtgacc	180
aagttgaggt tcacgcgacc ttctgttgcg attacggcta taacatctac gtgggtgaaa	240
acttctttgc gaactatgac tgcaccattc tggatgttgc gccgatccgt attggcaagc	300
actgcctgct gggtcgaaa gtgcagattt acagcgttaa ccatccggcg gagccggaac	360
tgcgtcgtaa cggcgcgatg ggcatctgca agccggtgac cctgggtgac gatgtgtggg	420
ttggtggcgg tgcgatcgc tgtccgggtg tgaccctggg tgataacgtg atcgttgcgg	480
cgggcgcggt ggttaccaag agcttcggta gcaacgtggt tctgggcggt aaccggcgcg	540
gtgtgattaa gccgctgaaa taa	563
<210> 20	
<211> 554	
<212> DNA	
<213> Bacillus subtilis	
<400> 20	
atgctgcgta ccgagaagga aaaaatggcg gcgggtgagc tgtacaacag cgaagaccag	60
caactgctgc tggagcgtaa gcacgcgctc cagctgatcc gtcaatataa cgaaaccccg	120
gaagacgatg cggtgcgtac caagctgctg aaagaactgc tgggtagcgt gggcgatcag	180
gttaccatcc tgccgacctt ccgttgcgac tacggttacc acatccacat tggcgatcac	240
accttcgtga actttgactg cgttattctg gatgtgtgcg aggttcgtat cggctgccac	300
tgcctgattg cggcgggtgt tcacatctac accgcgggcc acccgctgga cccgattgag	360
cgtaagagcg gtaagaatt tggcaaaccg gtgaccattg gtgacaggt ttggatcggg	420
ggccgtgcgg tgattaatcc ggggtgtgacc atcggcgaca acgcgggtgat tgcgagcggc	480
agcgtggtta ccaagatgt tccgcgaac accgggttgg tggcaaccg gcgcgtattc	540
tgaacaact gtaa	554
<210> 21	
<211> 563	
<212> DNA	
<213> Pseudomonas putida	
<400> 21	
atgagcctga gcgagaagca caaatgctg accggtcaac tgtatcatgc gggttccccg	60
gagctgcaag cggaacaaat tgcaacaag cactggatgc accgttataa caacagcgtg	120

gaactgtgaa cgacgcgcgt cacggtctgc tggttgagca cttcgccaa gtgggtgaag 180
gcgcggttat tcgtccgccc ttttactgcg actacggtta taacatcagc gtgggccgta 240
acacattcat gaacttaact gcgtgatacct ggatgtggtt ccggttcgta tcggtgacga 300

ttgccagatt ggcccgaacg gcaaattctat accgcggacc acccgctgga cccggaagtg 360
cgctgtagcg gtctggaaag cggccgtacc gtgaccattg gtgacaacgt ttggatcggc 420
ggcgcggcga tcattctgcc ggggtgtgacc atcggcgaca acgcgattgt tggcgcgggc 480
agcgtggtta cccgtgatgt tccggcgggg cgaccgtggt tggtaaccgc gcgcgtgttc 540
gtcagccgga tcagggtcaa taa 563

<210> 22
<211> 48
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Sc-gpp2-F
<400> 22
tgctgcagag gaggtaatat atatgggatt gactactaaa cctctatc 48

<210> 23
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Sc-gpp2-R
<400> 23
cccaagctta ccatttcaac agatcgtcc 29

<210> 24
<211> 660
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> pSTV28 VECTOR
<400> 24
atggagaaaa aaatcactgg atataccacc gttgatatat cccaatggca tcgtaaagaa 60
cattttgagg catttcagtc agttgctcaa tgtacctata accagaccgt tcagctggat 120
attacggcct ttttaaagac cgtaaagaaa aataagcaca agttttatcc ggcctttatt 180

cacattcttg cccgcctgat gaatgctcat ccggaatttc gtatggcaat gaaagacggt 240

gagctggatga tatgggatag tgttcaccct tgttacaccg ttttccatga gcaaactgaa 300
acgttttcat cgctctggag tgaataccac gacgatttcc ggcagtttct acacatatat 360
tcgcaagatg tggcgtgtta cggtgaaaac ctggcctatt tccctaaagg gtttattgag 420
aatatgtttt tcgtctcagc caatccctgg gtgagtttca ccagttttga tttaaacgtg 480
gccaatatgg acaacttctt cgccccgtt ttcacatgg gcaaatatta tacgcaaggc 540
gacaaggatg tgatgccgtt ggcgattcag gttcatcatg ccgtctgtga tggcttccat 600

gtcggcagaa tgcttaatga attacaacag tactgcatg agtggcaggg cggggcgtaa 660
660

<210> 25
<211> 636
<212> DNA
<213> Bacillus cereus
<400> 25

atggacttcc accagatcga cattgatcgt tggaaccgta agccgtactt tgagcactat 60
atcaaggggt aagtgcagct acagcgtgac cgcgaacctg aacgttacg cgctgctgaa 120
cggcctgcta aaaaaacatg aagctgtacc cggcgttcat ctatatgatt agccgtgtgg 180
ttaacagcca catcgagtc gtaccgcgtt taacgataag ggtcagctgg gctactggga 240

acaaatgggt cgcacctata cattttccac aaagaggaca aaacctttag cgcgatgtgg 300
accgaataca gcagcgattt cagccttttt acaagaacta cctgcaagac atcgatcgtt 360
atggtgacaa gaaaggcctg tgggtgaaag gaacgttccg gcgcacacct tcagcattag 420
cgcgtgccc tgggttagct tcaccggttt tcaacgaacc tgtacaacgg cgagtatctg 480
ctgccgatca ttaccctggg caagtacttt agcgatggca aaccgtgtgc ctgccgatca 540
gcctgcaagt tcaccacgcg gtttgcgacg gttatcacgt tagagtccat taacgaactg 600
caaaaactgg cggatagctt tgaggaaagg ctgtaa 636

<210> 26
<211> 633
<212> DNA
<213> Pseudomonas aeruginosa
<400> 26

atgagctaca cccgtgttga catcagcagc tggaaccgtc gtgagcactt tgaaattttc 60
cgtgggtatg ccaatgcacc tttagccaga ccgttcaact ggacatcacc cgtctgctgg 120
atttcacccg taccgtgggt accgttttta tccggtgttc atccacagca ttgcgaaggt 180

ggttaaccgt ttcccgggta ccgtatggcg atgaaaggcg acgaactgat tgtgtgggat	240
tgcgttcacc cgaactatac cacctttcac ccggacaccg aaacctttag cagcttctgg	300
agccactacc acgacgatct ggcgcggtcc tggcggagta tagcatggac cgtgaaaagt	360
accgtaacga tcacagctat tttccgaaag gticcatcgaa aacgtgtttt atgttagcgc	420
gaaccctggg gttagcttca ccagcttcga ttttaacttc gcgagcgcga acaacttctt	480
tgcgcgctg tttaccgtgg gcaagtacta tagccaagcg ggtaaaaccc tggtgccgct	540
ggcgggtgcaa gttcaccatg cggtttgcga tggttttcat gcggccgtct ggtgaccgag	600
ctgcaaaagc tgtgcgatga agcgggtggc taa	633
<210> 27	
<211> 655	
<212> DNA	
<213> Clostridium acetobutylicum	
<400> 27	
atgaacagca acttccacgc gatcgacatg aacacctacc cgcgtgcgca cacctacaac	60
tattttacaa gaccgtgagc accctgatct atagcatcaa cattaccctg gatgttacca	120
ttctgcgtgc gacctgaaga acaaaggtct gaaattcttt ccggcgtacg tgtatctggt	180
taccctgctg atcggctcga ccaggagtgc ctgatggcga ttcaaaacga catgctgggc	240
tactgggatt gccgtacccc gtctatccga tctttcacga ggacgataag accattacct	300
ttctgtggac cgagtacaac gaagactcga ggtgttttac aagaactaca tcagcgatat	360
tcgtgaatac ggtaacaacc acggcatcat gcgagcaagg acgctccgcc gagcaacaac	420
tacatcatta gctgcattcc gtggttcagc tttaacacct gagcatgcag ctgcaaaacg	480
cgaaaaacta ctatgcgccg atcttcgaag cgggtcgttt taccgaaacc aacggcatca	540
ttacctgcc gctgagcatc accgtgaacc acgcgaccgt tgacgctacc acattaagct	600
gctgctggat gagctgcaat ggagcatgag ccaccgaaa gactggattc gttaa	655
<210> 28	
<211> 680	
<212> DNA	
<213> Mycobacterium abscessus	
<400> 28	
atgccggcgg agcacgcgct gctggttgtg atggcgacct tcgaaccgct ggacctgcaa	60
caatgccgcg tcgtgagtgg tttgaacct acctggatcg ttgcccgacc tactatagca	120

tgaccgtgga ctggacatca ccaacctgcg tgcggcgggt gacgcgagcg gtcgtaagac	180
ctatccgacc cagattgggc gctggcgacc gtggttaacc gtcacccgga gttccgtatg	240
gcgctggacg atcaaggtat ccgggtgtgt gggacgtggt tgatccggcg ttcaccgttt	300
ttaaccgga ccgtgaaacc ttgcgggtat cagcgcgcgt tacaccccg acttcgatgc	360
gtttcacagc gaggcggcgg aactgcgagc gaatatcgta acgcgagcac cctgttccc	420
cagggcgcgc cgcgtccgcg taactgttg acatcagcag cattccgtgg acccgtttca	480
ccggttttac cctgaccatt gcgccgggtt ggggcacctg gcgccgatct tcaccattgg	540
taaattttac gagcaggaag gccgtacat gatgccgcgg cgctgcaaat tcaccatgcg	600
gcggcggacg gciatcacag cgcgctctg gtggaggaac tcgtcaaac attgcggacc	660
cggattgggt tcgtgattaa	680
<210> 29	
<211> 663	
<212> DNA	
<213> Lactobacillus brevis	
<400> 29	
atgaccgagc tgaacaccca tgcgaccccg attgaccaga ccacctgggc gcgtcgtgaa	60
tacttacta cttaccaag atgatgccga ccggtttcac cctgaacgtg gacatggaca	120
tcaccgcgac caaagcgtgg ctgaccaagc acgatcgtaa attcaaccg gcgtacctgt	180
atctggttac caagctatta ccaaacaccc ggagtttcgt gtgggtcagg ttgacggcca	240
actggtggaa tacgatgttc tgcacccgag ciatagcacc tttcacggtg acgatctgac	300
cattagcaac ctgtggaccg cgtataccg agcttcgagc agtttcacca aaactacctg	360
gcggaccagg cgacctatgg cgatcaacat acccgcgtgc cgaaggcgcc gcaaggtgcg	420
aacacctaca tgatcggcag cattccgtgg acccacttca acagctatac cccgctgccg	480
tttaccgccg tgaacacctt ctttcgggtg atccagcgcg tcgtttcacc tttaaagatg	540
gccaatggct gatgcgcgtg agcttcacca ttcaccacgc ggtgcggacg getaccacgt	600
tagccagttc tttaacgagc tgcaacgtgt tttgatcac ccggaacttg gctgaccgcg	660
taa	663
<210> 30	
<211> 960	
<212> DNA	
<213> Escherichia coli	

<400> 30

atgaagccgg aaaacaaact acctgttctg gaccttattt ctgctgaaat gaagaccgtt	60
gtgaatactc ttcagccgga tttaccgccc tggcccgcaa cgggaacgat tgctgagcaa	120
cgacagtatt acacgcttga gcgccgattc tggaatgcgg gcgctccaga aatggcaacc	180
agagcttaca tggttccaac aaaatatggg caggtggaaa cacgtctctt ttgtccgcag	240
ccagatagcc cagcgacgct attttatttg catggaggcg gttttattct cggcaatctc	300
gatacccacg atcgcatcat gcgcctgctg gcaagctaca gccaatgtac ggtgattggt	360
attgattaca cccittcacc tgaagcgcgt tttccgcaag cgatagagga aattgtggct	420
gcttgttgtt atttccacca gcaggcggag gattatcaaa tcaatatgtc ccgcattggc	480
tttgccggtg attccgcagg tgccatgctg gcgctcgcca gtgcgttgtg gttgcgtgat	540
aaacagatcg attgcggtaa agttgcgggc gttttgctgt ggtatgggct ttacggatta	600
cgggattccg tgactcgtcg tctgttgggc ggtgtctggg atggcttaac gcaacaggat	660
ttgcagatgt acgaagaggc atatttaagc aacgacgcgg accgcgagtc gccgtattac	720
tgtctgttta ataatgatct cactcgcgaa gttccgcctt gttttattgc cggggcggag	780
ttcgatccgc tgctggatga cagccgtctg ctttaccaga cgttagcggc gcatcagcag	840
ccctgtgagt tcaaaactcta cccaggcacg ctgcacgcct ttttgatta ttcacggatg	900
atgaaaaccg ccgacgagge tcttcgcgac ggcgtcagt tctttaccgc tcagctttaa	960

<210> 31

<211> 1176

<212> DNA

<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 31

atgtctgctg ctgctgatag attaaactta acttccggcc acttgaatgc tggtagaaag	60
agaagtccct cttctgtttc ttggaaggt gccgaaaagc ctttcaaggt tactgtgatt	120
ggatctggta aciggggttac tactattgcc aaggtggttg ccgaaaattg taagggatac	180
ccagaagttt tcgctccaat agtacaaatg tgggtgttcg aagaagagat caatggtgaa	240
aaattgactg aaatcataaa tactagacat caaaacgtga aatacttgcc tggcatcact	300
ctaccgcaca atttggttgc taatccagac ttgattgatt cagtcaagga tgtcgacatc	360
atcgttttca acattccaca tcaatttttg ccccgatatc gtagccaatt gaaaggtcat	420
gttgattcac acgtcagagc tatctcctgt ctaaagggtt ttgaagttgg tgctaaaggt	480

gtccaattgc tatcctctta catcactgag gaactaggta ttcaatgtgg tgctctatct 540
 ggtgctaaca ttgccaccga agtcgctcaa gaacactggg ctgaacaac agttgcttac 600
 cacattccaa aggatttcag aggcgagggc aaggacgtcg accataaggt tctaaaggcc 660
 ttgttcaca gaccttactt ccacgttagt gtcacgaag atgttgctgg tatctccatc 720
 tgtggtgctt tgaagaacgt tgttgccctta ggttggtgtt tcgtcgaagg tctagctgg 780
 ggtaacaacg cttctgctgc catccaaaga gtcggtttgg gtgagatcat cagattcgg 840
 caaatgtttt tcccagaatc tagagaagaa acatactacc aagagtctgc tgggtgtgct 900

gatttgatca ccacctgcgc tgggtgtaga aacgtcaagg ttgctaggct aatggctact 960
 tctggttaagg acgcctggga atgtgaaaag gagttgttga atggccaatc cgctcaaggt 1020
 ttaattacct gcaaagaagt tcacgaatgg ttggaaacat gtggctctgt cgaagacttc 1080
 ccattatttg aagccgtata ccaaatcgtt tacaacaact acccaatgaa gaacctgccg 1140
 gacatgattg aagaattaga tctacatgaa gattag 1176

<210> 32

<211> 753

<212> DNA

<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 32

atgggattga ctactaaacc tctatctttg aaagttaacg ccgctttgtt cgacgtcgac 60

ggtaccatta tcattcttca accagccatt gctgcattct ggagggtatt cggttaaggac 120
 aaaccttatt tcgatgctga acacgttata caagtctcgc atggttgag aacgtttgat 180
 gccattgcta agttcgctcc agactttgcc aatgaagagt atgttaacaa attagaagct 240
 gaaattccgg tcaagtacgg tgaaaaatcc attgaagtc caggtgcagt taagctgtgc 300
 aacgctttga acgctctacc aaaagagaaa tgggctgtgg caacttccgg taccctgat 360
 atggcacaaa aatggttcga gcatctggga atcaggagac caaagtactt cattaccgt 420
 aatgatgtca aacagggtaa gcctcatcca gaaccatata tgaagggcag gaatggctta 480

ggatatccga tcaatgagca agaccttcc aaatctaagg tagtagtatt tgaagacgt 540
 ccagcaggta ttgccccgg aaaagccgcc ggttgtaaga tcattggtat tgccactact 600
 ttcgacttgg acttcctaaa ggaaaaaggc tgtgacatca ttgtcaaaaa ccacgaatcc 660
 atcagagttg gcggctacaa tgccgaaaca gacgaagttg aattcatttt tgacgactac 720
 ttatatgcta aggacgatct gttgaaatgg taa 753

<210> 33

<211> 41

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Ec-lacA-F
 <400> 33
 ctggatccag gaggtataaa aatggaacat gccaatgacc g 41

<210> 34
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Ec-lacA-R
 <400> 34
 gtttctagat taaactgacg attcaacttt ataatc 36

<210> 35
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Ec-cysE-F
 <400> 35
 ctggatccag gaggtataaa aatgtcgtgt gaagaactgg aaattg 46

<210> 36
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Ec-cysE-R
 <400> 36
 gtttctagat tagateccat ccccatactc 30

<210> 37
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Ec-yjgm-F
 <400> 37
 ctggatccag gaggtataaa aatgaataac attgcgcgcg 40

<210> 38
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Ec-yjgM-R
 <400> 38
 gtttctagat tagagttcgc gcaacatcc 29
 <210> 39
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Ec-yjaB-F
 <400> 39
 ctggatccag gaggtaataa aatggttatt agtattcgcc gctc 44

 <210> 40
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Ec-yjaB-R
 <400> 40
 gtttctagat tacgccccca catacgc 27
 <210> 41
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Ec-yiiD-F
 <400> 41
 ctggatccag gaggtaataa aatgagccag cttccaggg 39
 <210> 42
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Ec-nhoA-F
 <400> 42

ctggatccag gaggtataaa aatgcagccc attctgaatc ac	42
<210> 43	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Ec-nhoA-R	
<400> 43	
gtttctagat tattttcccg cctccggg	28
<210> 44	
<211> 42	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Ec-wecH-F	
<400> 44	
ctggatccag gaggtataaa aatgcagccc aaaatttact gg	42
<210> 45	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Ec-WecH-R	
<400> 45	
gtttctagat taactcacta atctgtttct gtcg	34
<210> 46	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Ec-yiiD-R	
<400> 46	
gtttctagat tactcttctt cgttccgc	29
<210> 47	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Ec-maa-F

<400> 47

ctggatccag gaggtataa aatgagcaca gaaaaagaaa agatg 45

<210> 48

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ec-maa-R

<400> 48

gtttctagat tacaattttt taattattct ggctg 35

<210> 49

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sc-maa-F

<400> 49

ctggatccag gaggtataa aatgaccacc gagaaggaaa aaatg 45

<210> 50

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sc-maa-R

<400> 50

gtttctagat taatccagcg gcacttcac 29

<210> 51

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Hj-maa-F

<400> 51

ctggatccag gaggtataa aatgaccagc gagaaggaac g 41

<210> 52

<211> 31

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Hj-maa-R
 <400> 52
 gtttctagat taatcaacgt ccttcagcac a 31
 <210> 53
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Lb-maa-F
 <400> 53
 ctggatccag gaggtataa aatggacaag agcgagaagg 40
 <210> 54
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Lb-maa-R
 <400> 54
 gtttctagat tatttcagcg gcttaatcac 30

 <210> 55
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Pp-maa-F
 <400> 55
 ctggatccag gaggtataa aatgagcctg agcgagaagc ac 42
 <210> 56
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Pp-maa-R
 <400> 56
 gtttctagat tattgaccct gatccggctg 30
 <210> 57

<211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Bs-maa-F
 <400> 57
 ctggatccag gaggtataa aatgctgcgt accgagaagg 40

<210> 58
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Bs-maa-R
 <400> 58
 gtttctagat tacagttggt tcagaatagc cgc 33

<210> 59
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Sc-gpd1-R
 <400> 59
 aatgctgcag ttaattctca tgtagatcta attcttcaat c 41

<210> 60
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Cat-F
 <400> 60
 ctaggagctc aggagaaata taatggagaa aaaaatcact ggatatac 48

<210> 61
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Cat-R
 <400> 61

ctggatcctt acgccccgcc ctgcc	25
<210> 62	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Trc-Bs.maa-F	
<400> 62	
agatctgagt cgacagtatc ggcggg	26
<210> 63	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Trc-Bs.maa-R	
<400> 63	
tatatttctc ctgaggatcc ccgggtaccg	30
<210> 64	
<211> 50	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Bc-Oat-F	
<400> 64	
ctcggtaccc ggggatcctc aggagaaata taatggactt ccaccagatc	50
<210> 65	
<211> 42	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Bc-Oat-R	
<400> 65	
cccgccgata ctgtcgacag atcttacagc cattcctcaa ag	42
<210> 66	
<211> 50	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Ca-Oat-F	

<400>	66	
ctcgggtaccc ggggatcctc aggagaaata taatgaacag caacttcac		50
<210>	67	
<211>	42	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Ca-Oat-R	
<400>	67	
cccgccgata ctgtcgacag atcttaacga atccactctt tc		42
<210>	68	
<211>	51	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Lb-Oat-F	
<400>	68	
ctcgggtaccc ggggatcctc aggagaaata taatgaccga gctgaacacc c		51
<210>	69	
<211>	41	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Lb-Oat-R	
<400>	69	
cccgccgata ctgtcgacag atcttacgcg gtcagccaca g		41
<210>	70	
<211>	50	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Ma-Oat-F	
<400>	70	
ctcgggtaccc ggggatcctc aggagaaata taatgccggc ggagcacgcg		50
<210>	71	
<211>	49	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ma-Oat-R

<400> 71

ccgcccgata ctgtcgacag atcttaatca cgaacccaat ccgggtccg 49

<210> 72

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pa-Oat-F

<400> 72

ctcggtagcc ggggatcctc aggagaaata taatgagcta caccgtgtt g 51

<210> 73

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pa-Oat-R

<400> 73

ccgcccgata ctgtcgacag atcttagcca ccgcttcat c 41

<210> 74

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ec-aes-F

<400> 74

ctggatccgt cacccaaccc tttatgaagc cggaaaacaa actacc 46

<210> 75

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ec-aes-R

<400> 75

tatcgtcgac ttaaagctga gcggtaaaga actg 34

<210> 76

<211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Sc-gpd1-F
 <400> 76
 gcggatccag gaggtaataa aatgtctgct gctgctgata gattaaac 48
 <210> 77
 <211> 2999
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pSTV28 VECTOR
 <400> 77
 aaattccgga tgagcattca tcaggcgggc aagaatgtga ataaaggccg gataaaactt 60
 gtgcttattt ttctttacgg tctttaaaaa ggccgtaata tccagctgaa cggctctggtt 120
 ataggtacat tgagcaactg actgaaatgc ctcaaaatgt tctttacgat gccattggga 180
 tatatcaacg gtggtatatac cagtgatattt ttctccatt ttagcttcct tagctcctga 240
 aaatctcgat aactcaaaaa atacccccgg tagtgatctt atttcattat ggtgaaagtt 300
 ggaacctctt acgtgccgat caacgtctca ttttcgcaa aagttggccc agggcttccc 360
 ggtatcaaca gggacaccag gatttattta ttctgcgaag tgatcttccg tcacaggtat 420
 ttattcgcg caaagtgcgt cgggtgatgc tgccaactta ctgatttagt gtatgatggt 480
 gtttttgagg tgctccagtg gcttctgttt ctatcagctg tccctcctgt tcagctactg 540
 acggggtggt gcgtaacggc aaaagcaccg ccggacatca gcgctagcgg agtgtatact 600
 ggcttactat gttggcactg atgagggtgt cagtgaagtg cttcatgtgg caggagaaaa 660
 aaggctgcac cggctgcgtca gcagaatatg tgatacagga tatattccgc ttcctcgctc 720
 actgactcgc tacgctcggc cgttcgactg cggcgagcgg aaatggctta cgaacggggc 780
 ggagatttcc tggaagatgc caggaagata cttaacaggg aagtgagagg gccgcggcaa 840
 agccgttttt ccataggctc cgccccctg acaagcatca cgaaatctga cgctcaaate 900
 agtgggtggc aaaccgcaca ggactataaa gataccaggc gtttcccctg gcggtccct 960
 cgtgcgctct cctgttctg cctttcgggt taccgggtgc attccgctgt tatggccgcg 1020
 tttgtctcat tccagcctg acactcagtt ccgggtaggc agttcgctcc aagctggact 1080
 gtatgcacga accccccgtt cagtccgacc gctgcgctt atccggtaac tatcgtcttg 1140
 agtccaacc ggaaagacat gcaaaagcac cactggcagc agccactggt aattgattta 1200

gaggagttag tcttgaagtc atgcgccggt taaggctaaa ctgaaaggac aagttttggt 1260
gactgcgtc ctccaagcca gttacctcgg ttcaaagagt tggtagctca gagaaccttc 1320
gaaaaaccgc cctgcaaggc gggttttttcg ttttcagagc aagagattac gcgcagacca 1380
aaacgatctc aagaagatca tcttattaat cagataaaat atttctagat ttcagtgcac 1440

tttatctctt caaatgtagc acctgaagtc agccccatac gatataagtt gtaattctca 1500
tgtttgacag cttatcatcg ataagctcat tcgccattca ggctgcgcaa ctgttgggaa 1560
gggcgatcgg tgcgggcctc ttcgctatta cgccagctgg cgaaaggggg atgtgctgca 1620
aggcgattaa gttgggtaac gccagggttt tccagtcac gacgttgtaa aacgacggcc 1680
agtccaagc ttgcatgcct gcaggtcgac tctagaggat ccccgggtac cgagctcgaa 1740
ttcgtaatca tggcatagc tgtttcctgt gtgaaattgt tatccgtca caattccaca 1800
caacatacga gccggaagca taaagtgtaa agcctggggg gcctaattgag tgagctaact 1860

cacattaatt gcgttgcgt cactgcccgc tttccagtcg ggaaacctgt cgtgccagct 1920
gcattaatga atcgccaac gcgcggggag aggcgggttg cgtattggaa cgccatgagc 1980
ggcctcattt cttattctga gttacaacag tccgcaccgc tgtccggtag ctccttcggg 2040
tgggcgcggg gcatgactat cgtcggcgca cttatgactg tcttctttat catgcaactc 2100
gtaggacagg tgccggcagc gccaacagt cccccggcca cggggcctgc caccataccc 2160
acgccgaaac aagcgccctg caccattatg ttccggatct gcatcgagg atgctgctgg 2220
ctaccctgtg gaacacctac atctgtatta acgaagcgt aaccgttttt atcaggctct 2280

gggaggcaga ataatgatac atatcgtaaa ttattacctc cacggggaga gcctgagcaa 2340
actggcctca ggcatctgag aagcacacgg tcacactgct tccggtagtc aataaaccgg 2400
taaaccagca atagacataa gcggtatctt aacgacctg ccctgaaccg acgaccgggt 2460
cgaatttgct ttcgaatttc tgccattcat ccgcttatta tcaattatc aggcgtagca 2520
ccaggcgttt aagggcacca ataactgcct taataaaatt acgccccgcc ctgccactca 2580
tcgcagtact gttgtaattc attagcatt ctgccgacat ggaagccatc acaaacggca 2640
tgatgaacct gaatgccag cggcacagc acctgtgcg cttgcgtata atattgccc 2700

atggtgaaaa cgggggcgaa gaagtgtcc atattggcca cgtttaaatc aaaactggtg 2760
aaactcacc agggattggc tgagacgaaa aacatatctt caataaacc tttagggaaa 2820
taggccaggt ttaccgta acacgccaca tcttgcaat atatgttag aaactgccgg 2880
aaatcgtcgt ggtattcact ccagagcgt gaaaacgtt cagtttgctc atggaaaacg 2940
gtgtaacaag ggtgaacact atccatac accagctcac cgtctttcat tgccatacg 2999

<210> 78

<211> 4176
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pTrc99A VECTOR
 <400> 78

gtttgacagc ttatcatcga ctgcacgggtg caccaatgct tctggcgtca ggcagccatc	60
ggaagctgtg gtatggctgt gcaggtcgta aatcactgca taattcgtgt cgctcaaggc	120
gcactcccggt tctggataat gttttttgcg ccgacatcat aacggttctg gcaaatattc	180
tgaaatgagc tgttgacaat taatcatccg gctcgtataa tgtgtggaat tgtgagcgga	240
taacaatttc acacaggaaa cagaccatgg aattcgagct cggtaaccgg ggatcctcta	300
gagtcgacct gcaggcatgc aagcttggct gttttggcgg atgagagaag attttcagcc	360
tgatacagat taaatcagaa cgcagaagcg gtctgataaa acagaatttg cctggcggca	420
gtagcgcggt ggtcccacct gaccccatgc cgaactcaga agtgaaacgc ctagcgccg	480
atggtagtgt ggggtctccc catgcgagag tagggaactg ccaggcatca aataaaacga	540
aaggctcagt cgaagactg ggcctttcgt tttatctgtt gttgtcgggt gaacgctctc	600
ctgagtagga caaatccgcc gggagcggat ttgaacgttg cgaagcaacg gcccgagggg	660
tggcgggcag gacgcccgc ataaactgcc aggcatacaa ttaagcagaa ggccatcctg	720
acggatggcc tttttgcgtt tctacaaact ctttttgttt atttttctaa atacattcaa	780
atatgtatcc gctcatgaga caataaccct gataaatgct tcaataatat tgaaaaagga	840
agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg cccttattcc cttttttgcg gcattttgcc	900
ttcctgtttt tgctcaccca gaaacgctgg tgaaagtaaa agatgctgaa gatcagttgg	960
gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg taagatcctt gagagttttc	1020
gccccgaaga acgttttcca atgatgagca cttttaagt tctgctatgt ggcgcggtat	1080
tatcccggtg tgacgccggg caagagcaac tcggtcgccg catacactat tctcagaatg	1140
acttggttga gtactcacca gtcacagaaa agcatcttac ggatggcatg acagtaagag	1200
aattatgcag tgctgccata accatgagtg ataactgc ggccaactta cttctgacaa	1260
cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt ttttgacaaa catgggggat catgtaactc	1320
gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc aaacgacgag cgtgacacca	1380
cgatgcctac agcaatggca acaacgttgc gcaactatt aactggcgaa ctacttactc	1440
tagcttcccc gcaacaatta atagactgga tggaggcgga taaagttgca ggaccacttc	1500
tgcgctcggc cttccggct ggctggttta ttgctgataa atctggagcc ggtgagcgtg	1560

ggctctcgcg taicattgca gcactggggc cagatggtaa gccctcccg atcgtagtta	1620
tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag	1680
gtgcctcact gattaagcat tggtaactgt cagaccaagt ttactcatat atactttaga	1740
ttgatttaaa acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt gaagatcctt ttgataatc	1800
tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt cgttcactg agcgtagac cccgtagaaa	1860
agatcaaagg atcttcttga gatccttttt tctgcgcggt aatctgctgc ttgcaaacia	1920
aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt tgccggatca agagctacca actctttttc	1980
cgaaggtaac tggcttcagc agagcgaga taccaatac tgtccttcta gtgtagccgt	2040
agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac atacctcgct ctgctaatec	2100
tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac	2160
gatagtacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca	2220
gcttggagcg aacgacctac accgaactga gatacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg	2280
ccacgttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag	2340
gagagcgac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt	2400
ttcgccacct ctgacttagc cgtcgatttt tgtgatgctc gtcagggggg cggagcctat	2460
ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac ggttctggc cttttgctgg cttttgctc	2520
acatgttctt tctgcttta tcccctgatt ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt	2580
gagctgatac cgctcgccc agccgaacga ccgagcgag cgagtcagt agcgaggaag	2640
cggaagagcg cctgatcggt tattttctcc ttacgcatct gtgcggtatt tcacaccgca	2700
tatggtgcac tctcagtaca atctgctctg atgccgata gttaaagccag tataactcc	2760
gctatcgcta cgtgactggg tcatggctgc gccccacac ccgcaacac ccgtgacgc	2820
gccctgacgg gcttgtctgc tcccggcatc cgtttacaga caagctgtga ccgtctccgg	2880
gagctgcatg tgtcagaggt ttccaccgtc atcaccgaaa cgcgcgaggc agcagatcaa	2940
ttcgcgcgcg aaggcgaagc ggcatgcatt tacgttgaca ccatcgaatg gtgcaaaacc	3000
tttcgcggtg tggcatgata gcgcccggaa gagagtcaat tcagggtggt gaatgtgaaa	3060
ccagtaacgt tatacgaigt cgcagagtat gccggtgtct cttatcagac cgtttccgc	3120
gtggtgaacc aggccagcca cgtttctgcg aaaacgctgg aaaaagtga agcgcgcatg	3180
gcggagctga attacattcc caaccgctg gcacaacaac tggcgggcaa acagtcgttg	3240
ctgattggcg ttgccacctc cagtctggcc ctgcacgcgc cgtcgcaaat tgtcgcgcg	3300

attaaatctc gcgccgatca actgggtgcc agcgtggtgg tgtcgatggt agaacgaagc 3360

ggcgtcgaag cctgtaaagc ggcggtgcac aatcttctcg cgcaacgcgt cagtgggctg 3420

atcattaact atccgctgga tgaccaggat gccattgctg tggaagctgc ctgcactaat 3480

gttccggcgt tatttcttga tgtctctgac cagacacca tcaacagtat tattttctcc 3540

catgaagacg gtacgcgact gggcgtggag catctggtcg cattgggtca ccagcaaatc 3600

gcgctgttag cgggcccatt aagtctctgc tcggcgctgc tgcgtctggc tggctggcat 3660

aaatatctca ctgcfaatca aattcagccg atagcggaac gggaaggcga ctggagtgcc 3720

atgtccggtt ttcaacaaac catgcaaatg ctgaatgagg gcatcgttcc cactgcgatg 3780

ctggttgcca acgatcagat ggcgtgggc gcaatgcgcg ccattaccga gtccgggctg 3840

cgcgttggtg cggatatctc ggtagtggga tacgacgata ccgaagacag ctcatgttat 3900

atcccgccgt taaccacat caaacaggat tttcgctgc tggggcaaac cagcgtggac 3960

cgttctctgc aactctctca gggccaggcg gtgaaggga atcagctgtt gcccgtctca 4020

ctggtgaaaa gaaaaaccac cctggcgccc aatacgaaa ccgctctcc ccgcgcttg 4080

gccgattcat taatgcagct ggcacgacag gtttcccgac tggaaagcgg gcagtgagcg 4140

caacgaatt aatgtagatt agcgcgaatt gatctg 4176

<210> 79

<211> 5369

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pET28a (+) VECTOR

<400> 79

atccgatat agttctctct ttcagcaaaa aaccctcaa gaccggttta gaggccccaa 60

ggggttatgc tagttattgc tcagcggtgg cagcagccaa ctgagcttcc ttccgggctt 120

tgttagcagc cggatctcag tgggtggtgt ggtggtgctc gagtgcggcc gcaagcttgt 180

cgacggagct cgaattcgga tccgcgacc atttgctgct caccagtcac gctagccata 240

tggctgccgc gcggcaccag gccgctgctg tgatgatgat gatgatggct gctgcccatg 300

gtatatctcc ttcttaaagt taaacaaaat tatttctaga ggggaattgt tatccgctca 360

caattcccct atagttagtc gtattaatct cgcgggatcg agatctcgat cctctacgcc 420

ggacgcacgc tggccggcat caccggcgcc acaggtgcgg ttgctggcgc ctatatcgcc 480

gacatcaccg atggggaaga tcgggctcgc cacttcgggc tcatgagcgc ttgtttcggc 540

gtgggtatgg tggcaggccc cgtggccggg ggactgttgg gcgccatctc cttgcatgca 600

ccattccttg cggcggcggg gctcaacggc ctcaacctac tactgggctg cttcctaattg	660
caggagtcgc ataagggaga gcgtcgagat cccggacacc atcgaatggc gcaaaacctt	720
tcgcggtatg gcatgatagc gcccggaaga gagtcaattc aggggtggtga atgtgaaacc	780
agtaacgtta tacgatgtcg cagagtatgc cgggtgtctct tatcagaccg tttcccgcgt	840
ggtgaaccag gccagccacg tttctgcgaa aacgcgggaa aaagtggaag cggcgatggc	900
ggagctgaat tacattccca accgcgtggc acaacaactg gcgggcaaac agtcgttgct	960
gattggcgtt gccacctcca gtctggccct gcacgcgccg tcgcaaattg tcgcgcgcat	1020
taaatctcgc gccgatcaac tgggtgccag cgtggtggtg tcgatggtag aacgaagcgg	1080
cgtcgaagcc tgtaaagcgg cgggtcacaa tcttctcgcg caacgcgtca gtgggctgat	1140
cattaactat ccgtggatg accaggatgc cattgctgtg gaagctgcct gcactaatgt	1200
tccggcgta tttcttgatg tctctgacca gacacccatc aacagtatta ttttctccca	1260
tgaagacggt acgcgactgg gcgtggagca tctggtcgca ttgggtcacc agcaaatcgc	1320
gctgttagcg ggcccattaa gttctgtctc ggcgcgctctg cgtctggctg gctggcataa	1380
atatctcact cgcaatcaaa ttcagccgat agcggaacgg gaaggcgact ggagtgccat	1440
gtccggtttt caacaaacca tgcaaatgct gaatgagggc atcgttccca ctgcgatgct	1500
ggttgccaac gatcagatgg cgctgggcgc aatgcgcgcc attaccgagt ccgggctgcg	1560
cgttggtgcg gatatctcgg tagtgggata cgacgatacc gaagacagct catgttatat	1620
cccgcggtta accaccatca aacaggattt tcgcctgctg gggcaaacca gcgtggaccg	1680
cttgctgcaa ctctctcagg gccaggcggg gaagggaat cagctgttgc ccgtctcact	1740
ggtgaaaaga aaaaccaccc tggcgcccaa tacgcaaacc gcctctcccc gcgcgttggc	1800
cgattcatta atgcagctgg cagcacaggt ttcccactg gaaagcgggc agtgagcgca	1860
acgcaattaa tgtaagttag ctcactcatt aggcaccggg atctcgaccg atgcccttga	1920
gagccttcaa ccagtcagc tccttcgggt gggcgcgggg catgactatc gtcgccgcac	1980
ttatgactgt cttctttatc atgcaactcg taggacaggt gccggcagcg ctctgggtca	2040
ttttcggcga ggaccgcttt cgctggagcg cgacgatgat cggcctgtcg cttgcggtat	2100
tcggaatctt gcacgccctc gctcaagcct tcgtcactgg tcccgcacc aaacgtttcg	2160
gcgagaagca ggccattatc gccggcatgg cgccccacg ggtgcgcatg atcgtgtccc	2220
tgtcgttag gaccggccta ggctggcggg gttgccttac tggtagcag aatgaatcac	2280
cgatacgca gcgaacgtga agcgactgct gctgcaaaac gtctgcgacc tgagcaacaa	2340

catgaatggt cticggtttc cgtgtttcgt aaagtctgga aacgcggaag tcagcgccct	2400
gcaccattat gticcggatc tgcacgcag gatgctctg gctaccctgt ggaacaccta	2460
catctgtatt aacgaagcgc tggcattgac cctgagtgat ttttctctgg tcccgcgcga	2520
tccataccgc cagttgttta ccctcacaac gticcagtaa cggggcatgt tcatcatcag	2580
taaccggtat cgtgagcatc ctctctcgtt tcatcggtat cattaccccc atgaacagaa	2640
atccccctta cacggaggca tcagtgaacca aacaggaaaa aaccgccctt aacatggccc	2700
gctttatcag aagccagaca ttaacgcttc tggagaaact caacgagctg gacgcggatg	2760
aacaggcaga catctgtgaa tcgcttcacg accacgctga tgagctttac cgcagctgcc	2820
tcgcgcgttt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctccc gagacggtca	2880
cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagccc tcagggcgcg tcagcgggtg	2940
ttggcgggtg tcggggcgca gccatgaccc agtcacgtag cgatagcgga gtgtatactg	3000
gcttaactat gcggcatcag agcagattgt actgagagtg caccatata gcggtgtgaa	3060
ataccgcaca gatgcgtaag gagaaaatac cgcacaggc gctcttcgc ttcctcgctc	3120
actgactcgc tgcgctcggc cgttcggctg cggcgagcgg tatcagctca ctcaaaggcg	3180
glaatacggc tatccacaga atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaggc	3240
cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaaggcc gcgttgctgg cgtttttcca taggctccgc	3300
ccccctgacg agcatcaca aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga	3360
ctataaagat accaggcgtt tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc tgttcgacc	3420
ctgccgtta ccggatacct gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcat	3480
agctcacgct gtaggtatct cagttcggig taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg	3540
cacgaacccc ccgttcagcc gcaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagtc	3600
aaccggtaa gacacgactt atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga	3660
gcgaggtatg taggcggigc tacagagttc ttgaagtgg ggcctaacta cggctacact	3720
agaaggacag tatttggat ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt	3780
ggtagctctt gatccggcaa acaaacacc gctggtagcg gtggtttttt tgtttgcaag	3840
cagcagatta cgcgcagaaa aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt ttctacggg	3900
tctgacgctc agtggaaacg aaactcacgt taagggattt tggatcatgaa caataaaact	3960
gtctgcttac ataaacagta atacaagggg tgttatgagc catattcaac gggaaacgtc	4020
ttgtctagg ccgcgattaa attccaacat ggatgctgat ttatatgggt ataaatgggc	4080

tcgcgataat gtcgggcaat cagggtcgac aatctatcga ttgtatggga agcccgatgc	4140
gccagagttg tttctgaaac atggcaaagg tagcgttgcc aatgatgtta cagatgagat	4200
ggtcagacta aactggctga cggaatttat gcctcttccg accatcaagc attttatccg	4260
tactcctgat gatgcatggt tactcaccac tgcgatcccc gggaaaacag cattccaggt	4320
attagaagaa tatcctgatt caggtgaaaa tattgttgat gcgctggcag tgttcctgcg	4380
ccggttgcat tcgattcctg tttgtaattg tcttttaac agcgatcgcg tatttcgtct	4440
cgctcaggcg caatcacgaa tgaataacgg ttgggttgat gcgagtgatt ttgatgacga	4500
gcgtaatggc tggcctgttg aacaagtctg gaaagaaatg cataaacttt tgccattctc	4560
accggattca gtcgtcactc atggtgattt ctcacttgat aaccttattt ttgacgaggg	4620
gaaattaata gggtgtattg atgttgacg agtcggaatc gcagaccgat accaggatct	4680
tgccatccta tggaactgcc tcggtgagtt tctccttca ttacagaaac ggctttttca	4740
aaaatatggt attgataatc ctgatatgaa taaattgcag tttcatttga tgctcgatga	4800
gtttttctaa gaattaattc atgagcggat acatatttga atgtatttag aaaaataaac	4860
aaataggggt tccgcgcaca tttccccgaa aagtgccacc tgaaattgta aacgttaata	4920
ttttgttaaa attcgcgtta aatttttgtt aaatcagctc attttttaac caataggccg	4980
aaatcggcaa aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga gatagggttg agtgtgttc	5040
cagtttggaa caagagtcca ctattaaaga acgtggactc caacgtcaaa gggcgaaaaa	5100
ccgtctatca gggcgatggc ccactacgtg aaccatcacc ctaatcaagt ttttgggggt	5160
cgaggtgccg taaagcacta aatcggaacc ctaaaggag ccccgattt agagcttgac	5220
ggggaaagcc ggcaacgtg gcgagaaagg aagggaagaa agcgaaagga gcgggcgcta	5280
gggcgctggc aagtgtagcg gtcacgtgc gcgtaaccac cacaccgcc gcgttaatg	5340
cgccgctaca gggcgcgtcc cattcgcca	5369
<210> 80	
<211> 612	
<212> DNA	
<213> Escherichia coli	
<400> 80	
atgaacatgc caatgaccga aagaataaga gcaggcaagc tatttaccga tatgtgcgaa	60
ggcttaccgg aaaaaagact tcgtgggaaa acgttaatgt atgagtttaa tcaactgcat	120
ccatcagaag ttgaaaaaag agaaagcctg attaaagaaa tgtttgccac ggtaggggaa	180
aacgcctggg tagaaccgcc tgtctatttc tcttacggtt ccaacatcca tataggccgc	240

aatTTTTatg caaatttcaa ttttaaccatt gtcgatgact acacggtaac aatcggatgat 300

aacgtactga ttgcacccaa cgttactctt tccgttacgg gacaccctgt acaccatgaa 360

ttgagaaaaa acggcgagat gtactctttt ccgataacga ttggcaataa cgtctggatc 420

ggaagtcattg ttgttattaa tccaggcgtc accatcgggg ataattctgt tattggcgcg 480

ggtagtatcg tcacaaaaga cattccacca aacgtcgtgg cggctggcgt tccttgcg 540

gttattcgcg aaataaacga ccgggataag cactattatt tcaaagatta taaagttgaa 600

tcgtcagttt aa 612

<210> 81

<211> 822

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 81

atgtcgtgtg aagaactgga aattgtctgg aacaatatta aagccgaagc cagaacgctg 60

gcggactgtg agccaatgct ggccagtttt taccacgca cgctactcaa gcacgaaaac 120

cttggcagtg cactgagcta catgctggcg aacaagctgt catcgccaat tatgcctgct 180

attgctatcc gtgaagtgtt ggaagaagcc tacgccgtg acccggaat gatcgctct 240

gcggcctgtg atattcaggc ggtgcgtacc cgcgaccgg cagtcgataa atactcaacc 300

ccgttggtat acctgaaggg ttttcatgcc ttgcaggcct atcgcatcgg tcaactggtt 360

tggaatcagg ggcgtcgcgc actggcaatc tttctgcaa accaggtttc tgtgacgttc 420

caggtcgata ttaccccggc agcaaaaatt ggtcgcggta tcatgcttga ccacgcgaca 480

ggcatcgtcg ttgtgaaac ggcggtgatt gaaaacgacg tatcgattct gcaatctgtg 540

acgcttggcg gtacgggtaa atctggtgtt gaccgtcacc cgaaaattcg tgaagtggtg 600

atgattggcg cgggcgcgaa aatcctcggc aatattgaag ttgggcgcgg cgcgaagatt 660

ggcgcaggtt ccgtggtgct gcaaccggtg ccgccgata ccaccgccgc tggcgttccg 720

gtcgtatttg tcggtaaacc agacagcgat aagccatcaa tggatatgga ccagcatttc 780

aacggtatta accatacatt tgagtatggg gatgggatct aa 822

<210> 82

<211> 996

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 82

atgcagccca aaatttactg gattgataac ctgcgagggg tagcgtgttt aatgggtggtg	60
atgattcaca ccactacctg gtatgtgacc aatgctcata gtgttagccc cgtcacatgg	120
gatatcgcca atgttctgaa ttctgcctct cgtgtcagcg tgccgctatt ttatcatgatt	180
tccggctatc tcttttttgg cgaacgcagc gcccgccgc gccatttctt gcgtatcggc	240
ttatgtctga ttttttatag cgcaatcgca ctgctctaca ttgcgctgtt tacctccatc	300
aatatggagt tagcgtgaa aaacctgctg caaaagccag tgttttacca ctgtggttt	360
ttcttcgca ttgcggtgat ttatctggtt tcaccgtga ttcaggtgaa gaacgtcggc	420
ggaaaaatgt tgcgtgtgt aatggcggtg attggcatta tcgctaacc aaacacagt	480
ccgcagaaaa ttgacggtt tgaatggctg ccaattaact tatatatcaa tggcgatact	540
ttttactaca ttctgtatgg catgttgggc cgcgctatag ggatgatgga cacacagcat	600
aaagcactgt cgtgggtgag cgccgcgctg ttgcgcaggg gggtttttat tatctctgc	660
gggacattat atgaattgca gtggcgcgga aattttgccg atacctggta tctttactgt	720
gggccgatgg tttttatctg cgcaatcgcg ctattgactc tggttaaaaa cacgctggat	780
acgctacca ttgcgggact tggcttaac tccgccatt cattgggtat atacggattc	840
cacgccttga ttatccatgc gctgcgcacc cggggaattg agcttaaaaa ttggccaata	900
ctggatatta tttggatctt ttgcgcgacg ttggcagcga gtttgttact ttctatgctg	960
gtacaacgaa tcgacagaaa cagattagt agttaa	996
<210> 83	
<211> 846	
<212> DNA	
<213> Escherichia coli	
<400> 83	
atgacgccc tttctgaatca ctattttgcc cgtattaact ggtcgggagc tgctgcggtc	60
aatattgata cgcttcgtgc attgcacctg aaacacaatt gcaccattcc gtttggaaac	120
ctcgacgttt tgcgtccgag ggaaatacag cttgataatc aatcgccgga agagaaactg	180
gtgatagccc gtcgtggcgg ttactgtttt gaggagaatg gcgtgtttga gcgggtgtta	240
cgcgagctgg ggtttaactg tcgcagcttg ttagggcgcg tagtgttacc aaatccgcca	300
gcattaccgc cgcgcaccca tcgtttgtcg ttggtggaac tggaagagga aaaatggatt	360
gctgatgtcg gtttcggtgg gcagacgcta accgcgccga ttcgtttagt ttccgatctc	420
gtgcagacca cgccacacgg agagtatcgg ttgttgagg agggatgatga ttgggtgttg	480
cagttaatac atcatcagca ttggcagtcg atgtaccgtt ttgatctctg cgagcagcaa	540

caaagcgatt atgtgatggg caatttctgg tcggcgcaact ggccgcagtc gcattttcgc 600
catcatttgc tgatgtgccg ccatttgccg gacggcgga agctgacact gaccaatfff 660
cattttaccc attatgaaaa tgggcacgcg gtggagcagc gaaatctacc ggatgtggcg 720
tcattatatg ctgtgatgca agaacagttt ggtctgggcg tggatgatgc gaaacatggc 780
ttaccgtgg atgagttagc gctgggtgatg gcggcgtttg atacgcaccc ggaggcggga 840
aaataa 846

<210> 84

<211> 504

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 84

atgaataaca ttgcgccgca atcacctgta atgcgtcgcc tgacgctgca ggataatcct 60
gctatcgccc gcgtcattcg tcaggtatcc gccgaatacg gtcttaccgc tgataaaggc 120
tacaccgtcg ccgataccgaa tcttgacgag ctgtatcaag tatatagtca gcctggccat 180
gcatattggg tcgttgagta cgagggtgaa gtggtcggcg gcggtgggat agcgccatta 240
accgggagtg agtcggatat ttgcgaactg caaaagatgt attttcttcc ggctatccgc 300
ggcaaagggc tggcaaaaaa actggcctta atggcgatgg agcaggcgcg agagatgggt 360

ttcaaacgct gctatctgga aacgaccgct tttttaagg aagccattgc gctttatgag 420
catttgggct ttgagcatat cgactatgcg cttggctgca cgggccatgt cgattgtgaa 480
gtgcggatgt tgcgcgaact ctaa 504

<210> 85

<211> 444

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 85

atggttatta gtattcgccg ctacacggcat gaggaagggg aggaactcgt tgcgatttgg 60
tgtcgttctg tcgatgccac tcacgatttt ctatcagcag agtatcggac cgagctggag 120
gacctagtgc gttccttctt gccggaagcg ccgttgtggg tcgcggttaa tgagcgggat 180
cagccggttg gatttatgtt gctaagtggg cagcatatgg atgcgctgtt tatcgatcct 240
gatgtgcgcg gctcggcgt aggtcgggtg ctggtggagc atgcgctctc gatggcaccg 300
gaactgacaa ccaacgttaa tgagcaaaat gacgaggcgg ttgggttcta taagaaggtg 360
ggttttaagg ttacgggacg ctctgaggtg gacgatttgg ggaaaccgta tccgttgctg 420

aatctggcgt atgtgggggc gtaa	444
<210> 86	
<211> 990	
<212> DNA	
<213> Escherichia coli	
<400> 86	
atgagccagc ttccagggtt gtcacgggaa acaagagaga gtatcgctat gtatcacctt	60
cgggttccac aaacagaaga agaattagag cgttactatc agtttcgctg ggaaatgttg	120
cgtaagcccc tgcataacc aaaagggttcg gaacgcgacg cgtgggatgc gatggcgcat	180
caccagatgg tcgtcgacga gcagggtaat ctggtggcgg taggccgact gtatattaat	240
gccgacaatg aagcgtccat tcgttttatg gccgttcac cgcacgtgca ggacaaagg	300
ttaggcacgc tgatggcgat gacctggag tcggtggcgc gtcaggaagg cgtaagcgc	360
gtgacctgta gcgccgtga agacgcggtg gagtttttcg ccaagctggg gtttgtaat	420
caggagaaaa tcaccacgcc aaccaccacg ccgattcgcc atttttgat gattaagccc	480
gtcgccactc tggatgacat tctgcatgc ggcgactggt gcgcgcagct gcaacaggcg	540
tggtacgaac atatcccgct tagtgaaaaa atgggcgtgc gcattcagca atataccggg	600
caaaaattta tcactacat gccagaaacc ggcaatcaga atccgcacca tacgtgttt	660
gccgggagtt tattctcact ggcgacgctc actggttggg gacttatctg gctgatgctg	720
cgtgaacgcc acctcggcgg aacgattatt cttgcggatg cgcatatccg ctacagcaag	780
ccgattagcg gtaaacctca tgcggtagcc gacctcgggt ccttaagcgg cgatctcgac	840
cgtctggcgc gcggacgaaa agcacgggtg cagatgcagg tcgaaatctt tggcgacgag	900
acgccgggtg cagtgtttga aggcacgtat atcgttctgc ccgcaagcc atttgcccg	960
tatgaagagg gcgggaacga agaagagtaa	990